

114068-
3

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

11-1543000-002293-01

안구건조
개선용
안토
시아닌
올리고머
대량생산
기술
개발
및
산업화

최
종
보
고
서

2018

농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

안구건조 개선용 안토시아닌 올리고머 대량생산 기술 개발 및 산업화 최종보고서

2018. 03. 30.

주관연구기관 / 건국대학교글로벌산학협력단
협동연구기관 / (주)키토라이프

농 립 축 산 식 품 부
농림식품기술기획평가원

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농생명산업기술개발사업”(개발기간 : 2014. 09. 25 ~ 2018. 02. 24)과
제 “안구건조 개선용 안토시아닌 올리고머 대량생산 기술 개발 및 산업화”(제 1 세부
과제 “안토시아닌 올리고머 중합효소 개발 및 향산화 활성 평가” 및 제 1 협동과제
“안토시아닌 올리고머 항염증 활성 검증 및 산업화”)의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 03. 30.

주관연구기관명 : 건국대학교글로벌산학협력단

(대표자) 이송현 (인)



협동연구기관명 : (주)키토라이프

(대표자) 정특래 (인)



주관연구책임자 : 박 표 잠

협동연구책임자 : 양 현 필

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

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	114068-3	해당단계 연구기간	2014. 09. 25 - 2018. 02. 24	단계구분	3/ 3
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	농생명기술개발사업			
연구과제명	대과제명	안구건조 개선용 안토시아닌 올리고머 대량생산 기술 개발 및 산업화			
	세부과제명	제 1 세부 : 안토시아닌 올리고머 중합효소 개발 및 향산화 활성 평가 제 1 협동 : 안토시아닌 올리고머 항염증 활성 검증 및 산업화			
연구책임자	박표잠	해당단계 참여 연구원 수	총: 12 명 내부: 12 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부:290,000천원 민간:100,000천원 계:390,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 36 명 내부: 36 명 외부: 0 명	총연구개발비	정부:870,000천원 민간:300,000천원 계:1,170,000천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교글로벌산학협력단			참여기업명 (주)키토라이프	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약				보고서 면수	
<ul style="list-style-type: none"> - 안토시아닌 올리고머 중합 효소를 결정하여 안토시아닌 올리고머 대량생산 기술을 개발 - 생산된 안토시아닌 올리고머의 안전성 및 생리활성을 검증 - 임상에서의 안토시아닌 올리고머의 안구건조 개선 효능 검증 				220 쪽	

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>본 연구에서는 항산화, 항염증 등 다양한 생리기능성을 나타내는 안토시아닌 모노머를 사용하여 용매 및 빛 등에 안정하고 기능성이 우수한 안토시아닌 올리고머를 합성할 수 있는 균주로부터 안토시아닌 올리고머를 생산할 수 있는 효소를 개발하여 곰팡이 균을 산업적으로 활용할 때 발생하는 문제점을 개선하고자 한다. 또한, 이렇게 생산된 안토시아닌 올리고머의 효능, 안정성 및 인체 내에서의 효능을 규명한 후 이를 참여기업에 기술 이전하여 산업화하고자 한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> -안토시아닌 올리고머 생합성 최적 조건 확립 -안토시아닌 올리고머 생합성 관련 효소 유전자 탐색 및 형질 전환 -합성 안토시아닌 올리고머의 <i>in vitro</i>에서의 생리기능성 검증 -합성 안토시아닌 올리고머의 <i>in vivo</i>에서의 생리기능성 검증 -합성 안토시아닌 올리고머의 안전성 및 독성 평가 -안토시아닌 올리고머의 대량생산 기술 확립 -안토시아닌 올리고머의 임상에서의 효능 검증 -안토시아닌 올리고머를 이용한 다양한 제품 생산 (예, 캡슐 형태 등) 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - 안토시아닌 올리고머 합성 효소 탐색 및 최적 조건의 확립 - 합성된 안토시아닌 올리고머의 <i>in vitro</i>에서의 항산화 활성 검증 - 합성된 안토시아닌 올리고머의 <i>in vitro</i>에서의 항염증 활성 검증 - 합성된 안토시아닌 올리고머의 <i>in vivo</i>에서의 항산화 활성 검증 - 합성된 안토시아닌 올리고머의 <i>in vivo</i>에서의 항염증 활성 검증 - 합성된 안토시아닌 올리고머의 안전성 검증 - 임상 시험을 통한 안토시아닌 올리고머의 안구 건조 개선 효능 검증 - 안토시아닌 올리고머의 대량생산 기술 확립 및 산업화 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - 본 연구의 결과물들은 특허 출원을 통해 지적재산권을 이미 확보하였으며, 이를 통하여 산업화를 모색할 수 있을 것으로 판단된다. - 본 연구 결과물들의 국제 학술지 논문 게재 (현재 2편 게재, 1편 투고 중)를 통한 안토시아닌 올리고머 연구의 기초 자료로 활용이 가능할 것으로 판단된다. - 본 연구에서 개발된 안토시아닌 올리고머가 다양한 분야에서 소재로 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 					
중심어 (5개 이내)	안토시아닌 올리고머	중합효소	항산화 활성	항염증 활성	임상 시험	

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<p>In this study, we have developed an enzyme of producing oligomeric anthocyanin from strains of synthesizing oligomeric anthocyanin that are functional and stable in solvents and light, using monomeric anthocyanin that exhibit various physiological functions such as antioxidant and antiinflammation. Because, in order to improve the problem that occurs when the fungus is used industrially. In addition, the efficacy, stability and efficacy of produced oligomeric anthocyanin in the human body will be studied and transferred to the participating companies for industrialization.</p> <p>-Establishment of optimal conditions for oligomeric anthocyanin biosynthesis, -Identification and transformation of oligomeric anthocyanin biosynthesis related enzymes, -Verification of physiological function of synthetic oligomeric anthocyanin <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>, -Safety and toxicity evaluation of synthetic oligomeric anthocyanin, -Establishment of mass production technology of oligomeric anthocyanin, -Clinical efficacy of oligomeric anthocyanin, -Production of various products using anthocyanin oligomer (example, capsule shape, etc)</p>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> - Investigation of oligomeric anthocyanin synthesis enzymes and establishment of optimal conditions - Verification of antioxidant activity of synthesized oligomeric anthocyanin <i>in vitro</i> - Investigation of anti-inflammatory activity of synthesized oligomeric anthocyanin <i>in vitro</i> - Verification of antioxidant activity of synthesized oligomeric anthocyanin <i>in vivo</i> - Investigation of anti-inflammatory activity of synthesized oligomeric anthocyanin <i>in vivo</i> - Safety evaluation of synthesized oligomeric anthocyanin - Clinical trials of oligomeric anthocyanin to improve ocular dryness - Establishment of mass production technology and industrialization of oligomeric anthocyanin 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> - The results of this study are secured by the Intellectual Property Rights through Patent application -> Possible seek of industrialization. - Results of this study are published in the international journal (currently publication to two volume, submission of one volume) -> Possible to take advantage of as a basic information for anthocyanin oligomer Research. - The oligomeric anthocyanin developed in this study are expected to be used as materials in various fields. 				
Keywords	Anthocyanin oligomer	Polymerase	Antioxidant activity	Anti-inflammat ory activity	Clinical trial

6. 영문목차

CONTENTS

Chapter 1. Overview of the Project	1
1.1. Research and development purpose	1
1.2. Research and development necessity	1
1.3. Range, for research and development	5
Chapter 2. State of the Art Report	6
2.1. Domestic related technology status	6
2.2. Foreign related technology status	6
Chapter 3. Contents and Results	8
3.1. Materials and Methods	8
3.1.1. Synthesis of oligomeric anthocyanin	8
3.1.1.1. Development of oligomeric anthocyanin polymerase	8
3.1.1.2. Production of oligomeric anthocyanin	8
3.1.1.3. Standardization of oligomeric anthocyanin	9
3.1.1.4. Heavy metal analysis of synthesized oligomeric anthocyanin	9
3.1.2. Antioxidant activity measurement of oligomeric anthocyanin	10
3.1.2.1. Measurement of antioxidant activity in vitro	10
3.1.2.2. Measurement of protective effect of oligomeric anthocyanin in retinal cells	11
3.1.2.3. Antioxidant activity of oligomeric anthocyanin in animal models ..	12
3.1.2.4. Identification of antioxidative action mechanism of oligomeric anthocyanin	13
3.1.3. Anti-inflammatory activity measurement of oligomeric anthocyanin ..	13
3.1.3.1. Measurement of anti-inflammatory activity in vitro	13
3.1.3.2. Anti-inflammatory activity of oligomeric anthocyanin in animal models	14
3.1.3.3. Identification of anti-inflammatory action mechanism of oligomeric anthocyanin	15
3.1.4. Safety evaluation of oligomeric anthocyanin	16
3.1.4.1. Mouse micronucleus test	16
3.1.4.2. Return mutation test using bacteria	16
3.1.4.3. Chromosome aberration test using mammalian cultured cells	16
3.1.4.4. Genotoxicity test of oligomeric anthocyanin using mouse	16
3.1.4.5. Single-oral toxicity study with Sprague-Dawley (SD) rats	16
3.1.4.6. Single-dose oral dosing toxicity test using beagle dogs	16
3.1.4.7. 4-weekly repeated oral dose determination test using SD rats ..	16
3.1.4.8. 13 weeks repeated dose toxicity test	16

3.1.5. Measurement of the effect of oligomeric anthocyanin on dry eye syndrome	16
3.1.5.1. Summary of clinical trial plan	16
3.1.5.2. Notification of clinical trial deliberation result	23
3.1.6. Individual certification of oligomeric anthocyanin	24
3.1.6.1. Health functional food functional material authorization application processing procedure	24
3.1.6.2. Required documents	25
3.1.6.3. Applicant, fees and processing period for individual certification	25
3.2. Results and discussion	26
3.2.1. Development of oligomeric anthocyanin polymerase	26
3.2.1.1. Base sequence of polymerase	26
3.2.1.2. The base sequence of the altered polymerase	28
3.2.1.3. Polymerase transformation using modified base sequences	29
3.2.1.4. Synthesis of oligomeric anthocyanin using obtained polymerase	29
3.2.1.5. Changes in base sequence, vector (pUC57) and competent cell (Yeast)	29
3.2.1.6. Synthesis of oligomeric anthocyanin using various enzymes	31
3.2.1.7. Standardization of oligomeric anthocyanin	31
3.2.1.8. Isolation of oligomeric anthocyanin	72
3.2.1.9. Prototype process development of oligomeric anthocyanin	72
3.2.1.10. Analysis of heavy metals in synthesized oligomeric anthocyanin	82
3.2.2. Antioxidant activity measurement of oligomeric anthocyanin	82
3.2.2.1. Antioxidative activity using electron spin resonance equipment	82
3.2.2.2. Antioxidant activity through lipid peroxidation inhibitory activity	86
3.2.3. Protective effect of oligomeric anthocyanin in retinal cells	89
3.2.3.1. Cytotoxicity of oligomeric anthocyanin in retinal cells	89
3.2.3.2. Protective effect of oligomeric anthocyanin on oxidative damage in retinal cells	89
3.2.3.3. Antioxidant enzyme activities in retinal cells	89
3.2.4. Antioxidant efficacy of oligomeric anthocyanin in animal models	97
3.2.4.1. Measurement of body weight and tissue weight	97
3.2.4.2. GOT & GPT analysis	97
3.2.4.3. Triglyceride analysis	99
3.2.4.4. Antioxidant enzyme analysis	100
3.2.4.5. Histological analysis through liver tissue staining	100
3.2.5. Antioxidant mechanism of oligomeric anthocyanin	100
3.2.6. Antioxidative activity measurement by oligomeric anthocyanin fraction	103

3.2.7. Anti-inflammatory activity of oligomeric anthocyanin	106
3.2.8. Evaluation of anti-inflammatory activity of oligomeric anthocyanin by animal experiments	106
3.2.8.1. Measurement of body weight and tissue weight, length	106
3.2.8.2. Measurement results of CD4 ⁺ and CD8 ⁺	106
3.2.8.3. Separation and purification of lymphocytes	106
3.2.9. Evaluation of anti-inflammatory activity of anthocyanin oligomers in IL-10 deficient mice	106
3.2.9.1. Measurement of body weight and tissue weight, length	106
3.2.9.2. Inflammation-related cytokine measurement results	112
3.2.9.3. Measurement results of CD4 ⁺ and CD8 ⁺	112
3.2.9.3. Separation and purification of lymphocytes	114
3.2.10. An anti-inflammatory mechanism of oligomeric anthocyanin	116
3.2.11. Results of anti-inflammatory activity measurement of oligomeric anthocyanin fractions	116
3.2.12. Safety evaluation result of oligomeric anthocyanin	120
3.2.12.1. Results of micronucleus test using mouse	120
3.2.12.2. Result of return mutation test using bacteria	125
3.2.12.3. Chromosomal aberration test results using mammalian cultured cells	136
3.2.12.4. Genotoxicity test of oligomeric anthocyanin using mouse	140
3.2.12.5. Results of single-oral toxicity test using Sprague-Dawley(SD) rats	140
3.2.12.6. Toxicity test results of single dose oral administration of beagle dogs	149
3.2.12.7. Results of 4-week repeated oral dose determination test using SD rats	153
3.2.12.8. Results of 13 weeks repeated dose toxicity test	166
3.2.13. The effect of anthocyanin oligomers in improving clinical symptoms of dry eye syndrome	193
3.2.13.1. Validity evaluation result	193
3.2.13.2. Safety evaluation result	204
3.2.13.3. Discussion and conclusions	206
3.3. Performance of journal and patent	207
3.3.1. Performance of journal	207
3.3.2. Performance of patent	209
3.4. Research achievement	212
3.4.1. Technical achievement	212
3.4.2. Economic performance	212

3.5. Commercialization plan	212
4. Achievement of Research Goals and External Contribution to the related field	213
4.1. Achievement of Research Goals	213
4.2. External Contribution to the related fields	213
5. Plan of Utilization of the Results	214
6. Collected information during research period	214
7. Security rating of R & D results	215
8. Research equipment constructions of registered with the Government Science Technology Information Systems	215
9. Implementation of safety management in laboratories according to the performance of R & D project	215
9.1. States of domestic related technologies	215
9.2. Status of foreign related technology	215
10. Representative Research Results of R & D project	215
11. Etc	216
12. References	216

<Inclosure> Self-assessment opinion

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
1.1. 연구개발 목적	1
1.2. 연구개발의 필요성	1
1.3. 연구개발 범위	5
2. 국내외 기술개발 현황	6
2.1. 국내 관련기술 현황	6
2.2. 국외 관련기술 현황	6
3. 연구수행 내용 및 결과	8
3.1. 연구 수행 방법	8
3.1.1. 안토시아닌 올리고머의 합성	8
3.1.1.1. 안토시아닌 올리고머 중합 효소 개발	8
3.1.1.2. 안토시아닌 올리고머의 생산	8
3.1.1.3. 안토시아닌 올리고머의 표준화	9
3.1.1.4. 합성된 안토시아닌 올리고머의 중금속 분석	9
3.1.2. 안토시아닌 올리고머의 항산화 활성 측정	10
3.1.2.1. <i>In vitro</i> 에서의 항산화 활성 측정	10
3.1.2.2. 망막세포에서의 안토시아닌 올리고머의 보호 효과 측정	11
3.1.2.3. 동물 모델에서의 안토시아닌 올리고머의 항산화 효능 검토	12
3.1.2.4. 안토시아닌 올리고머의 항산화 작용기작 규명	13
3.1.3. 안토시아닌 올리고머의 항염증 활성 측정	13
3.1.3.1. <i>In vitro</i> 에서의 항염증 활성 측정	13
3.1.3.2. 동물 실험을 통한 안토시아닌 올리고머의 항염증 활성 평가	14
3.1.3.3. 안토시아닌 올리고머의 항염증 작용기작 규명	15
3.1.4. 안토시아닌 올리고머의 안전성 평가	16
3.1.4.1. 마우스를 이용한 소핵시험	16
3.1.4.2. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험	16
3.1.4.3. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험	16
3.1.4.4. 마우스를 이용한 안토시아닌 올리고머의 유전독성 시험	16
3.1.4.5. Sprague-Dawley (SD) 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험	16
3.1.4.6. 비글견을 이용한 단회 경구투여 용량증가 독성시험	16
3.1.4.7. SD 랫드를 이용한 4주 반복 경구투여 용량결정시험	16
3.1.4.8. 13주 반복투여 독성시험	16
3.1.5. 안토시아닌 올리고머의 안구 건조증 개선 효능 측정	16
3.1.5.1. 임상시험계획서 요약	16
3.1.5.2. 임상시험심의 결과 통보서	23

3.1.6. 안토시아닌 올리고머의 개별인증	24
3.1.6.1. 건강기능식품 기능성 원료 인정신청 처리절차	24
3.1.6.2. 구비서류	25
3.1.6.3. 개별인증 신청기관, 수수료 및 처리기간	25
3.2. 연구 수행 결과	26
3.2.1. 안토시아닌 올리고머 중합 효소 개발	26
3.2.1.1. 중합 효소의 염기 서열	26
3.2.1.2. 변경된 중합 효소의 염기 서열	28
3.2.1.3. 변경된 염기 서열을 사용한 중합 효소 형질 전환	29
3.2.1.4. 획득한 중합 효소를 사용한 안토시아닌 올리고머 합성	29
3.2.1.5. 염기서열, 벡터 (pUC57) 및 수용세포 (Yeast)의 변경	29
3.2.1.6. 다양한 효소를 사용한 안토시아닌 올리고머 합성	31
3.2.1.7. 안토시아닌 올리고머의 표준화	31
3.2.1.8. 안토시아닌 올리고머의 분리	72
3.2.1.9. 안토시아닌 올리고머의 시제품 공정 개발	72
3.2.1.10. 합성된 안토시아닌 올리고머의 중금속 분석 결과	82
3.2.2. 안토시아닌 올리고머의 항산화 활성 측정	82
3.2.2.1. 전자스핀공명기기를 이용한 항산화 활성	82
3.2.2.2. 지질과산화 억제 활성을 통한 항산화 활성	86
3.2.3. 망막세포에서 안토시아닌 올리고머의 보호효과	89
3.2.3.1. 망막세포에서 안토시아닌 올리고머의 세포 독성	89
3.2.3.2. 망막세포에서 안토시아닌 올리고머의 산화적 손상에 대한 보호 효과	89
3.2.3.3. 망막세포 내 항산화 효소 활성	89
3.2.4. 동물 모델에서의 안토시아닌 올리고머의 항산화 효능 검토 결과	97
3.2.4.1. 체중 및 조직 무게 측정	97
3.2.4.2. GOT & GPT 분석	97
3.2.4.3. 중성지방 분석	99
3.2.4.4. 항산화 효소 분석	100
3.2.4.5. 간 조직 염색을 통한 조직학적 분석	100
3.2.5. 안토시아닌 올리고머의 항산화 작용기작	100
3.2.6. 안토시아닌 올리고머 분획별 항산화 활성 측정 결과	103
3.2.7. 안토시아닌 올리고머의 항염증 활성	106
3.2.8. 동물 실험을 통한 안토시아닌 올리고머의 항염증 활성 평가 결과	106
3.2.8.1. 체중 및 조직 무게와 길이 측정	106
3.2.8.2. CD4 ⁺ 와 CD8 ⁺ 의 측정 결과	106
3.2.8.3. 임파구의 분리 및 정제 결과	106
3.2.9. IL-10 결핍 마우스에서의 안토시아닌 올리고머의 항염증 활성 평가 결과	106
3.2.9.1. 체중 및 조직 무게와 길이 측정	106

3.2.9.2. 염증 관련 사이토카인 측정 결과	112
3.2.9.3. CD4 ⁺ 와 CD8 ⁺ 의 측정 결과	112
3.2.9.4. 임파구의 분리 및 정제 결과	114
3.2.10. 안토시아닌 올리고머의 항염증 작용기작 규명 결과	116
3.2.11. 안토시아닌 올리고머의 분획별 항염증 활성 측정 결과	116
3.2.12. 안토시아닌 올리고머의 안전성 평가 결과	120
3.2.12.1. 마우스를 이용한 소핵시험 결과	120
3.2.12.2. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 결과	125
3.2.12.3. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 결과	136
3.2.12.4. 마우스를 이용한 안토시아닌 올리고머의 유전독성 실험	140
3.2.12.5. Sprague-Dawley (SD) 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험 결과	140
3.2.12.6. 비글견을 이용한 단회 경구투여 용량증가 독성시험 결과	149
3.2.12.7. SD 랫드를 이용한 4주 반복 경구투여 용량결정시험 결과	153
3.2.12.8. 13주 반복투여 독성시험 결과	166
3.2.13. 임상에서의 안토시아닌 올리고머의 안구 건조증 개선 효능 검토 결과	193
3.2.13.1. 유효성 평가 결과	193
3.2.13.2. 안전성 평가 결과	204
3.2.13.3. 고찰 및 전반적인 결론	206
3.3. 논문 및 특허 실적	207
3.3.1. 논문 실적	207
3.3.2. 특허 실적	209
3.4. 연구 성과	212
3.4.1. 기술적 성과	212
3.4.2. 경제적 성과	212
3.5. 사업화 계획	212
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	213
4.1. 목표 달성도	213
4.2. 관련분야 기여도	213
5. 연구결과의 활용계획 등	214
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	214
7. 연구개발성과의 보안등급	215
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	215
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	215
9.1. 국내 관련기술 현황	215
9.2. 국외 관련기술 현황	215
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	215
11. 기타사항	216

12. 참고문헌 216

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1.1. 연구개발 목적

○ 본 연구에서는 항산화, 항염증 및 항암 등 다양한 생리기능성을 나타내는 안토시아닌 모노머를 사용하여 용매 및 빛 등에 안정하고 기능성이 우수한 안토시아닌 올리고머를 합성할 수 있는 균주로부터 안토시아닌 올리고머를 생산할 수 있는 효소를 개발하여 곰팡이 균을 산업적으로 활용할 때 발생하는 문제점을 개선하고자 한다. 또한, 이렇게 생산된 안토시아닌 올리고머의 항산화 및 항염증 효능, 안전성 및 인체 내에서의 안구 건조 개선 효능을 규명한 후 이를 참여기업에 기술 이전하여 산업화하고자 한다.

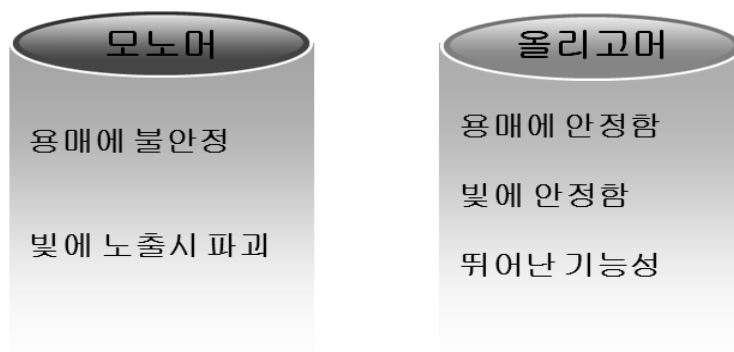
1.2. 연구개발의 필요성

- 다양한 생리기능성을 발현하는 monomer 형태의 안토시아닌은 중성 및 알칼리성 용매에 불안정하고 빛에 약한 단점을 가짐
- 안토시아닌 올리고머는 중성 용매와 빛에 안정하고 항산화, 항염증 및 항암 등의 생리기능성이 monomer 형태보다 우수함
- 포도 및 블루베리 등에서 추출되는 안토시아닌의 대부분은 monomer 형태이고 고기능성을 발현하는 올리고머 형태는 단지 5% 미만이 존재
- 안정성이 높고 기능성이 우수한 안토시아닌 올리고머 생산 기술의 개발 필요성 대두

○ 안토시아닌(anthocyanin)은 과일이나 채소 등에서 발견되는 적색이나 자주색 또는 청색을 띠는 천연색소로 300여 종이 알려져 있고, 가장 대표적인 생리기능성은 활성산소를 소거시키는 항산화활성, 항염증활성 및 항암활성 등의 다양한 생리기능성을 나타냄.

○ 다양한 생리기능성에도 불구하고 포도 및 블루베리 등에서 추출되는 안토시아닌의 대부분은 monomer 형태이고 고기능성을 발현하는 올리고머 형태는 단지 5% 미만이 존재.

○ monomer 형태의 안토시아닌의 효능은 시력개선효과, 항산화, 항암 및 동맥경화 등 다양하지만 중성 및 알칼리성 용매에서 불안정하고 빛에 노출되면 구조적으로 불안정화 되어 파괴되는 결점을 가짐. 반면, 안토시아닌의 중합체 형태인 안토시아닌 올리고머는 빛과 중성 용매에 안정하고 안토시아닌 보다 기능성이 뛰어나 (본 연구의 예비실험 결과 항산화 효과가 안토시아닌 보다 2배 이상 뛰어났음) 그 사용의 폭이 넓을 것으로 판단함.



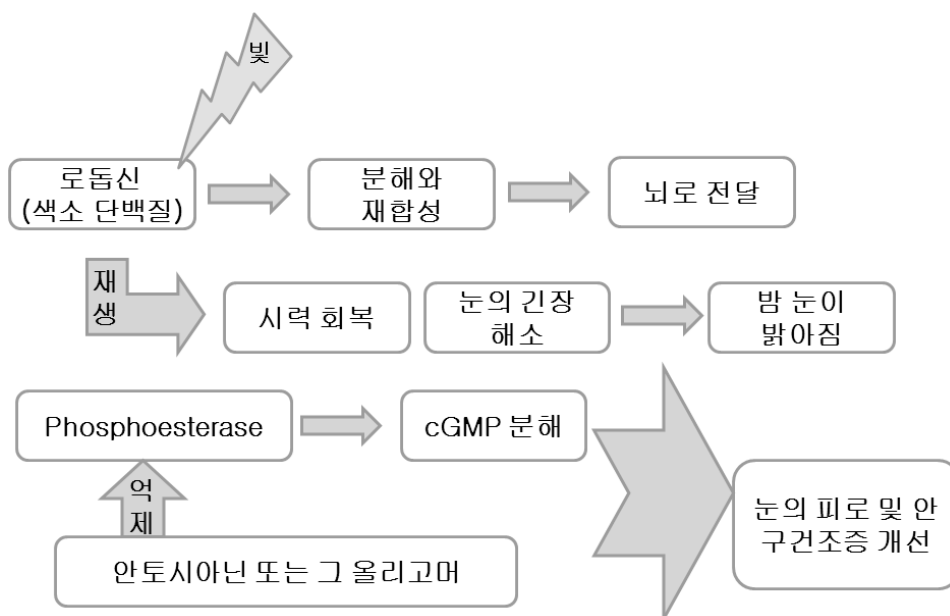
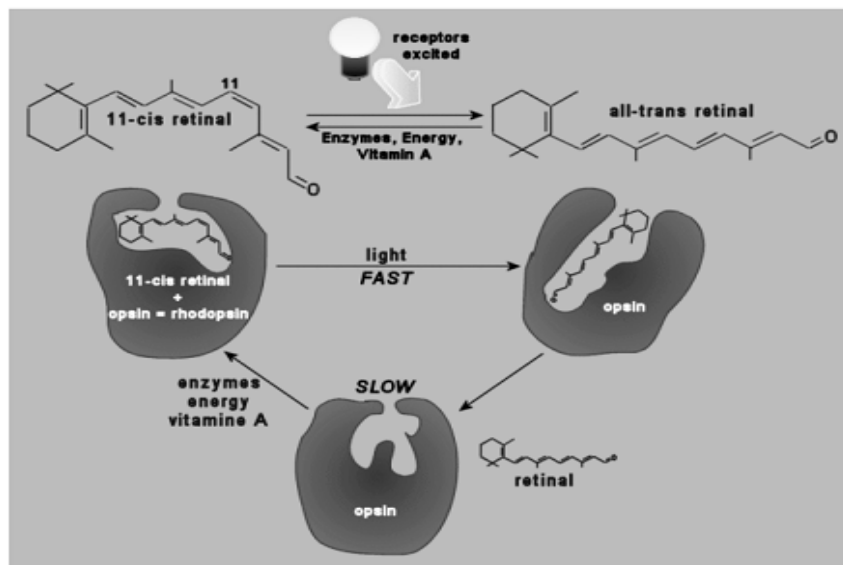
[안토시아닌 모노머와 올리고머의 차이점]

○ 한편, 안토시아닌 올리고머는 흑국균의 대표균으로 알려져 있는 *Aspergillus niger*에 의해 안토시아닌 용액과 발효배양 시 monomer인 안토시아닌이 dimer, trimer 및 tetramer 등의 올리고머 형태로 제조 됨.

○ 이러한 안토시아닌은 사람의 망막에 있는 시각관련 물질인 로돕신(rhodopsin)의 합성을 활성화시키고, 시신경 기능에 유해한 작용을 하는 각종 효소들을 저해할 뿐만 아니라 활성산소를 소거시킴.

○ 일반적으로 로돕신은 빛의 자극을 받으면 순간적으로 분해와 재합성을 반복하는 눈의 색소 단백질로 알려져 있으며, 망막에서 빛을 감지해 뇌로 전달해 주는 역할을 하는데 로돕신의 재생은 시력회복 및 눈의 긴장을 풀어 밤 눈이 밝아지는 효과가 있음.

○ 안토시아닌에 대한 로돕신의 재생 작용은 cGMP를 분해하는 포스포에스티라아제를 억제하여 로돕신의 재생을 도와 빛에 노출된 눈의 피로를 개선 (그림 참조).

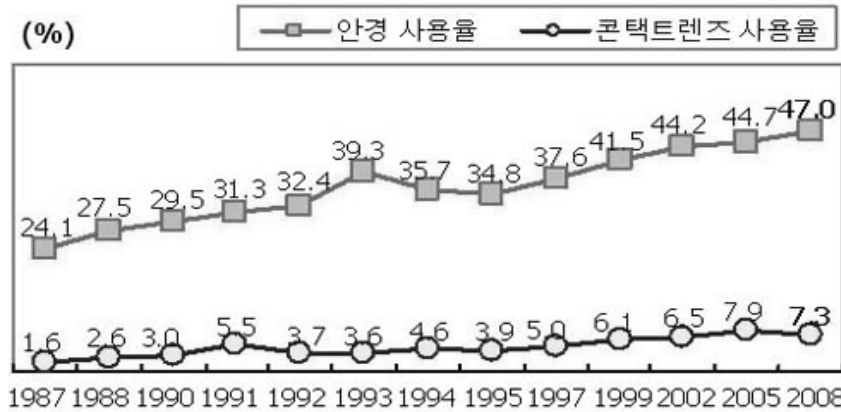


[로돕신의 역할과 안토시아닌의 활성화]

○ 또한, 1987년부터 실시한 전국 안경 사용률 조사결과를 연도별로 비교해 보면 안경사용률은 1987년 24.1%에서 2008년 4월 기준 47.0%로 증가한 것으로 나타났고, 콘택트렌즈 사용률 역시 1987년 1.6%에서 7.3%로 증가해 1987년보다 현재 국민의 시력이 저하되었음을 확인할 수 있었고 이에 따른 시력 보호 및 개선과 관련된 연구가 절실히 필요.

○ 국민건강보험공단 건강보험정책연구원이 2002년부터 2008년까지 건강보험 진료비 지급자료를 분석한 내용에 따르면 '눈물샘의 기타장애 질환'으로 분류되는 "안구건조증"의 2008년 실진료 환자수가 150만명을 넘은 것으로 나타나 최근 몇 년간 급속하게 증가.

<연도별 안경 사용률 추이>



(출처 : 2008년 전국 안경 사용률, 대한안경사협회, 한국갤럽조사연구소)

<안구건조증 연도별 건강보험 실진료 환자수 추이>

(단위 : 천명)

연도	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
계	744	810	974	1,104	1,196	1,427	1,511
남성	222	246	298	342	378	449	475
여성	522	564	676	762	818	978	1,036
전년대비 증가율(%)		8.9	20.2	13.4	8.3	19.3	5.9

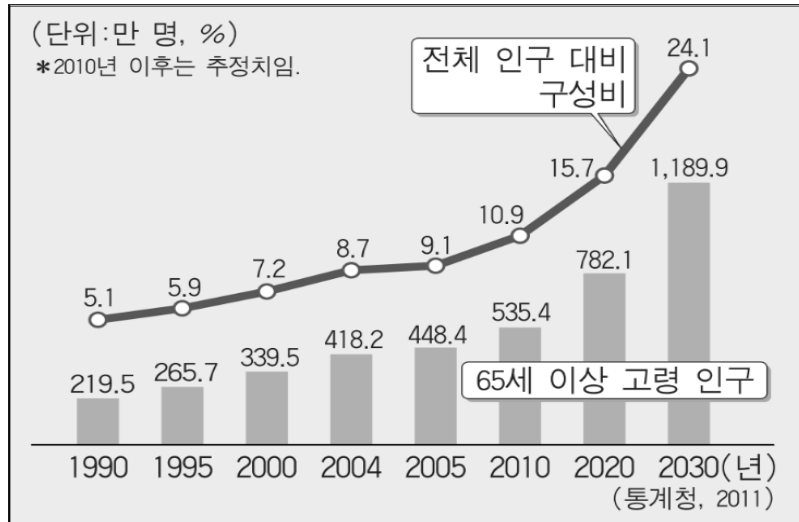
(출처 : 국민건강보험공단 건강보험 정책연구원)

○ 한편, 2011년 통계청 자료 전체 인구 대비 65살 이상 고령인구의 구성비는 1990년 5.1% 이었는데, 2010년에는 고령인구의 비중이 그 두 배인 10%에 달했으며 이런 추세가 지속될 때, 2030년에는 고령인구가 전체 인구의 24.1% 까지 높아지게 되어 초고령화 사회로 진입될 것으로 예측됨.

○ 연령별 인구구조 변동 추세를 연령별로 살펴보면, 유소년인구(0~14세) 감소세와 노령인구(65세 이상)의 증가추세에 따라 생산가능인구(15~64세)는 2016년을 정점으로 감소할 전망이다.

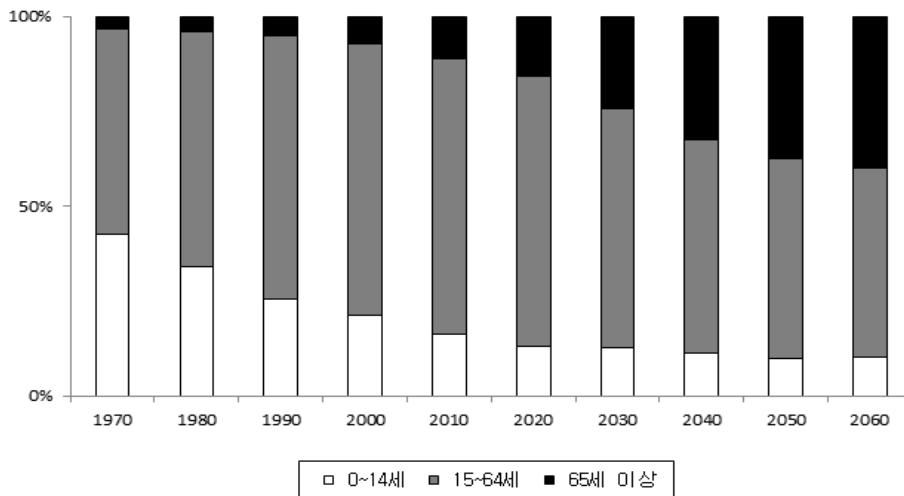
○ 특히, 인구의 고령화가 급진전됨에 따라 총인구중 65세 이상 비율이 70년 3.1%에서 2000년에는 7.2%, 2017년에는 14.0%, 2026년에는 20.8%에 진입될 것으로 예측되며 이에 따라 2012년에는 생산가능인구(15~64세) 6.2명당 노인1명을 부양했지만, 2020년에는 4.5명당 노인1명, 2040년 1.7명당 노인1명, 2060년 1.2명당 노인1명을 부양해야 할 것으로 전망됨.

<고령인구 구성비 추이>



(통계청, 2011)

<연령계층별 인구 구성비>



(통계청, 장래인구추계, 2010)

○ 고령화의 속도를 국제적으로 비교하면 최근 우리나라의 경우 저출산과 평균수명 연장으로 고령화 속도가 빠르게 진행되고 있으며, 우리나라의 고령사회 진입속도는 선진국에 비해 매우 빠르게 진행 중임 (고령화는 전체인구에서 65세 이상인구가 차지하는 비율로 7%이상, 14%이상, 20%이상으로 구분).

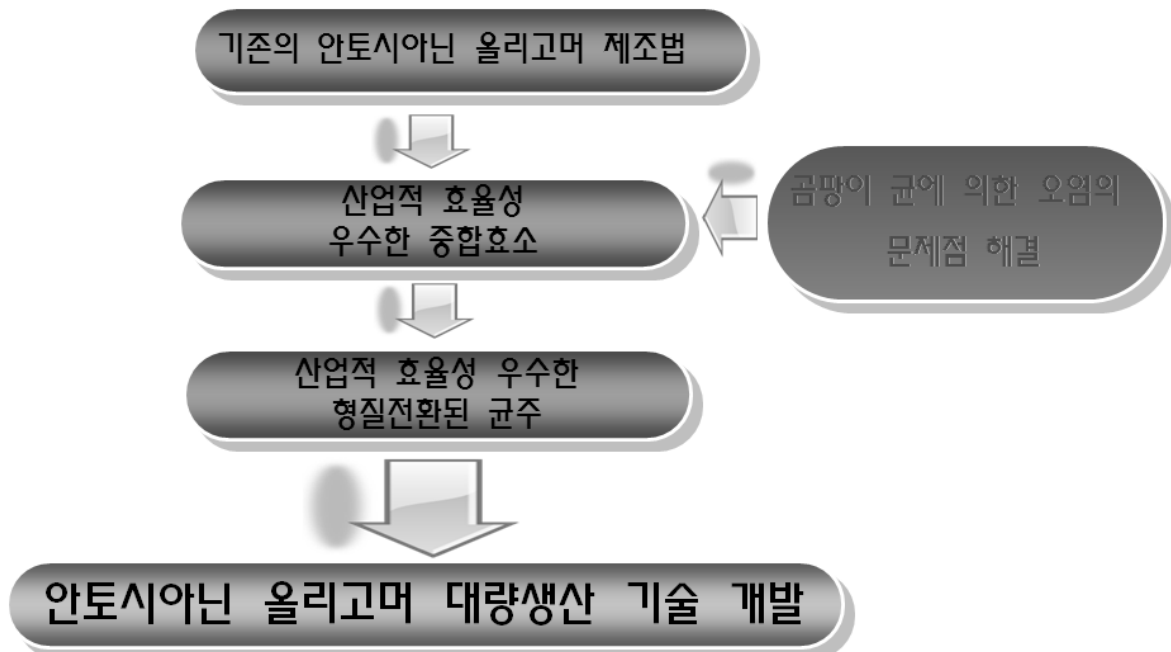
○ 고령화 사회는 다양한 사회적, 의학적, 경제적 문제를 유발시키고 있으며, 이러한 노령화 인구의 급격한 증가는 안과질환을 포함한 다양한 노인성 질환의 동반 상승을 초래하였으며, 이는 커다란 사회문제로 대두되고 있는 실정임.

<고령화 속도 국제비교표>

	도달년도			증가소요년수	
	7% (고령화사회)	14% (고령사회)	20% (초고령사회)	7%→14%	14%→20%
일본	1970	1994	2005	24	11
프랑스	1894	1979	2018	115	39
영국	1929	1975	2028	46	53
미국	1942	2014	2032	72	18
한국	2000	2017	2026	17	9

자료: 일본 국립사회보장, 인구문제연구소, (인구통계자료집) 2010

○ 한편, 현재 안토시아닌에 대한 연구의 대부분은 포도, 블루베리, 고구마 등의 적색 및 홍색 식물이나 과일로부터 안토시아닌의 추출 및 그 생리기능성 연구에 한정되어 있고 안토시아닌보다 열과 빛에 상대적으로 안정하여 그 효율성이 큰 안토시아닌 올리고머에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않음.



[기존 기술과의 차별성 도식화]

○ 따라서, 본 연구에서는 항산화, 항염증 및 항암 등 다양한 생리기능성을 나타내는 안토시아닌 monomer를 사용하여 용매 및 빛 등에 안정하고 기능성이 우수한 안토시아닌 올리고머를 합성할 수 있는 균주를 탐색한 후 이들 균주로부터 안토시아닌 올리고머를 생산할 수 있는 효소를 개발하여 곰팡이 균을 산업적으로 활용할 때 발생하는 문제점을 개선하고자 함. 또한, 이렇게 생산된 안토시아닌 올리고머의 효능, 안정성 및 인체 내에서의 효능을 규명한 후 이를 참여기업에 기술 이전하여 산업화하고자 함.

1.3. 연구개발 범위

[제 1세부 : 안토시아닌 올리고머 종합효소 개발 및 항산화 활성 평가]

- 안토시아닌 올리고머 생합성 관련 효소 탐색
- 안토시아닌 올리고머 생합성 균주로부터 생합성에 관여하는 효소 분리

- 안토시아닌 올리고머 생합성 관련 효소 유전자 탐색
- 안토시아닌 올리고머 생합성 효소 유전자의 형질 전환
- 생합성 된 안토시아닌 올리고머의 *in vitro*, *in vivo*에서의 생리활성 검증
- 안토시아닌 올리고머의 안전성 및 독성 평가 검증
- 안토시아닌 올리고머의 임상에서의 효능 검증

[제 1협동 : 안토시아닌 올리고머 항염증 활성 검증 및 산업화]

- 생합성 된 안토시아닌 올리고머의 *in vitro*, *in vivo*에서의 항염증 활성 검증
- 안토시아닌 올리고머 중합 효소의 대량생산 기술 확립
- 안토시아닌 올리고머의 대량생산 기술 확립
- 안토시아닌 올리고머를 이용한 다양한 제품 생산 (예, 캡슐 형태 등)
- 경영 컨설팅

2. 국내외 기술개발 현황

2.1. 국내 관련기술 현황

- 컬러 Food에 대한 관심이 커지면서 검정콩, 검은깨, 흑미, 자색고구마, 블루베리, 딸기 및 포도 등의 다양한 식물에서 추출한 안토시아닌의 효능 검증에 관한 논문이 다수 출판.
- 합성식용색소의 사용이 점차 규제되면서 천연식용색소로 안토시아닌의 관심이 증가하고 있으며, 점차 식색소로 사용이 증가하고 있는 추세이나 상업적으로 대량생산에는 경제적인 측면에서 한계에 부딪히고 있음.
- 자연계에는 다양한 종류의 안토시아닌이 존재하고, 이러한 안토시아닌은 안토시아닌 모노머가 대부분을 차지하며, 시력개선 효과가 탁월한 안토시아닌 올리고머는 5%미만만이 함유되어 있어 이를 보완하고자 각종 비타민을 혼합한 제품들이 시판되고 있음.
- 현재 국내 식품 산업은 안토시아닌의 추출보다는 안토시아닌이 많이 함유되어 있는 검은콩, 검은깨, 블루베리 등을 이용한 음료, 건과류 및 제과류 등의 제품을 생산.
- 안토시아닌의 국내 연구현황은 대부분 식물류로부터 안토시아닌 추출 및 효능 검증에 국한되어 있을 뿐이고, 안토시아닌 보다 상대적으로 빛과 열에 안정하고 항산화 효능이 더 뛰어난 안토시아닌 올리고머에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않음.
- 올리고머 안토시아닌을 이용한 연구는 야맹증과 근시의 개선에 대한 연구 2건 외에 본 연구진에서 발표한 안토시아닌 올리고머의 항산화 활성 및 G2/M기 진행 억제에 관련한 연구가 존재하며 올리고머 안토시아닌을 생합성하는 공정에 대한 특허가 1건 존재함.
- 그러나, 특허에서 검색되고 있는 *Aspergillus niger*에 의한 안토시아닌 올리고머의 생산은 현재 제품으로 나오고 있지 않음.

2.2. 국외 관련기술 현황

○ 미국 오하이오 주립대 연구진이 발표한 컬러 Food의 항산화, 항염증 등의 생리활성에 대한 보고 이후 컬러 Food가 주목을 받고 있음 (영국 가디언지).

○ 현재, 구미에서 특정 색깔을 지닌 식재료들 중에서도 가장 인기를 얻고 있는 것은 블랙 Food 인데, 이는 이 안에 안토시아닌 성분이 함유되어 있고 이 성분이 노화, 암, 심장질환 및 뇌졸중 등의 질환을 예방하고 치료하는 효과가 뛰어난 것이 알려지면서부터 임.

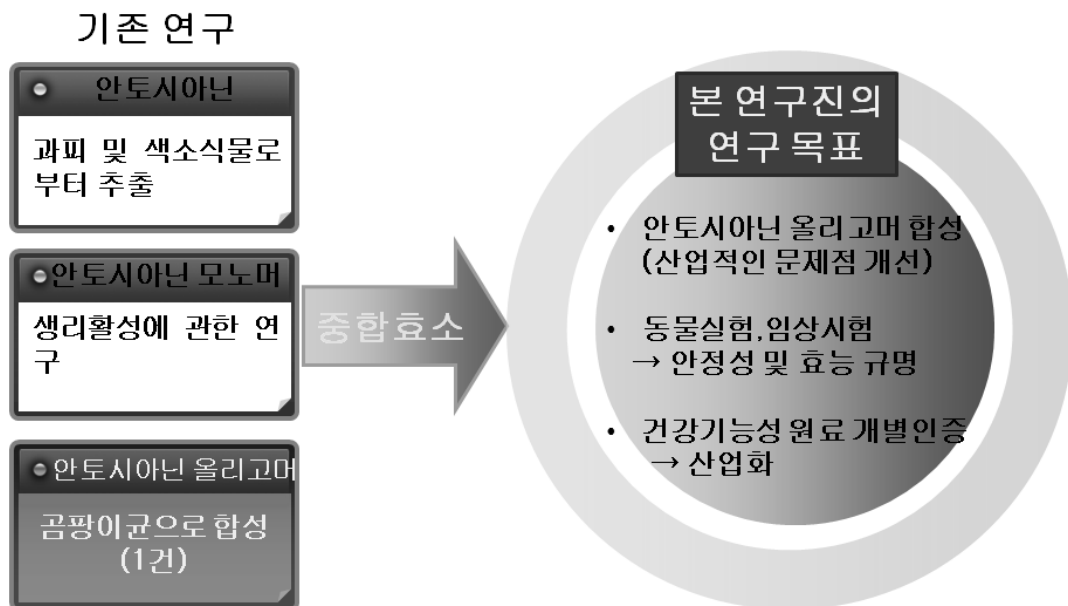
○ 90년대 후반 미국에서 항산화작용에 의한 시력보호 기능을 가진 건강기능식품으로 안토시아닌 함유 음료가 10억불 이상의 큰 시장을 형성하였음.

○ 또한, 일본 가고시마에서는 안토시아닌이 들어있는 흑마늘 및 흑초 제품이 선풍적인 인기를 누렸으며, 이는 한국에도 수입되어 고가로 판매되었음.

○ 유럽의 경우 현재 안토시아닌을 포함한 색소시장의 규모는 약 2천억 유로를 상회하며 매년 10-15% 정도 증가하는 추세임.

○ 현재 세계적으로 안토시아닌 시장은 올리고머 형태보다는 monomer 형태의 안토시아닌이 판매되고 있음. 단지 그 함량에는 차이가 있어, 미주 및 유럽에서 시판되고 있는 안토시아닌은 그 함량이 대략 20%정도이며, 국내시장에 많이 수입되는 중국산의 경우는 안토시아닌이 6%정도 함유되어 있음.

=>기존 국내·외 관련 기술 및 연구 결과를 보았을 때, 안토시아닌 올리고머의 획득이 용의하지 않기 때문에, 안토시아닌의 추출 및 그 생리활성을 본 연구 결과가 주를 이루고 안토시아닌 올리고머와 관련된 연구 결과는 미미한 수준임. 본 연구진에서는 이러한 기존 연구 결과를 바탕으로 안토시아닌 올리고머의 중합효소를 개발하여 안토시아닌 올리고머의 생리활성에 관한 연구 및 산업화를 이루고자 함.



[기존 연구결과에 따른 연구 목표 도식화]

3. 연구수행 내용 및 결과

3.1. 연구 수행 방법

3.1.1. 안토시아닌 올리고머의 합성

3.1.1.1. 안토시아닌 올리고머 중합 효소 개발

가. RT-PCR 방법으로 중합효소유전자를 클로닝

Linker adapted oligo-dT primer (primer 1 : 5'-GAT CAT GCC TCA AAA AGA ATT CGT CCC C)를 이용하여 single-stranded cDNA를 합성한 후 single-stranded cDNA를 주형으로 RT-PCR 방법으로 double stranded cDNA를 합성하고 그 후 5'RACE 방법으로 전체 길이의 유전자를 클로닝하고 그 염기서열을 결정한 후 클로닝한 유전자를 발현벡터에 클로닝 (pET series, etc)하여 발현시켰다.

나. 발현 벡터에 클로닝한 유전자 산물의 활성 검사

정제한 중합효소와 발현 벡터에 클로닝한 유전자 산물을 이용하여 안토시아닌 올리고머를 생합성하고 ESI-MS를 사용하여 기존의 안토시아닌 모노머와 비교한 후 활성을 검토 하였다.

다. 안토시아닌 올리고머의 생합성 균주 개발 형질전환

벡터에 맞는 DNA ligase를 처리하여 만들어진 recombinant plasmid DNA를 조제한 후 recipient cell로서 argD strain을 이용 형질 전환시킨 후 항생제가 첨가된 최소배지 위에서 생장한 colony를 선별. 즉, 약 200 ~ 500 ng의 ligates DNA (total volume 10 µl)에 0.2 ml의 competent cell을 넣고 얼음에서 60분간 놓아두고 나서 42°C에서 90초간 heat shock를 주고 다음에 얼음에서 다시 2분간 방치한 다음 LB 800µl를 첨가하여 37°C에서 45분간 배양하였다. Regeneration 후 원심분리하여 균체를 200µl 정도로 줄인 후 ampicillin을 첨가한 Luria-Bertani 및 minimal 배지(proline, leucin, thiamine, threonine)에 도말하여 37°C에서 16시간 배양한 후 최소배지에서 자란 colony를 똑같은 다른 최소배지에 picking하여 생육하는 colony를 선별하였다.

라. *E. Coli*, *P. pastoris* 등의 균을 사용한 안토시아닌 올리고머 중합 효소 대량 생산

발현 유전자로 형질 전환된 *E. coli*에 IPTG를 처리하여 중합효소 유전자를 발현시킨 후 이미 정립된 중합효소 정제법으로 효소를 분리하여 그 활성을 검사하였다. *P. pastoris*의 경우에는 pPIC9k에 중합효소 유전자를 클로닝한 후 발현 유전자로 형질 전환된 *P. pastoris*를 이용하여 중합효소를 발현시켜 그 활성을 확인하였다.

3.1.1.2. 안토시아닌 올리고머의 생산

Aspergillus niger 균을 배양하여 *Aspergillus niger* 균을 제거한 후 배양액과 유기용매를 1:1로 혼합한 다음 8 시간 침전 후 침전물로부터 중합효소 얻었다. 이때 얻을 수 있는 중합효소는 배양액 1 L당 100 mg의 중합효소를 얻을 수 있었다. 다음으로 중합효소를 사용하여 안토시아닌 모노머를 안토시아닌 올리고머로 중합하였다. 중합효소 100 mg은 10 g의 안토시아닌 모노머를 중합하여 8 g의 안토시아닌 올리고머를 얻을 수 있었고 이 때 중합 방법은 안토시아닌 모노머 10 g을 100 ml의 증류수에 녹인 후 중합효소 100 mg을 첨가하여 25°C에서 5일간 교반하였다. 5일간 중합한 안토시아닌 올리고머 용액은 필터를 통하여 불용성 안토시아닌 모노머를 제거하여 준

후 동결 건조하여 안토시아닌 올리고머를 제조하였다.

3.1.1.3. 안토시아닌 올리고머의 표준화

가. ESI-MS를 이용한 안토시아닌 올리고머의 표준화

합성된 안토시아닌 올리고머는 전문 분석기관이 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 ESI-MS기기를 사용하여 분석하였다.

나. HPLC를 이용한 안토시아닌 올리고머의 표준화

HPLC기기에서 다양한 분석 컬럼(C18, GPC, 극성)과 디텍터(UV, RI detector)를 사용하여 안토시아닌 모노머와 올리고머의 시그널을 분석하였다.

3.1.1.4. 합성된 안토시아닌 올리고머의 중금속 분석

중금속 분석을 위해 전처리용으로 HNO₃ (JUNSEI, Japan)과 HCl (DAEJUNG, Korea)을 사용하였고, 중금속 표준용액으로 Pb, Cd, Hg, Sb, As standard solution (1,000 ppm, Kanto Chemical, Japan)을 사용하였다. 실험에 사용한 물은 모두 초 순수제조장치로 제조한 것을 사용하였다.

가. 납, 카드뮴 분석

납, 카드뮴 분석은 안토시아닌 올리고머 분말 10 g에 0.5 N HNO₃ 를 90 ml 첨가하고, waterbath를 사용하여 70°C에서 1시간 동안 추출하였다. 추출한 시료를 70°C에서 10분간 sonication 한 후 식혔다. 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액만 회수해 정량 분석에 사용하였다. 납 표준용액은 1,000 ppm 표준품을 증류수로 희석하여 1, 2, 4, 6, 8, 10 ppm으로, 카드뮴 표준용액은 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 ppm이 되도록 제조한 후 검량선을 작성하여 정량하였다. 중금속 분석을 위해 Atomic Absorption Spectrophotometer (원자흡광광도계, Shimadzu AA-6300, Japan)를 이용하여 분석하였다.

나. 수은 분석

수은 함유량을 분석하기 위해 안토시아닌 올리고머 시료는 납, 카드뮴 분석법과 같은 방법으로 준비하였다. 수은 표준용액은 1,000 ppm 표준품을 증류수로 희석하여 10, 20, 30, 40, 50 ppb가 되도록 제조한 후 검량선을 작성하여 정량하였다. 중금속 분석을 위해 수소화물 발생장치 (Hydride Vapor Generator, Shimadzu HVG-1, Japan)이 부착된 원자흡광광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer, Shimadzu AA-6300, Japan)를 이용하여 분석하였다.

다. 비소 분석

비소는 안토시아닌 올리고머 2 g에 1 N HCl 를 40 ml 첨가하고, waterbath를 사용하여 70°C에서 1시간 동안 추출하였다. 추출한 시료를 4 ml의 5% KI 용액과 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 뒤, 총 부피가 200 ml이 되도록 증류수로 make-up 하였다. 3,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상등액만 회수해 정량 분석에 사용하였다. 표준용액은 1,000 ppm 표준품을 1 N HCl로 1 ppm이 되도록 희석하고, 5% KI 용액을 총 부피의 10% 함량으로 첨가하여 반응시켰다. 이 후 증류수로 희석하여 1, 2, 5, 10, 15, 20 ppb가 되도록 제조한 후 검량선을 작성하여 정량하였다. 중금속 분석을 위해 수소화물 발생장치(Hydride Vapor Generator, Shimadzu HVG-1, Japan)이 부착된 원자흡광광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer, Shimadzu AA-6300,

Japan)를 이용하여 분석하였다.

3.1.2. 안토시아닌 올리고머의 항산화 활성 측정

3.1.2.1. *In vitro*에서의 항산화 활성 측정

가. 전자스핀공명기기(ESR)에 의한 hydroxyl radical 소거활성 측정

안토시아닌 올리고머의 hydroxyl radical 소거 활성은 시료를 일정한 농도가 되게 증류수에 녹이고, 농도별 시료 20 μ l와 0.3 M 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) 20 μ l, 10 mM FeSO₄ 20 μ l 및 10 mM H₂O₂/0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 20 μ l를 혼합한 다음 실온에서 2.5분 방치한 후 quartz capillary tube에 옮겨 electron spin resonance (ESR) spectrometer로 측정하였다.

나. 전자스핀공명기기(ESR)에 의한 superoxide radical 소거활성 측정

안토시아닌 올리고머의 superoxide radical 소거 활성은 안토시아닌 올리고머 시료와 리보프라빈 (0.3 mM), EDTA (5 mM), DMPO (0.8 M)을 각각 20 μ l 씩 e-tube에 넣어 365 nm UV 램프에서 1분간 반응시키고 용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 ESR로 측정하였다.

다. 전자스핀공명기기(ESR)에 의한 DPPH radical 소거활성 측정

안토시아닌 올리고머의 DPPH radical 소거활성은 60 μ l 시료 용액에 60 μ l DPPH 용액 (60 μ M)을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮겨 2분 간 반응시킨 후에 ESR로 측정하였다.

라. 전자스핀공명기기(ESR)에 의한 alkyl radical 소거활성 측정

안토시아닌 올리고머의 alkyl radical 소거활성은 10 mM AAPH, 10 mM 4-POBN 및 다양한 농도의 시료가 포함된 phosphate-buffered saline (pH 7.4) 반응물을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮긴 다음 ESR로 측정하였다.

마. FRAP (ferric reducing antioxidant power)

FRAP 측정은 Benzie와 Strain 방법을 96 well plate에 실험하였다. sodium acetate와 acetic acid를 이용하여 300 mM acetate buffer (pH 3.6)를 조제하고 40 mM HCl과 TPTZ를 이용하여 10 mM TPTZ solution을 만들었다. 실험을 위한 반응용액은 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ 및 20 mM FeCl₃·6H₂O를 10:1:1 (V/V/V)의 비율로 실험 직전에 만들어 사용하였다. FeSO₄를 이용하여 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mM의 standard를 만들었으며 시료농도는 각 1 mg/ml를 사용하였다. 시료 또는 standard를 각 50 μ L씩 FRAP solution 1 ml과 섞고 약 5 분 동안 37 °C에서 incubation 한 후 microplate reader (Tecan, Austria)를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

바. ABTS (2,2'-azinbis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)) 라디칼을 이용한 총 항산화력 측정

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 유리 라디칼이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 Park과 Kim (12)의 방법에 따라 7 mM ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12~16 시간 동안 반응시켰

다. 이를 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정된 후 3.0 ml를 취하여 추출물 1.0 ml를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 414 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사. 지질과산화억제 활성 측정

안토시아닌 올리고머의 지질과산화도는 linoleic acid emulsion을 사용한 Osawa 등의 방법에 따라 linoleic acid 0.13 ml, ethanol 10 ml, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 10 ml를 혼합하고, 이 혼합물에 안토시아닌 올리고머 시료를 linoleic acid에 대해 각각 1% (w/v)의 농도로 첨가하여 40±1°C로 조절된 항온기내에서 저장하면서 자동산화를 촉진시킨 후 TBA 및 FTC의 방법을 사용하여 측정하였다. Thiobarbituric acid (TBA)에 의한 지질과산화도 측정은 Ohkawa 등의 방법에 따라 실행. 즉, 40°C에서 배양시킨 linoleic acid emulsion 50 ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.2 ml, 20% acetic acid 1.5 ml 및 0.8% TBA 수용액 1.5 ml를 넣고 혼합한 다음, 5°C에서 60분간 방치한 후 95°C에서 60분간 발색시켜 분광광도계 (Hitachi, Japan)를 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 (FTC)에 의한 지질과산화도 측정은 linoleic acid emulsion 100 µl를 75% 에탄올 (4.7 ml), 30% ammonium thiocyanate (100 µl), 3.5% 염산용액으로 녹인 ferrous sulfate (100 µl)와 혼합 한 후 암실에서 실온으로 3분 동안 반응시켜 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

3.1.2.2. 망막세포에서의 안토시아닌 올리고머의 보호 효과 측정

가. 안토시아닌 올리고머의 세포독성 측정

안토시아닌 올리고머의 세포독성 여부를 확인하기 위하여 MTT 방법에 준하여 세포의 생존율 (cell viability)을 측정하였다.

나. 안토시아닌 올리고머의 산화적 스트레스로 인한 망막세포 손상에 대한 보호 효과 측정

안토시아닌 올리고머의 산화적 스트레스로부터 망막세포 손상에 대한 보호 효과는 H₂O₂를 손상 요인으로 사용하여 연구를 진행하였다. 6-well plate에 망막세포를 접종하고 24시간 뒤에 H₂O₂ 또는 H₂O₂ + 안토시아닌 올리고머를 처리한 후 37°C의 CO₂ 인큐베이터에 24시간 동안 배양한 후, 수확하여 4°C, 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 버리고, 인산염완충용액 300 µl를 첨가하여 잘 섞어 tween 20 0.5%가 함유된 차가운 에탄올 1 ml을 첨가하여 4°C에서 고정하였다. 24시간 후, 4°C, 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 버리고, 여기에 인산염완충용액 1 ml을 첨가한 후 잘 섞어서 다시 4°C, 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하고, 상층액을 버린 다음, 여기에 RNase 10 µg/ml이 포함된 요오드 프로피디움 용액 (최종농도 50 µg/ml) 300 µl를 첨가하여 잘 섞어준 후 37°C에서 30분 염색하여 유세포 분석기 (FACScan, BD Science, USA)에서 세포사멸과 세포주기를 측정하였다.

다. 세포 내에서 카탈라제 (catalase; CAT) 활성 측정

안토시아닌 올리고머가 세포내 카탈라아제 (catalase) 활성에 미치는 영향을 시그마사의 카탈라아제 분석 키트 (Catalase assay kit)를 사용하여 측정하였다. 즉, eppendorf 튜브에 시료를 첨가하여 인산염완충용액으로 전체 75 µl로 맞춰주고 비색분석을 위한 기질용액 25 µl를 첨가한 후, 각각의 튜브를 역전 (inversion)하여 혼합한 다음 실온에서 5분 방치하여 정지 용액 900 µl를 첨가한 후, 이 중 10 µl를 취하여 새로운 eppendorf 튜브로 옮겨 발색용액 1 µl를 첨가하고 혼합한 후 15분 동안 실온에서 방치한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. 세포 내 글루타티온 과산화효소 (glutathion peroxidase; GPx) 활성 측정

안토시아닌 올리고머가 신경세포 내 글루타티온 과산화효소 (glutathion peroxidase) 활성에 미치는 영향을 시그마사의 글루타티온 과산화효소 분석 키트를 사용하여 측정하였으며, 그 방법은 eppendorf 튜브에 GPx assay buffer, NADPH assay reagent, 시료를 첨가하고, 마지막으로 30 mM t-BuOOH를 각각의 튜브에 첨가한 후 혼합한 다음 340 nm에서 10초 간격으로 총 6번 흡광도를 측정하였다.

마. 세포 내 글루타티온-에스-전이효소 (glutathion-s-transferase; GST) 활성 측정

안토시아닌 올리고머가 신경세포 내 글루타티온-에스-전이효소 (glutathion-s-transferase) 활성에 미치는 영향을 시그마사의 글루타티온-에스-전이효소 분석 키트를 사용하여 측정하였으며, 그 방법은 eppendorf 튜브에 기질용액 1,000 μ l에 각각 시료 2 μ l를 넣거나, 효소 보정군에 GST control 2 μ l를 첨가하여 섞어준 다음 340 nm에서 30초 간격으로 총 9번 흡광도를 측정하였다.

바. 세포 내 과산화 분자변위보호소 (superoxide dismutase; SOD) 활성 측정

안토시아닌 올리고머가 신경세포 내 과산화 분자변위보호소 (superoxide dismutase) 활성에 미치는 영향을 시그마사의 글루타티온-에스-전이효소 분석 키트를 사용하여 측정하였으며, 그 방법은 96-well plate에 시료와 정해진 양의 각 용매를 첨가하고, 37°C에서 20분간 방치한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3.1.2.3. 동물 모델에서의 안토시아닌 올리고머의 항산화 효능 검토

가. 급성 산화스트레스 동물 모델

건국대학교 동물실험윤리위원회 (IACUC)에 동물실험계획을 승인받아 실험동물의 윤리적 사용과 3Rs원칙에 따라 동물실험 방법을 준수하면서 수행하였다. 실험에 사용된 실험동물은 6주령 수컷 ICR계 mouse로 건국대학교 동물사육실에서 온도 $22\pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $56\pm 5\%$, 12시간 명암주기를 유지하면서 사육하고 실험기간동안 사료는 자유롭게 먹을 수 있게 하였다. 실험시작 전 일주일 동안 적응시킨 후, 생쥐를 정상군, t-BHP로 산화 유발시킨 대조군 (2 mmol/kg), 안토시아닌 모노머 실험군 (200 mg/kg), 안토시아닌 올리고머 실험군 (200 mg/kg), positive control 비교군은 silymarin (100 mg/kg)을 사용하였으며, 총 5 그룹으로 나누어 군당 5마리씩 실험을 진행하였다. 일주일동안 안토시아닌 올리고머를 구강투여한 후 7일 째에 t-BHP를 복강 주사하여 산화적 손상을 유발하였다. 18시간 사료를 제거하고 물만 준 후 다음날 CO₂ 심마취하고 혈액 및 장기를 적출하여 실험을 수행하였다.

나. 급성 산화스트레스 동물 모델을 통한 항산화 효능 실험방법

실험이 끝난 마우스는 마취한 후 심장에서 혈액을 채취하여 실온에서 30분 정도 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻은 후, -80°C 에서 냉동보관 하였고, 아산제약 kit를 이용하여 Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)와 Glutamic pyruvic transaminase (GPT), 중성지방을 측정하여 독성평가를 수행하였다. 간 조직 중의 단백질 정량은 Bradford 방법에 의해서 595 nm에서 흡광도를 측정하고 표준단백시료를 bovine serum albumin (BSA)으로 정량하였다.

적출된 간 0.5 g에 3배의 5% sulfosalicylic acid solution을 가하여 균질화시킨 후 1차 원심분리 ($600\times g$, 10 min) 하여 상등액을 얻고, 이 상등액을 2차 원심분리 ($10,000\times g$, 20 min)하여

얻은 cytosol 획분을 superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT) 활성 측정에 사용하였다. 간 조직 중 catalase (CAT) 활성은 20 mM 과산화수소를 기질로 균질액 내의 CAT에 의해 감소되는 과산화수소량을 측정하는 방법, superoxide dismutase (SOD) 활성은 xanthin과 xanthine oxidase의 반응에서 형성된 superoxide anion radical이 tetrazolium blue와 formazan을 형성하는 원리를 이용한 방법으로 catalase assay kit와 SOD assay kit를 사용하여 제조사 (Sigma, MO, USA)의 방법대로 수행하였다.

간 조직의 일부는 조직표본을 만들어 H&E 염색을 하고 현미경으로 형태학적인 관찰을 통하여 간조직의 변화를 확인하였다. H&E의 염색 단계는 아래와 같다.

고정: 간 적출 후, 10% formalin에 넣고 2-3일 동안 고정하였다.

Wash: tap water로 2시간 이상 washing 하였다.

Dehydration: 50%, 70%, 95%, 100% ethyl alcohol을 이용하여 순차적으로 탈수시켰다.

Clearing: xylene 으로 조직을 투명화 하였다.

조직 포매: 단단하지 않고 불규칙한 조직을 paraffin을 침투시켜 굳혔다.

조직 절편: 5 um의 두께로 박절한 후 온수에 넣어 파라핀 절편의 주름을 펴고 슬라이드에 올린 후 slide warmer에 올려 파라핀을 녹여 슬라이드에 밀착 시켰다.

조직 염색: hematoxlin과 eosin 염색을 하였다.

Dehydration: 95%, 100% ethyl alcohol을 이용하여 2번씩 순차적으로 탈수시켰다.

Clearing: xylene 으로 조직을 투명화 하였다.

Mounting : 봉입제를 이용하여 커버글래스를 덮었다.

