

11-1543000  
-001878-01

발간등록번호  
11-1543000-001878-01

# 인삼꽃대를 이용한 간기능 개선 기능성 강화 식품 개발 최종보고서

2017. 11. 1.

주관연구기관/고연(高研)  
1협동연구기관/세명대학교  
2협동연구기관/경희대학교  
3협동연구기관/(주)엠디젠

농림축산식품부

## 고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

인삼꽃대를 이용한 간기능 개선 기능성 강화 식품 개발 최종보고서

2017

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “인삼꽃대를 이용한 간기능 개선 기능성 강화 식품 개발”(개발기간 : 2014. 8. ~ 2017. 7.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 11. 1.

주관연구기관명	: 고연(高研)	(대표자)	(인)
1협동연구기관명	: 세명대학교 산학협력단	(대표자)	(인)
2협동연구기관명	: 경희대학교 산학협력단	(대표자)	(인)
3협동연구기관명	: (주) 엠디젠	(대표자)	(인)

주관연구책임자 : 고성권  
1협동연구책임자 : 고호연  
2협동연구책임자 : 정성현  
3협동연구책임자 : 백형개

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호		해당단계 연구기간	2014. 8. ~ 2017. 7.	단계구분	(해당단계)/ (총단계)
연구사업명	중사업명	고부가가치식품기술개발사업			
	세부사업명				
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	인삼꽃대를 이용한 간기능 개선 기능성 강화 식품 개발			
연구책임자	고성권	해당단계 참여 연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 35 명 내부: 12 명 외부: 23 명	총연구개발비	정부: 540,000천원 민간: 180,000천원 계: 720,000천원
연구기관명 및 소속부서명	고연(高研)			참여기업명 (주)엠디젠	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
				보고서 면수 457	

〈 요약 〉

		코드번호	D-01																												
연구의 목적 및 내용	<p>(연구목적) 인삼꽃대를 이용한 간기능 개선 개별인정형 기능성 원료 개발</p> <p>(연구내용)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 인삼꽃대의 성분 분리 분석</li> <li>○ prosapogenin 성분 고농도 함유 인삼꽃대 조성물 개발</li> <li>○ 인삼꽃대의 지방간 개선 생리활성 시험</li> <li>○ 인삼꽃대의 지방간 인체적용 시험</li> <li>○ 인삼꽃대의 안전성(독성) 시험</li> <li>○ 안정성 연구</li> <li>○ 개별인정 원료 인정서 작성/신청</li> <li>○ 인삼꽃대의 임상시험을 위한 프로토콜 및 CRF 작성</li> <li>○ 임상시험을 위한 IRB통과</li> <li>○ 건강기능성 식품의 제품허가에 필요한 임상시험의 수행 및 결과보고서 완료</li> </ul>																														
연구개발성과	<p>(연구성과 목표대비 실적)</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="2">특허</th> <th colspan="2">논문</th> <th rowspan="2">학술발표</th> <th rowspan="2">교육지도</th> </tr> <tr> <th>출원</th> <th>등록</th> <th>SCI</th> <th>비SCI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>목표</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>4</td> <td>1</td> <td>3</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>성과</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>3</td> <td>6</td> <td>6</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table> <p>(연구개발성과)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, F<sub>4</sub> 등의 홍삼 활성 prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 초음파 처리 인삼꽃대 조성물 개발 및 대량 추출조건 최적화</li> <li>○ Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, F<sub>4</sub> 분리 화학구조 동정</li> <li>○ 지표성분 (Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, F<sub>4</sub>) 표준화 (밸리데이션)</li> <li>○ 지방간 동물모델에서 초음파 처리 인삼 꽃대 조성물의 간 보호효과</li> <li>○ 초음파 처리 인삼꽃대 조성물의 간기능 개선 인체적용 시험 IRB 승인</li> <li>○ 초음파 처리 인삼꽃대 조성물의 간기능 개선 인체적용 시험</li> <li>○ 초음파 처리 인삼꽃대 조성물의 안전성(독성)시험[단회독성, 4주 DRF, 유전독성 (염색체이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험), 13주 반복독성시험 및 4주 회복시험]</li> <li>○ 초음파 처리 인삼꽃대 조성물 시제품 제작</li> </ul>							특허		논문		학술발표	교육지도	출원	등록	SCI	비SCI	목표	1	0	4	1	3	1	성과	1	0	3	6	6	2
	특허		논문		학술발표	교육지도																									
	출원	등록	SCI	비SCI																											
목표	1	0	4	1	3	1																									
성과	1	0	3	6	6	2																									
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 간기능 개선 기능성 강화 인삼꽃대 조성물 제품 개발</li> <li>○ 국민 건강 향상으로 국가 의료비 절감</li> <li>○ 인삼가공식품 시장규모 약 1조원에서 20-30% 확대 예상</li> </ul>																														
중심어 (5개 이내)	초음파	인삼꽃대	간	기능성	식품																										

〈 SUMMARY 〉

		코드번호	D-02																											
Purpose& Contents	(Purposes of research) Development of functional food for improvement of hepatic protective effect using ultrasonication processed ginseng flower buds extract (Research contents) ○ Separation and analysis of components from ultrasonication processed ginseng flower buds extract ○ Development of ultrasonication processed ginseng flower buds extract containing a high concentration prosapogenin component ○ Physiological activity test of liver function improvement for ultrasonication processed ginseng flower buds extract ○ Clinical trials of liver function improvement for ultrasonication processed ginseng flower buds extract ○ Safety(toxic) test of ultrasonication processed ginseng flower buds extract ○ Prototyping of ultrasonication processed ginseng flower buds extract																													
Results	(Research performance against goals) <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="2">Patent</th> <th colspan="2">Paper</th> <th rowspan="2">Conferenc e</th> <th rowspan="2">Education guide</th> </tr> <tr> <th>Applicati on</th> <th>Enrollme nt</th> <th>SCI</th> <th>Non-SCI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Goal</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>4</td> <td>1</td> <td>3</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Result</td> <td><b>1</b></td> <td><b>0</b></td> <td><b>3</b></td> <td><b>6</b></td> <td><b>6</b></td> <td><b>2</b></td> </tr> </tbody> </table> (Results of research) ○ Development of ultrasonication processed ginseng flower buds extract containing a high concentration ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> component and Optimization of mass extraction conditions ○ Separation and chemical structure identification of ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> ○ Standardization of component indicators (Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> ) (validation) ○ Liver protective effect of ultrasonication processed ginseng flower buds extract on hepatotoxicity model ○ IRB approval for clinical trials of liver function improvement for ultrasonication processed ginseng flower buds extract ○ Clinical trials of liver function improvement for ultrasonication processed ginseng flower buds extract ○ Safety(toxic) test of ultrasonication processed ginseng flower buds extract[single dose toxicity, 4 weeks DRF, genetic toxicity (chromosomal aberration test, reverse mutation test, micronucleus test), 13 weeks repeated toxicity test and 4 weeks recovery test ○ Prototyping of ultrasonication processed ginseng flower buds extract(product name : Inpro)						Patent		Paper		Conferenc e	Education guide	Applicati on	Enrollme nt	SCI	Non-SCI	Goal	1	0	4	1	3	1	Result	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>2</b>
	Patent		Paper		Conferenc e		Education guide																							
	Applicati on	Enrollme nt	SCI	Non-SCI																										
Goal	1	0	4	1	3	1																								
Result	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>2</b>																								
Expected Contribution	○ Development of functional food for improvement of hepatic protective effect using ultrasonication processed ginseng flower buds extract ○ Reducing medical costs by improving national public health ○ 20-30% expansion expected in the ginseng food market about 1 trillion won																													
Keywords	ultrasonication	ginseng flower buds	liver	functional	food																									

< Contents >

1. Overview of R & D projects .....	8
2. Status of domestic and international technology developments	13
3. Details and results of study .....	14
4. Goal achievement and contribution to relevant areas .....	448
5. Use Plan of research results .....	450
6. International scientific and technical information collected in the research process .....	451
7. Security clearance of research and development achievements .....	451
8. Equipment Status and research facility registered with the National Science and Technology Information System .....	451
9. Implemented performance of laboratory safety measures .....	452
10. Typical study results of research and development projects ·	453
11. Etc .....	454
12. References .....	455

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	8
2. 국내외 기술개발 현황 .....	13
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	14
1) 인삼꽃대의 추출조건 최적화 .....	14
○ 추출 조건에 따른(시간, 온도) Ginsenosides 함량분석 .....	14
○ 인삼꽃대의 용매 추출조건 최적화 .....	25
2) PROSAPOGENIN 성분 고농도 함유 인삼꽃대엑스 개발 및 기능성 성분 분리 .....	29
○ Ultrasonication 및 열 처리 추출조건에 따른 성분 분석(HPLC) .....	29
○ prosapogenin 성분 대량 분리 동정 .....	47
○ 독성 및 동물 시험용 초음파 인삼꽃대 조성물 조제 .....	53
3) 안전성 시험[ I ] .....	56
○ 초음파처리 인삼꽃대의 독성시험 .....	56
- 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 Sprague-Dawley랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험 .....	57
- 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 용량설정 4주 반복 경구 투여 독성시험 .....	76
- 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 박테리아 균주를 이용한복귀돌연변이시험 .....	123
- 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 마우스를 이용한 소핵시험 .....	136
- 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 .....	156
4) 비알코올성지방간에 효과가 우수한 인삼꽃대 제제의 세포수준에서 스크리닝 .....	169
5) 인삼꽃대의 수집 .....	175
6) 기능성 성분 대량 분리 동정 .....	176
○ 인삼 꽃대 성분 대량 분리 동정(ginsenoside Re, Rg2) .....	176
○ 지역에 따른 인삼꽃대 인삼사포닌 성분 분석 (HPLC 법) .....	187
7) 인체적용시험 준비 .....	192
○ 인삼 꽃대 엑스의 용매에 따른 용해성 검토 .....	192
○ 인체적용시험계획서 작성 및 전략 수립 .....	196
8) 인삼꽃대 제제를 대상으로 한 비알코올성 지방간 동물모델의 약효 및 기전규명 .....	251
○ In vitro에서 지방대사 관련 유전자 발현에 미치는 영향 확인 .....	251
○ 비알코올성 지방간 동물모델에서 인삼꽃대의 약효 및 기전 평가 .....	253
9) 인삼꽃대엑스의 제조 및 제조공정 최적화 .....	259
○ 초음파 및 식초 추출에 의한 인삼 꽃대의 인삼사포닌 변화 분석 .....	259

○ 인삼꽃대엑스의 제조 및 제조공정 표준화 .....	264
○ 인삼꽃대의 성분 표준화 .....	267
10) 안전성 시험[Ⅱ] .....	269
○ 13주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험 .....	269
11) 인체적용시험 .....	379
12) 시제품 제작 .....	445
○ 초음파 처리 인삼꽃대 추출물 정제 시제품 제작 .....	445
○ 제제 안정성 분석 .....	446
○ 시제품의 경제성 분석 .....	447
4. 목표달성도 및 관련분야 기여도 .....	448
5. 연구결과의 활용계획 .....	450
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	451
7. 연구개발결과의 보안등급 .....	451
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황 .....	451
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	452
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	453
11. 기타사항 .....	454
12. 참고문헌 .....	455



## 1. 연구개발과제의 개요

### 1) 연구개발 목적

- 인삼꽃대를 이용한 간기능 개선 개별인정형 기능성 원료 개발

### 2) 연구개발의 필요성

#### □ 우리나라 고려인삼은 해외수출 시장의 성장동력 및 전략 품목으로서 차별성 필요

- 세계 인삼시장 규모는 '09년 기준 200억불 수준이며, '11년도 고려인삼 수출액은 189백만\$로 농산물 단일품목 중 1위를 차지('12.3월, 인삼산업 중장기 발전대책에 의거 '17년 600백만\$ 수출목표 제시).
- 반면 아직까지 중국, 홍콩을 비롯한 아시아 시장이 85% 이상으로 편중되어 있고, 상대적으로 부가가치가 낮은 뿌리삼(원형삼)이 50% 이상을 차지.
- 제품류의 경우도 분말, 엑기스, 차, 음료 등 단순가공품이 주를 이루어 미국, 유럽 등 건강기능식품 시장의 진입이 어려운 실정임.

#### □ 기능성 소재(의약품 등) 및 관련 제품 시장의 발 빠른 변화 및 성장

- 세계 기능성 식품시장은 '08년 기준 2,697억\$이며, 미국(37%), 유럽(28%), 일본(14%)의 순으로 현지 소비자의 기대에 부응할 수 있는 차별화된 제품 개발이 필요.
- FTA 대응 미국의 경우에는 생체방어관련 비타민, 미네랄류의 시장 점유율이 가장 높으므로, 이를 대체할 수 있는 인삼 소재를 활용한 제품개발이 필요하며, 비만으로 인한 대사증후군 및 당뇨병, 고령화로 인한 뇌인지장애, 암 치료 보조식품 등 생활습관병 기능성 식품의 필요성이 증대되므로, 이에 대응할 수 있는 맞춤형 인삼 기능성 성분 강화 제품 개발이 필요.

#### □ 해외 인삼소비 패턴의 변화와 수출여건의 변화

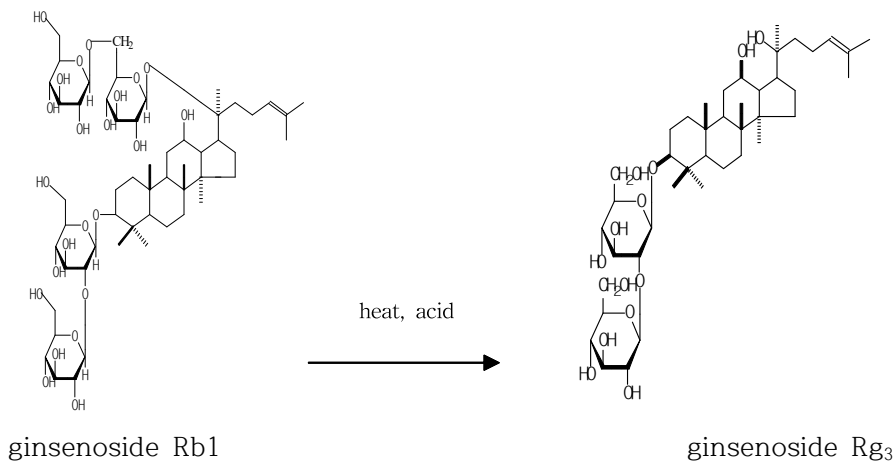
- 중국인삼 시장의 확대('09년 기준 10억\$) 및 뿌리삼(절편)보다 제품류 매출이 증가하고 있는 추세.
- 홍콩의 경우 '13년 7월부터 인삼제품류에 대한 '중성약등록제' 시행을 예고하여 수출여건 악화가 예상, 수출시장의 다변화 및 신시장 진입 필요.
- 특히 인삼제품류(뿌리삼 제외) 시장은 미국이 258백만\$, 중국이 137백만\$로 가장 큰 시장을 형성, 미국을 중심으로 하는 북미시장의 개척도 시급.

#### □ 인삼의 효능 강화를 위한 특정사포닌 강화 기술 대두

- 고부가가치 기능성 강화 인삼제품을 개발하기 위해서는 강력한 생리활성을 나타내는 특정성분을 고농도로 함유하게 하는 가공기술과 이와 관련한 생리활성소재의 유효성을 입증한 기능성제품을 개발해야함.
- 인삼 함유 성분에 있어서 수삼 및 백삼에는 인삼사포닌 배당체(ginsenoside Ra, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub> 등)가 함유되어 있음.
- 인삼사포닌 배당체는 동맥경화 및 고혈압의 예방, 위 및 간기능 촉진 및 숙취 제거 효과, 항피로 및 항스트레스 작용, 노화방지 작용, 두뇌활동 촉진 작용, 항당뇨작용 등이 보고되어 있음.
- 홍삼은 수삼 즉 발에서 채굴한 생삼을 수증기로 찌서 건조한 것을 말함. 찌때 열에 의해서 가수분해가 일어나 사환성 triterpenoid인 Dammarane 기본구조에서 일부분의 당이 유리되어 prosapogenin type의 ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rh<sub>2</sub>, Rh<sub>4</sub>등의 Artifact 즉 홍삼특유성분이 생성됨.
- 인삼 prosapogenin 즉 홍삼특유성분(ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>2</sub>)은 암전이 억제활성, 항종양작용,

혈압강하, 항산화, 항당뇨, 뇌인지개선 등의 생리활성이 국제저널에 보고됨으로서 기능성 물질로서 세계적인 주목을 받고 있음.

- 이와 같은 인삼 prosapogenin을 고농도로 함유한 제제를 개발하기 위한 생명공학적인 연구가 활발히 진행되고 있음.
- 서울대학교의 박만기 등은 열과 압력을 가하는 물리적인 방법에 의해 인삼사포닌 배당체(ginsenosides)의 당기를 일부분 가수분해하여 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>)을 높은 농도로 함유하는 인삼제품(선삼)을 개발하여 현재 시판 중임.



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

- 한편, (주) 일화와 (주) 원광제약은 장내미생물이 분비하는 효소를 이용하여 효소 가수분해를 유도하여 얻어지는 인삼 prosapogenin(IH-901, Compound K)을 높은 농도로 함유하는 인삼식품(락토진생, 효삼)을 개발하여 현재 시판 중임.
- 그러나, 본 연구팀은 안전성에 커다란 문제가 없는 초단파와 식용 양조식초를 이용하여 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rk<sub>1</sub>)을 고농도로 함유하는 인삼제제와 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, F<sub>4</sub>)를 고농도로 함유하는 인삼 지상부 조성물을 천연물화학적인 접근방법을 통하여 개발하여 국내특허(국내특허 출원번호: 10-2011-0141997, 10-2011-0141998, 10-2011-0141999, 10-2011-0142000, 출원일 : 2011년 12월 26일)를 출원하였음.
- 이와 같은 발명은 현재 개발된 어떤 방법보다 수율이 높고, 빠른 시간에 간단히 인삼 prosapogenin을 대량으로 생산할 수 있는 방법으로 산업계에 활용가치가 매우 높음.
- 특히, 공지의 사실인 인삼사포닌 배당체(ginsenoside Rb<sub>2</sub>, Re)의 항당뇨작용, 뇌인지개선작용, 암예방작용과 관련하여 기능성식품 개발을 위한 보다 체계적인 접근의 연구개발이 필요함.
- 이와 같이 인삼의 주요 약리 성분으로 알려진 인삼사포닌(ginsenosides)을 물리·화학·생물학적 공정을 적용하여 특정 ginsenoside의 함량을 증가시키는 연구는 국내·외적으로 많은 연구가 이미 진행.
- 그러므로 인삼에 함유된 다양한 생리활성 물질들의 함량 패턴을 조절하여 특정 효능을 강화할 수 있는 제어 기술 필요.

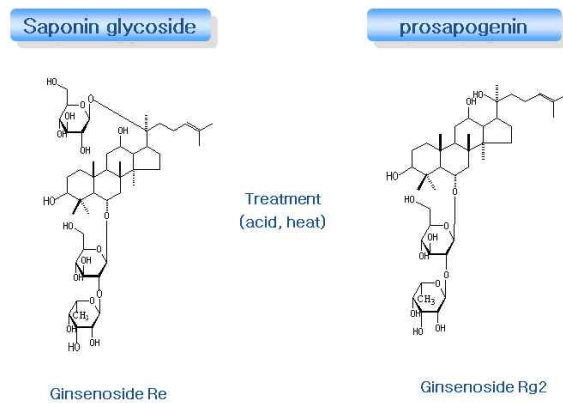
**□ 인삼 재배 및 가공 부산 폐기물을 이용한 기능성 강화 제품 개발 필요**

- 인삼꽃대는 인삼뿌리를 굵게 하기위하여 채종용(5%) 만 제외하고 따서 폐기하는데, 인삼재배면적 평당 150 g의 인삼꽃대가 생산되어 연간 10,000톤 가량 폐기되고 있음.



Fig. 1. Figure of Ginseng Flower buds

- 본 연구진은 충북홍삼영농조합법인과 김길 인삼재배자협회 부회장과 의 인삼열매 원료 공급 MOU를 체결하여 사업화에 원료 공급을 원활히 하고자 함.
- 인삼꽃대에는 항산화, 항백혈병, 위장보호 작용 등 생리활성이 확인되었고, ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2 뿐만 아니라, floralginsenosides Ka, Kb, Kc, vinaginsenoside R, majoroside F, ginsenoside I, II, III, floralginsenosides Ta, Tb, Tc, Td, floralginsenosides A, B, C, D, E, F, floralginsenosides M, N, O, P 등의 성분이 분리 보고되었음.
- 또한, ginsenoside Re 가 약 3.388%의 높은 농도로 존재하는 것을 본 연구팀(1협동)이 확인하였음. [J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.(SCIE) 54(1), 154-157, 2011]
- 인삼꽃대의 ginsenoside Re 는 물리화학적 가공에 의해서 ginsenoside Rg2 등 활성 사포닌으로 전환될 수 있으며, 본 연구팀(1협동)은 ginsenoside Rg2, Rh1, F4 등 기능성 성분 강화 조성물을 초음파 처리를 이용하여 개발하여 특허를 출원하였음. [초음파 처리를 이용한 인삼 프로사포게닌 고농도 함유 인삼꽃대 제제 및 이의 제조방법 (출원번호 : 10-2011-0142000), 출원일 : 2011년 12월 26일]



- 본 연구진은 인삼꽃대의 알코올성 지방간에 대한 연구를 통하여 특허[예방 및 숙취해소 효과를 갖는 조성물 (출원번호 : 10-2011-0057835), 2011년 6월 15일 출원, (등록번호 : 10-1303541) 특허등록일 2013년 8월 28일. 발명자 정성현, 고성권 특허권자 경희대학교 산학협력단, 세명대학교 산학협력단]가 등록되었음
- 따라서, 이와 같은 예비연구 결과를 바탕으로 인삼꽃대를 이용한 간기능 개선 건강기능식품을 개발하고자 함

### 3) 연구개발 범위

#### 가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

##### - 연구목표

- 인삼꽃대를 이용한 간기능 개선 개별인정형 기능성 원료 개발

##### - 연구내용

##### (1세부) 기능성 강화 인삼꽃대 조성물 개발 및 안전성시험

- 인삼꽃대의 추출조건 최적화
- 인삼꽃대의 성분 분리 분석
- prosapogenin 성분 고농도 함유 인삼꽃대 개발
- 인삼꽃대의 성분 표준화
- 인삼꽃대의 안전성(독성) 시험
- 개별인정 원료 인정서 작성/신청

##### (1협동) 인삼꽃대를 이용한 간기능 개선능에 대한 임상시험

- 비알코올성 간손상을 모델로 한 임상시험 실시

##### (2협동) 인삼꽃대의 생리활성 시험

- 인삼꽃대의 비알콜성 지방간 (NAFLD) 개선 생리활성 규명 및 작용기전 연구

##### (3협동) 인삼꽃대의 수집 및 제조공정 표준화

- 인삼꽃대의 수집
- 인삼꽃대엑스의 제조
- 인삼꽃대엑스의 제조공정 표준화
- 안정성 연구

##### - 산업화 방안

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

나. 과제별(세부.협동) 연구개발의 목표 및 내용

구분	세부과제	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2014)	1세부	인삼꽃대의 추출조건 최적화 prosapogenin 성분 고농도 함유 인삼꽃대엑스 개발 기능성 성분 분리 안전성 시험	○ 추출 조건 별(시간, 온도) 성분 분석(HPLC) ○ ultrasonication 및 열 처리 추출조건에 따른 성분 분석(HPLC) ○ prosapogenin 성분 대량 분리 동정 (Column chromatography법, Preb-LC, HPCPC) ○ 독성시험(단회, 유전독성시험, GLP 독성연구기관인 (주)바이오독스텍에 시험의뢰함)
	2협동	비알코올성지방간에 효과가 우수한 인삼꽃대 제제의 세포수준에서 스크리닝	○ 30 mM glucose와 palmitate로 배양한 (비알코올성지방간의 세포모델임) HepG2 human hepatoma cell line을 이용하여 제작된 제제들을 일차 스크리닝 ○ 고지방식을 생후 3주된 SD rats에 투여 후 1개월에 간세포를 분리 배양하여 위 실험에서 선진된 제제를 대상으로 약효를 평가하고 확인함
	3협동	인삼꽃대의 수집	○ 전국 인삼재배지로부터 인삼꽃대의 대량 수집
2차년도 (2015)	1세부	기능성 성분 대량 분리 동정	○ prosapogenin 성분 대량 분리 동정 (Column chromatography법, Preb-LC, HPCPC)
	1협동	인체시험 준비	○ 자료 검토 및 전략 수립 - 간보호 기능의 규명에 의한 인체 시험 전략 수립 ○ IRB 신청 ○ 피험자 모집 - 60명 기준, 비알코올성 간수치 상승자, 이중맹검법 - AST40~120, ALT45~135, 감마-GTP 60~180 IU/L 대상
	2협동	1차년도에 선정된 인삼꽃대 제제를 대상으로 비알코올성 지방간 동물모델에서 약효 및 기전 규명	○ SD rats에 고지방식이 투여로 유발된 비알코올성지방간 동물모델을 이용하여 1차년도에 선정된 제제의 약효를 평가하고 (간조직에서 중성지방 축적을 Oil Red O, Hematoxylin staining으로 검증) 작용기전을 분자수준에서 규명함
	3협동	인삼꽃대엑스의 제조 인삼꽃대의 제조공정 최적화	○ 인삼꽃대엑스의 제조 ○ 인삼꽃대의 제조공정 표준화
3차년도 (2016)	1세부	인삼꽃대의 성분 표준화 안전성 시험	○ 인삼꽃대의 성분 표준화(HPLC) ○ 독성시험(반복독성, GLP 독성연구기관인 (주)바이오독스텍에 시험의뢰함)
	1협동	인체시험	○ 인체시험 - 인삼꽃대의 간기능보호 효능평가를 위한 ALT,AST등의 검사항목 조사 - 안전성 평가를 위한 일반혈액검사 ○ Data 입력과 통계분석
	3협동	안정성연구	○ 안정성 연구(유효기간 설정)

## 2. 국내외 기술개발 현황

### 1) 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### ○ 인삼꽃대제품 기술현황

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

#### ○ 인삼제품 생산현황

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

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

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

### 3. 연구수행 내용 및 결과

#### 1) 인삼꽃대의 추출조건 최적화

○ 추출 조건에 따른(시간, 온도) Ginsenosides 함량분석

##### 가. 재료 및 방법

###### (1) 실험재료

본 연구에 사용한 인삼꽃대는 충청북도 음성에서 2010년 8월 20일에 4년근 인삼꽃대 10 kg를 채집하였고, 건조는 음성의 충북홍삼영농조합법인에서 시행하였다. 제품표본은 고연 인삼연구센터에 보관하고 있다.

Figure of ginseng flower buds (*Panax ginseng* Meyer)



Fresh ginseng flower buds



dried ginseng flower buds

###### (2) 엑스의 조제

인삼꽃대를 세말하고, 시료 각각 1 kg씩에 증류수 10 ℓ를 넣고, 100°C에서 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60시간 그리고 72시간씩 1회 추출하여 여과 후, 동결건조 하여 인삼꽃대 엑스를 얻었다.

###### (3) HPLC-ginsenoside의 분석

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

사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system(Waters, Milford, MA, USA)이며, 컬럼은 Eurospher 100-5 C18(3x250 mm; Knauer, Germany)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC grade; Sigma-Aldrich Chem Co., USA)과 증류수(HPLC급, B&J, USA)이며, acetonitrile의 비율을 17%(0 min)에서 25%(25 min), 39%(50 min), 60%(105 min) 그리고 100%(110 min)로 순차적으로 늘려 주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector(Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203 nm에서 검출하였다.

## 나. 결과 및 고찰

인삼을 가공하는 데는 추출농축을 통하여 진행되고, 열에 의한 가수분해에 의해서 홍삼 및 흑삼 제조시 생성되는 prosapogenin 성분(ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rk<sub>1</sub>)이 산생<sup>20, 29)</sup>된다고 하는 점에 착안하여, 본 연구는 인삼꽃대의 추출 시간에 따른 인삼 사포닌의 함량을 HPLC 법으로 비교분석하였다.

인삼꽃대 증류수 추출(100°C) 시간별 인삼사포닌 함량 비교 분석을 실시한 결과, 각 ginsenoside의 총합인 총 사포닌 (total saponin) 함량에 있어서는 GFB-2이 24.178%이었으며 GFB-4은 23.670%이었으며, GFB-8은 20.443%로서 100°C 2시간 추출 인삼꽃대 추출물의 총 사포닌이 높은 함량을 보여주었다.

Protopanaxadiol group prosapogenin의 경우는 24시간 추출(GFB-24)시 ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 함량이 1.833%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 20시간 추출했을 때, 1.697%(GFB-20), 16시간 추출시 1.426%(GFB-16)의 순이었다. ginsenoside Rd의 함량에 있어서는 16시간 추출(GFB-16)시 3.922%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 8시간 추출했을 때, 3.919%(GFB-8), 4시간 추출시 3.900%(GFB-4)의 순이었다. 또한, ginsenoside Rc의 함량에 있어서는 4시간 추출했을 때, 2.883%의 가장 높은 함량을 나타내었고, 2시간 추출시 2.659%, 8시간 추출시 2.510%의 순이었고, 추출시간이 길어질수록 함유량이 적어졌다. ginsenoside Rb<sub>2</sub>의 함량에 있어서는 4시간 추출(GFB-4)시 2.713%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 2시간 추출했을 때, 2.429%(GFB-2), 8시간 추출시 2.387%(GFB-8)의 순이었다.

한편, Protopanaxatriol group prosapogenin의 경우는 인삼꽃대의 주성분으로 알려진 ginsenoside Re의 함량에 있어서 2시간 추출(GFB-2)시 11.873%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 4시간 추출했을 때, 9.317%(GFB-4), 8시간 추출시 5.490%(GFB-8)의 순이었으며, 추출시간이 길어질수록 함량이 줄어들었다. 줄,aro선 효능이 알려진 ginsenoside Rg<sub>2</sub>의 함량은 16시간 추출시 1.271%로 가장 높은 함량을 나타내었으나, 20시간 추출했을 때, 1.177%, 24시간 추출시 1.139%의 순이었다. 또한, 항알러지 및 항암작용이 보고된 ginsenoside Rh<sub>1</sub>의 함량에 있어서는 16시간 추출(GFB-16)시 2.367%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 20시간 추출했을 때, 2.295%(GFB-20), 24시간 추출시 2.285%(GFB-24)의 순이었다. ginsenoside F<sub>4</sub>의 함량에 있어서는 20시간 추출(GFB-20)시 1.574%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 24시간 추출했을 때, 1.529%(GFB-24), 12시간 추출시 1.157%(GFB-12)의 순이었다.

## 다. 결론

인삼꽃대의 물추출을 통한 기능성분 고농도 함유 최적조건을 탐색한 결과, ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 경우는 20시간 추출 시 가장 높은 함유량을 나타내었고, ginsenoside Rd, Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>의 경우는 16시간 추출시 가장 높은 함유량을 나타내었으며, 인삼꽃대의 주 사포닌 배당체 성분인 ginsenoside Re의 함량은 2시간 추출시 가장 높은 함유량을 나타내었다.



Ginsenoside contents in ginseng flower buds extracted under various conditions

Ginsenosides	(% ,w/w)			
	GFB-2	GFB-4	GFB-8	GFB-12
Rb1	1.017±0.002	1.164±0.010	1.003±0.008	0.813±0.012
Rb2	2.429±0.009	2.713±0.016	2.387±0.011	2.030±0.006
Rc	2.659±0.006	2.883±0.024	2.510±0.009	2.101±0.006
Rd	3.077±0.028	3.900±0.014	3.919±0.015	3.646±0.008
Re	11.873±0.103	9.317±0.029	5.490±0.070	3.178±0.013
Rf	0.065±0.001	0.068±0.001	0.068±0.002	0.067±0.002
Rg1	1.564±0.259	1.053±0.018	0.622±0.014	0.0378±0.003
Rg2	0.566±0.005	0.706±0.001	0.915±0.009	1.040±0.007
(20S)Rg3	-	0.115±0.001	0.343±0.001	0.538±0.001
(20R)Rg3	-	0.054±0.001	0.223±0.002	0.370±0.000
Rg5(E)	-	0.028±0.000	0.120±0.001	0.196±0.000
Rg6	0.053±0.002	0.121±0.002	0.225±0.002	0.297±0.005
Rh1	0.521±0.008	0.876±0.014	1.446±0.003	1.833±0.007
Rh4	0.009±0.001	0.026±0.001	0.065±0.001	0.091±0.001
Rk1+ Rg5(Z)	0.000±0.000	0.026±0.000	0.088±0.000	0.142±0.001
Rk3	0.004±0.000	0.013±0.001	0.034±0.000	0.047±0.000
F1	0.190±0.005	0.190±0.001	0.160±0.002	0.128±0.002
F4	0.152±0.002	0.426±0.026	0.861±0.003	1.157±0.001
Total ginsenosides <sup>a)</sup>	24.178	23.670	20.443	17.993
Diol/Triol <sup>b)</sup>	0.432	0.627	0.907	1.171

\* GFB-2 : ginseng flower buds extracted 2 hours at 100°C, GFB-4 : ginseng flower buds extracted 4 hours at 100°C, GFB-8 : ginseng flower buds extracted 8 hours at 100°C, GFB-12 : ginseng flower buds extracted 12 hours at 100°C, Values represent the mean±S.E. (n=3), a) sum total of individual ginsenoside contents. b) Rb1+Rb2+Rc+Rd+Rg3+Rg5/Re+Rf+Rg1+Rg2+Rg6+Rh1+Rh4+Rk3+F1+F4

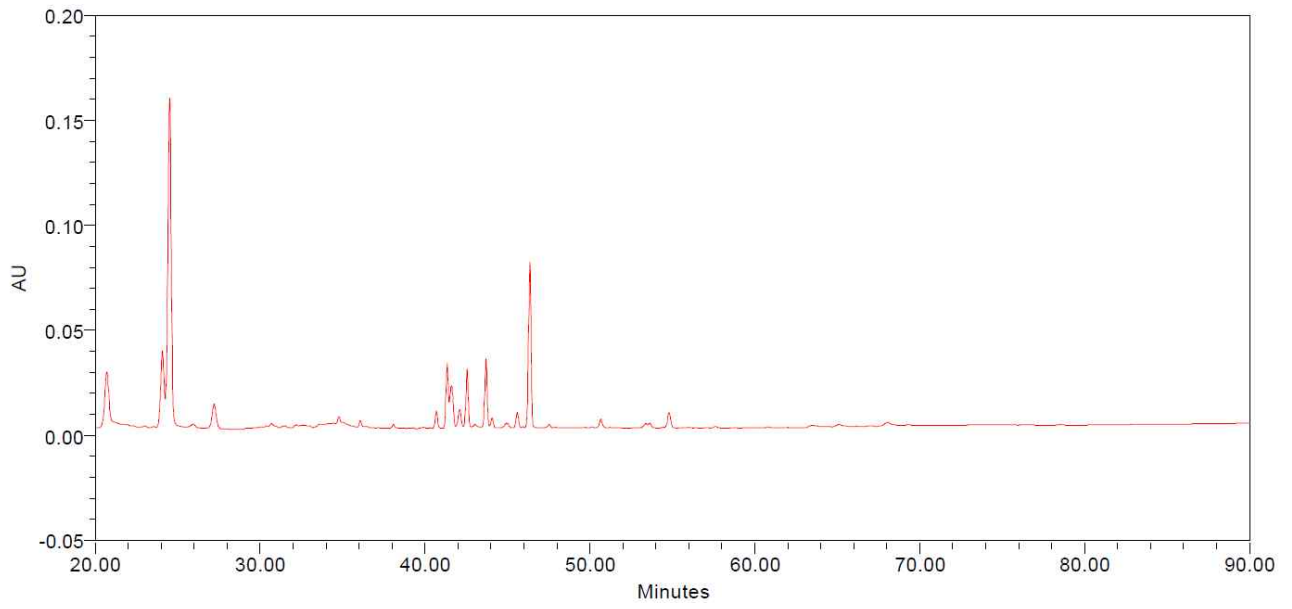
	(% w/w)			
Ginsenosides	GFB-16	GFB-20	GFB-24	GFB-36
Rb1	0.747±0.003	0.534±0.001	0.414±0.006	0.101±0.001
Rb2	1.933±0.004	1.436±0.010	1.148±0.008	0.315±0.003
Rc	1.982±0.016	1.474±0.013	1.173±0.007	0.314±0.009
Rd	3.922±0.004	3.210±0.008	2.823±0.008	0.987±0.006
Re	2.230±0.106	1.152±0.017	0.699±0.010	0.081±0.020
Rf	0.069±0.006	0.064±0.002	0.062±0.005	0.032±0.004
Rg1	0.326±0.118	0.140±0.004	0.100±0.002	0.016±0.002
Rg2	1.271±0.005	1.177±0.007	1.139±0.007	0.553±0.003
(20S)Rg3	0.801±0.148	0.992±0.006	1.066±0.007	0.477±0.004
(20R)Rg3	0.625±0.002	0.705±0.013	0.767±0.005	0.232±0.002
Rg5(E)	0.217±0.188	0.367±0.001	0.397±0.001	0.227±0.002
Rg6	0.409±0.011	0.394±0.005	0.384±0.007	0.151±0.004
Rh1	2.367±0.004	2.295±0.009	2.285±0.011	1.183±0.005
Rh4	0.158±0.039	0.138±0.003	0.139±0.002	0.053±0.002
Rk1+ Rg5(Z)	0.236±0.001	0.266±0.001	0.289±0.001	0.166±0.002
Rk3	0.092±0.039	0.073±0.002	0.070±0.000	0.024±0.000
F1	0.136±0.016	0.098±0.002	0.083±0.006	0.018±0.000
F4	1.112±0.840	1.574±0.006	1.529±0.002	0.609±0.007
Total ginsenosides <sup>a</sup>	18.602	15.983	14.452	5.494
Diol/Triol <sup>b)</sup>	1.454	1.611	1.762	2.049

\* GFB-16 : ginseng flower buds extracted 16 hours at 100°C, GFB-20 : ginseng flower buds extracted 20 hours at 100°C, GFB-24 : ginseng flower buds extracted 24 hours at 100°C, GFB-36 : ginseng flower buds extracted 36 hours at 100°C, Values represent the mean±S.E. (n=3), a) sum total of individual ginsenoside contents. b) Rb1+Rb2+Rc+Rd+Rg3+Rg5/Re+Rf+Rg1+Rg2+Rg6+Rh1+Rh4+Rk3+F1+F4

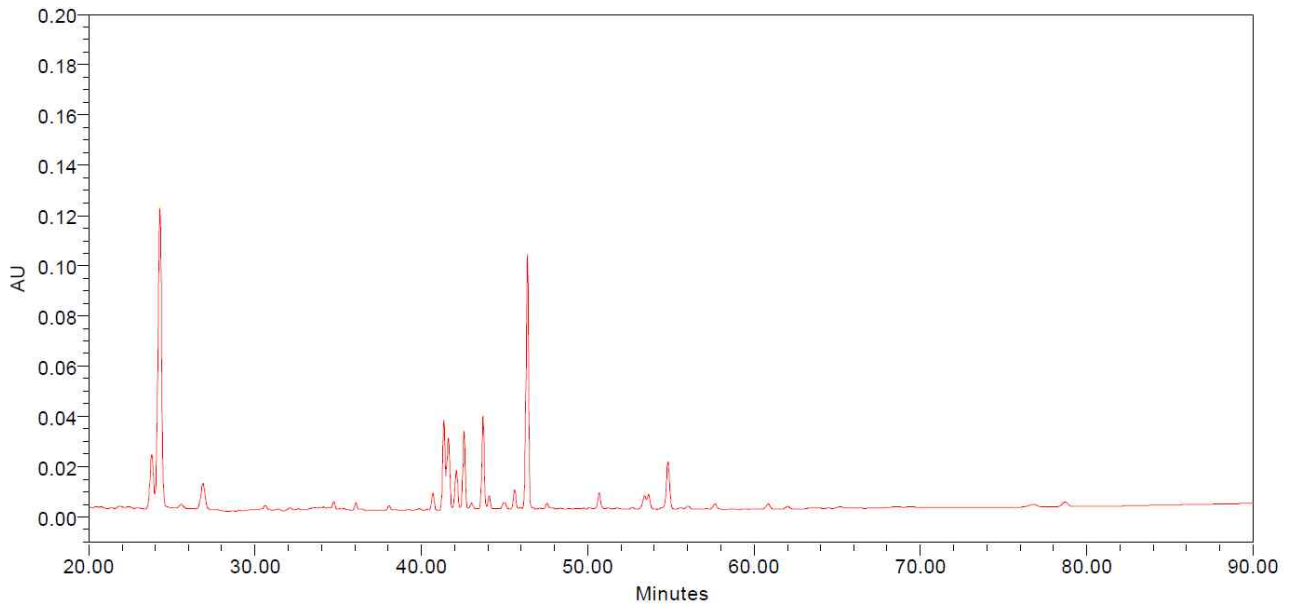
Ginsenosides	(% w/w)		
	GFB-48	GFB-60	GFB-72
Rb1	0.069±0.003	0.034±0.025	0.018±0.002
Rb2	0.197±0.010	0.132±0.003	0.047±0.008
Rc	0.226±0.011	0.169±0.020	1.109±0.006
Rd	0.942±0.004	0.863±0.003	0.354±0.003
Re	0.149±0.026	0.244±0.336	0.033±0.019
Rf	0.028±0.003	0.030±0.010	0.022±0.002
Rg1	0.096±0.118	0.053±0.046	0.013±0.007
Rg2	0.614±0.003	0.696±0.014	0.454±0.000
(20S)Rg3	0.689±0.015	0.930±0.015	0.451±0.002
(20R)Rg3	0.281±0.004	0.179±0.012	0.121±0.009
Rg5(E)	0.278±0.001	0.405±0.005	0.236±0.002
Rg6	0.189±0.002	0.244±0.003	0.125±0.004
Rh1	1.375±0.009	1.620±0.011	0.075±0.015
Rh4	0.073±0.001	0.101±0.001	0.051±0.000
Rk1+ Rg5(Z)	0.203±0.002	0.284±0.003	0.153±0.001
Rk3	0.035±0.002	0.044±0.001	0.023±0.000
F1	-	-	0.006±0.000
F4	0.724±0.033	0.941±0.008	0.497±0.002
Total ginsenosides <sup>a</sup>	6.103	6.990	2.136
Diol/Triol <sup>b)</sup>	1.899	1.805	2.684

\* GFB-48 : ginseng flower buds extracted 48 hours at 100°C, GFB-60 : ginseng flower buds extracted 60 hours at 100°C, GFB-72 : ginseng flower buds extracted 72 hours at 100°C, Values represent the mean±S.E. (n=3), a) sum total of individual ginsenoside contents. b) Rb1+Rb2+Rc+Rd+Rg3+Rg5/Re+Rf+Rg1+Rg2+Rg6+Rh1+Rh4+Rk3+F1+F4

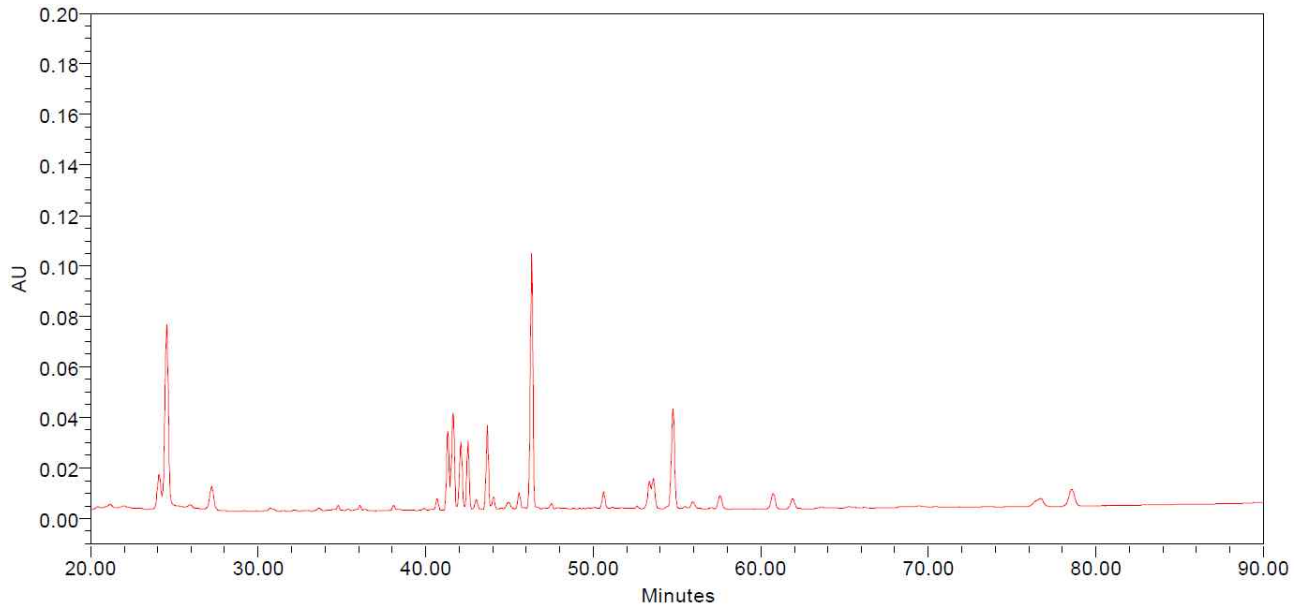
{HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the extracted ginseng flower buds (GFB-2)}



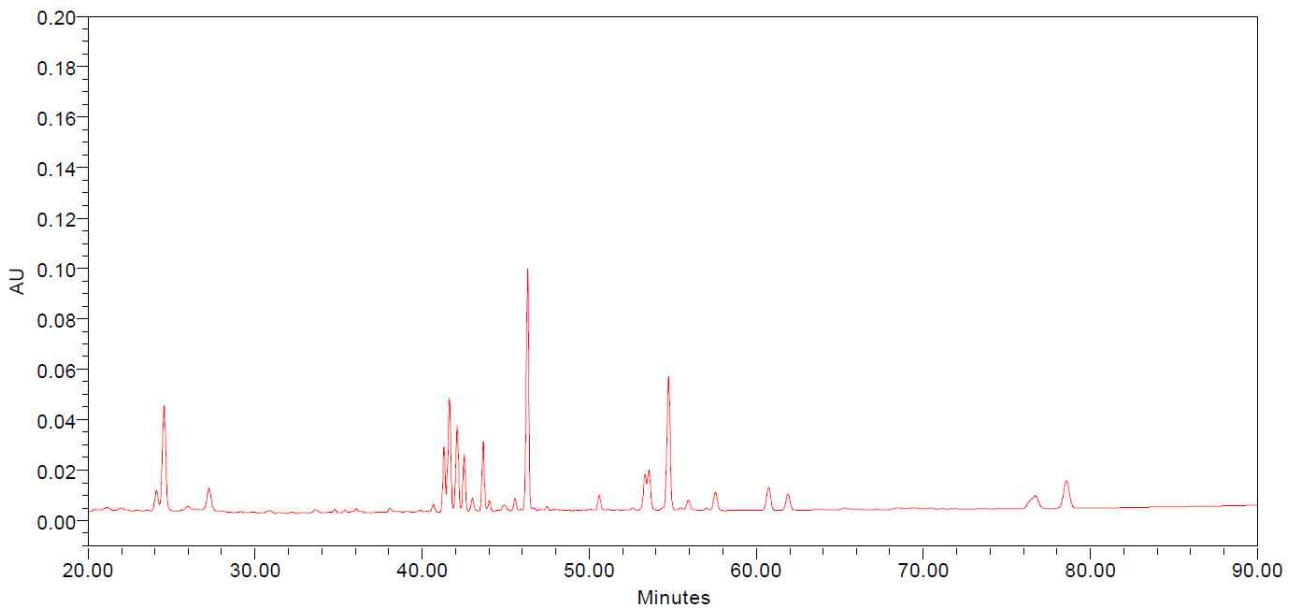
{HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the extracted ginseng flower buds (GFB-4)}



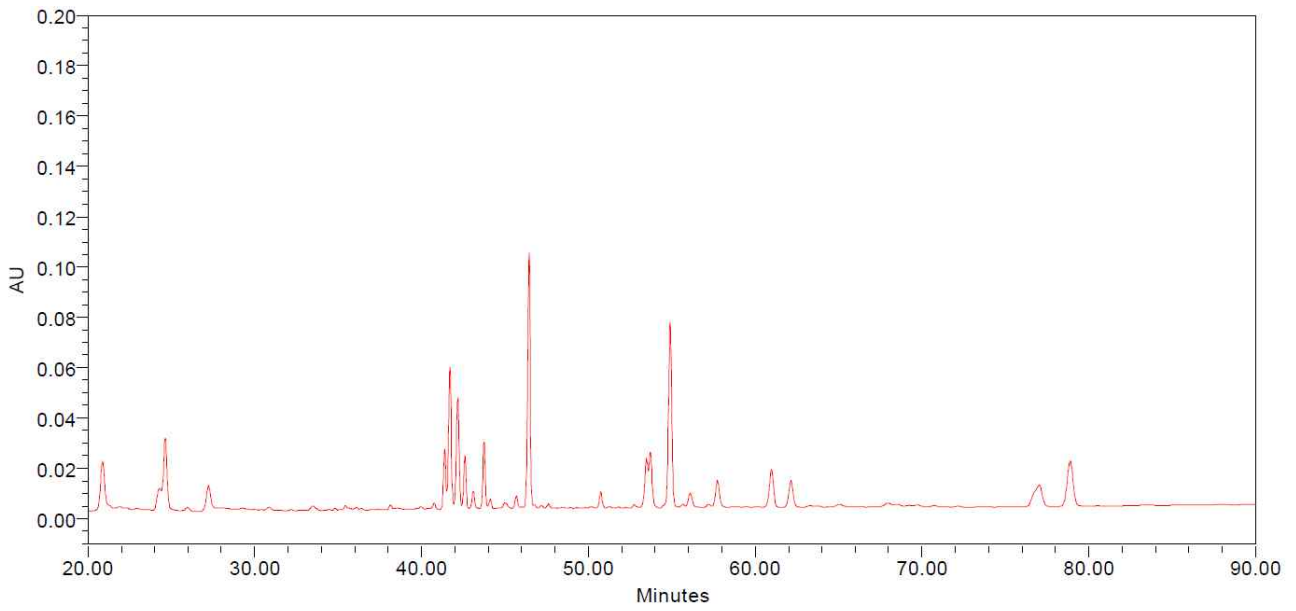
{HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the extracted ginseng flower buds (GFB-8)}



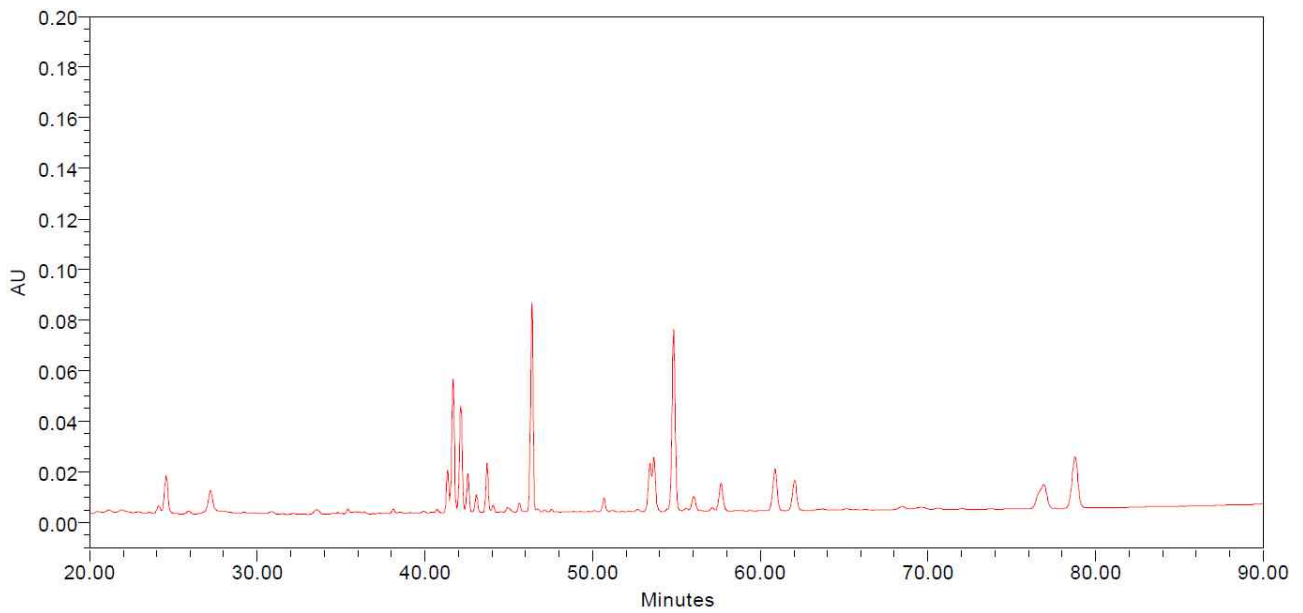
{HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the extracted ginseng flower buds (GFB-12)}



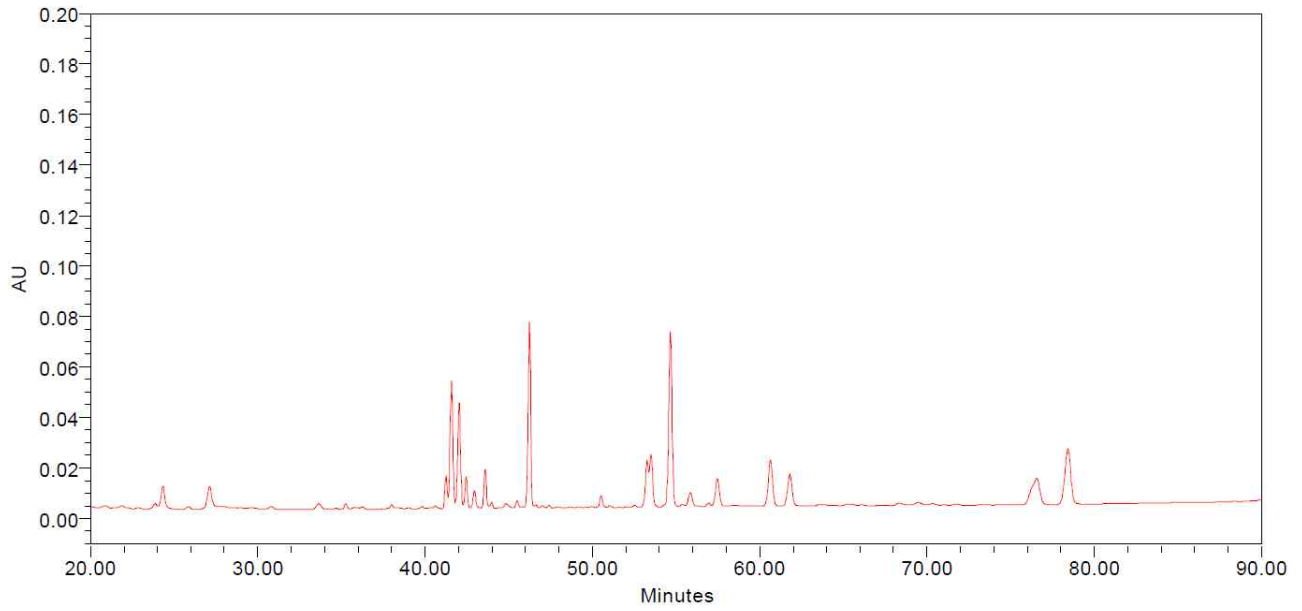
{HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the extracted ginseng flower buds (GFB-16)}



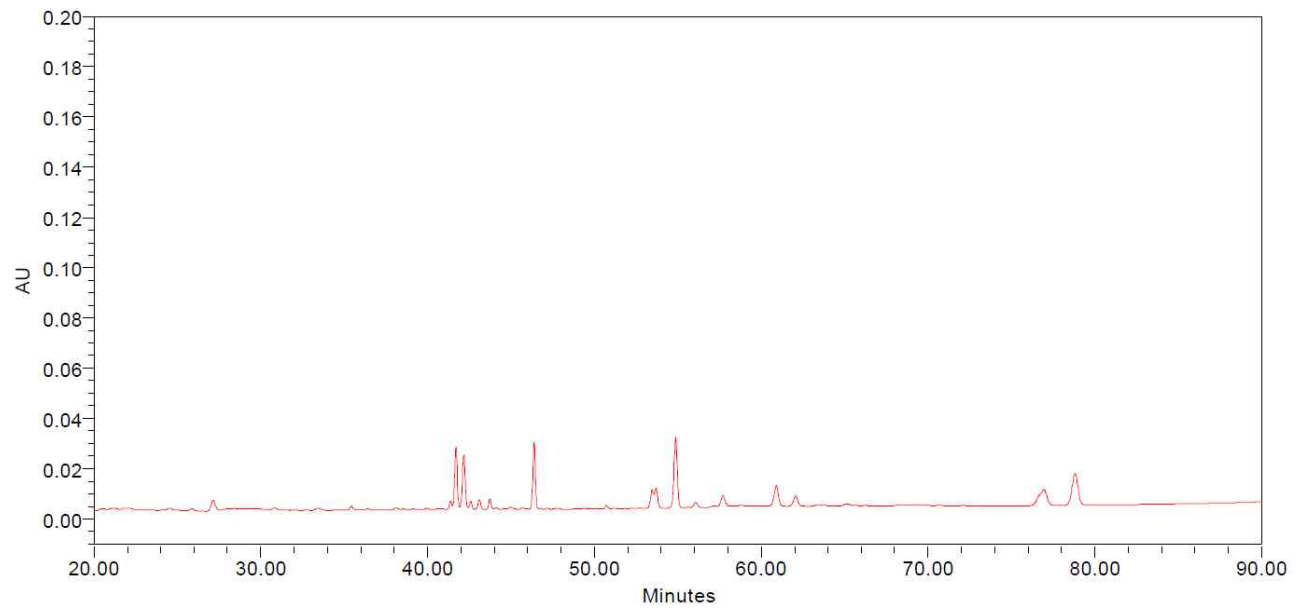
{HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the extracted ginseng flower buds (GFB-20)}



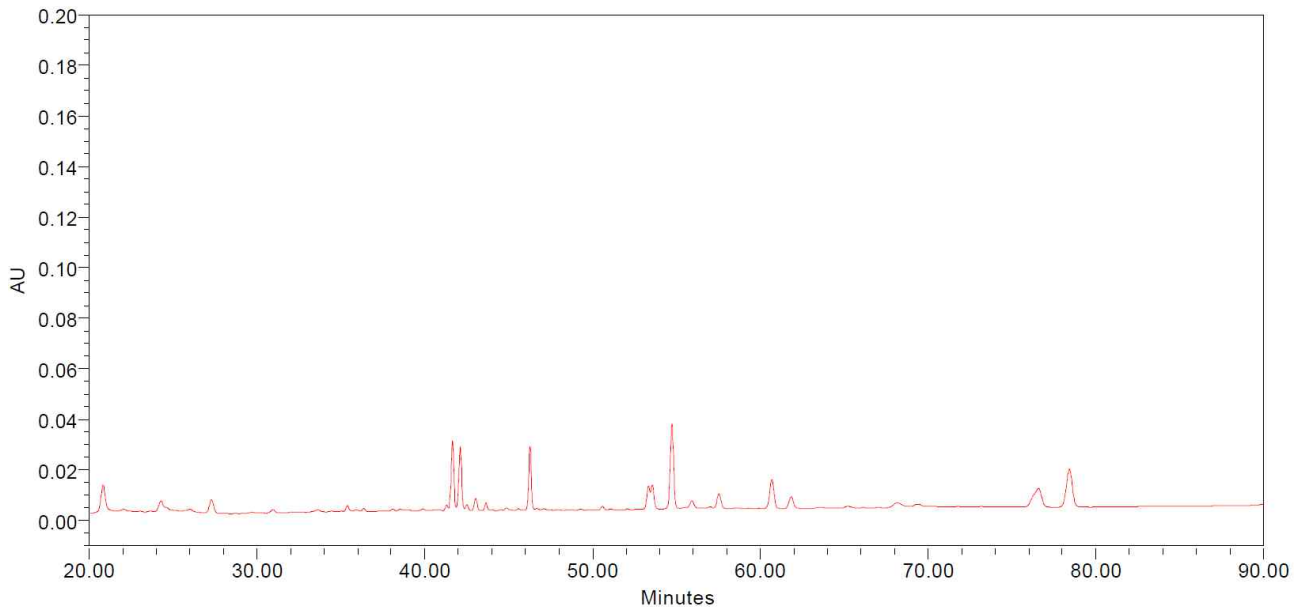
{HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the extracted ginseng flower buds (GFB-24)}



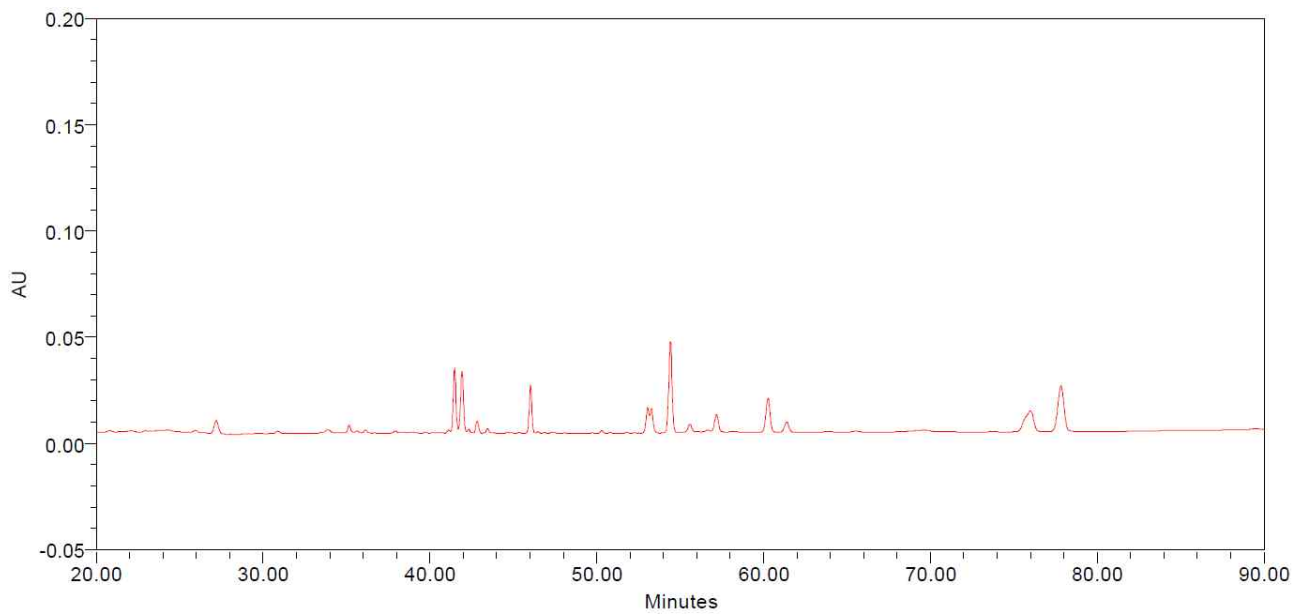
{HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the extracted ginseng flower buds (GFB-36)}



{HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the extracted ginseng flower buds (GFB-48)}

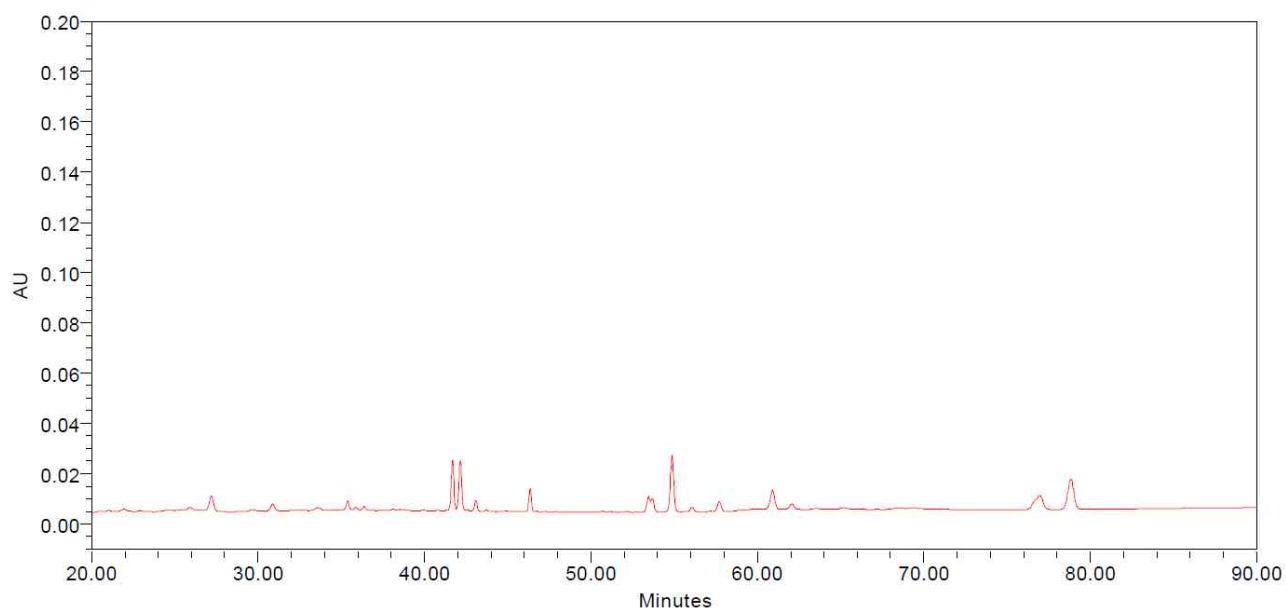


{HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the extracted ginseng flower buds (GFB-60)}





{HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the extracted ginseng flower buds (GFB-72)}



## ○ 인삼꽃대의 용매 추출조건 최적화

### 가. 실험재료 및 방법

#### (1) 실험재료

본 연구에 사용한 인삼꽃대는 충청북도 음성에서 2010년 8월 20일에 4년근 인삼꽃대 10 kg를 채집하였고, 건조는 음성의 충북홍삼영농조합법인에서 시행하였다. 제품표본은 고연 인삼연구센터에 보관하고 있다.

#### (2) 엑스의 조제

건조한 각 인삼꽃대를 세말로 하여 시료 각각 10g 씩에 95% ethyl alcohol, 50% ethyl alcohol, 70% ethyl alcohol 과 증류수 250 mL로 24시간씩 1회 추출하여 여과 후 여액을 합하여 감압 농축하여 엑스를 얻었다.

#### (3) 조사포닌(crude saponin) 조제

위에서 얻은 엑스 각 2g에 diethylether 50mL를 가하여 1시간씩 3회 초음파 세정기(고도기업, 4020P, 한국)로 추출한후, 원심분리하여 상등액을 제거한다. 얻은 잔사에 수포화 butanol 50mL를 가하여 2시간씩 3회 추출하고, 원심분리하여 상등액을 취하여 여과하고, 감압농축을 하여 조사포닌을 얻는다.

#### (4) HPLC-ginsenoside의 분석

위에서 얻은 엑스를 고 등의 조건을 응용하여 HPLC를 실시하고, 상법에 따라 표준과 직접 비교하여 인삼사포닌의 함량 및 조성을 각 시료당 3회 반복 실험하여 결과의 재현성을 확인하여 분석하였다. 표준은 Chromadex(USA)와 엠보연구소(Korea)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside를 사용하였다. 사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system(Waters, Milford, MA, USA)이며, 컬럼은 Eurospher 100-5 C18(3x250 mm; Knauer, Germany)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC grade; Sigma-Aldrich Chem Co., USA)과 증류수(HPLC급, B&J, USA)이며, acetonitrile의 비율을 17%(0 min)에서 25%(25 min), 39%(50 min), 60%(105 min) 그리고 100%(110 min)로 순차적으로 늘려 주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector(Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203 nm에서 검출하였다.

### 나. 결과 및 고찰

본 연구에서는 용매 조건에 따른 인삼꽃대의 인삼사포닌 변화를 검토하여 최적의 인삼꽃대 조성물 개발을 위하여 시행하였다. 추출 용매는 증류수, 50%, 70%, 95% ethylalcohol을 사용하였다. 추출 수율은 증류수 추출물이 44.56%를 나타내어 가장 높은 수율을 보여주었고, 70% ethylalcohol로 추출한 엑스가 41.48%, 50% ethylalcohol 추출물이 39.32%, 95% ethylalcohol 추출물이 24.33%의 순이었다.

조사포닌 함량에 있어서 95% ethylalcohol 추출물이 84.85%를 나타내어 가장 높은 인삼사포닌 함량을 보여주었고, 70% ethylalcohol로 추출한 엑스가 66.75%, 50% ethylalcohol 추출물이 55.08%, 증류수

추출물이 31.18%의 순이었다.

한편, 총사포닌 함량에 있어서 70% ethylalcohol 추출물이 19.502%를 나타내어 가장 높은 인삼사포닌 함량을 보여주었고, 50% ethylalcohol로 추출한 엑스가 16.654%, 95% ethylalcohol 추출물이 13.721%, 증류수 추출물이 5.069%의 순이었다.

특히, 인삼꽃대의 주 인삼사포닌인 ginsenoside Re에 있어서도 70% ethylalcohol 추출물이 8.027%를 나타내어 가장 높은 인삼사포닌 함량을 보여주었고, 50% ethylalcohol로 추출한 엑스가 6.872%, 95% ethylalcohol 추출물이 5.794%, 증류수 추출물이 0.076%의 순으로 총사포닌과 동일한 패턴을 보여주었다.

홍삼 특유사포닌으로 활성사포닌인 ginsenoside Rh1, Rg3의 함량에 있어서는 증류수 24시간 추출시 1.339, 0.954%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 인삼사포닌 배당체인 ginsenoside Rb2, Rc, Rd의 함량에 있어서는 70% ethylalcohol 24시간 추출시 2.277%, 2.307%, 4.013%로 가장 높은 함량을 나타내었다.

#### 다. 결론

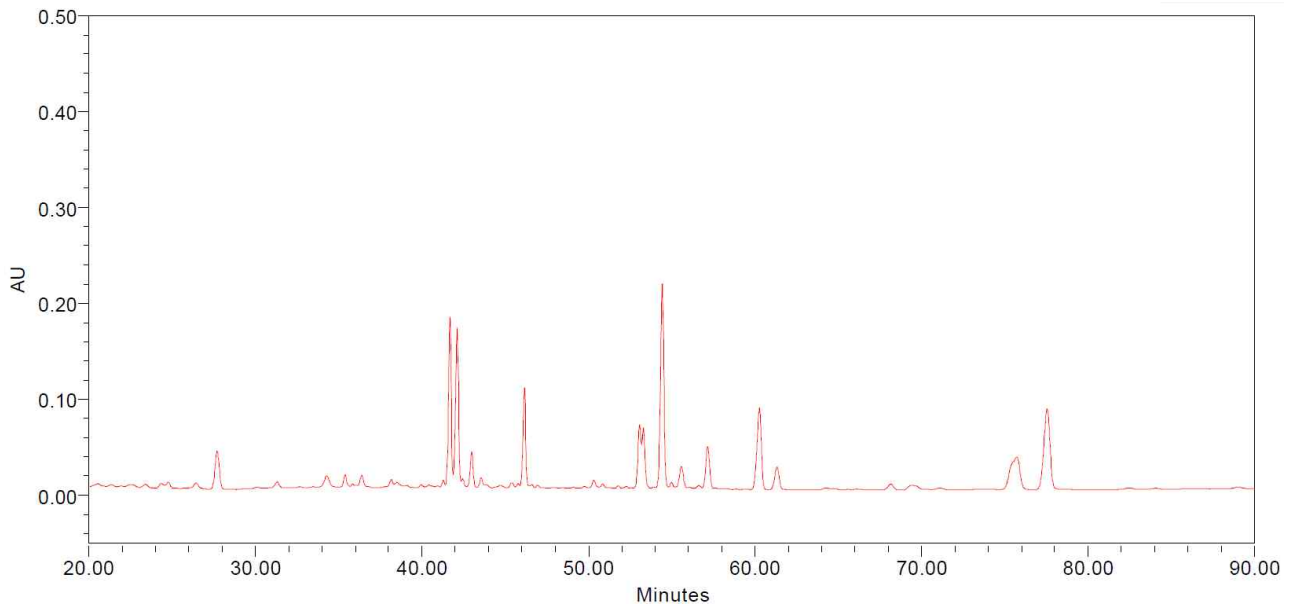
홍삼 특유사포닌으로 활성사포닌인 ginsenoside Rh1, Rg3 고농도 함유 조성물은 증류수 24시간 추출물이 좋고, 인삼사포닌 배당체인 ginsenoside Rb2, Rc, Rd 고농도 함유 조성물은 70% ethylalcohol 24시간 추출물을 사용하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

#### Quantitative analysis of Ginsenosides in ginseng flower buds extracted under various solvent

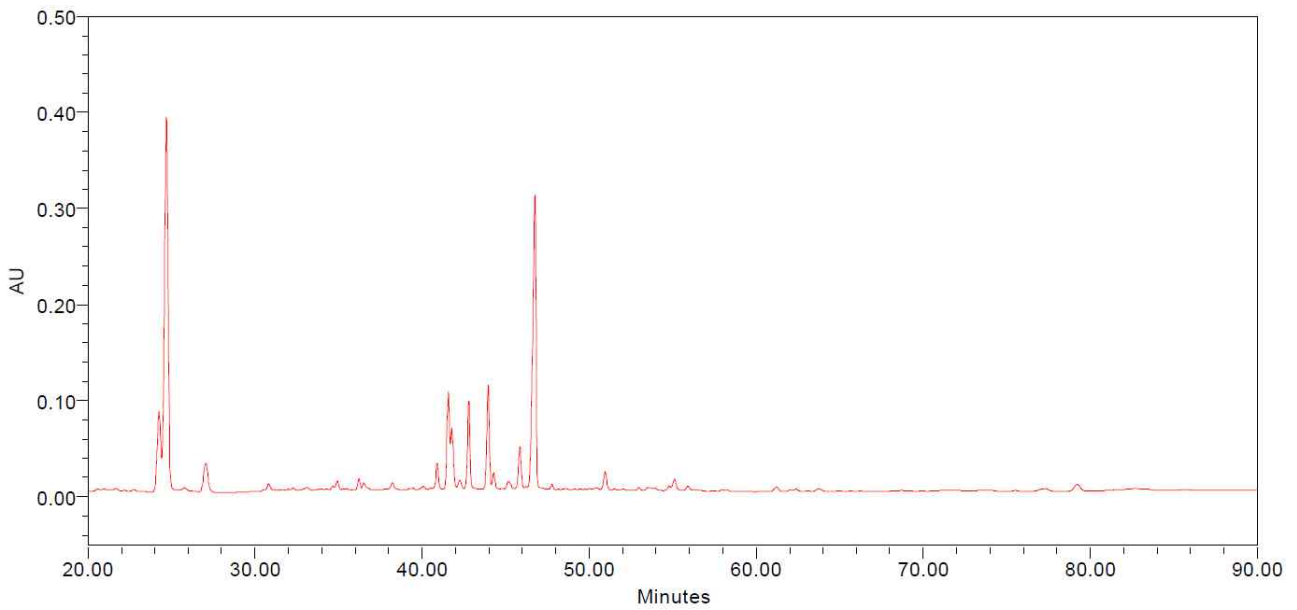
Ginsenosides	(% ,w/w)			
	water 24h	50%EtOH24h	70%EtOH 24h	95%EtOH 24h
Rb1	0.034±0.003	0.763±0.018	0.953±0.020	0.553±0.005
Rb2	0.461±0.005	1.831±0.011	2.277±0.034	1.494±0.017
Rc	0.129±0.007	1.939±0.035	2.307±0.077	1.605±0.021
Rd	0.600±0.010	3.349±0.026	4.013±0.050	2.490±0.039
Re	0.076±0.007	6.872±0.042	8.027±0.106	5.794±0.037
Rf	0.050±0.013	0.085±0.003	0.105±0.007	0.044±0.010
Rg1	0.044±0.002	0.868±0.009	1.018±0.016	0.632±0.001
Rg2	0.560±0.007	0.312±0.012	0.340±0.010	0.282±0.007
(20S)Rg3	0.743±0.019	0.067±0.004	0.035±0.001	0.017±0.001
(20R)Rg3	0.211±0.009	0.036±0.008	0.024±0.003	0.013±0.002
Rg5(E)	0.242±0.003	0.030±0.000	0.011±0.000	-
Rg6	0.191±0.002	0.012±0.000	0.016±0.000	0.016±0.001
Rh1	1.339±0.014	0.118±0.009	0.107±0.011	0.078±0.002
Rh4	0.077±0.002	0.005±0.000	0.001±0.000	0.002±0.000
Rk1+ Rg5(Z)	0.151±0.002	0.016±0.000	0.007±0.000	-
Rk3	0.043±0.002	0.011±0.000	0.013±0.000	0.009±0.000
F1	0.026±0.008	0.260±0.004	0.310±0.004	0.242±0.009
F4	0.679±0.010	0.062±0.003	0.037±0.002	0.019±0.001
Total ginsenosides <sup>a</sup>	5.656	16.634	19.602	13.289
Diol/Triol <sup>b</sup>	0.833	0.933	0.965	0.867

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

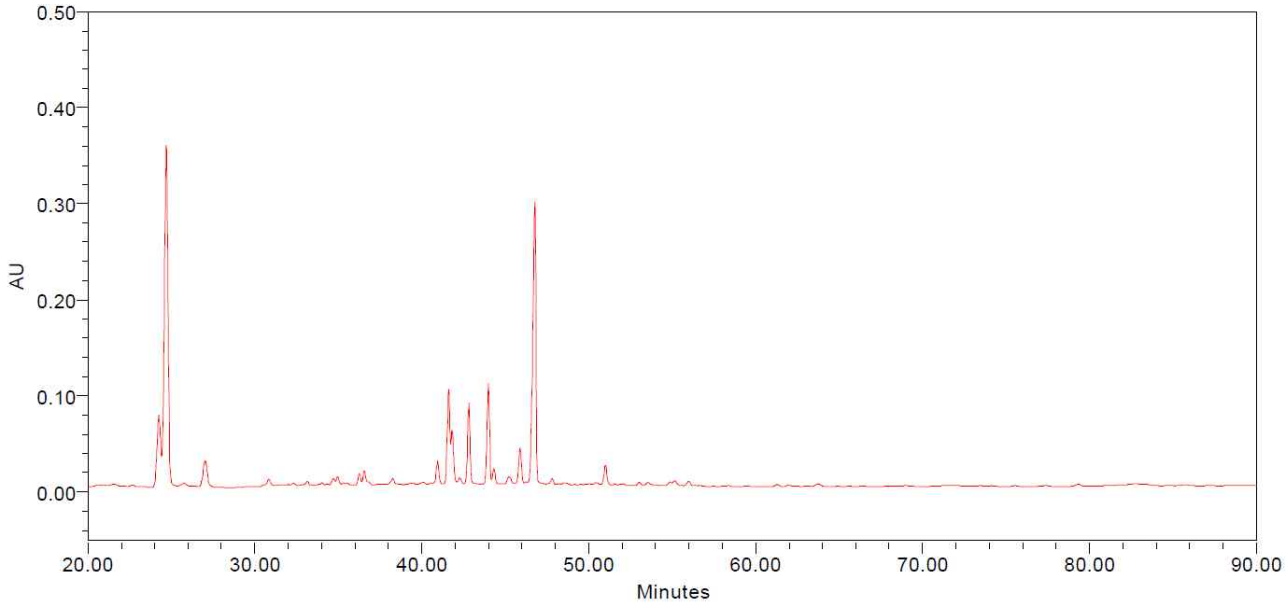
(HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower buds extracted by distilled water for 24 hours)



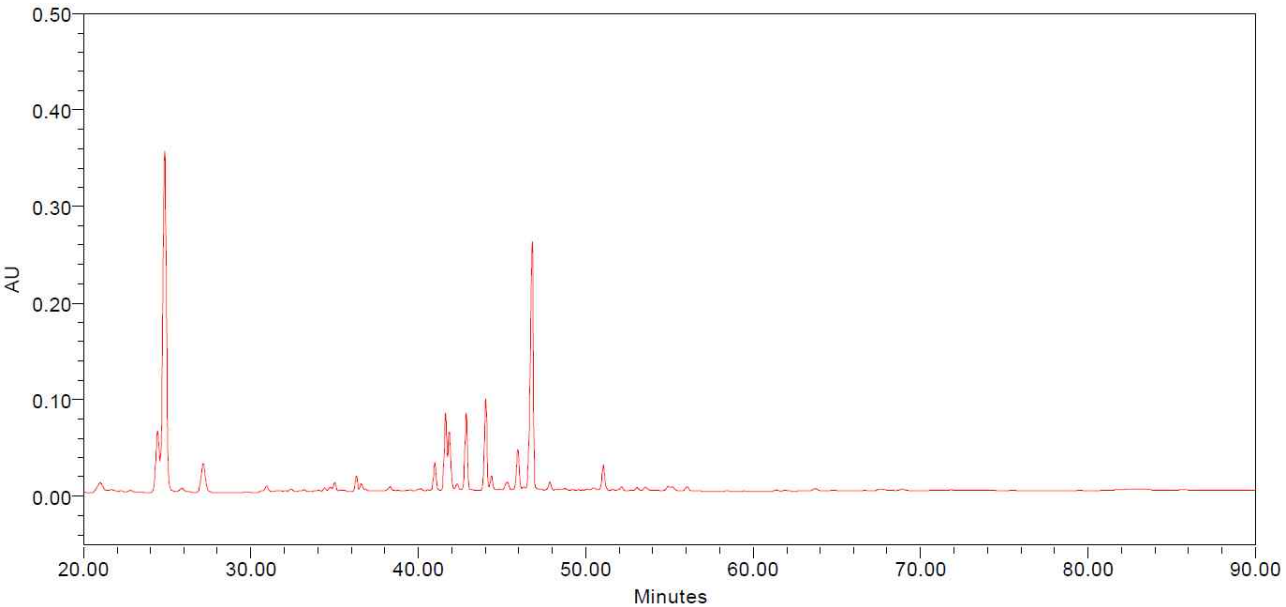
(HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower buds extracted by 50% ethylalcohol for 24 hours)



(HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower buds extracted by 70% ethylalcohol for 24 hours)



(HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower buds extracted by 95% ethylalcohol for 24 hours)



## 2) PROSAPOGENIN 성분 고농도 함유 인삼꽃대엑스 개발 및 기능성 성분 분리

○ Ultrasonication 및 열 처리 추출조건에 따른 성분 분석(HPLC)

### 가. 실험재료 및 방법

#### (1) 실험재료

본 연구에 사용한 인삼꽃대(Ginseng Fros, Flower buds of *Panax ginseng*)는 충청북도 음성에서 2010년 8월 20일에 4년근 인삼꽃대 10 kg를 채집하였고, 건조는 음성의 충북홍삼영농조합법인에서 시행하였다. 얻은 시료를 대상으로 조건별 초음파 처리 후, 인삼의 사포닌함량을 비교 검토하였다. 각각의 제품표본은 고연 인삼연구센터에 보관하고 있다.

Figure of ginseng flower buds (*Panax ginseng* Meyer)



Fresh ginseng flower buds



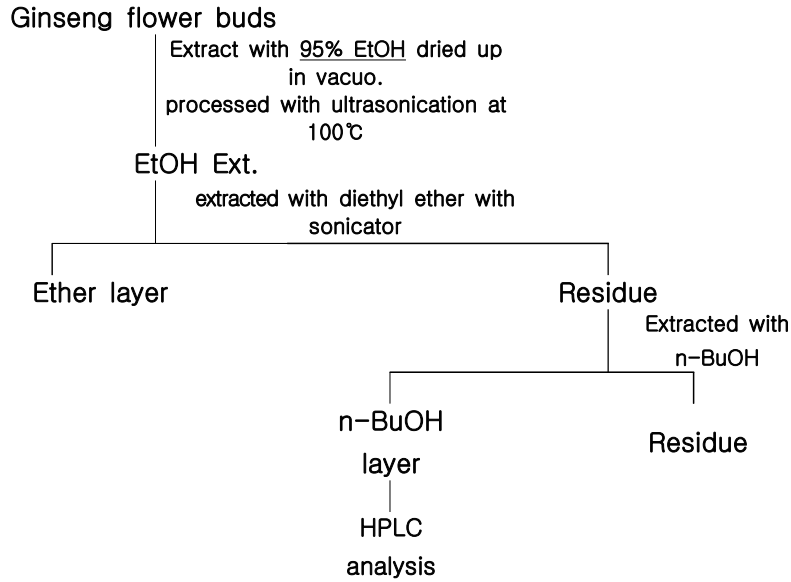
dried ginseng flower buds

#### (2) 인삼꽃대 초음파 처리 조성물 조제

인삼꽃대 건조물 각각 5 kg에 Ethyl alcohol 10 L를 가하여 2회 환류 추출후 여과하여 감압농축하여 Ethyl alcohol 엑스를 얻었다. 얻은 에탄올 엑스 1.5 kg에 증류수 20 L를 가하여 ultrasonicator(고도기연, 한국)에 넣고, 100°C에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 시간씩 초음파 처리를 각각 시행하였다.

#### (3) 조사포닌(crude saponin) 조제

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



Scheme. 1. Fractionation of crude saponin

(4) HPLC-ginsenoside의 분석

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

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

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

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

Flower bud of <i>Panax ginseng</i> <sup>a)</sup>	Time	0	25	50	105	110	120	130	140
	%A	17	25	40	60	100	100	100	17

1) Mobile phase :

Solvent A - ACN

Solvent B - water

2) Flow rate : 0.8 mL/min

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

4) Detector : Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters, U.S.A.)

#### 나. 결과 및 고찰

Table 1에서와 같이 각 ginsenoside의 총합인 총 사포닌(total saponin) 함량에 있어서는 UGFB-16이 18.657%이었으며 UGFB-19은 16.674%이었으며, UGFB-13는 15.386%로서 초음파 16시간 처리 인삼꽃대 제제의 총 사포닌이 높은 함량을 보여주었다. 인삼꽃대의 주성분인 ginsenoside Re가 가수분해되어 생성되는 ginsenoside F<sub>4</sub>에 있어서는 UGFB-16이 8.833%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, UGFB-19 (7.797%), UGFB-11 (6.838%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

홍삼의 특유성분이며, 항암, 혈압강하, 항산화, 뇌신경 보호작용이 보고된 ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 경우, UGFB-16가 2.230%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, UGFB-13 (2.190%), UGFB-11 (2.189%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

또다른 열 가수분해물인 Ginsenoside Rg<sub>5</sub>의 경우, UGFB-16가 2.339%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, UGFB-19 (2.116%), UGFB-20 (1.969%) 의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

한편, 주름개선작용이 보고된 ginsenoside Rg<sub>2</sub>의 함량에 있어서는 UGFB-13이 1.046%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, UGFB-16 (1.002%), UGFB-11 (0.877%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 항알러지 작용이 보고된 ginsenoside Rh<sub>1</sub>에 있어서는 UGFB-12이 1.396%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, UGFB-16 (0.761%), UGFB-13 (0.705%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

#### 다. 결론

본 연구는 Ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rg<sub>6</sub>, Rh<sub>1</sub> 그리고 F<sub>4</sub> 등의 인삼의 활성 prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 제제를 개발하여 건강기능식품의 핵심 원료 소재 획득을 목표로 하였다. 이의 일환으로 농림 부산 폐기물인 인삼 꽃대에 물리화학적 가공 방법의 하나로서 증류수를 가하여 초음파 처리를 함으로써 인삼사포닌 배당체를 인삼 prosapogenin으로 전환하여 HPLC법으로 검토했다.

그 결과, 인삼꽃대 제제에서는 100°C에서 16시간 초음파 처리시 ginsenoside F<sub>4</sub>가 8.833%, Rg<sub>2</sub> 1.002%, Rg<sub>3</sub> 2.230%, 그리고 Rg<sub>5</sub>가 2.339%로 고농도 함유를 보여주었다.

이와 같은 결과를 검토해 보면, 인삼 꽃대를 이용한 초음파 처리 prosapogenin 고농도 함유 제제는 건강기능식품의 기능성 강화 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료되며, 향후, 본 제제를 이용한 새로운 기능성 제품의 개발이 기대되고 있다.



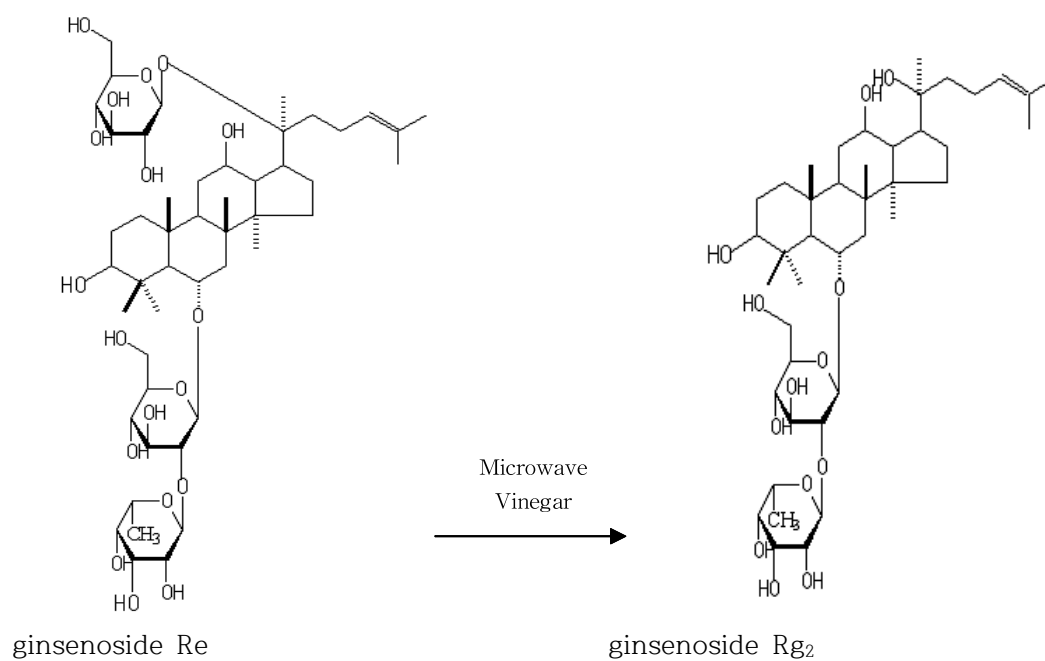


Fig. 1. Transformation of protopanaxatriol saponin ginsenoside Re to ginsenoside Rg<sub>2</sub>

Table 1. Ginsenoside composition of the ginseng flower buds extracts processed with ultrasonication over time.

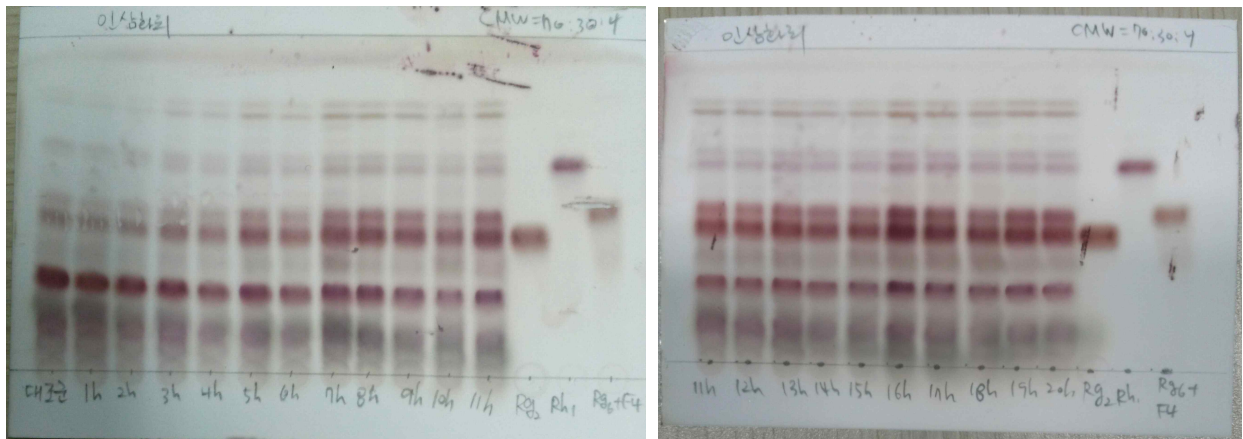
Ginsenosides	ginseng flower buds										(%,w/w)
	GFB	UGFB-1	UGFB-2	UGFB-3	UGFB-4	UGFB-5	UGFB-6	UGFB-7	UGFB-8	UGFB-9	UGFB-10
Rb1	0.193±0.002	0.194±0.011	0.158±0.005	0.381±0.002	0.405±0.001	0.609±0.003	0.425±0.001	0.745±0.001	0.740±0.006	0.704±0.003	0.539±0.012
Rb2	0.159±0.002	0.152±0.009	0.097±0.003	0.140±0.002	0.115±0.004	0.151±0.003	0.094±0.002	0.174±0.007	0.135±0.006	0.121±0.002	0.112±0.008
Rc	0.013±0.001	0.015±0.002	0.004±0.000	0.006±0.001	0.006±0.001	0.012±0.000	0.005±0.001	0.017±0.003	0.008±0.001	0.010±0.002	0.011±0.003
Rd	1.081±0.013	1.034±0.040	0.652±0.022	1.007±0.004	0.803±0.002	0.971±0.001	0.647±0.006	1.062±0.008	0.928±0.014	0.834±0.004	0.663±0.011
Re	1.583±0.008	1.533±0.055	0.800±0.026	0.957±0.008	0.631±0.011	0.620±0.005	0.390±0.002	0.470±0.002	0.386±0.005	0.297±0.002	0.200±0.003
Rf	0.012±0.001	0.015±0.005	0.004±0.000	0.009±0.004	0.011±0.003	0.017±0.003	0.008±0.001	0.026±0.001	0.011±0.001	0.010±0.001	0.019±0.002
Rg1	0.296±0.003	0.299±0.007	0.171±0.007	0.211±0.003	0.138±0.005	0.140±0.003	0.087±0.001	0.111±0.001	0.082±0.001	0.068±0.003	0.054±0.003
Rg2	0.559±0.001	0.553±0.021	0.382±0.011	0.664±0.006	0.598±0.005	0.773±0.003	0.545±0.010	0.872±0.006	0.823±0.004	0.761±0.014	0.589±0.006
20S-Rg3	0.222±0.009	0.184±0.011	0.202±0.007	0.615±0.017	0.682±0.020	1.161±0.009	0.753±0.003	1.629±0.036	1.564±0.031	1.594±0.012	1.257±0.017
20R-Rg3	0.013±0.001	0.012±0.000	0.005±0.000	0.012±0.001	0.008±0.001	0.021±0.003	0.007±0.001	0.032±0.002	0.014±0.001	0.021±0.002	0.021±0.000
20E-Rg5	0.094±0.014	0.078±0.031	0.125±0.005	0.321±0.046	0.317±0.043	0.619±0.006	0.338±0.023	0.618±0.077	0.702±0.043	0.773±0.080	0.475±0.025
20Z-Rg5	0.041±0.003	0.044±0.017	0.067±0.005	0.125±0.012	0.160±0.054	0.235±0.002	0.148±0.010	0.340±0.031	0.321±0.013	0.341±0.009	0.254±0.006
Rg6	0.004±0.001	0.005±0.001	0.004±0.000	0.019±0.003	0.016±0.005	0.034±0.001	0.019±0.004	0.042±0.002	0.042±0.001	0.042±0.002	0.032±0.004
Rh1	0.089±0.021	0.066±0.009	0.291±0.357	0.217±0.022	0.213±0.019	0.350±0.011	0.229±0.017	0.476±0.031	0.483±0.029	0.433±0.026	0.349±0.017
Rh4	0.031±0.001	0.026±0.002	0.025±0.001	0.001±0.000	0.001±0.000	0.003±0.000	0.001±0.000	0.009±0.000	0.003±0.000	0.090±0.001	0.057±0.000
Rk1	0.072±0.004	0.031±0.005	0.061±0.004	0.194±0.022	0.186±0.012	0.321±0.001	0.203±0.013	0.362±0.029	0.309±0.233	0.444±0.001	0.271±0.008
Rk3	0.030±0.001	0.021±0.003	0.028±0.002	0.085±0.000	0.086±0.001	0.133±0.001	0.092±0.001	0.143±0.001	0.177±0.002	0.003±0.002	0.003±0.002
F1	0.021±0.001	0.020±0.002	0.012±0.001	0.022±0.002	0.017±0.002	0.025±0.002	0.011±0.000	0.023±0.008	0.020±0.005	0.020±0.005	0.025±0.002
F4	0.724±0.058	0.842±0.037	0.881±0.025	2.381±0.042	2.721±0.023	4.267±0.083	3.004±0.028	5.753±0.138	5.625±0.121	5.594±0.282	4.154±0.484
Total ginsenosides <sup>a</sup>	5.238	5.126	3.970	7.369	7.113	10.460	7.006	12.904	12.372	12.159	9.085

(%w/w)

Ginsenosides	ginseng flower buds									
	UGFB-1	UGFB-1	UGFB-1	UGFB-1	UGFB-1	UGFB-1	UGFB-1	UGFB-1	UGFB-1	UGFB-2
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0
Rb1	0.849± 0.003	0.523± 0.450	1.041± 0.006	0.680± 0.007	0.698± 0.002	1.048± 0.008	0.660± 0.001	0.750± 0.023	0.932± 0.004	0.710± 0.224
Rb2	0.126± 0.007	0.087± 0.058	0.157± 0.008	0.093± 0.013	0.094± 0.007	0.129± 0.015	0.078± 0.004	0.084± 0.008	0.095± 0.006	0.590± 0.667
Rc	0.014± 0.004	0.061± 0.079	0.017± 0.004	0.053± 0.074	0.011± 0.001	0.016± 0.006	0.011± 0.002	0.017± 0.008	0.014± 0.003	0.065± 0.095
Rd	0.919± 0.013	0.570± 0.453	1.089± 0.010	0.676± 0.006	0.684± 0.007	0.994± 0.008	0.617± 0.009	0.674± 0.009	0.793± 0.006	0.380± 0.399
Re	0.209± 0.003	0.169± 0.010	0.194± 0.010	0.113± 0.004	0.092± 0.002	0.113± 0.003	0.064± 0.004	0.083± 0.025	0.097± 0.009	0.047± 0.044
Rf	0.013± 0.000	0.014± 0.001	0.021± 0.001	0.013± 0.000	0.015± 0.002	0.014± 0.000	0.009± 0.002	0.017± 0.004	0.007± 0.003	0.232± 0.393
Rg1	0.046± 0.004	0.037± 0.004	0.045± 0.005	0.027± 0.003	0.023± 0.003	0.028± 0.004	0.013± 0.002	0.009± 0.002	0.009± 0.004	0.056± 0.074
Rg2	0.877± 0.010	0.779± 0.046	1.046± 0.006	0.677± 0.003	0.685± 0.009	1.002± 0.010	0.634± 0.013	0.721± 0.022	0.874± 0.011	0.497± 0.410
20S-Rg3	2.159± 0.116	1.787± 0.036	2.151± 0.026	1.031± 0.838	1.549± 0.069	2.195± 0.130	0.770± 0.662	1.276± 0.124	1.584± 0.009	0.839± 0.789
20R-Rg3	0.030± 0.003	0.026± 0.002	0.039± 0.002	0.042± 0.053	0.029± 0.003	0.035± 0.005	0.017± 0.014	0.027± 0.003	0.021± 0.001	0.006± 0.011
20E-Rg5	0.945± 0.097	0.806± 0.134	1.222± 0.172	0.610± 0.513	0.813± 0.039	1.507± 0.186	0.802± 0.081	0.942± 0.038	1.417± 0.005	1.346± 0.344
20Z-Rg5	0.454± 0.032	0.470± 0.135	0.773± 0.191	0.600± 0.250	0.483± 0.089	0.832± 0.166	0.461± 0.049	0.628± 0.073	0.699± 0.009	0.623± 0.212
Rg6	0.048± 0.002	0.071± 0.048	0.058± 0.002	0.043± 0.003	0.043± 0.002	0.070± 0.002	0.035± 0.013	0.048± 0.001	0.062± 0.001	0.068± 0.014
Rh1	0.586± 0.039	1.396± 1.493	0.705± 0.023	0.471± 0.028	0.489± 0.030	0.761± 0.015	0.480± 0.013	0.492± 0.002	0.631± 0.045	0.229± 0.223
Rh4	0.109± 0.001	0.095± 0.000	0.123± 0.001	0.100± 0.012	0.082± 0.001	0.148± 0.001	0.072± 0.023	0.086± 0.004	0.139± 0.000	0.108± 0.035
Rk1	0.559± 0.040	0.473± 0.026	0.665± 0.038	0.606± 0.211	0.453± 0.006	0.904± 0.007	0.601± 0.179	0.672± 0.248	1.488± 0.022	1.254± 0.621
Rk3	0.000± 0.000	0.039± 0.067	0.000± 0.000	0.000± 0.000	0.000± 0.000	0.000± 0.000	0.000± 0.000	0.000± 0.000	0.000± 0.000	0.000± 0.000
F1	0.023± 0.004	0.405± 0.661	0.032± 0.001	0.016± 0.003	0.075± 0.107	0.028± 0.004	0.020± 0.001	0.015± 0.005	0.015± 0.001	0.054± 0.087
F4	6.838± 0.241	4.383± 3.458	6.007± 4.447	5.546± 0.212	5.943± 0.279	8.833± 0.275	5.354± 0.411	6.571± 0.415	7.797± 0.330	3.560± 0.561
Total ginsenosides <sub>a)</sub>	14.806	12.192	15.386	11.398	12.261	18.657	10.699	13.112	16.674	10.667

\* GFB : ginseng flower buds extract, UGFB-1 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 1 hour, UGFB-2 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 2 hours, UGFB-3 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 3 hours, UGFB-4 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 4 hours, UGFB-5 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 5 hours, UGFB-6 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 6 hours, UGFB-7 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 7 hours, UGFB-8 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 8 hours, UGFB-9 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 9 hours, UGFB-10 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 10 hours, UGFB-11 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 11 hours, UGFB-12 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 12 hours, UGFB-13 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 13 hours, UGFB-14 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 14 hours, UGFB-15 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 15 hours, UGFB-16 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 16 hours, UGFB-17 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 17 hours, UGFB-18 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 18 hours, UGFB-19 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 19 hours, UGFB-20 : ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 20 hours, <sup>a)</sup> Sum of individual ginsenosides content, Values represent the mean±S.E. (n=3)

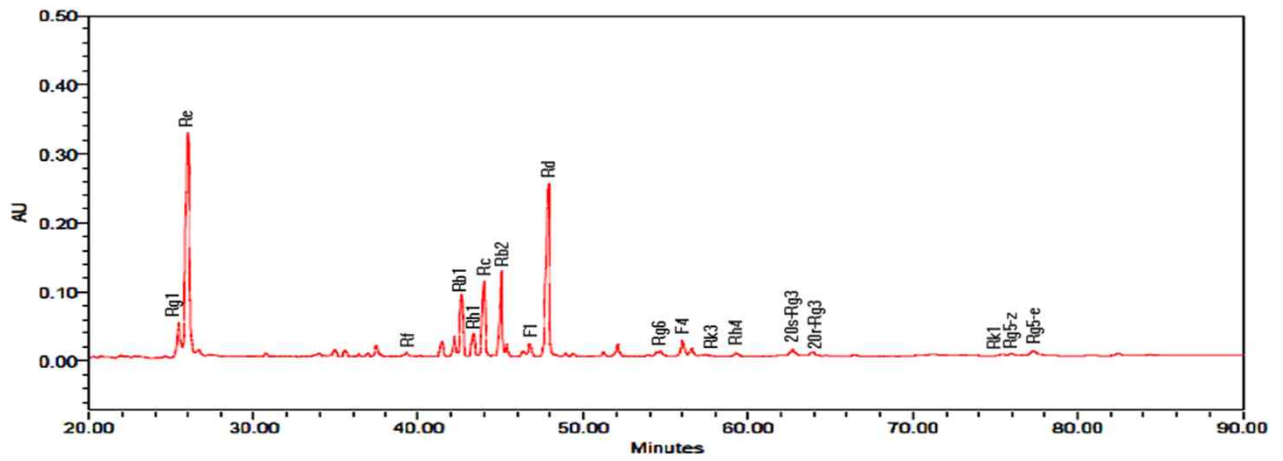
Fig 2. TLC chromatogram of ginsenosides in the ginseng flower buds extracts processed with ultrasonication (UGFB)



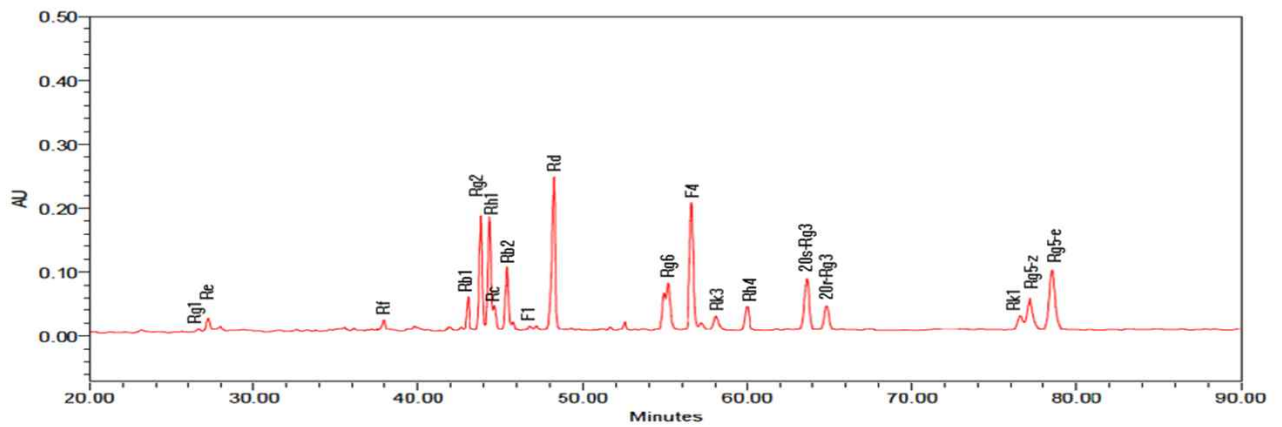
TLC plate : silicagel, 전개용매 : Chlorform; Methanol; Water = 70; 30; 4

Fig. 2. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower buds extracts processed with ultrasonication

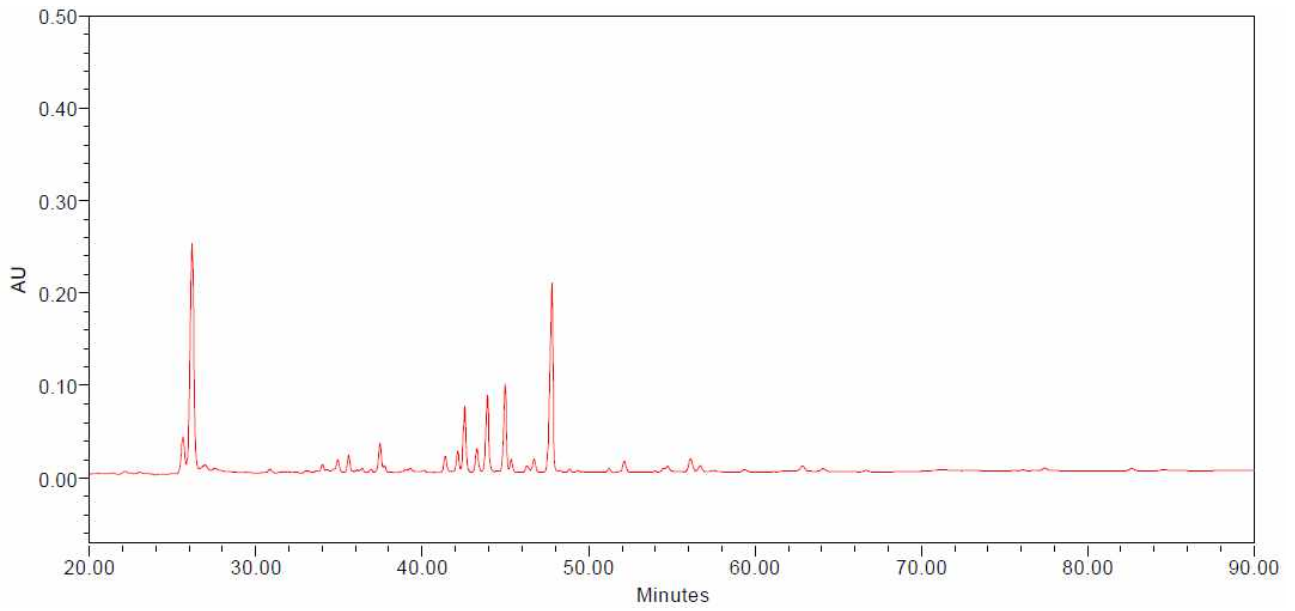
(GFB, ginseng flower buds extract)



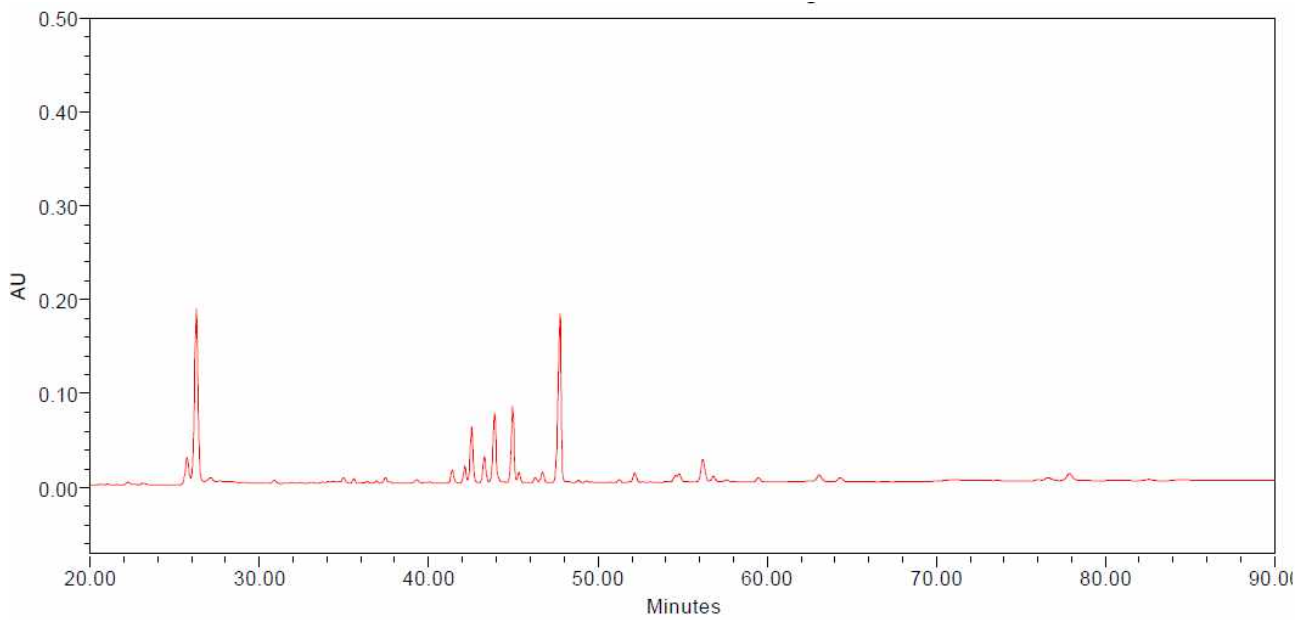
(UGFB-16, ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 16 hours)



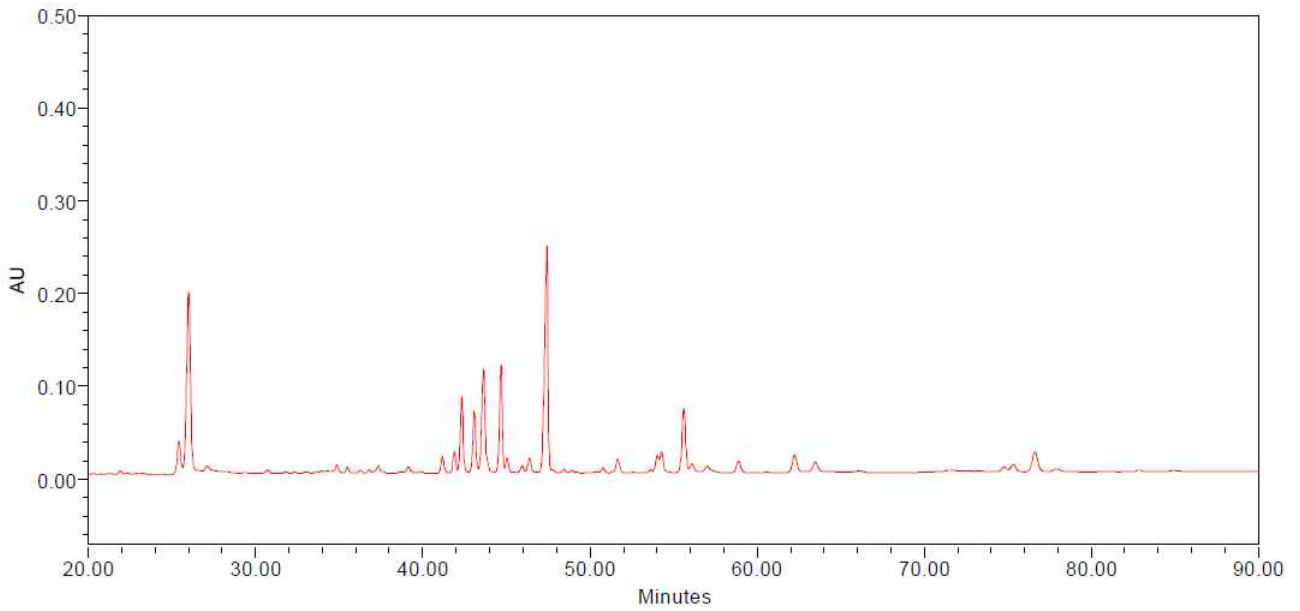
(UGFB-1, ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 1 hour)



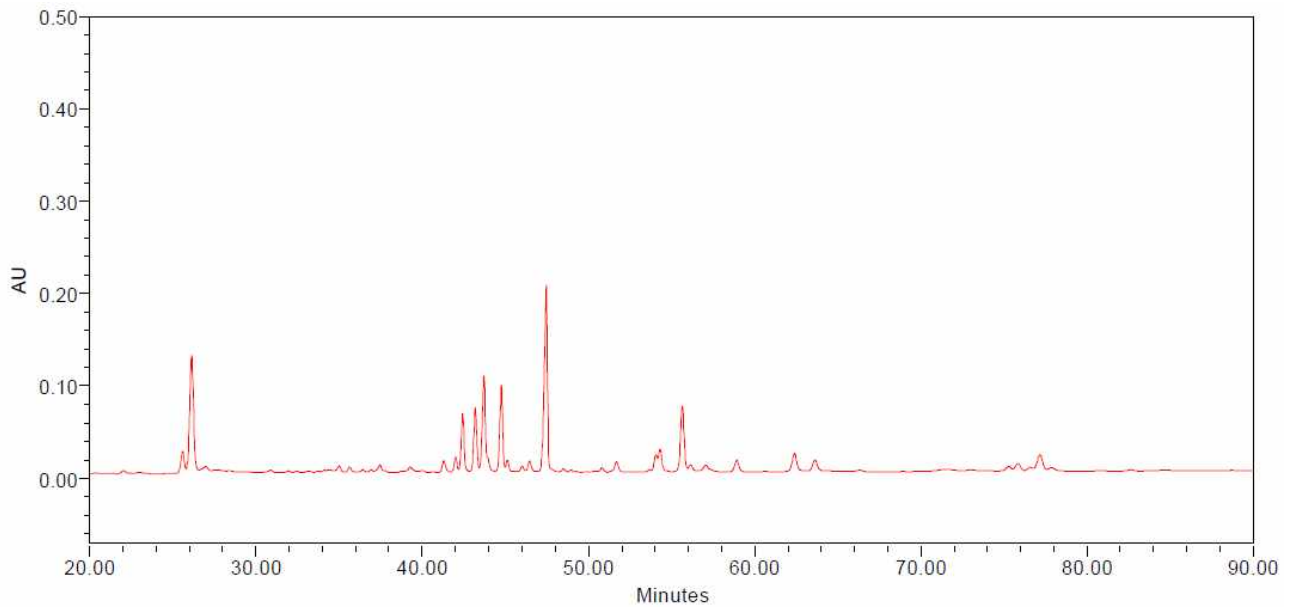
(UGFB-2, ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 2 hours)



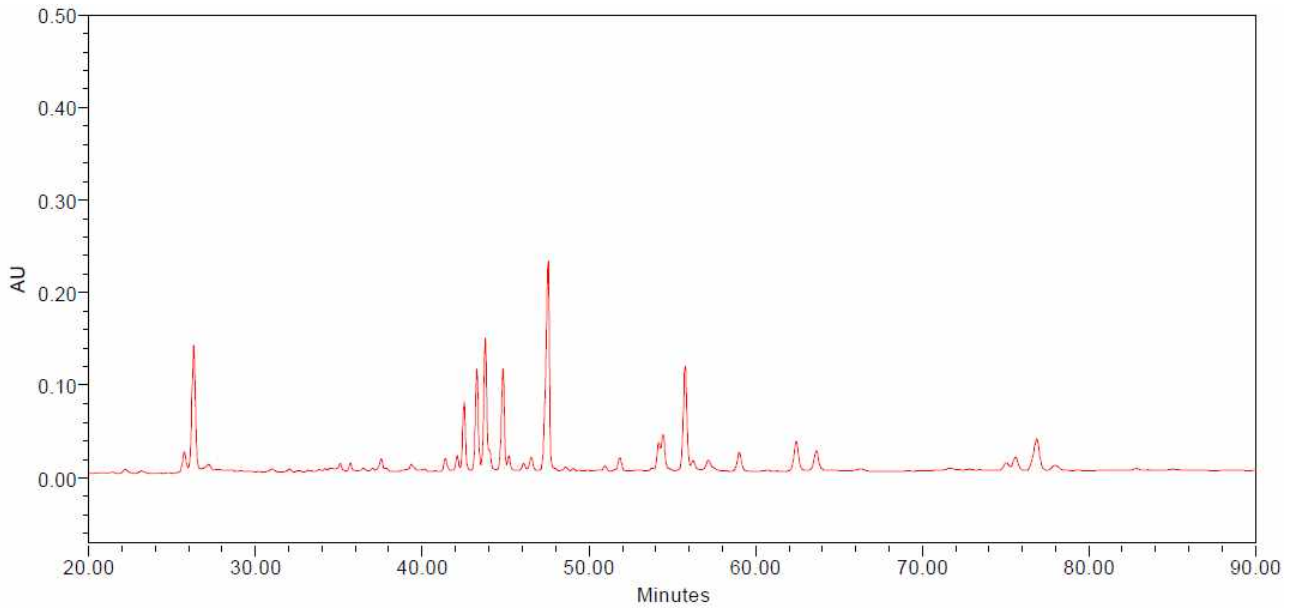
(UGFB-3, ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 3 hours)



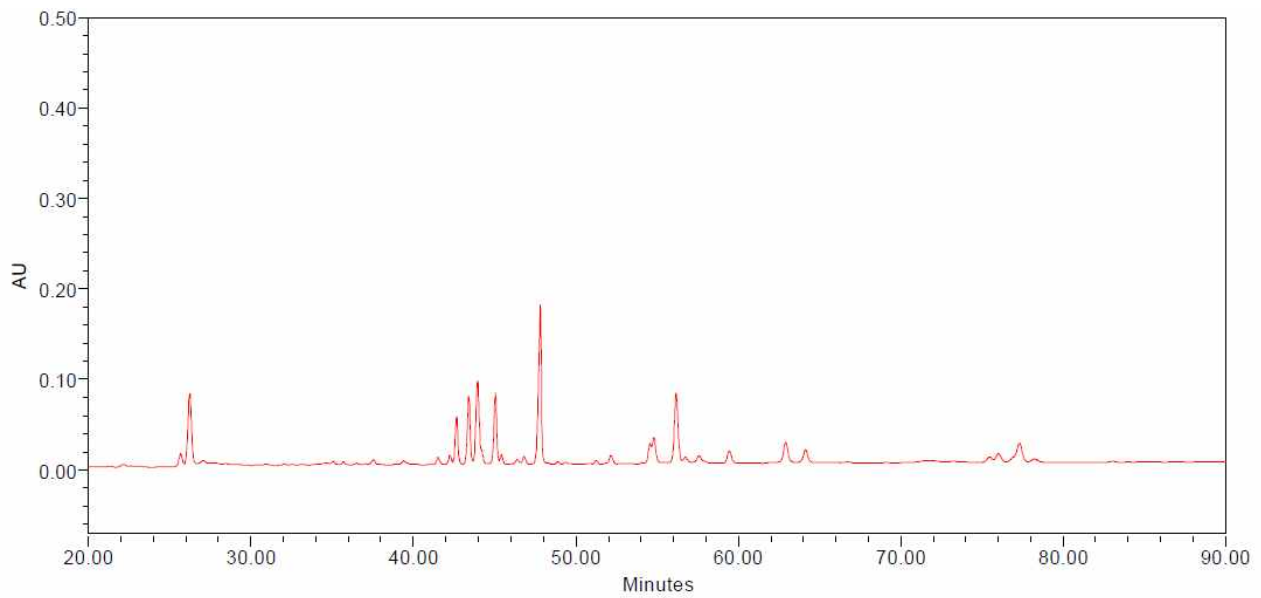
(UGFB-4, ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 4 hours)



(UGFB-5, ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 5 hours)

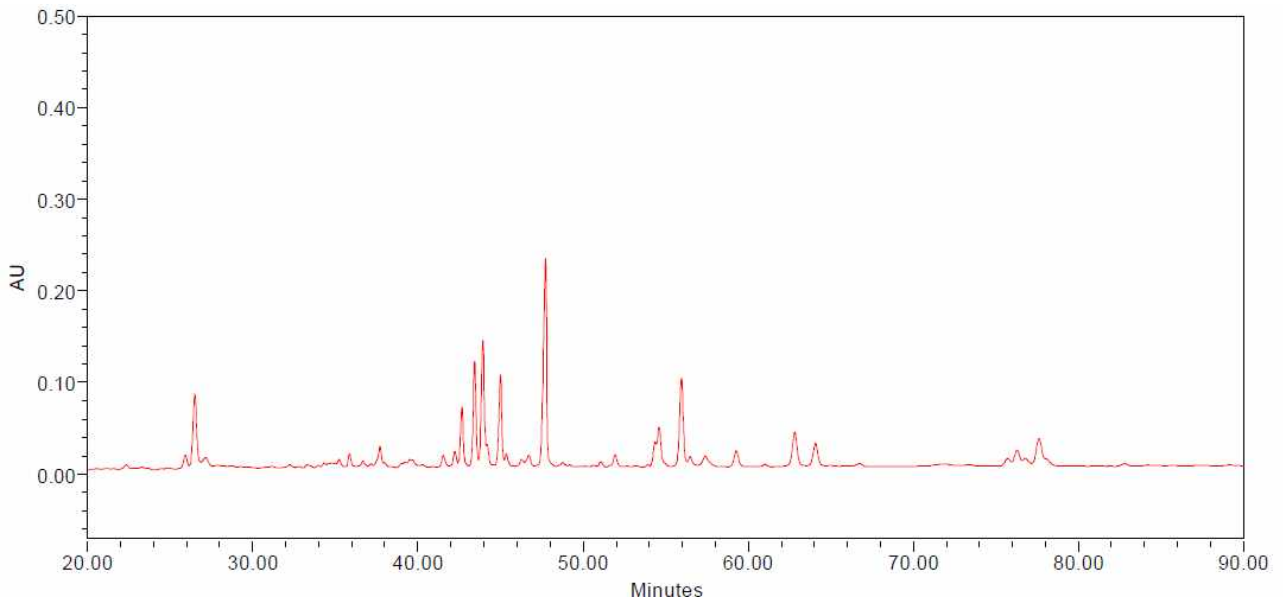


(UGFB-6, ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 6 hours)

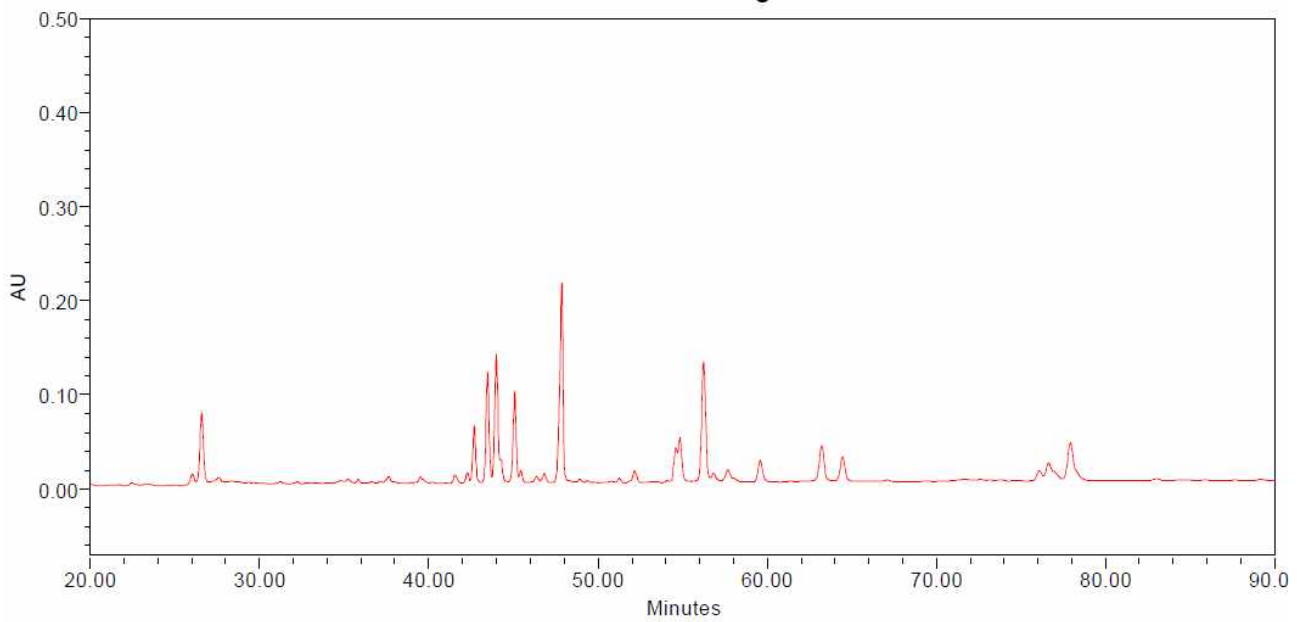




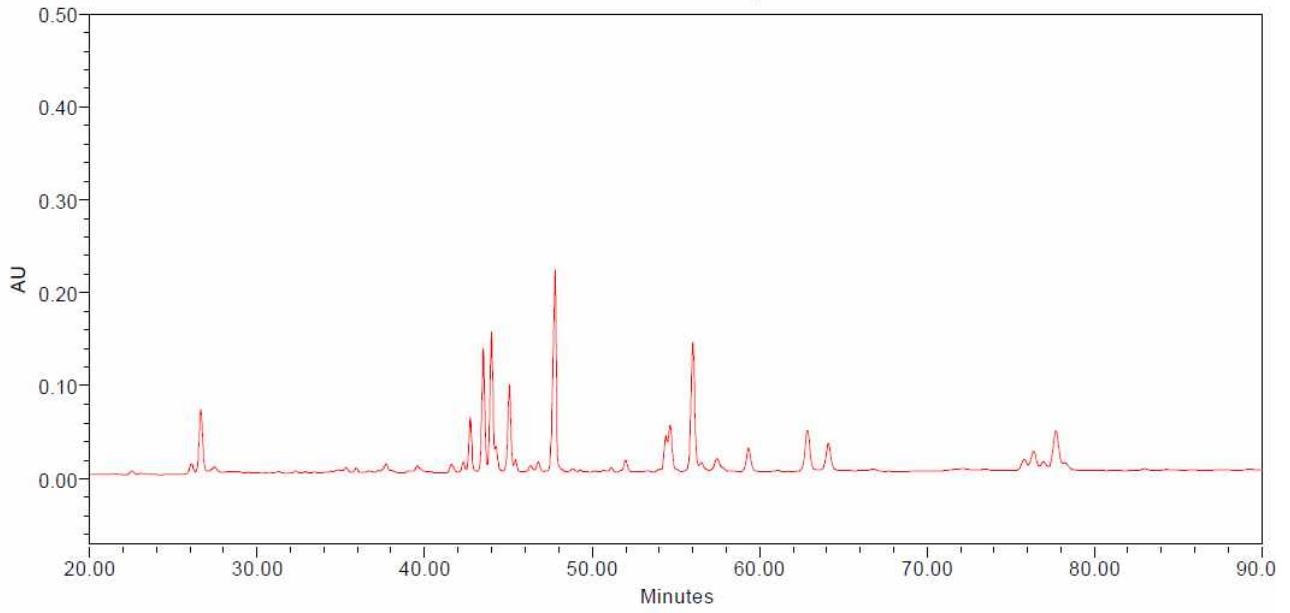
(UGFB-7, ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 7 hours)



