

발간등록번호

11-1543000-000366-01

웃나무 건강기능식품개발 사업단

(Research Center for Health Functional Food)

(주)생명의나무

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “웃나무 건강기능식품개발 사업단” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 10월 31일

주관연구기관명 : (주)생명의나무

주관연구책임자 : 나 천 수

1 핵심연구책임자 : 나 천 수

세부연구책임자 : 나 천 수

세부연구책임자 : 이 동 호

세부연구책임자 : 조 남 한

2 핵심연구책임자 : 동 미 숙

세부연구책임자 : 동 미 숙

세부연구책임자 : 이 정 민

세부연구책임자 : 이 무 열

세부연구책임자 : 오 구 택

세부연구책임자 : 유 혜 현

세부연구책임자 : 김 지 연

3 핵심연구책임자 : 정 문 구

세부연구책임자 : 정 문 구

요 약 문

I. 제 목

옻나무 건강기능식품개발 사업단

II. 연구개발의 목적 및 필요성

천연물로부터 인간의 질병을 예방 또는 치료할 수 있는 새로운 물질을 찾고자 하는 시도는 오래 전부터 수많은 연구자들의 연구 대상이 되어 왔으며, 실제로 천연 자원들을 이용한 의약품의 개발 또한 매우 활발하여 현재 사용되고 있는 의약품의 50% 이상이 천연물로부터 유래된 것이고 미국의 경우 사용하는 의약품 중 30%가 식물로부터 얻어진 것이며 미국 FDA가 승인한 것이 120종으로 시장 규모는 약 10조 달러로 알려져 있다.

과학의 발달로 고령화 사회로 가는 것을 대비하기 위해 건강한 노후를 위한 갱년기 개선용 건강기능 식품을 개발하고자 함. 또한 세계적으로 옻나무를 식용과 약용으로 복용하는 나라는 우리나라가 유일하며 옻나무는 우리나라 농민들이 선호하는 소득자원 중 하나이므로 옻나무산업을 1차 산업에서 벗어나 고부가가치 제품을 생산하는 2차 산업으로 발전시켜 농업 분야의 발전에 이바지하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구사업단의 주관기관인 생명의나무에서는 지금까지 옻나무에 대한 선행연구결과로 항암, 간보호 등 옻나무가 갖고 있는 독성을 제거하고 얻은 옻나무추출물(MU2물질)의 다양한 약리효능을 검증하였으며, 옻나무로부터 우루시올을 제거한 플라보노이드 물질그룹의 남성호르몬 증가와 정자형성촉진 등의 효능을 세포실험, 동물실험, 임상실험 까지를 거쳐 그 효능을 확인하였고 단회투여, 3개월 아급성 유전독성, 비글견 단회독성시험 등을 통해 안전성을 검증한 많은 연구를 수행하여 왔음.

본 사업을 통해 증년이후 갱년기 증상 개선은 물론 혈전증가, 콜레스테롤 증가감소, 골관절염 발생 탈모현상 등 갱년기에 나타나는 여러 증상들을 분야별로 과학적으로 검증하여 과학의 발달로 증가되는 노령인구의 건강한 노후생활에 기여할 수 있는 옻나무 기능성식품 개발을 위하여 본 사업단을 구성하였음.

본 연구사업단에서는 옻나무 건강기능식품 개발, 옻나무의 갱년기 관련 약리효능 검증 및 기전연구, 옻나무의 생식독성연구 등을 핵심연구과제로 선정하여 다음과 같이 수행함.

[제1핵심과제] 옻나무를 이용한 건강기능식품 개발

제1세부 율나무추출물의 율효성분 탐색 및 제품개발

- 율효성분 추출조건 확립
- 율나무추출물의 표준물질의 대량생산 공정개발
- 인체적용시험을 위한 율나무추출물 제품 개발 및 제품적용성 실험
- 율나무추출물의 안정성 평가
- 율나무추출물 및 지표성분의 제품적용성 및 내산성, 내알칼리성, 내열성 평가
- 식약청 현장기술상담 신청
 - 기능성 인정을 위한 식약청과의 정책적 협의를 위한 상담 신청
- 기능성인허가
 - 식약청 기능성원료 인정
- 사업화 계획
 - 율통전문회사 연계 및 마케팅 전문기관과의 컨설팅을 통해 제품개발부터 마케팅 및 판매를 위한 계획 수립
- 기존 제품과의 융복합 제품 개발을 위한 협의(대기업 및 제약회사)
- 특허 및 논문 발표
 - 여성갱년기 특허 및 제품기술개발 관련 논문 발표

제2세부 율나무의 생리활성성분 분리정제, 분석 및 모니터링 연구

- 율나무의 생리활성성분의 분리 정제 및 구조 분석
- 율나무의 생리활성성분에 대한 HPLC를 이용한 정량법 개발 및 확립.
- 율나무의 모니터링 분석

제3세부 율나무 추출물의 갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배

정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구

- 임상 연구를 진행할 연구 기관 선정
- 갱년기 장애 및 고지혈증을 호소하는 피험자 모집
- 생명윤리 위원회(IRB) 등록 및 승인
- 피험자 총 216명(남자 108명, 여자 108명)을 대상으로 대조식품군과 시험식품(MU-3 500, 1000)군으로 무작위배정하여 8주간의 Double-blind treatment period를 진행한 후 율효성 및 안전성 평가를 3년간 진행
 - 1) 율나무 추출물의 갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과 평가
 - 2) 갱년기 증상 및 혈청 지질을 효과적으로 개선시키는 적합한 용량 결정

- 3) Hormone parameters, Osteoporosis & Osteoarthritis parameters, circulatory system parameters 변화 비교, 국제 발기기능 지수 설문 평가
- 4) 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사, 이상반응 등을 통한 식품의 안전성 평가

[제2핵심과제] 옷나무의 남성갱년기 장애 개선 관련 효능 검증

제1세부 옷나무가 성호르몬 작용에 미치는 영향

- 옷나무의 *in vitro* (anti)androgenic effect 관찰
- Androgen 합성 및 관련 효소들의 유전자 발현에 옷나무추출물이 미치는 영향 관찰
- 옷나무추출물 자체의 (anti)androgenic action을 관찰하기 위하여 Hershberger assay 실시
- AR nuclear translocation assay, AR binding assay
- 옷나무추출물의 (anti)estrogenic effect를 *in vitro* transcription assay로 관찰
- 옷나무추출물을 MCF-7 cell에 estrogen과 동시 또는 단독 처리에 의한 estrogen 효능관련 유전자들 발현변화 관찰
- 옷나무 추출물의 남성 및 여성 호르몬 관련 약리효능 기전연구
 - Uterotrophic assay에 의한 옷나무 추출물의 *in vivo* estrogenic action 관찰
 - Androgen signal 관련 경로 저해제를 이용한 관련 옷나무 추출물의 작용 경로 도출
 - Aromatase assay를 통한 옷나무의 남성 hr 합성에 미치는 영향 및 기전 관찰
- 옷나무 추출물 및 단일물질에 androgen signal 관련 경로 저해제를 이용한 작용경로 도출
- 옷나무 추출물 및 단일물질에 estrogen signal 관련 경로 저해제를 이용한 작용경로 도출
- 옷나무 추출물 및 단일성분이 5 α -reductase 활성에 미치는 영향을 관찰하여 testosterone 작용 활성에 옷나무가 미치는 영향에 대하여 예측
- 화학연구소의 샘플에 대하여 유전자 발현변화 관찰

제2세부 옷 추출물을 이용한 탈모방지 및 골관절염 개선 기능성식품의 개발

- In vivo test : in vitro test에서 최적소재를 이용하여 동물 모델에 적용, 시료의 동물모델에서의 효능과 적정 용량 검증
 - 마우스에서 모발성장 및 탈모방지 효과 확인 및 골관절염 질환 동물모델에서의 효능 검증
 - 탈모방지 및 골관절염 기능 개선 효능을 갖는 기료의 최적용량 결정 및 기전탐색을 통한 탈모방지 제품 소재 개발
- 골관절염 질환 동물모델에서의 효능 검증

- 골관절염 기능 개선 효능을 갖는 시료의 최적용량 결정 및 기전탐색을 통한 제품 소재 개발
- 골다공증과 관련된 Bio Maker들을 이용한 in vitro 효능 검증

제3세부 옷나무 유효성분의 순환기계 기능 개선 연구

- 옷나무추출물의 혈행 개선 효과 및 혈관장력 조절능 탐색
 - 옷나무추출물을 이용한 항응고능 평가
 - 옷나무추출물의 혈소판 응집 억제능 평가
- 옷나무 추출물의 혈행 개선 효과의 in vivo 효과를 평가함
- 혈관장력 조절에 미치는 영향을 연구함.
 - 혈관 수축과 이완에 미치는 옷나무추출물의 효능 시험
- 혈관 수축 억제의 기전을 밝히기 위한 칼슘관련 신호 기작을 연구하며, 고혈압 동물 모델을 활용하여 혈압 강하 효과를 시험함.

제4세부 고지혈증 유발 마우스에서 옷나무 고지혈증 치료효능 및 기전 연구

- 옷나무 추출물의 고지혈증 유발 마우스 모델에서의 약리 효능 연구
 - 혈중 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지질 분석을 실시함으로써 고지혈증에 미치는 영향 분석
- 옷나무 추출물의 고지혈증 마우스 모델에서의 약리 효능 연구
 - 고지혈증 모델로 사용되는 Apolipoprotein E 결핍 마우스에서 endogenous 고지혈증 분석을 위해 일반 식이와 고지질 식이를 통해 심각한 고지혈증을 유도하기 위하여 20% 지질과 0.15% 콜레스테롤을 함유한 고지질 식이를 2주 동안 실시함
 - 고지혈증에서 옷나무 추출물의 효과를 검증하기 위하여 대조군 및 옷나무 추출물 투여군으로 나누어 경구 투여함
 - 고지질 식이 후 마우스의 혈중 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지질 분석을 실시함으로써 고지혈증에 미치는 영향 분석
 - 약물의 독성 검증을 위해 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) 및 albumin (ALB)의 혈중 농도를 분석 및 간 조직의 병리학적 분석
 - 옷나무 추출물이 고지혈증 억제에 따른 지방간 개선 효과 분석: 고지질 식이에 의해 유도되는 지방간 형성을 옷나무 추출물 투여에 의해 개선되는지 분석하기 위하여 H&E 염색을 통해 확인함
 - 옷나무 추출물의 고지혈증 개선효과 작용 메커니즘 분석
- 콜레스테롤 대사 조절 및 담즙산 생합성에 관여하는 transcription factor의 활성을 알아보

기 위해 luciferase assay 실시

- Reporter gene assay를 통해 확인된 Transcription Factor의 활성을 단백질 수준에서 확인

제5세부 율나무추출물의 약동력학 연구

- 율나무추출물에 의한 약물대사효소(CYP450)의 대사활성 억제 작용 평가
- LC/MS/MS를 이용한 혈중 율나무 지표성분 정량분석법 확립
- 율나무 경구 투여 후 지표성분의 혈중농도 프로파일 분석 및 PK 파라미터 산출

제6세부 율나무추출물의 항산화 기능성 검증

- 율나무추출물의 DPPH 소거능 검증
- 율나무추출물의 철 환원 능력 검증
- 산화스트레스 유발시 율나무추출물의 간 손상 보호능력 검증
- 산화스트레스 유발시 율나무추출물의 지질과산화 및 DNA 손상 보호능력 검증
- 산화스트레스 유발시 GSH 기전에서 율나무추출물의 보호능력 검증 및 기전 규명
- murine macrophage cell line에 LPS 투여 후 염증성 스트레스 회복 효과 검증
- LPS/galactosamine으로 간 조직에 염증성 산화스트레스 부여한 동물모델에서 율나무추출물의 항산화 효과 검증

[제3핵심과제] 율나무의 생식독성연구

제1세부 율나무의 생식독성연구

- 임신동물을 이용한 랫드 발생독성시험
- 율나무 추출물의 생식독성시험 중 발생독성시험(토끼) 및 2세대 번식독성 시험(랫드)을 수행함으로써 식약청 제출용 등록자료를 생산

IV. 연구개발결과

[제1핵심과제] 율나무를 이용한 건강기능식품 개발

- 율나무에서 우루시올을 제거하는 법을 개발하였고, 물, 주정알코올 등 용매별 추출효율과 활성을 확인하여 가장 좋은 조건(수율 6%이상)의 추출방법을 찾았으며, 율나무추출물을 대량생산하여 우루시올의 유무확인 및 세부과제연구에 제공하였음.
- Prep-LC를 사용하여 율나무추출물에서 Fraction을 분리하였으며, HPLC를 사용하여 Fustin 표준품과 비교하여 Fraction에 Fustin이 함유되어 있음을 확인하였음.

- 옷나무추출물의 제품 적용성 실험을 위해 다양한 식품군에 옷나무추출물을 첨가하여 분석을 통하여 제품가능성을 확인하였고, 우유류, 유가공품류, 주스류, 알콜첨가제품류에서 옷나무추출물 및 6종 기능성물질이 반응성이 없었음(80-120% 내 적합). 옷나무 기능성 소재 제품화 및 소비자 요구성 충족 완료됨. 옷나무추출물과 지표성분인 Fustin의 내산성/내알칼리성 평가 결과 pH 8.3 이상에서 옷나무추출분말 및 Fustin의 변질 확인하였고, pH 0.2~6.05에서는 변화가 없어 내산성만 있는 것으로 확인. 내열성(92℃)도 보유 확인(기준 : 검출효율 80~120%).
- 옷나무 추출물의 장기 안정성 평가 결과 지표성분인 Fustin의 변화량이 2년동안 80-120%내로 유통기한은 2년이상으로 판단됨.
- 옷나무추출물을 3가지 분획으로 나누고 분리 정제를 시작하였고 신규물질 1종을 포함한 총 24종의 단일 물질의 구조 확인을 완료하였음.
- 옷나무의 지표성분을 설정하고 분석법을 개발하였고 ICH 및 FDA Guideline에 따라서 분석법을 검증하였음.
- 옷나무의 주요 성분에 대한 동시분석법을 개발하고 식약청의 가이드라인에 따라 검증을 실시하고 다양한 조건 하에 추출된 옷나무 추출물에 대한 함량 모니터링을 실시함.
- 옷나무 추출물의 갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구를 수행 한 결과 다음과 같았음.

1. 남자

- 1) 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사 결과, 임상적 이상반응 발현상황 등을 종합하여 평가한 결과, 옷나무추출물은 안전한 것으로 평가되었음.
- 2) 혈청 지질개선 효과에 대한 유효성 평가를 실시한 결과, Total cholesterol(평균 21.83mg/dL 감소, $p < 0.001$), HDL cholesterol(평균 5.22mg/dL 증가, $p = 0.001$), LDL cholesterol(평균 14.86mg/dL 감소, $p < 0.001$), Triglyceride(평균 35.19mg/dL 감소, $p < 0.001$), Apolipoprotein-B(평균 14.56mg/dL 감소, $p < 0.001$), 동맥경화지수(평균 0.76 감소, $p < 0.001$) 모두 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 유의하게 개선되는 효과가 높은 것으로 평가되었음.

갱년기 증상 개선 효과에 대한 유효성 평가를 실시한 결과, 남성갱년기 증상 설문(AM S) 총점수의 경우 MU-3 500군(평균 12.36점 감소, $p < 0.001$)에서 갱년기 증상 정도가 중간정도(moderate)에서 증상 없음(No)으로까지 개선되는 효과를 보였다. 또한 Total Testosterone(평균 0.78ng/mL 증가, $p = 0.001$), Free Testosterone(평균 1.81pg/mL 증가, $p = 0.001$), C-Telopeptide(평균 0.07ng/mL 감소, $p = 0.004$), Osteocalcin(평균 1.34ng/mL 감소, $p < 0.001$), COMP(180.88ng/mL 감소, $p < 0.001$), 국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 총점수(평균

12.31점 증가, $p < 0.001$) 모두 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 유의하게 개선되는 효과가 높은 것으로 평가되었다.

따라서 옷나무 추출물은 혈청 지질 및 갱년기 증상 개선 효과가 있는 것으로 평가되었다. 혈청 지질 및 갱년기 증상을 효과적으로 개선시키는 적합한 용량은 MU-3 500 시험식품군으로 결정되었다.

2. 여자

- 1) 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사 결과, 임상적 이상반응 발현상황 등을 종합하여 평가한 결과, 옷나무추출물은 안전한 것으로 평가되었다.
- 2) 혈청 지질개선 효과에 대한 유효성 평가를 실시한 결과, Total cholesterol(평균 17.23mg/dL 감소, $p < 0.001$), HDL cholesterol(평균 9.20mg/dL 증가, $p < 0.001$), Triglyceride(평균 29.57mg/dL 감소, $p < 0.001$), Apolipoprotein-A1(평균 10.17mg/dL 증가, $p < 0.001$), hs CRP(0.31mg/L 감소, $p < 0.001$), 동맥경화지수(평균 0.89 감소, $p < 0.001$) 모두 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 유의하게 개선되는 효과가 높은 것으로 평가되었다.

갱년기 증상 개선 효과에 대한 유효성 평가를 실시한 결과, 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 총점수의 경우 MU-3 500군(평균 14.74점 감소, $p < 0.001$)에서 갱년기 증상 정도가 중증에서 준정상 상태까지 개선효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한 FSH(평균 6.27 mIU/mL 감소, $p < 0.001$), Osteocalcin(평균 3.07ng/mL 감소, $p = 0.002$), COMP(평균 165.10 ng/mL 감소, $p < 0.001$) 모두 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 유의하게 개선되는 효과가 높은 것으로 평가되었다.

- 따라서 옷나무 추출물은 혈청 지질 및 갱년기 증상 개선 효과가 있는 것으로 평가되었다. 혈청 지질 및 갱년기 증상을 효과적으로 개선시키는 적합한 용량은 MU-3 500 시험식품군으로 결정되었다.

[제2핵심과제] 옷나무의 갱년기 장애 개선 관련 효능 검증

- 다양한 방법으로 추출한 옷나무추출물의 in vitro transcription assay를 이용한 활성 평가를 통해 가장 적합한 추출법 RV10%를 선정하였음
- RV10%의 세포독성은 저농도에서는 나타나지 않았으나 200ug/ml에서 급격히 나타나 약 50% 내외의 생존율을 나타내었음
- RV10% 자체는 안드로겐작용을 나타내지 않았으나 1nM DHT와 동시처리하였을 때 DHT의 안드로겐 작용을 크게 증가시켰으며, 이는 항안드로겐 약물인 bicalutamide에 의하여 완전히 저해되었음.

- 이러한 RV10%의 작용은 RV10%가 저농도에서는 안드로겐이 안드로겐 수용체에 결합하는 것을 촉진하여 안드로겐 작용을 크게 증가시키는 것으로 나타났음.
- RV10%는 저농도에서는 안드로겐 관련 PSA나 KLK2 유전자 발현을 증가시켰으나 고농도에서는 발현을 크게 저해하였으며, DHT와 동시처리하였을 때도 같은 결과를 나타내었음
- 옷나무추출물은 저농도에서는 DHT에 의한 안드로겐 수용체의 핵내로 이동을 촉진하나 고농도에서는 저해하였음.
- 이상의 in vitro 결과를 종합하면 옷나무추출물은 저농도에서는 agonist로 고농도에서는 항안드로겐 작용을 나타내는 것으로 사료됨
- In vivo 안드로겐 작용을 관찰하기 위하여 Hershberger assay 2회를 반복시험 하였으며, 옷나무추출물에 의하여 특이한 독성이 나타나지 않았으며, 체중 변화나 안드로겐 관련 장기 무게의 변화가 관찰되지 않았음. 혈액내 안드로겐 작용 역시 유의적 변화가 없었음.
- MCF7/ERE 유방암 세포에 옷나무추출물은 세포독성을 나타내지 않았으며 오히려 세포증식이 증가되었음.
- RV10은 in vitro estrogenic activity를 갖고 있음.
- Estrogen receptor의 isoform에 대한 옷나무 추출물질 및 분리물질에 대한 reporter gene assay 및 receptor binding assay를 실시하여 ER β 에 대한 affinity가 큰 것을 밝혔음.
- 골관절염 동물실험에 앞서 옷나무 추출물의 동물에서의 독성평가를 시행하였으며, 열수 추출물과 EtoAc 추출물 각각에서 모두 동물독성은 나타나지 않았음
- 관절염 유발 하루 뒤, Rat에 옷나무 추출물을 경구투여 하고 보행 및 관절통증에 관한 분석을 위해 실시한 Treadmill 측정 하였으며 Speed 측정 결과, 정상군에 비해 관절염 유발군에서 Speed가 40% 감소한 것을 확인하였고, 열수추출물 200mg/kg·bw 투여군에서 Speed가 14% 증가되어 가장 효과가 좋은 것으로 나타났음.
- 압력 측정 결과, 열수추출물 500mg/kg·bw 투여군에서 5%가 증가되어 가장 효과가 좋은 것으로 나타났으며, 추진력 역시 열수추출물 200mg/kg·bw 투여군에서 관절염 유발군에 비해 평균 25%가 증가되어 가장 효과가 좋은 것으로 관찰되었음.
- Real-Time PCR 수행 결과, 관절염 유발군에 비해 옷 추출물 투여 군에서 Collagen의 발현이 증가한 것으로 나타났음. 특히 Type 1 Collagen 에서는 옷나무 열수 추출물 투여군에서 콜라겐의 발현이 관절염 유발군에 비해 4배 증가한 것으로 나타났음.
- 관절염 유발에 따른 SD rat의 골구조의 변화를 보기 위하여 실시한 micro-CT 결과에서, 옷나무 추출물을 투여한 모든 군에서 비교적 골상태가 좋아진 것을 관찰할 수 있었으며, 특히 옷나무 열수추출물 200mg/kg·bw 투여군에서 좋은 효과가 나타난 것을 확인하였음.
- 관절 조직 H&E 염색결과, 옷나무 열수 추출물을 투여한 군에서 효과가 나타나는 것을 관찰

- 하였으며 특히 옷나무 열수 추출물 200mg/kg · bw 투여군에서 효과가 나타나는 것을 관찰하였음.
- 옷나무 추출물 및 지표성분의 농도는 모두 80 μ M으로 하여 유전자발현 실험을 진행하였으며, 그 결과 9가지 지표성분 모두에서 농도증가에 따라 유의적으로 collagen 발현이 증가한 것을 관찰하였음.
 - Taxifolin, Fisetin, 그리고 Fustin을 처리한 연골세포에서 유의적으로 발현이 증가한 것으로 나타나 관절의 염증에 효과가 있을 것으로 생각됨.
 - H₂O₂의 처리는 MMP-3와 MMP-7의 발현을 정상세포군에 비해 70%까지 증가시켰고, 이에 비해 9가지 옷나무 추출물 지표성분을 처리한 세포에서 유의적으로 MMP-3와 MMP-7의 발현이 감소함.
 - 9가지 옷나무 추출물 지표성분을 처리한 모든 세포에서 유의적으로 TIMP-1의 발현이 증가하는 것으로 나타남.
 - 옷나무 추출물에 대한 모유두 세포(HHDPC)의 증식률을 MTT assay를 통하여 세포 활성도를 평가한 결과 옷나무 추출물을 처리한 경우에는 대조군에 비하여 약 10% 정도의 세포사멸 많을 일으켜 DHT를 동시에 처리하였음에도 불구하고, 세포 사멸을 방지하는 것을 확인할 수 있었음. 또한, 발모제로 알려진 Minoxidil 및 Finasteride와 모발 관련 세포 증식 효능과 비교하여도 옷나무 추출물의 세포 증식률이 10%~40% 이상 증식률이 증가함을 알 수 있었음.
 - 옷나무 추출물을 경구투여한 그룹의 경우(그림 2, 3), 마우스의 털을 깎고 난 후 6주째 털이 잘 자라기 시작하여 8주째에는 대조군과 차이를 보일 정도로 모발의 성장한 모습을 확인할 수 있었음.
 - 옷나무 추출물이 육안적 평가뿐만 아니라, 조직학적 변화에서도 휴지기의 모낭을 성장기의 모낭으로 유도하여 모성장기 촉진 효과에 효과적임을 알 수 있었음.
 - 옷나무 추출물을 경구투여한 경우 성장기/휴지기 모낭의 비율(Anagen/Telogen Ratio)은 대조군에 비하여 6배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었음.
 - 옷나무 추출물은 혈장 응고능에 유의미한 영향을 미치지 않음.
 - 옷나무 추출 분획 중, 3-9-1 (fisetin), 3-27-4 (butein) and 3-47-8 (sulfuretin)은 혈소판 응집을 억제할 수 있음. 그러나 그러한 항혈소판 효능은 30분 이상 지속되지 않으며, 전혈의 응집에는 영향을 미치지 않음.
 - 동물 실험 결과, 옷나무 추출물의 복강 투여는 혈전 생성을 유의적으로 억제하지 못함.
 - 옷나무 열수 추출물은 혈관 수축 정도를 감소시킬 수 있음.
 - 배양한 혈관 평활근 세포의 칼슘 반응성을 감소시키며, 이는 칼슘의 유입과 저장소로부터의 유리를 모두 억제하기 때문인 것으로 예상됨.

- 향후의 연구를 통해, 윗나무의 혈관 수축 억제 효능에 대한 작용 기전을 연구할 것이며, in vivo 동물 실험을 통해 혈압 개선 효능이 있는 지를 확인할 예정이다.
- Arterial thrombosis 동물모델을 활용하여 윗나무 추출물과 fisetin의 혈전생성 억제능을 확인함
- SHR에서 윗나무 추출물 및 fisetin의 혈압 강화 효능을 확인함
- 고지질 식이를 실시하는 마우스에 윗나무 추출물(1g/kg)을 함께 섭취시킨 경우 1029.85 ± 124.62 dl/ml에서 867.60 ± 52.96 dl/ml로 유의적으로 총 콜레스테롤 수준이 감소하는 것을 확인함($P < 0.05$). 또한 나쁜 콜레스테롤인 LDL-콜레스테롤의 경우에도 3group에 비해 5group에서 유의적으로 감소하는 것을 확인함($P < 0.05$).
- 고지질 식이 또는 윗나무 추출물 섭취에 따른 간 독성 여부를 확인하기 위하여 혈중 GOT, GPT 및 Albumin 분석을 위해 혈액분석기기를 통해 분석한 결과 각 그룹간의 유의적인 차이는 나타나지 않은 것으로 윗나무 추출물 섭취에 의한 GOT, GPT 및 Albumin의 변화는 나타나지 않은 것을 확인함.
- 지방 세포의 사이즈 분석 결과 윗나무추출물(1g/kg)을 함께 섭취시킨 경우 3group에 비해 5group에서 유의적으로 감소하는 것을 확인함($P < 0.01$)
- 콜레스테롤 배출을 위한 담즙 생합성 관련 유전자 4종 (CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1, CYP8B1)을 분석한 결과 C57BL/6 마우스 간 조직에서 CYP7A1, CYP8B1 유전자 발현이 윗나무 추출물 (1g/kg) group에서 유의적으로 증가하였고 ApoE KO에서는 CYP27A1 유전자가 유의적으로 증가함.
- 간 내 합성된 담즙 산의 정도가 고지질 식이를 실시한 군에 비해 고지질 식이와 윗나무 추출물을 함께 식이 한 군에서 통계적으로 유의하게 증가됨을 확인함
- 윗나무 추출물을 처리한 AML-12 간세포에서 통계적으로 유의하게 Cyp7a1 프로모터 활성이 증가되어 있음을 확인함
- 7종의 CYP isozyme(CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4)를 동시에 분석할 수 있는 LC/MS/MS법을 확립함.
- 윗나무추출물을 1~100 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때, CYP2C8과 CYP2C9에 대하여 억제 작용을 나타내었으며 IC50값은 각각 64.3, 68.1 μ g/mL로 계산됨. Fisetin의 경우 대부분 모든 CYP isozyme에서 농도의존적인 억제 작용을 보였으며, 특히, CYP2C8의 경우 IC50값이 0.7 μ M로 매우 강한 억제 작용을 보임. 따라서 윗나무 추출물에 의한 CYP2C8의 억제는 fisetin에 의한 작용일 것으로 사료됨.
- 윗나무추출물의 9가지 지표성분에 대한 LC/MS/MS 분석법 확립함.
- 경구 투여 후의 윗나무추출물 지표성분의 혈중농도 프로파일 완성 및 생체동력학 특성 규

명함.

- 윗나무 추출물 농도별 DPPH radical 소거능 측정결과 농도 의존적으로 DPPH 소거능이 높아짐을 확인할 수 있음. 윗나무 추출물 농도별 철 환원능력 측정결과(FRAP value) 농도 의존적으로 FRAP value가 높아짐을 확인할 수 있음.
- 혈청 지질과산화물과 간 조직 지질 과산화물 함량 분석 결과 군 간 통계적으로 유의적인 차는 없었지만 윗나무추출물 저용량군과 지표물질인 fustin 투여군에서 낮아지는 경향성을 보임. 간 조직의 GSH 함량 분석 결과 윗나무 추출물 저용량 군과 지표물질인 fustin 투여군에서 유의적으로 높아짐을 확인할 수 있음.
- LPS군과 sample간의 비교에서도 sample고농도에서 NO의 생성량이 유의적으로 감소한 것을 알 수 있었음.
- 윗나무, Fustin sample을 농도별로 처리한 결과 고농도로 갈수록 ROS의 양이 줄어드는 것을 관찰 할 수 있었음
- IL-1 β , IL-6, TNF- α 모두 LPS군과 sample군을 비교해 sample의 농도에 따라 유의적으로 감소했음을 알 수 있었음.

[제3핵심과제] 윗나무의 생식독성연구

- 윗나무추출분말의 착상 후 임신기동안 경구 반복투여는 1000 mg/kg 투여군에서 모든 검사항목에 있어서 이상을 유발하지 않았음. 따라서 본 시험조건에 의한 윗나무추출물의 무해용량(no-observed-adverse-effect levels)은 모동물과 태자에 있어서 공히 1000mg/kg 이상으로 사료됨.
- 윗나무추출분말의 2세대 시험기간 동안의 경구 반복투여는 F0 친세대동물, F1 및 F2세대 동물의 경우 1000mg/kg 투여군에서 모든 검사항목에 있어서 이상을 유발하지 않았음. 따라서 본 시험조건에 의한 윗나무추출물의 무해용량(no-observed-adverse-effect levels)은 F0 친세대동물, F1 및 F2세대 동물에 있어서 공히 1000mg/kg 이상으로 사료됨.
- 윗나무의 생식발생독성학적 평가를 위한 발생독성시험 및 번식시험 실시결과 무해용량 (NOAEL, No Observed Adverse Effect Level)이 모두 1000 mg/kg 이상인 것으로 판단되었음.
- 수컷동물의 수태능력 및 호르몬 검사를 실시한 결과 시험물질 투여에 기인한 수컷동물의 생식능력 개선효과는 관찰되지 않았음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연차별 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종수 생산 입매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	2								1	
2차년도	2						2	1	1	
3차년도	1						3			
계	5						5	1	2	

2. 연구종료 후 연구결과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	2	4		1	1	2

3. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Simultaneous determination of bioactive phenolic compounds in the stem extract of <i>Rhus verniciflua</i> Stokes by high performance liquid chromatography	김선아	유혜현	김인숙, 이동호, 동미숙, 나천수	Food Chem	141. 3813-3819		SCI
2013	Syandardized <i>Rhus verniciflua</i> Stokes extract and its major flavonoid fustin attenuate the oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide via activation of nuclear factor erythroid 2-related factor	문지은	김지연	김동민, 나천수	Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry	in press	국내	SCIE
2013	Inhibitory effect of <i>Rhus verniciflua</i> Stokes extract on human aromatase activity; butin is its major bioactive component	유혜현		박명현, 김인숙, 김선아, 나천수, 홍철이, 동미숙	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters		국외	SCI

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Antiplatelet Effect of Rhus verniciflua Stokes Heartwood and its Active Constituents Fisetin, Butein, and Sulfuretin	이무열		이준형, 김미경, 장경화, 홍철이, 나천수, 동미숙, 이동호	Journal of Medicinal Food		국외	SCI
2013	Extract of Rhus verniciflua Stokes Protects against Diet-induced Hyperlipidemia in Mice	오구택		정세진, 박종길	Phytomedicine		국외	SCI
2013	Study of Rhus verniciflua extracts on osteoarthritis in experimental model	남다운	이정민	김옥경, 나천수, 홍철이	Biological and Pharmaceutical Bulletin		국외	SCI

4. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	옷나무 추출물을 함유하는 고지혈증 및 지방간 개선 및 예방용 조성물	(주)생명의나무	대한민국	10-2011-0105585					
2011	옷나무 추출물을 함유하는 발모촉진 및 탈모예방조성물	(주)생명의나무	대한민국	10-2011-0105586					
2012	옷나무 추출물을 함유하는 퇴행성 관절염의 예방 및 치료용 조성물	(주)생명의나무	대한민국	10-2012-0004226					
2012	옷나무 추출물을 함유하는 골다공증의 예방 및 치료용 조성물	(주)생명의나무	대한민국	10-2012-0004225					
2013	옷나무 추출물 유래 플라보노이드 화합물을 유효성분으로 하는 갱년기 증후군 예방 및 치료용 약학적 조성물	(주)생명의나무	대한민국	10-2013-0055721					

5. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
18	7	7	2	2	8	10	18		

6. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
	1		1		3	3

7. 성과활용계획

본 연구사업단에서는 본 연구 사업을 완료하고 현재 1차산업이 주를 이루고 있는 옷산업을 옷나무를 이용한 건강기능식품의 개발로 2차산업으로의 전환을 통한 고부가가치 산업으로 육성하기 위하여 핵심과제들의 성공적인 수행을 위한 기반 조성 및 지원책을 통해 옷나무의 기능성 연구, 연구인력 양성을 도모하며, 지자체와의 유기적인 협력, 농민단체들과의 연계 등 다각적인 사업들을 진행하여 옷나무 건강기능식품 개발에 주도적인 역할을 수행한다. 이를 위하여

1. 옷나무 추출물의 기능성 원료 인정

- 남성, 여성 갱년기 증상 개선 및 콜레스테롤 개선 등 옷나무 추출물을 기능성 원료로 식약처에 인허가를 받아 건강기능식품으로 개발.

2. 천연물신약 개발

- 옷나무 추출물에서 단일물질을 분리하여 갱년기개선 및 콜레스테롤 저하, 퇴행성관절염, 고혈압 등 성인병 및 노인성 질환에 관련되 천연물 신약 개발

3. 사업단 홈페이지를 활용하여 옷나무 관련 정보를 공유.

- 구축한 사업단 홈페이지를 활용하여 옷나무 관련 정보 및 연구 진행에 대한 정보들을 공유함.

4. 옷나무 재배농민, 옷나무 관련단체, 지방자치단체 등과 옷산업 관련 네트워크를 구축.

- 본 사업단은 옷나무 재배 및 공급과 관련하여 관련 재배 농민, 관련단체 및 지방자치단체 등과 유기적인 네트워크를 구축하여 워크샵/설명회를 개최함.

5. 옷나무 기능성 연구를 통한 옷나무의 부가가치를 창출.

- 본 과제는 갱년기 관련 다양한 효능 연구팀 및 독성 연구팀들로 구성되어 있어 성호르몬, 심혈관계, 콜레스테롤, 관절염, 탈모 등 다양한 옷나무의 효능을 연구하며 아울러 전임상 연구팀인 화학연구소의 안전성 센터팀이 생식독성 연구함.
- 특히 천연물 신약 개발에 적용하는 추출물의 약동력학까지 연구함으로써 효능, 안전성 및 PK까지 연구하여 본 사업단에서는 이러한 결과들을 건강기능 식품으로 개발하기 위하여 종합 구성하여 옷나무의 부가가치를 최대한으로 창출할 예정임

5. 옷나무 기능성 관련 워크샵/설명회 등을 개최 사업단의 성과 등을 홍보.

- 옷나무 연구 및 건강기능식품 관련 다양한 정보 및 동향에 대한 워크샵을 개최하여 사업단의 성과 홍보 및 동향에 대한 정보를 수집함.

6. 교육연수 프로그램, 단기 강좌 등을 개최하여 맞춤형 인재를 양성할 수 있도록 지원

본 사업단에서는 위의 역할을 충실히 수행하여 옷나무 산업을 건강기능식품, 천연물신약 등 고부가가치 산업으로 발전시켜 이를 이용한 농촌의 신성장 동력을 만들고 고령화 사회에서의 국민건강증진 및 삶의 질 향상을 도모하려 함.

또한, 본 사업단에서는 연구기간 안에 개별인정형 건강기능식품 인허가를 획득하여 사업화할 수 있도록 최선을 다하여 운영하도록 하겠음.

본 연구사업단에서 옷나무를 이용한 건강기능식품을 개발하여 1차산업에 국한된 옷산업을 2차산업으로 발전시켜 지속적인 소득작물로의 재배가 가능하며, 7~10년 까지는 옷칠액의 생산이 가능하고 건강기능식품용 원재료는 그 이후 옷나무 목부를 이용하기 때문에 농가에서는 2중의 수입이 가능하게 됨.

전통산업인 옷산업을 현재 많은 지자체에서 핵심 산업으로 육성 중에 있으며, 본 연구사업단과 유기적인 협력관계를 통해 재배면적이 많은 옷나무 재배 지자체에 새로운 활력이 될 것임.

옷나무에서 단일물질을 분리 활성 평가를 통한 기능성을 입증한다면 신약후보물질로도 개발이 가능함.

천연물을 이용한 바이오산업은 우리 농촌의 새로운 소득원으로 자리를 잡게 될 것이며, 이러한 소득원의 증가는 귀농인구의 증가로 이어져 고령화되어가고 있는 농촌 사회에서 젊은 농촌으로 변화하는데 기여할 것으로 사료됨.

SUMMARY

I. Title

Research Center for Health Functional Food

II. Purpose and necessity of research

To prepare aging society through scientific development, development of health functional food against menopause is necessary. Also, because *Rhus verniciflua* is only used in Korea as food and medicinal purpose and Korean farmers' preferred plant for incoming, we hope to develop the industry of *R.verniciflua* from primary to secondary for improving the farming industry.

III. Overview of research

Isolation and structural elucidation of compounds is performed using various column chromatography from *Rhus verniciflua*. Also, simultaneous determination of bioactive compound is operated using HPLC from *R.verniciflua* and the validity of developed method is confirmed and contents monitoring was performed.

Rhus verniciflua extracts were performed Menopause-related improvement in vivo and in vitro tests.

Investigational product (MU-3 500, MU-3 1000) and comparator (MU-3 placebo capsule) distributed to total 216 participants (108 males, 108 females) randomly. After a double-blind treatment period for 8 weeks, evaluation of efficacy and stability are implemented.

Evaluate the effect of *Rhus verniciflua* extracts on climacteric symptoms and serum lipid improvement. Find proper amount for improving serum lipid and climacteric symptom effectively. Comparison of the changes in Hormone parameters, Osteoporosis & Osteoarthritis parameters, circulatory system parameters, and evaluate IIEF (International Index of Erectile Function) questionnaire. Evaluate the stability of the food by measuring vital signs, anthropometry and physical examinations, checking adverse reactions and inspecting clinical laboratory.

IV. Results of research

Isolation and structural elucidation of compounds was performed using various column chromatography from *Rhus verniciflua*, and consequently 24 compounds including 1 new

compounds was isolated. Also, simultaneous determination of fustin, main bioactive constituent of *R. verniciflua*, is operated using HPLC, and the validity of developed method is confirmed. Last, contents monitoring of fustin from *Rhus verniciflua* was performed.

Evaluate the effect of *Rhus verniciflua* extracts on climacteric symptoms and serum lipid improvement.

1. Male:

1) *Rhus verniciflua* extracts are considered safe, according to the evaluation results of vital sign, anthropometry and physical examinations, adverse reactions and inspecting clinical laboratory.

2) Following the results of efficacy evaluations in the effects of serum lipid improvements, MU-3 500 group had a more positive effective, depending on total cholesterol (average 21.83mg/dL decreased, $p < 0.001$), HDL cholesterol (average 5.22mg/dL increased, $p = 0.001$), LDL cholesterol (average 14.86mg/dL decreased, $p < 0.001$), Triglyceride (average 35.19mg/dL decreased, $p < 0.001$), Apolipoprotein-B (average 14.56mg/dL decreased, $p < 0.001$), and atherogenic index (average 0.76 decreased, $p < 0.001$), than the MU-3 placebo capsule group or MU-3 1000 group.

Following the results of efficacy evaluations in climacteric symptoms improvement, MU-3 group (average 12.36 decreased, $p < 0.001$) had a positive effect on improving climacteric symptoms, moderate symptoms, and no symptoms on the age male symptom questionnaire. Also, MU-3 500 group had a more positive effect on total Testosterone (average 0.78ng/mL increased, $p = 0.001$), Free Testosterone (average 1.81pg/mL increased, $p = 0.001$), C-Telopeptide (average 0.07ng/mL decreased, $p = 0.004$), Osteocalcin (average 1.34ng/mL decreased, $p < 0.001$), COMP (180.88ng/mL decreased, $p < 0.001$), International Index of Erectile Function total score (average 12.31 increased, $p < 0.001$), than the MU-3 placebo capsule group or MU-3 1000 group.

As a result, *Rhus verniciflua* extracts are rated as effective on serum lipid improvements and climacteric symptoms. Proper amounts of MU-3 500 group are shown to be effective for improving serum lipid and climacteric symptoms.

2. Female

1) *Rhus verniciflua* extracts are considered safe, according to the evaluation results of vital signs, anthropometry and physical examinations, adverse reaction and inspecting clinical

laboratory.

2) Following the results of efficacy evaluations in the effects of serum lipid improvements, MU-3 500 group had a more positive effect depending on total cholesterol (average 17.23mg/dL decreased, $p < 0.001$), HDL cholesterol (average 5.22mg/dL increased, $p = 0.001$), LDL cholesterol (average 14.86mg/dL decreased, $p < 0.001$), Triglyceride (average 35.19mg/dL decreased, $p < 0.001$), Apolipoprotein-B (average 14.56mg/dL decreased, $p < 0.001$), and Atherogenic index (average 0.76 decreased, $p < 0.001$), than the MU-3 placebo capsule group or MU-3 1000 group.

Following the results of efficacy evaluations in climacteric symptoms improvements, MU-3 group (average 14.74 decreased, $p < 0.001$) had a positive effect on improving climacteric symptoms, moderate to slight symptoms on the Kupperman's index questionnaire.

Also, MU-3 500 group had a more positive effect, depending on Total FSH (average 6.27mIU/mL decreased, $p < 0.001$), Osteocalcin (average 3.07ng/mL decreased, $p = 0.002$), and COMP (average 165.10ng/mL decreased, $p < 0.001$), than MU-3 placebo capsule group or MU-3 1000 group.

As a result, *Rhus verniciflua* extracts are rated as effective on serum lipid improvements and climacteric symptoms. Proper amounts of MU-3 500 group are shown to be effective for improving serum lipid and climacteric symptoms.

Identified in the efficacy of *Rhus verniciflua* extracts material confirmed the protective effect of the cartilage cells

Platelet aggregation inhibitory ability of *Rhus verniciflua* extracts was confirmed. And the in vivo tests antithrombotic effect through fisetin was confirmed.

Rhus verniciflua extract is to reduce cholesterol, and inhibit the formation of fatty liver that was demonstrated to improve hyperlipemia.

Rhus verniciflua extract is due to the anti-inflammatory action effective for inflammatory oxidative stress defense in vitro experiments and animal studies that could confirm through.

This study was conducted to investigate the potential reproductive toxicity and improvement effect of aging male reproductive function of *Rhus verniciflua*. Embryo-Fetal development study (rat and rabbit) and two generation reproductive toxicity study (rat) were conducted to investigate the reproductive toxicity. In addition, pharmacological efficacy test of aging male reproductive function was conducted using Brown Norway rat. In reproductive toxicity test, NOAELs (No Observed Adverse Effect Level) were considered to be over 1000 mg/kg/day for

embryo-fetal development study and two generation reproductive toxicity test. In efficacy test, there was no improvement effect of *Rhus verniciflua* on aging male reproductive function.

V. Achievement and application of research

We hope to develop health functional food from *R.verniciflua* and to apply these results to relevant fields.

CONTENTS

Chapter 1	Overview of research.	25
Chapter 2	Development status in domestic and foreign.	34
Chapter 3	Contents and results of research.	41
Chapter 4	Achievement of research and contribution of relevant field.	455
Chapter 5	Results and application of research.	472
Chapter 6	Status of research facilities.	480
Chapter 7	Reference.	481

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	25
제 1절	연구개발의 목적	25
제 2절	연구개발의 필요성 및 범위	25
1.	연구개발의 배경	25
2.	연구개발의 필요성	27
3.	연구개발의 범위	31
제 2 장	국내외 기술개발 현황	34
1.	국내외 기술개발 현황	34
2.	국내외 시장 현황	37
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	41
제 1절	옻나무 건강기능식품 개발	41
1-1절	옻나무 건강기능식품 개발	41
1.	옻나무추출물 제조	41
2.	옻나무 추출분말 안정성 평가	47
3.	옻나무추출물의 용매분획 및 HPLC 분석	48
4.	Rhus verniciflua extract 지표성분 분리 확인	49
5.	DPPH 자유 라디칼의 소거능력 측정	52
6.	옻나무 제품 적용성 실험	53
7.	옻나무추출분말 내 기능성물질의 장·단기제품 적용성 평가	55
8.	옻나무추출물의 내열성/내산성/내알칼리성 평가	58
1-2절.	옻나무의 생리활성 성분 분리정제, 분석 및 모니터링 연구	61
1.	연구 추진 전략 및 방법	61
2.	연구 결과	61
1-3절.	옻나무 추출물의 갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배 정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구	96
1.	임상시험 계획	96
2.	피험자	114
3.	임상시험의 결과	116
4.	결 론	194
제 2절	옻나무의 갱년기 관련 약리효능 검증 및 기전연구	202

2-1절 . 옷나무가 안드로젠 작용에 미치는 영향	202
1. 연구개발수행 내용	202
2. 연구개발수행 결과	206
2-2절. 옷 추출물을 이용한 탈모방지 및 골관절염 개선 기능성식품의 개발	224
1. 골관절염 개선 기능성식품의 개발	224
2. 옷 추출물을 이용한 탈모방지	257
2-3절. 옷나무 유효성분의 순환기계 기능 개선 연구	264
1. 옷나무 추출물 및 활성 성분의 확보	264
2. 실험 방법	264
3. 옷나무의 혈행 개선 효과 연구 결과	267
4. 옷나무의 항고혈압능 연구	274
5. 요약 및 결론	281
2-4절. 옷나무 추출물의 고지혈증 치료효능 및 기전에 관한 연구	283
1. 연구개발 내용	283
2. 연구결과	284
2-5절. 옷나무 추출물의 약동력학 연구	294
1. 연구내용	294
2. 연구수행 결과	294
2-6절. 옷나무 추출물의 항산화 기능성 검증 및 비교	302
1. 연구내용	302
2. 연구수행결과	304
제 3절 옷나무의 생식독성 연구	311
3-1절. 옷나무의 생식독성연구	311
1. 발생독성시험 (랫드)	311
2. 발생독성시험 (토끼)	323
3. 번식시험 (랫드)	335
4. 노화 동물에 있어서 옷나무 추출물의 수컷 생식기노화 억제 및 개선 효과 연구	411
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	455
제 1절. 연구개발 수행내용 및 목표달성도	455
1. 평가의 착안점 및 기준	455
2. 연구개발목표의 달성도	458
3. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가	465
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	472

1. 연구개발 성과	472
2. 성과활용계획	476
3. 연구개발 기대효과	477
4. 성과 활용 방안	478
5. 연구사업단 보유(활용)기술의 산업화 계획 및 기대효과	478
제 6 장 연구시설·장비 현황	480
제 7 장 참고문헌	481

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

본 사업의 수행을 통해 과학의 발달로 고령화 사회로 가는 것에 대비하기 위하여 중년이후 남성과 여성에게서 성호르몬이 저하되면서 발생하는 갱년기 증상을 개선하고 갱년기에 나타날 수 있는 콜레스테롤저하 혈액순환개선, 골관절염, 탈모의 예방 등을 검증하여 건강한 노후를 위한 갱년기 개선용 및 콜레스테롤 개선 기능성원료 인정을 식약처로부터 허가를 받는 것과 우수한 신약 후보물질을 찾는 것을 목표로 하며, 전통산업으로 옷순, 옷닭, 옷칠액 등 1차 생산물이 주를 이루고 있는 옷나무산업을 1차 산업에서 벗어나 옷나무의 기능성을 이용한 고부가가치 제품을 생산하는 2차 산업으로의 발전을 바탕으로 농림바이오 산업화 촉진, 농산물의 고부가가치 개발, 이를 통한 농가의 신소득원 창출과 과학적이고 안전한 기능성 제품을 통한 국민의 건강향상 및 삶의 질 향상을 연구사업단의 목적으로 한다.

제 2절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 연구개발의 배경

천연물로부터 인간의 질병을 예방 또는 치료할 수 있는 신물질을 찾고자 하는 시도는 과거부터 많은 과학자들의 연구 대상이 되어 왔음. 그간 이들 자원을 이용한 의약품의 개발로 현재 사용되고 있는 의약품의 50% 이상이 천연물로부터 유래된 것이고 미국의 경우 사용하는 의약품 중 30%가 식물로부터 얻어진 것임. 최근 각광을 받고 있는 기능성 식품의 개발에서도 대부분의 재료가 천연물로부터 유래하고 있어 천연물의 생리 활성 기능을 가진 물질 탐색 연구는 대단히 중요한 과제로 대두되고 있음. 또한 자연 환경의 파괴 및 무분별한 개발 등으로 인한 생물자원의 급속한 감소는 생물자원의 농림업적, 의약적 이용을 위한 생물 다양성 유지 및 유전자원 보존 전략에 대한 지대한 관심을 대두시켰다. 이는 단순한 식물 보호 차원이 아닌 천연자원의 근간인 식물 유전자원을 수집·보존·증식하여 인간에게 유용한 새로운 품종을 육성하거나, 변화하고 있는 사회의 요구와 환경의 변화에 대처할 수 있는 새로운 특수 유용 물질 생산을 위하여 국가적 차원의 자원으로써 이에 대한 연구가 중요시되고 있음.

전 세계적으로 노인인구는 점차 증가하고 있으며, 급격한 고령화 사회로 변화되면서 고령남성과 고령여성 모두 건강증진 및 예방의학적 대처가 국가 정책뿐만 아니라 사회적 안정성, 개인적 삶의 측면에서 그 중요성이 증대되고 있으며, 질병의 극복에 이어, 보다 높은 삶이 질을 어떻게 유지할 것인가는 해결해야할 큰 과제로 남아 있음.

2002년 국내 의료 및 질병관리의 방향을 치료 관점에서 예방 차원으로 전환된 것과 2004년

천연물 개발에 대한 정책적 지원과 건강기능식품법의 시행 등으로 인해 최근 천연물에 대한 관심이 크게 고조되었으며 이와 관련하여 국내에서도 건강기능식품의 생산과 연구가 꾸준히 전개되고 있다. 이러한 천연물 소재 및 신약 개발 연구는 향후 국가보건적 차원에서 긍정적 영향을 미칠 것으로 평가되며 고령화 사회로 진입하고 있는 국내의 현실을 감안하면 지속적인 관련 연구의 필요성을 요구받을 것으로 예상된다.

식물 자원 중 옷나무(*Rhus verniciflua*)는 중앙아시아 고원지대인 티벳 및 히말라야지방이 원산지로 알려져 있으며 옷나무과(*Anacardiaceae*)에 속하는 낙엽교목(落葉喬木)으로 칠목(漆木)이라고도 불림(원색대한식물도감. 향문사, 2006). 또한 수고가 20m, 직경이 50cm에 이르며, 중국에서 약 4000년 전부터 재배하여 왔다고 알려져 있고 우리나라에서는 약 2000년 전인 낙랑고분과 광주 신창동 발굴지에서 칠기가 발굴되어 선사시대부터 우리나라 전역에서 목기에 옷칠을 하여 사용하는 것이 보편화된 것으로 추측할 수 있음(나천수 등 2005).



그림 1. 옷나무 (70년생(좌) 7년생(우))

그 후 1950년대까지 이렇다 할 합성도료가 생산되기 전까지 생활용기, 관, 제기, 병기, 가구, 건축재 등에 치수안정화, 내구성과 보존성을 요구하는 목제품 및 목구조물에 광범위하게 사용하여 왔기 때문에 우리나라뿐만 아니라 동양권에서는 옷나무속 수목이 천연도료를 생산하는 매우 중요한 자원이었음.



그림 2. 옷칠액의 채취 및 정제

토종약초백과에서 “옷은 제일 우수한 방부제이며, 살충제로 인체의 세포를 보존하여 상하지 않고 갖가지 질병을 다스린다. 옷은 소화를 돕고 어혈과 염증을 풀어주며 피를 맑게 하고 균을 죽인다. 소변을 잘 나오게 하고 몸을 따뜻하게 하며, 신경통, 관절염, 위장병, 간병, 늑막염, 골수염, 갖가지 암 치료 등에 사용할 수 있다.” 고 하였으며, 신약, 구세심방, 동의보감, 방약합편, 본초강목 등에서도 만성위장병, 신장병, 발기부전, 생리통, 수족냉증, 변비, 피로회복, 주독, 관절염, 신경통, 피부병, 암의 예방 및 수술후 전이방지, 당뇨병, 지방간, 심장병 등을 개선시킨다고 전함.

국내 옷나무 재배 본수는 거의 조림되어진 것만 300만 그루 이상에 육박하고 있으며, 일제시대 옷칠액의 생산을 위하여 야산을 비롯하여 전국에 많은 옷나무들이 심어져 있으며, 또한 옷나무가 특용수종으로 인기를 얻어 매년 옷나무의 조림면적과 조림 본수는 증가하고 있음(2009년 4450ha, 776만본).

옷나무는 농가의 새 소득원으로 부상하여 충북 옥천군은 2005년 재정경제부로부터 ‘옷산업특구’로 지정돼 현재 청성·안내·안남·동이면 등에서 약 200여 농가가 참여해 80ha의 옷나무 단지를 조성했고, 오는 2015년에는 600여 농가에서 250여ha까지 면적을 확대할 방침임.

각 지자체에서는 옷나무를 특용수로 지정하고 우량 옷나무 품종의 선발·육성과 함께 재배기술을 보급해 옷나무를 향토자원으로 가꾸고 있고, 특히 영농조합과 작목반 등을 조직해 고품질 옷나무 생산은 물론, 산업체와 연계해 부작용이 없는 옷दन장, 옷간장, 옷사료, 옷염색 제품의 생산·개발에 나서는 등 지역경제 활성화를 위한 옷산업 클러스터 구축에도 박차를 가하고 있음.

옷추출물이 식품공전에 제한적 식품원료로 등재되면서 옷의 식용판매액 비중이 증가하고 있고, 재배면적은 2002년 대비 2010년에는 10배 이상 증가(1,216천㎡에서 11,570천㎡)하였으며, 2010년 재배면적으로 강원도 원주 467ha, 전남곡성 450ha, 충북옥천 120ha, 경남함양 120ha, 등으로 지자체에서 소득작물로 지원하고 있음(농촌진흥청. 옷나무의 기능성물질 탐색 및 상품 이용기술연구. 2011)

2. 연구개발의 필요성

현재 전 세계적으로 노인인구는 점차 증가하고 있으며, 세계적으로 1950년도에는 출생 이후 기대되는 남성의 평균수명이 46.5세였으나 이후 의료수준 향상 등에 힘입어 2000년에는 65.6세의 평균수명이 기대되며 2050년에는 76.6세로 더 증가할 전망이다. 또한 1940 - 60년대 세계적인 베이비붐 세대가 곧 노인 인구로 진입하기 시작한다는 점을 고려할 때 앞으로 노인 인구는 계속 증가할 전망이다(2008년 고령자 통계).

급격한 고령화 사회로 변화되면서 고령 인구의 건강증진 및 예방의학적 대처가 국가 정책뿐만

아니라 사회적 안정성, 개인적 삶의 측면에서 그 중요성이 증대되고 있으며, 고령층에서 질병의 극복에 이어, 보다 높은 삶이 질을 어떻게 유지할 것인가는 해결해야할 큰 숙제로 남아 있음.

이와 같이 전반적인 사회수준의 향상과 증가하는 중년인구와 중년기에 대한 사회적 관심과 여러 건강 문제에도 불구하고 갱년기와 관련하여 중년 여성을 대상으로 한 연구가 주로 이루어 졌을 뿐 중년기 남성의 갱년기 건강문제에 대해 연구한 것은 절대적으로 부족한 실정이며, 또한 중년기 남성들의 갱년기 증상들에 대한 인식과 연구는 아직 활발하게 이루어지지 않고 있는 상태임.

남성은 여성에서의 폐경기와 같이 갑작스러운 생식선 기능의 감퇴를 경험하지 않으나 고령화와 관련하여 남성호르몬의 감소에 의한 남성갱년기 증상들이 임상학적으로 나타나고 있다(Gray 등, 1991; 박광성 등, 2000). 남성호르몬의 저하는 어느 시기에 급작스럽게 진행되는 여성 갱년기와 달리 서서히 점진적으로 시작되며, 남성갱년기는 여성 갱년기보다 나타나는 시기도 다르고, 모든 남성에게서 동일하게 증상이 나타나는 현상도 아니다. 남성갱년기란 남성호르몬의 저하로 인한 영향으로 남성적 특징, 전반적인 생활력이나 기분이 서서히 저하되는 것을 말함(ISSAM, 2003; 대한 성학회, 2003; 김철민 등, 2006). 특히 Werner(1939)는 여성에서 일어나는 폐경기와 마찬가지로 남성에서 일어나는 내분비계의 변화인 예민함, 우울함, 기억력 장애, 집중력 저하, 쉽게 피로함, 불면, 안면홍조, 주기적 발한과 성적 활력 저하 등의 복합적 증상을 남성갱년기라 정의하였다. 노화에 따른 혈청 테스토스테론 농도의 감소는 39~70세 연령의 남성들을 대상으로 한 조사에서 매년 유리 테스토스테론(free testosterone)은 1.2%씩, 알부민 결합 테스토스테론(Albumin-bound testosterone)은 1.0%씩, 총 테스토스테론은 0.4%씩 감소한다고 함(Gray 등, 1991; 박광성 등, 2000). 또한 남성호르몬의 저하로 나타나는 신체의 영향은 골다공증, 근육량의 감소와 체지방의 증가, 이로 인한 남성 활동도 저하, 발기현상을 포함한 성기능 저하, 지질대사와 관련된 콜레스테롤 문제, 활력감소, 우울감, 수면이상, 전신 피로 등 많은 증상들이 보고되고 있음(Gooren, 1997; Park 등, 1999).

여성은 특히 신체적으로 모든 기관의 기능 감퇴, 노화 및 호르몬 감소로 폐경이라는 생리적 변화가 나타나며, 폐경을 전후하여 다양한 갱년기 증상을 경험하게 됨(O'Connor 등, 1994; Jo & Lee, 2001). 여성갱년기란 폐경 전 생식능력이 있는 상태에서 폐경 후 생식능력이 없는 상태로 변화되는 과도기를 의미하며 난포 호르몬의 분비감소와 더불어 배란, 월경 등 생식기능을 위한 월경현상이 불규칙해지는 내분비적 혼란시기로부터 폐경이 되어 생식능력을 상실한 후 다시 안정을 찾을 때까지의 기간을 말함(한인권, 2001). 여성갱년기 증상을 신체적 요인에 의해 나누어 살펴보면, 초기증상으로는 열성홍조와 야간발한 등의 혈관운동성 증상과 우울증, 가슴 두근거림, 불안초조, 무력감, 집중력장애 등의 정신적 심리적 증상, 근육통과 관절통 등의 전신증상이 있음. 대부분 기간 경과와 함께 소실됨. 중기증상으로는 비뇨생식기 위축으로 인한 빈뇨, 배

노 등 성교통증, 질출혈 등과 신체 각 부위 결합조직의 야교질이 감소함에 따라 나타나는 피부의 탄력성 감소, 유방 처짐 등이 있음. 이러한 증기증상은 기간이 경과함에 따라 증상이 악화되는 경향을 보임. 말기증상으로는 골다공증, 심혈관질환, 뇌혈관질환 등이 나타날 수 있는데 이러한 증상은 일상생활에 심한 불편을 초래하고 매우 심각한 건강문제도 야기할 수 있음(한국유방암학회, 2005, 문자민, 2009). 우리나라 여성들이 가장 힘들어하는 갱년기 증상은 관절의 통증(이종화, 2000), 혈관운동성 증상(이종화, 2000; 박영주 등, 2001; 김영혜 등, 2003), 피곤함(김영혜 등, 2003), 신경근육계 증상(김영혜 등, 2003) 등이 나타났으며, 특히 열성홍조와 야간발한 등의 혈관 운동성 증상은 대표적인 갱년기 증상으로 불면, 우울, 불안, 인지기능 저하 등 정신심리적인 증상까지 영향을 주는 것으로 알려져 있음(Soares, 2003). 일반적으로 혈관운동성 증상은 50-88%의 갱년기 여성들이 경험하고 있으며, 4-5년의 기간 동안에 점차 감소하는 것으로 되어있음(Clemons 등, 2002; Alan 등, 2003).

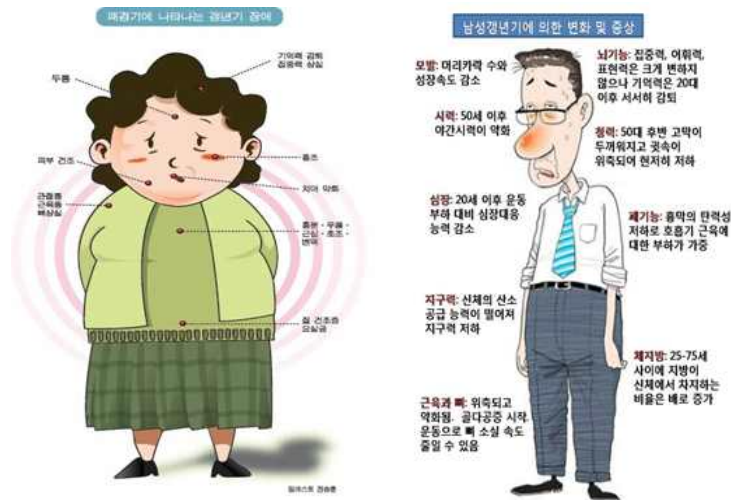


그림 3. 갱년기에 의한 변화 및 증상

1998년과 2001년도 국민건강영양조사에 의하면 관절염은 45세 이상에서 흔한 만성질환이었으며 관절염의 유병률은 연령에 따라 증가하여 65세 이상 인구에서는 1998년 천명 당 356.7명, 2001년 364.2명을 차지함(Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2001.).

‘2008년 고령자 통계’에 따르면 우리나라 65세 이상 노인인구 비율은 10.3%(501만 6,000명)으로 인구구조의 고령화에 따라 만성퇴행성 질환 유병률 또한 증가하고 있고, 연간 유병율이 높은 만성질환으로 관절염이 43.1%로 가장 많았음(Senior Statistical Reports. 2010.).

최근 우리나라는 생활의 변화로 동물성 포화지방, 고칼로리 식품의 섭취 등 지방 섭취량이 증가함에 따라 고콜레스테롤, 성인병, 동맥경화, 고혈압 등 순환기계 질환이 점차 증가되고 있는 추세다. 뿐만 아니라 순환기계 질환이 한국인 사망원인 의 30% 이상을 차지하고 주요 위험인자인 고지혈증 또한 빠른 속도로 증가하고 있으며(Byun, J. H. 1995), 심혈관계 질환에서는 혈중 콜레스테롤, 중성 지질의 증가 및 지단백 함량의 변화와 같은 비정상적인 지질대사가 문제

시 되고 있음. 질환의 발병 원인은 지질대사 이상으로 나타나게 되는데, 그중에서 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia) 뿐만 아니라 고 탄수화물식이 로 인한 당질유도성 고 중성지질혈증(hypertriglyceridemia) 으로 유발된다는 보고가 있음(Park, Y. H. 1993, 김민선 등 2012).

2008년 국민건강·영양조사에 따르면 국민 1인당 하루 평균 식품섭취량 중 식물성 식품이 전체의 80.5%이고 동물성식품이 19.5%로 집계되어 동물성 식품의 섭취 비율이 국민건강 영양 조사를 처음 시작한 1969년에 조사된 3%에 비하여 6배 이상 증가하였음(Ministry of Health & Welfare. Report 2008, 이재준 등 2011). 고지혈증을 유발하는 환경적 요인 중 식이요인의 영향이 크다고 알려져 있으며(Janes PJ. 1993, 이재준 등 2011) 그 요인으로는 고지방, 고당질, 포화 지방산 및 콜레스테롤 등이 있음.

따라서, 식사요법의 중요성이 인식되면서 식이섬유소나 올리고당을 함유한 저칼로리 식품을 섭취하려는 욕구가 날로 증가하고 있으며, 독성이 없고 안전하여 장기간 복용이 가능한 기능성 식품에 관한 관심이 높아져 이를 통한 성인병 예방 및 치료효과에 따른 건강기능성 식품에 관한 많은 연구와 개발이 요구되고 있음(이재준 등 2011).

세계적으로 옷나무를 식용이나 약용으로 복용하는 나라는 우리나라뿐인데 옷나무는 우리나라 농민들이 선호하는 소득자원 중 하나임.

옷나무(*Rhus verniciflua*)는 우리의 민속의학 분야에서 갖가지 난치병 치료에 탁월한 효과를 나타낸다고 알려져 있으며, 특히 토종약초백과에서 “옷은 제일 우수한 방부제이며, 살충제로 인체의 세포를 보존하여 상하지 않고 갖가지 질병을 다스린다. 옷은 소화를 돕고 어혈과 염증을 풀어 주며 피를 맑게하고 균을 죽인다. 소변을 잘 나오게 하고 몸을 따뜻하게 하며, 신경통, 관절염, 위장병, 간병, 늑막염, 골수염, 갖가지 암 등에 투로 약으로 쓸 수 있다.” 고 전해지고 있음.

옷나무(*Rhus verniciflua*)는 다양한 약리학적 효능을 갖는 것으로 알려져 있다. 최근에 옷나무 추출물이나 그 구성 성분들의 약리작용이 활발히 연구되고 있으며 항산화 작용, 항염증 작용, 항돌연변이원성 및 항암작용 등이 보고되고 있음(나천수 등 2005, Park H. S. 2011, Jeong et al. 2001 이상훈 등 2013). 옷나무를 대상으로 한 이러한 연구결과는 옷나무의 실질적인 활용 가능성을 제시하고 있으나, 보다 과학적인 용도개발 및 효능 인증에 대한 과제가 남아 있음.

지금까지 옷나무로부터 우루시올을 제거한 플라보노이드 물질그룹의 남성호르몬 증가와 정자형성촉진 등의 효능을 세포실험, 동물실험, 임상실험 까지를 거쳐 그 효능을 확인하였고, 단회투여, 3개월 아급성 유전독성, 비글견 단회독성시험 등을 통해 안전성을 검증한 많은 연구를 수행하여 왔음.

식품의약품안전처의 “식품일반(옷나무)에 대한 공통기준 및 규격” 을 적용하여 옷나무 부작용으로 알려진 우루시올(Urushiol) 성분을 제거한 옷나무 추출물은 설치류 독성시험, 비설치류 독성시험, 유전독성시험, 국소독성시험 등을 수행하여 안전성에도 이상반응이 없는 것으로 나

타났음. 또한 In vitro 실험에 의한 옷나무 추출물의 Testosterone 분비촉진, In vivo 실험에 의한 어린 마우스에 의한 동물실험, 성숙한 랫드에 의한 동물실험, 정자의 운동성 및 성행동 실험 등에서 성기능 향상 작용 기능을 보였음(나천수 등 2005). 2005년에 성기능 장애를 호소하는 사람에서 옷나무 추출물의 성기능 개선 효능평가 임상연구(가톨릭대학교 부천성모병원 IRB 승인)를 실시하였으며, 옷나무 추출물은 임상시험기간 동안 이상반응 및 부작용이 1건도 발생하지 않았음(생명의 나무, 2005).

이러한 옷나무가 가진 약리적 효능을 가장 효과적으로 주장하면서 제품화 할 수 있는 방법은 독성, 안전성, 유효성 자료를 구비하여 식약청으로부터 개별인정형 건강기능식품으로 인정받는 것임.

2007년 식약청에서 옷나무추출물을 옷담용 옷물을 주된 용도로 하는 식품소재로 허용한 이후 옷담용 제품이 시장에 나오고 있으나 본질적으로 옷담용이 아닌 건강식품의 형태로 기능성을 전제로 한 과장광고에 의하여 암암리로 판매되어지고 있는 실정으로 본 과제를 통하여 옷나무의 효능을 밝혀 건강기능식품으로 개발할 필요성이 매우 크며, 특히 현재 식재된 옷나무를 효과적으로 활용하여 고부가가치 제품으로 산업화하기 위해서는 건강기능식품의 개발이 가장 이상적으로 이에 대한 개발이 매우 시급한 과제임.

본 연구사업단에서 (주)생명의나무의 건강기능식품의 개발 경험을 살려 옷나무추출물을 이용 건강기능식품으로 개발한다면 현재 지속적으로 성장하고 있는 건강기능식품 시장에 국내 자생하는 식물자원을 이용한 건강기능식품의 개발에 새로운 성장 동력이 될 것이므로 이에 대한 지원이 절실히 요구됨.

아울러 옷나무에서 단일물질을 분리 활성 평가를 통한 기능성을 입증한다면 신약후보물질로도 개발이 가능하며, 이는 천연물을 이용한 남성호르몬을 증가시키는 최초의 연구결과가 될 것임.

3. 연구개발의 범위

가. 연구개발 범위

본 연구사업단의 주관기관인 생명의나무에서는 지금까지 옷나무에 대한 선행연구결과로 항암, 간보호 등 옷나무가 갖고 있는 독성을 제거하고 얻은 옷나무추출물(MU2물질)의 다양한 약리효능을 검증하였으며, 옷나무로부터 우루시올을 제거한 플라보노이드 물질그룹의 남성호르몬 증가와 정자형성촉진 등의 효능을 세포실험, 동물실험, 임상실험 까지를 거쳐 그 효능을 확인하였고 단회투여, 3개월 아급성 유전독성, 비글견 단회독성시험 등을 통해 안전성을 검증한 많은 연구를 수행하여 왔음.

본 사업을 통해 증년이후 갱년기 증상 개선은 물론 혈전증가, 콜레스테롤 증가감소, 골관절

염 발생 탈모현상 등 갱년기에 나타나는 여러 증상들을 분야별로 과학적으로 검증하여 과학의 발달로 증가되는 노령인구의 건강한 노후생활에 기여할 수 있는 옷나무 기능성식품 개발을 위하여 본 사업단을 구성하였음.

본 연구사업단에서는 옷나무 건강기능식품 개발, 옷나무의 갱년기 관련 약리효능 검증 및 기전연구, 옷나무의 생식독성연구 등을 핵심연구과제로 선정하여 다음과 같이 수행함.

제 1핵심과제 : 옷나무 건강기능식품 개발

- 우루시올을 제거한 옷나무추출물 제조 및 대량생산공정 개발
- 생리활성성분 분리 정제 및 옷나무추출물의 기준규격 설정
- 갱년기 장애의 개선 및 콜레스테롤저하 효능 및 안전성 평가를 위한 임상연구
- 건강기능식품 개발과 신약후보물질 개발

제 2핵심과제 : 옷나무의 남성갱년기 관련 약리효능 검증 및 기전연구

- 옷나무가 성호르몬 증가시키는 기작 및 약리대사 연구
- *In vitro*, *In vivo*에서의 질환모델 개발
- 골관절염 탈모 기능개선 효능검증
- 순환기계 기능개선연구
- 고지혈증기능개선연구
- 옷나무 분리 단일물질의 남성갱년기 개선 관련 기능성 활성 평가 확인
- 옷나무추출물의 생체 동력학을 관찰함으로써 용량 설정 및 흡수율 등을 연구
- 옷나무의 항산화 효과 탐색

제 3핵심과제 : 옷나무의 생식독성연구

- 수컷 생식기 노화 억제 및 개선 효과 연구 및 랫드 발생독성시험
- 토끼 발생독성시험 및 랫드 번식시험(1)
- 랫드 번식시험(2)

상기 과제들을 수행하여 남성 갱년기 관련 효능 논문 발표 및 특허를 출원·등록하고, 전 임상과 임상시험 결과 등의 남성 갱년기 개선 효능 및 안전성 자료들을 본 (주)생명의 나무가 이미 헛개나무로 건강기능식품 개별인증 받은 경험을 바탕으로 식품의약품안전처에 개별인증형 건강기능식품으로 허가를 받아 산업화하며, 더 나아가 신약후보물질의 개발을 통해 다국적 제약회사 등과 제휴를 통한 세계시장으로의 진출을 모색함.

나. 연차별 목표

년도	연구목표	연구내용
1차년도 (2010)	<p>옻나무추출물의 대량생산방법 연구 및 건강기능식품 개발을 위한 기준규격 설정, 전임상, 용량 임상실험 등 기초 활성 연구를 목표로 함.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 우루시올을 제거한 옻나무추출물 제조 및 대량생산 공정 개발, 생리활성성분 분리 정제 및 옻나무추출물의 기준규격 설정 ◆ 옻나무추출물의 남성 및 여성 호르몬양 약리 효능, 관절염 및 탈모 관련 효능 및 기전연구 ◆ <i>In vitro</i>, <i>In vivo</i>에서의 질환모델 개발 및 옻나무추출물의 심혈관계, 콜레스테롤 저하 활성 평가 확인 ◆ 수컷 생식기 노화 억제 및 개선 효과 연구 및 랫드 발생독성시험 ◆ 옻나무추출물의 약물상호작용 연구 옻나무 추출물의 갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구
2차년도 (2011)	<p>옻나무추출물의 기능성물질의 탐색 및 분리, <i>In vitro</i>, <i>In vivo</i>에서기능성 활성 평가, 안전성평가, 임상실험 등 갱년기 장애 관련 활성 평가를 목표로 함.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 옻나무의 유효물질 탐색, 활성물질 분리·정제 및 단일물질 규명, 옻나무의 생리활성성분에 대한 HPLC 및 LC/MS를 이용한 정량법 개발 ◆ 옻나무추출물의 남성 및 여성 호르몬양 약리 효능, 관절염 및 탈모 관련 효능 및 기전연구 ◆ <i>In vitro</i>, <i>In vivo</i>에서 갱년기 장애 관련 옻나무추출물의 심혈관계, 콜레스테롤 저하 활성 기전연구 ◆ Rat에서 옻나무추출물의 pharmacokinetic 연구 ◆ 토끼 발생독성시험 및 랫드 번식시험(1) ◆ 옻나무의 항산화 효능 탐색 ◆ 옻나무추출물의 약물상호작용 연구 옻나무 추출물의 갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구
3차년도 (2012)	<p>옻나무추출물의 제품화연구, 기능성 단일물질 활성평가, 개별 인정형 건강기능식품 식품의약품안전청 인허가와 신약후보물질의 개발을 목표로 함.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 제품공정개발, 제형개발 등 제품화 연구 및 건강기능식품 인허가 완료 ◆ 개발된 분석법에 대해 옻나무의 모니터링 분석 ◆ 옻나무 분리물질의 남성 및 여성 호르몬양 약리 효능, 관절염 및 탈모 관련 효능 및 기전연구 ◆ 옻나무 분리 단일물질의 <i>In vitro</i>, <i>In vivo</i>에서 남성 갱년기 장애 관련 기능성 활성 평가 확인 ◆ 랫드 번식시험(2) ◆ 옻나무의 항산화 효능 탐색 ◆ 옻나무추출물의 약물상호작용 연구 옻나무 추출물의 갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구 ◆ 단일물질의 활성평가를 통한 신약후보물질 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 기술개발 현황

남성갱년기에 대한 연구는 최근에서야 연구되어지고 있으며 구미에서는 1980년대부터 고령남성의 문제를 극복하기 위한 연구가 다루어져 왔으며, 1998년에는 남성건강이라는 목적의 국제학회인 국제남성갱년기학회(International society for the study of the aging male, ISSAM)가 스위스 제네바에서 창립되었고, 아시아에서는 2001년 아시아태평양남성갱년기 학회가 개최 되었으며, 국내에서도 아시아에서와 거의 같은 시기에 시작되었음.

남성갱년기와 관련된 학술활동의 활성화는 1935년 andro-sten-3-one-17-ol이라는 테스토스테론이 처음으로 인공 합성된 이래 약 70년간 계속되어온 근주제, 경구제, 패취제 및 겔 등의 다양한 테스토스테론 제제의 개발을 배경으로 하고 있다. 최근 10년간 복용법이 보다 편리하고 안전한 제제로 새롭게 개발된 경피용 제제나 장기지속형 근주제의 개발은 남성갱년기에 대한 호르몬보충요법의 중요성을 더욱 가속화하고 있음.

여성갱년기의 주요 호르몬 변화로는 에스트라디올(Estradiol)의 감소, 인히빈(Inhibin)의 감소, 이들 두가지 호르몬의 감소에 따른 난포자극호르몬(Follicle Stimulating Hormone)의 지속적인 증가, 난소기질에서의 남성호르몬(Androstenedione 및 Testosterone)의 증가, 피하지방에서의 에스트론(Estrone)합성 증가, 이로 인한 황체화호르몬(Luteinizing Hormone)의 증가 및 무배란으로 인한 프로게스테론(Progesterone)의 생성불능 등으로 요약됨.

이러한 내분비의 변화로 인하여 배란 및 월경주기의 주기성은 서서히 상실되며 월경주기의 불규칙화, 즉 주기의 단축에 이은 연장이 반복 교대되는 현상이 발생하고 동시에 출혈, 생리양의 증가, 불규칙성 등의 월경이상이 올 수 있고 일부에서는 자궁내막증식증과 자궁내막암이 발생하기도 함(김정구, 2007).

최근 콩(Glycinemax, soybean)의 식물성에스트로겐(Phytoestrogens)은 안면홍조를 비롯한 혈관운동성 증상을 완화시키고 유방 및 자궁내막암 위험성을 감소시키는 것으로 발표되었으며, 붉은 크로버(*Trifolium pratense*, red clover), 아마인(Flaxseed), 승마(BlackCohosh), 당귀(DongQuai), 인삼 (Ginseng), 톱야자(Saw Palmetto), 감초(Licorice)등 다양한 식물화합물들이 호르몬대체요법의 대안으로 거론되고 있음.

그러나 실제 콩의 이소플라본, 승마, 붉은 크로버, 감초, 아마인, 당귀, 인삼, 달맞이꽃 종자유 등은 그 효과성 여부를 놓고 논란이 있으며, 이렇게 식물화합물의 연구결과는 여러 이유 때문에 일관성 있는 연구결과를 기대하기 어려움. 이는 취하는 식품의 식물성에스트로겐 함량에 대한 정확한 정보가 없고, 측정하는 것이 까다로우며, 일정량의 식물성에스트로겐을 투여하여도

장에서의 대사, 혈중농도 및 소변의 배설량이 개인차이가 심하고, 목표조직에 따라 혹은 내인성호르몬이나 식물성에스트로겐 자체농도에 따라 작용기전이 다르기 때문이다(박형무 2005, 김정구 2007).

국내에서는 건강기능식품원료로서 대두 이소플라본, 석류추출물, 회화나무열매추출물, 백수오 등 복합추출물 등이 개발되어 식품의약품안전처로부터 기능성원료로서 개별인정을 획득하였고, 제약분야에서는 승마와 성요한초의 추출물이 제품화되었음(농림수산식품부 2010).

퇴행성관절염은 골관절염이라고도 하는데 노인에게 가장 흔한 유형의 관절염으로 모든 관절에서 일어날 수 있으나 호발하는 부위는 체중 부하를 많이 받는 슬관절, 고관절, 척추관절 및 손가락 등에 나타남. 관절의 연골이 얇게 닳아서 없어지게 되면 양단의 뼈가 서로 융합되고 이로 인한 통증이 서서히 시작되며, 관절구조가 변형되어 관절가동역이 줄어들고 근육경련도 일어나며 보행자세가 변형되기도 함.

퇴행성관절염의 발병과 관련된 인자들을 크게 분류해 보면 단백질 가수분해효소(proteolytic enzymes), cytokines, 그리고 nitric oxide가 퇴행성관절염의 발병에 관련된 주요 인자들임.

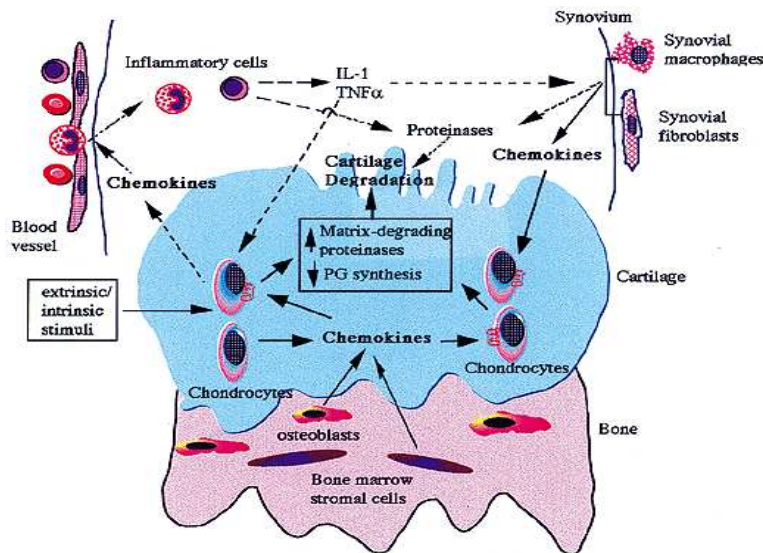


그림 4. 퇴행성관절염의 발생 기전

퇴행성관절염의 발생에 있어서 단백질 가수분해 효소(proteolytic enzymes)는 연골질의 퇴화에 가장 핵심적인 역할을 하며 그 중 가장 대표적인 것이 금속단백분해효소(metalloproteinase; MMP)임. MMP-3(Stromelysin)은 proteoglycan의 퇴화에 결정적인 역할을 하는 금속단백분해효소이며 관절강 내 MMP-3 level의 증가는 심각한 연골손상과도 연관 지을 수 있음. 금속단백분해효소의 활성화는 촉진제(activator)와 억제제(inhibitor)에 의해 조절되는데, 금속단백분해효소의 억제에 관여하는 것이 TIMPs(tissue inhibitors of metalloproteinases)로 TIMPs는 관절의 연골세포인 chondrocytes에서 분비가 됨. 정상적인 기능의 chondrocytes는 metalloproteinases와 inhibitor

인 TIMPs가 균형을 이루게 하는 기능을 함. 단백질 가수분해 효소인 Aggrecanase 역시 proteoglycan을 분해하는 효소로 관절강(synovial fluids)에서 확인할 수 있음(3,4,5).

Cytokines은 세포들에서 분비되는 수용성 단백질로 특정 신호물질에 의해 발현되며 Cytokines은 효소와는 구별되게 주변 세포에 의해 영향을 받고, cytokines은 그 반감기가 매우 짧아 그 작용하는 범위도 cytokines이 분비되는 인접한 세포들로 국한됨. Interleukin(IL)-1, tumor necrosis factor(TNF)- α , IL-17은 chondrocytes의 이화작용에 영향을 주는 cytokines이며 Transforming growth factor(TGF)- β 와 insulin-like growth factor(IGF)는 chondrocytes의 재생에 관련된 cytokines들임(6,7,8).

IL-1은 chondrocytes의 이화작용에서 금속단백분해효소의 발현을 유도하고 serum TGF- β 가 chondrocytes를 증식시키는 것을 방해함. IL-1은 연골생성에 관련된 collagen II와 proteoglycan의 합성을 저해하고 퇴행성관절염인 chondrocytes에서는 IL-1이 정상의 chondrocytes보다 2배의 IL-1 receptors가 존재하며 TNF- α 는 chondrocytes에 IL-1과 비슷한 역할을 하는데, IL-1에 의해서 TNF- α receptors가 chondrocytes와 synoviocytes에 발현됨(8).

Nitric oxide는 free radical의 일종으로 퇴행성관절염의 발생에 있어서 관절의 혈관 확장과 침투성을 증가시켜서 백혈구로부터의 발현된 TNF- α 와 IL- β 가 관절에 침투하는 것을 증가시키고, chondrocytes의 apoptosis(programmed cell death)을 유인함.

콜레스테롤은 지방의 일종으로 인체의 기능을 정상적으로 유지시키는 데 필수적으로 필요한 구성 성분임. 콜레스테롤은 다섯 종류로 나뉘는데 이중 ‘좋은 콜레스테롤’이라 불리는 HDL과 ‘나쁜 콜레스테롤’로 불리는 LDL이 중요하게 다뤄지고 있음. 콜레스테롤은 혈액을 돌면서 필요한 곳에 쓰이거나, 담즙의 원료로 이용되어, 장으로 배출되기도 함. 그러나 여러 가지 이유로 조절능력이 떨어지거나, 동물성 지방이나 지방이 많은 가공식품을 과량 섭취할 경우, 콜레스테롤이 여러 기관(특히 혈관)에 축적되어 건강에 해로움. 콜레스테롤은 인체에 필요한 필수 영양소로서 체내에서 일정량 합성되지만, 많으면 건강에 해로움. 혈액 속의 콜레스테롤 농도가 높으면 동맥경화의 원인이 되거나 협심증, 심근경색증(허혈성 심장병이라고도 한다) 등의 심장 질환과 뇌졸중, 고혈압 등의 뇌혈관 질환이 발생할 가능성이 높고, 또한 이런 질병들은 최근 발생하는 주요 사망원인이기도 하기 때문에 무엇보다 이러한 질병에 대한 이해와 예방, 조기 진료가 필요함(식약처 건강기능식품).

최근에는 지방질의 과잉섭취로 인한 유발되는 고지혈증 및 심혈관계 질환은 치료보다 예방이 필요한 질환으로 여겨져, 최근에는 콜레스테롤 합성을 저해하는 생리활성물질을 천연물로부터 찾아내려는 연구가 활발하게 진행되고 있음(김현정 외 2011).

그 중 우리나라의 전통 발효식품 중 청국장(청국장)은 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 감소로 인한 지질대사를 개선하는 기능 등이 보고되었음(Yang JL 2000).

현재 우리나라에서 콜레스테롤 개선 건강기능식품은 고시형으로 감마리놀렌산 함유 유지 외 11종, 개별인정형 대나무잎추출물의 10종으로 총 23가지 원료가 인정되어 있음.

서양에서는 옷나무가 poison ivy로 알려져 있어 실질적인 활용에 대해 연구되는 바가 거의 없음. 우리나라에서 옷나무는 전통적으로 식품 및 의약품의 원료나 소재로 활용되어 있음.

옷나무 또는 옷으로부터 약리활성물질의 탐색과 약리활성에 대한 연구는 옷나무 껍질보다는 옷나무 속대(껍질을 제거한 목질부위)를 대상으로 이루어져 왔으며, 항암, 항산화, 항염증, 항혈전 등에 관한 연구가 주를 이루고 있음. 옷나무의 화학적인 성질에 관한 연구는 옷의 알러지 성분 연구와 생옷의 정제에 관한 연구가 대부분이나, 근래 polyphenol 및 flavonoid화합물에 대한 일부 연구가 있음. 우리나라에서 한약재로 사용하던 옷나무 껍질을 미생물 발효, 전자이온화에너지(방사선, 전자선) 및 화학적 처리 등을 이용하여 알레르기 유발물질인 urushiol을 제거하는 연구가 진행되고 있으나 이는 urushiol의 성분이 상당량 많이 남아있어 일반적인 상품화가 이루어지지 못하고 있음.

아직까지 외국의 경우 옷나무는 독초로 인식되어져 있어서 현재 옷나무를 이용한 연구가 활성화 되어 이루어지지 않고 있는 실정임. 피부가 민감한 서양인과 동양인 10명중 1명은 심한 옷오름 현상이 나타나기 때문에 옷나무를 도료나 약용자원으로 연구하기보다 면역학적 연구 및 피부염에 대한 연구를 진행하고 있음.

옷의 주생산국인 한국, 일본, 중국에서는 옷칠의 정제기술과 생칠의 성분분석 등에 불과하고 옷칠 사용은 아직 생활 공예나 예술영역을 벗어나지 못하고 있는 실정이며, 중국의 경우 옷나무의 법제방법을 제도화 하여 중약처방에 사용토록 하였으며, 항암, 우울증, 난치성피부염, 생리불순치료 및 옷술 제조에 이용되고 있음.

옷나무의 다양한 약리학적 효능이 입증되고 있는데, 전통적으로 동의보감 등에서 어혈을 풀어주는 등의 혈행 개선 효과가 보고되어 있음.

최근 농축산 식품분야의 핵심기술에 대한 사업의 확대에 의하여 고부가가치 동식물의 생산, 질병예방 및 조기 치료가 가능한 세계적 기능성 식품의 개발에 투자가 모이고 있고 건강기능식품의 최근 연구 동향은 기존의 기능성이 고시되어 있는 고시형보다 공전에 고시되어있지 않은 기능성을 인정받는 개별인정형 건강기능식품의 개발이 점차 늘어가고 있으며, 시장 규모도 확대되어지고 있음.

2. 국내외 시장 현황

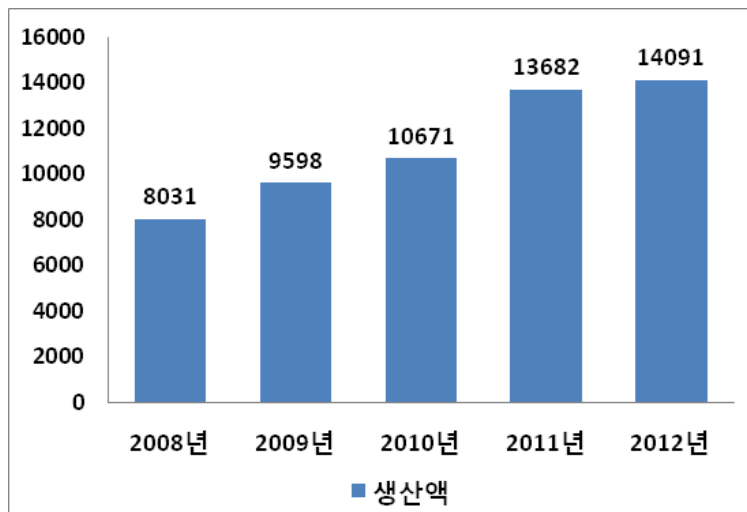
국내 옷나무 재배 본수는 거의 조림되어진 것만 300만 그루 이상에 육박하고 있으며, 일제시대 옷칠액의 생산을 위하여 야산을 비롯하여 전국에 많은 옷나무들이 심어져 있으며, 또한 옷나무가 특용수종으로 인기를 얻어 매년 옷나무의 조림면적과 조림 본수는 증가하고 있음(2009

년 현재 4450ha, 776만분). 옷나무는 지금까지는 옷칠액의 생산, 옷담용 등이 주된 용도로 이용되고 있으며, 그 시장 규모는 미미한 수준임.

2007년 식약청에서 옷나무추출물을 옷담용 옷물을 주된 용도로 하는 식품소재로 허용한 이후 옷담용 제품이 시장에 나오고 있으며, 본질적으로 옷담용이 아닌 건강식품의 형태로 기능성을 전제로 한 과장광고에 의하여 암암리로 판매되어지고 있는 실정임.

남성 갱년기 환자는 비뇨기와 환자의 약 10%를 차지하는 것으로 추정되며 남성 호르몬제 보충용법이 필요한 환자는 약 55만명 정도로 파악되고 있음. 발기부전치료제 시장은 연평균 4~5%씩 꾸준히 성장하고 있고 시장규모는 약 900억원으로 예측되고 있으며, 이렇듯 발기부전 치료 시장의 성장세는 성생활의 중요성에 대한 인식이 확대되고 있는 것으로 풀이됨. 국내의 남성호르몬 보충제 시장은 2003년까지 10억원대에 불과하였지만 현재 40억원대로 급성장했음.

유럽, 아시아 등지에서 남성호르몬 시장이 증가하는 것처럼, 국내 역시도 다양한 신약 개발과 삶의 질 향상으로 인해 남성호르몬 시장이 급격히 신장할 것으로 2015년에는 100억원이상의 시장이 형성될 것으로 판단됨. 기능성 식품의 총 시장가치는 600억 달러에 이를 것으로 예측되고 있으며, 일본, 미국, 유럽 등 선진국을 중심으로 그 수요가 증가되고 있음. 국내 2009년도 건강기능식품 전체시장규모는 전년대비 10% 증가하여 1조 2천억원 정도의 규모를 가지고 있으며, 전체 시장 중 수입제품의 비율은 20%정도(2009년)임.



(단위 : 억원, %)

구분	2008	2009	2010	2011	2012
생산액	8,031	9,598	10,671	13,682	14,091
성장률(%)	11.0	19.5	11.2	28.2	3.0

그림 5. 국내 건강기능식품 시장 현황

현재 국내외적으로 기능성 식품에 대한 소비자 요구성으로, “효능 및 성분 안정성” 과 가격은 “식품” 으로 품질은 “의약품” 수준을 요구하고 있으며, 또한 생산과 제품화에 친환경등을

동시 요구하고 있음.

세계 및 국내 기능성식품 시장은 지속적 성장으로 2014년도에는 세계는 3,973억불, 국내는 4조 7,693억원로 증가할 것으로 추산되고 있음.

임산자원을 포함한 생물자원의 원산국에 지불해야 하는 로열티는 188~1,642억원에 달하는 수입대체효과를 얻을 수 있을 것으로 추정됨.

“바이오 식품” 영역에서의 국내 판매액 및 수출액을 기준으로 시장성(2010년 기준)을 평가하여 보았더니, 건강기능식품은 1,230억(수출액 290억원), 식품첨가물은 약 1,800억(수출액 3,900억), 사료첨가제는 4,990억(수출액 8,880억) 그리고 기타바이오식품 영역은 1,130억(수출액 196억)으로 조사되어 총 연간 약 9,000억(수출액 1조 4천억, 2010년)이상의 국내외 신규런칭이 가능함을 확인하였음(근거 : 지식경제부, 바이오산업 국내판매 및 수출규모, 2010).

“바이오식품” 영역에서의 국내 수입액을 조사하여 보았더니, 2009년의 304억으로 정점을 이루었지만 약 50억(2010년)으로 감소하였는데, 이는 국내 기술력의 발전으로 소비자 요구성에 부합하는 고부가 소재 및 제품의 개발과 연계하여 생산량의 증가로 인한 수입대체 효과가 이루어 졌음이 아닌가 하고 판단되었음. 따라서 고부가 기능성 소재 관련 기술력과 소재 및 제품이 개발되는 경우, 관련산업의 수입대체 효과와 더불어 해외수출까지 충분히 가능함을 알 수 있었음(근거 : 통계청, 바이오산업 수입 규모(2002~2010)(수입액)).

국내는 2002년 건강기능식품에 관한 법률을 제정한 이후 국내 연구개발제품에 대한 정책적 지원 프로그램이 미미한 상태였으나, 최근 농림축산식품부와 식품의약품안전청을 중심으로 건강기능식품산업을 미래 식품산업의 캐시카우로 육성하기 위한 정책적 지원 프로그램을 추진하고 있어, 건강기능식품 개발을 촉진할 것으로 보임.

우리나라의 경우, 출산율 감소 추세가 진행됨에 따라 가구당 자녀수가 줄어들고 있는 반면 자녀의 건강을 위한 지출은 증가하고 있음. 또한, 고령친화형 건강기능식품 중 미네랄류, 면역제제 및 두뇌 기능향상, 집중력, 기억력 관련 제품은 어린이 및 청소년과 수요층이 중복되므로 인구구조 변화는 이들 제품군에 대한 수요 촉진요인으로 분석됨. 따라서 과학의 진보가 인류의 수명연장을 가져옴에 따라 인간은 건강한 삶을 추구하였고 이러한 소비자의 요구가 건강식품의 개발로 이어지면서 건강기능식품은 미래식품산업의 돌파구로 부상하게 되었음.

건강기능식품의 발전은 정체기에 들어선 세계 식품산업의 새로운 발전의 계기가 되어 세계 식품산업의 전반에 걸쳐 커다란 지각변동을 일으킬 것 이라는 전문가들의 예측이 현실로 구현되고 있으며, 이러한 시장변화는 많은 기업에게 새로운 기회로 인식되어 식품산업체 뿐만 아니라 식품 관련 분야에 참여하고 있는 대기업, 다국적 유통업체 및 제약업체도 적극 적인 시장참여 의사를 밝히고 있음.

우리나라 식품산업은 원재료의 80%를 수입 원료에 의존하고 있으나, 건강기능식품산업은 선

진기술을 바탕으로 국내 자생원료만으로 개발이 가능하므로, 국내식품산업 구조개선 전략분야로 인식되어 관련제도 및 국가적 지원규모가 크게 확대될 전망이고, 건강기능식품으로 촉발된 식품과 의약품의 산업간, 학문간, 시장 간의 부분적 통합 움직임이 활발히 이루어지고 있어 잠재적 시장성은 더욱 확대될 것으로 전망임.

국내 10대 질환별 건강기능식품 R&D 로드맵을 살펴보면, 생활습관병인 비만(치지방유지), 당뇨병(혈당유지), 고혈압(혈행개선), 이상지질혈증(콜레스테롤유지), 관절염(뼈건강), 면역증강과 환경질환병인 천식(호흡기질환), 아토피(피부염), 정신건강병인 치매(기억력개선), 우울증(스트레스해소)으로 선정한 바 있으며, 건강기능성식품의 연구개발 방향도 여기에 발맞추어 집중되고 있음.

현재까지 식물유래 천연물에 대한 연구가 많이 진행되어왔고, 지금도 진행되며 많은 연구비들이 투입되고 있으나 사업화 실적은 미미하며, 효능물질(Single compound) 위주의 연구로 산업화하기 위해서는 많은 추가연구가 필요하나 본 사업단에서는 임산자원 원재료를 이용한 기능성식품개발을 통해 빠른 산업화와 농민들에게 직접적인 소득원으로 임산자원의 활용을 추구함

국내외 기능성식품 연구개발 및 산업화 방향을 토대로 국내 임산자원의 현재 제품화 경향 및 추후 장기적 국가정책성을 고려할 때, 국내 미이용 임산자원이 보유하는 기능성에 주목하고 임산농가의 수익성 창출과 더불어 국가경쟁력으로 연계되는 방향을 제시하고, 또한 기존의 수행되어진 연구와는 다른 임산자원 원재료를 이용하여 산업화를 하기 위한 소재 및 제품개발을 제시하고자 함.

웃나무 추출물의 지금까지 독성시험 결과는 설치류 및 비설치류 단회 투여 독성시험과 설치류 13주 반복투여 독성시험에서 무해용량은 2,000mg/kg 이상으로 확인되었음. 복귀돌연변이유발성시험, 염색체이상시험 및 소핵시험 등의 유전독성시험에서는 무해한 것으로 판명되었고, 피부자극성시험에서는 비자극물질로 확인되었고 피부감작성시험에서는 48 시간째에 0%로 나타났음. 그런데 식품의약품 안전청에 건강기능성식품으로 등록하기 위해서는 생식독성시험 자료가 추가적으로 필요함, 따라서 본 시험을 통하여 발생독성시험(랫드 및 토끼)과 번식시험(랫드)을 수행하고자 함

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 옷나무 건강기능식품 개발(제 1핵심)

1-1절. 옷나무 건강기능식품 개발(1핵심 1세부)

1. 옷나무추출물의 제조

가. 옷나무추출물의 제조

옷나무(*Rhus verninclflua* STROKE)를 음건하여 분쇄한 후 분쇄되어진 옷나무에 음용수 및 주정알코올을 넣고 추출 조건에 따라 4시간동안 2회 추출하였다. 추출액은 여과 및 감압 농축한 뒤 분무건조(spray dry) 또는 진공건조하여 옷나무 조추출물을 제조하였다. 위에서 제조된 옷나무 조추출물에 2차처리 등을 통하여 옷나무추출물을 제조하였다(그림 1).

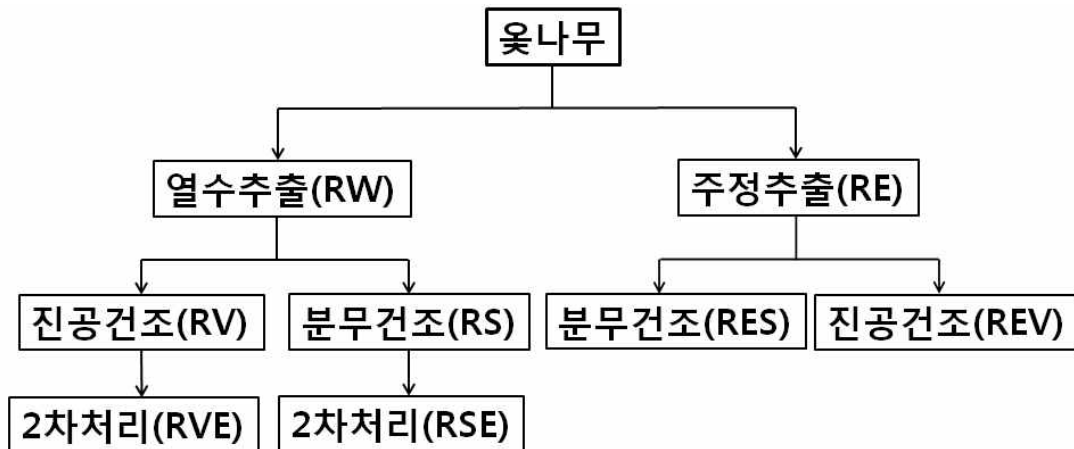


그림 6. 옷나무추출물 제조

표 1. 옷나무 조추출물별 수율

옷나무추출물	수율
열수추출 진공건조	4%
열수추출 분무건조	2.7%
열수추출 진공건조 2차처리	3.8%
열수추출 분무건조 2차처리	2.6%
주정추출 분무건조	1%
주정추출 진공건조	5%

위에서 만들어진 6가지 옷나무 조추출물을 가지고 남성호르몬증가에 대한 활성이 좋으면서 산업화에 적합한 추출물을 찾기 위하여 in vitro 및 in vivo 실험을 활성시험팀에 의뢰하여 수행하였다(그림 2).

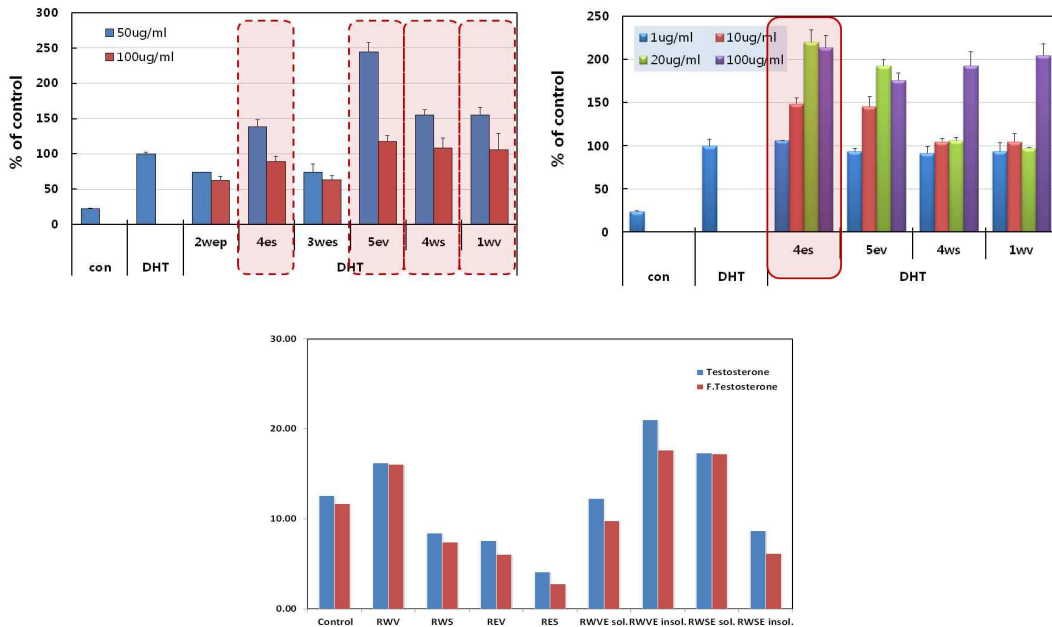


그림 7. 옷나무 조추출물별 안드로젠 작용 스크리닝 시험

스크리닝 실험과 추출용매별 수율 등을 고려하여 옷나무의 추출방법을 RV10%추출물로 결정하였다. 그러나 대량 생산과정에서 제조과정상의 문제로 인하여 텍스트린을 추가한 옷나무추출물을 제조하였다. 새로운 옷나무추출물을 안드로젠, 항안드로젠 및 세포독성에 대하여 실험을 실행한 결과 옷나무추출물 RV10%와 효능에 차이가 없는 것으로 나타나 최종적으로 산업화하기 위한 옷나무추출분말(RSD)를 개발하였다.

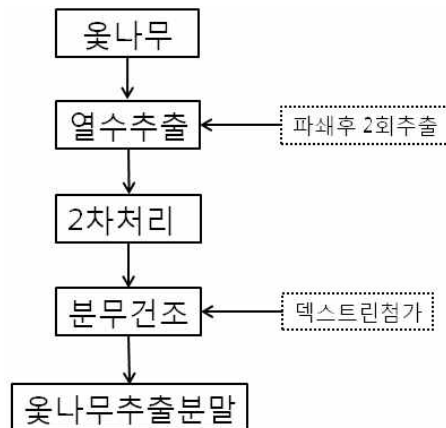


그림 8. 옷나무추출분말의 제조공정



그림 9. 옷나무 추출분말

대량생산공정을 통하여 생산된 옷나무추출분말(RSD)를 식약청 공인기관인 한국식품연구소에 의뢰하여 우루시올 함유여부를 검사한 결과 우루시올이 검출되지 않았음을 통보받았으며, 중금속(총비소, 총수은, 납, 카드뮴)과 잔류농약(알드린, 디엔드린, 엔드린, 디디티, 비에치씨) 검사에서도 불검출 되었다(시험성적서 참조). 이에 각 세부과제와 인체적용시험을 위한 제품생산에 옷나무추출분말을 제공하였다.



그림 10. 옷나무 추출분말 인체적용 시험용 시제품



일반 제 530 호							
시 험 성 적 서							
검 체 명	옷나무추출분말						
시 험 항 목	총비소 외 9항목						
의뢰인주소및성명	경기도 수원시 권선구 서둔동 14-3 대성빌딩2층 (주)생명의나무 나원수						
시 험 의 의 목 적	참고용	제조일자	2010.12.22	유통기한		접수일자	2011.01.20

귀하가 우리 연구소에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

성 적 :

외관.....	황토색 분말 형태임
총비소(ng/kg).....	불검출
중수은(ng/kg).....	불검출
납(ng/kg).....	불검출
카드뮴(ng/kg).....	불검출
알드린(ppm).....	불검출
디엘드린(ppm).....	불검출
엔드린(ppm).....	불검출
디디티(ppm).....	불검출
비에치씨(ppm).....	불검출
우루시올.....	불검출

2011년 02월 15일

한국식품연구소장



이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전용 상업용 및 자기품질검사용으로 사용할 수 없음.

그림 11. 옷나무 추출분말 성적서

나. 옷나무추출물 유해성분 기준규격

(1) 중금속 및 대장균군 규격 및 시험방법

옷나무 추출분말 일일섭취량(최대 2g/day)에 따른 중금속 및 대장균군 규격 설정

항 목	규 격	시험방법
① 납(Pb)	1.0 ppm 이하	식품 공전 제10.일반시험법 중 6. 유해성금속시험법
② 총비소(As)	1.0 ppm 이하	식품 공전 제10.일반시험법 중 6. 유해성금속시험법
③ 카드뮴(Cd)	1.0 ppm 이하	식품 공전 제10.일반시험법 중 6. 유해성금속시험법
④ 총수은(Hg)	0.7 ppm 이하	식품 공전 제10.일반시험법 중 6. 유해성금속시험법
⑤ 대장균군	음성	식품 공전 제10.일반시험법 중 8. 미생물시험법

(가) 납 : 납의 성인 일일 노출 허용량은 10.8 μ g미만임

옷나무추출분말 최대 2g 섭취시 납의 총 섭취량은 10.8 μ g미만이 되어야 하므로 10.8 μ g/2g=5.4 μ g/g(ppm)미만의 범위에서 국내검사기관의 결과값인 불검출을 참고하여 규격을 1.0ppm이하로 설정하였음.

(나) 총비소 : 비소의 성인 일일 노출 허용량은 150 μ g미만

옷나무추출분말 최대 2g 섭취시 비소의 총 섭취량은 150 μ g미만이 되어야 하므로 150 μ g/2g=75 μ g(ppm)미만의 범위에서 국내검사기관의 결과값인 불검출을 참고하여 규격을 1.0ppm이하로 설정하였음.

(다) 카드뮴 : 카드뮴의 성인 일일 노출 허용량은 3 μ g미만

옷나무추출분말 최대 2g 섭취시 납의 총 섭취량은 3 μ g미만이 되어야 하므로 3 μ g/2g=1.5 μ g/g(ppm)미만의 범위에서 국내검사기관의 결과값인 불검출을 참고하여 규격을 1.0ppm 이하로 설정하였음.

(라) 총수은 : 총수은의 성인 일일 노출 허용량은 2.1 μ g미만

옷나무추출분말 최대 2g 섭취시 납의 총 섭취량은 2.1 μ g미만이 되어야 하므로 2.1 μ g/2g=1.0 μ g/g(ppm)미만의 범위에서 국내검사기관의 결과값인 불검출을 참고하여 규격을 0.7ppm 이하로 설정하였음.

(마) 대장균군 : 본 제품은 액상 제품이 아니므로 대장균군(규격 : 음성)만 규격으로 설정하였음.

(2) 중금속 및 대장균군 규격 설정 근거자료

(가) 옷나무추출분말 시험결과(검사기관 : (주)한국식품연구소)

항 목	시험 결과	시험방법
① 납(Pb)	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 6. 유해성금속시험법
② 총비소(As)	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 6. 유해성금속시험법
③ 카드뮴(Cd)	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 6. 유해성금속시험법
④ 총수은(Hg)	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 6. 유해성금속시험법
⑤ 대장균군	음성	식품 공전 제10.일반시험법 중 8. 미생물시험법

(3) 잔류농약 규격 및 시험방법

(가) 잔류농약 규격 및 시험방법

항 목	규격	시험방법
① 알드린	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 9. 식품 중 농약잔류시험법
② 엔드린	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 9. 식품 중 농약잔류시험법
③ 디엘드린	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 9. 식품 중 농약잔류시험법
④ BHC	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 9. 식품 중 농약잔류시험법
⑤ DDT	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 9. 식품 중 농약잔류시험법

(나) 잔류농약 규격 설정 근거자료

항 목	국내 시험 결과 (검사기관 : (주)한국식품연구소)	
	시험결과	시험방법
① 알드린	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 9. 식품 중 농약잔류시험법
② 엔드린	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 9. 식품 중 농약잔류시험법
③ 디엘드린	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 9. 식품 중 농약잔류시험법
④ BHC	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 9. 식품 중 농약잔류시험법
⑤ DDT	불검출	식품 공전 제10.일반시험법 중 9. 식품 중 농약잔류시험법

2. 옷나무 추출분말 안정성 평가

가. 유통기간 산출

장기보존 시험에서 지표성분(Fustin)의 함량 결과에 따라 ‘옷나무 추출분말’의 유통기간을 다음과 같이 산출하였다.

표2. Fustin 함량(%)

저장온도 \ 저장기간	0개월	24개월
4℃	3.0%	3.1%
20℃		3.0%

위의결과에 의해 옷나무 추출분말의 지표성분인 Fustin의 초기함량이 3%이었으며, 두 온도 (4℃, 20℃) 조건에서 24개월 후에 다시 Fustin의 함량을 측정한 결과 변화가 없는 것으로 나타났으며, 이를 바탕으로 건강기능식품 기준에 적합한 원료를 사용하여 각 공정에 따라 위생적이고 엄중한 품질관리를 한 이 제품은 밀폐포장재질로 포장하여 실온에서 유통되므로 24개월 이내에 장기보존 실험 결과 이상의 품질의 변화요인은 없다고 판단된다. 따라서 적정 유통기간을 24개월로 설정함에 있어 품질관리상 이상이 없다고 판단된다.

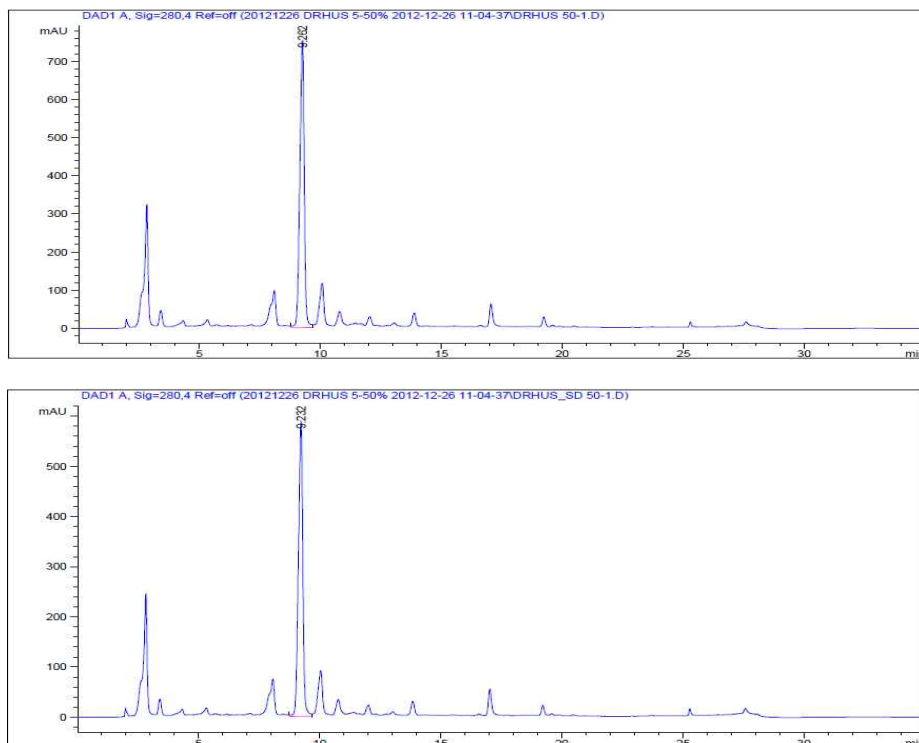


그림 12. 옷나무추출분말 HPLC 크로마토그램

3. 옷나무추출물의 용매분획 및 HPLC 분석

옷나무의 활성분획을 확인하기 위하여 옷나무로부터 RSD추출물을 생산하여 Hexane, DCM, EtOAc 등의 유기용매를 이용한 분획 제조하였다(그림 13).

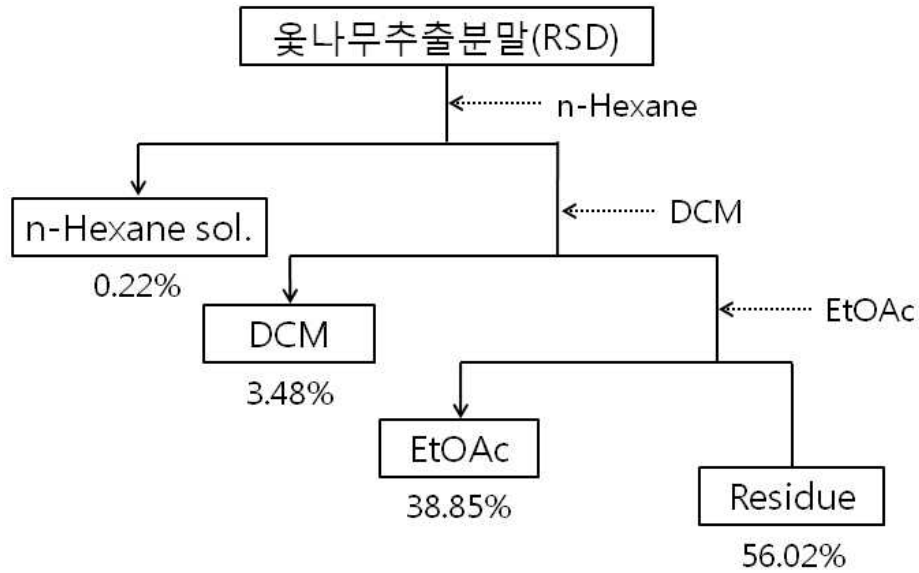


그림 13. 옷나무추출분말 유기용매분획

옷나무추출분말을 유기용매별로 분획한 후 극성별로 나누어진 유기용매 분획물의 유효성분들을 확인하기 위하여 HPLC를 사용하여 확인하였다(그림 14).

표 3. HPLC 조건

HPLC System	Agilent Technologies 1200 Series	
Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6×250mm, 5 μ m	
Mobile phase	A : 2%Acetic acid in Water B : MeOH	
Gradient Condition	Time(min)	%B
	0	20
	20	60
	25	80
	30	20
	Stop Time : 35min	
Flow rate	1ml/min	
Injection Vol.	10 μ l	
Detection	DAD SL 280nm, 360nm, 254nm	
Column Temperature	25 $^{\circ}$ C	

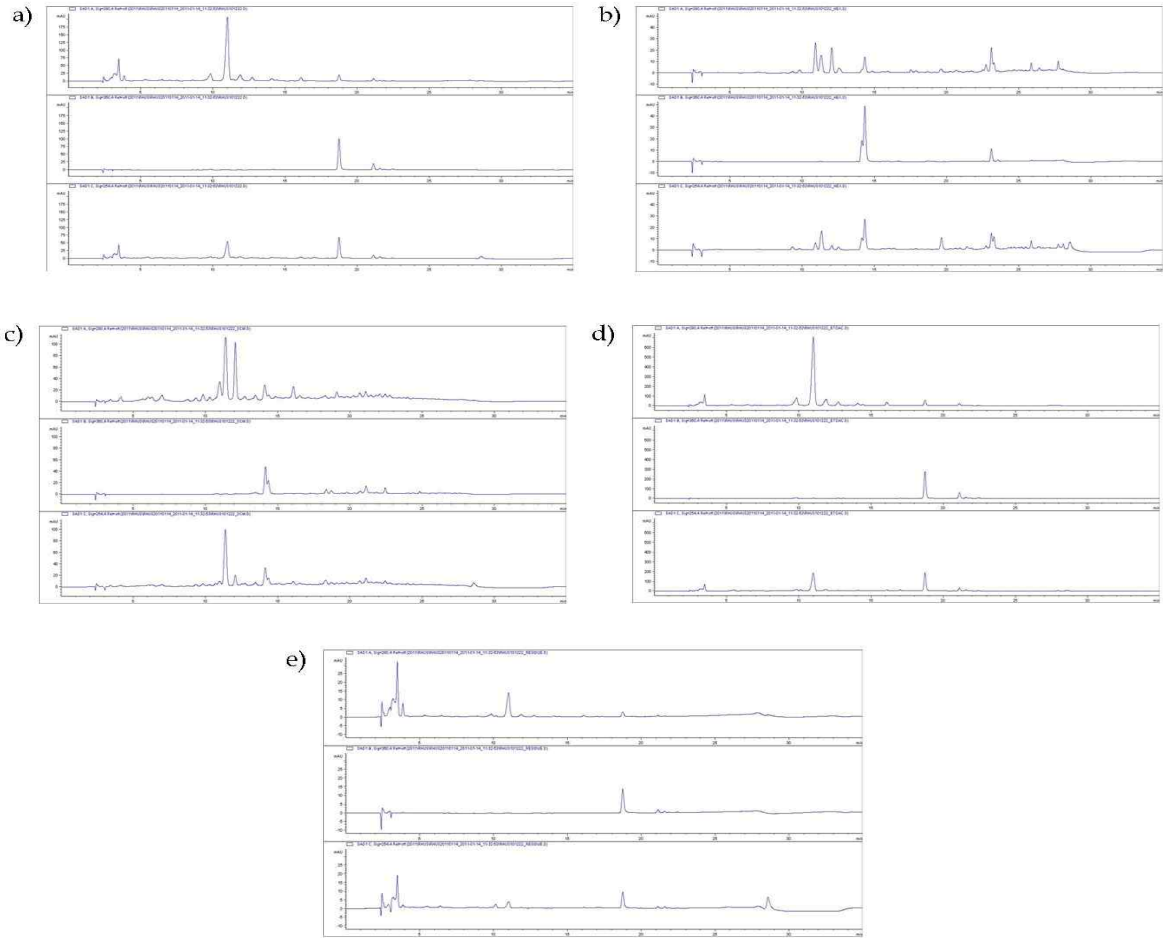


그림 14. 유기용매분획별 HPLC Chromatogram
 a)RSD total, b)Hexane분획, c)DCM분획, d)EtOAc분획, e)Residue

4. *Rhus verniciflua* extract 지표성분 분리 확인

웃나무추출물의 지표성분은 Fustin으로 2세부과제에서 건강기능식품 기준규격에 적합하게 분석법 Validation을 수행하여 분석법을 개발하였다. 1세부과제에서는 지표물질인 Fustin의 대량분리를 위한 확인 연구를 진행하였다.

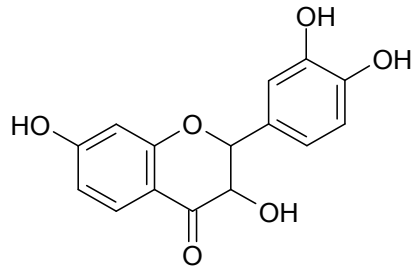


그림 15. The structure of Fustin

가. Prep-LC를 이용한 Fustin Fraction 분리

옻나무추출물을 Prep-LC를 사용하여 Fustin Fraction 분리하였다. Fustin Fraction 분리하기 위한 Prep-LC의 조건은 아래의 표 4에 자세히 기술하였다.

표 4. Prep-LC Condition

Instrument	ARMEN Instrument SPOT PREP Liquid Chromatography	
Column	Waters 120 ODS-BP 10 μ m, 250×20mm	
Injection Volume	1.0 ml	
Flow rate	20 ml/min	
Solvent	H ₂ O(A), MeOH(B)	
Detection Spectrum	280nm	
Gradient	Time(min)	%B
	0	40
	15	100
	18	100
	20	40
25	40	

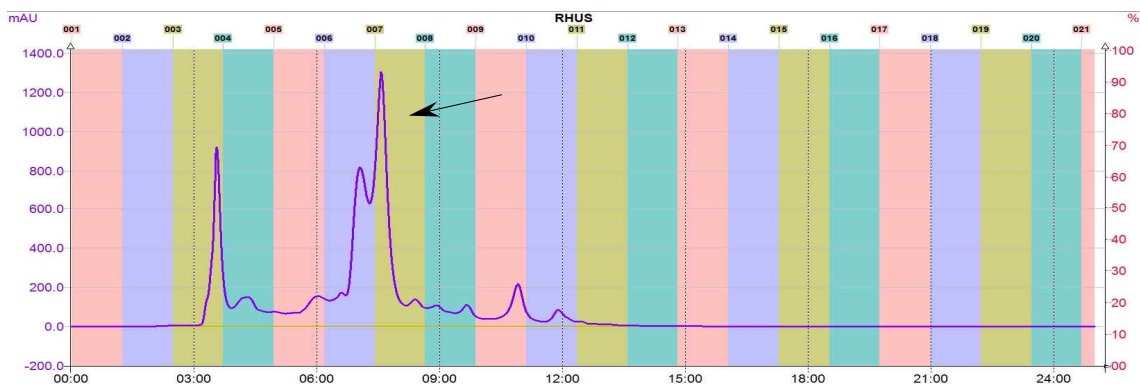


그림 16. Prep-LC chromatogram of Rhus verniciflua extract

그림 16에서 보는 바와 같이 Fraction을 Prep-LC를 사용하여 옻나무추출물에서 분리하였으며, HPLC를 사용하여 Fustin 표준품과 비교하여 Fraction에 Fustin이 함유되어 있음을 확인하였다. 그러나 순도 확인 결과 불순물이 포함되어 있어 바로 표준품을 대신하여 사용하기에는 무리가 있어 순도를 높이기 위한 전처리 과정이 있어야 할 것으로 판단된다.

표 5. HPLC Condition

Instrument	Agilent Technologies 1200 Series
Detector	G1315 DAD SL
Column	Agilent Eclipse XDB-C18 5 μ m, 4.6 \times 250mm
Injection Volume	10.0 μ l
Flow rate	1.0 ml/min
Solvent	2% acetic acid(A), MeOH(B)
Detection Spectrum	280nm
Column Temperature	25 $^{\circ}$ C

	Time(min)	%B
Gradient	0	20
	20	60
	25	80
	30	20
	35	20

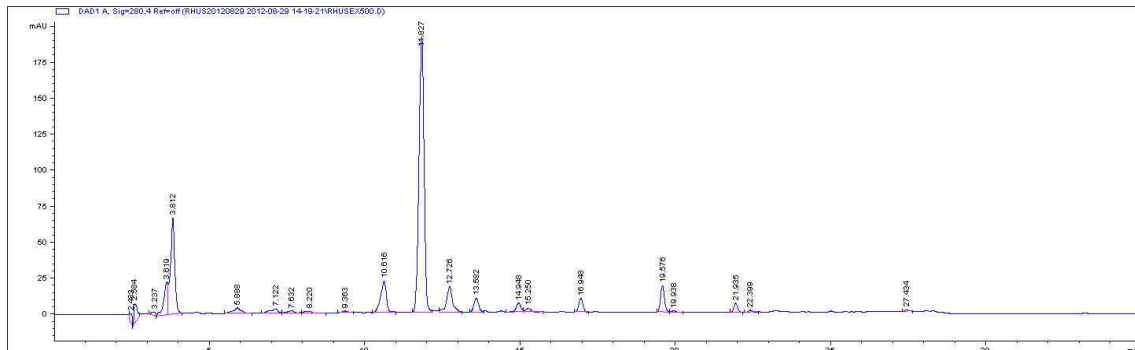


그림 17. HPLC chromatogram of Rhus verniciflua extract

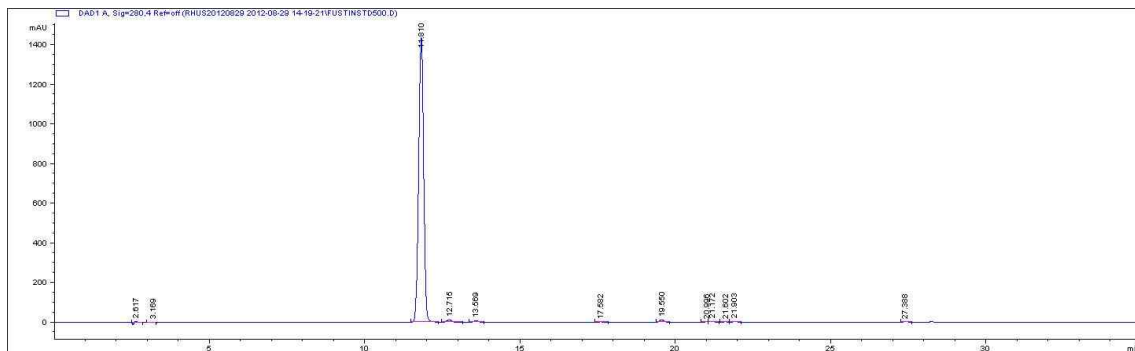


그림 18. HPLC chromatogram of Fustin Standard

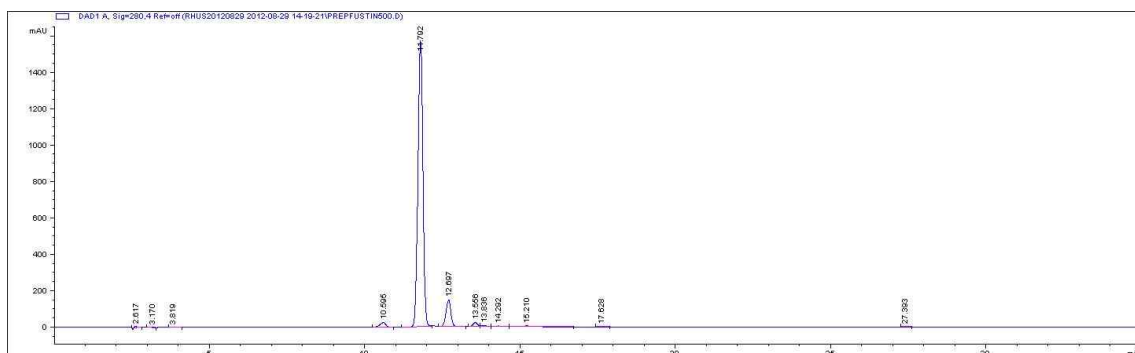


그림 19. HPLC chromatogram of Prep-LC Fraction

5. DPPH 자유 라디칼의 소거능력 측정

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유 라디칼 소거능은 Blois의 DPPH 방법을 변형하여 측정법으로 사용하였다. 옷나무추출물, 분획물 및 단일물질은 농도별로 MeOH에 희석한 용액 1ml과 0.1mM DPPH (Sigma, USA) 용액 3ml을 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 산출된 흡광도 값은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었으며 대조군의 흡광도를 0.92~0.98이 되도록 조정하였다.

$$\text{소거능 (\%)} = (1 - \text{시료처리구 흡광도} / \text{미처리구 흡광도}) \times 100$$

가. 옷나무추출물, 분획물 및 Fustin의 DPPH 라디칼 소거능

본 실험은 옷나무추출물, 분획물 및 Fustin의 DPPH 라디칼 소거능을 이용하여 항산화능을 측정한 결과이다. 옷나무추출물, 옷나무EtoAC분획물, Fustin 5ug/ml 농도에서 84.53%, 77.58%, 81.39%의 소거율을 나타내었다. 이러한 결과는 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid 5ug/ml의 소거율 보다 작거나 동등한 효과를 나타냈다. 그러나 옷나무 DCM분획물은 10배 큰 농도인 50ug/ml에서 다른 옷나무추출물, 옷나무 EtoAC분획물과 같은 소거율을 나타냈다. 따라서 옷나무추출물, 분획물 및 Fustin에 의한 DPPH 라디칼의 소거 효과가 DCM보다 비교적 극성이 큰 화합물이 많이 포함되어 있는 EtoAC 혹은 Water에서 효과가 크게 나타났으며 DPPH 자유 라디칼이 안정한 구조를 유지할 수 있는 phenol성 구조의 화합물들에 의해 일어난 효과로 추정된다. Fustin은 옷나무 EtoAC분획층의 일부 물질로 옷나무 EtoAC 분획물과 농도별로 동일한 DPPH 라디칼 소거 효과를 나타냈다. 이는 옷나무 EtoAC분획물에 Fustin 이외의 다른 물질 또한 DPPH 소거능력을 나타낼 것이라 생각된다.

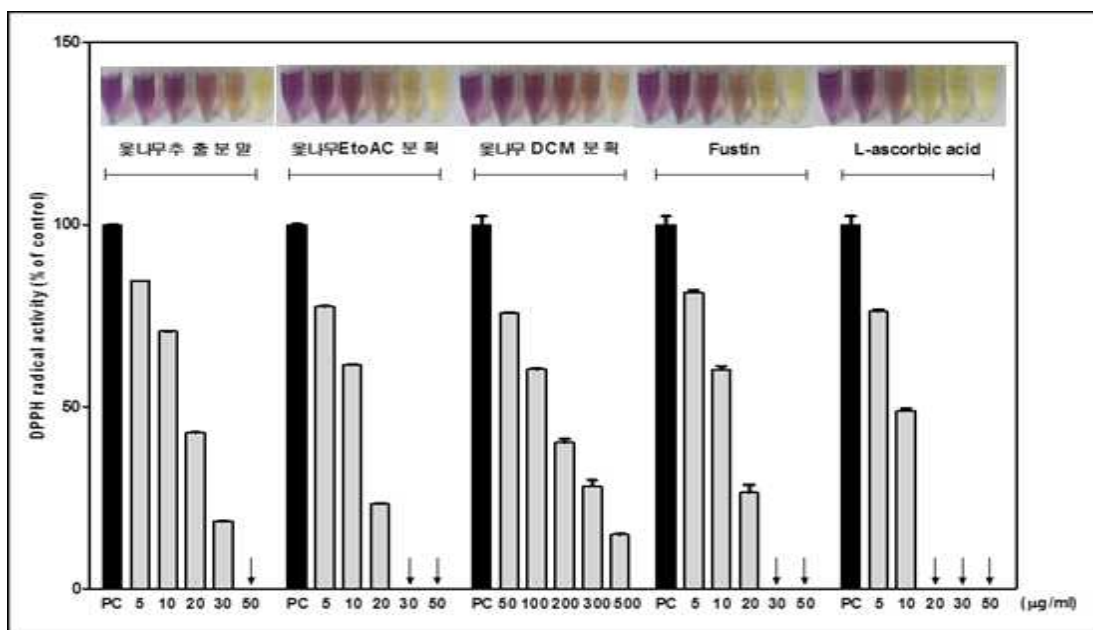


그림 20. 옷나무추출물, 분획물 및 Fustin의 DPPH 라디칼 소거능

6. 옷나무 제품 적용성 실험

옷나무추출물을 여러 제품에 적용해보았을 때 옷나무의 단일물질들이 제품의 성분과 반응 유무를 확인하였다.

가. 표준용액조제

Fisetin, Taxifolin hydrate, Fisetin, Sulfuretin, Quercetin, Butein 표준품을 정밀히 취하여 MeOH을 이용하여 10 μ g/mL의 농도로 조제하여 사용하였다.

나. 시험용액조제 : 실험 제품 - MeOH, 3차증류수, 우유, 월, 요쿠르트, 과실음료(사과주스)

- ① 1mL Microtube에 실험 제품을 900 μ l 취하고 100ppm으로 조제한 표준용액 6종과 옷나무추출물을 각 100 μ l 취한 후 MeOH로 표선을 맞춘다.
- ② 시료용액을 4 $^{\circ}$ C 에서 24hr 동안 반응시킨다.
- ③ 반응이 끝난 시료용액을 1mL Microtube에 200 μ l 취한 후 MeOH로 정용한다.
- ④ 시료용액을 vortex mixer로 충분히 혼합한 후 원심분리한다. (10,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10min)
- ⑤ 원심분리가 끝난 시료용액의 상층액을 0.2 μ m 주사기용 필터를 사용하여 여과 한 후 HPLC用 2mL Sample Vial에 담아 시험용액으로 사용한다.

다. 기기분석 조건

Instrumnet	HPLC		
Detector	UV detector		
wavelength.	280nm		
Column	YMC-Pack ODS-A (4.6 \times 150 mm, 5 μ m)		
Mobile Phase	A- 2% Acetic acid in DW		
	B- MeOH		
	Time (min)	% A	% B
	0	80	20
	20	40	60
	25	0	100
	30	80	20
35	80	20	
Flow rate	1.0mL/min		
Injection volume	10 μ l		
Column Tem.	25 $^{\circ}$ C		

라. 분석결과

(1) 표준용액

single compound	RT (min)	Area	Height
Fustin	9.155	366.6	28.5
Taxifolin	10.716	256.5	21.4
Fisetin	17.191	73.1	5.5
Sulfuretin	19.412	173.7	19.3
Quercetin	19.812	133.2	10.3
Butein	20.709	116.1	12.2

(2) 시험용액

Sample	함량(ppm)					
	Fustin	Taxifolin	Fisetin	Sulfuretin	Quercetin	Butein
Control(MeOH)	2383.285	218.278	1038.400	186.420	100.047	89.806
3차증류수	2286.366	214.195	1030.875	188.096	108.862	100.624
우유	2365.657	221.621	1020.472	186.849	101.970	96.004
월	2405.371	227.447	1033.628	189.200	102.987	94.862
요쿠르트	2252.701	210.301	1020.932	181.563	103.504	96.583
과실음료	2354.800	220.241	1055.775	193.179	112.340	105.016
평균	2341.363	218.681	1033.347	187.551	104.951	97.149

마. 결론

Control과 비교했을 때, Fustin은 각 시험용액에서 0.740~5.479% 함량 차이를 보임. Taxifolin hydrate은 각 시험용액에서 0.184~1.871% 함량 차이를 보임. Fisetin은 각 시험용액에서 0.460~1.646% 함량 차이를 보임. Sulfuretin은: 각 시험용액에서 0.230~3.450% 함량 차이를 보임. Quercetin은 각 시험용액에서 1.886~10.943% 함량 차이를 보임(과실음료에서 10.943%). Butein은 각 시험용액에서 5.330~16.937%함량 차이를 보임(과실음료에서 16.937%).

옷나무에 존재하는 단일물질을 여러 제품에 적용해보았을 때 반응 유무를 확인하기 위해 HPLC 분석 결과, 과실음료에서의 Quercetin과 Butein을 제외한 모든 시험용액의 단일물질은 Control과 비교하여 0.184~7.558%의 함량 차이를 보였다. 실험 과정 중 발생하는 오차를 고려했을 때(10%) 과실음료에서의 Quercetin과 Butein을 제외한 모든 시험용액에서 옷나무추출분말을 사용할 수 있다.

7. 옷나무추출분말 내 기능성물질의 장·단기제품 적용성 평가

가. 목적

- (1) 다양한 음료 Base로 제품화되어 판매되고 있는 대표적 음료 제품에서 옷나무의 대표적 기능성물질의 결합성 확인(30일)
- (2) 대표적 음료제품과 옷나무추출분말 내 기능성물질의 결합성 확인(20일)
- (3) 20~30일의 장기간 보관 시 기능성물질의 함량 변화 확인

나. 재료 및 방법

(1) 재료

- (가) 표준체 : Butein (Sigma, 99.5%), Fisetin (Sigma, 98%), Fustin (EXTRASYNTHESE, 99%), Quercetin (Sigma, 98%), Sulfuretin (EXTRASYNTHESE, 99%), (±)-Taxifolin hydrate (Sigma, 90%)
- (나) 시료 : 옷나무추출분말
- (다) 제품 : 3차증류수, MeOH (HPLC용), 70%MeOH (HPLC용 시약급, v/v) 조성액, 우유 (매일우유, 8800 2002), 발효우 (한국야쿠르트 월, 8 801128 2300 18), 요쿠르트 (한국야쿠르트, 11.050AN), 과실음료 (델몬트 사과드링크, 8 801056 020415)

(2) 방법

- (가) 표준용액 : 표준품을 10 μ g/mL로 MeOH 용해하여 표준검량시료로 준비

(나) 검정시료 용액

① 시험용액 : 기능성물질 표준용액

- ㉠ 6종의 표준품을 각 1000 μ g/mL로 MeOH 용해(Stock solution)한 후 각 100 μ g/mL가 되도록 희석, 배합하여 working solution 으로 사용
- ㉡ MeOH, 3차증류수와 4종의 제품 27mL를 50mL Conical tube에 취한 후 표준품 working solution 3mL을 투입
- ㉢ 일정별로 시험용액 500 μ l를 1mL E.P 튜브에 분취한 후 MeOH로 용해시켜 최종 1mL로 정용
- ㉣ 4 $^{\circ}$ C에서 10,000rpm으로 10분 동안 원심분리 후 상층액을 0.2 μ m 주사기용 필터로 여과 후 기기분석

② 시험용액 : 옷나무추출분말 용액

- ㉠ 옷나무추출분말을 약 750mg 분취
- ㉡ 분취한 시료를 50mL Conical tube에 투입 후 MeOH, 3차증류수, 4종의 제품 30mL을 첨가하고 10회 상·하로 흔들어 혼합

- ㉔ 일정별로 시험용액 200 μ l를 1mL E.P 튜브에 분취한 후 70% MeOH로 용해시켜 최종 1mL로 정용
- ㉕ 4 $^{\circ}$ C에서 10,000rpm으로 10분 동안 원심분리 후 상층액을 0.2 μ m 주사기용 필터로 여과 후 기기분석

다. 기기분석조건 (HPLC)

Detector	UV detector		
Wavelength.	280nm		
Column	YMC-Pack ODS-A column(4.5 \times 150 mm, 5 μ m)		
Mobile Phase	A : 2% Acetic acidin DW		
	B : MeOH		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	80	20
	20	40	60
	25	0	100
	30	80	20
35	80	20	
Flow rate	1.0mL/min		
Injectionvolume	10 μ l		
Temperature	25 $^{\circ}$ C		

라. 분석결과

(1) Standard Solution

일 자	물 질	대 조 구	시 험 구			
		물	우유	월	야쿠르트	사과주스
0일	Fustin	5.63 \pm 0.01	5.68 \pm 0.09	6.23 \pm 0.09	6.15 \pm 0.03	6.19 \pm 0.07
	Taxifolin hydrate	5.00 \pm 0.02	4.60 \pm 0.01	5.03 \pm 0.05	5.27 \pm 0.03	5.52 \pm 0.06
	Fisetin	4.99 \pm 0.08	4.60 \pm 0.11	4.80 \pm 0.07	5.33 \pm 0.01	5.68 \pm 0.08
	Sulfuretin	4.83 \pm 0.02	4.69 \pm 0.01	4.95 \pm 0.06	5.14 \pm 0.03	5.25 \pm 0.04
	Quercetin	5.00 \pm 0.07	4.74 \pm 0.01	4.23 \pm 0.23	5.19 \pm 0.14	5.91 \pm 0.49
	Butein	5.37 \pm 0.03	4.84 \pm 0.06	4.95 \pm 0.40	5.52 \pm 0.04	5.90 \pm 0.21

일 자	물 질	대 조 구		시 험 구		
		물	우유	월	야쿠르트	사과주스
30일	Fustin	5.88±0.03 (104.49%)	5.66±0.99 (99.53%)	6.28±0.06 (100.12%)	6.26±0.02 (101.81%)	6.40±0.04 (103.42%)
	Taxifolin hydrate	5.25±0.03 (105.08%)	4.45±0.05 (96.95%)	5.06±0.04 (100.46%)	5.43±0.02 (102.93%)	5.73±0.04 (103.88%)
	Fisetin	5.14±0.05 (102.85%)	4.26±0.11 (92.77%)	4.54±0.06 (94.57%)	5.36±0.01 (100.51%)	5.27±0.02 (92.73%)
	Sulfuretin	4.98±0.09 (103.21%)	5.22±0.05 (111.30%)	4.91±0.02 (99.23%)	5.17±0.02 (100.45%)	5.26±0.04 (100.25%)
	Quercetin	5.08±0.08 (101.65%)	3.74±0.09 (78.88%)	4.14±0.11 (96.48%)	5.40±0.11 (104.12%)	3.97±0.24 (67.11%)
	Butein	4.92±0.06 (91.60%)	4.37±0.08 (90.44%)	4.83±0.03 (97.75%)	5.69±0.03 (103.14%)	5.70±0.09 (96.70%)

(2) 옷나무추출물

일 자	물 질	대 조 구		시 험 구		
		물	우유	월	야쿠르트	사과주스
0일	Fustin	5.63±0.01	5.68±0.09	6.23±0.09	6.15±0.03	6.19±0.07
	Taxifolin hydrate	5.00±0.02	4.60±0.01	5.03±0.05	5.27±0.03	5.52±0.06
	Fisetin	4.99±0.08	4.60±0.11	4.80±0.07	5.33±0.01	5.68±0.08
	Sulfuretin	4.83±0.02	4.69±0.01	4.95±0.06	5.14±0.03	5.25±0.04
	Quercetin	5.00±0.07	4.74±0.01	4.23±0.23	5.19±0.14	5.91±0.49
	Butein	5.37±0.03	4.84±0.06	4.95±0.40	5.52±0.04	5.90±0.21
30일	Fustin	5.88±0.03 (104.49%)	5.66±0.99 (99.53%)	6.28±0.06 (100.12%)	6.26±0.02 (101.81%)	6.40±0.04 (103.42%)
	Taxifolin hydrate	5.25±0.03 (105.08%)	4.45±0.05 (96.95%)	5.06±0.04 (100.46%)	5.43±0.02 (102.93%)	5.73±0.04 (103.88%)
	Fisetin	5.14±0.05 (102.85%)	4.26±0.11 (92.77%)	4.54±0.06 (94.57%)	5.36±0.01 (100.51%)	5.27±0.02 (92.73%)
	Sulfuretin	4.98±0.09 (103.21%)	5.22±0.05 (111.30%)	4.91±0.02 (99.23%)	5.17±0.02 (100.45%)	5.26±0.04 (100.25%)
	Quercetin	5.08±0.08 (101.65%)	3.74±0.09 (78.88%)	4.14±0.11 (96.48%)	5.40±0.11 (104.12%)	3.97±0.24 (67.11%)
	Butein	4.92±0.06 (91.60%)	4.37±0.08 (90.44%)	4.83±0.03 (97.75%)	5.69±0.03 (103.14%)	5.70±0.09 (96.70%)

마. 결론

- (1) 옷나무추출물의 현장수거제품 적용성 평가 결과
 - 평가기준 : 6종 기능성 소재
 - 반응(결합)성 : 비결합 (냉장조건, 20일 기준)
- (2) 규제기관(식약처, 수관원) 판정범위 적합성 여부
 - 허용범위 : 80-120% 내 적합
- (3) 적용제품범위 : 우유류, 유가공품류, 주스류, 알콜첨가제품류 (예 : 가그린)
- (4) 옷나무 기능성소재 제품화 및 소비자 요구성 충족 준비 완료

8. 옷나무추출물의 내열성/내산성/내알칼리성 평가

가. 목적

- (1) 옷나무추출분말과 지표성분(Fustin)의 내열성, 내산성, 내알칼리성 확인(17일)
 - (가) 적용제품 : 과실음료 (델몬트 사과드링크)
 - (나) 적용시료 : Fustin,
 - (다) 적용범위 : 유기산(Citric acid, Sigma; DL-Malic acid, JUNSEI; Tartaric acid, YAKURI), 강산(HCl, Deajung), 강알칼리(NaOH, Sigma)

나. 재료 및 방법

(1) 재료

- (가) 표준체 : Fustin (EXTRASYNTHESE, 99%), Citric acid (Sigma, 99.5%), DL-Malic acid (JUNSEI, 99%), Tartaric acid (YAKURI, 99.8%)
- (나) 시료 : 옷나무추출분말, 80% MeOH(v/v, HPLC용), 3rd ddH₂O, 과실음료(델몬트 사과드링크)

(2) 방법

- (가) 표준용액 : Fustin을 각각 1,000 μ g/mL로 MeOH 용해하여 표준검량시료로 준비
- (나) 검정시료 용액
 - ① 산·알칼리용액 조제
 - ㉞ 유기산 3종 2g을 각각 3차증류수와 제품(사과드링크)으로 용해하여 20g이 되도록 정용
 - ㉟ HCl 용액을 0.01N, 0.1N, 1N이 되도록 3차증류수와 제품(사과드링크)로 희석
 - ㊱ NaOH 표준품 1g을 각각 3rd ddH₂O와 제품(사과드링크)로 용해하여 50g이 되도록 정용 후 0.01%, 0.1%가 되도록 희석
 - ② 조제한 산·알칼리용액에 5,000ppm의 검정시료용액이 되도록 옷나무추출분말 첨가
 - ③ 30분간 Sonication 하고 80% MeOH(v/v)로 5배 희석하여 원심분리(4,000rpm, 5min, 4 $^{\circ}$ C)

후 분취

④ 0.2 μm Syringe filter로 여과하여 기기분석

⑤ water bath를 이용하여 92°C에서 30분간 열처리 후 0.2 μm Syringe filter로 여과하여 기기분석

다. 기기분석조건 (HPLC)

Detector	UV detector		
Wavelength.	280nm		
Column	YMC-Pack ODS-A column(4.5× 150 mm, 5μm)		
Mobile Phase	A : 2% Acetic acidin DW		
	B : MeOH		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	80	20
	20	40	60
	25	0	100
	30	80	20
35	80	20	
Flow rate	1.0mL/min		
Injectionvolume	10μℓ		
Temperature	25°C		

라. 결 과

(1) 내열성/내산성/내알칼리성 평가

(가) 유기산 3종 (Citric acid, DL-Malic acid, Tartaric acid) + 3rd ddH₂O or 사과드링크 + 옷나무추출분말(5,000ppm) (pH 측정온도: 20±2°C)

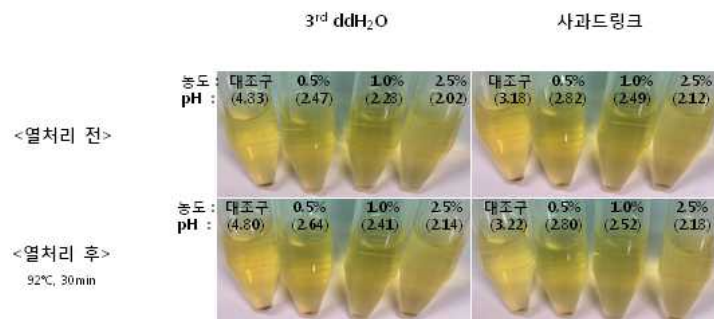


그림 21. 옷나무추출물의 유기산 내산성 평가

(나) 강산(HCl), 강알칼리(NaOH) + 3rd ddH₂O or 사과드링크 + 옷나무추출분말(5,000ppm)
 (pH 측정온도: 20±2℃)

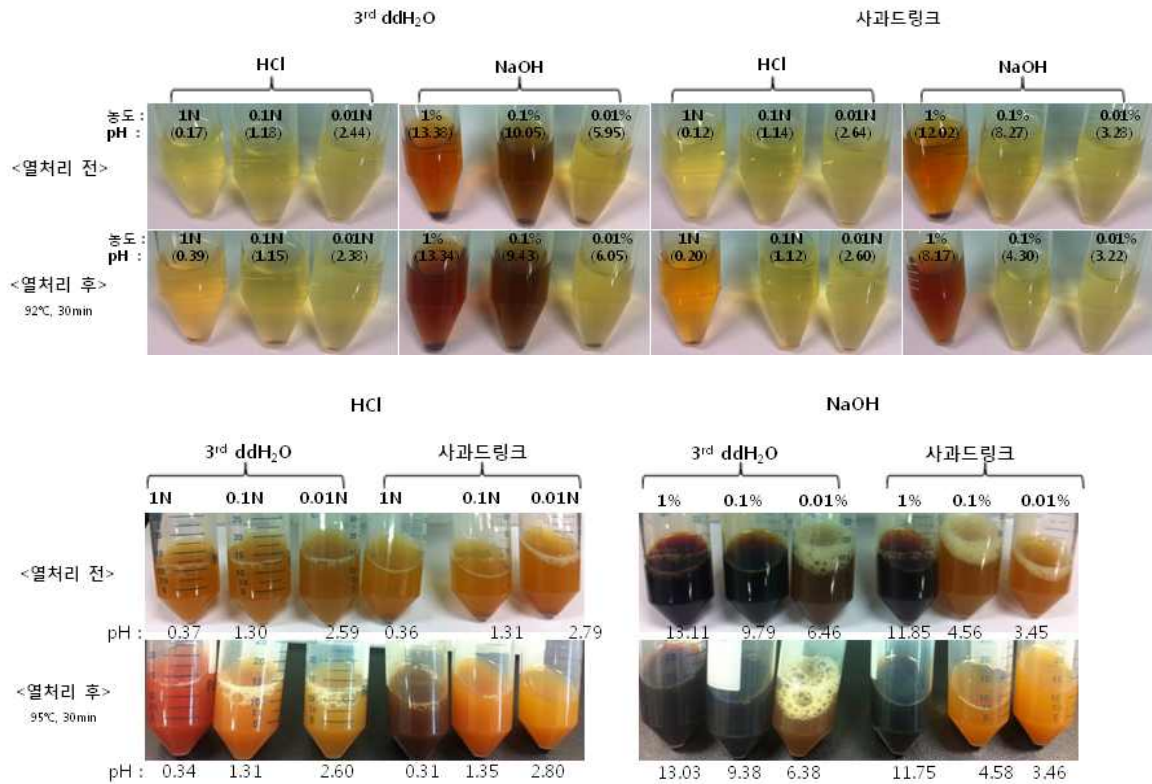


그림 22. 옷나무추출물의 강산, 강알칼리 내성 평가

마. 결론

(1) 내열성/내산성/내알칼리성 평가

(가) 내산성/내알칼리성

- pH 8.3 이상에서 옷나무추출분말 및 Fustin의 변질 확인

(나) 내열성(92℃) 보유 확인 (기준 : 검출효율 80~120%)

- Fustin : pH 0.2~6.05

(2) 장·단기 안정성 평가 (17일)

(가) 비열처리구 (기준 : 검출효율 80~120%) : 안정성 보유

- Fustin : pH 0.12~10.05

- (±)-Taxifolin hydrate : pH 0.12~8.27

(나) 열처리구 (기준 : 검출효율 80~120%) : 안정성 보유

- Fustin : pH 0.20~8.17

1-2절. 옷나무의 생리활성 성분 분리정제, 분석 및 모니터링 연구(1핵심 2세부)

1. 연구 추진 전략 및 방법

- 남성 갱년기에 나타날 수 있는 성기능 저하, 혈액순환 장애, 골관절염, 탈모 등의 개선하기 위한 예방 및 치료제를 위해 옷나무를 이용한 건강기능식품을 개발하고자 함.
- 생리활성 물질을 효과적으로 발견하기 위해 다양한 분석 장비를 이용하여 분석을 실시하고 다양한 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 해당 성분들에 대한 분리를 진행함. 분리 정제된 생리활성 성분의 구조를 규명하기 위하여 NMR 등의 고가의 분석 장비를 이용하여 물질이 가진 proton과 carbon의 정보와 correlation을 바탕으로 구조를 해석하여 구조를 규명해 냄.
- 옷나무의 생리활성 성분을 분석하기 위해 HPLC/UV를 이용하여 동시분석법을 개발을 진행하고 분석법의 유효성을 검증하기 위해서 ICH 및 FDA Guideline에 따라 다양한 항목에 걸쳐서 분석법 확립을 실시함.
- 다양하게 처리된 옷나무 추출물에 대한 모니터링 분석을 실시하여 해당 추출물의 생리활성 성분의 함량 분석을 실시함.

2. 연구 결과

가. 옷나무의 생리활성 성분의 분리 정제 및 구조 분석

(1) 옷나무의 물질 분리

옷나무의 추출물을 헥산으로 분획하여 비극성 부분을 분리한다. 남은 수층을 에틸아세테이트로 분획하여 감압 농축한다. 이렇게 극성별로 나누어진 헥산 층, 에틸아세테이트 층, 물 층의 분획들을 silica gel로 세 분획 하고 다시 여러 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 각각의 세 분획에서 계속하여 유효성분들을 분리하였다. 분획 및 물질의 분리는 silica gel 뿐 아니라, sephadex LH-20, ODS-A, diol, preparative MPLC, 또는 preparative HPLC 등의 다양한 크로마토그래피법을 이용하여 시행하였다.

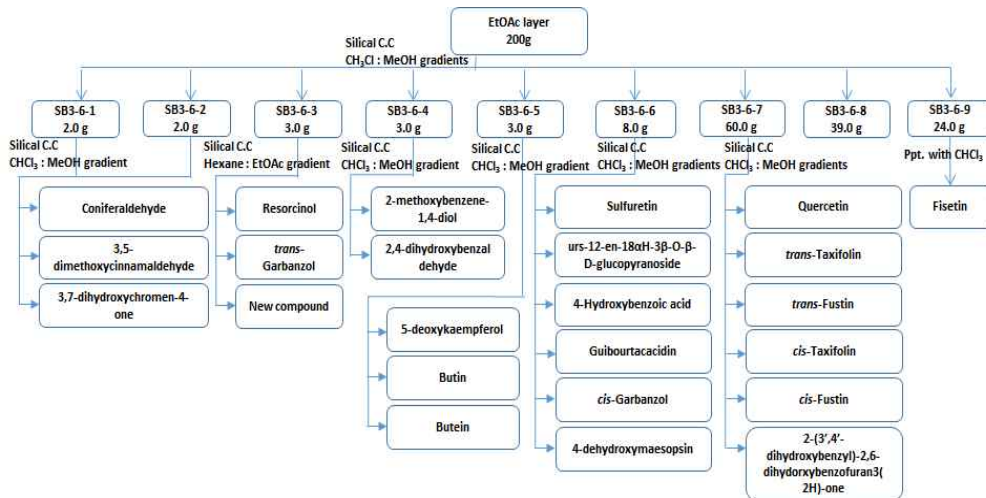


그림 23. 옷나무의 분리 모식도.

(2) 옷나무에서 분리된 물질 구조

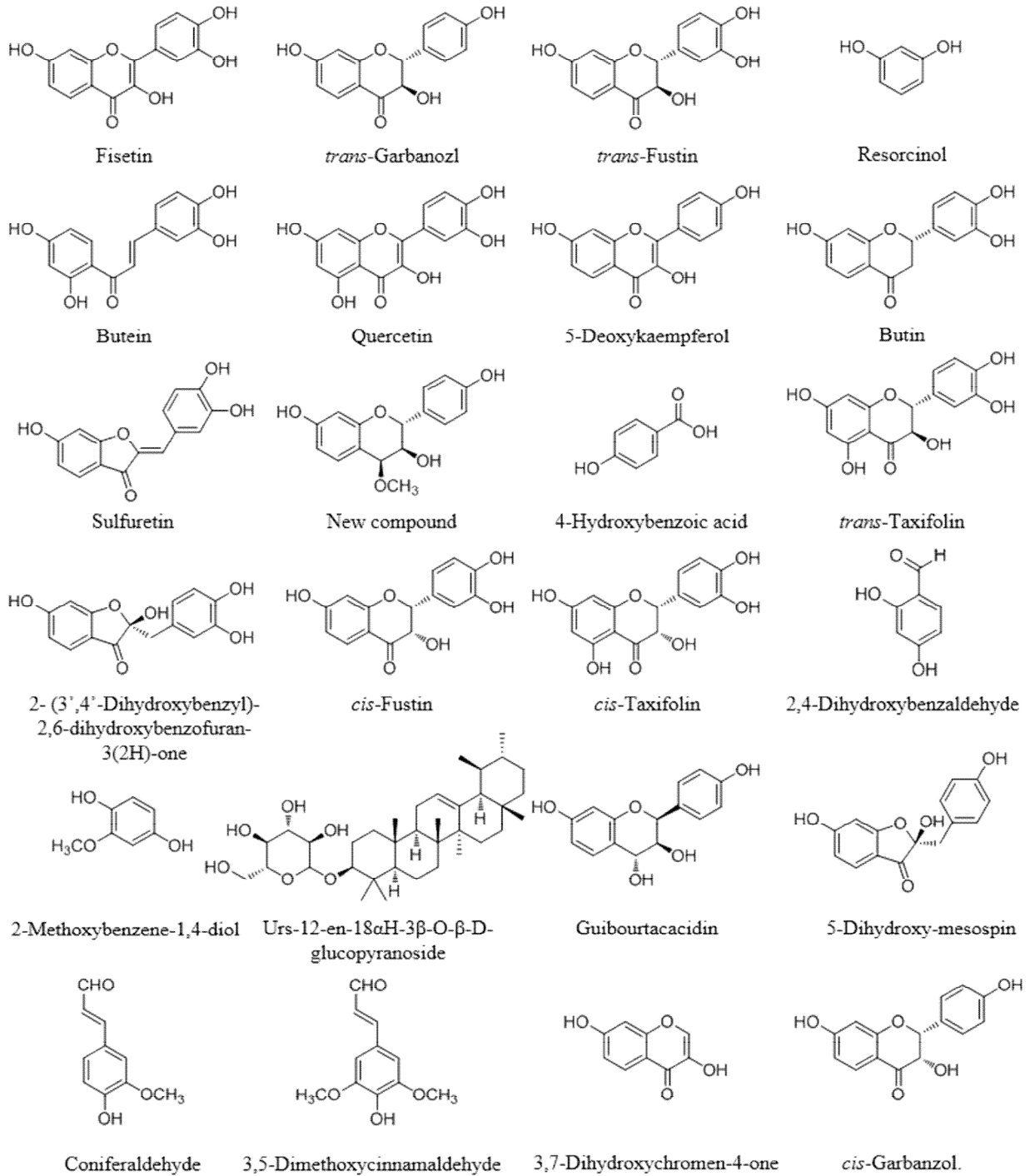


그림 24. 옷나무에서 분리된 물질 구조.