In vivo 실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 GraphPad InStat(GraphPad InStat Version 5.00) 통계 package를 이용하여, 대조군과 처리군 간의 평균차의 통계적 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 Tukey-Kramer multiple comparisons test에 의해 검정하였다.

3.1.2.4. 안토시아닌 올리고머의 항산화 작용기작 규명

가. Western blotting : 6-well plate에 망막세포를 접종하고 24시간 뒤에 손상 요인(LPS 등) 또는 손상 요인+ 안토시아닌 올리고머를 처리한 후 37°C에서 CO₂ 인큐베이터에 24시간 동안 배양한 후, 수확하여 4°C, 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 버리고, 단백질을 분리시켜 (Pro-PREP)를 60 uL를 넣은 후 0°C에서 60분간 방치한 후 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 함량은 Bradford 반응으로 측정하였다. 1 ml의 Bradford reagent에 1 ul의 상층액을 넣어서 혼합한 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질을 정량한 후 5분간 100 °C에서 끓여 준 후, 10% gel을 이용해 SDS-PAGE를 진행하였다. PVDF membrane에 transfer 시킨 후, 5% skim milk를 이용하여 상온에서 60분간 반응시킨 후 각각의 1차 antibody를 24시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 membrane에 2차 antibody를 넣어 60분간 반응시킨 후 ECL을 membrane에 3분간 반응시키고 Davinch™를 이용하여 측정하였다.

3.1.3. 안토시아닌 올리고머의 항염증 활성 측정

3.1.3.1. *In vitro*에서의 항염증 활성 측정

가. NO level 측정

12-well plate에 well당 2×10^4 cells/ml로 세포를 주입하여 4시간 동안 배양시키고, 시료를 농도별로 처리하여 2시간 배양시킨다. 2시간 후 배지를 제거한 후 well당 990 μ l의 새 배지를 넣은

후 LPS (0.1 µg/ml)를 첨가하여 스트레스를 유발하여 24시간 배양한 후 상층액을 취해 측정하였다. 상층액의 NO 함량은 Griess 반응으로 측정하였다. 100 µl의 상층액에 같은 양의 Griess reagent [0.1% N-(1-naphthyl)- ethylenediamine, 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid]를 넣어서 혼합한 후, 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 전자스핀공명기기(ESR)에 의한 Nitric Oxide (NO) radical 소거활성 측정

안토시아닌 올리고머의 NO 라디칼 소거 활성은 12-well plate에 well당 2×10^4 cells/ml로 세포를 주입하여 4시간 동안 배양시키고, 시료를 농도별로 처리하여 2시간 배양시킨다. 2시간 후 배지를 제거한 후 well당 990 µl의 새 배지를 넣은 후 LPS (0.1 µg/ml)를 첨가하여 스트레스를 유발하여 24시간 배양한 후 세포를 수확하여 13,000 rpm, 3 분으로 원심분리 하여 세포를 모아 준다. 그 후 Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS) 1 ml을 사용하여 세척을 2번 한 후 2.8 mM의 FeSO₄ 105 µl와 19.6 mM의 ammonium N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate (MGD) 105 µl를 혼합하였다. 여기에 1.9 mM의 CaI를 2.3 µl를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시킨다. 반응시킨 혼합용액은 quartz capillary tube에 옮긴 다음 ESR로 측정하였다.

3.1.3.2. 동물 실험을 통한 안토시아닌 올리고머의 항염증 활성 평가

가. DSS를 이용한 염증성 장질환 유도

실험에 사용된 실험동물은 5주령 수컷 ICR 마우스를 사용하여, 건국대학교 동물사육실에서 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $56 \pm 5\%$, 12시간 명암주기를 유지하면서 실험을 수행하였다. 실험기간동안 사료는 자유롭게 먹을 수 있게 하였다. 실험시작 전 일주일 동안 순화기간을 거친 후, 생쥐를 정상군 (n=10), 안토시아닌 모노머군 (n=10), 안토시아닌 올리고머군 (n=10), Dextran sulfate sodium (DSS)으로 유발시킨 대조군(n=10), DSS+ 안토시아닌 모노머군 (n=10), DSS+ 안토시아닌 올리고머군 (n=10), 총 6 그룹으로 나누어 실험을 진행, DSS 처리군 세 그룹에게 5% dextran sulfate sodium (DSS) 용액을 물병에 담아 7일간 제공하여 급성 염증성 장질환을 유발시킨 후, 8일째에 실험동물을 마취한 후 심장에서 혈액을 채취하고 대장 조직을 적출하여 맹장부터 직장까지의 길이를 측정하고 조직검사를 위해 10% 포르말린 용액에 고정하였다. 또한, 간, 신장 비장, 폐를 분리하여 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 뒤 무게를 잰 후 -70°C 에 냉동 보관한다. 채취한 혈액을 실온에서 30분 정도 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻은 후, -70°C 에서 냉동 보관하였다.

나. 장관 면역계의 세포 배양

Mouse의 장관계에 속하는 peyer`s patch, epithelial cell, lamina proprior, mesenteric lymph node와 spleen을 적출 하여 분리정제한 후, 2×10^6 cells/ml의 농도로 조제하여 96-well에 첨가하여 IgE는 6시간 후, 다른 항체는 24시간 또는 72시간 배양하여 배양 상층을 회수하여 상층 중의 cytokine양과 항체를 측정하며, 세포는 flow cytometer을 이용한 세포 표면 항원을 측정하였다.

다. Flow cytometry 분석

장관면역계 임파구를 PBS로 세척하고 monoclonal antibody 첨가된 PBS 100 µL가 첨가되어 있는 micro tube를 ice에서 30 분간 staining한 후, HBSS로 3회 세척한 후 mesh를 통과시켜 flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson)를 이용하여 fluorescence intensity를 측정하였다.

라. CD4⁺와 CD8⁺의 측정

10% FBS를 함유한 PBS 100 ml당 1×10^6 cell이 부유된 비장, 림프절, 흉선 임파구에 CD4⁺-Fluorescein isothiocyanate나 CD8⁺-Phycoerthrin monoclonal antibodies 5 μ L를 첨가하고, 4°C에서 30 분간 배양한 후, 임파구는 10% FBS가 함유된 PBS로 3번 세정하고, 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하고, 염색된 임파구는 2% paraformaldehyde로 고정시켜, flow cytometry로 측정하였다.

마. 임파구의 분리 및 정제

마우스의 mesenteric lymph node (MLN)를 적출하고 임파구는 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지(Invitrogen Corporation, Grand island, N.Y.) 내에서 분리하며 세포는 RPMI 1640 배지로 3번 세척한다. 임파구는 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen Corporation, Grand island, N.Y.)이 함유된 RPMI 1640 배지로 배양하고, 배양한 상층액에서의 IgE와 IgA 함량은 ELISA로 측정하였다.

바. H&E 염색

DSS를 이용하여 급성대장염을 유발시킨 생쥐 대장의 염증 정도를 판단하기 위하여 조직학적 검사를 진행하였다. 즉, 생쥐를 희생시킨 후 대장을 적출하여 10% 포르말린 용액에 24시간 고정시키고 에탄올 탈수, 자일렌 치환 및 파라핀 포매를 거쳐 파라핀 블록을 제작하고, 제작된 파라핀 블록은 4 μ m 두께로 절편을 만들고 Hematoxylin과 eosin 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

3.1.3.3. 안토시아닌올리고머의 항염증 작용기작 규명

가. ELISA

12-well plate에 well당 2×10^4 cells/ml로 세포를 주입하여 4시간 동안 배양시키고, 시료를 농도별로 처리하여 2시간 배양시킨다. 2시간 후 배지를 제거한 후 well당 990 μ l의 새 배지를 넣은 후 LPS (0.1 μ g/ml)를 첨가하여 스트레스를 유발하여 24시간 배양한 후 상층액을 취해 측정하였다. 상층액의 IL-6 함량은 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

나. Western blotting

6-well plate에 대식세포를 접종하고 24시간 뒤에 염증유도물질 (LPS) 또는 LPS+ 안토시아닌 올리고머를 처리한 후 37°C에서 CO₂ 인큐베이터에 24시간 동안 배양한 후, 수확하여 4°C, 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 버리고, 단백질 lysis 버퍼 (Pro-PREP)를 60 μ L를 넣은 후 0°C에서 60분간 방치한 후 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 함량은 Bradford 반응으로 측정하였다. 1 ml의 Bradford reagent에 1 μ l의 상층액을 넣어서 혼합한 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질을 정량한 후 5분간 100 °C에서 끓여 준 후, 10% gel을 이용해 SDS-PAGE를 진행하였다. PVDF membrane에 transfer 시킨 후, 5% skim milk를 이용하여 상온에서 60분간 반응시킨 후 각각의 1차 antibody를 24시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 membrane에 2차 antibody를 넣어 60분간 반응시킨후 ECL을 membrane에 3분간 반응시키고 Davinch™를 이용하여 측정하였다.

3.1.4. 안토시아닌 올리고머의 안전성 평가

3.1.4.1. 마우스를 이용한 소핵시험.

비임상시험관리기준 (식품의약품안전처 고시 제 2014-67호)를 준수하여 (주)바이오톡스텍에 의뢰하여 마우스를 이용한 소핵시험을 수행하였다.

3.1.4.2. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

비임상시험관리기준 (식품의약품안전처 고시 제 2014-67호)를 준수하여 (주)바이오톡스텍에 의뢰하여 세균을 이용한 복귀돌연변이시험을 수행하였다.

3.1.4.3. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

비임상시험관리기준 (식품의약품안전처 고시 제 2014-67호)를 준수하여 (주)바이오톡스텍에 의뢰하여 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험을 수행하였다.

3.1.4.4. 마우스를 이용한 안토시아닌 올리고머의 유전독성 실험

의약품등의 독성시험기준 (식품의약품안전처 고시 제 2015-82호)를 참고하여 경남대학교 식품영양학과에 의뢰하여 마우스를 이용한 유전독성 실험을 수행하였다.

3.1.4.5. Sprague-Dawley (SD) 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

비임상시험관리기준 (식품의약품안전처 고시 제 2014-67호)를 준수하여 (주)바이오톡스텍에 의뢰하여 SD 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험을 수행하였다.

3.1.4.6. 비글견을 이용한 단회 경구투여 용량증가 독성시험

비임상시험관리기준 (식품의약품안전처 고시 제 2014-67호)를 준수하여 (주)바이오톡스텍에 의뢰하여 비글견을 이용한 단회 경구투여 용량증가 독성시험을 수행하였다.

3.1.4.7. SD 랫드를 이용한 4주 반복 경구투여 용량결정시험

의약품등의 독성시험기준 (식품의약품안전처 고시 제 2015-82호)를 참고하여 (주)바이오톡스텍에 의뢰하여 SD 랫드를 이용한 4주 반복 경구투여 용량결정시험을 수행하였다.

3.1.4.8. 13주 반복투여독성시험

비임상시험관리기준 (식품의약품안전처 고시 제 2014-67호)를 준수하여 (주)바이오톡스텍에 의뢰하여 SD 랫드를 이용한 12주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험을 수행하였다.

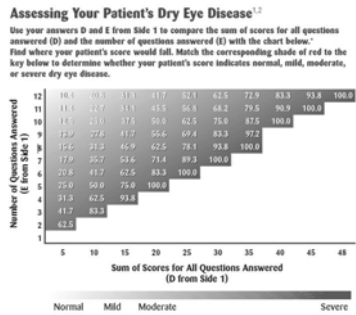
3.1.5. 안토시아닌 올리고머의 안구 건조증 개선 효능 측정

3.1.5.1. 임상시험계획서 요약

연구제목	포도껍질추출물(안토시아닌 올리고머)의 안구건조증 개선에 대한 위약대조, 맹검 연구			
	Protocol No.	kitto oligo_Kittolife	Version No.	1.0
실시기관	서울삼육병원 안과			

책임연구자	김수아			
연구참여 기관(전체)	서울삼육병원 안과			
연구목적	본 연구의 목적은 안구건조증 환자에서 포도껍질 추출물(안토시아닌 올리고머)의 경구 투여의 효과를 평가하는 것이다.			
연구약	<ul style="list-style-type: none"> - 시험물질 : 안토시아닌 올리고머 - 제형 : 중갈색불투명 경질캡셀 - 함량 : 1캡셀당 200 mg 함유 - 섭취량 : 1일 2회, 1회 2캡셀, 총 4캡셀 섭취(총 800 mg/일) 			
	구분	성분	배합비 (%)	함량 (mg)
	원료	안토시아닌 올리고머	100	200
대조약	<ul style="list-style-type: none"> - 대조물질 : 말토덱스트린 - 제형 : 시험물질과 같은 외형의 캡셀 - 함량 : 시험물질과 동일한 중량/부피 - 섭취량 : 1일 2회, 1회 2캡셀, 총 4캡셀 섭취 			
	구분	성분	배합비 (%)	함량 (mg)
	원료	말토덱스트린	100	200
	<ul style="list-style-type: none"> - 원료제공 및 제조 : (주)키토라이프 및 (주)유유헬스케어 - 캡셀기재(시험식품과 대조식품 동일) 			
	성분		배합비 (%)	
	젤라틴(돈피)		95.5103	
	합성착색료(이산화티타늄)		0.6686	
	빙초산		0.1719	
	자당지방산에스테르		0.0478	
합성착색료	식용색소적색제3호		0.0282	
	식용색소적색제40호		0.0282	
	식용색소황색제4호		0.0267	
	식용색소청색제1호		0.0244	
	정제수		3.4939	
대상질환	경증의 안구건조증 (Mild Dry Eye Syndrome) 상기 질환으로 본원 안과를 방문한 환자 중 연구에 참여하고자 하는 환자를 대상으로 한다.			
연구기간	IRB 승인일 ~ 2019년 09월 30일			
연구방법 개요	<p>모든 환자는 연구에 참여하게 되면 다음과 같은 안과 검사를 베이스라인과 4주후, 12주후에 시행 받게 된다.</p> <p>(1) 시력(나안 및 교정시력), 세극등 검사, 안압 측정 등 대상자 선정 적합 여부를 위한 기초적 검사.</p> <p>(2) 각종 안질환 및 전신 질환에 대한 문진.</p> <p>(3) 쉬르머 I 검사(Schirmer Test), 눈물막 파괴 검사(Tear Break up time).</p> <p>(4) 안구 표면 미란 염색 점수 (NEI scale)</p>			

(5) 안구표면질환지수(OSDI: Ocular Surface Disease Index)의 설문지 작성
안구표면질환지수의 평가는 통상적으로 사용하고 있는 환산표를 이용하여 점
수로 평가한다. (최저점수 62.5점에서 최고 점수 100점, 아래 그림 참고)



대상자 수 목표한 피험자의 수는 108(실험 식품 섭취군 54례, 대조군 54례)이다.

대상자 선정기준

본 연구는 안구건조증 진단을 받은 환자 중 본 연구에 자발적으로 참여를 원하는 환자를 대상으로 한다. 다만 현재 점안 약제나 경구 약제를 사용하지 않고 있는 환자를 대상으로 제한 한다. 또한 최근 6개월내에 안과 관련 수술이나 시술을 받은 과거력이 없는 환자를 대상으로 제한 한다.

일반적인 안구건조증 진단 기준을 바탕으로 안구 표면의 기질적 병변 소견을 보이지 않는 경증 건성안을 가지는 성인 대상자로 한정하며 기준은 다음과 같다.

1. 18세 이상의 건강한 성인.
2. 이물감, 통증, 가려움, 시력 저하 및 눈부심 등의 증상을 호소하는 경우.
3. 결막 충혈, 각막 미란(NEI scale 사용), 마이봄샘 이상 등 안구 표면의 기질적 이상 소견을 보이지 않는 경우.
4. 슈르머 I 검사(Schimer test)상 10 mm이상인 경우.
5. 눈물막 파괴시간(Tear break up time)이 10초 이상인 경우.
6. 콘택트렌즈 착용자의 경우 최근 1개월 간 착용을 중지하여야 선정이 가능하다.

상기와 같은 안구 표면 증상은 호소하나 기질적 이상이 없고, 슈르머 및 눈물막 파괴 시간 검사상 정상 소견으로 확인되는 대상자 중, 남녀 구분 없이 18세 이상의 성인이 등록될 것이다. 본 연구는 단일기관 연구이고 총 피험자 수는 108명이다.

대상자 제외기준

- ① 환자가 정신지체나 기타 이유로 인하여 검사가 불가능 할 경우
- ② 다른 안과적인 질환이 있어서 연구에 참여할 수 없다고 의료진이 판단하는 환자
- ③ 치료의 일환으로 연구 기관을 방문하는 경과 관찰을 원하지 않거나 할 수 없는 경우
- ④ 연구에 참여하기를 원하지 않는 환자
- ⑤ 면역 억제, 결합조직 질환 등 수술의 위험도나 결과에 혼동을 줄 수 있는 질환을 가진 경우
- ⑥ 가임기의 여성
- ⑦ 안외상, 감염, 건조증 이외의 안구 표면 염증 질환, 최근 6개월 이내에 안

과 수술 과거력이 있는 대상자는 제외

⑧ 점안용 싸이클로스포린, 스테로이드 제제 및 기타 건조증 치료 약제를 최근 1개월 이내에 사용한 과거력이 있는 경우

⑨ 건성안을 악화시킬 수 있는 약제(항히스타민제, 베타차단제 등의 항고혈압제제, 이노제, 항우울제(특히 삼환계 항우울제), 파킨슨 치료 약물 등)를 복용하시는 분은 본 연구에 참여할 수 없다.

⑩ 쇼스렌 증후군, 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 홍반성 루푸스 등 안구 표면의 염증을 증가시켜 안구 건조증을 악화시킬 수 있는 질환을 가진 대상자는 제외

1. 일차유효성 평가 기준(primary endpoint for efficacy)은 12주째 방문 시 베이스라인에서부터 쉬르머 I 검사 수치, TBUT의 변화, NEI scale의 변화에 대한 통계적 유의성을 검정하는 것이다. 이차유효성 평가 기준(secondary endpoint for efficacy)은 건성안의 주관적인 증상, 즉, 이물감, 가려움, 통증, 시야 흐림 등의 증상의 개선 여부를 평가하는 것으로써 OSDI 설문 조사 점수의 변화 여부를 통계적 유의성 검정을 시행한다. 안토시아닌 제제의 위약에 대한 비열등성(non-inferiority)은 각 분석 항목에 대하여 두 군 간 차이에 근거하여 평가하며, 그 경계값은 0.34 (열등성(inferiority)은 95% 신뢰구간에서 upper limit이 비열등성 경계보다 낮을 경우 확정)로 하였다. 비열등성이 확인되면, 12주 방문 시점에서 각 분석 항목에 대한 군간 비교를 위하여 t-test를 사용하여 검정하여 안토시아닌 제제의 우월성(superiority)을 평가한다. Fisher's direct test를 사용하여 부작용 발생률의 군 간 비교를 평가한다. 안전성과 효능에 관한 시험의 유의수준은 양측 모두 5%로 한다. 통계 분석을 위하여 SAS ver 9.1프로그램(SAS institute, Cary, North Carolina, USA)을 사용한다.

통계학적
분석 및
평가 방법

2. 피험자 수

	대조 식품군	시험 식품 섭취군	총 피험자수
최종 평가 예수 (PP)	45	45	90
Drop - out (20%) 고려예수	54	54	108

피험자 선정, 제외 기준에 적합한 108명 이상을 확보하여 복용하도록 하고, Protocol에 명시된 PP기준에 적합한 평가 예수로 108명 이상(그룹당 45명 이상)을 확보하여 평가하고자 한다.

3. 피험자 수 설정 근거

(1) 귀무가설 [$H_0: X_1 = X_2$]

: 12주 후, 시험식품 섭취군에서의 주관적인 설문지 점수(OSDI)를 비교했을 때, 5% 유의수준에서 차이가 없다.

(2) 대립가설 [$H_1 : X_1 \neq X_2$]

: 12주 후, 시험식품 섭취군에서의 주관적인 설문지 점수(OSDI)를 비교했을 때, 5% 유의수준에서 차이가 있다.

* $\alpha=5\%$, $\beta=20\%$ (Power= $1-\beta=80\%$)

	<p>* 표본수 산출 공식</p> $N_p = \frac{(Z_\alpha + Z_\beta)^2 \times \delta d^2 \times 2}{(\mu_{dc} - \mu_{dp})^2}$ <p>* $N_c = N_p$</p> <p>$\alpha = 0.05$</p> <p>* $\beta = 0.20$ (power=0.80)</p> <p>* N_p : placebo 군에서의 피험자수</p> <p>* N_c : test product 군에서의 피험자수</p> <p>* Z_α : $P(Z-z)=\alpha$ 를 만족하는 표준규정치 $z: Z_{1/2\alpha}=1.96$</p> <p>* Z_β : $P(Z-z)=\beta$ 를 만족하는 표준규정치 $z: Z_\beta=0.84$</p> <p>* δd : 1.58% - 주관적인 설문지 점수(OSDI)에 대한 모표준편차</p> <p>* μ_{dc} : 43.41% -test product 군에서의 주관적인 설문지 점수(OSDI) 변화율의 모평균</p> <p>* μ_{dp} : 42.48% -placebo 군에서의 주관적인 설문지 점수(OSDI) 변화율의 모평균</p> <p>* $\mu_{dc} - \mu_{dp} = 0.93\%$</p> <p>일차 유효성 평가를 위해서 적어도 90명의 환자(중도탈락율 약20%고려)들을 평가대상으로 확인하기 위하여 총 108명의 환자들이 본 시험에 등록될 것이다. 이러한 표본 크기는 베이스라인과 12주 방문 사이에서 안구건조증의 정도의 주관적 측정치인 안구표면질환지수(OSDI: Ocular Surface Disease Index)의 점수 변화가 일차 유효성 평가변수로서 계산될 것이다. OSDI 설문은 건성안과 관련하여 대상자가 일상생활에서 느끼는 불편감을 질문한 뒤 항목별로 점수화하여 산출한다. 1.58% - 주관적인 설문지 점수(OSDI)에 대한 모표준편차는 1.58%로 가정하였고 식품섭취군에서의 OSDI 변화율의 모평균은 43.41%로, 대조군에서의 OSDI 변화율의 모평균은 42.48%로 가정하였다. 통계 분석은 독립적인 생물통계학자가 적절한 통계 프로그램을 이용하여 실시할 것이다.</p>
<p>대상자에 대한 안전성의 배려</p>	<p>책임 연구자는 모든 예상치 못했지만 부작용으로 의심되는 사항들을 윤리위원회(ethic committee)와 임상연구심의위원회에 보고하며 연구자에게 사전에 충분한 설명을 한다. 본 연구는 참여자에게 본 연구에서 복용하게 될 건강기능보조식품은 안토시아닌 올리고머가 주성분인 캡슐형태의 재제이며 위약과 겔모습이 구별되지 않는다고 설명할 것이다. 또한 본 연구에서 사용되는 안토시아닌 올리고머는 향후 식약처의 건강기능보조식품으로 개별인정을 받을 목적으로 시행되고 있음을 충분히 설명할 것이다. 만약의 부작용에 대비하여 첫 환자의 스크리닝 전에 본 임상연구에서 나타날 수 있는 환자에 대한 부작용 및 피해보상에 대한 보험을 가입하고 보험증서를 IRB 위원회에 제출할 예정이다. IRB의 본 연구 승인 후 피해보상에 대한 보험 가입을 위원회에 서면으로 반드시 제출한 후에 본 연구를 시작한다. 더불어 본 건강 식품을 복용하면서 발생할 수 있는 심각한 부작용(severe adverse effect, SAE)이 발생할 경우 IRB에 바로 보고가 되며, 필요 시 본원 응급실에서 진료를 받을 수 있도록 연계시</p>

	<p>킬 계획이다. 이와 함께, 가벼운 이상 증상 발현 시 안과 외래에서 응급처치를 시행할 수 있도록 응급 kit를 구비하여 준비한다.</p>
<p>모니터링 계획</p>	<p>(1)관찰항목</p> <ol style="list-style-type: none"> a. 쉬르머 I 검사(Schirmer test)를 시행. b. 눈물막 파괴시간(TBUT)을 측정. c. 각결막 염색 후 염색 점수(NEI scale)를 평가. <p>(2)임상검사항목 : 안과 기본검사-시력(나안 및 교정시력), 안압, 세극등 검사</p> <p>(3)설문검사항목 : 안구표면질환지수(OSDI: Ocular Surface Disease Index) 설문지</p> <p>(4)방문 및 검사</p> <p>A. 스크리닝 방문 (방문 1)</p> <p>스크리닝 방문에서, 다음의 절차를 실시해야 한다:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 연구의 목적, 특성 및 수행에 대하여 설명한다. 2. 어떠한 스크리닝 절차라도 실시하기 전에, 환자 또는 환자의 법적 대리인은 피험자 동의서를 읽고, 서명하고 날짜를 적어야 한다. 피험자 동의 논의를 진행한 사람도 피험자 동의서에 서명을 하고 날짜를 적어야 한다. 만약 환자가 읽을 수 없거나 또는 법적 대리인이 읽을 수 없다면, 공정한 입회자가 동의에 대하여 논의하는 전체 과정 동안 참석해야 한다. 공정한 입회자는 피험자 동의에 대한 논의를 진행하는 사람과 같은 사람이 되어서는 안 된다. 서면 피험자 동의의 모든 요소에 대하여 환자 그리고/또는 환자의 법적 대리인에게 설명해야 한다. 환자 그리고/또는 환자의 법적 대리인은 환자의 연구 참여에 구두로 동의해야 한다. 만약 가능하다면, 환자 그리고/또는 환자의 법적 대리인이 피험자 동의서에 서명을 하고 날짜를 적어야 한다. 공정한 입회자 및 피험자 동의에 대한 논의를 진행하는 사람도 피험자 동의서에 서명을 하고 날짜를 적어야 한다. 각 환자 또는 환자의 법적 대리인이 서명을 한 피험자 동의서는 해당 연구에 대하여 IRB의 승인을 받은 것이어야 한다. 3. 인구학적 정보 및 병력을 수집한다. 병력의 경우, 만약 환자가 알고 있다면, 각 의학적 상태 그리고/또는 약물의 시작일과 중단일을 포함시켜야 한다. 4. 임상연구계획서 선정/제외 기준에 대하여 환자를 스크리닝한다. 콘택트렌즈를 사용하는 환자의 경우, 다음의 정보를 수집한다. 콘택트 렌즈의 종류: 소프트 렌즈, RGP, 또는 하드 렌즈, 착용 빈도: 매일 착용 또는 장기간 착용 5. 환자의 양쪽 눈 모두에서 최대 교정 시력을 평가한다. 6. 세극등 검사를 (Slit lamp examination; 생체현미경검사) 실시한다. 환자의 양쪽 눈 모두에서 각막, 수정체, 눈꺼풀/결막, 및 홍채/전방을 평가한다. 7. 환자의 양쪽 눈 모두에서 안압 측정(non-contact tonometry)을 실시한다. 9. 쉬르머 I 검사(Schirmer test), 눈물막 파괴시간(TBUT), 각막 염색 후 염색 점수를 평가(NEI scale) 및 측정한다. 10. 적합한 환자의 제 1 회 방문 일정을 정한다.

B. 제 1 회 방문 (방문 2, 베이스라인)

제 1 회 방문에서, 다음의 절차를 실시할 것이다:

1. 의학적 건강 상태 그리고/또는 병용 약물의 모든 변화를 기록한다.
2. 환자의 양쪽 눈 모두에서 최대 교정 시력을 평가한다.
3. 세극등 검사를 (Slit lamp examination; 생체현미경검사) 실시한다.
4. 안압 및 쉬르머 I 검사(Schirmer test), 눈물막 파괴시간(TBUT), 각막 염색 후 염색 점수(NEI scale)를 평가 및 측정한다.
5. 안구표면질환지수(OSDI: Ocular Surface Disease Index) 설문지를 작성한다.
6. 환자에게 건강보조식품의 투여 및 보관 요건에 대하여 설명한다.
7. 해당하는 경우, 모든 이상반응을 기록한다.
8. 제 2 회 방문을 계획한다.

C. 연구 제 2 회 (방문 3, 4주) ± 7 일

1. 환자가 경험하였을 수 있는 연구 건강보조식품과 관련된 모든 이상반응을 기록한다.
2. 연구 건강보조식품을 마지막으로 섭취한 날짜와 시간을 기록한다.
3. 의학적 건강 상태 그리고/또는 병용 약물의 모든 변화를 기록한다.
4. 환자의 양쪽 눈 모두에서 최대 교정 시력을 평가한다
5. 세극등 검사를 (Slit lamp examination; 생체현미경검사) 실시한다. 안압 및 쉬르머 I 검사(Schirmer test), 눈물막 파괴시간(TBUT), 각막 염색 후 염색 점수(NEI scale)를 평가 및 측정한다.
5. 안구표면질환지수(OSDI: Ocular Surface Disease Index) 설문지를 작성한다.
6. 제 3 회 방문을 계획한다.

D. 연구 제 3 회 (방문 4, 12주) ± 7 일

1. 환자가 경험하였을 수 있는 연구 건강보조식품과 관련된 모든 이상반응을 기록한다.
2. 연구 건강보조식품을 마지막으로 섭취한 날짜와 시간을 기록한다.
3. 의학적 건강 상태 그리고/또는 병용 약물의 모든 변화를 기록한다.
4. 환자의 양쪽 눈 모두에서 최대 교정 시력을 평가한다
5. 세극등 검사를 (Slit lamp examination; 생체현미경검사) 실시한다. 안압 및 쉬르머 I 검사(Schirmer test), 눈물막 파괴시간(TBUT), 각막 염색 후 염색 점수(NEI scale)를 평가 및 측정한다.
5. 안구표면질환지수(OSDI: Ocular Surface Disease Index) 설문지를 작성한다.
6. 환자에게서 남아 있는 모든 연구 건강보조식품을 수거한다.
7. 환자를 연구로부터 종료시킨다.

#계획되지 않은 방문

	<p>연구자의 재량에 따라 계획되지 않은 방문을 실시할 수 있으며, 증례기록서(Case Report Form, CRF) 소책자의 계획되지 않은 방문 페이지에 정보를 기록한다. 만약 환자가 계획되지 않은 방문에서 연구를 중단한다면 (즉, 연구에서 조기 중단), 다음의 절차를 실시해야 한다:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 자료 수집 양식(Data Collection Form)에 (또는 증례기록서의 조기 중단 페이지) 중단한 이유를 기록한다. 2. 환자가 경험하였을 수 있는 연구 건강보조식품과 관련된 모든 이상반응을 기록한다. 3. 의학적 건강 상태 그리고/또는 병용 약물의 모든 변화를 기록한다. 4. 환자의 양쪽 눈 모두에서 최대 교정 시력을 평가한다 5. 세극등 검사를 (생체현미경검사) 실시한다. 안압 및 쉬르머 I 검사(Schirmer test), 눈물막 파괴시간(TBUT), 각막 염색 후 염색 점수(NEI scale)를 평가 및 측정한다. 6. 환자에게서 남아 있는 모든 연구 건강보조식품을 수거한다. 7. 환자를 연구로부터 종료시킨다. <p>만약 환자가 계획되지 않은 방문 후에 연구를 지속한다면, 다음 연구 방문 일정을 정하고 환자에게 투여 절차를 상기시킨다.</p>
--	--

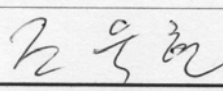
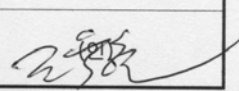
3.1.5.2. 임상시험심의 결과 통보서

부록 3
SF 15-003

임상시험심의결과 통보서

IRB No	SYMC IRB 1710-01					
수신	책임연구자	김수아	소속	삼육서울병원 진료부	직위	안과 과장
	의뢰기관	키토라이프㈜				
연구과제명	(국문) 포도껍질추출물(안토시아닌 올리고머)의 안구건조증 개선에 대한 위약대조, 맹검 연구					
	(영문) The effect of the extract from grape skin(anthocyanoside oligomer) administration in dry eye patients (Double blind placebo control study)					
	Protocol No.	kitto oligo_Kittolife	Version No.	1.1		
연구대상	<input type="checkbox"/> 증례보고 <input type="checkbox"/> 생태학적 연구 <input type="checkbox"/> 단면조사 연구 <input type="checkbox"/> 조사, 설문, 인터뷰 연구 <input type="checkbox"/> 환자군 연구(case series) <input type="checkbox"/> 임상시험 <input type="checkbox"/> 환자-대조군 연구 <input type="checkbox"/> 등록(레지스트리) 연구 <input type="checkbox"/> 시판후조사(PMS) <input type="checkbox"/> 행동관찰 <input type="checkbox"/> 전향적 코호트 연구 <input type="checkbox"/> 후향적 코호트 연구 <input type="checkbox"/> 기타()					
	<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 시약 <input type="checkbox"/> 진단 및 치료법 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(건강기능식품)					
	일반명			상품명		
연구목적	<input type="checkbox"/> 의뢰자주도임상 <input checked="" type="checkbox"/> 연구자주도임상 <input type="checkbox"/> 학술용 <input type="checkbox"/> 기타					
■변경계획서	변경 날짜	2017.10.16	Version No.	1.1		
<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서(수정된) <input checked="" type="checkbox"/> 설명문 및 동의서 <input type="checkbox"/> 대상자 보상에 관한 문서 <input type="checkbox"/> 연구자 준수 서약서			<input type="checkbox"/> 증례 기록지 <input type="checkbox"/> 임상시험 자료집 <input type="checkbox"/> 경제적 이해상충 점검표 <input type="checkbox"/> 연구계획서 심의 통과 확인서(학위논문)			

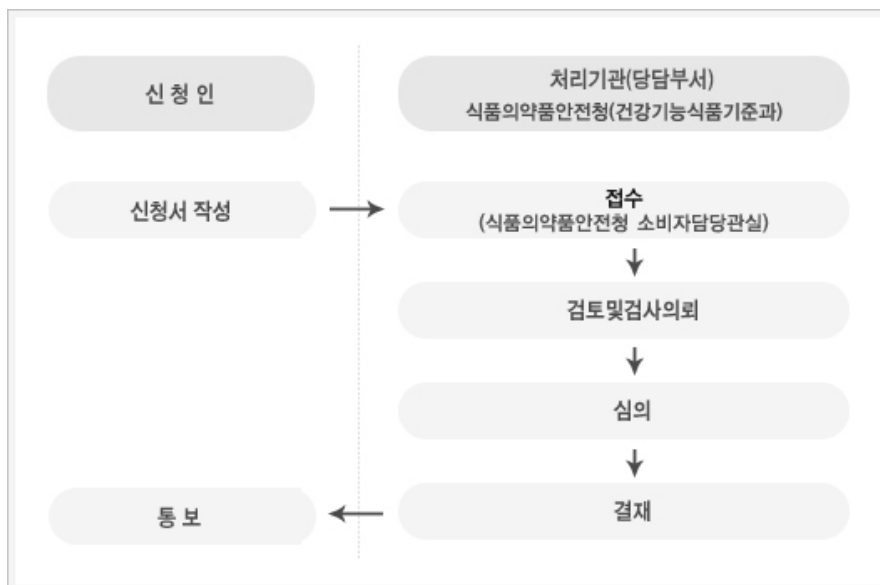
심의 서류	<input type="checkbox"/> 대상자 모집안 <input type="checkbox"/> 연구 진행 중간 보고서 <input type="checkbox"/> 연구 결과 보고서 <input type="checkbox"/> 연구 위반/변동 사례보고서 <input type="checkbox"/> 심의연제 신청서			<input type="checkbox"/> 중대한 이상 반응 발생보고서 <input type="checkbox"/> 임상시험 조기종료보고서 <input type="checkbox"/> 연구 중지 보고서 <input type="checkbox"/> 동의서 연제 신청서 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(근거자료 참고문헌 1~5, 연구비계획서, 식품품목제조보고서,)		
신청일	2017.10.16	심의일자	2017.10.31			
심의종류	신속심의(재심의)					
연구계획서 승인일	2017.11.12	정기보고주기	12 개월			
심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 권고승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 승인된 임상시험의 중지					
승인유효일자	2018년 11월 11일					

심의의견 (변경사항)	<p>1. 건강기능식품 기능성 원료 인정을 받기 위한 인체적용 시험(환자-대조군) 연구로써, 시험 식품이 처음으로 사람을 대상으로 하는 연구이나, 이미 성분이 건강기능식품으로 다양하게 시판되고 있는 상태이므로, 피험자의 안전에 심각한 해를 끼칠 가능성은 미미하다고 사료됩니다.</p> <p>2. 단, 제조상의 예상하지 못한 문제나 고용량 섭취등에 대한 이상반응의 가능성을 완전히 배제할 수 없으므로 안전보호에 대한 대책을 충실히 이행하고, 주의깊은 모니터링이 필요하다고 생각됩니다.</p>
심의위원장	 

※ 삼육서울병원 임상시험심의위원회(서울시 동대문구 망우로 82)는 ICH/GCP 및 임상시험관리 기준(KGCP)을 준수합니다.

3.1.6. 안토시아닌 올리고머의 개별인증

3.1.6.1. 건강기능식품 기능성 원료 인정신청 처리절차



3.1.6.2. 구비서류

가. 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서(전자문서로 된 신청서 포함)

- 제출자료 2부 (원본 1부 포함)
- 제출자료수록 CD 1개
- 제품 또는 시제품 및 기능성분(또는 지표성분) 표준품
- 국내 건강기능식품검사기관이 발행한 시험성적서

나. 제출자료

- 제출자료 전체의 총괄 요약본
- 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
- 제조방법 및 그에 관한 자료
- 원료의 특성에 관한 자료
- 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 안전성에 관한 자료
- 기능성 내용 및 그에 관한 자료
- 섭취량, 섭취 시 주의 사항 및 그 설정에 관한 자료
- 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

다. 주의사항

- 제출자료를 생략하는 경우에는 그 사유를 구체적으로 기재하여야 함
- 모든 제출자료는 원문과 요약본을 함께 제출하여야 하며, 영어 이외의 외국어 자료는 한글 번역문을 제출하여야 함

3.1.6.3. 개별인증 신청기관, 수수료 및 처리기간

가. 신청기관

- 전자접수 또는 식품의약품안전처 고객지원담당관실
- 처리부서 : 건강기능식품기준과

나. 수수료

- 전자결제 또는 수입인지 : 신규 1,900,000원, (추가변경) 800,000원

다. 처리기간

- 신규원료 : 120일
- 기능성추가 : 60일

3.2. 연구 수행 결과

3.2.1. 안토시아닌 올리고머 중합 효소 개발

3.2.1.1. 중합 효소의 염기 서열

Aspergillus niger 균으로부터 얻은 조효소를 분석하여 확보한 후보군 중 현재 구입 가능한 효소를 사용하여 안토시아닌 올리고머를 중합한 결과, 하나의 효소를 확정할 수 있었다 (현재, 특허 준비 중에 있으므로 특정 효소의 명칭은 생략하였음). 선택된 효소의 분석한 결과 아미노산 서열은 985개의 아미노산으로 이루어져 있는 Sequence. 1.이였으며, 이 아미노산 서열의 염기 서열은 3748개의 염기로 이루어진 Sequence. 2.임을 확인할 수 있었다. 이 염기 서열을 바탕으로 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), PCR와 제조합 DNA의 형질전환 기법을 사용하여 안토시아닌 올리고머 중합 효소를 발현시켜 그 활성을 측정하였으나 우수한 활성을 나타내지 않았다.

Sequence. 1.

```
1  MVKLTHLLAR AWLVPLAYGA SQSLLSTTAP SQPQFTIPAS ADVGAQLIAN IDDPQAADAQ
61  SVCPGYKASK VQHNSRGFTA SLQLAGRPCN VYGTDVESLT LSVEYQSDSDR LNIQILPHTV
121 DSTNASWYFL SENLVPRPKA SLNASVSQSD LFSWSNEPS FNFKVIRKAT GDALFSTEGT
181 VLVYENQFIE FVTALPEEYN LYGLGEHITQ FRLQRNANLT IYPSDDGTPI DQNLYGQHPF
241 YLDTRYKGD RQNGSYIPVK SSEADASQDY ISLSHGVFLR NSHGLEILLR SQKLIWRTLK
301 GGIDLTFYSG PAPADVTRQY LTSTVGLPAM QQYNTLGFHQ CRWGYNNWSD LADVVANFEK
361 FEIPLEYIWT DIDYMHGYRN FDNDQHRFSY SEGDEFSLKL HESGRYYVPI VDAALYIPNP
421 ENASDAYATY DRGAADDVFL KNPDGSLYIG AVWPGYTVFP DWHHPKAVDF WANELVIWSK
481 KVAFDGVWYD MSEVSSFCVG SCGTGNLTLN PAHPSFLLPG EPGDIIYDYP EAFNITNATE
541 AASASAGASS QAAATATTTTS TSVSYLRTTP TPGVRNVEHP PYVINHDQEG HDLSVHAVSP
601 NATHVDGVEE YDVHGLYGHQ GLNATYQGLL EVWSHKRRPF IIGRSTFAGS GKWAGHWGGD
661 NYSKWWSMY YSISQALSFSL FGIPMFGADT CGFNNGSDEE LCNRWMQLSA FFPFYRNHNE
721 LSTIPQEPYR WASVIEATKS AMRIRYAILP YFYTLFDLAH TTGSTVMRAL SWEFPNDPTL
781 AAVETQFMVG PAIMVVPVLE PLVNTVKGVF PGVGHGEVWY DWYTQAAVDA KPGVNTTISA
841 PLGHIPVYVR GGNILPMQEP ALTTREARQT PWALLAALGS NGTASGQLYL DDGESIYPNA
901 TLHVDFTASR SSLRSSAQGR WKERNPLANV TVLGVNKEPS AVTLNGQAVF PGSVTYNSTS
961 QVLFVGGGLQN LTKGGAWAEN WVLEW
```

Sequence. 2.

```
1  GGCATCAATA CGGTACTCGG CAGTATCCAC TCCCGTTTCT CCGGTGCAAC AAATCATCGT
61  TGGAGAATCC CCAGCTCCCC CGCCAACGGG GGTCGATGCT TCTCCAGTTG TCCTGGTTTC
121 TCCCATGAAC TCGCTTACGA TAAGCTGCTG TACCAGCCA CCAGCACAAC AATATCTTCA
181 ATCAGGTAGG TGCTTGTTTCG TTACCTGCC CATCCTCTCC TCTTCTTCGG TCATTATGAA
241 CTCAATTCGG TCGCTAGCTT TGCCGATTCT CCGCAGTCCA TAAAAATATA TCTGCATTTG
301 CCCCTTACAC GTCGGGAATT CACCGGCGCA ATGAGCCTTC GGGTATGGTC GCACAGCGTC
361 ATGTCAATAG GAGGCTGCTC CTAGTGGTGA TCTACTAGTC GCCTCAACAC AGCAATATAT
421 AAATAACAAG AGCATTCCTT GAGCACATCT GGGTAATAGC TGTTCATTC TCATCAAGGA
481 TTACGCGACC GTGCCTCGAG CCTCCTTAAG CGAGCCATGG TGAAGTTGAC GCATCTCCTT
541 GCCAGAGCAT GGCTTGTTCC TCTGGCTTAT GGAGCGAGCC AGTCACTCTT ATCCACCACT
601 GCCCCTTCGC AGCCGCAGTT TACCATTCCT GCTTCCGAG ATGTCGGTGC GCAGCTGATT
661 GCCAACATCG ATGATCCTCA GGCTGCCGAC GCGCAGTCGG TTTGTCCGGG CTACAAGGCT
```

721 TCAAAAGTGC AGCACAATTC ACGTGGATTC ACTGCCAGTC TTCAGCTCGC GGGCAGGCCA
781 TGTAACGTAT ACGGCACAGA TGTTGAGTCC TTGACACTGT CTGTGGAGTA CCAGGATTCG
841 GATCGACTGA ATATTCAGAT TCTCCCCACT CATGTTGACT CCACAAACGC TTCTTGGTAC
901 TTTCTTTCGG AAAACCTGGT CCCCAGACCC AAGGCTTCCC TCAATGCATC TGTATCCCAG
961 AGCGACCTTT TTGTGTCATG GTCAAATGAG CCGTCGTTCA ATTTCAAGGT GATCCGAAAG
1021 GCTACAGGCG ACGCGCTTTT CAGTACAGAA GGCAGTGTGC TCGTATATGA GAATCAGTTC
1081 ATCGAATTTG TGACCGCGCT CCCTGAAGAA TATAACTTGT ATGGCCTTGG GGAGCATATC
1141 ACGCAATTC GCCTCCAGAG AAATGCTAAT CTGACCATAT ATCCTTCGGA TGATGGAACA
1201 CCTATTGACC AGTGAGTACT GATATCCCGC CCGTATCTTC TGGTTCTACT CTTGAAACTT
1261 ACTCGTCCTA GAAACCTCTA CGGCCAACAT CCCTTCTATC TGGATACAAG ATATTACAAA
1321 GGAGATAGGC AGAATGGGTC TTATATTCCC GTCAAAAGCA GCGAGGCTGA TGCCTCGCAA
1381 GATTATATCT CCCTCTCTCA TGGCGTGTTT CTGAGGAACT CTCATGGACT TGAGATACTC
1441 CTCCGGTCTC AAAAATTGAT CTGGCGGACC CTAGGTGGAG GAATCGATCT CACCTTCTAC
1501 TCAGGCCCCG CCCC GGCCGA TGTTACCAGG CAATATCTTA CCAGCACTGT GGGATTACCG
1561 GCCATGCAGC AATACAACAC TCTTGGATTC CACCAATGTC GTTGGGGCTA CAACAACCTGG
1621 TCGGATCTGG CGGACGTTGT TGCGAACTTT GAGAAGTTTG AGATCCCGTT GGAATATATC
1681 TGGTGCATG TGTACTGGTT TATGGTATCT CAAAACAGTC TAACAGGCAC TTAGGACCGA
1741 TATTGACTAC ATGCACGGAT ATCGCAACTT TGACAACGAT CAACATCGCT TTTCTACAG
1801 TGAGGGCGAT GAATTTCTCA GCAAGCTACA TGAGAGTGGA CGCTACTATG TACCCATTGT
1861 TGATGCGGCG CTCTACATTC CTAATCCCGA AAATGCCTCT GATGCGTAAG TGTCTAGTGA
1921 CAAATTATAT TACTGCCTGT ATGCTAATTA GCGATACAGA TACGCTACGT ATGACAGAGG
1981 AGCTGCGGAC GACGTCTTCC TCAAGAATCC CGATGGTAGC CTCTATATTG GAGCCGTTTG
2041 GCCAGGATAT ACAGTCTTCC CCGATTGGCA TCATCCCAAG GCAGTTGACT TCTGGGCTAA
2101 CGAGCTTGTT ATCTGGTCGA AGAAAGTGGC GTTCGATGGT GTGTGGTACG ACATGTCTGA
2161 AGTTTCATCC TTCTGTGTCG GGAGCTGTGG CACAGGTAAC CTGACTCTGA ACCCGGCACA
2221 CCCATCGTTT CTTCTCCCCG GTGAGCCTGG TGATATCATA TATGATTACC CAGAGGCTTT
2281 CAATATCACC AACGCTACAG AGGCGGCGTC AGCTTCGGCG GGAGCTTCCA GTCAGGCTGC
2341 AGCAACCGCG ACCACCACGT CCACTTCGGT ATCATATCTG CGGACAACGC CCACGCCTGG
2401 TGTCCGCAAT GTTGAGCACC CACCCTATGT GATCAACCAT GACCAAGAAG GCCATGATCT
2461 CAGTGTCCAT GCGGTGTCG CGAATGCAAC GCATGTTGAT GGTGTTGAGG AGTATGATGT
2521 GCACGGTCTC TACGGACATC AAGGATTGAA CGCTACCTAC CAAGGTCTGC TTGAGGTCTG
2581 GTCTCATAAG CGGCGGCCAT TTATTATTGG CCGCTCAACC TTCGCTGGCT CTGGCAAATG
2641 GGCAGGCCAC TGGGGCGGCG ACAACTATTC CAAATGGTGG TCCATGTACT ACTCCATCTC
2701 GCAAGCCCTC TCCTTCTCAC TTTTCGGCAT TCCGATGTTT GGTGCGGACA CCTGTGGGTT
2761 TAACGGAAAC TCCGATGAGG AGCTCTGCAA CCGATGGATG CAACTGTCCG CATTCTTCCC
2821 ATTCTACCGA AACCACAATG AGCTCTCCAC AATCCCACAG GAGCCTTATC GGTGGGCTTC
2881 TGTTATTGAA GCAACCAAGT CCGCCATGAG AATTCGGTAC GCCATCCTAC CTTACTTTTA
2941 TACGTTGTTT GACCTGGCCC ACACCACGGG CTCCACTGTA ATGCGCGCAC TTTCTGGGA
3001 ATTCCCTAAT GACCCAACAT TGGCTGCGGT TGAGACTCAA TTCATGGTTG GGCCGGCCAT
3061 CATGGTGGTC CCGGTATTGG AGCCTCTGGT CAATACGGTC AAGGGCGTAT TCCCAGGAGT
3121 TGGACATGGC GAAGTGTGGT ACGATTGGTA CACCCAGGCT GCAGTTGATG CGAAGCCCGG
3181 GGTCAACACG ACCATTTTCGG CACCATTGGG CCACATCCA GTTTATGTAC GAGGTGGAAA
3241 CATCTTGCCG ATGCAAGAGC CGGCATTGAC CACTCGTGAA GCCCGGCAAA CCCCGTGGGC
3301 TTTGCTAGCT GCACTAGGAA GCAATGGAAC CGCGTCGGGG CAGCTCTATC TCGATGATGG
3361 AGAGAGCATC TACCCCAATG CCACCCTCCA TGTGGACTTC ACGGCATCGC GGTCAAGCCT
3421 GCGCTCGTCG GCTCAAGGAA GATGGAAAGA GAGGAACCCG CTTGCTAATG TGACGGTGTCT

3481 CGGAGTGAAC AAGGAGCCCT CTGCGGTGAC CCTGAATGGA CAGGCCGTAT TTCCCGGGTC
 3541 TGTCACGTAC AATTCTACGT CCCAGTTTCT CTTTGTGGG GGGCTGCAA ACTTGACGAA
 3601 GGGCGGCGCA TGGGCGGAAA ACTGGGTATT GGAATGGTAG TGTCAGCCAC AAGCCAGGTG
 3661 TGCGCGTACA GCATGCAACA TGGGAACGAT GCTCTGCAAT GTAGCTCTTT GGTTATAATT
 3721 CAAAATTCAA CTTCCACCTT TGTTTCAC

3.2.1.2. 변경된 중합 효소의 염기 서열

따라서, 염기 서열 분석을 통하여 얻은 염기 서열을 사용하여 연구를 진행한 결과 본 연구진이 필요한 결과를 얻을 수 없었기 때문에 다음으로 아미노산 서열은 같은 염기 서열을 사용하여 연구를 진행하였고 이때 사용한 염기 서열은 Sequence. 3.을 사용하였다.

Sequence. 3.

1 ATGCATCATC ACCATCACCA TCTGGTGCCG CGTGGCAGCT CCACCACCGC ACCGTCCCAG
 61 CCGCAGTTTA CGATTCCGGC CTCCGCAGAT GTTGGCGCAC AGCTGATTGC AAATATTGAT
 121 GACCCGCAGG CAGCCGATGC ACAGAGCGTT TGCCCCGGTT ACAAAGCCAG CAAAGTGCAG
 181 CACAACCTCTC GTGGCTTCAC CGCAAGTCTG CAGCTGGCAG GTCGTCCGTG TAATGTCTAC
 241 GGCACGGATG TGGAAAGTCT GACCCTGTCC GTGGAATATC AGGATAGCGA CCGTCTGAAC
 301 ATCCAGATTC TGCCGACGCA TGTTGATAGC ACCAACGCAT CTTGGTATTT CCTGTCCGAA
 361 AATCTGGTGC CGCGCCCGAA AGCGAGCCTG AATGCAAGTG TGTCCCAGAG CGACCTGTTC
 421 GTTTCTTGGA GTAACGAACC GTCTTTCAAC TTCAAAGTTA TCCGTAAAGC CACCGGTGAT
 481 GCGCTGTTCA GTACGGAAGG CACCGTTCTG GTCTACGAAA ACCAGTTCAT TGAATTTGTG
 541 ACGGCACTGC CGGAAGAATA CAATCTGTAT GGCCTGGGTG AACACATCAC CCAGTTTCGT
 601 CTGCAGCGCA ACGCCAATCT GACGATTTAT CCGAGCGATG ACGGTACCCC GATCGATCAG
 661 AACCTGTACG GCCAGCATCC GTTCTATCTG GATACCCGTT ACTATAAAGG CGACCGCCAG
 721 AATGGTTCTT ACATTCCGGT TAAAAGCTCT GAAGCGGATG CAAGTCAGGA CTATATCTCC
 781 CTGAGCCACG GTGTGTTTCT GCGTAACTCC CATGGCCTGG AAATCCTGCT GCGTAGCCAG
 841 AAAGTGAATTT GCGCACGCT GGGTGGCGGT ATCGATCTGA CCTTCTACTC CGGTCCGGCA
 901 CCGGCAGACG TTACGCGTCA GTATCTGACG TCTACCGTGG GCCTGCCGGC AATGCAGCAG
 961 TACAACACC TGGGTTTCCA CCAGTGCCGC TGGGGCTATA ACAATTGGAG CGATCTGGCA
 1021 GACGTGGTTG CCAATTTCTGA AAAATTTGAA ATCCCGCTGG AATACATCTG GACCGATATT
 1081 GACTACATGC ACGGCTATCG TAACTTCGAT AATGACCAGC ATCGCTTTTC TTATAGTGAA
 1141 GGTGATGAAT TTCTGAGCAA ACTGCATGAA TCTGGCCGTT ACTATGTTCC GATCGTCGAT
 1201 GCGGCACTGT ACATTCCGAA CCCGGAATAAT GCGTCTGATG CATA CGCCAC CTATGACCGC
 1261 GGTGCCGCGG ATGACGTGTT CCTGAAAAAC CCGGATGGCA GCCTGTACAT TGGTGCAGTG
 1321 TGGCCGGGCT ATACCGTTTT CCCGGATTGG CATCACCCGA AAGCAGTTGA CTTTTGGGCC
 1381 AACGAAGTGG TCATCTGGAG CAAAAAAGTT GCCTTCGATG GTGTCTGGTA TGACATGTCT
 1441 GAAGTGAGCT CCTTTTGCGT TGGCAGTTGT GGCACGGGTA ACCTGACCCT GAATCCGGCA
 1501 CACCCGAGCT TCCTGCTGCC GGGTGAACCG GGCGATATCA TTTACGACTA TCCGGAAGCC
 1561 TTAAACATTA CGAATGCGAC CGAAGCAGCC TCCGCAAGCG CAGGTGCAAG CTCTCAGGCA
 1621 GCAGCCACGG CAACCACGAC CTCTACCAGT GTTTCCTACC TGCGTACGAC CCCGACCCCG
 1681 GGTGTGCGTA ACGTTGAACA CCCGCCGTAT GTGATCAATC ATGATCAGGA AGGCCACGAC
 1741 CTGAGTGTCC ATGCGGTGTC CCCGAACGCA ACCCATGTTG ATGGTGTGCA AGAATACGAC
 1801 GTTCACGGTC TGTATGGCCA TCAGGGTCTG AATGCAACCT ACCAGGGTCT GCTGGAAGTG
 1861 TGGAGCCACA AACGTCGCC GTTCATCATT GGTCGTAGCA CCTTTGCAGG CTCTGGTAAA
 1921 TGGGCCGGCC ATTGGGGCGG TGATAACTAT AGTAAATGGT GGTCCATGTA CTATAGCATT
 1981 TCTCAGGCGC TGAGTTTCTC CCTGTTTGGT ATCCCGATGT TCGGCGCAGA TACCTGCGGC

2041 TTTAACGGTA ATTCCGACGA AGAACTGTGT AACCGTTGGA TGCAGCTGAG CGCATTCTTT
 2101 CCGTTTTACC GCAACCACAA TGAAGTACGAC ACGATTCCGC AGGAACCGTA TCGTTGGGCC
 2161 TCCGTTATCG AAGCGACCAA AAGCGCAATG CGTATCCGCT ACGCGATTCT GCCGTACTTC
 2221 TATACGCTGT TTGATCTGGC GCATACGACC GGTTCTACCG TGATGCGCGC ACTGAGTTGG
 2281 GAATTCCCGA ACGATCCGAC GCTGGCGGCA GTCGAAACCC AGTTTATGGT GGGCCCCGCA
 2341 ATCATGGTCG TGCCGGTGCT GGAACCGCTG GTGAATACGG TTAAAGGTGT CTCCCCGGGC
 2401 GTCGGTCACG GCGAAGTGTG GTACGATTGG TATACCCAGG CAGCAGTTGA CGCAAACCG
 2461 GGTGTCAACA CGACCATCAG CGCGCCGCTG GGCCATATTC CGGTGTACGT TCGTGGCGGT
 2521 AATATTCTGC CGATGCAGGA ACCGGCACTG ACGACCCGTG AAGCACGTCA GACGCCGTGG
 2581 GCACTGCTGG CAGCACTGGG TAGTAACGGT ACCGCATCCG GTCAGCTGTA CCTGGATGAC
 2641 GGCGAAAGTA TCTATCCGAA TGCCACGCTG CATGTGGATT TTACCGCGAG CCGTAGTTCC
 2701 CTGCGCAGCT CTGCACAGGG TCGTTGGAAA GAACGCAACC CGCTGGCCAA TGTCACGGTG
 2761 CTGGGCGTCA ACAAAGAACC GTCTGCGGTG ACCCTGAATG GTCAGGCAGT TTTCCCCGGC
 2821 AGTGTACGT ACAACAGCAC CTCTCAGGTG CTGTTTGGTTG GCGGTCTGCA GAACCTGACG
 2881 AAAGGCGGTG CGTGGGCGGA AACTGGGTC CTGGAATGG

3.2.1.3. 변경된 염기 서열을 사용한 중합 효소 형질 전환

변경된 염기 서열과 pET11a 벡터를 사용하여 *E.Coli*에 형질전환을 수행한 결과, 형질 전환된 *E.Coli*의 Colony를 얻을 수 있었고 이를 Lysis하여 SDS-PAGE를 수행해본 결과 Fig. 1의 결과를 얻을 수 있었으며, SDS-PAGE 수행을 통해 *E.Coli* lysate에서 80 kDa의 단백질이 많이 발견된 것을 확인할 수 있었다.

3.2.1.4. 획득한 중합 효소를 사용한 안토시아닌 올리고머 합성

중합 효소를 활용하여 안토시아닌 올리고머를 중합하여 ESI-MS를 측정하여 Fig. 2 ~ 4에 나타내었으며, 그 결과는 *E.Coli* 형질 전환하여 얻은 중합 효소는 기존에 사용한 조효소와 달리 안토시아닌 올리고머 중합 활성을 나타내지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, *E.Coli* lysate의 다른 인자들의 영향을 감소시키고 중합 효소의 양을 늘리기 위해 원심분리를 수행하고 상층액만을 사용하는 방법과 lysate의 양을 늘리는 방법을 사용해서 안토시아닌 올리고머의 중합과정을 반복하여 수행한 후 ESI-MS 분석을 통하여 Fig. 5 ~ 7.에 나타내었으며, 그 결과, 안토시아닌 올리고머의 중합이 이루어지지 않는 것을 확인하였고 다음으로 중합 온도에 영향을 받는지 확인하기 위하여 25 ~ 60°C 범위에서 안토시아닌 올리고머 중합반응을 실행하였다. 그 결과는 Fig. 8 ~ 16.에 나타내었으며, 이 결과에서도 안토시아닌 올리고머의 중합이 이루어지지 않았음을 확인하고, 안토시아닌 올리고머 중합효소의 염기서열의 *E.Coli*로의 형질전환은 잘 이루어졌지만 형질 전환된 염기로부터 유래한 단백질은 안토시아닌 올리고머의 중합 활성은 발견되지 않음을 확인하였다.

3.2.1.5. 염기서열, 벡터 (pUC57) 및 수용세포(Yeast)의 변경

형질전환에 사용할 유전자를 수용하는 수용세포를 *E.Coli*에서 Yeast로 변경하고자 그에 맞는 벡터 pPIC9k을 사용하고 다음의 유전자 서열 (Sequence. 4.)을 형질 전환하여 연구를 진행하였다. 하지만 형질 전환이 잘 이루어지지 않아 더 이상의 결과를 얻지 못 하였다.

Sequence. 4.

1 ATGGTGAAAC TGACGCATCT GCTGGCTCGT GCTTGGCTGG TTCCGCTGGC TTATGGTGCC

61 TCTCAATCCC TGCTGTCCAC CACCGCACCG TCTCAACCGC AGTTCACCAT TCCGGCTTCC
121 GCAGATGTTG GCGCACAGCT GATTGCAAAT ATCGATGACC CGCAGGCGGC CGATGCTCAA
181 TCTGTGTGCC CGGGCTATAA AGCGAGTAAA GTTCAGCACA ACTCCCCTGG TTTTACCGCA
241 TCACTGCAAC TGGCTGGCCG CCCGTGTAAT GTCTATGGTA CGGATGTGGA AAGCCTGACC
301 CTGTCTGTGG AATACCAGGA TAGCGACCGT CTGAACATTC AAATCCTGCC GACGCATGTT
361 GATAGTACCA ACGCGTCTCG GTATTTTCTG TCTGAAAATC TGGTGCCGCG CCCGAAAGCA
421 AGTCTGAATG CTTCAAGTGC GCAGAGCGAT CTGTTCTGTTT CTTGGAGTAA CGAACCGAGT
481 TTTAATTTCA AAGTTATTCG TAAAGCGACC GGCGATGCCC TGTTTTCCAC GGAAGGTACC
541 GTTCTGGTCT ATGAAAACCA GTTTATCGAA TTCGTGACGG CGCTGCCGGA AGAATATAAT
601 CTGTACGGTC TGGGCGAACA CATTACCCAG TTCCGTCTGC AACGCAACGC CAATCTGACG
661 ATCTATCCGA GCGATGACGG CACCCCGATT GATCAGAACC TGTATGGTCA ACATCCGTTT
721 TACCTGGATA CCCGTTATTA CAAAGGTGAC CGCCAGAATG GCTCCTATAT CCCGGTTAAA
781 AGCTCTGAAG CCGATGCATC ACAAGACTAC ATTTCCCTGT CACACGGCGT GTTCCTGCGC
841 AACTCCCATG GTCTGGAAAT TCTGCTGCGT TCACAGAAAC TGATCTGGCG CACGCTGGGC
901 GGTGGCATTG ATCTGACCTT TTATTCCGGT CCGGCTCCGG CAGACGTCAC GCGTCAGTAC
961 CTGACGTCAA CCGTGGGTCT GCCGGCGATG CAGCAATATA ACACCCTGGG CTTTCACCAA
1021 TGCCGCTGGG GTTACAACAA TTGGAGCGAT CTGGCAGACG TGGTTGCTAA CTTCGAAAAA
1081 TTCGAAATCC CGCTGGAATA CATCTGGACC GATATCGACT ATATGCACGG TTACCGTAAC
1141 TTTGATAATG ACCAGCATCG CTTCTCGTAC AGCGAAGGCG ATGAATTCCT GAGCAAACCTG
1201 CATGAATCTG GTCGTTATTA CGTTCCGATT GTCGACGCAG CTCTGTATAT CCCGAACCCG
1261 GAAAATGCAT CTGATGCATA TGCAACCTAC GACCGTGGTG CAGCAGATGA CGTGTTTCTG
1321 AAAAACC CG ATGGTAGTCT GTATATCGGC GCGGTGTGGC CGGGTTACAC CGTTTTTCCG
1381 GATTGGCATC ACCCGAAAGC GGTTGACTTC TGGGCCAATG AACTGGTCAT TTGGAGCAAG
1441 AAAGTTGCCT TTGATGGCGT CTGGTATGAC ATGTCCGAAG TGAGTTCCTT CTGCGTTGGT
1501 AGCTGTGGTA CGGGCAACCT GACCCTGAAT CCGGCACATC CGAGCTTCTT GCTGCCGGGT
1561 GAACCGGGCG ATATTATCTA TGACTACCCG GAAGCGTTCA ACATCACGAA TGCCACCGAA
1621 GCAGCTTCTG CTAGTGCAGG TGCCCTCATCG CAGGCGGCGG CAACGGCCAC CACGACCTCC
1681 ACCTCAGTTT CGTATCTGCG TACGACCCCG ACCCCGGGCG TGCGCAACGT TGAACACCCG
1741 CCGTACGTGA TTAATCATGA TCAGGAAGGT CACGACCTGA GTGTCCATGC AGTGTCCCCG
1801 AACGCTACCC ATGTTGATGG CGTCGAAGAA TATGACGTTT ACGGCCTGTA CGGTCATCAG
1861 GGCCTGAATG CGACCTATCA AGGCCTGCTG GAAGTGTGGA GCCACAAACG TCGCCCGTTT
1921 ATTATCGGCC GTTCAACCTT CGCAGGTTTC GGCAAATGGG CTGGTCATTG GGGTGGCGAT
1981 AACTACTCAA AATGGTGGTC GATGTATTAC AGCATCTCTC AGGCTCTGAG TTTTTCCTG
2041 TTCGGCATTG CGATGTTTGG TGCGGATACC TGCGGTTTCA ACGGCAATTC GGACGAAGAA
2101 CTGTGTAATC GTTGGATGCA GCTGAGCGCC TTTTTCCTG TTTATCGCAA CCACAATGAA
2161 CTGAGCACGA TCCCGCAAGA ACCGTACCGT TGGGCCTCGG TTATTGAAGC GACCAAAGC
2221 GCCATGCGTA TTCGCTATGC AATCCTGCCG TATTTTACA CGCTGTTCGA TCTGGCCCAT
2281 ACGACCGGCT CTACCGTGAT GCGCGCACTG AGTTGGGAAT TTCCGAACGA TCCGACGCTG
2341 GCTGCGGTCG AAACCCAGTT CATGGTGGGT CCGGCGATTA TGGTCGTGCC GGTGCTGGAA
2401 CCGCTGGTGA ATACGGTTAA AGGCGTCTTT CCGGGTGTG GCCACGGTGA AGTGTGGTAT
2461 GATTGGTACA CCCAGGCCGC AGTTGACGCT AAACCGGGCG TCAACACGAC CATTAGCGCG
2521 CCGCTGGGTC ATATCCCGGT GTATGTTTCG GGTGGCAATA TCCTGCCGAT GCAGGAACCG
2581 GCACTGACGA CCCGTGAAGC ACGTCAAACG CCGTGGGCAC TGCTGGCTGC ACTGGGTAGC
2641 AACGGTACCG CATCTGGTCA GCTGTATCTG GATGACGGTG AATCGATCTA TCCGAATGCC
2701 ACGCTGCATG TGGATTTTAC CGCATCTCGT AGCTCTCTGC GCAGTTCCTG CCAGGGCCGT
2761 TGGAAGAAGC GCAACCCGCT GGCAAATGTC ACGGTGCTGG GTGTCAACAA AGAACCGTCT

2821 GCTGTGACCC TGAATGGCCA GGCGGTTTTT CCGGGTAGTG TCACGTATAA TTCAACCTCG
2881 CAAGTGCTGT TCGTTGGTGG TCTGCAAAT CTGACGAAAG GCGGTGCGTG GGCTGAAAAC
2941 TGGGTGCTGG AATGG

3.2.1.6. 다양한 효소를 사용한 안토시아닌 올리고머 합성

곰팡이균을 이용한 안토시아닌 올리고머 합성의 문제점을 해결하기 위해 형질전환 기법을 사용하여 연구를 수행한 결과 원하는 형질전환 된 효소를 얻기 못하였다. 안토시아닌 올리고머 합성에 관한 연구를 계속 진행하기 위하여 상업용으로 판매되는 다양한 효소(예비 실험 결과 얻은 당 가수분해 효소)를 사용하여 안토시아닌 올리고머의 합성을 진행하였다. 그 결과, 효소 Glucosidase에 의한 안토시아닌 올리고머 합성을 ESI-MS상으로 확인할 수 있었다(Fig. 20). 또한, 효소 Glucosidase과 유사한 활성을 나타내는 시판 효소 (효소 AMG 300L, Sumizyme AC, Rohament CL, Celluclaset 1.5 LFG, Viscozyme L, BAN 480L)를 사용하여 안토시아닌 올리고머를 합성하여 분석한 결과를 Fig. 17 ~ 19와 Fig. 21 ~ 31.에 나타내었다. Fig. 20.을 보면 600, 900, 1200 대의 분자량이 비교군인 Fig. 17에 비해 증가하였음을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 안토시아닌 올리고머가 합성된 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로하여 결과가 나오지 않는 안토시아닌 올리고머 중합효소를 형질전환으로 사용하는 것 보다 상업용 효소를 사용한 것이 연구 시간적, 경제적으로 유익하다고 판단되어 상업용 효소를 사용한 연구를 진행하기로 결정하였다.