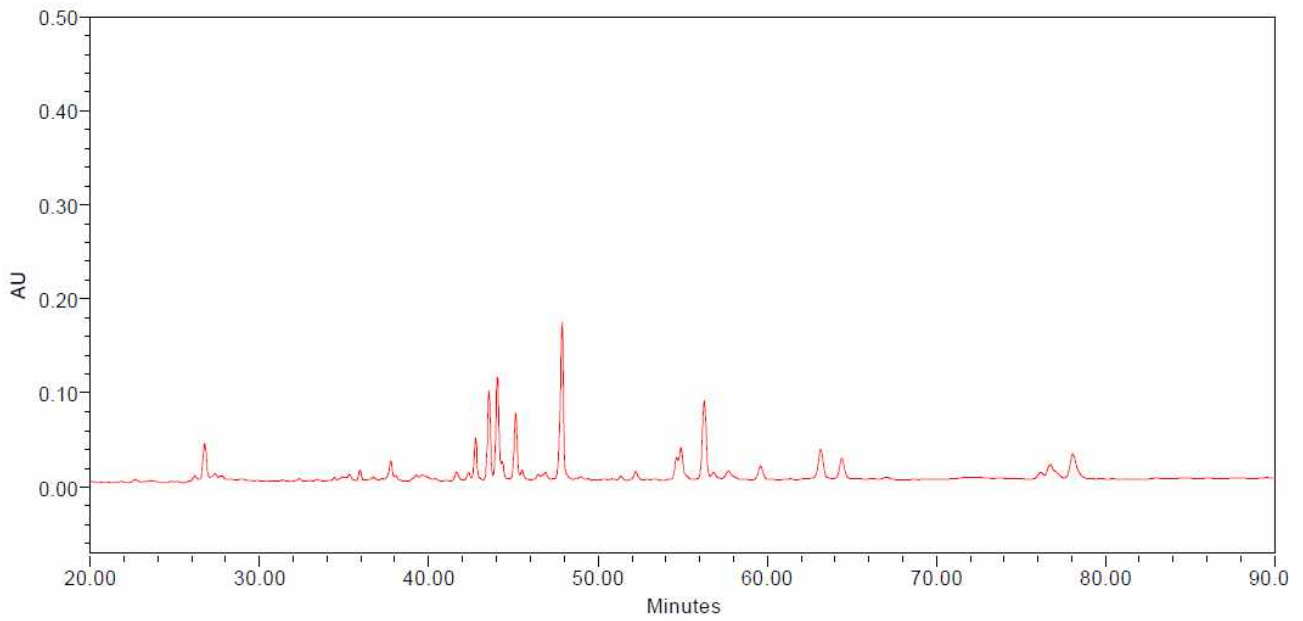
(UGFB-8 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 8hours)



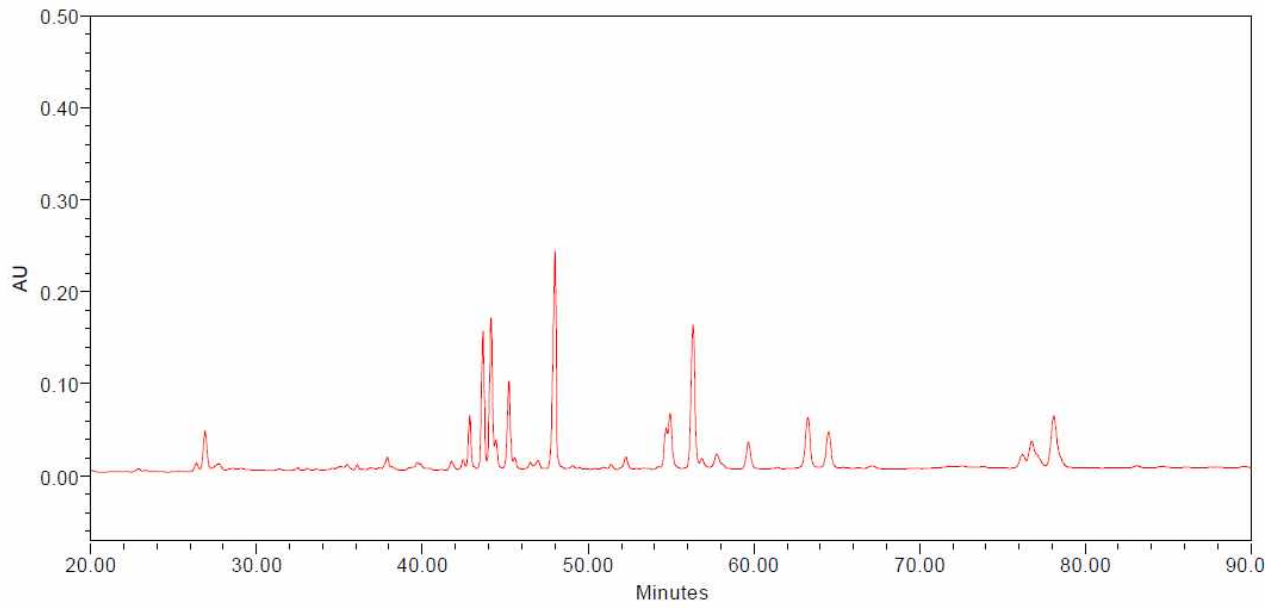
(UGFB-9 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 9hours)



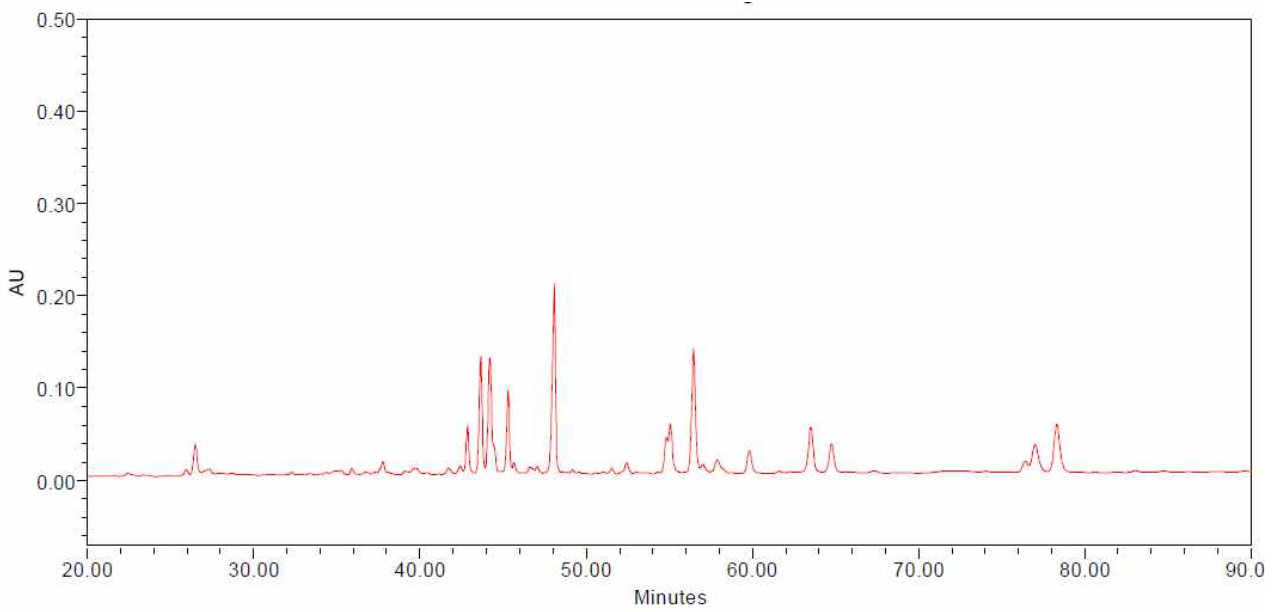
(UGFB-10 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 10hours)



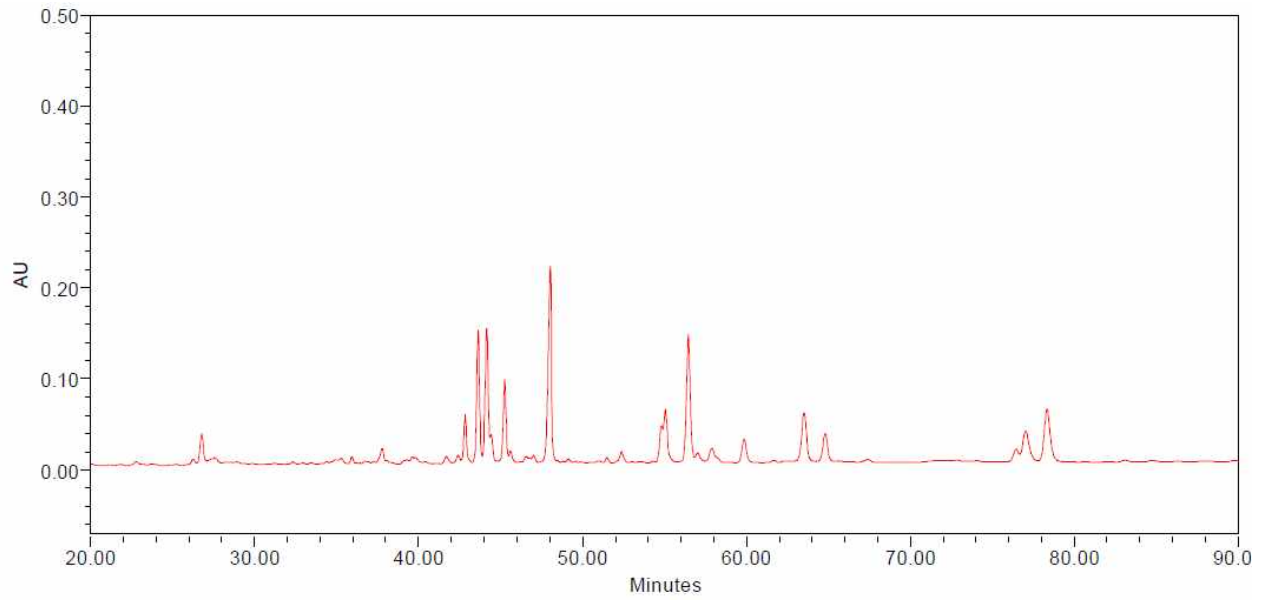
(UGFB-11 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 11hours)



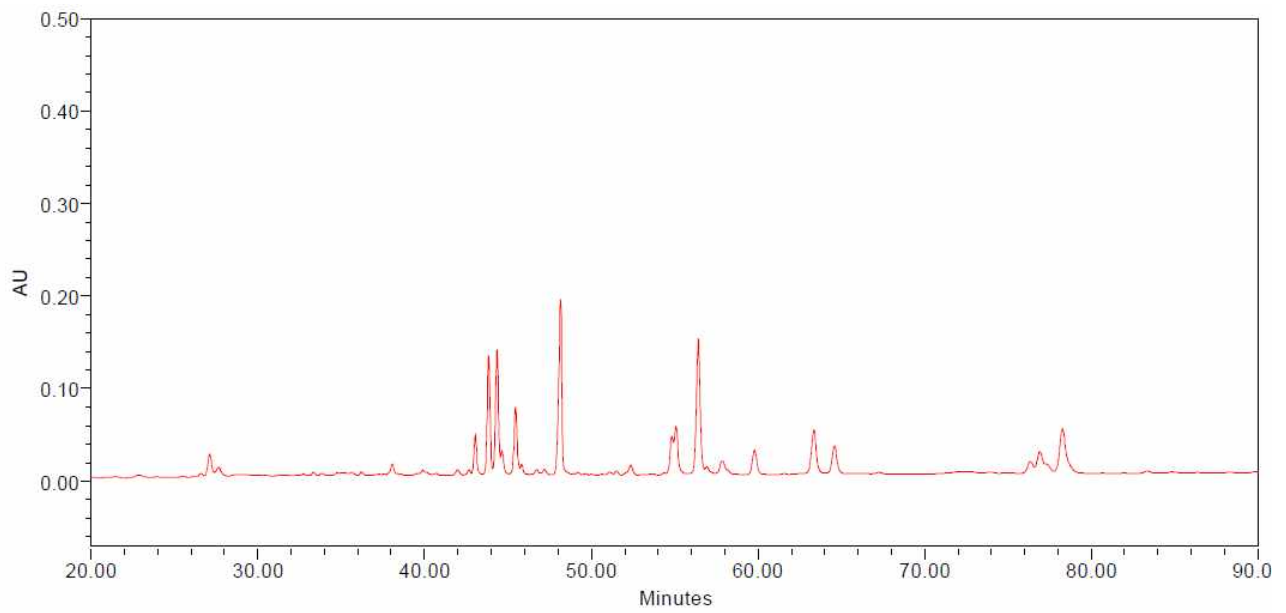
(UGFB-12 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 12hours)



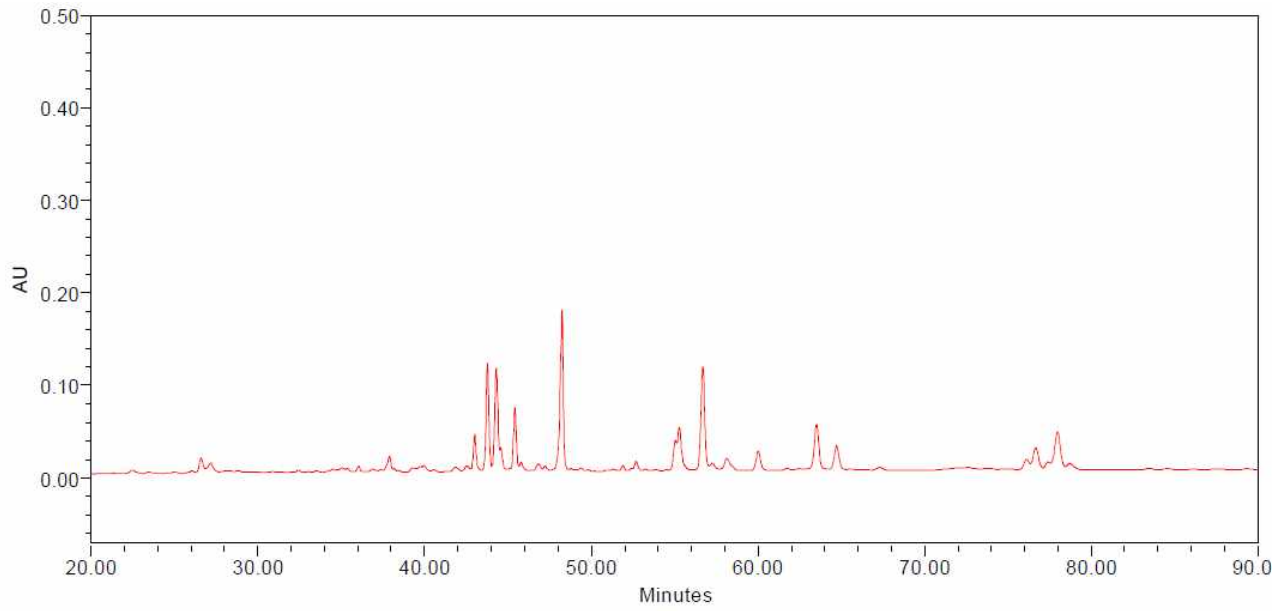
(UGFB-13 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 13hours)



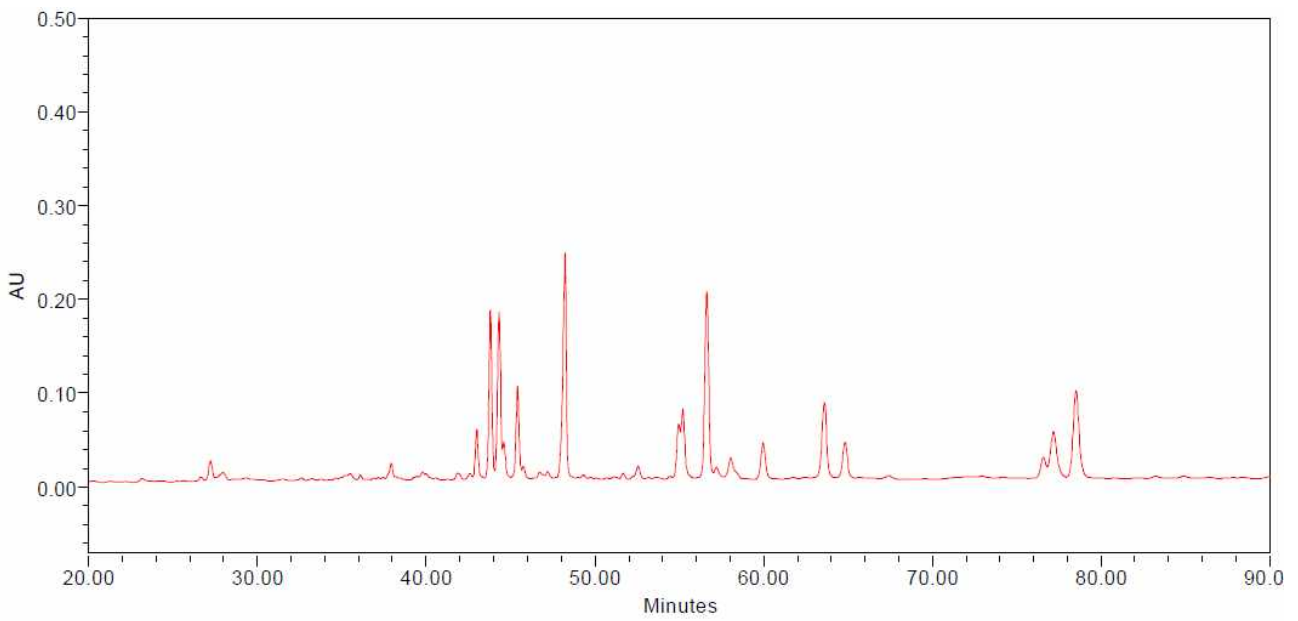
(UGFB-14 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 14hours)



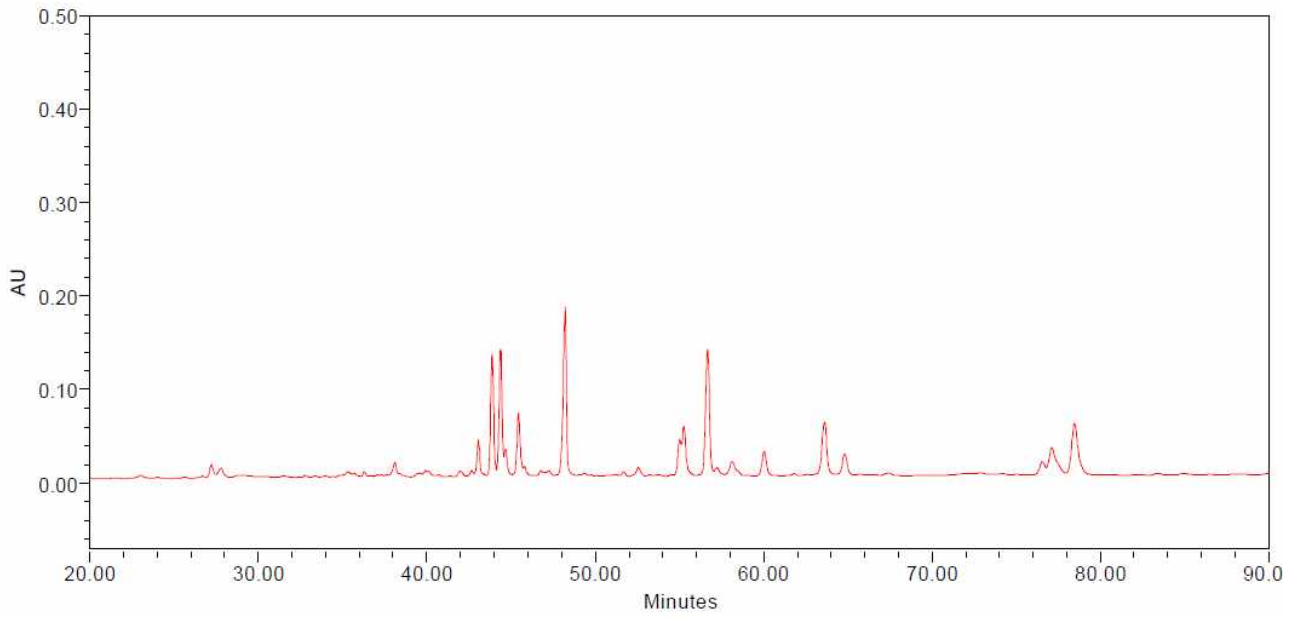
(UGFB-15 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 15hours)



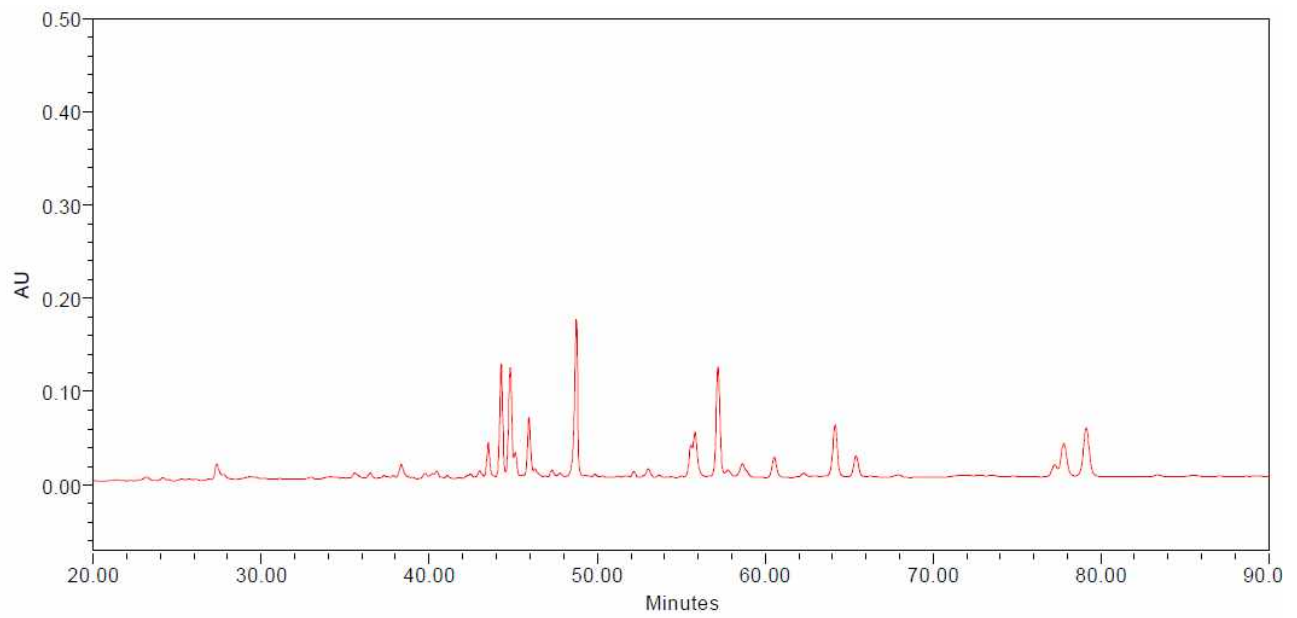
(UGFB-16 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 16hours)



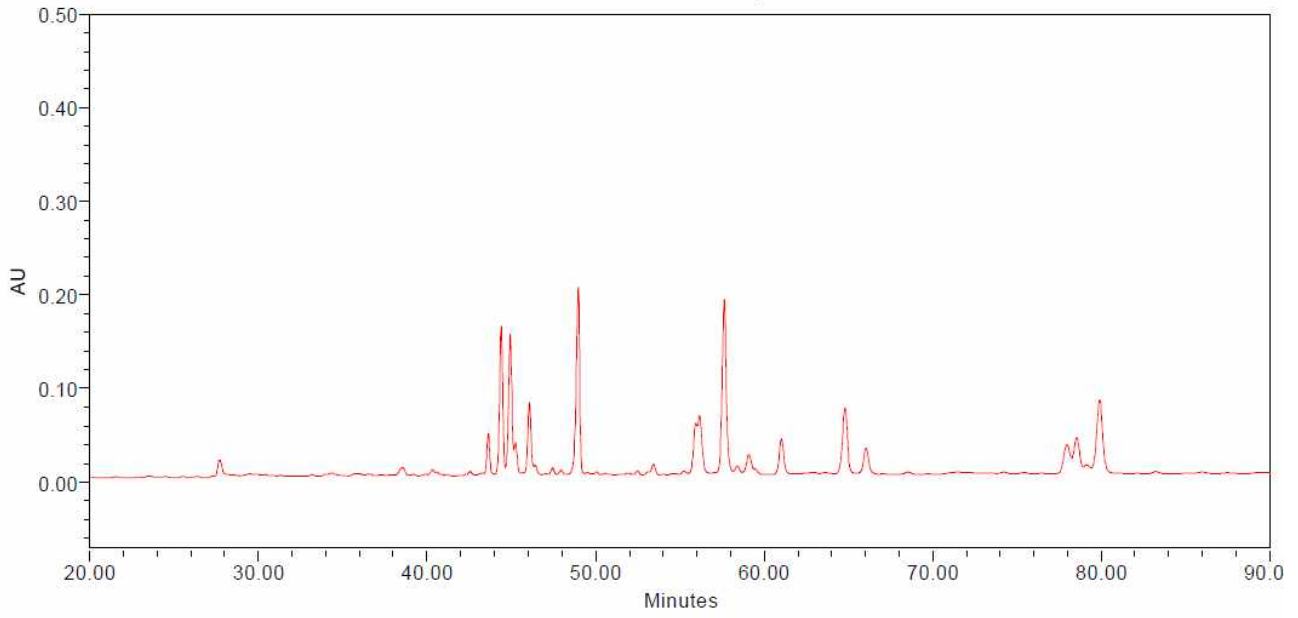
(UGFB-17 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 17hours)



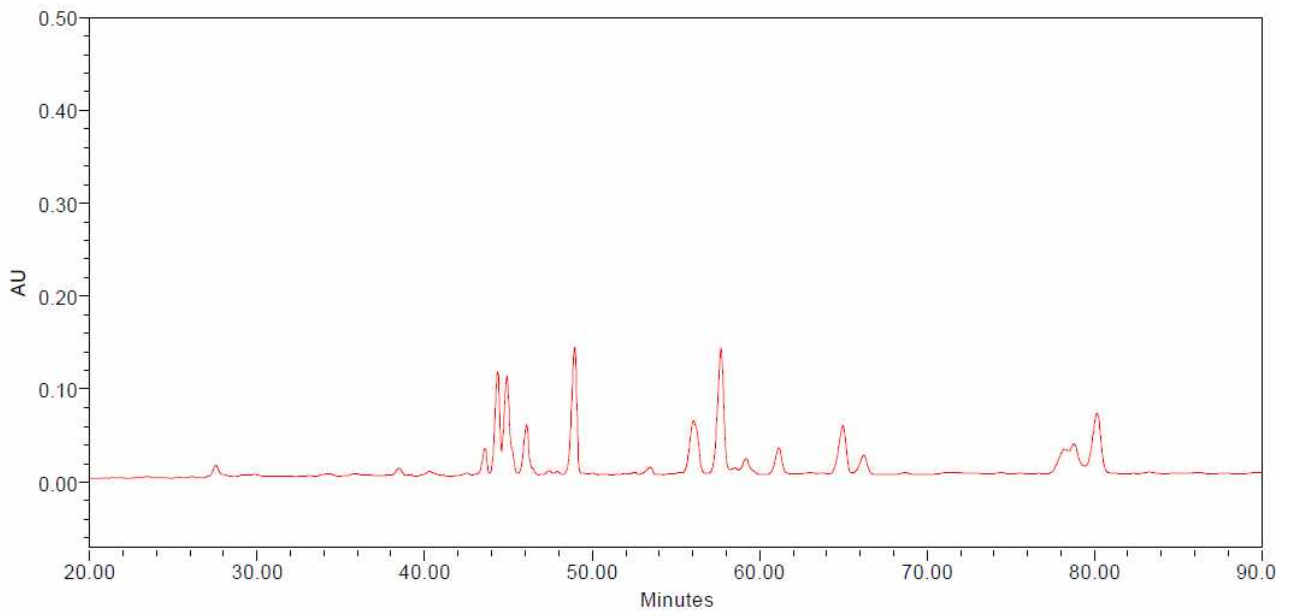
(UGFB-18 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 18hours)



(UGFB-19 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 19hours)



(UGFB-20 ginseng flower buds extract processed with ultrasonication for 20hours)



## ○ prosapogenin 성분 대량 분리 동정

### 가. 초음파 처리 인삼꽃대 조성물의 prosapogenin 성분 분리 화학구조 동정

#### (1) 실험 재료 및 엑스의 조제

본 연구에 사용한 인삼꽃대(Ginseng Fros, Flower buds of *Panax ginseng*)는 충청북도 음성에서 2010년 8월 20일에 4년근 인삼꽃대 10kg를 채집하였고, 건조는 음성의 충북홍삼영농조합법인에서 시행하였다. 얻은 시료를 대상으로 조건별 초음파 처리 후, prosapogenin 성분 분리 화학구조 동정하였다. 각각의 제품표본은 고연 인삼연구센터에 보관하고 있다.

Figure of ginseng flower buds (*Panax ginseng* Meyer)



Fresh ginseng flower buds



dried ginseng flower buds

#### (2) 초음파 처리 인삼꽃대 조성물 조제

인삼꽃대 건조물 15 kg에 Ethyl alcohol 30 L를 가하여 2회 환류 추출후 여과하여 감압농축하여 Ethyl alcohol 엑스를 얻었다. 얻은 에탄올 엑스 4.5 kg에 증류수 20 L를 가하여 ultrasonicator(고도기연, 한국)에 넣고, 100°C에서 16 시간 초음파 처리를 시행하였다.

#### (3) 초음파 처리 인삼꽃대 조성물의 prosapogenin 성분 분리

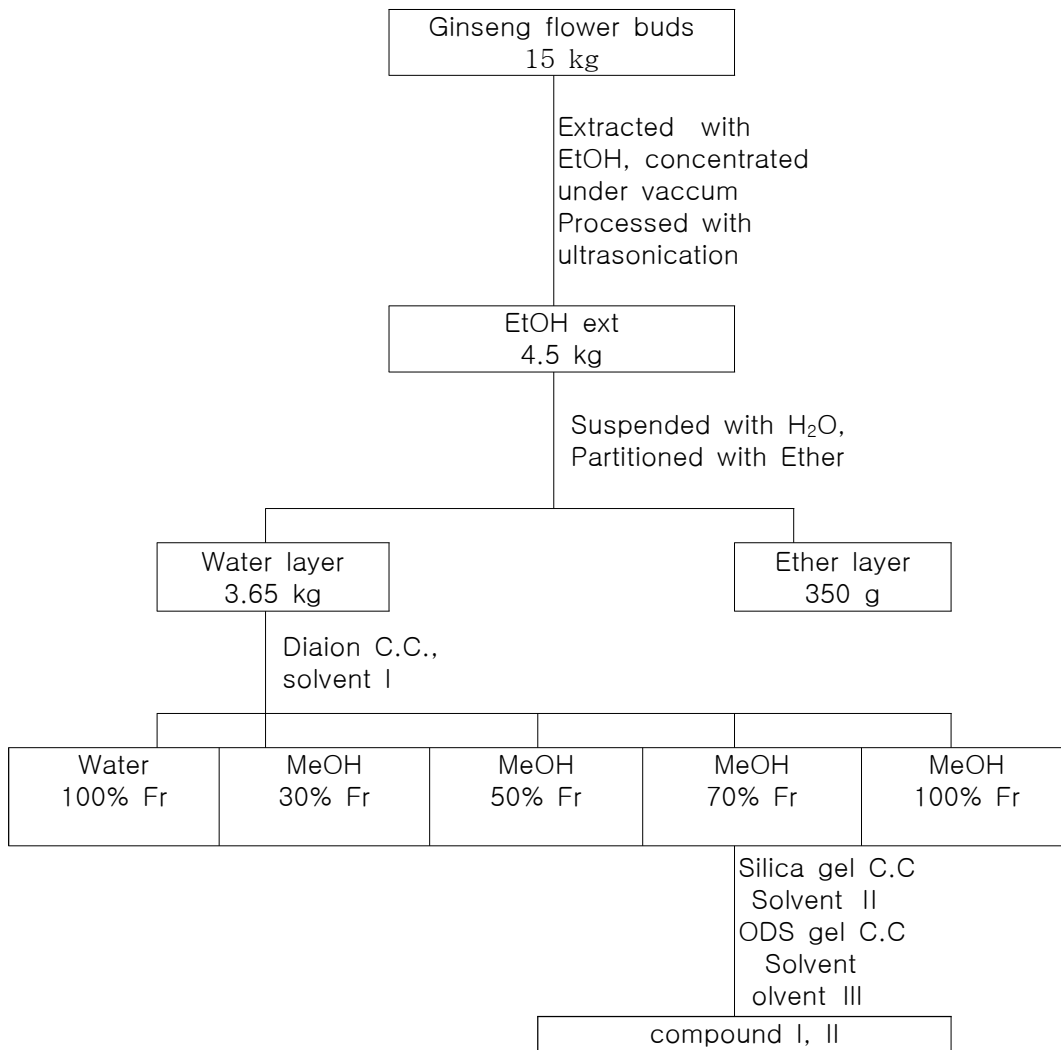
##### ① 초음파 처리 인삼꽃대 조성물로부터 사포닌 분획의 추출

초음파 처리 인삼꽃대 조성물 4.0 kg을 증류수에 현탁하여 분획 깔때기에 넣고 Diethyl Ether 넣어 shaking 하여 진탕하고 방치한 후 Ether를 제거한다. 이 방법을 10회 처리하여 Diethyl Ether 분획(350 g), 물 분획(3.65 kg)을 얻었다.

##### ② 초음파 처리 인삼꽃대 조성물 사포닌 분획과 인삼사포닌의 분리

위의 수가용성 분획을 증류수에 현탁하여 Diaion column에 흡착시킨 후 30% methanol 분획, 50% methanol 분획, 70% methanol 분획, 100% methanol 분획을 하였고, 50% methanol 분획 10g을 silica gel column에 [CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 70:30:4 v/v]로 로딩하여 F1 - F4를 얻었다. 위에서 얻은 F4로 ODS gel column에 전개 용매 50% methanol로 전개하여 Compound I -II를 얻었다. (scheme. 1.)





Extraction and Isolation ginsenosides from ultrasonication processed ginseng flower buds extract

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

\*Solvent II :  $\text{CHCl}_3$  : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 70:30:4 v/v

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

(4) 초음파 처리 인삼꽃대 조성물로부터 주 사포닌의 화학구조 동정

① 기기 및 조건

<sup>1</sup>H-NMR spectrometer : 모델명-VNS, 제조회사-varian, 500MHz (미국)

<sup>13</sup>C-NMR spectrometer : 모델명-VNS, 제조회사-varian, 500MHz (미국)

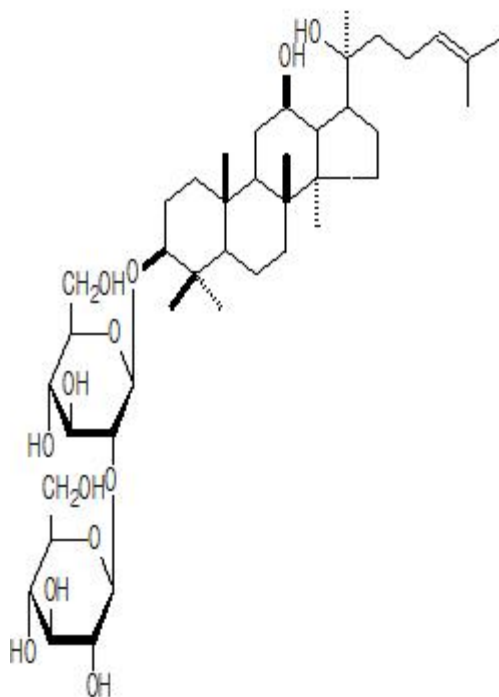
② Compound I -II의 단리 및 물리 화학적 성상

③ Compound I의 물리 화학적 성상 및 화학구조 동정

④ Compound I의 화학구조 동정

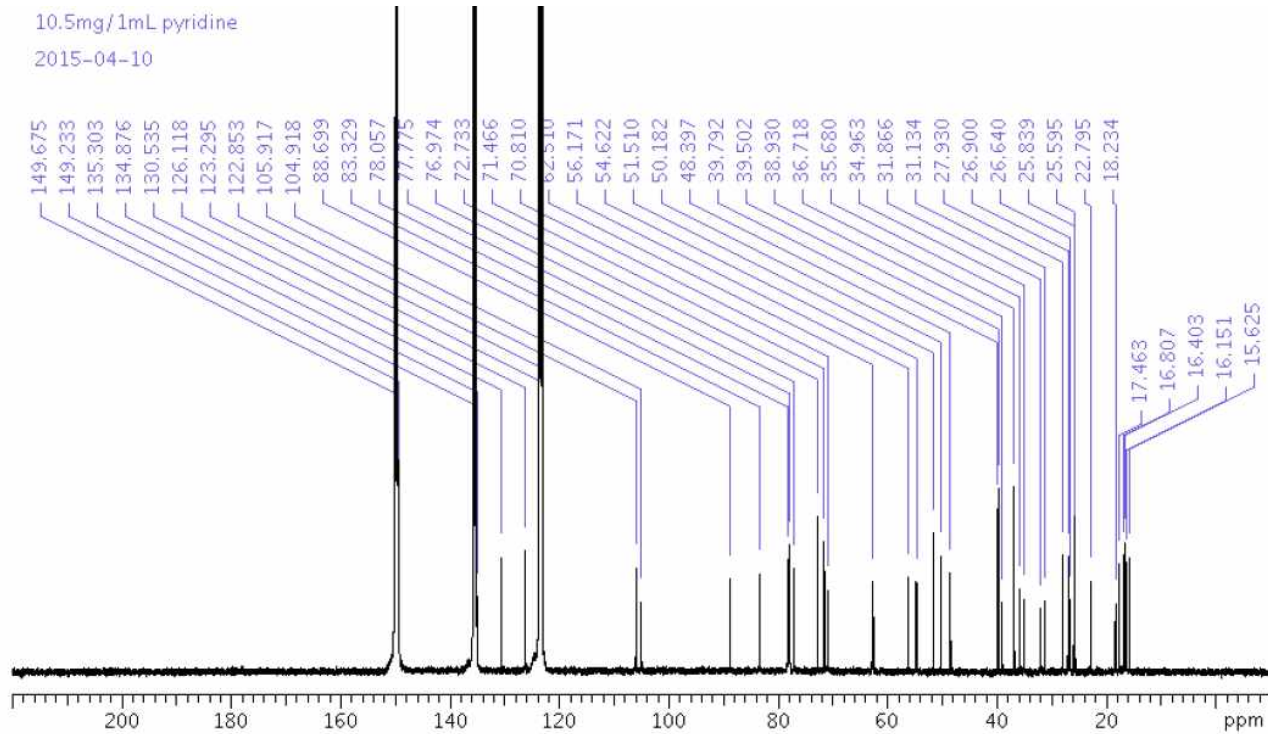
Compound I의 TLC Rf값은 0.5(CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 70 : 30 : 4/kieselgel 60 F254 Merk)이고, UV 램프(254, 365 nm)하에서 아무 반점을 확인할 수 없었으나, 묽은 황산으로 가열하여 적자색으로 발색됨으로서 인삼사포닌으로 추정할 수 있었으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 δ 0.79ppm으로부터 δ 1.64ppm까지 8개의 methyl singnal이 나타나고 있으며, δ 3.92ppm에서의 doublet은 H-3의 anomeric proton임을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 C-24와 C-25가 126.12ppm과 130.54ppm의 저자장에서 확인되었으며, 당으로부터 기인하는 3-gLC-1'이 104.92ppm에서 확인되었고, 3-gLC-1''는 105.92ppm에서 확인되었다. 이러한 결과들은 홍삼(*Panax ginseng*)으로부터 추출 분리되었던 ginsenoside Rg3의 문헌 data와 일치하였다. 따라서, Compound I을 ginsenoside Rg3로 동정하였다.

Chemical structures of compound I

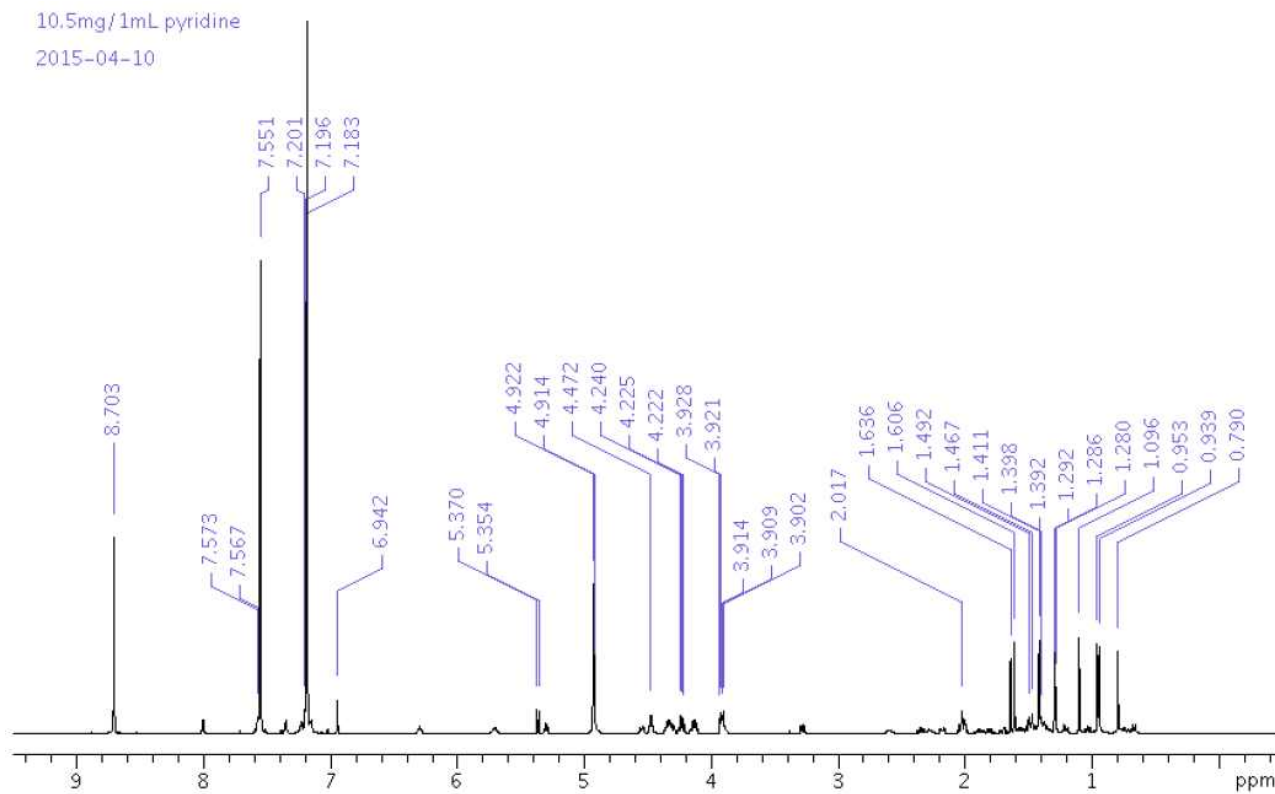


compound I : ginsenoside-Rg3

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



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



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

Carbon No.	G-Rg3	Compound I
C-1	38.51	38.93
C-2	26.46	26.90
C-3	88.30	88.70
C-4	39.37	39.79
C-5	55.74	56.17
C-6	18.32	18.23
C-7	36.29	36.72
C-8	37.34	37.33
C-9	49.76	50.18
C-10	39.09	39.50
C-11	31.43	31.87
C-12	70.40	70.81
C-13	47.94	48.40
C-14	51.10	51.51
C-15	30.72	31.13
C-16	26.24	26.54
C-17	54.19	54.62
C-18	16.45	16.40
C-19	16.26	16.15
C-20	72.40	72.41
C-21	26.12	26.54
C-22	35.27	35.68
C-23	22.39	23.00
C-24	126.95	126.12
C-25	130.16	130.54
C-26	25.24	25.60
C-27	17.39	17.46
C-28	27.51	27.93
C-29	15.73	15.63
C-30	16.31	16.40
3-Glc 1'	104.52	104.92
3-Glc 2'	82.80	83.33
3-Glc 3'	77.80	78.16
3-Glc 4'	70.99	71.43
3-Glc 5'	77.33	72.73
3-Glc 6'	62.05	62.51
3-Glc 1''	105.45	105.92
3-Glc 2''	76.55	76.98
3-Glc 3''	78.21	78.20
3-Glc 4''	72.36	72.73
3-Glc 5''	77.52	77.92
3-Glc 6''	62.21	62.66

⑤ Compound II의 화학구조 동정

Compound II의 TLC Rf값은 0.52(CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 70 : 30 : 4/kieselgel 60 F254 Merk)이고, UV 램프(254, 365 nm)하에서 아무 반점을 확인할 수 없었으나, 묽은 황산으로 가열하여 적자색으로 발색됨으로서 인삼사포닌으로 추정할 수 있었으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는

δ 0.84ppm으로부터 δ 1.84ppm까지 8개의 methyl singnal이 나타나고 있으며, δ 3.29ppm에서의 doublet은 H-3의 anomeric proton임을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 C-24와 C-25가 123.92ppm과 131.74ppm의 저자장에서 확인되었으며, 당으로부터 기인하는 3-gLC-1'이 105.62ppm에서 확인되었고, 3-gLC-1''는 106.55ppm에서 확인되었다. 이러한 결과들은 흑삼(*Panax ginseng*)으로부터 추출 분리되었던 ginsenoside Rg5의 문헌 data와 일치하였다. 따라서, Compound II를 ginsenoside Rg5로 동정하였다.

FAB-MS(m/z) : 765[M-H]<sup>-</sup>(Fig.12)

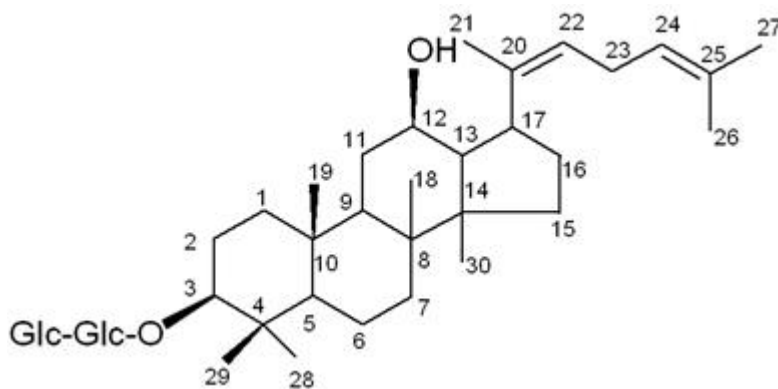
EIS-MS : 765[M-H]<sup>-</sup>(Fig.13)

MS/MS : 765.5[M-H]<sup>-</sup>, 603.6[M-Glc]<sup>-</sup>(Fig.14)

<sup>1</sup>H-NMR : pyridine-d<sub>5</sub>, δ ppm (Fig. 15-17)

4.950 (1H, d, J=7.5, H-1'), 5.400 (1H, d, J=7.5, H-1''), 3.288 (1H, d, H-3), 2.791 (1H, d, H-23), 0.835, 0.979, 1.040, 1.130, 1.313, 1.603, 1.644, 1.840 (3H, br, CH<sub>3</sub>-21,26,27,28,19,29,30,18)

Chemical structures of compound II

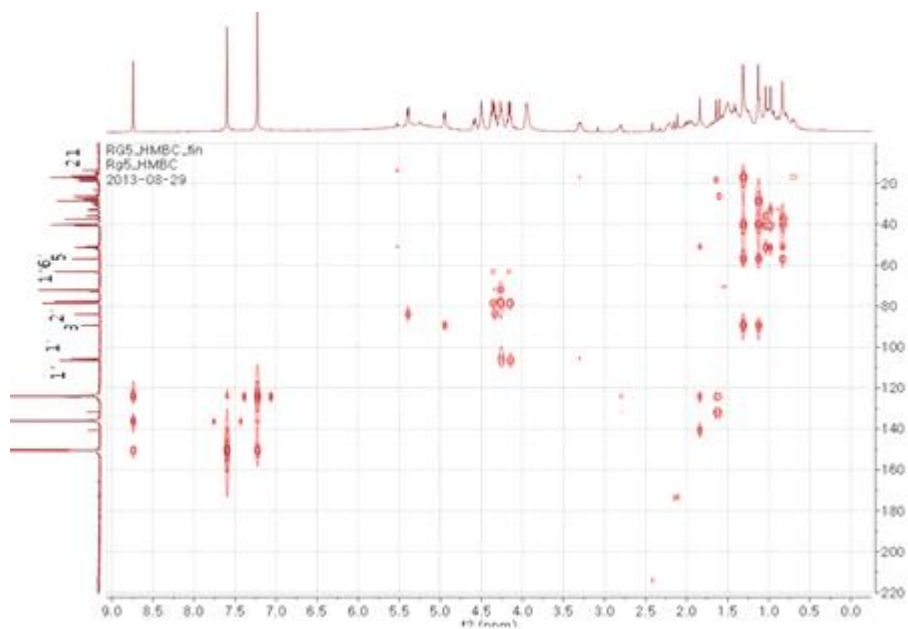


compound II : ginsenoside-Rg5

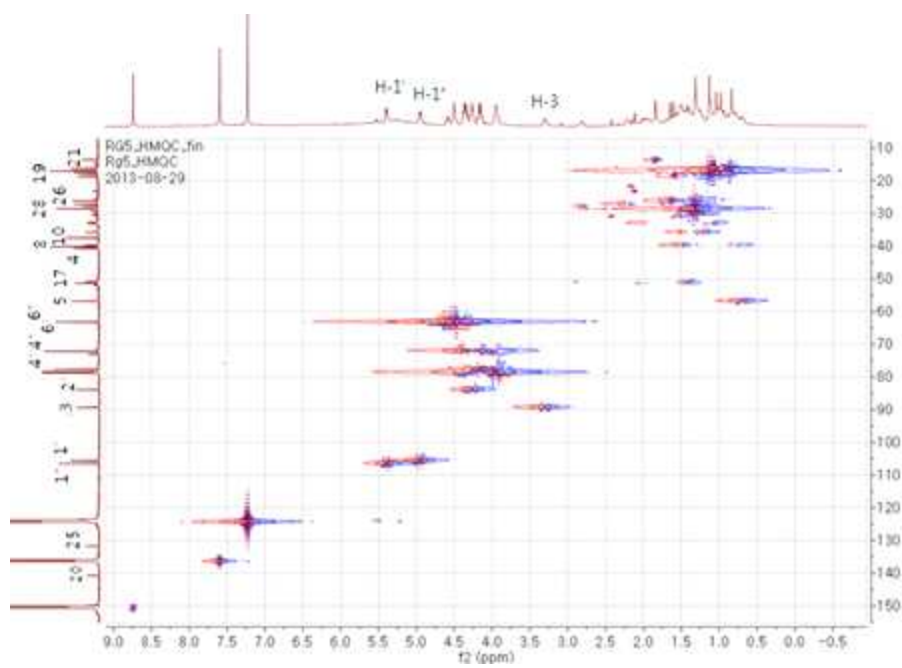
Chemical shifts of compound II in  $^{13}\text{C}$ -NMR

	ginsenoside Rg <sub>5</sub>	compound II
1	39.17	39.76
2	28	28.60
3	88.82	89.42
4	40.14	40.75
5	56.29	56.89
6	18.33	18.93
7	35.24	35.84
8	39.6	40.21
9	50.66	51.26
10	36.91	37.51
11	32.1	32.72
12	72.49	73.08
13	50.33	50.94
14	50.91	51.52
15	32.54	33.13
16	26.64	27.25
17	50.8	51.40
18	16.35	16.94
19	16.49	17.09
20	140.06	140.66
21	13.07	13.66
22	123.21	123.82
23	27.35	27.95
24	123.54	123.92
25	131.16	131.74
26	25.6	26.18
27	17.66	18.22
28	28.73	28.60
29	15.72	16.31
30	16.92	17.52
1'	105	105.62
2'	83.31	83.95
3'	78.13	78.45
4'	71.50	72.15
5'	77.82	78.76
6'	62.58	63.34
1''	105.91	106.55
2''	77.00	77.64
3''	78.21	78.84
4''	71.53	72.12
5''	77.98	78.62
6''	62.73	63.19





HMOC spectra of compound II ( $d_5$ -Py).





FAB-MS of compound II

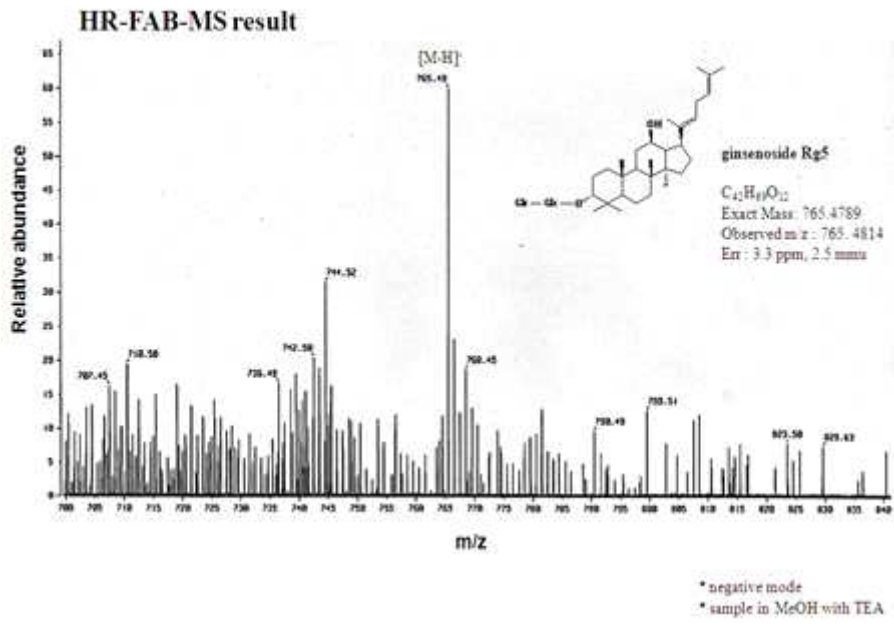


Figure 13. EIS-MS of compound II

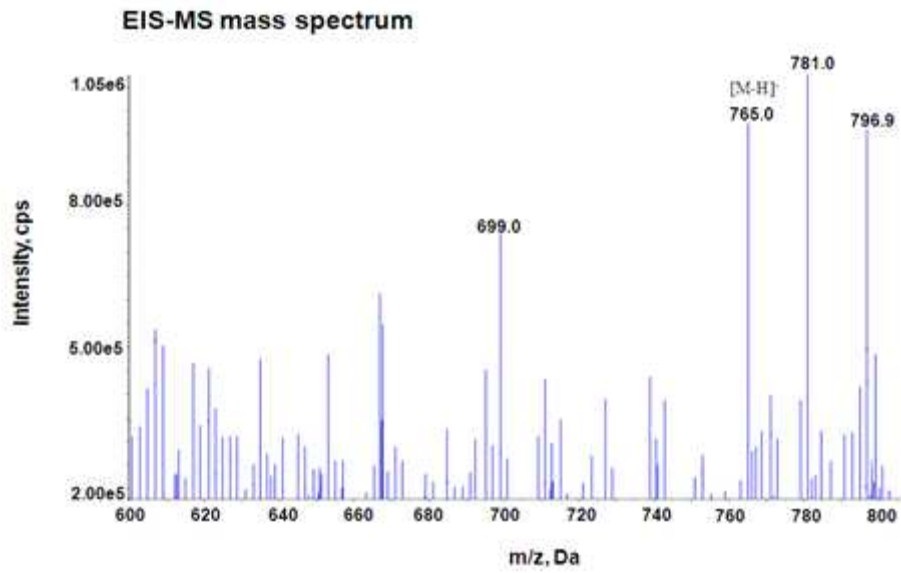
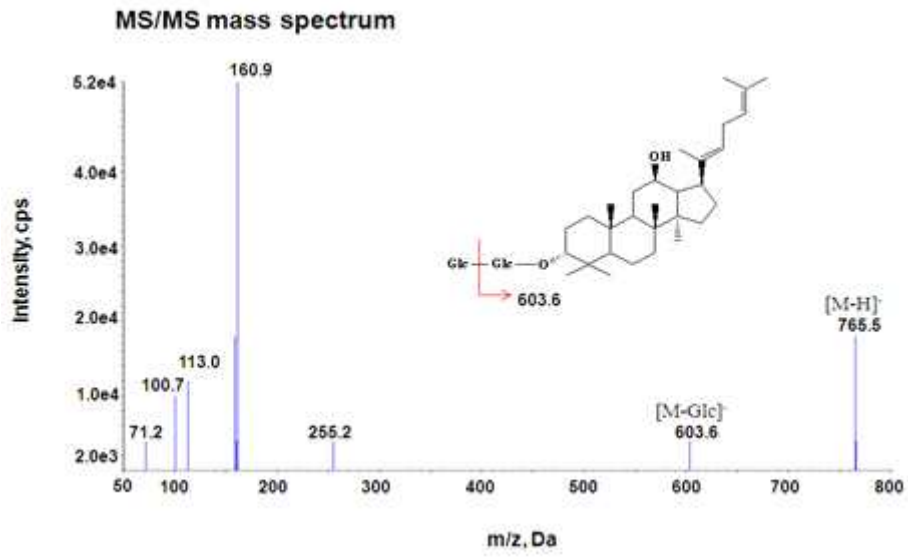


Figure 14. MS/MS mass spectrum of compound II



## ○ 독성 및 동물 시험용 초음파 인삼꽃대 조성물 조제

### 가. 초음파 처리 인삼꽃대 조성물

인삼꽃대 에탄올 엑스 4.5 kg에 증류수 60 L를 가하여 ultrasonicator(고도기연, 한국)에 넣고, 100°C에서 16시간 초음파 처리를 시행하였다.

### 나. 조사포닌(crude saponin) 조제

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

### 다. HPLC-ginsenoside의 분석

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

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

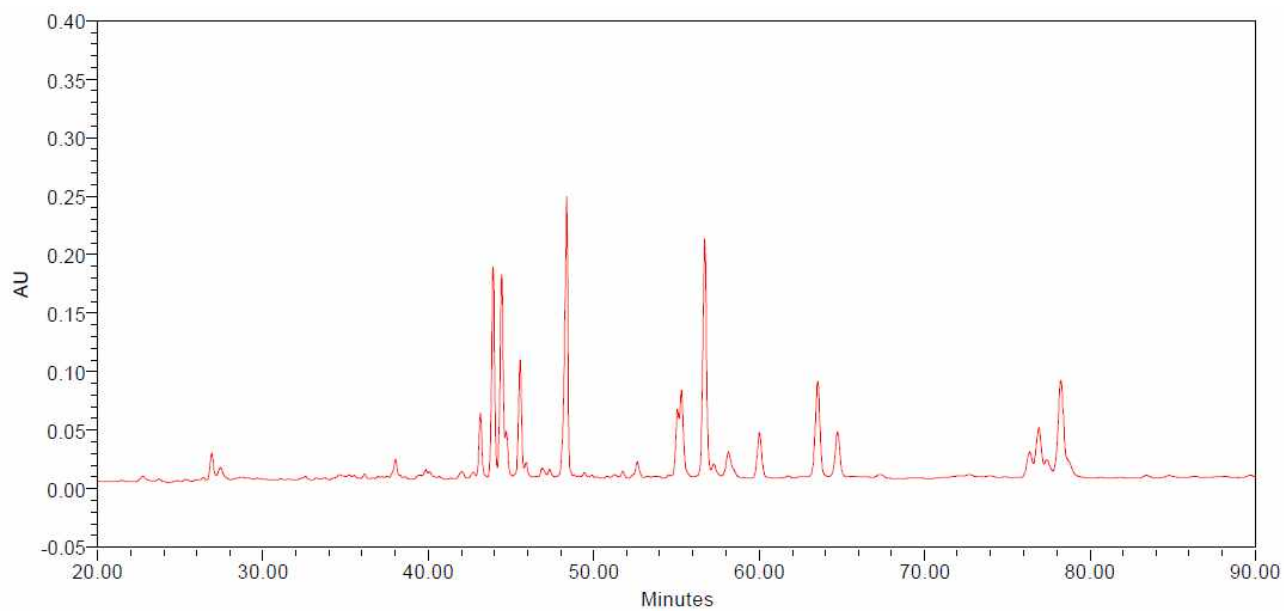
이동상은 acetonitrile(HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 17 %(0 min)에서 25 %(25 min), 40 %(50 min), 60%(105 min) 그리고 100 %(110 min)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

Ginsenoside composition of the ginseng flower buds extracts processed with ultrasonication

(%,w/w)

Ginsenosides	초음파 처리 인삼꽃대 조성물
Rb1	1.148± 0.006
Rb2	0.029± 0.011
Rc	0.019± 0.006
Rd	0.101±0.005
Re	0.113±0.003
Rf	0.016±0.001
Rg1	0.024±0.005
Rg2	1.003±0.011
20S-Rg3	2.001±0.132
20R-Rg3	0.036±0.007
20E-Rg5	1.607±0.185
20Z-Rg5	0.834±0.165
Rg6	0.071±0.003
Rh1	0.762±0.017
Rh4	0.152±0.001
Rk1	0.905±0.003
Rk3	0.000±0.000
F1	0.029±0.002
F4	8.952±0.002
Total ginsenosides a)	17.802

HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower buds extracts processed with ultrasonication.



### 3) 안전성 시험[ I ]

#### ○ 초음파처리 인삼꽃대의 독성시험

##### 가. 시험기관

GLP 독성연구기관으로 연구원간 소통, 연구비용 등을 고려 (주)메드빌과 협약하여 독성연구를 진행함.

##### 나. 독성시험의 범위

1차년도에는 단회독성시험, 유전독성시험(소핵시험, 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험), 4주 DRF 용량결정시험 등을 실시하고, 3차년도에 12주 반복 독성시험을 실시함.

- 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 Sprague-Dawley랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

요 약

본 시험은 Sprague-Dawley 계통의 랫드를 이용하여 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 단회 경구투여 했을 때의 독성을 조사하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다. 시험물질을 0, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 용량으로 암·수 각각 5 마리씩 단회 경구투여 하였고, 투여 후 14 일 동안의 일반증상, 체중변화 및 사망률을 관찰하였으며, 관찰 종료일에 부검을 실시하여 육안검사를 하였다. 실험기간 동안 암·수 모든 투여군에서 사망동물 및 일반증상은 관찰되지 않았다. 체중은 순조롭게 증가하였으며, 부검 시 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 보아, 암·수 Sprague-Dawley 랫드에 대한 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물에 대한 독성은 인정되지 않았고, 개략의 치사량은 암·수 모두 5,000 mg/kg 이상인 것으로 판단하였다.

## 1. 시험실시의 개요

### 1) 시험목적

암·수 Sprague-Dawley 계통의 랫드를 이용하여 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 단회 경구투여했을 때의 독성을 조사하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

### 2) Good Laboratory Practice

시험의 모든 과정은 다음의 Good Laboratory Practice 규정을 준수하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-67 호 (2014 년 2 월 12 일)

### 3) 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시 하였다.

“의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-136 호 (2014 년 7 월 30 일)

### 4) 시험의뢰자

기관명 고연 (高研)

주 소 (390-711) 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112 호

### 5) 시험기관

기관명 (주)메드빌

주 소 (153-760) 서울특별시 금천구 디지털로 9 길 33, 15 층 (가산동, IT 미래타워)

### 6) 시험일정

시험개시일	2015 년 1 월 21 일
실험개시일	2015 년 1 월 21 일
동물입수일	2015 년 1 월 21 일
군분리일	2015 년 1 월 26 일
투여일	2015 년 1 월 27 일
부검일	2015 년 2 월 10 일
실험종료일	2015 년 2 월 10 일
시험종료일	2015 년 2 월 24 일



7) 시험책임자

성명	-
소속	일반독성

8) 부문책임자

검역	-
병리	-
동물관리	-
시험물질 관리	-

9) 시험담당자

시험담당	-
부검	-
시험물질 조제	-

10) 기록 및 자료의 보관

시험기간 중 발생한 모든 기록은 (주)메드빌의 자료보관실에 보관한다. 보관기간은 최종보고서 승인 후 3년간 보관함을 원칙으로 하며, 그 후 보관에 관해서는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

시험자료: 시험기초자료, 시험계획서, 최종보고서

11) 동물윤리

본 시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정을 준수하며, 동물보호법 (법률 제 4379 호, 1991. 5. 31., 제정, 법률 제 13023 호, 2015. 1. 20., 일부개정)에 근거한 (주)메드빌 동물실험윤리위원회 (IACUC)에 의해 승인되었다.

2. 재료 및 방법

1) 시험물질

- (1) 물질명 초음파처리 인삼꽃대 추출물
- (2) Lot No. UGFB(001)
- (3) 성상 갈색분말
- (4) pH 4.95
- (5) 제조일 2015년 1월 15일
- (6) 유효기한 정보없음
- (7) 입수일 2015년 1월 21일
- (8) 입수량 609.9327 g (용기포함)
- (9) 보관조건 냉장 (3.6 - 5.7 °C)
- (10) 공급처 고연 (高研)
- (11) 잔여시험물질의 처리 반환

## 2) 부형제

- (1) 명칭 주사용수
- (2) Lot No. J5N5K21
- (3) 보관조건 실온
- (4) 제조사 대한약품공업(주)
- (5) 부형제 선택이유 부형제 확인 결과 시험물질이 주사용수에 현탁되어 부형제를 주사용수로 정하였다.

## 3) 시험물질의 조제 및 분석

### (1) 시험물질의 조제

투여 당일 전자저울 (Explorer Ex224G, OHAUS, U.S.A.)로 시험물질을 칭량 후 부형제를 일부 넣어 stirrer (HSD150-03P, MTOPS®, U.S.A.)를 이용하여 현탁 시킨 후, 부형제를 가하여 규정농도로 조제하였다.

- (2) 조제물의 분석 : 조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

## 4) 시험계

- (1) 종 및 계통 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF
- (2) 공급원 (주)오리엔트바이오
- (3) 시험계 선정 이유

Sprague-Dawley 랫드는 일반 독성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.

### (4) 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 22 마리, 8 주령, 231.0 - 253.3 g

암컷, 22 마리, 8 주령, 192.8 - 216.6 g

### (5) 투여시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 20 마리, 9 주령, 252.2 - 278.7 g

암컷, 20 마리, 9 주령, 200.5 - 222.2 g

### (6) 검역 및 순화

반입시 동물의 일반증상 관찰 및 체중측정 후, 개체식별법에 따랐다. 5일의 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 순화기간 종료일에 체중측정 및 일반증상을 관찰하여 이상이 없는 동물을 시험에 사용하였다.

### (7) 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 순화기간 개체식별카드를 부착하였다.

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

(8) 균분리

균분리는 순화종료일에 일반증상 및 체중에 이상이 없는 동물 중 암·수 각각 20 마리를 선발하였다. 선발한 동물은 평균체중 및 표준편차를 계산하여 대조군, 저용량군, 중용량군 및 고용량군을 각각 5 마리씩 균일하게 분리하였다.

(9) 잔여동물의 처리

균분리 후 잔여동물은 시험계로부터 제외하여 SOP 에 따라 처리하였다.

5) 사육환경조건

- (1) 동물실 번호 동물실III
- (2) 사육상자 종류 및 크기 Polycarbonate cage, 420W × 270D × 180H (mm)
- (3) 사육상자당 수용동물 수 검역·순화기간 2 - 3마리, 관찰기간 1마리
- (4) 온도 19.0 - 24.6°C
- (5) 상대습도 45.7 - 64.5%
- (6) 환기횟수 10 - 20회/시간
- (7) 명암주기 (조명시간) 12시간/일 (08:00 - 20:00)
- (8) 조도 150 - 300 Lux

6) 사료

- (1) 종류 실험동물용 고형사료 (LabDiet 5053)
- (2) Lot No. L80154490
- (3) 제조사 PMI Nutrition International Inc., U.S.A.
- (4) 공급원 (주)오리엔트바이오
- (5) 급이방법 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취 시켰다.
- (6) 사료의 분석 및 확인 제조사에서 제공한 분석자료의 결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지 확인하였다.

6) 음수

- (1) 종류 및 급수방법  
서울특별시의 수도물을 UV 멸균 및 필터를 이용하여 여과된 정제수를 Polycarbonate 음수병 (500 mL)에 넣어 자유섭취 시켰다.
- (2) 음수의 분석 및 확인  
“먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙” (환경부령 제 553 호, 2014. 4. 30, 타법개정)의 전 항목에 대하여 서울특별시 보건환경 연구원 (경기도 과천시 장군마을 3 길 30)에 의뢰하여 1 회/년 검사를 실시하며, 그 결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지 확인하였다 (2014 년 12 월 16 일).

## 7) 투여

- (1) 투여경로 : 경구투여
- (2) 투여경로 선택이유 : 임상예정 경로에 따라 경구투여를 선택하였다.
- (3) 투여방법 및 투여횟수

투여액은 10 mL/kg 으로 하고, 개체별 투여액은 당일 체중측정을 기준으로 산출 하였다. 투여 전 16 시간 이상 절식 후, 투여 당일 경구투여용 위존데를 부착한 일회용 주사기 (3 mL)를 이용하여 1 회 이내 강제 경구투여를 실시하고, 약 4 시간에 사료를 급이 하였다.

## 8) 투여용량 및 시험군의 구성

### (1) 투여용량

본 시험은 의뢰자의 요청에 따라 고용량을 5,000 mg/kg 으로 설정하고, 2,500 및 1,250 mg/kg 을 중간 및 저용량으로 설정 하였다. 또한, 부형제에 대한 영향을 알아보기 위하여 대조군을 설정하였다.

### (2) 시험군의 구성

군	투여액량 (mL/kg)	투여용량 (mg/kg)	동물수 (동물번호)	
			수컷	암컷
G1	10	0	5 (11001~11005)	5 (21001~21005)
G2	10	1,250	5 (12001~12005)	5 (22001~22005)
G3	10	2,500	5 (13001~13005)	5 (23001~23005)
G4	10	5,000	5 (14001~14005)	5 (24001~24005)

## 9) 관찰 및 검사

### (1) 일반증상관찰

모든 동물에 대하여 부검일까지 매일 1 회 이상 일반증상을 관찰하였다. 단, 투여 당일 (0 일)에는 투여 후 0.5, 1, 2, 4 및 6 시간째에 일반증상 (독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등)을 관찰하였다.

### (2) 빈사 및 사망동물의 처리

관찰기간 중 빈사 및 사망동물은 발견되지 않았다.

### (3) 체중측정

모든 동물에 대하여 투여 직전 (0 일), 투여 후 1, 3, 7 및 14 일에 측정하였다.

### (4) 부검

관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대해서 CO<sub>2</sub> 마취하에 복대 동·정맥을 절단하여 방혈 안락사 후 부검을 실시하였으며, 모든 장기에 대하여 상세한 육안검사를 하였다.

### (5) 조직병리학적 검사

부검 시 특이적인 육안소견이 관찰되지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

## 10) 통계학적 분석

통계학적 분석은 체중에 대하여 SPSS program (SPSS 16.0)을 사용하여 실시하였다. 정규성과 등분산성을 만족하면 One-way analysis of variance (ANOVA)을 실시 하였으며, 대조군과의 유의성을 확인하였다. (유의수준: 양측 5%). 정규성이나 등분산성을 만족하지 않으면 Kruskal-Wallis's H-test 를 통하여 대조군과의 유의성을 확인하였다. (유의수준: 양측 5%).

## 3. 결과 및 고찰

### 1) 사망동물 (Table 1)

시험기간 중 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다.

### 2) 일반증상 (Table 2, Appendix 1)

시험기간 중 모든 시험군에서 일반증상은 관찰되지 않았다.

### 3) 체중 (Figure 1, Figure 2, Table 3, Appendix 2)

시험기간 중 모든 시험군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

### 4) 부검 (Table 4, Appendix 3)

실험종료 시 모든 생존동물의 부검 결과 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.

## 4. 결론

본 시험은 Sprague-Dawley 계통의 랫드를 이용하여 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 0, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 용량으로 단회 경구투여 했을 때의 독성을 조사하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

실험기간 동안 암·수 모든 투여군에서 사망동물 및 일반증상은 관찰되지 않았다. 체중은 순조롭게 증가하였으며, 부검 시 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 독성은 인정되지 않았고, 개략의 치사량은 암·수 모두 5,000 mg/kg 이상인 것으로 판단된다.

FIGURES

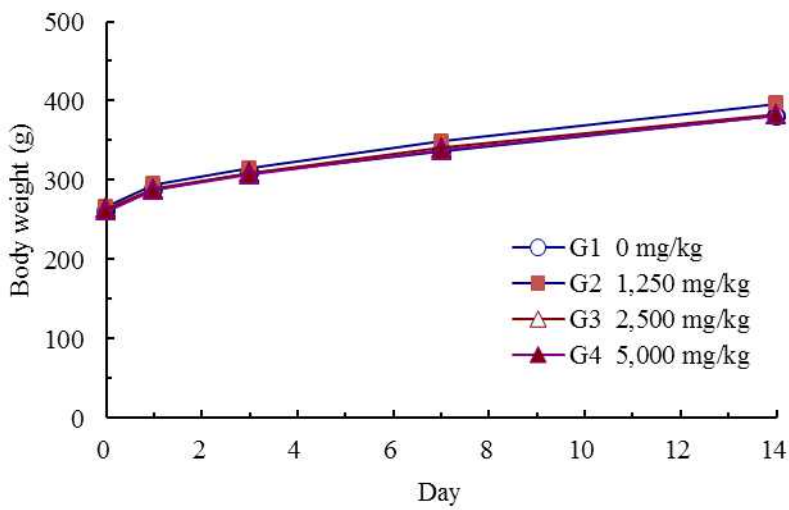


Figure 1. Mean body weights of male SD rats

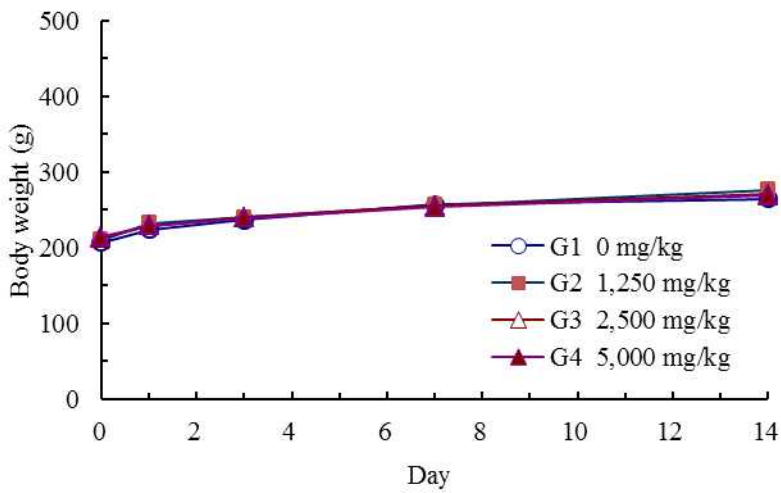


Figure 2. Mean body weights of female SD rats

TABLES

Table 1. Summary of mortality data for single dose toxicity study SD rats

Sex: Male																		
Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after dosing														Mortality (dead/total)		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	
G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
G2 1,250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
G3 2,500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
G4 5,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
Sex: Female																		
Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after dosing														Mortality (dead/total)		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	
G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
G2 1,250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
G3 2,500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
G4 5,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)

Table 2. Summary of clinical signs data for single dose toxicity study SD rats

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Hours after dosing (Day 0)				
			0.5	1	2	4	6
G1 0	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1 0	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5



Table 2. Summary of clinical signs data for single dose toxicity study SD rats

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Hours after dosing (Day 0)				
			0.5	1	2	4	6
G1 0	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1 0	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 3. Mean body weights data for single dose toxicity study SD rats

Sex: Male							(g)
Group /Dose (mg/kg)		Days					Final weight gain
		0	1	3	7	14	
G1 0	Mean	261.9	288.3	309.1	336.5	381.3	119.4
	S.D.	6.9	8.3	11.5	15.4	14.1	10.4
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	266.7	294.5	314.6	348.5	396.6	129.9
	S.D.	6.1	7.8	12.0	12.8	15.6	10.0
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	263.6	288.7	308.9	341.0	382.9	119.3
	S.D.	8.0	9.2	12.2	19.3	24.5	21.5
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	260.7	287.5	306.4	337.3	381.8	121.1
	S.D.	10.4	10.9	19.2	28.1	35.1	27.6
	N	5	5	5	5	5	5

S.D.: standard deviation

Sex: Female							(g)
Group /Dose (mg/kg)		Days					Final weight gain
		0	1	3	7	14	
G1 0	Mean	207.1	224.1	236.7	257.2	264.4	57.4
	S.D.	6.0	8.8	6.7	12.8	19.0	13.9
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	210.6	232.6	240.0	255.9	276.7	66.1
	S.D.	3.6	4.1	7.4	8.4	4.2	5.3
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	213.0	230.0	240.1	255.7	270.3	57.3
	S.D.	4.8	8.2	8.5	10.8	19.7	15.6
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	214.3	228.8	239.4	253.9	268.8	54.5
	S.D.	7.3	4.2	4.8	7.1	15.3	14.8
	N	5	5	5	5	5	5

S.D.: standard deviation

Table 4. Summary of necropsy data for single dose toxicity study SD rats

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Organ*	Findings	No. of animals affected
G1 0	5	All	Unremarkable findings	0
G2 1,250	5	All	Unremarkable findings	0
G3 2,500	5	All	Unremarkable findings	0
G4 5,000	5	All	Unremarkable findings	0

\* External surface and organs in body cavity

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Organ*	Findings	No. of animals affected
G1 0	5	All	Unremarkable findings	0
G2 1,250	5	All	Unremarkable findings	0
G3 2,500	5	All	Unremarkable findings	0
G4 5,000	5	All	Unremarkable findings	0

\* External surface and organs in body cavity

APPENDICES

Appendix 1. Individual clinical signs data for single dose toxicity study SD rats

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Hours after dosing (Day 0)				
		0.5	1	2	4	6
G1 0	11001	N	N	N	N	N
	11002	N	N	N	N	N
	11003	N	N	N	N	N
	11004	N	N	N	N	N
	11005	N	N	N	N	N
G2 1,250	12001	N	N	N	N	N
	12002	N	N	N	N	N
	12003	N	N	N	N	N
	12004	N	N	N	N	N
	12005	N	N	N	N	N
G3 2,500	13001	N	N	N	N	N
	13002	N	N	N	N	N
	13003	N	N	N	N	N
	13004	N	N	N	N	N
	13005	N	N	N	N	N
G4 5,000	14001	N	N	N	N	N
	14002	N	N	N	N	N
	14003	N	N	N	N	N
	14004	N	N	N	N	N
	14005	N	N	N	N	N

N: normal

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Days after dosing													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	11001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	11002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	11003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	11004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	11005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G2 1,250	12001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	12002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	12003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	12004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	12005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G3 2,500	13001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	13002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	13003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	13004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	13005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G4 5,000	14001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	14002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	14003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	14004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	14005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: normal

Appendix 1. Individual clinical signs data for single dose toxicity study SD rats

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Hours after dosing (Day 0)				
		0.5	1	2	4	6
G1 0	21001	N	N	N	N	N
	21002	N	N	N	N	N
	21003	N	N	N	N	N
	21004	N	N	N	N	N
	21005	N	N	N	N	N
G2 1,250	22001	N	N	N	N	N
	22002	N	N	N	N	N
	22003	N	N	N	N	N
	22004	N	N	N	N	N
	22005	N	N	N	N	N
G3 2,500	23001	N	N	N	N	N
	23002	N	N	N	N	N
	23003	N	N	N	N	N
	23004	N	N	N	N	N
	23005	N	N	N	N	N
G4 5,000	24001	N	N	N	N	N
	24002	N	N	N	N	N
	24003	N	N	N	N	N
	24004	N	N	N	N	N
	24005	N	N	N	N	N

N: normal

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Days after dosing													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	21001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	21002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	21003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	21004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	21005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G2 1,250	22001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	22002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	22003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	22004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	22005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G3 2,500	23001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	23002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	23003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	23004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	23005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G4 5,000	24001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	24002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	24003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	24004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	24005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: normal

Appendix 2. Individual body weights data for single dose toxicity study SD rats

Sex: Male							(g)
Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Days					Final weight gain
		0	1	3	7	14	
G1 0	11001	256.5	280.6	294.8	319.3	379.0	122.5
	11002	261.8	287.5	316.1	344.4	391.0	129.2
	11003	255.1	280.3	306.1	334.4	368.3	113.2
	11004	263.6	293.9	303.8	326.0	368.2	104.6
	11005	272.4	299.4	324.6	358.4	400.1	127.7
	Mean	261.9	288.3	309.1	336.5	381.3	119.4
	S.D.	6.9	8.3	11.5	15.4	14.1	10.4
N	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	12001	261.1	289.0	305.0	338.6	382.0	120.9
	12002	260.0	287.5	308.2	343.4	384.4	124.4
	12003	269.1	292.9	307.1	344.6	400.4	131.3
	12004	268.5	295.9	318.9	344.7	395.0	126.5
	12005	274.6	307.2	333.7	371.0	421.0	146.4
	Mean	266.7	294.5	314.6	348.5	396.6	129.9
	S.D.	6.1	7.8	12.0	12.8	15.6	10.0
N	5	5	5	5	5	5	
G3 2,500	13001	259.3	280.8	294.1	313.2	351.9	92.6
	13002	255.0	282.5	307.5	341.5	371.9	116.9
	13003	259.3	283.1	309.3	348.4	396.9	137.6
	13004	272.0	296.8	305.7	335.7	377.6	105.6
	13005	272.3	300.5	327.9	366.1	416.1	143.8
	Mean	263.6	288.7	308.9	341.0	382.9	119.3
	S.D.	8.0	9.2	12.2	19.3	24.5	21.5
N	5	5	5	5	5	5	
G4 5,000	14001	257.6	283.0	297.9	332.9	376.2	118.6
	14002	252.2	275.0	286.0	303.4	338.7	86.5
	14003	256.5	287.4	310.2	347.8	405.0	148.5
	14004	258.4	287.2	301.0	323.8	361.4	103.0
	14005	278.7	304.7	337.0	378.6	427.6	148.9
	Mean	260.7	287.5	306.4	337.3	381.8	121.1
	S.D.	10.4	10.9	19.2	28.1	35.1	27.6
N	5	5	5	5	5	5	

S.D.: standard deviation

Appendix 2. Individual body weights data for single dose toxicity study SD rats

Sex: Female							(g)
Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Days					Final weight gain
		0	1	3	7	14	
G1 0	21001	200.5	216.6	236.0	258.7	257.5	57.0
	21002	207.1	215.1	231.5	244.2	255.7	48.6
	21003	202.5	225.0	229.7	248.2	243.6	41.1
	21004	209.6	226.9	239.8	257.7	272.1	62.5
	21005	215.7	237.0	246.3	277.2	293.3	77.6
	Mean	207.1	224.1	236.7	257.2	264.4	57.4
	S.D.	6.0	8.8	6.7	12.8	19.0	13.9
N	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	22001	205.8	227.2	237.0	252.0	273.9	68.1
	22002	209.2	230.6	231.2	247.6	275.0	65.8
	22003	210.1	232.1	238.3	252.4	278.9	68.8
	22004	215.4	235.1	242.3	257.9	272.6	57.2
	22005	212.4	237.9	251.2	269.5	283.0	70.6
	Mean	210.6	232.6	240.0	255.9	276.7	66.1
	S.D.	3.6	4.1	7.4	8.4	4.2	5.3
N	5	5	5	5	5	5	
G3 2,500	23001	208.5	226.0	228.6	239.4	246.8	38.3
	23002	215.6	230.9	249.9	265.3	291.1	75.5
	23003	211.9	223.5	239.5	256.1	273.0	61.1
	23004	209.2	225.8	236.0	252.5	253.6	44.4
	23005	220.0	243.9	246.6	265.4	287.1	67.1
	Mean	213.0	230.0	240.1	255.7	270.3	57.3
	S.D.	4.8	8.2	8.5	10.8	19.7	15.6
N	5	5	5	5	5	5	
G4 5,000	24001	203.8	222.1	236.1	243.2	259.8	56.0
	24002	211.7	231.4	237.0	256.0	282.0	70.3
	24003	213.7	227.3	239.2	256.0	258.7	45.0
	24004	220.3	232.4	236.8	251.9	255.1	34.8
	24005	222.2	230.8	247.7	262.4	288.6	66.4
	Mean	214.3	228.8	239.4	253.9	268.8	54.5
	S.D.	7.3	4.2	4.8	7.1	15.3	14.8
N	5	5	5	5	5	5	

S.D.: standard deviation

Appendix 3. Individual necropsy data for single dose toxicity study SD rats

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ*	Findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	11001	All	Unremarkable findings	S	14
	11002	All	Unremarkable findings	S	14
	11003	All	Unremarkable findings	S	14
	11004	All	Unremarkable findings	S	14
	11005	All	Unremarkable findings	S	14
G2 1,250	12001	All	Unremarkable findings	S	14
	12002	All	Unremarkable findings	S	14
	12003	All	Unremarkable findings	S	14
	12004	All	Unremarkable findings	S	14
	12005	All	Unremarkable findings	S	14
G3 2,500	13001	All	Unremarkable findings	S	14
	13002	All	Unremarkable findings	S	14
	13003	All	Unremarkable findings	S	14
	13004	All	Unremarkable findings	S	14
	13005	All	Unremarkable findings	S	14
G4 5,000	14001	All	Unremarkable findings	S	14
	14002	All	Unremarkable findings	S	14
	14003	All	Unremarkable findings	S	14
	14004	All	Unremarkable findings	S	14
	14005	All	Unremarkable findings	S	14

\* External surface and organs in body cavity

S: scheduled



Appendix 3. Individual necropsy data for single dose toxicity study SD rats

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ*	Findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	21001	All	Unremarkable findings	S	14
	21002	All	Unremarkable findings	S	14
	21003	All	Unremarkable findings	S	14
	21004	All	Unremarkable findings	S	14
	21005	All	Unremarkable findings	S	14
G2 1,250	22001	All	Unremarkable findings	S	14
	22002	All	Unremarkable findings	S	14
	22003	All	Unremarkable findings	S	14
	22004	All	Unremarkable findings	S	14
	22005	All	Unremarkable findings	S	14
G3 2,500	23001	All	Unremarkable findings	S	14
	23002	All	Unremarkable findings	S	14
	23003	All	Unremarkable findings	S	14
	23004	All	Unremarkable findings	S	14
	23005	All	Unremarkable findings	S	14
G4 5,000	24001	All	Unremarkable findings	S	14
	24002	All	Unremarkable findings	S	14
	24003	All	Unremarkable findings	S	14
	24004	All	Unremarkable findings	S	14
	24005	All	Unremarkable findings	S	14

\* External surface and organs in body cavity

S: scheduled

- 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 용량설정 4주 반복 경구투여 독성시험

요 약

본 시험은 암·수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 4주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하였고, 13 주 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위하여 실시하였다. 각 군당 암·수 5마리에 0, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 용량으로 4주 반복 경구투여를 실시하여 일반증상, 사료 섭취량, 임상병리검사, 부검, 장기중량 측정 및 조직병리학적 검사를 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다. 시험기간 중 사망동물은 발생하지 않았고, 일반증상 관찰결과 시험물질 투여 후 일시 적으로 유연 (salivation)이 관찰되었다. 체중변화, 사료 섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학 적 검사, 부검, 장기중량 측정 및 조직병리학적 검사 결과 암·수 모든 동물에서 시험물질 투여와 관련된 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다. 이상으로, 본 시험조건하에서 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 4주간 반복 경구 투여한 결과, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 독성학적으로 의미 있는 변화는 관찰되지 않았다. 따라서, 13주 반복 경구투여 독성시험에서는 5,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 공비 2로 하여 2,500 및 1,250 mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정하는 것이 합당할 것이라 판단한다.

## 1. 시험실시의 개요

### 1) 시험목적

본 시험은 암·수 Sprague-Dawley 계통의 랫드를 이용하여 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 4주간 반복 경구투여시 나타나는 독성을 평가하여 13주 반복 경구투여 독성시험의 용량을 설정하기 위하여 실시하였다.

### 2) Good Laboratory Practices

Non-GLP

### 3) 시험기준

시험의 모든 규정은 다음의 시험기준을 준수하였다.

“의약품등의독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-136호 (2014년 7월 30일)

### 4) 의뢰자

기관명 고연 (高研)

주 소 (390-711) 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112호

5) 시험기관

기관명 (주)메드빌  
주 소 (153-760) 서울특별시 금천구 디지털로 9길 33, 15층 (가산동, IT미래타워)

6) 시험장소

기관명 주식회사 녹십자랩셀  
주 소 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107 (보정동)

7) 시험일정

시험개시일	2015년 2월 11일
실험개시일	2015년 2월 11일
동물입수일	2015년 2월 11일
군분리일	2015년 2월 16일
투여일	2015년 2월 17일 - 3월 16일
부검일	2015년 3월 17일
실험종료일	2015년 4월 6일
시험종료일	2015년 00월 00일

8) 시험책임자

성명	-
소속	일반독성

9) 주임시험자

성명	-
소속	주식회사 녹십자랩셀

10) 부문책임자

검역	-
병리	-
동물관리	-
시험물질 관리	-

## 11) 시험담당자

투여 및 관찰	-
부검	-
임상병리	-
검체제작	-
시험물질 조제	-

## 12) 기록 및 자료의 보관

시험기간 중에 발생된 모든 기록은 (주)메드빌의 자료보관실에 보관한다. 보관기간은 최종보고서 승인 후 3년간 보관함을 원칙으로 하며, 그 후 보관에 관해서는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

시험자료: 시험계획서, 시험기초자료, 검체, 최종보고서

## 13) 동물윤리

본 시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정을 준수하며, 동물보호법 (법률 제 4379호, 1991. 5. 31., 제정, 법률 제 13023호, 2015. 1. 20., 일부개정)에 근거한 (주)메드빌 동물실험윤리위원회 (IACUC)에 의해 승인되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 시험물질

- (1) 물질명 초음파처리 인삼꽃대 추출물
- (2) Lot No. UGFB(001)
- (3) 성상 갈색 분말
- (4) pH 4.95
- (5) 제조일 2015년 1월 15일
- (6) 유효기한정보없음
- (7) 입수일 2015년 1월 21일, 2015년 2월 27일
- (8) 입수량 609.9327, 871.67 g (용기포함)
- (9) 보관조건냉장 (4.4 - 6.8°C)
- (10) 공급처 고연 (高研)
- (11) 잔여시험물질의 처리 반환

### 2) 부형제

- (1) 명칭 주사용수
- (2) Lot No. J5N5K21
- (3) 보관조건실온
- (4) 제조사 대한약품공업(주)

(5) 부형제 선택이유 부형제 확인 결과 시험물질이 주사용수에 현탁되어 부형제를 주사용수로 정하였다.

### 3) 시험물질의 조제 및 분석

#### (1) 시험물질의 조제

투여 당일 전자저울 (Explorer Ex224G, E12140, OHAUS, U.S.A.)로 시험물질을 칭량하여 부형제를 일부 넣어 stirrer (HSD150-03P, MTOPS®, U.S.A.)를 이용하여 현탁시킨 후, 부형제를 가하여 규정농도로 조제하였다.

#### (2) 조제물의 분석

조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

### 4) 시험계

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

(2) 공급원 (주)오리엔트바이오

(3) 시험계 선정 이유

Sprague-Dawley 랫드는 일반 독성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.

(4) 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중

수컷, 22마리, 5주령, 111.9 - 128.5 g

암컷, 22마리, 5주령, 95.9 - 110.6 g

(5) 투여시 성별, 동물수, 주령 및 체중

수컷, 20마리, 6주령, 180.9 - 200.7 g

암컷, 20마리, 6주령, 128.0 - 155.5 g

(6) 검역 및 순화

반입시 동물의 일반증상을 관찰 및 체중측정을 실시하였다. 5일의 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 시험에 사용하였다.

(7) 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 순화기간 개체식별카드를 부착하였다.

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

(8) 군분리

군분리는 순화종료일에 일반증상 및 체중에 이상이 없는 동물 중 암·수 각각 20마리를 선발하였다. 선발한 동물은 평균체중 및 표준편차를 계산하여 대조군, 저용량군, 중용량군 및 고용량군으로 각각 5마리씩 균일하게 분리하였다.

(9) 잔여동물의 처리

군분리 후 잔여동물은 시험계로부터 제외시켜 SOP에 따라 처리하였다.

## 5) 사육환경조건

- (1) 동물실 번호 동물실 III
- (2) 사육상자 종류 및 크기 Polycarbonate cage, 420W × 270D × 180H (mm)
- (3) 사육상자당 수용동물 수 순화기간 2 - 3 마리, 관찰기간 1 - 2 마리
- (4) 온도 18.9 - 23.9°C
- (5) 상대습도 35.1 - 60.2%
- (6) 환기횟수 10 - 20 회/시간
- (7) 명암주기 (조명시간) 12 시간/일 (08:00 - 20:00)
- (8) 조도 150 - 300 Lux

## 6) 사료

- (1) 종류 실험동물용 고형사료 (LabDiet 5053)
- (2) Lot No. L80154492
- (3) 제조사 PMI Nutrition International Inc., U.S.A.
- (4) 공급원 (주)오리엔트바이오
- (5) 급이방법 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취 시켰다.
- (6) 사료의 분석 및 확인 제조사에서 제공한 분석 자료의 결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지 확인하였다.

## 7) 음수

- (1) 종류 및 급수방법  
서울특별시의 수도물을 UV 멸균 및 필터를 이용하여 여과된 정제수를 Polycarbonate 음수병 (500 mL)에 넣어 자유섭취 시켰다.
- (2) 음수의 분석 및 확인  
“먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙” (환경부령 제553호, 2014. 4. 30. 타법개정)의 전 항목에 대하여 서울특별시 보건환경연구원 (경기도 과천시 장군마을 3길 30)에 의뢰하여 1회/년 검사를 실시하며, 그 결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지 확인하였다 (2014년 12월 16일).

## 8) 투여

- (1) 투여경로 : 경구투여
- (2) 투여경로 선택이유 : 임상예정 경로에 따라 경구투여를 선택하였다.
- (3) 투여방법 및 투여횟수  
투여액량은 10 mL/kg으로 하고, 개체별 투여액량은 최근의 체중측정을 기준으로 산출하였다. 위존대를 부착한 일회용 주사기 (3 - 5 mL)를 이용하여 4주간 1일 1회 강제 경구투여를 실시하였다.

## 9) 투여용량 및 시험군의 구성

- (1)투여용량  
본 시험물질에 대하여 실시한 단회 경구투여 독성시험 (주)메드빌 시험번호: M15004)을 바탕으로 의뢰자의

요청에 따라 고용량을 5,000 mg/kg으로 설정하였고, 2,500 및 1,250 mg/kg을 각각 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 부형제에 대한 영향을 알아보기 위하여 대조군을 설정하였다.

(2) 시험군의 구성

군	투여액량 (mL/kg)	투여용량 (mg/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1	10	0	5 (11001 - 11005)	5 (21001 - 21005)
G2	10	1,250	5 (12001 - 12005)	5 (22001 - 22005)
G3	10	2,500	5 (13001 - 13005)	5 (23001 - 23005)
G4	10	5,000	5 (14001 - 14005)	5 (24001 - 24005)

10) 관찰 및 검사

(1) 일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 투여개시로부터 부검 전일까지 매일 1회 이상 일반증상 관찰하였다.

(2) 빈사 및 사망동물의 처리

관찰기간 중 빈사 및 사망동물은 관찰되지 않았다.

(3) 체중측정

모든 동물에 대하여 투여 직전 (0일), 투여 개시 후 주 1회, 부검전일 및 부검당일에 체중측정을 실시하였다.

(4) 사료섭취량 측정

투여개시 후 주 1회 사육상자 별로 일일 공급량 및 잔량을 측정하여 평균섭취량을 산출하였다.

(5) 임상병리검사

투여기간 종료 후, 모든 생존동물에 대하여 부검 전 16시간 이상 절식시킨 동물을 isoflurane으로 흡입 마취하여 회복한 후, 복대동맥으로부터 채혈하였고, 이를 이용하여 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 혈액응고 검사를 실시하였다.

① 혈액학적 검사

부검 전 채혈한 혈액 중 약 1 mL을 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 vacutainer tube (BD, U.S.A.)에 주입한 후, 주식회사 녹십자랩셀에 의뢰하여 자동혈액분석기 (XH 9000, SYSMEX, Japan)로 다음 항목을 측정하였다.

❶ 일반혈액학적 검사

항 목	단 위	측 정 방 법
WBC (white blood cell count)	10 <sup>3</sup> /μL	Flowcytometry
RBC (red blood cell count)	10 <sup>6</sup> /μL	Flowcytometry,
HGB (hemoglobin conc.)	g/dL	isovolumetry
HCT (hematocrit)	%	Modified CN met-Hb
MCV (mean corpuscular volume)	fL	method
		(RBC×MCV)÷10
		Histogram



MCH (mean corpuscular hemoglobin)	Pg	$(HGB \div RBC) \times 10$
MCHC (mean corpuscular hemoglobin conc.)	g/dL	$[HGB \div (RBC \times MCV)] \times 1000$
RDW (red cell distribution width)	%	Histogram
PLT (platelet)	$10^3/\mu\text{L}$	Flowcytometry
MPV (mean platelet volume)	fL	Histogram

### ② 혈액생화학적 검사

부검 전 채혈한 혈액 중 약 3 mL을 clot activator가 들어있는 vacutainer tube (BD, UK)에 주입하고 15 - 20분간 상온에 방치하여 응고시킨 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청으로 혈액생화학분석기 (Hitachi 7020, HITACHI, Japan)와 전해질분석기 (PDC-800, FUJIFILM, Japan)를 이용하여 아래 항목에 대하여 측정하였다.

항 목	단 위	측 정 방 법
AST (aspartateaminotransferase)	IU/L	IFCC
ALT (alanine aminotransferase)	IU/L	IFCC
ALP (alkaline phosphatase)	IU/L	P-NPP
BUN (blood urea nitrogen)	mg/dL	Urease-UV
CRE (creatinine)	mg/dL	Jaffe
GLU (glucose)	mg/dL	UV
CHO (total cholesterol)	mg/dL	Enzyme
PRO (total protein)	g/dL	Biuret
CPK (creatine phosphokinase)	IU/L	UV-Rate
ALB (albumin)	g/dL	BCG
BIL (total bilirubin)	mg/dL	Evelyn-Malloy
TG (triglyceride)	mg/dL	Enzyme
IP (inorganic phosphorus)	mg/dL	Enzyme
Ca <sup>2+</sup> (calcium ion)	mg/dL	O-CPC
A/G ratio (albumin/globulin ratio)	ratio	PRO, ALB로 산출
Na <sup>+</sup> (sodium ion)	mmol/L	전극법
K <sup>+</sup> (potassium ion)	mmol/L	전극법
Cl <sup>-</sup> (chloride ion)	mmol/L	전극법

### ③ 혈액응고검사

부검 전 채혈한 혈액 중 약 1 mL을 3.2% sodium citrate가 담겨있는 vacutainer tube (BD, UK)에 주입한 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈액응고분석기 (ACL ELITE PRO, Instrumentation Laboratory, U.S.A.)를 이용하여 다음 항목을 측정하였다.

항 목	단 위	측 정 방 법
PT (prothrombin time)	Sec	Nephelometry
aPTT (activated partial thromboplastin time)	Sec	Nephelometry

#### (6) 부검

투여가 종료된 후, 모든 생존동물에 대하여 16시간 이상 절식시킨 다음 육안검사를 진행하며 부검을 실시하였다.

#### (7) 장기중량 측정

모든 동물의 다음 장기에 대한 중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기 중량비 (organ to bodyweight)를 산출하였다. 좌·우가 있는 장기(#)는 좌·우를 합하여 무게를 측정하였다.

측 정 항 목	
뇌 (brain)	신장# (kidney)
심장 (heart)	폐 (lung)
간 (liver)	비장 (spleen)

(8) 조직고정

모든 부검동물에서 적출한 아래의 장기 및 조직에 대하여 10% 중성완충포르말린에 고정하였다.

측 정 항 목	
뇌 (brain)	신장 (kidney)
심장 (heart)	폐 (lung)
간 (liver)	비장 (spleen)

(9) 조직병리학적 검사

고정 장기 및 조직에 대하여 삭정, 파라핀 포매, 조직 절편제작, 박절, Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 잔여 장기·조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존하였다. 조직병리학적 검사는 대조군 및 고용량군에 대하여 실시하였다.

11) 통계학적 분석

통계학적 분석은 체중, 혈액검사 및 장기중량에 대하여 SPSS program (SPSS 16.0)을 사용하여 실시하였다.

정규성과 등분상성을 만족하면 One-way analysis of variance (ANOVA)을 실시하며, 유의성이 인정되면 다중비교방법인 Dunnett t-test를 통하여 대조군과의 유의성을 확인하였다 (유의수준: 양측 5%). 정규성이나 등분산성을 만족하지 않으면 Kruskal-Wallis's H-test를 실시하며, 유의성이 인정되면 Bonferroni 방법으로 다중성을 보강한 Mann-Whitney U-test를 통하여 대조군과의 유의성을 확인하였다 (유의수준: 양측 5%).

3. 결과 및 고찰

1) 일반증상 (Table 1, Appendix 1)

관찰기간 동안, 암·수 대조군 및 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

유연 (salivation)증상이 투여 직후 일시적으로 암컷 1,250 mg/kg 투여군 1마리에서 투여 17 및 23일에 단 2회 관찰되었고, 암수 2,500 및 5,000 mg/kg 투여군에서는 1 ~ 5마리에서 투여 8일부터 투여 종료 시까지 관찰되었다. 상기 증상은 투여직후 일시적으로 관찰된 후 회복되어 시험물질의 물리화학적 특성에 따른 일시적인 것으로 독성학적 변화는 아닌 것으로 판단되었다.

2) 체중변화 (Figure 1, Figure 2, Table 2, Appendix 2)

시험기간 중 모든 시험군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

3) 사료섭취량 (Table 3, Appendix 3)

시험기간 중 모든 시험군에서 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

4) 혈액학적 검사 (Table 4, Appendix 4)

암·수 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

5) 혈액생화학적 검사 (Table 5, Appendix 5)

암·수 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

그 외, 수컷 1,250 mg/kg 투여군에서 혈액요소질소 (BUN) 수치의 감소 ( $p < 0.05$ ), 2,500 mg/kg 투여군에서 BUN 및 A/G ratio 수치의 감소 ( $p < 0.05$ )가 관찰되었으며 용량상관성이 없었으며, 암컷 5,000 mg/kg 투여군에서 칼슘 ( $Ca^{2+}$ ) 및 나트륨 ( $Na^+$ ) 수치의 감소가 관찰되었으나 경미한 변동으로서 다른 관련된 항목의 변화가 관찰되지 않았으므로 독성학적 의미는 없었다.

6) 혈액응고 검사 (Table 6, Appendix 6)

암·수 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

7) 장기중량 (Table 7, Table 8, Appendix 7, Appendix 8)

암·수 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

그 외, 수컷 5,000 mg/kg 투여군에서 신장의 상대장기 중량의 증가 ( $p < 0.05$ )가 관찰되었으나, 체중감소에 따른 증가로 조직병리학적 검사 결과 특이성이 관찰되지 않아 독성학적 의미는 없었으며, 암컷 1,250 mg/kg 투여군에서 간 및 신장의 절대장기 중량이 증가 ( $p < 0.05$ ) 하였으나 용량의존성이 없는 변화로 독성학적 의미는 없었다.

8) 부검소견 (Table 9, Appendix 9)

부검에서 암·수 대조군 및 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 투여군에서 어떠한 육안소견도 관찰되지 않았다.

#### 9) 조직병리학적 검사 (Table 10, Appendix 10)

암·수 시험물질 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 그 외, 암·수 대조군 및 시험물질 5,000 mg/kg 투여군에서 관찰된 소견은 모두 자연발생성으로서 우발적 또는 산발적으로 분포하였으므로 독성학적 의미는 없었다.

#### 4. 결론

본 시험은 암·수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 0, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 용량으로 4주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 13 주 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위하여 임상병리검사, 부검, 장기중량 측정 및 조직병리학적 검사를 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

시험기간 중 사망동물은 발생하지 않았고, 일반증상 관찰, 체중변화, 사료 섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검 및 조직병리학적 검사 결과 암·수 모두 시험물질 투여에 의한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다.

따라서, 13주 반복 경구투여 독성시험에서는 5,000mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 공비 2로 하여 2,500 및 1,250 mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정하는 것이 합당할 것으로 판단한다.

FIGURES

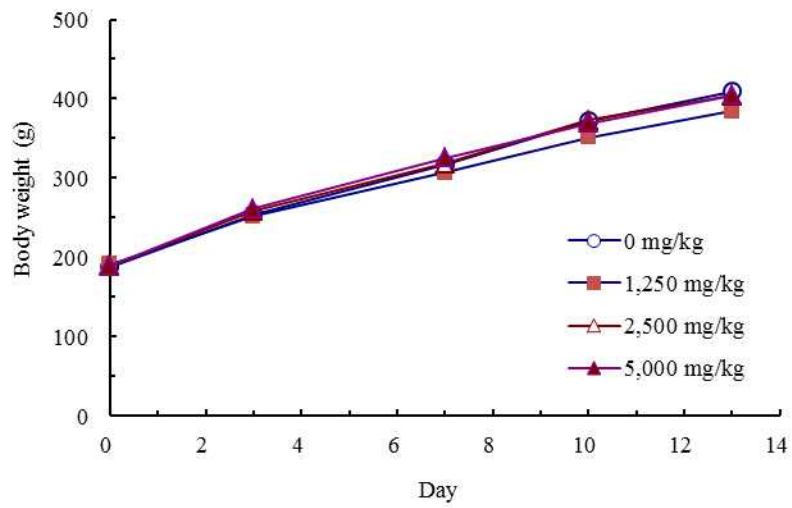


Figure 1. Mean body weights of male rats

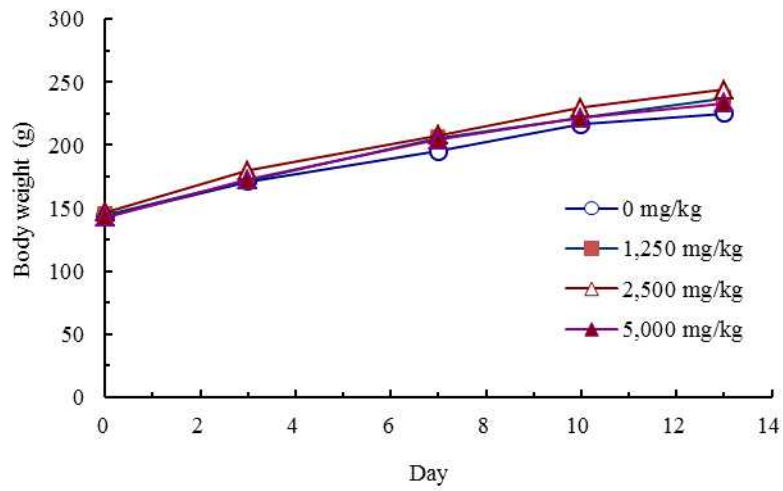


Figure 2. Mean body weights of female rats

TABLES

Table 1. Summary clinical signs

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing														
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
G1 0	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	No abnormality findings Salivation	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	3
														1		2	

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing														
			14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
G1 0	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	No abnormality findings Salivation	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	No abnormality findings Salivation	5	5	5	3	3	2	2	3	2	3	3	2	2	4	
						2	2	3	3	2	3	2	2	3	3	1	
G4 5,000	5	No abnormality findings Salivation	5	2	3	1		1	2	1			1				
				3	2	4	5	4	3	4	5	5	4	5	5	5	

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing														
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
G1 0	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	No abnormality findings Salivation	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
													1	2		1	

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing														
			14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
G1 0	5	No abnormality findings	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	No abnormality findings Salivation	5	5	5	4	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5
						1						1					
G3 2,500		No abnormality findings Salivation	5	5	4	2	3	3	3	3	2	2	2	4	2	3	
					1	3	2	2	2	2	3	3	3	1	3	2	
G4 5,000	5	No abnormality findings Salivation	5	2	2				2	2	2		1	2	1		
				3	3	5	5	5	3	3	3	5	4	3	4	5	

Table 2. Mean body weights

Sex: Male (g)

Group /Dose (mg/kg)		Weeks					Final weight gain
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	188.3	254.1	317.2	371.9	409.3	221.0
	S.D.	5.3	9.2	14.5	23.1	28.4	26.2
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	191.0	251.7	306.9	351.3	384.2	193.1
	S.D.	6.6	7.8	12.6	16.2	22.6	22.2
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	189.8	257.9	318.3	373.0	403.9	214.2
	S.D.	6.6	5.5	7.6	15.4	17.1	21.9
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	189.1	261.8	325.3	368.8	404.6	215.5
	S.D.	6.7	5.2	8.3	16.2	20.7	20.8
	N	5	5	5	5	5	5

Sex: Female (g)

Group /Dose (mg/kg)		Weeks					Final weight gain
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	143.7	171.1	195.1	216.1	224.8	81.1
	S.D.	6.7	6.5	9.0	6.2	9.5	6.4
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	144.4	172.3	205.4	221.3	237.4	92.9
	S.D.	7.1	9.1	6.3	15.2	21.2	25.2
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	146.6	179.6	207.8	229.6	243.7	97.1
	S.D.	7.0	10.9	18.4	23.5	19.4	14.3
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	142.6	172.4	204.0	221.3	233.1	90.4
	S.D.	8.9	18.0	22.1	20.6	20.4	12.3
	N	5	5	5	5	5	5

Table 3. Mean food consumption

Sex: Male							(g)
Group /Dose (mg/kg)		Weeks					
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	24.2	26.5	31.7	30.6	34.5	
	S.D.	1.1	2.0	1.5	1.1	1.9	
	N	5	5	5	5	5	
G2 1,250	Mean	25.5	20.2	32.6	29.8	33.3	
	S.D.	1.6	10.7	1.3	1.9	0.3	
	N	5	5	5	5	5	
G3 2,500	Mean	23.3	26.9	32.1	29.6	33.6	
	S.D.	0.9	0.5	0.8	1.7	1.0	
	N	5	5	5	5	5	
G4 5,000	Mean	24.1	26.2	32.6	30.0	34.1	
	S.D.	0.3	2.9	2.5	2.6	3.4	
	N	5	5	5	5	5	
Sex: Female							(g)
Group /Dose (mg/kg)		Weeks					
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	16.3	17.0	19.9	19.6	21.4	
	S.D.	1.3	0.9	1.5	1.6	3.0	
	N	5	5	5	5	5	
G2 1,250	Mean	16.9	16.4	23.8	20.2	23.8	
	S.D.	1.0	2.8	2.1	4.5	3.9	
	N	5	5	5	5	5	
G3 2,500	Mean	16.7	18.4	22.1	20.4	23.3	
	S.D.	0.8	0.9	2.0	4.3	2.2	
	N	5	5	5	5	5	
G4 5,000	Mean	15.7	15.8	21.6	19.1	22.3	
	S.D.	1.7	1.5	1.1	2.9	2.7	
	N	5	5	5	5	5	



Table 4. Summary of hematological parameters

Sex: Male											
Group		WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	PLT	MPV
/Dose (mg/kg)		(10 <sup>3</sup> /μL)	(10 <sup>6</sup> /μL)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)	(%)	(10 <sup>3</sup> /μL)	(fL)
G1 0	Mean	6.35	7.51	14.5	47.0	62.7	19.4	30.9	11.0	1026	6.7
	S.D.	2.52	0.22	0.1	1.0	1.5	0.6	0.7	0.3	191	0.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	7.35	7.60	15.1	49.0	64.3	19.8	30.8	11.1	1006	6.9
	S.D.	1.54	0.25	0.9	3.3	2.4	0.5	0.9	0.5	134	0.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	5.39	7.37	14.7	47.6	64.6	19.9	30.8	11.0	1006	7.0
	S.D.	2.08	0.14	0.4	1.4	0.9	0.6	0.8	0.5	168	0.2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	7.02	6.95	13.9	45.2	65.3	20.1	30.8	11.0	749	7.3
	S.D.	3.39	0.80	1.4	4.0	3.0	0.7	0.4	0.4	276	0.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Sex: Female											
Group		WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	PLT	MPV
/Dose (mg/kg)		(10 <sup>3</sup> /μL)	(10 <sup>6</sup> /μL)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)	(%)	(10 <sup>3</sup> /μL)	(fL)
G1 0	Mean	2.74	7.53	14.8	46.9	62.3	19.7	31.6	10.3	1172	6.4
	S.D.	0.79	0.38	0.6	2.0	1.5	0.8	0.6	0.2	195	0.3
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	3.82	7.66	15.2	47.7	62.3	19.8	31.8	10.3	940	8.3
	S.D.	1.10	0.24	0.3	1.7	1.6	0.3	0.8	0.5	535	3.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	3.58	7.31	14.4	45.8	62.7	19.8	31.6	10.4	1163	6.7
	S.D.	0.81	0.28	0.2	1.4	1.4	0.6	0.8	0.3	167	0.4
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	3.29	7.38	14.6	45.7	62.0	19.9	32.0	10.5	1000	6.5
	S.D.	1.53	0.46	0.5	2.3	1.2	0.7	0.9	0.3	107	0.2
	N	4 ^	4 ^	4 ^	4 ^	4 ^	4 ^	4 ^	4 ^	4 ^	4 ^

^: Values are excluded due to blood clot from the statistic.

Table 5. Summary of serum biochemical values

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)		AST (IU/L)	ALT (IU/L)	T-BIL (mg/mL)	ALP (IU/L)	CK (IU/L)	BUN (mg/dL)	GLU (mg/dL)	ALB (g/dL)	TP (g/dL)	GGT (IU/L)
G1 0	Mean	132	34	-	575	482	13	100	3.0	7.6	0
	S.D.	26	7	-	89	188	1	8	0.1	0.2	1
	N	5	5	0 ^	5	5	5	5	5	5	0 ^
G2 1,250	Mean	134	37	-	661	456	11 *	95	3.1	7.9	0
	S.D.	14	5	-	145	188	1	12	0.1	0.2	1
	N	5	5	0 ^	5	5	5	5	5	5	4 ^
G3 2,500	Mean	130	34	-	618	472	11 *	90	3.1	7.3	1
	S.D.	24	5	-	192	164	1	8	0.1	0.3	1
	N	5	5	0 ^	5	5	5	5	5	5	4 ^
G4 5,000	Mean	125	33	-	558	429	11	101	3.1	7.8	0
	S.D.	32	2	-	41	221	2	18	0.2	0.4	1
	N	5	5	0 ^	5	5	5	5	5	5	3 ^

Group /Dose (mg/kg)		A/G ratio	CHO (mg/dL)	CRE (mg/dL)	TG (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)	Cl <sup>-</sup> (mmol/L)
G1 0	Mean	0.61	64	0.4	33	8.71	10.4	142	5.2	102
	S.D.	0.02	10	0.1	10	0.84	0.5	2	0.5	1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	0.61	70	0.4	33	8.71	10.4	142	5.2	102
	S.D.	0.01	11	0.1	10	0.84	0.5	2	0.5	1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	0.58 *	54	0.4	41	8.62	10.1	143	5.4	102
	S.D.	0.01	9	0.1	21	0.60	0.4	1	0.8	2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	0.60	57	0.5	26	9.33	10.4	142	6.3	104
	S.D.	0.01	4	0.1	7	1.04	0.5	1	1.5	2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

^: Values below the level of detection are excluded from statistics.

- : No data

Significantly different from the control : \*  $p < 0.05$

Table 5. Summary of serum biochemical values

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)		AST (IU/L)	ALT (IU/L)	T-BIL (mg/mL)	ALP (IU/L)	CK (IU/L)	BUN (mg/dL)	GLU (mg/dL)	ALB (g/dL)	TP (g/dL)	GGT (IU/L)
G1 0	Mean	117	29	0.01	420	381	17	91	3.3	8.1	1
	S.D.	20	4	0.01	149	68	2	13	0.2	0.5	1
	N	5	5	3 ^	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	110	25	0.00	370	427	15	100	3.4	8.1	0
	S.D.	25	3	-	55	281	5	18	0.1	0.2	1
	N	5	5	1 ^	5	5	5	5	5	5	4 ^
G3 2,500	Mean	101	28	0.00	409	255	15	95	3.3	8.0	1
	S.D.	16	3	0.00	91	134	3	9	0.3	0.4	1
	N	5	5	3 ^	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	113	26	-	337	379	18	94	3.2	7.9	1
	S.D.	12	2	-	87	126	3	4	0.1	0.3	1
	N	5	5	0 ^	5	5	5	5	5	5	5

Group /Dose (mg/kg)		A/G ratio	CHO (mg/dL)	CRE (mg/dL)	TG (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)	Cl <sup>-</sup> (mmol/L)
G1 0	Mean	0.59	76	0.6	13	8.70	11.2	144	5.0	103
	S.D.	0.01	4	0.0	5	1.23	0.6	1	0.7	1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	0.57	70	0.5	10	8.46	10.9	144	5.0	104
	S.D.	0.01	13	0.0	2	1.05	0.3	1	0.7	1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	0.58	73	0.5	15	8.59	11.1	142	5.2	103
	S.D.	0.02	14	0.1	6	1.37	0.6	1	1.5	2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	0.59	83	0.6	23	8.02	10.1 *	141 *	5.3	102
	S.D.	0.01	28	0.0	13	0.86	0.2	1	0.4	1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

^: Values below the level of detection are excluded from statistics.

- : No data

Significantly different from the control : \*  $p < 0.05$

Table 6. Summary of blood chemical values

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)		PT (Sec)	aPTT (Sec)
G1 0	Mean	13.1	53.0
	S.D.	1.8	11.4
	N	5	5
G2 1,250	Mean	16.2	61.6
	S.D.	4.5	22.1
	N	5	5
G3 2,500	Mean	15.1	54.6
	S.D.	3.1	10.0
	N	5	5
G4 5,000	Mean	14.1	52.8
	S.D.	2.6	11.7
	N	5	5

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)		PT (Sec)	aPTT (Sec)
G1 0	Mean	9.2	29.6
	S.D.	0.3	6.7
	N	5	5
G2 1,250	Mean	9.8	36.1
	S.D.	0.7	7.6
	N	5	5
G3 2,500	Mean	15.1	54.6
	S.D.	3.1	10.0
	N	5	5
G4 5,000	Mean	10.1	41.0
	S.D.	0.7	13.2
	N	5	5

Table 7. Mean absolute organ weights

Sex: Male		(g)						
Group / Dose (mg/kg)		B.W.	Brain	Liver	Lung	Spleen	Heart	Kidney
G1 0	Mean	375.2	1.9605	12.4280	1.6482	0.7572	1.3583	2.9673
	S.D.	22.4	0.1333	1.0099	0.0461	0.0775	0.1164	0.1742
	N	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	354.9	1.9273	11.2644	1.5843	0.7528	1.4142	3.0514
	S.D.	18.7	0.0581	1.0478	0.1079	0.0716	0.1084	0.3189
	N	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	373.6	1.9891	11.7395	1.5368	0.7913	1.3501	3.0325
	S.D.	14.9	0.1036	1.4294	0.0997	0.1280	0.0591	0.1563
	N	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	367.4	2.0295	12.4489	1.6395	0.8289	1.4663	3.2482
	S.D.	16.4	0.0515	0.9494	0.0726	0.1146	0.0651	0.1392
	N	5	5	5	5	5	5	5
Sex: Female		(g)						
Group / Dose (mg/kg)		B.W.	Brain	Liver	Lung	Spleen	Heart	Kidney
G1 0	Mean	209.1	1.8289	6.5103	1.1603	0.4487	0.8573	1.7108
	S.D.	9.9	0.0773	0.1043	0.1178	0.0815	0.0508	0.1039
	N	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	216.0	1.7882	6.8377 *	1.2567	0.5407	0.9365	1.9232 *
	S.D.	17.4	0.0574	0.2429	0.1118	0.0616	0.0449	0.1041
	N	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	225.5	1.8806	7.0103	1.2074	0.5037	0.9140	1.8598
	S.D.	20.0	0.0832	0.6149	0.1212	0.0717	0.0944	0.1051
	N	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	218.1	1.8171	7.1114	1.2294	0.4838	0.8882	1.7941
	S.D.	15.2	0.0474	0.7561	0.0974	0.1064	0.0949	0.0880
	N	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from the control : \*  $p < 0.05$ .

Table 8. Mean relative organ weights

Sex: Male		(g/100g body weight)						
Group / Dose (mg/kg)		B.W.	Brain	Liver	Lung	Spleen	Heart	Kidney
G1 0	Mean	375.2	0.5230	3.3099	0.4402	0.2018	0.3630	0.7921
	S.D.	22.4	0.0307	0.1255	0.0223	0.0163	0.0367	0.0499
	N	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	354.9	0.5438	3.1696	0.4471	0.2121	0.3986	0.8584
	S.D.	18.7	0.0227	0.1603	0.0350	0.0176	0.0244	0.0537
	N	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	373.6	0.5326	3.1364	0.4114	0.2121	0.3615	0.8132
	S.D.	14.9	0.0216	0.2872	0.0222	0.0352	0.0111	0.0599
	N	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	367.4	0.5530	3.3858	0.4472	0.2255	0.3998	0.8848 *
	S.D.	16.4	0.0202	0.1388	0.0324	0.0286	0.0272	0.0376
	N	5	5	5	5	5	5	5

Sex: Female		(g/100g body weight)						
Group / Dose (mg/kg)		B.W.	Brain	Liver	Lung	Spleen	Heart	Kidney
G1 0	Mean	209.1	0.8767	3.1197	0.5544	0.2145	0.4101	0.8178
	S.D.	9.9	0.0670	0.1844	0.0425	0.0377	0.0207	0.0247
	N	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	216.0	0.8314	3.1772	0.5831	0.2503	0.4351	0.8934
	S.D.	17.4	0.0606	0.1951	0.0487	0.0209	0.0304	0.0636
	N	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	225.5	0.8373	3.1103	0.5353	0.2231	0.4057	0.8279
	S.D.	20.0	0.0531	0.0639	0.0189	0.0219	0.0290	0.0568
	N	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	218.1	0.8355	3.2538	0.5644	0.2226	0.4070	0.8239
	S.D.	15.2	0.0465	0.1391	0.0377	0.0499	0.0289	0.0329
	N	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from the control : \*  $p < 0.05$ .