표 6. 옷나무에서 분리된 물질

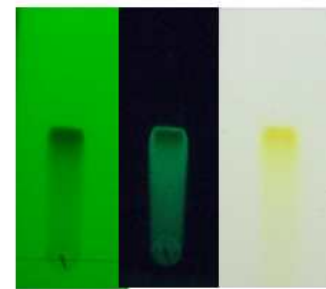
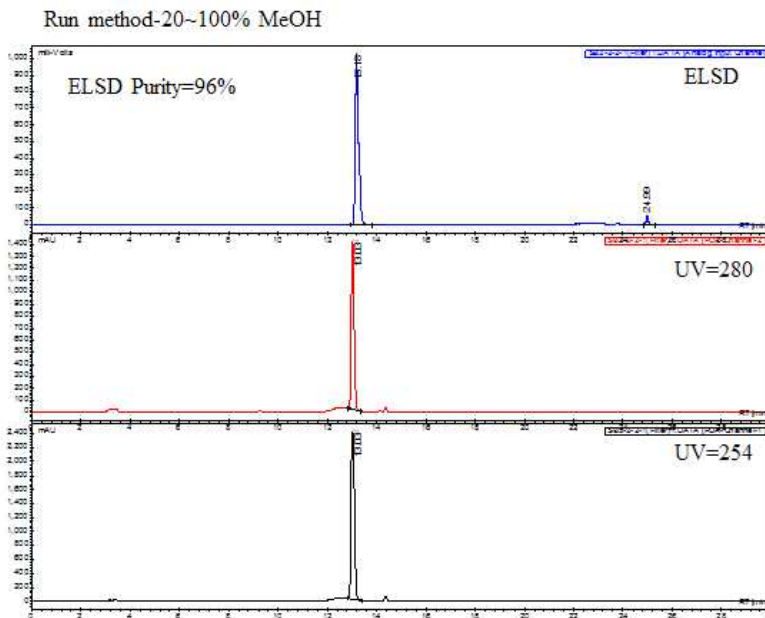
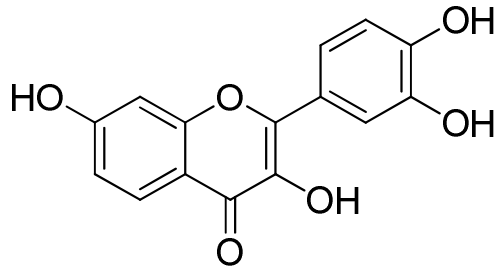
	물질명	분자식 및 분자량	분리량
(1)	Fisetin	$C_{15}H_{10}O_6$ MW=286	2 g
(2)	<i>trans</i> -Garbanzol	$C_{15}H_{12}O_5$ MW=272	800 mg
(3)	<i>trans</i> -Fustin	$C_{15}H_{12}O_6$ MW=288	13 g
(4)	Resorcinol	$C_6H_6O_2$ MW=110	38 mg
(5)	Butein	$C_{15}H_{12}O_5$ MW=272	60 mg
(6)	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$ MW=302	7 mg
(7)	5-Deoxykaempferol	$C_{15}H_{10}O_5$ MW=270	25 mg
(8)	Butin	$C_{15}H_{12}O_5$ MW=272	450 mg
(9)	Sulfuretin	$C_{15}H_{10}O_7$ MW=270	130 mg
(10)	New	$C_{15}H_{10}O_5$ MW=288	230 mg
(11)	4-Hydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_3$ MW=270	5 mg
(12)	<i>trans</i> -Taxifolin	$C_{15}H_{12}O_7$ MW=304	150 mg
(13)	2-(3',4'-Dihydroxyl)-2,6 dihydroxubenzofuran-3-(2H)-one	$C_{15}H_{12}O_6$ MW=288	300 mg
(14)	<i>cis</i> -Fustin	$C_{15}H_{12}O_6$ MW=288	60 mg
(15)	<i>cis</i> -Taxifolin	$C_{15}H_{12}O_7$ MW=304	7 mg
(16)	2,4-Dihydroxybenzaldehyde	$C_7H_6O_3$ MW=138	2 mg
(17)	2-Methoxybenzne-1,4-diol	$C_7H_8O_6$ MW=140	3 mg
(18)	Urs-12-en-18aH-3β-O-β-D- glucopyranoside	$C_{36}H_{60}O_6$ MW=588	115 mg
(19)	Guibourtacacidin	$C_{15}H_{14}O_4$ MW=274	4 mg
(20)	5-Dehydroxy-mesospin	$C_{15}H_{12}O_5$ MW=272	20 mg
(21)	Coniferaldehyde	$C_7H_8O_3$ MW=140	20 mg
(22)	Sinapaldehyde	$C_{36}H_{60}O_6$ MW=588	20 mg
(23)	3,7-Dihydroxychromen-4-one	$C_{15}H_{14}O_5$ MW=274	8 mg
(24)	<i>cis</i> -Garbanzol	$C_{15}H_{12}O_5$ MW=272	2 mg

(3) 옷나무에서 분리된 물질의 구조 동정

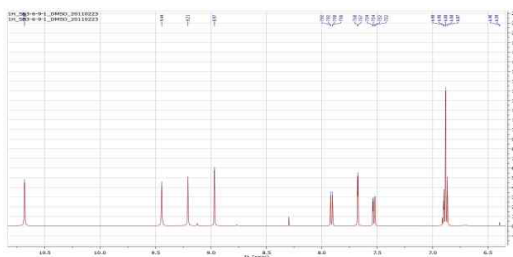
여러 컬럼 크로마토그래피를 이용해 분리 정제 후, 1D, 2D NMR, LC-MS, UV, IR 등의 분석

장비를 이용해 해당 물질의 데이터를 수집하였다. 수집한 데이터와 참고 문헌을 비교하여 신규 물질 1개를 포함해 총 24개의 물질에 대한 구조를 동정하였다.

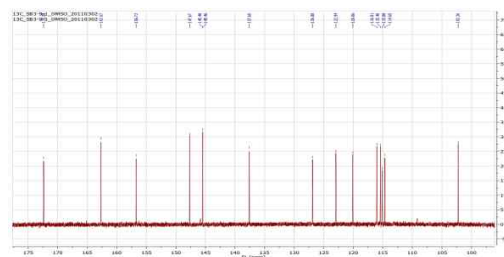
① Fisetin



NP (C:M) = 5:1



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)

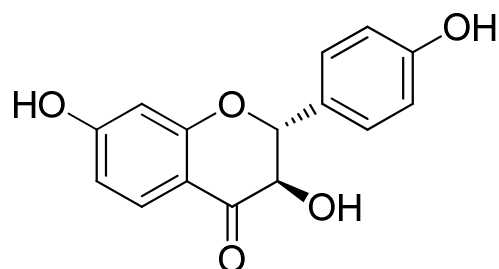


¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆)

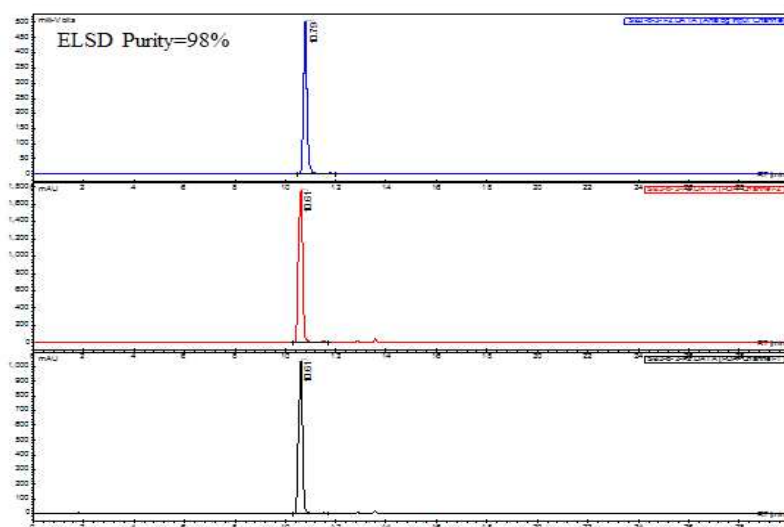
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.91 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-6'), 7.67 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-3'), 7.53 (1H, dd, J = 8.5, 2.5 Hz, H-6), 6.88–6.90 (3H, m, H-2' , 7, 8)

¹³C-NMR (125 mHz, DMSO-*d*₆): δ 147.5 (C-2), 137.4 (C-3), 172.2 (C-4), 126.7 (C-5), 114.9 (C-6), 162.5 (C-7), 102.1 (C-8), 156.8 (C-9), 114.5 (C-10), 122.8 (C-1'), 119.9 (C-2'), 115.2 (C-3'), 145.3 (C-4'), 145.3 (C-5'), 115.8 (C-6')

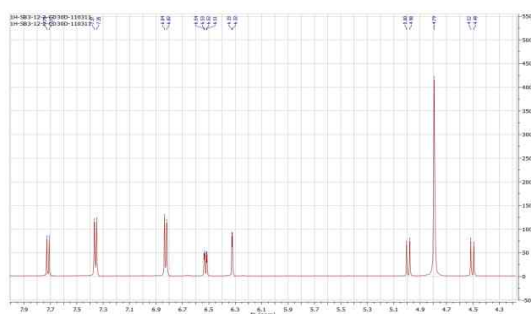
② *trans*-Garbanzol



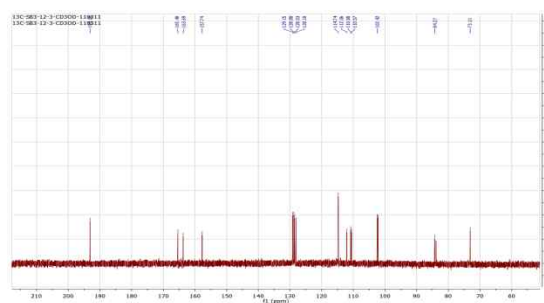
Run method-20~100% MeOH



NP (C:M) = 10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)

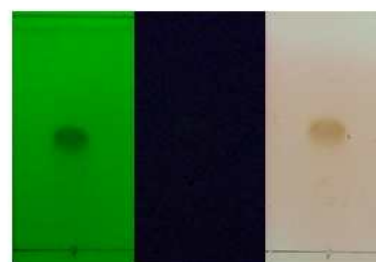
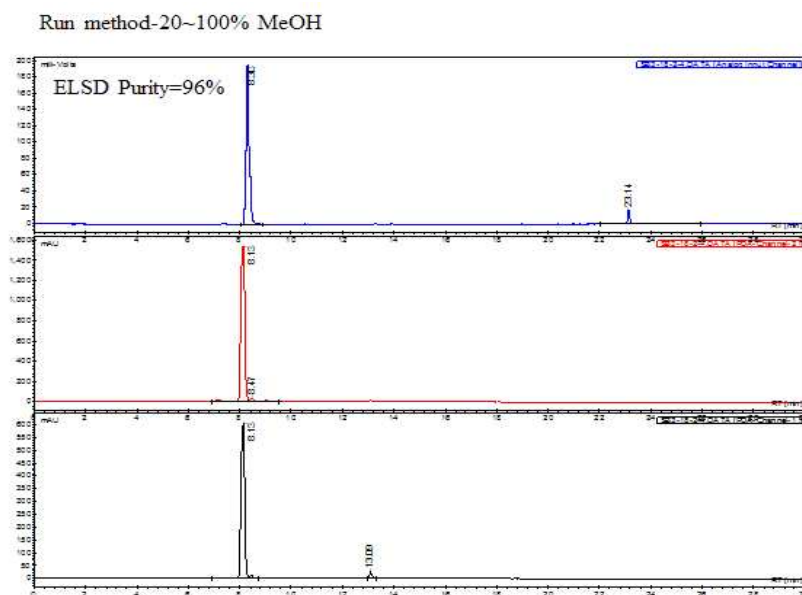
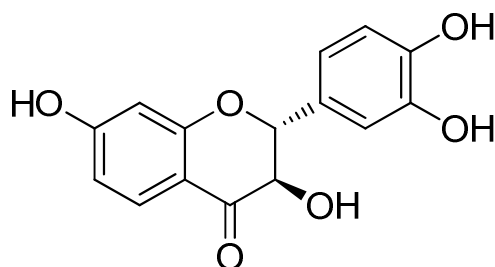


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD)

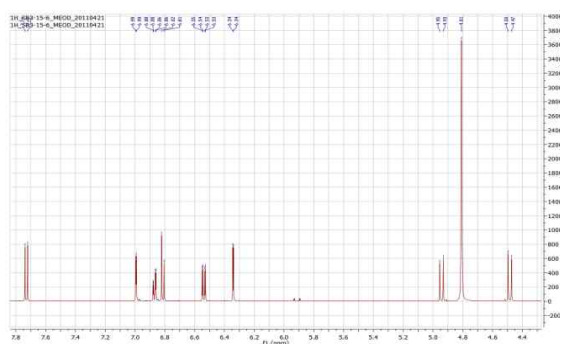
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.71 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.35 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2' , 6'), 6.82 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3' , 5'), 6.53 (1H, dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, H-6), 6.32 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-8), 4.98 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-2), 4.51 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 84.2 (C-2), 73.1 (C-3), 193.1 (C-4), 128.1 (C-5), 110.5 (C-6), 165.4 (C-7), 102.4 (C-8), 163.7 (C-9), 112.1 (C-10), 129.1 (C-1'), 128.8 (C-2'), 114.7 (C-3'), 157.7 (C-4'), 114.7 (C-5'), 128.8 (C-6')

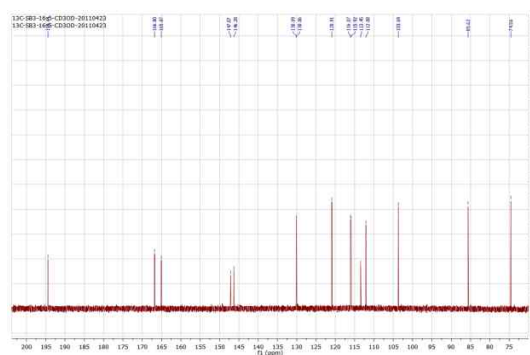
③ *trans*-Fustin



NP (H:A) = 1:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)

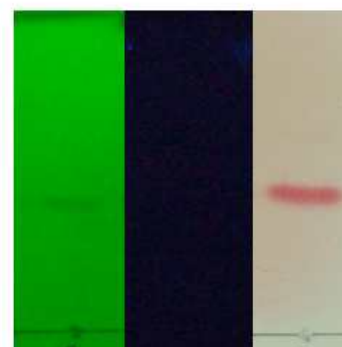
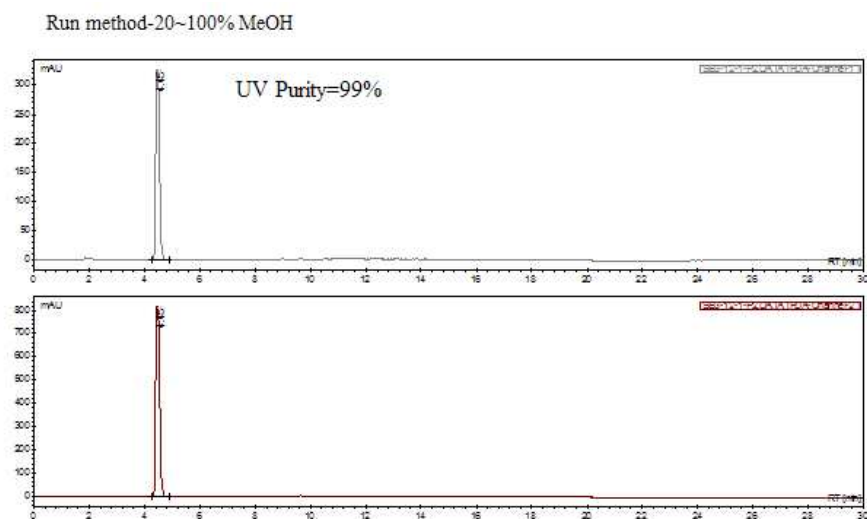
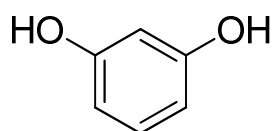


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD)

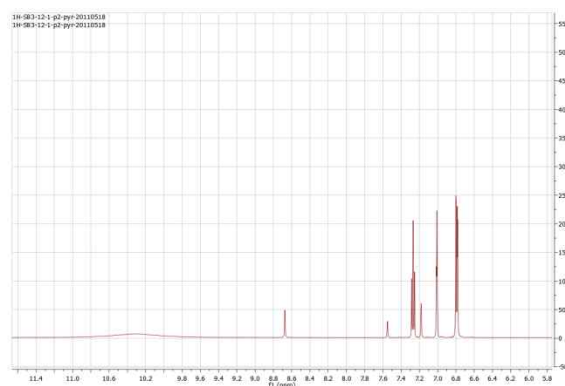
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.73 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-5), 6.99 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.82 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.87 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.64 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.54 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6), 4.94 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-2), 4.46 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 85.6 (C-2), 74.5 (C-3), 194.4 (C-4), 130.0 (C-5), 112.0 (C-6), 166.8(C-7), 103.7 (C-8), 165.0 (C-9), 113.4 (C-10), 130.1 (C-1'), 116.0 (C-2'), 146.2 (C-3'), 147.0 (C-4'), 115.9 (C-5'), 120.9 (C-6')

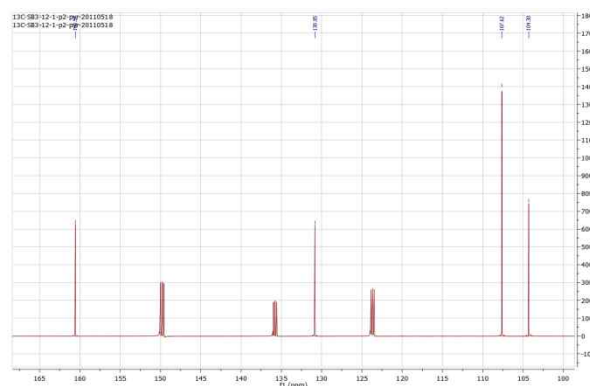
④ Resorcinol



NP (C:M) = 10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Pyridine- d_6)

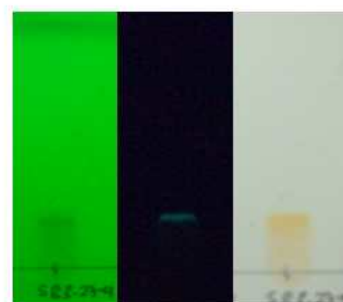
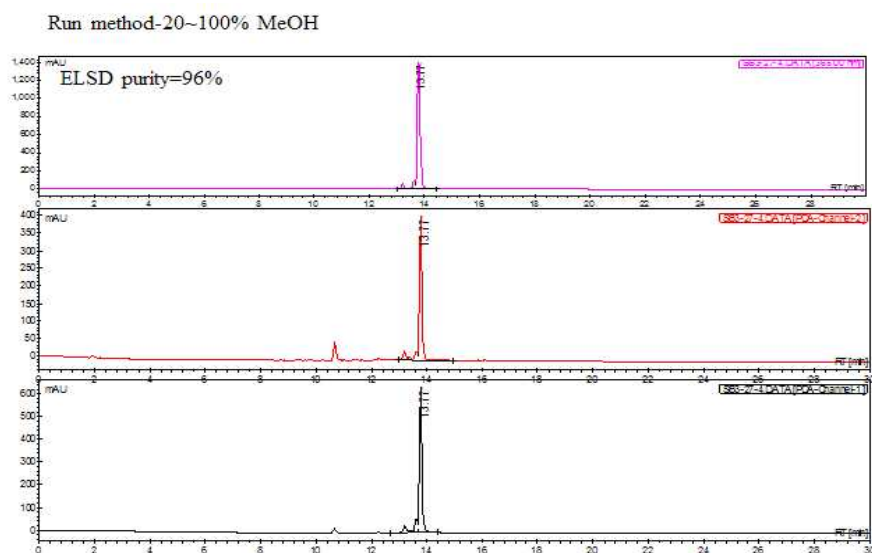
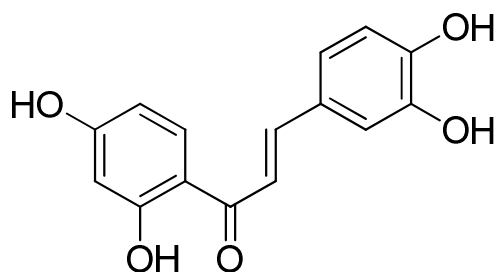


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Pyridine- d_6)

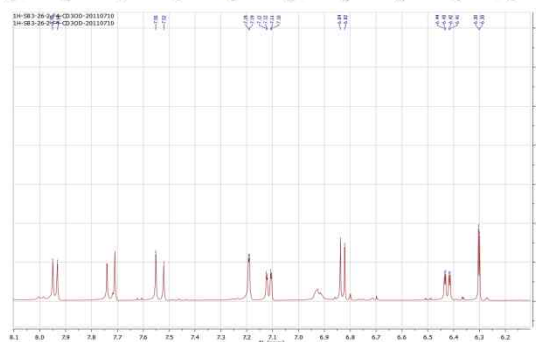
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Pyridine- d_6): δ 6.79 (2H, dd, J = 8.5, 2.5 Hz, H-3, 5), 7.26 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-4), 7.01 (1H, t, J = 2.0 Hz, H-1), 10.31 (2H, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Pyridine- d_6): δ 104.3 (C-1), 107.6 (C-3, C-5), 130.8, 160.4 (C-2, C-6)

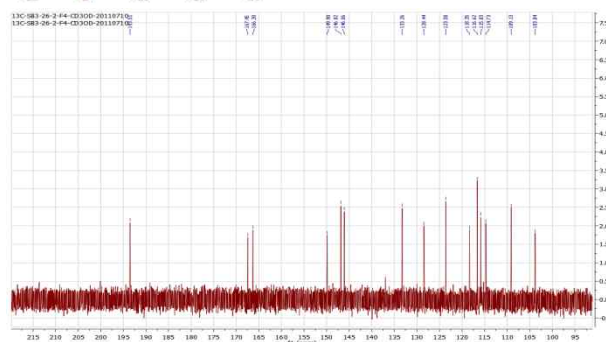
⑤ Butein



NP (C:M) = 10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)

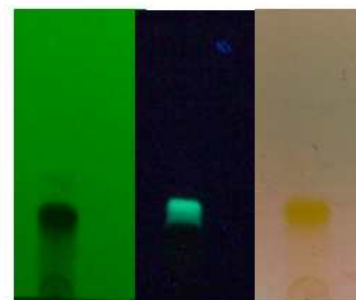
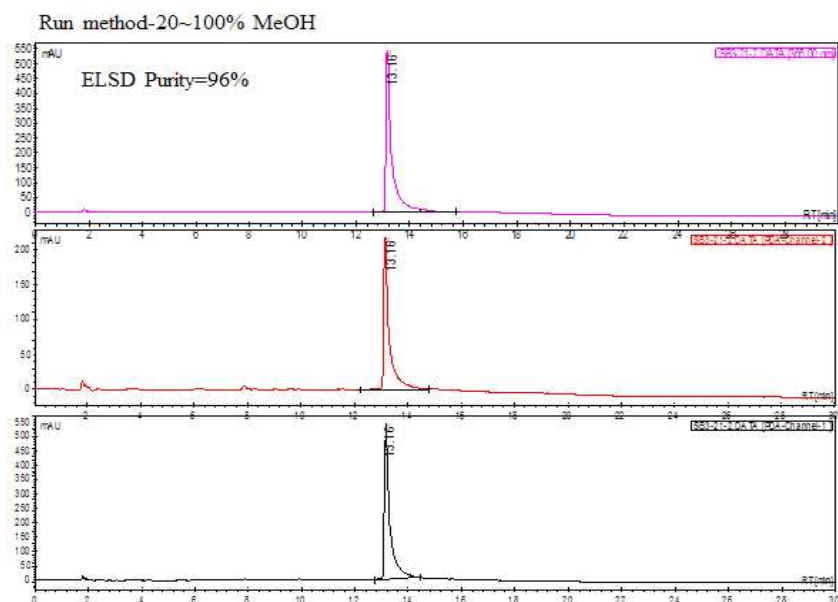
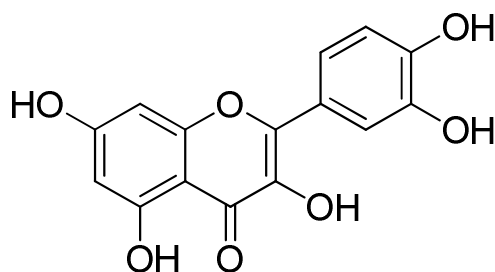


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD)

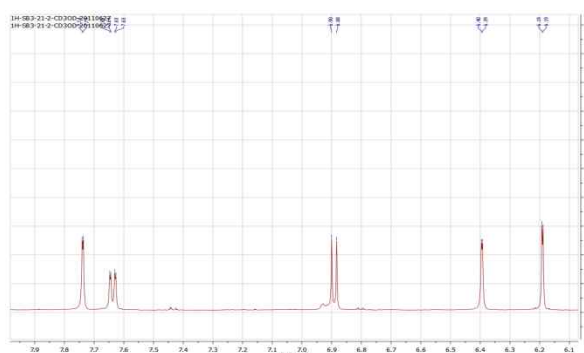
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.92 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6'), 7.70 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H- β), 7.52, (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H- α), 7.17 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-6), 7.12 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-2), 6.83 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3), 6.431 (1H, dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz, H-5'), 6.28 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3')

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 193.5 (C- β'), 167.4 (C-5), 166.3 (C-7), 149.9 (C-4'), 146.8 (C- β), 146.0 (C-3'), 133.2 (C-9), 128.4 (C-1'), 123.5 (C-6'), 118.3 (C- α), 116.6 (C-2'), 115.8 (C-5'), 114.7 (C-10), 109.1 (C-8), 103.8 (C-6)

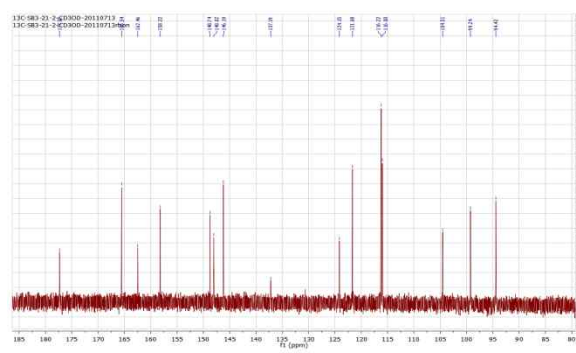
⑥ Quercetin



NP (C:M) =10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)

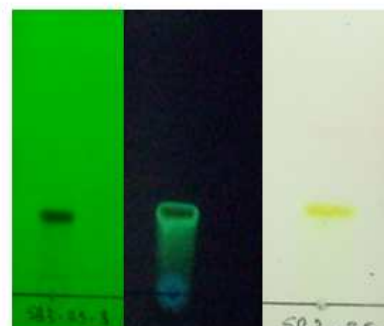
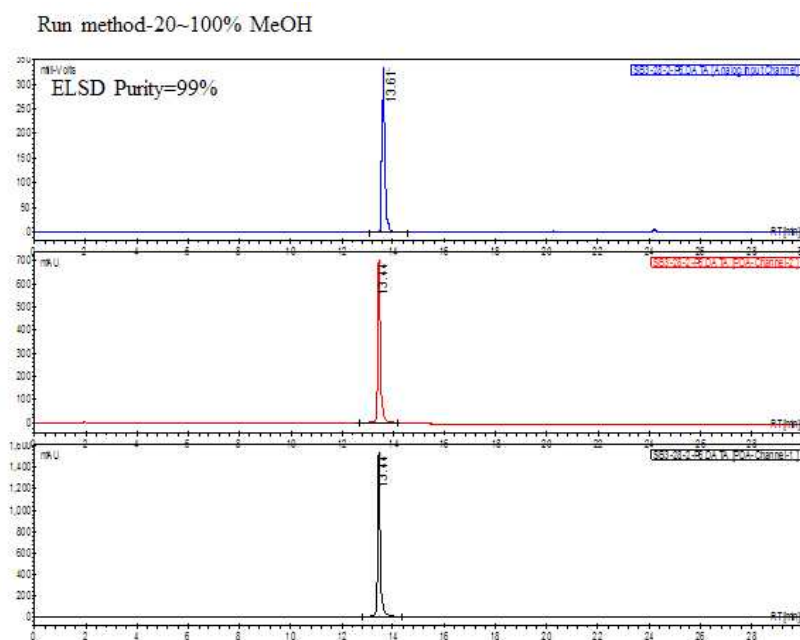
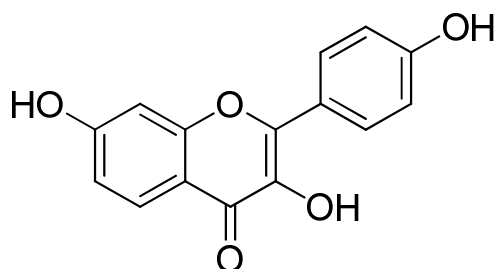


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD)

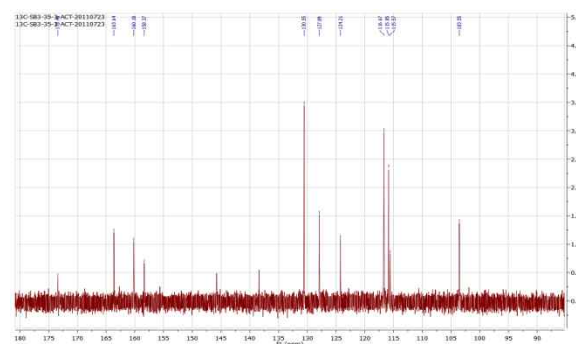
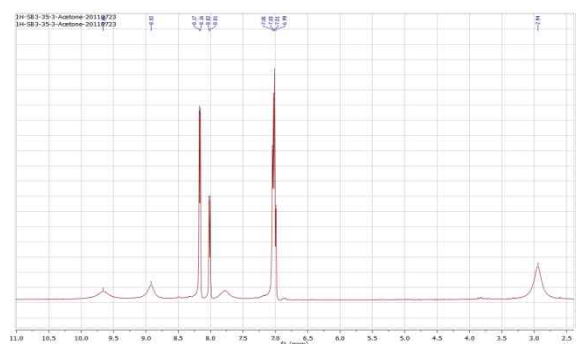
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.38 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.63 (1H, dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, H-6'), 6.89 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 146.1 (C-2), 137.1 (C-3), 177.3 (C-4), 162.4 (C-5), 99.2 (C-6), 165.5 (C-7), 94.2 (C-8), 158.2 (C-9), 104.5 (C-10), 121.6 (C-1'), 116.2 (C-2'), 148.0 (C-3'), 148.7 (C-4'), 116.0 (C-5'), 124.1 (C-6')

⑦ 5-Deoxykaemferol



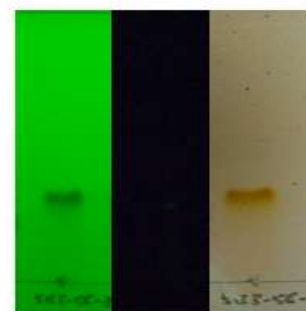
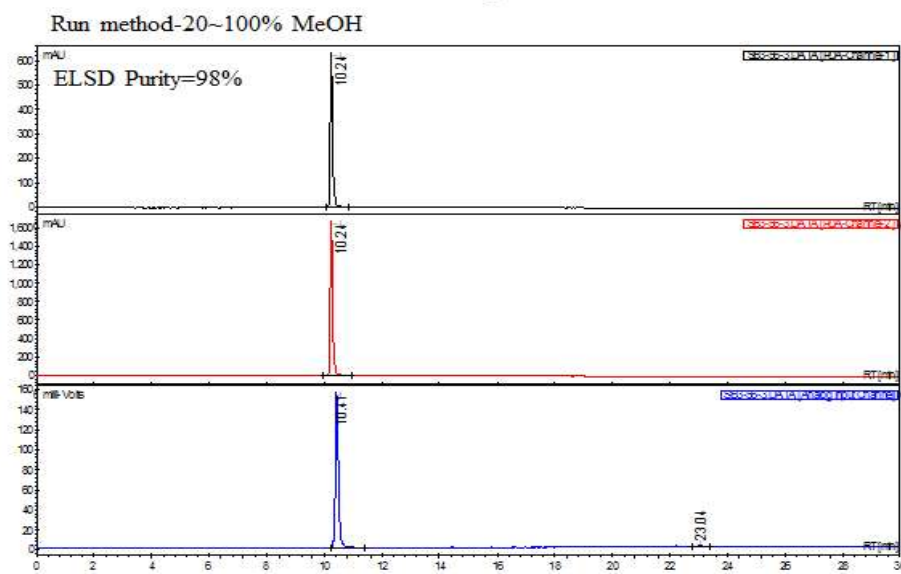
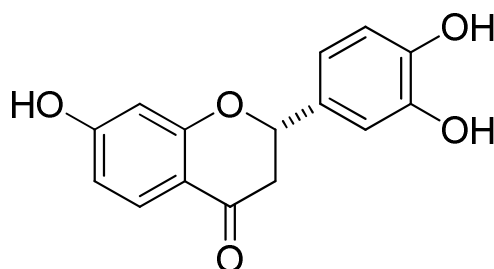
NP (C:M) = 10:1



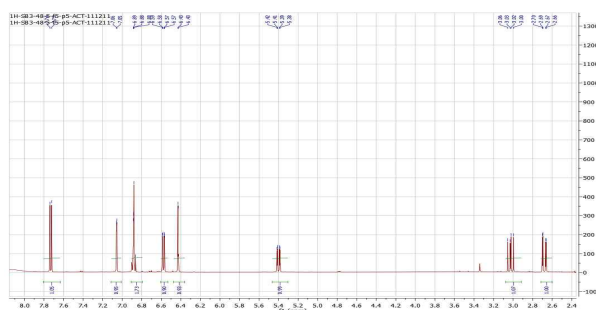
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6): δ 8.16 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2' , 6'), 8.01 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-8), 6.9-7.0 (4H, m, H-1' , 5' , 5, 6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6): δ 145.7 (C-2), 138.3 (C-3), 173.4 (C-4), 127.9 (C-5), 115.8 (C-6), 163.6 (C-7), 103.5 (C-8), 158.3 (C-9), 115.5 (C-10), 124.2 (C-1'), 130.5 (C-2'), 116.6 (C-3'), 160.2 (C-4'), 116.6 (C-5'), 130.5 (C-6')

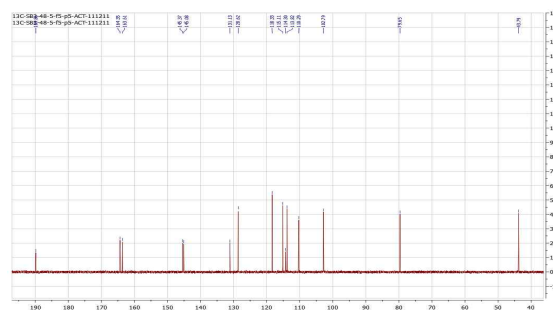
⑧ Butin



NP (CM) = 10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6)

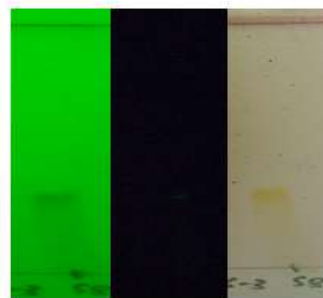
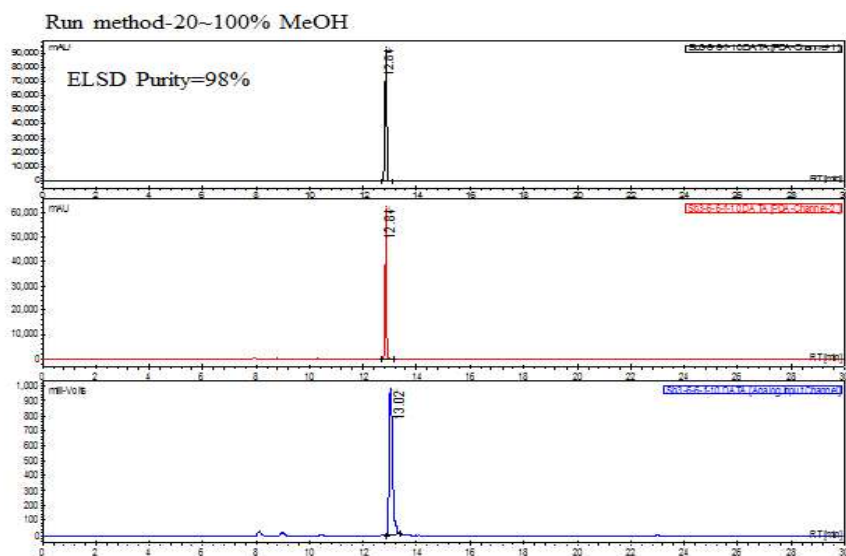
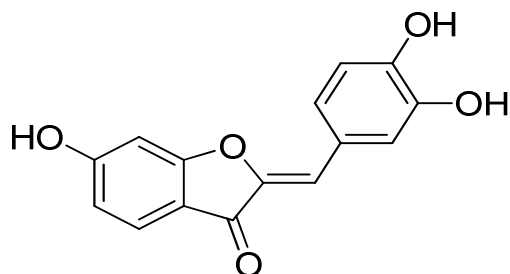


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6)

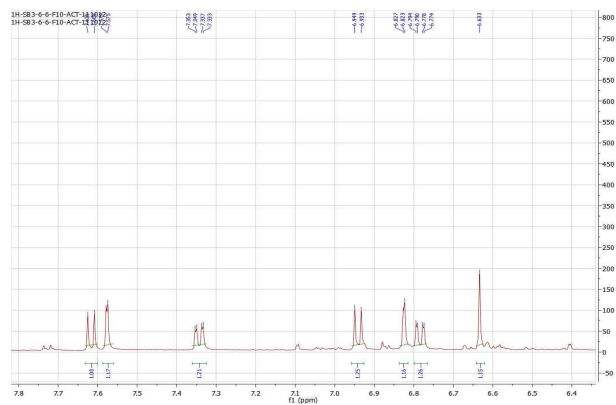
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6): δ 7.72 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 7.05 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.86-6.90 (2H, m, H-5' , 6'), 6.87 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6), 6.42 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-8), 5.39 (1H, dd, J = 13.0, 3.0 Hz, H-2), 3.02 (1H, dd, J = 17.0, 13.0 Hz, H_b-3), 2.67 (1H, dd, J = 17.0, 2.5 Hz, H_a-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6): δ 79.6 (C-2), 43.7 (C-3), 189.1 (C-4), 128.1 (C-5), 110.2 (C-6), 164.3 (C-7), 102.7 (C-8), 163.6 (C-9), 114.3 (C-10), 131.1 (C-1'), 113.8 (C-2'), 145.3 (C-3'), 145.1 (C-4'), 115.1 (C-5'), 118.3 (C-6')

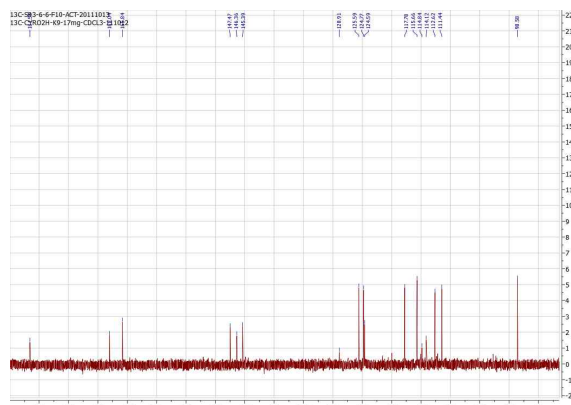
⑨ Sulfuretin



NP (CM) = 10:1



¹H-NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆)

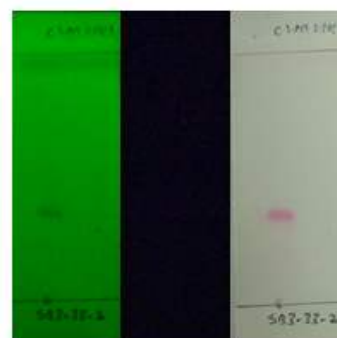
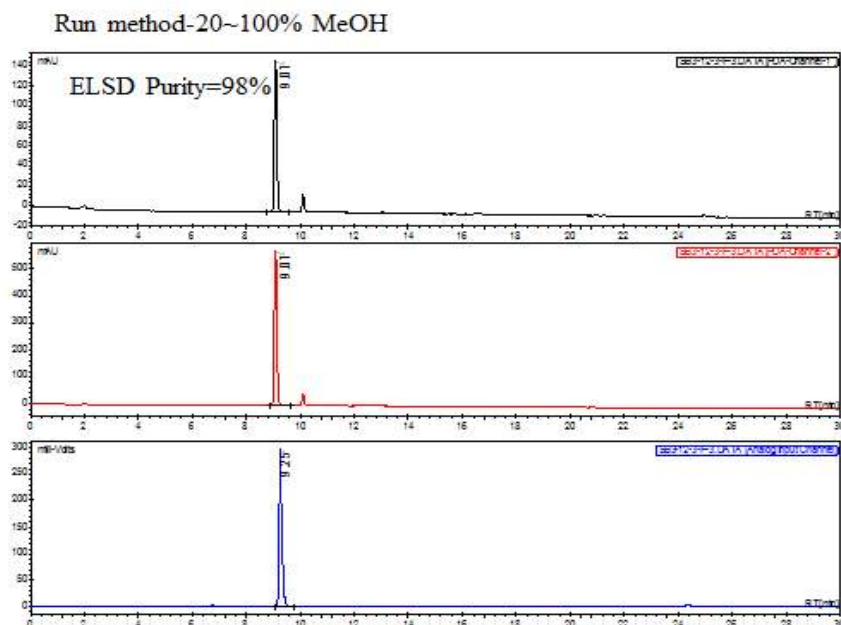
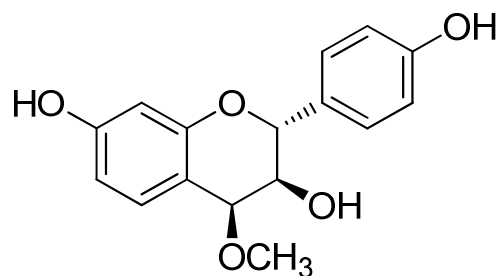


¹³C-NMR (125 MHz, Acetone-*d*₆)

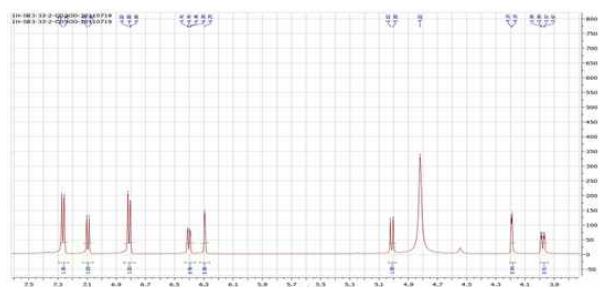
¹H-NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆): δ 7.62 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-2'), 7.57 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5'), 7.34 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.93 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-4), 6.82 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-7), 6.78 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-5), 6.63 (1H, s, H-10)

¹³C-NMR (125 MHz, Acetone-*d*₆): δ 145.3 (C-2), 181.5 (C-3), 125.5 (C-4), 114.8 (C-5), 168.0 (C-6), 98.5 (C-7), 165.8 (C-8), 115.6 (C-9), 112.6 (C-10), 124.5 (C-1'), 111.4 (C-2'), 146.3 (C-3'), 1147.4 (C-4'), 117.7 (C-5'), 124.7 (C-6')

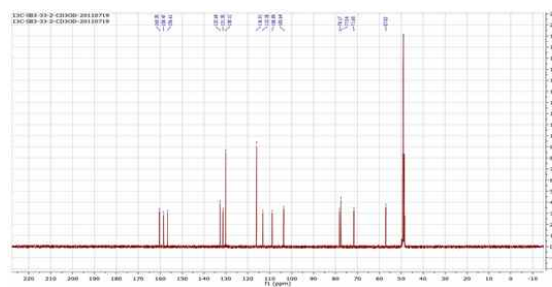
⑩ New compound



NP (CM) = 10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)

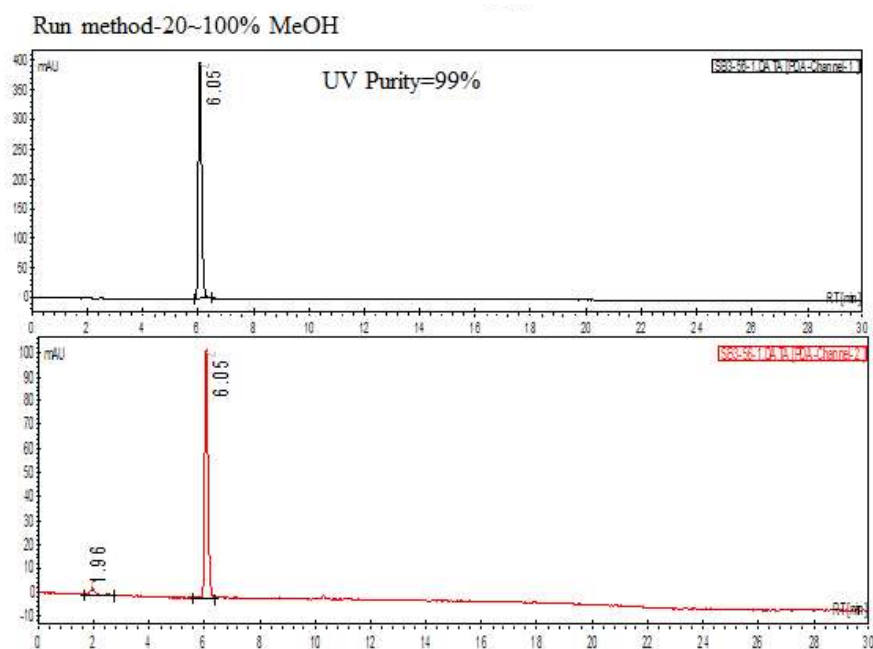
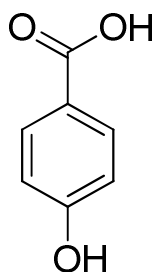


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD)

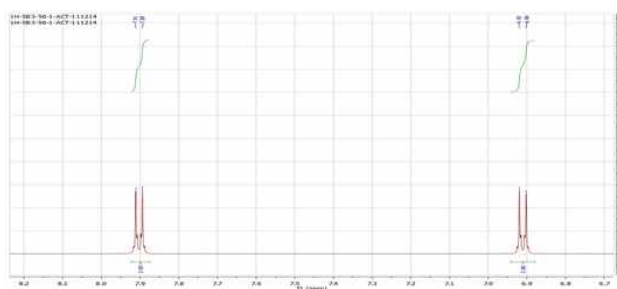
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.26 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2' , 6'), 7.06 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.81 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3' , 5'), 6.39 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6), 6.27 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 5.09 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-2), 4.18 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-4), 3.97 (1H, dd, J = 10.0, 3.0 Hz, H-3), 3.44 (3H, s, OCH_3 -4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 78.1 (C-2), 71.5 (C-3), 77.5 (C-4), 132.7 (C-5), 108.9 (C-6), 160.3 (C-7), 103.6 (C-8), 156.6 (C-9), 113.2 (C-10), 131.3 (C-1'), 130.1 (C-2'), 116.0 (C-3'), 158.4 (C-4'), 116.0 (C-5'), 130.1 (C-6'), 57.0 (OCH_3 -4).

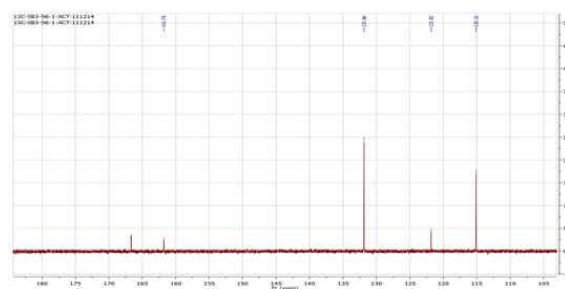
① 4-Hydroxybenzoic acid



NP (CM) = 10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6)

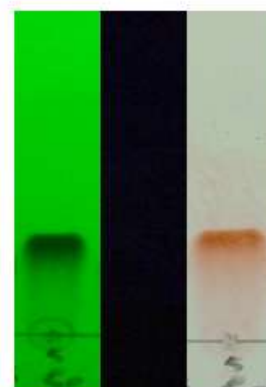
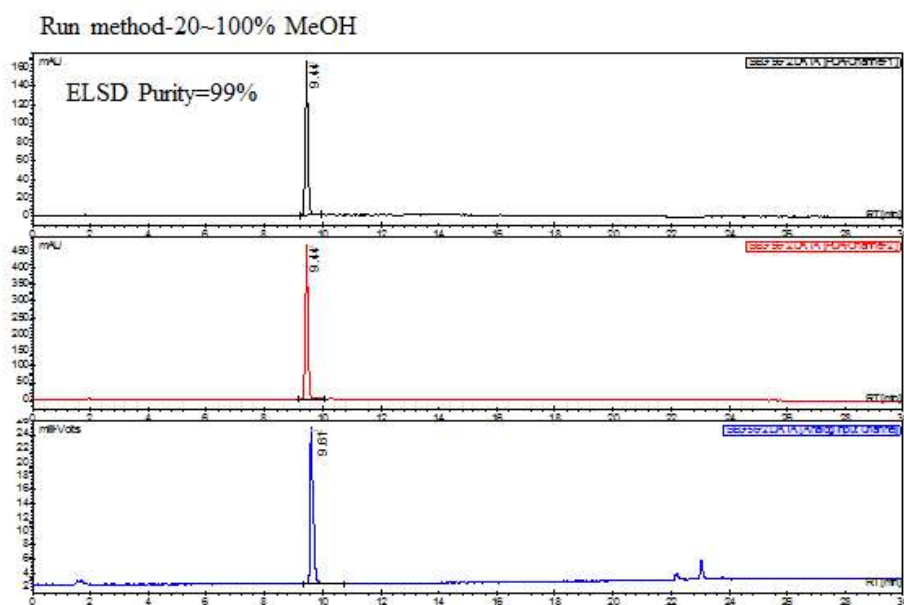
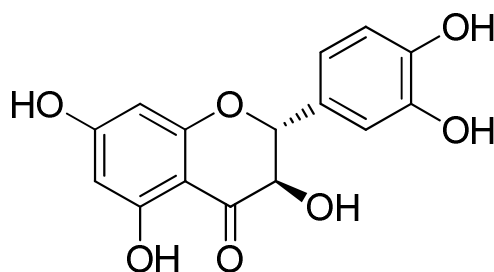


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6)

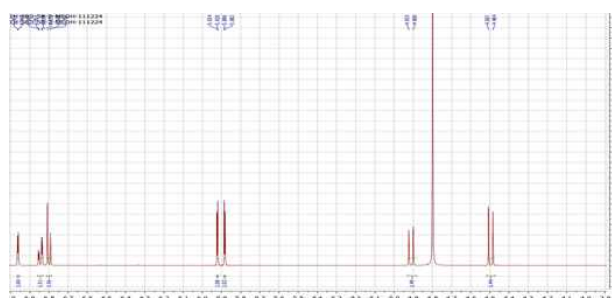
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6): δ 7.90 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2, 6), 8.01 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3, 5)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6): δ 121.8 (C-1), 131.6 (C-2), 115.1 (C-3), 161.7 (C-4), 115.1 (C-5), 131.6 (C-6), 166.6 (C-7)

⑫ *trans*-Taxifolin



NP (C:M) = 10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)

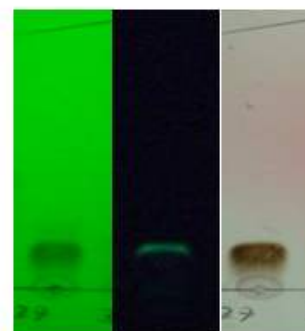
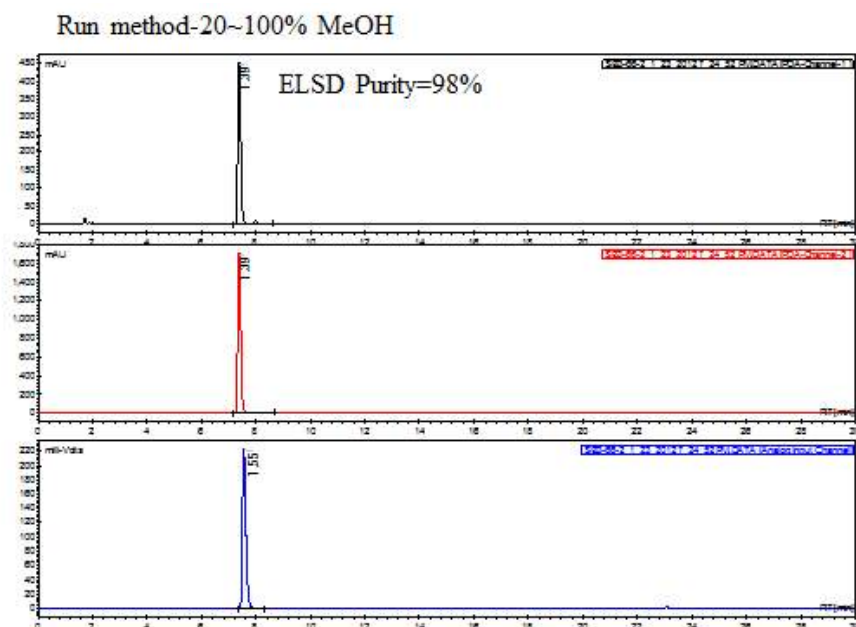
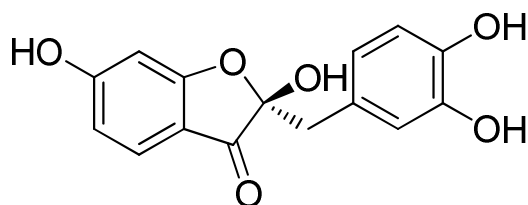


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD)

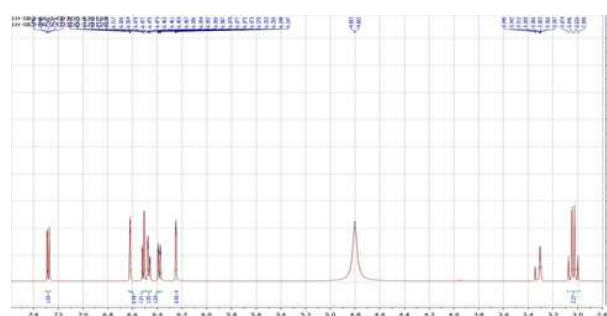
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 6.96 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.84 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 5.92 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.88 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 4.92 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-2), 4.49 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 85.1 (C-2), 73.6 (C-3), 198.1 (C-4), 164.4 (C-5), 97.2 (C-6), 168.6 (C-7), 96.2 (C-8), 165.2 (C-9), 101.8 (C-10), 129.8 (C-1'), 116.0 (C-2'), 146.2 (C-3'), 147.1 (C-4'), 115.8 (C-5'), 120.8 (C-6')

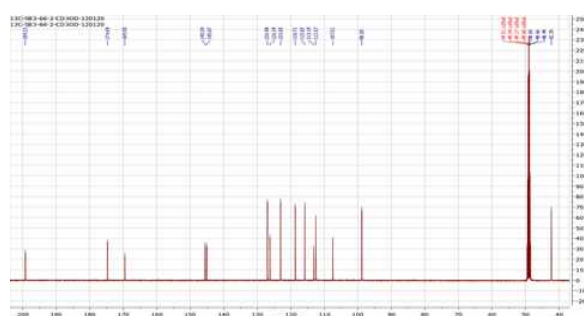
⑬ 2-(3',4'-Dihydroxybenzyl)-2,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one



NP (C:M) = 10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)

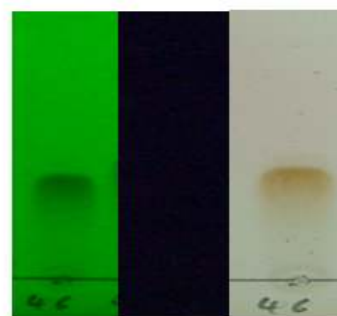
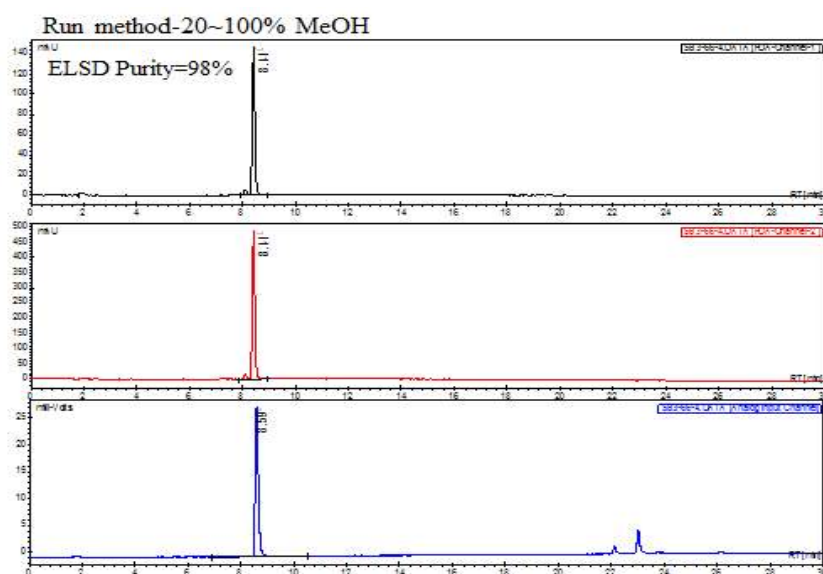
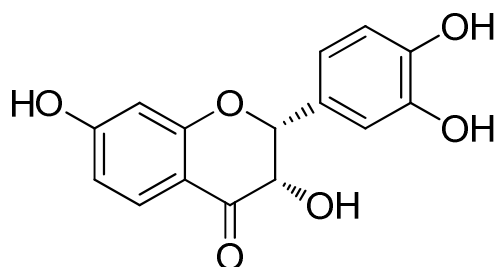


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD)

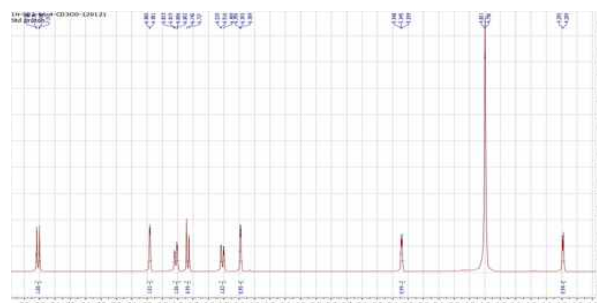
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.28 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-4), 6.62 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.51 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.46 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.38 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-5), 6.25 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-7), 3.03 (2H, d, J = 14.0 Hz, H-10)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 106.1 (C-2), 197.8 (C-3), 125.6 (C-4), 111.8 (C-5), 168.1 (C-6), 97.4 (C-7), 173.3 (C-8), 111.1 (C-9), 40.9 (C-10), 124.9 (C-1'), 117.3 (C-2'), 144.2 (C-3'), 143.6 (C-4'), 114.4 (C-5'), 121.6 (C-6')

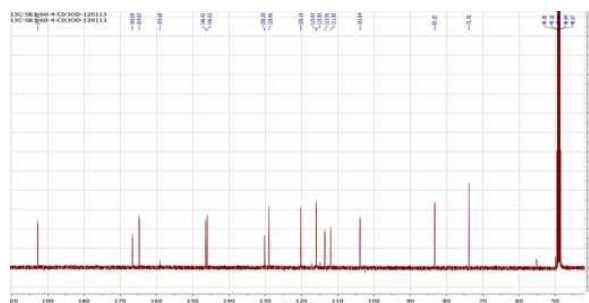
⑭ *cis*-Fustin



NP (C:M) = 10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)

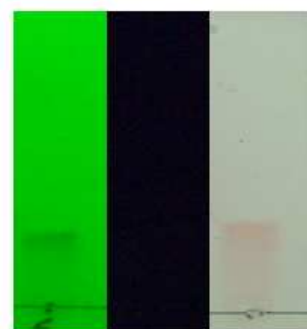
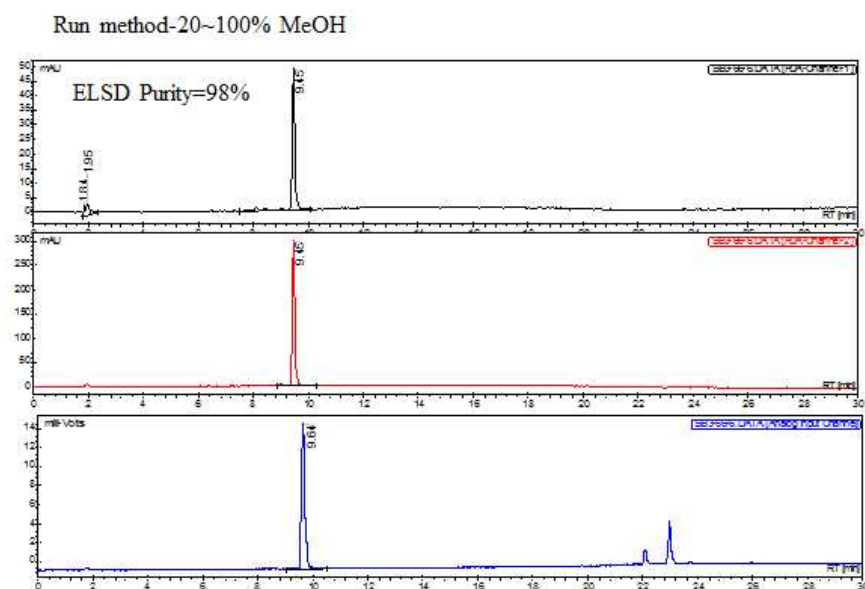
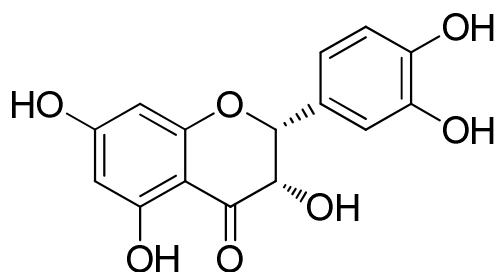


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD)

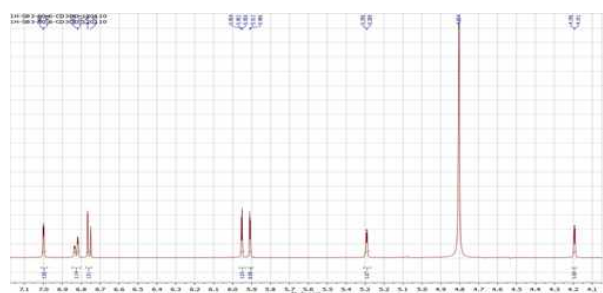
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.70 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 6.98 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 6.82 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-6'), 6.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.50 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6), 6.39 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.34 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-2), 4.29 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 80.8 (C-2), 72.4 (C-3), 191.4 (C-4), 128.7 (C-5), 119.5 (C-6), 165.3 (C-7), 102.4 (C-8), 163.4 (C-9), 112.1 (C-10), 127.5 (C-1'), 114.5 (C-2'), 144.6 (C-3'), 145.4 (C-4'), 114.5 (C-5'), 118.7 (C-6')

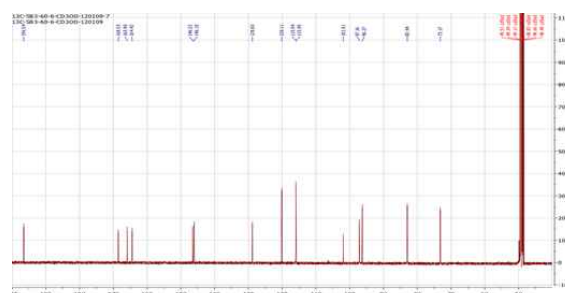
⑮ *cis*-Taxifolin



NP (C:M) = 10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)

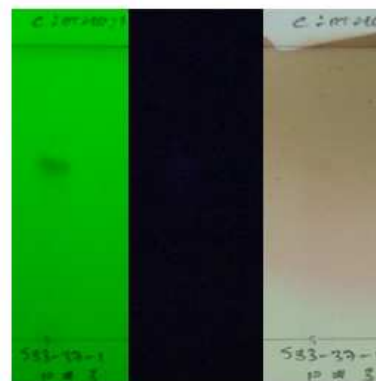
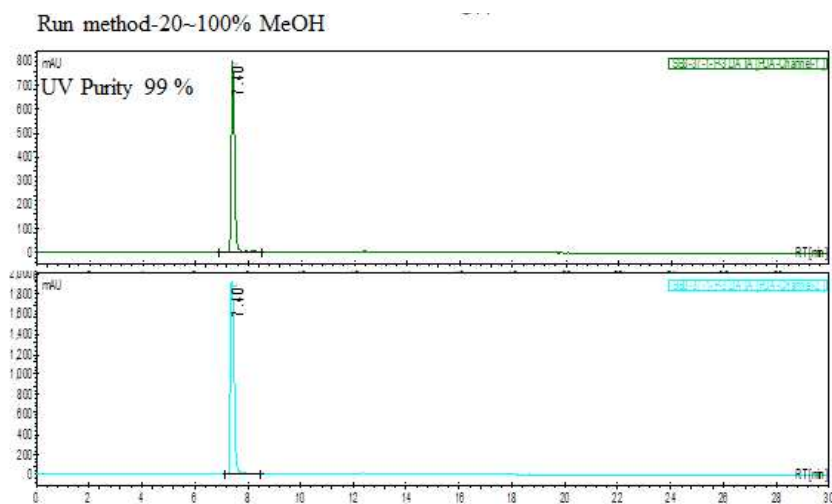
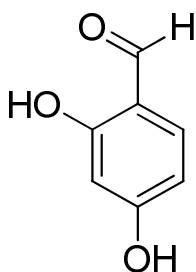


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD)

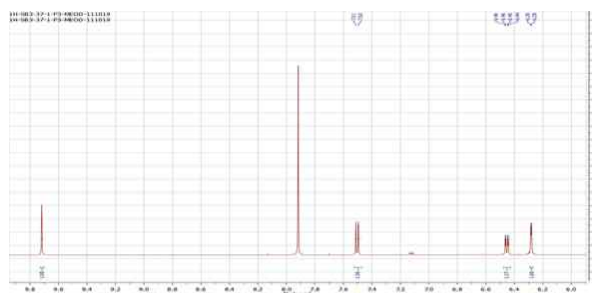
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.10 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.83 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 6.75 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 5.91 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.92 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.29 (1H, d, $J = 2.5$, Hz, H-2), 4.19 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 82.9 (C-2), 73.1 (C-3), 196.7 (C-4), 164.4 (C-5), 97.1 (C-6), 168.5 (C-7), 96.2 (C-8), 165.8 (C-9), 101.9 (C-10), 128.8 (C-1'), 115.9 (C-2'), 146.0 (C-3'), 146.5 (C-4'), 115.8 (C-5'), 120.1 (C-6')

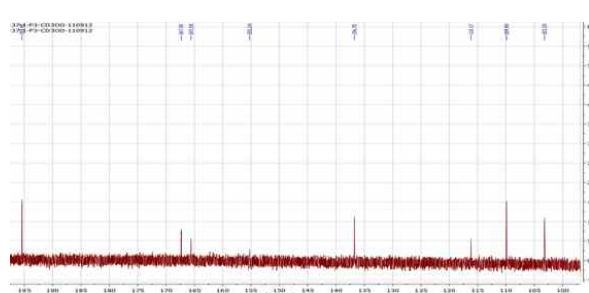
⑩ 2,4-Dihydroxybenzaldehyde



NP (C:M)=10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)

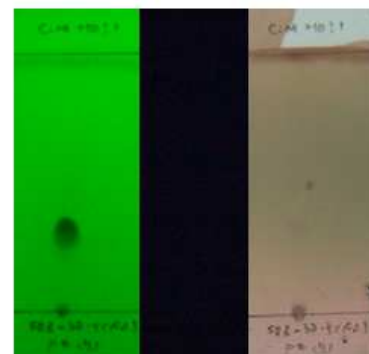
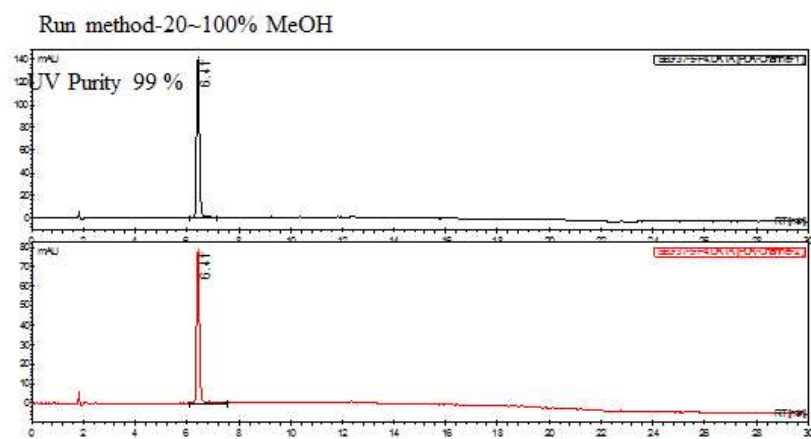
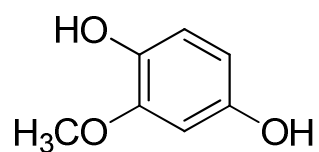


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD)

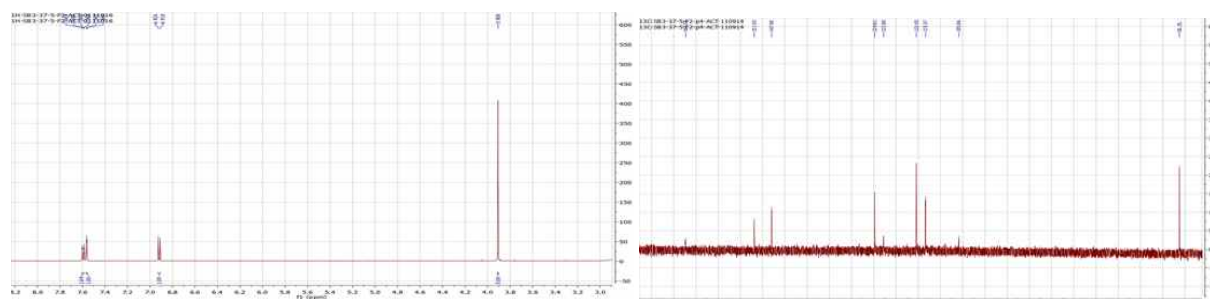
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 9.71 (1H, s, H-7), 7.50 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 6.44 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-5), 6.27 (1H, d, $J = 2.0$, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 116.1 (C-1), 165.5 (C-2), 103.2 (C-3), 167.3 (C-4), 109.9 (C-5), 136.7 (C-6), 195.4 (C-7)

⑰ 2-Methoxybenzene-1,4-diol



NP=CM: 10:1



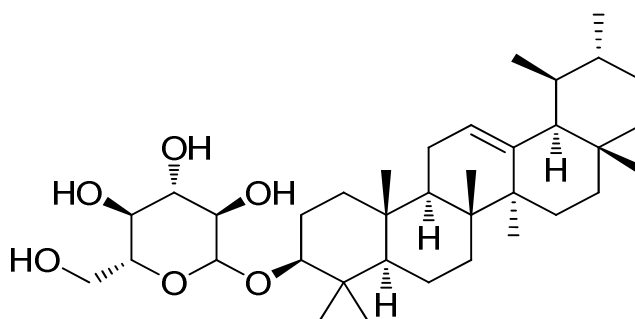
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6): δ 7.59 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-5), 7.56 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-3), 6.91 (1H, d, J = 8.0, H-6), 3.90 (3H, s, OCH₃-2)

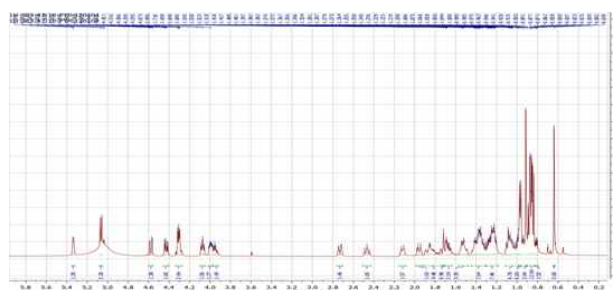
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6): δ 167.5 (C-1), 147.9 (C-2), 124.1 (C-3), 151.9 (C-4), 112.5 (C-5), 114.6 (C-6), 56.2 (OCH₃-2)

⑱ Urs-12-en-18 α H-3 β -O- β -D-glucopyranoside

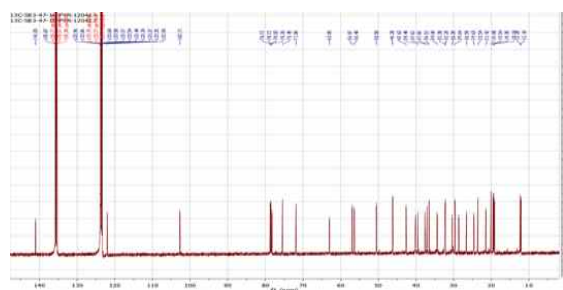


NP (C:M) = 10:1 NP (C:M) = 5:1

UV inactive



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Pyridine- d_6)

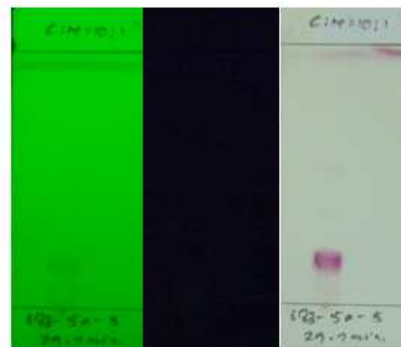
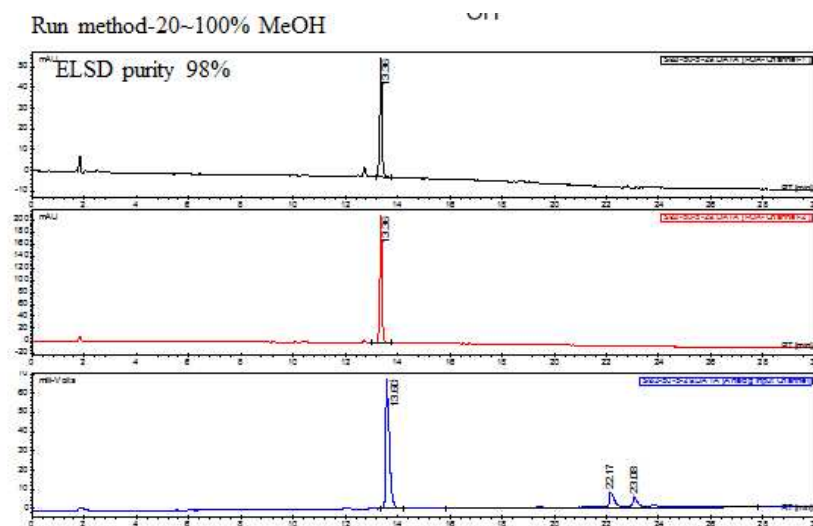
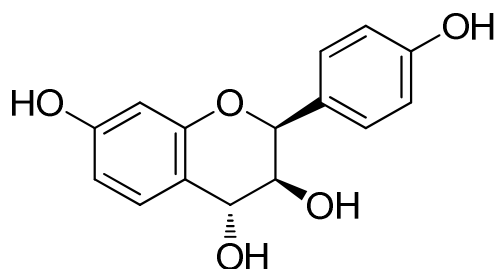


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Pyridine- d_6)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Pyridine- d_6): δ 5.35 (1H, br s, H-12), 5.01 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.57 (1H, dd $J = 12.0, 2.5$ Hz, H-6'), 4.42 (1H, dd, $J = 12.0, 5.0$, H-6'), 0.96 (3H, d, $J = 6.5$, H-29), 0.91 (3H, s, H-26), 0.84 (3H, d, $J = 6.5$, H-30), 0.87 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s H-25), 0.85 (3H, s, H-23), 0.81 (3H, s, H-27), 0.63 (3H, s, H-28).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Pyridine- d_6): δ 37.6 (C-1), 28.6 (C-2), 78.7 (C-3), 37.0 (C-4), 56.9 (C-5), 19.3 (C-6), 32.3 (C-7), 40.1 (C-8), 50.5 (C-9), 36.5 (C-10), 24.6 (C-11), 122.0 (C-12), 141.1 (C-13), 42.6 (C-14), 28.3 (C-15), 26.5 (C-16), 34.3 (C-17), 56.4 (C-18), 39.4 (C-19), 40.1 (C-20), 32.2 (C-21), 42.3 (C-22), 29.6 (C-23), 12.2 (C-24), 12.1 (C-25), 19.1 (C-26), 21.4 (C-27), 24.6 (C-28), 19.5 (C-29), 20.0 (C-30), 102.7 (C-1'), 75.4 (C-2'), 78.2 (C-3'), 71.8 (C-4'), 78.5 (C-5'), 63.0 (C-6').

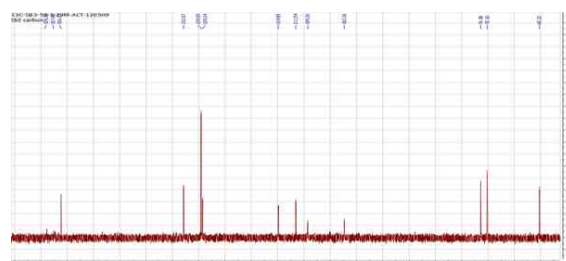
⑲ Guibourtacacidin



NP (C:M)= 10:1



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6)

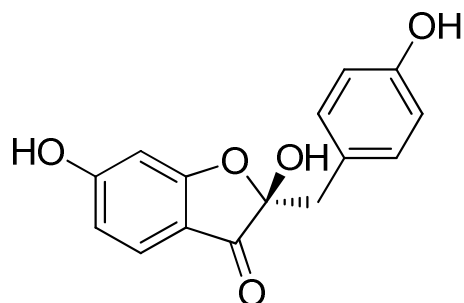


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6)

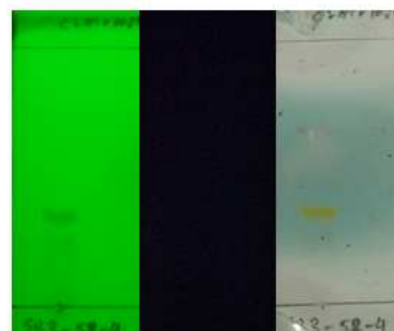
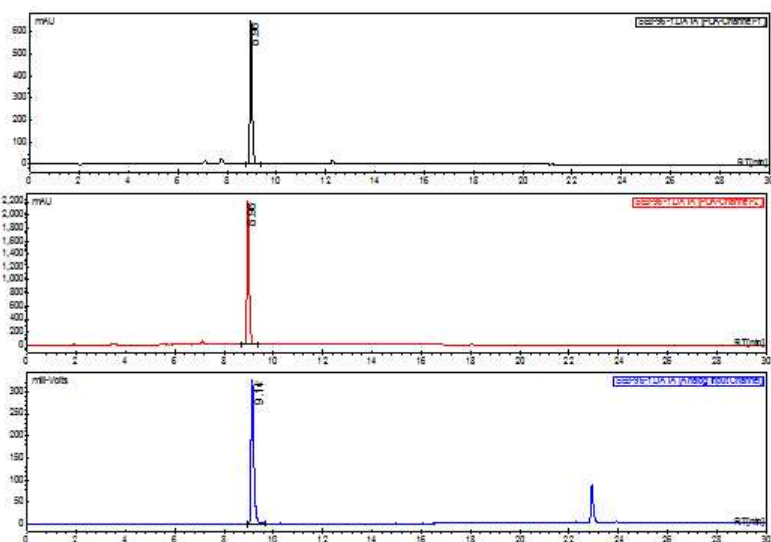
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6): δ 7.33 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2' , 6'), 7.01 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 6.82 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3' , 5'), 6.39 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, H-6), 6.26 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-8), 5.12 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-2), 4.94 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3), 4.51 (1H, dd, $J = 9.0, 4.0$ Hz, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6): δ 66.1 (C-2), 75.1 (C-3), 76.3 (C-4), 132.7 (C-5), 111.4 (C-6), 158.7 (C-7), 102.2 (C-8), 156.1 (C-9), 111.4 (C-10), 129.1 (C-1'), 129.4 (C-2'), 114.7 (C-3'), 157.7 (C-4'), 114.7 (C-5'), 129.4 (C-6').

⑩ 5-Dihydroxy-mesospin



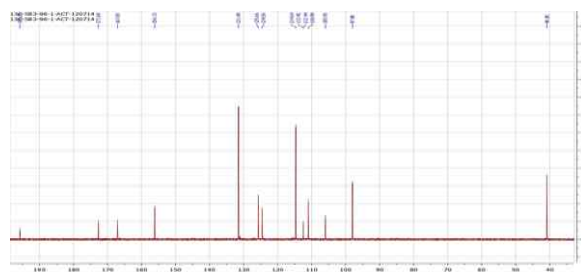
Run method-20~100% MeOH



NP (C:M= 10:1)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6)

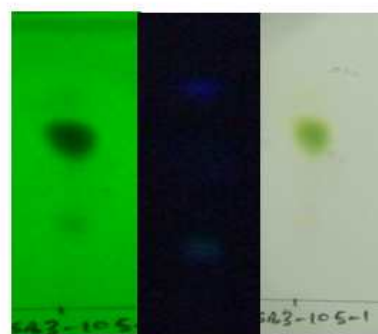
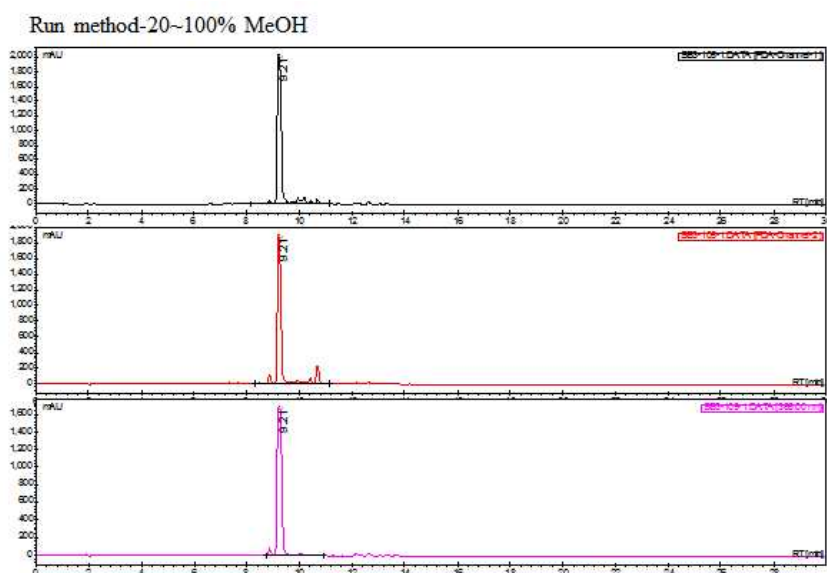
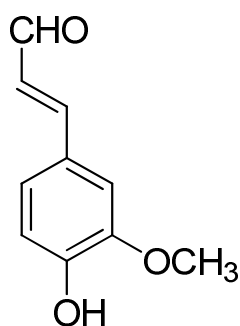


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6): δ 7.28 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-4), 7.02 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2' , 6'), 6.62 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3' , 5'), 6.47 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-5), 6.34 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-7), 3.14 (1H, d, J = 13.5 Hz, Ha-10), 3.10 (1H, d, J = 14.0 Hz, Hb-10).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6): δ 106.0 (C-2), 195.8 (C-3), 132.9 (C-4), 111.0 (C-5), 172.1 (C-6), 97.6 (C-7), 167.2 (C-8), 111.5 (C-9), 40.6 (C-10), 123.8 (C-1'), 131.1 (C-2'), 114.5 (C-3'), 155.8 (C-4'), 114.5 (C-5'), 131.1 (C-6').

② Coniferaldehyde



NP (C:M= 20:1)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6)

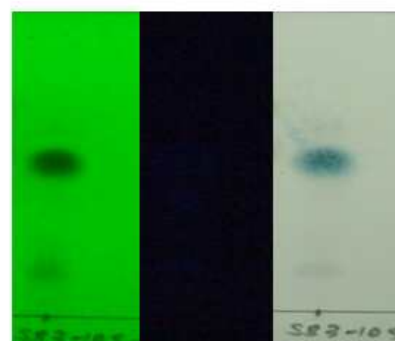
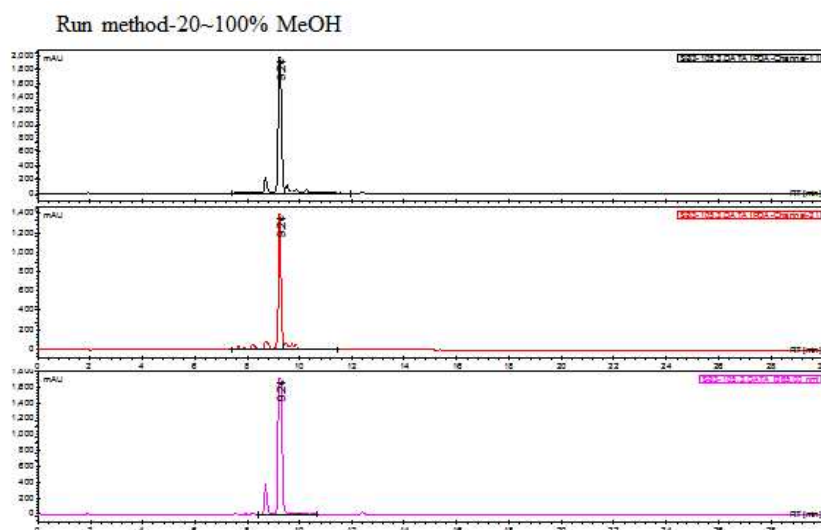
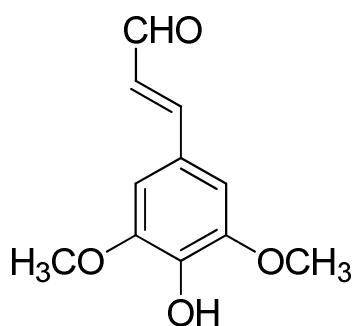


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6)

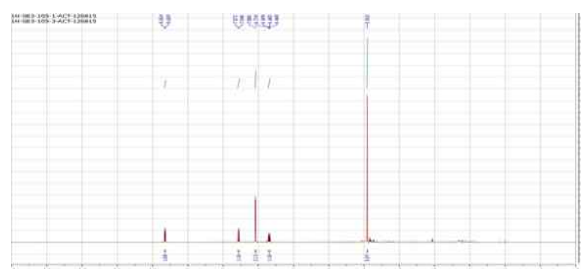
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6): δ 9.64 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-9), 7.57 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-7), 7.38 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2), 7.22 (1H, dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, H-6), 6.93 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.67 (1H, dd, $J = 16.0, 8.0$ Hz, H-8), 3.93 (3H, s, OCH₃-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6): δ 126.6 (C-1) 110.7 (C-2), 150.0 (C-3), 148.0 (C-4), 115.3 (C-5), 123.8 (C-6), 153.1 (C-7), 126.2 (C-8), 192.3 (C-9), 55.5 (OCH₃-3)

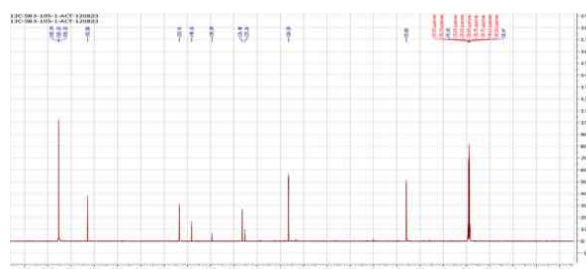
② Sinapaldehyde



NP (C:M= 10:1)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6)

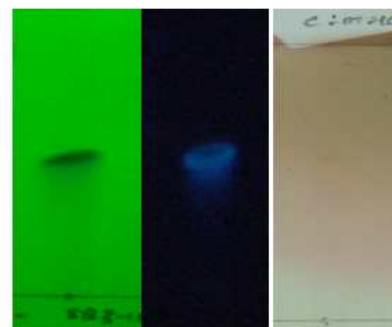
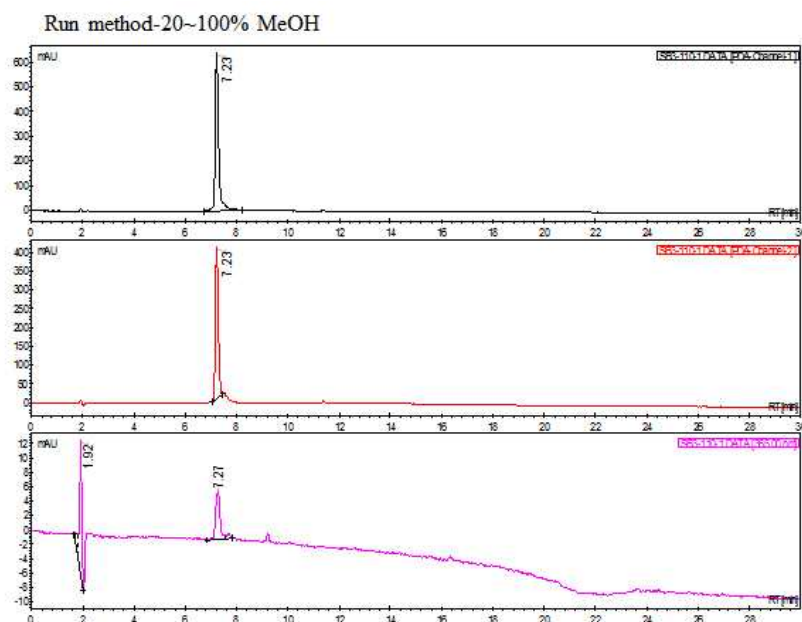
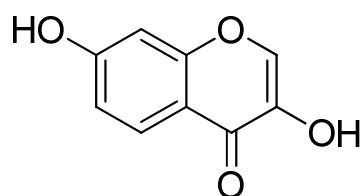


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6): δ 9.64 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-9), 7.57 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-7), 7.08 (2H, s, H-2, H-6), 6.69 (1H, dd, $J = 16.0, 8.0$ Hz, H-8), 3.91 (6H, s, OCH₃-3, 5)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6): δ 126.2 (C-1) 107.4 (C-2), 149.0 (C-3), 140.3 (C-4), 149.0 (C-5), 107.4 (C-6), 154.2 (C-7), 127.3 (C-8), 193.7 (C-9), 56.7 (OCH₃-3, 5)

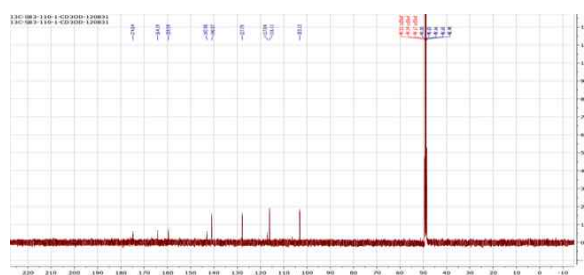
② 3,7-Dihydroxychromen-4-one



NP (C:M= 10:1)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)

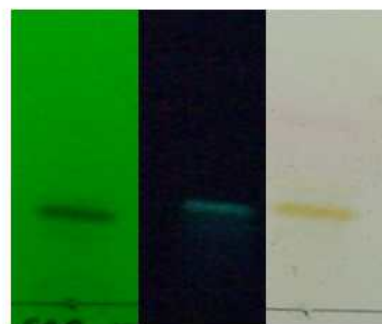
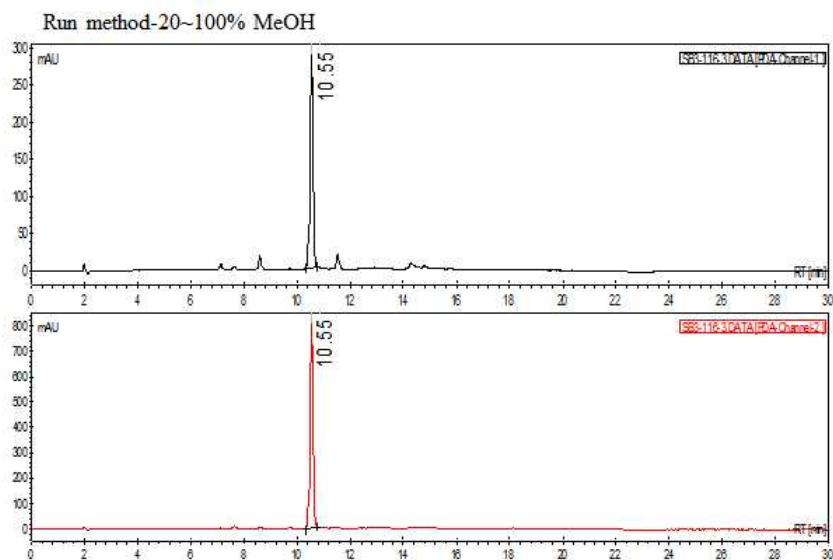
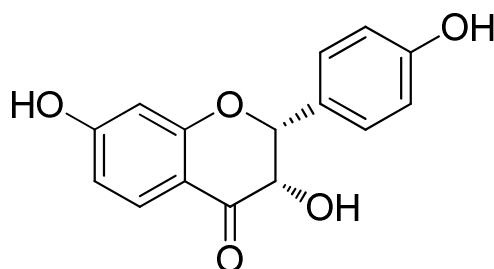


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD)

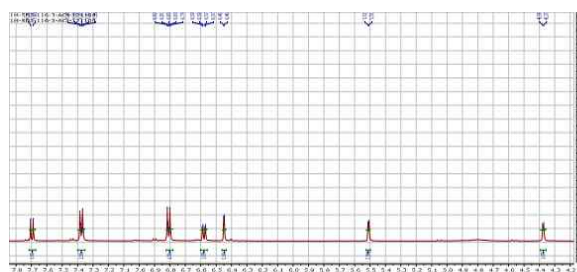
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6): δ 8.01 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5), 7.96 (1H, s, H-2), 6.90 (1H, dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz, H-6), 6.80 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6): δ 72.2 (C-2), 69.9 (C-3), 193.8 (C-4), 130.1 (C-5), 112.1 (C-6), 167.0 (C-7), 103.6 (C-8), 165.5 (C-9), 113.5 (C-10)

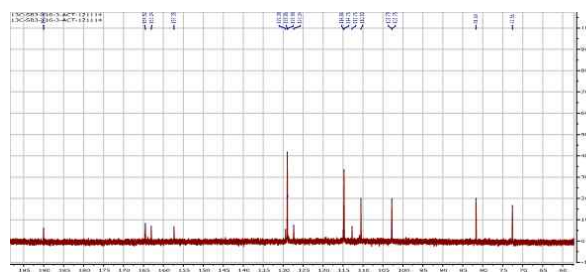
④ *cis*-Garbanzol



NP (C:M= 10:1)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6)



$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.70 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 7.37 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2' , 6'), 6.81 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-3' , 5'), 6.58 (1H, dd, J = 9.0, 2.0 Hz, H-6), 6.45 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-8), 5.51 (1H, d, J = 3.5 Hz, H-2), 4.37 (1H, d, J = 3.5 Hz, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 81.7 (C-2), 72.6 (C-3), 190.0 (C-4), 128.9 (C-5), 110.5 (C-6), 164.5 (C-7), 102.8 (C-8), 163.0 (C-9), 112.8 (C-10), 129.4 (C-1'), 129.0 (C-2'), 114.8 (C-3'), 157.3 (C-4'), 114.8 (C-5'), 129.0 (C-6')

나. 옷나무 생리활성 성분에 대한 HPLC를 이용한 정량법 개발 및 분석법 확립 및 모니터링

(1) 시약 및 재료 (Reagents and Materials)

(가) 재료 (Materials)

본 연구의 대상인 옷나무(*Rhus verniciflua*) 추출물은 생명의 나무에서 제공받았다

(나) 시약 (Reagents)

추출, 분리 및 정량분석에 사용한 methanol, ethanol 및 acetonitrile은 HPLC grade용으로 J.T.Baker (USA)로부터 구입하여 사용하였다. Trifluoroacetic acid는 Samchun Pure Chemical Co. Ltd. (Koera)로부터 구입하여 사용하였으며 Water은 aquaMAXtm-Ultra (영린기기, Korea)를 통과한 탈이온수를 사용하였다.

(다) 표준용액 (Standard preparation)

Fustin의 보존용액을 methanol과 DMSO로 제조한 후 -20°C로 냉동차광보관 하였다. 표준용액 (standard solution)은 사용 직전에 working 농도범위에서 이동상 용매로 계열희석 (serial dilution)하여 사용하였다. 내부표준물질 (4-hydroxybenzaldehyde)은 2 mg/mL로 methanol에 제조하여 희석하여 사용하였다.

(라) 기기 및 장치 (Instrument and apparatus)

분석용 HPLC는 Varian 920LC를 사용하였으며, 칼럼은 YMC-Pack ODS-A (5 um, 150 × 4.6 mm), YMC J' sphere ODS-H80 (4 um, 150 × 4.6 mm), SHISEIDO UG120 (3 um, 150 × 4.6 mm), guard 칼럼은 C18 reverse phase (1.7um, 2.1 X 5 mm)를 사용하였다. 검출기는 UV/VIS를 사용하였고 칼럼 온도는 35°C를 유지하였다.

(마) HPLC 분리

Reversed-phase HPLC의 column은 C18과 이동상은 용매 A (0.05% TFA H₂O) : B (methanol) gradient =0 (B 25%) → 20 (B 25%)를 사용하여 분리 조건으로 실험하였다. 유속 1 mL/min, column 온도 35°C 및 검출기는 UV (279 nm)를 사용하였으며, 주입량은 10 uL였다.

• HPLC analysis condition:	• HPLC mobile phase condition:		
<ul style="list-style-type: none"> • HPLC system: Varian 920 LC • Mobile Phase : MeOH:DW • Column: YMC-Pack ODS-A • I.D: (4.6 × 150 mm., 5 μm) • Mobile phase A: 0.05% TFA in DW <li style="padding-left: 20px;">B: Methanol • Flow rate: 1 ml/min • Injection vol.: Fustin-10 μl, Extract- 10μl • Detection: PDA (279 nm) 	Time (min)	%A	%B
	0	75	25
	20	75	25

(2) 결과

(가) HPLC 분리 (HPLC separation)

본 연구에서는 옷나무의 대표적인 지표성분으로 함량이 가장 많은 Fustin을 대상으로 최적의 분리조건을 탐색하였다(그림 25). 이동상은 용매 A (0.05% TFA H₂O) : B (Methanol) gradient = 0min (B 25%) → 20min (B 25%)로 실험하였으며 chromatogram은 그림에 나타내었다.

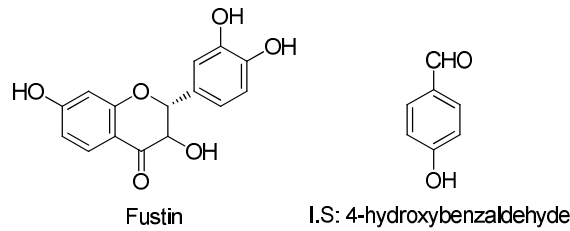


그림 25. 옷나무의 지표 성분과 내부 표준 물질(I.S.)

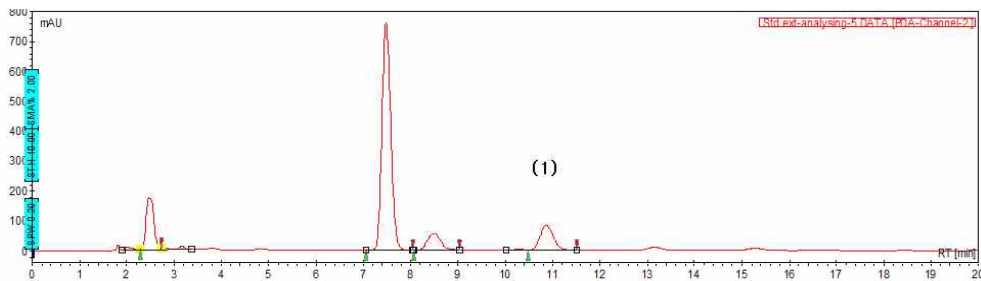


그림 26. 옷나무 70% MeOH 추출물의 LC-UV 크로마토그램

(1) Fustin; (I.S.) 4-hydroxybenzaldehyde.

(나) 표준품의 순도 확인

HPLC를 이용, 순도 실험을 실시하여 1종 성분(Fustin)에 대한 순도를 확인하였다(그림 27). 확인결과 각 표준품의 순도는 99.9%로 측정되었다.

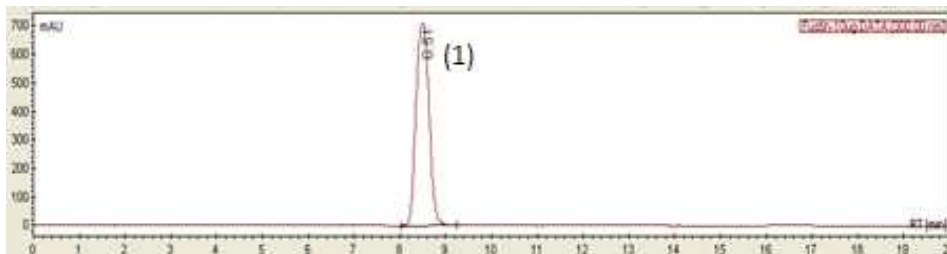


그림 27. 옷나무 유효 성분의 LC-UV 크로마토그램. (1) Fustin

(다) 추출 및 전처리 (Sample extraction and pretreatments)

추출에 미치는 각 parameter를 검토하여 최적조건을 확립하였다. 조건마다 대상 성분을 정량한 결과를 비교하였다.

① 추출용매 (Extraction solvents)

추출용매에 따른 영향은 표 7과 같다. 이들 지표성분의 단시간에 초음파 추출은 70% MeOH의 효율이 다른 용매에 비해 더 높은 결과를 보이므로 본 연구에서는 70% MeOH를 추출용매로 선정하였다.

표 7. 용매에 따른 추출 효율

Extraction solvents	Analytes, content (w/w, %)	
	Fustin	
	Mean	
100 % MeOH	0.61	
70 % MeOH	0.68	
100 % EtOH	0.64	
70 % EtOH	0.64	

Extraction time: sonication 30min; Test sample wt.: 20 mg; solvent volume: 1 mL

② 추출방법 (Extraction methods)

추출방법으로 초음파 추출, 환류 추출 및 진탕법을 비교한 결과는 표와 같다. 각 방법간에 초음파 추출법이 가장 효율적이므로 이 방법을 추출방법으로 선택하였다. 환류 추출법은 60°C에서 검체를 추출하였다.

표 8. 추출 방법에 따른 추출 효율

Extraction solvents	Analytes, content (w/w, %)	
	Gastrodin	
	Mean	
Reflux	0.66	
Sonication	0.68	
Shaking	0.60	

Extraction time: sonication 30 min; reflux 30 min; shaking 30 min

Extracting solvent: 70% MeOH

Test sample w.t.: 20 mg, solvent volume: 1 mL

(라) 분석법 검증 (Validation)

① 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, Range, LOD and LOQ)

각 지표성분의 정량범위는 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도 즉, Fustin(25.0 ~ 1000.0ug/mL)로 표시할 수 있으며, 내부표준물질과의 면적비를 이용한 검량선은 상관계수 $r^2 \geq 0.9989$ 로 양호한 직선성을 나타내었다. 검출한계 (LOD)는 S/N=3을 기준으로 정하였고, 정량한계 (LOQ)는 S/N=10을 나타내는 농도로써 표기하였다. 이 결과는 그림 28과 표 9에 나타내었다.

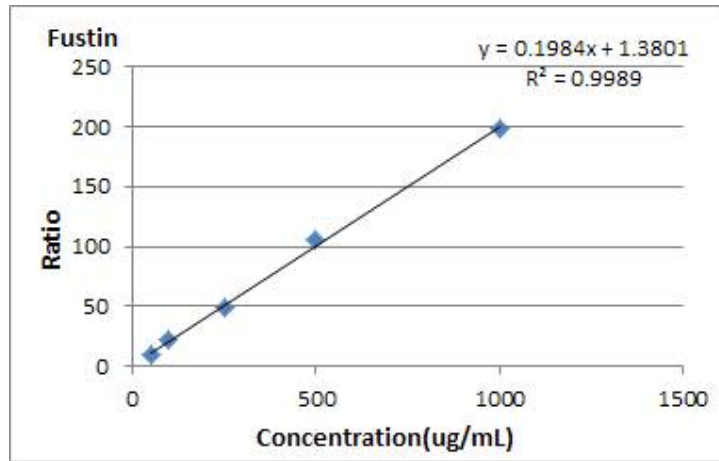


그림 28. Fustin의 calibration curve

표 9. 직선성, 검출 한계, 정량 한계

Analytes	Linear range (ug/mL)	Correlation coefficient	LOD (ug/mL)	LOQ (ug/mL)
Fustin	25.0 ~ 1000.0	0.9989	0.006	0.017

$LOD = 3 \times S/N$; $LOQ = 10 \times S/N$

② 회수율 (Recovery)

균질한 검체 분말을 추출, 원심분리, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물첨가법에 의한 분석결과로부터 구하였다. 일정농도의 Fustin (50.0, 250, 1000.0ug/mL)을 첨가한 3 batch의 검액과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구한 결과는 표 10와 같다.

표 10. 회수율 (n=3)

Compounds	Fortified conc. (ug/mL)	Observed conc. (ug/mL)	Mean Recovery (%)	Recovery RSD (%)
Fustin	0	21.9	-	-
	50.0	75.5	105.0	1.064
	250.0	275.9	101.5	0.601
	1000.0	1044.0	102.2	0.636

③ 특이성과 선택성 (Specificity and Selectivity)

특이성은 분석성분이 시료 중에 포함되어 있는 다른 내인성 성분들(matrix, 불순물, 분해 산물, 유연물질 등)이나 외인성 성분으로부터 분석에 방해 받지 않고 분명하게 구별할 수 있는 정도를 나타내는데 본 분리조건에서 background 성분으로부터 잘 분리되는 결과를 나타내었다.

④ 재현성 (Repeatability)

Peak 면적의 측정 재현성(repeatability)은 표 11과 같이 모든 성분이 RSD 0.25% 이내로 우수하였으며, 머무름시간(RT)의 재현성도 장기간의 실험기간 중 일간 및 일내 RSD는 0.72% 이내로 우수하였다.

표 11. Peak 면적, 머무름시간의 재현성 (n=5)

Compounds	Peak area ratio (peak area/IS area)			Retention time (min)		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
Fustin	1.47	0.003	0.250	10.43	0.007	0.718

⑤ 정밀성 및 정확성 (Precision and Accuracy)

전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과 값으로부터 계산하였으며 그 결과는 표 과 같다. 정확성은 표준물 첨가법에서 실제 첨가한 표준물의 spike 량과 표준물 첨가법에 따라 분석한 결과 값의 차이 (bias)로 표시하였다.

표 12. 정밀성 및 정확성 (n=5)

Compounds	Spiked conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day (n=3)				Inter-day (n=3)			
		Observed conc. ($\mu\text{g/mL}$)	SD	Precision RSD (%)	Accuracy (%)	Observed Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	SD	Precision RSD (%)	Accuracy (%)
Fustin	50.0	45.8	1.950	2.126	91.7	47.5	3.373	3.547	95.1
	250.0	250.7	1.413	1.409	100.3	249.1	2.915	2.926	99.6
	1000.0	991.5	0.250	0.252	99.2	995.0	0.977	0.982	99.5

⑥ 완전성 (Robustness)

완전성은 HPLC column에 따른 영향, 이동상 용매 조건변화, 유기첨가제 영향, pH 변화, 완충용액의 이온강도 변화, 칼럼온도 및 gradient 조건의 변화 등을 임의적으로 약간씩 변화를 주었을 때 분리인자의 변화 정도를 나타내는데 (HPLC column and desired temperature \pm 5°C) 본 연구에서는 검토한 결과는 다음 표 13과 같다.

표 13. 온도에 따른 분리 효율 (n=3)

	Temp. (°C)	Analytes
		Fustin
<i>Theoretical plate (N)</i>	30	3602.12±179.65
	35	2590.69±173.07
	40	3701.57±273.54
<i>Capacity factor (k')</i>	30	3.27±0.00
	35	3.01±0.03
	40	2.73±0.00
<i>Separation factor (α)</i>	30	1.65±0.00
	35	1.61±0.00
	40	1.52±0.00
<i>Resolution (Rs)</i>	30	7.08±0.11
	35	5.18±0.07
	40	4.53±0.07

표 14. 컬럼 종류에 따른 분리 효율 (n=3)

Columns	Column size (mm)	Particle size (µm)	Analytes
			Fustin
<i>Theoretical plate (N)</i>			
SHISEIDO UG120	150 X 4.6	3.0	2431.46±178.27
YMC J'sphere ODS-H80	150 X 4.6	4.0	1733.03±184.50
YMC-Pack ODS-A	150 X 4.6	5.0	3602.12±179.65
<i>Capacity factor (k')</i>			
SHISEIDO UG120	150 X 4.6	3.0	2.09±0.00
YMC J'sphere ODS-H80	150 X 4.6	4.0	3.34±0.00
YMC-Pack ODS-A	150 X 4.6	5.0	3.27±0.00
<i>Separation factor (α)</i>			
SHISEIDO UG120	150 X 4.6	3.0	1.74±0.00
YMC J'sphere ODS-H80	150 X 4.6	4.0	1.47±0.00
YMC-Pack ODS-A	150 X 4.6	5.0	1.65±0.00
<i>Resolution (Rs)</i>			
SHISEIDO UG120	150 X 4.6	3.0	5.44±0.11
YMC J'sphere ODS-H80	150 X 4.6	4.0	3.09±0.08
YMC-Pack ODS-A	150 X 4.6	5.0	4.53±0.07

*gradient = 0min (B 25%) → 20 (B 25%)

⑦ 시스템적합성 (System suitability)

본 분석법에서 시스템 적합성은 표 15와 같다.

표 15. 시스템 적합성, (n=3)

Compounds	<i>N</i>	<i>k'</i>	α	<i>R_s</i>
Fustin	3602.12±179.65	3.27±0.00	1.65±0.00	4.53±0.07

⑧ 안정성 (Stability of analytes)

본 분석법에서 표준품의 용액에 대한 안정성은 표 과 같다. Fustin 표준품에 대하여 냉동차광, 냉장차광과 상온차광에서 Solvent(water)에서의 안정성에 관하여 30일간 실험한 결과 4개의 표준품 모두 냉동차광, 냉장차광 및 상온차광 보관에서 RSD(%)가 2.2% 이하로 안정한 결과를 나타내었다.

표 16. 안정성 시험 (n=3)

Compounds	Temp. (°C)	Day								Mean n=3	SD	RSD %
		0	1	2	3	5	10	15	30			
Fustin	상온차광	99.2	101.1	100.5	100.4	102.4	103.7	102.2	101.3	101.3	1.398	1.379
	냉장차광	99.8	99.1	101.5	102.9	105.0	102.2	104.3	102.1	102.1	2.021	1.979
	냉동차광	99.7	97.9	102.6	101.4	104.5	102.0	104.2	101.8	101.8	2.203	2.164

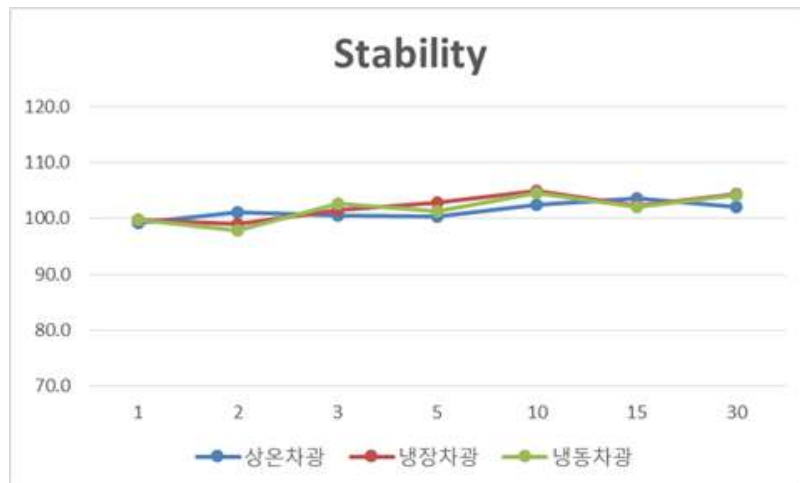


그림 29. Fustin 안정성

(마) 옷나무의 지표성분의 함량분석 (Analytical results)

본 분석법을 사용하여 여러 추출물에서 Fustin의 함량을 분석한 결과는 표 17과 같다.

표17. Fustin 함량 분석

Name	Fustin 함량
2010년 11월 12일 추출물	14.42 %
2010년 12월 22일 추출물	15.72 %
2011년 1월 5일 추출물	15.75 %
2011년 5월 20일 추출물	16.43 %
2013년 6월 21일 추출물 (덱스트린 첨가)	8.99 %
2013년 7월 4일 추출물 (덱스트린 첨가)	4.98 %
2013년 7월 2일 추출물 (동결건조)	18.00 %
2013년 7월 4일 추출물 (동결건조)	15.49 %
표준 추출물	3.15%

1-3절. 옷나무 추출물의 갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구(1핵심 3세부)

1. 임상시험 계획

가. 임상시험용 건강기능식품

임상시험에 사용되는 건강기능식품의 성분, 함량, 제형 등은 다음과 같다.

	시험식품	시험식품	대조식품
일반명	옷나무 추출물	옷나무 추출물	위캡슐(placebo)
제품명(코드명)	MU-3 500	MU-3 1000	MU-3 위캡슐
원료약품 및 분량	1캡슐 중 MU-3 125mg 함유	1캡슐 중 MU-3 250mg 함유	1캡슐 중 MU-3 위캡슐 250mg 함유(옥수수분말)
성상 및 제형	황토색의 분말이 들어 있는 타원형 캡슐	황토색의 분말이 들어 있는 타원형 캡슐	황토색의 분말이 들어 있는 타원형 캡슐
저장방법	실온보관, 차광기밀용기	실온보관, 차광기밀용기	실온보관, 차광기밀용기

(1) 임상시험에 사용되는 건강기능식품의 생산, 포장, labeling 및 저장

임상시험용 건강기능식품은 임상시험 의뢰자인 “(주)생명의 나무” 에서 제조하여 시험식품과 대조식품 모두 1일 8캡슐(1회 4캡슐, 1일 2회)을 5주(Visit windows 포함)복용 분량인 280캡슐씩 포장하여 아래 예시(약사법 시행규칙 제 75조 6항에 준함)와 같은 라벨을 부착하고 임상시험 실시기관의 시험 담당자에게 공급한다. 시험식품 또는 대조식품으로 생산되는 제제는 각각 외형 및 성상이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않아야 하며, 중량 차이도 크지 않아야 한다. 시험 담당자는 임상시험용 건강기능식품의 수령사실 및 수량을 서면으로 확인하고 서명해야 하며, 안전한 장소인 분당 서울대병원 임상연구실 내의 잠금장치가 있는 약품보관함에 취급·보관하여야 한다.

임 상 시 험 용			
▶	제품의 코드 명:	MU-3 500 또는 MU-3 1000 또는 MU-3 위캡슐	
▶	제 조 번 호:		
▶	사용(유효)기한 또는 재검사일자:	년	월 일
▶	저 장 방 법:		
▶	제 조 업 자:	(주)생명의 나무	
▶	임상시험 외의 목적으로 사용할 수 없습니다.		

나. 대상질환

갱년기 증후군

다. 대상 피험자

(1) 선정기준

(가) 대상 피험자 선정기준은 선별기간 시점이다.

- ▶ 남성갱년기 증상 설문(AMS)의 점수가 27점 이상으로 갱년기 증상을 호소하고, 총 콜레스테롤 농도가 180~299mg/dL이고 약물을 복용하지 않는 만 40세 이상의 남성
- ▶ 폐경이 확인되고, 여성갱년기 증상 지수 설문(KI)의 점수가 15점 이상으로 갱년기 증상을 호소하고, 총 콜레스테롤 농도가 180~299mg/dL이고 약물을 복용하지 않는 만 45세 이상의 여성

[폐경은 아래의 1가지라도 만족하는 경우 진단하였다.]

- ① 12개월간의 자연적인 무월경
- ② 혈청 Estradiol(E2) 농도가 30pg/ml 이하, FSH 농도가 40mIU/ml 이상이고, 6개월간 자연적인 무월경이 있는 경우
- ③ 양측난소절제술 후 최소 6주가 경과한 경우
- ④ 자궁절제술을 받았을 경우 최소 6주가 경과하고 혈청 FSH 농도가 40mIU/ml 이상인 경우

▶ 본 임상시험의 개요를 설명 받고 본 시험의 동의서에 서명한 자

[총 콜레스테롤 농도가 180~299mg/dL이고 약물을 복용하지 않는 피험자 선정기준의 근거]

- ①곽정현, 김지영, 김혜진, 신동혁, 이종호. 폐경 후 여성에서 이소플라본과 감마 리놀렌산의 보충 섭취가 혈중 지질 농도 및 갱년기 증상에 미치는 영향. 한국영양학회지. 2010;43(2)123-131.

(2) 제외기준

(가) 대상 피험자 제외 기준은 선별기간 시점이다.

* 과거 및 현재 병력

- ▶ 알코올 중독 또는 약물 남용의 병력이 있는 자
- ▶ BMI 45 이상의 비만증인 자
- ▶ ALT, AST, Total bilirubin, Alkaline Phosphatase 검사치가 정상 상한치의 2.5배 이상 높은 간기능 장애자
- ▶ B형간염 항원의 의심 또는 양성 반응을 보이는 자
- ▶ 신부전 병력이 있거나 Serum Creatinine 검사치가 정상 상한치의 30% 이상 높은 신기

능 장애자

- ▶ 6개월 이내에 심근경색증, 심부전, 뇌경색, 뇌출혈, 협심증 등의 병력이 있었던 자
- ▶ 다음의 기저질환이 확인된 자 : 조절되지 않는 고혈압(고혈압 약물 복용 후에도 수축기 혈압 > 140mmHg 및 이완기혈압 > 90mmHg), 제 1형 당뇨병 및 인슐린 치료를 받는 당뇨병 환자, 악성종양, 결핵, 천식, 녹내장, 다발성경화증, 정신병의 소견을 보이는 우울증, 양극성 정서장애, 정신분열증, 치매, 지방간, 약물성/알코올성 간염, 간경화증, 만성 신부전증, 거식증, 이상식욕항진, 간질
- ▶ 시험제품에 대한 과민 반응력이 있는 자
- ▶ 5년 이내에 암(cancer)의 병력이 있는 자
- ▶ 병용약물로 인해 심각한 약물 상호작용의 위험성이 있는 자
- ▶ 갑상선기능저하증, 쿠싱증후군 등 체중에 영향을 미칠 수 있는 내분비질환 병력이 있는 자
- ▶ 3개월 이내에 식욕억제제, 식욕완화제, 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬, 암페타민, 싸이프로헵타딘, 페노다이아진 등의 약물을 복용한 경험이 있는 자
- ▶ 심인성 갱년기 장애를 동반한 자
- ▶ 6개월 이내에 호르몬 대체요법을 시행했거나 시행중인 자
- ▶ 뇌졸중 또는 일시적인 허혈성 심장마비의 병력이 있는 자
- ▶ 체중감량을 위해 외과적 수술(위성형, 장관절제술 등)을 받은 경험이 있는 자

* 기타

- ▶ 의학적, 정신적으로 연구약물 복용의 금기 사항을 가지는 자
- ▶ 법적으로 임상시험에 참가가 불가능한 자
- ▶ 현재 본 임상시험 이외에 연구개발 중인 다른 시험에 참가하고 있거나, 시험 전 4주 이내에 타 임상시험에 참여하였던 자
- ▶ 본 임상시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 연구자가 판단하여 시험을 진행할 수 없다고 판단되는 자

라. 목표한 피험자 수 및 그 근거

시험식품 투여군이 대조 투여군에 비해 갱년기 증상과 혈청 지질개선의 우월함을 증명하고 효과적으로 개선시키는 용량을 찾아내기 위해, 총 216명[MU-3 500 시험식품군 72명(남자 36명, 여자 36명), MU-3 1000 시험식품군 72명(남자 36명, 여자 36명), 대조식품군 72명(남자 36명, 여자 36명)]의 피험자를 모집한다. 이는 유효성 평가에서 제외되는 피험자의 비율(non-evaluable rate)을 15%로 가정한 상황이다.

<산출 근거>

▶ 남자

Effects of Testosterone on Muscle Strength, Physical Function, Body Composition, and Quality of Life in Intermediate-Frail and Frail Elderly Men : A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study에서 Aging Male Symptoms 점수가 대조군 17 ± 5.3 점, 시험군 13 ± 4.2 점으로 확인된 연구 결과로 군간의 차와 분산추정치를 예상하였다.

$$H_0 : \mu_1 - \mu_2 \leq \delta \quad vs \quad H_1 : \mu_1 - \mu_2 > \delta$$

μ_1 : 대조군의 평균

μ_2 : 시험군의 평균

δ : 군간 차이

σ_δ^2 : 분산 추정치

$\alpha = 0.05, Z_{1-\alpha/2} = 1.960$

$\beta = 0.15, Z_{1-\beta} = 1.036$

$$\sigma_\delta^2 = \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} = \frac{((132 - 1) \times 5.3^2) + (130 - 1) \times 4.2^2}{(132 + 130 - 2)} = 22.91$$

$$n \geq \frac{2(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 \sigma_\delta^2}{\delta^2} = \frac{2(1.96 + 1.036)^2 \times 22.91}{4^2} = 25.71$$

▶ 여자

Black Gohosh and St. John's Wort(GYNO-Plus®) for Climacteric Symptoms에서 Kupperman Index 점수가 대조군 19.6 ± 11.1 점, 시험군 12.5 ± 7.0 점으로 확인된 연구 결과로 군간의 차와 분산추정치를 예상하였다.

$$H_0 : \mu_1 - \mu_2 \leq \delta \quad vs \quad H_1 : \mu_1 - \mu_2 > \delta$$

μ_1 : 대조군의 평균

μ_2 : 시험군의 평균

δ : 군간 차이

σ_δ^2 : 분산 추정치

$\alpha = 0.05, Z_{1-\alpha/2} = 1.960$

$\beta = 0.15, Z_{1-\beta} = 1.036$

$$\sigma_\delta^2 = \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} = \frac{((35 - 1) \times 11.1^2) + (42 - 1) \times 7.0^2}{(35 + 42 - 2)} = 82.64$$

$$n \geq \frac{2(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 \sigma_\delta^2}{\delta^2} = \frac{2(1.96 + 1.036)^2 \times 82.64}{7.1^2} = 29.43$$

<참고문헌>

① Srinivas-Shankar U, Roberts SA, Connolly MJ, O'Connell MD, Adams JE, Oldham JA, Wu FC. Effects of Testosterone on Muscle Strength, Physical Function, Body Composition, and Quality of Life in Intermediate-Frail and Frail Elderly Men : A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(2):639-650.

② Chung DJ, Kim HY, Park KH, Jeong KA, Lee SK, Lee YI, Hur SE, Cho MS, Lee BS, Bai SW, Kim CM, Cho SH, Hwang JY, Park JH. Black Cohosh and St. John's Wort(GYNO-Plus®) for Climacteric Symptoms. Yonsei Med J. 2007;48(2):289-294.

따라서 표본산정은 남자에서는 각 군당 26명 정도가 적당할 것으로 산정되었으며, 여자에서는 각 군당 30이 적당할 것으로 산출되었다. 최종 표본 산정은 두 가설을 모두 확인하기 위해 그룹별 30명 정도가 적당할 것으로 산정되었으나, 예상 탈락률을 15%로 고려하여 $30/(1-0.15)$ 로써 그룹별 36명[MU-3 500 시험식품군 72명(남자 36명, 여자 36명), MU-3 1000 시험식품군 72명(남자 36명, 여자 36명), 대조식품군 72명(남자 36명, 여자 36명)]으로 총 216명의 대상자들을 선정하였다.

마. 임상시험 기간

임상시험 승인일로부터 20개월

바. 임상시험 방법

(1) 임상시험의 설계

본 임상시험은 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 연구로 시행한다. 피험자는 총 216명[MU-3 500 시험식품군 72명(남자 36명, 여자 36명), MU-3 1000 시험식품군 72명(남자 36명, 여자 36명), 대조식품군 72명(남자 36명, 여자 36명)]으로 이루어져 있으며, 본 연구에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 피험자를 선정하고 필요한 임상검사 및 설문을 받는다. Visit 2에 선정 및 제외기준에 적합한 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 시험식품군(그룹 A, 그룹 B)과 대조식품군(그룹 C)으로 배정한다. 무작위 배정된 피험자는 시험식품 또는 대조식품을 1회 4캡슐, 1일 2회, 총 4주간 복용한다. Visit 3에서 임상시험용 건강기능식품을 수거하고, Visit 2에 배정된 시험식품 또는 대조식품을 재처방 받아 1회 4캡슐, 1일 2회, 총 4주간 복용한다(표 18).

표 18. 임상시험 계획도

Screening Period	Double-blind treatment period		
Visit 1 -7d (-1wk)	Visit 2 1d (0wk+7)	Visit 3 28d (4wk±7)	Visit 4 56d (8wk±7)
선별 검사 가능성시험 준비단계 1) 약 1주일간의 금주 및 일반적 영양 섭취, 운동요법 등 실험참가 중 주의사항 교육	1. 무작위 배정 그룹 A, 그룹 B, 그룹 C 등 세 집단으로 난수표를 활용한 무작위 배정 2. 임상(trial) 그룹 A : MU-3 500 섭취 후 검사 시행 그룹 B : MU-3 1000 섭취 후 검사 시행 그룹 C : MU-3 위캡슐 섭취 후 검사 시행		

(2) 임상시험에 사용되는 식품 배분방법(무작위 배정(Randomization))

무작위 배정표는 임상시험 시작 전에 임상시험 수탁기관인 “크로벤CRO” 에서 작성하였으며, 무작위 배정방법은 restricted block randomization 방법을 적용하였고 SPSS의 균등분포에 따른 난수 발생을 이용한 프로그램을 통하여 실시한다. 시험자에게 임상시험 시작 시점에 무작위배정 봉투를 각각 개별로 봉합된 상태로 전달한다. 임상시험계획서에서 제시된 선정 및 제외 기준을 만족한 피험자는 그룹 A, 그룹 B, 그룹 C에 각각 무작위로 배정하여 Visit 2와 Visit 3에 처방 받는다.

사. 임상시험 진행

(1) 임상시험 진행 일정표

임상시험의 진행 일정표는 다음과 같다(표 19).

표 19. 임상시험 진행 일정표

관찰항목	Screening ¹	Double-blind treatment period		
	Visit 1 -7d (-1wk)	Visit 2 1d (0wk+ 7)	Visit 3 28d (4wk±7)	Visit 4 56d (8wk±7)
피험자 방문 ²	√	√	√	√
서면동의 및 Baseline Number 부여	√			
인구학적, 병력 및 치료력 조사	√			
폐경 여부 검사(여성의 경우 Estradiol, FSH)	√			
Total cholesterol 평가 및 약물복용 여부	√			
활력 징후, 신체검사 및 측정	√	√	√	√
임상실험실 검사	√	√	√	√
심전도(ECG)	√			√
남성갱년기 증상 설문(AMS) 조사	√	√	√	√
여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 조사	√	√	√	√
Lipid parameters		√	√	√
Hormone parameters		√	√	√
Osteoporosis & Osteoarthritis parameters		√	√	√
국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 조사		√	√	√
선정/제외 기준 판정 ³	√			
Randomization Number 부여 및 무작위배정		√		
임상시험용 건강기능식품 처방		√	√	
반납약 회수 및 순응도 평가 ⁴			√	√
병용약물 확인	√	√	√	√
이상반응 평가		√	√	√
식사 및 운동요법 교육	√	√	√	√

[Note]

* 모든 임상시험은 계획된 진행 일정표를 따른다. 단, 부득이한 사정 때문에 정해진 방문일에 방문하지 못할 경우를 대비하여 피험자의 복약 순응도를 유지하고 치료효과의 정확한 판정을 위하여 예비식품을 추가로 배부한다. 또한 남성과 여성으로 구분하지 않은 검사는 모든 피험자에게 실시한다.

¹ 스크리닝 방문 절차는 여러 방문에 걸쳐 시행할 수 있다.

² 피험자는 가급적 공복 상태여야 하고, 오전 방문을 권장한다.

방문일 오차범위 : V2는 +7일(V1 기준), V3은 ±7일(V2 기준), V4는 ±7일(V2 기준)

또한, 여러 가지 사유로 임상시험 기간을 완료하지 않은 피험자는 시험 중단 시점에서 Visit 4(종료 방문)의 모든 절차를 시행해야 하며, 종료 방문(Visit 4) 페이지 및 임상시험 종료 페이지의 기록이 완료되어야 한다.

³ 피험자의 선정/제외 기준 판정은 Screening period 최종 결과로 판단한다.

⁴ 반납약 회수 시에는 모든 미사용 임상시험용 건강기능식품, 사용/미사용 용기도 같이 반납을 받고, 복약 순응도는 아래와 같이 계산한다. 소수점 둘째 자리에서 반올림하여 소수점 첫째 자리까지 기록한다.

$$\text{복약 순응도 (\%)} = \frac{\text{방문 전까지 복용한 수량}}{\text{방문 전까지 복용하여야 할 수량}} \times 100$$

(2) 관찰항목, 임상검사 항목

방문시마다 임상실험실 검사와 유효성 평가변수 측정(Kit 사용 포함)을 위해 최소 11ml(Visit 1)에서 최대 13ml(Visit 2 ~ Visit 4)의 채혈을 실시하게 되고, 10ml(Visit 1 ~ Visit 4)의 소변검사를 진행한다.

(가) Visit 1 : -7d (-1wk)

- ① 피험자 방문 및 서면 동의서 취득
- ② Baseline Number(이하 BN) 부여
- ③ 인구학적, 병력 및 치료력 조사
- ④ 활력징후, 신체검사 및 계측
 - ㉠ 활력징후 : 혈압, 맥박, 체온
 - ㉡ 신체검사 : 영양상태, 소화기계, 피부/점막, 근골격계, 이비인후계, 갑상선, 호흡기, 심혈관계, 대사/내부비계, 비뇨생식기계, 신경/정신계, 척추/사지 종양
 - ㉢ 신체 계측 : 키, 체중, 체질량지수
- ⑤ 임상실험실 검사
 - ㉠ 일반혈액검사 : Hematocrit, Hemoglobin, RBC, WBC, Platelet count, Differential Count(Neutrophil, Eosinophil, Basophil, Lymphocyte, Monocyte), MCV, MCH, MCHC
 - ㉡ 혈청생화학검사 : Fasting plasma glucose, AST, ALT, Total Bilirubin, Creatinine, BUN, Alkaline Phosphatase, Albumin, Total protein
 - ㉢ 뇨검사 : PH, SG, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Nitrite, Blood, Leukocyte
 - ㉣ 혈청검사 : HBsAg test (Visit 1에서만 실시)
- ⑥ 폐경 여부 검사(여성의 경우 Estradiol, FSH)
[폐경은 아래의 1가지라도 만족하는 경우 진단하였다.]
 - ㉠ 12개월간의 자연적인 무월경
 - ㉡ 혈청 Estradiol(E2) 농도가 30pg/ml 이하, FSH 농도가 40mIU/ml 이상이고, 6개월간 자연적인 무월경이 있는 경우
 - ㉢ 양측난소절제술 후 최소 6주가 경과한 경우
 - ㉣ 자궁절제술을 받았을 경우 최소 6주가 경과하고 혈청 FSH 농도가 40mIU/ml 이상인 경우
- ⑦ Total cholesterol 평가 및 약물복용 여부

Total cholesterol 농도가 180~299mg/dL이고 약물을 복용하지 않는 경우 임상시험에 참여 가능하다.

⑧ 남성갱년기 증상 설문(AMS, 남성의 경우) 조사

남성갱년기 장애의 진단 및 선별검사로서 AMS 설문지를 통해 평가한다. 정신적 증상 5문항, 신체적 증상 7문항, 성적 증상 5문항 등 총 17문항으로 구성되어 있다. 모든 항목은 증상 없음(1점), 가벼움(2점), 보통(3점), 심함(4점), 매우 심함(5점)으로 정량화하여 총점 27점 이상인 경우를 양성으로 판정하며, 증상 정도에 따라 17~26점은 증상 없음(No), 27~36점은 가벼운 정도(mild), 37~49점을 중간정도(moderate), 50점 이상을 심한정도(severe)로 구분한다. Visit 1 기준 2주 이내의 AMS 설문 평가 자료가 있는 경우 재 측정하지 않아도 된다.

⑨ 여성갱년기 증상 지수 설문(KI, 여성의 경우) 조사

여성갱년기 증상의 진단 및 선별검사로서 KI 설문지를 통해 평가한다. 안면홍조, 감각이상, 불면증, 신경과민, 우울증, 현기증, 허약(피로), 관절통/근육통, 두통, 가슴 두근거림(심계항진), 의주감(피부에 개미가 기는 느낌) 등 총 11문항으로 구성되어 있다. 모든 항목은 증상 없음(0점), 가벼움(1점), 보통(2점), 심함(3점)으로 정량화하고 여기에 가중치(1점, 2점, 4점)를 부여한 후 합산하여 총점 15점 이상인 경우를 양성으로 판정하며, 증상 정도에 따라 15~19점은 경증, 20~35점은 중증, 35점 이상을 심한정도(severe)로 구분한다. Visit 1 기준 2주 이내의 KI 설문 평가 자료가 있는 경우 재 측정하지 않아도 된다.

⑩ 심전도(ECG) 검사

⑪ 병용약물 확인

⑫ 선정 및 제외 기준 판정

⑬ 식사 및 운동요법 교육

(나) Visit 2 : 1d (0wk+7, Visit 1 기준)

Visit 2 시점에 검사한 활력징후, 신체검사, 임상실험실 검사, 유효성 평가변수 측정 결과 등은 임상시험용 건강기능식품 투여 후 검사에 대한 기저치(Baseline)로 이용된다.

① Randomization Number(이하 RN) 부여

② 활력징후, 신체검사 및 계측

③ 임상실험실 검사

④ 유효성 평가변수 측정

㉠ 남성갱년기 증상 설문(AMS, 남성의 경우) 조사

㉡ 여성갱년기 증상 지수 설문(KI, 여성의 경우) 조사

㉢ Lipid parameters : Total cholesterol, HDL-C, LDL-C, Triglyceride, Apo-A1, Apo-B, hsCRP, 동맥경화지수(Atherogenic index, $\{(Total\ cholesterol - HDL\ cholesterol) / HDL\ cholesterol\}$ 계산공식을 통해 구한다.)

㉣ Hormone parameters

㉑ (남성의 경우) Total Testosterone, Free Testosterone

㉒ (여성의 경우) FSH

㉓ Osteoporosis parameters : C-Telopeptide, Osteocalcin

㉔ Osteoarthritis parameters : COMP (Kit 이용)

㉕ circulatory system parameters : systolic blood pressure, diastolic blood pressure

㉖ 국제 발기기능 지수 설문(IIIEF, 남성의 경우) 조사 : 국제 발기기능 지수 설문(IIIEF) 조사를 통한 평가로서 발기력 6문항(1,2,3,4,5,15번), 성교시 만족감 3문항(6,7,8번), 절정감 2문항(9,10번), 성적 욕구 2문항(11,12번), 성생활 만족감 2문항(13,14번) 등 총 15문항으로 구성되어 있다. 모든 항목은 0점에서 5점 또는 1점에서 5점으로 정량화하였다.

⑤ 임상시험용 건강기능식품 처방

⑥ 병용약물 확인

⑦ 이상반응 평가

⑧ 식사 및 운동요법 교육

(다) Visit 3 : 28d (4wk±7, Visit 2 기준)

① 활력징후, 신체검사 및 계측

② 임상실험실 검사

③ 유효성 평가변수 측정

④ 임상시험용 건강기능식품 처방

⑤ 반납약 회수 및 순응도 평가

⑥ 병용약물 확인

⑦ 이상반응 평가

⑧ 식사 및 운동요법 교육

(라) Visit 4 : 56d (8wk±7, Visit 2 기준)

Visit 4 시점에 검사한 활력징후, 신체검사, 임상실험실 검사, 유효성 평가변수 측정 결과 등은 임상시험용 건강기능식품 투여 후 검사에 대한 최종 평가시점(endpoint)로 이용된다.

① 활력징후, 신체검사 및 계측

② 임상실험실 검사

③ 심전도(ECG) 검사

④ 유효성 평가변수 측정

⑤ 반납약 회수 및 순응도 평가

⑥ 병용약물 확인

⑦ 이상반응 평가

⑧ 식사 및 운동요법 교육

(마) Unscheduled Visit

임상시험 진행 중 시험 책임자가 이상약물반응이나 중대한 이상반응이라고 판단할 증상을 피험자가 호소하는 경우 또는 그밖에 필요한 경우에는 정규 방문 이외에 unscheduled visit을 할 수 있다. 시험 책임자는 피험자에 대하여 활력징후, 신체검사 및 계측, 임상실험실 검사, 심전도(ECG) 검사, 남성갱년기 증상 설문(AMS, 남성의 경우) 조사, 여성갱년기 증상 지수 설문(KI, 여성의 경우) 조사, 국제 발기기능 지수 설문(IIEF, 남성의 경우) 조사, Lipid parameters 평가, Hormone parameters 평가, Osteoporosis parameters 평가, Osteoarthritis parameters 평가, 병용약물 확인, 이상반응 평가 등 필요하다고 판단되는 검사를 시행할 수 있고, 해당 내용을 증례기록서에 기록한다.

(3) 관찰검사 방법

(가) 유효성 평가

설문 조사를 제외한 모든 유효성 평가변수는 결과 분석의 객관성 유지를 위하여 중앙검사실에 의뢰하여 측정한다. 단, 오전 방문(공복상태)을 권장하여 가급적 비슷한 시간대에 검체를 채취하고, 되도록 빨리 수거를 하도록 한다.

남성갱년기 증상 설문(AMS), 여성갱년기 증상 지수 설문(KI), 국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 등의 구조화된 설문지는 자기기입식 방법을 통하여 이루어지며, 설문조사가 완료되면 합계점수를 파악하고 증례기록서에 정확하게 옮겨 적도록 하며, 전자의무기록(EMR)에도 기록을 남긴다. 설문조사를 완료한 설문지는 근거문서로 보관하며, 증례기록서와 전자의무기록(EMR)에 확인 서명을 한다.

① 일차 유효성 평가변수 측정 : 남성갱년기 증상 설문(AMS) 조사, 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 조사, Lipid parameters 측정

② 이차 유효성 평가변수 측정 : Hormone parameters 측정, Osteoporosis parameters 측정, Osteoarthritis parameters 측정(Kit 이용), circulatory system parameters 측정, 국제 발기기능 지수 설문(IIEF, 남성의 경우) 조사

(나) 안전성 평가

이상반응은 정기적/비정기적 문진, 활력징후, 신체검사, 임상실험실 검사 등을 통해 평가한다. 피험자의 상태는 임상시험 참여 동의서 취득 이후부터 모니터링 및 평가하며, 문진은 피험자가 상태를 설명할 수 있는 방법으로 한다(예: ‘지난 번 방문 이후로 어떻습니까?’).

① 활력징후 : 혈압, 맥박, 체온

피험자는 최소 5~10분간 앉은 자세로 안정을 시킨 후에 측정하되, 혈압은 매번 동일한 팔에서 측정한다. 피험자는 조용한 환경에서 발을 바닥에 편평하게 펴고, 등을 의자에 대고

앉아 팔을 탁자 위나 다른 지지대 위에 올려놓아 cuff 중앙이 심장높이와 같도록 한다.

② 신체검사 및 계측 : 이학적 검사, 키, 체중, 체질량지수

㉠ 신체검사 : 영양상태, 소화기계, 피부/점막, 근골격계, 이비인후계, 갑상선, 호흡기, 심혈관계, 대사/내분비계, 비뇨생식기계, 신경/정신계, 척추/사지 종양 등을 확인한다.

㉡ 신체 계측 : 키, 체중, 체질량지수를 계측하여 소수점 둘째자리에서 반올림하여 첫째자리까지 기록한다.

- 키 : 신발은 벗은 채로, 무릎을 펴고 머리를 똑바로 한 상태에서 시선을 앞으로 향하게 한 후 측정한다. 모든 방문시 동일한 신장계로 측정해야 한다.

- 체중 : 실내복을 입고, 신발은 벗고, 소변을 본 상태에서 측정한다. 모든 방문시 동일한 체중계로 측정해야 한다.

- 체질량지수 : 체중(kg)을 키(m)의 제곱으로 나눈 값(체중/(키)²)으로 계산한다.

③ 임상실험실 검사

일반혈액검사, 혈청생화학검사, 뇨검사, 혈청검사 등을 중앙검사실에 의뢰하여 측정하며, 모든 검사는 가급적 공복상태에서 시행한다.

아. 중지 및 탈락기준

임상시험을 진행하는 동안 임상시험계획서를 위반하였음이 알려진 경우, 시험 책임자는 가능한 빨리 임상시험 의뢰자인 (주)생명의 나무에게 위반 사실을 알려야 하며, 해당 피험자가 임상시험을 지속해야 할지, 중단해야 할지를 결정해야 한다. 임상시험을 중지 및 탈락 할 경우, 시험 중단 시점에서 최종방문(Visit 4)에 계획된 모든 검사를 실시하는 것을 원칙으로 하며, 그 원인이 증례기록서(최종 방문 페이지 및 임상시험 종료 페이지)와 피험자 진료차트에 자세하게 기록되어야 한다.

무작위 배정되었거나 임상시험용 건강기능식품을 투여 받았지만 어떤 이유에서든 본 임상시험 전 기간에 참여할 수 없는 피험자는 탈락으로 분류된다. 또한 피험자가 요구하거나 시험 책임자가 피험자를 탈락해야 된다고 판단될 경우에는 어느 시기든 관계없이 피험자는 탈락 가능하며 안전성 평가 대상에 포함된다.

다음 경우에 1가지라도 해당하는 피험자는 중지 및 탈락될 수 있다.

- ▶ 피험자 또는 대리인의 시험 중지요구
- ▶ 이상반응 발생 (중대한 이상반응 포함)
- ▶ 피험자의 불순응
- ▶ 병용금지 식품 또는 약물을 복용
- ▶ 기타 연구자의 판단

자. 병용요법 및 병용금지 약물

임상시험 참가 당시 이미 받고 있던 치료나 복용하는 식품 및 임상시험 기간 중 추가되는 치료는 병용요법으로 간주하며, 병용투여 할 필요가 있는 경우에는 투여 내역을 증례기록서와 피험자 진료차트에 기록(가능하면 성분명 기재)해야 하며 가능한 한 시험기간 중에는 병용요법을 변경하지 않는다.

시험기간 중 병용약물의 투여는 최소화해야 하며 피험자의 복지를 위해 필요하고 또 임상시험용 건강기능식품에 영향을 주지 않는다고 판단될 경우에만 시험 책임자의 판단에 따라 투여할 수 있다. 즉, 필요한 경우 시험 책임자의 판단에 따라 필요한 약제를 병용투여 할 수 있다. 그러나 임상시험기간 중에는 다른 건강기능식품을 섭취해서는 안 된다.

의문 사항이 있을 경우는 임상시험모니터요원과 상의한다. 임상시험 진행 중 본 임상시험의 목적에 위배되지 않는 외과적 수술을 시행하는 경우에도 이를 증례기록서의 이상반응 페이지에 기록한다.

차. 예측 부작용 및 사용상의 주의사항

(1) 금기

중증의 간장 또는 신장 및 심장기능 장애자

(2) 예측 부작용 및 과량투여 시 처치

식품의약품안전청으로부터 “식품일반(웃나무)에 대한 공통기준 및 규격”을 통과하여 승인을 받은 식품원료인 웃나무 추출물은 동물실험에서 과량투여 시 황색뇨의 배출, 일반혈액검사 및 혈청생화학적 검사에서 일부 수치의 증가가 관찰되었으나 용량의존적인 결과를 보이지 않았으며, 임상례에서 관찰된 부작용은 없다. 또한, 모동물의 일반증상, 체중, 사료섭취량, 부검소견 및 장기중량에 있어서 시험물질의 투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다. 모동물의 제왕절개시 시험물질의 영향으로 인정되는 소견은 관찰되지 않았다. 태자의 내부장기 및 골격 관찰시 시험물질에 기인한 기형, 변이 및 골화지연은 관찰되지 않았다.

인체를 대상으로 한 과량복용시의 증상에 대해서는 알려진바 없으나, 과량투여로 인하여 독증상이 나타나는 경우에는 일반적인 해독요법을 실시한다.

(3) 일반적 주의

(가) 간기능이상은 시험 책임자에게서 확인되어야 하며, 투약기간 중 효소수치를 정기적으로 관찰하고 만일 수치가 높아진 경우에는 투여를 중지한다.

(나) 시험 책임자에게서 확인되어진 병용요법을 실시하는 경우, 각 사용약품의 설명서를 숙지한다.

(4) 상호작용

이 임상시험용 건강기능식품의 작용기전은 아직 알려지지 않았기에 다른 식품과의 상호작용에 대한 정보는 없다.

카. 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법(통계분석방법)

(1) 유효성 평가기준

유효성에 대한 자료는 ITT(intention to treat) 분석법과 PP(per protocol) 분석법의 두 가지 형태로 분석된다. ITT 분석법은 임상시험에 등재되어 1회 이상 임상시험용 건강기능식품을 복용하고, 최소한 1회 이상 유효성 평가가 실시된 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함한다. 이때 어떤 시점에서 결측치가 발생되면 발생한 시점을 기준으로 가장 최근에 얻은 자료를 해당시점에서 얻어진 것처럼 처리하는 LOCF(Last Observation Carried Forward) 방법을 적용한다. PP 분석법은 임상시험에서 중도 탈락한 경우와 복약 순응도가 70% 미만인 피험자를 제외한 계획서순응 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함한다. 유효성에 대한 자료는 ITT 분석법 및 PP 분석법을 모두 사용하여 분석하며, 유효성 평가변수에 대한 최종판정은 PP 분석법으로 실시한다.

(2) 유효성 평가방법

(가) 일차 유효성 평가변수

기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 남성갱년기 증상 설문(AMS), 여성갱년기 증상 지수 설문(KI), Lipid parameters [Total cholesterol, HDL-C, LDL-C, Triglyceride, Apo-A1, Apo-B, hsCRP, 동맥경화지수(AD)] 의 변화를 통한 평가이다.

(나) 이차 유효성 평가변수

- ① 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 Hormone parameters [㉠ (남성의 경우) Total Testosterone, Free Testosterone ㉡ (여성의 경우) FSH] 의 변화
- ② Osteoporosis parameters [C-Telopeptide, Osteocalcin] 의 변화
- ③ Osteoarthritis parameters [COMP] 의 변화
- ④ circulatory system parameters[systolic blood pressure, diastolic blood pressure] 의 변화
- ⑤ 국제 발기기능 지수 설문(IIEF, 남성의 경우)을 통한 평가

(3) 통계분석방법

(가) 인구학적 정보 및 기타 치료 전 특성

본 임상시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 임상시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용하였으며, 임상시험용 건강기능식품 복용 후 전화 또는 방문에 의하여 시험자가 안전성 관련 데이터를 최소한 1회 이상 확인한 모든 피험자를 대상으로 인구학적 정보

(연령, 신장, 체중 등) 및 기타 임상시험용 건강기능식품 투여 이전에 실시한 검사치에 대하여 연속형 변수에 대해서는 독립표본 t-검정(independence samples t-test) 또는 분산분석(ANOVA)을 실시하고, 범주형 변수에 대해서는 카이제곱 검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 실시하여 세 군을 비교한다.

(나) 유효성 자료의 분석(Statistical Analysis of Efficacy Data)

시험식품 투여군이 대조식품 투여군에 비해 개선효과의 우월함과 용량결정을 위해 카이제곱 검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)과 독립표본 t-검정(independence samples t-test) 또는 분산분석(ANOVA)을 통하여 분석한다.

다. 부작용을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법

(1) 안전성 평가기준

본 임상시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 임상시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용하였으며, 임상시험용 건강기능식품 복용 후 전화 또는 방문에 의하여 시험자가 안전성 관련 데이터를 최소한 1회 이상 확인한 모든 피험자를 대상으로 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사 결과, 임상적 이상반응 발현상황, 약물 복용력 등을 종합하여 평가한다.

(2) 안전성 평가대상 및 평가방법

(가) 활력징후 및 신체계측, 임상실험실 결과는 각 방문 시점별 평균 및 표준편차 등의 기술통계량과 임상시험용 건강기능식품 복용 전후 변화량으로 기술하고, 각 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test) 또는 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, 치료 전후 비교는 짝지은 표본 t-검정(paired samples t-test) 또는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 분석한다.

(나) 신체검사 결과는 각 방문별로 증례 수를 계산하여 카이제곱검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석한다.

(다) 임상시험 전반에 걸쳐 발생한 이상반응에 대하여는 신체기관별로 구분해서 증례 수를 계산하여 카이제곱검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석한다. 또한 발생한 이상반응을 중증도, 투약과의 관련여부별로 증례수를 산출하고 카이제곱검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석한다.

(라) 약물 복용력은 임상시험 기간 동안 임상시험용 건강기능식품 이외에 피험자가 복용한 모든 약물을 기록하고, 기록된 약물은 계열별로 분류하여 평가한다.

(3) 안전성 보고 방법

(가) 정의

- ① “이상반응(Adverse Event, 이하 AE)“이라 함은 임상시험용의약품을 투여 받은 피험자에서 발생한, 바람직하지 않고 의도되지 않은 증후(sign, 예; 실험실적 검사치의 이상), 증상(symptom), 질병을 말하며, 해당 임상시험용의약품과 반드시 인과관계를 가져야 하는 것은 아니다.
- ② “이상약물반응(Adverse Drug Reaction, 이하 ADR)” 이라 함은 임상시험용의약품의 임의의 용량에서 발생한, 모든 유해하고 의도되지 않은 반응으로서, 임상시험용의약품과의 인과관계를 배제할 수 없는 경우를 말한다.
- ③ “중대한 이상반응/이상약물반응(Serious AE/ADR)” 이라 함은 임상시험에 사용되는 의약품의 임의의 용량에서 발생한 이상반응 또는 이상약물반응 중에서 다음 항목의 어느 하나에 해당하는 경우를 말한다.
 - ㉠ 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우
 - ㉡ 입원 또는 입원 기간의 연장이 필요한 경우
 - ㉢ 지속적 또는 의미 있는 불구나 기능 저하를 초래하는 경우
 - ㉣ 선천적 기형 또는 이상을 초래하는 경우
 - ㉤ 기타 의학적으로 중요한 상황
- ④ “예상하지 못한 이상약물반응(Unexpected Adverse Drug Reaction)” 이라 함은 이용가능한 의약품 관련 정보(예를 들어 임상시험자 자료집 또는 의약품의 첨부문서)에 비추어 이상약물반응의 양상이나 위해의 정도에서 차이가 나는 것을 말한다.

(나) 이상반응의 기록

임상시험 중 발생하는 모든 이상반응을 기록하는 것은 시험 책임자와 시험 담당자의 의무이다. 이상반응은 의학 진단 용어로 기록하여야 하며, 이것이 불가능한 경우 시험 책임자 또는 시험 담당자가 관찰하거나, 피험자가 보고한 증상 및 징후에 대한 용어를 기록하여야 한다.

(다) 심각한 정도의 평가

이상반응의 중증도는 아래와 같이 3단계로 분류하여 평가한다.

- ① 경 중(Mild) : 피험자가 거의 느끼지 못할 정도로 정상적인 일상생활(기능)을 저해하지 않는 정도. 대부분 치료가 필요하지 않는 정도
- ② 중등중(Moderate) : 피험자가 불편함을 느낄 수 있으며, 정상적인 일상생활(기능)을 저해하는 정도. 피험자가 시험을 계속 할 수는 있으나 치료가 필요할 수도 있는 정도
- ③ 중 중(Severe) : 피험자가 매우 불편하여 일상생활(기능)이 불가능하고, 시험의 지속적인 참여가 불가능한 정도. 치료나 입원이 필요할 수 있는 정도

(라) 약물과의 인과관계 평가

시험물질과의 인과관계는 아래와 같이 분류하여 평가한다.

① 관련성이 명백함(Definitely related)

- ▶ 약물을 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
- ▶ 이상반응이 다른 어떤 이유보다 이 약 투여에 의해 가장 개연성 있게 설명되는 경우
- ▶ 투여 중단으로 이상반응이 사라지는 경우
- ▶ 재 투여(가능한 경우에만 실시) 결과가 양성인 경우
- ▶ 이상반응이 약물 또는 동일 계열의 약물에 대해 이미 알려져 있는 정보와 일관된 양상을 보이는 경우

② 관련성이 많음(Probably related)

- ▶ 약물을 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
- ▶ 이상반응이 다른 어떤 이유보다 이 약 투여에 의해 더욱 개연성 있게 설명되는 경우
- ▶ 투여 중단으로 이상반응이 사라지는 경우

③ 관련성이 의심됨(Possibly related)

- ▶ 약물을 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
- ▶ 이상반응이 다른 가능성 있는 원인들과 같은 수준으로 약물 투여에 기인한다고 판단되는 경우
- ▶ 투여 중단(실시된 경우)으로 이상반응이 사라지는 경우

④ 관련성이 적음(Unlikely)

- ▶ 약물을 투여하였다는 증거가 있는 경우
- ▶ 이상반응보다 가능성이 있는 원인이 있는 경우
- ▶ 투여 중단(실시된 경우) 결과 음성이거나 모호한 경우
- ▶ 재 투여(실시된 경우) 결과 음성이거나 모호한 경우

⑤ 관련성이 없음(Not related)

- ▶ 피험자가 약물을 투여 받지 않은 경우
- ▶ 약물 투여와 이상반응 발현과의 시간적 순서가 타당하지 않는 경우
- ▶ 이상반응에 대해 다른 명백한 원인이 있는 경우

⑥ 불명(Unknown)

- ▶ 연관성을 판단하기에 근거가 부족한 경우
- ▶ 정보가 불충분하거나 상충되어 판단할 수 없고 이를 보완하거나 확인할 수 없는 경우

(마) 이상반응과 관련하여 취해진 조치

① 취해진 조치 없음(No action taken)

- ② 투여용량 변경 / 일시적 중단(Study drug dosage adjusted / temporarily interrupted)
- ③ 영구적 중단(Study drug permanently discontinued due to this adverse event)
- ④ 치료약물 병용 투여(Concomitant medication taken)
- ⑤ 비약물 치료(Non-drug therapy given)
- ⑥ 입원 / 입원 기간의 연장(Hospitalization / prolonged hospitalization)

(바) 이상반응의 결과

- ① 회복, 후유증 없음(recovered without sequel AE)
- ② 회복, 후유증 있음(recovered with sequel AE)
- ③ 이상반응 존재, 진행 없음(AE still +, no further treatment)
- ④ 이상반응 지속, 진행중(AE still +, treatment continuing)
- ⑤ 사망(death)

(사) 중대한 이상반응/이상약물반응의 보고

본 임상시험 기간 중 시험 책임자 및 시험 담당자는 피험자의 안전에 만전을 기해야 하며, 중대한 이상반응 발생시에는 신속하고 적절한 조치를 위하여 이상반응을 최소화하여야 한다. 임상시험 중 중대한 이상반응 발생시 각 담당자의 의무는 다음과 같다.

① 시험 책임자

중대한 이상반응이 임상시험 기간 도중에 발생하는 경우, 임상시험용 건강기능식품과의 상관유무와 관계없이 발생 후 24시간이내, 혹은 늦어도 다음 근무일까지 임상시험 의뢰자 또는 임상시험모니터요원에게 보고해야 한다.

② 시험 담당자

중대한 이상반응이 임상시험 기간 도중에 발생하는 경우 즉시 시험 책임자에게 보고하여야 한다.

③ 임상시험 의뢰자

임상시험 의뢰자는 기타 관련된 시험자, 심사위원회 및 식품의약품안전청장에게 중대하고 예상하지 못한 이상약물반응을 정한 기간 내에 신속히 보고해야 한다.

㉠ 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고 받거나 알게 된 날로부터 7일 이내(단, 이 경우 상세한 정보를 최초 보고일로부터 8일 이내에 추가로 보고)

㉡ 다른 모든 중대하고 예상하지 못한 이상약물반응의 경우에는 임상시험 의뢰자가 이 사실을 보고 받거나 알게 된 날로부터 15일 이내

2. 피험자

가. 피험자의 임상시험 참여 상태

(1) 남자

방문 1에 본 임상연구에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 선별검사를 실시한 피험자 수는 총 112명이었으며, 그 중에 총 4명은 “동의철회(1명), B형간염 양성(2명), Total cholesterol 검사치 선정기준 부적합(1명)” 등의 이유로 무작위 배정되기 전에 탈락하였다. 방문 2에 선정 및 제외기준에 적합한 총 108명의 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 대조 식품군(MU-3 위캡슐)과 시험식품군(MU-3 500, MU-3 1000)으로 배정하였다. 무작위 배정된 피험자는 대조식품 또는 시험식품을 1회 4캡슐, 1일 2회, 총 4주간 복용하였다.

방문 3에서 임상시험용 건강기능식품을 회수하였고, 피험자 1명(MU-3 1000군, 이상반응 발생)이 중도탈락 하였으며, 나머지 피험자들은 방문 2에 배정된 대조식품 또는 시험식품을 재처방 받아 총 4주간 복용하였다. 방문 4에서 임상시험용 건강기능식품을 회수하였으며 검사를 시행하고 임상시험을 완료하였다(그림 30).

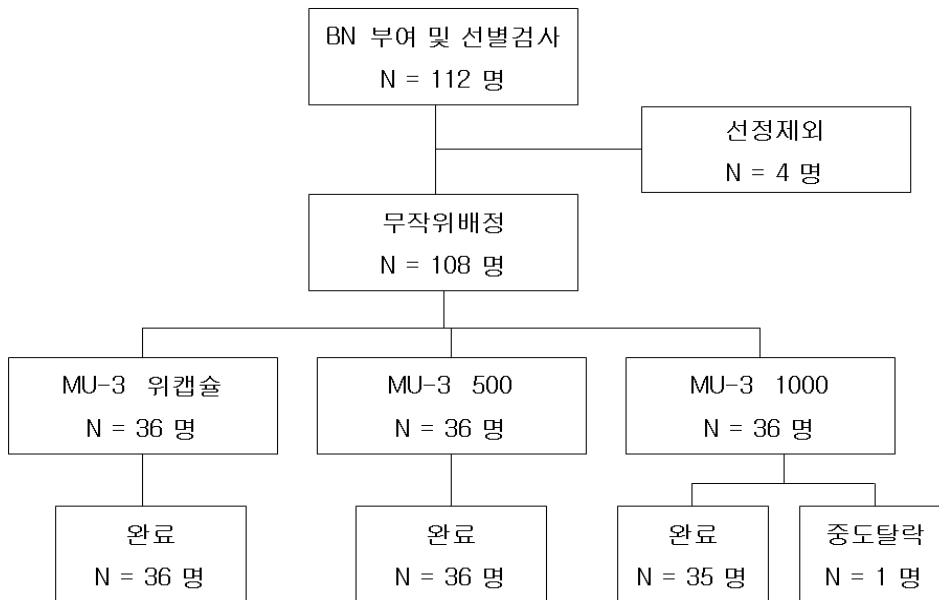


그림 30. 피험자의 임상시험 참여 상태 - 남자

(2) 여자

Visit 1에 본 임상연구에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 선별검사를 실시한 피험자 수는 총 113명이었으며, 그 중에 총 5명은 “피험자의 비협조(1명), B형간염 양성(3명), 동의철회(1명)” 등의 이유로 무작위 배정되기 전에 탈락하였다. Visit 2에 선정 및 제외기준에 적합한 총 108명의 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 대조식품군(MU-3 위캡슐)과 시험식품군(MU-3 500, MU-3 1000)으로 배정하였다. 무작위 배정된 피험자는 대조식품 또는 시

험식품을 1회 4캡슐, 1일 2회, 총 4주간 복용하였다.

Visit 3에서 임상시험용 건강기능식품을 회수하였고, 2명의 피험자(MU-3 1000군에서 이상반응 발생 1명, MU-3 500군에서 피험자의 불순응 1명)가 중도탈락 하였으며, 나머지 피험자들은 Visit 2에 배정된 대조식품 또는 시험식품을 재처방 받아 총 4주간 복용하였다. Visit 4에서 임상시험용 건강기능식품을 회수하였으며 검사를 시행하고 임상시험을 완료하였다(그림 31).

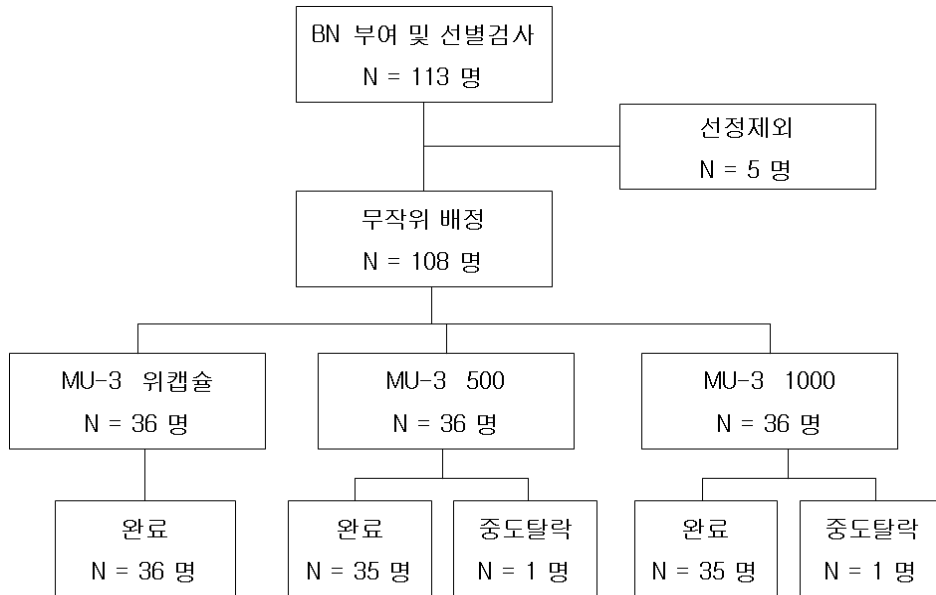


그림 31. 피험자의 임상시험 참여 상태 - 여자

3. 임상시험의 결과

가. 피험자의 인구학적 정보 및 기타 특성에 대한 비교

본 임상시험에 등재한 피험자 중, 무작위 배정을 받고 임상시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용하였으며, 임상시험용 건강기능식품 복용 후 전화 또는 방문에 의하여 시험자가 안전성 관련 데이터를 최소한 1회 이상 확인한 남자 피험자 108명[MU-3 위캡슐군 36명, MU-3 500군 36명, MU-3 1000군 36명], 여자 피험자 107명[MU-3 위캡슐군 36명, MU-3 500군 35명(1명 제외 : 피험자의 불순응으로 인한 중도탈락), MU-3 1000군 36명]에 대해 분석을 실시하였다.

(1) 남자

(가) 피험자의 인구학적 정보

남자 피험자들의 인구학적 정보를 살펴보면, 평균 연령의 경우 MU-3 위캡슐군(만 58.42±6.44세)이 MU-3 500군(만 56.19±7.30세)과 MU-3 1000군(만 54.25±5.05세) 보다 약간 높게 나타났으며, 선정기준에 해당되었다. 키(p=0.765)와 체중(p=0.431), BMI(p=0.489)의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었고, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에도 키(p=0.233)와 체중(p=0.696), BMI(p=0.177) 모두 유의한 차이를 보이지 않아 최초 무

작위 배정에 의한 대상자간의 편견이 없는 것으로 확인되었다(표 20).