3.2.1.7. 안토시아닌 올리고머의 표준화

HPLC기기에서 분석 컬럼(GPC, 극성)과 검출기(UV, RI detector)를 사용하여 안토시아닌 모노머와 올리고머의 시그널을 분석하여 표준화 방법을 찾고자 하였다. 우선 HPLC로 측정하기 전 안토시아닌 올리고머보다 용해도가 떨어지는 안토시아닌의 용해도를 확인하기 위해 HPLC에서 많이 사용되는 증류수, 메탄올과 acetonitrile (ACN)을 사용하여 용해도를 확인하였다 (Fig. 32.). 모든 용액의 100%에서는 용해도가 100%를 나타내지 않았고 메탄올과 ACN을 사용한 경우에는 메탄올 50% 이상에서 높은 용해도를 나타내었지만 100%의 용해도를 나타내지는 않았다. 반면에 증류수와 ACN의 경우에는 20~80%의 acetonitrile을 사용한 경우 100%의 용해도를 확인할 수 있었다. 안토시아닌 올리고머의 경우 증류수 100%를 비롯해 증류수와 ACN을 사용했을 때 안토시아닌 모노머와 같은 용매 비율에서 100%의 용해도를 보여주었다. 이를 바탕으로, 다양한 컬럼을 사용하여 UV, RI 검출기를 사용하여 안토시아닌 모노머와 올리고머를 측정한 결과 유사한 시그널을 얻을 수 있었다 (Fig. 33. ~ 36.). 그 중 SB-802 컬럼을 사용하여 측정하였을 때, 안토시아닌 모노머와 올리고머의 시그널이 달라지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 37.). 하지만 차이가 분명하지 않아 확실한 차이를 보여주는 시그널을 찾기 위해 다양한 컬럼을 사용하여 HPLC를 수행한 결과 Acclaim™ PolarAdvantage II 컬럼을 사용하였을 경우 확실한 안토시아닌 모노머와 올리고머의 차이를 확인할 수 있었다. Fig. 38을 보면 2.7분대에 확실하게 다른 피크가 나온다는 것을 확인할 수 있었고, 이를 받아서 LC-MS를 측정한 결과 (Fig. 39.) 400대 분자량을 나타내는 피크와 900대 분자량을 확인할 수 있었다. 이때 900대 피크를 사용하여 한 번 더 MS로 분석한 결과 900대 피크와 400대 피크를 확인할 수 있었다 (Fig. 40). 이를 통하여 2.7분대에 확인된 피크는 모노머 형태가 아닌 최소 다이머 이상의 올리고머라는 것을 확인할 수 있었다. 또한, MALS 장비를 사용하여 안토시아닌 모노머와 올리고머를 분석한 결과 뚜렷한 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 41). 이런 결과들을 통하여 본 연구에서 사용한 효소를 이용한 안토시아닌 올리고머 합성에서 안토시아닌 모노머에 없었던 피크가 합성된 안토시아닌

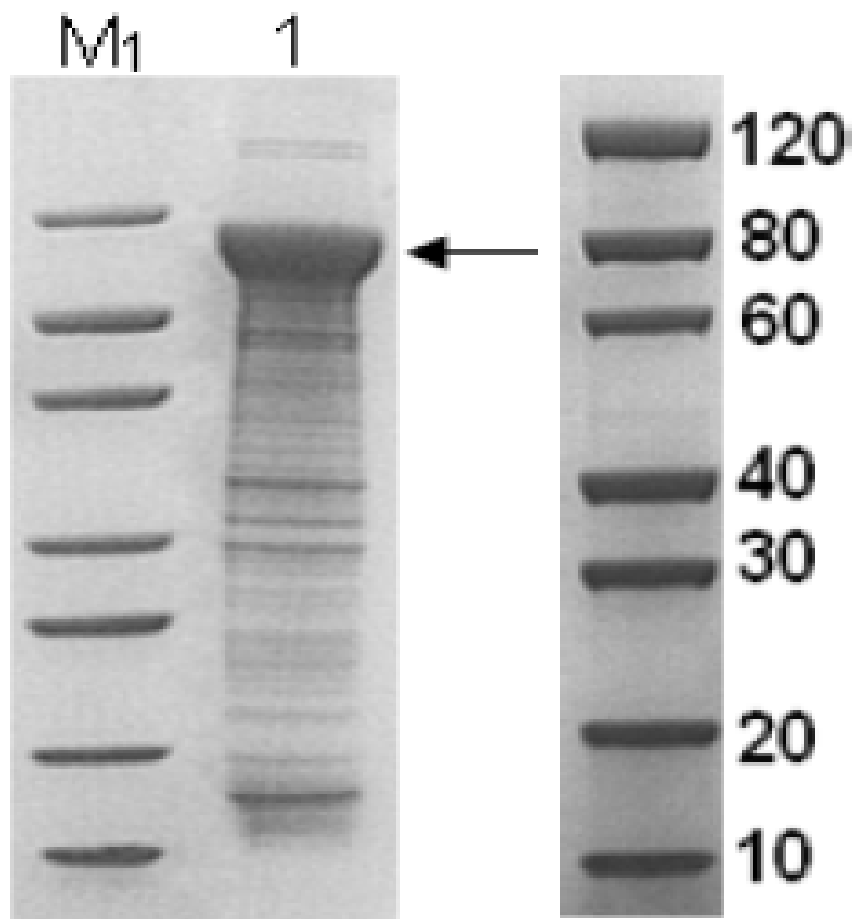


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of transformed *E.Coli* lysate . M₁ : Protein marker, 1 : Cell lysate of *E.Coli*

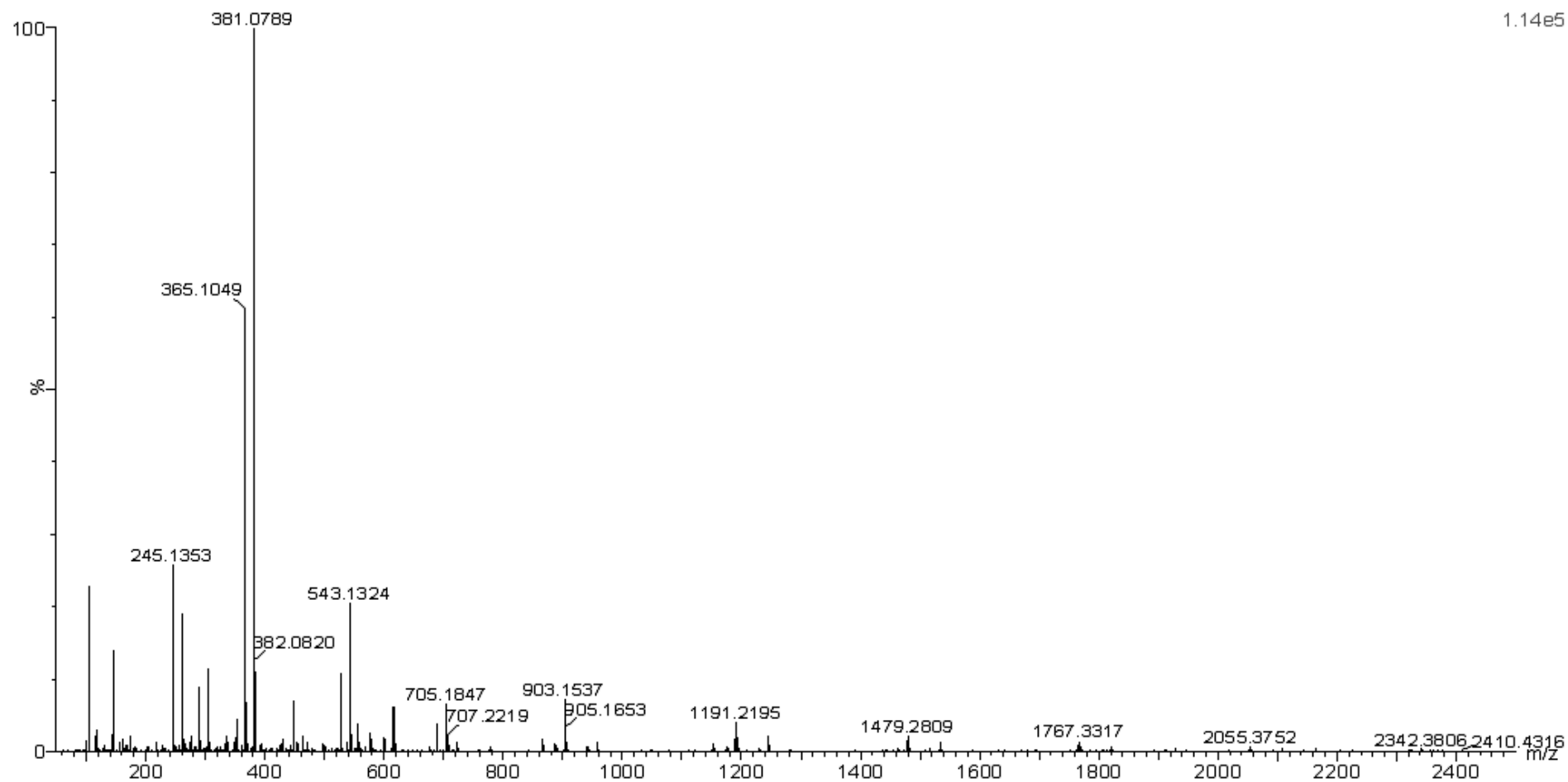


Fig. 2. ESI-MS profile of monomeric anthocyanin.

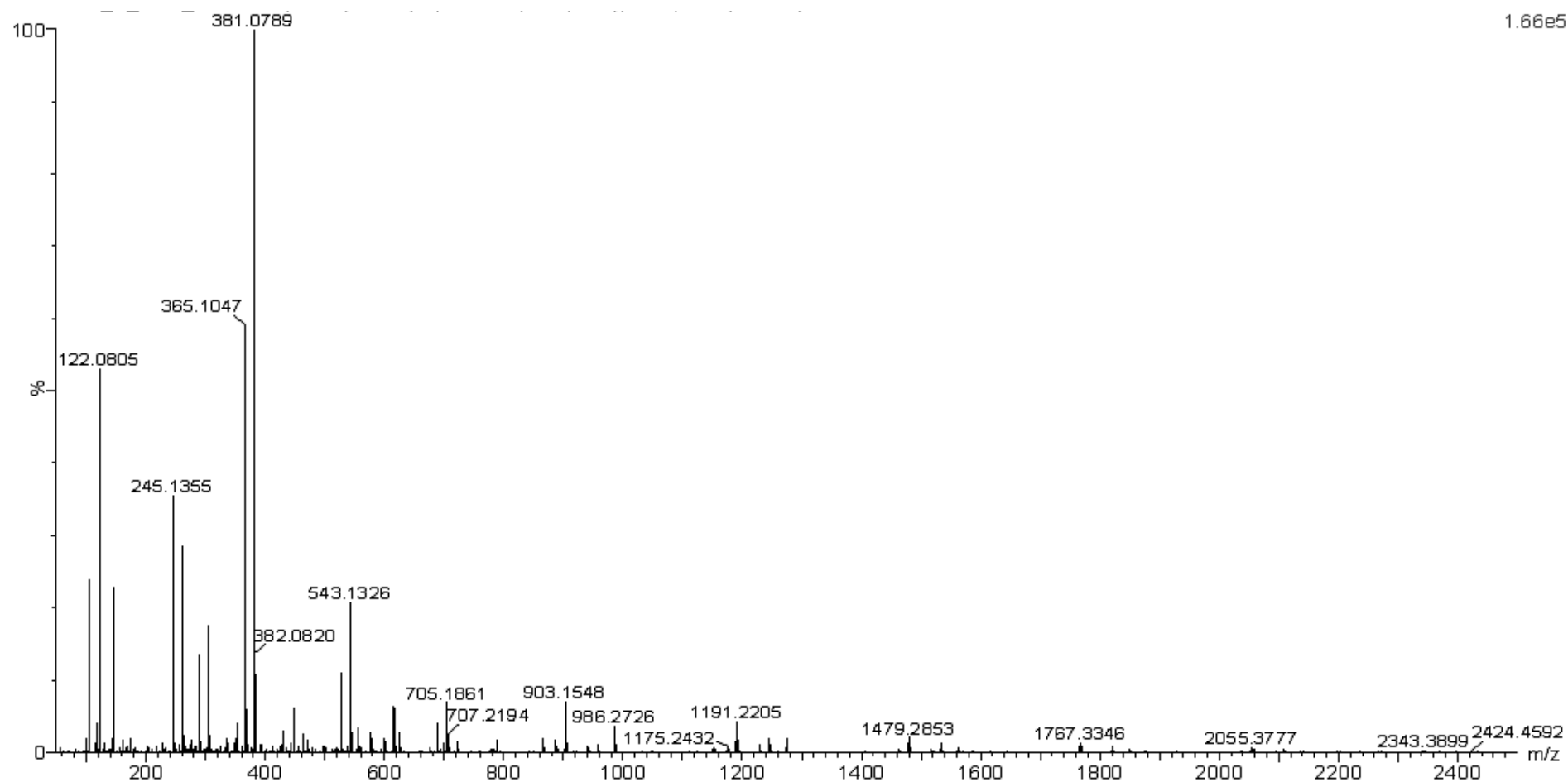


Fig. 3. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by *E.Coli* lysate. (Substrate : Lysate = 100 : 1).

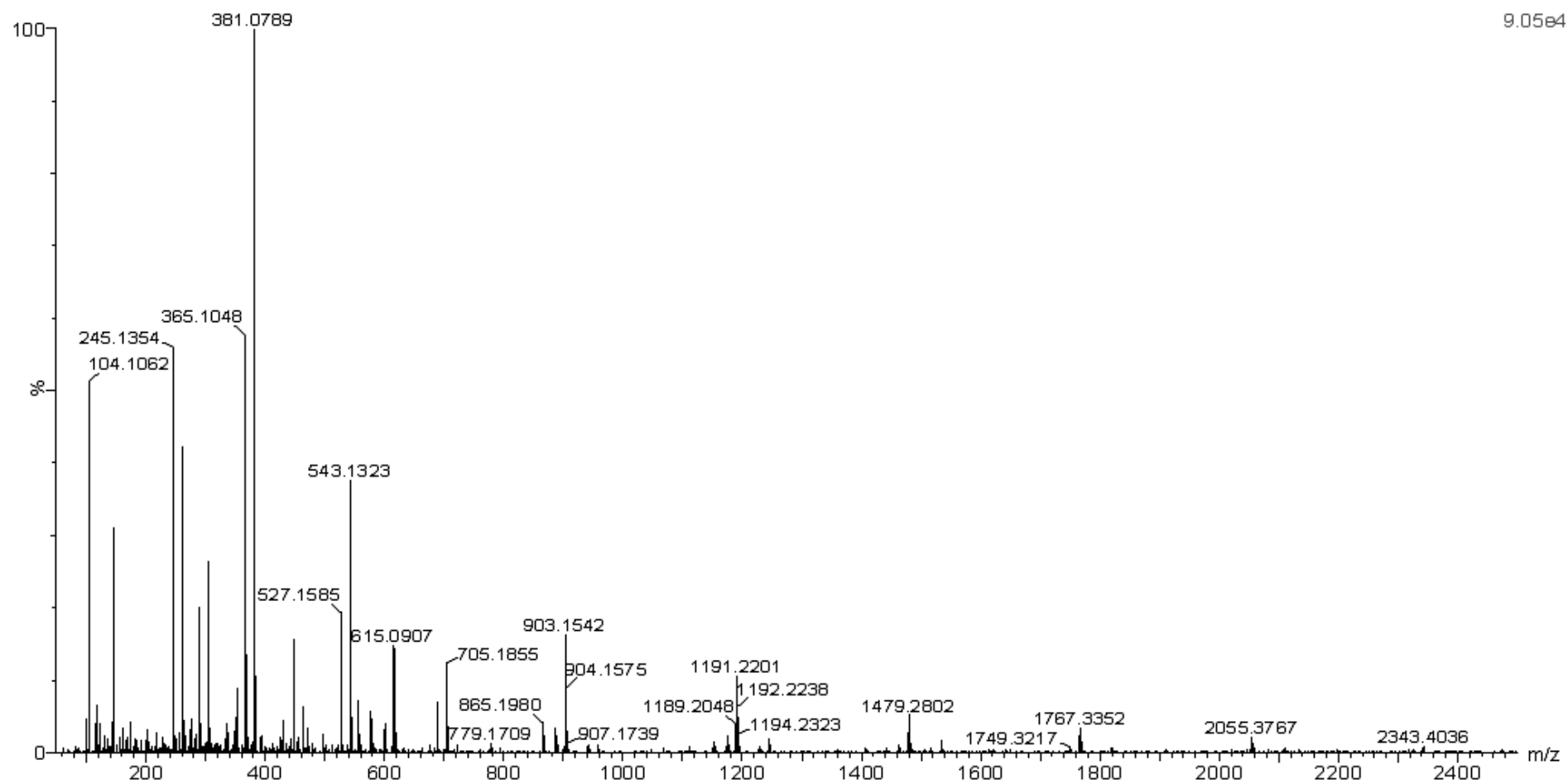


Fig. 4. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by polymerase (Substrate : Polymerase = 100 : 1)

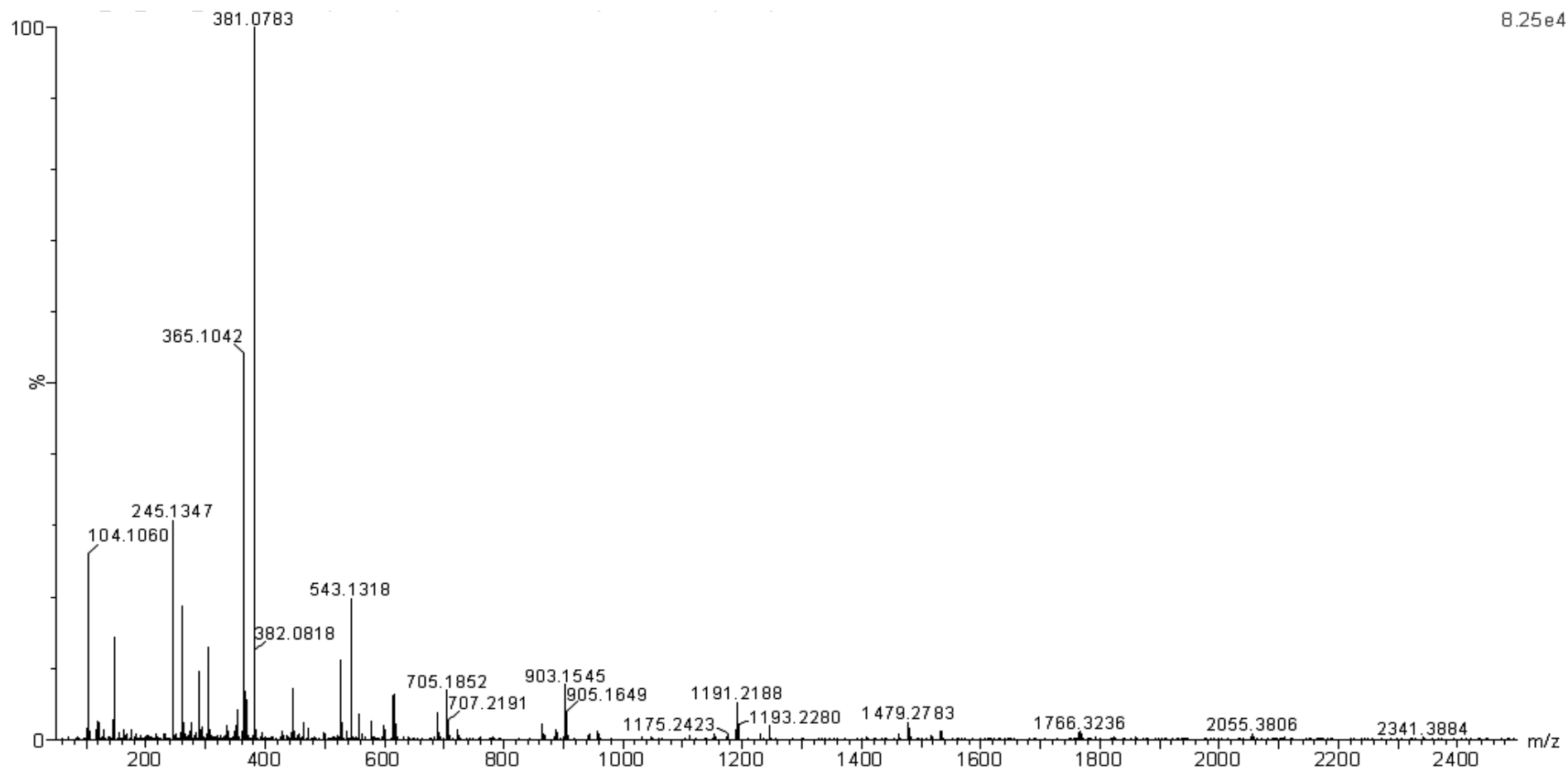


Fig. 5. ESI-MS profile of monomeric anthocyanin.

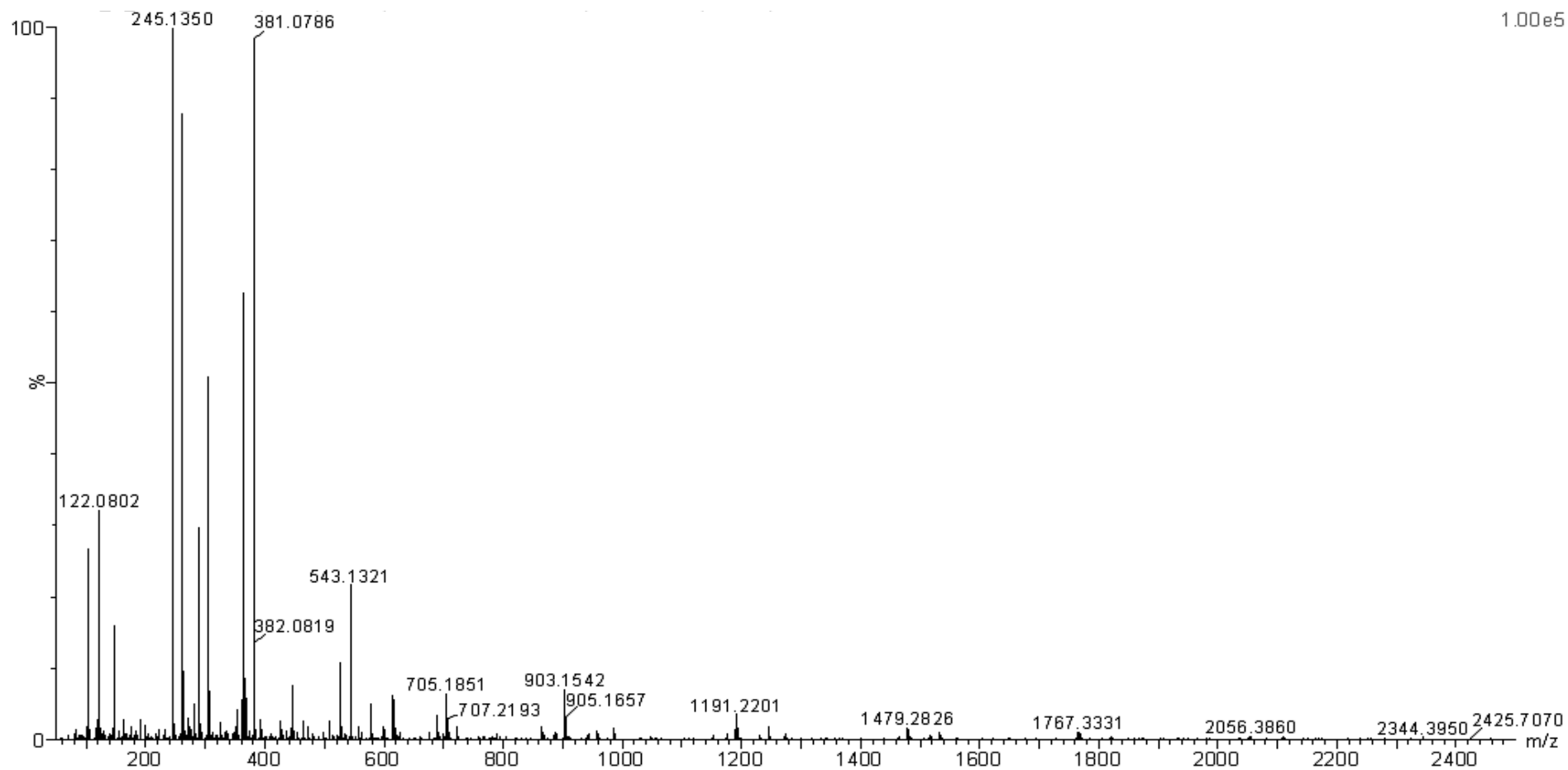


Fig. 6. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by Supernatant (Substrate : Supernatant = 100 : 1).

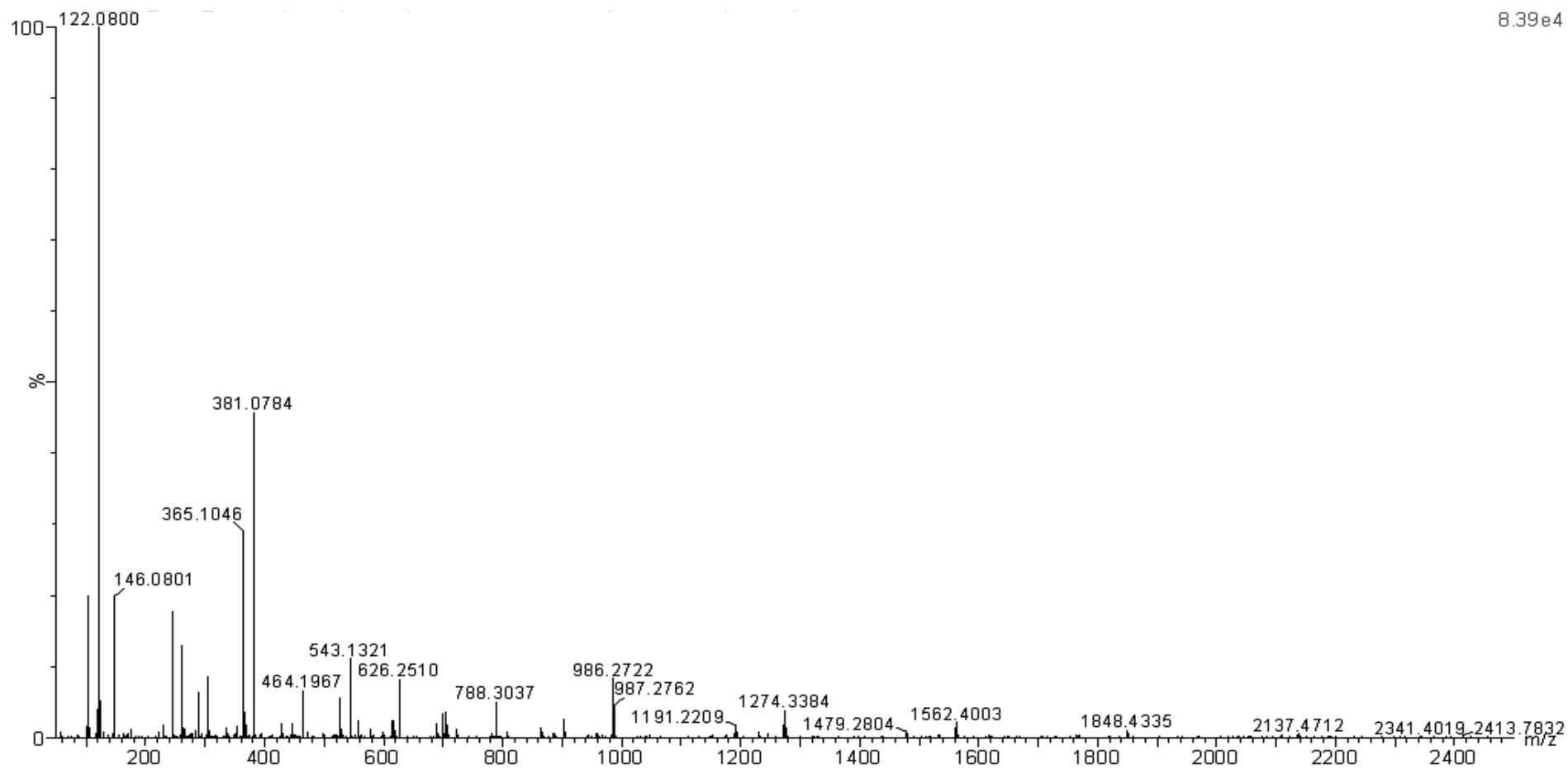


Fig. 7. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by *E.Coli* lysate (Substrate : Lysate = 50 : 1).

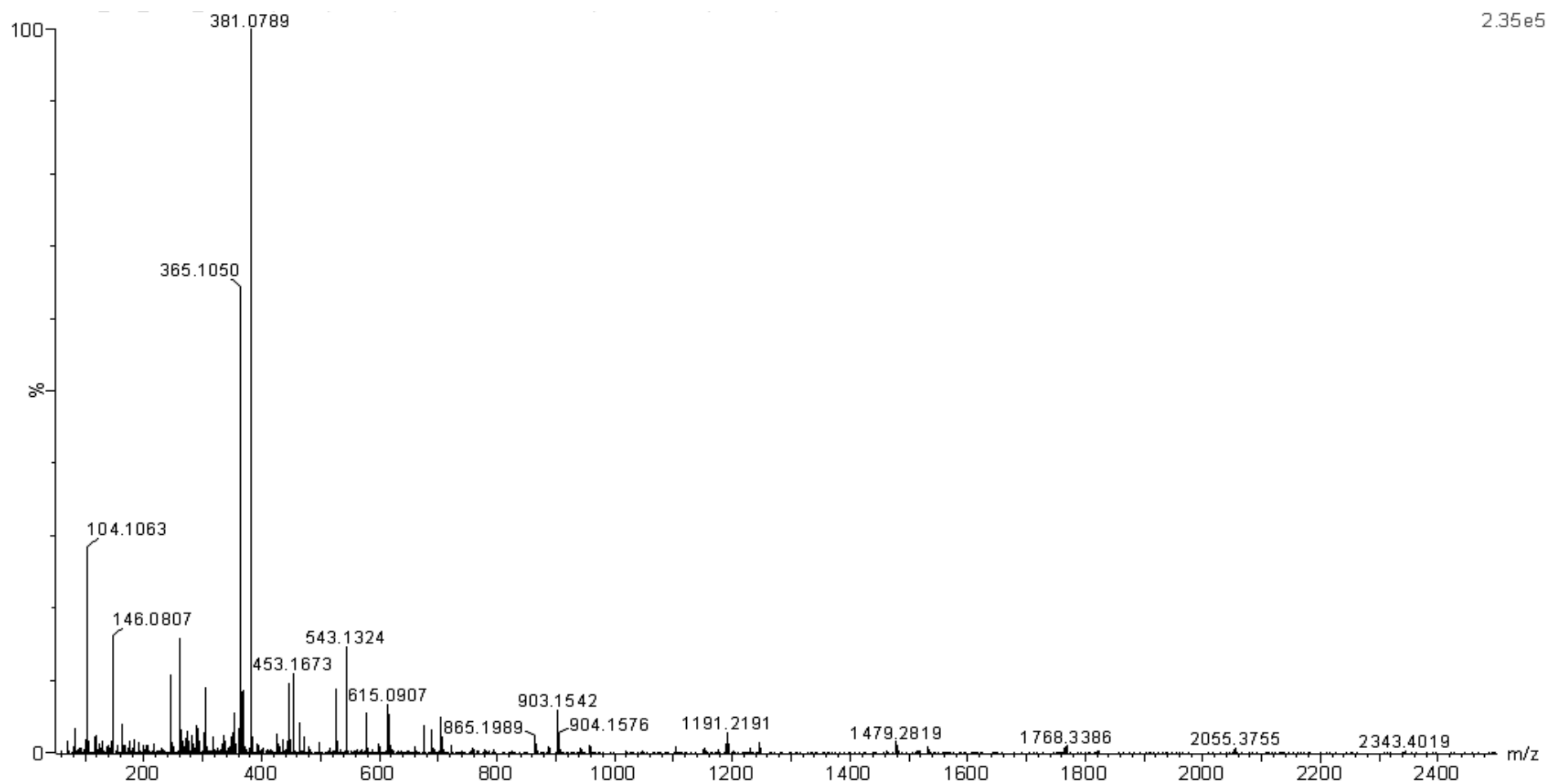


Fig. 8. ESI-MS profile of monomeric anthocyanin.

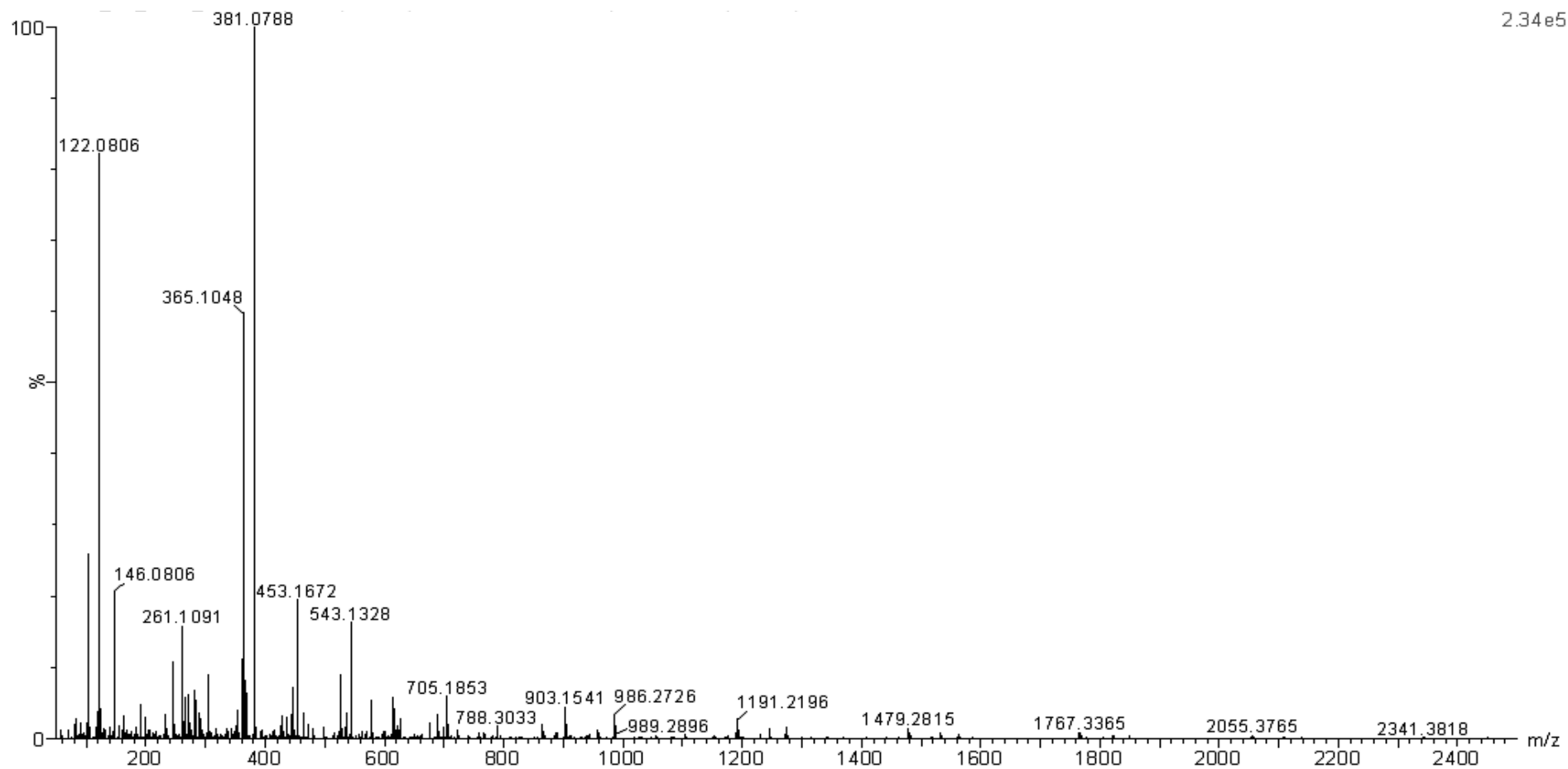


Fig. 9. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by *E.Coli* lysate in 25°C water bath (Substrate : Lysate = 100 : 1).

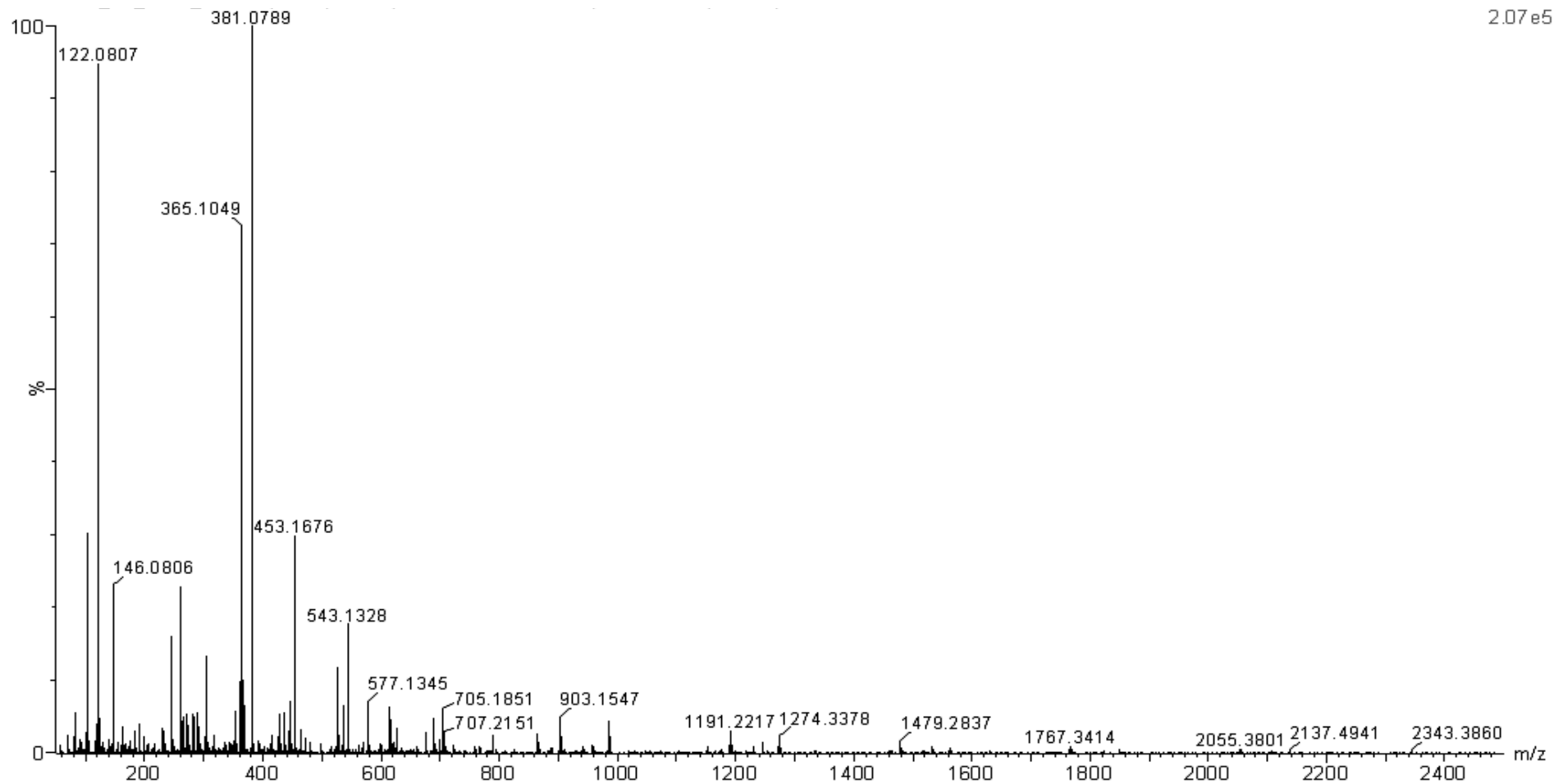


Fig. 10. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by *E.Coli* lysate in 30°C water bath (Substrate : Lysate = 100 : 1).

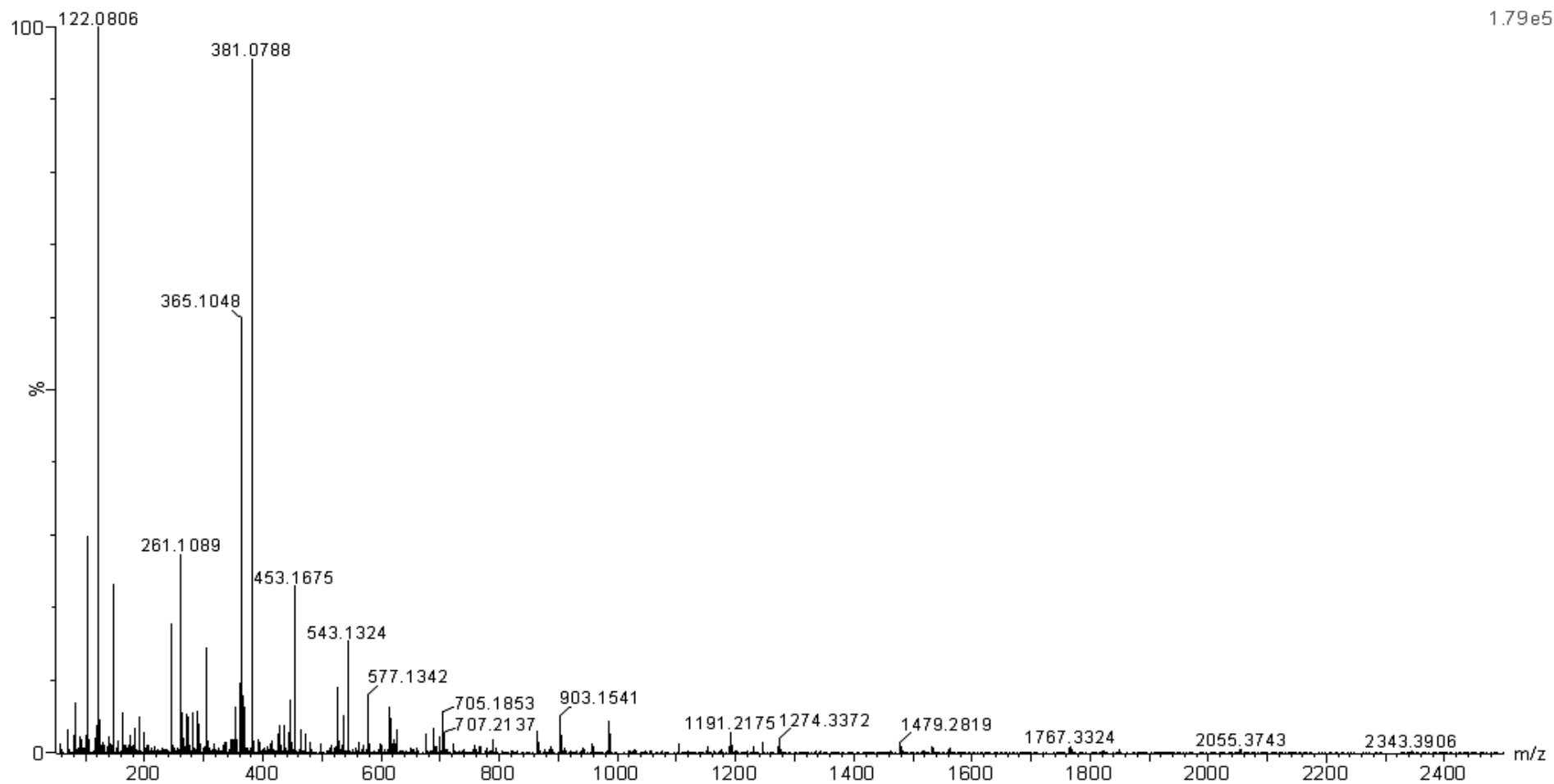


Fig. 11. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by *E.Coli* lysate in 35°C water bath (Substrate : Lysate = 100 : 1).

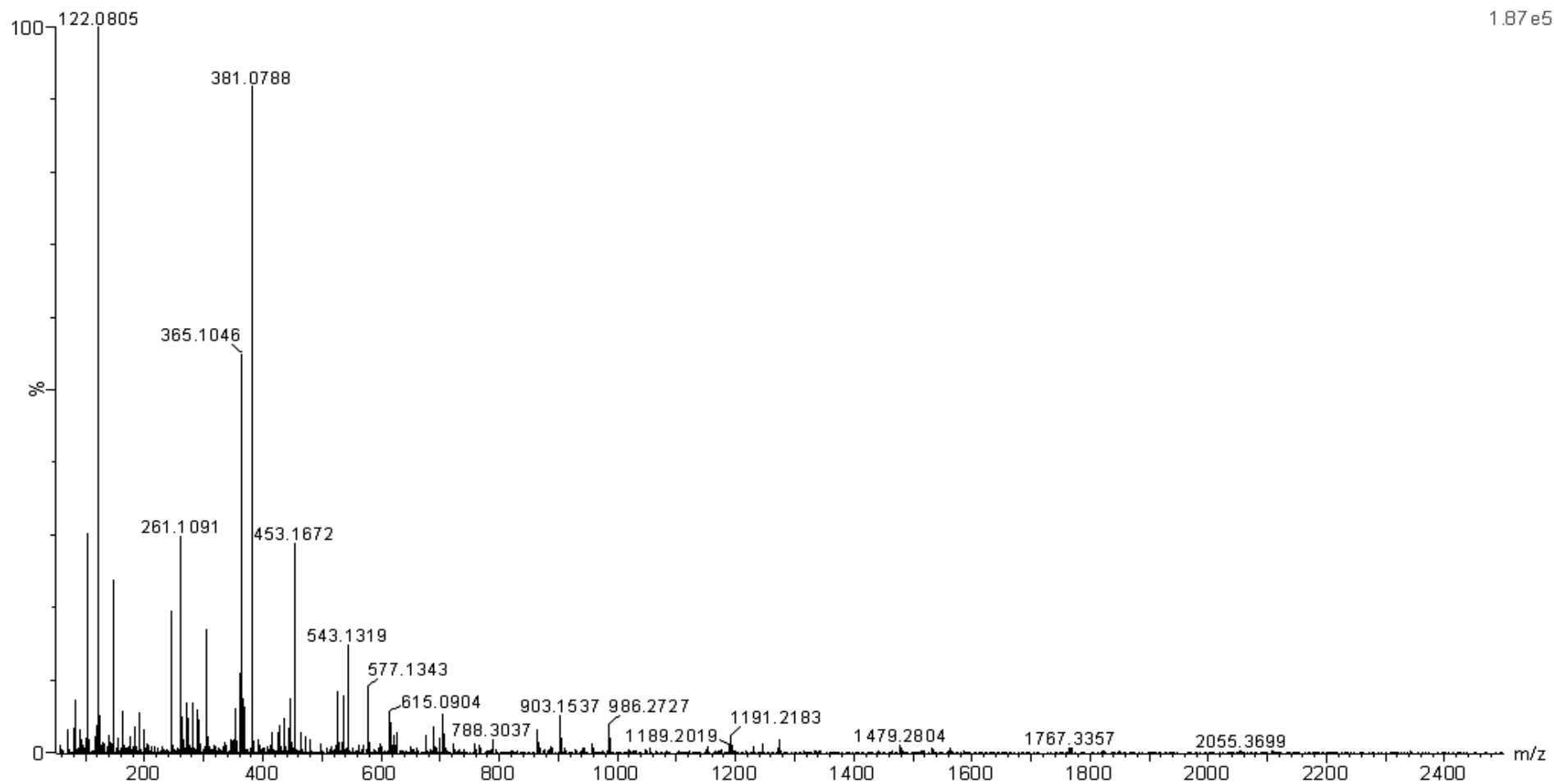


Fig. 12. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by *E.Coli* lysate in 40°C water bath (Substrate : Lysate = 100 : 1).

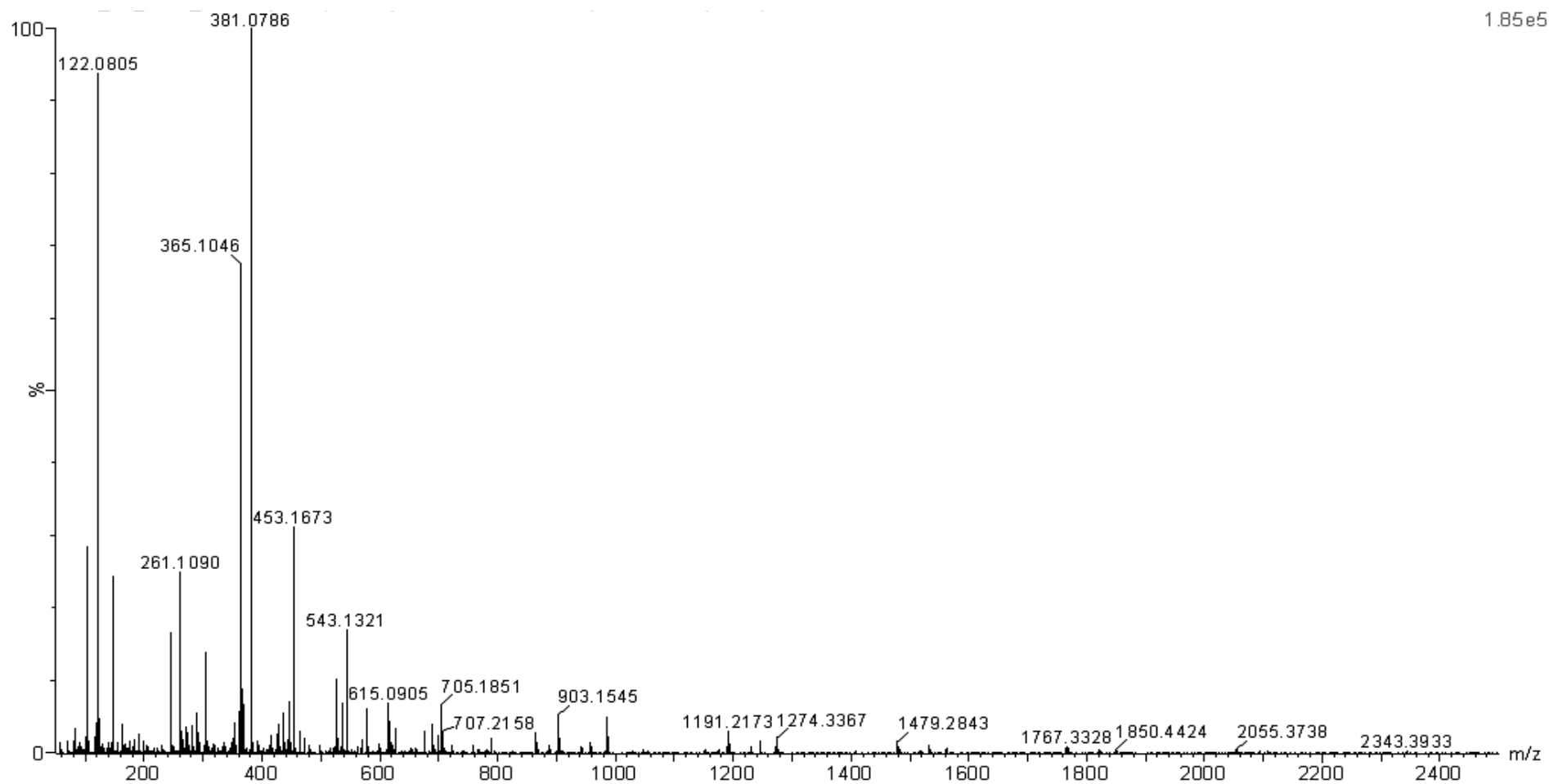


Fig. 13. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by *E.Coli* lysate in 45°C water bath (Substrate : Lysate = 100 : 1).

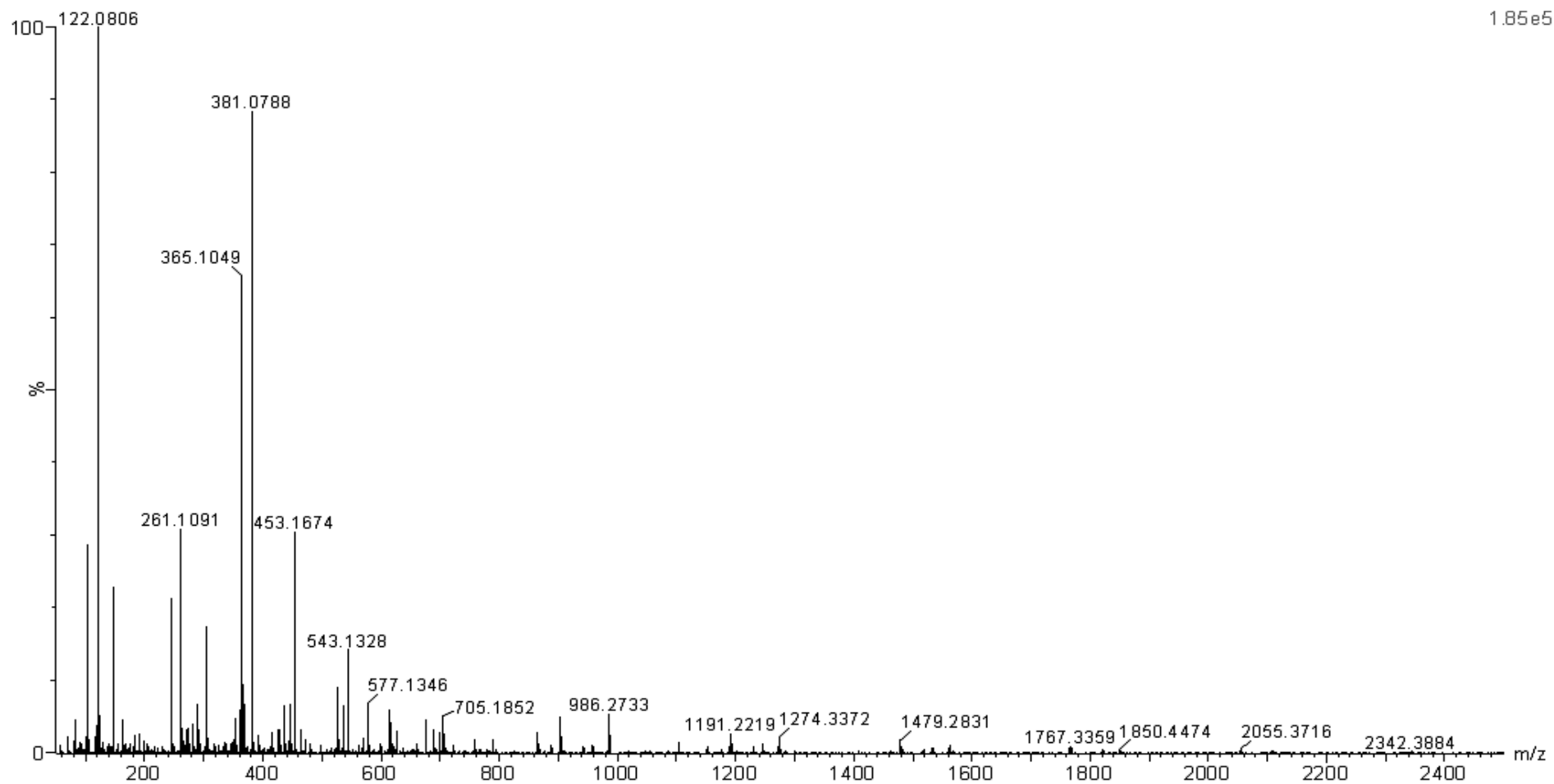


Fig. 14. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by *E.Coli* lysate in 50°C water bath (Substrate : Lysate = 100 : 1).

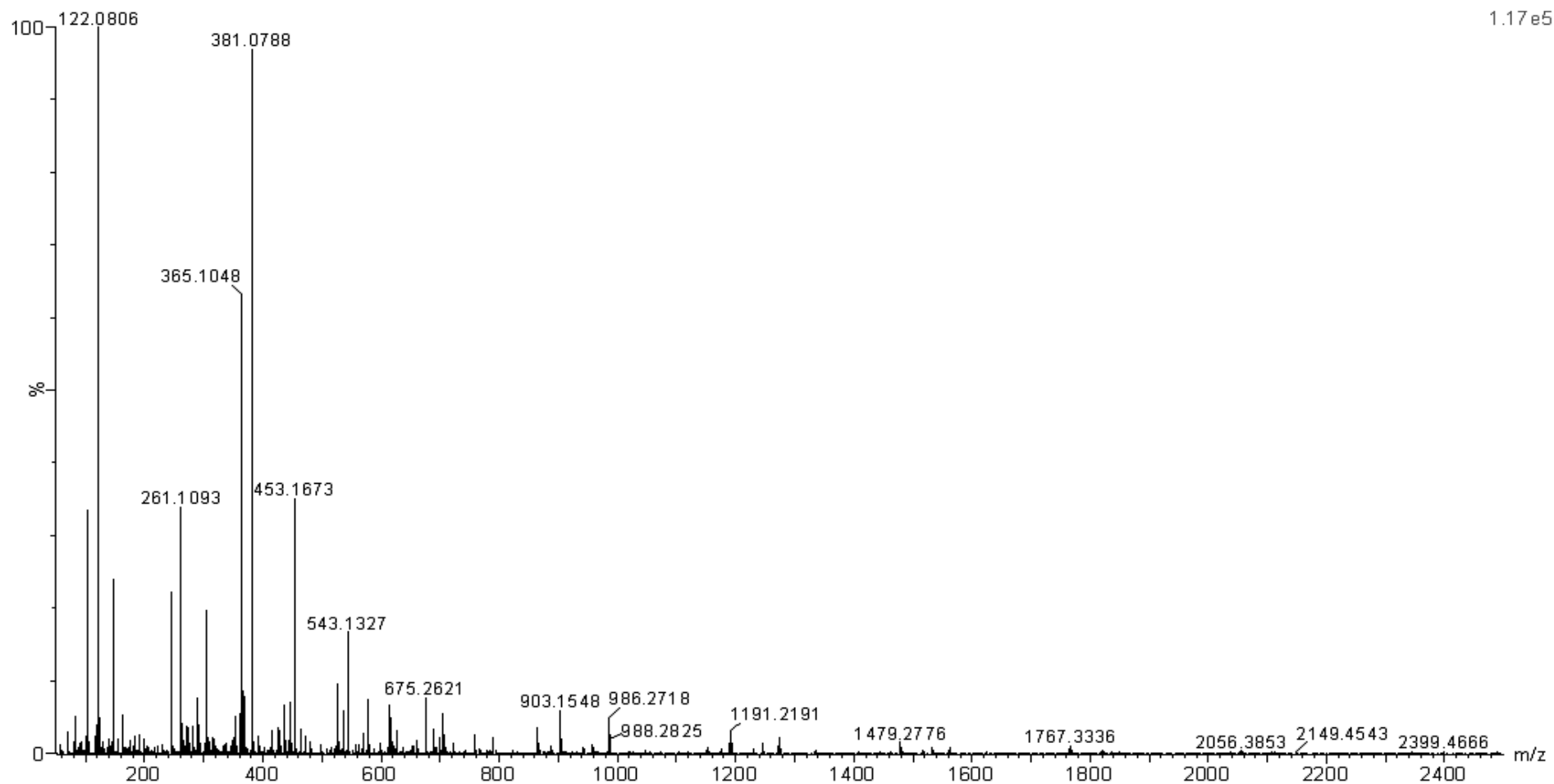


Fig. 15. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by E.Coli lysate in 55°C water bath (Substrate : Lysate = 100 : 1).

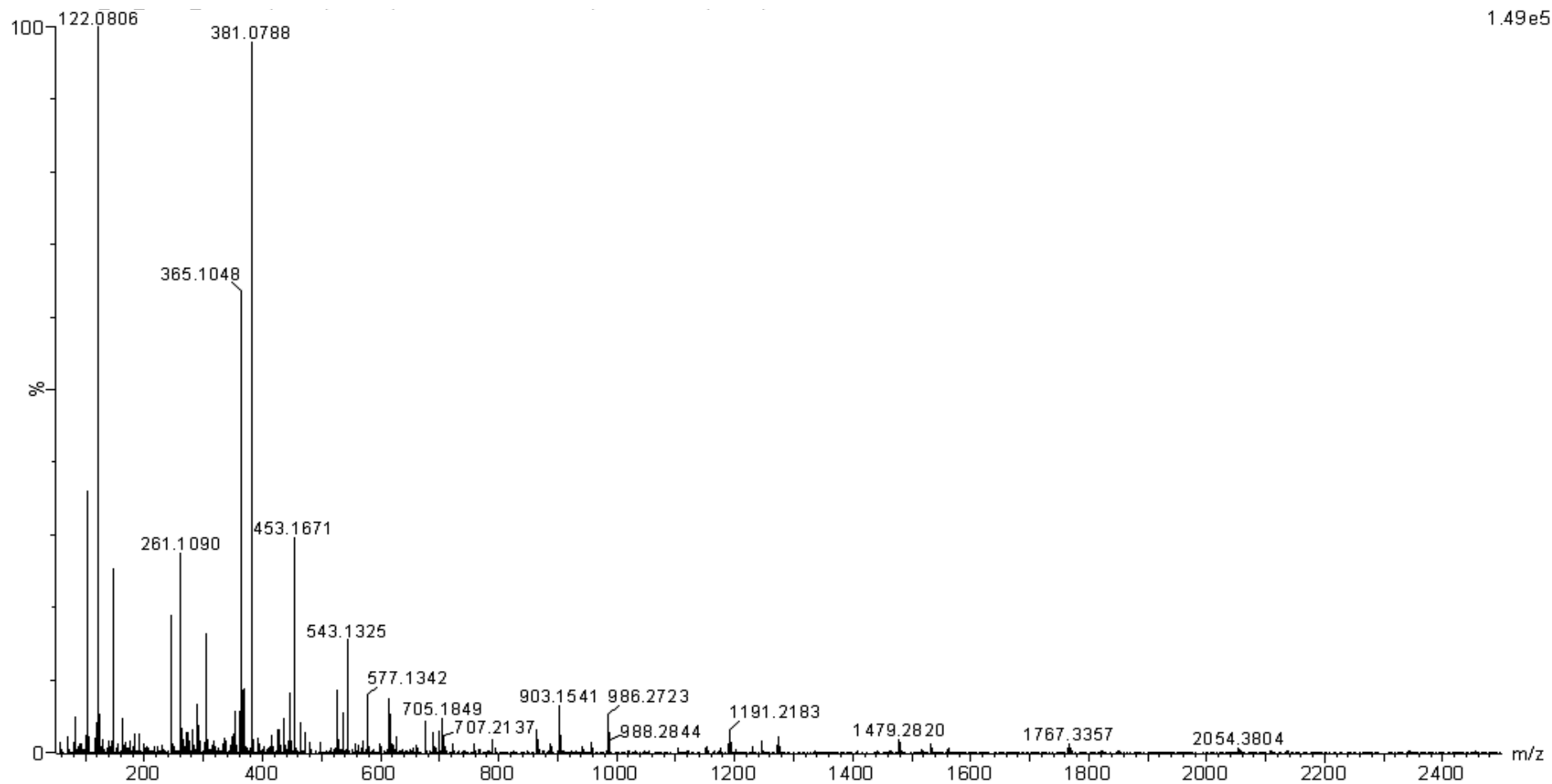


Fig. 16. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by *E.Coli* lysate in 60°C water bath (Substrate : Lysate = 100 : 1).

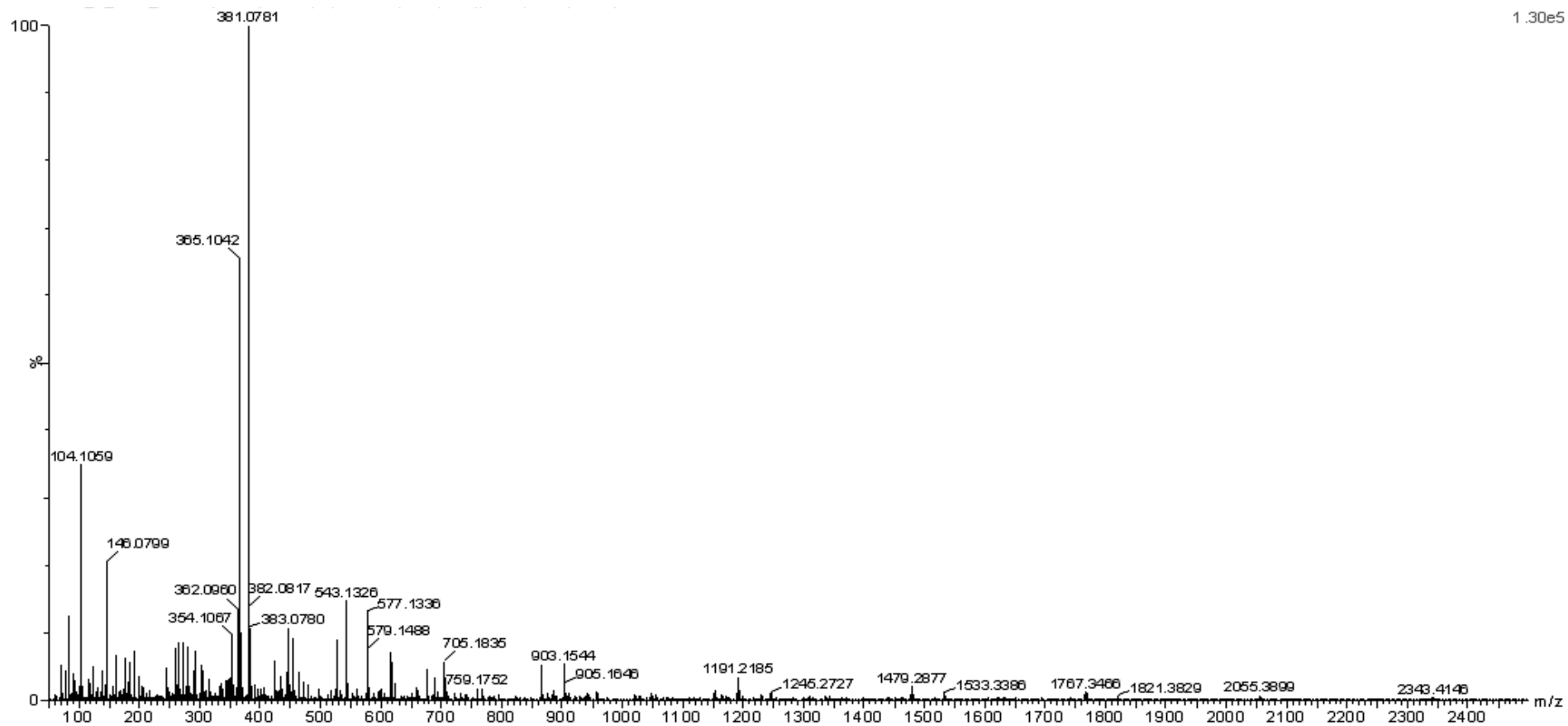


Fig. 17. ESI-MS profile of monomeric anthocyanin.