Table 9. Summary of necropsy findings

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Organ	Necropsy findings	No. of animals affected	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	5	All	Unremarkable findings		S	28
G2 1,250	5	All	Unremarkable findings		S	28
G3 2,500	5	All	Unremarkable findings		S	28
G4 5,000	5	All	Unremarkable findings		S	28

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Organ	Necropsy findings	No. of animals affected	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	5	All	Unremarkable findings		S	28
G2 1,250	5	All	Unremarkable findings		S	28
G3 2,500	5	All	Unremarkable findings		S	28
G4 5,000	5	All	Unremarkable findings		S	28

S: scheduled

Table 10. Summary histopathological findings

Organ / Findings	Sex		Male		Female			
	Group	Dose (mg/kg)		G1	G4	G1	G4	
		0		5,000	0	5,000		
		No. of animals		5	5	5	5	
<b>Brain</b>	<b>No. examined</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
<b>Heart</b>	<b>No. examined</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
<b>Kidney</b>	<b>No. examined</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
-Hyaline cast		0	1	0	0	0	0	
-Mineralization, CM junction		0	0	1	3			
-Regeneration tubular		1	0	0	0			
<b>Liver</b>	<b>No. examined</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
-Cell infiltration, mononuclear, focal		0	1	2	0			
<b>Lung</b>	<b>No. examined</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
<b>Spleen</b>	<b>No. examined</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	



APPENDICES

Appendix 1. Individual clinical signs

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical signs	Days after dosing													
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
G1 0	11001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11005		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250	12001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12005		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3 2,500	13001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13005		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4 5,000	14001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	14002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14005		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

- : no abnormal findings

+ : Salivation

## Appendix 1. Individual clinical signs

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing													
			14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
G1 0	11001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11005		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250	12001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12005		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3 2,500	13001		-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	13002		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
	13003		-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
	13004		-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
	13005		-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
G4 5,000	14001		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	14002		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	14003		-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	14004		-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	14005		-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

- : no abnormal findings

+ : Salivation

## Appendix 1. Individual clinical signs

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical signs	Days after dosing													
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
G1 0	21001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21005		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250	22001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22005		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3 2,500	23001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23005		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4 5,000	24001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	24004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24005		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

- : no abnormal findings

+ : Salivation

## Appendix 1. Individual clinical signs

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing													
			14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
G1 0	21001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21005		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250	22001		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22002		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22003		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22005		-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G3 2,500	23001		-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
	23002		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
	23003		-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
	23004		-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
	23005		-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
G4 5,000	24001		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24002		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24003		-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
	24004		-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	24005		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+

- : no abnormal findings

+ : Salivation

## Appendix 2. Individual body weights

Sex: Male							(g)
Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Weeks					Final weight gain
		0	1	2	3	4	
G1 0	11001	197.2	265.4	331.1	395.2	438.9	241.7
	11002	187.7	245.5	302.4	347.9	382.1	194.4
	11003	187.9	259.9	329.2	375.2	415.2	227.3
	11004	184.7	244.1	301.0	348.3	377.4	192.7
	11005	184.1	255.8	322.3	393.0	432.8	248.7
	Mean	188.3	254.1	317.2	371.9	409.3	221.0
	S.D.	5.3	9.2	14.5	23.1	28.4	26.2
N	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	12001	192.1	251.6	298.2	339.6	361.4	169.3
	12002	200.7	263.0	312.7	354.1	385.0	184.3
	12003	192.4	254.3	321.1	377.3	418.7	226.3
	12004	184.1	242.1	289.8	336.1	366.5	182.4
	12005	185.8	247.7	312.5	349.4	389.2	203.4
	Mean	191.0	251.7	306.9	351.3	384.2	193.1
	S.D.	6.6	7.8	12.6	16.2	22.6	22.2
N	5	5	5	5	5	5	
G3 2,500	13001	195.9	262.0	316.6	359.2	390.3	194.4
	13002	195.8	261.6	313.7	362.9	391.8	196.0
	13003	191.5	260.2	319.2	384.4	408.0	216.5
	13004	183.1	256.9	330.9	394.2	431.8	248.7
	13005	182.5	248.8	311.2	364.1	397.8	215.3
	Mean	189.8	257.9	318.3	373.0	403.9	214.2
	S.D.	6.6	5.5	7.6	15.4	17.1	21.9
N	5	5	5	5	5	5	
G4 5,000	14001	195.2	267.4	338.4	394.2	437.7	242.5
	14002	196.8	265.9	321.2	361.7	386.8	190.0
	14003	187.2	256.9	316.2	350.3	387.1	199.9
	14004	185.5	262.8	326.2	366.6	405.8	220.3
	14005	180.9	256.0	324.6	371.1	405.6	224.7
	Mean	189.1	261.8	325.3	368.8	404.6	215.5
	S.D.	6.7	5.2	8.3	16.2	20.7	20.8
N	5	5	5	5	5	5	

## Appendix 2. Individual body weights

Sex: Female							(g)
Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Weeks					Final weight gain
		0	1	2	3	4	
G1 0	21001	152.2	177.9	200.5	222.5	226.1	73.9
	21002	146.2	171.9	203.6	221.2	235.0	88.8
	21003	146.6	176.2	200.2	213.4	232.1	85.5
	21004	136.2	161.7	182.4	207.1	211.7	75.5
	21005	137.5	167.9	189.0	216.1	219.1	81.6
	Mean	143.7	171.1	195.1	216.1	224.8	81.1
	S.D.	6.7	6.5	9.0	6.2	9.5	6.4
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	22001	155.5	185.1	207.9	218.2	234.8	79.3
	22002	144.9	177.7	209.6	221.8	235.3	90.4
	22003	144.3	166.5	194.4	200.5	215.1	70.8
	22004	141.0	162.5	208.9	222.9	229.3	88.3
	22005	136.4	169.7	206.4	243.3	272.3	135.9
	Mean	144.4	172.3	205.4	221.3	237.4	92.9
	S.D.	7.1	9.1	6.3	15.2	21.2	25.2
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	23001	154.0	190.7	226.3	246.4	249.5	95.5
	23002	153.3	190.7	228.0	261.8	273.0	119.7
	23003	144.7	178.9	202.4	220.2	243.6	98.9
	23004	143.8	170.0	195.0	211.6	225.2	81.4
	23005	137.4	167.8	187.4	207.8	227.3	89.9
	Mean	146.6	179.6	207.8	229.6	243.7	97.1
	S.D.	7.0	10.9	18.4	23.5	19.4	14.3
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	24001	147.1	186.7	220.1	236.1	253.4	106.3
	24002	151.5	191.5	229.4	242.4	248.5	97.0
	24003	143.9	168.2	197.7	218.4	230.8	86.9
	24004	142.7	169.8	200.1	220.2	231.2	88.5
	24005	128.0	145.8	172.6	189.4	201.4	73.4
	Mean	142.6	172.4	204.0	221.3	233.1	90.4
	S.D.	8.9	18.0	22.1	20.6	20.4	12.3
	N	5	5	5	5	5	5

### Appendix 3. Individual food consumption

Sex: Male

(g)

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Weeks									
		0		1		2		3		4	
		Total*	Mean**	Total	Mean	Total	Mean	Total	Mean	Total	Mean
G1 0	2	50.4	25.2	48.6	24.3	66.9	33.5	62.7	31.4	72.8	36.4
	2	48.7	24.4	56.6	28.3	61.3	30.7	58.5	29.3	68.7	34.4
	1	23.1	23.1	27.0	27.0	30.9	30.9	31.1	31.1	32.6	32.6
	Mean		24.2		26.5		31.7		30.6		34.5
	S.D.		1.1		2.0		1.5		1.1		1.9
	N		5		5		5		5		5
	G2 1,250	2	51.2	25.6	52.3	26.2	62.2	31.1	55.5	27.8	66.8
2	47.8	23.9	53.3	26.7	66.4	33.2	60.5	30.3	67.0	33.5	
1	27.1	27.1	7.9	7.9	33.5	33.5	31.4	31.4	32.9	32.9	
Mean		25.5		20.2		32.6		29.8		33.3	
S.D.		1.6		10.7		1.3		1.9		0.3	
N		5		5		5		5		5	
G3 2,500	2	47.7	23.9	54.5	27.3	62.4	31.2	56.2	28.1	66.6	33.3
	2	44.6	22.3	52.8	26.4	65.0	32.5	63.0	31.5	65.7	32.9
	1	23.8	23.8	27.1	27.1	32.6	32.6	29.2	29.2	34.7	34.7
	Mean		23.3		26.9		32.1		29.6		33.6
	S.D.		0.9		0.5		0.8		1.7		1.0
	N		5		5		5		5		5
	G4 5,000	2	48.5	24.3	56.9	28.5	70.7	35.4	64.8	32.4	74.0
2		48.6	24.3	54.2	27.1	64.0	32.0	60.5	30.3	70.0	35.0
1		23.7	23.7	22.9	22.9	30.4	30.4	27.3	27.3	30.4	30.4
Mean			24.1		26.2		32.6		30.0		34.1
S.D.			0.3		2.9		2.5		2.6		3.4
N			5		5		5		5		5

\*: the sum of weekly food consumption of rats in the cage

\*\*: the average of weekly food consumption of each rats in the cage

### Appendix 3. Individual food consumption

Sex: Female

(g)

Group /Dose (mg/kg)	No. of animals	Weeks									
		0		1		2		3		4	
		Total*	Mean**	Total	Mean	Total	Mean	Total	Mean	Total	Mean
G1 0	2	29.6	14.8	34.3	17.2	41.1	20.6	35.9	18.0	45.2	22.6
	2	34.7	17.4	35.6	17.8	42.0	21.0	39.2	19.6	47.3	23.7
	1	16.8	16.8	16.0	16.0	18.2	18.2	21.1	21.1	18.0	18.0
	Mean		16.3		17.0		19.9		19.6		21.4
	S.D.		1.3		0.9		1.5		1.6		3.0
	N		5		5		5		5		5
G2 1,250	2	32.3	16.2	39.0	19.5	51.7	25.9	35.0	17.5	55.3	27.7
	2	33.3	16.7	30.9	15.5	43.2	21.6	35.3	17.7	47.6	23.8
	1	18.0	18.0	14.1	14.1	23.8	23.8	25.3	25.3	19.9	19.9
	Mean		16.9		16.4		23.8		20.2		23.8
	S.D.		1.0		2.8		2.1		4.5		3.9
	N		5		5		5		5		5
G3 2,500	2	35.3	17.7	37.9	19.0	48.2	24.1	48.2	24.1	50.6	25.3
	2	33.1	16.6	34.8	17.4	44.2	22.1	42.8	21.4	47.3	23.7
	1	16.0	16.0	18.8	18.8	20.1	20.1	15.6	15.6	20.9	20.9
	Mean		16.7		18.4		22.1		20.4		23.3
	S.D.		0.8		0.9		2.0		4.3		2.2
	N		5		5		5		5		5
G4 5,000	2	34.9	17.5	35.1	17.6	45.1	22.6	44.6	22.3	48.2	24.1
	2	31.5	15.8	29.9	15.0	40.9	20.5	36.5	18.3	47.0	23.5
	1	14.0	14.0	15.0	15.0	21.9	21.9	16.7	16.7	19.2	19.2
	Mean		15.7		15.8		21.6		19.1		22.3
	S.D.		1.7		1.5		1.1		2.9		2.7
	N		5		5		5		5		5

\*: the sum of weekly food consumption of rats in the cage

\*\*: the average of weekly food consumption of each rats in the cage



#### Appendix 4. Individual hematological parameters

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	PLT (10 <sup>3</sup> /μL)	MPV (fL)
G1 0	11001	11.18	7.61	15.1	49.0	64.5	19.9	30.9	11.0	1195	6.6
	11002	8.63	7.48	14.5	46.9	62.6	19.4	30.9	11.3	1099	6.6
	11003	8.09	7.22	14.6	46.0	63.8	20.2	31.7	11.3	910	7.4
	11004	5.52	7.72	14.4	46.7	60.5	18.7	30.9	10.7	1258	6.1
	11005	3.17	7.61	14.6	48.4	63.7	19.1	30.1	10.8	835	7.0
	Mean	6.35	7.51	14.5	47.0	62.7	19.4	30.9	11.0	1026	6.7
	S.D.	2.52	0.22	0.1	1.0	1.5	0.6	0.7	0.3	191	0.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	12001	5.67	7.42	14.6	47.0	63.3	19.7	31.1	10.6	1023	6.5
	12002	5.98	7.47	14.6	45.7	61.1	19.5	32.0	11.2	848	6.9
	12003	7.36	7.91	15.7	52.5	66.4	19.8	29.8	10.8	999	6.8
	12004	9.08	7.84	16.3	52.6	67.1	20.7	30.9	11.1	948	7.6
	12005	8.67	7.38	14.2	47.1	63.8	19.3	30.2	11.9	1214	6.5
	Mean	7.35	7.60	15.1	49.0	64.3	19.8	30.8	11.1	1006	6.9
	S.D.	1.54	0.25	0.9	3.3	2.4	0.5	0.9	0.5	134	0.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	13001	8.06	7.21	14.3	45.5	63.1	19.8	31.4	11.2	847	6.9
	13002	6.19	7.27	14.4	46.9	64.6	19.8	30.6	10.4	1073	6.8
	13003	2.39	7.48	15.0	48.8	65.2	20.0	30.7	10.8	835	7.4
	13004	5.60	7.54	14.5	48.8	64.8	19.2	29.6	11.7	1235	6.8
	13005	4.69	7.35	15.3	48.0	65.3	20.8	31.8	10.8	1038	7.0
	Mean	5.39	7.37	14.7	47.6	64.6	19.9	30.8	11.0	1006	7.0
	S.D.	2.08	0.14	0.4	1.4	0.9	0.6	0.8	0.5	168	0.2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	14001	9.75	7.28	14.9	48.7	66.8	20.4	30.5	11.3	967	7.1
	14002	2.61	7.87	15.0	48.1	61.2	19.0	31.1	10.6	819	6.9
	14003	11.04	7.08	14.6	47.0	66.4	20.6	31.1	11.4	1034	7.1
	14004	5.78	6.80	13.4	43.2	63.5	19.7	31.1	10.7	524	8.1
	14005	5.90	5.70	11.8	39.2	68.8	20.8	30.2	11.0	403	7.4
	Mean	7.02	6.95	13.9	45.2	65.3	20.1	30.8	11.0	749	7.3
	S.D.	3.39	0.80	1.4	4.0	3.0	0.7	0.4	0.4	276	0.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

#### Appendix 4. Individual hematological parameters

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	PLT (10 <sup>3</sup> /μL)	MPV (fL)
G1 0	21001	3.31	7.31	14.5	45.2	61.9	19.8	32.0	10.2	1078	6.2
	21002	3.49	7.12	14.1	44.5	62.5	19.9	31.8	10.4	1312	6.2
	21003	2.00	7.72	15.8	49.1	63.6	20.5	32.2	10.6	877	6.8
	21004	3.12	7.42	14.8	47.2	63.6	19.9	31.3	10.1	1350	6.4
	21005	1.78	8.08	14.9	48.5	60.0	18.4	30.7	10.2	1241	6.6
	Mean	2.74	7.53	14.8	46.9	62.3	19.7	31.6	10.3	1172	6.4
	S.D.	0.79	0.38	0.6	2.0	1.5	0.8	0.6	0.2	195	0.3
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	22001	2.37	7.54	15.3	47.5	63.0	20.2	32.1	10.5	41	14.5
	22002	4.76	7.75	15.1	46.8	60.4	19.5	32.2	10.1	1292	7.3
	22003	3.76	7.36	14.7	47.0	63.9	19.9	31.2	9.9	1132	6.4
	22004	5.02	7.65	15.3	46.6	60.8	20.0	32.8	10.0	878	7.1
	22005	3.17	8.01	15.5	50.6	63.2	19.4	30.7	11.2	1357	6.4
	Mean	3.82	7.66	15.2	47.7	62.3	19.8	31.8	10.3	940	8.3
	S.D.	1.10	0.24	0.3	1.7	1.6	0.3	0.8	0.5	535	3.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	23001	3.61	6.84	14.2	44.1	64.4	20.8	32.3	10.0	1239	7
	23002	4.67	7.35	14.3	46.4	63.2	19.5	30.9	10.5	1265	6.4
	23003	2.42	7.48	14.7	45.4	60.7	19.6	32.4	10.6	1092	6.5
	23004	3.79	7.31	14.3	45.4	62.2	19.6	31.6	10.7	904	7.2
	23005	3.42	7.57	14.7	47.9	63.2	19.4	30.7	10.0	1314	6.5
	Mean	3.58	7.31	14.4	45.8	62.7	19.8	31.6	10.4	1163	6.7
	S.D.	0.81	0.28	0.2	1.4	1.4	0.6	0.8	0.3	167	0.4
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	24001	3.99	7.71	14.9	48.0	62.3	19.3	31.0	10.8	1105	6.2
	24002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24003	5.09	7.26	14.8	44.8	61.8	20.5	33.1	10.5	891	6.6
	24004	2.36	6.78	13.8	42.9	63.3	20.4	32.2	10.2	1078	6.6
	24005	1.73	7.78	14.9	47.1	60.5	19.2	31.7	10.6	927	6.7
	Mean	3.29	7.38	14.6	45.7	62.0	19.9	32.0	10.5	1000	6.5
	S.D.	1.53	0.46	0.5	2.3	1.2	0.7	0.9	0.3	107	0.2
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

-: Values are excluded due to blood clot.

Appendix 5. Individual serum biochemical values

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	T-BIL (mg/mL)	ALP (IU/L)	CK (IU/L)	BUN (mg/dL)	GLU (mg/dL)	ALB (g/dL)	TP (g/dL)	GGT (IU/L)
G1 0	11001	155	46	<0.00	705	626	13	99	2.9	7.7	1
	11002	159	33	<0.00	529	699	14	94	3.0	7.9	0
	11003	105	27	<0.00	502	340	13	113	2.8	7.4	0
	11004	132	30	<0.00	510	495	12	103	3.0	7.3	0
	11005	107	33	<0.00	628	250	14	92	3.2	7.7	1
	Mean	132	34	-	575	482	13	100	3.0	7.6	0
	S.D.	26	7	-	89	188	1	8	0.1	0.2	1
N	5	5	0 ^	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	12001	147	35	<0.00	636	724	11	107	3.3	8.1	0
	12002	140	30	<0.00	674	435	10	78	3.0	7.8	0
	12003	113	37	<0.00	544	255	13	90	3.1	8.2	0
	12004	128	45	<0.00	900	317	11	97	3.2	8.0	<0.00
	12005	142	36	<0.00	549	551	9	104	3.0	7.6	1
	Mean	134	37	-	661	456	11	95	3.1	7.9	0
	S.D.	14	5	-	145	188	1	12	0.1	0.2	1
N	5	5	0 ^	5	5	5	5	5	5	5	4 ^
G3 2,500	13001	140	42	<0.00	549	505	11	94	3.0	7.0	<0.00
	13002	122	32	<0.00	593	444	11	78	3.0	7.2	0
	13003	104	28	<0.00	358	311	11	85	3.1	7.7	1
	13004	166	33	<0.00	713	734	10	98	3.1	7.3	0
	13005	117	35	<0.00	875	366	10	96	3.2	7.4	1
	Mean	130	34	-	618	472	11	90	3.1	7.3	1
	S.D.	24	5	-	192	164	1	8	0.1	0.3	1
N	5	5	0 ^	5	5	5	5	5	5	5	4 ^
G4 5,000	14001	169	35	<0.00	575	741	12	94	3.4	8.4	<0.00
	14002	142	32	<0.00	559	480	11	82	3.2	7.9	<0.00
	14003	124	33	<0.00	504	467	8	101	3.1	7.6	0
	14004	100	35	<0.00	614	310	13	97	3.0	7.6	0
	14005	88	32	<0.00	540	147	13	131	3.0	7.5	1
	Mean	125	33	-	558	429	11	101	3.1	7.8	0
	S.D.	32	2	-	41	221	2	18	0.2	0.4	1
N	5	5	0 ^	5	5	5	5	5	5	5	3 ^

<0.00 : Below the level of detection

^: Values below the level of detection are excluded from statistics.

- : No data

Appendix 5. Individual serum biochemical values

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	A/G ratio	CHO (mg/dL)	CRE (mg/dL)	TG (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	Na <sup>+</sup> mmol/L	K <sup>+</sup> mmol/L	Cl <sup>-</sup> mmol/L
G1 0	11001	0.62	65	0.5	39	8.84	10.3	142	4.8	102
	11002	0.62	74	0.4	25	8.68	10.0	142	5.3	104
	11003	0.62	70	0.4	46	7.84	10.2	140	4.7	100
	11004	0.59	64	0.4	32	8.18	10.2	141	5.3	102
	11005	0.58	49	0.5	23	10.03	11.3	145	5.9	103
	Mean	0.61	64	0.4	33	8.71	10.4	142	5.2	102
	S.D.	0.02	10	0.1	10	0.84	0.5	2	0.5	1
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	12001	0.59	66	0.4	40	10.25	10.5	141	6.8	101
	12002	0.62	62	0.4	21	7.67	9.6	142	5.0	104
	12003	0.62	89	0.5	49	10.05	11.0	142	8.7	103
	12004	0.60	64	0.5	24	9.98	10.5	143	7.4	105
	12005	0.61	67	0.4	33	8.50	10.1	143	4.9	104
	Mean	0.61	70	0.4	33	9.29	10.3	142	6.6	103
	S.D.	0.01	11	0.1	12	1.14	0.5	1	1.6	2
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G3 2,500	13001	0.57	62	0.4	38	8.61	9.6	143	5.9	102
	13002	0.58	41	0.4	17	9.66	10.0	142	6.5	104
	13003	0.60	62	0.5	63	8.25	10.7	143	4.9	100
	13004	0.58	53	0.4	61	8.37	10.1	144	5.0	104
	13005	0.57	52	0.5	25	8.20	10.3	144	4.7	102
	Mean	0.58	54	0.4	41	8.62	10.1	143	5.4	102
	S.D.	0.01	9	0.1	21	0.60	0.4	1	0.8	2
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G4 5,000	14001	0.60	59	0.5	32	9.28	10.4	142	5.7	101
	14002	0.59	54	0.5	22	8.21	10.4	142	5.8	104
	14003	0.59	59	0.4	35	8.87	10.5	142	5.2	105
	14004	0.61	51	0.5	23	9.25	9.6	144	6.1	107
	14005	0.60	61	0.4	19	11.03	11.0	140	8.9	103
	Mean	0.60	57	0.5	26	9.33	10.4	142	6.3	104
	S.D.	0.01	4	0.1	7	1.04	0.5	1	1.5	2
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

## Appendix 5. Individual serum biochemical values

Sex: Female

Group	Animal	AST	ALT	T-BIL	ALP	CK	BUN	GLU	ALB	TP	GGT	
/Dose (mg/kg)	ID	(IU/L)	(IU/L)	(mg/mL)	(IU/L)	(IU/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(g/dL)	(g/dL)	(IU/L)	
G1 0	21001	152	34	<0.00	607	483	20	77	3.2	7.7	0	
	21002	116	25	0.02	438	354	17	76	3.2	7.8	1	
	21003	106	32	0.00	512	349	16	100	3.3	8.2	2	
	21004	108	27	<0.00	265	307	16	104	3.3	8.0	1	
	21005	102	29	0.00	277	412	14	96	3.7	8.9	1	
	Mean		117	29	0.01	420	381	17	91	3.3	8.1	1
	S.D.		20	4	0.01	149	68	2	13	0.2	0.5	1
N		5	5	3 ^	5	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	22001	101	25	<0.00	377	390	12	100	3.6	8.4	<0.00	
	22002	111	31	<0.00	452	289	18	81	3.5	8.0	0	
	22003	101	22	0.00	306	320	12	97	3.3	7.9	1	
	22004	152	25	<0.00	381	917	22	91	3.4	8.0	0	
	22005	87	24	<0.00	334	219	12	130	3.4	8.1	0	
	Mean		110	25	0.00	370	427	15	100	3.4	8.1	0
	S.D.		25	3	-	55	281	5	18	0.1	0.2	1
N		5	5	1 ^	5	5	5	5	5	5	4 ^	
G3 2,500	23001	83	24	0.00	338	150	13	94	3.1	7.7	0	
	23002	100	26	0.00	343	251	15	89	3.2	7.8	1	
	23003	122	30	0.00	462	481	21	106	3.1	7.8	1	
	23004	90	29	<0.00	357	231	12	102	3.7	8.5	0	
	23005	110	31	<0.00	543	160	15	84	3.6	8.3	2	
	Mean		101	28	0.00	409	255	15	95	3.3	8.0	1
	S.D.		16	3	0.00	91	134	3	9	0.3	0.4	1
N		5	5	3 ^	5	5	5	5	5	5	5	
G4 5,000	24001	130	26	<0.00	267	519	17	91	3.3	7.8	0	
	24002	107	30	<0.00	463	282	24	88	3.4	8.3	2	
	24003	121	27	<0.00	304	487	15	98	3.1	7.9	1	
	24004	101	24	<0.00	260	378	19	97	3.2	7.8	0	
	24005	106	25	<0.00	390	227	17	97	3.1	7.6	1	
	Mean		113	26	-	337	379	18	94	3.2	7.9	1
	S.D.		12	2	-	87	126	3	4	0.1	0.3	1
N		5	5	0 ^	5	5	5	5	5	5	5	

<0.00 : Below the level of detection

^ : Values below the level of detection are excluded from statistics.

- : No data

## Appendix 5. Individual serum biochemical values

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	A/G ratio	CHO (mg/dL)	CRE (mg/dL)	TG (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	Na <sup>+</sup> mmol/L	K <sup>+</sup> mmol/L	Cl <sup>-</sup> mmol/L
G1 0	21001	0.58	77	0.6	10	7.59	10.4	142	4.8	103
	21002	0.59	77	0.5	9	7.20	10.6	145	4.0	102
	21003	0.60	69	0.6	18	9.59	11.5	145	5.2	101
	21004	0.59	80	0.6	20	9.19	11.5	143	5.4	103
	21005	0.58	76	0.6	10	9.93	11.9	144	5.7	104
	Mean	0.59	76	0.6	13	8.70	11.2	144	5.0	103
	S.D.	0.01	4	0.0	5	1.23	0.6	1	0.7	1
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	22001	0.57	69	0.5	14	8.08	11.1	143	4.7	103
	22002	0.56	91	0.5	9	6.81	10.3	143	4.2	103
	22003	0.58	57	0.5	11	9.51	11.1	145	5.8	106
	22004	0.58	69	0.6	8	8.91	11.0	143	4.4	104
	22005	0.58	64	0.5	9	8.97	10.9	145	5.7	104
	Mean	0.57	70	0.5	10	8.46	10.9	144	5.0	104
	S.D.	0.01	13	0.0	2	1.05	0.3	1	0.7	1
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G3 2,500	23001	0.60	90	0.5	9	8.18	11.3	142	4.0	103
	23002	0.59	81	0.5	18	7.86	10.8	142	4.7	103
	23003	0.60	68	0.6	19	7.09	10.3	144	4.0	104
	23004	0.56	73	0.4	21	9.18	11.7	142	6.0	100
	23005	0.57	53	0.5	10	10.64	11.6	142	7.4	105
	Mean	0.58	73	0.5	15	8.59	11.1	142	5.2	103
	S.D.	0.02	14	0.1	6	1.37	0.6	1	1.5	2
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G4 5,000	24001	0.58	75	0.6	39	7.61	10.0	140	5.5	101
	24002	0.59	128	0.6	29	9.49	10.4	141	5.9	103
	24003	0.61	71	0.6	13	7.30	10.0	141	4.9	103
	24004	0.59	90	0.7	28	8.05	10.2	141	5.1	100
	24005	0.59	53	0.6	8	7.67	9.9	140	5.3	103
	Mean	0.59	83	0.6	23	8.02	10.1	141	5.3	102
	S.D.	0.01	28	0.0	13	0.86	0.2	1	0.4	1
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

## Appendix 6. Individual blood coagulation values

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	PT (Sec)	aPTT (Sec)
G1 0	11001	13.3	53.5
	11002	11.6	48.2
	11003	15.7	57.9
	11004	11.2	37.4
	11005	13.9	68.1
	Mean	13.1	53.0
	S.D.	1.8	11.4
	N	5	5
G2 1,250	12001	24.1	97.2
	12002	14.5	47.8
	12003	13.2	57.5
	12004	15.9	65.6
	12005	13.3	40.1
	Mean	16.2	61.6
	S.D.	4.5	22.1
	N	5	5
G3 2,500	13001	20.2	68.0
	13002	14.7	46.3
	13003	12.2	51.4
	13004	15.4	61.8
	13005	13.2	45.3
	Mean	15.1	54.6
	S.D.	3.1	10.0
	N	5	5
G4 5,000	14001	15.1	63.8
	14002	15.8	64.9
	14003	17.0	53.2
	14004	11.6	40.6
	14005	11.2	41.5
	Mean	14.1	52.8
	S.D.	2.6	11.7
	N	5	5

## Appendix 6. Individual blood coagulation values

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	PT (Sec)	aPTT (Sec)
G1 0	21001	9.0	31.0
	21002	9.2	22.8
	21003	9.7	27.9
	21004	8.9	26.1
	21005	9.1	40.3
	Mean	9.2	29.6
	S.D.	0.3	6.7
	N	5	5
G2 1,250	22001	10.9	42.9
	22002	9.1	44.6
	22003	10.0	26.2
	22004	9.8	32.7
	22005	9.3	33.9
	Mean	9.8	36.1
	S.D.	0.7	7.6
	N	5	5
G3 2,500	23001	9.7	27.8
	23002	10.0	30.1
	23003	9.7	19.1
	23004	10.7	44.4
	23005	11.4	26.9
	Mean	10.3	29.7
	S.D.	0.7	9.2
	N	5	5
G4 5,000	24001	9.7	51.8
	24002	9.3	36.4
	24003	10.0	22.4
	24004	10.8	55.4
	24005	10.9	39.1
	Mean	10.1	41.0
	S.D.	0.7	13.2
	N	5	5



## Appendix 7. Individual absolute organ weights

Sex: Male		(g)						
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	B.W.	Brain	Liver	Lung	Spleen	Heart	Kidney
G1 0	11001	397.2	1.9460	13.0823	1.6136	0.7351	1.3803	3.0300
	11002	354.3	1.9978	12.1056	1.6323	0.7226	1.4549	3.1054
	11003	387.8	2.1143	13.0103	1.6925	0.7569	1.2107	2.9206
	11004	348.0	1.7492	10.7897	1.6010	0.6840	1.2676	2.6849
	11005	388.7	1.9954	13.1521	1.7016	0.8875	1.4782	3.0956
	Mean	375.2	1.9605	12.4280	1.6482	0.7572	1.3583	2.9673
	S.D.	22.4	0.1333	1.0099	0.0461	0.0775	0.1164	0.1742
	N	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	12001	336.3	1.9250	10.8507	1.4534	0.7868	1.4287	2.7729
	12002	355.9	1.9464	10.9194	1.5393	0.7909	1.4914	3.1222
	12003	382.6	2.0136	12.7138	1.6559	0.8239	1.5381	3.5732
	12004	339.2	1.8893	9.9803	1.7281	0.6452	1.2730	2.9299
	12005	360.6	1.8621	11.8576	1.5446	0.7173	1.3400	2.8586
	Mean	354.9	1.9273	11.2644	1.5843	0.7528	1.4142	3.0514
	S.D.	18.7	0.0581	1.0478	0.1079	0.0716	0.1084	0.3189
	N	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	13001	361.3	1.8715	10.9297	1.5675	0.6908	1.3186	3.1559
	13002	358.7	1.9523	10.3321	1.4892	0.8589	1.2864	3.0413
	13003	379.5	2.1438	13.5196	1.5702	0.9857	1.4367	3.2098
	13004	395.6	2.0328	13.0238	1.6613	0.7158	1.3806	2.917
	13005	372.8	1.9451	10.8921	1.3956	0.7055	1.3281	2.8384
	Mean	373.6	1.9891	11.7395	1.5368	0.7913	1.3501	3.0325
	S.D.	14.9	0.1036	1.4294	0.0997	0.1280	0.0591	0.1563
	N	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	14001	391.3	2.0871	14.0116	1.5286	0.8882	1.5190	3.3730
	14002	350.9	2.0560	11.5600	1.6318	0.8210	1.5079	3.3242
	14003	354.2	1.9485	11.9897	1.6600	0.6577	1.5062	3.0663
	14004	365.7	2.0295	12.6058	1.6464	0.9678	1.4293	3.1319
	14005	374.9	2.0263	12.0776	1.7305	0.8099	1.3690	3.3456
	Mean	367.4	2.0295	12.4489	1.6395	0.8289	1.4663	3.2482
	S.D.	16.4	0.0515	0.9494	0.0726	0.1146	0.0651	0.1392
	N	5	5	5	5	5	5	5

## Appendix 7. Individual absolute organ weights

Sex: Female		(g)						
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	B.W.	Brain	Liver	Lung	Spleen	Heart	Kidney
G1 0	21101	214.7	1.9161	6.3999	1.0736	0.5402	0.9162	1.8148
	21102	220.0	1.7538	6.4680	1.3620	0.4395	0.8451	1.7645
	21103	212.8	1.7823	6.5806	1.1641	0.4726	0.8646	1.7321
	21104	195.6	1.9091	6.6545	1.0899	0.4728	0.7793	1.5406
	21105	202.6	1.7833	6.4486	1.1120	0.3184	0.8812	1.7022
	Mean	209.1	1.8289	6.5103	1.1603	0.4487	0.8573	1.7108
	S.D.	9.9	0.0773	0.1043	0.1178	0.0815	0.0508	0.1039
	N	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	22001	216.5	1.7599	6.9651	1.1060	0.4911	0.9586	1.8139
	22002	213.1	1.8356	7.0913	1.2942	0.5905	0.9204	1.9170
	22003	196.7	1.8018	6.5662	1.1759	0.4624	0.9491	1.9643
	22004	209.6	1.7032	6.5882	1.3374	0.5567	0.8681	1.8443
	22005	244.0	1.8404	6.9775	1.3700	0.6026	0.9863	2.0763
	Mean	216.0	1.7882	6.8377	1.2567	0.5407	0.9365	1.9232
	S.D.	17.4	0.0574	0.2429	0.1118	0.0616	0.0449	0.1041
	N	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	23001	235.9	1.9016	7.1286	1.3327	0.5958	0.9277	1.8064
	23002	255.1	1.9997	8.0339	1.3338	0.5352	1.0339	2.0347
	23003	218.8	1.8083	6.7312	1.1674	0.5088	0.8495	1.7732
	23004	205.9	1.8992	6.5605	1.0622	0.4021	0.7943	1.8787
	23005	211.6	1.7940	6.5973	1.1410	0.4768	0.9647	1.8062
	Mean	225.5	1.8806	7.0103	1.2074	0.5037	0.9140	1.8598
	S.D.	20.0	0.0832	0.6149	0.1212	0.0717	0.0944	0.1051
	N	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	24001	230.2	1.8002	7.6450	1.2594	0.4576	1.0297	1.8755
	24002	230.0	1.8576	7.9626	1.3830	0.4119	0.9342	1.7916
	24003	220.7	1.8302	7.0328	1.1995	0.6709	0.8114	1.8751
	24004	216.8	1.8547	6.9158	1.1330	0.4247	0.8630	1.7643
	24005	193.0	1.7430	6.0009	1.1722	0.4539	0.8026	1.6640
	Mean	218.1	1.8171	7.1114	1.2294	0.4838	0.8882	1.7941
	S.D.	15.2	0.0474	0.7561	0.0974	0.1064	0.0949	0.0880
	N	5	5	5	5	5	5	5

## Appendix 8. Individual relative organ weights

Sex: Male		(g/100g body weight)						
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	B.W. (g)	Brain	Liver	Lung	Spleen	Heart	Kidney
G1 0	11001	397.2	0.4899	3.2936	0.4062	0.1851	0.3475	0.7628
	11002	354.3	0.5639	3.4168	0.4607	0.2040	0.4106	0.8765
	11003	387.8	0.5452	3.3549	0.4364	0.1952	0.3122	0.7531
	11004	348.0	0.5026	3.1005	0.4601	0.1966	0.3643	0.7715
	11005	388.7	0.5134	3.3836	0.4378	0.2283	0.3803	0.7964
	Mean	375.2	0.5230	3.3099	0.4402	0.2018	0.3630	0.7921
	S.D.	22.4	0.0307	0.1255	0.0223	0.0163	0.0367	0.0499
N	5	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	12001	336.3	0.5724	3.2265	0.4322	0.2340	0.4248	0.8245
	12002	355.9	0.5469	3.0681	0.4325	0.2222	0.4191	0.8773
	12003	382.6	0.5263	3.3230	0.4328	0.2153	0.4020	0.9339
	12004	339.2	0.5570	2.9423	0.5095	0.1902	0.3753	0.8638
	12005	360.6	0.5164	3.2883	0.4283	0.1989	0.3716	0.7927
	Mean	354.9	0.5438	3.1696	0.4471	0.2121	0.3986	0.8584
	S.D.	18.7	0.0227	0.1603	0.0350	0.0176	0.0244	0.0537
N	5	5	5	5	5	5	5	
G3 2,500	13001	361.3	0.5180	3.0251	0.4338	0.1912	0.3650	0.8735
	13002	358.7	0.5443	2.8804	0.4152	0.2394	0.3586	0.8479
	13003	379.5	0.5649	3.5625	0.4138	0.2597	0.3786	0.8458
	13004	395.6	0.5139	3.2922	0.4199	0.1809	0.3490	0.7374
	13005	372.8	0.5218	2.9217	0.3744	0.1892	0.3563	0.7614
	Mean	373.6	0.5326	3.1364	0.4114	0.2121	0.3615	0.8132
	S.D.	14.9	0.0216	0.2872	0.0222	0.0352	0.0111	0.0599
N	5	5	5	5	5	5	5	
G4 5,000	14001	391.3	0.5334	3.5808	0.3906	0.2270	0.3882	0.8620
	14002	350.9	0.5859	3.2944	0.4650	0.2340	0.4297	0.9473
	14003	354.2	0.5501	3.3850	0.4687	0.1857	0.4252	0.8657
	14004	365.7	0.5550	3.4470	0.4502	0.2646	0.3908	0.8564
	14005	374.9	0.5405	3.2216	0.4616	0.2160	0.3652	0.8924
	Mean	367.4	0.5530	3.3858	0.4472	0.2255	0.3998	0.8848
	S.D.	16.4	0.0202	0.1388	0.0324	0.0286	0.0272	0.0376
N	5	5	5	5	5	5	5	

## Appendix 8. Individual relative organ weights

Sex: Female		(g/100g body weight)						
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	B.W.	Brain	Liver	Lung	Spleen	Heart	Kidney
G1 0	21101	214.7	0.8925	2.9809	0.5000	0.2516	0.4267	0.8453
	21102	220.0	0.7972	2.9400	0.6191	0.1998	0.3841	0.8020
	21103	212.8	0.8375	3.0924	0.5470	0.2221	0.4063	0.8140
	21104	195.6	0.9760	3.4021	0.5572	0.2417	0.3984	0.7876
	21105	202.6	0.8802	3.1829	0.5489	0.1572	0.4349	0.8402
	Mean	209.1	0.8767	3.1197	0.5544	0.2145	0.4101	0.8178
	S.D.	9.9	0.0670	0.1844	0.0425	0.0377	0.0207	0.0247
	N	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	22001	216.5	0.8129	3.2171	0.5109	0.2268	0.4428	0.8378
	22002	213.1	0.8614	3.3277	0.6073	0.2771	0.4319	0.8996
	22003	196.7	0.9160	3.3382	0.5978	0.2351	0.4825	0.9986
	22004	209.6	0.8126	3.1432	0.6381	0.2656	0.4142	0.8799
	22005	244.0	0.7543	2.8596	0.5615	0.2470	0.4042	0.8509
	Mean	216.0	0.8314	3.1772	0.5831	0.2503	0.4351	0.8934
	S.D.	17.4	0.0606	0.1951	0.0487	0.0209	0.0304	0.0636
	N	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	23001	235.9	0.8061	3.0219	0.5649	0.2526	0.3933	0.7657
	23002	255.1	0.7839	3.1493	0.5229	0.2098	0.4053	0.7976
	23003	218.8	0.8265	3.0764	0.5335	0.2325	0.3883	0.8104
	23004	205.9	0.9224	3.1863	0.5159	0.1953	0.3858	0.9124
	23005	211.6	0.8478	3.1178	0.5392	0.2253	0.4559	0.8536
	Mean	225.5	0.8373	3.1103	0.5353	0.2231	0.4057	0.8279
	S.D.	20.0	0.0531	0.0639	0.0189	0.0219	0.0290	0.0568
	N	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	24001	230.2	0.7820	3.3210	0.5471	0.1988	0.4473	0.8147
	24002	230.0	0.8077	3.4620	0.6013	0.1791	0.4062	0.7790
	24003	220.7	0.8293	3.1866	0.5435	0.3040	0.3676	0.8496
	24004	216.8	0.8555	3.1899	0.5226	0.1959	0.3981	0.8138
	24005	193.0	0.9031	3.1093	0.6074	0.2352	0.4159	0.8622
	Mean	218.1	0.8355	3.2538	0.5644	0.2226	0.4070	0.8239
	S.D.	15.2	0.0465	0.1391	0.0377	0.0499	0.0289	0.0329
	N	5	5	5	5	5	5	5

## Appendix 9. Individual necropsy findings

Sex: Male

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Necropsy findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1	11001	All	Unremarkable findings	S	28
0	11002	All	Unremarkable findings	S	28
	11003	All	Unremarkable findings	S	28
	11004	All	Unremarkable findings	S	28
	11005	All	Unremarkable findings	S	28
	G2	12001	All	Unremarkable findings	S
1,250	12002	All	Unremarkable findings	S	28
	12003	All	Unremarkable findings	S	28
	12004	All	Unremarkable findings	S	28
	12005	All	Unremarkable findings	S	28
G3	13001	All	Unremarkable findings	S	28
2,500	13002	All	Unremarkable findings	S	28
	13003	All	Unremarkable findings	S	28
	13004	All	Unremarkable findings	S	28
	13005	All	Unremarkable findings	S	28
G4	14001	All	Unremarkable findings	S	28
5,000	14002	All	Unremarkable findings	S	28
	14003	All	Unremarkable findings	S	28
	14004	All	Unremarkable findings	S	28
	14005	All	Unremarkable findings	S	28

S: scheduled

## Appendix 9. Individual necropsy findings

Sex: Female

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Necropsy findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	21001	All	Unremarkable findings	S	28
	21002	All	Unremarkable findings	S	28
	21003	All	Unremarkable findings	S	28
	21004	All	Unremarkable findings	S	28
	21005	All	Unremarkable findings	S	28
G2 1,250	22001	All	Unremarkable findings	S	28
	22002	All	Unremarkable findings	S	28
	22003	All	Unremarkable findings	S	28
	22004	All	Unremarkable findings	S	28
	22005	All	Unremarkable findings	S	28
G3 2,500	23001	All	Unremarkable findings	S	28
	23002	All	Unremarkable findings	S	28
	23003	All	Unremarkable findings	S	28
	23004	All	Unremarkable findings	S	28
	23005	All	Unremarkable findings	S	28
G4 5,000	24001	All	Unremarkable findings	S	28
	24002	All	Unremarkable findings	S	28
	24003	All	Unremarkable findings	S	28
	24004	All	Unremarkable findings	S	28
	24005	All	Unremarkable findings	S	28

S: scheduled

## Appendix 10. Individual histopathological findings

Group / Dose (mg/kg)	G1 / 0					G4 / 5,000				
Animal ID	11001	11002	11003	11004	11005	14001	14002	14003	14004	14005
Brain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidney	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Hyaline cast						<+>				
-Regeneration tubular		±								
Liver	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Cell infiltration, mononuclear, focal									±	
Lung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: normal, <+>: present.

Grade: ±: minimal.

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)	G1 / 0					G4 / 5,000				
Animal ID	21001	21002	21003	21004	21005	24001	24002	24003	24004	24005
Brain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidney	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Mineralization, CM junction				<+>		<+>	<+>		<+>	
Liver	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Cell infiltration, mononuclear, focal			±	±						
Lung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: normal, <+>: present.

Grade: ±: minimal.

## ATTACHMENTS

### Attachment 1. Protocol deviations

#### 1 번

시험계획서에는 동물실의 온도 ( $22.0 \pm 3.0^{\circ}\text{C}$ ) 설정되어 있으나, 온도에서 아래와 같이 이탈이 발생하였다.

이탈내용	날짜(시간)	온도
	2015. 3. 8 (15:00)	18.9°C

상기 이탈은 공조기 이상발생으로 보수작업 실시하였고, 동물의 일반증상 관찰하여 일반증상 관찰결과 건강 상태에 이상이 없었다. 따라서 시험에 미치는 영향은 없었다.

#### 2 번

아래 항목을 측정자 실수로 인하여 측정을 하지 못하여 이탈함.

##### (1) 일반혈액학적검사

항 목
RET (reticulocyte)

##### (2) 백혈구감별계수

항 목	항 목
NEU (neutrophil)	EOS (eosinophil)
LYM (lymphocyte)	BASO (basophil)
MON (monocyte)	LUC (large unstained cells)

조치 사항: 실험을 실시하기 전 담당자가 시험계획서를 확인하여 측정항목을 체크 할 것을 지시함.

시험에 미치는 영향

망상적혈구 (Reticulocyte)는 적혈구 생성과 빈혈에 관련된 검사로서, 이와 관련된 총적혈구량 (RBC), MCV, RDW, MCHC 등의 검사를 실시하였으며 검사 결과 이상이 없었으므로 시험에 미치는 영향은 없었다.

백혈구감별계수는 염증이 발생하였을 때에는 백혈구 생산이 증가하며 이때 호중구, 림프구, 단핵구 등의 변화에 따라 염증의 진행 정도를 확인할 수 있는 검사로서, 해당 시험에서는 백혈구 변화가 관찰되지 않았으므로 시험에 미치는 영향은 없었다.



- 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 박테리아 균주를 이용한 복귀돌연변이시험

요 약

본 시험은 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 히스티딘 요구성 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 균주와 트립토판 요구성 *Escherichia coli* (WP2uvrA(pKM101)) 균주를 이용한 복귀돌연변이 시험을 실시하였다. 본시험의 용량을 결정 하기 위해 용량설정시험의 최고용량을 5,000 µg/plate로 하며, 최고용량을 포함한 공비 4의 7단계 (1,250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88 및 1.22 µg/plate) 용량으로 처리하였다. 그 결과, 대사활성계 및 비대사활성계의 모든 균주의 전용량에서 침전이 관찰되지 않았다. 또한, 대사활성계 및 비대사활성계의 모든 균주에서 시험물질에 의한 생육저해는 관찰되지 않았다. 따라서 본시험의 최고용량은 대사활성계 및 비대사활성계 모두 5,000 µg/plate을 최고용량으로 하여 공비 2의 4단계 (2,500, 1,250, 625 및 312.5 µg/plate)로 희석하고, 시험물질군과 음성대조군, 양성대조군으로 설정하였다. 본시험의 결과, 대사활성계 및 비대사활성계의 모든 균주에서 침전 및 생육저해가 관찰되지 않았다. 대사활성계 및 비대사활성계의 모든 균주에서 음성대조군과 비교하여 복귀돌연변이 콜로니수의 증가가 관찰되지 않았다. 양성대조군의 복귀돌연변이 콜로니수는 음성대조군에 비해 현저하게 증가하여 뚜렷한 복귀돌연변이 양성반응을 나타냈다. 또한, 음성대조군의 복귀돌연변이 콜로니수는 시험방법에 제시한 시험적합성 판정기준의 정상 범위내로 평가되었다. 이상의 결과로부터, 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물은 본 시험조건에서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단된다.

## 1. 시험실시의 개요

### 1) 시험목적

시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 히스티딘 요구성 시험균주 (*Salmonella typhimurium*)와 트립토판 요구성 시험균주 (*Escherichia coli*)을 이용하여 유전독성을 평가하였다.

### 2) Good Laboratory Practice

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice 규정을 준수하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-67호 (2014년 2월 12일)

### 3) 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시하였다.

“의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-136호 (2014년 7월 30일)

### 4) 시험의뢰자

기관명            고연 (高研)

주소               (390-711) 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112호

### 5) 시험기관

기관명           (주)메드빌

주소               (153-760) 서울특별시 금천구 디지털로 9길 33, 15층 (가산동, IT미래타워)

### 6) 시험일정

시험개시일	2015년 2월 24일
실험개시일	2015년 3월 2일
실험종료일	2015년 3월 27일
시험종료일	2015년 4월 15일

### 7) 시험책임자

성명	-
소속	유전독성

### 8) 부문책임자

- 세포주관리 -
- 시험물질 관리 -

9) 시험담당자

- 시험담당 -
- 시험물질 조제 -

10) 시험자료의 보관

시험기간 중에 작성된 모든 자료는 3년간 (주)메드빌 자료보관실에 보관한다. 그 후 보관에 관해서는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

시험자료: 시험기초자료, 시험계획서, 최종보고서

2. 재료 및 방법

1) 시험물질

- (1) 물질명 초음파처리 인삼꽃대 추출물
- (2) Lot No. UGFB(001)
- (3) 성상 갈색분말
- (4) pH 4.95
- (5) 제조일 2015년 1월 15일
- (6) 유효기한 정보없음
- (7) 입수일 2015년 1월 21일, 2015년 3월 4일 (추가입수)
- (8) 입수량 609.9327 g (용기포함), 871.67g (추가입수,용기포함)
- (9) 보관조건 냉장 (3.6-6.8°C)
- (10) 공급처 고연 (高研)
- (11) 잔여시험물질의 처리 반환

2) 부형제

- (1) 명칭 주사용수
- (2) Lot No. J5N5K21
- (3) 보관조건 실온
- (4) 제조사 대한약품공업(주)
- (5) 용매선택이유 : 부형제 확인 결과 시험물질이 주사용수에 현탁되어 부형제를 주사용수로 정하였다.

3) 시험물질의 조제 및 분석

(1) 시험물질의 조제

실험 실시 당일 전자저울 (Explorer Ex224G, OHAUS, U.S.A.)로 시험물질을 칭량한 후, 부형제를 가하여 규정농도로 조제하였다. 이를 syringe filter (0.2 μm)에 여과한 후 사용하였다.

(2) 조제물의 분석

조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 별도로 실시하지 않았다.

4) 양성대조물질

(1) 양성대조물질의 조제

양성대조물질은 처리농도의 10배 stock solution을 조제하였다. Sodium azide (SA, Sigma-Aldrich, U.S.A.)는 주사용수 (Water for injection, 대한멸균증류수, Korea)를 그 외 양성대조 물질 2-Nitrofluorene (2-NF, TCI Co., Ltd., Japan), 9-Aminoacridine (9-AA, TCI Co., Ltd., Japan), 2-Aminoanthracene (2-AA, Sigma-Aldrich, U.S.A.), 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2, Wako, Japan)는 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 부형제로 사용하여 조제하였다. 2-AA의 경우, 고농도를 칭량하여 조제한 후 이를 희석하여 저농도를 조제하였다. 조제된 양성 대조물질은 갈색튜브에 분주하여 차광하였다. 초저온 냉동고에 보관 하고 사용직전에 해동하여 사용 하였다.

(2) 양성대조물질의 처리농도

S9 mix	균주명	양성대조물질	용량 (µg/plate)
S9 mix (-)	TA98	2-NF	1.0
	TA100	SA	1.0
	TA1535	SA	1.0
	TA1537	9-AA	80.0
	WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	AF-2	0.01
S9 mix (+)	TA98	2-AA	0.5
	TA100	2-AA	1.0
	TA1535	2-AA	2.0
	TA1537	2-AA	2.0
	WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	2-AA	20.0

5) S9 혼합물

(1) 공급원과 보관

동결건조된 S9 (Molecular toxicology, U.S.A., Lot No. 3388)과 대사 효소 활성화에 필요한 보조인자들을 혼합하여 대사활성계로 사용한다. S9은 초저온 냉동고에 보관하고 사용직전에 해동하여 사용하였다.

(2) S9 혼합물의 농도

S9 혼합물의 구성	Amount / mL
Rat liver S9	50 µL
0.4M MgCl <sub>2</sub> -1.65 M KCl	20 µL
1 M glucose-6-phosphate	5 µL
0.1 M NADP	40 µL
0.2 M sodium phosphate buffer, pH7.4	500 µL
Sterile distilled H <sub>2</sub> O	385 µL

## 6) 배지

### (1) Nutrient broth 배지

Nutrient broth와 염화나트륨을 각각 1.6% w/v와 10% w/v가 되도록 칭량한 후 증류수를 첨가하였다. stirrer로 교반하여 용해시킨 후, 고압증기멸균하였다.

### (2) 최소 glucose 한천평판배지

Bacto agar에 적량의 증류수를 넣고 고압증기 멸균하였다. 멸균 후 25X Vogel-bonner salts (25X VB salts)와 40% glucose를 첨가하였다. 페트리디쉬에 분주한 후, 실온에서 굳혔다.

최소 glucose 한천평판배지 구성	Amount / L
Bacto agar	15 g
25 X VB salts	40 ml
40% glucose	50 ml
증류수	910 ml

### (3) Top agar

Bacto agar와 염화나트륨을 각각 0.6% w/v와 0.5% w/v 되도록 칭량하고 증류수를 첨가하여 고압증기멸균하였다. 살모넬라 균주용 top agar는 0.5 mM L-histidine/D-biotin 혼합액을 10:1의 비율로 혼합하고, 대장균용 top agar는 0.5 mM L-tryptophan 용액을 10:1의 비율로 혼합하여 조제하였다.

## 7) 시험계

### (1) 사용균주의 종

*Salmonella typhimurium* TA98

*Salmonella typhimurium* TA100

*Salmonella typhimurium* TA1535

*Salmonella typhimurium* TA1537

*Escherichia coli* WP2uvrA (pKM101)

### (2) 공급원

균주는 2012년 10월 31일에 Molecular Toxicology (U.S.A.)사에서 구입하였다. 본 연구실에서 유전적형질과 자발복귀돌연변이의 콜로니 수 및 양성대조물질에 대한 감수성을 확인한 후 균주를 계대배양 하였다.

### (3) 선택이유

복귀돌연변이 시험에 광범위하게 사용되고, 가이드라인에서 추천되고 있는 상기 균주를 선택하였다.

## 8) 용량설정시험

- (1) 가이드라인에서 추천하는 5,000 µg/plate을 최고용량으로 설정하였다. 최고용량을 포함한 공비 4의 7단계이상 (1,250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 µg/plate)으로 설정하였다.
- (2) 대사활성계와 비대사활성계를 설정하였다.
- (3) 음성대조군 및 양성대조군을 포함하고, 음성대조군은 부형제를 사용하였다.
- (4) 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하였다.

## 9) 본시험

- (1) 본시험의 용량설정에 대한 정의

용량설정시험 결과, 대사활성계 및 비대사활성계의 모든 균주의 전 용량에서 침전이 관찰되지 않았다. 또한, 대사활성계 및 비대사활성계 모두 시험물질에 의한 생육저해는 관찰되지 않았다.

따라서 본시험의 최고용량은 대사활성계 및 비대사활성계 모두 5,000 µg/plate을 최고용량으로 하여 공비 2의 4단계 (2,500, 1,250, 625 및 312.5 µg/plate)로 희석하고, 시험물질군과 음성대조군, 양성대조군으로 설정하였다.

- (2) 음성대조군 및 양성대조군을 포함하고, 음성대조군은 부형제를 사용하였다.
- (3) 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하였다.

## 10) 시험방법

- (1) 균주접종

동결보관된 균주를 해동하여 nutrient broth에 접종하고 37°C 진탕 배양기에서 200 rpm으로 전 배양하였다. 전 배양 종료 후 각각의 시험균주를 ELISA reader (EL800, Korea)를 사용하여 흡광도 (650nm)를 측정하였다. 측정결과 균현탁액의 생균수가 시험에 적합한지 확인 후 시험에 사용하였다.

- (2) 처리방법

① 대사활성계에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질을 각 0.1 mL씩, 균배양액 0.1 mL, S9 혼합물 0.5 mL을 멸균된 시험관에 넣었다. 살모넬라 균주는 히스티딘과 비오틴을 포함하는 살모넬라용 top agar, 대장균에는 트립토판을 포함하는 대장균용 top agar를 각 2 mL씩 분주 후 vortexing 하였다. 그 후 최소 glucose 한천평판배지에 고르게 부어 굳혔다.

② 비대사활성계는 S9 혼합물을 대신해서 인산완충액 (pH 7.4)을 0.5 mL 첨가하였다. 그 후 대사활성계와 동일한 방법으로 처리하였다.

- (3) 배양

Top agar가 굳은 후 plate를 뒤집어 37°C 배양기에서 약 48시간 배양하였다.

- (4) 무균검사

잡균에 의한 오염유무를 확인하기 위해 최고용량의 시험물질, S9 혼합물 및 인산완충액을 멸균된 시험관에 넣고 top agar를 가해서 vortexing 한 후, 최소 glucose 한천평판배지에 고르게 부어 굳혔다. Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기에서 약 48시간 배양한 후, 잡균의 오염으로 인한

콜로니 형성 유무를 확인하였다.

#### 11) 관찰 및 계수

##### (1) 시험물질의 관찰

육안으로 시험물질의 침전에 대해 관찰하였다.

##### (2) 콜로니 계수

육안으로 콜로니의 수를 관찰하였다.

##### (3) Background lawn의 관찰

실체현미경으로 background lawn을 관찰하여 시험물질에 의한 균주의 생육저해 유무를 확인하였다. 생육저해의 판정기준은 background lawn이 음성대조군과 비교시 옅어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다.

#### 12) 시험적합성의 판정

음성 및 양성대조군의 평균 복귀변이 콜로니수가 historical control data의 범위내에 있으며 양성대조군의 복귀변이 콜로니수가 음성대조군의 2배 이상이었다. 연속하는 4용량 이상에서 생육저해가 관찰되지 않으며 시험물질, S9 혼합물 및 인산완충액의 오염이 없는 것을 확인 후 결과에 사용하였다.

#### 13) 시험결과의 판정

대사활성계 유·무와 관계없이 최소 1개 이상의 균주에서 복귀돌연변이 콜로니수가 모든 농도에서 농도 의존적으로 증가 하거나 하나 이상의 농도에서 재현성이 있는 증가를 보일 경우 양성으로 판정하였다.

#### 14) 시험결과의 처리

복귀돌연변이 콜로니수를 기록하고 평균과 표준편차를 구하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) 용량설정시험 (Table 1)

대사활성계 및 비대사활성계의 모든 균주의 전 용량에서 침전이 관찰되지 않았다. 또한, 대사활성계 및 비대사활성계 모두 시험물질에 의한 생육저해는 관찰되지 않았다.

따라서 본시험의 최고용량은 대사활성계 및 비대사활성계 모두 5,000 µg/plate을 최고용량으로 하여 공비 2의 4단계 (1,250, 625, 312.5 및 156.3 µg/plate)로 희석하고, 시험물질군과 음성대조군, 양성대조군으로 설정하였다.

## 2) 본시험 (Figures 1, 2) (Table 2)

본시험의 결과, 대사활성계 및 비대사활성계 모두 침전이 관찰되지 않았다. 또한, 대사활성계 및 비대사활성계의 모든 균주의 전 용량에서 시험물질에 의한 생육저해는 관찰되지 않았다.

대사활성계 및 비대사활성계의 모든 균주에서 음성대조군과 비교하여 복귀돌연변이 콜로니수의 증가가 관찰되지 않았다.

양성대조군의 복귀돌연변이 콜로니수는 음성대조군에 비해 현저하게 증가하여 뚜렷한 복귀돌연변이 양성반응을 나타냈다. 또한, 음성대조군의 복귀돌연변이 콜로니수는 시험방법에 제시한 시험적합성 판정기준의 정상 범위내로 평가되었다. 음성 및 양성대조군에 대한 history profile을 제시하였다 (Appendix 1).

## 4. 결론

시험의 결과에 따라 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물은 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀돌연변이를 유발시키지 않는 것으로 판단된다.

## 5. 참고문헌

- (1) Ames, B.M., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 31, 347-364.
- (2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113, 173-275.
- (3) Kim, B. S., Margolin, B. H. (1999): Statistical methods for the Ames Salmonella assay: a review, *Mutat. Res.*, 436, 113-122.
- (4) Singer VL, Lawlor TE, Yue S. (1999): Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test), *Mutat. Res.*, 439, 37-47.
- (5) 일본제약공업협회 의약품평가위원회 기초연구부회 편집: 일본후생성의약품독성시험법 변이원성시험 Q&A p16.



FIGURES

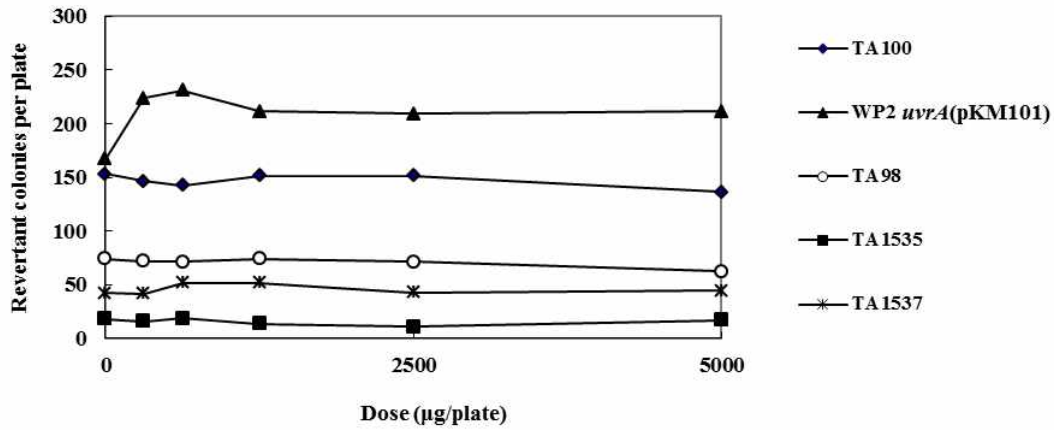


Figure 1. Dose-response curve of revertant colony numbers of differential bacterial strains in the presence of metabolic activation (Main Study)

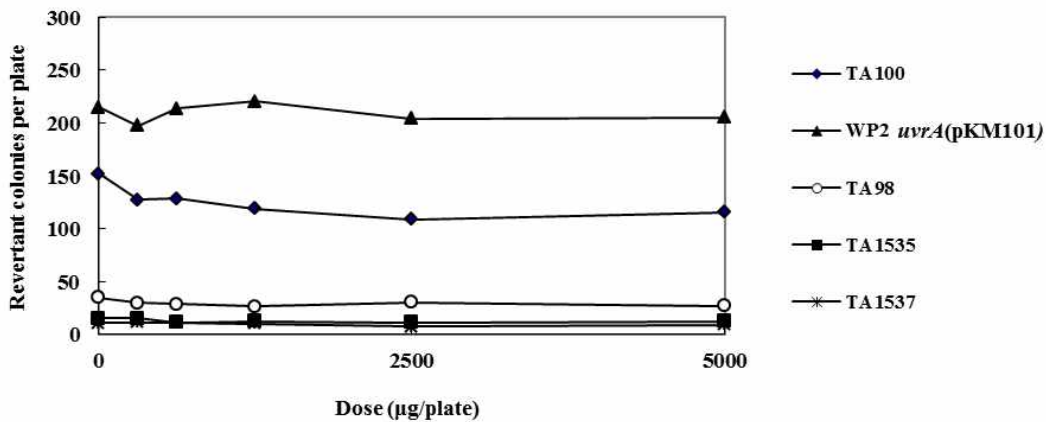


Figure 2. Dose-response curve of revertant colony numbers of differential bacterial strains in the absence of metabolic activation (Main Study)

TABLES

Table 1. Dose range-finding study of presence and absence of metabolic activation

Strain	Dose (ug/plate)	Number of revertant colonies/plate presence of metabolic activation				Strain	Dose (ug/plate)	Number of revertant colonies/plate absence of metabolic activation			
		Colony No.			Mean ± S.D			Colony No.			Mean ± S.D
TA98	5000	60	64	61	62 ± 2	TA98	5000	34	58	40	44 ± 12
	1250	57	58	50	55 ± 4		1250	38	30	25	31 ± 7
	312.5	57	61	58	59 ± 2		312.5	49	40	40	43 ± 5
	78.1	71	58	67	65 ± 7		78.1	38	32	29	33 ± 5
	19.5	55	39	45	46 ± 8		19.5	39	27	29	32 ± 6
	4.88	60	56	50	55 ± 5		4.88	37	40	31	36 ± 5
	1.22	52	60	58	57 ± 4		1.22	39	32	41	37 ± 5
	NC	50	60	51	54 ± 6		NC	30	42	35	36 ± 6
	PC	792	780	720	764 ± 39		PC	488	336	456	427 ± 80
TA100	5000	97	104	103	101 ± 4	TA100	5000	122	123	123	123 ± 1
	1250	153	130	136	140 ± 12		1250	120	142	120	127 ± 13
	312.5	139	148	146	144 ± 5		312.5	133	141	149	141 ± 8
	78.1	135	138	161	145 ± 14		78.1	122	142	145	136 ± 13
	19.5	154	145	157	152 ± 6		19.5	162	144	163	156 ± 11
	4.88	159	169	144	157 ± 13		4.88	127	150	185	154 ± 29
	1.22	144	134	155	144 ± 11		1.22	161	151	135	149 ± 13
	NC	159	159	160	159 ± 1		NC	149	135	137	140 ± 8
	PC	1376	1104	1360	1280 ± 153		PC	672	688	800	720 ± 70
TA1535	5000	20	6	11	12 ± 7	TA1535	5000	9	16	21	15 ± 6
	1250	23	11	8	14 ± 8		1250	15	4	11	10 ± 6
	312.5	20	13	16	16 ± 4		312.5	11	8	10	10 ± 2
	78.1	12	11	9	11 ± 2		78.1	13	21	18	17 ± 4
	19.5	14	15	14	14 ± 1		19.5	10	19	17	15 ± 5
	4.88	5	19	7	10 ± 8		4.88	15	18	15	16 ± 2
	1.22	17	17	19	18 ± 1		1.22	11	14	13	13 ± 2
	NC	14	13	7	11 ± 4		NC	13	19	14	15 ± 3
	PC	258	301	314	291 ± 29		PC	482	437	474	464 ± 24
TA1537	5000	18	18	13	16 ± 3	TA1537	5000	9	15	7	10 ± 4
	1250	28	20	14	21 ± 7		1250	11	7	6	8 ± 3
	312.5	21	15	16	17 ± 3		312.5	17	3	7	9 ± 7
	78.1	27	13	22	21 ± 7		78.1	14	18	13	15 ± 3
	19.5	25	23	24	24 ± 1		19.5	15	14	15	15 ± 1
	4.88	18	18	19	18 ± 1		4.88	12	11	10	11 ± 1
	1.22	18	25	18	20 ± 4		1.22	12	9	8	10 ± 2
	NC	17	23	24	21 ± 4		NC	19	20	10	16 ± 6
	PC	480	418	415	438 ± 37		PC	1544	1280	1560	1461 ± 157
WP2 <sup>uvrA</sup> (pKM101)	5000	162	126	142	143 ± 18	WP2 <sup>uvrA</sup> (pKM101)	5000	150	146	147	148 ± 2
	1250	163	146	162	157 ± 10		1250	130	162	158	150 ± 17
	312.5	171	166	161	166 ± 5		312.5	127	163	109	133 ± 27
	78.1	176	190	162	176 ± 14		78.1	115	122	122	120 ± 4
	19.5	173	153	142	156 ± 16		19.5	116	140	147	134 ± 16
	4.88	124	156	132	137 ± 17		4.88	114	136	166	139 ± 26
	1.22	154	165	180	166 ± 13		1.22	111	134	130	125 ± 12
	NC	180	186	178	181 ± 4		NC	150	147	171	156 ± 13
	PC	1888	1968	1232	1696 ± 404		PC	2408	1744	2032	2061 ± 333

NC: Negative control

PC: Positive control

Table 2. Revertant colony numbers obtained per plate presence and absence of metabolic activation (Main Study)

Strain	Dose (ug/plate)	Number of revertant colonies/plate presence of metabolic activation					Strain	Dose (ug/plate)	Number of revertant colonies/plate absence of metabolic activation				
		Colony No.			Mean ± S.D				Colony No.			Mean ± S.D	
TA98	5000	57	60	70	62	± 7	TA98	5000	23	23	34	27	± 6
	2500	70	76	68	71	± 4		2500	23	40	28	30	± 9
	1250	61	79	82	74	± 11		1250	21	24	33	26	± 6
	625	59	76	78	71	± 10		625	20	36	30	29	± 8
	312.5	62	72	81	72	± 10		312.5	31	32	26	30	± 3
	NC	83	63	76	74	± 10		NC	32	37	35	35	± 3
	PC	192	281	254	242	± 46		PC	370	358	414	381	± 29
TA100	5000	141	144	124	136	± 11	TA100	5000	128	114	104	115	± 12
	2500	137	167	151	152	± 15		2500	122	113	91	109	± 16
	1250	136	172	146	151	± 19		1250	121	98	138	119	± 20
	625	153	129	146	143	± 12		625	128	137	120	128	± 9
	312.5	143	162	135	147	± 14		312.5	146	120	116	127	± 16
	NC	136	176	148	153	± 21		NC	144	146	166	152	± 12
	PC	952	1016	1032	1000	± 42		PC	424	480	588	497	± 83
TA1535	5000	20	16	14	17	± 3	TA1535	5000	12	8	17	12	± 5
	2500	17	11	4	11	± 7		2500	11	12	11	11	± 1
	1250	11	18	11	13	± 4		1250	13	13	10	12	± 2
	625	15	23	17	18	± 4		625	9	12	13	11	± 2
	312.5	11	19	16	15	± 4		312.5	16	15	14	15	± 1
	NC	19	17	17	18	± 1		NC	12	18	15	15	± 3
	PC	157	161	170	163	± 7		PC	280	196	268	248	± 45
TA1537	5000	51	40	41	44	± 6	TA1537	5000	9	11	7	9	± 2
	2500	38	48	41	42	± 5		2500	4	10	8	7	± 3
	1250	52	52	50	51	± 1		1250	9	11	10	10	± 1
	625	48	59	48	52	± 6		625	9	16	8	11	± 4
	312.5	50	30	45	42	± 10		312.5	11	12	11	11	± 1
	NC	48	43	35	42	± 7		NC	10	8	13	10	± 3
	PC	305	220	178	234	± 65		PC	592	488	488	523	± 60
WP2 <sup>uvrA</sup> (pKM101)	5000	222	200	213	212	± 11	WP2 <sup>uvrA</sup> (pKM101)	5000	266	174	176	205	± 53
	2500	184	254	189	209	± 39		2500	179	211	222	204	± 22
	1250	217	201	217	212	± 9		1250	203	225	234	221	± 16
	625	259	228	206	231	± 27		625	193	239	210	214	± 23
	312.5	229	214	229	224	± 9		312.5	174	201	217	197	± 22
	NC	121	196	184	167	± 40		NC	238	195	212	215	± 22
	PC	1560	1816	1704	1693	± 128		PC	1780	1764	1568	1704	± 118

NC: Negative control

PC: Positive control

## APPENDICES

### Appendix 1. History profile of negative and positive control values

#### Historical control data (Bacterial reverse mutation assay)

Historical negative control values of revertant colonies						
Strain	S9 mix	Mean	±	SD	Range	
					MIN	MAX
TA98	+	50	±	9	19	85
	—	30	±	7	11	63
TA100	+	144	±	28	67	262
	—	134	±	27	43	253
TA1535	+	14	±	3	4	27
	—	14	±	3	2	29
TA1537	+	15	±	6	1	48
	—	11	±	4	1	35
WP2uvrA(pKM101)	+	179	±	39	50	316
	—	158	±	46	40	335

Historical positive control values of revertant colonies							
Strain	S9 mix	Positive control	Mean	±	SD	Range	
						MIN	MAX
TA98	+	2-AA	631	±	217	224	1394
	—	2-NF	376	±	102	165	732
TA100	+	2-AA	1095	±	433	358	2253
	—	SA	753	±	217	374	1548
TA1535	+	2-AA	181	±	64	76	431
	—	SA	583	±	192	168	1267
TA1537	+	2-AA	408	±	197	144	1400
	—	9-AA	826	±	374	185	2000
WP2uvrA(pKM101)	+	2-AA	1127	±	691	193	3196
	—	AF2	873	±	786	66	2805

SA: Sodium azide

2-AA: 2-Aminoanthracene

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2-NF: 2-Nitrofluorene

9-AA: 9-Aminoacridine

SD: Standard deviation

Appendix 2. S9 fraction quality control statement

# MOLTOX<sup>®</sup>

Molecular Toxicology, Inc.

## POST MITOCHONDRIAL SUPERNATANT (S9) QUALITY CONTROL & PRODUCTION CERTIFICATE

---

<b>Animal Information</b> SPECIES: <u>Rat</u> STRAIN: <u>Sprague Dawley</u> SEX: <u>Male</u> AGE: <u>5 - 6 weeks</u> WEIGHT: <u>175 - 199 g</u> TISSUE: <u>Liver</u>	<b>Part Number Information</b> LOT NO.: <u>3388</u> PART NO.: <u>11-01L</u> VOLUME: <u>2.1 mL</u> BUFFER: <u>0.15 M</u> <u>KCl/Lyophilization Buffer</u> STORAGE: <u>At or below -20°C</u>	PREP: <u>December 19, 2014</u> EXPIRY: <u>December 19, 2016</u> INDUCING AGENT: <u>Aroclor</u> <u>1254, (Monsanto KL615), 500</u> <u>mg/kg i.p.</u>
--	--	---

---

REFERENCE: Maron, D & Ames, B., *Mutat Res*, **113**: 173, 1983. **For Research Purposes Only**

**BIOCHEMISTRY:** Assayed according to the method of Lowry et al., *JBC* 193:265, 1951 using bovine serum albumin as the standard.

- PROTEIN: 34.6 mg/ml

- ALKOXYRESORUFIN-0-DEALKYLASE ACTIVITIES

Activity	P450	Fold - Induction	
BROD	2B1, 2B2	29.1	Assays for ethoxyresorufin-0-deethylase (EROD), pentoxy-, benzyl- and methoxyresorufin-0-dealkylases (PROD, BROD, & MROD) were conducted using a modification of the methods of Burke, et al., <i>Biochem Pharm</i> 34:3337, 1985. Fold-inductions were calculated as the ratio of the sample vs. uninduced specific activities (SA's). Control SA's (pmoles/min/ mg protein) were 184, 92.4, 226.7, & 15.5 for BROD, EROD, MROD and PROD, respectively.
EROD	1A1, 1A2	104.7	
MROD	1A1, 1A2	10.1	
PROD	2B1, 2B2	110.6	

**BIOASSAY:**

- TEST FOR THE PRESENCE OF ADVENTITIOUS AGENTS  
 Samples of S-9 were assayed for the presence of contaminating microflora by plating 1.0 ml volumes on Nutrient Agar and Minimal Glucose (Vogel-Bonner E, supplemented with 0.05 mM L-histidine and D-biotin) media. Duplicate plates were read after 40 - 48 h incubation at 35 ± 2°C. The tested samples met acceptance criteria.

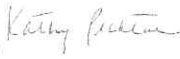
- PROMUTAGEN ACTIVATION  
 No. His<sup>+</sup> Revertants

<u>TA98</u>	<u>TA1535</u>	
354.8	900	The ability of the sample to activate ethidium (EtBr) and cyclophosphamide (CPA) to intermediates mutagenic to TA98 and TA1535, respectively, was determined according to Lesca, et al., <i>Mutation Res</i> 129: 299, 1984. Data were expressed as revertants per µg EtBr or per mg CPA.

Dilutions of the sample S9, ranging from 0.2 - 10% in S9 mix, were tested for their ability to activate benzo(a)pyrene (BP) and 2-aminoanthracene (2-AA) to intermediates mutagenic to TA100. Assays were conducted as described by Maron & Ames, (*Mutat Res* 113: 173, 1983).

<u>µl S9 per plate/number his<sup>-</sup> revertants per plate</u>						
<u>Promutagen</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>5</u>	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>50</u>
BP (5 µg)	83	124	266	367	647	852
2-AA (2.5 µg)	98	293	1292	1943	1881	1726

---

Approved:  12/29/14

MOLLECULAR TOXICOLOGY, INC. www.moltox.com (828) 264-9099

## - 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 마우스를 이용한 소핵시험

### 요 약

본 시험은 시험물질인 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 유전독성을 평가하기 위하여 ICR 마우스의 골수세포를 이용한 소핵 유발을 검토하였다. 본시험의 최고용량을 설정하기 위해 암·수의 마우스를 이용하여 1250, 2,500 및 5,000 mg/kg의 용량으로 용량결정시험을 실시한 결과, 투여 후 1일에 수컷의 2,500 및 5,000 mg/kg에서 각 1마리씩 사망동물이 발생하였다. 그 외, 다른 동물에서는 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서 소핵유발시험은 수컷의 경우 1,250 mg/kg, 암컷의 경우 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하여 24, 48 및 72시간째 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰하였다. 그 결과, 모든 시간대에서 소핵이 증가되지 않아 24시간을 골수세포채취시간으로 정하였다. 본시험은 용량설정시험 및 소핵유발시험의 결과에 따라 수컷의 경우 1,250, 625 및 312.5 mg/kg, 암컷의 경우 5,000, 2500 및 1,250 mg/kg을 설정하였다. 또한 각각 음성대조군은 부형제를, 양성대조군은 Mitomycin C를 설정하여 투여 후 24시간에 소핵유발을 관찰하였다. 본시험 결과, 암, 수 모두 시험물질군에서는 다염성적혈구 (Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 증가는 관찰되지 않았다 ( $p>0.05$ ). 또한, 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군에 비해 현저하게 증가하였다 ( $p<0.05$ ). 그리고 다염성 적혈구의 출현 빈도는 모든 용량군에서 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 초음파처리 인삼꽃대 추출물은 본 시험의 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵을 유발하지 않는것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1) 시험목적

ICR 마우스 골수세포를 이용하여 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 소핵유발 유무를 평가하였다.

2) Good Laboratory Practices

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practices 규정을 준수하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-67 호 (2014 년 2 월 12 일)

3) 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시하였다.

“의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-136 호 (2014 년 7 월 30 일)

4) 시험의뢰자

명칭                    고연 (高研)

주소    (390-711) 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112호

5) 시험기관

명칭                    (주)메드빌

주소    (153-760) 서울특별시 금천구 디지털로 9길 33, 15층 (가산동, IT미래타워)

6) 시험일정

시험개시일	2015년 2월 4일
실험개시일	2015년 2월 5일
동물입수일	2015년 2월 5일, 2015년 2월 16일, 2015년 2월 26일
실험종료일	2015년 3월 25일
시험종료일	2015년 4월 22일

7) 시험책임자

성명	-
소속	유전독성

8) 부문책임자

- 검역 -
- 동물관리 -
- 시험물질 관리 -

9) 시험담당자

- 시험담당자 -
- 동물시험 담당자 -
- 시험물질 조제 -

10) 기록 및 자료의 보관

시험기간 중에 발생한 모든 기록과 시험물질은 (주)메드빌의 자료보관실에 보관한다. 보관기간은 최종보고서 작성일 이후 3년간 보관함을 원칙으로 하며, 그 후 보관에 관해서는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

시험자료: 시험기초자료, 시험계획서, 최종보고서

11) 동물윤리

본 시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정을 준수하며, 동물보호법 (법률 제 4379호, 1991. 5. 31., 제정, 법률 제 13023호, 2015. 1. 20., 일부개정)에 근거한 (주)메드빌의 동물실험윤리위원회 (IACUC)에 의해 승인되었다.

2. 재료 및 방법

1) 시험물질

- (1) 물질명 초음파처리 인삼꽃대 추출물
- (2) Lot No. UGFB(001)
- (3) 성상 갈색분말
- (4) pH 4.95
- (5) 제조일 2015년 1월 15일
- (6) 유효기한 정보없음
- (7) 입수일 2015년 1월 21일
- (8) 입수량 609.9327 g (용기포함)
- (9) 보관조건 냉장 (3.6 - 6.8)
- (10) 공급처 고연 (高研)
- (11) 잔여시험물질의 처리 반환

2) 부형제

- (1) 명칭 주사용수
- (2) 보관조건 실온



- (3) Lot No. J5N5K21
- (4) 제조사 대한약품공업(주), Korea
- (5) 부형제 선택이유 부형제 확인 결과 시험물질이 주사용수에 현탁되어 부형제를 주사용수로 정하였다.

### 3) 시험물질의 조제 및 분석

#### (1) 시험물질의 조제

투여 당일 전자저울 (Explorer Ex224G, OHAUS, U.S.A.)로 시험물질을 측정 후 부형제를 일부 넣어 stirrer 를 이용하여 현탁 시킨 후, 부형제를 가하여 규정농도로 조제하였다.

#### (2) 조제물의 분석

조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 별도로 실시하지 않았다.

### 4) 양성대조물질

#### (1) 양성대조물질의 조제

2mg/vial 의 Mitomycin C(MMC, Sigma- Aldrich)에 주사용수 2mL 을 가하여 vortex mixer 로 용해시킨 후 주사용수로 희석하여 0.2mg/ml 의 solution 을 조제하였다. 조제된 양성대조물질은 갈색 튜브에 분주하여 초저온냉동고에 동결보관 하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.

### 5) 시험계

- (1) 종 및 계통 마우스, Crlj:Ori:CD1(ICR), SPF
- (2) 공급원 (주)오리엔트바이오
- (3) 시험계 선정 이유

ICR 마우스는 설치류로서 소핵시험을 비롯한 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있으며 기초자료가 풍부하여 선택하였다.

- (4) 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

용량결정시험 : 수컷 10 마리, 암컷 10 마리, 7 주령,  
수컷 (27.2-29.4 g), 암컷 (21.7-24.2 g)

소핵유발시험 : 수컷 10 마리, 암컷 10 마리, 7 주령,  
수컷 (25.5-27.5 g), 암컷 (22.0-23.9 g)

본시험 : 수컷 27 마리, 암컷 27 마리, 7 주령, 수컷 (28.4-33.2 g), 암컷 (22.8-27.7 g)

- (5) 검역 및 순화

반입시 동물의 외관 검사를 실시 후 일반증상을 관찰하고 체중을 측정하였다. 약 5-7일의 순화기간 중 검역실에서 순화기간을 거쳐 동물실로 이동하였다. 동물 입수 후 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

순화기간 종료일에 체중을 측정하였다.

(6) 개체 및 사육상자 식별

입수시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 순화기간 개체식별카드를 부착하였다.

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

(7) 군분리

용량설정시험의 최종검역일에 이상이 있는 암컷 한마리를 제외하고 그 외 일반증상 및 체중에 이상이 없는 동물을 선발하였다. 군분리는 선발한 동물의 평균체중 및 표준편차를 계산하여 군간 균일하게 분리하였다.

(8) 잔여동물의 처리

군분리 후 잔여동물은 시험계로부터 제외시켜 SOP 에 따라 처리하였다.

6) 사육환경조건

- (1) 동물실 번호 동물실 I
- (2) 사육상자 종류 및 크기 Polycarbonate cage, 270W × 220D × 130H (mm)
- (6) 사육상자당 수용동물 수 3~5마리
- (3) 온도 19.6 - 24.4 °C
- (4) 상대습도 35.7 - 73.4 %
- (5) 환기횟수 10 - 20 회/시간
- (6) 명암주기 (조명시간) 12 시간/일 (08:00 - 20:00)
- (7) 조도 150 - 300 Lux

7) 사료

- (1) 종류 실험동물용 고형사료
- (2) Lot No. L80154492
- (3) 제조사 PMI Nutrition International Inc., U.S.A.
- (4) 공급원 (주)오리엔트바이오
- (5) 급이방법 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취 시켰다.
- (6) 사료의 분석 및 확인 공급원에서 제공한 분석 성적서의 결과가 허용범위 내에 속하는지 확인하였다.

8) 음수

(1) 종류 및 급수방법

서울특별시의 수도물을 UV 멸균 및 필터를 이용하여 여과시킨 정제수를 Polycarbonate 음수병 (250 mL)에 넣어 자유섭취 시켰다.

(2) 음수의 분석 및 확인

“먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙” (환경부령 제 439 호, 2011. 12. 30, 일부개정)의 전 항목에 대하여 서울특별시 보건환경 연구원 (경기도 과천시 장군마을 3 길 30)에 의뢰하여 1 회/년 (2014 년 12 월 16 일) 검사를 실시하며, 그 결과가 허용범위 내에 속하는지를 확인하였다.

9) 투여

(1) 투여경로

음성대조물질 및 시험물질은 경구투여하고, 양성대조물질은 복강 내 투여하였다.

(2) 투여경로 선택이유

사람에 대한 노출 경로 중의 하나로서 경구투여를 선택하였다.

(3) 투여방법 및 투여회수

일회용 주사기 (1mL)에 경구용 존데를 이용하여 위 내에 강제 경구투여, 또는 주사침 (26G)을 이용하여 복강내 투여를 1 회 실시하였다.

(4) 투여액량

투여액량은 10mL/kg 으로 하고, 개체별 투여량은 당일 측정된 체중을 기준으로 산출하였다.

10) 관찰

(1) 일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 매일 1 회 이상 또는 투여 후 일반 상태의 변화, 운동성, 외관등의 일반 증상 및 사망동물 유무를 관찰하였다.

(2) 체중측정

모든 동물에 대하여 투여 전 또는 골수채취 당일에 체중을 측정한다. 또한 사망동물 발생시 사망동물의 체중을 측정하였다.

11) 용량결정시험

본시험의 용량을 결정하기 위하여 Non-GLP시험으로 실시하였다.

(1) 투여용량의 설정

가이드라인에서 정하고 있는 최고용량은 2,000 mg/kg/day이지만, 건강기능식품임을 고려하여 단회 투여독성시험의 최고용량에 준하는 5,000 mg/kg/day을 최고용량으로 공비 2의 2,500 및 1,250 mg/kg/day의 총 3용량으로 설정하였다.

(2) 시험군의 구성

군	투여액량 (mL/kg/day)	투여용량 (mg/kg/day)	동물수 (동물번호)	
			수컷	암컷
G1 저용량군	10	1,250	3 (11001D - 11003D)	3 (21001D - 21003D)
G2 중용량군	10	2,500	3 (12001D - 12003D)	3 (22001D - 22003D)
G3 고용량군	10	5,000	3 (13001D - 13003D)	3 (23001D - 23003D)

(3) 일반증상 및 체중측정

시험물질 투여 직후, 투여 후 2시간, 투여 후 1, 2 및 3일간 동물의 일반증상을 관찰하였다. 그 결과 투여 후 1일에 수컷의 2,500 및 5,000 mg/kg에서 각각 1마리씩 사망동물이 발생하였다. 발견즉시 사망동물의 체중을 측정하였다. 그 외, 다른 동물에서는 일반증상이 나타나지 않았다.

12) 소핵유발시험

본시험의 골수세포 채취시간을 결정하기 위하여 Non-GLP 시험으로 실시하였다.

(1) 투여용량의 설정 및 군구성

용량결정시험의 결과에 따라 수컷의 경우 1,250 mg/kg, 암컷의 경우 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하여 1회 경구투여후 24, 48 및 72시간째 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰하였다. 각 시간당 동물은 3마리로 한다.

투여경로, 투여횟수 및 투여액량은 용량결정시험과 동일하게 진행하였다.

(2) 일반증상 및 체중측정

시험물질 투여 직후, 투여 후 2시간, 투여 후 1, 2 및 3일에 일반증상을 관찰하였다. 그 결과 암, 수 모두 시험물질 투여군에서 일반증상이 나타나지 않았다.

(3) 검체제작시간의 설정

모든 시간대에서 소핵이 증가되지 않아 24시간을 골수세포채취시간으로 설정하였다.

13) 본시험

본시험은 GLP 시험으로 실시하였다.

(1) 본시험의 용량결정

본시험의 용량은 사망례가 나타난 수컷의 경우 1,250, 625 및 312.5 mg/kg, 암컷의 경우 5,000, 2,500 및 1,250 mg/kg으로 설정하였다.

(2) 시험군의 구성

시간	군	투여액량 (mL/kg)	투여횟수	투여경로	마리수 (개체번호)	
24시간	G1	주사용수	10	1	경구	5 (11001 - 11005)
	G2	312.5 mg/kg	10	1	경구	5 (12001 - 12005)
	G3	625 mg/kg	10	1	경구	5 (13001 - 13005)
	G4	1,250 mg/kg	10	1	경구	5 (14001 - 14005)
	G5	MMC	10	1	복강내	5 (15001 - 15005)
시간	군	투여액량 (mL/kg)	투여횟수	투여경로	마리수 (개체번호)	
24시간	G1	주사용수	10	1	경구	5 (21001 - 21005)
	G2	1,250 mg/kg	10	1	경구	5 (22001 - 22005)
	G3	2,500 mg/kg	10	1	경구	5 (23001 - 23005)
	G4	5,000 mg/kg	10	1	경구	5 (24001 - 24005)
	G5	MMC	10	1	복강내	5 (25001 - 25005)

### (3) 일반증상 및 체중측정

시험물질 투여 직후, 투여 후 2시간, 투여 후 1일에 동물의 일반증상을 관찰하였다. 그 결과 암, 수 모두 시험물질 투여군에서 일반증상이 나타나지 않았다.

#### 14) 골수세포의 채취 및 도말검체 제작

골수세포의 채취는 시험물질의 최종투여 후 24시간에 경추탈골로 마우스를 안락사 시키고 대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 양 끝단을 가위로 절단하여 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, Invitrogen, U.S.A.)을 관류시켜 골수세포를 채취하였다. 골수세포부유액은 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 소량을 슬라이드글라스에 떨어뜨려 도말하였다. 개체당 2매의 골수도말검체를 제작하였다. 공기중에 충분히 건조시킨 후, 메탄올로 고정하였다. 5% Giemsa 염색액으로 약 30분간 염색하였다.

#### 15) 검체의 판독

동물개체별로 코드화된 검체를 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte)와 정염성적혈구 (NCE, Normochromatic, erythrocyte)의 합이 200개가 되도록 계수하여 총적혈구 중 다염성적혈구의 비  $[PCE/(PCE+NCE)]$ 를 구하였다. 이어서 다염성적혈구가 2000개가 되도록 계수하여 다염성적혈구 중 소핵을 가지고있는 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte) 의 비  $(MNPCE/2000PCE)$ 를 구하였다.

#### 16) 결과의 판정

소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum and Bowman<sup>2)</sup>의 추정학적 통계 방법을 사용하여 검증하고, 통계학적으로 유의하게 증가할 경우 양성으로 판정하였다.

#### 17) 자료의 통계처리

소핵다염성적혈구의 유발빈도에 대하여 Kastenbaum and Bowman의 통계방법을 이용하여 5% 유의수준에서 검증하였다. 다염성 적혈구의 출현빈도와 체중의 변화는 ANOVA test 를 실시하여 5% 유의수준에서 통계적으로 유의성을 검증하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) 용량결정시험 및 소핵유발시험 (Table 1, Table 2, Table 3, Table 4)

본시험의 최고용량을 결정하기 위해 암·수의 마우스를 이용하여 1250, 2,500 및 5,000 mg/kg의 용량으로 용량결정시험을 실시한 결과, 투여 후 1일에 수컷의 2,500 및 5,000 mg/kg에서 각 1마리씩 사망동물이 발생하였다. 그 외, 다른 동물에서는 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서 소핵유발시험은 수컷의 경우 1,250 mg/kg, 암컷의 경우 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하여 24, 48 및 72시간째 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰하였다. 그 결과, 모든 시간대에서 소핵이 증가되지 않아 24시간을 골수세포채취시간으로 정하였다.

## 2) 본시험

용량결정시험의 결과 수컷과 암컷의 성차가 확인되어 본시험에서는 수컷과 암컷을 모두 이용하였다. 수컷의 경우 1,250, 625 및 312.5 mg/kg, 암컷의 경우 5,000, 2500 및 1,250 mg/kg을 설정하였다. 또한 각각 음성대조군은 부형제를, 양성대조군은 Mitomycin C를 설정하였다.

### (1) 일반증상 및 사망동물 관찰

본시험 결과 수컷 및 암컷 모두 투여 용량에서 일반증상 및 사망동물이 발견되지 않았다.

### (2) 체중변화 (Table 5, Table 6)

각 군간의 체중을 음성대조군과 비교한 결과 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다 ( $p>0.05$ , ANOVA test).

### (3) 소핵다염성 적혈 구 및 다염성 적혈구의 출현 빈도 (Table 7, Table 8)

수컷 및 암컷의 모든용량의 시험물질군에서 다염성적혈구 중 소핵다염성 적혈구의 출현 빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 또한 양성대조군의 소핵다염성 적혈구의 출현빈도는 음성대조군에 비해 현저하게 증가 하였다 ( $p<0.05$ , ANOVA test).

총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현 빈도는 모든 용량군에서 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

## 4. 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물은 마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

## 5. 참고문헌

1) CAMBRIDGE University press: Basic mutagenicity tests, 5 In vivo cytogenetics assays, 115-137.

2) Kastenbaum M.A. and Bowman K.O. (1970) : Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, Mutation Research, 9, 527-549.

TABLES

Table 1. Clinical signs results of dose range finding study (Male)

Test article	Route	Dose mg/kg	Animal ID	Clinical sign of days after treatment			
				0hr	2hr	Day 1	Day 2
중 등 표 치	P.O.	1,250	11001D	NAD	NAD	NAD	NAD
			11002D	NAD	NAD	NAD	NAD
			11003D	NAD	NAD	NAD	NAD
근 연 습	P.O.	2,500	12001D	NAD	NAD	NAD	NAD
			12002D	C07	NAD	NAD	NAD
			12003D	C07	C10	A01, B01	-
중 등 표 치	P.O.	5,000	13001D	NAD	NAD	NAD	NAD
			13002D	C07	C10	A01, B01	-
			13003D	C07	NAD	NAD	NAD

P.O. : Per Os

NAD : No Abnormalities Detected

C07: Inanimation

C10:Stupor

A01:Death

B01:Prone position

- : No data

Table 2. Clinical signs results of dose range finding study (Female)

Test article	Route	Dose mg/kg	Animal ID	Clinical sign of days after treatment			
				0hr	2hr	Day 1	Day 2
코 을 포 스 르 인 수 꽃 다 추 를 들	P.O.	1,250	21001D	NAD	NAD	NAD	NAD
			21002D	NAD	NAD	NAD	NAD
			21003D	NAD	NAD	NAD	NAD
	P.O.	2,500	22001D	NAD	NAD	NAD	NAD
			22002D	NAD	NAD	NAD	NAD
			22003D	NAD	NAD	NAD	NAD
	P.O.	5,000	23001D	NAD	NAD	NAD	NAD
			23002D	NAD	NAD	NAD	NAD
			23003D	NAD	NAD	NAD	NAD

P.O. : Per Os

NAD : No Abnormalities Detected



Table 3. Result of sampling time study (Male)

Treatment	Dose	Sex	Sample Size	Human	NCE	PCE	PCE/ (PCE+NCE) Ratio of PCE	MNPCE /2000PCE
				Animal ID				
Group 1	1	M	5	11001S	98	102	51.0	1 : 2000
				11002S	100	100	50.0	2 : 2000
				11003S	104	96	48.0	2 : 2000
				TOTAL	-	-	-	5 : 6000
				Mean	-	-	49.7	1.7 : 2000
S.D.	-	-	1.5	0.6	-			
Group 2	1	M	5	12001S	99	101	50.5	1 : 2000
				12002S	105	95	47.5	1 : 2000
				12003S	111	89	44.5	0 : 2000
				TOTAL	-	-	-	2 : 6000
				Mean	-	-	47.5	0.7 : 2000
S.D.	-	-	3.0	0.6	-			
Group 3	1	M	5	13001S	86	114	57.0	0 : 2000
				13002S	94	106	53.0	0 : 2000
				13003S	109	91	45.5	1 : 2000
				TOTAL	-	-	-	1 : 6000
				Mean	-	-	51.8	0.3 : 2000
S.D.	-	-	5.8	0.6	-			

P.O.: Per Os, S.D.: Standard Deviation

PCE: Polychromatic erythrocyte, NCE: Normochromatic erythrocyte, MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

Table 4. Result of sampling time study (Female)

Treatment	Dose	Sex	Sample ID	NCE	PCE	PCE/ (PCE+NCE) Ratio of PCE	MNPCE	
							:	2000PCE
P5, C0	F	m 2	21001S	93	107	53.5	1	: 2000
			21002S	103	97	48.5	1	: 2000
			21003S	89	111	55.5	0	: 2000
			TOTAL	-	-	-	2	6000
			Mean	-	-	52.5	0.7	: 2000
			S.D.	-	-	3.6	0.6	-
P5, C0	F	m 4	22001S	102	98	49.0	1	: 2000
			22002S	99	101	50.5	0	: 2000
			22003S	101	99	49.5	0	: 2000
			TOTAL	-	-	-	1	6000
			Mean	-	-	49.7	0.3	: 2000
			S.D.	-	-	0.8	0.6	-
P5, C0	F	m 7	23001S	104	96	48.0	1	: 2000
			23002S	98	102	51.0	0	: 2000
			23003S	111	89	44.5	1	: 2000
			TOTAL	-	-	-	2	6000
			Mean	-	-	47.8	0.7	: 2000
			S.D.	-	-	3.3	0.6	-

P.O.: Per Os, S.D.: Standard Deviation

PCE: Polychromatic erythrocyte, NCE: Normochromatic erythrocyte, MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

Table 5. Results of main study in male ICR mice (Male)

Test article	Route	Dose mg/kg	Sex	Clinical signs		Animal ID	Body weight (g)	
				0hr	24hr		0hr	24hr
Water for injection	P.O.	0	Male	NAD	NAD	11001	34.5	34.5
				NAD	NAD	11002	35.5	37.0
				NAD	NAD	11003	36.6	37.6
				NAD	NAD	11004	37.3	36.3
				NAD	NAD	11005	37.9	38.2
				Mean			36.4	36.7
				S.D.			1.4	1.4
	P.O.	312.5	Male	NAD	NAD	12001	34.9	34.9
				NAD	NAD	12002	35.7	34.7
				NAD	NAD	12003	36.7	36.4
				NAD	NAD	12004	37.4	36.9
				NAD	NAD	12005	38.0	36.7
				Mean			36.5	35.9
				S.D.			1.3	1.0
초음파처리 인삼꽃대 추출물	P.O.	625	Male	NAD	NAD	13001	35.0	33.7
				NAD	NAD	13002	35.7	35.3
				NAD	NAD	13003	37.1	36.3
				NAD	NAD	13004	37.4	36.2
				NAD	NAD	13005	38.8	38.2
				Mean			36.8	35.9
				S.D.			1.5	1.6
	P.O.	1250	Male	NAD	NAD	14001	35.3	33.5
				NAD	NAD	14002	36.0	36.0
				NAD	NAD	14003	37.3	35.8
				NAD	NAD	14004	37.5	37.1
				NAD	NAD	14005	38.8	38.2
				Mean			37.0	36.1
				S.D.			1.4	1.8
MMC	I.P.	2	Male	NAD	NAD	15001	35.5	35.4
				NAD	NAD	15002	36.0	35.0
				NAD	NAD	15003	37.3	36.5
				NAD	NAD	15004	37.7	36.1
				NAD	NAD	15005	38.9	38.8
				Mean			37.1	36.4
				S.D.			1.4	1.5

P.O. : Per Os

I.P.: Intraperitoneal

S.D.: Standard Deviation

MMC : Mitomycin C

NAD : No Abnormalities Detected

Table 6. Results of main study in male ICR mice (Female)

Test article	Route	Dose mg/kg	Sex	Clinical signs		Animal ID	Body weight (g)	
				0hr	24hr		0hr	24hr
Water for injection	P.O.	0	Female	NAD	NAD	21001	26.5	25.1
				NAD	NAD	22002	27.4	26.0
				NAD	NAD	22003	28.2	27.5
				NAD	NAD	22004	28.8	27.1
				NAD	NAD	22005	29.9	28.0
				Mean			28.2	26.7
				S.D.			1.3	1.2
초음파처리 인삼꽃대 추출물	P.O.	1250	Female	NAD	NAD	22001	26.7	26.3
				NAD	NAD	22002	27.4	26.0
				NAD	NAD	22003	28.5	27.1
				NAD	NAD	22004	29.2	28.7
				NAD	NAD	22005	30.2	29.2
				Mean			28.4	27.5
				S.D.			1.4	1.4
초음파처리 인삼꽃대 추출물	P.O.	2500	Female	NAD	NAD	23001	26.8	25.2
				NAD	NAD	23002	27.5	27.6
				NAD	NAD	23003	28.6	27.7
				NAD	NAD	23004	29.3	28.4
				NAD	NAD	23005	30.2	29.8
				Mean			28.5	27.7
				S.D.			1.4	1.7
초음파처리 인삼꽃대 추출물	P.O.	5000	Female	NAD	NAD	24001	26.9	26.1
				NAD	NAD	24002	28.0	27.3
				NAD	NAD	24003	28.7	28.1
				NAD	NAD	24004	29.7	29.2
				NAD	NAD	24005	30.5	29.6
				Mean			28.8	28.1
				S.D.			1.4	1.4
MMC	I.P.	2	Female	NAD	NAD	25001	27.2	27.5
				NAD	NAD	25002	28.1	25.8
				NAD	NAD	25003	28.8	27.0
				NAD	NAD	25004	29.9	28.3
				NAD	NAD	25005	31.1	28.9
				Mean			29.0	27.5
				S.D.			1.5	1.2

P.O. : Per Os

I.P.: Intraperitoneal

S.D.: Standard Deviation

MMC : Mitomycin C

NAD : No Abnormalities Detected

Table 7. Results of main study in male ICR mice (Male)

Test article	Route	Dose mg/kg	Sex	Hour after administration	Animal ID	NCE	PCE	PCE/	MNPCE/2000PCE
								(PCE+NCE) Ratio of PCE	
Water for injection	P.O.	0	Male	24	11001	121	79	39.5	2 : 2000
					11002	128	72	36.0	0 : 2000
					11003	119	81	40.5	4 : 2000
					11004	120	80	40.0	2 : 2000
					11005	131	69	34.5	1 : 2000
					TOTAL	-	-	-	9 : 10000
					Mean	-	-	38.1	1.8 : 2000
S.D.	-	-	2.7	1.5 -					
	P.O.	312.5	Male	24	12001	100	100	50.0	2 : 2000
					12002	92	108	54.0	0 : 2000
					12003	111	89	44.5	1 : 2000
					12004	113	87	43.5	3 : 2000
					12005	124	76	38.0	2 : 2000
					TOTAL	-	-	-	8 : 10000
					Mean	-	-	46.0	1.6 : 2000
S.D.	-	-	6.2	1.1 -					
초음파 처리 인삼꽃대 추출물	P.O.	625	Male	24	13001	125	75	37.5	1 : 2000
					13002	105	95	47.5	2 : 2000
					13003	123	77	38.5	2 : 2000
					13004	106	94	47.0	4 : 2000
					13005	129	71	35.5	3 : 2000
					TOTAL	-	-	-	12 : 10000
					Mean	-	-	41.2	2.4 : 2000
S.D.	-	-	5.6	1.1 -					
	P.O.	1250	Male	24	14001	85	115	57.5	0 : 2000
					14002	92	108	54.0	0 : 2000
					14003	107	93	46.5	1 : 2000
					14004	122	78	39.0	2 : 2000
					14005	135	65	32.5	4 : 2000
					TOTAL	-	-	-	7 : 10000
					Mean	-	-	45.9	1.4 : 2000
S.D.	-	-	10.3	1.7 -					
MMC	I.P.	2	Male	24	15001	90	110	55.0	124 : 2000
					15002	85	115	57.5	120 : 2000
					15003	102	98	49.0	123 : 2000
					15004	116	84	42.0	98 : 2000
					15005	130	70	35.0	91 : 2000
					TOTAL	-	-	-	556* : 10000
					Mean	-	-	47.7	111.2 : 2000
S.D.	-	-	9.3	15.5 -					

P.O.: Per Os

I.P.: Intraperitoneal

S.D.: Standard Deviation

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

MMC: Mtromycin C

\*: Significantly different from mice negative control by Kastenbaum & Bowman ( $p < 0.05$ )

Table 8. Results of main study in male ICR mice (Female)

Test article	Route	Dose mg/kg	Sex	Hour after administration	Animal ID	NCE	PCE	PCE/	MNPCE/2000PCE	
								(PCE+NCE) Ratio of PCE		
Water for injection	P.O.	0	Female	24	21001	75	125	62.5	1	: 2000
					21002	84	116	58.0	3	: 2000
					21003	100	100	50.0	0	: 2000
					21004	91	109	54.5	5	: 2000
					21005	92	108	54.0	4	: 2000
					TOTAL	-	-	-	13	10000
					Mean	-	-	55.8	2.6	: 2000
					S.D.	-	-	4.7	2.1	-
	P.O.	1250	Female	24	22001	95	105	52.5	2	: 2000
					22002	101	99	49.5	0	: 2000
					22003	88	112	56.0	1	: 2000
					22004	94	106	53.0	3	: 2000
					22005	89	111	55.5	2	: 2000
					TOTAL	-	-	-	8	10000
					Mean	-	-	53.3	1.6	: 2000
					S.D.	-	-	2.6	1.1	-
초음파 처리 인삼꽃대 추출물	P.O.	2500	Female	24	23001	92	108	54.0	1	: 2000
					23002	100	100	50.0	0	: 2000
					23003	104	96	48.0	2	: 2000
					23004	105	95	47.5	2	: 2000
					23005	89	111	55.5	0	: 2000
					TOTAL	-	-	-	5	10000
					Mean	-	-	51.0	1.0	: 2000
					S.D.	-	-	3.6	1.0	-
	P.O.	5000	Female	24	24001	81	119	59.5	3	: 2000
					24002	78	122	61.0	2	: 2000
					24003	65	135	67.5	4	: 2000
					24004	80	120	60.0	0	: 2000
					24005	111	89	44.5	2	: 2000
					TOTAL	-	-	-	11	10000
					Mean	-	-	58.5	2.2	: 2000
					S.D.	-	-	8.5	1.5	-
MMC	I.P.	2	Female	24	25001	134	66	33.0	60	: 2000
					25002	114	86	43.0	100	: 2000
					25003	94	106	53.0	78	: 2000
					25004	89	111	55.5	68	: 2000
					25005	90	110	55.0	84	: 2000
					TOTAL	-	-	-	390	10000
					Mean	-	-	47.9	78.0	2000
					S.D.	-	-	9.7	15.4	-

P.O.: Per Os

I.P.: Intraperitoneal

S.D.: Standard Deviation

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

MMC: Mtromycin C

\*: Significantly different from mice negative control by Kastenbaum & Bowman ( $p < 0.05$ )

APPENDIX

Appendix 1. History profile of negative and positive control values

Historical control data (Micronucleus assay in ICR mice)

<b>Historical control values of micronucleated polychromatic erythrocytes(MNPCE)</b>						
Group	Dose (mg/kg)	MNPCE/2000PCE		Range(MNPCE/2000PCE) %		
		Mean±S.D.		MIN	MAX	
Negative control	0	1.3	± 1.5	0.0	6.8	
Positive control	2	133.3	± 26.2	111.2	183.2	

<b>Historical control values of ratio of polychromatic erythrocytes(PCE) to total erythrocytes</b>						
Group	Dose (mg/kg)	PCE/NCE+PCE		Range(PCE/NCE+PCE ) %		
		Mean±S.D.		MIN	MAX	
Negative control	0	51.7	± 5.2	38.1	59.0	
Positive control	2	48.5	± 4.2	43.3	54.0	

Negative control : Including water for injection, corn oil, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution

Positive control : Mitomycin C (2mg/kg, I.P., single administration)

The range was calculated by the control limit from Mean ± S.D.

ATTACHMENTS

Attachment 1. Certificate of analysis

고연(高研)

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

물 질 명	:	초음파처리 인삼꽃대 추출물
제조번호	:	UGFB(001)      제조일자 :2015.1.15
제 조 량	:	490g      시험일자 :2015.1.19

시험항목	기 준	결 과	분석자
1. 성 상	황갈색~흑갈색의 건조분말	: 갈색	
2. pH	4.0~6.0	: 4.95	
3. TLC	TLCsilicagel, chloroform:Methaol:Water=70:30:4로 뉘은황산 발색시 Rf치 0.48,0.42,0.44	Rf치 0.48,0.42,0.44	
4. 확인시험 (HPLC)	HPLCwaters1525binaryHPLC system(water,미국)에서 acetonitrile,water(HPLC급,sigma,미 국)이며 acetonitrile의 비율 17%에서 25%(25분),40%(50분),60%(105 분),100%(110분)조건으로 분석시 ginsenoside F4,Rg3,Rg5검출	:ginsenoside F4 RT      57.84 GinsenosideRg3 RT      64.64 Gisenoside Rg5 RT      77.37	

분 석 자 :

확 인 자 :

승 인 자 :





## Attachment 2. Protocol deviation

2015년 2월 13일과 2월 26일에 동물이 사육되어 있는 습도가 각각 73.4% 와 70.3%로 시험계획서의 습도 범위인  $50.0 \pm 20.0$  %보다 이탈 되었다. 확인결과 온-습도 센서의 이상으로 확인이 되었으며 동물의 건강상태에는 이상이 없음이 확인 되었다.

따라서, 위의 습도 이탈은 시험에 신뢰성에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

- 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

요 약

본 시험은 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물의 염색체이상의 유발유무를 확인하기 위하여 Chinese hamster lung (CHL/IU) 세포를 이용하여 염색체이상시험을 실시하였다. 처리농도결정시험의 결과, 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성계와 비대사 성계 및 연속처리법의 비대사활성계 모두 5,000 µg/mL의 용량에서 관찰되었다. 또한, 대사활성계는 세포독성이 관찰되지 않았으나, 단시간처리법의 비대사활성계 및 연속처리법의 비대사활성계 모두 50% 세포성장억제가 관찰되어 IC<sub>50</sub> 값을 확인하였다. 그 결과, 단시간처리법의 비대사활성계의 IC<sub>50</sub> 값은 3881.8 µg/mL, 연속처리법의 비대사활성계의 IC<sub>50</sub> 값은 820.0 µg/mL이었다. 따라서 본시험의 최고용량은 단시간처리법의 대사활성계의 경우 침전이 나타난 5,000 µg/mL으로 결정하였다. 또한 세포독성이 나타난 비대사활성계의 경우, 단시간처리법의 비대사활성계 및 연속처리법의 비대사활성계의 최고용량은 각각 5,000 µg/ml과 850 µg/mL으로 결정하였다. 단시간처리법의 대사활성계는 최고용량을 포함하여 공비 2의 3단계 용량으로 설정하고, 비대사활성계의 경우 공비 2의 4단계 용량으로 설정하였다. 또한, 각각 음성대조군과 양성대조군을 두었다. 본시험 결과, 단시간처리법의 대사활성계 및 비대사활성계와 연속처리법의 비대사활성계에서 염색체이상세포는 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가는 나타나지 않았다. 그러나, 양성대조군의 염색체이상세포는 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가되었다. 이상의 결과로부터 본 시험조건하에서 시험물질인 초음파처리 인삼꽃대 추출물은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

## 1. 시험실시의 개요

### 1) 시험목적

시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 포유동물 세포주인 Chinese hamster lung (CHL/IU) cell line에 노출시켜 염색체이상 빈도를 측정하여 유전독성 여부를 평가하였다.

### 2) Good Laboratory Practice

시험의 모든 과정은 다음의 Good Laboratory Practice 규정을 준수하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-67호 (2014년2월12일)

### 3) 시험기준

시험의 모든 규정은 다음의 시험기준을 준수하였다.

“의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-136호 (2014년7월30일)

### 4) 시험의뢰자

기관명 고연 (高研)

주소 (390-711) 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112호

### 5) 시험기관

기관명 (주)메드빌

주소 (153-760) 서울특별시 금천구 디지털로 9길 33, 15층 (가산동, IT미래타워)

### 6) 시험일정

시험개시일	2015년 2월 24일
실험개시일	2015년 3월 2일
실험종료일	2015년 3월 30일
시험종료일	2015년 4월 20일

### 7) 시험책임자

성명

소속

유전독성

8) 부문책임자

세포주 관리  
시험물질 관리

9) 시험담당자

담당자  
시험물질 조제

10) 시험자료의 보관

시험기간 중에 작성된 모든 자료는 3년간 (주)메드빌 자료보관실에 보관한다. 그 후 보관에 관해서는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

시험자료: 시험기초자료, 시험계획서, 최종보고서

2. 재료 및 방법

1) 시험물질

- (1) 물질명 초음파처리 인삼꽃대 추출물
- (2) Lot No. UGFB(001)
- (3) 성상 갈색분말
- (4) pH 4.95
- (5) 제조일 2015년 1월 15일
- (6) 유효기한정보없음
- (7) 입수일 2015년 1월 21일
- (8) 입수량 609.9327 g (용기포함)
- (9) 보관조건냉장 (3.2°C ~ 6.5°C)
- (10) 공급처 고연 (高研)
- (11) 잔여시험물질의 처리 반환

2) 부형제

- (1) 명칭 주사용수
- (2) Lot No. J5N5K21
- (3) 보관조건실온
- (4) 제조사 대한약품공업(주)
- (5) 부형제 선택이유 부형제 확인 결과 시험물질이 주사용수에 현탁되어 부형제를 주사용수로 정하였다.

3) 시험물질의 조제 및 분석

- (1) 시험물질의 조제

최고용량인 5,000 µg/mL의 10배 stock을 조제하기 위하여 실험 실시 당일 전자저울 (Explorer Ex224G, OHAUS, U.S.A.)로 시험물질을 칭량한 후, 부형제를 가하여 규정농도로 조제하였다.

(2) 조제물의 분석

조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 별도로 실시하지 않았다.

4) 양성대조물질

양성대조물질인 mitomycin C (MMC, Sigma-Aldrich)는 주사용수를 가하여 용해시키고, cyclophosphamide monohydrate (CP, Sigma-Aldrich)는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)를 가한 후 용해시켜 stock solution을 조제하였다. 양성대조물질은 갈색 튜브에

배양계열	S9 mix	명칭	Stock concentration (µg/mL)	Final concentration (µg/mL)
단시간처리 (6hr)	-	MMC	10	0.1
	+	CP	500	5
연속처리 (24hr)	-	MMC	10	0.1

분주하여 초저온 냉동고 (-80°C ~ -60°C)에 보관하였다.

5) S9 혼합물

(1) 동결건조된 S9 (Molecular toxicology, Lot No. 3388)과 대사 효소 활성화에 필요한 보조인자들을 혼합하여 대사활성계로 사용하였다. S9은 초저온 냉동고에 보관하고 사용직전에 해동하여 사용하였다.

(2) S9 혼합물 농도

S9 혼합물의 구성	Amount / µL
Rat liver S9 fraction	582 µL
0.4M MgCl <sub>2</sub> - 1.65M KCl	20 µL
0.1M glucose-6-phosphate	50 µL
0.1M NADP	40 µL
0.2M sodium phosphate buffer, pH 7.4	250 µL
Sterile distilled H <sub>2</sub> O	48 µL

6) 시험계

(1) 세포주

Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cells

(2) 선택이유

가이드라인에서 추천하고, 체외 염색체이상시험에서 널리 사용되고 있으며 기초자료가 풍부한 CHL/IU 세포주를 선택하였다.

(3) 공급원

American Type Culture Collection (ATCC, U.S.A.)에서 2006년 10월 26일에 구입한 CHL/IU 세포주 (Lot No. 3375917)를 계대 배양하였다.

#### (4) 세포의 배양

Heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Invitrogen)과 antibiotic 용액 (streptomycin/penicillin, Invitrogen)이 각각 10% 및 1% 첨가된 Eagle's minimal essential medium (EMEM, Invitrogen)을 배양액으로 사용하며, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

#### (5) 세포의 보존

배양된 세포는 0.05% trypsin-EDTA 용액 (Invitrogen)을 첨가하여 배양 플레이트 바닥으로 부터 세포를 분리 하고, 분리된 세포는 1000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 세포는 FBS로 현탁시켜 DMSO (Sigma-Aldrich)를 최종농도 10% 되도록 넣고 동결보존용 튜브에 일정량 분주하였다. 분주한 세포는 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에 24시간 동안 보관하고, 그 후에 액체질소에 보관하였다. 마이코플라스마의 오염 유무에 대해 확인하였다.

#### (6) 계대배양

동결보존된 세포를 항온수조에서 녹인 후, EMEM 배양액에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, EMEM 배양액으로 현탁시켰다. 세포현탁액은 배양플라스크에 옮겨, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포가 배양플라스크 바닥면적에 70 ~ 80% 이상 생육할 때 세포형태를 관찰하고, 0.05% trypsin-EDTA 용액을 첨가하여 배양플라스크 바닥으로부터 세포를 분리하였다. 분리된 세포는 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후, EMEM 배양액에 현탁시켰다. 세포현탁액을 배양플라스크에 옮겨, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

#### (7) 전배양

염색제이상시험에는 25계대 이하의 세포를 사용하였다.

세포가 배양된 플라스크에 0.05% trypsin-EDTA 용액을 첨가하여 배양 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리하고, 분리된 세포는 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, EMEM 배양액에 현탁 시켰다. 세포를 계수하여  $3 \times 10^4$  cells/mL로 60 mm (3 mL/plate, SPL) 플레이트에 분주하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 3일간 배양하였다.

### 7) 시험 농도 결정

처리농도결정시험을 통하여 CHL/IU세포에 시험물질의 처리 농도를 결정하기 위하여 다음과 같이 수행하였다.

#### (1) 처리농도결정시험

시험물질의 최고용량은 가이드라인에서 추천하고 있는 5,000 µg/mL으로 설정하였다. 최고용량을 포함하여 공비 2의 7단계로 설정하며, 최고용량으로 낮은 용량을 순차적으로 희석하였다. 음성대조군은 부형제를 사용하였다.

처리농도결정시험의 결과, 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성계와 비대사활성계, 연속처리법의 비대사활성계 모두 5,000 µg/mL의 용량에서 관찰되었다.

또한, 대사활성계는 세포독성이 관찰되지 않았으나, 단시간처리법의 비대사활성계 및 연속처리법의 비대사활성계 모두 50% 세포성장억제가 관찰되어 IC<sub>50</sub> 값을 확인하였다. 그 결과, 단시간처리법의 비대사활성계의 IC<sub>50</sub> 값은 3881.8 µg/mL, 연속처리법의 비대사활성계의 IC<sub>50</sub> 값은 820.0 µg/mL이었다.

## (2) 본시험

본시험의 최고용량은 단시간처리법의 대사활성계의 경우 침전이 나타난 5,000 µg/mL으로 결정하였다. 또한 세포독성이 나타난 비대사활성계의 경우, 단시간처리법의 비대사활성계 및 연속처리법의 비대사활성계의 최고용량은 각각 5,000 µg/ml과 850 µg/mL으로 결정하였다. 단시간처리법의 대사활성계는 최고용량을 포함하여 공비 2의 3단계 용량으로 설정하고, 비대사활성계의 경우 공비 2의 4단계 용량으로 설정하였다. 또한, 각각 음성대조군과 양성대조군을 두었으며 시험군은 다음과 같이 설정하였다.

시험법	S9 mix	처리시간	양성대조
단시간처리법	+	단시간처리 (6hr)	CP
	-	단시간처리 (6hr)	MMC
연속처리법	-	연속처리 (24hr)	MMC

## 8) 시험방법

### (1) 처리농도결정시험

대사활성계는 음성대조군 및 시험물질군의 배양액에 S9 혼합물을 첨가하여 6시간 배양하였다. 그 후 phosphate buffer saline (PBS, Invitrogen)로 세척하고 새 배양액으로 교체하여 18시간 배양하였다. 비대사활성계는 S9 혼합물을 첨가하지 않은 음성대조군 및 시험물질 배양액을 단시간처리군과 연속처리군으로 나누었다. 단시간처리법은 시험물질을 6시간 배양한 다음 PBS로 세척하고 새 배양액으로 교체하여 18시간 배양 하였다. 연속처리법은 24시간 연속 배양하였다.

세포에 0.05% trypsin-EDTA 용액을 첨가하여 배양 플레이트 바닥으로부터 세포를 분리 하고, 분리한 세포는 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 새 배양액으로 세포를 현탁하였다. 그리고 hemacytometer를 이용하여 세포를 계수하였다.

### (2) 본시험

단시간처리법의 대사활성계는 음성대조, 시험물질 및 양성대조 (CP)를 함유한 배양액에 S9 혼합물을 첨가하여 6시간 배양하였다. 그 후 PBS로 세척하고 새 배양액으로 교체하여 18시간 배양하였다. 단시간처리법의 비대사활성계는 음성대조, 시험물질 및 양성대조물질 (MMC)을 함유한 배양액에 6시간 배양한 다음 PBS로 세척하고 새 배양액으로 교체하여 18시간 배양 하였다. 연속처리법의 비대사활성계는 24시간 연속 배양하였다. 용량당 2개의 plate를 사용하였다.

## 9) 슬라이드 제작

(1) 세포 수거 2시간 전에 colcemid (Invitrogen, U.S.A.) 용액을 최종농도가 1 µM 또는 0.25 µg/mL가 되도록 처리하였다. 배양 종료 후 0.05% trypsin-EDTA 용액을 첨가하여 배양플레이트 바닥으로부터 세포를 분리 하고, 분리된 세포는 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 세포를 수거 한 후 0.075 mol/L KCl 수용액을 첨가하여 37°C에서 30분간 방치하였다. 그 후 냉각 고정액 (methanol : acetic acid = 3 : 1)을 첨가하여 1,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 반고정하였다. 그 후 vortex mixer하면서 3 mL의 냉각 고정액을 첨가하여 2,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 세포를 고정하고, 이를 2회 이상 반복하여 각 플레이트당 2매씩 검체를 제작하였다.

(2) 5% Giemsa 용액으로 30분간 염색하여 200개의 분열중기세포에서 염색체 이상을 계수하였다.

### 10) 관찰

단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 슬라이드 검체를 관찰하였다.

(1) 한 용량 당 최소 200개의 분열중기세포를 현미경의 1,000배 배율로 관찰하며, 염색체 구조이상 (structural aberration)과 수적이상 (numerical aberration) 유무를 관찰하였다.

(2) 구조이상은 염색분체형 (chromatid type)과 염색체형 (chromosome type)으로 구분하여 계수하였다.

구조이상 (structural aberration)	수적이상 (numerical aberration)
염색분체형 gap (ctg)	배수체 (poly)
염색분체형 절단 (ctb)	핵내변화 (endo)
염색분체형 교환 (cte)	
염색체형 gap (csg)	
염색체형 절단 (csb)	
염색체형 교환 (cse)	
Fragment (frg)	

### 11) 시험적합성의 판정

염색체이상시험은 다음의 판정기준을 만족하여 그 결과가 적합하다고 판정하였다.

- (1) 음성대조군 및 양성대조군의 염색체이상세포수가 historical data 범위 내에 있어야 한다.
- (2) 오염이 없어야 한다.

### 12) 평가방법

(1) 염색체이상의 분류는 일본환경변이원학회 (JEMS) 포유동물시험분과회 (MMS)판 ‘염색체 이상 아틀라스 (1988)’에 의하였다.

(2) 각 처리 농도당 200개의 분열중기세포에서 염색체이상의 수를 표시하였다.

(3) 구조이상은 크게 염색체형과 염색분체형으로 구별해 계수하였다.

(4) Gap은 염색분체의 폭보다 좁은 결손으로 분류하고 계수하되 염색체이상에 포함시키지 않았다.

(5) 수적이상은 4배수체 이상인 polyploid 및 endoreduplication만을 평가하였다.

(6) 구조이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고, 양성세포의 출현 빈도를 염색체이상빈도로 하였다.

### 13) 자료의 통계처리

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도는 SAS 프로그램을 사용하며, Fisher's exact test (Altman, 1993)에 의해 음성대조군과 시험물질군 및 음성대조군과 양성대조군의 유의차 검증을 실시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 1) 처리농도결정시험 (Figure 1)

처리농도결정시험의 결과, 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성계와 비대사활성계 및 연속처리법의 비대사활성계 모두 5,000 µg/mL의 용량에서 관찰되었다.

또한, 대사활성계는 세포독성이 관찰되지 않았으나, 단시간처리법의 비대사활성계 및 연속처리법의 비대사활성계 모두 50% 세포성장억제가 관찰되어 IC<sub>50</sub> 값을 확인하였다. 그 결과, 단시간처리법의



비대사활성계의 IC<sub>50</sub> 값은 3881.8 µg/mL, 연속처리법의 비대사활성계의 IC<sub>50</sub> 값은 820.0 µg/mL이었다.

따라서 본시험의 최고용량은 단시간처리법의 대사활성계의 경우 침전이 나타난 5,000 µg/mL으로 결정하였다. 또한 세포독성이 나타난 비대사활성계의 경우, 단시간처리법의 비대사활성계 및 연속처리법의 비대사활성계의 최고용량은 각각 5,000 µg/ml과 850 µg/mL으로 결정하였다. 단시간처리법의 대사활성계는 최고용량을 포함하여 공비 2의 3단계 용량으로 설정하고, 비대사활성계의 경우 공비 2의 4단계 용량으로 설정하였다. 또한, 각각 음성대조군과 양성대조군을 두었다.

## 2) 본시험 (Table 1)

본시험의 결과, 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성계와 단시간처리법의 비대사활성계의 5,000 µg/mL 용량에서 관찰되었다.

단시간처리법의 대사활성계의 경우 1,250, 2,500 및 5,000 µg/mL의 분열중기세포를 관찰한 결과, 염색체의 구조 및 수적 이상빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0%로 확인되었다. 단시간처리법의 비대사활성계의 경우 최고용량인 5,000 µg/mL 용량에서는 200개의 분열중기세포를 관찰할 수 없었고, 625, 1,250 및 2,500 µg/mL의 분열중기세포를 관찰한 결과, 염색체의 구조 및 수적 이상빈도는 각각 0.0, 0.0 및 1.0%로 확인되었다. 연속처리법의 비대사활성계의 경우 106.3, 212.5, 425 및 850 µg/mL의 분열중기세포를 관찰한 결과, 염색체의 구조 및 수적 이상빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0%로 확인되었다.

또한, 단시간처리법의 대사활성계와 단시간처리법의 비대사활성계, 연속처리법의 비대사활성계의 양성대조군의 경우 염색체의 구조 및 수적 이상빈도는 각각 12.5, 13.5 및 24.5%로 확인되었다.

따라서, 모든 처리군은 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 반면에 단시간처리법의 대사활성계와 비대사활성계, 연속처리법의 비대사활성계의 양성대조물질은 음성대조군과 비교하여 통계적으로 현저하게 염색체이상을 유발하였다 (Fisher's exact test,  $P < 0.05$ ).

음성대조군 및 양성대조군의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 historical control data의 범위 안에 있는 것으로 확인되었다 (Appendix 1).

## 4. 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 초음파처리 인삼꽃대 추출물은 염색체이상을 유발하지 않는다고 판단된다.

FIGURE

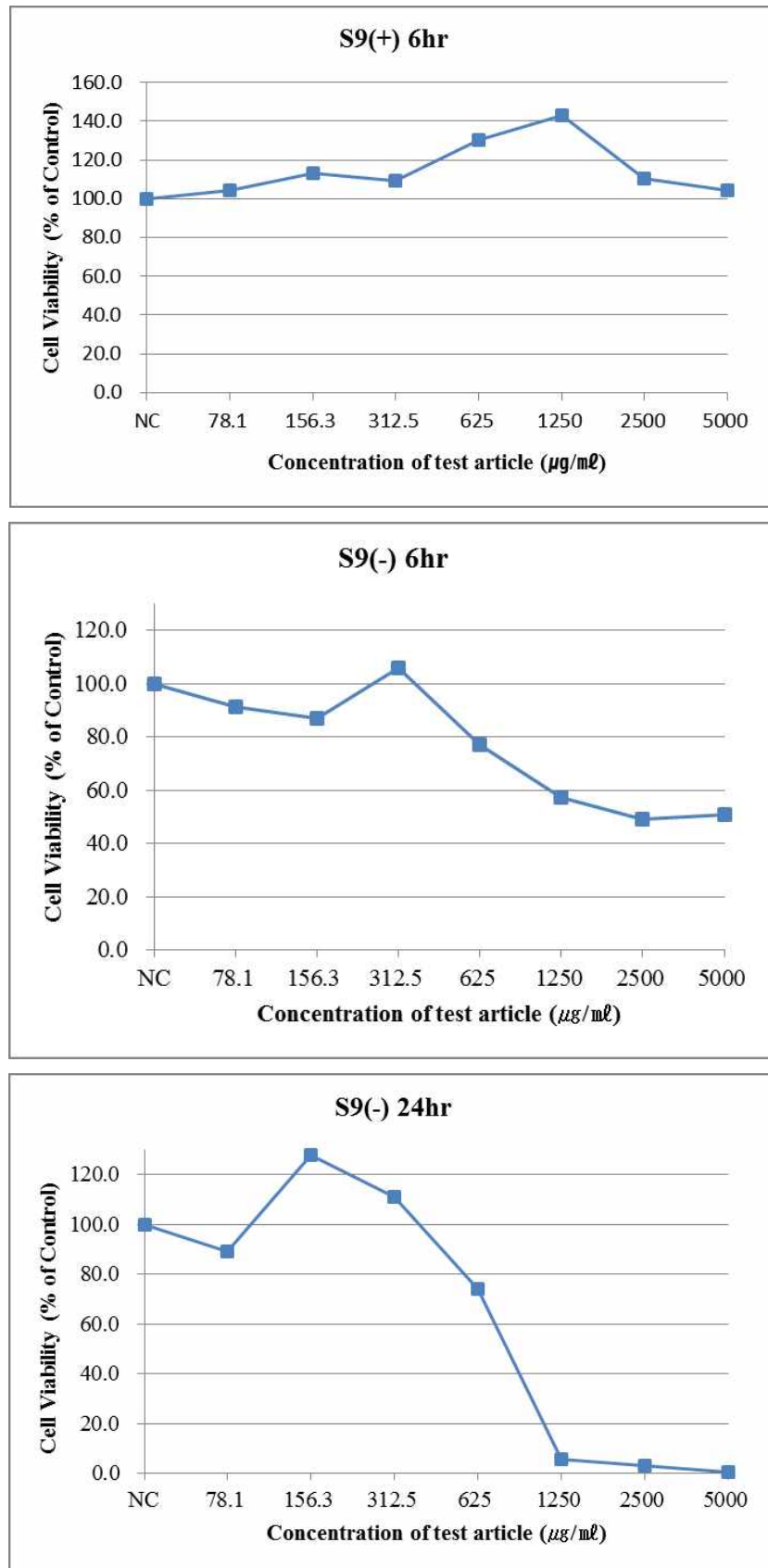


Figure 1. Results of a dose range finding study

TABLE

Table 1. Summary of results obtained from chromosome aberration test (main study)

S9 mix	Exposure period (hours)	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	No. of cells analyzed	csg	ctg	csb	ctb	cse	cte	frg	poly	endo	Normal cell	Structure aberrations		Numerical aberrations (%)		
														-gap cell (%)	+gap cell (%)			
+	6	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0.0	0.5	0.0	
			100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	99				
		1250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0.0	0.0	0.0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100				
		2500	100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0.0	0.5	0.0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100				
		#5000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0.0	0.0	0.0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100				
		5 (PC:CP)	100	3	7	0	0	5	12	0	0	0	0	89	12.5*	12.5	0.0	
			100	7	5	1	1	3	15	0	0	0	0	86				
		-	6	NC	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	98	0.0	1.0	0.0
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
625	100			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0.0	0.5	0.0	
	100			0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	99				
1250	100			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0.0	0.0	0.0	
	100			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100				
2500	100			0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	99	1.0	1.5	0.0	
	100			1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	98				
0.1 (PC:MMC)	100			3	2	6	4	0	8	0	0	0	0	85	13.5*	15.0	0.0	
	100			1	3	4	3	0	8	0	0	0	0	85				
24	NC			100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0.5	1.0	0.0
				100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	99			
	106.3		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0.0	0.0	0.0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100				
	212.5		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0.0	0.0	0.0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100				
	425		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0.0	0.5	0.0	
			100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	99				
	850	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0.0	0.0	0.0		
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100					
	0.1 (PC:MMC)	100	2	8	7	5	1	19	0	0	0	0	73	24.5*	28.5	0.0		
		100	2	8	11	11	0	23	0	0	0	0	70					

ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break,

cse: chromosome exchange, ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, frg: fragment

poly: polyploid, endo: endoreduplication,

NC: Water for injection

CP: Cyclophosphamide monohydrate (5  $\mu\text{g/mL}$ ), MMC: Mitomycin C (0.1  $\mu\text{g/mL}$ )

\*:  $P < 0.05$ , significant differences between control and treatment group by Fisher's exact test

#: Precipitation

APPENDICES

Appendix 1. Historical control data of negative control in chromosome aberration test

CA Historical control data

Group	Hour	S9 mix	N	Structural aberration cells excluding gap(%) (Mean ± SD)			MIN (%)	MAX (%)
Negative control	6h	+	75	0.2	±	0.4	0	<5
		-	75	0.3	±	0.5	0	<5
	24h	-	75	0.3	±	0.4	0	<5
Positive control	6h	+	75	23.8	±	8.1	8*	40*
		-	75	17.7	±	5.5	7*	29*
	24h	-	75	26.1	±	7.0	12*	40*

Group	Hour	S9 mix	N	Numerical aberration cells (Mean ± SD)			MIN (%)	MAX (%)
Negative control	6h	+	75	0.0	±	0.0	0	<5
		-	75	0.0	±	0.0	0	<5
	24h	-	75	0.0	±	0.0	0	<5
Positive control	6h	+	75	0.0	±	0.0	0	0
		-	75	0.0	±	0.1	0	0
	24h	-	75	0.0	±	0.0	0	0

N: chromosome aberration test total number

\* : Mean ± 2SD

Appendix 2. Certificate of analysis for CHL cell



Certificate of Analysis for ATCC® CRL-1935™

ATCC® Catalog Number: CRL-1935™  
 Designation: CHL/IU  
 Lot Number: 3375917

Test	Specifications	Results
Post-Freeze Viability	≥ 50% average	92% average (range of 89% to 98%)
Morphology	Fibroblast-like	Fibroblast-like
Mycoplasma Contamination (Hoechst DNA Stain and Direct Culture Methods)	None Detected	None Detected
Post-Freeze Cell Growth	Cells are able to be successfully subcultured for two passages post-freeze	Cells are able to be successfully subcultured for two passages post-freeze
Interspecies Determination (Isoenzyme Analysis)	Hamster, Chinese	Hamster, Chinese
Bacterial and Fungal Contamination	None Detected	None Detected

*Kim Ellis*

Kim Ellis  
 Quality Control Supervisor, BioProduction

06 December 2006

Date

ATCC hereby represents and warrants that the material provided under this certificate has been subjected to the tests and procedures specified and that the results described, along with any other data provided in this certificate, are true and correct to the best of ATCC's knowledge and belief.