표 20. 인구학적 정보 - 남자

항목	MU-3 위캡술(N=36)	MU-3 500(N=36)	MU-3 1000(N=36)	p*	p**
	평균±표준편차 (최소값-최대값)	평균±표준편차 (최소값-최대값)	평균±표준편차 (최소값-최대값)		
연령 (만)	58.42±6.44 (41-71)	56.19±7.30 (42-69)	54.25±5.05 (42-65)	0.175	0.003
키 (cm)	168.56±4.77 (158.8-178.0)	168.20±5.29 (159.6-182.7)	170.02±5.52 (159.5-184.0)	0.765	0.233
체중 (kg)	71.16±6.73 (56.7-92.0)	69.75±8.30 (50.3-89.7)	70.40±9.50 (57.1-91.5)	0.431	0.696
BMI (kg/m ²)	25.04±2.09 (19.4-29.9)	24.65±2.59 (19.1-29.6)	24.29±2.53 (19.0-30.1)	0.489	0.177

p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군), p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

(나) 병력 및 치료력, 병용약물 여부

남자 피험자들의 임상시험 선별 당시 병력(수술력 포함) 및 치료력을 조사한 결과, MU-3 500군에서 2명(5.6%), MU-3 1000군에서 1명(2.8%)이 병력 및 치료력이 있는 것으로 조사되었다. 병력 및 치료력이 있는 피험자들 중 본 임상시험용 건강기능식품과 병용 투여할 수 있는 약물 인지를 평가하기 위하여 병용약물 여부를 조사한 결과, 현재 병력을 치료하기 위한 병용약물은 전혀 없는 것으로 확인하였다(표 21).

표 21. 병력 및 치료력, 병용약물 여부 - 남자

단위 : 명(%)

항목	MU-3 위캡술(N=36)	MU-3 500(N=36)	MU-3 1000(N=36)	Total	p*	p**
병력 및 치료력						
없음	36(100.0)	34(94.4)	35(97.2)	105(97.2)	0.493	1.000
있음	0(0.0)	2(5.6)	1(2.8)	3(2.8)		
병력 및 치료력이 있는 경우 병용약물 여부						
없음	36(100.0)	36(100.0)	36(100.0)	108(100.0)	-	-
있음	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

p* : Fisher's exact test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군), p** : Fisher's exact test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

(2) 여자

(가) 피험자의 인구학적 정보

여자 피험자들의 인구학적 정보를 살펴보면, 평균 연령의 경우 MU-3 위캡술군(만 56.81±3.20세)이 MU-3 500군(만 55.49±2.89세)과 MU-3 1000군(만 56.14±3.61세) 보다 약간 높게 나타났으며, 선정기준에 해당되었다. MU-3 위캡술군과 MU-3 500군 간에 키(p=0.252), 체중(p=0.911), BMI(p=0.550)의 경우 통계적으로 유의한 차이는 없었고, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 간에도 키(p=0.676)와 체중(p=0.457), BMI(p=0.581) 모두 유의한 차이를 보이지 않아 최초

무작위 배정에 의한 대상자간의 편견이 없는 것으로 확인되었다(표 22).

표 22. 인구학적 정보 - 여자

항목	MU-3 위캡술(N=36)	MU-3 500(N=35)	MU-3 1000(N=36)	p*	p**
	평균±표준편차 (최소값-최대값)	평균±표준편차 (최소값-최대값)	평균±표준편차 (최소값-최대값)		
연령 (만 세)	56.81±3.20 (52-64)	55.49±2.89 (50-61)	56.14±3.61 (47-63)	0.073	0.410
키 (cm)	156.49±4.32 (148.4-166.1)	155.21±4.99 (147.6-167.2)	156.96±5.17 (146.7-167.9)	0.252	0.676
체중 (kg)	59.06±7.69 (46.2-74.4)	59.29±8.95 (48.9-81.5)	60.34±6.82 (46.0-77.0)	0.911	0.457
BMI (kg/m ²)	24.14±3.20 (18.7-31.4)	24.61±3.40 (19.0-32.5)	24.54±2.92 (20.2-30.7)	0.550	0.581

p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군), p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

(나) 병력 및 치료력, 병용약물 여부

여자 피험자들의 임상시험 선별 당시 병력(수술력 포함) 및 치료력을 조사한 결과, MU-3 위캡술군에서 2명(5.6%), MU-3 500군에서 2명(5.7%), MU-3 1000군에서 2명(5.6%)이 병력 및 치료력이 있는 것으로 조사되었다. 병력 및 치료력이 있는 피험자들 중 본 임상시험용 건강기능식품과 병용 투여할 수 있는 약물인지를 평가하기 위하여 병용약물 여부를 조사한 결과, MU-3 위캡술군에서 1명(2.8%), MU-3 500군에서 2명(5.7%)이 현재 병용약물이 있는 것으로 조사되었으나, 피험자의 복지를 위해 필요하고 또 임상시험용 건강기능식품에 영향을 주지 않는다는 시험 책임자의 판단에 따라 병용 투여할 수 있도록 결정되어 임상시험 진행에는 문제가 없음을 확인하였다(표 23).

표 23. 병력 및 치료력, 병용약물 여부 - 여자

단위 : 명(%)

항목	MU-3 위캡술(N=36)	MU-3 500(N=35)	MU-3 1000(N=36)	Total	p*	p**
<u>병력 및 치료력</u>						
없음	34(94.4)	33(94.3)	34(94.4)	101(94.4)	1.000	1.000
있음	2(5.6)	2(5.7)	2(5.6)	6(5.6)		
<u>병력 및 치료력이 있는 경우 병용약물 여부</u>						
없음	35(97.2)	33(94.3)	36(100.0)	104(97.2)	0.614	1.000
있음	1(2.8)	2(5.7)	0(0.0)	3(2.8)		

p* : Fisher's exact test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군), p** : Fisher's exact test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

나. 안전성 평가

본 임상시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 임상시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용하였으며, 임상시험용 건강기능식품 복용 후 전화 또는 방문에 의하여 시험자가 안전성 관련 데이터를 최소한 1회 이상 확인한 남자 피험자 108명[MU-3 위캡술군 36명,

MU-3 500군 36명, MU-3 1000군 36명]과 여자 피험자 107명[MU-3 위캡술군 36명, MU-3 500군 35명(1명 제외 : 피험자의 불순응으로 인한 중도탈락), MU-3 1000군 36명]을 대상으로 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사 결과, 임상적 이상반응 발현상황, 약물 복용력 등을 종합하여 평가하였다.

(1) 남자

(가) 활력 징후

남자 피험자들의 활력 징후 측정치를 비교하였다. 수축기 혈압의 경우 MU-3 위캡술군(p=0.566), MU-3 500군(p=0.274), MU-3 1000군(p=0.234) 모두 방문시기별에 따라 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 각 방문별 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 간에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이완기 혈압에서는 MU-3 위캡술군에서만 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 차이(p=0.002)를 보였으나, 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 변화는 아니었다. 각 방문별 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 간의 비교에서는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 맥박의 경우 각 군의 방문시기별, 각 방문별 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 간의 비교에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 체온에서는 MU-3 위캡술군(p<0.001), MU-3 500군(p=0.001), MU-3 1000군(p=0.004) 모두에서 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 차이는 아니었으며, 각 방문별 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 간에서는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(표 24).

표 24. 활력 징후 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
수축기혈압 (mmHg)	0주	121.06±5.56 (100-130)	0.566	119.56±5.90 (104-128)	0.274	120.83±5.60 (100-130)	0.234	0.271	0.866
	4주	121.06±4.67 (104-130)		119.33±5.35 (106-126)		120.44±4.97 (102-126)			
	8주	120.72±3.89 (106-130)		118.89±4.82 (106-126)		120.28±4.71 (102-128)			
이완기혈압 (mmHg)	0주	80.06±4.37 (62-86)	0.002	79.33±4.95 (60-88)	0.084	80.44±3.07 (72-88)	0.263	0.514	0.663
	4주	79.83±4.01 (64-84)		79.39±4.43 (64-86)		80.00±3.02 (72-86)			
	8주	78.89±4.29 (64-84)		78.72±4.66 (66-86)		79.78±3.30 (70-86)			
맥박 (회)	0주	68.56±4.75 (62-80)	0.349	68.33±5.46 (54-78)	0.322	69.00±5.79 (60-84)	0.978	0.854	0.723
	4주	69.11±4.23 (64-80)		68.44±4.74 (60-76)		68.94±4.13 (62-80)			
	8주	69.08±3.15 (64-76)		67.72±3.35 (60-76)		68.89±3.75 (60-76)			
체온 (℃)	0주	36.19±0.17 (35.8-36.5)	<0.001	36.16±0.14 (35.9-36.5)	0.001	36.17±0.20 (35.9-36.5)	0.004	0.373	0.662
	4주	36.13±0.15 (35.9-36.4)		36.13±0.14 (35.8-36.4)		36.14±0.19 (35.9-36.5)			
	8주	36.08±0.13 (35.8-36.3)		36.07±0.11 (35.9-36.2)		36.07±0.14 (35.8-36.3)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)
p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

(나) 신체 계측

남자 피험자들의 신체 계측을 비교한 결과, 키, 체중, BMI의 경우 MU-3 위캡술군, MU-3 500군, MU-3 1000군 모두 방문시기별에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었으며, 각 방문별 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 간에서도 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(표 25).

표 25. 신체 계측 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
키 (cm)	0주	168.56±4.77 (158.8-178.0)	0.342	168.20±5.29 (159.6-182.7)	0.127	170.02±5.52 (159.5-184.0)	0.275	0.765	0.233
	4주	168.56±4.76 (159.0-177.7)		168.14±5.20 (159.5-182.6)		170.09±5.43 (160.2-184.0)			
	8주	168.49±4.76 (159.1-177.5)		168.09±5.21 (159.5-182.4)		170.04±5.46 (160.2-183.9)			
체중 (kg)	0주	71.16±6.73 (56.7-92.0)	0.495	69.75±8.30 (50.3-89.7)	0.631	70.40±9.50 (57.1-91.5)	0.617	0.431	0.696
	4주	71.27±6.92 (57.0-93.5)		69.66±8.07 (50.1-89.0)		70.40±9.47 (57.0-91.3)			
	8주	71.29±6.82 (57.3-93.0)		69.78±8.02 (49.8-88.7)		70.32±9.45 (56.7-90.3)			
BMI (kg/m ²)	0주	25.04±2.09 (19.4-29.9)	0.141	24.65±2.59 (19.1-29.6)	0.398	24.29±2.53 (19.0-30.1)	0.829	0.489	0.177
	4주	25.08±2.09 (19.5-30.3)		24.63±2.58 (19.1-29.6)		24.28±2.53 (19.1-30.0)			
	8주	25.11±2.08 (19.5-30.3)		24.69±2.56 (18.9-29.6)		24.27±2.52 (18.9-29.8)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)
 p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

(다) 신체검사

각 방문시마다 남자 피험자들에게 영양상태, 소화기계, 피부/점막, 근골격계, 이비인후계, 갑상선, 호흡기, 심혈관계, 대사/내분비계, 비뇨생식기계, 신경/정신계, 척추/사지 종양 등의 신체검사를 실시하여 비교한 결과, 비정상(NCS, 임상적 의미 없음)에 해당하는 MU-3 500군 1명(2.8%)과 MU-3 1000군 1명(2.8%)은 이미 병력 및 치료력이 있으며 현재 병용약물이 없다고 조사된 피험자를 말한다. 비정상(CS, 임상적 의미 있음)에 해당하는 MU-3 500군 1명(2.8%)과 MU-3 1000군 1명(2.8%)은 임상시험용 건강기능식품을 복용하고 이상반응 발현으로 인한 경우를 말하며, MU-3 500군 1명(2.8%)은 계속 임상시험을 진행한 후 완료하였으며 MU-3 1000군 1명(2.8%)은 중도탈락을 하였다(표 26).

표 26. 신체검사 비교 - 남자

		MU-3 위캡술(N=36)	MU-3 500(N=36)	MU-3 1000(N=36)	Total	p*	p**
신체검사	정상	36(100.0)	34(94.4)	34(94.4)	104(96.3)	0.358	0.358
	비정상(NCS)	0(0.0)	1(2.8)	1(2.8)	2(1.9)		
	비정상(CS)	0(0.0)	1(2.8)	1(2.8)	2(1.9)		

p* : chi-square test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군), p** : chi-square test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

(라) 임상실험실 검사

남자 피험자들의 일반 혈액검사 결과를 살펴보면, MU-3 위캡술군, MU-3 500군, MU-3 1000군별로 방문시점에 따라 Hemoglobin, Hematocrit, RBC, WBC, Platelet, MCV, MCH, MCHC, Neutrophils, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

각 방문별 군간의 검사치를 비교한 결과, Platelet의 경우 MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 비교에서는 4주차(p=0.017)와 8주차(p=0.030)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 모두 정상범위이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다.

Basophil의 경우 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군 비교에서는 8주차(p=0.046)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으나, 임상적으로 문제가 있는 경우는 없었다. 그 외의 Hemoglobin, Hematocrit, RBC, WBC, MCV, MCH, MCHC, Neutrophils, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil 검사 수치 모두 각 방문별 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 간에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(표 27, 표 28).

표 27. 일반혈액검사 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Hemoglobin (g/dL)	0주	14.95±1.18 (12.7-17.6)	0.406	15.07±1.17 (11.8-17.0)	0.768	15.30±0.82 (13.5-17.6)	0.719	0.652	0.142
	4주	14.97±0.96 (12.7-17.1)		15.12±1.11 (12-17.5)		15.37±0.92 (13.4-17.0)		0.549	0.073
	8주	15.07±0.81 (13.2-16.6)		15.14±1.03 (12.6-17.0)		15.31±0.80 (13.6-16.5)		0.741	0.202
Hematocrit (%)	0주	46.61±2.90 (40.9-53.3)	0.207	47.30±2.96 (40.4-52.6)	0.677	47.50±2.86 (42.6-55.3)	0.195	0.320	0.192
	4주	47.13±2.83 (43.2-56.1)		47.40±3.32 (38.4-53.8)		48.00±2.66 (42.2-54.2)		0.706	0.182
	8주	47.22±2.79 (42.4-53.2)		47.58±3.09 (39.8-53.7)		47.23±3.21 (38.8-52.5)		0.610	0.991
RBC (Mil/uL)	0주	4.92±0.40 (4.06-5.48)	0.339	5.03±0.43 (4.13-5.74)	0.507	5.04±0.32 (4.39-5.66)	0.245	0.256	0.183
	4주	4.95±0.35 (4.19-5.50)		5.01±0.40 (4.22-5.88)		5.03±0.32 (4.35-5.67)		0.523	0.329
	8주	4.98±0.34 (4.18-5.49)		5.04±0.37 (4.32-5.71)		4.97±0.31 (4.19-5.44)		0.470	0.947
WBC (Thous/uL)	0주	5.93±1.38 (3.4-9.3)	0.915	5.88±1.55 (3.6-9.7)	0.690	5.73±2.06 (2.9-10.5)	0.686	0.904	0.644
	4주	5.88±1.47 (4.0-10.5)		6.08±1.62 (3.3-10.5)		5.90±1.54 (3.0-9.5)		0.579	0.956
	8주	5.96±1.86 (2.7-11.9)		5.94±1.13 (4.0-8.8)		5.79±1.64 (3.6-9.7)		0.951	0.688
Platelet (Thous/uL)	0주	247.28±40.79 (176-337)	0.072	255.78±49.11 (161-351)	0.790	253.64±45.62 (122-323)	0.125	0.427	0.535
	4주	239.19±41.59 (160-354)		258.22±53.80 (154-372)		265.17±48.28 (187-357)		0.098	0.017
	8주	236.14±44.83 (127-323)		255.31±47.96 (155-367)		259.81±46.04 (154-348)		0.084	0.030

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

표 28. 일반혈액검사 (계속) - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
MCV (fL)	0주	94.96±4.10 (87.8-102.4)	0.162	94.23±4.63 (86.6-102.6)	0.274	94.82±4.45 (86-104.1)	0.086	0.484	0.893
	4주	95.74±4.64 (84.9-106.5)		94.84±3.83 (89.1-103.8)		95.71±4.33 (87.3-104.5)			
	8주	95.35±4.45 (88-106)		94.46±4.07 (87-102.1)		95.37±4.16 (87.6-105.6)			
MCH (pg)	0주	30.45±1.69 (25.7-33.9)	0.553	30.01±1.49 (26.7-33.2)	0.185	30.50±1.21 (28.4-32.9)	0.553	0.243	0.886
	4주	30.31±1.50 (24.7-33.4)		30.20±1.47 (27.2-33.2)		30.64±1.27 (27.8-33.4)			
	8주	30.43±1.55 (26.3-33.7)		30.06±1.32 (27.1-32.3)		30.61±1.21 (28.4-33.6)			
MCHC (%)	0주	32.07±1.34 (28.5-36.0)	0.102	31.85±1.03 (29.3-33.8)	0.994	32.18±1.13 (30.2-34.5)	0.752	0.444	0.718
	4주	31.67±0.96 (29.1-33.8)		31.85±0.94 (30.4-34.2)		32.02±1.15 (30.1-34.3)			
	8주	31.94±0.94 (29.9-34.6)		31.84±0.98 (30.1-33.9)		32.07±1.13 (30.3-34.5)			
Neutrophils (%)	0주	53.46±8.84 (37.4-73.6)	0.988	54.35±7.38 (39.3-67.3)	0.325	53.66±10.22 (34.6-69.9)	0.247	0.643	0.930
	4주	53.42±7.88 (38.3-69.5)		55.59±9.13 (34.5-79.7)		52.99±9.09 (32.8-78.4)			
	8주	53.59±9.10 (34.9-68.9)		56.83±8.15 (38.4-75.9)		55.66±9.51 (39.1-76.7)			
Lymphocyte (%)	0주	36.61±8.37 (19.5-51.8)	0.990	35.15±6.74 (22.0-50.6)	0.438	35.99±8.93 (22.4-57.0)	0.117	0.418	0.761
	4주	36.72±7.24 (19.9-52.2)		34.79±7.83 (15.1-51.4)		37.00±7.61 (20.3-54.6)			
	8주	36.79±8.16 (21.4-55.2)		33.59±7.30 (14.3-49.0)		34.50±7.46 (18.0-46.5)			
Monocyte (%)	0주	5.66±1.58 (2.7-10.0)	0.470	5.87±1.19 (3.5-8.3)	0.270	5.58±1.09 (3.5-7.7)	0.201	0.518	0.822
	4주	5.63±1.25 (3.6-8.8)		5.58±0.95 (3.4-7.6)		5.91±1.26 (3.8-9.1)			
	8주	5.41±1.14 (3.0-8.0)		5.60±1.13 (3.5-7.8)		5.83±1.17 (4.0-8.4)			
Eosinophil (%)	0주	3.23±1.84 (0.3-7.2)	0.458	3.75±1.95 (0.6-8.7)	0.177	3.59±2.04 (0.9-9.4)	0.620	0.247	0.433
	4주	3.25±1.71 (0.5-7.6)		3.31±1.63 (1.1-8.9)		3.39±1.97 (1.2-10.6)			
	8주	3.56±1.87 (0.3-8.4)		3.61±2.08 (1.0-9.9)		3.50±1.92 (1.1-8.5)			
Basophil (%)	0주	0.74±0.46 (0.2-2.8)	0.503	0.81±0.43 (0.3-2.6)	0.103	0.78±0.37 (0.2-1.9)	0.651	0.559	0.755
	4주	0.70±0.34 (0.2-1.5)		0.72±0.27 (0.2-1.4)		0.83±0.41 (0.2-2.0)			
	8주	0.66±0.28 (0.2-1.2)		0.98±0.88 (0.3-5.2)		0.77±0.45 (0.3-1.8)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

남자 피험자들의 혈청생화학 검사 수치를 비교한 결과, MU-3 위캡술군에서는 AST(2.42U/L 증가, p=0.033)와 ALT(3.91U/L 증가, p=0.005)에서 방문시기별로 유의한 차이가 있었으나 검사치의 변화가 정상 수치의 범위 안에 있었으며, 임상적으로 큰 의미는 없었다. MU-3 500군에서도

Albumin(0.06g/dL 증가, p=0.019)에서 방문시기별로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범 위 내에서의 변화이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다. 그 밖에 BUN, Creatinine, Fasting plasma glucose, Total Bilirubin, Alkaline phosphatase, Total protein 검사 수치는 MU-3 위캡 술군, MU-3 500군, MU-3 1000군 별로 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

각 방문별 군간의 검사치를 비교한 결과, BUN의 경우 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군 비교 에서는 4주차(p=0.012)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 모두 정상범위이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다. Fasting plasma glucose의 경우에도 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차(p=0.046)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 모두 정상범 위이며, 임상적으로 큰 의미는 없었다. Alkaline phosphatase의 경우 MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 비교에서는 8주차(p=0.043)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 모두 정상범위이며, 임상적으로 큰 문제가 있는 경우는 없었다. 그 외의 Creatinine, Total Bilirubin, AST, ALT, Albumin, Total protein 검사 수치는 각 방문별 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군, MU-3 위캡술군 과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(표 29, 표 30).

표 29. 혈청생화학 검사 - 남자

Variables	방문 주	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	P	평균±표준편차 (최소값-최대값)	P	평균±표준편차 (최소값-최대값)	P		
BUN (mg/dL)	0주	16.49±3.50 (9.5-22.9)	0.412	16.98±3.88 (11.0-26.0)	0.180	17.34±3.60 (10.6-24.4)	0.079	0.574	0.313
	4주	15.68±3.86 (9.8-26.8)		18.11±4.16 (7.4-28.7)		15.61±3.66 (9.0-23.9)		0.012	0.938
	8주	16.42±3.45 (9.8-22.2)		16.76±4.51 (9.3-30.2)		16.25±3.31 (9.4-23.4)		0.717	0.832
Creatinine (mg/dL)	0주	1.08±0.12 (0.83-1.31)	0.356	1.08±0.13 (0.90-1.56)	0.304	1.12±0.11 (0.84-1.32)	0.200	0.941	0.103
	4주	1.09±0.13 (0.84-1.46)		1.09±0.13 (0.94-1.55)		1.13±0.13 (0.76-1.39)		0.884	0.308
	8주	1.10±0.12 (0.91-1.37)		1.08±0.14 (0.91-1.49)		1.10±0.12 (0.77-1.28)		0.471	0.945
Fasting plasma glucose (mg/dL)	0주	96.50±9.79 (78-114)	0.812	92.19±9.54 (74-110)	0.431	91.47±11.49 (73-114)	0.701	0.063	0.050
	4주	95.42±10.42 (74-114)		90.69±9.31 (77-109)		93.39±10.95 (70-112)		0.046	0.424
	8주	95.89±9.20 (75-109)		91.92±8.80 (79-110)		92.39±8.86 (77-109)		0.065	0.104
Total Bilirubin (mg/dL)	0주	0.74±0.36 (0.21-1.75)	0.448	0.70±0.22 (0.38-1.23)	0.671	0.76±0.19 (0.43-1.18)	0.145	0.560	0.766
	4주	0.75±0.37 (0.30-1.79)		0.74±0.26 (0.40-1.62)		0.71±0.20 (0.45-1.20)		0.835	0.536
	8주	0.70±0.27 (0.23-1.50)		0.72±0.22 (0.36-1.33)		0.79±0.25 (0.42-1.41)		0.631	0.142
Alkaline phosphatase (U/L)	0주	73.36±15.33 (46-118)	0.545	71.25±15.01 (42-115)	0.682	69.08±16.22 (41-116)	0.607	0.557	0.254
	4주	73.36±12.48 (45-116)		71.67±12.75 (46-94)		68.28±13.30 (42-101)		0.571	0.099
	8주	74.89±15.04 (50-129)		70.44±13.90 (38-96)		67.75±14.36 (45-94)		0.197	0.043
AST (U/L)	0주	25.19±6.25 (15-41)	0.033	27.00±4.28 (17-33)	0.399	27.19±5.54 (15-37)	0.678	0.157	0.155
	4주	25.72±5.46 (17-43)		27.17±6.35 (16-44)		27.39±4.96 (15-36)		0.304	0.180
	8주	27.61±5.52 (18-40)		26.14±3.81 (19-33)		26.72±5.44 (15-36)		0.192	0.494

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)
p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

표 30. 혈청생화학 검사 (계속) - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
ALT (U/L)	0주	23.92±10.12 (13-47)	0.005	25.67±7.67 (12-44)	0.405	27.61±10.93 (13-54)	0.531	0.411	0.141
	4주	26.61±9.71 (12-48)		25.36±9.76 (12-59)		27.39±9.94 (11-49)		0.588	0.738
	8주	27.83±9.61 (11-46)		24.17±7.62 (11-43)		26.33±9.25 (10-43)		0.077	0.502
Albumin (g/dL)	0주	4.42±0.19 (4.0-4.8)	0.103	4.41±0.17 (4.1-4.8)	0.019	4.47±0.16 (4.1-4.8)	0.621	0.792	0.226
	4주	4.45±0.16 (4.2-4.8)		4.47±0.18 (4.1-4.8)		4.44±0.20 (4.0-4.8)		0.636	0.898
	8주	4.48±0.20 (4.1-4.8)		4.47±0.19 (4.1-4.8)		4.47±0.21 (4.1-4.8)		0.722	0.820
Total protein (g/dL)	0주	7.37±0.33 (6.4-8.2)	0.182	7.35±0.36 (6.8-8.3)	0.111	7.37±0.29 (6.8-7.9)	0.645	0.812	0.970
	4주	7.45±0.41 (6.6-8.3)		7.44±0.31 (7.0-8.0)		7.39±0.35 (6.4-8.1)		0.897	0.519
	8주	7.45±0.37 (6.6-8.3)		7.40±0.36 (6.8-8.1)		7.42±0.40 (6.5-8.2)		0.585	0.761

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

남자 피험자들의 뇨 검사 (1) 수치를 비교한 결과, pH의 경우 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 변화는 없었다. SG의 경우 0주차에서 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군(p=0.009), MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군(p=0.001) 간에 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다.

MU-3 위캡슐군에서는 pH(p=0.048)에서, MU-3 1000군에서도 SG(p=0.002)에서 방문시기별로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위 내에서의 변화이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다(표 31).

표 31. 뇨 검사 (1) - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
pH	0주	5.57±0.67 (5.0-7.5)	0.048	5.44±0.62 (5.0-7.0)	0.671	5.47±0.63 (5.0-7.5)	0.768	0.412	0.528
	4주	5.39±0.48 (5.0-7.0)		5.56±0.66 (5.0-7.5)		5.47±0.68 (5.0-7.5)		0.226	0.548
	8주	5.65±0.70 (5.0-7.5)		5.57±0.73 (5.0-7.5)		5.56±0.69 (5.0-7.5)		0.621	0.555
S.G	0주	1.02±0.01 (1.000-1.031)	0.836	1.02±0.01 (1.008-1.036)	0.087	1.02±0.01 (1.002-1.039)	0.002	0.009	0.001
	4주	1.02±0.01 (1.005-1.033)		1.02±0.01 (1.004-1.033)		1.02±0.01 (1.000-1.030)		0.243	0.550
	8주	1.02±0.01 (1.004-1.028)		1.02±0.01 (1.001-1.034)		1.02±0.01 (1.007-1.039)		0.771	0.227

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

남자 피험자들의 뇨 검사 (2) 수치를 비교한 결과, Nitrate와 Urobilinogen 검사 수치는 모두 정상으로 조사되었다. Protein 검사 수치가 비정상적으로 나온 피험자는 MU-3 위캡슐군의 경우 4주차 1명(2.8%), MU-3 500군의 경우 0주차 1명(2.8%)으로 조사되었으나 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었으며 임상적으로 큰 의미는 없었다. Glucose 수치에서도 MU-3 위캡슐군의 경우 0주차 1명(2.8%), 4주차 2명(5.6%), 8주차 1명(2.8%), MU-3 500군의 경우 0주차 1명(2.8%), 8주차 1명(2.8%)이 비정상적으로 조사되었으나 군간에 유의하지 않았으며 임상적으로 큰 의미는 없었다. 그 밖에 Ketone, Bilirubin, Blood, Leukocyte 검사 수치에서도 비정상적으로 나온 경우가 있었으나 모든 방문시점에서 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 임상적으로 큰 의미는 없었다(표 32).

표 32. 뇨 검사 (2) - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		정상	비정상	정상	비정상	정상	비정상		
Nitrate (Negative)	0주	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	4주	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
Protein (Negative)	0주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(97.2%)	1(2.8%)	36(100.0%)	0(0.0%)	0.314	-
	4주	35(97.2%)	1(2.8%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	0.314	0.314
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
Glucose (Negative)	0주	35(97.2%)	1(2.8%)	35(97.2%)	1(2.8%)	36(100.0%)	0(0.0%)	1.000	0.314
	4주	34(94.4%)	2(5.6%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	0.151	0.151
	8주	35(97.2%)	1(2.8%)	35(97.2%)	1(2.8%)	36(100.0%)	0(0.0%)	1.000	0.314
Ketone (Negative)	0주	36(100.0%)	0(0.0%)	34(94.4%)	2(5.6%)	36(100.0%)	0(0.0%)	0.151	-
	4주	35(97.2%)	1(2.8%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	0.314	0.314
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	34(94.4%)	2(5.6%)	-	0.151
Bilirubin (Negative)	0주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(97.2%)	1(2.8%)	36(100.0%)	0(0.0%)	0.314	-
	4주	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
Blood (Negative)	0주	35(97.2%)	1(2.8%)	33(91.7%)	3(8.3%)	33(91.7%)	3(8.3%)	0.303	0.303
	4주	35(97.2%)	1(2.8%)	33(91.7%)	3(8.3%)	33(91.7%)	3(8.3%)	0.303	0.303
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	34(94.4%)	2(5.6%)	36(100.0%)	0(0.0%)	0.151	-
Urobilinog en (Trace)	0주	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	4주	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
Leukocyte (Negative)	0주	36(100.0%)	0(0.0%)	34(94.4%)	2(5.6%)	36(100.0%)	0(0.0%)	0.151	-
	4주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(97.2%)	1(2.8%)	36(100.0%)	0(0.0%)	0.314	-
	8주	34(94.4%)	2(5.6%)	36(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	0.151	0.151

p* : chi-square test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군), p** : chi-square test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

(마) 임상적 이상반응 발현상황

남자 피험자들의 대조군(MU-3 위캡슐)과 시험군(MU-3 500, MU-3 1000)에서 임상시험 제 품과의 인과관계와 상관없이 발현된 모든 이상반응 현황을 살펴보면, MU-3 500군에서 발현된 이상반응(AE)은 1건이었으며, MU-3 1000군에서도 1건 발현되었다.

이상약물반응(ADR) 발현은 1건도 없었다. 또한 중대한 이상반응(Serious AE)과 중대한 이 상약물반응(Serious ADR)도 1건도 발생하지 않았다(표 33).

표 33. 이상반응 발현상황 비교 - 남자

단위 : 명(%)

		MU-3 위캡슐(N=36)	MU-3 500(N=36)	MU-3 1000(N=36)	Total	p*	p**
이상반응	없다	36(100.0)	35(97.2)	35(97.2)	106(98.1)	1.000	1.000
	있다	0(0.0)	1(2.8)	1(2.8)	2(1.9)		

p* : Fisher's exact test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군), p** : Fisher's exact test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

남자 피험자들의 이상반응 발현 현황을 자세히 살펴보면, MU-3 500군에서 발현된 ‘항문주위 가려움’의 이상반응은 ‘관련성이 적음’으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증’, 결과는 ‘후유증 없이 회복’으로 평가되었고, 시험제품과의 인과관계와 상관성이 적어 계속 시험을 진행하였다.

MU-3 1000군에서 발현된 ‘가슴쓰림(속쓰림)’의 이상반응은 ‘관련성이 의심됨’으로 평가되었다. 중증도는 ‘중등증’, 결과는 ‘후유증 없이 회복’으로 평가되었으나 이상반응 발현으로 인해 피험자의 시험 중지요구로 중도탈락을 하였다(표 34).

표 34. 이상반응 발현 현황 - 남자

이상반응 종류	발현 건수	경과	중증도	본제와의 관련여부	조치	결과
MU-3 500 항문주위 가려움	1건	계속됨	경증	관련성이 적음	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복
MU-3 1000 가슴쓰림(속쓰림)	1건	계속됨	중등증	관련성이 의심됨	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복

(바) 약물 복용력

남자 피험자들의 임상시험 선별 당시 병용약물이 없는 것으로 확인되었으며, 무작위 배정을 받고 임상시험용 건강기능식품을 1회 이상 복용한 이후의 병용약물도 전혀 없는 것으로 확인하였다.

(2) 여자

(가) 활력 징후

여자 피험자들의 각 방문시마다 측정된 활력 징후 측정치를 비교한 결과, 수축기 혈압과 맥박의 경우 각 군의 방문시기별, 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간의 비교에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

이완기 혈압에서는 MU-3 위캡슐군(p=0.020)과 MU-3 1000군(p=0.001)에서 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나, 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 변화는 아니었다. 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간의 비교에서는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

체온에서는 MU-3 위캡슐군(p=0.033), MU-3 500군(p=0.004), MU-3 1000군(p=0.001) 모두에서 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 차이는 아니었으며, 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간

의 차이에서는 유의한 차이가 없었다(표 35).

표 35. 활력 징후 비교 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
수축기혈압 (mmHg)	0주	117.33±7.63 (96-128)	0.756	116.91±7.43 (96-124)	0.885	118.06±6.51 (100-128)	0.479	0.815	0.667
	4주	117.11±7.51 (96-128)		116.80±6.72 (96-124)		117.83±6.05 (100-128)			
	8주	117.28±6.64 (96-128)		116.74±6.00 (98-124)		117.61±5.73 (100-124)			
이완기혈압 (mmHg)	0주	76.83±5.74 (60-86)	0.020	77.09±6.31 (64-86)	0.236	77.50±5.42 (64-86)	0.001	0.861	0.614
	4주	75.83±5.82 (64-86)		76.86±5.58 (64-84)		77.11±5.23 (62-86)			
	8주	76.22±4.96 (64-84)		76.40±5.59 (62-84)		75.83±4.93 (60-82)			
맥박 (회)	0주	68.06±4.96 (58-80)	0.737	67.09±4.71 (60-80)	0.114	68.33±3.69 (62-76)	0.843	0.401	0.788
	4주	68.44±4.20 (60-78)		67.77±3.87 (62-80)		68.17±3.22 (64-76)			
	8주	68.33±3.66 (58-76)		68.00±3.69 (60-78)		68.11±2.29 (64-72)			
체온 (°C)	0주	36.15±0.13 (35.9-36.5)	0.033	36.15±0.18 (35.8-36.5)	0.004	36.17±0.17 (35.9-36.5)	0.001	0.971	0.581
	4주	36.14±0.15 (35.9-36.5)		36.11±0.17 (35.8-36.5)		36.11±0.19 (35.8-36.5)			
	8주	36.09±0.16 (35.8-36.5)		36.07±0.16 (35.8-36.5)		36.04±0.15 (35.8-36.5)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)
p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

(나) 신체 계측

여자 피험자들의 신체 계측을 비교한 결과, 남자 피험자의 경우와 마찬가지로 MU-3 위캡술군, MU-3 500군, MU-3 1000군 별로 방문시점에 따라 키, 체중, BMI 지수 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었으며, 각 방문별 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 간의 비교에서도 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(표 36).

표 36. 신체 계측 비교 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
키 (cm)	0주	156.49±4.32 (148.4-166.1)	0.914	155.21±4.99 (147.6-167.2)	0.339	156.96±5.17 (146.7-167.9)	0.767	0.252	0.676
	4주	156.49±4.27 (148.6-166.4)		155.21±4.93 (147.5-167.1)		156.97±5.15 (146.1-167.5)			
	8주	156.51±4.31 (148.3-166.5)		155.16±4.94 (147.6-167.3)		156.93±5.18 (146.2-167.5)			
체중 (kg)	0주	59.06±7.69 (46.2-74.4)	0.825	59.29±8.95 (48.9-81.5)	0.890	60.34±6.82 (46.0-77.0)	0.439	0.911	0.457
	4주	59.08±7.55 (46.3-74.9)		59.33±9.03 (49.3-81.3)		60.22±6.78 (46.6-75.7)			
	8주	59.13±7.57 (46.4-74.8)		59.32±9.00 (49.6-81.2)		60.23±6.72 (46.3-74.9)			
BMI (kg/m ²)	0주	24.14±3.20 (18.7-31.4)	0.863	24.61±3.40 (19.0-32.5)	0.804	24.54±2.92 (20.2-30.7)	0.542	0.550	0.581
	4주	24.15±3.16 (18.4-31.5)		24.62±3.42 (18.9-32.5)		24.48±2.95 (20.1-30.4)			
	8주	24.16±3.15 (18.4-31.2)		24.63±3.44 (19.0-32.5)		24.50±2.93 (20.1-30.5)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)
p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

(다) 신체검사

각 방문시마다 여자 피험자들에게 영양상태, 소화기계, 피부/점막, 근골격계, 이비인후계, 갑상선, 호흡기, 심혈관계, 대사/내분비계, 비뇨생식기계, 신경/정신계, 척추/사지 종양 등의 신체검사를 실시하여 비교한 결과, 비정상(NCS, 임상적 의미 없음)에 해당하는 MU-3 위캡슐군 1명(2.8%)과 MU-3 500군 2명(5.7%)은 이미 병력 및 치료력이 있으며 현재 병용약물이 있다고 조사된 피험자를 말한다. 비정상(CS, 임상적 의미 있음)에 해당하는 MU-3 위캡슐군 3명(8.3%)과 MU-3 1000군 5명(13.9%)은 임상시험용 건강기능식품을 복용하고 이상반응 발현으로 인한 경우를 말하며, MU-3 위캡슐군 3명(8.3%)은 계속 임상시험을 진행한 후 완료하였으며 MU-3 1000군 5명 중 1명은 중도탈락을 하였다(표 37).

표 37. 신체검사 비교 - 여자

단위 : 명(%)

	MU-3 위캡슐(N=36)	MU-3 500(N=35)	MU-3 1000(N=36)	Total	p*	p**
신체검사						
정상	32(88.9)	33(94.3)	31(86.1)	96(89.7)		
비정상(NCS)	1(2.8)	2(5.7)	0(0.0)	3(2.8)	0.189	0.469
비정상(CS)	3(8.3)	0(0.0)	5(13.9)	8(7.5)		

p* : chi-square test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군), p** : chi-square test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

(라) 임상실험실 검사

여자 피험자들의 일반 혈액검사 결과를 비교한 결과, Hemoglobin, Hematocrit, RBC, Platelet, MCHC, Monocyte, Eosinophil, Basophil의 경우 MU-3 위캡슐군, MU-3 500군, MU-3 1000군 별로 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었으며, 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에도 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. MU-3 위캡슐군에서는 WBC(0.52Thous/uL 증가, p=0.006)에서 방문시기별로 유의한 차이가 있었으나 검사치의 변화가 정상 수치의 범위 안에 있었으며, 임상적으로 큰 의미는 없었다. MU-3 1000군에서도 MCV(0.19fL 감소, p=0.001)와 MCH(0.25pg 증가, p=0.003)에서 방문시기별로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위 내에서의 변화이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다.

각 방문별 군간의 검사치를 비교한 결과, MCV의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서 0주차(p=0.045)와 8주차(p=0.015), MCH의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서 0주차(p=0.019)와 4주차(p=0.049), Neutrophils의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서 0주차(p=0.012), Lymphocyte의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서 0주차(p=0.016)에 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위이며, 임상적으로 문제가 있는 경우는 없었다(표 38, 표 39).

표 38. 일반혈액검사 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Hemoglobin (g/dL)	0주	13.29±0.74 (11.6-14.8)		13.14±0.67 (12.0-14.5)		13.14±0.86 (11.1-15.2)		0.368	0.414
	4주	13.30±0.83 (11.2-14.7)	0.995	13.19±0.76 (11.7-14.7)	0.835	13.29±0.69 (11.1-14.4)	0.061	0.569	0.963
	8주	13.29±0.80 (11.7-14.7)		13.20±0.78 (11.6-15.2)		13.10±0.73 (11.5-14.3)		0.627	0.293
Hematocrit (%)	0주	42.38±2.74 (35.6-48.1)		41.38±2.24 (37.0-45.6)		41.90±2.73 (35.3-49.2)		0.098	0.456
	4주	42.31±2.76 (35.9-46.9)	0.961	41.75±2.69 (36.0-47.9)	0.385	42.37±2.34 (35.0-45.1)	0.155	0.390	0.912
	8주	42.30±2.79 (37.9-49.3)		41.48±2.91 (35.9-47.1)		41.74±2.27 (36.2-45.8)		0.228	0.350
RBC (Mil/uL)	0주	4.52±0.29 (3.89-5.12)		4.40±0.32 (3.79-5.09)		4.54±0.33 (3.76-5.39)		0.090	0.810
	4주	4.49±0.28 (3.78-4.94)	0.317	4.44±0.33 (3.78-5.12)	0.193	4.57±0.28 (3.68-5.10)	0.760	0.496	0.261
	8주	4.54±0.32 (3.99-5.07)		4.46±0.34 (3.78-5.32)		4.55±0.29 (3.87-5.10)		0.287	0.859
WBC (Thous/uL)	0주	4.50±0.95 (2.2-7.1)		4.77±1.25 (3.1-9.7)		4.99±1.24 (3.3-8.8)		0.305	0.062
	4주	5.01±1.45 (3.0-8.6)	0.006	4.86±0.93 (3.4-7.0)	0.675	5.33±1.88 (2.9-12.6)	0.417	0.617	0.418
	8주	5.02±1.35 (3.2-9.7)		4.94±0.98 (3.4-7.2)		5.14±1.32 (3.4-9.5)		0.778	0.706
Platelet (Thous/uL)	0주	250.42±52.67 (135-370)		253.74±52.26 (166-376)		268.36±57.27 (173-400)		0.790	0.171
	4주	249.11±52.61 (154-360)	0.333	246.03±51.82 (154-361)	0.472	264.92±78.70 (163-572)	0.360	0.804	0.320
	8주	254.44±50.86 (163-368)		250.31±51.73 (165-394)		273.78±79.52 (186-621)		0.735	0.223
MCV (fL)	0주	93.94±2.93 (88.0-100.8)		94.29±3.21 (88.5-101.6)		92.53±2.97 (87.2-101.3)		0.633	0.045
	4주	94.69±2.48 (89.3-98.1)	0.093	94.71±2.78 (89.5-100.0)	0.148	93.61±3.53 (88.2-103.3)	0.001	0.971	0.135
	8주	94.15±3.17 (86.5-99.0)		94.02±3.27 (88.1-101.0)		92.34±3.02 (87.5-99.0)		0.862	0.015
MCH (pg)	0주	29.50±0.94 (27.6-31.5)		29.97±1.12 (27.8-32.6)		28.96±0.99 (27.2-31.8)		0.057	0.019
	4주	29.66±0.76 (28.0-31.0)	0.142	29.86±1.06 (28.0-31.6)	0.136	29.23±1.01 (27.2-31.6)	0.003	0.361	0.049
	8주	29.46±0.88 (27.4-31.6)		29.74±1.06 (27.7-31.8)		29.21±1.03 (27.0-31.5)		0.232	0.256
MCHC (%)	0주	31.41±0.95 (30.0-33.2)		31.81±0.87 (30.0-33.7)		31.32±0.78 (30.0-33.0)		0.067	0.647
	4주	31.33±0.71 (30.3-33.3)	0.827	31.51±0.85 (29.2-33.3)	0.078	31.26±0.85 (29.7-33.0)	0.546	0.349	0.707
	8주	31.30±1.00 (29.8-34.1)		31.69±0.91 (30.1-33.9)		31.44±0.90 (30.0-33.7)		0.091	0.536

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

표 39. 일반혈액검사 (계속) - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Neutrophils (%)	0주	52.32±6.28 (39.4-63.4)	0.248	53.22±8.99 (35.3-75.3)	0.890	56.55±7.61 (41.3-79.9)	0.137	0.625	0.012
	4주	53.42±8.93 (37.9-76.6)		52.59±6.22 (41.9-64.4)		56.72±7.76 (46.2-71.9)			
	8주	51.22±6.37 (40.7-65.3)		52.92±8.24 (38.5-75.9)		53.95±7.86 (41.9-71.5)			
Lymphocyte (%)	0주	39.44±6.23 (26.8-53.3)	0.352	38.49±8.68 (15.2-56.3)	0.882	35.58±7.03 (16.3-51.1)	0.311	0.599	0.016
	4주	38.62±8.65 (19.7-54.4)		38.71±6.52 (25.9-50.1)		35.92±7.07 (17.5-45.5)			
	8주	40.21±6.22 (27.1-50.5)		38.98±7.24 (24.6-53.1)		37.68±7.96 (18.2-49.3)			
Monocyte (%)	0주	5.40±1.41 (2.5-10.3)	0.078	4.88±1.09 (3.2-7.5)	0.343	4.84±0.99 (3.0-7.1)	0.082	0.085	0.052
	4주	5.11±1.23 (2.4-8.2)		5.10±1.05 (3.4-7.7)		4.73±1.06 (2.6-6.7)			
	8주	5.64±1.42 (3.4-9.6)		5.14±1.08 (3.3-7.4)		5.14±1.20 (2.6-7.8)			
Eosinophil (%)	0주	2.35±1.46 (0.8-8.8)	0.726	2.59±1.94 (0.6-11.8)	0.987	2.37±1.24 (0.7-6.9)	0.980	0.545	0.951
	4주	2.20±0.93 (0.6-4.5)		2.56±1.69 (1.0-7.3)		2.36±1.27 (0.9-6.2)			
	8주	2.24±1.07 (0.9-5.4)		2.59±1.73 (0.8-7.3)		2.33±0.97 (1.0-5.1)			
Basophil (%)	0주	0.67±0.27 (0.2-1.4)	0.203	0.61±0.30 (0.2-1.4)	0.522	0.60±0.30 (0.1-1.4)	0.152	0.397	0.327
	4주	0.60±0.25 (0.2-1.2)		0.67±0.38 (0.2-1.9)		0.59±0.22 (0.2-1.1)			
	8주	0.69±0.29 (0.2-1.4)		0.67±0.40 (0.2-2.4)		0.69±0.37 (0.2-2.1)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)
 p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

여자 피험자들의 혈청생화학 검사 수치를 비교한 결과, BUN, Creatinine, Fasting plasma glucose, Total Bilirubin, Alkaline phosphatase, AST, ALT, Albumin 검사 수치는 MU-3 위캡술군, MU-3 500군, MU-3 1000군 별로 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었으며, 각 방문별 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 간에도 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. Total protein의 경우 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군 비교에서는 0주차(p=0.016)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 모두 정상범위이며, 임상적으로 큰 의미는 없었다(표 40, 표 41).

표 40. 혈청생화학 검사 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
BUN (mg/dL)	0주	15.26±3.56 (8.6-22.4)	0.443	16.67±3.73 (9.1-23.4)	0.338	16.36±3.90 (7.3-24.8)	0.503	0.109	0.216
	4주	14.58±3.35 (9.1-20.8)		16.00±2.83 (12.0-22.2)		15.73±3.49 (9.3-23.1)			
	8주	14.98±3.81 (8.9-25.6)		15.66±3.96 (8.1-24.9)		16.18±3.46 (8.9-23.3)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)
 p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

표 41. 혈청생화학 검사 (계속) - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Creatinine (mg/dL)	0주	0.89±0.08 (0.73-1.09)		0.89±0.09 (0.67-1.11)		0.89±0.08 (0.79-1.04)		0.800	0.930
	4주	0.89±0.08 (0.72-1.06)	0.932	0.89±0.11 (0.67-1.16)	0.347	0.90±0.09 (0.71-1.09)	0.602	0.887	0.399
	8주	0.89±0.09 (0.74-1.07)		0.87±0.11 (0.67-1.14)		0.90±0.08 (0.70-1.09)		0.538	0.663
Fasting plasma glucose (mg/dL)	0주	87.67±10.14 (71-108)		91.17±8.67 (76-109)		91.72±9.74 (73-115)		0.122	0.088
	4주	89.81±9.05 (74-108)	0.260	88.63±9.94 (70-110)	0.188	90.81±7.38 (80-108)	0.567	0.603	0.609
	8주	88.64±8.66 (72-111)		89.63±9.26 (72-109)		89.97±8.22 (74-109)		0.643	0.505
Total Bilirubin (mg/dL)	0주	0.69±0.23 (0.33-1.28)		0.65±0.24 (0.25-1.36)		0.63±0.21 (0.36-1.22)		0.507	0.235
	4주	0.66±0.19 (0.30-1.16)	0.537	0.69±0.24 (0.33-1.37)	0.179	0.64±0.16 (0.36-0.97)	0.560	0.497	0.704
	8주	0.67±0.19 (0.35-1.14)		0.65±0.18 (0.34-1.31)		0.66±0.16 (0.36-1.08)		0.595	0.721
Alkaline phosphatase (U/L)	0주	75.06±16.27 (50-129)		71.14±15.37 (45-110)		75.11±18.82 (38-119)		0.301	0.989
	4주	76.14±17.65 (49-127)	0.068	73.06±14.66 (45-104)	0.166	75.11±17.58 (46-108)	0.096	0.427	0.805
	8주	77.69±18.24 (47-129)		73.94±15.42 (45-109)		78.33±18.82 (47-126)		0.353	0.884
AST (U/L)	0주	25.14±5.97 (15-48)		24.14±3.91 (16-31)		24.47±6.33 (14-47)		0.410	0.647
	4주	23.92±3.91 (15-33)	0.306	24.46±5.61 (15-43)	0.661	23.53±4.71 (13-33)	0.412	0.638	0.704
	8주	24.06±4.19 (17-34)		24.91±4.55 (17-38)		24.22±3.80 (15-32)		0.411	0.860
ALT (U/L)	0주	18.81±6.26 (10-37)		18.91±4.61 (12-30)		20.25±8.97 (11-53)		0.934	0.431
	4주	19.31±5.01 (12-30)	0.770	21.09±6.78 (11-35)	0.138	19.33±7.10 (10-40)	0.544	0.211	0.985
	8주	19.31±6.48 (11-33)		21.34±8.79 (10-49)		20.33±7.23 (10-43)		0.269	0.527
Albumin (g/dL)	0주	4.38±0.18 (3.8-4.7)		4.33±0.19 (3.9-4.8)		4.38±0.19 (3.8-4.7)		0.215	0.900
	4주	4.38±0.20 (4.0-4.8)	0.662	4.38±0.17 (4.0-4.8)	0.212	4.40±0.18 (4.1-4.9)	0.441	0.959	0.667
	8주	4.41±0.20 (4.0-4.7)		4.37±0.20 (4.0-4.8)		4.42±0.17 (4.0-4.8)		0.340	0.796
Total protein (g/dL)	0주	7.42±0.32 (6.9-8.3)		7.21±0.39 (6.3-8.0)		7.34±0.39 (6.4-8.3)		0.016	0.341
	4주	7.41±0.37 (6.8-8.2)	0.833	7.29±0.33 (6.4-7.9)	0.223	7.37±0.32 (6.7-8.2)	0.627	0.163	0.610
	8주	7.44±0.37 (6.3-8.2)		7.31±0.30 (6.6-7.9)		7.39±0.27 (6.7-7.9)		0.088	0.514

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

여자 피험자들의 뇨 검사 (1) 수치를 비교한 결과, pH와 SG 모두 각 방문별 MU-3 위캡슐 군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없는 것으로 나타났다. MU-3 1000군의 경우 pH(0.07 증가, p=0.041)에서 방문시기별로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위 내에서의 변화이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다(표 42).

표 42. 뇨 검사 (1) - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
pH	0주	5.64±0.69 (5-7.5)	0.587	5.73±0.74 (5-7.5)	0.681	5.54±0.69 (5-7.5)	0.041	0.600	0.553
	4주	5.75±0.78 (5-8)		5.69±0.76 (5-7.5)		5.88±0.89 (5-7.5)			
	8주	5.60±0.73 (5-7.5)		5.80±0.72 (5-7.5)		5.61±0.71 (5-7.5)			
S.G	0주	1.02±0.01 (1.004-1.03)	0.167	1.02±0.01 (1.001-1.032)	0.086	1.02±0.01 (1.006-1.031)	0.079	0.526	0.510
	4주	1.02±0.01 (1.007-1.03)		1.02±0.01 (1.006-1.032)		1.02±0.01 (1.006-1.029)			
	8주	1.02±0.01 (1.005-1.029)		1.02±0.01 (1.005-1.032)		1.02±0.01 (1.008-1.031)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

여자 피험자들의 뇨 검사 (2-1, 2-2) 수치를 비교한 결과, Ketone, Bilirubin, Urobilinogen 검사 수치는 모두 정상으로 조사되었다. Nitrate 검사 수치가 비정상적으로 나온 피험자는 MU-3 위캡슐군의 경우 0주차 1명(2.8%), MU-3 500군의 경우 0주차 3명(8.6%), 4주차 2명(5.7%), 8주차 1명(2.9%), MU-3 1000군의 경우 0주차 1명(2.8%), 4주차 2명(5.6%), 8주차 1명(2.8%)으로 조사되었으나 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었으며 임상적으로 큰 의미는 없었다. Protein 검사 수치는 MU-3 500군의 경우 0주차 1명(2.9%), MU-3 1000군의 경우 0주차 1명(2.8%), 8주차 1명(2.8%)이 비정상적으로 조사되었으며, 군간에 유의하지 않았으며 임상적으로 큰 의미는 없었다. Glucose 수치에서도 MU-3 500군의 경우 8주차 1명(2.9%)이 비정상적으로 조사되었으나 군간에 유의하지 않았으며 임상적으로 문제가 있는 경우는 없었다. 그 밖에 Blood, Leukocyte 검사 수치에서도 비정상적으로 나온 경우가 있었으나 모든 방문시점에서 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 임상적으로 큰 의미는 없었다(표 43).

표 43. 뇨 검사 (2) - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		정상	비정상	정상	비정상	정상	비정상		
Nitrate (Negative)	0주	35(97.2%)	1(2.8%)	32(91.4%)	3(8.6%)	35(97.2%)	1(2.8%)	0.290	1.000
	4주	36(100.0%)	0(0.0%)	33(94.3%)	2(5.7%)	34(94.4%)	2(5.6%)	0.146	0.151
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	34(97.1%)	1(2.9%)	35(97.2%)	1(2.8%)	0.307	0.314
Protein (Negative)	0주	36(100.0%)	0(0.0%)	34(97.1%)	1(2.9%)	35(97.2%)	1(2.8%)	0.307	0.314
	4주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	35(97.2%)	1(2.8%)	-	0.314
Glucose (Negative)	0주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	4주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	34(97.1%)	1(2.9%)	36(100.0%)	0(0.0%)	0.307	-
Ketone (Negative)	0주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	4주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
Bilirubin (Negative)	0주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	4주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
Blood (Negative)	0주	34(94.4%)	2(5.6%)	29(82.9%)	6(17.1%)	33(91.7%)	3(8.3%)	0.123	0.643
	4주	34(94.4%)	2(5.6%)	31(88.6%)	4(11.4%)	34(94.4%)	2(5.6%)	0.374	1.000
	8주	33(91.7%)	3(8.3%)	34(97.1%)	1(2.9%)	35(97.2%)	1(2.8%)	0.317	0.303
Urobilinogen (Trace)	0주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	4주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
	8주	36(100.0%)	0(0.0%)	35(100.0%)	0(0.0%)	36(100.0%)	0(0.0%)	-	-
Leukocyte (Negative)	0주	30(83.3%)	6(16.7%)	26(74.3%)	9(25.7%)	29(80.6%)	7(19.4%)	0.350	0.759
	4주	30(83.3%)	6(16.7%)	25(71.4%)	10(28.6%)	27(75.0%)	9(25.0%)	0.230	0.384
	8주	29(80.6%)	7(19.4%)	30(85.7%)	5(14.3%)	30(83.3%)	6(16.7%)	0.562	0.759

p* : chi-square test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군), p** : chi-square test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

(마) 임상적 이상반응 발현상황

여자 피험자들의 대조군(MU-3 위캡슐)과 시험군(MU-3 500, MU-3 1000)에서 임상시험 제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 모든 이상반응 현황을 살펴보면, MU-3 위캡슐군에서 발현된 이상반응(AE)은 3건이었으며, MU-3 1000군에서도 5건 발현되었다.

이상약물반응(ADR) 발현은 1건도 없었다. 또한 중대한 이상반응(Serious AE)과 중대한 이상약물반응(Serious ADR)도 1건도 발생하지 않았다(표 44).

표 44. 이상반응 발현상황 비교 - 여자

단위 : 명(%)

	MU-3 위캡슐(N=36)	MU-3 500(N=35)	MU-3 1000(N=36)	Total	p*	p**	
이상반응	없다	33(91.7)	35(100.0)	31(86.1)	99(92.5)	0.239	0.710
	있다	3(8.3)	0(0.0)	5(13.9)	8(7.5)		

p* : Fisher's exact test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군), p** : Fisher's exact test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

여자 피험자들의 이상반응 발현 현황을 자세히 살펴보면, MU-3 위캡슐군에서 발현된 ‘소화불량’ 2건의 이상반응은 ‘관련성이 의심됨’으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증’, 결과는 ‘후유증 없이 회복’으로 평가되었고, 계속 시험을 진행하였다. ‘가슴쓰림(속쓰림)’ 1건의

이상반응은 ‘관련성이 적음’으로 평가되었고 중증도는 ‘경증’, 결과는 ‘후유증 없이 회복’으로 평가되었으며, 계속 시험을 진행하였다. MU-3 1000군에서 발현된 ‘가슴쓰림(속쓰림)’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 의심됨’으로 평가되었고 중증도는 ‘경증’, 결과는 ‘후유증 없이 회복’으로 평가되었으며, 계속 시험을 진행하였다. 또다른 ‘가슴쓰림(속쓰림)’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 의심됨’으로 평가되었고 취해진 조치도 ‘복용 일시적 중단’이었다. 중증도는 ‘중등증’, 결과는 ‘후유증 없이 회복’으로 평가되었으나 이상반응 발현으로 인해 피험자의 시험 중지요구로 중도탈락을 하였다. ‘식욕증가(다식증)’ 2건과 ‘소화불량’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 적음’으로 평가되었고 중증도는 ‘경증’, 결과는 ‘후유증 없이 회복’으로 평가되었으며, 계속 시험을 진행하였다(표 45).

표 45. 이상반응 발현 현황 - 여자

	이상반응 종류	발현 건수	경과	중증도	본제와의 관련여부	조치	결과
MU-3 위캡슐	소화불량	1건	1회	경증	관련성이 의심됨	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복
	소화불량	1건	1회	경증	관련성이 의심됨	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복
	가슴쓰림(속쓰림)	1건	간헐적	경증	관련성이 적음	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복
MU-3 1000	가슴쓰림(속쓰림)	1건	1회	경증	관련성이 의심됨	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복
	가슴쓰림(속쓰림)	1건	계속됨	중등증	관련성이 의심됨	일시적 중단	후유증 없이 회복
	식욕 증가(다식증)	1건	간헐적	경증	관련성이 적음	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복
	식욕 증가(다식증)	1건	1회	경증	관련성이 적음	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복
	소화불량	1건	1회	경증	관련성이 적음	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복

(바) 약물 복용력

여자 피험자들의 임상시험 선별 당시 병용약물이 있는 것으로 확인되었으며, 피험자의 복지를 위해 필요하고 또 임상시험용 건강기능식품에 영향을 주지 않는다는 시험 책임자의 판단에 따라 병용 투여할 수 있도록 결정되어 임상시험 진행에는 문제가 없음을 확인하였다. 또한 무작위 배정을 받고 임상시험용 건강기능식품을 1회 이상 복용한 이후의 병용약물도 전혀 변화 없음을 확인하였다.

다. 갱년기 증상 개선 효과에 대한 유효성 평가

유효성에 대한 자료는 ITT 분석법, PP 분석법 등을 사용하여 분석하였으며, 유효성 평가변수에 대한 최종판정은 PP 분석법으로 실시하였다.

(1) 남성갱년기 증상 개선 효과에 대한 유효성 평가(ITT 분석)

ITT 분석법은 임상시험에 등재되어 1회 이상 임상시험용 건강기능식품을 복용하고, 최소한 1회 이상 유효성 평가가 실시된 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 따라서 남자 피험자 108명[MU-3 위캡슐군 36명, MU-3 500군 36명, MU-3 1000군 36명]과 여자 피험자 107명[MU-3 위캡슐군 36명, MU-3 500군 35명(1명 제외 : 피험자의 불순응으로 인한 중도탈락), MU-3 1000군 36명]을 대상으로 평가하였다.

(가) 일차 유효성 평가

남자 피험자들의 남성갱년기 증상 설문(AMS) 점수의 변화량을 분석한 결과, AMS 총점수의 경우 MU-3 위캡슐군은 평균 2.97점 증가한 반면 MU-3 500군은 평균 12.36점 감소하여 통계적으로 유의한 개선효과($p < 0.001$)가 있었다. MU-3 1000군(평균 9.86점 감소)에서도 MU-3 위캡슐군에 비해 유의한 개선효과($p < 0.001$)를 보였다. 특히 MU-3 위캡슐군과 비교하여 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 갱년기 증상 정도의 개선효과($p < 0.001$)가 높은 것으로 확인되었다.

남성갱년기 증상 설문(AMS)을 세분화하여 살펴보면, AMS 정신적 증상의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군(평균 2.56점 감소, $p = 0.001$), MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군(평균 3.00점 감소, $p = 0.001$) 간에 유의한 차이가 있었으며, MU-3 1000군에서 높은 개선효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 MU-3 위캡슐군과 비교하여 MU-3 1000군보다 MU-3 500군의 AMS 신체적 증상(평균 5.39점 감소, $p < 0.001$)과 AMS 성적 증상(평균 4.42점 감소, $p < 0.001$)에서 개선효과가 높게 나타났다(표 46, 그림 32).

표 46. 남성갱년기 증상 설문(AMS) 변화량 비교

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
ASM 총 점수	2.97±5.67	0.003	-12.36±8.03	<0.001	-9.86±9.33	<0.001	<0.001	<0.001
ASM_정신적 증상	-0.22±2.54	0.603	-2.56±3.06	<0.001	-3.00±3.90	<0.001	0.001	0.001
ASM_신체적 증상	3.42±4.60	<0.001	-5.39±4.26	<0.001	-3.58±4.00	<0.001	<0.001	<0.001
ASM_성적 증상	-0.22±2.73	0.628	-4.42±3.52	<0.001	-3.28±3.54	<0.001	<0.001	<0.001

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

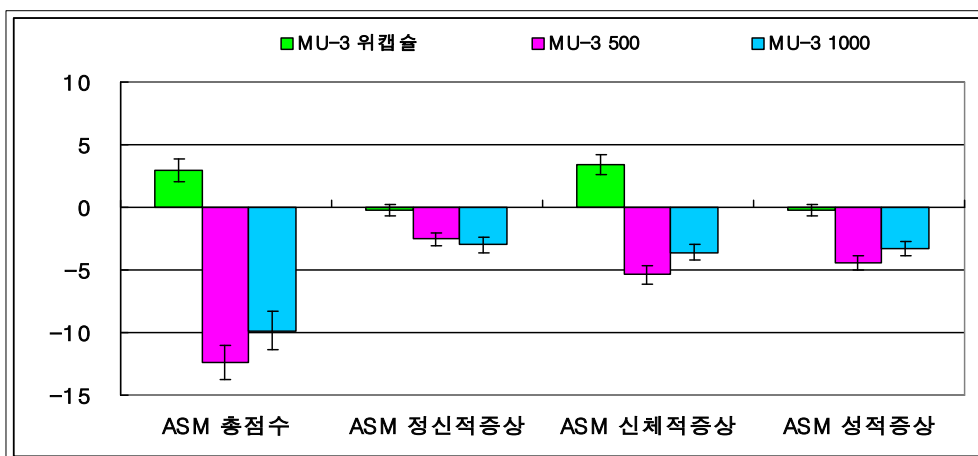


그림 32. 남성갱년기 증상 설문(AMS) 변화량 비교

남자 피험자들의 남성갱년기 증상 설문(AMS)을 비교 평가하였다. 남성갱년기 증상 설문

(AMS)은 총 17문항이며 정신적 증상 5문항, 신체적 증상 7문항, 성적 증상 5문항 등으로 구성되어 있다. 모든 항목은 증상 없음(1점), 가벼움(2점), 보통(3점), 심함(4점), 매우 심함(5점)으로 정량화하여 총점 27점 이상인 경우를 양성으로 판정하며, 증상 정도에 따라 17~26점은 증상 없음(No), 27~36점은 가벼운 정도(mild), 37~49점을 중간정도(moderate), 50점 이상을 심한정도(severe)로 구분한다.

AMS 총점수의 경우 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차(p<0.001)와 8주차(p=0.009)에서, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 비교에서도 4주차(p<0.001)와 8주차(p<0.001)에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 식품 투여 후 4주차의 AMS 총점수는 MU-3 위캡술군은 증가한 반면 MU-3 500군과 MU-3 1000군에서는 갱년기 증상 정도가 중간정도(moderate)에서 가벼운 정도(mild)로 개선되는 효과가 있었다. 8주차의 AMS 총점수는 MU-3 위캡술군과 비교하여 특히 MU-3 500군에서 갱년기 증상 정도가 증상 없음(No)으로까지 개선효과가 있는 것으로 나타났다. 남성갱년기 증상 설문(AMS)을 세분화하여 살펴본 결과, AMS 정신적 증상, AMS 신체적 증상, AMS 성적 증상의 경우 MU-3 위캡술군과 비교하여 MU-3 500군과 MU-3 1000군 모두에서 방문시기별로 갱년기 증상 정도가 유의하게 감소하는 효과가 있는 것을 확인하였다(표 47, 그림 33).

표 47. 남성갱년기 증상 설문(AMS) 비교

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
ASM 총 점수 (17문항)	0주	39.72±10.37 (27-63)		38.72±12.68 (27-85)		40.53±9.69 (27-61)		0.715	0.734
	4주	41.00±10.61 (26-64)	0.002	30.64±12.76 (17-82)	<0.00 1	34.36±10.51 (17-53)	<0.00 1	<0.00 1	0.009
	8주	42.69±10.82 (21-66)		26.36±10.48 (17-59)		30.67±9.01 (17-50)		<0.00 1	<0.00 1
ASM_정신적 증상(5문항)	0주	9.72±3.82 (5-17)		9.33±4.93 (5-25)		10.56±4.15 (5-20)		0.709	0.379
	4주	10.00±3.99 (5-17)	0.435	7.61±4.20 (5-25)	<0.00 1	9.08±3.41 (5-17)	<0.00 1	0.016	0.298
	8주	9.50±4.35 (5-21)		6.78±3.10 (5-15)		7.56±3.13 (5-15)		0.003	0.033
ASM_신체적 증상(7문항)	0주	16.33±4.77 (9-25)		16.22±5.63 (8-35)		16.86±4.33 (9-26)		0.928	0.625
	4주	17.28±5.16 (9-30)	<0.00 1	12.56±5.35 (7-33)	<0.00 1	14.83±4.86 (7-23)	<0.00 1	<0.00 1	0.042
	8주	19.75±4.87 (7-30)		10.83±4.33 (7-21)		13.28±3.85 (7-20)		<0.00 1	<0.00 1
ASM_성적 증상 (5문항)	0주	13.67±3.21 (8-21)		13.17±3.74 (7-25)		13.11±2.93 (6-19)		0.544	0.445
	4주	13.72±3.49 (6-21)	0.825	10.47±4.21 (5-24)	<0.00 1	10.44±3.56 (5-19)	<0.00 1	0.001	<0.00 1
	8주	13.44±3.84 (6-21)		8.75±3.77 (5-23)		9.83±3.57 (5-19)		<0.00 1	<0.00 1

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

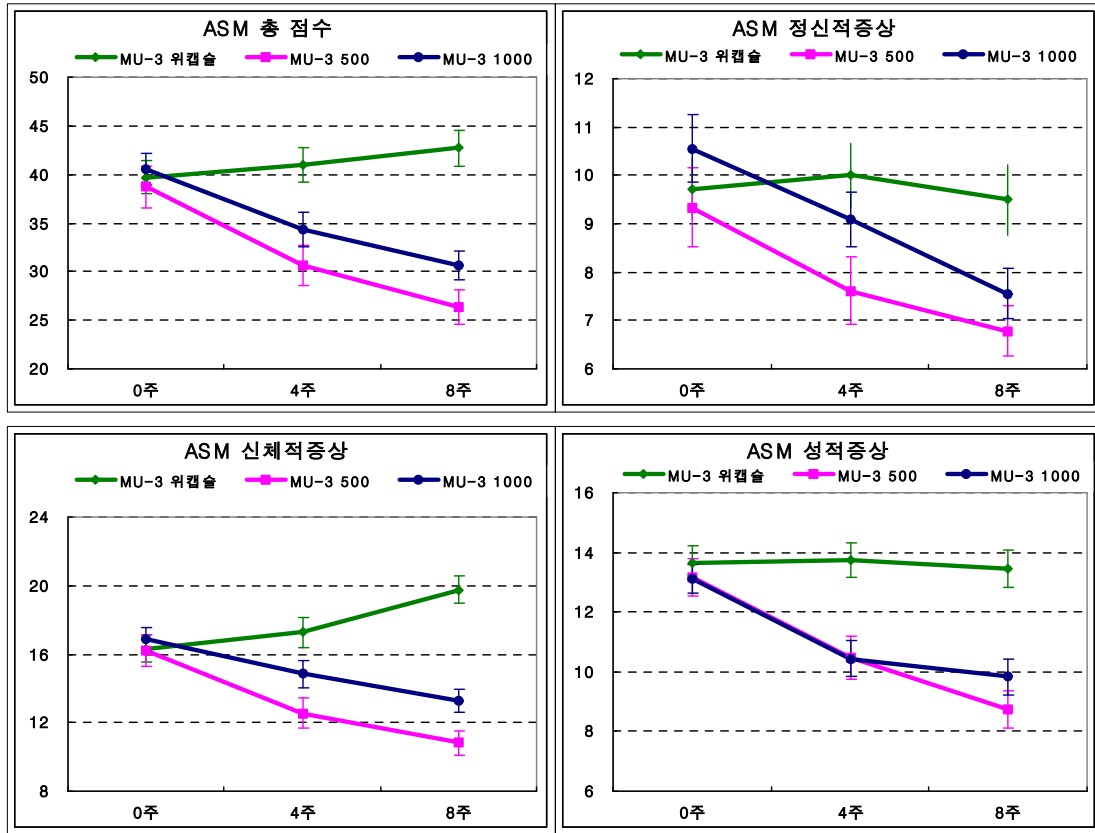


그림 33. 남성갱년기 증상 설문(AMS) 비교

(나) 이차 유효성 평가

① 남성호르몬

남자 피험자들의 Hormone parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, Total Testosterone의 경우 MU-3 위캡슐군에서 평균 0.47ng/mL 감소한 반면 MU-3 500군에서는 평균 0.78ng/mL 증가하여 유의한 개선효과(p=0.001)를 보였다. MU-3 1000군(평균 0.60ng/mL 증가)에서도 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의하게 개선되는 효과(p=0.007)가 있었다.

Free Testosterone의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 0.73pg/mL 감소)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 1.81pg/mL 증가, p=0.001)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 1.50pg/mL 증가, p=0.023)에서 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다.

Total Testosterone, Free Testosterone 검사치 모두 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다(표 48, 그림 34).

표 48. Hormone parameters 변화량 비교 - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
Total Testosterone	-0.47±1.30	0.038	0.78±1.73	0.011	0.60±1.89	0.064	0.001	0.007
Free Testosterone	-0.73±3.12	0.167	1.81±3.09	0.001	1.50±4.81	0.070	0.001	0.023

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)
 p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

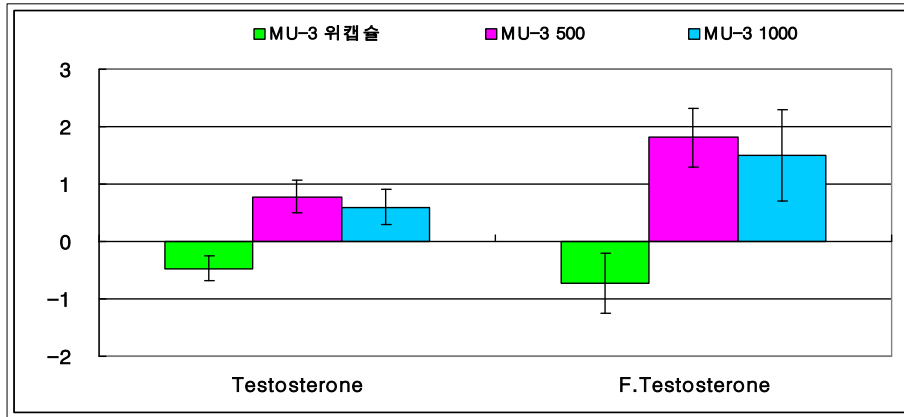


그림 34. Hormone parameters 변화량 비교 - 남자

남자 피험자들의 Hormone parameters 검사치를 비교한 결과, Total Testosterone 검사치의 경우 8주차에서만 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군(p=0.027) 간에 유의한 차이가 있었으며, 방문 시기별 변화는 MU-3 500군에서만 유의하게 증가하는 개선효과(p=0.009)를 보였다.

Free Testosterone의 경우 8주차의 검사치에서만 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군(p<0.001), MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군(p=0.011) 간에 통계적으로 유의한 변화가 있었으며, 검사치는 MU-3 500군에서만 방문시기별로 점차 수치가 증가하였으며, 이는 개선효과가 유의한 것 (p=0.005)으로 분석되었다(표 49, 그림 35).

< 표 49. Hormone parameters 비교 - 남자 >

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Total Testosterone (ng/mL)	0주	5.18±1.81 (2.17-9.19)	0.069	4.80±1.43 (1.83-7.47)	0.009	4.72±1.64 (1.18-8.74)	0.076	0.331	0.270
	4주	5.06±1.75 (2.11-8.83)		5.20±1.42 (1.74-8.83)		4.91±1.33 (1.75-7.63)			
	8주	4.71±1.61 (1.80-7.70)		5.58±1.66 (2.00-8.10)		5.32±1.58 (2.20-8.20)			
Free Testosterone (pg/mL)	0주	9.75±3.50 (3.88-19.66)	0.246	9.45±2.70 (3.47-16.98)	0.005	9.54±3.44 (2.35-18.88)	0.075	0.685	0.804
	4주	9.54±2.66 (3.40-15.60)		10.21±2.43 (5.70-15.80)		10.39±3.01 (4.60-17.70)			
	8주	9.02±2.56 (3.14-14.94)		11.26±2.58 (5.94-17.21)		11.04±3.89 (4.39-19.67)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

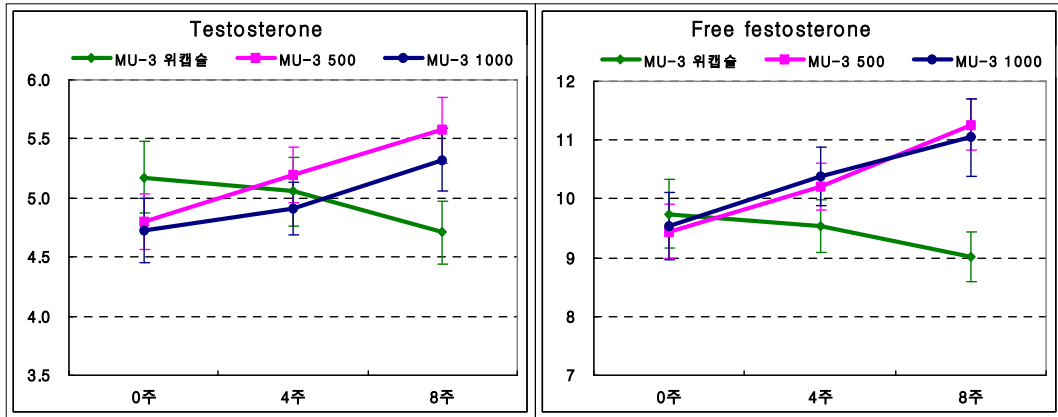


그림 35. Hormone parameters 비교 - 남자

② Osteoporosis

남자 피험자들의 Osteoporosis parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, C-Telopeptide의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 0.05ng/mL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 0.07ng/mL 감소, $p=0.004$)에서만 유의한 개선효과가 있었다. Osteocalcin 검사치의 경우에도 MU-3 위캡슐군(평균 1.52ng/mL 증가)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 1.34ng/mL 감소, $p<0.001$)에서만 유의한 개선효과를 보였다.

C-Telopeptide, Osteocalcin 검사치 모두 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군에서만 유의한 개선효과가 나타났다(표 50, 그림 36).

표 50. Osteoporosis parameters 변화량 비교 - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
C-Telopeptide	0.05±0.16	0.057	-0.07±0.19	0.028	0.05±0.15	0.089	0.004	0.868
Osteocalcin	1.52±2.76	0.002	-1.34±2.70	0.005	0.31±2.92	0.534	<0.001	0.074

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

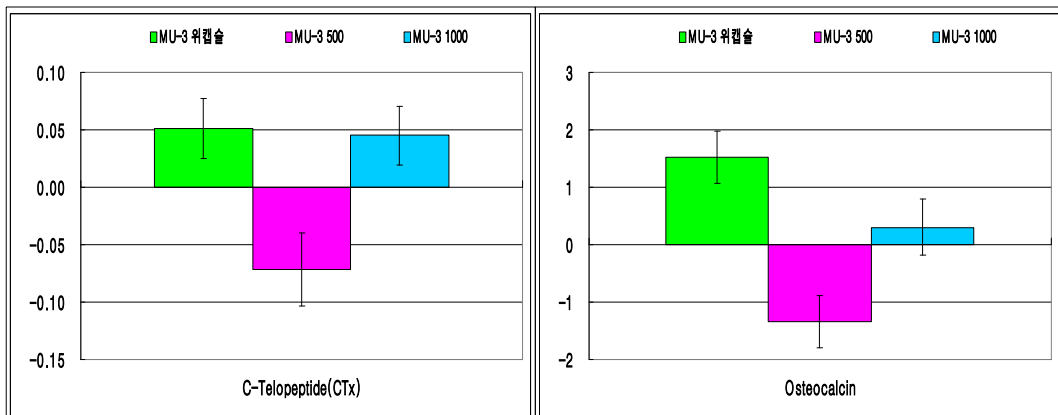


그림 36. Osteoporosis parameters 변화량 비교 - 남자

남자 피험자들의 Osteoporosis parameters 검사치를 비교한 결과, C-Telopeptide 검사치의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차(p=0.031)와 8주차(p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 0주차(p=0.036)와 8주차(p=0.036)에서 유의한 차이가 있었으며, 특히 MU-3 500군에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 효과(p=0.020)가 있는 것으로 나타났다.

Osteocalcin의 경우 8주차에서 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군(p=0.004)에서만 유의한 차이가 있었으며, MU-3 500군에서만 방문시기별로 점차 수치가 유의하게 감소하는 효과(p=0.021)가 있었다(표 51, 그림 37).

표 51. Osteoporosis parameters 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
C-Telopeptide (ng/mL)	0주	0.36±0.19 (0.08-0.80)	0.108	0.33±0.16 (0.03-0.69)	0.020	0.28±0.12 (0.08-0.54)	0.028	0.508	0.036
	4주	0.38±0.17 (0.12-0.69)		0.30±0.14 (0.09-0.64)		0.33±0.17 (0.09-0.85)			
	8주	0.41±0.18 (0.12-0.73)		0.26±0.12 (0.04-0.52)		0.32±0.17 (0.07-0.78)			
Osteocalcin (ng/mL)	0주	14.37±4.80 (5.94-24.59)	0.010	14.32±3.55 (7.67-23.39)	0.021	13.88±4.01 (6.20-22.89)	0.753	0.964	0.642
	4주	14.89±5.08 (6.61-29.19)		13.64±4.06 (4.02-23.14)		14.11±4.01 (5.57-24.58)			
	8주	15.89±4.54 (9.53-29.48)		12.98±3.72 (4.17-22.82)		14.19±4.37 (5.05-26.81)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

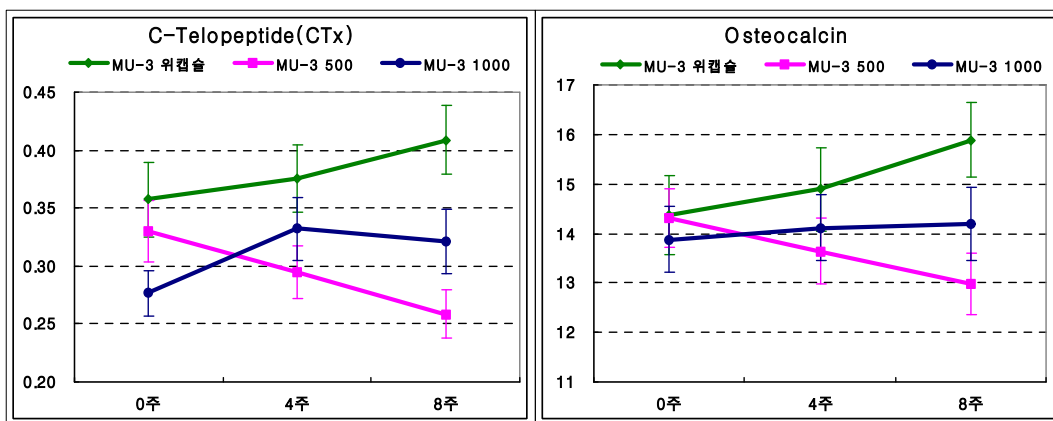


그림 37. Osteoporosis parameters 비교 - 남자

③ Osteoarthritis

남자 피험자들의 Osteoarthritis parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, COMP의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 146.33ng/mL 증가)보다 MU-3 500군(평균 180.88ng/mL 감소, p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군(평균 144.60ng/mL 감소, p<0.001)에서 유의한 개선

효과가 있었다. 특히 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다(표 52, 그림 38).

표 52. Osteoarthritis parameters 변화량 비교 - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
COMP	146.33±123.01	<0.001	-180.88±161.87	<0.001	-144.60±181.97	<0.001	<0.001	<0.001

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

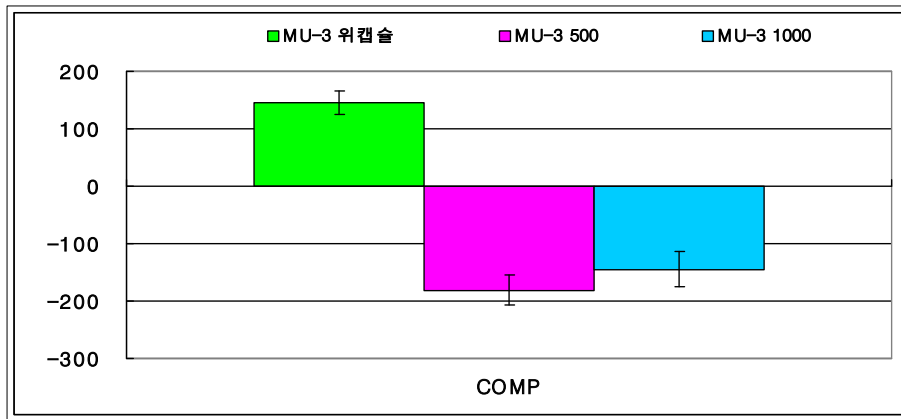


그림 38. Osteoarthritis parameters 변화량 비교 - 남자

남자 피험자들의 Osteoarthritis parameters 검사치를 비교한 결과, COMP 검사치의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 8주차(p<0.001)에서만, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 4주차(p=0.039)와 8주차(p<0.001)에서 유의한 차이가 있었다. 특히 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p=0.<001)에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 효과가 있는 것으로 나타났다(표 53, 그림 39).

표 53. Osteoarthritis parameters 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
COMP (ng/mL)	0주	755.41±305.14 (416.05-1795.85)		806.08±266.47 (262.40-1477.45)		763.44±204.16 (415.70-1217.35)		0.455	0.896
	4주	802.99±298.60 (404.90-1798.35)	<0.001	702.32±224.07 (298.95-1156.15)	<0.001	672.48±222.94 (387.10-1174.40)	<0.001	0.110	0.039
	8주	901.74±288.55 (388.95-1799.95)		625.21±205.32 (327.40-1065.85)		618.83±220.11 (263.35-1140.70)		<0.001	<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

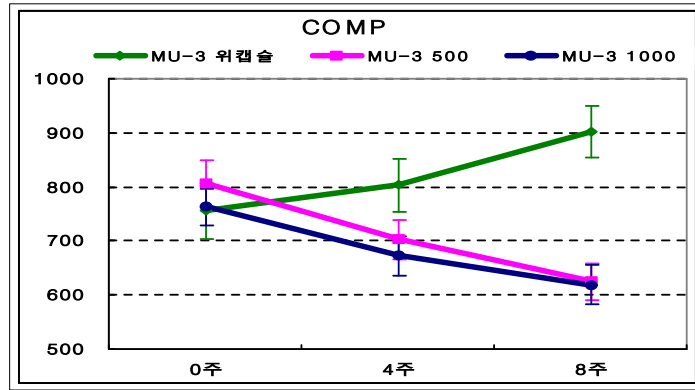


그림 39. Osteoarthritis parameters 비교 - 남자

④ circulatory system

남자 피험자들의 circulatory system parameters 검사치의 변화량을 비교하였다. MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군을 비교하였을 때 systolic blood pressure의 경우 MU-3 500군(평균 0.67mmHg 감소, p=0.586), diastolic blood pressure의 경우에도 MU-3 500군(평균 0.61mmHg 감소, p=0.338)에서 개선효과는 있었지만 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군을 비교하였을 때 systolic blood pressure의 경우 MU-3 1000군(평균 0.56mmHg 감소, p=0.713)에서, diastolic blood pressure의 경우에도 MU-3 1000군(평균 0.67mmHg 감소, p=0.437)에서 감소효과를 보였지만 통계적인 유의성은 없었다.

circulatory system parameters 검사치 모두 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군과 MU-3 1000군 모두에서 감소하였지만 개선효과의 유의성은 없었다(표 54, 그림 40).

표 54. circulatory system parameters 변화량 비교 - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
systolic blood pressure	-0.33±2.73	0.468	-0.67±2.44	0.110	-0.56±2.37	0.169	0.586	0.713
diastolic blood pressure	-1.17±2.41	0.006	-0.61±2.48	0.148	-0.67±2.99	0.189	0.338	0.437

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

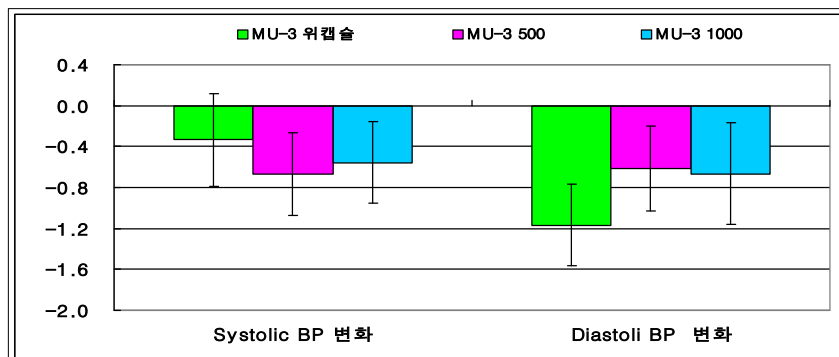


그림 40. circulatory system parameters 변화량 비교 - 남자

남자 피험자들의 circulatory system parameters 검사치를 비교한 결과, systolic blood pressure와 diastolic blood pressure의 경우 각 방문별 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, MU-3 500군과 MU-3 1000군에서 방문시기별로 점차 수치가 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었다.

MU-3 위캡술군의 경우 diastolic blood pressure(p=0.002)에서 방문시기별로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위 내에서의 변화이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다(표 55, 그림 41).

표 55. circulatory system parameters 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
systolic blood pressure (mmHg)	0주	121.06±5.56 (100-130)	0.566	119.56±5.90 (104-128)	0.274	120.83±5.60 (100-130)	0.234	0.271	0.866
	4주	121.06±4.67 (104-130)		119.33±5.35 (106-126)		120.44±4.97 (102-126)			
	8주	120.72±3.89 (106-130)		118.89±4.82 (106-126)		120.28±4.71 (102-128)			
diastolic blood pressure (mmHg)	0주	80.06±4.37 (62-86)	0.002	79.33±4.95 (60-88)	0.084	80.44±3.07 (72-88)	0.263	0.514	0.663
	4주	79.83±4.01 (64-84)		79.39±4.43 (64-86)		80.00±3.02 (72-86)			
	8주	78.89±4.29 (64-84)		78.72±4.66 (66-86)		79.78±3.30 (70-86)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

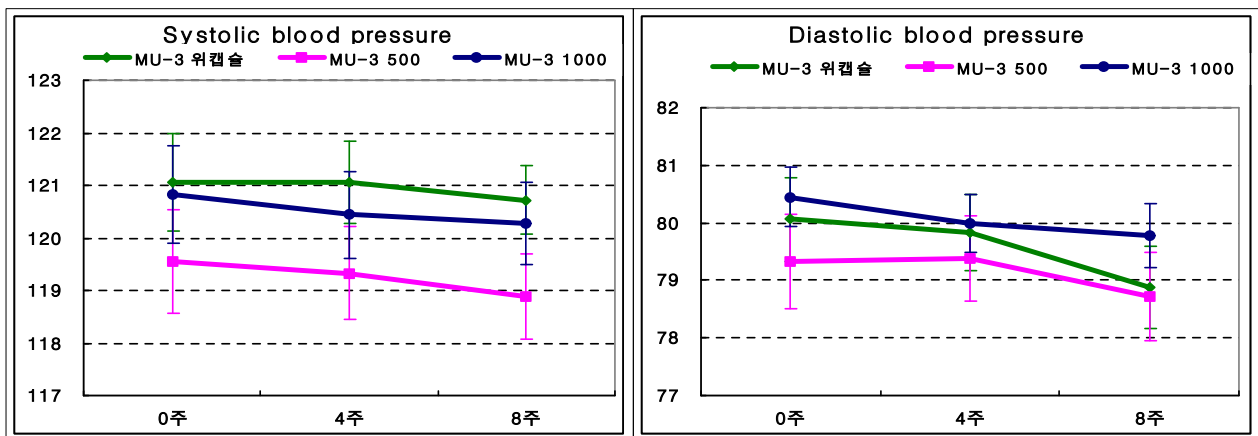


그림 41. circulatory system parameters 비교 - 남자

⑤ 발기기능 지수

남자 피험자들의 국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 점수의 변화량을 분석한 결과, IIEF 총점수의 경우 MU-3 위캡술군은 평균 1.69점 감소한 반면 MU-3 500군은 평균 12.31점 증가하여

유의한 개선효과($p < 0.001$)를 보였다. MU-3 1000군(평균 6.78점 증가)에서도 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선효과($p = 0.001$)가 있었다. 특히 MU-3 위캡슐군과 비교하여 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다.

국제 발기기능 지수 설문(IIEF)을 세분화하여 살펴보면, MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군을 비교하였을 때 IIEF 발기력의 경우 MU-3 500군(평균 5.42점 증가, $p < 0.001$)에서, IIEF 성교시 만족감의 경우 MU-3 500군(평균 2.75점 증가, $p < 0.001$)에서, IIEF 절정감의 경우에도 MU-3 500군(평균 1.83점 증가, $p = 0.003$)에서, IIEF 성적 욕구의 경우에도 MU-3 500군(평균 1.33점 증가, $p < 0.001$)에서, IIEF 성생활 만족감의 경우에도 MU-3 500군(평균 5.42점 증가, $p < 0.001$)에서 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다.

MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군을 비교하였을 때 IIEF 발기력의 경우 MU-3 1000군(평균 2.78점 증가, $p = 0.002$)에서, IIEF 성교시 만족감의 경우 MU-3 1000군(평균 1.44점 증가, $p = 0.005$)에서, IIEF 절정감의 경우에도 MU-3 1000군(평균 0.92점 증가, $p = 0.031$)에서, IIEF 성적 욕구의 경우에도 MU-3 1000군(평균 1.14점 증가, $p < 0.001$)에서, IIEF 성생활 만족감의 경우에도 MU-3 1000군(평균 0.50점 증가, $p = 0.006$)에서 유의하게 개선되는 효과가 나타났다.

국제 발기기능 지수 설문(IIEF)을 세분화한 결과 모두 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다(표 56, 그림 42).

표 56. 국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 변화량 비교 - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
IIEF 총점수	-1.69±11.87	0.398	12.31±14.88	<0.001	6.78±7.36	<0.001	<0.001	0.001
IIEF_발기력	-0.81±5.73	0.405	5.42±7.34	<0.001	2.78±3.18	<0.001	<0.001	0.002
IIEF_성교시 만족감	0.00±2.46	1.000	2.75±3.48	<0.001	1.44±1.70	<0.001	<0.001	0.005
IIEF_절정감	-0.06±2.20	0.881	1.83±2.93	0.001	0.92±1.48	0.001	0.003	0.031
IIEF_성적욕구	-0.33±1.69	0.245	1.33±1.62	<0.001	1.14±1.50	<0.001	<0.001	<0.001
IIEF_성생활 만족감	-0.50±1.70	0.086	0.97±1.34	<0.001	0.50±1.28	0.024	<0.001	0.006

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

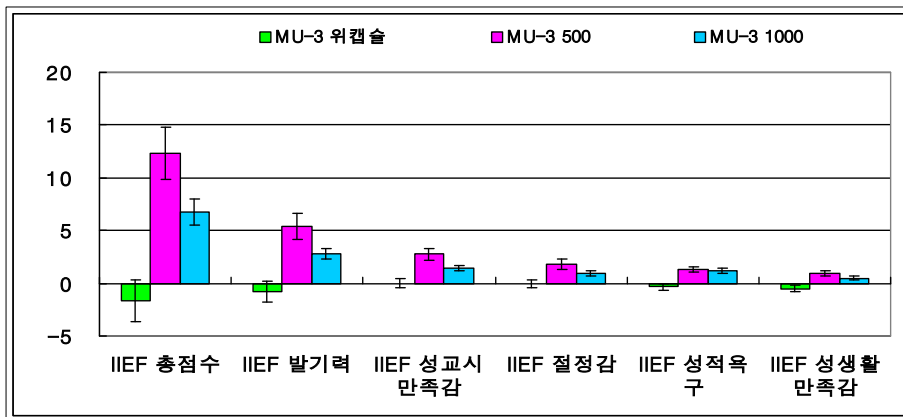


그림 42. 국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 변화량 비교 - 남자

남자 피험자들의 국제 발기기능 지수 설문(IEEF)을 비교 평가하였다. 국제 발기기능 지수 설문(IEEF)은 총 15문항이며 발기력 6문항, 성교시 만족감 3문항, 절정감 2문항, 성적 욕구 2문항, 성생활 만족감 2문항 등으로 구성되어 있다. 모든 항목은 0점에서 5점 또는 1점에서 5점으로 정량화하였다.

IEEF 총점수의 경우 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차($p=0.026$)와 8주차($p=0.001$)에서, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 비교에서도 4주차($p=0.002$)와 8주차($p<0.001$)에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 특히 MU-3 500군과 MU-3 1000군에서 방문시기별로 남성 발기기능 증상 정도를 개선시키는 효과가 있는 것으로 나타났다.

국제 발기기능 지수 설문(IEEF)을 세분화하여 살펴본 결과, IIEF 발기력, IIEF 성교시 만족감, IIEF 절정감의 경우 MU-3 위캡술군과 비교하여 MU-3 500군과 MU-3 1000군 모두에서 4주차와 8주차에서 통계적으로 유의한 변화가 있었으며, MU-3 500군과 MU-3 1000군에서 방문시기별로 남성 성기능 증상 정도가 유의하게 개선되는 효과를 보였다.

IEEF 성적 욕구의 경우 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군 비교에서는 8주차($p=0.001$)에서만, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 비교에서는 4주차($p=0.004$)와 8주차($p<0.001$)에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다. MU-3 500군과 MU-3 1000군에서 방문시기별로 남성 발기기능 증상 정도를 개선시키는 효과가 있었다.

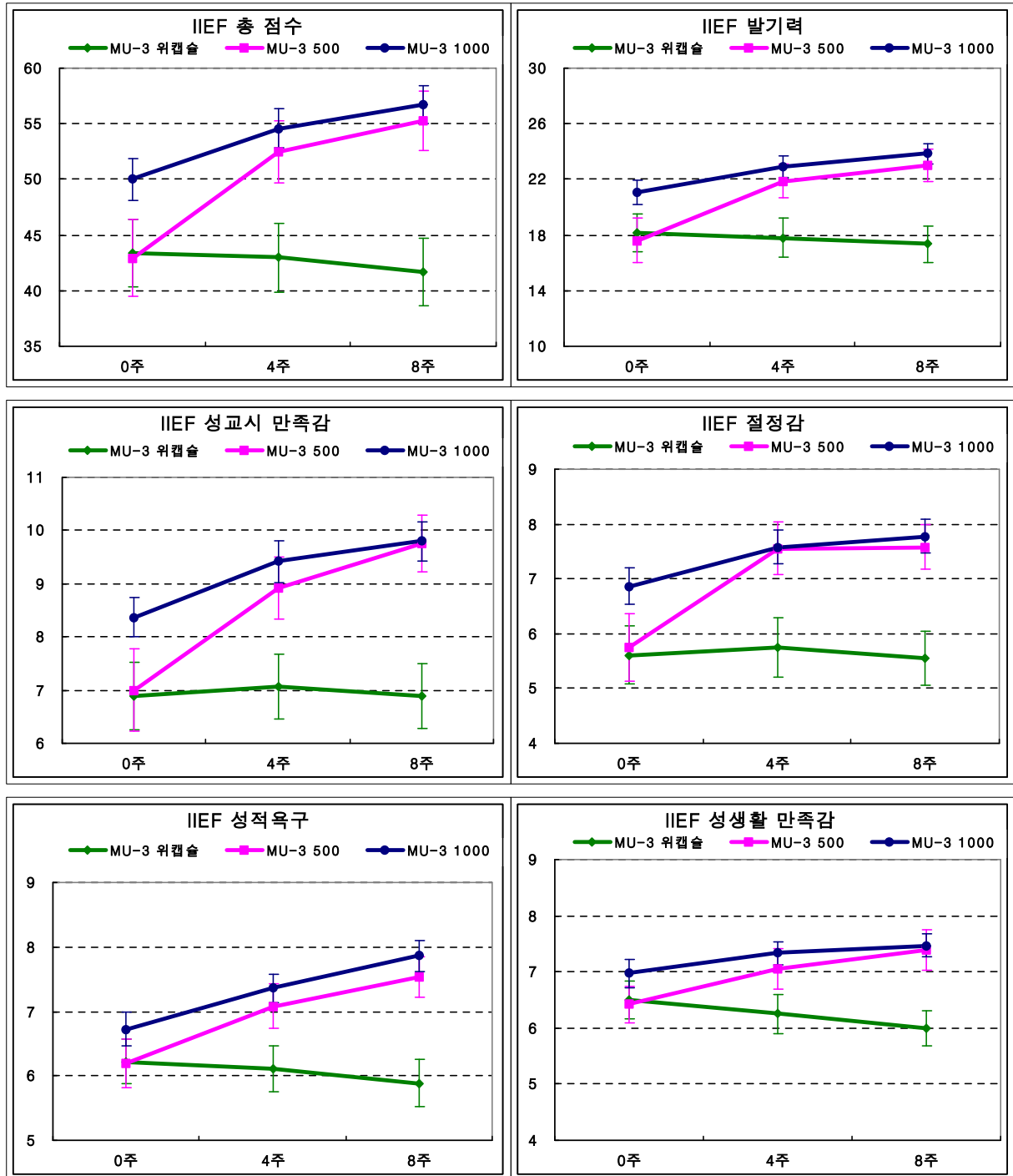
IEEF 성생활 만족감의 경우에도 MU-3 위캡술군과 MU-3 500군 비교에서는 8주차($p=0.005$)에서만, MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군 비교에서는 4주차($p=0.010$)와 8주차($p<0.001$)에서 유의한 차이가 있었으며, MU-3 500군에서만 방문시기별로 남성 발기기능 증상 정도가 유의하게 증가하는 효과가 있는 것을 확인하였다(표 57, 그림 43).

표 57. 국제 발기기능 지수 설문(IEEF) 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
IEEF 총점수 (15문항)	0주	43.36±18.21 (5-67)	0.564	42.94±20.87 (8-71)	<0.001	50.00±11.28 (28-70)	<0.001	0.928	0.068
	4주	42.97±18.69 (5-67)		52.47±16.68 (9-73)		54.58±10.61 (32-73)			
	8주	41.67±17.93 (5-69)		55.25±15.87 (9-74)		56.78±10.22 (36-73)			
IEEF_발기력 (6문항)	0주	18.14±8.18 (1-29)	0.621	17.58±9.59 (2-30)	<0.001	21.08±5.06 (11-30)	<0.001	0.792	0.071
	4주	17.81±8.37 (1-29)		21.86±7.30 (2-30)		22.89±4.77 (11-30)			
	8주	17.33±7.82 (1-29)		23.00±6.90 (2-30)		23.86±4.41 (14-30)			
IEEF_성교시 만족감(3문항)	0주	6.89±3.81 (0-12)	0.849	7.00±4.61 (0-14)	<0.001	8.36±2.21 (5-13)	<0.001	0.912	0.050
	4주	7.06±3.66 (0-14)		8.92±3.49 (0-14)		9.42±2.32 (6-14)			
	8주	6.89±3.69 (0-15)		9.75±3.22 (0-14)		9.81±2.21 (6-14)			
IEEF_절정감 (2문항)	0주	5.61±3.21 (0-10)	0.843	5.75±3.66 (0-10)	<0.001	6.86±1.97 (3-10)	0.002	0.865	0.051
	4주	5.75±3.28 (0-10)		7.56±2.86 (0-10)		7.58±1.92 (4-10)			
	8주	5.56±2.97 (0-10)		7.58±2.39 (0-10)		7.78±1.84 (4-10)			
IEEF_성적욕구 (2문항)	0주	6.22±2.04 (2-9)	0.380	6.19±2.23 (2-10)	<0.001	6.72±1.60 (4-10)	<0.001	0.956	0.251
	4주	6.11±2.11 (2-10)		7.08±2.06 (2-10)		7.36±1.33 (4-10)			
	8주	5.89±2.20 (2-10)		7.53±1.87 (3-10)		7.86±1.44 (5-10)			
IEEF_성생활 만족감(2문항)	0주	6.50±1.95 (2-10)	0.233	6.42±1.93 (2-10)	<0.001	6.97±1.46 (3-10)	0.080	0.856	0.249
	4주	6.25±2.12 (2-10)		7.06±2.14 (2-10)		7.33±1.24 (4-10)			
	8주	6.00±1.87 (2-10)		7.39±2.18 (2-10)		7.47±1.25 (4-10)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)



< 그림 43. 국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 비교 - 남자 >

(2) 남성갱년기 증상 개선 효과에 대한 유효성 평가(PP 분석법-최종 판정)

PP 분석법은 임상시험에서 중도 탈락한 경우와 복약 순응도가 70% 미만인 피험자를 제외한 계획서순응 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 따라서 남자 피험자 107명[MU-3 위캡슐군 36명, MU-3 500군 36명, MU-3 1000군 35명(1명 제외 : 이상반응으로 인한 중도탈락)]을 대상으로 평가하였다.

(가) 일차 유효성 평가

남자 피험자들의 남성갱년기 증상 설문(AMS) 점수의 변화량을 분석한 결과, AMS 총점수의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 2.97점 증가)과 비교했을 때 MU-3 500군(평균 12.36점 감소, $p < 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군(평균 10.26점 감소, $p < 0.001$)에서 유의한 개선효과가 있었다. 특히 MU-3 위캡슐군과 비교하여 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 갱년기 증상 정도가 중간정도(moderate)에서 증상 없음(No)으로까지 개선되는 효과를 보여 MU-3 500군에서 갱년기 증상 정도의 개선효과($p < 0.001$)가 높은 것으로 확인되었다.

남성갱년기 증상 설문(AMS)을 세분화하여 살펴보면, AMS 정신적 증상, AMS 신체적 증상, AMS 성적 증상 모두 MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 500군에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군에서 유의한 개선효과를 보였다. 특히 AMS 정신적 증상의 경우 MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 500군보다는 MU-3 1000군(평균 3.00점 감소, $p = 0.001$)에서 높은 개선효과가 있었다. 또한 MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군보다는 MU-3 500군에서의 AMS 신체적 증상(평균 5.39점 감소, $p < 0.001$)과 AMS 성적 증상(평균 4.42점 감소, $p < 0.001$)에서 개선효과가 높게 나타났다 (표 58, 그림 44).

표 58. 남성갱년기 증상 설문(AMS) 변화량 비교 - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
ASM 총 점수	2.97±5.67	0.003	-12.36±8.03	<0.001	-10.26±9.15	<0.001	<0.001	<0.001
ASM_정신적증상	-0.22±2.54	0.603	-2.56±3.06	<0.001	-3.00±3.96	<0.001	0.001	0.001
ASM_신체적증상	3.42±4.60	<0.001	-5.39±4.26	<0.001	-3.74±3.94	<0.001	<0.001	<0.001
ASM_성적증상	-0.22±2.73	0.454	-4.42±3.52	<0.001	-3.51±3.29	<0.001	<0.001	<0.001

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

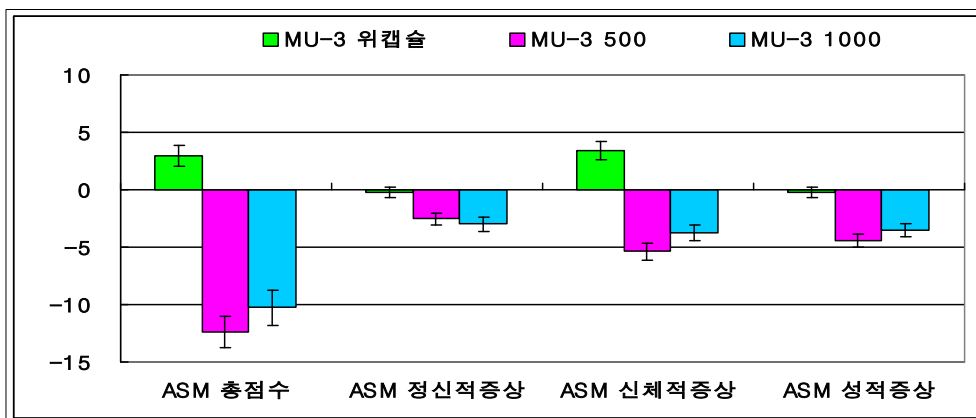


그림 44. 남성갱년기 증상 설문(AMS) 변화량 비교

남자 피험자들의 남성갱년기 증상 설문(AMS)을 비교 평가하였다. 남성갱년기 증상 설문(AMS)은 총 17문항이며 정신적 증상 5문항, 신체적 증상 7문항, 성적 증상 5문항 등으로 구성되어 있다. 모든 항목은 증상 없음(1점), 가벼움(2점), 보통(3점), 심함(4점), 매우 심함(5점)으로 정량화하여 총점 27점 이상인 경우를 양성으로 판정하며, 증상 정도에 따라 17~26점은 증상 없음(No), 27~36점은 가벼운 정도(mild), 37~49점을 중간정도(moderate), 50점 이상을 심한정도(severe)로 구분한다.

AMS 총점수의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차($p < 0.001$)와 8주차($p = 0.006$)에서, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서도 4주차($p < 0.001$)와 8주차($p < 0.001$)에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 식품 투여 후 4주차의 AMS 총점수는 MU-3 위캡슐군은 증가한 반면 MU-3 500군과 MU-3 1000군에서는 갱년기 증상 정도가 중간정도(moderate)에서 가벼운 정도(mild)로 개선되는 효과가 있는 것으로 나타났다. 8주차의 AMS 총점수는 MU-3 위캡슐군과 비교하여 특히 MU-3 500군에서 갱년기 증상 정도가 증상 없음(No)으로까지 개선효과가 있는 것으로 확인되었다.

남성갱년기 증상 설문(AMS)을 세분화하여 살펴본 결과, AMS 정신적 증상, AMS 신체적 증상, AMS 성적 증상의 경우 MU-3 위캡슐군과 비교하여 MU-3 500군과 MU-3 1000군 모두에서 4주차와 8주차에서 통계적으로 유의한 변화가 있었으며, MU-3 500군과 MU-3 1000군에서 방문시기별로 갱년기 증상 정도가 유의하게 감소하는 효과가 있는 것을 확인하였다(표 59, 그림 45).

표 59. 남성갱년기 증상 설문(AMS) 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
ASM 총점수 (17문항)	0주	39.72±10.37 (27-63)	0.002	38.72±12.68 (27-85)	<0.001	40.43±9.81 (27-61)	<0.001	0.715	0.769
	4주	41.00±10.61 (26-64)		30.64±12.76 (17-82)		33.97±10.40 (17-53)			
	8주	42.69±10.82 (21-66)		26.36±10.48 (17-59)		30.17±8.63 (17-50)			
ASM_정신적 증상(5문항)	0주	9.72±3.82 (5-17)	0.435	9.33±4.93 (5-25)	<0.001	10.51±4.20 (5-20)	<0.001	0.709	0.409
	4주	10.00±3.99 (5-17)		7.61±4.20 (5-25)		9.09±3.46 (5-17)			
	8주	9.50±4.35 (5-21)		6.78±3.10 (5-15)		7.51±3.17 (5-15)			
ASM_신체적 증상(7문항)	0주	16.33±4.77 (9-25)	<0.001	16.22±5.63 (8-35)	<0.001	16.83±4.39 (9-26)	<0.001	0.928	0.651
	4주	17.28±5.16 (9-30)		12.56±5.35 (7-33)		14.69±4.85 (7-23)			
	8주	19.75±4.87 (7-30)		10.83±4.33 (7-21)		13.09±3.73 (7-20)			
ASM_성적증 상 (5문항)	0주	13.67±3.21 (8-21)	0.825	13.17±3.74 (7-25)	<0.001	13.09±2.96 (6-19)	<0.001	0.544	0.431
	4주	13.72±3.49 (6-21)		10.47±4.21 (5-24)		10.20±3.29 (5-16)			
	8주	13.44±3.84 (6-21)		8.75±3.77 (5-23)		9.57±3.25 (5-15)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)
p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

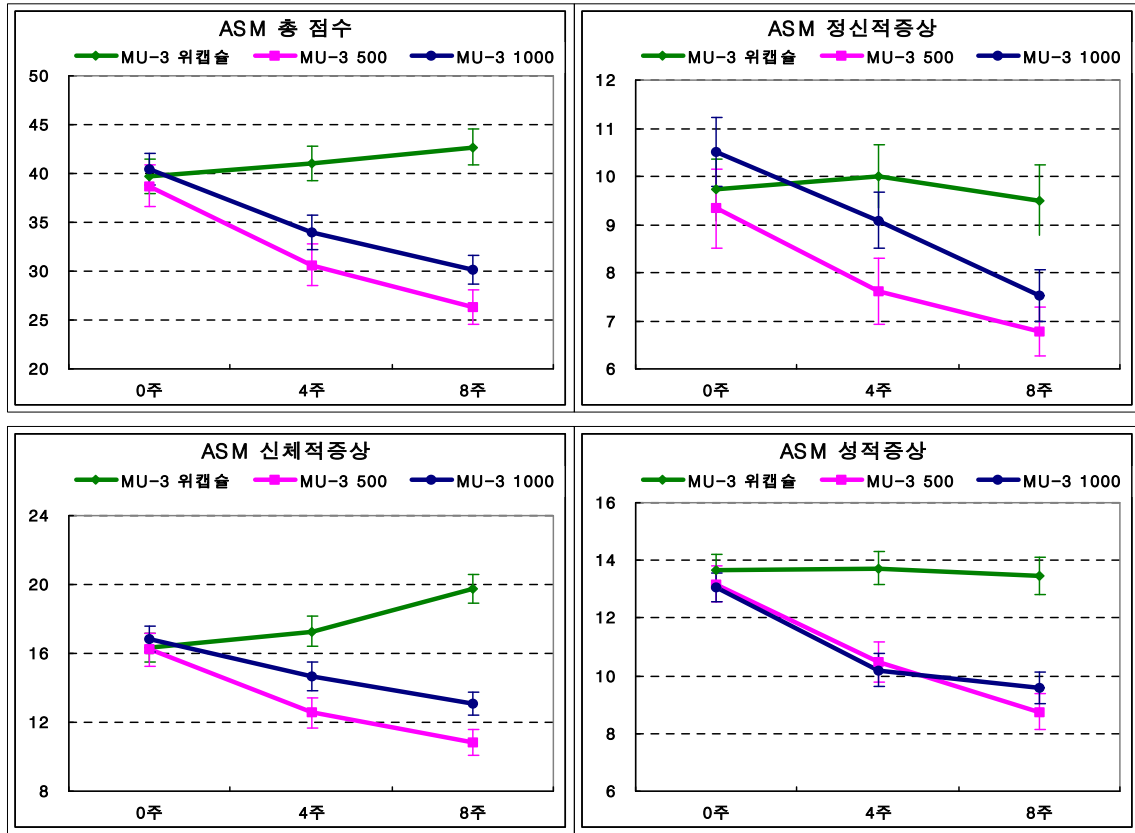


그림 45. 남성갱년기 증상 설문(AMS) 비교 - 남자

(나) 이차 유효성 평가

① 남성호르몬

남자 피험자들의 Hormone parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, Total Testosterone의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 0.47ng/mL 감소한 반면 MU-3 500군에서는 평균 0.78ng/mL 증가하여 유의한 개선효과(p=0.001)를 보였다. MU-3 1000군(평균 0.66ng/mL 증가)에서도 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의하게 개선되는 효과(p=0.005)가 있었다.

Free Testosterone의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 0.73pg/mL 감소)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 1.81pg/mL 증가, p=0.001)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 1.50pg/mL 증가, p=0.026)에서 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다.

Hormone parameters 검사치 모두 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다는 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다(표 60, 그림 46).

표 60. Hormone parameters 변화량 비교 - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
Total Testosterone	-0.47±1.30	0.038	0.78±1.73	0.011	0.65±1.89	0.050	0.001	0.005
Free Testosterone	-0.73±3.12	0.167	1.81±3.09	0.001	1.50±4.88	0.078	0.001	0.026

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)
 p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

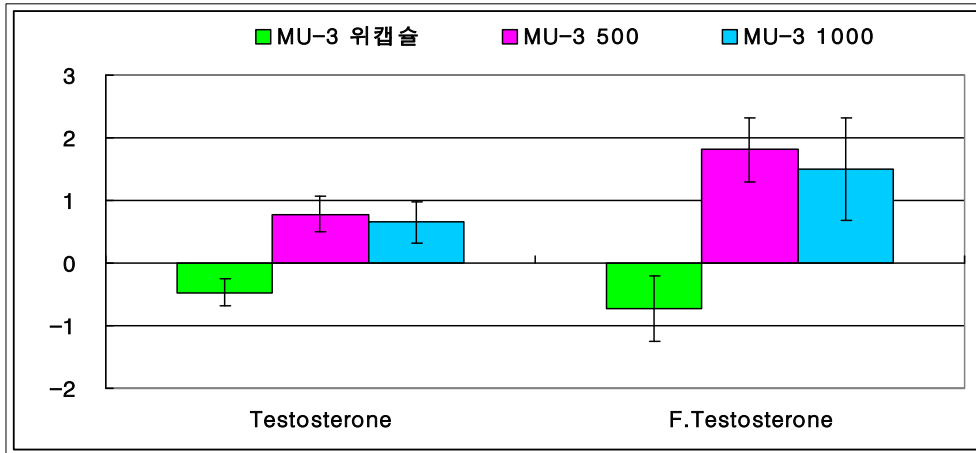


그림 46. Hormone parameters 변화량 비교 - 남자

남자 피험자들의 Hormone parameters 검사치를 비교 분석한 결과, Baseline의 Total Testosterone 검사치는 시험 시작 전 군간에 통계학적으로 유의한 차이(p=0.442)는 없었다. 식품 투여 후 4주차의 검사치(p=0.764)와 8주차의 검사치도 군간에 유의한 변화(p=0.066)가 없었다. MU-3 500군에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 증가하는 효과(p=0.009)가 있는 것으로 나타났다.

Free Testosterone 검사치는 MU-3 500군에서 방문시기별로 점차 수치가 증가하였으며, 이는 개선효과가 유의한 것(p=0.005)으로 분석되었다(표 61, 그림 47).

표 61. Hormone parameters 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Total Testosterone (ng/mL)	0주	5.18±1.81 (2.17-9.19)		4.80±1.43 (1.83-7.47)		4.71±1.66 (1.18-8.74)		0.331	0.258
	4주	5.06±1.75 (2.11-8.83)	0.069	5.20±1.42 (1.74-8.83)	0.009	4.93±1.35 (1.75-7.63)	0.058	0.712	0.737
	8주	4.71±1.61 (1.80-7.70)		5.58±1.66 (2.00-8.10)		5.35±1.59 (2.20-8.20)		0.027	0.094
Free Testosterone (pg/mL)	0주	9.75±3.50 (3.88-19.66)		9.45±2.70 (3.47-16.98)		9.55±3.49 (2.35-18.88)		0.685	0.813
	4주	9.54±2.66 (3.40-15.60)	0.246	10.21±2.43 (5.70-15.80)	0.005	10.38±3.06 (4.60-17.70)	0.087	0.266	0.221
	8주	9.02±2.56 (3.14-14.94)		11.26±2.58 (5.94-17.21)		11.05±3.95 (4.39-19.67)		<0.001	0.013

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

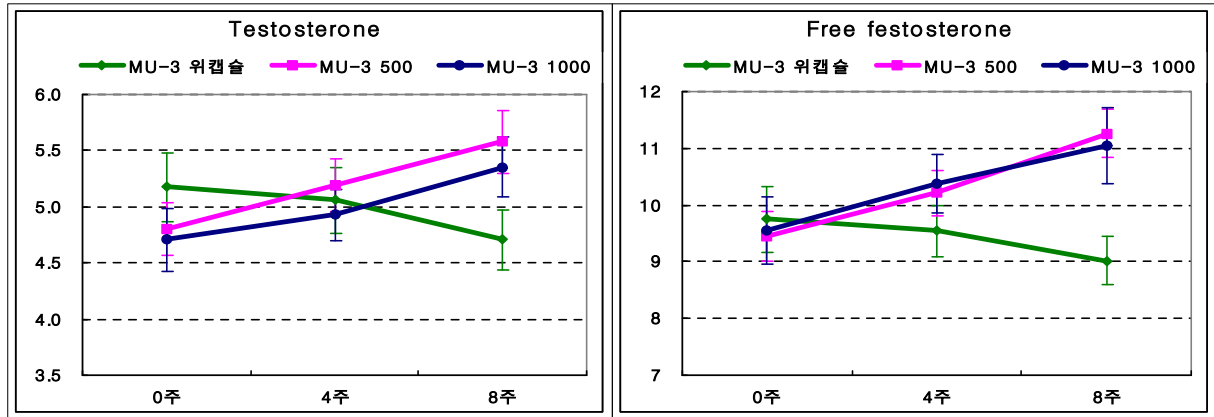


그림 47. Hormone parameters 비교 - 남자

② Osteoporosis

남자 피험자들의 Osteoporosis parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, C-Telopeptide의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군(평균 0.05ng/mL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 0.07ng/mL 감소, p=0.004)에서만 유의한 개선효과가 있었다.

Osteocalcin 검사치의 경우에도 MU-3 위캡슐군(평균 1.52ng/mL 증가)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 1.34ng/mL 감소, p<0.001)에서만 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다. Osteoporosis parameters 검사치 모두 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군에서만 유의한 개선효과가 나타났다(표 62, 그림 48).

표 62. Osteoporosis parameters 변화량 비교 - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
C-Telopeptide	0.05±0.16	0.057	-0.07±0.19	0.028	0.05±0.16	0.087	0.004	0.903
Osteocalcin	1.52±2.76	0.002	-1.34±2.70	0.005	0.33±2.96	0.513	<0.001	0.084

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

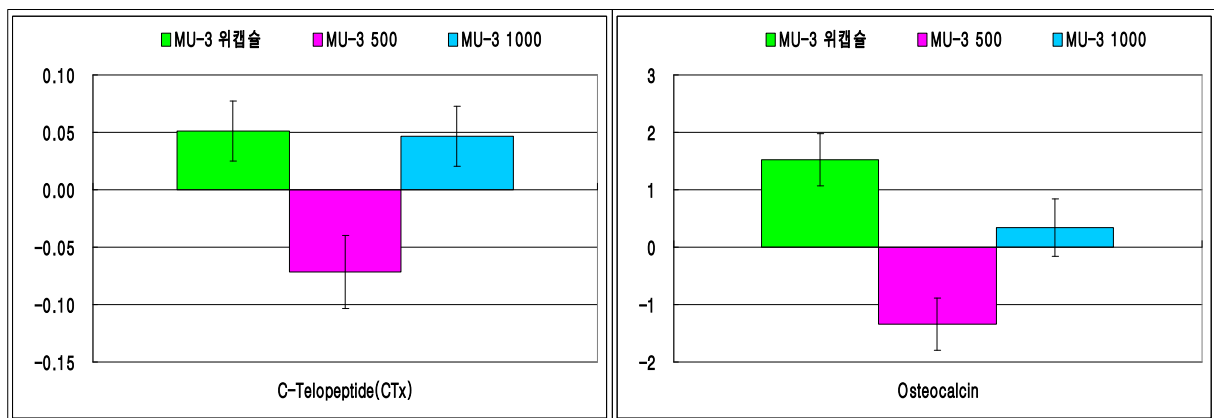


그림 48. Osteoporosis parameters 변화량 비교 - 남자

③ Osteoporosis

남자 피험자들의 Osteoporosis parameters 검사치를 비교한 결과, Baseline의 C-Telopeptide 검사치는 시험 시작 전 군간에 통계학적으로 유의한 차이(p=0.096)는 없었다. 식품 투여 후 8주 차의 검사치에서는 군간에 유의한 차이(p=0.001)가 있었다. 특히 MU-3 500군에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 효과(p=0.020)가 있는 것으로 나타났다.

Osteocalcin 검사치의 방문 시기별 변화는 MU-3 500군(p=0.021)에서만 유의하게 감소하는 효과를 보였다(표 63, 그림 49).

표 63. Osteoporosis parameters 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
C-Telopeptide (ng/mL)	0주	0.36±0.19 (0.08-0.80)		0.33±0.16 (0.03-0.69)		0.28±0.12 (0.08-0.54)		0.508	0.036
	4주	0.38±0.17 (0.12-0.69)	0.108	0.30±0.14 (0.09-0.64)	0.020	0.33±0.17 (0.09-0.85)	0.027	0.031	0.299
	8주	0.41±0.18 (0.12-0.73)		0.26±0.12 (0.04-0.52)		0.32±0.17 (0.07-0.78)		<0.001	0.041
Osteocalcin (ng/mL)	0주	14.37±4.80 (5.94-24.59)		14.32±3.55 (7.67-23.39)		13.80±4.03 (6.20-22.89)		0.964	0.590
	4주	14.89±5.08 (6.61-29.19)	0.010	13.64±4.06 (4.02-23.14)	0.021	14.05±4.05 (5.57-24.58)	0.730	0.254	0.445
	8주	15.89±4.54 (9.53-29.48)		12.98±3.72 (4.17-22.82)		14.13±4.42 (5.05-26.81)		0.004	0.103

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

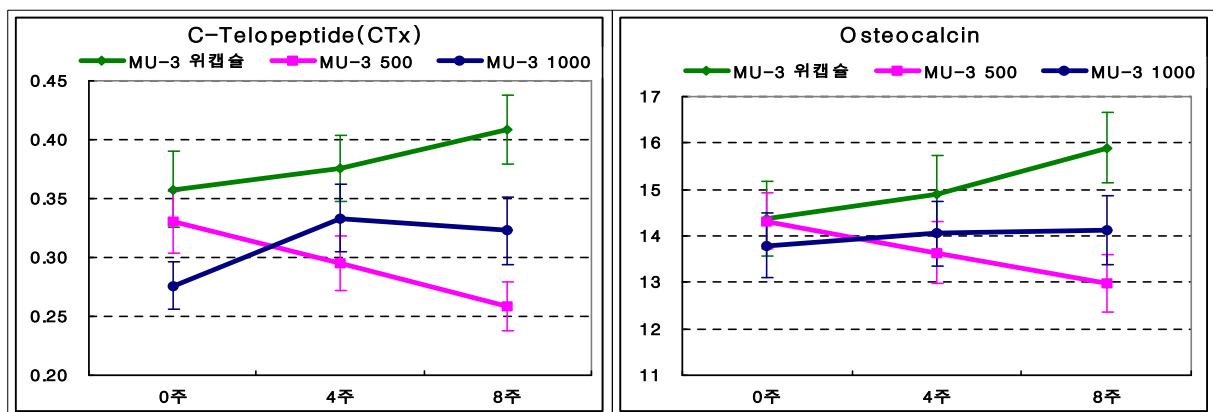


그림 49. Osteoporosis parameters 비교 - 남자

남자 피험자들의 Osteoarthritis parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, COMP는 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군(146.33ng/mL 증가)에 비해 MU-3 500군(180.88ng/mL 감소, p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(151.12ng/mL 감소, p<0.001)에서 유의한 개선효과가 있는 것으로 평가되었다. 특히 MU-3 위캡슐군과 비교했을

때 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다(표 64, 그림 50).

표 64. Osteoarthritis parameters 변화량 비교 - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
COMP	146.33±123.01	<0.001	-180.88±161.87	<0.001	-151.12±180.33	<0.001	<0.001	<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

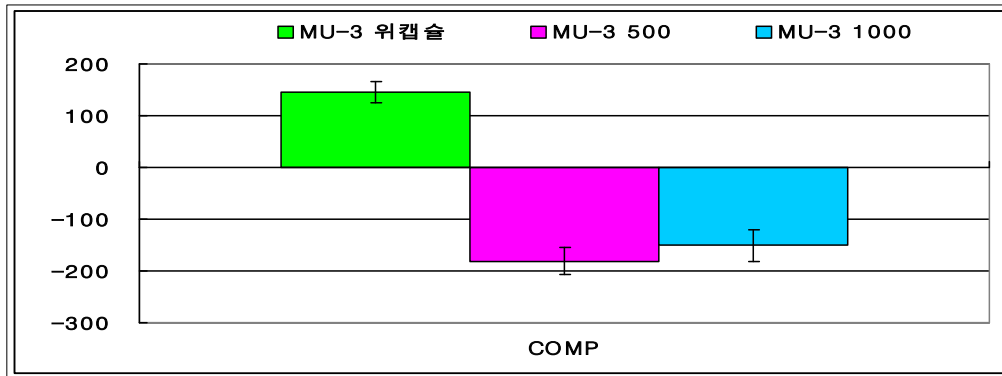


그림 50. Osteoarthritis parameters 변화량 비교 - 남자

남자 피험자들의 Osteoarthritis parameters 검사치를 비교한 결과, Baseline의 COMP 검사치는 시험 시작 전 군간에 통계학적으로 유의한 차이(p=0.671)는 없었다. 식품 투여 후 8주차의 검사치에서는 군간에 유의한 차이(p<0.001)가 있었다. 특히 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p=0.<001)에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 효과가 있는 것으로 나타났다(표 66, 그림 51).

표 66. Osteoarthritis parameters 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
COMP (ng/mL)	0주	755.41±305.14 (416.05-1795.85)		806.08±266.47 (262.40-1477.45)		760.91±206.57 (415.70-1217.35)		0.455	0.930
	4주	802.99±298.60 (404.90-1798.35)	<0.001	702.32±224.07 (298.95-1156.15)	<0.001	664.98±221.54 (387.10-1174.40)	<0.001	0.110	0.031
	8주	901.74±288.55 (388.95-1799.95)		625.21±205.32 (327.40-1065.85)		609.80±216.44 (263.35-1140.70)		<0.001	<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

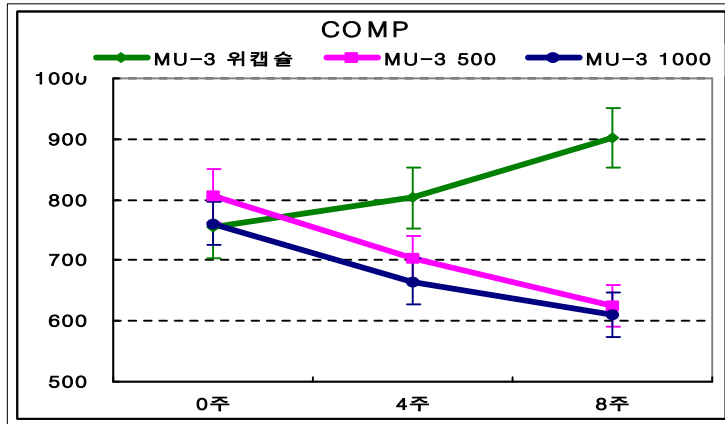


그림 51. Osteoarthritis parameters 비교 - 남자

④ circulatory system

남자 피험자들의 circulatory system parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, systolic blood pressure와 diastolic blood pressure 모두 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 유의한 변화가 없었다.

circulatory system parameters 검사치 모두 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군과 MU-3 1000군 모두에서 감소하였지만, 개선효과는 없었다(표 67, 그림 52).

< 표 67. circulatory system parameters 변화량 비교 - 남자 >

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
Systolic BP	-0.33±2.73	0.468	-0.67±2.44	0.110	-0.51±2.39	0.212	0.586	0.767
Diastolic BP	-1.17±2.41	0.006	-0.61±2.48	0.148	-0.74±2.99	0.151	0.338	0.513

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

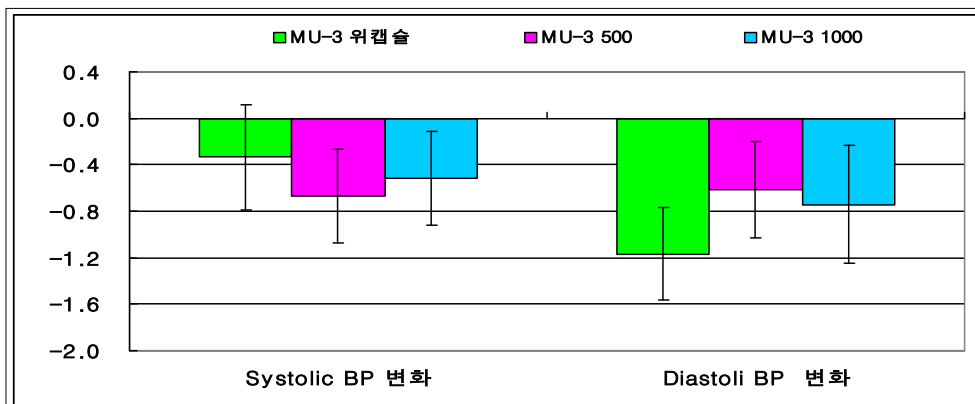


그림 52. circulatory system parameters 변화량 비교 - 남자

남자 피험자들의 circulatory system parameters 검사치를 비교 분석한 결과, systolic blood pressure와 diastolic blood pressure 각 방문별 구간에서 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, MU-3 500군과 MU-3 1000군의 경우 방문시기별로 점차 수치가 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었다.

MU-3 위캡술군의 경우 diastolic blood pressure(p=0.002)에서 방문시기별로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위 내에서의 변화이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다(표 68, 그림 53).

표 68. circulatory system parameters 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
systolic blood pressure (mmHg)	0주	121.06±5.56 (100-130)	0.566	119.56±5.90 (104-128)	0.274	120.80±5.68 (100-130)	0.309	0.271	0.849
	4주	121.06±4.67 (104-130)		119.33±5.35 (106-126)		120.46±5.04 (102-126)		0.150	0.605
	8주	120.72±3.89 (106-130)		118.89±4.82 (106-126)		120.29±4.78 (102-128)		0.080	0.674
diastolic blood pressure (mmHg)	0주	80.06±4.37 (62-86)	0.002	79.33±4.95 (60-88)	0.084	80.46±3.11 (72-88)	0.199	0.514	0.658
	4주	79.83±4.01 (64-84)		79.39±4.43 (64-86)		79.94±3.05 (72-86)		0.657	0.898
	8주	78.89±4.29 (64-84)		78.72±4.66 (66-86)		79.71±3.33 (70-86)		0.875	0.369

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

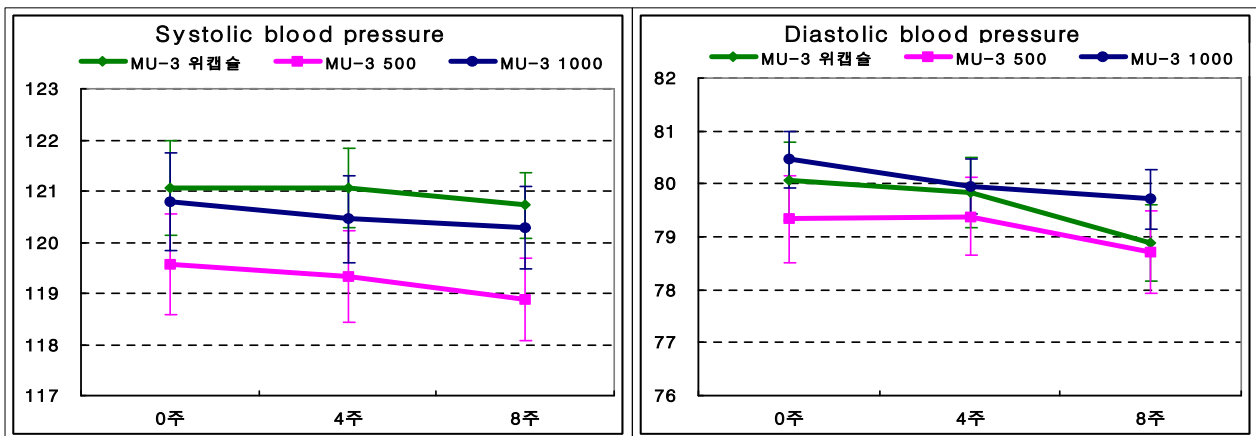


그림 53. circulatory system parameters 비교 - 남자

⑤ 발기기능 지수

남자 피험자들의 국제 발기기능 지수 설문(IEEF) 점수의 변화량을 분석한 결과, IIEF 총점 수는 Baseline의 증상 정도와 비교하였을 때 MU-3 위캡술군에서는 평균 1.69점 감소하였으나 MU-3 500군은 평균 12.31점 유의하게 증가(p<0.001)하였으며, MU-3 1000군에서도 평균 7.06점

증가하여 MU-3 위캡슐군에 비해 유의한 개선효과($p < 0.001$)가 있었다. 특히 MU-3 위캡슐군과 비교하여 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 남성 발기기능 증상 정도가 높게 개선되는 효과를 보였다.

국제 발기기능 지수 설문(IIEF)을 세분화하여 살펴보면, Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 유의한 변화가 있었다. 특히 IIEF 발기력, IIEF 성교시 만족감, IIEF 절정감, IIEF 성적 욕구, IIEF 성생활 만족감 모두 MU-3 위캡슐군과 비교하였을 때 MU-3 1000군보다는 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다(표 69, 그림 54).

표 69. 국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 변화량 비교 - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
IIEF 총점수	-1.69±11.87	0.398	12.31±14.88	<0.001	7.06±7.27	<0.001	<0.001	<0.001
IIEF_발기력	-0.81±5.73	0.405	5.42±7.34	<0.001	2.91±3.12	<0.001	<0.001	0.001
IIEF_성교시 만족감	0.00±2.46	1.000	2.75±3.48	<0.001	1.49±1.70	<0.001	<0.001	0.004
IIEF_절정감	-0.06±2.20	0.881	1.83±2.93	0.001	0.94±1.49	0.001	0.003	0.029
IIEF_성적욕구	-0.33±1.69	0.245	1.33±1.62	<0.001	1.14±1.52	<0.001	<0.001	<0.001
IIEF_성생활 만족감	-0.50±1.70	0.086	0.97±1.34	<0.001	0.57±1.22	0.009	<0.001	0.003

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

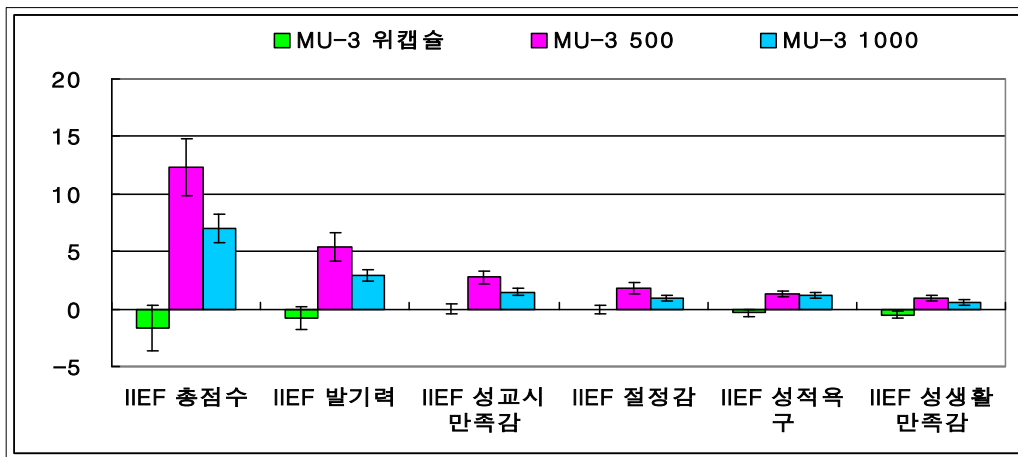


그림 54. 국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 변화량 비교 - 남자

남자 피험자들의 국제 발기기능 지수 설문(IIEF)을 비교 평가하였다. 국제 발기기능 지수 설문(IIEF)은 총 15문항이며 발기력 6문항, 성교시 만족감 3문항, 절정감 2문항, 성적 욕구 2문항, 성생활 만족감 2문항 등으로 구성되어 있다. 모든 항목은 0점에서 5점 또는 1점에서 5점으로 정량화하였다.

MU-3 위캡슐군, MU-3 500군, MU-3 1000군의 Baseline IIEF 총점수는 각각 43.36 ± 18.21 점, 42.94 ± 20.87 점, 50.31 ± 11.29 점으로 군간에 통계적으로 유의한 차이($p=0.138$)는 없었다. 식품 투여 후 4주차의 IIEF 총점수는 MU-3 위캡슐군(42.97 ± 18.69 점), MU-3 500군(52.47 ± 16.68 점)

점), MU-3 1000군(55.11±10.27점) 간에 유의한 차이(p=0.004)가 있었으며, 8주차의 IIEF 총점수도 MU-3 위캡술군(41.67±17.93점), MU-3 500군(55.25±15.87점), MU-3 1000군(57.37±9.72점) 간에 유의한 차이(p<0.001)가 있었으며, 특히 MU-3 500군과 MU-3 1000군은 남성 발기기능 증상 정도를 개선시키는 효과가 있는 것으로 나타났다.

국제 발기기능 지수 설문(IIEF)을 세분화하여 살펴본 결과에서도 IIEF 발기력, IIEF 성교시 만족감, IIEF 절정감, IIEF 성적 욕구, IIEF 성생활 만족감 모두 MU-3 500군과 MU-3 1000군에서 Baseline의 증상 정도와 비교하였을 때 4주차와 8주차에서 남성 발기기능 증상 정도가 유의하게 개선되는 효과를 보였다(표 70, 그림 55).

표 70. 국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 비교 - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
IIEF 총점수 (15문항)	0주	43.36±18.21 (5-67)		42.94±20.87 (8-71)		50.31±11.29 (28-70)		0.928	0.057
	4주	42.97±18.69 (5-67)	0.564	52.47±16.68 (9-73)	<0.001	55.11±10.27 (32-73)	<0.001	0.026	0.001
	8주	41.67±17.93 (5-69)		55.25±15.87 (9-74)		57.37±9.72 (37-73)		0.001	<0.001
IIEF_발기력 (6문항)	0주	18.14±8.18 (1-29)		17.58±9.59 (2-30)		21.23±5.06 (11-30)		0.792	0.060
	4주	17.81±8.37 (1-29)	0.480	21.86±7.30 (2-30)	<0.001	23.14±4.59 (11-30)	<0.001	0.032	0.001
	8주	17.33±7.82 (1-29)		23.00±6.90 (2-30)		24.14±4.13 (16-30)		0.002	<0.001
IIEF_성교시 만족감(3문항)	0주	6.89±3.81 (0-12)		7.00±4.61 (0-14)		8.43±2.20 (5-13)		0.912	0.041
	4주	7.06±3.66 (0-14)	0.849	8.92±3.49 (0-14)	<0.001	9.51±2.28 (6-14)	<0.001	0.030	0.001
	8주	6.89±3.69 (0-15)		9.75±3.22 (0-14)		9.91±2.15 (7-14)		0.001	<0.001
IIEF_절정감 (2문항)	0주	5.61±3.21 (0-10)		5.75±3.66 (0-10)		6.94±1.94 (3-10)		0.865	0.038
	4주	5.75±3.28 (0-10)	0.843	7.56±2.86 (0-10)	<0.001	7.69±1.84 (4-10)	0.002	0.015	0.003
	8주	5.56±2.97 (0-10)		7.58±2.39 (0-10)		7.89±1.75 (4-10)		0.002	<0.001
IIEF_성적욕구 (2문항)	0주	6.22±2.04 (2-9)		6.19±2.23 (2-10)		6.77±1.59 (4-10)		0.956	0.212
	4주	6.11±2.11 (2-10)	0.380	7.08±2.06 (2-10)	<0.001	7.40±1.33 (4-10)	<0.001	0.052	0.003
	8주	5.89±2.20 (2-10)		7.53±1.87 (3-10)		7.91±1.42 (5-10)		0.001	<0.001
IIEF_성생활 만족감(2문항)	0주	6.50±1.95 (2-10)		6.42±1.93 (2-10)		6.94±1.47 (3-10)		0.856	0.285
	4주	6.25±2.12 (2-10)	0.233	7.06±2.14 (2-10)	<0.001	7.37±1.24 (4-10)	0.030	0.113	0.008
	8주	6.00±1.87 (2-10)		7.39±2.18 (2-10)		7.51±1.25 (4-10)		0.005	<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

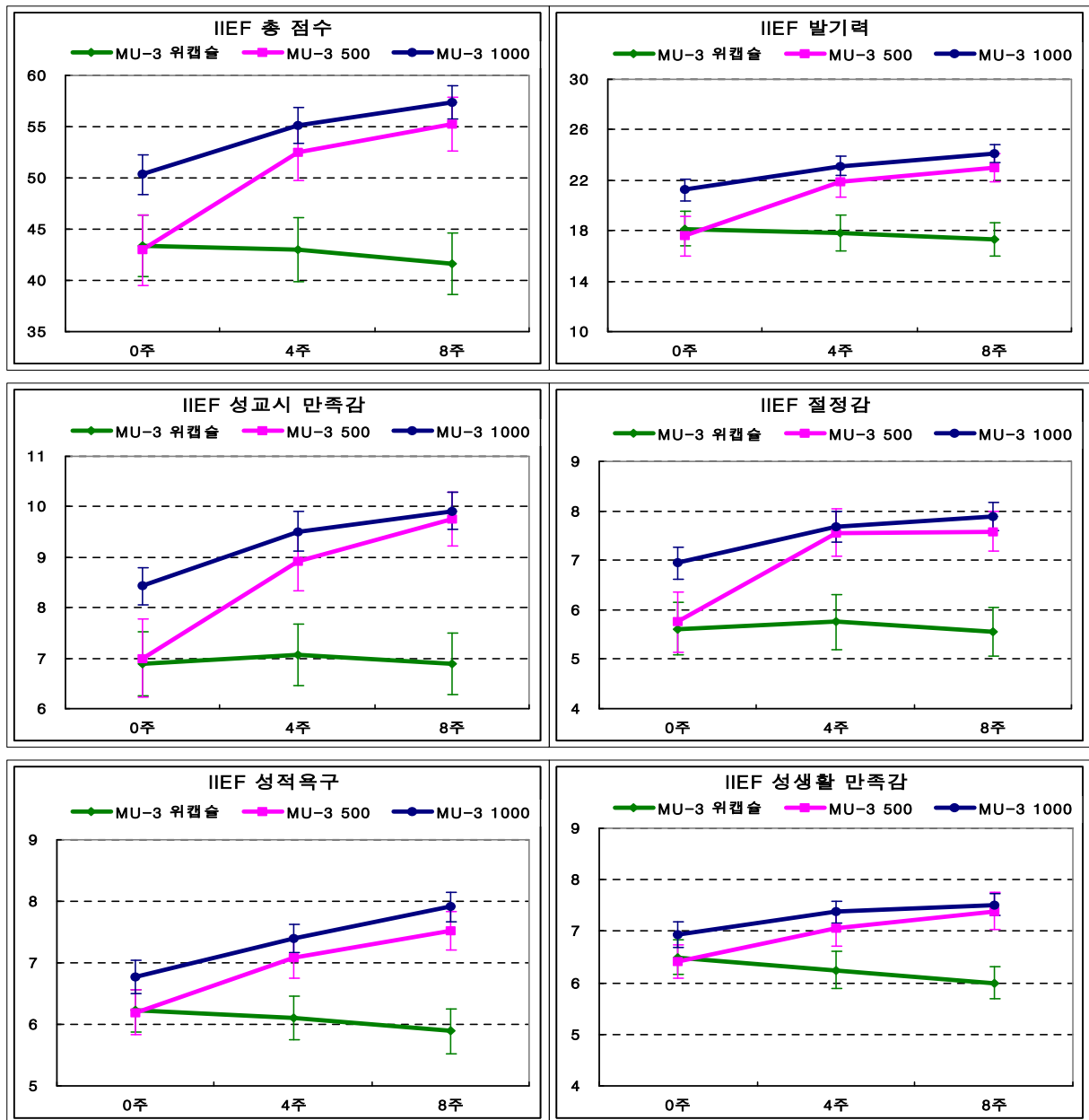


그림 55. 국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 비교 - 남자

(3) 여성갱년기 증상 개선 효과에 대한 유효성 평가(ITT 분석)

(가) 일차 유효성 평가

ITT 분석법은 임상시험에 등재되어 1회 이상 임상시험용 건강기능식품을 복용하고, 최소한 1회 이상 유효성 평가가 실시된 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 여자 피험자들의 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 점수의 변화량을 분석한 결과, KI 총점수의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 0.58점 증가)보다 MU-3 500군(평균 14.74점 감소, $p < 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군(평균 13.25점 감소, $p < 0.001$)에서 유의한 개선효과를 보였다. 특히 MU-3 500군($p < 0.001$)과 MU-3 1000군($p < 0.001$)에서 갱년기 증상 정도가 중증에서 준정상 상태

로까지 감소하는 개선효과가 있는 것으로 확인되었으며, MU-3 위캡슐군과 비교하여 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다(표 71, 그림 56).

표 71. 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 변화량 비교 - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
KI 총점수	0.58±5.38	0.520	-14.74±6.59	<0.001	-13.25±7.67	<0.001	<0.001	<0.001

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

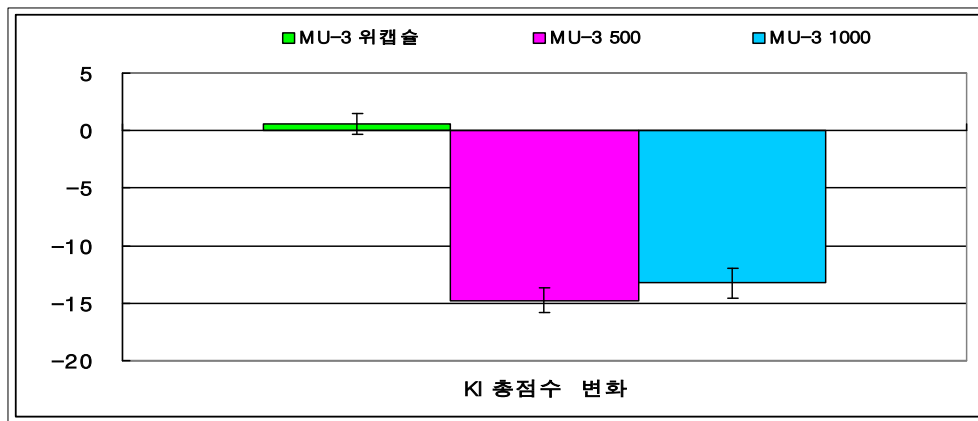


그림 56. 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 변화량 비교 - 여자

여자 피험자들의 여성갱년기 증상 지수 설문(KI)을 비교 평가하였다. 여성갱년기 증상 지수 설문(KI)은 안면홍조, 감각이상, 불면증, 신경과민, 우울증, 현기증, 허약(피로), 관절통/근육통, 두통, 가슴 두근거림(심계항진), 의주감(피부에 개미가 기는 느낌) 등 총 11문항으로 구성되어 있다. 모든 항목은 증상 없음(0점), 가벼움(1점), 보통(2점), 심함(3점)으로 정량화하고 여기에 가중치(1점, 2점, 4점)를 부여한 후 합산하여 총점 15점 이상인 경우를 양성으로 판정하며, 증상 정도에 따라 15~19점은 경증, 20~35점은 중증, 35점 이상을 심한정도(severe)로 구분한다.

KI 총점수의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차(p=<0.001)와 8주차(p=<0.001)에서, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서도 4주차(p=<0.001)와 8주차(p=<0.001)에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 식품 투여 후 4주차의 KI 총점수는 MU-3 1000군은 갱년기 증상 정도가 중증에서 경증으로, MU-3 500군은 중증에서 준정상 상태로까지 개선되는 효과가 있었다. 8주차의 KI 총점수에서도 MU-3 500군과 MU-3 1000군에서 갱년기 증상 정도가 준정상 상태로까지 개선효과가 있는 것으로 확인되었다(표 72, 그림 57).

표 72. 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 비교 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
KI 총점수	0주	22.94±7.03 (15-45)		23.11±7.10 (15-45)		24.44±7.35 (13-39)		0.920	0.380
	4주	23.61±7.41 (12-47)	0.549	13.31±5.93 (2-27)	<0.00 1	16.81±7.33 (3-34)	<0.00 1	<0.00 1	<0.00 1
	8주	23.53±7.92 (1-46)		8.37±6.56 (0-30)		11.19±6.18 (0-22)		<0.00 1	<0.00 1

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

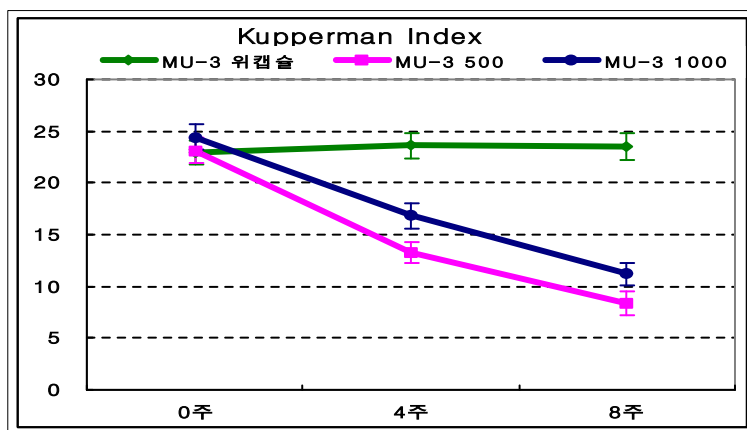


그림 57. 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 비교 - 여자

(나) 이차 유효성 평가

① 여성호르몬

여자 피험자들의 Hormone parameters 검사치의 변화량을 분석한 결과, FSH의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 3.46mIU/mL 증가)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 6.27mIU/mL 감소, $p < 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 3.30mIU/mL 감소, $p = 0.009$)에서 유의하게 개선되는 효과를 확인하였으며, MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다(표 73, 그림 54).

표 73. Hormone parameters 변화량 비교 - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
FSH	3.46±8.60	0.021	-6.27±11.15	0.002	-3.30±12.48	0.121	<0.001	0.009

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

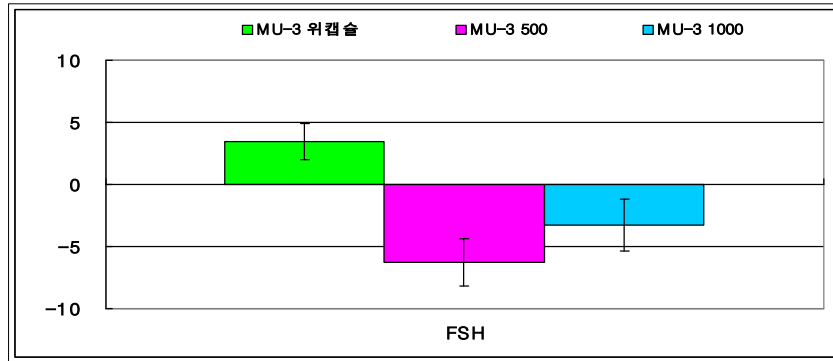


그림 54. Hormone parameters 변화량 비교 - 여자

여자 피험자들의 Hormone parameters 검사치를 비교한 결과, FSH 검사치의 경우 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으며, MU-3 500군에서만 방문시기별로 점차 수치가 유의하게 감소하는 효과 (p=0.009)가 있는 것으로 나타났다(표 74, 그림 56).

표 74. Hormone parameters 비교 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
FSH (mIU/mL)	0주	69.52±19.28 (42.80-115.52)		75.59±26.13 (48.54-181.79)		69.32±20.05 (44.62-120.79)		0.269	0.965
	4주	71.67±19.94 (44.39-123.67)	0.059	72.86±25.62 (40.82-141.06)	0.009	69.21±20.21 (42.04-114.96)	0.163	0.827	0.606
	8주	72.98±17.18 (45.40-113.10)		69.32±28.78 (35.70-172.30)		66.01±19.22 (32.80-117.80)		0.516	0.110

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

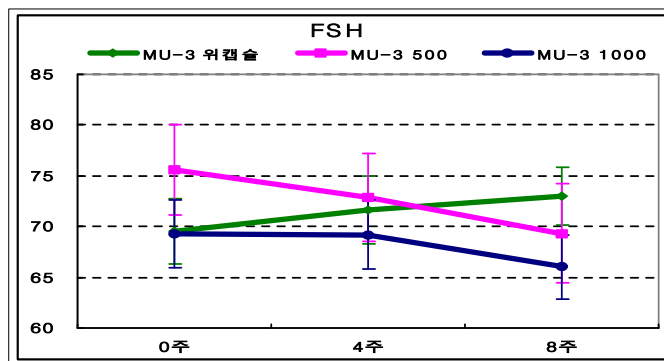


그림 56. Hormone parameters 비교 - 여자

② Osteoporosis

여자 피험자들의 Osteoporosis parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, C-Telopeptide 의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 0.03ng/mL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 0.05ng/mL 감소, p=0.067)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 0.01ng/mL 감소, p=0.434)에서 개선효과를

보였지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

Osteocalcin은 MU-3 위캡슐군(평균 0.45ng/mL 증가)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 3.07ng/mL 감소, p=0.002)에서만 유의한 개선효과를 보였다(표 75, 그림 57).

표 75. Osteoporosis parameters 변화량 비교 - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
C-Telopeptide	0.03±0.13	0.214	-0.05±0.19	0.172	-0.01±0.23	0.849	0.067	0.434
Osteocalcin	0.45±3.50	0.446	-3.07±5.33	0.002	-0.52±3.90	0.432	0.002	0.272

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

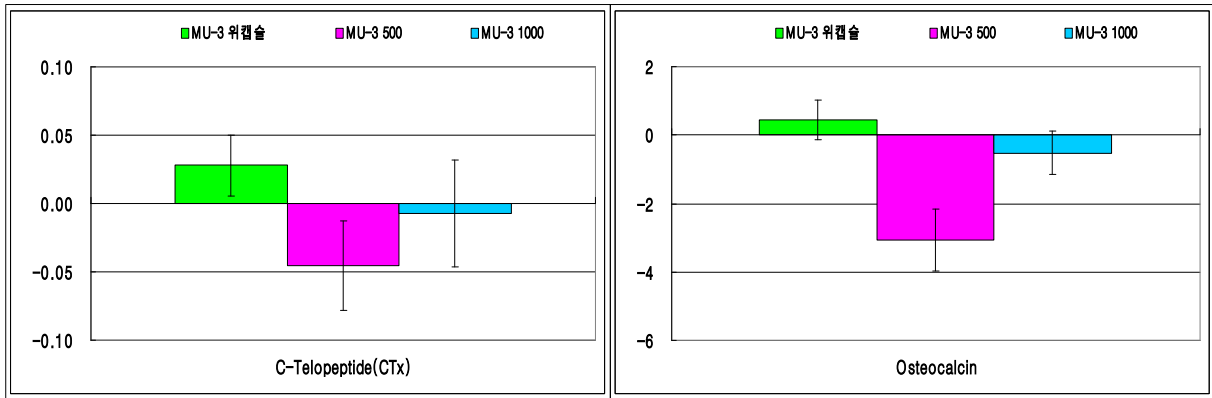


그림 57. Osteoporosis parameters 변화량 비교 - 여자

여자 피험자들의 Osteoporosis parameters 검사치를 비교한 결과, C-Telopeptide 검사치의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 8주차(p=0.001)에서만, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 0주차(p=0.046)와 8주차(p=0.008)에서 유의한 차이가 있었으며, MU-3 500군과 MU-3 1000군에서 방문 시기별 변화는 통계적으로 유의한 효과가 없었다.

Osteocalcin 검사치의 방문 시기별 변화는 MU-3 500군에서만 유의하게 감소하는 효과(p<0.001)를 보였다(표 76, 그림 58).

표 76. Osteoporosis parameters 비교 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
C-Telopeptide (ng/mL)	0주	0.47±0.21 (0.07-1.35)	0.191	0.39±0.18 (0.10-0.74)	0.274	0.38±0.19 (0.10-0.98)	0.485	0.080	0.046
	4주	0.47±0.20 (0.14-1.24)		0.40±0.20 (0.13-0.86)		0.40±0.18 (0.11-0.83)			
	8주	0.50±0.21 (0.20-1.30)		0.34±0.17 (0.12-0.90)		0.37±0.19 (0.02-1.00)			
Osteocalcin (ng/mL)	0주	22.10±6.44 (12.98-41.33)	0.747	20.80±4.87 (12.36-30.92)	<0.001	19.46±5.04 (10.41-27.25)	0.504	0.339	0.057
	4주	22.37±6.87 (11.75-38.94)		19.70±6.26 (9.32-35.37)		19.50±5.38 (10.13-30.08)			
	8주	22.55±6.63 (11.19-35.59)		17.72±5.68 (9.12-30.35)		18.95±6.19 (9.52-37.14)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

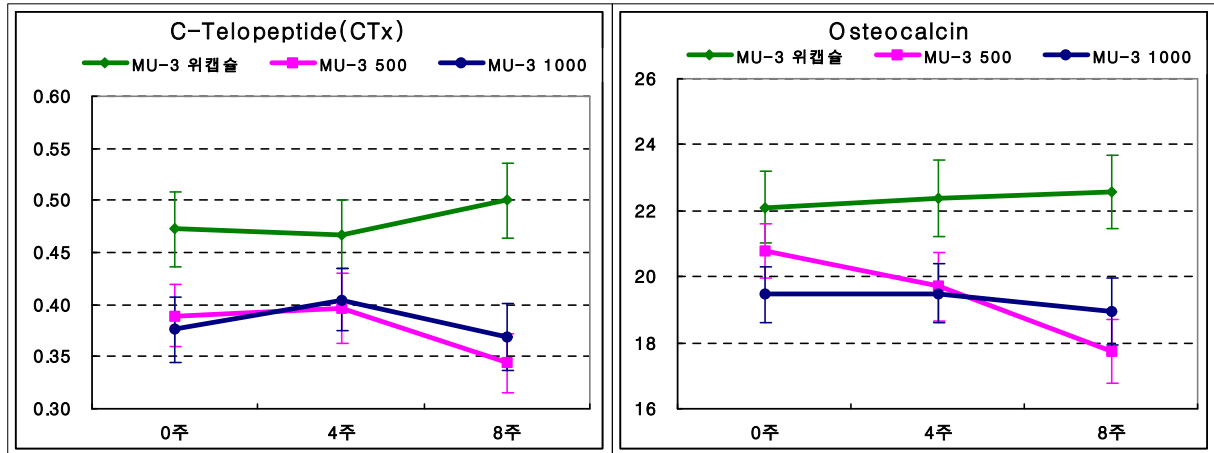


그림 58. Osteoporosis parameters 비교 - 여자

③ Osteoarthritis

여자 피험자들의 Osteoarthritis parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, COMP의 경우 MU-3 위캡술군에서 평균 120.91ng/mL 증가한 반면 MU-3 500군에서는 평균 165.10ng/mL 감소하여 유의한 개선효과($p < 0.001$)가 있는 것을 확인하였다. MU-3 1000군에서도 평균 134.46ng/mL 감소하여 MU-3 위캡술군에 비해 통계적으로 유의하게 개선되는 효과($p < 0.001$)가 있었다. 특히 MU-3 위캡술군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다(표 77, 그림 59).

표 77. Osteoarthritis parameters 변화량 비교 - 여자

Variables	MU-3 위캡술(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
COMP	120.91±138.08	<0.001	-165.10±146.7 3	<0.001	-134.46±160.2 4	<0.001	<0.001	<0.001 1

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡술군과 MU-3 1000군)

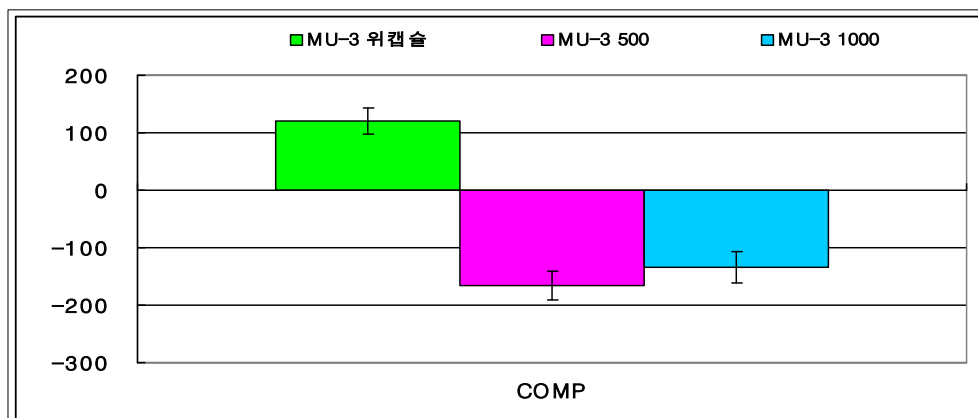


그림 59. Osteoarthritis parameters 변화량 비교 - 여자

여자 피험자들의 Osteoarthritis parameters 검사치를 비교한 결과, COMP 검사치의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차(p=0.029)와 8주차(p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 8주차(p<0.001)에서만 유의한 차이가 있었다. 특히 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p=0.<001)에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 효과가 있는 것으로 나타났다(표 78, 그림 60).