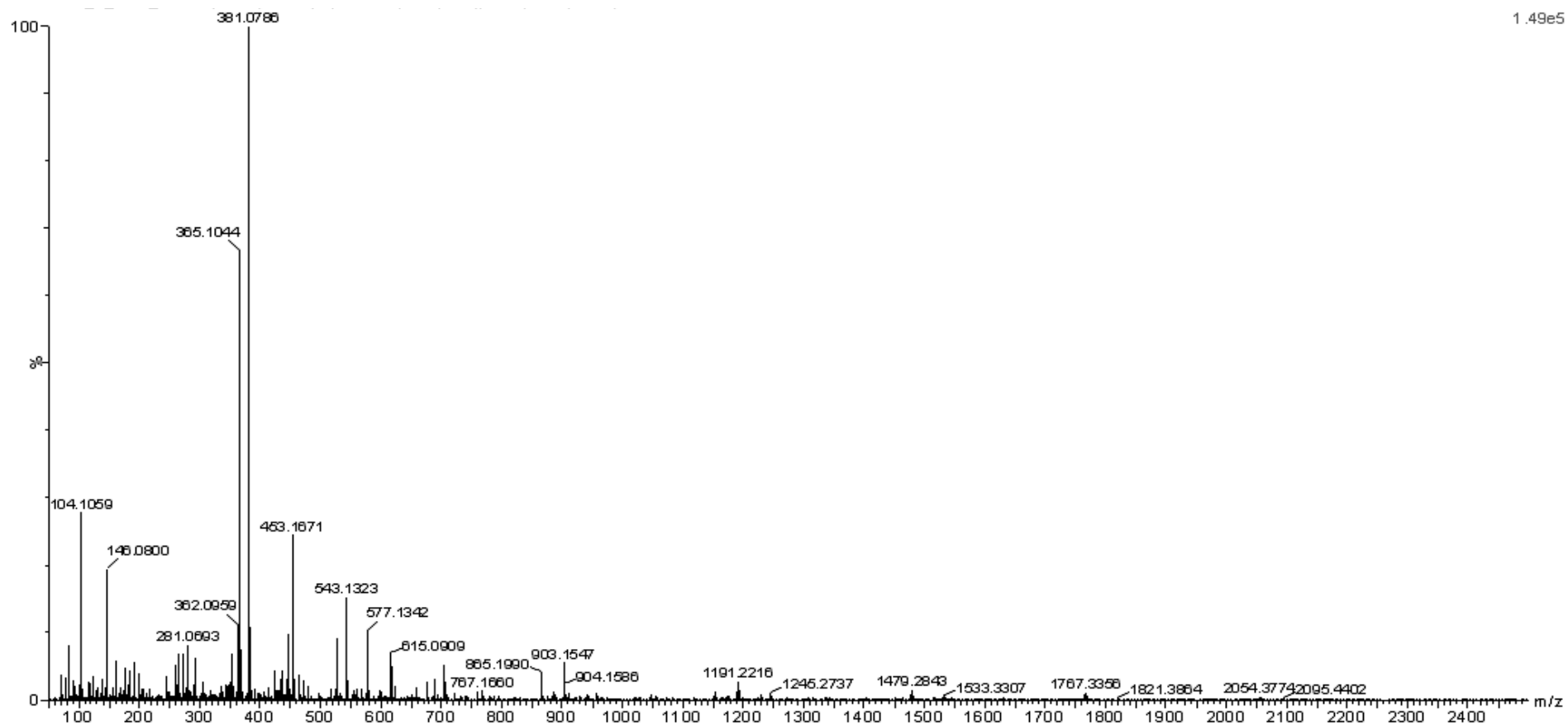


Fig. 18. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by AMG 300L (Substrate : Enzyme = 50 : 1, 25°C, 8 Hr).

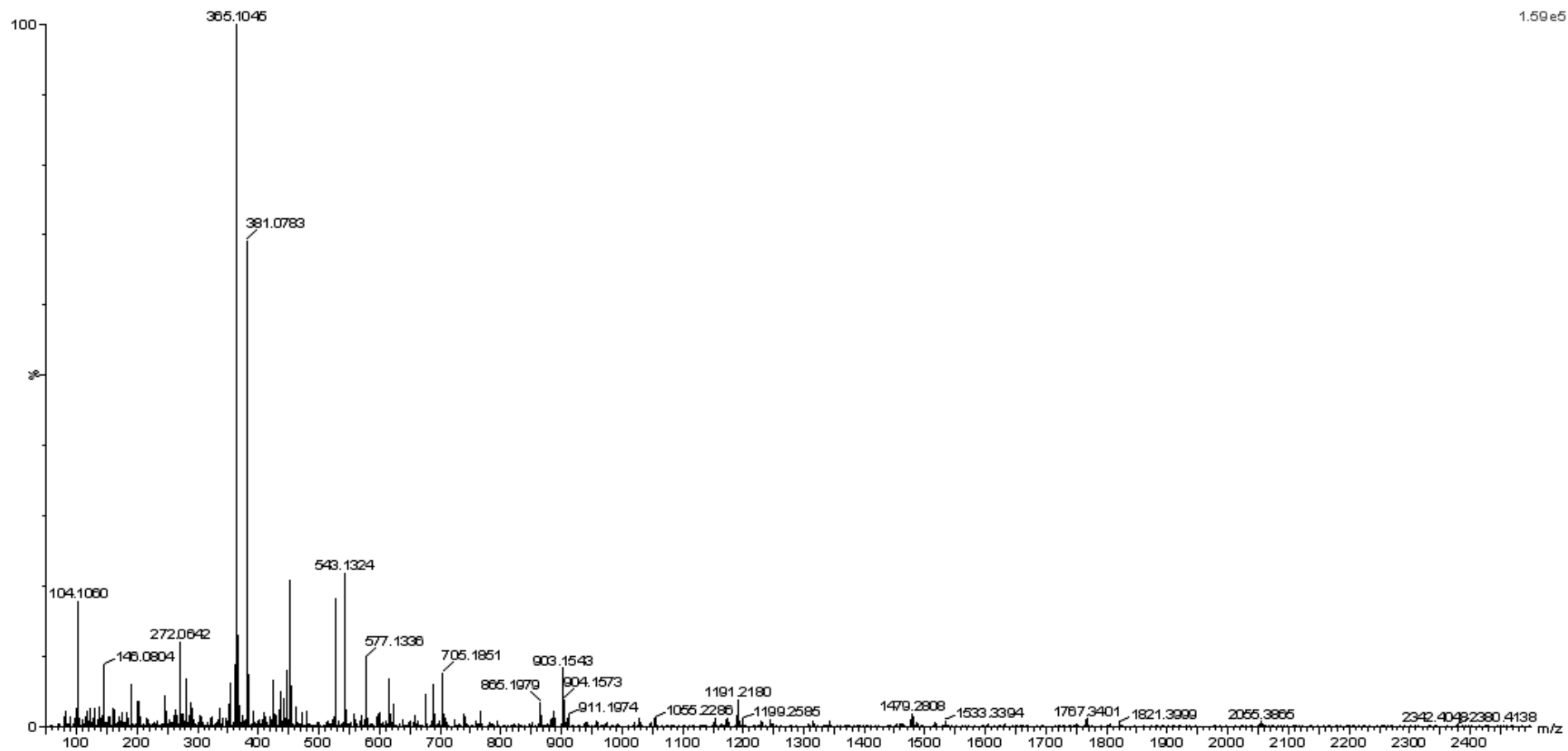


Fig. 19. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by Sumizyme AC (Substrate : Enzyme = 50 : 1, 25°C, 8 Hr).

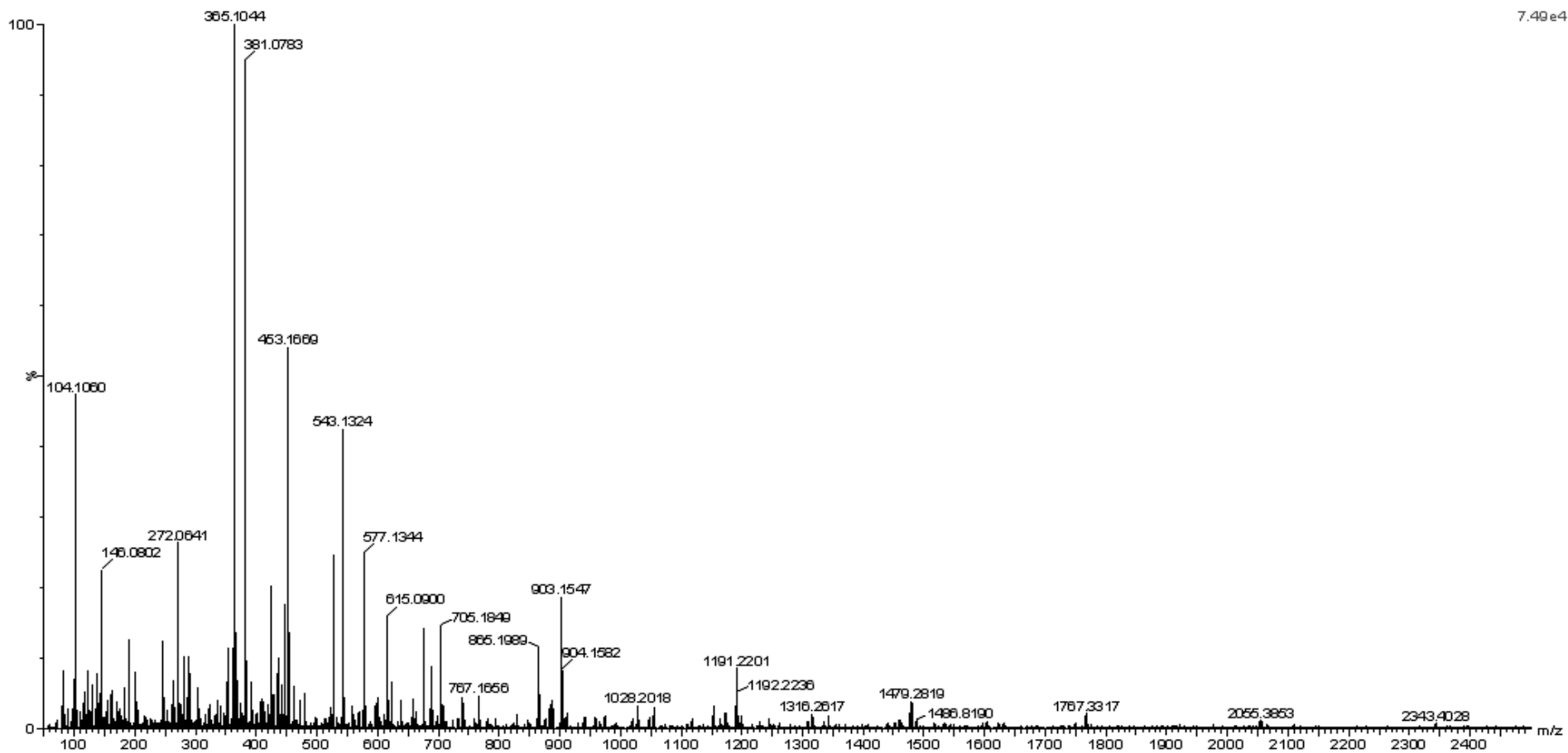


Fig. 20. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by Glucosidase (Substrate : Enzyme = 50 : 1, 25°C, 8 Hr).

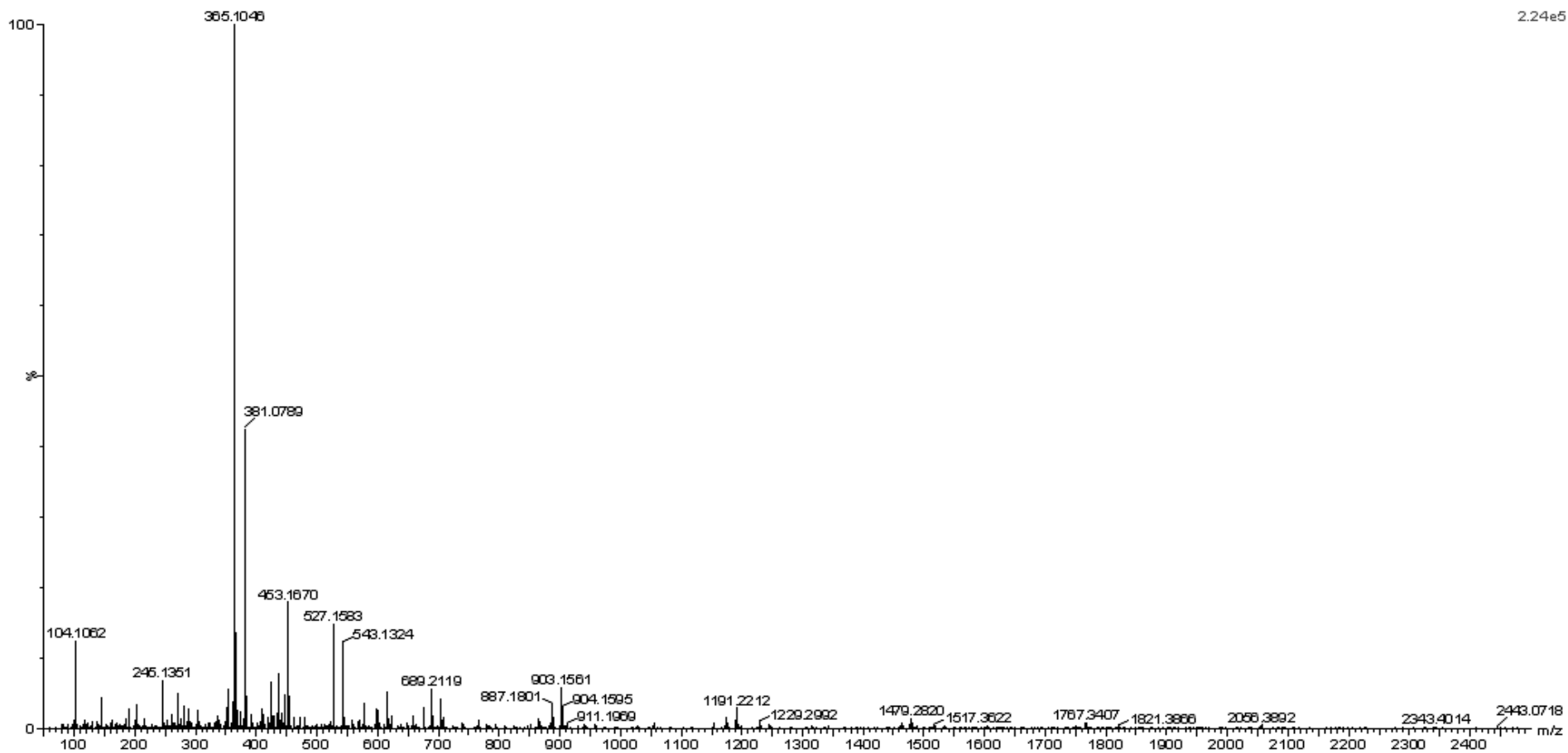


Fig. 21. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by Rohament CL (Substrate : Enzyme = 50 : 1, 25°C, 8 Hr).

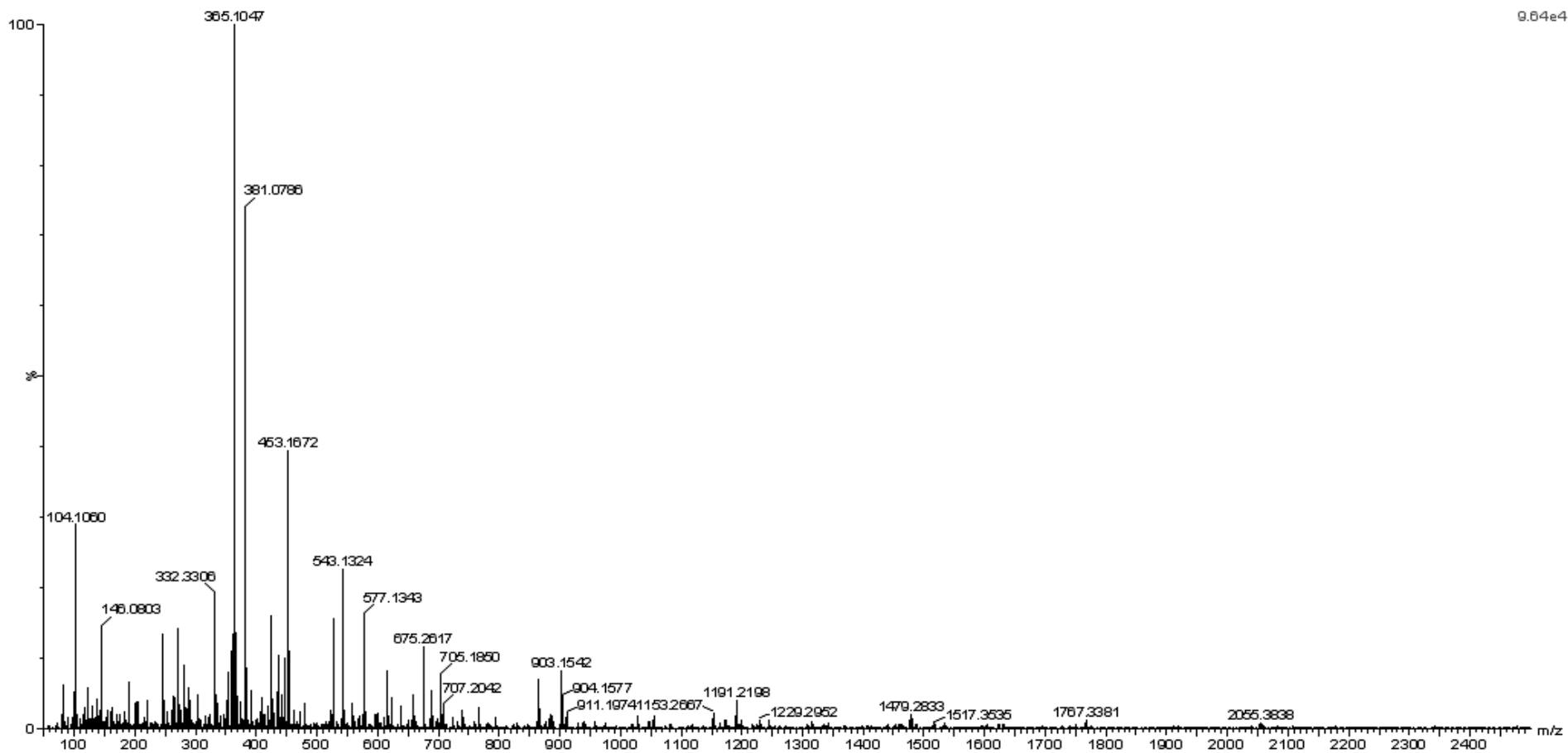


Fig. 22. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by Celluclaset 1.5 LFG (Substrate : Enzyme = 50 : 1, 25°C, 8 Hr).

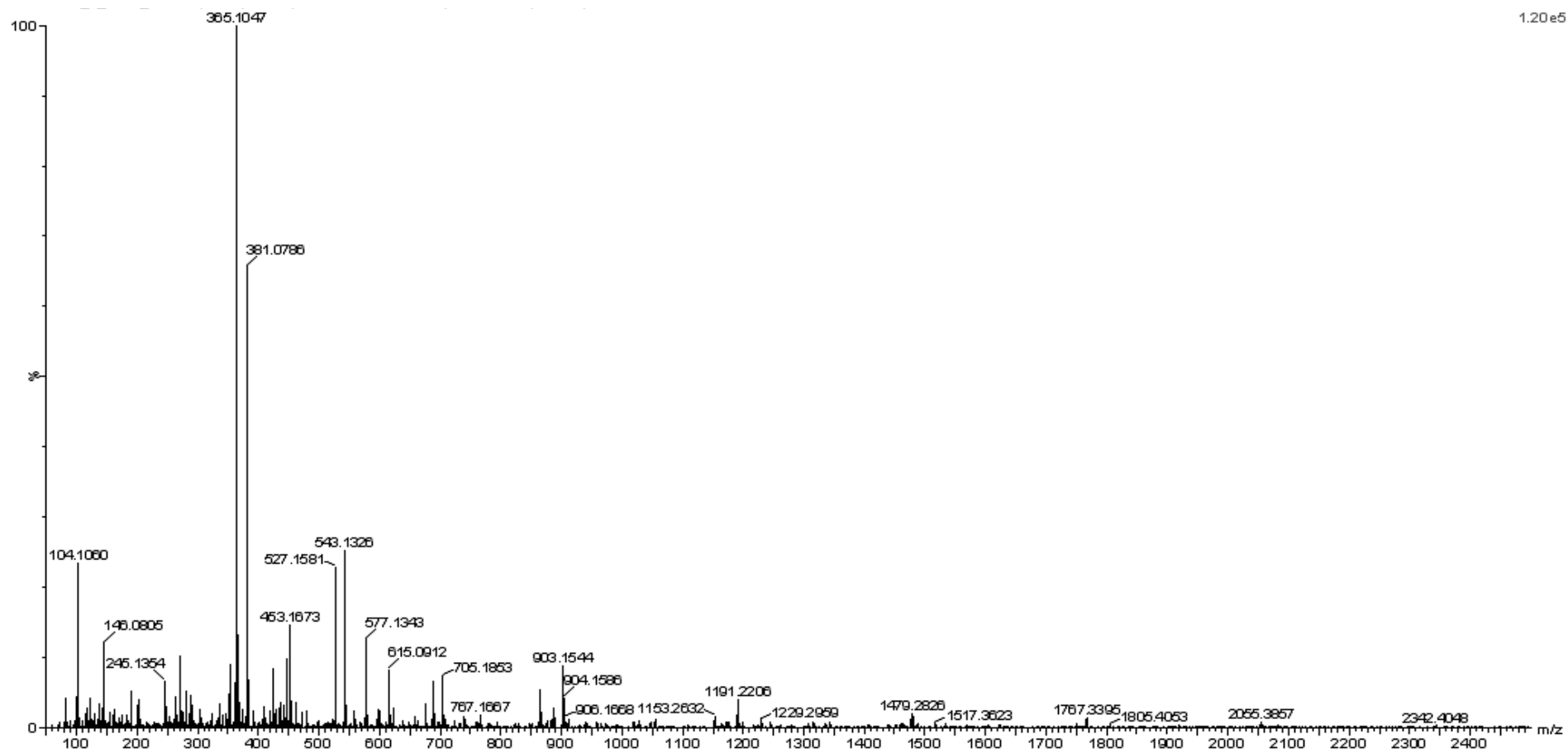


Fig. 23. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by Viscozyme L (Substrate : Enzyme = 50 : 1, 25°C, 8 Hr).

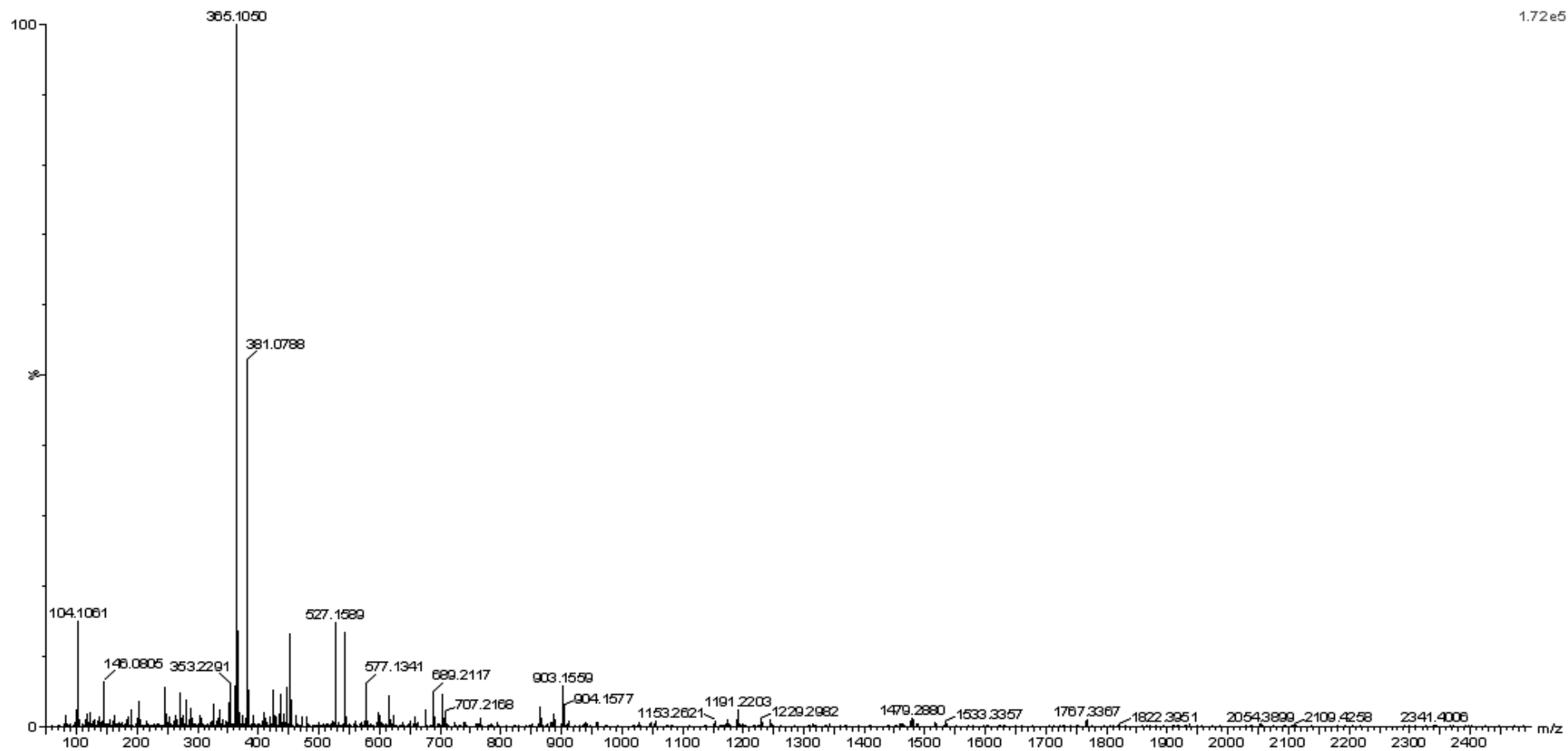


Fig. 24. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by BAN 480L (Substrate : Enzyme = 50 : 1, 25°C, 8 Hr).

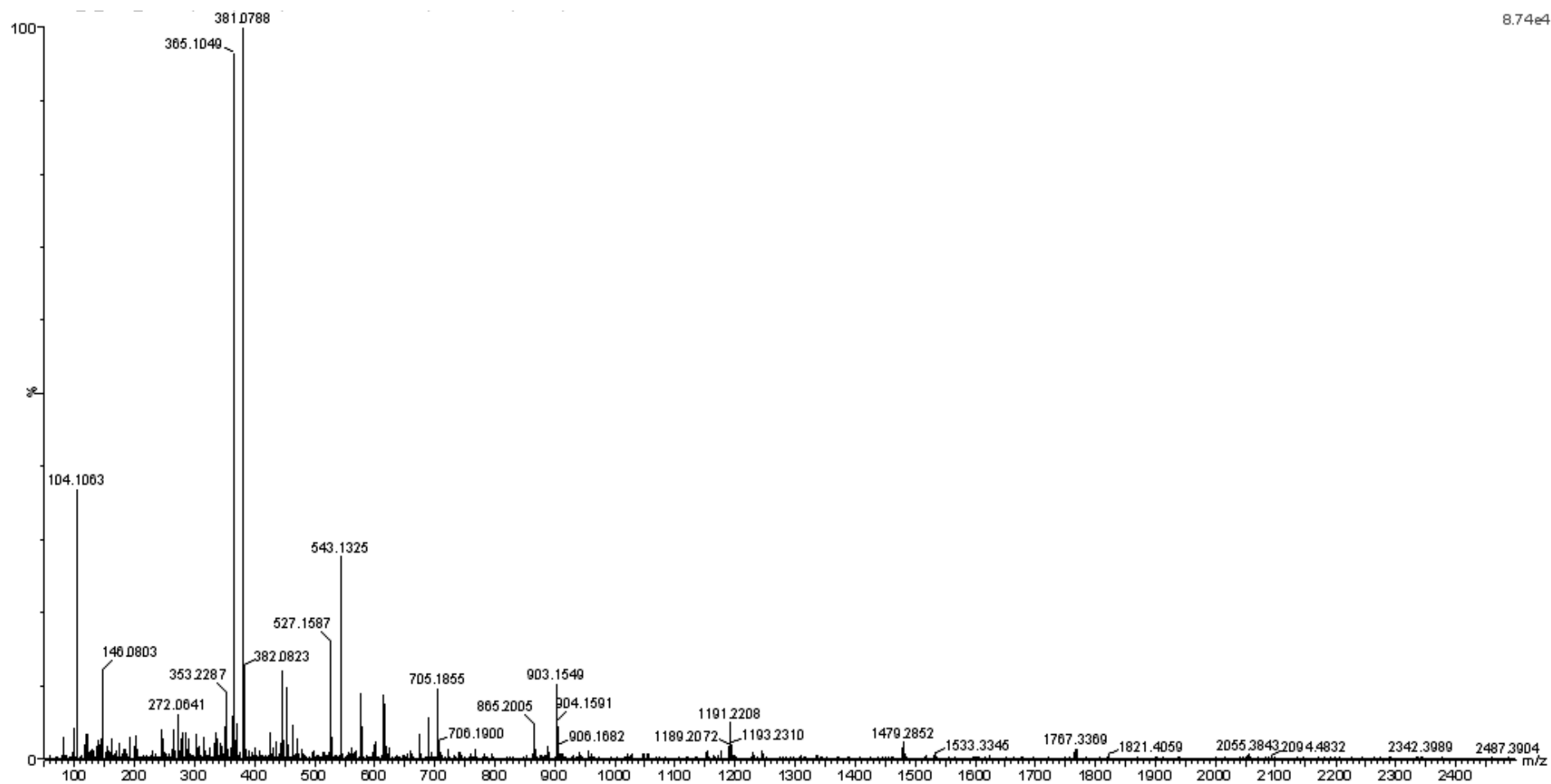


Fig. 25. ESI-MS profile of monomeric anthocyanin.

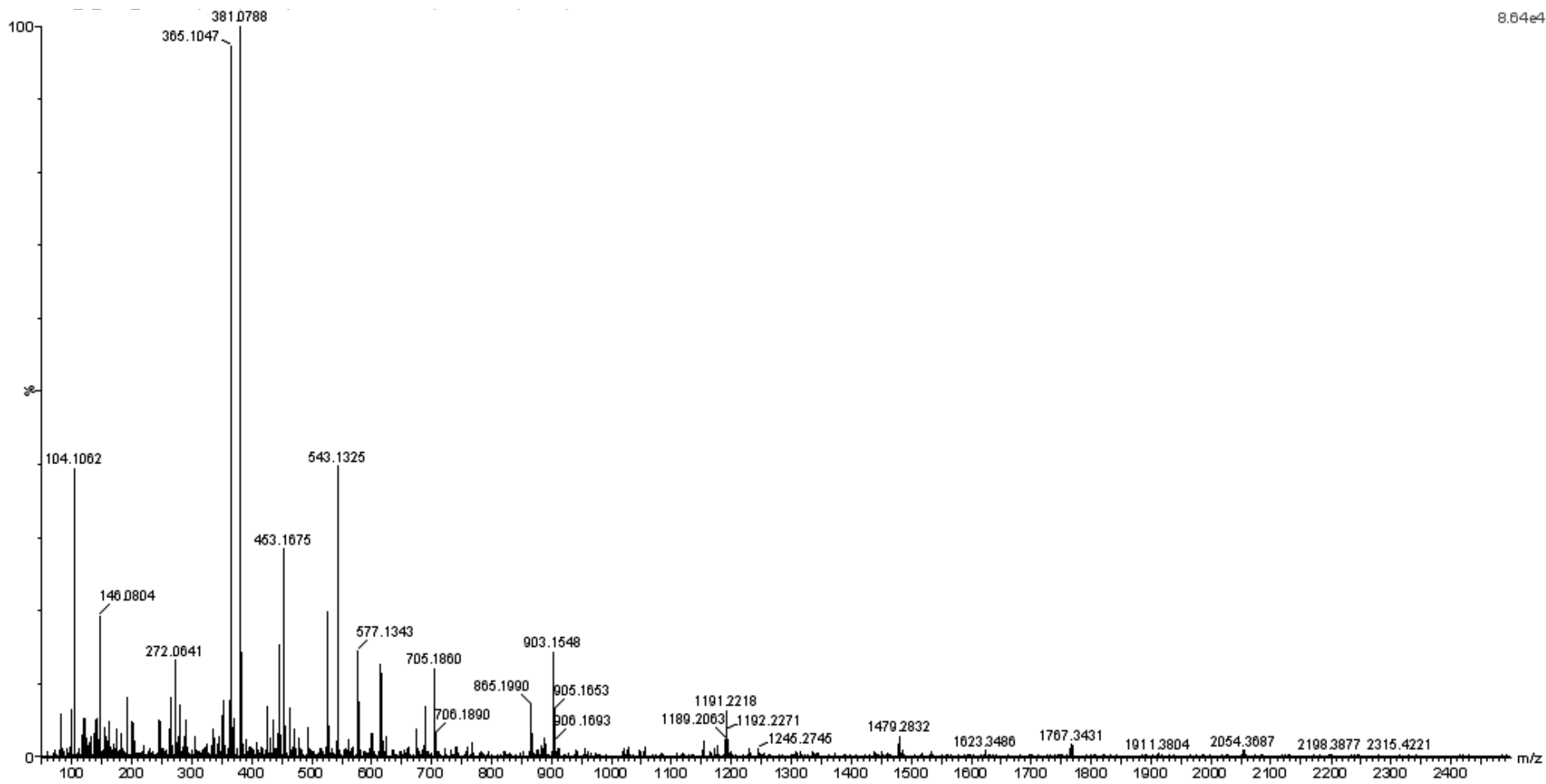


Fig. 26. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by AMG 300L (Substrate : lysate = 50 : 1, 25°C, 3 Day).

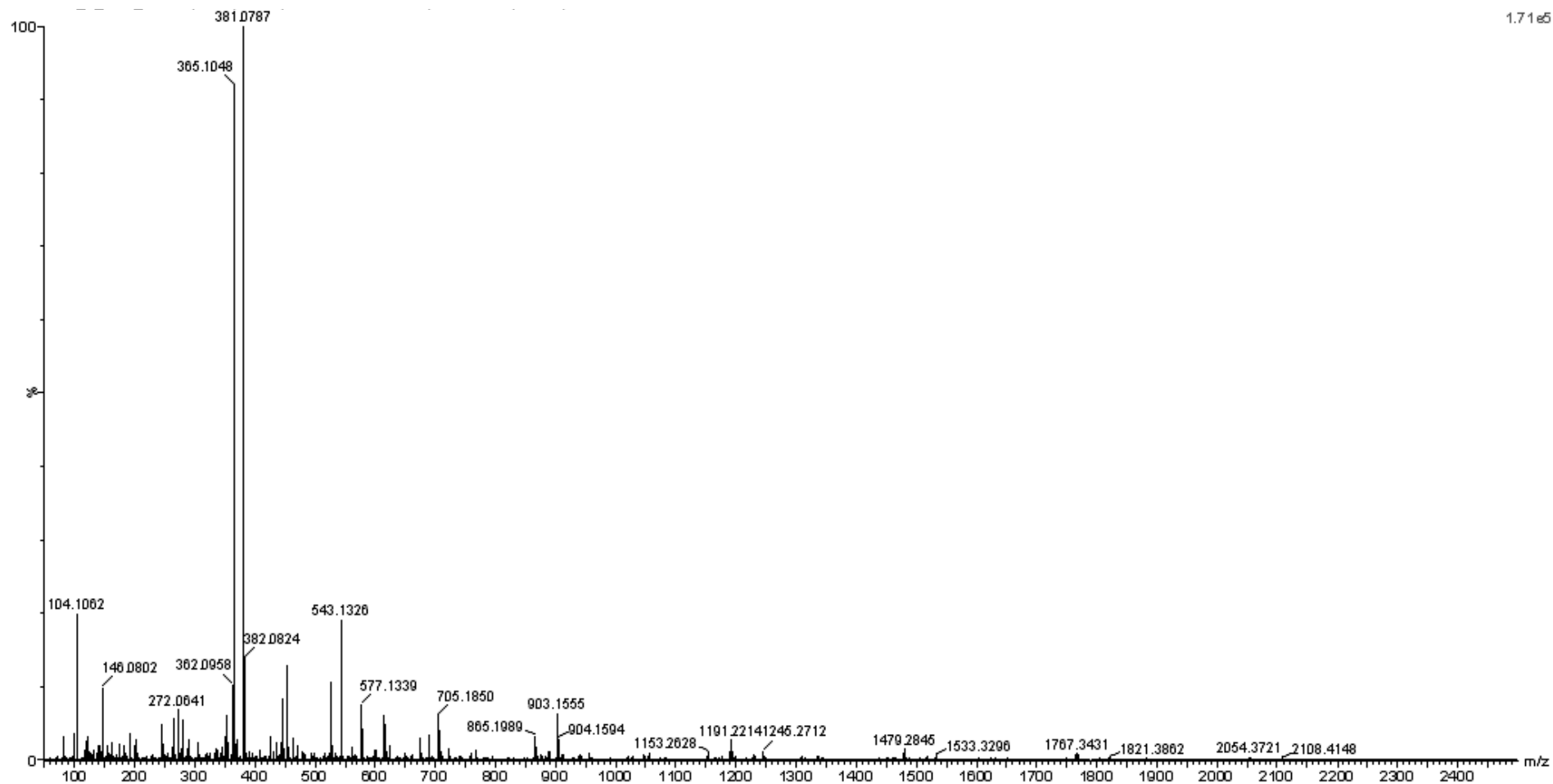


Fig. 27. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by Sumizyme AC (Substrate : lysate = 50 : 1, 25°C, 3 Day).

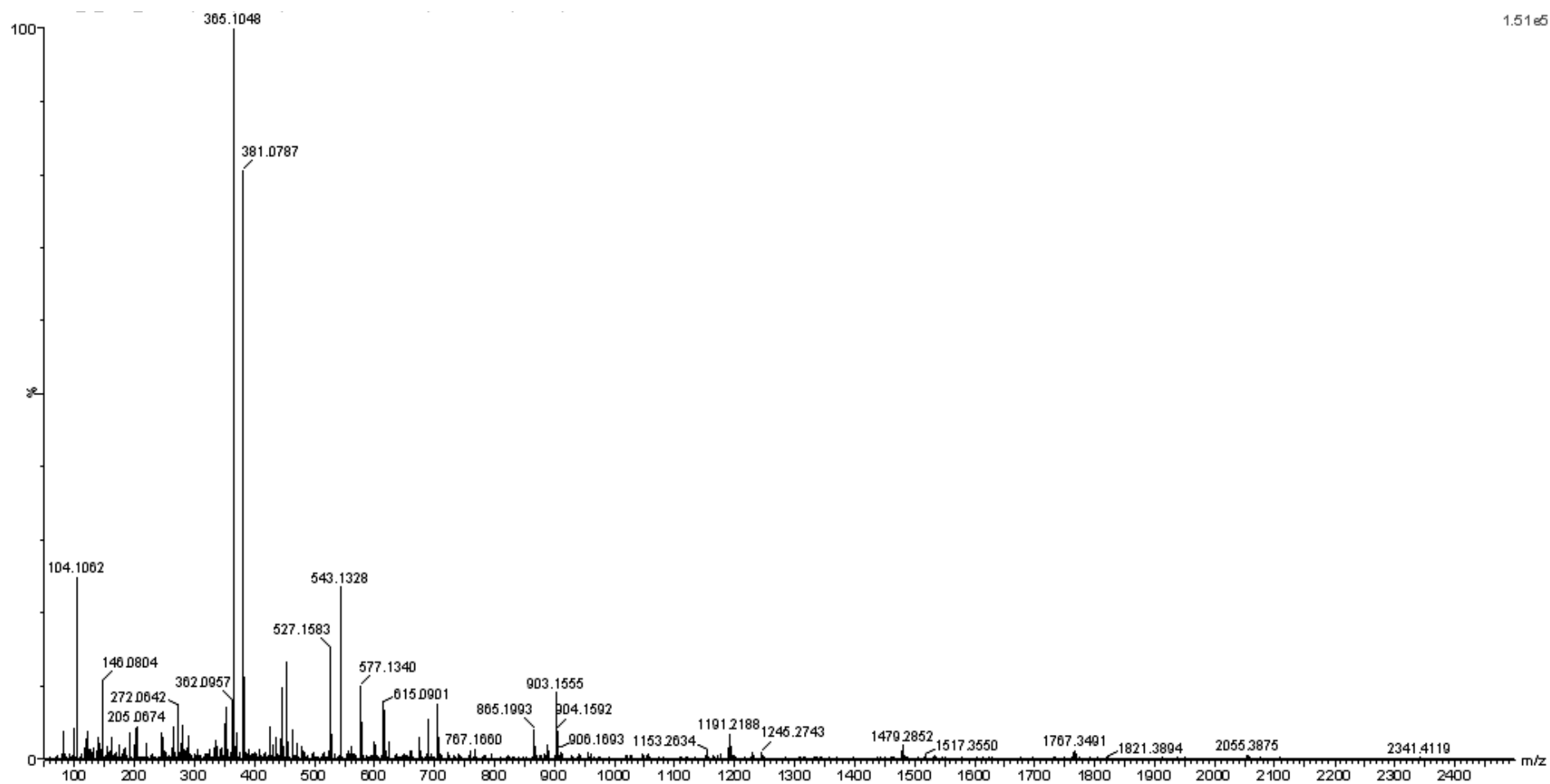


Fig. 28. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by Rohament CL (Substrate : lysate = 50 : 1, 25°C, 3 Day).

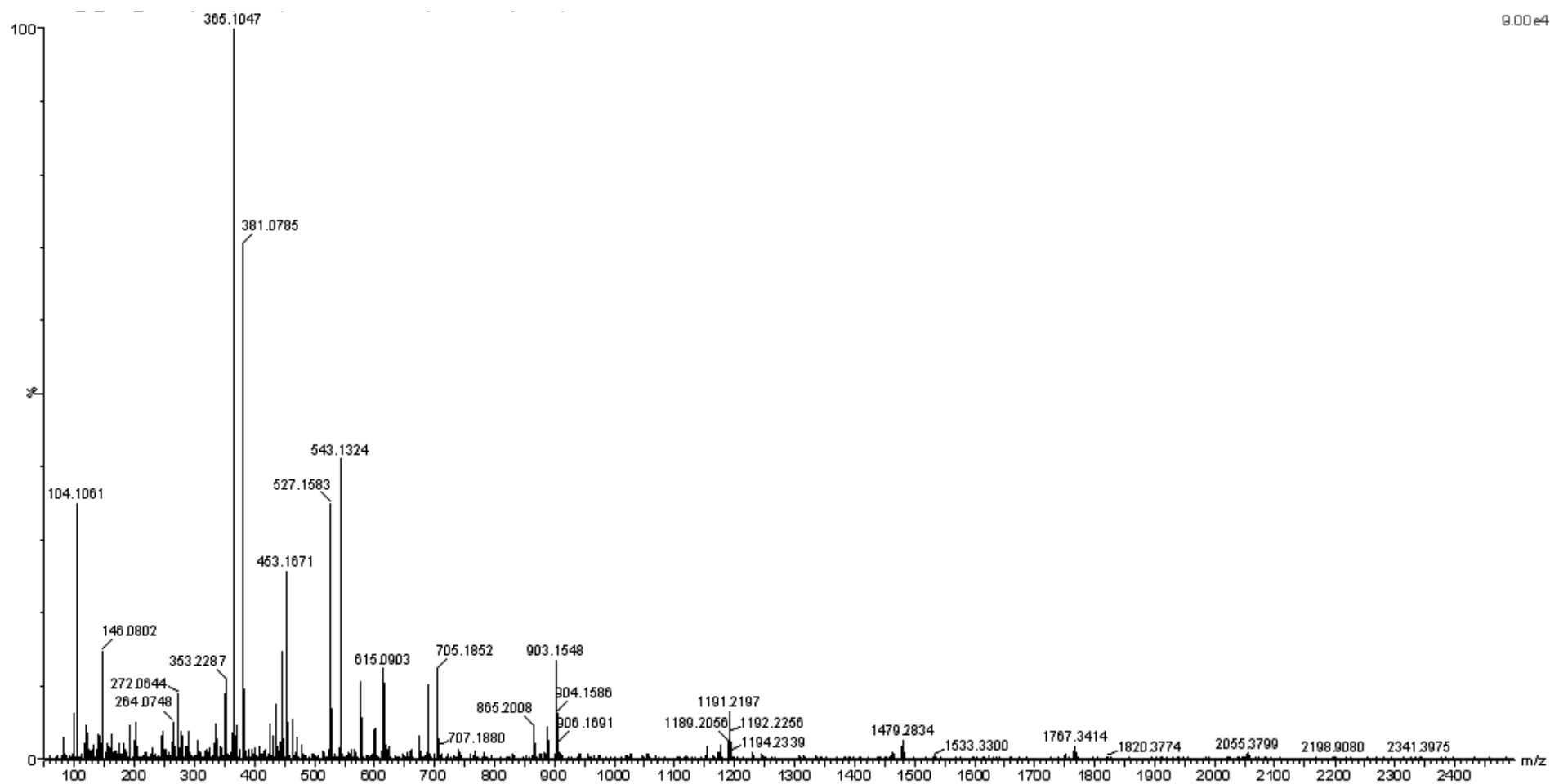


Fig. 29. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by Celluclaset 1.5 LFG (Substrate : lysate = 50 : 1, 25°C, 3 Day).

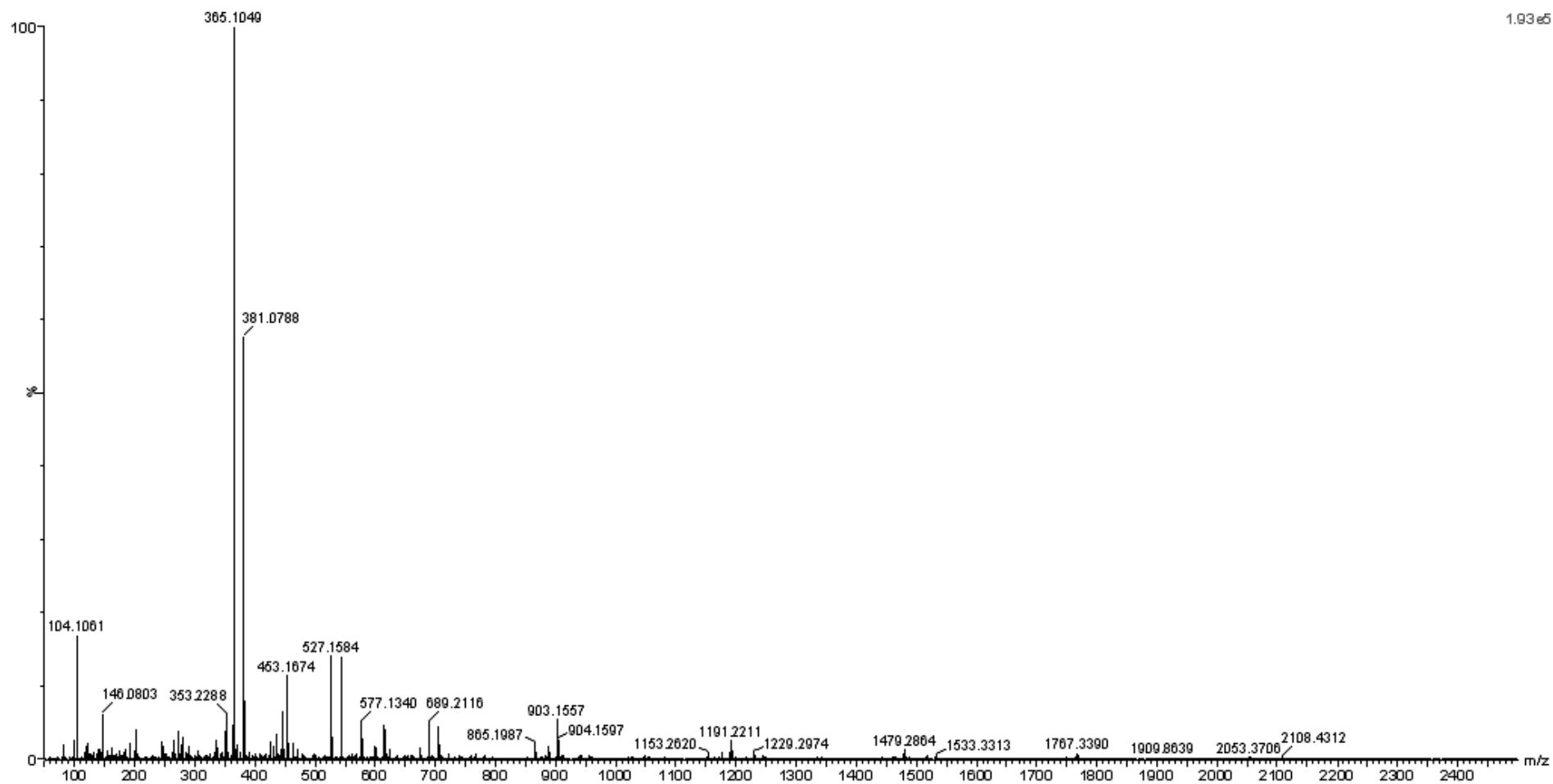


Fig. 30. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by Viscozyme L (Substrate : lysate = 50 : 1, 25°C, 3 Day).

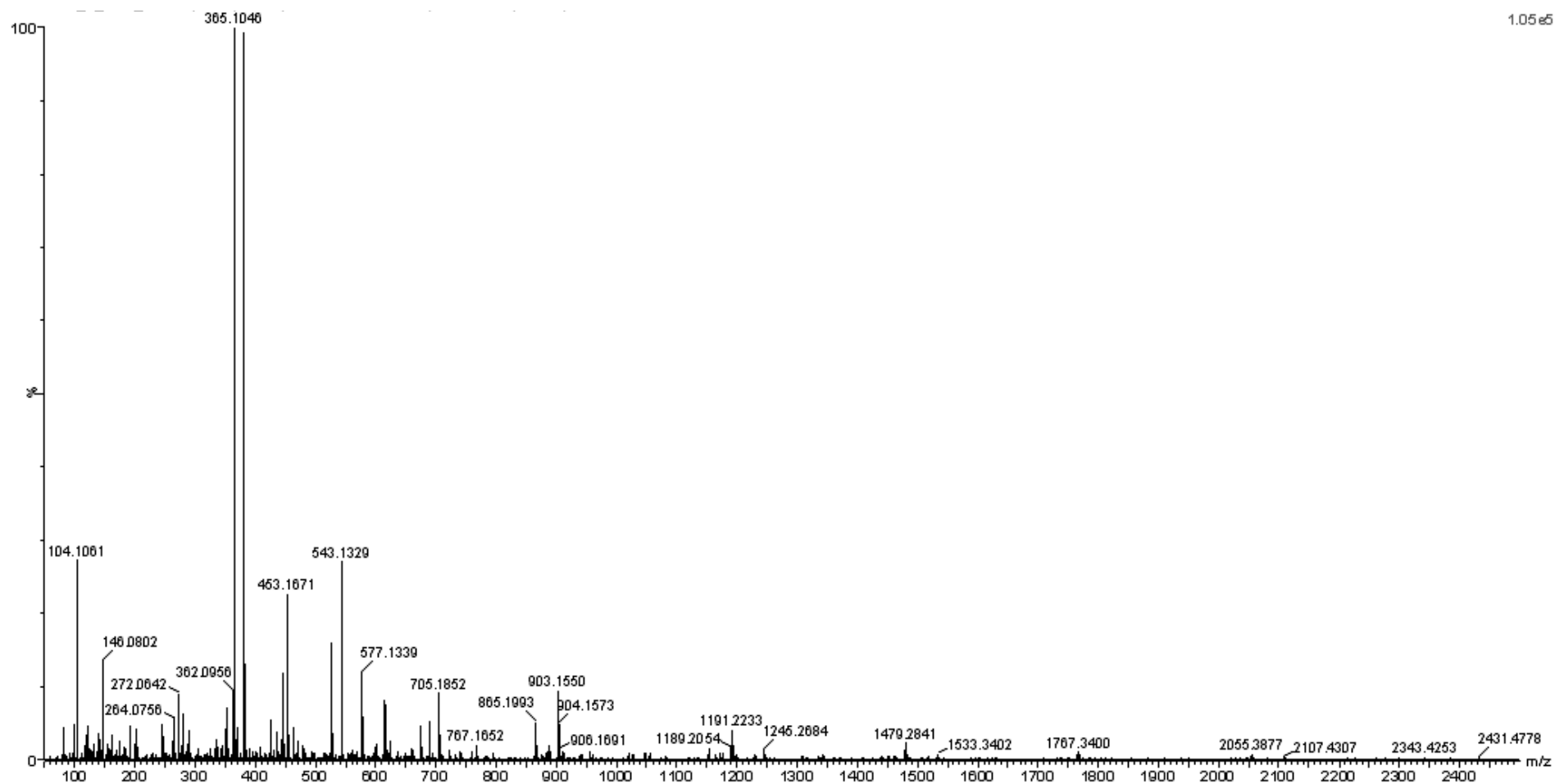
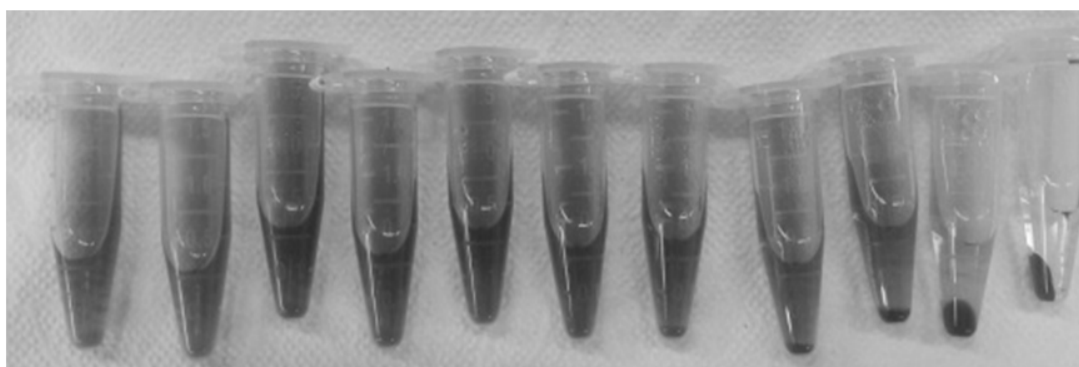


Fig. 31. ESI-MS profile of Polymerized oligomeric anthocyanin by BAN 480L (Substrate : lysate = 50 : 1, 25°C, 3 Day).

(A)



Acetonitrile (%)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MeOH (%)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0

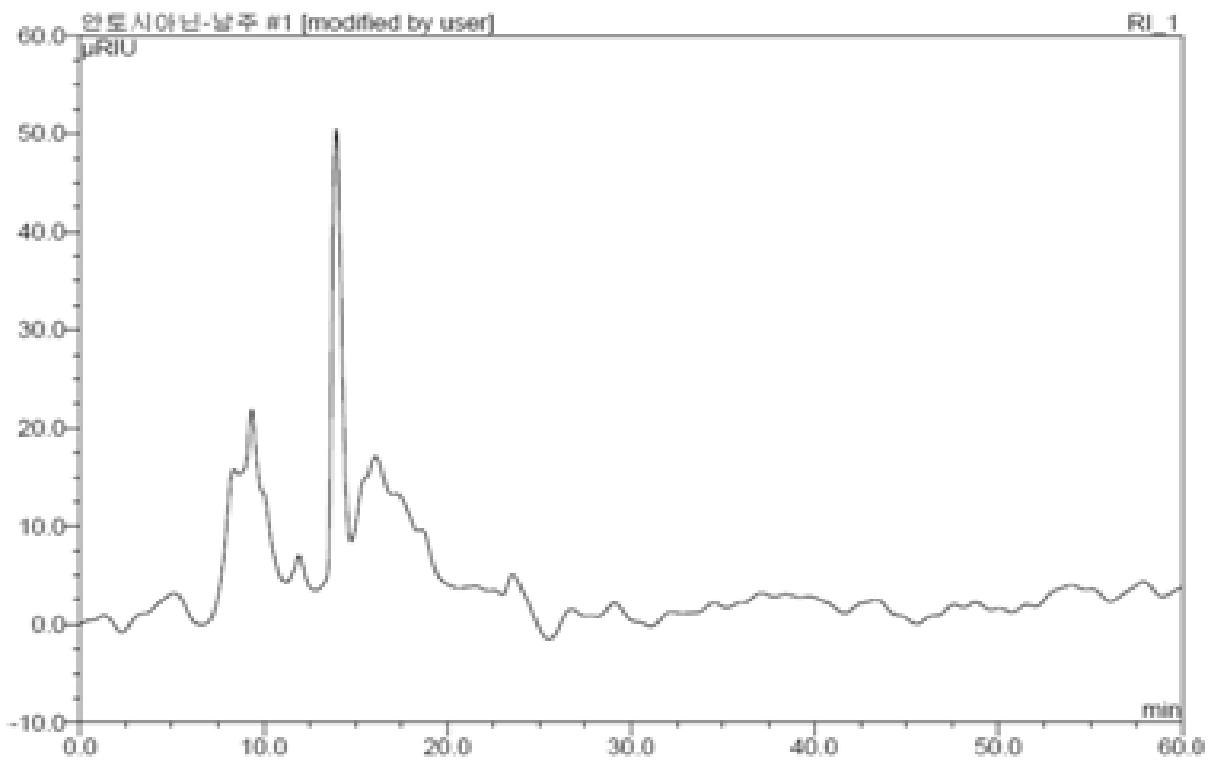
(B)



Acetonitrile (%)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
H ₂ O (%)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0

Fig. 32. The solubility of monomeric anthocyanins. (A) Acetonitrile and MeOH, (B) Acetonitrile and H₂O

(A)



(B)

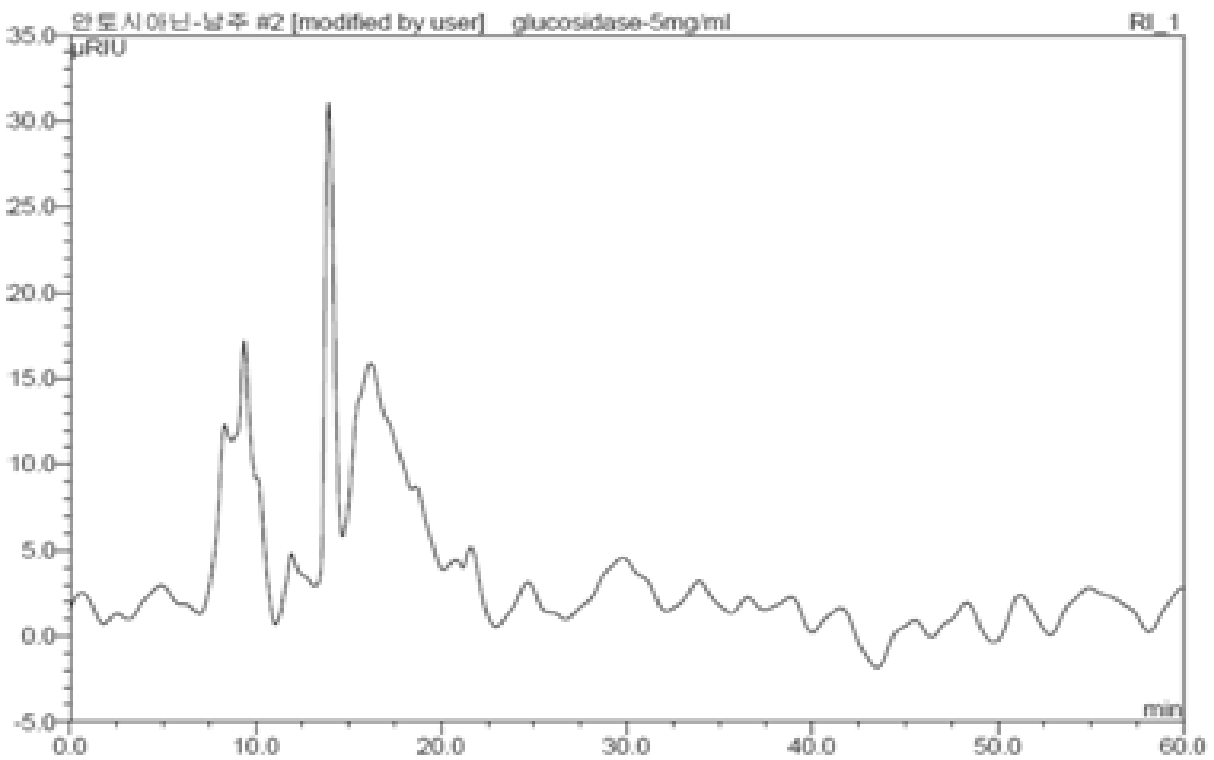
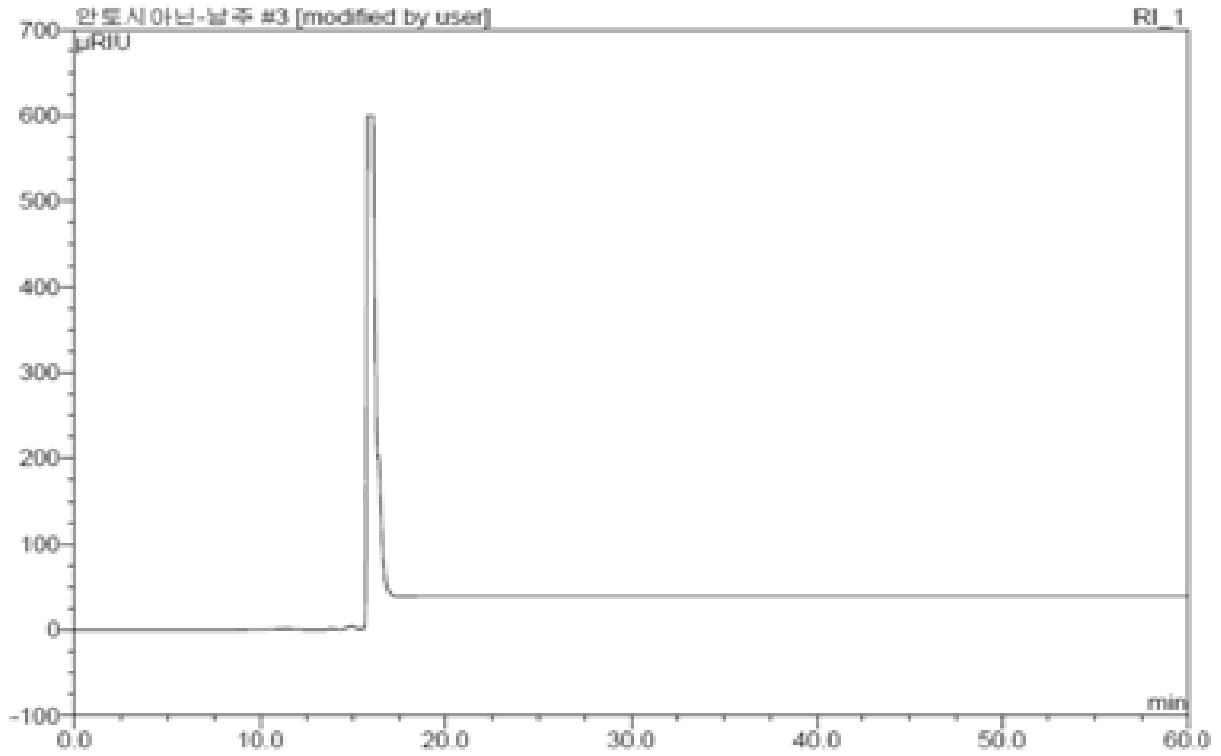


Fig. 33. HPLC signal used Develosil™ 100 Diol-5 (4.6 X 250 mm) column and RI detector. (A) monomeric anthocyanin, (B) oligomeric anthocyanin.