This product is intended to be used for research purposes only. It is not to be used for drug or diagnostic purposes nor is it intended for human use. ATCC® products may not be resold, modified for resale, used to provide commercial services or to manufacture commercial products without ATCC's prior written agreement.

© 2006 ATCC. All rights reserved.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection.

American Type Culture Collection  
 P.O. Box 1549  
 Manassas, VA 20108 USA  
 www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700  
 Fax: 703-365-2750  
 E-mail: tech@atcc.org  
 or contact your local distributor.

Appendix 3. S9 fraction quality control statement

# MOLTOX<sup>®</sup>

Molecular Toxicology, Inc.

## POST MITOCHONDRIAL SUPERNATANT (S9) QUALITY CONTROL & PRODUCTION CERTIFICATE

---

<b>Animal Information</b> SPECIES: <u>Rat</u> STRAIN: <u>Sprague Dawley</u> SEX: <u>Male</u> AGE: <u>5 - 6 weeks</u> WEIGHT: <u>175 - 199 g</u> TISSUE: <u>Liver</u>	<b>Part Number Information</b> LOT NO.: <u>3388</u> PART NO.: <u>11-01L</u> VOLUME: <u>2.1 mL</u> BUFFER: <u>0.15 M</u> <u>KCl/Lyophilization Buffer</u> STORAGE: <u>At or below -20°C</u>	PREP: <u>December 19, 2014</u> EXPIRY: <u>December 19, 2016</u> INDUCING AGENT: <u>Aroclor</u> <u>1254, (Monsanto KL615), 500</u> <u>mg/kg i.p.</u>
--	--	---

---

REFERENCE: Maron, D & Ames, B., *Mutat Res*, **113**: 173, 1983. **For Research Purposes Only**

**BIOCHEMISTRY:** Assayed according to the method of Lowry et al., *JBC* **193**:265, 1951 using bovine serum albumin as the standard.

- PROTEIN: 34.6 mg/ml

- ALKOXYRESORUFIN-0-DEALKYLASE ACTIVITIES

<u>Activity</u>	<u>P450</u>	<u>Fold - Induction</u>	
BROD	2B1, 2B2	29.1	Assays for ethoxyresorufin-0-deethylase (EROD), pentoxy-, benzyl- and methoxyresorufin-0-dealkylases (PROD, BROD, & MROD) were conducted using a modification of the methods of Burke, et al., <i>Biochem Pharm</i> <b>34</b> :3337, 1985. Fold-inductions were calculated as the ratio of the sample vs. uninduced specific activities (SA's). Control SA's (pmoles/min/ mg protein) were 184, 92.4, 226.7, & 15.5 for BROD, EROD, MROD and PROD, respectively.
EROD	1A1, 1A2	104.7	
MROD	1A1, 1A2	10.1	
PROD	2B1, 2B2	110.6	

**BIOASSAY:**

- TEST FOR THE PRESENCE OF ADVENTITIOUS AGENTS  
 Samples of S-9 were assayed for the presence of contaminating microflora by plating 1.0 ml volumes on Nutrient Agar and Minimal Glucose (Vogel-Bonner E, supplemented with 0.05 mM L-histidine and D-biotin) media. Duplicate plates were read after 40 - 48 h incubation at 35 ± 2°C. The tested samples met acceptance criteria.

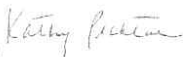
- PROMUTAGEN ACTIVATION  
 The ability of the sample to activate ethidium (EtBr) and cyclophosphamide (CPA) to intermediates mutagenic to TA98 and TA1535, respectively, was determined according to Lesca, et al., *Mutation Res* **129**: 299, 1984. Data were expressed as revertants per µg EtBr or per mg CPA.

No. His+ Revertants						
<u>TA98</u>	<u>TA1535</u>					
354.8	900					

Dilutions of the sample S9, ranging from 0.2 - 10% in S9 mix, were tested for their ability to activate benzo(α)pyrene (BP) and 2-aminoanthracene (2-AA) to intermediates mutagenic to TA100. Assays were conducted as described by Maron & Ames, (*Mutat Res* **113**: 173, 1983).

<u>µl S9 per plate/number his<sup>-</sup> revertants per plate</u>						
<u>Promutagen</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>5</u>	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>50</u>
BP (5 µg)	83	124	266	367	647	852
2-AA (2.5 µg)	98	293	1292	1943	1881	1726

---

Approved:  12/29/14

MOLECULAR TOXICOLOGY, INC.
www.moltox.com
(828) 264-9099

#### 4) 비알코올성지방간에 효과가 우수한 인삼꽃대 제제의 세포수준에서 스크리닝

##### 가. 연구수행 방법

###### (1) 세포배양 및 세포 생존율 측정

HepG2 Human hepatoma cell line은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS), 100 unit/ml penicilin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 세포 독성을 확인하기 위해 HepG2 cell을 96-well plate에 3x10<sup>4</sup> cell/well 로 seeding하여 24 h 후 인삼꽃대추출물을 농도별로 처리하였다. 24 h 후 Cell Titer 96 Aqueous One solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 생존율을 측정하였다.

###### (2) 세포내 지방 축적 유도

세포 내에 지방 축적을 유도하여 지방간의 세포모델을 만들기 위해 HepG2 cell을 6-well plate에 1x10<sup>5</sup> cell/well로 seeding하였다. Seeding 24시간 후 palmitate와 oleate를 1:2 비율로 섞은 유리지방산 (free fatty acid; FFA) mixture를 1 mM로 처리하여 1% BSA-DMEM에 세포를 배양하여 지방 축적을 유도하였다.

###### (3) 간세포 초대 분리배양

지방간의 세포 분리배양을 위하여 3주령 male SD rat을 60% Kcal fat 고지방식으로 3주간 사육하였다. Zoletil과 rompun으로 마취된 rat에서 2-step 콜라게나아제 관류법으로 간세포를 수집한 후 원심분리를 통하여 간세포만을 분리하였다. 간세포의 생존율은 trypan blue 염색으로 확인하였고, 생존율 90% 이상의 세포만 사용하였다. 분리된 간세포는 collagen-coating 6-well plate에 10% FBS, 100 unit/ml penicilin/streptomycin이 함유된 DMEM에 10 nM dexamethasone과 10 nM insulin을 첨가하여 안정화를 시켰고, 6 h 후 10% FBS, 100 unit/ml penicilin/streptomycin이 함유된 DMEM으로 바꾸어 배양하였다.



[그림 1] 좌 - 일반식이 섭취 Rat (콜라게나아제 처리 후),  
우 - 고지방식이 섭취 Rat (콜라게나아제 처리 전)

(4) Oil Red O 염색법

염색할 세포를 ice-cold phosphate buffered saline (PBS)로 3회 washing한 후 10% formaldehyde로 1시간 고정하였다. Oil Red O dye로 1시간 동안 염색한 다음 3차 증류수로 washing하여 광학현미경 (Olympus CKX41, Tokyo, Japan) 으로 관찰하였다. 관찰 후 isoprophyl alcohol로 세포내 지방에 염색된 Oil Red O dye를 탈염색 한 후 540 nm로 흡광도를 측정하여 세포내의 lipid 축적량을 정량적으로 확인하였다.

(5) 세포내 중성지방 측정

세포내 중성지방을 정량적으로 측정하기 위하여 세포를 ice-cold PBS로 2회 washing한 후 lysis buffer (1x PBS, 2% triton X-100)으로 lysed 시켰다. Cell lysate를 원심분리하여 상층액을 취한 후 아산셋트 중성지방 측정용 시액을 이용하여 중성지방량을 측정하였으며 이때 보정은 단백질 농도로 하였다.

(6) Quantitative RT-PCR

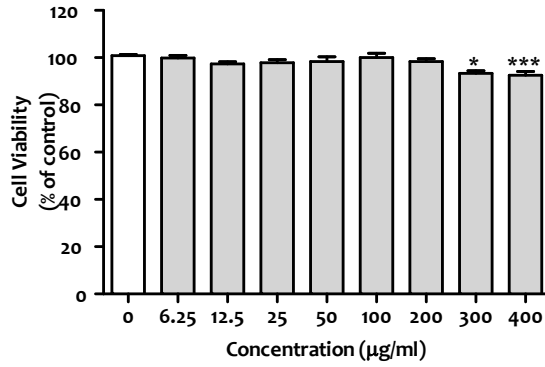
Total RNA는 EASY-BLUE total RNA extraction kit (Intron Biotechnology Inc, Seoul, Korea)를 이용하여 분리하였다. Single-strand cDNA는 5 µg RNA, Oligo(15)dT primer, reverse transcriptase를 이용하여 합성하였다. 합성된 cDNA와 SYBR premix Ex Taq을 총 볼륨 20 µl로 하여 StepOnePlus™ Real-time PCR (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)를 사용하여 타겟 유전자를 증폭시켰다. 반응 조건은 95°C 15 min 후 40 cycle의 95°C 30 s denaturation, annealing 30s, 72°C에서 1 min extension으로 하였다. 이때 유전자의 발현량은 GAPDH와 CPN을 대조군으로 사용하여  $\Delta\Delta Ct$ 법으로 계산하였다.



나. 연구수행 결과

1) Human hepatoma cell line (HepG2)에서 인삼꽃대추출물이 중성지방 축적에 미치는 영향

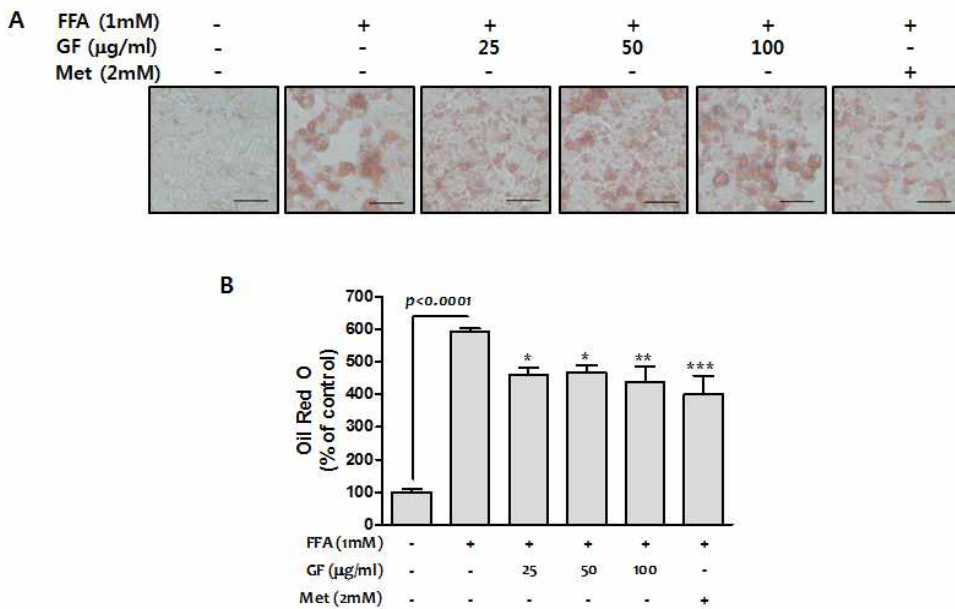
(1) 세포 생존율



[그림 2]

HepG2 세포에 인삼꽃대 (GF)를 0-400 µg/ml 농도로 24시간 처리하여 세포 독성을 확인한 결과 control과 비교하였을 때 200 µg/ml 까지는 세포 독성이 없음을 확인하였고 300 µg/ml 이상에서 세포 생존율이 감소함을 확인하였다 (그림 2). 하지만 200 µg/ml에서 세포의 morphology 가 변하는 것이 확인되어 인삼꽃대 시료의 농도는 100 µg/ml을 최대치로 하여 다음 실험을 진행하였다.

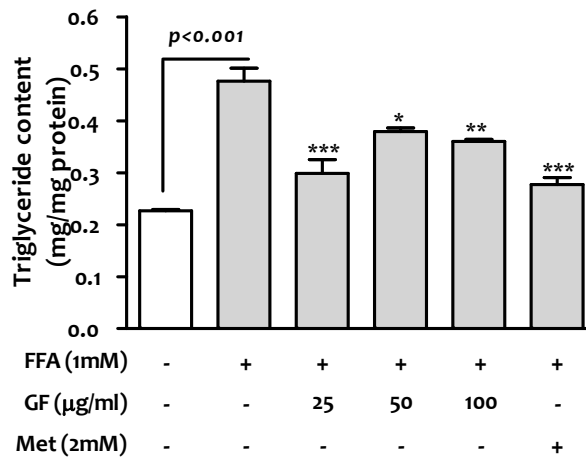
(2) Oil Red O staining



[그림 3]

인삼꽃대의 lipid accumulation 억제 효과를 확인하기 위하여 인삼꽃대를 2시간 전 처리한 후 free fatty acid mix로 지방 축적을 24 시간 유도하여 Oil Red O staining으로 확인하였고, 이 때 metformin을 양성대조군으로 사용하였다. 결과, 인삼꽃대 처리 시 농도 의존성은 보이지 않았으나 (25, 50, 100 µg/ml에서 각각 22.2%, 20.9%, 26.1%) free fatty acid mix에 의한 세포 내 지방 축적이 억제됨을 알 수 있었다 (그림 3).

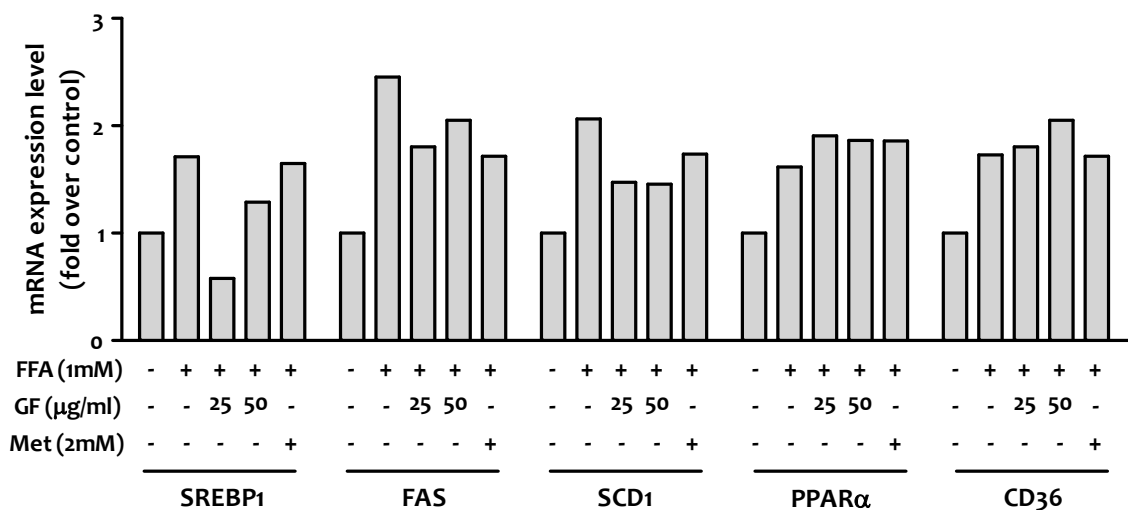
(3) 세포 내 중성지방 측정



[그림 4]

인삼꽃대의 지방 축적 억제 효과를 정량적으로 확인하기 위하여 세포 내 중성지방을 측정해본 결과 인삼꽃대 처리 시 중성지방 축적이 25, 50, 100 µg/ml에서 각각 37.3%, 20.4%, 24.3% 감소함을 확인할 수 있었지만 앞의 결과와 마찬가지로 농도 의존적인 경향은 보이지 않았다 (그림 4).

(4) 지방생성 및 분해 관련 유전자들의 발현에 미치는 영향



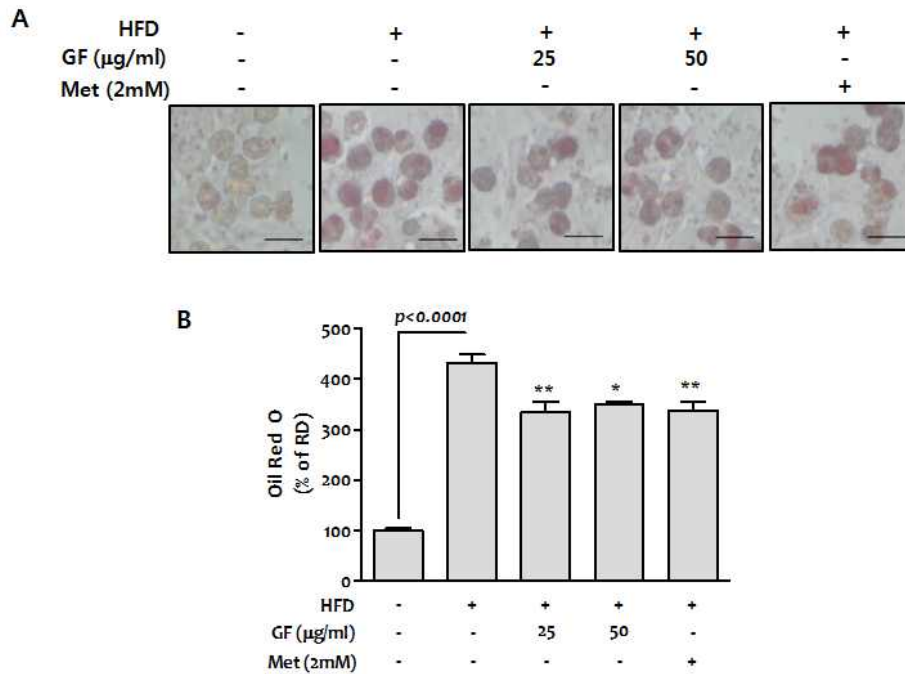
[그림 5]

인삼꽃대 시료의 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 qPCR을 시행한 결과, 중성지방 생성

관련 전사인자 및 타겟 효소 (SREBP1, FAS, SCD1) 발현은 억제시키는 경향을 나타내었고, 반면 중성 지방 분해 관련 유전자 (PPAR $\alpha$ , CD36) 발현에는 영향이 미비함을 관찰하였으나 (그림 5) 실험의 n수가 부족하여 통계적 유의성 확인이 이루어 질 수 없었으므로 재 실험이 진행되어야 한다.

2) Liver primary culture cell에서 인삼꽃대추출물이 중성지방 축적에 미치는 영향

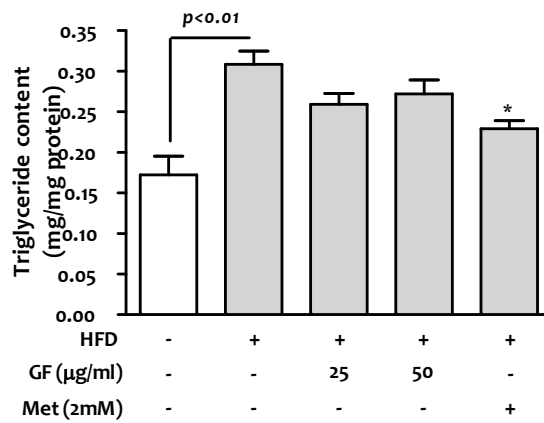
(1) Oil Red O staining



[그림 6]

인삼꽃대추출물의 지방간에 대한 약리활성을 검토하고자 고지방식이 (HFD; 60% Kcal from fat)로 3주간 사육하여 지방간을 유도한 SD rat으로 부터 간세포를 분리 배양하여 인삼꽃대의 약효를 확인하였다. 3주간의 고지방식으로 간세포 내에 지방이 축적된 것을 그림 6에 왼쪽 2개 패널에서 확인 할 수 있다. 분리된 간세포에 인삼꽃대 추출물을 처리하였을 때 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 독성을 나타내었기에 실험 농도는 최대 50  $\mu\text{g/ml}$ 로 하였다. HepG2에서 확인 된 인삼꽃대의 지방축적 억제 효과는 HFD로 사육한 rat의 간세포에서도 지방축적이 감소됨 (25, 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 22.4%, 19.3%) 을 보여 그 효과를 검증하였다 (그림 6).

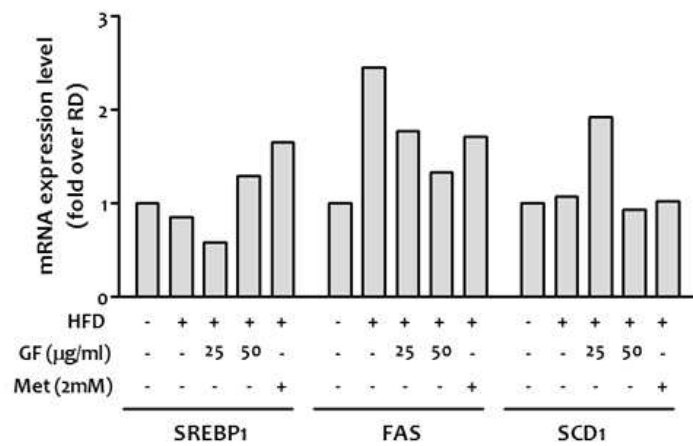
(2) 세포 내 중성지방 측정



[그림 7]

그림 7은 3주간 고지방식으로 사육한 SD rat 의 간세포를 초대 분리배양 후 인삼꽃대를 24시간 처리 하였을 때의 세포내 중성지방량을 측정된 것이다. 고지방식에 의해 간세포 내에 축적된 중성지방량이 인삼꽃대 추출물에 의해 줄어드는 경향 (25, 50 μg/ml에서 15.9%, 11.8%)을 확인할 수 있다.

(3) 지방 생성 관련 유전자들의 발현에 미치는 영향



[그림 8]

그림 8은 인삼꽃대 시료의 지방 생성 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 primary cultured hepatocyte에서 qPCR로 확인한 것이다. 결과, 인삼꽃대 시료의 농도에 따라 상이한 결과를 보였으며 양성대조군인 metformin 역시 그 결과가 유의하다고 판단할 수 없기에 재 실험을 진행하기로 하였다.

## 5) 인삼꽃대의 수집

### 가. 인삼꽃대 수집 및 건조

인삼꽃대(충청북도 음성군 남성업 재배)는 2014년 5월 15일 수집한 것을 일건하였다.



### 나. 인삼꽃대 추출 농축

인삼꽃대를 증류수로 2시간 2회 반복 추출하여 20브릭스로 농축하였다.



## 6) 기능성 성분 대량 분리 동정

### ○ 인삼 꽃대 성분 대량 분리 동정(ginsenoside Re, Rg2)

#### 가. 실험 재료 및 엑스의 조제

##### (1) 실험 재료

본 연구에 사용한 인삼꽃대(Ginseng flower buds, *Panax ginseng*)는 충청북도 음성에서 2014년 5월 10일에 4년근 인삼꽃대 10kg을 채집하였고, 건조는 음성의 충북인삼영농조합법인에서 시행하였다. 각각의 제품표본은 고연 연구실에 보관하고 있다. (Fig. 1.)



Fig. 1. Figure of Ginseng Flower buds

##### (2) 초음파 처리 인삼꽃대 조성물 조제

인삼꽃대에 100 kg에 증류수 600 ℓ를 가하여 초음파처리기에 넣고, 출력 1200W, 주파수 28KHz 100°C에서 16시간 초음파 처리를 시행하였다.

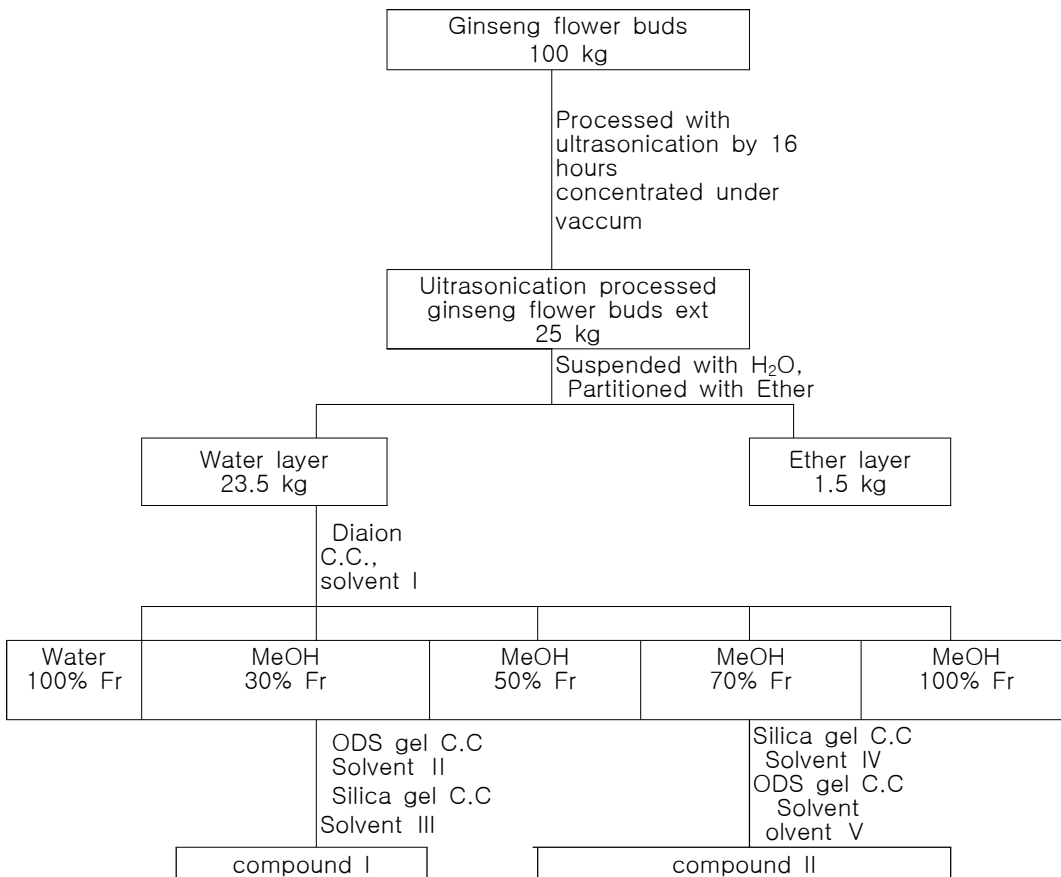
##### (3) 초음파 처리 인삼꽃대 조성물로부터 주 사포닌의 분리

###### ① 초음파 처리 인삼꽃대 조성물로부터 사포닌 분획의 추출

초음파 처리 인삼꽃대 조성물 25 kg을 증류수에 현탁하여 분획 깔때기에 넣고 Diethyl Ether넣어 shaking 하여 진탕하고 방치한 후 Ether를 제거한다. 이 방법을 10회 처리하여 Diethyl Ether 분획(1.5 kg), 물 분획(23.5 kg)을 얻었다.

② 초음파 처리 인삼꽃대 조성물로부터 사포닌 분획과 인삼사포닌의 분리

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



Scheme 1. Extraction and Isolation ginsenosides from ginseng flower buds

- \*Solvent I : 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH, 100% MeOH 순차적으로 치환
- \*Solvent II : 30% MeOH, 100% MeOH 순차적으로 치환
- \*Solvent III: CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 70:30:4 v/v
- \*Solvent IV: CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 7:3:1 v/v
- \*Solvent V: 70% MeOH, 100% MeOH 순차적으로 치환



Fig. 2. 대용량 컬럼크로마토그램(silica gel)



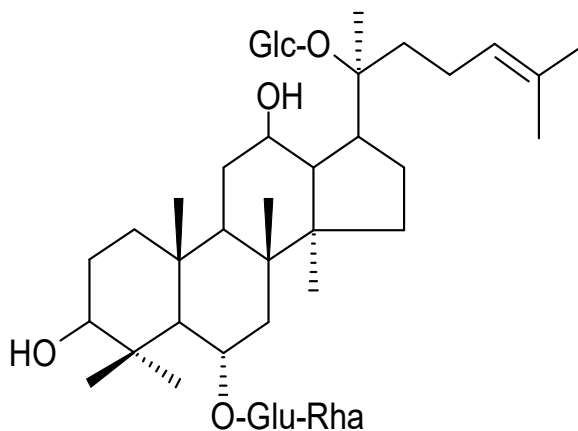
### (3) 인삼꽃대로부터 주 사포닌의 화학구조 동정

#### ① Compound I의 화학구조 동정

Compound I의 TLC Rf값은 0.5(CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 65 : 35 : 8/kieselgel 60 F254 Merk)이고(Fig. 5.), UV 램프(254, 365 nm)하에서 아무 반점을 확인할 수 없었으나, 묽은 황산으로 가열하여 적자색으로 발색됨으로서 인삼사포닌으로 추정할 수 있었으며,(Fig.5.) <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 δ 0.97ppm으로부터 δ 2.13ppm까지 8개의 methyl singnal이 나타나고 있으며, δ 3.476ppm에서의 doublet은 H-3의 anomeric proton이고, δ 3.935과 δ 4.491에서의 doublet은 당으로부터 기인하는 singnal로 나타났으며, δ 4.179의 singnal은 H-12의 singnal임을 알수있고, δ 5.190의 singnal은 H-24의 olefinic singnal임을 알 수 있었다.

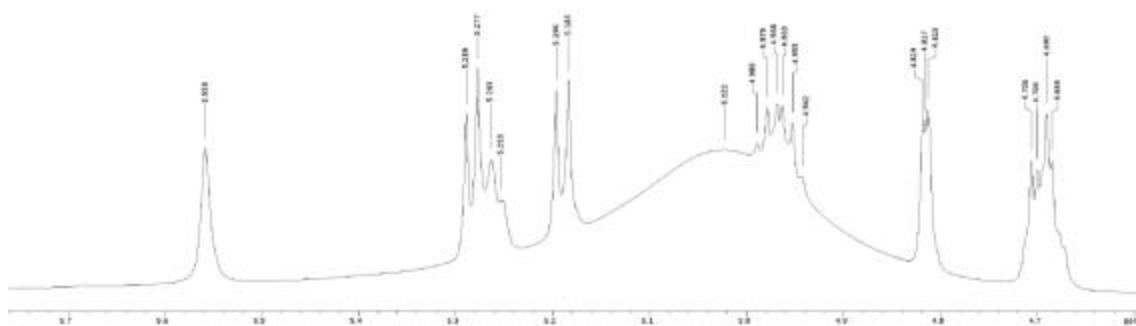
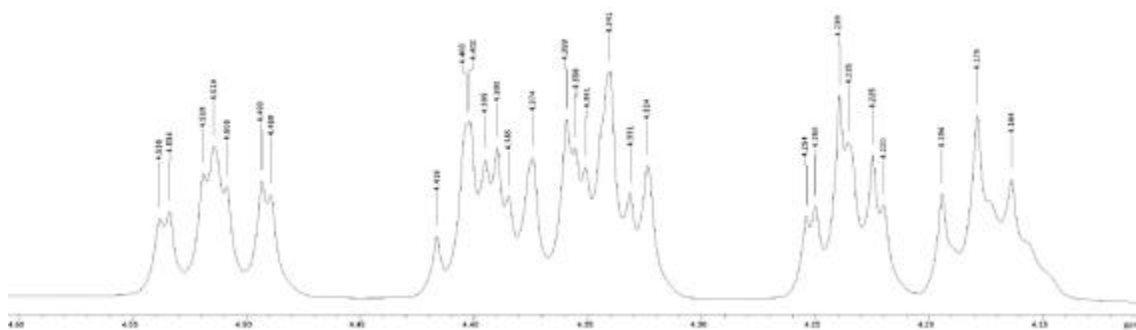
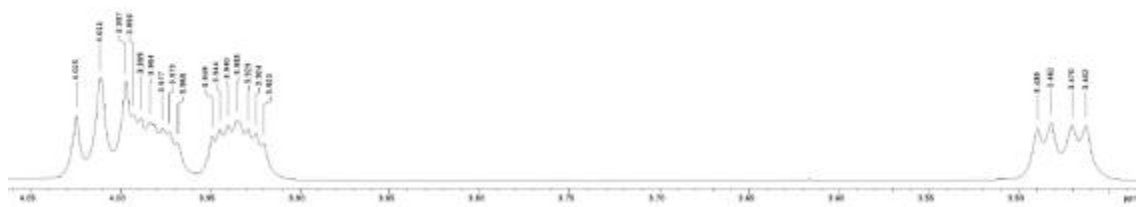
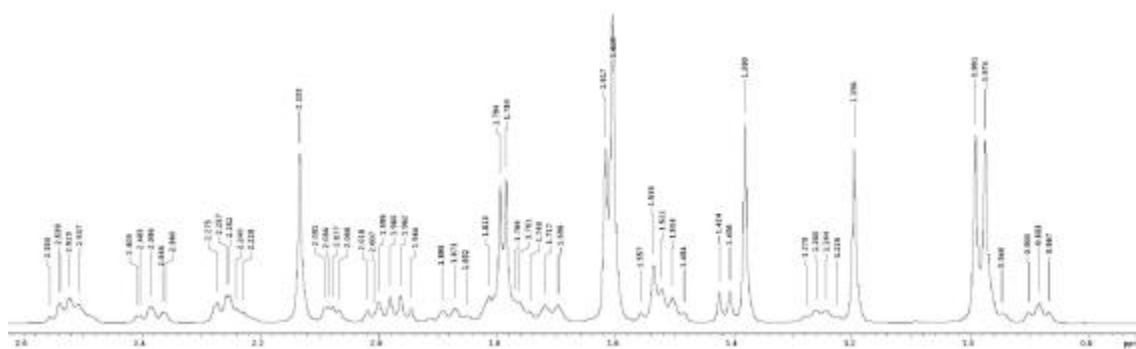
<sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 C-24와 C-25가 126.005ppm과 131.082ppm의 저자장에서 확인되었으며, 당으로부터 기인하는 C-1'''가 98.302ppm에서 확인되었고, C-3는 78.619ppm에서 확인되었다. 이러한 결과들은 인삼(*Panax ginseng*)으로부터 추출 분리되었던 (20S)-ginsenoside Re의 문헌 data와 일치하였다. 따라서, Compound I을 (20S)-ginsenoside Re로 동정하였다.

Fig. 3. Chemical structures of compound I



compound II : ginsenoside-Re

<sup>1</sup>H-NMR spectra of compound I (d<sub>5</sub>-Py)



<sup>13</sup>C-NMR spectra of compound I (d<sub>5</sub>-Py)

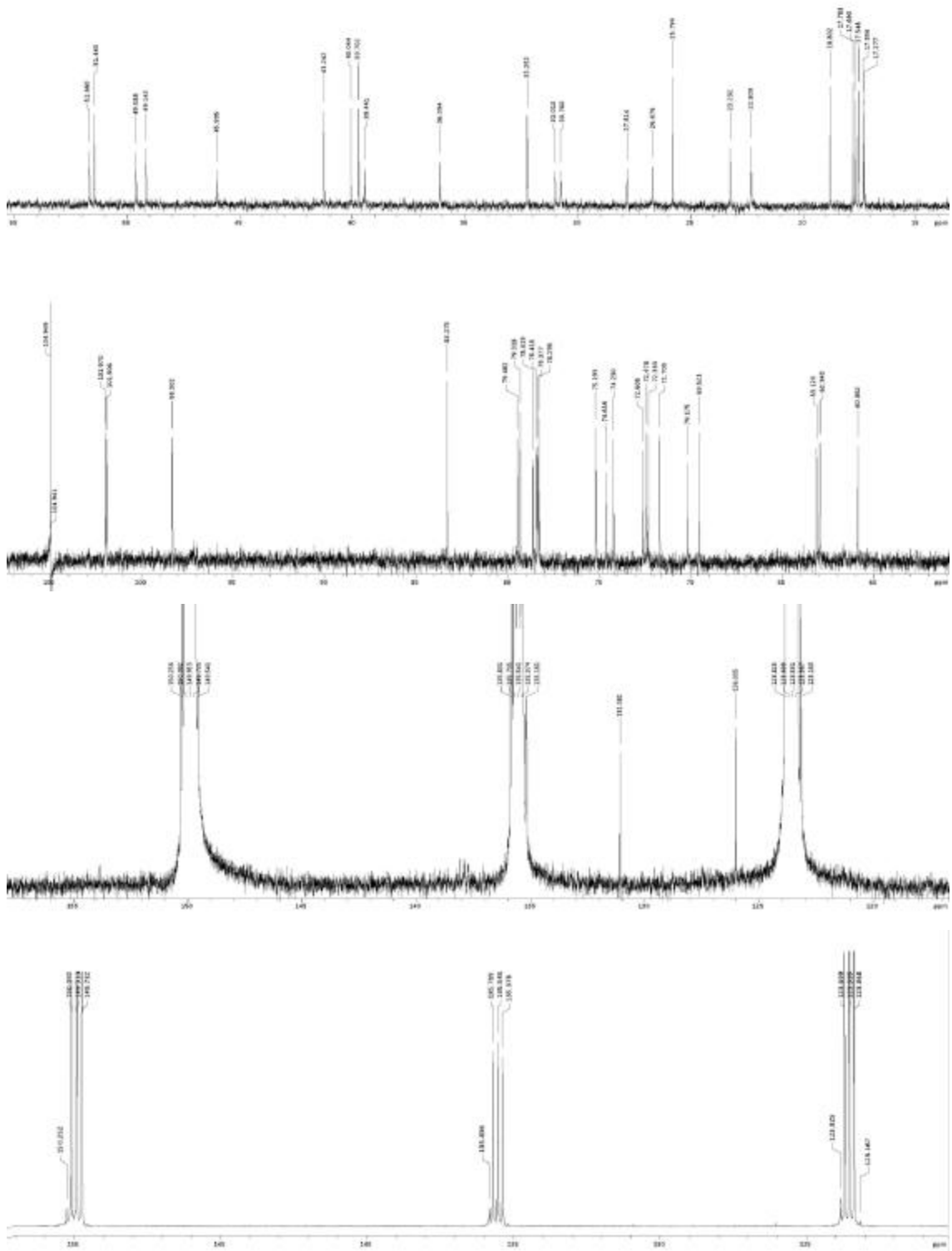


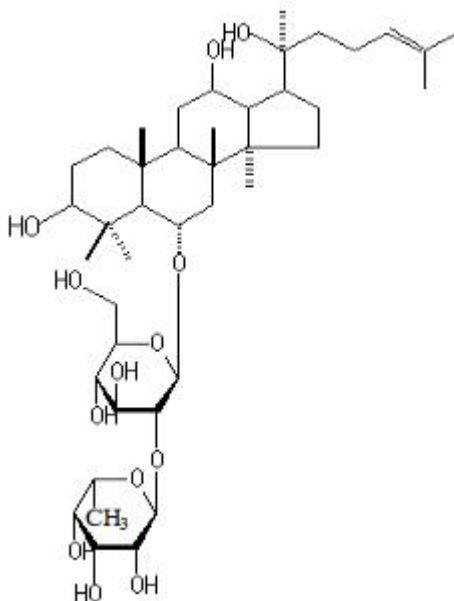
Table. 1. Chemical shifts of compound I in  $^{13}\text{C}$ -NMR

Carbon No.	G-Re	Compound I
C-1	39.4	39.441
C-2	27.4	27.814
C-3	78.7	78.619
C-4	39.8	40.044
C-5	60.7	60.862
C-6	74.6	74.616
C-7	45.7	45.955
C-8	41	41.242
C-9	49.4	49.588
C-10	39.4	39.702
C-11	30.6	30.760
C-12	70.4	70.175
C-13	48.8	49.142
C-14	51.3	51.440
C-15	30.6	31.013
C-16	26.5	26.676
C-17	51.8	51.660
C-18	17.5	17.548
C-19	17.2	17.277
C-20	83.2	83.275
C-21	22.4	22.309
C-22	35.8	36.054
C-23	23.3	23.232
C-24	125.7	126.005
C-25	130.9	131.082
C-26	25.7	25.794
C-27	17.5	17.693
C-28	32	32.252
C-29	17.2	17.336
C-30	17.5	17.783
6-O-Glc 1	101.6	101.906
6-O-Glc 2	79.1	79.318
6-O-Glc 3	78	78.295
6-O-Glc 4	72.1	72.333
6-O-Glc 5	78	78.377
6-O-Glc 6	62.7	63.120
20-O-Glc 1	98.1	98.302
20-O-Glc 2	75	75.193
20-O-Glc 3	79.1	79.482
20-O-Glc 4	71.1	71.700
20-O-Glc 5	78.5	78.418
20-O-Glc 6	62.4	62.945
2-O-Rha 1	101.6	101.970
2-O-Rha 2	72.1	72.478
2-O-Rha 3	72.1	72.608
2-O-Rha 4	73.8	74.230
2-O-Rha 5	69.3	69.521
2-O-Rha 6	18.6	18.802

② Compound II의 화학구조 동정

Compound II의 TLC Rf값은 0.39 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 70 : 30 : 4/kieselgel 60 F254 Merk)이고, UV 램프(254, 365 nm)하에서 아무 반점을 확인할 수 없었으나, 묶은 황산으로 가열하여 적자색으로 발색됨으로서 인삼사포닌으로 추정할 수 있었으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 δ 0.961ppm으로부터 δ 2.145ppm까지 8개의 methyl singnal이 나타나고 있으며, δ 3.497ppm에서의 doublet은 H-3의 proton임을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 C-24와 C-25가 126.381ppm과 130.788ppm의 저자장에서 확인되었으며, 당으로부터 기인하는C-1', C-1"가 101.832, 102.018ppm에서 확인되었고, C-22는 35.815ppm에서 확인되었다. 이러한 결과들은 인삼(*Panax ginseng*)으로부터 추출 분리되었던 (20S)-ginsenoside Rg2의 문헌 data와 일치하였다. 따라서, Compound I을 (20S)-ginsenoside Rg2으로 동정하였다.

Fig. 4. Chemical structures of compound II



compound II : ginsenoside-Rg2





Table. 2. Chemical shifts of compound II in  $^{13}\text{C}$ -NMR

Carbon No.	G-Rg2	Compound I
C-1	39.46	39.642
C-2	26.88	27.074
C-3	78.36	78.541
C-4	39.87	40.040
C-5	60.65	60.829
C-6	74.14	74.297
C-7	45.95	46.114
C-8	40.99	41.171
C-9	49.59	49.771
C-10	39.2	39.378
C-11	31.14	31.307
C-12	70.89	71.053
C-13	48.02	48.242
C-14	51.54	51.712
C-15	31.92	32.122
C-16	26.69	26.862
C-17	54.55	54.751
C-18	17.49	17.653
C-19	17.53	17.675
C-20	72.83	72.950
C-21	22.85	23.016
C-22	35.64	35.815
C-23	22.85	23.016
C-24	126.2	126.381
C-25	130.67	130.788
C-26	25.73	25.854
C-27	17.57	17.705
C-28	32.07	32.244
C-29	17.01	17.184
C-30	16.77	16.880
6-Glc 1	101.66	101.832
6-Glc 2	79.31	79.497
6-Glc 3	78.19	78.344
6-Glc 4	72.42	72.630
6-Glc 5	78.29	78.448
6-Glc 6	62.91	63.123
6-Rha 1	101.87	102.018
6-Rha 2	72.31	72.478
6-Rha 3	72.14	72.325
6-Rha 4	74.03	74.237
6-Rha 5	69.33	69.476
6-Rha 6	18.64	18.791



## ○ 지역에 따른 인삼꽃대 인삼사포닌 성분 분석 (HPLC 법)

### 가. 인삼꽃대 전처리

각 지역별 인삼꽃대 건조분말 50g에 95% EtOH를 500 mL을 가하여 2시간씩 3회 반복 추출하여 여과하였다. 이를 감압농축하여 인삼꽃대 에틸알콜 추출물을 얻고, 이를 증류수에 현탁하여 분획 깔대기에 넣고 Diethyl Ether넣어 진탕하고 방치한 후 Ether층을 제거한다. Ether층이 제거된 물층에 수포화부탄올을 가하여 2시간 진탕추출하여 방치한 후 수포화부탄올층을 분리한다. 이 방법을 3회 반복하여 얻어진 수포화부탄올층을 감압농축하여 조사포닌을 얻었다.

### 나. HPLC 기기분석

위에서 얻은 인삼꽃대 추출물을 고 등의 조건을 응용하여 HPLC를 실시하고, 상법에 따라 표품과 직접 비교하여 지역별 인삼꽃대로부터 주요 인삼사포닌의 함량을 비교하였다. 표품은 Chromadex (U.S.A.)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside를 사용하였다. 사용한 HPLC 장치는 Shimadzu 10Avp HPLC system (Shimadzu, 일본)이며, 컬럼은 GraceApollo RP18 column 250\*4.6mm, 5u (Grace, 미국)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC급, JT Baker, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율은 20 %(0 min)에서 20 %(10 min), 26 %(42 min), 40%(67 min), 47 %(70 min), 65 %(80 min) 그리고 65 %(93 min)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 20%로 조절하였다. 전개온도는 40°C, 유속은 분당 1.2 ml, 크로마토그램은 SPD-10Avp (Shimadzu, 일본) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

### 다. 결과 및 고찰

인삼꽃대의 총사포닌 함량은 영광산 인삼꽃대가 5.157%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 안성산 인삼꽃대(3.866%), 음성산 인삼꽃대(3.092%), 양구산 인삼꽃대(2.854%)의 순이었다. 주성분인 ginsenoside Re의 함량은 영광산 인삼꽃대가 4.012%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 안성산 인삼꽃대(2.635%), 양구산 인삼꽃대(1.817%), 음성산 인삼꽃대(1.815%)의 순이었다. 이와 같은 결과는 산지별로 함유성분의 다름으로써, 채취시기에 따른 함량의 차이가 있지 않을 까 판단이 되며, 향후, 채취시기에 따른 성분분석이 필요할 것으로 판단된다.

Table 3. HPLC gradient elution on the separation for each of ginsenoside standards

Time	Flow	A% (Water)	B% (Acetonitrile)
0	1.2	80	20
10	1.2	80	20
42	1.2	74	26
67	1.2	60	40
70	1.2	53	47
80	1.2	35	65
93	1.2	35	65
95	1.2	80	20
115	1.2	80	20

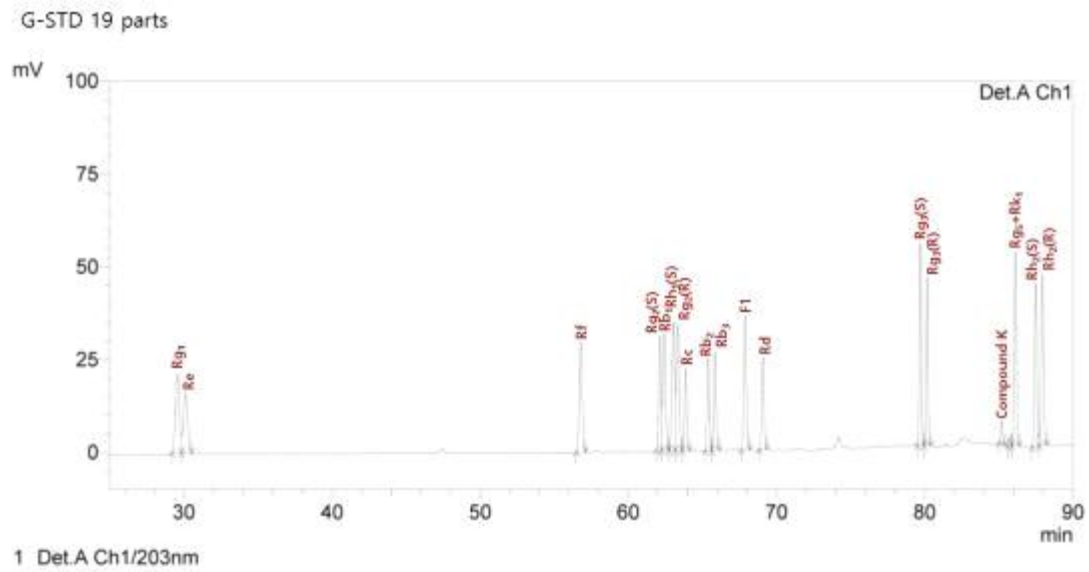


Fig. 6. HPLC chromatogram of ginsenoside standard 19 parts

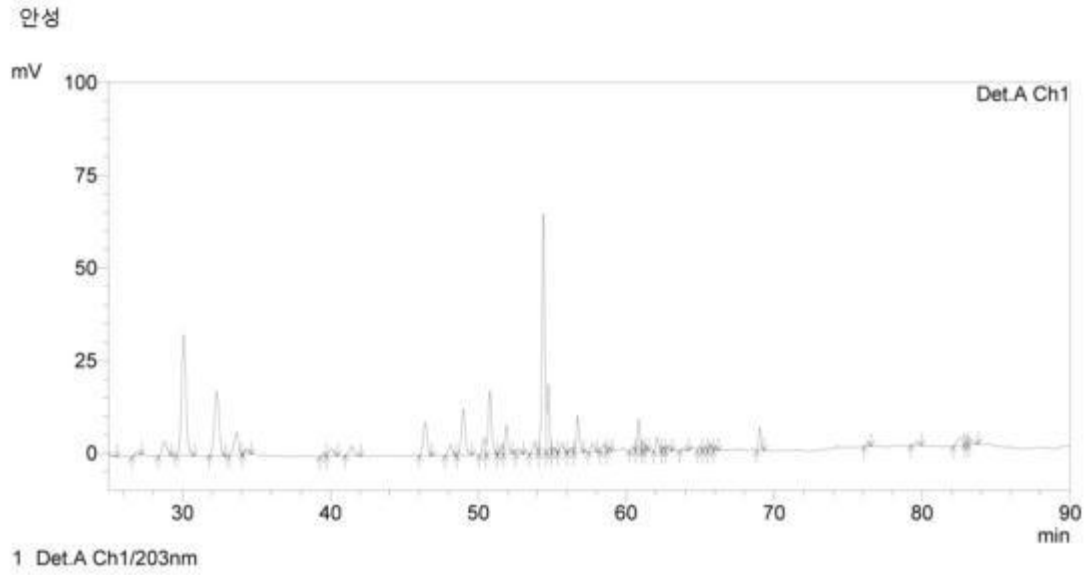


Fig. 7. HPLC chromatogram of ginseng flower buds in An-seong, Gyeonggi

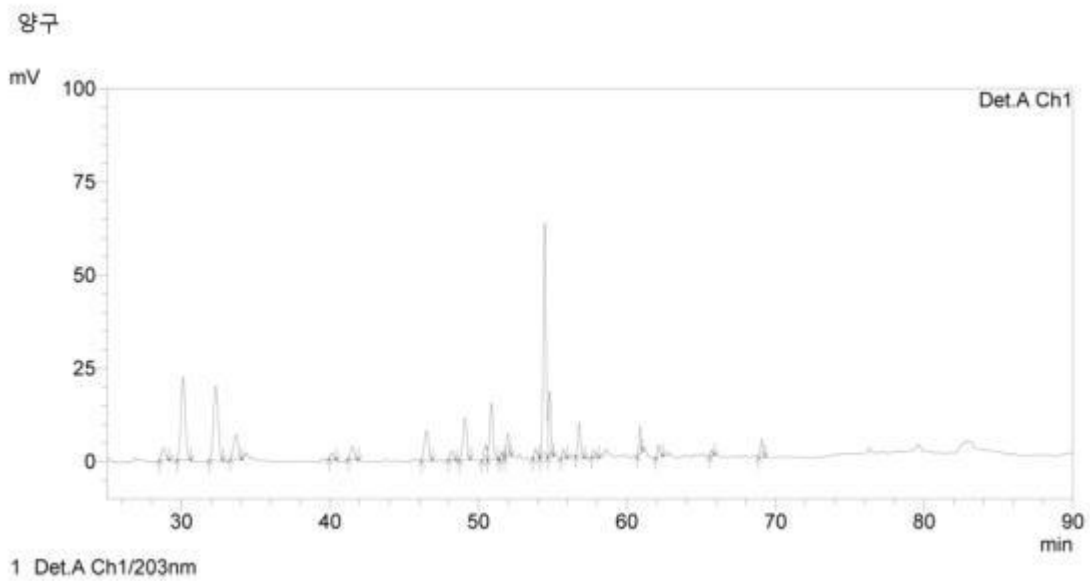


Fig. 8. HPLC chromatogram of ginseng flower buds in Yang-gu, Gangwon

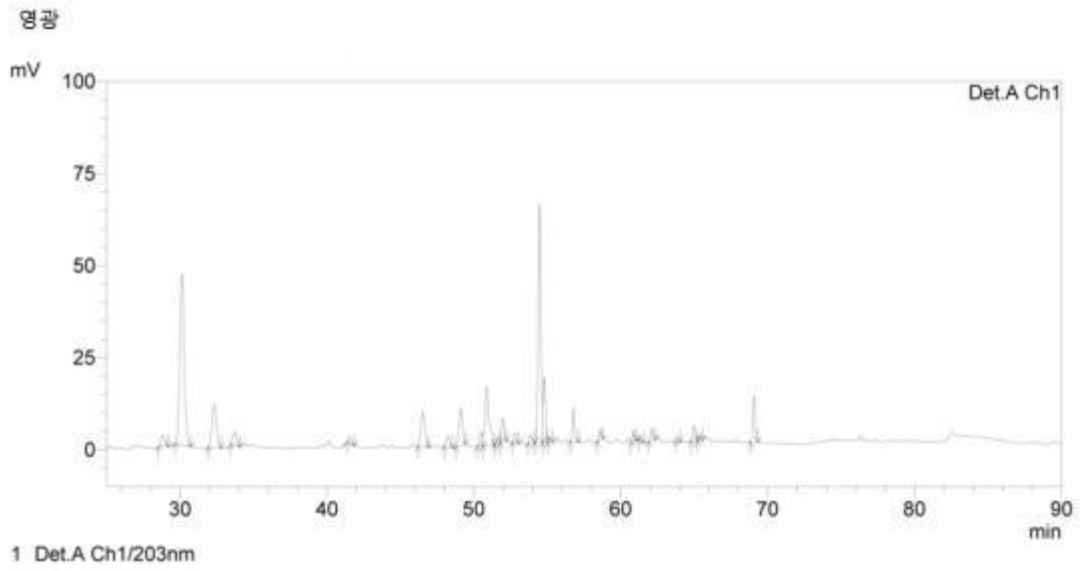


Fig. 9. HPLC chromatogram of ginseng flower buds in Yeong-gwang, Jeonnam

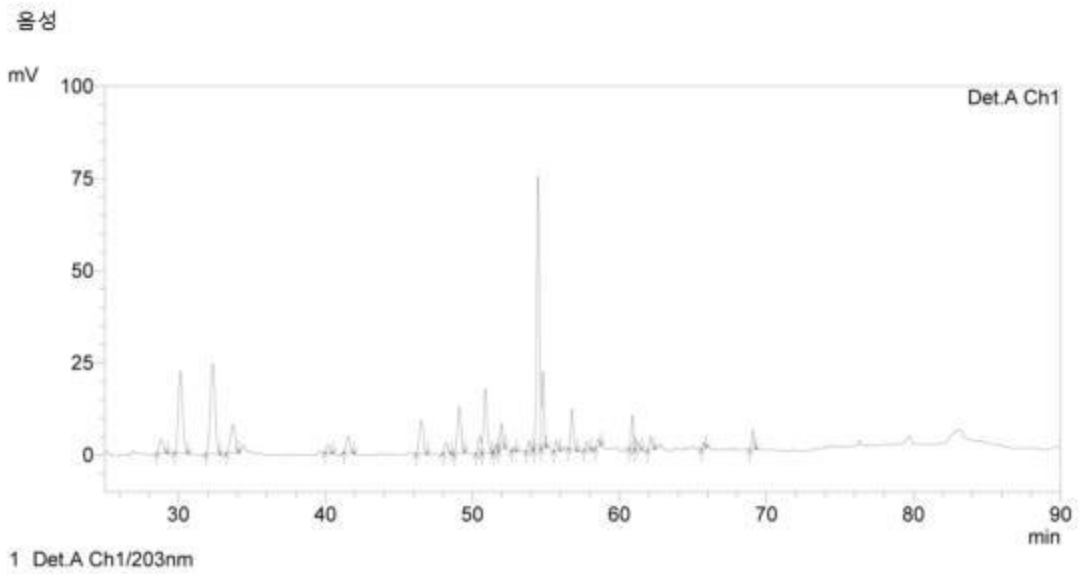


Fig. 10. HPLC chromatogram of ginseng flower buds in Eum-seong, Chungbuk

Table 4. Ginsenoside composition of the ginseng flower buds from various region in Korea

Ginsenosides	(%w/w)			
	An-seong	Yang-gu	Yeong-gwang	Eum-seong
Rg1	0.243±0.003	0.220±0.002	0.212±0.011	0.250±0.010
Re	2.635±0.002	1.817±0.012	4.012±0.016	1.815±0.003
Rf	0.437±0.004	0.422±0.005	0.363±0.013	0.492±0.008
Rb1	0.186±0.013	0.159±0.006	-	0.185±0.009
Rh1(S)	0.042±0.010	0.031±0.003	0.078±0.018	0.037±0.002
Rg2(R)	0.058±0.006	0.053±0.013	-	0.068±0.003
Rc	0.061±0.003	-	0.092±0.021	0.058±0.019
Rb2	0.074±0.004	0.055±0.002	0.301±0.012	0.072±0.004
Rb3	0.127±0.006	0.094±0.002	0.099±0.011	0.112±0.002
Rg3(S)	0.003±0.002	0.003±0.006	-	0.003±0.016
Total ginsenosides	3.866	2.854	5.157	3.092

## 7) 인체적용시험 준비

### ○ 인삼 꽃대 엑스의 용매에 따른 용해성 검토

#### 가. 실험재료 및 방법

##### (1) 실험재료

본 연구에 사용한 인삼꽃대는 충청북도 음성에서 2014년 5월 10일에 4년근 인삼꽃대 10 kg를 채집하였고, 건조는 음성의 충북홍삼영농조합법인에서 시행하였다. 제품표본은 고연 인삼연구센터에 보관하고 있다.

##### (2) 엑스의 조제

건조한 각 인삼꽃대를 세말로 하여 시료 각각 10g 씩에 95% ethyl alcohol, 50% ethyl alcohol, 70% ethyl alcohol 과 증류수 250 ml로 2시간씩 2회 추출하여 여과 후 여액을 합하여 감압 농축하여 엑스를 얻었다.

##### (3) 조사포닌(crude saponin) 조제

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

##### (4) HPLC-ginsenoside의 분석

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

사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system(Waters, Milford, MA, USA)이며, 컬럼은 Eurospher 100-5 C18(3x250 mm; Knauer, Germany)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC grade; Sigma-Aldrich Chem Co., USA)과 증류수(HPLC급, B&J, USA)이며, acetonitrile의 비율을 17%(0 min)에서 25%(25 min), 39%(50 min), 60%(105 min) 그리고 100%(110 min)로 순차적으로 늘려 주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector(Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203 nm에서 검출하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

본 연구에서는 용매 조건에 따른 인삼꽃대의 인삼사포닌 변화를 검토하여 최적의 인삼꽃대 조성물 개발을 위하여 시행하였다. 추출 용매는 증류수, 50%, 70%, 95% ethylalcohol을 사용하였다. 추출 수율은 증류수 추출물이 40.23%를 나타내어 가장 높은 수율을 보여주었고, 70% ethylalcohol로 추출한 엑스가

39.20%, 50% ethylalcohol 추출물이 38.13%, 95% ethylalcohol 추출물이 22.31%의 순이었다.

조사포닌 함량에 있어서 95% ethylalcohol 추출물이 83.15%를 나타내어 가장 높은 인삼사포닌 함량을 보여주었고, 70% ethylalcohol로 추출한 엑스가 65.89%, 50% ethylalcohol 추출물이 54.19%, 증류수 추출물이 30.54%의 순이었다.

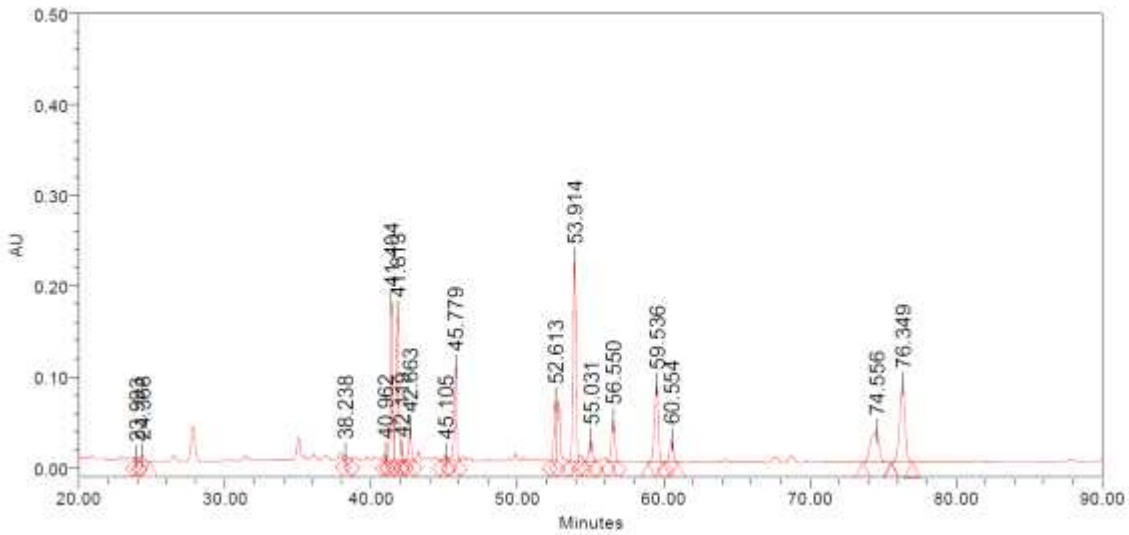
한편, 총사포닌 함량에 있어서 70% ethylalcohol 추출물이 16.821%를 나타내어 가장 높은 인삼사포닌 함량을 보여주었고, 50% ethylalcohol로 추출한 엑스가 13.756%, 95% ethylalcohol 추출물이 11.229%, 증류수 추출물이 3.513%의 순이었다. 특히, 인삼꽃대의 주 인삼사포닌인 ginsenoside Re에 있어서도 70% ethylalcohol 추출물이 7.028%를 나타내어 가장 높은 인삼사포닌 함량을 보여주었고, 50% ethylalcohol로 추출한 엑스가 5.873%, 95% ethylalcohol 추출물이 4.795%, 증류수 추출물이 0.068%의 순으로 총사포닌과 동일한 패턴을 보여주었다.

#### Ginsenoside contents in ginseng flower buds extracted under various solvent

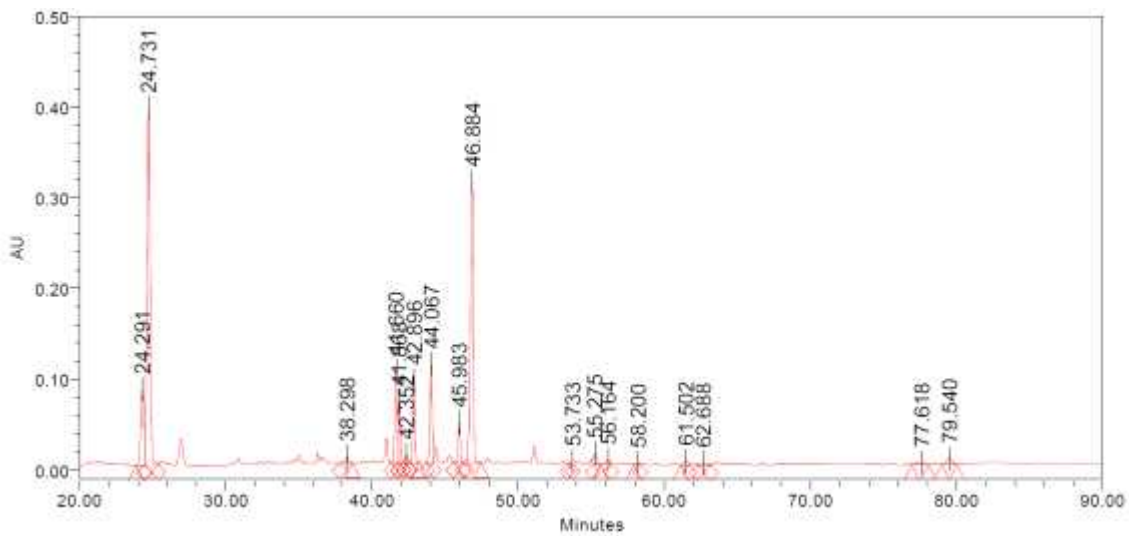
Ginsenosides	(% w/w)			
	water 4h	50%EtOH 4h	70%EtOH 4h	95%EtOH 4h
Rb1	0.025±0.002	0.663±0.019	0.853±0.021	0.453±0.006
Rb2	0.362±0.004	1.731±0.012	2.177±0.035	1.394±0.018
Rc	0.029±0.006	1.839±0.036	2.107±0.078	1.505±0.022
Rd	0.510±0.009	2.249±0.027	3.013±0.051	2.090±0.040
Re	0.068±0.006	5.873±0.043	7.028±0.107	4.795±0.038
Rf	0.041±0.012	0.075±0.004	0.095±0.008	0.034±0.011
Rg1	0.035±0.001	0.768±0.010	0.918±0.017	0.532±0.002
Rg2	0.461±0.006	0.212±0.013	0.240±0.011	0.182±0.008
(20S)Rg3	0.644±0.018	0.057±0.005	0.025±0.002	0.007±0.002
(20R)Rg3	0.112±0.008	0.026±0.009	0.014±0.004	0.003±0.003
Rg5(E)	0.143±0.002	0.020±0.001	0.001±0.001	-
Rg6	0.092±0.001	0.002±0.001	0.006±0.001	0.006±0.002
Rh1	0.240±0.013	0.018±0.010	0.097±0.012	0.068±0.003
Rh4	0.068±0.001	0.004±0.001	0.001±0.001	0.001±0.001
Rk1+ Rg5(Z)	0.052±0.001	0.006±0.001	0.006±0.001	-
Rk3	0.034±0.001	0.001±0.001	0.003±0.001	0.008±0.001
F1	0.017±0.007	0.160±0.005	0.210±0.005	0.142±0.010
F4	0.580±0.009	0.052±0.004	0.027±0.003	0.009±0.002
Total ginsenosides <sup>a</sup>	3.513	13.756	16.821	11.229

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

(HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower buds extracted by distilled water for 4 hours)

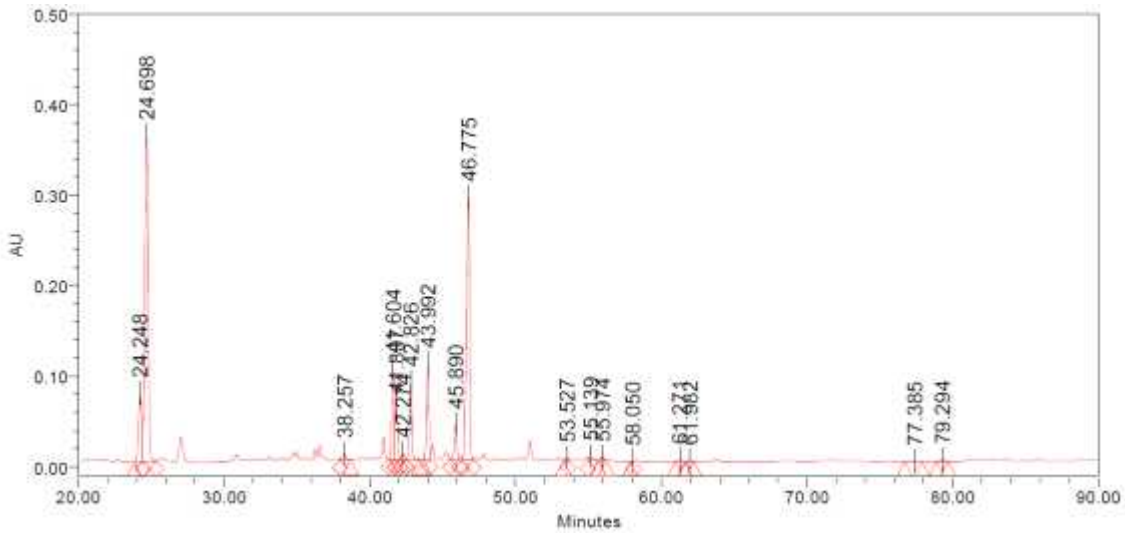


(HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower buds extracted by 50% ethylalcohol for 4 hours)

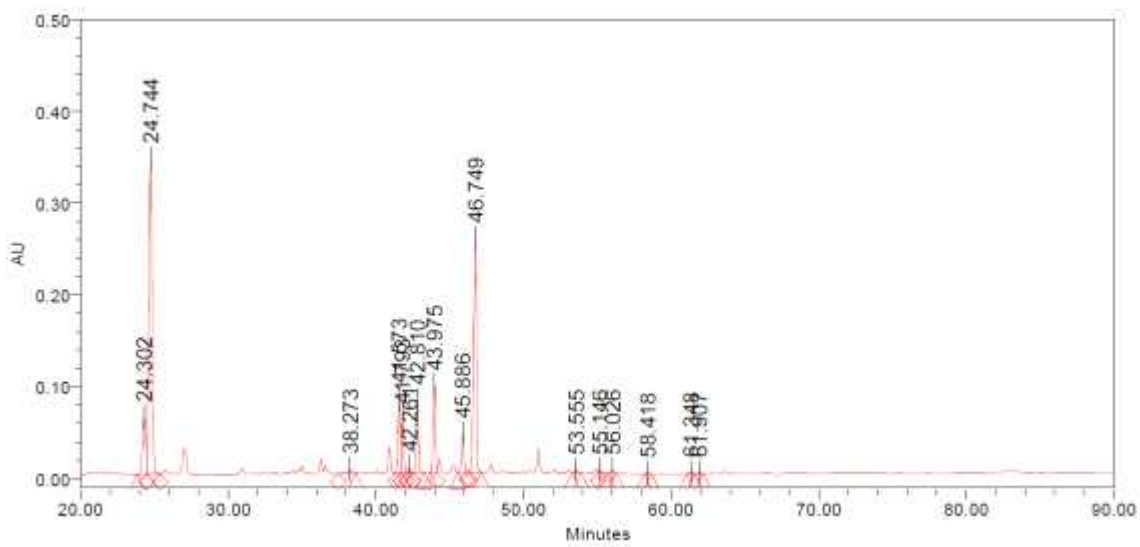




(HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower buds extracted by 70% ethylalcohol for 4 hours)



(HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower buds extracted by 95% ethylalcohol for 4 hours)



○ 인체적용시험계획서 작성 및 전략 수립

## 인 체 적 용 시 험 계 획 서

경증 간 기능 저하 대상자에서 초음파처리 인삼꽃대 추출물(UGFB)의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Intervention Study of the Efficacy and Safety of "UGFB" in Liver function decreased healthy subjects

시험계획서번호	UGFB-01
버전(작성일)	1.0 (2016.05.10)
인체적용시험의뢰자	고연(高研)
인체적용시험수탁기관	㈜파마크로(PharmaCRO)

### 기밀문서

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

# 인 체 적 용 시 험 계 획 서

경증 간 기능 저하 대상자에서 조음파처리 인삼꽃대 추출물(UGFB)의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Intervention Study of the Efficacy and Safety of "UGFB" in Liver function decreased healthy subjects

시험계획서번호 UGFB-01  
 버전(작성일) 1.0 (2016.05.10)  
 인체적용시험의뢰자 고연(高研)  
 인체적용시험수탁기관 ㈜파마크로(PharmaCRO)

### 기밀문서

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

Protocol No. UGFB-1  
 Study Protocol Version 1.0(2016.05.10)

CONFIDENTIAL

### ◆ 본 인체적용시험계획서에 사용된 약어 및 용어정의

약어 및 용어	정 의
시험의뢰자	고연(高研)
시험군	UGFB(조음파처리인삼꽃대추출물)
대조군	Placebo, 대조약품
실험실적 검사	혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 소변검사
활약성분	제온, 혈압, 맥박수 등
ADR	Adverse Drug Reaction
AE	Adverse Events
ALT (SGPT)	Alanine Aminotransferase: GPT
ALP	Alkaline Phosphatase
AST (SGOT)	Aspartate Aminotransferase: GOT
BUN	Blood Urea Nitrogen
CRA	Clinical Research Associate (임상시험 모니터 요원)
CRF	Case Report Form
CRO	Contract Research Organization
DBP	Diastolic Blood Pressure, 이완기 혈압
FAS	Full Analysis Set
Hb	Hemoglobin
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
Hct	Hematocrit
HDL Cholesterol	High Density Lipoprotein Cholesterol
IRB	Institutional Review Board (임상시험심사위원회)
ITT	Intention To Treat
KGCP	Korean Good Clinical Practice
KKS	Korean Knee Score
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-inflammatory Drug
LDL Cholesterol	Low Density Lipoprotein Cholesterol
PP	Per Protocol
RBC	Red Blood Cell
γ-GT	Gamma-glutamyltransferase
TG	Triglyceride
Wash-out Period	약물투여 중지기간
WBC	White Blood Cell

인체적용시험계획서 개요

인체적용시험 개 목	경동 간 기능 저하 대상자에서 조음과처리인상꽃대수술(UGFB)의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험 책임 자	서울대학교부속재천한방병원 김경준 교수
인체적용시험 의 외 자	고연(高延)(高研)
인체적용시험 기 간	IRB 최초 승인일로부터 12개월
인체적용시험 대 상	만 19세 이상 만 70세 미만의 건강한 성인으로 간 기능이 손상되어 자각증상과 생화학적 소견을 가지고 있는 대상자
인체적용시험 목 적	경동 간 기능 저하 대상자에서 조음과처리 인상꽃대 수술(UGFB)을 복용한 후 간 기능 개선효과 등의 기능성 및 안전성을 평가하고자 함
인체적용시험 디 자 안	단일기관, 무작위 배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험 용 적 품	• 시험군 조음과처리 인상꽃대 수술(UGFB) 하루 2그람 • 위약군 대조제(위약)
용 법 · 용 량 및 복 용 방 법	인체적용시험용 식물을 아침, 저녁 중 2회 식사 직전에 3정씩 하루 6정을 복용한 다
복 용 기 간	12주
대 상 자 수	총 60명 (각군 최종 평가가능 예수 군당 24명, 20% 내외 탈락률 고려 시)
선 정 기 준	<b>선정기준</b> (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 함) 1) 만 19세 이상 만 70세 미만의 건강한 성인 남녀 2) 2주 이상 AST 수치가 25 IU/L 이상인 자 3) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 들은 후 자의로 참여를 결정하고 동의 서에 서명한 대상자
제 외 기 준	<b>제외기준</b> (다음 조건에 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없다) 1) 임상이나 정연물에 과민증 또는 그 병력이 있는 대상자 2) 3개월 이내 간 기능 관련 약물, 건강기능식품을 복용 중인 대상자 3) 간염보균자 급성간염환자 및 간경화의 징후가 인정되거나 지방간으로 진단되 어 약물 등 치료중인 대상자 4) 황달, 담석 등 광도계 질환자 또는 심한 간 기능 장애(ALT, AST 중 정상 상한치 의 3배 이상)이거나 특정 질환, 약물, 간염 및 간경화에 의한 간 기능 장애 대

시 험 방 법	상자												
	<ol style="list-style-type: none"> <li>조절되지 않는 고혈압(systolic blood pressure &gt; 140mmHg 또는 diastolic blood pressure &gt; 90mmHg)이거나 조절 되지 않는 당뇨(hbA1c ≥ 9%) 환자</li> <li>스크리닝 1년 이내에 임상적으로 유의한 심장계 질환(허혈성 등), 심혈관 질환 (허혈성 심질환 및 심부전 등의 심정질환, 항응고제 복용 및 협소관 또는 혈역 용고인자 이상 등의 혈액학적 이상), 호흡기 질환 (만성 폐쇄성 폐질환, 폐렴, 폐결핵 등의 감염성 폐질환 등)의 병력이 있는 자</li> <li>스크리닝 6개월 이내의 위장관의 출혈이 있거나 소화성 궤양, 영구성 장질환(크 론병 또는 궤양성 장염 등)의 병력이 있는 자</li> <li>주요 위장관 수술의 병력이 있는 자(중수절제술을 제외한 위절제, 위장관 우회 술 또는 문합술 등)</li> <li>스크리닝 5년 내 알코올 및 약물 남용 적이 있거나 치료 중인 대상자</li> <li>콜레스테롤 수치 및 심한 신기능 장애(serum creatinine &gt; 2.0 mg/dl)가 있는 대상 자</li> <li>신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 대상자 (우울증, 정신분열증, 간질, 약물중독, 거식증, 이상식욕증 등)</li> <li>인체적용시험 중 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물(대량진통제 및 비스테로이드성 소염진통제, 항콜린제, 항응고제, 항생제나 항진균제)을 지속적으로 복용 해야 하는 자 (상세내용은 7.2. 병용약물의 허용 및 금기약물/식품을 참고한 다.)</li> <li>최근 4주 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제, 또는 식물의 흡수, 대사, 배설 에 영향을 주는 약물이나 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험 이 있거나 기타 임상시험에 참여한 경험이 있는 대상자</li> <li>임신부, 수유부 및 가임여성으로 참여기간 동안 임신 및 수유의 계획이 있는 대상자</li> <li>연구자 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 대상자</li> </ol>												
가 능 성 평 가	<p>대상자가 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의하면, 계획서에 따라 필요한 검진 및 검사를 실시한 후, 대상자 적합성 평가결과, 선정기준에 적합한 대상자에 한하여 무작위 배정된다.</p> <p>무작위 배정된 대상자는 12주간 시험제 또는 대조제(위약)를 복용하게 된다.</p> <table border="1"> <tr> <td>방문 1 (-4~0주)</td> <td>방문 2 (0일)</td> <td>방문 3 (6주±7일)</td> <td>방문 4 (12주±7일)</td> </tr> <tr> <td>스크리닝 방문</td> <td>무작위배정방문</td> <td>중간방문</td> <td>종료방문</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>투 약</td> <td></td> </tr> </table> <p>• 1차 기능성 평가 변수 (Primary endpoint): - AST 수치의 감소치</p>	방문 1 (-4~0주)	방문 2 (0일)	방문 3 (6주±7일)	방문 4 (12주±7일)	스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문			투 약	
방문 1 (-4~0주)	방문 2 (0일)	방문 3 (6주±7일)	방문 4 (12주±7일)										
스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문										
		투 약											

	<ul style="list-style-type: none"> <li>2차 기능성 평가 변수(Secondary endpoint)             <ul style="list-style-type: none"> <li>- ALT 수치의 감소지 및 개선율</li> <li>- AST 수치의 개선율</li> <li>- TG 수치의 감소지 및 개선율</li> <li>- γ-GT 수치의 감소지 및 개선율</li> <li>- Lipid profiles의 감소지 및 개선율</li> </ul> </li> </ul>
안전성 평가	<p>인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 중, 복용 12 주 후에 실험실적 검사 및 활력징후 측정, 이학적 검사를 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다. 이상반응이 없는 경우라면, 추적 방문 검사로 방문을 종료할 예정이다.</p>
병용 약물 및 식품	<p>인체적용시험 중 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물로 마약성 및 비마약성 소염/진통제, 항우울제, 항암제, 항우울제, 항정신성 약물, 기타 간 기능 개선, 지방간 개선, 간보호 등을 목적으로 하는 약물, 판방치표(질, 부황, 염), 이와외의 연구자 판단에 따른 약물의 흡수, 대사 또는 배설에 영향을 줄 수 있는 약물은 시험기간 동안 병용 할 수 없다.</p> <p>(7.2.2 병용약물 및 식품) 참조</p>

◆ 인체적용시험 흐름도

시험항목	스크리닝	복용기간				Follow up <sup>*)</sup>
	방문 1 4주 ~ 0주	방문 2 0주(0일)	방문 3 6주(±7일)	방문 4 <sup>*)</sup> 12주(±7일)	추가 방문	
대상자 선정	√					
인구학적 조사 <sup>1)</sup>	√					
신체검사 <sup>2)</sup>	√			√		
활력징후 <sup>3)</sup>	√	√	√	√	√	
병력 및 동반질환	√					
이학적 검사	√			√	√	
생활습관 조사 <sup>4)</sup>		√				
실험실적 검사 <sup>5)</sup>	√	√	√	√	√	
임신여부 검사 <sup>6)</sup>	√	√	√	√	√	
대상자 적합성 평가 <sup>7)</sup>	√	√				
무작위 배정		√				
① 처방 및 교부		√	√			
선형/영양학적 조사	√	√	√	√	√	
이상반응 확인			√	√	√	
② 빈혈 및 특이응답도			√	√		

1) 인구학적 조사: 성년절묘, 성별, 등을 조사한다.

2) 신체검사: 신장과 체중, 신장은 신발을 벗고 5m 앞에서 측정하고 방문1에서만 측정하고 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용하여 방문 1, 4에서 실시한다.

3) 활력징후: 발열, 맥박수, 체온 - 5분간 3분 지체로 안정을 취한 후 측정한다.

4) 생활습관 조사: 흡연/음주/식이/운동습관에 관하여 방문2, 4에서 실시한다.

5) 실험실적 검사: 대상자는 채혈하기 전 최소 8시간 이내 금식한 상태로 내원해야 한다.

혈액학적 검사	WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
혈액화학적 검사	Total bilirubin, ALP, Total Protein, Albumin, AGE, ALT, α-GTP, BUN, Creatinine, Glucose, Uric acid, Total cholesterol, Triglyceride, LDL, HDL
소변 검사	pH, RBC, WBC, Protein+Albumin, Glucose, Specific gravity
임뇨 검사	HbA1c (Screening 시 시행)

6) 임신여부 검사: 임신여부 및 임신 4주 내에 분포에서 실시한 실험실적 검사 결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않으며, ALT활력증 수치가 가능하다. 방문2의 실험실적 검사는 방문2 이전 7일 내에 실시한 실험실적 검사 결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 된다. 검사 항목 중 특이한 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서는 추가적으로 검사를 할 수 있다.

7) 대상자 적합성 평가: 방문 1과 방문 2결과 AST수치 25U이상인지 확인하고 다른 임상 제외기준 항목을 평가하여 적합한 경우 등록한다.

8) 초기 방문 시도, 병력 방문과 동일한 검사 및 평가를 수행한다.

9) Follow up: 시험자의 판단에 따라 시험제품 최종 복용 후 혹은 초기복용 후 임상상적인 실험실 결과 계속되는 이상반응, 용도 불용, 시험자 판단에 따라 추가 검사가 필요하다고 여기지는 경우 필요에 따라 추가 검사를 위해 4주 이내 다시 방문하도록 한다.

목 차

인체적용시험계획서 개요	3
◆ 인체적용시험 흐름도	6
1. 인체적용시험의 명칭 및 단계	10
2. 인체적용시험 의뢰자 및 주소	10
3. 인체적용시험의 목적 및 배경	10
3.1. 인체적용시험의 목적	10
3.2. 인체적용시험의 배경	10
4. 인체적용시험용 식품의 품명, 원료제품의 분량 및 제형	12
4.1. 인체적용시험용 식품의 품명	12
4.2. 원료제품의 분량 및 제형	12
4.3. 라벨	13
4.4. 포장	13
4.5. 시험제품의 관리	13
4.6. 미사용 제품의 처리	13
5. 대상질환 및 인체적용시험 기간	13
5.1. 대상질환	13
5.2. 인체적용시험 기간	14
6. 대상자의 선정기준, 제외기준, 목표한 대상자 수 및 근거	15
6.1. 선정기준	15
6.2. 제외기준	15
6.3. 목표 대상자 수 및 그 근거	16
6.3.1. 대상자 수	16
6.3.2. 대상자 수 산출 및 그 근거	16
7. 인체적용시험 방법	18
7.1. 복용방법 및 복용기간	18
7.2. 병용요법의 허용 및 금기약품/제품	18
7.2.1. 병용약품의 허용	18
7.2.2. 금기약품 및 식품	18
8. 무작위 배정	20
9. 이중눈가림	20
10. 관찰항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법	21
10.1. 실험실적 검사	21
10.1.1. 분석장소	21
10.1.2. 정도 관리	21
10.1.3. 검사수치범위	21
10.2. 관찰항목, 임상검사항목	21
10.2.1. 대상자 동의	21

10.2.2. 인구학적 조사	21
10.2.3. 신체검사	21
10.2.4. 활력징후	21
10.2.5. 실험/병용약품 조사	21
10.2.6. 병력 및 동반질환	21
10.2.7. 생활습관 조사	22
10.2.8. 실험실적 검사	22
10.2.9. 임신 여부 검사	23
10.2.10. 대상자 적합성 평가	23
10.2.11. 스크리닝 평가 검사	23
10.2.12. 무작위 배정	23
10.2.13. 기능성 평가 검사	23
10.2.14. 인체적용시험용 식품 처방 및 교부	23
10.2.15. 인체적용시험용 식품 반납 및 복용순응도	23
10.2.16. 이상반응 확인	24
10.2.17. 이력적 검사	24
10.3. 방문 별 관찰 검사 방법	24
10.3.1. 방문 1: 스크리닝(2주~0 일)	24
10.3.2. 방문 2: 기준시기 (0주, 0 일)	24
10.3.3. 방문 3: 중간방문 (6주±7 일)	25
10.3.4. 방문 4/조기방문: 종료방문(12주±7 일)	25
10.3.5. Follow up 방문(필요시)	25
11. 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항	27
11.1. 예측 이상반응	27
11.2. 일반적 주의	27
11.3. 일부 및 수유부에 대한 적용	27
11.4. 과량복용시의 조치	27
12. 시험 중지 및 탈락기준	28
12.1. 시험자에 의해 중지, 탈락되는 경우	28
12.2. 대상자에 의해 중지, 탈락되는 경우	28
13. 기능성 평가기준, 평가변수 및 통계분석방법	29
13.1. 기능성 평가기준	29
13.2. 기능성 평가변수	29
13.3. 통계분석 방법	29
13.3.1. 분석 대상군	29
13.3.2. 결과 해석의 원칙	30
13.3.3. 대상자의 인구학적 기초자료 및 기타 적용 전 특성	30
13.3.4. 기능성 평가변수 분석방법	30
14. 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법	32

Protocol No. UGFB-1  
Study Protocol Version 1.0(2016.05.10) CONFIDENTIAL

14.1. 안전성 평가	32
14.2. 평가기준	32
14.3. 안전성 평가범주 및 분석방법	32
15. 이상반응 정의 및 보고 규정	33
15.1. 정의	33
15.2. 중증도의 평가 기준	33
15.3. 시험제품과의 인과관계 평가	33
15.4. 이상반응의 기록	34
15.5. 중대한 이상반응의 보고	35
15.6. 이상반응을 경험한 대상자의 추적조사	35
16. 시험 대상자 동의서, 피해자 보상에 대한 규약, 인체적용시험 후 대상자 진료 및 치료 기준	36
16.1. 시험 대상자 동의서 및 동의서	36
16.2. 피해자 보상에 대한 규약	36
16.3. 인체적용시험 후 대상자의 진료 및 추적관찰 기준	36
17. 대상자의 안전보호에 관한 대책	37
18. 그 밖에 인체적용시험을 안전하게 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항	37
18.1. 윤리적 고려	37
18.2. 인체적용시험 자료의 보관 및 보존의 결함	37
18.3. 자료 및 대상자 기록의 기밀 유지	37
18.4. 보고서 제출 및 출판에 관한 방침	38
18.5. 시험계획서 준수에 대한 모니터링	38
18.6. 품질관리(QC) 및 보증(QA)	38
19. 참고문헌	39

- [별첨 1] 인체적용시험계획서 서명페이지(실시기관)
- [별첨 1] 인체적용시험계획서 서명페이지(의뢰자)
- [별첨 2] 인체적용시험 실시기관 및 인체적용시험 관련 담당자 연락처
- [별첨 3] 시험대상자 설명서 및 동의서
- [별첨 4] 피해자 보상에 대한 규약
- [별첨 5] 인체적용시험용식품 복용지도
- [별첨 6] 대상자 모집 공고문

Protocol No. UGFB-1  
Study Protocol Version 1.0(2016.05.10) CONFIDENTIAL

**1. 인체적용시험의 명칭 및 단계**  
경증 간 기능 저하 대상자에서 초음파차단상꽃대주술물(UGFB)의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

**2. 인체적용시험 의뢰자 및 주소**

- 1) 의뢰자명: 고연(高前)
- 2) 주소: 충청북도 직전시 세영로 65(신월동)
- 3) 대표이사: 고성권

**3. 인체적용시험의 목적 및 배경**

**3.1. 인체적용시험의 목적**

- 1) 본 시험의 주 목적은 경증 간 기능 저하 대상자에게 12주간 시험제품인 UGFB를 아침, 저녁 식전 30분에 5정씩 1달 2회, 총 6회(하루 2그램)를 복용하였을 때, 간기능 개선 등의 가능성을 평가하려는 것이다.
- 2) 두 번째 목적은 혈액질소, 이화력 검사, 임상실험실력 수치 등에 대한 영향, 이상반응의 측면에서의 UGFB의 안전성을 평가하려는 것이다.

**3.2. 인체적용시험의 배경**

인삼의 사포닌 성분은 간세포의 단백질 합성과 간세포의 재생을 촉진하는 작용이 있다. 사포닌성분은 실험적으로 여러 가지 간 독성물질로 여기되는 간세포의 괴사 등 조직학적 병변을 경감시키고 간의 독성대사에 관여하는 효소(Epoxide hydratase, glutathione transferase, epoxide hydroxylase)를 활성화시켜 간장장해를 개선, 예방하는 효과가 있다. 한양대 위대 구국회 교수는 바이러스 B형 간염환자를 대상으로 한 임상시험에서 인삼추여가 식욕, 소화상태, 두통, 오심, 구토 등의 자각증상의 개선효과 및 급성간염의 조기회복 촉진과 만성화 예방에 도움을 준다고 보고하였다. 일본 Nissei 병용 Yamamoto 박사는 만성간염(바이러스 C형)환자에 대해서도 인삼추여가 간 기능의 생화학적 지표 개선에 유효성이 있고, 항방사제인 시시오텔과 병용 시 보다 개선효과가 촉진되었다고 보고하였다. 또한, 인삼사포닌 성분은 알코올 대사에 관여하는 알코올 분해효소(alcohol dehydrogenase), 아세트알데히드 분해효소(acetaldehyde dehydrogenase)의 활성을 증가시켜 알코올 섭취로 여기되는 유해한 작용을 경감시켜 알코올 독성에 예방적 효과를 나타낸다. 실제로 사람을 대상으로 한 실험에서도 술을 마신 후 40분이 경과하였을 때 혈중 알코올 농도가 술만 마신 사람(0.11%)에 비하여 인삼추여가 술을 함께 마신 경우(0.11%)가 훨씬 낮은 사실이 입증되었다.

인삼꽃대에는 항산화, 항박형성, 위장보호 작용 등 생리활성이 확인되었고, ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2 뿐만 아니라, floralginsenosides Ka, Kb, Kc, vinaginsenoside R, majoroside F, ginsenoside I, II, III, floralginsenosides Ta, Tb, Tc, Td, floralginsenosides A, B, C, D, E, F, floralginsenosides M, N, O, P 등의 성분이 분리 보고되었다. 또한, ginsenoside Re 가 약 3.58%의 높은 농도로 존재하는 것을 본 연구팀이 확인하였고 인삼꽃대의 ginsenoside Re 는 물리화학적 가공에 의해서 ginsenoside

Rg2 등 활성 사포닌으로 전환될 수 있으며, ginsenoside Rg2, Rh1, F4 등 기능성 성분 강화 조성을 조음과 차이를 이용하여 개발하였다.  
인삼꽃대의 말포음성 지방간에 대한 연구를 진행 하였으며, 이와 같은 예비연구 결과를 바탕으로 인삼 꽃대를 이용한 간 기능 개선 건강기능식품을 개발하고자 한다.

#### 4. 인체적용시험용 식품의 품명, 원료제품의 분량 및 제형

##### 4.1. 인체적용시험용 식품의 품명

UGFB 또는 대조제품(위약)

##### 4.2. 원료제품의 분량 및 제형

###### 1) 시험군 (시험제품)

- ① 제품명: UGFB, 고연(高研)
- ② 제품성상: 진한 갈색의 타원형 필름 코팅 정제
- ③ 함량: **500mg/정**

● 하루섭취량: 아침, 저녁 식전 30분에 1회 3정씩 1일 2회 복용

	%	<b>500 mg</b>
인삼꽃대건조엑스	48	336
미결정셀룰로스	23	161
옥수수전분	17	119
경질옥수수유산	5	35
전분글리콜산나트륨	3	21
스테아린산마그네슘	1.4	9.8
HPMC	2	14
글리세린지방산에스테르	0.237	1.659
이산화티타늄	0.218	1.526
식용적색제 40 호	0.145	1.015

- ④ 저장방법: 직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관
- ⑤ 유효기간: 2018 년 5 월 10 일

###### 2) 위약군(대조제품)

- ① 제품명: UGFB, 고연(高研)
- ② 제품성상: 진한 갈색의 타원형 필름 코팅 정제
- ③ 함량: **500mg/정**

● 하루 섭취량: 아침, 저녁 식전 30분에 1회 3정씩 1일 2회 복용

	%	<b>500</b>	(mg)
옥수수전분	65	455	
미결정셀룰로스	23	161	
경질옥수수유산	5	35	
전분글리콜산나트륨	3	21	
스테아린산마그네슘	1.4	9.8	
HPMC	2	14	
글리세린지방산에스테르	0.237	1.659	
이산화티타늄	0.218	1.526	



식용적약제 40 표	0.145	1.015
④ 저장방법: 직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관		
⑤ 유효기간: 2018 년 5 월 10 일		

#### 4.3. 라벨

- 1) 인체적용시험제품은 의약품임상시험관리기준 (의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표4) 제8호 거목의 규정에 따라 의뢰자가 제조(또는 구입) 후, 인체적용시험기관의 관리약사에게 공급하여야 한다.
- 2) 인체적용시험제품 라벨의 기재는 의약품 등의 안전에 관한 규칙 제 69 조 6 항에 준하며, 대상자번호를 추가하여 아래와 같이 기입한다. 시험제품에 대한 라벨은 다음과 같은 내용을 포함하여야 한다.
  - ① "인체적용시험용"이라는 표시
  - ② 제품의 코드명 또는 주성분의 일반명
  - ③ 대상자의 시험고유번호
  - ④ 제조번호 및 사용기한 또는 재검시일자
  - ⑤ 저장방법, 직사광선을 피하고 서늘한 곳에 보관
  - ⑥ 인체적용시험 승인을 받은 자의 상호와 주소
  - ⑦ "인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없음"이라는 표시

#### 4.4. 포장

대상자 60명에 대한 충분한 양의 제품을 포장하고 라벨 하여야 한다.  
각 대상자는 0주, 6주 방문 시에 포장 단위를 고려하여 42일+7일의 시험제품을 제공받는다. 인체적용시험용 식품은 Bottle 형태로 제공되며, 1 Bottle에는 총 294표(6주 42일 + 7일 여유분)의 시험제품 또는 대조제품이 들어있다. Bottle 외부에는 시험계획서 4.3에서 언급한 라벨이 붙어있다.

#### 4.5. 시험제품의 관리

인체적용시험제품은 해당 인체적용시험실시기관의 시험책임자가 관리 책임을 진다. 인체적용시험제품은 의뢰자가 지정한 조건(약국 또는 별도 마련된 시간 장에 직사광선을 피하고 서늘한 곳에 보관)과 관계 법령에 따라 보관하여야 하며, 의약품 임상시험 관리기준 제7조 밖의 임상시험용 의약품 관리에 따라 관리되어야 한다. 인체적용시험 담당자는 재고를 관리하여야 하며, 시험 제품의 수량, 배분, 회수 등을 관리한다.

#### 4.6. 미사용 제품의 처리

미사용 제품과 재고는 모두 의뢰자인 고연(高研)에게 돌려주어야 한다.

### 5. 대상질환 및 인체적용시험 기간

#### 5.1. 대상질환

만 18 세 이상 만 70 세 미만의 건강한 성인으로 간 기능이 손상되어 자각증상과 생화학적 수치를 가지고 있는 대상자

#### 5.2. 인체적용시험 기간

각 시험기관의 IRB 최종 승인일로부터 12 개월로 한다. 단, 대상자 등록 속도에 따라 가감될 수 있다.

6. 대상자의 선정기준, 제외기준, 목표한 대상자 수 및 근거

6.1. 선정기준

(시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.)

- 1) 만 19세 이상 만 70세 미만의 건강한 성인 남자
- 2) 2주 이상 AST 수치가 25 IU/L 이상인 자
- 3) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 들은 후 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 대상자

6.2. 제외기준

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

- 1) 임상표나 진단표에 과민증 또는 그 병력이 있는 대상자
- 2) 3개월 이내 간 기능 관련 약물, 간장기능검사를 복용 중인 대상자
- 3) 간염보균자 급성간염환자 및 간경화의 징후가 인정되거나 지방간으로 진단되어 막을 등 치료중인 대상자
- 4) 황달, 담석 등 담도계 질환자 또는 심한 간 기능 장애(ALT, AST 중 정상 상한치의 3배 이상)이거나 특정 질환, 약물, 간염 및 간경화에 의한 간 기능 장애 대상자
- 5) 조절되지 않는 고혈압(sBP > 140mmHg 또는 dBP > 90mmHg)이거나 조절되지 않는 당뇨(HbA1c ≥ 9%) 환자
- 6) 스크리닝 1년 이내에 임상적으로 유의한 신경계 질환(뇌졸중 등), 심혈관 질환(허혈성 심질환 및 심부전 등의 심장질환, 협심증, 허혈성 심질환 및 협심증 또는 혈색소침착증 이상 등의 혈액학적 이상), 호흡기 질환(만성 폐쇄성 폐질환, 폐렴, 폐결핵 등의 감염성 폐질환 등)의 병력이 있는 자
- 7) 스크리닝 6개월 이내의 위장관의 출혈이 있거나 소화성 궤양, 궤양성 장질환(크론병 또는 궤양성 장염 등)의 병력이 있는 자
- 8) 주요 위장관 수술의 병력이 있는 자(중수절제술을 제외한 위절제, 위장관 우회술 또는 문합술 등)
- 9) 스크리닝 5년 내 알 진단 및 치료 받은 적이 있거나 치료 중인 대상자
- 10) 동열성 신부전 및 심한 신기능 장애(serum creatinine > 2.0 mg/dl)가 있는 대상자
- 11) 신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 대상자 (우울증, 정신분열증, 간질, 약물중독, 자살충, 이상성욕정진 등)
- 12) 인체적용시험 중 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물(해열진통제 및 비스테로이드성 소염진통제, 항결핵제, 항생제나 항진균제)을 지속적으로 복용해야 하는 자 (상세내용은 7.2. 병용약물의 허용 및 금기약물/식품을 참고한다.)
- 13) 최근 4주 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제, 또는 식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물이나 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용할 계획이 있거나 기타 임상시험에 참여한 경험이 있는 대상자
- 14) 임신부, 수유부 및 가임여성으로 참여기간 동안 임신 및 수유의 계획이 있는 대상자
- 15) 연구자 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적절하다고 판단되는 대상자

6.3. 목표 대상자 수 및 그 근거

6.3.1. 대상자 수

대상자 선정기준 및 제외기준에 적합한 지원자를 군당 30명 이상을 등록하여 최종 군당 24명 이상을 분석하기로 계획한다.

	시험군	대조군	합계
가능성평가 레수	24명	24명	48명
중도탈락을 포함한 레수	30명	30명	60명

6.3.2. 대상자 수 산출 및 그 근거

경증 간기능 저하 피험자에서 위약대조 시험법에 의한 기능성식품 조음파저리인삼꽃대추술(UGFB)의 간기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조, 비교 인체시험으로 대조식품군과 시험식품군 간의 간기능 향상효과를 비교 평가한다.  
Primary end point 는 기능성식품 복용 후 12 주 후 AST 수치의 감소치이며, 각 군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는지를 검정하기 위하여 t-test 를 시행한다.

각 군별 피험자 수는 다음과 같은 공식에 의해 계산된다.

$$n_f = \frac{2(\bar{X}_{\alpha/\beta} + \bar{X}_{1-\beta})^2 \sigma^2}{(D_t - D_c)^2}$$

단,  $\alpha$  = 통계학 유의수준, 백분위수,  
 $1-\beta$  = 검정력  
 $\bar{X}_{\alpha/\beta}$  = 100(1- $\alpha$ )/2% 표준정규분포  
 $D_t, D_c$  = 두 군의 평균 변화량의 차이

; 본 연구에서는 시험군과 대조군에서 조음파저리인삼꽃대추술(UGFB)주어 전과 주의 변화량의 평균치를 의미한다.

본 시험에서 필요한 피험자 수를 산정하기 위하여 다음을 가정한다.

일반적인 기능성식품의 인체시험에서와 같이 제 1종 오류를 5%로 가정하고 제 2종 오류를 20%로 가정한다.

- (1) 유의수준 (level of significance),  $\alpha = 0.05$   
 $Z_{1-\alpha/2} = 1.96$  (양측검정)
- (2) 검정력(Power of the test),  $1-\beta = 0.8$   
 $Z_{\beta} = 0.845$
- (3)  $D_t - D_c = 3.27, \sigma = 4.0$

일반인구집단의 AST 의 참고범위는 8-32 IU/L 로 평균이 20 정도이지만 본 연구에서는 대상자를 AST 25 이상인 사람으로 한정했으므로 일반인의 평균을 그대로 적용하기는 어렵다. 본 연구에서는 본 연구실에서 보유한 일반인의 AST 자료 중 25 IU/L 이상인 사람들의 평균치인 32.7 을 참고자료로 가정한다. 평균치의 10% 감소를 효과적인 감소치로 볼 수 있으므로 두 군간의 평균치의 차이는 3.27 로

가정한다. 변화함에 대한 자료는 없으나 일반인의 자료를 근거로 할 때 대부분의 대상자가  $\mu \pm 3\sigma$  에 포함되므로  $\sigma$  를 4.0 으로 가정한다.

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

$$n_c = \frac{2(z_{\alpha/2} + z_{1-\beta})^2 d^2}{(D_T - D_C)^2} = \frac{2(1.96 + 0.845)^2 4.0^2}{(3.27)^2} = 23.55$$

따라서, 각군당 필요한 대상자수는 24 명이 된다.

여기에 각군당 중도탈락율을 10% 감안하고 순응도를 90% 고려해보면, 다음 공식에 의해서 각군의 피험자 수가 계산된다.

$$N = \frac{n_c}{C \cdot (1 - \delta)} = \frac{23.55}{(0.9)(0.9)} = 29.07$$

단, N = 탈락률 보정 대상자수,  
C = 대상자들의 복용에 대한 순응도,  
 $\delta$  = 각군의 중도탈락률

결론적으로 본 임상시험에 필요한 피험자수는 각 군당 30 명으로 총 60 명이 된다.

## 7. 인체적용시험 방법

### 7.1. 복용방법 및 복용기간

- 1) 시험제품 복용기간  
아침, 저녁 식전 30분에 3정씩 1일 2회 (총 6정, 하루 2그램) 중분파 물과 함께 초음파처리인상온 대추술(UGFB)을 baseline(0주)부터 12주간 복용한다.
- 2) 대조제품 복용기간  
아침, 저녁 식전 30분에 3정씩 1일 2회 (총 6정) 중분파 물과 함께 대조제품(위약)을 baseline(0주)부터 12주간 복용한다.
- 3) 복용방법 (별첨 '인체적용시험용 식물 복용지도' 참조)
- 4) 복용순응도: 인체적용시험용 제품 복용순응도는 방문 3, 방문 4에 반납된 제품의 수를 측정하며 복용순응도가 평균 80% 미만인 경우 비순응(non-compliance)으로 간주하여 인체적용시험에서 통계 처리 시 pp에서 제외시킨다. 또한, 과다 복용하지 않도록 복용 지도한다.
- 5) 용기 반납: 대상자들에게 제품을 복용하는 방법과 횟수 등을 알려주고 방문 3, 방문 4 시험종료시에는 복용하고 남은 제품과 포장용기(Bottle)를 반납해야 함을 알려준다.

### 7.2. 병용요법의 허용 및 금기약물/제품

#### 7.2.1. 병용약물의 허용

시험제품 복용 외에 일반약 또는 운동요법, 식이요법 등은 금기행목이 아닌 경우 필요하다면 허용할 수 있다.

- 1) 뇌졸중 예방책적으로 부여되는 저용량의 aspirin (1일 최대 부여량 300mg)
- 2) 기타 대상자가 본 인체적용시험에 참여하기 전부터 복용하고 있던 병용약물 중 본 연구의 결과에 적에 영향을 미치지 않을 것으로 사용되는 병용약물은 연구자의 판단 하에 허용한다.
- 3) 연구자의 판단에 따라 간기능에 영향을 미칠 수 있는 약물은 복용 할 수 없으며, 복용중인 약물 복용(간질약 등)을 본 제품 복용 2주 전에 끊은 경우 인체적용시험에 참여할 수 있다.

모든 병용약물 투여 시작, 중단 또는 이상반응 발현 시 지용력을 포함, 해당 약물에 대한 정보(제품명, 투여목적, 투여용량, 투여기간 등)을 중재 기록서에 상세히 기록한다.

#### 7.2.2. 금기약물 및 식물

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

- 1) 마약성 및 비마약성 소염/진통제  
(단, aspirin은 1일 최대 부여량 300mg까지 허용, 또한 일과성 지료를 목적으로 한 소염/진통제는 7일 이내의 간헐적 투여가 가능하나 시험 발문 전 3일 내의 투여는 금지.)
  - ① 마약성 진통제  
: Codeine phosphate, Tramadol hydrochloride 등
  - ② 경구용 소염/진통제

- Salicylates류(aspirin), Acetaminophen, 경구용 NSAIDs(Naproxen, Ibuprofen), COX-2 억제제 (Celecoxib, Aceclofenac) 등
- ③ 국소용 소염/진통제  
○ 국소용 NSAIDs(Diclofenac sodium), 국외제를 포함한 기타 국소용제(Capsaicin)
- 2) 경구 및 주사제를 포함한 스테로이드제제  
○ Prednisolone, methylprednisolone, dexamethasone, hydrocortisone, betamethasone 등
- 3) 간 건강에 도움을 주는 건강기능식품  
○ 밀크씨슬(카르푸스마리아누스)추출물, 표고버섯균사체추출물, 표고버섯균사체, 도라지추출물, 갈  
항추출물, 브로콜리스프라우브로말, 유산균발효다시더추출물, 복분자추출분말, 발효율균, 헹개나무  
과병추출물-성분을 포함한 간 기능 개선 건강기능식품 및 제품
- 4) 호르몬 제제  
○ 성장 호르몬제제, 테스토스테론, 호르몬 대체 요법(hormone replacement therapy), 에스트로겐, 프로  
게스테론 제제, 갑상선호르몬 제제 등  
(단, 연구자의 판단에 따라 인체적용시험 참여 이전 3개월 전부터 안정된 용량으로 복용하고 있으며,  
인체적용시험 동안 용량 및 용법이 변경될 가능성이 없는 경우는 허용.)
- 5) Antineoplastic 제제  
○ Methotrexate, Tamoxifen 등 모든 antineoplastic 제제
- 6) 항우울제, 항정신성 의약품  
① 항우울제  
○ 삼환계 항우울제(imipramine, Amitriptyline), MAO 억제약 (phenelzine), SSRIs(Fluoxetine,  
Escitalopram), Trazodone 등  
② 항정신성 의약품  
○ Chlorpromazine, Thioridazine, Haloperidol, Clozapine, Olanzapine, Risperidone, Quetiapine 등
- 7) 기타 간 기능 개선, 지방간 개선, 간보호 등을 목적으로 하는 약물, 한방지유(집, 부황, 뜸) 등
- 8) 이외의 연구자 판단에 따른 약물의 흡수, 대사 또는 배설에 영향을 줄 수 있는 약물

연구자의 판단에 따라 인체적용시험 기간 중 병용금지 약물의 사용이 필요한 경우에는 해당 대상  
자와 인체적용시험을 중단해야 하며, 종료기록서의 마지막 페이지에 이와 관련하여 자세히 기록해  
야 한다. 또한 시험기간 중 환자용의 일코를 섭취는 강력히 금지되며, 일코를 섭취하였을 경우  
해당기관 임상연구담당자에게 연락한다. 정기적으로 환자들에게 일코를 섭취에 대해 질문을 하고,  
이에 대한 적절한 소견을 CRF에 기록한다.

## 8. 무작위 배정

무작위 배정 코드는 의회사의 업무를 위임 받은 무작위 배정 코드 생성 담당자가 생성한다. 시험군과  
대조군의 비율은 1:1이며, Permuted Block Randomization 방식을 적용, SAS Proc Plan을 이용하여 무작  
위 배정 코드를 생성한다.

- ① 연구대상으로 선정된 대상자를 확률에 의거한 무작위 배정 방법으로 각 군에 배정한다.
- ② 두 군 중의 한 군에 방문일(Day 0) 순서대로 낮은 번호부터 할당된다. 즉, 인체적용시험에 참여하  
는 순서대로 무작위 배정표에 따라 배정번호(Randomization Number: RN)를 부여하여 시험군 또  
는 대조군에 배정되도록 한다.
- ③ 무작위 배정 계획에 의해 대상자에게 사용할 제품은 관리약사가 대상자에게 부여한 코드대로 인  
체적용시험 제품을 제공하여 처방한다.

## 9. 이중눈가림

시험진행 중에는 연구자와 대상자 모두 각 대상자가 어느 군에 배정되어 있는지 알지 못하며, 의학적  
긴급상황이 발생하기 전까지는 이중눈가림을 해제하지 않으며, 배정된 군의 비밀을 유지한다. 이상 반  
응 등으로 이중눈가림을 해제 할 경우 시험책임자는 눈가림 해제 전에 의뢰자 또는 위임된 자에게 코  
드 공개의 필요성에 대한 설명과 함께 연락을 취해야 하며, 의뢰자는 눈가림해제가 반드시 필요한 사항  
인지 검토 후 눈가림해제 여부를 결정하여 결과를 시험자에게 전달한다. 눈가림해제가 결정된 경우 의  
뢰자는 이를 즉시 통보 받고, 시험자는 눈가림해제일자, 시간, 사유에 대한 눈가림 해제 문서를 할자에  
따라 ②B에 보고하고 기록 및 보관해야 한다.

10. 관찰항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법

10.1. 실험실적 검사

10.1.1. 분석항소

실험실적 검사의 측정 및 분석은 (재)서울의과대학연구소(SCL)실시한다.

10.1.2. 정도 관리

시험을 시작하기 전에 임상실험실로부터 정도 관리 관련 서류를 확인 하여야 한다.

10.1.3. 정상수치범위

위의 측정항목에 대한 정상수치는 실험실에서 시험 의뢰자에게 알려주고 변경사항도 통보하여야 한다.

10.2. 관찰항목, 임상검사항목

10.2.1. 대상자 동의

인체적용시험에 들어가기 전, 인체적용시험의 목적과 내용에 대하여 대상자에게 설명하고, 대상자의 자유의사에 따라 서면 동의를 받은 후 스크리닝 검사를 실시하나 AST검사와 수행도 가능하다. 시험 대상자의 적임성 스크리닝 검사는 각 대상자에 대하여 스크리닝 방문에 시행하며 스크리닝 방문 검사에 의해 임상적으로 유의한 이상이 있는 대상자는 제외된다.

10.2.2. 인구학적 조사

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

10.2.3. 신체검사

신체검사는 신장, 체중을 방문 1, 방문 4 에서 실시하며 신장은 신발을 벗고 cm 단위로 방문 1 에서만 측정하며, 체중은 시험기간 동안 동일한 체중계로 측정한다.

10.2.4. 활력징후

활력징후는 혈압, 맥박수, 체온을 측정하며 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 오른쪽이나 왼쪽 선택된 팔에서 매번 동일한 혈압계 및 체온계를 사용하여 측정한다.

10.2.5. 신형/병용약물 조사

신형/병용약을 조사는 인체적용시험 참가 4 주 이내 약을 복용력 또는 인체적용시험 진행 중에 병용한 약을 복용현황(용법, 용량, 복용기간 등)에 대하여 조사한다.

10.2.6. 병력 및 동반질환

외과적 수술력, 알러지력 등을 포함한 6개월 이내 과거력 및 현 병력에 대하여 발생시기(발생년도 또는 발생년월), 시험자의 의견 등을 획득록 한다. 단, 약성 용량 진단 및 치료 기록에 대하여서는 스크리닝 이전 5년 이내로 조사한다.

10.2.7. 생활습관 조사

생활습관 조사는 흡연, 음주, 식사, 운동 습관을 방문 2, 방문 4 에서 조사한다.

10.2.8. 실험실적 검사

실험실적 검사를 위한 혈액채취 및 소변 검사는 매 방문에서 이루어진다. 대상자들은 방문 전 8 시간 이내에 물을 제외한 음료수나 음식을 금기하여 공복 채혈하도록 한다. 방문 1의 실험실적 검사는 방문 1 이전 4 주 내에 방문에서 실시한 실험실적 검사 결과 AST 결과치가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 방문 2의 실험실적 검사는 방문 2 이전 7일 내에 실시한 실험실적 검사 결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 된다. 검사 항목 중 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있다.

단일 인체적용시험 종료 시험에서 시행한 실험실적 검사에 임상적으로 문제가 있을 경우에는 추적 조사 방문 시에 이러한 검사들을 다시 시행한다. 실험실적 검사결과는 시험자가 시기 적절하게 이를 검토해야 한다. 실험실적 검사치가 정상 범위를 벗어날 경우 시험자는 이에 대한 임상적 의의를 규명하고 해결을 때까지 또는 시험자가 임상적인 관련이 없다고 인정할 때까지 추적 조사를 한다.

<방문 1>

혈액학적 검사	WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
혈액화학적 검사	Total bilirubin, ALP, Total Protein, Albumin, AST, ALT, $\gamma$ -GTR, BUN, Creatinine, Glucose, Uric acid, Total cholesterol, Triglyceride, LDL, HDL
소변 검사	pH, RBC, WBC, Protein(=Albumin), Glucose, Specific gravity
당뇨 검사	HbA1c

<방문 2>

혈액학적 검사	WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
혈액화학적 검사	Total bilirubin, ALP, Total Protein, Albumin, AST, ALT, $\gamma$ -GTR, BUN, Creatinine, Glucose, Uric acid, Total cholesterol, Triglyceride, LDL, HDL
소변 검사	pH, RBC, WBC, Protein(=Albumin), Glucose, Specific gravity

<방문 3>

혈액학적 검사	WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
혈액화학적 검사	Total bilirubin, ALP, Total Protein, Albumin, AST, ALT, $\gamma$ -GTR, BUN, Creatinine, Glucose, Uric acid, Total cholesterol, Triglyceride, LDL, HDL
소변 검사	pH, RBC, WBC, Protein(=Albumin), Glucose, Specific gravity

<방문 4>

혈액학적 검사	WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
혈액화학적 검사	Total bilirubin, ALP, Total Protein, Albumin, AST, ALT, $\gamma$ -GTR, BUN, Creatinine, Glucose, Uric acid, Total cholesterol, Triglyceride, LDL, HDL
소변 검사	pH, RBC, WBC, Protein(=Albumin), Glucose, Specific gravity

10.2.9. 임신 여부 검사

불임수술(자궁절제술 또는 외과적 처치, 즉 양측성 난소절제술 등) 및 폐경이 확인된 대상자(surgical menopause 포함, 폐경 2년 이상)를 제외한 모든 가임 여성은 각 방문 시 소변 HCG 반응 검사를 통한 임신 여부를 확인 한다. 단, 방문 2의 임신 검사는 방문 2 이전 7일 내에 실시한 임신 검사 결과가 있는 경우 방문 2의 임신 검사를 생략하고 방문 1의 결과를 방문 2에 기재할 수 있다.

10.2.10. 대상자 적합성 평가

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

10.2.11. 스크리닝 평가 검사

대상자 선정을 위하여 스크리닝 시 스크리닝 방문을 기준 설정기준 간수치 250U 이상으로 2 주 이상 유지 되어 선정기준에 부합되어야 하며, 제외기준에 해당되는 조건이 없어야 한다. 단 간 기능을 개선하기 위한 약물 등을 투여 받지 않는 대상자에 한해서 스크리닝 방문 기준 4 주 이내에 실시한 결과를 사용할 수 있다.

10.2.12. 무작위 배정

방문1의 대상자 적합성 평가에 합당한 대상자를 선정된 후 시험군, 대조군에 무작위로 배정하고 인체 적용시험용 식물을 복용한다. 무작위 배정은 방문2의 최종 적합성 평가 후 시행되며, 무작위 배정 후 방문2에 인체적용시험용 식물을 처방 받도록 한다.

10.2.13. 기능성 평가 검사

실험실적 검사 이외의 간 기능 평가는 수행하지 않는다.

10.2.14. 인체적용시험용 식물 처방 및 교부

무작위배정 후 방문2, 방문3에 처방한다.

10.2.15. 인체적용시험용 식물 반납 및 복용순응도

인체적용시험용 식물은 방문3, 방문4에서 남은 제품과 포장용기 모두를 반납한다. 인체적용시험용 식물의 복용순응도는 대상자가 반납한 남은 약물의 개수를 세는 것으로 측정하는데, 복용하고 남은 제품은 반납한다.

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

(복용한 식물수 = 반납한 식물수 - 미반납한 식물수) / (복용할 수 \* 포장용기수)

10.2.16. 이상반응 확인

인체적용시험 중 발생하는 모든 이상반응을 기록하는 것은 시험자의 의무이다. 시험자는 IP 가 교부된 이후 방문 3, 방문 4에 조사하여야 하며, 이상반응은 의학진단용어로 기록하여야 한다. 이것이 불가능한 경우 시험자가 관찰하거나 보고한 증상 및 징후에 대한 용어를 기록하여야 한다.

10.2.17. 이학적 검사

이학적 검사는 시진, 촉진, 문진에 의해 확인할 수 있는 위관, 피부, 두/경부, 흉부/배, 복부, 비뇨/생식계, 사지, 근골격계, 심혈계, 림프계 등 기타 신체기관 검진을 포함한다.

스크리닝 검사상 발견된 유의할만한 사항은 중재기록서의 이학적 검사란에 기록하고, 인체적용시험용 제품의 복용 개시 후 이상반응의 정위에 부합되는 이학적 소견상의 유의할만한 사항이 발견된 경우에는 중재기록서의 이상반응란에 기록한다. 단, 인체적용시험용 제품의 복용 개시 이전에 발견된 바깥쪽까지 못한 이학적 증상에 발견된 경우에는 전 병력 조사란에 추가하여 기록하도록 한다.

10.3. 방문 별 관찰 검사 방법

10.3.1. 방문 1: 스크리닝(-2 주~0 일)

인체적용시험에 들어가기 전, 시험의 목적과 내용에 대하여 대상자에게 설명하고, 대상자의 자유의사에 따라 서면 동의를 받은 후 스크리닝 검사를 실시한다. 대상자의 적합성 스크리닝 검사는 각개의 대상자에 대하여 첫 복용 예정일 -2 주~0 일에 시행하며 다음 검사에 의해 임상적으로 유의할 이상이 있는 대상자는 제외한다.

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

스크리닝 시 대상자가 선정/제외기준에 적합인지 여부를 평가한다. 대상자로서 만족한 경우 다음 방문을 진행 할 수 있다.

10.3.2. 방문 2: 기준시기 (0 주, 0 일)

- 1) 활력징후
- 2) 생활습관 조사
- 3) 병용약물 조사
- 4) 실험실적 검사
- 5) 임신여부 검사

- 6) 대상자 적합성 평가
- 7) 무작위 배정
- 8) 인체적용시험용 식품 처방 및 교부

방문 2 에서 방문 1 의 결과 등을 토대로 인체적용시험에 적합하다고 판단된 대상자에게 무작위 배정을 집행한 후 인체적용시험용 식품을 처방한다.

**10.3.3. 방문 3: 중간방문 (6 주±7 일)**

- 1) 활력징후
- 2) 병용약물 조사
- 3) 이상반응 확인
- 4) 실험실적 검사
- 5) 임신여부 검사
- 6) 인체적용시험용 식품 반납 및 복용순응도
- 7) 인체적용시험용 식품 처방 및 교부

**10.3.4. 방문 4/초기방문: 종료방문(12 주±7 일)**

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

복용기간 중에 초기 종료 또는 종료 일확된 대상자는 종료방문 시 실시해야 할 항목을 실시한다. 종료에 대한 사유와 날짜를 대상자의 의무 기록지 또는 근거문서와 종래기록서의 시험 종료 양식에 기록한다.

**10.3.5. Follow up 방문(필요시)**

- 1) 활력징후
- 2) 이학적 검사
- 3) 병용약물 조사
- 4) 이상반응 확인
- 5) 실험실적 검사
- 6) 임신 검사

인체적용시험용 식품 최종 복용 후 혹은 초기 종료 후 비정상적인 임상실험실 결과, 계속되는 이상반응, 중도탈락, 시험자 판단에 따라 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 항목은 추적관찰을 위해 4 주 이내 다시 방문하도록 한다.

## 11. 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항

### 11.1. 예측 이상반응

UGFB 의 복용으로 발생할 수 있는 특별한 부작용은 없었으며, 11.2 에 명시된 일반적 주의사항과 관련된 이상반응이 예측될 수 있다. 또한, 과민반응을 가진 경우 해당 대상자는 복용을 즉시 중단하고 의사의 판단에 의해 인체적용시험 참여 여부를 결정한다.

### 11.2. 일반적 주의

- 1) 이 기능성제품의 복용으로 건강한 자의 정신 및 신체기능에 영향을 미치지 않았지만 과량으로 복용하지 않도록 주의토록 한다.
- 2) 이 제품의 복용으로 발락, 두드러기 또는 다른 알러지 반응이 나타나는 경우 즉시 연구자와 상의하여야 한다.
- 3) 이 기능성제품의 복용으로 구토, 설사, 메스꺼움 등의 증상이 나타나는 경우 즉시 연구자와 상의하여야 한다. 위장장애 및 특정질환(담낭질환) 등이 있는 경우 복용을 피한다.
- 4) 남용과 신체적 정신적 의존성 이 제품의 투약중단 시 금단증상이나 경시변화의 징후는 없었으나, 의사는 약물남용의 경향이 있는 대상자에 대하여 오남용의 징후가 있는지 조심하여 관찰하여야 한다.

### 11.3. 임부 및 수유부에 대한 복용

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

### 11.4. 과량복용시의 처치

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

## 12. 시험 중지 및 탈락기준

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

대상자는 정해진 복용기간을 완료하기 전에 특정한 이유로 인해 중도 탈락할 수 있다. 인체적용시험 실시기관에 다시 방문하는 것을 거절한 대상자를 제외하고, 어떠한 이유이든 복용기간 중 중도 탈락 또는 조기 종료된 모든 대상자는 조기 종료 불가(방문4 불가합격 철회) 항목에 기술되어 있는 불가들을 준수하여야 한다.

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

### 12.1. 시험자에 의해 중지, 탈락되는 경우

- 1) 선정/제외기준에 적합하지 않은 경우
- 2) 갑작스런 사고로 인하여 시험을 계속할 수 없는 경우
- 3) 대상자의 안전성에 문제를 일으킬 수 있다고 판단의사가 판단한 경우
- 4) 과도한 예측 이상반응 증상, 사망을 포함한 중대한 이상반응의 경우
- 5) 방문 계획 등에 대한 순응도 계획된 방문일에 방문하지 않아 안전성 및 기능성 평가를 하지 못하는 경우(단, 계획된 방문일이 지난으나 여유분의 약물이 있어 제대로 복용한 경우는 제외)
- 6) 병용 금지된 약물의 투약 등 시험계획서 위반의 경우
- 7) 인체적용시험을 식용을 용법 용량대로 복용하지 않아 인체적용시험을 진행 할 수 없다고 판단될 경우
- 8) 시험 전 평가에서 발견하지 못한 증상이나 질환이 확인 된 경우
- 9) 대상자의 증상 약화로 더 이상 인체적용시험을 진행할 수 없다고 판단될 경우
- 10) 기타 인체적용시험담당자가 시험을 중지하여야 한다고 판단한 경우

### 12.2. 대상자에 의해 중지, 탈락되는 경우

- 1) 대상자나 그 가족이 시험 중지를 요청한 경우
- 2) 이상반응 발생으로 인한 중도탈락
- 3) 인체적용시험을 식용 복용거부, 비협조, 등의 철회 등의 기타 이유로 인한 중도탈락



### 13. 기능성 평가기준, 평가변수 및 통계분석방법

#### 13.1. 기능성 평가기준

인체적용시험 진행 일정에 따라 아래의 기능성 평가 항목을 검사한다.

1, 2 차 기능성 평가변수에서의 변화지의 경우는 "종류시험(12 주째) 수치 - 기저시험(0 주째) 수치"의 식을 이용하여 산출한다.  
또한, 변화율은 [(종류시험(12 주째) 수치 - 기저시험(0 주째) 수치)/기저시험(0 주째) 수치] × 100 (%)의 식으로 계산한다.

#### 13.2. 기능성 평가변수

1) 1 차 기능성 평가변수:

- Baseline(방문 0) 대비 12 주 후 평가시험(방문 4)에서 AST 수치의 감소치

2) 2 차 기능성 평가변수:

- Baseline(방문 0) 대비 12 주 후 평가시험(방문 4)에서 ALT 수치의 감소치 및 개선율
- Baseline(방문 0) 대비 12 주 후 평가시험(방문 4)에서 AST 개선율
- Baseline(방문 0) 대비 12 주 후 평가시험(방문 4)에서 TG 수치의 감소치 및 개선율
- Baseline(방문 0) 대비 12 주 후 평가시험(방문 4)에서  $\gamma$ -GT 수치의 감소치 및 개선율
- Baseline(방문 0) 대비 12 주 후 평가시험(방문 4)에서 Lipid profiles 의 감소치 및 개선율

#### 13.3. 통계분석 방법

- 모든 통계적 분석은 SPSS version 21.0 또는 SAS version 9.4 로 수행한다.
- 본 인체적용시험에서는 중간분석을 실시하지 않는다.

##### 13.3.1. 분석 대상군

본 인체적용시험의 대상으로부터 얻어진 자료는 크게 안전성 평가(Safety)군, FA(Full Analysis)군, PP(Per Protocol)군의 세 가지 형태로 분석된다.

##### 1) 안전성평가(Safety)군

Safety군은 본 인체적용시험에 무작위 배정되어 인체시험용 식품을 1회 이상 복용한 대상자를 의미한다.

##### 2) FA군

FA군은 인체적용시험에 무작위 배정되어 인체시험용 식품을 1회 이상 복용한 대상자 중 인체시험용 식품 복용 후 1차 기능성 평가 자료가 1회 이상 수집된 대상자를 의미한다.