표 78. Osteoarthritis parameters 비교 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
COMP (ng/mL)	0주	674.80±245.01 (303.70-1301.30)		696.82±188.31 (348.75-1111.05)		736.86±187.35 (315.20-1148.30)		0.673	0.231
	4주	728.03±244.02 (352.70-1323.80)	<0.001	606.46±214.57 (310.65-1220.35)	<0.001	654.14±207.39 (226.10-1159.60)	<0.001	0.029	0.171
	8주	795.71±233.64 (425.65-1355.70)		531.72±204.31 (273.40-1239.40)		602.40±184.53 (288.05-1004.65)		<0.001	<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

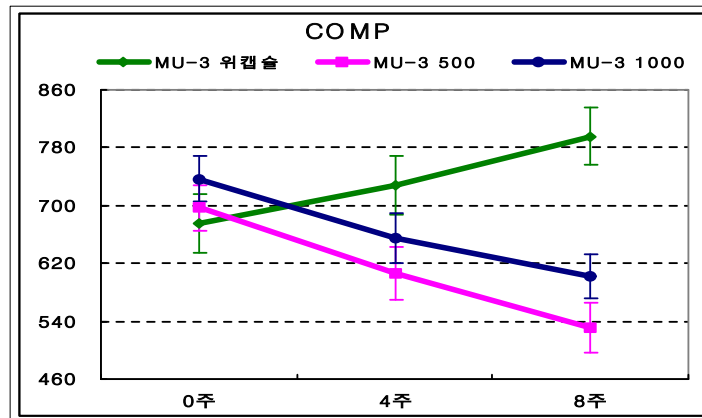


그림 60. Osteoarthritis parameters 비교 - 여자

④ circulatory system

여자 피험자들의 circulatory system parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, systolic blood pressure의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 0.06mmHg 감소)에 비해 MU-3 500군(평균 0.17mmHg 감소, p=0.848)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 0.44mmHg 감소, p=0.526)에서 감소효과를 보였지만 유의성은 없었다. diastolic blood pressure의 경우에도 MU-3 위캡슐군(평균 0.61mmHg 감소)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 0.69mmHg 감소, p=0.905)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 1.67mmHg 감소, p=0.119)에서 개선효과가 있었지만

유의한 차이는 나타나지 않았다.

특히 diastolic blood pressure의 경우 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군보다 MU-3 1000군에서 수치가 유의하게 감소하는 효과(p=0.005)를 보였다(표 79, 그림 61).

표 79. circulatory system parameters 변화량 비교 - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
systolic blood pressure	-0.06±2.55	0.897	-0.17±2.54	0.692	-0.44±2.62	0.316	0.848	0.526
diastolic blood pressure	-0.61±2.23	0.110	-0.69±2.95	0.178	-1.67±3.33	0.005	0.905	0.119

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

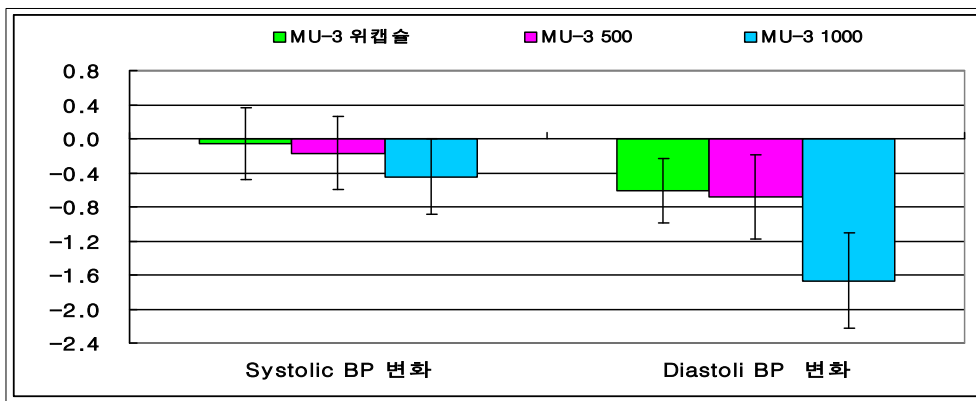


그림 61. circulatory system parameters 변화량 비교 - 여자

여자 피험자들의 circulatory system parameters 검사치를 비교 분석한 결과, systolic blood pressure와 diastolic blood pressure 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에서 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, MU-3 500군의 경우 방문시기별로 점차 수치가 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었다. diastolic blood pressure의 경우 MU-3 1000군에서 방문시기별로 통계적으로 유의하게 감소하는 효과(p=0.001)가 있는 것으로 분석되었다(표 80, 그림 62).

표 80. circulatory system parameters 비교 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
systolic blood pressure (mmHg)	0주	117.33±7.63 (96-128)		116.91±7.43 (96-124)		118.06±6.51 (100-128)		0.815	0.667
	4주	117.11±7.51 (96-128)	0.756	116.80±6.72 (96-124)	0.885	117.83±6.05 (100-128)	0.479	0.855	0.655
	8주	117.28±6.64 (96-128)		116.74±6.00 (98-124)		117.61±5.73 (100-124)		0.723	0.820
diastolic blood pressure (mmHg)	0주	76.83±5.74 (60-86)		77.09±6.31 (64-86)		77.50±5.42 (64-86)		0.861	0.614
	4주	75.83±5.82 (64-86)	0.020	76.86±5.58 (64-84)	0.236	77.11±5.23 (62-86)	0.001	0.452	0.331
	8주	76.22±4.96 (64-84)		76.40±5.59 (62-84)		75.83±4.93 (60-82)		0.888	0.740

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

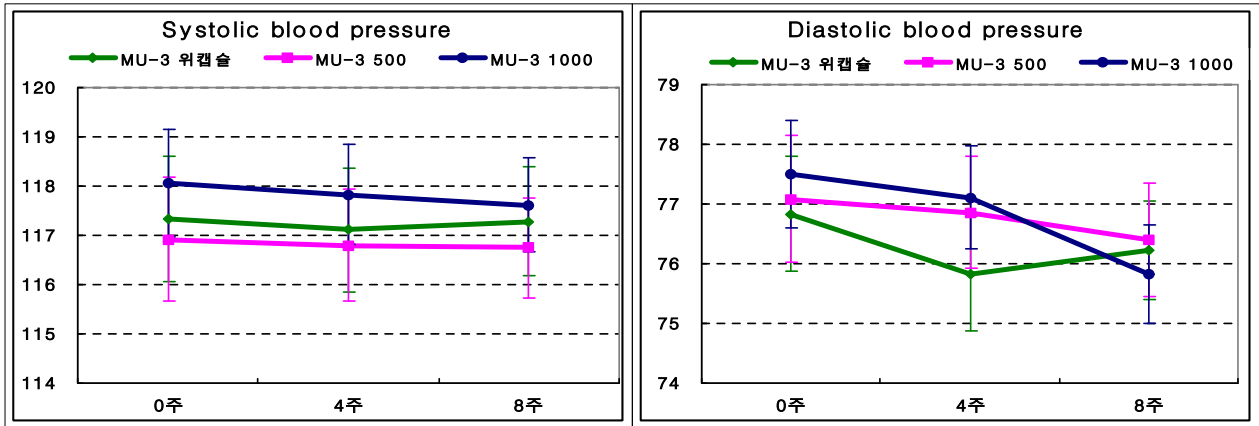


그림 62. circulatory system parameters 비교 - 여자

(4) 여성갱년기 증상 개선 효과에 대한 유효성 평가(PP 분석)

PP 분석법은 임상시험에서 중도 탈락한 경우와 복약 순응도가 70% 미만인 피험자를 제외한 계획서순응 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 여자 피험자 106명[MU-3 위캡슐군 36명, MU-3 500군 35명(1명 제외 : 피험자의 불순응으로 인한 중도탈락), MU-3 1000군 35명(1명 제외 : 이상반응으로 인한 중도탈락)]을 대상으로 평가하였다.

(가) 일차 유효성 평가

여자 피험자들의 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 점수의 변화량을 분석한 결과, KI 총점수는 Baseline의 증상 정도와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 0.58점 증가한 반면 MU-3 500군은 평균 14.74점 감소하여 유의한 개선효과($p < 0.001$)가 있었다. MU-3 1000군(평균 13.66점 감소)에서도 MU-3 위캡슐군에 비해 유의하게 감소하는 효과($p < 0.001$)가 있는 것으로 평가되었다. 특히 MU-3 500군($p < 0.001$)과 MU-3 1000군($p < 0.001$)에서 갱년기 증상 정도가 중증에서 준정상 상태로까지 개선효과가 있는 것으로 확인되었으며, MU-3 위캡슐군과 비교하여 MU-3 1000군보다는 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다(표 81, 그림 63).

표 81. 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 변화량 비교 - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
KI 총점수	0.58±5.38	0.520	-14.74±6.59	<0.001	-13.66±7.38	<0.001	<0.001	<0.001

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

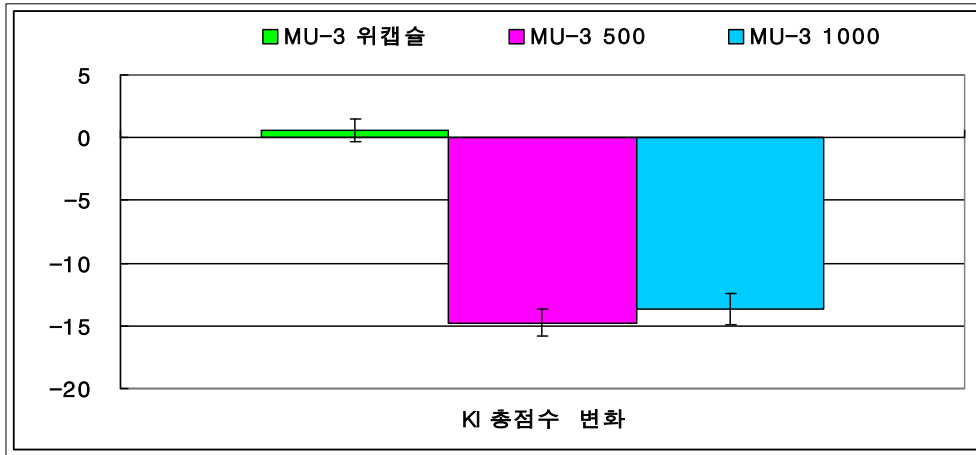


그림 63. 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 변화량 비교 - 여자

여자 피험자들의 여성갱년기 증상 지수 설문(KI)을 비교 평가하였다. 여성갱년기 증상 지수 설문(KI)은 안면홍조, 감각이상, 불면증, 신경과민, 우울증, 현기증, 허약(피로), 관절통/근육통, 두통, 가슴 두근거림(심계항진), 의주감(피부에 개미가 기는 느낌) 등 총 11문항으로 구성되어 있다. 모든 항목은 증상 없음(0점), 가벼움(1점), 보통(2점), 심함(3점)으로 정량화하고 여기에 가중치(1점, 2점, 4점)를 부여한 후 합산하여 총점 15점 이상인 경우를 양성으로 판정하며, 증상 정도에 따라 15~19점은 경증, 20~35점은 중증, 35점 이상을 심한정도(severe)로 구분한다.

Baseline의 KI 총점수는 MU-3 위캡슐군(22.94±7.03점), MU-3 500군(23.11±7.10점), MU-3 1000군(24.66±7.35점) 간에 통계적으로 유의한 차이(p=0.544)는 없었다. 건강기능식품 투여 후 4주차의 KI 총점수는 군간에 유의한 차이(p<0.001)가 있었으며, MU-3 1000군은 갱년기 증상 정도가 중증에서 경증으로, MU-3 500군은 중증에서 준정상 상태로까지 개선되는 효과가 있었다. 8주차의 KI 총점수에서도 군간에 유의한 차이(p<0.001)가 있었으며, 특히 MU-3 500군과 MU-3 1000군은 갱년기 증상 정도가 준정상 상태로까지 개선효과가 있는 것으로 확인되었다(표 82, 그림 64).

< 표 82. 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 비교 - 여자 >

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
KI 총점수	0주	22.94±7.03 (15-45)	0.549	23.11±7.10 (15-45)	<0.001	24.66±7.35 (13-39)	<0.001	0.920	0.319
	4주	23.61±7.41 (12-47)		13.31±5.93 (2-27)		16.77±7.43 (3-34)			
	8주	23.53±7.92 (1-46)		8.37±6.56 (0-30)		11.00±6.16 (0-22)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

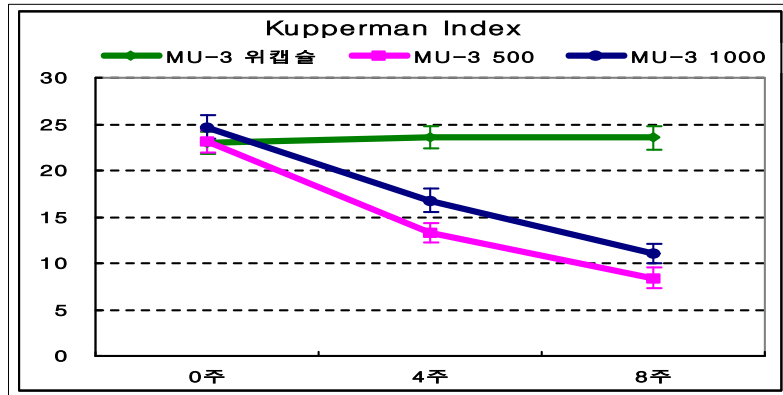


그림 64. 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 비교 - 여자

(나) 이차 유효성 평가

① 여성호르몬

여자 피험자들의 Hormone parameters 검사치의 변화량을 분석한 결과, FSH는 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 3.46mIU/mL 증가하였으나 MU-3 500군에서는 평균 6.27mIU/mL 유의하게 감소($p < 0.001$)하였으며, MU-3 1000군에서는 평균 3.51mIU/mL 감소하여 MU-3 위캡슐군에 비해 유의한 개선효과($p = 0.008$)가 있었다. 특히 MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다(표 83, 그림 65).

표 83. Hormone parameters 변화량 비교 - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
FSH	3.46±8.60	0.021	-6.27±11.15	0.002	-3.51±12.60	0.108	<0.001	0.008

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

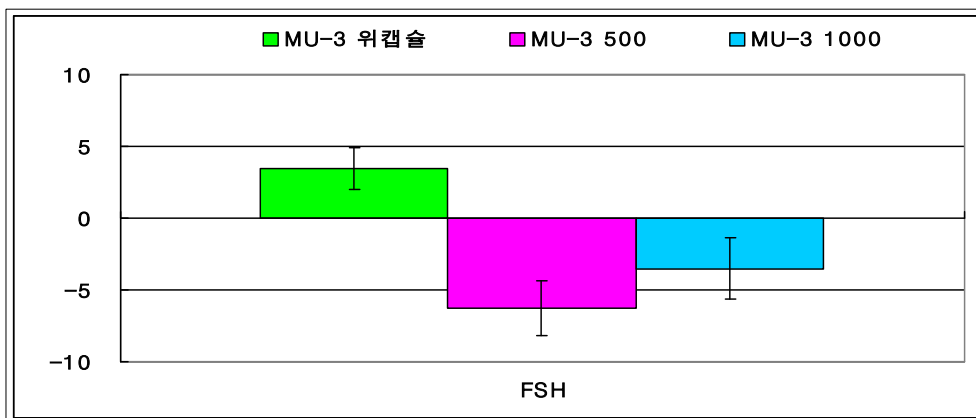


그림 65. Hormone parameters 변화량 비교 - 여자

여자 피험자들의 Hormone parameters 검사치를 비교한 결과, Baseline의 FSH 검사치는 시험 시작 전 군간에 통계학적으로 유의한 차이(p=0.439)는 없었다. 식품 투여 후 4주차의 검사치(p=0.840)와 8주차의 검사치도 군간에 유의한 변화(p=0.470)가 없었다. MU-3 500군에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 효과(p=0.009)가 있는 것으로 나타났다(표 84, 그림 66).

표 84. Hormone parameters 비교 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
FSH (mIU/mL)	0주	69.52±19.28 (42.80-115.52)	0.059	75.59±26.13 (48.54-181.79)	0.009	69.99±19.92 (44.62-120.79)	0.155	0.269	0.920
	4주	71.67±19.94 (44.39-123.67)		72.86±25.62 (40.82-141.06)		69.77±20.23 (42.04-114.96)			
	8주	72.98±17.18 (45.40-113.10)		69.32±28.78 (35.70-172.30)		66.48±19.30 (32.80-117.80)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

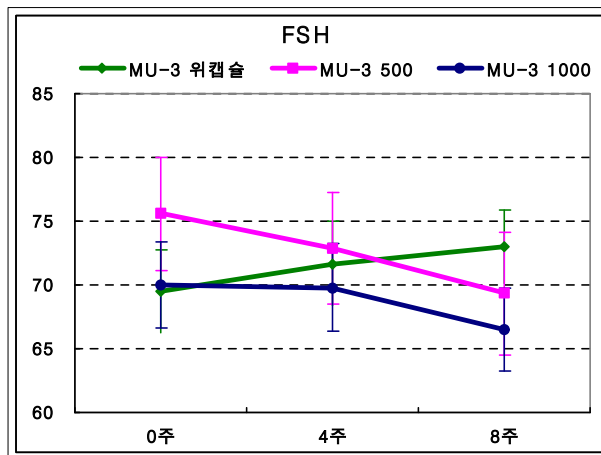


그림 66. Hormone parameters 비교 - 여자

② Osteoporosis

여자 피험자들의 Osteoporosis parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, C-Telopeptide는 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 500군(p=0.067)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(p=0.453)에서 개선효과를 보였지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

Osteocalcin의 경우에는 MU-3 위캡슐군(평균 0.45ng/mL 증가)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 3.07ng/mL 감소, p=0.002)에서만 유의한 개선효과를 보였다(표 85, 그림 67).

표 85. Osteoporosis parameters 변화량 비교 - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
C-Telopeptide	0.03±0.13	0.214	-0.05±0.19	0.172	-0.01±0.24	0.871	0.067	0.453
Osteocalcin	0.45±3.50	0.446	-3.07±5.33	0.002	-0.55±3.95	0.418	0.002	0.264

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

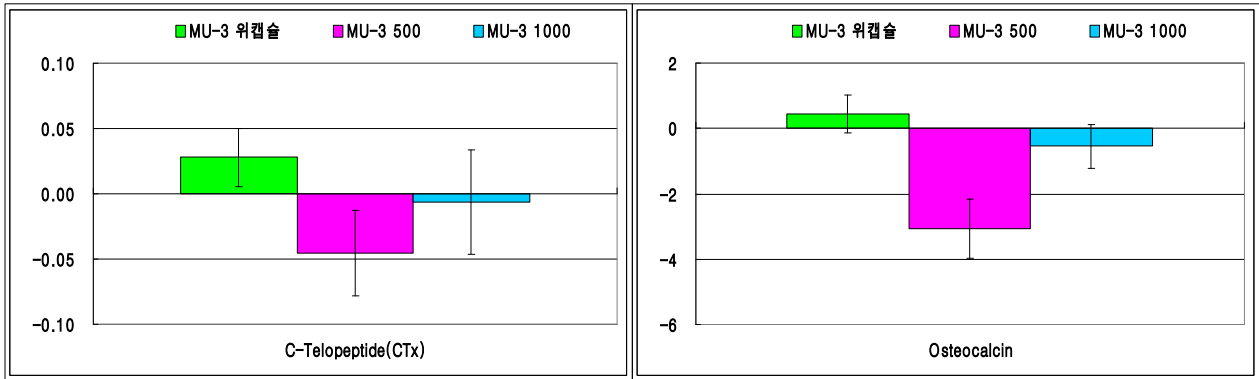


그림 67. Osteoporosis parameters 변화량 비교 - 여자

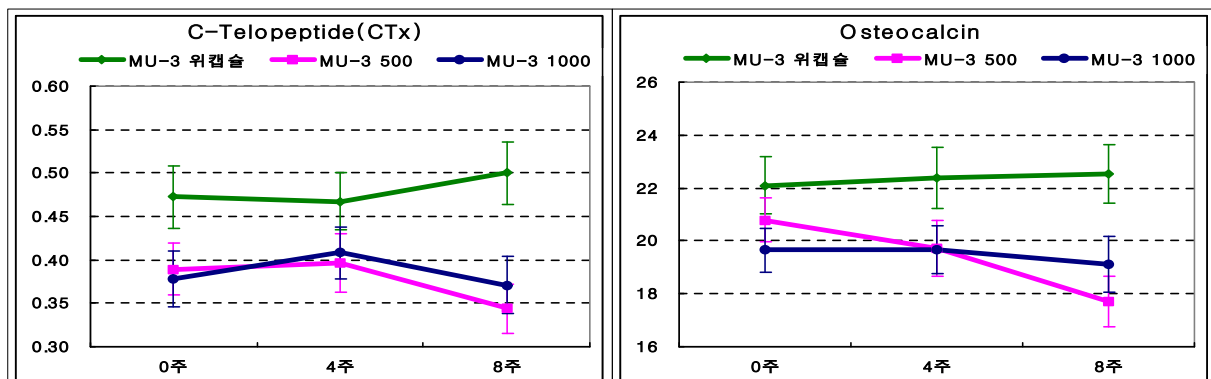
여자 피험자들의 Osteoporosis parameters 검사치를 비교한 결과, Baseline의 C-Telopeptide 검사치는 시험 시작 전 군간에 통계학적으로 유의한 차이(p=0.087)는 없었다. 식품 투여 후 8주차의 검사치에서는 군간에 유의한 차이(p=0.002)가 있었다. MU-3 500군과 MU-3 1000군에서 방문 시기별 변화는 통계적으로 유의한 효과가 없었다. Osteocalcin 검사치의 방문 시기별 변화는 MU-3 500군(p<0.001)에서 유의하게 감소하는 효과를 보였다(표 86, 그림 68).

표 86. Osteoporosis parameters 비교 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
C-Telopeptide (ng/mL)	0주	0.47±0.21 (0.07-1.35)	0.191	0.39±0.18 (0.10-0.74)	0.274	0.38±0.19 (0.10-0.98)	0.477	0.080	0.052
	4주	0.47±0.20 (0.14-1.24)		0.40±0.20 (0.13-0.86)		0.41±0.18 (0.11-0.83)			
	8주	0.50±0.21 (0.20-1.30)		0.34±0.17 (0.12-0.90)		0.37±0.19 (0.02-1.00)			
Osteocalcin (ng/mL)	0주	22.10±6.44 (12.98-41.33)	0.747	20.80±4.87 (12.36-30.92)	<0.001	19.65±4.99 (10.41-27.25)	0.495	0.339	0.077
	4주	22.37±6.87 (11.75-38.94)		19.70±6.26 (9.32-35.37)		19.67±5.36 (10.13-30.08)			
	8주	22.55±6.63 (11.19-35.59)		17.72±5.68 (9.12-30.35)		19.10±6.21 (9.52-37.14)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)



< 그림 68. Osteoporosis parameters 비교 - 여자 >

③ Osteoarthritis

여자 피험자들의 Osteoarthritis parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, COMP는 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서 평균 120.91ng/mL 증가하였으나 MU-3 500군에서는 평균 165.10ng/mL 유의하게 감소($p < 0.001$)하였으며, MU-3 1000군에서도 평균 134.70ng/mL 감소하여 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선되는 효과($p < 0.001$)가 있는 것을 확인하였다. 특히 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군에 비해 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다(표 87, 그림 69).

< 표 87. Osteoarthritis parameters 변화량 비교 - 여자 >

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
COMP	120.91±138.08	<0.001	-165.10±146.73	<0.001	-134.70±162.58	<0.001	<0.001	<0.001

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

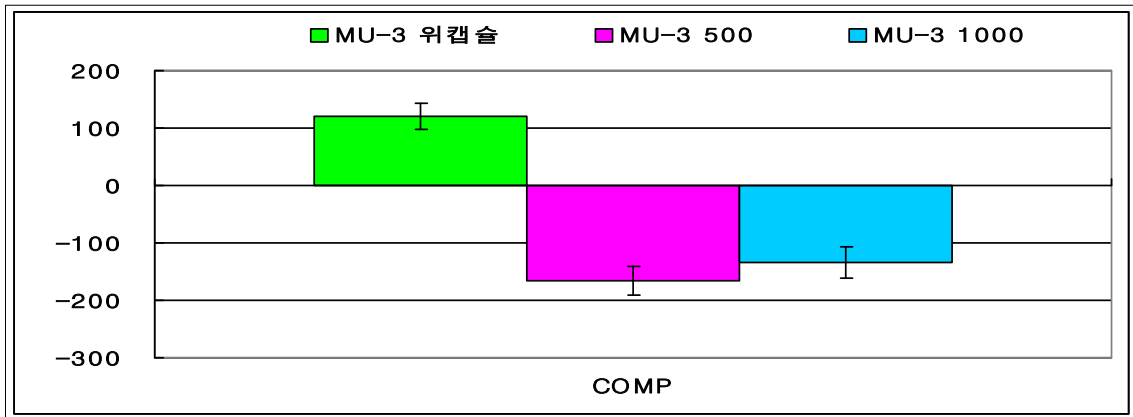


그림 69. Osteoarthritis parameters 변화량 비교 - 여자

여자 피험자들의 Osteoarthritis parameters 검사치를 비교한 결과, Baseline의 COMP 검사치는 시험 시작 전 군간에 통계학적으로 유의한 변화($p=0.447$)는 없었다. 식품 투여 후 8주차의 검사치에서는 군간에 유의한 차이($p < 0.001$)가 있었다. 특히 MU-3 500군($p < 0.001$)과 MU-3 1000군($p < 0.001$)에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 효과가 있는 것으로 나타났다(표 88, 그림 70).

표 88. Osteoarthritis parameters 비교 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
COMP (ng/mL)	0주	674.80±245.01 (303.70-1301.30)		696.82±188.31 (348.75-1111.05)		737.44±190.05 (315.20-1148.30)		0.673	0.234
	4주	728.03±244.02 (352.70-1323.80)	<0.001	606.46±214.57 (310.65-1220.35)	<0.001	655.96±210.13 (226.10-1159.60)	<0.001	0.029	0.187
	8주	795.71±233.64 (425.65-1355.70)		531.72±204.31 (273.40-1239.40)		602.74±187.22 (288.05-1004.65)		<0.001	<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

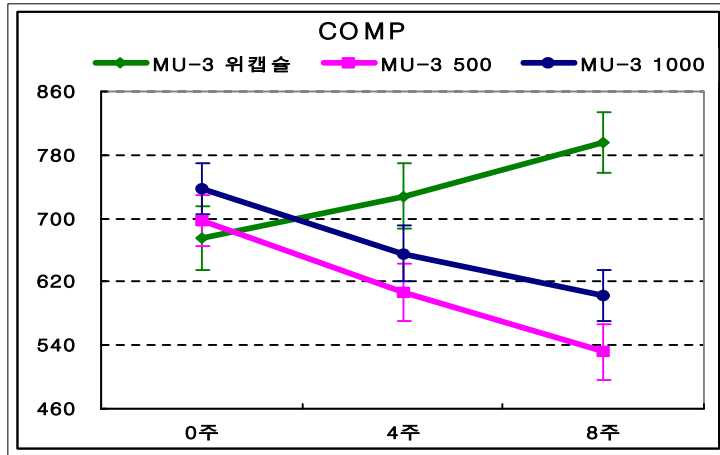


그림 70. Osteoarthritis parameters 비교 - 여자

④ circulatory system

여자 피험자들의 circulatory system parameters 검사치의 변화량을 비교한 결과, systolic blood pressure와 diastolic blood pressure 모두 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 유의한 변화가 없었다.

특히 diastolic blood pressure 검사치의 경우 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군에 비해 MU-3 1000군에서 수치가 유의하게 감소(p=0.002)하였다(표 89, 그림 71).

표 89. circulatory system parameters 변화량 비교 - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
systolic blood pressure	-0.06±2.55	0.897	-0.17±2.54	0.692	-0.46±2.66	0.317	0.848	0.518
diastolic blood pressure	-0.61±2.23	0.110	-0.69±2.95	0.178	-1.83±3.23	0.002	0.905	0.070

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

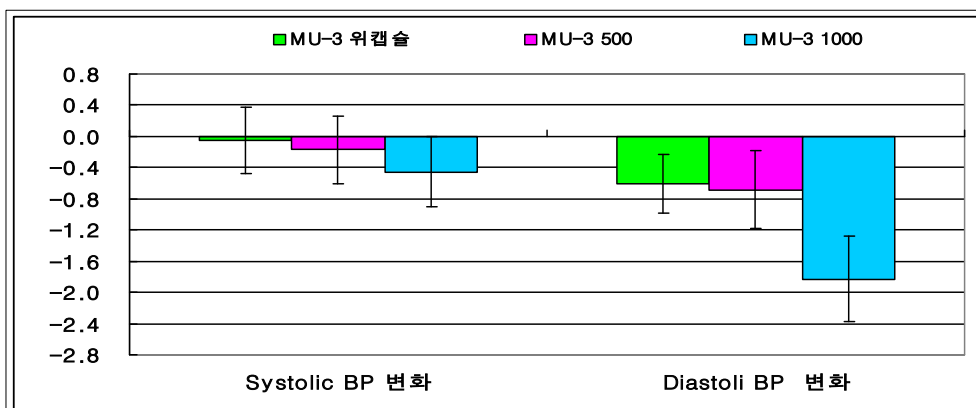


그림 71. circulatory system parameters 변화량 비교 - 여자

여자 피험자들의 circulatory system parameters 검사치를 비교 분석한 결과, systolic blood pressure와 diastolic blood pressure 각 방문별 구간에서 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, MU-3 500군과 MU-3 1000군의 경우 방문시기별로 점차 수치가 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었다. diastolic blood pressure의 경우 MU-3 1000군에서 방문시기별로 통계적으로 유의한 차이(p<0.001)가 있는 것으로 분석되었다(표 90, 그림 72).

표 90. circulatory system parameters 비교 - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
systolic blood pressure (mmHg)	0주	117.33±7.63 (96-128)	0.756	116.91±7.43 (96-124)	0.885	118.00±6.60 (100-128)	0.479	0.815	0.695
	4주	117.11±7.51 (96-128)		116.80±6.72 (96-124)		117.77±6.13 (100-128)			
	8주	117.28±6.64 (96-128)		116.74±6.00 (98-124)		117.54±5.80 (100-124)			
diastolic blood pressure (mmHg)	0주	76.83±5.74 (60-86)	0.020	77.09±6.31 (64-86)	0.236	77.71±5.34 (64-86)	<0.001	0.861	0.506
	4주	75.83±5.82 (64-86)		76.86±5.58 (64-84)		77.20±5.27 (62-86)			
	8주	76.22±4.96 (64-84)		76.40±5.59 (62-84)		75.89±4.99 (60-82)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

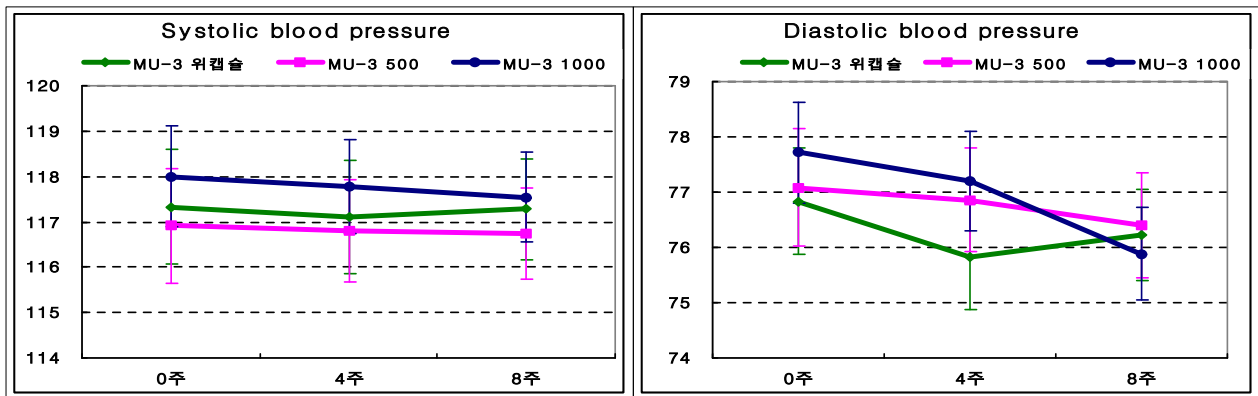


그림 72. circulatory system parameters 비교 - 여자

(5) 혈청 지질개선 효과에 대한 일차 유효성 평가

(가) ITT 분석법

ITT 분석법은 임상시험에 등재되어 1회 이상 임상시험용 건강기능식품을 복용하고, 최소한 1회 이상 유효성 평가가 실시된 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 따라서 남자 피험자 108명[MU-3 위캡슐군 36명, MU-3 500군 36명, MU-3 1000군 36명]과 여자 피험자 107명[MU-3 위캡슐군 36명, MU-3 500군 35명(1명 제외 : 피험자의 불순응으로 인한 중도탈락),

MU-3 1000군 36명]을 대상으로 평가하였다.

① 남자

남자 피험자들의 Lipid parameters (1) 검사치의 변화량을 비교한 결과, Total cholesterol의 경우 MU-3 위캡슐군에서는 평균 3.67mg/dL 증가하였으나 MU-3 500군에서는 평균 21.83mg/dL 감소하여 유의한 개선효과(p<0.001)를 보였다. MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군(평균 18.06mg/dL 감소, p<0.001)에서도 통계적으로 유의하게 개선되는 효과가 있었다.

HDL cholesterol의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 3.33mg/dL 감소)과 비교하였을 때 MU-3 500군에서는 평균 5.22mg/dL 유의하게 증가하는 효과(p=0.001)가 있는 것으로 평가되었고, MU-3 1000군(평균 4.69mg/dL 증가, p=0.002)에서도 MU-3 위캡슐군에 비해 유의하게 개선되는 효과를 보였다. LDL cholesterol의 경우에도 MU-3 위캡슐군(평균 5.47mg/dL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 14.86mg/dL 감소, p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 14.86mg/dL 감소, p=0.001)에서 유의한 개선효과가 나타났다.

Triglyceride의 경우에도 MU-3 위캡슐군(평균 29.58mg/dL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 35.19mg/dL 감소, p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 21.06mg/dL 감소, p=0.001)에서 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다.

Total cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride 검사치의 경우 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다(표 91, 그림 73).

표 91. Lipid parameters 변화량 비교 (1) - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
Total cholesterol	3.67±19.71	0.272	-21.83±19.92	<0.001	-18.06±25.02	<0.001	<0.001	<0.001
HDL cholesterol	-3.33±8.78	0.029	5.22±11.02	0.007	4.69±12.28	0.028	0.001	0.002
LDL cholesterol	5.47±24.13	0.181	-14.86±20.55	<0.001	-14.86±23.62	0.001	<0.001	0.001
Triglyceride	29.58±59.30	0.005	-35.19±47.14	<0.001	-21.06±66.37	0.065	<0.001	0.001

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

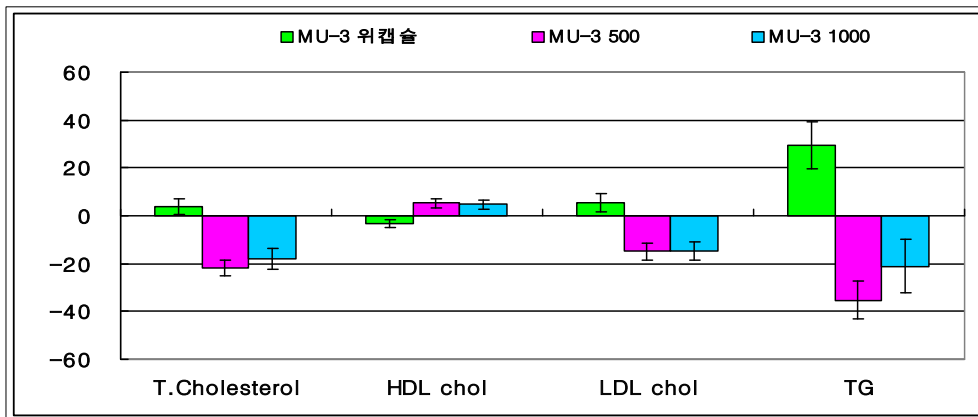


그림 73. Lipid parameters 변화량 비교 (1) - 남자

남자 피험자들의 Lipid parameters (1) 검사치를 비교 분석하였다. Total cholesterol 검사

치의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차(p=0.024)와 8주차(p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 8주차(p=0.001)에서만 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 방문 시기별 변화에서는 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p=0.001)은 유의하게 감소하는 개선효과를 보였다.

HDL cholesterol의 경우 8주차의 검사치에서만 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군(p=0.001), MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군(p=0.002) 간에 차이가 있었다. 방문 시기별 변화에서는 MU-3 500군(p=0.002)과 MU-3 1000군(p=0.012)은 유의하게 증가하는 개선효과가 있었다.

LDL cholesterol의 경우 8주차의 검사치에서 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군(p=0.038)에서만 유의한 차이를 보였으며, 방문 시기별 변화에서는 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p=0.002)은 통계적으로 유의하게 감소하는 개선효과를 보였다.

Triglyceride 검사치의 경우 MU-3 500군에서만 방문시기별로 점차 수치가 감소하였으며, 이는 개선효과가 유의한 것(p<0.001)으로 분석되었다(표 92, 그림 74).

표 92. Lipid parameters 비교 (1) - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Total cholesterol (mg/dL)	0주	205.42±17.25 (182-249)	0.532	207.56±17.76 (184-247)	<0.001	210.00±19.65 (182-242)	0.001	0.606	0.296
	4주	207.11±19.39 (154-246)		196.47±19.62 (157-245)		202.61±19.92 (158-236)			
	8주	209.08±19.73 (180-249)		185.72±19.03 (151-227)		191.94±20.35 (137-246)			
HDL cholesterol (mg/dL)	0주	50.22±12.41 (27-82)	0.085	50.28±9.70 (34-77)	0.002	50.92±8.06 (39-74)	0.012	0.983	0.779
	4주	48.31±10.88 (32-88)		52.56±9.63 (33-79)		52.03±9.35 (35-68)			
	8주	46.89±9.86 (30-75)		55.50±11.71 (34-81)		55.61±13.17 (32-82)			
LDL cholesterol (mg/dL)	0주	113.14±25.53 (47-169)	0.414	123.22±21.52 (67-163)	<0.001	119.94±25.61 (57-169)	0.002	0.074	0.263
	4주	116.78±26.13 (47-169)		117.94±20.81 (78-158)		116.53±25.51 (49-171)			
	8주	118.61±28.84 (38-183)		108.36±21.29 (66-144)		105.08±25.28 (56-149)			
Triglyceride (mg/dL)	0주	160.42±71.20 (59-294)	0.021	165.03±70.92 (55-327)	<0.001	178.08±80.76 (66-347)	0.018	0.784	0.328
	4주	177.25±70.57 (62-338)		151.64±72.31 (42-320)		182.42±80.13 (68-379)			
	8주	190.00±75.81 (68-317)		129.83±50.48 (68-242)		157.03±72.23 (41-366)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

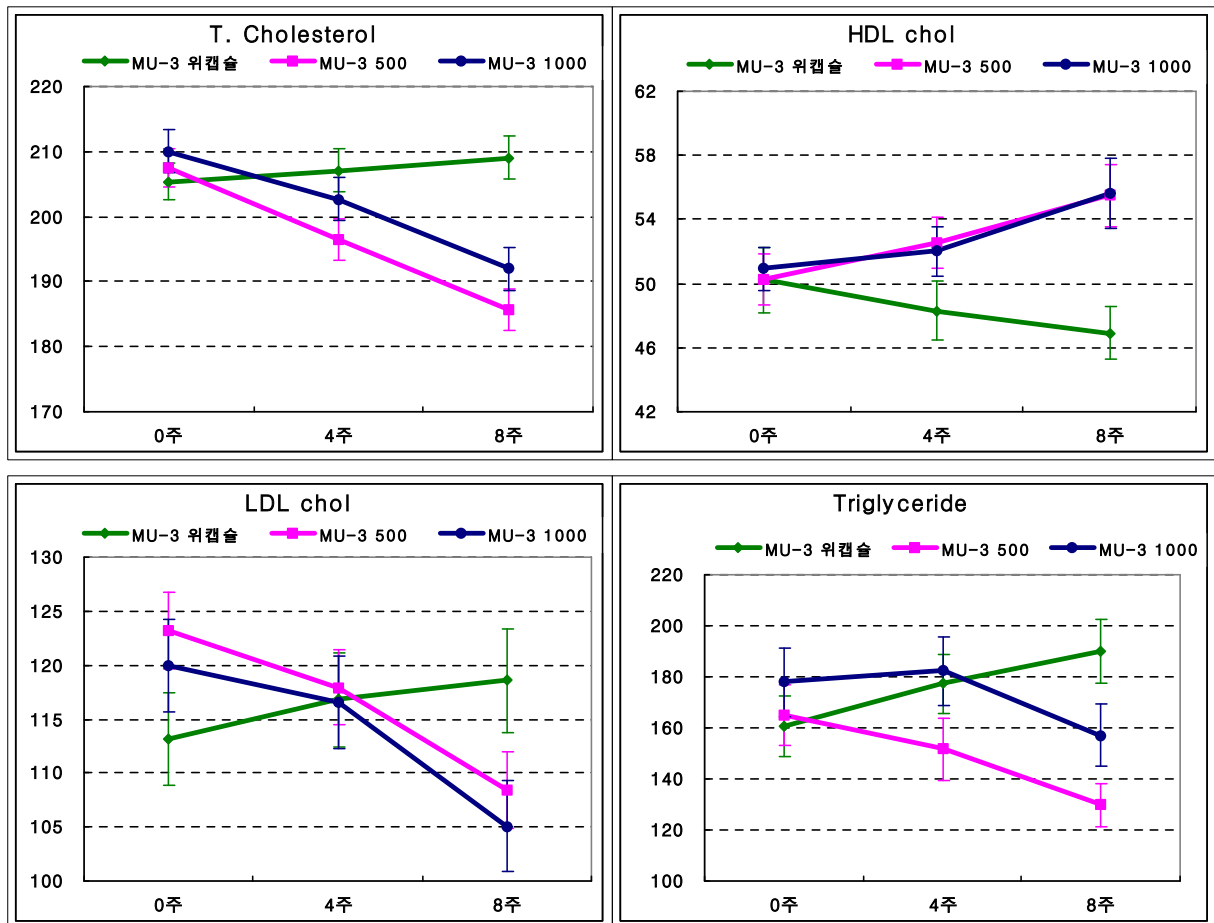


그림 74. Lipid parameters 비교 (1) - 남자

남자 피험자들의 Lipid parameters (2) 검사치의 변화량을 비교한 결과, Apolipoprotein-A1의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 6.69mg/dL 감소)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 6.83mg/dL 증가, $p=0.007$)에서, MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군(평균 7.64mg/dL 증가, $p=0.003$)에서 통계적으로 유의한 개선효과를 보였다.

Apolipoprotein-B의 경우에도 MU-3 위캡슐군(평균 4.64mg/dL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 14.56mg/dL 감소, $p<0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 12.50mg/dL 감소, $p<0.001$)에서 유의하게 개선되는 효과가 나타났다.

hs CRP의 경우에는 MU-3 위캡슐군(평균 0.28mg/L 증가)보다 MU-3 500군(평균 0.18mg/L 감소, $p=0.118$)에서, MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군(평균 0.24mg/L 감소, $p=0.053$)에서 개선효과가 있었지만 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.

동맥경화지수(AD)는 MU-3 위캡슐군(평균 0.29 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 0.76 감소, $p<0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 0.58 감소, $p=0.002$)에서 유의한 개선효과가 있었다.

Apolipoprotein-A1 검사치는 MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군에서, Apolipoprotein-B 검사치와 동맥경화지수(AD)는 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나

타났다(표 93, 그림 75).

표 93. Lipid parameters 변화량 비교 (2) - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
Apolipoprotein-A1	-6.69±17.06	0.024	6.83±24.01	0.097	7.64±21.92	0.044	0.007	0.003
Apolipoprotein-B	4.64±21.10	0.196	-14.56±11.01	<0.001	-12.50±18.47	<0.001	<0.001	<0.001
hs CRP	0.28±1.14	0.156	-0.18±1.28	0.413	-0.24±1.07	0.193	0.118	0.053
동맥경화지수(AI)	0.29±1.15	0.138	-0.76±0.93	<0.001	-0.58±1.12	0.004	<0.001	0.002

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

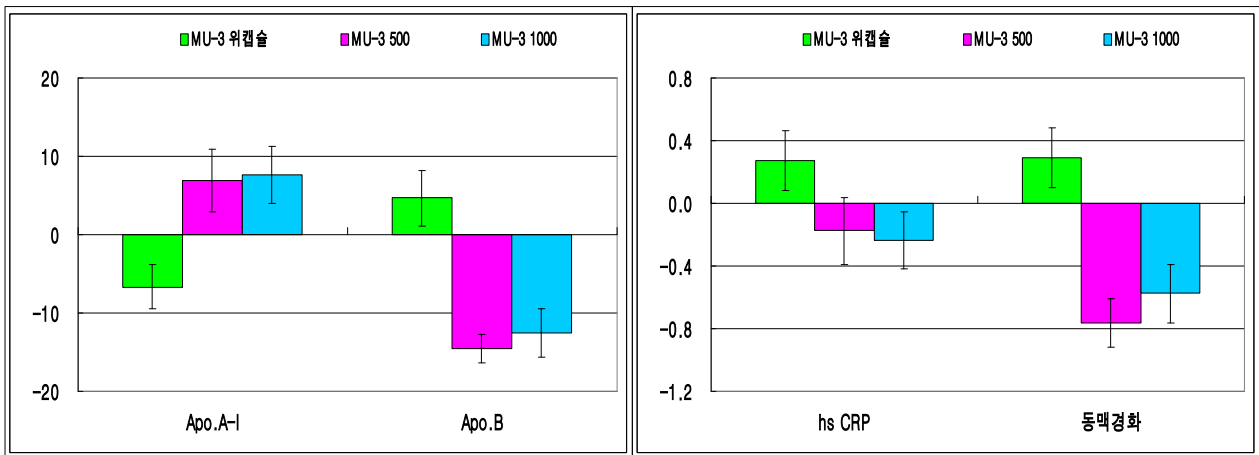


그림 75. Lipid parameters 변화량 비교 (2) - 남자

남자 피험자들의 Lipid parameters (2) 검사치를 비교한 결과, Apolipoprotein-A1의 경우 8주차의 검사치에서만 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군(p=0.030), MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군(p=0.007) 간에 유의한 차이가 있었다.

Apolipoprotein-B 검사치의 경우에도 8주차의 검사치에서만 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군(p=0.003), MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군(p=0.008) 간에 차이가 있었으며, 방문 시기별 변화는 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p<0.001)에서 유의하게 감소하는 효과를 보였다. hs CRP 검사치는 8주차의 검사치에서만 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군(p=0.029)에서만 차이가 있었으며, MU-3 1000군에서 방문시기별로 점차 수치가 감소하였지만 통계적인 유의성(p=0.295)은 없었다.

동맥경화지수(AI)는 {(Total cholesterol - HDL cholesterol) / HDL cholesterol} 계산공식을 통해 구하였다. MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차(p=0.008)와 8주차(p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 8주차(p<0.001)에서만 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 방문 시기별 변화는 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p=0.001)에서 유의하게 감소하는 효과가 있는 것으로 나타났다(표 94, 그림 76).

표 94. Lipid parameters 비교 (2) - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Apolipoprotein-A1(mg/dL)	0주	149.81±25.32 (104-208)	0.025	148.81±23.57 (97-202)	0.112	152.33±17.09 (112-203)	0.092	0.863	0.621
	4주	147.72±23.91 (107-208)		152.03±18.79 (95-193)		153.47±18.89 (113-189)			
	8주	143.11±25.11 (96-219)		155.64±22.84 (110-196)		159.97±26.70 (106-236)			
Apolipoprotein-B (mg/dL)	0주	114.17±19.19 (69-148)	0.258	120.06±15.60 (92-149)	<0.001	118.50±19.72 (85-150)	<0.001	0.157	0.348
	4주	116.11±15.51 (86-150)		114.33±18.08 (76-159)		115.64±20.32 (75-159)			
	8주	118.81±20.37 (77-154)		105.50±15.78 (75-151)		106.00±19.66 (73-161)			
hs CRP (mg/L)	0주	1.17±1.12 (0.07-3.98)	0.156	1.22±1.27 (0.14-6.70)	0.531	1.16±0.95 (0.18-4.15)	0.295	0.876	0.959
	4주	1.14±0.93 (0.24-3.41)		1.25±1.14 (0.07-5.28)		1.06±0.91 (0.13-3.76)			
	8주	1.45±1.13 (0.18-4.14)		1.04±0.99 (0.02-4.02)		0.92±0.84 (0.11-3.76)			
동맥경화지수(AD)	0주	3.36±1.37 (1.3-8.2)	0.229	3.28±0.87 (1.5-5.0)	<0.001	3.24±0.84 (1.5-4.9)	0.001	0.774	0.664
	4주	3.47±0.97 (1.3-6.1)		2.88±0.84 (1.2-5.3)		3.04±0.88 (1.5-4.9)			
	8주	3.65±1.01 (1.5-5.6)		2.51±0.94 (1.1-5.4)		2.66±1.04 (1.0-4.9)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

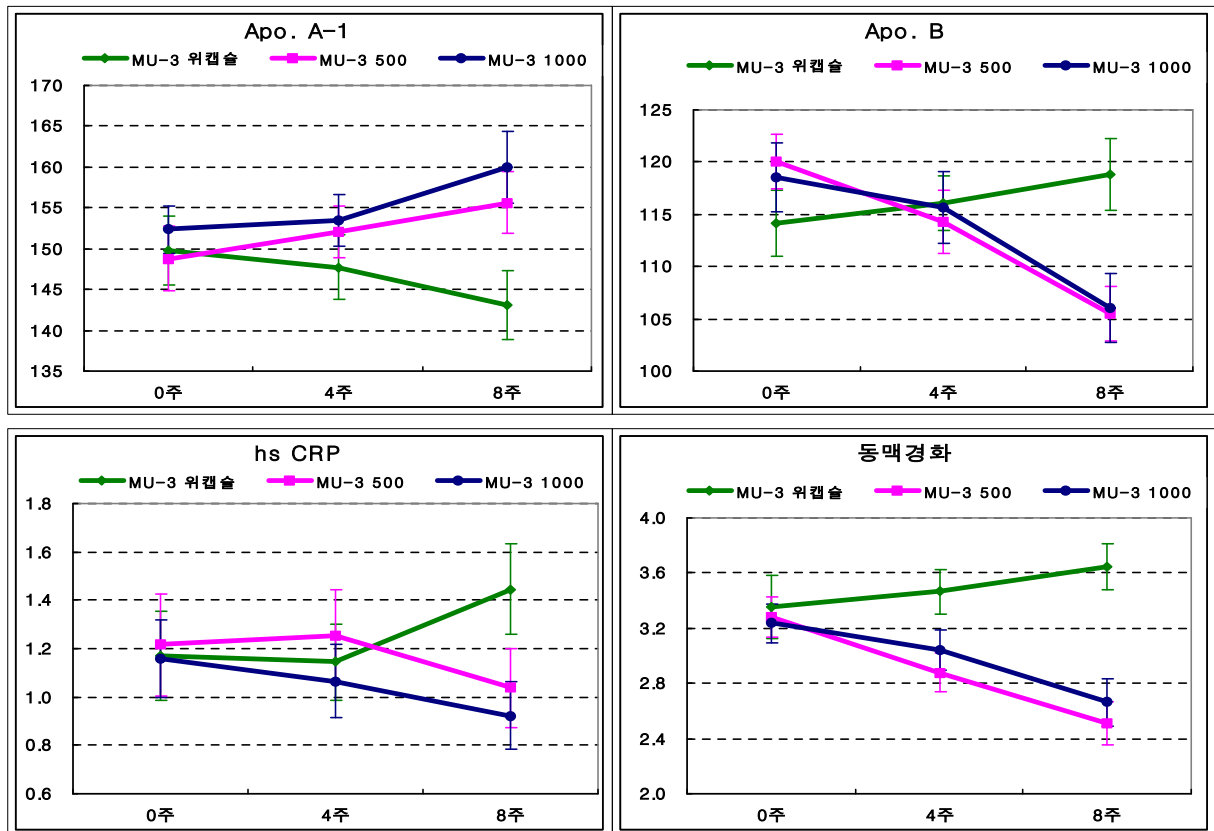


그림 76. Lipid parameters 비교 (2) - 남자

② 여자

여자 피험자들의 Lipid parameters (1) 검사치의 변화량을 비교한 결과, Total cholesterol의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 10.39mg/dL 증가)보다 MU-3 500군(평균 17.23mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군(평균 16.08mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서 유의한 개선효과를 보였다.

MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군을 비교하였을 때 HDL cholesterol의 경우 MU-3 500군(평균 9.20mg/dL 증가, $p < 0.001$)에서, LDL cholesterol의 경우에도 MU-3 500군(평균 14.71mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서, Triglyceride의 경우에도 MU-3 500군(평균 29.57mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서 유의하게 개선되는 효과가 있었다.

MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군을 비교하였을 때 HDL cholesterol의 경우 MU-3 1000군(평균 6.22mg/dL 증가, $p < 0.001$), LDL cholesterol의 경우에도 MU-3 1000군(평균 15.03mg/dL 감소, $p < 0.001$), Triglyceride의 경우에도 MU-3 1000군(평균 15.11mg/dL 감소, $p = 0.010$)에서 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다.

LDL cholesterol 검사치는 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군보다 MU-3 1000군에서, Total cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride 검사치의 경우에는 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다(표 95, 그림 77).

표 95. Lipid parameters 변화량 비교 (1) - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
Total cholesterol	10.39±13.90	<0.001	-17.23±23.18	<0.001	-16.08±21.05	<0.001	<0.001	<0.001
HDL cholesterol	-3.47±5.82	0.001	9.20±10.28	<0.001	6.22±10.82	<0.001	<0.001	<0.001
LDL cholesterol	9.25±19.07	0.006	-14.71±21.03	<0.001	-15.03±26.23	0.002	<0.001	<0.001
Triglyceride	18.83±53.57	0.042	-29.57±41.84	<0.001	-15.11±54.48	0.105	<0.001	0.010

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

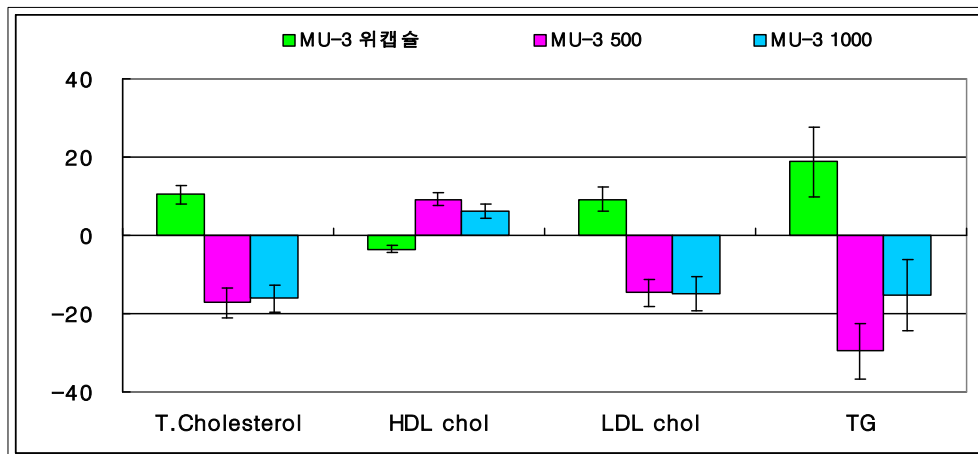


그림 77. Lipid parameters 변화량 비교 (1) - 여자

여자 피험자들의 Lipid parameters (1) 검사치를 비교 분석한 결과, Total cholesterol 검사치의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차(p<0.001)와 8주차(p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 8주차(p=0.001)에서만 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 방문 시기별 변화에서는 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p<0.001)은 유의하게 감소하는 개선효과를 보였다. HDL cholesterol의 경우 8주차의 검사치에서만 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군(p<0.001), MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군(p=0.004) 간에 차이가 있었다. 방문 시기별 변화에서는 MU-3 500군(p=0.002)과 MU-3 1000군(p=0.012)은 유의하게 증가하는 개선효과가 있었다.

LDL cholesterol의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 8주차(p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 0주차(p=0.026)와 8주차(p=0.044)에서만 유의한 차이를 보였으며, 방문 시기별 변화에서는 MU-3 500군(p=0.001)과 MU-3 1000군(p<0.001)은 통계적으로 유의하게 감소하는 개선효과를 보였다.

Triglyceride 검사치의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차(p=0.008)와 8주차(p=0.001)에서, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 8주차(p=0.014)에서만 통계적으로 유의한 변화가 있었다. MU-3 500군에서만 방문시기별로 점차 수치가 감소하였으며, 이는 개선효과가 유의한 것(p<0.001)으로 분석되었다(표 96, 그림 78).

표 96. Lipid parameters 비교 (1) - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Total cholesterol (mg/dL)	0주	207.14±19.45 (181-245)	<0.001	205.94±18.65 (184-245)	<0.001	213.89±16.97 (185-254)	<0.001	0.792	0.121
	4주	213.56±20.80 (178-258)		195.31±18.87 (146-238)		207.28±18.12 (169-249)			
	8주	217.53±21.42 (177-258)		188.71±22.91 (125-228)		197.81±25.16 (135-249)			
HDL cholesterol (mg/dL)	0주	54.25±11.66 (35-89)	0.001	53.23±11.61 (27-76)	<0.001	54.06±11.48 (40-87)	<0.001	0.713	0.943
	4주	53.28±11.53 (33-86)		57.20±11.70 (36-84)		56.11±11.49 (30-84)			
	8주	50.78±12.05 (33-88)		62.43±11.88 (37-91)		60.28±15.19 (39-104)			
LDL cholesterol (mg/dL)	0주	117.19±20.68 (70-157)	0.007	118.69±15.75 (73-156)	0.001	128.89±22.92 (84-164)	<0.001	0.734	0.026
	4주	122.44±25.94 (74-187)		114.37±25.49 (55-178)		125.47±24.38 (77-164)			
	8주	126.44±22.95 (67-165)		103.97±23.10 (64-153)		113.86±28.89 (66-169)			
Triglyceride (mg/dL)	0주	132.08±59.88 (53-291)	0.125	130.46±45.89 (67-288)	<0.001	129.11±56.49 (51-298)	0.104	0.898	0.829
	4주	141.92±57.69 (70-316)		109.00±42.02 (51-208)		128.03±69.36 (44-344)			
	8주	150.92±69.40 (48-399)		100.89±48.93 (44-239)		114.00±54.46 (40-255)			

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

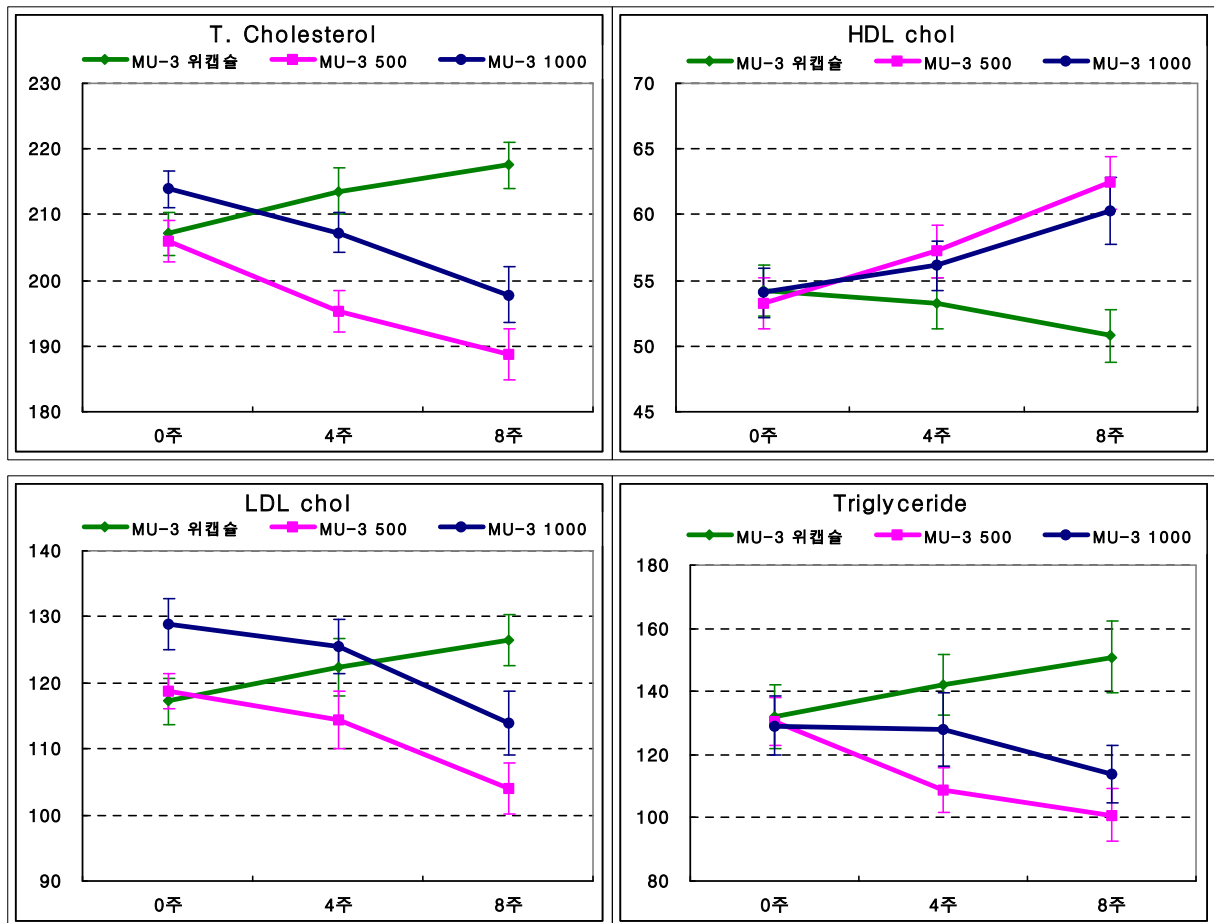


그림 78. Lipid parameters 비교 (1) - 여자

여자 피험자들의 Lipid parameters (2) 검사치의 변화량을 비교 분석하였다. MU-3 위캡슐 군과 MU-3 500군을 비교하였을 때 Apolipoprotein-A1의 경우 MU-3 500군(평균 10.17mg/dL 증가, $p < 0.001$)에서, Apolipoprotein-B 검사치의 경우 MU-3 500군(평균 9.49mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서, hs CRP의 경우 MU-3 500군(평균 0.31mg/L 감소, $p < 0.001$)에서, 동맥경화지수(AI)의 경우 MU-3 500군(평균 0.89 감소, $p < 0.001$)에서 유의하게 개선되는 효과가 나타났다.

MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군을 비교하였을 때 Apolipoprotein-A1의 경우 MU-3 1000군(평균 7.47mg/dL 증가, $p < 0.001$)에서, Apolipoprotein-B의 경우 MU-3 1000군(평균 12.61mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서, hs CRP의 경우에도 MU-3 1000군(평균 0.24mg/L 감소, $p < 0.001$)에서, 동맥경화지수(AI)의 경우에도 MU-3 1000군(평균 0.60 감소, $p < 0.001$)에서 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다.

Apolipoprotein-B 검사치는 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군보다 MU-3 1000군에서, Apolipoprotein-A1, hs CRP, 동맥경화지수(AI)의 경우에는 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다(표 97, 그림 79).

표 97. Lipid parameters 변화량 비교 (2) - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
Apolipoprotein-A1	-6.28±10.63	0.001	10.17±17.72	0.002	7.47±17.65	0.016	<0.001	<0.001
Apolipoprotein-B	9.58±19.98	0.007	-9.49±15.59	0.001	-12.61±19.99	0.001	<0.001	<0.001
hs CRP	0.28±0.52	0.002	-0.31±0.78	0.025	-0.24±0.67	0.036	<0.001	<0.001
동맥경화지수(AI)	0.52±0.54	<0.001	-0.89±0.89	<0.001	-0.60±0.80	<0.001	<0.001	<0.001

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

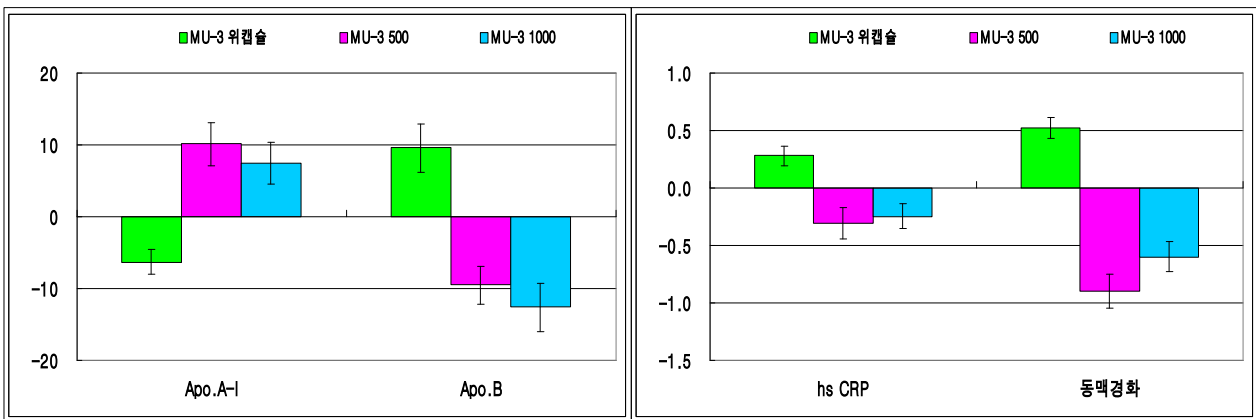


그림 79. Lipid parameters 변화량 비교 (2) - 여자

여자 피험자들의 Lipid parameters (2) 검사치를 비교한 결과, Apolipoprotein-A1의 경우 8주차의 검사치에서만 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군(p=0.001), MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군(p=0.009) 간에 유의한 차이가 있었으며, 방문 시기별 변화는 MU-3 500군(p=0.001)과 MU-3 1000군(p=0.015)에서 유의하게 증가하는 효과를 보였다.

Apolipoprotein-B 검사치의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차(p=0.033)와 8주차(p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 8주차(p=0.004)에서만 유의한 차이가 있었으며, 방문 시기별 변화는 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p<0.001)에서 유의하게 감소하는 효과를 보였다.

hs CRP 검사치는 8주차의 검사치에서만 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군(p=0.001), MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군(p=0.007) 간에 유의한 차이가 있었으며, MU-3 500군에서만 방문시기별로 점차 수치가 유의하게 감소하는 효과(p=0.022)가 있었다.

동맥경화지수(AI)는 {(Total cholesterol - HDL cholesterol) / HDL cholesterol} 계산공식을 통해 구하였다. MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차(p=0.001)와 8주차(p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 8주차(p<0.001)에서만 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 방문 시기별 변화는 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p<0.001)에서 유의하게 감소하는 효과가 있는 것으로 나타났다(표 98, 그림 80).

표 98. Lipid parameters 비교 (2) - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=36)		p*	p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Apolipoprotein-AI(mg/dL)	0주	150.69±24.21 (100-206)		152.14±24.62 (86-198)		153.03±21.87 (117-202)		0.803	0.669
	4주	150.17±24.59 (102-217)	<0.001	156.54±25.12 (100-210)	0.001	155.47±22.98 (118-195)	0.015	0.284	0.348
	8주	144.42±23.10 (104-211)		162.31±21.89 (110-198)		160.50±27.41 (119-226)		0.001	0.009
Apolipoprotein-B(mg/dL)	0주	107.11±22.32 (60-166)		103.63±18.35 (53-152)		113.08±21.76 (73-164)		0.476	0.254
	4주	112.61±22.74 (69-166)	0.005	101.71±19.19 (62-149)	<0.001	110.19±24.30 (70-173)	<0.001	0.033	0.664
	8주	116.69±19.87 (68-162)		94.14±19.04 (62-149)		100.47±25.74 (61-164)		<0.001	0.004
hs CRP(mg/L)	0주	0.78±0.54 (0.13-2.45)		0.80±0.63 (0.15-3.36)		0.82±0.83 (0.08-3.32)		0.897	0.802
	4주	0.80±0.63 (0.05-3.38)	<0.001	0.63±0.50 (0.12-2.18)	0.022	0.81±1.01 (0.06-4.71)	0.097	0.225	0.941
	8주	1.06±0.81 (0.23-3.12)		0.49±0.54 (0.03-2.85)		0.58±0.65 (0.02-2.64)		0.001	0.007
동맥경화지수(AI)	0주	2.96±0.80 (1.1-4.6)		3.05±0.95 (1.7-5.9)		3.10±0.74 (1.5-4.4)		0.685	0.465
	4주	3.17±0.89 (1.3-5.1)	<0.001	2.54±0.66 (1.5-4.1)	<0.001	2.86±0.91 (1.6-6.1)	<0.001	0.001	0.140
	8주	3.48±0.99 (1.2-5.6)		2.15±0.86 (1.0-4.6)		2.50±1.01 (0.9-4.3)		<0.001	<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

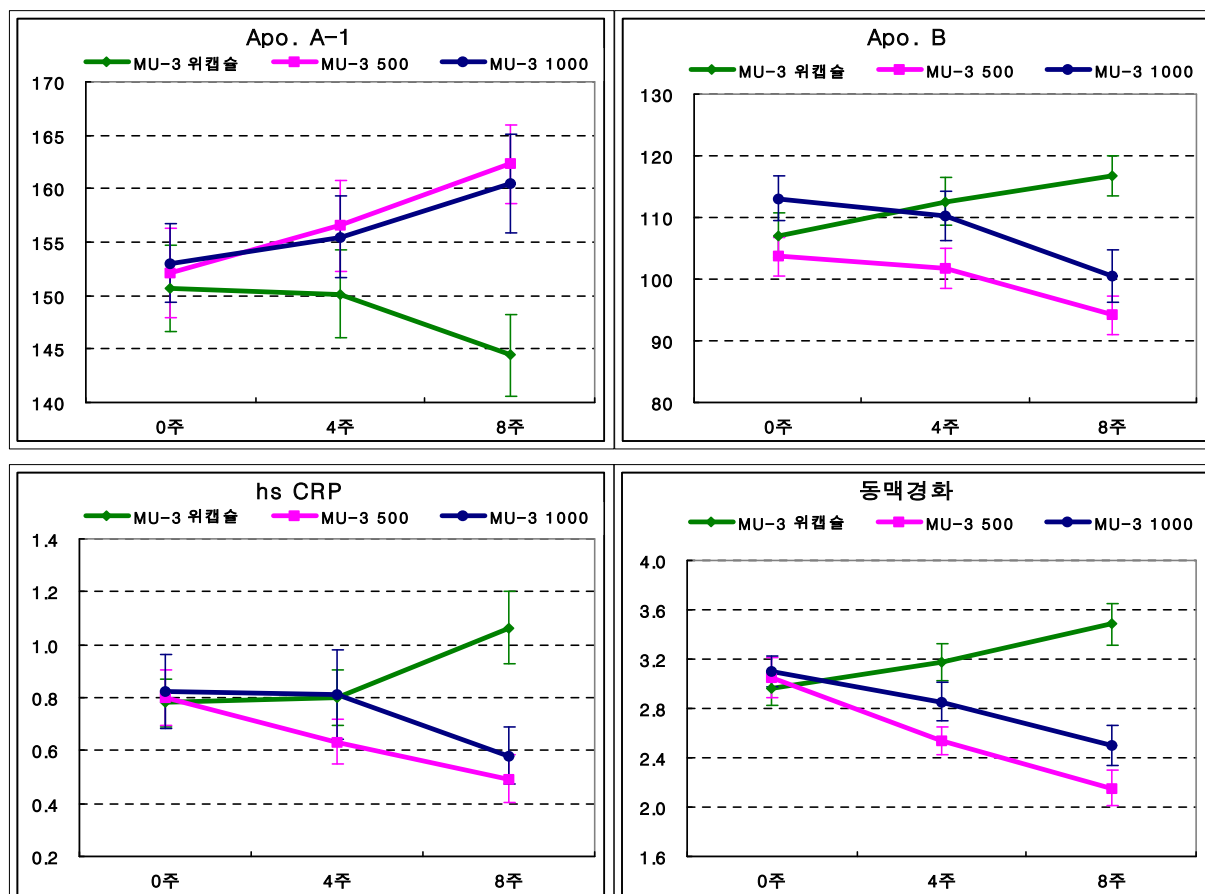


그림 80. Lipid parameters 비교 (2) - 여자

(나) PP 분석법(최종 판정)

PP 분석법은 임상시험에서 중도 탈락한 경우와 복약 순응도가 70% 미만인 피험자를 제외한 계획서순응 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 따라서 남자 피험자 107명[MU-3 위캡슐군 36명, MU-3 500군 36명, MU-3 1000군 35명(1명 제외 : 이상반응으로 인한 중도탈락)]과 여자 피험자 106명[MU-3 위캡슐군 36명, MU-3 500군 35명(1명 제외 : 피험자의 불순응으로 인한 중도탈락), MU-3 1000군 35명(1명 제외 : 이상반응으로 인한 중도탈락)]을 대상으로 평가하였다.

① 남자

남자 피험자들의 Lipid parameters (1) 검사치의 변화량을 비교한 결과, Total cholesterol은 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 3.67mg/dL 증가한 반면 MU-3 500군에서는 평균 21.83mg/dL 유의하게 감소하는 효과($p < 0.001$)가 있는 것으로 평가되었다. MU-3 1000군에서도 평균 18.20mg/dL 감소하여 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선효과($p < 0.001$)를 보였다.

HDL cholesterol의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 3.33mg/dL 감소하였으나 MU-3 500군에서는 평균 5.22mg/dL 유의하게 증가하는 효과($p = 0.001$)가 있었으며, MU-3 1000군에서도 평균 4.89mg/dL 증가하여 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선되는 효과($p = 0.002$)를 보였다.

LDL cholesterol의 경우에도 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군(평균 5.47mg/dL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 14.86mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 14.57mg/dL 감소, $p = 0.001$)에서 유의한 개선효과가 나타났다.

Triglyceride의 경우에도 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군(평균 29.58mg/dL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 35.19mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 23.77mg/dL 감소, $p = 0.001$)에서 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다.

Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride 검사치 모두 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다(표 99, 그림 81).

표 99. Lipid parameters 변화량 비교 (1) - 남자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
Total cholesterol	3.67±19.71	0.272	-21.83±19.92	<0.001	-18.20±25.37	<0.001	<0.001	<0.001
HDL cholesterol	-3.33±8.78	0.029	5.22±11.02	0.007	4.89±12.41	0.026	0.001	0.002
LDL cholesterol	5.47±24.13	0.182	-14.86±20.55	<0.001	-14.57±23.90	0.001	<0.001	0.001
Triglyceride	29.58±59.30	0.005	-35.19±47.14	<0.001	-23.77±65.27	0.038	<0.001	0.001

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

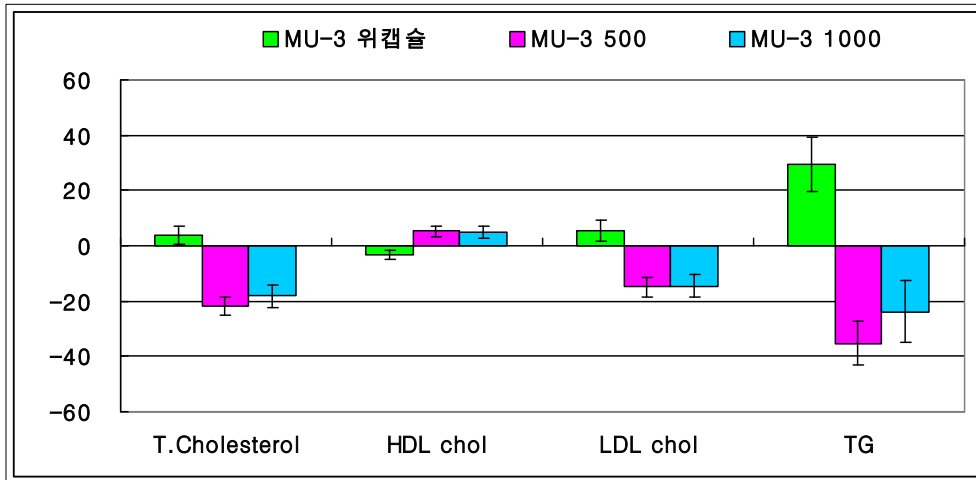


그림 81. Lipid parameters 변화량 비교 (1) - 남자

남자 피험자들의 Lipid parameters (1) 검사치를 비교 분석하였다. Baseline의 Total cholesterol 검사치는 시험 시작 전 군간에 통계학적으로 유의한 차이(p=0.517)는 없었다. 건강 기능식품 투여 후 8주차의 Total cholesterol 검사치는 군간에 유의한 차이(p<0.001)가 있었으며, MU-3 500군과 MU-3 1000군에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 개선효과가 있는 것으로 나타났다.

HDL cholesterol 검사치의 Baseline 시점은 군간에 유의한 차이(p=0.919)가 없었으며, 투여 후 8주차의 검사치는 군간에 차이(p=0.001)가 있었다. 방문 시기별 변화에서는 MU-3 500군 (p=0.002)과 MU-3 1000군(p=0.011)은 유의하게 증가하는 개선효과를 보였다.

LDL cholesterol 검사치의 방문 시기별 변화에서는 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군 (p=0.003)은 통계적으로 유의하게 감소하는 개선효과를 보였다.

Baseline의 Triglyceride 검사치는 시험 시작 전 군간에 통계학적으로 유의한 차이(p=0.705)는 없었고, 식품 투여 후 8주차의 Triglyceride 검사치는 군간에 유의한 차이(p=0.001)가 있었다. 특히 MU-3 500군에서 방문시기별로 점차 수치가 감소하였으며, 이는 개선효과가 유의한 것 (p<0.001)으로 분석되었다(표 100, 그림 92).

표 100. Lipid parameters 비교 (1) - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Total cholesterol (mg/dL)	0주	205.42±17.25 (182-249)		207.56±17.76 (184-247)		210.40±19.78 (182-242)		0.606	0.261
	4주	207.11±19.39 (154-246)	0.532	196.47±19.62 (157-245)	<0.001	203.17±19.93 (158-236)	0.001	0.024	0.401
	8주	209.08±19.73 (180-249)		185.72±19.03 (151-227)		192.20±20.59 (137-246)		<0.001	0.001
HDL cholesterol (mg/dL)	0주	50.22±12.41 (27-82)		50.28±9.70 (34-77)		51.11±8.09 (39-74)		0.983	0.722
	4주	48.31±10.88 (32-88)	0.085	52.56±9.63 (33-79)	0.002	52.31±9.32 (35-68)	0.011	0.084	0.100
	8주	46.89±9.86 (30-75)		55.50±11.71 (34-81)		56.00±13.15 (32-82)		0.001	0.002
LDL cholesterol (mg/dL)	0주	113.14±25.53 (47-169)		123.22±21.52 (67-163)		120.43±25.81 (57-169)		0.074	0.236
	4주	116.78±26.13 (47-169)	0.414	117.94±20.81 (78-158)	<0.001	117.63±25.00 (49-171)	0.003	0.835	0.889
	8주	118.61±28.84 (38-183)		108.36±21.29 (66-144)		105.86±25.21 (56-149)		0.091	0.052
Triglyceride (mg/dL)	0주	160.42±71.20 (59-294)		165.03±70.92 (55-327)		174.83±79.51 (66-347)		0.784	0.424
	4주	177.25±70.57 (62-338)	0.021	151.64±72.31 (42-320)	<0.001	177.17±74.77 (68-379)	0.011	0.133	0.996
	8주	190.00±75.81 (68-317)		129.83±50.48 (68-242)		151.06±63.64 (41-350)		<0.001	0.022

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

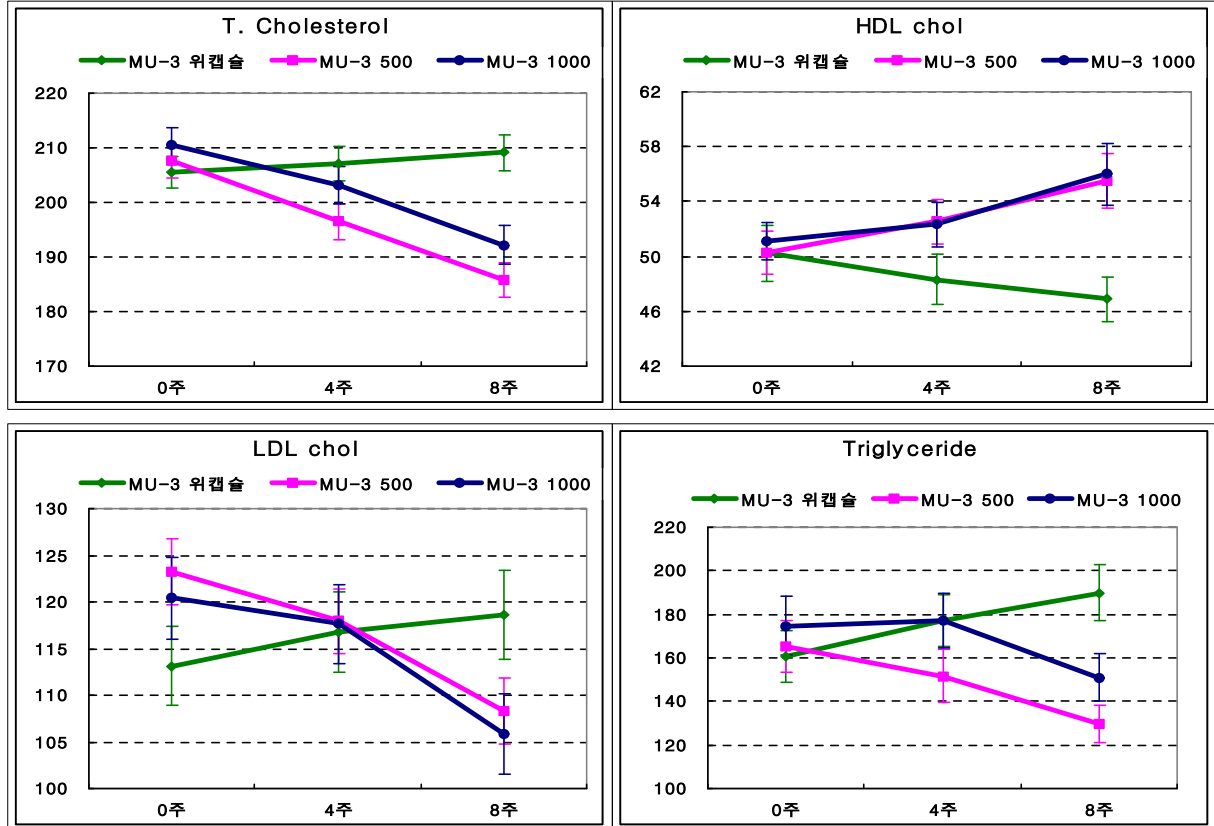


그림 92. Lipid parameters 비교 (1) - 남자

남자 피험자들의 Lipid parameters (2) 검사치의 변화량을 비교한 결과, Apolipoprotein-A1의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 6.69mg/dL 감소하였으나 MU-3 500군에서는 평균 6.83mg/dL 유의하게 증가하는 효과(p=0.007)가 있었으며, MU-3 1000군에서도 평균 7.66mg/dL 증가하여 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선되는 효과(p=0.003)를 보였다.

Apolipoprotein-B는 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 4.64mg/dL 증가한 반면 MU-3 500군에서는 평균 14.56mg/dL 유의하게 감소하는 효과(p<0.001)가 있는 것으로 평가되었다. MU-3 1000군에서도 평균 12.60mg/dL 감소하여 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선효과(p=0.001)를 보였다.

hs CRP의 경우에는 MU-3 위캡슐군(평균 0.28mg/L 증가)에 비해 MU-3 1000군(평균 0.31mg/L 감소, p=0.023)에서만 유의한 개선효과가 있었다.

동맥경화지수(AI)는 MU-3 위캡슐군(평균 0.29 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 0.76 감소, p<0.001)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 0.59 감소, p=0.002)에서 유의한 개선효과가 있었다.

Apolipoprotein-B 검사치와 동맥경화지수(AI)는 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다는 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다(표 101, 그림 93).

< 표 101. Lipid parameters 변화량 비교 (2) - 남자 >

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
Apolipoprotein-A1	-6.69±17.06	0.027	6.83±24.01	0.097	7.66±22.24	0.050	0.007	0.003
Apolipoprotein-B	4.64±21.10	0.196	-14.56±11.01	<0.001	-12.60±18.73	<0.001	<0.001	0.001
hs CRP	0.28±1.14	0.156	-0.18±1.28	0.413	-0.31±0.99	0.070	0.118	0.023
동맥경화지수(AI)	0.29±1.15	0.138	-0.76±0.93	<0.001	-0.59±1.13	0.004	<0.001	0.002

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

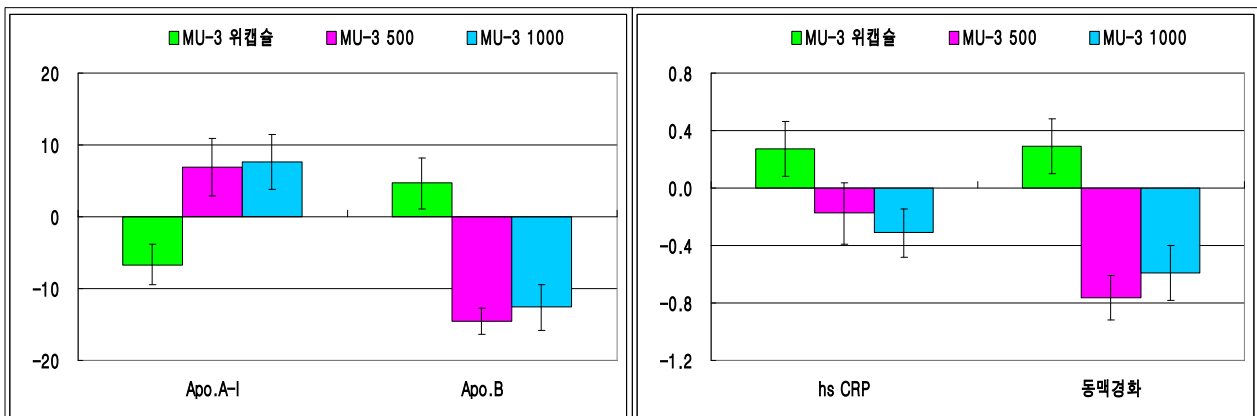


그림 93. Lipid parameters 변화량 비교 (2) - 남자

남자 피험자들의 Lipid parameters (2) 검사치를 비교한 결과, Apolipoprotein-A1 검사치는 MU-3 500군(p=0.112)과 MU-3 1000군(p=0.097)에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 증가하는 효과가 있었지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다. Apolipoprotein-B 검사치의 방문 시기별 변화는 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p<0.001)에서 유의하게 감소하는 효과를 보였다. hs CRP 검사치는 MU-3 1000군(p=0.099)에서 방문시기별로 점차 수치가 감소하였지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

동맥경화지수(AI)는 {(Total cholesterol - HDL cholesterol) / HDL cholesterol} 계산공식을 통해 구하였다. MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p=0.001)에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 효과가 있는 것으로 나타났다(표 102, 그림 94).

표 102. Lipid parameters 비교 (2) - 남자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=36)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	P	평균±표준편차 (최소값-최대값)	P	평균±표준편차 (최소값-최대값)	P		
Apolipoprotein-A1(mg/dL)	0주	149.81±25.32 (104-208)		148.81±23.57 (97-202)		152.69±17.20 (112-203)		0.863	0.576
	4주	147.72±23.91 (107-208)	0.025	152.03±18.79 (95-193)	0.112	153.66±19.13 (113-189)	0.097	0.398	0.253
	8주	143.11±25.11 (96-219)		155.64±22.84 (110-196)		160.34±27.00 (106-236)		0.030	0.007
Apolipoprotein-B (mg/dL)	0주	114.17±19.19 (69-148)		120.06±15.60 (92-149)		118.23±19.94 (85-150)		0.157	0.385
	4주	116.11±15.51 (86-150)	0.258	114.33±18.08 (76-159)	<0.001	115.54±20.61 (75-159)	<0.001	0.656	0.896
	8주	118.81±20.37 (77-154)		105.50±15.78 (75-151)		105.63±19.82 (73-161)		0.003	0.007
hs CRP (mg/L)	0주	1.17±1.12 (0.07-3.98)		1.22±1.27 (0.14-6.70)		1.15±0.97 (0.18-4.15)		0.876	0.942
	4주	1.14±0.93 (0.24-3.41)	0.156	1.25±1.14 (0.07-5.28)	0.531	0.99±0.80 (0.13-3.51)	0.099	0.659	0.451
	8주	1.45±1.13 (0.18-4.14)		1.04±0.99 (0.02-4.02)		0.84±0.69 (0.11-3.03)		0.107	0.008
동맥경화지수(AI)	0주	3.36±1.37 (1.3-8.2)		3.28±0.87 (1.5-5.0)		3.23±0.85 (1.5-4.9)		0.774	0.649
	4주	3.47±0.97 (1.3-6.1)	0.229	2.88±0.84 (1.2-5.3)	<0.001	3.03±0.89 (1.5-4.9)	0.001	0.008	0.054
	8주	3.65±1.01 (1.5-5.6)		2.51±0.94 (1.1-5.4)		2.64±1.04 (1.0-4.9)		<0.001	<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

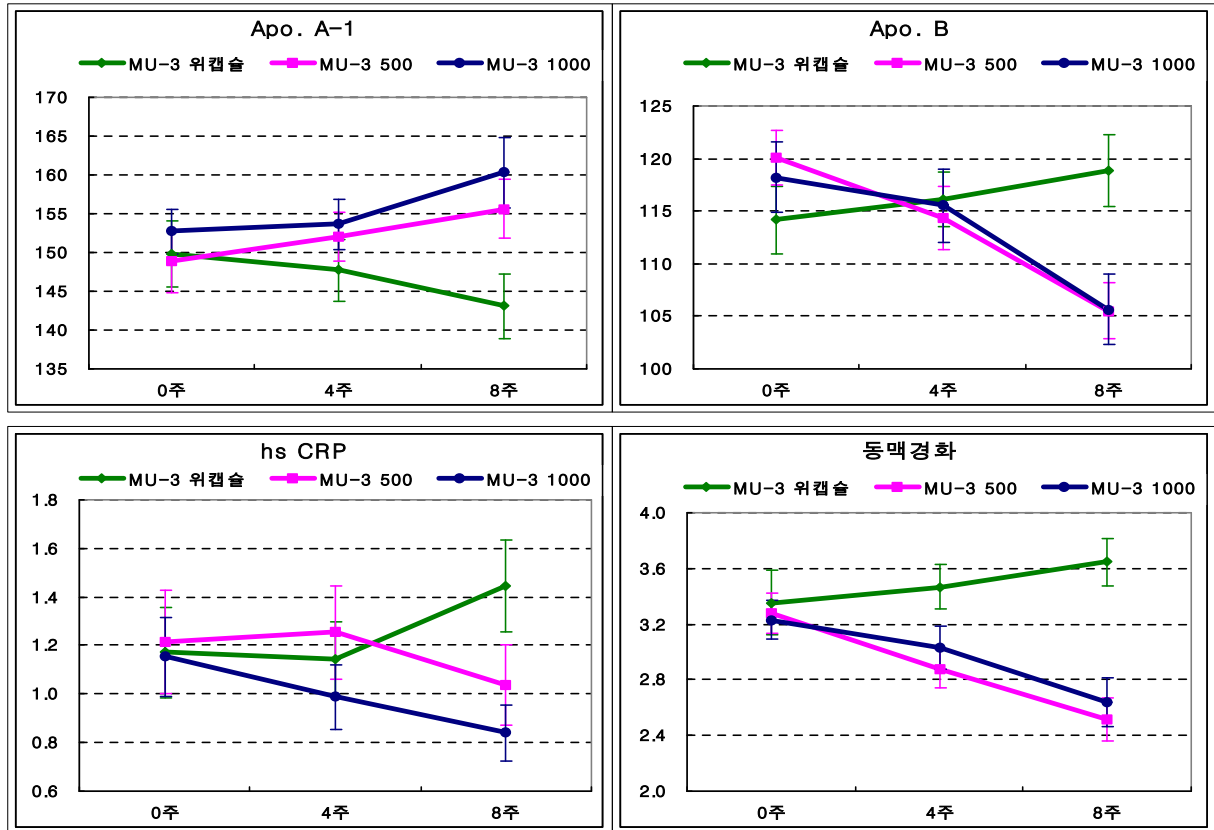


그림 94. Lipid parameters 비교 (2) - 남자

② 여자

여자 피험자들의 Lipid parameters (1) 검사치의 변화량을 비교한 결과, Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 간에는 Total cholesterol의 경우 MU-3 500군(평균 17.23mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서, HDL cholesterol의 경우 MU-3 500군(평균 9.20mg/dL 증가, $p < 0.001$)에서, LDL cholesterol의 경우에도 MU-3 500군(평균 14.71mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서, Triglyceride의 경우에도 MU-3 500군(평균 29.57mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서 유의하게 개선되는 효과가 있었다.

MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에는 Total cholesterol의 경우 MU-3 1000군(평균 15.97mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서, HDL cholesterol의 경우 MU-3 1000군(평균 6.46mg/dL 증가, $p < 0.001$), LDL cholesterol의 경우에도 MU-3 1000군(평균 15.14mg/dL 감소, $p < 0.001$), Triglyceride의 경우에도 MU-3 1000군(평균 14.66mg/dL 감소, $p = 0.012$)에서 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다.

LDL cholesterol 검사치는 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군보다는 MU-3 1000군에서, Total cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride 검사치의 경우에는 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다는 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다(표 103, 그림 95).

표 103. Lipid parameters 변화량 비교 (1) - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
Total cholesterol	10.39±13.90	<0.001	-17.23±23.18	<0.001	-15.97±21.35	<0.001	<0.001	<0.001
HDL cholesterol	-3.47±5.82	0.001	9.20±10.28	<0.001	6.46±10.88	0.001	<0.001	<0.001
LDL cholesterol	9.25±19.07	0.006	-14.71±21.03	<0.001	-15.14±26.60	0.002	<0.001	<0.001
Triglyceride	18.83±53.57	0.042	-29.57±41.84	<0.001	-14.66±55.20	0.125	<0.001	0.012

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

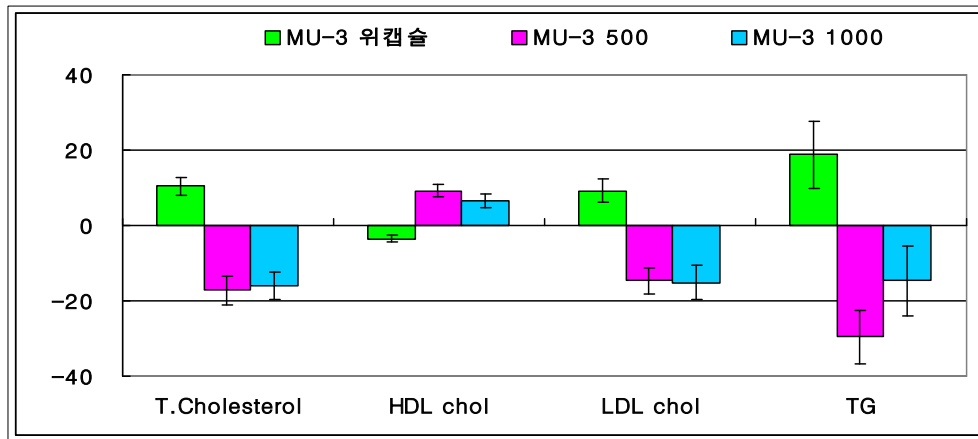


그림 95. Lipid parameters 변화량 비교 (1) - 여자

여자 피험자들의 Lipid parameters (1) 검사치를 비교한 결과, Baseline의 Total cholesterol 검사치는 시험 시작 전 군간에 통계학적으로 유의한 차이(p=0.174)는 없었다. 식품 투여 후 4주차의 검사치는 군간에 유의한 변화(p=0.001)를 보였고, 8주차의 검사치도 군간에 유의한 차이(p<0.001)가 있었으며, MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p<0.001)에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

HDL cholesterol 검사치의 Baseline 시점은 군간에 유의한 차이(p=0.896)가 없었으며, 투여 후 8주차의 검사치는 군간에 차이(p<0.001)가 있었다. 방문 시기별 변화에서는 MU-3 500군(p<0.001)과 MU-3 1000군(p=0.005)은 유의하게 증가하는 효과를 보였다.

LDL cholesterol 검사치의 방문 시기별 변화에서도 MU-3 500군(p=0.001)과 MU-3 1000군(p=0.001)은 통계적으로 유의하게 감소하는 효과를 보였다.

Triglyceride 검사치는 MU-3 500군에서 방문시기별로 점차 수치가 감소하여 개선효과가 유의한 것(p<0.001)으로 분석되었고, MU-3 1000군의 경우에는 수치는 감소하였지만 통계적으로 유의한 변화(p=0.116)는 없었다(표 104, 그림 96).

표 104. Lipid parameters 비교 (1) - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Total cholesterol (mg/dL)	0주	207.14±19.45 (181-245)		205.94±18.65 (184-245)		213.66±17.16 (185-254)		0.792	0.139
	4주	213.56±20.80 (178-258)	<0.001	195.31±18.87 (146-238)	<0.001	207.43±18.36 (169-249)	<0.001	<0.001	0.193
	8주	217.53±21.42 (177-258)		188.71±22.91 (125-228)		197.69±25.52 (135-249)		<0.001	0.001
HDL cholesterol (mg/dL)	0주	54.25±11.66 (35-89)		53.23±11.61 (27-76)		54.43±11.42 (40-87)		0.713	0.948
	4주	53.28±11.53 (33-86)	0.001	57.20±11.70 (36-84)	<0.001	56.60±11.27 (30-84)	0.005	0.159	0.224
	8주	50.78±12.05 (33-88)		62.43±11.88 (37-91)		60.89±14.96 (39-104)		<0.001	0.002
LDL cholesterol (mg/dL)	0주	117.19±20.68 (70-157)		118.69±15.75 (73-156)		128.80±23.25 (84-164)		0.734	0.029
	4주	122.44±25.94 (74-187)	0.007	114.37±25.49 (55-178)	0.001	125.60±24.72 (77-164)	0.001	0.190	0.602
	8주	126.44±22.95 (67-165)		103.97±23.10 (64-153)		113.66±29.28 (66-169)		<0.001	0.044
Triglyceride (mg/dL)	0주	132.08±59.88 (53-291)		130.46±45.89 (67-288)		125.66±53.32 (51-298)		0.898	0.635
	4주	141.92±57.69 (70-316)	0.125	109.00±42.02 (51-208)	<0.001	125.43±68.57 (44-344)	0.116	0.008	0.276
	8주	150.92±69.40 (48-399)		100.89±48.93 (44-239)		111.00±52.15 (40-255)		0.001	0.008

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)
 p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

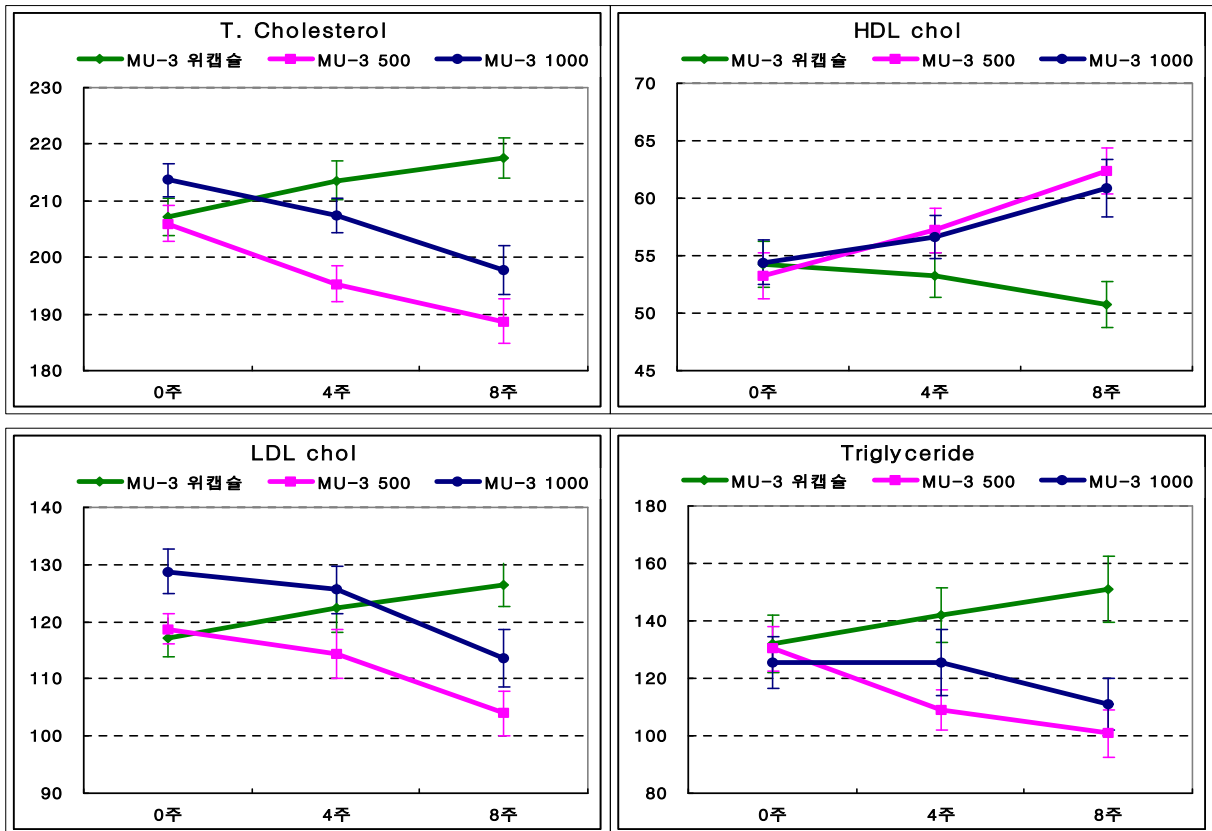


그림 96. Lipid parameters 비교 (1) - 여자

여자 피험자들의 Lipid parameters (2) 검사치의 변화량을 비교한 결과, Apolipoprotein-A1의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군(평균 6.28mg/dL 감소)에 비해 MU-3 500군(평균 10.17mg/dL 증가, $p < 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 8.03mg/dL 증가, $p < 0.001$)에서 유의한 개선효과가 나타났다.

Apolipoprotein-B의 경우에도 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군(평균 9.58mg/dL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 9.49mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 11.97mg/dL 감소, $p < 0.001$)에서 유의하게 감소하는 효과를 보였다.

hs CRP의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 0.31mg/L 증가)과 비교하였을 때 MU-3 500군(0.31mg/L 감소, $p < 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(0.27mg/L 감소, $p < 0.001$)에서 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다.

동맥경화지수(AI)의 경우에도 MU-3 위캡슐군에서 평균 0.52 증가한 반면 MU-3 500군에서는 0.89 감소하여 유의한 개선효과($p < 0.001$)를 보였다. MU-3 1000군(0.61 감소, $p < 0.001$)에서도 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의하게 개선되는 효과($p < 0.001$)가 있었다.

Apolipoprotein-B 검사치는 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군에서, Apolipoprotein-A1, hs CRP, 동맥경화지수(AI)의 경우에는 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다(표 105, 그림 97).

표 105. Lipid parameters 변화량 비교 (2) - 여자

Variables	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
Apolipoprotein-A1	-6.28±10.63	0.001	10.17±17.72	0.002	8.03±17.58	0.011	<0.001	<0.001
Apolipoprotein-B	9.58±19.98	0.007	-9.49±15.59	0.001	-11.97±19.91	0.001	<0.001	<0.001
hs CRP	0.31±0.56	0.002	-0.31±0.78	0.025	-0.27±0.67	0.022	<0.001	<0.001
동맥경화지수(AI)	0.52±0.54	<0.001	-0.89±0.89	<0.001	-0.61±0.81	<0.001	<0.001	<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

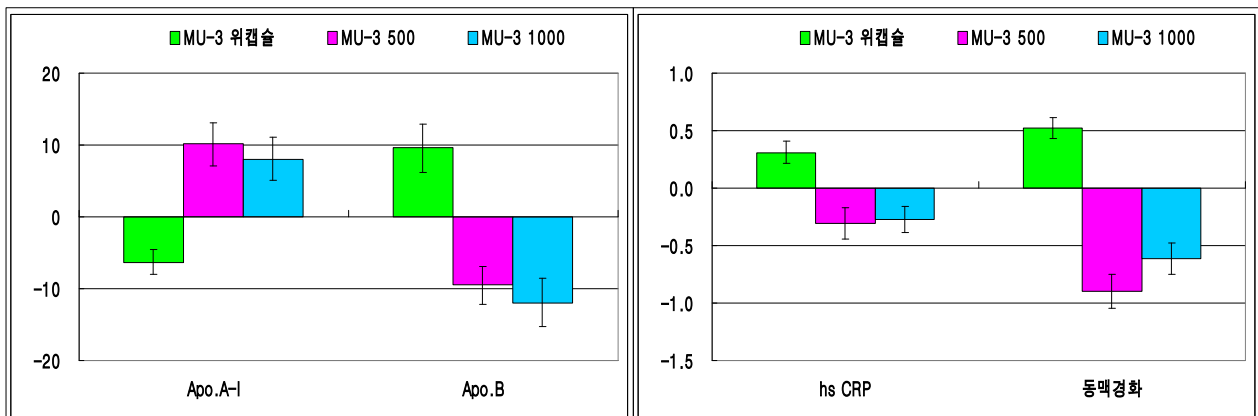


그림 97. Lipid parameters 변화량 비교 (2) - 여자

여자 피험자들의 Lipid parameters (2) 검사치를 비교한 결과, Apolipoprotein-A1 검사치는 MU-3 500군(p=0.001)과 MU-3 1000군(p=0.010)에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 증가하는 개선효과가 있었다. Apolipoprotein-B 검사치의 방문 시기별 변화는 MU-3 500군(p=<0.001)과 MU-3 1000군(p=<0.001)에서 유의하게 감소하는 효과를 보였다. hs CRP 검사치의 경우 MU-3 500군(p=0.022)에서 유의하게 감소하는 효과를 보였으며, MU-3 1000군(p=0.076)에서는 방문시기별로 점차 수치가 감소하였지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

동맥경화지수(AI) 의 경우 MU-3 500군(p=<0.001)과 MU-3 1000군(p=0.<001)에서 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 효과가 있는 것으로 나타났다(표 106, 그림 98).

표 106. Lipid parameters 비교 (2) - 여자

Variables	방문	MU-3 위캡슐(N=36)		MU-3 500(N=35)		MU-3 1000(N=35)		p*	p**
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p		
Apolipoprotein-A1(mg/dL)	0주	150.69±24.21 (100-206)		152.14±24.62 (86-198)		153.54±21.97 (117-202)		0.803	0.606
	4주	150.17±24.59 (102-217)	<0.001	156.54±25.12 (100-210)	0.001	156.40±22.62 (118-195)	0.010	0.284	0.271
	8주	144.42±23.10 (104-211)		162.31±21.89 (110-198)		161.57±27.04 (119-226)		0.001	0.005
Apolipoprotein-B (mg/dL)	0주	107.11±22.32 (60-166)		103.63±18.35 (53-152)		111.80±20.65 (73-164)		0.476	0.362
	4주	112.61±22.74 (69-166)	0.005	101.71±19.19 (62-149)	<0.001	109.83±24.55 (70-173)	<0.001	0.033	0.622
	8주	116.69±19.87 (68-162)		94.14±19.04 (62-149)		99.83±25.82 (61-164)		<0.001	0.003
hs CRP (mg/L)	0주	0.75±0.56 (0.06-2.45)		0.80±0.63 (0.15-3.36)		0.80±0.83 (0.08-3.32)		0.897	0.900
	4주	0.80±0.63 (0.05-3.38)	<0.001	0.63±0.50 (0.12-2.18)	0.022	0.77±1.00 (0.06-4.71)	0.076	0.225	0.901
	8주	1.06±0.81 (0.23-3.12)		0.49±0.54 (0.03-2.85)		0.53±0.59 (0.02-2.64)		0.001	0.002
동맥경화지수(AI)	0주	2.96±0.80 (1.1-4.6)		3.05±0.95 (1.7-5.9)		3.06±0.72 (1.5-4.3)		0.685	0.596
	4주	3.17±0.89 (1.3-5.1)	<0.001	2.54±0.66 (1.5-4.1)	<0.001	2.82±0.89 (1.6-6.1)	<0.001	0.001	0.098
	8주	3.48±0.99 (1.2-5.6)		2.15±0.86 (1.0-4.6)		2.45±0.98 (0.9-4.3)		<0.001	<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군)

p** : independence samples t-test(MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군)

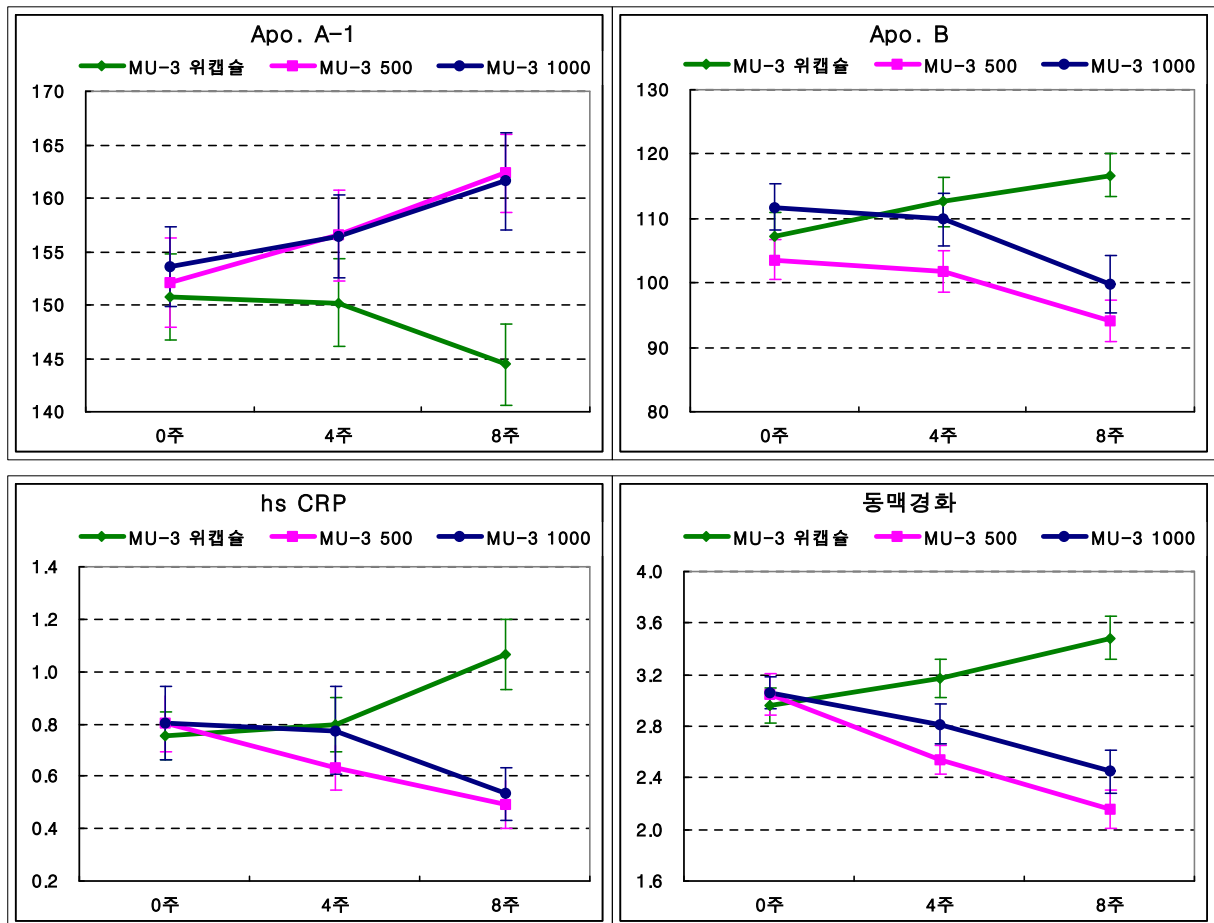


그림 98. Lipid parameters 비교 (2) - 여자

4. 결론

가. 안전성 평가

(1) 윗나무 추출물은 안전한 것으로 평가되었음.

(가) 남자

활력 징후를 비교한 결과, 수축기 혈압과 맥박의 경우 각 군의 방문시기별, 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간의 비교에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이완기 혈압에서는 MU-3 위캡슐군($p=0.020$)과 MU-3 1000군 ($p=0.001$)에서, 체온에서는 MU-3 위캡슐군($p=0.033$), MU-3 500군($p=0.004$), MU-3 1000군 ($p=0.001$) 모두에서 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 차이는 아니었으며, 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간의 차이에서는 유의한 차이가 없었다.

신체 계측을 비교한 결과, 키, 체중, BMI의 경우 MU-3 위캡슐군, MU-3 500군, MU-3 1000군 모두 방문시기별에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었으며, 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에서도 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

각 방문시마다 영양상태, 소화기계, 피부/점막, 근골격계, 이비인후계, 갑상선, 호흡기, 심혈관계, 대사/내분비계, 비뇨생식기계, 신경/정신계, 척추/사지 종양 등의 신체검사를 실시하여 비교한 결과, 비정상(NCS, 임상적 의미 없음)에 해당하는 MU-3 500군 1명(2.8%)과 MU-3 1000군 1명(2.8%)은 이미 병력 및 치료력이 있으며 현재 병용약물이 없다고 조사된 피험자를 말한다. 비정상(CS, 임상적 의미 있음)에 해당하는 MU-3 500군 1명(2.8%)과 MU-3 1000군 1명(2.8%)은 시험 제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 이상반응의 모든 경우를 말한다.

일반혈액검사 결과를 살펴보면, Hemoglobin, Hematocrit, RBC, WBC, Platelet, MCV, MCH, MCHC, Neutrophils, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil 모두 MU-3 위캡슐군, MU-3 500군, MU-3 1000군별로 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었다. 각 방문별 군간의 검사치를 비교한 결과, Platelet의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 4주차($p=0.017$)와 8주차($p=0.030$)에서, Basophil의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 8주차($p=0.046$)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으나, 임상적으로 문제가 있는 경우는 없었다. 그 밖에 Hemoglobin, Hematocrit, RBC, WBC, MCV, MCH, MCHC, Neutrophils, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil의 경우 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

혈청생화학 검사를 비교한 결과, MU-3 위캡슐군의 경우 AST(2.42U/L 증가, $p=0.033$)와 ALT(3.91U/L 증가, $p=0.005$)에서, MU-3 500군에서도 Albumin(0.06g/dL 증가, $p=0.019$)에서 방문시기별로 유의한 차이가 있었으나 검사치의 변화가 정상 수치의 범위 안에 있었으며, 임상적으로 큰 의미는 없었다. 그 밖에 BUN, Creatinine, Fasting plasma glucose, Total Bilirubin, Alkaline phosphatase, Total protein 검사 수치는 MU-3 위캡슐군, MU-3 500군, MU-3 1000군별로 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었다. 각 방문별 군간의 검사치를 비교한 결과, BUN의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차($p=0.012$)에서, Fasting plasma glucose의 경우에도 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 4주차($p=0.046$)에서, Alkaline phosphatase의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서는 8주차($p=0.043$)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 모두 정상범위이며, 임상적으로 큰 의미는 없었다. 그 외의 Creatinine, Total Bilirubin, AST, ALT, Albumin, Total protein 검사 수치는 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

뇨 검사 수치를 비교한 결과, pH의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 변화는 없었다. SG의 경우 0주차에서 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군($p=0.009$), MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군($p=0.001$) 간에 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다. MU-3 위캡슐군에서는

pH(p=0.048)에서, MU-3 1000군에서도 SG(p=0.002)에서 방문시기별로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위 내에서의 변화이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다. Nitrate와 Urobilinogen 검사 수치는 모두 정상으로 조사되었다. 그 밖에 Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Leukocyte 검사 수치에서 비정상으로 나온 경우가 있었으나 모든 방문시점에서 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 임상적으로 큰 의미는 없었다.

대조군(MU-3 위캡슐)과 시험군(MU-3 500, MU-3 1000)에서 임상시험 제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 모든 이상반응 현황을 살펴보면, MU-3 500군에서 발현된 이상반응(AE)은 1건이었으며, MU-3 1000군에서도 1건 발현되었다. 이상약물반응(ADR) 발현은 1건도 없었다. 또한 중대한 이상반응(Serious AE)과 중대한 이상약물반응(Serious ADR)도 1건도 발생하지 않았다.

(나) 여자

활력 징후를 비교한 결과, 수축기 혈압과 맥박의 경우 각 군의 방문시기별, 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간의 비교에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이완기 혈압에서는 MU-3 위캡슐군(p=0.020)과 MU-3 1000군(p=0.001)에서, 체온에서는 MU-3 위캡슐군(p=0.033), MU-3 500군(p=0.004), MU-3 1000군(p=0.001) 모두에서 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 차이는 아니었으며, 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간의 차이에서는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

신체 계측을 비교한 결과, MU-3 위캡슐군, MU-3 500군, MU-3 1000군 별로 방문시점에 따라 키, 체중, BMI 지수 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었으며, 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간의 비교에서도 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

각 방문시마다 피험자들에게 영양상태, 소화기계, 피부/점막, 근골격계, 이비인후계, 갑상선, 호흡기, 심혈관계, 대사/내분비계, 비뇨생식기계, 신경/정신계, 척추/사지 종양 등의 신체검사를 실시하여 비교한 결과, 비정상(NCS, 임상적 의미 없음)에 해당하는 MU-3 위캡슐군 1명(2.8%)과 MU-3 500군 2명(5.7%)은 이미 병력 및 치료력이 있으며 현재 병용약물이 있다고 조사된 피험자를 말한다. 비정상(CS, 임상적 의미 있음)에 해당하는 MU-3 위캡슐군 3명(8.3%)과 MU-3 1000군 5명(13.9%)은 시험 제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 이상반응의 모든 경우를 말한다.

일반혈액검사 결과를 살펴보면, Hemoglobin, Hematocrit, RBC, Platelet, MCHC, Monocyte, Eosinophil, Basophil의 경우 MU-3 위캡슐군, MU-3 500군, MU-3 1000군 별로 방문시점에 따라

통계적으로 유의한 변화는 없었으며, 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에도 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. MU-3 위캡슐군에서는 WBC(0.52Thous/uL 증가, $p=0.006$)에서, MU-3 1000군에서는 MCV(0.19fL 감소, $p=0.001$)와 MCH(0.25pg 증가, $p=0.003$)에서 방문시기별로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위 내에서의 변화이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다. 각 방문별 군간의 검사치를 비교한 결과, MCV의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서 0주차($p=0.045$)와 8주차($p=0.015$), MCH의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서 0주차($p=0.019$)와 4주차($p=0.049$), Neutrophils의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서 0주차($p=0.012$), Lymphocyte의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 비교에서 0주차($p=0.016$)에 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위이며, 임상적으로 문제가 있는 경우는 없었다.

혈청생화학 검사를 비교한 결과, BUN, Creatinine, Fasting plasma glucose, Total Bilirubin, Alkaline phosphatase, AST, ALT, Albumin 검사 수치는 MU-3 위캡슐군, MU-3 500군, MU-3 1000군 별로 방문시점에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었으며, 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에도 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. Total protein의 경우 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군 비교에서는 0주차($p=0.016$)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 모두 정상범위이며, 임상적으로 큰 의미는 없었다.

뇨 검사 수치를 비교한 결과, pH와 SG 모두 각 방문별 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없는 것으로 나타났다. MU-3 1000군의 경우 pH(0.07 증가, $p=0.041$)에서 방문시기별로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위 내에서의 변화이며, 임상적으로 큰 의미가 없는 것으로 분석되었다. Ketone, Bilirubin, Urobilinogen 검사 수치는 모두 정상으로 조사되었다. 그 밖에 Nitrate, Protein, Glucose, Blood, Leukocyte 검사 수치에서도 비정상적으로 나온 경우가 있었으나 모든 방문시점에서 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 임상적으로 큰 의미는 없었다.

대조군(MU-3 위캡슐)과 시험군(MU-3 500, MU-3 1000)에서 임상시험 제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 모든 이상반응 현황을 살펴보면, MU-3 위캡슐군에서 발현된 이상반응(AE)은 3건이었으며, MU-3 1000군에서도 5건 발현되었다. 이상약물반응(ADR) 발현은 1건도 없었다. 또한 중대한 이상반응(Serious AE)과 중대한 이상약물반응(Serious ADR)도 1건도 발생하지 않았다.

나. 유효성 평가 및 용량결정

(1) 용량결정

ITT 분석법과 PP 분석법에 의해 산출된 1차 및 2차 유효성 평가 결과는 차이가 없었음. 따

라서 최종판정은 PP 분석법으로 실시하였음.

옷나무 추출물은 갱년기 증상 개선 및 혈청 지질 개선 효과가 있는 것으로 평가됨. 갱년기 증상 및 혈청 지질을 효과적으로 개선시키는 적합한 용량은 MU-3 500 시험식품군(125mg * 8 캡슐 = 1일 총 1,000mg 복용)으로 결정됨.

(2) 유효성 평가

(가) 남성갱년기 증상 개선 효과에 대한 유효성 평가

① 일차 유효성 평가

남성갱년기 증상 설문(AMS) 총점수의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 2.97점 증가)과 비교했을 때 MU-3 500군(평균 12.36점 감소, $p < 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군(평균 10.26점 감소, $p < 0.001$)에서 유의한 개선효과가 있었다. 특히 MU-3 위캡슐군과 비교하여 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 갱년기 증상 정도가 중간정도(moderate)에서 증상 없음(No)으로까지 개선되는 효과를 보여 MU-3 500군에서 갱년기 증상 정도의 개선효과($p < 0.001$)가 높은 것으로 확인되었다. 남성갱년기 증상 설문(AMS)을 세분화하여 살펴보면, AMS 정신적 증상, AMS 신체적 증상, AMS 성적 증상 모두 MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 500군에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군에서 유의한 개선효과를 보였다. 특히 AMS 정신적 증상의 경우 MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 500군보다는 MU-3 1000군(평균 3.00점 감소, $p = 0.001$)에서 높은 개선효과가 있었다. 또한 MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군보다는 MU-3 500군에서의 AMS 신체적 증상(평균 5.39점 감소, $p < 0.001$)과 AMS 성적 증상(평균 4.42점 감소, $p < 0.001$)에서 개선효과가 높게 나타났다.

② 이차 유효성 평가

Total Testosterone의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 0.47ng/mL 감소한 반면 MU-3 500군에서는 평균 0.78ng/mL 증가하여 유의한 개선효과($p = 0.001$)를 보였다. MU-3 1000군(평균 0.66ng/mL 증가)에서도 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의하게 개선되는 효과($p = 0.005$)가 있었다. Free Testosterone의 경우 MU-3 위캡슐군(평균 0.73pg/mL 감소)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 1.81pg/mL 증가, $p = 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 1.50pg/mL 증가, $p = 0.026$)에서 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다. Hormone parameters 검사치 모두 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다는 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다.

C-Telopeptide의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군(평균 0.05ng/mL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 0.07ng/mL 감소, $p = 0.004$)에서만 유의한 개선효과가 있었다. Osteocalcin 검사치의 경우에도 MU-3 위캡슐군(평균 1.52ng/mL 증가)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 1.34ng/mL 감소, $p < 0.001$)에서만 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다.

Osteoporosis parameters 검사치 모두 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군에서만 유의한 개선효과가 나타났다.

COMP는 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군(146.33ng/mL 증가)에 비해 MU-3 500군(180.88ng/mL 감소, $p < 0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(151.12ng/mL 감소, $p < 0.001$)에서 유의한 개선효과가 있는 것으로 평가되었다. 특히 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다.

systolic blood pressure, diastolic blood pressure 모두 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군과 MU-3 1000군 모두에서 감소하였지만, 개선효과는 없었다.

국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 총점수는 Baseline의 증상 정도와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 1.69점 감소하였으나 MU-3 500군은 평균 12.31점 유의하게 증가($p < 0.001$)하였으며, MU-3 1000군에서도 평균 7.06점 증가하여 MU-3 위캡슐군에 비해 유의한 개선효과($p < 0.001$)가 있었다. 특히 MU-3 위캡슐군과 비교하여 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 남성 발기기능 증상 정도가 높게 개선되는 효과를 보였다. 국제 발기기능 지수 설문(IIEF)을 세분화하여 살펴보면, Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 유의한 변화가 있었다. 특히 IIEF 발기력, IIEF 성교시 만족감, IIEF 절정감, IIEF 성적 욕구, IIEF 성생활 만족감 모두 MU-3 위캡슐군과 비교하였을 때 MU-3 1000군보다는 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다.

(나) 여성갱년기 증상 개선 효과에 대한 유효성 평가

① 일차 유효성 평가

여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 총점수는 Baseline의 증상 정도와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 0.58점 증가한 반면 MU-3 500군은 평균 14.74점 감소하여 유의한 개선효과($p < 0.001$)가 있었다. MU-3 1000군(평균 13.66점 감소)에서도 MU-3 위캡슐군에 비해 유의하게 감소하는 효과($p < 0.001$)가 있는 것으로 평가되었다. 특히 MU-3 500군($p < 0.001$)과 MU-3 1000군($p < 0.001$)에서 갱년기 증상 정도가 중증에서 준정상 상태로까지 개선효과가 있는 것으로 확인되었으며, MU-3 위캡슐군과 비교하여 MU-3 1000군보다는 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다.

② 이차 유효성 평가

FSH는 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 3.46mIU/mL 증가하였으나 MU-3 500군에서는 평균 6.27mIU/mL 유의하게 감소($p < 0.001$)하였으며, MU-3 1000군에서는 평균 3.51mIU/mL 감소하여 MU-3 위캡슐군에 비해 유의한 개선효과($p = 0.008$)가 있었다. 특히 MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다.

C-Telopeptide는 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에 비해 MU-3 500군($p=0.067$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군($p=0.453$)에서 개선효과를 보였지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다. Osteocalcin의 경우에는 MU-3 위캡슐군(평균 0.45ng/mL 증가)과 비교하였을 때 MU-3 500군(평균 3.07ng/mL 감소, $p=0.002$)에서만 유의한 개선효과를 보였다.

COMP는 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서 평균 120.91ng/mL 증가하였으나 MU-3 500군에서는 평균 165.10ng/mL 유의하게 감소($p<0.001$)하였으며, MU-3 1000군에서도 평균 134.70ng/mL 감소하여 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선되는 효과($p<0.001$)가 있는 것을 확인하였다. 특히 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군에 비해 MU-3 500군에서 개선효과가 유의하게 높게 나타났다.

systolic blood pressure와 diastolic blood pressure 모두 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군과 MU-3 500군, MU-3 위캡슐군과 MU-3 1000군 간에 유의한 변화가 없었다. 특히 diastolic blood pressure 검사치의 경우 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 500군에 비해 MU-3 1000군에서 수치가 유의하게 감소($p=0.002$)하였다.

(다) 혈청 지질개선 효과에 대한 일차 유효성 평가

Total cholesterol은 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 3.67mg/dL 증가한 반면 MU-3 500군에서는 평균 21.83mg/dL 유의하게 감소하는 효과($p<0.001$)가 있는 것으로 평가되었다. MU-3 1000군에서도 평균 18.20mg/dL 감소하여 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선효과($p<0.001$)를 보였다. HDL cholesterol의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 3.33mg/dL 감소하였으나 MU-3 500군에서는 평균 5.22mg/dL 유의하게 증가하는 효과($p=0.001$)가 있었으며, MU-3 1000군에서도 평균 4.89mg/dL 증가하여 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선되는 효과($p=0.002$)를 보였다. LDL cholesterol의 경우에도 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군(평균 5.47mg/dL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 14.86mg/dL 감소, $p<0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 14.57mg/dL 감소, $p=0.001$)에서 유의한 개선효과가 나타났다. Triglyceride의 경우에도 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군(평균 29.58mg/dL 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 35.19mg/dL 감소, $p<0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 23.77mg/dL 감소, $p=0.001$)에서 유의한 개선효과가 있는 것을 확인하였다. Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride 검사치 모두 MU-3 1000군보다 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다.

Apolipoprotein-A1의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 6.69mg/dL 감소하였으나 MU-3 500군에서는 평균 6.83mg/dL 유의하게 증가하는 효과($p=0.007$)가 있었으며, MU-3 1000군에서도 평균 7.66mg/dL 증가하여 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로

유의한 개선되는 효과($p=0.003$)를 보였다. Apolipoprotein-B는 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 MU-3 위캡슐군에서는 평균 4.64mg/dL 증가한 반면 MU-3 500군에서는 평균 14.56mg/dL 유의하게 감소하는 효과($p<0.001$)가 있는 것으로 평가되었다. MU-3 1000군에서도 평균 12.60mg/dL 감소하여 MU-3 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선효과($p=0.001$)를 보였다. hs CRP의 경우에는 MU-3 위캡슐군(평균 0.28mg/L 증가)에 비해 MU-3 1000군(평균 0.31mg/L 감소, $p=0.023$)에서만 유의한 개선효과가 있었다. 동맥경화지수(AI)는 MU-3 위캡슐군(평균 0.29 증가)에 비해 MU-3 500군(평균 0.76 감소, $p<0.001$)에서, MU-3 위캡슐군보다 MU-3 1000군(평균 0.59 감소, $p=0.002$)에서 유의한 개선효과가 있었다. Apolipoprotein-B 검사치와 동맥경화지수(AI)는 MU-3 위캡슐군과 비교했을 때 MU-3 1000군보다는 MU-3 500군에서 개선효과가 높게 나타났다.

제 2절 옷나무의 남성갱년기 관련 약리효능 검증 및 기전연구(제 2핵심)

2-1절 . 옷나무가 안드로젠 작용에 미치는 영향(2핵심 1세부)

1. 연구개발수행 내용

가. 옷나무 추출물 및 분리물질들의 안드로젠/항안드로젠 작용

- 예로부터 옷나무는 닭과 함께 요리한 옷닭으로 남성들의 양기를 북돋기 위하여 널리 사용되고 있음. 이러한 옷나무의 작용이 남성호르몬 작용과의 관련이 있는가를 관찰하기 위하여 옷나무 추출물 및 분리물질들이 남성호르몬 안드로젠에 미치는 영향을 관찰하였음.
- 대표적인 안드로젠인 testosterone의 작용은 그림과 같이 세포 밖에서 세포 내로 uptake 되면 세포막에 존재하는 5-alpha reductase에 의하여 dihydrotestosterone (DHT)로 전환됨. DHT나 testosterone은 세포질내에 heat shock protein(hsp) complex와 함께 결합되어 불활성인 형태로 존재하는 androgen receptor (AR)과 결합하며, AR은 conformational change가 일어나 hsp complex와 해리되어 핵 내로 이동함. 핵내로 이동한 AR은 dimer 형태로 androgen responsive element를 promoter에 갖고 있는 유전자들의 transcription을 활성화시켜 이들의 발현을 증가시킴.

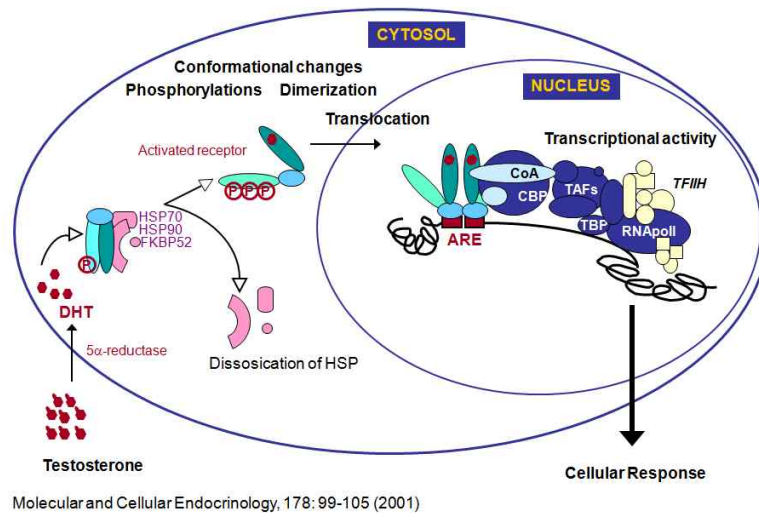


그림 99. 안드로젠 작용 세포에서 테스토스테론의 작용

- 옷나무 추출물의 안드로젠/항안드로젠 작용은 그림의 테스토스테론의 작용을 바탕으로 다음과 같은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 수행하였음.

(1) *In vitro* 안드로젠 작용 assay

(가) 세포독성 측정: 옷나무의 세포 처리 농도설정을 위하여 실시

22RV1/MMTV-Hyg 세포에 여러 농도의 옷나무 추출물을 24시간동안 처리한 후 MTS assay 실시

(나) Transcriptional activation assay (ARE-reporter gene assay)

in vitro에서 안드로젠이 작용하는 androgen responsive element (ARE)를 promoter 부분에 갖고 있고 reporter gene으로 luciferase를 함유하는 plasmid인 pGL4_MMTV_hyg를 영구 transfection 시킨 22Rv1 세포 (22RV1/MMTV-Hyg)에 옷나무 추출물을 단독으로 또는 DHT, bicalutamide(AR antagonist)와 동시에 24시간 처리한 후 luciferase 활성 변화 측정

(다) Cell based AR binding assay

Androgen receptor plasmid를 Cos-1 세포에 일시적으로 transfection 한 후 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ $[\text{H}^3]$ DHT를 여러 농도의 DHT나 옷나무 추출물과 동시에 처리한 후 세포내의 radioactivity를 β -counter로 측정하여 10^{-9}M $[\text{H}^3]$ DHT를 단독 처리한 대조군과 비교

(다) Androgen receptor nuclear translocation assay

안드로젠 수용체 (androgen receptor, AR)는 안드로젠이 세포내에 들어오면 세포질내에서 결합한 후 핵내로 이동하여 ARE와 결합하여 transcriptional activation 작용을 나타냄. 따라서 AR이 안드로젠 작용을 나타내기 위해서는 ligand 와 결합하여 핵내로 이동하는 필수적이므로 AR nuclear translocation을 관찰하였음.

AR-GFP plasmid를 cos-1 세포에 일시적으로 transfection한 후 옷나무 추출물을 단독으로 또는 DHT와 동시에 1시간 처리한 후 고정하여 confocal microscopy로 세포 사진을 찍어 AR의 핵내로 전이 정도를 관찰

(2) *In vivo* 안드로젠 작용 assay (Hershberger assay)

Hershberger assays OECD 공인 안드로젠/항안드로젠 시험법임.

5주령 male rat을 구입하여 1주일간 적응시킨 후 ether 마취하에 고환을 적출함. 다시 10일간 회복기를 거친 후 200, 400, 1000mg/kg의 옷나무 추출물(경구투여)을 testosterone propionate(TP, 경피주사)와 동시에 투여하거나 1000mg/kg 옷나무 추출물은 단독으로 경구투여를 10일간 실시한 후 안드로젠 관련 장기들을 적출하여 무게를 측정함. 아울러 혈액을 채취하여 혈액의 안드로젠 작용 정도를 reporter gene assay로 측정하였음.

항안드로젠 작용은 옷나무 추출물과 TP를 동시에 투여하여 TP에 의한 안드로젠 관련 장기들의 무게 증가에 옷나무 추출물이 미치는 영향을 측정하였음

나. 옷나무 추출물 및 분리물질들의 에스트로젠/항에스트로젠 작용

- 옷나무 추출물의 flavonoid 분획이 여러 효능을 나타내며, flavonoid 류는 여성 호르몬양 작용을 나타내므로 옷나무 추출물 및 분리물질들이 여성호르몬 작용에 미치는 영향을 관찰하였음.

- ligand-activated transcription factor인 estrogen receptor(ER)은 nuclear hormone receptor family에 속하며, 주로 핵 내에 존재함. ER은 ER α 와 ER β 두가지 isoform이 있으며, 세포내에서 호르몬에 의해 활성화된 ER은 dimer를 이루며, 이때 ER dimer는 ER α ($\alpha\alpha$) 또는 ER β ($\beta\beta$) homodimer 또는 ER $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$) heterodimer 등 형태를 띠며(Dahlman-Wright et al., 2006; Leitman et al., 2012).
- ER은 생체 내 여러 다른 조직에 널리 분포하고 있으며, ER α 는 주로 endometrium, breast cancer cells, ovarian stromal cells, 그리고 hypothalamus 등에 발현되고, ER β 는 간, 신장, 뼈, 심장, 폐, intestinal mucosa, prostate 및 endothelial cell 등에 분포함. 그 기능면에서도 ER α 와 ER β 가 다르며, 특히 암세포에서 ER α 는 세포 증식을 ER β 는 세포 증식을 저해하는 것으로 보고됨(Dahlman-Wright et al., 2006; Leitman et al., 2012).
- 옷나무 추출물의 에스트로겐/항에스트로겐 작용은 다음과 같은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 수행하였음

(1) *In vitro* 에스트로겐 작용 assay

(가) 세포독성 측정: 옷나무의 세포 처리 농도설정을 위하여 실시

MCF-7/ERE 세포에 여러 농도의 옷나무 추출물을 24시간동안 처리한 후 MTS assay 실시

(나) Transcriptional activation assay (ERE-reporter gene assay)

ER α -, ER β -mediated transcriptional activation을 관찰하기 위하여 유방암 세포주인 MCF-7 세포(ER α 와 ER β 각각 90과 10% 존재), HEK293T 세포에 ER α 와 ER β plasmid를 각각 일시적으로 과발현시켜 ERE reporter gene assay를 실시하였음.

*in vitro*에서 에스트로겐이 작용하는 estrogen responsive element (ERE)를 promoter 부분에 갖고 있고 reporter gene으로 luciferase를 함유하는 plasmid인 pGL2_3xERE 를 영구 transfection 시킨 MCF-7 세포(MCF7/ERE)에 옷나무 추출물을 단독으로 또는 17 β -estradiol(E2)이나 ICI 182,780(ER α antagonist)와 동시에 24시간 처리한 후 luciferase 활성 변화 측정

HEK293T 세포에 ER α 나 ER β plasmid reporter plasmid와 동시에 transfection 시키고 24시간 경과 후 옷나무 추출물을 단독으로 또는 17 β -estradiol(E2)이나 ICI 182,780(ER α antagonist) 및 4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl-)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl] phenol (PHTPP; ER β antagonist) 동시에 24시간 처리한 후 luciferase 활성 변화 측정

(다) Cell based ER binding assay

ER α -나 ER β -plasmid를 각각 Cos-1 세포에 일시적으로 transfection 한 후 1×10^{-10} M [H^3]E2를 여러 농도의 E2나 옷나무 추출물과 동시에 처리한 후 세포내의 radioactivity를 β

-counter로 측정하여 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ [H^3] E2를 단독 처리한 대조군과 비교

(2) *In vivo* 에스트로겐 작용 assay (Uterotrophic assay)

7주령 SPF female Sprague-Dawley rat을 구입하여 1주일간 환경에 적응시킨 후 ether 마취 하에 난소를 적출함. 2주간 회복시킨 후 20, 100, 500mg/kg 옷나무추출물 (경구투여)이나 2 ug/kg ethinylestradiol(EE, 경피주사)를 각각 단독 투여 (에스트로겐 작용 관찰)하거나 EE와 500 mg/kg 옷나무 추출물을 동시에(항에스트로겐 작용) 3일간 투여한 후 에스트로겐관련 장기 들을 적출하여 무게를 측정함.

다. 옷나무 추출물 및 주성분들의 Aromatase 활성화에 미치는 영향

- 선행연구에서 옷나무 추출물을 투여한 rat에서 혈중 testosterone level이 증가하는 것을 관찰한 바 있음(Na et al., 2005). 이는 testosterone을 estrogen으로 전환하는 aromatase (Cytochrome P450 19, CYP19) 활성을 저해하면 혈중 testosterone level이 증가할 수 있을 것으로 사료되어 2-5 세부과제 유혜현 교수팀과 공동으로 이에 대한 실험을 실시하였음.
- CYP19은 supersome (BD bioscience, USA)을 효소원으로 하여 androstenedione이 estrone으로 전환되는 것을 LC/MS/MS로 측정하였음.

라. 옷나무 추출물 및 주성분들이 5α -reductase 활성화에 미치는 영향

- 그림 에서와 같이 testosterone이 uptake되어 세포 내로 들어올 때 5α -reductase에 의하여 환원되어 AR에 대한 affinity가 testosterone 보다 1000배 정도 강한 것으로 알려진 DHT로 전환됨.
- 5α -reductase는 type 1(5aR1)과 type 2(5aR2) 두가지 isoform이 있으며, 이들은 50% 이하의 sequence identity를 가짐. 더구나 두 isozyme은 생화학적 특성이나 특이적인 장기 분포를 지님. 5aR1은 뇌, 간, 모낭의 모두유 (the dermal papilla of hair follicles)에 주로 분포되어 있으며, 5aR2는 prostate, epididymis와 seminal vesicle 등 안드로겐 의존성 조직에서 발견됨 (Kumar et al., 2011).
- 본 과제에서는 옷나무 추출물과 분리물질이 5α -reductase에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 5aR1과 5aR2를 과발현시킨 Cos-1 세포를 이용하여 testosterone이 DHT로 전환되는 것을 관찰함.

2. 연구개발수행 결과

가. 옷나무 추출물 및 분리물질들의 안드로겐/항안드로겐 작용

(1) 상품화를 위한 최적의 옷나무 추출물 선정

다양한 추출 조건으로 추출한 옷나무 추출물들에 대하여 *in vitro* transcriptional activation assay를 실시하여 제품 개발에 가장 적합한 추출조건을 선정하였음. 그림 -a와 -b에서와 같이 6종의 추출물을 각각 50, 100 μ g/ml, 2가지 농도로 1차 스크리닝을 실시하여 luciferase 활성이 큰 4es, 4ev, 4ws, 1wv를 선정하였음. 다시 여러 농도의 4종 옷나무 추출물에 대한 안드로겐, 항안드로겐 및 세포독성에 대한 2차 스크리닝 실험을 통하여 4es가 가장 효과가 좋은 것으로 나타났음. 그 외 RWV 및 RV10% 및 RV30%에 대한 실험을 통하여 최종 RV10을 선정 하였음(그림 100).

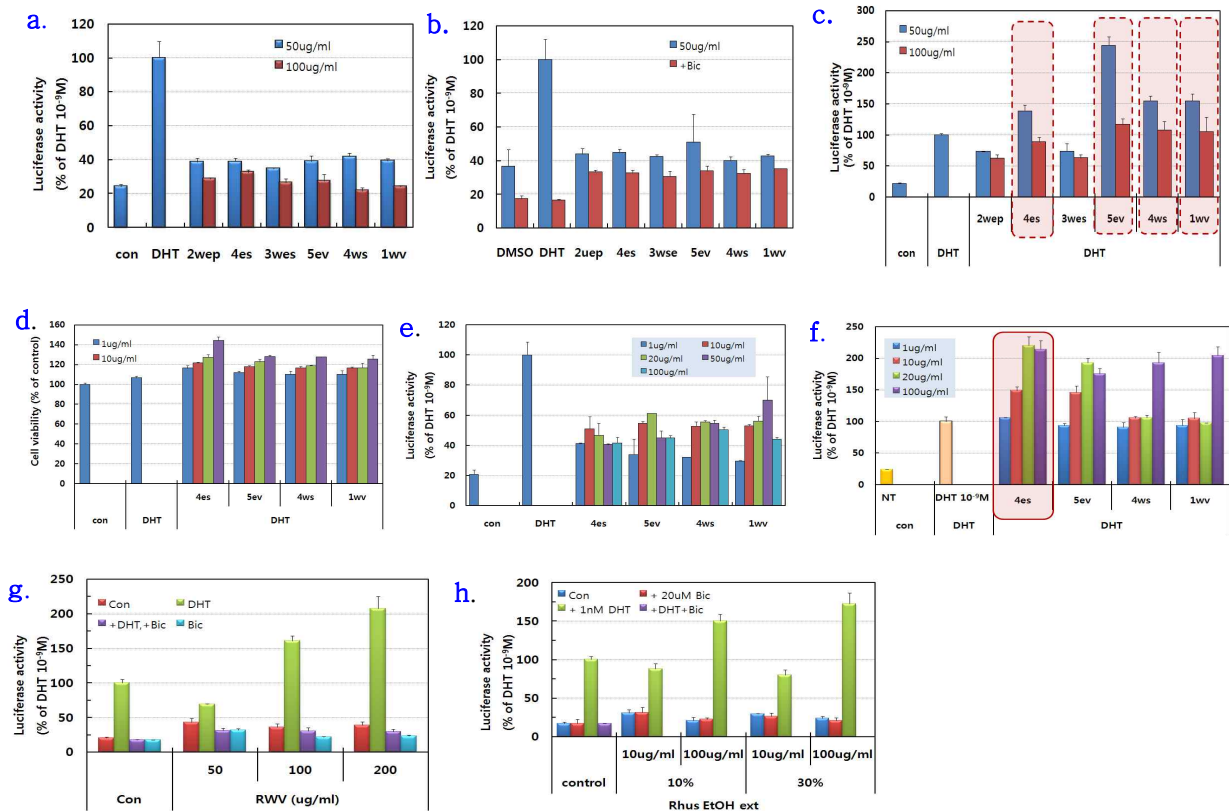


그림 100. 옷나무 추출 조건에 따른 추출물들의 안드로겐 작용 스크리닝

22RV1/MMTV-hyg 세포에 a) 50, 100 μ g/ml 농도 옷나무 추출물들의 안드로겐 작용, b) 50 μ g/ml 추출물과 bicalutamide 처리에 의한 안드로겐 작용 저해, c. 옷나무 추출물과 DHT 동시처리에 의한 안드로겐 작용 영향 d. 4종의 옷나무 추출물 농도변화에 따른 세포독성 e. 4종 옷나무 추출물의 안드로겐 작용 및 f. 옷나무 추출물과 DHT 동시처리에 의한 안드로겐 작용 영향 g. RWV 및 h. 옷나무 추출물 RV10% 및 RV30%의 안드로겐 작용

(2) 옷나무 추출물의 *in vitro* 안드로겐 작용

그러나 RV10 역시 제조공정 상 문제로 인하여 RV10d로 바꾸어 이에 대한 안드로겐, 항안드로겐 및 세포독성에 대하여 실험을 실시하여 RV10과 효능에 차이가 없는 것으로 나타나 최종 RV10d로 결정하였음(그림 101).

되는 것으로 나타났음. 이는 옷나무 추출물 저농도는 $[H^3]$ -DHT가 안드로젠 수용체에 결합을 증가시켜 DHT 작용을 증가시키나 고농도에서는 DHT 작용이 저해되는 항안드로젠 작용을 나타내는 것을 의미함.

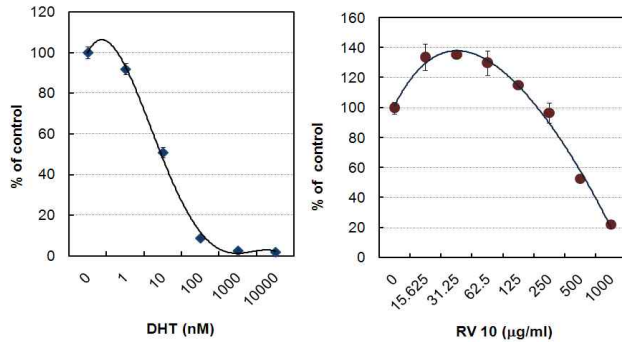


그림 102. Androgen receptor를 과발현시킨 COS-7 세포에서 옷나무 추출물이 $[H^3]$ DHT의 androgen receptor 결합에 미치는 영향

옷나무 추출물이 안드로젠 수용체의 핵내 이동에 미치는 영향을 GFP를 tagging 시킨 안드로젠 수용체를 과발현시킨 PC3 전립선암 세포주에서 관찰하였을 때 그림 103에서와 같이 옷나무 추출물 저농도에서는 안드로젠 수용체 핵내 이동이 촉진되었으나 고농도에서는 핵내 이동이 저해되어 항안드로젠 작용을 나타냄을 확인하였음.

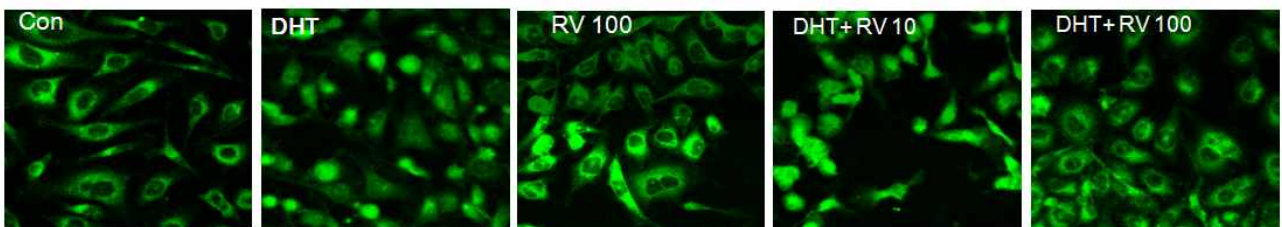


그림 103. Androgen receptor를 과발현시킨 PC3 세포에서 옷나무 추출물이 androgen receptor의 nuclear translocation에 미치는 영향

Genistein과 같은 isoflavonoid가 estrogen responsive element-driven reporter gene assay에서 luciferase를 post-transcriptional mechanism에 의하여 superinduction된다고 보고되었음 (Freyberger and Schmuck, 2005; Sotoca et al., 2010). 따라서 옷나무 추출물이 저농도에서 DHT의 안드로젠 작용을 증강시키는 것이 superinduction에 의한 것인가를 확인하는 실험을 실시하였음. 그림 104에서와 같이 DHT 처리에 의하여 AR 발현이 증가되었고 아울러 luciferase 발현도 증가됨을 나타내었음. 그리고 옷나무 추출물 자체는 안드로젠에 의해 유도되는 prostate specific antigen(PSA)과 KLK2 및 reporter gene luciferase 유전자(Luc2P)의 발현이 증가되지 않았음. 그러나 DHT와 동시 처리하였을 때는 저농도에서는 유사하거나 발현이 약간

증가되었으나 고농도에서는 유전자 발현이 감소되는 양상을 나타내었음. 이러한 결과는 reporter gene assay 및 AR receptor binding assay 결과를 뒷받침 함.

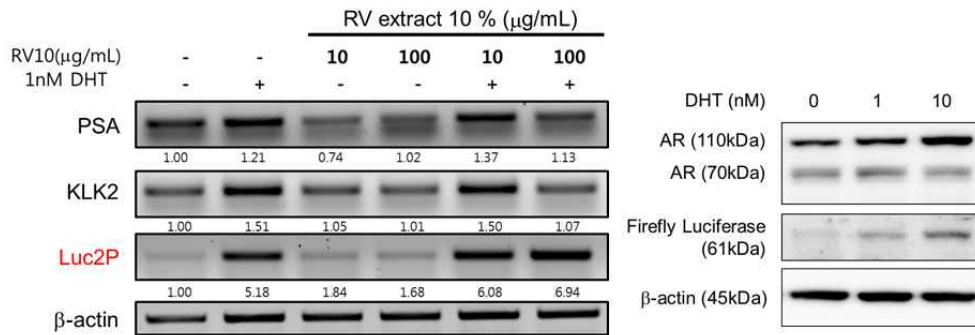


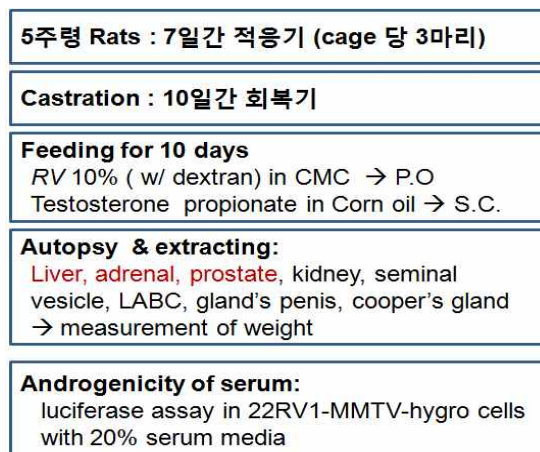
그림 104. 옷나무 추출물에 의한 안드로젠 관련 유전자 및 luciferase 유전자의 발현 변화

이상의 ARE dependent reporter gene assay, AR binding assay, AR nuclear translocation 및 유전자 발현 변화에 관한 결과들은 옷나무 추출물이 저농도에서는 DHT의 작용이 증가되나 고농도에서는 항안드로젠 작용을 나타내는 것으로 사료되었음.

(3) 옷나무 추출물의 *in vivo* 안드로젠 작용

옷나무 추출물의 안드로젠 작용에 대한 *in vitro* 실험에서 그 자체는 안드로젠 작용을 나타내지 않았으나 DHT와 동시투여에 의하여 저농도에서는 DHT 작용을 증가시켰으나 고농도에서는 DHT 작용을 저해시켰으므로 *in vivo* 시험에서는 옷나무 추출물과 testosterone을 동시에 투여하여 옷나무가 testosterone 작용에 미치는 영향을 관찰하였음.

Scheme 1과 같이 *in vivo* Hershberger Assay를 통하여 옷나무 추출물의 안드로젠 작용에 대하여 2차에 걸쳐 실험을 실시하였음.



Scheme 1. The protocol of Hershberger assay

1차 실험은 rat을 거세한 후 10일 동안 회복한 다음 2µg/kg의 testosterone propionate (TP)를 피하주사하고 동시에 RV10d를 200, 400 이나 1000mg/kg 용량(옷나무 추출물량은 100, 200, 500 mg/kg)으로 10일간 경구투여하여 TP의 안드로젠 작용에 옷나무 추출물의 효과를 안드로

겐에 민감한 남성생식기를 적출하여 각 생식기의 무게 변화를 관찰하였음.

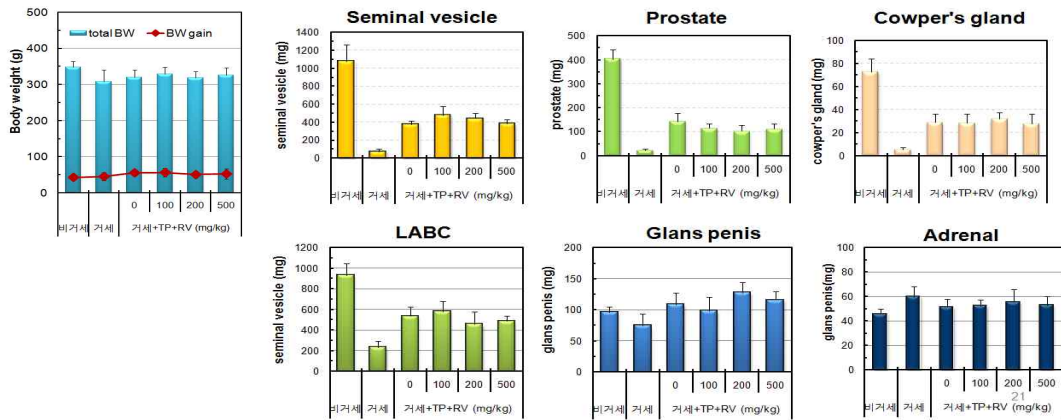


그림 105. Hershberger 시험에서 옷나무 추출물이 체중 및 안드로젠 영향 장기들 무게에 미치는 영향

Rat의 거세한 군이 비거세군에서의 남성 생식기 무게 보다 크게 줄어들었으며, 이는 TP를 투여했을 때 비거세군보다는 적으나 거세군보다 유의적으로 증가하였음. 그러나 TP와 옷나무 추출물 동시 투여한 군이 TP 단독투여한 군과 비교하였을 때 체중 및 안드로젠 작용에 의한 생식 장기무게 증가에 대하여 유의적인 변화를 나타내지 않았음 (그림 105).

이때 혈액의 안드로젠 작용을 관찰하기 위하여 rat 혈액의 혈장을 20%로 22RV1/MMTV-Hyg 세포에 처리한 후 luciferase 활성을 측정하였을 때 그림 106-a에서와 같이 각 개체의 안드로젠 작용은 다양하였으나 그룹별로 비교하였을 때(그림 106-b) 비거세 rat의 혈액은 androgen 작용이 매우 강하게 나타났으며, DHT $10^{-6}M$ 의 활성보다 크게 나타났으나 거세한 군의 rat 혈액은 androgen 작용이 매우 약해 혈액 내 안드로젠의 효과가 거의 없음을 확인할 수 있었다. 그리고 testosterone propionate(TP) 만을 처리한 군에서 DHT 10^{-10} 과 $10^{-9}M$ 사이의 활성을 나타내었으며 옷나무 추출물 동시처리에 의하여 약간 감소하는 경향이 나타났으나 통계적인 유의성은 없었음.

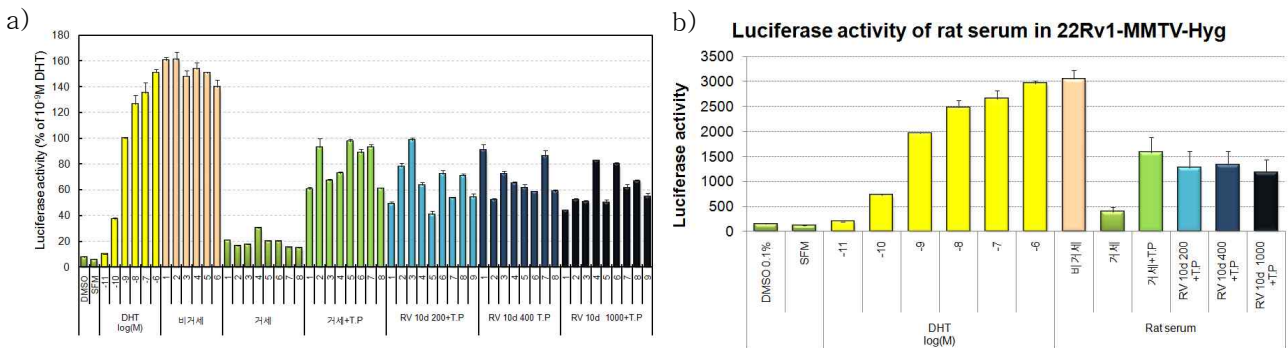


그림 106. 옷나무 추출물을 투여한 Hershberger 실험 rat에서 얻은 혈액의 안드로젠 활성.

a) 각 rat 개체별 혈액의 안드로젠 활성, b) rat의 그룹별 혈액내의 안드로젠 활성 평균

1차 실험의 결과를 확인하기 위하여 2차 실험을 실시하였음. 6주령 male rat을 거세한 후

10일 동안 회복시킨 후 2 μg/kg의 testosterone propionate(TP)를 피하주사하고 동시에 RV10d를 200, 400, 1000mg/kg 용량(옷나무 추출물 량은 100, 200, 500mg/kg)으로 10일간 경구투여하여 TP의 안드로겐 작용에 대한 옷나무 추출물의 효과를 관찰하였음. 아울러 고용량 즉 1000mg/kg의 옷나무 추출물을 단독으로 투여하여 옷나무 자체의 안드로겐 작용을 확인하였음.

그림 107에서와 같이 옷나무 추출물에 의한 rat 체중의 유의적 변화가 관찰되지 않았음. 그리고 안드로겐 영향 장기들의 무게도 유의적인 변화를 나타내지 않아 옷나무 추출물 자체에 의하여 DHT의 활성을 증가시키는 작용을 관찰할 수 없었음. 그리고 옷나무 추출물 자체도 안드로겐 작용을 전혀 나타내지 않았음. 이러한 결과는 in vitro에서 관찰했던 것과는 달리 나타났으며 이는 옷나무 추출물에 포함되어 있는 안드로겐 작용을 향상시키는 성분들이 대사되어 혈액 내에서 효과를 나타낼 만큼의 혈중농도를 유지하지 못하였거나 옷나무 자체에 의하여 TP를 대사시키는 효소들을 유도하여 이들이 대사가 빨리 되어 혈중 농도가 낮아서 그럴 수 있을 것으로 사료되었음.