(A)



(B)

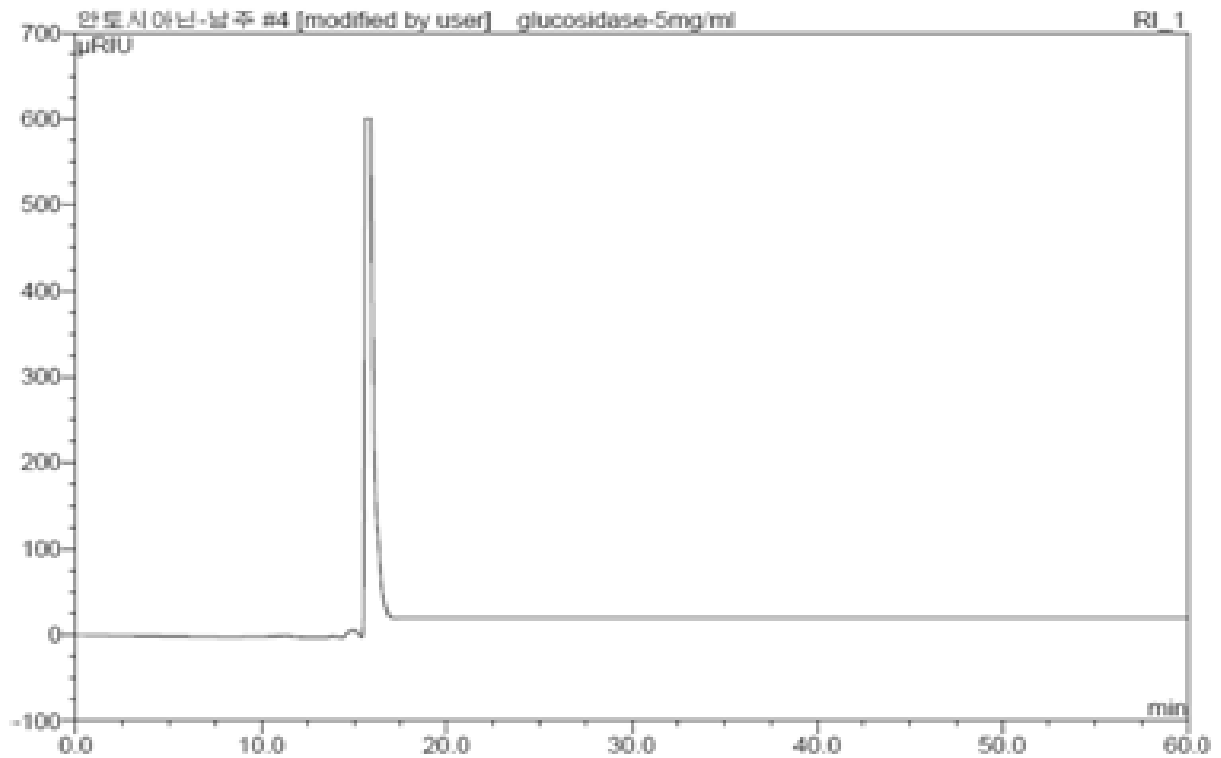
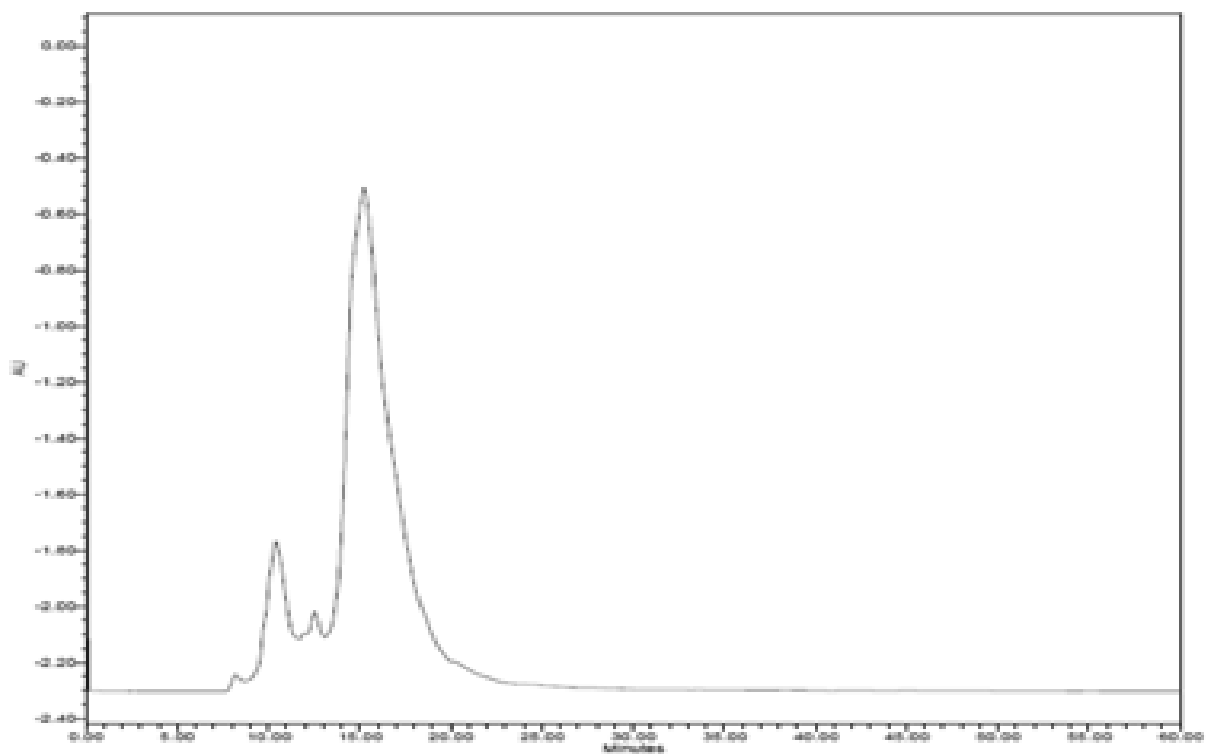


Fig. 34. HPLC signal used Acclaim™ PolarAdvantage II (5 μ m, 4.6 X 250 mm) column and RI detector. (A) monomeric anthocyanin, (B) oligomeric anthocyanin.

(A)



(B)

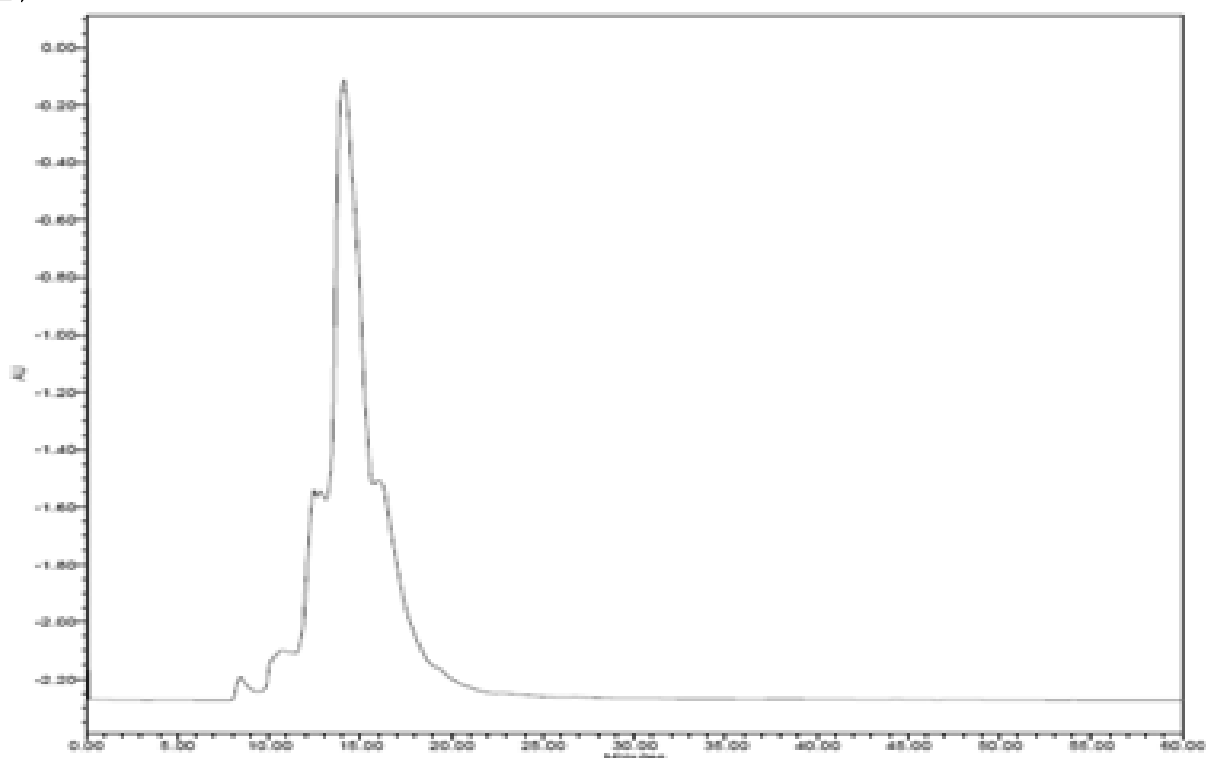
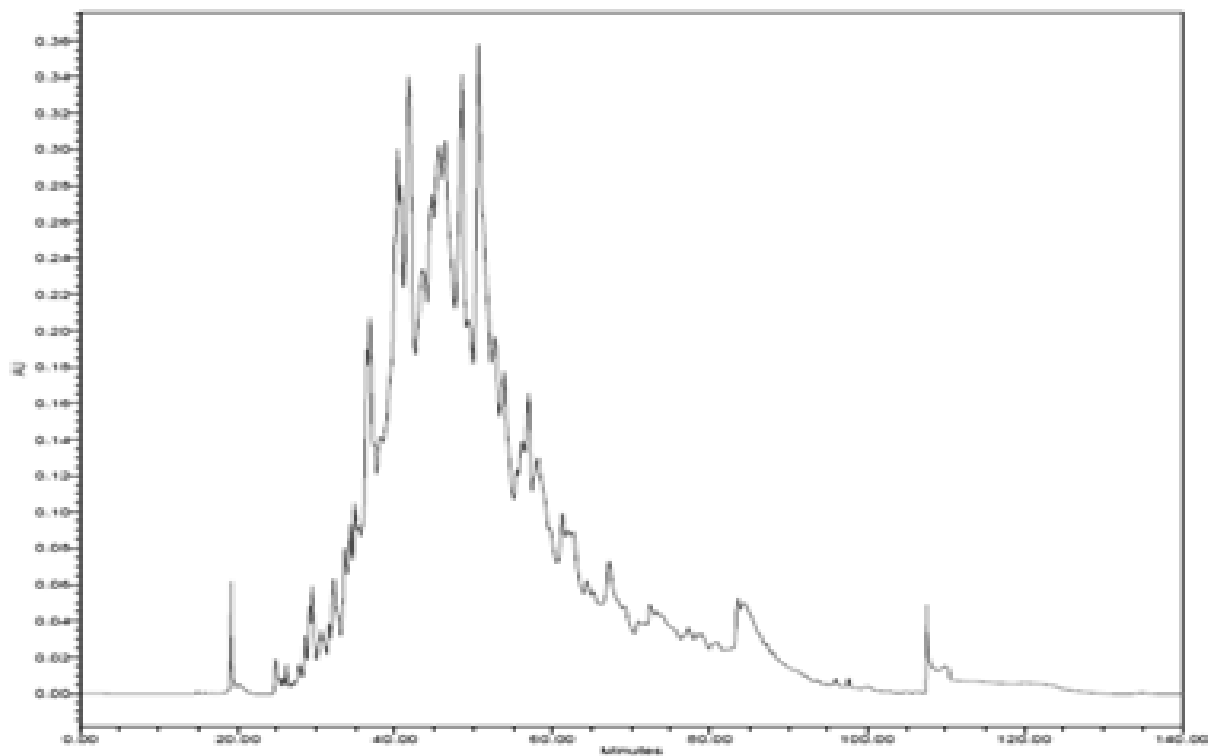


Fig. 35. HPLC signal used Develosil™ 100 Diol-5 (4.6 X 250 mm) column and UV detector. (A) monomeric anthocyanin, (B) oligomeric anthocyanin.

(A)



(B)

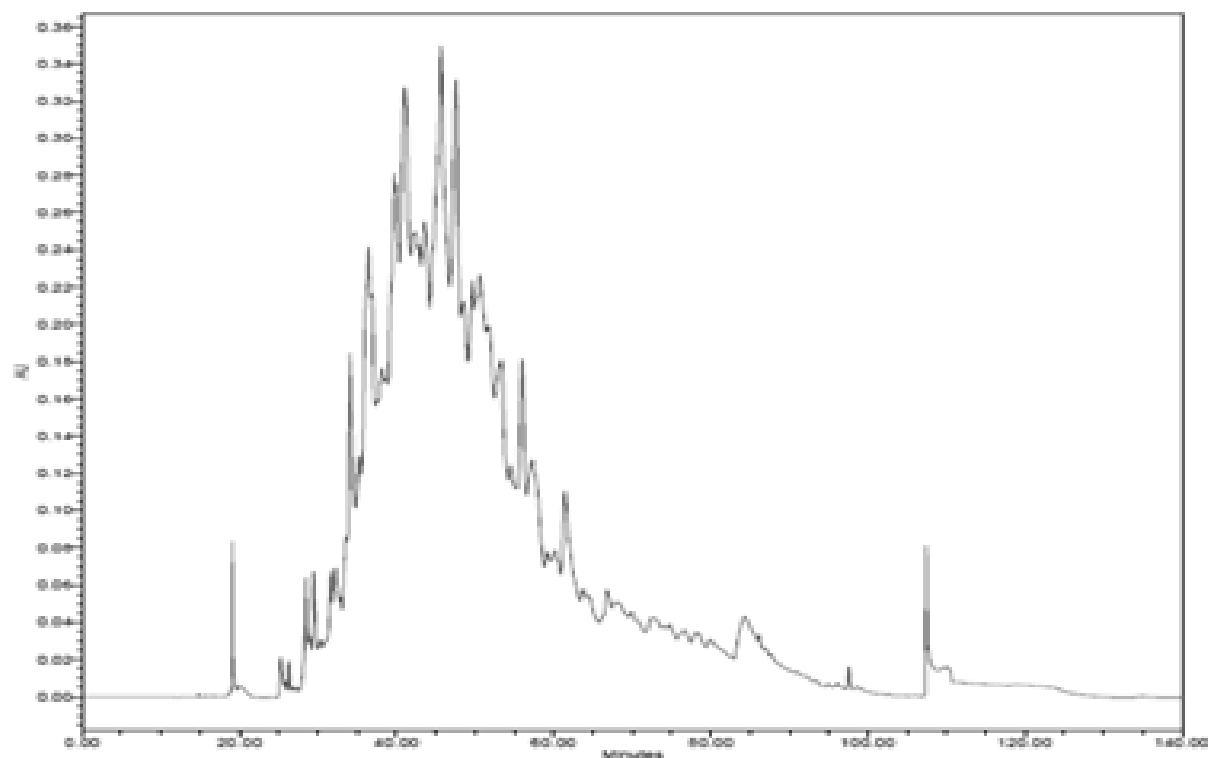
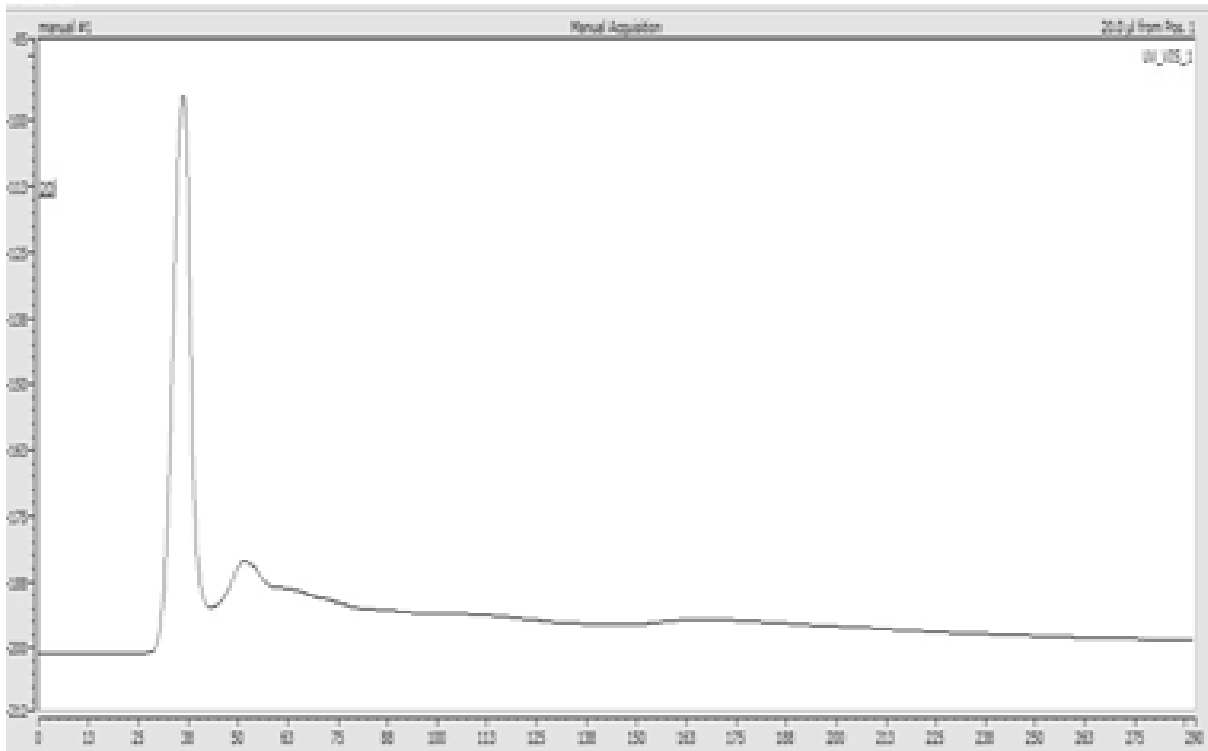


Fig. 36. HPLC signal used Acclaim™ PolarAdvantage II (5 μ m, 4.6 X 250 mm) column and UV detector. (A) monomeric anthocyanin, (B) oligomeric anthocyanin.

(A)



(B)

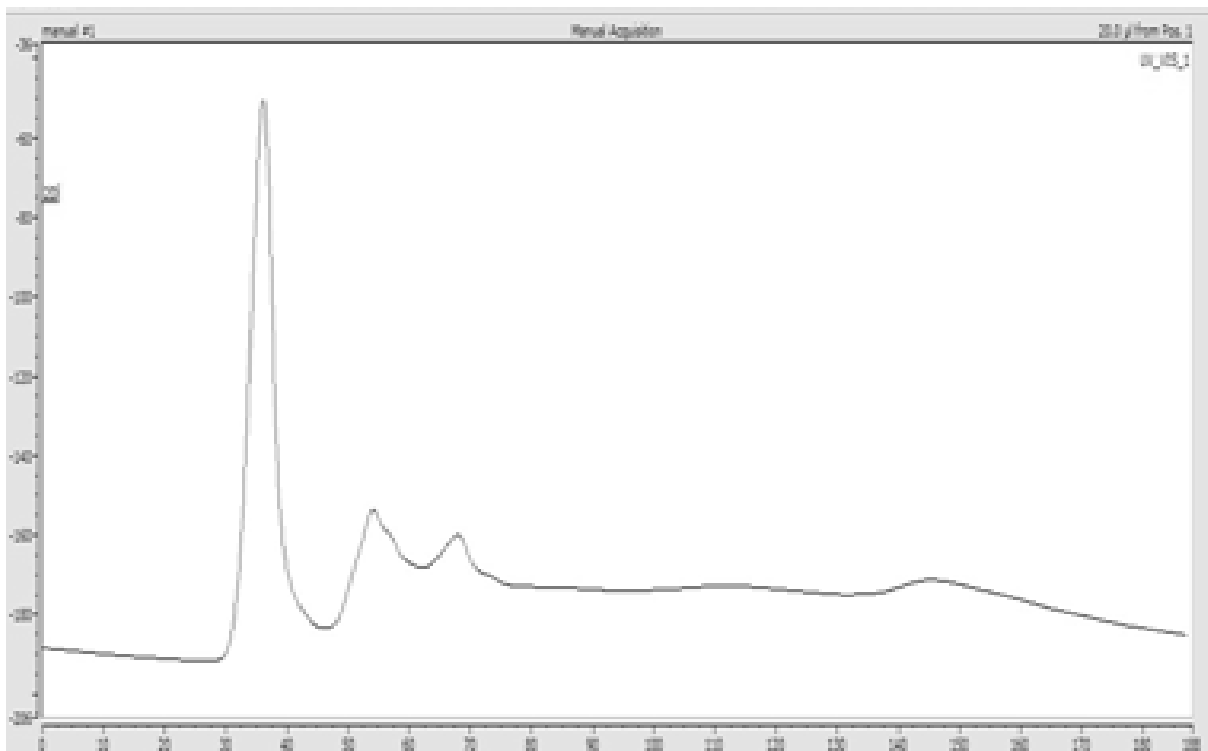
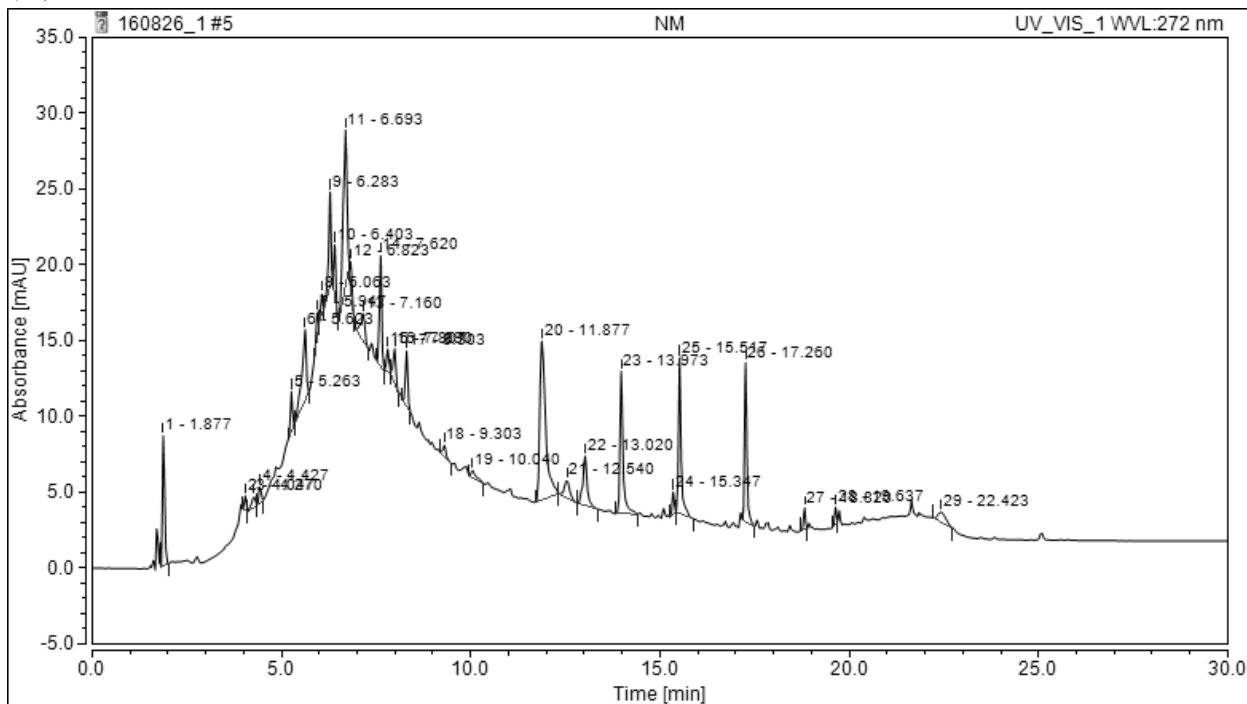


Fig. 37. HPLC signal used Shodex OHpak SB-802 HQ column and UV detector. (A) monomeric anthocyanin, (B) oligomeric anthocyanin.

(A)



(B)

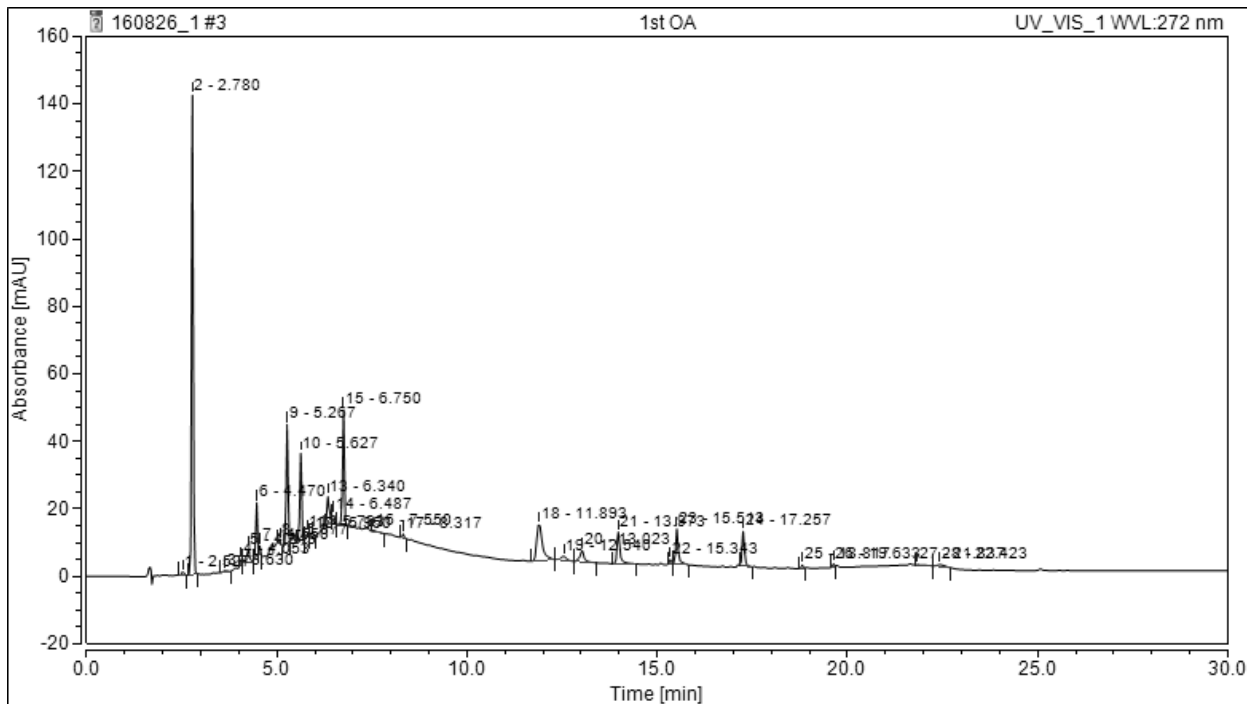


Fig. 38. HPLC profiles used Acclaim™ PolarAdvantage II column and UV detector. (A) monomeric anthocyanin, (B) oligomeric anthocyanin.

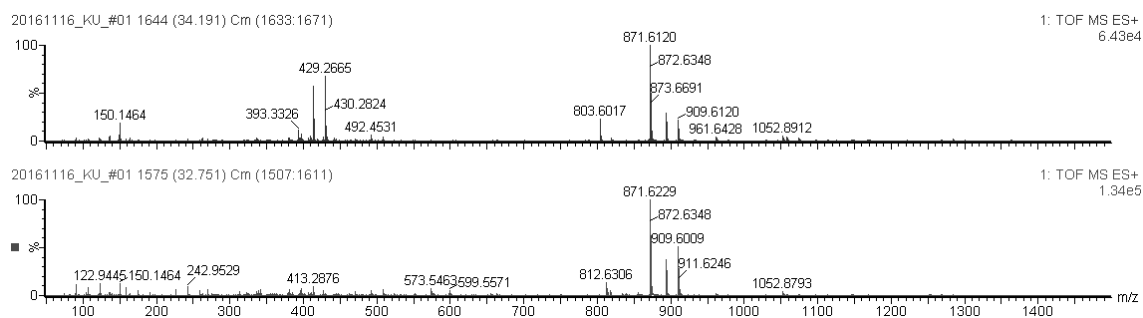


Fig. 39. LC-MS profiles of 2.7 min peak in oligomeric anthocyanin

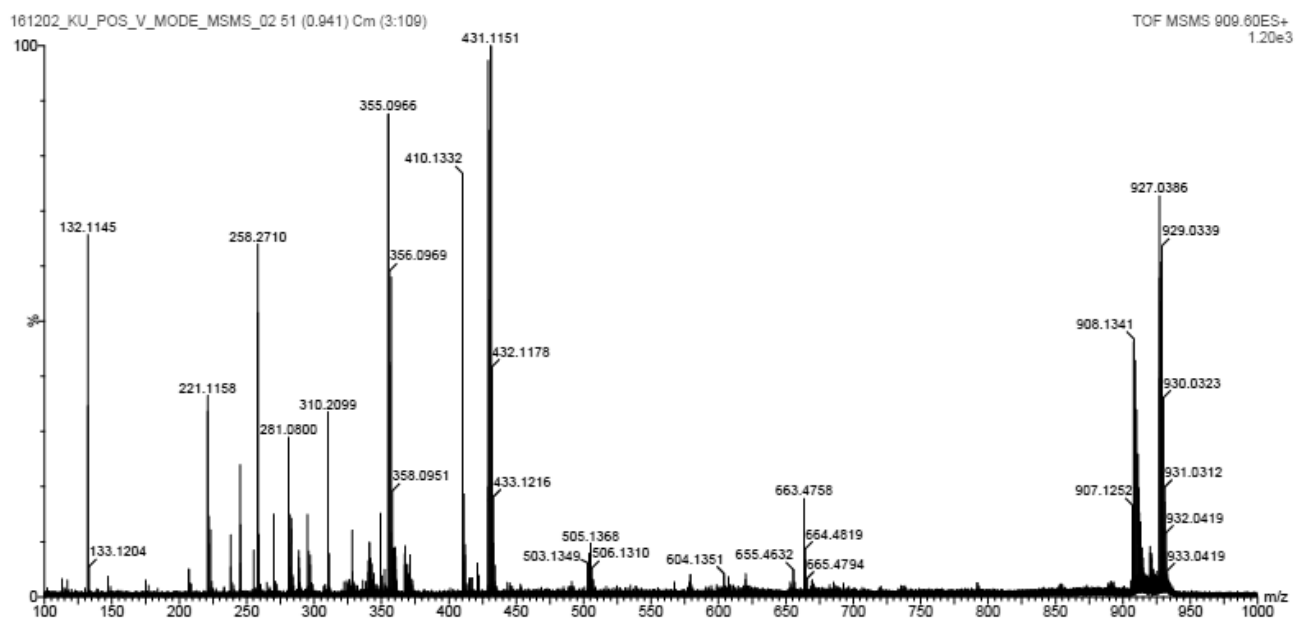
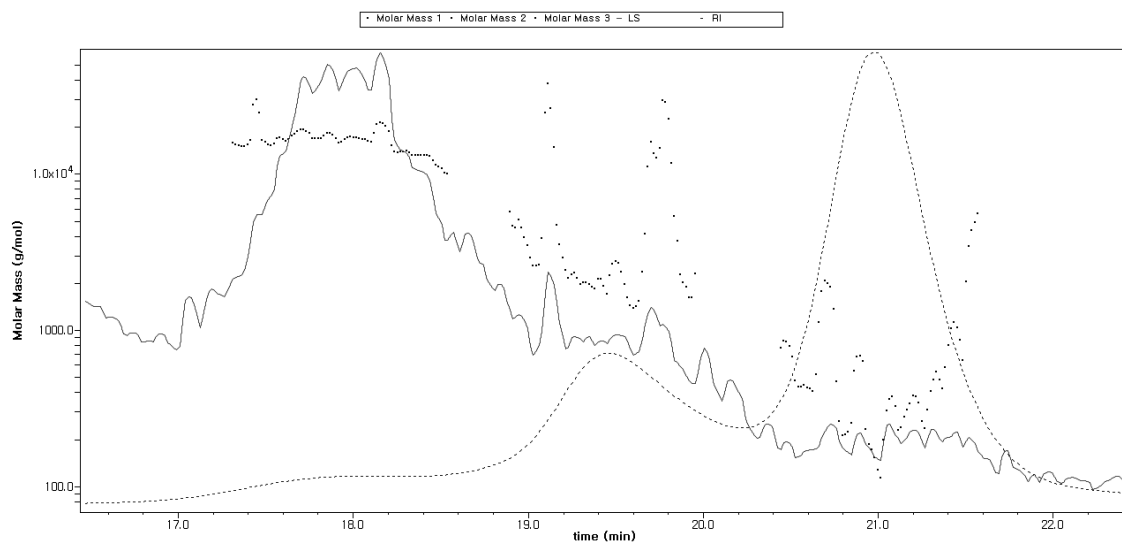


Fig. 40. ESI-MS profiles of 909.6 m/z peak in oligomeric anthocyanin

(A)



(B)

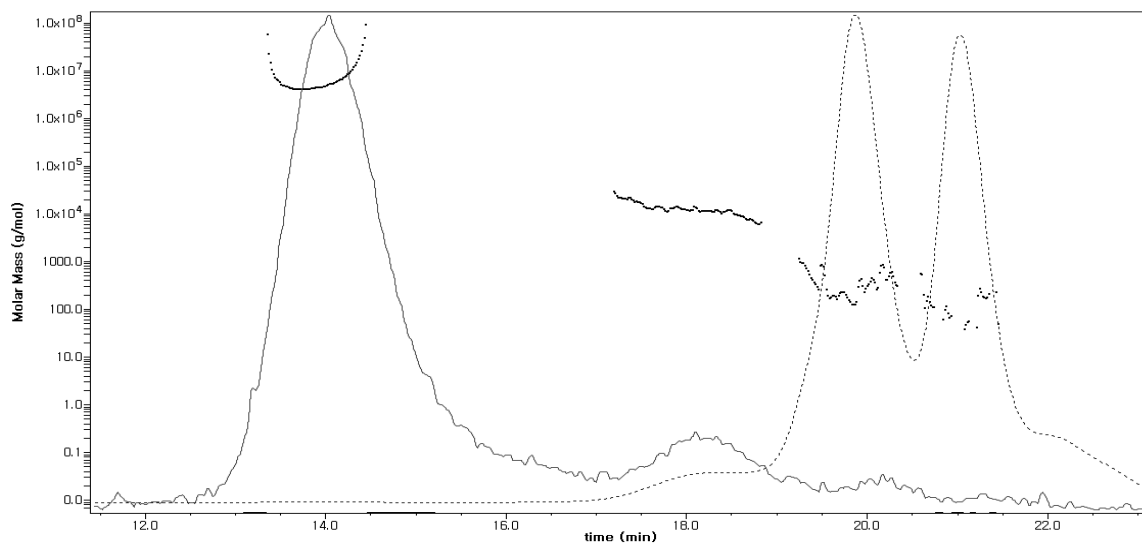


Fig. 41. MALS profiles used Acclaim™ PolarAdvantage II column and UV detector. (A) monomeric anthocyanin, (B) oligomeric anthocyanin.

올리고머에서 존재하고 이를 분석한 결과 모노머가 아닌 올리고머 형태를 띠는 것으로 확인되었으므로 본 연구에서의 합성은 제대로 이루어진 것으로 판단할 수 있었고, 안토시아닌 올리고머에 대한 표준화를 할 수 있었다.

3.2.1.8. 안토시아닌 올리고머의 분리

안토시아닌 올리고머를 분리하기 위하여 우선 한외여과막을 사용하여 분리하고자 하였다. 현재, 판매되고 있는 1 kDa의 막을 사용하여 시도한 결과 분리가 용이하지 않았는데 이는 시중 판매되는 한외여과 막의 유효 범위가 3,000 Da까지 작용을 해서 분리가 제대로 이루어지지 않았다 (data not shown). 다음으로, HPLC와 C18 컬럼을 사용하여 분리를 시도하였고, 그 결과 많은 피크가 짧은 시간 안에 나타나 피크별로 분리가 어렵다는 것을 확인하였다 (Fig. 42). 다음으로 다양한 컬럼(Acclaim™ PolarAdvantage II, Develosil 100 Diol-5)를 이용하여 안토시아닌 올리고머의 분리를 수행하였지만 효율적으로 분리할 수 없었다 (Fig. 43, 44). 마지막으로, 분자량의 크기별로 분리할 때 사용되는 GPC 컬럼을 사용하여 분리를 수행하였다. 하지만 한 개의 GPC 컬럼을 사용할 경우 컬럼의 분해능이 안토시아닌 올리고머의 예상 분자량보다 높기 때문에 분리하기가 어려워 2개의 GPC 컬럼을 연결하여 분리를 시도하였다. 그 결과 4개의 피크로 분리되는 것을 확인 할 수 있었고 (Fig. 45), 각 피크로 분획하여 동결 건조 후 분석을 의뢰하였지만 피크별 다양한 분자량들이 발견되어 다른 방법을 모색하였지만 뚜렷한 분자량별 분리 방법이 없어 안토시아닌 올리고머를 표준화한 시그널에서 일정 분획을 나누어서 연구를 진행하기로 하였다 (Fig. 46).

3.2.1.9. 안토시아닌 올리고머의 시제품 공정 개발

1차년도 연구를 통해 효소 Glucosidase가 안토시아닌 모노머를 안토시아닌 올리고머로 합성한다는 것을 확인하였다 (Fig. 47). 다음으로 안토시아닌 올리고머의 합성 최적 조건을 확인하기 위하여 기존 합성 온도인 25℃에서 합성 기간을 3, 5, 7일로 하여 합성을 진행하였다. 그 결과 7일 동안 합성 시 높은 합성률을 보인다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 48). 7일간의 합성 기간을 정한 후, 온도를 정하기위해서 4, 25℃에서 합성을 하여 비교해 보았다. 그 결과 25℃ 더 높은 합성 효율을 확인할 수 있었다 (Fig. 49). 마지막으로 효소의 양에 따라 합성에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여 효소를 기존 효소대 기질 비가 1:100이 아닌 1:10을 사용하여 합성을 진행하였다. 그 결과 1:100 보다 1:10이 더 높은 합성을 보였지만 많은 차이를 보이지 않아 1:100으로 합성을 진행하기도 하였다 (Fig. 50). 하지만 Glucosidase를 사용하여 안토시아닌 올리고머를 합성하기에는 단가가 너무 높기 때문에 상업적으로 사용되고 있는 효소를 검색하여 본 결과 Glucosidase를 포함하고 있는 Sumizyme AC, Viscozyme L을 찾을 수 있었다. Sumizyme AC, Viscozyme L을 사용하여 합성하여 본 결과 Viscozyme L가 더 높은 합성률을 보여 주었다 (Fig. 51). 이 상의 결과를 바탕으로 시제품은 Viscozyme L를 사용하여 25℃에서 7일간 합성하여 제작하기로 하였다 (Scheme 1, Table 1).

Table 1. Synthesis yield of oligomeric anthocyanin

A.niger	Crude enzyme	Glucosidase	Viscozyme L
71.122± 2.243	78.064±1.611	83.646±1.597	82.109±2.634

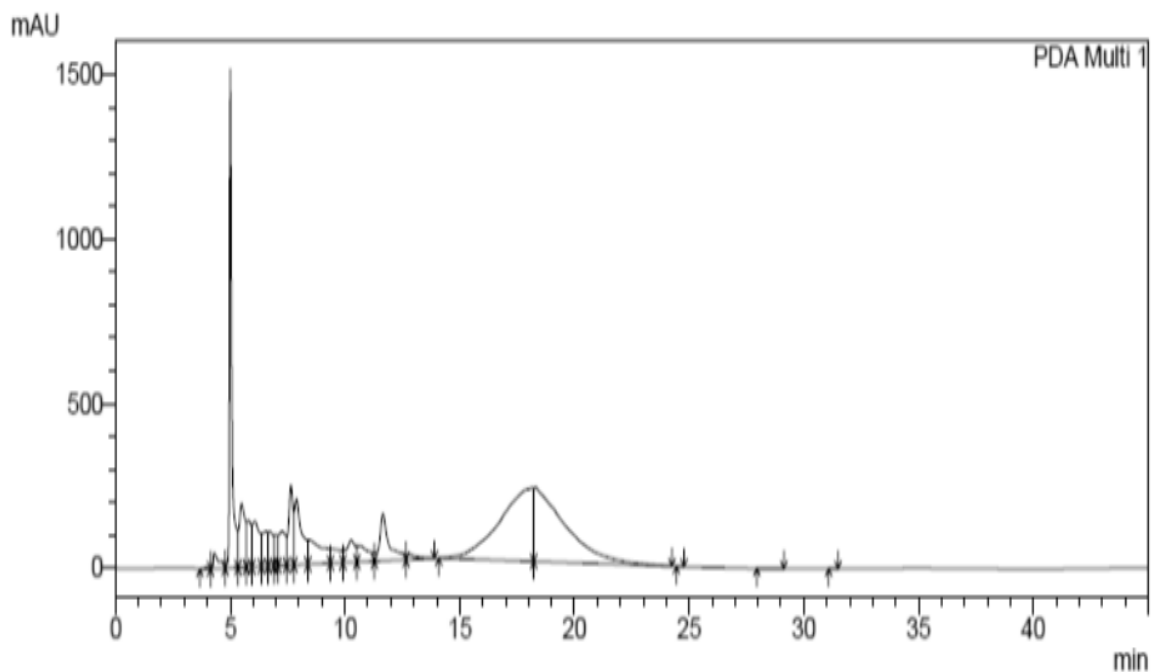


Figure 42. HPLC profiles of oligomeric anthocyanin used Alltima HP C18 column.

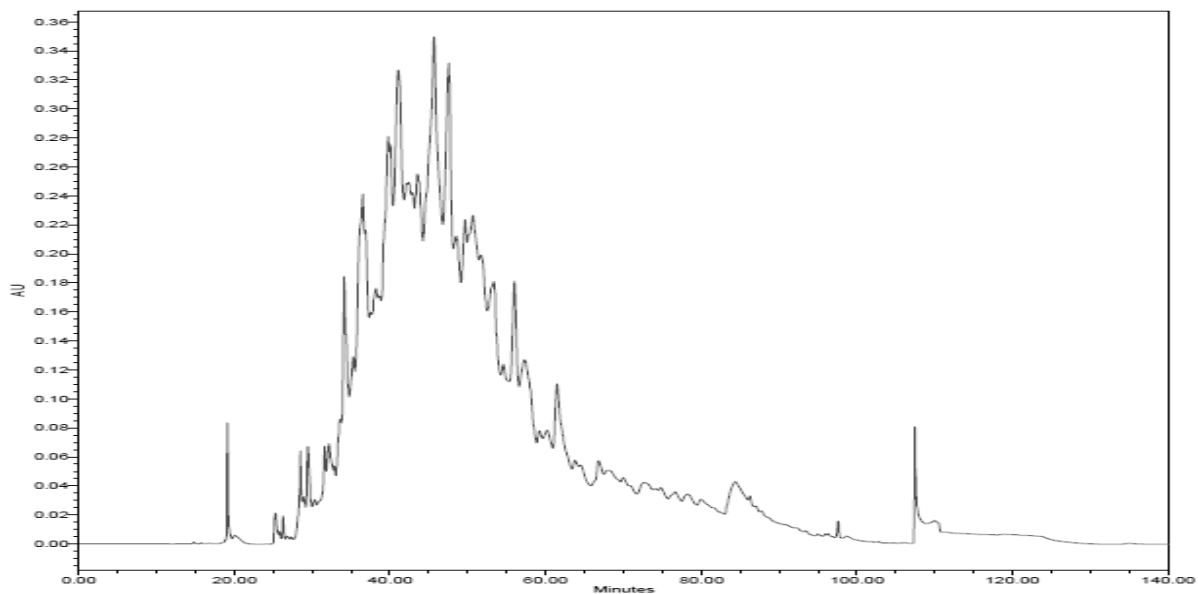


Figure 43. HPLC profiles of oligomeric anthocyanin used Acclaim™ PolarAdvantage II column.

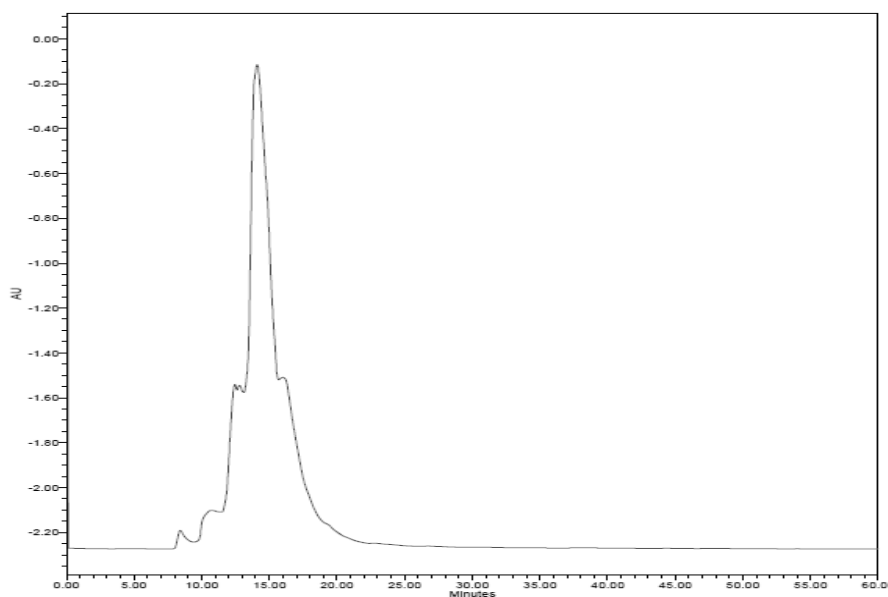


Figure 44. HPLC profiles of oligomeric anthocyanin used Develosil 100 Diol-5 column.

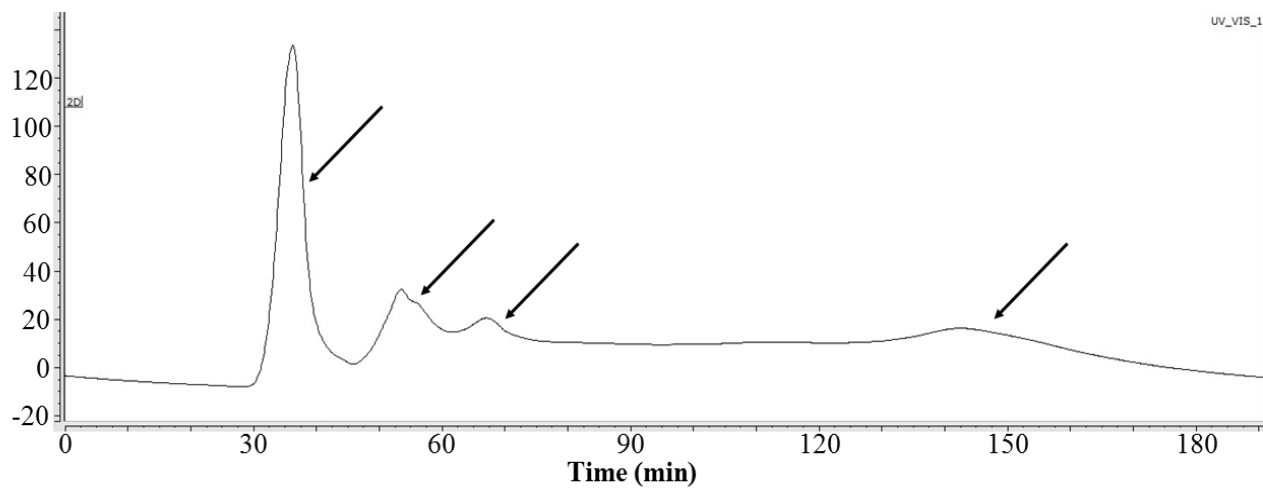


Figure 45. HPLC profiles of oligomeric anthocyanin used two Shodex, SB-802 HQ column

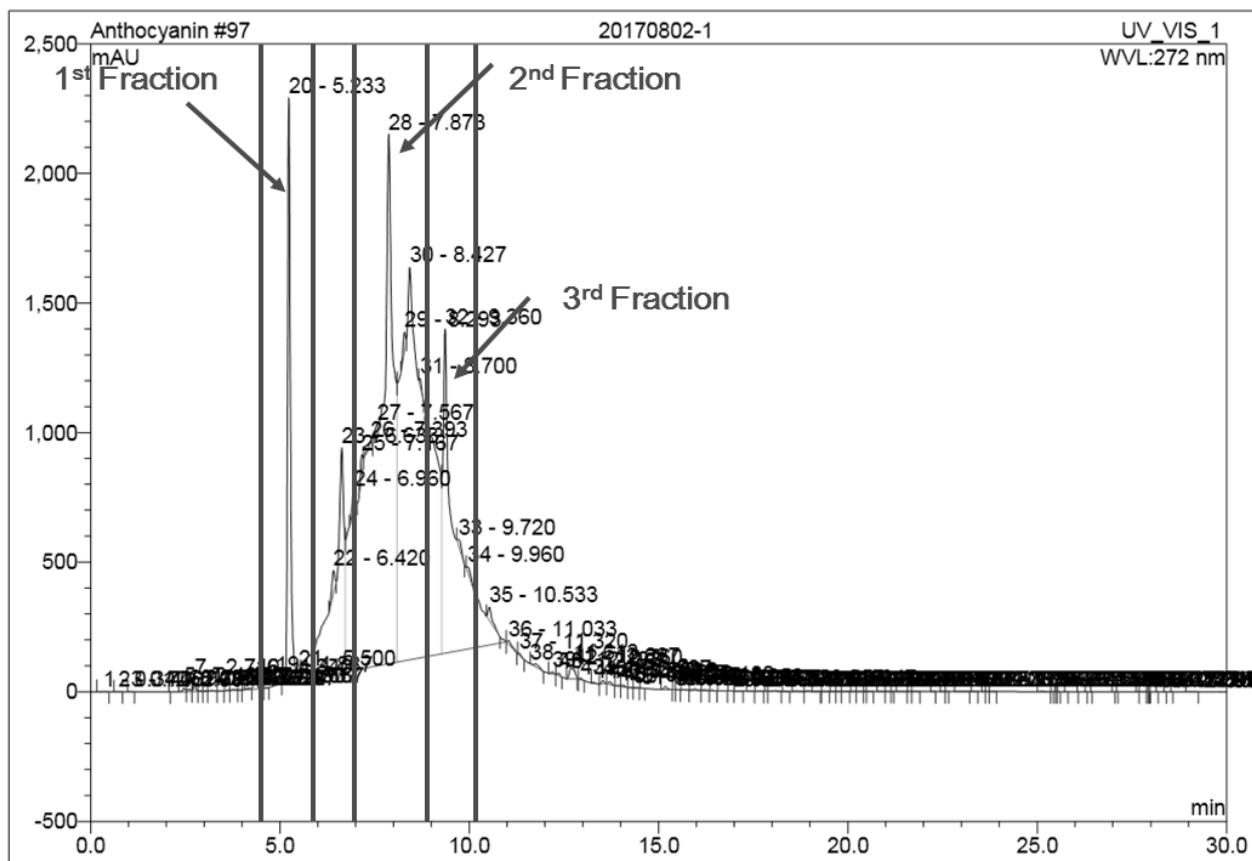
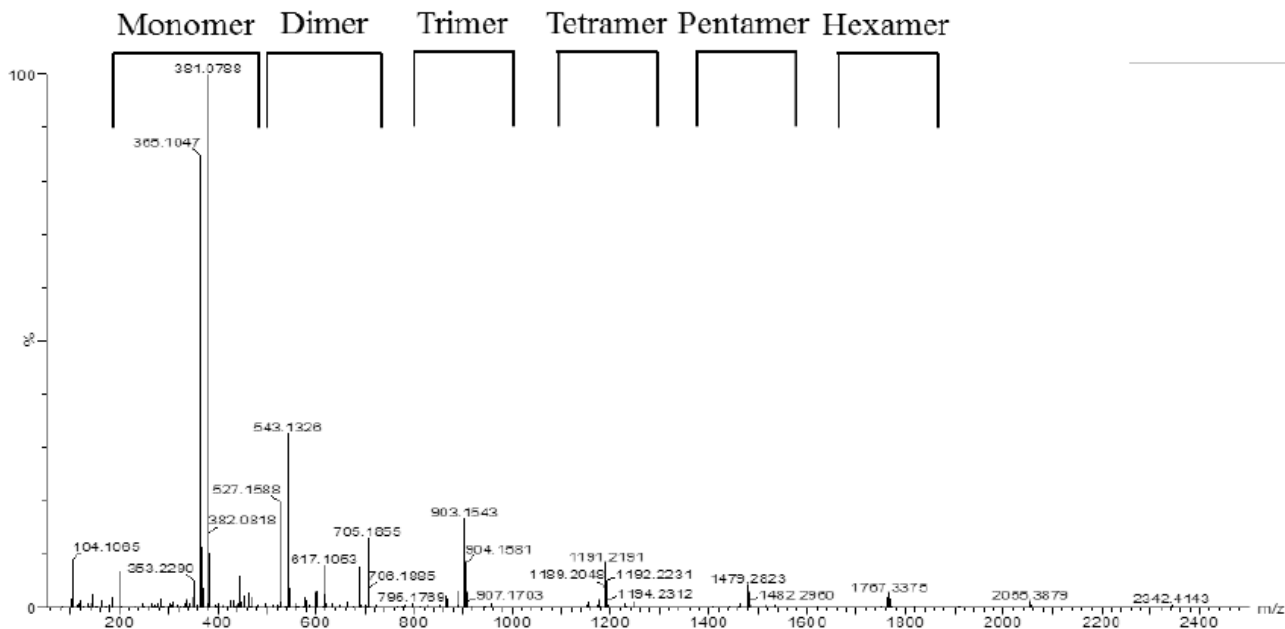


Figure 46. Divided of oligomeric anthocyanin fraction

(A)



(B)

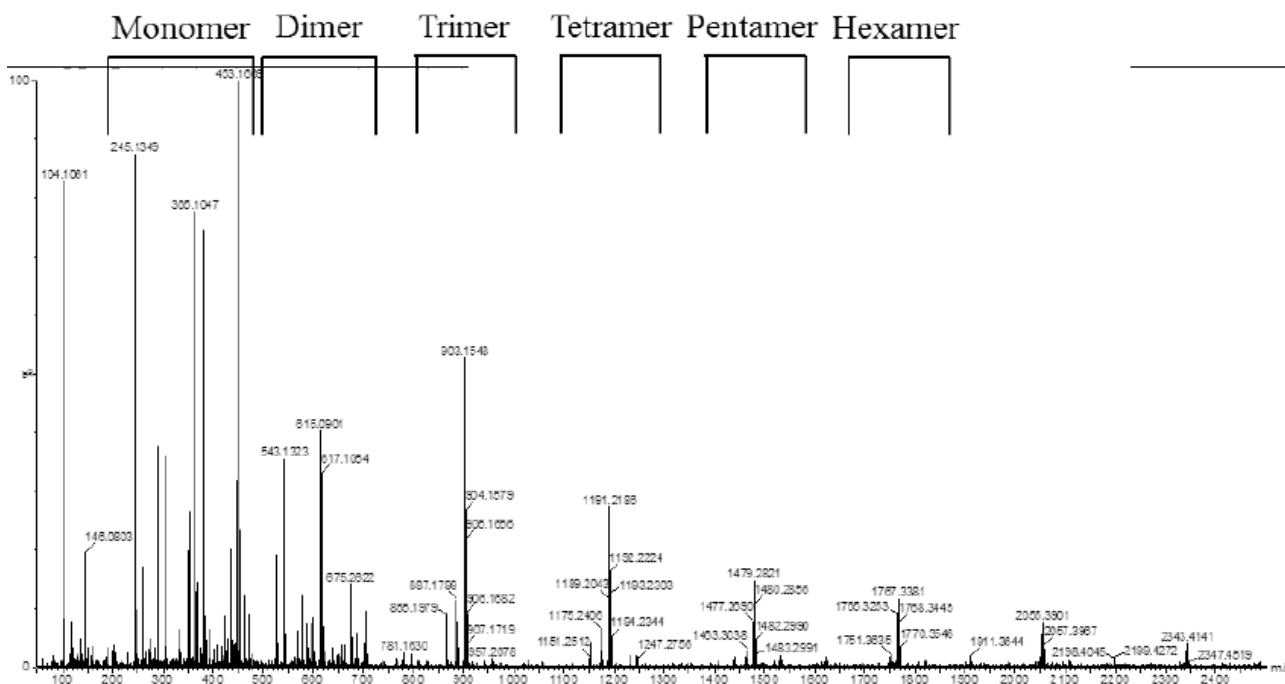


Fig. 47. The synthesis of oligomeric anthocyanin from monomeric anthocyanin using glucosidase from *Aspergillus niger*. (A) Before biosynthesis, (B) After biosynthesis using enzyme A.

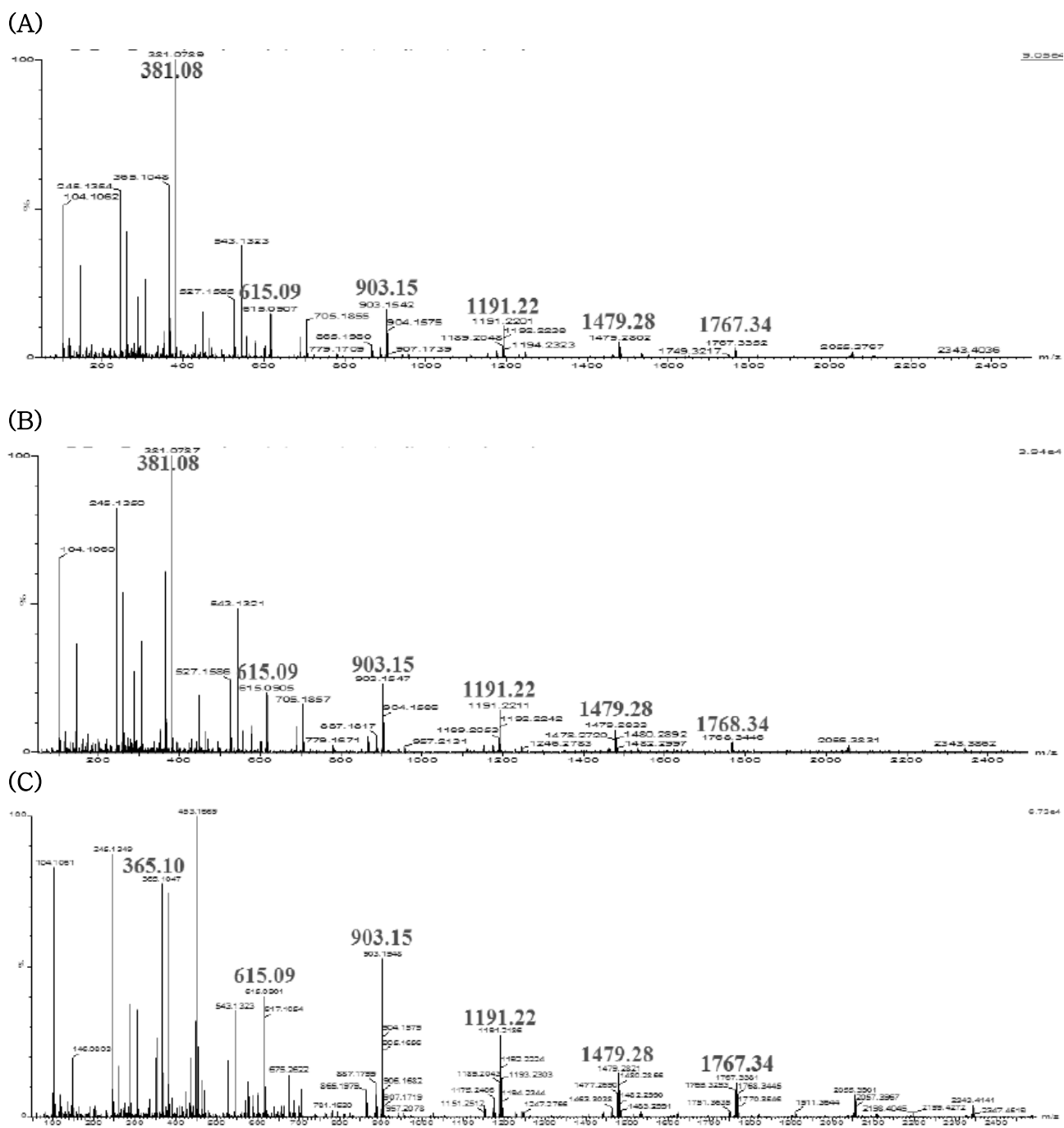
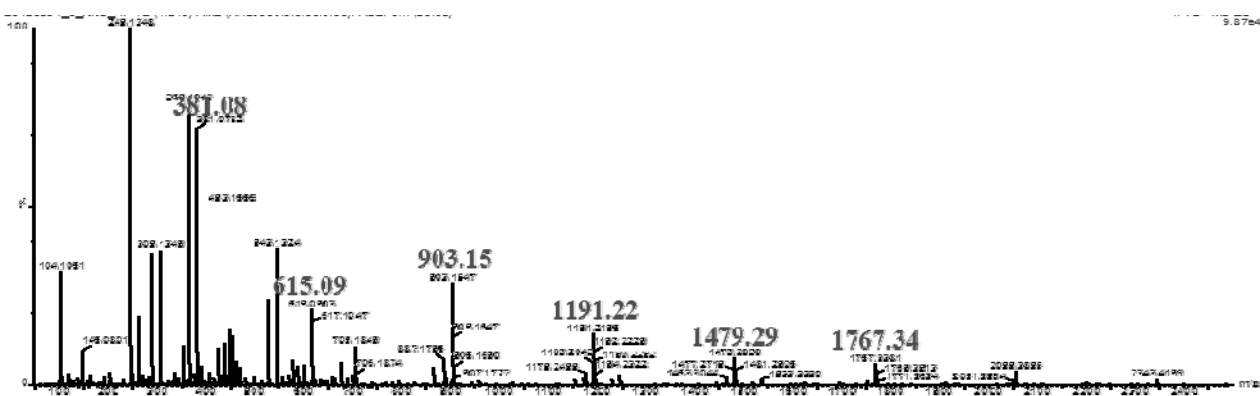


Fig. 48. Effect of culture duration on the synthesis of oligomeric anthocyanin. (A) 3 day, 25°C, (B) 5 day, 25°C, (C) 7 day, 25°C

(A)



(B)

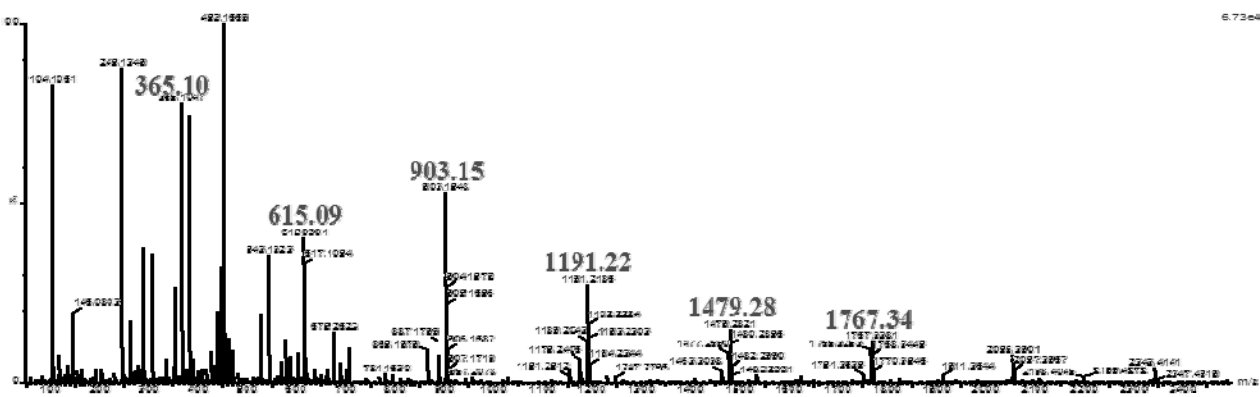
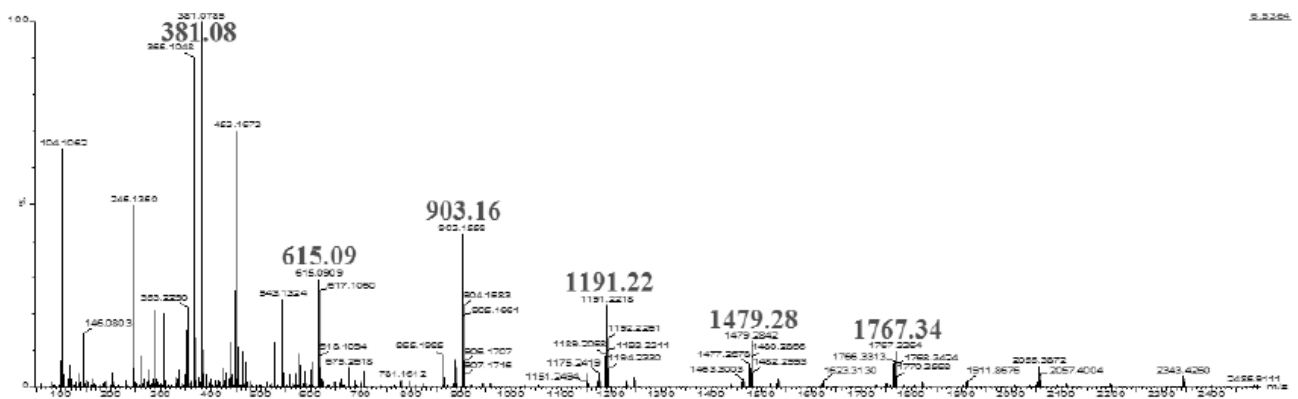


Fig. 49. Synthesis of oligomeric anthocyanin in two temperature. (A) 7 day, 4°C, (B) 7 day, 25°C.

(A)



(B)

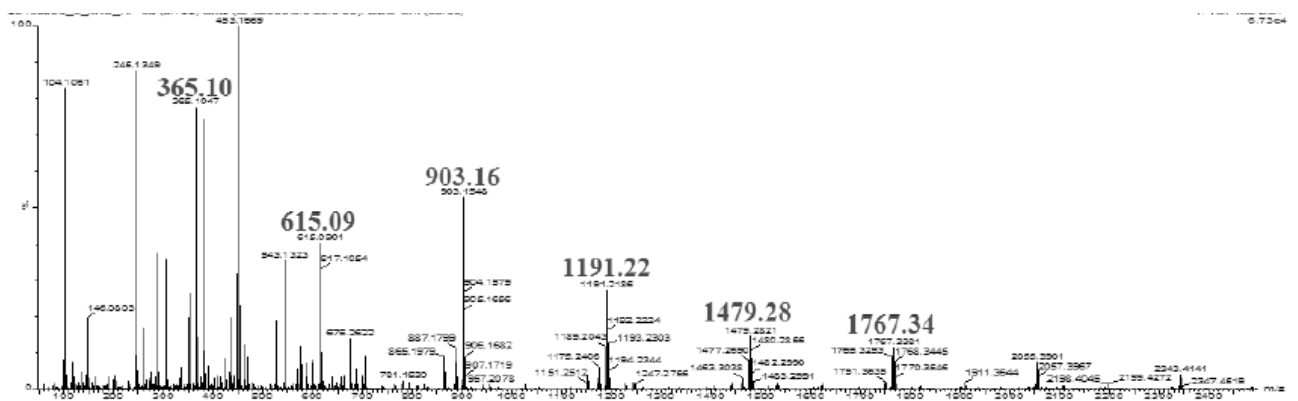
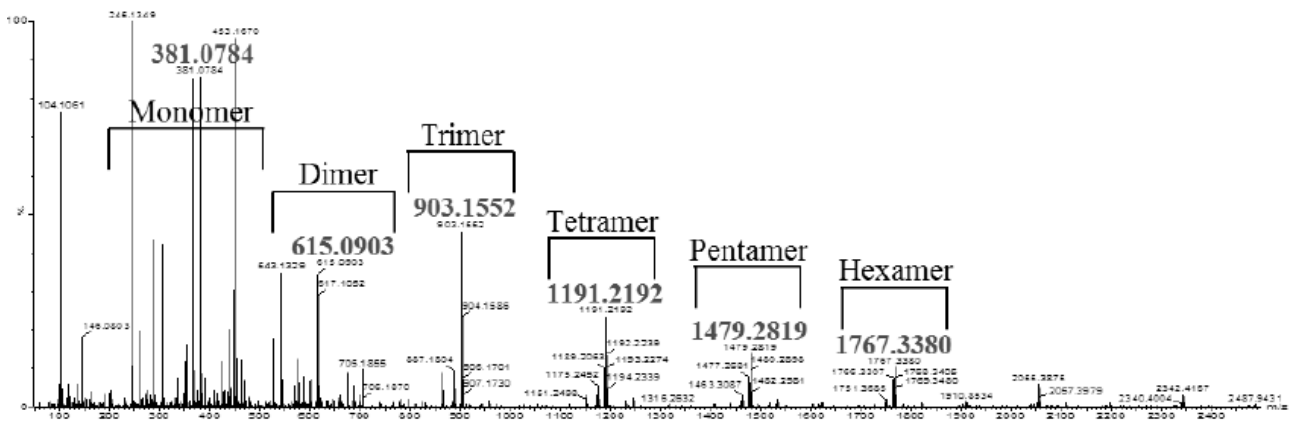


Fig. 50. Effect of enzyme concentration of the synthesis of oligomeric anthocyanin. (A) 7 day, 25°C, 1:100, (B) 7 day, 25°C, 1:10.