##### 3) PP군

PP군은 FA군 대상자 중 중대한 계획서 위반 없이 본 인체적용시험을 완료한 대상자이며, 중대한 계획서 위반으로는 중의사 미 취직, 신청/제외 기준 위반, 병용 금지 약물 복용, 시험 개시/종료 시험의 주요 검사의 누락, 전체 복용 평균 순응도 80% 미만, 종료 방문 기간 미준수 등을 포함한다. 기타, 연구

결과 해석에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되는 경미한 인체적용시험계획서의 위반사항은 위반 또는 지연 정도와 사유를 정확히 기재하고 논거를 제시 이전 시험자, 의뢰자, 모니터, 통계학자 등이 시험연구에 영향을 주었는지 종합적으로 고찰하여 PP군 포함 여부를 판단한다.

#### 13.3.2. 결과 해석의 원칙

기능성 자료에 대한 분석은 FA군과 PP군을 대상으로 하고 주 분석군은 FA군으로 한다. 안전성 자료에 대한 평가는 Safety군 그리고 인구통계학적 및 기타 기저 특성에 대한 분석은 FA군을 대상으로 한다. FA군의 기능성 자료에 관해 최종 종료 시험의 자료가 부재한 경우 LOCF(Last Observation Carried Forward Analysis)를 적용해 무작위 배정 후 가장 최근에 얻어진 자료로 대체한다.

#### 13.3.3. 대상자의 인구학적 기초자료 및 기타 특성에 대한 분석

인구통계학적 및 기타 기저 특성에 대한 분석은 연속형 자료의 경우 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값 및 최댓값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test로 검증한다. 범주형 자료의 경우 빈도와 비율을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 Chi-square test 또는 Fisher's exact test로 검증한다.

#### 13.3.4. 기능성 평가변수 분석방법

인체적용시험 진행 일정에 따라 아래의 기능성 평가 항목을 검사한다. 단, 각 변수들은 대상자의 AST 수치 중에서도 따라 평가변수의 차이를 별도로 분석 할 수 있다.

##### 1) 1 차 기능성 평가변수 분석방법

###### Baseline(방문 0) 대비 12 주 후 평가시험(방문 4)에서 AST 감소치

인체시험용 식품 투여 전 대비 12 주 평가 시험의 AST 감소치에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값 및 최댓값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test로 검증한다. 만일 Baseline 점수의 군 간 차이가 통계적으로 유의하다면 이를 공변량으로 하는 공분산분석 (ANCOVA)을 실시한다. 또한 각 군 내 AST 감소치의 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 검증한다.

##### 2) 2 차 기능성 평가변수 분석방법

###### ① Baseline(방문 0) 대비 12 주 후 평가시험(방문 4)에서 ALT의 감소치 및 개선율

인체시험용 식품 투여 전 대비 12 주 평가 시험의 ALT 감소치 및 개선율에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값 및 최댓값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test로 검증한다. 또한 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 검증한다.

###### ② Baseline(방문 0) 대비 12 주 후 평가시험(방문 4)에서 AST 개선율

인체시험용 식품 투여 전 대비 12 주 평가 시험의 AST 개선율에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값 및 최댓값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은

independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test 를 이용해 결정한다.

③ **Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서 TG의 감소치 및 개선율**

인체시험용 식품 투여 전 대비 12주 평가 시점의 TG 수치의 감소치 및 개선율에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test 를 이용해 결정한다.

④ **Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서 FGT 감소치 및 개선율**

인체시험용 식품 투여 전 대비 12주 평가 시점의 FGT 수치의 감소치 및 개선율에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test 를 이용해 결정한다.

⑤ **Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서 lipid profile 각 수치 감소치 및 개선율**

인체시험용 식품 투여 전 대비 12주 평가 시점의 Lipid profiles 의 감소치 및 개선율에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test 로 결정한다.

14. 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법

14.1. 안전성 평가

인체시험용시행제를 복용 전, 복용 중(6주) 그리고 최종 복용(12주)에 실험실적 검사 및 활력징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다.

14.2. 평가기준

- (1) 이상반응
- (2) 실험실적 검사 결과
- (3) 활력징후 결과

14.3. 안전성 평가변수 및 분석방법

(1) 이상반응  
전체, 중대한 그리고 중도 탈락의 원인이 된 이상반응과 인체시험용 식품과 관련 있는 이상반응에 대해 시험대상자 수와 비율을 제시하고, Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 군 간 차이에 대한 유의성을 결정한다. 또한 미용의 중증도, 중대성, 위대한 조치 그리고 결과 등에 대한 발생건수를 제시한다.

(2) 실험실적 검사 결과  
실험실적 검사 결과는 인체시험용 식품 투여 전 스크리닝 방문 대비 종료 시험 (12주)의 정상/비정상 변화에 대해 분할표를 이용해 빈도와 비율을 제시하고 McNemar's test 또는 McNemar's exact test를 이용하여 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성을 결정한다.  
또한 혈액학 및 혈액화학 검사와 같은 연속형 자료의 경우 인체시험용 식품 투여 전 스크리닝 방문 대비 종료 시험 (12주)의 변화량에 대해 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화의 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 결정한다.

(3) 활력 징후  
활력징후는 인체시험용 식품 투여 전 스크리닝 방문 대비 종료 시험(12주)의 변화량에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화량의 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 결정한다.

(4) 이학적 검사  
이학적검사는 인체시험용 식품 투여 전 스크리닝 방문 대비 종료 시험(12주)의 정상/비정상 변화에 대해 분할표를 이용해 빈도와 비율을 제시하고 McNemar's test 또는 McNemar's exact test를 이용하여 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성을 결정한다.

## 15. 이상반응 정의 및 보고 규정

### 15.1. 정의

#### 1) 이상반응(Adverse Events, AE)

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

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

인체적용시험용 식품의 임의 용량에서 발생한 모든 유해하고 의도하지 않은 반응으로서 인체적용시험용 식품과의 인과관계를 부정할 수 없는 경우를 일컫는다.

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

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

- ㉠ 사망하거나 생명에 대한 위험이 발생한 경우
- ㉡ 입원할 필요가 있거나 입원 기간을 연장할 필요가 있는 경우
- ㉢ 영구적이거나 중대한 장애 및 기능 저하를 가져온 경우
- ㉣ 태아에게 기형 또는 이상을 초래하는 경우

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

### 15.2. 중증도의 평가 기준

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

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

### 15.3. 시험제품과의 인과관계 평가

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

#### 1) 명확히 관련 있음(Definitely)

- 시험제품을 복용하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
- 이상반응이 다른 어떤 이유보다 시험제품 복용에 의해 가장 개연성 있게 설명되는 경우
- 시험제품의 복용 중단으로 이상반응이 사라지는 경우
- 시험제품 재복용(가능한 경우에만 실시) 결과가 양성인 경우

- 이상반응이 시험제품 또는 동일 계열의 건강기능식품에 대해 이미 알려져 있는 정보와 일관된 양상을 보이는 경우

#### 2) 관련이 있다고 생각됨(Probably)

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

#### 3) 관련 가능성이 있음(Possibly)

- 시험제품을 복용하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
- 이상반응이 다른 가능성 있는 원인과 같은 수준으로 시험제품 복용에 기인했다고 판단되는 경우
- 시험제품 복용 중단으로 이상반응이 사라지는 경우

#### 4) 관련 가능성이 없음(Unlikely, probably not)

- 시험제품을 복용하였다는 증거가 있는 경우
- 이상반응에 대해 보다 가능성 있는 원인이 있는 경우
- 시험제품의 복용 중단 결과 음성이거나 모호한 경우
- 시험제품 재복용 결과가 음성이거나 모호한 경우

#### 5) 명확히 관련 없음(Not related, None)

- 대상자가 시험제품을 복용 받지 않은 경우
- 시험제품 복용과 이상반응 발현간의 시간적 순서가 타당하지 않은 경우
- 이상반응에 대해 다른 명백한 원인이 있는 경우

#### 6) UK(Unknown, unassessable)

- 연관성을 판단하기에 근거가 부족한 경우
- 근거자료의 질적 수준이 떨어지거나 데이터 간의 일관성이 없는 경우

### 15.4. 이상반응의 기록

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

중려기록지(CRF)에는 이상반응의 증상 및 중후, 발현일, 수실일, 이상반응 정도, 보고방법, SAE 해당여부, 인체적용시험용 식품과 인과관계, 예측여부, 이상반응 처치, 이상반응 결과가 기재되어야 한다. 세부적인 치료 내용은 CRF의 이상반응 코미자에 기록하여야 한다.

### 15.5. 중대한 이상반응의 보고

예측하지 못한 중대한 이상반응이 투약기간 도중에 발생하는 경우, 인체적용시험용 식품과의 인과관계와 관계없이 시험자가 아래의 루파마크로 연락자로 24시간 이내에 보고한다. 또한 기타 관련된 시험자, 심사위원회에 통대하고 예상하지 못한 모든 이상반응을 보고하여야 한다.

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

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

### 15.6. 이상반응을 경험한 대상자의 추적조사

시험자는 이상반응이 나타난 대상자에 대해 증상이 가라앉고 비정상적 실험실적 검사치가 기준치로 회복되거나, 혹은 관찰된 변화에 대해 만족스러운 설명이 될 때까지 추적 관찰 한다. 또한 이상반응의 진행 결과는 병력기록서 양식에 따라 기재하도록 한다.

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

#### 16.1. 시험 대상자 설명서 및 동의서

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

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

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

#### 16.2. 피해자 보상에 대한 규약

[별첨 4] 피해자 보상에 대한 규약 참조

#### 16.3. 인체적용시험 후 대상자의 진료 및 추적관찰 기준

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

- 1) 신체검사(재중)
- 2) 혈액검사
- 3) 병용약물 조사
- 4) 이상반응 조사
- 5) 실험실적 검사
- 6) 임신검사

### 17. 대상자의 안전보호에 관한 대책

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

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

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

인체적용시험으로 인한 이상반응이 발생할 경우 대상자가 회복할 때까지 적절한 의료조치가 취해지고 인체적용시험연구자는 가입된 피험자 보호에 따라 보상할 것이다.

### 18. 그 밖에 인체적용시험을 안전하게 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항

#### 18.1. 윤리적 고려

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

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

#### 18.2. 인체적용시험 자료의 보관 및 문헌의 열람

인체적용시험 관련 문서에는 모든 학업일지, 근원서본, 모니터링 기록과 약측 일경, 인체적용시험 의뢰자-시험자간의 서신교환과 규정문서 등이 포함된다. 시험자가 서명한 인체적용시험 계획서와 그 개입된, 임상시험심사위원회 관련 서신, 허가관련서류, 서명된 시험대상자동서, 인체적용시험용 식용 수령증, 수물기록).

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

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

#### 18.3. 자료 및 대상자 기록의 기밀 유지

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

임사위원회 및 식용의약품안전처장은 대상자의 비밀보장을 침해하지 않고 관련 규정이 정하는 범위 안에서 시험결과와 자료의 신뢰성을 검증하기 위해 대상자에 대한 기록을 열람할 수 있다.

#### 18.4. 보고서 제출 및 출판에 관한 방침

원칙적으로 본 인체적용시험결과를 시험의뢰자의 소유이다. 그러나, 인체적용시험연구자는 시험의뢰자와 상의 후 시험의 결과를 독립적으로 한문자에 기재하거나 발표할 권리가 있으며, 발표문물을 제출하기 30 일전에 조류 사본은 시험의뢰자에게 제공하여야 한다. 시험의뢰자는 인체적용시험연구자와 협의 후 인체적용시험연구자와는 별도로 시험 결과를 학회에 발표할 수 있는 권리가 있다. 시험의뢰자는 조류를 제출하기 전에 적어도 30 일간 충분한 연구와 협의 및 검토하여야 한다.

#### 18.5. 시험계획서 준수에 대한 모니터링

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

#### 18.6. 품질관리(QC) 및 보증(OA)

매이되는 직접 CRF 에 기입된다. 수정 시에는 원본이 보이도록 수정하고자 하는 곳을 판 줄을 가로로 긋고 새로 기입한다. 수정한 곳에 수정한 사람의 이니셜과 서명, 날짜를 기입한다. 종래기록지 및 자료는 위파마크로에서 모니터 한다.

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

19. 참고문헌

- 1) 건강기능식품에 관한 법률, 식품의약품안전청 2002
- 2) 국민건강영양조사 제 4기 3차년도(2009), 보건복지부
- 3) 의약품 등의 독성시험기준: 식품의약품안전청 고시 제 2009.116 호
- 4) 의약품 임상시험 관리기준, 의약품 임상시험관리기준 (의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표 4)
- 5) 건강기능식품공전 2014, KFDA
- 6) 대한약전의 의약품등록집 제 4 개정, 2012, KFDA
- 7) Namba T. The encyclopedia of Wakan-yaku with color pictures. Osaka: Hoikusha (1980)
- 8) Park JD. Recent studies on the chemical constituents of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A.Meyer). Korea J Ginseng Sci. 20:389-415 (1996)
- 9) Sanata S, Kondo N, Shoji I, Tanaka O, Shibata S. Studies on the saponins of ginseng. I. Structure of ginseng-R0, Rb1, Rb2, Rc and Rd. ChemPharmBull. 22:421-428 (1974)
- 10) Kitagawa I, Taniyama T, Shibuya H, Noto T, Yoshikawa M. Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra (2) : Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same *Panax ginseng* root. YakugakuZasshi. 107:495-505 (1987)
- 11) Ko SK, Bae HM, Cho OS, Im BO, Chung SH, Lee BY. Analysis of ginsenoside composition of ginseng berry and seed. Food SciBiotechnol. 17:1379-1382 (2008)
- 12) Dey L, Zhang L, Yuan CS. Anti-diabetic and anti-obese effects of ginseng berry extract: comparison between intraperitoneal and oral administrations. Am J Chin Med. 30:645-647. (2002)
- 13) Huo YS. Anti-senility action of saponin in *Panax ginseng* fruit in 327 cases. Zhong Xi Yi Jie He ZaZhi. 4:593-596 (1984)
- 14) Zhang SC, Jiang XL. The anti-stress effect of saponins extracted from *Panax ginseng* fruit and the hypophyseal-adrenal system. Yao XueXueBao. 18:860-863 (1981)
- 15) Bae HM, Cho OS, Kim SJ, Im BO, Cho SH, Lee S, Kim MG, Kim KT, Leem KH, Ko SK. Inhibitory effects of ginsenoside Re isolated from ginseng berry on histamine and cytokine release in human mast cells and human alveolar epithelial cells. J Ginseng Res. 36:369-374. (2012)
- 16) Wang W, Zhao Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H, Zhang R. In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. Cancer ChemotherPharmacol. 59:589-601 (2007)
- 17) Lee SA, Jo HR, Im BO, Kim S, Whang WK, Ko SK. Changes in the contents of prosapogenin in the red ginseng (*Panax ginseng*) depending on steaming batches. J Ginseng Res. 36:102-106 (2012)
- 18) Ko SK, Lee KH, Hong JK, Kang SA, Sohn UD, Im BO, Han ST, Yang BW, Chung SH, Lee BY. Change of ginsenoside composition in ginseng extract by the vinegar process. Food SciBiotechnol. 14:509-513 (2005)
- 19) Zheng H, Jeong Y, Song J, Ji GE. Oral administration of ginsenoside Rk1 inhibits the development of

- atopic dermatitis-like skin lesions induced by oxazolone in hairless mice. IntImmunopharmacol. 11:511-518. (2011)
- 20) Keum YS, Han SS, Chun KS, Park KK, Park JH, Lee SK, Surh YJ. Inhibitory effects of the ginsenoside Rg3 on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF-kappaB activation and tumor promotion. Mutat Res. 523-524:75-85. (2003)
  - 21) Kim ND, Kang SY, Park JH, Schini-Kerth VB. Ginsenoside Rg3 mediates endothelium-dependent relaxation in response to ginsenosides in rat aorta: role of K+ channels. Eur J Pharmacol. 367:41-49. (1999)
  - 22) Yang L, Hao J, Zhang J, Xia W, Dong X, Hu X, Kong F, Cui X. Ginsenoside Rg3 promotes beta-amyloid peptide degradation by enhancing gene expression of neprilysin. J Pharm Pharmacol. 61:375-380. (2009)
  - 23) Lee WM, Kim SD, Park MH, Cho JY, Park HJ, Seo GS, Rhee MH. Inhibitory mechanisms of dihydroginsenoside Rg3 in platelet aggregation: critical roles of ERK2 and cAMP. J Pharm Pharmacol. 60:1531-1536. (2008)
  - 24) Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H, Surh YJ. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. Cancer Lett. 150:41-48. (2000)
  - 25) Jeong SJ, Han SH, Kim DY, Lee JC, Kim HS, Kim BH, Lee JS, Hwang EH, Park JK. Effects of m Rg2, a mixture of ginsenosides containing 60% Rg2, on the ultraviolet B-induced DNA repair synthesis and apoptosis in NIH3T3 cells. Int J Toxicol. 26:151-158 (2007)

# Case Report Form

Protocol No: UGFB-1

Site	세명대학교부속제천한방병원								
Initial	<table border="1"> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>Family</td><td>First Name</td><td></td><td></td> </tr> </table>					Family	First Name		
Family	First Name								
Screening No	S <table border="1"> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>								
Random No	R <table border="1"> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>								

## Confidential Documents

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



## CRF Guideline

### [대용기입]

1. 권장역 불변을 사용하여 읽기 쉽도록 명확하게 한 칸에 한 자씩 왼쪽에서 오른쪽으로 기록한다.
2. 대상자 정보란 작성 시 스크리닝 번호를 먼저 부여한 후 스크리닝을 통과한 대상자에 대해서 무작위화된 번호를 부여한다.
3. 빈칸은 최대 길이의 앞에 일정한 제시되므로 공란이 없도록 모든 항목을 기록한다.
4. 숫자 작성 시 그 수치가 한자리일 경우 다음의 예시 1)과 같이 기록한다. 0 | 0 | 7  
수준을 셋째 자리까지 작성해야 하는 경우 둘째 자리에서 반올림하여 기록한다.  
날짜 작성은 다음의 예시 2) 및 예시 3)를 참고하여 작성한다.

예시 2) 양년월일 1970년 6월 20일  

7	0	0	6	2	0
YY	MM	DD			

예시 3) 영문항목에서 날짜가 확실치 않을 경우  

7	0	0	6	U	K
YY	MM	DD			

5. 대상자 이니셜 작성 시 기입한이 부족한 경우 제시된 칸 내에서 공백 순으로 채우고 기입한이 남는 경우 "-"를 작성하여 오류를 방지한다.
6. 허위된 공간 외 바깥이나 여백에 낙서 또는 정보 기입을 하지 않는다.
7. 응례기록서 각 페이지 상단의 대상자 정보란을 기록한다.
8. 응례기록서 내용을 잘 읽고 해당하는 체크박스에 해당없이 'N' 표시 한다.
9. 약물 및 의료 기기명 등은 실용명으로 명확하게 기록한다.
10. 요구나 순서가 필요한 경우에는 필자가 분명하게 보충도박 기록한다.
11. 약어 사용 시 의학적으로 분명하고 표준화된 약용어만을 사용하고 그 외의 약어나 머리글자의 사용을 금한다.

### [무확정보]

12. 누락된 정보에는 다음의 약어를 확인하고 해당하는 체크박스에 해당없이 'N' 표시한다.  
 ND(Not Done) 시행하지 않음     NA(Not Available/ Not Applicable) 존재하지 않음/적용되지 않음  
 UK (Unknown) 모름

### [기록확인]

13. 스크리닝 완료 후 스크리닝 종합 평가에 대한 기록을 완료한다.
14. 응례기록서의 이상반응 보고서에 기록된 정보와 중대한 이상반응 상세보고서의 기록이 일치하는지 확인한다.
15. 응례기록서가 페이지 순서대로 있는지 또는 누락 및 훼손된 것은 없는지 확인한다.

### [수정필치]

16. 기재 사항을 수정할 경우에는 예시 4)를 참고하여 한 줄을 긋고 '기록오기'라 적은 뒤 가능한 한 가까운 곳에 수정내용 수정일 그리고 수정한 사람의 이름(또는 서명)을 작성한다. 수정역의 사용을 금한다.  
 예시 5) 

	X	Y	Z
A	B	C	

 12/07/10 기록오기(이름(서명))
17. 수정정보를 지우거나 겹쳐 쓰지 않는다. 수정 이전의 기록은 읽을 수 있게 한다.
18. 응례기록서의 원본을 복사하여 사용하지 않는다.

Protocol No.	Screening	Screening No.	Initials	Page
UGFB-1	-4 주- 0 주	S <input type="text"/>	<input type="text"/>	3

**Contents**

- Visit 1: 스크리닝 (-4 주-0 일, Week -4)
- Visit 2: 투여 직전 (0 일, Week 0)
- Visit 3: 투여 6 주 ±7 일 (42 일, Week 6)
- Visit4/조기종료: 투여 12 주 ±7 일 (84 일, Week 12)
- 추가방문 / 추적조사 (필요 시)
- 반응약물 / 이상반응 보고 양식
- 임상시험종료 양식

**Study Flow Chart**

시험항목	스크리닝	복용기간			Follow up <sup>*)</sup>
	방문 1 -4 주 ~ 0 주	방문 2 0 주(0 일)	방문 3 6 주(±7 일)	방문 4* 12 주(±7 일)	추가 방문 필요 시
대상자 동의	√				
연구목적 조사 *	√				
신체검사 *	√			√	
혈액검사 *	√	√	√	√	√
생역 및 동반질환	√				
이학적 검사	√			√	√
생활습관 조사 *		√		√	
심혈관계 검사 *	√	√	√	√	√
임신여부 검사 *	√	√	√	√	√
대상자 적합성 평가 *	√	√			
투약위 배정		√			
약 처방 및 교육		√	√		
선형-반응약물 조사	√	√	√	√	√
이상반응 확인			√	√	√
12 주 방문 및 복용종료			√	√	

Protocol No.	Screening	Screening No.	Initials	Page
UGFB-1	-4 주- 0 주	S <input type="text"/>	<input type="text"/>	4



Protocol No.	Screening	Screening No.	Initials	Page
UGFB-1	-4 주 ~ 0 주	S [ ] [ ] [ ] [ ]	[ ] [ ] [ ] [ ]	5

**방문일**  
방문일을 기록하여 주십시오.

[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]  
년 YYYY 월 MM 일 DD

**대상자 동의**  
대상자에게 본 임상시험에 관해 상세히 설명하고 서면 동의 받았습니까?  
 Yes  No

서면동의일  
[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]  
년 YYYY 월 MM 일 DD

**연구학적 조사**

성 별  남  여

생년월일 [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]  
년 YYYY 월 MM 일 DD

나이 [ ] [ ] 세

\* 만 18 세 이상 만 75 세 미만 대상자는 본 임상시험에 참여할 수 있습니다.  
\* (특히 65세 이상 75세 미만 대상자) (생년월일 기온 생일이 지나지 않은 경우 -1 세)

**신체검사**

체 중 [ ] [ ] [ ] [ ] kg

신 장 [ ] [ ] [ ] [ ] cm

\* 체중은 시행기간 후 동일한 동일한 적중계를 사용하며, 신장은 신을 넣고 cm 단위로 측정합니다.

**혈액징후 (Vital Sign)**

혈압(mmHg) 수축기(SBP) [ ] [ ] [ ] [ ] 이완기(DBP) [ ] [ ] [ ] [ ]

맥 박(beats/min) [ ] [ ] [ ] [ ]

체온(°C) [ ] [ ] [ ] [ ]

\* 측정은 동일한 병원 자체로 임상을 위한 후 측정하며, 각 방문 시마다 같은 곳에서 측정합니다.

**임신검사(Pregnancy)**

NA ▶ 임신 계획이 없거나 임신일 이후 2년 이상 무임부 무임부, 최근적 임신수용후 임신 징후가 없는 'NA'에 해당

검체 채취일 [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]  
년 YYYY 월 MM 일 DD

검사 결과  Negative  Positive "Positive"인 경우 임상시험에 참여할 수 없습니다.

CRF\_Version 1.0

CONFIDENTIAL

Protocol No.	Screening	Screening No.	Initials	Page
UGFB-1	-4 주 ~ 0 주	S [ ] [ ] [ ] [ ]	[ ] [ ] [ ] [ ]	6

**선행/방문 약물 조사**  
지난 4주 이내 복용된 약물 또는 현재 복용중인 약물이 있습니까?  
 No  Yes "선행/방문 약물" 31page 에 자세한 사항을 기재하십시오.

**병력 및 동반질환**  
대상자가 지난 3개월 내에 경험하였거나 현재 가지고 있는 질환이 있습니까?  
 No  Yes 아래에 자세히 기재하십시오.

질환명	발생시기 (년 YY/ 월 MM)	Ongoing		소 견
		Yes	No	
	[ ] [ ] [ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	[ ] [ ] [ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	[ ] [ ] [ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	[ ] [ ] [ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	[ ] [ ] [ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	[ ] [ ] [ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	[ ] [ ] [ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	[ ] [ ] [ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

**이학적 검사**  
방문 당시 어떤 비정상 내용 있습니까?  Yes  No

No.	분류 번호	비정상 내용	임상적 의미
1	[ ] [ ]		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
2	[ ] [ ]		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
3	[ ] [ ]		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
4	[ ] [ ]		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS

▶ 소 견 [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]

\* 본 설문지의 기입 사항은 본 연구에 사용되고 오직 연구 목적으로만 사용됩니다. 본 연구에 관련된 연구자가 본 설문지를 본 연구에 사용하며, 이를 기록합니다.

**표. 분류번호 - 이학적검사**

01 General appearance	06 Heart/Circulation	11 Neurological/ Psychiatric
02 Skin and Mucosae	07 Abdomen	12 Heart/Circulation
03 HEENT	08 Renal/ Genitourinary	13 Extremities
04 Breast	09 Rectal	14 Musculoskeletal
05 Lung	10 Lymph nodes	15 Others

CRF\_Version 1.0

CONFIDENTIAL

Protocol No.	Screening	Screening No.	Initials	Page
UGFB-1	-4 주 - 0 주	S <input type="text"/>	<input type="text"/>	7

**실험실적 검사 (Laboratory test)**  일부만 수행  No

검체 채취일  yy/mm/dd

**혈액학 검사(Hematology)** 재검  없음  있음 (  yy/mm/dd)

항목	참고치	검사치	재검치	Nomal Yes	Abnormal NCS	CS	소견
WBC	3.5-10.0 x10 <sup>9</sup> / $\mu$ L			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC	M 4.50-6.30 x10 <sup>12</sup> /L F 4.00-6.00 x10 <sup>12</sup> /L			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemoglobin	M 13.0-17.0 g/dL F 12.0-16.0 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemogocrit	M 39.0-52.0 % F 36.0-48.0 %			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Platelet	150-400 x10 <sup>3</sup> / $\mu$ L			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

**혈액화학검사(Blood Chemistry)** 재검  없음  있음 (  yy/mm/dd)

항목	참고치	검사치	재검치	Nomal Yes	Abnormal NCS	CS	소견
ALP	104-388 U/L			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total bilirubin	0.2-1.2 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total Protein	5.8-8.7 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Albumin	3.8-5.1 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total cholesterol	130-220 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Triglyceride	50-130 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
HDL cholesterol	35-88 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LDL cholesterol	140 이하 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
BUN	8-20 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Creatinine	M 0.8-1.2 mg/dL F 0.6-0.9 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uric acid	M 3.0-8.3 mg/dL F 2.0-8.3 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose	70-110 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

**소변검사(Urine Analysis)** 재검  없음  있음 (  yy/mm/dd)

항목	참고치	검사치	재검치	Nomal Yes	Abnormal NCS	CS	소견
Specific gravity	1.000-1.030			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
pH	5.0-8.0			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Protein	-			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose	-			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Blood(RBC)	0-5/HPF			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
WBC	-			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

\* 실험실 검사가 계속되어 있는 날에는 반복성해결문 한 2시간 이내에 물을 제외한 음료수나 음식 섭취를 일시적으로 중단하십시오.  
1. 재검치가 기록된 경우 재검치에 의해 정상/비정상 표기하고 NCS/CS 환원하여 표기하십시오.  
2. Abnormal CS 인 경우 소견란에 기록하십시오.

Protocol No.	Screening	Screening No.	Initials	Page
UGFB-1	-4 주 - 0 주	S <input type="text"/>	<input type="text"/>	8

**대상자 적합성(Eligibility) 판정**

**선정기준 (Inclusion Criteria)**

각 항목의 해당함에 $\checkmark$ 하시오.	Yes	No
1. 만 18세 이상 만 70세 미만의 건강한 성인 남녀	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. 2주 이상 AST 수치가 $\leq 30$ U/L 이상인 자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. 본 임상시험에 대한 자세한 설명을 들은 후 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

>한 항목이라도 "No"에 체크되었다면  $\rightarrow$  본 임상시험에 참여할 수 없음

**제외기준 (Exclusion Criteria)**

1. 임신중이거나 임신을 계획 중이거나 그 병력이 있는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. 2개월 이내 간기능 관련 약물, 전이기능식품을 복용중인 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. 간염보균자 급성간염환자 및 간경변의 징후가 관찰되거나 지방간으로 진단되어 약물 용 치료중인 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. 알콜, 담배 등 임도중 유전자 또는 일반 간 기능 장애(ALT, AST 중 정상 상한치의 3배 이상이거나 총ビリrubin, 알콜 간염 및 간경변에 의한 간 기능 장애 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. 조영되지 않는 고혈압(sBP > 140mmHg 또는 dDBP > 90mmHg)이거나 조영되지 않는 당뇨병(HbA1c $\geq 8\%$ ) 환자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. 스테로이드 1년 이내에 임상적으로 유의한 신장계 질환(비율증 등) 심혈관 질환(허혈성 심질환 및 심부전 등) 심부전, 당뇨병, 폐렴, 고혈압, 비만 및 흡연 또는 혈액응고인자 이상 등의 혈액학적 이상) 호흡기 질환 (만성 폐쇄성 폐질환, 폐렴, 폐결핵 등) 장문로 패혈증 등의 병력이 있는 자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. 스테로이드 6개월 이내의 위장관의 출혈이 있거나 소화성 궤양, 만성 위염, 위궤양, 위암 또는 위암 전 단계의 병력이 있는 자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. 주요 위장관 수술의 병력이 있는 자(중수술제술을 제외한 위절제, 위양전 수술 또는 분할술 등)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. 스테로이드 5년 내 병 진단 및 치료 병력 없이 있거나 치료 중인 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. 불활성 간염 및 다른 신기능 장애(serum creatinine > 2.0 mg/dL)가 있는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. 심장 또는 정신적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 대상자 (우울증, 정신병, 불안, 약물중독, 자살, 의의식장애 등)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. 임상시험에 참여할 수 없도록 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물(해열진통제 및 비스테로이드성 소염진통제, 항응고제, 항생제나 항진균제를 지속적으로 복용해야 하는 자) (상세내용은 7.2. 병용약물의 허용 및 금지(약물/식품)를 참고한다)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. 최근 4주 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제, 또는 식물의 흡수, 대사 과정에 영향을 주는 약물이 나 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경력이 있거나 기타 임상시험에 참여한 경력이 있는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14. 임신부, 수유부 및 가임여성으로 참여기간 동안 임신 및 수유의 계획이 있는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15. 연구자 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

>한 항목이라도 "Yes"에 체크되었다면  $\rightarrow$  본 임상시험에 참여할 수 없음

Protocol No.	Screening	Screening No.	Initials	Page
UGFB-1	-4 주 - 0 주	S <input type="text"/>	<input type="text"/>	9

**스크리닝 종합 평가**

본 대상자의 인체적용시험 참여는 적합합니까?

Yes    No (→ 만약 'No'라고 표기되었다면 그 사유를 기술하여 주십시오.)

선정/제외기준 위반

동의불파

연구자의 판단 \_\_\_\_\_

기타 \_\_\_\_\_

**인체적용시험 시험자 확인**

본인은 본 대상자에 대한 해당 검사를 책임없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 중재기록서에 기록된 모든 정보가 정확함을 확인합니다.

인체적용시험 책임자 서명  
(시험책임자의 위임을 받은자)

서명일

Y Y Y W M M D D

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

**Visit 2**

**투여 직전 (0일, Week 0)**

1. 활력징후
2. 생활습관 조사
3. 병용 약물 조사
4. 임신검사
5. 대상자 적합성 평가
6. 실험실적 검사
7. 우작위 배정
8. IP 처방 및 교부

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

**방문일**  
방문일을 기록하여 주십시오.

년 월 일  
 년 YYY      월 MM      일 DD

**활력징후 (Vital Sign)**

혈압(mmHg)      수축기(SBP)       이완기(DBP)

맥 박(beats/min)     

체온(°C)     

\* 체온은 5분간 휴식 자세로 안정을 취한 후 측정하며, 각 방문 시마다 같은 자세에서 측정합니다.

**병용 약물 확인**

지난 방문 이후 복용한 약물 또는 현재 복용중인 약물이 있습니까?

No       Yes\* \*병용약물-31page 에 자세한 사항을 기재하십시오.

**임신검사(Pregnancy)**

NA      ▶ 임신 계획이 없거나 임신 후 2년 이상의 미임, 최후관 불임수술을 받은 기임가 여성은 NA에 체크

검체 채취일      년 월 일

검사 결과       Negative       Positive

**생활습관**

흡연 습관		음주 습관	
비흡연자	<input type="checkbox"/>	비음주자 및 과거 음주자	<input type="checkbox"/>
과거 흡연자	<input type="checkbox"/>	음주자	<input type="checkbox"/>
→ 흡연 종류 나이 _____ 세	<input type="checkbox"/>	복용으로 마신다 (소주 360ml 1/2 병 이하/주)	<input type="checkbox"/>
흡연자	<input type="checkbox"/>	음주자	<input type="checkbox"/>
→ _____ 갑/주	<input type="checkbox"/>	말이 마신다 (소주 360ml 1/2 병 초과/주)	<input type="checkbox"/>
식사 습관		운동 습관	
규칙적	<input type="checkbox"/>	전혀 하지 않음	<input type="checkbox"/>
불규칙적	<input type="checkbox"/>	불규칙적 (30 분 이상 주 3회 이하)	<input type="checkbox"/>
식이요법 준수	<input type="checkbox"/>	규칙적 (30 분 이상 주 3회 이상)	<input type="checkbox"/>
식이요법 미 준수	<input type="checkbox"/>	→ _____ 회 / 주	<input type="checkbox"/>

\* 음주습관에서 "비음주자 및 과거 음주자" 항목에 "Yes"에 체크되었다면 "4분 임상시험에 참여할 수 없음"

CRF\_Version 1.0

CONFIDENTIAL

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

**실험실직 검사 (Laboratory test)**       ND

검체 채취일      년 월 일      yy/mm/dd

혈액학 검사(Hematology)      재검  없음       있음 (      )      yy/mm/dd

항목	참고치	검사지	재검지	Normal	Abnormal		소견
				Yes	NCS	CS	
WBC	±5-10.0 x10 <sup>9</sup> /uL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC	M 4.50-5.50 x10 <sup>12</sup> /uL F 4.00-5.00 x10 <sup>12</sup> /uL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemoglobin	M 13.0-17.0 g/dL F 12.0-16.0 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemagorit	M 39.0-52.0 % F 36.0-48.0 %			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Platelet	150-400 x10 <sup>9</sup> /uL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

혈액화학검사(Blood Chemistry)      재검  없음       있음 (      )      yy/mm/dd

항목	참고치	검사지	재검지	Normal	Abnormal		소견
				Yes	NCS	CS	
ALP	108-339 U/L			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total bilirubin	0.2-1.2 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total Protein	5.8-8.1 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Albumin	3.5-5.1 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total cholesterol	130-230 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Triglyceride	50-130 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
HDL cholesterol	35-88 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LDL cholesterol	140-195 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
BUN	8-20 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Creatinine	M 0.8-1.2 mg/dL F 0.6-0.9 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uric acid	M 3.0-8.3 mg/dL F 2.0-8.3 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose	70-110 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

소변검사(Urine Analysis)      재검  없음       있음 (      )      yy/mm/dd

항목	참고치	검사지	재검지	Normal	Abnormal		소견
				Yes	NCS	CS	
Specific gravity	1.000-1.030			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
pH	5.0-8.0			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Protein	-			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose	-			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Blood/RBC	0-5/HPF			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
WBC				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

\* 실험실 검사가 계획되어 있는 날에는 금식상태(최소 8시간 이내)에 방문 예정인 환자(수나 음식 금식)로 실시기관을 방문하도록 교육하십시오.  
1. 재검지가 기록된 경우 재검지에 의해 정상/여부를 표기하고 NCS/CS 판단하여 표기하십시오.  
2. Abnormal CS 인 경우 소견란에 기록하십시오.

CRF\_Version 1.0

CONFIDENTIAL

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

대상자 적합성(Eligibility) 판정	Yes	No
선정기준 (혹히 2 주 이상 AST 수치가 25 IU/L 이상) 확인	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
제외기준 확인	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

시험식품/대조식품 처방	
시험식품/대조식품 처방 되었습니까?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
⇒ 상기 질문에 "아니오"인 경우 그 사유를 기재하십시오.	
▶ _____	<input type="text"/>
시험식품/대조식품 처방일	년 YYYY 월 MM 일 DD

인체적용시험 시험자 확인	
본인은 본 대상자에 대한 해당 검사를 책임없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 중재기록서에 기록된 모든 정보가 정확함을 확인합니다.	
인체적용시험 책임자 서명 (시험책임자와 위임을 받은자)	
서명일	년 YYYY 월 MM 일 DD

Protocol No.	Visit 3	Random No.	Initials	Page
UGFB-1	6 주 + 7 일	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	15

### Visit 3

#### 투여 6주 + 7일 (42일, Week 6)

1. 활력징후
2. 병용약물 확인
3. 이상반응 평가
4. 실험실적 검사
5. 임신검사
6. IP 처방 및 교부
7. IP 반납 및 복용순응도 조사

Protocol No.	Visit 3	Random No.	Initials	Page
UGFB-1	6 주 ± 7 일	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	16

**방문일**  
방문일을 기록하여 주십시오.

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

**혈액징후 (Vital Sign)**

혈압(mmHg) 수축기(SBP)  / 이완기(DBP)

맥 박(bats/min)

체온(°C)

\* 약복용 5분간 또는 자세로 안정을 위한 후 측정하며, 각 방문 때마다 같은 자세에서 측정합니다.

**병용 약물 확인**

지난 방문 이후 복용한 약물 또는 현재 복용중인 약물이 있습니까?

No  Yes- '병용 약물' 31page 에 자세한 사항을 기재하십시오.

**이상반응 (Adverse Events)**

대상자가 지난 방문 이후에 이상반응이 있었습니까?

No  Yes- '이상반응' 32page 에 자세한 사항을 기재하십시오.

대상자가 지난 방문 이후에 중대한 이상반응이 있었습니까?

No  Yes- '중대한 이상반응' 34 시간 이내에 보고하십시오.

**임신여부 검사(Pregnancy)**

NA ▶ 임신 계획이 없거나 성관계 이후 2년 이상의 무배란 불임수술을 받은 자임가 대상은 NA에 해당

검사 재위일

검사 결과  Negative  Positive

Protocol No.	Visit 3	Random No.	Initials	Page
UGFB-1	6 주 ± 7 일	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	17

**실험실적 검사 (Laboratory test)**  NO

검사 재위일

**혈액학 검사(Hematology)** 재검  없음  있음 (  yy/mm/dd)

항목	참고치	검사치	재검치	Normal			수견
				Yes	NCS	CS	
WBC	3.5-10.0 x10 <sup>9</sup> /uL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC	M 4.50-4.50 x10 <sup>12</sup> /uL F 4.00-6.00 x10 <sup>12</sup> /uL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemoglobin	M 13.0-17.0 g/dL F 12.0-16.0 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemagocrit	M 39.0-52.0 % F 36.0-48.0 %			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Platelet	150-400 x10 <sup>9</sup> /uL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

**혈액화학검사(Blood Chemistry)** 재검  없음  있음 (  yy/mm/dd)

항목	참고치	검사치	재검치	Normal			수견
				Yes	NCS	CS	
ALP	70-338 IU/L			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total bilirubin	0.2-1.2 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total Protein	5.8-8.1 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Albumin	3.8-5.1 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total cholesterol	130-220 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Triglyceride	50-150 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
HDL cholesterol	35-88 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LDL cholesterol	140 이하 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
BUN	8-20 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Creatinine	M 0.8-1.2 mg/dL F 0.6-0.9 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uric acid	M 3.0-8.3 mg/dL F 3.0-6.5 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose	70-110 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

**소변검사(Urine Analysis)** 재검  없음  있음 (  yy/mm/dd)

항목	참고치	검사치	재검치	Yes	NCS	CS	수견
Specific gravity	1.000-1.030			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
pH	5.0-8.0			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Protein	-			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose	-			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Blood(RBC)	0-5/HPF			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
WBC				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

\* 실험실 검사가 계획되어 있는 날에는 중복검사(방문 전 8시간 이내에 복용 재검한 용량이나 용액 공기로 실시기준을 방문하도록 교육하십시오.)

1. 재검치가 기록된 경우 재검치에 의해 임상여부를 표기하고 NCS/CS 판단하여 표기하십시오.
2. Abnormal CS 인 경우 소견란에 기록하십시오.

Protocol No.	Visit 3	Random No.	Initials	Page
UGFB-1	6주 ± 7일	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	19

<b>순응도 평가</b> <input type="checkbox"/> ND 반납일 <input type="text"/> 년 <input type="text"/> 월 <input type="text"/> 일 <input type="text"/> 일 <small>년 YYYY 월 MM 일 DD</small>			
복용 시작 일	<input type="text"/>	복용 일수	<input type="text"/>
복용 중단 일	<input type="text"/>		
적당한 시험식품/대조식품 수	<input type="text"/>	순응도(%)	<input type="text"/>
반납한 시험식품/대조식품 수	<input type="text"/>		
복용한 시험식품/대조식품 수	<input type="text"/>	<small>복용한 시험식품/대조식품 수 - 복용한 수 - 반납한 수 - 미반납 수</small>	
복용해야 할 시험식품/대조식품 수	<input type="text"/>	<small>복용해야 할 시험식품/대조식품 수 - 복용 일수 × 1일 복용량 (Skip)</small>	
$\text{순응도(}\%) = \frac{\text{복용한 식품의 수}}{\text{복용해야 할 식품의 수}} \times 100$ <small>※ 순응도는 소수 둘째 자리에서 반올림하여 기재</small>			
대상자가 복용하지 않은 시험식품/대조식품 모두 반납하였습니까? <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 (→ "아니오"인 경우 아래에 기재하십시오) 미반납 시험식품/대조식품 수 <input type="text"/> 미반납 사유: _____			
소견			

<b>시험식품/대조식품 저장</b> 시험식품/대조식품 저장 되었습니까? <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <small>※ 상기 질문의 "아니오"인 경우 그 사유를 기재하십시오</small>	
시험식품/대조식품 저장일 <input type="text"/> 년 <input type="text"/> 월 <input type="text"/> 일 <input type="text"/> 일 <small>년 YYYY 월 MM 일 DD</small>	

<b>인체적용시험 시험자 확인</b> 본인은 본 대상자에 대한 해당 검사를 빠짐없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 중재기록서에 기록된 모든 정보가 정확함을 확인합니다.  인체적용시험 책임자 서명 (시험책임자의 위임을 받은자)  서명일 <input type="text"/> 년 <input type="text"/> 월 <input type="text"/> 일 <input type="text"/> 일 <small>년 YYYY 월 MM 일 DD</small>	
---	--

Protocol No.	Visit 4	Random No.	Initials	Page
UGFB-1	12주 ± 7일	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	20

Visit 4  조기종료

투여 12주 ± 7일 (84일, Week 12)

1. 신체검사
2. 활력징후
3. 이학적 검사
4. 생활습관 조사(음주만)
5. 병용 약물 조사
6. 이상반응 평가
7. 임신 검사
8. 실험실적 검사
9. 순응도 평가

Protocol No.	Visit 4	Random No.	Initials	Page
UGFB-1	12 주 ± 7 일	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	21

**방문일**  
방문일을 기록하여 주십시오.

년 YYYY	월 MM	일 DD
--------	------	------

**신체검사**

체 중  kg

신 장  cm (mm±mm)

\*약품의 시험기간 중 동일한 동일한 제우계를 사용합니다.

**활력징후 (Vital Sign)**

혈압(mmHg) 수축기(SBP)  이완기(DBP)

맥 박(beat/min)

체온(°C)

\*약력은 5분간 같은 자세로 안정을 취한 후 측정하며, 각 방문 시마다 같은 자세에서 측정합니다.

**이학적 검사**

방문 당시 어떤 비정상성의 내용이 있습니까?  Yes  No

No.	분류 번호	비정상 내용	임상적 의미
1	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
2	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
3	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
4	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS

**▶ 소견**

※ 분류번호의 기원은 아래의 표를 참고하여 기록하고, 검사결과 비정상성이라도 불구하고 대상자로 선정하고자 할 경우 소견란에 그 사실을 기록하십시오.

**표. 분류번호 - 이학적 검사**

01	General appearance	06	Heart/Circulation	11	Neurological/ Psychiatric
02	Skin and Mucosae	07	Abdomen	12	Heart/Circulation
03	HEENT	08	Renal/ Genitourinary	13	Extremities
04	Breast	09	Rectal	14	Musculoskeletal
05	Lung	10	Lymph nodes	15	Others

CRF\_Version 1.0

CONFIDENTIAL

Protocol No.	Visit 4	Random No.	Initials	Page
UGFB-1	12 주 ± 7 일	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	22

**생활습관 조사(음주만)**

음 주 여 부(방문 3)	음 주 습 관 변 화(방문 4)
보통으로 마신다 (소주 360ml 1/2 병 이하/주)	<input type="checkbox"/> 시험참여 전과 동일 <input type="checkbox"/>
많이 마신다 (소주 360ml 1/2 병 초과/주)	<input type="checkbox"/> 시험 참여 전보다 더 많이 마신다. <input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> 시험 참여 전보다 덜 마신다. <input type="checkbox"/>

**병용 약물 확인**

지난 방문 이후 복용된 약물 또는 현재 복용중인 약물이 있습니까?

No  Yes → "병용약물" 3page 에 자세한 사항을 기재하십시오.

**이상반응 (Adverse Events) 평가**

대상자가 지난 방문 이후에 이상반응이 있었습니까?

No  Yes → "이상반응" 22page 에 자세한 사항을 기재하십시오.

대상자가 지난 방문 이후에 중대한 이상반응이 있었습니까?

No  Yes → "중대한 이상반응" 24 시간 이내에 보고하십시오.

**임신검사(Pregnancy)**

NA ▶ 임신 계획없이 임신 후 2년 이상은 무임, 보고할 불임수술을 받은 기질이 무임상태에 해당

검체 채취일

검사 결과  Negative  Positive

CRF\_Version 1.0

CONFIDENTIAL





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

**추 가 방 문(필요시)**

**추 적 조 사(필요시)**

1. 활력징후
2. 이학적 검사
3. 병용약물 확인
4. 이상반응 평가
5. 임신 검사
6. 실험실적 검사

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

방문일

년 YYYY      월 MM      일 DD

방문사유

Comments

인제적용시험 시험자 확인

본인은 상기 내용에 대해 모두 검토/확인하였습니다.

인제적용시험 책임자 서명  
(시험책임자의 위임을 받은자)

서명일

년 YYYY      월 MM      일 DD

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

**방문일**  
방문일을 기록하여 주십시오.

년 YYYY 월 MM 일 DD

**활력징후 (Vital Sign)**

혈압(mmHg) 수축기(SBP)  이완기(DBP)

맥 박(beats/min)

체온(°C)

\* 맥박은 5분간 3회 측정된 평균을 취한 후 측정하며, 각 부분 시마다 같은 곳에서 측정합니다.

**병용약물 확인**

지난 방문 이후 복용한 약물 또는 현재 복용중인 약물이 있습니까?

No  Yes\* \* 병용약물\* 31page 에 자세한 사항을 기재하십시오.

**이상반응 (Adverse Events) 평가**

대상자가 지난 방문 이후에 이상반응이 있었습니까?

No  Yes \* \* 이상반응\* 32page 에 자세한 사항을 기재하십시오.

대상자가 지난 방문 이후에 중대한 이상반응이 있었습니까?

No  Yes \* \* 중대한 이상반응\* 34 시간 이내에 보고하십시오.

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

**임신검사(Pregnancy)**

NA  임신 계획(임신)의 위험을 2년 이상은 유방, 폐경기, 출혈-출생 전은 기밀이 유방선(NA)에 해당

검사 재취일: 년 YYYY 월 MM 일 DD

검사 결과  Negative  Positive

**이학적 검사**

방문 당시 어떤 비정상적 내용이 있습니까?  Yes  No

No.	분류 번호	비정상 내용	임상적 의미
1	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
2	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
3	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
4	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS

▶ 소견 \_\_\_\_\_

\* 분류번호의 기록은 아래의 표를 참고하여 기재하고 검사결과 비정상항에도 불구하고 대상자로 인정하고자 할 경우 소견에 그 사유를 기재하십시오.

**표. 분류번호 - 이학적 검사**

01	General appearance	06	Heart/Circulation	11	Neurological/ Psychiatric
02	Skin and Mucosae	07	Abdomen	12	Heart/Circulation
03	HED/IT	08	Renal/ Genitourinary	13	Extremities
04	Swart	09	Rectal	14	Musculoskeletal
05	Lung	10	Lymph nodes	15	Others

Protocol No.	추가방문/ 추적조사	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGFB-1		S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	29

실험실적 검사 (Laboratory test) <input type="checkbox"/> ND						
검체 채취일 <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> yy/mm/dd						
혈액학 검사(Hematology) 재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음 ( <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> yy/mm/dd)						
항목	참고치	검사치	재검치	Normal Yes	Abnormal NCS CS	수견
WBC	3.5-10.0 x10 <sup>3</sup> /ul			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC	M 4.00-6.00 x10 <sup>6</sup> /ul F 4.00-6.00 x10 <sup>6</sup> /ul			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemoglobin	M 13.0-17.0 g/dL F 12.0-16.0 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemagocrit	M 39.0-52.0 % F 36.0-48.0 %			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Platelet	150-400 x10 <sup>3</sup> /ul			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
혈액화학검사(Blood Chemistry) 재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음 ( <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> yy/mm/dd)						
ALP	104-338 IU/L			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total bilirubin	0.2-1.2 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total Protein	5.8-8.1 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Albumin	3.8-5.1 g/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total cholesterol	130-220 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Triglyceride	50-150 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
HDL cholesterol	35-88 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LDL cholesterol	140 이하 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
BLPn	8-20 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Creatinine	M 0.8-1.2 mg/dL F 0.6-0.9 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uric acid	M 3.0-8.3 mg/dL F 2.0-6.3 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose	70-110 mg/dL			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
소변검사(Urine Analysis) 재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음 ( <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> yy/mm/dd)						
Specific gravity	1.000-1.030			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
pH	5.0-8.0			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Protein	-			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose	-			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
BloodRBC	0-5/Hpf			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
WBC				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
* 실험실 검사가 정확되어 있는 날에는 공복상태(음식 전 8시간 이내)에 물을 제외한 음료수나 음식 섭취로 실시기준을 위반하도록 교정하십시오. 1. 재검치가 기록된 경우 재검치에 대해 정상여부를 표기하고 NCS/CS 현상여부 표기하십시오. 2. Abnormal CS 인 경우 수견란에 기록하십시오.						

Protocol No.	추가방문/ 추적조사	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGFB-1		S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	30

<b>안재적용시험 시험자 확인</b>	
본인은 본 대상자에 대한 해당 검사를 빠짐없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 열거기록서에 기록된 모든 정보가 정확함을 확인합니다.	
안재적용시험 책임자 서명 (시험책임자의 위임을 받음자)	
서명일	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
	년 YYYY 월 MM 일 DD

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

■ 선행/병용약물  
■ 이상반응

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

선행/병용약물								
시험전(4 주 이내) 및 안전관측시험기간 동안 병용한 약물이 있습니까? <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes → 병용약물이 있다면 <b>번호</b> 시키고 세부항목을 기재하십시오.								
No	약물명	1 일 복용량 (용량/단위)	경로	복용기간(yy/mm/dd)		기타정보		특용 목적
				시작일	종료일	Y	N	
1				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
4				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
5				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
6				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
7				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
8				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
9				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
10				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
11				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
12				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

1.단위: ID = intradermal, SL = sublingual, I = intraleisonal, PO = oral, PR = per rectum, SC = subcutaneous, TD = transdermal  
 IM = intramuscular, TD = topical, IV = intravenous, PV = per vagina, OI = other IH = inhalation  
 2. 지속약물: "Yes"로 체크한 경우 종료일은 "-"로 표기하십시오.  
 3. 복용 목적: 모든 요과 및 비효율 기입하지 않고, 해당 기재번호와 일치하여 기입하십시오.  
 예) 항암제 → 항기, 후대복용은 항기로 기입하십시오.

Comment:

□추가 병용약물 채어지 있음

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

이상반응			
중요한 이상반응이 있었습니까? <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes (⇒ 이상반응이 있다면 표시하고 세부항목을 기재하십시오.)			
항목	Events 1	Events 2	Events 3
증상 및 증상 후			
발현일	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
소실일	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
이상반응 정도	<input type="checkbox"/> 경도 <input type="checkbox"/> 중등도 <input type="checkbox"/> 중증	<input type="checkbox"/> 경도 <input type="checkbox"/> 중등도 <input type="checkbox"/> 중증	<input type="checkbox"/> 경도 <input type="checkbox"/> 중등도 <input type="checkbox"/> 중증
보고 방법	<input type="checkbox"/> 방문 <input type="checkbox"/> 가정 <input type="checkbox"/> 전화 <input type="checkbox"/> 자택 방문	<input type="checkbox"/> 방문 <input type="checkbox"/> 가정 <input type="checkbox"/> 전화 <input type="checkbox"/> 자택 방문	<input type="checkbox"/> 방문 <input type="checkbox"/> 가정 <input type="checkbox"/> 전화 <input type="checkbox"/> 자택 방문
SAE	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes (SAE 보고서 작성)	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes (SAE 보고서 작성)	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes (SAE 보고서 작성)
임상 시험 의 불과 인과 관계	<input type="checkbox"/> DUK <input type="checkbox"/> 명확히 관련이 있다고 생각됨 <input type="checkbox"/> 관련 있을 가능성 있음 <input type="checkbox"/> 관련이 있다고 생각됨 <input type="checkbox"/> 명확히 관련이 있음	<input type="checkbox"/> DUK <input type="checkbox"/> 명확히 관련이 있다고 생각됨 <input type="checkbox"/> 관련 있을 가능성 있음 <input type="checkbox"/> 관련이 있다고 생각됨 <input type="checkbox"/> 명확히 관련이 있음	<input type="checkbox"/> DUK <input type="checkbox"/> 명확히 관련이 없다고 생각됨 <input type="checkbox"/> 관련 있을 가능성 있음 <input type="checkbox"/> 관련이 있다고 생각됨 <input type="checkbox"/> 명확히 관련이 없음
예측 여부	<input type="checkbox"/> 예측된 이상반응 <input type="checkbox"/> 예측하지 못한 이상반응	<input type="checkbox"/> 예측된 이상반응 <input type="checkbox"/> 예측하지 못한 이상반응	<input type="checkbox"/> 예측된 이상반응 <input type="checkbox"/> 예측하지 못한 이상반응
이상 반응 자 지	<input type="checkbox"/> 원래의 조치 없음 <input type="checkbox"/> 임상시험용의약품 복용 중단 변경/일시적 중단 <input type="checkbox"/> 임상시험용의약품 복용 중단 <input type="checkbox"/> 치료약을 병용 투여 <input type="checkbox"/> 비약물 치료 <input type="checkbox"/> 약물/유형 기간 연장 <input type="checkbox"/> 기타	<input type="checkbox"/> 원래의 조치 없음 <input type="checkbox"/> 임상시험용의약품 복용 중단 변경/일시적 중단 <input type="checkbox"/> 임상시험용의약품 복용 중단 <input type="checkbox"/> 치료약을 병용 투여 <input type="checkbox"/> 비약물 치료 <input type="checkbox"/> 약물/유형 기간 연장 <input type="checkbox"/> 기타	<input type="checkbox"/> 원래의 조치 없음 <input type="checkbox"/> 임상시험용의약품 복용 중단 변경/일시적 중단 <input type="checkbox"/> 임상시험용의약품 복용 중단 <input type="checkbox"/> 치료약을 병용 투여 <input type="checkbox"/> 비약물 치료 <input type="checkbox"/> 약물/유형 기간 연장 <input type="checkbox"/> 기타
이상 반응 결과	<input type="checkbox"/> 이상반응 회복/부작용 없음 <input type="checkbox"/> 이상반응 회복/부작용 있음 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행중 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행중 <input type="checkbox"/> 사망 <input type="checkbox"/> 추적관찰 필요	<input type="checkbox"/> 이상반응 회복/부작용 없음 <input type="checkbox"/> 이상반응 회복/부작용 있음 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행중 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행중 <input type="checkbox"/> 사망 <input type="checkbox"/> 추적관찰 필요	<input type="checkbox"/> 이상반응 회복/부작용 없음 <input type="checkbox"/> 이상반응 회복/부작용 있음 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행중 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행중 <input type="checkbox"/> 사망 <input type="checkbox"/> 추적관찰 필요
* 이상반응이 지속되는 경우 소실일에 "-"로 표기하십시오.			
본인은 본 대상자에게 발생한 모든 이상반응을 확인하였습니다.			
시험자 서명 _____		날짜: <input type="text"/> yy/mm/dd	
<input type="checkbox"/> 추가 이상반응 페이지 있음			

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

## 인체적용시험 종료

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

#### Study Termination

**본 대상자가 시험계획에 따라 시험이 끝까지 완료되었습니까?**

예 → 완료일: 년 월 일 일

아니오 → 아래에 자세히 기입해 주십시오.

> 중도탈락일: 년 월 일 일

> 중도탈락 이유

<input type="checkbox"/> 대상자 선정기준/제외기준 위반	<input type="checkbox"/> 추적조사 실패
<input type="checkbox"/> 이상반응/병발질환	<input type="checkbox"/> 사망
<input type="checkbox"/> 효과부족	<input type="checkbox"/> 기타
<input type="checkbox"/> 자료거부/동의철회/연락부절	사유 <input type="text"/>
<input type="checkbox"/> 인체적용시험계획서위반	

**이중눈가림 해제 여부**

없음

있음 ▶ 아래에 기입해 주십시오.

이중 눈가림 해제 날짜: 년 월 일 일

이중 눈가림 해제 사유:

**인체적용시험책임자 확인**

본인은 본 대상자에 대한 해당 검사를 빠짐없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 중재기록서에 기록된 모든 정보가 정확함을 확인합니다.

인체적용시험 책임자 서명

서명일: 년 월 일 일

[별첨 1] 인체적용시험계획서 서명 페이지(연구자)

인체적용시험계획서 서명 페이지

인체적용시험계획서 제목: 경증 간 기능 저하 대상자에서 인삼꽃대추출물(UGFB)의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

인체적용시험계획서 번호 및 버전: UGFB-1 Version1.0(2016.05.17)

인체적용시험용 식품: UGFB 또는 대조식품(위약)

본 시험 의뢰자는 아래에 서명함으로써, 본 인체적용시험계획서에 서술된 내용에 따라 인체적용시험을 진행할 것에 동의합니다.

인체적용시험 실시기관: 세명대학교부속 충주 한방병원

시험책임자: 서명 \_\_\_\_\_

일 시: / /



**[별첨 2] 인체적용시험 실시기관 및 인체적용시험 관련 담당자 연락처**

**1. 인체적용시험 관련 연락처**

본 인체적용시험 수행과 관련된 의문사항이 있을 경우, 아래의 연락처로 문의하십시오:

세명대학교부속충주한방병원	한의학과		
충북홍삼영농조합법인	의뢰자 (담당자)		
(주)파마크로	CRO		

**2. 인체적용시험 실시기관**

인체적용시험 실시기관	주소
세명대학교부속충주한방병원	충북 충주시 상방 4길 63

**3. 인체적용시험 의뢰자**

기관명 충북홍삼영농조합법인

주소 충북 음성군 금왕읍 선정로 97번길 55

**4. 인체적용시험 수탁기관**

(주)파마크로

서울특별시 서초구 강남대로 275 강남메인타워 11층

**5. 인체적용시험 책임자, 시험담당자 및 관리약사, 연구간호사**

직명	소속	성명	직명
시험책임자	세명대학교 충주한방병원		부교수
시험담당자	세명대학교 충주한방병원		전문수련의
관리약사	세명대학교 충주한방병원		한약사
연구간호사	세명대학교 충주한방병원		연구간호사

## 시험대상자설명서

<b>인체적용시험의 제목</b>	경증 간 기능 저하 대상자에서 인삼꽃대추출물(UGFB)의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
<b>시험계획서 번호</b>	UGFB-1
<b>의뢰자</b>	충북홍삼영농조합법인
<b>시험 책임자</b>	한의학과
<b>인체적용시험 실시기관</b>	세명대학교부속충주한방병원, 충북 충주시 상방 4길 63 전화: 043)856-1010

다음 내용은 본 인체적용시험의 목적, 절차, 이익, 위험성, 불편, 및 주의사항에 대한 것입니다. 또한, 여기에는 귀하가 사용할 수 있는 대체 절차 및 어느 때라도 연구를 중단할 수 있는 귀하의 권리에 대해 설명하고 있습니다.

본 설명서를 주의 깊게 읽어 주십시오. 귀하가 갖고 있는 모든 질문을 할 수 있는 충분한 시간을 가지십시오. 그리고 가족과 친지 및 주위 분들과 상의를 하십시오. 연구담당자는 귀하가 명확히 이해하지 못하는 모든 단어 혹은 정보에 대해 설명해 드릴 것입니다.

### 1. 인체적용시험 목적 및 방법

본 인체적용시험은 경증 간 기능 저하 대상자에서 인체적용시험용 식품인 인삼꽃대추출물(UGFB)의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 연구목적으로 시행되며 인삼꽃대추출물(UGFB) 또는 대조식품(위약)을 복용하게 됩니다. 시험기간은 총 12주간 시행되며 본원에서만 시행됩니다. 이 시험에 참여하게 될 대상자 수는 60명입니다. 연구 참여 시 병원 방문 횟수는 4회이며, 각 방문당 소요 시간은 약 1시간 내외입니다.

### 2. 인체적용시험 실시 배경

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

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

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

그러므로 본 시험의 목적은 경증 간 기능 저하 대상자에게 인삼꽃대추출물(UGFB)를 복용하게 하여 간 기능 개선 효과 및 안전성 여부를 확인하려고 합니다.

### 3. 인체적용시험용 식품

인체적용시험용 식품은 12주간 매일 아침, 저녁 식사 직전 3캡셀(연질캡셀)씩 1일 2회, 총 6캡셀을 복용하여야 합니다. 하루 분량의 식품에는 인삼꽃대추출물(UGFB) 또는 대조식품(위약)이 들어있습니다. 6주간 매일 6캡셀의 식품을 복용하십시오(1병에는 7일간의 여유 분량이 포함되어 있습니다.). 가능하면 직사광선 및 고온 다습한 곳을 피해 서늘한 곳에서 실온 보관하시고 6주간 복용하고 남은 식품은 그대로 보관하여 6주, 12주 방문 시에 연구담당자에게 반납하여 합니다.

### 4. 시험과정

본 인체적용시험은 만 19세 이상 만 70세 미만의 남성 및 여성으로 경증 간 기능 저하 대상자를 대상으로 진행하게 됩니다.

먼저 참여 이전에 본 설명서를 모두 읽고 이해한 후 동의서에 서명하신 후에 모든 검사 및 절차가 시행될 것입니다. 제일 먼저 생년월일, 나이 인구학적 조사를 한 후 매 방문 시 귀하의 건강상태를 평가하기 위해 혈압, 맥박수를 측정합니다. 또한 귀하는 본인이 복용하고 있는 모든 약물에 대해 변경된 사항이 있는지에 대한 질문을 받게 됩니다.

**첫 번째 방문(방문 1)**에서는 귀하가 본 인체적용시험에 참가하기에 적합한지 평가하기 위해 활력징후(혈압/맥박수) 등의 기본적인 건강상태를 평가하고 현재까지의 모든 병력(수술 포함) 및 현재 복용하고 있거나 과거 복용하였던 약물이 있는지에 대한 질문을 받게 됩니다. 전반적인 건강을 점검하기 위해 8시간 공복 상태에서의 혈액 검체에 대한 검사가 시행됩니다(팔에 있는 정맥으로부터 바늘을 이용하여 약 1스푼에 해당하는 최대 10ml의 혈액을 채취합니다. 채취된 검체는 본 연구 외의 다른 용도로는 사용되지 않을 것이며, 검사 후 바로 폐기됩니다.). 임신가능성이 있는 대상자의 경우 임신검사를 시행하게 됩니다. 연구담당자는 행해진 모든 검사 및 평가를 검토하여 귀하가 본 인체적용시험에 참여하는 것이 적합한지 선정/제외 기준을 토대로 결정하게 됩니다. 귀하의 연구담당자가 귀하가 이 시험을 지속하는 데 적합하지 않다고 결정하는 경우에는, 귀하에게 그 이유를 설명하여 줄 것입니다. 선정/제외기준을 토대로 적합하다고 판정된 대상자는 2주 이내에 두 번째 방문을 진행하게 됩니다.

**두 번째 방문(방문 2)**에서는 귀하의 신체검사, 활력징후(혈압/맥박)를 기록하고 방문 1 이후에 약물 투여를 하였는지에 대한 질문을 받게 됩니다. 또한, 전반적인 건강을 점검하기 위해 8시간 공복상태에서의 혈액 검체에 대한 검사가 시행됩니다. 임신가능성이 있는 대상자의 경우 임신검사를 시행하게 되며, 흡연과 음주여부, 운동 및 식이습관에 관해서 질문 받게 됩니다. 방문 2에서 선정/제외기준을 최종 확인한 후 무작위로 배정된 순서에 의해 1:1로 시험군 또는 대조군(위약군)으로 배정되며, 인체적용시험용 식품을 교부 받아 6주간 복용하게 될 것입니다.

**세 번째 방문(방문 3)**에서는 방문 2로부터 6주 후 방문을 하여 귀하의 신체검사, 활력징후(혈압/맥박)를 기록하고 방문 2 이후에 약물 투여를 하였는지 여부를 조사하게 됩니다. 전반적인 건강을 점검하기 위해 공복상태에서의 혈액 검체에 대한 검사가 시행되며, 임신가능성이 있는 대상자의 경우 임신검사를 시행하게 됩니다. 방문 3에서는 지난 방문 이후 이상반응이 있었는지 확인하게 되며 지난 방문에 수령한 인체적용시험용 식품의- 남은 식품은 반납 하셔야 하고, 인체적용시험용 식품을 재교부 받아 6주간 복용하게 될 것입니다. 이 때에 재교부되는 인체적용시험용 식품은 방문 2에 배정된 군과 동일하며 시험군 및 대조군(위약군)에 해당하는 식품이 교부 됩니다.

**네 번째 방문(방문 4)**에서는 방문 3으로부터 6주후 방문을 하여 귀하의 신체검사, 활력징후(혈압/맥박)를 기록하고 방문 3 이후에 약물 투여를 하였는지 조사하고 전반적인 건강을 점검하기 위해 8시간 공복상태

에서의 혈액 검체에 대한 검사가 시행됩니다. 임신가능성이 있는 대상자의 경우 임신검사를 시행하게 됩니다. 흡연과 음주여부, 운동 및 식이습관에 관해서 질문 받게 됩니다. 방문 4에서는 지난 방문 이후 이상반응이 있었는지 확인하게 되며 지난 방문에 수령한 인체적용시험용 식품의 남은 식품은 반납 하셔야 합니다. 종료방문(12주)에 이상반응이 있거나 연구담당자 판단 하에 추적조사가 필요한 경우는 추가적으로 방문을 할 수도 있습니다.

#### 5. 무작위배정, 이중눈가림, 대조식품(위약)사용

이 연구는 무작위배정, 이중눈가림으로 진행되며 대조식품(위약)을 사용합니다. 아래 내용은 귀하가 본 인체적용시험에 참여할 경우 중요하게 고려하셔야 할 내용이므로 자세히 읽어보시고 이해되지 않는 부분이 있다면 언제든지 질문하시기 바랍니다.

##### - 무작위배정

귀하가 본 인체적용시험에 참여할 경우, 귀하는 인삼꽃대추출물(UGFB)를 복용하는 시험군 또는 대조식품(위약)을 복용하는 대조군으로 배정됩니다. 무작위 배정의 목적은 각 군의 배정에 연구진의 주관이나 개입되지 않고, 각 군에 대해 수집된 정보를 신뢰성 있게 비교하기 위함입니다. 귀하가 각 군에 배정될 확률은 1/2 입니다.

##### - 이중눈가림

이 인체적용시험은 이중눈가림으로 진행됩니다. 이중눈가림이란 귀하와 귀하의 연구담당자 모두 시험이 끝날 때까지 귀하가 어떤 시험식품을 복용하고 있는지 알지 못함을 의미합니다. 이는 인체적용시험 결과가 대조식품(위약)이나 특정시험식품의 효과에 의해 영향을 받거나 편향되는 것을 예방하고, 인체적용시험용 식품의 객관적인 유효성을 평가하기 위한 것입니다. 하지만 응급상황이 발생하면 귀하가 복용하는 식품을 파악하여 적절한 조치를 받으실 수 있습니다.

##### - 대조식품(위약)

이 시험에 사용되는 대조식품(위약)은 인체적용시험용 식품과 모양과 크기, 색깔이 동일하지만 활성 성분이 없는 식품입니다. 대조군(위약군)은 인체적용시험에서 나타난 결과가 우연히 일어난 것이 아님을 확인하기 위해 사용합니다. 인체적용시험용 식품이 작용하는 방식과 그 부작용을 적절히 평가할 수 있으려면 대조군(위약군)과의 비교가 필수적입니다.

#### 6. 대상자가 준수하여야 할 사항

시험기간 중 연구담당자와 상의하지 않은 다른 약품을 복용하거나 다른 요법이나 처치를 받아서는 안됩니다. 인체적용시험용 식품 투여 기간 중 이상반응이 발생하는 경우 식품과의 연관성의 유무에 상관없이 증상을 보고해야 하며 시험이 끝난 후에도 이상반응이 발생하는 경우 연구담당자에게 전화로 연락을 취해, 인체적용시험용 식품과의 연관성을 확인하도록 합니다. **방문 전 24 시간 동안 금주하여야 하며, 24 시간 이내에 음주 시 방문일정을 다시 잡고 방문하여야 합니다.** 또한 시험 참여기간 중에는 음주를 하지 않도록 주의 해 주셔야 합니다. 시험에 참여하는 동안 연구담당자와 상호 협조해야 하고 시험과 관련한 모든 문서나 그 외의 지침사항을 준수해야 하며, 다른 시험에는 참여해서는 안됩니다. 임신부, 수유부, 또는 시험 기간 중에 임신계획을 가지고 있는 여성은 이 시험에 참여할 수 없습니다.

인체적용시험용 식품은 연구 중인 식품이므로 가정에 돌아가 가족들에게 본 식품을 복용하게 하여서는 안됩니다. 인체적용시험에 참여하시는 동안 복용하는 인체적용시험용 식품을 어린이 또는 인체적용시험용 식품의 잠재적 위험을 평가할 능력이 없는 사람이 볼 수 없고, 이들의 손이 닿지 않는 안전한 장소에 보관하시기 바랍니다.

## 7. 병용약물(함께 복용하는 약물)

인체적용시험용 식품 복용 외에 일반약 또는 운동요법, 식이요법 등은 금기항목이 아닌 경우 필요하다면 허용할 수 있습니다. 단, 연구담당자의 판단에 따라 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물은 복용 할 수 없으며, 인체적용시험 기간 중 병용 약물은 연구담당자에게 알려주어야 합니다.

## 8. 예상되는 위험이나 불편

본 연구에 참여하는 동안, 귀하는 아래에 나열된 부작용과 그 밖에 예측하지 못한 부작용을 경험 할 위험이 있습니다. 부작용은 사람에 따라 다양하며, 귀하는 이들 부작용을 모두 또는 일부를 경험하거나 전혀 경험하지 않을 수도 있습니다. 귀하가 부작용을 경험한다면, 귀하의 연구담당자에게 알려서 귀하의 고통을 치료하거나 귀하가 경험한 불편을 해소하기 위해 다른 약물을 제공받으실 수 있습니다. 귀하의 연구담당자는 인체적용시험용 식품의 복용여부를 일시 중단할 수 있습니다. 또한, 인체적용시험용 식품에 대한 중증 반응이 발생하는 경우, 귀하의 연구담당자가 귀하의 인체적용시험 참여를 영구적으로 중단시킬 수 있습니다.

인삼꽃대추출물(UGFB)의 과복용으로 발생할 수 있는 부작용은 알레르기, 속쓰림, 호흡곤란, 두통, 복통 등이 있습니다. 또한, 이 식품의 투여로 발적(충혈되어 붉어짐), 두드러기, 다른 알레르기 반응이 나타나는 경우 즉시 연구담당자와 상의하여야 합니다.

## 9. 본 인체적용시험에 참여함으로써 얻을 수 있는 이익

본 시험에 참여함으로써 간 기능 개선에 도움이 될 수 있습니다. 귀하의 간 기능 개선 가능성을 포함하여 본 인체적용시험 결과가 향후 다른 대상자들을 위한 새로운 치료법이나 건강기능식품 개발에 도움을 줄 수 있습니다.

## 10. 대체약물 및 치료

시험식품이 아닌 다른 대체약물 또는 치료법이 귀하에게 더 적합할 수도 있습니다. 치료 방법에 대해서는 언제든지 연구담당자와 자유롭게 논의 할 수 있습니다.

## 11. 윤리적 측면

본 시험에 참여하는 동안 인체적용시험에서 인간의 권리에 대한 헬싱키 선언에서 설명하고 있는 권리가 있습니다. 전문을 받기를 원하는 경우에는 사본을 제공받을 수 있습니다. 본 시험은 식품의약품안전처 의약품임상시험관리기준에 의거하여 실시하게 됩니다.

## 12. 개인정보 및 비밀보장

귀하가 본 인체적용시험에 참여하실 경우, 귀하의 건강에 대한 개인정보를 연구담당자가 수집하여 기록할 것입니다. 수집되는 정보는 귀하의 이름, 주소, 전화번호, 생년월일, 새로운 의무기록과 이미 존재하는 의무기록 또는 각종 검사와 절차의 형태, 날짜, 결과와 같은 귀하의 신원을 밝히는데 사용될 수 있는 정보입니다. 이런 정보에는 귀하의 의무기록에 있는 정보 그리고 인체적용시험 중에 만들어지거나 수집되는 정보가 포함될 수 있습니다. 하지만 인체적용시험 기관 외부로 보내지는 귀하의 모든 정보는 코드 번호와 이니셜로 처리 될 것이며, 이 정보가 귀하에 대한 정보임을 알아볼 수 없을 것입니다.

귀하에게 배정된 번호와 귀하의 이름을 연결시키는 것을 가능하게 해주는 코드 목록을 보관하는 것은 귀하의 연구담당자의 책임입니다. 응급 시에 귀하를 식별하여 귀하에게 연락할 수 있도록 이 목록을 안전한 곳에 보관할 것입니다. 이 인체적용시험과 관련된 자료는 인체적용시험 완료일로부터 3년간 병원에서 보관하게 됩니다. 귀하는 개인정보제공 동의를 거부할 권리가 있으며, 동의 거부 시 따르는 불이익은 없습니다. 다만 이 인체적용시험에 참여하실 수 없습니다.

또한, 인체적용시험의 결과가 출판될 경우에도 귀하의 신상정보는 비밀상태로 유지될 것입니다.

### 13. 신원에 대한 기밀 유지

본 인체적용시험에 참여한 대상자의 모든 개인적인 정보는 비밀이며, 어느 누구에 의해서도 개인적인 목적으로 사용되지 않을 것입니다. 다만, 의학적인 목적, 허가 목적 혹은 법적으로 요구될 경우에만 충북홍삼영농조합법인, 임상시험심사위원회, 식품의약품안전처장은 대상자의 비밀보장을 침해하지 않고 관련규정이 정하는 범위 안에서 인체적용시험의 실시 절차와 자료의 신뢰성을 검증하기 위해 귀하의 의무기록을 직접 열람할 수 있습니다. 귀하가 동의서 서식에 서명하는 것은 이러한 자료의 직접열람을 허용함을 의미합니다.

### 14. 참여 동의 철회 및 질문할 수 있는 권리

귀하는 본 시험과 관련되어 알려져 있거나 가능성이 있는 위험성에 대해서 언제라도 질문할 권리가 있으며, 귀하의 안전과 관련된 중요한, 인체적용시험 지속참여에 영향을 줄 수 있는 새로운 정보가 입수되었을 때는 적시에 귀하에게 알려줄 것입니다. 본 인체적용시험과 관련하여 질문사항이 있을 경우 아래의 연락처로 연구담당자에게 연락하십시오. 귀하는 언제라도 본 인체적용시험의 참여동의를 철회할 수 있으며 귀하를 위해 필요하다고 판단이 될 경우, 예를 들어 본 인체적용시험용 식품을 복용한 후 이상반응 혹은 중대한 이상반응이 발생하였을 시 연구담당자가 귀하의 동의 없이도 인체적용시험에서 귀하를 제외시킬 것입니다. 귀하가 본 동의서에 서명하더라도 대상자의 권리가 침해 되는 것은 아닙니다. 귀하가 이 시험으로부터 자의적으로 혹은 연구담당자의 요청에 의해 인체적용시험에서 제외된 경우 투여하지 않은 인체적용시험용 식품은 모두 반환하여야 하며 인체적용시험용 식품에 대한 이상반응 등에 대한 질문을 받을 것입니다. 또한 연구담당자가 필요하다고 판단되는 신체검진 및 임상실험실 검사에 협조해 줄 것을 요청 받을 것입니다.

### 15. 피해 발생시 보상 및 치료 대책

연구기간 중 의료진은 귀하의 안전에 만전을 기할 것이며 예측 가능한 이상반응을 포함한 중대한 이상반응의 발생시는 신속하고 적절한 조치를 취하여 가능한 그 이상반응을 최소화할 것이며 본 식품을 복용하는 도중 발생하는 어떠한 이상반응이라도 즉시 적절한 치료를 받을 수 있습니다. 본 인체적용시험에 의한 피해가 발생할 경우에는 인체적용시험보험에 가입하여 인체적용시험 의뢰자인 충북홍삼영농조합법인에서 법적인 책임을 부담하여 피해보상 할 것입니다. 충북홍삼영농조합법인 및 세명대학교부속충주한방병원은 본 시험에 참여함으로써 귀하가 손해를 입고 또한 그 피해가 본 시험에 참여한 것과 연관이 있다고 밝혀진다면 가입된 보험을 통하여 이를 보상해줄 것입니다. 더 자세한 정보는 연구담당자로부터 얻을 수 있을 것입니다.

### 16. 발생하는 비용 및 인체적용시험 참여에 대한 사례

본 인체적용시험의 참여로 인하여 발생하는 모든 시험식품, 검사, 진찰료 등이 의뢰자 부담으로 제공될 것입니다. 그러나 인체적용시험과 무관한 치료를 위해 이용한 약제나 치료에 대한 비용은 귀하께서 부담하셔야 합니다. 본 인체적용시험에 참여시 시험식품인 인삼꽃대추출물(UGFB) 또는 대조식품(위약)과 여러 가지 검사를 제공받을 것입니다. 또한 본 연구에 참여 시 총 4회의 방문이 있으며, 매 방문 시 소정의 교통비 5만원을 제공할 것입니다. 그러나, 대상자 선정에 적합하지 않아 임상시험에 참여하지 못하는 대상자께서는 해당 방문의 검사항목까지만 혜택을 드립니다. 연구참여로 인하여 귀하가 추가적으로 부담해야 할 비용은 없습니다.

## 17. 자의에 의한 참여

본 인체적용시험에 참여하는 것은 자의에 의한 것이며 만일 참가에 동의하지 않더라도 추후의 치료에 전혀 불이익을 받지 않습니다. 연구기간 중 언제라도 본 인체적용시험에의 참여를 중단할 수 있으며 이로 인해 다음 치료에 어떠한 불이익도 받지 않을 것입니다. 간 기능 관련 약 복용이 필요한 경우 언제든지 인체적용시험을 중단 할 수 있습니다. 귀하가 동의서에 서명하더라도 대상자의 권리가 침해 되는 것은 아닙니다.

귀하의 안전을 위하여 시험의 중단을 원하신다면 연구담당자에게 알리고 그 시기가 언제이던 간에 귀하의 안전보장을 위한 필요한 검사를 위해 시험종료 방문을 하게 됩니다.

방문 시 복용하고 남아있는 모든 식품을 용기와 함께 연구담당자에게 반드시 반납하셔야 합니다.

귀하에게는 서명된 본 동의서와 설명서의 사본을 받을 권리가 있습니다. 귀하 또는 귀하의 대리인에게 대상자설명서 및 귀하가 서명한 대상자동의서 사본 한 부가 제공됩니다.

## 18. 문의

귀하는 동의서에 서명하기 전에 귀하가 이해하지 못하는 부분이 있다면 질문을 해야 합니다. 연구진은 인체적용시험 참여 전, 인체적용시험 기간 동안 및 인체적용시험 종료 후에 언제라도 질문에 답할 것입니다. 만일, 본 시험에 대한 질문이 있거나, 정보를 원한다면 주저하지 말고 아래로 연락 주시기 바랍니다.

시 험 책 임 자:

연 구 한 의 사:

**시험대상자동의서**  
다음의 사항이 사실일 때 표기 및 서명하십시오

1. 본 시험에 대한 정보가 들어있는 대상자 설명서를 제공 받았으며 내용을 충분히 이해하였습니다.	<input type="checkbox"/>
2. 본인은 연구담당자로부터 본 인체적용시험의 목적과 구체적인 방법, 예상되는 효과 및 부작용 등에 대해 자세하게 설명을 듣고, 궁금한 사항이 있으면 질문을 하였으며 적절한 답변을 들었습니다.	<input type="checkbox"/>
3. 본인은 인체적용시험 외의 다른 치료를 받아야 하거나 이 연구계획서에 따르지 않을 경우, 기타 인체적용시험 대상자 선정기준에서 제외되는 경우에 이 인체적용시험에 참여할 수 없다는 것을 알고 있습니다.	<input type="checkbox"/>
4. 본 시험에 대한 충분한 정보를 얻었습니다.	<input type="checkbox"/>
5. 본 시험을 중단하고 싶을 때는 시기에 상관없이, 특별한 이유 없이도 사후의 진료상 불이익 없이 자유롭게 중단할 수 있음을 이해하였습니다.	<input type="checkbox"/>
6. 본인의 동의서와 기타 기록들이 인체적용시험 담당자에게 제공될 수 있으며 관계기관 또는 임상시험심사위원회, 점검을 실시하는 자에 의해 검토될 수 있으나, 이들 모든 기록은 절대비밀로 유지될 것이며 대상자의 신원이 확인될 수 있는 형태로는 공개되지 않는다는 것에 동의합니다.	<input type="checkbox"/>
7. 본 시험과 관련이 없는 의사가 처방해 준 약물에 어떠한 변화가 있거나 또는 처방전 없이 구입한 약물을 투여한 경우 연구담당자에게 알려야 함을 알고 있습니다.	<input type="checkbox"/>
8. 본 시험에 참여할 것을 자유의사에 의해 동의합니다.	<input type="checkbox"/>
9. 본인은 서명된 본 동의서의 사본 1부 및 설명서를 수령합니다.	<input type="checkbox"/>
10. 본인은 시험대상자의 질문에 대한 대답이 완벽하게 이루어지지 않는 한, 서명하지 않아도 된다는 사실을 알고 있습니다.	<input type="checkbox"/>
11. 본인은 인체적용시험을 위한 개인 정보 수집의 필요성에 대해 충분히 설명을 듣고 이해하였으며, 개인정보보호법 등에 의해 보호되고 있는 나의 각종 정보자료를 세명대학교부속충주한방병원이 이 인체적용시험을 위해 활용 및 제공하는 것에 대해 동의합니다.	<input type="checkbox"/>

**시험대상자**

---

대상자 성명 \_\_\_\_\_ 서명 \_\_\_\_\_ 서명일 \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

<b>대리인(해당되는 경우)</b>		
대리인 필요 사유 _____		대상자와의 관계 _____
대리인 성명 _____	서명 _____	서명일 _____ / _____ / _____
<b>참관인(해당되는 경우)</b>		
참관인 성명 _____	서명 _____	서명일 _____ / _____ / _____

<b>시험책임자 또는 시험책임자의 위임을 받은 의사</b>		
시험책임자 성명 (또는 시험책임자의 위임을 받은 의사)	서명 _____	서명일 _____ / _____ / _____



#### [별첨 4] 피해자 보상에 대한 규약

##### 피해자 보상규약

시험의뢰자인 충북홍삼영농조합법인은 시험실시기관에서 본 시험계획서에 따라 충실히 시험을 수행하였고 다음 사항에 적합할 경우, 본 인체적용시험의 시험제품이나 절차로 인해 직·간접적으로 시험대상자에게 야기된 손상을 책임진다.

1. 합의된 시험계획서에 따라 시험제품이 투여된 경우 충북홍삼영농조합법인으로부터 공급된 인체적용시험용 식품에 의한 피해  
(단, 시험계획서를 준수하지 않았거나 대상자의 부주의로 인한 손상의 경우 제외)
2. 인체적용시험책임자(담당자)의 명백한 태만이나 의도적 또는 중대한 과실이 인정되지 않은 피해
3. 예기치 않은 반응의 결과 합법적으로 요구되는 치료 또는 진단방법의 결과 발생한 피해
4. 인체적용시험과 관련하여 발생한 손상 및 피해 중에서 충북홍삼영농조합법인이 인체적용시험용 식품과의 인과관계가 없음을 입증하지 못하는 경우

인체적용시험 의뢰자, 시험책임자, 시험담당자는 피해자가 본 시험에 의해 어떠한 불이익이라도 받지 않도록 관계법규와 시험계획서의 내용을 충실히 준수하는 등 최선을 다해야 한다. 이러한 노력에도 불구하고 시험제품이나 인체적용시험 절차로 인해 직·간접적으로 대상자에게 건강상의 피해가 발생했을 경우 연구자는 즉시 필요한 조치를 취함과 동시에 인체적용시험 의뢰자에게 보고하여 대상자의 안전을 최대한 확보할 수 있도록 해야 한다.

##### 보상평가 기준

1. 보상수준은 손상의 본질, 그 정도, 지속성 여부 등에 적절한 액수여야 하며, 대한민국의 법정에 의해 유사 손상들에 대해 일반적으로 지급되는 것과 동일해야 한다.
2. 보상수준에 대해서 대상자와 충북홍삼영농조합법인 사이에 이견이 있을 경우, 양자가 수용할 수 있는 전문가의 자문을 구하여야 한다.

충북홍삼영농조합법인은 위의 여러 제반 내용을 참고하여 대상자가 본 시험으로 불이익을 받지 않도록 주의하며, 만약 본 시험으로 문제점이 발생된 경우 피해자 보상규약에 의거 책임질 것을 서약합니다.

년 월 일  
충북홍삼영농조합법인 (인)

## [별첨 5] 인체적용시험용 제품 복용지도

### 인체적용시험용 제품 복용지도

#### 섭취시기

1일 2회 아침, 저녁 식사 직전 3연질캡셀씩 복용하도록 합니다. 가급적 식사 직전에 섭취하도록 합니다.

#### 섭취방법

식사 직전에 충분한 물과 함께 섭취하는 것을 권장합니다.

#### 섭취 시 주의사항

일일 정해진 용법, 용량 대로 섭취하십시오.

임산부나 수유부의 복용을 금합니다.

#### 시험제품의 보관

- 직사광선 및 고온 다습한 곳을 피하고 서늘한 곳에서 실온 보관하십시오.
- 어린이들의 손이 닿지 않는 곳에 보관하십시오.

[별첨 6] 대상자 모집 공고문

◀ 인체적용시험 지원자 모집 공고 ▶

세명대학교부속충주한방병원에서는 상기 인체적용시험을 위한 지원자를 아래와 같이 모집합니다.

1. 인체적용시험제목 및 목적

경증 간 기능 저하 대상자에서 인삼꽃대추출물(UGFB)의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

2. 인체적용시험 대상자

= 만 19세 이상 만 70세 미만의 건강한 성인으로 간 기능이 손상되어 자각증상과 생화학적 소견을 가지고 있는 대상자

3. 참여방법

= 본 인체적용시험에 참여를 원하시는 경우 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 서면 동의하시게 됩니다.  
= 혈액검사, 소변검사, 신체검사, 이학적 검사를 실시하여 인체적용시험에 적합하다고 판단되면 참여 가능합니다.

4. 참여시 제공되는 사항

= 본 인체적용시험의 참여로 인하여 발생하는 모든 시험식품, 검사, 진찰료 등은 무료로 제공될 것입니다.  
= 인체적용시험 참여로 인하여 발생하는 시간 손실 및 불편함에 대하여 소정의 사례비가 지급됩니다.

5. 인체적용시험 예상 대상자 수 및 기간

본 인체적용시험은 세명대학교부속충주한방병원에서 진행되며 총 60명의 지원자를 모집할 것입니다.  
각 대상자 별로 총 14주(스크리닝 2주, 인체적용시험약 투여 후 12주)간 총 4회 내원하게 됩니다.

6. 지원방법

세명대학교 충주한방병원 한방여성의학과 연구담당 한의사 또는 간호사로 전화하십시오.

세명대학교 충주한방병원  
충북 충주시 상방 4길 63

[별첨 1] 인체적용시험계획서 서명 페이지(의뢰자)

인체적용시험계획서 서명 페이지

인체적용시험계획서 제목: 경증 간 기능 저하 대상자에서 인삼꽃대추출물(UGFB)의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

인체적용시험계획서 번호 및 버전: UGFB-1 Version1.0(2016.05.17)

인체적용시험용 식품: UGFB 또는 대조식품(위약)

본 시험 의뢰자는 아래에 서명함으로써, 본 인체적용시험계획서에 서술된 내용에 따라 인체적용시험을 진행할 것에 동의합니다.

인체적용시험 의뢰자: 충북홍삼영농조합법인

의뢰자 대표(위임): 서명 \_\_\_\_\_

일 시: / /

**(제 1 협동기관인 세명대학교 고호연교수 및 임상시험 연구책임자인 김형준 교수와 CRO기관의 협동을 통한 임상시험 진행 결과)**

CRO기관에서는 프로토콜 작성 및 임상시험 진행의 관리와 결과보고서등을 전체적으로 맡아 진행하며, 궁극적으로 식약처에는 제1협동에서 나온 임상시험 결과를 바탕으로 건강기능식품의 인증까지를 전체적으로 진행하는데 도움을 주는 기관입니다.

그러나 임상시험 프로토콜은 전임상시험의 결과를 바탕으로하여 피험자인 사람을 대상으로 시험을 진행하기위한 계획서로 임상시험을 실제적으로 직접 진행하는 인체적용시험 책임자인 1협동 교수와 임상시험 연구책임자 교수와 함께 기타 연구원들과 수개월간의 지속적인 협의 및 회의과정을 거쳐 완성하게 되었으며, 이과정에서 CRO와 여러번의 수정작업을 거쳐 프로토콜을 완성하게 되었습니다. 연구계획서인 프로토콜과 더불어 연구기록지인 CRF도 완성하였고, 시험대상자 설명서 및 동의서와 피해자 보상에 대한 규약을 작성하였으며, 인체적용시험용 제품 복용지도서와 대상자 모집공고문을 같이 작성하였습니다.

또한 이렇게 작성된 프로토콜 및 CRF를 바탕으로 2016년 5월 16일에 세명대 부속 제천한방병원에 임상시험 윤리위원회에 연구심의 신청서를 제출하였고, 이어 2016년 5월 27일에 임상시험 윤리위원회인 IRB 심의 개최를 앞두고 있습니다.

임상시험을 위한 보험가입을 위하여 임상시험 보험 전문기관인 KB생명보험에 견적을 의뢰하여 받은 결과를 바탕으로 보험을 동부화재와 비교견적하여 세명대학교 산학협력단에 보험사에 보험료를 입금 신청하여 현재 계약이체가 된 상황으로 곧 임상시험 보험증권을 송부 받을 예정입니다.

CRO기관과는 이번주에 개최된 임상시험 윤리위원회의 통과가 나온후에 바로 6월 첫째주에 임상시험 개시미팅을 실시하고자 예정 계획을 한 상태이고, 임상시험 개시미팅이 끝나면 바로 피험자를 모집하여 이번 연차에 남은 기간인 6월과 7월 두달사이에 전체모집인원 60명의 피험자중 10명 이상의 피험자를 모집하여 임상시험을 진행할 예정이고, 피험자 모집이 되어 임상시험이 진행되어가는 과정중에 현재 남아있는 올해 연구비중 임상시험비의 비용을 피험자 교통비와 임상시험 검사비로 지출할 예정입니다.

임상시험약은 고연(주)에서 한풍제약에 의뢰하여 제조중에 있으며 임상시험이 시작되기전인 다음주까지 약물을 지급하여 주시기로 하였습니다.

과제 선정시 연구계획서에 제출한 연구과제 초기의 계획서에는 제1협동의 임상시험 계획이 총 60명의 간기능 저하 임상시험 피험자를 임상시험 준비가 필요한 2차년도와 임상시험이 본격화된 3차년도에 각각 15명과 45명을 모집하여 진행할 계획이었으나, 실제로 2차년도의 연구진행과정에서 간기능의 식약처 허가 사항에 맞추어서 프로토콜을 작성해가는 과정에서 시간적으로 조금 늦춰진 상황이 있어 연구 2차년도인 올해에 10여명의 피험자를 모집하고 연구 3차년도인 차년도에 나머지 피험자들을 모집하여 연구를 진행할 예정입니다. 이에 1협동의 임상시험진행은 1차년도(2016년 7월 30일까지)에 총 12명, 2차년도 연구기간(2016년 8월 1일부터 2017년 7월 30일까지)에 48명의 피험자 모집하여 임상시험진행을 마치고 임상시험 결과를 통계처리하여 결과보고서를 작성하였습니다.

5. 시험약과 부형제의 조성

	%	700	(mg)
초음파처리인삼꽃대엑스	48	336	
미결정셀룰로스	23	161	
옥수수전분	17	119	
경질무수규산	5	35	
전분글리콜산나트륨	3	21	
스테아리린산마그네슘	1.4	9.8	
HPMC	2	14	
글리세린지방산에스테르	0.237	1.659	
이산화티타늄	0.218	1.526	
식용적색제40호	0.145	1.015	
	100	700	

시험약 사진



6. 시험약 라벨

본 제품은 “인체적용시험용” 임	
1. 제품명: UGFB 또는 위약	대상자 번호
2. 원재료 및 함량(700 mg 중): 인삼꽃대건조엑스 336 mg 또는 옥수수전분 455 mg	
3. 제조번호: UGFB16-1 또는 UGFB16-2	
4. 내용량: 700 mg/정, 294 정/병	
5. 사용기한: 2018년 05월 10일 까지	
6. 저장방법: 직사광선 및 고온 다습한 곳을 피하고 서늘한 곳에서 실온 보관	
7. 복용법: <u>1일 2회, 아침·저녁 식사직전에 3정씩 (하루 총 6정) 드십시오.</u>	
8. 인체적용시험계획승인을 받은 자의 상호와 주소: 고연(高研), 충북 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112	
본 제품은 인체적용시험 이외의 목적으로 사용할 수 없음	

## 7. 시험약 복용방법 및 주의사항

### ① 시험제품 복용방법 및 규격에 관한 내용

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

### ② 시험제품에 대한 주의사항 및 부작용에 대한 자료

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



## 8) 인삼꽃대 제제를 대상으로 한 비알콜성 지방간 동물모델의 약효 및 기전규명

○ In vitro에서 지방대사 관련 유전자 발현에 미치는 영향 확인

### 가. 연구 방법

#### (1) 세포배양 및 지방축적 유도

HepG2 Human hepatoma cell line은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS), 100 unit/ml penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 세포 내에 지방 축적을 유도하여 지방간 세포모델을 만들기 위해 HepG2 cell을 6-well plate에 1x10<sup>6</sup> cell/well로 seeding하였다. Seeding 24시간 후 palmitate와 oleate를 1:2 비율로 섞은 유리지방산 (free fatty acid; FFA) mixture를 1 mM로 처리하여 1% BSA-DMEM에 세포를 배양하여 지방 축적을 유도하였다.

#### (2) Quantitative RT-PCR

Total RNA는 EASY-BLUE total RNA extraction kit (Intron Biotechnology Inc, Seoul, Korea)를 이용하여 분리하였다. Single-strand cDNA는 4 µg RNA, Oligo(15)dT primer, reverse transcriptase를 이용하여 합성하였다. 합성된 cDNA와 SYBR green PCR master mix를 총 볼륨 20 µl로 하여 StepOnePlus™ Real-time PCR (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)를 사용하여 타겟 유전자를 증폭시켰다. Primer의 종류 및 서열은 다음과 같다. *Srebf1* (Sterol regulatory element-binding protein)의 주형사 서열은 5'-GCC CCT GTA ACG ACC ACT G-3', 비주형사 서열은 5'-CAG CGA GTC TGC CTT GAT G-3'; *Fasn* (Fatty acid synthase)의 주형사 서열은 5'-AAG GAC CTG TCT AGG TTT GAT GC-3', 비주형사 서열은 5'TGG CTT CAT AGG TGA CTT CCA-3'; *SCD* (Stearoyl-CoA desaturase)의 주형사 서열은 5'-TCT AGC TCC TAT ACC ACC ACC A-3', 비주형사 서열은 5'-TCG TCT CCA ACT TAT CTC CTC C-3'이다. 반응 조건은 95°C 10분 후 40 cycle의 95°C 15초 denaturation, 60°C 1분 annealing/extension으로 하였다. 이때 유전자 발현량은 GAPDH를 housekeeping gene으로 사용하여  $\Delta\Delta Ct$ 법으로 계산하였다.

### 나. 연구 결과

#### (1) Human hepatoma cell line (HepG2)에서 인삼꽃대가 지방 생합성 관련 유전자 발현에 미치는 영향

인삼꽃대의 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 HepG2 세포에서 인삼꽃대를 50 µg/ml, 100 µg/ml의 농도로 2시간 처리 한 후, 24시간 동안 FFA (1 mM) 처리로 지방축적을 유도하였다. 지방 축적이 유도된 HepG2 세포에서 quantitative PCR을 시행한 결과, 중성지방 생성 관련 전사인자 및 타겟 효소 (*Srebf1*, *Fasn*, *Scd*)의 발현이 인삼꽃대를 저농도 (50 µg/ml)로 처리하였을 때 유의하게 억제됨을 확인하였다 (그림 1). 이 결과로 인삼꽃대가 지방 합성 유전자 발현 조절을 통해 지방 대사를 조절함을 확인할 수 있었다.

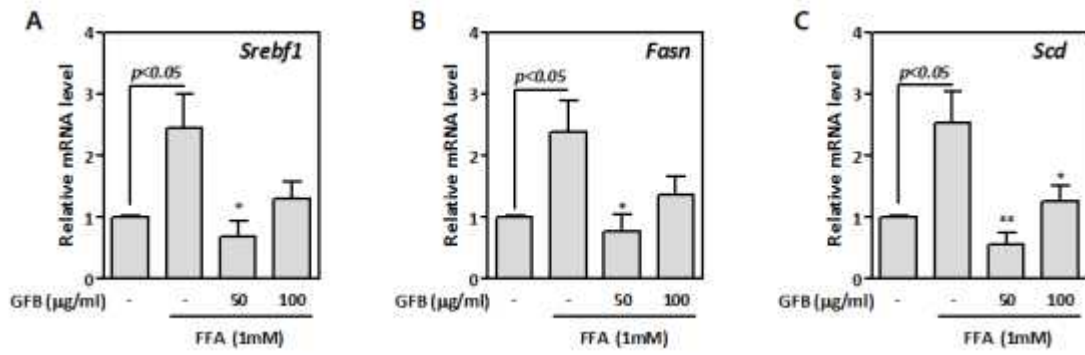


그림 1. 인삼꽃대의 지방 생합성 관련 유전자 발현 억제 효과

## ○ 비알코올성 지방간 동물모델에서 인삼꽃대의 약효 및 기전 평가

### 가. 연구 방법

#### (1) 실험동물의 사육 및 시료 처리

5주령의 C57BL/6J 마우스를 고지방식이 사육으로 지방간을 유도하여 동물모델에서 인삼꽃대의 약효를 평가하였다. 실험동물은 plastic mouse cage에 보관하여 실험동물실에서  $23 \pm 2$  °C, 상대습도  $50 \pm 10$  %, light/dark cycle (12/12 hr)의 조건하에서 사육하였고, 물과 사료는 자유로이 섭취하도록 하여 실험시작 전 일주일 동안 환경에 적응시킨 후 실험을 진행하였다. 실험군은 일반식이군 (RD)과 고지방식이군 (HFD) 고지방식에 인삼꽃대를 두 농도로 투여한 그룹, 각 250 mg/kg/day (HFD + GFB250), 500 mg/kg/day (HFD + GFB500), 양성대조군으로 metformin 300 mg/kg/day (HFD + MET300)의 5개 그룹으로 나누었고, 각 그룹당 개체 수는 8마리로 하였다. 투여 시작 후 12주 동안 매 주 식이 섭취량과 몸무게의 변화를 측정하였고, 12주 후 실험동물을 희생하고 간무게를 측정하였다.

#### (2) 조직형태학 분석

간 조직의 형태를 확인하고자 희생 시 적출한 간 조직을 10 % neutral buffered formalin에 고정하고 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하여 두께 5  $\mu$ m의 관상 절편으로 제작하여 hematoxylin과 eosin (H&E) 염색 후 광학현미경으로 형태학적 관찰을 하였다. 간 내 지방축적의 정도를 확인하고자 고정된 간 조직을 30 % sucrose 용액에서 48시간동안 보관 후 optimal cutting temperature compound에 embedding시켜 - 25 °C에서 냉동조직절편을 제작하였다. 냉동조직절편을 고정시킨 후 Oil Red O와 hematoxylin 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

#### (3) 혈액지표 분석

혈액 지표 분석을 위해 실험동물 희생 전 12시간 절식 후 혈액을 채취하여 원심분리로 혈청을 분리한 후 분석에 사용하였다. 혈중 중성지방과 간 지표지수인 alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase (AST)를 측정 키트 (Stanbio Laboratory, Boerne, TX)와 자동분석기 (SMARTLAB, Mannheim, Germany)를 사용하여 측정하였다.

#### (4) 간 내 중성지방 측정

간 조직을 클로로포름과 메틸알코올 2 : 1 비율로 혼합한 용액에서 균질화 시킨 후 50 mM sodium chloride를 넣었다. 4 °C에서 overnight 인큐베이션 후 원심분리하여 지방층을 분리하였다. 지방층을 질소가스로 말린 후 총 지방량을 측정하고 1% Triton X-100 in PBS에 녹여 아산셋트 중성지방 측정용 시액을 이용하여 중성지방량을 측정하였다.

#### (5) Microarray 실험 및 분석

간 조직에서 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다. RNA의 순도는 흡광도 260nm 와 280nm의 비율로 확인 후, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent

Technologies, Palo Alto, USA)로 측정하였다. Microarray 실험은 Affymetrix Whole transcript expression array 방법대로 진행하였다. GeneChip WT (Whole Transcript) Amplification kit를 사용하여 cDNA를 합성 하였고, 5.5 µg의 DNA를 Affymetrix GeneChip Mouse 2.0 ST Array에 45 °C에서 16시간 hybridize한 후, GeneChip Fluidics Station 450로 stain하여 Affymetrix GCS3000 Scanner로 스캔하였다. 시그널의 값은 Affymetrix® GeneChip™ Command Console software로 측정하였다. Raw data (.CEL 파일)는 Robust Multi-Average 방법으로 background subtraction, quantile normalization 그리고 summarization을 진행하였다. Differentially Expressed Genes (DEGs) 선별하기 위하여 Rank Product 방법을 적용하였다. pheatmap R package를 이용하여 DEGs의 유전자 발현을 heatmap으로 나타내었고, DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)를 이용하여 DEGs의 Gene Ontology (GO) analysis를 하였다 ( $p \text{ value} < 0.01$ ). GO의 Biological Process (BP)에 대하여 up-regulated genes와 down-regulated genes을 구분하여 분석을 진행 하였다. 모든 데이터 분석과 visualization은 R 3.1.2 프로그램을 사용하여 진행하였다.

## 나. 연구 결과

### (1) 인삼꽃대의 고지방식이에 의한 체중증가 억제 효과

그림 2는 고지방식이에 의한 체중증가에 미치는 인삼꽃대의 효과를 확인한 결과다. 고지방식과 인삼꽃대 투여 후 12주 동안의 체중변화를 그림 2A에 나타내었다. 12주간의 고지방식이 섭취에 의한 무게 증가량을 계산 하였을 때 인삼꽃대를 투여한 그룹에서 고지방식이 대조군에 비해 HFD + GFB250군에서 16.9 %, HFD + GFB500군에서 21.2 %의 체중증가가 억제됨을 확인하였다 (그림 2B). 이 결과로 인삼꽃대가 고지방식이에 의한 체중 증가를 통계적으로 유의하게 억제함을 알 수 있었다.

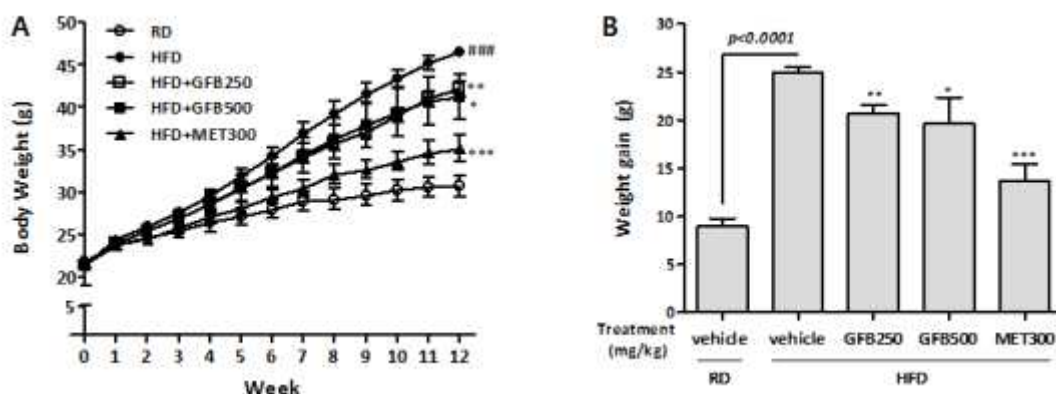


그림 2. 인삼꽃대의 고지방식이에 의한 체중증가 억제 효과

### (2) 간 조직의 형태학적 관찰

고지방식이에 의한 지방간 형성에 미치는 인삼꽃대의 효과를 확인하기 위해 실험동물 희생 시 간 조직을 적출하여 간 조직의 형태를 확인하였다. 그림 3A는 각 투여군의 간 사진이며, 그림 3B는 H&E 염색, 그림 3C는 Oil Red O 염색을 한 사진이다. H&E 염색과 Oil Red O 염색 모두 일반식이 대조군에 비해 고지방식이 대조군에서 눈에 띄게 많은 지방 축적이 확인 되었으며 이는 인삼꽃대를 투

여한 그룹에서 크게 감소되는 것을 확인하였다. 이 결과로부터 인삼꽃대가 고지방식이에 의한 간 내 지방축적을 억제하는 것을 확인하였다.

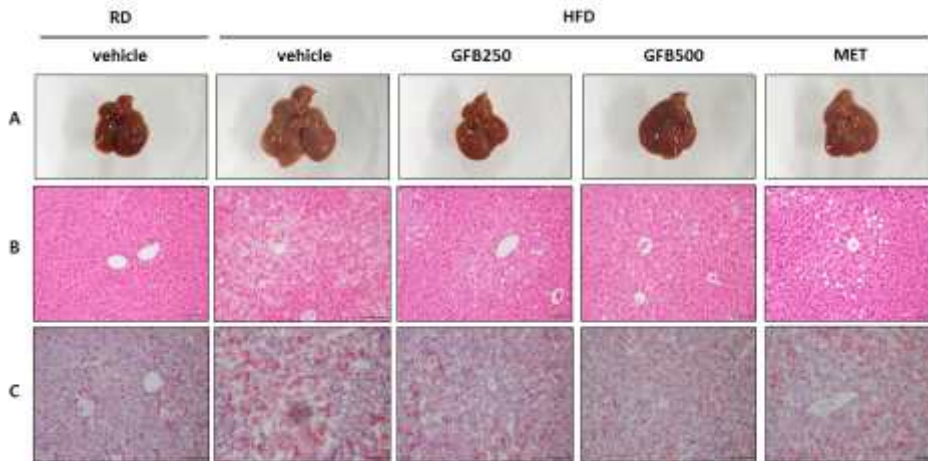


그림 3. 인삼꽃대 투여에 의한 간 조직의 형태 변화

### (3) 인삼꽃대 시료의 간 기능 개선 효과

고지방식이에 의한 간 기능 저하에 미치는 인삼꽃대의 효과를 평가하기 위해 간 기능 지표효소를 혈액에서 측정하였다. 고지방식이 대조군에서 일반식이 대조군에 비해 현저히 증가된 간 지표지수 (ALT, AST)가 인삼꽃대 250 mg/kg과 500 mg/kg 투여군에서 고지방식이 대조군에 비해 각각 ALT는 50.9 %, 63.8 %, AST는 26.8 %, 31.1 % 감소하여 용량 의존적으로 유의하게 감소됨을 확인하였다. 이 결과로부터 인삼꽃대 제제가 간 내 지방축적으로 인한 간 기능 저하를 현저하게 개선 한다는 것을 알 수 있었다.

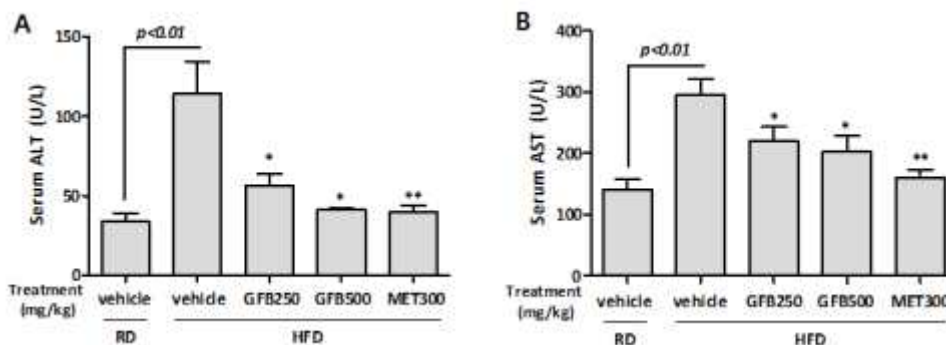


그림 4. 인삼꽃대의 간 기능 개선 효과

### (4) 혈중 및 간 내 중성지방 감소 효과

인삼꽃대의 간 내 지방 축적 억제 효과를 보다 명확히 확인하기 위하여 혈중 중성지방 농도와 간 내 축적된 지방량을 측정하였다. 그림 5A는 혈중 중성지방량을 측정한 결과이며, 고지방식으로 인한 혈중 중성지방증가가 인삼꽃대 투여군에서 유의하게 감소함을 확인하였다 (그림 5A). 고지방식으로 인한 간 내 지방축적에 의해 증가된 간 조직의 무게가 인삼꽃대 투여군에서 용량 의존적으로 줄어들 수 있으며 (그림 5B), 고지방식이 섭취로 인해 간 조직에 축적된 총 지방량 (그림 5C: HFD vs. HFD + GFB500, 35.6 %)과 중성지방량 (그림 5D: HFD vs. HFD + GFB500, 34.1 %)을

측정하였을 때도 인삼꽃대 투여군에서 고지방식이 대조군에 비해 현저히 감소함을 확인하였다. 따라서 인삼꽃대가 고지방식이에 의한 간 내 지방 축적 억제에 효과가 있다는 것을 확인하였다.

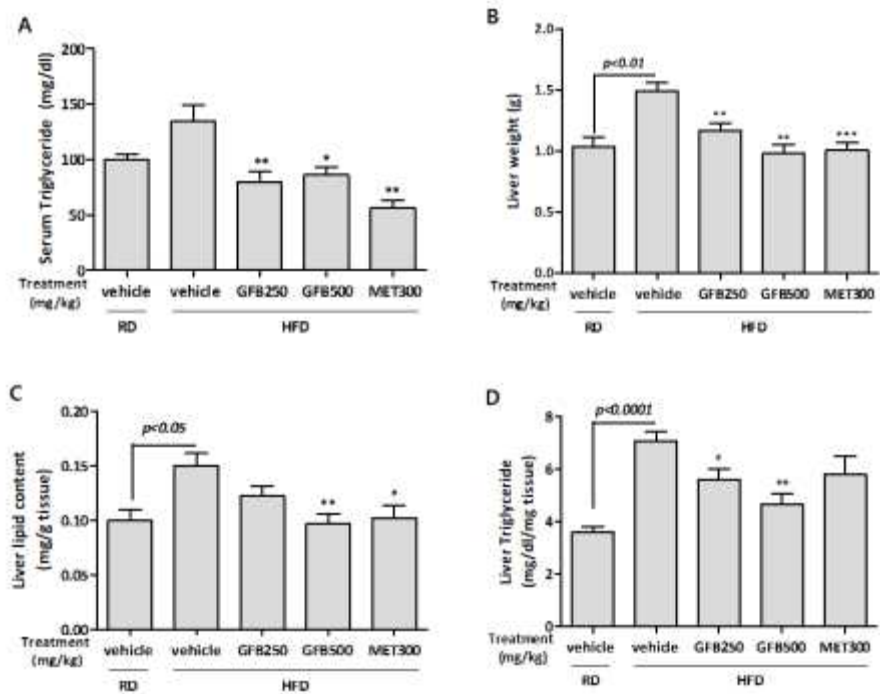


그림 5. 인삼꽃대의 혈중 중성지방 증가 억제 및 간 내 지방축적 억제 효과

(5) Microarray를 통한 인삼꽃대의 유전자 발현에 미치는 영향 검토

인삼꽃대의 타겟 유전자와 기전을 확인하기 위하여 일반식이 대조군, 고지방식이 대조군, 인삼꽃대 500 mg/kg 투여군의 간에서 RNA를 분리하여 microarray 실험을 시행하였다. Rank product algorithm ( $p$  value < 0.01)을 적용하여 인삼꽃대 투여군에서 발현 증가된 유전자 59개와 발현 억제된 유전자 162개를 선별하였고, 그 결과를 그림 6에 heatmap으로 나타내었다.

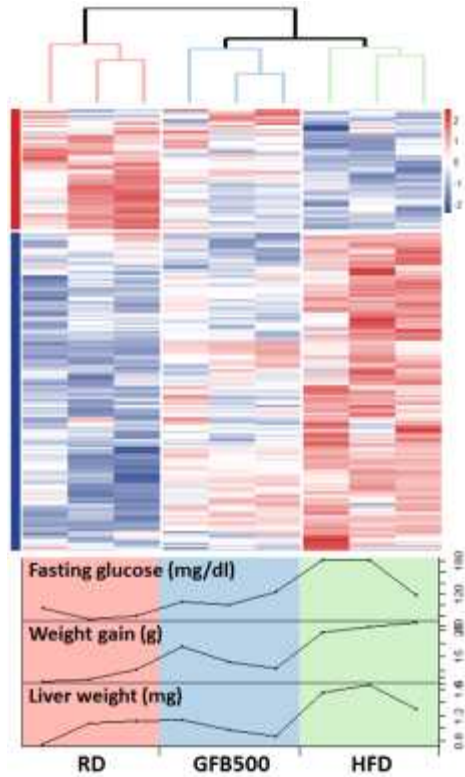


그림 6. 인삼꽃대 투여군의 유전자 발현 패턴 heatmap과 각 replicate의 공복혈당, 체중증가, 간 무게

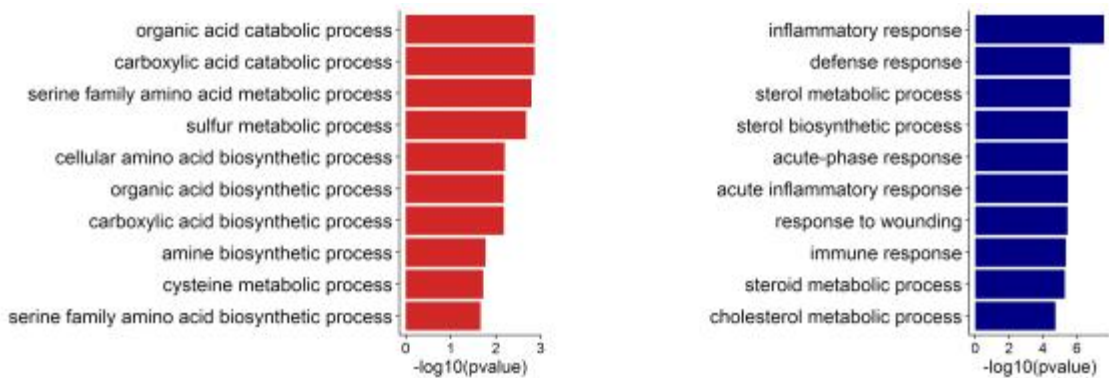


그림 7. 인삼꽃대 투여에 의해 증가 혹은 감소 된 유전자의 GO 분석

이 DEGs의 GO 분석을 진행하여 발현 증가된 유전자 (붉은색)와 발현 억제된 유전자 (파란색)의 상위 10개의 GO biological process term ( $p$  value < 0.01)을 그림 7에 바 그래프로 나타내었다. 증가된 유전자 군은 통계적으로 유의하게 organic acid catabolic process를 비롯한 metabolic process에 관여하는 것을 확인하였고, 감소된 유전자 군은 inflammatory response와 cholesterol metabolic process 등에 관여하는 것을 확인하여 **인삼꽃대가 간에서 염증반응 억제와 지방대사 관련 유전자 발현을 억제함을 확인하였다**. 표 1은 'inflammatory response'와 'cholesterol metabolic process' GO term에 속하는 유전자 리스트이다.

표 1. GO term 'Inflammatory response'와 'Cholesterol metabolic process'에 속하는 인삼꽃대 투여에 의해 발현 억제된 유전자 리스트

GO term	Gene	description	FC
inflammatory response	Clec7a	C-type lectin superfamily member 12	-1.6
	Cxcl1	C-X-C motif chemokine 1	-1.7
	Cxcl10	C-X-C motif chemokine 10	-1.6
	Cxcl9	C-X-C motif chemokine 9	-1.9
	Cfd	Complement factor D	-2.6
	Orm2	Orosomucoid-2	-3.7
	Orm3	Orosomucoid-3	-2.9
	Pparg	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	-1.8
	Saa1	Serum amyloid A-1 protein	-2.9
	Saa2	Serum amyloid A-2 protein	-3.7
	Saa3	Serum amyloid A-3 protein	-2.3
	Saa4	Serum amyloid A-4 protein	-1.7
C4a	Complement component 4a	-2.2	
cholesterol metabolic process	Nsdhl	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase	-1.9
	Cyp51	Sterol 14-alpha demethylase	-1.6
	Idi1	Isopentenyl pyrophosphate isomerase 1	-1.7
	Hmgcs1	HMG-CoA synthase	-1.7
	Fdps	Farnesyl pyrophosphate synthase	-1.8
	Srebf1	Sterol regulatory element-binding protein 1	-1.6

인삼의 항염효과는 이미 많은 연구가 진행되어 있으며 널리 알려져 있다. 또한, 비만으로 야기되는 지방간은 염증과 밀접한 관계가 있음이 밝혀졌으며, 단순 지방간이 보다 심각한 지방간염, 간섬유화, 간경화, 간암으로 발병하는데에 염증반응이 관여함이 보고되어있다. **Microarray** 분석을 통해 인삼꽃대 시료가 간에서 염증반응에 관여하는 유전자 발현 억제와 지방 합성에 관여하는 유전자 발현을 억제함으로써 고지방식으로 인한 지방간을 예방 및 치료하는데 효과를 나타냄을 확인하였다.



## 9) 인삼꽃대엑스의 제조 및 제조공정 최적화

### ○ 초음파 및 식초 추출에 의한 인삼 꽃대의 인삼사포닌 변화 분석

#### 가. 실험재료 및 방법

##### (1) 실험재료

본 연구에 사용한 인삼꽃대(Ginseng Fros, Flower buds of *Panax ginseng*)는 충청북도 음성에서 2014년 5월 10일에 4년근 인삼꽃대 10 kg를 채집하였고, 건조는 음성의 충북홍삼영농조합법인(대표 : 남성엽)에서 시행하였다. 얻은 시료를 대상으로 조건별 초음파 처리 후, 인삼의 사포닌함량을 비교 검토하였다. 각각의 제품표본은 고연 인삼연구센터에 보관하고 있다.

Figure of ginseng flower buds (*Panax ginseng* Meyer)



fresh ginseng flower buds



dried ginseng flower buds

##### (2) 인삼꽃대 초음파 식초 추출 조성물 조제

인삼꽃대 건조물 2 kg에 증류수 2 L를 가하여 ultrasonicator(고도기연, 한국) 출력 1200W 주파수 28 KHz에 넣고, 100°C에서 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 그리고 540 분씩 초음파 추출을 각각 시행하였다.

##### (3) 조사포닌(crude saponin) 조제

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

##### (4) HPLC-ginsenoside의 분석

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

사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system (Waters, 미국)이며, 컬럼은 Eurospher 100-5 C18 (250\*3mm)를 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 17 %(0 min)에서 25 %(25 min), 40 %(50 min), 60%(105 min) 그리고 100

(110 min)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

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

Flower bud of <i>Panax ginseng</i> <sup>a)</sup>	Time	0	25	50	105	110	120	130	140
	%A	17	25	40	60	100	100	17	17

1) Mobile phase :

Solvent A - ACN

Solvent B - water

2) Flow rate : 0.8 ml/min

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

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

#### 나. 결과 및 고찰

각 ginsenoside의 총합인 총 사포닌(total saponin) 함량에 있어서는 UVGFB-480이 12.65%이었으며 UVGFB-60은 11.453%이었으며, UVGFB-120는 11.399%로서 초음파 480분 추출 인삼꽃대 제제의 총 사포닌이 높은 함량을 보여주었다. 인삼꽃대의 주성분인 ginsenoside Re가 가수분해되어 생성되는 ginsenoside F<sub>4</sub>에 있어서는 UVGFB-480이 1.535%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, UVGFB-120 (1.417%), UVGFB-60 (1.228%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 홍삼의 특유성분이며, 항암, 혈압강하, 항산화, 뇌신경 보호작용이 보고된 ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 경우, UVGFB-480가 1.580%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, VGFB-120 (1.456%), UVGFB-60 (1.429%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 또다른 열 가수분해물인 Ginsenoside Rg<sub>5</sub>의 경우, UVGFB-480가 3.548%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, UVGFB-420 (2.618%), UVGFB-540 (1.991%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 항알러지 작용이 보고된 ginsenoside Rh<sub>1</sub>에 있어서는 UVGFB-120이 3.260%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, UVGFB-60 (2.894%), UVGFB-480 (2.037%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

Table 1. Ginsenoside composition in the butanol fraction of ginseng flower buds processed with ultrasonication and vinegar over time

Ginsenosides	(% <sub>w/w</sub> )								
	UVGFB 60 <sup>1)</sup>	UVGFB 120 <sup>1)</sup>	UVGFB 180 <sup>1)</sup>	UVGFB 240 <sup>1)</sup>	UVGFB 300 <sup>1)</sup>	UVGFB 360 <sup>1)</sup>	UVGFB 420 <sup>1)</sup>	UVGFB 480 <sup>1)</sup>	UVGFB 540 <sup>1)</sup>
Rd	0.159 ±0.1378	-	-	-	-	-	-	-	-
Re	0.139 ±0.0047	-	-	-	-	-	0.081 ±0.0087	0.204 ±0.0178	-
Rf	0.067 ±0.0056	-	-	-	-	-	-	-	-
Rg <sub>1</sub>	0.015 ±0.0016	-	-	-	-	-	0.047 ±0.0101	0.062 ±0.0122	-
Rg <sub>2</sub>	2.523 ±0.0408	2.338 ±0.2041	0.986 ±0.0912	0.236 ±0.0307	0.436 ±0.483	0.303 ±0.0498	0.929 ±0.0097	0.806 ±0.0123	0.435 ±0.0330
20S-Rg <sub>3</sub>	0.819 ±0.0087	0.819 ±0.0147	0.463 ±0.0105	0.035 ±0.0057	0.401 ±0.0087	0.040 ±0.0012	0.943 ±0.0046	1.039 ±0.0084	0.630 ±0.0047
20R-Rg <sub>3</sub>	0.610 ±0.0093	0.637 ±0.0035	0.341 ±0.0081	0.021 ±0.0087	0.247 ±0.0038	0.100 ±0.0022	0.500 ±0.0040	0.541 ±0.0147	0.309 ±0.0092
Rg <sub>5</sub>	1.527 ±0.0239	1.400 ±0.0326	0.552 ±0.0254	-	0.888 ±0.0385	0.060 ±0.0308	2.618 ±0.0169	3.548 ±0.0343	1.991 ±0.0198
Rg <sub>6</sub>	0.313 ±0.0076	0.274 ±0.0088	0.099 ±0.0040	0.006 ±0.0019	0.107 ±0.0010	0.078 ±0.0025	0.141 ±0.0039	0.123 ±0.0087	0.193 ±0.0032
Rh <sub>1</sub>	2.894 ±0.2697	3.260 ±0.1015	1.496 ±0.0148	0.115 ±0.0415	0.992 ±0.846	0.345 ±0.0892	1.878 ±0.0190	2.037 ±0.0036	1.182 ±0.0267
Rh <sub>4</sub>	0.161 ±0.0024	0.219 ±0.0035	0.073 ±0.0010	0.012 ±0.0055	0.112 ±0.0105	0.089 ±0.0083	0.446 ±0.0007	0.654 ±0.0146	0.334 ±0.0045
Rk <sub>1</sub>	0.902 ±0.0151	0.853 ±0.0169	0.505 ±0.0389	-	0.507 ±0.1322	0.087 ±0.0124	1.537 ±0.0038	1.821 ±0.0257	0.977 ±0.0010
Rk <sub>3</sub>	0.096 ±0.0024	0.091 ±0.0035	-	-	-	-	0.247 ±0.0055	0.269 ±0.0146	0.130 ±0.0043
F4	1.228 ±0.0258	1.417 ±0.0323	0.476 ±0.0027	0.020 ±0.0019	0.500 ±0.0093	0.070 ±0.0169	1.267 ±0.0027	1.535 ±0.0269	0.826 ±0.0030
20S-Rg <sub>3</sub> +20R-Rg <sub>3</sub>	1.429	1.456	0.804	0.056	0.647	0.140	1.444	1.580	0.939
Total ginsenosides <sup>2)</sup>	11.453	11.399	4.992	0.445	4.160	1.173	10.634	12.650	7.007

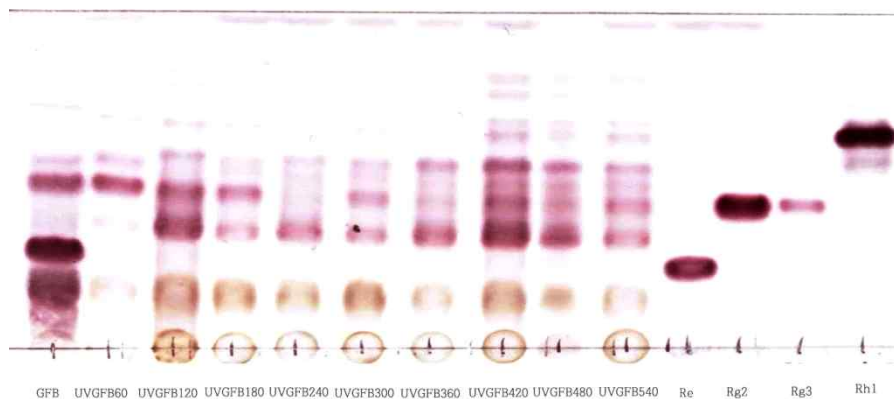
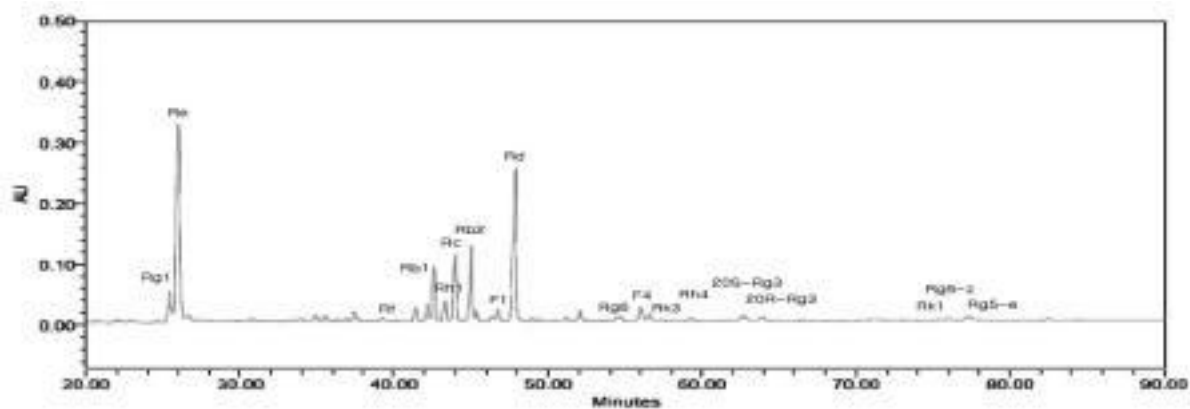
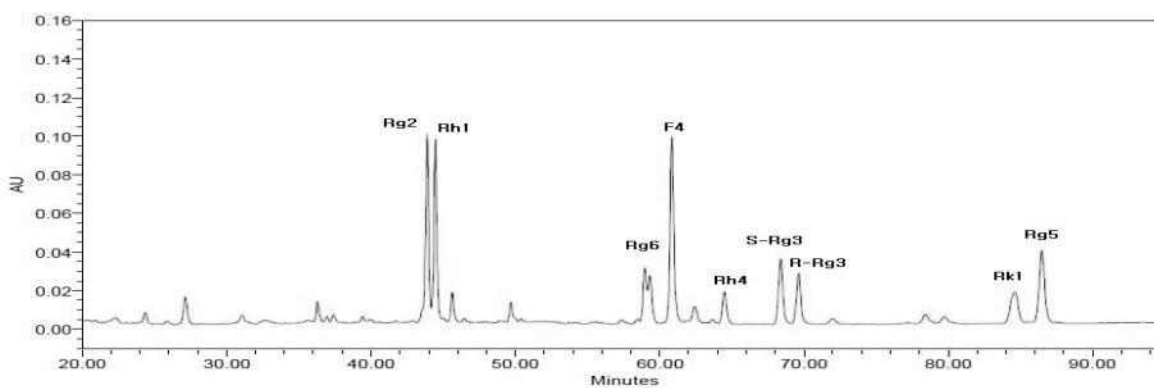


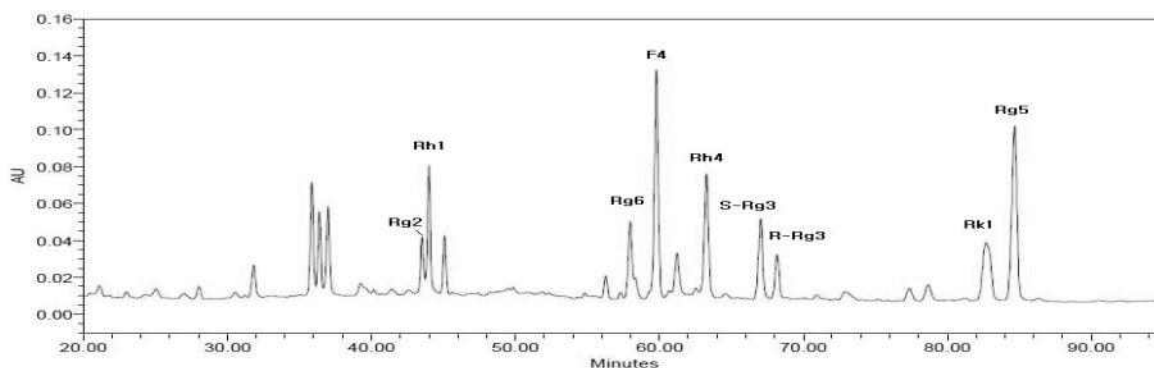
Fig. 2. TLC chromatogram of ginsenosides in the butanol fraction of ginseng flower buds processed with ultrasonication and vinegar over time.