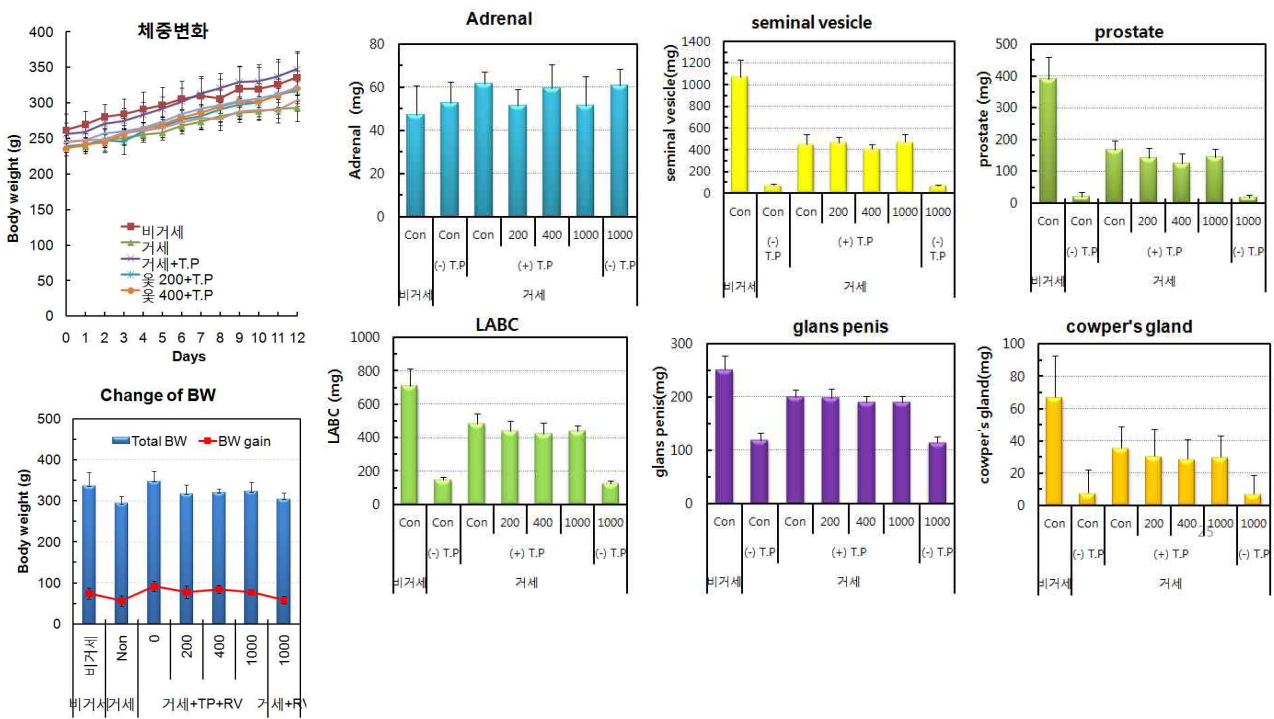


그림 107. Hershberger 2차 시험에서 옷나무 추출물이 체중 및 안드로겐 영향 장기들 무게에 미치는 영향

(4) 옷나무 분리물질의 in vitro 안드로겐 작용

옷나무 분리물질 중 안드로겐 작용에 주성분을 찾기 위하여 각 성분들에 대하여 안드로겐 작용 또는 항안드로겐 작용을 안드로겐 수용체 의존성 reporter gene assay를 이용하여 관찰하였음. 분리물질 중 안드로겐 작용은 그림 108에서와 같이 fisetin, garbanzole, fustin, butin, butein 및 sulfuretin 등은 효능이 농도의존적으로 안드로겐 작용의 최대 약 40% 정도까지 나

타내었으나 AR antagonist인 bicalutamide에 의하여 저해되는 정도가 매우 약했다. 이러한 것은 이들의 안드로겐 작용은 안드로겐 수용체를 경유하는 canonical pathway 라기 보다는 non-canonical 경로에 의한 것으로 사료되었음.

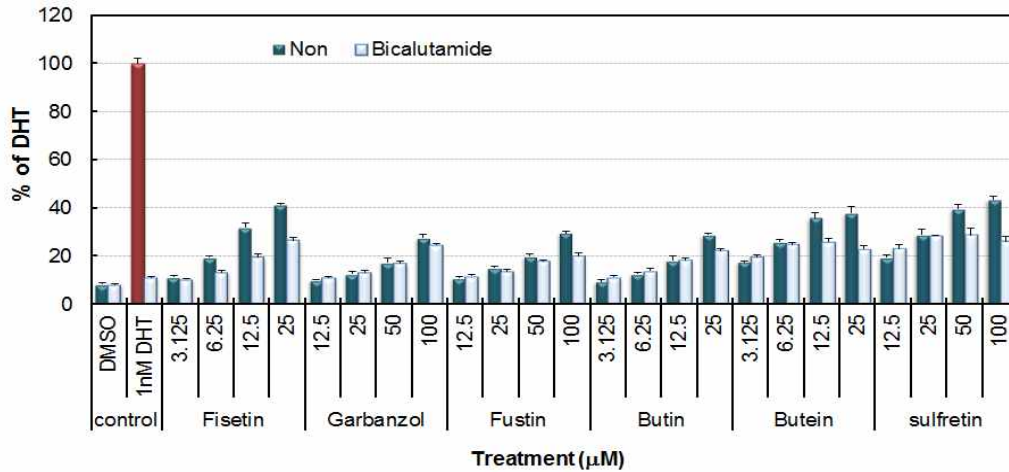


그림 108. 옷나무 분리물질의 안드로겐 작용 및 bicalutamide에 의한 저해

1nM DHT와 여러 농도의 옷나무 분리 물질을 동시에 처리한 후 luciferase 활성을 관찰하였을 때(그림 109) 옷나무 분리물질들의 농도가 증가함에 따라 luciferase 활성이 유의적으로 증가되었음. 이러한 luciferase 활성이 AR 매개성인가를 관찰하기 위하여 AR antagonist인 bicalutamide를 동시 처리하였을 때 luciferase 활성은 대부분 저해되었으나 ficetin, garbazol, fustin, butin 등 일부는 bicalutamide 처리에 의해서도 농도-의존적으로 luciferase 활성이 약하게 증가되는 경향을 나타내었음. 이러한 것은 옷나무 추출물이 DHT의 안드로겐 작용을 증가시키는 것은 대부분은 수용체 경유 경로일 것이나 일부는 다른 경로에 의한 것으로 사료되었음.

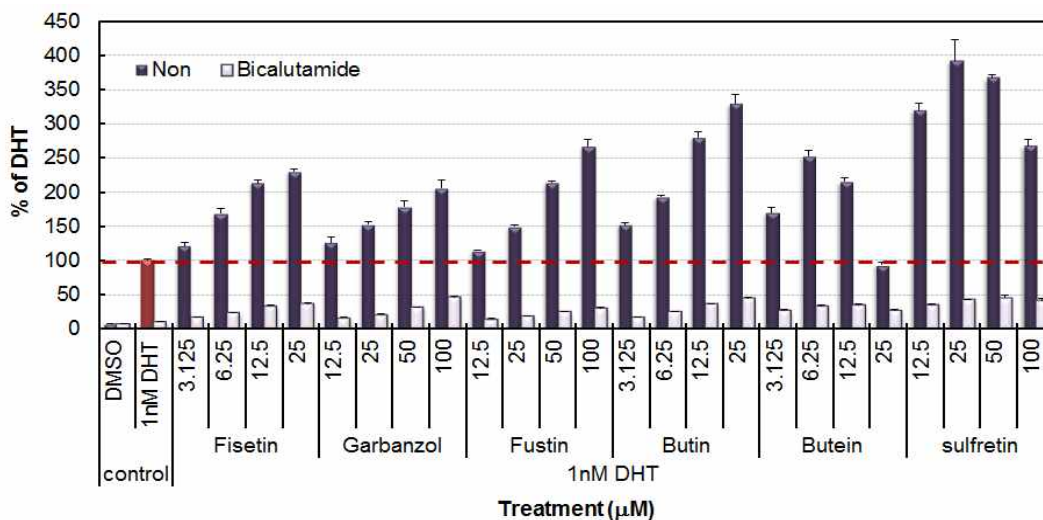


그림 109. 옷나무 분리물질의 항안드로겐 작용 및 bicalutamide에 의한 저해

이러한 DHT에 의한 안드로겐 작용은 그림 110에서와 같이 DHT가 cytosol에 있는 AR과 결

합하면 AR을 안정화시키는 Hsp90가 떨어져 나가면서 시작됨. 옷나무 추출물이 DHT 안드로겐 작용을 증가시키는 것이 Hsp90과 관련있는 가를 관찰하기 위하여 Hsp90 저해제인 geldanamycin을 처리하여 안드로겐 활성을 측정하였음. 그림 4와 같이 DHT의 작용이 geldamycin에 의하여 크게 저하되었으며, 이는 옷나무 추출물 동시처리에 의해서 회복되지 않았다. 이러한 결과는 옷나무 추출물이 Hsp90에 영향을 주지 않는 것으로 사료되었음.

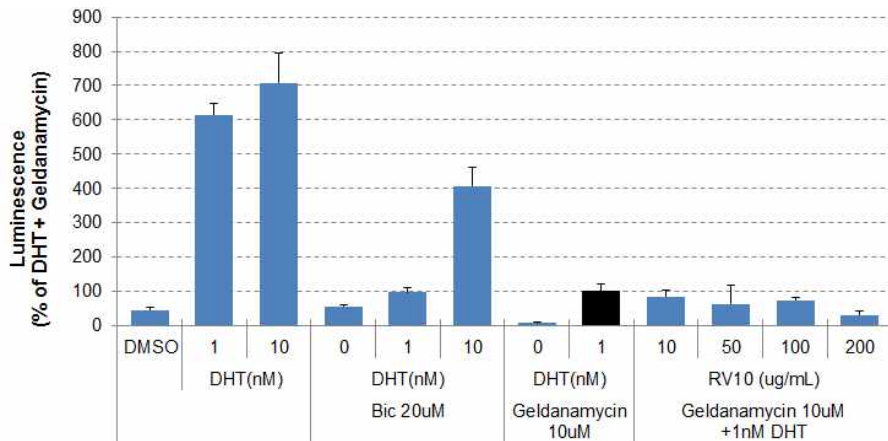


그림 110. Hsp90 저해제 geldanamycin에 의한 옷나무 추출물과 DHT의 안드로겐 작용 저해

나. 옷나무 추출물 및 분리물질들의 에스트로겐/항에스트로겐 작용

(1) 옷나무 추출물의 *in vitro* 에스트로겐 작용

옷나무 추출물의 에스트로겐 활성을 관찰하기 전에 MCF7/ERE 세포에서 옷나무 추출물의 세포독성을 관찰하였을 때 그림 111과 같이 100 μ g/ml 농도까지 세포독성이 나타나지 않았음.

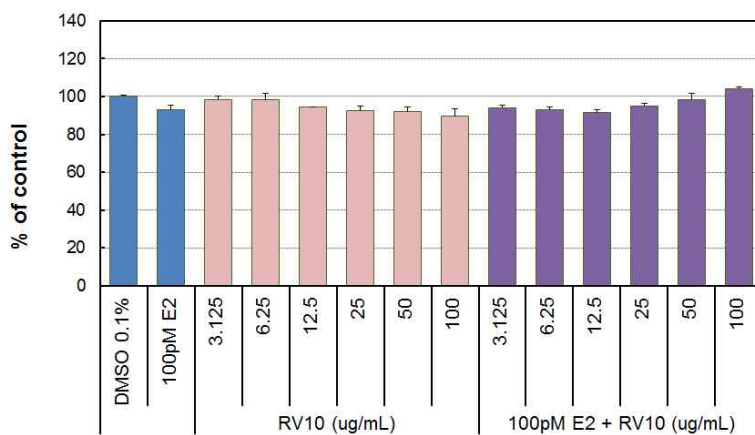


그림 111. MCF7/ERE 세포에서 옷나무 추출물의 세포독성

옷나무 추출물의 에스트로겐 작용을 관찰하기 위하여 estrogen receptor α 가 발현되며, estrogen responsive element 함유 reporter plasmid를 영구 함유하고 있는 MCF7/ERE 세포에서 100 μ g/ml 농도까지 옷나무 추출물 (RV10)을 처리하였을 때 농도의존적으로 luciferase 활성이 증

가되었으며, 이는 ER α antagonist인 ICI 182.770 (ICI)에 의하여 완전히 저해되었음(그림 112).

그리고 17 β -estradiol (E2)와 RV10 동시에 처리하였을 때 에스트로겐 작용을 저해하지 않았으며 오히려 E2에 의한 luciferase 활성 증가를 농도가 RV10 농도가 증가함에 따라 더 크게 증가시키는 양상을 나타내었음. 따라서 옷나무 추출물은 강력한 에스트로겐 작용을 나타내나 E2의 에스트로겐 작용은 저해시키지 않는 것으로 사료되었음.

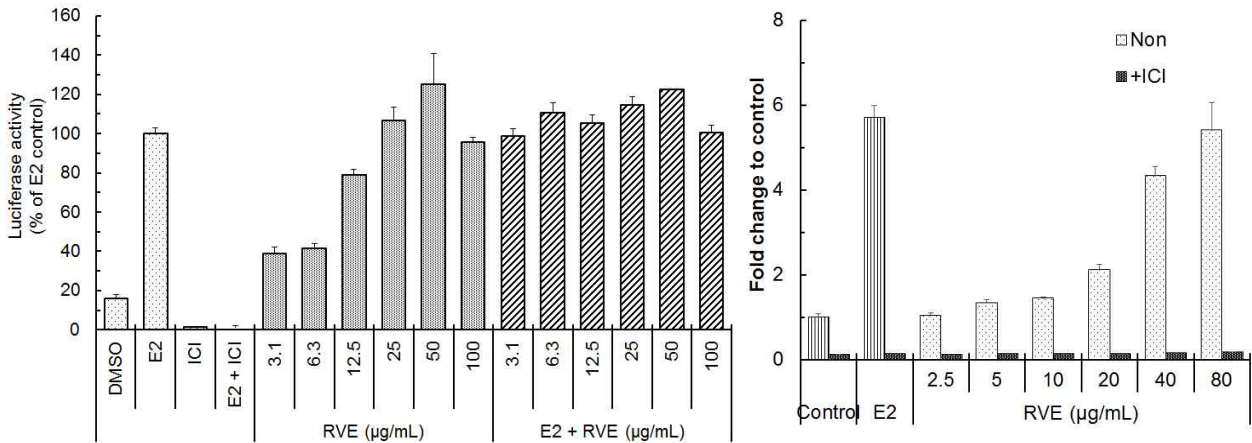


그림 112. MCF7/ERE 세포에서 옷나무 추출물의 에스트로겐/항에스트로겐 작용과 ICI 182.770에 의한 에스트로겐 활성저해

옷나무 추출물의 에스트로겐 작용이 ER α 와 ER β 중 어떤 것이 더 강하게 작용할 것인가를 관찰하기 위하여 ER α 나 ER β 를 각각 발현시키는 plasmid와 ERE를 함유하는 reporter plasmid를 함께 일시적으로 transfection 시킨 HEK293T 세포에 여러 농도의 RV10을 처리하였음. 그림 113에서와 같이 RV10은 ER α 매개 에스트로겐 작용보다 ER β 매개 에스트로겐 작용이 상대적으로 크게 나타났음.

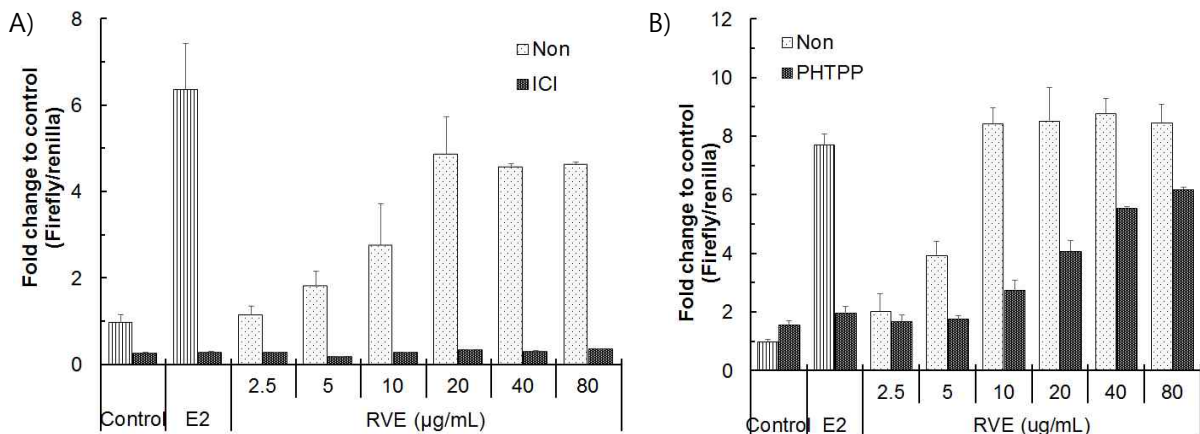
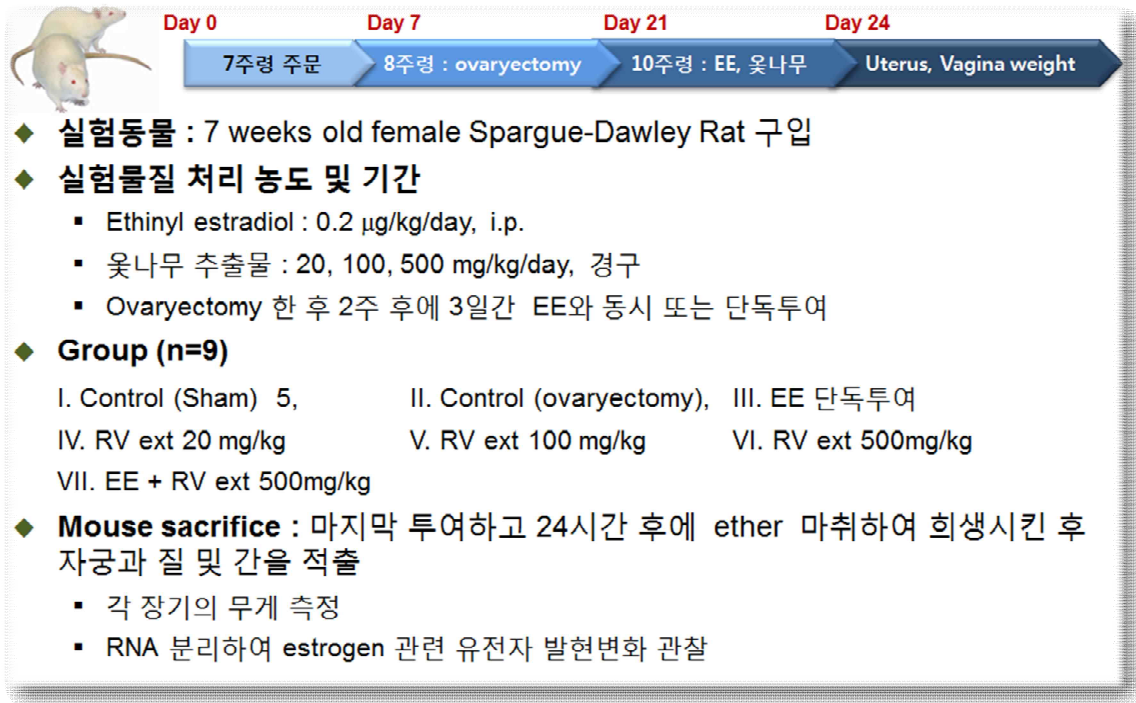


그림 113. A) ER α 또는 B) ER β 를 과발현시킨 HEK293T 세포에서 옷나무 추출물의 에스트로겐 활성

(2) Uterotrophic assay에 의한 옷나무 추출물의 *in vivo* estrogenic action 관찰

OECD 공인 (항)에스트로겐시험법인 uterotrophic assay를 이용하여 옷나무 추출물의 *in vivo* 에스트로겐 작용을 관찰하기 위하여 scheme 2와 같이 실험을 진행하였음.



Scheme 2. Uterotrophic assay의 시험법 및 시험조건

자궁적출 대조군의 자궁 무게가 유의적으로 감소하였으며, Ethinyl estradiol(EE) 처리군의 자궁무게는 Sham군과 유사하게 나타나 실험이 잘 되었음을 확인하였음. RV 처리군은 자궁 무게가 유의적으로 증가되었으나 농도 의존성은 보이지 않았으며, 에스트로겐과 RV를 동시 투여한 경우에는 wet 자궁무게가 EE 처리군 보다 유의적이지는 않았으나 증가된 경향을 나타내었음(그림 114). 그러나 간 및 체중은 옷나무 추출물 투여에 의하여 유의적인 변화가 없었음(그림 115).

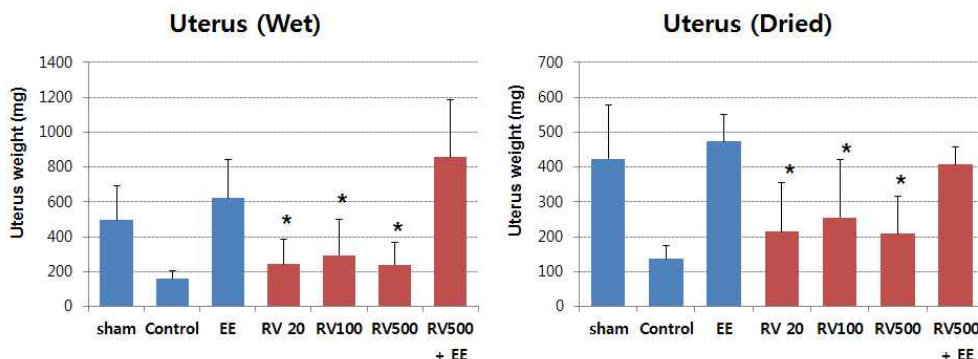


그림 114. Uterotrophic assay에서 옷나무 추출물의 에스트로겐 작용

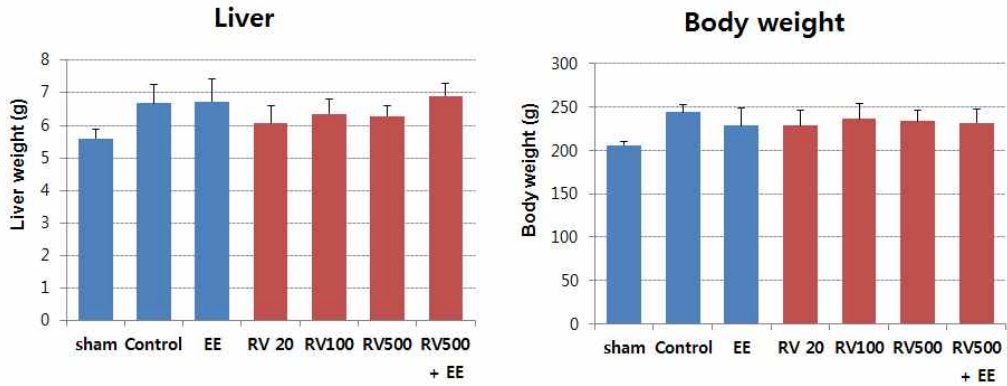


그림 115. 옷나무 추출물이 자궁비대시험에서 간 및 체중에 미치는 영향

(3) 옷나무 분리물질의 *in vitro* estrogenic action 관찰

옷나무 추출물 분리물질 중 가장 강력한 에스트로겐 활성을 나타내는 물질을 확인하기 위하여 7종의 분리물질 (fisetin, garbanzol, fustin, resorciol, butin, butein, sulfretin)에 대한 세포 독성과 에스트로겐 활성을 MCF7/ERE 세포에서 관찰하였음. 그림 116과 같이 분리물질들은 100 μ M 농도까지 세포독성을 나타내지 않았음.

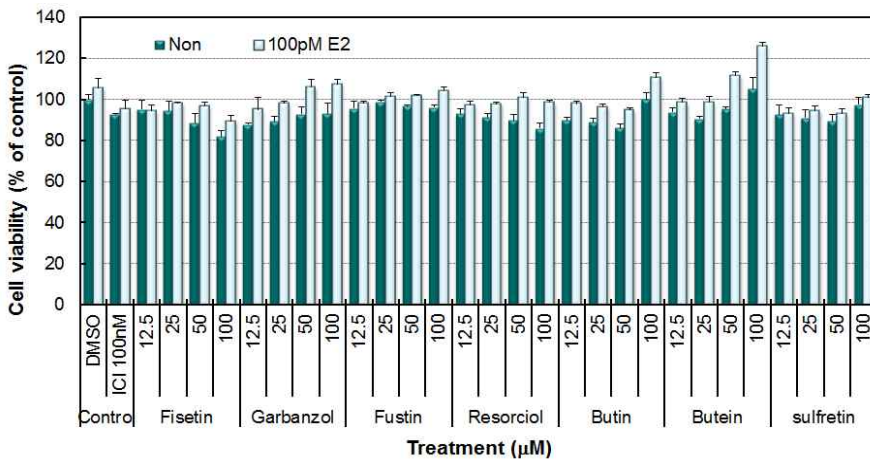


그림 116. MCF7/ERE 세포에서 옷나무 분리물질들의 세포독성

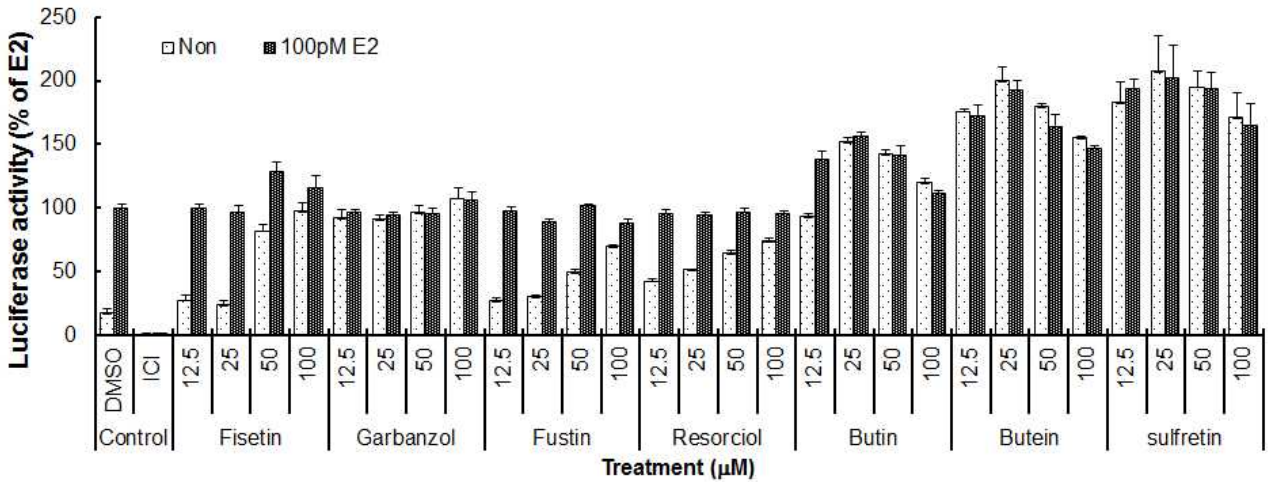
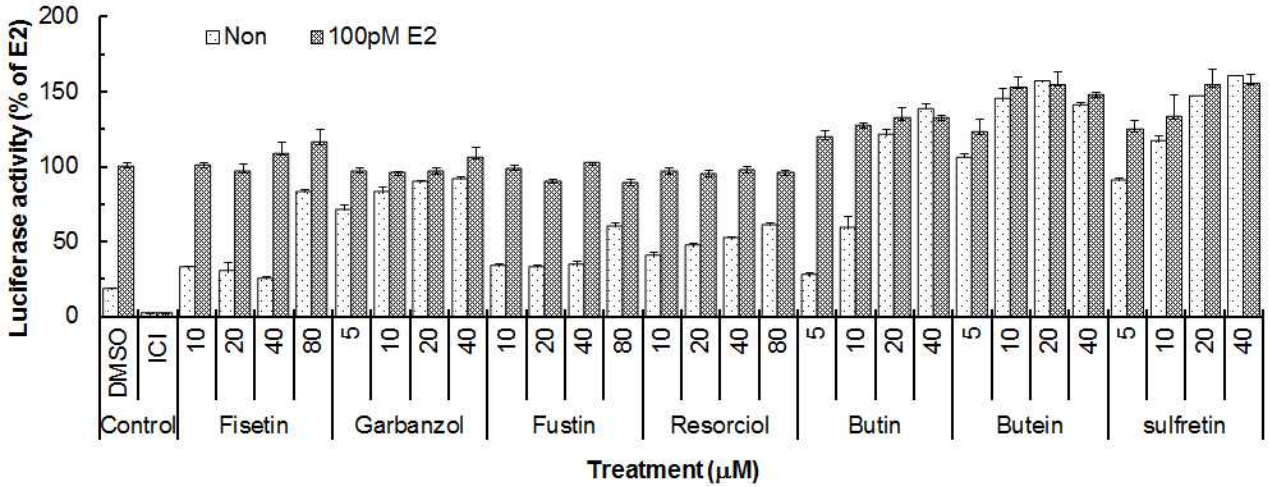


그림 117. MCF7/ERE 세포에서 옷나무 분리물질들의 에스트로겐 또는 항에스트로겐 작용 (상; 저농도; 하, 고농도 분리물질)

MCF7/ERE 세포에서 estrogen 100pM E2의 luciferase 활성을 100으로 놓고 옷나무 추출물 및 옷나무 분리물질들에 대한 최대 luciferase 활성도를 100pM E2 활성과 비교한 maximum relative estrogen activity(REA)와 각 물질들의 EC50 값은 표 107과 같음.

표 107. Estrogenic activities of RVE and purified compounds in MCF7 /ERE cells

	RTA (% of 100pM E2)	EC50 (μM)
RVE	95.09	28.9 μg/ml
Garbanzol	80.22	2.72
Sulfuretin	143.80	4.96
Butin	130.40	10.35
Butein	137.10	2.50
Fisetin	78.07	~ 60.0
Fustin	56.40	~ 57.5
Resorcinol	49.91	10.3

분리물질 중 butin, butein, sulfuretin이 다른 물질들 보다 강력한 에스트로겐 작용을 나타내었으며, 고농도로 가면 항에스트로겐 작용을 나타내는 듯 하였으며, EC50 값을 보았을 때 butein과 butein이 가장 낮은 농도를 나타내었으며, sulfuretin이 그 뒤를 이었음. 그리고 E2와 동시투여 해도 E2에 의한 에스트로겐 작용은 옷나무 분리물질들이 저해하지 않았음 (그림 117).

이러한 옷나무 분리물질의 에스트로겐 작용이 ER α 나 ER β 중 어느 것이 더 큰 영향을 미치는 가를 관찰하기 위하여 ER α 나 ER β 를 각각 발현시키는 plasmid와 ERE를 함유하는 reporter plasmid를 함께 일시적으로 transfection 시킨 HEK293T 세포에 여러 농도의 각 분리물질들을 처리한 후 luciferase 활성을 측정하였음.

옷나무 분리물질들에 대한 에스트로겐 작용을 관찰하였을 때 전반적으로 ER α 매개 에스트로겐 작용보다 ER β 매개 에스트로겐 작용이 큰 것으로 나타났음. ER α -매개와 ER β -매개 에스트로겐 efficacy는 sulfuretin이 가장 크게 나타났으며, ficetin, fustin이 상대적으로 에스트로겐 작용이 약한 것으로 나타났음.

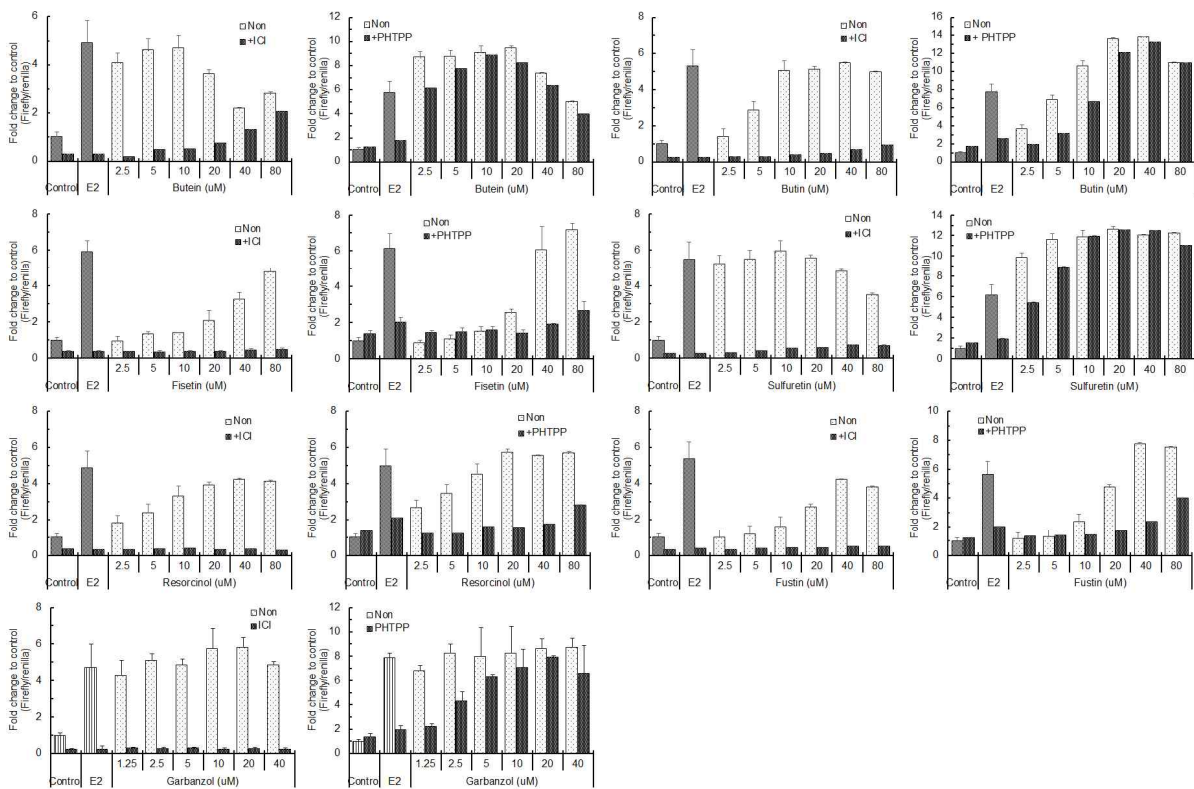


그림 117. ER α 나 ER β 와 ERE-reporter gene을 일시적으로 transfection 시킨 HEK293T 세포에서 옷나무 분리물질들의 에스트로겐 또는 항에스트로겐 작용

이들 분리물질들에 대한 최대 RTA 값과 EC50값은 표 109에 나타내었음. sulfuretin과 butein이 ER β 에 대해서 더 강력한 작용을 나타내나 ER α 에도 역시 강한 작용을 나타내었음.

표 109. Relative estrogen activity (RTA) and EC50 values of RVE and purified compounds in ER α or ER β overexpressed HEK293T cells

Chemical	REA (% of E2 control)		EC50 (μ M)	
	ER α	ER β	ER α	ER β
RVE	74.1	111.8	9.73 μ g/ml	5.59 μ g/ml
Garbanzol	67.9	130.1	2.43	1.70
Sulfuretin	102.7	194.4	1.49	1.90
Butin	98.0	180.0	5.23	1.91
Butein	96.6	168.2	1.59	1.70
Fisetin	89.2	116.9	26.4	27.3
Fustin	74.6	136.3	17.8	17.7
Resorcinol	79.4	107.6	5.18	5.07

이러한 분리물질들이 ER α -매개와 ER β -매개 에스트로겐 작용이 실질적으로 ER과 이들 분리물질과의 affinity를 관찰하기 위하여 cell based ER binding assay를 실시하였음. 100pM [H^3] E2가 ER α 와 ER β 에 결합은 non-labeling 한 E2 농도가 높아짐에 따라 결합이 감소됨을 나타내어 실험이 잘 되고 있음을 확인하였음 (그림 118).

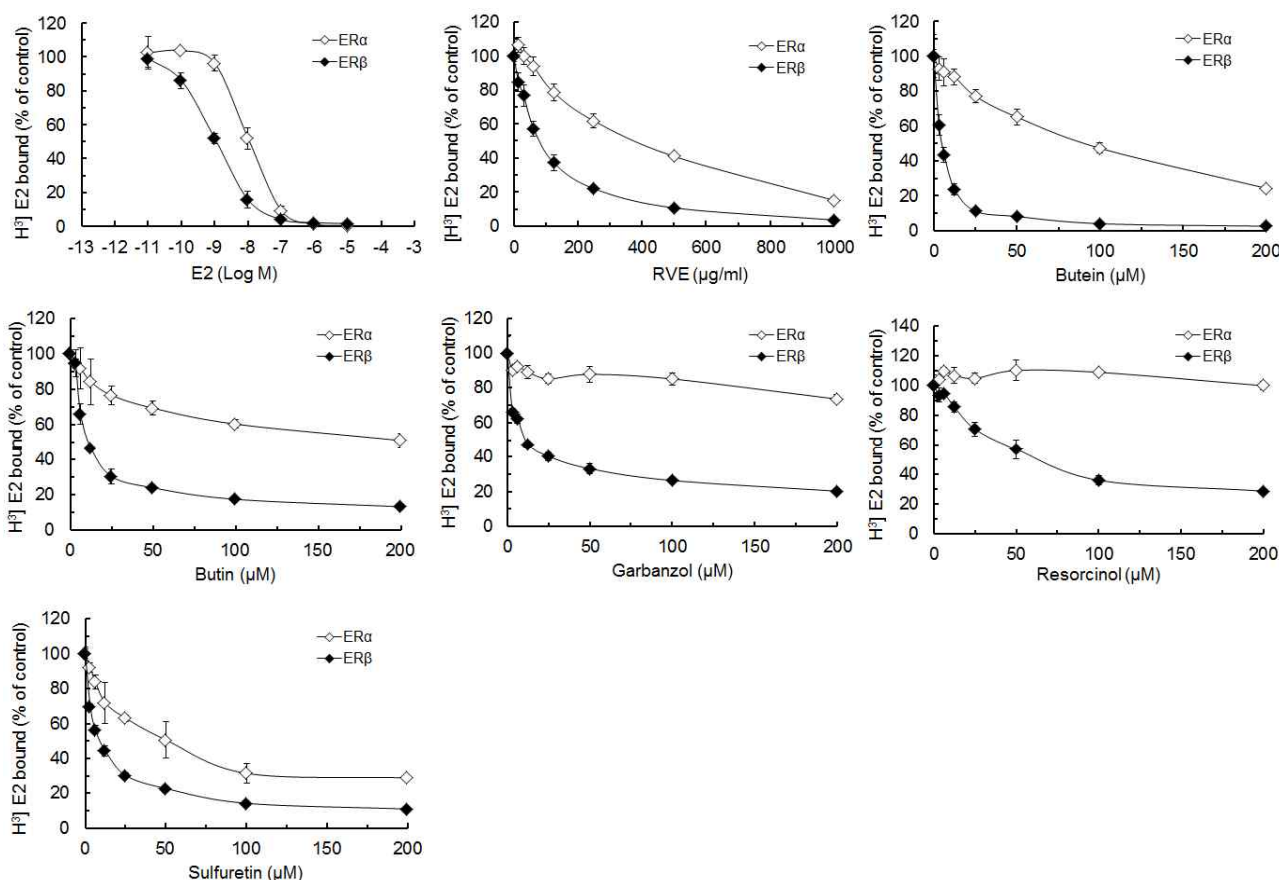


그림 118. ER α 나 ER β 를 일시적으로 발현시킨 Cos-7 세포에서 옷나무 분리물질들이 [H^3] 17 β -estradiol가 ER binding에 미치는 영향

그림 119에서 나타나는 바와 같이 옷나무 추출물과 그 분리물질들은 모두가 ER β 에 높은

affinity를 나타내며, 특히 gabansol과 resocinol은 ER β 에는 affinity가 좋으나 ER α 는 affinity가 매우 낮은 것으로 나타났음. Butein 역시 상대적으로 ER β 에 친화력이 크게 보였으며, sulfuretin의 경우는 ER α 와 ER β 에 모두 high affinity를 나타내었음.

옻나무 추출물 및 그 분리물질들이 100pM [H^3] E2가 ER α 와 ER β 에 결합하는 것을 저해하는 IC50 값은 표 108에 나타내었음.

표 108. Estrogen receptor binding affinity of RVE and purified compounds in COS7 cells transiently expressed with ER α or ER β .

	Concentrations at 50% of [H^3]E2 binding to ER(μ M)	
	ER α	ER β
RVE (mg/ml)	391.5	84.8
butein	92.3	5.08
Sulfuretin	51.7	9.56
Butin	-	11.4
Garbanzol	-	11.4
Resorcinol	-	66.6
E2 control	1.11E-07	1.13E-08

이러한 옻나무 추출물 및 분리물질들의 에스트로겐 작용과 에스트로겐 의존 유전자 발현변화를 비교 관찰하기 위하여 각 물질들을 고농도와 저농도 두 농도를 MCF7 세포에 처리하고 24시간 경과후 RT-PCR로 유전자발현 변화를 관찰하였음(그림 120). RV10과 resocinol은 저농도 부터 에스트로겐 작용을 나타냈으며 저농도에서 pS2 유전자 발현 변화가 나타났고, 특히 ER β 의 발현도 증가시켰음.

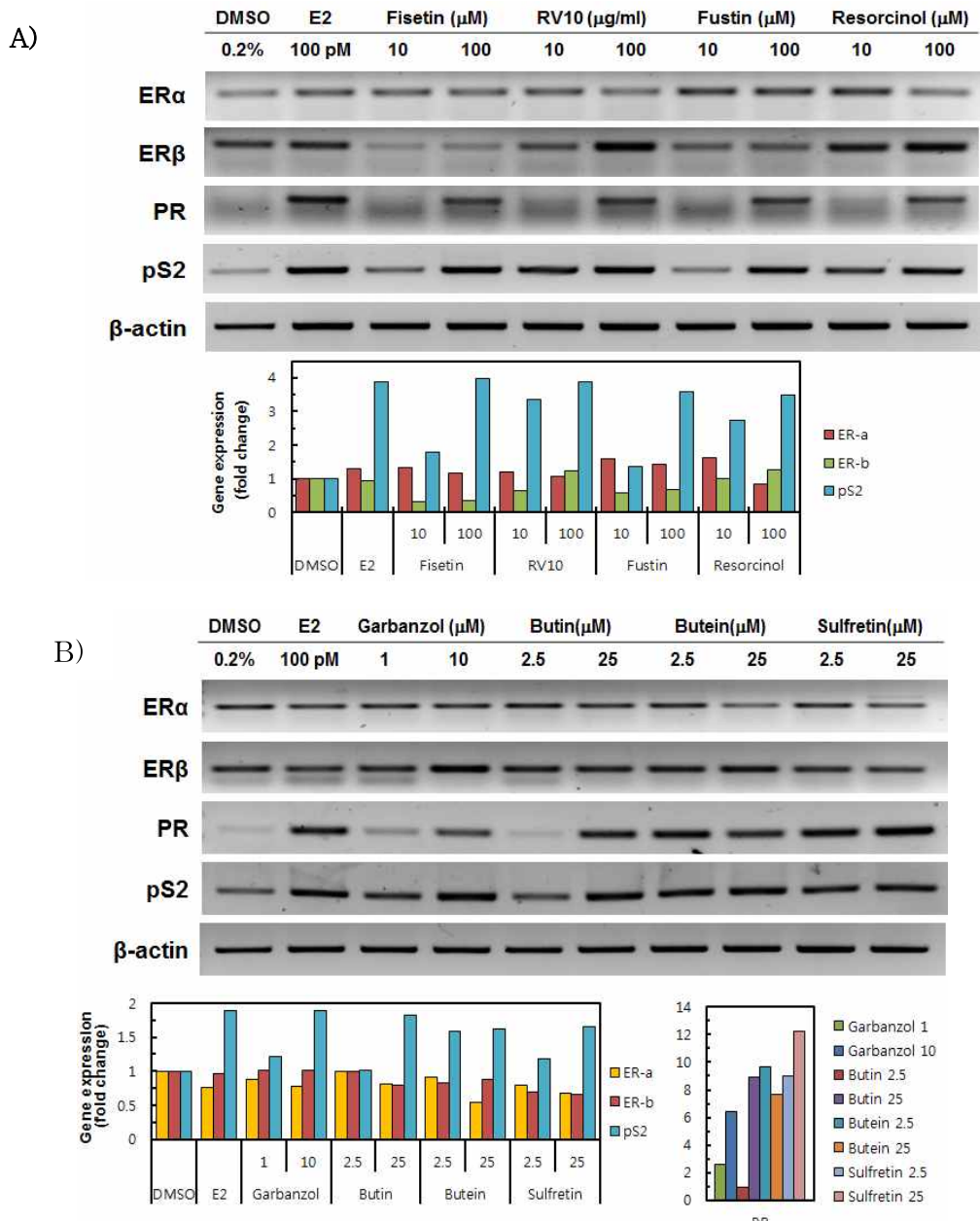
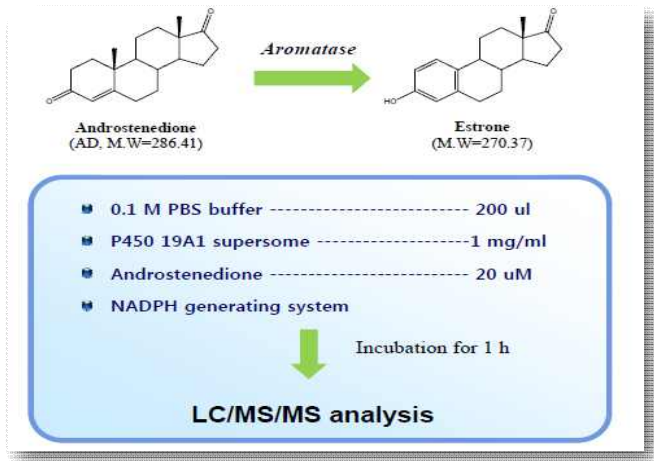


그림 120. MCF7/ERE 세포에서 A) 옷나무 추출물(RV10), fisetin, fustin과 resorcinol B) garbanzole, butin, butein과 sulfuretin의 에스트로겐 관련 유전자 발현 변화

옷나무 분리물질인 garbanzole, butin, butein 및 sulfuretin에 대한 에스트로겐 활성화와 에스트로겐 의존 유전자 발현변화를 비교 관찰하였을 때, butin, butein과 sulfuretin이 RV10 보다 효력이 좋았음. 특히 butein과 sulfuretin은 저농도에서부터 pS2나 progesterone receptor 유전자 발현도 크게 증가하여 RV10의 에스트로겐 작용에 크게 기여할 것으로 사료되었음.

다. Aromatase assay를 통한 옷나무의 남성 hr 합성에 미치는 영향 및 기전 관찰

Aromatase는 supersome P45019A1을 이용하여 scheme 3에 의하여 활성을 측정하였음.



Scheme 3. Aromatase 실험법 및 실험조건

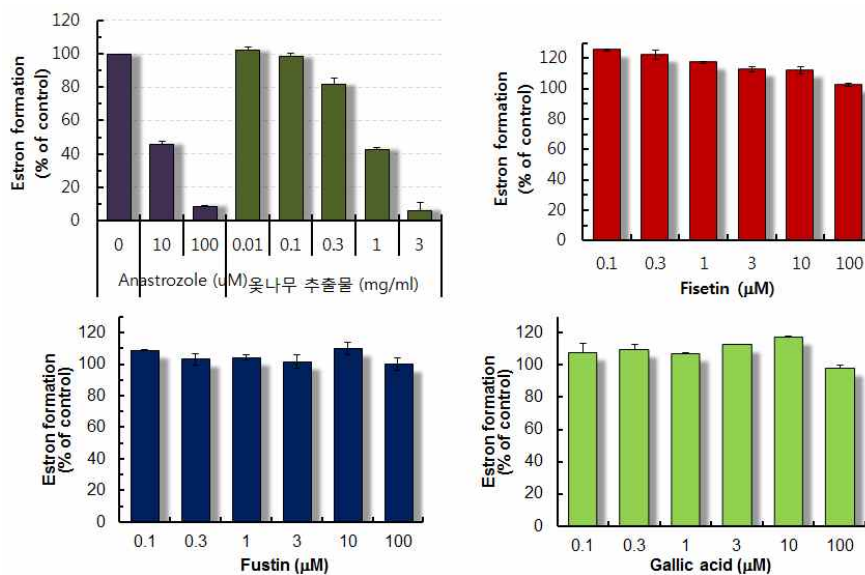


그림 121. 옻나무 추출물 및 대표 분리물질이 aromatase 활성에 미치는 영향

양성 대조군으로 사용한 anastrozole의 IC 50값이 약 10ug/ml 내외로 보고된 것 보다 높았으며, 옻나무 추출물은 IC50 값이 약 1mg/ml 농도로 나타났음. 그러나 옻나무 추출물 중 대표적인 3종 fisetin, fustin 및 gallic acid은 aromatase 활성에 영향을 미치지 않았음(그림 121).

라. 옻나무 추출물 및 주성분들이 5 α -reductase 활성에 미치는 영향

Testosterone이 dihydrotestosterone으로 환원되는 데 관여하는 5 α -reductase 활성에 옻나무 추출물 및 주성분들이 미치는 영향에 대하여 관찰하고자 하였음.

본 과제에서는 두가지 종류이 5 α -reductase 즉 type 1(5aR1)과 type 2(5aR2) 유전자를 지니는 plasmid를 Cos-7 세포에 일시적으로 과발현시켜 효소활성을 측정하고자 하였으나 Cos-7 세포내 과발현을 관찰하기 힘들었음. 따라서 transient 발현이 힘들어 plasmid를 G418에

대한 selection marker를 갖고 있는 pcDNA 3.1 plasmid에 다시 subcloning 하여 pcDNA_5aR1과 pcDNA_5aR2 plasmid를 Cos-7 세포에 transfection 시켜 G418로 selection한 후 immunoblot으로 이들 효소들의 발현을 관찰하였을 때 그림 122-A)와 같이 isoform specific 발현을 확인할 수 없었음.

그래서 이러한 것이 antibody의 문제인지 또는 발현이 안되서 그런 것 인가를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였을 때 각 세포에서 과발현시키는 isoform에 대한 band 만이 확인되어 과발현되고 있음을 알 수 있었으나 그 발현량이 매우 낮을 것으로 예상되었음.

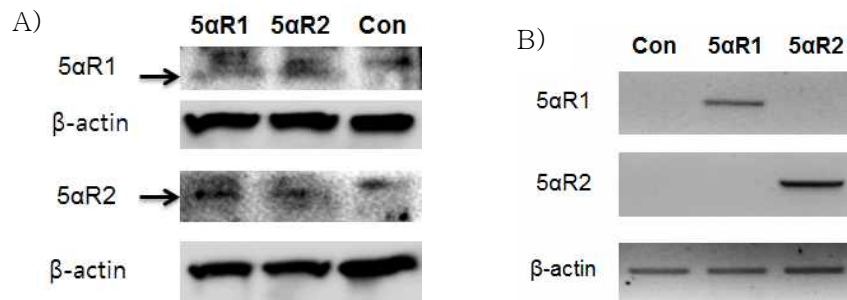


그림 122. Cos-1 세포에 5aR1과 5aR2 과발현 시킨 후 A) immunoblot 과 B) RT-PCR으로 과발현 확인

2-2절. 옷 추출물을 이용한 탈모방지 및 골관절염 개선 기능성식품의 개발(2핵심 2세부)

1. 골관절염 개선 기능성식품의 개발

가. 골관절염 개선 및 골다공증 개선 연구

(1) 실험방법

(가) 시약 및 재료

표 110. 실험을 위해 사용한 주요 시약 및 재료

No.	Name	Company	Catalogue Number
1	ICR mouse(male, 8 weeks old)	Dooyeol Biotech Inc.	
2	SD rat (male, 6 weeks old)	대한바이오링크	
3	Monosodium Iodoacetate	Sigma, #I2512	
4	Zoletile	virbac, #06516	
5	Rumpun	바이엘코리아, #41882	
6	Custom Chow Diet	(주)중앙실험동물	
7	Bedding(Soft)	Central Lab. Animal Inc.	
8	FBS	Hyclone, USA	15-010. 02
9	Penicillin Streptomycin	Hyclone, USA	SV30010
10	L-glutamine	Hyclone, USA	SH30034.01
11	Trypsin	Hyclone, USA	SH30042.01
12	DMEM	Hyclone, USA	SH30243.01
13	Gentamycin Sulfate	Lonza, USA	17-518Z
14	DPBS	Hyclone, USA	SH30028.03
15	Lipopolysaccharides	Sigma, USA	L4391
16	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma, USA	M5655
17	Dimethyl sulfoxide	Sigma, USA	D4540

(나) Chondrocytes의 분리 및 primary culture

실험을 위한 chondrocytes는 rat의 primary culture를 통해서 얻었고, primary culture의 진행은 다음과 같은 과정으로 진행하였다.

연골 채취를 위한 실험동물은 4~6주령 무게 약 180-200g 정도의 male Sprague-Dawley rat을 경추탈구 후에 70% 알코올로 피부를 소독하여 절개한 후, 관절연골을 2~3mm정도 크기로 채취하였다. 채취한 연골조직은 phosphate buffer saline(calcium & magnesium free, Hyclone SH30256.01) 용액에서 보관하여 clean bench로 옮겨 0.1% EDTA-CDMF(calcium magnesium free, Sigma E5134)용액에 30분씩 2회 넣어 incubation 시켰다(37°C, 5% CO₂). 0.25% trypsin으로 1시간 incubation(37°C, 5% CO₂) 시킨 후, 2mg/ml collagenase type I(Sigma, C0130)에서 흔들면서 overnight시켰다. 이렇게 해서 얻어진 세포 부유액을 100um pore size cell strainer (BD Falcon, 352360, USA)에 여과한 후 1,600rpm으로 10분간 원심분리 하여 원심분리 된 세포를 Hank's balanced salt solution(Hyclone SH30031.01)으로 3회 세척한 후 연골세포를 얻었다. 얻어

진 세포는 10% FBS(Fetal Bovine Serum, Hyclone, SH30396.03)와 DMEM(Hyclone, SH30243.01)에 1% penicillin-Streptomycin(Hyclone, SV30010)와 1% L-glutamine(Hyclone, SH30034.01) 그리고 0.1% Gentamycin sulfate(Lonza 17-518Z, USA)을 첨가하여 75T flask에서 배양하였다.



그림 123. SD Rat으로부터 연골세포 분리

(다) In vitro 에서의 연골세포 활성 평가

① Cell Viability 측정

Primary culture를 통해 얻은 chondrocytes를 96well plate에 1×10^4 cells /well의 농도로 세포를 DMEM 배양액에 분주하여 4시간동안 안정화시킨 후, 옷나무추출물을 농도별로 처리하여 72시간(독성시험) 또는 4시간(H_2O_2 처리 시)동안 배양하였다.

3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약을 $20 \mu\text{l}$ 처리하여 최대 4시간 37°C incubator에서 배양한 후 배지와 MTT 시약을 제거하고, DMSO 시약 $200 \mu\text{l}$ 를 가하여 560nm 에서 ELISA reader(VERSAMAXSL-20 Molecular Devices, Korea)를 이용하여 측정하였다. 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 오차를 구하였다.

② 연골세포 활성 평가 - sodium sulfate incorporation

sodium sulfate는 proteoglycans의 생합성의 구성성분으로서 작용하게 된다. 일반적으로 세포로의 흡수가 용이한 embryonic tissue에 처리하여 생합성 정도를 확인하는 방법이 많이 사용되어져 왔으나 본 실험에서는 생후 4주된 rat으로부터 아직 성장과정 중에 있는 chondrocytes

를 분리하여 사용함으로써 세포로의 흡수를 용이하도록 하였다.

(라) 골형성능의 확인

① Formation of osteoclast-like cells from co-culture

Femoral bone marrow cells은 7주령의 C57BL/6 female mice로부터 얻었다. 뼈의 말단부 위에 26-gauge의 바늘을 사용하여 골수의 빈 부분에 주사 후 붉은 액체를 얻었다. 채취한 대퇴 골수에서 얻어진 세포는 10% FBS(Fetal Bovine Serum, Hyclone, SH30396.03)와 DMEM(Hyclone, SH30243.01)에 1% penicillin-Streptomycin(Hyclone, SV30010)와 1% L-glutamine(Hyclone, SH30034.01) 그리고 0.1% Gentamycin sulfate(Lonza 17-518Z, USA)을 첨가하여 75T flask에서 배양하였다. MC3T3-E1 cells (1.5x10⁴ cells/well)을 bone marrow cells (5x10⁵ cells/well)과 함께 24-well microplate에서 배양하였으며 3일마다 배양액을 교체하였다.

② TRAP activity of co-culture cells

배양된 세포는 세척 2회 후 4.5 mM citric acid, 2.25 mM trisodium citrate, 3 mM hydrochloric acid, 4% formic acid, and 3% acetic acid) 이 포함된 고정용액에서 40분간 고정시켰다. 그리고 세척 후 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining kit (Sigma, St. Louis, USA)를 사용하여 30° C에서 5분간 처리한다. 다시 세척 과정을 거친 후 Hematoxyline으로 2분간 staining 한다. Image-pro Discovery (Media Cybernetics Inc., MD, USA)를 이용하여 붉게 염색된 세포의 수를 관찰하고 셀 수를 측정한다.

③ Measurement of RANKL

Quantikine M mouse RANKL immunoassay kit (R&D Systems)를 사용하여 RANKL 발현량을 분석한다. microplate reader를 사용하여 450nm에서 40분 이내에 측정하였다.

④ Measurement of mineralization

MC3T3-E1 cells (1x10⁴cells/well)은 앞서 설명한 배지에서 배양하였다. 세포가 증식을 하여 plate에 꽉 차면 10 mM glycerol 2-phosphate, 50 μ g/ml ascorbic acid가 포함된 배지로 3일에 한번 씩 세포분화를 시켜주었다. 21일 후 cell은 mineralization의 수준을 평가하기 위하여 Alizarin red S solution(2%, v/v) (Sigma, St. Louis, USA)를 사용하여 5분간 염색 후 증류수로 3번 세척하고 나면 염색물이 cetylpyridinium chloride (10%, w/v)에 의해 용출된다. 흡광도는 plate reader(Multiskan Spectrum, Thermo, Japan)를 이용하여 562nm에서 측정하였다.

⑤ in vitro에서 Collagen 및 MMPs 발현 확인

Rat의 연골로부터 채취한 chondrocyte 세포를 배양하여 세포독성실험을 바탕으로 샘플 및 H₂O₂ 처리후, Quiagen RNeasy mini kit(USA, 74106)를 이용하여 mRNA를 추출하고 세포수준에서 유전자 발현정도를 측정하였다. Collagen 및MMPs는 Real Time PCR 방법으로 측정하였다. (Applied Biosystem, Step One Real-Time PCR System, USA)

(마) ICR mouse를 대상으로 *in vivo* 독성시험을 통한 적정투여용량 결정

실험에 사용한 ICR mouse는 무게 $23 \pm 1.4g$ 의 5주령(Central Lab. Animal Inc.)의 mouse로 동물 사육실에서 1주간의 적응기간을 거친 후 옷나무 열수추출물 500mg/kg · bw, 1000mg/kg · bw 과 옷나무 EtAc 추출물 500mg/kg · bw, 1000mg/kg · bw 농도로 7일간 일정한 시간에 경구 투여 하여 독성시험을 진행하였다. mouse는 Female과 Male 각 5마리를 한 그룹으로 하였으며, 실험군의 분류는 다음과 같다.

Group 1 : Custom chow diet

Group 2 : Custom chow diet + 옷나무 열수추출물 500mg/kg · bw

Group 3 : Custom chow diet + 옷나무 열수추출물 1000mg/kg · bw

Group 4 : Custom chow diet + 옷나무 EtAc 500mg/kg · bw

Group 5 : Custom chow diet + 옷나무 EtAc 1000mg/kg · bw

(바) SD rat를 이용한 옷나무 추출물의 관절염 효과 규명

① 실험동물

관절염 유발에 사용된 동물은 생후 6주 된 $145.2 \pm 3.2g$ 무게의 male SD rat(대한바이오링 크.주)로, 일반 사육환경에서 1주간 적응기간을 둔 후에 실험군당 8마리씩 8개 군으로 할당하여 64마리를 사용하였다. 사육실의 온도는 $25 \pm 2^\circ C$, 습도 $55 \pm 10\%$ 로 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 하였고, 물과 사료는 자유롭게 공급하였다.

② 시료 투여 및 식이

선행 연구결과와 동물독성 실험을 통해 결정한 500mg/kg · bw 와 200mg/kg · bw를 적정 농도로 하여 Carboxyl metlycellulose (cmc) 0.5% 용액에 시료를 녹여 사용하였으며, 양성대조군으로는 항관절염 효과가 있는 약물인 Methotrexate (Sigma, St. Louis, USA)와 연골재생에 효과를 나타내는 것으로 알려진 Glucosamine (Sigma, St. Louis, USA)를 사용하였다. 모든 실험군은 존대를 이용하여 경구투여 하였으며, 시료를 cmc 0.5% 용액에 녹인 후 매일 1회 일정시간, 6주 동안 경구투여를 실시하였다.

methotrexate는 장기적인 투여 시 나타나는 독성과, 투여기간동안 약물의 반감기로 인해 효과가 감소할 것을 우려하여 주1회 2mg/kg로 경구투여 하였고, Glucosamine은 식약청의 고시에 따른 농도를 참고하여 동물에서의 적정농도를 환산, 100mg/kg · bw로 cmc 0.5% 용액에 녹여 옷나무 추출물 투여군과 동일한 방법으로 투여하였다. 식이는 3일에 한번 씩 교환하였으며 이때 잔여무게(일부 cage 안으로 떨어진 것을 회수하였다)를 측정하여 섭취량을 환산 하였고, 물에 대한 접근은 임의대로 하였으며 음용한 량은 3일에 한번 씩 측정하고 새로운 물로 교환 하였다.

시료의 경구투여 시기는 예방차원에서 접근하여 관절염 유발 2주 전부터 섭취를 시켰으

며 관절염 유발 이후 4주간 더 섭취시켜 실험을 진행하였으며 실험군의 분류는 다음과 같다.

표 111. 동물실험 군 분류 (n=8/group)

Groups	induced arthritis	Dietary administration	Orally administration
Normal control	-	Custom-chow diet	
Negative control	+	Custom-chow diet	
Positive control MTX	+	Custom-chow diet	Methotrexate 2mg/kg-bw
Positive control Glucosamine	+	Custom-chow diet	Glucosamine 100mg/kg-bw
water 200mg/kg-bw	+	Custom-chow diet	웃나무 열수 추출물 200mg/kg-bw
water 500mg/kg-bw	+	Custom-chow diet	웃나무 열수 추출물 500mg/kg-bw
EtAc 20mg/kg-bw	+	Custom-chow diet	웃나무 EtAc 추출물 20mg/kg-bw
EtAc 100mg/kg-bw	+	Custom-chow diet	웃나무 EtAc 추출물 100mg/kg-bw

③ 관절염 모델

관절염의 유발은 6주령의 male SD rat (대한바이오링크)를 이용하였으며 마취제 Zoletile (virbac, cat. No. 06516)과 근육이완제 Rumpun(바이엘코리아, cat. No. 41882)을 2:1 비율로 희석하여 랫드를 마취시켰다(i.p 투여). 무릎 주변을 깨끗이 제모한 후 골관절염 유발물질인 Monosodium Iodoacetate induced arthritis(MIA)를 1mL 주사기를 이용하여 양쪽 무릎 관절강 내에 50ul(60mg/ml)씩 투여하였다. MIA 희석시에는 0.9% saline을 사용하고 MIA 투여 7일 후에 관절염 유발 유무를 확인하고 관절염이 유발된 동물만을 사용하였다.

(사) 생존한 Rat에서 웃나무 추출물 투여에 따른 골관절염 효과검증을 위한 Treadmill 측정

골관절염을 유발한 Rat에서 웃나무 추출물 투여의 효과를 확인하기 위하여 보행훈련 및 관절통증 검사를 시행하였다. 실험에 사용한 기계는 Treadmill (TreadScan Gait, Clever Sys, Inc)이며 전라남도 천연자원연구소의 장비를 이용하였다. 골관절염 유발을 위한 약물 주입 이틀 후 측정을 시작하여 14일동안 총 6회 측정을 통하였으며, 매일 웃나무 추출물의 경구 투여 후 1시간 이내에 측정하여 효과를 확인하였다.

(아) Real Time Polymerase Chain Reaction에 의한 proteoglycans 및 관련 인자 측정

웃나무 추출물 투여에 따른 large aggregating proteoglycans의 생성과 관련된 인자인 Collagen I, Collagen II, Collagen x의 발현을 Real Time PCR로 확인하였다.

① 동물의 연골조직으로부터 RNA 추출

실험기간동안 웃나무 추출물을 투여한 동물을 희생하여 primary culture를 통해서 얻은 Chondrocyte로부터 RNA를 추출하였고, primary culture는 다음과 같은 과정으로 진행하였다. 관절염을 유발하고 웃나무 추출물을 경구투여한 Rat은 경추탈구 후에 70% 알코올로 피부를 소독하여 절개한 후, 관절연골을 2~3mm정도 크기로 채취하였다. 채취한 연골조직은 phosphate buffer saline(calcium & magnesium free, Hyclone SH30256.01) 용액에서 보관하여 clean bench

로 옮겨 0.1% EDTA-CDMF(calcium magnesium free, Sigma E5134)용액에 30분씩 2회 넣어 incubation 시켰다 (37°C, 5% CO₂). 0.25% trypsin으로 1시간 incubation(37°C, 5% CO₂) 시킨 후, 2mg/ml collagenase type I(Sigma, C0130)에서 흔들면서 overnight시켰다. 이렇게 해서 얻어진 세포 부유액을 100um pore size cell strainer(BD Falcon, 352360, USA)에 여과한 후 1,600rpm으로 10분간 원심분리 하여 원심분리 된 세포를 Hank's balanced salt solution(Hyclone SH30031.01)으로 3회 세척한 후 연골세포를 얻었다. 얻어진 세포는 10% FBS(Fetal Bovine Serum, Hyclone, SH30396.03)와 DMEM(Hyclone, SH30243.01)에 1% penicillin-Streptomycin (Hyclone, SV30010)와 1% L-glutamine(Hyclone, SH30034.01) 그리고 0.1% Gentamycin sulfate (Lonza 17-518Z, USA)을 첨가하여 75T flask에서 배양하였다. 배양된 세포를 다시 6-well plate 에서 3~4일 안정시킨 후 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit로 제조사의 manual에 따라 total RNA를 추출하였다.

② 추출된 RNA로부터 cDNA 합성과 Real-Time PCR 진행

cDNA의 합성을 위해 iScript Select cDNA Synthesis Kit(BIO-RAD, 170-8889)을 이용하여 5ug의 total RNA에 5X iScript select reaction mix를 4ul, Oligo(dT) Primer 2ul, RNA sample 5ul, Nuclease-Free Water 8ul를 각각 넣고 마지막에 iScript Reverse Transcriptase 1ul를 넣어 pipet 으로 up & down하여 골고루 섞어주고 42°C 에서 60분, 85°C 에서 5분간 반응시킨 후 합성된 cDNA를 PCR 반응에 사용하였다. Real-Time PCR 실험시 사용한 기계는 Step One Real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA) 이며 iQ SYBR Green Supermix (500 assay, BIO-RAD, #170-8882)로 반응하였다. PCR을 위한 혼합액 최종농도는 cDNA 2ul(10~100ng), 2X iQ SYBR Green Supermix 10ul, Forward&Reverse Primer 각 1ul(250nM), H₂O 7ul 이 되도록 하였다. 95°C 에서 10분간 hot start 한 후 95°C 에서 15초간, 55°C 에서 15초, 72°C 에서 30초간 30 cycling 으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 95°C 에서 15초, 60°C 에서 1분, 95°C 15초간 polishing step을 거쳐 PCR data를 얻었다.

표 112. Real-Time PCR 을 위해 사용한 Primer Sequence

Sequence Name	Forward Sequence	Reverse Sequence	NCBI Reference
Collagen Type I	GAG CGG AGA GTA CTG GAT CGA	CTG ACC TGT CTC CAT GTT GCA	BC133728
Collagen TypeII	GCA ACA GCA GGT TCA CGT ACA	TCG GTA CTC GAT GAT GGT CTT G	L48440
Collagen X	CAT CCT AAT CCC CCG CTT AGA	TTT TAG CCT ACC TCC ATA TGC ATC A	XM001053056
GAPDH	TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C	CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT	BC087743.1

(자) 관절염 유발에 따른 실험동물의 골구조 측정

① Micro CT 촬영

실험 종료 후 각 실험군별로 골구조의 변화를 측정하기 위해 three-dimensional micro-CT 촬영을 시행하였다. MIA로 관절염을 유도한 후 6주째 희생을 시켜 양쪽 앞다리를 분리하여 4% formalin에 고정시킨후 Micro-CT 촬영은 중앙실험동물(주)에 의뢰하여 High resolution micro-CT(Skycan 1172, Belgium)로 왼쪽 앞발을 촬영하였다. 측정 지표들로는 골 부피(Bone Volume-BV), 골 표면적(Bone Surface area), 조직 전체 부피(total tissue volume-TV)를 바탕으로 골의 부피와 조직 전체부피의 비율(BV/TV), 골표면적과 골부피의 비(BS/BV), 치밀골의 두께(trabecular thickness-Tb.Th.)를 통해서 관절염 유발에 따른 SD rat의 골지표들을 분석하였다.

② 조직학적 검사(Histological assessment)

㉠ 조직 표본제작

관절염 유발 6주 후에 희생시킨 SD rat의 뒷다리의 슬관절 부위를 4% formalin(Sigma, USA)에 1일 동안 고정시킨 후, 이것을 Calci-Clear Rapid(national diagnostics, Georgia, USA)에 24시간 동안 탈회한 후 다시 4% formalin에 2일간 고정한 뒤에 한국실험병리(주)에 의뢰하여 실시하였다.

㉡ 슬관절의 병리조직학적인 관찰

파라핀에 고정한 슬관절 조직을 7 μ m의 크기로 잘라 슬라이드를 제작하였고, Hematoxyline & Eosin(H&E) 염색을 통해 염증반응 발생 유무나 활막세포의 증식, 염증세포의 조직침윤 여부를 확인하였다.

(차) ELISA 방법에 의한 cytokines 측정

퇴행성관절염은 관절의 연골이 마모되면서 그 주변으로 염증반응을 동반하면서 통증을 유발하는 질환이다. 퇴행성관절염의 염증반응은 그와 관련한 cytokine들인 TNF-alpha, IL1-beta 등을 관절 주변으로 분비하고, 이러한 cytokine들은 다시 관절부위에 염증반응을 일으켜 NO, PGE2 등을 분비하고 이것이 지속적으로 반복되면서 통증을 유발하게 되는 것이다. *In vitro* 실험에서도 chondrocytes에 염증을 유발하는 물질인 Lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 pro inflammatory cytokine 들을 유도할 수가 있다. Pro inflammatory cytokine의 하나인 TNF-alpha, IL-6의 발현확인을 위해 본 실험에서는, Primary culture를 통해 얻은 chondrocytes를 96well plate에 5x10⁴ cells /well의 농도로 세포를 DMEM 배양액에 분주 후 overnight 하여 안정화시킨 후, 샘플 및 LPS (50 μ g/mL) 처리하여 24시간 배양 후에 상층 액을 따서 두가지 cytokine을 측정하였다. 측정을 위해 R&D ELISA kit (Rat TNF-alpha; DY510, Rat IL-1beta; DY506)을 이용하여 R&D Systems의 General ELISA Protocol을 따라서 실험을 진행하고 ELISA reader(Molecular Devices, Korea)를 이용하여 측정하였다.

(카) PGE2의 측정

PGE2 발현확인을 위해 본 실험에서는, Primary culture를 통해 얻은 chondrocytes를 96well plate에 5×10^4 cells /well의 농도로 세포를 DMEM 배양액에 분주 후 overnight 하여 안정화시킨 후, 샘플 및 LPS (50 μ g/mL) 처리하여 24시간 배양 후에 상층 액을 따서 PGE2를 측정하였다. 측정을 위해 R&D PGE2 ELISA kit (R&D Systems, KGE004B)를 이용하였으며 General ELISA Protocol에 따라 실험을 진행하고 ELISA reader(Molecular Devices, Korea)를 이용하여 측정하였다.

(타) Nitric oxide (NO) 측정

NO 측정을 위해 Primary culture를 통해 얻은 chondrocytes를 96well plate에 5×10^4 cells /well의 농도로 세포를 DMEM 배양액에 분주 후 overnight 하여 안정화시킨 후, 샘플 및 LPS (50 μ g/mL) 처리하여 24시간 배양 후에 상층 액을 따서 측정하였다. 상층액 100 μ L를 새로운 96 well plate에 모아주고 Griess reagent (Sigma) 100 μ L/well 첨가 후 570 nm에서 흡광도를 측정한다.

(파) Reverse Transcript Polymerase Chain Reaction에 의한 MMPs 및 관련 인자 측정

실험동물에서 분리한 연골세포를 6-well plate에 5×10^6 cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후, 부위별 꾸지뽕 주정 추출물을 H₂O₂와 함께 연골세포에 2시간 동안 처리한 후 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit(QIAGEN, Maryland, USA)로 제조사의 manual에 따라 total RNA를 추출하고 cDNA의 합성을 위해 iScript Select cDNA Synthesis Kit(BIO-RAD, Singapore)을 이용하여 5 μ g의 total RNA에 $5 \times$ iScript select reaction mix를 4 μ L, Oligo(dT) Primer set 2 μ L (Table 1), RNA sample 5 μ l, Nuclease-Free Water 8 μ L를 각각 넣고 마지막에 iScript Reverse Transcriptase 1 μ L를 넣어 pipet으로 up & down하여 골고루 섞어주었다. 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 85 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 합성된 cDNA를 PCR 반응에 사용하였다. Real-Time PCR 실험 시 사용한 기계는 Step One Real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA) 이며 iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, BIO-RAD, Singapore)의 protocol에 따라 수행하였다. PCR을 위한 혼합액 최종농도는 cDNA 2 μ l(10~100ng), 2X iQ SYBR Green Supermix 10 μ L, Forward & Reverse Primer 각 1 μ L(250 nM), H₂O 7 μ L 이 되도록 하였다. 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 hot start 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 15초간, 55 $^{\circ}$ C에서 15초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 40 cycling 으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 95 $^{\circ}$ C 15초간 polishing step을 거쳐 PCR 분석을 시행하였다. 반응에 사용한 Primer는 표 113에 제시하였다.

표 113. Primer set sequence used for Real-Time PCR

Sequence Name	Forward Sequence	Reverse Sequence	NCBI Reference
GAPDH	TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C	CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT	BC087743.1
Aggrecan	GAA GTG GCG TCC AAA CCA A	CGT TCC ATT CAC CCC TCT CA	NM_022190. 1
Collagen Type I	GAG CGG AGA GTA CTG GAT CGA	CTG ACC TGT CTC CAT GTT GCA	BC133728
Collagen Type II	GCA ACA GCA GGT TCA CGT ACA	TCG GTA CTC GAT GAT GGT CTT G	L48440
Collagen Type X	CAT CCT AAT CCC CCG CTT AGA	TTT TAG CCT ACC TCC ATA TGC ATC A	XM00105305 6
TIMP-1	AAG GGC TAC CAG AGC GAT CA	ATC GAG ACC CCA AGG TAT TGC	NM_053819. 1
MMP-3	GAG TGT GGA TTC TGC CAT TGA G	TTA TGT CAG CCT CTC CTT CAG AGA	NM_133523. 2
MMP-7	ACT CTA GGC CAT GCC TTT GC	CCA TCC GTC CAG TAC TCA TCC T	NM_012864. 2

(하) 파골세포 형성을 위한 세포배양

7주령의 C57BL/6 female mice로부터 분리해낸 골수세포를 이용하였다. 대퇴골을 분리 후 접착조직을 제거하고, 뼈의 한쪽 끝을 절단한 뒤에 골수 공간에 26gauge 바늘로 media를 주입하였다. MC3T3-E1 세포를 (1.5x10⁴ cells/well) bone marrow 세포 (5x10⁵ cells/well)와 함께 배양하였으며 이때 사용한 배지는 α -minimum essential medium(MEM)에 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin을 첨가한 것으로 사용하였다. Co-culture 한 세포는 10⁻⁸M1 α ,25(OH)₂vitaminD₃과 10⁻⁷Mdexamethasone를 처리하여 24-well plate에 배양하였다. 배지는 3일에 한번 교환했으며 세포는 7일동안 배양하였다. 함께 배양한 세포는 두번 washing 후에 4.5 mM citric acid, 2.25 mM trisodium citrate, 3 mM hydrochloric acid, 4% formic acid, and 3% acetic acid으로 만든 고정액을 첨가하여 40분간 고정하였다. 이후 세척하여 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining kit로 30 ° C에서 5시간동안 염색하고, 다시 세척하여 Hematoxyline으로 2분간 다시 염색했다. 붉은색으로 염색된 세포의 숫자는 Image-pro Discovery (Media Cybernetics Inc., MD, USA)를 이용하여 계산하였다.

(A) Mineralization 측정

MC3T3-E1 (1x10⁴cells/well)는 앞서 설명한 배지를 이용하였으며, 10mM glycerol 2-phosphate, 50mg/ml ascorbic acid가 포함된 분화용 배지로 3일마다 교체하였다. 21일 후 세포는

mineralization 정도를 평가 할 수 있는 Alizarin red S(Sigma, St. Louis, USA)를 이용하여 5분간 염색하였다. 증류수를 이용하여 3번 세척 한 후 cetylphridinium chloride(10%, w/v)를 처리하고, 흡광도는 plate reader (Multiskan Spectrum, Thermo, Japan)를 이용하여 562nm에서 측정하였다.

(B) RANKL 발현 측정

A Quantikine M mouse RANKL immunoassay kit (R&D Systems)를 이용하여 RANKL 발현을 측정하였다. 흡광도는 microplate reader를 사용하여 450nm에서 40분 이내에 측정하였다.

(2) 통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며 얻어진 결과는 SPSS 12.0 software를 이용하여 유의적 차이를 확인한 후 그룹간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test를 수행하였고 두 그룹간의 차이는 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였으며 5% 이내에서 통계적 유의성을 부여하였다($p < 0.05$).

(3) 실험결과

(가) 율나무추출물로부터 얻은 분획들의 *in vitro* 세포 사멸억제 효과

본 연구에서는 율나무추출물 분획을 얻어 primary cultured chondrocytes에서 *in vitro* 세포 사멸 억제효과를 우선적으로 규명하였다. *in vivo* 실험 수행전에 일차적으로 *in vitro* 실험을 통해 가능한 농도를 우선 선정하기로 하였다. 율나무추출물 분획에서 세포독성은 나타나지 않았다(그림 124).

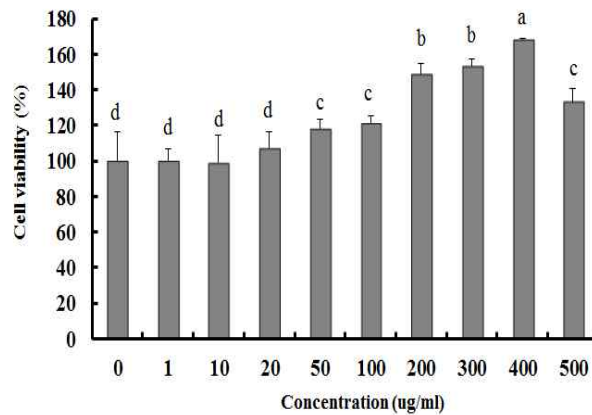


그림 124. Cytotoxicity of *Rhus verniciflua* Hot water extract in different doses against Chondrocyte determined by MTT assay

(ANOVA 수행 후 Multiple Range test에 의해 $p < 0.05$ 값에서 유의성 확인)

또한 옷나무추출물에서 H₂O₂에 의해 유도된 세포사멸로부터 chondrocytes를 보호 또는 억제하는 효과가 샘플 농도 300 μg/ml에서 가장 높게 나타났다(그림 125).

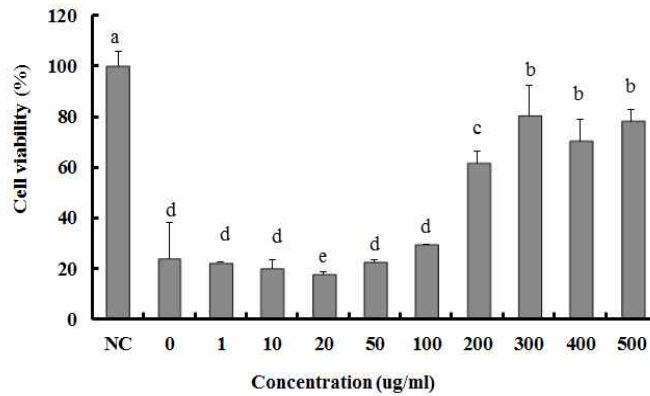


그림 125. Cytotoxicity of *Rhus verniciflua* Hot water extract in different doses against Chondrocyte treated H₂O₂ 300 μM for 2h and determined by MTT assay (ANOVA 수행 후 Multiple Range test에 의해 p < 0.05 값에서 유의성 확인)

(나) 연골세포 활성 평가 - sodium sulfate incorporation

실험의 결과에 따르면 전반적으로 세포로의 유입이 나타나는 것으로 보이지만 실험 처리군 사이에 유의적 변화가 크지는 않은 것으로 나타났다. 그러나 옷나무 열수 추출물의 200ug/ml의 농도에서 가장 높은 세포 유입이 나타났으며 전반적으로 샘플의 효과가 있는 것으로 보인다. (그림 126)

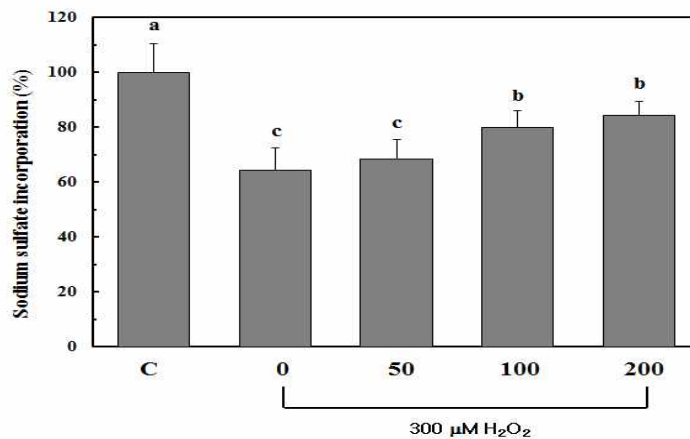


그림 126. 관절세포의 isotope labeled sodium sulfate (Na₂³⁵SO₄)의 세포내 proteoglycan 합성을 위한 incorporation에 미치는 옷나무추출물의 효과 (ANOVA 수행 후 Multiple Range test에 의해 p < 0.05 값에서 유의성 확인)

(다) 골 형성능 확인

실험결과 옷나무추출물 100ug/ml을 처리한 실험군에서 RANKL의 수치가 낮게 나타났다. 이는 옷나무추출물이 RANKL발현을 감소시킨 것으로 보이며 골형성이 촉진되는 것으로 생각된다(그림 127).

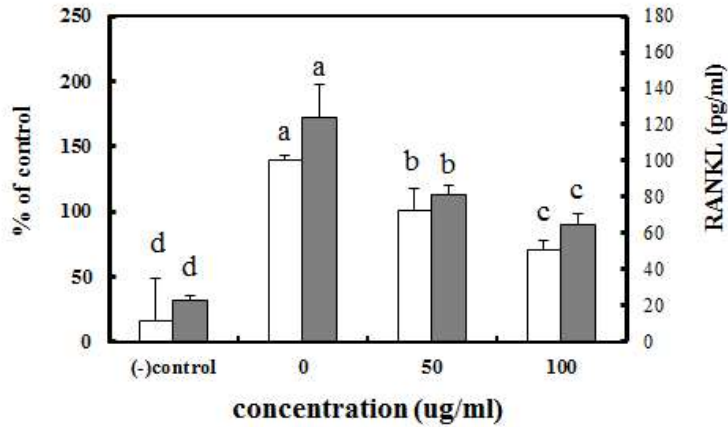


그림 127. osteoclast-like cell formation and RANKL 발현에 옷나무추출물이 미치는 효과 (ANOVA 수행 후 Multiple Range test에 의해 $p < 0.05$ 값에서 유의성 확인)

Alizarin Red S 염색은 석회화된 골기질을 평가하는데 가장 많이 사용하는 방법중 하나이며 석회화된 골기질 형성정도는 성숙한 조골세포의 표지자로 알려져 있다. bone mineralization을 측정된 결과는 옷나무추출물의 농도가 높아질수록 측정값이 높아졌으며 이는 100ug/ml의 농도에서 골형성능이 가장 효과적인 것으로 보인다(그림 128).

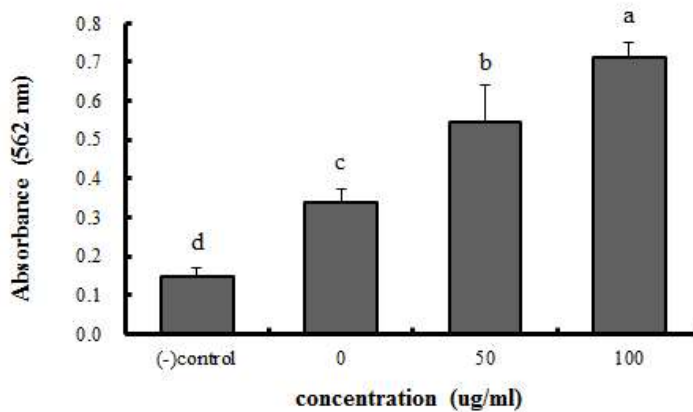


그림 128. MC3T3-E1 세포의 mineralization에 미치는 옷나무추출물 영향 (ANOVA 수행 후 Multiple Range test에 의해 $p < 0.05$ 값에서 유의성 확인)

(라) 옷나무 열수 추출물로부터 얻은 분획들의 *in vitro* 효력시험(Real Time PCR)

Real Time PCR을 수행한 결과 positive 인자인 Type 1 Collagen 과 Type 2 Collagen 및 Aggrecan의 경우 100ug/ml 농도에서 collagen과 aggrecan의 생성정도가 증가하는 것으로 보이며, 콜라겐보다 aggrecan에서 샘플효과가 더 잘 나타난 것으로 보인다(그림 129, 130).

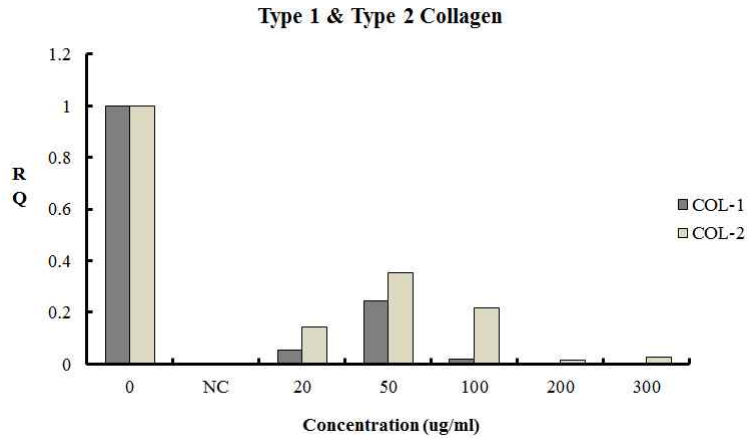


그림 129. Rat의 chondrocyte에 옷나무추출물 처리 후 세포수준에서의 Type 1 & Type 2 Collagen 형성에 미치는 샘플효과

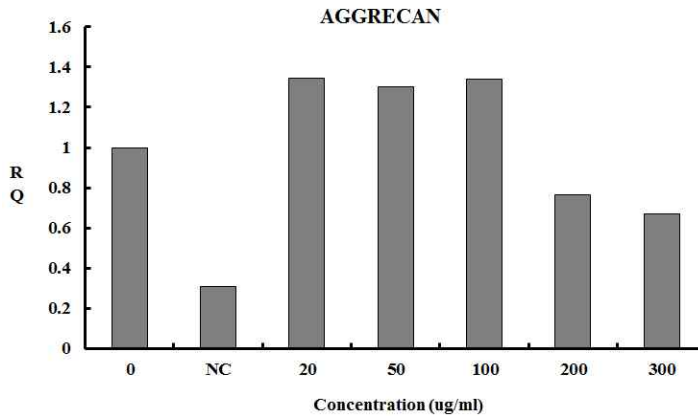


그림 130. Rat의 chondrocyte에 옷나무추출물 처리 후 세포수준에서의 Aggrecan 형성에 미치는 샘플효과

Negative 인자인 MMPs 측정결과 역시 H₂O₂ 만 처리한 NC (Negative Control) 에 비해서 옷나무추출물 샘플을 처리한 군에서 MMPs의 감소가 나타난 것으로 보였다. 특히 100ug/ml 농도에서 MMP3과 MMP7의 감소하는 경향이 뚜렷하게 나타났으며, 이는 샘플의 효과가 미치는 영향이 긍정적인 것으로 생각되므로 향후 추가 실험을 통해 효과를 관찰할 수 있으리라 기대된다(그림 131, 132).

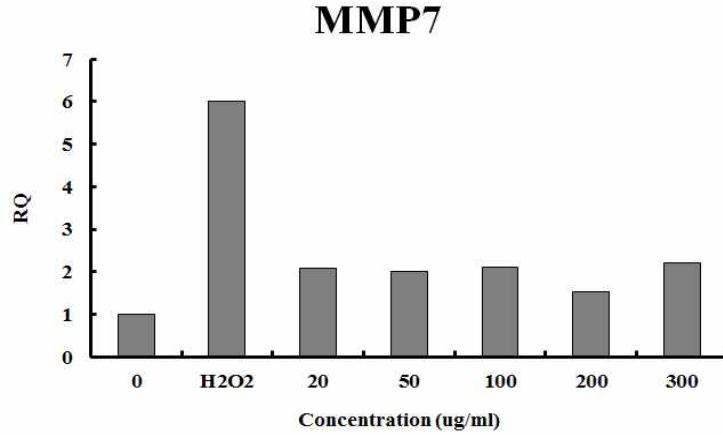


그림 131. Rat의 chondrocyte에 옷나무추출물 처리 후 세포수준에서의 MMP-7 형성에 미치는 샘플효과

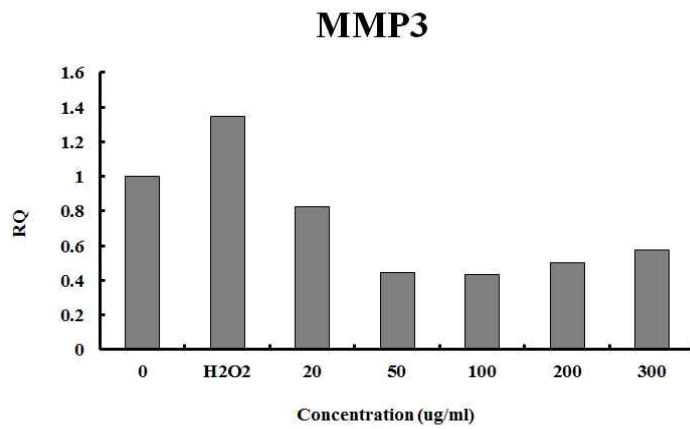


그림 132. Rat의 chondrocyte에 옷나무추출물 처리 후 세포수준에서의 MMP-3 형성에 미치는 샘플효과

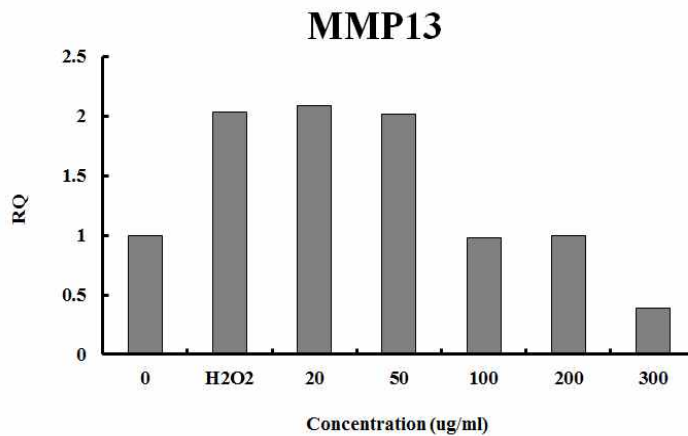


그림 133. Rat의 chondrocyte에 옷나무 추출물 처리 후 세포수준에서의 MMP-13 형성에 미치는 샘플효과

(마) ICR mouse를 대상으로 한 투여용량에 따른 *in vivo* 독성실험

본 연구에서는 1차년도 *in vitro* 실험결과를 바탕으로 하여 골관절염 동물모델에서 옷나무 추출물의 효과를 알아보려고 하였다. 골관절염 동물실험에 앞서 옷나무 추출물의 동물에서의 독성평가를 시행하였으며, 육안관찰 결과 및 간독성 실험을 시행한 결과 열수 추출물과 EtoAc 추출물 각각에서 모두 동물독성은 나타나지 않았다

또한 독성실험 후 동물로부터 얻은 serum을 분석하여 간독성 test를 실시한 결과 열수 추출물 및 EtoAc 추출물 모두에서 control 군과 비교하여 독성을 나타내지 않은 것으로 확인되었다(그림 134).

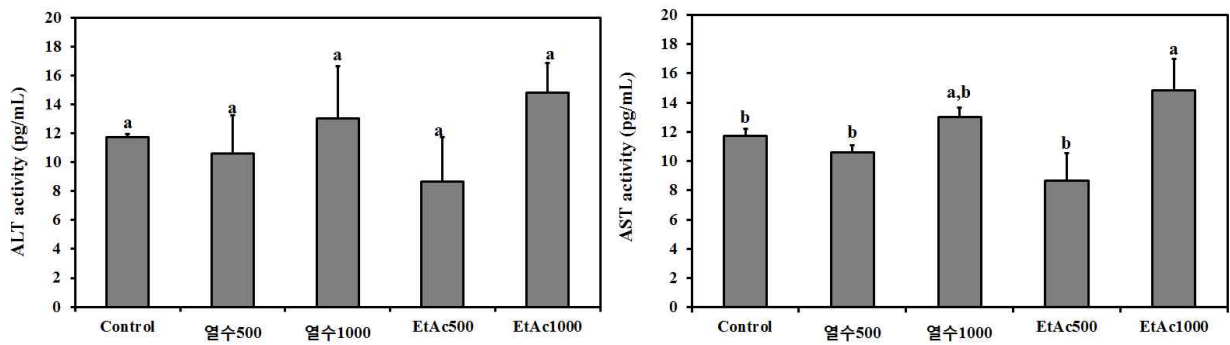


그림 134. 옷 추출물 동물독성 실험 - ALT, AST activity test

(바) 몸무게 변화량 및 식이섭취 효율

6주간 Rat의 몸무게 변화와 식이섭취량을 측정하고 이에 따라 식이섭취효율을 측정한 결과 그룹간에 유의적으로 차이가 나타나지 않았으며, 해부 뒤 장기의 육안 관찰 결과 또한 이상이 없는 것으로 나타났다. (표 114)

표 114. 몸무게 변화량, 식이 섭취량 및 식이섭취 효율¹⁾

Groups	induced arthritis	Weight gain(g) ²⁾	Diet Intake(g)	FER ³⁾
Normal control	-	184.22±23.96 ^a	20.85±2.18 ^a	2.08±0.27 ^a
Negative control	+	191.78±14.66 ^a	19.57±2.27 ^a	2.31±0.16 ^a
Positive control MTX	+	181.25±20.88 ^a	19.6±2.59 ^a	2.18±0.25 ^a
Positive control Glucosamine	+	198.7±15.76 ^a	19.77±2.24 ^a	2.37±0.19 ^a
water 200mg/kg·bw	+	195.45±25.98 ^a	20.18±2.51 ^a	2.28±0.30 ^a
water 500mg/kg·bw	+	196.46±16.58 ^a	21.47±2.00 ^a	2.11±0.19 ^a
EtAc 20mg/kg·bw	+	191.93±22.19 ^a	21.05±1.65 ^a	2.14±0.25 ^a
EtAc 100mg/kg·bw	+	189.3±22.93 ^a	20.63±1.05 ^a	2.20±0.36 ^a

1) Values are means ± SEM, n=5. Mean with different letters differ $p < 0.05$.

2) Weight gain(g) = final body weight (g) - initial body weight(g)

3) FER (Food efficiency rate) = gain of body weight (g)/food intake calories (kcal)

그러나 관절염 유발 Rat의 무릎 연골을 해부하여 관찰한 결과, 관절염을 유발하지 않는 정상군에 비하여 관절염을 유발한 군에서 현저한 연골손실이 관찰되었으며, 이에 반해 Positive control 군인 MTX와 Glucosamine 군에서 비교적 연골손실이 덜 한 것을 육안으로 관찰 할 수 있었다. 옷나무 추출물을 경구투여한 군에서는 육안관찰 결과에서는 큰 차이가 없었으나 비교적 열수추출물 군에서 유발정도가 덜 한 것으로 나타났다. (그림 135)

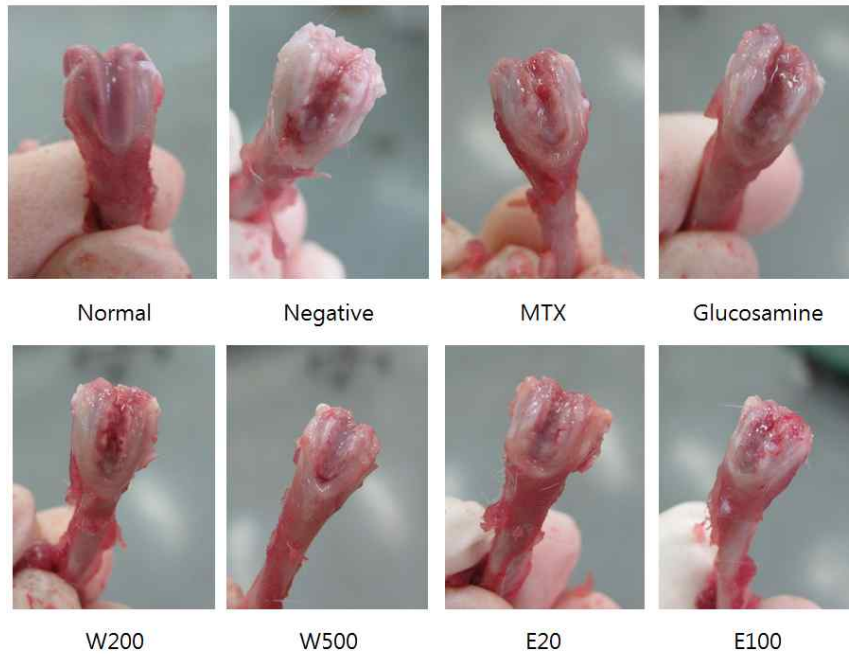


그림 135. 관절염 유발 Rat의 무릎 연골 사진

(사) 생존한 Rat에서 옷나무 추출물 투여에 따른 골관절염 효과검증을 위한 Treadmill 측정
관절염 유발 하루 뒤, Rat에 옷나무 추출물을 경구투여 하고 보행 및 관절통증에 관한 분석을 위해 실시한 Treadmill 측정 하였으며 Speed, 뒷발이 받는 압력, 추진력을 분석하였다.

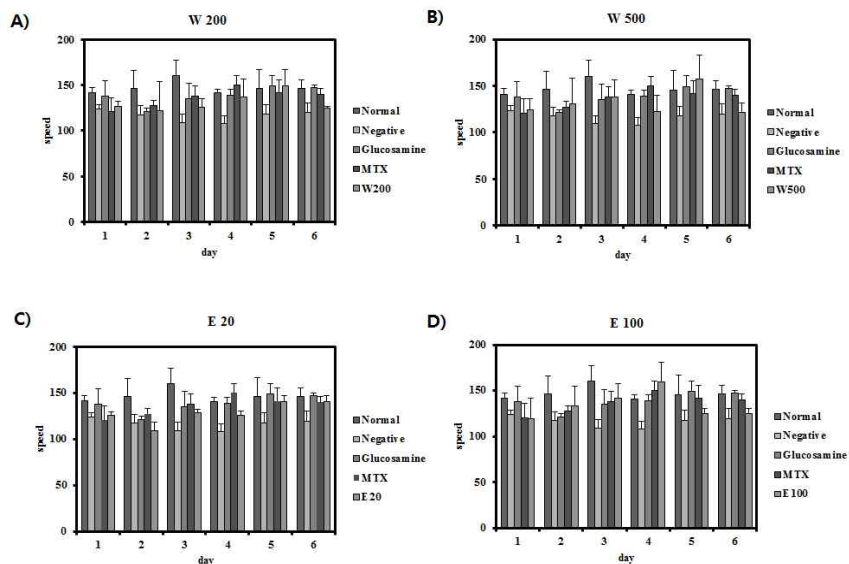


그림 136. 골관절염 유발 Rat의 Treadmill 분석에서 Speed측정

Speed 측정 결과, 유발 3일 뒤부터 관절염이 유발되지 않은 정상군에 비해 관절염 유발군에서 Speed가 40% 감소한 것을 확인하였고, 마지막 측정일 까지 비슷한 양상을 보였다. 그러나 관절염 유발군에 비해 옷나무 추출물을 투여한 군에서는 Speed가 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였다. Positive control군인 MTX와 Glucosamine을 투여한 그룹에서 관절염 유발군에 비해 Speed가 16% 증가하였으며, 열수추출물 200mg/kg · bw 투여군에서 이와 비슷한 수치인 14%가 증가되어 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다. 옷나무 EtAc 추출물 투여군은 관절염 유발군에 비해 평균 8% 증가한 것으로 나타났으나 EtAc 추출물 100mg/kg · bw 투여군의 경우 마지막 2회 측정에서 관절염 유발군과의 차이가 미미한 것으로 나타났다(그림 136-A).

압력 측정 결과, 관절염이 유발되지 않은 정상군에 비해 관절염 유발군에서 압력이 8% 감소한 것을 확인하였고, 마지막 측정일 까지 비슷한 양상을 보였다. 그러나 관절염 유발군에 비해 옷나무 추출물을 투여한 군에서는 압력이 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였다. Positive control군인 MTX와 Glucosamine을 투여한 그룹에서 관절염 유발군에 비해 압력 5% 증가하였으며, 유발 14일 후 측정치에서는 열수추출물 500mg/kg · bw 투여군에서 이와 비슷한 수치인 5%가 증가되어 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다. EtAc 추출물 투여군에서도 관절염 유발군에 비해 평균 10% 정도 수치가 증가한 것으로 나타났으나, 측정 일에 따라 효과에 대한 편차가 보였다. (그림 137-B)

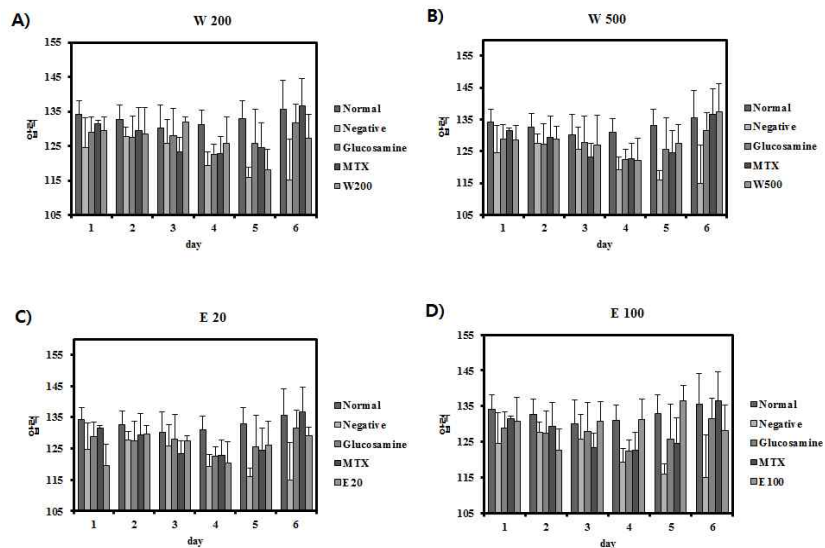


그림 137. 골관절염 유발 Rat의 Treadmill 분석에서 압력 측정

추진력 측정 결과, 관절염이 유발되지 않은 정상군에 비해 관절염 유발군에서 압력이 40% 감소한 것을 확인하였다. 반면 관절염 유발군에 비해 옷나무 추출물을 투여한 군에서는 추진력이 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였다. Positive control군인 MTX와 Glucosamine을 투여한 그룹에서 관절염 유발군에 비해 추진력이 20%이상 증가하였으며, 열수추출물 200mg/kg · bw 투여군에서 평균 25%가 증가되어 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다. 옷나무 EtAc 추출물의

경우 관절염 유발 초기에는 효과가 미미하였으며, 유발 후 14일째 측정에서는 관절염 유발군에 비해 15% 수치가 증가 한 것을 관찰 하였다(그림 138-A).

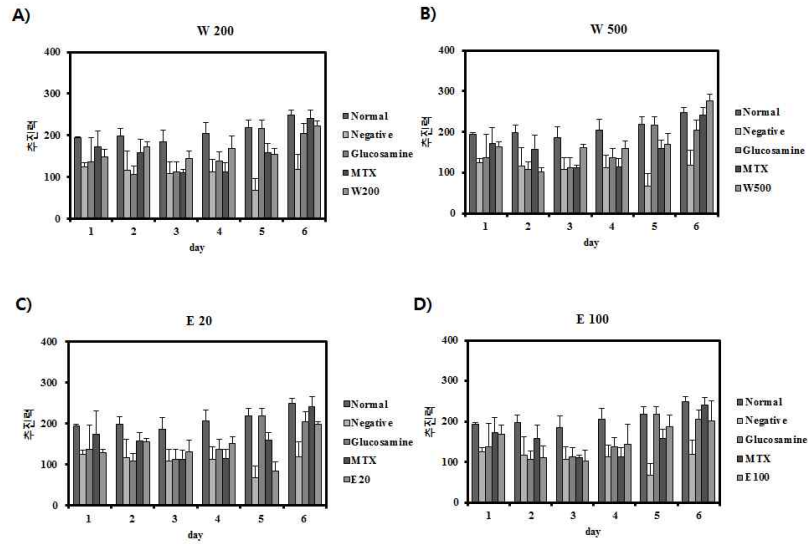


그림 138. 골관절염 유발 Rat의 Treadmill 분석에서 추진측정

(아) Real Time Polymerase Chain Reaction에 의한 proteoglycans 및 관련 인자 측정

Real-Time PCR 수행하여 positive 인자인 Type 1 Collagen 과 Type 2 Collagen 및 Type X Collagen 발현을 확인하였으며, 관절염 유발군에 비해 옷 추출물 투여 군에서 Collagen의 발현이 증가한 것으로 나타났다. 특히 Type 1 Collagen 에서는 옷나무 열수 추출물 투여군에서 콜라겐의 발현이 관절염 유발군에 비해 4배 증가한 것으로 나타났으며, EtAc 추출물 투여군의 경우 두가지 모든 농도에서 관절염 유발군과의 차이가 거의 없는 것으로 나타났다(그림 139).

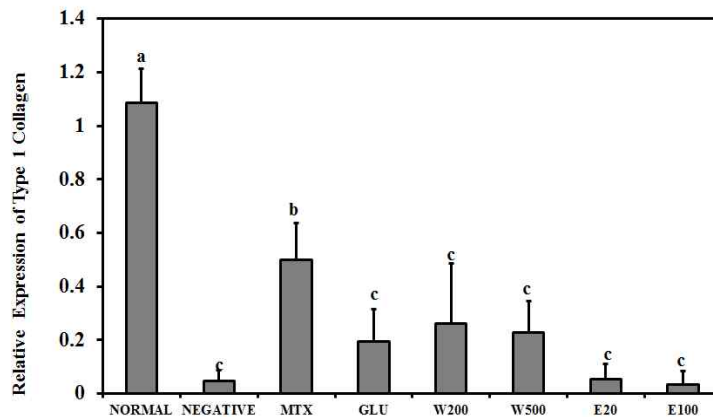


그림 139. 옷나무 추출물 투여 후 Rat의 Chondrocyte에서 Type 1 Collagen 형성효과

Type 2 Collagen 및 Type X Collagen 발현 측정에서는 옷나무 EtAc 추출물 투여 군에서 발현이 증가하는 것이 관찰 되었으며, 열수추출물의 경우 Collagen의 발현이 두드러지게 나타나지는 않은 것으로 관찰되었으며 오히려 EtAc 20mg/kg · bw 투여군에서 발현이 증가 한 것으로

나타났다(그림 140).

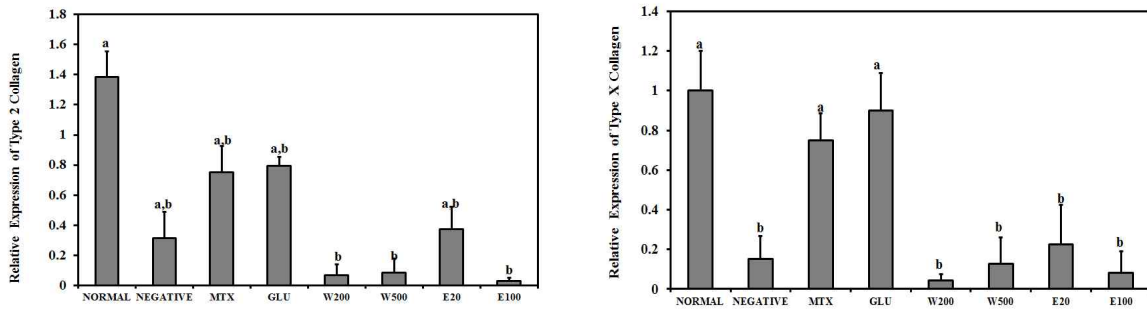


그림 140. 옷나무 추출물 투여 후 Rat의 Chondrocyte에서 Type 2 Collagen 및 Type X Collagen형성효과

(자) 관절염 유발에 따른 실험동물의 골구조 측정

① Micro CT 촬영

관절염 유발에 따른 SD rat의 골구조의 변화를 보기 위하여 각 실험군별로 왼쪽 앞발을 micro-CT로 촬영하여 제시하였다. micro-CT 사진으로 관절염 유발에 따른 뼈조직을 살펴보면, 정상군에서는 관절과 뼈조직의 손상이 없이 치밀한 골구조를 보이고 있었고, 관절염을 유발군에서는 발가락 전체의 밀도나 두께가 감소하고 손실이 나타난 것을 관찰 할수 있다. 비교실험군인 MTX 및 Glucosamine군은 관절염 유발군에 비해 전반적으로 좋은 골상태를 보이고 있고, 옷나무 추출물을 투여한 모든 군에서 비교적 골상태가 좋아진 것을 관찰할 수 있었으며, 특히 옷나무 열수추출물 200mg/kg.bw 투여군에서 좋은 효과가 나타난 것을 확인하였다(그림 141).

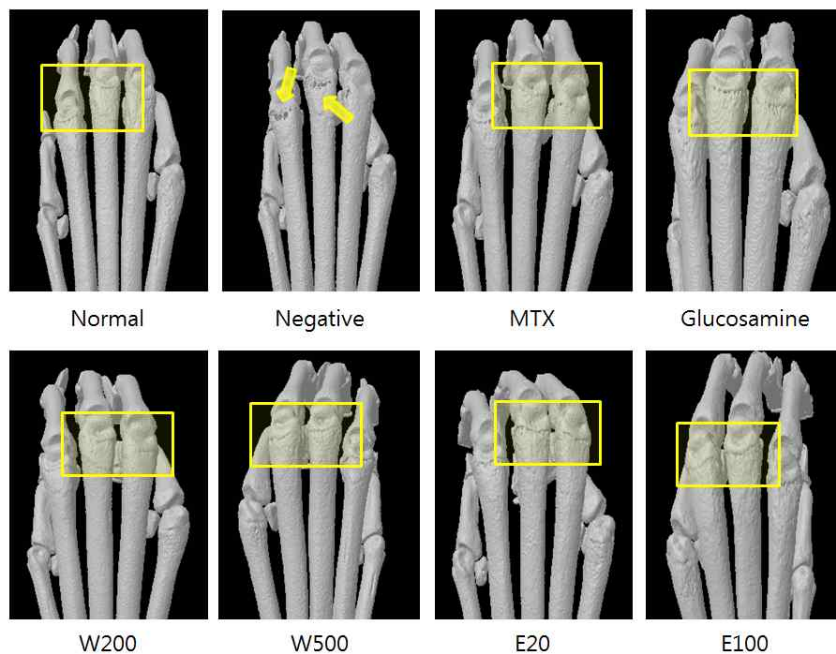


그림 141. Rat 오른쪽 앞발 골밀도 micro-CT 촬영 사진

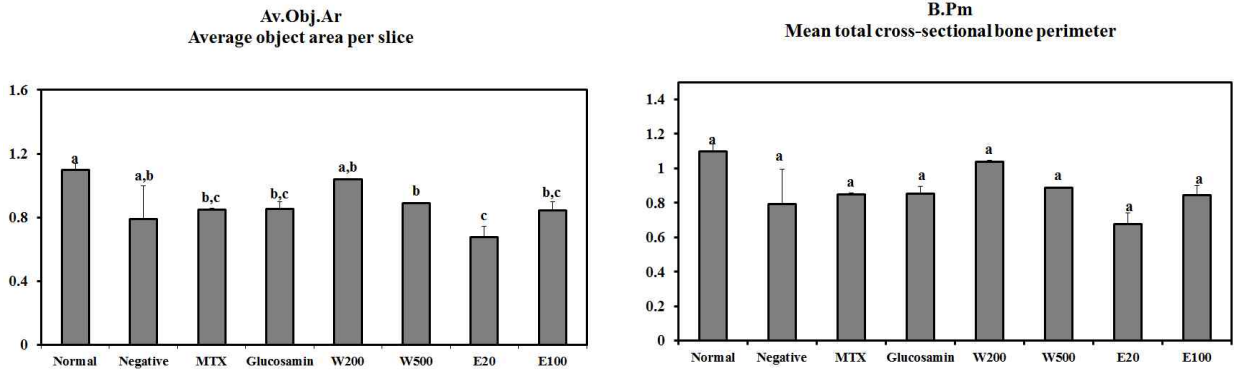


그림 142. Micro-CT 촬영 후 Rat 연골의 골소실 정도 측정치 - 골두께 평균 & 연골단면적 둘레

② 조직 표본제작 및 슬관절의 병리조직학적인 관찰

관절 조직 및 주변 조직의 염증성 침윤(infiltration) 정도를 평가하기 위해 SD rat의 슬관절 절편을 H&E 염색을 하였고, 그 결과는 아래에 나타내었다. 일반적으로 정상적인 관절강에서는 세포의 형태가 둥글게 나타나는 반면 염증이 유발하여 chondrocytes가 사멸하는 경우 세포가 작게 밀집하거나 형태를 확인하기 어려운 정도로 침윤되기도 한다.

H&E 염색의 결과 정상군에 비해 관절염 유발군의 관절강에 염증반응을 확연하게 볼 수 있으며, 양성대조군인 MTX는 관절강에도 염증의 병변이 나타나지만 관절염 유발군보다는 양호한 것을 확인할 수 있었다. 옷나무 열수 추출물을 투여한 군에서 효과가 나타나는 것을 관찰하였으며 특히 옷나무 열수 추출물 200mg/kg.bw 투여군에서 효과가 나타나는 것을 관찰 하였다. 옷나무 EtAc 추출물을 투여한 군에서도 효과가 있었으나 미미한 것으로 관찰되었다(그림 143).

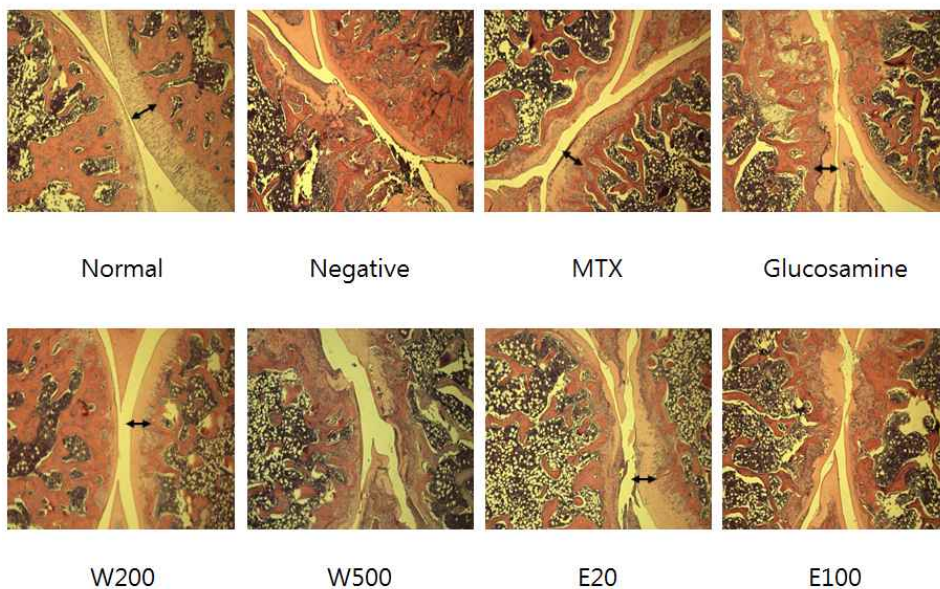


그림 143. SD Rat의 chondrocyte H&E staining

(차) 옷나무 추출 단리물질의 *in vitro* 평가

① Primary 연골세포 배양

Primary culture 후 분리한 chondrocyte는 일주일동안 CO₂ incubator에서 배양하며, 그림 144와 같은 과정을 거쳐 계대배양 하여 실험에 이용하였다.

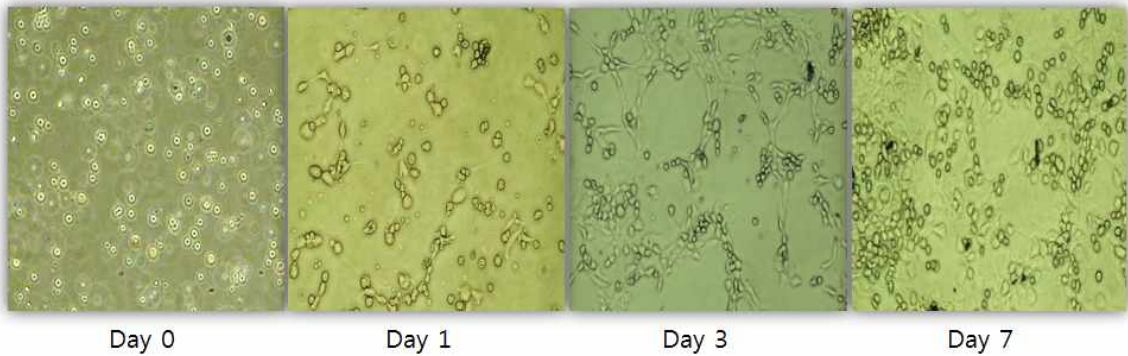


그림 144. Primary culture 후 분리한 chondrocyte의 증식과정

② H₂O₂ 산화적 독성에 대한 세포사멸 억제효과

골관절염 실험에 대한 *in vitro* 모델은 LPS 또는 H₂O₂로 염증을 유발하는 것이 일반적으로 알려져 있다(9,10). 골관절염에 있어서 가장 중요하게 여겨지는 점은 연골세포의 사멸억제와 세포재생이다. 단순히 염증만을 유발할 경우는 LPS로도 충분하겠지만 세포사멸을 유도하기 위해서는 H₂O₂로 실험하는 것이 적절할 것으로 판단하여(11) 시간별, 농도별로 실험한 결과 H₂O₂ 1.5 mM에서 2시간을 처리할 경우 시험대조군에서 48-52% 정도의 사멸을 나타내는 것으로 확인되었다(data not shown). 또한 옷나무 추출물의 지표성분의 최적농도는 실험결과 80 μM로 나타났으며 (data not shown) 이러한 기존의 실험결과를 바탕으로 옷나무 추출물의 지표성분 80 μM 처리하여 H₂O₂ 산화적 독성에 대한 세포사멸 억제효과를 관찰하였다.

실험 결과, 아무것도 처리하지 않은 세포(N)에 비해 H₂O₂ 1.5mM만 처리한 세포(0)의 생존률이 53.3%로 산화적 독성이 나타난 것으로 관찰되었다. 옷나무 추출물의 지표성분을 처리한 세포 중에서는 Taxifolin 82.5%, Fisetin 97.8%, Fustin 88.9%, Butein 90%, sulfuretin 90%의 세포생존률이 나타나, H₂O₂ 1.5mM만 처리한 세포(0)와 비교하여 세포 생존률이 유의적으로 증가하였다. Galic acid, Gabanzol, A, B 물질을 처리한 세포에서도 세포의 생존률이 증가했지만 유의적인 차이는 없었다(그림 155).

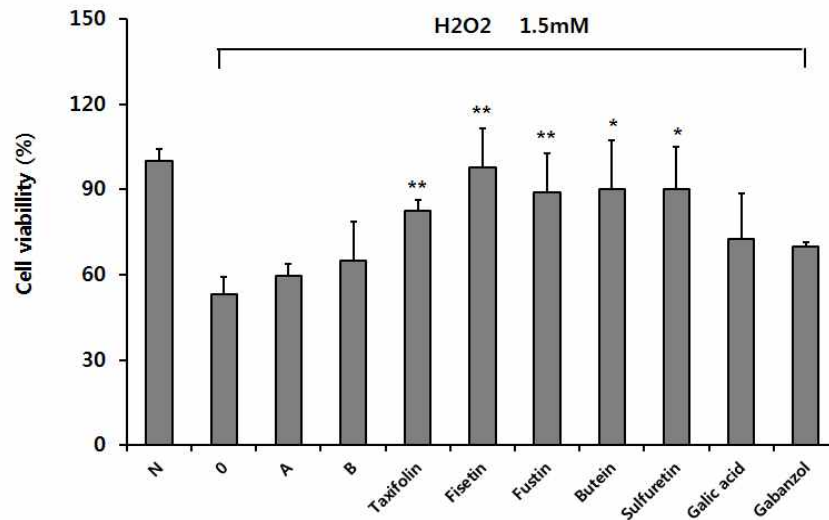


그림 155. Effect of extracts on cell survival against 1.5 mM H₂O₂ treatment.

Data are means \pm SD. Statistical differences were determined by Student's t-test at * p <0.05, ** p <0.01.

③ Cytokine (TNF- α , IL-6) 생성 억제효과

사이토카인은 세포에서 분비되는 수용성 단백질로 특정 신호물질에 의해 발현되며 효소와는 구별되게 주변 세포에 의해 영향을 받으며, 관절염에 있어서 Interleukin(IL)-1, tumor necrosis factor(TNF)- α , IL-6은 연골세포조직의 이화작용에 영향을 주는 사이토카인으로 알려져 있다. 대부분의 염증반응은 Cox-2, inducible nitric oxide(iNOS)와 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 염증유발 사이토카인이 관련된 것으로 알려져 있다(4,5). 또한 골관절염의 경우 관절강 내에서 대식세포 등에 의한 일련의 염증반응으로 TNF- α 와 Cox-2등이 과다 생성되는 것으로도 알려져 있다(6). 본 실험에서는 연골조직세포의 특징상 고농도의 LPS처리가 필요하였고 실험결과 50 μ g/ml에서 최적의 효과를 확인하였다(data not shown). 먼저 TNF- α 생성 억제효과를 확인한 결과 정상세포(N)에 비하여 LPS 50 μ g/ml를 처리하여 염증을 유발한 세포에서 TNF- α 의 발현이 3배이상 증가한 것으로 나타났으며, 옷나무 추출물의 지표성분을 처리한 세포에서는 9가지 지표성분 모두 LPS만 처리한 세포에 비해 유의적으로 TNF- α 의 발현이 낮아진 것을 확인할 수 있었다. 특히 Fustin, Fisetin 과 Butein의 경우 정상세포와 비슷한 수준으로 관찰되었다(그림. 4A.). IL-6 발현에서도 마찬가지로 정상세포(N)에 비해 LPS 50 μ g/ml를 처리하여 염증을 유발한 세포에서 IL-6 발현이 4배이상 증가하였으며, 옷나무 추출물 지표성분을 처리한 모든 세포에서 유의적인 발현차이를 나타낸 것으로 나타났다(그림 156B.). Cytokine의 발현에 옷나무 추출물 지표성분이 미치는 영향을 관찰한 결과 염증발현시 나타나는 두가지 cytokine (TNF- α , IL-6)의 생성을 억제하는 것으로 생각되며, 추가 실험을 통하여 기전검증을 진행하였

다.

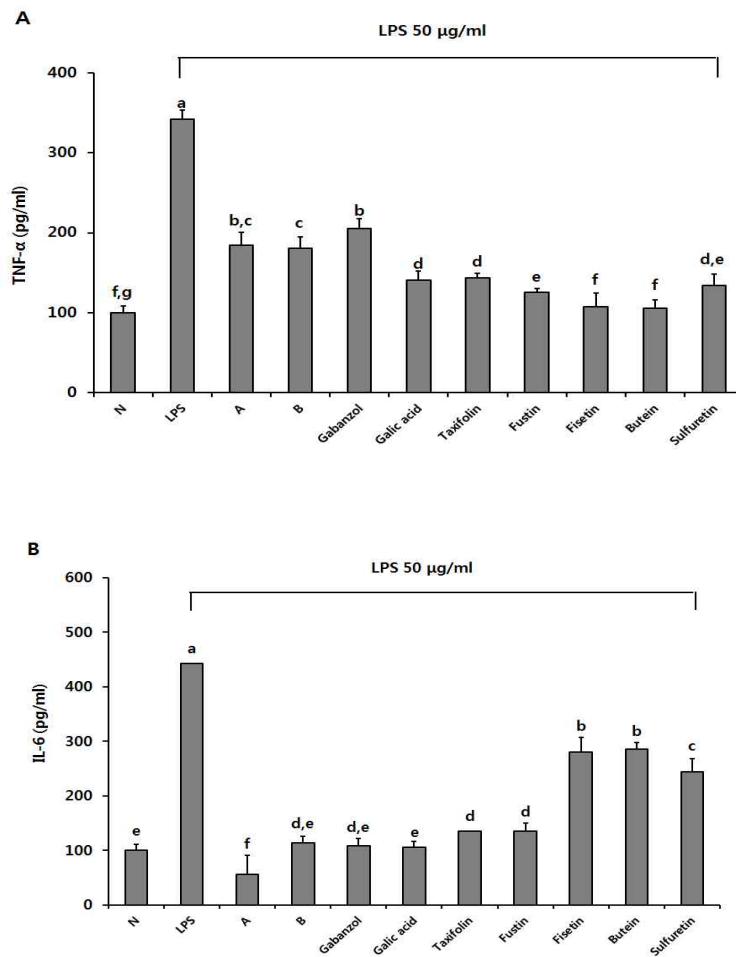


그림 156. Inhibitory effect of extracts on TNF- α and IL-6 expression.

A; TNF- α , B; IL-1 β .

Data are means \pm SD. Significant differences were determined by one-way ANOVA test at $p < 0.05$.

④ NO, PGE₂ 생성 억제효과

iNOS에 의해 정상적으로 생성된 NO는 일차면역 방어체계에 중요한 역할을 하며 혈관확장 등 생리조절에 중요한 역할을 담당하고 있다. 하지만 LPS와 TNF- α 등의 외부인자에 의해서 iNOS가 생성될 경우 과도한 NO의 생성으로 염증반응과 세포괴사를 연결되게 된다(6). 또한 NO는 퇴행성관절염의 발생에 있어서 관절의 혈관 확장과 침투성을 증가시켜서 백혈구로부터의 발현된 TNF- α 와 IL- β 가 관절에 침투하는 것을 증가시키며 연골세포의 apoptosis(programmed cell death)을 유도하기도 한다(5). 본 실험에서는 Butein, Fisetin, 그리고 Fustin에서 유의적으로 NO 생성억제 효과가 나타났으며 Galic acid에서는 LPS만 처리한 세포와 NO 생성정도 차이가 나타나지 않았다(그림 157).

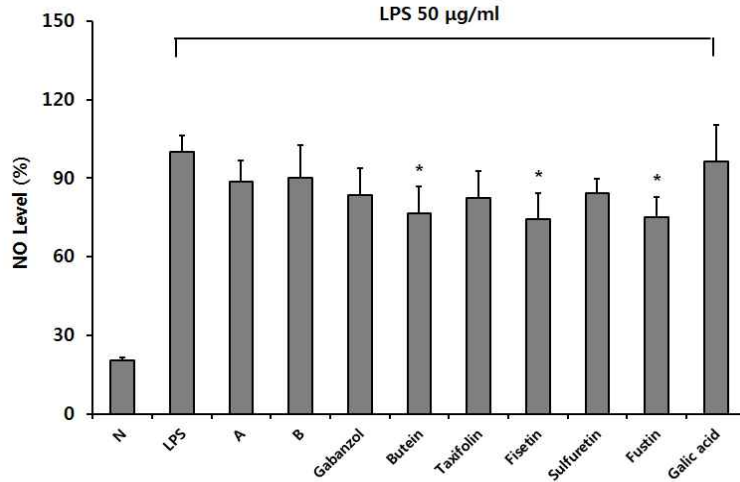


그림 157. Inhibitory effect of extracts on NO expression.

Data are means \pm SD. Statistical differences were determined by Student's t-test at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Prostaglandin E_2 (PGE_2) 생성을 촉진하여 염증을 유발시키는 Cox 효소는 Cox-1과 Cox-2의 두가지 형태가 존재한다. Cox-1은 지속적으로 일정량 생성되어 여러종류의 prostaglandin의 합성에 관여하여 혈장의 항상성, 위액분비, 혈소판응고 등에 관여하는 반면 Cox-2의 경우는 TNF- α 와 LPS 등의 외부 인자에 의해 일시적으로 유도되어 생성되어 염증에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 연골조직세포에 4가지 추출물 처리 후 LPS를 처리한 결과 A, B, Gabanzol, Butein 및 Taxifolin에서 PGE_2 발현이 유의적인 감소를 보인 것으로 확인되었다(그림 158). Fisetin, Sulfuretin 및 Fustin을 처리한 세포에서도 PGE_2 발현이 감소하였으나 유의적인 차이가 나타나지는 않았다.

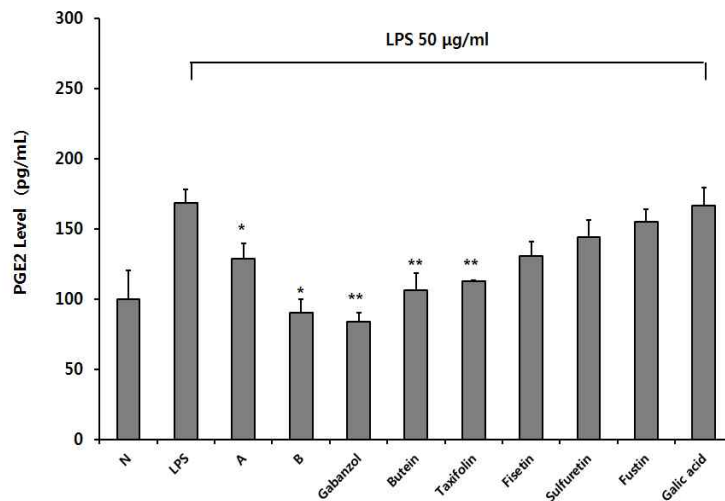


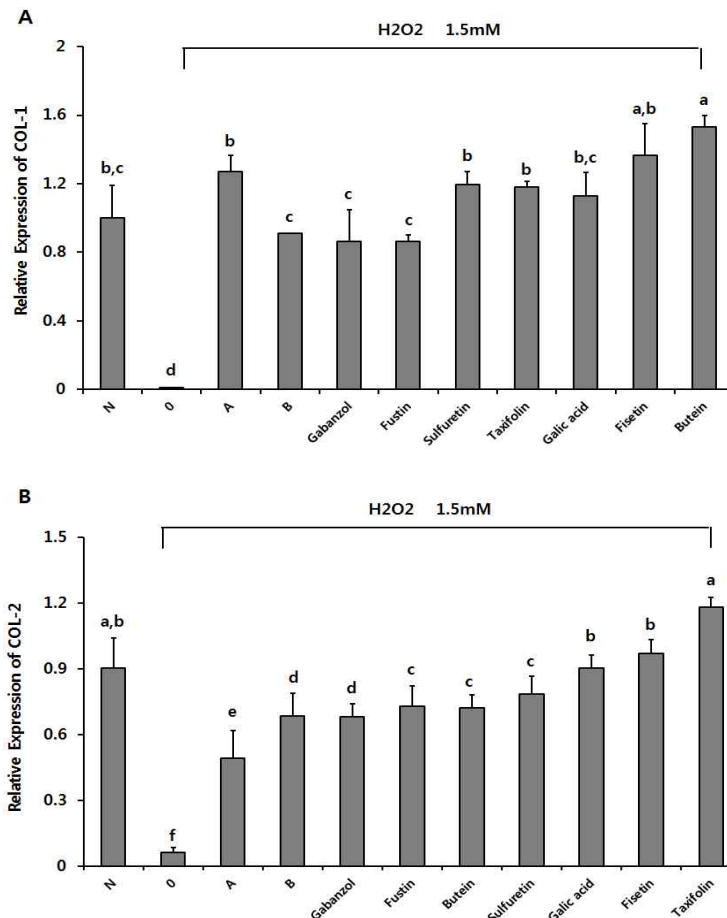
그림 158. Inhibitory effect of extracts on PGE_2 expression.

Data are means \pm SD. Statistical differences were determined by Student's t-test at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

⑤ 연골세포 조직의 동화작용 및 이화작용에 관여하는 인자의 측정

연골세포 조직의 생리학적 물리학적 작용을 유지시키는 것은 조직의 동화작용(anabolism)과 이화작용(catabolism)의 균형에 의한 것으로 인식된다. 동화작용에 관여하는 것으로는 collagens, 금속단백분해효소 조직억제(tissue inhibitors of metalloprotenases, TIMPs), aggrecan을 포함하는 proteoglycan 등이 해당되는 반면 이화작용에는 금속단백분해효소(metalloproteinase; MMP), nitric oxide(NO), TNF-a, collagenase, aggrecanase 등이 해당된다(12,13).

본 실험에서 동화작용 인자로서 확인한 collagen type I은 연골세포 뿐만 아니라 일반적으로 인체 세포에서 가장 많이 분포하고 있는 형태이며 collagen type II는 연골조직 단백질의 50%를 차지하고 있으며 연골에 분포하고 있는 collagen 종류 중 약 85-90%를 차지하고 있는 단백질이다. 따라서 collagen type I과 II의 형성은 연골조직의 상태를 결정하는 중요한 인자가 되고 있다. 본 실험에서 연골조직세포에 대한 H₂O₂ 1.5mM의 처리는 유의적인 collagen type I 과 II, 그리고 collagen type X 유전자의 발현을 감소시킨 것으로 확인되었다. 앞선 실험 결과에 따라 옷나무 추출물 지표성분의 농도는 모두 80 μM으로 하여 유전자발현 실험을 진행하였으며, 그 결과 9가지 지표성분 모두에서 농도증가에 따라 유의적으로 collagen 발현이 증가한 것을 관찰 할 수 있었다(그림 159).



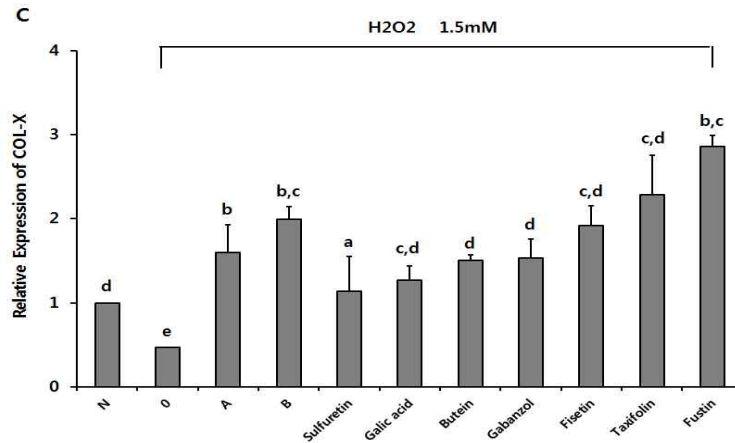


그림 159. Genetic expression of anabolic factors in primary cultured cells.

A; Collagen type 1, B; Collagen type 2, C; Collagen type X.

Data are means±SD. Significant differences were determined by one-way ANOVA test at $p < 0.05$.

Aggrecan은 연골조직에서 대표적으로 합성되는 proteoglycan core protein의 하나로서 주로 관절에서 외부의 압력(compressive load)으로부터 저항성을 나타내어 관절을 유지시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 H_2O_2 를 처리한 후 9가지 지표성분을 처리하여 aggrecan 유전자의 발현을 측정된 결과 1.5 mM H_2O_2 만 처리한 세포에 비하여 선정된 자원을 처리한 세포에서 aggrecan 유전자 발현이 증가하였으며, 특히 Taxifolin, Fisetin, 그리고 Fustin을 처리한 연골세포에서 유의적으로 증가한 것으로 나타나 관절의 염증에 효과가 있을 것으로 생각된다(그림 160).

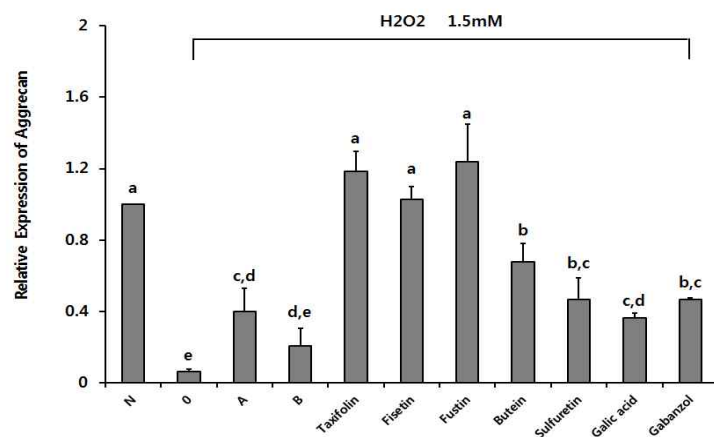


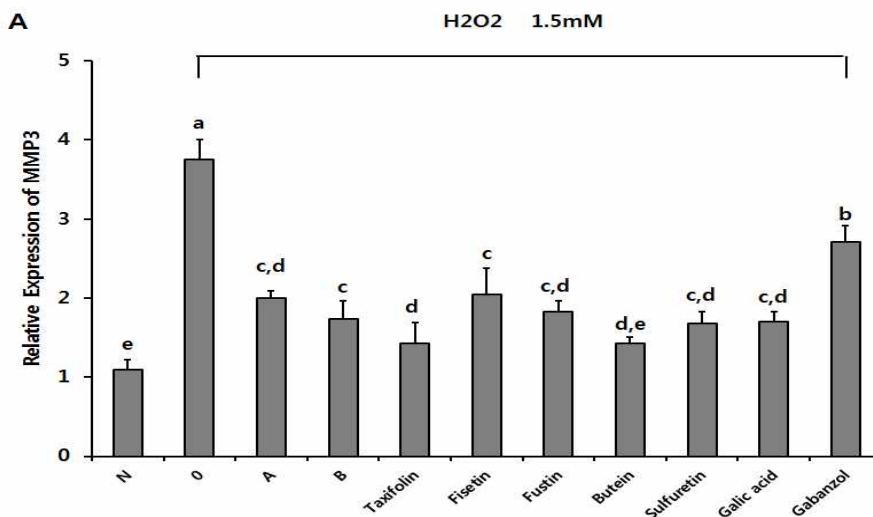
그림 160. Genetic expression of Aggrecan in primary cultured cells.

Data are means±SD. Significant differences were determined by one-way ANOVA test at $p < 0.05$.

퇴행성관절염의 발생에 있어서 단백질 가수분해 효소(proteolytic enzymes)는 연골질의 퇴화에 가장 핵심적인 역할을 하며 그 중 가장 대표적인 것이 금속단백분해효소(metalloproteinase;

MMP)이다. MMP-3(Stromelysin)은 proteoglycan의 퇴화에 결정적인 역할을 하는 금속단백분해효소이며 관절강 내 MMP-3 level의 증가는 심각한 연골손상과도 연관 지을 수 있다(14). 금속단백분해효소의 활성은 촉진제(activator)와 억제제(inhibitor)에 의해 조절되는데, 금속단백분해효소의 억제에 관여하는 것이 TIMPs(tissue inhibitors of metalloproteinases)로 TIMPs는 관절의 연골세포에서 분비된다. 정상적인 기능의 연골세포는 metalloproteinases와 inhibitor인 TIMPs가 균형을 이루면서 기능을 한다. 단백질 가수분해 효소인 Aggrecanase 역시 proteoglycan을 분해하는 효소로서 관절강(synovial fluids)에서 확인할 수 있다. 먼저 MMP-3와 MMP-7 발현 측정결과 전반적으로 H₂O₂의 처리는 MMP-3와 MMP-7의 발현을 정상세포군에 비해 70%까지 증가시켰고, 이에 비해 9가지 율나무 추출물 지표성분을 처리한 세포에서 유의적으로 MMP-3와 MMP-7의 발현이 감소한 것을 확인하였다(그림 161A, 161B).

또한 TIMP-1의 유전자 발현을 측정한 결과, H₂O₂의 처리에 의해 TIMP-1의 발현이 정상세포군에 비해 약 95%까지 감소한 것으로 확인되었다. MMPs 측정 결과와 마찬가지로, 9가지 율나무 추출물 지표성분을 처리한 모든 세포에서 유의적으로 TIMP-1의 발현이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 Taxifolin을 처리한 세포에서 정상세포보다 더 많은 TIMP-1이 발현되었음을 확인하였다(그림 9C). 이러한 결과는 율나무 추출물이 MMPs의 유전자 발현을 억제하고, TIMPs의 유전자 발현조절 함으로써 연골세포조직의 파괴를 억제하고 연골세포를 보호하는 효과가 있을 것으로 생각되어지며, 율나무 추출물에서 관절염에 효과가 있는 생리활성 물질을 분리할 때 근거자료가 될 것으로 기대된다.



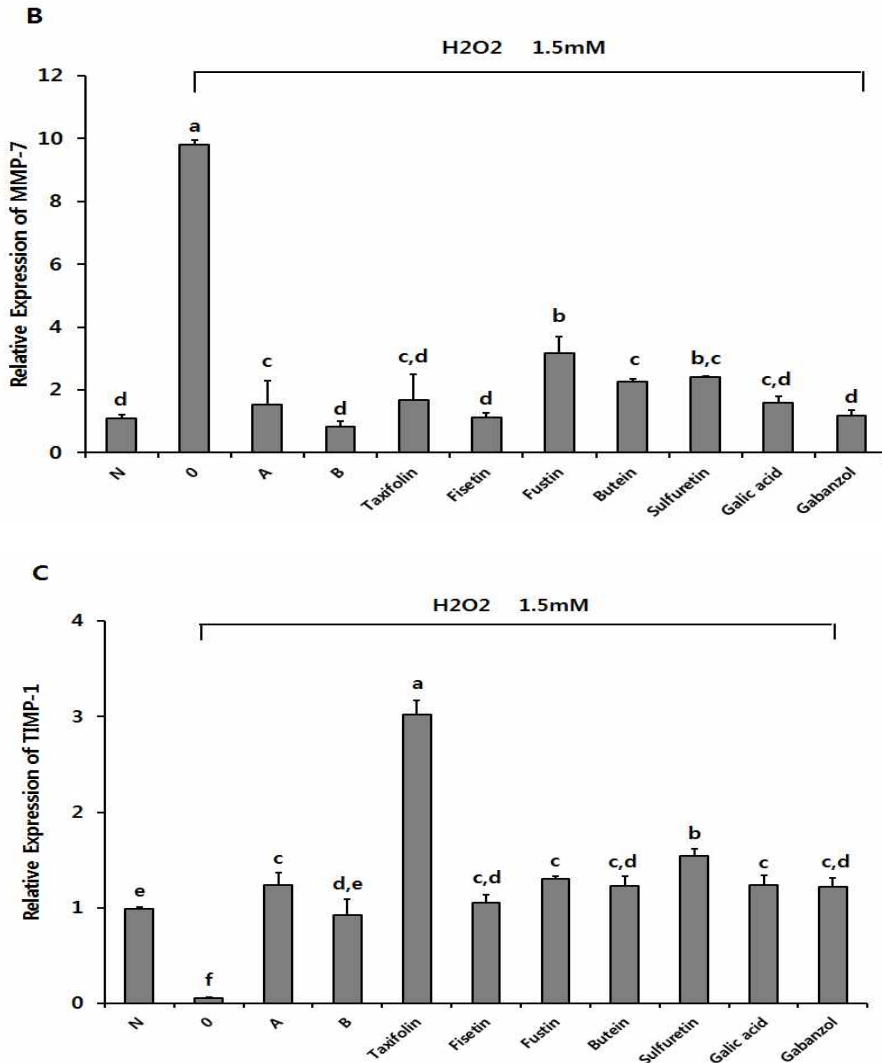


그림 161. Genetic expression of anabolic factors in primary cultured cells.

A; MMP-3, B; MMP-7, C; TIMP-1.

Data are means±SD. Significant differences were determined by one-way ANOVA test at $p < 0.05$.

⑥ Osteoclast-like cell 형성에 미치는 옷나무 추출물 효능물질의 영향 평가

Osteoclast(또는 파골세포)는 다수의 핵을 가진 세포로 골조직의 파괴, 흡수에 관여하며, 골다공증 발생 시 그 발현이 증가하여 골조직의 손실을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 파골세포 형성을 측정하므로써 옷나무 추출물 효능물질의 영향을 평가하였다. 파골세포의 분화정도는 osteoblastic cell 과 bone marrow co-culture 한 세포에서 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{vitaminD}_3$ 로 자극하였으며, TRAP(+)을 이용한 다핵세포 형성 정도 측정을 통해 결과를 얻었다. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{vitaminD}_3$ 를 처리하지 않은 세포에서는 Osteoclast-like cell의 형성이 나타나지 않았지만, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{vitaminD}_3$ 처리 세포에서 분화된 osteoclast-like cell이 $96 \pm 6.56 \text{ cells/cm}^2$ 만큼 증가하였다. 옷나무 추출물 효능물질을 처리한 세포에서 osteoclast-like cell 의 감소가 나타났으며,

특히 Sulfuretin, Taxifolin, Fustin을 처리한 세포에서 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{vitaminD}_3$ 를 처리한 세포에서 보다 각각 59.8%, 51.9%, 55.7%으로 크게 감소한 것으로 확인되었다(그림 162). 이러한 결과는 옷나무 추출물 효능물질에서 Osteoclast-like cell의 형성을 억제하는 기능이 나타난 것으로 생각되며, 골다공증에 효과가 있는 물질로 추후 상품개발의 근거자료가 될 것으로 기대된다.

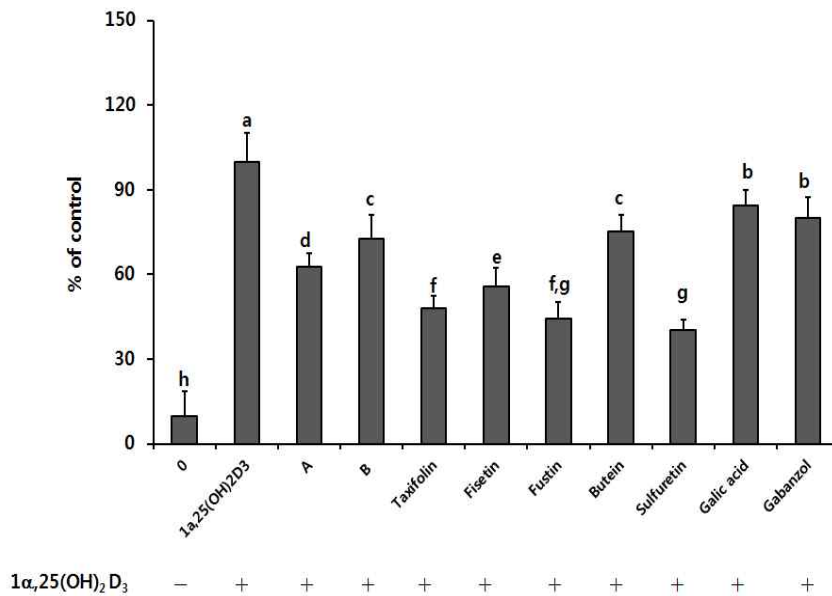


그림 162. Effects of RV on osteoclast-like cell formation in co-culture.

The level of columns indicate osteoclast-like cell formation.

Data are means±SD. Significant differences were determined by one-way ANOVA test at $p < 0.05$.

⑦ 파골세포 생성과정에서 RANKL 발현에 미치는 옷나무 추출물 효능물질의 영향 평가

RANKL 발현은 osteoblastic cell 과 bone marrow co-culture 세포에서 anti-RANKL antibody를 이용하여 측정하였다. RANKL은 osteoclast differentiation factor로 파골세포 분화시에 함께 증가하는 것으로 알려져 있다. 실험결과, 옷나무 추출물 효능물질이 osteoclast-like cell의 형성을 억제하였으며 이와 비슷한 양상으로 RANKL 발현 또한 감소 하는 것을 확인했다. 아무것도 처리하지 않은 세포 (29.1pg/ml) 에 비해 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{vitaminD}_3$ 처리한 세포 (184.3pg/ml)에서 RANKL 발현이 6배 이상 증가하였으며, 옷나무 추출물 효능물질 가운데 Sulfuretin, Fisetin, Fustin에서 각각 88.7, 94.1, 82.6pg/ml 수준으로 감소하여 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다(그림 163).

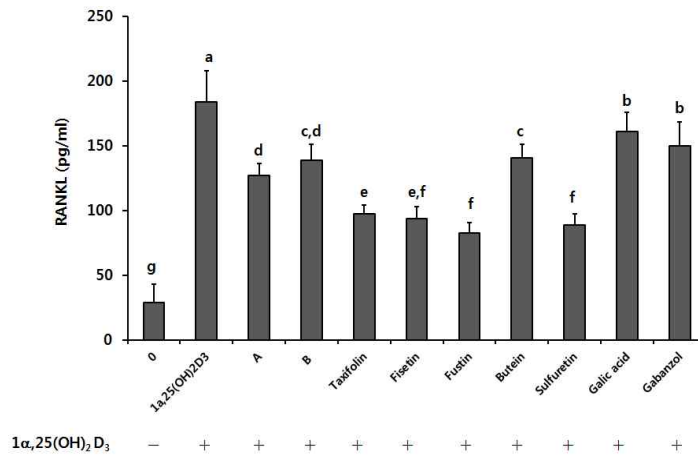


그림 163. Effects of RV on RANKL expression in co-culture.

The level of columns indicate RANKL expression.

Data are means±SD. Significant differences were determined by one-way ANOVA test at p<0.05.

⑧ 옷나무 추출물 효능물질이 MC3T3-E1 세포에서 osteoblast (조골세포) mineralization에 미치는 효능 평가

10mM glycerol 2-phosphate (G2P), 50mg/ml ascorbic acid를 처리한 MC3T3-E1 세포의 mineralization에 대한 옷나무 추출물 효능물질의 효능을 평가한 결과, G2P와 ascorbic acid만 처리했을 때 보다 효능물질을 함께 처리했을 때 mineralization level이 증가하는 것으로 나타났다. 실험 결과, 9가지 효능물질에서 모두 유의적으로 수치가 증가했으며, 특히 Sulfuretin, Fisetin, Fustin에서 mineralization level이 3배 이상 증가한 것으로 나타났다(그림 164).

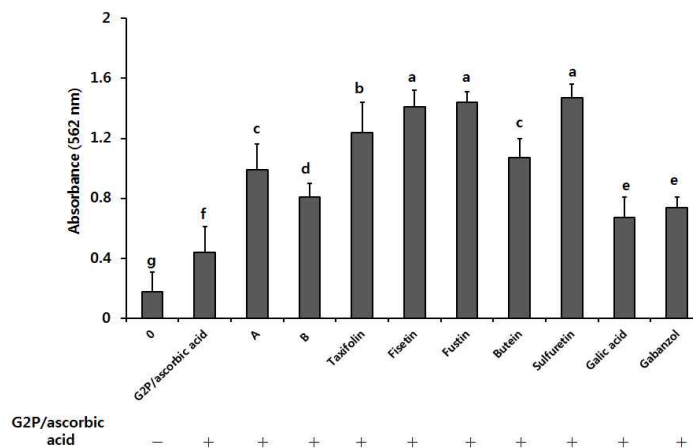


그림 164. Effects of RV on mineralization of MC3T3-E1 cells.

MC3T3-E1 cells were incubated with glycerol 2-phosphate and ascorbic acid for 21 days. The level of calcium deposition was evaluated by Alizarin red S staining. The stain was eluted by ceptylpyridinium chloride and quantified by colorimetric measurement.

Data are means±SD. Significant differences were determined by one-way ANOVA test at p<0.05.

이상의 세가지 실험결과를 통해 윗나무 추출물 효능물질이 골다공증에서 효과적으로 작용 하는 것을 확인했으며, 효능물질 가운데 특히 Sulfuretin, Fisetin, Fustin의 세가지 물질에서 효과가 가장 좋았다. Sulfuretin의 경우 기존에 보고된 논문과 연구 결과에서 윗나무의 효능물질로 골관련 질환에서 효과가 나타나는 것으로 알려져 있으며(16,17), 이번 실험결과를 통해서 직접 확인하였다. 이러한 실험결과를 바탕으로 향후 윗나무 건강기능식품개발 사업에 이용할 수 있을 것으로 생각되어 진다.

다. 결론

본 실험은 윗나무 수추출물에서 분리된 지표성분을 통해 연골세포사멸 억제에 대한 *in vitro* 효능평가를 수행한 것으로 향후 관절염에 효과가 있는 기능성식품 개발에 기초자료로 활용하고자 하였다.

우선적으로 H₂O₂를 이용하여 연골세포 손상을 유도하였다. 윗나무 추출물의 지표성분의 최적농도는 실험결과 80 μ M로 나타났으며 (data not shown) 이러한 기존의 실험결과를 바탕으로 윗나무 추출물의 지표성분 80 μ M 처리하여 H₂O₂ 산화적 독성에 대한 세포사멸 억제효과를 관찰하였다. 실험 결과, 아무것도 처리하지 않은 정상세포(N)에 비해 H₂O₂ 1.5mM만 처리한 세포(0)의 생존률이 53.3%로 산화적 독성이 나타난 것으로 관찰되었다. 윗나무 추출물의 지표성분을 처리한 세포 중에서는 Taxifolin 82.5%, Fisetin 97.8%, Fustin 88.9%, Butein 90%, sulfuretin 90%의 세포생존률이 나타나, H₂O₂ 1.5mM만 처리한 세포(0)와 비교하여 세포 생존률이 유의적으로 증가하였다. Galic acid, Gabanzol, A, B 물질을 처리한 세포에서도 세포의 생존률이 증가했지만 유의적인 차이는 없었다.

Cytokine은 세포에서 분비되는 수용성 단백질로 특정 신호물질에 의해 발현되며 효소와는 구별되게 주변 세포에 의해 영향을 받으며, 관절염에 있어서 Interleukin(IL)-1, tumor necrosis factor(TNF)- α , IL-6은 연골세포조직의 이화작용에 영향을 주는 사이토카인으로 알려져 있다. 대부분의 염증반응은 Cox-2, inducible nitric oxide(iNOS)와 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 염증유발 사이토카인이 관련된 것으로 알려져 있다. 또한 골관절염의 경우 관절강 내에서 대식세포 등에 의한 일련의 염증반응으로 TNF- α 와 Cox-2등이 과다 생성되는 것으로도 알려져 있다. 먼저 TNF- α 생성 억제효과를 확인한 결과 정상세포(N)에 비하여 LPS 50 μ g/ml를 처리하여 염증을 유발한 세포에서 TNF- α 의 발현이 3배이상 증가한 것으로 나타났으며, 윗나무 추출물의 지표성분을 처리한 세포에서는 9가지 지표성분 모두 LPS만 처리한 세포에 비해 유의적으로 TNF- α 의 발현이 낮아진 것을 확인 할 수 있었다. 특히 Fustin, Fisetin 과 Butein의 경우 정상세포와 비슷한 수준으로 관찰되었다. IL-6 발현에서도 마찬가지로 정상세포(N)에 비해 LPS 50 μ g/ml를 처리하여 염증을 유발한 세포에서 IL-6 발현이 4배 이상 증가하였으며, 윗나무 추출물

지표성분을 처리한 모든 세포에서 유의적인 발현차이를 나타낸 것으로 나타났다. Cytokine의 발현에 윗나무 추출물 지표성분이 미치는 영향을 관찰 한 결과 염증 발현시 나타나는 두 가지 cytokine (TNF- α , IL-6)의 생성을 억제하는 것으로 나타났으며, 추가 실험을 통하여 기전검증을 진행하였다.

NO는 퇴행성관절염의 발생에 있어서 관절의 혈관 확장과 침투성을 증가시켜서 백혈구로부터의 발현된 TNF- α 와 IL-6가 관절에 침투하는 것을 증가시키며 연골세포의 apoptosis (programmed cell death)을 유도하기도 한다. 본 실험에서는 Butein, Fisetin, 그리고 Fustin에서 유의적으로 NO 생성억제 효과가 나타났으며 Galic acid에서는 LPS만 처리한 세포와 NO 생성 정도 차이가 나타나지 않았다. 또한 Prostaglandin E₂(PGE₂) 생성을 촉진하여 염증을 유발시키는 Cox 효소는 Cox-1과 Cox-2의 두가지 형태가 존재한다. Cox-1은 지속적으로 일정량 생성되어 여러종류의 prostaglandin의 합성에 관여하여 혈장의 항상성, 위액분비, 혈소판응고 등에 관여하는 반면 Cox-2의 경우는 TNF- α 와 LPS 등의 외부 인자에 의해 일시적으로 유도되어 생성되어 염증에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 연골조직세포에 4가지 추출물 처리 후 LPS를 처리한 결과 A, B, Gabanzol, Butein 및 Taxifolin에서 PGE₂ 발현이 유의적인 감소를 보인 것으로 확인되었다. Fisetin, Sulfuretin 및 Fustin을 처리한 세포에서도 PGE₂ 발현이 감소하였으나 유의적인 차이가 나타나지는 않았다.

연골세포 조직의 생리학적 물리학적 작용을 유지시키는 것은 조직의 동화작용(anabolism)과 이화작용(catabolism)의 균형에 의한 것으로 인식된다. 동화작용에 관여하는 것으로는 collagens, 금속단백분해효소 조직억제(tissue inhibitors of metalloprotenases, TIMPs), aggrecan을 포함하는 proteoglycan 등이 해당되는 반면 이화작용에는 금속단백분해효소(metalloproteinase; MMP), nitric oxide(NO), TNF-a, collagenase, aggrecanase 등이 해당된다.

본 실험에서 동화작용 인자로서 확인한 collagen type I은 연골세포 뿐만 아니라 일반적으로 인체 세포에서 가장 많이 분포하고 있는 형태이며 collagen type II는 연골조직 단백질의 50%를 차지하고 있으며 연골에 분포하고 있는 collagen 종류 중 약 85-90%를 차지하고 있는 단백질이다. 따라서 collagen type I과 II의 형성은 연골조직의 상태를 결정하는 중요한 인자가 되고 있다. 앞선 실험 결과에 따라 윗나무 추출물 지표성분의 농도는 모두 80 μ M으로 하여 유전자 발현 실험을 진행하였으며, 그 결과 9가지 지표성분 모두에서 농도증가에 따라 유의적으로 collagen 발현이 증가한 것을 관찰 할 수 있었다. Aggrecan은 연골조직에서 대표적으로 합성되는 proteoglycan core protein의 하나로서 주로 관절에서 외부의 압력(compressive load)으로부터 저항성을 나타내어 관절을 유지시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. Aggrecan 유전자의 발현을 측정된 결과 특히 Taxifolin, Fisetin, 그리고 Fustin을 처리한 연골세포에서 유의적으로 발현이 증가한 것으로 나타나 관절의 염증에 효과가 있을 것으로 생각된다.

퇴행성관절염의 발생에 있어서 단백질 가수분해 효소(proteolytic enzymes)는 연골질의 퇴화에 가장 핵심적인 역할을 하며 그 중 가장 대표적인 것이 금속단백분해효소(metalloproteinase; MMP)이다. MMP-3(Stromelysin)은 proteoglycan의 퇴화에 결정적인 역할을 하는 금속단백분해효소이며 관절강 내 MMP-3 level의 증가는 심각한 연골손상과도 연관 지을 수 있다(15). 금속단백분해효소의 활성은 촉진제(activator)와 억제제(inhibitor)에 의해 조절되는데, 금속단백분해효소의 억제에 관여하는 것이 TIMPs(tissue inhibitors of metalloproteinases)로 TIMPs는 관절의 연골세포에서 분비된다. 정상적인 기능의 연골세포는 metalloproteinases와 inhibitor인 TIMPs가 균형을 이루면서 기능을 한다. 단백질 가수분해 효소인 Aggrecanase 역시 proteoglycan을 분해하는 효소로서 관절강(synovial fluids)에서 확인할 수 있다. 먼저 MMP-3와 MMP-7 발현 측정결과 전반적으로 H₂O₂의 처리는 MMP-3와 MMP-7의 발현을 정상세포군에 비해 70%까지 증가시켰고, 이에 비해 9가지 율나무 추출물 지표성분을 처리한 세포에서 유의적으로 MMP-3와 MMP-7의 발현이 감소하였다.

또한 TIMP-1의 유전자 발현을 측정한 결과, 9가지 율나무 추출물 지표성분을 처리한 모든 세포에서 유의적으로 TIMP-1의 발현이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 Taxifolin을 처리한 세포에서 정상세포보다 더 많은 TIMP-1이 발현되었다. 이상에 따라 율나무 성분에서 확인된 관절염 개선 효능물질을 이용한 기전 연구 결과, 율나무 추출물에서 확인된 지표성분들이 MMPs의 유전자 발현을 억제하고, TIMPs의 유전자 발현조절 함으로써 연골세포조직의 파괴를 억제하고 연골세포를 보호하는 효과가 있을 것으로 생각되어지며, 율나무 추출물에서 관절염에 효과가 있는 생리활성 물질을 분리할 때 근거자료가 될 것으로 기대된다. 또한 율나무에서 확인된 지표성분들의 효능을 확인함에 따라, 1-2차년도에 시행되었던 율나무 추출물의 생리활성 평가 연구 (*in vitro*, *in vivo*)의 타당성이 증명되었다.

또한 이번 연구에서는 율나무 추출물 효능물질이 골다공증에 어떠한 영향을 미치는지에 관한 실험을 진행하였다. Osteoclast-like cell 형성능, RANKL 발현 및 osteoblast (조골세포) mineralization 정도를 각각 평가하였다. 먼저 osteoclast (또는 파골세포)는 다수의 핵을 가진 세포로 골조직의 파괴, 흡수에 관여하며, 골다공증 발생 시 그 발현이 증가하여 골조직의 손실을 일으키는 것으로 알려져 있다. osteoblastic cell 과 bone marrow co-culture 한 세포에서 1 α ,25(OH)₂vitaminD₃를 처리하지 않은 세포에서는 Osteoclast-like cell의 형성이 나타나지 않았지만, 1 α ,25(OH)₂vitaminD₃ 처리 세포에서 분화된 osteoclast-like cell이 96 \pm 6.56 cells/cm² 만큼 증가하였다. 율나무 추출물 효능물질을 처리한 세포에서 osteoclast-like cell의 감소가 나타났으며, 특히 Sulfuretin, Taxifolin, Fustin을 처리한 세포에서 1 α ,25(OH)₂vitaminD₃를 처리한 세포에서 보다 각각 59.8%, 51.9%, 55.7%으로 크게 감소한 것으로 확인되었다. RANKL 발현은 osteoblastic cell 과 bone marrow co-culture 세포에서 anti-RANKL antibody를 이용하여 측정하

였다. RANKL은 osteoclast differentiation factor로 파골세포 분화시에 함께 증가하는 것으로 알려져 있다. 실험결과, 옷나무 추출물 효능물질이 osteoclast-like cell의 형성을 억제하였으며 이와 비슷한 양상으로 RANKL 발현 또한 감소 하는 것을 확인했다. 아무것도 처리하지 않은 세포 (29.1 pg/ml) 에 비해 1 α ,25(OH) $_2$ vitaminD $_3$ 처리한 세포 (184.3 pg/ml) 에서 RANKL 발현이 6 배 이상 증가하였으며, 옷나무 추출물 효능물질 가운데 Sulfuretin, Fisetin, Fustin에서 각각 88.7, 94.1, 82.6 pg/ml 수준으로 감소하여 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다.