(A)



(B)

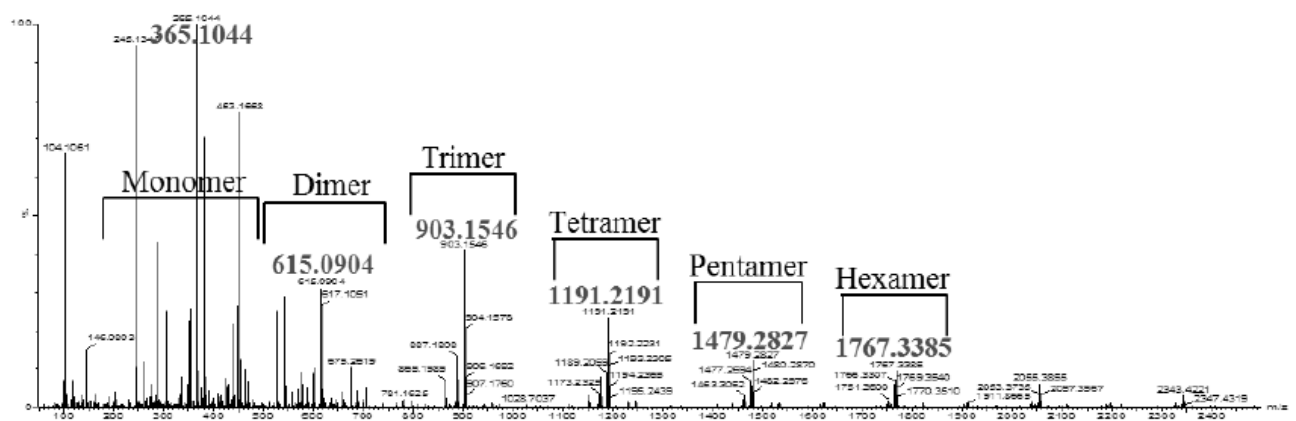
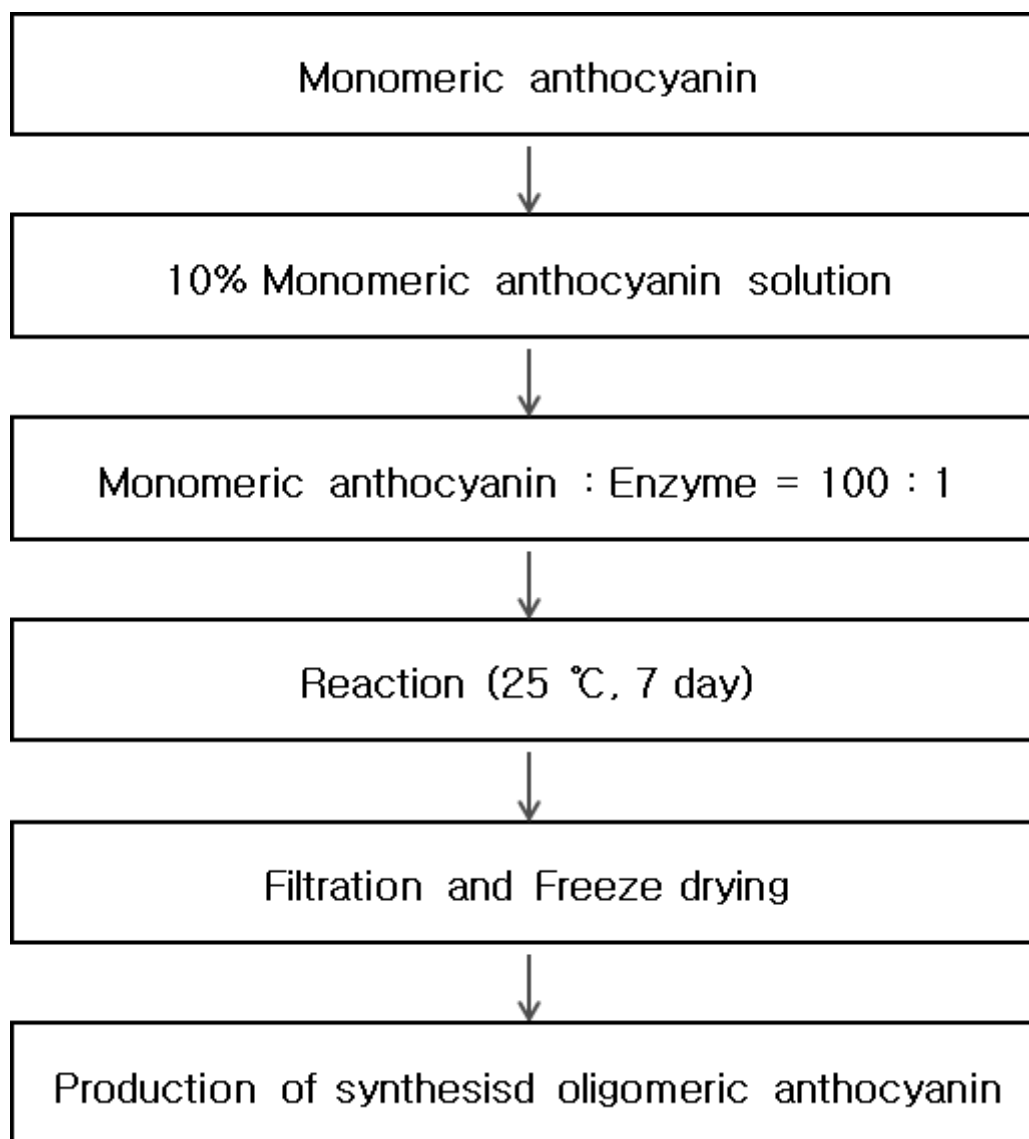


Fig. 51. The synthesis of oligomeric anthocyanin from monomeric anthocyanin using two enzyme. (A) Sumizyme AC, (B) Viscozyme L.



Scheme 1. Manufacturing process of oligomeric anthocyanin.

3.2.1.10. 합성된 안토시아닌 올리고머의 중금속 분석 결과

중금속 분석 방법을 사용하여 납, 카드뮴, 수은, 비소를 분석한 결과 중금속이 발견되지 않았으며 (Table 2), 미생물 검사에서도 대장균 및 일반세균이 나타나지 않았다.

Table 2. Result of heavy metals measure

	중금속 항목 (mg/kg)			
	납 (Pb)	비소 (As)	수은 (Hg)	카드뮴 (Cd)
기준	<5	<3	<0.5	<0.5
안토시아닌 올리고머	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

3.2.2. 안토시아닌 올리고머의 항산화 활성

3.2.2.1. 전자스핀공명기기를 이용한 항산화 활성

전자스핀공명기기를 이용한 안토시아닌 올리고머의 자유 라디칼 소거 활성은 Fig. 52 ~ 54와 Table 2.에 나타내었다. DPPH 라디칼은 라디칼 중에서 안정한 자유 라디칼에 속하기에 다양한 천연물로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 안토시아닌 올리고머의 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과는 Fig. 52-(A)와 같이 농도 의존적인 활성을 나타내었으며, 1.953, 3.906, 7.813, 15.625 $\mu\text{g/ml}$ 에서 25.11, 75.89, 81.16, 91.23 %의 DPPH 라디칼 소거 활성을 보여주었다. 이때, 50%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내는 IC_{50} 값은 2.911 $\mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다.

전자스핀공명기기를 이용한 안토시아닌 올리고머의 DPPH 라디칼 소거 활성에 대한 histogram은 Fig. 52-(B)에서와 같이 안토시아닌 올리고머 처리 농도가 증가함에 따라 signal intensity가 낮아짐으로써, 농도 의존적으로 DPPH 라디칼이 소거됨을 알 수 있었다.

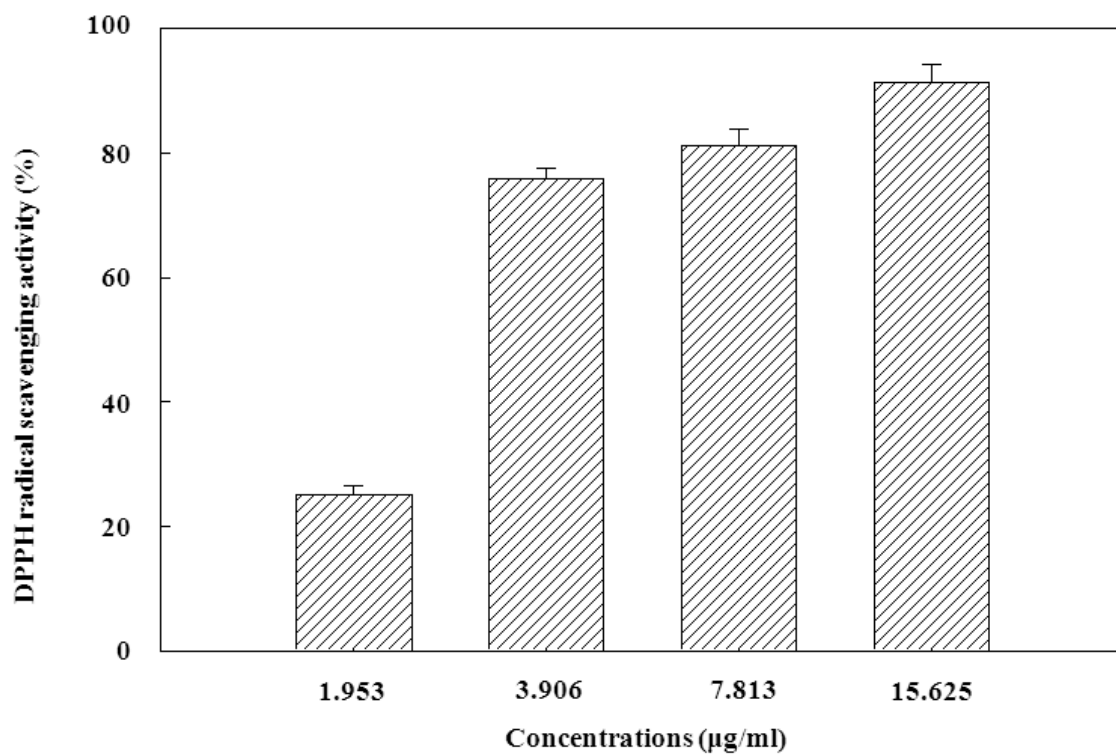
안토시아닌 올리고머의 alkyl 라디칼 소거능을 측정된 결과 Fig. 53-(A)와 같이 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 안토시아닌 올리고머 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$ 일 때, alkyl 라디칼 소거능은 각각 21.99%, 39.81%, 54.99%, 81.21%, 94.52%를 나타내었으며 이때 안토시아닌 올리고머의 IC_{50} 값은 52.194 $\mu\text{g/ml}$ 를 나타내었다.

전자스핀공명기기를 이용한 안토시아닌 올리고머의 alkyl 라디칼 소거활성에 대한 histogram은 Fig. 53-(B)에서와 같이 안토시아닌 올리고머의 처리 농도가 높아짐에 따라 signal intensity가 낮아짐으로써, 농도 의존적으로 alkyl 라디칼이 소거됨을 확인 할 수 있었다.

한편, 라디칼 중 가장 강력한 라디칼로 알려져 있는 hydroxyl 라디칼에 대한 안토시아닌 올리고머의 라디칼 소거 효능을 측정된 결과는 Fig. 54-(A)에 나타내었다. 안토시아닌 올리고머의 농도 의존적으로 hydroxyl 라디칼 소거 활성이 증가한 것을 확인 할 수 있었으며, 안토시아닌 올리고머 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml 일 때, hydroxyl 라디칼 소거활성은 각각 24.65%, 29.13%, 61.44%, 77.36%를 나타내었으며, 이 때 안토시아닌 올리고머의 IC_{50} 값은 0.823 mg/ml 로 나타났다.

전자스핀공명기기를 이용한 안토시아닌 올리고머의 hydroxyl radical 소거능에 대한 histogram은 Fig. 54-(B)에 나타내었다. Hydroxyl radical은 spin trapping agent인 DMPO에 의해 반감기가 비교적 긴 DMPO-OH· adduct를 형성한다. DMPO-OH· adduct는 hydroxyl radical의 전형적

(A)



(B)

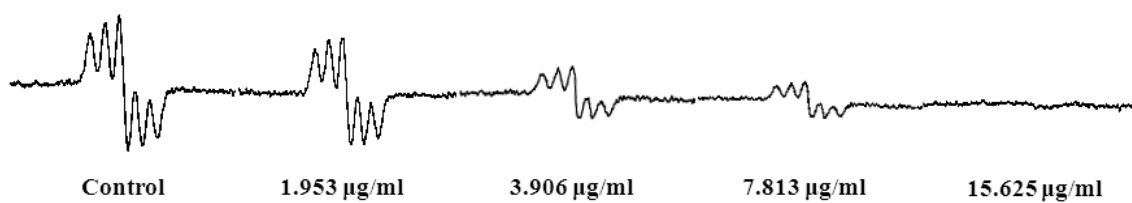
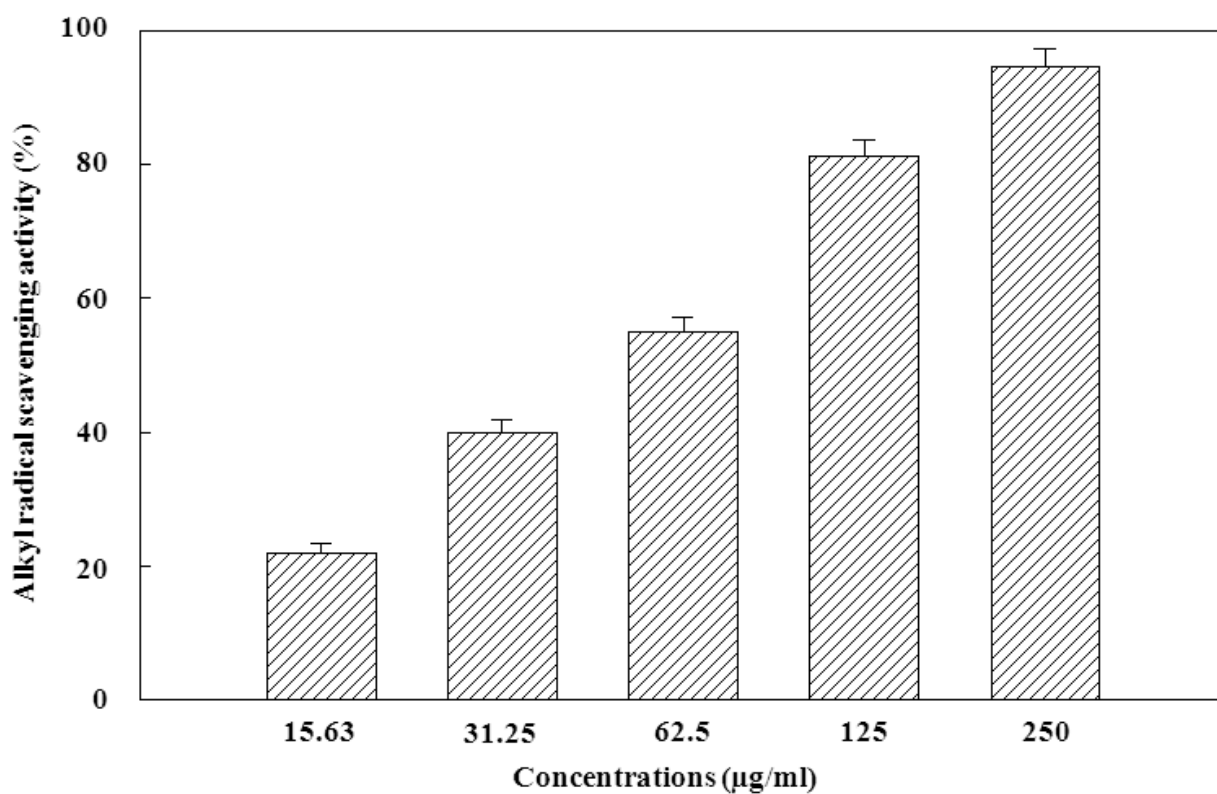


Fig. 52. DPPH radical scavenging activity of oligomeric anthocyanin (A) and ESR spectra of the oligomeric anthocyanin (B).

(A)



(B)

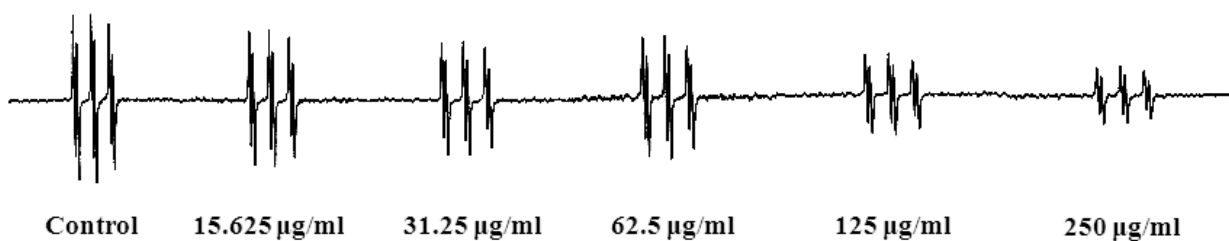
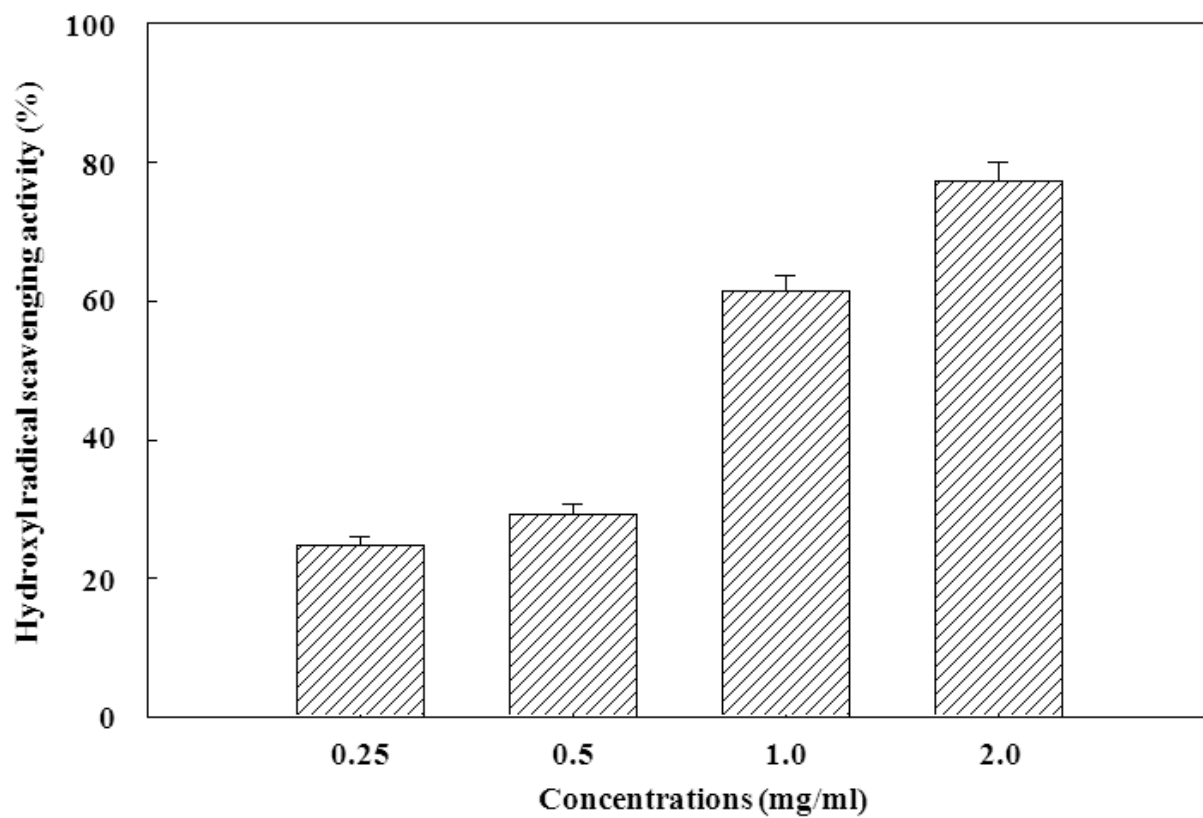


Fig. 53. Alkyl radical scavenging activity of oligomeric anthocyanin (A) and ESR spectra of the oligomeric anthocyanin (B).

(A)



(B)



Fig. 54. Hydroxyl radical scavenging activity of oligomeric anthocyanin (A) and ESR spectra of the oligomeric anthocyanin (B).

인 1 : 2 : 2 : 1의 독특한 ESR spectrum을 나타내게 되고 그 signal intensity로서 DMPO-OH-adduct의 양을 측정하였다. 본 연구에서도 hydroxyl radical의 전형적인 spectrum을 확인할 수 있었으며, 농도 의존적으로 signal intensity가 낮아짐을 확인할 수 있었다.

DPPH, alkyl, hydroxyl 라디칼 소거 활성에서 높은 항산화 활성을 보여준 안토시아닌 올리고머는 superoxide 라디칼에서는 낮은 항산화 활성을 보여주었다 (Table 3). 50% 라디칼 소거 활성을 보여주는 농도인 IC₅₀ 값은 7.742 mg/ml로, 안토시아닌 올리고머의 superoxide 라디칼에 대한 소거활성은 비교적 낮았다.

Table. 3. 전자스핀공명기기를 통한 안토시아닌 올리고머의 자유 라디칼 소거 활성

	안토시아닌 올리고머	비타민 C
DPPH 라디칼 소거 활성 (IC ₅₀ , µg/ml)	2.911	3.049
Hydroxyl 라디칼 소거 활성 (IC ₅₀ , mg/ml)	0.823	0.021
Superoxide 라디칼 소거 활성 (IC ₅₀ , mg/ml)	7.742	0.059
Alkyl 라디칼 소거 활성 (IC ₅₀ , µg/ml)	52.194	11.135

3.2.2.2. 지질과산화 억제 활성을 통한 항산화 활성

항산화 활성을 측정하는 방법 중에서 지질과산화도를 측정하는 방법인 TBA, FTC법은 linoleic acid를 첨가하여 시간의 경과에 따라 변화되는 지질의 산패도를 측정하는 방법으로 반응 기간 동안 지질과산화물의 생성 정도와 생성 억제 정도를 동시에 측정할 수 있는 방법으로 세포막에 존재하는 지질은 라디칼에 의하여 지방산으로부터 수소원자가 이탈하여 산화되기 시작하여 반응성이 높은 free radical이 형성된다. 지질의 산화에 의하여 생성된 hydroperoxide가 촉매력이 강한 전이 금속들에 의해 분해되어 생성되는 alkoxy radicals(RO), peroxy radicals(ROO), hydroxyl radical(OH) 및 malondialdehyde 및 4-hydroxynonenal 등은 간접적으로 단백질과 DNA의 손상을 일으킬 뿐만 아니라 노화와 암 발생의 중요한 원인 인자가 된다. 이 원리를 이용하여 안토시아닌 올리고머 및 비타민 E의 지질과산화물 생성 억제도를 측정하여 비교하였다.

안토시아닌 올리고머의 지질과산화도를 FTC(Ferric Thiocyanate)법을 사용하여 측정한 결과 Fig. 55에서와 같이 농도별 안토시아닌 올리고머와 비타민 E를 처리한 군에서는 실험이 진행되는 동안 지질과산화물 생성이 억제됨을 알 수 있었다. 특히, 안토시아닌 올리고머 0.5, 1.0 mg/ml의 농도에서 비타민 E보다 높거나 비슷한 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 안토시아닌 올리고머 1.0 mg/ml은 비타민 E보다 높은 활성을 보여, 안토시아닌 올리고머의 항산화 활성이 우수함을 알 수 있었다.

또한, 안토시아닌 올리고머의 지질과산화도를 TBA(thiobarbituric acid)법을 사용하여 측정한 결과는 Fig. 56과 같다. FTC 결과와 같이 안토시아닌 올리고머 0.5, 1.0 mg/ml에서는 비타민 E와 유사한 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었고, 이를 통하여 안토시아닌 올리고머의 지질과산화도 억제 활성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때 안토시아닌 올리고머의 항산화 활성은 천연 항산화제인 비타민 E 및 C의 항산화 활성과 비슷한 활성을 보여주고 있다. 이 결과를 바탕으로 안토시아닌 올리고머의 세포와 동물 모델에서의 항산화 활성을 평가하고, 안토시아닌 올리고머 중 더욱 항산화 활성이 뛰어난 분자량의 안토시아닌 올리고머 중합체를 분리하고자 연구를 진행하였으며 그 작용기작을 연구하였다.

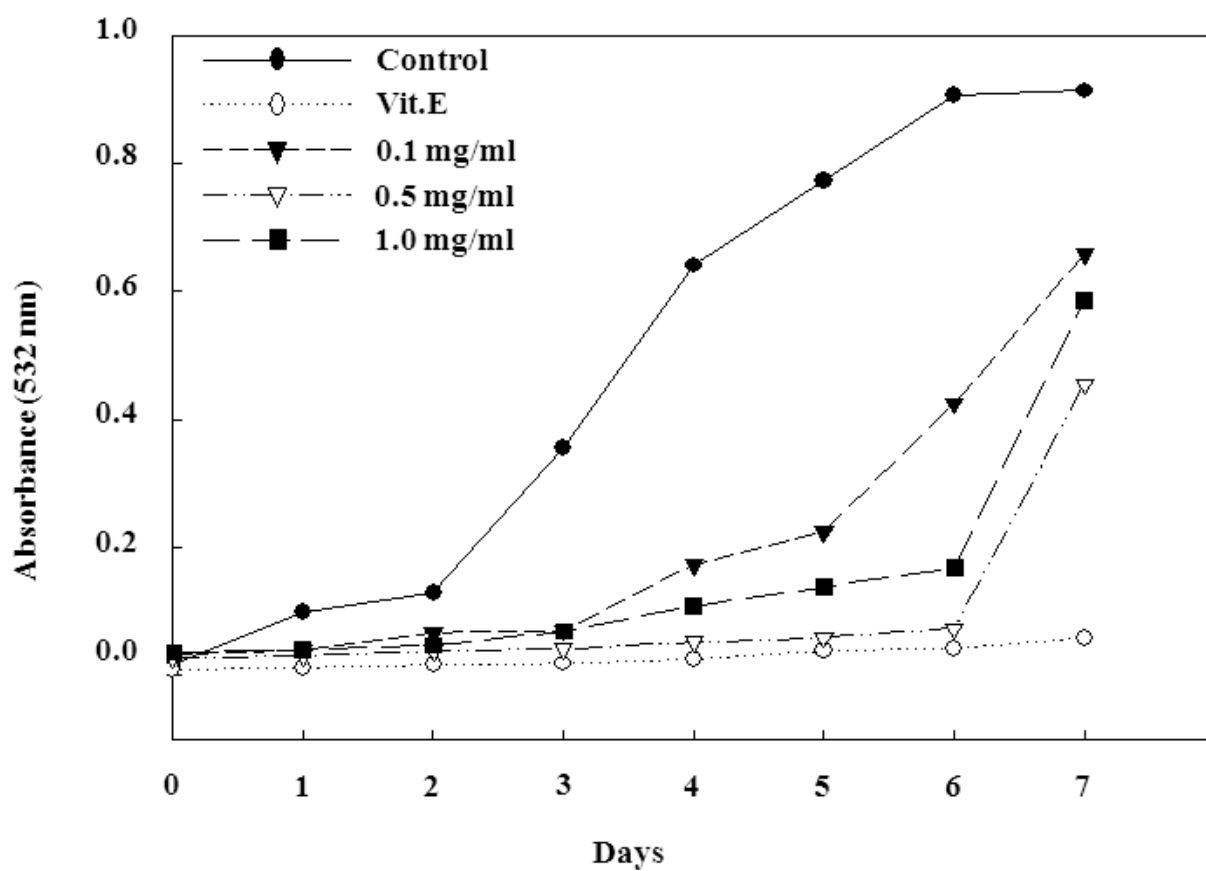


Fig. 55. Inhibitory effect of lipid peroxidation of oligomeric anthocyanin using TBA method.

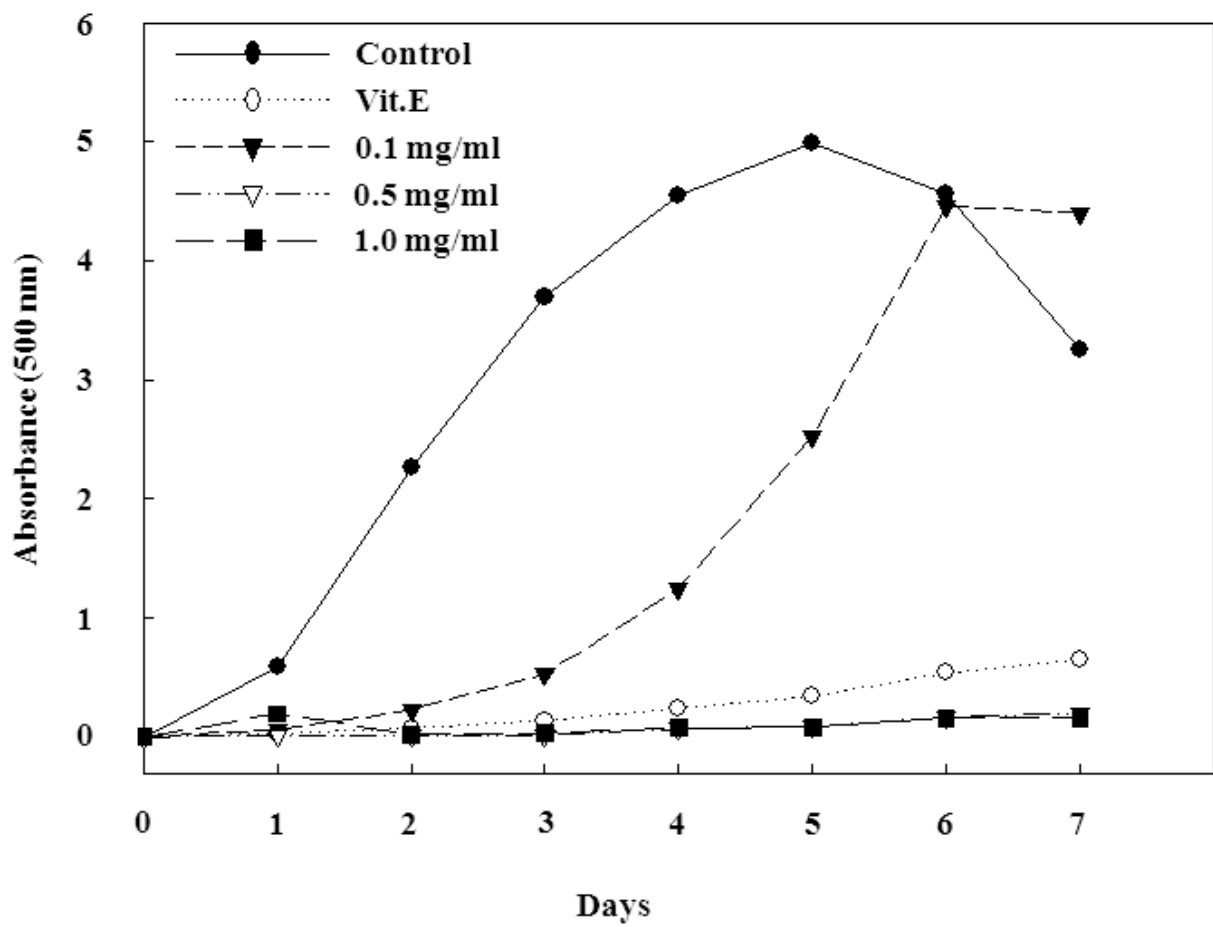


Fig. 56. Inhibitory effect of lipid peroxidation of oligomeric anthocyanin using FTC method.

3.2.3. 망막세포에서 안토시아닌 올리고머의 보호효과

3.2.3.1. 망막세포에서 안토시아닌 올리고머의 세포독성

안토시아닌 올리고머가 망막세포 ARPE-19에 독성을 나타내는지 확인하기 위해 세포독성 측정 실험을 수행한 결과 Fig. 57에 나타난 것과 같이 농도 1.0 mg/ml까지 100% 이상의 세포 생존율을 나타내어 안토시아닌 올리고머는 ARPE-19세포에 독성을 나타내지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 이 실험 결과를 바탕으로 향후 실험에서 올리고머 안토시아닌의 최고 농도를 1.0 mg/ml로 수행하였다.

3.2.3.2. 망막세포에서 안토시아닌 올리고머의 산화적 손상에 대한 보호 효과

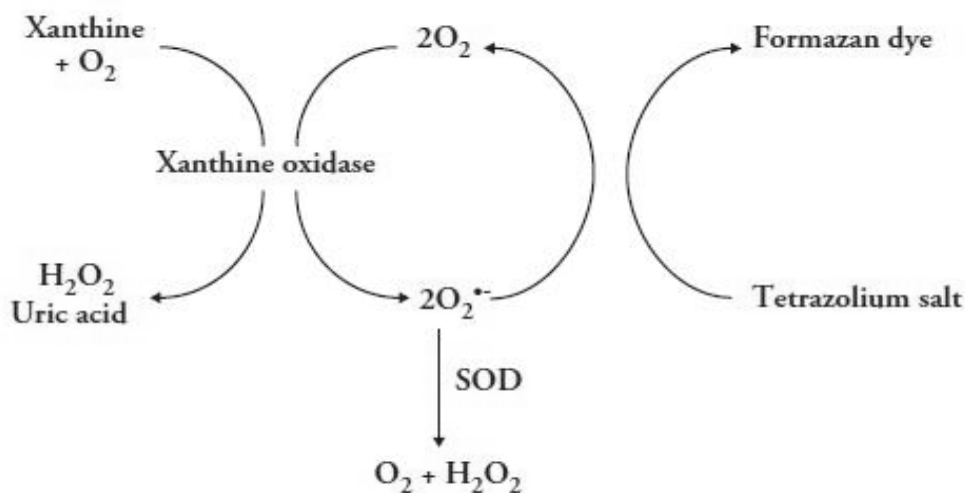
안토시아닌 올리고머 및 H₂O₂ 처리 후 ARPE-19의 세포사멸 및 세포주기를 측정한 결과는 Fig. 58과 같다. 0.5 mM H₂O₂를 처리한 경우 G2 arrest가 발생하는 것을 확인할 수 있었고 안토시아닌 올리고머를 처리하였을 때 농도 의존적으로 G2 arrest가 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 안토시아닌 올리고머가 산화 스트레스로 인한 ARPE-19의 G2 arrest를 억제시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

안토시아닌 올리고머 및 H₂O₂ 처리 후 ARPE-19의 세포사멸 및 세포주기 히스토그램은 Fig. 59와 같다.

3.2.3.3. 망막세포 내 항산화 효소 활성화

안토시아닌 올리고머 및 H₂O₂ 처리 후 ARPE-19의 항산화 효소 활성화는 SOD, catalase, GPx, GST 등 총 4종의 항산화 효소 활성을 측정하였다.

SOD assay는 아래에 나타낸 SOD 측정 원리에서와 같이 xanthine/xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide anion(O₂⁻)에 의한 cytochrome c의 환원 반응을 SOD가 억제하는 정도를 측정하는 것으로 O₂⁻은 SOD에 의해 H₂O₂로 전환되고 이어서 H₂O₂의 전환 효소인 catalase, GPx, GST에 의해 제거되는 것으로 알려져 있다. 따라서 ARPE-19에 산화스트레스 처리 후 생성되는 활성산소에 대하여 안토시아닌 올리고머가 항산화 효소활성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.



<SOD 활성 측정 원리>

안토시아닌 올리고머 및 H₂O₂ 처리 후 ARPE-19의 SOD 효소 활성을 측정한 결과는 Fig. 60과 같다. 산화적 스트레스 단독군보다 안토시아닌 올리고머 1.0 mg/ml를 처리한 군이 더 높은 SOD

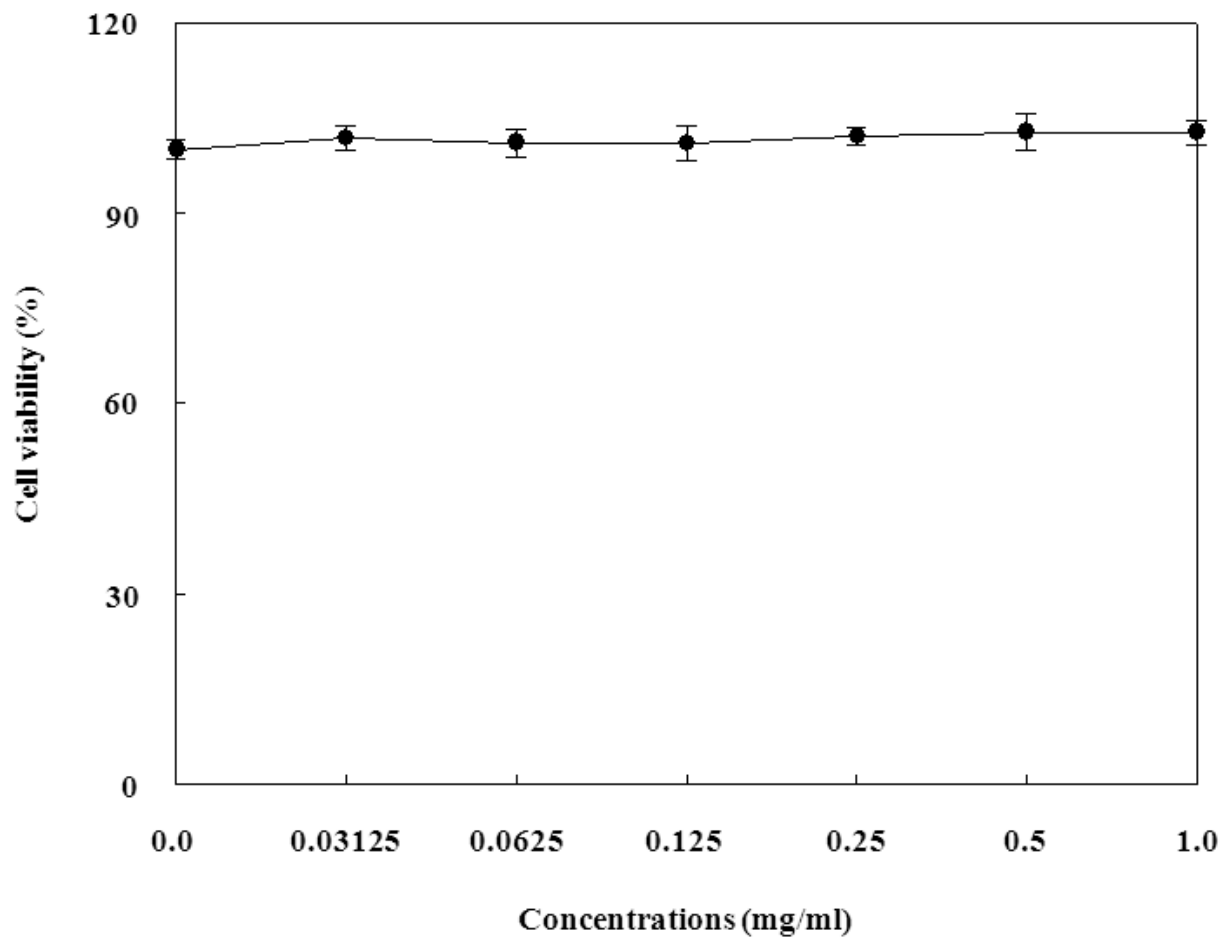


Fig. 57. Cytotoxicity of oligomeric anthocyanin in ARPE-19 cells.

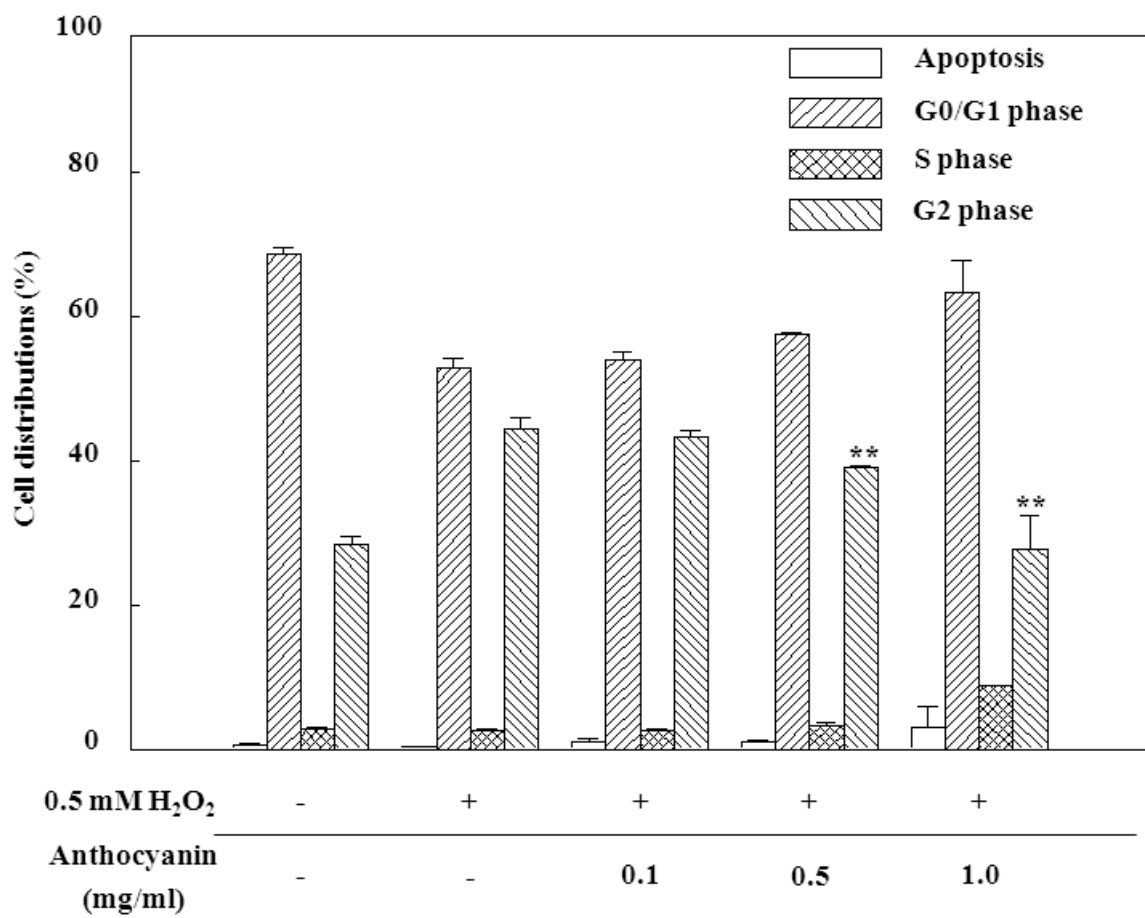


Fig. 58. Effect of oligomeric anthocyanin on the distribution of cell cycle.

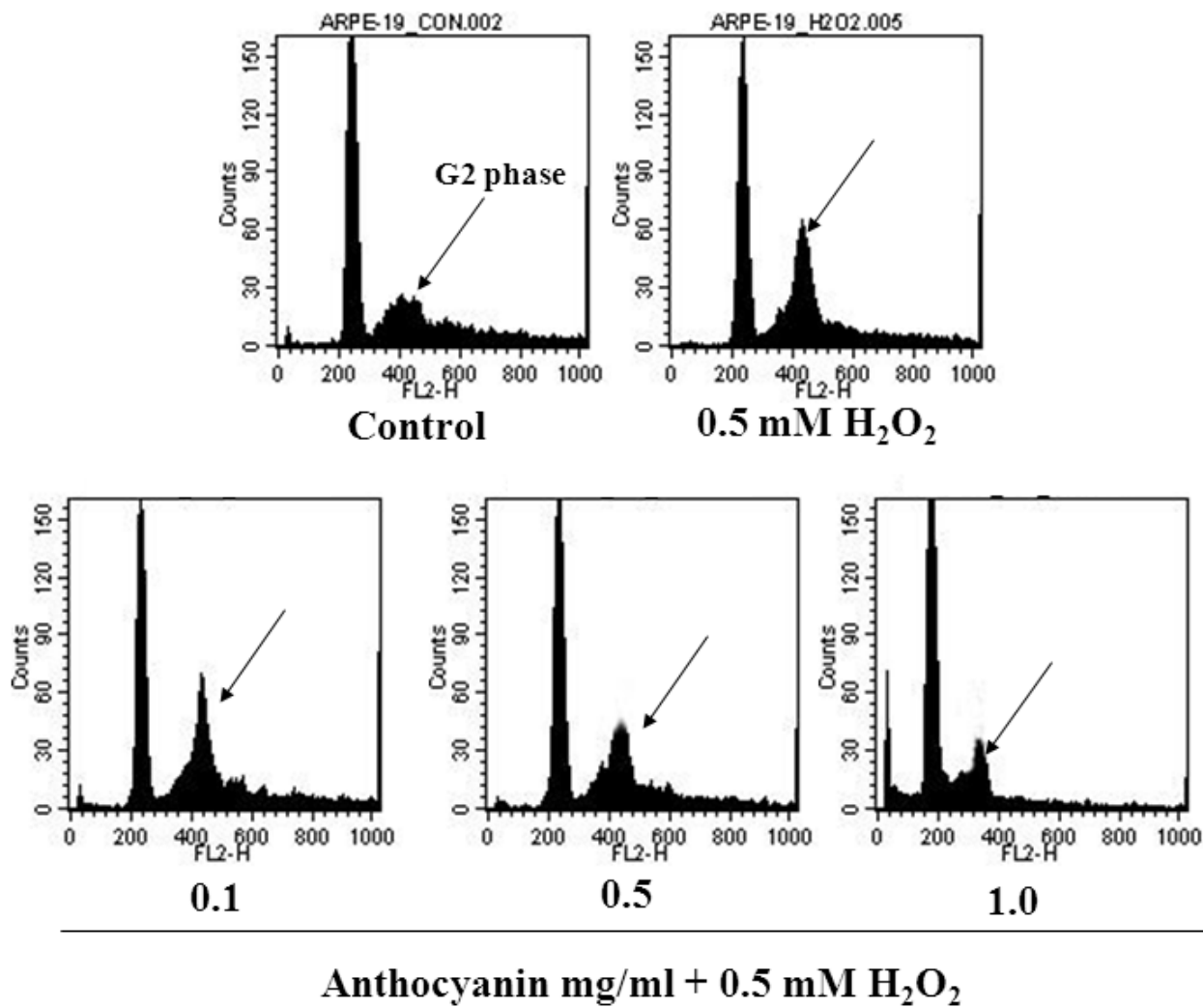


Fig. 59. Effect of oligomeric anthocyanin on cell cycle of ARPE-19 injury induced by H₂O₂.

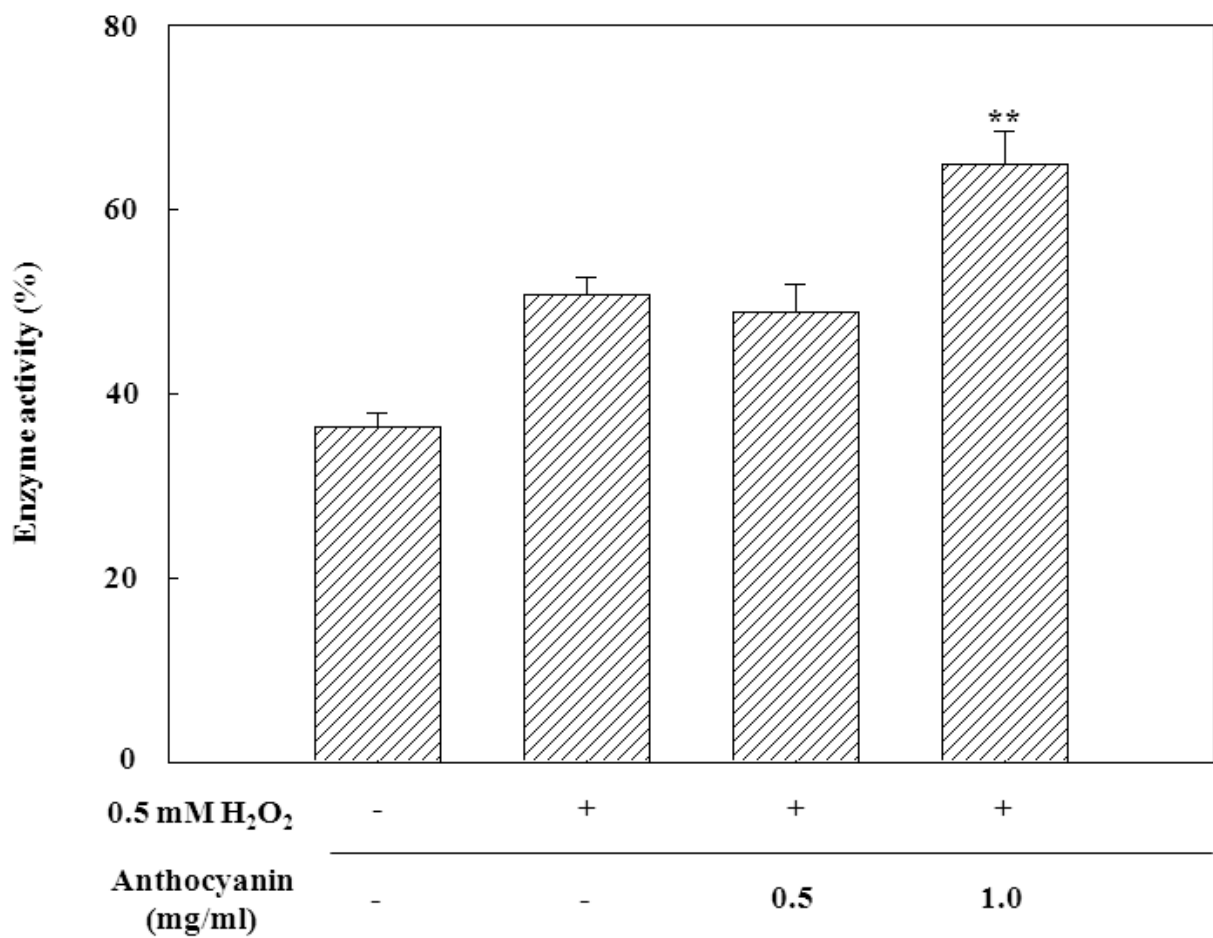
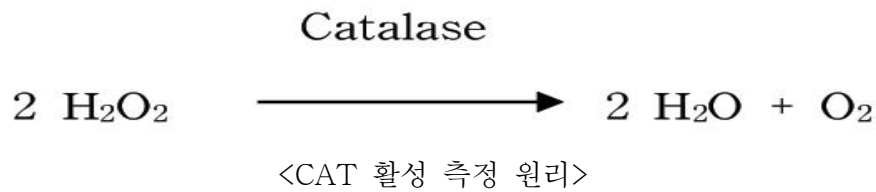


Fig. 60. Effect of the oligomeric anthocyanin on superoxide dismutase activity in retinal cells.

활성을 나타낸 것을 확인 할 수 있었다. 이 결과를 통하여 안토시아닌 올리고머가 ARPE-19 내 SOD 활성을 높여준다는 것을 알 수 있었다.

SOD 활성 측정 결과 산화스트레스 처리 후 O_2^- 를 소거하는 SOD 활성 또한 증가함을 보였지만 O_2^- 는 반감기가 10-6초 정도로 그 양을 정확하게 정량하기는 어려운 것으로, SOD에 의해 모두 또는 충분히 제거되지 않으면 즉시 다음 반응으로 진행하여 H_2O_2 를 생성하게 된다. 이 H_2O_2 는 caspase 활성화에 의해 세포 독성을 유발하므로 H_2O_2 를 제거하기 위해 H_2O_2 를 제거하는 효소인 catalase, GPx, GST의 활성이 증가할 것으로 보여 이들 효소 활성을 측정하였다. 먼저 catalase는 아래 catalase의 원리에서 나타나 있는 바와 같이 H_2O_2 를 물과 산소로 분해시키는 역할을 한다.



망막세포에 산화적 스트레스를 가한 후 안토시아닌 올리고머를 처리하여 catalase 활성을 측정한 결과, 산화적 스트레스 단독군보다 안토시아닌 올리고머 0.5, 1.0 mg/ml를 처리한 군에서 더 catalase 활성이 더 높은 것으로 나타났다(Fig. 61).

한편 GPx 활성 실험은 아래의 원리에서 나타낸 바와 같이 glutathione, *t*-butylhydroperoxide가 GPx와 반응하여 생성된 GSSG가 다시 NADPH, glutathione reductase와 반응하여 NADP와 glutathione을 생성하게 되는데, 이때 NADPH가 GPx와 반응하여 감소되는 흡광도를 측정하는 방법으로 진행하였다.



안토시아닌 올리고머 및 H_2O_2 처리 후 ARPE-19의 GPx 효소 활성을 측정한 결과는 Fig. 62와 같다. 산화 스트레스 단독군보다 안토시아닌 올리고머 0.5, 1.0 mg/ml를 처리한 군에서 glutathion peroxidase 활성이 더 높은 것으로 나타났다.

그리고 glutathion-S-transferase는 아래 원리에 나타나 있는 바와 같이 GSH와 CDNB를 GS-DNB 공여체로 변환시키는 역할을 수행하는 효소로 알려져 있다.



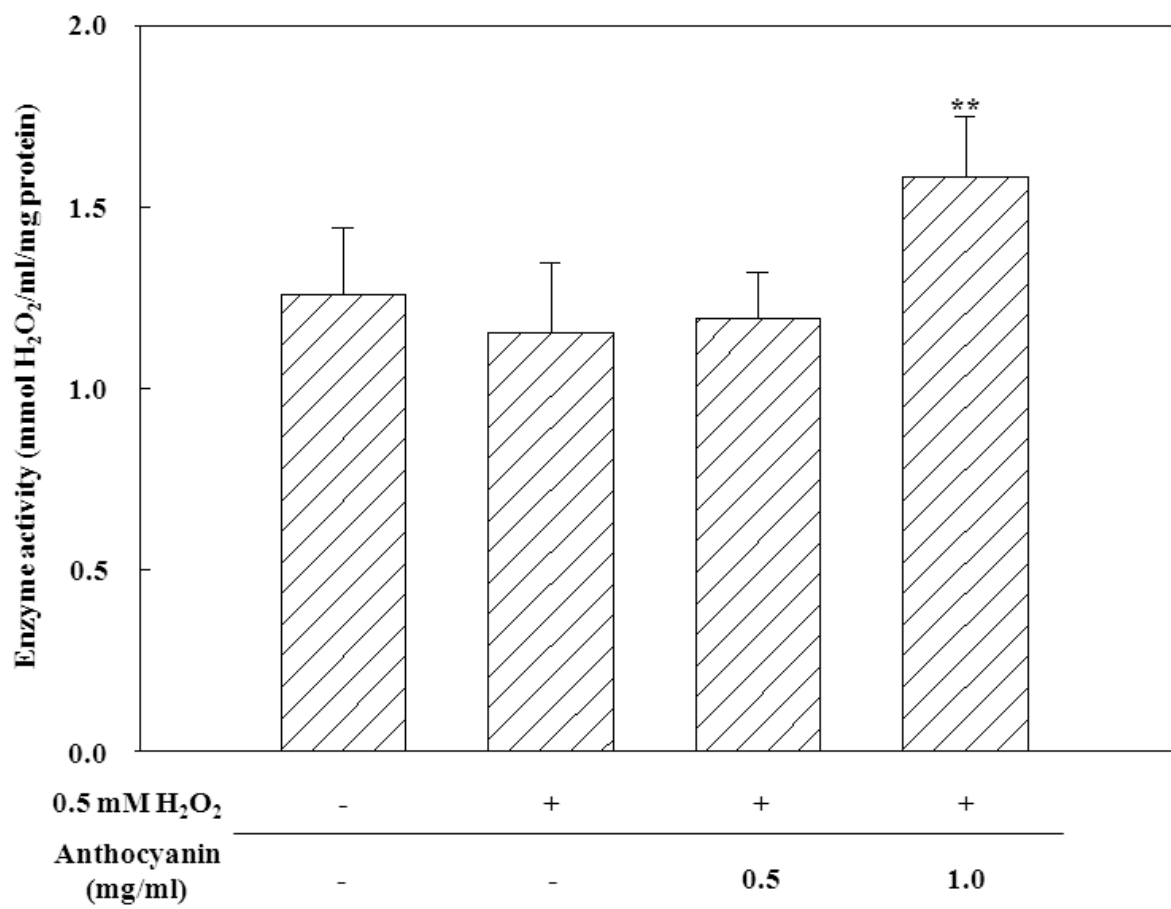


Fig. 61. Effect of the oligomeric anthocyanin on catalase activity in retinal cells.

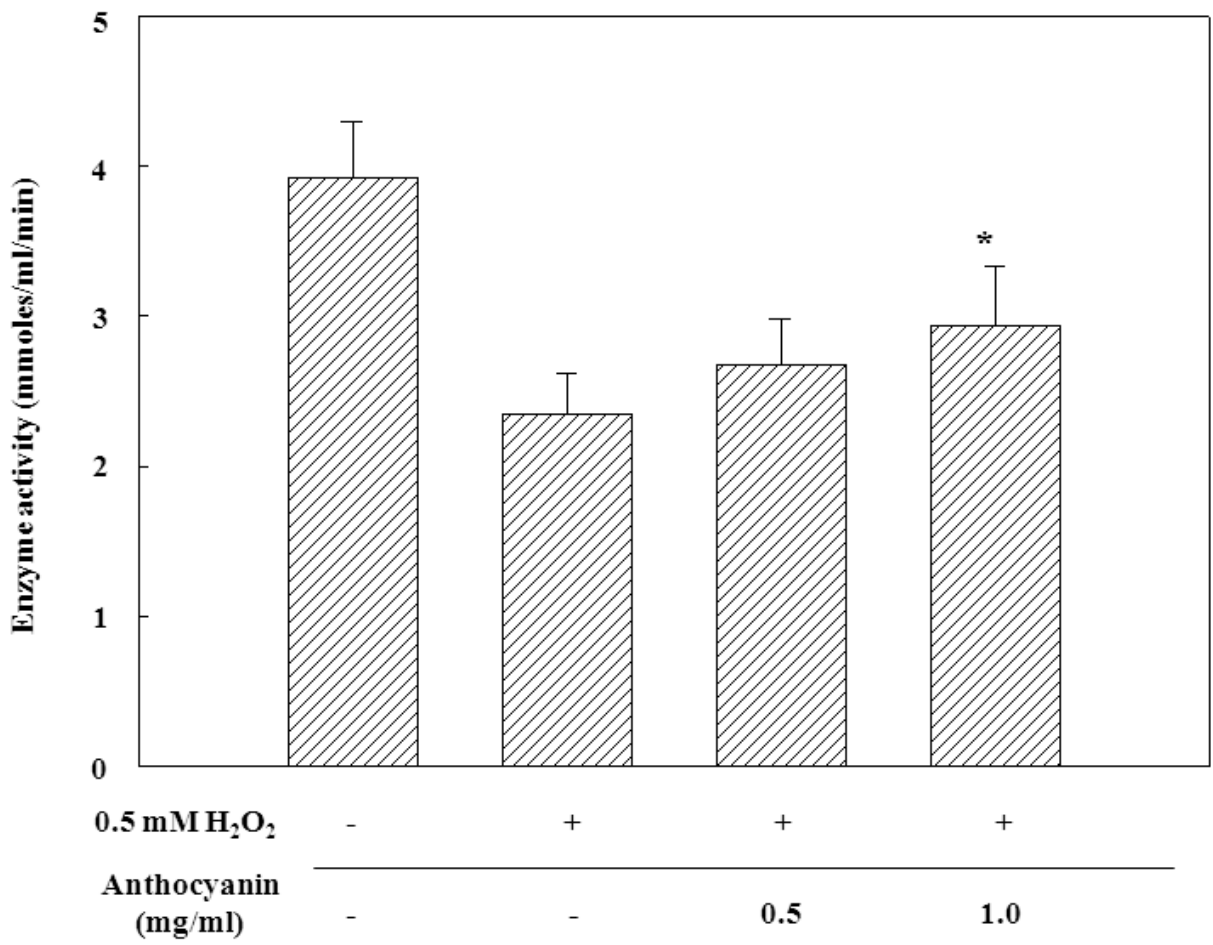


Fig. 62. Effect of the oligomeric anthocyanin on glutathione peroxidase activity in retinal cells.

안토시아닌 올리고머 및 H₂O₂ 처리후 ARPE-19의 GST 효소 활성을 측정한 결과는 Fig. 63과 같다. 산화 스트레스를 받은 군보다 안토시아닌 올리고머 0.5, 1.0 mg/ml을 처리한 군에서 매우 높은 활성을 나타낸 것을 확인 할 수 있었다.

이상의 항산화 효소 활성의 결과로 망막세포에 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발한 후 안토시아닌 올리고머를 처리한 결과 SOD, CAT, GPx, GST 등의 항산화 효소 활성이 증가함을 알 수 있었다. 따라서, 안토시아닌 올리고머의 라디칼 소거활성, 지질과산화도 억제활성 및 항산화 효소활성을 종합해 볼 때 안토시아닌 올리고머의 항산화 활성이 우수함을 확인 할 수 있었다.

3.2.4. 동물 모델에서의 안토시아닌 올리고머의 항산화 효능 검토 결과

3.2.4.1. 체중 및 조직 무게 측정

Table 4은 실험 시작 시 마우스 무게와 종료 시 마우스의 무게를 측정한 결과이다. 단회 독성 투여로 인하여 장기적인 손상모델이 아니기에 실험군 간의 체중 차이는 크게 나타나지 않았다. Table 5는 실험 종료 후 장기 무게를 측정한 결과이다. *t*-BHP를 투여하여 산화를 유도한 대조군은 정상군에 비해 비장무게와 간 무게가 모두 증가하였는데, *t*-BHP 투여로 인해 산화스트레스가 증가되어 이를 억제하기 위하여 조직이 비대해진 반면 안토시아닌 모노머와 올리고머를 투여한 군은 안토시아닌 올리고머의 산화스트레스의 억제력으로 인해 비장과 간 무게가 증가하지 않은 것으로 판단된다.

Table 4. Body weight of experimental mice.

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)
Control	32.1 ± 1.3	32.5 ± 2.1
<i>t</i> -BHP (2 mmol/kg)	32.2 ± 1.6	32.0 ± 2.2
<i>t</i> -BHP + Monomeric anthocyanin (200 mg/kg)	31.4 ± 1.1	32.1 ± 1.4
<i>t</i> -BHP + Oligomeric anthocyanin (200 mg/kg)	31.8 ± 1.6	32.1 ± 1.2
<i>t</i> -BHP + Silymarin (100 mg/kg)	32.2 ± 1.8	32.4 ± 1.4

Table 5. Spleen weight and Liver weight in experimental mice

Group	Spleen weights (mg)	Liver weights (g)
Control	94.72 ± 19.83	1.25 ± 0.04
<i>t</i> -BHP (2 mmol/kg)	108.18 ± 19.68	1.53 ± 0.08
<i>t</i> -BHP + Monomeric anthocyanin (200 mg/kg)	98.34 ± 18.91	1.37 ± 0.14
<i>t</i> -BHP + Oligomeric anthocyanin (200 mg/kg)	95.37 ± 21.97	1.29 ± 0.06
<i>t</i> -BHP + Silymarin (100 mg/kg)	96.79 ± 23.82	1.34 ± 0.11

3.2.4.2. GOT & GPT 분석

GOT 및 GPT는 아미노산 대사에 관여하는 전이효소로서 GOT는 주로 심장, 간, 골격 및 신

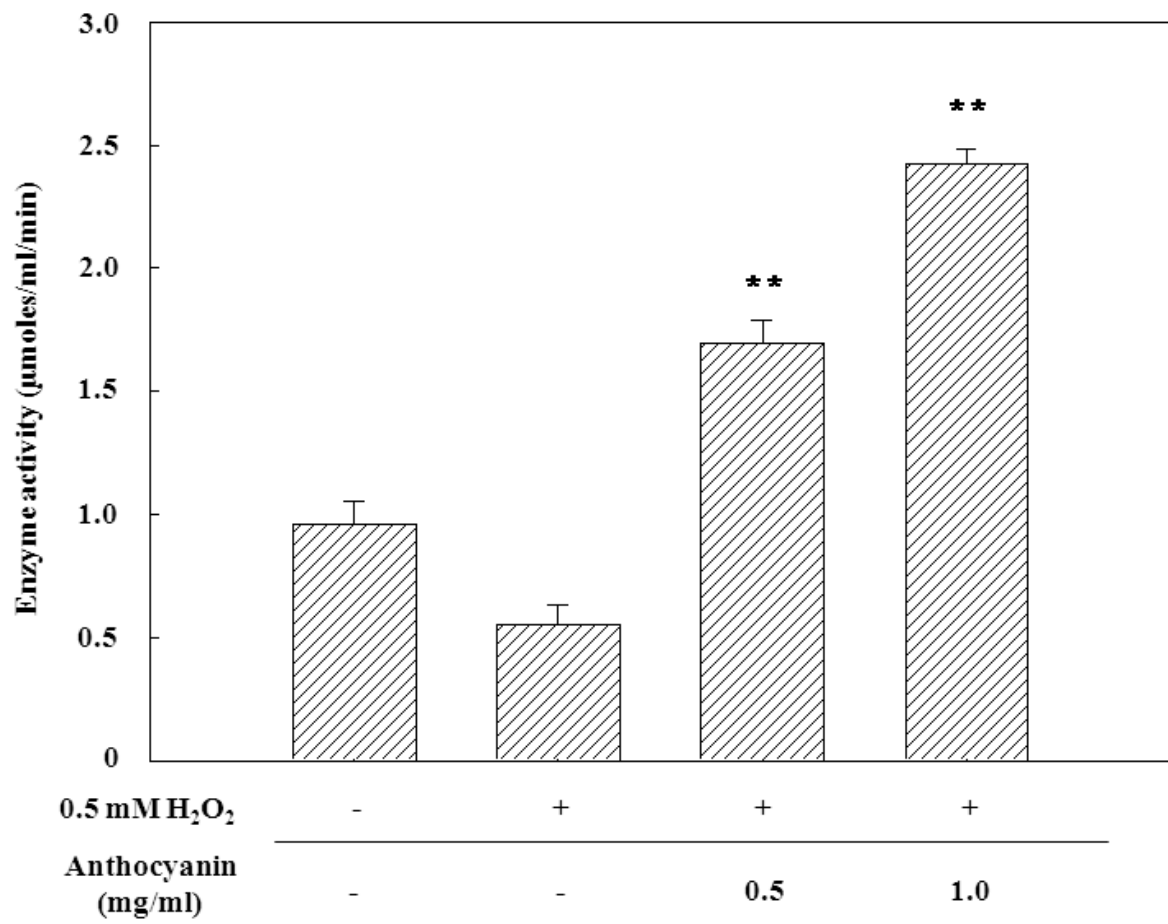


Fig. 63. Effect of the oligomeric anthocyanin on glutathione-S-transferase activity in retinal cells.

장 순으로 많이 분포되어 있다. 또한 세포장애 정도와 상관성이 높을 뿐만 아니라 다른 혈청 효소에 비해 민감하게 변화하여 간염 및 간 경변 등 간질환의 bio marker로 널리 사용되고 있다. 또한 GPT는 주로 간세포 내 존재하는 효소로 간의 활성도가 높아 이들 세포의 괴사 및 파괴 정도를 반영하는 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 이들은 간 조직이 손상을 받게 되면 다량 혈중으로 유출되어 그 활성이 증가하게 된다. 특히, 사염화탄소 처리 등 급성 간손상 시 혈중 GOT 및 GPT의 활성도가 급격하게 증가하며, 심한 바이러스성 간염 및 독성물질에 의한 간 손상 등과 같이 상당한 간 괴사가 있는 경우에 혈액 중으로 유리되어 높은 활성을 나타내게 된다. Table 6에 나타난 바와 같이 *t*-BHP 투여 대조군은 정상군에 비하여 혈청 중 GOT 및 GPT 활성이 유의적으로 증가하였다. GOT 활성의 경우, 안토시아닌 모노머와 올리고머 투여로 인하여 감소되는 경향이 나타났으며, positive control군으로 사용된 실리마린 투여군과 비슷한 수준으로 나타났다. 특히, 안토시아닌 올리고머를 투여한 군에서 현저히 GOT, GPT가 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 안토시아닌 올리고머가 *t*-BHP에 의하여 증가된 간질환 지표 효소들의 활성을 감소시키는 것으로 보아 *t*-BHP에 의해 유발되는 급성 간 조직의 산화를 억제하는 효과가 있는 것으로 판단된다.