(A) GFB



(B) UVGFB-60



(C) UVGFB-480

Fig. 3. HPLC chromatogram of ginsenosides in the butanol fraction of ginseng flower buds processed with ultrasonication and vinegar over time. (A) GFB : the butanol fraction of ginseng flower buds (B) UVGFB-60 : the butanol fraction of ginseng flower buds processed with ultrasonication and vinegar for 60 min, (C) UVGFB-480 : the butanol fraction of ginseng flower buds processed with ultrasonication and vinegar for 480 min.

○ 인삼꽃대엑스의 제조 및 제조공정 표준화

가. 인삼꽃대엑스의 제조

(1) 인삼 꽃대 10% 글리세린 용액 초음파 세척



(2) 인삼 꽃대 10% 식초 초음파 세척



(3) 세척 인삼 꽃대 초음파 처리기 투입



(4) 세척 인삼 꽃대 초음파 추출

인삼 꽃대 1.0kg에 증류수 10ℓ를 가하여 출력 200W, 주파수 28 KHz, 100℃ 규격의 소니케이터에 넣고, 초음파 처리를 16시간 시행하여 감압하에 농축시켜서 갈색의 추출물을 얻는다.



나. 초음파 인삼 꽃대 건조엑스 제조과정

건조과정	
사용기기	진공건조기
진공도	400torr 이하
진공챔버온도	75°C 이하
건조시간	약 20시간
분쇄과정	
사용기기	핀밀
분쇄망	80mesh 제를 통과시킴

다. 원료 및 기능성분(또는 지표성분)에 관한 자료

지표물질 : 초음파 인삼 꽃대 엑스의 주성분으로 표준품 확보 등 고려하여 지표물질을 Rb1, Rg2, Rg3, Rg5, Rh1, F4을 지표물질로 한다.

규격 : 초음파 인삼 꽃대 엑스의 주성분인 Rb1, Rg2, Rg3, Rg5, Rh1, F4의 합이 5%-20%(W/W) 또는 50mg/g-200mg/g 으로 한다.

초음파 처리 인삼꽃대 엑스의 인삼사포닌 함량

		(W/W%)
ginsenosides		UGFB
	Rb1	1.048±0.008
	Rb2	0.129±0.015
	Rc	0.016±0.006
	Rd	0.994±0.008
	Re	0.113±0.003
	Rf	0.014±0.000
	Rg1	0.028±0.004
	Rg2	1.002±0.010
	20S-Rg3	2.195±0.130
	20R-Rg3	0.035±0.005
	20E-Rg5	1.507±0.186
	20Z-Rg5	0.832±0.166
Rg6		0.070±0.002
	Rh1	0.761±0.015
	Rh4	0.148±0.001
	Rk1	0.904±0.007
	Rk3	0.000±0.000
	F1	0.028±0.004
	F4	8.833±0.275
Total ginsenosides		18.657



○ 인삼꽃대의 성분 표준화

가. 분석법 연구

(1) 조사포닌법을 이용한 분석

① 실험방법

인삼꽃대 엑스 각 2 g에 디에틸에테르(diethylether) 50 ml를 가하여 1시간씩 3회 초음파 세정기(고도기 업, 4020P, 한국)로 70°C이하에서 추출한 후, 원심분리하여 상등액을 제거한다. 얻은 잔사에 수포화 부탄올(butanol) 50 ml를 가하여 2시간씩 3회 추출하고, 원심분리 하여 상등액을 취하여 여과하고, 감압 농축을 하여 조사포닌을 얻는다.

② 실험결과

인삼꽃대 엑스	조사포닌함량(%)
Water 추출 엑스	31.18
50% EtOH 추출 엑스	55.08
70% EtOH 추출 엑스	66.75
95% EtOH 추출 엑스	84.85

(2) HPLC를 이용한 분석

① 원료의 분석

- 표준액의 조제

진세노사이드 F4 표준품 1mg 을 정밀히 달아 20ml 용량플라스크에 넣고 30% Acetonitrile용액 (Acetonitrile:Water=30:70, v/v) 10ml을 넣어 완전히 녹인 후 같은 용매로 표선을 채워 표준액으로 한다.

- 검액의 조제

초음파 처리 인삼꽃대 추출물 100mg을 정밀히 취해 100ml 용량플라스크에 넣고 30% Acetonitrile용액 50ml 를 넣어 완전히 녹인 후 같은 용매로 표선하여 검액으로 한다.

- HPLC 조건

검액 및 표준액을 다음 조건으로 분석한다.

- 컬 럼 : Eurospher 100-5 C18(3×250 mm; Knauer, Germany)
- 유 속 : 0.8 ml/min
- 이 동 상 : A - Water, B - Acetonitrile
- 검 출 기 : UV 203 nm

- 정밀성

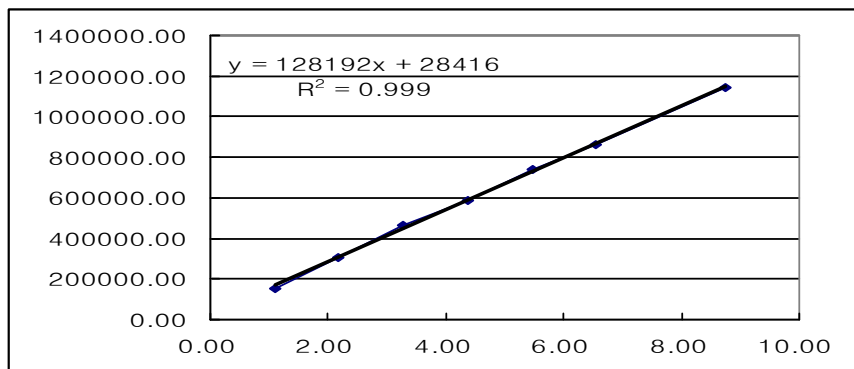
sample	F4 함량 (mg/ml)				SD	RSD
	x1	x2	x3	평균		
1	4.32	4.28	4.31	4.30	0.025	0.586
2	4.47	4.43	4.46	4.45	0.037	0.844
3	4.37	4.32	4.38	4.36	0.031	0.710
4	4.46	4.52	4.45	4.48	0.030	0.676
5	4.44	4.42	4.45	4.44	0.019	0.438
$X_{avg}$				4.41	0.030	0.680

- 정확성

농도 (mg/ml)	상대함량 (%)	F4 함량 (mg/ml)				deviation (%)	RSD
		x1	x2	x3	평균		
3.50	80	3.48	3.47	3.49	3.48	-0.57	0.439
4.37	100	4.34	4.35	4.32	4.33	-0.92	0.400
5.24	120	5.21	5.25	5.23	5.23	-0.19	0.481
$X_{avg}$						-0.56	0.440

- 직선성

농도 (mg/ml)	상대함량 (%)	F4 peak area				SD	RSD
		x1	x2	x3	평균		
1.09	25	153967.49	156238.03	155287.03	155165.52	1139.30	0.71
2.19	50	303674.30	309119.92	306141.91	306310.71	2726.73	0.89
3.28	75	466112.88	468406.95	467476.91	467333.58	1152.93	0.25
4.37	100	588568.91	589973.10	588788.24	589111.42	754.25	0.13
5.46	125	738861.03	738953.02	736198.97	738005.67	1563.57	0.21
6.56	150	865434.25	861539.20	852874.25	859940.57	6428.94	0.75
8.74	200	1136081.42	1156956.74	1140378.72	1144473.63	11022.15	0.96



HPLC를 이용하여 주성분인 ginsenoside F4를 분석한 결과 정밀성과 정확성 그리고 직선성이 뛰어나 본 분석조건은 ginsenoside F4를 분석하기에 좋은 방법으로 확인되었다.

## 10) 안전성 시험[II]

### ○ 13주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험

#### 요 약

본 시험은 암·수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 13주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 안전성을 평가하고, 4주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하기 위하여 실시하였다. 본 시험의 투여용량은 0, 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day로 암·수 각각 10 마리에 13주 반복 경구 투여하였고, 회복군은 0 및 5,000 mg/kg/day 용량으로 암·수 각각 5 마리에 13주 반복 경구 투여한 후 4주간 회복 기간을 두었다. 관찰기간 동안, 일반증상, 체중, 사료 섭취량, 안과학적 검사 및 뇨 검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정 및 부검 시 육안적 검사를 수행하였다. 관찰기간 동안 암·수 0, 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 사망례는 관찰되지 않았다. 투여기간 동안, 암·수 1,250 mg/kg/day 투여군 및 대조군에서 전례에서 특이적인 일반증상은 관찰되지 않았다. 수컷 2,500 mg/kg/day 투여군 2 레에서는 투여 후 74일부터 탈모 (loss of fur)증상이 나타났다. 수컷 5,000 mg/kg/day 투여군 1 레에서는 투여 후 76일부터, 1 레에서는 77일부터 탈모 증상이 나타났으며 5 레에서 산발적으로 유연 (salivation)현상을 보였다. 암컷 1,250 mg/kg/day 투여군 1 레와 5,000 mg/kg/day 투여군 1 레에서는 투여 후 78일부터 탈모증상이 나타났다. 암·수 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 체중, 사료 섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검소견에 있어서 시험물질 투여에 기인한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다. 이상으로 볼 때, 초음파처리 인삼열매 추출물을 13주 반복 경구투여 독성시험을 실시한 결과, 무독성량 (NOAEL)은 암·수 모두 5,000 mg/kg/day 이상인 것으로 판단된다.

## 1. 시험실시의 개요

### 1.1 시험목적

본 시험은 암·수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 13주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 안전성을 평가하고, 4주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하기 위하여 실시하였다.

### 1.2 Good Laboratory Practice Regulations

시험의 모든 과정은 다음의 Good Laboratory Practice 규정을 준수한다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-67호 (2014년 2월 12일)

### 1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시한다.

“의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제 2015-82호 (2015년 11월 11일)

### 1.4 의뢰자

기관명 고연

주 소 27136 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 106 호

연락처 043-649-1433

### 1.5 시험기관

기관명 (주)메드빌

주 소 08511 서울특별시 금천구 디지털로 9길 33, 15층 (가산동, IT 미래타워)

연락처 02-2027-5775

### 1.6 시험일정

시험개시일	2017년 03월 27일
동물 입수일	2017년 03월 29일
군 분리일	2017년 04월 04일 (수컷), 2017년 04월 05일 (암컷)
투여기간	2017년 04월 05일 ~ 2017년 07월 04일 (수컷) 2017년 04월 06일 ~ 2017년 07월 05일 (암컷)
부검	2017년 07월 05일 ~ 2017년 07월 06일 (주시험군) 2017년 08월 02일 ~ 2017년 08월 03일 (회복군)
실험종료일	2017년 00월 00일
시험종료일	2017년 00월 00일

### 1.7 시험책임자

성명

소속

일반독성

### 1.8 부문책임자

검역

시험물질보관

### 1.9 시험담당자

투여, 관찰 및 측정

조제

부검

병리

통계

### 1.10 기록 및 자료의 보관

시험기간 중 발생된 모든 기록과 시험물질은 (주)메드빌의 자료보관실에 보관한다. 보관기간은 최종보고서 승인 후 5년간 보관함을 원칙으로 하며, 그 후 보관에 관해서는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

### 1.11 동물윤리

본 시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정을 준수하며, 동물보호법 (법률 제 4379 호, 1991. 5. 31., 법률 제 13023 호, 2015. 1. 20., 일부개정)에 근거한 (주)메드빌 동물실험윤리위원회 (IACUC)에 의해 승인되었다 (승인번호 : 17-35).

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 시험물질

물질명	초음파처리 인삼꽃대 추출물
Lot No.	UGFE
성상	갈색 분말
pH	4.95
제조일	2016년 09월 01일
유효기간	2018년 08월 31일 (제조 후 2년)
입수일	① 2016년 09월 22일, ② 2017년 05월 02일
입수량	① 1332.71 g (용기포함), ② 8226.8 g (용기포함)
보관조건실온	(19.6 ~ 26.7 °C), 제습
공급처	고연 (高研)
잔여시험물질의 처리	시험 종료 후 반환

### 2.2 부형제

명칭	주사용수 (제이더블유중외제약, Lot No. DBA6010)
보관조건	실온

### 2.3 시험물질의 조제 및 분석

#### 2.3.1 시험물질의 조제

투여 당일 전자저울 (Explorer Ex224G, OHAUS, U.S.A.)로 시험물질을 칭량한 후, 부형제를 가하여 규정농도 (0, 1,250, 2,500, 5,000 mg/mL)로 조제하였다.

#### 2.3.2 조제물의 분석

조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 별도로 실시하지 않았다.

### 2.4 시험계

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

2.4.2 공급원                                     (주) 오리엔트바이오

#### 2.4.3 시험계 선정 이유

Sprague-Dawley 랫드는 일반 독성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.

#### 2.4.4 입수 시 동물 수, 주령 및 체중범위

수컷, 55 마리, 5 주령, 114.4 ~ 137.4 g

암컷, 55 마리, 5 주령, 113.4 ~ 129.1 g

#### 2.4.5 투여개시 시 성별, 동물수, 주령 및 체중

수컷, 50 마리, 6 주령, 183.2 ~ 209.2 g

암컷, 50 마리, 6 주령, 156.7 ~ 187.9 g

#### 2.4.6 검역 및 순화

입수 시 동물의 일반증상 관찰 및 체중측정 후, 개체식별법에 따랐다. 5 ~ 6일 간의 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하였고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 이상이 없는 동물을 시험에 사용하였다.

#### 2.4.7 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수 시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하였고, 사육상자에는 순화기간 사육상자카드를 부착하였다.

관찰기간 중에는 군분리 시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하였고, 사육상자에는 사육상자카드를 부착하였다.

#### 2.4.8 군분리

최종검역은 순화종료일에 일반증상 및 체중에 이상이 없는 동물로 군 평균체중 및 표준편차를 계산하여 대조군 및 실험물질 투여군으로 균일하게 배치하였다..

#### 2.4.9 잔여동물의 처리

군분리 후 잔여동물은 시험계로부터 제외하여 SOP 에 따라 처리하였다.

### 2.5 사육환경조건

2.5.1 동물실 번호	동물실 II
2.5.2 사육상자 종류 및 크기	Polycarbonate cage, 420W × 270D × 180H (mm)
2.5.3 사육상자당 수용동물 수	검역·순화기간 5 마리, 시험기간 1 ~ 2 마리
2.5.4 온도	19.2 ~ 25.0°C
2.5.5 상대습도	40.4 ~ 69.9%
2.5.6 환기횟수	10 ~ 20 회/시간
2.5.7 명암주기 (조명시간)	12 시간/일 (08:00 ~ 20:00)
2.5.8 조도	150 ~ 300 Lux

### 2.6 사료

2.6.1 종류	감마선 멸균된 실험동물용 고형사료 (2918C)
2.6.2 Lot No.	2918C-062215MA
2.6.3 제조사	ENVIGO RMS INC.
2.6.4 급이방법	급이기에 고형사료를 넣어 자유 섭취시켰다.
2.6.5 사료의 분석 및 확인	공급원에서 제공한 분석자료의 결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는 것을 확인하였다.

### 2.7 음수

#### 2.7.1 종류 및 급수방법

UV 멸균 및 필터를 이용하여 여과된 서울특별시의 수도물을 Polycarbonate 음수병 (500 mL)에 넣어 자유 섭취시킨다.

#### 2.7.2 음수의 분석 및 확인

“먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙” (환경부령 제 621 호, 2015. 11. 23, 일부개정) 의 전 항목에 대하여 (주)위트랩생활환경연구원 (경기도 수원시 권선구 서호동로 39)에 의뢰하여 1 회/년 검사를 실시하며, 그 결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는 것을 확인하였다.

### 2.8 투여

#### 2.8.1 투여경로 선택이유

임상예정 경로에 따라 경구투여를 선택 하였다.

#### 2.8.2 투여방법 및 투여횟수

투여액량은 10 mL/kg/day 로 하였고, 개체별 투여액량은 최근 체중측정을 기준으로 산출하였다. 투여 당일 경구투여용 위존데를 부착한 일회용 주사기 (3 ~ 10 mL)를 이용하여

13 주간 1 일 1 회 위내 강제 경구투여를 실시하였다.

## 2.9 투여용량 및 시험군의 구성

본 시험물질을 이용한 4 주 반복경구투여 용량결정시험 (㈜메드빌 시험번호: M15005)에서 투여용량인 5,000 mg/kg 에서 독성학적으로 의미있는 변화가 관찰되지 않아, 본 시험의 투여용량은 5,000 mg/kg 을 고용량으로 설정하고, 공비 2 를 적용한 2,500 및 1,250 mg/kg/day 를 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 대조군은 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였고, 4 주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하였다.

각 단계별 투여용량은 다음과 같이 설정하였다.

군	투여용량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg/day)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	10 (11001 ~ 11010) + 5* (11011 ~ 11015)	10 (21001 ~ 21010) + 5* (21011 ~ 21015)
G2 저용량군	1,250	10	10 (12001 ~ 12010)	10 (22001 ~ 22010)
G3 중용량군	2,500	10	10 (13001 ~ 13010)	10 (23001 ~ 23010)
G4 고용량군	5,000	10	10 (14001 ~ 14010) + 5* (14011 ~ 14015)	10 (24001 ~ 24010) + 5* (24011 ~ 24015)

\*: 회복군

## 2.10 관찰 및 검사

이하의 관찰, 측정 및 검사일은 투여개시일을 0 일로 하여, 투여개시일부터 7 일간을 투여 1 주로 계산하였다.

### 2.10.1 일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 13 주간 매일 1 회 일반증상을 관찰하였고, 1 일 2 회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다. 13 주 투여 종료 후 회복군에 대하여 4 주간 일반증상 관찰을 실시하였다.

### 2.10.2 사망동물의 처리

시험기간 동안 빈사 및 사망동물은 발생하지 않았다.

### 2.10.3 체중측정

모든 동물에 대하여 입수일, 군 분리일, 투여 개시 전, 투여 후 및 회복기간에 주 1 회, 부검일에 체중을 측정하였다. 단 부검일의 체중은 절식을 실시하였으므로 체중평가에서 제외하였다.

### 2.10.4 사료 섭취량 측정

투여 개시 후 주 1 회 사료섭취량을 측정하였다. 측정방법은 사육상자별 급이한 사료량을 측정하고, 익일에 잔량을 측정하여, 개체당 일일 섭취량 (g/rat/day)을 산출하였다.

### 2.10.5 안과학적 검사

각 군 5 마리의 동물에 대하여 투여 13 주 및 회복 4 주에 실시하였다. 검사는 산동제 점안전 육안으로 동공대광반사 및 전안부를 관찰하고, 점안후 검안경 (binocular indirect ophthalmoscope, HEINE EN 50, HEINE, Germany)으로 전안부, 중간투광체 및 안저에 대한 검사를 실시하였다.

### 2.10.6 뇨검사

각 군당 5 마리의 동물에 대하여 투여 후 13 주 및 회복 4 주에 대사케이지를 이용하여 신선뇨 (배설 후 약 3 시간 이내의 뇨) 및 축뇨 (배설 후 약 24 시간 이내의 뇨)를 채취하여 아래



항목에 대한 검사를 실시하였다.

	항 목	단 위	측 정 방 법
신선뇨	당 (glucose)	mg/dL	뇨 자동분석기 검사 (CTK Status, SIEMENS, U.S.A.)
	빌리루빈 (bilirubin)	mg/dL	
	케톤체 (ketone body)	mg/dL	
	비중 (specific gravity)	-	
	잠혈 (occult blood)	Ery/uL	
	단백 (protein)	mg/dL	
	pH	-	
	침사	-	
축뇨	뇨량	mL	메스실린더 측정
	색조 및 투명도	-	육안관찰

### 2.10.7 혈액학적 검사

부검전 16 시간 이상 절식시킨 동물을 isoflurane 으로 마취하여 복대동맥으로부터 채혈한 혈액 중 약 1 mL 를 항응고제인 EDTA-2K 가 들어있는 vacutainer tube (BD, U.S.A.)에 주입한 후 한국건설생활환경시험연구원에 의뢰하여 자동혈액분석기 (ADVIA 2120, SIEMENS, U.S.A.)로 다음 항목을 측정하였다.

항 목	단 위	측 정 방 법
적혈구수 (erythrocyte count, RBC)	$\times 10^6$ cells/ $\mu$ L	Flow cytometry
혈색소량 (hemoglobin, HGB)	g/dL	Flow cytometry, Cyanmethemoglobin
헤마토크리트치 (hematocrit, HCT)	%	Calculated
평균적혈구용적 (mean corpuscular volume, MCV)	fL	Flow cytometry
평균적혈구헤모글로빈량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)	pg	Calculated
평균적혈구헤모글로빈농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	g/dL	
혈소판수 (platelet, PLT)	$\times 10^3$ cells/ $\mu$ L	Flow cytometry
백혈구수 (leucocyte count, WBC)	$\times 10^3$ cells/ $\mu$ L	Flow cytometry, Peroxidase stain
백혈구백분율 (WBC differential counting)	%	
- 중성호성백혈구 (neutrophil, NEU)		
- 림프구 (lymphocyte, LYM)		
- 단핵구 (monocyte, MONO)		
- 산호성 백혈구 (eosinophil, EOS)		
- 염기호성 백혈구 (basophil, BASO)		
망상적혈구 (reticulocytes, Reti)	%	Flow cytometry, RNA stain

혈액응고검사는 채혈한 혈액 중 약 1 mL 를 3.2% sodium citrate 가 담겨있는 vacutainer tube (BD, UK)에 주입하여 혈액응고분석기 (ACL ELITE PRO, Instrumentation Laboratory, U.S.A.)를 이용하여 다음 항목을 측정하였다

항 목	단 위	측 정 방 법
프로트롬빈시간 (prothrombin time, PT)	Sec	Nephelometry
부분활성트롬보플라스틴시간 (activated partial thromboplastin time, APTT)	Sec	Nephelometry

#### 2.10.8 혈액생화학적 검사

채혈한 혈액 중 약 3 mL 를 clot activator 가 들어있는 vacutainer tube (BD, UK)에 주입하고 15 - 20 분간 상온에 응고시킨 후, 10 분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청으로 혈액생화학분석기 (Hitachi 7020, HITACHI, Japan)와 전해질분석기 (PDC-800, FUJIFILM, Japan)를 이용하여 다음 항목을 측정하였다.

항 목	단 위	측 정 방 법
ALT (Alanine aminotransferase)	IU/L	IFCC법
AST (Aspartate aminotransferase)	IU/L	IFCC법
ALP (Alkaline phosphatase)	IU/L	P-NPP법
BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dL	Urease-UV법
CRE (Creatinine)	mg/dL	Jaffe법
GLU (Glucose)	mg/dL	UV법
CHO (Total cholesterol)	mg/dL	Enzyme법
TP (Total protein)	g/dL	Biuret법
ALB (Albumin)	g/dL	BCG법
T-BIL (Total bilirubin)	mg/dL	Evelyn-Malloy법
TG (Triglyceride)	mg/dL	Enzyme법
IP (Inorganic phosphorus)	mg/dL	Enzyme법
Ca <sup>2+</sup> (Calcium ion)	mg/dL	O-CPC법
A/G ratio (Albumin/Globulin ratio)	ratio	[ALB/(TP-ALB)] 산출
Cl <sup>-</sup> (Chloride ion)*	mmol/L	전극법
Na <sup>+</sup> (Sodium ion)*	mmol/L	전극법
K <sup>+</sup> (Potassium ion)*	mmol/L	전극법

\*: 전해질 분석기로 측정

#### 2.10.9 부검

모든 동물에 대하여 주 시험군은 투여 91 일, 회복군은 119 일에 isoflurane 마취 하에 채혈 및 방혈하여 안락사 시키고 부검하였다.

#### 2.10.10 장기중량 측정

모든 동물에 대하여 다음의 장기에 대한 중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대 장기 중량비를 산출하였다. 좌·우가 있는 장기(#)는 좌·우 무게를 합하여 측정하였다.

---

측 정 항 목

---

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>· 뇌 (brain)</li> <li>· 심장 (heart)</li> <li>· 간 (liver)</li> <li>· 신장# (kidney)</li> <li>· 고환# (testis)</li> <li>· 난소# (ovary)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>· 뇌하수체 (pituitary)</li> <li>· 폐 (lung)</li> <li>· 비장 (spleen)</li> <li>· 부신# (adrenal)</li> <li>· 전립선 (prostate)</li> <li>· 자궁 (uterus)</li> </ul> |
|---|---|
- 

2.10.11 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기·조직을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액 (neutral buffered formalin)에 고정하였고, 고환 및 안구는 Davidson 고정액에 고정하였다.

---

측 정 항 목

---

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>· 뇌 (brain)</li> <li>· 갑상선 및 부갑상선<sup>a)</sup> (thyroid and parathyroid)</li> <li>· 흉선 (thymus)</li> <li>· 기관 (trachea)</li> <li>· 간 (liver)</li> <li>· 신장 (kidney)</li> <li>· 타액선 (악하선, 설하선, 이하선)<br/>(salivary gland: submandibular, sublingual and parotid gland)</li> <li>· 식도 (esophagus)</li> <li>· 십이지장 (duodenum)</li> <li>· 회장 (ileum)</li> <li>· 결장 (colon)</li> <li>· 췌장 (pancreas)</li> <li>· 부고환 (epididymis)</li> <li>· 정낭 (seminal vesicle)</li> <li>· 자궁 (uterus)</li> <li>· 방광 (urinary bladder)</li> <li>· 장간막 림프절 (mesenteric lymph node)</li> <li>· 안구 (시신경<sup>a)</sup> 포함) 및 하더리안선 (eye including optic nerve and harderian gland)</li> <li>· 유선 (서혜부) (mammary gland: inguinal)</li> <li>· 흉골 (골수 포함) (sternum including bone marrow)</li> <li>· 대퇴골 (골수 포함) (femur including bone marrow)</li> <li>· 혀 (tongue)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>· 뇌하수체 (pituitary)</li> <li>· 폐 (기관지 포함) (lung including bronchi)</li> <li>· 심장 (heart)</li> <li>· 비장 (spleen)</li> <li>· 부신 (adrenal)</li> <li>· 위 (stomach)</li> <li>· 공장 (jejunum)</li> <li>· 맹장 (cecum)</li> <li>· 직장 (rectum)</li> <li>· 고환 (testis)</li> <li>· 전립선 (prostate)</li> <li>· 난소 (ovary)</li> <li>· 질 (vagina)</li> <li>· 악하 림프절 (submandibular lymph node)</li> <li>· 척수 (흉부) (spinal cord: thoracic)</li> </ul> |
|---|---|

<sup>a)</sup> 해당 장기는 조직이 슬라이드에 존재하는 것 만을 검사하였다.

---

고정된 장기·조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하여 박절한 후, Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하였다.

조직병리학적 검사는 대조군과 고용량군의 모든 개체의 장기·조직에 대하여 실시하였다.

## 2.11 통계학적 분석

통계학적 분석은 체중, 사료 섭취량, 뇨량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 장기중량에 대하여 SPSS program (SPSS 16.0)을 사용하여 실시하였다.

Levene test 를 통하여 등분산성이 인정되면 One-way analysis of variance (ANOVA)을 실시하여 유의성이 인정되면 사후검정으로 Scheffe 검정을 실시하였고, 등분산성이 기각되면 Dunnett's T3 검정을 실시하여 대조군과의 유의성을 확인하였다 (유의수준: 양측 5%).

회복군은 등분산인 경우 Student T 검정을 실시하였다 (유의수준: 양측 5%).

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 일반증상

(Table 1, Appendix 1)

투여기간 동안, 암·수 1,250 mg/kg/day 투여군 및 대조군에서 전례에서 특이적인 일반증상은 관찰되지 않았다.

수컷 2,500 mg/kg/day 투여군 2 레에서는 투여 후 74일부터 탈모 (loss of fur)증상이 나타났다.

수컷 5,000 mg/kg/day 투여군 1 레에서는 투여 후 76일부터 탈모증상이 나타났고 1 레에서는 77일부터 탈모 증상이 나타났으며 5 레에서 산발적으로 유연 (salivation)현상을 보였다.

암컷 1,250 mg/kg/day 투여군 1 레와 5,000 mg/kg/day 투여군 1 레에서는 투여 후 78일부터 탈모증상이 나타났다.

#### 3.2 체중변화

(Figure 1, Table 2, Appendix 2)

관찰기간 동안, 모든 시험물질 투여군에서 대조군과 비교 시 통계적으로 유의성 있는 체중의 변화는 관찰되지 않았다.

#### 3.3 사료 섭취량

(Table 3, Appendix 3)

관찰기간 동안, 수컷 2,500 mg/kg/day 투여군에서 투여 후 2, 5, 13 주 에 대조군에 비해 유의성 있는 사료섭취량의 증가 또는 증가경향이 관찰되었고, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 후 2 주에 대조군에 비해 유의성 있는 사료섭취량의 증가 또는 증가경향이 관찰되었다. 사료섭취량의 증가는 그 정도가 경미하여 독성학적인 의미는 없는 것으로 사료되었다.

회복기간 동안에는 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 회복 2 주 및 3 주에 대조군에 비해 유의성 있는 사료섭취량의 일시적 증가 또는 증가경향이 관찰되었다.

#### 3.4 안과학적 검사

(Figure 4, Appendix 4)

모든 시험물질 투여군에서 투여에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

#### 3.5 뇨 검사

(Table 5, Appendix 5)

모든 시험물질 투여군에서 투여에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

#### 3.6 혈액학적 검사

(Table 6, Appendix 6)

주시험군의 암·수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암·수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

수컷 2,500 mg/kg/day 투여군에서 헤마토크리트치 (HGB)의 수치 감소경향 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 평균적혈구용적 (HCV)의 수치 증가경향, 암컷 회복군에서 백혈구 (WBC)수의 감소, 산호성 백혈구(EOS)의 증가경향, 부분활성 트롬보플라스틴 시간 (APTT)의 증가등이 관찰되었으나, 경미한 변동으로서, 대부분 배경 데이터 내의 변동이며, 다른 관련 변화가 동반되지 않아 독성학적인

의미는 없는 것으로 판단하였다.

### 3.7 혈액생화학적 검사

(Table 7, Appendix 7)

주시험군의 암·수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암·수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

수컷 1,250 mg/kg/day 투여군에서 인 (P)의 수치가 대조군에 비해 유의성 있는 감소경향이 관찰되었고, 2,500 mg/kg/day 투여군에서 크레아티닌 (Crea), 인 (P) 및 나트륨 (Na<sup>+</sup>)의 수치 감소경향이 관찰되었고, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 나트륨 및 염소 (Cl) 수치의 감소경향이 관찰되었으며 암컷 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서는 나트륨 수치의 감소가 관찰되었다. 하지만 이는 경미한 변동으로서, 대부분 배경 데이터 내의 변동이며, 다른 관련 변화가 동반되지 않아 독성학적인 의미는 없는 것으로 판단하였다.

회복군에는 수컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 albumin/globulin ratio 수치의 변화가 관찰되었으나, 배경 데이터 내의 변동이며, 다른 관련 변화가 동반되지 않아 독성학적인 의미는 없는 것으로 판단하였다.

### 3.8 장기중량 측정

(Table 8, Table 9, Appendix 8, Appendix 9)

장기중량 측정 결과 수컷 3군에서 간 무게의 증가 경향이 관찰되었으나 농도의존적이지 않고, 정상치 이내의 변화였으므로 독성학적 의미는 없는 것으로 판단되었다.

### 3.9 부검소견

(Table 10, Appendix 10)

모든 시험물질 투여군에서 투여에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

### 4.0 조직병리학적 검사

(Table 11, Appendix 11)

#### 4. 결론

이상으로 본 시험 조건하에서, 초음파처리 인삼꽃대 추출물을 13 주 반복 경구투여 독성시험을 실시한 결과, 무독성량 (NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day 이상인 것으로 판단된다.

## FIGURES



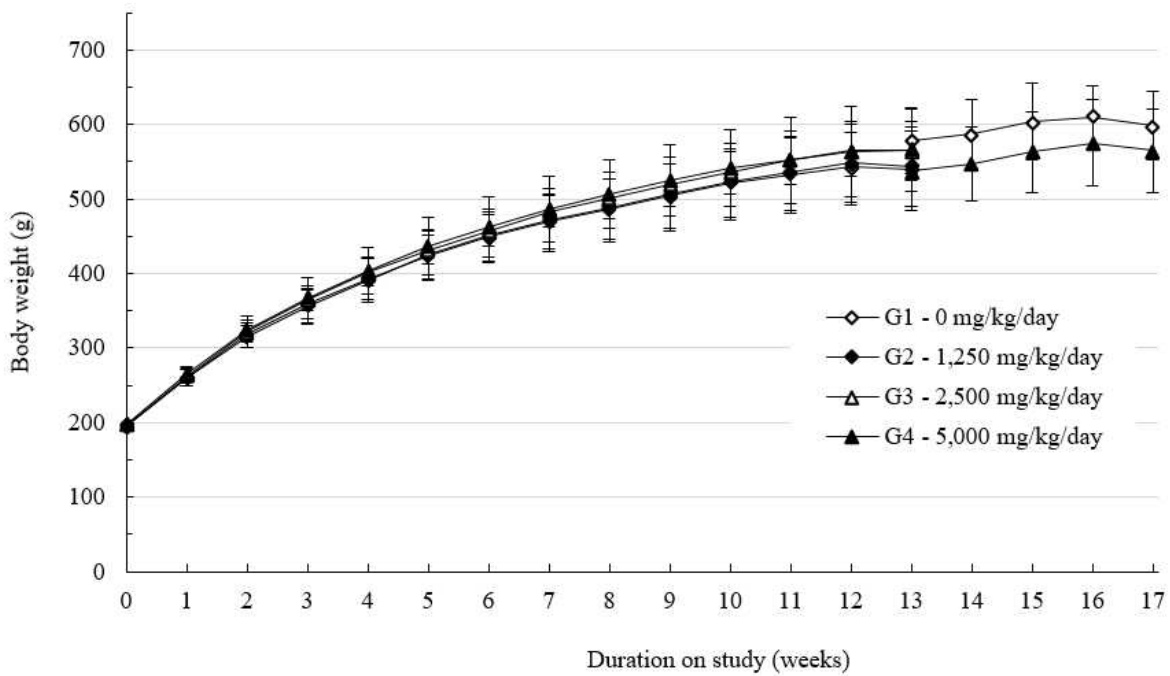


Figure 1. Body weights in male SD rats

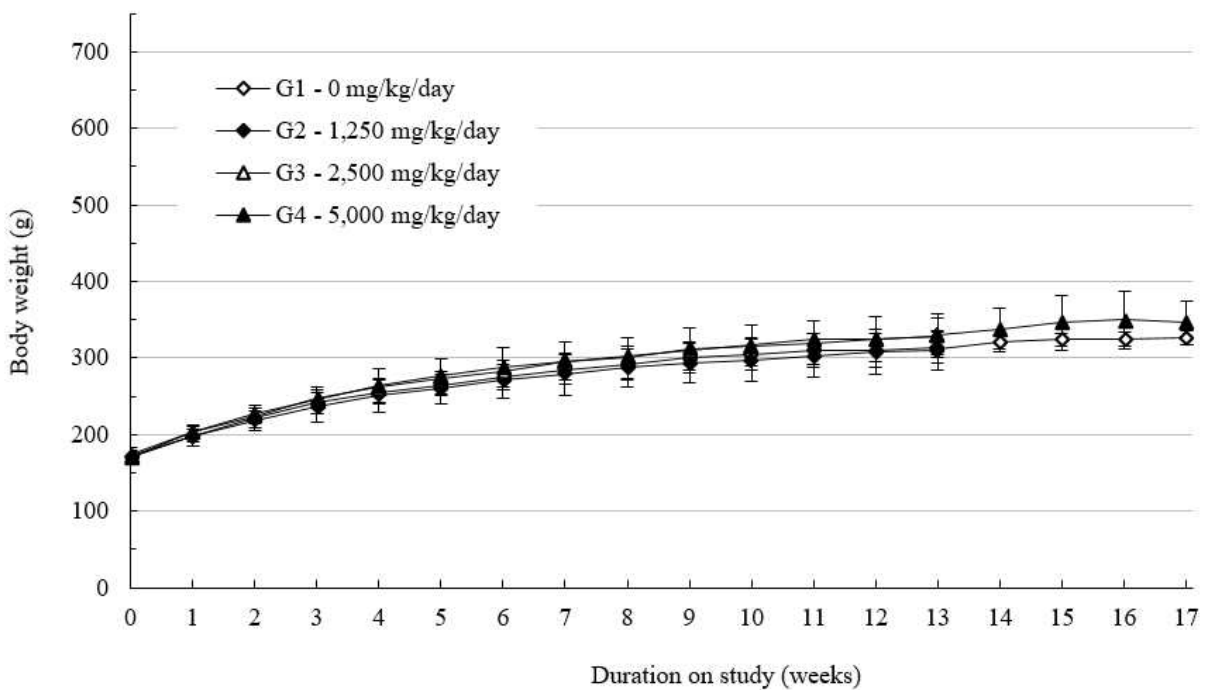


Figure 2. Body weights in female SD rats

## TABLES

Table 1-1. Summary of clinical signs (Main Group)

Sex: Male																	
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

NOA: No Observable Abnormality

Table 1-1. (Continued)

Sex: Male																	
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	10	NOA Loss of fur	10	10	10	8 2	8 2	8 2	8 2	8 2	8 2	8 2	8 2	8 2	8 2	8 2	8 2
G4 5,000	15	NOA Loss of fur Salivation	15	14	14	11 3	14 3	12 1	12 1	11 1	12 2	12 2	12 2	12 2	11 2	11 2	12 2

NOA: No Observable Abnormality

Table 1-1. (Continued)

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day						
			85	86	87	88	89	90	91
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	10	NOA	8	8	8	8	8	8	8
		Loss of fur	2	2	2	2	2	2	2
G4 5,000	15	NOA	11	10	11	12	12	12	12
		Loss of fur	2	2	2	2	2	2	2
		Salivation	1	2	1				

NOA: No Observable Abnormality

Table 1-1. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day															
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
G4 5,000	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

NOA: No Observable Abnormality

Table 1-1. (Continued)

Sex: Female															
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day												
			43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day												
			57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day												
			71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA Loss of fur	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	15	NOA Loss of fur	15	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14

NOA: No Observable Abnormality

Table 1-1. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day						
			85	86	87	88	89	90	91
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	10	NOA Loss of fur	9 1	9 1	9 1	9 1	9 1	9 1	9 1
G3 2,500	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	15	NOA Loss of fur	14 1	14 1	14 1	14 1	14 1	14 1	14 1

NOA: No Observable Abnormality



Table 1-2. Summary of clinical signs (Recovery Group)

Sex: Male															
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day												
			92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	NOA Loss of fur	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0
Sex: Female															
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day												
			106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	NOA Loss of fur	5 1	5 1	5 1	5 1	5 1	5 1	5 1	5 1	5 1	5 1	5 1	5 1	5 1
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day												
			106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	NOA Loss of fur	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1	4 1

NOA: No Observable Abnormality

Table 2-1. Summary of body weights (Main Group)

Sex: Male		(g)						
Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		0	1	2	3	4	5	6
G1 0	Mean	196.0	260.6	318.9	358.7	393.2	424.5	449.1
	S.D.	6.3	11.5	18.6	25.1	28.6	31.4	32.5
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	Mean	195.0	260.4	315.2	355.7	390.8	425.0	450.5
	S.D.	6.4	11.6	15.1	23.9	29.0	33.5	35.6
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	196.2	262.3	322.2	364.2	401.7	432.0	457.6
	S.D.	5.8	9.6	12.0	14.1	18.2	18.5	21.1
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	196.8	266.1	325.2	367.3	402.7	436.3	462.3
	S.D.	7.0	9.1	17.6	27.4	31.3	39.1	40.3
	N	15	15	15	15	15	15	15

Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	469.8	486.7	503.8	521.2	532.6	542.3	540.3
	S.D.	37.0	40.5	42.8	45.4	48.3	47.6	51.3
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	Mean	471.6	488.7	506.3	523.0	535.7	548.0	543.7
	S.D.	41.7	46.5	48.9	51.7	54.5	56.2	53.3
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	483.3	500.0	518.4	535.4	551.5	565.0	564.5
	S.D.	20.8	25.8	27.7	28.7	32.7	34.5	39.6
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	486.9	506.1	524.4	542.0	552.1	563.4	566.1
	S.D.	44.0	45.7	47.7	51.3	58.0	61.1	56.1
	N	15	15	15	15	15	15	15

Table 2-1. (Continued)

Sex: Female									(g)
Group /		Week							
Dose (mg/kg/day)		0	1	2	3	4	5	6	
G1 0	Mean	170.9	198.3	221.6	241.5	255.3	264.7	275.5	
	S.D.	8.1	7.9	12.3	14.0	15.5	13.4	16.6	
	N	15	15	15	15	15	15	15	
G2 1,250	Mean	171.3	197.7	218.3	236.8	250.9	260.8	272.0	
	S.D.	11.1	12.2	12.8	21.7	21.6	20.9	24.5	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G3 2,500	Mean	173.4	202.3	224.0	247.4	261.9	273.4	282.9	
	S.D.	5.7	9.1	12.9	14.2	14.3	16.0	18.5	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G4 5,000	Mean	170.0	202.7	226.2	245.0	263.5	275.9	287.9	
	S.D.	8.1	9.6	12.5	17.7	21.7	22.5	25.1	
	N	15	15	15	15	15	15	15	

Group /		Week							
Dose (mg/kg/day)		7	8	9	10	11	12	13	
G1 0	Mean	284.3	292.1	300.4	304.0	309.5	309.1	313.1	
	S.D.	19.5	20.2	20.7	19.9	22.6	21.8	20.7	
	N	15	15	15	15	15	15	15	
G2 1,250	Mean	279.0	288.2	293.5	297.8	302.9	308.4	309.6	
	S.D.	27.8	26.9	26.3	28.5	28.8	29.7	25.4	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G3 2,500	Mean	295.6	302.9	310.4	317.1	324.1	324.9	328.8	
	S.D.	19.6	21.7	19.2	21.7	21.5	19.1	22.5	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G4 5,000	Mean	295.2	300.3	312.0	315.7	319.6	323.6	328.7	
	S.D.	24.6	26.5	28.0	26.3	28.0	29.4	28.8	
	N	15	15	15	15	15	15	15	

Table 2-2. Summary of body weights (Recovery Group)

Sex: Male		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		13	14	15	16	17
G1 0	Mean	577.3	586.8	603.6	609.6	598.1
	S.D.	43.4	45.6	51.6	42.1	45.5
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	537.0	546.7	562.8	575.3	564.9
	S.D.	53.4	49.7	54.8	57.2	56.3
	N	5	5	5	5	5

Sex: Female		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		13	14	15	16	17
G1 0	Mean	312.3	320.9	323.7	324.4	326.3
	S.D.	8.2	8.9	8.5	9.5	9.4
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	329.7	336.4	346.1	349.9	346.0
	S.D.	22.5	28.6	35.6	37.7	28.7
	N	5	5	5	5	5

Table 3-1. Summary of food consumptions (Main Group)

Sex: Male		(g/rat/day)						
Group /		Week						
Dose (mg/kg/day)		1	2	3	4	5	6	7
G1 0	Mean	24.20	26.44	24.35	27.32	25.39	26.29	26.69
	S.D.	0.86	1.07	1.42	1.44	1.77	2.58	1.44
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	Mean	23.35	26.49	24.21	26.67	25.84	25.64	26.21
	S.D.	1.54	1.58	1.99	2.12	1.01	1.22	1.67
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	24.53	28.43 <sup>##</sup>	25.65	27.29	28.01 <sup>#</sup>	27.64	28.09
	S.D.	1.24	1.34	1.30	0.88	2.08	1.01	1.69
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	24.93	28.98 <sup>##</sup>	25.13	27.44	27.80	27.30	28.12
	S.D.	2.35	2.42	3.13	2.75	2.84	2.84	2.46
	N	15	15	15	15	15	15	15

Group /		Week					
Dose (mg/kg/day)		8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	27.05	27.04	27.70	24.73	26.41	25.03
	S.D.	1.87	2.27	1.67	1.90	1.37	1.07
	N	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	Mean	26.70	28.20	27.26	24.24	26.12	25.39
	S.D.	2.05	2.65	1.74	1.46	1.93	1.64
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	26.32	29.00	28.27	27.13	27.13	27.29 <sup>#</sup>
	S.D.	1.80	1.97	2.22	1.90	2.01	2.09
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	27.75	26.98	26.92	25.67	24.27	25.06
	S.D.	2.10	3.34	3.11	2.48	2.79	2.43
	N	15	15	15	15	15	15

Significantly different from control by Dunnett's T3-test: # p<0.05, ## p<0.01

Table 3-1. (Continued)

Sex: Female		(g/rat/day)						
Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		1	2	3	4	5	6	7
G1 0	Mean	17.37	18.50	17.43	18.94	19.09	19.31	18.99
	S.D.	1.05	1.98	1.18	1.31	2.02	1.75	1.26
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	Mean	17.42	17.64	16.50	18.50	19.30	18.35	20.27
	S.D.	1.53	1.69	0.88	1.20	2.11	2.28	1.16
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	18.56	19.19	17.82	20.43	21.84	21.09	21.18 **
	S.D.	1.67	1.57	2.21	1.95	2.78	2.24	1.39
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	18.03	18.58	17.80	20.40	20.05	18.69	19.97
	S.D.	1.81	1.77	1.79	3.70	3.13	1.62	1.75
	N	15	15	15	15	15	15	15

		(g/day)					
Group / Dose (mg/kg/day)		Week					
		8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	18.37	18.96	20.25	17.38	16.49	16.97
	S.D.	1.32	2.48	1.81	1.71	3.68	1.73
	N	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	Mean	19.40	18.64	19.24	17.96	16.91	17.91
	S.D.	2.39	1.70	2.33	0.55	1.41	2.96
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	20.90 **	19.97	19.38	18.72	17.40	19.08 #
	S.D.	1.45	2.03	1.55	1.34	1.94	1.52
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	19.63	17.66	18.79	18.27	17.44	17.21
	S.D.	1.67	1.89	1.57	1.42	2.25	2.67
	N	15	15	15	15	15	15

Significantly different from control by Sheffe-test: \*\* p&lt;0.01

Significantly different from control by Dunnett's T3-test: # p&lt;0.05

Table 3-2. Summary of food consumptions (Recovery Group)

Sex: Male		(g/rat/day)			
Group /		Week			
Dose (mg/kg/day)		14	15	16	17
G1 0	Mean	27.70	26.20	26.50	24.34
	S.D.	1.78	2.18	1.36	1.73
	N	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	25.78	27.62	27.10	23.26
	S.D.	2.45	3.83	1.97	2.59
	N	5	5	5	5

Sex: Female		(g/rat/day)			
Group /		Week			
Dose (mg/kg/day)		14	15	16	17
G1 0	Mean	17.48	16.28	15.64	16.42
	S.D.	0.48	2.16	0.90	1.76
	N	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	19.08	19.52 *	18.14 **	14.42
	S.D.	3.16	2.05	0.70	2.32
	N	5	5	5	5

Significantly different from control by Student t-test: \* p<0.05, \*\* p<0.01

Table 4-1. Summary of ophthalmological examination (Main Group)

Sex: Male										
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
Sex: Female										
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5



Table 4-2. Summary of ophthalmological examination (Recovery Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	4	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 5-1. Summary of urinalysis (Main Group)

Sex: Male					
Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0	G2 / 1,250	G3 / 2,500	G4 / 5,000
No. of animals		5	5	5	5
Volume (mL)	Mean	15.5	18.9	24.1	23.0
	S.D	4.6	6.9	8.6	9.9
Glucose (mg/dL)	Negative	5	5	5	5
	Trace				
	1+				
	2+				
	3+				
Bilirubin (mg/dL)	Negative	5	5	4	1
	1+			1	4
	2+				
	3+				
Ketone body (mg/dL)	Negative	4	3	4	1
	Trace	1	2	1	4
	1+				
	2+				
	3+				
Specific gravity	≤1.005				
	1.010		1		3
	1.015	5	4	4	
	1.020			1	
	1.025				2
	≥1.030				
Occult blood (Ery/uL)	Negative		1	3	2
	Trace intact	3	2	1	2
	Trace lysed	1	2		1
	1+	1		1	
	2+				
	3+				
Protein (mg/dL)	Negative	2			
	Trace		1		1
	1+	2	4	3	
	2+	1		2	4
	3+				
pH	5.0				
	5.5				
	6.0				
	6.5				
	7.0				1
	7.5	1			1
	8.0				
	8.5	4	5	5	2
≥9.0				1	

Table 5-1. (Continued)

Sex: Female					
Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0	G2 / 1,250	G3 / 2,500	G4 / 5,000
No. of animals		5	5	5	5
Volume (mL)	Mean	10.5	14.1	12.2	16.0
	S.D	2.0	4.6	4.7	9.0
Glucose (mg/dL)	Negative	5	5	5	5
	Trace				
	1+				
	2+				
	3+				
Bilirubin (mg/dL)	Negative	4	4	5	1
	1+	1	1		4
	2+				
	3+				
Ketone body (mg/dL)	Negative	3	4	5	4
	Trace	2	1		1
	1+				
	2+				
	3+				
Specific gravity	≤1.005				
	1.010	2	1	1	1
	1.015	3	4	4	1
	1.020				3
	1.025				
	≥1.030				
Occult blood (Ery/uL)	Negative	4	4	4	4
	Trace intact	1	1		1
	Trace lysed			1	
	1+				
	2+				
	3+				
Protein (mg/dL)	Negative	2	3	3	
	Trace	1	1	1	
	1+	2		1	3
	2+		1		2
	3+				
pH	5.0				
	5.5				
	6.0				
	6.5				
	7.0				
	7.5				3
	8.0				
	8.5	5	5	5	2
≥9.0					

Table 5-2. Summary of urinalysis (Recovery Group)

Sex		Male		Female	
		G1 / 0	G4 / 5,000	G1 / 0	G4 / 5,000
Group / Dose (mg/kg)					
No. of animals		5	5	5	5
Volume (mL)	Mean	20.6	16.5	15.2	7.9
	S.D	5.2	8.0	4.5	3.5
Glucose (mg/dL)	Negative	5	5	5	5
	Trace				
	1+				
	2+				
	3+				
Bilirubin (mg/dL)	Negative	5	5	5	5
	1+				
	2+				
	3+				
Ketone body (mg/dL)	Negative	1		5	5
	Trace	1	4		
	1+	3	1		
	2+				
	3+				
Specific gravity	≤1.005				
	1.010	1	1	1	2
	1.015	4	4	4	3
	1.020				
	1.025				
	≥1.030				
Occult blood (Ery/uL)	Negative	1			1
	Trace intact	1			
	Trace lysed	1	2	5	4
	1+	2	3		
	2+				
	3+				
Protein (mg/dL)	Negative			3	5
	Trace				
	1+	3	3	1	
	2+	2	2	1	
	3+				
pH	5.0				
	5.5				
	6.0				
	6.5				
	7.0			1	
	7.5				
	8.0				
	8.5	5	5	3	5
≥9.0			1		

Table 6-1. Summary of hematological parameters

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	8.91	15.1	48.9	54.9	16.9	30.9	736	2.05
	S.D.	0.63	0.9	4.2	1.9	0.6	1.2	155	0.28
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	9.12	15.2	50.1	55.0	16.6	30.3	604	2.09
	S.D.	0.37	0.5	2.1	1.7	0.5	0.5	251	0.42
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	8.14	13.6 <sup>##</sup>	44.5	54.7	16.7	30.6	841	2.04
	S.D.	0.61	0.8	3.1	1.0	0.5	0.8	140	0.31
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	8.98	15.2	52.3	58.1 <sup>**</sup>	17.0	29.3	635	1.98
	S.D.	1.48	2.1	9.5	1.6	0.6	1.6	154	0.23
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	6.31	18.90	76.10	1.75	2.45	0.39	12.1	40.6
	S.D.	2.30	4.98	5.88	0.55	1.57	0.20	0.6	9.9
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	7.03	18.86	74.73	2.00	3.73	0.33	12.2	39.2
	S.D.	2.15	6.38	7.55	0.73	2.44	0.09	1.1	10.0
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	8.33	18.93	74.74	2.00	3.58	0.32	12.2	37.0
	S.D.	1.99	7.87	9.00	0.77	1.87	0.09	0.5	4.1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	6.19	15.73	77.49	2.18	3.76	0.38	12.7	34.3
	S.D.	1.92	7.22	10.46	0.99	3.29	0.21	0.3	4.2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Sheffe test: \*\* p&lt;0.01

Significantly different from control by Dunnett's T3-test: ## p&lt;0.01

Table 6-1. (Continued)

		Sex: Female							
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	7.78	13.8	45.2	58.2	17.8	30.6	757	2.49
	S.D.	0.55	0.9	2.7	1.4	0.5	0.7	217	0.49
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	7.80	14.0	45.4	58.3	17.9	30.8	587	2.03
	S.D.	0.69	0.9	3.9	2.1	0.7	1.0	315	0.45
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	7.34	12.8	42.5	57.8	17.4	30.2	895	2.45
	S.D.	1.19	2.3	7.5	2.4	0.4	1.1	252	0.58
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	7.63	13.7	45.1	59.1	18.0	30.5	511	2.22
	S.D.	0.58	1.1	4.4	2.1	0.6	0.6	349	0.40
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	3.71	15.49	76.15	2.20	5.37	0.34	11.2	38.4
	S.D.	1.39	4.84	7.35	0.82	3.20	0.15	0.6	5.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	4.72	12.83	80.41	2.20	3.71	0.37	11.2	40.1
	S.D.	2.29	2.70	3.08	1.13	1.81	0.32	1.2	6.9
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	4.55	13.99	79.22	2.72	3.17	0.35	10.5	38.9
	S.D.	1.05	4.53	7.06	0.84	2.92	0.14	0.5	6.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	3.53	14.99	77.61	2.09	4.43	0.29	10.8	35.6
	S.D.	1.25	4.10	6.99	0.76	4.16	0.20	0.5	5.3
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Table 6-2. Summary of hematological parameters (Recovery Group)

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	7.85	13.1	42.5	54.1	16.8	31.0	993	2.16
	S.D.	1.59	2.6	9.0	1.6	0.3	0.7	259	0.25
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	8.70	14.8	47.5	54.5	17.1	31.4	705	2.22
	S.D.	1.16	1.7	7.3	2.5	0.7	1.4	145	0.28
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	9.81	12.34	82.88	2.48	1.42	0.42	11.4	20.4
	S.D.	3.59	3.60	4.60	0.83	0.55	0.28	1.1	2.2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	8.65	15.20	78.96	2.12	2.84	0.46	12.6	18.3
	S.D.	2.43	5.60	5.92	0.52	1.41	0.13	0.7	2.4
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex: Female									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	8.22	14.9	45.9	55.8	18.2	33.1	885	2.53
	S.D.	0.75	1.0	3.9	1.1	0.5	1.5	109	0.28
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	7.28	13.5	40.8	56.1	18.6	33.2	674	2.43
	S.D.	0.93	1.4	5.4	0.8	0.5	0.9	364	0.45
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	6.16	8.76	85.90	2.86	1.18	0.54	10.2	18.1
	S.D.	2.16	3.28	3.02	0.74	0.15	0.23	0.8	2.1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	3.21 *	14.26	79.76	2.66	2.42 *	0.38	10.7	21.9 *
	S.D.	1.28	5.86	6.61	0.81	1.00	0.29	1.0	2.0
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Student t-test: \* p<0.05

Table 7-1. Summary of clinical chemistry (Main Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	Mean	33	116	146	133	16	1.09	0.08	63.9	54.0
	S.D.	8	24	32	35	3	0.19	0.03	7.7	16.7
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	35	102	171	150	15	0.96	0.08	63.8	46
	S.D.	5	15	26	43	1	0.10	0.02	14.6	21
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	34	110	145	151	14	0.88 #	0.08	69.0	38
	S.D.	6	22	11	35	2	0.08	0.01	11.4	14
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	30	115	141	143	14	0.94	0.07	67.4	44
	S.D.	4	13	33	50	2	0.13	0.01	14.7	12
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	Mean	6.4	4.2	1.97	10.97	10.10	139	6.9	97
	S.D.	0.6	0.3	0.20	1.80	1.27	2	1.5	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	6.3	4.2	1.97	8.47 *	10.15	137	6.6	97
	S.D.	0.4	0.2	0.12	1.33	0.94	1	1.9	1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	6.3	4.2	2.00	8.42 *	10.18	135 **	6.1	96
	S.D.	0.2	0.1	0.15	0.85	0.40	2	1.4	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	6.3	4.1	1.94	9.42	10.15	135 **	6.4	95 *
	S.D.	0.5	0.3	0.12	2.86	1.32	1	1.5	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Sheffe test: \*p<0.05, \*\* p<0.01

Significantly different from control by Dunnett's T3-test: # p<0.05



Table 7-1. (Continued)

Sex: Female										
Group /		ALT	AST	ALP	Glu	BUN	Crea	T-Bili	T-Chol	TG
Dose (mg/kg/day)		(U/L)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
G1 0	Mean	32	130	94	125	19	1.04	0.07	94.9	58.9
	S.D.	13	54	27	51	5	0.18	0.02	19.0	20.3
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	34	121	70	104	20	1.05	0.08	103.2	57.6
	S.D.	19	34	18	30	4	0.11	0.01	24.4	14.8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	29	104	76	112	16	1.06	0.06	107.2	60.7
	S.D.	11	18	20	18	3	0.11	0.01	17.3	15.9
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	33	104	69	116	15	1.07	0.07	92.1	58
	S.D.	16	42	13	26	2	0.08	0.01	16.7	19
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Group /		TP	Alb	A/G	P	Ca	Na	K	Cl
Dose (mg/kg/day)		(g/dL)	(g/dL)	ratio	(mg/dL)	(mg/dL)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)
G1 0	Mean	7.1	4.7	2.04	8.87	11.58	133	5.1	93
	S.D.	0.4	0.3	0.16	2.56	0.92	1	1.3	3
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	7.0	4.6	1.99	8.37	12.29	131 **	4.7	92
	S.D.	0.6	0.4	0.12	2.34	2.20	1	0.8	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	7.5	5.0	2.00	3.50	10.60	130 **	3.5	90
	S.D.	7.1	4.7	2.02	7.03	10.81	130	5.0	90
	N	0	0	0	2	1	1	1	1
G4 5,000	Mean	7.0	4.6	2.01	6.90	10.96	129 **	5.6	92
	S.D.	0.7	0.4	0.09	1.40	1.04	1	1.2	3
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Sheffe test: \*\* p&lt;0.01

Table 7-2. Summary of clinical chemistry (Recovery Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	Mean	34	145	134	184	16	1.16	0.11	79.2	81.2
	S.D.	4	38	29	83	1	0.18	0.03	19.8	43.7
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	30	120	114	175	15	0.92	0.10	67.2	66
	S.D.	3	35	20	23	2	0.18	0.02	14.2	21
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	Mean	6.9	4.4	1.71	12.90	11.44	141	6.4	100
	S.D.	0.5	0.3	0.07	3.38	0.84	1	1.0	1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	6.6	4.3	1.86 *	9.28	10.86	141	6.8	101
	S.D.	0.2	0.2	0.11	1.27	0.67	1	0.7	2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Student t-test: \* p<0.05

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	Mean	26	104	54	128	15	0.94	0.14	86.4	80.4
	S.D.	5	6	29	38	2	0.05	0.03	21.9	34.9
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	25	121	57	109	16	0.98	0.13	87.2	68.4
	S.D.	6	38	11	36	3	0.15	0.03	18.8	7.3
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	Mean	7.0	4.7	2.02	6.38	10.90	139	5.8	101
	S.D.	0.6	0.4	0.11	1.29	0.78	1	0.6	1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	7.2	4.8	2.02	5.81	10.60	139	6.2	100
	S.D.	0.7	0.4	0.15	1.50	0.89	2	1.4	2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 8-1. Summary of absolute organ weights (Main Group)

Sex: Male		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Liver	Heart	spleen	Lung	Kidney
G1 0	Mean	521.8	13.3099	1.5257	0.8180	1.7837	3.4815
	S.D.	46.0	1.3182	0.1136	0.1226	0.2283	0.4654
	N	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	543.7	13.6038	1.5083	0.8774	1.8615	3.4833
	S.D.	53.3	1.5693	0.1565	0.1348	0.1420	0.4137
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	564.5	14.2025	1.5884	0.9102	1.8933	3.6766
	S.D.	39.6	1.4598	0.1189	0.0990	0.1640	0.3980
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	580.6	14.9424	1.5723	0.8829	1.9192	3.7956
	S.D.	54.1	1.6974	0.1326	0.1176	0.2087	0.2888
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Brain	Pituitary	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	2.2353	0.0131	0.0623	3.4869	0.7749
	S.D.	0.1728	0.0026	0.0115	0.2705	0.2030
	N	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	2.2996	0.0143	0.0659	3.5432	0.8110
	S.D.	0.1626	0.0028	0.0118	0.3257	0.2160
	N	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	2.2211	0.0120	0.0670	3.4829	0.6433
	S.D.	0.0928	0.0043	0.0086	0.2214	0.1171
	N	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	2.1761	0.0138	0.0698	3.3575	0.7093
	S.D.	0.1509	0.0039	0.0098	0.3243	0.0948
	N	10	10	10	10	10

Table 8-1. (Continued)

Sex: Female		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Liver	Heart	spleen	Lung	Kidney
G1 0	Mean	313.5	7.5931	0.9537	0.5137	1.4365	1.9953
	S.D.	25.2	0.9086	0.0895	0.0777	0.0913	0.2352
	N	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	309.6	7.8238	0.9513	0.5274	1.3968	1.9193
	S.D.	25.4	1.0673	0.0726	0.1123	0.1617	0.2252
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	328.8	9.0452 *	0.9887	0.5711	1.4890	2.1079
	S.D.	22.5	0.8486	0.1069	0.0840	0.1519	0.1891
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	328.3	8.7707	0.9761	0.5504	1.4977	2.1168
	S.D.	32.6	1.3174	0.0947	0.0937	0.2643	0.1856
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Brain	Pituitary	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	2.0644	0.0182	0.0827	0.1093	0.6420
	S.D.	0.1332	0.0023	0.0137	0.0331	0.1971
	N	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	2.0435	0.0163	0.0728	0.1184	0.7535
	S.D.	0.0770	0.0056	0.0066	0.0337	0.2713
	N	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	2.0836	0.0183	0.0778	0.1278	0.8875
	S.D.	0.1142	0.0039	0.0110	0.0379	0.3188
	N	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	2.0676	0.0208	0.0863	0.1265	0.7742
	S.D.	0.0728	0.0034	0.0156	0.0433	0.2274
	N	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Sheffe test: \*p&lt;0.05

Table 8-2. Summary of absolute organ weights (Recovery Group)

Sex: Male		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
G1 0	Mean	575.9	16.1624	1.5182	0.9560	1.8656	3.6330
	S.D.	44.9	3.2026	0.1139	0.1843	0.3645	0.4689
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	541.3	13.3262	1.5316	0.8530	1.9086	3.3936
	S.D.	52.1	1.8551	0.0789	0.1360	0.2691	0.4228
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		Brain	Pituitary	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	2.2564	0.0132	0.0606	3.6818	0.7200
	S.D.	0.0989	0.0049	0.0092	0.2742	0.2537
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	2.1460	0.0128	0.0530	3.3238	0.7578
	S.D.	0.0450	0.0025	0.0119	0.1646	0.2059
	N	5	5	5	5	5

Sex: Female		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
G1 0	Mean	305.8	7.6386	0.7702	0.4235	1.4886	2.0200
	S.D.	7.6	0.4339	0.3847	0.2243	0.0211	0.1400
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	325.6	7.9402	0.9532	0.5354	1.6226	1.8962
	S.D.	31.5	0.6762	0.0851	0.0440	0.2702	0.1645
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		Brain	Pituitary	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	2.0692	0.0168	0.0776	0.1096	0.6846
	S.D.	0.1277	0.0032	0.0115	0.0311	0.0556
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	2.0754	0.0200	0.0742	0.1330	0.7286
	S.D.	0.0960	0.0041	0.0129	0.0357	0.1556
	N	5	5	5	5	5

Table 9-1. Summary of relative organ weights (Main Group)

Sex: Male		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Liver	Heart	spleen	Lung	Kidney
G1 0	Mean	521.8	2.5504	0.2934	0.1565	0.3414	0.6667
	S.D.	46.0	0.1107	0.0223	0.0171	0.0264	0.0553
	N	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	543.7	2.4363	0.2745	0.1600	0.3398	0.6217
	S.D.	53.3	0.2662	0.0210	0.0238	0.0363	0.0663
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	564.5	2.5153	0.2818	0.1612	0.3361	0.6519
	S.D.	39.6	0.1725	0.0180	0.0126	0.0279	0.0583
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	580.6	2.5858	0.2713	0.1525	0.3326	0.6590
	S.D.	54.1	0.3161	0.0140	0.0201	0.0429	0.0805
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Brain	Pituitary	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	0.4305	0.0025	0.0119	0.6722	0.1488
	S.D.	0.0415	0.0005	0.0019	0.0722	0.0375
	N	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	0.4254	0.0026	0.0122	0.6557	0.1481
	S.D.	0.0388	0.0005	0.0021	0.0724	0.0283
	N	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	0.3951	0.0021	0.0119	0.6194	0.1145
	S.D.	0.0305	0.0008	0.0018	0.0525	0.0213
	N	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	0.3784	0.0024	0.0120	0.5835	0.1230
	S.D.	0.0484	0.0006	0.0014	0.0826	0.0183
	N	10	10	10	10	10

Table 9-1. (Continued)

Sex: Female		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Liver	Heart	spleen	Lung	Kidney
G1 0	Mean	313.5	2.4181	0.3042	0.1641	0.4596	0.6362
	S.D.	25.2	0.1654	0.0138	0.0232	0.0307	0.0530
	N	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	309.6	2.5182	0.3079	0.1696	0.4521	0.6192
	S.D.	25.4	0.1411	0.0188	0.0293	0.0467	0.0416
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	328.8	2.7501 ##	0.3005	0.1740	0.4543	0.6420
	S.D.	22.5	0.1691	0.0216	0.0257	0.0506	0.0548
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	328.3	2.6864	0.2988	0.1685	0.4580	0.6493
	S.D.	32.6	0.4223	0.0302	0.0278	0.0793	0.0765
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Brain	Pituitary	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	0.6621	0.0058	0.0264	0.0353	0.2091
	S.D.	0.0638	0.0008	0.0036	0.0122	0.0783
	N	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	0.6648	0.0053	0.0236	0.0384	0.2454
	S.D.	0.0682	0.0018	0.0023	0.0111	0.0924
	N	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	0.6363	0.0056	0.0238	0.0387	0.2688
	S.D.	0.0563	0.0013	0.0038	0.0106	0.0893
	N	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	0.6350	0.0063	0.0264	0.0388	0.2394
	S.D.	0.0644	0.0009	0.0044	0.0141	0.0775
	N	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's T3-test: ## p<0.01



Table 9-2. Summary of relative organ weights (Recovery Group)

Sex: Male		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
G1 0	Mean	558.3	2.7882	0.2639	0.1657	0.3251	0.6294
	S.D.	49.3	0.3205	0.0130	0.0284	0.0652	0.0391
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	336.4	2.4565	0.2842	0.1574	0.3516	0.6279
	S.D.	39.0	0.1719	0.0191	0.0176	0.0220	0.0611
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		Brain	Pituitary	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	0.3939	0.0023	0.0106	0.6435	0.1233
	S.D.	0.0366	0.0009	0.0020	0.0785	0.0342
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	0.3994	0.0024	0.0099	0.6193	0.1412
	S.D.	0.0395	0.0004	0.0025	0.0759	0.0420
	N	5	5	5	5	5

Sex: Female		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
G1 0	Mean	309.3	2.4977	0.2523	0.1394	0.4871	0.6610
	S.D.	38.9	0.1245	0.1253	0.0754	0.0178	0.0509
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	336.4	2.4497	0.2932	0.1647	0.4970	0.5831
	S.D.	39.0	0.2347	0.0115	0.0074	0.0574	0.0173
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		Brain	Pituitary	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	0.6770	0.0055	0.0254	0.0359	0.2240
	S.D.	0.0441	0.0011	0.0040	0.0101	0.0187
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	0.6421	0.0061	0.0227	0.0406	0.2274
	S.D.	0.0664	0.0008	0.0026	0.0102	0.0611
	N	5	5	5	5	5

Table 10-1. Summary of necropsy findings (Main Group)

Sex: Male					
Group / Dose (mg/kg)	No. of examined	Organ	Findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	10	All	Unremarkable	S	92
G2 1,250	10	All	Unremarkable	S	92
G3 2,500	10	All	Unremarkable	S	92
G4 5,000	10	All	Unremarkable	S	92
Sex: Female					
Group / Dose (mg/kg)	No. of examined	Organ	Findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	10	All	Unremarkable	S	92
G2 1,250	10	All	Unremarkable	S	92
G3 2,500	10	All	Unremarkable	S	92
G4 5,000	10	All	Unremarkable	S	92

S: scheduled

Table 10-2. Summary of necropsy findings (Recovery Group)

Sex: Male					
Group / Dose (mg/kg)	No. of examined	Organ	Findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	5	All	Unremarkable	S	120
G4 5,000	5	All	Unremarkable	S	120
Sex: Female					
Group / Dose (mg/kg)	No. of examined	Organ	Findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	5	All	Unremarkable	S	120
G4 5,000	5	All	Unremarkable	S	120

S: scheduled    U : unscheduled

Table 11-1. Summary of histopathological findings (Main Group)

Table 11-2. Summary of histopathological findings (Recovery Group)

## APPENDICES

Appendix 1-1. Individual clinical signs (Main Group)

Appendix 1-1. (Continued)

Appendix 1-1. (Continued)



Appendix 1-1. (Continued)

Appendix 1-2. Individual clinical signs (Recovery Group)

## Appendix 2-1. Individual body weights (Main Group)

Sex: Male		(g)							
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week							
		0	1	2	3	4	5	6	
G1 0	11001	208.7	279.6	333.0	371.1	400.4	429.4	451.7	
	11002	198.0	256.3	306.9	345.1	379.9	410.7	429.9	
	11003	200.7	257.0	300.9	328.0	362.6	392.3	415.3	
	11004	198.3	269.0	336.8	382.9	421.5	452.8	472.4	
	11005	189.3	240.4	292.9	331.8	354.0	383.7	406.0	
	11006	201.0	282.5	358.7	343.3	373.6	410.7	437.8	
	11007	188.6	249.7	304.5	327.4	365.9	392.7	419.4	
	11008	194.0	255.6	305.0	408.4	454.8	489.9	512.0	
	11009	192.7	251.9	301.4	332.0	364.5	385.1	408.0	
	11010	183.2	252.7	310.1	351.3	386.1	419.5	446.5	
	11011	200.6	273.7	345.5	394.2	432.1	469.0	501.4	
	11012	200.3	258.6	318.4	353.3	386.8	411.5	435.4	
	11013	197.3	257.1	321.2	366.3	395.8	428.7	455.4	
	11014	196.4	264.7	328.1	375.9	412.0	448.5	480.6	
	11015	191.3	260.7	320.6	369.8	407.5	442.3	465.4	
	<b>Mean</b>	<b>196.0</b>	<b>260.6</b>	<b>318.9</b>	<b>358.7</b>	<b>393.2</b>	<b>424.5</b>	<b>449.1</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>6.3</b>	<b>11.5</b>	<b>18.6</b>	<b>25.1</b>	<b>28.6</b>	<b>31.4</b>	<b>32.5</b>	
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	
G2 1,250	12001	204.8	275.2	325.0	367.3	402.8	439.3	467.2	
	12002	201.5	269.5	322.1	362.9	396.9	427.0	446.0	
	12003	204.5	266.1	327.8	363.8	394.7	429.2	443.8	
	12004	193.1	277.9	340.9	409.1	461.2	507.4	538.1	
	12005	190.9	253.4	304.6	336.2	366.7	402.4	429.0	
	12006	194.6	260.9	323.4	368.5	401.3	438.5	473.1	
	12007	193.9	258.8	312.4	346.3	383.1	412.9	437.7	
	12008	191.6	250.3	304.6	337.1	369.2	402.1	426.1	
	12009	186.9	245.5	294.4	330.7	366.2	399.0	421.1	
	12010	188.5	246.1	296.5	335.3	365.9	392.3	422.6	
		<b>Mean</b>	<b>195.0</b>	<b>260.4</b>	<b>315.2</b>	<b>355.7</b>	<b>390.8</b>	<b>425.0</b>	<b>450.5</b>
		<b>S.D.</b>	<b>6.4</b>	<b>11.6</b>	<b>15.1</b>	<b>23.9</b>	<b>29.0</b>	<b>33.5</b>	<b>35.6</b>
		<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

## Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Male									(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week							
		0	1	2	3	4	5	6	
G3 2,500	13001	209.2	279.1	338.3	378.8	422.3	448.9	477.9	
	13002	199.8	262.3	314.5	355.4	394.1	423.5	450.8	
	13003	200.7	279.3	348.2	394.5	431.1	454.8	473.5	
	13004	195.2	259.8	315.1	349.9	378.3	409.3	427.7	
	13005	194.7	253.8	315.1	359.0	399.2	431.2	468.3	
	13006	195.2	256.8	316.3	362.7	411.8	451.3	479.6	
	13007	194.6	264.7	326.3	372.1	415.4	448.7	476.3	
	13008	192.3	253.6	320.5	365.2	399.2	430.3	457.1	
	13009	192.4	257.5	314.6	353.8	388.3	418.5	441.6	
	13010	188.2	255.6	313.3	350.7	376.9	403.1	423.1	
		<b>Mean</b>	<b>196.2</b>	<b>262.3</b>	<b>322.2</b>	<b>364.2</b>	<b>401.7</b>	<b>432.0</b>	<b>457.6</b>
	<b>S.D.</b>	<b>5.8</b>	<b>9.6</b>	<b>12.0</b>	<b>14.1</b>	<b>18.2</b>	<b>18.5</b>	<b>21.1</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	14001	199.2	273.1	342.2	398.8	436.5	489.8	518.4	
	14002	207.3	276.4	349.0	394.6	440.0	479.9	518.5	
	14003	199.9	265.4	326.0	357.8	398.2	432.2	465.7	
	14004	203.3	272.6	345.8	406.5	442.0	478.3	510.5	
	14005	196.6	259.3	315.3	348.2	386.2	417.2	440.8	
	14006	207.3	286.7	357.4	409.1	452.4	492.9	501.5	
	14007	195.6	263.8	323.2	365.3	391.7	422.8	452.6	
	14008	193.0	261.2	318.7	367.0	402.1	442.4	467.9	
	14009	187.1	251.3	296.9	328.0	367.9	385.8	412.4	
	14010	184.1	251.6	304.0	337.9	373.3	389.2	421.2	
	14011	202.7	270.9	326.4	371.6	400.2	436.6	449.9	
	14012	199.6	264.5	306.0	325.7	350.1	371.4	392.1	
	14013	195.3	264.5	311.2	345.7	367.5	398.4	420.1	
	14014	193.5	266.7	333.4	387.5	428.0	460.5	490.9	
	14015	187.8	263.3	322.8	365.6	404.0	446.7	471.8	
		<b>Mean</b>	<b>196.8</b>	<b>266.1</b>	<b>325.2</b>	<b>367.3</b>	<b>402.7</b>	<b>436.3</b>	<b>462.3</b>
	<b>S.D.</b>	<b>7.0</b>	<b>9.1</b>	<b>17.6</b>	<b>27.4</b>	<b>31.3</b>	<b>39.1</b>	<b>40.3</b>	
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

## Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Male									(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week							
		7	8	9	10	11	12	13	
G1 0	11001	461.9	472.4	483.2	501.5	507.3	515.3	507.6	
	11002	455.2	478.9	497.6	509.7	519.9	531.5	514.5	
	11003	438.5	454.3	477.8	489.3	507.3	535.2	511.2	
	11004	496.7	513.0	533.4	552.0	558.4	570.2	555.1	
	11005	418.0	420.0	434.1	443.5	443.4	450.3	448.9	
	11006	465.4	477.8	494.2	518.5	533.0	544.7	542.9	
	11007	434.0	457.5	473.6	486.3	498.7	509.8	497.0	
	11008	536.0	556.5	577.4	591.5	605.5	611.1	607.7	
	11009	417.1	427.3	439.3	452.8	461.4	469.3	473.2	
	11010	461.8	479.9	500.4	528.5	547.2	547.8	559.9	
	11011	534.8	552.4	581.1	603.6	623.0	632.4	644.8	
	11012	461.3	470.1	487.8	506.4	518.4	526.4	533.4	
	11013	472.0	500.0	511.1	530.4	534.5	547.0	548.9	
	11014	505.6	529.1	543.9	566.3	578.8	582.2	590.4	
	11015	488.4	510.6	522.4	537.6	552.1	561.7	568.9	
	<b>Mean</b>	<b>469.8</b>	<b>486.7</b>	<b>503.8</b>	<b>521.2</b>	<b>532.6</b>	<b>542.3</b>	<b>540.3</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>37.0</b>	<b>40.5</b>	<b>42.8</b>	<b>45.4</b>	<b>48.3</b>	<b>47.6</b>	<b>51.3</b>	
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	
G2 1,250	12001	490.9	518.7	538.1	564.4	578.2	585.5	577.7	
	12002	465.4	482.9	495.9	511.5	514.8	524.4	513.4	
	12003	462.2	483.2	503.5	511.3	526.5	538.6	531.6	
	12004	574.4	596.6	619.3	640.2	659.6	678.4	664.3	
	12005	449.9	458.2	477.5	494.0	507.1	525.9	515.3	
	12006	498.3	519.8	541.5	559.7	577.4	591.1	593.3	
	12007	456.4	476.7	489.5	509.6	520.7	532.0	533.1	
	12008	446.5	461.7	477.2	491.2	500.6	514.7	517.3	
	12009	441.3	452.5	469.2	483.1	491.1	497.3	493.7	
	12010	431.1	436.3	451.2	464.6	480.7	492.3	496.8	
		<b>Mean</b>	<b>471.6</b>	<b>488.7</b>	<b>506.3</b>	<b>523.0</b>	<b>535.7</b>	<b>548.0</b>	<b>543.7</b>
		<b>S.D.</b>	<b>41.7</b>	<b>46.5</b>	<b>48.9</b>	<b>51.7</b>	<b>54.5</b>	<b>56.2</b>	<b>53.3</b>
		<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

## Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Male									(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week							
		7	8	9	10	11	12	13	
G3 2,500	13001	507.5	524.7	544.7	560.8	569.5	579.1	572.3	
	13002	473.8	490.2	506.3	523.4	544.6	553.0	545.0	
	13003	491.3	507.6	528.9	545.1	555.6	564.5	559.4	
	13004	452.8	461.7	479.9	495.5	505.3	512.8	501.6	
	13005	491.2	515.0	524.4	545.8	571.4	584.1	592.9	
	13006	505.2	529.5	550.7	573.7	599.6	622.4	634.3	
	13007	502.8	528.3	550.4	565.4	586.8	602.5	602.4	
	13008	488.2	497.2	526.0	540.3	557.2	571.0	572.1	
	13009	469.0	486.6	498.6	511.7	519.6	538.6	547.3	
	13010	450.7	459.3	474.5	491.9	505.8	521.8	517.4	
		<b>Mean</b>	<b>483.3</b>	<b>500.0</b>	<b>518.4</b>	<b>535.4</b>	<b>551.5</b>	<b>565.0</b>	<b>564.5</b>
	<b>S.D.</b>	<b>20.8</b>	<b>25.8</b>	<b>27.7</b>	<b>28.7</b>	<b>32.7</b>	<b>34.5</b>	<b>39.6</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	14001	546.7	571.6	593.6	618.6	646.5	662.7	658.8	
	14002	539.6	562.6	577.3	601.9	607.6	627.7	620.8	
	14003	489.5	507.7	522.4	543.1	553.9	558.3	551.6	
	14004	552.7	573.1	592.7	622.8	641.7	656.6	647.6	
	14005	463.1	484.0	502.1	522.8	537.0	553.5	544.1	
	14006	527.2	542.5	562.0	584.9	607.5	631.0	635.4	
	14007	466.0	490.4	499.4	512.0	511.8	523.4	533.8	
	14008	495.4	508.7	537.3	551.0	560.9	561.6	567.3	
	14009	436.9	459.5	477.3	492.8	505.8	517.8	526.8	
	14010	447.8	466.2	486.4	492.1	500.1	523.2	520.0	
	14011	473.8	495.8	514.3	528.7	520.8	537.6	552.2	
	14012	409.2	421.2	432.9	454.3	454.7	458.0	470.2	
	14013	437.5	453.1	468.3	479.9	479.2	489.1	497.2	
	14014	516.6	541.1	562.9	572.4	586.7	607.6	604.5	
	14015	500.9	513.3	536.5	552.8	567.5	543.6	560.7	
		<b>Mean</b>	<b>486.9</b>	<b>506.1</b>	<b>524.4</b>	<b>542.0</b>	<b>552.1</b>	<b>563.4</b>	<b>566.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>44.0</b>	<b>45.7</b>	<b>47.7</b>	<b>51.3</b>	<b>58.0</b>	<b>61.1</b>	<b>56.1</b>	
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

## Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Female									(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week							
		0	1	2	3	4	5	6	
G1 0	21001	187.9	209.5	246.8	264.1	280.5	284.9	303.2	
	21002	179.9	206.0	234.9	254.6	269.7	274.0	285.7	
	21003	172.8	207.7	243.3	257.6	280.2	288.3	308.0	
	21004	176.5	204.2	230.9	250.9	258.1	260.2	271.2	
	21005	177.0	203.4	217.8	243.4	252.1	268.3	267.8	
	21006	161.4	197.3	215.5	235.8	242.0	257.2	259.9	
	21007	167.3	204.0	218.9	250.9	268.1	275.7	277.3	
	21008	163.7	188.6	207.1	216.2	231.1	246.2	255.1	
	21009	163.8	197.7	216.0	242.2	258.6	273.6	284.0	
	21010	156.7	191.2	205.7	219.6	232.0	242.8	248.9	
	21011	173.4	200.4	224.0	241.0	248.4	262.6	282.3	
	21012	174.1	197.8	212.5	225.1	240.5	249.7	261.2	
	21013	172.2	182.5	215.5	241.7	259.3	264.9	281.6	
	21014	172.0	196.2	222.9	248.8	261.6	267.2	281.5	
	21015	164.1	188.2	212.7	230.0	247.6	254.7	265.5	
	<b>Mean</b>	<b>170.9</b>	<b>198.3</b>	<b>221.6</b>	<b>241.5</b>	<b>255.3</b>	<b>264.7</b>	<b>275.5</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>8.1</b>	<b>7.9</b>	<b>12.3</b>	<b>14.0</b>	<b>15.5</b>	<b>13.4</b>	<b>16.6</b>	
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	
G2 1,250	22001	184.7	202.4	214.1	246.7	258.9	270.5	290.7	
	22002	183.7	223.6	240.6	273.2	286.5	301.0	307.9	
	22003	179.7	201.2	214.4	233.3	250.4	261.0	262.6	
	22004	181.9	205.9	228.9	255.8	271.3	280.5	298.4	
	22005	162.5	191.2	210.4	214.5	236.6	242.5	254.1	
	22006	175.9	202.0	232.6	260.3	273.4	275.9	294.9	
	22007	159.2	186.9	208.0	211.6	231.6	247.5	252.0	
	22008	168.7	196.1	225.8	237.1	251.3	252.6	271.1	
	22009	157.8	185.8	203.1	219.2	224.3	241.0	253.1	
	22010	158.7	182.0	205.5	216.0	225.1	235.6	235.0	
		<b>Mean</b>	<b>171.3</b>	<b>197.7</b>	<b>218.3</b>	<b>236.8</b>	<b>250.9</b>	<b>260.8</b>	<b>272.0</b>
	<b>S.D.</b>	<b>11.1</b>	<b>12.2</b>	<b>12.8</b>	<b>21.7</b>	<b>21.6</b>	<b>20.9</b>	<b>24.5</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	

## Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Female									(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week							
		0	1	2	3	4	5	6	
G3 2,500	23001	180.8	223.3	252.1	272.5	275.1	295.0	305.3	
	23002	180.5	203.6	212.2	243.6	255.6	267.8	269.1	
	23003	175.1	206.9	223.7	238.5	246.6	260.6	263.1	
	23004	172.5	202.9	229.3	246.1	257.3	278.3	283.1	
	23005	173.4	198.8	229.7	249.8	263.9	268.3	282.0	
	23006	174.0	206.1	225.4	257.2	277.7	285.2	288.5	
	23007	173.2	198.4	226.2	253.2	273.2	289.0	300.7	
	23008	175.8	200.2	222.1	257.2	278.2	283.7	308.3	
	23009	166.5	194.0	216.3	233.8	255.0	264.8	277.3	
	23010	162.0	189.2	203.3	221.7	235.9	241.4	251.8	
		<b>Mean</b>	<b>173.4</b>	<b>202.3</b>	<b>224.0</b>	<b>247.4</b>	<b>261.9</b>	<b>273.4</b>	<b>282.9</b>
	<b>S.D.</b>	<b>5.7</b>	<b>9.1</b>	<b>12.9</b>	<b>14.2</b>	<b>14.3</b>	<b>16.0</b>	<b>18.5</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	24001	183.2	206.9	238.4	247.2	276.6	300.0	285.8	
	24002	187.2	229.8	251.0	280.6	303.5	322.5	338.6	
	24003	172.9	203.9	223.6	240.1	254.8	266.4	283.7	
	24004	173.4	204.0	231.9	262.8	302.2	292.2	306.1	
	24005	172.7	208.0	242.9	275.2	276.9	295.0	326.2	
	24006	167.3	200.1	223.8	228.2	246.6	259.5	267.7	
	24007	161.4	201.9	226.5	247.5	264.4	279.5	281.0	
	24008	173.1	204.3	228.6	242.4	262.8	270.4	286.8	
	24009	168.0	198.6	213.6	223.5	227.8	233.8	244.8	
	24010	164.4	195.6	216.2	223.9	250.6	269.5	279.8	
	24011	174.8	210.5	233.0	252.5	274.3	292.1	300.5	
	24012	167.3	200.2	206.6	237.0	254.2	271.6	276.5	
	24013	160.4	190.1	206.1	224.6	231.2	241.9	248.3	
	24014	157.9	198.3	225.6	237.4	256.3	270.2	300.4	
	24015	165.6	188.7	224.9	252.7	270.1	274.6	292.6	
		<b>Mean</b>	<b>170.0</b>	<b>202.7</b>	<b>226.2</b>	<b>245.0</b>	<b>263.5</b>	<b>275.9</b>	<b>287.9</b>
		<b>S.D.</b>	<b>8.1</b>	<b>9.6</b>	<b>12.5</b>	<b>17.7</b>	<b>21.7</b>	<b>22.5</b>	<b>25.1</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	



## Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Female									(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week							
		7	8	9	10	11	12	13	
G1 0	21001	316.6	326.6	333.7	337.7	340.1	325.0	335.9	
	21002	301.8	312.3	314.2	323.7	316.0	314.7	322.6	
	21003	313.4	320.6	338.2	334.9	349.6	344.5	356.3	
	21004	283.7	293.2	298.6	300.4	305.4	300.5	297.7	
	21005	278.2	288.1	299.8	294.9	303.4	312.4	301.9	
	21006	265.9	266.0	279.8	286.2	287.6	283.0	291.4	
	21007	291.0	302.2	312.2	318.2	330.0	333.2	333.0	
	21008	254.7	271.2	274.8	281.4	275.2	280.5	287.0	
	21009	298.3	309.2	318.6	319.0	330.5	340.1	329.1	
	21010	256.1	255.5	263.4	269.1	272.2	271.6	280.1	
	21011	282.2	284.6	299.3	302.2	309.1	305.5	320.2	
	21012	260.7	276.9	288.8	286.9	290.3	294.1	309.1	
	21013	290.4	298.3	303.2	308.8	318.6	320.9	317.4	
	21014	296.9	295.6	292.9	306.4	314.8	315.5	315.1	
	21015	275.3	281.8	287.9	289.9	300.0	295.2	299.6	
	<b>Mean</b>	<b>284.3</b>	<b>292.1</b>	<b>300.4</b>	<b>304.0</b>	<b>309.5</b>	<b>309.1</b>	<b>313.1</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>19.5</b>	<b>20.2</b>	<b>20.7</b>	<b>19.9</b>	<b>22.6</b>	<b>21.8</b>	<b>20.7</b>	
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	
G2 1,250	22001	282.2	298.2	301.1	300.4	299.7	315.1	317.3	
	22002	328.7	334.0	346.2	352.6	359.4	363.8	353.6	
	22003	278.6	292.1	296.1	283.6	304.1	310.9	305.3	
	22004	309.9	319.2	316.8	330.2	343.1	343.4	339.3	
	22005	256.7	272.3	283.4	285.9	283.6	294.4	296.4	
	22006	301.5	307.5	307.3	315.8	308.5	318.7	321.7	
	22007	247.2	260.0	270.3	276.3	277.2	287.2	292.0	
	22008	281.5	282.8	289.1	300.6	302.6	307.9	315.2	
	22009	254.1	260.8	267.8	274.0	282.2	277.3	287.3	
	22010	249.6	254.7	257.0	258.4	268.8	265.2	267.7	
		<b>Mean</b>	<b>279.0</b>	<b>288.2</b>	<b>293.5</b>	<b>297.8</b>	<b>302.9</b>	<b>308.4</b>	<b>309.6</b>
		<b>S.D.</b>	<b>27.8</b>	<b>26.9</b>	<b>26.3</b>	<b>28.5</b>	<b>28.8</b>	<b>29.7</b>	<b>25.4</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	

## Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Female									(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week							
		7	8	9	10	11	12	13	
G3 2,500	23001	311.8	308.1	318.6	331.1	333.5	330.4	338.1	
	23002	286.2	298.4	297.7	299.2	314.0	312.8	307.7	
	23003	282.9	282.3	292.3	298.3	307.4	311.6	310.3	
	23004	296.4	297.6	308.1	314.2	315.0	313.4	320.8	
	23005	297.5	302.9	305.3	317.8	326.1	329.6	327.8	
	23006	307.3	320.3	323.2	323.9	333.4	338.0	341.5	
	23007	315.6	329.4	331.3	345.1	355.7	355.0	362.0	
	23008	320.7	334.4	340.7	348.4	353.6	345.0	359.0	
	23009	281.9	293.6	310.9	314.8	318.6	324.2	329.9	
	23010	255.9	262.0	275.4	277.9	283.9	289.0	291.1	
	<b>Mean</b>	<b>295.6</b>	<b>302.9</b>	<b>310.4</b>	<b>317.1</b>	<b>324.1</b>	<b>324.9</b>	<b>328.8</b>	
<b>S.D.</b>	<b>19.6</b>	<b>21.7</b>	<b>19.2</b>	<b>21.7</b>	<b>21.5</b>	<b>19.1</b>	<b>22.5</b>		
<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>		
G4 5,000	24001	302.1	310.9	333.1	330.6	326.8	332.4	326.8	
	24002	343.2	355.6	370.6	366.4	381.9	392.9	390.7	
	24003	294.3	293.6	302.6	302.9	313.7	305.4	304.7	
	24004	317.3	314.3	339.1	339.2	339.9	337.5	338.0	
	24005	328.3	329.2	342.7	343.8	350.8	353.6	355.4	
	24006	277.5	282.3	290.6	297.4	298.0	297.3	305.1	
	24007	298.5	311.1	310.3	311.2	317.7	329.9	339.0	
	24008	291.6	295.5	306.9	317.9	325.0	320.1	336.5	
	24009	245.8	247.8	259.8	257.6	263.8	270.5	269.7	
	24010	287.2	296.7	303.0	305.4	303.4	312.6	317.0	
	24011	304.2	316.8	325.9	329.9	332.1	336.3	347.3	
	24012	286.2	291.1	302.3	311.8	310.2	313.7	319.5	
	24013	257.0	257.3	270.2	280.0	283.4	283.5	295.0	
	24014	290.9	292.8	310.8	317.4	315.6	329.5	348.1	
	24015	304.6	309.8	312.1	324.0	332.4	338.4	338.4	
	<b>Mean</b>	<b>295.2</b>	<b>300.3</b>	<b>312.0</b>	<b>315.7</b>	<b>319.6</b>	<b>323.6</b>	<b>328.7</b>	
<b>S.D.</b>	<b>24.6</b>	<b>26.5</b>	<b>28.0</b>	<b>26.3</b>	<b>28.0</b>	<b>29.4</b>	<b>28.8</b>		
<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>		

Appendix 2-2. Individual body weights (Recovery Group)

Sex: Male		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		13	14	15	16	17
G1 0	11011	644.8	659.5	677.9	680.7	675.5
	11012	533.4	544.7	565.8	576.1	564.4
	11013	548.9	555.1	571.5	582.2	567.0
	11014	590.4	598.3	599.1	611.6	598.7
	11015	568.9	576.5	585.3	597.3	584.8
	<b>Mean</b>	<b>577.3</b>	<b>586.8</b>	<b>603.6</b>	<b>609.6</b>	<b>598.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>43.4</b>	<b>45.6</b>	<b>51.6</b>	<b>42.1</b>	<b>45.5</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	552.2	563.6	579.4	591.3	583.6
	14012	470.2	486.0	491.9	504.3	491.5
	14013	497.2	505.3	521.6	529.5	520.6
	14014	604.5	606.2	625.8	643.6	620.1
	14015	560.7	572.4	595.2	607.6	608.9
	<b>Mean</b>	<b>537.0</b>	<b>546.7</b>	<b>562.8</b>	<b>575.3</b>	<b>564.9</b>
	<b>S.D.</b>	<b>53.4</b>	<b>49.7</b>	<b>54.8</b>	<b>57.2</b>	<b>56.3</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Sex: Female		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		13	14	15	16	17
G1 0	21011	320.2	327.0	322.1	320.8	321.4
	21012	309.1	311.2	314.3	317.1	326.0
	21013	317.4	330.7	332.8	338.4	340.8
	21014	315.1	323.9	332.1	329.8	328.0
	21015	299.6	311.8	317.1	316.1	315.4
	<b>Mean</b>	<b>312.3</b>	<b>320.9</b>	<b>323.7</b>	<b>324.4</b>	<b>326.3</b>
	<b>S.D.</b>	<b>8.2</b>	<b>8.9</b>	<b>8.5</b>	<b>9.5</b>	<b>9.4</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	347.3	346.0	349.0	356.4	352.1
	24012	319.5	322.1	322.5	324.2	326.9
	24013	295.0	294.1	303.5	302.6	307.1
	24014	348.1	366.2	396.5	399.4	375.7
	24015	338.4	353.6	358.8	367.1	368.4
	<b>Mean</b>	<b>329.7</b>	<b>336.4</b>	<b>346.1</b>	<b>349.9</b>	<b>346.0</b>
	<b>S.D.</b>	<b>22.5</b>	<b>28.6</b>	<b>35.6</b>	<b>37.7</b>	<b>28.7</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Appendix 3-1. Individual food consumption (Main Group)

Sex: Male		(g/rat/day)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		1	2	3	4	5	6	7
G1 0	11001	25.90	26.90	23.90	26.70	24.45	29.95	25.80
	11002	25.90	26.90	23.90	26.70	24.45	29.95	25.80
	11003	24.25	25.90	22.65	26.95	25.65	24.80	26.75
	11004	24.25	25.90	22.65	26.95	25.65	24.80	26.75
	11005	23.90	26.80	22.80	24.60	23.10	23.55	25.25
	11006	23.90	26.80	22.80	24.60	23.10	23.55	25.25
	11007	23.85	24.65	26.30	29.70	27.05	27.85	26.65
	11008	23.85	24.65	26.30	29.70	27.05	27.85	26.65
	11009	24.40	25.55	23.60	27.90	27.90	22.80	26.05
	11010	24.40	25.55	23.60	27.90	27.90	22.80	26.05
	11011	23.60	28.20	26.40	27.50	26.10	28.85	29.85
	11012	23.60	28.20	26.40	27.50	26.10	28.85	29.85
	11013	24.40	26.85	24.65	27.40	23.00	25.40	25.90
	11014	24.40	26.85	24.65	27.40	23.00	25.40	25.90
	11015	22.40	26.90	24.70	28.30	26.30	28.00	27.80
	<b>Mean</b>	<b>24.20</b>	<b>26.44</b>	<b>24.35</b>	<b>27.32</b>	<b>25.39</b>	<b>26.29</b>	<b>26.69</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.86</b>	<b>1.07</b>	<b>1.42</b>	<b>1.44</b>	<b>1.77</b>	<b>2.58</b>	<b>1.44</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
G2 1,250	12001	24.85	27.95	25.30	26.50	26.95	26.50	26.20
	12002	24.85	27.95	25.30	26.50	26.95	26.50	26.20
	12003	25.20	28.35	27.35	30.55	26.80	27.50	27.65
	12004	25.20	28.35	27.35	30.55	26.80	27.50	27.65
	12005	21.30	26.45	23.10	25.95	24.55	24.70	28.05
	12006	21.30	26.45	23.10	25.95	24.55	24.70	28.05
	12007	22.75	25.25	22.05	25.35	24.95	24.55	25.50
	12008	22.75	25.25	22.05	25.35	24.95	24.55	25.50
	12009	22.65	24.45	23.25	25.00	25.95	24.95	23.65
	12010	22.65	24.45	23.25	25.00	25.95	24.95	23.65
	<b>Mean</b>	<b>23.35</b>	<b>26.49</b>	<b>24.21</b>	<b>26.67</b>	<b>25.84</b>	<b>25.64</b>	<b>26.21</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.54</b>	<b>1.58</b>	<b>1.99</b>	<b>2.12</b>	<b>1.01</b>	<b>1.22</b>	<b>1.67</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

## Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Male		(g/rat/day)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		1	2	3	4	5	6	7
G3 2,500	13001	25.75	26.90	25.05	26.10	26.05	25.85	28.25
	13002	25.75	26.90	25.05	26.10	26.05	25.85	28.25
	13003	24.65	30.55	26.15	27.15	29.40	27.90	27.25
	13004	24.65	30.55	26.15	27.15	29.40	27.90	27.25
	13005	23.65	29.05	27.35	28.70	31.05	28.75	30.75
	13006	23.65	29.05	27.35	28.70	31.05	28.75	30.75
	13007	22.80	27.60	26.05	27.15	25.95	27.80	25.85
	13008	22.80	27.60	26.05	27.15	25.95	27.80	25.85
	13009	25.80	28.05	23.65	27.35	27.60	27.90	28.35
	13010	25.80	28.05	23.65	27.35	27.60	27.90	28.35
	<b>Mean</b>	<b>24.53</b>	<b>28.43</b>	<b>25.65</b>	<b>27.29</b>	<b>28.01</b>	<b>27.64</b>	<b>28.09</b>
<b>S.D.</b>	<b>1.24</b>	<b>1.34</b>	<b>1.30</b>	<b>0.88</b>	<b>2.08</b>	<b>1.01</b>	<b>1.69</b>	
<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	14001	24.95	31.35	28.75	31.70	32.05	29.95	31.55
	14002	24.95	31.35	28.75	31.70	32.05	29.95	31.55
	14003	24.30	28.90	26.80	26.50	27.75	28.90	29.95
	14004	24.30	28.90	26.80	26.50	27.75	28.90	29.95
	14005	28.95	31.10	28.90	28.70	27.45	30.25	29.65
	14006	28.95	31.10	28.90	28.70	27.45	30.25	29.65
	14007	26.50	29.40	24.55	28.80	31.25	29.30	27.50
	14008	26.50	29.40	24.55	28.80	31.25	29.30	27.50
	14009	23.35	25.65	21.35	23.65	23.50	26.10	29.30
	14010	23.35	25.65	21.35	23.65	23.50	24.00	26.10
	14011	21.25	26.20	20.30	23.70	25.50	23.80	28.20
	14012	21.25	26.20	20.30	23.70	25.50	21.70	22.70
	14013	24.05	27.95	25.70	28.20	26.45	24.80	25.55
	14014	24.05	27.95	25.70	28.20	26.45	24.80	25.55
	14015	27.30	33.60	24.30	29.10	29.10	27.50	27.10
<b>Mean</b>	<b>24.93</b>	<b>28.98</b>	<b>25.13</b>	<b>27.44</b>	<b>27.80</b>	<b>27.30</b>	<b>28.12</b>	
<b>S.D.</b>	<b>2.35</b>	<b>2.42</b>	<b>3.13</b>	<b>2.75</b>	<b>2.84</b>	<b>2.84</b>	<b>2.46</b>	
<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

## Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Male		(g/rat/day)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week					
		8	9	10	11	12	13
G1 0	11001	26.95	25.30	28.40	22.15	26.15	25.60
	11002	26.95	25.30	28.40	22.15	26.15	25.60
	11003	28.60	24.90	27.00	24.30	24.90	23.35
	11004	28.60	24.90	27.00	24.30	24.90	23.35
	11005	25.40	24.30	24.80	22.50	24.70	26.10
	11006	25.40	24.30	24.80	22.50	24.70	26.10
	11007	29.65	28.10	26.60	26.45	28.40	23.75
	11008	29.65	28.10	26.60	26.45	28.40	23.75
	11009	24.15	26.75	28.30	25.40	25.95	26.45
	11010	24.15	26.75	28.30	25.40	25.95	26.45
	11011	28.70	31.10	30.20	27.45	27.80	24.95
	11012	28.70	31.10	30.20	27.45	27.80	24.95
	11013	26.70	27.65	27.55	23.90	27.50	24.85
	11014	26.70	27.65	27.55	23.90	27.50	24.85
	11015	25.40	29.40	29.80	26.70	25.30	25.30
		<b>Mean</b>	<b>27.05</b>	<b>27.04</b>	<b>27.70</b>	<b>24.73</b>	<b>26.41</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.87</b>	<b>2.27</b>	<b>1.67</b>	<b>1.90</b>	<b>1.37</b>	<b>1.07</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
G2 1,250	12001	28.15	27.90	27.50	24.10	27.15	24.35
	12002	28.15	27.90	27.50	24.10	27.15	24.35
	12003	29.60	31.80	29.45	26.90	29.20	27.75
	12004	29.60	31.80	29.45	26.90	29.20	27.75
	12005	25.40	28.15	28.50	23.45	24.45	23.90
	12006	25.40	28.15	28.50	23.45	24.45	23.90
	12007	24.15	24.00	25.90	22.95	24.45	24.20
	12008	24.15	24.00	25.90	22.95	24.45	24.20
	12009	26.20	29.15	24.95	23.80	25.35	26.75
	12010	26.20	29.15	24.95	23.80	25.35	26.75
		<b>Mean</b>	<b>26.70</b>	<b>28.20</b>	<b>27.26</b>	<b>24.24</b>	<b>26.12</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.05</b>	<b>2.65</b>	<b>1.74</b>	<b>1.46</b>	<b>1.93</b>	<b>1.64</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

## Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Male		(g/rat/day)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week					
		8	9	10	11	12	13
G3 2,500	13001	26.10	28.80	28.25	26.10	28.10	26.20
	13002	26.10	28.80	28.25	26.10	28.10	26.20
	13003	28.00	32.15	27.60	25.85	25.30	27.75
	13004	28.00	32.15	27.60	25.85	25.30	27.75
	13005	26.30	27.20	33.40	27.60	29.50	28.50
	13006	29.30	28.30	30.70	32.30	31.10	32.40
	13007	23.65	29.60	27.40	26.80	26.50	26.80
	13008	23.65	29.60	27.40	26.80	26.50	26.80
	13009	26.05	26.70	26.05	26.95	25.45	25.25
	13010	26.05	26.70	26.05	26.95	25.45	25.25
	<b>Mean</b>	<b>26.32</b>	<b>29.00</b>	<b>28.27</b>	<b>27.13</b>	<b>27.13</b>	<b>27.29</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.80</b>	<b>1.97</b>	<b>2.22</b>	<b>1.90</b>	<b>2.01</b>	<b>2.09</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	31.00	29.35	30.35	28.60	26.55	27.80
	14002	31.00	29.35	30.35	28.60	26.55	27.80
	14003	27.20	29.30	28.35	26.25	28.00	27.50
	14004	27.20	29.30	28.35	26.25	28.00	27.50
	14005	28.00	31.15	31.15	29.00	25.95	27.40
	14006	28.00	31.15	31.15	29.00	25.95	27.40
	14007	28.35	25.65	24.95	25.65	25.65	24.90
	14008	28.35	25.65	24.95	25.65	25.65	24.90
	14009	26.30	24.30	26.50	24.40	20.30	20.40
	14010	24.20	20.20	21.70	22.50	22.20	22.60
	14011	27.60	23.70	24.10	24.30	23.70	24.40
	14012	27.10	21.60	22.60	20.20	19.00	21.60
	14013	29.30	28.15	25.20	25.20	22.20	23.60
	14014	29.30	28.15	25.20	25.20	22.20	23.60
	14015	23.40	27.70	28.90	24.20	22.20	24.50
<b>Mean</b>	<b>27.75</b>	<b>26.98</b>	<b>26.92</b>	<b>25.67</b>	<b>24.27</b>	<b>25.06</b>	
<b>S.D.</b>	<b>2.10</b>	<b>3.34</b>	<b>3.11</b>	<b>2.48</b>	<b>2.79</b>	<b>2.43</b>	
<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

## Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Female		(g/rat/day)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		1	2	3	4	5	6	7
G1 0	21001	18.65	22.00	16.90	18.70	20.55	22.60	17.95
	21002	18.65	22.00	16.90	18.70	20.55	22.60	17.95
	21003	17.90	19.95	17.85	19.95	21.45	17.65	19.10
	21004	17.90	19.95	17.85	19.95	21.45	17.65	19.10
	21005	16.90	17.05	18.25	19.85	19.20	17.20	20.25
	21006	16.90	17.05	18.25	19.85	19.20	17.20	20.25
	21007	16.85	19.75	18.30	19.90	17.25	20.80	20.15
	21008	16.85	19.75	18.30	19.90	17.25	20.80	20.15
	21009	18.30	17.95	18.80	19.80	20.30	18.85	18.85
	21010	18.30	17.95	18.80	19.80	20.30	18.85	18.85
	21011	15.35	15.80	17.45	18.45	15.35	18.60	20.30
	21012	15.35	15.80	17.45	18.45	15.35	18.60	20.30
	21013	17.85	17.15	15.45	16.10	20.20	19.80	17.70
	21014	17.85	17.15	15.45	16.10	20.20	19.80	17.70
	21015	17.00	18.20	15.40	18.60	17.80	18.70	16.30
	<b>Mean</b>	<b>17.37</b>	<b>18.50</b>	<b>17.43</b>	<b>18.94</b>	<b>19.09</b>	<b>19.31</b>	<b>18.99</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.05</b>	<b>1.98</b>	<b>1.18</b>	<b>1.31</b>	<b>2.02</b>	<b>1.75</b>	<b>1.26</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
G2 1,250	22001	18.95	19.95	17.90	19.05	22.30	18.55	22.00
	22002	18.95	19.95	17.90	19.05	22.30	18.55	22.00
	22003	19.40	18.60	16.25	20.45	20.60	21.55	21.00
	22004	19.40	18.60	16.25	20.45	20.60	21.55	21.00
	22005	16.25	16.25	15.65	18.05	17.20	16.00	19.80
	22006	16.25	16.25	15.65	18.05	17.20	16.00	19.80
	22007	16.00	17.90	15.75	17.60	17.10	19.70	19.70
	22008	16.00	17.90	15.75	17.60	17.10	19.70	19.70
	22009	16.50	15.50	16.95	17.35	19.30	15.95	18.85
	22010	16.50	15.50	16.95	17.35	19.30	15.95	18.85
		<b>Mean</b>	<b>17.42</b>	<b>17.64</b>	<b>16.50</b>	<b>18.50</b>	<b>19.30</b>	<b>18.35</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.53</b>	<b>1.69</b>	<b>0.88</b>	<b>1.20</b>	<b>2.11</b>	<b>2.28</b>	<b>1.16</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>



## Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Female		(g/rat/day)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		1	2	3	4	5	6	7
G3 2,500	23001	20.15	19.35	20.85	22.10	23.90	21.75	22.85
	23002	20.15	19.35	20.85	22.10	23.90	21.75	22.85
	23003	17.60	17.15	17.05	18.15	20.50	17.30	18.90
	23004	17.60	17.15	17.05	18.15	20.50	17.30	18.90
	23005	19.45	21.05	18.75	22.10	20.70	20.75	20.90
	23006	19.45	21.05	18.75	22.10	20.70	20.75	20.90
	23007	19.70	20.50	14.45	18.20	25.75	23.75	21.25
	23008	19.70	20.50	14.45	18.20	25.75	23.75	21.25
	23009	15.90	17.90	18.00	21.60	18.35	21.90	22.00
	23010	15.90	17.90	18.00	21.60	18.35	21.90	22.00
	<b>Mean</b>	<b>18.56</b>	<b>19.19</b>	<b>17.82</b>	<b>20.43</b>	<b>21.84</b>	<b>21.09</b>	<b>21.18</b>
<b>S.D.</b>	<b>1.67</b>	<b>1.57</b>	<b>2.21</b>	<b>1.95</b>	<b>2.78</b>	<b>2.24</b>	<b>1.39</b>	
<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	24001	19.30	17.85	19.20	21.65	21.40	17.50	19.60
	24002	19.30	17.85	19.20	21.65	21.40	17.50	19.60
	24003	19.35	19.70	19.65	28.30	25.15	18.95	19.75
	24004	19.35	19.70	19.65	28.30	25.15	18.95	19.75
	24005	19.60	19.80	19.20	18.30	22.05	20.85	20.40
	24006	19.60	19.80	19.20	18.30	22.05	20.85	20.40
	24007	19.65	16.75	17.95	18.70	18.20	17.25	22.25
	24008	19.65	16.75	17.95	18.70	18.20	17.25	22.25
	24009	14.95	15.95	14.75	18.50	14.55	16.20	18.45
	24010	14.95	15.95	14.75	18.50	14.55	16.20	18.45
	24011	16.80	19.15	18.75	21.80	18.40	18.95	20.90
	24012	16.80	19.15	18.75	21.80	18.40	18.95	20.90
	24013	17.90	18.85	15.80	16.15	20.60	20.15	20.90
	24014	17.90	18.85	15.80	16.15	20.60	20.15	20.90
	24015	15.40	22.60	16.40	19.20	20.10	20.60	15.10
	<b>Mean</b>	<b>18.03</b>	<b>18.58</b>	<b>17.80</b>	<b>20.40</b>	<b>20.05</b>	<b>18.69</b>	<b>19.97</b>
<b>S.D.</b>	<b>1.81</b>	<b>1.77</b>	<b>1.79</b>	<b>3.70</b>	<b>3.13</b>	<b>1.62</b>	<b>1.75</b>	
<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

## Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Female		(g/rat/day)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week					
		8	9	10	11	12	13
G1 0	21001	19.50	22.55	22.35	17.05	21.00	18.45
	21002	19.50	22.55	22.35	17.05	21.00	18.45
	21003	19.10	20.65	20.00	16.15	8.95	19.30
	21004	19.10	20.65	20.00	16.15	8.95	19.30
	21005	16.05	18.35	17.75	18.20	14.95	15.10
	21006	16.05	18.35	17.75	18.20	14.95	15.10
	21007	18.15	16.30	22.20	18.35	15.80	16.35
	21008	18.15	16.30	22.20	18.35	15.80	16.35
	21009	17.20	19.35	17.80	19.25	15.85	16.65
	21010	17.20	19.35	17.80	19.25	15.85	16.65
	21011	20.00	15.20	20.75	19.10	19.05	14.60
	21012	20.00	15.20	20.75	19.10	19.05	14.60
	21013	18.00	21.05	21.50	15.40	18.60	18.80
	21014	18.00	21.05	21.50	15.40	18.60	18.80
	21015	19.60	17.50	19.10	13.70	19.00	16.00
	<b>Mean</b>	<b>18.37</b>	<b>18.96</b>	<b>20.25</b>	<b>17.38</b>	<b>16.49</b>	<b>16.97</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.32</b>	<b>2.48</b>	<b>1.81</b>	<b>1.71</b>	<b>3.68</b>	<b>1.73</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
G2 1,250	22001	20.25	20.45	23.15	18.75	14.95	22.05
	22002	20.25	20.45	23.15	18.75	14.95	22.05
	22003	21.05	20.70	19.90	18.40	16.90	20.45
	22004	21.05	20.70	19.90	18.40	16.90	20.45
	22005	21.20	17.20	18.15	17.70	19.05	16.35
	22006	21.20	17.20	18.15	17.70	19.05	16.35
	22007	19.45	16.95	18.35	17.50	17.35	14.95
	22008	19.45	16.95	18.35	17.50	17.35	14.95
	22009	15.05	17.90	16.65	17.45	16.30	15.75
	22010	15.05	17.90	16.65	17.45	16.30	15.75
		<b>Mean</b>	<b>19.40</b>	<b>18.64</b>	<b>19.24</b>	<b>17.96</b>	<b>16.91</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.39</b>	<b>1.70</b>	<b>2.33</b>	<b>0.55</b>	<b>1.41</b>	<b>2.96</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

## Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Female		(g/rat/day)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week					
		8	9	10	11	12	13
G3 2,500	23001	20.80	21.65	19.45	20.30	17.75	20.65
	23002	20.80	21.65	19.45	20.30	17.75	20.65
	23003	20.30	18.15	16.95	17.65	19.70	19.50
	23004	20.30	18.15	16.95	17.65	19.70	19.50
	23005	18.80	20.95	18.85	17.05	14.25	19.05
	23006	18.80	20.95	18.85	17.05	14.25	19.05
	23007	22.90	21.90	21.30	18.60	18.50	19.80
	23008	22.90	21.90	21.30	18.60	18.50	19.80
	23009	21.70	17.20	20.35	20.00	16.80	16.40
	23010	21.70	17.20	20.35	20.00	16.80	16.40
	<b>Mean</b>	<b>20.90</b>	<b>19.97</b>	<b>19.38</b>	<b>18.72</b>	<b>17.40</b>	<b>19.08</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.45</b>	<b>2.03</b>	<b>1.55</b>	<b>1.34</b>	<b>1.94</b>	<b>1.52</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	20.45	18.80	20.15	19.85	18.30	19.75
	24002	20.45	18.80	20.15	19.85	18.30	19.75
	24003	22.30	19.30	21.10	18.90	14.85	19.45
	24004	22.30	19.30	21.10	18.90	14.85	19.45
	24005	21.10	19.55	19.00	18.95	17.90	16.55
	24006	21.10	19.55	19.00	18.95	17.90	16.55
	24007	17.65	17.55	19.55	15.60	21.30	17.85
	24008	17.65	17.55	19.55	15.60	21.30	17.85
	24009	18.45	13.85	16.50	17.70	14.25	12.60
	24010	18.45	13.85	16.50	17.70	14.25	12.60
	24011	20.20	17.60	17.85	19.55	16.50	14.20
	24012	20.20	17.60	17.85	19.55	16.50	14.20
	24013	18.10	16.25	17.05	18.25	18.15	18.40
	24014	18.10	16.25	17.05	18.25	18.15	18.40
	24015	17.90	19.10	19.40	16.40	19.10	20.60
<b>Mean</b>	<b>19.63</b>	<b>17.66</b>	<b>18.79</b>	<b>18.27</b>	<b>17.44</b>	<b>17.21</b>	
<b>S.D.</b>	<b>1.67</b>	<b>1.89</b>	<b>1.57</b>	<b>1.42</b>	<b>2.25</b>	<b>2.67</b>	
<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

Appendix 3-2. Individual food consumption (Recovery Group)

Sex: Male		(g/rat/day)			
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week			
		14	15	16	17
G1 0	11011	29.30	28.55	25.95	26.15
	11012	29.30	28.55	25.95	26.15
	11013	25.80	24.95	27.90	23.55
	11014	25.80	24.95	27.90	23.55
	11015	28.30	24.00	24.80	22.30
	<b>Mean</b>	<b>27.70</b>	<b>26.20</b>	<b>26.50</b>	<b>24.34</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.78</b>	<b>2.18</b>	<b>1.36</b>	<b>1.73</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
G4 5,000	14011	26.90	30.50	30.20	23.60
	14012	23.00	21.50	26.70	18.70
	14013	24.80	27.45	25.45	24.65
	14014	24.80	27.45	25.45	24.65
	14015	29.40	31.20	27.70	24.70
	<b>Mean</b>	<b>25.78</b>	<b>27.62</b>	<b>27.10</b>	<b>23.26</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.45</b>	<b>3.83</b>	<b>1.97</b>	<b>2.59</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
Sex: Female		(g/rat/day)			
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week			
		14	15	16	17
G1 0	21011	17.10	18.65	15.60	15.05
	21012	17.10	18.65	15.60	15.05
	21013	18.00	14.70	16.40	18.35
	21014	18.00	14.70	16.40	18.35
	21015	17.20	14.70	14.20	15.30
	<b>Mean</b>	<b>17.48</b>	<b>16.28</b>	<b>15.64</b>	<b>16.42</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.48</b>	<b>2.16</b>	<b>0.90</b>	<b>1.76</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
G4 5,000	24011	17.60	18.25	18.25	13.00
	24012	17.60	18.25	18.25	13.00
	24013	22.40	21.75	17.50	13.80
	24014	22.40	21.75	17.50	13.80
	24015	15.40	17.60	19.20	18.50
	<b>Mean</b>	<b>19.08</b>	<b>19.52</b>	<b>18.14</b>	<b>14.42</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3.16</b>	<b>2.05</b>	<b>0.70</b>	<b>2.32</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

Appendix 4-1. Individual ophthalmological examination (Main Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Right eye				Left eye			
		Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus
G1 0	11001	-	-	-	-	-	-	-	-
	11002	-	-	-	-	-	-	-	-
	11003	-	-	-	-	-	-	-	-
	11004	-	-	-	-	-	-	-	-
	11005	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250	12001	-	-	-	-	-	-	-	-
	12002	-	-	-	-	-	-	-	-
	12003	-	-	-	-	-	-	-	-
	12004	-	-	-	-	-	-	-	-
	12005	-	-	-	-	-	-	-	-
G3 2,500	13001	-	-	-	-	-	-	-	-
	13002	-	-	-	-	-	-	-	-
	13003	-	-	-	-	-	-	-	-
	13004	-	-	-	-	-	-	-	-
	13005	-	-	-	-	-	-	-	-
G4 5,000	14001	-	-	-	-	-	-	-	-
	14002	-	-	-	-	-	-	-	-
	14003	-	-	-	-	-	-	-	-
	14004	-	-	-	-	-	-	-	-
	14005	-	-	-	-	-	-	-	-

-: Normal

Appendix 4-1. (Continued)

Sex: Female									
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Right eye				Left eye			
		Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus
G1 0	21001	-	-	-	-	-	-	-	-
	21002	-	-	-	-	-	-	-	-
	21003	-	-	-	-	-	-	-	-
	21004	-	-	-	-	-	-	-	-
	21005	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250	22001	-	-	-	-	-	-	-	-
	22002	-	-	-	-	-	-	-	-
	22003	-	-	-	-	-	-	-	-
	22004	-	-	-	-	-	-	-	-
	22005	-	-	-	-	-	-	-	-
G3 2,500	23001	-	-	-	-	-	-	-	-
	23002	-	-	-	-	-	-	-	-
	23003	-	-	-	-	-	-	-	-
	23004	-	-	-	-	-	-	-	-
	23005	-	-	-	-	-	-	-	-
G4 5,000	24001	-	-	-	-	-	-	-	-
	24002	-	-	-	-	-	-	-	-
	24003	-	-	-	-	-	-	-	-
	24004	-	-	-	-	-	-	-	-
	24005	-	-	-	-	-	-	-	-

-: Normal

Appendix 4-2. Individual ophthalmological examination (Recovery Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Right eye				Left eye			
		Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus
G1 0	11011	-	-	-	-	-	-	-	-
	11012	-	-	-	-	-	-	-	-
	11013	-	-	-	-	-	-	-	-
	11014	-	-	-	-	-	-	-	-
G4 5,000	14011	-	-	-	-	-	-	-	-
	14012	-	-	-	-	-	-	-	-
	14013	-	-	-	-	-	-	-	-
	14014	-	-	-	-	-	-	-	-
	14015	-	-	-	-	-	-	-	-

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Right eye				Left eye			
		Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus
G1 0	21011	-	-	-	-	-	-	-	-
	21012	-	-	-	-	-	-	-	-
	21013	-	-	-	-	-	-	-	-
	21014	-	-	-	-	-	-	-	-
	21015	-	-	-	-	-	-	-	-
G4 5,000	24011	-	-	-	-	-	-	-	-
	24012	-	-	-	-	-	-	-	-
	24013	-	-	-	-	-	-	-	-
	24014	-	-	-	-	-	-	-	-
	24015	-	-	-	-	-	-	-	-

-: Normal

Appendix 5-1. Individual urinalysis (Main Group)

Sex: Male											
Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0					G2 / 1,250				
Animal ID		11001	11002	11003	11004	11005	12001	12002	12003	12004	12005
Volume (mL)		9	21.0	17.7	13.4	16.6	13.4	11.7	21.8	29	18.5
Glucose (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	Trace										
	1+										
	2+										
	3+										
Bilirubin (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	1+										
	2+										
	3+										
Ketone body (mg/dL)	Negative		v	v	v	v	v			v	v
	Trace							v	v		
	1+	v									
	2+										
	3+										
Specific gravity	≤1.005										
	1.010							v			
	1.015	v	v	v	v	v	v		v	v	
	1.020										
	1.025										
	≥1.030										
Occult blood (Ery/uL)	Negative								v		
	Trace intact	v		v	v		v				v
	Trace lysed		v					v		v	
	1+					v					
	2+										
	3+										
Protein (mg/dL)	Negative			v	v					v	
	Trace										
	1+		v			v	v	v			v
	2+	v									
	3+										
pH	5.0										
	5.5										
	6.0										
	6.5										
	7.0										
	7.5					v					
	8.0										
	8.5	v	v	v	v		v	v	v	v	v
	≥9.0										



Appendix 5-1. (Continued)

Sex: Male		G3 / 2,500					G4 / 5,000				
Group / Dose (mg/kg)		13001	13002	13003	13004	13005	14001	14002	14003	14004	14005
Volume (mL)		14	15.5	30.5	31	29.5	18.5	16	31	13.5	36
Glucose (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Bilirubin (mg/dL)	Negative 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Ketone body (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Specific gravity	≤1.005 1.010 1.015 1.020 1.025 ≥1.030	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Occult blood (Ery/uL)	Negative Trace intact Trace lysed 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Protein (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
pH	5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 ≥9.0	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v

Appendix 5-1. (Continued)

Sex : Female											
Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0					G2 / 1,250				
Animal ID		21001	21002	21003	21004	21005	22001	22002	22003	22004	22005
Volume (mL)		12.1	9.0	8.5	13.2	9.7	16	11.3	12.5	21.2	9.7
Glucose (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Bilirubin (mg/dL)	Negative 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Ketone body (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Specific gravity	≤1.005 1.010 1.015 1.020 1.025 ≥1.030	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Occult blood (Ery/uL)	Negative Trace intact Trace lysed 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Protein (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
pH	5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 ≥9.0	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v

Appendix 5-1. (Continued)

Sex : Female		G3 / 2,500					G4 / 5,000				
Group / Dose (mg/kg)		23001	23002	23003	23004	23005	24001	24002	24003	24004	24005
Animal ID											
Volume (mL)		8.4	16.8	10.5	17.5	7.6	8.3	12.5	7.8	26.1	25.2
Glucose (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	Trace										
	1+										
	2+										
	3+										
Bilirubin (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v		v		v	v
	1+						v		v	v	v
	2+										
	3+										
Ketone body (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v		v	v	v	v
	Trace						v				
	1+										
	2+										
	3+										
Specific gravity	≤1.005										
	1.010			v			v				
	1.015	v	v		v	v		v			
	1.020								v	v	v
	1.025										
≥1.030											
Occult blood (Ery/uL)	Negative	v	v	v		v	v		v	v	v
	Trace intact							v			
	Trace lysed				v						
	1+										
	2+										
	3+										
Protein (mg/dL)	Negative		v		v	v					
	Trace			v							
	1+	v						v		v	v
	2+						v		v		
	3+										
pH	5.0										
	5.5										
	6.0										
	6.5										
	7.0										
	7.5								v	v	v
	8.0										
	8.5	v	v	v	v	v	v	v			
	≥9.0										