마지막으로 osteoblast (조골세포) mineralization에 미치는 효능 평가 결과, G2P와 ascorbic acid만 처리했을 때 보다 효능물질을 함께 처리했을 때 mineralization level이 증가하는 것으로 나타났다. 9가지 효능물질에서 모두 유의적으로 증가했으며, 특히 Sulfuretin, Fisetin, Fustin에서 mineralization level이 3배 이상 증가한 것으로 나타났다.

이상의 세가지 실험결과를 통해 옷나무 추출물 효능물질이 골다공증에서 효과적으로 작용하는 것을 확인했으며, 효능물질 가운데 특히 Sulfuretin, Fisetin, Fustin의 세가지 물질에서 효과가 가장 좋았다. Sulfuretin의 경우 기존에 보고된 논문과 연구 결과에서 옷나무의 효능물질로 골관련 질환에서 효과가 나타나는 것으로 알려져 있으며(16,17), 이번 연구를 통해서 이와 같은 효과를 확인하였다. 이러한 결과는 옷나무 추출물 효능물질이 골다공증에 효과적인 작용을 하는 것으로 생각되며, 추후 골관련 질환 건강기능성 상품개발의 근거자료가 될 것으로 기대된다.

2. 옷 추출물을 이용한 탈모방지

가. In vitro 에서의 모발 관련 세포 증식 활성 평가

(1) 옷나무의 HHDPC(Human Hair Dermal Papilla Cell) 및 HaCaT(Human Keratinocyte) 를 이용한 모발 형성 능력 확인.

인간 모유두세포 (HHDPC), 각질형성세포 (HaCaT)를 사용하여 옷나무추출물 시료에 의한 Cell Proliferation 증가율을 확인하였다.(그림 165) 옷나무추출물에 대한 모유두 세포(HHDPC)와 각질 형성 세포(HaCaT)의 증식률을 MTT assay를 통하여 세포 활성도를 나타낸 것이다.

옷나무추출물 시료의 농도는 0.01, 0.1, 1, 10ppm 을 사용하여 MTT assay를 통해 cell proliferation을 측정한 결과, control과 비교하였을 때, 옷나무추출물 시료 처리에 의한 HHDPC 증식률은 33% HaCaT 증식률은 28% 증가한 것을 확인하였다.

또한, 발모제로 알려진 Minoxidil 및 Finasteride와 모발 관련 세포 증식 효능과 비교하여도 옷나무추출물의 증식률이 20% 이상 증식률이 증가함을 알 수 있다.

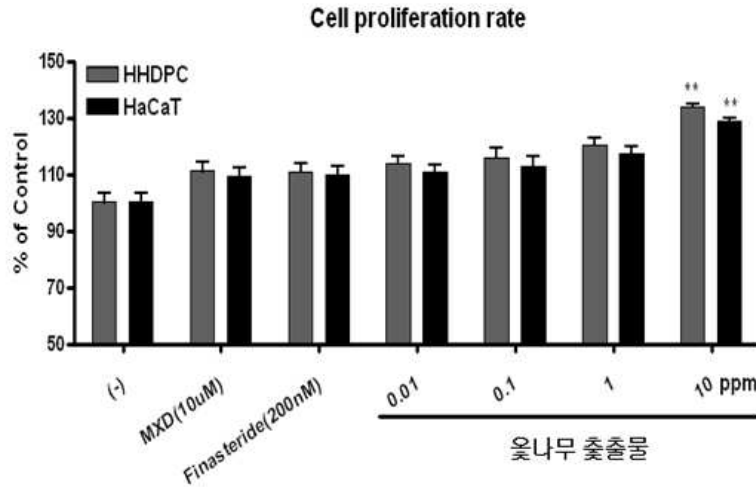


그림 165. cell proliferation

(2) Raw 264.7 cell을 통한 NO 생성 억제 확인

Murine macrophage Raw 264.7을 이용하여, 옻나무추출물과 염증 반응을 유도하는 LPS를 처리하여, 생성되는 염증 산물 중의 하나인, NO의 생성량을 확인하였다. 자극에 의하여 과량 생성된 NO는 염증성 질환을 초래하는 것으로 알려져 있다. LPS를 처리하여 생성된 NO의 양은 Griess reagent를 이용하여 측정하였고, 옻나무추출물 시료를 동시 처리하여 NO 생성이 억제되는지 확인하였다(그림 166).

그림 166에서 보는 바와 같이 옻나무추출물의 경우 음성대조군인 LPS 처리군에 비하여 65% NO생성을 억제하였고, 양성대조군인 항염작용 약품으로 사용되고 있는 dexamethasone과 비교하여도 37%의 NO생성 억제 효능을 보였다.

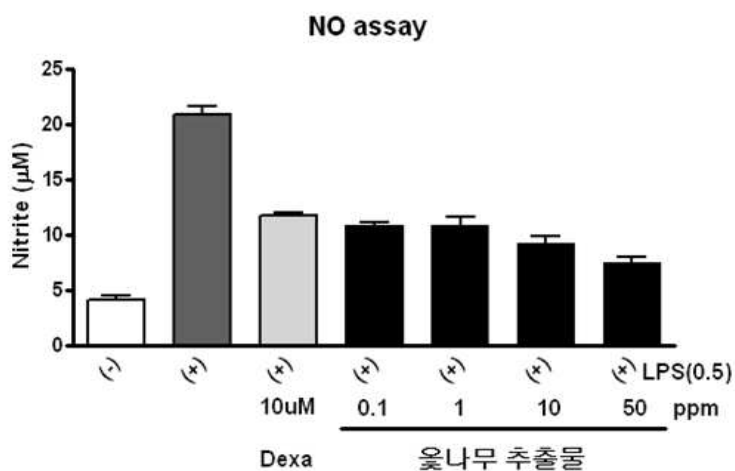


그림 166. NO

(3) 옻나무 추출물의 모발관련 세포 증식 효능 확인

인간 모유두세포 (HHDPc)T를 사용하여 옻나무 추출물에 의한 Cell Proliferation 증가율을

확인하였다(그림 167) 옷나무 추출물에 대한 모유두 세포(HHDPC)의 증식률을 MTT assay를 통하여 세포 활성도를 나타내었다.

옷나무 추출물 시료의 농도는 0.01, 0.1, 1 μ g/ml 을 사용하여 MTT assay를 통해 cell proliferation을 측정한 결과, control과 비교하였을 때, 옷나무 추출물 시료 처리에 의한 HHDPC 증식률은 30% 증가하였고, 모유두 세포의 세포사멸을 유도하는 DHT(Dehydrotestosterone)을 함께 처리하였을 때에는 DHT 만을 처리한 경우에는 DHT를 처리하지 않은 대조군에 비하여 50% 이상 세포사멸이 일어난 것을 확인하였지만, 옷나무 추출물을 처리한 경우에는 대조군에 비하여 약 10% 정도의 세포사멸 많을 일으켜 DHT를 동시에 처리하였음에도 불구하고, 세포 사멸을 방지하는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 발모제로 알려진 Minoxidil 및 Finasteride와 모발 관련 세포 증식 효능과 비교하여도 옷나무 추출물의 세포 증식률이 10%~40% 이상 증식률이 증가함을 알 수 있다.

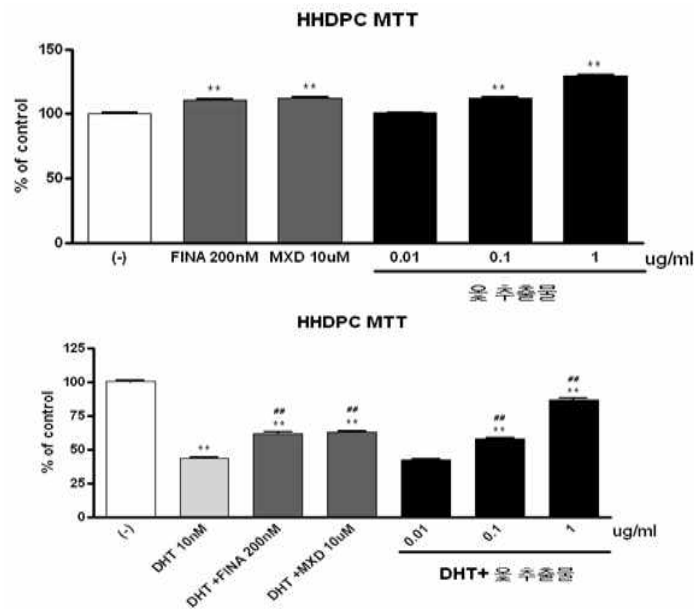


그림 167. 인간 모유두세포에서 옷나무 추출물의 세포 증식률

나. 옷나무추출물의 발모촉진 효과 구명 (*in vivo*)

본 실험에 적용하는 C57BL/6 마우스 탈모모델은 탈모와 관계된 각종 연구와 실험에 제일 일반적으로 적용되는 모델이다. 7주령 마우스의 등쪽 털에 wax-rosin 혼합물을 바른 후 잡아 당겨서 털을 제거하면 동시에 모발이 성장기로 유도되며 이때 적절한 약물을 처리하면 성장기모발이 더욱 잘 자라는지 (모발성장 증가; raising proliferation rates)확인할 수 있다.

일반적인 C57BL/6 마우스의 피부색 변화는 7일째 anagen 5기에 진입하면서 회색빛에서 검은색으로 바뀌기 시작하여 11일에서 14일째에는 anagen 6기로서 가장 활발하게 모발 성장이 진

행되는 시기이다. 옷나무추출물 도포 그룹 및 경구 투여 그룹의 경우(그림 168, 169), depilation 후 7일째 피부색은 회색빛으로 다른 그룹과 유사하게 모발주기가 진행되었지만, 9일째 짧은 털이 등을 덮으면서 음성대조군에 비하여 약 1-2일 정도의 모성장기 촉진 효과를 나타냈고 양성대조군인 minoxidil 그룹과도 비슷한 속도의 모성장기가 진행되었다. C57BL/6마우스의 피부색이 회색빛으로 변하는 건 휴지기에서 성장기로 돌아감을 뜻한다. 마우스의 모성장기를 약 1-2일 앞당겼다는 것은, 옷나무추출물 시료가 모성장기 촉진과 성장기 유지에 유의적인 효과가 있음을 알 수 있었다.

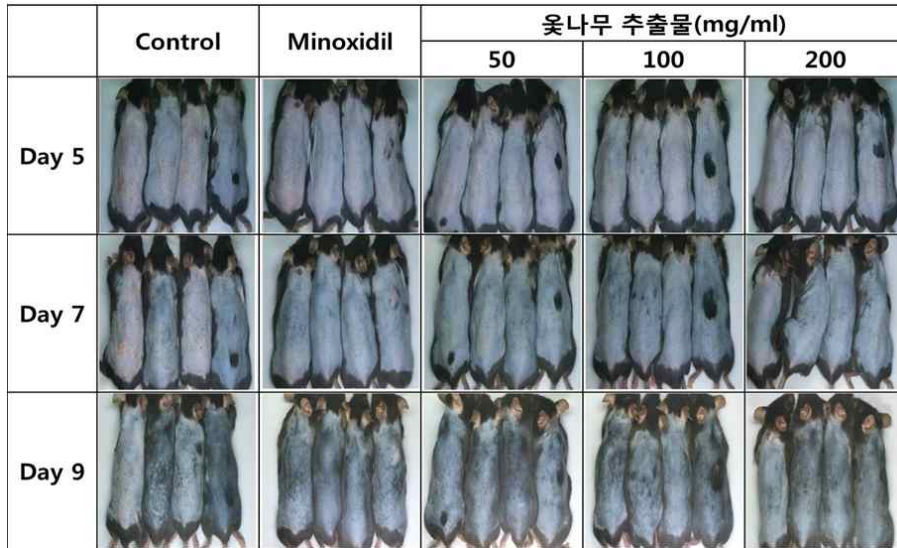


그림 168. 도포

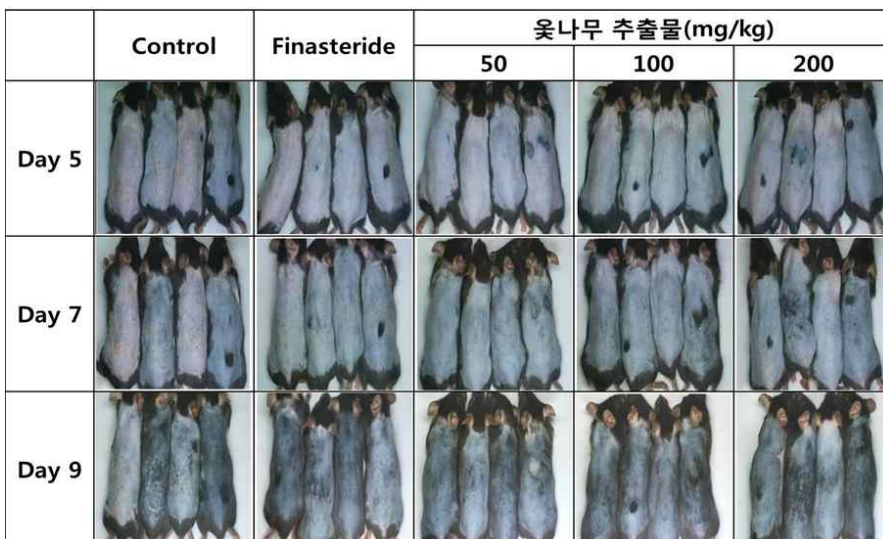


그림 169. 경구

또한 제모모델을 통한 성장기 유도 후, 옷나무추출물을 처리한 mouse피부의 접촉식 피부촬영장치(Aramo-MDS, aramhuvis)를 사용하여 모발의 밀도와 굵기의 변화를 확인하였다. 옷나무

추출물 시료의 도포와 경구투여에 의한 모발의 밀도 및 굵기의 변화를 확인한 결과, 대조군 및 양성대조군(Minoxidil 투여그룹)에 비하여 모발의 밀도 및 굵기가 모두 증가한 것을 확인함.(그림 170, 171)

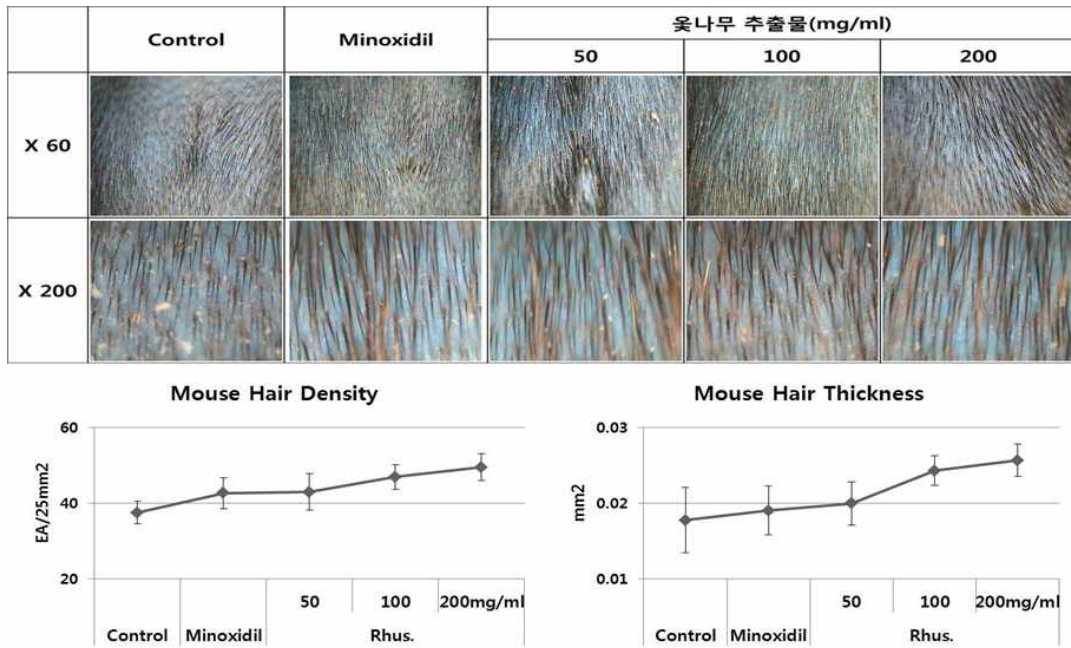


그림 170. 도포

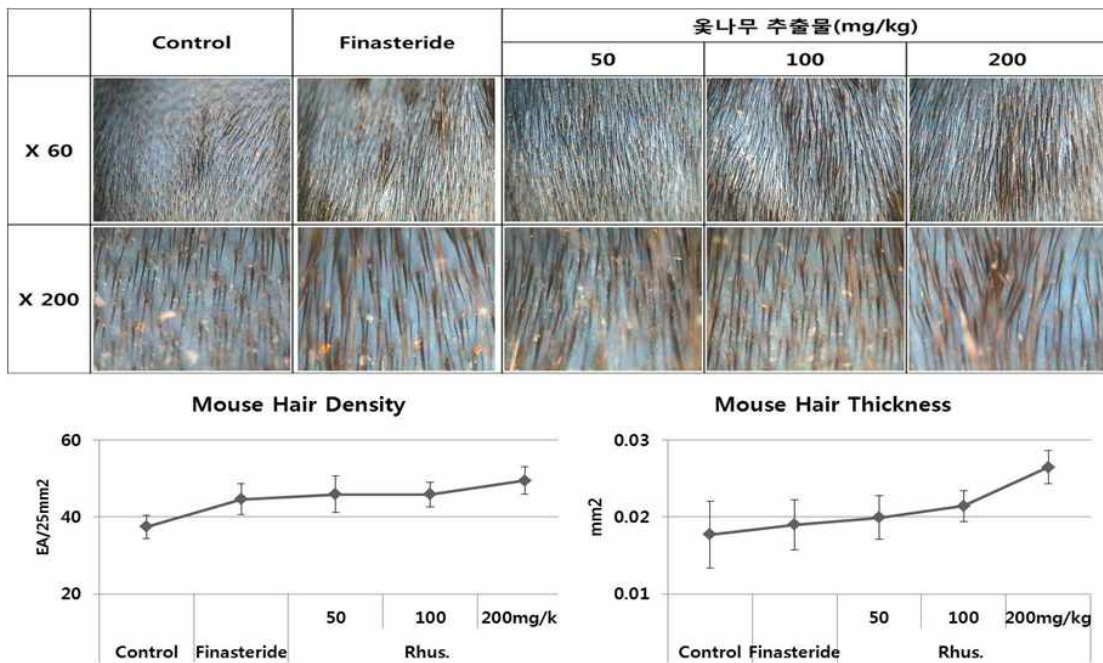


그림 171. 경구

(1) 육안적 관찰

췌나무 추출물을 경구투여한 그룹의 경우(그림 172, 173), 마우스의 털을 깎고 난 후 6주째 털이 잘 자라기 시작하여 8주째에는 대조군과 차이를 보일 정도로 모발의 성장한 모습을 확인

할 수 있다. 이러한 결과는 양성대조군인 finasteride 그룹과도 비슷한 속도의 모성장기가 진행된 것이라 판단 할 수 있다.

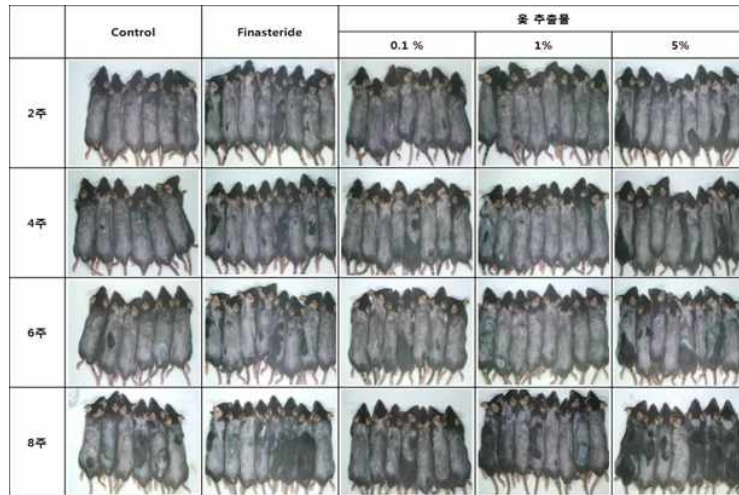


그림 172. C57BL/6 마우스에서 옷나무 추출물에 의한 모발 성장 변화의 육안적 관찰

(2) 조직학적 관찰

좀 더 객관적인 자료를 얻기 위하여 Hematoxylin & Eosin 염색으로 현미경 검사를 실시하였다. 피부 내 모낭(hair follicle)의 변화, 피부 두께 및 조직의 변화를 관찰하기 위하여, 8주째에 각 군의 마우스를 치사시킨 후, 등 쪽 피부의 발모된 부위의 조직을 채취하여 4% 포르말린 용액으로 고정하였다. 고정 후, 수세, 탈수과정을 거쳐 파라핀으로 포매하고, 7 μ m의 절편을 제작하여 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 시행하였다. 마우스의 조직 검사 시 옷나무 추출물이 대조군보다 모낭의 길이와 크기 및 수에서 큰 차이를 보였다. 음성대조군에 비하여 모낭의 길이가 길어져 성장기의 모낭 형태를 나타냈고, 모낭의 수와 bulb의 크기에서도 유의성 있는 증가를 보였다. 양성대조군에 비하여서도 모낭의 길이 및 굵기에서 유의성 있는 증가를 보였다. 이를 통해, 옷나무 추출물이 육안적 평가뿐만 아니라, 조직학적 변화에서도 휴지기의 모낭을 성장기의 모낭으로 유도하여 모성장기 촉진 효과에 효과적임을 알 수 있었다.

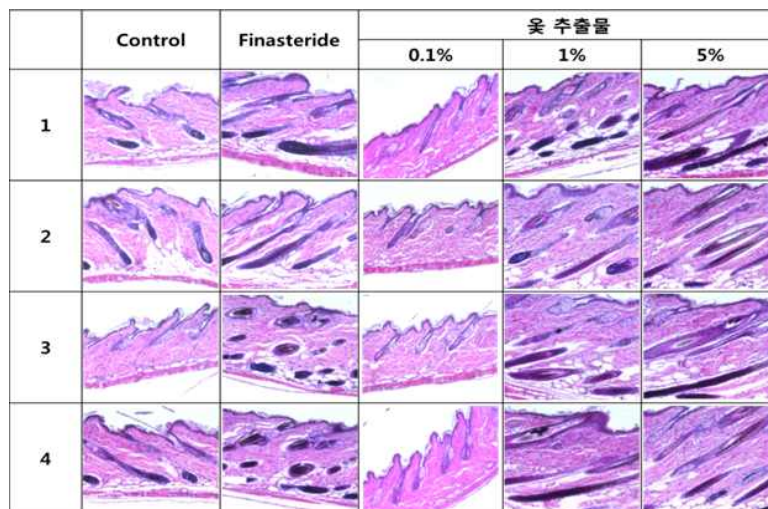


그림 173. C57BL/6 마우스에서 옷나무 추출물에 의한 모발 성장 변화의 조직학적 관찰

또한, 조직학적 관찰결과를 바탕으로 마우스 조직 내에서의 성장기모발과 휴지기 모발의 개수를 확인하여 성장기/휴지기 모발의 비율(Anagen/Telogen Ratio)을 측정하였다. 본 연구결과 율나무 추출물을 경구투여한 경우 Anagen/Telogen Ratio는 대조군에 비하여 6배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었다(표 120).

표 120. 마우스에서 조직내의 Anagen/Telogen Ratio 확인 결과

	Control	Finasteride	Rhus. Extracts(%)		
			0.1	1	5
Anagen Hair Count	7.45 ± 1.36	14.36 ± 1.91	14.45 ± 2.33	16.27 ± 1.90	16.18 ± 2.04
Telogen Hair Count	13.09 ± 1.7	5.72 ± 1.42	6.54 ± 1.86	6.81 ± 1.88	5.27 ± 1.84
Anagen/Telogen ratio	0.57 ± 0.10	2.62 ± 0.65	0.46 ± 0.16	2.61 ± 0.98	3.44 ± 1.20

다. 마우스 모델에서의 율나무 추출물의 모발성장 및 탈모방지 기전 확인

(가) 마우스 조직을 이용한 율나무 추출물의 모발성장 기전 확인

율나무 추출물을 경구투여 한 후, 마우스의 조직을 이용하여 모발의 성장을 유도하는 인자인 Sox-9 및 β -catenin 등의 발현을 western blot 및 immunofluorescence 등의 방법을 통하여 모발성장 효과 기전을 확인하였다. Western blot을 이용한 실험 결과, 율나무 추출물을 경구투여한 조직에서 Sox-9 및 β -catenin 단백질의 발현을 농도의존적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(그림 174).

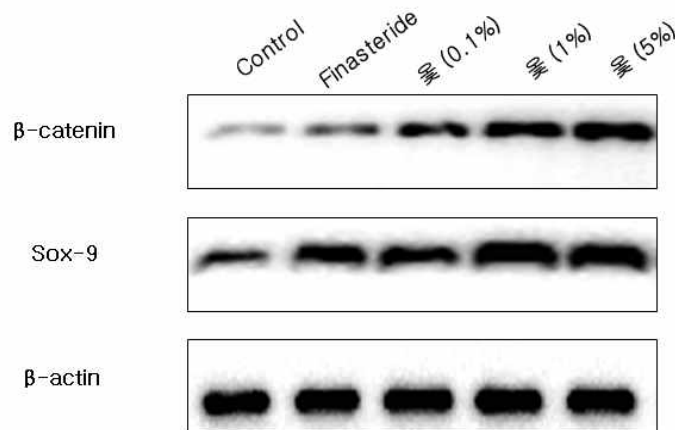


그림 174. 마우스 조직에서 율나무 추출물에 의한 모발 성장 인자의 발현량 확인

2-3절. 옷나무 유효성분의 순환기계 기능 개선 연구(2핵심 3세부)

1. 옷나무 추출물 및 활성 성분의 확보

본 연구에서 사용된 옷나무 추출물, 분리 분획 및 단일 성분 등은 제1핵심연구과제, 제2세부과제 연구 그룹으로부터 제공받음.

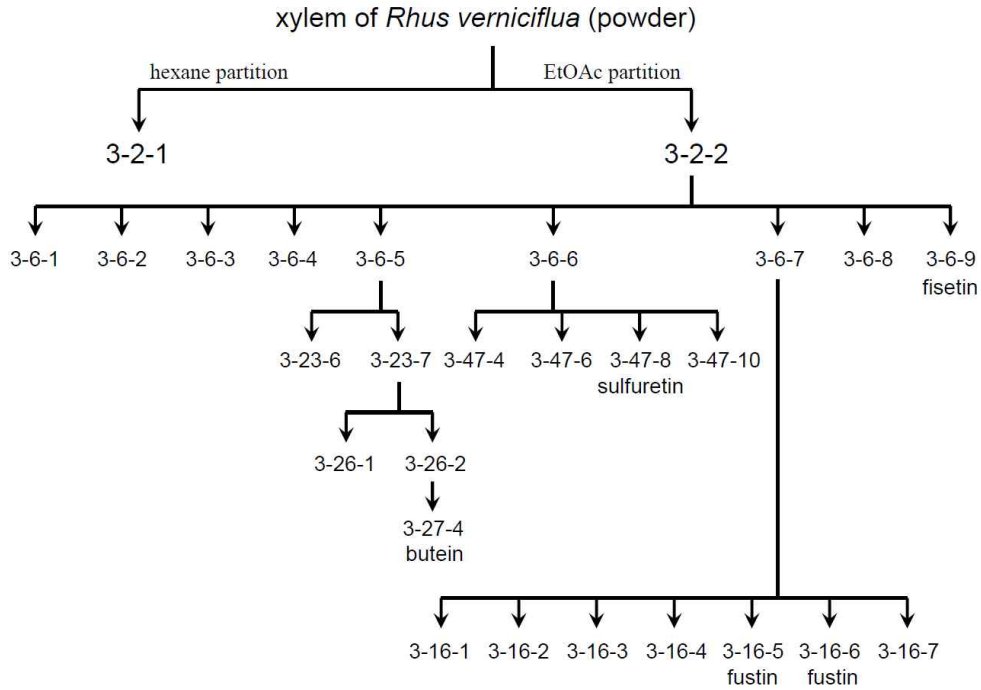


그림 175. Extraction and fractionation of active substances from *Rhus verniciflua* Stokes heartwood.

2. 실험 방법

가. 혈장 응고능 측정

(1) 혈장의 분리

Sprague-Dawley 랫드를 diethyl ether로 마취한 다음 개복하여 복대 동맥으로부터 혈액을 채취함. 항응고제로 3.2% sodium citrate(1:9)를 이용함. 전혈을 1,500g에서 10분간 원심분리함으로써 혈장을 분리하였으며, 혈장을 얻은 다음 30분 이내에 사용함.

(2) Prothrombin time (PT)과 activated partial thromboplastin time (aPTT) 측정

분리한 혈장에 옷나무 추출물을 100 μ g/ml의 농도로 10분 혹은 30분간 전처리한 다음, Coagulator2 (Behnk Elektronik, Norderstedt, Germany)를 이용하여 PT와 aPTT를 측정함. PT 측정을 위해 100 μ l의 혈장에 thromboplastin-D 200 μ l를 가하여 혈장 응고까지의 시간을 측정함. aPTT는 100 μ l의 혈장에 0.02 M CaCl₂ 100 μ l와 APTT-XL 100 μ l를 가한 다음 반응 종결까지 걸리는 시간을 측정하여 구함. 시료 처리 없이 dimethylsulfoxide(DMSO)만을 적용한 혈장을 대조군으로 함.

나. 혈소판 응집 실험

(1) 혈소판 분산액 (washed platelets, WP)의 조제

Sprague-Dawley 랫드의 복대동맥으로부터 채혈함. 항응고제로 acid-citrate-dextrose(85mM trisodium citrate, 71mM citric acid, 111mM glucose)를 1:9의 비율로 사용함. 채혈액을 150g에서 15분간 원심분리하여 상등액으로부터 platelet-rich plasma(PRP)를 분리하였으며, 이를 다시 500g에서 10분간 원심분리하여 혈소판 잔사(pellet)를 얻음. 혈소판 잔사를 washing buffer solution(조성, mM; NaCl 138, KCl 2.8, MgCl₂ 0.8, KH₂PO₄ 0.8, HEPES 10, glucose 5.6, trisodium citrate 8.5, citric acid 7.1, bovine serum albumin 0.35%, pH 7.4)에 재현탁하고, 다시 500g에서 10분간 원심분리 함. 여기서 얻은 혈소판 잔사를 suspension buffer solution(조성, mM; NaCl 138, KCl 2.8, MgCl₂ 0.8, KH₂PO₄ 0.8, HEPES 10, glucose 5.6, CaCl₂ 1.0, pH 7.4)에 재현탁하여 WP를 조제함. Suspension buffer로 희석하여 1 ml 당 2×10^8 개의 혈소판이 포함되도록 한 후 실험에 사용함.

(2) 혈소판 응집 측정

혈소판 응집은 4channel aggregometer(Chrono-Log, Wester Chester, PA, USA)를 이용하여 turbidity의 변화로써 측정함. 혈소판에 옷나무 분리물질을 5분간 노출시킨 다음, 혈소판 응집 유발 물질인 thrombin으로 응집을 유도함. 혈소판 응집 억제를 시험하기 위하여 70-80%의 응집을 유발하는 thrombin양을 적용하였으며, 5분간 응집 반응을 기록함.

다. Arterial thrombosis animal model을 이용한 옷나무 추출물의 혈전 억제능 평가

(1) 수술

7주령의 숫컷 Sprague-Dawley 랫드에 2g/kg 용량의 옷나무 추출물을 복강 투여하고 4시간 후에 혈전 생성을 유도함. 즉, 옷나무 추출물 투여 후 약 3시간 30분 후에 50mg/kg의 sodium pentobarbital을 복강 투여하여 마취를 유도함. 약 10mm의 우측 대퇴동맥을 노출시킨 다음, 신경과 결합조직 등을 제거함. 대퇴동맥에 MA0.7PSB ultrasonic flowprobe(Transonic Systems, Ithaca, NY)를 적용하고 혈류를 측정하기 위하여 TS420 perivascular flowmeter module (Transonic Systems)에 연결함.

(2) 혈전의 유도

Whatman No. 1 filter paper (1×1 mm)를 50% FeCl₃에 적신 다음, flowprobe 상부측의 혈관에 적용함으로써 혈관 손상을 유도함. 지속적으로 혈류량을 관찰하면서 혈관 폐색까지의 시간을 측정함. 임상적으로 사용 중인 항혈소판 약물, clopidogrel (30mg/kg)을 양성대조군으로 사용함.

라. 혈관 수축력 측정

(1) 혈관 조직 분리

Sprague-Dawley 랫드의 흉부 대동맥(thoracic aorta)을 적출함. 즉시 95% O₂/5% CO₂의 혼합 가스로 포화된 ice-cold Krebs-Ringer 완충액 (K-R 완충액; 조성, mM; NaCl 115.5, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25.0, glucose 11.1, pH 7.4)으로 옮긴 다음, 혈관 내의 혈액과 주변의 지방 및 결합 조직 등을 제거하여, 길이 3-4mm의 혈관 ring을 준비함.

(2) 혈관 장력 측정

텅스텐 와이어를 이용하여 K-R 완충액을 담고 있는 organ bath에 혈관 ring을 현수함. 기저 장력이 2g가 되도록 하였으며, 30분 이상 방치하여 평형 상태에 도달하게 함. Organ bath 내의 K-R 완충액은 M3 thermostat(LAUDA-Brinkmann, Delran, NJ, USA)를 이용하여 37°C로 유지하였으며, 95% O₂/5% CO₂의 혼합가스를 지속적으로 공급하여 pH 7.4로 유지함. 혈관의 장력은 텅스텐 와이어에 연결된 Grass FT03 force transducer(Grass Instrument, West Warwick, RI, USA)로 감지하였으며, 감지된 장력 신호를 PowerLab 8/30 data acquisition system으로 변환한 다음 computer로 전달함. 데이터의 기록 및 분석에는 LabChart pro computer program (AD Instruments, Australia)을 이용함.

(3) 혈관 수축에 미치는 옷나무 추출물의 활성 평가

혈관의 장력 조절능에 미치는 옷나무 추출물의 영향을 시험하기 위하여, 옷나무 추출물을 노출시킨 혈관의 수축을 대조군과 비교함. 혈관의 수축은 10⁻⁷-10⁻⁴M의 5-hydroxytryptamine으로 유발함. 수축을 유발하기 전 10분간 100 μg/ml의 옷나무 추출물을 혈관에 노출시켰으며, 수축 정도는 75mM K⁺에 의해 유도되는 수축 정도를 100%로 하여 이에 대한 비율로 제시함.

마. 혈관 평활근 세포 배양 및 세포 내 칼슘 측정

(1) 혈관 평활근 세포 배양

5주령 Sprague-Dawley 랫드의 흉부 대동맥을 적출하여 결합조직과 지방조직을 제거함. 150U/ml의 collagenase를 적용하여 adventitia를 제거한 다음, complete Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)에 두어 12시간 방치함. 혈관에 다시 150U/ml의 collagenase와 1.5U/ml elastase를 적용하여 단일세포를 얻어 plate에 seeding함. Intact aorta와 가장 근접한 시험계를 확보하기 위하여 subculture하지 않은 passage 0 상태의 세포만으로 칼슘 측정 실험을 수행함.

(2) 세포 내 칼슘 측정

혈관 평활근 세포 내 칼슘을 측정하기 위하여 형광 칼슘 indicator인 fura-2와 digital imaging을 이용함. 혈관 평활근 세포를 coverslip에 배양한 다음, 1 μM의 fura-2/AM을 60분간 노출시켜 fura-2를 loading 함. 형광현미경 상에 mounting 한 다음 physiological salt solution

(PSS; 140mM NaCl, 5mM KCl, 5mM NaHCO₃, 1.8mM CaCl₂, 1.4mM MgCl₂, 1.2mM NaH₂PO₄, 11.5mM glucose, and 10mM HEPES, pH 7.4)으로 perfusion 하며 실험을 수행함. 시험 대상물질을 전처리한 다음, 칼슘 분포에 변화를 유도하며 지속적으로 칼슘 신호를 측정함. 형광 신호의 측정에는 S Fluor 40X(N.A. 1.30, oil) objective lens(Nikon, Tokyo, Japan)와 Evolve 512 electron multiplying charge coupled device(EMCCD) camera(Photometrics, Tucson, AZ)를 장착한 Nikon Eclipse Ti-U inverted microscope을 이용함. 모든 실험은 33°C에서 수행되었으며, fura-2의 excitation과 emission 파장은 각각 340/380, 535nm를 이용함. 이미지의 획득과 분석에는 Meta Imaging System (Molecular Devices, WestChester,PA)을 사용함.

바. 고혈압 동물을 이용한 혈압 강하능 시험

(1) 실험 동물

혈압 측정 실험을 위해 8주령의 수컷 spontaneously hypertensive rats(SHR)을 분양받음. 2주간 tail cuff를 이용한 혈압측정 시험에 적응시킨 다음, 10주령부터 윗나무 추출물과 fisetin을 투여하여 혈압을 측정함.

(2)혈압 측정

SHR의 혈압은 conventional tail-cuff method를 이용하여 측정함. 윗나무 추출물과 fisetin을 각각 1,000, 100mg/kg의 용량으로 1일 1회, 총 2주간 투여하며 혈압변화의 추이를 관찰함. 시험 물질 투여 후 2시간 후에 혈압을 측정하였으며, 6회 측정하여 평균값을 산출함.

3. 윗나무의 혈행 개선 효과 연구 결과

- 윗나무 성분의 혈행 개선 효과를 시험하기 위하여 혈장 응고능과 혈소판 응집능에 미치는 영향을 시험함.
- 갱년기와 관련된 혈행 장애는 주로 혈전(thrombus)의 생성에 기인하는 혈전증 (thrombosis)에 의해 발생함. 따라서 윗나무 성분이 혈전 생성을 억제하거나 감소시킬 수 있다면 갱년기와 관련된 혈행 장애를 개선할 수 있을 것이라 가정함.
- 혈전의 생성은 1) 혈액 응고 인자(clotting factor)의 응고(coagulation)와 2) 혈소판의 응집(aggregation)에 의해 매개됨. 응고와 응집이 과도할 경우, 혈전의 생성이 유도되어 혈행 장애가 발생함(아래 그림 참조). 따라서 본 연구에서는 윗나무 성분이 혈장의 응고와 혈소판의 응집에 미치는 영향을 시험함.

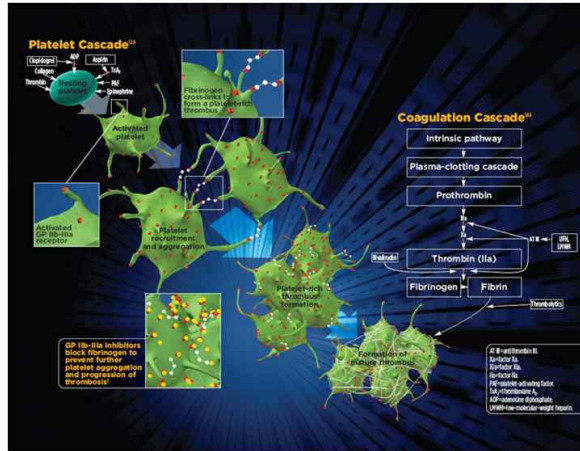


그림 176. Process of thrombus formation.

가. 옷나무 추출물이 혈장 응고능에 미치는 효과

옷나무 추출물의 혈장 응고 차단 효과를 검색하기 위하여 prothrombin time (PT)와 activated partial thromboplastin time (aPTT)을 측정함.

PT와 aPTT는 각각 혈장 응고의 extrinsic pathway와 intrinsic pathway의 활성을 나타내며, 임상적으로 가장 널리 활용되는 지표임 (아래 그림).

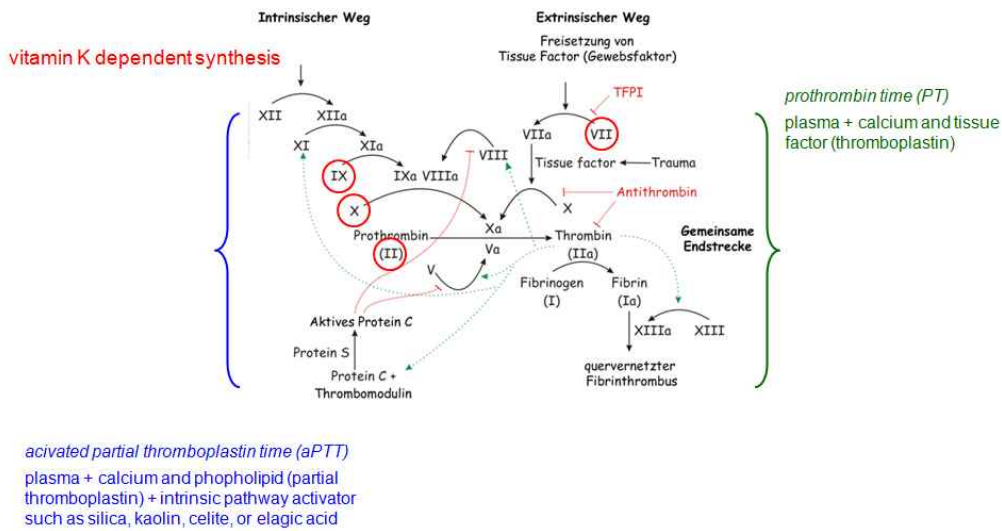


그림 177. Principles of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) measurement

흰쥐로부터 분리한 혈장에 옷나무 추출물 및 분획을 100 μ g/ml의 농도로 10분 혹은 30분간 전처리한 다음, PT와 aPTT를 측정함.

모든 시험 물질들은 100 μ g/ml의 농도까지 PT와 aPTT에 유의적인 영향을 나타내지 않음 (아래 그림). 이 결과는 옷나무 분리물질이 직접적으로 응고 인자들에 영향을 미침으로써 혈장 응고능에 변화를 유발하지는 않음을 나타냄.

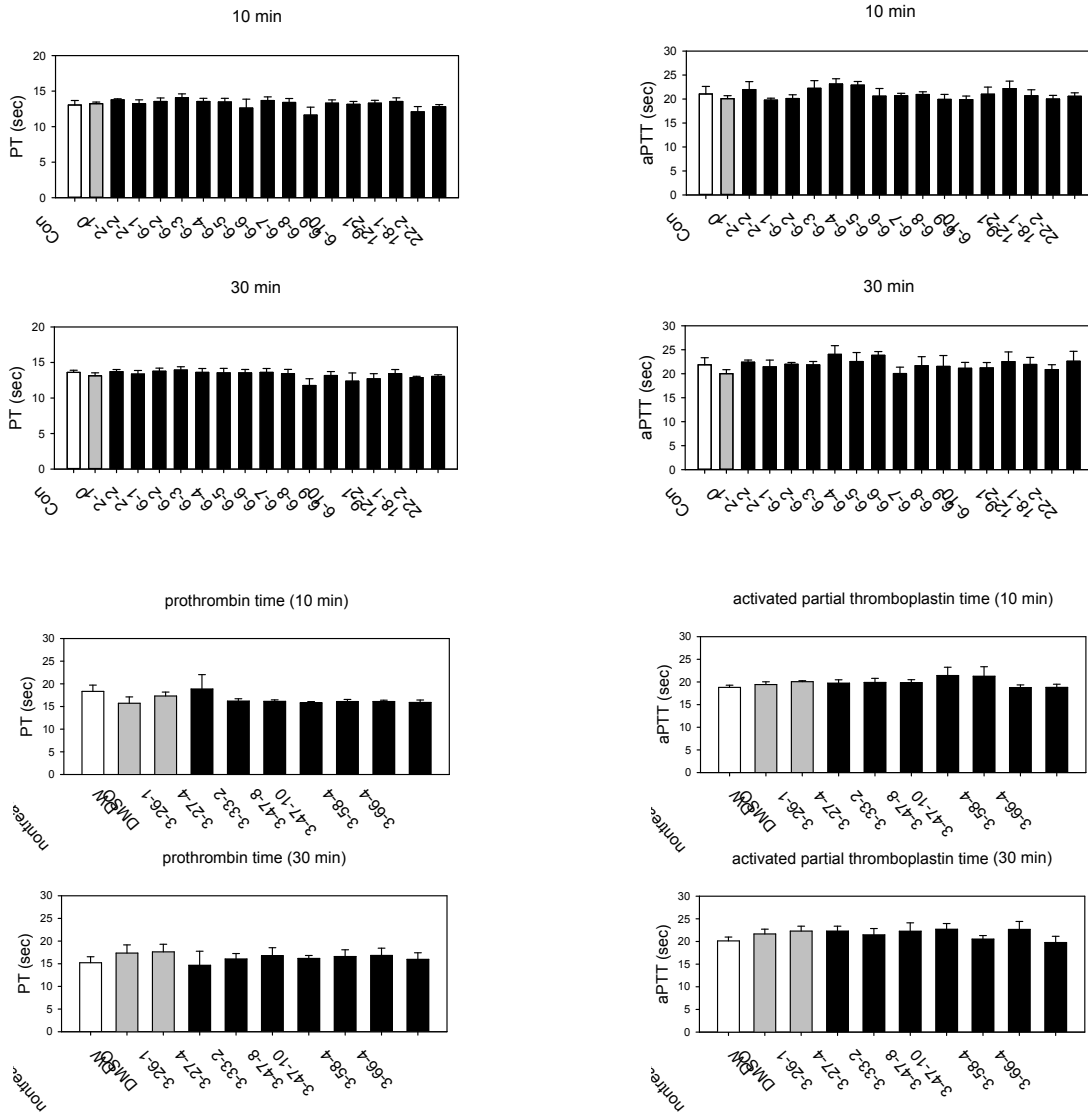


그림 178. Effect of *Rhus verniciflua* extract on prothrombin time (PT; left panel) and activated partial thromboplastin time (aPTT; right panel).

나. 옷나무 추출물이 혈소판 응집에 미치는 효과

옷나무 추출물이 혈소판에 미치는 영향을 시험하기 위하여 흰쥐 혈액으로부터 washed platelets(WP)를 분리, 조제함.

Aggregometer(Chronolog Co.; Havertown, PA, USA) 상에서 WP에 옷나무 추출물을 100 mg/ml로 5분간 노출시킨 다음, 내인성 응집 유발 물질인 collagen에 의한 응집 정도를 측정하여 대조군과 비교함.

우선적으로 hexane partition과 ethyl acetate partition을 비교한 결과, 후자가 응집 억제 효과를 나타낸 반면 전자는 효능을 나타내지 않음(아래 그림). Ethyl acetate partition은 0.1-1,000mg/ml의 비교적 넓은 농도 범위에서 collagen과 ADP에 대한 응집을 억제함. Thrombin에 의한 응집에는 1-10mg/ml의 비교적 좁은 농도 범위에서 유효함.

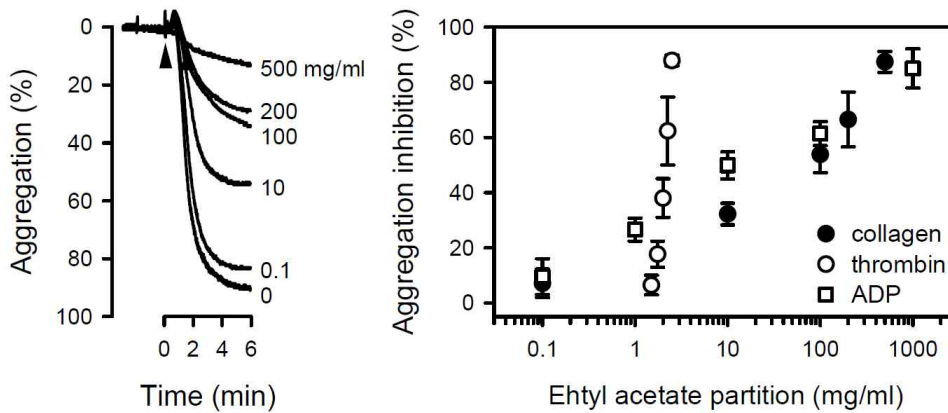


그림 179. Anti-aggregatory effect of *Rhus verniciflua* ethyl acetate partition on rat washed platelets (WP).

Ethyl acetate partition의 항혈소판 능력을 확인한 다음, 그 하위 분획들의 활성을 추적함 (아래 그림 참조).

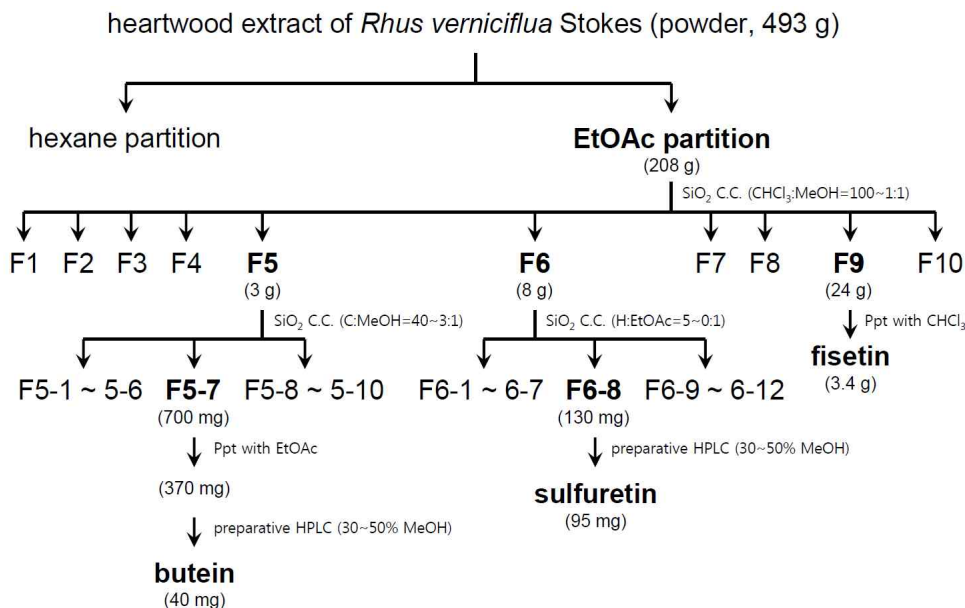


그림 180. Identification of fractions exhibiting anti-platelet effect from *Rhus verniciflua* heartwood.

실험 결과, F5, 6, 9 분획이 혈소판 응집 억제능을 나타내었으며, 이들은 F5-7, F6-8을 거쳐 fisetin, sulfuretin, butein으로 확인됨. Fisetin은 10-100, 5-300 μ M의 농도 범위에서 collagen과 ADP에 의한 혈소판 응집을 용량-의존적으로 억제함. 다만 thrombin에 대한 응집 억제 효과는 상대적으로 낮아 유효 농도가 100-300 μ M에 이름(아래 그림).

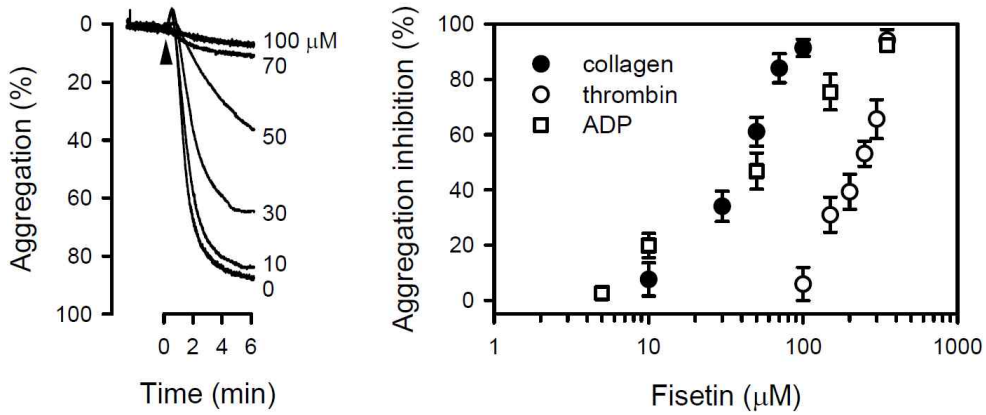


그림 181. Inhibitory effect of fisetin on platelet aggregation induced by collagen, thrombin, or ADP.

Butein과 sulfuretin의 항혈소판 효능도 유사한 양상을 나타냄. Fisetin과 유사한 정도로 collagen과 ADP에 의한 응집을 억제하였으며, thrombin에 의한 응집을 억제하기 위해서는 상대적으로 높은 농도가 요구됨(아래 그림). 즉, thrombin에 비해, collagen 및 ADP에 의해 유도되는 혈소판 응집을 더욱 효과적으로 차단할 수 있음.

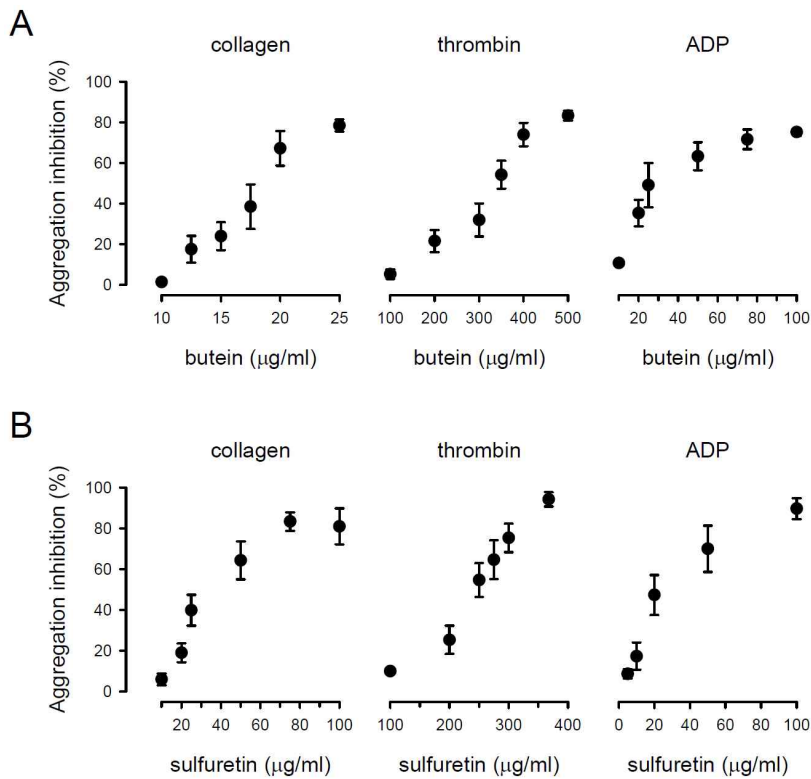


그림 182. Anti-aggregation effect of butein and sulfuretin.

Fisetin, butein, 그리고 sulfuretin의 IC₅₀을 산출하여 아래의 표에 제시함.

표 121. IC₅₀ values for fisetin, butein, and sulfuretin on platelet aggregation induced by collagen, thrombin and ADP.^a

	Collagen	Thrombin	ADP
Fisetin	46	229	48
Butein	19	286	32
Sulfuretin	42	236	41

^a Unit is μM

Fisetin, butein, 그리고 sulfuretin의 혈소판 응집 억제에 대한 효능 지속 시간을 확인함. WP에 시험물질들을 각각 5, 10, 30분 전처리한 다음 collagen에 의한 혈소판 응집 억제 정도를 비교함. 의존성을 확인함. Fisetin의 경우 30분까지 지속적으로 혈소판 응집 억제능을 나타냄. 그러나 예상과는 달리, butein과 sulfuretin의 경우 전처리 시간이 길어짐에 따라 혈소판 응집 억제능이 감소함(아래 그림). 이는 butein과 sulfuretin의 경우 혈소판 응집 억제능이 소실될 수 있음을 의미함.

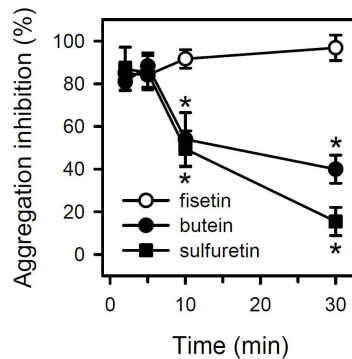


그림 183. Time-dependent effect of fisetin, butein or sulfuretin on platelet aggregation.

혈소판 응집 억제 기전을 규명하기 위하여 mitogen-activated protein kinase(MAPK) extracellular signal-regulated kinase(ERK) 1/2(p44/42 MAPK)와 p38 MAPK 활성화에 미치는 fisetin, butein, sulfuretin의 영향을 시험함.

기존의 연구 보고와 동일하게, collagen은 ERK2(p42 MAPK, lower bands in doublets)의 활성화를 유도함. 100 μM fisetin의 전처리는 collagen에 의해 활성화되는 ERK의 인산화를 효과적으로 억제함. 그러나 p38의 인산화를 억제하지는 못함. Butein과 sulfuretin은 100 μM 까지 ERK와 p38의 활성화에 유의적인 영향을 미치지 못함(아래 그림, A). ERK 활성화 억제 효과의 용량 의존성을 시험하기 위해 낮은 농도의 fisetin을 시험함. Fisetin은 25-100 μM 의 범위에서 ERK의 활성화를 억제하였으며 그 정도는 농도에 비례함 (아래 그림, B).

이상의 결과는 fisetin이 혈소판 응집을 억제하며 응집에 관여하는 ERK의 활성화 억제가 주

요한 기전이 될 수 있음을 나타냄.

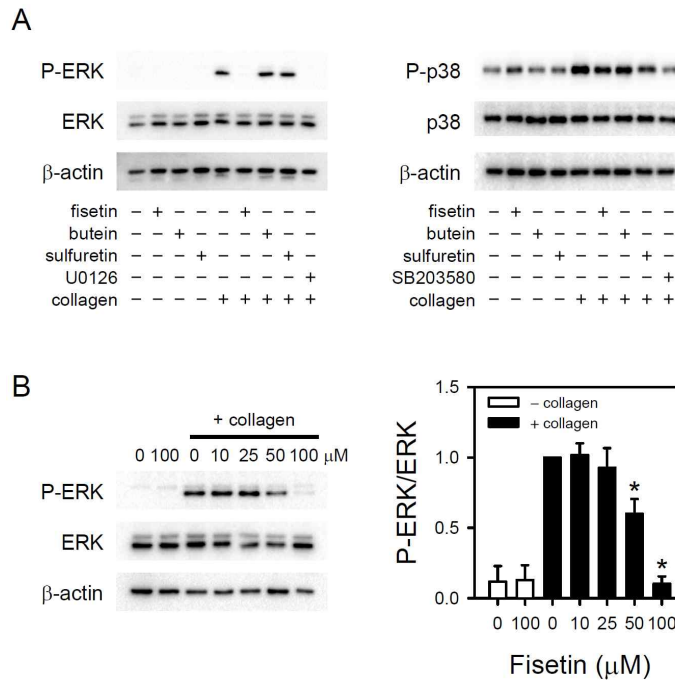


그림 184. Effect of fisetin, butein, and sulfuretin on ERK and p38 activation by collagen.

다. 옷나무 추출물과 fisetin의 혈전 생성 억제능 연구

옷나무 추출물과 fisetin의 혈전 생성 억제능을 arterial thrombosis animal model을 이용하여 시험함.

Sprague-Dawley 랫드에 옷나무 추출물과 fisetin을 각각 1,000 및 100mg/kg의 용량으로 1일 1회, 7일간 복강투여함. 최종 투여 2시간 후에 FeCl₃를 적용하여 femoral artery에 손상을 유발함. 혈관 손상에 따른 thrombosis에 의해 혈관 폐색이 유도되며, 폐색까지 소요되는 시간 (arterial occlusion time)을 측정함으로써 혈전 생성 정도를 파악함.

대조군의 arterial occlusion time이 15.8±2분이었으며, fisetin을 투여한 동물에서는 44.7±11.3분으로서 유의적으로 증가함(아래 그림). 그러나 옷나무 추출물 투여군의 경우, arterial occlusion time이 12.9±1.0 분으로서 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않음. 대조군에는 항혈소판 약물로 널리 이용되는 clopidogrel을 투여하였으며, clopidogrel은 occlusion time을 유의적으로 증가시킴. 이상의 결과는 fisetin이 혈소판 응집을 억제함으로써 혈관 손상에 의한 혈전증을 억제할 수 있음을 나타냄. Fisetin은 경구적으로 혈행 개선 효과가 있을 것으로 예상됨.

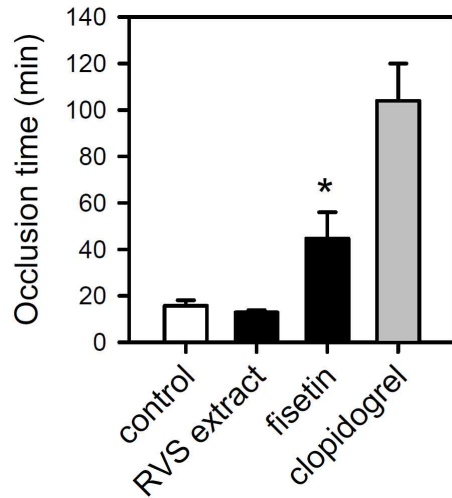


그림 185. Effect of RVS extract and fisetin on arterial thrombosis.

4. 옷나무의 항고혈압능 연구

- 옷나무 성분의 순환기계 기능 개선 연구로서 옷나무 추출물이 혈관 장력 조절능에 미치는 영향을 시험함.
- 혈관의 이완 증가 및 수축 억제는 혈관 장력의 감소를 유도함으로써, 말초저항(peripheral resistance)을 감소시킴. 이는 혈압을 강하시킴으로써 고혈압을 개선하는 중요한 생리 기전임.
- 따라서 옷나무 추출물과 유효 성분이 혈관의 수축과 이완에 미치는 영향을 시험함. 이를 위해 Sprague-Dawley 랫드의 흉부 대동맥(thoracic aorta)을 분리하여 organ bath system에서 장력 측정 실험을 수행함.
- 혈관의 장력을 발생시키는 주요 조직이 혈관 평활근 세포임과 평활근 세포의 수축 신호가 세포 내 칼슘에 의해 조절됨을 고려하여, 혈관 평활근 세포의 칼슘 신호에 미치는 옷나무의 영향을 아울러 시험함.

가. 옷나무 추출물이 혈관 수축에 미치는 효과

옷나무 추출물이 혈관 이완능에 미치는 영향을 시험하기 위하여 흰쥐 흉부 대동맥(thoracic aorta)을 분리하여 organ bath system에서 장력 측정 실험을 수행함.

우선적으로 organ bath에 현수된 혈관에 옷나무 추출물을 처리하여 basal tension이 변하지 않음을 확인함으로써 옷나무 추출물이 직접적으로 혈관 이완 및 수축을 유발하지 않음을 확인함(결과 제시 안함).

혈관 수축에 미치는 영향을 시험하기 위하여 옷나무 추출물을 250 μ g/ml의 농도로 30분간 전처리한 다음, 10^{-7} - 10^{-4} M의 5-hydroxytryptamine(5-HT)에 의해 유도되는 수축을 측정함. 5-HT

는 용량 의존적으로 혈관 수축을 유도하였으며, 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 옷나무 추출물은 5-HT에 의한 수축을 유의적으로 감소시킴(아래 그림). 동일한 실험을 phenylephrine으로 수행한 결과, 옷나무 추출물은 5-HT에 의한 수축에서 보였던 억제 효과와 유사하게 phenylephrine에 의한 혈관 수축도 억제함. 즉, 옷나무 추출물은 수축 자극에 무관하게 혈관 수축을 억제하는 것으로 확인됨.

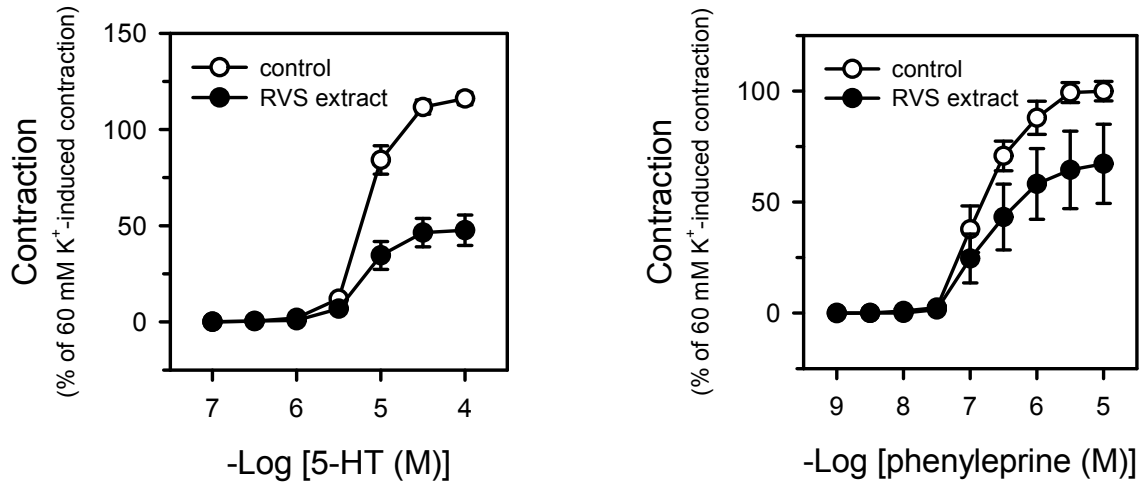


그림 186. Effect of *Rhus verniciflua* extract on vasoconstriction induced by 5-hydroxytryptamine (5-HT) or phenylephrine.

나. 옷나무 추출물이 혈관 이완에 미치는 효과

수축 실험과 유사한 방법으로, 옷나무 추출물을 0, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 혈관에 30분간 처리한 다음, 10^{-9} - 10^{-5} M의 acetylcholine에 의해 유도되는 이완을 측정함. 그 결과, acetylcholine에 의한 용량 의존적인 이완이 확인되었으며, 옷나무 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 까지 이완에 유의적인 영향을 미치지 않음 (아래 그림).

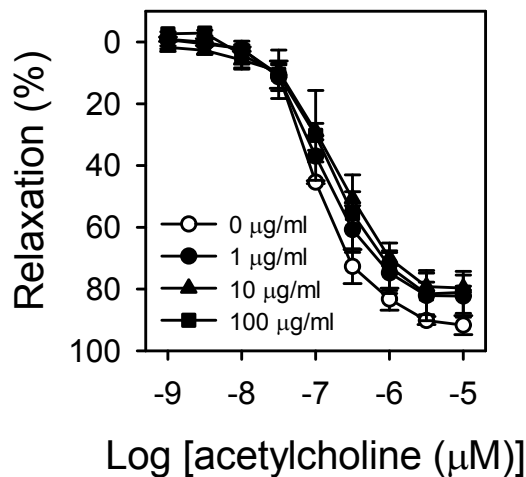


그림 187. Effect of *Rhus verniciflua* extract on vasorelaxation by acetylcholine.

다. 옷나무 추출물이 혈관 평활근 세포 칼슘 분포에 미치는 영향

옷나무 추출물에 의한 혈관 수축의 기전을 이해하기 위하여 옷나무 추출물이 혈관 평활근 내 칼슘 변화에 미치는 영향을 시험함. 칼슘은 혈관 평활근의 수축을 조절하는 가장 중요한 신호 분자이며 칼슘 증가의 억제제는 혈관 수축을 억제함이 잘 알려져 있음.

옷나무 추출물 100 μ g/ml을 5분간 전처리한 다음, 10^{-5} M 5-HT에 의해 유도되는 칼슘 증가 반응을 분석함. 5-HT는 혈관 평활근 세포에서 전형적인 calcium transient를 유도함. 옷나무 추출물은 5-HT에 의해 발생하는 세포 내 칼슘 신호를 유의적으로 감소시킴(아래 그림, A).

칼슘 억제의 옷나무 추출물 처리 시간 의존성을 시험하기 위하여 평활근 세포에 100 μ M 추출물을 처리한 다음, 각각 2.5, 5, 10분 후에 10^{-5} M 5-HT로 칼슘 증가를 유도함. 2.5분 전처리에서 이미 칼슘 증가의 유의적인 감소를 확인할 수 있었으며, 10분까지 처리시간 의존적으로 효능이 증가함(아래 그림, B 왼쪽 패널). 또한 칼슘 억제능의 용량 의존성을 시험한 결과, 1-100 μ g/ml의 범위에서 농도에 비례하여 칼슘 억제능이 강해짐(아래 그림, B 가운데 패널). 즉, 옷나무 추출물은 혈관 평활근 세포의 칼슘 신호를 억제할 수 있으며, 이러한 효과는 농도와 처리 시간에 비례함.

이상과 같은 칼슘 증가의 억제가 옷나무 추출물의 가역적인 효능임을 확인하기 위해 옷나무 추출물 처리 후 washing out한 다음 칼슘 증가를 유도함. 아래 그림, B 오른쪽 패널에 제시된 바와 같이, 옷나무 추출물을 전처리할 경우 칼슘의 증가가 유의적으로 감소하며, 추출물을 제거한 다음 칼슘 반응을 유도할 경우, 억제 효능이 거의 완전히 사라짐. 즉, 옷나무 추출물의 칼슘 억제 효과는 가역적임. 이 결과는 옷나무 추출물에 의한 칼슘 억제 효과가 세포 독성이 아니라 약리학적 효능임을 제시함.

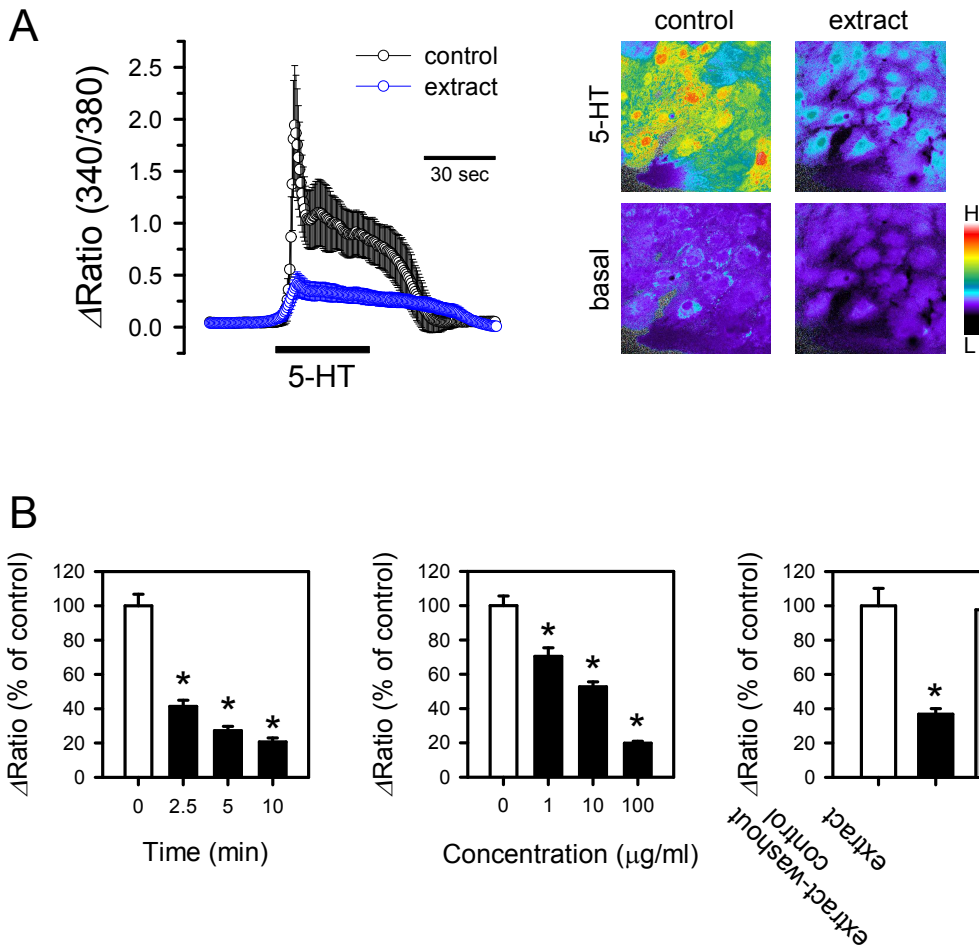


그림 188. Effect of *Rhus verniciflua* extract on calcium response induced by 5-HT.

라. Fisetin이 혈관 평활근 세포 칼슘 분포에 미치는 영향

웃나무 추출물의 하위 분획들을 시험하여 칼슘 억제 작용을 나타내는 유효 성분으로 fisetin을 동정함(결과 제시 안함). 따라서 웃나무에 의한 혈관 수축의 기전을 이해하기 위하여 fisetin이 혈관 평활근 내 칼슘 변화에 미치는 영향을 시험함.

Fisetin을 10 μ M 농도로 5분간 전처리한 다음, 10⁻⁵M 5-HT에 의해 유도되는 칼슘 증가 반응을 분석함. Fisetin은 5-HT에 의해 발생하는 calcium transient를 유의적으로 감소시킴(아래 그림, 왼쪽 위 패널). 이러한 칼슘 억제 효과는 2-10분의 전처리 시간과 1-10 μ M의 농도에서 처리 시간 및 농도에 의존적으로 증가함(아래 그림, 오른쪽 위 패널과 왼쪽 아래 패널).

Fisetin의 칼슘 억제 효과가 가역적임을 확인하기 위해 fisetin 처리 후 washing out한 다음 동일한 실험을 수행함. 아래 그림, 오른쪽 아래 패널에 제시된 바와 같이, fisetin의 칼슘 억제 효과는 wash out에 의해 회복되는 가역적인 효과임.

이상의 결과들은 fisetin의 효과가 웃나무 추출물의 효과와 유사하며, 추출물의 주된 유효 성

분임을 간접적으로 제시함.

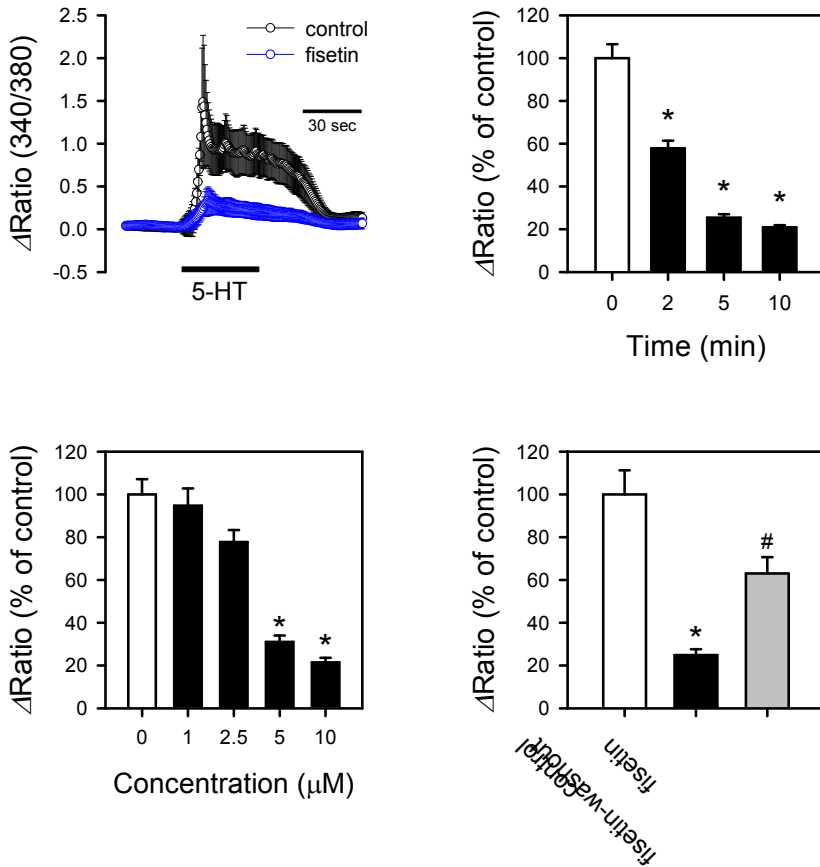


그림 189. Effect of fisetin on calcium response induced by 5-HT.

Fisetin에 의한 칼슘 억제 효과를 구체적으로 규명하기 위하여 L-type voltage-gated calcium channel(LVGCC)의 활성화에 의한 칼슘 증가에 미치는 fisetin의 효과를 시험함. Fisetin은 65mM K⁺과 LVGCC agonist인 Bay K8644에 의한 칼슘 influx를 모두 감소시킴(아래 그림). 이 결과는 fisetin이 LVGCC에 의한 칼슘 influx를 차단하는 효과가 있음을 나타냄.

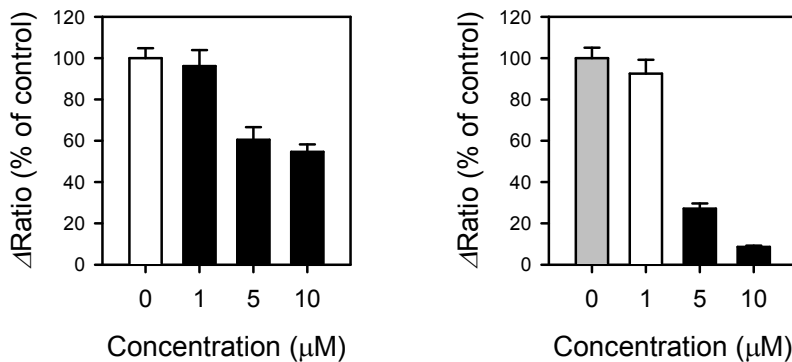


그림 190. Effect of fisetin on vascular contraction induced by 65 mM K⁺ (left panel) and Bay K8644 (right panel).

Fisetin이 세포 내 저장 칼슘의 세포질로의 유리(release)에 미치는 영향을 시험함. 이를 위해

세포 외 칼슘을 제거한 상태에서 $10^{-5}M$ 5-HT에 의한 칼슘 증가를 측정함. Fisetin의 5분 전처리는 저장 칼슘의 유리를 차단함(아래 그림, 왼쪽 패널). 이러한 효과는 정상상태에서 5-HT에 의한 칼슘 증가를 억제했던 것과 동일한 농도에서 용량 의존성을 나타냄(아래 그림, 오른쪽 패널).

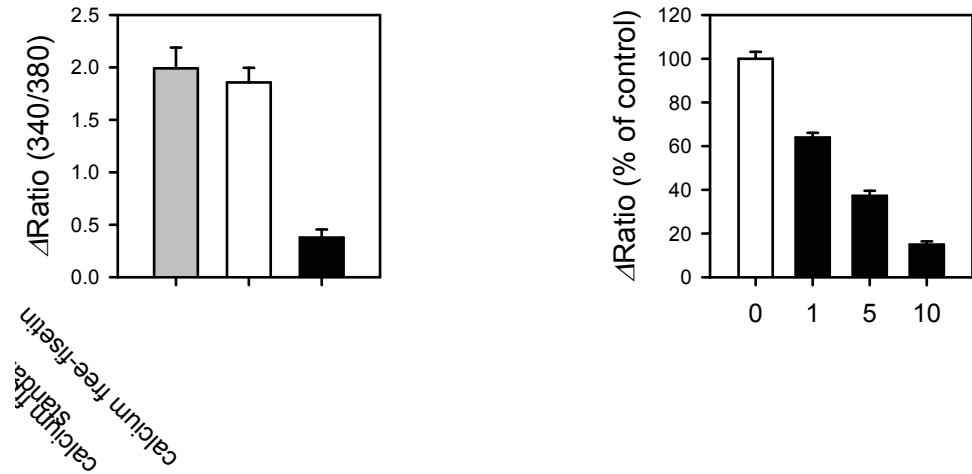


그림 191. Effect of fisetin on calcium release from intracellular calcium store.

또 다른 칼슘 증가의 주요한 경로인 store-operated calcium entry(SOCE)에 미치는 fisetin의 영향을 시험함. Fisetin은 sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) inhibitor인 cyclopiazonic acid(CPA)의한 칼슘 유리를 다소간 저해하였으며, store의 calcium emptying과 calcium restoration에 의한 SOCE를 억제함(아래 그림).

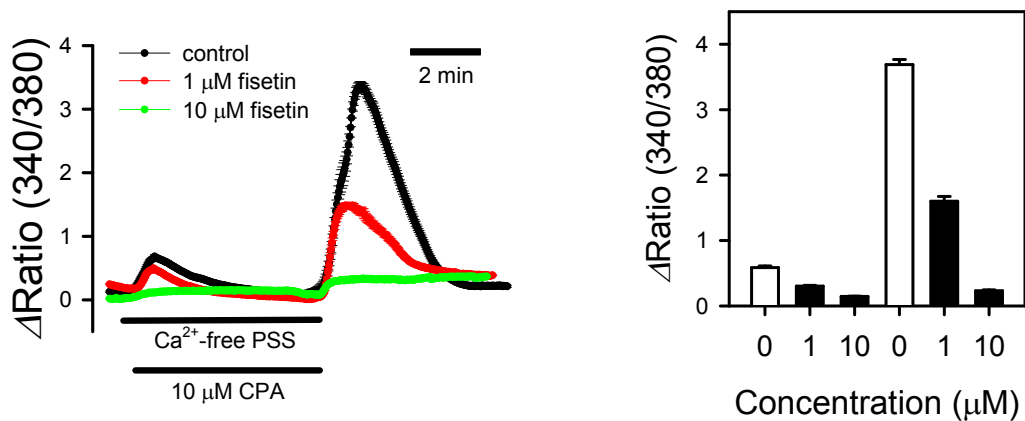


그림 192. Effect of fisetin on store-operated calcium entry.

이상의 결과는 fisetin이 혈관 평활근 세포의 칼슘 신호를 저해하며, LVGCC에 의한 칼슘 유입, SOCE, store로부터의 칼슘 유출 등을 모두 억제할 수 있음을 나타냄.

Fisetin 작용 기전과의 비교를 위해 옷나무 추출물이 혈관 평활근 칼슘 신호 발생 기전에 미치는 영향을 시험함. 아래 그림에 제시된 바와 같이, $100 \mu g/ml$ 의 옷나무 추출물은 $65mM K^+$ 에

의한 칼슘 증가를 억제하며, 세포 내 저장 칼슘의 유리를 저해함. 그러나 LVGCC에 의한 칼슘 유입의 억제 정도는 fisetin 10 μ M에 비해 약함. 옷나무 추출물은 예상과 달리 SOCE를 억제하지는 않음. 옷나무 추출물과 fisetin은 칼슘 신호 억제에 대해 완전히 동일한 방식으로 작용하지는 않음. 이러한 차이는 추출물 중 다양한 성분들의 복합적인 효과에 기인하는 것으로 추측됨.

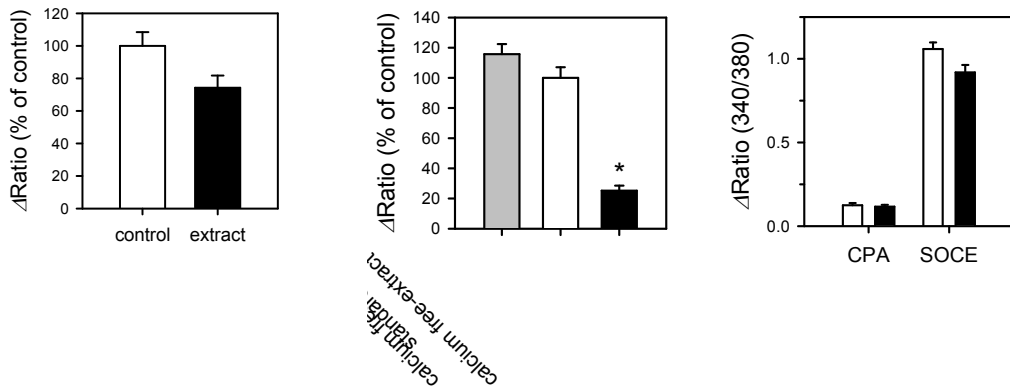


그림 193. Effect of *Rhus verniciflua* extract on 65mM K⁺-induced calcium influx (left panel), calcium release from intracellular calcium store (middle panel), and store-operated calcium entry (right panel).

마. Fisetin이 혈관 수축에 미치는 효과

옷나무 추출물의 경우와 동일하게, fisetin의 혈관 수축 억제능을 시험함. 5-20 μ M의 fisetin을 30분간 전처리한 다음, 5-HT와 phenylephrine에 의한 수축 정도를 측정하여 대조군과 비교함.

아래 그림에 제시된 바와 같이, fisetin은 5-HT와 phenylephrine에 의한 수축을 모두 유의적으로 억제하였으며, 억제 정도는 fisetin의 용량에 비례하여 증가함. 이 결과는 옷나무 추출물의 실험 결과와 유사하며, 옷나무 추출물의 주요한 유효 성분이 fisetin임을 제시함. 이러한 수축 억제 효과를 근거로 하여 옷나무 추출물과 fisetin의 혈압 강하능을 시험함.

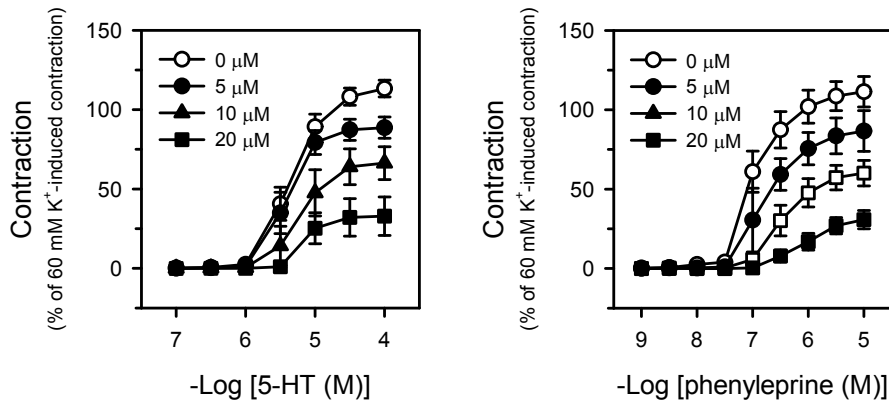


그림 194. Inhibition of vasoconstriction by fisetin.

바. 옷나무 추출물과 fisetin이 혈압에 미치는 영향

옷나무 추출물과 fisetin의 혈관 수축 억제 효능을 근거로 하여 이들의 혈압 강하 효능을 시험함. 10주령 수컷 SHR에 옷나무 추출물과 fisetin을 각각 1,000mg/kg과 100mg/kg의 용량으로 1일 1회 경구 투여 함. 12일간 투여하며 실험 동물의 체중 변화, 혈압의 추이를 측정, 관찰함.

옷나무 추출물과 fisetin 투여군은 대조군과 비교하여 체중 변화에 차이를 유발하지는 않음 (아래 그림, 왼쪽 위 패널). 혈압을 측정한 결과, 옷나무 추출물 투여군과 fisetin 투여군 모두 혈압을 낮추는 효과를 나타내지 않음. Diastolic blood pressure, systolic blood pressure 그리고 mean blood pressure 모두 대조군과 다르지 않음(아래 그림 참조).

이 결과는 본 실험 조건에서 옷나무 추출물과 fisetin이 SHR의 혈압을 낮추지 않음을 제시함. 추후에 시험 물질의 용량과 투여 기간, 고혈압 동물 모델 등을 달리하여 연구를 지속하고자 함.

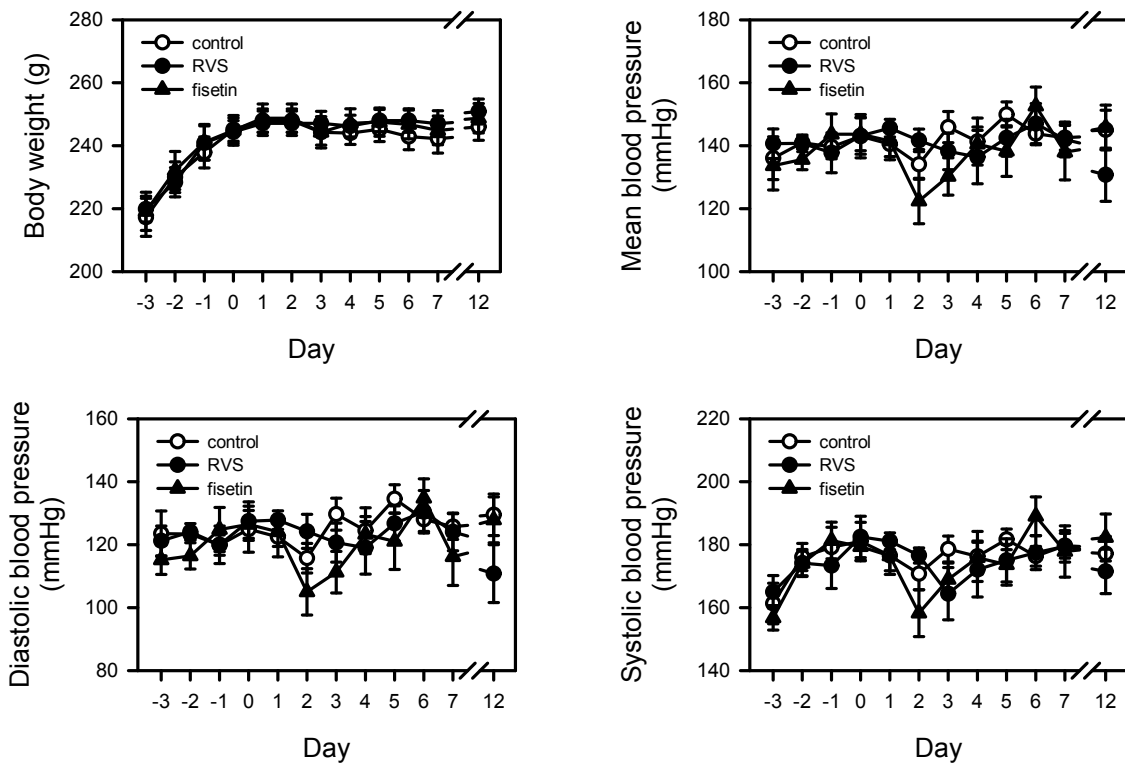


그림 195. Effect of *Rhus verniciflua* extract and fisetin administration on body weight gaining and blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR).

5. 요약 및 결론

- 옷나무 추출물 및 성분들은 혈장 응고능에 유의미한 영향을 미치지 않음.
- 옷나무 추출물은 혈소판 응집을 억제하며 그 유효 성분은 fisetin, butein 그리고 sulfuretin임.
- 동물실험에서 fisetin은 혈관 손상에 의한 혈전 생성을 억제함. 옷나무의 주된 유효 성분 중

하나인 fisetin은 혈전 생성 억제를 통해 혈행 개선 효과를 나타낼 수 있으리라 예상됨.

- 옷나무 추출물은 혈관 수축을 억제함으로써 혈관 장력을 낮추어 말초 저항을 감소시킬 수 있으리라 예상됨. 옷나무 추출물에 의한 혈관 수축 억제에는 주로 fisetin이 기여하며, 혈관 평활근 세포의 칼슘 신호 억제가 주요한 기전으로 작용함.
- 옷나무 추출물과 fisetin은 경구적으로 SHR의 혈압을 감소시키지는 않음.

2-4절. 옷나무 추출물의 고지혈증 치료효능 및 기전에 관한 연구(2핵심 4세부)

1. 연구개발 내용

가. 옷나무 추출물의 고지혈증 유발 마우스 모델에서의 약리 효능 연구

- C57BL/6 마우스에서 고지혈증을 유도하기 위하여 20% 지질과 0.15% 콜레스테롤을 함유한 고지질 식이를 2주 동안 실시함
- 고지질 식이를 실시하는 동안 고지혈증에서 옷나무 추출물의 효과를 검증하기 위하여 대조군 및 옷나무 추출물 투여 군으로 나누어 경구 투여함
- 고지질 식이 후 마우스의 혈중 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지질 분석을 실시함으로써 고지혈증에 미치는 영향 분석
- 약물의 독성 검증을 위해 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) 및 albumin (ALB)의 혈중 농도를 분석 및 간 조직의 병리학적 분석
- 옷나무 추출물이 고지혈증 억제와 관련할 콜레스테롤 대사 조절 유전자 발현 분석: 고지질 식이를 실시한 대조군과 옷나무 추출물 투여군의 마우스의 간 조직에서 콜레스테롤 대사 관련 유전자의 발현 조절을 분석하기 위해 qRT-PCR을 실시함

나. Apolipoprotein E 결핍(ApoE K/O) 마우스에서 옷나무 추출물 투여에 의한 콜레스테롤 대사 조절 및 유전자 발현 분석

- 고지혈증 모델 마우스인 ApoE K/O 마우스에서 고지질 식이를 2주간 실시하여 혈중 콜레스테롤의 수치가 일반 마우스의 10배 이상으로 콜레스테롤 수준을 증가시킴
- 극도로 증가된 고지혈증에서 옷나무 추출물의 효과를 검증하기 위하여 대조군 및 옷나무 추출물 투여 군으로 나누어 경구 투여함
- 고지질 식이 후 마우스의 혈중 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지질 분석을 실시함으로써 극도로 증가된 고지혈증에서 약리 효과 분석
- 1차년도에서 발굴된 옷나무 추출물에 의해 조절되는 콜레스테롤 대사 관련 유전자의 발현 조절을 분석하기 위해 qRT-PCR을 실시함

다. 옷나무 분리물질의 고지혈증 억제 효과의 세포 및 분자 수준에서의 기전연구

- 콜레스테롤 수용 및 배출과 관련된 마우스 간세포 및 대식세포에서 옷나무 추출물 및 분리물질의 콜레스테롤 대사에 미치는 영향 분석
- 콜레스테롤 수용 및 배출과 관련된 마우스 간세포 및 대식세포에서 옷나무 추출물 및 분리물질의 콜레스테롤 수송에 미치는 기전 연구

2. 연구결과

가. 고지혈증 마우스 모델 제작

6주령의 숫컷 C57BL/6 마우스를 고지질 식이하여 유도되는 고지혈증에서 옷나무 추출물의 고지혈증 개선효과를 보고자 마우스를 일반 식이 또는 고지질 식이(20% 지질+ 0.15% 콜레스테롤, western diet)를 2주 동안 실시하여 마우스를 마취한 후 안와정맥혈을 통해 채혈 한 후 serum 분리를 위해 상온에서 30분간 유지한 후 4°C 에서 1500g로 15분간 원심분리를 2회 실시한 후 상층액을 획득한 후 혈액생화학분석기(Hitachi)를 통해 혈중 총콜레스테롤을 비교한 결과 일반식이 시, 혈중 총콜레스테롤은 131.10 ± 20.73 dl/ml이고, 2주간 western diet (20% 지질+ 0.15% 콜레스테롤)를 실시한 마우스에서는 혈중 총콜레스테롤이 183.30 ± 12.23 dl/ml로 식이에 의해 유도되는 고지혈증을 나타냄.

나. 옷나무 추출물의 혈중 콜레스테롤 개선 효과 분석

옷나무 추출물의 효과를 검증하기 위하여 Group I (일반식이+vehicle), Group II (western diet+vehicle), Group III (western diet+옷나무추출물; 0.1g/kg), Group IV (western diet+옷나무추출물; 1g/kg)와 같이 4group으로 나누어 2주간 실시한 후 각 그룹의 마우스를 마취한 후 안와정맥혈을 통해 채혈 한 후 serum 분리를 위해 상온에서 30분간 incubation 후 4°C 에서 1500g로 15분간 원심분리를 2회 실시한 후 상층액을 획득한 후 혈액생화학분석기(Hitachi)를 통해 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지질(TG)를 분석한 결과 group I 의 총콜레스테롤은 131.10 ± 20.74 dl/ml이고 group II 는 183.30 ± 12.23 dl/ml, group III 은 173.70 ± 29.14 dl/ml, group IV 은 154.13 ± 14.76 dl/ml으로 통계적 분석으로 고지질 식이를 실시하는 마우스에 옷나무 추출물(1g/kg)을 함께 섭취시킨 경우 183.30 ± 12.23 dl/ml에서 154.13 ± 14.76 dl/ml로 유의적으로 총 콜레스테롤 수준이 감소하는 것을 확인함($P < 0.01$). 또한 나쁜 콜레스테롤인 LDL-콜레스테롤의 경우에도 group II 에 비해 group IV 에서 유의적으로 감소하는 것을 확인함($P < 0.05$).

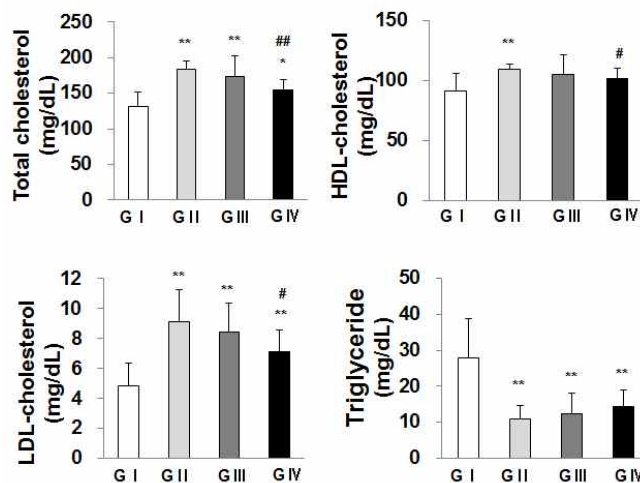


그림 195. Analysis of Cholesterol Level of Plasma

다. 약물 독성 검사를 위한 GOT, GPT, Albumin 분석

고지질 식이 또는 옷나무 추출물 섭취에 따른 간 독성 여부를 확인하기 위하여 혈중 GOT, GPT 및 Albumin 분석을 위해 혈액분석기기를 통해 분석한 결과 각 그룹간의 유의적인 차이는 나타나지 않은 것으로 옷나무 추출물 섭취에 의한 GOT, GPT 및 Albumin의 변화는 나타나지 않은 것을 확인함.

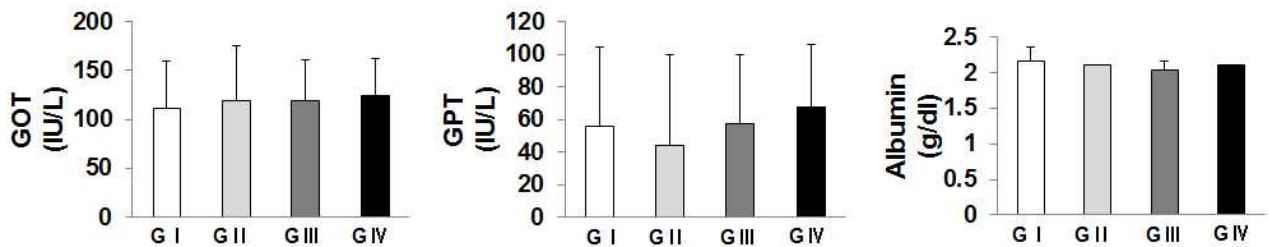


그림 196. Analysis of GOT, GPT & Albumin Level of Plasma

라. 지방간 개선 효과 분석

(1) H&E 염색법을 통한 지방간 개선 효과 분석

고지질 식이를 통해 유도되는 지방간 형성이 옷나무 추출물 섭취 시 개선되는지 확인하기 위하여 2주간 diet 후 각 그룹의 마우스 간을 획득하여 10% 포르말데하이드로 고정 후 파라핀 블록을 제작하고 마이크로 절편기로 잘라 조직절편을 획득하여 H&E 염색을 실시한 후 지방간 형성 및 개선 효과를 분석. 각 그룹의 파라핀 블록을 잘라 획득한 조직절편을 H&E 염색을 실시하여 고지질 식이에 의한 지방간 형성과 옷나무 추출물의 지방간 개선 효과를 분석한 결과 고지질 식이를 실시하는 마우스에 옷나무 추출물을 함께 섭취시킨 경우 유의적으로 지방간 형성 정도가 감소되어 있는 것을 확인함. 또한 이 감소 정도는 옷나무 추출물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 감소하였음($P < 0.01$).

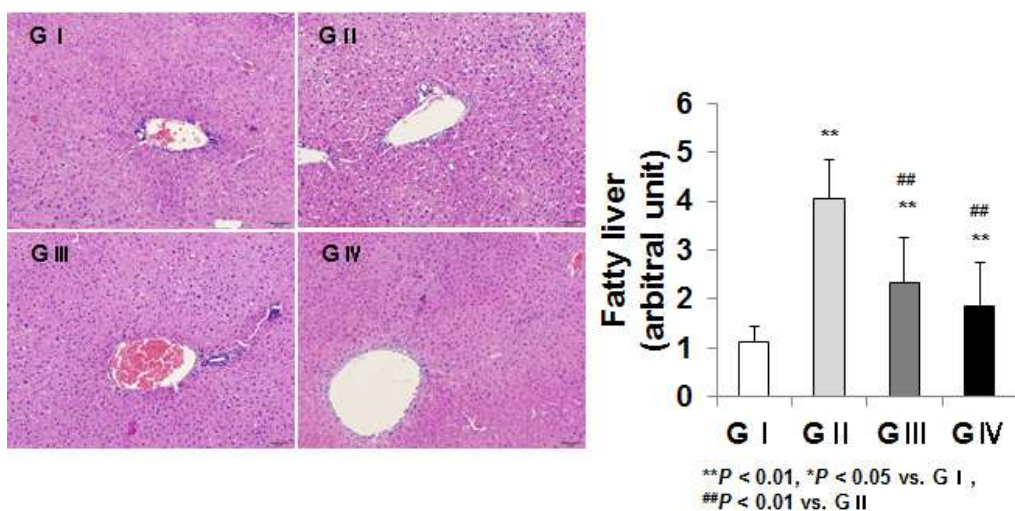


그림 197. Analysis of fatty liver by H&E staining

(2) Oil red O 염색법을 통한 지방간 개선 효과 분석

고지질 식이를 통해 유도되는 지방간 형성이 윗나무 추출물 섭취 시 개선되는지 확인하기 위하여 H&E 염색법과 동일한 방법으로 간의 파라핀 조직 블록을 획득하여 oil red O 염색을 실시한 후 지방간 형성 및 개선 효과를 분석. 각 그룹의 파라핀 블록을 잘라 획득한 조직절편을 oil red O 염색을 실시하여 고지질 식이에 의한 지방간 형성과 윗나무 추출물의 지방간 개선 효과를 분석한 결과 고지질 식이를 실시하는 마우스에 윗나무 추출물을 함께 섭취시킨 경우 유의적으로 지방간 형성 정도가 감소되어 있는 것을 확인함. 또한 이 감소 정도는 윗나무 추출물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 감소하였음($P < 0.01$).

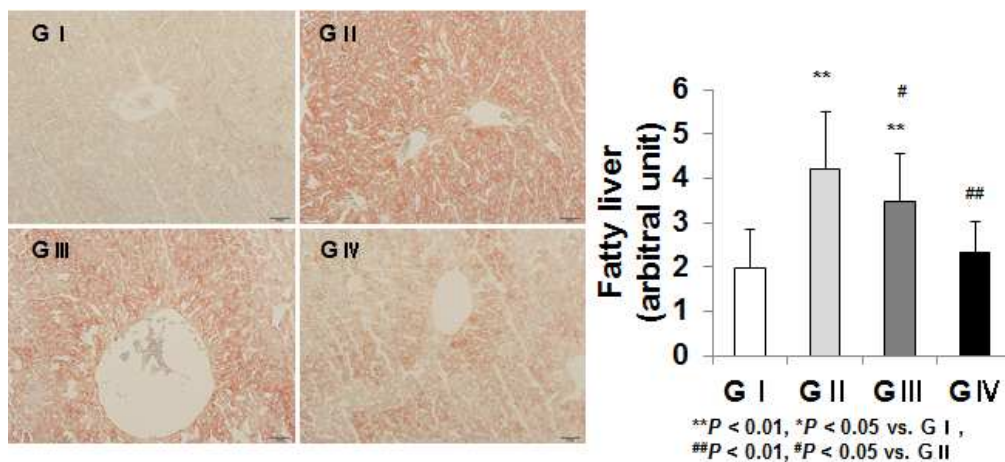


그림 198. Analysis of fatty liver by oil red O staining

마. 고지혈증 마우스 모델 제작(ApoE KO 마우스)

6주령의 숫컷 ApoE KO 마우스를 내부적으로 생성되는 고지혈증과 추가적인 고지질 식에 따른 심각한 고지혈증에서 윗나무 추출물의 고지혈증 개선효과를 보고자 마우스를 일반 식이 또는 고지질 식이(20% 지질과 0.15% 콜레스테롤, western diet)를 2주 동안 실시하여 마우스를 마취한 후 안와정맥혈을 통해 채혈 한 후 serum 분리를 위해 상온에서 30분간 incubation 후 4°C 에서 1500g로 15분간 원심분리를 2회 실시한 후 상층액을 획득한 후 혈액생화학분석기(Hitachi)를 통해 혈중 총 콜레스테롤을 비교한 결과 일반식이 시에도 혈중 총 콜레스테롤이 642.42 ± 93.93 dl/ml 으로 C57BL/6 마우스(131.10 ± 20.73 dl/ml)에 비해 약 5배 증가 되었으며, 2주간 western diet (20% 지질+0.15% 콜레스테롤)를 실시한 ApoE KO 마우스에서는 혈중 총 콜레스테롤이 1029.85 ± 124.62 dl/ml로 심각한 고지혈증을 나타냄.

바. 윗나무 추출물의 혈중 콜레스테롤 개선 효과 분석(ApoE KO 마우스)

윗나무 추출물의 효과를 검증하기 위하여 윗나무 추출물의 효과를 검증하기 위하여 1group

(일반식이+vehicle), 2group(일반식이+옻나무추출물; 1g/kg), 3group(western diet+vehicle), 4group(western diet+옻나무추출물; 0.1g/kg), 5group(western diet+옻나무추출물; 1g/kg)와 같이 5group으로 나누어 2주간 실시한 후 각 그룹의 마우스를 마취한 후 안와정맥혈을 통해 채혈 한 후 serum 분리를 위해 상온에서 30분간 incubation 후 4℃에서 1500g로 15분간 원심분리를 2회 실시한 후 상층액을 획득한 후 혈액생화학분석기(Hitachi)를 통해 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지질(TG)를 분석한 결과 1group의 총콜레스테롤은 642.42±93.93dl/ml 이고 2group은 578.57±108.47dl/ml, 3 group은 1029.85±124.62dl/ml, 4 group은 979.71±173.87 dl/ml, 5group은 867.60±52.96dl/ml으로 통계적 분석으로 일반 식이를 실시한 1, 2 group에서 옻나무 추출물을 식이를 통해 혈중 총 콜레스테롤이 642.42±93.93dl/ml에서 578.57±108.47dl/ml로 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성을 나타나지 않았으나 고지질 식이를 실시하는 마우스에 옻나무추출물(1g/kg)을 함께 섭취시킨 경우 1029.85±124.62dl/ml에서 867.60±52.96dl/ml로 유의적으로 총 콜레스테롤 수준이 감소하는 것을 확인함($P < 0.05$). 또한 나쁜 콜레스테롤인 LDL-콜레스테롤의 경우에도 3 group에 비해 5 group에서 유의적으로 감소하는 것을 확인함($P < 0.05$).

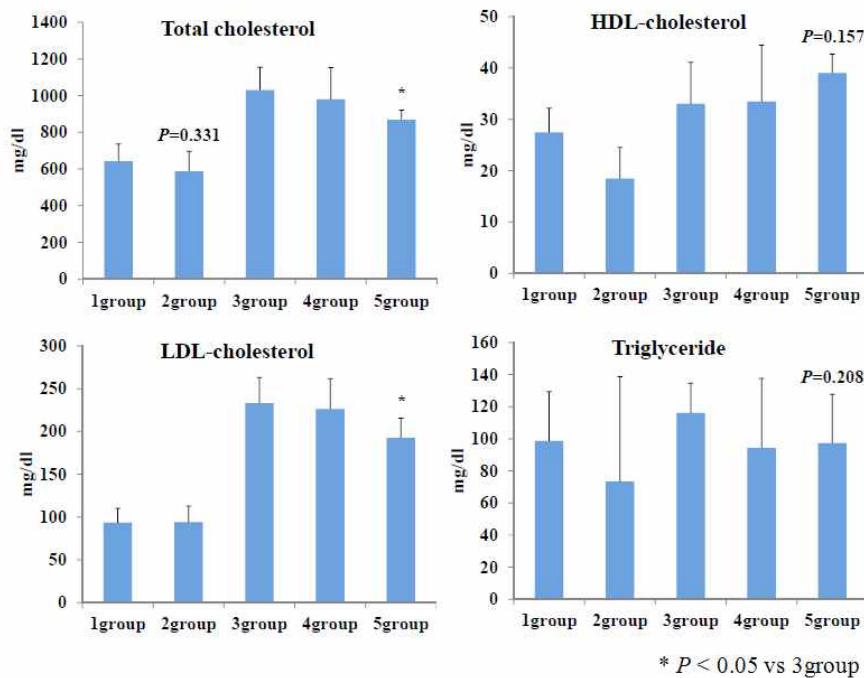


그림 199. Analysis of Cholesterol Level of Plasma

사. 약물 독성 검사를 위한 GOT, GPT, Albumin 분석

고지질 식이 또는 옻나무 추출물 섭취에 따른 간 독성 여부를 확인하기 위하여 혈중 GOT, GPT 및 Albumin 분석을 위해 혈액분석기기를 통해 분석한 결과 각 그룹간의 유의적인 차이는

나타나지 않은 것으로 율나무 추출물 섭취에 의한 GOT, GPT 및 Albumin의 변화는 나타나지 않은 것을 확인함.

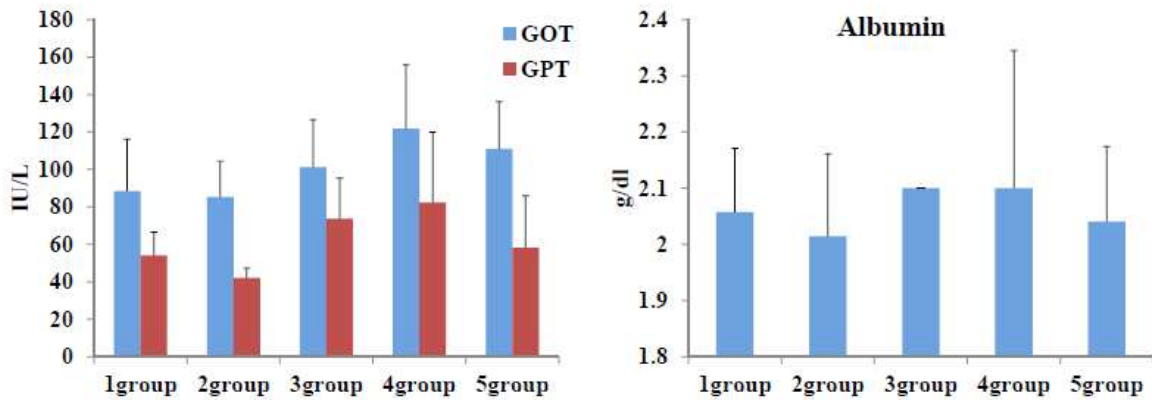


그림 200. Analysis of GOT, GPT & Albumin Level of Plasma

아. H&E 염색을 통한 지방간 개선 효과 분석

고지질 식이를 통해 유도되는 지방간 형성을 율나무 추출물 섭취 시 개선되는지 확인하기 위하여 2주간 diet 후 각 그룹의 마우스 간을 획득하여 10% 포르말린으로 고정 후 파라핀 블록을 제작하고 마이크로 절편기로 잘라 조직절편을 획득하여 H&E 염색을 실시한 후 지방간 형성 및 개선 효과를 분석. 각 그룹의 파라핀 블록을 잘라 획득한 조직절편을 H&E 염색을 실시하여 고지질 식이에 의한 지방간 형성과 율나무 추출물의 지방간 개선 효과를 분석한 결과 1차년도에서 보였던 개선효과가 심각한 고지혈증을 가지고 있는 ApoE KO 마우스에서는 나타나지 않음.

Analysis of fatty liver by H&E staining

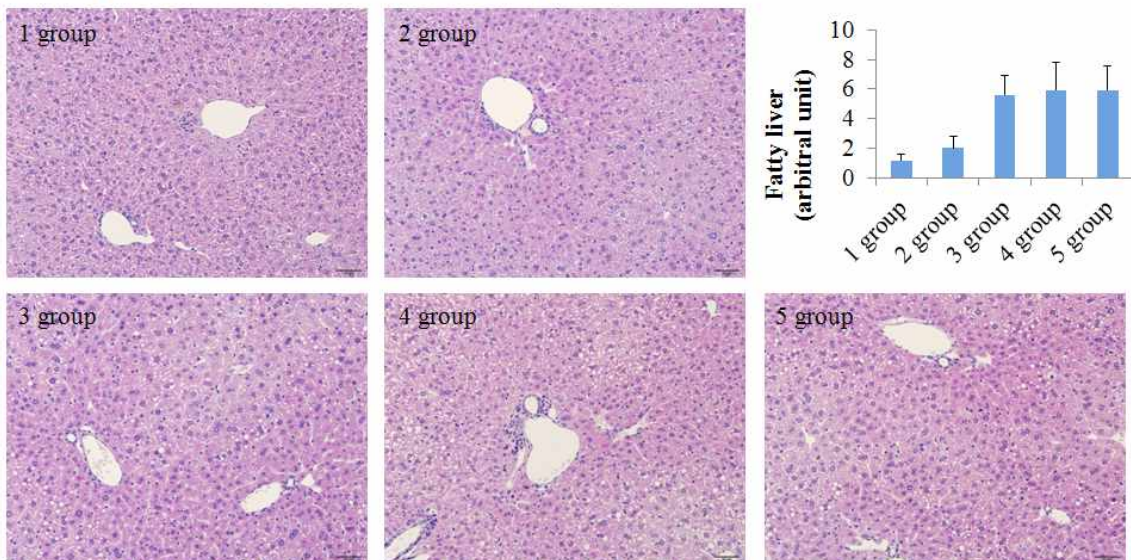


그림 201. Analysis of fatty liver by H&E staining

자. 옷나무 추출물의 지방 형성 억제 효과 분석

옷나무 추출물의 혈중 콜레스테롤 및 지방간 개선효과와 더불어 지방 형성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 2주간 diet 실시 후 각 그룹의 마우스 epididymal fat을 획득하여 무게를 측정한 후 마우스 몸무게와의 비율을 통해 마우스 지방 형성을 확인한 결과 고지질 식이를 실시한 3group에 비해 고지질 식이와 옷나무 추출물을 함께 식이한 4, 5group에서 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 보이지 않았으나 지방 세포의 사이즈 분석 결과 옷나무 추출물(1g/kg)을 함께 섭취시킨 경우 3group에 비해 5group에서 유의적으로 감소하는 것을 확인함 ($P < 0.01$)

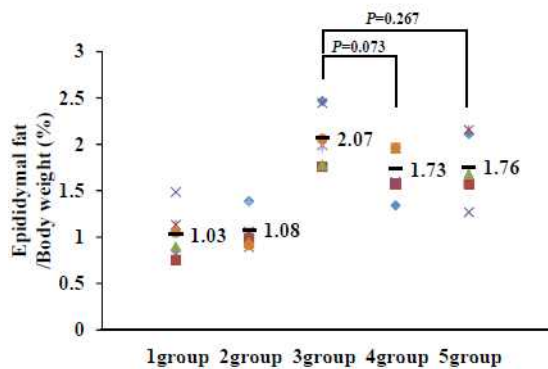


그림 202. The Percentage of Epididymal Fat

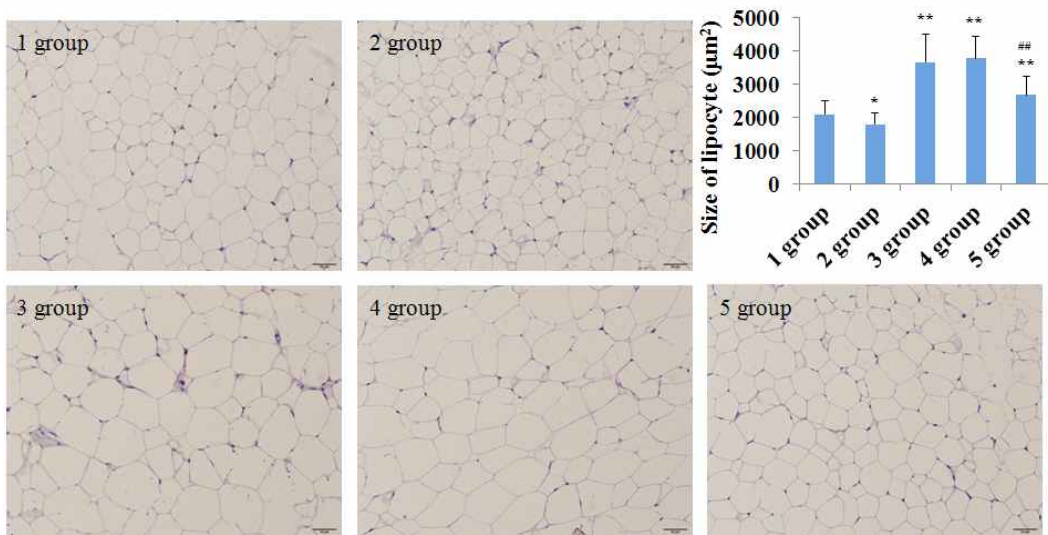


그림 203. Analysis of fatty liver by oil red O staining

차. 옷나무 추출물의 지방 형성 억제 효과 분석

옷나무 추출물의 혈중 콜레스테롤 및 지방간 개선효과와 더불어 지방 형성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 2주간 diet 실시하는 동안 각 그룹의 마우스 체중을 측정한 결과, 고지질 식이를 실시한 Group II에 비해 고지질 식이와 옷나무 추출물을 함께 식이 한 Group IV에서 통계적으로 유의하게 마우스 몸무게가 감소하는 것을 확인하였음($P < 0.001$). 그리고 2주간 diet 실

시 후 각 그룹의 마우스 epididymal fat을 획득하여 무게를 측정 후 마우스 몸무게와의 비율을 통해 마우스 지방 형성을 확인한 결과 고지질 식이를 실시한 Group II에 비해 고지질 식이와 옷나무 추출물을 함께 식이 한 Group III, IV에서 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 보이지 않았음.

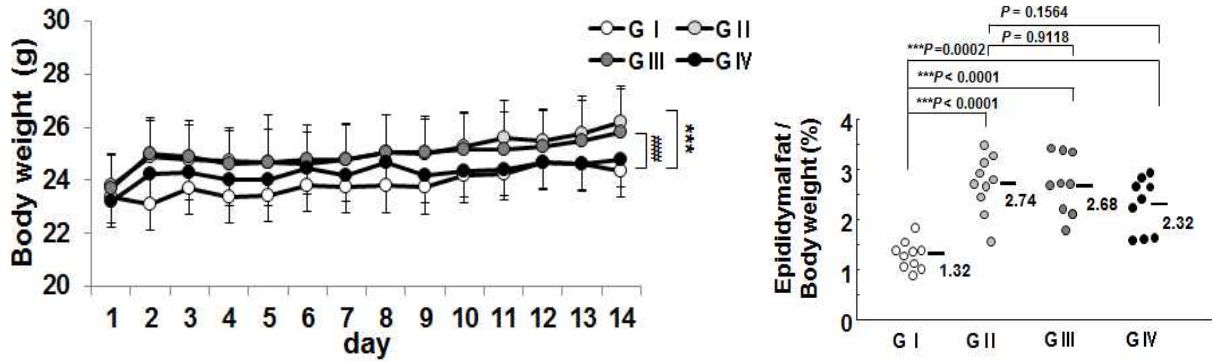


그림 204. Relative body & epididymal fat weight

카. 옷나무 추출물의 고지혈증 개선 작용 기전 분석

각 그룹의 마우스 간 및 장의 mRNA 획득을 위해 Trizol에 담긴 조직을 분쇄하여 RNA 추출 방법에 따라 RNA를 획득하고 oligo dT primer를 사용하여 mRNA를 cDNA로 합성한 후 지질 대사와 관련된 유전자를 확인할 수 있는 특정 primers를 사용하여 Real-Time PCR로 유전자 발현 변화를 확인함. 콜레스테롤 합성 및 대사를 조절하는 transcription factors의 발현을 조사하기 위해 SREBP1과 2, PPAR, HNF4alpha, LXR과 같은 유전자 10종, 콜레스테롤 수송 및 수용체 관련 유전자 13종 (ABCA1, LDLR, ApoA1 등), 콜레스테롤 배출을 위한 담즙 생합성 관련 유전자 4종 (CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1, CYP8B1)을 분석한 결과 C57BL/6 마우스 간 조직에서 CYP7A1, CYP8B1 유전자 발현이 옷나무 추출물(1g/kg) group에서 유의적으로 증가하였고 ApoE KO에서는 CYP27A1 유전자가 유의적으로 증가함.

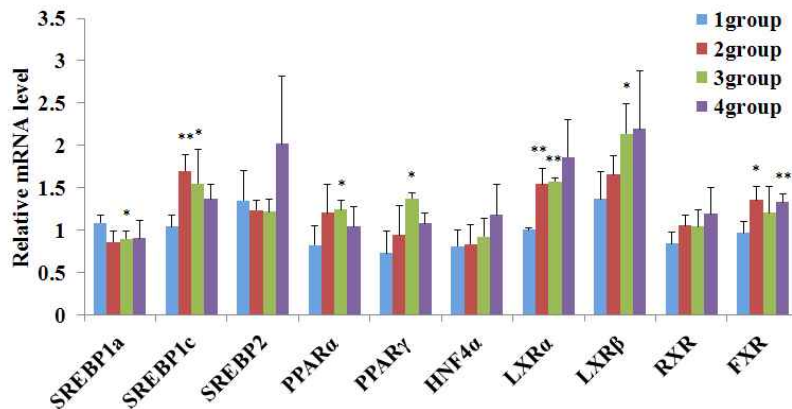


그림 205. 콜레스테롤 합성 및 대사 조절 Transcription Factors

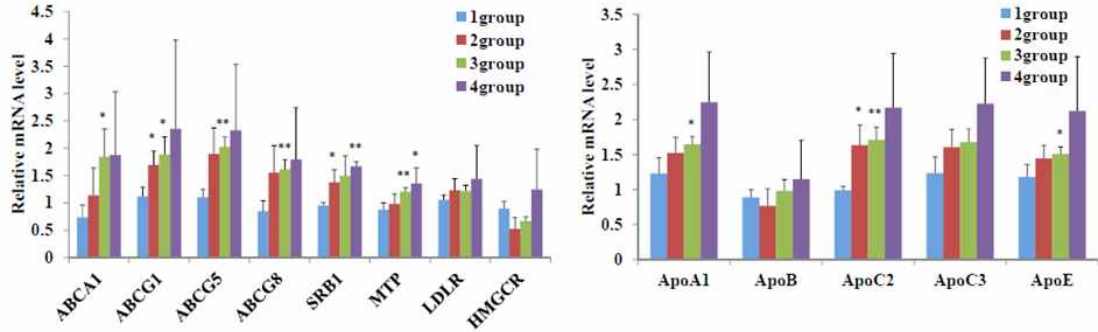


그림 206. 콜레스테롤 수송 및 수용체 관련 유전자

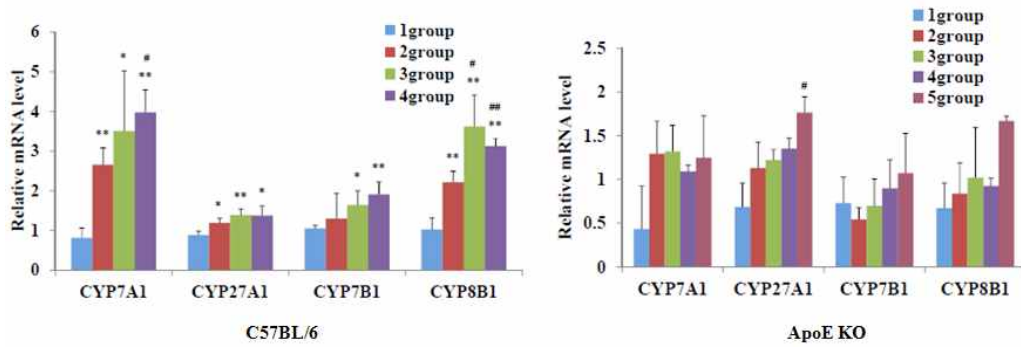


그림 207. 담즙산 생합성 관련 유전자(C57BL/6 마우스)

다. 윗나무 추출물의 고지혈증 개선 작용 기전 분석

각 그룹의 마우스 간 및 장의 mRNA 획득을 위해 Trizol에 담긴 조직을 분쇄하여 RNA 추출 방법에 따라 RNA를 획득하고 oligo dT primer를 사용하여 mRNA를 cDNA로 합성한 후 지질 대사와 관련된 유전자를 확인할 수 있는 특정 primers를 사용하여 Real-Time PCR로 유전자 발현 변화를 확인함. 분석 결과 고지질 식이를 실시한 Group II에 비해 고지질 식이와 고농도의 윗나무 추출물을 함께 식이한 Group IV의 간 조직에서 콜레스테롤 합성 및 대사를 조절하는 전사인자인 LXR α 과 콜레스테롤 배출을 위한 담즙산 생합성 관련 유전자인 CYP7A1, CYP8B1 유전자 발현이 유의적으로 증가하였음($P < 0.05$).

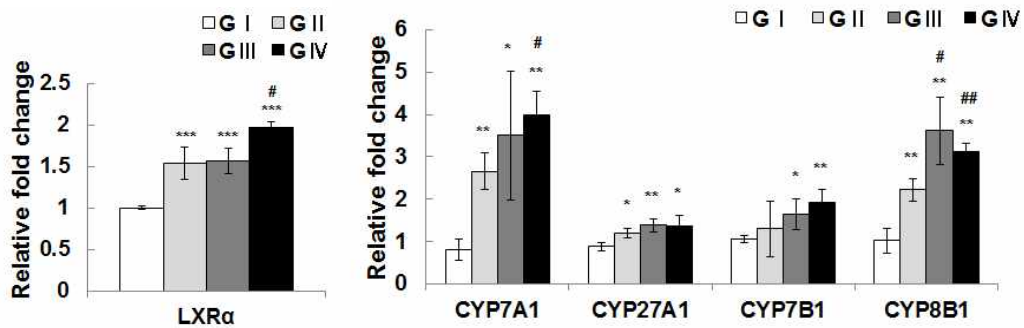


그림 208. Quantitative real-time PCR

파. 옷나무 추출물의 간 내 콜레스테롤 개선 효과 분석

콜레스테롤 합성 및 대사를 조절과 콜레스테롤 배출을 위한 담즙산 생합성 관련 유전자의 발현 증가와 더불어 이러한 조절이 실제 간 내 콜레스테롤을 개선할 수 있는지 확인하기 위하여, 냉동 보관한 각 그룹의 마우스 간의 일부를 분쇄하여 원심 분리한 상층액을 획득한 후 콜레스테롤과 담즙산 정도를 측정할 수 있는 colorimetric kit를 사용하여 간 내 콜레스테롤과 담즙산을 확인함. 분석 결과 고지질 식이를 실시한 Group II에 비해 고지질 식이와 옷나무 추출물을 함께 식이 한 Group III, IV의 간 조직에서 통계적으로 유의하게 콜레스테롤의 정도가 감소하였음($P < 0.05$, $P < 0.01$). 또한 간 내 합성된 담즙산의 정도가 고지질 식이를 실시한 Group II에 비해 고지질 식이와 옷나무 추출물을 함께 식이 한 Group III, IV에서 통계적으로 유의하게 증가됨을 확인함($P < 0.01$, $P < 0.001$).

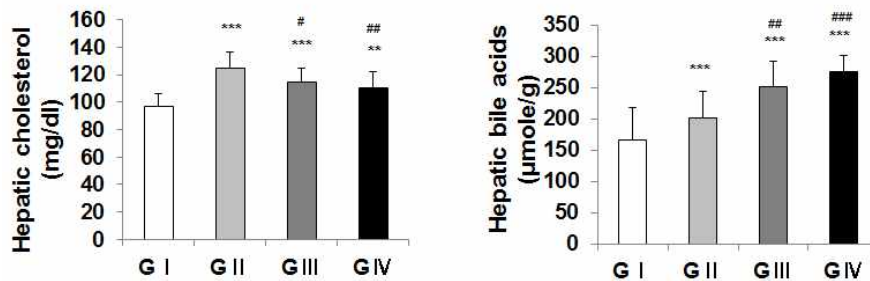


그림 209. Measurement of hepatic cholesterol and bile acids

하. 옷나무 추출물의 담즙산 생합성 촉진 작용 기전 분석

옷나무 추출물의 담즙산 생합성 촉진 작용 기전을 분석하기 위해, 간세포주인 alpha mouse liver (AML)-12에 콜레스테롤 배출을 위한 담즙산 생합성 관련 유전자인 Cyp7a1의 luciferase vector를 transfection 시킨 후, 옷나무 추출물을 처리하여 프로모터의 활성을 확인함. 분석 결과 옷나무 추출물을 처리한 AML-12 간세포에서 통계적으로 유의하게 Cyp7a1 프로모터 활성이 증가되어 있음을 확인함($P < 0.05$).

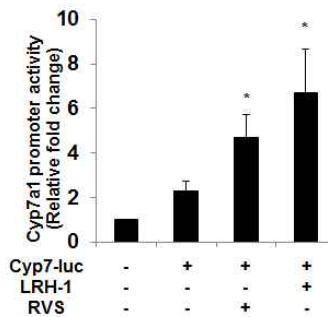


그림 210. Cyp7a1 luciferase assay

A. 옷나무 추출물 단일분리물질의 담즙 산 생합성 촉진 효과 검증

옷나무 추출물의 단일분리물질에 의한 효과를 검증하기 위해, 앞서 사용한 방법을 이용하여 콜레스테롤 배출을 위한 담즙 산 생합성 관련 유전자인 Cyp7a1 프로모터의 활성을 확인함. 분석 결과 여러 단일분리물질 중 Butein에 의해 Cyp7a1 프로모터 활성이 가장 높게 증가됨을 확인함($P < 0.05$). 또한, 이러한 Butein의 담즙 산 생합성 유전자의 활성화 촉진은 농도의존적으로 증가됨을 확인하였음($P < 0.01$).

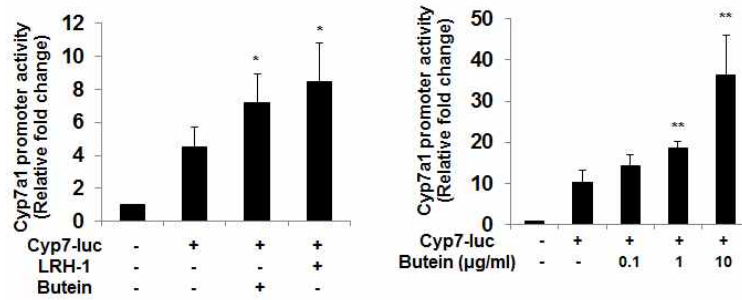


그림 211. Cyp7a1 luciferase activity was increased by Butein

2-5절. 옷나무 추출물의 약동력학 연구(2핵심 5세부)

1. 연구내용

가. 약물대사효소와 관련된 옷나무 추출물의 약물상호작용 연구

- 옷나무 추출물 및 주요 성분이 cytochrome P450 효소 활성화에 미치는 영향을 평가하여 약물 상호작용을 예측함.
- CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4에 대한 억제 작용을 평가함.
- Human liver microsome에서 cassette probe assay를 이용하여 분석

나. 옷나무 추출물의 체내동태 연구

- 옷나무 추출물의 PK 연구를 위한 생체시료에서의 분석법 확립
- 옷나무 추출물을 투여 후 지표성분에 대하여 혈중 농도 프로파일을 평가함.
- 정맥 및 경구 투여 후 생체 이용률 및 PK 특성을 규명.

2. 연구수행 결과

가. 옷나무추출물과 약물과의 상호작용 연구

(1) LC/MS/MS를 이용한 high throughput CYP inhibition assay법 확립

7종의 CYP isozyme (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4)에 의한 특이적 대사반응인 phenacetin O-deethylation, coumarin 7-hydroxylation, paclitaxel 6-hydroxylation, diclofenac 4-hydroxylation, mephenytoin 4-hydroxylation, dextromethorphan O-demethylation, midazolam 1-hydroxylation의 반응에 의해 생성되는 7종의 대사체를 동시에 분석할 수 있는 LC/MS/MS법을 확립함 (그림 212).

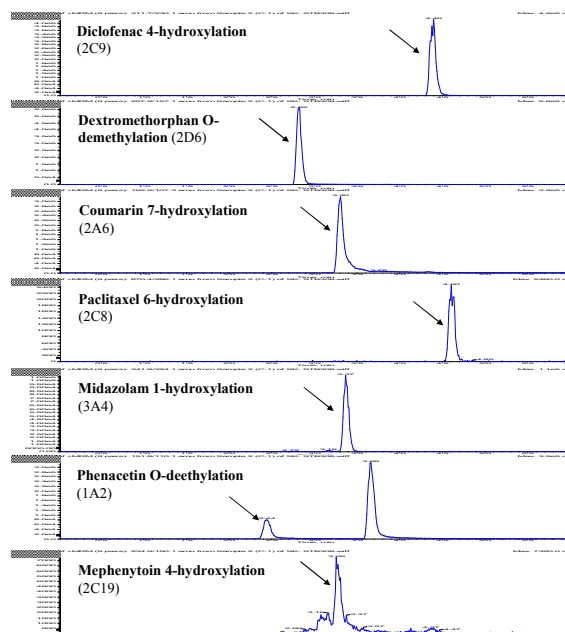


그림 212. 7종의 CYP효소의 선택적 대사체에 대한 LC/MS 크로마토그램

(2) 옷나무 추출물의 CYP 억제 작용 평가

Human liver microsome 분획을 이용하여 옷나무추출물과 CYP 효소의 선택적 기질을 동시에 처리한 후 CYP에 의한 대사체 생성율을 변화를 측정하여 옷나무추출물이 CYP isozyme의 대사활성에 미치는 영향을 평가함.

옷나무추출물을 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, CYP2C8과 CYP2C9에 대하여 억제작용을 나타내었으며 IC₅₀값은 각각 64.3, 68.1 $\mu\text{g/mL}$ 로 계산됨.

나머지 CYP isozyme에 대해서는 억제반응을 보이지 않거나 IC₅₀값이 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상으로 억제작용이 매우 미미함(표 122).

표 122. 옷나무추출물이 CYP isozyme의 대사활성에 미치는 영향

P450 isozyme	Remaining activities (% of control)					
	옷나무 추출물 ($\mu\text{g/mL}$)					
	1	3	10	30	100	IC ₅₀
CYP1A2 (Phenacetin O-deethylation)	98.3	101.9	99.2	82.5	53.1	>100
CYP2A6 (Coumarin 7-hydroxylation)	95.2	105.0	91.9	97.8	84.9	>100
CYP2C8 (Paclitaxel 6-hydroxylation)	108.5	106.1	78.3	56.9	29.8	64.3
CYP2C9 (Diclofenac 4-hydroxylation)	91.0	47.7	91.1	49.7	40.2	68.1
CYP2C19 (Mephenytoin 4-hydroxylation)	101.2	115.9	99.3	95.7	68.5	>100
CYP2D6 (Dextromethorphan O-demethylation)	94.8	115.0	103.0	87.8	87.8	>100
CYP3A4 (Midazolam 1-hydroxylation)	91.0	99.9	87.0	85.0	63.5	>100

(3) 옷나무 추출물의 CYP 억제 작용 기전 연구

Human liver microsome 분획에 옷나무추출물을 먼저 preincubation한 후 CYP 효소의 선택적 기질을 처리하여 옷나무추출물에 의한 CYP 억제 작용이 경쟁적 억제인지, mechanism-based inactivation에 의한 억제인지를 규명하고자 함.

옷나무추출물을 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 먼저 20분간 preincubation한 후, CYP효소 억제 작용을 평가하였을 때, preincubation 하지 않은 경우에 비하여 CYP2C8, CYP1A2 및 CYP2D6의 억제 작용이 증가됨. 따라서 옷나무추출물이 이들 CYP isozyme에 대하여 mechanism-based inactivation에 의한 억제작용을 할 가능성이 있으나 그 영향은 크지 않을 것으로 사료됨(표 123).

표 123. 윗나무추출물을 preincubation했을 때 CYP isozyme에 대한 억제 작용

P450 isozyme	Remaining activities (% of control)					IC ₅₀
	윗나무 추출물 (μg/mL)					
	1	3	10	30	100	
CYP1A2 (Phenacetin O-deethylation)	96.9	84.1	77.5	72.7	34.5	71.2
CYP2A6 (Coumarin 7-hydroxylation)	103.1	89.1	89.4	98.9	65.0	>100
CYP2C8 (Paclitaxel 6-hydroxylation)	86.3	73.0	58.2	45.1	16.5	43.1
CYP2C9 (Diclofenac 4-hydroxylation)	89.1	85.2	67.6	63.0	35.6	67.1
CYP2C19 (Mephenytoin 4-hydroxylation)	98.3	82.8	90.3	91.1	65.1	> 100
CYP2D6 (Dextromethorphan O-demethylation)	83.7	73.3	67.6	65.9	40.4	73.3
CYP3A4 (Midazolam 1-hydroxylation)	106.5	89.0	88.0	91.9	52.6	> 100

(4) 윗나무 추출물의 주요성분에 대한 CYP 억제 작용 평가

윗나무추출물의 주요성분인 fustin, fisetin, gallic acid에 대하여 0.1~10 μM의 농도 범위에서 각 성분이 CYP 효소에 의한 대사 작용에 미치는 영향을 평가함.

Fustin의 경우 CYP2C8과 CYP2C19에 대하여 농도 의존적인 억제활성을 보였으며 IC50값이 모두 10 μM 이상으로 실제 체내에서 CYP 효소에 의한 약물 대사를 억제할 가능성은 매우 희박함(표 124).

표 124. Fustin에 의한 CYP 대사 억제 작용

P450 isozyme	Remaining activities (% of control)					IC ₅₀
	Fustin (μM)					
	0.1	0.3	1	3	10	
CYP1A2 (Phenacetin O-deethylation)	103.7	92.8	91.4	100.2	73.6	>10
CYP2A6 (Coumarin 7-hydroxylation)	104.2	100.3	98.9	100.3	97.2	>10
CYP2C8 (Paclitaxel 6-hydroxylation)	97.4	86.1	95.8	84.9	50.4	10
CYP2C9 (Diclofenac 4-hydroxylation)	113.9	90.1	96.6	94.1	84.8	>10
CYP2C19 (Mephenytoin 4-hydroxylation)	116.9	90.7	87.2	96.5	68.2	>10
CYP2D6 (Dextromethorphan O-demethylation)	100	103.4	99.7	105.1	106.7	>10
CYP3A4 (Midazolam 1-hydroxylation)	100.8	101.5	102.5	102.9	99.5	> 10

Fisetin의 경우 대부분 모든 CYP isozyme에서 농도 의존적인 억제 작용을 보였으며, 특히, CYP2C8의 경우 IC50값이 0.7 μM로 매우 강한 억제 작용을 보임 (표 125). 따라서 윗나무추출물에 의한 CYP2C8의 억제는 fisetin에 의한 작용일 것으로 사료됨.

표 125. Fisetin에 의한 CYP 대사 억제 작용

P450 isozyme	Remaining activities (% of control)					
	Fisetin (μM)					IC ₅₀
	0.1	0.3	1	3	10	
CYP1A2 (Phenacetin O-deethylation)	100.1	96.4	93.9	84.9	41.2	8.6
CYP2A6 (Coumarin 7-hydroxylation)	102.8	98.4	99.0	91.3	54.2	>10
CYP2C8 (Paclitaxel 6-hydroxylation)	100.1	61.5	48.5	32.1	11.0	0.7
CYP2C9 (Diclofenac 4-hydroxylation)	100.9	92.9	66.5	70.0	43.0	7.9
CYP2C19 (Mephenytoin 4-hydroxylation)	100.1	108.2	105.9	91.8	52.9	>10
CYP2D6 (Dextromethorphan O-demethylation)	100.3	103.5	98.1	97.5	66.4	>10
CYP3A4 (Midazolam 1-hydroxylation)	100.2	99.2	99.8	92.1	52.5	>10

Gallic acid의 경우 CYP2C9을 제외한 모든 CYP isozyme에서 농도의존적인 억제 작용을 보였으나, IC₅₀값이 모두 10 μM 이상으로 실제 체내에서 CYP 효소에 의한 약물 대사를 억제할 가능성은 매우 희박할 것으로 사료됨(표 126).

표 126. Gallic acid에 의한 CYP 대사 억제 작용

P450 isozyme	Remaining activities (% of control)					
	Gallic acid (μM)					IC ₅₀
	0.1	0.3	1	3	10	
CYP1A2 (Phenacetin O-deethylation)	98.0	95.9	70.0	70.4	66.6	>10
CYP2A6 (Coumarin 7-hydroxylation)	105.8	92.2	65.9	66.6	65.7	>10
CYP2C8 (Paclitaxel 6-hydroxylation)	115.2	86.3	65.8	42.3	57.3	>10
CYP2C9 (Diclofenac 4-hydroxylation)	104.2	101.6	109.0	95.4	104.7	>10
CYP2C19 (Mephenytoin 4-hydroxylation)	103.0	101.2	72.9	69.9	64.2	>10
CYP2D6 (Dextromethorphan O-demethylation)	94.4	87.4	69.4	68.8	66.6	>10
CYP3A4 (Midazolam 1-hydroxylation)	112.6	81.0	57.3	60.5	57.8	>10

나. 옷나무추출물의 지표성분 정량분석법

(1) LC/MS/MS를 이용한 옷나무추출물의 지표성분의 분석법 확립

옷나무추출물의 9종의 지표성분 gallic acid, 3,4 dihydroxybenzoic acid (3,4DHBA), 2,4 dihydroxybenzoic acid (2,4DHBA), fustin, taxifolin, garbanzol, butin, fisetin, sulfuretin을 동시에 분석할 수 있는 LC/MS/MS법을 확립함(그림 213).

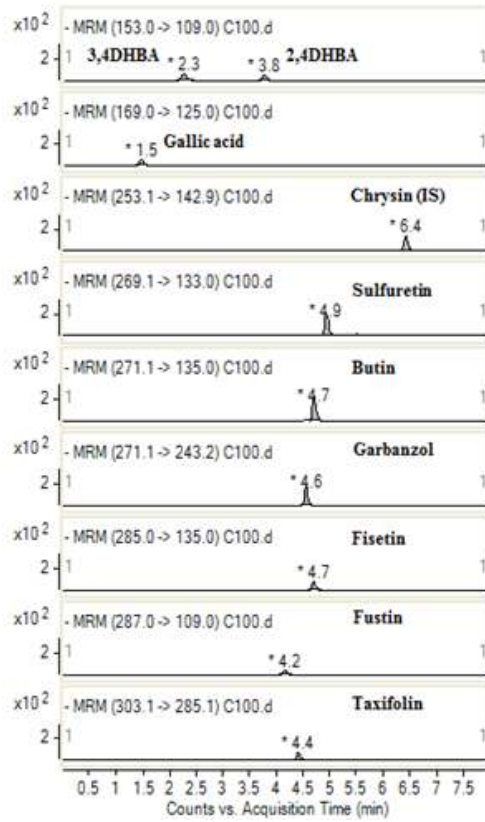


그림 213. 9가지의 옷나무추출물의 지표성분에 대한 LC/MS/MS 크로마토그램

(2) SD rat 동물모델에서의 옷나무추출물 지표성분의 혈중농도 프로파일 분석

각 지표성분들의 검량선의 범위를 gallic acid, 3,4DHBA, 2,4DHBA, fustin, taxifolin, garbanzol, fisetin, sulfuretin의 경우에는 1 -1000ng/mL로 butin의 경우에는 1 - 500ng/mL로 설정하였으며, 모든 지표성분의 검량선의 상관계수의 값이 0.998이상으로 직선성을 나타냄(그림 214).

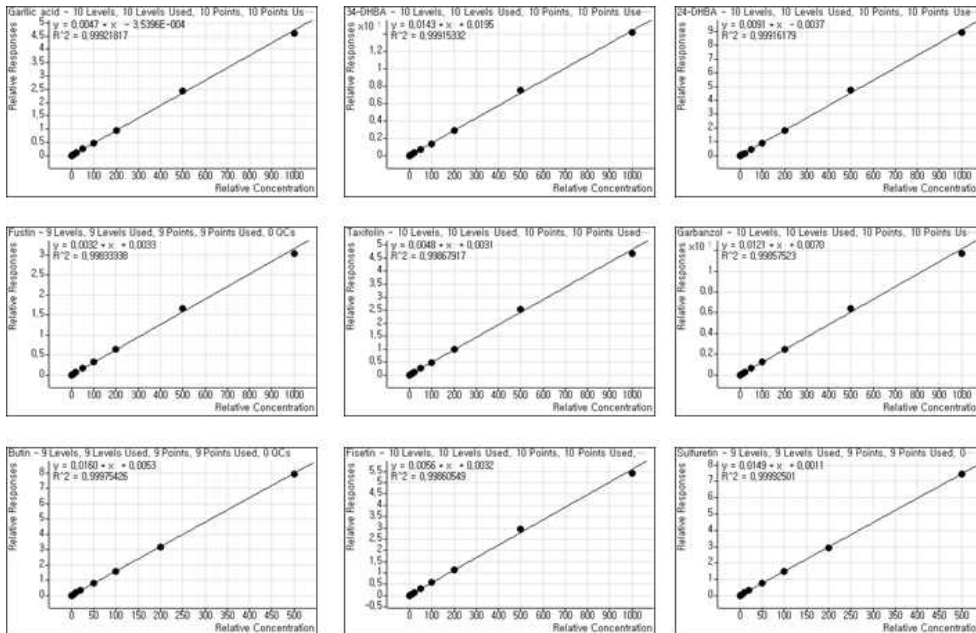


그림 214. 지표성분 9가지의 각 검량선 그래프

SD rat에 옷나무추출물 1.5g/kg의 용량으로 경구투여를 하여 혈장 내의 각 지표성분들과 지표성분의 glucuronide 대사체를 시간 별로 농도를 측정함. 9개의 옷나무추출물 지표성분 중 gallic acid는 glucuronide 대사체가 검출되지 않아 지표성분만을 시간대 별로 측정함 (그림 215).

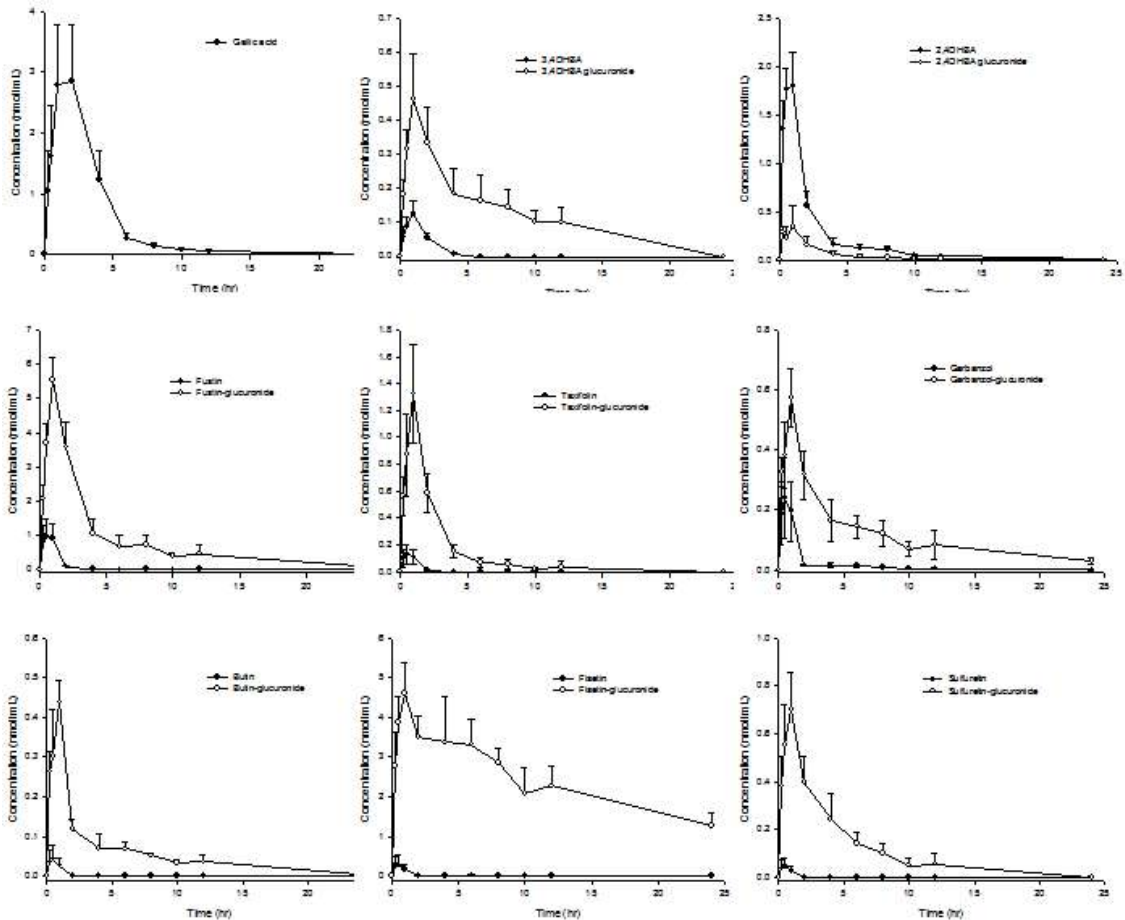


그림 215. 옷나무추출물의 지표성분과 지표성분의 glucuronide 대사체의 시간 별 혈중농도 프로파일 (●; 지표성분, ○; 지표성분의 glucuronide 대사체)

다. 옷나무추출물의 지표성분 정량분석의 PK 파라미터 산출 및 평가

(1) 옷나무추출물의 지표성분 정량분석의 PK 파라미터 산출

각 지표성분과 지표성분의 glucuronide 대사체 별로 AUC(nmol•hr/mL), C_{max} (nmol/mL), T_{max} (hr), $T_{1/2}$ (hr), MRT_{0-} (hr) 5가지의 PK 파라미터를 산출해냄(표 124).

표 124. 옷나무추출물의 각 지표성분 및 지표성분의 glucuronide 대사체의 Pharmacokinetics 파라미터

Compounds	AUC (nmol·hr/mL)	C _{max} (nmol/mL)	T _{max} (hr)	T _{1/2} (hr)	MRT _{0-t} (hr)
24DHBA	4.15 ± 0.74	1.83 ± 0.33	0.70 ± 0.27	3.52 ± 1.69	2.42 ± 0.30
24DHBA- glucuronide	1.95 ± 0.76	0.44 ± 0.21	1.40 ± 0.55	5.90 ± 2.08	5.56 ± 1.28
34DHBA	0.21 ± 0.08	0.13 ± 0.04	1.00 ± 0.00	0.79 ± 0.07	1.22 ± 0.21
34DHBA- glucuronide	3.40 ± 0.99	0.46 ± 0.13	1.00 ± 0.00	15.37 ± 9.40	8.73 ± 0.29
Butin	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.45 ± 0.11	-	0.54 ± 0.03
Butin- glucuronide	1.38 ± 0.23	0.44 ± 0.06	1.00 ± 0.00	5.44 ± 1.27	4.99 ± 1.24
Fisetin	0.55 ± 0.27	0.28 ± 0.27	0.45 ± 0.11	7.51 ± 2.10	5.28 ± 2.56
Fisetin-glucuronide	57.65 ± 3.92	4.65 ± 0.75	1.60 ± 1.34	16.64 ± 5.80	9.41 ± 0.77
Fustin	1.42 ± 0.66	1.01 ± 0.51	0.80 ± 0.27	1.79 ± 2.17	1.12 ± 0.35
Fustin-glucuronide	21.10 ± 3.37	5.53 ± 0.67	1.00 ± 0.00	8.12 ± 3.47	5.09 ± 0.57
Garbanzol	0.41 ± 0.17	0.24 ± 0.13	0.60 ± 0.22	5.44 ± 1.22	2.52 ± 0.47
Garbanzol-glucuronide	2.91 ± 0.59	0.58 ± 0.10	0.58 ± 0.10	7.45 ± 2.51	6.58 ± 0.66
Sulfuretin	0.03 ± 0.03	0.05 ± 0.04	0.50 ± 0.00	-	0.54 ± 0.03
Sulfuretin-glucuronide	2.68 ± 0.36	0.70 ± 0.16	1.00 ± 0.00	3.46 ± 1.14	3.84 ± 1.15
Taxifolin	0.15 ± 0.09	0.13 ± 0.07	0.70 ± 0.27	0.37 ± 0.03	0.73 ± 0.09
Taxifolin-glucuronide	2.96 ± 0.47	1.32 ± 0.36	1.00 ± 0.00	2.06 ± 0.74	2.25 ± 0.41
Garlic acid	10.71 ± 3.47	3.02 ± 1.01	1.60 ± 0.55	1.97 ± 0.55	2.75 ± 0.14

(2) 옷나무추출물의 약동학 특성 평가

혈장 내, 3,4DHBA의 glucuronide 대사체의 AUC, C_{max}, t_{1/2}, MRT는 3,4DHBA에 비해 각각 15.9, 3.7, 19.4, 7.1배 높았고 유의성 있는 차이가 있었다. 이 결과로부터 3,4DHBA는 소장에서 흡수된 후 혈장 중에서 주로 glucuronide 대사체 형태로 존재한다는 것을 알 수 있다. 그리고 혈중최고농도는 모두 1 hr에 나타났고 3,4DHBA가 6시간 후에 검출되지 않았는데 이런 결과로부터 3,4DHBA가 6시간 후에는 대부분 glucuronide 대사체로 전환된다고 추측할 수 있다.

혈장 내, 2,4DHBA의 AUC와 C_{max}는 glucuronide 대사체에 비하여 각각 2.1, 4.2배 높았다. 이 결과로부터 2,4DHBA는 소장에서 흡수된 후 혈장 중에서 주로 2,4DHBA의 형태로 존재한다는 것을 알 수 있다. 그리고 혈중농도는 각각 0.7, 1 hr에 최고 혈중농도를 나타냈다.

혈장 내, fustin의 glucuronide 대사체의 AUC, C_{max}, t_{1/2}, MRT는 fustin에 비해 각각 14.9, 5.5, 4.5, 4.6배 높았고 유의성 있는 차이가 있었다. 이 결과로부터 fustin은 소장에서 흡수된 후 혈장 중에서 주로 glucuronide 대사체 형태로 존재한다는 것을 알 수 있다. 그리고 혈중최고농도

는 각각 0.8, 1 hr에 나타났다.

혈장 내, taxifolin glucuronide 대사체의 AUC, C_{max} , MRT는 taxifolin에 비해 각각 19.3, 10.0, 5.6, 3.1배 높았고 유의성 있는 차이가 있었다. 이 결과로부터 taxifolin은 소장에서 흡수된 후 혈장 중에서 주로 glucuronide 대사체 형태로 존재한다는 것을 알 수 있다. 그리고 혈중최고농도는 각각 0.7, 1 hr에 나타났고 taxifolin은 4시간 후 부터 검출되지 않았는데 이런 결과로부터 우리는 taxifolin이 2시간 후에는 대부분 glucuronide 대사체로 전환된다고 추측할 수 있다.

혈장 내, garbanzol의 glucuronide 대사체의 AUC, C_{max} , $t_{1/2}$, MRT는 garbanzol에 비해 각각 7.1, 2.4, 1.4, 2.6배 높았고 유의성 있는 차이가 있었다. 이 결과로부터 garbanzol은 소장에서 흡수된 후 혈장 중에서 주로 glucuronide 대사체 형태로 존재한다는 것을 알 수 있다. 그리고 혈중최고농도는 각각 0.6, 1 hr에 나타났다.

혈장 내, butin의 glucuronide 대사체의 AUC, C_{max} , MRT는 butin에 비해 각각 44.3, 10.3, 9.23배 높았고 유의성 있는 차이가 있었다. 이 결과로부터 butin은 소장에서 흡수된 후 혈장 중에서 주로 glucuronide 대사체 형태로 존재한다는 것을 알 수 있다. 그리고 혈중최고농도는 각각 0.5, 1 hr에 나타났고 butin은 2시간 후에는 검출되지 않았는데 이런 결과로부터 우리는 butin이 2시간 후에는 대부분 glucuronide 대사체로 전환된다고 추측할 수 있다.

혈장 내, fisetin의 glucuronide 대사체의 AUC, C_{max} , $t_{1/2}$, MRT는 fisetin에 비해 각각 105.2, 16.8, 2.2, 1.8배 높았고 유의성 있는 차이가 있었다. 이 결과로부터 fisetin은 소장에서 흡수된 후 혈장 중에서 주로 glucuronide 대사체 형태로 존재한다는 것을 알 수 있다. 그리고 혈중최고농도는 각각 0.5, 2 hr에 나타났다.

혈장 내, sulfuretin glucuronide 대사체의 AUC, C_{max} , MRT는 sulfuretin에 비해 각각 77.8, 14.9, 7.2배 높았고 유의성 있는 차이가 있었다. 이 결과로부터 garbanzol은 소장에서 흡수된 후 혈장 중에서 주로 glucuronide 대사체 형태로 존재한다는 것을 알 수 있다. 그리고 혈중최고농도는 각각 0.5, 1 hr에 나타났고 sulfuretin은 2시간 후부터 검출되지 않았는데 이런 결과로부터 우리는 sulfuretin이 2시간 후에는 대부분 glucuronide 대사체로 전환된다고 추측할 수 있다.

옻나무 추출물을 rat에 경구 투여했을 때 소장에서 흡수된 후 혈장에서 gallic acid는 glucuronide 대사체가 발견되지 않았고 gallic acid자체로 존재하는 것이 확인되었고 24DHBA는 glucuronide 대사체가 발견되었지만 주로는 24DHBA로 존재하는 것이 확인되었다. 34DHBA, butin, fisetin, fustin, sulfuretin, garbanzol, taxifolin은 혈장 내 glucuronide 대사체 형태로 존재하는 것이 확인되었으며 AUC를 비교할 때 gallic acid, fisetin, fustin이 다른 성분들에 비하여 혈장에서 비교적 높은 농도를 나타냈다.

2-6절. 옷나무 추출물의 항산화 기능성 검증 및 비교(2핵심 6세부)

1. 연구내용

가. Murine macrophage cell line을 통한 염증성 산화스트레스 회복 효과

(1) Nitric Oxide

Cell을 2×10^5 cell/well에 농도로 96well plate에 분주한 후 24시간 incubation을 시킨 후 sample(옷나무 : 100, 50, 25, 12.5, 6.25ug/ml)에 농도로 20ul씩 처리 후 24시간 incubation을 시켰다. 24시간 후 LPS를 2ug/ml을 18ul씩 대조군을 제외한 각 well에 처리 한 후 18시간 incubation을 시킨 후 상층액 100ul를 새 plate에 옮긴 후 griess reagent 100ul와 섞어 10분간 반응 시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

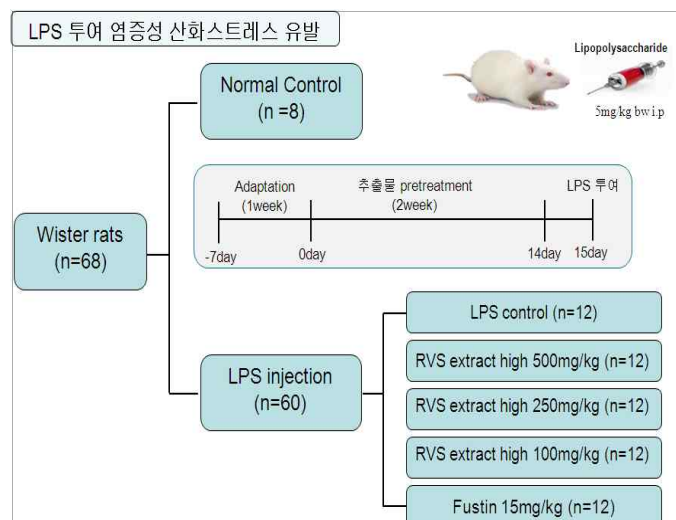
(2) ROS(reactive oxygen species)

Cells in the 8well cell culture slide에 cell을 1×10^4 의 농도로 분주한 후 24시간 incubation을 하였다. DPBS로 washing 후에 LPS(2ug/ml)로 18시간 처리한 후 sample을 농도별로 1시간 처리 후 다시 DPBS로 washing을 하였다. 그뒤 DMSO에 녹인 DCF-DA를 30분간 처리한 후 형광현미경을 통해 관찰하였다.

나. 동물실험을 통한 옷나무추출물의 염증성 산화스트레스에 대한 항산화 효과 확인

(1) 동물 사육

- Wister 종 수컷 흰쥐 68마리를 6군으로 나누어 3주간 사육시킴.
- 옷나무 추출물의 용량을 달리하여 옷나무 추출물과 fustin을 2주간 경구 투여함.
- 한 군에는 LPS를 투여하지 않고(saline투여), 나머지 다섯 군에는 LPS를 투여하여 산화스트레스를 유발시킨 9시간 후 바로 희생
- 부검 후 Biomarker 분석을 위해 혈액, 간, 신장을 -80°C 에 저장



(2) GOT, GPT 측정

아산제약 kit를 사용하였다. 기질액 100ul를 넣고 37°C에서 5분간 방치한다. 혈청(serum, plasma) 20ul를 잘 혼합하여, 37°C에서 got는 60분 gpt는 30분간 방치한다. 정색시액 100ul를 잘 혼합하여, 실온에서 20분간 방치한다. 0.4N NaOH용액을 1ml 잘 혼합하여 실온에서 10분간 방치한다. 60분 이내 505nm에서 흡광도를 찍는다.