Table 6. Measurement of GOT & GPT from mice serum

Group	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)
Control	32.25 ± 9.83	12.34 ± 3.21
<i>t</i> -BHP (2 mmol/kg)	82.35 ± 8.68	64.25 ± 4.56
<i>t</i> -BHP + Monomeric anthocyanin (200 mg/kg)	69.24 ± 7.91	58.24 ± 4.22
<i>t</i> -BHP + Oligomeric anthocyanin (200 mg/kg)	54.22 ± 6.97	46.28 ± 3.56
<i>t</i> -BHP + Silymarin (100 mg/kg)	68.41 ± 8.82	48.16 ± 3.22

3.2.4.3. 중성지방 분석

Table 7은 혈액 중의 중성지방을 측정된 결과이며, 정상군과 비교할 때 *t*-BHP 투여 대조군은 중성지방 수치가 높았다. 정상군은 중성지방 수치가 48.23 ± 2.22mg/dL, *t*-BHP 투여군은 86.60 ± 3.56 mg/dL, 안토시아닌 모노머와 올리고머를 투여한 군은 각각 75.22 ± 4.25mg/dL, 64.26 ± 5.32mg/dL를 나타내었으며, 이는 대조군에 비해 중성지방의 수치가 낮았다. 양성 대조군으로 사용된 실리마린 투여군의 중성지방 수치는 63.45 ± 5.46mg/dL로 안토시아닌 올리고머를 처리한 군과 비슷한 수치를 나타냈다. 따라서, 안토시아닌 올리고머가 혈액 내 중성지방의 증가를 효과적으로 억제하는 것으로 판단된다.

Table 7. Measurement of Triglyceride (TG) from mice serum

Group	TG (mg/dL)
Control	48.23 ± 2.22
<i>t</i> -BHP (2 mmol/kg)	86.60 ± 3.56
<i>t</i> -BHP + Monomeric anthocyanin (200 mg/kg)	75.22 ± 4.25
<i>t</i> -BHP + Oligomeric anthocyanin (200 mg/kg)	64.26 ± 5.32
<i>t</i> -BHP + Silymarin (100 mg/kg)	63.45 ± 5.46

3.2.4.4. 항산화 효소 분석

Catalase는 간에 가장 많이 존재하며, 체내에서 지방의 자동산화 및 유기물의 산화로 생긴 H₂O₂를 분해하여 무독화시키는 free radical scavenging 효소 중의 하나이다. Table 6에서와 같이 *t*-BHP 투여 대조군은 정상군에 비해 catalase활성이 증가 되었지만 안토시아닌 올리고머 투여군은 대조군보다 감소되는 경향을 나타내었다. 또한 본 연구의 결과 *t*-BHP 투여로 catalase활성이 증가한 것은 H₂O₂와 같은 free radical을 제거하기 위해 다량 생성된 것으로 볼 수 있으며, 안토시아닌 모노머와 올리고머를 투여한 군은 안토시아닌 모노머와 올리고머의 free radical 소거활성으로 인해 catalase의 활성이 증가하지 않은 것으로 판단된다. 이는 안토시아닌 모노머와 올리고머가 항산화 활성이 우수한 것으로 판단된다.

SOD는 활성산소(O₂⁻)를 H₂O₂와 O₂로 전환시켜 활성 산소에 의해 생기는 산화적 손상의 일차적 방어에 관여한다. Superoxide anion은 호기적 대사과정에서 여러 가지 생화학적 반응으로 생성되며, 이것으로부터 생성되는 hydroxyl radical은 조직 및 거대분자를 파괴하거나 기능을 상실케 한다. 산소를 이용하는 물체는 superoxide를 제거하는 효소인 SOD를 가지고 있어 생체는 superoxide에 의한 손상으로 보호되고 있다. Table 8에 나타난 바와 같이 *t*-BHP를 투여한 대조군의 SOD 활성은 정상군에 비해 감소되었고, 안토시아닌 모노머와 올리고머 투여군은 대조군보다 증가하는 결과를 나타내었으며 특히 안토시아닌 올리고머를 투여한 군이 모노머를 투여한 군보다 SOD 활성이 우수한 것으로 확인되었다.

Table 8. Measurement of antioxidant enzyme

Group	Catalase (U/mg protein)	SOD (U/ml)
Control	290.45 ± 20.12	330.41 ± 12.32
<i>t</i> -BHP (2 mmol/kg)	422.32 ± 13.45	230.23 ± 14.26
<i>t</i> -BHP + Monomeric anthocyanin (200 mg/kg)	370.23 ± 25.24	262.32 ± 12.25
<i>t</i> -BHP + Oligomeric anthocyanin (200 mg/kg)	356.23 ± 22.32	276.33 ± 13.34
<i>t</i> -BHP + Silymarin (100 mg/kg)	364.88 ± 24.56	274.64 ± 10.42

3.2.4.5. 간 조직 염색을 통한 조직학적 분석

안토시아닌 올리고머의 항산화 효과를 평가하기 위해서 Hematoxylin과 Eosin으로 간 조직을 염색하여 광학현미경 200배로 관찰하였으며, 그 결과는 Fig. 64에 나타내었다. *t*-BHP를 처리한 대조군의 간조직은 간세포의 괴사와 경화가 간조직의 바깥쪽으로 나타났다. 이는 *t*-BHP의 복강 투여로 인하여 간조직의 바깥쪽 부분이 산화스트레스를 받아 괴사와 경화가 확인되었으며 안토시아닌 모노머와 올리고머를 전처리 한 그룹은 간세포의 변성이 완화되었다. 이는, 안토시아닌 모노머와 올리고머가 효과적으로 간세포를 보호하고 있는 것으로 판단된다.

3.2.5. 안토시아닌 올리고머의 항산화 작용기작

세포와 동물 모델에서 항산화 효능을 보여준 안토시아닌 올리고머의 항산화 작용기작을 망막세포를 사용하여 규명하였다. Fig. 65.에서 *t*-BHP로 망막세포에 산화스트레스를 주었을 때 망막세포 내에서 세포 주기에 작용하여 세포주기 중 G2기의 진행을 억제하게 된다. 산화스트레

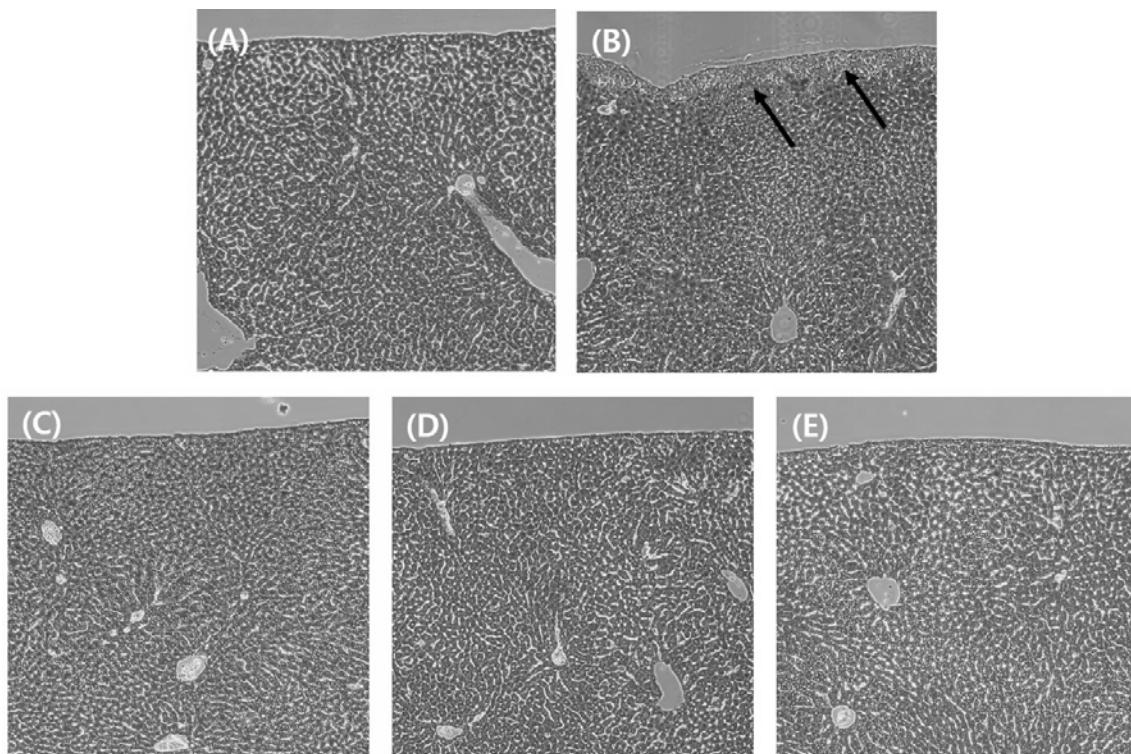


Fig. 64. Histopathological examination in liver tissue with H&E staining. (A) Control, (B) *t*-BHP (2 mmol/kg), (C) *t*-BHP + Monomeric anthocyanin (200 mg/kg), (D) *t*-BHP + Oligomeric anthocyanin (200 mg/kg), (E) *t*-BHP + Silymarin (100 mg/kg)

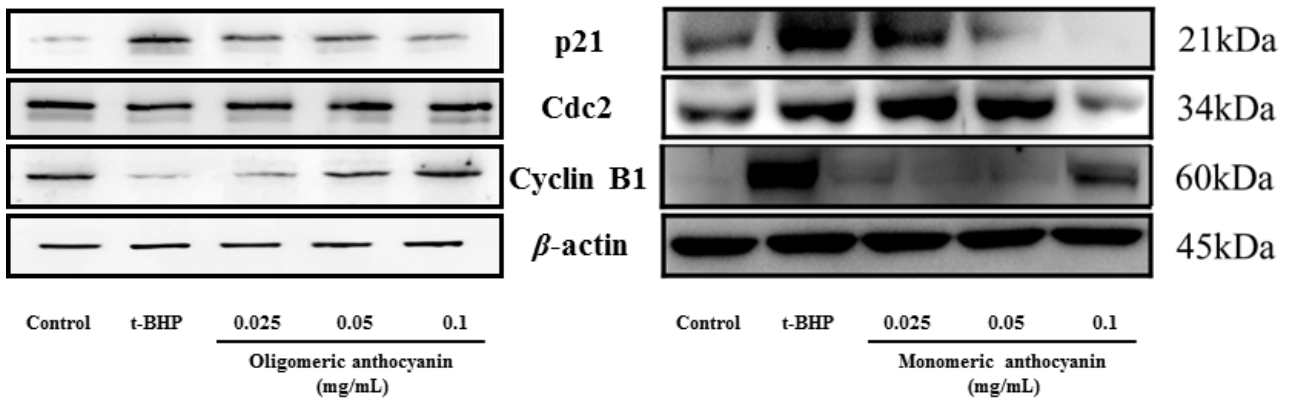


Fig. 65. Change proteins related to G2/M phase arrest in ARPE-19 cells after *t*-BHP treatment.

스를 처리하면 세포주기 중 G2기에 관여하는 단백질인 p21와 cdc2가 증가하고 cyclin B1이 감소하여 G2기가 억제됨을 확인 할 수 있었으며, 안토시아닌 올리고머를 전처리 하였을 때는 p21과 cdc2가 감소하고 cyclin B1이 증가하여 G2기 억제가 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 안토시아닌 모노머를 처리하였을 경우 올리고머를 처리하였을 경우와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 이와 더불어 FACS를 이용하여 세포주기 변화를 확인하였다. *t*-BHP로 망막세포에 산화스트레스를 주었을 때 세포의 G1기가 감소하고 G2기가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Fig. 66.에 나타내었다.

3.2.6. 안토시아닌 올리고머 분획별 항산화 활성 측정 결과

안토시아닌 올리고머를 분자량 별로 분획하여 연구를 진행하고자 하였지만, 분자량별 분리의 어려움으로 HPLC를 이용하여 구간을 분획으로 나누어 연구를 진행하였다. 첫 번째 분획의 FRAP과 ABTS 활성은 각각 1.172 ± 0.011 , 0.745 ± 0.001 을 나타내었고, 두 번째 분획은 4.195 ± 0.016 , 1.128 ± 0.000 을 나타내었고 세 번째 분획은 3.089 ± 0.02 , 1.118 ± 0.000 의 활성을 나타내었으며, 3 분획 중 2번 분획에서 가장 높은 항산화 활성을 보여주었다. 이는 table 9에 나타내었다.

또한, 각 분획과 안토시아닌 올리고머 (0.1 mg/ml), 안토시아닌 모노머 (0.1 mg/ml)를 이용하여 정상 간세포에서 세포독성을 확인하였을 때 (Fig. 67), 첫 번째 분획과 세 번째 분획은 세포에서 독성을 거의 나타내지 않은 반면에 두 번째 구간은 약 75%의 세포생존율을 나타내었다. 안토시아닌 올리고머와 안토시아닌 모노머는 약 50%의 세포생존율을 나타내었다.

Table 9. FRAP and ABTS activity of oligomeric anthocyanin fraction

Group	FRAP (mM FeSO ₄ eq./mg extract)	TEAC (mM Trolox eq./mg extract)
1 st fraction	1.172 ± 0.011 ¹⁾	0.745 ± 0.001
2 nd fraction	4.195 ± 0.016	1.128 ± 0.000
3 rd fraction	3.089 ± 0.020	1.118 ± 0.000
Vitamin C	8.279 ± 0.016	1.147 ± 0.000
BHT	6.981 ± 0.020	1.063 ± 0.001

FRAP : Ferric reducing antioxidant power

TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity

¹⁾Values represent means±SD (n=3)

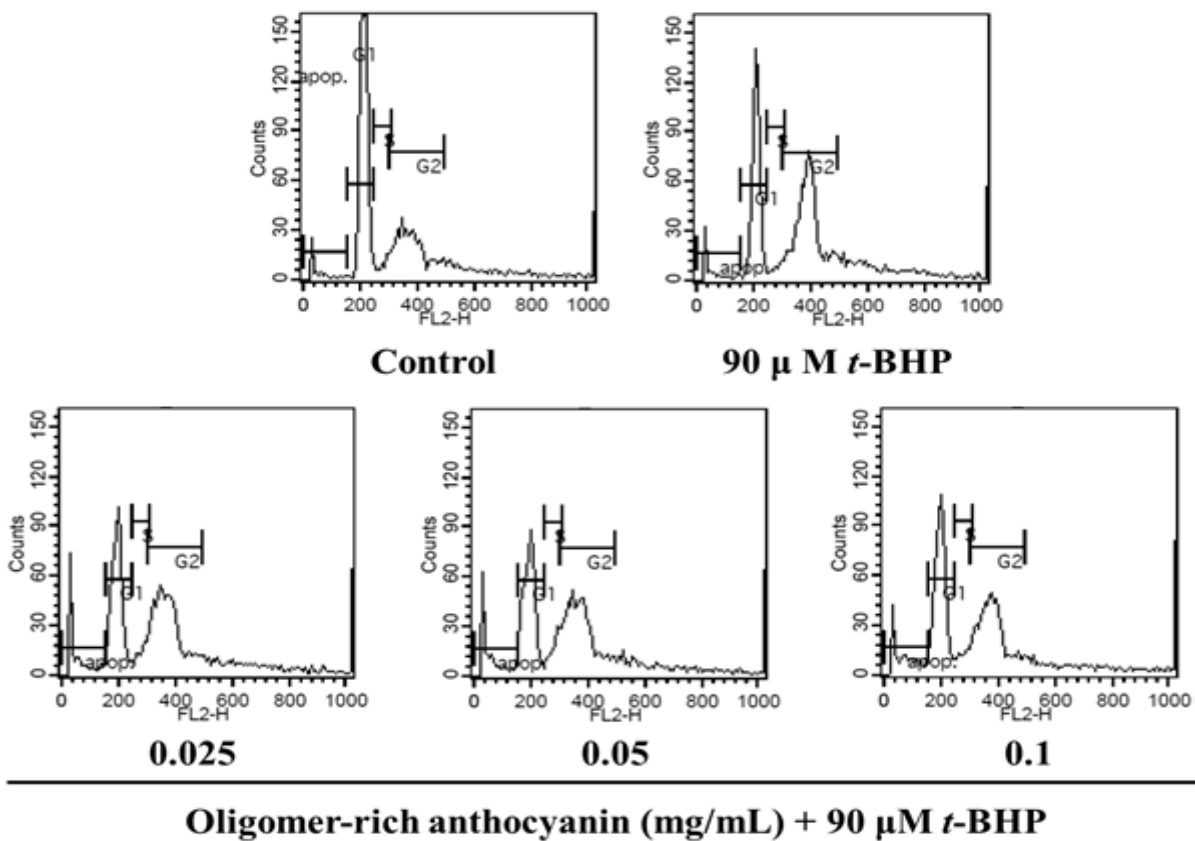


Fig. 66. Flow cytometric histogram of ARPE-19 after oligomeric anthocyanin treatment prior to *t*-BHP treatment.

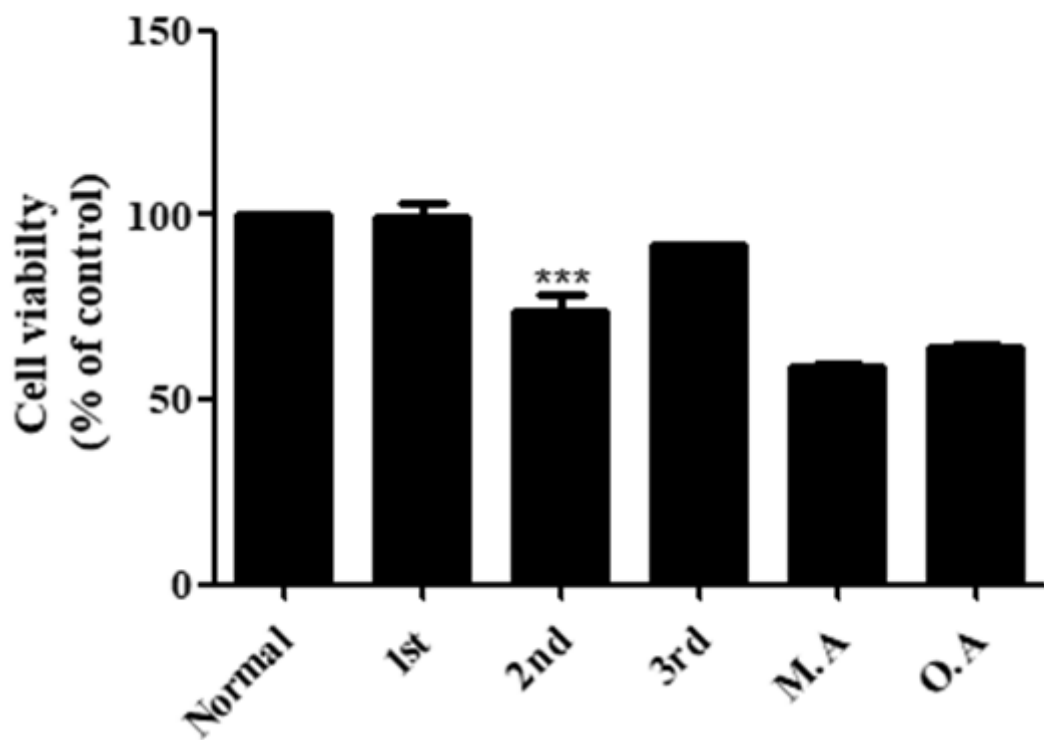


Fig. 67. Cytotoxic effect of oligomeric anthocyanin in ARPE-19 retinal cells.

3.2.7. 안토시아닌 올리고머의 항염증 활성

안토시아닌 올리고머의 항염증 활성을 NO assay법을 사용하여 측정한 결과, LPS (0.1 µg/ml)를 처리한 군보다 안토시아닌 올리고머를 처리한 군이 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소한 것으로 확인되었다 (Fig. 68).

3.2.8. 동물 실험을 통한 안토시아닌 올리고머의 항염증 활성 평가 결과

3.2.8.1. 체중 및 조직 무게와 길이 측정

실험 결과, DSS를 섭취한 마우스의 경우 체중 증가량이 정상군과 시료만 먹인 마우스보다 낮은 증가량을 보여주었다. 간의 경우에는 DSS 섭취여부와 상관없이 유사한 무게를 보여주었지만 비장의 경우 DSS 섭취군에서 체중에 비해 무거운 중량을 나타내었다. 이는 DSS로 인한 염증 발생으로 비장의 중량이 증가한 것으로 판단된다. 대장·직장의 길이를 비교한 결과, DSS 섭취군의 대장 길이가 비섭취군에 비해 짧은 것을 확인 할 수 있다. 이는 DSS에 의한 대장염의 발생에 따른 결과라고 판단된다 (Table 10). 또한, DSS 섭취군간의 비교 결과를 통하여 DSS만 섭취한 군보다 안토시아닌 모노머 및 올리고머를 같이 섭취한 군에서 비장의 중량 감소와 대장·직장의 길이 증가를 확인하였다. 이는 안토시아닌이 DSS로 유발된 대장염에 효능이 있음을 확인할 수 있다. 특히 안토시아닌 올리고머가 모노머보다 더 높은 보호효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

3.2.8.2. CD4⁺와 CD8⁺의 측정 결과

염증 반응에서 중요한 역할을 하는 CD4⁺와 CD8⁺을 측정하였다 (Table 11, 12). 비장에서는 CD4⁺의 수치가 DSS 비섭취군보다 섭취군이 더 낮은 것을 확인 할 수 있었고 CD8⁺는 DSS 섭취군이 더 높은 것을 확인 할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 CD4⁺/CD8⁺을 구하였을 때 Table 11의 결과를 얻었고 DSS 섭취군에서 낮은 수치를 확인 할 수 있었다. 림프절에서도 비장과 같은 경향의 결과를 나타내었다. DSS 섭취군에 비해 안토시아닌을 섭취시킨 군의 CD4⁺와 CD8⁺의 수치가 정상군 쪽으로 회복되는 것을 확인 할 수 있었고, 특히, 안토시아닌 올리고머를 섭취시킨 군이 모노머 섭취군에 비해 더 높은 수치 회복을 보여주었다.

3.2.8.3. 임파구의 분리 및 정제 결과

IgA와 IgE를 측정한 결과, 혈청 내에는 IgE가 IgA보다 높은 수치를 보여주었으며, 림프절에서는 IgA가 높은 수치를 보여주었다(Fig. 69, 70). IgA는 혈청과 림프절 모두에서 DSS 섭취와 상관없이 유사한 수치를 보여주었으며, IgE의 경우 DSS 섭취군에서 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, DSS 섭취군 중 안토시아닌 섭취군은 IgE의 수치가 감소하는 것을 확인 할 수 있었고, 안토시아닌 올리고머가 안토시아닌 모노머보다 더 높은 감소 수치를 보여주었다. DSS로 유도된 염증성 장질환 모델에서 안토시아닌이 항염증 활성이 있음을 확인 하였고, 그 중 합성된 안토시아닌 올리고머의 활성이 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

3.2.9. IL-10 결핍 마우스에서의 안토시아닌 올리고머의 항염증 활성 측정 결과

3.2.9.1. 체중 및 조직 무게와 길이 측정

항염 작용을 하는 IL-10을 결핍시킨 마우스를 사용하여 안토시아닌 올리고머의 항염증 활성을 확인하였다. IL-10 결핍 마우스는 정상 마우스보다 체중이 적었으며, 안토시아닌 올리고머

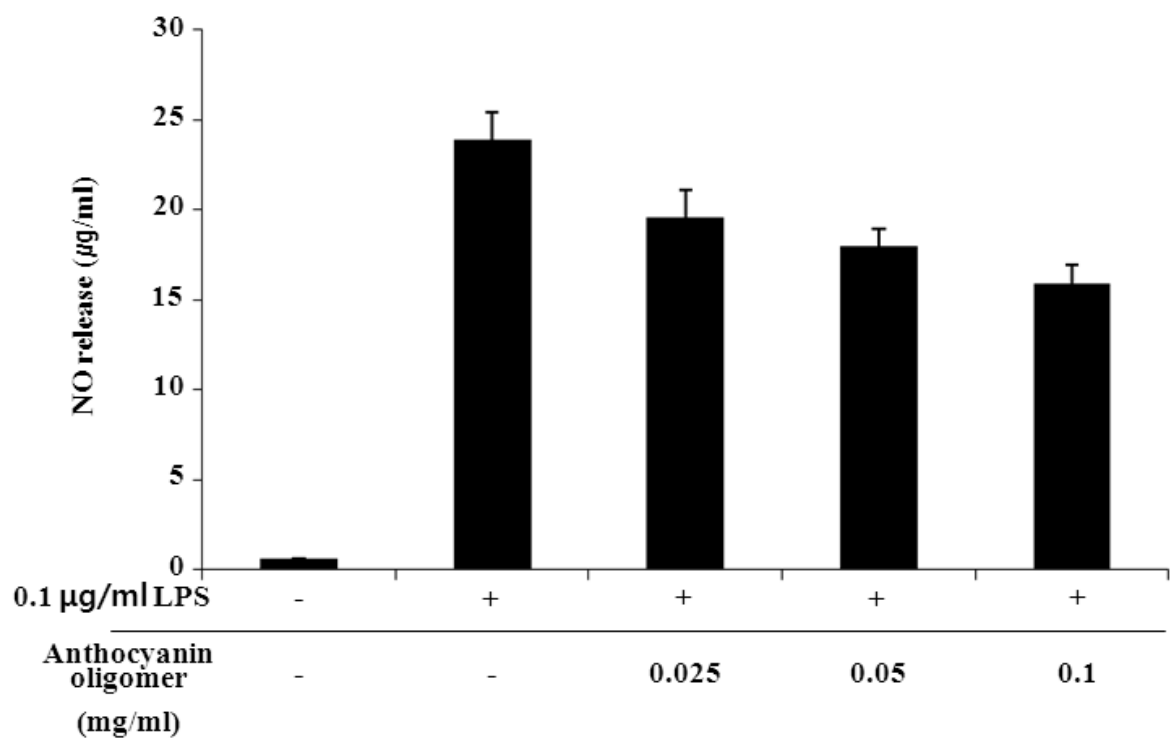


Fig. 68. NO inhibitory activity of oligomeric anthocyanin.

Table 10. Weights of body and organs, length of colorectum

		DSS-untreated			DSS-treated		
		Control	Monomeric anthocyanin	Oligomeric anthocyanin	DSS	Monomeric anthocyanin	Oligomeric anthocyanin
Body weight (g)	Initial	22.43±0.13	21.94±0.27	21.72±0.24	21.49±0.39	22.08±0.23	20.83±0.34
	Final	29.73±0.25	29.46±0.32	29.82±0.29	22.45±0.26	22.68±0.16	21.62±0.21
Liver weight (g/kg body weight)		69.94±3.53	70.49±2.97	69.73±4.82	68.75±4.57	65.41±3.83	67.82±5.76
Spleen weight (g/kg body weight)		7.59±0.15	7.29±0.18	7.05±0.27	17.82±1.08	15.48±0.85	15.29±1.53
Length of colorectum (cm)		8.75±0.27	8.14±0.28	8.64±0.22	5.97±0.31	6.24±0.45	6.17±0.26

DSS = Dextran Sulfate Sodium

Table 11. Spleen T lymphocyte populations in experimental groups.

	DSS-untreated			DSS-treated		
	Control	Monomeric anthocyanin	Oligomeric anthocyanin	DSS	Monomeric anthocyanin	Oligomeric anthocyanin
CD4+	17.49±1.25	17.22±0.99	17.39±1.34	8.65±1.45	12.55±1.13	14.27±2.34
CD8+	7.60±0.66	7.11±1.24	7.00±1.22	11.59±1.67	9.13±1.22	8.25±1.67
CD4+/CD8+	2.30±0.01	2.42±0.02	2.49±0.01	0.75±0.02	1.38±0.03	1.73±0.02

DSS = Dextran Sulfate Sodium

Table 12. MLN T lymphocyte populations in experimental groups.

	DSS-untreated			DSS-treated		
	Control	Monomeric anthocyanin	Oligomeric anthocyanin	DSS	Monomeric anthocyanin	Oligomeric anthocyanin
CD4+	47.58±3.54	48.22±2.59	47.79±1.34	38.46±2.99	41.46±3.00	46.35±3.46
CD8+	16.88±1.22	16.10±1.56	16.46±1.22	21.60±1.89	20.57±1.12	17.14±2.55
CD4+/CD8+	2.82±0.02	2.99±0.03	2.90±0.02	1.78±0.01	2.02±0.03	2.70±0.03

DSS = Dextran Sulfate Sodium

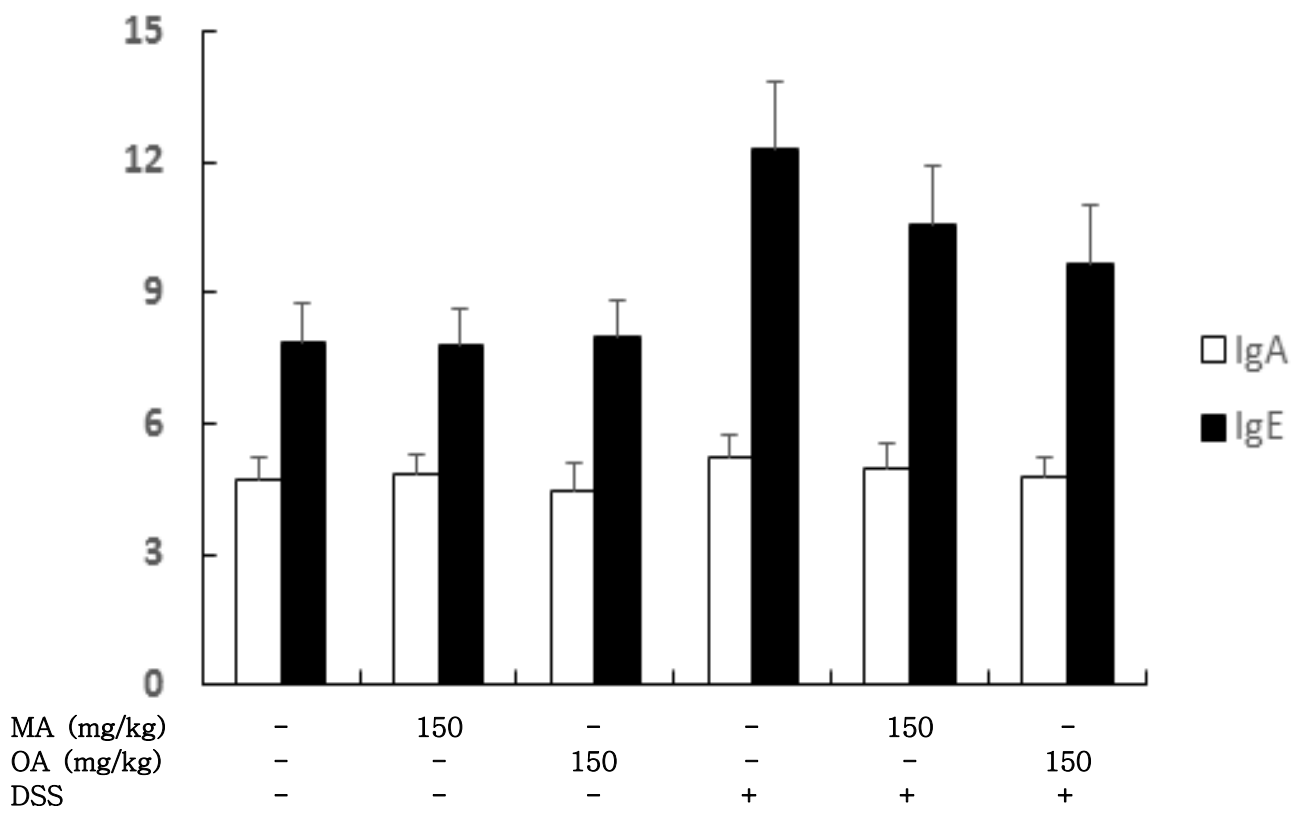


Figure 69. IgA and IgE concentrations in serum lymphocytes.

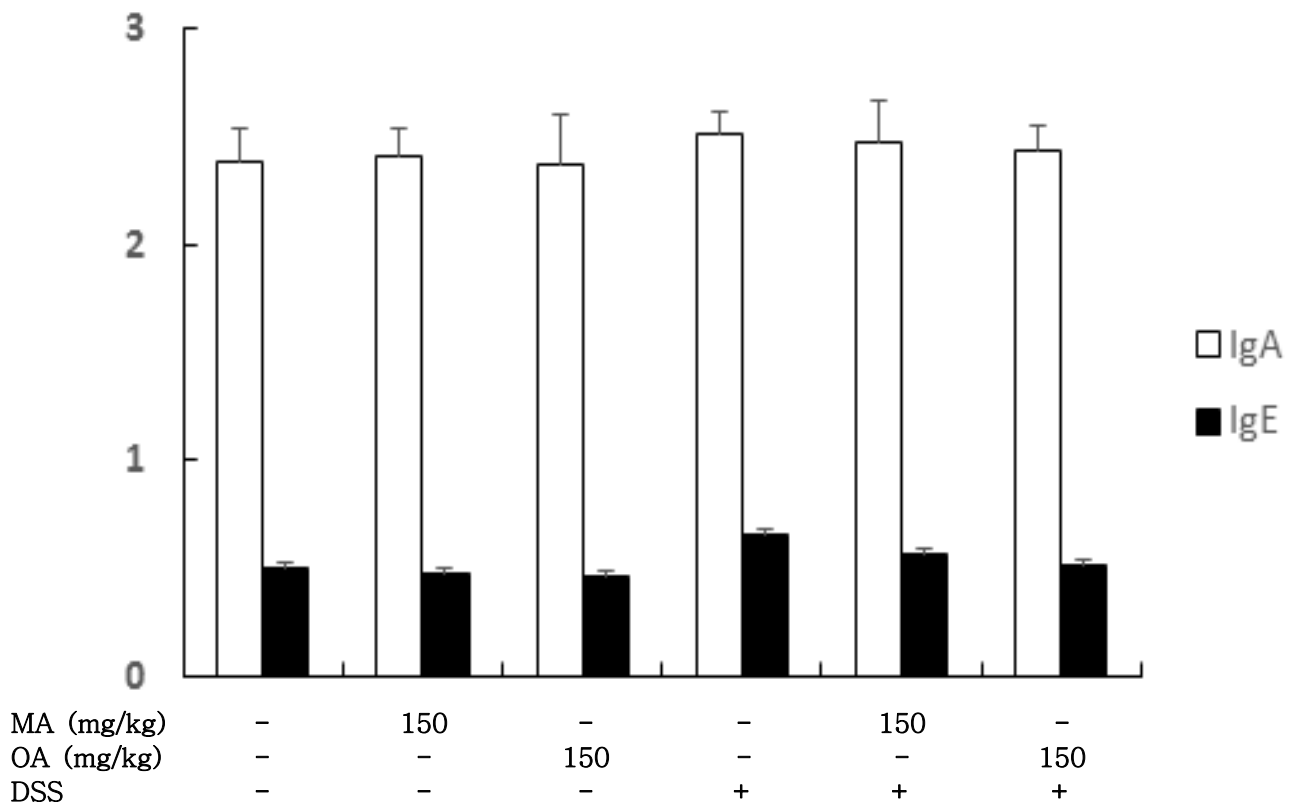


Figure 70. IgA and IgE concentrations in MLN lymphocytes.

를 섭취한 경우 몸무게 증가량이 더 적은 것을 확인 할 수 있었다 (Table 13). IL-10 결핍 마우스의 비장은 체중 대비 중량이 많이 나가는 것을 확인 할 수 있으며, 이는 IL-10의 결핍으로 염증이 발생하여 비장에 무리를 주어 증가한 것으로 보인다. 또한, 간의 무게, 소장 길이와 대장의 길이를 보면 정상군, IL-10 결핍군과 안토시아닌 올리고머군의 순으로 나타나는데 체중을 고려하였을 때, 유사한 결과임을 확인 할 수 있다 (Table 14).

Table 13. Weights of body

Group	Initial body weight (g)	Final weight (g)	Food intake (g)
Normal	22.20 ± 0.98 ^a	27.00 ± 0.63 ^a	17.70 ± 2.55 ^b
IL-10	17.60 ± 0.97 ^b	24.60 ± 0.63 ^b	19.89 ± 2.31 ^a
IL-10 + Oligomeric anthocyanin	18.40 ± 1.14 ^b	21.40 ± 1.14 ^c	16.93 ± 2.65 ^b

Table 14. Weights of organs

Group	Organs weight (g)		Organs length (cm)	
	Spleen	Liver	Small intestine	Large intestine
Normal	0.088 ± 0.010 ^b	1.412 ± 0.106 ^a	40.10 ± 1.95 ^a	10.94 ± 0.68 ^a
IL-10	0.154 ± 0.018 ^a	1.193 ± 0.100 ^b	37.36 ± 0.66 ^b	8.78 ± 0.58 ^b
IL-10 + Oligomeric anthocyanin	0.137 ± 0.019 ^a	0.892 ± 0.054 ^c	36.84 ± 0.85 ^b	7.90 ± 0.93 ^b

3.2.9.2. 염증 관련 사이토카인 측정 결과

다음으로 염증관련 사이토카인을 측정한 결과, 염증 발생 관련 사이토카인인 TNF- α , pSTAT1, T-bet와 pSTAT6을 IL-10 결핍군과 안토시아닌 처리군과 비교하였을 때 안토시아닌 올리고머 처리군이 더 낮은 발현량을 보여주었으며, 반대로 항염증 관련 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-4에서는 더 많은 발현량을 보여주었다 (Fig. 71, 72). 이런 결과를 보았을 때 안토시아닌 올리고머는 항염증 효능이 뛰어나다는 것을 확인 할 수 있었다.

3.2.9.3. CD4⁺와 CD8⁺의 측정 결과

염증 반응에서 중요한 역할을 하는 CD4⁺와 CD8⁺을 측정하였다 (Table 15, 16, 17). 비장에서는 CD4⁺와 CD8⁺의 수치가 IL-10 결핍군에서 낮은 것을 확인 할 수 있고, 안토시아닌 올리

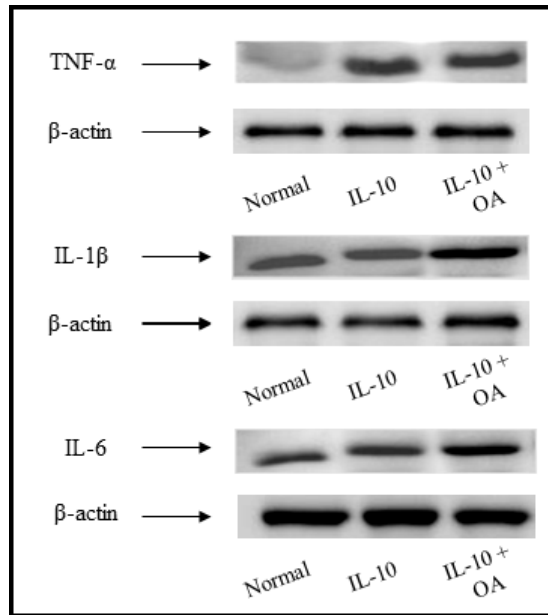


Figure 71. Effects of oligomeric anthocyanin on the regulation of various protein expression levels in experimental groups.

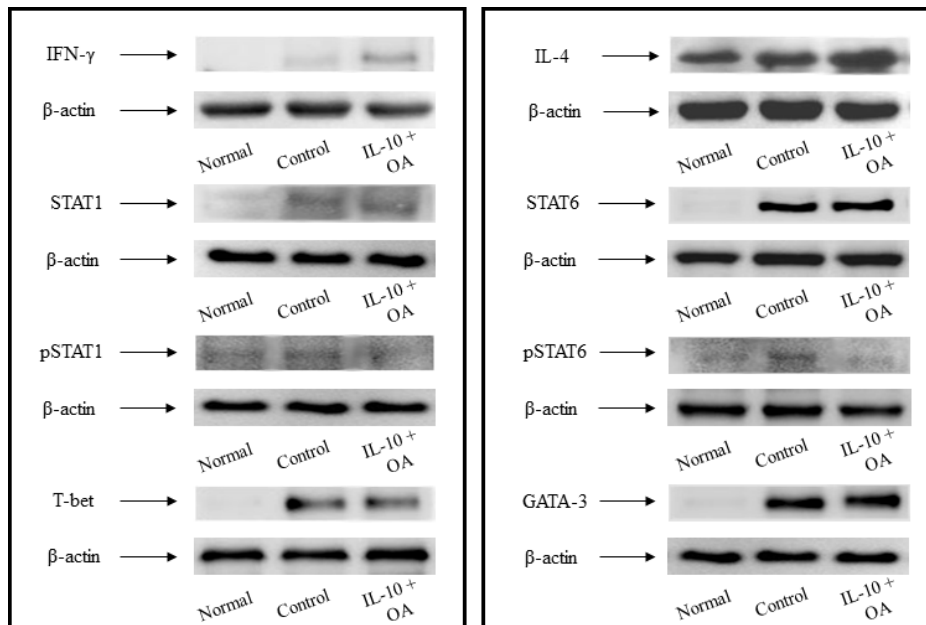


Figure 72. Effects of oligomeric anthocyanin on the regulation of various protein expression levels in experimental groups.

Table 15. Spleen T lymphocyte populations in experimental groups.

Group	CD4+ (%)	CD8+ (%)	CD4+/CD8+ (%)
Normal	10.9 ± 1.7a	5.2 ± 0.6a	2.1 ± 0.1b
IL-10	2.8 ± 0.8c	1.8 ± 0.2b	1.6 ± 0.1b
IL-10 + Oligomeric anthocyanin	7.0 ± 0.5b	2.0 ± 0.4b	3.5 ± 0.1a

Table 16. MLN T lymphocyte populations in experimental groups.

Group	CD4+ (%)	CD8+ (%)	CD4+/CD8+ (%)
Normal	28.3 ± 4.5a	9.3 ± 1.2a	3.0 ± 0.1c
IL-10	16.7 ± 3.1b	1.5 ± 0.7b	11.1 ± 0.1b
IL-10 + Oligomeric anthocyanin	33.8 ± 4.8a	1.5 ± 0.4b	22.5 ± 0.1a

Table 17. PP T lymphocyte populations in experimental groups.

Group	CD4+ (%)	CD8+ (%)	CD4+/CD8+ (%)
Normal	3.1 ± 0.8b	2.3 ± 0.3a	1.3 ± 0.1c
IL-10	2.7 ± 0.6b	0.4 ± 0.2c	6.8 ± 0.1a
IL-10 + Oligomeric anthocyanin	8.4 ± 0.6a	1.2 ± 0.4b	7.0 ± 0.1a

며 처리군에서는 CD4⁺와 CD8⁺의 수치가 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 림프절은 비장과 같이 정상군에 비해 IL-10 결핍군의 CD4⁺와 CD8⁺의 수치가 감소하는 것을 볼 수 있다. 하지만 안토시아닌 올리고머를 처리한 군에서는 CD4⁺가 높은 수치를 보이고 CD8⁺는 회복되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 흉선의 임파구는 비장의 결과와 유사한 결과를 나타내었다.

3.2.9.4. 임파구의 분리 및 정제 결과

IgA와 IgE를 측정된 결과, IL-10 결핍군에서 IgA와 IgE의 수치가 높아지는 것을 확인할 수 있었고, 반면에, 안토시아닌 올리고머 처리군에서는 IgA와 IgE의 수치가 회복되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 73).

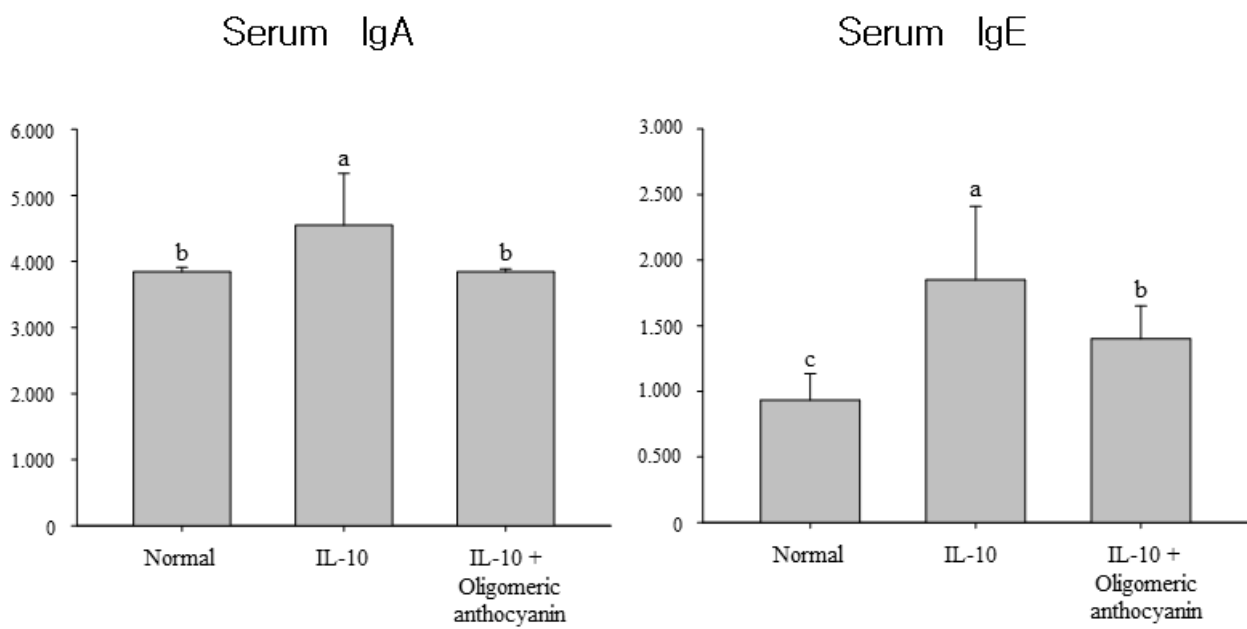


Figure 73. IgA and IgE concentrations in MLN lymphocytes.

3.2.10. 안토시아닌 올리고머의 항염증 작용기작 규명 결과

대식세포 및 동물 모델에서 항염증 활성이 입증된 안토시아닌 올리고머의 항염증 작용기작을 대식세포에서 규명하였다. Fig. 74를 보면, LPS 처리군에서 iNOS 단백질이 증가하였고 안토시아닌 올리고머 처리군은 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타내었다. Fig. 75에서도 염증 매개체인 nitrite oxide와 cytokine인 IL-6 역시 안토시아닌 올리고머가 억제하는 것으로 나타내었다. 또 다른 항염증 작용기작 중 하나인 MAPK 단백질에서는 안토시아닌 올리고머가 ERK와 JNK 단백질의 인산화를 억제하지 못하였지만, p38 단백질의 인산화는 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타내었다 (Fig. 76).

3.2.11. 안토시아닌 올리고머의 분획별 항염증 활성 측정 결과

안토시아닌 올리고머의 분자량별 항염증 활성 역시 HPLC를 이용하여 구간을 나누어 측정하였다. 대식세포에서 nitrite oxide의 생성 억제를 확인한 결과, 첫 번째 구간과 두 번째 구간은 대조군에 준하는 효과를 나타내었고 세 번째 구간은 대조군보다 뛰어난 nitrite oxide의 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 반면에 안토시아닌 올리고머와 모노머 (0.1 mg/ml)는 각각의 구간들보다 낮은 억제효과를 나타내었다. 이때 세포생존율에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. (Fig. 77).

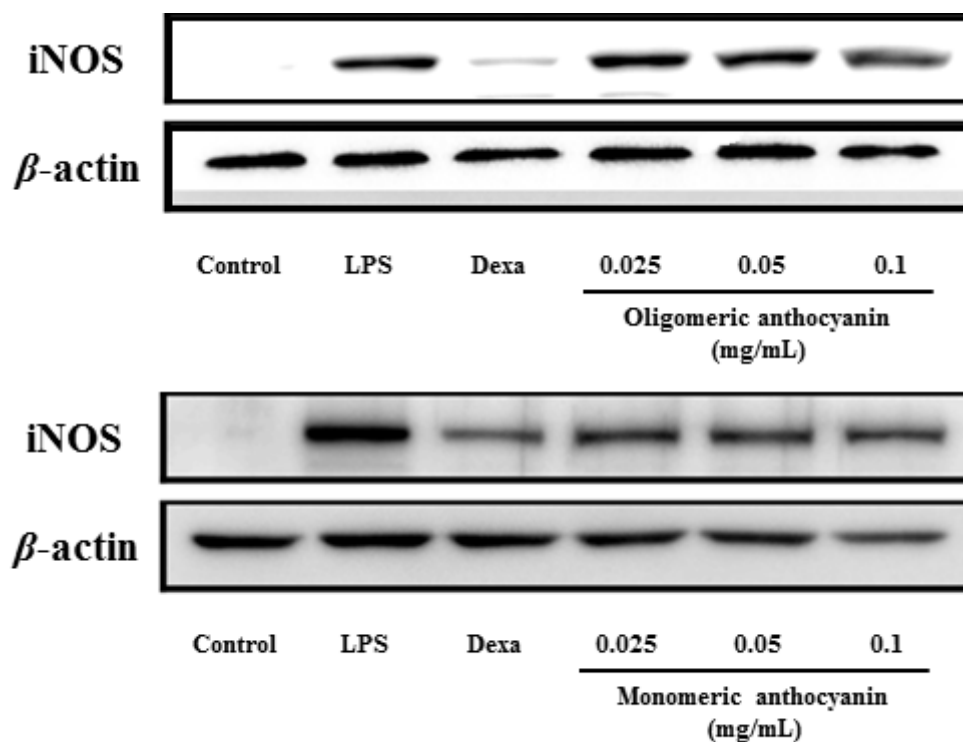


Figure 74. iNOS protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage.

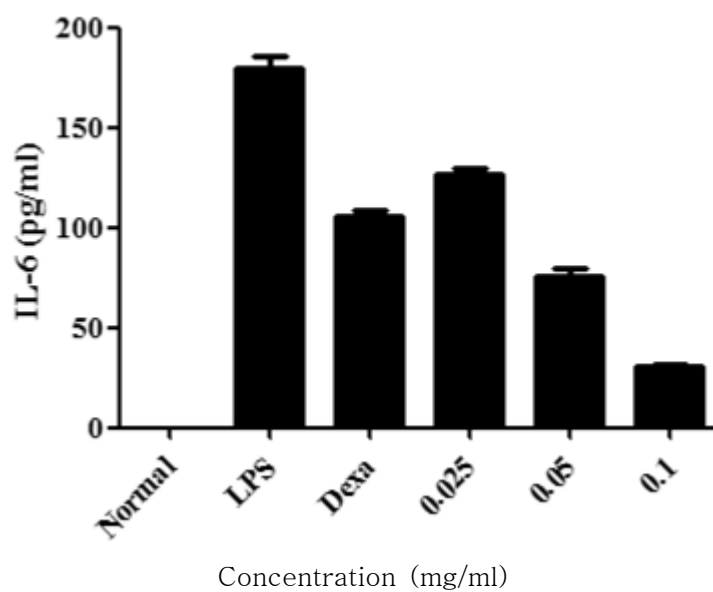


Figure 75. Pro-inflammatory cytokine inhibitory effects of oligomeric anthocyanin in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage.

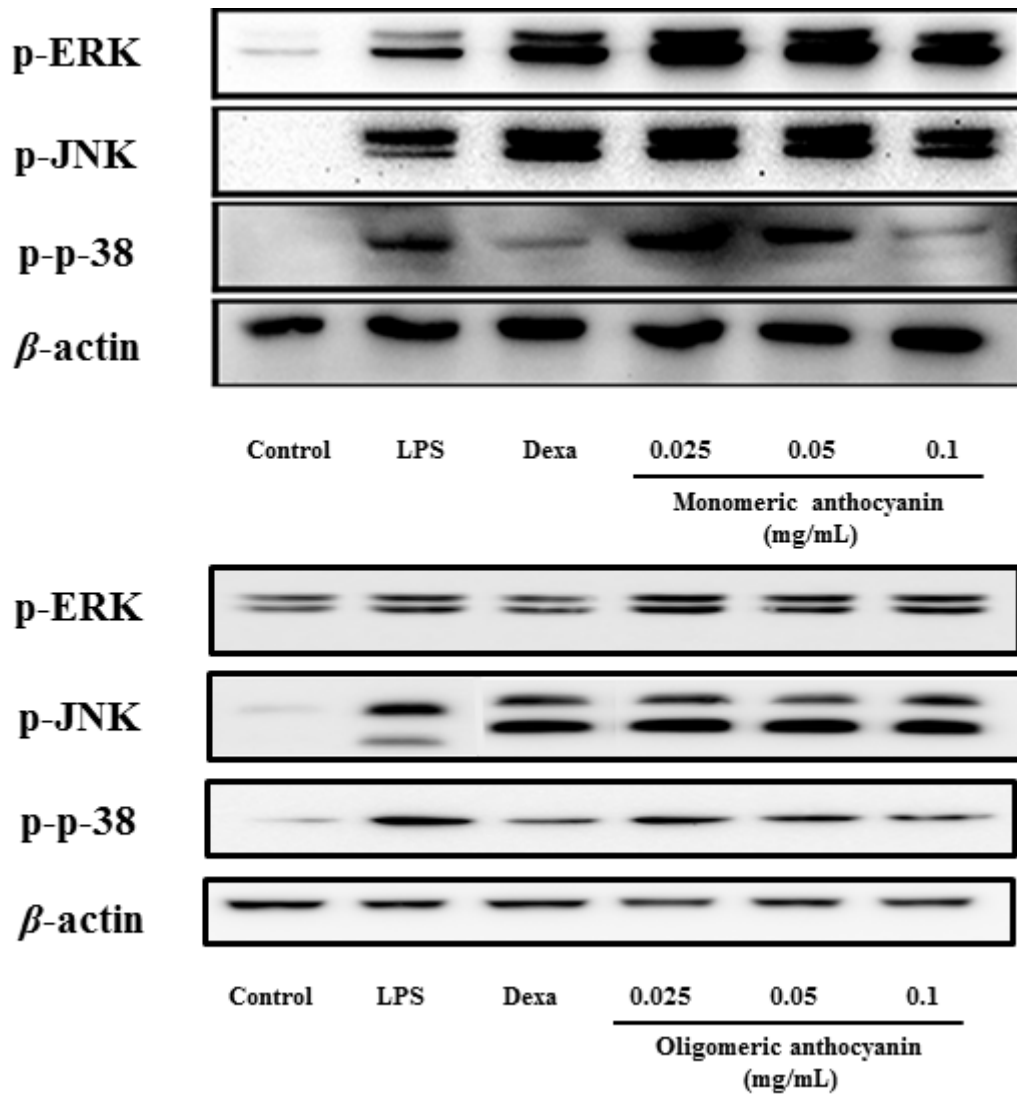
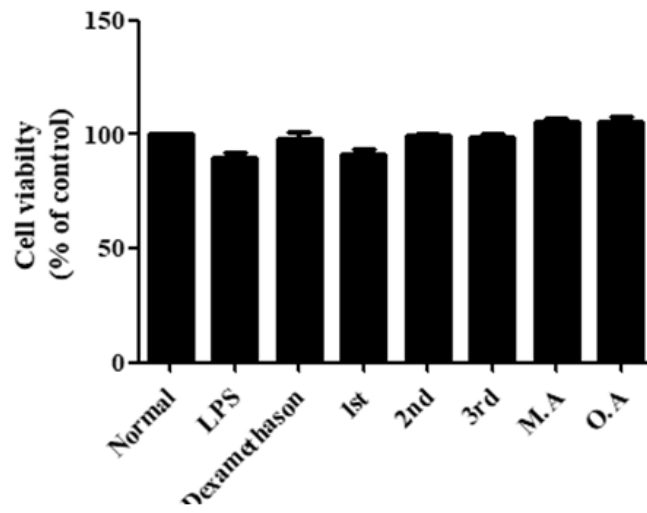


Figure 76. MyD88-dependent pathway associated protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage.

(A)



(B)

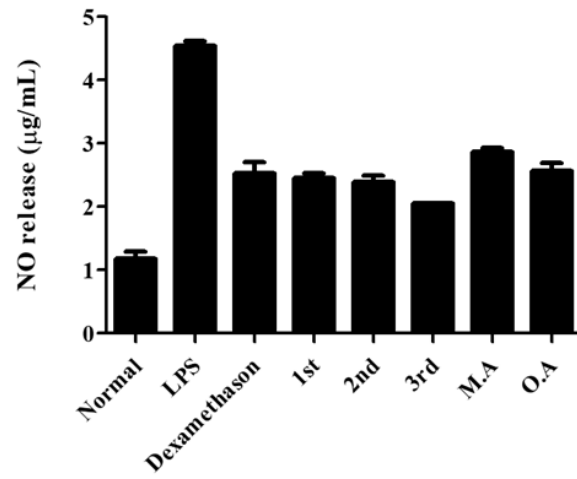


Figure 77. Cell viability(A) and inhibition of nitrite production (B).

3.2.12. 안토시아닌 올리고머의 안전성 평가 결과

3.2.12.1. 마우스를 이용한 소핵시험 결과

안토시아닌 올리고머의 소핵 시험을 수행하기 위하여 용량 설정 시험을 수행하였다. 가이드라인에서 정하고 있는 최고용량은 2,000 mg/kg이지만, 시험물질이 식품인 것을 고려하여 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 2,500, 1,250, 625 및 313 mg/kg의 4용량을 설정하였다. 1 용량당 암수 각 3 마리로 하였고 폴리에틸렌제 존데를 장착한 주사기 (1 ml)를 사용하여 1회 강제경구 투여하였다. 투여액량은 10 ml/kg로 하고, 균분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다. 투여직후, 투여후 2시간, 투여후 1, 2 및 3일에 각 용량별 일반증상 및 사망동물을 관찰하였다.

용량설정시험의 결과, 시험물질 독성에 의한 일반증상 및 사망동물은 관찰하였다 (Table 18, 19). 5,000 mg/kg에서 암, 수에서 사망례가 존재하여 본 시험의 최고용량은 사망동물이 관찰되지 않은 2,500 mg/kg 으로 하고, 이하 공비 2로 2 용량 (1,250 및 625 mg/kg)의 시험물질 균을 설정하였고, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 또한, 일반증상 및 사망동물에 있어 암수 차이가 관찰되지 않았기 때문에 본 시험은 수컷 동물만 사용하였다.

용량설정시험에서 설정한 최고용량 (2,500 mg/kg)을 1회 경구투여하고, 투여후 24, 48 및 72 시간째에 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도를 확인하였다. 각 시간당 동물은 3마리로 하여, 10 ml/kg를 투여액량으로 하고, 균분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

시험물질 투여직후, 투여후 2시간, 투여후 1, 2 및 3일에 일반증상을 관찰하여 큰 이상을 발견하지 못했다 (Table 20). 검체제작시간 설정시험의 결과, 투여후, 24 시간대에서 소핵유발빈도가 0.233%로 투여후 48 (0.083%) 및 72 시간대 (0.017%)보다 높게 나타난 것으로부터 투여후 24시간을 본 시험의 검체제작시간으로 설정하였다 (Table 21).

안토시아닌 올리고머는 식품으로 사용되기 때문에 경구 투여를 투여경로로 선택하여 본 시험을 진행하였다. 시험물질은 폴리에틸렌제 존데를 장착한 주사기 (1 ml)를 사용하여 1회 강제경구 투여하였고, 음성대조군은 시험물질과 동일한 방법으로 부형제를 1회 강제경구 투여하였으며, 양성대조물질 MMC는 일반적으로 많이 사용되고 있는 복강에 1 ml (26 G) 일회용 주사기를 이용하여 검체제작 24시간 전에 1회 투여하였다. 투여액량은 10 ml/kg로 하고, 균분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

일반증상 관찰은 투여직후, 투여 후 2 시간 및 검체제작일까지 24시간 간격으로 실시하며, 각 용량의 사망동물을 관찰하였고, 체중은 골수채취직전에 측정하였다. 시험물질 투여후 각군의 검체제작시간에 동물을 경추탈골한 후, 대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 200 µL의 우데아 혈청을 관류시켜 골수세포를 채취하였다. 골수세포부유액은 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 소량을 슬라이드글라스에 떨어뜨려 도말하였다. 개체당 2매의 골수도말검체를 제작하였다. 슬라이드글라스에 개별번호를 기입하고 충분히 건조시킨 후, 메탄올로 고정하였다. 3% Giemsa 염색액 (0.01 mol/L Sörenson 인산완충액 (pH 6.8)의 조제)으로 30분간 염색하였다. 0.01 mol/L Sörenson 인산완충액 (pH 6.8)을 사용하여 세척하고 0.004% citric acid 수용액에 세정하여 건조시켰다. 코드화된 골수도말표본을 600배 배율의 현미경으로 관찰하였다. 검체 1장당 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte)를 1,000개씩 관찰하고, 1개체당 2,000개의 다염성적혈구를 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 대한 소핵다염성적혈구 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현율을 구하였다. 골수세포의 증

Table 18. Clinical Signs (Dose Range Finding Study : Male)

Test substance	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing					
					0		1	2	3	
					Post dosing	2 hours post dosing				
Anthocyanin oligomers for improving dry eye	313	P.O.	3	NOA	3	3	3	3	3	
	625	P.O.	3	NOA	3	3	3	3	3	
	1,250	P.O.	3	Soft stool		3				
				Soiled perineal region		1				
				NOA	3		3	3	3	
	2,500	P.O.	3	Soft stool		3				
				Soiled perineal region		2				
				Rale			3			
				Compound-colored stool			3	3		
				Abnormal fur					2	
				NOA	3					3
				NOA				3		
	5,000	P.O.	3	Soft stool		3				
				Soiled perineal region		1	1			
				Rale			2			
				Compound-colored stool			2	1		
				Abnormal fur			2	1	1	
				Hypothermia			2			
Death						1	1			
NOA	3									

NOA : No Observable Abnormality

P.O. : Per Os

Table 19. Clinical Signs (Dose Range Finding Study : Female)

Test substance	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing				
					0		1	2	3
					Post dosing	2 hours post dosing			
	313	P.O.	3	NOA	3	3	3	3	3
	625	P.O.	3	NOA	3	3	3	3	3
	1,250	P.O.	3	NOA	3	3	3	3	3
Anthocyanin oligomers for improving dry eye	2,500	P.O.	3	Soft stool		3			
				Rale			3		
				Compound-colored stool			3	3	
				NOA	3				3
				Soft stool		3			
				Soiled perineal region		3			
				Compound-colored stool			1	1	
5,000	P.O.	3	Death			2			
			NOA	3				1	

NOA : No Observable Abnormality

P.O. : Per Os

Table 20. Clinical Signs (Sampling Time Determining Study : Male)

Test substance	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing					
					0					
					Post dosing	2 hours post dosing	1	2	3	
Anthocyanin oligomers for improving dry eye	2,500	P.O.	3	Soft stool		3	3	-	-	
				Soiled perineal region		2		-	-	
				Rale		1	1	-	-	
			Compound-colored stool		3	3	-	-		
			Abnormal fur			3	-	-		
			NOA	3		-	-			
			Soft stool		3	3		-		
			Soiled perineal region		1			-		
			Compound-colored stool		3	3	3	-		
	Abnormal fur			2	3	-				
	NOA	3				-				
	3			3	Soft stool		3	3		
					Soiled perineal region		2			
					Rale			1		
					Compound-colored stool		3	3	3	
					Abnormal fur					
					NOA	3				3

NOA : No Observable Abnormality

P.O. : Per Os

: No data

Table 21. Results (Sampling Time Determining Study : Male)

Test Substance	Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE
Anthocyanin oligomers for improving dry eye	2,500	P.O.	24	B1101	99 / 500	5 / 2000
				B1102	117 / 500	5 / 2000
				B1103	131 / 500	4 / 2000
				Total	347 / 1500	14 / 6000
				% (Mean±S.D.)	23.1 ± 3.21	0.233 ± 0.029
			48	B1201	113 / 500	1 / 2000
				B1202	88 / 500	3 / 2000
				B1203	124 / 500	1 / 2000
				Total	325 / 1500	5 / 6000
				% (Mean±S.D.)	21.7 ± 3.69	0.083 ± 0.058
			72	B1301	104 / 500	0 / 2000
				B1302	130 / 500	1 / 2000
				B1303	122 / 500	0 / 2000
Total	356 / 1500	1 / 6000				
% (Mean±S.D.)	23.7 ± 2.66	0.017 ± 0.029				

P.O. : Per Os

S.D. : Standard Deviation

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte

식억제의 지표로서, 검체 1장당 총적혈구 250개를 관찰하여, 1개체당 500개의 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비를 구하였다. 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum and Bowman의 추정학적 통계 방법을 사용하여 검증하고, 통계학적으로 유의하게 증가할 경우 양성으로 판정한다.

시험기간 동안 모든 용량에서 시험물질에 의한 사망동물은 관찰되지 않았으나, 1,250 mg/kg 이상에서 연변, 항문주위의 오염, 수포음, 시험물질색변, 피모상태의 이상 및 체온저하가 관찰되었고 (Table 22), 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다 (Table 23).

시험물질군에서는 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte) 중 소핵다염성적혈구 (MNPC, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 비율이 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가는 관찰되지 않았다. 또한, 총적혈구 중 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의하게 증가하였고, 총적혈구 중 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (Table 24).

음성대조군 및 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 historical control data의 범위내에 있었기 때문에 해당시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것으로 판단하였다 (Table 25.). 이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 안토시아닌 올리고머의 마우스 골수세포의 소핵 유발성은 음성으로 판단되었다.

3.2.12.2. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 결과

복귀돌연변이시험에 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium* TA98, *Salmonella typhimurium* TA100, *Salmonella typhimurium* TA1535, *Salmonella typhimurium* TA1537, *Escherichia coli* WP2uvrA(pKM101)를 사용하였다. 본 시험의 용량을 결정하기 위하여 용량 설정시험을 실시하였다. 가이드라인에서 추천하는 5,000 µg/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 4로 1,250, 313, 78.1 및 19.5 µg/plate의 4 용량을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 용량설정시험은 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하였다.

시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하의 TA98 및 TA100 균주의 313 µg/plate 이상, TA1535 및 TA1537 균주는 78.1 µg/plate 이상, 대사활성화존재하의 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 5,000 µg/plate에서 관찰되었고, 대사활성화비존재하 및 존재하의 WP2uvrA(pKM101) 균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전은 대사활성화비존재하 및 존재하의 5,000 µg/plate에서 관찰되었지만, 복귀돌연변이콜로니수의 측정에는 영향이 없었다.