Appendix 5-2. Individual urinalysis (Recovery Group)

Sex: Male											
Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0					G4 / 5,000				
Animal ID		11011	11012	11013	11014	11015	14011	14012	14013	14014	14015
Volume (mL)		28.0	18.5	20.0	16.0	24.0	20	11	6.8	17	27.5
Glucose (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	Trace										
	1+										
	2+										
	3+										
Bilirubin (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	1+										
	2+										
	3+										
Ketone body (mg/dL)	Negative					v					
	Trace			v			v	v	v	v	
	1+	v	v		v						v
	2+										
	3+										
Specific gravity	≤1.005										
	1.010					v				v	
	1.015	v	v	v	v		v	v	v		v
	1.020										
	1.025										
	≥1.030										
Occult blood (Ery/uL)	Negative			v							
	Trace intact					v					
	Trace lysed		v				v	v			
	1+	v			v				v	v	v
	2+										
	3+										
Protein (mg/dL)	Negative										
	Trace										
	1+			v	v	v	v	v			v
	2+	v	v						v	v	
	3+										
pH	5.0										
	5.5										
	6.0										
	6.5										
	7.0										
	7.5										
	8.0										
	8.5	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	≥9.0										

Appendix 5-2. (Continued)

Sex: Female											
Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0					G4 / 5,000				
Animal ID		21011	21012	21013	21014	21015	24011	24012	24013	24014	24015
Volume (mL)		15	8.5	16.5	15	21	13.5	13	9.8	13.5	8.5
Glucose (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	Trace										
	1+										
	2+										
	3+										
Bilirubin (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	1+										
	2+										
	3+										
Ketone body (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	Trace										
	1+										
	2+										
	3+										
Specific gravity	≤1.005										
	1.010			v					v	v	
	1.015	v	v		v	v	v	v			v
	1.020										
	1.025										
	≥1.030										
Occult blood (Ery/uL)	Negative									v	
	Trace intact										
	Trace lysed	v	v	v	v	v	v	v	v		v
	1+										
	2+										
3+											
Protein (mg/dL)	Negative			v	v	v	v	v	v	v	v
	Trace										
	1+		v								
	2+	v									
3+											
pH	5.0										
	5.5										
	6.0										
	6.5										
	7.0				v						
	7.5										
	8.0										
	8.5		v	v		v	v	v	v	v	v
	≥9.0	v									

Appendix 6-1. Individual hematological parameters (Main Group)

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	11001	9.73	16.2	53.5	55.0	16.7	30.2	427	1.60
	11002	9.88	16.1	55.6	56.2	16.3	29	575	2.06
	11003	8.91	15.2	49.9	56.0	17.0	30.4	916	1.83
	11004	9.06	14.6	48.1	53.1	16.1	30.4	856	2.00
	11005	7.96	13.9	42.2	53.0	17.5	33.0	875	2.06
	11006	9.18	15.1	48.0	52.3	16.4	31.5	760	2.25
	11007	8.78	15.4	47.2	53.8	17.5	32.5	685	2.28
	11008	8.99	15.8	52.4	58.3	17.6	30.1	704	2.24
	11009	8.60	15.0	48.5	56.4	17.5	31.0	678	1.67
	11010	7.97	13.3	43.7	54.9	16.7	30.5	883	2.46
		<b>Mean</b>	<b>8.91</b>	<b>15.1</b>	<b>48.9</b>	<b>54.9</b>	<b>16.9</b>	<b>30.9</b>	<b>736</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.63</b>	<b>0.9</b>	<b>4.2</b>	<b>1.9</b>	<b>0.6</b>	<b>1.2</b>	<b>155</b>	<b>0.28</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	9.27	15.2	51.3	55.4	16.4	29.5	713	1.93
	12002	8.69	14.6	47.3	54.3	16.8	31.0	39	1.41
	12003	9.04	15.6	51.8	57.3	17.2	30.1	733	1.68
	12004	8.62	14.9	49.2	57.0	17.3	30.3	568	2.49
	12005	9.86	15.7	52.8	53.5	15.9	29.7	888	2.08
	12006	8.88	14.1	46.1	51.9	15.8	30.5	946	2.42
	12007	9.16	15.1	50.7	55.4	16.5	29.8	558	2.52
	12008	8.99	15.4	50.0	55.6	17.1	30.7	574	2.56
	12009	9.26	15.9	52.0	56.1	17.1	30.5	519	1.59
	12010	9.43	15.4	50.2	53.2	16.3	30.7	497	2.20
		<b>Mean</b>	<b>9.12</b>	<b>15.2</b>	<b>50.1</b>	<b>55.0</b>	<b>16.6</b>	<b>30.3</b>	<b>604</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.37</b>	<b>0.5</b>	<b>2.1</b>	<b>1.7</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>251</b>	<b>0.42</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	8.21	13.5	44.9	54.7	16.5	30.2	740	1.91
	13002	8.28	13.8	45.3	54.7	16.6	30.4	793	1.83
	13003	9.38	15.3	50.0	53.3	16.4	30.7	636	1.56
	13004	8.27	13.9	46.3	56.0	16.8	29.9	901	1.87
	13005	7.63	13.4	41.3	54.1	17.6	32.5	792	2.05
	13006	7.97	13.5	44.9	56.4	16.9	30.0	961	2.35
	13007	7.18	11.9	39.1	54.5	16.6	30.5	1074	2.39
	13008	7.68	13.1	42.0	54.7	17.1	31.3	662	1.77
	13009	8.71	13.8	46.6	53.4	15.8	29.6	937	2.52
	13010	8.11	13.6	44.5	54.9	16.8	30.6	910	2.13
		<b>Mean</b>	<b>8.14</b>	<b>13.6</b>	<b>44.5</b>	<b>54.7</b>	<b>16.7</b>	<b>30.6</b>	<b>841</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.61</b>	<b>0.8</b>	<b>3.1</b>	<b>1.0</b>	<b>0.5</b>	<b>0.8</b>	<b>140</b>	<b>0.31</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	6.62	11.8	36.7	55.4	17.7	32.0	659	1.88
	14002	9.81	16.4	58.3	59.4	16.7	28.1	727	1.74
	14003	9.86	16.5	58.6	59.5	16.7	28.1	503	1.76
	14004	7.85	13.3	46.6	59.4	16.9	28.5	960	1.89
	14005	12.06	19.5	71.2	59.1	16.2	27.4	409	2.02
	14006	9.25	15.9	54.1	58.4	17.2	29.4	696	2.22
	14007	8.13	13.8	46.1	56.7	17.0	30.0	684	2.45
	14008	9.10	15.5	54.6	59.9	17.0	28.3	562	2.15
	14009	7.91	14.5	45.0	57.0	18.4	32.2	501	1.76
	14010	9.19	15.1	51.7	56.3	16.4	29.2	646	1.89
		<b>Mean</b>	<b>8.98</b>	<b>15.2</b>	<b>52.3</b>	<b>58.1</b>	<b>17.0</b>	<b>29.3</b>	<b>635</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.48</b>	<b>2.1</b>	<b>9.5</b>	<b>1.6</b>	<b>0.6</b>	<b>1.6</b>	<b>154</b>	<b>0.23</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

## Appendix 6-1. (Continued)

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	11001	4.39	26.9	65.1	0.6	6.8	0.3	11.8	39.3
	11002	9.75	12.3	83.0	2.3	1.4	0.5	11.4	31.0
	11003	6.77	14.0	82.1	1.8	1.4	0.3	11.5	40.2
	11004	5.18	17.4	78.8	1.2	2.0	0.3	11.9	49.2
	11005	4.45	17.6	77.8	1.7	2.0	0.4	12.9	23.4
	11006	8.01	26.6	68.1	2.2	2.5	0.3	11.7	34.4
	11007	7.37	21.8	73.7	1.7	2.3	0.2	13.0	59.6
	11008	3.70	18.8	74.7	2.4	2.4	0.9	12.9	41.5
	11009	3.92	19.2	76.7	1.5	2.0	0.3	12.3	41.9
	11010	9.56	14.4	81.0	2.1	1.7	0.4	12.0	45.4
		<b>Mean</b>	<b>6.31</b>	<b>18.9</b>	<b>76.1</b>	<b>1.8</b>	<b>2.5</b>	<b>0.4</b>	<b>12.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.30</b>	<b>5.0</b>	<b>5.9</b>	<b>0.6</b>	<b>1.6</b>	<b>0.2</b>	<b>0.6</b>	<b>9.9</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	6.61	13.5	82.4	1.8	1.7	0.3	11.2	32.7
	12002	3.20	12.1	84.0	1.6	1.5	0.4	12.6	57.2
	12003	9.98	9.0	84.9	2.8	2.5	0.5	12.0	37.1
	12004	7.33	14.0	78.3	2.6	4.3	0.3	11.0	34.6
	12005	6.93	23.0	70.6	2.2	3.7	0.2	12.2	35.1
	12006	7.03	18.5	75.4	3.4	1.9	0.2	11.5	22.0
	12007	6.10	25.7	64.6	1.3	8.0	0.3	13.4	52.9
	12008	6.34	24.6	65.5	1.1	8.1	0.3	13.7	39.4
	12009	5.87	27.2	68.0	1.6	2.5	0.4	13.5	42.9
	12010	10.92	21.0	73.6	1.6	3.1	0.4	11.0	37.7
		<b>Mean</b>	<b>7.03</b>	<b>18.9</b>	<b>74.7</b>	<b>2.0</b>	<b>3.7</b>	<b>0.3</b>	<b>12.2</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.15</b>	<b>6.4</b>	<b>7.5</b>	<b>0.7</b>	<b>2.4</b>	<b>0.1</b>	<b>1.1</b>	<b>10.0</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	9.62	14.5	79.2	3.1	2.4	0.4	12.1	38.3
	13002	9.83	10.0	84.7	1.2	2.9	0.4	12.0	36.5
	13003	8.56	11.3	83.6	2.4	2.1	0.4	11.3	42.6
	13004	8.72	19.7	76.0	1.5	2.1	0.2	12.7	37.7
	13005	9.84	12.8	82.1	1.9	2.6	0.2	12.0	33.6
	13006	10.29	15.0	79.7	2.6	1.7	0.4	12.0	37.9
	13007	7.33	32.7	58.8	3.2	4.7	0.2	13.2	36.2
	13008	9.14	19.7	70.8	1.4	7.6	0.3	12.6	35.4
	13009	5.67	30.8	61.9	1.5	4.9	0.4	12.0	28.8
	13010	4.26	22.8	70.6	1.2	4.8	0.3	12.4	42.6
		<b>Mean</b>	<b>8.33</b>	<b>18.9</b>	<b>74.7</b>	<b>2.0</b>	<b>3.6</b>	<b>0.3</b>	<b>12.2</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.99</b>	<b>7.9</b>	<b>9.0</b>	<b>0.8</b>	<b>1.9</b>	<b>0.1</b>	<b>0.5</b>	<b>4.1</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	5.75	14.9	79.9	1.8	3.0	0.1	12.7	30.3
	14002	8.44	16.0	77.2	2.3	3.6	0.4	13.1	30.0
	14003	8.59	15.5	76.8	2.1	4.9	0.4	12.7	33.8
	14004	7.13	10.8	84.9	1.2	1.4	0.8	12.9	41.9
	14005	6.37	9.1	85.0	3.6	1.1	0.6	12.1	35.0
	14006	6.81	9.2	85.0	2.9	1.7	0.5	12.1	33.1
	14007	4.16	19.8	76.6	1.1	2.0	0.2	13.1	29.7
	14008	5.75	15.6	78.0	1.0	4.9	0.4	12.7	33.1
	14009	2.15	33.9	49.4	3.8	12.3	0.2	12.7	40.4
	14010	6.79	12.5	82.1	2.0	2.7	0.2	12.6	35.9
		<b>Mean</b>	<b>6.19</b>	<b>15.7</b>	<b>77.5</b>	<b>2.2</b>	<b>3.8</b>	<b>0.4</b>	<b>12.7</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.92</b>	<b>7.2</b>	<b>10.5</b>	<b>1.0</b>	<b>3.3</b>	<b>0.2</b>	<b>0.3</b>	<b>4.2</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

## Appendix 6-1. (Continued)

Sex: Female									
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	21001	7.26	12.6	40.9	56.4	17.3	30.7	775	2.92
	21002	6.61	12.2	40.4	61.2	18.4	30.1	1019	2.73
	21003	7.46	13.7	43.9	58.8	18.3	31.2	1050	3.00
	21004	8.03	13.8	46.2	57.5	17.2	29.9	993	3.03
	21005	8.25	14.6	47.9	58.1	17.8	30.6	381	2.03
	21006	8.41	14.6	48.4	57.6	17.3	30.1	798	2.54
	21007	8.13	14.2	47.2	58.0	17.4	30.1	700	1.69
	21008	8.04	14.6	46.0	57.1	18.2	31.8	599	2.33
	21009	7.52	13.6	44.7	59.5	18.1	30.4	560	1.88
	21010	8.04	14.5	46.1	57.4	18.1	31.5	690	2.79
	<b>Mean</b>		<b>7.78</b>	<b>13.8</b>	<b>45.2</b>	<b>58.2</b>	<b>17.8</b>	<b>30.6</b>	<b>757</b>
<b>S.D.</b>		<b>0.55</b>	<b>0.9</b>	<b>2.7</b>	<b>1.4</b>	<b>0.5</b>	<b>0.7</b>	<b>217</b>	<b>0.49</b>
<b>N</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	22001	7.75	14.0	42.9	55.3	18.0	32.6	732	2.63
	22002	7.82	14.4	46.6	59.5	18.4	30.8	597	1.92
	22003	7.22	12.9	41.0	56.8	17.8	31.4	336	1.38
	22004	7.45	14.2	45.0	60.4	19.0	31.5	61	2.84
	22005	7.00	12.8	42.1	60.2	18.2	30.3	873	1.84
	22006	8.46	15.3	51.3	60.7	18.1	29.8	726	2.04
	22007	8.06	13.7	44.9	55.7	17.0	30.6	920	1.88
	22008	8.91	14.9	50.9	57.1	16.8	29.3	763	1.80
	22009	6.82	12.8	41.0	60.1	18.8	31.3	85	2.34
	22010	8.50	14.7	48.7	57.3	17.3	30.3	780	1.65
	<b>Mean</b>		<b>7.80</b>	<b>14.0</b>	<b>45.4</b>	<b>58.3</b>	<b>17.9</b>	<b>30.8</b>	<b>587</b>
<b>S.D.</b>		<b>0.69</b>	<b>0.9</b>	<b>3.9</b>	<b>2.1</b>	<b>0.7</b>	<b>1.0</b>	<b>315</b>	<b>0.45</b>
<b>N</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	23001	8.28	14.9	49.0	59.2	18.0	30.4	478	2.41
	23002	9.00	15.6	52.9	58.8	17.3	29.4	754	2.07
	23003	6.00	10.3	34.6	57.5	17.1	29.8	1103	2.38
	23004	8.08	14.3	48.9	60.5	17.7	29.2	832	2.45
	23005	7.15	12.4	42.5	59.5	17.3	29.2	1240	2.60
	23006	7.89	13.7	42.3	53.6	17.4	32.4	851	1.97
	23007	7.73	13.8	46.1	59.6	17.9	30.1	787	2.10
	23008	7.59	13.4	43.3	57.0	17.7	31.0	830	2.91
	23009	4.89	8.2	28.3	58.0	16.9	29.1	1315	3.81
	23010	6.80	11.5	36.7	53.9	16.9	31.4	757	1.80
	<b>Mean</b>		<b>7.34</b>	<b>12.8</b>	<b>42.5</b>	<b>57.8</b>	<b>17.4</b>	<b>30.2</b>	<b>895</b>
<b>S.D.</b>		<b>1.19</b>	<b>2.3</b>	<b>7.5</b>	<b>2.4</b>	<b>0.4</b>	<b>1.1</b>	<b>252</b>	<b>0.58</b>
<b>N</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	7.39	13.5	43.3	58.5	18.2	31.2	862	1.88
	24002	6.89	12.6	41.4	60.1	18.2	30.3	1160	2.55
	24003	7.56	12.9	41.6	55.0	17.1	31.1	250	1.80
	24004	7.49	13.7	43.8	58.4	18.2	31.2	826	2.43
	24005	7.67	14.3	46.3	60.3	18.6	30.8	265	2.07
	24006	7.73	13.4	45.0	58.3	17.3	29.8	169	2.26
	24007	7.78	13.6	44.6	57.4	17.5	30.5	197	1.51
	24008	6.87	12.3	40.3	58.7	17.9	30.4	284	2.32
	24009	8.00	15.1	50.1	62.6	18.9	30.2	381	2.51
	24010	8.93	16.0	54.6	61.2	18.0	29.4	712	2.85
	<b>Mean</b>		<b>7.63</b>	<b>13.7</b>	<b>45.1</b>	<b>59.1</b>	<b>18.0</b>	<b>30.5</b>	<b>511</b>
<b>S.D.</b>		<b>0.58</b>	<b>1.1</b>	<b>4.4</b>	<b>2.1</b>	<b>0.6</b>	<b>0.6</b>	<b>349</b>	<b>0.40</b>
<b>N</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>



## Appendix 6-1. (Continued)

Sex: Female									
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	21001	2.17	21.2	65.7	2.6	9.8	0.4	10.4	46.3
	21002	3.19	9.1	85.4	2.5	1.5	0.6	10.7	40.7
	21003	3.42	16.4	78.0	2.1	2.9	0.3	11.7	35.6
	21004	4.03	9.7	86.1	1.9	1.3	0.2	11.8	29.6
	21005	4.37	12.7	79.5	1.8	5.2	0.4	10.8	35.5
	21006	3.56	17.0	73.8	4.3	3.8	0.5	10.5	32.4
	21007	3.09	11.6	82.1	1.5	4.1	0.4	10.9	42.3
	21008	2.57	18.2	69.6	1.8	10.0	0.2	11.7	46.1
	21009	7.23	15.1	74.7	2.0	7.4	0.3	10.9	38.4
	21010	3.46	23.9	66.6	1.5	7.7	0.1	12.1	37.4
		<b>Mean</b>	<b>3.71</b>	<b>15.5</b>	<b>76.2</b>	<b>2.2</b>	<b>5.4</b>	<b>0.3</b>	<b>11.2</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.39</b>	<b>4.8</b>	<b>7.3</b>	<b>0.8</b>	<b>3.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.6</b>	<b>5.5</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	22001	6.05	12.8	77.9	0.9	7.6	0.3	10.8	47.9
	22002	8.35	14.4	76.9	2.7	5.4	0.3	10.4	40.6
	22003	4.36	9.9	83.8	1.7	4.0	0.2	14.4	39.7
	22004	1.94	10.1	83.3	1.2	3.4	1.2	11.5	29.7
	22005	4.16	14.3	81.1	2.1	1.8	0.3	10.2	37.9
	22006	7.39	12.3	80.3	4.8	1.6	0.4	10.2	48.3
	22007	6.70	8.8	85.2	2.3	3.1	0.2	11.3	30.7
	22008	3.56	12.5	81.4	1.8	3.6	0.0	10.6	47.0
	22009	1.86	16.8	76.5	1.4	4.4	0.4	11.0	34.7
	22010	2.86	16.4	77.7	3.1	2.2	0.4	11.5	44.6
		<b>Mean</b>	<b>4.72</b>	<b>12.8</b>	<b>80.4</b>	<b>2.2</b>	<b>3.7</b>	<b>0.4</b>	<b>11.2</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.29</b>	<b>2.7</b>	<b>3.1</b>	<b>1.1</b>	<b>1.8</b>	<b>0.3</b>	<b>1.2</b>	<b>6.9</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	23001	3.65	24.2	63.8	2.4	8.7	0.6	11.3	38.4
	23002	4.22	11.5	83.3	2.1	2.0	0.4	11.2	35.2
	23003	4.61	12.7	83.0	2.0	1.0	0.5	9.7	34.7
	23004	4.82	12.7	82.2	2.7	1.4	0.2	10.2	36.3
	23005	6.21	7.6	87.2	3.0	0.9	0.4	10.0	32.8
	23006	4.35	16.1	74.6	4.1	4.6	0.3	10.3	51.9
	23007	5.45	14.0	80.8	3.0	1.6	0.3	9.9	38.6
	23008	4.41	10.8	84.6	2.1	1.8	0.4	10.5	38.6
	23009	5.36	12.6	80.7	4.1	1.7	0.2	10.5	34.0
	23010	2.38	17.7	72.0	1.7	8.0	0.2	10.9	48.8
		<b>Mean</b>	<b>4.55</b>	<b>14.0</b>	<b>79.2</b>	<b>2.7</b>	<b>3.2</b>	<b>0.4</b>	<b>10.5</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.05</b>	<b>4.5</b>	<b>7.1</b>	<b>0.8</b>	<b>2.9</b>	<b>0.1</b>	<b>0.5</b>	<b>6.4</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	4.64	9.6	84.5	2.3	2.7	0.1	10.3	29.6
	24002	5.97	9.6	86.8	1.4	1.4	0.2	10.2	30.1
	24003	3.49	14.3	79.5	1.4	4.0	0.1	11.3	42.3
	24004	3.37	16.7	74.0	3.6	5.2	0.1	11.2	41.5
	24005	2.52	18.3	76.4	1.4	2.9	0.3	10.8	33.8
	24006	1.59	19.3	72.1	2.0	5.7	0.2	10.3	41.0
	24007	2.37	11.7	82.0	2.8	2.6	0.5	11.4	32.9
	24008	3.32	19.9	75.2	1.9	2.3	0.2	10.9	29.2
	24009	3.68	18.8	63.1	1.4	15.6	0.6	11.3	35.1
	24010	4.38	11.7	82.5	2.7	1.9	0.6	10.6	40.6
		<b>Mean</b>	<b>3.53</b>	<b>15.0</b>	<b>77.6</b>	<b>2.1</b>	<b>4.4</b>	<b>0.3</b>	<b>10.8</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.25</b>	<b>4.1</b>	<b>7.0</b>	<b>0.8</b>	<b>4.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.5</b>	<b>5.3</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 6-2. Individual hematological parameters (Recovery Group)

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	11011	9.60	16.10	54.10	56.40	16.80	29.80	761	2.04
	11012	6.81	11.80	37.60	55.20	17.30	31.40	1116	2.01
	11013	9.34	15.40	49.20	52.70	16.50	31.20	901	1.89
	11014	5.93	9.90	31.70	53.50	16.80	31.30	1385	2.40
	11015	7.55	12.50	39.90	52.80	16.60	31.40	802	2.45
	<b>Mean</b>	<b>7.85</b>	<b>13.14</b>	<b>42.50</b>	<b>54.12</b>	<b>16.80</b>	<b>31.02</b>	<b>993</b>	<b>2.16</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.59</b>	<b>2.58</b>	<b>9.04</b>	<b>1.62</b>	<b>0.31</b>	<b>0.69</b>	<b>259</b>	<b>0.25</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	9.32	15.90	54.00	57.90	17.10	29.40	623	2.25
	14012	9.46	15.90	50.80	53.70	16.80	31.40	702	1.75
	14013	7.47	12.40	38.30	51.20	16.70	32.50	750	2.46
	14014	7.42	13.60	41.20	55.50	18.30	32.90	919	2.37
	14015	9.81	16.40	53.30	54.30	16.70	30.80	533	2.29
	<b>Mean</b>	<b>8.70</b>	<b>14.8</b>	<b>47.5</b>	<b>54.5</b>	<b>17.1</b>	<b>31.4</b>	<b>705</b>	<b>2.22</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.16</b>	<b>1.7</b>	<b>7.3</b>	<b>2.5</b>	<b>0.7</b>	<b>1.4</b>	<b>145</b>	<b>0.28</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	11011	9.49	13.30	81.50	2.70	1.10	0.90	10.50	22.40
	11012	6.04	15.30	79.80	2.30	2.20	0.20	10.30	22.00
	11013	14.49	8.60	87.80	1.80	1.00	0.30	11.30	19.40
	11014	6.74	8.50	87.60	1.80	1.00	0.40	12.20	17.00
	11015	12.27	16.00	77.70	3.80	1.80	0.30	12.80	21.10
	<b>Mean</b>	<b>9.81</b>	<b>12.34</b>	<b>82.88</b>	<b>2.48</b>	<b>1.42</b>	<b>0.42</b>	<b>11.4</b>	<b>20.4</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3.59</b>	<b>3.60</b>	<b>4.60</b>	<b>0.83</b>	<b>0.55</b>	<b>0.28</b>	<b>1.1</b>	<b>2.2</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	9.66	15.60	77.60	1.90	4.30	0.40	11.80	21.90
	14012	9.62	14.50	81.30	1.90	1.40	0.40	12.80	17.80
	14013	5.75	24.10	69.50	1.50	4.30	0.40	13.50	15.40
	14014	6.57	8.80	85.10	2.50	2.60	0.40	12.80	17.10
	14015	11.64	13.00	81.30	2.80	1.60	0.70	12.00	19.20
	<b>Mean</b>	<b>8.65</b>	<b>15.20</b>	<b>78.96</b>	<b>2.12</b>	<b>2.84</b>	<b>0.46</b>	<b>12.6</b>	<b>18.3</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.43</b>	<b>5.60</b>	<b>5.92</b>	<b>0.52</b>	<b>1.41</b>	<b>0.13</b>	<b>0.7</b>	<b>2.4</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

11015 : Dead animal

Appendix 6-2. (Continued)

Sex: Female									
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	21011	7.24	13.7	41.6	57.4	18.9	33	954	2.30
	21012	8.28	14.90	46.50	56.20	18.00	32.00	1004	2.21
	21013	8.00	14.60	44.30	55.40	18.30	35.60	885	2.82
	21014	8.27	14.90	45.00	54.40	18.00	33.20	716	2.79
	21005	9.33	16.50	52.00	55.70	17.70	31.80	864	2.52
	<b>Mean</b>	<b>8.22</b>	<b>14.92</b>	<b>45.88</b>	<b>55.82</b>	<b>18.18</b>	<b>33.12</b>	<b>885</b>	<b>2.53</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.75</b>	<b>1.01</b>	<b>3.85</b>	<b>1.10</b>	<b>0.45</b>	<b>1.51</b>	<b>109</b>	<b>0.28</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
G4 5,000	24011	7.32	13.60	40.70	55.60	18.50	33.40	909	2.17
	24012	7.33	13.60	40.30	55.00	18.50	33.60	927	2.71
	24013	5.77	11.20	32.60	56.50	19.40	34.30	51	3.09
	24014	7.69	14.30	43.30	56.20	18.60	33.10	660	2.03
	24015	8.29	15.00	47.30	57.10	18.10	31.80	823	2.15
	<b>Mean</b>	<b>7.28</b>	<b>13.5</b>	<b>40.8</b>	<b>56.1</b>	<b>18.6</b>	<b>33.2</b>	<b>674</b>	<b>2.43</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.93</b>	<b>1.4</b>	<b>5.4</b>	<b>0.8</b>	<b>0.5</b>	<b>0.9</b>	<b>364</b>	<b>0.45</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	21011	4.77	6.50	87.50	3.90	1.10	0.40	9.20	21.50
	21012	9.44	4.30	90.40	3.00	1.00	0.60	10.00	18.10
	21013	6.30	11.70	84.00	1.90	1.20	0.30	10.70	16.80
	21014	3.76	11.70	83.00	2.50	1.40	0.50	9.90	18.20
	21015	6.54	9.60	84.60	3.00	1.20	0.90	11.30	16.00
	<b>Mean</b>	<b>6.16</b>	<b>8.76</b>	<b>85.90</b>	<b>2.86</b>	<b>1.18</b>	<b>0.54</b>	<b>10.22</b>	<b>18.12</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.16</b>	<b>3.28</b>	<b>3.02</b>	<b>0.74</b>	<b>0.15</b>	<b>0.23</b>	<b>0.80</b>	<b>2.10</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
G4 5,000	24011	4.68	13.40	80.10	2.40	3.40	0.30	12.30	22.60
	24012	3.96	7.80	87.20	2.70	1.80	0.40	11.30	21.50
	24013	1.50	16.30	79.00	1.50	1.80	0.80	10.00	23.10
	24014	2.35	23.10	69.40	3.70	3.60	0.00	10.10	18.70
	24015	3.56	10.70	83.10	3.00	1.50	0.40	10.00	23.80
	<b>Mean</b>	<b>3.21</b>	<b>14.26</b>	<b>79.76</b>	<b>2.66</b>	<b>2.42</b>	<b>0.38</b>	<b>10.7</b>	<b>21.9</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.28</b>	<b>5.86</b>	<b>6.61</b>	<b>0.81</b>	<b>1.00</b>	<b>0.29</b>	<b>1.0</b>	<b>2.0</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

21011 : blood sample was coagulated

Appendix 7-1. Individual clinical chemistry (Main Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	11001	43	157	205	167	20	1.2	0.05	78	50
	11002	24	118	122	81	11	0.8	0.06	58	77
	11003	44	146	181	152	20	1.1	0.06	72	46
	11004	23	123	124	82	12	0.8	0.06	59	78
	11005	26	82	171	112	18	1.2	0.08	58	67
	11006	33	102	140	141	15	0.9	0.15	59	65
	11007	34	113	95	126	16	1.1	0.08	70	32
	11008	36	114	148	148	15	1.3	0.08	54	37
	11009	30	84	135	132	15	1.3	0.07	67	39
	11010	41	117	142	192	16	1.2	0.09	64	49
		<b>Mean</b>	<b>33</b>	<b>116</b>	<b>146</b>	<b>133</b>	<b>16</b>	<b>1.09</b>	<b>0.08</b>	<b>63.9</b>
	<b>S.D.</b>	<b>8</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>35</b>	<b>3</b>	<b>0.19</b>	<b>0.03</b>	<b>7.7</b>	<b>16.7</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	24	118	169	98	14	0.9	0.06	48	32
	12002	34	108	179	255	14	1.2	0.06	71	81
	12003	34	104	149	113	15	1	0.1	67	41
	12004	39	119	228	156	18	1	0.07	96	46
	12005	35	94	168	155	15	0.9	0.06	70	44
	12006	37	121	171	117	16	0.9	0.08	68	59
	12007	30	87	130	141	14	1	0.08	64	77
	12008	34	96	155	147	16	0.9	0.11	56	22
	12009	39	77	190	143	16	0.9	0.08	47	27
	12010	39	95	168	175	15	0.9	0.11	51	27
		<b>Mean</b>	<b>35</b>	<b>102</b>	<b>171</b>	<b>150</b>	<b>15</b>	<b>0.96</b>	<b>0.08</b>	<b>63.8</b>
	<b>S.D.</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>26</b>	<b>43</b>	<b>1</b>	<b>0.10</b>	<b>0.02</b>	<b>14.6</b>	<b>20.8</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	31	80	153	204	17	1	0.07	71	46
	13002	32	87	142	169	16	0.9	0.08	53	29
	13003	37	95	151	122	16	0.9	0.08	60	43
	13004	33	113	158	180	12	0.9	0.08	73	22
	13005	41	115	156	123	14	0.8	0.08	63	47
	13006	44	94	144	189	12	0.8	0.08	60	34
	13007	26	112	135	139	12	0.9	0.1	87	69
	13008	37	153	155	107	15	1	0.08	68	25
	13009	29	128	126	169	15	0.8	0.06	67	29
	13010	31	122	134	108	14	0.8	0.07	88	39
		<b>Mean</b>	<b>34</b>	<b>110</b>	<b>145</b>	<b>151</b>	<b>14</b>	<b>0.88</b>	<b>0.08</b>	<b>69.0</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6</b>	<b>22</b>	<b>11</b>	<b>35</b>	<b>2</b>	<b>0.08</b>	<b>0.01</b>	<b>11.4</b>	<b>13.9</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5000	14001	25	96	78	152	10	0.7	0.08	72	47
	14002	29	138	123	112	14	0.9	0.07	92	54
	14003	30	111	153	103	13	0.9	0.07	63	27
	14004	38	107	177	193	16	1.1	0.07	77	34
	14005	31	131	190	184	16	1.1	0.09	81	42
	14006	35	120	147	60	15	0.8	0.08	45	63
	14007	26	108	114	97	14	1	0.09	72	46
	14008	30	120	122	147	13	0.9	0.05	64	61
	14009	31	121	149	159	14	0.9	0.06	46	38
	14010	29	99	160	224	15	1.1	0.06	62	32
		<b>Mean</b>	<b>30</b>	<b>115</b>	<b>141</b>	<b>143</b>	<b>14</b>	<b>0.94</b>	<b>0.07</b>	<b>67.4</b>
	<b>S.D.</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>33</b>	<b>50</b>	<b>2</b>	<b>0.13</b>	<b>0.01</b>	<b>14.7</b>	<b>12.2</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 7-1. (Continued)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	11001	7	4.5	1.80	13.78	11.4	137	8.6	97
	11002	5.4	3.7	2.18	8.2	8.2	140	6.2	97
	11003	6.4	4.2	1.91	12.2	8.8	138	9.8	95
	11004	5.4	3.8	2.38	8.09	8	140	5.3	100
	11005	6.6	4.4	2.00	12.13	10.9	138	6.6	95
	11006	7	4.4	1.69	11.53	10.4	137	4.6	97
	11007	6.7	4.4	1.91	10.04	10.6	140	6.5	99
	11008	6.5	4.2	1.83	11.42	11.2	140	6.6	97
	11009	6.2	4.1	1.95	11.91	10.7	139	7.3	99
	11010	6.7	4.5	2.05	10.44	10.8	136	7	94
		<b>Mean</b>	<b>6.4</b>	<b>4.2</b>	<b>1.97</b>	<b>10.97</b>	<b>10.10</b>	<b>139</b>	<b>6.9</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.6</b>	<b>0.3</b>	<b>0.20</b>	<b>1.80</b>	<b>1.27</b>	<b>2</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	5.4	3.7	2.18	10.08	7.7	139	3.8	97
	12002	7	4.5	1.80	5.98	10.2	139	7.4	97
	12003	6.1	4.1	2.05	8.77	10.3	136	6.9	95
	12004	6.5	4.3	1.95	9.15	11.1	137	7	98
	12005	6.3	4.1	1.86	8.84	10.5	136	7.8	96
	12006	6.2	4.1	1.95	7.14	10	138	4.4	97
	12007	6.1	4.1	2.05	6.92	9.9	137	4.4	96
	12008	6.8	4.4	1.83	8.88	10.5	138	7.3	99
	12009	6.5	4.3	1.95	9.69	11	135	10.3	98
	12010	6.5	4.4	2.10	9.2	10.3	136	6.2	97
		<b>Mean</b>	<b>6.3</b>	<b>4.2</b>	<b>1.97</b>	<b>8.47</b>	<b>10.15</b>	<b>137</b>	<b>6.6</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.4</b>	<b>0.2</b>	<b>0.12</b>	<b>1.33</b>	<b>0.94</b>	<b>1</b>	<b>1.9</b>	<b>1</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	6.4	4.2	1.91	8.04	10.6	136	4.3	93
	13002	6	4.1	2.16	8.42	9.9	135	7.4	94
	13003	6.4	4.3	2.05	7.95	9.9	135	5.6	95
	13004	6.3	4.2	2.00	7.68	10	136	6.5	95
	13005	6	3.9	1.86	7.47	9.7	135	4.6	98
	13006	6.1	4.2	2.21	9.25	10.5	131	7.8	95
	13007	6.8	4.4	1.83	9.76	11	133	8.1	96
	13008	6.4	4.4	2.20	8.5	10.1	138	6.4	97
	13009	6.5	4.2	1.83	9.61	10	135	6	96
	13010	6.2	4.1	1.95	7.56	10.1	136	4.3	97
		<b>Mean</b>	<b>6.3</b>	<b>4.2</b>	<b>2.00</b>	<b>8.42</b>	<b>10.18</b>	<b>135</b>	<b>6.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.2</b>	<b>0.1</b>	<b>0.15</b>	<b>0.85</b>	<b>0.40</b>	<b>2</b>	<b>1.4</b>	<b>2</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	5.5	3.7	2.06	7	9.8	134	3.6	91
	14002	5.8	3.8	1.90	7.03	9.6	134	4.3	95
	14003	6.4	4.3	2.05	10.85	11	135	7.9	97
	14004	6.8	4.4	1.83	10.16	11.6	137	6.4	99
	14005	6.9	4.4	1.76	11.12	11.9	135	6.6	94
	14006	5.7	3.8	2.00	6.94	7.3	134	6.1	92
	14007	6.7	4.3	1.79	6.82	9.6	134	6.2	94
	14008	6.3	4.2	2.00	9.02	10.3	136	6.5	94
	14009	5.9	4	2.11	9.25	9.5	134	8.1	96
	14010	6.7	4.4	1.91	16	10.9	133	8.3	94
		<b>Mean</b>	<b>6.3</b>	<b>4.1</b>	<b>1.94</b>	<b>9.42</b>	<b>10.15</b>	<b>135</b>	<b>6.4</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.5</b>	<b>0.3</b>	<b>0.12</b>	<b>2.86</b>	<b>1.32</b>	<b>1</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 7-1. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	21001	30	68	94	218	12	1	0.06	77	44
	21002	27	81	128	155	14	0.8	0.09	77	38
	21003	38	230	77	114	20	1	0.1	96	52
	21004	39	134	77	204	27	1.5	0.08	123	94
	21005	28	115	114	97	21	1	0.07	92	56
	21006	25	121	125	76	14	1	0.05	87	70
	21007	20	96	73	116	20	1	0.07	98	52
	21008	22	120	120	80	17	1	0.07	76	49
	21009	64	219	50	106	22	1	0.06	132	93
	21010	22	117	78	86	27	1.1	0.09	91	41
		<b>Mean</b>	<b>32</b>	<b>130</b>	<b>94</b>	<b>125</b>	<b>19</b>	<b>1.04</b>	<b>0.07</b>	<b>94.9</b>
	<b>S.D.</b>	<b>13</b>	<b>54</b>	<b>27</b>	<b>51</b>	<b>5</b>	<b>0.18</b>	<b>0.02</b>	<b>19.0</b>	<b>20.3</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	22001	27	112	104	95	17	1	0.07	92	62
	22002	21	109	72	107	26	1	0.06	85	36
	22003	26	112	77	111	24	1.2	0.09	89	42
	22004	27	128	82	110	21	1.2	0.09	153	61
	22005	29	90	57	37	18	1.1	0.07	83	66
	22006	29	104	47	150	15	1.1	0.09	135	67
	22007	36	96	50	87	19	0.9	0.07	90	50
	22008	29	111	64	127	17	1.1	0.09	93	56
	22009	24	134	85	87	24	1	0.07	90	48
	22010	87	211	58	124	19	0.9	0.05	122	88
		<b>Mean</b>	<b>34</b>	<b>121</b>	<b>70</b>	<b>104</b>	<b>20</b>	<b>1.05</b>	<b>0.08</b>	<b>103.2</b>
	<b>S.D.</b>	<b>19</b>	<b>34</b>	<b>18</b>	<b>30</b>	<b>4</b>	<b>0.11</b>	<b>0.01</b>	<b>24.4</b>	<b>14.8</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	23001	25	93	109	87	21	1	0.07	84	46
	23002	20	82	45	116	18	0.9	0.06	77	45
	23003	28	127	100	102	15	1.1	0.06	132	68
	23004	29	100	71	125	14	1.2	0.07	101	72
	23005	26	98	66	110	16	1	0.06	114	51
	23006	32	101	71	101	18	1	0.05	123	54
	23007	22	88	94	136	15	1.2	0.06	119	73
	23008	58	142	75	143	13	1	0.06	105	91
	23009	29	114	57	110	12	1	0.07	100	66
	23010	19	97	74	92	16	1.2	0.06	117	41
		<b>Mean</b>	<b>29</b>	<b>104</b>	<b>76</b>	<b>112</b>	<b>16</b>	<b>1.06</b>	<b>0.06</b>	<b>107.2</b>
	<b>S.D.</b>	<b>11</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>3</b>	<b>0.11</b>	<b>0.01</b>	<b>17.3</b>	<b>15.9</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5000	24001	26	114	79	129	14	1.1	0.06	81	42
	24002	50	126	57	123	13	1	0.06	112	105
	24003	25	65	45	121	19	1.1	0.05	80	63
	24004	28	83	76	111	14	1	0.08	84	42
	24005	30	86	75	79	17	1.2	0.07	80	47
	24006	20	93	89	127	15	1.1	0.08	95	55
	24007	19	75	65	64	17	1	0.04	69	53
	24008	28	86	79	125	13	1	0.06	90	39
	24009	30	95	59	124	12	1	0.07	110	65
	24010	71	212	65	155	16	1.2	0.08	120	66
		<b>Mean</b>	<b>33</b>	<b>104</b>	<b>69</b>	<b>116</b>	<b>15</b>	<b>1.07</b>	<b>0.07</b>	<b>92.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>16</b>	<b>42</b>	<b>13</b>	<b>26</b>	<b>2</b>	<b>0.08</b>	<b>0.01</b>	<b>16.7</b>	<b>19.4</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

## Appendix 7-1. (Continued)

Sex: Female									
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	11001	6.8	4.4	1.83	12.02	12.5	133	4.7	95
	11002	6.7	4.3	1.79	10.54	12.7	133	7.8	94
	11003	7.2	4.9	2.13	7.45	12.1	132	6.1	93
	11004	8.1	5.5	2.12	13.06	12.3	133	5.2	94
	11005	7.1	4.7	1.96	10.1	12.2	132	5.1	93
	11006	7.3	4.9	2.04	7.41	11.3	133	5.8	90
	11007	6.7	4.6	2.19	9.44	10.3	132	4.6	90
	11008	6.6	4.6	2.30	7.23	11.2	134	3.3	98
	11009	6.9	4.6	2.00	6.24	11.1	133	5.2	90
	11010	7.2	4.8	2.00	5.25	10.1	134	3.4	92
	<b>Mean</b>		<b>7.1</b>	<b>4.7</b>	<b>2.04</b>	<b>8.87</b>	<b>11.58</b>	<b>133</b>	<b>5.1</b>
<b>S.D.</b>		<b>0.4</b>	<b>0.3</b>	<b>0.16</b>	<b>2.56</b>	<b>0.92</b>	<b>1</b>	<b>1.3</b>	<b>3</b>
<b>N</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	7.1	4.7	1.96	8.37	11.5	130	4	92
	12002	6.3	4.3	2.15	6.15	9.5	130	5.6	89
	12003	6.5	4.3	1.95	6.82	10.7	132	3.5	92
	12004	7.9	5.1	1.82	12.94	15.9	133	4.4	91
	12005	6.9	4.5	1.88	5.72	11.1	131	6.3	95
	12006	7.8	5.1	1.89	10.03	16.1	130	5	89
	12007	6.5	4.3	1.95	10.93	13.6	130	4.2	93
	12008	7.2	4.8	2.00	8.58	11.7	131	4.4	91
	12009	6.1	4.1	2.05	7.81	11.4	132	5.2	92
	12010	7.4	5.1	2.22	6.3	11.4	132	4.6	94
	<b>Mean</b>		<b>7.0</b>	<b>4.6</b>	<b>1.99</b>	<b>8.37</b>	<b>12.29</b>	<b>131</b>	<b>4.7</b>
<b>S.D.</b>		<b>0.6</b>	<b>0.4</b>	<b>0.12</b>	<b>2.34</b>	<b>2.20</b>	<b>1</b>	<b>0.8</b>	<b>2</b>
<b>N</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	6.6	4.4	2.00	7.39	11.3	130	4.8	91
	13002	6.7	4.7	2.35	6.77	10.2	131	5.2	91
	13003	7	4.6	1.92	8.85	11.5	130	5.5	89
	13004	7.4	4.8	1.85	8.95	11.3	132	5.2	92
	13005	7	4.7	2.04	8.03	11.1	130	5.9	91
	13006	7.1	4.7	1.96	5.57	9.9	129	3.3	89
	13007	7.2	4.8	2.00	8.7	11.2	129	6.4	88
	13008	7.2	4.8	2.00	7.37	10.8	129	5.1	89
	13009	7	4.7	2.04	5.16	10.2	127	5.2	92
	13010	7.5	5	2.00	3.5	10.6	130	3.5	90
	<b>Mean</b>		<b>7.1</b>	<b>4.7</b>	<b>2.02</b>	<b>7.03</b>	<b>10.81</b>	<b>130</b>	<b>5.0</b>
<b>S.D.</b>		<b>0.3</b>	<b>0.2</b>	<b>0.13</b>	<b>1.80</b>	<b>0.56</b>	<b>1</b>	<b>1.0</b>	<b>1</b>
<b>N</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	6.2	4.1	1.95	6.12	9.8	129	3.9	91
	14002	7.6	5.1	2.04	5.81	11.6	129	5.5	91
	14003	6.5	4.4	2.10	5	10.7	128	5.1	92
	14004	6.3	4.3	2.15	4.97	9.7	130	3.8	94
	14005	6.7	4.5	2.05	8.49	10.7	130	6.5	94
	14006	7.4	4.9	1.96	7.28	11.5	130	5.6	85
	14007	6.3	4.2	2.00	7.7	10.3	129	5.4	92
	14008	6.9	4.5	1.88	7.41	10.9	128	5.6	92
	14009	7.2	4.9	2.13	7.14	11.1	129	6.2	91
	14010	8.4	5.5	1.90	9.12	13.3	129	7.9	94
	<b>Mean</b>		<b>7.0</b>	<b>4.6</b>	<b>2.01</b>	<b>6.90</b>	<b>10.96</b>	<b>129</b>	<b>5.6</b>
<b>S.D.</b>		<b>0.7</b>	<b>0.4</b>	<b>0.09</b>	<b>1.40</b>	<b>1.04</b>	<b>1</b>	<b>1.2</b>	<b>3</b>
<b>N</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 7-2. Individual clinical chemistry (Recovery Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	11011	42	143	164	308	16	1.4	0.09	111	158
	11012	33	201	120	86	17	1.3	0.12	71	75
	11013	33	125	157	207	16	1	0.07	79	54
	11014	33	99	136	139	15	1.1	0.13	57	61
	11015	31	158	93	180	14	1	0.12	78	58
	<b>Mean</b>	<b>34</b>	<b>145</b>	<b>134</b>	<b>184</b>	<b>16</b>	<b>1.2</b>	<b>0.11</b>	<b>79</b>	<b>81</b>
	<b>S.D.</b>	<b>4</b>	<b>38</b>	<b>29</b>	<b>83</b>	<b>1</b>	<b>0.2</b>	<b>0.03</b>	<b>20</b>	<b>44</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	32	147	109	161	15	1.2	0.11	74	69
	14012	33	167	132	190	17	1	0.12	84	69
	14013	27	90	96	144	15	0.8	0.08	55	37
	14014	29	109	96	180	14	0.8	0.1	73	95
	14015	27	88	137	201	12	0.8	0.11	50	61
	<b>Mean</b>	<b>30</b>	<b>120</b>	<b>114</b>	<b>175</b>	<b>15</b>	<b>0.9</b>	<b>0.10</b>	<b>67</b>	<b>66</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3</b>	<b>35</b>	<b>20</b>	<b>23</b>	<b>2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.02</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	11011	7.7	4.9	1.75	18.04	12.6	142	5.6	101
	11012	7	4.3	1.59	14.09	11.1	139	7.6	98
	11013	6.8	4.3	1.72	10.56	11.5	142	5.6	100
	11014	6.8	4.3	1.72	12.43	11.7	141	7.3	100
	11015	6.4	4.1	1.78	9.4	10.3	140	5.7	101
	<b>Mean</b>	<b>6.9</b>	<b>4.4</b>	<b>1.71</b>	<b>12.90</b>	<b>11.4</b>	<b>141</b>	<b>6.4</b>	<b>100</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.5</b>	<b>0.3</b>	<b>0.07</b>	<b>3.38</b>	<b>0.8</b>	<b>1</b>	<b>1.0</b>	<b>1</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	7	4.5	1.80	11.32	11.9	140	7.6	103
	14012	6.6	4.4	2.00	8.75	10.7	143	5.7	103
	14013	6.4	4.1	1.78	8.46	10.1	140	7.3	99
	14014	6.6	4.2	1.75	8.19	10.6	140	6.7	100
	14015	6.5	4.3	1.95	9.69	11	141	6.9	102
	<b>Mean</b>	<b>6.6</b>	<b>4.3</b>	<b>1.86</b>	<b>9.28</b>	<b>10.9</b>	<b>141</b>	<b>6.8</b>	<b>101</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.11</b>	<b>1.27</b>	<b>0.7</b>	<b>1</b>	<b>0.7</b>	<b>2</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	



## Appendix 7-2. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	21011	28	95	63	188	14	0.9	0.12	101	141
	21012	24	112	51	86	19	1	0.13	112	73
	21013	24	103	70	133	14	0.9	0.19	73	67
	21014	20	105	80	123	16	1	0.12	89	70
	21015	33	103	4.5	110	13	0.9	0.13	57	51
	<b>Mean</b>	<b>26</b>	<b>104</b>	<b>54</b>	<b>128</b>	<b>15</b>	<b>0.9</b>	<b>0.14</b>	<b>86</b>	<b>80</b>
	<b>S.D.</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>29</b>	<b>38</b>	<b>2</b>	<b>0.1</b>	<b>0.03</b>	<b>22</b>	<b>35</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	30	169	65	90	19	1	0.14	74	61
	24012	25	143	64	92	15	1	0.13	72	70
	24013	30	109	65	74	19	1.2	0.11	94	80
	24014	16	114	44	123	11	0.8	0.09	79	64
	24015	25	69	46	165	16	0.9	0.18	117	67
	<b>Mean</b>	<b>25</b>	<b>121</b>	<b>57</b>	<b>109</b>	<b>16</b>	<b>1.0</b>	<b>0.13</b>	<b>87</b>	<b>68</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6</b>	<b>38</b>	<b>11</b>	<b>36</b>	<b>3</b>	<b>0.1</b>	<b>0.03</b>	<b>19</b>	<b>7</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	21011	8	5.4	2.08	7.86	12.1	139	5.7	99
	21012	7.2	4.7	1.88	7.67	11.1	139	5.6	101
	21013	6.7	4.5	2.05	5.55	10.5	138	5.3	101
	21014	6.3	4.3	2.15	5.06	10	138	5.4	102
	21015	6.8	4.5	1.96	5.76	10.8	139	6.9	103
	<b>Mean</b>	<b>7.0</b>	<b>4.7</b>	<b>2.02</b>	<b>6.38</b>	<b>10.9</b>	<b>139</b>	<b>5.8</b>	<b>101</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.6</b>	<b>0.4</b>	<b>0.11</b>	<b>1.29</b>	<b>0.8</b>	<b>1</b>	<b>0.6</b>	<b>1</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	6.9	4.6	2.00	5.67	10.1	140	4.7	100
	24012	6.6	4.5	2.14	3.44	9.7	140	5.1	102
	24013	7.6	4.9	1.81	6.79	10.9	141	8.1	103
	24014	6.7	4.6	2.19	5.81	10.3	137	6.1	99
	24015	8.3	5.5	1.96	7.35	12	139	6.8	98
	<b>Mean</b>	<b>7.2</b>	<b>4.8</b>	<b>2.02</b>	<b>5.81</b>	<b>10.6</b>	<b>139</b>	<b>6.2</b>	<b>100</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.7</b>	<b>0.4</b>	<b>0.15</b>	<b>1.50</b>	<b>0.9</b>	<b>2</b>	<b>1.4</b>	<b>2</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Appendix 8-1. Individual absolute organ weights (Main Group)

Sex: Male								(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W.	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney	
G1 0	11001	507.6	12.596	1.337	0.829	1.505	3.431	
	11002	514.5	13.542	1.502	0.885	1.947	3.696	
	11003	511.2	12.659	1.571	0.771	1.596	3.136	
	11004	555.1	14.145	1.582	1.022	1.963	3.621	
	11005	448.9	11.864	1.514	0.701	1.606	3.176	
	11006	542.9	15.023	1.596	0.889	1.834	3.119	
	11007	497.0	12.675	1.448	0.707	1.810	3.475	
	11008	607.7	15.076	1.581	0.820	2.182	4.605	
	11009	473.2	11.210	1.393	0.616	1.486	2.968	
	11010	559.9	14.309	1.733	0.940	1.908	3.588	
		<b>Mean</b>	<b>521.8</b>	<b>13.310</b>	<b>1.526</b>	<b>0.818</b>	<b>1.784</b>	<b>3.482</b>
	<b>S.D.</b>	<b>46.0</b>	<b>1.318</b>	<b>0.114</b>	<b>0.123</b>	<b>0.228</b>	<b>0.465</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G2 1,250	12001	577.7	14.733	1.678	1.081	1.845	3.830	
	12002	513.4	13.416	1.219	0.641	1.891	3.393	
	12003	531.6	12.121	1.519	0.878	1.948	3.580	
	12004	664.3	17.026	1.723	0.967	2.037	4.380	
	12005	515.3	13.306	1.655	0.890	1.880	3.401	
	12006	593.3	15.127	1.521	0.926	2.079	3.754	
	12007	533.1	12.541	1.521	0.862	1.769	3.134	
	12008	517.3	12.943	1.433	0.976	1.782	3.142	
	12009	493.7	12.668	1.324	0.664	1.587	3.119	
	12010	496.8	12.157	1.490	0.889	1.797	3.100	
		<b>Mean</b>	<b>543.7</b>	<b>13.604</b>	<b>1.508</b>	<b>0.877</b>	<b>1.862</b>	<b>3.483</b>
	<b>S.D.</b>	<b>53.3</b>	<b>1.569</b>	<b>0.157</b>	<b>0.135</b>	<b>0.142</b>	<b>0.414</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G3 2,500	13001	572.3	14.979	1.758	1.053	2.014	3.877	
	13002	545.0	12.927	1.618	0.768	1.790	3.601	
	13003	559.4	13.889	1.544	0.901	2.048	3.377	
	13004	501.6	13.699	1.505	0.867	1.758	3.728	
	13005	592.9	13.853	1.615	0.875	1.934	3.223	
	13006	634.3	15.868	1.770	1.053	1.932	4.522	
	13007	602.4	17.140	1.648	0.976	2.164	3.800	
	13008	572.1	14.433	1.494	0.964	1.739	3.976	
	13009	547.3	12.654	1.387	0.849	1.623	3.438	
	13010	517.4	12.583	1.545	0.796	1.931	3.224	
		<b>Mean</b>	<b>564.5</b>	<b>14.203</b>	<b>1.588</b>	<b>0.910</b>	<b>1.893</b>	<b>3.677</b>
	<b>S.D.</b>	<b>39.6</b>	<b>1.460</b>	<b>0.119</b>	<b>0.099</b>	<b>0.164</b>	<b>0.398</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	14001	658.8	15.378	1.720	1.017	1.975	4.120	
	14002	620.8	14.379	1.593	1.002	1.742	3.600	
	14003	551.6	13.768	1.459	0.733	1.780	3.497	
	14004	647.6	14.276	1.798	0.829	1.723	3.396	
	14005	544.1	16.759	1.488	1.048	2.132	4.024	
	14006	635.4	18.274	1.724	0.904	2.212	4.004	
	14007	533.8	12.194	1.420	0.836	1.871	3.460	
	14008	567.3	14.466	1.447	0.841	2.251	3.831	
	14009	526.8	15.807	1.517	0.920	1.730	4.178	
	14010	520.0	14.123	1.557	0.699	1.776	3.846	
		<b>Mean</b>	<b>580.6</b>	<b>14.94</b>	<b>1.57</b>	<b>0.88</b>	<b>1.92</b>	<b>3.80</b>
	<b>S.D.</b>	<b>54.1</b>	<b>1.70</b>	<b>0.13</b>	<b>0.12</b>	<b>0.21</b>	<b>0.29</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	

## Appendix 8-1. (Continued)

Sex: Male							(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Brain	Pituitary	Adrenal	Testis	Prostate	
G1 0	11001	1.801	0.008	0.060	3.458	0.461	
	11002	2.323	0.010	0.068	3.682	0.609	
	11003	2.315	0.016	0.061	3.298	0.601	
	11004	2.335	0.015	0.065	3.205	0.947	
	11005	2.067	0.013	0.064	3.611	0.898	
	11006	2.287	0.012	0.049	3.882	0.624	
	11007	2.308	0.013	0.055	3.069	0.860	
	11008	2.260	0.015	0.073	3.844	1.142	
	11009	2.299	0.013	0.044	3.508	0.844	
	11010	2.358	0.016	0.084	3.312	0.763	
		<b>Mean</b>	<b>2.235</b>	<b>0.013</b>	<b>0.062</b>	<b>3.487</b>	<b>0.775</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.173</b>	<b>0.003</b>	<b>0.012</b>	<b>0.271</b>	<b>0.203</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G2 1,250	12001	2.535	0.016	0.092	3.532	0.834	
	12002	2.056	0.014	0.071	3.397	0.738	
	12003	2.281	0.018	0.058	3.360	1.021	
	12004	2.342	0.014	0.066	4.161	1.332	
	12005	2.500	0.012	0.054	3.854	0.735	
	12006	2.412	0.019	0.066	2.994	0.698	
	12007	2.172	0.013	0.062	3.488	0.750	
	12008	2.181	0.011	0.075	3.568	0.571	
	12009	2.127	0.011	0.050	3.298	0.731	
	12010	2.390	0.015	0.065	3.780	0.700	
		<b>Mean</b>	<b>2.300</b>	<b>0.014</b>	<b>0.066</b>	<b>3.543</b>	<b>0.811</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.163</b>	<b>0.003</b>	<b>0.012</b>	<b>0.326</b>	<b>0.216</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G3 2,500	13001	2.391	0.016	0.072	3.749	0.797	
	13002	2.156	0.011	0.051	3.357	0.542	
	13003	2.365	0.007	0.060	3.939	0.633	
	13004	2.171	0.011	0.071	3.337	0.685	
	13005	2.096	0.013	0.066	3.653	0.641	
	13006	2.207	0.010	0.070	3.324	0.474	
	13007	2.216	0.016	0.057	3.333	0.859	
	13008	2.248	0.014	0.075	3.483	0.644	
	13009	2.155	0.004	0.079	3.333	0.533	
	13010	2.206	0.018	0.069	3.321	0.625	
		<b>Mean</b>	<b>2.221</b>	<b>0.012</b>	<b>0.067</b>	<b>3.483</b>	<b>0.643</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.093</b>	<b>0.004</b>	<b>0.009</b>	<b>0.221</b>	<b>0.117</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	14001	2.000	0.013	0.076	2.802	0.565	
	14002	2.486	0.015	0.070	3.649	0.780	
	14003	2.194	0.015	0.060	2.901	0.659	
	14004	2.033	0.019	0.083	3.404	0.897	
	14005	2.156	0.013	0.078	3.491	0.684	
	14006	2.004	0.015	0.072	3.645	0.664	
	14007	2.173	0.018	0.076	3.389	0.797	
	14008	2.251	0.014	0.073	3.141	0.684	
	14009	2.319	0.011	0.054	3.798	0.633	
	14010	2.145	0.005	0.056	3.355	0.730	
		<b>Mean</b>	<b>2.176</b>	<b>0.014</b>	<b>0.070</b>	<b>3.358</b>	<b>0.709</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.151</b>	<b>0.004</b>	<b>0.010</b>	<b>0.324</b>	<b>0.095</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	

## Appendix 8-1. (Continued)

Sex: Female							(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W.	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
G1 0	21001	335.9	7.997	1.082	0.471	1.548	2.119
	21002	322.6	9.066	0.991	0.508	1.369	2.452
	21003	356.3	8.510	0.978	0.501	1.543	2.207
	21004	297.7	7.370	0.906	0.472	1.443	1.823
	21005	301.9	7.122	0.903	0.609	1.406	1.897
	21006	291.4	7.155	0.881	0.475	1.433	1.945
	21007	333.0	8.316	1.062	0.551	1.538	2.051
	21008	287.0	6.351	0.847	0.399	1.254	1.593
	21009	329.1	7.755	1.044	0.670	1.391	2.019
	21010	280.1	6.289	0.843	0.481	1.440	1.847
		<b>Mean</b>	<b>313.5</b>	<b>7.593</b>	<b>0.954</b>	<b>0.514</b>	<b>1.437</b>
	<b>S.D.</b>	<b>25.2</b>	<b>0.909</b>	<b>0.090</b>	<b>0.078</b>	<b>0.091</b>	<b>0.235</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	22001	317.3	8.187	0.931	0.606	1.488	2.045
	22002	353.6	10.132	1.053	0.712	1.673	2.346
	22003	305.3	7.706	1.026	0.544	1.568	1.924
	22004	339.3	8.792	1.011	0.459	1.299	1.981
	22005	296.4	7.178	0.855	0.523	1.489	2.057
	22006	321.7	7.942	1.003	0.639	1.369	1.882
	22007	292.0	7.169	0.979	0.584	1.348	1.667
	22008	315.2	7.849	0.915	0.431	1.186	1.962
	22009	287.3	6.945	0.859	0.435	1.387	1.804
	22010	267.7	6.338	0.881	0.341	1.161	1.525
		<b>Mean</b>	<b>309.6</b>	<b>7.824</b>	<b>0.951</b>	<b>0.527</b>	<b>1.397</b>
	<b>S.D.</b>	<b>25.4</b>	<b>1.067</b>	<b>0.073</b>	<b>0.112</b>	<b>0.162</b>	<b>0.225</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	23001	338.1	8.987	0.995	0.529	1.446	2.246
	23002	307.7	8.371	0.961	0.505	1.417	1.997
	23003	310.3	9.766	0.977	0.719	1.548	2.412
	23004	320.8	8.035	0.986	0.544	1.401	1.901
	23005	327.8	9.043	0.990	0.668	1.502	2.212
	23006	341.5	9.147	0.956	0.487	1.403	2.068
	23007	362.0	10.324	1.034	0.635	1.342	2.237
	23008	359.0	10.030	1.249	0.617	1.626	2.184
	23009	329.9	9.070	0.906	0.542	1.843	2.057
	23010	291.1	7.679	0.833	0.465	1.362	1.765
		<b>Mean</b>	<b>328.8</b>	<b>9.045</b>	<b>0.989</b>	<b>0.571</b>	<b>1.489</b>
	<b>S.D.</b>	<b>22.5</b>	<b>0.849</b>	<b>0.107</b>	<b>0.084</b>	<b>0.152</b>	<b>0.189</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	326.8	8.240	1.136	0.616	1.385	1.918
	24002	390.7	10.399	1.037	0.493	2.076	2.421
	24003	304.7	7.814	0.931	0.472	1.358	1.968
	24004	338.0	8.157	1.036	0.508	1.383	2.031
	24005	355.4	10.064	1.069	0.710	1.746	2.272
	24006	305.1	8.460	0.853	0.514	1.295	2.017
	24007	339.0	6.722	0.871	0.432	1.339	1.930
	24008	336.5	8.174	0.912	0.670	1.261	2.040
	24009	269.7	8.657	0.902	0.480	1.733	2.194
	24010	317.0	11.020	1.014	0.609	1.401	2.377
		<b>Mean</b>	<b>328.3</b>	<b>8.771</b>	<b>0.976</b>	<b>0.550</b>	<b>1.498</b>
	<b>S.D.</b>	<b>32.6</b>	<b>1.317</b>	<b>0.095</b>	<b>0.094</b>	<b>0.264</b>	<b>0.186</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

## Appendix 8-1. (Continued)

Sex: Female							(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Brain	Pituitary	Adrenal	Ovary	Uterus	
G1 0	21001	2.001	0.019	0.099	0.086	0.579	
	21002	2.191	0.020	0.091	0.083	0.637	
	21003	1.917	0.017	0.101	0.132	0.410	
	21004	2.206	0.018	0.082	0.105	0.612	
	21005	2.145	0.016	0.076	0.109	0.549	
	21006	2.017	0.022	0.087	0.187	0.962	
	21007	2.286	0.020	0.088	0.082	0.520	
	21008	1.891	0.014	0.059	0.082	0.536	
	21009	1.983	0.019	0.064	0.097	0.585	
	21010	2.007	0.017	0.080	0.130	1.030	
		<b>Mean</b>	<b>2.064</b>	<b>0.018</b>	<b>0.083</b>	<b>0.109</b>	<b>0.642</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.133</b>	<b>0.002</b>	<b>0.014</b>	<b>0.033</b>	<b>0.197</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G2 1,250	22001	2.103	0.019	0.079	0.114	1.249	
	22002	2.008	0.005	0.081	0.141	0.504	
	22003	2.119	0.021	0.078	0.185	0.635	
	22004	1.953	0.022	0.072	0.107	0.611	
	22005	1.945	0.014	0.077	0.145	0.464	
	22006	1.991	0.011	0.065	0.079	0.752	
	22007	2.176	0.016	0.065	0.088	0.845	
	22008	1.999	0.024	0.069	0.101	0.788	
	22009	2.095	0.016	0.078	0.140	1.168	
	22010	2.046	0.015	0.064	0.084	0.519	
		<b>Mean</b>	<b>2.044</b>	<b>0.016</b>	<b>0.073</b>	<b>0.118</b>	<b>0.754</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.077</b>	<b>0.006</b>	<b>0.007</b>	<b>0.034</b>	<b>0.271</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G3 2,500	23001	2.059	0.019	0.083	0.102	0.872	
	23002	2.259	0.016	0.072	0.110	0.656	
	23003	2.120	0.024	0.073	0.130	0.827	
	23004	2.008	0.016	0.082	0.120	1.385	
	23005	2.208	0.021	0.069	0.100	0.629	
	23006	2.043	0.015	0.063	0.185	0.692	
	23007	2.051	0.011	0.080	0.151	0.900	
	23008	2.198	0.022	0.072	0.118	1.536	
	23009	1.877	0.021	0.103	0.191	0.637	
	23010	2.013	0.018	0.081	0.071	0.741	
		<b>Mean</b>	<b>2.084</b>	<b>0.018</b>	<b>0.078</b>	<b>0.128</b>	<b>0.888</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.114</b>	<b>0.004</b>	<b>0.011</b>	<b>0.038</b>	<b>0.319</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	24001	2.081	0.022	0.074	0.126	0.577	
	24002	2.121	0.027	0.121	0.173	0.731	
	24003	1.947	0.021	0.085	0.101	1.030	
	24004	2.082	0.021	0.080	0.105	1.266	
	24005	2.156	0.020	0.087	0.194	0.504	
	24006	2.020	0.015	0.083	0.104	0.741	
	24007	2.121	0.019	0.061	0.086	0.657	
	24008	1.951	0.019	0.087	0.119	0.612	
	24009	2.126	0.019	0.087	0.187	0.823	
	24010	2.071	0.025	0.098	0.070	0.801	
		<b>Mean</b>	<b>2.068</b>	<b>0.021</b>	<b>0.086</b>	<b>0.127</b>	<b>0.774</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.073</b>	<b>0.003</b>	<b>0.016</b>	<b>0.043</b>	<b>0.227</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	

Appendix 8-2. Individual absolute organ weights (Recovery Group)

Sex: Male								(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W.	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney	
G1 0	11011	652.1	21.768	1.636	1.058	1.721	4.435	
	11012	540.6	13.682	1.397	0.667	1.764	3.258	
	11013	548.4	15.277	1.471	0.878	1.497	3.637	
	11014	577.7	15.324	1.643	1.069	2.469	3.455	
	11015	560.5	14.761	1.444	1.108	1.877	3.380	
	<b>Mean</b>	<b>575.9</b>	<b>16.162</b>	<b>1.518</b>	<b>0.956</b>	<b>1.866</b>	<b>3.633</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>44.9</b>	<b>3.203</b>	<b>0.114</b>	<b>0.184</b>	<b>0.364</b>	<b>0.469</b>	
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	556.4	14.508	1.554	0.777	2.124	3.466	
	14012	471.0	11.172	1.446	0.712	1.577	2.890	
	14013	504.3	11.757	1.489	0.838	1.673	3.410	
	14014	591.4	13.588	1.515	0.866	2.174	3.171	
	14015	583.6	15.606	1.654	1.072	1.995	4.031	
	<b>Mean</b>	<b>541.3</b>	<b>13.326</b>	<b>1.532</b>	<b>0.853</b>	<b>1.909</b>	<b>3.394</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>52.1</b>	<b>1.855</b>	<b>0.079</b>	<b>0.136</b>	<b>0.269</b>	<b>0.423</b>	
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Brain	Pituitary	Adrenal	Testis	Prostate		
G1 0	11011	2.166	0.005	0.053	3.389	1.117		
	11012	2.142	0.014	0.051	3.408	0.499		
	11013	2.354	0.015	0.074	4.017	0.755		
	11014	2.346	0.014	0.062	3.819	0.732		
	11015	2.274	0.018	0.063	3.776	0.497		
	<b>Mean</b>	<b>2.256</b>	<b>0.013</b>	<b>0.061</b>	<b>3.682</b>	<b>0.720</b>		
	<b>S.D.</b>	<b>0.099</b>	<b>0.005</b>	<b>0.009</b>	<b>0.274</b>	<b>0.254</b>		
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		
G4 5,000	14011	2.079	0.012	0.041	3.054	0.512		
	14012	2.126	0.009	0.044	3.362	0.658		
	14013	2.182	0.015	0.071	3.470	1.029		
	14014	2.189	0.015	0.052	3.434	0.902		
	14015	2.154	0.013	0.057	3.299	0.688		
	<b>Mean</b>	<b>2.146</b>	<b>0.013</b>	<b>0.053</b>	<b>3.324</b>	<b>0.758</b>		
	<b>S.D.</b>	<b>0.045</b>	<b>0.002</b>	<b>0.012</b>	<b>0.165</b>	<b>0.206</b>		
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		

## Appendix 8-2. (Continued)

Sex: Female								(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W.	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney	
G1 0	21011	304.4	7.916	0.954	0.469	1.498	1.933	
	21012	305.9	7.997	0.925	0.536	1.480	1.834	
	21013	315.1	7.448	1.028	0.432	1.488	2.029	
	21014	309.2	7.870	0.091	0.047	1.460	2.178	
	21015	294.4	6.962	0.853	0.634	1.517	2.126	
	<b>Mean</b>	<b>305.8</b>	<b>7.639</b>	<b>0.770</b>	<b>0.424</b>	<b>1.489</b>	<b>2.020</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>7.583</b>	<b>0.434</b>	<b>0.385</b>	<b>0.224</b>	<b>0.021</b>	<b>0.140</b>	
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	331.7	7.443	0.983	0.562	1.841	1.882	
	24012	306.9	7.094	0.859	0.526	1.660	1.789	
	24013	282.4	7.983	0.876	0.463	1.207	1.690	
	24014	362.5	8.495	1.064	0.553	1.872	2.046	
	24015	344.3	8.686	0.984	0.573	1.533	2.074	
	<b>Mean</b>	<b>325.6</b>	<b>7.940</b>	<b>0.953</b>	<b>0.535</b>	<b>1.623</b>	<b>1.896</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>31.5</b>	<b>0.676</b>	<b>0.085</b>	<b>0.044</b>	<b>0.270</b>	<b>0.165</b>	
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Brain	Pituitary	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	21011	2.009	0.013	0.071	0.078	0.603
	21012	2.056	0.021	0.067	0.135	0.760
	21013	1.952	0.015	0.088	0.083	0.685
	21014	2.286	0.016	0.070	0.148	0.688
	21015	2.043	0.019	0.092	0.104	0.687
	<b>Mean</b>	<b>2.069</b>	<b>0.017</b>	<b>0.078</b>	<b>0.110</b>	<b>0.685</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.128</b>	<b>0.003</b>	<b>0.012</b>	<b>0.031</b>	<b>0.056</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
G4 5,000	24011	2.085	0.017	0.068	0.142	0.804
	24012	2.055	0.019	0.078	0.168	0.641
	24013	2.088	0.016	0.058	0.075	0.859
	24014	2.209	0.026	0.093	0.153	0.497
	24015	1.940	0.022	0.074	0.127	0.842
	<b>Mean</b>	<b>2.075</b>	<b>0.020</b>	<b>0.074</b>	<b>0.133</b>	<b>0.729</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.096</b>	<b>0.004</b>	<b>0.013</b>	<b>0.036</b>	<b>0.156</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

Appendix 9-1. Individual relative organ weights (Main Group)

Sex: Male		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W. (g)	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
G1 0	11001	507.6	2.481	0.263	0.163	0.296	0.676
	11002	514.5	2.632	0.292	0.172	0.378	0.718
	11003	511.2	2.476	0.307	0.151	0.312	0.613
	11004	555.1	2.548	0.285	0.184	0.354	0.652
	11005	448.9	2.643	0.337	0.156	0.358	0.708
	11006	542.9	2.767	0.294	0.164	0.338	0.575
	11007	497.0	2.550	0.291	0.142	0.364	0.699
	11008	607.7	2.481	0.260	0.135	0.359	0.758
	11009	473.2	2.369	0.294	0.130	0.314	0.627
	11010	559.9	2.556	0.310	0.168	0.341	0.641
		<b>Mean</b>	<b>521.8</b>	<b>2.550</b>	<b>0.293</b>	<b>0.157</b>	<b>0.341</b>
	<b>S.D.</b>	<b>46.0</b>	<b>0.111</b>	<b>0.022</b>	<b>0.017</b>	<b>0.026</b>	<b>0.055</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	577.7	2.550	0.290	0.187	0.319	0.663
	12002	513.4	2.613	0.237	0.125	0.368	0.661
	12003	531.6	2.280	0.286	0.165	0.366	0.673
	12004	664.3	2.003	0.249	0.134	0.283	0.512
	12005	515.3	2.936	0.295	0.180	0.403	0.729
	12006	593.3	2.114	0.256	0.145	0.298	0.528
	12007	533.1	2.352	0.285	0.162	0.332	0.588
	12008	517.3	2.502	0.277	0.189	0.344	0.607
	12009	493.7	2.566	0.268	0.134	0.321	0.632
	12010	496.8	2.447	0.300	0.179	0.362	0.624
		<b>Mean</b>	<b>543.7</b>	<b>2.436</b>	<b>0.274</b>	<b>0.160</b>	<b>0.340</b>
	<b>S.D.</b>	<b>53.3</b>	<b>0.266</b>	<b>0.021</b>	<b>0.024</b>	<b>0.036</b>	<b>0.066</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	572.3	2.617	0.307	0.184	0.352	0.677
	13002	545.0	2.372	0.297	0.141	0.328	0.661
	13003	559.4	2.483	0.276	0.161	0.366	0.604
	13004	501.6	2.731	0.300	0.173	0.350	0.743
	13005	592.9	2.336	0.272	0.148	0.326	0.544
	13006	634.3	2.502	0.279	0.166	0.305	0.713
	13007	602.4	2.845	0.274	0.162	0.359	0.631
	13008	572.1	2.523	0.261	0.169	0.304	0.695
	13009	547.3	2.312	0.253	0.155	0.297	0.628
	13010	517.4	2.432	0.299	0.154	0.373	0.623
		<b>Mean</b>	<b>564.5</b>	<b>2.515</b>	<b>0.282</b>	<b>0.161</b>	<b>0.336</b>
	<b>S.D.</b>	<b>39.6</b>	<b>0.173</b>	<b>0.018</b>	<b>0.013</b>	<b>0.028</b>	<b>0.058</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	658.8	2.334	0.261	0.154	0.300	0.625
	14002	620.8	2.316	0.257	0.161	0.281	0.580
	14003	551.6	2.496	0.265	0.133	0.323	0.634
	14004	647.6	2.204	0.278	0.128	0.266	0.524
	14005	544.1	3.080	0.274	0.193	0.392	0.740
	14006	635.4	2.876	0.271	0.142	0.348	0.630
	14007	533.8	2.284	0.266	0.157	0.351	0.648
	14008	567.3	2.550	0.255	0.148	0.397	0.675
	14009	526.8	3.001	0.288	0.175	0.328	0.793
	14010	520.0	2.716	0.299	0.134	0.342	0.740
		<b>Mean</b>	<b>580.6</b>	<b>2.586</b>	<b>0.271</b>	<b>0.153</b>	<b>0.333</b>
	<b>S.D.</b>	<b>54.1</b>	<b>0.316</b>	<b>0.014</b>	<b>0.020</b>	<b>0.043</b>	<b>0.080</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>



## Appendix 9-1. (Continued)

Sex: Male		(g/100 g body weight)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Brain	Pituitary	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	11001	0.355	0.002	0.012	0.681	0.091
	11002	0.452	0.002	0.013	0.716	0.118
	11003	0.453	0.003	0.012	0.645	0.118
	11004	0.421	0.003	0.012	0.577	0.171
	11005	0.460	0.003	0.014	0.804	0.200
	11006	0.421	0.002	0.009	0.715	0.115
	11007	0.464	0.003	0.011	0.618	0.173
	11008	0.372	0.002	0.012	0.633	0.188
	11009	0.486	0.003	0.009	0.741	0.178
	11010	0.421	0.003	0.015	0.592	0.136
		<b>Mean</b>	<b>0.430</b>	<b>0.003</b>	<b>0.012</b>	<b>0.672</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.041</b>	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	<b>0.072</b>	<b>0.038</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	0.439	0.003	0.016	0.611	0.144
	12002	0.400	0.003	0.014	0.662	0.144
	12003	0.429	0.003	0.011	0.632	0.192
	12004	0.353	0.002	0.010	0.626	0.201
	12005	0.485	0.002	0.010	0.748	0.143
	12006	0.407	0.003	0.011	0.505	0.118
	12007	0.407	0.002	0.012	0.654	0.141
	12008	0.422	0.002	0.014	0.690	0.110
	12009	0.431	0.002	0.010	0.668	0.148
	12010	0.481	0.003	0.013	0.761	0.141
		<b>Mean</b>	<b>0.425</b>	<b>0.003</b>	<b>0.012</b>	<b>0.656</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.039</b>	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	<b>0.072</b>	<b>0.028</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	0.418	0.003	0.013	0.655	0.139
	13002	0.396	0.002	0.009	0.616	0.099
	13003	0.423	0.001	0.011	0.704	0.113
	13004	0.433	0.002	0.014	0.665	0.137
	13005	0.354	0.002	0.011	0.616	0.108
	13006	0.348	0.002	0.011	0.524	0.075
	13007	0.368	0.003	0.009	0.553	0.143
	13008	0.393	0.002	0.013	0.609	0.113
	13009	0.394	0.001	0.014	0.609	0.097
	13010	0.426	0.003	0.013	0.642	0.121
		<b>Mean</b>	<b>0.395</b>	<b>0.002</b>	<b>0.012</b>	<b>0.619</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.031</b>	<b>0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>0.052</b>	<b>0.021</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	0.304	0.002	0.012	0.425	0.086
	14002	0.400	0.002	0.011	0.588	0.126
	14003	0.398	0.003	0.011	0.526	0.119
	14004	0.314	0.003	0.013	0.526	0.139
	14005	0.396	0.002	0.014	0.642	0.126
	14006	0.315	0.002	0.011	0.574	0.105
	14007	0.407	0.003	0.014	0.635	0.149
	14008	0.397	0.002	0.013	0.554	0.121
	14009	0.440	0.002	0.010	0.721	0.120
	14010	0.413	0.001	0.011	0.645	0.140
		<b>Mean</b>	<b>0.378</b>	<b>0.002</b>	<b>0.012</b>	<b>0.583</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.048</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.083</b>	<b>0.018</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

## Appendix 9-1. (Continued)

Sex: Female		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W. (g)	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
G1 0	21001	335.9	2.381	0.322	0.140	0.461	0.631
	21002	322.6	2.810	0.307	0.157	0.424	0.760
	21003	356.3	2.388	0.275	0.141	0.433	0.619
	21004	297.7	2.476	0.304	0.159	0.485	0.612
	21005	301.9	2.359	0.299	0.202	0.466	0.628
	21006	291.4	2.455	0.302	0.163	0.492	0.667
	21007	333.0	2.497	0.319	0.165	0.462	0.616
	21008	287.0	2.213	0.295	0.139	0.437	0.555
	21009	329.1	2.356	0.317	0.204	0.423	0.613
	21010	280.1	2.245	0.301	0.172	0.514	0.659
		<b>Mean</b>	<b>313.5</b>	<b>2.418</b>	<b>0.304</b>	<b>0.164</b>	<b>0.460</b>
	<b>S.D.</b>	<b>25.2</b>	<b>0.165</b>	<b>0.014</b>	<b>0.023</b>	<b>0.031</b>	<b>0.053</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	22001	317.3	2.580	0.293	0.191	0.469	0.645
	22002	353.6	2.865	0.298	0.201	0.473	0.663
	22003	305.3	2.524	0.336	0.178	0.514	0.630
	22004	339.3	2.591	0.298	0.135	0.383	0.584
	22005	296.4	2.422	0.289	0.176	0.502	0.694
	22006	321.7	2.469	0.312	0.199	0.426	0.585
	22007	292.0	2.455	0.335	0.200	0.462	0.571
	22008	315.2	2.490	0.290	0.137	0.376	0.622
	22009	287.3	2.417	0.299	0.151	0.483	0.628
	22010	267.7	2.368	0.329	0.127	0.434	0.570
		<b>Mean</b>	<b>309.6</b>	<b>2.518</b>	<b>0.308</b>	<b>0.170</b>	<b>0.452</b>
	<b>S.D.</b>	<b>25.4</b>	<b>0.141</b>	<b>0.019</b>	<b>0.029</b>	<b>0.047</b>	<b>0.042</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	23001	338.1	2.658	0.294	0.156	0.428	0.664
	23002	307.7	2.721	0.312	0.164	0.461	0.649
	23003	310.3	3.147	0.315	0.232	0.499	0.777
	23004	320.8	2.505	0.307	0.170	0.437	0.593
	23005	327.8	2.759	0.302	0.204	0.458	0.675
	23006	341.5	2.678	0.280	0.143	0.411	0.606
	23007	362.0	2.852	0.286	0.175	0.371	0.618
	23008	359.0	2.794	0.348	0.172	0.453	0.608
	23009	329.9	2.749	0.275	0.164	0.559	0.624
	23010	291.1	2.638	0.286	0.160	0.468	0.606
		<b>Mean</b>	<b>328.8</b>	<b>2.750</b>	<b>0.301</b>	<b>0.174</b>	<b>0.454</b>
	<b>S.D.</b>	<b>22.5</b>	<b>0.169</b>	<b>0.022</b>	<b>0.026</b>	<b>0.051</b>	<b>0.055</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	326.8	2.521	0.348	0.188	0.424	0.587
	24002	390.7	2.662	0.265	0.126	0.531	0.620
	24003	304.7	2.564	0.306	0.155	0.446	0.646
	24004	338.0	2.413	0.307	0.150	0.409	0.601
	24005	355.4	2.832	0.301	0.200	0.491	0.639
	24006	305.1	2.773	0.280	0.168	0.424	0.661
	24007	339.0	1.983	0.257	0.127	0.395	0.569
	24008	336.5	2.429	0.271	0.199	0.375	0.606
	24009	269.7	3.210	0.334	0.178	0.643	0.813
	24010	317.0	3.476	0.320	0.192	0.442	0.750
		<b>Mean</b>	<b>328.3</b>	<b>2.686</b>	<b>0.299</b>	<b>0.168</b>	<b>0.458</b>
	<b>S.D.</b>	<b>32.6</b>	<b>0.422</b>	<b>0.030</b>	<b>0.028</b>	<b>0.079</b>	<b>0.077</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

## Appendix 9-1. (Continued)

Sex: Female		(g/100 g body weight)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Brain	Pituitary	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	21001	0.596	0.006	0.030	0.026	0.172
	21002	0.679	0.006	0.028	0.026	0.197
	21003	0.538	0.005	0.028	0.037	0.115
	21004	0.741	0.006	0.028	0.035	0.206
	21005	0.711	0.005	0.025	0.036	0.182
	21006	0.692	0.008	0.030	0.064	0.330
	21007	0.686	0.006	0.026	0.025	0.156
	21008	0.659	0.005	0.021	0.029	0.187
	21009	0.603	0.006	0.019	0.030	0.178
	21010	0.717	0.006	0.029	0.046	0.368
		<b>Mean</b>	<b>0.662</b>	<b>0.006</b>	<b>0.026</b>	<b>0.035</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.064</b>	<b>0.001</b>	<b>0.004</b>	<b>0.012</b>	<b>0.078</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	22001	0.663	0.006	0.025	0.036	0.394
	22002	0.568	0.001	0.023	0.040	0.143
	22003	0.694	0.007	0.026	0.061	0.208
	22004	0.576	0.006	0.021	0.032	0.180
	22005	0.656	0.005	0.026	0.049	0.157
	22006	0.619	0.003	0.020	0.025	0.234
	22007	0.745	0.005	0.022	0.030	0.289
	22008	0.634	0.008	0.022	0.032	0.250
	22009	0.729	0.006	0.027	0.049	0.407
	22010	0.764	0.006	0.024	0.031	0.194
		<b>Mean</b>	<b>0.665</b>	<b>0.005</b>	<b>0.024</b>	<b>0.038</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.068</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>0.011</b>	<b>0.092</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	23001	0.609	0.006	0.025	0.030	0.258
	23002	0.734	0.005	0.023	0.036	0.213
	23003	0.683	0.008	0.024	0.042	0.267
	23004	0.626	0.005	0.026	0.037	0.432
	23005	0.674	0.006	0.021	0.031	0.192
	23006	0.598	0.004	0.018	0.054	0.203
	23007	0.567	0.003	0.022	0.042	0.249
	23008	0.612	0.006	0.020	0.033	0.428
	23009	0.569	0.006	0.031	0.058	0.193
	23010	0.692	0.006	0.028	0.024	0.255
		<b>Mean</b>	<b>0.636</b>	<b>0.006</b>	<b>0.024</b>	<b>0.039</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.056</b>	<b>0.001</b>	<b>0.004</b>	<b>0.011</b>	<b>0.089</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	0.637	0.007	0.023	0.039	0.177
	24002	0.543	0.007	0.031	0.044	0.187
	24003	0.639	0.007	0.028	0.033	0.338
	24004	0.616	0.006	0.024	0.031	0.375
	24005	0.607	0.006	0.025	0.055	0.142
	24006	0.662	0.005	0.027	0.034	0.243
	24007	0.626	0.006	0.018	0.025	0.194
	24008	0.580	0.006	0.026	0.035	0.182
	24009	0.788	0.007	0.032	0.069	0.305
	24010	0.653	0.008	0.031	0.022	0.253
		<b>Mean</b>	<b>0.635</b>	<b>0.006</b>	<b>0.026</b>	<b>0.039</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.064</b>	<b>0.001</b>	<b>0.004</b>	<b>0.014</b>	<b>0.078</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 9-2. Individual relative organ weights (Recovery Group)

Sex: Male		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W. (g)	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
G1 0	11011	532.9	3.3381	0.2509	0.1622	0.2639	0.6801
	11012	527.6	2.5309	0.2584	0.1234	0.3263	0.6027
	11013	528.2	2.7857	0.2682	0.1601	0.2730	0.6632
	11014	559.4	2.6526	0.2844	0.1850	0.4274	0.5981
	11015	643.2	2.6335	0.2576	0.1977	0.3349	0.6030
	<b>Mean</b>	<b>558.3</b>	<b>2.7882</b>	<b>0.2639</b>	<b>0.1657</b>	<b>0.3251</b>	<b>0.6294</b>
	<b>S.D.</b>	<b>49.3</b>	<b>0.3205</b>	<b>0.0130</b>	<b>0.0284</b>	<b>0.0652</b>	<b>0.0391</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	352.3	2.6075	0.2793	0.1396	0.3817	0.6229
	14012	285.5	2.3720	0.3070	0.1512	0.3348	0.6136
	14013	367.6	2.3314	0.2953	0.1662	0.3317	0.6762
	14014	304.7	2.2976	0.2562	0.1464	0.3676	0.5362
	14015	372.0	2.6741	0.2834	0.1837	0.3418	0.6907
	<b>Mean</b>	<b>336.4</b>	<b>2.4565</b>	<b>0.2842</b>	<b>0.1574</b>	<b>0.3516</b>	<b>0.6279</b>
	<b>S.D.</b>	<b>39.0</b>	<b>0.1719</b>	<b>0.0191</b>	<b>0.0176</b>	<b>0.0220</b>	<b>0.0611</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Brain	Pituitary	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	11011	0.3322	0.0008	0.0081	0.5197	0.1713
	11012	0.3962	0.0026	0.0094	0.6304	0.0923
	11013	0.4292	0.0027	0.0135	0.7325	0.1377
	11014	0.4061	0.0024	0.0107	0.6611	0.1267
	11015	0.4057	0.0032	0.0112	0.6737	0.0887
	<b>Mean</b>	<b>0.3939</b>	<b>0.0023</b>	<b>0.0106</b>	<b>0.6435</b>	<b>0.1233</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0366</b>	<b>0.0009</b>	<b>0.0020</b>	<b>0.0785</b>	<b>0.0342</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	0.3737	0.0022	0.0074	0.5489	0.0920
	14012	0.4514	0.0019	0.0093	0.7138	0.1397
	14013	0.4327	0.0030	0.0141	0.6881	0.2040
	14014	0.3701	0.0025	0.0088	0.5807	0.1525
	14015	0.3691	0.0022	0.0098	0.5653	0.1179
	<b>Mean</b>	<b>0.3994</b>	<b>0.0024</b>	<b>0.0099</b>	<b>0.6193</b>	<b>0.1412</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0395</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0025</b>	<b>0.0759</b>	<b>0.0420</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

## Appendix 9-2. (Continued)

Sex: Female		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W. (g)	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
G1 0	21011	307.6	2.6005	0.3134	0.1541	0.4921	0.6350
	21012	312.0	2.6143	0.3024	0.1752	0.4838	0.5995
	21013	255.2	2.3637	0.3262	0.1371	0.4722	0.6439
	21014	306.5	2.5453	0.0295	0.0150	0.4722	0.7044
	21015	365.1	2.3648	0.2897	0.2154	0.5153	0.7221
	<b>Mean</b>	<b>309.3</b>	<b>2.4977</b>	<b>0.2523</b>	<b>0.1394</b>	<b>0.4871</b>	<b>0.6610</b>
	<b>S.D.</b>	<b>38.9</b>	<b>0.1245</b>	<b>0.1253</b>	<b>0.0754</b>	<b>0.0178</b>	<b>0.0509</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
G4 5,000	24011	352.3	2.2439	0.2964	0.1694	0.5550	0.5674
	24012	285.5	2.3115	0.2799	0.1714	0.5409	0.5829
	24013	367.6	2.8268	0.3102	0.1640	0.4274	0.5984
	24014	304.7	2.3434	0.2935	0.1526	0.5164	0.5644
	24015	372.0	2.5228	0.2858	0.1664	0.4453	0.6024
	<b>Mean</b>	<b>336.4</b>	<b>2.4497</b>	<b>0.2932</b>	<b>0.1647</b>	<b>0.4970</b>	<b>0.5831</b>
	<b>S.D.</b>	<b>39.0</b>	<b>0.2347</b>	<b>0.0115</b>	<b>0.0074</b>	<b>0.0574</b>	<b>0.0173</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Brain	Pituitary	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	21011	0.6600	0.0043	0.0233	0.0256	0.1981
	21012	0.6721	0.0069	0.0219	0.0441	0.2484
	21013	0.6195	0.0048	0.0279	0.0263	0.2174
	21014	0.7393	0.0052	0.0226	0.0479	0.2225
	21015	0.6940	0.0065	0.0313	0.0353	0.2334
	<b>Mean</b>	<b>0.6770</b>	<b>0.0055</b>	<b>0.0254</b>	<b>0.0359</b>	<b>0.2240</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0441</b>	<b>0.0011</b>	<b>0.0040</b>	<b>0.0101</b>	<b>0.0187</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
G4 5,000	24011	0.6286	0.0051	0.0205	0.0428	0.2424
	24012	0.6696	0.0062	0.0254	0.0547	0.2089
	24013	0.7394	0.0057	0.0205	0.0266	0.3042
	24014	0.6094	0.0072	0.0257	0.0422	0.1371
	24015	0.5635	0.0064	0.0215	0.0369	0.2446
	<b>Mean</b>	<b>0.6421</b>	<b>0.0061</b>	<b>0.0227</b>	<b>0.0406</b>	<b>0.2274</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0664</b>	<b>0.0008</b>	<b>0.0026</b>	<b>0.0102</b>	<b>0.0611</b>
	<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

Appendix 10-1. Individual necropsy findings (Main Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Observation	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	11001	All	Unremarkable	S	92
	11002	All	Unremarkable	S	92
	11003	All	Unremarkable	S	92
	11004	All	Unremarkable	S	92
	11005	All	Unremarkable	S	92
	11006	All	Unremarkable	S	92
	11007	All	Unremarkable	S	92
	11008	All	Unremarkable	S	92
	11009	All	Unremarkable	S	92
	11010	All	Unremarkable	S	92
G2 1,250	12001	All	Unremarkable	S	92
	12002	All	Unremarkable	S	92
	12003	All	Unremarkable	S	92
	12004	All	Unremarkable	S	92
	12005	All	Unremarkable	S	92
	12006	All	Unremarkable	S	92
	12007	All	Unremarkable	S	92
	12008	All	Unremarkable	S	92
	12009	All	Unremarkable	S	92
	12010	All	Unremarkable	S	92
G3 2,500	13001	All	Unremarkable	S	92
	13002	All	Unremarkable	S	92
	13003	All	Unremarkable	S	92
	13004	All	Unremarkable	S	92
	13005	All	Unremarkable	S	92
	13006	All	Unremarkable	S	92
	13007	All	Unremarkable	S	92
	13008	All	Unremarkable	S	92
	13009	All	Unremarkable	S	92
	13010	All	Unremarkable	S	92
G4 5,000	14001	All	Unremarkable	S	92
	14002	All	Unremarkable	S	92
	14003	All	Unremarkable	S	92
	14004	All	Unremarkable	S	92
	14005	All	Unremarkable	S	92
	14006	All	Unremarkable	S	92
	14007	All	Unremarkable	S	92
	14008	All	Unremarkable	S	92
	14009	All	Unremarkable	S	92
	14010	All	Unremarkable	S	92

S: scheduled

## Appendix 10-1. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Observation	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	21001	All	Unremarkable	S	92
	21002	All	Unremarkable	S	92
	21003	All	Unremarkable	S	92
	21004	All	Unremarkable	S	92
	21005	All	Unremarkable	S	92
	21006	All	Unremarkable	S	92
	21007	All	Unremarkable	S	92
	21008	All	Unremarkable	S	92
	21009	All	Unremarkable	S	92
	21010	All	Unremarkable	S	92
G2 1,250	22001	All	Unremarkable	S	92
	22002	All	Unremarkable	S	92
	22003	All	Unremarkable	S	92
	22004	All	Unremarkable	S	92
	22005	All	Unremarkable	S	92
	22006	All	Unremarkable	S	92
	22007	All	Unremarkable	S	92
	22008	All	Unremarkable	S	92
	22009	All	Unremarkable	S	92
	22010	All	Unremarkable	S	92
G3 2,500	23001	All	Unremarkable	S	92
	23002	All	Unremarkable	S	92
	23003	All	Unremarkable	S	92
	23004	All	Unremarkable	S	92
	23005	All	Unremarkable	S	92
	23006	All	Unremarkable	S	92
	23007	All	Unremarkable	S	92
	23008	All	Unremarkable	S	92
	23009	All	Unremarkable	S	92
	23010	All	Unremarkable	S	92
G4 5,000	24001	All	Unremarkable	S	92
	24002	All	Unremarkable	S	92
	24003	All	Unremarkable	S	92
	24004	All	Unremarkable	S	92
	24005	All	Unremarkable	S	92
	24006	All	Unremarkable	S	92
	24007	All	Unremarkable	S	92
	24008	All	Unremarkable	S	92
	24009	All	Unremarkable	S	92
	24010	All	Unremarkable	S	92

S: scheduled

Appendix 10-2. Individual necropsy findings (Recovery Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Observation	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	11011	All	Unremarkable	S	120
	11012	All	Unremarkable	S	120
	11013	All	Unremarkable	S	120
	11014	All	Unremarkable	S	120
	11015	All	Unremarkable	S	120
G4 5,000	14011	All	Unremarkable	S	120
	14012	All	Unremarkable	S	120
	14013	All	Unremarkable	S	120
	14014	All	Unremarkable	S	120
	14015	All	Unremarkable	S	120

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Observation	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	21011	All	Unremarkable	S	120
	21012	All	Unremarkable	S	120
	21013	All	Unremarkable	S	120
	21014	All	Unremarkable	S	120
	21015	All	Unremarkable	S	120
G4 5,000	24011	All	Unremarkable	S	120
	24012	All	Unremarkable	S	120
	24013	All	Unremarkable	S	120
	24014	All	Unremarkable	S	120
	24015	All	Unremarkable	S	120

S: scheduled U : unscheduled



## 11) 인체적용시험

### CLINICAL STUDY REPORT

인체적용시험 제목 (Study Title)	경증 간 기능 저하 대상자에서 초음파처리 인삼꽃대 추출물(UGFB)의 간기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험용의약품 (Investigational Product)	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시험군: 초음파처리 인삼꽃대 추출물(UGFB) 하루 2 그램</li> <li>■ 위약군: 대조제품(위약)</li> </ul>
인체적용시험 디자인 (Study Design)	단일기관, 무작위 배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험 책임자 (Principal Investigator)	세명대학교 부속 제천한방병원 교수
인체적용시험 공동연구자 (Co/Sub Investigator)	세명대학교 부속 제천한방병원 전문수련의
인체적용시험 실시기관	세명대학교 부속 제천한방병원, 충청북도 제천시 세명로 66
의뢰자 (Name of Sponsor)	고연(高研) 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112
의뢰자의 담당자 (Contact at Sponsor)	고연(高研)
IRB 승인일 (IRB Approval Date)	2016년 06월 07일
인체적용시험 시작일 (Study Initiation Date)	2016년 10월 17일(First Subject Screened)
인체적용시험 종료일 (Study Completion Date)	2017년 07월 13일(Last Subject Last Visit)

❖ 요약

인 체 적 용 시 험 명	경증 간 기능 저하 대상자에서 초음파처리 인삼꽃대 추출물(UGFB)의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인 체 적 용 시 험 책 임 자	세명대학교 부속 제천한방병원 교수
인 체 적 용 시 험 실 시 기 관	세명대학교 부속 제천한방병원, 충청북도 제천시 세명로 66
인체적용시험의 목적	경증 간 기능 저하 대상자에서 초음파처리 인삼꽃대 추출물(UGFB)을 복용한 후 간 기능 개선효과 등의 기능성 및 안전성을 평가하고자 하였다.
시 험 설 계	단일기관, 무작위 배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
대 상 자 수	총 60 예(2군, 최종 평가가능 예수 군당 24 예, 20% 내외 탈락률 고려 시)
연 구 대 상	만 19 세 이상 만 70 세 미만의 건강한 성인으로 생화학적 소견상 경증의 간기능 저하 대상자
선 정 기 준	<b>선정기준</b> (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 하였다) 1) 만 19세 이상 만 70세 미만의 건강한 성인 남녀 2) 2주 이상 AST 수치가 25 IU/L 이상인 자 3) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 들은 후 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 대상자
제 외 기 준	<b>제외기준</b> (다음 조건에 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없었다) 1) 인삼 류나 천연물에 과민증 또는 그 병력이 있는 대상자 2) 3개월 이내 간 기능 관련 약물, 건강기능식품을 복용 중인 대상자 3) 간염보균자 급성간염환자 및 간경화의 징후가 인정되거나 지방간으로 진단되어 약물 등 치료중인 대상자 4) 황달, 담석 등 담도계 질환자 또는 심한 간 기능 장애(ALT, AST 중 정상 상한치의 3배 이상)이거나 특정 질환, 약물, 간염 및 간경화에 의한 간 기능 장애 대상자 5) 조절되지 않는 고혈압(sitSBP > 140mmHg 또는 sitDBP >90mmHg)이거나 조절되지 않는 당뇨(HbA1c ≥ 9%) 환자 6) 스크리닝 1년 이내에 임상적으로 유의한 신경계 질환(뇌졸중 등), 심혈관 질환(허혈성 심질환 및 심부전 등의 심장질환, 항응고제 복용 및 혈소판 또는 혈액응고인자 이상 등의 혈액학적 이상), 호흡기 질환 (만성 폐쇄성 폐질환, 폐렴, 폐결핵 등의 감염성 폐질환 등)의 병력이 있는 자 7) 스크리닝 6개월 이내의 위장관의 출혈이 있거나 소화성 궤양, 염증성 장 질환(크론병 또는 궤양성 장염 등)의 병력이 있는 자 8) 주요 위장관 수술의 병력이 있는 자(충수절제술을 제외한 위절제, 위장관 우회술 또는 문합술 등) 9) 스크리닝 5년 내 암 진단 및 치료 받은 적이 있거나 치료 중인 대상자 10) 울혈성 신부전 및 심한 신기능 장애(serum creatinine > 2.0 mg/dl)가 있는 대상자 11) 신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는

	<p>대상자 (우울증, 정신분열증, 간질, 약물중독, 거식증, 이상식욕항진 등)</p> <p>12) 인체적용시험 중 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물(해열진통제 및 비스테로이드성 소염진통제, 항결핵제, 항생제나 항전간제)을 지속적으로 복용해야 하는 자 (상세내용은 7.2. 병용약물의 허용 및 금기약물/식품을 참고한다.)</p> <p>13) 최근 4주 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제, 또는 식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물이나 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있거나 기타 임상시험에 참여한 경험이 있는 대상자</p> <p>14) 임신부, 수유부 및 가임여성으로 참여기간 동안 임신 및 수유의 계획이 있는 대상자</p> <p>15) 연구자 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 대상자</p>
시 험 제 품	시험군: UGFB(인삼 꽃대 추출물)
대 조 제 품	대조제품(위약)
투 여 방 법 및 투 여 기 간	아침, 저녁 총 2회 식사 직전에 3정씩 하루 6정을(하루 인삼 꽃대 추출물 4,200mg) 복용(12주)
시 험 기 간	IRB 최초 승인일로부터 12개월
평 가 방 법	<p><b>유효성 (efficacy)</b></p> <p>① 1차 유효성 평가 (Primary endpoint):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- AST 수치의 감소치</li> </ul> <p>② 2차 유효성 평가 (Secondary endpoint):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ALT 수치의 감소치 및 개선율</li> <li>- AST 수치의 개선율</li> <li>- TG 수치의 감소치 및 개선율</li> <li>- <math>\gamma</math>-GT 수치의 감소치 및 개선율</li> <li>- Lipid profiles의 감소치 및 개선율</li> </ul> <p><b>안전성 (safety)</b></p> <p>인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 중, 복용 12주 후에 실험실적 검사 및 활력징후 측정, 이학적 검사를 실시하였고 연구기간 내내 이상반응을 평가하였다.</p>
병 용 금 기 약 물	<p>인체적용시험 종료 시까지 금지되며, 다음 약물을 복용하는 대상자는 인체적용시험에서 제외되어야 했다.</p> <p>1. 마약성 및 비마약성 소염/진통제 (단, aspirin은 1일 최대 투여량 300mg까지 허용, 또한 일과성 치료를 목적으로 한 소염/진통제는 7일 이내의 간헐적 투여가 가능하나 시험 방문 전 3일 내의 투여는 금지.)</p> <p>① 마약성 진통제 Codeine phosphate, Tramadol hydrochloride 등</p> <p>② 경구용 소염/진통제: Salicylates류(aspirin), Acetaminophen, 경구용 NSAIDs(Naproxen,</p>

	<p>Ibuprofen), COX-2 억제제(Celecoxib, Aceclofenac)</p> <p>③ 국소용 소염/진통제 국소용 NSAIDs(Diclofenac sodium), 패치제를 포함한 기타 국소용제 (Capsaicin)</p> <p>2. 경구 및 주사제를 포함한 스테로이드제제 Prednisolone, methylprednisolone, dexamethasone, hydrocortisone, betamethasone 등</p> <p>3. 간 건강에 도움을 주는 건강기능식품 밀크씨슬(카르두스마리아누스)추출물, 표고버섯균사체추출물, 표고버섯균사체, 도라지추출물, 강황 추출물, 브로콜리 스프라우트 분말, 유산균발효다시마추출물, 복분자 추출분말, 발효율금, 헛개나무과병 추출물 성분을 포함한 간 기능 개선 건강기능식품 및 제품</p> <p>4. 호르몬 제제 성장 호르몬제제, 테스토스테론, 호르몬 대체 요법(hormone replacement therapy), 에스트로겐, 프로게스테론 제제, 갑상선호르몬 제제 등(단, 연구자 의 판단에 따라 인체적용시험 참여 이전 3개월 전부터 안정된 용량으로 복용하고 있으며, 인체적용시험 동안 용량 및 용법이 변경될 가능성이 없는 경우는 허용)</p> <p>5. Antineoplastic 제제 Methotrexate, Tamoxifen 등 모든 antineoplastic 제제</p> <p>6. 항우울제, 항정신성 의약품</p> <p>① 항우울제 삼환계 항우울제(Imipramine, Amitriptyline), MAO 억제약(phenelzine), SSRIs(Fluoxetine, Escitalopram), Trazodone 등</p> <p>② 항정신성 의약품 Chlorpromazine, Thioridazine, Haloperidol, Clozapine, Olanzapine, Risperidone, Quetiapine 등</p> <p>7. 기타 간 기능 개선, 지방간 개선, 간 보호 등을 목적으로 하는 약물, 한방 치료(침, 부항, 뜸) 등</p> <p>8. 이외의 연구자 판단에 따른 약물의 흡수, 대사 또는 배설에 영향을 줄 수 있는 약물</p>
<p>결 과</p>	<p>본 인체적용시험은 단일기관, 무작위 배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험으로 만 19세 이상 만 70세 미만의 건강한 성인 남녀에서 2주 이상 AST 수치가 25 IU/L 이상인 경증 간 기능 저하 대상자에서 12주 동안 초음파 처리 인삼꽃대 추출물(UGFB) 하루 2그램을 복용한 후 간 기능 개선효과 등의 기능성 및 안전성을 평가하고자 하였다.</p> <p>기능성 평가 결과, 일차변수는 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 12주 후 AST 수치의 감소치이며, 위약에 비해 시험식품이 우월한지를 입증하고자 하였다. 인체적용시험용 식품 복용 전 AST 수치는 시험군의 경우 <math>34.97 \pm 12.38</math>, 대조군의 경우 <math>33.86 \pm 10.32</math>로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 AST 수치는 시험군의 경우 <math>37.17 \pm 19.45</math>, 대조군의 경우 <math>35.52 \pm 19.74</math>로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 각 군 내 AST 수치 감소치도 통계적으로</p>

유의한 차이가 없었다. 시험 식품이 대조식품에 비하여 우월함을 입증하기 어려웠다.

안전성 분석결과, 이상반응은 대조군에서 1명 (3.45%)의 대상자에게 총 1건이 발생하였으나 이상반응 발현에 대한 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았고 대조군에서 발생한 이상반응은 예측된 이상반응으로 경증이었으며 후유증 없이 회복되었다. 활력징후에서는 시험군의 군 내 비교에서 이완기 체온이 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 군 내 비교에서 수축기 혈압이 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 정상적인 범위 이내에서의 변화로 임상적인 의미를 두기 어려웠다. 혈액학 검사 결과 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다. 혈액화학 검사에서는 LDL cholesterol 시험군과 대조군의 군 내 비교에서 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 그 외에 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 혈액화학 항목은 없었다. 소변 검사 결과도 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다. 혈액학, 혈액화학, 소변 검사의 정상/비정상 결과는 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다.

인삼꽃대의 경우 항산화, 항백혈병, 위장보호 작용 등 생리활성이 확인되었고 다양한 ginsenoside를 함유하고 있어 알코올성 지방간에 대한 연구를 선행하였으며 이를 확인하고자 인체시험을 계획하였다. 19세 이상 만 70세 미만의 건강한 성인 남녀에서 2주 이상 AST 수치가 25 IU/L 이상인 경증 간 기능 저하 대상자에서 12주 동안 복용하게 한 후 간기능과 관련된 다양한 검사를 수행하였으나 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 결과를 얻지 못하였다. 대상자수가 적으나 AST수치가 일시적 상승이 아닌 2주 이상 유지된 대상자에서 12주간 수행한 결과로 일관적인 기능성 자료를 보여주지 못하였으나 12주간 복용하여도 이상반응 등 안전성에는 아무런 문제가 없어 안전한 식품으로 판단된다.

❖ 약어 및 용어 정의

약어 및 용어	정 의
시험의뢰자	고연(高研)
시험군	UGFB (초음파처리 인삼꽃대 추출물)
대조군	Placebo (대조제품)
실험실적 검사	혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 소변검사
활력징후	체온, 혈액, 맥박수 등
ADR	Adverse Drug Reaction
AE	Adverse Events
ALT (SGPT)	Alanine Aminotransferase: GPT
ALP	Alkaline Phosphatase
AST (SGOT)	Aspartate Aminotransferase: GOT
BUN	Blood Urea Nitrogen
CRA	Clinical Research Associate (임상시험 모니터 요원)
CRF	Case Report Form
CRO	Contract Research Organization
DBP	Diastolic Blood Pressure (이완기 혈압)
FAS	Full Analysis Set
Hb	Hemoglobin
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
Hct	Hematocrit
HDL Cholesterol	High Density Lipoprotein Cholesterol
IRB	Institutional Review Board (임상시험심사위원회)
ITT	Intention To Treat
KGCP	Korean Good Clinical Practice
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
LDL Cholesterol	Low Density Lipoprotein Cholesterol
PP	Per Protocol
RBC	Red Blood Cell
γ-GT	Gamma-glutamyltransferase
TG	Triglyceride
Wash-out Period	약물투여 중지기간
WBC	White Blood Cell

❖ 윤리적인 고려(Ethics)

1. 인체적용시험관리기준(KGCP, ICH E6)

본 계획서에 규정된 절차는 고연(高研) 및 시험책임자 또는 담당자가 이 시험을 실시, 평가하고 결과를 기록하는데 있어서 의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표4 의약품 임상시험 관리기준(개정 2016.10.28, 이하 KGCP) 및 헬싱키선언의 근본정신을 준수하여 수행하였다.

2. 인체적용시험심사위원회 (IRB) 승인

연구자는 인체적용시험심사위원회로부터 인체적용시험에 대한 심사, 승인을 얻을 책임이 있었다. KGCP에 따라 연구자는 최초 허가된 계획서의 모든 중요한 변경에 대해 인체적용시험심사위원회의 승인을 받은 후 진행하였다.

IRB 심의	신청일	승인일	변경사유
초기심의	2016-05-16	2016-06-07	-
1차 변경	2016-06-20	2016-06-27	Protocol V1.1로 변경
2차 변경	2016-09-10	2016-09-22	Protocol V1.1, ICF V1.1, CRF V1.1로 변경
3차 변경	2016-10-04	2016-10-14	Protocol V2.0, CRF V1.2로 변경
위반/이탈	2016-12-07	2016-12-29	이탈: 실험실적 검사 시행 누락 위반: 금기약물 복용
4차 변경	2016-12-30	2017-01-03	ICF V1.2로 변경
SAE보고	2017-02-01		교통사고로 인한 염좌로 본원 입원함. 증상 회복 및 제품과 명백하게 관련 없는 것으로 연구자 판단함.
중간보고	2017-05-15	2017-06-08	-
위반/이탈	신청 중		이탈: 대상자 Visit Window Period 위반 위반: 선정제외기준 위반
종료보고	신청 중		-

3. 인체적용시험의 윤리적 수행 (Ethical Conduct of the Study)

본 인체적용시험은 1964년에 제정된 헬싱키 선언과 이후 개정된 1975년 Tokyo(Japan), 1983년 Venice(Italy), 1989년 Hong Kong, 1996년 Somerset West(Republic of South Africa), 2000년 Edinburgh(Scotland), 2002년 Washington, DC(USA), 2004년 Tokyo, 2008년 Seoul(Korea), 2013년 Fortaleza(Brazil)의 헬싱키 선언의 원리에 입각한 윤리적 원칙에 따라 수행되었다.

4. 대상자 동의 (Patient Information and Consent)

대상자에게 인체적용시험에 참여하기 전 연구자는 본 시험의 원리와 목적, 잠재적인 위험성에 대해 IRB 에서 승인 받은 동의 설명문에 근거한 정보를 제공 하였다. 대상자 또는 법정 대리인이 동의서에 서명을 함으로써 인체적용시험 참여에 대한 동의가 이루어졌고, 서명한 동의서의 사본 1부는 대상자 본인에게 배부하였다.

5. 모니터링 (Monitoring)

인체적용시험이 KGCP기준에 따라 그리고 인체적용시험계획서에 따라 실시되는지의 여부를 확인하기 위해서 의뢰자인 고연(高研)의 의뢰를 받아 인체적용시험대행 CRO인 (주)파마크로(PharmaCRO)에 의하여 모니터링이 실시되었다. 본 시험의 모니터링 시에는 증례기록이 명확하고 완전한지 확인 및 기록원부와의 대조검토(Source Document Verification, SDV)가 수행되었고 시험책임자 또는 담당자는 어느 때든지 모니터에게 협조 하였다.

❖ 시험기관 및 시험자

1. 인체적용시험 책임자 (Principal Investigator)

인체적용시험의 직명	소 속	성 명	직 명
시험책임자	세명대학교 부속 제천한방병원		교수

2. 시험 담당자 (Co-investigator / Sub-investigator)

인체적용시험의 직명	소 속	성 명	직 명
시험책임자	세명대학교 부속 제천한방병원		전문수련의

3. 인체적용시험용 의약품 관리약사 (Clinical Pharmacist)

인체적용시험의 직명	소 속	성 명	직 명
관리 약사	세명대학교 부속 제천한방병원		한약사

4. 모니터 요원 (Monitors)

(주)파마크로(PharmaCRO), [www.PharmaCRO.co.kr](http://www.PharmaCRO.co.kr)

서울특별시 서초구 서초동 강남대로 275 강남메인타워 11F

: 전화 02) 529- 1310, 1410 팩스 02) 521-1180



## 1. 서론 (INTRODUCTION)

인삼의 사포닌 성분은 간세포의 단백질 합성과 간세포의 재생을 촉진하는 작용이 있다. 사포닌 성분은 실험적으로 여러 가지 간 독성물질로 야기되는 간세포의 괴사 등 조직학적 병변을 경감시키고 간의 독성대사에 관여하는 효소(Epoxide hydratase, glutathione transferase, epoxide hydroxylase)를 활성화시켜 간장장애를 개선, 예방하는 효과가 있다. 한양대 의대 구국희 교수는 바이러스 B형 간염환자를 대상으로 한 임상시험에서 인삼투여가 식욕, 소화상태, 두통, 오심, 구토 등의 자각증상의 개선효과 및 급성간염의 조기회복 촉진과 만성화 예방에 도움을 준다고 보고하였다. 일본 Nissei 병원 Yammamoto 박사는 만성간염(바이러스 C형)환자에 대해서도 인삼 투여가 간기능의 생화학적 지표개선에 유용성이 있고, 한방제제인 소시호탕과 병용 시 보다 개선효과가 촉진되었다고 보고하였다. 또한, 인삼사포닌 성분은 알코올 대사에 관여하는 알코올 분해효소(alcohol dehydrogenase), 아세트알데하이드 분해효소(acetaldehyde dehydrogenase)의 활성을 증가시켜 알코올 섭취로 야기되는 유해한 작용을 경감시켜 알코올 독성에 예방적 효과를 나타낸다. 실제로 사람을 대상으로 한 실험에서도 술을 마신 후 40분이 경과하였을 때 혈중 알코올 농도가 술만 마신 사람(0.18%)에 비하여 인삼엑기스와 술을 함께 마신 경우(0.11%)가 훨씬 낮다는 사실이 입증되었다.

인삼꽃대에는 항산화, 항백혈병, 위장보호 작용 등 생리활성이 확인되었고, ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2 뿐만 아니라, floralginsenosides Ka, Kb, Kc, vinaginsenoside R, majoroside F, ginsenoside I, II, III, floralginsenosides Ta, Tb, Tc, Td, floralginsenosides A, B, C, D, E, F, floralginsenosides M, N, O, P 등의 성분이 분리 보고되었다. 또한, ginsenoside Re 가 약 3.388%의 높은 농도로 존재하는 것을 본 연구팀이 확인하였고 인삼꽃대의 ginsenoside Re 는 물리화학적 가공에 의해서 ginsenoside Rg2 등 활성 사포닌으로 전환될 수 있으며, ginsenoside Rg2, Rh1, F4 등 기능성 성분 강화 조성물을 초음파 처리를 이용하여 개발하였다.

인삼꽃대의 알코올성 지방간에 대한 연구를 선행 하였으며, 이와 같은 예비연구 결과를 바탕으로 인삼꽃대를 이용한 간 기능 개선 건강기능식품을 개발하고자 하였다.

## 2. 인체적용시험의 목적 (STUDY OBJECTIVE)

본 시험의 주 목적은 경증 간 기능 저하 대상자에게 12주간 시험제품인 UGFB을 아침, 저녁 식사 직전에 3정씩 1일 2회, 총 6정(하루 2그램)을 복용하였을 때, 간 기능 개선 등의 기능성을 평가하려는 것이었다.

두 번째 목적은 활력징후, 이학적 검사, 임상실험실적 수치들에 대한 영향, 이상반응의 측면에서의 UGFB의 안전성을 평가하려는 것이었다.

## 3. 인체적용시험의 계획 (INVESTIGATIONAL PLAN)

### 3.1. 종합적인 시험의 고안 및 계획

본 연구는 경증 간 기능 저하 대상자에서 “UGFB”의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험으로 설계되었다. 무작위 배정 후 UGFB(인삼꽃대 추출물) 또는 대조제품(위약)을 아침, 저녁 식사 3정씩 1일 2회, 총 12주간 60 명에게 복용하고 나서 “UGFB”의 간 기능 개선 효과관련 기능성 및 안전성을 연구하기 위한 인체 적용시험이었다.

### 3.2. 시험대상자 (STUDY SUBJECTS)

#### 3.2.1. 선정기준

시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 했다.

- 1) 만 19세 이상 만 70세 미만의 건강한 성인 남녀
- 2) 2주 이상 AST 수치가 25 IU/L 이상인 자
- 3) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 대상자

#### 3.2.2. 제외기준

다음 조건의 어느 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없었다.

- 1) 인삼 류나 천연물에 과민증 또는 그 병력이 있는 대상자
- 2) 3개월 이내 간 기능 관련 약물, 건강기능식품을 복용 중인 대상자
- 3) 간염보균자 급성간염환자 및 간경화의 징후가 인정되거나 지방간으로 진단되어 약물 등 치료 중인 대상자
- 4) 황달, 담석 등 담도계 질환자 또는 심한 간 기능 장애(ALT, AST 중 정상 상한치의 3배 이상)이거나 특정 질환, 약물, 간염 및 간경화에 의한 간 기능 장애 대상자
- 5) 조절되지 않는 고혈압(sitSBP > 140mmHg 또는 sitDBP > 90mmHg)이거나 조절되지 않는 당뇨(HbA1c ≥ 9%) 환자
- 6) 스크리닝 1년 이내에 임상적으로 유의한 신경계 질환(뇌졸중 등), 심혈관 질환(허혈성 심질환 및 심부전 등의 심장질환, 항응고제 복용 및 혈소판 또는 혈액응고인자 이상 등의 혈액학적 이상), 호흡기 질환(만성 폐쇄성 폐질환, 폐렴, 폐결핵 등의 감염성 폐질환 등)의 병력이 있는 자
- 7) 스크리닝 6개월 이내의 위장관의 출혈이 있거나 소화성 궤양, 염증성 장질환(크론병 또는 궤양성 장염 등)의 병력이 있는 자
- 8) 주요 위장관 수술의 병력이 있는 자(충수절제술을 제외한 위절제, 위장관 우회술 또는 문합 술 등)
- 9) 스크리닝 5년 내 암 진단 및 치료 받은 적이 있거나 치료 중인 대상자
- 10) 울혈성 신부전 및 심한 신기능 장애(serum creatinine > 2.0 mg/dl)가 있는 대상자
- 11) 신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 대상자 (우울증, 정신분열증, 간질, 약물중독, 거식증, 이상식욕항진 등)
- 12) 인체적용시험 중 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물(해열진통제 및 비스테로이드 성 소염진통제, 항결핵제, 항생제나 항진균제)을 지속적으로 복용해야 하는 자
- 13) 최근 4주 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제, 또는 식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물이나 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있거나 기타 임상시험에 참여한 경험이 있는 대상자
- 14) 임신부, 수유부 및 가임 여성으로 참여기간 동안 임신 및 수유의 계획이 있는 대상자
- 15) 연구자 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 대상자

#### 3.2.3. 중지, 탈락기준

모든 대상자는 언제 어느 경우라도 특정 이유의 유무와 상관없이 중도 탈락할 수 있었으며, 중도 탈락할 경우 대상자에게 주어질 권리 등예의 어떠한 불이익 또는 이익예의 손실은 없었다.

대상자는 정해진 복용기간을 완료하기 전에 특정한 이유로 인해 중도 탈락될 수 있었다. 인체적용시험 실시기관에 다시 방문하는 것을 거절한 대상자를 제외하고, 어떠한 이유로든 복용기간 중 중도 탈락 또는 조기 종료한 모든 대상자는 조기 종료 평가(방문4 평가항목 참조) 항목에 기술되어 있는 평가들을 완료하도록 하였다.

대상자의 요청, 이상반응의 발생, 중대한 계획서 위반, 기타의 인체적용시험을 진행할 수 없는 경우에는 조기 종료될 수 있었다. 이때 인체적용시험책임자는 이를 모니터요원에게 구두, 전화 및 서면으로 이를 알려야 하였다. 그리고 이에 대한 기록을 증례기록지에 자세히 기록하였다.

### 3.2.3.1. 시험자에 의해 중지, 탈락되는 경우

- 1) 선정/제외기준에 적합하지 않은 경우
- 2) 갑작스런 사고로 인하여 시험을 계속할 수 없는 경우
- 3) 대상자의 안전성에 문제를 일으킬 수 있다고 담당의사가 판단한 경우
- 4) 과도한 예측 이상반응 증상, 사망을 포함한 중대한 이상반응의 경우
- 5) 방문 계획 등에 대한 순응도: 계획된 방문 일에 방문하지 않아 안전성 및 기능성 평가를 하지 못하는 경우(단, 계획된 방문 일이 지났으나 여유분의 약물이 있어 제대로 복용한 경우는 제외)
- 6) 병용 금지된 약물의 투약 등 시험계획서 위반의 경우
- 7) 인체적용시험용 식품을 용법 용량대로 복용하지 않아 인체적용시험을 진행 할 수 없다고 판단될 경우
- 8) 시험 전 평가에서 발견하지 못한 증상이나 질환이 확인 된 경우
- 9) 대상자의 증상 악화로 더 이상 인체적용시험을 진행할 수 없다고 판단될 경우
- 10) 기타 인체적용시험담당자가 시험을 중지하여야 한다고 판단한 경우

### 3.2.3.2. 대상자에 의해 중지, 탈락되는 경우

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

## 3.3. 인체적용시험용 제품의 투여

### 3.3.1. 인체적용시험에 사용된 제품

#### 3.3.1.1. 시험군

- 1) 제품명: UGFB, 고연(高研)
- 2) 제품성상: 진한 갈색의 타원형 필름 코팅정제
- 3) 함량: 700mg/정

원료명	함유율 (%)	700 mg
인삼꽃대 건조엑스	48	336 mg
미결정셀룰로스	23	161 mg
옥수수전분	17	119 mg
경질무수규산	5	35 mg
전분글리콜산나트륨	3	21 mg
스테아리린산마그네슘	1.4	9.8 mg
HPMC	2	14 mg
글리세린지방산에스테르	0.237	1.659 mg
이산화티타늄	0.218	1.526 mg
식용적색제 40호	0.145	1.015 mg
<b>합계</b>	<b>100.0</b>	<b>700 mg</b>

- 4) 저장방법: 직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관
- 5) 유효기간: 2018년 5월 10일

### 3.3.1.2. 대조군

- 1) 제품명: UGFB, 고연(高研)
- 2) 제품성상: 진한 갈색의 타원형 필름 코팅정제
- 3) 함량: 700mg/정

원료명	함유율 (%)	700 mg
옥수수전분	65	455 mg
미결정셀룰로스	23	161 mg
경질무수규산	5	35 mg
전분글리콜산나트륨	3	21 mg
스테아리린산마그네슘	1.4	9.8 mg
HPMC	2	14 mg
글리세린지방산에스테르	0.237	1.659 mg
이산화티타늄	0.218	1.526 mg
식용적색제 40호	0.145	1.015 mg
<b>합계</b>	<b>100.0</b>	<b>700 mg</b>

- 4) 저장방법: 직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관
- 5) 유효기간: 2018년 5월 10일

### 3.3.2. 무작위배정

무작위 배정 코드는 의뢰사의 업무를 위임 받은 무작위 배정 코드 생성 담당자가 생성하였다. 시험군과 대조군의 비율은 1:1이며, Permuted Block Randomization 방식을 적용, SAS Proc Plan 이용하여 무작위 배정 코드를 생성하였다.

- 1) 연구대상으로 선정한 대상자를 확률에 의거한 무작위 배정 방법으로 각 군에 배정하였다.
- 2) 두 군 중의 한 군에 방문일(Day 0) 순서대로 낮은 번호부터 할당되었다. 즉, 인체적용시험에 참여하는 순서대로 무작위 배정표에 따라 배정번호(Randomization Number: RN)를 부여하여 시험군 또는 대조군에 배정되도록 하였다.
- 3) 무작위 배정 계획에 의해 대상자에게 사용할 제품은 관리약사가 대상자에게 부여한 코드대로 인체적용시험 제품을 제공하여 처방하였다.

### 3.3.3. 이중눈가림

시험진행 중에는 연구자와 대상자 모두 각 대상자가 어느 군에 배정되어 있는지 알지 못하고, 의학적 긴급상황이 발생하기 전까지는 이중눈가림을 해제하지 않았으며, 배정된 군의 비밀을 유지하였다. 이상 반응 등으로 이중눈가림을 해제 할 경우 시험책임자는 눈가림 해제 전에 의뢰자 또는 위임된 자에게 코드 공개의 필요성에 대한 설명과 함께 연락을 취해야 했으며, 의뢰자는 눈가림해제가 반드시 필요한 사항인지 검토 후 눈가림해제 여부를 결정하여 결과를 시험자에게 전달해야 하였다. 눈가림해제가 결정된 경우 시험자는 눈가림 해제 일자, 시간, 사유에 대한 눈 가림 해제 문서를 절차에 따라

IRB에 보고하고 기록 및 보관해야 하였다.

### 3.3.4. 병용약물

#### 3.3.4.1. 병용약물의 허용

시험제품 복용 외에 일반 약 또는 운동요법, 식이요법 등은 금기항목이 아닌 경우 필요하다면 허용할 수 있었다.

- 1) 뇌졸중 예방목적으로 투여되는 저 용량의 aspirin (1일 최대 투여량 300mg)
- 2) 기타 대상자가 본 인체적용시험에 참여하기 전부터 복용하고 있던 병용약물 중 본 연구의 결과해석에 영향을 미치지 않을 것으로 사료되는 병용약물은 연구자의 판단 하에 허용하였다.
- 3) 연구자의 판단에 따라 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물은 복용 할 수 없으며, 복용중인 약물복용(간장약 등)을 본 제품 복용 2주 전에 끊은 경우 인체적용시험에 참여할 수 있었다.

모든 병용약물 투여 시(타 질환 또는 이상반응 발현 시 치료약물 포함) 해당 약물에 대한 정보 (제품명, 투여목적, 투여용량, 투여기간 등)을 증례기록서에 상세히 기록하였다.