(3) MDA, Catalase 측정

(가) MDA

- ① 간 조직 0.1g에 phosphate buffer(0.1M Na_2HPO_4 pH 7.4) 300ul를 가하여 homogenize 한 다음 1.5ml씩 duplicate 취한다.
- ② 33mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solution 5ul, 0.33mM BHT 5ul, 33mM L-ascorbic acid 5ul를 가하여 혼합한 후 37°C에서 30분간 incubation한다.
- ③ 10% TCA sol. 150ul를 가하여 12,000g (11,000rpm)에서 10분간 원심분리한다.
- ④ 상층액 200ul를 취하여 1% TBA reagent 50ul 넣어준다.
- ⑤ 95도에서 10분간 끓인 후 실온에서 냉각시켜 발색시킨다.
- ⑥ 상층액을 취하여 파장 532nm에서 비색정량한다.

(나) Catalase

- ① liver 현탁액 150 μl 를 준비한다.
- ② 1.35ml의 10mM Tris - 1mM EDTA buffer를 넣는다.
- ③ 0.01M phosphate buffer(pH 7.4)를 넣어 적당히 희석한다.
- ④ 15ml 튜브에 250mM KH_2PO_4 -NaOH buffer(pH 7.0) 300 μl , 100% methanol 300 μl , 0.27% H_2O_2 60 μl 을 넣는다. 튜브에 standard와 전처리한 sample 600 μl 넣고 vortexing한 후 20°C에서 20분간 인큐베이터에서 incubation 한다.
- ⑤ 7.8M KOH 300 μl 을 넣어 반응을 종결한다.
- ⑥ 34.2mM purpald 용액 600 μl 을 넣고 vortexing 한 후 인큐베이터 20°C에서 10분간 incubation 시킨다.
- ⑦ 65.2mM Potassium periodate 300 μl 가하여 발색한다.
- ⑧ 분광광도계 550nm에서 흡광도를 측정한다.

(4) Nitric Oxide(NO)

(가) 실험방법 : Bioassay kit를 사용하였다.

- ① Liver 조직 0.3g을 PBS 1ml에 homogenize 한 후 10,000g 4°C에서 Centrifuge하였다. (sample이 혈액일 경우 이과정을 생략한다.)
- ② 현탁액 150ul와 ZnSO_4 8ul와 8ul NaOH 혼합 후 14000g에서 10분간 Centrifuge하여

deproteinatin과정을 거친 후 상층액 100ul를 새 1.5tube에 옮겼다.

- ③ Working Reagent(100ul reagent A, 4ul reagent B, 100ul reagent C)를 sample수만큼 용량을 만들어 놓는다.
- ④ 96well plate에 satadard와 sample을 각각 100ul씩 분주 한 후 Working reagent를 200ul씩 섞어준 후 37°C 에서 60분간 반응시켰다.
- ⑤ 540nm에서 흡광도를 측정한다.

(5) Cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α)

(가) 실험방법 USCN kit를 사용하였다.

- ① 7개 well은 standard, 1개 well은 Blank, 나머지는 sample로 결정한다. 농도별로 희석한 standard와 blank, sample을 100ul씩 well에 넣는다.
- ② Plate strip으로 잘 봉합하여 37°C 에서 2시간 incubation합니다)
- ③ 각 well에 있는 용액을 버린다. (절대로 washing을 하지 않는다)
- ④ Detection Reagent A를 각 well에 100ul씩 넣고, Plate strip으로 잘 봉합하여 37°C 에서 1시간 incubation한다.
- ⑤ 각 well에 있는 용액을 버리고 well마다 (1 \times) 350ul Wash Solution로 세 번 씻어냅니다.
- ⑥ Detection Reagent B를 각 well에 100ul씩 넣고, Plate strip으로 잘 봉합하여 37°C 에서 30분 incubation한다.
- ⑦ 각 well에 있는 용액을 버리고 well마다 (1 \times) 350ul Wash Solution 로 다섯 번 씻어냅니다.
- ⑧ 각 well에 Substrate Solution 90ul씩 넣고, 새 Plate strip으로 잘 봉합하여 37°C 에서 15분 ~ 25분 incubation한다. (절대 30분을 넘기 않는다) - 빛차단, 색이 blue로 바뀜
- ⑨ 각 well에 Stop Solution well 한쪽 벽면을 통해 50ul씩 넣는다. (색이 yellow로 바뀐다. 부드럽게 흔들어 충분히 섞일 수 있게 합니다.)
- ⑩ 450nm에서 흡광도를 측정합니다.

2. 연구수행결과

가. Murine macrophage cell line을 통한 염증성 산화스트레스 회복 효과

(1) Nitric Oxide

RVS sample에서 대조군과 LPS처리한 cell에 NO의 생성량을 비교했을 때 유의적으로 LPS를 처리한 cell에서 NO의 생성량이 증가하였고 LPS만 처리한 cell과 sample과의 비교에서는 sample의 농도가 고농도가 될수록 NO의 생성량이 줄어드는 것을 알 수 있었다. Fustin의 sample도 RVS sample과 마찬가지로 sample의 농도가 높아질수록 NO의 생성량이 줄어드는 것

을 알 수 있었다. 하지만 Fistin같은 경우 LPS만 처리했을 때 NO의 생성량이 증가하는 것을 볼 수 있었지만 sample간의 유적으로 차이가 나타나지는 않았다.

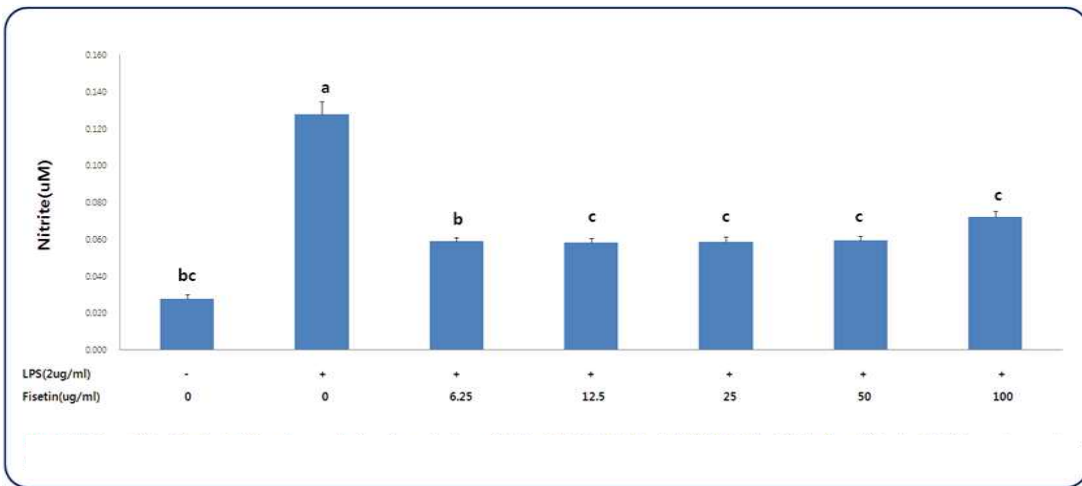
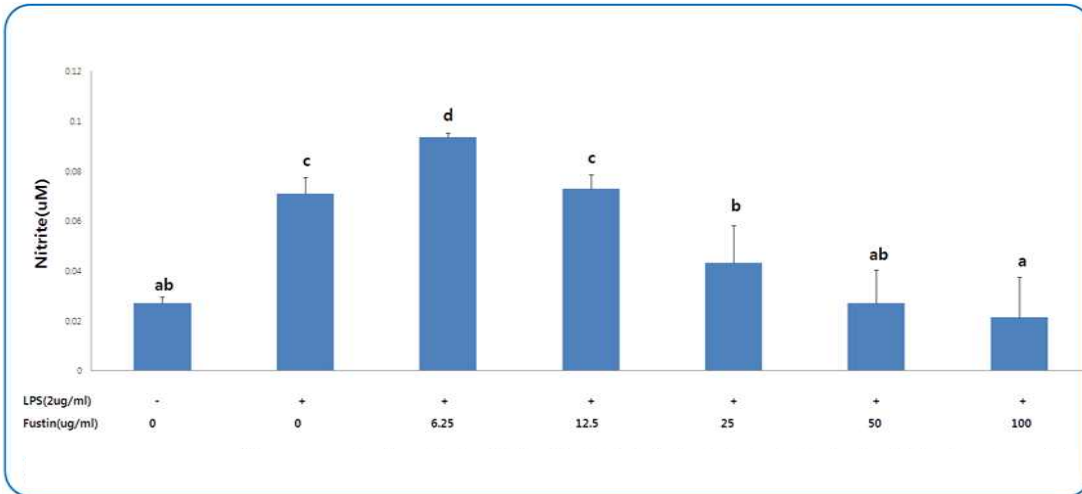
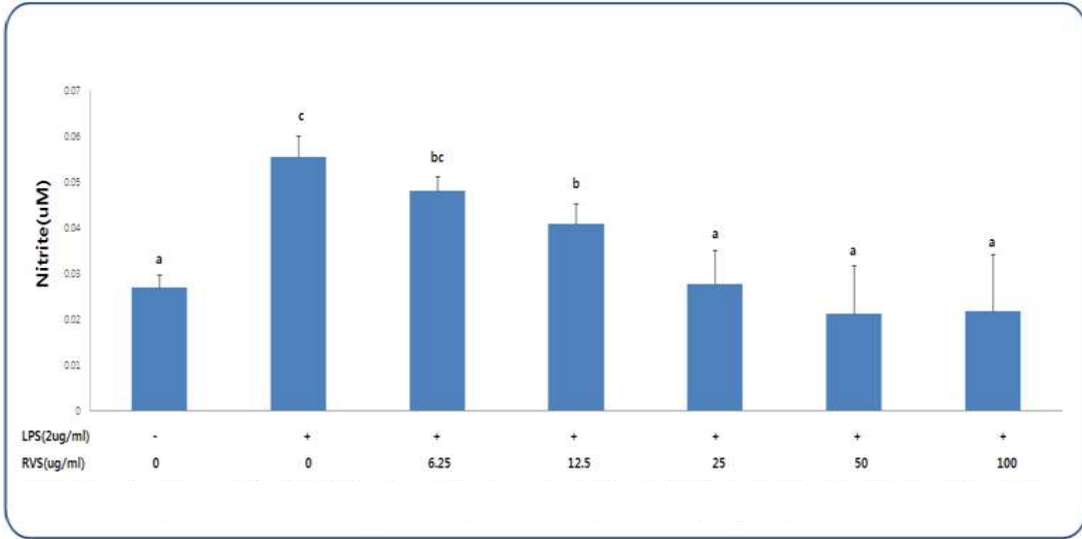


그림 216. Inhibitory effect of RVS, Fustin and fisetin for productin of nitric oxide(NO)

나. ROS(reactive oxygen species)

(A)대조군에 비해 (B)LPS만 처리한 cell에서 ROS생성량이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. (C)웃나무, (D)Fustin sample을 농도별로 처리한 결과 고농도로 갈수록 ROS의 양이 줄어드는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 (E)Fisetin, (F)Sulfuretin sample을 농도별로 유의적 차이가 나타나지 않았다.

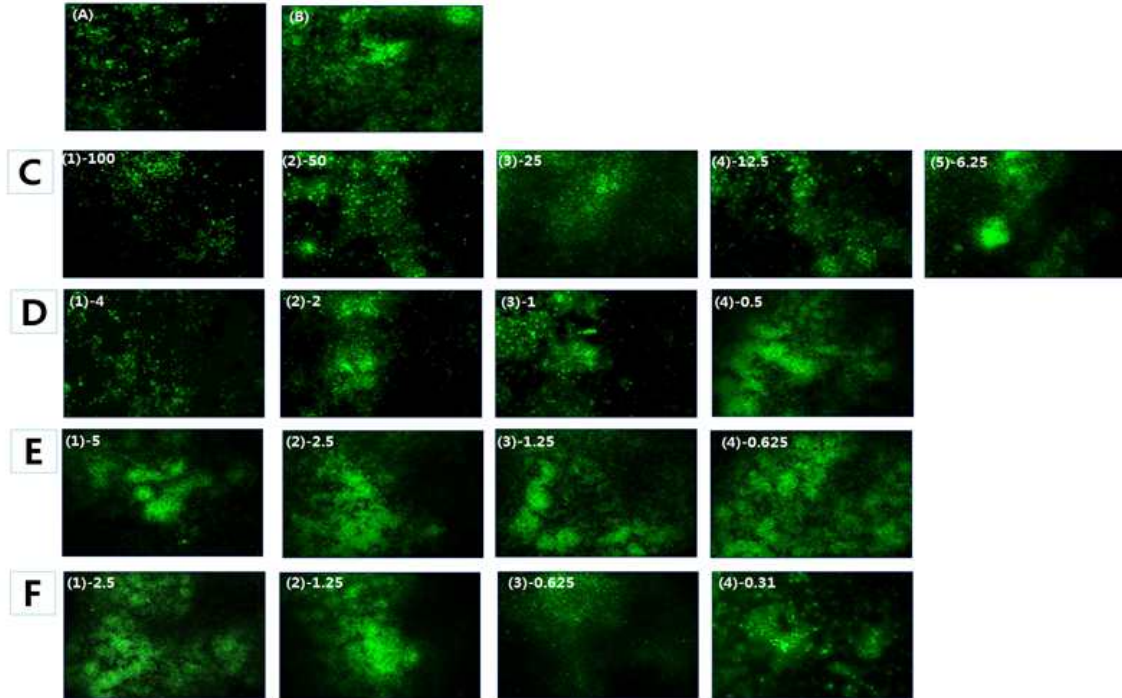


그림 217. Effect of RVS, fisetin, fustin, sulfuretin on thr immflamation in Raw 164.7cells exposed to LPS.

다. 동물실험을 통한 웃나무추출물의 염증성 산화스트레스에 대한 항산화 효과 확인

(1) 동물 사육

Food intake and body weight, Organ weight 들 다 큰 변화가 없었다. (표 125, 126)

표 125. Food intake and body weight¹⁾

Group ²⁾	NC	LC	RH	RM	RL	FO	P value
Food intake (g/day)	20.00 ± 0.66	21.10 ± 0.4	19.00 ± 0.58	22.98 ± 1.22	18.29 ± 0.89	20.52 ± 0.8	0.969
Body weight (g/15 days)	264.92 ± 4.28	265.12 ± 3.00	264.87 ± 3.27	264.21 ± 2.78	260.11 ± 2.93	276.76 ± 3.37	0.089

1) Mean ± Standard error(n=8~12)

2) NC, saline; LC, LPS + 0g; RH, LPS + 500mg; RM, LPS + 250mg; RL, LPS + 100mg; FO, LPS + fustin 15mg

표 126. Organ weight

Group	Liver weight	kidney weight	spleen weight
Control	8.75 ± 0.20	2.15 ± 0.05	0.52 ± 0.01
LPS 5mg/kg+ LPS	8.76 ± 0.30	2.64 ± 0.05	0.60 ± 0.02
RVS 100mg/kg+ LPS	8.63 ± 0.19	2.62 ± 0.07	0.64 ± 0.03
RVS 250mg/kg+ LPS	8.90 ± 0.15	2.68 ± 0.07	0.63 ± 0.02
RVS 500mg/kg+ LPS	8.51 ± 0.09	2.55 ± 0.06	0.58 ± 0.01
Fustin 15mg/kg + LPS	9.11 ± 0.23	2.68 ± 0.06	0.63 ± 0.03
p value	0.9229	0.7043	0.6330

(2) GOT, GPT 측정

Normal군에 비해 LPS군이 증가했으며 RVS고농도에서 ALT, AST가 감소하는것을 알 수 있었다. (그림 218)

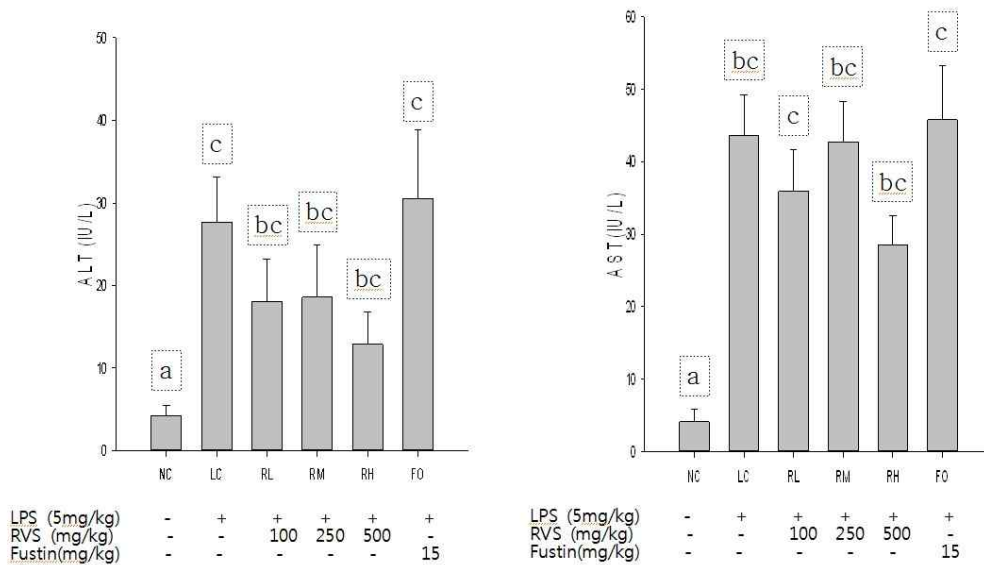


그림 218. Effect of *Rhus Verniciflua* Stokes or Fustinon Plasma ALT, AST activity in rat treated with LPS. Plasma levels of ALT(A) and AST(B).

Values are expressed as means ± SE. Alphabets indicate significant difference determined by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test. P<0.05

(3) MDA, Catalase

MDA의 경우 Normal군과 LPS군간의 차이가 없었으며, sample의 고농도와 중간농도에서 유의적으로 MDA양이 줄어드는 것을 알 수 있었다. catalase 경우 Normal군과 LPS군 sample군에서 유의적인 차이가 나타나질 않았다. (그림 219)

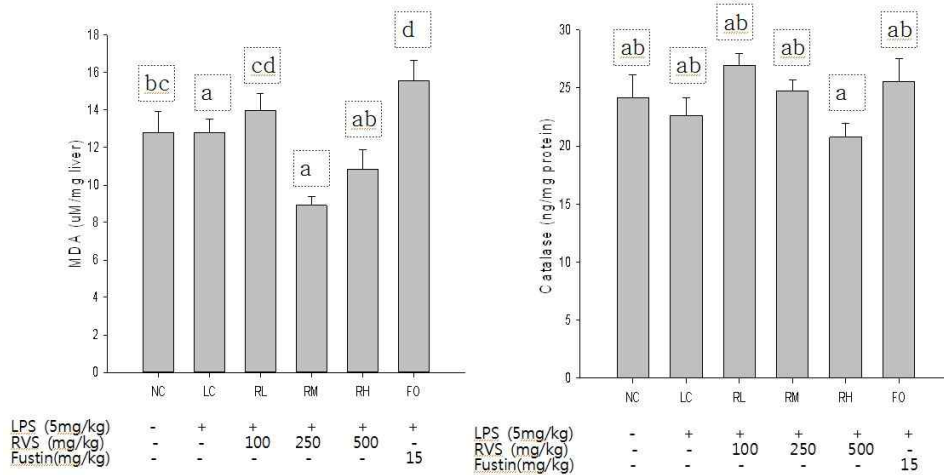


그림 219. Effect of *Rhus Verniciflua* Stokes or Fustin on hepatic MDA, Catalase activity in rat treated with LPS. Hepatic levels of MDA(A) and Catalase(B).

Values are expressed as means \pm SE. Alphabets indicate significant difference determined by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test. $P < 0.05$

(4) Nitric Oxide(NO)

Liver와 Plasma 경우 모두 Normal군과 LPS군을 비교했을 때 LPS군에서 NO생성량이 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 LPS군과 sample간의 비교에서도 sample고농도에서 NO의 생성량이 유의적으로 감소한 것을 알 수 있었다.(그림 220)

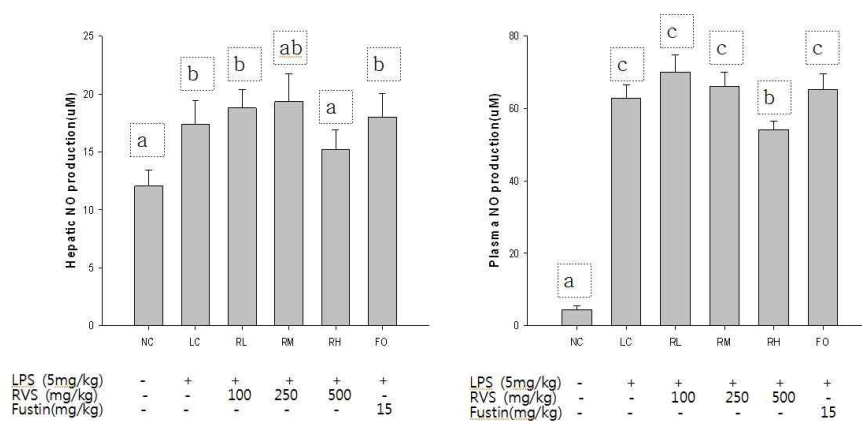


그림 220. Effect of *Rhus Verniciflua* Stokes or Fustin on hepatic MDA, Catalase activity in rat treated with LPS. Hepatic levels of MDA(A) and Catalase(B).

Values are expressed as means \pm SE. Alphabets indicate significant difference determined by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test. $P < 0.05$

(5) Cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α)

IL-1 β , IL-6, TNF- α 모두 Normal군과 LPS군간 비교해 볼 때 LPS군에서 cytokine이 유의적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 TNF-a를 제외하고 IL-1 β , IL-6에서 LPS군과 sample군

을 비교해 smaple의 농도에 따라 유의적으로 감소했음을 알 수 있었다(그림 221).

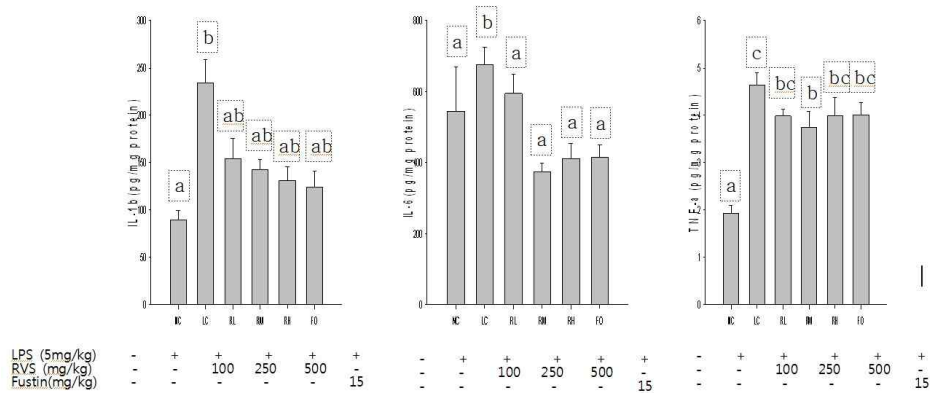


그림 221. Effect of *Rhus Verniciflua* Stokes or Fustin on hepatic NO activity in rat treated with LPS. Plasma levels of NO(A) and hepatic(B).

Values are expressed as means \pm SE. Alphabets indicate significant difference determined by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test. $P < 0.05$

(6) H&E staining

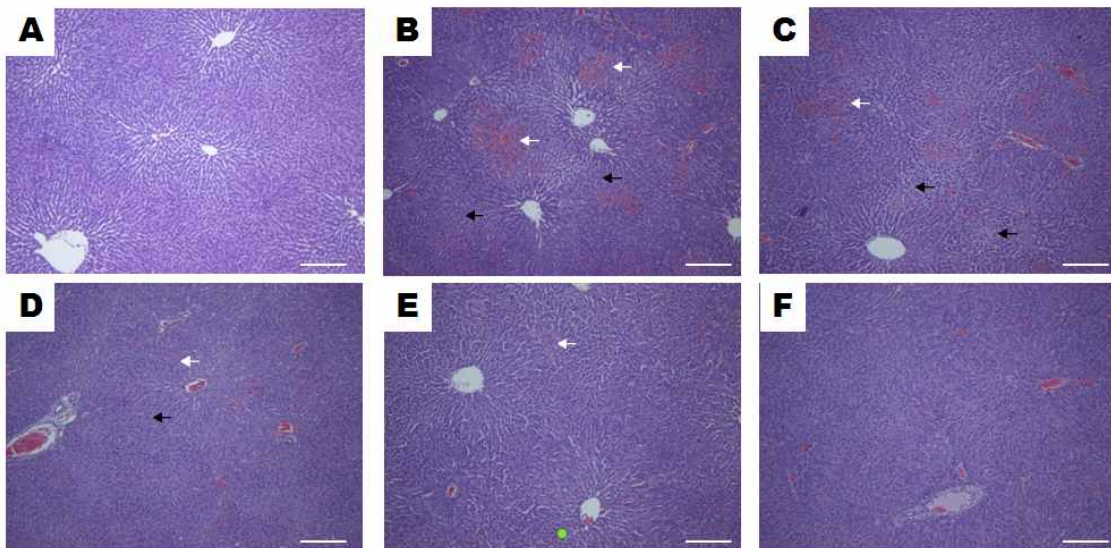


그림 222. Effect of *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) extracts or Fustin on liver abnormalities induced by lipopolysaccharide (LPS).

Liver samples from (A) NC, saline; (B) LPS, LPS (5mg/kg bw); (C) RL, LPS (5mg/kg bw) + RVS 100 mg/kg bw (D) RM, LPS (5mg/kg bw) + RVS 250 mg/kg bw (E) RH, LPS (5mg/kg bw) + RVS 500 mg/kg bw (E) FS, LPS (5mg/kg bw) + fustin 15mg/kg bw. Note improvement of liver damages in the livers of rats treated with RVS (D, E) or fustin (F) in a dose-dependent manner, when compared with those of LPS-treated rats. (B). White arrows, congestions; black arrows, necrosis with inflammatory cell infiltrations. Hematoxylin and eosin (HE) staining, Bar : 50 μ m.

(B) LPS군과 (A) Normal한 그룹의 사진과 비교하였을 때 간조직의 괴사와 울혈이 나타나는

것으로 보아 상당한 간손상이 나타난 것을 알 수 있었다. (B번에 하얀 화살표) (B)번 LPS군과 (C, D, and E)군과 비교를 하였을 때 옷나무 sample을 고농도로 투여한 군에서 회복 효과를 보였지만 확실한 효과는 보지 못했다. 하지만 LPS군과 비교하였을 때 확실한 회복 효과를 가진 것으로 나타났다.

제 3절 옷나무의 생식독성 연구(제 3핵심)

3-1절. 옷나무의 생식독성연구(3핵심 1세부)

1. 발생독성시험 (랫드)

가. 목적 및 시험법

임신 랫드의 착상 후 6일부터 20일까지 옷나무추출분말을 경구 투여하여 모체 및 태자에 미치는 영향을 조사하기 위하여 OECD Guideline for Testing of Chemicals Test Guideline No. 414 (January 22, 2001) ‘Prenatal Development Toxicity Study’에 준하여 실시하였다.

나. 시험계

- (1) 종 및 계통: 특정병원체부재(SPF) CrI:CD(SD) 계통의 랫드
- (2) 성별 및 입수시 주령 : 암컷 약 9주령, 수컷은 BR11008에서 사육중인 교배용 수컷동물을 사용함
- (3) 선택이유 : 본 시험에 사용될 랫드는 생식독성 평가에 가장 널리 되는 동물로서 풍부한 기초데이터가 확보되어 있어서 결과 해석에 용이함
- (4) 공급원 : (주) 오리엔트 바이오 경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1번지
- (5) 입수시 동물수 : 암컷 140마리
- (6) 사용동물수 : 교미 확인된 암컷 72마리
- (7) 투여개시시 주령 : 암컷 약 11주령
- (8) 균분리후 체중범위: 평균체중 \pm 20%g
- (9) 균분리법 : 교미가 확인된 동물에 대하여 체중을 측정후 SOP/RER/005에 따라 ‘르’ 자법에 의해 순차적으로 균분리함

다. 교배방법

- (1) 교배 : 스테인레스제 망사육상자에 암:수 2:1이하로 필요한 임신동물의 작출시까지 동거시켰다.
- (2) 교미 및 임신확인 : 질전 또는 질도말시 정자를 확인한 날을 임신 0일로 정하며, 임신에 대한 최종판정은 제왕절개시 자궁의 착상흔적에 의하여 실시하였다.

라. 시험물질 및 부형제

(1) 시험물질

- (가) 명 칭 : 옷나무추출분말

(나) 시험기관내 코드번호 : K-3711

(다) 로트번호 : Not available

(라) 입수일 : 2011년 2월 15일

(마) 유효기간 : 2012년 12월 21일

(바) 입수량 : 500 g x 6 (총 3 kg)

(사) 지표성분 : 푸스틴(Fustin) 15.3 %

(아) 외관 및 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황토색 분말

(자) 보관조건 : 실온보관 [보관고번호 : KIT-401(113)]

(차) 공 급 원 : (주)생명의나무

(2) 부형제

(가) 명 칭 : 주사용 멸균증류수

(나) 공 급 원 : (주)대한약품

(다) 보관조건: 실온보관

마. 시험물질의 조제 및 조제물 분석

(1) 시험물질의 조제 : 시험물질을 부형제에 현탁시켜 최고용량군의 시험물질을 조제하고, 이를 다시 부형제로 희석하여 아래 단계 용량군의 시험물질을 조제하였다. 시험물질에 대한 안정성이 확보되지 않아 시험물질은 매일 조제하였다.

(2) 조제 시험물질의 분석 : 본시험에서 조제시험물질에 대한 분석은 실시하지 않았다.

바. 투여방법

(1) 투여경로 : 경구투여를 실시하였다.

(2) 선택이유 : 임상에서의 적용예상경로로서 경구투여를 선택하였다.

(3) 투여횟수 및 투여기간 : 임신 6일부터 20일까지 1일 1회 반복 투여하였다.

(4) 투여부위 및 투여법 : 경구투여용 존데를 이용하여 위내에 직접 주입하였다.

(5) 투여시각 : 매일 08시에서 13시 사이에 투여하는 것을 원칙으로 하였다.

(6) 투여액량 : 가장 최근에 측정한 체중을 기준으로 하여 Path/Tox System (Version 4.2.2, Xybion Medical Systems Corporation, USA)에서 체중 kg당 10 ml로 계산된 것을 이용하였다.

(7) 시험군의 구성, 투여액량 및 투여량

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg)
Vehicle control	Female	24	1~24	10	0
T1	Female	24	25~48	10	500
T2	Female	24	49~72	10	1000

※투여량 설정이유 : 500 및 1000mg/kg/day의 용량으로 옷나무추출물의 랫드를 이용한 배.태 자발생 및 2세대번식독성 예비시험(P11001)을 실시한 결과, 모든 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 변화가 관찰되지 않았다. 상기 시험성적을 기초로 하여 한계용량인 1000mg/kg/day을 고용량으로 설정하고, 아래로 500mg/kg/day의 저용량군을 설정하였고, 그 외에 용매를 투여하는 부형제 대조군을 두었다.

사. 시험관찰 항목

(1) 일반증상 관찰 : 시험기간중에 비투여일에는 1일 1회, 투여시에는 투여전후 1회씩 동물의 일반상태, 중독증상, 사망유무, 유산, 조산 등의 이상에 관해서 관찰하고, 이상이 있으면 증상의 종류, 발견일과 시각, 지속시간, 필요에 따라서는 증상의 정도를 개체별로 기록하였다. 빈사동물은 즉시 절박도살하여 부검하고 사망동물도 가능한 빠른 시간 내에 부검을 실시하였다. 임신동물의 경우 조산이나 유산의 징후가 발견되면 부검하여 13.(4)가)항에 따라 육안적 소견을 관찰하였다. 공휴일의 경우 사망동물의 부검이 늦어질 경우에는 사체를 냉장보관한 후 부검하였다.

(2) 체중측정 : 전 임신동물은 임신 0, 6, 9, 12, 15, 18 및 21일째에 체중을 측정하였다.

(3) 사료섭취량측정 : 전 임신동물은 체중측정일에 사료를 정량 급여하고 그 다음 체중측정일에 사료의 잔량을 측정하였다. 단, 임신 0일째에는 사료의 급여량만을 측정하고, 임신 21일째에는 사료의 잔량만 측정하였다.

(4) 해부검사

(가) 부검 : 전 임신동물을 임신 21일째에 CO₂ 과마취에 의해 안락사 시킨 다음 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 모든 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 이상 장기는 10% 중성완충포름알린용액에 고정하여 보존하였다. 부검시에 육안소견상 비임신으로 판단되는 동물의 자궁은 임신여부의 확인을 위하여, 10% ammonium sulphide 용액에 담근 후 임신여부를 최종 확인하였다.

(나) 장기중량 : 모든 부검동물에 대해서 간장, 신장, 비장, 심장, 뇌, 뇌하수체, 부신, 난소, 임신자궁의 습중량을 측정하였다. 양측장기는 좌·우 분리하여 측정하였다.

(5) 제왕절개 : 각 군의 임신동물을 임신 21일째에 CO₂ 과마취에 의해 안락사 시킨 다음 부검하여 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 초기 및 후기 흡수배·태자수, 사망태자수, 생존태자의 성별 및 개체별 체중, 태반중량 등을 조사하고, 그것을 기초로 하여 다음과 같은 자료를 산출하였다.

▶태자사망수 = 흡수배자수 + 사망태자수

▶성 비(%) = (수컷생존태자수/암컷생존태자수) × 100

▶착상전배자손실률 (%) = [(임신허체수 - 착상수)/임신허체수] × 100

▶착상후태자사망률 (%) = [(착상수 - 생존태자수)/착상수] × 100

▶생존태자의 암수별 평균체중 등

제왕절개시 비임신 동물로 판단되는 경우는 자궁을 철저히 검사한 다음 육안적 검사를 실시하지 않고 폐기하였다. 비임신 동물과 관련된 모든 자료는 기초자료에는 보관하되 최종보고서에는 반영하지 않았다.

(6) 태자의 형태학적 검사

(가) 외표검사 : 생존태자를 자궁에서 적출한 후 즉시 외표이상의 유무에 대하여 관찰하였다. 생존태자에 관해서는 왼쪽 자궁각의 난소측에서 순서대로 번호를 매겨 흡수번호는 골격검사에, 짝수번호는 내장검사에 사용하였다.

(나) 내부장기 검사 : 각 배당 생존태자를 Bouin 액에 고정한 후, 두부 및 복부는 Wilson법, 흉부는 Nishimura 법에 의하여 내장이상 유무를 검사하였다. 검사종료후 내부장기검체는 개체식별 후 모체별로 보존하였다.

(다) 골격검사 : 각 배당 생존태자를 5% 포르말린에 고정한 후, 연골은 alcian blue로 경골은 alizarin red로 염색하여 골격표본을 제작한 뒤에 골격이상 유무 및 골화상태에 대하여 검사하였다. 검사종료후 골격검체를 개체식별 후 모체별로 보존하였다.

(7) 통계학적 방법

얻어진 자료에 대한 통계분석은 다중비교검정법을 실시하였다. 검사항목에 대해 Bartlett법으로 등분산 검정을 실시하여 유의성이 인정되지 않을 경우에는 일원배치분산분석(ANOVA)을 유의수준 $\alpha = 0.05$ 로 검정하여, 유의성이 인정되면 유의한 결과가 부형제대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett test를 실시하였다. Bartlett법에서 유의성이 인정된 경우에는 부등분산으로서 non-parametric 통계학적 방법에 이용되는 Kruskal-Wallis (H) 검정을 유의수준 $\alpha = 0.05$ 로 검정하여 유의성이 인정된 경우에만 부형제대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 Dunn's Rank Sum test를 실시하였다. 출현율 및 백분율에 대한 시험자료는 χ^2 -test를 실시하여 유의성($\alpha = 0.05$)이 인정된 경우에 부형제대조군과 각 투여군간에 차이가 있는지를 확인하기 위하여 Fisher exact test를 실시하였다. 신생자에 대한 시험자료는 한배에서 나온 착상수, 생존자수 및 사망자수를 이용하여 통계분석을 실

시하였다. 통계학적인 유의성은 위험을 1% 혹은 5%에서 검사하였다. 이러한 분석은 당 연구소에서 사용하고 있는 GLP 독성시험용 전산프로그램인 Path/Tox System 또는 SAS program (SAS/STAT, Version 9.2, NC, USA)을 이용하여 실시하였다.

(8) 결과 및 결론

(가) 모동물에 대한 영향

① 모동물의 일반증상, 체중, 사료섭취량, 부검소견 및 장기중량에 있어서 시험물질의 투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다(Table 1-6).

(나) 태자에 대한 영향

① 모동물의 제왕절개시 시험물질의 영향으로 인정되는 소견은 관찰되지 않았다(Table 7).

② 태자의 내부장기 및 골격 관찰시 시험물질에 기인한 기형, 변이 및 골화지연은 관찰되지 않았다(Table 8-9).

이상의 결과를 종합해 볼 때, 본 시험물질 옷나무추출분말의 착상후 임신기동안 경구 반복투여는 1000mg/kg 투여군에서 모든 검사항목에 있어서 이상을 유발하지 않았다. 따라서 본 시험조건에 의한 옷나무추출물의 무해용량(no-observed-adverse-effect levels)은 모동물과 태자에 있어서 공히 1000mg/kg 이상으로 사료된다.

Table 1 Summary of Clinical Signs (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE							
Gestation							
STUDY : G11001	V. CONTROL			T1		SEX : FEMALE	
GROUP:	0			500		T2	
DOSE : (mg/kg)						1000	
No. of animals	22		24		24		
	#	(%)	#	(%)	#	(%)	
Normal	22	100.00	24	100.00	24	100.00	
Normal Fur, Hair, Coat							
Loss of fur	3	13.64	0	0.00	5	20.83	
Mouth							
Salivation	0	0.00	3	12.50	17	70.83	

Table 2 Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g) Gestation				
STUDY : G11001				
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	SEX : FEMALE T2 1000
DAY 0 Gestation	MEAN S. D. N	238.0 8.50 22	238.9 8.62 24	238.9 8.64 24
DAY 6 Gestation	MEAN S. D. N	277.9 13.14 22	279.1 11.07 24	274.7 12.25 24
DAY 9 Gestation	MEAN S. D. N	288.6 15.16 22	291.3 11.50 24	287.4 14.12 24
DAY 12 Gestation	MEAN S. D. N	309.4 18.60 22	312.0 15.05 24	309.1 16.69 24
DAY 15 Gestation	MEAN S. D. N	328.7 18.91 22	331.8 16.36 24	328.4 19.18 24
DAY 18 Gestation	MEAN S. D. N	367.1 22.45 22	370.2 17.67 24	364.4 20.61 24
DAY 21 Gestation	MEAN S. D. N	420.2 25.94 22	423.5 21.19 24	412.6 23.40 24

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 3 Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11001				
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	SEX : FEMALE T2 1000
DAY 6 Gestation	INTAKE (g) S. D. N	23.4 2.08 22	23.4 1.68 24	22.9 1.93 24
DAY 9 Gestation	INTAKE (g) S. D. N	24.3 2.65 22	24.4 1.92 24	24.2 2.49 24
DAY 12 Gestation	INTAKE (g) S. D. N	24.3 3.05 22	25.2 2.76 24	25.2 2.99 24
DAY 15 Gestation	INTAKE (g) S. D. N	24.6 2.54 22	25.2 2.24 24	25.6 3.14 24
DAY 18 Gestation	INTAKE (g) S. D. N	27.2 2.86 22	27.7 2.42 24	27.6 3.35 24
DAY 21 Gestation	INTAKE (g) S. D. N	27.2 2.41 22	27.8 2.50 24	26.7 3.17 24

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 4 Gross Findings (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : G11001 GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	SEX : FEMALE	
		T1 500	T2 1000
NUMBER OF ANIMALS:	22	24	24
Observed/No remarkable finding	22	24	22
No. of Observations	22	24	22
SKIN			
Hair loss	0	0	1
No. of Observations	0	0	1
SPLEEN			
Enlarged	0	0	1
No. of Observations	0	0	1

Table 5 Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11001 GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	SEX : FEMALE
			T2 1000
BRAIN			
MEAN (g)	1.865	1.875	1.859
SD	0.0940	0.0893	0.0928
N	22	24	24
PITUITARY GLAND			
MEAN (g)	0.013	0.013	0.012
SD	0.0020	0.0022	0.0017
N	22	24	24
LIVER			
MEAN (g)	14.095	14.768	14.581
SD	1.6476	1.0292	1.5011
N	22	24	24
SPLEEN			
MEAN (g)	0.646	0.640	0.668
SD	0.0930	0.1006	0.1227
N	22	24	24
HEART			
MEAN (g)	1.058	1.041	1.038
SD	0.1133	0.0963	0.0840
N	22	24	24
KIDNEYS			
MEAN (g)	1.978	2.031	2.026
SD	0.1948	0.1818	0.2035
N	22	24	24
ADRENAL GLANDS			
MEAN (g)	0.066	0.065	0.070
SD	0.0088	0.0088	0.0102
N	22	24	24
OVARIES			
MEAN (g)	0.140	0.136	0.129
SD	0.0194	0.0220	0.0153
N	22	24	24
UTERUS/CERVIX			
MEAN (g)	101.664	100.653	97.733
SD	12.3543	6.6500	10.8467
N	22	24	24

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 6 Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : G11001	V. CONTROL	T1	SEX : FEMALE
GROUP :	0	500	T2
DOSE : (mg/kg)			1000
BRAIN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.445	0.443	0.451
SD	0.0319	0.0226	0.0263
N	22	24	24
PITUITARY GLAND			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.003	0.003	0.003
SD	0.0005	0.0005	0.0004
N	22	24	24
LIVER			
MEAN (% BODY WEIGHT)	3.350	3.488	3.532*
SD	0.2655	0.1817	0.2800
N	22	24	24
SPLEEN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.154	0.151	0.162
SD	0.0215	0.0196	0.0297
N	22	24	24
HEART			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.252	0.246	0.252
SD	0.0235	0.0193	0.0161
N	22	24	24
KIDNEYS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.472	0.479	0.491
SD	0.0434	0.0310	0.0382
N	22	24	24
ADRENAL GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.016	0.015	0.017
SD	0.0021	0.0022	0.0026
N	22	24	24
OVARIES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.033	0.032	0.031
SD	0.0045	0.0051	0.0031
N	22	24	24
UTERUS/CERVIX			
MEAN (% BODY WEIGHT)	24.166	23.793	23.709
SD	2.3700	1.5293	2.4956
N	22	24	24

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: NSg-05/Anova: Sig-05/Dunnett's

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 7. Caesarean Section Data of Dams (Group Summary)

SUMMARY OF CAESAREAN SECTION DATA			
STUDY : G11001			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
No. of pregnant animals	22	24	24
No. of corpora lutea			
MEAN	15.9	15.7	15.5
SD	1.31	1.81	1.69
N	22	24	24
No. of implantations			
MEAN	15.3	14.8	14.6
SD	1.58	1.38	1.71
N	22	24	24
Mean % pre-implantation loss ^{a)}			
MEAN	3.8	5.4	5.7
SD	8.48	6.59	7.47
N	22	24	24
Fetal deaths (resorptions+dead fetuses)			
MEAN	0.8	0.6	0.5
SD	0.87	0.65	0.59
N	22	24	24
Resorptions			
MEAN (Total)	0.7	0.6	0.5
SD	0.88	0.65	0.59
N	22	24	24
MEAN (Early)	0.6	0.5	0.4
SD	0.90	0.66	0.58
N	22	24	24
MEAN (Late)	0.1	0.0	0.0
SD	0.29	0.20	0.20
N	22	24	24
Litter size (No. of live fetuses)			
MEAN	14.5	14.2	14.1
SD	1.95	1.38	1.75
N	22	24	24

a) Pre-implantation loss = $\{(\text{corpora lutea} - \text{implantations}) / \text{corpora lutea}\} \times 100$
 Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 7(Continued). Caesarean Section Data of Dams (Group Summary)

SUMMARY OF CAESAREAN SECTION DATA			
STUDY : G11001			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
Mean % post-implantation loss ^{b)}			
MEAN	5.2	3.9	3.4
SD	5.96	4.29	4.08
N	22	24	24
Sex ratio (Mean % of males per litter)			
MEAN	51.9	49.7	49.3
SD	14.38	10.35	12.26
N	22	24	24
Body weight of live fetuses (g)			
MEAN (male)	5.5	5.5	5.4
SD	0.21	0.34	0.29
N	22	24	24
MEAN (female)	5.2	5.3	5.1
SD	0.19	0.33	0.22
N	22	24	24
No. of external anomalies of fetuses	0	4	1
b) Post-implantation loss={ (implantations-live fetuses)/implantations} × 100 Bart:Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed Bart:NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed			

Table 8. Visceral Findings in Fetuses (Group Summary)

SUMMARY OF VISCERAL FINDINGS			
STUDY : G11001			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
No. of dams	22	24	24
No. of Fetuses examined	153	164	164
Fetuses with malformations (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.8)
Ventricular septum defec	0	0	1
Absent left eye	0	0	1
Small lung	0	0	1
Fused right lung lobe	0	0	1
Double outlet ventricle	0	0	1
Absent left atrium	0	0	1
Enlarged right ventricle chamber	0	0	1
Fetuses with variations (%)	61 (39.9)	71 (43.3)	81 (49.4)
Misshapen thymus	4	11	11
Dilated renal pelvis	5	1	4
Dilated ureter	43	43	57
Convolute ureter	16	20	19
Malpositioned kidney	0	1	0
Short innominate artery	0	0	1

Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Chi-Square Test: NSg-05/ No unplanned test performed

Table 9. Skeletal Findings in Fetuses (Group Summary)

SUMMARY OF SKELETAL FINDINGS				
STUDY : G11001		SEX : FEMALE		
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2	
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000	
No. of dams	22	24	24	
Fetuses examined	166	176	175	
Fetuses with malformations (%)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	
Absent lumbar vertebra	0	1	0	
Fetuses with variations (%)	16 (9.6)	12 (6.8)	16 (9.1)	
Litters affected (%)	7 (31.8)	7 (29.2)	12 (50.0)	
Misshapen sternebra	1	1	0	
Short supernumerary rib	14	9	14	
Full supernumerary rib	1	2	1	
Misshapen ossification of thoracic centrum	0	0	1	
Fetuses with retardations (%)	45 (27.1)	47 (26.7)	61 (34.9)	
Litters affected (%)	15 (68.2)	16 (66.7)	22 (91.7)	
Bipartite ossification of thoracic centrum	0	1	1	
Dumbbell ossification of thoracic centrum	44	47	59	
Dumbbell ossification of lumbar centrum	1	1	1	
Dumbbell ossification of sternebra	0	0	1	
Bipartite ossification of sternera	0	0	1	
Bipartite ossification of cervical centrum	1	0	0	
No. of ossification centers				
Sternebra	MEAN	5.98	5.99	5.98
	S. D.	0.04	0.04	0.07
Metacarpals in both forelimbs	MEAN	7.99	8.01	7.99
	S. D.	0.06	0.06	0.04
1st phalanges in both forelimbs	MEAN	5.29	5.51	5.88
	S. D.	1.29	1.39	1.52
Metatarsals in both hindlimbs	MEAN	9.58	9.51	9.73
	S. D.	0.37	0.61	0.31
1st phalanges in both hindlimbs	MEAN	0.51	0.82	0.68
	S. D.	1.34	1.18	1.25
Cervical vertebra	MEAN	3.05	3.14	3.11
	S. D.	1.21	1.21	1.01
Sacral and caudal vertebra	MEAN	10.00	10.10	9.98
	S. D.	0.67	0.61	0.57

Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Chi-Square Test: NSg-05/ No unplanned test performed

2. 발생독성시험 (토끼)

가. 목적 및 시험법

임신 토끼의 착상 후 6일부터 28일까지 옷나무추출분말을 경구 투여하여 모체 및 태자에 미치는 영향을 조사하기 위하여 OECD Guideline for Testing of Chemicals Test Guideline No. 414 (January 22, 2001) ‘Prenatal Development Toxicity Study’에 준하여 실시하였다.

나. 시험계

- (1) 종 및 계통: SPF New Zealand White Rabbit, *Yac:NZW(KBL)*
- (2) 성별 및 입수시 주령 : 약 4-5개월령
- (3) 선택이유 : 본 시험에 사용될 토끼는 실험동물로서 역사가 길고 자연발생 기형 등의 시험에 관한 기초자료가 풍부하기 때문에 생식독성시험에 많이 이용되고 있다.
- (4) 공급원 : 천안연암대학 SPF 실험동물센터, 충청남도 천안시 성환읍 수향리 산 3-1
- (5) 입수시 동물수 : 암컷 72마리
- (6) 사용동물수 : 교미 확인된 암컷 66마리
- (7) 투여개시시 주령 : 약 4-5개월령
- (8) 군분리후 체중범위: 평균체중 \pm 20%g
- (9) 군분리법 : 교미가 확인된 동물에 대하여 체중을 측정한 후 SOP/RER/005에 따라 ‘르’ 자법에 의해 순차적으로 군분리하였다.

다. 인공수정방법

성숙 수컷동물로부터 채취한 정액으로 암컷 동물을 인공수정시켜서 임신동물을 작출하며 인공수정 실시일을 임신 0일로 정하였다.

라. 시험물질 및 부형제

(1) 시험물질

- (가) 명 칭 : 옷나무추출분말
- (나) 시험기관내 코드번호 : K-3711
- (다) 로트번호 : Not available
- (라) 입수일 : 2011년 07월 04일
- (마) 유효기간 : 2013년 06월 03일
- (바) 입수량 : 30 kg (10 kg \times 3)
- (사) 지표성분 : 푸스틴(Fustin) 3.0 %

(아) 외관 및 색상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황토색 분말

(자) 보관조건 : 실온보관 [보관고번호 : KIT-401(105)]

(차) 공 급 원 : (주)생명의나무

(2) 부형제

(가) 명 칭 : 주사용 멸균증류수

(나) 공 급 원 : (주)대한약품

(다) 보관조건: 실온보관

마. 시험물질의 조제 및 조제물 분석

(1) 시험물질의 조제 : 시험물질을 부형제에 현탁시켜 최고용량군의 시험물질을 조제하고, 이를 다시 부형제로 희석하여 아래 단계 용량군의 시험물질을 조제하였다. 시험물질에 대한 안정성이 확보되지 않아 시험물질은 매일 조제하였다.

(2) 조제 시험물질의 분석 : 본시험에서 조제시험물질에 대한 분석은 실시하지 않았다.

바. 투여방법

(1) 투여경로 : 경구투여를 실시하였다.

(2) 선택이유 : 임상에서의 적용예상경로로서 경구투여를 선택하였다.

(3) 투여횟수 및 투여기간 : 임신 6일부터 28일까지 1일 1회 반복 투여하였다.

(4) 투여부위 및 투여법 : 경구투여용 카테터를 이용하여 위내에 직접 주입하였다.

(5) 투여시각 : 매일 08시에서 14시 사이에 투여하는 것을 원칙으로 하였다.

(6) 투여액량 : 가장 최근에 측정한 체중을 기준으로 하여 Path/Tox System (Version 4.2.2, Xybion Medical Systems Corporation, USA)에서 체중 kg당 5 ml로 계산된 것을 이용하였다.

사. 시험군의 구성, 투여액량 및 투여량

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg)
Vehicle control	Female	22	1~22	5	0
T1	Female	22	23~44	5	500
T2	Female	22	45~66	5	1000

※투여량 설정이유 : 동일한 시험물질에 대하여 토끼 배-태자 발생독성 예비시험 (시험번호: P11002)을 500 및 1000mg/kg/day의 용량으로 시험한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 상기 시험성적을 기초로 하여 1000mg/kg/day을 고용량

군으로 설정하고 아래로 500mg/kg/day 투여군을 설정하였다. 그 외에 용매를 투여하는 부형제대 조군을 두었다.

아. 시험관찰 항목

비임신통물의 모든 자료는 기초자료에는 보관하되 최종보고서에는 반영하지 않았다.

(1) 일반증상 관찰 : 순화 및 비투여 기간에는 1일 1회, 투여시에는 투여 전·후 1회씩 동물의 일반상태, 중독증상, 사망유무, 유산, 조산 등의 이상에 관해서 관찰하고, 관찰결과를 Path/Tox system을 이용하여 입력하였다. 단, 인공수정기간 중 일반증상은 임신동물 작출 후 군분리 완료 전까지는 일반증상관찰기록지에 기록하였다.

일반증상 관찰시 유산 또는 조산한 동물에서 관찰된 태자는 검사가 가능한 경우 12.(6) 태자의 형태학적 검사에 따라 외표기형, 내부장기 및 골격 검사를 실시하고 검사결과는 보고서 appendix에 기록하며 table에서는 제외하였다.

유산, 조산 및 빈사동물은 관찰 즉시 펜토탈 소디움을 과량 투여하여 안락사하고 사망동물도 가능한 빠른 시간 내에 부검을 실시하였다. 공휴일의 경우 유산, 조산 및 사망동물의 부검이 늦어질 경우에는 사망동물은 냉장보관한 후 부검하고 유산 및 조산 동물은 관찰 후 가능한 시간에 안락사하여 부검하였다.

(2) 체중측정 : 입수일 및 임신 0, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 및 29일째에 체중을 측정하였다.

(3) 사료섭취량측정 : 전 동물을 체중측정일에 사료를 급여하고 익일 잔량을 측정한다. 단, 임신 29일째에는 제왕절개로 인해 임신 28일째에 사료급여 후 임신 29일째 잔량을 측정하였다.

(4) 해부검사

(가) 부검 : 전 생존동물을 임신 29일째에 펜토탈 소디움 과마취에 의해 안락사 시킨 다음 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하고 이상장기는 10% 중성완충포르말린용액에 고정(안구의 경우는 Davidson액에 고정)하여 보존하였다.

유산, 조산 및 빈·폐사 동물도 동일하게 검사하였다. 빈·폐사 동물의 경우 부검시 임신여부를 확인하였다. 필요에 따라 고정된 조직은 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시한 후 조직병리학적 검사를 실시하였다.

(나) 비임신통물의 검사 : 부검시에 육안소견상 비임신으로 판단되는 동물의 자궁은 임신여부의 확인을 위하여 2% NaOH용액에 자궁을 한시간 동안 침척시킨 다음, 황색 또는 황갈색으로 나타나는 착상흔의 유무를 확인하여 비임신여부를 판별하였다.

(다) 장기중량 : 임신 29일째 계획 도살하는 모든 임신 동물에 대하여 간, 신장, 비장, 심장, 부신, 임신자궁(경부포함) 및 난소(좌,우)의 습중량을 측정하고, 임신 29일째 측정된 체중을 기준으로 체중에 대한 상대 장기중량을 산출하였다. 유산, 조산, 빈사 및 비임신 동물의 장기중량은 측정하지 않으며 난소의 경우 좌우 구별하여 측정하였다.

(5) 제왕절개 : 임신 29일째 계획 도살하는 모든 임신 동물에 대하여 부검시 임신자궁을 적출한 다음 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 초기 및 후기 흡수배-태자수, 사망태자수, 생존태자의 성별 및 개체별 체중을 조사하고, 그것을 기초로 하여 다음과 같은 자료를 산출하였다.

▶태자사망수 = 흡수배자수 + 사망태자수

▶성 비(%) = (수컷생존태자수/생존태자수) × 100

▶착상전배자사망률 (%) = [(임신황체수 - 착상수)/임신황체수] × 100

▶착상후태자사망률 (%) = [(착상수 - 생존태자수)/착상수] × 100

▶생존태자의 암수별 평균체중

(6) 태자의 형태학적 검사

(가) 외표검사 : 생존태자를 자궁에서 적출한 후 즉시 외형이상의 유무에 대하여 관찰한 후 기록하며 필요시 사진촬영을 실시하고 참고자료로 활용하였다. 태자에 관해서는 왼쪽 자궁각의 난소측에서 순서대로 번호를 매긴 후 내부장기 및 골격검사를 실시하였다.

(나) 내부장기 검사 : 모든 생존태자에 대하여 제왕절개일에 또는 냉장보관 후 익일에 흉부와 복부장기의 이상유무를 검사하고, 흡수번호의 두부는 신선 내부장기 검사를 실시하고, 짝수번호의 두부는 Bouin's solution에 고정한 다음 절단하여 검사하였다. 내부장기 검사시 태자의 성별을 확인하였다.

(다) 골격검사 : 골격검사를 위하여 내부장기 검사 후 태자를 95% ethanol에 고정한 다음 연골은 alcian blue로 경골은 alizarin red로 염색하여 골격표본을 제작한 뒤에 골격 이상유무 및 골화상태에 대하여 검사하였다. 검사종료 후 골격검체를 모체별로 보존하였다.

(7) 통계학적 방법

얻어진 자료에 대한 통계분석은 다중비교검정법을 실시하였다. 검사항목에 대해 Bartlett법으로 등분산 검정을 실시하여 유의성이 인정되지 않을 경우에는 일원배치분산분석(ANOVA)을 유의수준 $\alpha = 0.05$ 로 검정하여, 유의성이 인정되면 유의한 결과가 부형제대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett test를 실시하였다. Bartlett법에서 유의성이 인정된 경우에는 부등분산으로서 non-parametric 통계학적 방법에 이용되는 Kruskal-Wallis (H) 검정을 유의수준 $\alpha = 0.05$ 로 검정하여 유의성이 인정된 경우에만 부형제대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 Dunn's Rank Sum test를 실시하였다. 출현율 및 백분율에 대한 시험자료는 χ^2 -test를 실시하여 유의성($\alpha = 0.05$)이 인정된 경우에 부형제대조군과 각 투여군간에 차이가 있는지를 확인하기 위하여 Fisher exact test를 실시하였다. 신생자에 대한 시험자료는 한배에서 나온 착상수, 생존자수 및 사망자수를 이용하여 통계분석을 실시하였다. 통계학적인 유의성은 위험율 1% 혹은 5%에서 검사하였다. 이러한 분석은 당 연구소에서 사용하고 있는 GLP 독성시험용 전산프로그램인 Path/Tox System 또는 SAS program (SAS/STAT, Version 9.2, NC, USA)을 이용하여 실시하였다.

(8) 결과 및 결론

(가) 모동물에 대한 영향

모동물의 일반증상, 체중, 사료섭취량, 부검소견, 장기중량 및 제왕절개성적에 있어서 전 시험기간 중 모든 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다.

(나) 태자에 대한 영향

태자의 내부장기 및 골격검사에 있어서 모든 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 본 시험물질 옷나무추출분말의 착상 후 임신기동안 경구 반복투여는 1000mg/kg 투여군에서 모든 검사항목에 있어서 이상을 유발하지 않았다. 따라서 본 시험조건에 의한 옷나무추출물의 무해용량(no-observed-adverse-effect levels)은 모동물과 태자에 있어서 공히 1000mg/kg 이상으로 사료된다.

Table 1 Summary of Clinical Signs (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE						
Gestation						
STUDY : G11003	V. CONTROL		T1	SEX : FEMALE		
GROUP:	0		500	T2		
DOSE : (mg/kg)	0		500	1000		
No. of animals	22		13	19		
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
No Abnormalities Detected	22	100.00	13	100.00	19	100.00
General Appearance						
Anorexia	3	13.64	2	15.38	2	10.53
Abortion	1	4.55	0	0.00	0	0.00
Excretion						
Few or no feces	4	18.18	3	23.08	3	15.79

Table 2

Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Gestation				
STUDY : G11003		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 0	MEAN	3364.6	3374.1	3339.1
Gestation	S. D.	158.52	148.82	144.15
	N	22	13	19
DAY 6	MEAN	3529.3	3452.0	3486.6
Gestation	S. D.	160.45	177.62	134.49
	N	22	13	19
DAY 9	MEAN	3525.5	3439.0	3466.4
Gestation	S. D.	156.16	208.16	135.45
	N	22	13	19
DAY 12	MEAN	3572.8	3448.4	3484.7
Gestation	S. D.	154.92	235.33	148.16
	N	22	12	19
DAY 15	MEAN	3640.2	3514.7	3528.4
Gestation	S. D.	166.99	260.56	157.67
	N	22	12	19
DAY 18	MEAN	3665.9	3499.9*	3518.1*
Gestation	S. D.	191.08	264.12	165.61
	N	22	12	19
DAY 21	MEAN	3674.1	3467.6*	3510.5*
Gestation	S. D.	216.08	273.66	162.77
	N	22	12	19
DAY 24	MEAN	3703.6	3513.7*	3543.3*
Gestation	S. D.	210.59	243.26	202.86
	N	22	12	19
DAY 27	MEAN	3745.6	3559.8*	3594.7
Gestation	S. D.	217.26	234.91	212.55
	N	21	12	19

a Bart: NSg-05/Anova; NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: NSg-05/Anova; Sig-05/Dunnett's

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 2(Continued) Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Gestation				
STUDY : G11003				SEX : FEMALE
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 29	MEAN	3759.5	3579.9	3648.1
Gestation	S. D.	231.81	245.37	231.40
	N	21	12	19

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

Table 3 Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11003				SEX : FEMALE
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 1	INTAKE (g)	143.9	148.5	126.9
Gestation	S. D.	48.11	55.69	39.70
	N	22	13	19
DAY 7	INTAKE (g)	178.6	169.9	156.3
Gestation	S. D.	34.31	61.28	36.02
	N	22	13	19
DAY 10	INTAKE (g)	167.2	159.1	145.2
Gestation	S. D.	29.95	58.21	33.29
	N	22	13	19
DAY 13	INTAKE (g)	161.5	170.3	111.2+
Gestation	S. D.	48.24	111.43	52.36
	N	22	12	19
DAY 16	INTAKE (g)	164.1	105.1	128.8
Gestation	S. D.	85.50	53.53	60.52
	N	22	12	19
DAY 19	INTAKE (g)	161.2	135.4	110.5*
Gestation	S. D.	61.39	76.98	55.58
	N	22	12	19
DAY 22	INTAKE (g)	149.8	106.5	99.6*
Gestation	S. D.	64.63	47.35	55.16
	N	22	12	19
DAY 25	INTAKE (g)	122.5	90.3	108.3
Gestation	S. D.	65.21	40.53	50.46
	N	22	12	19
DAY 28	INTAKE (g)	116.1	95.3	104.7
Gestation	S. D.	62.21	46.42	45.97
	N	21	12	19

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

b Bart:Sig-05/NP-KW:NSg-05/No unplanned test performed

c Bart:Sig-05/NP-KW:Sig-05/Dunn's Rank Sum

d Bart:NSg-05/Anova:Sig-05/Dunnett's

* : Significant differences from control group (p<0.05)

+ : Significant differences from control group (p<0.01)

Table 3(Continued) Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11003		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 29	INTAKE (g)	125.4	101.2	107.0
Gestation	S. D.	63.72	47.05	41.48
	N	21	12	19

- a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed
 b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed
 c Bart;Sig-05/NP-KW;Sig-05/Dunn's Rank Sum
 d Bart;NSg-05/Anova;Sig-05/Dunnett's

Table 4 Gross Findings (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS				
STUDY : G11003		SEX : FEMALE		
GROUP: DOSE: (mg/kg)		V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
NUMBER OF ANIMALS:		21	12	19
Observed/No remarkable finding		21	11	19
No. of Observations		21	11	19
UTERUS				
Developmental anomaly		0	1	0
No. of Observations		0	1	0

Table 5

Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11003			SEX : FEMALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
LIVER			
MEAN (g)	84.964	83.290	82.023
SD	19.4779	15.7795	11.3871
N	21	11	19
SPLEEN			
MEAN (g)	1.448	1.530	1.404
SD	0.4085	0.2746	0.4143
N	21	11	19
HEART			
MEAN (g)	7.471	6.943	7.473
SD	1.4194	1.2069	0.8925
N	21	12	19
KIDNEYS			
MEAN (g)	15.161	14.633	14.658
SD	2.0495	1.5400	1.6720
N	21	11	19
ADRENAL GLANDS			
MEAN (g)	0.458	0.478	0.462
SD	0.0997	0.0889	0.0889
N	21	11	19
OVARIES			
MEAN (g)	0.995	0.961	1.001
SD	0.2084	0.1222	0.2107
N	21	11	19
UTERUS/CERVIX			
MEAN (g)	469.255	488.613	472.039
SD	127.5005	67.3341	88.8076
N	21	11	19

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 6

Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : G11003			SEX : FEMALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
LIVER			
MEAN (% BODY WEIGHT)	2.254	2.326	2.262
SD	0.4562	0.3873	0.3867
N	21	11	19
SPLEEN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.038	0.043	0.038
SD	0.0094	0.0078	0.0105
N	21	11	19
HEART			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.198	0.194	0.205
SD	0.0314	0.0330	0.0266
N	21	12	19
KIDNEYS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.403	0.409	0.403
SD	0.0452	0.0356	0.0459
N	21	11	19
ADRENAL GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.012	0.013	0.013
SD	0.0027	0.0026	0.0025
N	21	11	19
OVARIES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.026	0.027	0.027
SD	0.0048	0.0030	0.0051
N	21	11	19
UTERUS/CERVIX			
MEAN (% BODY WEIGHT)	12.517	13.632	12.934
SD	3.4166	1.4138	2.2591
N	21	11	19

a Bart; NSg-05/Anova; NSg-05/No unplanned test performed

b Bart; Sig-05/NP-KW; NSg-05/No unplanned test performed

Table 7. Caesarean Section Data of Dams (Group Summary)

SUMMARY OF VISCERAL FINDINGS			
STUDY : G11003			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
No. of pregnant animals	21	11	19
No. of corpora lutea			
MEAN	9.4	9.9	9.4
SD	2.65	1.64	1.46
N	21	11	19
No. of implantations			
MEAN	8.0	9.8	8.6
SD	2.97	1.66	1.77
N	21	11	19
Mean % pre-implantation loss ^{a)}			
MEAN	14.6	0.9*	8.1
SD	21.13	3.02	14.74
N	21	11	19
Fetal deaths(resorptions+dead fetuses)			
MEAN	0.3	0.4	0.3
SD	0.66	0.81	0.56
N	21	11	19
Resorptions			
MEAN (Total)	0.2	0	0.2
SD	0.51	0	0.54
N	21	11	19
MEAN (Early)	0.1	0	0.2
SD	0.48	0	0.54
N	21	11	19
MEAN (Late)	0.0	0	0
SD	0.22	0	0
N	21	11	19
Litter size (No. of live fetuses)			
MEAN	7.7	9.5	8.3
SD	2.90	1.81	1.70
N	21	11	19

a) Pre-implantation loss= $\{(\text{corpora lutea}-\text{implantations})/\text{corpora lutea}\} \times 100$

Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Bart;Sig-05/NP-KW;Sig-05/Dunn's Rank Sum

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 7(Continued). Caesarean Section Data of Dams (Group Summary)

SUMMARY OF VISCERAL FINDINGS			
STUDY : G11003	SEX : FEMALE		
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
Mean % post-implantation loss ^{b)}			
MEAN	3.8	3.7	2.8
SD	7.84	8.22	6.43
N	21	11	19
Sex ratio (Mean % of males per litter)			
MEAN	55.5	46.8	47.8
SD	23.28	21.41	21.38
N	21	11	19
Body weight of live fetuses (g)			
MEAN (male)	43.5	34.5+	39.0
SD	8.47	4.27	6.10
N	21	11	18
MEAN (female)	41.4	33.8+	37.4
SD	7.05	5.86	5.64
N	20	11	18
No. of external anomalies of fetuses	0	0	0

b) Post-implantation loss = $\{(\text{implantations} - \text{live fetuses}) / \text{implantations}\} \times 100$
 Bart: NSg-05/Anova; NSg-05/No unplanned test performed
 Bart: NSg-05/Anova; Sig-05/Dunnett's
 + : Significant differences from control group (p<0.01)

Table 8. Visceral Findings in Fetuses (Group Summary)

SUMMARY OF VISCERAL FINDINGS			
STUDY : G11003	SEX : FEMALE		
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
No. of dams	21	11	19
Fetuses examined	161	104	158
Fetuses with malformations (%)	1 (0.6)	1 (1.0)	0 (0.0)
Fetuses with variations (%)	37 (23.0)	14 (13.5)	28 (17.7)

Chi-Square Test: NSg-05/No unplanned test performed

Table 9. Skeletal Findings in Fetuses (Group Summary)

SUMMARY OF SKELETAL FINDINGS				
STUDY : G11003 GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL		SEX : FEMALE	
	0	T1 500	T2 1000	
No. of dams	21	11	19	
Fetuses examined	161	104	158	
Fetuses with malformations (%)	2(1.2)	1(1.0)	0(0)	
Fetuses with variations (%)	138(85.7)	84(80.8)	120(75.9)	
Fetuses with retardations (%)	6(3.7)	2(1.9)	2(1.3)	
Litters affected (%)	2(9.5)	1(9.1)	2(10.5)	
No. of ossification centers				
Sternebra	MEAN	6.00	5.99	5.93
	S. D.	0.10	0.05	0.12
Metacarpals in both forelimbs	MEAN	9.90	9.65	9.82
	S. D.	0.20	0.46	0.43
1st&2nd phalanges in both forelimbs	MEAN	17.60	17.65	17.52
	S. D.	0.53	0.44	0.59
3rd phalanges in both forelimbs	MEAN	10.00	10.00	10.00
	S. D.	0	0	0
Metatarsals in both hindlimbs	MEAN	8.00	8.00	8.00
	S. D.	0	0	0
1st&2nd phalanges in both hindlimbs	MEAN	15.98	15.95	15.96
	S. D.	0.06	0.15	0.14
3rd phalanges in both hindlimbs	MEAN	8.00	8.00	8.00
	S. D.	0	0	0
Cervical vertebra	MEAN	7.00	7.00	6.99
	S. D.	0	0	0.02
Sacral and caudal vertebra	MEAN	19.83	19.53	19.68
	S. D.	0.34	0.54	0.32

Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Chi-square: NSg-05/No unplanned test performed

3. 번식시험 (랫드)

가. 목적 및 시험법

랫드에 있어서 시험물질 옷나무추출분말이 성선기능, 발정주기, 교미행동, 수정, 임신, 분만, 수유 및 이유와 차세대동물의 성장 및 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 OECD Guideline for Testing of Chemicals Test Guideline No. 416 (January 22, 2001) ‘Two-Generation Reproduction Toxicity Study’에 준하여 실시하였다.

나. 시험계

- (1) 종 및 계통 : 특정병원체 부재(SPF) CrI:CD(SD) 계통의 랫드
- (2) 성별 및 입수시 주령 : 암수 약 4주령
- (3) 선택이유 : 본 시험에 사용될 랫드는 실험동물로서의 역사가 길고 생식생리에 관한 지견이 나 일반적인 대사양식이 잘 알려져 있으며 성 성숙시까지 기간과 임신 및 수유기간이 비교적 짧은 이점이 있어 생식독성시험에 많이 이용되고 있다.
- (4) 공 급 원 : (주) 오리엔트 바이오 경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1번지
- (5) 입수예정일 : 2011년 4월 19일
- (6) 입수시 동물수 : 암수 각각 110마리
- (7) 검역 및 순화기간 : 입수 후 시험물질 투여전까지 7일간 (순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공)
- (8) 사용동물수 : 암수 각각 90마리[군분리후 남은 암수동물 각각 20마리씩은 필요시 교배에 이용함(test mate group)]
- (9) 투여개시시 주령 : 암수 약 5주령
- (10) 군분리시 체중범위 : 평균체중 \pm 20%
- (11) 군분리법 : 동물의 군분리는 당 연구소에서 사용하고 있는 GLP 독성시험용 전산프로그램인 Path/Tox System(version 4.2.2, Xybion Medical Systems Corporation, USA)의 A-module을 이용하여 실시하였다.
- (12) 식별법 : 순화기간 중에는 꼬리에 청색 매직으로 표시하고 시험기간중의 친세대동물(P)에 대한 개체식별은 tattoo법 및 흑색매직을 이용하였다. 군식별 및 개체식별을 위하여 각 사육상자 별로 케이지카드를 부착하고 그 위에 각각의 시험계별로 시험번호, 동물번호, 케이지번호 등을 기입한다. F1 동물의 개체식별은 분만후 2일째 F2세대를 얻기 위한 동물로서 모동물별로 암수 각각 한 마리를 선택하여 뒷발바닥에 tattoo법을 이용하여 실시하고, 분만후 5일째 행동시험동물에 사용할 F1 동물을 모동물별로 암수 각각 한 마리씩 선택하여 이개바깥쪽에 tattoo법을 이용하여 실시하였다. 이후에는 매직을 이용하여 개체식별을 실시하고 5-7주령사이에 꼬리에 tattoo법으로 개체식별을 실시하였다. 사용동물실 입구에는 동물실번호, 시험번호, 시험종류, 동물실사용기간 및 시험담당자명 등을 기재한 동물실사용기록지를 부착하였다. F1 차세대 동물의 경우 행동검사를 위한 동물은 모동물번호에 FB를 붙여서 기록하고, 성장 및 생식기능검사를 위한 동물은 모동물번호에 FG를 붙여서 기록하였다. F2 동물에 대한 개체식별은 실시하지 않았다.

다. 동 물 실

- (1) 동물실번호 : 안전성시험연구동 225호실

(2) 온·습도 범위 : 온도 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 50~60%를 목표범위로 하지만, 동물실 청소등의 작업에 의해 이탈될 수 있으며, 동물실 청소 이외의 시간에는 최저 30% 이상을 유지하며, 바람직하게는 70%를 초과하지 않았다.

(3) 환기 회수 : 10 ~ 20 회/hr (공조방식)

(4) 명암 cycle : 형광등조명 12 hr. (08:00 점등 ~ 20:00 소등)

(5) 조 도 : 150 ~ 300 Lux

(6) 사육상자의 종류 및 사육밀도

(가) 순화 및 검역기간 : 스테인레스제 망사육상자(255W×465L×200H mm)에 4마리이하 수용

(나) 교배전 및 교배시 : 스테인레스제 망사육상자(255W×465L×200H mm)에 교배전 투여기간동안에는 2마리씩, 교배시에는 암수 1:1로 동거

(다) 임신 및 포육동물 : 폴리카보네이트제 사육상자(240W×390L×180H mm)에 모동물별로 수용

(라) 성육기간 : 이유 후 약 4 ~ 5주령까지는 폴리카보네이트제 사육상자(240W×390L×180H mm)에 그리고 그 후에는 스테인레스제 망사육상자(255W×465L×200H mm)에 차세대동물의 교배기간을 제외하고 암·수 구분하여 F1 동물을 수용

라. 시험물질 및 부형제

(1) 시험물질

(가) 명 칭 : 옷나무추출분말

(나) 시험기관내 코드번호 : K-3711

(다) 로트번호 : Not available

(라) 입수일 : 2011년 2월 15일

(마) 유효기간 : 2012년 12월 22일

(바) 입수량 : 500g x 6 (총 3 kg)

(사) 외관 및 성상 : Light brown powder

(아) 보관조건 : 실온보관 [보관고번호 : KIT-401(113)]

(자) 공 급 원 : (주)생명의나무

(2) 부형제

(가) 명 칭 : 주사용 멸균증류수

(나) 공 급 원 : (주)대한약품

(다) 보관조건 : 실온보관

마. 시험물질과 부형제와의 혼합물

(1) 시험물질의 조제 : 시험물질을 부형제에 현탁시켜 최고용량군의 시험물질을 조제하고, 이를 다시 부형제로 희석하여 아래 단계 용량군의 시험물질을 조제하였다. 시험물질에 대한 안정성이 확보되지 않아 시험물질은 매일 조제하였다.

(2) 조제 시험물질의 분석 : 본시험에서 조제시험물질에 대한 분석은 실시하지 않았다.

바. 투여방법

(1) 투여경로 : 경구투여를 실시하였다.

(2) 선택이유 : 사람에게 대한 적용예상경로로서 경구투여를 선택하였다.

(3) 투여횟수 및 투여기간 : 친세대동물(P)의 경우 수컷은 교배 10주전부터 교배기간의 종료시점까지, 그리고 암컷은 교배 10주전부터 교배기간, 임신기간과 분만 후 이유시(포육 20일)까지 1일 1회 반복 투여한다. 교배용 차세대동물(F1)에 대해서는 이유일부터 70일 이상 투여 한 후 교배기간, 임신기간과 분만 후 차세대동물(F2) 신생자의 이유시(포육 20일)까지 투여하였다.

(4) 투여부위 및 투여법 : 경구투여용 존데를 이용하여 위내에 직접 주입하였다.

(5) 투여시각 : 매일 08시에서 13시 사이에 투여하는 것을 원칙으로 하였다.

(6) 투여액량 산출 : 가장 최근에 측정한 체중을 기준으로 하여 Path/Tox System에서 체중 kg당 10 ml로 계산된 것을 이용하였다.

사. 시험군의 구성 및 투여량 설정이유

(1) 시험군의 구성

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg)
Vehicle control	Male	30	1~30	10	0
T1	Female	30	91~120	10	500
	Male	30	31~60	10	
T2	Female	30	121~150	10	1000
	Male	30	61~90	10	
Test mate ^{a)}	Female	30	151~180	10	
	Male	20	181~200		
	Female	20	201~220		

^{a)} 교배용 무처치동물: 고용량군에서 교미율 및 출산율이 현저히 낮을 경우 교차교배를 실시하기 위한 동물임

(2) 투여량 설정이유

500 및 1000mg/kg/day의 용량으로 옷나무추출물의 랫드를 이용한 배태자발생 및 2세대번식독성 예비시험(P11001)을 실시한 결과, 모든 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 변화가 관찰되지

않았다. 상기 시험성적을 기초로 하여 한계용량인 1000 mg/kg/day을 고용량으로 설정하고, 아래로 500 mg/kg/day의 저용량군을 설정하였고, 그 외에 용매를 투여하는 부형제대조군을 두었다.

아. 교배

(1) 교배방법: 스테인레스제 망사육상자에 동일군내에서 암수 1:1 로 2 주일간 동거시켰다. 최초 2주간 교배가 성립되지 않은 암컷동물은 동일군의 교배성립한 수컷동물과 1주일간 추가로 교배를 실시하였다.

(2) 교배확인: 질전 또는 질도말시 정자를 확인한 날을 임신 0일로 정하며, 최종판정은 출산 여부 또는 자궁의 착상흔적에 따랐다.

(3) 차세대동물(F1)의 교배: 모동물당 F1 동물을 암수 각각 1 마리씩 형매교배를 피하여 동일군내에서 13(1) 및 13(2)항과 같이 실시한다. F1 동물들에서 각 개체별로 큰 차이가 나타날 경우에는 체중이 가장 많이 나가는 동물을 교배를 위한 차세대동물(F1)로 선택하였다.

비임신으로 판정된 암수 차세대(F1) 모동물에 대해서는 생식능력이 확인된 동물과 교배시키며, 생식기관의 조직병리 검사를 실시하고, 발정주기 검사나 정자발생 검사를 통하여 생식불능의 원인을 파악해야 했다.

(4) 2차교배: P동물과 교배용 F1 동물의 첫 번째 교배에서 시험물질 영향에 의한 산자수의 감소나 모호한 소견이 관찰되었을 때, 추가적인 차세대동물을 얻기 위하여 2차교배를 실시하였다. 각각의 암수 비임신 동물을 동일군의 임신확인동물과 1:1로 13(1) 및 13(2)항에 따라서 교배를 실시한다. 2차교배는 마지막 임신동물에 대한 차세대 동물의 이유 후 약 1주째에 실시하였다.

자. 계대방법

(1) F0 세대 : 전 동물을 자연분만시켜 F1 동물을 얻었다.

(2) F1 동물의 조정 : F1 동물은 생후 4일째에 어미 1마리당 암수 4마리씩으로 조정한다(1배당 새끼가 8마리가 안될 때는 조정하지 않음). 이 때 조정하고 남은 F1 동물은 외관검사를 실시한 후 CO₂ 과마취에 의해 안락사 시킨 다음 부검하여 내부장기검사를 실시하였다.

(3) F1 동물의 시험군 구성 : 분만후 1일째 각 모동물 별로 암수 1마리씩 선택하여 F2 동물을 얻기 위한 F1 동물을 선택하고 분만 후 5일째 행동검사를 위한 F1 동물을 암수 각각 1마리씩 선택하였다. F1 동물을 자연분만시켜 F2동물을 얻었다.

(4) F2 동물의 조정 : F2 동물은 생후 4일째에 어미 1마리당 암수 4마리씩으로 조정하였다(1배당 새끼가 8마리가 안될 때는 조정하지 않음). 이 때 조정하고 남은 F2 동물은 외관검사를 실시한 후 CO₂ 과마취에 의해 안락사 시킨 다음 부검하여 내부장기검사를 실시하였다.

차. 시험관찰 항목

(1) 일반증상 관찰

친세대 동물(P)에 대하여 순화기간 동안 하루에 한 번씩 임상증상을 관찰하였다. 시험물질 투여기간 동안에는 친세대동물(P) 및 교배용 차세대동물(F1)에 대하여 투여전·후 1회, 하루 두 번씩 일반증상, 분만장해, 사망유무등에 관하여 관찰하였다. 단, 체중측정일에는 체중측정시 상세관찰을 실시하였다. 출생자는 출산일로부터 이유일까지 일반증상을 관찰하고 생사유무를 확인하였다. 사망동물을 발견할 시에는 즉시 부검을 행하고, 빈사동물은 즉시 절박도살하여 부검하였다.

(2) 체중측정

P 동물 및 교배용 F1 동물에 대해서 투여개시일로부터 교배개시일까지 주 1회 체중을 측정하였다. 또한 암컷동물의 경우 임신 0, 7, 14 및 20일째와 포육 0, 4, 7, 14 및 21일째에 체중측정을 실시한다. 교배후 분만하지 않는 동물은 교배후 25일째 체중을 측정하였다.

(3) 사료섭취량 측정

P동물 및 교배용 F1 동물에 대하여 교배 전 투여기간과 임신기간 동안 주 1회 체중측정일에 사료의 정량을 급여하고 다음 체중 측정일에는 사료의 잔량을 측정하였다. 단, 시험물질 투여 개시일 및 임신 개시일에는 사료의 급여량만 측정하고 암수동물을 교배 당일과 임신 20일째에는 사료의 잔량만 측정하였다. 포육기간에는 포육 0, 7, 14 및 20일째 사료의 정량을 급여하고 그 다음날에 사료의 잔량을 측정하였다.

사료의 섭취량은 개체당 하루의 평균섭취량(단위: g/rat/day)으로 계산하였다.

(4) 성주기관찰

암컷 P 동물 및 교배용 F1 동물의 경우 교배개시 2주전부터 질도말검사를 실시하여 성주기의 규칙성과 기간을 조사하였다.

(5) 교배의 판정

교배는 13항에 따라서 실시하며 다음과 같은 자료를 산출하였다.

$$1) \text{ 교배율} = (\text{교배확인 동물수} / \text{교배동물수}) \times 100$$

$$2) \text{ 수태율} = (\text{임신시킨 동물수} / \text{교미확인 동물수}) \times 100$$

$$3) \text{ 임신율} = (\text{임신된 동물수} / \text{교미확인 동물수}) \times 100$$

(6) 분만일의 관찰

각 모동물(P, F1)에 대해서 분만종료시 임신기간, 생존자수, 사산자수, 성별 및 외표이상 유무를 조사한다. 사산자 및 분만후 포육 4일째까지 사망한 출생자에 대해서는 관찰이 가능하다면 Bouin solution에 고정 후 내부장기 검사를 실시하여 기형 및 변이여부를 조사하였다. 사망한 출생자(사산자포함)에 대한 내부장기 검사시 시험물질 투여에 기인한 결과과 관찰되지 않았

을 경우 최종보고서에 반영하지 않았다.

(7) 포육기간중의 관찰

F1 및 F2 동물에 대하여 생후 4 및 21 일째에 생존자수를 조사하고 생후 0, 4, 7, 14 및 21 일째에는 개체별 체중을 측정한다. 이상의 관찰을 기초로 아래의 자료를 산출하였다.

- 1) 출산율 = (생존자를 출산한 암컷 동물수/임신암컷동물수) \times 100
- 2) 생후 4일째 생존율=(생후 4일째 생존자수/생후 0일째 생존자수) \times 100
- 3) 이유율 = (생후 21일째 생존자수/생후 4일째 조정자수) \times 100

(8) F1 차세대 동물의 검사

전 임신동물을 자연분만시켜 얻은 F1 동물에 대하여 아래와 같이 시험을 실시하였다.

- 1) 이유부검 : 16(2)항에 기술된 방법에 따라 실시하였다.
- 2) 행동학습기능시험 : 행동학습기능시험을 위해 선택된 동물에 대해서아래 항목과 같은 행동학습기능검사를 실시한다. 모든 검사가 종료된 후에 CO₂ 과마취에 의해 안락사시킨 다음 부검을 실시하여 육안적 병변을 확인하고, 이상장기에 대해서는 10% 중성완충포르말린용액에 고정하여 보존하였다. 부검전 체중은 측정하지 않았다. Infra Mot locomotivity 시험과 수미로 시험은 안전성시험연구동 F203 실시하고 이외의 행동시험은 안전성시험연구동 F225호실에서 실시하였다.
 - ① 정향반사, 부주지성, 견인력, 동공반사, 청각반사
 - ② 회전봉시험
 - ③ Infra Mot locomotivity
 - ④ 수미로시험 (Morris Water Maze Test)
- 3) 성장 및 생식기능시험 : 성장 및 생식기능시험을 위해 선택된 F1 암수 동물에 대해서 아래와 같은 검사를 실시하였다.
 - ① 체중측정 : 15(2)항과 같이 모동물의 체중측정일에 체중을 개체별로 측정하였다.
 - ② 발육분화 : 이개개전, 안검개열, 절치붕출, 피모발생, 포피개열, 질개구 등을 관찰하였다. 단, 교배용 F1 동물에 대해서 포피개열 및 질개구 일령의 경우 관찰결과를 기록한 후, 완료시 추가로 체중을 측정하였다.
 - ③ 교배 : 원칙적으로 형매교배를 피하며 암수를 13주령 이후에 13항과 같이 교배하고 다음과 같은 자료를 산출하였다.
 - ▶ 교배율 : (교배확인 동물수/교배동물수) \times 100
 - ▶ 수태율 : (임신시킨 동물수/교배확인 동물수) \times 100
 - ▶ 임신율 : (임신된 동물수/교배확인 동물수) \times 100

(9) F2 차세대 동물의 검사

전 임신동물을 자연분만시켜 얻은 F2 동물에 대하여 아래와 같이 시험을 실시하였다.

(가) 체중측정 : F2 모든 신생자에 대해서 15(2)항과 같이 모동물의 체중측정일에 체중을 개체별로 측정하였다.

(나) 기능검사 : 모든 F2 동물에 대하여 정향반사, 부주지성, 견인력 시험을 실시하였다.

(다) 발육분화검사 : 모든 F2 동물에 대하여 이개개전, 안검개열, 절치붕출, 피모발생을 관찰하였다. F1동물의 성비나 성성숙에 있어서 시험물질의 영향이 인정될 경우 F2 출생자에 대해서 출생당일에 모든 출생자에 대해서 성기항문간 거리를 측정하였다.

(라) 이유부검 : 16(2)항에 기술된 방법에 따라 실시하였다.

(10) 비임신동물의 자료 정리

친세대 및 차세대 비임신동물의 시험자료는 기초자료로 보관을 하였다. 단, 교배 이후 일반증상, 체중 및 사료섭취량은 최종보고서에서 제외하였다.

(11) 부검시 검사

(가) 해부시기

P, F1 수컷 모동물은 교배종료 후, P, F1 및 F2 암컷 모동물은 포육 21일째에 부검하였다. 사용하지 않은 F1 동물 및 F2 동물은 포육 21일째에 부검하였다.

(나) 부검

① 계획도살 : P, F1 수컷 모동물은 교배종료 후, P, F1 및 F2 암컷 모동물은 포육 21일째 부검전 체중을 측정한 다음 CO₂ 마취하에(혈액을 채취하는 동물은 isoflurane을 이용하여 마취) 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전 장기(특히 생식기)에 대하여 육안적 검사를 실시한다. 부검시 좌우 자궁별로 착상흔수를 계수하였다. 교배에 사용하지 않은 F1 동물과 모든 F2 동물에 대해서는 모동물당 암수 각각 3마리씩 이유후 부검하여 흉·복강내 주요장기의 육안적 검사를 실시하였다.

② P 및 F1 비임신 동물 : 시험물질의 영향으로 임신율이 저하되었을 경우에는 13(4)항에 따라 비임신동물은 2차 교배를 실시하였다. 이외의 경우 비임신 동물은 교배 27일 이후에 부검을 실시하였다. 부검시 착상흔적 등 임신유무를 자세히 관찰하였다. 부검전 체중 및 장기중량은 측정하지 않으나 상기에 기술된 바와 같이 부검시 육안적 검사를 실시한 후, 이상장기 및 아래 16(4)항에 지시된 장기를 고정한 다음 조직병리학적인 검사를 실시하였다.

③ 모든 출생자가 사망한 암컷 모동물 : 마지막 출생자가 사망한 후 3일 이내에 부검을 실시하였다. 부검전 체중 및 장기중량은 측정하지 않으나 상기에 기술된 바와 같이 부검시 육안적 검사를 실시한 후 아래 16(3)항에 지시된 장기를 고정한 다음 16(4)항에 따라 조직병리학적인 검사를 실시하였다.

④ F1 이유부검 동물 : 포육 21일째 이유한 다음 행동 및 성장/생식시험에 이용할 동물은

제외한 모든 F1 이유동물은 부검을 실시하였다. 부검전 체중을 측정하고 다음 CO₂ 과마취에 의해 안락사시킨 후 부검하여 육안적인 검사를 실시하고, 병변부위는 10% 중성완충포르말린용액에 고정하여 보존한 후 16(5)항에 따라서 조직병리학적 검사를 실시하였다.

⑤ F2 이유부검 동물 : F2동물은 포육 21일째 부검을 실시하였다. 각 모동물별로 암수 각각 1마리씩 선택하여 부검전 체중을 측정하고 16(4)항에 따라 장기중량을 측정하였다. 일반증상 또는 외형적 이상이 관찰된 동물도 부검전 확인한 다음 부검시 체중을 측정하고 16(4)항에 따라 장기중량을 측정하였다. 이외의 F2 생존동물은 부검하여 육안적인 검사를 실시하고, 장기중량은 측정하지 않으며, 병변부위는 10% 중성완충포르말린용액에 고정하여 보존한 후 16(5)항에 따라서 조직병리학적 검사를 실시하였다.

(다) 정자검사

부검시 P세대 및 F1 세대 수컷동물의 경우 각 군당 10마리씩 무작위로 동물을 선택하여 SOP/RER/022에 따라 고환의 정자두부수 그리고 부고환의 정자수, 운동성 및 형태학적 이상유무를 조사하였다. 정자독성을 평가한 동물에 대해서는 부검시 복대동맥에서 채혈한 후 혈청을 채취하고 외부기관(삼광임상검사센터, Non-GLP 기관)에 의뢰하여 혈중 테스토스테론 농도를 측정하였다.

(라) 장기중량 및 고정

계획도살되는 P, F1 암수 모동물에 대해서 아래에 기술된 장기의 습중량을 측정하고 10% 중성완충포르말린액으로 고정시키며, 고환 및 부고환은 Bouin's액에 고정한다. 단, 양측장기는 좌우 구별하여 측정하고 비임신 및 모든 출생자가 사망한 암컷 동물의 장기중량은 측정하지 않았다.

뇌, 뇌하수체, 부신, 간, 비장, 신장, 갑상선, 고환, 부고환, 전립선, 정낭선(응고선 및 fluid 포함), 자궁, 난소

F1 및 F2 동물 이유부검시 부검 대상인 동물중에서 각 모동물별로 암수 각각 1마리씩 무작위로 선택하여 뇌, 비장 및 흉선의 중량을 측정하고 다음 이들 장기를 10% 중성완충포르말린용액에 고정하여 보존하였다. 또한 F1 및 F2 이유부검 대상동물중 외형이상이나 일반증상 관찰시 이상소견이 관찰된 동물의 경우 부검하여 뇌, 비장 및 흉선의 중량을 측정하고 다음 이들 장기를 10% 중성완충포르말린용액에 고정하여 보존하였다.

(라) 조직병리학적검사

P 동물과 교배용 F1 동물의 경우 부형제대조군과 최고농도군에 대하여 아래에 기술된 장기의 조직병리학적 검사를 실시하였다. 고환에 대해서는 Hematoxylin & Eosin 염색 이외에 추가로 PAS & Hematoxylin 염색을 실시하여 검경하였다.

포육 21일째 부검하는 F1 암컷 모동물의 경우 각 난소당 5개씩 연속절단한 후, primordial follicle의 수를 계수하였다.

고정된 모든 이상장기에 대해서 조직병리학적 검사를 실시하였다.

고환, 부고환, 전립선, 정낭선(응고선포함), 질, 자궁(자궁경부포함), 난소, 최고용량군에서 중량변화가 관찰된 장기, 이상장기

최고농도군에서 시험물질투여에 기인한 이상소견이 나타날 경우에는 다른 군까지 확대해서 실시하였다. 그리고 수태율의 감소가 나타난 경우, 교배 또는 임신 미성립동물의 경우 또는 정상새끼가 출산되지 않은 경우에는 저농도군과 중간농도군에 속한 모든 동물의 생식장기에 대해서 조직병리학적 검사를 실시하였다.

(12) 통계학적 방법

얻어진 자료에 대한 통계분석은 다중비교검정법을 실시하였다. 검사항목에 대해 Bartlett법으로 등분산 검정을 실시하여 유의성이 인정되지 않을 경우에는 일원배치분산분석(ANOVA)을 유의수준 $\alpha = 0.05$ 로 검정하여, 유의성이 인정되면 유의한 결과가 부형제대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett test를 실시하였다. Bartlett법에서 유의성이 인정된 경우에는 부등분산으로서 non-parametric 통계학적 방법에 이용되는 Kruskal-Wallis (H) 검정을 유의수준 $\alpha = 0.05$ 로 검정하여 유의성이 인정된 경우에만 부형제대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 Dunn's Rank Sum test를 실시하였다. 출현율 및 백분율에 대한 시험자료는 χ^2 -test를 실시하여 유의성($\alpha = 0.05$)이 인정된 경우에 부형제대조군과 각 투여군간에 차이가 있는지를 확인하기 위하여 Fisher exact test를 실시하였다. 신생자에 대한 시험자료는 한배에서 나온 착상수, 생존자수 및 사망자수를 이용하여 통계분석을 실시한다. 통계학적인 유의성은 위험율 1% 혹은 5%에서 검사하였다. 이러한 분석은 당 연구소에서 사용하고 있는 GLP 독성시험용 전산프로그램인 Path/Tox System 또는 SAS program (SAS/STAT, Version 9.2, NC, USA)을 이용하여 실시하였다.

(13) 결과 및 결론

(가) F0 모동물에 대한 영향

모동물의 일반증상, 체중, 사료섭취량, 부검소견, 장기중량 및 생식장기에 대한 조직병리학적 검사에 있어서 시험물질에 기인한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다(Figure 1-4, Table 1-7).

(나) F0 모동물에 대한 생식독성학적 영향

① 성주기의 기간, 교배소요기간, 교미율, 수태율, 임신율, 정자검사성적 및 혈중 테스토스테론 농도에 있어서 시험물질에 의한 영향은 인정되지 않았다(Table 8-11).

② 출생시의 임신기간, 출산율, 생존자수, 사산자수, 생존자의 성비, 생후 4일째 생존율 및 이

유율에 있어서 시험물질의 영향은 관찰되지 않았다(Table 12).

③ 생후 4일째 조정후 남은 F1 동물의 내부장기 검사시 시험물질의 영향은 관찰되지 않았다(Table 13).

(다) F1 동물에 대한 영향

① F1 모동물의 일반증상, 체중, 사료섭취량, 부검소견, 장기중량 및 생식장기에 대한 조직병리학적 검사에 있어서 시험물질에 기인한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다(Figure 7-10, Table 19-21, 23-29).

② 형태분화관찰일령 및 행동기능시험의 합격률에 있어서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다(Table 17-18).

③ F1 암수동물의 이유전 관찰한 일반증상, 체중변화와 이유부검시 관찰한 부검소견 및 장기중량에 있어서 시험물질의 영향은 관찰되지 않았다(Figure 5-6, Table 14-16, 20-21).

④ F1 모동물에 대한 생식독성학적 영향

F1 암수동물의 성주기의 기간, 교배소요기간, 교미율, 수태율, 임신율, 정자검사성적 및 혈중 테스토스테론 농도에 있어서 시험물질에 의한 영향은 인정되지 않았다(Table 30-33).

출생시의 임신기간, 출산율, 생존자수, 사산자수, 생존자의 성비, 생후 4일째 생존율 및 이유율에 있어서 시험물질의 영향은 관찰되지 않았다(Table 34).

생후 4일째 조정후 남은 F2 동물의 내부장기 검사시 시험물질의 영향은 관찰되지 않았다(Table 35).

⑤ F2 동물에 대한 영향

형태분화관찰일령 및 행동기능시험의 합격률에 있어서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다(Table 38-39).

F2 암수동물의 이유전 관찰한 일반증상, 체중변화와 이유부검시 관찰한 부검소견 및 장기중량에 있어서 시험물질의 영향은 관찰되지 않았다(Table 36-37, 40-42).

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 본 시험물질 윗나물 추출분말의 2세대동안 500 및 1000 mg/kg/day의 용량으로 경구반복투여시 시험물질 투여에 기인한 독성학적변화는 모든 투여군에서 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험조건에 의한 무해용량(no-observed-adverse-effect levels)은 F0 암수 모동물, F1차세대 동물 및 F2 차세대 동물의 일반독성 및 번식독성에 있어서 1000 mg/kg/day 이상인 것으로 판단되었다.

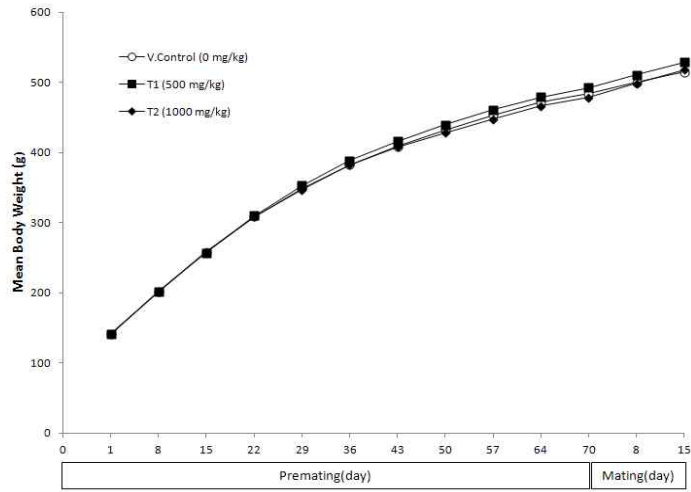


그림 223. Mean Body Weight of F0 Male Rats

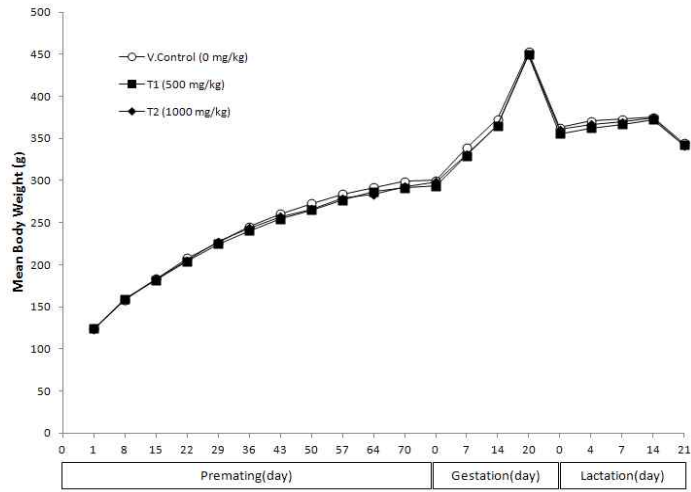


그림 224. Mean Body Weight of F0 Female Rats

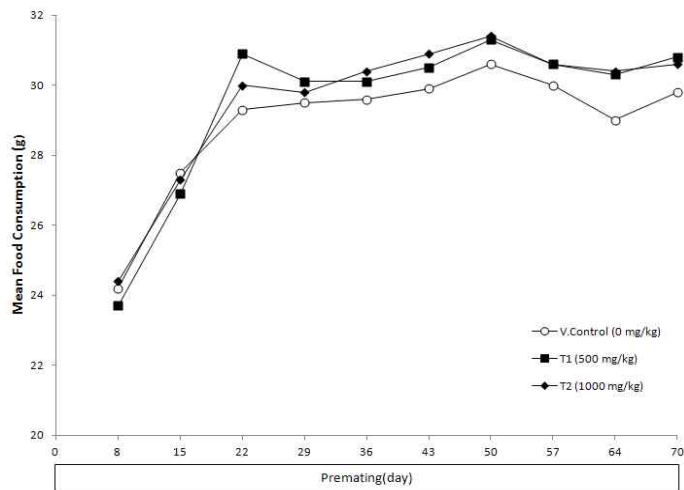


그림 225. Mean Food Consumption of F0 Male Rats

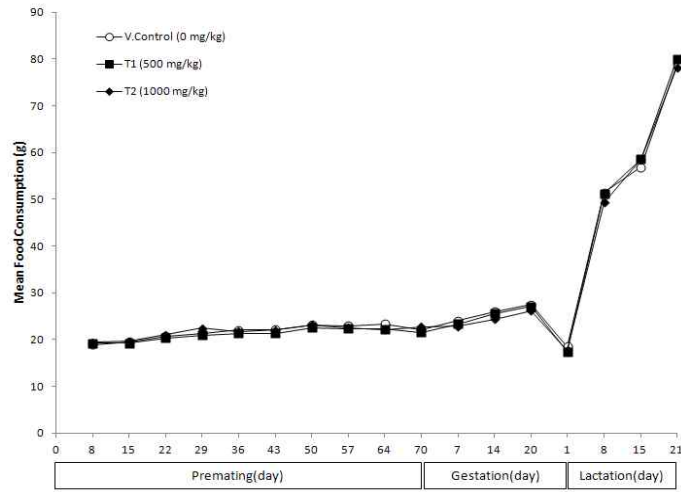


그림 226. Mean Food Consumption of F0 Female Rats

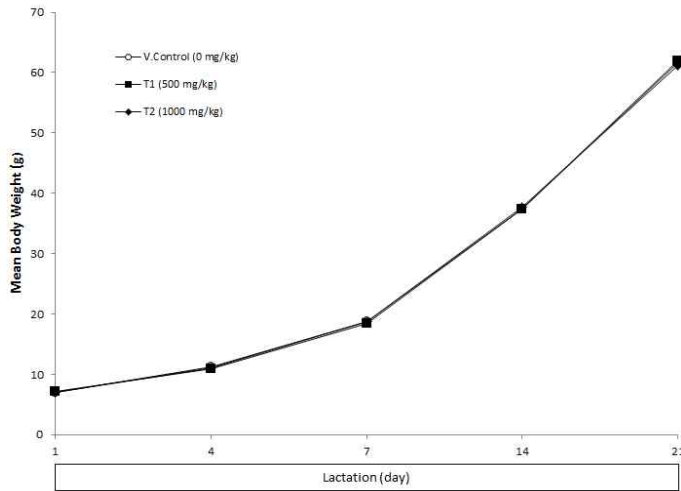


그림 227. Mean Body Weight of F1 Male Rats before Weaning

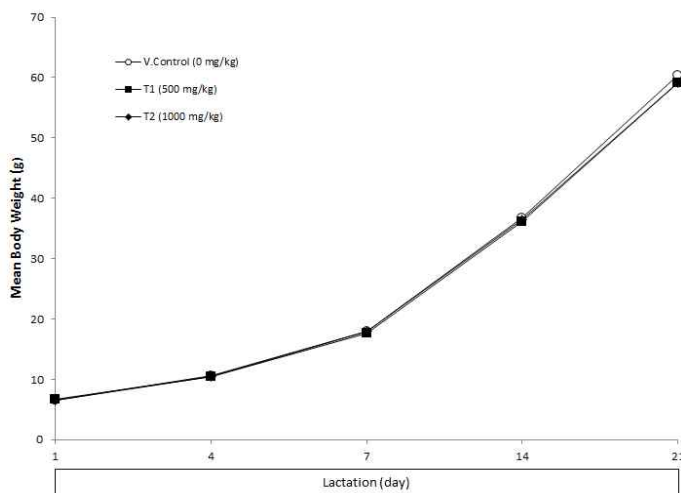


그림 228. Mean Body Weight of F1 Female Rats before Weaning

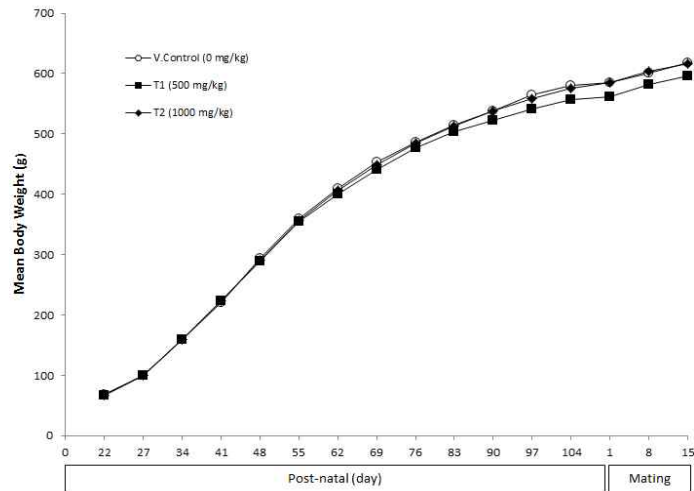


그림 229. Mean Body Weight of F1 Male Rats after Weaning

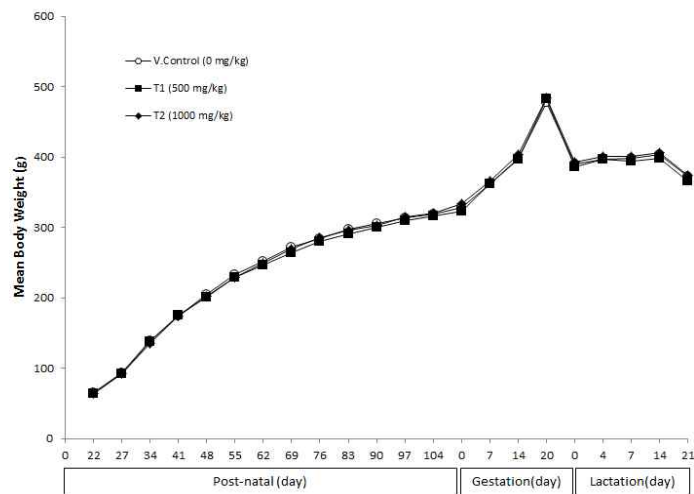


그림 230. Mean Body Weight of F1 Female Rats after Weaning

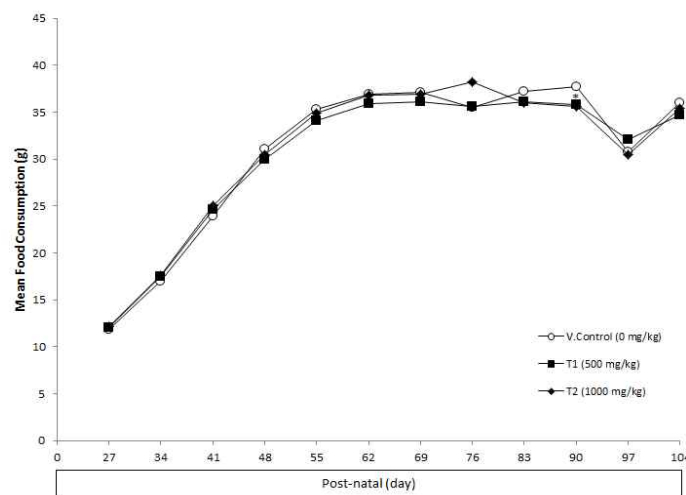


그림 231. Mean Food Consumption of F1 Male Rats

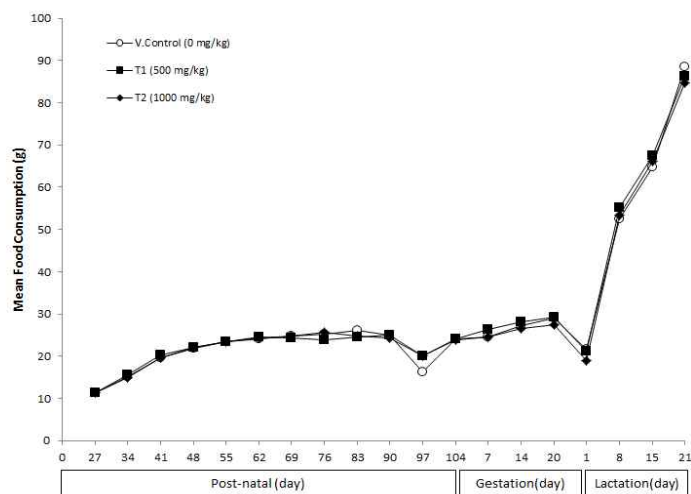


그림 232. Mean Food Consumption of F1 Female Rats

Table 1 Summary of Clinical Signs of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE							
Premating							
STUDY : G11002 GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL		T1		T2		SEX : MALE
	0		500		1000		
No. of animals	30		30		30		
	#	(%)	#	(%)	#	(%)	
Normal	30	100.00	30	100.00	30	100.00	
Fur, Hair, Coat							
Loss of fur	1	3.33	1	3.33	4	13.33	
Skin							
Bite wound	2	6.67	0	0.00	0	0.00	
Scratch wound	0	0.00	0	0.00	1	3.33	
Callosity	1	3.33	0	0.00	0	0.00	
Mouth							
Salivation	0	0.00	11	36.67	29	96.67	

Table 1(Continued) Summary of Clinical Signs of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE							
Premating							
STUDY : G11002	V. CONTROL			T1		SEX : FEMALE	
GROUP:	0			500		T2	
DOSE : (mg/kg)						1000	
No. of animals	30		30		30		
	#	(%)	#	(%)	#	(%)	
Normal							
Normal	30	100.00	30	100.00	30	100.00	
Fur, Hair, Coat							
Loss of fur	4	13.33	14	46.67	7	23.33	
Skin							
Bite wound	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
Scratch wound	0	0.00	1	3.33	0	0.00	
Callosity	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
Eye							
Eye discharge	0	0.00	1	3.33	0	0.00	
Mouth							
Salivation	0	0.00	5	16.67	29	96.67	

Table 1(Continued) Summary of Clinical Signs of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE							
Mating							
STUDY : G11002	V. CONTROL			T1		SEX : MALE	
GROUP:	0			500		T2	
DOSE : (mg/kg)						1000	
No. of animals	30		30		30		
	#	(%)	#	(%)	#	(%)	
Normal							
Normal	29	96.67	30	100.00	27	90.00	
Fur, Hair, Coat							
Loss of fur	0	0.00	0	0.00	4	13.33	
Skin							
Bite wound	1	3.33	0	0.00	0	0.00	
Scratch wound	0	0.00	0	0.00	1	3.33	
Callosity	1	3.33	0	0.00	0	0.00	
Mouth							
Salivation	0	0.00	6	20.00	25	83.33	

Table 1(Continued) Summary of Clinical Signs of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE							
Mating							
STUDY : G11002	V. CONTROL			T1		SEX : FEMALE	
GROUP:	0			500		T2	
DOSE : (mg/kg)						1000	
No. of animals	30		30		30		
	#	(%)	#	(%)	#	(%)	
Normal							
Normal	30	100.00	29	96.67	29	96.67	
Fur, Hair, Coat							
Loss of fur	0	0.00	0	0.00	1	3.33	
Eye							
Eye discharge	0	0.00	1	3.33	0	0.00	
Mouth							
Salivation	0	0.00	1	3.33	15	50.00	

Table 1(Continued) Summary of Clinical Signs of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE						
Gestation						
STUDY : G11002	V. CONTROL		T1	SEX : FEMALE		
GROUP:	0		500	T2		
DOSE : (mg/kg)				1000		
No. of animals	27		28		27	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
Normal	27	100.00	27	96.43	27	100.00
Fur, Hair, Coat						
Loss of fur	9	33.33	4	14.29	5	18.52
Eye						
Eye discharge	0	0.00	1	3.57	0	0.00
Mouth						
Salivation	0	0.00	0	0.00	14	51.85

Table 1(Continued) Summary of Clinical Signs of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE						
Lactation						
STUDY : G11002	V. CONTROL		T1	SEX : FEMALE		
GROUP:	0		500	T2		
DOSE : (mg/kg)				1000		
No. of animals	27		28		27	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
Normal	20	74.07	24	85.71	24	88.89
Fur, Hair, Coat						
Loss of fur	10	37.04	6	21.43	3	11.11
Skin						
Palpable mass	0	0.00	1	3.57	0	0.00
Eye						
Eye discharge	0	0.00	1	3.57	0	0.00

Table 2

Body Weights of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Premating				
STUDY : G11002		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 1	MEAN	141.1	141.3	140.7
Premating	S. D.	4.40	4.33	3.81
	N	30	30	30
DAY 8	MEAN	201.4	201.3	202.1
Premating	S. D.	9.37	8.14	8.90
	N	30	30	30
DAY 15	MEAN	258.1	257.2	257.0
Premating	S. D.	15.63	13.14	15.56
	N	30	30	30
DAY 22	MEAN	308.6	310.1	308.9
Premating	S. D.	24.11	16.86	19.67
	N	30	30	30
DAY 29	MEAN	348.6	352.7	347.1
Premating	S. D.	30.73	19.72	24.75
	N	30	30	30
DAY 36	MEAN	382.4	388.2	382.2
Premating	S. D.	37.10	24.02	29.44
	N	30	30	30
DAY 43	MEAN	408.7	415.7	407.9
Premating	S. D.	41.69	26.87	32.60
	N	30	30	30
DAY 50	MEAN	432.0	439.2	428.0
Premating	S. D.	44.97	30.30	34.31
	N	30	30	30
DAY 57	MEAN	453.6	461.0	447.4
Premating	S. D.	49.92	31.79	35.24
	N	30	30	30

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 2(Continued) Body Weights of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g) Premating & Mating				
STUDY : G11002		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 64	MEAN	471.6	478.8	466.5
Premating	S. D.	53.70	35.28	38.25
	N	30	30	30
DAY 70	MEAN	483.4	492.4	478.1
Premating	S. D.	54.30	38.32	38.08
	N	30	30	30
DAY 8	MEAN	500.0	510.4	498.7
Mating	S. D.	53.18	36.75	42.04
	N	30	30	30
DAY 15	MEAN	514.4	528.6	517.8
Mating	S. D.	57.11	38.27	43.03
	N	30	30	30

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 2(Continued) Body Weights of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Premating				
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 1	MEAN	124.2	124.2	123.6
Premating	S. D.	3.89	4.15	4.95
	N	30	30	30
DAY 8	MEAN	158.4	159.4	159.5
Premating	S. D.	7.84	7.43	11.48
	N	30	30	30
DAY 15	MEAN	183.2	181.8	183.2
Premating	S. D.	10.65	8.20	13.48
	N	30	30	30
DAY 22	MEAN	208.1	204.2	205.4
Premating	S. D.	12.74	10.41	17.26
	N	30	30	30
DAY 29	MEAN	226.6	224.6	227.7
Premating	S. D.	15.50	12.42	19.39
	N	30	30	30
DAY 36	MEAN	245.7	240.4	243.9
Premating	S. D.	18.66	13.78	21.56
	N	30	30	30
DAY 43	MEAN	260.3	254.2	257.2
Premating	S. D.	20.06	13.44	21.62
	N	30	30	30
DAY 50	MEAN	272.6	264.9	266.0
Premating	S. D.	19.89	15.05	22.82
	N	30	30	30
DAY 57	MEAN	283.8	277.0	278.9
Premating	S. D.	22.43	15.65	23.22
	N	30	30	30

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 2(Continued) Body Weights of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Premating				
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 64	MEAN	291.6	286.9	283.7
Premating	S. D.	24.74	15.62	21.83
	N	30	30	30
DAY 70	MEAN	299.2	291.5	292.8
Premating	S. D.	23.76	17.74	22.66
	N	30	30	30

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

Table 2(Continued) Body Weights of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Gestation & Lactation				
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 0	MEAN	300.2	293.7	298.8
Gestation	S. D.	28.83	18.32	22.96
	N	27	28	27
DAY 7	MEAN	338.9	329.4	330.8
Gestation	S. D.	28.26	21.24	23.09
	N	27	28	27
DAY 14	MEAN	372.7	365.0	365.8
Gestation	S. D.	27.74	20.71	23.16
	N	27	28	27
DAY 20	MEAN	452.8	449.3	449.7
Gestation	S. D.	35.92	30.90	31.36
	N	27	28	27
DAY 0	MEAN	362.7	355.7	360.7
Lactation	S. D.	30.51	25.92	25.74
	N	27	28	27
DAY 4	MEAN	370.7	362.3	367.0
Lactation	S. D.	31.37	22.40	23.47
	N	27	28	27
DAY 7	MEAN	372.8	366.8	369.3
Lactation	S. D.	28.81	25.93	22.24
	N	27	28	27
DAY 14	MEAN	374.9	372.6	374.8
Lactation	S. D.	26.79	22.80	22.20
	N	27	28	27
DAY 21	MEAN	344.5	342.4	341.6
Lactation	S. D.	25.57	19.94	21.52
	N	27	28	27

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

Table 3

Food Consumption of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11002		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 8	INTAKE (g)	24.2	23.7	24.4
Premating	S. D.	1.16	1.02	0.93
	N	15	15	15
DAY 15	INTAKE (g)	27.5	26.9	27.3
Premating	S. D.	1.79	1.58	1.15
	N	15	15	15
DAY 22	INTAKE (g)	29.3	30.9	30.0
Premating	S. D.	2.10	5.83	1.69
	N	15	15	15
DAY 29	INTAKE (g)	29.5	30.1	29.8
Premating	S. D.	2.12	0.98	2.01
	N	15	15	15
DAY 36	INTAKE (g)	29.6	30.1	30.4
Premating	S. D.	2.19	1.25	2.20
	N	15	15	15
DAY 43	INTAKE (g)	29.9	30.5	30.9
Premating	S. D.	2.31	1.56	2.00
	N	15	15	15
DAY 50	INTAKE (g)	30.6	31.3	31.4
Premating	S. D.	2.46	1.67	2.01
	N	15	15	15
DAY 57	INTAKE (g)	30.0	30.6	30.6
Premating	S. D.	2.54	2.21	1.96
	N	15	15	15
DAY 64	INTAKE (g)	29.0	30.3	30.4
Premating	S. D.	2.24	1.81	2.33
	N	15	15	15

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 3(Continued) Food Consumption of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11002		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 70	INTAKE (g)	29.8	30.8	30.6
Premating	S. D.	2.15	1.64	1.97
	N	15	15	15

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 3(Continued) Food Consumption of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 8	INTAKE (g)	18.9	19.2	19.4
Premating	S. D.	0.53	0.92	1.09
	N	15	15	15
DAY 15	INTAKE (g)	19.5	19.2	19.6
Premating	S. D.	0.66	1.18	1.23
	N	15	15	15
DAY 22	INTAKE (g)	20.7	20.3	21.0
Premating	S. D.	1.18	1.35	1.52
	N	15	15	15
DAY 29	INTAKE (g)	21.3	20.9	22.4
Premating	S. D.	1.12	1.52	2.62
	N	15	15	15
DAY 36	INTAKE (g)	22.0	21.3	21.7
Premating	S. D.	1.42	1.44	1.84
	N	15	15	15
DAY 43	INTAKE (g)	22.1	21.3	22.0
Premating	S. D.	1.70	1.46	1.86
	N	15	15	15
DAY 50	INTAKE (g)	23.1	22.5	23.1
Premating	S. D.	1.68	1.12	1.41
	N	15	15	15
DAY 57	INTAKE (g)	22.9	22.3	22.5
Premating	S. D.	1.81	1.36	2.00
	N	15	15	15
DAY 64	INTAKE (g)	23.3	22.2	22.1
Premating	S. D.	1.77	1.57	2.05
	N	15	15	15

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 3(Continued) Food Consumption of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11002				SEX : FEMALE
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 70	INTAKE (g)	22.1	21.5	22.7
Premating	S. D.	1.42	1.51	1.54
	N	15	15	15

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 3(Continued) Food Consumption of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11002				SEX : FEMALE
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 7	INTAKE (g)	24.1	23.3	22.8
Gestation	S. D.	2.78	3.53	2.52
	N	27	28	27
DAY 14	INTAKE (g)	26.0	25.6	24.4
Gestation	S. D.	2.31	3.01	3.15
	N	27	28	27
DAY 20	INTAKE (g)	27.5	27.1	26.2
Gestation	S. D.	3.02	3.29	1.84
	N	27	28	27
DAY 1	INTAKE (g)	18.5	17.4	17.7
Lactation	S. D.	6.54	6.23	6.56
	N	27	28	27
DAY 8	INTAKE (g)	51.4	51.2	49.3
Lactation	S. D.	7.36	6.97	5.39
	N	27	28	27
DAY 15	INTAKE (g)	56.9	58.6	58.5
Lactation	S. D.	9.39	7.01	6.66
	N	27	28	27
DAY 21	INTAKE (g)	78.8	80.0	78.2
Lactation	S. D.	13.62	7.98	6.11
	N	27	28	27

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 4

Gross Findings of F0 Rats (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : G11002	SEX : MALE		
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
NUMBER OF ANIMALS:	30	30	30
Observed/No remarkable finding	28	30	30
No. of Observations	28	30	30
SPLEEN			
Fibrous capsule	1	0	0
No. of Observations	1	0	0
GROSS LESIONS			
Pinna			
Firm	1	0	0
No. of Observations	1	0	0

Table 4(Continued) Gross Findings of F0 Rats (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : G11002	SEX : FEMALE		
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
NUMBER OF ANIMALS:	27	28	27
Observed/No remarkable finding	21	23	24
No. of Observations	21	23	24
KIDNEYS			
Focus/foci	1	0	0
Hydronephrosis	0	1	0
No. of Observations	1	1	0
OVARIES			
Cyst	0	1	0
No. of Observations	0	1	0
SKIN			
Mass(es)	0	1	0
Hair loss	5	2	2
No. of Observations	5	3	2
THYROID/PARATHY.			
Absent	0	0	1
No. of Observations	0	0	1

Table 5

Absolute Organ Weights of F0 Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
BRAIN			
MEAN (g)	1.995	2.031	2.030
SD	0.0958	0.0900	0.0631
N	30	30	30
PITUITARY GLAND			
MEAN (g)	0.012	0.012	0.011
SD	0.0025	0.0025	0.0029
N	30	30	30
LIVER			
MEAN (g)	17.519	18.166	18.274
SD	2.7184	2.0525	2.3967
N	30	30	30
SPLEEN			
MEAN (g)	0.846	0.823	0.790
SD	0.1628	0.1091	0.0955
N	30	30	30
SEMINAL VESICLE			
MEAN (g)	2.015	2.019	2.014
SD	0.2755	0.2856	0.2800
N	30	30	30
PROSTATE			
MEAN (g)	0.587	0.566	0.616
SD	0.1253	0.1217	0.1357
N	30	30	30
KIDNEYS			
MEAN (g)	3.569	3.606	3.659
SD	0.4619	0.3565	0.3672
N	30	30	30
ADRENAL GLANDS			
MEAN (g)	0.057	0.057	0.057
SD	0.0077	0.0077	0.0111
N	30	30	30
TESTES			
MEAN (g)	3.247	3.343	3.351
SD	0.2676	0.2733	0.2716
N	30	30	30

a Bart; NSg-05/Anova; NSg-05/No unplanned test performed

b Bart; Sig-05/NP-KW; NSg-05/No unplanned test performed

Table 5(Continued) Absolute Organ Weights of F0 Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
EPIDIDYIMIDES			
MEAN (g)	1.342	1.394	1.343
SD	0.1123	0.1144	0.0980
N	30	30	30
THYROID/PARATHY.			
MEAN (g)	0.020	0.022	0.021
SD	0.0039	0.0051	0.0048
N	30	30	30

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 5(Continued) Absolute Organ Weights of F0 Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
BRAIN			
MEAN (g)	1.972	1.993	1.983
SD	0.0923	0.0872	0.0856
N	27	28	27
PITUITARY GLAND			
MEAN (g)	0.014	0.013	0.014
SD	0.0025	0.0030	0.0024
N	27	28	27
LIVER			
MEAN (g)	14.935	15.049	15.175
SD	1.4421	1.5484	1.4456
N	27	28	27
SPLEEN			
MEAN (g)	0.614	0.617	0.588
SD	0.0731	0.0871	0.0588
N	27	28	27
KIDNEYS			
MEAN (g)	2.613	2.693	2.645
SD	0.2474	0.2197	0.1962
N	27	28	27
ADRENAL GLANDS			
MEAN (g)	0.067	0.067	0.065
SD	0.0099	0.0094	0.0080
N	27	28	27
OVARIES			
MEAN (g)	0.099	0.097	0.098
SD	0.0113	0.0156	0.0126
N	27	28	27
THYROID/PARATHY.			
MEAN (g)	0.018	0.017	0.017
SD	0.0046	0.0035	0.0038
N	27	28	26
UTERUS/CERVIX			
MEAN (g)	0.532	0.546	0.522
SD	0.1380	0.0984	0.1321
N	27	28	27

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 6

Relative Organ Weights of F0 Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
BRAIN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.393	0.386	0.397
SD	0.0387	0.0236	0.0301
N	30	30	30
PITUITARY GLAND			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.002	0.002	0.002
SD	0.0005	0.0005	0.0005
N	30	30	30
LIVER			
MEAN (% BODY WEIGHT)	3.406	3.440	3.550*
SD	0.2021	0.2388	0.2334
N	30	30	30
SPLEEN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.165	0.156	0.154
SD	0.0287	0.0203	0.0157
N	30	30	30
SEMINAL VESICLE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.396	0.385	0.395
SD	0.0572	0.0609	0.0637
N	30	30	30
PROSTATE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.115	0.108	0.120
SD	0.0254	0.0247	0.0259
N	30	30	30
KIDNEYS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.697	0.684	0.713
SD	0.0578	0.0511	0.0463
N	30	30	30

a Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

c Bart;NSg-05/Anova;Sig-05/Dunnett's

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 6 (Continued) Relative Organ Weights of F0 Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
ADRENAL GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.011	0.011	0.011
SD	0.0014	0.0016	0.0019
N	30	30	30
TESTES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.638	0.637	0.656
SD	0.0609	0.0621	0.0628
N	30	30	30
EPIDIDYMIDES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.264	0.265	0.263
SD	0.0282	0.0242	0.0251
N	30	30	30
THYROID/PARATHY.			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.004	0.004	0.004
SD	0.0008	0.0009	0.0009
N	30	30	30

b Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 6(Continued) Relative Organ Weights of FO Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
BRAIN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.582	0.592	0.591
SD	0.0418	0.0441	0.0433
N	27	28	27
PITUITARY GLAND			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.004	0.004	0.004
SD	0.0007	0.0008	0.0007
N	27	28	27
LIVER			
MEAN (% BODY WEIGHT)	4.396	4.450	4.505
SD	0.3582	0.3263	0.3143
N	27	28	27
SPLEEN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.181	0.183	0.175
SD	0.0192	0.0279	0.0161
N	27	28	27
KIDNEYS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.769	0.797	0.786
SD	0.0651	0.0525	0.0431
N	27	28	27
ADRENAL GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.020	0.020	0.019
SD	0.0030	0.0026	0.0023
N	27	28	27
OVARIES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.029	0.029	0.029
SD	0.0026	0.0042	0.0035
N	27	28	27

a Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 6(Continued) Relative Organ Weights of F0 Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
THYROID/PARATHY.			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.005	0.005	0.005
SD	0.0015	0.0012	0.0011
N	27	28	26
UTERUS/CERVIX			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.157	0.162	0.155
SD	0.0441	0.0327	0.0414
N	27	28	27

b Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 7 Histopathological Findings of F0 Rats (Group Summary)

Incidence Summary Table With Statistics

	Dosing units: mg/kg	Group dosage level:	Animal sex:	-- Males --		-- Females --	
				No. in group:			
STUDY : G11002				0	500	1000	
Tissues with Diagnoses				30	30	30	
TESTES			Number examined:	30	0	30	
Lymphocytic infiltration, perivascular				1	0	0	
EPIDIDYMIDES			Number examined:	30	0	30	
Lymphocytic infiltration				6	0	7	
PROSTATE			Number examined:	30	0	30	
Mononuclear cell infiltrations				16	0	19	
SEMINAL VESICLE			Number examined:	30	0	30	
Lymphocytic infiltration				2	0	0	
UTERUS/CERVIX			Number examined:				27
Squamous cyst							1
VAGINA			Number examined:				27
OVARIES			Number examined:				27
Cyst							1

Note: Entries flagged with a * are significantly different from control at the 0.05 level using Fisher's exact two tailed test.
 All Diagnoses: Phases: All; Death types: All scheduled; Date of death range: 19-Jul-11 To 04-Sep-11

Table 7(Continued) Histopathological Findings of F0 Rats (Group Summary)

Incidence Summary Table With Statistics

	STUDY : G11002	Dosing units: mg/kg	T i s s u e s	W i t h	D i a g n o s e s	Group dosage level:	Animal sex:	-- A n i m a l s --		A f f e c t e d --		
								0 500 1000	No. in group:	--- M a l e s ---	--- F e m a l e s ---	
LIVER								30	30	27	0	27
Mononuclear cell infiltrations								30	0	30		27
Glycogen vacuolation								0	0	2		5
<u>Extramedullary hemopoiesis</u>								4	0	3		2
Vacuolated area/focus								1	0	4		1
Bile duct hyperplasia								7	0	8		1
Focal necrosis								2	0	2		0
Clear cell focus								0	0	0		1
Periportal vacuolation								0	0	0		0
MAMMARY GLAND								0	0	0		0
M-ADENOCARCINOMA								0	0	0		0
EARS								1	0	0		0
Chondropathy								1	0	0		0
SPLEEN								1	0	0		0

Note: Entries flagged with a * are significantly different from control at the 0.05 level using Fisher's exact two tailed test.
 All N/Aenses: Phases: All: Death types: All scheduled: Date of death range: 19-Jul-11 To 04-Sep-11

Table 7(Continued) Histopathological Findings of F0 Rats (Group Summary)

Incidence Summary Table With Statistics

	STUDY : G11002		Animal sex:		Affected			
	Dosing units: mg/kg		Group dosage level:		Females			
Tissues	With	Diagnoses	No. in group:	30	30	27	28	27
SKIN			Number examined:	0	0	5	2	2
Epidermal hyperplasia				0	0	3	1	1
Abscess				0	0	0	0	1
KIDNEYS			Number examined:	0	0	1	1	0
Basophilic tubule				0	0	1	1	0
Cyst				0	0	1	0	0
Casts				0	0	1	0	0
Mineralization				0	0	1	1	0
Lymphocytic infiltration				0	0	0	1	0
Hydronephrosis				0	0	0	1	0
THYROID GLANDS			Number examined:	0	0	0	0	1

Note: Entries flagged with a * are significantly different from control at the 0.05 level using Fisher's exact two tailed test.
 All Diagnoses; Phases: All; Death types: All scheduled; Date of death range: 19-Jul-11 To 04-Sep-11

Table 8 Changes in Estrus Cycle of F0 Female Rats (Group Summary)

SUMMARY OF ESTRUS CYCLE			
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
No. of female examined	30	30	30
LENGTH (Days)			
MEAN	4.0	4.1	4.1
S. D.	0	0.27	0.23
N	29	28	29
REGULARITY			
Regular (%)	29 (96.7)	28 (93.3)	29 (96.7)
Irregular (%)	1 (3.3)	2 (6.7)	1 (3.3)
Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed			
χ^2 -test: NSg/No unplanned test performed			

Table 9 Precoital Time of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF PRECOITAL TIME			
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
No. of females paired	30	30	30
No. of females mated	30	29	29
Days (Mean \pm S. D.)	2.9 \pm 3.02	3.5 \pm 4.19	3.4 \pm 3.75
Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed			

Table 10 Fertility Data of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FERTILITY DATA			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
No. of mated animals	30	30	30
Copulation index ^{a)} (%)	30/31 ^{d)} (96.8)	29/33 ^{e)} (87.9)	29/32 ^{f)} (90.6)
Fertility index ^{b)} (%)	27/30 (90.0)	28/29 (96.6)	27/29 (93.1)
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
No. of mated animals	30	30	30
Copulation index ^{a)} (%)	30/30 (100)	29/30 (96.7)	29/30 (96.7)
Pregnancy index ^{c)} (%)	27/30 (90.0)	28/29 (96.6)	27/29 (93.1)

^{a)} Copulation Index (%) = (No. of animals with evidence of mating/No. of mated animals) × 100

^{b)} Fertility Index (%) = (No. of impregnating animals/No. of animals with evidence of mating) × 100

^{c)} Pregnancy Index (%) = (No. females pregnant/No. females with evidence of mating) × 100

^{d)} One male was used for second mating.

^{e)} Three males were used for second mating.

^{f)} Two males were used for second mating.

χ^2 -test; NSg/No unplanned test performed

Table 11

Sperm Examination Results of F0 Male Rats (Group Summary)

SUMMARY OF SPERM EXAMINATION RESULTS			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
No. of males examined	10	10	10
Motile Parameters			
Motility (%)			
MEAN	88.7	86.2	88.5
S. D.	5.08	7.96	6.38
N	10	10	10
VAP ($\mu\text{m/s}$)			
MEAN	150.4	151.5	148.5
S. D.	11.21	9.63	8.59
N	10	10	10
VSL ($\mu\text{m/s}$)			
MEAN	104.7	101.6	102.6
S. D.	9.15	6.22	6.45
N	10	10	10
VCL ($\mu\text{m/s}$)			
MEAN	314.6	325.8	313.5
S. D.	21.64	20.64	19.92
N	10	10	10
ALH (μm)			
MEAN	19.8	20.0	19.3
S. D.	1.84	2.42	1.92
N	10	10	10
BCF (Hz)			
MEAN	21.6	22.9	22.2
S. D.	1.29	1.73	1.07
N	10	10	10
STR (%)			
MEAN	70.4	68.3	70.3
S. D.	3.89	4.19	4.08
N	10	10	10
LIN (%)			
MEAN	33.9	31.8	33.4
S. D.	1.97	1.55	2.17
N	10	10	10

Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 11(Continued) Sperm Examination Results of F0 Male Rats (Group Summary)

SUMMARY OF SPERM EXAMINATION RESULTS			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
No. of males examined	10	10	10
Sperm head count (x10 ⁶ /testis)			
MEAN	165.9	171.1	164.6
S.D.	14.68	16.42	18.01
N	10	10	10
Sperm head count (x10 ⁶ /epididymis)			
MEAN	169.9	145.7	134.7*
S.D.	25.46	29.66	24.44
N	10	10	10
Sperm abnormality (%)			
MEAN	6.1	5.2	5.3
S.D.	3.13	2.27	4.49
N	10	10	10
No. of abnormal sperms	122	103	106
Small head	42	21	38
Amorphous head	2	3	3
Two head	0	0	0
Excessive hook	1	2	1
Blunt hook	27	24	19
Folded tail	24	28	21
Short tail	0	0	0
Two tail	0	0	0
Detached tail	26	25	24

Bart: NSg-05/Anova; NSg-05/No unplanned test performed

Bart: NSg-05/Anova; Sig-05/Dunnet's

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 12 Reproductive and Littering Findings of F0 Female Rats (Group Summary)

SUMMARY OF REPRODUCTIVE AND LITTERING FINDINGS			
STUDY : G11002	SEX : FEMALE		
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
No. of dams	27	28	27
No. of Implantations (Mean± S. D.)	389 14. 4±2. 93	422 15. 1±1. 44	404 15. 0±1. 76
No. of perinatal deaths % to Implantation (Mean± S. D.)	12 4. 7±9. 70	8 1. 9±4. 67	6 1. 5±2. 83
No. of live young at birth	355	387	372
Male	161	185	185
Female	194	202	187
Live litter size (Mean± S. D.)	13. 1±3. 10	13. 8±1. 79	13. 8±2. 06
% to Implantation (Mean± S. D.)	90. 1±12. 94	91. 8±9. 11	92. 0±8. 09
No. of neonates with external anomalies	1	1	0
Pregnancy period (day) (Mean± S. D.)	21. 8±0. 40	21. 8±0. 33	21. 8±0. 40
Viability index ^{a)} (%) (Mean± S. D.)	100	97. 6±7. 28	99. 1±3. 48
Lactation index ^{b)} (%) (Mean± S. D.)	100	99. 0±3. 52	100
Delivery index ^{c)} (%)	100	100	100

a) Viability index (%) = (No. of live offsprings at day 4 / No. of live offsprings at birth) × 100

b) Lactation index (%) = (No. of live offsprings at day 21 / No. of live offsprings after litter size control) × 100

c) Delivery index (%) = (No. of dams with live new borns / No. of pregnant dams) × 100

Bart:Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Bart:NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 13 Visceral Findings of F1 Culled Pups (Group Summary)

SUMMARY OF VISCERAL FINDINGS			
STUDY : G11002	SEX : FEMALE		
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
No. of Litters	26	27	26
Pups examined	146	155	153
Pups with malformations (%)	0	0	0
Pups with variations (%)	34(23.3)	31(20.0)	17(11.1)+
Misshapen thymus	3	3	2
Dilated ureter	29	28	13
Convuluted uerter	2	0	2

Chi-square test;Sig-05/Fisher's exact test

+ : Significant differences from control group (p<0.01)

Table 14-1 Clinical Signs of F1 Pups before Culling (Group Summary)

SUMMARY OF OBSERVATION FREQUENCY					
STUDY : G11002	SEX : BOTH SEXES				
GROUP:	V. CONTROL		T1		T2
DOSE: (mg/kg)	0		500		1000
No. of Litters	27		28		27
No. of F1 Pups	355		387		372
	#	(%)	#	(%)	# (%)
Normal	355	100.00	387	100.00	372 100.00
Thread-like tail	1	0.28	0	0.00	0 0.00
Thin appearance	2	0.56	1	0.26	0 0.00
Cut Tail	0	0.00	1	0.26	0 0.00
Dwarfism	0	0.00	1	0.26	0 0.00

Table 14-2 Clinical Signs of F1 Rats from Culling to Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF OBSERVATION FREQUENCY						
STUDY : G11002			SEX : BOTH SEXES			
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0		T1 500		T2 1000	
No. of litters	27		28		27	
No. of F1 Pups	209		223		216	
Normal	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Cut tail	209	100.00	223	100.00	216	100.00
	0	0.00	1	0.45	0	0.00

Table 15 Body Weights of F1 Pups during the Lactation Period (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (Grams)							
STUDY : G11002			SEX : MALE				
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0		T1 500		T2 1000	
DAY 1	MEAN	7.0		7.1		7.0	
Lactation	S. D.	0.51		0.49		0.46	
	N	27		28		27	
DAY 4	MEAN	11.2		10.9		11.1	
Lactation	S. D.	0.97		0.97		1.12	
	N	27		28		27	
DAY 7	MEAN	18.7		18.5		18.8	
Lactation	S. D.	1.72		1.50		1.59	
	N	27		28		27	
DAY 14	MEAN	37.4		37.3		37.7	
Lactation	S. D.	4.00		3.50		2.62	
	N	27		28		27	
DAY 21	MEAN	61.6		62.0		61.1	
Lactation	S. D.	6.68		5.29		4.40	
	N	27		28		27	

Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 15(Continued) Body Weights of F1 Pup During the Lactation Period
(Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (Grams)				
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 1 Gestation	MEAN S. D. N	6.6 0.44 26	6.7 0.42 28	6.6 0.45 27
DAY 4 Gestation	MEAN S. D. N	10.6 0.95 26	10.5 0.96 28	10.5 1.00 27
DAY 7 Gestation	MEAN S. D. N	18.0 1.53 26	17.7 1.67 28	18.0 1.42 27
DAY 14 Gestation	MEAN S. D. N	36.7 2.53 26	36.1 3.43 28	36.5 2.57 27
DAY 21 Gestation	MEAN S. D. N	60.4 4.21 26	59.2 4.57 28	59.1 3.80 27

Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 16 Gross Findings of F1 Pups at Weaning (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS (Weaning Group)				
STUDY : G11002		SEX : MALE		
GROUP: DOSE: (mg/kg)		V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
NUMBER OF ANIMALS:		49	54	53
Observed/No remarkable finding		49	54	53
No. of Observations		49	54	53
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
GROUP: DOSE: (mg/kg)		V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
NUMBER OF ANIMALS:		55	56	55
Observed/No remarkable finding		55	56	55
No. of Observations		55	56	55

Table 17 Postnatal Physical Development Results of F1 Rats (Group Summary)

POSTNATAL PHYSICAL DEVELOPMENT RESULTS			
STUDY : G11002			
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
MALE			
No. of animals	27	28	27
Pinna detachment	2.1±0.27	2.0±0.19	2.2±0.42
Hair growth	8.0±0.00	8.0±0.00	8.0±0.00
Incisors eruption	11.0±0.76	11.0±1.00	11.2±1.00
Eyelid opening	13.7±0.66	14.0±0.33	13.9±0.60
Preputial separation	41.0±1.18	40.8±1.13	41.1±0.91
FEMALE			
No. of animals	26	28	27
Pinna detachment	2.1±0.27	2.0±0.19	2.2±0.42
Hair growth	8.0±0.00	8.0±0.00	8.0±0.00
Incisors eruption	10.7±0.72	11.0±0.82	11.2±0.93
Eyelid opening	14.0±0.53	13.9±0.36	13.8±0.62
Vaginal opening	32.7±2.01	32.1±2.07	32.7±1.94

Values are days of physical development (Mean±S.D.).
Bart: NSg-05/Anova; NSg-05/No unplanned test performed

Table 18 Faculty Test Results of F1 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FACULTY TEST RESULTS			
STUDY : G11002			
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
MALE			
No. of animals	26	28	27
Righting reflex	5.0±0.00	5.0±0.00	5.0±0.00
Negative geotaxis	10.0±0.00	10.0±0.00	10.0±0.00
Traction test	15.5±0.76	15.8±1.12	15.5±0.85
Pupillary reflex	22.0±0.00	22.0±0.00	22.0±0.00
Startle response	22.0±0.00	22.0±0.00	22.0±0.00
Rotating rod test	23.3±0.53	23.2±0.42	23.4±0.49
FEMALE			
No. of animals	26	27	27
Righting reflex	5.0±0.00	5.0±0.00	5.0±0.00
Negative geotaxis	10.0±0.00	10.0±0.00	10.0±0.00
Traction test	15.7±0.80	15.2±0.40*	15.6±0.97
Pupillary reflex	22.0±0.00	22.0±0.00	22.0±0.00
Startle response	22.0±0.00	22.0±0.00	22.0±0.00
Rotating rod test	23.2±0.43	23.1±0.36	23.2±0.40

Values are days of positive response (Mean±S.D.)
Bart: NSg-05/Anova; NSg-05/No unplanned test performed
Bart: Sig-05/NP-KW; Sig-05/Dunn's Rank Sum

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 19 Gross Findings of F1 Pups Used for Behavioral Tests (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS (Behavior Group)			
STUDY : G11002		SEX : MALE	
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
NUMBER OF ANIMALS:	26	28	27
Observed/No remarkable finding	26	28	27
No. of Observations	26	28	27
STUDY : G11002		SEX : FEMALE	
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
NUMBER OF ANIMALS:	26	27	27
Observed/No remarkable finding	26	27	27
No. of Observations	26	27	27

Table 20 Absolute Organ Weights of F1 Pups at Weaning (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11002		SEX : MALE	
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
BRAIN			
MEAN (g)	1.512	1.502	1.527
SD	0.0855	0.0609	0.0764
N	25	28	26
SPLEEN			
MEAN (g)	0.294	0.279	0.259
SD	0.0491	0.0609	0.0426
N	25	28	26
THYMUS			
MEAN (g)	0.243	0.240	0.238
SD	0.0422	0.0511	0.0372
N	25	28	26
STUDY : G11002		SEX : FEMALE	
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
BRAIN			
MEAN (g)	1.471	1.473	1.498
SD	0.0696	0.0588	0.0549
N	26	27	27
SPLEEN			
MEAN (g)	0.281	0.278	0.266
SD	0.0569	0.0306	0.0448
N	26	27	27
THYMUS			
MEAN (g)	0.250	0.238	0.249
SD	0.0400	0.0407	0.0311
N	26	27	27

Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed
 Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 21 Relative Organ Weights of F1 Pups at Weaning (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY				
STUDY : G11002		SEX : MALE		
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2	
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000	

BRAIN				
MEAN (g)	2.444	2.456	2.489	
SD	0.1666	0.2755	0.1958	
N	25	28	26	
SPLEEN				
MEAN (g)	0.473	0.447	0.420*	
SD	0.0696	0.0683	0.0635	
N	25	28	26	
THYMUS				
MEAN (g)	0.391	0.388	0.387	
SD	0.0610	0.0687	0.0634	
N	25	28	26	

STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2	
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000	

BRAIN				
MEAN (g)	2.450	2.500	2.516	
SD	0.1596	0.1652	0.1923	
N	26	27	27	
SPLEEN				
MEAN (g)	0.465	0.470	0.445	
SD	0.0752	0.0391	0.0614	
N	26	27	27	
THYMUS				
MEAN (g)	0.415	0.403	0.418	
SD	0.0649	0.0614	0.0486	
N	26	27	27	

Bart: NSg-05/Anova; NSg-05/No unplanned test performed

Bart: Sig-05/NP-KW; NSg-05/No unplanned test performed

Bart: NSg-05/Anova; Sig-05/Dunnet's

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 22 Age and Body Weight at Preputial Separation and Vaginal Opening of F1 Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11002	SEX : MALE		
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
PREPUTIAL SEPARATION (DAY)			
MEAN (g)	41.0	40.8	41.1
SD	1.18	1.13	0.91
N	27	28	27
BODY WEIGHT ON POSITIVE DAY OF PREPUTIAL SEPARATION			
MEAN (g)	220.9	221.6	224.4
SD	23.42	14.97	13.36
N	27	28	27

Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed
 Bart:Sig-05/NP-KW:NSg-05/No unplanned test performed

Table 22(Continued) Age and Body Weight at Preputial Separation and Vaginal Opening of F1 Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11002	SEX : FEMALE		
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
VAGINAL OPENING (DAY)			
MEAN (g)	32.7	32.1	32.7
SD	2.01	2.07	1.94
N	26	28	27
BODY WEIGHT ON POSITIVE DAY OF VAGINAL OPENING			
MEAN (g)	129.7	125.6	126.3
SD	15.99	12.98	11.81
N	26	28	27

Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

Table 23 Clinical Signs of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE PREMATING						
STUDY : G11002			SEX : MALE			
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0		T1 500		T2 1000	
No. of animals	27		28		27	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
No Abnormalities Detected	27	100.00	28	100.00	27	100.00
Fur, Hair, Coat						
Loss of fur	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Skin						
Scratch wound	0	0.00	1	3.57	0	0.00
Eye						
Eye discharge	0	0.00	1	3.57	0	0.00
Mouth						
Malocclusion	1	3.70	0	0.00	0	0.00
Loss of tooth	1	3.70	0	0.00	0	0.00

Table 23(Continued) Clinical Signs of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE Mating						
STUDY : G11002			SEX : MALE			
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0		T1 500		T2 1000	
No. of animals	27		28		27	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
No Abnormalities Detected	27	100.00	28	100.00	27	100.00
Skin						
Palpable mass	0	0.00	1	3.57	0	0.00
Scratch wound	0	0.00	1	3.57	0	0.00
Eye						
Eye discharge	0	0.00	1	3.57	0	0.00
Mouth						
Malocclusion	1	3.70	0	0.00	0	0.00
Loss of tooth	1	3.70	0	0.00	0	0.00

Table 23(Continued) Clinical Signs of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE PREMATING						
STUDY : G11002			SEX : FEMALE			
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0		T1 500		T2 1000	
No. of animals	26		28		27	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
No Abnormalities Detected	26	100.00	28	100.00	27	100.00
Fur, Hair, Coat						
Loss of fur	0	0.00	3	10.71	1	3.70
Skin						
Scratch wound	1	3.85	0	0.00	0	0.00
Eye						
Eye discharge	0	0.00	0	0.00	0	0.00

Table 23(Continued) Clinical Signs of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE Mating						
STUDY : G11002			SEX : FEMALE			
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0		T1 500		T2 1000	
No. of animals	26		28		27	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
No Abnormalities Detected	26	100.00	27	96.43	27	100.00
Fur, Hair, Coat						
Loss of fur	0	0.00	1	3.57	0	0.00
Skin						
Palpable mass	0	0.00	0	0.00	1	3.70
Scratch wound	0	0.00	1	3.57	0	0.00

Table 23(Continued) Clinical Signs of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE						
Gestation						
STUDY : G11002			SEX : FEMALE			
GROUP:	V. CONTROL		T1		T2	
DOSE : (mg/kg)	0		500		1000	
No. of animals	26		27		27	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
No Abnormalities Detected	26	100.00	27	100.00	26	96.30
Fur, Hair, Coat						
Loss of fur	2	7.69	1	3.70	0	0.00
Skin						
Palpable mass	0	0.00	0	0.00	1	3.70
Scratch wound	0	0.00	1	3.70	0	0.00

Table 23(Continued) Clinical Signs of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE						
Lactation						
STUDY : G11002			SEX : FEMALE			
GROUP:	V. CONTROL		T1		T2	
DOSE : (mg/kg)	0		500		1000	
No. of animals	26		27		27	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
No Abnormalities Detected	24	92.31	27	100.00	26	96.30
Fur, Hair, Coat						
Loss of fur	2	7.69	1	3.70	0	0.00
Skin						
Palpable mass	0	0.00	0	0.00	1	3.70

Table 24

Body Weights of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
PREMATING				
STUDY : G11002			SEX : MALE	
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 22	MEAN	67.9	67.1	66.4
Post-natal	S. D.	7.61	5.88	5.13
	N	27	28	27
DAY 27	MEAN	100.2	99.8	100.0
Post-natal	S. D.	9.70	7.88	6.45
	N	27	28	27
DAY 34	MEAN	158.7	158.6	158.6
Post-natal	S. D.	16.88	11.82	9.73
	N	27	28	27
DAY 41	MEAN	221.0	223.9	223.6
Post-natal	S. D.	22.26	14.89	12.13
	N	27	28	27
DAY 48	MEAN	293.5	289.9	291.0
Post-natal	S. D.	27.41	17.16	14.42
	N	27	28	27
DAY 55	MEAN	359.5	354.6	357.2
Post-natal	S. D.	35.39	19.82	18.46
	N	27	28	27
DAY 62	MEAN	409.0	401.0	406.0
Post-natal	S. D.	40.93	22.62	23.68
	N	27	28	27
DAY 69	MEAN	453.0	441.8	448.4
Post-natal	S. D.	47.82	25.87	27.46
	N	27	28	27
DAY 76	MEAN	485.9	476.3	484.3
Post-natal	S. D.	53.76	30.65	30.57
	N	27	28	27

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 24(Continued) Body Weights of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Growth & Mating				
STUDY : G11002		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 83	MEAN	514.6	503.7	513.6
Post-natal	S. D.	58.71	32.14	34.50
	N	27	28	26
DAY 90	MEAN	538.2	521.8	538.0
Post-natal	S. D.	59.64	32.61	37.19
	N	27	28	27
DAY 97	MEAN	564.2	541.4	559.1
Post-natal	S. D.	58.39	37.87	40.01
	N	26	26	26
DAY 104	MEAN	580.5	556.5	575.7
Post-natal	S. D.	61.73	38.85	36.96
	N	26	26	24
DAY 1	MEAN	584.8	561.8	585.8
Mating	S. D.	67.51	39.46	43.18
	N	27	28	27
DAY 8	MEAN	601.1	581.3	603.9
Mating	S. D.	70.60	42.65	42.99
	N	27	28	27
DAY 15	MEAN	617.8	596.1	617.1
Mating	S. D.	74.02	44.13	44.67
	N	27	28	27

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 24(Continued) Body Weights of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g) PREMATING				
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 22	MEAN	65.8	64.1	64.0
Post-natal	S. D.	5.77	5.25	3.99
	N	26	28	27
DAY 27	MEAN	94.0	92.3	91.6
Post-natal	S. D.	7.92	7.75	5.37
	N	26	28	27
DAY 34	MEAN	138.9	137.4	134.8
Post-natal	S. D.	11.44	11.38	8.17
	N	26	28	27
DAY 41	MEAN	174.2	174.8	174.0
Post-natal	S. D.	16.58	13.87	9.73
	N	26	28	27
DAY 48	MEAN	204.8	201.2	201.8
Post-natal	S. D.	15.71	16.24	12.47
	N	26	28	27
DAY 55	MEAN	233.0	228.8	228.5
Post-natal	S. D.	18.79	20.01	14.72
	N	26	28	27
DAY 62	MEAN	252.0	246.1	249.1
Post-natal	S. D.	21.58	21.76	17.20
	N	26	28	27
DAY 69	MEAN	272.5	264.4	269.0
Post-natal	S. D.	23.85	23.40	18.99
	N	26	28	27
DAY 76	MEAN	284.5	280.5	285.4
Post-natal	S. D.	25.87	24.31	20.25
	N	26	28	27

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 24(Continued) Body Weights of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
PREMATING				
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 83	MEAN	297.2	290.7	296.6
Post-natal	S. D.	25.44	27.98	22.71
	N	26	28	26
DAY 90	MEAN	305.2	300.1	302.8
Post-natal	S. D.	26.00	28.76	24.36
	N	26	28	27
DAY 97	MEAN	313.7	309.2	314.8
Post-natal	S. D.	27.01	30.06	24.17
	N	26	26	26
DAY 104	MEAN	319.3	316.8	320.8
Post-natal	S. D.	31.25	33.40	25.80
	N	26	26	24
DAY 1	MEAN	326.8	322.7	327.5
Mating	S. D.	28.77	32.38	24.96
	N	26	28	27

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 24(Continued) Body Weights of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Gestation & Lactation				
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 0	MEAN	327.9	323.4	333.6
Gestation	S. D.	29.25	33.30	26.42
	N	26	27	27
DAY 7	MEAN	361.9	361.5	366.1
Gestation	S. D.	29.38	34.26	26.23
	N	26	27	27
DAY 14	MEAN	398.4	396.9	403.6
Gestation	S. D.	30.09	35.90	29.19
	N	26	27	27
DAY 20	MEAN	477.9	482.8	483.8
Gestation	S. D.	35.97	45.27	33.80
	N	26	27	27
DAY 0	MEAN	390.2	385.7	392.3
Lactation	S. D.	32.13	41.51	33.90
	N	26	27	27
DAY 4	MEAN	396.8	396.2	400.3
Lactation	S. D.	29.96	36.61	28.92
	N	26	27	27
DAY 7	MEAN	397.9	394.8	400.3
Lactation	S. D.	30.10	34.19	27.47
	N	26	27	27
DAY 14	MEAN	403.0	398.4	405.6
Lactation	S. D.	27.78	30.00	23.68
	N	26	27	27
DAY 21	MEAN	372.2	365.4	373.6
Lactation	S. D.	28.55	28.82	25.24
	N	26	27	27

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 25

Food Consumption of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11002		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 27	INTAKE (g)	11.9	12.1	12.2
Post-natal	S. D.	1.15	0.86	0.93
	N	14	16	15
DAY 34	INTAKE (g)	17.0	17.5	17.6
Post-natal	S. D.	1.59	1.16	1.04
	N	14	16	15
DAY 41	INTAKE (g)	23.9	24.6	25.0
Post-natal	S. D.	2.88	1.82	1.03
	N	14	16	15
DAY 48	INTAKE (g)	31.1	30.0	30.5
Post-natal	S. D.	2.41	2.04	0.80
	N	14	16	15
DAY 55	INTAKE (g)	35.3	34.1	34.9
Post-natal	S. D.	2.87	2.62	1.67
	N	14	16	15
DAY 62	INTAKE (g)	36.9	35.9	36.8
Post-natal	S. D.	2.77	2.07	1.45
	N	14	16	15
DAY 69	INTAKE (g)	37.1	36.1	36.9
Post-natal	S. D.	2.59	2.19	1.69
	N	14	16	15
DAY 76	INTAKE (g)	35.5	35.6	38.2
Post-natal	S. D.	8.63	7.36	1.42
	N	14	16	15
DAY 83	INTAKE (g)	37.2	36.1	36.0
Post-natal	S. D.	2.73	2.82	7.21
	N	14	16	14

a Bart: NSg-05/Anova; NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: Sig-05/NP-KW; NSg-05/No unplanned test performed

c Bart: Sig-05/NP-KW; Sig-05/Dunn's Rank Sum

Table 25(Continued) Food Consumption of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11002			SEX : MALE	
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 90	INTAKE (g)	37.7	35.8*	35.6
Post-natal	S. D.	2.76	1.85	6.36
	N	14	16	14
DAY 97	INTAKE (g)	30.8	32.1	30.5
Post-natal	S. D.	5.02	2.38	7.28
	N	13	14	14
DAY 104	INTAKE (g)	36.0	34.7	35.4
Post-natal	S. D.	2.23	2.08	1.38
	N	13	14	13

- a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed
b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed
c Bart;Sig-05/NP-KW;Sig-05/Dunn's Rank Sum
* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 25(Continued) Food Consumption of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 27	INTAKE (g)	11.4	11.4	11.4
Post-natal	S. D.	0.68	0.85	0.81
	N	13	16	15
DAY 34	INTAKE (g)	15.1	15.5	15.0
Post-natal	S. D.	1.43	0.95	0.96
	N	13	16	15
DAY 41	INTAKE (g)	19.6	20.3	19.6
Post-natal	S. D.	1.98	1.04	1.64
	N	13	16	15
DAY 48	INTAKE (g)	21.8	22.1	22.0
Post-natal	S. D.	2.07	1.65	1.01
	N	13	16	15
DAY 55	INTAKE (g)	23.4	23.4	23.4
Post-natal	S. D.	1.95	1.84	1.47
	N	13	16	15
DAY 62	INTAKE (g)	24.0	24.5	24.4
Post-natal	S. D.	2.00	1.56	1.62
	N	13	16	15
DAY 69	INTAKE (g)	24.8	24.3	24.7
Post-natal	S. D.	2.25	1.51	1.59
	N	13	16	15
DAY 76	INTAKE (g)	25.3	23.8	25.6
Post-natal	S. D.	2.34	5.42	1.60
	N	13	16	15
DAY 83	INTAKE (g)	26.0	24.5	24.7
Post-natal	S. D.	2.65	3.94	3.39
	N	13	16	14

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 25(Continued) Food Consumption of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 90	INTAKE (g)	25.1	24.9	24.3
Post-natal	S. D.	1.85	1.50	4.22
	N	13	16	14
DAY 97	INTAKE (g)	16.3	20.0	20.0
Post-natal	S. D.	8.23	4.40	6.27
	N	13	14	14
DAY 104	INTAKE (g)	24.1	24.0	23.9
Post-natal	S. D.	3.59	1.97	2.44
	N	13	14	13

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 25(Continued) Food Consumption of F1 Rats after Weaning (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : G11002		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 7	INTAKE (g)	24.6	26.3	24.6
Gestation	S. D.	2.75	3.26	3.07
	N	26	27	27
DAY 14	INTAKE (g)	27.3	28.2	26.5
Gestation	S. D.	2.54	3.89	2.87
	N	26	27	27
DAY 20	INTAKE (g)	29.0	29.3	27.5
Gestation	S. D.	2.60	3.46	3.20
	N	26	27	27
DAY 1	INTAKE (g)	21.6	21.2	19.0
Lactation	S. D.	8.44	8.26	6.38
	N	26	27	27
DAY 8	INTAKE (g)	52.6	55.2	53.3
Lactation	S. D.	4.90	6.34	6.43
	N	26	27	27
DAY 15	INTAKE (g)	64.7	67.5	66.1
Lactation	S. D.	9.25	7.53	10.88
	N	26	27	27
DAY 21	INTAKE (g)	88.6	86.3	84.6
Lactation	S. D.	8.08	8.92	8.43
	N	26	27	27

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 26

Gross Findings of F1 Adult Rats (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : G11002	SEX : MALE		
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
NUMBER OF ANIMALS:	27	28	27
Observed/No remarkable finding	27	27	25
No. of Observations	27	27	25
SEMINAL VESICLE			
Discoloration	0	0	1
Small	0	0	1
No. of Observations	0	0	2
SKIN			
Mass(es)	0	1	0
No. of Observations	0	1	0
THYROID GLAND			
Enlarged	0	0	1
Absent	0	0	1
No. of Observations	0	0	2

Table 26 (Continued) Gross Findings of F1 Adult Rats (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : G11002	SEX : FEMALE		
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
NUMBER OF ANIMALS:	26	27	27
Observed/No remarkable finding	25	25	26
No. of Observations	25	25	26
KIDNEYS			
Cyst	1	0	0
Irregular surface	0	1	0
No. of Observations	1	1	0
LIVER			
Discoloration	0	1	0
No. of Observations	0	1	0
SKIN			
Mass(es)	0	0	1
No. of Observations	0	0	1

Table 27

Absolute Organ Weights of F1 Adult Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
BRAIN			
MEAN (g)	2.214	2.205	2.218
SD	0.0974	0.0953	0.0842
N	27	28	27
PITUITARY GLAND			
MEAN (g)	0.012	0.011	0.012
SD	0.0020	0.0018	0.0016
N	27	28	27
LIVER			
MEAN (g)	22.533	20.587*	22.884
SD	3.5060	1.5984	2.7810
N	27	28	27
SPLEEN			
MEAN (g)	0.970	0.918	0.927
SD	0.1874	0.1096	0.1323
N	27	28	27
SEMINAL VESICLE			
MEAN (g)	1.971	2.062	1.890
SD	0.3448	0.4080	0.3924
N	27	28	27
PROSTATE			
MEAN (g)	0.518	0.506	0.499
SD	0.1356	0.1366	0.1019
N	27	28	27
KIDNEYS			
MEAN (g)	4.321	4.187	4.331
SD	0.4747	0.2951	0.4676
N	27	28	27
ADRENAL GLANDS			
MEAN (g)	0.066	0.064	0.066
SD	0.0080	0.0076	0.0117
N	27	28	27
TESTES			
MEAN (g)	3.641	3.787	3.633
SD	0.3486	0.3284	0.3601
N	27	28	27

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;Sig-05/Dunn's Rank Sum

c Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 27(Continued) Absolute Organ Weights of F1 Adult Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
EPIDIDYMIDES			
MEAN (g)	1.609	1.607	1.619
SD	0.1620	0.1458	0.1545
N	27	28	27
THYROID/PARATHY.			
MEAN (g)	0.025	0.026	0.027
SD	0.0042	0.0061	0.0047
N	27	28	27

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 27(Continued) Absolute Organ Weights of F1 Adult Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
BRAIN			
MEAN (g)	2.031	2.019	2.017
SD	0.0847	0.0778	0.0898
N	26	27	27
PITUITARY GLAND			
MEAN (g)	0.014	0.015	0.014
SD	0.0029	0.0035	0.0027
N	26	27	27
LIVER			
MEAN (g)	16.110	16.214	16.860
SD	1.4609	1.9350	1.3731
N	26	27	27
SPLEEN			
MEAN (g)	0.636	0.638	0.644
SD	0.0901	0.0926	0.0990
N	26	27	27
KIDNEYS			
MEAN (g)	2.852	2.859	2.887
SD	0.3392	0.2298	0.1850
N	26	27	27
ADRENAL GLANDS			
MEAN (g)	0.073	0.072	0.071
SD	0.0086	0.0087	0.0106
N	26	27	27
OVARIES			
MEAN (g)	0.106	0.105	0.108
SD	0.0136	0.0130	0.0175
N	26	27	27
THYROID/PARATHY.			
MEAN (g)	0.018	0.019	0.019
SD	0.0044	0.0040	0.0051
N	26	27	27
UTERUS/CERVIX			
MEAN (g)	0.523	0.547	0.544
SD	0.0711	0.1499	0.1244
N	26	27	27

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 28

Relative Organ Weights of F1 Adult Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
BRAIN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.364	0.374	0.360
SD	0.0399	0.0326	0.0224
N	27	28	27
PITUITARY GLAND			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.002	0.002	0.002
SD	0.0004	0.0003	0.0003
N	27	28	27
LIVER			
MEAN (% BODY WEIGHT)	3.647	3.474*	3.699
SD	0.2518	0.1759	0.3079
N	27	28	27
SPLEEN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.158	0.156	0.150
SD	0.0255	0.0222	0.0187
N	27	28	27
SEMINAL VESICLE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.326	0.350	0.307
SD	0.0765	0.0764	0.0657
N	27	28	27
PROSTATE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.086	0.086	0.081
SD	0.0261	0.0238	0.0176
N	27	28	27
KIDNEYS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.704	0.708	0.702
SD	0.0551	0.0511	0.0652
N	27	28	27

a Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

c Bart;Sig-05/NP-KW;Sig-05/Dunn's Rank Sum

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 28(Continued) Relative Organ Weights of F1 Adult Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
ADRENAL GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.011	0.011	0.011
SD	0.0015	0.0015	0.0019
N	27	28	27
TESTES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.597	0.642	0.591
SD	0.0773	0.0762	0.0694
N	27	28	27
EPIDIDYMIDES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.264	0.272	0.263
SD	0.0347	0.0298	0.0258
N	27	28	27
THYROID/PARATHY.			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.004	0.004	0.004
SD	0.0007	0.0010	0.0008
N	27	28	27

b Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

d Bart: NSg-05/Anova: Sig-05/Dunnett's

Table 28(Continued) Relative Organ Weights of F1 Adult Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP :	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
BRAIN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.555	0.563	0.549
SD	0.0335	0.0496	0.0503
N	26	27	27
PITUITARY GLAND			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.004	0.004	0.004
SD	0.0008	0.0010	0.0008
N	26	27	27
LIVER			
MEAN (% BODY WEIGHT)	4.386	4.491	4.568
SD	0.2793	0.3209	0.3154
N	26	27	27
SPLEEN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.173	0.177	0.175
SD	0.0183	0.0242	0.0268
N	26	27	27
KIDNEYS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.775	0.796	0.783
SD	0.0600	0.0720	0.0517
N	26	27	27
ADRENAL GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.020	0.020	0.019
SD	0.0024	0.0025	0.0029
N	26	27	27
OVARIES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.029	0.029	0.029
SD	0.0042	0.0035	0.0041
N	26	27	27

b Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 28(Continued) Relative Organ Weights of F1 Adult Rats (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
THYROID/PARATHY.			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.005	0.005	0.005
SD	0.0011	0.0011	0.0014
N	26	27	27
UTERUS/CERVIX			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.143	0.153	0.148
SD	0.0237	0.0478	0.0365
N	26	27	27

a Bart:Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart:NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 29 Histopathological Findings of F1 Adult Rats (Group Summary)

		Incidence Summary Table With Statistics						
	Dosing units: mg/kg	T i s s u e s	W i t h	D i a g n o s e s	A n i m a l s		A f f e c t e d	
					Group dosage level:	No. in group:	M a l e s	F e m a l e s
STUDY :	G11002							
Dosing units:	mg/kg				0	500	0	500
T i s s u e s	W i t h	D i a g n o s e s	No. in group:		27	28	27	26
TESTES			Number examined:		27	0	27	
Tubular atrophy					1	0	2	
EPIDIDYMIS			Number examined:		27	0	27	
Lymphocytic infiltration					9	0	9	
PROSTATE			Number examined:		27	0	27	
Mononuclear cell infiltrations					19	0	17	
SEMINAL VESICLE			Number examined:		27	0	27	
Lymphocytic infiltration					1	0	1	
OVARIES			Number examined:					26
Mineralization								3
Cyst								0
UTERUS			Number examined:					26
								0
								27

Note: Entries flagged with a * are significantly different from control at the 0.05 level using Fisher's exact two tailed test.
 All Diagnoses; Phases: All; Death types: All scheduled; Date of death ranges: 29-Nov-11 To 17-Jan-12

Table 29(Continued) Histopathological Findings of F1 Adult Rats (Group Summary)

		Incidence Summary Table With Statistics					
		-- Animals --			-- Affected --		
		Male	500	1000	Female	500	1000
Dosing units: mg/kg	Group dosage level:	0	500	1000	0	500	1000
Issues With Diagnoses	No. in group:	27	28	27	26	27	27
STUDY : G11002		Animal sex:		-- Males --		-- Females --	
Dosing units: mg/kg		Group dosage level:		0 500 1000		0 500 1000	
Issues With Diagnoses		No. in group:		27 28 27		26 27 27	
VAGINANumber examined:					26 0 27	
LIVERNumber examined:	0 0		0 0		0 1 0	
Mononuclear cell infiltrations		0 0		0 0		0 1 0	
Caudate lobe necrosis		0 0		0 0		0 1 0	
KIDNEYSNumber examined:	0 0		0 0		1 1 0	
Basophilic tubule		0 0		0 0		1 0 0	
Mineralization		0 0		0 0		1 0 0	
Pyelitis		0 0		0 0		0 1 0	
Focal nephropathy		0 0		0 0		0 1 0	
Hydronephrosis		0 0		0 0		1 1 0	
EARSNumber examined:	0 1		0 0		0 0 0	
Chondropathy		0 1		0 0		0 0 0	

Note: Entries flagged with a * are significantly different from control at the 0.05 level using Fisher's exact two tailed test.
 All Diagnoses; Phases: All; Death types: All scheduled; Date of death range: 29-Nov-11 To 17-Jan-12

Table 29(Continued) Histopathological Findings of F1 Adult Rats (Group Summary)

Incidence Summary Table With Statistics

STUDY : G11002	Dosing units: mg/kg	T i s s u e s	W i t h	D i a g n o s e s	No. in group:	-- Animals --		Affected --	
						Animal sex:	Group dosage level:	Male	Female
						0	500	0	500
						27	28	27	26
									27
THYROID GLANDS					Number examined:	0	0	0	0
MAMMARY GLAND					Number examined:	0	0	0	0
M-ADENOCARCINOMA						0	0	0	1

Note: Entries flagged with a * are significantly different from control at the 0.05 level using Fisher's exact two tailed test.
 All Diagnoses: Phases: All; Death types: All scheduled; Date of death range: 29-Nov-11 To 17-Jan-12

Table 30 Changes in Estrus Cycle of F1 Female Rats (Group Summary)

SUMMARY OF ESTRUS CYCLE			
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
No. of female examined	26	28	27
LENGTH (Days)			
MEAN	4.1	4.1	4.1
S. D.	0.23	0.21	0.29
N	22	27	25
REGULARITY			
Regular (%)	22 (84.6)	27 (96.4)	25 (92.6)
Irregular (%)	4 (15.4)	1 (3.6)	2 (7.4)

Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed
 χ^2 -test: NSg/No unplanned test performed

Table 31 Precoital Time of F1 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF PRECOITAL TIME			
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
No. of females paired	26	28	27
No. of females mated	26	28	27
Days (Mean \pm S. D.)	3.0 \pm 1.73	3.0 \pm 3.15	5.9 \pm 5.88

Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 32 Fertility Data of F1 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FERTILITY DATA			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
No. of mated animals	26	28	27
Copulation index ^{a)} (%)	26/26 (100)	28/29 ^{d)} (96.6)	27/32 ^{e)} (84.4)
Fertility index ^{b)} (%)	26/26 (100)	27/28 (96.4)	27/27 (100)
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
No. of mated animals	26	28	27
Copulation index ^{a)} (%)	26/26 (100)	28/28 (100)	27/27 (100)
Pregnancy index ^{c)} (%)	26/26 (100)	27/28 (96.4)	27/27 (100)

^{a)} Copulation Index (%) = (No. of animals with evidence of mating/No. of mated animals) \times 100

^{b)} Fertility Index (%) = (No. of impregnating animals/No. of males with evidence of mating) \times 100

^{c)} Pregnancy Index (%) = (No. females pregnant/No. females with evidence of mating) \times 100

^{d)} One male was used for second mating.