#### 3.3.4.2. 금기약물 및 의약품

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

- 1) 마약성 및 비마약성 소염/진통제  
(단, aspirin은 1일 최대 투여량 300mg까지 허용, 또한 일과성 치료를 목적으로 한 소염/진 통제는 7일 이내의 간헐적 투여가 가능하나 시험 방문 전 3일 내의 투여는 금지.)
  - ① 마약성 진통제  
Codeine phosphate, Tramadol hydrochloride 등
  - ② 경구용 소염/진통제  
Salicylates류(aspirin), Acetaminophen, 경구용 NSAIDs(Naproxen, Ibuprofen), COX-2 억제제 (Celecoxib, Aceclofenac) 등
  - ③ 국소용 소염/진통제  
국소용 NSAIDs(Diclofenac sodium), 패취제를 포함한 기타 국소용제(Capsaicin)
- 2) 경구 및 주사제를 포함한 스테로이드제제  
Prednisolone, methylprednisolone, dexamethasone, hydrocortisone, betamethasone 등
- 3) 간 건강에 도움을 주는 건강기능식품  
밀크씨슬(카르두스마리아누스)추출물, 표고버섯균사체추출물, 표고버섯균사체, 도라지추출 물, 강황추출물, 브로콜리스프라우트분말, 유산균발효다시마추출물, 복분자추출분말, 발효율 금, 헛개나무과병추출물 성분을 포함한 간 기능 개선 건강기능식품 및 제품
- 4) 호르몬 제제  
성장 호르몬제제, 테스토스테론, 호르몬 대체 요법(hormone replacement therapy), 에스트 로겐, 프로게스테론 제제, 갑상선호르몬 제제 등  
(단, 연구자의 판단에 따라 인체적용시험 참여 이전 3개월 전부터 안정된 용량으로 복용하 고 있으며, 인체적용시험 동안 용량 및 용법이 변경될 가능성이 없는 경우는 허용)
- 5) Antineoplastic 제제  
Methortezate, Tamoxifen 등 모든 antineoplastic 제제
- 6) 항우울제, 항정신성 의약품
  - ① 항우울제

삼환계 항우울제(Imipramine, Amitriptyline), MAO 억제약 (phenelzine), SSRIs(Fluoxetine, Escitalopram), Trazodone 등

② 항정신성 의약품

Chlorpromazine, Thioridazine, Haloperidol, Clozapine, Olanzapine, Risperidone, Quetiapine 등

7) 기타 간 기능 개선, 지방간 개선, 간 보호 등을 목적으로 하는 약물, 한방치료(침, 부황, 뜸)

8) 이외의 연구자 판단에 따른 약물의 흡수, 대사 또는 배설에 영향을 줄 수 있는 약물 연구자의 판단에 따라 인체적용시험 기간 중 병용금지 약물의 사용이 필요한 경우에는 해당 대상자의 인체적용시험을 중단해야 했으며, 증례기록서의 마지막 페이지에 이와 관련하여 자세히 기록해야 하였다. 또한 시험기간 중 환자들의 알코올 섭취는 강력히 금지되었으며, 알코올을 섭취하였을 경우 해당기관 임상연구담당자에게 연락하였다. 정기적으로 환자들에게 알코올 섭취에 대해 질문을 하였고, 이에 대한 적절한 소견을 CRF에 기록하였다.

3.4. 시험절차

3.4.1. 인체적용시험 흐름도

<Table A>은 시험기간 동안 검사일정을 요약한 것이다. 자세한 내용은 아래에 기술 하였다.

Table A. 인체적용시험진행일정(Schedule of Study Assessments)

시험항목	스크리닝	복용기간			Follow up <sup>9)</sup>
	방문 1	방문 2	방문 3	방문 4	추가 방문
	-4 주 ~ 0 주	0 주(0 일)	6 주(±7 일)	-4 주 ~ 0 주	필요 시
대상자 동의	✓				
인구학적 조사 <sup>1)</sup>	✓				
신체검사 <sup>2)</sup>	✓			✓	
활력징후 <sup>3)</sup>	✓	✓	✓	✓	✓
병력 및 동반질환	✓				
이학적 검사	✓			✓	✓
생활습관 조사 <sup>4)</sup>		✓		✓	
실험실적 검사 <sup>5)</sup>	✓	✓	✓	✓	✓
임신여부 검사 <sup>6)</sup>	✓	✓	✓	✓	✓
대상자 적합성 평가 <sup>7)</sup>	✓	✓			
무작위 배정		✓			
IP 처방 및 교부		✓	✓		
선행/병용약물 조사	✓	✓	✓	✓	✓
이상반응 확인			✓	✓	✓
IP 반납 및 복용 순응도			✓	✓	

- 1) 인구학적 조사: 생년월일, 성별 등을 조사하였다.
- 2) 신체검사: 신장과 체중, 신장은 신발을 벗고 cm 단위로 측정하고 방문1에서만 측정하고 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용하며 방문 1, 4에서 실시하였다.
- 3) 활력징후: 혈압, 맥박수, 체온 - 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 측정하였다.
- 4) 생활습관 조사: 흡연/음주/식이/운동습관에 관하여 방문2, 4에서 실시하였다.
- 5) 실험실적 검사: 대상자는 채혈하기 전 최소 8시간 이상 금식한 상태로 내원해야 하였다.

혈액학적 검사	WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
혈액화학적 검사	Total bilirubin, ALP, Total Protein, Albumin, AST, ALT, r-GTP, BUN, Creatinine, Glucose, Uric acid, Total cholesterol, Triglyceride, LDL, HDL
소변 검사	pH, RBC, WBC, Protein(=Albumin), Glucose, Specific gravity,
당뇨 검사	HbA1c (Screening시 시행)

방문1의 실험실적 검사는 방문1 이전 4주 내에 본원에서 실시한 실험실적 검사 결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, AST, ALT, Creatinine, HbA1c 항목만 수행이 가능하였다. 방문2의 실험실적 검사는 방문2 이전 7일 내에 실시한 실험실적 검사 결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 되었다. 검사 항목 중 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있었다.

6) 임신여부 검사: 불임수술 및 폐경이 확인된 대상자를 제외한 모든 가임 여성은 각 방문 시 소변 HCG 반응 검사를 통한 임신여부를 확인 하였다.

7) 대상자적합성 평가: 방문1과 방문2 결과 AST수치 25IU이상인지 확인 후 다른 선정 제외기준 항목을 평가하여 적합한 경우 등록하였다.

8) 조기 종료 시도 종료 방문과 동일한 검사 및 평가를 수행하였다.

9) Follow up: 시험자의 판단에 따라 시험제품 최종 복용 후 혹은 조기종료 후 비정상적인 실험실 결과, 계속되는 이상반응, 중도 탈락, 시험자 판단에 따라 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우 필요에 따라 추적 관찰을 위해 4주 이내 다시 방문하도록 하였다.

### 3.4.2. 방문 별 관찰 검사 방법

#### 3.4.2.1. 방문1: 스크리닝(-4주~0일)

인체적용시험에 들어가기 전, 시험의 목적과 내용에 대하여 대상자에게 설명하고, 대상자의 자유 의사에 따라 서면 동의를 받은 후 스크리닝 검사를 실시하였다. 대상자의 적합성 스크리닝 검사는 개개의 대상자에 대하여 첫 복용 예정일 -4주~0일에 시행하며 다음 검사에 의해 임상적으로 유의한 이상이 있는 대상자는 제외하였다.

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

스크리닝 시 대상자가 선정/제외기준에 적합한지 여부를 평가하였다. 대상자로서 만족한 경우 다음 방문을 진행 할 수 있었다.

#### 3.4.2.2. 방문2: 기준시기 (0주, 0일)

- 1) 활력징후
- 2) 생활습관 조사
- 3) 병용약물 조사

- 4) 실험실적 검사
- 5) 임신여부 검사
- 6) 대상자 적합성 평가
- 7) 무작위 배정
- 8) 인체적용시험용 식품 처방 및 교부

방문2에서 방문1의 결과 등을 토대로 인체적용시험에 적합하다고 판정된 대상자에게 무작위 배정 을 진행한 후 인체적용시험용 식품을 처방하였다.

#### 3.4.2.3. 방문3: 중간방문 (6주±7일)

- 1) 활력징후
- 2) 병용약물 조사
- 3) 이상반응 확인
- 4) 실험실적 검사
- 5) 임신여부 검사
- 6) 인체적용시험용 식품 반납 및 복용순응도
- 7) 인체적용시험용 식품 처방 및 교부

#### 3.4.2.4. 방문4:/조기방문: 종료방문(12주±7일)

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

복용기간 중에 조기 종료 또는 중도 탈락된 대상자는 종료방문 시 실시해야 할 항목을 실시하였다. 종료에 대한 사유와 날짜를 대상자의 의무 기록지 또는 근거문서와 증례기록서의 시험 종료 양식에 기록하였다.

#### 3.4.2.5. Follow up 방문(필요 시)

- 1) 활력징후
- 2) 이학적 검사
- 3) 병용약물 조사
- 4) 이상반응 확인
- 5) 실험실적 검사
- 6) 임신 검사

인체적용시험용 식품 최종 복용 후 혹은 조기 종료 후 비정상적인 임상실험실 결과, 계속되는 이상반응,



중도탈락, 시험자 판단에 따라 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 항목은 추적관찰을 위해 4주 이내 다시 방문하도록 하였다.

### 3.5. 기능성 및 안전성 평가변수 및 분석방법

#### 3.5.1. 기능성 평가변수 및 분석방법

##### 3.5.1.1. 기능성 평가대상

인체적용시험 진행 일정에 따라 아래의 기능성 평가 항목을 검사하였다.

1, 2차 기능성 평가변수에서의 변화치의 경우는 “종료시점(12주째) 수치 - 기저시점(0주째) 수치”의 식을 이용하여 산출하였다.

또한, 변화율은 [(종료시점(12주째) 수치 - 기저시점(0주째) 수치)/기저시점(0주째) 수치] x 100 (%)의 식으로 계산하였다.

##### 3.5.1.2. 기능성 평가

###### 1) 1차 기능성 평가변수

- Baseline 대비 복용 12주 후에 AST 수치의 감소치

###### 2) 2차 기능성 평가변수

- Baseline 대비 복용 12주 후에 ALT 수치의 감소치 및 개선율
- Baseline 대비 복용 12주 후에 AST 개선율
- Baseline 대비 복용 12주 후에 TG 수치의 감소치 및 개선율
- Baseline 대비 복용 12주 후에  $\gamma$ -GT 수치의 감소치 및 개선율
- Baseline 대비 복용 12주 후에 Lipid profiles의 감소치 및 개선율

##### 3.5.1.3. 통계분석 방법

- 모든 통계적 분석은 SPSS version 21.0 또는 SAS version 9.4로 수행하였다.
- 본 인체적용시험에서는 중간분석을 실시하지 않았다.

##### 3.5.1.4. 통계분석 시험대상자 집단의 정의

본 인체적용시험의 대상자로부터 얻어진 자료는 크게 안전성 평가(Safety)군, FA(Full Analysis)군, PP(Per Protocol)군의 세 가지 형태로 분석하였다.

###### 1) 안전성평가(Safety)군

Safety군은 본 인체적용시험에 무작위 배정되어 인체시험용 식품을 1회 이상 복용한 대상자를 의미하였다.

###### 2) FA군

FA군은 인체적용시험에 무작위 배정되어 인체시험용 식품을 1회 이상 복용한 대상자 중 인체 시험용 식품 복용 후 1차 기능성 평가 자료가 1회 이상 수집된 대상자를 의미하였다.

###### 3) PP군

PP군은 FA군 대상자 중 중대한 계획서 위반 없이 본 인체적용시험을 완료한 대상자이며, 중대한 계획서 위반으로는 동의서 미 취득, 선정/제외 기준 위반, 병용 금기 약물 복용, 시험 개시- 종료 시점의 주요 검사의 누락, 전체 복용 평균 순응도 80% 미만, 종료 방문 기간 미 준수 등을 포함한다. 기타, 연

구 결과 해석에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되는 경미한 인체적용시 험계획서의 위반사항은 위반 또는 지연 정도와 사유를 정확히 기재하고 눈가림 해제 이전 시 험자, 의뢰자, 모니터, 통계학자 등이 시험연구에 영향을 주었는지 종합적으로 고찰하여 PP군 포함 여부를 판단하였다.

### 3.5.1.5. 기능성 평가변수 분석 방법

인체적용시험 진행 일정에 따라 아래의 기능성 평가 항목을 검사하였다. 단, 각 변수들은 대상자의 AST 수치 중등도에 따라 평가변수의 차이를 별도로 분석 할 수 있었다.

#### 1) 1 차 기능성 평가변수 분석방법

##### Baseline 대비 복용 12주 후에 AST 감소치

인체시험용 식품 투여 전 대비 12 주 평가 시점의 AST 감소치에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test로 검정하였다. 만일 Baseline 점수의 군 간 차이가 통계적으로 유의하다면 이를 공변량으로 하는 공분산분석 (ANCOVA)을 실시하였다. 또한 각 군 내 AST 감소치의 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 검정하였다.

#### 2) 2 차 기능성 평가변수 분석방법

##### ① Baseline 대비 복용 12 주 후에 ALT 의 감소치 및 개선율

인체시험용식품 투여 전 대비 12 주 평가 시점의 ALT 감소치 및 개선율에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 검정하였다.

##### ② Baseline 대비 복용 12 주 후에 AST 개선율

인체시험용 식품 투여 전 대비 12 주 평가 시점의 AST개선율에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용해 검정하였다.

##### ③ Baseline 대비 복용 12 주 후에 TG 의 감소치 및 개선율

인체시험용 식품 투여 전 대비 12 주 평가 시점의 TG 수치의 감소치 및 개선율에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용해 검정하였다.

##### ④ Baseline 대비 복용 12 주 후에 r-GT 감소치 및 개선율

인체시험용 식품 투여 전 대비 12 주 평가 시점의 r-GT 수치의 감소치 및 개선율에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용해 검정하였다.

### ⑤ Baseline 대비 복용 12 주 후에 lipid profile 각 수치 감소치 및 개선율

인체시험용 식품 투여 전 대비 12 주 평가 시점의 Lipid profiles의 감소치 및 개선율에 대해 기술 통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 검정하였다.

### 3.5.2. 안전성 평가변수 및 분석방법

#### 3.5.2.1. 평가기준

- 1) 이상반응
- 2) 실험실적 검사 결과
- 3) 활력징후 수치
- 4) 이학적 검사 결과

#### 3.5.2.2. 안전성 평가변수 분석방법

##### 1) 이상반응

전체, 중대한 그리고 중도 탈락의 원인이 된 이상반응과 인체시험용 식품과 관련 있는 이상반응에 대해 시험대상자 수와 비율을 제시하고, Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 군 간 차이에 대한 유의성을 검정한다. 또한 이들의 중증도, 중대성, 취해진 조치 그리고 결과 등에 대한 발생건수를 제시하였다.

##### 2) 실험실적 검사 결과

실험실적 검사 결과는 인체시험용 식품 투여 전 스크리닝 방문 대비 종료 시점 (12주)의 정상/비정상 변화에 대해 분할표를 이용해 빈도와 비율을 제시하고 McNemar's test 또는 McNemar's exact test를 이용하여 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성을 검정하였다.

또한 혈액학 및 혈액화학 검사와 같은 연속형 자료의 경우 인체시험용 식품 투여 전 스크리닝 방문 대비 종료 시점 (12주)의 변화량에 대해 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화의 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 검정하였다.

##### 3) 활력징후

활력징후는 인체시험용 식품 투여 전 스크리닝 방문 대비 종료 시점(12주)의 변화량에 대해 기술 통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test, 각 군 내 변화량의 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 검정하였다.

##### 4) 이학적 검사

이학적검사는 인체시험용 식품 투여 전 스크리닝 방문 대비 종료 시점(12주)의 정상/비정상 변화에 대해 분할표를 이용해 빈도와 비율을 제시하고 McNemar's test 또는 McNemar's exact test를 이용하여 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성을 검정하였다.

#### 4. 인체적용시험의 결과

##### 4.1. 인체적용시험 대상자 집단의 정의

##### 4.1.1. 대상자의 인체적용시험 참여 상태

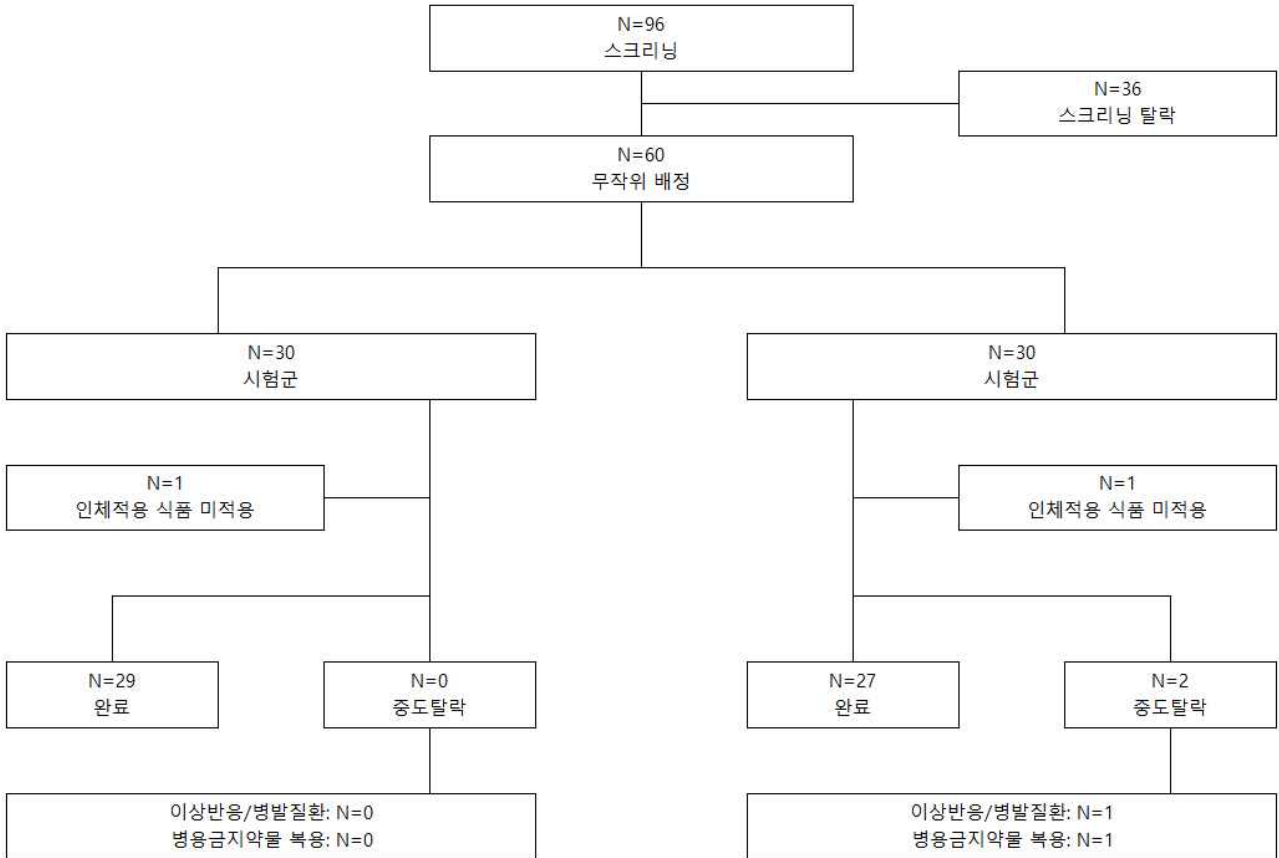


Figure 1. 대상자의 인체적용시험 참여 상태

표 1. 인체적용시험 대상자 참여 현황

	시험군	대조군	Total
스크리닝	-	-	96
스크리닝 탈락 <sup>1)</sup>	-	-	36 (37.50)
선정/제외 기준 부적합 <sup>1)</sup>	-	-	34 (35.42)
동의철회 <sup>1)</sup>	-	-	2 (2.08)
무작위 배정	30	30	60
인체적용식품 적용 <sup>2)</sup>	29 (96.97)	29 (96.97)	58 (96.67)
인체적용식품 미적용 <sup>2)</sup>	1 (3.33)	1 (3.33)	2 (3.33)
인체적용시험 완료 <sup>2)</sup>	29 (96.97)	27 (90.00)	56 (93.33)
인체적용시험 중도 탈락 <sup>2)</sup>	0 (0.00)	2 (6.67)	2 (3.33)
이상반응/병발질환 <sup>2)</sup>	0 (0.00)	1 (3.33)	1 (1.67)
병용금지약물 복용 <sup>2)</sup>	0 (0.00)	1 (3.33)	1 (1.67)

1) 스크리닝 받은 인체적용시험 대상자를 기준으로 비율 계산

2) 각 처치군에 무작위 배정된 인체적용시험 대상자를 기준으로 비율 계산

표 2. 무작위 배정된 인체적용시험 대상자의 분석군 별 참여 현황

분석 대상군	시험군 n(%)	대조군 n(%)	합계 n(%)
무작위배정	30 (100.0)	30 (100.0)	60 (100.0)
Safety 군			
포함 <sup>1)</sup>	29 (96.97)	29 (96.97)	58 (96.67)
제외 <sup>1)</sup>	1 (3.33)	1 (3.33)	2 (3.33)
인체적용시험용 식품 미복용 <sup>1)</sup>	1 (3.33)	1 (3.33)	2 (3.33)
FA 군			
포함 <sup>1)</sup>	29 (96.97)	29 (96.97)	58 (96.67)
제외 <sup>1)</sup>	1 (3.33)	1 (3.33)	2 (3.33)
Safety 군 제외 대상자 <sup>1)</sup>	1 (3.33)	1 (3.33)	2 (3.33)
PP 군			
포함 <sup>1)</sup>	19 (63.33)	19 (63.33)	38 (63.33)
제외 <sup>1)</sup>	11 (36.67)	11 (36.67)	22 (36.67)
FA 군 제외 대상자 <sup>1)</sup>	1 (3.33)	1 (3.33)	2 (3.33)
연속 복용 순응도 80% 미만 <sup>1)</sup>	2 (6.67)	4 (13.33)	6 (10.00)
병용금지약물 복용 <sup>1)</sup>	0 (0.00)	1 (3.33)	1 (1.67)
종료 방문 기간 미준수 <sup>1)</sup>	8 (26.67)	4 (13.33)	12 (20.00)
중도 탈락 <sup>1)</sup>	0 (0.00)	1 (3.33)	1 (1.67)

1) 각 처치군 내 무작위 배정된 인체적용시험 대상자를 기준으로 비율 계산

#### 4.2. 인구학적 및 기타 기저 특성 정보

인구학적 특성을 포함한 대상자의 기저 특성에 대한 분석은 FA 군을 대상으로 하였다. 모든 통계 분석은 SAS 시스템 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하였고, 기술통계량으로 연속형 자료의 경우 시험 대상자 수 (N), 평균 (Mean), 표준편차 (SD), 중앙값 (Median), 최소값 (Min), 최대값 (Max), 범주형 자료의 경우 시험 대상자 수 (N)와 비율 (%)을 제시하였다. 통계적 유의성은 유의 수준 5% 하에서 양측 검정으로 수행하였고, 연속형 자료의 경우 Independent two sample t-test 또는 Mann-Whitney U test, 범주형 자료의 경우 Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용해 검정하였다.

표 3에 제시된 인구학적 및 기타 기저 특성에 대한 분석 결과를 살펴보면, 본 인체적용시험에 참여한 시험 대상자의 평균 연령은 시험군의 경우  $43.03 \pm 6.86$  세, 대조군의 경우  $45.83 \pm 8.27$  세, 남성 대상자의 비율은 시험군과 대조군 각각 100.0%와 96.55% 이며, 여성 대상자의 비율 또한 각각 0.00%와 3.45%로 연령과 성별 모두 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다. (연령: p-value = 0.1671, 성별: p-value = 1.0000)

평균 신장은 시험군의 경우  $172.45 \pm 5.03$  cm, 대조군의 경우  $171.93 \pm 6.67$  cm 이며, 평균 체중은 시험군의 경우  $78.25 \pm 9.96$  kg, 대조군의 경우  $76.61 \pm 8.30$  kg으로, 평균신장과 평균체중 모두 두 군 간에 유의한 차이가 없었다. (신장: p-value = 0.8516, 체중: p-value = 0.5008)

흡연습관에서 흡연자의 비율은 시험군의 경우 37.93%, 대조군의 경우 55.17% 이며, 음주습관에서 음주자의 비율은 시험군의 경우 100.0%, 대조군의 경우 100.0%이며, 흡연습관과 음주습관 모두 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (흡연습관: p-value = 0.2020, 음주습관: p-value = 1.0000)

식사 습관에서 규칙적인 대상자의 비율은 시험군의 경우 65.52%, 대조군의 경우 58.62%이며, 운동 습관에서 규칙적인 운동을 하는 대상자의 비율은 시험군의 경우 27.59%, 대조군의 경우 31.03%이며, 식사습관과 운동습관 모두 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (식사 습관: p-value = 0.5883, 운동 습관: p-value = 0.8502)

과거 병력을 보고한 대상자 비율은 시험군의 경우 0.00%, 대조군의 경우 0.00%이며, 현 병력을 보고한 대상자 비율은 시험군의 경우 6.90%, 대조군의 경우 20.69%, 과거 병력과 현 병력 모두 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (과거 병력: p-value = -, 현 병력: p-value = 0.2529)

선행 약물력을 가진 대상자의 비율은 시험군의 경우 6.90%, 대조군의 경우 24.14%이며, 인체적용 시험 기간 동안 타 약물을 복용한 대상자의 비율은 시험군의 경우 6.90%, 대조군의 경우 20.69%, 선행 약물 및 병용약물 모두 두 군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (선행 약물: p-value = 0.1443, 병용 약물: p-value = 0.2529)

표 3. 대상자의 기초정보(FA 군)

인구학적 정보 및 기타 기초정보		시험군 n= 29 n (%)		대조군 N= 29 n (%)		합계 N= 58 n (%)		군간 p-value
연령 (세)	n	29		29		58		0.1671 <sup>a</sup>
	Mean±SD	43.03	6.86	45.83	8.27	44.43	7.66	
	Median	43.00		46.00		44.50		
	Min, Max	32.00	56.00	24.00	60.00	24.00	60.00	
성별	n	29		29		58		1.0000 <sup>f</sup>
	남	29	(100.0)	28	(96.55)	57	(98.28)	
	여	0	(0.00)	1	(3.45)	1	(1.72)	
신장 (cm)	n	29		29		58		0.8516 <sup>b</sup>
	Mean±SD	172.45	5.03	171.93	6.67	172.19	5.86	
	Median	171.00		172.00		171.50		
	Min, Max	165.00	185.00	150.00	182.00	150.00	185.00	
체중 (kg)	n	29		29		58		0.5008 <sup>a</sup>
	Mean±SD	78.25	9.96	76.61	8.30	77.43	9.12	
	Median	75.90		75.70		75.80		
	Min, Max	53.90	100.10	63.20	101.10	53.90	101.10	
흡연습관	n	29		29		58		0.2020 <sup>e</sup>
	비흡연자	8	(27.59)	3	(10.35)	11	(18.97)	
	과거 흡연자	10	(34.48)	10	(34.48)	20	(34.48)	
	흡연자	11	(37.93)	16	(55.17)	27	(46.55)	
음주습관	n	29		29		58		1.0000 <sup>e</sup>
	비음주자 및 과거 음주자	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	
	음주자 (보통으로마신다)	5	(17.24)	5	(17.24)	10	(17.24)	
	음주자 (많이 마신다)	24	(82.76)	24	(82.76)	48	(82.76)	
식사습관	n	29		29		58		0.5883 <sup>e</sup>
	규칙적	19	(65.52)	17	(58.62)	36	(62.07)	
	불규칙적	10	(34.48)	12	(41.38)	22	(37.93)	
운동습관	n	29		29		58		0.8502 <sup>e</sup>
	전혀 하지 않음	10	(34.48)	8	(27.59)	18	(31.03)	
	불규칙적	11	(37.93)	12	(41.38)	23	(39.66)	
	규칙적	8	(27.59)	9	(31.03)	17	(29.31)	
과거병력	n	29		29		58		—
	있음	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	
	없음	29	(100.0)	29	(100.0)	58	(100.0)	
현 병력	n	29		29		58		0.2529 <sup>f</sup>
	있음	2	(6.90)	6	(20.69)	8	(13.79)	
	없음	27	(93.10)	23	(79.31)	50	(86.21)	
선행약물	n	29		29		58		0.1443 <sup>f</sup>
	있음	2	(6.90)	7	(24.14)	9	(15.52)	
	없음	27	(93.10)	22	(75.86)	49	(84.48)	
병용약물	n	29		29		58		0.2529 <sup>f</sup>
	있음	2	(6.90)	6	(20.69)	8	(13.79)	
	없음	27	(93.10)	23	(79.31)	50	(86.21)	

a: Independent two-samplet-test

b: Mann-Whitney U test

e: Pearson's chi-square test

f: Fisher's exact test

## 5. 결과: 기능성 평가

### 5.1. 기능성 평가분석 방법

본 인체적용시험의 기능성평가 분석은 FA 군과 PP 군 모두에서 실시하여 결과를 제시하였고, 분석 결과에 대한 해석은 주 분석군인 FA 군을 중심으로 기술하였다. PP 군의 결과에 대한 해석은 FA 군의 결과와 상이한 경우에만 그 차이에 대해 기술하였다.

모든 기능성평가 분석은 인체적용시험용 식품 복용 전 시점으로 V2 (0주) 그리고 인체적용시험용 식품 복용 후 시점으로 종료 시점인 V4 (무작위 배정 12주 후) 자료를 이용하여 분석하였다. 분석은 SAS 시스템 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)로 수행하였고 기술통계량으로 연속형 자료의 경우 시험 대상자 수 (N), 평균 (Mean), 표준편차 (SD), 중앙값 (Median), 최소값 (Min), 최대값 (Max), 범주형 자료의 경우 시험 대상자 수 (N)와 비율 (%)을 제시하였다. 통계적 유의성은 유의 수준 5% 하에서 양측 검정으로 수행하였고, 두 군 간 차이 비교는 Independent two sample t- test 또는 Mann-Whitney U test, 각 군 내 비교는 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용해 검정하였다. FA 군에 한해서 종료 시점인 V4의 기능성 자료가 부재한 경우 LOCF (Last Observation Carried Forward)를 적용해 대체하였다.

### 5.2. 일차 기능성 평가분석

#### 5.2.1. Baseline 대비 복용 12주 후에 AST 수치의 감소치

본 인체적용시험의 일차 기능성 평가 변수는 인체적용시험용 식품 복용 전 (V2) 대비 복용 12주 (V4) 후 시점에서의 AST 수치의 감소치 (AST at V4 - AST at V2)이며, 위약에 비해 시험식품이 우월한지를 입증하는 것이다.

표 4에 요약된 FA 군의 인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 AST 수치 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 AST 수치는 시험군의 경우  $34.97 \pm 12.38$ , 대조군의 경우  $33.86 \pm 10.32$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 AST 수치는 시험군의 경우  $37.17 \pm 19.45$ , 대조군의 경우  $35.52 \pm 19.74$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.9502, 종료: p-value = 0.8396)

각 군 내 AST 수치 감소치는 시험군의 경우  $2.21 \pm 22.67$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $1.66 \pm 15.23$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.5033, 대조군: p-value = 0.7307) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 AST 수치 감소치의 군간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.9193)



표 4. Baseline 대비 복용 12주 후에 AST 수치의 감소치 (FA & PP 군)

AST		시험군		대조군		군간 $p$ -value
FA 군		N= 29		N= 29		
	n	29		29		
Baseline	Mean±SD	34.97	12.38	33.86	10.32	0.9502 <sup>b</sup>
	Median	30.00		30.00		
	Min, Max	25.00	86.00	25.00	66.00	
12 weeks	n	29		29		0.8396 <sup>b</sup>
	Mean±SD	37.17	19.45	35.52	19.74	
	Median	30.00		29.00		
	Min, Max	21.00	107.00	22.00	122.00	
Change	n	29		29		0.9193 <sup>b</sup>
	Mean±SD	2.21	22.67	1.66	15.23	
	Median	-3.00		-1.00		
	Min, Max	-62.00	73.00	-18.00	56.00	
군내 $p$ -value		0.5033 <sup>d</sup>		0.7307 <sup>d</sup>		
PP 군		N= 19		N= 19		
	n	19		19		
Baseline	Mean±SD	30.95	5.95	35.21	12.11	0.2290 <sup>b</sup>
	Median	29.00		30.00		
	Min, Max	25.00	43.00	26.00	66.00	
12 weeks	n	19		19		0.5011 <sup>b</sup>
	Mean±SD	37.84	22.29	39.16	23.27	
	Median	30.00		31.00		
	Min, Max	21.00	107.00	22.00	122.00	
Change	n	19		19		0.7923 <sup>b</sup>
	Mean±SD	6.89	22.64	3.95	17.91	
	Median	-3.00		1.00		
	Min, Max	-14.00	73.00	-18.00	56.00	
군내 $p$ -value		0.6191 <sup>d</sup>		0.7577 <sup>d</sup>		

Change = 12 weeks - Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

### 5.3. 이차 기능성 평가분석

#### 5.3.1. Baseline 대비 복용 12 주 후에 ALT 수치의 감소치

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 ALT 수치의 감소치 (ALT at V4 - ALT at V2)의 분석 결과를 표 5 에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 ALT 수치는 시험군의 경우  $43.34 \pm 20.72$ , 대조군의 경우  $32.21 \pm 11.38$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 ALT 수치는 시험군의 경우  $49.21 \pm 37.26$ , 대조군의 경우  $35.34 \pm 20.91$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.0555, 종료: p-value = 0.0663)

각 군 내 ALT 수치 감소치는 시험군의 경우  $5.86 \pm 35.24$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $3.14 \pm 14.48$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.7358, 대조군: p-value = 0.6170) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 ALT 수치 감소치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.8763)

표 5. Baseline 대비 복용 12주 후에 ALT 수치의 감소치 (FA & PP 군)

ALT		시험군		대조군		군간 <i>p</i> -value
FA 군		N= 29		N= 29		
Baseline	n	29		29		0.0555 <sup>b</sup>
	Mean±SD	43.34	20.72	32.21	11.38	
	Median	37.00		30.00		
	Min, Max	14.00	89.00	13.00	69.00	
12 weeks	n	29		29		0.0663 <sup>b</sup>
	Mean±SD	49.21	37.26	35.34	20.91	
	Median	37.00		31.00		
	Min, Max	15.00	179.00	13.00	121.00	
Change	n	29		29		0.8763 <sup>b</sup>
	Mean±SD	5.86	35.24	3.14	14.48	
	Median	2.00		0.00		
	Min, Max	-46.00	126.00	-18.00	52.00	
군내 <i>p</i> -value		0.7358 <sup>d</sup>		0.6170 <sup>d</sup>		
PP 군		N= 19		N= 19		
Baseline	n	19		19		
	Mean±SD	37.05	15.54	32.95	12.63	
	Median	33.00		30.00		
	Min, Max	20.00	78.00	13.00	69.00	
12 weeks	n	19		19		0.2667 <sup>b</sup>
	Mean±SD	48.53	42.31	34.37	23.13	
	Median	32.00		31.00		
	Min, Max	15.00	179.00	13.00	121.00	
Change	n	19		19		0.8149 <sup>b</sup>
	Mean±SD	11.47	38.92	1.42	13.90	
	Median	1.00		-1.00		
	Min, Max	-14.00	126.00	-18.00	52.00	
군내 <i>p</i> -value		0.7454 <sup>d</sup>		0.7750 <sup>d</sup>		

Change = 12 weeks - Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

### 5.3.2. Baseline 대비 복용 12 주 후에 ALT 수치의 개선율

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 ALT 수치의 개선율 ( $[\text{ALT at V4} - \text{ALT at V2}] / \text{ALT at V2} * 100$ )의 분석 결과를 표 6 에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 ALT 수치는 시험군의 경우  $43.34 \pm 20.72$ , 대조군의 경우  $32.21 \pm 11.38$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 ALT 수치는 시험군의 경우  $49.21 \pm 37.26$ , 대조군의 경우  $35.34 \pm 20.91$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.0555, 종료: p-value = 0.0663)

각 군 내 ALT 수치 개선율은 시험군의 경우  $21.04 \pm 91.43$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $8.50 \pm 35.47$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.8085, 대조군: p-value = 0.4556) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 ALT 수치 개선율의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.8035)

표 6. Baseline 대비 복용 12주 후에 ALT 수치의 개선을 (FA & PP 군)

ALT		시험군		대조군		군간 <i>p</i> -value
FA 군		N= 29		N= 29		
Baseline	n	29		29		0.0555 <sup>b</sup>
	Mean±SD	43.34	20.72	32.21	11.38	
	Median	37.00		30.00		
	Min, Max	14.00	89.00	13.00	69.00	
12 weeks	n	29		29		0.0663 <sup>b</sup>
	Mean±SD	49.21	37.26	35.34	20.91	
	Median	37.00		31.00		
	Min, Max	15.00	179.00	13.00	121.00	
Change (%)	n	29		29		0.8035 <sup>b</sup>
	Mean±SD	21.04	91.43	8.50	35.47	
	Median	3.45		0.00		
	Min, Max	-56.25	411.11	-39.13	117.14	
군내 <i>p</i> -value		0.8085 <sup>d</sup>		0.4556 <sup>d</sup>		
PP 군		N= 19		N= 19		
Baseline	n	19		19		0.5589 <sup>b</sup>
	Mean±SD	37.05	15.54	32.95	12.63	
	Median	33.00		30.00		
	Min, Max	20.00	78.00	13.00	69.00	
12 weeks	n	19		19		0.2667 <sup>b</sup>
	Mean±SD	48.53	42.31	34.37	23.13	
	Median	32.00		31.00		
	Min, Max	15.00	179.00	13.00	121.00	
Change (%)	n	19		19		0.8153 <sup>b</sup>
	Mean±SD	33.03	109.27	1.24	28.04	
	Median	2.56		-3.23		
	Min, Max	-28.57	411.11	-39.13	75.36	
군내 <i>p</i> -value		0.6432 <sup>d</sup>		0.8497 <sup>c</sup>		

Change = (12 weeks - Baseline)/Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

### 5.3.3. Baseline 대비 복용 12 주 후에 AST 수치의 개선율

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 AST 수치의 개선율 ( $[\text{AST at V4} - \text{AST at V2}] / \text{AST at V2} * 100$ )의 분석 결과를 표 7 에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 AST 수치는 시험군의 경우  $34.79 \pm 12.38$ , 대조군의 경우  $33.86 \pm 10.32$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 AST 수치는 시험군의 경우  $37.17 \pm 19.45$ , 대조군의 경우  $35.52 \pm 19.74$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.9502, 종료: p-value = 0.8396)

각 군 내 AST 수치 개선율은 시험군의 경우  $13.05 \pm 64.06$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $4.35 \pm 36.94$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.5268, 대조군: p-value = 0.7902) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 AST 수치 개선율의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.9442)

표 7. Baseline 대비 복용 12주 후에 AST 수치의 개선을 (FA & PP 군)

AST		시험군		대조군		군간 <i>p</i> -value
FA 군		N= 29		N= 29		
Baseline	n	29		29		0.9502 <sup>b</sup>
	Mean±SD	34.97	12.38	33.86	10.32	
	Median	30.00		30.00		
	Min, Max	25.00	86.00	25.00	66.00	
12 weeks	n	29		29		0.8396 <sup>b</sup>
	Mean±SD	37.17	19.45	35.52	19.74	
	Median	30.00		29.00		
	Min, Max	21.00	107.00	22.00	122.00	
Change (%)	n	29		29		0.9442 <sup>b</sup>
	Mean±SD	13.05	64.06	4.35	36.94	
	Median	-8.33		-3.57		
	Min, Max	-72.09	214.71	-33.33	141.38	
군내 <i>p</i> -value		0.5268 <sup>d</sup>		0.7902 <sup>d</sup>		
PP 군		N= 19		N= 19		
Baseline	n	19		19		
	Mean±SD	30.95	5.95	35.21	12.11	
	Median	29.00		30.00		
	Min, Max	25.00	43.00	26.00	66.00	
12 weeks	n	19		19		0.5011 <sup>b</sup>
	Mean±SD	37.84	22.29	39.16	23.27	
	Median	30.00		31.00		
	Min, Max	21.00	107.00	22.00	122.00	
Change (%)	n	19		19		0.8839 <sup>b</sup>
	Mean±SD	24.85	74.27	10.77	42.60	
	Median	-8.33		3.23		
	Min, Max	-32.56	214.71	-32.14	141.38	
군내 <i>p</i> -value		0.6029 <sup>d</sup>		0.7578 <sup>d</sup>		

Change = (12 weeks - Baseline)/Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

#### 5.3.4. Baseline 대비 복용 12 주 후에 TG 수치의 감소치

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 TG 수치의 감소치 (TG at V4 - TG at V2)의 분석 결과를 표 8 에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 TG 수치는 시험군의 경우  $196.55 \pm 78.49$ , 대조군의 경우  $206.62 \pm 96.94$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 TG 수치는 시험군의 경우  $215.00 \pm 94.38$ , 대조군의 경우  $192.66 \pm 85.66$ 으로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.9010, 종료: p-value = 0.3427)

각 군 내 TG 수치 감소치는 시험군의 경우  $18.45 \pm 97.73$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $-13.97 \pm 74.48$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.3181, 대조군: p-value = 0.3212) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 TG 수치 감소치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.1610)



표 8. Baseline 대비 복용 12주 후에 TG 수치의 감소치 (FA & PP 군)

TG		시험군		대조군		군간 <i>p</i> -value
FA 군		N= 29		N= 29		
Baseline	n	29		29		0.9010 <sup>b</sup>
	Mean±SD	196.55	78.49	206.62	96.94	
	Median	178.00		178.00		
	Min, Max	89.00	391.00	77.00	429.00	
12 weeks	n	29		29		0.3427 <sup>b</sup>
	Mean±SD	215.00	94.38	192.66	85.66	
	Median	196.00		177.00		
	Min, Max	93.00	469.00	82.00	381.00	
Change	n	29		29		0.1610 <sup>a</sup>
	Mean±SD	18.45	97.73	-13.97	74.48	
	Median	6.00		-4.00		
	Min, Max	-121.00	302.00	-245.00	139.00	
군내 <i>p</i> -value		0.3181 <sup>c</sup>		0.3212 <sup>c</sup>		
PP 군		N= 19		N= 19		
Baseline	n	19		19		
	Mean±SD	178.89	76.88	221.68	103.02	
	Median	163.00		216.00		
	Min, Max	89.00	368.00	77.00	429.00	
12 weeks	n	19		19		0.7347 <sup>a</sup>
	Mean±SD	220.05	101.86	209.21	93.70	
	Median	196.00		184.00		
	Min, Max	93.00	469.00	82.00	381.00	
Change	n	19		19		0.0718 <sup>a</sup>
	Mean±SD	41.16	95.49	-12.47	82.25	
	Median	24.00		-1.00		
	Min, Max	-121.00	302.00	-245.00	139.00	
군내 <i>p</i> -value		0.0766 <sup>c</sup>		0.5170 <sup>c</sup>		

Change = 12 weeks - Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

### 5.3.5. Baseline 대비 복용 12 주 후에 TG 수치의 개선율

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 TG 수치의 개선율 ( $(\text{TG at V4} - \text{TG at V2}) / \text{TG at V2} * 100$ )의 분석 결과를 표 9 에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 TG 수치는 시험군의 경우  $196.55 \pm 78.49$ , 대조군의 경우  $206.62 \pm 96.94$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 TG 수치는 시험군의 경우  $215.00 \pm 94.38$ , 대조군의 경우  $192.66 \pm 85.66$ 으로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저:  $p\text{-value} = 0.9010$ , 종료:  $p\text{-value} = 0.3427$ )

각 군 내 TG 수치 개선율은 시험군의 경우  $17.83 \pm 54.61$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $0.36 \pm 37.00$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군:  $p\text{-value} = 0.2453$ , 대조군:  $p\text{-value} = 0.9581$ ) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 TG 수치 개선율의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. ( $p\text{-value} = 0.3196$ )

PP군의 각 군 내 TG 수치 개선율은 시험군의 경우  $30.80 \pm 57.31$ 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우  $0.90 \pm 35.99$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군:  $p\text{-value} = 0.0361$ , 대조군:  $p\text{-value} = 0.9144$ )

표 9. Baseline 대비 복용 12주 후에 TG 수치의 개선을 (FA & PP 군)

TG		시험군		대조군		군간 <i>p</i> -value
FA 군		N= 29		N= 29		
Baseline	n	29		29		0.9010 <sup>b</sup>
	Mean±SD	196.55	78.49	206.62	96.94	
	Median	178.00		178.00		
	Min, Max	89.00	391.00	77.00	429.00	
12 weeks	n	29		29		0.3427 <sup>b</sup>
	Mean±SD	215.00	94.38	192.66	85.66	
	Median	196.00		177.00		
	Min, Max	93.00	469.00	82.00	381.00	
Change (%)	n	29		29		0.3196 <sup>b</sup>
	Mean±SD	17.83	54.61	0.36	37.00	
	Median	4.49		-1.80		
	Min, Max	-47.14	180.84	-57.11	98.80	
군내 <i>p</i> -value		0.2453 <sup>d</sup>		0.9581 <sup>c</sup>		
PP 군		N= 19		N= 19		
Baseline	n	19		19		0.2428 <sup>b</sup>
	Mean±SD	178.89	76.88	221.68	103.02	
	Median	163.00		216.00		
	Min, Max	89.00	368.00	77.00	429.00	
12 weeks	n	19		19		0.7347 <sup>a</sup>
	Mean±SD	220.05	101.86	209.21	93.70	
	Median	196.00		184.00		
	Min, Max	93.00	469.00	82.00	381.00	
Change (%)	n	19		19		0.1218 <sup>b</sup>
	Mean±SD	30.80	57.31	0.90	35.99	
	Median	12.75		-0.61		
	Min, Max	-36.07	180.84	-57.11	87.01	
군내 <i>p</i> -value		<b>0.0361<sup>d</sup></b>		0.9144 <sup>c</sup>		

Change = (12 weeks - Baseline)/Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

### 5.3.6. Baseline 대비 복용 12 주 후에 $\gamma$ -GT 수치의 감소치

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후  $\gamma$ -GT 수치의 감소치 ( $\gamma$ -GT at V4 -  $\gamma$ -GT at V2)의 분석 결과를 표 10 에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전  $\gamma$ -GT 수치는 시험군의 경우  $78.62 \pm 48.49$ , 대조군의 경우  $74.03 \pm 44.52$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후  $\gamma$ -GT 수치는 시험군의 경우  $75.90 \pm 55.62$ , 대조군의 경우  $71.69 \pm 41.07$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.7855, 종료: p-value = 0.9071)

각 군 내  $\gamma$ -GT 수치 감소치는 시험군의 경우  $-2.72 \pm 26.83$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $-2.34 \pm 24.50$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.5889, 대조군: p-value = 0.7358) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후  $\gamma$ -GT 수치 감소치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.6351)

표 10. Baseline 대비 복용 12주 후에  $\gamma$ -GT 수치의 감소치 (FA & PP 군)

$\gamma$ -GT		시험군		대조군		군간 $p$ -value
FA 군		N= 29		N= 29		
Baseline	n	29		29		0.7855 <sup>b</sup>
	Mean $\pm$ SD	78.62	48.49	74.03	44.52	
	Median	67.00		71.00		
	Min, Max	12.00	162.00	14.00	185.00	
12 weeks	n	29		29		0.9071 <sup>b</sup>
	Mean $\pm$ SD	75.90	55.62	71.69	41.07	
	Median	64.00		65.00		
	Min, Max	13.00	218.00	18.00	170.00	
Change	n	29		29		0.6351 <sup>b</sup>
	Mean $\pm$ SD	-2.72	26.83	-2.34	24.50	
	Median	-1.00		2.00		
	Min, Max	-60.00	56.00	-67.00	60.00	
군내 $p$ -value		0.5889 <sup>c</sup>		0.7358 <sup>d</sup>		
PP 군		N= 19		N= 19		
Baseline	n	19		19		
	Mean $\pm$ SD	68.37	47.27	80.84	45.29	
	Median	55.00		77.00		
	Min, Max	12.00	162.00	14.00	185.00	
12 weeks	n	19		19		0.4303 <sup>b</sup>
	Mean $\pm$ SD	69.37	57.13	74.74	41.38	
	Median	64.00		65.00		
	Min, Max	13.00	218.00	18.00	170.00	
Change	n	19		19		0.3276 <sup>b</sup>
	Mean $\pm$ SD	1.00	27.92	-6.11	27.45	
	Median	1.00		-8.00		
	Min, Max	-60.00	56.00	-67.00	60.00	
군내 $p$ -value		0.8777 <sup>c</sup>		0.2618 <sup>d</sup>		

Change = 12 weeks - Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

### 5.3.7. Baseline 대비 복용 12 주 후에 $\gamma$ -GT 수치의 개선율

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후  $\gamma$ -GT 수치의 개선율 ( $[\gamma\text{-GT at V4} - \gamma\text{-GT at V2}] / \gamma\text{-GT at V2} * 100$ )의 분석 결과를 표 11 에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전  $\gamma$ -GT 수치는 시험군의 경우  $78.62 \pm 48.49$ , 대조군의 경우  $74.03 \pm 44.52$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후  $\gamma$ -GT 수치는 시험군의 경우  $75.90 \pm 55.62$ , 대조군의 경우  $71.69 \pm 41.07$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.7855, 종료: p-value = 0.9071)

각 군 내  $\gamma$ -GT 수치 개선율은 시험군의 경우  $-1.16 \pm 27.15$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $4.63 \pm 31.24$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.8196, 대조군: p-value = 0.4315) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후  $\gamma$ -GT 수치 개선율의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.4543)

표 11. Baseline 대비 복용 12주 후에  $\gamma$ -GT 수치의 개선을 (FA & PP 군)

$\gamma$ -GT		시험군		대조군		군간 $p$ -value
FA 군		N= 29		N= 29		
Baseline	n	29		29		0.7855 <sup>b</sup>
	Mean $\pm$ SD	78.62	48.49	74.03	44.52	
	Median	67.00		71.00		
	Min, Max	12.00	162.00	14.00	185.00	
12 weeks	n	29		29		0.9071 <sup>b</sup>
	Mean $\pm$ SD	75.90	55.62	71.69	41.07	
	Median	64.00		65.00		
	Min, Max	13.00	218.00	18.00	170.00	
Change (%)	n	29		29		0.4543 <sup>a</sup>
	Mean $\pm$ SD	-1.16	27.15	4.63	31.24	
	Median	-1.18		3.45		
	Min, Max	-50.75	62.50	-50.00	78.57	
군내 $p$ -value		0.8196 <sup>c</sup>		0.4315 <sup>c</sup>		
PP 군		N= 19		N= 19		
Baseline	n	19		19		0.2609 <sup>b</sup>
	Mean $\pm$ SD	68.37	47.27	80.84	45.29	
	Median	55.00		77.00		
	Min, Max	12.00	162.00	14.00	185.00	
12 weeks	n	19		19		0.4303 <sup>b</sup>
	Mean $\pm$ SD	69.37	57.13	74.74	41.38	
	Median	64.00		65.00		
	Min, Max	13.00	218.00	18.00	170.00	
Change (%)	n	19		19		0.6363 <sup>a</sup>
	Mean $\pm$ SD	3.91	29.44	-0.93	32.95	
	Median	6.45		-6.56		
	Min, Max	-50.75	62.50	-50.00	78.57	
군내 $p$ -value		0.5703 <sup>c</sup>		0.9035 <sup>c</sup>		

Change = (12 weeks - Baseline)/Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

### 5.3.8. Baseline 대비 복용 12 주 후에 Lipid profiles 수치의 감소치

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 Lipid profiles 수치의 감소치 (Lipid profiles at V4 - Lipid profiles at V2)의 분석 결과를 표 12와 표 13에 예 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 Total cholesterol 수치는 시험군의 경우  $214.14 \pm 41.50$ , 대조군의 경우  $205.76 \pm 34.41$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 Total cholesterol 수치는 시험군의 경우  $220.52 \pm 38.61$ , 대조군의 경우  $213.07 \pm 43.54$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.4061, 종료: p-value = 0.2728)

각 군 내 Total cholesterol 수치 감소치는 시험군의 경우  $6.38 \pm 27.43$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $7.31 \pm 35.41$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.2208, 대조군: p-value = 0.2757) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 Total cholesterol 수치 감소치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.9113)

HDL cholesterol의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 HDL cholesterol 수치는 시험군의 경우  $53.69 \pm 10.51$ , 대조군의 경우  $52.52 \pm 10.03$ 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 HDL cholesterol 수치는 시험군의 경우  $56.76 \pm 10.25$  대조군의 경우  $55.24 \pm 11.78$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.6656, 종료: p-value = 0.4273)

각 군 내 HDL cholesterol 수치 감소치는 시험군의 경우  $3.07 \pm 8.14$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $2.72 \pm 9.58$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.0520, 대조군: p-value = 0.1368) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 HDL cholesterol 수치 감소치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.8831)

LDL cholesterol의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 LDL cholesterol 수치는 시험군의 경우  $130.83 \pm 31.00$ , 대조군의 경우  $123.31 \pm 27.32$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 LDL cholesterol 수치는 시험군의 경우  $144.76 \pm 30.87$ , 대조군의 경우  $133.10 \pm 26.49$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.3315, 종료: p-value = 0.1285)

각 군 내 LDL cholesterol 수치 감소치는 시험군의 경우  $13.93 \pm 22.76$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우  $9.79 \pm 24.26$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었다. (시험군: p-value = 0.0027, 대조군: p-value = 0.0384) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 LDL cholesterol 수치 감소치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.5058)

PP군의 LDL cholesterol의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 LDL cholesterol 수치는 시험군의 경우  $132.74 \pm 30.34$ , 대조군의 경우  $120.68 \pm 24.26$ 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 LDL cholesterol 수치는 시험군의 경우  $149.79 \pm 27.99$ , 대조군의 경우  $130.26 \pm 22.55$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다. (기저: p-value = 0.1847, 종료: p-value = 0.0234)



각 군 내 LDL cholesterol 수치 감소치는 시험군의 경우  $17.05 \pm 22.29$ 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우  $9.58 \pm 23.75$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.0037, 대조군: p-value = 0.0957) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 LDL cholesterol 수치 감소치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.3239)

표 12. Baseline 대비 복용 12주 후에 Lipid profiles 수치의 감소치 (FA군)

Lipid profiles			시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value	
Total cholesterol	Baseline	N	29		29		0.4061 <sup>a</sup>	
		Mean±SD	214.14	41.50	205.76	34.41		
		Median	220.00		206.00			
		Min, Max	131.00	314.00	142.00	290.00		
	12 weeks	n	29		29		0.2728 <sup>b</sup>	
		Mean±SD	220.52	38.61	213.07	43.54		
		Median	222.00		210.00			
		Min, Max	148.00	331.00	150.00	368.00		
	Change	n	29		29		0.9113 <sup>a</sup>	
		Mean±SD	6.38	27.43	7.31	35.41		
		Median	8.00		4.00			
		Min, Max	-60.00	76.00	-54.00	78.00		
군내 <i>p</i> -value			0.2208 <sup>c</sup>		0.2757 <sup>d</sup>			
HDL cholesterol	Baseline	n	29		29		0.6656 <sup>a</sup>	
		Mean±SD	53.69	10.51	52.52	10.03		
		Median	55.00		53.00			
		Min, Max	34.00	78.00	37.00	77.00		
	12 weeks	n	29		29		0.4273 <sup>b</sup>	
		Mean±SD	56.76	10.25	55.24	11.78		
		Median	57.00		55.00			
		Min, Max	41.00	92.00	30.00	83.00		
	Change	n	29		29		0.8831 <sup>a</sup>	
		Mean±SD	3.07	8.14	2.72	9.58		
		Median	3.00		3.00			
		Min, Max	-11.00	18.00	-18.00	23.00		
군내 <i>p</i> -value			0.0520 <sup>c</sup>		0.1368 <sup>c</sup>			
LDL cholesterol	Baseline	n	29		29		0.3315 <sup>a</sup>	
		Mean±SD	130.83	31.00	123.31	27.32		
		Median	127.00		125.00			
		Min, Max	64.00	202.00	59.00	180.00		
	12 weeks	n	29		29		0.1285 <sup>a</sup>	
		Mean±SD	144.76	30.87	133.10	26.49		
		Median	141.00		133.00			
		Min, Max	91.00	228.00	94.00	190.00		
	Change (%)	n	29		29			
	Lipid profiles			시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value
		Mean±SD	13.93	22.76	9.79	24.26	0.5058 <sup>a</sup>	
		Median	14.00		10.00			
	Min, Max	-46.00	70.00	-44.00	53.00			
군내 <i>p</i> -value			0.0027 <sup>c</sup>		0.0384 <sup>c</sup>			

Change = 12 weeks Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

표 13. Baseline 대비 복용 12주 후에 Lipid profiles 수치의 감소치 (PP군)

Lipid profiles		시험군 N= 19		대조군 N= 19		군간 <i>p</i> -value	
Total cholesterol	Baseline	n	19		19		0.2971 <sup>a</sup>
		Mean±SD	214.26	39.42	202.32	29.47	
		Median	220.00		206.00		
		Min, Max	135.00	314.00	142.00	253.00	
	12 weeks	n	19		19		0.0880 <sup>a</sup>
		Mean±SD	225.63	36.19	207.11	28.48	
		Median	222.00		213.00		
		Min, Max	168.00	331.00	150.00	250.00	
	Change	n	19		19		0.4931 <sup>a</sup>
		Mean±SD	11.37	27.25	4.79	31.19	
		Median	12.00		4.00		
		Min, Max	-34.00	76.00	-44.00	72.00	
군내 <i>p</i> -value		0.0857 <sup>c</sup>		0.5118 <sup>d</sup>			
HDL cholesterol	Baseline	n	19		19		0.4584 <sup>a</sup>
		Mean±SD	52.53	10.15	50.21	8.85	
		Median	50.00		47.00		
		Min, Max	38.00	77.00	38.00	70.00	
	12 weeks	n	19		19		0.4825 <sup>b</sup>
		Mean±SD	55.68	8.69	53.95	10.44	
		Median	57.00		55.00		
		Min, Max	41.00	73.00	30.00	83.00	
	Change	N	19		19		0.8300 <sup>a</sup>
		Mean±SD	3.16	8.17	3.74	8.33	
		Median	3.00		5.00		
		Min, Max	-11.00	18.00	-15.00	17.00	
군내 <i>p</i> -value		0.1094 <sup>c</sup>		0.0661 <sup>c</sup>			
LDL cholesterol	Baseline	n	19		19		0.1847 <sup>a</sup>
		Mean±SD	132.74	30.34	120.68	24.26	
		Median	136.00		124.00		
		Min, Max	70.00	202.00	79.00	173.00	
	12 weeks	n	19		19		<b>0.0234<sup>a</sup></b>
		Mean±SD	149.79	27.99	130.26	22.55	
		Median	146.00		133.00		
		Min, Max	106.00	228.00	94.00	163.00	
	Change (%)	n	19		19		
	Lipid profiles		시험군 N= 19		대조군 N= 19		군간 <i>p</i> -value
		Mean±SD	17.05	22.29	9.58	23.75	0.3239 <sup>a</sup>
		Median	15.00		13.00		
	Min, Max	-21.00	70.00	-44.00	47.00		
군내 <i>p</i> -value		<b>0.0037<sup>c</sup></b>		0.0957 <sup>c</sup>			

Change = 12 weeks - Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

### 5.3.9. Baseline 대비 복용 12 주 후에 Lipid profiles 수치의 개선율

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 Lipid profiles 수치의 감소치 ( $[\text{Lipid profiles at V4} - \text{Lipid profiles at V2}] / \text{Lipid profiles at V2} * 100$ )의 분석 결과를 표 14와 표 15에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 Total cholesterol 수치는 시험군의 경우  $214.14 \pm 41.50$ , 대조군의 경우  $205.76 \pm 34.41$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 Total cholesterol 수치는 시험군의 경우  $220.52 \pm 38.61$ , 대조군의 경우  $213.07 \pm 43.54$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.4061, 종료: p-value = 0.2728)

각 군 내 Total cholesterol 수치 감소치는 시험군의 경우  $4.48 \pm 15.30$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $4.62 \pm 18.31$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.1186, 대조군: p-value = 0.1849) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 Total cholesterol 수치 감소치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.7676)

HDL cholesterol의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 HDL cholesterol 수치는 시험군의 경우  $53.69 \pm 10.51$ , 대조군의 경우  $52.52 \pm 10.03$ 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 HDL cholesterol 수치는 시험군의 경우  $56.76 \pm 10.25$ , 대조군의 경우  $55.24 \pm 11.78$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.6656, 종료: p-value = 0.4273)

각 군 내 HDL cholesterol 수치 감소치는 시험군의 경우  $7.22 \pm 15.44$ 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우  $6.38 \pm 18.62$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (시험군: p-value = 0.0178, 대조군: p-value = 0.0754) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 HDL cholesterol 수치 감소치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.8527)

LDL cholesterol의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 LDL cholesterol 수치는 시험군의 경우  $130.83 \pm 31.00$ , 대조군의 경우  $123.31 \pm 27.32$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 LDL cholesterol 수치는 시험군의 경우  $144.76 \pm 30.87$ , 대조군의 경우  $133.10 \pm 26.49$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.3315, 종료: p-value = 0.1285)

각 군 내 LDL cholesterol 수치 감소치는 시험군의 경우  $13.60 \pm 23.70$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우  $11.10 \pm 23.54$ 로 통계적으로 유의한 차이가 있었다. (시험군: p-value = 0.0009, 대조군: p-value = 0.0170) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 LDL cholesterol 수치 감소치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.7558)

표 14. Baseline 대비 복용 12주 후에 Lipid profiles 수치의 개선을 (FA군)

Lipid profiles		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value	
Total cholesterol	Baseline	n	29		29		0.4061 <sup>a</sup>
		Mean±SD	214.14	41.50	205.76	34.41	
		Median	220.00		206.00		
		Min, Max	131.00	314.00	142.00	290.00	
	12 weeks	n	29		29		0.2728 <sup>b</sup>
		Mean±SD	220.52	38.61	213.07	43.54	
		Median	222.00		210.00		
		Min, Max	148.00	331.00	150.00	368.00	
	Change	n	29		29		0.7676 <sup>b</sup>
Mean±SD		4.48	15.30	4.62	18.31		
Median		3.74		1.99			
	Min, Max	-25.53	56.30	-23.28	44.44		
군내 <i>p</i> -value		0.1186 <sup>d</sup>		0.1849 <sup>d</sup>			
HDL cholesterol	Baseline	n	29		29		0.6656 <sup>a</sup>
		Mean±SD	53.69	10.51	52.52	10.03	
		Median	55.00		53.00		
		Min, Max	34.00	78.00	37.00	77.00	
	12 weeks	n	29		29		0.4273 <sup>b</sup>
		Mean±SD	56.76	10.25	55.24	11.78	
		Median	57.00		55.00		
		Min, Max	41.00	92.00	30.00	83.00	
	Change (%)	n	29		29		0.8527 <sup>a</sup>
Mean±SD		7.22	15.44	6.38	18.62		
Median		7.89		7.14			
	Min, Max	-17.46	35.29	-33.33	44.74		
군내 <i>p</i> -value		<b>0.0178<sup>c</sup></b>		0.0754 <sup>c</sup>			
LDL cholesterol	Baseline	n	29		29		0.3315 <sup>a</sup>
		Mean±SD	130.83	31.00	123.31	27.32	
		Median	127.00		125.00		
		Min, Max	64.00	202.00	59.00	180.00	
	12 weeks	n	29		29		0.1285 <sup>a</sup>
		Mean±SD	144.76	30.87	133.10	26.49	
Median		141.00		133.00			
	Min, Max	91.00	228.00	94.00	190.00		

Lipid profiles		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value
Change (%)	n	29		29		0.7558 <sup>b</sup>
	Mean±SD	13.60	23.70	11.10	23.54	
	Median	11.76		7.94		
	Min, Max	-30.87	100.00	-31.88	77.97	
군내 <i>p</i> -value		<b>0.0009<sup>d</sup></b>		<b>0.0170<sup>c</sup></b>		

Change = (12 weeks - Baseline)/Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

표 15. Baseline 대비 복용 12주 후에 Lipid profiles 수치의 개선을 (PP군)

Lipid profiles		시험군 N= 19		대조군 N= 19		군간 <i>p</i> -value	
Total cholesterol	Baseline	n	19		19		0.2971 <sup>a</sup>
		Mean±SD	214.26	39.42	202.32	29.47	
		Median	220.00		206.00		
		Min, Max	135.00	314.00	142.00	253.00	
	12 weeks	n	19		19		0.0880 <sup>a</sup>
		Mean±SD	225.63	36.19	207.11	28.48	
		Median	222.00		213.00		
		Min, Max	168.00	331.00	150.00	250.00	
	Change	n	19		19		0.4478 <sup>b</sup>
Mean±SD		6.89	16.21	3.75	17.33		
Median		4.74		1.94			
	Min, Max	-16.43	56.30	-21.36	44.44		
군내 <i>p</i> -value		0.0799 <sup>d</sup>		0.3582 <sup>d</sup>			
HDL cholesterol	Baseline	n	19		19		0.4584 <sup>a</sup>
		Mean±SD	52.53	10.15	50.21	8.85	
		Median	50.00		47.00		
		Min, Max	38.00	77.00	38.00	70.00	
	12 weeks	n	19		19		0.4825 <sup>b</sup>
		Mean±SD	55.68	8.69	53.95	10.44	
		Median	57.00		55.00		
		Min, Max	41.00	73.00	30.00	83.00	
	Change (%)	n	19		19		0.8742 <sup>a</sup>
Mean±SD		7.60	15.30	8.46	17.93		
Median		7.89		10.00			
	Min, Max	-14.29	32.73	-33.33	44.74		
군내 <i>p</i> -value		<b>0.0440<sup>c</sup></b>		0.0544 <sup>c</sup>			
LDL cholesterol	Baseline	n	19		19		0.1847 <sup>a</sup>
		Mean±SD	132.74	30.34	120.68	24.26	
		Median	136.00		124.00		
		Min, Max	70.00	202.00	79.00	173.00	
	12 weeks	n	19		19		<b>0.0234<sup>a</sup></b>
		Mean±SD	149.79	27.99	130.26	22.55	
Median		146.00		133.00			
	Min, Max	106.00	228.00	94.00	163.00		
군내 <i>p</i> -value		<b>0.0033<sup>d</sup></b>		<b>0.0433<sup>c</sup></b>			

Lipid profiles		시험군 N= 19		대조군 N= 19		군간 <i>p</i> -value
Change (%)	n	19		19		0.8153 <sup>b</sup>
	Mean±SD	16.22	25.49	10.47	20.99	
	Median	12.87		13.46		
	Min, Max	-16.54	100.00	-31.88	47.78	
군내 <i>p</i> -value		<b>0.0033<sup>d</sup></b>		<b>0.0433<sup>c</sup></b>		

Change = (12 weeks - Baseline)/Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

## 6. 결과: 안전성

### 6.1. 이상반응 요약

인체적용시험용식품 복용 후 발생한 이상반응을 표 16에 요약하였다. 이상반응은 시험군에서 0명 (0.00%)의 대상자에게 총 0건이 발생하였고, 대조군에서 1명 (3.45%)의 대상자에게 총 1건이 발생하였다. 이상반응 발현에 대한 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. (p-value = 1.0000)

대조군에서 인체적용시험용식품 복용 이후 발생한 이상반응은 모두 경증 이었으며, 후유증 없이 회복되었다. 이상반응 처치를 살펴보면, 인체적용시험제품 복용 용량 변경/일시적 중단으로 보고 되었고, 예측된 이상반응으로 보고 되었다.

표 16. 이상반응 요약 (Safety 군)

이상반응 요약	시험군 N=29			대조군 N=29			군간 p-value
	n	(%)	[건]	n	(%)	[건]	
인체적용시험용식품 복용 이후 발생한 이상반응 (TEAE)	0	(0.00)	0	1	(3.45)	1	1.0000 <sup>f</sup>
이상약물반응(ADR) <sup>1)</sup>	0	(0.00)	0	0	(0.00)	0	—
중대한 이상반응(SAE)	0	(0.00)	0	0	(0.00)	0	—
예상하지 못한 이상약물반응(UADR) <sup>1)</sup>	0	(0.00)	0	0	(0.00)	0	—
중도탈락의 원인이 된 이상반응	0	(0.00)	0	0	(0.00)	0	—

1) 명확히 관련 있음, 관련이 있다고 생각됨, 관련 가능성이 있음, UK

e: Pearson's chi-square test

f: Fisher's exact test

Note: 인체적용시험용식품 복용 전 발생한 이상반응의 중증도가 복용 후 악화되었거나 복용 후 새로 발생한 모든 이상반응 들을 TEAE로 제시

## 6.2. 이상반응 발생상황

### 6.2.1. 활력징후 검사 결과와 변화량

인체적용시험용 식품 복용 전과 후의 활력징후 분석 결과를 표 17 에 정리하였다. Safety 군의 분석 결과를 살펴보면, 시험군의 군 내 비교 에서 이완기 체온이 통계적으로 유의한 차이가 있었고, (체온:p-value = 0.0437) 대조군의 군 내 비교 에서 수축기가 통계적으로 유의한 차이가 있었다. (수축기:p-value = 0.0095)

이외에 각 군 내 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 활력징후 항목은 없었다.



표 17. 활력징후 검사 결과와 변화량 (Safety 군)

활력 징후		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value	
수축기 (mmHg)	Baseline	n	29		29		0.3256 <sup>a</sup>
		Mean±SD	127.86	6.47	129.48	5.97	
		Median	130.00		131.00		
	Min, Max	109.00	138.00	114.00	139.00		
	Final visit	n	29		29		0.9192 <sup>b</sup>
		Mean±SD	126.17	7.12	125.83	7.74	
		Median	127.00		126.00		
	Min, Max	110.00	148.00	104.00	139.00		
	Change	n	29		29		0.4975 <sup>b</sup>
Mean±SD		-1.69	8.54	-3.66	7.07		
Median		0.00		-4.00			
Min, Max	-14.00	24.00	-21.00	12.00			
군내 <i>p</i> -value		0.1387 <sup>d</sup>		<b>0.0095<sup>c</sup></b>			
이완기 (mmHg)	Baseline	n	29		29		0.6025 <sup>a</sup>
		Mean±SD	79.41	5.03	80.17	5.96	
		Median	80.00		81.00		
	Min, Max	69.00	88.00	70.00	90.00		
	Final visit	n	29		29		0.3779 <sup>b</sup>
		Mean±SD	77.69	6.22	79.03	6.76	
		Median	78.00		80.00		
	Min, Max	66.00	90.00	66.00	88.00		
	Change	n	29		29		0.7660 <sup>a</sup>
Mean±SD		-1.72	7.33	-1.14	7.59		
Median		-1.00		-3.00			
Min, Max	-22.00	14.00	-14.00	16.00			

활력 징후		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value	
군내 <i>p</i> -value		0.2159 <sup>c</sup>		0.4263 <sup>c</sup>			
맥박 (beats/min)	Baseline	n	29		29		0.1592 <sup>a</sup>
		Mean±SD	74.21	7.22	71.21	8.72	
		Median	75.00		72.00		
		Min, Max	59.00	90.00	55.00	87.00	
	Final visit	n	29		29		0.3794 <sup>a</sup>
		Mean±SD	73.28	9.38	71.14	8.99	
		Median	72.00		70.00		
		Min, Max	53.00	91.00	53.00	83.00	
	Change	n	29		29		0.7346 <sup>a</sup>
		Mean±SD	-0.93	8.48	-0.07	10.67	
		Median	-1.00		-1.00		
		Min, Max	-23.00	22.00	-21.00	27.00	
군내 <i>p</i> -value		0.5589 <sup>c</sup>		0.9725 <sup>c</sup>			
체온 (°C)	Baseline	n	29		29		0.2918 <sup>b</sup>
		Mean±SD	36.40	0.21	36.35	0.24	
		Median	36.40		36.30		
		Min, Max	36.10	36.70	36.00	36.90	
	Final visit	n	29		29		0.1747 <sup>a</sup>
		Mean±SD	36.51	0.20	36.43	0.22	
		Median	36.50		36.40		
		Min, Max	36.10	36.90	36.00	36.90	
	Change	n	29		29		0.7328 <sup>a</sup>
		Mean±SD	0.11	0.27	0.08	0.26	
		Median	0.20		0.10		
		Min, Max	-0.40	0.80	-0.40	0.60	
군내 <i>p</i> -value		<b>0.0437<sup>c</sup></b>		0.1016 <sup>c</sup>			

Change = Final visit - Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

6.2.2. 실험실검사: 혈액학 검사 결과 분석

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 실험실검사: 혈액학 검사 결과 분석을 표 18 에 정리하였다. Safety 군의 분석 결과를 살펴보면, 실험실검사: 혈액학 검사 결과는 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다.

표 18. 혈액학 검사 결과 분석 (Safety 군)

혈액학 검사		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value	
WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	Baseline	n	29		29		0.7795 <sup>b</sup>
		Mean±SD	6.64	1.90	6.72	1.74	
		Median	6.02		6.54		
		Min, Max	3.36	10.83	4.10	9.78	
	Final visit	n	29		29		0.8388 <sup>a</sup>
		Mean±SD	6.55	1.48	6.47	1.66	
		Median	6.43		6.03		
		Min, Max	3.90	10.56	4.32	10.16	
	Change	n	29		29		0.4054 <sup>b</sup>
Mean±SD		-0.09	1.41	-0.25	1.08		
Median		0.00		-0.39			
	Min, Max	-2.68	3.94	-2.21	3.54		
군내 <i>p</i> -value		0.7366 <sup>c</sup>		0.0666 <sup>d</sup>			
RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	Baseline	n	29		29		0.5723 <sup>a</sup>
		Mean±SD	5.13	0.34	5.19	0.42	
		Median	5.08		5.16		
		Min, Max	4.41	5.75	4.31	6.04	
	Final visit	n	29		29		0.7394 <sup>a</sup>
		Mean±SD	5.11	0.35	5.14	0.41	
		Median	5.07		5.10		
		Min, Max	4.31	6.10	4.25	5.92	
	Change	n	29		29		0.6662 <sup>a</sup>
Mean±SD		-0.02	0.18	-0.05	0.23		
Median		-0.01		-0.09			
	Min, Max	-0.40	0.35	-0.41	0.59		
군내 <i>p</i> -value		0.4716 <sup>c</sup>		0.2684 <sup>c</sup>			
Hemoglobin (g/dL)	Baseline	n	29		29		0.5966 <sup>a</sup>
		Mean±SD	16.03	1.02	16.18	1.15	
	Median	16.00		16.00			

Platelets (10 <sup>3</sup> /μL)	Baseline	n	29		29		0.6132 <sup>b</sup>
		Mean±SD	263.90	53.27	266.55	59.03	
		Median	273.00		253.00		
	Final visit	n	29		29		0.9945 <sup>a</sup>
		Mean±SD	264.10	56.38	264.00	57.33	
		Median	268.00		258.00		
	Change	n	29		29		0.7557 <sup>b</sup>
		Mean±SD	0.21	37.24	-2.55	25.82	
		Median	-9.00		0.00		
		Min, Max	117.00	376.00	126.00	374.00	
		Min, Max	96.00	372.00	140.00	392.00	
		Min, Max	-71.00	83.00	-88.00	41.00	

혈액학 검사		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 p-value	
		Min, Max	13.90	17.70	13.70	19.20	
Final visit	n	29		29		0.6892 <sup>a</sup>	
	Mean±SD	15.90	0.96	16.01	1.19		
	Median	15.90		16.10			
	Min, Max	13.40	17.70	13.40	18.30		
Change	n	29		29		0.8142 <sup>a</sup>	
	Mean±SD	-0.13	0.52	-0.17	0.69		
	Median	0.00		-0.20			
	Min, Max	-1.40	1.00	-1.30	2.10		
군내 p-value		0.1762 <sup>c</sup>		0.1893 <sup>c</sup>			
Hematocrit (%)	Baseline	n	29		29		0.6783 <sup>a</sup>
		Mean±SD	46.66	2.63	47.00	3.48	
		Median	46.90		46.70		
	Final visit	n	29		29		0.4780 <sup>a</sup>
		Mean±SD	46.06	2.57	46.58	3.04	
		Median	45.80		46.70		
	Change	n	29		29		0.7407 <sup>a</sup>
		Mean±SD	-0.60	1.74	-0.41	2.53	
		Median	-0.30		-0.90		
		Min, Max	39.80	51.60	40.90	56.20	
		Min, Max	39.40	51.70	41.30	52.80	
		Min, Max	-4.60	3.50	-5.10	6.20	
군내 p-value		0.0727 <sup>c</sup>		0.3857 <sup>c</sup>			

혈액학 검사	시험군		대조군		군간 p-value
	N= 29		N= 29		
	군내 p-value		0.9763 <sup>c</sup>		1.0000 <sup>d</sup>

Change = Final visit - Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

### 6.2.3. 실험실검사: 혈액화학 검사 결과 분석

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 실험실검사: 혈액화학 검사 결과 분석을 표 19 에 정리 하였다. Safety 군의 분석 결과를 살펴보면, LDL cholesterol 시험군과 대조군의 군 내 비교에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다. (시험군: p-value =0.0027, 대조군: p-value =0.0384)

이 외에 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 혈액화학 항목은 없었다.

표 19. 혈액화학 검사 결과 분석 (Safety 군)

혈액화학 검사			시험군		대조군		군간 p-value	
			N= 29		N= 29			
γ-GT (U/L)	Baseline	n	29		29		0.7855 <sup>b</sup>	
		Mean±SD	78.62	48.49	74.03	44.52		
		Median	67.00		71.00			
	Min, Max	12.00	162.00	14.00	185.00			
	Final visit	n	29		29			0.9071 <sup>b</sup>
		Mean±SD	75.90	55.62	71.69	41.07		
		Median	64.00		65.00			
	Min, Max	13.00	218.00	18.00	170.00			
	Change	n	29		29			0.6351 <sup>b</sup>
Mean±SD		-2.72	26.83	-2.34	24.50			
Median		-1.00		2.00				
Min, Max	-60.00	56.00	-67.00	60.00				
군내 p-value			0.5889 <sup>c</sup>		0.7358 <sup>d</sup>			
AST (U/L)	Baseline	n	29		29		0.9502 <sup>b</sup>	
		Mean±SD	34.97	12.38	33.86	10.32		
		Median	30.00		30.00			
	Min, Max	25.00	86.00	25.00	66.00			
	Final visit	n	29		29			

혈액화학 검사		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value	
ALT (U/L)		Mean±SD	37.17	19.45	35.52	19.74	0.8396 <sup>b</sup>
		Median	30.00		29.00		
		Min, Max	21.00	107.00	22.00	122.00	
		n	29		29		
	Change	Mean±SD	2.21	22.67	1.66	15.23	0.9193 <sup>b</sup>
		Median	-3.00		-1.00		
		Min, Max	-62.00	73.00	-18.00	56.00	
		군내 <i>p</i> -value	0.5033 <sup>d</sup>		0.7307 <sup>d</sup>		
		n	29		29		
	Baseline	Mean±SD	43.34	20.72	32.21	11.38	0.0555 <sup>b</sup>
		Median	37.00		30.00		
		Min, Max	14.00	89.00	13.00	69.00	
	n	29		29			
Final visit	Mean±SD	49.21	37.26	35.34	20.91	0.0663 <sup>b</sup>	
	Median	37.00		31.00			
	Min, Max	15.00	179.00	13.00	121.00		
	n	29		29			
Change	Mean±SD	5.86	35.24	3.14	14.48	0.8763 <sup>b</sup>	
	Median	2.00		0.00			
	Min, Max	-46.00	126.00	-18.00	52.00		
	군내 <i>p</i> -value	0.7358 <sup>d</sup>		0.6170 <sup>d</sup>			

ALP (U/L)	Baseline	n	29		29		0.9223 <sup>a</sup>
		Mean±SD	71.97	14.91	71.59	14.57	
		Median	68.00		70.00		
	Final visit	n	29		29		0.8889 <sup>a</sup>
		Mean±SD	71.69	14.69	71.17	13.34	
		Median	72.00		72.00		
	Change	n	29		29		0.9615 <sup>a</sup>
		Mean±SD	-0.28	10.35	-0.41	11.30	
		Median	0.00		3.00		
군내 <i>p</i> -value		0.8869 <sup>c</sup>		0.8451 <sup>c</sup>			
Albumin (g/dL)	Baseline	n	29		29		0.8115 <sup>a</sup>
		Mean±SD	4.49	0.32	4.47	0.22	
		Median	4.50		4.40		
	Final visit	n	29		29		0.4054 <sup>b</sup>
		Mean±SD	4.59	0.27	4.54	0.24	
		Median	4.60		4.60		
	Change	n	29		29		0.3562 <sup>b</sup>
		Mean±SD	0.10	0.30	0.07	0.25	
		Median					
HDL cholesterol (mg/dL)	Baseline	n	29		29		0.6656 <sup>a</sup>
		Mean±SD	53.69	10.51	52.52	10.03	
		Median	55.00		53.00		
	Final visit	n	29		29		0.4273 <sup>b</sup>
		Mean±SD	56.76	10.25	55.24	11.78	
		Median					
	혈액화학 검사		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value
			Min, Max	-38.00	33.00	-45.00	130.00
	군내 <i>p</i> -value		0.2976 <sup>c</sup>		0.3101 <sup>d</sup>		

Change = Final visit - Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

혈액화학 검사		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 $p$ -value
bilirubin (mg/dL)	Mean±SD	0.94	0.36	0.85	0.42	0.1524 <sup>b</sup>
	Median	0.86		0.73		
	Min, Max	0.38	1.79	0.43	2.58	
	n	29		29		
Final visit	Mean±SD	0.89	0.25	0.84	0.29	0.5162 <sup>a</sup>
	Median	0.92		0.83		
	Min, Max	0.44	1.47	0.46	1.55	
	n	29		29		
Change	Mean±SD	-0.05	0.33	-0.01	0.34	0.4097 <sup>b</sup>
	Median	-0.06		0.00		
	Min, Max	-0.68	0.63	-1.15	0.55	
	군내 $p$ -value	0.4372 <sup>c</sup>		0.8152 <sup>d</sup>		
	n	29		29		
Baseline	Mean±SD	7.31	0.46	7.31	0.36	0.9495 <sup>a</sup>
	Median	7.30		7.30		
	Min, Max	6.30	8.10	6.60	8.00	
	n	29		29		
Total protein (mg/dL)	Mean±SD	7.30	0.39	7.24	0.31	0.6773 <sup>b</sup>
	Median	7.30		7.30		
	Min, Max	6.50	8.30	6.50	7.70	
	n	29		29		
Change	Mean±SD	-0.01	0.39	-0.07	0.36	0.3289 <sup>b</sup>
	Median	0.10		-0.10		
	Min, Max	-0.90	0.80	-0.60	0.90	
	군내 $p$ -value	0.8513 <sup>c</sup>		0.1252 <sup>d</sup>		

d: Wilcoxon's signed rank test

#### 6.2.4. 실험실검사: 소변 검사 결과 분석

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 실험실검사: 소변 검사 결과 분석을 표 20 에 정리하였다. Safety 군의 분석 결과를 살펴보면, 실험실검사: 소변 검사 결과는 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다.



혈액화학 검사		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value	
	Median	0.00		0.10			
	Min, Max	-0.70	0.50	-0.40	0.80		
	군내 <i>p</i> -value	0.0681 <sup>d</sup>		0.1309 <sup>c</sup>			
Total cholesterol (mg/dL)	n	29		29			
	Baseline	Mean±SD	214.14	41.50	205.76	34.41	0.4061 <sup>a</sup>
		Median	220.00		206.00		
		Min, Max	131.00	314.00	142.00	290.00	
	n	29		29			
	Final visit	Mean±SD	220.52	38.61	213.07	43.54	0.2728 <sup>b</sup>
		Median	222.00		210.00		
		Min, Max	148.00	331.00	150.00	368.00	
	n	29		29			
	Change	Mean±SD	6.38	27.43	7.31	35.41	0.9113 <sup>a</sup>
		Median	8.00		4.00		
		Min, Max	-60.00	76.00	-54.00	78.00	
	군내 <i>p</i> -value	0.2208 <sup>c</sup>		0.2757 <sup>c</sup>			
Triglyceride (mg/dL)	n	29		29			
	Baseline	Mean±SD	196.55	78.49	206.62	96.94	0.9010 <sup>b</sup>
		Median	178.00		178.00		
		Min, Max	89.00	391.00	77.00	429.00	
	n	29		29			
	Final visit	Mean±SD	215.00	94.38	192.66	85.66	0.3427 <sup>b</sup>
		Median	196.00		177.00		
		Min, Max	93.00	469.00	82.00	381.00	
	n	29		29			
	Change	Mean±SD	18.45	97.73	-13.97	74.48	0.1610 <sup>a</sup>
		Median	6.00		-4.00		
		Min, Max	-121.00	302.00	-245.00	139.00	
	군내 <i>p</i> -value	0.3181 <sup>c</sup>		0.3212 <sup>c</sup>			

혈액화학 검사		시험군		대조군		군간 <i>p</i> -value	
		N= 29		N= 29			
LDL cholesterol (mg/dL)		Median	57.00		55.00		0.8831 <sup>a</sup>
		Min, Max	41.00	92.00	30.00	83.00	
	Change	n	29		29		
		Mean±SD	3.07	8.14	2.72	9.58	
		Median	3.00		3.00		
		Min, Max	-11.00	18.00	-18.00	23.00	
		군내 <i>p</i> -value	0.0520 <sup>c</sup>		0.1368 <sup>c</sup>		
	Baseline	n	29		29		
		Mean±SD	130.83	31.00	123.31	27.32	
		Median	127.00		125.00		
	Final visit	n	29		29		
		Mean±SD	144.76	30.87	133.10	26.49	
		Median	141.00		133.00		
	Change	Min, Max	64.00	202.00	59.00	180.00	
		n	29		29		
Mean±SD		13.93	22.76	9.79	24.26		
Median		14.00		10.00			
Min, Max		-46.00	70.00	-44.00	53.00		
군내 <i>p</i> -value	<b>0.0027<sup>c</sup></b>		<b>0.0384<sup>c</sup></b>				
BUN (mg/dL)	Baseline	n	29		29		
		Mean±SD	13.75	3.41	13.95	3.84	
		Median	13.20		13.60		
	Final visit	Min, Max	8.50	22.70	8.10	21.10	
		n	29		29		
		Mean±SD	13.73	4.77	15.06	3.88	
	Change	Median	12.70		14.40		
		Min, Max	6.80	26.50	9.30	26.20	
		n	29		29		
		Mean±SD	-0.02	5.11	1.10	3.62	
		Median	-0.50		0.70		
	Min, Max	-10.50	15.80	-6.50	8.00		
군내 <i>p</i> -value	0.9856 <sup>c</sup>		0.1122 <sup>c</sup>				
Creatinine (mg/dL)	Baseline	n	29		29		
		Mean±SD	1.00	0.10	1.03	0.15	

혈액화학 검사		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value	
	Median	1.00		1.01			
	Min, Max	0.75	1.22	0.75	1.40		
Final visit	n	29		29			
	Mean±SD	1.01	0.16	1.00	0.13	0.8457 <sup>b</sup>	
	Median	0.98		1.00			
	Min, Max	0.77	1.64	0.74	1.24		
Change	n	29		29			
	Mean±SD	0.01	0.14	-0.03	0.09	0.5281 <sup>b</sup>	
	Median	-0.01		-0.01			
	Min, Max	-0.18	0.61	-0.27	0.15		
군내 <i>p</i> -value		0.5036 <sup>d</sup>		0.1073 <sup>c</sup>			
Uric acid (mg/dL)	n	29		29			
	Baseline	Mean±SD	6.27	1.32	6.43	1.17	0.6304 <sup>a</sup>
		Median	6.40		6.30		
		Min, Max	3.60	8.60	4.20	8.60	
	Final visit	n	29		29		
		Mean±SD	6.46	1.51	6.52	1.17	0.8776 <sup>a</sup>
		Median	6.80		6.50		
		Min, Max	2.90	8.70	4.50	9.10	
	Change	n	29		29		
		Mean±SD	0.19	0.73	0.09	1.03	0.6589 <sup>a</sup>
		Median	0.20		0.20		
		Min, Max	-0.99	1.70	-3.00	1.70	
군내 <i>p</i> -value		0.1704 <sup>c</sup>		0.6552 <sup>c</sup>			
Glucose (mg/dL)	n	29		29			
	Baseline	Mean±SD	103.14	19.42	100.76	16.17	0.6743 <sup>b</sup>
		Median	100.00		96.00		
		Min, Max	75.00	163.00	71.00	150.00	
	Final visit	n	29		29		
		Mean±SD	100.00	20.43	101.48	33.21	0.5806 <sup>b</sup>
		Median	96.00		95.00		
		Min, Max	79.00	194.00	76.00	259.00	
	Change	n	29		29		
		Mean±SD	-3.14	15.92	0.72	27.60	0.7734 <sup>b</sup>
		Median	-4.00		0.00		

표 20. 소변 검사 결과 분석 (Safety 군)

소변 검사		시험군 N= 29		대조군 N= 29		군간 <i>p</i> -value	
pH		n	29	29			
	Baseline	Mean±SD	5.47	0.78	5.55	0.98	0.8327 <sup>b</sup>
		Median	5.00		5.00		
		Min, Max	5.00	7.50	5.00	8.00	
		n	29	29			
	Final visit	Mean±SD	5.55	0.84	5.57	0.88	0.9321 <sup>b</sup>
		Median	5.00		5.00		
		Min, Max	5.00	8.00	5.00	8.00	
		n	29	29			
	Change	Mean±SD	0.09	0.95	0.02	1.35	0.9676 <sup>b</sup>
		Median	0.00		0.00		
		Min, Max	-2.00	2.00	-3.00	3.00	
군내 <i>p</i> -value		0.6595 <sup>d</sup>		0.9455 <sup>c</sup>			

Change = Final visit - Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

6.2.5. 실험실검사: 혈액학 검사의 정상/비정상 결과 분석

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 실험실검사: 혈액학 검사의 정상/비정상 결과 분석을 표 21에 정리하였다. Safety 군의 분석 결과를 살펴보면, 혈액학 검사의 정상/비정상 결과는 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다.

표 21. 혈액학 검사의 정상/비정상 결과 분석 (Safety 군)

Baseline	Final visit	시험군 N=29				대조군 N=29				군간 <i>p</i> -value		
		N	정상		비정상		N	정상			비정상	
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)						
WBC	정상		21 (72.41)	2 (6.90)		20 (68.97)	1 (3.45)	1.0000 <sup>f</sup>				
	비정상	29	5 (17.24)	1 (3.45)	29	3 (10.34)	5 (17.24)					
	군내 <i>p</i> -value		0.4531 <sup>h</sup>			0.6250 <sup>h</sup>						
RBC	정상		27 (93.10)	0 (0.00)		24 (82.76)	1 (3.45)	0.4906 <sup>f</sup>				
	비정상	29	1 (3.45)	1 (3.45)	29	2 (6.90)	2 (6.90)					
	군내 <i>p</i> -value		1.0000 <sup>h</sup>			1.0000 <sup>h</sup>						
Hemoglobin	정상		19 (65.52)	1 (3.45)		21 (72.41)	1 (3.45)	1.0000 <sup>f</sup>				
	비정상	29	3 (10.34)	6 (20.69)	29	1 (3.45)	6 (20.69)					
	군내 <i>p</i> -value		0.6250 <sup>h</sup>			1.0000 <sup>h</sup>						
Hematocrit	정상		28 (96.55)	0 (0.00)		26 (89.66)	0 (0.00)	—				
	비정상	29	0 (0.00)	1 (3.45)	29	2 (6.90)	1 (3.45)					
	군내 <i>p</i> -value		—			0.5000 <sup>h</sup>						
Platelets	정상		24 (82.76)	1 (3.45)		25 (86.21)	1 (3.45)	1.0000 <sup>f</sup>				
	비정상	29	3 (10.34)	1 (3.45)	29	2 (6.90)	1 (3.45)					
	군내 <i>p</i> -value		0.6250 <sup>h</sup>			1.0000 <sup>h</sup>						

e: Pearson's chi-square test

f: Fisher's exact test

g: McNemar's test

h: McNemar's Exact test

6.2.6. 실험실검사: 혈액화학 검사의 정상/비정상 결과 분석

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 실험실검사: 혈액화학 검사의 정상/비정상 결과 분석을 표 22 에 정리하였다. Safety 군의 분석 결과를 살펴보면, 혈액화학 검사의 정상/비정상 결과는 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다.

표 22. 혈액화학 검사의 정상/비정상 결과 분석 (Safety 군)

HDL cholesterol	정상	26	(89.66)	1	(3.45)	24	(82.76)	3	(10.34)	0.6124 <sup>f</sup>		
	비정상	29	2	(6.90)	0	(0.00)	29	2	(6.90)		0	(0.00)
	군내 p-value	1.0000 <sup>h</sup>				1.0000 <sup>h</sup>						
LDL cholesterol	정상	12	(41.38)	6	(20.69)	18	(62.07)	5	(17.24)	0.5295 <sup>e</sup>		
	비정상	29	2	(6.90)	9	(31.03)	29	1	(3.45)		5	(17.24)
	군내 p-value	0.2891 <sup>h</sup>				0.2188 <sup>h</sup>						
BUN	정상	23	(79.31)	4	(13.79)	26	(89.66)	1	(3.45)	0.3563 <sup>f</sup>		
	비정상	29	2	(6.90)	0	(0.00)	29	1	(3.45)		1	(3.45)
	군내 p-value	0.6875 <sup>h</sup>				1.0000 <sup>h</sup>						
Creatinine	정상	27	(93.10)	1	(3.45)	27	(93.10)	1	(3.45)	1.0000 <sup>f</sup>		
	비정상	29	0	(0.00)	1	(3.45)	29	0	(0.00)		1	(3.45)
	군내 p-value	1.0000 <sup>h</sup>				1.0000 <sup>h</sup>						
Uric acid	정상	15	(51.72)	7	(24.14)	20	(68.97)	2	(6.90)	0.1595 <sup>f</sup>		
	비정상	29	2	(6.90)	5	(17.24)	29	4	(13.79)		3	(10.34)
	군내 p-value	0.1797 <sup>h</sup>				0.6875 <sup>h</sup>						
Glucose	정상	17	(58.62)	1	(3.45)	21	(72.41)	0	(0.00)	0.4750 <sup>f</sup>		
	비정상	29	7	(24.14)	4	(13.79)	29	3	(10.34)		5	(17.24)
	군내 p-value	0.0703 <sup>h</sup>				0.2500 <sup>h</sup>						

e: Pearson's chi-square test

f: Fisher's exact test

g: McNemar's test

h: McNemar's Exact test

Baseline	Final visit	시험군 N=29				대조군 N=29				군간 <i>p</i> -value		
		N	정상		비정상		N	정상			비정상	
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)						
γ-GT	정상		11 (37.93)	2 (6.90)		13 (44.83)	1 (3.45)			1.0000 <sup>f</sup>		
	비정상	29	4 (13.79)	12 (41.38)	29	1 (3.45)	14 (48.28)					
	군내 <i>p</i> -value		0.6875 <sup>h</sup>				1.0000 <sup>h</sup>					
AST	정상		23 (79.31)	4 (13.79)		24 (82.76)	2 (6.90)			0.6732 <sup>f</sup>		
	비정상	29	1 (3.45)	1 (3.45)	29	2 (6.90)	1 (3.45)					
	군내 <i>p</i> -value		0.3750 <sup>h</sup>				1.0000 <sup>h</sup>					
ALT	정상		15 (51.72)	3 (10.34)		24 (82.76)	3 (10.34)			0.6804 <sup>f</sup>		
	비정상	29	6 (20.69)	5 (17.24)	29	0 (0.00)	2 (6.90)					
	군내 <i>p</i> -value		0.5078 <sup>h</sup>				0.2500 <sup>h</sup>					
ALP	정상		29 (100.0)	0 (0.00)		29 (100.0)	0 (0.00)			—		
	비정상	29	0 (0.00)	0 (0.00)	29	0 (0.00)	0 (0.00)					
	군내 <i>p</i> -value		—				—					
Total bilirubin	정상		20 (68.97)	3 (10.34)		24 (82.76)	1 (3.45)			0.6098 <sup>f</sup>		
	비정상	29	5 (17.24)	1 (3.45)	29	1 (3.45)	3 (10.34)					
	군내 <i>p</i> -value		0.7266 <sup>h</sup>				1.0000 <sup>h</sup>					
Total protein	정상		27 (93.10)	0 (0.00)		28 (96.55)	1 (3.45)			1.0000 <sup>f</sup>		
	비정상	29	1 (3.45)	1 (3.45)	29	0 (0.00)	0 (0.00)					
	군내 <i>p</i> -value		1.0000 <sup>h</sup>				1.0000 <sup>h</sup>					
Albumin	정상		28 (96.55)	0 (0.00)		29 (100.0)	0 (0.00)			—		
	비정상	29	1 (3.45)	0 (0.00)	29	0 (0.00)	0 (0.00)					
	군내 <i>p</i> -value		1.0000 <sup>h</sup>				—					
Total cholesterol	정상		11 (37.93)	4 (13.79)		16 (55.17)	4 (13.79)			1.0000 <sup>f</sup>		
	비정상	29	3 (10.34)	11 (37.93)	29	3 (10.34)	6 (20.69)					
	군내 <i>p</i> -value		1.0000 <sup>h</sup>				1.0000 <sup>h</sup>					
Tri glyceride	정상		5 (17.24)	3 (10.34)		8 (27.59)	2 (6.90)			0.6404 <sup>f</sup>		
	비정상	29	4 (13.79)	17 (58.62)	29	2 (6.90)	17 (58.62)					
	군내 <i>p</i> -value		1.0000 <sup>h</sup>				1.0000 <sup>h</sup>					

6.2.7. 실험실검사: 소변 검사의 정상/비정상 결과 분석

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 실험실검사: 소변 검사의 정상/비정상 결과 분석을 표 23에 정리하였다. Safety 군의 분석 결과를 살펴보면, 소변 검사의 정상/비정상 결과는 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다.

표 23. 소변 검사의 정상/비정상 결과 분석 (Safety 군)

Baseline	Final visit	시험군 N=29				대조군 N=29				군간 p-value		
		N	정상		비정상		N	정상			비정상	
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)						
Specific gravity	정상		20 (68.97)	4 (13.79)		19 (65.52)	6 (20.69)	0.7342 <sup>f</sup>				
	비정상	29	1 (3.45)	4 (13.79)	29	2 (6.90)	2 (6.90)					
	군내 p-value		0.3750 <sup>h</sup>			0.2891 <sup>h</sup>						
pH	정상		29 (100.0)	0 (0.00)		29 (100.0)	0 (0.00)	—				
	비정상	29	0 (0.00)	0 (0.00)	29	0 (0.00)	0 (0.00)					
	군내 p-value		—			—						
RBC	정상		26 (89.66)	2 (6.90)		25 (86.21)	3 (10.34)	1.0000 <sup>f</sup>				
	비정상	29	1 (3.45)	0 (0.00)	29	0 (0.00)	1 (3.45)					
	군내 p-value		1.0000 <sup>h</sup>			0.2500 <sup>h</sup>						
WBC	정상		29 (100.0)	0 (0.00)		28 (96.55)	0 (0.00)	—				
	비정상	29	0 (0.00)	0 (0.00)	29	1 (3.45)	0 (0.00)					
	군내 p-value		—			1.0000 <sup>h</sup>						
Protein	정상		27 (93.10)	1 (3.45)		26 (89.66)	1 (3.45)	1.0000 <sup>f</sup>				
	비정상	29	1 (3.45)	0 (0.00)	29	0 (0.00)	2 (6.90)					
	군내 p-value		1.0000 <sup>h</sup>			1.0000 <sup>h</sup>						
Glucose	정상		28 (96.55)	1 (3.45)		25 (86.21)	4 (13.79)	0.3574 <sup>f</sup>				
	비정상	29	0 (0.00)	0 (0.00)	29	0 (0.00)	0 (0.00)					
	군내 p-value		1.0000 <sup>h</sup>			0.1250 <sup>h</sup>						

e: Pearson's chi-square test

f: Fisher's exact test

g: McNemar's test

h: McNemar's Exact test

6.2.8. 이학적 검사

본 연구에서는 모든 대상들에게서 이학적 검사결과에서 비정상 내용을 찾아볼 수 없었다.



## 7. 결과 및 고찰

본 인체적용시험은 단일기관, 무작위 배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험으로 만 19세 이상 만 70세 미만의 건강한 성인 남녀에서 2주 이상 AST 수치가 25 IU/L 이상인 경증 간 기능 저하 대상자에서 12주 동안 초음파처리 인삼꽃대 추출물(UGFB) 하루 2그램을 복용한 후 간 기능 개선효과 등의 기능성 및 안전성을 평가하고자 하였다. 총 96명 스크리닝하여 스크리닝 탈락 36명 되었고 적합하다고 판단되는 60명을 등록하여 시험군과 대조군에서 1명씩 복용하지 않은 대상자를 제외하고 시험군 29명 완료 대조군 중도탈락 2명 종료 27명 이었다. 참여한 대상자의 인구학적 및 기타 기저 특성에 대한 분석 결과 연령, 성별, 신장, 체중, 흡연습관, 식사습관, 운동습관, 과거병력, 선행약물 복용력 등에서 군간 차이가 없었다. 기능성평가 분석은 FA 군과 PP 군 모두에서 실시하였고, 분석 결과에 대한 해석은 주 분석군인 FA 군을 중심으로 기술하였으며 PP 군의 결과에 대한 해석은 FA 군의 결과와 상이한 경우에만 기술하였다.

기능성 평가 결과, 일차변수는 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 12주 후 AST 수치의 감소치이며, 위약에 비해 시험식품이 우월한지를 입증하고자 하였다. 인체적용시험용 식품 복용 전 AST 수치는 시험군의 경우  $34.97 \pm 12.38$ , 대조군의 경우  $33.86 \pm 10.32$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 AST 수치는 시험군의 경우  $37.17 \pm 19.45$ , 대조군의 경우  $35.52 \pm 19.74$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 각 군 내 AST 수치 감소치도 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 시험식품이 대조식품에 비하여 우월함을 입증하기 어려웠다. 식품 복용 전과 복용 후 ALT 수치의 경우, 인체적용시험용 식품 복용 전 ALT 수치는 시험군의 경우  $43.34 \pm 20.72$ , 대조군의 경우  $32.21 \pm 11.38$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 ALT 수치는 시험군의 경우  $49.21 \pm 37.26$ , 대조군의 경우  $35.34 \pm 20.91$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 각 군 내 ALT 수치 감소치도 통계적으로 유의한 차이가 없었다. ALT 수치의 개선율, AST 수치의 개선율에서도 군내 군간 비교에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 TG 수치의 감소치도 각 군 내 TG 수치 감소치는 시험군의 경우  $18.45 \pm 97.73$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우  $-13.97 \pm 74.48$ 로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 TG 수치 감소치와 개선율의 군간 차이도 통계적으로 유의한 차이가 없었다.  $\gamma$ -GT 수치의 감소치 및 개선율에서도 군내 군간 차이를 보여주지 못하였다. 복용 후 Lipid profiles 수치의 경우 각 군내 및 군간 Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol 수치에서도 차이가 없었다. PP분석시 LDL cholesterol의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 LDL cholesterol 수치는 시험군의 경우  $132.74 \pm 30.34$ , 대조군의 경우  $120.68 \pm 24.26$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 시험군의 경우  $149.79 \pm 27.99$ , 대조군의 경우  $130.26 \pm 22.55$ 로 증가하여 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다.

안전성 분석결과, 이상반응은 대조군에서 1명 (3.45%)의 대상자에게 총 1건이 발생하였으나 이상반응 발현에 대한 군간 차이는 통계적으로 유의하지 않았고 대조군에서 발생한 이상반응은 예측된 이상반응으로 경증이었으며 후유증 없이 회복되었다. 활력징후에서는 시험군의 군내 비교에서 이완기 체온이 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 군내 비교에서 수축기 혈압이 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 정상적인 범위 이내에서의 변화로 임상적인 의미를 두기 어려웠다. 혈액학 검사 결과 각 군내 및 군간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다. 혈액화학 검사에서는 LDL cholesterol 시험군과 대조군의 군내 비교에서 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 그 외에 각 군내 및 군간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 혈액화학 항목은 없었다. 소변 검사 결과도

각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다. 혈액학, 혈액화학, 소변 검사의 정상/비정상 결과는 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다.

인삼꽃대의 경우 항산화, 항백혈병, 위장보호 작용 등 생리활성이 확인되었고 다양한 ginsenoside를 함유하고 있어 알코올성 지방간에 대한 연구를 선행 하였으며 이를 확인하고자 인 체시험을 계획하였다. 19세 이상 만 70세 미만의 건강한 성인 남녀에서 2주 이상 AST 수치가 25 IU/L 이상인 경증 간 기능 저하 대상자에서 12주 동안 복용하게 한 후 간기능과 관련된 다양한 검사를 수행하였으나 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 결과를 얻지 못하였다. 대상자수가 적 으나 AST 수치가 일시적 상승이 아닌 2주 이상 유지된 대상자에서 12주간 수행한 결과로 일관적 인 기능성 자료를 보여주지 못하였으나 12주간 복용하여도 이상반응 등 안전성에는 아무런 문제 가 없어 안전한 식품으로 판단된다.

## 12) 시제품 제작

○ 초음파 처리 인삼꽃대 추출물 정제 시제품 제작 [진프로 Ginpro]

가. 초음파 처리 인삼꽃대 추출물 정제 조성

	%	700	(mg)
인삼꽃대건조엑스	48	336	
미결정셀룰로스	23	161	
옥수수전분	17	119	
경질무수규산	5	35	
전분글리콜산나트륨	3	21	
스테아리린산마그네슘	1.4	9.8	
HPMC	2	14	
글리세린지방산에스테르	0.237	1.659	
이산화티타늄	0.218	1.526	
식용적색제40호	0.145	1.015	



시제품 사진

○ 제제 안정성 분석

가. 초음파 처리 인삼꽃대 추출물

가속조건(40°C, 75%RH)에서 6개월간 안정성시험을 하였을 때 함량의 변화가 초기 대비 5%이내의 변화를 갖는 안정한 원료를 확정하였다.

시험항목	기준	Initial	2개월		4개월		6개월		Initial 대비 변화 비율
함량	함량변화비율 5%이내 (F4 함량 4.36%)	100	99.2	99.2	98.7	98.7	97.8	97.9	-2.1 %
			99.1		98.2		97.5		
			99.3		99.3		98.5		

나. 초음파 처리 인삼꽃대 정제

가속조건(40°C, 75%RH)에서 6개월간 안정성시험을 하였을 때 함량의 변화가 초기 대비 5%이내의 변화를 갖는 안정한 처방을 확립하였다.

시험항목	기준	Initial	2개월		4개월		6개월		Initial 대비 변화 비율
함량	함량변화비율 5%이내 (F4 함량 4.36%)	100	98.8	98.9	98.2	98.3	97.3	97.3	-2.7%
			99.2		98.7		97.6		
			98.6		98.1		97.0		

표준제조공정에 의해 제조된 초음파 처리 인삼꽃대 추출물 원료 및 정제처방을 통해 확정된 제제 모두에서 가속조건시 6개월 후 초기함량대비 5% 이내의 원료와 제제임을 확인하였다.

○ 시제품의 경제성 분석

(1) 시제품의 단가

- 인삼꽃대분쇄물 20 Kg 원가 50,000원
- 인삼꽃대 엑스 건조, 20,000 정 타정시 인삼꽃대분쇄물(20 Kg) 20통(1,000,000원) 소요
- 포장 비용 (3,000,000원) 총 4,000,000원 소요
- 인삼꽃대 엑스 333 mg 1정 당 200원 소요

2) 1일 복용량 (2 g) 단가

- 1일 복용량 2 g으로 산정하였으므로 1일 6정(1정 333 mg) 복용 단가는 1,200원으로 산정

3) 100정 포장 단위 판매 전략

- 100정 포장 인삼꽃대 정제 건강기능식품 단가 20,000원으로 판매가격 70,000원으로 판매할 계획임.

[사업화 계획]

- 진프로(Ginpro) 원료 및 본제품 판매 계획

구분		코드번호		
		B-13-01		
		( 2019 년 ) 개발 종료 후 1년	( 2020 년 ) 개발 종료 후 2년	( 2021 년 ) 개발 종료 후 3년
국 내	시장점유율(%)	5%	20%	30%
	판매량(단위:1개월분/1box)	B to B/ 50,000 box B to C/ 10,000 box	B to B/ 50,000 box B to C/ 50,000 box	B to B/ 100,000 box B to C/ 100,000 box
	판매단가(원)	B to B/ 20,000원(1box) B to C/ 38,000원(1box)	B to B/ 20,000원(1box) B to C/ 38,000원(1box)	B to B/ 20,000원(1box) B to C/ 38,000원(1box)
	국내매출액(백만원)	1,380	2,900	5,800
해 외	시장점유율(%)		0.01%	0.02%
	판매량(단위:1개월분/1box)		B to B/ 100,000 box B to C/ 50,000 box	B to B/ 200,000 box B to C/ 100,000 box
	판매단가(\$)		B to B/ 20(\$/1box) B to C/ 40(\$/1box)	B to B/ 20(\$/1box) B to C/ 40(\$/1box)
	해외매출액(백만\$)		4백만\$	8백만\$
당사 생산능력1)		원료3톤(ton)/3만개이상	원료 20톤(ton)/25만개	원료20톤(ton)/25만개 생 산/ 원료20톤은 시설확장 또는 외주고려

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

##### 4-1. 목표달성도

구분	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	목표의 달성도
1차년도 (2014)	인삼꽃대의 추출조건 최적화 prosapogenin 성분 고농도 함유 인삼꽃대엑스 개발 기능성 성분 분리 안전성 시험	Ginsenoside Rg2, Rg3, Rg5, Rh1, F4 등의 홍삼 활성 prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 초음파 처리 인삼꽃대 조성물 개발 여부  Ginsenoside Rg3, Rg5 분리 화학구조 동정 여부  단회독성, 4주 DRF, 유전독성 (염색체이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험) 시험 여부	100%
	비알코올성지방간에 효과가 우수한 인삼꽃대 제제의 세포수준에서 스크리닝	고지방식이 지방간 동물모델에서 초음파 처리 인삼꽃대 조성물의 간 보호시험 여부	100%
	인삼꽃대의 수집	전국 인삼재배지로부터 인삼꽃대의 대량 수집 여부	100%
2차년도 (2015)	기능성 성분 대량 분리 동정	Ginsenoside Re, Rg2 분리 화학구조 동정 여부	100%
	인체시험 준비	Protocol과 CRF의 작성 및 IRB 통과 여부	100%
	1차년도에 선정된 인삼꽃대 제제를 대상으로 비알코올성 지방간 동물모델에서 약효 및 기전 규명	SD rats에 고지방식이 투여로 유발된 비알코올성지방간 동물모델 시험 여부	100%
	인삼꽃대엑스의 제조 인삼꽃대의 제조공정 최적화	인삼꽃대 제조공정 최적화 시험 여부	100%
3차년도 (2016)	인삼꽃대의 성분 표준화 안전성 시험	지표성분 (Ginsenoside Rg3, Rg5, F4) 표준화 (밸리데이션) 여부	100%
	건강기능식품 개별인정 신청	13주 반복독성시험 여부	
	인체시험	인체적용시험 여부	100%
	안정성연구	유효기간 설정을 위한 안정성 시험 여부	100%

#### 4-2. 관련분야 기여도

- 인삼꽃대의 간기능 개선 기능성을 실험 및 동물모델을 이용한 효능을 확인함으로써 국내 인삼 부산물을 기반으로 한 기능성 식품 개발의 가능성을 제시하였으며 농가 소득 증대를 기대할 수 있는 계기를 마련하였음.
- 국내산 농산물의 기능성 성분을 규명하고 특정 성분을 표준화하여 제조하는 원료 제조방법 연구를 수행하여 원료 표준화를 확립하였음. 이렇게 제조된 원료의 품질 관리를 위한 기준규격을 설정하여 기능성 소재의 품질 관리에 중요한 지표로서 활용이 가능하도록 하였음.
- 원물소재의 특정 성분 함량을 강화하기 위하여 초음파 추출조건을 최적화하고 생산 과정을 확립함으로써 국내 인삼 부산물의 표준화된 원료 그 자체로서의 상품성을 높였으며 화장품 소재로만 한정적으로 사용되고 있는 인삼꽃대를 이용하여 지표성분 함량을 표준화하고 고부가가치 기능성 소재로 개발함으로써 인삼꽃대의 산업적 가치를 증대시킴.
- 국내산 천연물로부터 도출된 인삼꽃대의 간기능 개선 및 항산화 등의 기능성을 입증함으로써 기능식품 마켓쉐어의 대부분을 차지하는 간기능에 대한 해결책으로 활용될 경우 관련질환의 발병률 감소와 국민 건강 증진에 기여할 것임.
- 국내산 원료를 이용한 간기능 개선능을 국제 저널에 게재하고 발표함으로써 국내산 기능성 소재의 가능성을 제시하고 기능성 원료개발을 통해 국내 식품관련 기술력을 인정받을 수 있는 계기를 마련하였음.

## 5. 연구결과의 활용계획

구분	기술실시 (이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용계획	1	1	-	2	1	2

- 과제 종료 후 인체적용시험 결과를 통해 참여기업인 고연(高研)에 기술실시를 실시하고, 개별인정형 건강기능식품으로 개발할 예정 임. 인체적용 시험 결과 추가 연구가 필요하다고 판단되면 보완하여 추가 시험을 수행하여 제품화 할 예정 임.
- 독성시험결과 인삼꽃대 추출물은 별다른 독성학적 이상반응을 보이지 않았음이 확인 되었으나, 인체적용시험에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 결과를 얻지 못하여 건강기능식품(개별인정형)으로 등록하는 절차를 진행하지는 못하지만 인삼의 여러 가지 생리활성 기능을 활용하여 일반식품으로의 개발을 진행할 예정임.
- 또한, 과제 종료 후에 간기능 개선 건강기능식품 허가를 취득하여 람노피(Rhamnopy)이라고 하는 상품명으로 제품을 출시하며, 약국 유통을 담당하는 (주)데일리몰 에 론칭하여 유통판매하기로 계약을 실시 하였음.
- 현재 인삼재배 부산물인 지상부에 대하여 식품원료로 사용은 어려우나 기능성성분의 함량 등 여러 가지 경제적 부가가치를 생각할 때 지상부의 활용이 절실히 요구되는바 생산자단체 등 및 식약처 및 관계 기관과 협의하여 식품원료로서 인삼 지상부의 등록을 추진할 예정임.
- 본 연구를 진행하면서 얻어진 기술 및 정보는 관련 학회 및 산업체 연구원에게 세미나 등을 통해 홍보 및 교육을 진행할 예정이며, 연구기간 중에도 고려인삼포럼, (주)코스맥스바이오에 인삼꽃대가 기능성 신소재로서의 유용성에 대하여 교육지도하였음.



## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

인삼의 사포닌 성분은 간세포의 단백질 합성과 간세포의 재생을 촉진하는 작용이 있다. 사포닌성분은 실험적으로 여러 가지 간 독성물질로 야기되는 간세포의 괴사등 조직학적 병변을 경감시키고 간의 독성대사에 관여하는 효소(Epoxide hydratase, glutathione transferase, epoxide hydroxylase)를 활성화 시켜 간장장애를 개선, 예방하는 효과가 있다. 한양대 의대 구국회 교수는 바이러스 B형 간염환자를 대상으로 한 임상실험에서 인삼투여가 식욕, 소화상태, 두통, 오심, 구토등의 자각증상의 개선효과 및 급성간염의 조기회복 촉진과 만성화 예방에 도움을 준다고 보고하였다. 일본 Nissei 병원 Yammamoto 박사는 만성간염(바이러스 C형)환자에 대해서도 인삼투여가 간기능의 생화학적 지표개선에 유용성이 있고, 한방제제인 소시호탕과 병용시 보다 개선효과가 촉진되었다고 보고하였다. 또한, 인삼사포닌 성분은 알콜대사에 관여하는 알콜 분해효소(alcohol dehydrogenase), 아세트알데히드 분해효소(acetylaldehyde dehydrogenase)의 활성을 증가시켜 알콜섭취로 야기되는 유해한 작용을 경감시켜 알콜독성에 예방적 효과를 나타낸다. 실제로 사람을 대상으로 한 실험에서도 술을 마신후 40분이 경과하였을 때 혈중 알콜농도가 술만 마신 사람(0.18%)에 비하여 인삼엑기스와 술을 함께 마신 경우(0.11 %)가 훨씬 낮다는 사실이 입증되었다.

## 7. 연구개발결과의 보안등급

해당사항 없음.

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

해당사항 없음.

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

### ○ 기술적 위험요소 분석

인삼꽃대 추출, 성분분리시 폭발성이 있는 유기용매 사용시 후드 장치가 되어있는 실험실 공간에서 시험하도록 함.

1협동 : 동물 및 세포 실험시 별도의 실험 센터 또는 셀룸을 이용하여, 오염 및 교차 오염을 방지하고 있음. 세포 실험실은 청결 및 위생을 위하여 독립 공간이며, 동물 실험센터의 경우 SPF10000 grade 이상의 청정 실험 센터를 이용.

### ○ 안전관리대책

연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 따라 산단에서 정기적으로 ,해당 연구실 안전점검 및 정밀안전진단 실시, 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진을 실시하고 있으며, 실험실에서 참여연구원대상으로 상해보험을 가입하고 있습니다.

1협동 : 중앙대학교는 산업 및 연구실 안전법에 의거한 안전 교육 및 안전 정기 점검 2회를 국가 해당 기관 및 자체 기관에서 수행 하고 있음. 정기 교육은 6개월 마다 이수해야 하며, 교내에서 상해 보험을 가입 하여 실시.

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사시여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인용횟 수 등)
1	논문	Changes in the contents of prosapogenin in the Skin White ginseng( <i>Panax ginseng</i> ) depending on extracting batches	고연	책임	Kor. J. Pharmacogn.	-	2014.12.30	단독사사	비SCI
2	논문	Inhibition of MMP-1 Expression and Collagen Synthesis Activity of Ultrasonication Processed Ginseng Flower Buds Extract	고연	책임	Kor. J. Pharmacogn.	-	2015.06.30	단독사사	비SCI
3	논문	Inhibitory Effects of Ginseng ( <i>Panax ginseng</i> ) Berry on Tumour Promotion and Inflammatory Ear Oedema Induced by TPA	세명대	책임	Journal of Nutritional Therapeutics	-	2015.12.30	단독사사	Scopus
4	논문	Changes in ginsenoside composition of ginseng flower buds extracts after a ultrasonication process	고연	책임	Kor. J. Pharmacogn.	-	2015.03.30	단독사사	비SCI
5	논문	Changes in the contents of prosapogenin in Red ginseng ( <i>Panax ginseng</i> ) depending on the extracting conditions	고연	책임	J Ginseng Res.	3.89	2016.01.30	단독사사	SCI
6	논문	Modification of ginsenoside composition in red ginseng ( <i>Panax ginseng</i> ) by ultrasonication	고연	책임	J Ginseng Res.	3.89	2016.12.30	단독사사	SCI
7	논문	서양삼 백삼과 홍삼의 인삼사포닌	고연	책임	삼학회지	-	2016.12.30	단독사사	비SCI
8	논문	인삼 미숙과실의 인삼사포닌 성분 함량	고연	책임	삼학회지	-	2016.12.30	단독사사	비SCI
9	논문	Optimal Condition for Extracting the Ginsenoside Rg3, Rg5, and Rk1 from Black Ginseng	고연	책임	Journal of Food and Nutrition Research	1.95	2017.03.30	단독사사	SCI
10	논문	Modification of ginsenoside composition in Red ginseng ( <i>Panax ginseng</i> ) by microwave and vinegar	고연	책임	J Ginseng Res.	3.89	submission	단독사사	SCI

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인용횟 수 등)
1	학회발 표논문	인삼류 생약의 사포닌 비교	고연	책임	2016 고려인삼포럼 동계학술대회	-	2016.12.09	단독사사	구두발표
2	학회발 표논문	기능성 강화 인삼 신소재 개발	고연	책임	2015년도 한국생약학회 춘계 심포지엄	-	2015.04.30	단독사사	구두발표
3	학회발 표논문	The change of ginsenoside composition of ginseng flower buds depending on extracting conditions	고연	책임	2015 산삼학회, 고려인삼포럼 공동 국제인삼(산양 삼) 학술대회	-	2015.12.18	단독사사	포스터발표
4	학회발 표논문	Inhibition of MMP-1 expression and collagen synthesis activity of ultrasonication processed ginseng flower buds extract	고연	책임	2015년도 대한약학회 추계 학술대회	-	2015.10.23	단독사사	포스터발표
5	학회발 표논문	The change of ginsenoside composition of Black ginseng depending on extracting conditions	고연	책임	2015년도 대한약학회 춘계 학술대회	-	2015.04.23	단독사사	포스터발표
6	학회발 표논문	Changes in ginsenoside composition of ginseng flower buds extracts after ultrasonication process	고연	책임	2014년도 한중일 합동생약 심포지엄	-	2014.09.13	단독사사	포스터발표
7	교육지 도	기능성 강화 인삼 신소재 개발	고연	책임	(주)코스맥스 바이오 연구소 세미나	-	2017.04.26	단독사사	구두강연
8	교육지 도	한방바이오 신소재 발굴과 전략	고연	책임	충북오송 CV 센터	-	2014.09.29	단독사사	구두강연

## 11. 기타사항

해당사항 없음.

## 12. 참고문헌

1. Namba, T. : The encyclopedia of Wakan-Yaku with color pictures., Hoikusha., Osaka, p. 1 (1980).
2. Park, J. D. : Recent studies on the chemical constituents of Korean Ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Korea J. Ginseng Sci.* 20, 389 (1996).
3. Sanata, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O. and Shibata, S. : Studies on the saponins of ginseng. I. Structure of ginseng-R<sub>0</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc and Rd. *Chem. Pharm. Bull.* 22, 421 (1974).
4. Kitagawa, I., Taniyama, T., Shibuya, H., Nota, T. and Yoshikawa, M. : Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra(2) : Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same *Panax ginseng* root. *Yakugaku Zasshi* 107,95 (1987).
5. Ko, S. K., Bae, H. M., Cho, O. S., Im, B. O., Chung, S. H. and Lee, B. Y. : Analysis of ginsenoside composition of ginseng flower buds and seed. *Food Sci. Biotechnol.* 17, 1379 (2008).
6. Dey, L., Zhang, L. and Yuan, C. S. : Anti-diabetic and anti-obese effects of ginseng flower buds extract : comparison between intraperitoneal and oral administrations. *Am. J. Chin. Med.* 30, 645 (2002).
7. Huo, Y. S. : Anti-senility action of saponin in *Panax ginseng* fruit in 327 cases. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 4, 593 (1984).
8. Zhang, S. C. and Jiang, X. L. : The anti-stress effect of saponins extracted from *Panax ginseng* fruit and the hypophyseal-adrenal system. *Yao Xue Xue Bao* 16, 860 (1981).
9. Bae, H. M., Cho, O. S., Kim, S. J, Im, B. O., Cho, S. H., Lee, S., Kim, M. G., Kim, K. T., Leem, K. H. and Ko, S. K. : Inhibitory effects of ginsenoside Re isolated from ginseng flower buds on histamine and cytokine release in human mast cells and human alveolar epithelial cells. *J. Ginseng Res.* 36, 369 (2012).
10. Wang, W., Zhao, Y., Rayburn, E. R., Hill, D. L., Wang, H. and Zhang, R. : In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 59, 589 (2007).
11. Wu, J. 1., Lin, L. and Chau, F. T. : Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrason. Sonochem.* 8, 347 (2001).
12. Gwak, H. W., Hong, J. T., Ahn, C. H., Kim, K. J., Kim, S. G., Yoon, S. S., Im, B. O., Cho,

13. S. H., Nam, Y. M. and Ko, S. K. : The change of ginsenoside composition in the ginseng(*Panax ginseng*) flower buds by the ultrasonication and vinegar process. *Natural Product Sciences*. 21, 1 (2015).

<인체적용시험>

- 1) 건강기능식품에 관한 법률, 식품의약품안전청 2002
- 2) 국민건강영양조사 제 4 기 3 차년도(2009), 보건복지부
- 3) 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시 제 2009-116 호
- 4) 의약품 임상시험 관리기준, 의약품임상시험관리기준 (의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표 4)
- 5) 건강기능식품공전. 2014. KFDA.
- 6) 대한약전의 의약품등록집 제 4 개정. 2012, KFDA.
- 7) Namba T. The encyclopedia of Wakan-Yaku with color pictures. Osaka: Hoikusha (1980)
- 8) Park JD. Recent studies on the chemical constituents of Korean Ginseng (*Panax ginseng*C.A.Meyer). *Korea J Ginseng Sci*. 20:389-415 (1996)
- 9) Sanata S, Kondo N, Shoji J, Tanaka O, Shibata S. Studies on the saponins of ginseng. I. Structure of ginseng-R0, Rb1, Rb2, RcdandRd. *ChemPharmBull*. 22:421-428 (1974)
- 10) Kitagawa I, Taniyama T, Shibuya H, Nota T, Yoshikawa M. Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra (2) : Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same *Panax ginseng* root. *YakugakuZasshi*. 107:495-505 (1987)
- 11) Ko SK, Bae HM, Cho OS, Im BO, Chung SH, Lee BY. Analysis of ginsenoside composition of ginseng berry and seed. *Food SciBiotechnol*. 17:1379-1382 (2008)
- 12) Dey L, Zhang L, Yuan CS. Anti-diabetic and anti-obese effects of ginseng berry extract: comparison between intraperitoneal and oral administrations. *Am J Chin Med*. 30:645-647. (2002)
- 13) Huo YS. Anti-senility action of saponin in *Panax ginseng* fruit in 327 cases. *Zhong Xi Yi Jie He ZaZhi*. 4:593-596 (1984)
- 14) Zhang SC, Jiang XL. The anti-stress effect of saponins extracted from *Panax ginseng* fruit and the hypophyseal-adrenal system. *Yao XueXueBao*. 16:860-863 (1981)
- 15) Bae HM, Cho OS, Kim SJ, Im BO, Cho SH, Lee S, Kim MG, Kim KT, Leem KH, Ko SK. Inhibitory effects of ginsenoside Re isolated from ginseng berry on histamine and cytokine release in human mast cells and human alveolar epithelial cells. *J Ginseng Res*. 36:369-374. (2012)
- 16) Wang W, Zhao Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H, Zhang R. In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer ChemotherPharmacol*. 59:589-601. (2007)
- 17) Lee SA, Jo HK, Im BO, Kim S, Whang WK, Ko SK. Changes in the contents of prosapogenin in the red ginseng (*Panax ginseng*) depending on steaming batches. *J Ginseng Res*. 36:102-106 (2012)
- 18) Ko SK, Lee KH, Hong JK, Kang SA, Sohn UD, Im BO, Han ST, Yang BW, Chung SH,

- Lee BY. Change of ginsenoside composition in ginseng extract by the vinegar process. *Food SciBiotechnol.* 14:509-513 (2005)
- 19) Zheng H, Jeong Y, Song J, Ji GE. Oral administration of ginsenoside Rg1 inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions induced by oxazolone in hairless mice. *IntImmunopharmacol.* 11:511-518. (2011)
- 20) Keum YS, Han SS, Chun KS, Park KK, Park JH, Lee SK, Surh YJ. Inhibitory effects of the ginsenoside Rg3 on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF-kappaB activation and tumor promotion. *Mutat Res.* 523-524:75-85. (2003)
- 21) Kim ND, Kang SY, Park JH, Schini-Kerth VB. Ginsenoside Rg3 mediates endothelium-dependent relaxation in response to ginsenosides in rat aorta: role of K<sup>+</sup> channels. *Eur J Pharmacol.* 367:41-49. (1999)
- 22) Yang L, Hao J, Zhang J, Xia W, Dong X, Hu X, Kong F, Cui X. Ginsenoside Rg3 promotes beta-amyloid peptide degradation by enhancing gene expression of neprilysin. *J Pharm Pharmacol.* 61:375-380. (2009)
- 23) Lee WM, Kim SD, Park MH, Cho JY, Park HJ, Seo GS, Rhee MH. Inhibitory mechanisms of dihydroginsenoside Rg3 in platelet aggregation: critical roles of ERK2 and cAMP. *J Pharm Pharmacol.* 60:1531-1536. (2008)
- 24) Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H, Surh YJ. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett.* 150:41-48. (2000)
- 25) Jeong SJ, Han SH, Kim DY, Lee JC, Kim HS, Kim BH, Lee JS, Hwang EH, Park JK. Effects of mRg2, a mixture of ginsenosides containing 60% Rg2, on the ultraviolet B-induced DNA repair synthesis and apoptosis in NIH3T3 cells. *Int J Toxicol.* 26:151-158 (2007)