^{e)} Five males were used for second mating.

Chi-square test: NSg-05/No unplanned test performed

Chi-square test: Sig-05/Fisher's exact test

Table 33

Sperm Examination Results of F1 Male Rats (Group Summary)

SUMMARY OF SPERM EXAMINATION RESULTS			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
No. of males examined	10	10	10
Motile Parameters			
Motility (%)			
MEAN	90.3	89.5	89.3
S. D.	3.74	6.54	3.97
N	10	10	10
VAP ($\mu\text{m/s}$)			
MEAN	140.7	138.6	142.2
S. D.	9.21	8.49	11.98
N	10	10	10
VSL ($\mu\text{m/s}$)			
MEAN	94.3	92.3	94.0
S. D.	5.68	6.24	6.16
N	10	10	10
VCL ($\mu\text{m/s}$)			
MEAN	287.3	282.4	287.5
S. D.	24.55	22.77	25.26
N	10	10	10
ALH (μm)			
MEAN	19.0	18.7	18.7
S. D.	2.05	1.95	1.99
N	10	10	10
BCF (Hz)			
MEAN	20.5	21.2	20.6
S. D.	1.49	0.80	0.72
N	10	10	10
STR (%)			
MEAN	68.3	67.5	67.7
S. D.	2.71	2.07	2.95
N	10	10	10
LIN (%)			
MEAN	33.5	33.3	33.5
S. D.	2.01	1.06	1.58
N	10	10	10

Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 33(Continued) Sperm Examination Results of F1 Male Rats (Group Summary)

SUMMARY OF SPERM EXAMINATION RESULTS			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
No. of males examined	10	10	10
Sperm head count (x10 ⁶ /testis)			
MEAN	128.2	104.1	107.5
S. D.	28.33	26.45	13.00
N	10	10	10
Sperm head count (x10 ⁶ /epididymis)			
MEAN	250.1	224.3	200.9+
S. D.	30.83	44.04	29.30
N	10	10	10
Sperm abnormality (%)			
MEAN	4.0	4.6	3.4
S. D.	1.94	3.63	1.58
N	10	10	10
No. of abnormal sperms	79	92	68
Small head	26	48	38
Amorphous head	3	2	0
Two head	0	0	1
Excessive hook	7	5	3
Blunt hook	21	25	18
Folded tail	11	2	7
Short tail	2	1	0
Two tail	0	0	0
Detached tail	9	9	1

Bart: NSg-05/Anova; NSg-05/No unplanned test performed

Bart: Sig-05/NP-KW; NSg-05/No unplanned test performed

Bart: NSg-05/Anova; Sig-05/Dunnet's

+ : Significant differences from control group (p<0.01)

Table 34 Reproductive and Littering Findings of F1 Female Rats (Group Summary)

SUMMARY OF REPRODUCTIVE AND LITTERING FINDINGS			
STUDY : G11002	SEX : FEMALE		
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
No. of dams	26	27	27
No. of Implantations (Mean± S. D.)	374 14.4±2.56	413 15.3±1.79	400 14.8±2.88
No. of perinatal deaths % to Implantation (Mean± S. D.)	7 2.0±5.37	3 0.7±2.76	7 1.8±4.20
No. of live young at birth	339	383	368
Male	161	199	174
Female	178	184	204
Live litter size (Mean± S. D.)	13.0±2.65	14.2±1.62	13.6±2.73
% to Implantation (Mean± S. D.)	90.8±9.15	93.1±7.19	92.2±6.91
No. of neonates with external anomalies	0	0	0
Pregnancy period (day) (Mean± S. D.)	21.8±0.34	21.9±0.33	21.9±0.31
Viability index ^{a)} (%) (Mean± S. D.)	98.2±4.31	97.5±5.74	98.3±3.62
Lactation index ^{b)} (%) (Mean± S. D.)	100	100	99.5±2.41
Delivery index ^{c)} (%)	100	100	100

^{a)} Viability index (%) = (No. of live offsprings at day 4 / No. of live offsprings at birth) × 100

^{b)} Lactation index (%) = (No. of live offsprings at day 21 / No. of live offsprings after litter size control) × 100

^{c)} Delivery index (%) = (No. of dams with live new borns / No. of pregnant dams) × 100

Bart:Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Bart:NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 35 Visceral Findings of F2 Culled Pups (Group Summary)

SUMMARY OF VISCERAL FINDINGS			
STUDY : G11002	SEX : FEMALE		
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
No. of dams	25	27	25
Fetuses examined	128	156	147
Fetuses with malformations (%)	0	0	0
Fetuses with variations (%)	18(14.1)	25(16.0)	14(9.5)
Misshapen thymus	1	1	1
Dilated ureter	12	18	8
Convolutd ureter	6	5	5
Small thymus	0	1	0

Chi-square test: NSg-05/No unplanned test performed

Table 36-1 Summary of Clinical Signs of F2 Pups before Culling (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE						
STUDY : G11002	SEX : BOTH SEXES					
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0		T1 500		T2 1000	
No. of litters	26		27		27	
No. of pups	339		383		368	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal No Abnormalities Detected	339	100.00	383	100.00	368	100.00

Table 36-2 Summary of Clinical Signs of F2 Pups from culling to Necropsy (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE						
STUDY : G11002	SEX : BOTH SEXES					
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0		T1 500		T2 1000	
No. of litters	26		27		27	
No. of pups	205		216		213	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal No. of abnormalities detected	205	100.00	216	100.00	213	100.00
Loss of fur	0	0.00	1	0.46	0	0.00

Table 37 Body Weights of F2 Pups during the Lactation Period (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (Grams)				
STUDY : G11002			SEX : MALE	
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 1 Gestation	MEAN S. D. N	7.1 0.59 26	7.2 0.51 27	7.1 0.54 27
DAY 4 Gestation	MEAN S. D. N	11.7 1.65 26	11.4 1.32 27	11.5 1.66 27
DAY 7 Gestation	MEAN S. D. N	19.2 2.08 26	19.3 1.96 27	19.5 1.86 27
DAY 14 Gestation	MEAN S. D. N	38.4 3.72 26	39.1 3.44 27	39.5 2.68 27
DAY 21 Gestation	MEAN S. D. N	64.0 5.81 26	64.6 5.78 27	64.7 4.60 27

Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

Table 37(Continued) Body Weights of F2 Pups during the Lactation Period (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (Grams)				
STUDY : G11002			SEX : FEMALE	
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
DAY 1 Gestation	MEAN S. D. N	6.7 0.61 26	6.8 0.43 27	6.8 0.55 27
DAY 4 Gestation	MEAN S. D. N	11.2 1.62 26	10.8 1.30 27	11.1 1.69 27
DAY 7 Gestation	MEAN S. D. N	18.5 2.10 26	18.4 1.78 27	18.8 1.95 27
DAY 14 Gestation	MEAN S. D. N	37.2 3.89 26	37.8 2.88 27	38.3 3.09 27
DAY 21 Gestation	MEAN S. D. N	61.8 6.05 26	61.6 4.35 27	62.0 4.77 27

Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

Table 38 Postnatal Physical Development Results of F2 Rats (Group Summary)

POSTNATAL PHYSICAL DEVELOPMENT RESULTS			
STUDY : G11002			
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
MALE			
No. of animals	26	27	27
Pinna detachment	2.1±0.33	2.1±0.46	2.2±0.40
Hair growth	8.0±0.00	8.0±0.00	8.0±0.00
Incisor eruption	10.9±0.95	10.7±0.95	11.3±1.30
Eyelid opening	13.6±0.64	13.8±0.75	13.7±0.61
FEMALE			
No. of animals	26	27	27
Pinna detachment	2.1±0.33	2.1±0.42	2.1±0.32
Hair growth	8.0±0.00	8.0±0.00	8.0±0.00
Incisor eruption	10.6±0.70	10.7±0.88	10.9±0.96
Eyelid opening	13.7±0.56	13.6±0.56	13.7±0.53

Values are days of physical development (Mean±S.D.)
 Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 39 Faculty Test Results of F2 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FACULTY TEST RESULTS			
STUDY : G11002			
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000
MALE			
No. of animals	25	27	26
Righting reflex	5.0±0.00	5.0±0.00	5.0±0.00
Negative geotaxis	10.0±0.00	10.0±0.00	10.0±0.00
Traction test	15.9±1.47	15.9±1.33	15.9±1.11
FEMALE			
No. of animals	24	27	27
Righting reflex	5.0±0.00	5.0±0.00	5.0±0.00
Negative geotaxis	10.0±0.00	10.0±0.19	10.0±0.19
Traction test	16.1±1.32	15.7±0.92	16.0±1.53

Values are days of positive response (Mean±S.D.)
 Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed
 Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 40 Gross Findings of F2 Pups on Lactation Day 21 (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS (Weaning Group)			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
NUMBER OF ANIMALS:	105	109	107
Observed/No remarkable finding	105	108	107
Right eyeball opacity	0	1	0
No. of Observations	105	109	107
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000
NUMBER OF ANIMALS:	98	109	106
Observed/No remarkable finding	98	109	106
No. of Observations	98	109	106

Table 41 Absolute Organ Weights of F2 Pups on Lactation Day 21 (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : G11002			SEX : MALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
BRAIN			
MEAN (g)	1.542	1.546	1.519
SD	0.0596	0.0653	0.0722
N	26	27	27
SPLEEN			
MEAN (g)	0.315	0.319	0.302
SD	0.0637	0.0548	0.0676
N	26	27	27
THYMUS			
MEAN (g)	0.270	0.273	0.267
SD	0.0470	0.0370	0.0436
N	26	27	27
STUDY : G11002			SEX : FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000
BRAIN			
MEAN (g)	1.494	1.499	1.509
SD	0.0706	0.0845	0.0589
N	26	27	27
SPLEEN			
MEAN (g)	0.318	0.305	0.308
SD	0.0615	0.0425	0.0412
N	26	27	27
THYMUS			
MEAN (g)	0.272	0.283	0.274
SD	0.0474	0.0424	0.0391
N	26	27	27

Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 42 Relative Organ Weights of F2 Pups on Lactation Day 21
(Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY				
STUDY : G11002			SEX : MALE	
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2	
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000	
<hr/>				
BRAIN				
MEAN (g)	2.460	2.425	2.373	
SD	0.1977	0.2379	0.1815	
N	26	27	27	
SPLEEN				
MEAN (g)	0.498	0.495	0.465	
SD	0.0836	0.0585	0.0794	
N	26	27	27	
THYMUS				
MEAN (g)	0.428	0.423	0.413	
SD	0.0635	0.0352	0.0506	
N	26	27	27	
<hr/>				
STUDY : G11002			SEX : FEMALE	
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2	
DOSE : (mg/kg)	0	500	1000	
<hr/>				
BRAIN				
MEAN (g)	2.423	2.456	2.466	
SD	0.2420	0.1897	0.1850	
N	26	27	27	
SPLEEN				
MEAN (g)	0.511	0.498	0.500	
SD	0.0823	0.0547	0.0599	
N	26	27	27	
THYMUS				
MEAN (g)	0.439	0.461	0.445	
SD	0.0729	0.0554	0.0559	
N	26	27	27	

Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed
Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

4. 노화 동물에 있어서 옷나물 추출물의 수컷 생식기노화 억제 및 개선 효과 연구

가. 목 적

옷나무추출분말이 수컷의 생식기 노화진행을 억제 및 개선하는 효과가 있는지 수태능력, 혈중 호르몬 측정, 정자검사, 및 조직병리학적 검사 등을 통하여 알아보고자 하였다.

나. 시험계

(1) 종 및 계통 : BN/RijHsd (Brown Norway rat) 및 Crl:CD(SD) rats

(2) 성별 및 입수시 주령, 입수일, 동물수 :

(가) 수컷 Brown Norway rats : BR11006으로부터 관리되는 모든 수컷동물 105마리, 신규 3주령 구입 24마리 2012년 5월 11일 입수예정

(나) 암컷 Crl:CD(SD) rats : Brown Norway rats과 교배하기 위해서 입수하며 9주 및 6주령의 랫드를 교배개시 1주 및 4주전에 입수한다.

① 1차 입수 : 2012년 5월 8일 9주령 24마리 입수

② 2차 입수 : 2012년 7월 3일 6주령 96마리 입수

③ 3차 입수 : 2012년 10월 2일 6주령 144마리 입수

(3) 선택이유 : 본 시험에 사용될 동물은 사람과 유사한 생식기 노화과정을 나타내는 동물로서 남성 생식기기능 평가에 주로 사용되고 관련 자료가 풍부하여 많이 이용되고 있다.

(4) 공 급 원 : (주) 코아텍 (수컷 BN/RijHsd 공급원)

경기도 평택시 진위면 동천리 529-7 (Tel: 031-611-8224)

(주) 오리엔트 바이오 (암컷 Crl:CD(SD) 공급원)

경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1번지

(5) 검역 및 순화기간 : BR11006으로부터 입수되는 동물은 검역 및 순화를 실시하지 않으며 신규 도입되는 동물에 대하여 입수일에 검역한 후 1주 (Negative control group으로 사용할 Brown Norway rats, 1차교배에 사용할 9주령 암컷 SD rats) 또는 4주간(2, 3차 교배에 사용할 6주령 암컷 SD rats)의 순화기간을 두었다.

(6) 사용동물수

(가) 수컷 Brown Norway rats : 노화모델동물 되는 모든 수컷동물 105마리, 신규 3주령 구입, 24마리 2012년 5월 11일 입수

(나) 암컷 Crl:CD(SD) rats : 각각 입수일별로 사용되는 동물수는 아래와 같다.

① 1차 입수 : 2012년 5월 8일 9주령 24마리 입수

② 2차 입수 : 2012년 7월 3일 6주령 96마리 입수

③ 3차 입수 : 2012년 10월 2일 6주령 144마리 입수

(7) 투여개시시 개월령 : 노화억제군은 16개월령, 노화회복군은 19개월령, 장기투여군은 16개월령, 이외의 동물들은 투여하지 않음

(8) 군분리시 체중범위 : 평균체중±25%g

(9) 군분리법 : 동물의 군분리는 수컷 Brown-Norway rats 노화모델동물에 한하여 당 연구소에서 사용하고 있는 GLP 독성시험용 전산프로그램인 Path/Tox System의 A-module을 이용하여 실시하였다.

(10) 식별법 : 개체식별은 tattoo법 또는 꼬리에 매직으로 표식하여 실시한다. 군식별 및 개체식별을 위하여 각 사육상자별로 케이지카드를 부착하고 그 위에 각각의 시험계별로 시험번호, 동물번호, 케이지번호 등을 기입하였다. 사용동물실 입구에는 동물실번호, 시험번호, 시험종류, 동물실 사용기간 및 시험담당자명 등을 기재한 동물실사용기록지를 부착하였다.

(11) 잔여동물의 처리 : 잔여동물은 시험책임자의 판단하에 안락사 시켰다.

다. 시험물질 및 부형제

(1) 시험물질

(가) 명 칭 : 옷나무추출분말

(나) 시험기관내 코드번호 : K-3711

(다) 로트번호 : Not available

(라) 입수일 : 2011년 7월 4일

(마) 유통기한 : 2013년 6월 3일

(바) 입수량 : 30 kg (10 kg × 3)

(사) 외관 및 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황토색의 분말

(아) 지표성분 : 푸스틴(Fustin) 3.0 %

(자) 보관조건 : 실온보관 [보관고번호: KIT-401(105)]

(차) 공 급 원 : (주)생명의나무

(2) 부형제

(가) 명 칭 : 주사용멸균증류수

(나) 공 급 원 : (주)대한약품

(3) 시험물질과 부형제와의 혼합물

(가) 시험물질의 조제 : 시험물질을 부형제에 현탁시켜 최고용량군의 시험물질을 조제하고, 이를 다시 부형제로 희석하여 아래 단계 용량군의 시험물질을 조제한다. 시험물질은 주 1회 이상 조제하였다.

(나) 조제 시험물질의 분석 : 본시험에서 조제시험물질에 대한 분석은 실시하지 않았다.

(4) 투여방법

(가) 투여경로 : 경구투여를 실시한다.

(나) 선택이유 : 사람에게 대한 적용예상경로로서 경구투여를 선택하였다.

(다) 투여횟수 및 투여기간 : 투여는 노화동물만 대상으로 실시

노화억제군 : 16개월령(2012. 05. 15)부터 18개월령(2012. 08. 13)까지 3개월간 매일 투여

노화회복군 : 19개월령(2012. 08. 14)부터 21개월령(2012. 11. 12) 까지 3개월간 매일 투여

장기투여군 : 16개월령(2012. 05. 15)부터 21개월령(2012. 11. 12)까지 6개월간 매일 투여

(라) 투여부위 및 투여법 : 경구투여용 존데를 이용하여 위내에 직접 주입하였다.

(마) 투여시각 : 매일 10:00에서 15:00사이에 투여하는 것을 원칙으로 하였다.

(바) 투여액량 산출 : 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 하여 Path/Tox System에서 체중 kg 당 10 ml로 계산된 것을 이용하였다.

(5) 시험군의 구성 및 투여량 설정이유

(가) 수컷동물 시험군의 구성

군	구분	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg)
Negative control	노화억제군	12	NC0001-NC0012	투여하지 않음	
	노화회복군	12	NR0001-NR0012		
Vehicle control	노화억제군	12	1AC0001-1AC0012	10	0
	노화회복군	12	1AR0001-1AR0012		
T1	노화억제군	12	2AC0013-2AC0024	10	250
	장기투여군	12	2LT0001-2LT0012		
	노화회복군	12	2AR0013-2AR0024		
T2	노화억제군	12	3AC0025-3AC0036	10	500
	장기투여군	12	3LT0013-3LT0024		
	노화회복군	12	3AR0025-3AR0036		

NC, NR : Negative Control, 3주령 입수후 노화전 adult rats으로 투여하지 않고 옷나무추출물의 노화동물 대비 어느 정도 수컷갱년기에 대한 억제 및 회복 효능이 있는지 비교하는 동물군

AC : Andropause Control, 수컷 갱년기 진행 초기에 옷나무 추출물을 투여하여 수컷 생식기 노화의 진행을 옷나무 추출물이 억제하는 효능이 있는지 확인하는 동물

AR : Andropause Recovery, 수컷 갱년기가 어느 정도 진행된 동물에 옷나무추출물을 투여하여 진행된 생식기 노화를 회복하는 효능이 있는지 확인하는 동물군

LT : Long-term Treatment, 수컷 갱년기 진행 초기부터 후기까지 장기간 옷나무추출물을 투여하여 생식기 노화 전반에 옷나무추출물이 미치는 효능을 확인하는 동물군

* 투여량 설정이유 : 동일한 시험물질에 대하여 500 및 1000mg/kg/day의 용량으로 2세대 번식 독성 시험을 실시한 결과 시험물질 투여에 기인한 독성학적 변화가 관찰되지 않아, 투여용량을 500 및 1000mg/kg/day으로 설정하였다.

(나) 교배용 암컷 동물의 군구성

입수일	입수시주령	동물수 (마리)	동물번호	비고
2012년 5월 8일	9주령	24	MF0001-MF0024	AC0001-AC0012 동물과 교배
2012년 7월 3일	6주령	96	MC0001-MC0096	NC0001-NC0012 AC0001-AC0036 동물과 교배
2012년 10월 2일	6주령	48	MT0001-MT0048	LT0001-LT0024 동물과 교배
2012년 10월 2일	6주령	96	MR0001-MR0096	NR0001-NR0012 AR0001-AR0036 동물과 교배

(6) 시험관찰 항목

(가) 일반증상 관찰

노화모델 수컷동물에 한하여 관찰한다. 시험기간중에 투여후 1회씩 동물의 일반상태, 중독 증상, 사망유무 등의 이상에 관해서 관찰하고, 이상이 있으면 증상의 종류, 발견일과 시각, 지속시간, 필요에 따라서는 증상의 정도를 개체별로 기록한다. 일반증상 관찰은 08시에서 15시 사이에 실시하는 것을 원칙으로 하였다. 빈사동물은 즉시 절박 도살하여 부검하고 사망동물도 가능한 빠른 시간 내에 부검을 실시하였다. 공휴일의 경우 사망동물의 부검이 늦어질 경우에는 사체를 냉장보관한 후 부검하였다.

(나) 체중 및 사료섭취량의 측정

노화모델 수컷동물에 한하여 측정하였다. 체중 및 사료섭취량은 수컷동물에 한하여 주 1회 측정하였다.

(다) 혈중 호르몬 측정

노화억제군 및 노화회복군은 투여 후 4 및 8주에 꼬리정맥에서, 부검시 복대정맥에서 혈액을 채취하고, 장기투여군은 투여후 12, 16 및 20주에 꼬리정맥에서 부검시 복대정맥에서 혈액을 채취한 후 외부기관에 의뢰하여 혈중 테스토스테론, 난포자극호르몬(follicle-stimulating hormone) 및 황체형성호르몬(luteinizing hormone) 농도를 측정하였다.

(라) 수태능력의 측정 : 모든 수컷동물을 대상으로 실시

① 교배방법 및 시기

1차교배 : 10주령 암컷 24마리와 vehicle control 노화억제군 12마리와 투여개시 전날부터 2주간 교배를 실시하였다.

2차교배 : 암컷 96마리와 각 군의 노화억제군과 투여종료 전 2주간 교배를 실시하였다.

3차교배 : 암컷 144마리와 각 군의 노화회복군 및 장기투여군과 투여종료 2주간 교배를 실시하였다.

② 교배확인: 질전 또는 질도말시 정자를 확인한 날을 임신 0일로 정하며, 최종판정은 출산여부 또는 자궁의 착상흔적에 따른다. 다음과 같은 자료를 산출하였다.

$$\text{교배율} = (\text{교배확인 동물수} / \text{교배동물수}) \times 100$$

$$\text{수태율} = (\text{임신시킨 동물수} / \text{교배동물수 동물수}) \times 100$$

$$\text{임신율} = (\text{임신시킨 동물수} / \text{교미확인 동물수}) \times 100$$

(라) 부검

투여 종료 익일에 시험에 사용된 모든 생존 동물을 isoflurane에 의해 안락사시킨 다음 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 모든 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하고, 이상장기는 10% 중성완충포르말린액에 고정하여 보존하였다. 시험기간중의 빈사동물은 즉시 절박도살하여 부검하고 사망동물도 가능하면 발견 직후에 바로 부검하는 것을 원칙으로 하고, 그렇지 않으면 냉장보관후 가능한 빠른 시간내에 부검하며 이들 동물에 대하여 부검소견을 관찰한 후 이상장기는 10% 중성완충포르말린액에 고정하여 보존하고, 장기중량은 측정하지 않았다.

(마) 장기중량측정

비임신동물을 제외한 모든 부검동물에 대해서 아래에 기술된 장기의 중량을 측정하였다.

뇌, 뇌하수체, 부신, 간, 비장, 신장, 심장, 흉선, 폐, 고환, 부고환, 정낭선(응고선 포함), 전립선

(7) 통계학적 방법

얻어진 시험자료에 대한 통계분석이 필요할 경우에는 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소의 표준작업수순서(SOP/COM/006) 따른 적절한 통계방법을 이용하였다.

(8) 결과 및 결론

(가) 일반독성학적 영향

동물에 대한 일반증상, 체중, 사료섭취량, 부검소견 및 장기중량을 관찰한 결과 시험물질 투여에 기인한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다(Table 1-6, 10-15, 19-24).

(나) 수컷 생식능력 개선효과

수컷동물의 수태능력 및 호르몬 검사를 실시한 결과 시험물질 투여에 기인한 수컷동물의 생식능력 개선효과는 관찰되지 않았다(Table 7-8, 16-17, 25-26).

이상의 결과를 종합해 볼 때, 본 시험물질 옷나무추출분말 수컷 노령동물에 대한 반복투여에서 일반독성학적 영향은 관찰되지 않았으며 수컷동물의 생식능력 개선효과는 관찰되지 않았다.

Tables for Andropause Control Group

Table 1 Summary of Clinical Signs (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE						
Dosing						
STUDY : BR12013			SEX : MALE			
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. C. (AC) 0		T1 (AC) 250		T2 (AC) 500	
No. of animals	12		12		12	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
No Abnormalities Detected	12	100.00	12	100.00	12	100.00
Fur, Hair, Coat						
Piloerection	0	0.00	1	8.33	0	0.00
Loss of fur	0	0.00	3	25.00	0	0.00
Skin						
Scratch wound	0	0.00	1	8.33	0	0.00
Eye						
Exophthalmos	0	0.00	0	0.00	1	8.33
Cloudy eyes	0	0.00	0	0.00	1	8.33

Table 2

Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Dosing				
STUDY : BR12013		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. C. (AC) 0	T1 (AC) 250	T2 (AC) 500
DAY 1	MEAN	427.2	436.2	436.9
Dosing	S. D.	24.16	25.85	26.00
	N	12	12	12
DAY 8	MEAN	430.9	435.8	437.1
Dosing	S. D.	24.76	26.44	26.82
	N	12	12	12
DAY 15	MEAN	427.2	435.6	436.1
Dosing	S. D.	24.43	25.65	27.80
	N	12	12	12
DAY 22	MEAN	421.6	436.2	435.7
Dosing	S. D.	24.50	26.54	26.51
	N	12	12	12
DAY 29	MEAN	420.2	433.6	436.9
Dosing	S. D.	20.60	22.66	25.91
	N	12	12	12
DAY 36	MEAN	426.1	438.4	437.7
Dosing	S. D.	22.81	26.84	26.16
	N	12	12	12
DAY 43	MEAN	430.9	441.4	441.1
Dosing	S. D.	23.95	28.24	24.48
	N	12	12	12
DAY 50	MEAN	436.3	445.2	445.2
Dosing	S. D.	25.12	28.22	25.11
	N	12	12	12
DAY 57	MEAN	435.3	446.6	446.5
Dosing	S. D.	24.45	27.29	24.11
	N	12	12	12

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 2 (Continued) Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Dosing				
STUDY : BR12013		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. C. (AC) 0	T1 (AC) 250	T2 (AC) 500
DAY 64	MEAN	436.3	450.0	451.2
Dosing	S. D.	25.67	26.36	23.61
	N	12	12	12
DAY 71	MEAN	438.0	450.0	452.2
Dosing	S. D.	24.85	26.84	24.17
	N	12	12	12
DAY 78	MEAN	429.2	441.7	442.8
Dosing	S. D.	25.18	26.22	24.70
	N	12	12	12
DAY 85	MEAN	433.6	451.5	450.7
Dosing	S. D.	28.11	27.37	25.31
	N	12	12	12
DAY 92	MEAN	432.8	450.0	451.2
Dosing	S. D.	25.81	27.76	26.68
	N	12	12	12

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 3

Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : BR12013		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. C. (AC) 0	T1 (AC) 250	T2 (AC) 500
DAY 2	INTAKE (g)	–	18.9	18.9
Dosing	S. D.	–	1.36	1.68
	N	0	12	12
DAY 9	INTAKE (g)	–	19.0	18.3
Dosing	S. D.	–	2.37	1.29
	N	0	12	12
DAY 16	INTAKE (g)	19.5	20.6	19.5
Dosing	S. D.	2.52	1.96	1.33
	N	12	12	12
DAY 23	INTAKE (g)	20.7	21.4	21.7
Dosing	S. D.	1.07	1.10	1.05
	N	12	12	12
DAY 30	INTAKE (g)	20.2	20.1	20.8
Dosing	S. D.	1.98	3.62	1.20
	N	12	12	12
DAY 37	INTAKE (g)	20.1	21.3	20.3
Dosing	S. D.	1.74	1.47	0.93
	N	12	12	12
DAY 44	INTAKE (g)	20.3	21.4	20.7
Dosing	S. D.	2.33	2.21	1.66
	N	12	12	12
DAY 51	INTAKE (g)	20.0	20.4	19.4
Dosing	S. D.	0.81	2.46	1.10
	N	12	12	12
DAY 58	INTAKE (g)	20.2	20.8	21.1
Dosing	S. D.	1.59	1.85	1.71
	N	12	12	12

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 3 (Continued) Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : BR12013			SEX : MALE	
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. C. (AC) 0	T1 (AC) 250	T2 (AC) 500
DAY 65	INTAKE (g)	19.8	20.8	20.3
Dosing	S. D.	1.58	1.55	1.31
	N	12	12	12
DAY 72	INTAKE (g)	20.1	21.4	21.0
Dosing	S. D.	1.77	1.29	1.84
	N	12	12	12
DAY 92	INTAKE (g)	18.9	19.4	19.5
Dosing	S. D.	1.85	2.55	1.49
	N	12	12	12

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

Table 4

Gross Findings (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AC)	T1 (AC)	T2 (AC)
DOSE: (mg/kg)	0	250	500
NUMBER OF ANIMALS:	12	12	12
Observed/No remarkable finding	0	1	0
No. of Observations	0	1	0
ABNORMAL LESIONS			
Opacity	0	0	1
Exophthalmos	0	0	1
No. of Observations	0	0	2
ADRENAL GLANDS			
Enlarged	0	0	1
Focus/foci	11	11	12
No. of Observations	11	11	13
EPIDIDYMIDES			
Enlarged	1	1	0
Small	1	0	1
Flaccid	1	0	0
No. of Observations	3	1	1
KIDNEYS			
Cyst	0	0	2
No. of Observations	0	0	2
LIVER			
Cyst	0	0	1
Hernia	0	1	0
No. of Observations	0	1	1
PITUITARY GLAND			
Discoloration	2	1	3
No. of Observations	2	1	3
TESTES			
Enlarged	1	2	0

Table 4(Continued) Gross Findings (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AC)	T1 (AC)	T2 (AC)
DOSE: (mg/kg)	0	250	500
NUMBER OF ANIMALS:	12	12	12
TESTES			
Small	3	3	3
Flaccid	4	3	3
No. of Observations	8	8	6

Table 5

Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP :	V. C. (AC)	T1 (AC)	T2 (AC)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
BRAIN			
MEAN (g)	2.044	2.066	2.068
SD	0.0703	0.0697	0.0596
N	12	12	12
PITUITARY GLAND			
MEAN (g)	0.008	0.007	0.008
SD	0.0016	0.0011	0.0012
N	12	12	12
LIVER			
MEAN (g)	10.926	11.770	11.909
SD	1.0707	1.2141	1.1224
N	12	12	12
SPLEEN			
MEAN (g)	0.664	0.669	0.643
SD	0.0783	0.0521	0.0464
N	12	12	12
HEART			
MEAN (g)	1.372	1.380	1.396
SD	0.2092	0.0559	0.0915
N	12	12	12
THYMUS			
MEAN (g)	0.180	0.199	0.176
SD	0.0406	0.0623	0.0467
N	12	12	12
SEMINAL VESICLE			
MEAN (g)	1.860	1.948	1.923
SD	0.3715	0.1716	0.2553
N	12	12	12
PROSTATE			
MEAN (g)	0.514	0.439	0.396*
SD	0.1093	0.1322	0.0846
N	12	12	12
KIDNEYS			
MEAN (g)	2.197	2.274	2.330
SD	0.1141	0.1998	0.2343
N	12	12	12

a Bart; NSg-05/Anova; NSg-05/No unplanned test performed

b Bart; Sig-05/NP-KW; NSg-05/No unplanned test performed

c Bart; NSg-05/Anova; Sig-05/Dunnett's

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 5(Continued) Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AC)	T1 (AC)	T2 (AC)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
ADRENAL GLANDS			
MEAN (g)	0.062	0.063	0.065
SD	0.0071	0.0047	0.0123
N	12	12	12
TESTES			
MEAN (g)	3.529	3.952	3.622
SD	0.7689	0.6864	0.3663
N	12	12	12
EPIDIDYMIDES			
MEAN (g)	1.440	1.420	1.422
SD	0.1695	0.0875	0.0989
N	12	12	12
LUNG			
MEAN (g)	2.044	2.106	2.105
SD	0.1727	0.1854	0.2286
N	12	12	12

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 6

Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AC)	T1 (AC)	T2 (AC)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
BRAIN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.478	0.468	0.466
SD	0.0307	0.0303	0.0244
N	12	12	12
PITUITARY GLAND			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.002	0.002	0.002
SD	0.0004	0.0003	0.0003
N	12	12	12
LIVER			
MEAN (% BODY WEIGHT)	2.546	2.652	2.670
SD	0.1344	0.1433	0.1077
N	12	12	12
SPLEEN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.155	0.151	0.144*
SD	0.0113	0.0055	0.0082
N	12	12	12
HEART			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.320	0.312	0.314
SD	0.0404	0.0155	0.0184
N	12	12	12
THYMUS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.042	0.045	0.039
SD	0.0081	0.0128	0.0092
N	12	12	12
SEMINAL VESICLE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.433	0.442	0.433
SD	0.0775	0.0541	0.0603
N	12	12	12

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;NSg-05/Anova;Sig-05/Dunnett's

c Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 6(Continued) Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AC)	T1 (AC)	T2 (AC)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
PROSTATE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.120	0.099	0.089+
SD	0.0232	0.0294	0.0188
N	12	12	12
KIDNEYS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.514	0.513	0.524
SD	0.0325	0.0329	0.0488
N	12	12	12
ADRENAL GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.014	0.014	0.014
SD	0.0013	0.0010	0.0020
N	12	12	12
TESTES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.829	0.894	0.815
SD	0.1989	0.1608	0.0812
N	12	12	12
EPIDIDYMIDES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.337	0.321	0.320
SD	0.0457	0.0244	0.0286
N	12	12	12
LUNG			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.477	0.475	0.474
SD	0.0374	0.0249	0.0586
N	12	12	12

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;NSg-05/Anova;Sig-05/Dunnett's

c Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

+ : Significant differences from control group (p<0.01)

Table 7 Serum Testosterone and Luteinizing Hormone of Rats (Group Summary)

SUMMARY OF SERUM TESTOSTERONE AND LUTEINIZING HORMONE			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
TEST(s) :		Testosterone	LH
UNITS:		(ng/ml)	(ng/ml)
GROUP:	V. C. (AC) :	0 (mg/kg)	
MEAN		2.49*	0.42+
SD		1.30	0.24
N		12	12
GROUP:	T1 (AC) :	250 (mg/kg)	
MEAN		2.70	0.42
SD		0.99	0.24
N		12	12
GROUP:	T2 (AC) :	500 (mg/kg)	
MEAN		2.41	0.60
SD		0.94	0.26
N		12	12
GROUP:	NC :	-	
MEAN		5.65	0
SD		3.74	0
N		12	0

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Ftest;Sig-05/Welch's t-test:Sig-05

* : Significant differences from control group (p<0.01)

+ : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 8 Fertility Data of Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FERTILITY DATA				
STUDY : BR12013			SEX : MALE	
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. C. (AC) 0	T1 (AC) 250	T2 (AC) 500	NC -
No. of mated animals	12	12	12	12
Copulation index ^{a)} (%)	20/24 ^{c)} (83.3)	20/24 ^{c)} (83.3)	20/24 ^{c)} (83.3)	17/24 ^{c)} (70.8)
Fertility index ^{b)} (%)	19/20 (95.0)	18/20 (90.0)	18/20 (90.0)	17/17 (100)

^{a)} Copulation Index (%) = (No. of animals with evidence of mating/No. of mated animals) × 100

^{b)} Fertility Index (%) = (No. of impregnating animals/No. of animals with evidence of mating) × 100

^{c)} Every male mated with 2 females.

χ^2 -test: NSg/No unplanned test performed

Tables for Andropause Recovery Group

Table 10 Summary of Clinical Signs (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE						
Dosing						
STUDY : BR12013			SEX : MALE			
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. C. (AR) 0		T1 (AR) 250		T2 (AR) 500	
No. of animals	12		12		12	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
No Abnormalities Detected	11	91.67	12	100.00	12	100.00
General Appearance						
Thin appearance	0	0.00	0	0.00	1	8.33
Posture, Body position						
Crawling	0	0.00	0	0.00	1	8.33
Skin						
Scratch wound	0	0.00	0	0.00	1	8.33
Hard skin	3	25.00	0	0.00	3	25.00
Eye						
Eye discharge	0	0.00	0	0.00	1	8.33

Table 11

Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Dosing				
STUDY : BR12013		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. C. (AR) 0	T1 (AR) 250	T2 (AR) 500
DAY 92	MEAN	458.9	454.3	456.3
Dosing	S. D.	26.62	25.00	32.67
	N	12	12	12
DAY 99	MEAN	456.4	456.0	454.4
Dosing	S. D.	29.41	26.50	32.95
	N	12	12	12
DAY 106	MEAN	460.8	459.8	457.7
Dosing	S. D.	31.13	26.66	30.70
	N	12	12	12
DAY 113	MEAN	461.7	460.0	453.0
Dosing	S. D.	28.54	25.53	31.76
	N	12	12	11
DAY 120	MEAN	463.9	461.2	450.1
Dosing	S. D.	29.31	24.86	33.36
	N	12	12	11
DAY 127	MEAN	462.4	460.3	453.9
Dosing	S. D.	28.29	24.81	34.64
	N	12	12	10
DAY 134	MEAN	462.0	461.4	456.9
Dosing	S. D.	29.96	24.94	32.95
	N	12	12	10
DAY 141	MEAN	462.9	458.6	456.0
Dosing	S. D.	28.41	24.92	34.68
	N	12	12	10
DAY 148	MEAN	467.5	464.0	459.3
Dosing	S. D.	27.96	25.73	35.93
	N	12	12	10

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 11(Continued) Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Dosing				
STUDY : BR12013			SEX : MALE	
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. C. (AR) 0	T1 (AR) 250	T2 (AR) 500
DAY 155	MEAN	466.8	465.3	460.7
Dosing	S. D.	29.72	24.76	39.46
	N	12	12	10
DAY 162	MEAN	472.3	469.2	464.6
Dosing	S. D.	27.83	25.59	37.41
	N	12	12	10
DAY 169	MEAN	456.5	454.4	455.0
Dosing	S. D.	26.23	25.99	37.47
	N	12	12	10
DAY 176	MEAN	462.4	458.5	461.7
Dosing	S. D.	25.96	26.44	34.27
	N	12	11	10
DAY 183	MEAN	463.2	451.0	455.8
Dosing	S. D.	27.37	28.08	33.21
	N	12	11	10

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 12

Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : BR12013				SEX : MALE
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. C. (AR) 0	T1 (AR) 250	T2 (AR) 500
DAY 93	INTAKE (g)	19.5	19.9	18.9
Dosing	S. D.	1.95	1.97	1.86
	N	12	12	12
DAY 100	INTAKE (g)	20.4	20.5	20.2
Dosing	S. D.	1.82	2.03	2.05
	N	12	12	12
DAY 108	INTAKE (g)	19.4	19.9	19.8
Dosing	S. D.	1.80	2.30	1.13
	N	12	12	12
DAY 114	INTAKE (g)	20.5	20.1	19.9
Dosing	S. D.	2.30	2.02	2.08
	N	12	12	11
DAY 121	INTAKE (g)	20.0	19.8	18.4
Dosing	S. D.	1.47	1.40	5.46
	N	12	12	11
DAY 128	INTAKE (g)	19.1	20.1	19.7
Dosing	S. D.	2.90	1.33	1.66
	N	12	12	10
DAY 135	INTAKE (g)	20.1	21.0	21.2
Dosing	S. D.	1.78	1.74	1.48
	N	12	12	10
DAY 142	INTAKE (g)	20.7	21.2	20.7
Dosing	S. D.	2.48	1.78	2.52
	N	12	12	10
DAY 149	INTAKE (g)	19.1	19.5	19.1
Dosing	S. D.	2.10	0.73	2.19
	N	12	12	10

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 12(Continued) Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)

STUDY : BR12013		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. C. (AR) 0	T1 (AR) 250	T2 (AR) 500
DAY 156	INTAKE (g)	20.6	20.6	19.5
Dosing	S. D.	2.32	1.48	2.77
	N	12	12	10
DAY 163	INTAKE (g)	19.8	21.2	19.8
Dosing	S. D.	2.58	2.66	3.65
	N	12	12	10
DAY 183	INTAKE (g)	21.8	20.0	19.6
Dosing	S. D.	2.27	2.49	3.04
	N	12	11	10

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

Table 13

Gross Findings (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (AR)	T2 (AR)
DOSE: (mg/kg)	0	250	500
NUMBER OF ANIMALS:	12	11	10
Observed/No remarkable finding	2	1	3
No. of Observations	2	1	3
ABNORMAL LESIONS			
Nodule(s)	1	0	0
Hard skin	2	0	0
Enlarged	2	0	0
Scratch wound	0	0	1
No. of Observations	5	0	1
ADRENAL GLANDS			
Enlarged	0	0	1
No. of Observations	0	0	1
EPIDIDYMIDES			
Enlarged	1	0	0
Focus/foci	0	1	0
Small	2	6	1
Flaccid	0	0	1
No. of Observations	3	7	2
KIDNEYS			
Cyst	0	1	1
Rough surface	1	1	0
Small	0	1	0
Pitted	1	0	0
No. of Observations	2	3	1
LIVER			
Cyst	2	4	1
Focus/foci	1	0	0
Mass(es)	1	0	0

Table 13(Continued) Gross Findings (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : BR12013	SEX : MALE		
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (AR)	T2 (AR)
DOSE: (mg/kg)	0	250	500
NUMBER OF ANIMALS:	12	11	10
LIVER			
	0	0	0
No. of Observations	4	4	1
PROSTATE			
Discoloration	0	0	1
No. of Observations	0	0	1
PITUITARY GLAND			
Discoloration	3	2	1
No. of Observations	3	2	1
TESTES			
Enlarged	1	0	0
Small	4	9	2
Flaccid	4	10	4
No. of Observations	9	19	6

Table 14

Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (AR)	T2 (AR)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
BRAIN			
MEAN (g)	2.137	2.133	2.045*
SD	0.0387	0.0475	0.1047
N	12	11	10
PITUITARY GLAND			
MEAN (g)	0.008	0.008	0.007
SD	0.0014	0.0017	0.0018
N	12	11	10
LIVER			
MEAN (g)	13.873	12.333*	12.287*
SD	1.6796	1.2202	1.1128
N	12	11	10
SPLEEN			
MEAN (g)	0.753	0.727	0.720
SD	0.0575	0.0694	0.0924
N	12	11	10
HEART			
MEAN (g)	1.600	1.470	1.529
SD	0.3985	0.1688	0.2377
N	12	11	10
THYMUS			
MEAN (g)	0.227	0.241	0.242
SD	0.0558	0.0659	0.0923
N	12	11	10
SEMINAL VESICLE			
MEAN (g)	2.197	2.039	1.933
SD	0.6736	0.4796	0.3017
N	12	11	10
PROSTATE			
MEAN (g)	0.536	0.514	0.450
SD	0.0886	0.1053	0.0791
N	12	11	10

a Bart;Sig-05/NP-KW;Sig-05/Dunn's Rank Sum

b Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

c Bart;NSg-05/Anova;Sig-05/Dunnett's

d Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 14(Continued) Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (AR)	T2 (AR)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
KIDNEYS			
MEAN (g)	2.764	2.686	2.612
SD	0.1408	0.2236	0.1986
N	12	11	10
ADRENAL GLANDS			
MEAN (g)	0.068	0.064	0.066
SD	0.0062	0.0058	0.0123
N	12	11	10
TESTES			
MEAN (g)	3.856	2.975*	3.506
SD	0.7007	0.7391	0.8598
N	12	11	10
EPIDIDYMIDES			
MEAN (g)	1.599	1.337+	1.452
SD	0.1917	0.2162	0.1184
N	12	11	10
LUNG			
MEAN (g)	2.502	2.496	2.459
SD	0.3402	0.3670	0.1415
N	12	11	10

b Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

c Bart;NSg-05/Anova;Sig-05/Dunnett's

d Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

* : Significant differences from control group (p<0.05)

+ : Significant differences from control group (p<0.01)

Table 15

Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (AR)	T2 (AR)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
BRAIN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.471	0.484	0.460
SD	0.0298	0.0319	0.0219
N	12	11	10
PITUITARY GLAND			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.002	0.002	0.002
SD	0.0004	0.0004	0.0004
N	12	11	10
LIVER			
MEAN (% BODY WEIGHT)	3.059	2.786*	2.756*
SD	0.4273	0.1142	0.1329
N	12	11	10
SPLEEN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.166	0.164	0.161
SD	0.0116	0.0114	0.0130
N	12	11	10
HEART			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.352	0.332	0.343
SD	0.0855	0.0285	0.0431
N	12	11	10
THYMUS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.050	0.054	0.054
SD	0.0112	0.0147	0.0194
N	12	11	10
SEMINAL VESICLE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.483	0.464	0.434
SD	0.1418	0.1178	0.0599
N	12	11	10

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;Sig-05/Dunn's Rank Sum

c Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 15(Continued) Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (AR)	T2 (AR)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
PROSTATE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.118	0.117	0.102
SD	0.0155	0.0244	0.0204
N	12	11	10
KIDNEYS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.609	0.608	0.587
SD	0.0325	0.0262	0.0343
N	12	11	10
ADRENAL GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.015	0.014	0.015
SD	0.0015	0.0014	0.0027
N	12	11	10
TESTES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.847	0.674	0.791
SD	0.1385	0.1693	0.1960
N	12	11	10
EPIDIDYMIDES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.353	0.304*	0.326
SD	0.0457	0.0541	0.0204
N	12	11	10
LUNG			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.551	0.564	0.554
SD	0.0761	0.0650	0.0446
N	12	11	10

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;Sig-05/Dunn's Rank Sum

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 16 Serum Testosterone and Luteinizing Hormone of Rats (Group Summary)

SUMMARY OF SERUM TESTOSTERONE AND LUTEINIZING HORMONE

STUDY : BR12013		SEX : MALE	
TEST(s) :		Testosterone	LH
UNITS:		(ml)	(ml)

GROUP:	V. C. (AR) :	0 (ng/ml)		
MEAN		1.20		0.02
SD		0.72		0.08
N		12		12
GROUP:	T1 (AR) :	250 (ng/ml)		
MEAN		2.15		0.02
SD		1.14		0.07
N		11		11
GROUP:	T2 (AR) :	500 (ng/ml)		
MEAN		1.48		0
SD		0.82		0
N		10		0
GROUP:	NC :	0 (ng/ml)		
MEAN		2.26		0
SD		2.52		0
N		12		0

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Ftest;Sig-05/Welch's t-test:Nsg-05

Table 17 Fertility Data of Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FERTILITY DATA				
STUDY : BR12013	SEX : MALE			
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. C. (AR) 0	T1 (AR) 250	T2 (AR) 500	NC -
No. of mated animals	12	11	12	12
Copulation index ^{a)} (%)	17/24 ^{c)} (70.8)	11/22 ^{c)} (50.0)	12/20 ^{c)} (60.0)	21/24 ^{c)} (87.5)
Fertility index ^{b)} (%)	15/17 (88.2)	10/11 (90.9)	12/12 (100)	21/21 (100)

^{a)} Copulation Index (%) = (No. of animals with evidence of mating/No. of mated animals) × 100

^{b)} Fertility Index (%) = (No. of impregnating animals/No. of animals with evidence of mating) × 100

^{c)} Every male mated with 2 females.

χ^2 -test: NSg/No unplanned test performed

Tables for Long-Term Treatment Group

Table 19 Summary of Clinical Signs (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE						
Dosing						
STUDY : BR12013	SEX : MALE					
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. C. (AR) 0		T1 (LT) 250		T2 (LT) 500	
No. of animals	12		12		12	
	#	(%)	#	(%)	#	(%)
Normal						
No Abnormalities Detected	12	100.00	12	100.00	12	100.00
Posture, Body position						
Lateral position	0	0.00	0	0.00	1	8.33
Behavior						
Loss of use of limb	0	0.00	1	8.33	1	8.33
Fur, Hair, Coat						
Loss of fur	0	0.00	1	8.33	1	8.33
Skin						
Swollen	0	0.00	0	0.00	1	8.33
Palpable mass	0	0.00	0	0.00	1	8.33
Hard skin	3	25.00	3	25.00	1	8.33
Scar	0	0.00	1	8.33	0	0.00
Eye						
Eye discharge	0	0.00	0	0.00	1	8.33

Table 20

Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Acclimation				
STUDY : BR12013			SEX : MALE	
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. C. (AR) 0	T1 (LT) 250	T2 (LT) 500
DAY 1	MEAN	435.8	435.6	438.5
Dosing	S. D.	25.43	26.49	26.93
	N	12	12	12
DAY 8	MEAN	435.7	436.9	437.1
Dosing	S. D.	23.54	26.12	25.98
	N	12	12	12
DAY 15	MEAN	436.7	434.7	436.0
Dosing	S. D.	24.19	24.31	24.71
	N	12	12	12
DAY 22	MEAN	437.4	435.2	435.1
Dosing	S. D.	25.02	26.96	25.34
	N	12	12	12
DAY 29	MEAN	437.5	436.5	435.6
Dosing	S. D.	23.32	27.02	25.92
	N	12	12	12
DAY 36	MEAN	441.7	436.6	437.0
Dosing	S. D.	25.80	28.30	26.44
	N	12	12	12
DAY 43	MEAN	443.9	436.4	440.3
Dosing	S. D.	25.62	29.18	27.83
	N	12	12	12
DAY 50	MEAN	448.6	442.4	441.0
Dosing	S. D.	27.76	28.76	28.29
	N	12	12	12
DAY 57	MEAN	450.4	442.5	442.7
Dosing	S. D.	26.27	28.81	28.53
	N	12	12	12

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 20(Continued) Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Acclimation				
STUDY : BR12013			SEX : MALE	
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. C. (AR) 0	T1 (LT) 250	T2 (LT) 500
DAY 64	MEAN	453.7	444.5	450.6
Dosing	S. D.	26.79	27.72	24.69
	N	12	12	11
DAY 71	MEAN	451.5	445.4	453.0
Dosing	S. D.	25.99	29.38	26.34
	N	12	12	11
DAY 78	MEAN	454.7	445.6	452.1
Dosing	S. D.	26.58	28.48	24.75
	N	12	12	11
DAY 85	MEAN	454.7	448.9	454.9
Dosing	S. D.	26.03	27.76	26.04
	N	12	12	11
DAY 92	MEAN	458.9	449.4	456.6
Dosing	S. D.	26.62	28.39	25.69
	N	12	12	11
DAY 99	MEAN	456.4	454.8	460.1
Dosing	S. D.	29.41	28.70	25.80
	N	12	12	11
DAY 106	MEAN	460.8	457.8	462.6
Dosing	S. D.	31.13	29.36	27.71
	N	12	12	11
DAY 113	MEAN	461.7	460.2	464.2
Dosing	S. D.	28.54	29.13	27.31
	N	12	12	11
DAY 120	MEAN	463.9	460.1	466.5
Dosing	S. D.	29.31	30.50	28.48
	N	12	12	11

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 20(Continued) Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Acclimation				
STUDY : BR12013			SEX : MALE	
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. C. (AR) 0	T1 (LT) 250	T2 (LT) 500
DAY 127	MEAN	462.4	457.2	467.7
Dosing	S. D.	28.29	29.47	26.53
	N	12	12	11
DAY 134	MEAN	462.0	457.4	467.8
Dosing	S. D.	29.96	27.60	25.83
	N	12	12	11
DAY 141	MEAN	462.9	458.3	466.8
Dosing	S. D.	28.41	24.63	25.87
	N	12	12	11
DAY 148	MEAN	467.5	462.6	468.4
Dosing	S. D.	27.96	24.50	25.81
	N	12	12	11
DAY 155	MEAN	466.8	465.2	461.3
Dosing	S. D.	29.72	25.61	38.75
	N	12	12	11
DAY 162	MEAN	472.3	465.5	474.3
Dosing	S. D.	27.83	28.09	30.13
	N	12	12	10
DAY 169	MEAN	456.5	453.4	464.1
Dosing	S. D.	26.23	37.07	29.15
	N	12	12	10
DAY 176	MEAN	462.4	453.7	470.8
Dosing	S. D.	25.96	49.37	29.83
	N	12	12	10
DAY 183	MEAN	463.2	464.8	468.1
Dosing	S. D.	27.37	29.57	29.67
	N	12	11	10

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 21

Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : BR12013			SEX : MALE	
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. C. (AR) 0	T1 (LT) 250	T2 (LT) 500
DAY 2	INTAKE (g)	19.7	19.7	18.7
Dosing	S. D.	1.59	1.50	0.99
	N	12	12	12
DAY 9	INTAKE (g)	18.7	18.4	17.4
Dosing	S. D.	1.89	1.48	1.88
	N	12	12	12
DAY 16	INTAKE (g)	20.3	20.7	20.3
Dosing	S. D.	1.68	1.89	1.26
	N	12	12	12
DAY 23	INTAKE (g)	21.2	21.6	21.9
Dosing	S. D.	2.10	2.15	1.54
	N	12	12	12
DAY 30	INTAKE (g)	20.4	21.0	20.5
Dosing	S. D.	1.40	1.03	1.66
	N	12	12	12
DAY 37	INTAKE (g)	19.9	20.5	20.6
Dosing	S. D.	1.91	1.31	2.09
	N	12	12	12
DAY 44	INTAKE (g)	20.8	21.0	20.7
Dosing	S. D.	1.31	3.66	2.42
	N	12	12	12
DAY 51	INTAKE (g)	20.6	20.3	20.3
Dosing	S. D.	1.82	1.96	2.02
	N	12	12	12
DAY 58	INTAKE (g)	20.2	19.9	19.3
Dosing	S. D.	1.35	2.18	1.82
	N	12	12	12

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 21(Continued) Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : BR12013			SEX : MALE	
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. C. (AR) 0	T1 (LT) 250	T2 (LT) 500
DAY 65	INTAKE (g)	21.7	21.0	20.3
Dosing	S. D.	1.90	1.80	2.32
	N	12	12	11
DAY 72	INTAKE (g)	21.5	20.6	20.9
Dosing	S. D.	1.70	1.12	1.80
	N	12	12	11
DAY 79	INTAKE (g)	20.4	19.8	20.3
Dosing	S. D.	2.03	2.55	1.59
	N	12	12	11
DAY 86	INTAKE (g)	20.1	20.6	20.2
Dosing	S. D.	1.53	1.35	1.79
	N	12	12	11
DAY 93	INTAKE (g)	19.5	20.1	20.3
Dosing	S. D.	1.95	1.50	1.49
	N	12	12	11
DAY 100	INTAKE (g)	20.4	19.7	20.1
Dosing	S. D.	1.82	1.91	1.61
	N	12	12	11
DAY 108	INTAKE (g)	19.4	20.0	19.7
Dosing	S. D.	1.80	1.88	2.31
	N	12	12	11
DAY 114	INTAKE (g)	20.5	20.4	21.0
Dosing	S. D.	2.30	1.84	1.62
	N	12	12	11
DAY 121	INTAKE (g)	20.0	20.8	20.9
Dosing	S. D.	1.47	2.58	1.84
	N	12	12	11

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

Table 21 (Continued) Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : BR12013			SEX : MALE	
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. C. (AR) 0	T1 (LT) 250	T2 (LT) 500
DAY 128	INTAKE (g)	19.1	19.7	20.4
Dosing	S. D.	2.90	3.76	1.95
	N	12	12	11
DAY 135	INTAKE (g)	20.1	21.3	22.5*
Dosing	S. D.	1.78	2.53	1.59
	N	12	12	11
DAY 142	INTAKE (g)	20.7	19.4	20.8
Dosing	S. D.	2.48	3.88	2.28
	N	12	12	11
DAY 149	INTAKE (g)	19.1	19.9	17.9
Dosing	S. D.	2.10	2.75	5.62
	N	12	12	11
DAY 156	INTAKE (g)	20.6	19.5	18.2
Dosing	S. D.	2.32	3.01	5.01
	N	12	12	11
DAY 163	INTAKE (g)	19.8	19.7	21.0
Dosing	S. D.	2.58	3.27	2.75
	N	12	12	10
DAY 183	INTAKE (g)	21.8	21.4	20.5
Dosing	S. D.	2.27	2.46	2.33
	N	12	11	10

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

c Bart;NSg-05/Anova;Sig-05/Dunnett's

* : Significant differences from control group (p<0.05)

Table 22

Gross Findings (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (LT)	T2 (LT)
DOSE: (mg/kg)	0	250	500
NUMBER OF ANIMALS:	12	11	10
Observed/No remarkable finding	2	4	4
No. of Observations	2	4	4
ABNORMAL LESIONS			
Nodule(s)	1	3	0
Hard skin	2	0	0
Enlarged	2	0	0
No. of Observations	5	3	0
ADRENAL GLANDS			
Enlarged	0	1	1
Nodule	0	1	0
No. of Observations	0	2	1
EPIDIDYMIDES			
Enlarged	1	0	0
Small	2	3	1
Flaccid	0	2	2
No. of Observations	3	5	3
KIDNEYS			
Cyst	0	0	1
Nodule(s)	0	1	0
Rough surface	1	0	0
Small	0	1	0
Pitted	1	0	0
No. of Observations	2	2	1
LIVER			
Cyst	2	2	1
Focus/foci	1	0	0

Table 22(Continued) Gross Findings (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (LT)	T2 (LT)
DOSE: (mg/kg)	0	250	500
NUMBER OF ANIMALS:	12	11	10
LIVER			
Mass(es)	1	0	0
No. of Observations	4	2	1
PITUITARY GLAND			
Discoloration	3	1	1
No. of Observations	3	1	1
TESTES			
Enlarged	1	0	0
Small	4	4	3
Flaccid	4	4	2
No. of Observations	9	8	5

Table 23

Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP :	V. C. (AR)	T1 (LT)	T2 (LT)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
BRAIN			
MEAN (g)	2.137	2.126	2.107
SD	0.0387	0.0699	0.1118
N	12	11	10
PITUITARY GLAND			
MEAN (g)	0.008	0.009	0.009
SD	0.0014	0.0023	0.0017
N	12	11	10
LIVER			
MEAN (g)	13.873	13.009	13.504
SD	1.6796	1.1958	1.2687
N	12	11	10
SPLEEN			
MEAN (g)	0.753	0.735	0.777
SD	0.0575	0.0645	0.0888
N	12	11	10
HEART			
MEAN (g)	1.600	1.535	1.604
SD	0.3985	0.2576	0.2804
N	12	11	10
THYMUS			
MEAN (g)	0.227	0.234	0.228
SD	0.0558	0.0868	0.0425
N	12	11	10
SEMINAL VESICLE			
MEAN (g)	2.197	1.863	1.917
SD	0.6736	0.2401	0.2085
N	12	11	10
PROSTATE			
MEAN (g)	0.536	0.463	0.515
SD	0.0886	0.0814	0.0923
N	12	11	10
KIDNEYS			
MEAN (g)	2.764	2.773	2.742
SD	0.1408	0.1937	0.2891
N	12	11	10

a Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 23(Continued) Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (LT)	T2 (LT)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
ADRENAL GLANDS			
MEAN (g)	0.068	0.085	0.081
SD	0.0062	0.0646	0.0525
N	12	11	10
TESTES			
MEAN (g)	3.856	3.410	3.676
SD	0.7007	0.7562	0.4942
N	12	11	10
EPIDIDYMIDES			
MEAN (g)	1.599	1.507	1.491
SD	0.1917	0.0901	0.1870
N	12	11	10
LUNG			
MEAN (g)	2.502	2.458	2.491
SD	0.3402	0.2634	0.1298
N	12	11	10

a Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 24

Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (LT)	T2 (LT)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
BRAIN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.471	0.467	0.459
SD	0.0298	0.0353	0.0263
N	12	11	10
PITUITARY GLAND			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.002	0.002	0.002
SD	0.0004	0.0005	0.0004
N	12	11	10
LIVER			
MEAN (% BODY WEIGHT)	3.059	2.842	2.931
SD	0.4273	0.1657	0.1536
N	12	11	10
SPLEEN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.166	0.161	0.170
SD	0.0116	0.0107	0.0244
N	12	11	10
HEART			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.352	0.337	0.349
SD	0.0855	0.0664	0.0633
N	12	11	10
THYMUS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.050	0.051	0.050
SD	0.0112	0.0175	0.0095
N	12	11	10
SEMINAL VESICLE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.483	0.409	0.417
SD	0.1418	0.0606	0.0473
N	12	11	10

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 24(Continued) Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (LT)	T2 (LT)
DOSE : (mg/kg)	0	250	500
PROSTATE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.118	0.101	0.112
SD	0.0155	0.0142	0.0223
N	12	11	10
KIDNEYS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.609	0.607	0.596
SD	0.0325	0.0342	0.0462
N	12	11	10
ADRENAL GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.015	0.018	0.017
SD	0.0015	0.0128	0.0101
N	12	11	10
TESTES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.847	0.745	0.798
SD	0.1385	0.1665	0.0828
N	12	11	10
EPIDIDYMIDES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.353	0.330	0.323
SD	0.0457	0.0227	0.0268
N	12	11	10
LUNG			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.551	0.538	0.543
SD	0.0761	0.0589	0.0350
N	12	11	10

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

b Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 25 Serum Testosterone and Luteinizing Hormone of Rats (Group Summary)

SUMMARY OF SERUM TESTOSTERONE AND LUTEINIZING HORMONE			
STUDY : BR12013		SEX : MALE	
TEST(s):	Testosterone	LH	
UNITS:	(ml)	(ml)	
GROUP:	V. C. (AR) :	0 (ng/ml)	
MEAN		1.20	0.02
SD		0.72	0.08
N		12	12
GROUP:	T1 (LT) :	250 (ng/ml)	
MEAN		1.03	0.17
SD		0.33	0.34
N		11	11
GROUP:	T2 (LT) :	500 (ng/ml)	
MEAN		0.91	0.12
SD		0.26	0.19
N		10	10
GROUP:	NC :	0 (ng/ml)	
MEAN		2.26	0
SD		2.52	0
N		12	0

a Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

b Ftest;Sig-05/Welch's t-test:Nsg-05

Table 26 Fertility Data of F0 Rats (Group Summary)

SUMMARY OF FERTILITY DATA				
STUDY : BR12013		SEX : MALE		
GROUP:	V. C. (AR)	T1 (AR)	T2 (AR)	NC
DOSE: (mg/kg)	0	250	500	-
No. of mated animals	12	11	12	12
Copulation index ^{a)} (%)	17/24 ^{c)} (70.8)	13/24 ^{c)} (50.0)	14/20 ^{c)} (70.0)	21/24 ^{c)} (87.5)
Fertility index ^{b)} (%)	15/17 (88.2)	12/13 (92.3)	13/14 (92.9)	21/21 (100)

^{a)} Copulation Index (%) = (No. of animals with evidence of mating/No. of mated animals) × 100

^{b)} Fertility Index (%) = (No. of impregnating animals/No. of animals with evidence of mating) × 100

^{c)} Every male mated with 2 females.

χ^2 -test:NSg/No unplanned test performed

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 연구개발 수행내용 및 목표달성도

1. 평가의 착안점 및 기준

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2010	[제1핵심과제] 옷나무를 이용한 건강기능식품 개발		
		옷나무추출물의 추출조건 확립 및 대량생산공정개발	5%	우루시올 제거기술 및 대량생산 공정 개발
		생리활성성분 분리 정제 및 구조 분석	5%	HPLC, LC/MS, NMR 등의 기기분석 방법을 이용하여 순도 및 구조 확인
		생리활성성분에 대한 정량법 개발	5%	HPLC를 이용하여 ICH 및 FDA Guideline에 따라 분석법 검증 시행
		갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구	15%	연구 기관 선정, 임상계획서 작성, 피험자 모집, IRB 등록 및 승인
		[제2핵심과제] 옷나무의 갱년기 장애 개선 관련 효능 검증		
		옷나무추출물의 남성호르몬양 및 여성호르몬양 작용 및 기전연구	7.5%	in vitro, in vivo 효능 시험
		in vitro에서 모발관련 세포활성 평가	5%	HHDPC, HaCaT세포 이용한 cell proliferation 증가 확인
		in vitro에서 연골세포 활성 평가	5%	연골세포 배양후 cell viability 확인 proteoglycan의 양 측정
		in vitro에서 골 형성능 확인	5%	MC3T3-E1 cell 이용하여 샘플의 골 형성능 실험-Alizarin Red S 염색
		옷나무추출물을 이용한 항응고능 평가 및 혈소판 응집 억제능 평가	10%	옷나무추출물을 이용한 혈장 응고능 평가시험 및 항혈소판 효능 평가의 수행 여부
		혈관장력에 미치는 옷나무추출물의 효능	5%	혈관 수축과 이완에 미치는 옷나무추출물의 효능 시험 여부
		고지혈증 마우스 모델 제작	3%	고지질 식이를 통해 고지혈증 마우스 모델 제작 유무
		옷나무추출물의 혈중 콜레스테롤 개선 효과 분석	3%	혈액 생화학 분석을 통한 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지질 분석 유무
		약물 독성 검사를 위한 GOT, GPT, Albumin 분석	3%	GOT, GPT 및 Albumin의 혈중 농도 분석을 통한 독성검사 유무
		H&E 및 oil red O 염색을 통한 지방간 개선 효과 분석	3%	H&E 및 oil red O 염색을 통한 지방간 분석 유무
[제3핵심과제] 옷나무의 생식독성연구				
발생독성시험(랫드) NOAEL산출	10%	GLP 독성보고서 완료		

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
2차 년도	2011	[제1핵심과제] 옷나무를 이용한 건강기능식품 개발		
		기능성물질 규명 및 제품화연구	5%	유효성분 탐색 및 제형개발
		생리활성성분에 대한 HPLC 및 LC/MS를 이용한 정량법 개발	10%	생리활성성분에 대한 정량법 개발
		유효 성분 분석법 확립	10%	분석법 Validation
		옷나무 추출물의 갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구	25%	갱년기 장애 및 혈청 지질개선 효과를 호소하는 사람에서 옷나무추출물의 갱년기 장애의 개선 효능과 안전성 평가
		[제2핵심과제] 옷나무의 남성갱년기 장애 개선 관련 효능 검증		
		옷나무추출물의 여성호르몬양 작용 및 기전연구	3%	in vivo 효능시험
		옷나무추출물의 Aromatase 저해작용 연구	3%	in vitro 효능시험
		탈모 마우스 모델을 이용한 탈모 방지 및 모발성장 효능 확인	3%	모발의 변화를 육안으로 관찰하고 피부 조직내에서 변화를 관찰
		골관절염 유발 마우스 모델을 이용한 실험동물	3%	임상증상 및 골관절염 중증도 평가
		옷나무의 고혈압 개선 유효 성분 발굴	5%	In vivo 동물모델 및 인체 혈액에서의 효과 검증
		옷나무추출물 투여에 의한 콜레스테롤 대사 조절 및 유전자 발현 분석	5%	ApoE K/O 마우스에서 고지질 식이시 고지혈증 억제 효과 in vivo 마우스 모델에서의 콜레스테롤 대사 관련 유전자 분석
		약물대사효소와 관련된 옷나무 추출물의 약물상호작용 연구	5%	cytochrome P450 효소 활성화에 미치는 영향을 평가 CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4에 대한 억제 작용
		옷나무추출물의 항산화 기능성 검증	3%	옷나무추출물에 대한 in vitro 및 in vivo 항산화 실험
		[제3핵심과제] 옷나무의 생식독성연구		
		토끼 발생독성시험 및 랫드 번식시험	10%	임신동물을 이용한 토끼 발생독성시험 랫드를 이용한 랫드 번식시험: 동물 실험

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
3차 년도	2012	[제1핵심과제] 옷나무를 이용한 건강기능식품 개발		
		옷나무 건강기능식품 개발	20 %	제품개발 및 인허가
		유효 성분 분석법 확립	10 %	분석법 Validation
		옷나무의 모니터링 분석	10 %	단일물질 분리
		옷나무 추출물의 갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구	25 %	갱년기 장애 및 혈청 지질개선 효과를 호소하는 사람에서 옷나무추출물의 갱년기 장애의 개선 효능과 안전성 평가
		[제2핵심과제] 옷나무의 남성갱년기 장애 개선 관련 효능 검증		
		옷나무 분리성분의 남성 및 여성호르몬 양 작용 및 기전연구	5 %	분리물질의 in vitro, in vivo 효능 시험
		탈모방지 및 골관절염 관련 기전 연구	5 %	골관절염 마우스 모델에서의 사이토카인 발현 분석
		혈행 개선 성분의 생체 지표 및 임상 시험법 확립	4 %	유효 성분의 생리 활성 기전 규명 임상 시험을 위한 생체 지표 설정 및 시험법 확립
		콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현분석 및 세포수준에서의 분자 기전 연구	4 %	마우스 간세포 및 대식세포에서 콜레스테롤 대사 및 수송관련 분자 기전 연구
		옷나무 추출물의 체내동태 연구	4 %	지표성분의 생체이용률 및 PK 특성 규명
		옷나무추출물의 항산화 기능성 검증	3 %	옷나무추출물에 대한 in vitro 및 in vivo 항산화 실험
		[제3핵심과제] 옷나무의 생식독성연구		
랫드 번식시험	10 %	랫드를 이용한 랫드 번식시험: 부검, 정자검사, 조직병리학적검사		
최종 평가		옷나무 건강기능식품 개발	10 %	건강기능식품 제형 및 제품개발
		갱년기개선 관련 효능	20 %	갱년기 관련 증상 개선
		갱년기 인체시험	30 %	갱년기 장애 개선 효과
		옷나무 생식독성	10 %	생식독성 안전성
		식약청 건강기능식품인 허가	30 %	건강기능식품 인허가

2. 연구개발목표의 달성도

가. 옷나무를 이용한 건강기능식품 개발[제1핵심과제]

구분	목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
1차년도	옷나무추출물의 추출조건 확립 및 대량생산공정개발	옷나무에서 우루시올을 제거하는 법을 개발하였음. 물, 주정알코올 등 용매별 추출효율과 활성을 확인하여 가장 좋은 조건(수율 6%이상)의 추출방법을 찾았으며, 옷나무추출물을 대량생산하여 우루시올의 유무 확인 및 세부과제연구에 제공하였음.	100%
	생리활성성분의 분리 정제 및 구조 분석	옷나무추출물을 3가지 분획으로 나누고 분리 정제를 시작하였고 7종의 단일 물질의 구조 확인을 완료하였음	100%
	생리활성성분의 분석법 개발	옷나무의 지표성분을 설정하고 분석법을 개발하였고 ICH 및 FDA Guideline에 따라서 분석법을 검증하였음	100%
	갱년기 증상 및 혈청 지질 개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구	연구 기관 선정, 임상계획서 작성, 피험자 모집, IRB 등록 및 승인 등을 수행하였음	100%
2차년도	옷나무추출물의 추출조건 확립 및 표준물질 대량생산을 위한 분리법 확인	Prep-LC를 사용하여 옷나무추출물에서 Fraction을 분리하였으며, HPLC를 사용하여 Fustin 표준과 비교하여 Fraction에 Fustin이 함유되어 있음을 확인하였음. 옷나무추출물의 제품 적용성 실험을 위해 다양한 식품군에 옷나무추출물을 첨가하여 분석을 통하여 제품 가능성을 확인함.	100%
	생리활성성분의 분리 정제 및 구조 분석	1차년도에 이어 2차년도까지 실험을 진행하여 신규물질 1종을 포함한 총 19종의 단일 물질의 구조 확인을 완료하였다.	100%
	옷나무의 모니터링 분석	다양한 방법으로 추출된 옷나무 시료의 생리활성성분 함량을 분석하였음.	100%
	임상계획서 작성	옷나무 추출물의 갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구로 최종 결정하여 임상 계획서 최종본을 완성하였다.	100%
	연구 기관 선정	1차년도에 카톨릭대학교 부천성모병원으로 임상연구 기관을 선정하였으나, 기관 자체의 내부문제(건강기능식품의 임상시험 불허)로 인하여 분당서울대학교병원으로 변경하였다.	100%
	IRB 등록 및 승인	분당서울대학교병원으로 임상계획서 및 관련 서류들을 제출하여 등록 및 최종승인을 득하였다.	100%

구분	목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
2차년도	IRB 등록 및 승인	분당서울대학교병원으로 임상계획서 및 관련 서류들을 제출하여 등록 및 최종승인을 득하였다.	100%
	피험자 모집 및 임상시험 진행	남성의 경우 남성갱년기 증상 설문(Aging Male Symptoms)의 점수가 27점 이상으로 갱년기 증상을 호소하고, 총 콜레스테롤 농도가 180~299mg/dL이고 약물을 복용하지 않는 만 40세 이상의 남성을 선정하였으며, 여성의 경우 폐경이 확인되고, 여성갱년기 증상 지수 설문(Kupperman Index)의 점수가 15점 이상으로 갱년기 증상을 호소하고, 총 콜레스테롤 농도가 180~299mg/dL이고 약물을 복용하지 않는 만 45세 이상의 여성을 선정하여 임상시험에 참여시켰다. 2012년 8월 현재 216명 등재 예정에 169명이 등재되어 78%이상의 진행을 보이고 있다.	100%
3차년도	옷나무 추출물의 안정성 평가	옷나무 추출물의 장기 안정성 평가 결과 지표성분인 Fustin의 변화량이 2년동안 80-120%내로 유통기한은 2년이상으로 판단됨.	100%
	옷나무 추출물 기능성물질의 장·단기제품 적용성 평가 및 내열성/내산성/내알칼리성 평가	우유류, 유가공품류, 주스류, 알콜첨가제품류에서 옷나무 추출물 및 6종 기능성물질이 반응성이 없었음(80-120% 내 적합) 옷나무 기능성 소재 제품화 및 소비자 요구성 충족 완료. 옷나무 추출물과 지표성분인 Fustin의 내산성/내알칼리성 평가 결과 pH 8.3 이상에서 옷나무추출분말 및 Fustin의 변질 확인하였고, pH 0.2~6.05에서는 변화가 없어 내산성만 있는 것으로 확인. 내열성(92℃)도 보류 확인(기준 : 검출효율 80~120%).	100%
	옷나무의 생리활성성분의 분리 정제 및 구조 분석	옷나무의 추출물을 극성에 따라 분획하고 각각의 분획을 분석하여 그 결과에 따라 silica gel을 포함한 여러 가지 column을 사용하여 분리를 시도하고 NMR, LC/MS, UV, IR과 같은 최신 분석 기기를 사용하여 구조 동정.	100%
	옷나무의 생리활성성분에 대한 HPLC를 이용한 정량법 개발 및 검증, 모니터링	옷나무의 주요 성분에 대한 동시분석법을 개발하고 식약청의 가이드라인에 따라 검증을 실시하고 다양한 조건 하에 추출된 옷나무 추출물에 대한 함량 모니터링을 실시함.	100%

구분	목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
3차년도	갱년기 증상 및 혈청 지질 개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구	<p>남성의 경우 남성갱년기 증상 설문(AMS) 총점수의 경우 MU-3 500군(평균 12.36점 감소, $p < 0.001$)에서 갱년기 증상 정도가 중간정도(moderate)에서 증상 없음(No)으로까지 개선되는 효과를 보였음.</p> <p>Total Testosterone(평균 0.78ng/mL 증가), Free Testosterone(평균 1.81pg/mL 증가), C-Telopeptide(평균 0.07ng/mL 감소), Osteocalcin(평균 1.34ng/mL 감소), COMP(180.88ng/mL 감소), 국제 발기기능 지수 설문(IIEF) 총점수(평균 12.31점 증가) 모두 MU-3 500군에서 유의하게 개선되는 효과가 높았음.</p> <p>여성의 경우 여성갱년기 증상 지수 설문(KI) 총점수의 경우 MU-3 500군(평균 14.74점 감소, $p < 0.001$)에서 갱년기 증상 정도가 중증에서 준정상 상태까지 개선효과가 있는 것으로 확인되었음.</p> <p>FSH(평균 6.27mIU/mL 감소), Osteocalcin(평균 3.07ng/mL 감소), COMP(평균 165.10ng/mL 감소) 모두 MU-3 500군에서 유의하게 개선되는 효과가 높았음.</p> <p>혈청 지질개선 효과에 대한 유효성 평가를 실시한 결과, Total cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride, Apolipoprotein-A1, hs CRP, 동맥경화지수 모두 MU-3 500군에서 유의하게 개선되는 효과가 높은 것으로 평가되었음.</p>	100%

나. 옷나무의 갱년기 장애 개선 관련 효능 검증[제2핵심과제]

구분	목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
1차년도	옷나무추출물의 <i>in vitro</i> (항)안드로겐 작용 연구	<p>다양한 방법으로 추출한 옷나무추출물의 <i>in vitro</i> transcription assay를 이용한 활성 평가를 통해 가장 적합한 추출법 RV10%를 선정하였음</p> <p>RV10%의 세포독성은 저농도에서는 나타나지 않았으나 200ug/ml에서 급격히 나타나 약 50%내외의 생존율을 나타내었음</p> <p>RV10% 자체는 안드로겐작용을 나타내지 않았으나 1nM DHT와 동시처리하였을 때 DHT의 안드로겐 작용을 크게 증가시켰으며, 이는 항안드로겐 약물인 bicalutamide에 의하여 완전히 저해되었음.</p>	100%

구분	목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
1차년도	오틀나무추출물의 in vivo (항)안드로겐 작용 연구	이러한 RV10%의 작용은 RV10%가 저농도에서는 안드로겐이 안드로겐 수용체에 결합하는 것을 촉진하여 안드로겐 작용을 크게 증가시키는 것으로 나타났음. RV10%는 저농도에서는 안드로겐 관련 PSA나 KLK2 유전자 발현을 증가시켰으나 고농도에서는 발현을 크게 저해하였으며, DHT와 동시처리하였을 때도 같은 결과를 나타내었음 오틀나무추출물은 저농도에서는 DHT에 의한 안드로겐 수용체의 핵내로 이동을 촉진하나 고농도에서는 저해하였음. 이상의 in vitro 결과를 종합하면 오틀나무추출물은 저농도에서는 agonist로 고농도에서는 항안드로겐 작용을 나타내는 것으로 사료됨 In vivo 안드로겐 작용을 관찰하기 위하여 Hershberger assay 2회를 반복시험 하였으며, 오틀나무추출물에 의하여 특이한 독성이 나타나지 않았으며, 체중 변화나 안드로겐 관련 장기 무게의 변화가 관찰되지 않았음. 혈액 내 안드로겐 작용 역시 유의적 변화가 없었음.	100
	여성호르몬양 작용 및 기전연구	MCF7/ERE 유방암 세포에 오틀나무추출물은 세포독성을 나타내지 않았으며 오히려 세포증식이 증가되었음. RV10은 in vitro estrogenic activity를 갖고 있음.	100
	in vitro에서 모발관련 세포활성 평가	HHDPC, HaCaT세포 이용한 cell proliferation 증가 확인	100
	in vitro에서 연골세포 활성 평가	연골세포 배양후 cell viability 확인 proteoglycan의 양 측정	100
	in vitro에서 골 형성능 확인	MC3T3-E1 cell 이용하여 샘플의 골 형성능 실험 -Alizarin Red S 염색	100
	오틀나무추출물의 혈장 응고능 억제 효과 및 항혈소판 효능	오틀나무추출물 및 분획, 14종의 항응고능 및 혈소판 응집 억제능을 평가함.을 평가함.	100
	혈관 장력 조절에 미치는 오틀나무추출물의 효과	오틀나무 열수 추출물이 혈관 장력에 미치는 영향을 시험함.	100
	고지혈증 마우스 모델 제작	고지질 식이를 통해 고지혈증 마우스 모델 제작	100
	오틀나무 추출물의 혈중 콜레스테롤 개선 효과 분석	혈액 생화학 분석을 통한 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지질 분석	100
	약물 독성 검사를 위한 GOT, GPT, Albumin 분석	GOT, GPT 및 Albumin의 혈중 농도 분석을 통한 독성 검사	100
	H&E 및 oil red O염색을 통한 지방간 개선 효과 분석	H&E 및 oil red O 염색을 통한 지방간 분석	100

구분	목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
2차년도	Androgen signal 관련 경로 저해제를 이용한 관련 옷나무 추출물의 작용 경로 도출	22RV1/MMTV-Hyg 세포에 옷나무추출물을 단독으로 또는 DHT와 동시에 24시간 처리한 후 luciferase 활성 변화 측정. AR 저해제인 bicalutamide, Hsp90 저해제인 zeldanamycin을 처리한 후 luciferase 활성 변화 측정.	100
	옷나무 추출물에 의한 In vitro estrogenic activity 관찰	MCF/ERE 세포에서 옷나무 추출물 및 분리물질들에 대하여 옷나무 추출물과 분리물질 8종에 대하여 luciferase 활성 및 유전자 발현 관찰. 아울러 gene 발현을 luciferase 발현과 비교	100
	Uterotrophic assay에 의한 옷나무 추출물의 in vivo estrogenic action 관찰(OECD 공인 (항)에 스트로젠시험법)	7중령 female rat을 구입하여 1주일간 적응시킨 후 ether 마취하에 난소를 적출함. 2주간 회복시킨 후 20, 100, 500mg/kg 옷나무추출물(경구투여)이나 2 ug/kg ethinylestradiol(EE, 경피주사)를 각각 단독 투여하거나 EE와 500mg/kg 옷나무추출물을 동시에 3일간 투여한 후 에스트로젠관련 장기들을 적출하여 무게를 측정함.	100
	Aromatase assay를 통한 옷나무의 남성 hr 합성에 미치는 영향 및 기전 관찰	CYP19 supersome을 효소원으로하여 androstenedione이 estrone으로 전환되는 것을 LC/MS/MS로 측정함	100
	마우스 모델에서의 옷나무 추출물의 모발성장 및 탈모방지 효과 확인	C57BL/6 마우스 모델을 사용하여 모발성장 및 탈모방지 효과를 확인함	100
	마우스 모델에서의 옷나무 추출물의 모발성장 및 탈모방지 기전 확인	마우스 조직에서의 모발성장 관련 인자의 발현을 확인함	100
	골관절염 유발 동물 모델을 이용하여 샘플 효과 확인	동물에서 골관절염 유발 후 샘플 투여 효과확인 : Treadmill, Micro-CT, H&E, Real-Time PCR	100
	옷나무 추출물의 혈장 응고능 및 혈소판 응집 억제능 검색	새로이 동정된 옷나무 추출 분획, 7종의 혈장응고능과 혈소판 응집능 억제 효과를 평가함.	100
	옷나무 추출물 항혈소판 효능의 in vivo 연구	Arterial thrombosis 동물모델을 활용하여 옷나무 추출물의 혈행개선 효능을 시험함.	100
	옷나무 추출물의 혈관 수축억제 효능 평가	Physiometer를 이용하여 옷나무 추출물의 혈관 수축 억제능을 평가함.	100
	옷나무 추출물의 혈관 수축억제효능 기전 연구	평활근 세포 수축의 주요 기전으로서 칼슘 신호에 미치는 옷나무 추출물의 영향을 시험함.	100
	고지혈증 마우스 모델 제작	고지질 식이를 통해 고지혈증 마우스 모델 제작	100

구분	목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
2차년도	옻나무 추출물의 혈중 콜레스테롤 개선 효과 분석	혈액 생화학 분석을 통한 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지질 분석	100
	약물 독성 검사를 위한 GOT, GPT, Albumin 분석	GOT, GPT 및 Albumin의 혈중 농도 분석을 통한 독성 검사	100
	H&E 염색을 통한 지방간 개선 효과 분석	H&E 염색을 통한 지방간 분석	100
	옻나무 추출물의 고지혈증 개선 작용 기전 분석	Real-time PCR을 통해 마우스 간 및 장에서 지질대사 관련 유전자 변화 분석	100
	옻나무추출물과 약물과의 상호작용 연구	옻나무추출물에 의한 약물대사효소 (CYP450) 의 대사 활성 억제 작용 평가	100
	옻나무추출물의 DPPH 소거능 검증	옻나무 추출물의 농도별 DPPH 소거능 측정완료 옻나무를 구성하고 있는 flavonoid들 (fisetin, fustin, sulfuretin, butein)의 DPPH 소거능 측정완료	100
	옻나무추출물의 철 환원 능력 검증	옻나무 추출물의 농도별 철환원능력 측정완료 옻나무를 구성하고 있는 flavonoid들 (fisetin, fustin, sulfuretin, butein)의 철환원능력 측정완료	100
	산화스트레스 유발시 옻나무추출물의 간 손상 보호능력 검증	serum GOT, GPT 측정완료 H&E staining 염색 완료, 현재 scoring 중에 있음	100
	산화스트레스 유발시 옻나무추출물의 지질과산화 및 DNA 손상 보호능력 검증	serum MDA 측정 완료 liver MDA 측정 완료 현재 8OHdG 측정을 위해 간 조직에서 DNA 추출 중에 있음	100
	산화스트레스 유발시 GSH 기전에서 옻나무추출물의 보호능력 검증 및 기전 규명	GSH, GSSG 정량 완료 glutathione peroxidase 효소 활성 측정 완료 glutathione reductase 효소 활성 측정 완료 현재 gamma glutamyl cysteine synthetase 측정을 위한 간 조직 전처리 완료	100
옻나무 분리물질에 대한 여성 및 남성 호르몬양 작용	Estrogen receptor의 isoform에 대한 옻나무 추출물질 및 분리물질에 대한 reporter gene assay 및 receptor binding assay를 실시하여 ERβ에 대한 affinity가 큰 것을 밝혔다.	100	
연골조직의collagen type I과 II의 형성확인	옻나무 추출물 및 지표성분의 농도는 모두 80μM으로 하여 유전자발현 실험을 진행하였으며, 그 결과 9가지 지표성분 모두에서 농도증가에 따라 유의적으로 collagen 발현이 증가한 것을 관찰하였음.	100	

구분	목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
3차년도	Aggrecan 유전자의 발현을 측정	Taxifolin, Fisetin, 그리고 Fustin을 처리한 연골세포에서 유의적으로 발현이 증가한 것으로 나타나 관절의 염증에 효과가 있을 것으로 생각됨.	100
	MMP-3와 MMP-7 발현 측정	H ₂ O ₂ 의 처리는 MMP-3와 MMP-7의 발현을 정상세포군에 비해 70%까지 증가시켰고, 이에 비해 9가지 옷나무 추출물 지표성분을 처리한 세포에서 유의적으로 MMP-3와 MMP-7의 발현이 감소함.	100
	TIMP-1의 유전자 발현을 측정	9가지 옷나무 추출물 지표성분을 처리한 모든 세포에서 유의적으로 TIMP-1의 발현이 증가하는 것으로 나타남.	100
	옷나무 추출물 및 유효성분의 in vivo 혈행 개선능 평가	Arterial thrombosis 동물모델을 활용하여 옷나무 추출물과 fisetin의 혈전생성 억제능을 평가함	100
	옷나무 추출물 및 유효성분의 고혈압 개선 효능 평가	SHR에서 옷나무 추출물 및 fisetin의 혈압 강화 효능을 시험함	100
	옷나무 추출물의 고지혈증 개선 작용 기전 분석	Real-time PCR을 통해 마우스 간 및 장에서 지질대사 관련 유전자 변화 분석	100
	옷나무 추출물의 간 내 콜레스테롤 개선 효과 분석	간 내 콜레스테롤과 담즙 산 생성 분석	100
	옷나무 추출물의 담즙산 생합성 촉진 작용 기전 분석	Promoter luciferase assay를 통해 간세포주에서 담즙산 생합성 관련 유전자의 활성화 분석	100
	옷나무 추출물의 단일분리물질 효과 검증	Promoter luciferase assay를 통해 간세포주에서 담즙산 생합성 관련 유전자의 활성화 분석	100
	옷나무추출물의 지표성분에 대한 생체동력학 특성 규명	생체 시료 중 옷나무 지표성분의 분석법 확립 옷나무 경구 투여 후 지표성분의 혈중농도 프로파일 및 생체동력학 특성 규명	100
	murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell에 LPS로 염증성 스트레스를 유도한 후 옷나무추출물 및 지표성분 처리에 의한 영향을 관찰	Murine macrophage cell line에서 LPS에 의해 유도되는 nitric oxide와 ROS가 고농도로 처리한 옷나무와 fustin에서 감소하는 것으로 나타났음	100
	Wistar rat에 LPS로 염증성 스트레스를 유도한 후 옷나무추출물 및 지표성분 처리에 의한 영향을 관찰	고용량의 옷나무추출물을 투여한 쥐에게서 LPS군과 비교했을 때 cytokine과 NO의 생성량이 줄어드는 것을 알 수 있었	100

다. 옷나무의 생식독성연구[제3핵심과제]

구분	목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
1차년도	발생독성시험(랫드) NOAEL 산출	GLP 독성보고서 완료	100
2차년도	발생독성시험(토끼) NOAEL 산출	GLP 독성보고서 완료 예정	100
	2세대 번식발생독성시험(랫드) NOAEL 산출	GLP 독성보고서 완료 예정	100
3차년도	수컷 생식기 노화 및 개선 효과 연구	시험물질의 개선 효과는 없는 것으로 확인	100

3. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

가. 1차년도

평가의 착안점	자 체 평 가
[제1핵심과제] 옷나무를 이용한 건강기능식품 개발	
우루시올 제거기술 및 대량생산 공정개발	○ 공인기관에서 옷나무추출물의 우루시올의 유무를 2회 이상 확인하였으나 모두 불검출로 나왔으며, 수율이 가장 좋은 공정으로 원료의 대량생산을 수행함.
생리활성성분의 분리 정제 및 구조 분석을 통해 옷나무의 지표성분인 Fustin 외에 여러 단일 물질 분리	○ 지표성분인 Fustin을 포함한 7종의 단일 물질들을 분리하였고 그 외의 물질들에 대한 분리가 진행 중에 있음
생리활성성분을 이용한 최적의 분석법 개발 및 검증	○ 옷나무의 지표성분인 Fustin을 이용하여 안정적인 최적의 분석법을 개발하였고 이를 ICH 및 Guideline에 따라서 검증이 진행 중
갱년기 장애의 개선 효능과 안전성 평가 및 용량 결정을 위한 임상연구	○ 연구 기관 선정, 임상계획서 작성, 피험자 모집, IRB 등록 및 승인 등을 수행하였음
[제2핵심과제] 옷나무의 갱년기 장애 개선 관련 효능 검증	
옷나무추출물의 in vitro, in vivo 안드로겐 작용 및 기전연구	○ 옷나무추출물은 in vitro 연구에서 저농도에서 안드로겐 작용을 증강시키는 작용을 나타내었으나 고농도에서는 항안드로겐 작용을 나타내었으며, 이는 옷나무추출물이 안드로겐 수용체에 작용하는 것에 기인함. ○ 이러한 작용은 in vivo에서 관찰할 수 없었으나, 이는 옷나무추출물의 용량 조절 등 좀 더 다양한 실험 및 다른 실험모델을 이용할 필요가 있음.
여성호르몬양 작용 및 기전연구	○ 옷나무추출물의 주성분은 flavonoid로 이들이 phytoestrogen 작용을 나타내어 에스트로겐 작용을 나타냄

평가의 착안점	자 체 평 가
HHDPC, HaCaT세포 이용한 cell proliferation 증가 확인	○ 연구수행 완료 - 효과가 나타난 것으로 확인됨
연골세포 배양후 cell viability 확인 proteoglycan의 양 측정	○ 연구수행 - 완료효과가 나타난 것으로 확인됨
MC3T3-E1 cell 이용하여 샘플의 골 형성능 실험 -Alizarin Red S 염색	○ 연구수행 완료 - 효과가 나타난 것으로 확인됨
옻나무추출물을 이용한 혈장 응고능 평가시험	○ 합리적인 방법으로 정확한 시험을 수행하였으나, 항응고능이 나타내는 분획을 발굴하지 못함.
옻나무추출물의 항혈소판 효능 평가 수행 여부	○ 추출물의 항혈소판 효능을 확인하였으며, 분획 추적을 통하여 그 효능을 나타내는 물질이 fisetin임을 동정함. 차년도 연구를 통해 옻나무 추출물의 혈행개선 효과를 확인하고 작용기전을 규명하고자 함.
혈관 수축, 이완에 미치는 옻나무추출물의 효능 시험	○ 옻나무추출물의 수축 억제 효과를 확인하였으므로, 추후의 연구를 통해 구체적인 효능을 나타내는 분획 및 단일 물질과 기전을 규명하고자 함.
옻나무 추출물이 고지혈증을 유발시킨 마우스 모델에서 혈중 콜레스테롤의 감소 효과	○ 고지방식이(western diet; 20% 지방+0.15% 콜레스테롤)와 더불어 옻나무 추출물을 0.1g/kg의 저농도 또는 1g/kg의 고농도로 섭취시킨 경우 대조군(western diet+vehicle)에 비해 1g/kg 농도로 섭취시킨 그룹에서 통계적으로 유의적인 감소 효과를 확인할 수 있었고 0.1g/kg 농도로 섭취시킨 그룹에서도 유의적이진 않지만 감소하는 경향성을 확인한 것으로 보아 옻나무 추출물은 고지방 식이에 의해 증가되는 혈중 콜레스테롤을 효과적으로 감소시키는 효능을 가지고 있음을 증명함
옻나무 추출물의 고지방 식이에 의해 유발되는 지방간 형성에 대한 개선 효과	○ 옻나무 추출물의 지방간 개선 효과를 분석하기 위하여 1 group (일반식이+vehicle), 2 group (western diet+vehicle), 3 group (western diet+0.1g/kg 농도의 옻나무 추출물)과 4 group (western diet+1g/kg 농도의 옻나무 추출물)으로 나누어 2주간 diet 후 각 그룹의 마우스 간을 획득하여 각각 파라핀 블록과 동결블록을 제작하여 절편을 획득하고 H&E 염색과 oil red O 염색을 실시하여 지방간 형성에 대한 수치를 평가한 결과 3 group 및 4 group 모두 2 group에 비해 통계적으로 유의적인 개선 효과를 나타냈고 옻나무 추출물의 농도 증가에 따라 지방간 개선 효과도 증가되는 것을 증명함
[제3핵심과제] 옻나무의 생식독성연구	
GLP 독성보고서 1건 완료	○ 목표 달성함

나. 2차년도

[제1핵심과제] 옷나무를 이용한 건강기능식품 개발

평가의 착안점	자 체 평 가
옷나무추출물의 추출조건 확립 및 표준물질 대량생산을 위한 분리법 확인	인체적용시험을 위한 옷나무추출물 생산 옷나무의 추출물을 극성에 따라 분획하여 성분을 모니터 함. prep-LC를 사용하여 옷나무추출물을 분획한 후 표준물질인 Fustin 확인.
생리활성성분의 분리 정제 및 구조 분석을 통해 옷나무의 지표성분인 Fustin 외에 여러 단일 물질 분리	지표성분인 Fustin을 포함한 19종의 단일 물질들을 분리하였고 그 외의 물질들에 대한 분리가 진행 중 옷나무의 지표성분인 Fustin을 이용하여 안정적인
생리활성성분을 이용한 최적의 분석법 개발 및 확립	최적의 분석법을 개발하였고 이를 ICH 및 Guideline에 따라서 분석법 확립을 완료
옷나무의 모니터링 분석	다양한 방법으로 추출된 옷나무의 시료의 생리활성 성분 함량을 분석하고 모니터링 분석을 완료
임상계획서 작성	의약품 임상시험에 준하는 임상계획서 작성
연구 기관 선정	국내 최고 권위의 대학병원을 선정
IRB 등록 및 승인	특이한 지적사항없이 본 임상시험기관에서 IRB 승인을 득함
피험자 모집 및 임상시험 진행	2차년도 예상 피험자 등재(약 70%)를 웃도는 78%의 진행률을 보이고 있으며 2차년도 종료시까지 최소 80%이상을 달성할 것으로 기대하고 있음

[제2핵심과제] 옷나무의 갱년기 장애 개선 관련 효능 검증

평가의 착안점	자 체 평 가
옷나무 추출물의 남성 및 여성 호르몬 관련 약리효능 기전연구	Uterotrophic assay에 의한 옷나무 추출물의 <i>in vivo</i> estrogenic action 관찰함. Androgen signal 관련 경로 저해제를 이용한 관련 옷나무 추출물의 작용 경로 도출함. Aromatase assay를 통한 옷나무의 남성 hr 합성에 미치는 영향 및 기전 관찰함.
동물에서 골관절염 유발 후 샘플 투여 효과확인 : Treadmill (생존상태에서 확인)	연구수행 완료 - 효과가 나타난 것으로 확인됨
동물에서 골관절염 유발 후 샘플 투여 효과확인 : Micro-CT, H&E (희생후 확인)	연구수행 완료 - 효과가 나타난 것으로 확인됨
동물에서 골관절염 유발 후 샘플 투여 효과확인 : Real-Time PCR (희생후 확인)	연구수행 완료 - 효과가 나타난 것으로 확인됨
마우스 모델에서의 옷나무 추출물의 모발성장 및 탈모방지 효과 확인	C57BL/6 마우스 모델을 사용하여 모발성장 및 탈모방지 효과를 확인함
마우스 모델에서의 옷나무 추출물의 모발성장 및 탈모방지 기전 확인	마우스 조직에서의 모발성장 관련 인자의 발현을 확인함

평가의 착안점	자 체 평 가
새로이 분리된 옷나무 분획의 항응고능 및 혈소판 응집 억제능 검색 여부	검색 시험 결과, 혈소판 응집 억제 효능을 나타내는 새로운 성분 2종의 확인함. 그러나 효능이 지속적이지 않고, 전혈에서 무효하므로 향후 연구의 지속 여부에 대해 객관적인 판단이 요구됨.
동맥 혈전 동물모델을 이용한 혈행 개선능 평가	옷나무 추출물을 투여한 동물의 혈행 개선능을 시험하였으나 긍정적인 결과를 얻지 못함. 투여 스케줄과 용량, 분획의 사용 등에 대한 논의가 필요함.
Physiometer를 이용한 혈관 장력 측정 실험 진행 여부	옷나무 추출물이 혈관 수축을 억제한다는 근거를 확보하였으며, 차년도 연구를 통해 이의 in vivo 유효성 평가가 필요함.
Ratiometric imaging을 통한 평활근 세포내 칼슘 신호 측정 실험 수행	옷나무 추출물이 혈관 평활근 세포의 칼슘 신호를 억제할 수 있음을 확인함. 차년도 연구를 통해 보다 명확한 표적 분자를 규명할 예정임.
옷나무 추출물이 고지혈증을 유발시킨 마우스 모델에서 혈중 콜레스테롤의 감소 효과	고지방식이(western diet; 20% 지질+0.15% 콜레스테롤)와 더불어 옷나무 추출물을 0.1g/kg의 저농도 또는 1g/kg의 고농도로 섭취시킨 경우 대조군(western diet+vehicle)에 비해 1g/kg 농도로 섭취시킨 그룹에서 통계적으로 유의적인 감소 효과를 확인할 수 있었고 일반식이를 실시한 마우스에서도 1g/kg 농도로 섭취시킨 그룹에서도 유의적이진 않지만 감소하는 경향성을 확인한 것으로 보아 옷나무 추출물은 고지방 식이에 의해 증가되는 혈중 콜레스테롤을 효과적으로 감소시키는 효능을 가지고 있음을 증명함
옷나무 추출물의 고지혈증 개선 작용 기전 분석	콜레스테롤 합성 및 대사를 조절하는 transcription factors의 발현을 조사하기 위해 SREBP1과 2, PPAR, HNF4alpha, LXR과 같은 유전자 10종, 콜레스테롤 수송 및 수용체 관련 유전자 13종 (ABCA1, LDLR, ApoA1 등), 콜레스테롤 배출을 위한 담즙 생합성 관련 유전자 4종 (CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1, CYP8B1)을 분석한 결과 C57BL/6 마우스 간 조직에서 CYP7A1, CYP8B1 유전자 발현이 옷나무 추출물 (1g/kg) group에서 유의적으로 증가하였고 ApoE KO에서는 CYP27A1 유전자가 유의적으로 증가하는 것을 확인함으로써 옷나무 추출물의 고지혈증 개선 작용 기전은 콜레스테롤이 담즙으로 생합성되는 것을 촉진함으로써 나타나는 것을 증명함

평가의 착안점	자 체 평 가
옷나무추출물에 의한 약물대사효소 (CYP450)의 억제 작용 평가 여부	7종의 CYP 효소에 대한 옷나무추출물의 억제 작용 평가를 완료함.
옷나무추출물의 DPPH radical 소거능 정도	농도 의존적으로 소거능이 증가하였으며, Effective Dose가 24.1ug/ml로 적은 양으로 큰 효과를 나타내는 것으로 보임.
옷나무추출물의 철 환원 능력 정도	농도 의존적으로 철 환원 정도가 증가하였음.
옷나무추출물이 t-BHP 대조군 대비 GOT, GPT activity를 감소시킨 정도	GOT에서는 감소시킨 효과가 없었고, GPT에서는 통계적으로 유의적인 차이는 나지 않지만 저용량군과 fustin군에서 감소하는 경향성을 보임.
옷나무추출물이 t-BHP 대조군 대비 지질과산화물 생성량을 감소시킨 정도	serum MDA, liver MDA 모두 통계적으로 유의적인 차이는 나지 않지만 저용량군과 fustin군에서 감소하는 경향성을 보임.
옷나무추출물이 t-BHP 대조군 대비 GSH 생성을 증가시킨 정도	간 조직 GSH 정량 결과 저용량군과 fustin 군에서 유의적으로 증가하였음을 확인 할 수 있음.
옷나무추출물이 t-BHP 대조군 대비 GSSG 생성을 감소시킨 정도	간 조직 GSSG 정량 결과 통계적으로 유의적인 차이는 나지 않음

[제3핵심과제] 옷나무의 생식독성연구

평가의 착안점	자 체 평 가
GLP 독성보고서 2건 완료	목표 달성함

다. 3차년도

[제1핵심과제] 옷나무를 이용한 건강기능식품 개발

평가의 착안점	자 체 평 가
옷나무 추출물의 안정성 평가	옷나무 추출물의 장기 안정성 평가 결과 지표성분인 Fustin의 변화량이 2년동안 80-120%내로 유통기한은 2년이상으로 판단됨.
옷나무 추출물 및 지표성분의 제품적용성 및 내산성, 내알칼리성, 내열성 평가	우유류, 유가공품류, 주스류, 알콜첨가제품류에서 옷나무 추출물 및 6종 기능성물질이 반응성이 없었음(80-120% 내 적합) 옷나무 기능성 소재 제품화 및 소비자 요구성 충족 완료. 옷나무 추출물과 지표성분인 Fustin의 내산성/내알칼리성 평가 결과 pH 8.3 이상에서 옷나무추출분말 및 Fustin의 변질 확인하였고, pH 0.2~6.05에서는 변화가 없어 내산성만 있는 것으로 확인. 내열성(92℃)도 보유 확인(기준 : 검출효율 80~120%).

평가의 착안점	자 체 평 가
옷나무의 생리활성성분의 분리 정제 및 구조 분석	여러 컬럼 크로마토그래피를 이용해 총 24개의 단일 물질을 분리하고 구조 동정 완료함.
옷나무의 생리활성성분에 대한 HPLC를 이용한 정량법 개발 및 검증, 모니터링	옷나무의 주요 성분인 fustin에 대한 동시분석법을 개발하고 식약청의 가이드라인에 따라 검증을 완료함. 또한, 다양한 처리를 거친 옷나무 추출물에 대한 fustin 함량 모니터링을 실시함.
갱년기 증상 및 혈청 지질개선 효과를 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조, 용량결정 임상연구	남성의 경우 남성갱년기 개선 효과가 MU-3 500군에서 보였으며, 남성호르몬 증가, 2차평가지수인 C-Telopeptide, Osteocalcin, COMP, 국제 발기능지수 설문(IEEF) 모두 MU-3 500군에서 유의하게 개선되는 효과가 있었음. 여성의 경우 여성갱년기 증상 정도가 중증에서 준정상 상태까지 개선효과가 있는 것으로 확인되었음. FSH, Osteocalcin, COMP 모두 유의하게 개선되는 효과가 높았음. 혈청 지질개선 효과에 대한 유효성 평가를 실시한 결과, Total cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride, Apolipoprotein-A1, hs CRP, 동맥경화지수 모두 유의하게 개선되는 효과가 높은 것으로 평가되었음.

[제2핵심과제] 옷나무의 갱년기 장애 개선 관련 효능 검증

평가의 착안점	자 체 평 가
옷나무 추출물의 남성 및 여성 호르몬 관련 약리효능 기전연구	옷나무 분리물질에 대한 여성 및 남성 호르몬양 작용 estrogen receptor의 isoform에 대한 옷나무 추출물질 및 분리물질에 대한 reporter gene assay 및 receptor binding assay를 실시하여 ERβ에 대한 affinity가 큰 것을 밝혔다.
옷나무 추출물에서 검색된 효능물질에 대한 골관절염 in vitro 모델에서의 효능 검증	연구수행 완료 - 효과가 나타난 것으로 확인됨
골관절염 기능 개선 효능을 갖는 시료의 최적용량 결정 및 기전탐색을 통한 제품 소재 개발	연구수행 완료 - 효과가 나타난 것으로 확인됨
골다공증과 관련된 Bio Maker들을 이용한 in vitro 효능 검증동물에서 골관절염 유발 후 샘플 투여 효과확인	연구수행 완료 - 효과가 나타난 것으로 확인됨
whole blood를 이용한 항응집능 평가 및 arterial thrombosis 모델을 이용한 동물시험 수행 여부	Arterial thrombosis 동물모델을 활용하여 옷나무 추출물과 fisetin의 혈전생성 억제능을 확인함
spontaneously hypertensive rat을 이용한 혈압 측정 실험 수행 여부	SHR에서 옷나무 추출물 및 fisetin의 혈압 강화 효능을 확인함

평가의 착안점	자 체 평 가
Real-time PCR을 통해 마우스 간 및 장에서 지질대사 관련 유전자 변화 분석	옻나무 추출물을 함께 식이한 군의 간 조직에서 콜레스테롤 합성 및 대사를 조절하는 전사인자인 LXRα과 콜레스테롤 배출을 위한 담즙 산 생합성 관련 유전자인 CYP7A1, CYP8B1 유전자 발현이 유의적으로 증가
간 내 콜레스테롤과 담즙 산 생성 분석	간 내 합성된 담즙 산의 정도가 고지질 식이를 실시한 군에 비해 고지질 식이와 옻나무 추출물을 함께 식이 한 군에서 통계적으로 유의하게 증가됨을 확인함
Promoter luciferase assay를 통해 간세포주에서 담즙 산 생합성 관련 유전자의 활성화 분석	옻나무 추출물을 처리한 AML-12 간세포에서 통계적으로 유의하게 Cyp7a1 프로모터 활성이 증가되어 있음을 확인함
생체 시료 내의 옻나무추출물 지표성분의 LC/MS/MS 분석법 확립 여부	옻나무추출물의 9가지 지표성분에 대한 LC/MS/MS 분석법 확립함.
옻나무추출물의 경구 투여 후, 지표성분의 혈중농도 프로파일 완성 및 생체동력학 특성 규명 여부	경구 투여 후의 옻나무추출물 지표성분의 혈중농도 프로파일 완성 및 생체동력학 특성 규명함.
옻나무추출물의 NO생성량 억제	LPS군과 sample간의 비교에서도 sample고농도에 NO의 생성량이 유의적으로 감소한 것을 알 수 있었음.
옻나무추출물의 ROS생성량 억제	옻나무, Fustin sample을 농도별로 처리한 결과 고농도로 갈수록 ROS의 양이 줄어드는 것을 관찰 할 수 있었음
산화스트레스 유발시 옻나무추출물의 간 손상 보호 능력, 지질과산화 및 catalase생성 억제, cytokine기전에서 보호능력 검증	IL-1β, IL-6, TNF-α 모두 LPS군과 sample군을 비교해 smaple의 농도에 따라 유의적으로 감소했음을 알 수 있었음.

[제3핵심과제] 옻나무의 생식독성연구

평가의 착안점	자 체 평 가
수컷 생식능력 개선효과	수컷동물의 수태능력 및 호르몬 검사를 실시한 결과 시험물질 투여에 기인한 수컷동물의 생식능력 개선효과는 관찰되지 않았음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과

가. 연도별 목표(정량적 제시)

개발 기술	목표(수준, 성능, 품질)		
	1차년도 (2010)	2차년도 (2011)	3차년도 (2012)
1-1 옷나무 건강기능식품 개발	대량추출공정개발	유효물질 탐색	제품화 개발
1-2 옷나무추출물의 기준규격 확립	생리활성성분 분리 정제 및 구조 분석	생리 활성 성분 에 대한 HPLC 및 LC/MS를 이용한 정량법 개발	옷나무의 모니터 링 분석
1-3 옷나무추출물의 남성갱년기 개선 임상시험	남성갱년기 개선 용량임상	남성갱년기 개선 효능 임상	남성갱년기 개선 추가임상
2-1 남성 및 여성 호르몬 관련 효능	효능검정	작용기전연구	주성분 도출
2-2 옷나무 성분 중 탈모 방지 효능 물질 발굴	in vitro 효능 검증 및 유력 물질 선별	in vivo 마우스모델에서의 탈모방지효능 확인	탈모 방지 기전 연구 및 제형화 연구
2-3 옷나무 성분 중 관절염 개선 효능 물질 도출	in vitro 효능 검증 및 유력 물질 선별	in vivo 마우스모델에서의 관절염 개선 효능 확인	관절염 기전 연구 및 제형화 연구
2-4 옷나무 성분 중 혈행 개선 효능 물질의 도출	검색	기전규명	효능확인
2-5 옷나무의 고혈압 개선 유효 성분 발굴	검색	기전규명	효능확인
2-6 고지혈증 억제 효과연구	C57BL/6 마우스에서 고지질식이 시 고지혈증 억제 효과	ApoE K/O 마우스에서 고지질식이 시 고지혈증 억제 효과	
2-7 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현분석 및 세포수준에서의 분자 기전 연구	in vivo 마우스 모델에서의 콜레스테롤 대사 관련 유전자 분석	in vivo 마우스 모델에서의 콜레스테롤 대사 관련 유전자 분석	마우스 간세포 및 대식세포에서 콜레스테롤 대사 및 수송관련 분자 기전 연구
2-8 옷나무의 생체 동력학		약물상호작용 평가	지표성분의 plasma PK규명
2-9 옷나무의 항산화능 평가		옷 나무 추출물 에 대한 in vitro 및 in vivo 항산화 실험	In vitro, in vivo model을 통한 옷 나무추출물의 염증성 산화스트레스 회복 효과 검증
3-1 옷나무 생식독성 평가	NOAEL산출	NOAEL산출	NOAEL산출

나. 연차별 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명칭 등록	품종수입 생산 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	2								1	
2차년도	2						2	1	1	
3차년도	1						3			
계	5						5	1	2	

다. 연구종료 후 연구결과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	1	4		1	1	2

라. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Simultaneous determination of bioactive phenolic compounds in the stem extract of <i>Rhus verniciflua</i> Stokes by high performance liquid chromatography	김선아	유혜현	김인숙, 이동호, 동미숙, 나천수	Food Chem	141. 3813-3819		SCI
2013	Syandardized <i>Rhus verniciflua</i> Stokes extract and its major flavonoid fustin attenuate the oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide via activation of nuclear factor erythroid 2-related factor	문지은	김지연	김동민, 나천수	Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry	<i>in press</i>	국내	SCIE
2013	Inhibitory effect of <i>Rhus verniciflua</i> Stokes extract on human aromatase activity; butin is its major bioactive component	유혜현		박명현, 김인숙, 김선아, 나천수, 홍철이, 동미숙	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters		국외	SCI

계재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Antiplatelet Effect of Rhus verniciflua Stokes Heartwood and its Active Constituents Fisetin, Butein, and Sulfuretin	이무열		이준형, 김미경, 장경화, 홍철이, 나천수, 동미숙, 이동호	Journal of Medicinal Food		국외	SCI
2013	Extract of Rhus verniciflua Stokes Protects against Diet-induced Hyperlipidemia in Mice	오구택		정세진, 박종길	Phytomedicine		국외	SCI
2013	Study of Rhus verniciflua extracts on osteoarthritis in experimental model	남다운	이정민	김옥경, 나천수, 홍철이	Biological and Pharmaceutical Bulletin		국외	SCI

마. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	옷나무 추출물을 함유하는 고지혈증 및 지방간 개선 및 예방용 조성물	(주)생명의나무	대한민국	10-2011-0105585					
2011	옷나무 추출물을 함유하는 발모촉진 및 탈모예방조성물	(주)생명의나무	대한민국	10-2011-0105586					
2012	옷나무 추출물을 함유하는 퇴행성 관절염의 예방 및 치료용 조성물	(주)생명의나무	대한민국	10-2012-0004226					
2012	옷나무 추출물을 함유하는 골다공증의 예방 및 치료용 조성물	(주)생명의나무	대한민국	10-2012-0004225					
2013	옷나무 추출물 유래 플라보노이드 화합물을 유효성분으로 하는 갱년기 증후군 예방 및 치료용 약학적 조성물	(주)생명의나무	대한민국	10-2013-0055721					

바. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계

사. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

아. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
18	7	7	2	2	8	10	18		

(2) 장단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

아. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
	1		1		3	3

2. 성과활용계획

본 연구사업단에서는 본 연구 사업을 완료하고 현재 1차산업이 주를 이루고 있는 옷산업을 옷나무를 이용한 건강기능식품의 개발로 2차산업으로의 전환을 통한 고부가가치 산업으로 육

성하기 위하여 핵심과제들의 성공적인 수행을 위한 기반 조성 및 지원책을 통해 옷나무의 기능성 연구, 연구인력 양성을 도모하며, 지자체와의 유기적인 협력, 농민단체들과의 연계 등 다각적인 사업들을 진행하여 옷나무 건강기능식품 개발에 주도적인 역할을 수행한다. 이를 위하여

1. 옷나무 추출물의 기능성 원료 인정

- 남성, 여성 갱년기 증상 개선 및 콜레스테롤 개선 등 옷나무 추출물을 기능성 원료로 식약처에 인허가를 받아 건강기능식품으로 개발.
- 남성갱년기용 건강기능식품, 여성갱년기용 건강기능식품, 콜레스테롤 개선 건강기능식품, 복합제형의 건강기능식품 등 다양한 제품 개발.

2. 천연물신약 개발

- 옷나무 추출물에서 단일물질을 분리하여 갱년기개선 및 콜레스테롤 저하, 퇴행성관절염, 고혈압 등 성인병 및 노인성 질환에 관련되 천연물 신약 개발

3. 사업단 홈페이지를 활용하여 옷나무 관련 정보를 공유.

- 구축한 사업단 홈페이지를 활용하여 옷나무 관련 정보 및 연구 진행에 대한 정보들을 공유함.

4. 옷나무 재배농민, 옷나무 관련단체, 지방자치단체 등과 옷산업 관련 네트워크를 구축.

- 본 사업단은 옷나무 재배 및 공급과 관련하여 관련 재배 농민, 관련단체 및 지방자치단체 등과 유기적인 네트워크를 구축하여 워크샵/설명회를 개최함.

5. 옷나무 기능성 연구를 통한 옷나무의 부가가치를 창출.

- 본 과제는 갱년기 관련 다양한 효능 연구팀 및 독성 연구팀들로 구성되어 있어 성호르몬, 심혈관계, 콜레스테롤, 관절염, 탈모 등 다양한 옷나무의 효능을 연구하며 아울러 전임상 연구팀인 화학연구소의 안전성 센터팀이 생식독성 연구함.
- 특히 천연물 신약 개발에 적용하는 추출물의 약동력학까지 연구함으로써 효능, 안전성 및 PK까지 연구하여 본 사업단에서는 이러한 결과들을 건강기능 식품으로 개발하기 위하여 종합 구성하여 옷나무의 부가가치를 최대한으로 창출할 예정임

5. 옷나무 기능성 관련 워크샵/설명회 등을 개최 사업단의 성과 등을 홍보.

- 옷나무 연구 및 건강기능식품 관련 다양한 정보 및 동향에 대한 워크샵을 개최하여 사업단의 성과 홍보 및 동향에 대한 정보를 수집함.

6. 교육연수 프로그램, 단기 강좌 등을 개최하여 맞춤형 인재를 양성할 수 있도록 지원

7. 지속적인 성과 관리를 통하여 본 사업단을 통한 추가적인 성과를 보이도록 노력

8. 판매관련 전문기업과 MOU체결을 통한 사업화 방안 계획 수립

본 사업단에서는 위의 역할을 충실히 수행하여 옷나무 산업의 발전과 건강기능식품, 천연물 신약 등 천연물을 이용한 산업을 고부가가치 산업으로 발전시켜 이를 이용한 농촌의 신성장 동력을 만들고 고령화 사회에서의 국민건강증진 및 삶의 질 향상을 도모하려 함.

또한, 본 사업단에서는 연구기간 안에 개별인정형 건강기능식품 인허가를 획득하여 사업화할 수 있도록 최선을 다하여 운영하도록 하겠음.

본 연구사업단에서 옷나무를 이용한 건강기능식품을 개발하여 1차산업에 국한된 옷산업을 2차산업으로 발전시켜 지속적인 소득작물로의 재배가 가능함.

전통산업인 옷산업을 현재 많은 지자체에서 핵심 산업으로 육성 중에 있으며, 본 연구사업단과 유기적인 협력관계를 통해 재배면적이 많은 옷나무 재배 지자체에 새로운 활력이 될 것임.

옷나무에서 단일물질을 분리 활성 평가를 통한 기능성을 입증한다면 신약후보물질로도 개발이 가능함.

천연물을 이용한 바이오산업은 우리 농촌의 새로운 소득원으로 자리를 잡게 될 것이며, 이러한 소득원의 증가는 귀농인구의 증가로 이어져 고령화되어가고 있는 농촌 사회에서 젊은 농촌으로 변화하는데 기여할 것으로 사료됨.

3. 연구개발 기대효과

- 옷나무는 전통산업으로 옷칠액의 생산, 옷닭용 제품, 옷순 채취 등 1차생산물 또는 가공품에 국한된 1차산업 형태의 산업이 주를 이루고 있다. 이러한 1차산업은 농민들이 생산한 값어치 보다는 유통에 의한 결정이 대부분이며, 일정한 수입원이 되지 못하고 있음.
- 본 연구사업단에서 옷나무를 이용한 건강기능식품을 개발하여 1차산업에 국한된 옷산업을 2차산업으로 발전시켜 지속적인 소득작물로의 재배가 가능하며, 7~10년 까지는 옷칠액의 생산이 가능하고 건강기능식품용 원재료는 그 이후 옷나무 목부를 이용하기 때문에 농가에서는 2중의 수입이 가능하게 됨.
- 옷나무 원재료의 현지 가공 등으로 옷나무 재배라는 농업이외 2차적인 일거리를 창출할 수 있고, 옷나무에 의한 1차산업과 가공 등 2차산업의 조화를 이룰 수 있어 농산업 발전에 크게 기여할 것임.
- 전통산업인 옷산업을 현재 많은 지자체에서 핵심 산업으로 육성 중에 있으며, 본 연구사업단과 유기적인 협력관계를 통해 재배면적이 많은 옷나무 재배 지자체에 새로운 활력이 될 것으로 기대됨.
- 현재 1조 2천억원 규모의 건강기능식품 시장에 남성갱년기 개선이라는 개별인정형 건강기

농식품의 개발로 새로운 성장동력을 얻을 수 있을 것이며, 이는 세계적으로도 경쟁력 있는 산업이 될 것으로 기대됨.

- 건강기능식품의 원료는 대부분 수입에 의존하고 있어 옷나무 건강기능식품의 개발은 수입 대체효과는 물론 경쟁력 있는 수출품목이 될 것으로 기대되며, 천연물로 개발하였다 하여도 합성이나 수입원료를 사용하므로 농가에는 별 소득이 없었으나, 옷나무를 이용한 기능성원료의 경우 국내에서 재배한 옷나무를 사용하여 추출하기 때문에 국내 산업의 발전에 이바지할 것으로 기대됨.
- 옷나무 기능성에 대한 산업재산권 획득으로 기술수출이 가능함
- 기술제공 및 기술지원을 통해 건강기능식품 및 신약후보물질 개발의 기회를 확산하고 이를 통하여 남성갱년기 관련 신약개발 성공률을 높일 수 있음.
- 옷나무의 기능성 자료들이 충분히 확보될 경우 국내외 선진 제약기업들과도 전략적 제휴가 가능할 것임.
- 본 사업단의 주관 기관인 (주)생명의나무에서는 헛개나무과병추출분말을 이용하여 ‘알코올성 손상에서 간 보호’ 라는 기능성을 인정받아 건강기능식품으로 개발하여 연간 150억원 정도의 매출을 올리고 있음.
- 본 연구사업단에서 (주)생명의나무의 건강기능식품의 개발 경험을 살려 옷나무추출물을 이용 건강기능식품으로 개발한다면 현재 지속적으로 성장하고 있는 건강기능식품 시장에 새로운 성장 동력이 되어 발전할 수 있을 것이 기대됨.
- 옷나무에서 단일물질을 분리 활성 평가를 통한 기능성을 입증한다면 신약후보물질로도 개발이 가능하며, 이는 천연물을 이용한 남성호르몬을 증가시키는 최초의 연구업적이 될 것으로 기대됨.
- 천연물을 이용한 바이오산업은 우리 농촌의 새로운 소득원으로 자리를 잡게 될 것이며, 이러한 소득원의 증가는 귀농인구의 증가로 이어져 고령화되어가고 있는 농촌 사회에서 젊은 농촌으로 변화하는데 기여할 것으로 사료됨.

4. 성과 활용 방안

- 갱년기 개선과 관련한 국내 및 국제특허 출원
- 옷나무의 기능성 관련 논문발표
- 옷나무를 이용한 남성갱년기 개선 개별인정형 건강기능식품 개발 및 인허가
- 기능성식품 개발을 목표로 발생독성 및 번식시험 등의 생식독성시험을 수행함으로써 식약청 제출용

등록자료 생산

- 옷나무 재배기술 지도
- 우루시올이 없는 옷나무추출물의 대량생산기술 특허출원 및 등록
- 옷나무을 이용한 기능성 제품의 (주)생명의나무 기술실시
- 신약후보물질 개발로 인한 제약업체와의 기술제휴

5. 연구사업단 보유(활용)기술의 산업화 계획 및 기대효과

가. 산업화-제품화 계획(제품의 특징, 대상 등)

- 남성갱년기 증상으로 나타나는 발기부전(ED)과 테스테롤 증후군(TDS)은 성기능 뿐 아니라 전반적인 건강상태에도 영향을 미치며, 발기부전은 당뇨, 고혈압, 심장병 같은 심각한 기저질환의 신호 일수도 있으며 중년이상 남성의 전반적인 거강상태 악화와 관련 있는 테스토스테론 부족 증후군의 한 증상일수도 있음.
- 특히 고령인구의 급격한 증가로 실버산업의 증가율이 2010년 이후 연평균 12.9%로 같은 기간 전체 산업평균 4.7%에 비해 거의 3배에 이를 것으로 예측되고 있음.

(1) 산업화 계획

옷나무는 옷담으로 주로 사용되고, 식품첨가물로 연 8억원 정도의 매출이 이루어지고 있는 정도임. 옷칠은 원주에서 연 70관정도 생산되고 거의 중국수입에 의존하고 있음.

1단계: 우선 옷나무에서 우루시올을 제거한 추출물 제조 및 대량생산 공정을 개발. 또한 생리활성화 성분을 분리 정제하여 기준 규격을 정립

2단계: 갱년기 장애의 개선 및 콜레스테롤 개선 효능 및 안전성 평가를 위한 임상연구의 진행

3단계: 건강 기능 식품 개발

4단계: 신약 후보 물질 개발

1단계 - 3단계에서 건강 기능식품의 산업화가 완성되어 개별인정형 획득으로 용·복합형 또는 단독형 기능성 식품군으로 발전. 이때 시장 수요는 앞의 산수유와 누에그라의 연매출 300억원 규모와 발기부전치료제 1,000억원, 테스테론 시장의 600억원을 감안하면 기능성 식품으로 연 200억원을 시작으로 연매출 성장율 15% 이상이 가능할 것으로 추산됨. 4단계는 장기적 제휴 및 연구과제로 설정하여 세계적인 신약개발로 나감

(2) 대상

대한 남성 갱년기 학회 조사에 의하면 한국의 40대이상 남성은 남성호르몬 수치가 기준치

보다 낮은 경우가 15%- 20%에 이른다고 함. 실제로 70대는 30대의 1/2, 80대는 1/3 수준이 되고 있음.

이 경우 40대- 50대는 20%, 50대 -60대는 30%, 60대-70대는 50%, 70대 이상은 70%가 옷나무를 이용한 기능성 식품의 대상이됨

한국은 이미 65세 이상이 7%인 고령화 사회에 2000년에 진입했고, 14%인 고령 사회는 2018년, 20%인 초고령사회는 2026년에 진입 예정임.

(3) 제품화 계획

성공리에 진행된 개발을 통해 기능성식품은 우선 융합, 복합 제품으로 출시할 것을 검토함. 특히 옷에 대한 선입견이 강한 만큼 매우 부드러운 소프트한 제품에 융합하는 기능성제품 개발을 추진함.

1단계로 신뢰있는 중견기업 이상의 기존제품에 융복합하고, 2단계로 자체 성분 중심으로 바 전시킬것을 계획함.

특히 효용이 뛰어난 결과를 예견 했을 때 수출 수요는 매우 크리라고 예상함

제 6 장 연구시설·장비 현황

연구시설·장비명	구매금액(원)	구매일자	연구시설·장비 활용용도	설치장소	국가과학기술지식정보 시스템 등록번호
제조용 액체크로마토 그래피(Prep-LC)	85,000,000	2012.06.12	천연물 분리 정제	(주)생명의나무	NFEC-2013 -11-184126

제 7 장 참고문헌

- 이창복, 원색대한식물도감. 2006
- 대한남성갱년기학회. 남성갱년기. 군자출판사. 2009
- 농촌진흥청. 옷나무의 기능성물질 탐색 및 상품이용기술연구. 2011
- 나천수, 최범락, 추동완, 최원일, 김진범, 김현정, 정연준, 박영인, 동미숙. 옷나무 플라보노이드가 수컷 백서의 성행동에 미치는 영향. 대한약학회지, 2005, 49(6) 471-476
- 나천수, 최범락, 추동완, 최원일, 김진범, 김현정, 박영인, 동미숙. 옷나무(*Rhus verniciflua* STOKES) flavonoid 분획 투여가 정자생성 및 생식관련 장기에 미치는 영향. 한국독성학회지, 2005, 21(4) 309-318
- Park HS. 2011. Antioxidant and nitrite scavenging activities of solvent extracts from *Rhus verniciflua* Stokes. J. East Asian Soc. Dietary Life 21: 677-682.
- Jeong HJ, Kim EH, Lee KJ, Chung GY, Lim JK, Yoo JM, Shim YE, Park JH. 2001. Evaluation of the antioxidant potential and enzyme activities in species of *Rhus*. Korean J. Plant Res. 14: 220-228.
- 이상훈, 정현상, 강태수. 열풍 건조한 옷나무 열수 추출물의 항균 및 항산화 활성. 산업식품공학 17(1) 2013. 1-7
- Byun, J. H. 1995. The goals and strategy for health promotion. Korean Institute for Health and Social Affairs.
- Park, Y. H., Lee, J. S. and Lee, Y. J. 1993. Distribution of serum lipid by age and the relation of serum lipid to degree of obesity and blood pressure in Korean adults. Kor. J. Lipid. 3, 165-180.
- 김민선, 전성식, 김상현, 최정화. 울금(*Curcuma longa* L.)이 고지방·고콜레스테롤 식이 흰쥐에서의 담즙산 및 UDP-glucuronyl transferase 활성에 미치는 영향. Journal of Life Science 22(8) 2012. 1064-1070
- 이재준, 박미란, 김아라, 이명렬. 모시잎이 고지방-고콜레스테롤 식이 흰쥐의 지질대사 개선 및 항비만 효과에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 43(1). 2011. 83-90
- Ministry of Health & Welfare. Report 2008 National Health and Nutrition Examination Survey. 11-1351159-000027-10: 24-26 Korea Centers for Disease Control & Prevention, Seoul, Korea

(2008)

Janes PJ, Leith CA, Pederson RA. Meal-frequency effects on plasma hormone concentrations and cholesterol synthesis in human. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993. 57: 868-874

Awad, H. M.; Boersma, M, G.; Boeren, S.; Bladeren, P. J. V.; Vervoort, J.; Rietjens, I. M. C. M. *Chem. Res. Toxicol.* 2001, 14, 398-408.

Park, K. Y.; Jung, G. O.; Lee, K. T.; Choi, J. W.; Choi, M. Y.; Kim, G. T.; Jung, H. J.; Park, H. J. *J. Ethnopharmacol.* 2004, 90, 73-79.

Roux, D. G.; Paulus, E. *Biochem. J.* 1960, 77, 316-320.

Royer, M.; Herbette, G.; Eparvier, V.; Beauchene J.; Thibaut, B.; Stien, D. *Phytochemistry.* 2010, 71, 1708-1713..

Chokchaisiri, R.; Suaisom, C.; Sriphota, S.; Chindaduang A.; Chuprajob, T.; Suksamran. *Chem. Pharm. Bull.* 2009, 57, 428-432.

Sung, P. M.; Chang, S. K. *Food Sci. Biotechnol.* 2006, 15, 424-430.

Innok, P.; Rukachaisirikul, T.; Phongpaichit, S.; Suksamran A.; Chuprajob, T. *Fitoterapia.* 2010, 81, 518-523.

Chokchaisiri, R.; Suaisom, C.; Sriphota, S.; Chindaduang A.; Chuprajob, T.; Suksamran, A. *Chem. Pharm. Bull.* 2009, 57, 428-432.

Li, Y. L.; Li, J.; Li, Wang, L. N.; Yao, X. S. *Molecules.* 2008, 13, 1931-1941.

Ali, M.; Bhutani, K.K. 1993. *Pharmazie.* 48, 455-456.

Morikawa, T.; Xie, H.; Matsuda, H.; Wang, T.; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* 2006, 54, 506-513.

King, H. G. C.; White, T.; Hughes, R. B. *J. Chem Soc.* 1961, 96, 3234-3239.

Roux, D. G.; Paulus, E. *Biochem. J.* 1960, 77, 316-320.

Zhao, X. M.; Guo, F. J.; Li, Y. M.; Zu, D. Y. *J. Asian Nat. Product Res.* 2012, 14, 159-164.

Kang, W. Y.; Li, C. Q.; Zi, Z. Q. *Chem. Nat. Compds.* 2011, 47, 91-93.

Saayman, H. M.; Roux, D. G. *Biochem. J.* 1965, 96, 36-42.

Awale, S.; Li, F.; Onozuka, H.; Esumi, H.; Tezuka, Y.; Kadota, S. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 181-189.

Kim, H.; Ralph, J.; Lu, F.; Ralph, S. A.; Boudet, A. -M.; Mackay, J. J.; Sederoff, R. R.; Ito, T.; Kawai, S.; Obashi, H.; Higuchi, T. *Org. Biomol. Chem.* 2003, 1, 268-281.

Lai, W. -C.; Wang, H. -C.; Chen, G. -Y.; Yang, J. -C.; Korinek, M.; Hsieh, C. -J.; Nozaki, H.; Hayashi, K. -I.; Wu, C. -C.; Wu, Y. -C.; Chang, F. -R. *J. Nat. Prod.* 2011, 74, 1698-1706.

농림수산식품부. 활성성분 연구와 코카시언 대상으로 한 임상연구를 통한 식물성에스트로겐 특 허소재의 세계 시장 석권 추진 연구. 2010

서경근, 윤승환, 김세철. 발기부전증이 동반된 남성 갱년기 환자에서 AndrodermTM의 효과 및 안전성. *대한남성과학회지.* 1998;16(1):79-85.

김영찬, 박종호, 이석기, 이영진, 배철영, 조용욱, 강명서, 김정훈. 갱년기 남성에서 경피적 남성 호르몬 전달제인 안드로덤[®]의 6개월 간의 임상 경험. *대한내분비학회지.* 1999;14(1):102-121.

박광성, 김현학, 권동득, 이재혁, 오봉렬, 류수방, 박양일. 남성갱년기 환자에서 Andriol 투여가 성기능에 미치는 영향. *전남의대학술지.* 2000;36(3):265-269.

이종화. 중년여성이 호소하는 갱년기 증상에 관한 연구. 석사학위논문. 중앙대학교 사회계발대학원. 2000.

박영주, 구병삼, 강현철, 천숙희, 윤지원. 한국 여성의 폐경 연령, 갱년기 증상 관련 요인. *여성간호학회지.* 2001;7(4):473-485.

장원만, 윤종현, 이경진, 이종훈, 안세영. 성기능 저하를 호소하는 성인남성에 대한 保元丹의 효과 - IIEF와 Rigiscan을 이용한 발기능 변화 - . *대한한방내과학회지.* 2001;22(4):527-535.

최형기, 최영진. 국제 발기능측정설문지(IIEF)를 이용한 발기부전 환자에서의 홍삼 효능 평가. *J Ginseng Res.* 2001;25(3):112-117.

한인권. 폐경기 증후군. *대한내과학회지.* 2001;61(2):577-582.

최종태. 남성 갱년기의 치료. *대한임상건강증진학회지.* 2002;2(2):1-7.

김영혜, 하은화, 신수진. 중년여성의 폐경증상과 삶의 질. *대한간호학회지.* 2003;33(5):601-608.

대한 성학회. 제 1회 의사를 위한 성치료 교육과정. 2003.

양대열. How diagnose Aging Male. 제6회 가톨릭대학교비교기과 심포지움. 2004. 6. 12.

홍억기, 김재수, 조한성, 한인권, 이득주. PMS(Post- / Premenopausal Syndrome) 여성에 대한 대체요법의 유효성 및 안전성. *한국생물공학회지.* 2004;19(1):83-87.

(주)생명의 나무. 성기능 장애를 호소하는 사람에서 옷나무 추출물의 성기능 개선 효능평가를 위한 건강기능성식품 이중맹검-무작위 대조 임상연구. 2005:1-28.

한국유방암학회, 2005.

김철민, 옥선명, 이해국, 최희정, 양윤준, 오영아, 조수현, 이성희, 김철환, 최윤선, 김규남, 황환식, 김미영, 김정아, 유선미, 강동진, 강희철, 김영식. 일차의료에서 ADAM-Kor 설문지를 이용한

남성갱년기의 유병률 및 성생활 인식도. 대한임상건강증진학회지. 2006;6(1):1-8.

박정미. 중년후기여성의 태반요법 참여유무에 따른 갱년기 증상 비교. 석사학위논문. 고신대학교 보건대학원. 2006.

박현준, 박부경, 김정만, 박남철. 혈중 총 테스토스테론치와 남성갱년기 증상의 연관성. 대한남성과학회지. 2006;24(1):35-39.

정다정, 박기현, 정경아, 이성기, 이여일, 허성은, 조민선. 승마와 St. John's wort 복합제(지노플러스(R))의 갱년기 증상에 대한 이중 맹검, 무작위, 위약 대조, 다기관 임상 연구. 대한폐경학회지. 2006;12(1):56-64.

공미희. 중년기 여성에서 인태반추출물이 갱년기 증상 및 피로도와 심혈관질환 위험인자에 미치는 영향. 박사학위논문. 아주대학교 대학원. 2007.

박남철, 서주태, 문기학, 박광성, 박종관, 박현준. 남성갱년기증후군 환자에서 테스토스테론 겔(테스토겔®) 경피투여의 유효성과 안전성을 평가하기 위한 다기관, 공개연구. 대한남성과학회지. 2007;25(3):103-111.

박재민. 폐경 후 여성에 대한 당귀작약산 및 계지복령환 과립제의 삶의 질 개선 효과에 관한 임상연구. 석사학위논문. 동국대학교 대학원. 2007.

노명숙, 오영림, 김홍열, 어완규, 김홍배. 폐경기 여성에서 승마물질이 급성 폐경 증상과 골밀도에 미치는 영향. 대한골대사학회지. 2008;15(2):155-161.

문자민. 항암화학요법을 받은 유방암 여성의 갱년기 증상, 피로와 삶의 질. 석사학위논문. 연세대학교 대학원. 2009.

박유란, 김소라, 전균호, 김성호, 채희동, 김정훈, 서창석, 이병석, 최훈, 박형무, 강병문. 갱년기 장애에서 인태반 추출물 주사제의 효과 및 안전성에 대한 평가. 대한폐경학회지. 2009;15(3):178-185.

곽정현, 김지영, 김혜진, 신동혁, 이종호. 폐경 후 여성에서 이소플라본과 감마 리놀렌산의 보충 섭취가 혈중 지질 농도 및 갱년기 증상에 미치는 영향. 한국영양학회지. 2010;43(2):123-131.

김은탁, 이종현, 정지훈, 조현욱, 주현택, 박진성, 우승효, 김대경. 남성갱년기증상과 혈중 총테스토스테론의 일중변동이 소실된 남성에서의 남성호르몬보충요법. 대한남성과학회지. 2010;28(3):190-196.

안기훈, 김선미, 이경옥, 박현태, 신정호, 김영태, 허준용, 김선행, 이규완, 김탁. 여성의 갱년기 증상에 대한 석류농축액의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조군 임상시험. 대한폐경학회지. 2010;16(2):99-106.

- 김정구. 폐경기여성의 관리. 군자출판사, 2007
- 박형무. 식물성에스트로겐. 군자출판사, 2005
- 신안나. 여성 갱년기질환에 대한 국내 인터넷 건강정보 질 평가. 석사학위논문. 연세대학교 보건대학원. 2009
- Werner AA. The male climateric. J Am Med Assoc 1939;112:1441-1443.
- Gray A, Feldman HA, Mckinlay JB, Longcope C. Age, disease and changing sex hormone levels in middle-aged man; results of Massachusetts Male Aging Study. J Clin Endocrinol Metab. 1991;73:1016-1025.
- O'connor VM, Del Mar CB, Sheehan M, Fox-Young S, Cragg C. Do psycho-social factors contribute more to symptom reporting by middle-aged women than hormonal status?. Maturitas. 1994;20:63-69.
- Gooren LJG. The benefits and risks of androgen therapy in the aging male: prostate disease, lipids and vascular factors. In: Progress in the managemet of the menopause. (Eds) Wren BG: Parthenon Publishing. 1997:340-351.
- Park JS, Hong JI, Park NC. Changes in the quality of life after tansdermal testosterone (androderm) supplement therapy in the aging male. Korean J Urol. 1999;40:1057-65
- Elizabeth Alder. The Blatt-Kupperman menopausal Index: a critique. Maturitas. 1998;29:19-24.
- Jo HS, Lee KJ. A comparative study on climacteric symptoms of natural menopausal women and artificial menopausal women. J Korean Acad Nurs. 2001;31(4):692-702.
- Clemons M, Clamp A & Anderson B. Management of the menopause in cancer survivors. Cancer treatment reviews. 2002;28:321-333.
- Heinemann LAJ, Zimmerman T, Vermeulen A, Thiel C. A new 'aging male's symptoms'(AMS) rating scale. The Aging Male 2002;5:147-169.
- Alan HD & Lauren N. Current obstetric and gynecologic diagnosis and treatment(9th ed.). The McGraw-Hill company. 2003.
- Soares CN. Assessment and treatment of hot flushes and menopausal mood disturbance. Psychiatric Clinical Nursing of America. 2003;26:563-580.
- Claudia Moore, Doris Huebler, Thomas Zimmermann, Lothar A.J. Heinemann, Farid Saad, Do Minh Thai. The Aging Males' Symptoms Scale(AMS) as Outcome Measure for Treatment of Androgen Deficiency. European Urology. 2004;46:80-87.

ANNALIDIA SAMMARTINO, GIOVANNI ANTONIO TOMMASELLI, VIRGINIA GARGANO, COSTANTINO DI CARLO, WANDA ATTIANESE, & CARMINE NAPPI. Short-term effects of a combination of isoflavones, lignans and *Cimicifuga racemosa* on climacteric-related symptoms in postmenopausal women: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Gynecological Endocrinology*. 2006;22(11):646-650.

Lothar A Heinemann, Claudia Moore, Juergen C Dinger and Diana Stoehr. Sensitivity as outcome measure of androgen replacement : the AMS scale. *Health and Quality of Life Outcomes*. 2006;4(23):1-6.

Chung DJ, Kim HY, Park KH, Jeong KA, Lee SK, Lee YI, Hur SE, Cho MS, Lee BS, Bai SW, Kim CM, Cho SH, Hwang JY, Park JH. Black Cohosh and St. John's Wort(GYNO-Plus[®]) for Climacteric Symptoms. *Yonsei Med J*. 2007;48(2):289-294.

AKIRA TSUJIMURA, SHINGO TAKADA, YASUHIRO MATSUOKA, JIRO NAKAYAMA, TETSUYA TAKAO, YASUSHI MIYAGAWA, NORIO NONOMURA, & AKIHIKO OKUYAMA. Clinical trial of treatment with saikokaryukotsuboreito for eugonadal patients with late-inset hypogonadism-related symptoms. *The Aging Male*. 2008;11(2):95-99.

Akira Tsujimura, Shingo Takada, Yasuhiro Matsuoka, Toshiaki Hirai, Tetsuya Takao, Yasushi Miyagawa, Norio Nonomura and Akihiko Okuyama. Is discontinuation of hormone replacement therapy possible for patients with late-onset hypogonadism?. *International Journal of Urology*. 2008;15:625-629.

F. Saad, L. Gooren, A. Haider & A. Yassin. Effects of testosterone gel followed by parenteral testosterone undecanoate on sexual dysfunction and on features of the metabolic syndrome. *Andrologia*. 2008;40:44-48.

HERMANN M. BEHRE, LOTHAR HEINEMANN, ALVARO MORALES, & CLAIRE PEXMAN-FIETH. Rationale, design and methods of the ESPRIT study: Energy, Sexual desire and body Proportions wIth AndroGel[®], Testosterone 1% gel therapy, in hypogonadal men. *The Aging Male*. 2008;11(2):101-106.

S. KALINCHENKO, E. L. VISHNEVSKIY, A. N. KOVAL, G. J. MSKHALAYA, & F. SAAD. Beneficial effects of testosterone administration on symptoms of the lower urinary tract in men with late-onset hypogonadism: A pilot study. *The Aging Male*. 2008;11(2):57-61.

DANNY M.. RABAH, WALEED ALTAWHEEL & MOSTAFA A. ARAFA. Clinical assessment and

validation of an Arabic Aging Male symptoms questionnaire in patients with androgen deficiency. *The Aging Male*. 2010; Early Online; 1-4.

K. Yamaguchi, T. Ishikawa, K. Chiba & M. Fujisawa. Assessment of possible effects for testosterone replacement therapy in men with symptomatic late-onset hypogonadism. *Andrologia*. 2010;43:52-56.

Srinivas-Shankar U, Roberts SA, Connolly MJ, O'Connell MD, Adams JE, Oldham JA, Wu FC. Effects of Testosterone on Muscle Strength, Physical Function, Body Composition, and Quality of Life in Intermediate-Frail and Frail Elderly Men : A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(2):639-650.

TOSHIYASU AMANO, TETSUYA IMAO, KATSUROU TAKEMAE, TERUAKI IWAMOTO & MARIKO NAKANOME. Testosterone replacement therapy by testosterone ointment relieves lower urinary tract symptoms in late onset hypogonadism patients. *The Aging Male*. 2010;13(4):242-246.

ISSAM. International society for the study of the aging male. www.issam.ch

박용배, 전철현, 이호상, 2012, *옻나무 재배의 수익성 분석에 관한 연구*[ROI(Return on Investment) Analysis on *Rhus Verniciflua Stokes*] *산림과학 공동학술발표논문집*, 2012, p186-188.

Leitman DC, Paruthiyil S, Yuan C, Herber CB, Olshansky M, Tagliaferri M, Cohen I, Speed TP. 2012, Tissue-specific regulation of genes by estrogen receptors. *Semin Reprod Med*. 30(1):14-22.

Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA. 2006, International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev*. 58(4):773-81.

Kumar T, Chaiyasut C, Rungseevijitprapa R and Suttajit M, 2011, *Journal of Medicinal Plants Research* 5(7), 1265-1271.

Freyberger A, Schmuck G. 2005 Screening for estrogenicity and anti-estrogenicity: a critical evaluation of an MVLN cell-based transactivation assay. *Toxicol Lett.*, 155(1):1-13.

Sotoca AM, Bovee TF, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IM. 2010 Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J Steroid Biochem Mol*

Biol. 122(4):204-11.

Korea National Health and Nutrition Examination Survey. 2001. Ministry of Health and Welfare. Seoul, Korea. p 51.

Senior Statistical Reports. 2010. The Statistics Korea. Daejeon, Korea. p 5.

M. J. Janusz, E. B. Hookfin, S. A. Heitmeyer, J. F. Woessner, A. J. Freemont, J. A. Hoyland, K. K. Brown, L. C. Hsieh, N. G. Almstead, B. De, M. G. Natchus, S. Pikul and Y. O. Taiwo. 2001. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis and cartilage*. 9:751-760

Okada A, Okada Y. 2009. Progress of research in osteoarthritis. Metalloproteinases in osteoarthritis. *Clin Calcium* 19:1593-1601

Y Yoshihara, H Nakamura, K Obata, H Yamada, T Hayakawa, K Fujikawa, Y Okada. 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 59:455-461

Wenjun Wu, Xianxiang Xu, Yue Dai and Lunzhu Xia. 2009. Therapeutic Effect of the Saponin Fraction from Clematis chinensis Osbeck Roots on Osteoarthritis Induced by Monosodium Iodoacetate through Protecting Articular Cartilage. *phytother. Res* 10:1002/ptr.2977

Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung Chun-Shiang J, Ayala A. 2007. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets* 8:493-500

Herrington C, Hall P. Molecular and cellular themes in inflammation and immunology. 2008. *J Pathol* 214:123-125.

Mathy-Hartert M, Martin G, Devel P, Deby-Dupont G, Pujol JP, Reginster JY, Henrotin Y. 2003. Reactive oxygen species downregulate the expression of pro-inflammatory genes by human chondrocytes. *Inflamm Res* 52:111-118.

Asada S, Fukuda K, Oh M, Hamanishi C, Tanaka S. Effect of hydrogen peroxide on the metabolism of articular chondrocytes. 1999. *Inflamm Res*, 4 8:399-403

IM Khan, SJ Gilbert, B Caterson, LJ Sandell, and CW Archer. 2008. Oxidative stress induces expression of osteoarthritis markers procollagen IIA and 3B3(L) in adult bovine articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 16:698-707

Patwari P, Cook MN, DiMicco MA, Blake SM, James IE, Kumar S, Cole AA, Lark MW, Grodzinsky AJ: Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human

articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. *Arthritis Rheum* 2003, 48:1292-1301.

Lee JH, Fitzgerald JB, Dimicco MA, Grodzinsky AJ: Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis Rheum* 2005, 52:2386-2395.

Y Yoshihara, H Nakamura, K Obata, H Yamada, T Hayakawa, K Fujikawa, Y Okada. 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 59:455-461

EM Noh, JS Kim, H Hur, BH Park, EK Song, MK Han, KB Kwon, WH Yoo, IK Shim, SJ Lee, HJ Youn and YR Lee. Cordycepin inhibits IL-1 β -induced MMP-1 and MMP-3 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology.* 2009. 48:45-48

JS Shin, YM Park, JH Choi, HJ Park, MC Shin, YS Lee, KT Lee. Sulfuretin isolated from heartwood of *Rhus verniciflua* inhibits LPS-induced inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and pro-inflammatory cytokines expression via the down-regulation of NF- κ B in RAW 264.7 murine macrophage cells. *International Immunopharmacology.* 2010. 10:943-950

YR Lee, JK Hwang, HW Koh, KY Jang, JH Lee, JW Park, BH Park. Sulfuretin, a major flavonoid isolated from *Rhus verniciflua*, ameliorates experimental arthritis in mice. *Life Sci.* 2012. 90:799-807

Bensky, D., Clavey, S., Stöger, E., 2004. Chinese herbal medicine: materia medica, 3rd ed. Eastland Press, Seattle, WA.

Bugaud, F., Nadal-Wollbold, F., Levy-Toledano, S., Rosa, J.P., Bryckaert, M., 1999. Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood* 94, 3800-3805.

Cheong, S.H., Choi, Y.W., Min, B.S., Choi, H.Y., 2010. Polymerized urushiol of the commercially available *rhus* product in Korea. *Ann Dermatol* 22, 16-20.

Harrison, P., Mumford, A., 2009. Screening tests of platelet function: update on their appropriate uses for diagnostic testing. *Semin Thromb Hemost* 35, 150-157.

Heo, J., 2010. DongUiBoGam: Principles and practice of Eastern medicine. Part IV. Herbology and Pharmacology. Ministry for Health, Welfare and Family Affairs, Seoul, Korea.

Jeon, W.K., Lee, J.H., Kim, H.K., Lee, A.Y., Lee, S.O., Kim, Y.S., Ryu, S.Y., Kim, S.Y., Lee, Y.J., Ko, B.S., 2006. Anti-platelet effects of bioactive compounds isolated from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes. *J Ethnopharmacol* 106, 62-69.

Kim, H., Oh, S.J., Kwak, H.C., Kim, J.K., Lim, C.H., Yang, J.S., Park, K., Kim, S.K., Lee, M.Y., 2012. The impact of intratracheally instilled carbon black on the cardiovascular system of rats: elevation of blood homocysteine and hyperactivity of platelets. *J Toxicol Environ Health A* 75, 1471-1483.

Kurz, K.D., Main, B.W., Sandusky, G.E., 1990. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* 60, 269-280.

Lee, Y.R., Hwang, J.K., Koh, H.W., Jang, K.Y., Lee, J.H., Park, J.W., Park, B.H., 2012. Sulfuretin, a major flavonoid isolated from *Rhus verniciflua*, ameliorates experimental arthritis in mice. *Life Sci* 90, 799-807.

Lim, K.T., Hu, C., Kitts, D.D., 2001. Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract. *Food Chem Toxicol* 39, 229-237.

Singha Roy, A., Pandey, N.K., Dasgupta, S., 2013. Preferential binding of fisetin to the native state of bovine serum albumin: spectroscopic and docking studies. *Mol Biol Rep* 40, 3239-3253.

Tzeng, S.H., Ko, W.C., Ko, F.N., Teng, C.M., 1991. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res* 64, 91-100.

Sun-A kim, Simultaneous determination of bioactive phenolic compounds in the stem extract of *Rhus verniciflua* stokes by high performance liquid chromatography, *Food Chemistry* ,141, 3813-3819 (2013)

Su-Tze Chou, *Achillea millefolium* L. Essential Oil Inhibits LPS-Induced Oxidative Stress and Nitric Oxide Production in RAW264.7 Macrophages, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 12978-12993, (2013)

Tariq A.Bhat, Fisetin inhibits various attributes of angiogenesis in vitro and in vivo-implications for angioprevention, *Carcinogenesis*, 33, 385-393 (2012)

Yi-Syuan Lai, Antioxidant and anti-inflammatory effects of pigeon pea(*Cajanus cajan* L.) extracts on hydrogen peroxide- and lipopolysaccharide-treated RAW264.7 macrophages, *Food Funct*, 3, 1294-1301, (2012)

Chang Hwa Jung, Anti-inflammatory effect of *Rhus verniviflua* Stokes by suppression of iNOS-mediated Akt and ERK pathways : in-vitro and in-vivo studies, *Journal of Pharmacy and*

pharmacology, 63,679-687 (2011)

Dong-Sung Lee, Gil-Saeng Jeong, Anti-inflammatory effects of sulfuretin from *Rhus verniciflua* Stokes via the induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages, *International Immunopharmacology*, 10, 850-858 (2010)

Rajesh P. Rastogi, Detection of reactive oxygen species(ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC7937, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397, 603-607 (2010)

Chang Hwa Jung, *Rhus verniciflua* Stokes Extract : Radical Scavenging Activities and Protective Effects on H₂O₂-Induced Cytotoxicity in Macrophage RAW 264.7 Cell Lines, 29(8), 1603-0607, (2006)

Hee Kee Kim, Effects of Naturally Occurring Flavonoids on Nitric Oxide Production in the Macrophage Cell line RAW 264.7 and Their Structure-Activity Relationships. 58, 759-765

Eunkyo Park, Anti-inflammatory activity of mulberry leaf extract through inhibition of NF- κ B. 5, 178-186

Qisen Xiang, Carnosic acid attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury in rats via fortifying cellular antioxidant defense system. 53, 1-9

식품의약품안전청고시 제2009-183호 '비임상시험관리기준' . (2009년 12월 22일)

OECD Principles of Good Laboratory Practice. (1997)

OECD Guideline for Testing of Chemicals Test Guideline No. 416 'Two-Generation Reproductive Toxicity Study' (2001년 01월 22일)

OECD Guideline for Testing of Chemicals Test Guideline No. 414 Prenatal Development Toxicity Study' (2001).

Stuckhardt J.L. and Poppe S.M. (1984): Fresh visceral examination of rat and rabbit fetuses used in teratogenicity testing. *Teratogen Carcinogen Mutagen*, 4: 181 ~ 188.

Dawson, A.B. (1942): A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S. *Stain. Technol.* 1: 123 ~124.

Wilson, J.G. (1965): Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: *Teratology, Principles and Techniques*, Wilson, J.G. and Warkany, J. ed., University of Chicago press, Chicago and London, pp. 262-277.

Nishimura, K. (1974): A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses. *Cong. Anom.* 14(1), 23-40.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.