본시험의 최고용량은 생육저해가 관찰된 최저용량으로 하여 대사활성화비존재하의 TA98 및 TA100 균주는 313 µg/plate, TA1535 및 TA1537 균주는 78.1 µg/plate, 대사활성화존재하의 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주는 5,000 µg/plate로 하고, 생육저해가 관찰되지 않은 용량을 4용량 이상 확보하기 위해, 이하 공비 2로 5용량의 시험물질군을 설정하였다. 대사활성화비존재하 및 존재하의 WP2uvrA(pKM101) 균주는 5,000 µg/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 4용량의 시험물질군을 설정하였고, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

Table 22. Clinical Signs (Main Study : Male)

Group	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing			
					0		1	
					Post dosing	2 hours post dosing		
Negative control	Water for injection	0	P.O.	5	NOA	5	5	5
						625	P.O.	5
Test substance	Anthocyanin oligomers for improving dry eye	1,250	P.O.	5	Soft stool		5	5
					Soiled perineal region		1	
					Rale		1	
		Compound-colored stool			5			
		NOA	5					
		Soft stool		5	5			
		Soiled perineal region		4	2			
2,500	P.O.	5	Compound-colored stool		5	5		
Hypothermia				5				
Abnormal fur				5				
NOA	5							
Positive control	MMC	2	I.P.	5	NOA	5	5	5

NOA : No Observable Abnormality

P.O. : Per Os

I.P. : Intraperitoneal

MMC : Mitomycin C

Table 23. Body Weights (Main Study : Male) (unit : g)

Group	Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	Days after dosing		
					0	1	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	38.0	34.1
					1102	35.8	34.7
					1103	35.6	35.2
					1104	34.7	34.1
					1105	34.7	35.1
					Mean	35.8	34.6
					S.D.	1.32	0.51
Test substance	625	P.O.	24	1201	37.4	36.0	
				1202	36.1	33.6	
				1203	35.6	34.8	
				1204	34.8	31.3	
				1205	34.6	30.5	
				Mean	35.7	33.3	
	S.D.	1.11	2.32				
	Anthocyanin oligomers for improving dry eye	1,250	P.O.	24	1301	36.6	34.8
					1302	36.3	32.2
					1303	35.5	34.3
					1304	35.1	33.7
					1305	34.5	34.1
	Mean	35.6	33.8				
S.D.	0.86	0.97					
2,500	P.O.	24	1401	36.5	32.3		
			1402	36.3	35.0		
			1403	35.4	33.7		
			1404	35.3	33.7		
			1405	34.4	32.0		
			Mean	35.6	33.3		
			S.D.	0.84	1.22		
Positive control	MMC	2	I.P.	24	1501	36.4	35.2
					1502	36.4	35.6
					1503	35.4	35.2
					1504	35.3	34.8
					1505	34.4	34.2
					Mean	35.6	35.0
					S.D.	0.86	0.50

P.O. : Per Os

I.P. : Intraperitoneal

S.D. : Standard Deviation

MMC : Mitomycin C

Table 24. Results (Main Study : Male)

Group	Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	147 / 500	0 / 2000
					1102	163 / 500	1 / 2000
					1103	155 / 500	1 / 2000
					1104	123 / 500	1 / 2000
					1105	147 / 500	2 / 2000
					Total	735 / 2500	5 / 10000
					%(Mean±S.D.)	29.4 ± 2.99	0.050 ± 0.035
	625	P.O.	24	1201	152 / 500	0 / 2000	
				1202	93 / 500	0 / 2000	
				1203	160 / 500	1 / 2000	
				1204	150 / 500	1 / 2000	
				1205	104 / 500	1 / 2000	
				Total	659 / 2500	3 / 10000	
				%(Mean±S.D.)	26.4 ± 6.17	0.030 ± 0.027	
Test Substance	Anthocyanin oligomers for improving dry eye	1,250	P.O.	24	1301	134 / 500	3 / 2000
					1302	145 / 500	3 / 2000
					1303	160 / 500	3 / 2000
					1304	134 / 500	1 / 2000
					1305	137 / 500	1 / 2000
					Total	710 / 2500	11 / 10000
					%(Mean±S.D.)	28.4 ± 2.20	0.110 ± 0.055
	2,500	P.O.	24	1401	144 / 500	5 / 2000	
				1402	109 / 500	3 / 2000	
				1403	127 / 500	2 / 2000	
				1404	145 / 500	0 / 2000	
				1405	151 / 500	1 / 2000	
				Total	676 / 2500	11 / 10000	
				%(Mean±S.D.)	27.0 ± 3.43	0.110 ± 0.096	
Positive control	MMC	2	I.P.	24	1501	166 / 500	173 / 2000
					1502	115 / 500	135 / 2000
					1503	134 / 500	154 / 2000
					1504	129 / 500	149 / 2000
					1505	133 / 500	130 / 2000
					Total	677 / 2500	741† / 10000
					%(Mean±S.D.)	27.1 ± 3.74	7.410 ± 0.850

P.O. : Per Os

I.P. : Intraperitoneal

S.D. : Standard Deviation

MMC : Mitomycin C

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte

Significant difference from negative control by Kastenbaum & Bowman : †p<0.01

Table 25. Historical Control Data

Historical control values of micronucleated polychromatic erythrocytes(MNPCE)						
Group	Hours after administration (hrs)	Dose (mg/kg)	n	MNPCE/PCE (%) Mean±S.D.	Range [MNPCE/PCE (%)]	
					MIN	MAX
Negative control	24	0	160	0.031 ± 0.025	0.000	0.105
Positive control	24	2	160	5.759 ± 1.448	1.415	10.10

Historical control values of ratio of polychromatic erythrocytes(PCE) to total erythrocytes						
Group	Hours after administration (hrs)	Dose (mg/kg)	n	PCE/NCE+PCE (%) Mean±S.D.	Range [PCE/NCE+PCE (%)]	
					MIN	MAX
Negative control	24	0	160	34.06 ± 5.027	18.98	49.14
Positive control	24	2	160	31.84 ± 4.927	17.06	46.62

Negative control : Including water for injection, normal saline injection, olive oil, corn oil, DMSO, PBS, 0.5% methyl cellulose 1,500cP solution, 0.5% CMC-Na solution, DMSO:Co-solvent:DW (4:80:16), 5% dextrose injectable solution, Cosolvent:water for injection (25:75), 40% PEG 400, 0.5% Citric acid, 5% lactose-monohydrate etc. Positive control : Mitomycin C (2 mg/kg, I.P., single administration) The range was calculated by the control limit from Mean \pm 3 \times S.D.

시험은 프리인큐베이션법으로 실시하였고, 대사활성화비존재하 및 존재하의 2계열로 하였다. 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하였고, 각각의 플레이트에 균주명, 용량, 음성대조군, 양성대조군 및 S9 mix 존재유무를 식별한 번호를 기입하였다. 대사활성화비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질을 각각 100 µL씩 튜브에 넣고, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 및 각 균주현탁액 100 µL를 첨가한 후, 37°C에서 20분간 진탕하였다. 진탕 종료 후, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP2uvrA(pKM101) 균주에는 대장균용 top agar를 각각 2 ml씩 첨가하여 vortexing 하였다. 그 후, 현탁액을 최소 glucose 한천평판배지에 중층하여 실온에서 방치하였다. 대사활성화존재하에서는 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 대신에 S9 mix 500 µL를 첨가하였다. 그 외의 처리는 동일하게 실시하였다. 그 후 Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기에서 48시간 배양하였다.

잡균에 의한 오염유무를 확인하기 위해, 최고용량의 시험물질액 100 µL, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 및 S9 mix 500 µL를 튜브에 각각 넣고, 37°C 배양기에서 20분간 진탕하였다. 진탕 종료 후, top agar를 가해서 vortexing 한 후, nutrient broth 한천평판배지에 중층하여 실온에 방치하였다.

Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기에서 48시간 배양한 후, 미생물의 오염으로 인한 콜로니 형성 유무를 확인하였다.

용량설정시험과 결과 비교에서 재현성이 확보되었고, 생육저해가 확인되지 않은 용량의 4용량 이상이 확보되어 확인시험을 실시하지 않았다. 시험물질의 처리시 및 콜로니 수 계측시에 시험물질의 침전에 대해 육안으로 관찰하고 기록하였다. 배양 종료후, 자동계측이 정확하지 않다고 판단하여 복귀변이콜로니수를 육안계수 하였고, 생육저해 유무를 확인하기 위해, 복귀변이콜로니수 계측시, background lawn의 형성유무를 실체현미경으로 확인하였다. 생육저해의 판정기준은 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교시 현저히 감소하거나, background lawn이 음성대조군과 비교시 옅어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다.

복귀변이콜로니수를 계측하였을 때, 시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다. 반면에, 양성대조군에서는 각 균주의 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다 (Fig. 78 ~ 84).

시험물질에 의한 생육저해 및 침전을 보았을 때, 시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하의 TA98 및 TA100 균주의 156 µg/plate 이상, TA1535 및 TA1537 균주는 78.1 µg/plate, 대사활성화존재하의 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 2,500 µg/plate 이상에서 관찰되었다. 대사활성화비존재하 및 존재하의 WP2uvrA(pKM101) 균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전은 대사활성화비존재하의 WP2uvrA(pKM101) 균주의 5,000 µg/plate, 존재하의 모든 균주의 2,500 µg/plate 이상에서 관찰되었지만, 복귀변이콜로니수의 계측에는 영향이 없었다.

대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치는 historical control data의 범위내에 속하였다 (Table 26). 해당시험은 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치가 historical control data 범위내에 속하였고, 각 균주에 있어서의 양성대조군의 복귀변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실한 증가가 확인되었으며, 잡균에 의한 오염도 확인되지 않았기 때문에 해당시험은 적절하게 실시되

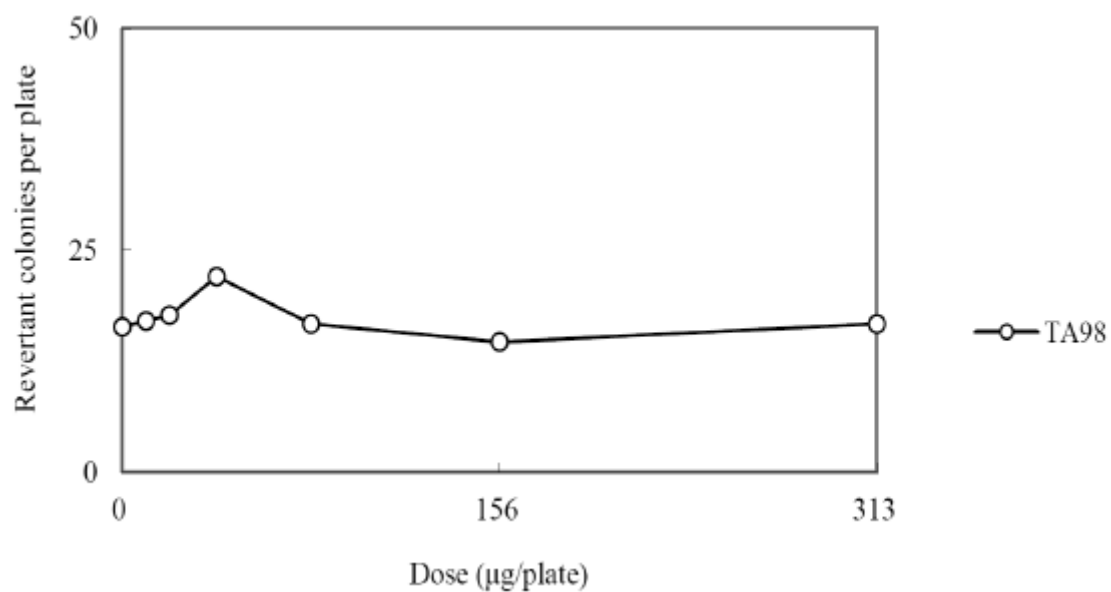


Figure 78. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation (TA98).

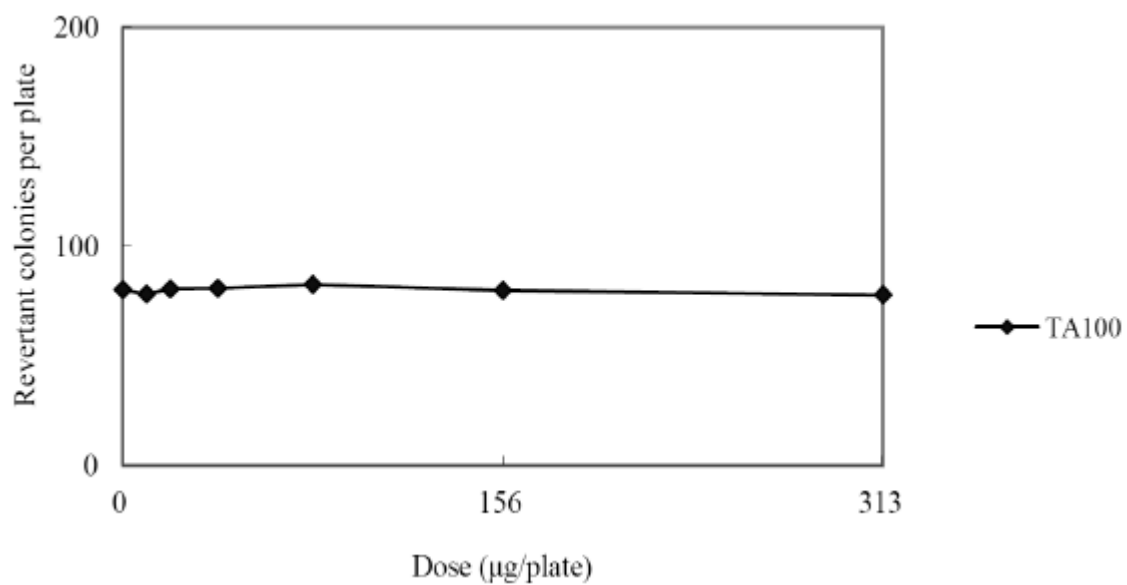


Figure 79. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation (TA100).

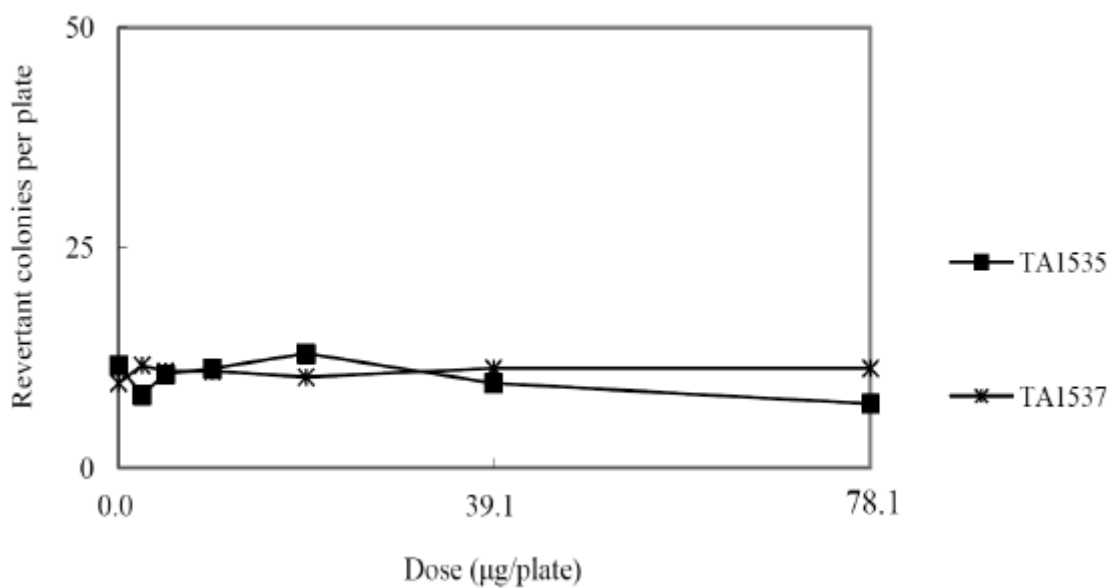


Figure 80. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation (TA1535 and TA1537).

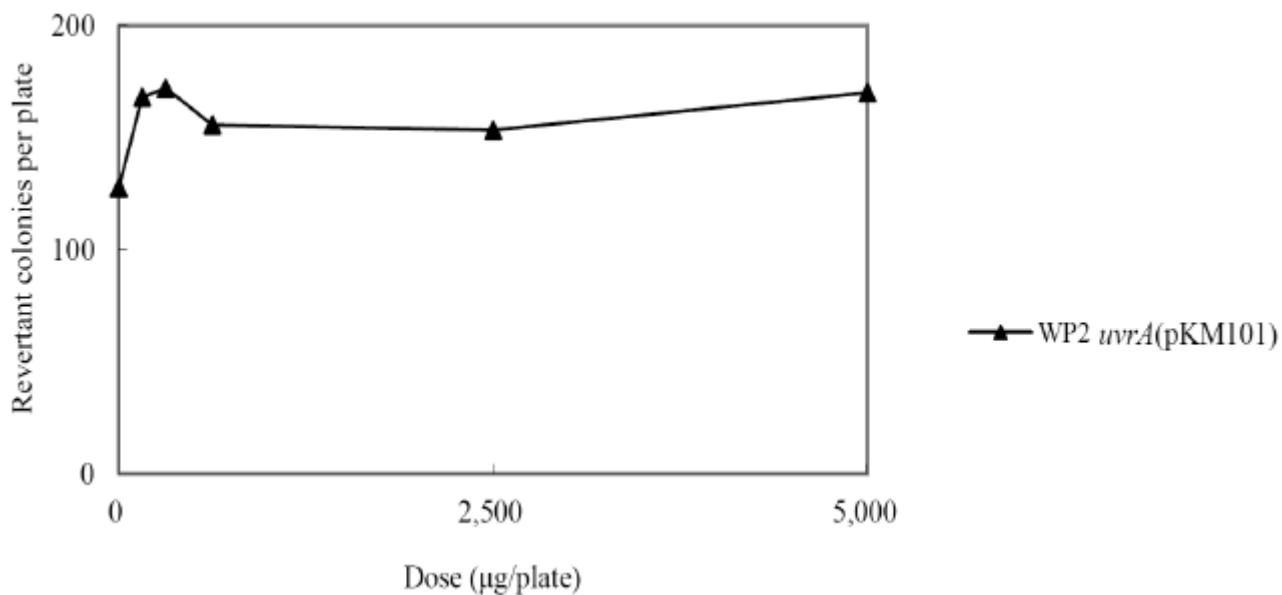


Figure 81. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation (WP2 *uvrA*(pKM101)).

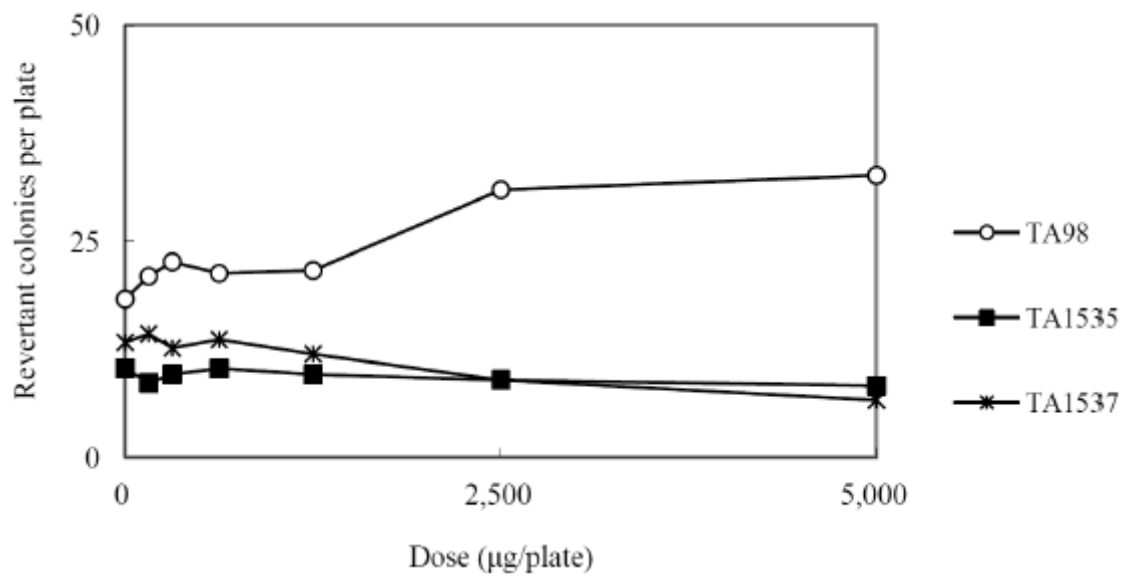


Figure 82. Dose-response Curve in the Presence of Metabolic Activation (TA98, TA1535 and TA1537).

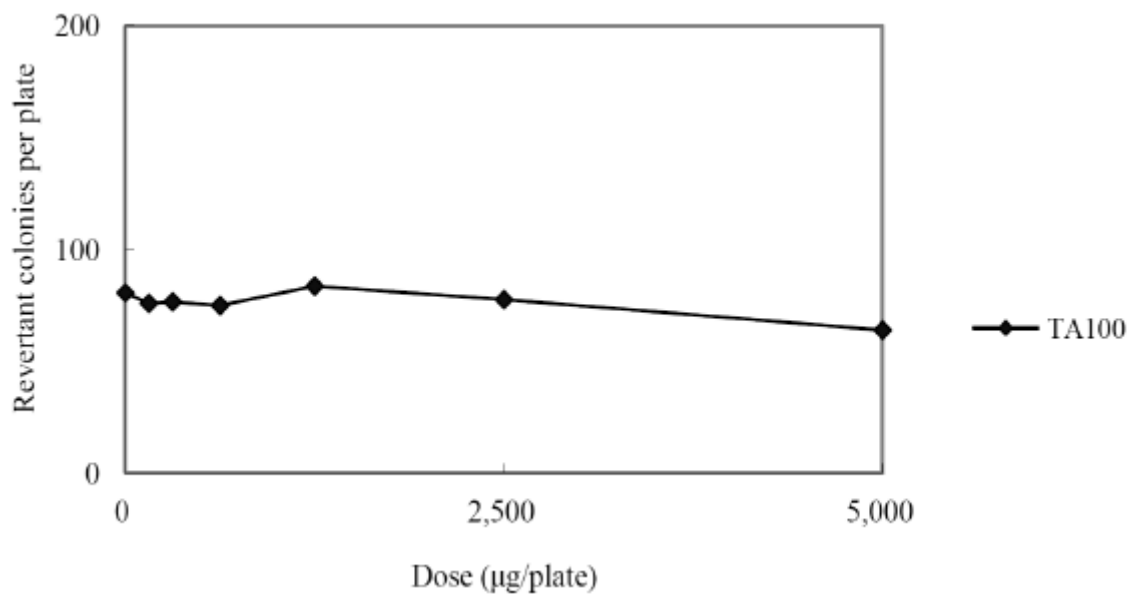


Figure 83. Dose-response Curve in the Presence of Metabolic Activation (TA100).

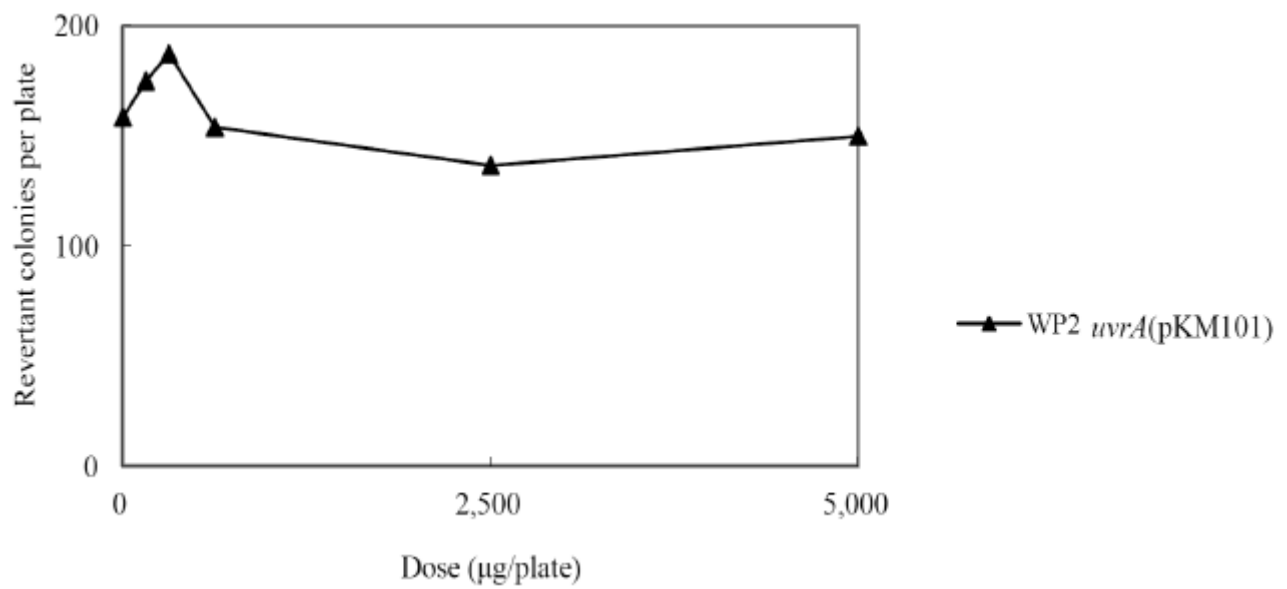


Figure 84. Dose-response Curve in the Presence of Metabolic Activation (WP2uvrA(pKM101)).

Table 26. Historical control Data

Historical negative control values of revertant colonies								
Strain	S9 mix	N	Mean	± S.D.	Range			
					Lower	Upper		
TA100	-	120	78.8	± 11.3	51.0	106.7		
	+	120	87.4	± 12.2	55.1	119.7		
TA1535	-	120	9.1	± 1.8	3.5	14.7		
	+	120	8.9	± 1.8	3.9	13.9		
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	-	120	118.8	± 19.3	64.4	173.2		
	+	120	141.9	± 19.1	89.3	194.6		
TA98	-	120	17.6	± 3.1	9.6	25.6		
	+	120	25.1	± 3.9	14.4	35.8		
TA1537	-	120	7.2	± 1.5	2.3	12.1		
	+	120	14.7	± 2.6	8.4	21.0		
Historical positive control values of revertant colonies								
Strain	S9 mix	Positive control	Dose (µg/plate)	N	Mean	± S.D.	Range	
							Lower	Upper
TA100	-	SA	1.5	120	545.9	± 63.5	382.4	709.4
	+	2-AA	2.0	116	536.9	± 135.2	239.9	833.9
TA1535	-	SA	1.5	120	441.7	± 49.2	309.6	573.8
	+	2-AA	3.0	120	109.0	± 21.5	50.6	167.4
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	-	AF2	0.005	120	816.6	± 177.2	446.7	1186.4
	+	2-AA	2.0	120	420.8	± 65.9	243.2	598.4
TA98	-	2-NF	5.0	120	537.8	± 88.7	310.9	764.8
	+	2-AA	1.0	116	300.7	± 58.0	183.9	417.5
TA1537	-	9-AA	80.0	120	334.0	± 105.3	61.8	606.3
	+	2-AA	3.0	116	144.2	± 32.5	61.5	226.9

Negative control : Water for injection, Dimethyl sulfoxide, Acetone, Tetrahydrofuran, Normal saline injection, Sodium phosphate buffer

SA : Sodium azide

2-AA : 2-Aminoanthracene

AF2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2-NF : 2-Nitrofluorene

9-AA : 9-Aminoacridine

The above historical control values were obtained from the data pooled from June 13, 2013 to May 14, 2015.

The range was calculated by the control limit of X derived from X-R-Rs valus.

었다고 판단하였다.

이상의 결과로부터, 본 시험의 판정조건에 따라 시험물질 안구건조증 개선용 안토시아닌 올리고머의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단하였다.

3.2.12.3. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 결과

본 시험은 검출감도가 높아 염색체이상시험에 많이 사용되고 있으며 염색체이상시험의 가이드라인에서도 추천하는 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 세포주를 선택하였다. CHL/IU 세포 (CRL-1935)는 10% Fetal bovine serum을 포함한 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)을 사용하여 배양하였다. 세포가 배양플라스크 바닥면적에 70 ~ 80% 이상 생육할 때 세포형태를 관찰하고, 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리하였다. 세포현탁액을 50 ml 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm² 플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 시험은 혈구계수관을 이용하여 세포수를 계수하여 5×10⁴ cells/ml 세포현탁액을 만든 후, 세포증식억제시험용은 6 well 플레이트 (2 ml/well), 본시험용은 60 mm 플레이트 (5 ml/plate) 및 6 well 플레이트 (2 ml/well)에 분주하여 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 1일간 배양하였다. 각 플레이트에 식별번호를 기입하였다.

본시험의 용량을 설정하기 위해 가이드라인에서 추천한 5,000 µg/ml을 최고용량으로 하고, 이하 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 및 19.5 µg/ml의 8용량을 설정하였고 음성대조군을 설정하였다. 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 총 3계열로 분리하였다. 한 용량당 1 well을 사용하였다. 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, well내를 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)으로 세정하고, 신선한 배양액을 가해 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였고, 시험물질의 침전은 시험물질액의 처리시, 처리종료시 및 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다.

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포증식을 50%이상 명확하게 억제하는 용량을 확인한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하는 39.1 µg/ml 이상, 존재하는 156 µg/ml 이상, 연속처리법의 대사활성화비존재하는 19.5 µg/ml 이상이었으며, 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하의 5,000 µg/ml, 단시간처리법의 대사활성화존재하의 2,500 µg/ml 이상에서 관찰되었다 (Table 27.). 이를 바탕으로 본 시험의 최고 용량은 세포증식을 약 55% 억제하는 용량으로 하여 단시간처리법의 대사활성화비존재하는 31.0 µg/ml 및 존재하는 156 µg/ml, 연속처리법의 대사활성화비존재하는 16.0 µg/ml로 하고, 이하 공비 2로 3용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

본 시험은 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 총 3 계열로 분리하여 한 용량당 2개의 플레이트를 사용하였다. 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, 플레이트 내를 D-PBS로 세정하고, 신선한 배양액을 가해 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO₂가 공급되는

Table 27. Summary of cell Growth Inhibition Study

Test substance	Dose (µg/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time (hr)	Relative Population Doubling (%)
Water for injection	0	-	6-18	100
Anthocyanin oligomers for improving dry eye	19.5	-	6-18	74.5
	39.1	-	6-18	22.4
	78.1	-	6-18	-15.7
	156	-	6-18	-105
	313	-	6-18	-176
	625	-	6-18	-138
	1,250	-	6-18	-130
	2,500	-	6-18	-123
	5,000†	-	6-18	-371
Water for injection	0	+	6-18	100
Anthocyanin oligomers for improving dry eye	19.5	+	6-18	103
	39.1	+	6-18	101
	78.1	+	6-18	94.9
	156	+	6-18	45.4
	313	+	6-18	-7.11
	625	+	6-18	-87.6
	1,250	+	6-18	-97.5
	2,500†	+	6-18	-69.8
	5,000†	+	6-18	-69.8
Water for injection	0	-	24-0	100
Anthocyanin oligomers for improving dry eye	19.5	-	24-0	33.1
	39.1	-	24-0	-121
	78.1	-	24-0	-161
	156	-	24-0	-88.4
	313	-	24-0	-115
	625	-	24-0	-278
	1,250	-	24-0	a)
	2,500	-	24-0	a)
	5,000†	-	24-0	a)

Trt-Rec time : Treatment-Recovery times

a): RPD was not calculated because of cytotoxicity.

†: PrecipitationAnthocyanin

37°C 배양기에서 배양하였고, 시험물질의 침전은 시험물질액의 처리시, 처리종료시 및 배양종료시 (colcemid 처리전)에 각 용량별로 관찰하였다.

세포현탁액 2 ml를 6 well 플레이트에 분주한 후, 각 계열에 대해 각 용량의 시험물질액, 양성대조물질 및 음성대조물질을 처리하였다. satellite대조군은 시험물질 처리시, 시험물질군은 배양종료 후에 세포수를 혈구계수관을 이용하여 계수하여 RPD을 구하였다.

$$RPD (\%) = \frac{(\text{No. of population doublings in treated cultures})}{(\text{No. of population doublings in control cultures})} \times 100$$

$$\text{Population doubling} = [\log (\text{Post-treatment cell number}/\text{Initial cell number})]/\log 2$$

배양종료 2시간 전에 Colcemid 용액을 최종농도가 0.2 µg/ml 되게 첨가하여 세포분열을 중지시켜 정지시켰다. 배양종료 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플레이트 바닥으로부터 세포를 떼어낸 후, 1,000 rpm 에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고 37°C에서 보온한 0.075 mol/L KCl 수용액을 5 ml 첨가하여 37°C에서 20분간 처리하였다. 냉각한 고정액 (methanol : acetic acid = 3 : 1) 1 ml를 첨가한 후, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 5 ml의 냉각한 고정액을 첨가한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 고정하였다. 이러한 고정 작업을 1회 반복하여 세포를 고정하였다. 얻어진 세포 부유액을 슬라이드글라스 2군데에 1방울씩 떨어뜨려 1장의 슬라이드 표본을 제작하였다. 건조 후, 슬라이드글라스에 코드화된 번호를 기입하였다. 3% Giemsa 염색액으로 20분간 염색한 후, 초순수로 세척한 후 건조하였다.

슬라이드 슬라이드 표본관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시하였고, 염색체 관찰의 대상용량은 각 처리법 모두 용량당 200개의 분열중기상이 관찰 가능한 3용량을 설정하였다. 각 용량 당 최소 200개의 분열중기상을 현미경으로 관찰하였다. 염색체이상은 구조이상, 수적이상 및 기타로 구분하였다. 구조이상에 대해서는 염색분체절단, 염색분체교환, 염색체절단, 염색체교환, 염색분체겹, 염색체겹 및 단편화를 관찰하였다. 1개의 분열중기상에 다수의 gap 및 절단 등이 포함된 것은 단편화로 기록하였다. 겹은 염색분체의 폭 보다도 좁은 비염색성 부위로 정의하였다. 또한, 수적이상에 대해서는 배수체 및 핵내배화를 관찰하였다.

이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 종류를 각각 기록하였다. Gap에 대해서는 gap만 관찰되는 세포를 포함 및 미포함하는 이상세포로 기록하였다. 기타는 구조이상 및 수적이상에 포함되지 않는 이상으로 종류와 수를 기록하였다.

본 시험 결과, RPD는 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 0, 3.88, 7.75, 15.5 및 31.0 µg/ml 용량에서 100, 114, 102, 90.6 및 62.2%, 대사활성화존재하의 0, 19.5, 39.0, 78.0 및 156 µg/ml 용량에서 100, 98.7, 97.5, 84.1 및 64.3%, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 0, 2.00, 4.00, 8.00 및 16.0 µg/ml 용량에서 100, 107, 100, 83.7 및 66.3%였다 (Table 28.). 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

염색체이상 관찰대상 용량은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 최고용량에서 관찰가능한 200개의 분열중기상이 확보되어, 최고용량을 포함한 3용량을 염색체이상 관찰 대상 용량으로 선정하였다. 관찰 결과, 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 5% 미만으로, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성은 관찰되지 않았다. 수적이상을

Table 28. Summary of Main Study

Test substance	Dose (µg/mL)	RPD (%)	S9 mix	Trt-Rec Time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations										Number of cells with numerical aberrations			Others ^{a)}						
						ctb	csb	cte	cse	frg	gap		total (%)		end	pol	total (%)								
											ctg	csg	gap-	gap+											
Water for injection	0	100	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	0		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
Anthocyanin oligomers for improving dry eye	3.88	114	-	6-18	not observed																				
	7.75	102	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
	15.5	90.6	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	7 (3.5)	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3		3
31.0	62.2	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	38 [#] (19.0)	0		
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18		0	0
MMC	0.1	68.9	-	6-18	100	9	0	30	1	0	0	0	0	0	0	60*	60 (30.0)	0	0	0	0	0	0		
					100	6	0	19	0	0	1	0	60*	60 (30.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Water for injection	0	100	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1 (0.5)	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
Anthocyanin oligomers for improving dry eye	19.5	98.7	+	6-18	not observed																				
	39.0	97.5	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1 (0.5)	0
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	78.0	84.1	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
156	64.3	+	6-18	100	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2 (1.0)	2	2 (1.0)	1	14	15	15	28 [#] (14.0)	0	
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	0	0		0
B[a]P	20	22.1	+	6-18	100	4	0	20	0	0	1	0	50*	50 (25.0)	52	52 (26.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	8	0	26	0	0	2	0	50*	50 (25.0)	52	52 (26.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Water for injection	0	100	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anthocyanin oligomers for improving dry eye	2.00	107	-	24-0	not observed																				
	4.00	100	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8.00	83.7	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16.0	66.3	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6	10 [#] (5.0)	0	
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0		0
MMC	0.1	59.8	-	24-0	100	8	0	36	0	0	0	0	89*	89 (44.5)	89	89 (44.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	7	0	48	0	0	0	0	89*	89 (44.5)	89	89 (44.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

D20=0.033 mg/ml (S9-, 6+ 18hr)

D20=0.213mg/ml (S9+, 6+ 18hr)

Aberration; ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange,

csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, frg: fragmentation, end: endoreduplication, pol: polyploidy

MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene

RPD : Relative Population Doubling, Trt-Rec time : Treatment-Recovery times

gap-: Total number of cells with structural aberrations excluding gap, gap+: Total number of cells with structural aberrations including gap

a): Others were excluded from the number of cells with chromosomal aberrations.

Significant difference from negative control by fisher's exact test : * p<0.01

Significant difference from negative control by Cochran-Armitage trend test : # p<0.01Test

가진 세포의 출현빈도는 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 15.5 및 31.0 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 3.5 및 19.0%, 존재하의 156 $\mu\text{g/ml}$ 에서 14.0%로 10% 이상으로 양성으로 확인되었고, 연속 처리법의 대사활성화비존재하의 16.0 $\mu\text{g/ml}$ 에서 5.0%로 5% ~ 10% 미만으로 확인되었으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였고, 용량의존성도 관찰되었다 (Cochran-Armitage trend test, $p < 0.01$). 각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 10% 이상으로 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가되었다 (Fisher's exact test, $p < 0.01$).

시험물질의 Clastogenic potential을 확인하기 위해 D20 (20%의 세포에 염색체이상이 출현할 수 있는 농도)을 구한결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하에서 0.033 mg/ml, 존재하에서 0.213 mg/ml로, medium clastogenic activity으로 분류되었다. 음성 대조군 및 양성대조군의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 historical control data의 범위 내에 있었다 (Table 29.).

음성대조군에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만이었고, 양성대조군에서 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 10% 이상이었다. 또한 시험물질군의 3용량에서 200개의 분열증기상이 관찰가능하였으며 세포의 오염도 없었기 때문에 해당시험은 적절한 시험 조건하에서 실시된 것이 확인되었다. 이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질 안구건조증 개선용 안토시아닌 올리고머의 수적 염색체이상 유발성은 양성으로 판단되었다.

3.2.12.4. 마우스를 이용한 안구건조증 개선용 안토시아닌 올리고머의 유전독성 실험

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 결과 수적 염색체이상이 관찰되어 안토시아닌 올리고머가 플라보노이드 계열이기 때문에 문제가 발생한 것인지 다른 요인으로 인하여 발생한 것인지 확인하기 위해 ICR 마우스를 이용하여 2 주간의 경구투여 후 Comet assay를 통하여 유전 독성을 검토하였다.

본 시험의 시험군은 안토시아닌 올리고머군 (100 mg/kg) 및 음성대조군으로 설정하였으며 음성대조군에는 시험물질 대신 주사용수를 투여하였다.

음성대조군과 시험물질군 처리한 군의 체중 및 장기 (간 및 신장) 무게를 비교한 결과 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (Table. 30, 31).

음성대조군과 시험물질군간의 마우스의 백혈구, 간 및 신장 세포를 이용하여 DNA 손상 정도를 비교하여 유전 독성을 평가한 결과 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다 (Fig 85 ~ 87).

마우스를 이용한 유전독성 시험에서 안토시아닌 올리고머 투여군은 음성대조군과 비교하여 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 이상의 결과로 안토시아닌 올리고머의 유전독성은 없는 것으로 판단된다.

3.2.12.5. Sprague-Dawley (SD) 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험 결과

랫드 단회 경구투여 독성 시험은 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부한 SD 랫드를 사용하였다. 랫드는 5주령 암·수 각 18마리를 오리엔트바이오로부터 구입하여 반입시동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울로 체중을 측정하였다. 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물입수 시 검역실에서 약 3일간 일반증상을 관찰 후 동물실로 이동하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하였고, 일반증상 및 체중변화 (Table 32)를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

Table 29. Historical Control Data

Historical control values of structural aberrations								
Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Structural aberration cells without gap (%) (Mean±S.D.)			Range (%)	
							MIN	MAX
Negative	-	6-18	129	0.1	±	0.2	0	<5
	+	6-18	129	0.1	±	0.3	0	<5
	-	24-0	123	0.1	±	0.2	0	<5
Positive	-	6-18 ^{a)}	117	21.0	±	4.9	10≤	35.8*
	+	6-18 ^{b)}	129	20.2	±	5.1	10≤	35.5*
	-	24-0 ^{a)}	113	31.1	±	7.5	10≤	53.6*
Historical control values of numerical aberrations								
Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Numerical aberration cells (%) (Mean±S.D.)			Range (%)	
							MIN	MAX
Negative	-	6-18	129	0.2	±	0.3	0	<5
	+	6-18	129	0.2	±	0.4	0	<5
	-	24-0	123	0.2	±	0.4	0	<5

Negative control : Water for injection, Dimethyl sulfoxide, 0.5% methyl cellulose 1500centipoise solution, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution, Acetone, Tetrahydrofuran, etc.

a : Mitomycin C (0.1 µg/ml)

b : Benzo[a]pyrene (20 µg/ml)

N : The total number of chromosome aberration test

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

Table 30. Body weight

Group	Dose (mg/kg)	Days after treatment							
		0	2	4	6	8	10	12	14
NC	-	30.2±0.5 ^{ns}	30.6±0.5 ^{ab}	31.2±0.6 ^{ns}	31.5±0.7 ^{ns}	32.1±0.7 ^{ns}	33.1±0.7 ^{ns}	33.4±0.6 ^{ns}	32.4±0.7 ^{ns}
OA	100	29.8±0.4	29.8±0.4 ^a	30.0±1.1	30.5±1.0	30.6±1.0	31.2±1.0	31.2±1.0	30.6±0.8

1) ^{a,b} : Significantly different between NC and OA (p<0.05) by Duncan's multiple-range test

2) ^{ns} : no significant different by Duncan's multiple-range test

Table 31. Organ weight

Group	Dose (mg/kg)	Organ	
		Liver	Kidney
NC	-	1.6±0.1 ^a	0.5±0.0 ^{ab}
OA	100	1.5±0.0 ^{ab}	0.5±0.0 ^a

1) ^{a,b} : Significantly different between NC and OA (p<0.05) by Duncan's multiple-range test

2) ^{ns} : no significant different by Duncan's multiple-range test

Table 32. Individual Body Weights during an Acclimation Period(g)

Male				Female			
Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group assignment	Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group assignment
1101	1013	136.6	197.4	2101	2015	107.9	143.9
1102	1015	134.4	193.6	2102	2016	112.4	150.1
1103	1010	136.1	190.4	2103	2011	115.9	149.8
1104	1001	135.3	197.4	2104	2002	112.5	145.0
1105	1005	134.5	193.2	2105	2006	119.5	152.9
1201	1012	133.0	196.9	2201	2009	105.9	142.3
1202	1011	135.8	189.2	2202	2014	112.9	147.7
1203	1008	132.7	190.9	2203	2017	111.4	152.3
1204	1017	134.9	197.5	2204	2001	111.3	148.3
1205	1016	133.3	197.7	2205	2013	117.3	151.6
1301	1002	132.2	195.1	2301	2008	114.3	149.2
1302	1018	132.5	189.2	2302	2012	109.2	152.8
1303	1014	133.9	197.9	2303	2007	108.0	147.4
1304	1004	133.0	198.5	2304	2003	116.7	148.7
1305	1003	134.5	190.6	2305	2010	113.1	144.4
	1006	131.5	200.6		2004	108.9	155.2
	1007	138.7	200.8		2005	109.4	138.7
	1009	129.7	187.2		2018	111.6	155.5
	Mean	134.0	194.7		Mean	112.1	148.7
	S.D.	2.1	4.2		S.D.	3.6	4.5
	N	18	18		N	18	18

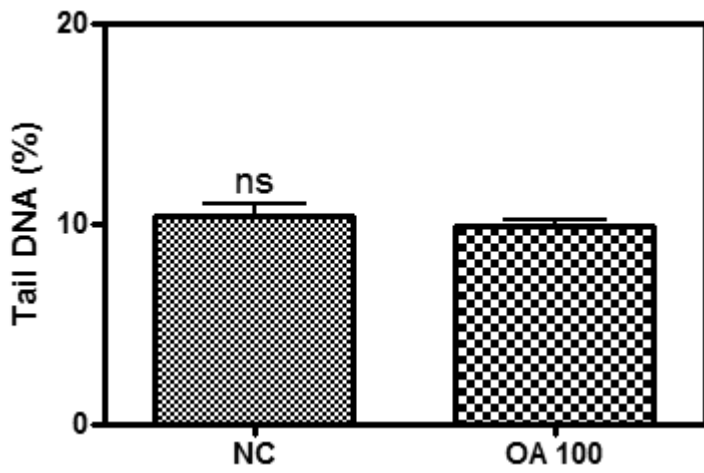


Fig. 85. DNA damage in leukaryote

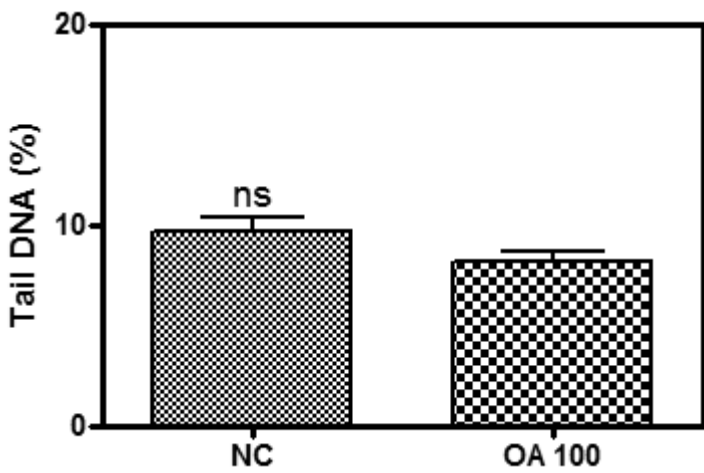


Fig. 86. DNA damage in liver

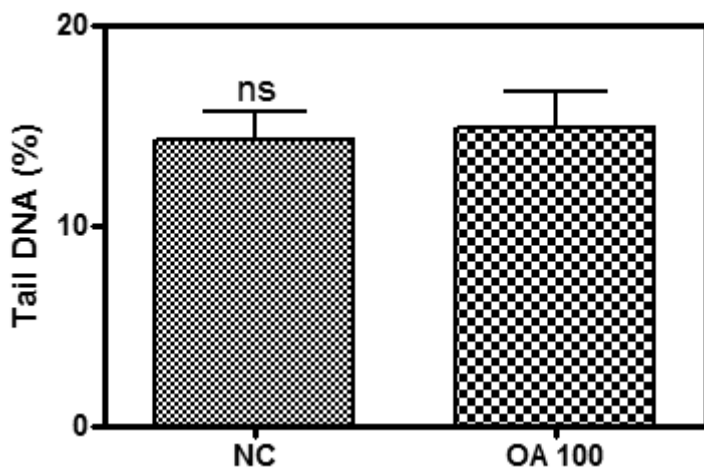


Fig. 87. DNA damage in kidney

순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역·순화기간 중 개체식별카드를 부착하였으며, 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다.

군분리는 모든 동물에 대하여 순화종료일 (군분리일)에 실시하였다. 군분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 15마리를 선발하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 3군, 군당 5마리로 군분리하였고, 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시켰다.

군분리 후 시험물질 투여는 경구투여 방법을 선택하였으며, 투여액량은 10 ml/kg으로 하였고, 개체별 투여액량은 절식 후 (투여당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (3 ml)를 이용하여 위내에 단회 강제투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 이상 음수는 자유섭취시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4시간에 사료를 급여하였다.

본시험의 예비시험으로 2,500 및 5,000 mg/10 ml/kg을 암수 랫드 각 1마리에 단회 경구투여한 결과, 시험물질 투여에 기인한 일반증상 및 체중변화가 관찰되었다. 따라서, 본시험의 투여용량은 5,000 mg/kg을 고용량으로 설정하고, 2,000 mg/kg을 저용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

투여 당일 (0일)에 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태 (독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 투여 후 1일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 관찰기간 중 발견된 사망동물은 체중을 측정하여 냉장보관 후, 부검을 실시하였으며, 체중은 투여 당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7 및 14일 (부검일)에 측정하였다. 관찰기간 종료 후, 모든 생존 동물에 대해서 CO₂가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다. 부검 결과, 5,000 mg/kg 투여군에서 사망한 암컷의 위 (stomach)에서 육안소견이 관찰되어, 조직병리학적 검사를 실시하였다.

관찰기간 동안, 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 2일에 암컷 1마리가 사망하였다. 암수 대조군, 2,000 mg/kg 투여군 및 수컷 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 없었다 (Table 33.).

관찰기간 동안, 암수 대조군에서 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다 (Table 34.). 2,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 4시간에 시험물질색변 (compound-colored stool) 및 점액변 (mucous stool)이 암컷 1마리에서 관찰되었고, 투여 후 1 및 2일에 시험물질색변 또는 점액변이 암수 모든 동물에서 관찰되었다. 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 2 ~ 6시간에 시험물질색변, 점액변 또는 하복부의 오염 (soiled perineal region)이 수컷 모든 동물 및 암컷 4마리에서 관찰되었다. 생존개체의 경우, 투여 후 1 및 2일에 시험물질색변 또는 점액변이 암수 모든 동물에서 관찰되었고, 사망한 암컷 1마리에서는 투여 후 1일에 변량의 감소 (decrease of fecal volume)가 관찰되었고, 투여 후 2일에 변량의 감소, 유루 (lacrimation) 및 복와위 (prone position)의 상태로 사망하였다. 이러한 증상은 시험물질에 투여에 기인한 영향으로 판단된다.

암수 5,000 mg/kg 투여군에서 투여후 1일에 체중 증가량의 감소경향이 인정되었다 (Fig. 88, 89, Table 35.). 이는 시험물질에 투여에 기인한 영향으로 판단되고, 암수 2,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

암수 대조군, 2,000 및 5,000 mg/kg 투여군의 생존개체에 대한 부검결과, 육안적 이상소견

Table 33. Summary of Mortality

Sex	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
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G3 5,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G3 5,000	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/5

Table 34. Summary of Clinical Signs

Sex: Male							
Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Hours (Day 0) after dosing				
			0.5	1	2	4	6
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
G2 2,000	5	NOA	5	5	5	5	5
G3 5,000	5	NOA	5	5	2	1	4
		Compound-colored stool			3	4	1
		Mucous stool			3	4	1
		Soiled perineal region			2		

Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Days after dosing													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 2,000	5	NOA			5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Compound-colored stool	5	5												
G3 5,000	5	NOA			5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Compound-colored stool	4	5												
		Decrease of fecal volume	1													
		Mucous stool	2	1												

Sex: Female							
Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Hours (Day 0) after dosing				
			0.5	1	2	4	6
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
G2 2,000	5	NOA	5	5	5	4	5
		Compound-colored stool				1	
		Mucous stool				1	
G3 5,000	5	NOA	5	5	3	3	2
		Compound-colored stool			2	2	3
		Mucous stool			2	2	3
		Soiled perineal region					1

Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Days after dosing													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 2,000	5	NOA			5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Compound-colored stool	5	5												
		Mucous stool	1													
G3 5,000	5	NOA			4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
		Compound-colored stool	4	4												
		Decrease of fecal volume	1	1												
		Mucous stool	1													
		Lacrimation		1												
		Prone position		1												
		Death		1												

NOA : No Observable Abnormality

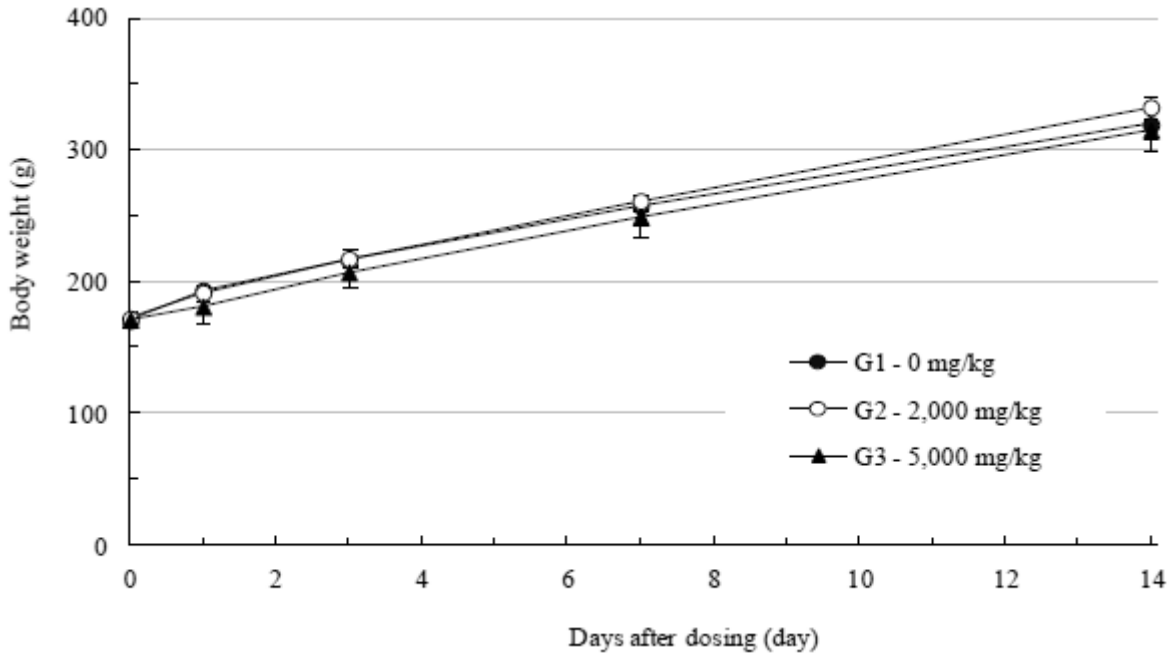


Figure 88. Body Weights in Male SD Rats

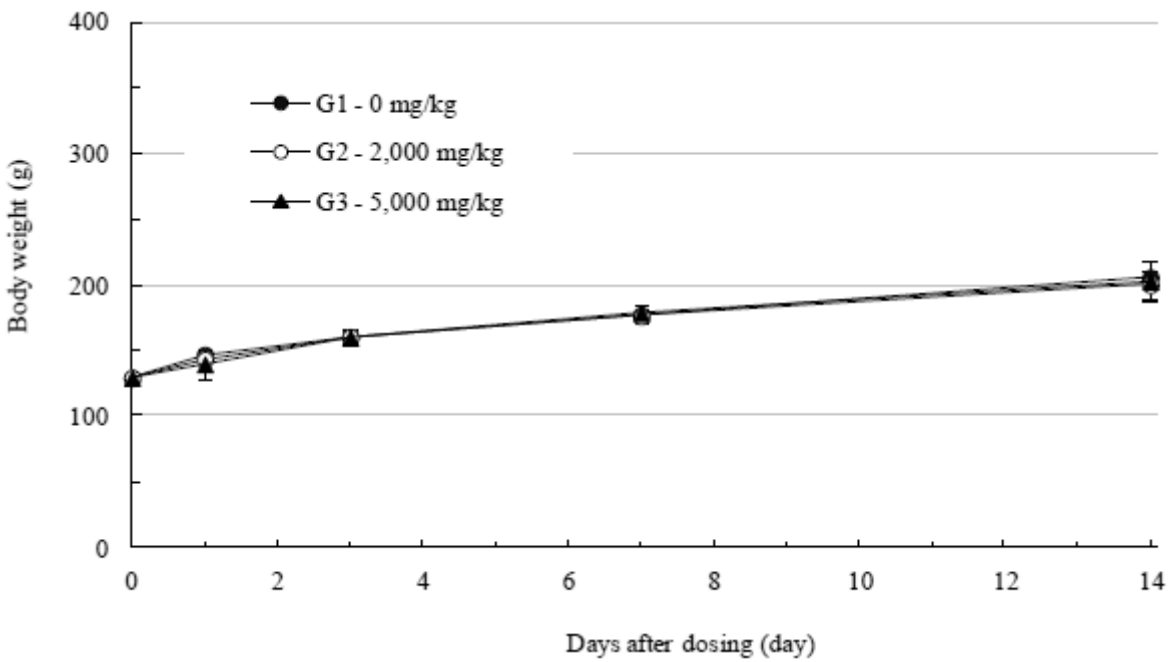


Figure 89. Body Weights in Female SD Rats

Table 35. Mean Body Weights

Sex Male							(g)
Group / Dose (mg/kg)		Days after dosing					Gain
		0	1	3	7	14	0 ~ 14
G1 0	Mean	170.3	193.1	216.1	257.5	319.0	148.7
	S.D.	1.8	2.7	4.2	4.8	10.4	10.6
	N	5	5	5	5	5	5
G2 2,000	Mean	171.7	191.5	217.2	261.0	332.3	160.6
	S.D.	5.5	6.2	6.4	6.2	8.1	3.8
	N	5	5	5	5	5	5
G3 5,000	Mean	171.1	180.9	207.1	249.0	314.9	143.8
	S.D.	3.6	12.0	11.2	14.4	16.4	13.7
	N	5	5	5	5	5	5

Sex Female							(g)
Group / Dose (mg/kg)		Days after dosing					Gain
		0	1	3	7	14	0 ~ 14
G1 0	Mean	129.3	147.1	160.3	177.4	205.9	76.6
	S.D.	4.0	4.6	3.2	3.7	10.8	12.2
	N	5	5	5	5	5	5
G2 2,000	Mean	129.5	143.6	160.7	176.4	200.3	70.8
	S.D.	2.1	3.4	6.2	5.7	10.2	11.0
	N	5	5	5	5	5	5
G3 5,000	Mean	129.6	139.8	160.2	178.8	203.0	74.0
	S.D.	2.5	10.7	4.3	5.5	14.9	13.8
	N	5	5	4	4	4	4

은 관찰되지 않았다. 암컷 5,000 mg/kg 투여군 사망개체의 부검 결과, 위에서 붉은색을 띤 액체와 사료에 의한 팽창(dilatation, with fluid and feed) 소견이 관찰되어, 조직병리학적 검사를 실시하였으나, 이상병변은 관찰되지 않았다. 사망원인은 스트레스와 위 마비에 의한 것으로 추정하였으나, 시험물질과의 연관성은 불명확하였다.

랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험의 조건 하에서 안토시아닌 올리고머를 암수 랫드에 단회 경구투여한 결과, 5,000 mg/kg 투여군에서 암컷 1례가 사망하였다. 따라서, 본 시험물질의 개략의 치사량은 수컷은 5,000 mg/kg 상회하는 것으로, 암컷은 5,000 mg/kg인 것으로 판단된다.

3.2.12.6. 비글견을 이용한 단회 경구투여 용량증가 독성시험 결과

의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 시험기초자료가 풍부한 동물실험용으로 키워진 비글견을 사용하여 단회 경구투여 용량증가 독성 시험을 진행하였다. 5개월령 암수 각 3마리를 구입하여 입수 시 모든 동물은 문신번호를 확인하고, 일반상태, 체중 및 체온을 측정하였다. 입수 후 15일간의 검역·순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 주 1회 체중을 측정하였으며, 검역·순화기간 종료 시에 동물의 건강상태를 확인하였다. 검역·순화기간 종료 후, 체중을 기초로 하여 암수 각각 대조군은 1마리, 시험물질투여군은 2마리로 군분리하였다.

개체별 투여액량은 투여당일의 체중을 기준으로 산출하였다. 투여는 경구투여용 카테터를 부착한 일회용 주사기 (50 ml)를 이용하여 투여당일 위내에 강제 투여하였다. 또한 1차 투여 후 약 15주 간의 휴약기간 후 4일 간격으로 용량을 증가하여 총 4회 투여하였다. 비글견을 이용한 독성시험에서는 1,250 mg/kg을 1차 투여용량으로 설정하여 투여한 결과, 구토 또는 연변 등 증상이 관찰되어 250, 500 및 2,500 mg/kg을 각각 2, 3 및 4차의 투여용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제인 주사용수를 투여하였다.

매번 투여당일에는 투여 후 약 30 분간 및 1, 2, 4, 6시간에 일반상태, 운동성 및 배설물 등에 대한 일반증상을 관찰하였다. 그 다음날부터는 1 일 2 회 이상 관찰하고, 빈사나 사망동물의 유무를 확인하였으며, 최종투여 후 2 주간 관찰하였다. 체중은 매번 투여당일 (투여 전), 투여 다음날, 최종투여 후 1, 3, 7 및 13일에 측정하였으며, 동일한 시간대에 실시하였다. (단, 투여 중단 이후부터 2차 투여 재개 시까지 주 1회 실시하였다.) 관찰기간 종료 후, 모든 생존동물은 펜토탈소디움으로 마취하여 방혈치사 시킨 후, 부검을 실시하였다. 부검 시 육안소견 및 병리변화가 의심되는 장기·조직이 관찰되지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

실험기간 중 1차 투여 (1,250 mg/kg) 후 약 15주 간의 휴약기간 후 2차 투여 (250 mg/kg)를 실시하였으며, 그 후 4일 간격으로 3차 (500 mg/kg) 및 4차 투여 (2,500 mg/kg)를 실시하였고, 시험기간 동안 암수 모두에서 사망동물은 발생하지 않았으며, 휴약기간 중에는 특이한 이상증상이 관찰되지 않았다 (Table 36).

1차 1,250 mg/kg 투여 후, 암수 전 개체에서 투여 후 약 0.5 ~ 1시간 사이에 구토가 관찰되었으며, 암수 각 1례에서 유연이 관찰되었다. 또한 그 중 암컷 1례에서는 투여 후 1시간에 설사가 관찰되었다. 2차 250 mg/kg 투여 후, 암수 전 개체에서 투여 후 약 0.5 ~ 4시간 사이에 구토가 관찰되었으며, 3차 500 mg/kg 투여 후, 암수 전 개체에서 투여 직후 구토가 관찰되었으며, 암컷 1례에서 투여 후 4시간에 설사가 관찰되었다. 그 외, 투여 2일후 수컷 1례에서 설사가 관찰되었다.

4차 2,500 mg/kg 투여 후, 암수 전 개체에서 투여 후 약 0.5 ~ 6시간 사이에 구토가 빈번

Table 36. Clinical Signs

Sex	Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day											
			0*					1	2	3	4	5	6	
			0.5 hr	1 hr	2 hrs	4 hrs	6 hrs							
Male	G1 0→0→0→0	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2 1,250→250→ 500→2,500	1201	V,Q	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1202	V	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Female	G1 0→0→0→0	2101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250→250→ 500→2,500		2201	V	D,V,Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		2202	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Sex	Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day										
			7	8	9	10	11	12	13	14	~		
Male	G1 0→0→0→0	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2 1,250→250→ 500→2,500	1201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Female	G1 0→0→0→0	2101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250→250→ 500→2,500		2201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		2202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

* : dosing day.

- : no abnormal findings, D: diarrhea, Q: salivation, V: vomiting.

~ : Animals were not dosed for drug-free period (Day 15 - 108 of dosing).

Sex	Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day												
			109*					110	111	112	113*				
			0.5 hr	1 hr	2 hrs	4 hrs	6 hrs				0.5 hr	1 hr	2 hrs	4 hrs	6 hrs
Male	G1 0→0→0→0	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2 1,250→250→ 500→2,500	1201	V	V	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-
		1202	V	V	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-
Female	G1 0→0→0→0	2101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2 1,250→250→ 500→2,500	2201	V	V	-	-	-	-	-	V	V	-	D	-	-
		2202	-	V	-	V	-	-	-	-	V	-	V	-	-

Sex	Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day												
			114	115	116	117*			118	119	120	121			
						0.5 hr	1 hr	2 hrs	4 hrs	6 hrs					
Male	G1 0→0→0→0	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2 1,250→250→ 500→2,500	1201	-	-	-	V	V	-	-	C,S	-	-	-	-	-
		1202	-	D	-	V	V	-	-	-	-	-	-	-	-
Female	G1 0→0→0→0	2101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2 1,250→250→ 500→2,500	2201	-	-	-	V	Q	V	V	C,S	-	-	-	-	-
		2202	-	-	-	V	-	-	V	V	-	-	-	-	-

* : dosing day. - : no abnormal findings, C: compound-mixed stool, D: diarrhea, Q: salivation, S: soft stool, V: vomiting.

Sex	Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day								
			122	123	124	125	126	127	128	129	130
Male	G1 0→0→0→0	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2 1,250→250→ 500→2,500	1201	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1202	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Female	G1 0→0→0→0	2101	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250→250→ 500→2,500		2201	-	-	-	-	-	-	-	-	
		2202	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* : dosing day. - : no abnormal findings.

하게 관찰되었으며, 그 중 암컷 1례에서 투여 후 1시간에 유연이 관찰되었다. 또한 암수 각 1례에서 투여 후 6시간에 시험물질 혼입변 및 연변이 관찰되었다. 상기의 구토 및 유연 증상은 시험물질의 투여에 의한 변화로 판단되었으며, 투여 당일 관찰된 시험물질 혼입변 및 연변, 설사 등의 증상은 시험물질이 배출되는 과정에서 관찰된 일시적인 현상으로 판단되었다.

체중에서는 1차, 2차 및 3차 투여 후 암수 전 개체에서 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 90, 91, Table 37.). 그러나, 4차 2,500 mg/kg 투여 후, 암컷 1례에서 체중의 감소경향 (투여 전 대비 약 7% 감소)이 관찰되었다. 부검에서는 암수 대조군을 포함한 모든 개체에서 육안소견은 관찰되지 않았다. 비글견을 이용한 단회 경구투여 용량증가 독성시험은 암수 각 2마리의 비글견에 시험물질인 안토시아닌 올리고머를 4일 간격 1,250→250→500→2,500 mg/kg의 용량으로 증가하여 단회 경구투여시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시한 결과, 암수 250 mg/kg 이상의 용량에서 시험물질의 투여에 의한 구토가 관찰되고, 1,250 mg/kg 이상의 용량에서는 유연이 관찰되었다. 500 및 2,500 mg/kg 에서 시험물질 혼입변 및 연변, 설사 등의 소화기증상이 산발적으로 관찰되었다. 또한 2,500 mg/kg 투여군 암컷 1례에서 체중감소가 관찰되었으나, 사망례는 관찰되지 않았다. 따라서 암수 비글견에 대한 최대내성용량 (MTD)은 2,500 mg/kg으로 판단되었다.

3.2.12.7. SD 랫드를 이용한 4주 반복 경구투여 용량결정시험 결과

본 시험은 암수 Sprague-Dawley 랫드에서 안토시아닌 올리고머를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위하여 4주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시하였다. 5주령 랫드를 암수 각 24마리 구입하여 1 주일의 순화과정을 거친 후 20마리씩을 사용하여 진행하였다. 순화과정 및 군분리는 단회 경구투여 독성시험과 동일한 방법을 이용했다. 투여액량은 10 ml/kg으로 하였고, 개체별 투여액량은 최근의 측정체중을 기준으로 산출하였다. 매일 오전에 경구투여용 존대를 부착한 일회용 주사기 (3 및 5 ml)를 이용하여 4주간 1일 1회 위내에 강제투여하였다.

단회투여 독성시험 결과, 5,000 mg/kg 용량에서 사망례가 관찰되었고, 2,000 mg/kg 용량에서 시험물질 투여에 기인한 일반증상이 관찰되었다. 따라서, 본시험의 투여용량은 2,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하였고, 공비 2를 적용하여 1,000 및 500 mg/kg/day를 각각 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

측정 및 검사일은 투여개시일을 1일로 하여, 투여개시일부터 7 일간을 투여 1주로 계산하였다. 모든 동물에 대하여 1일 1회 일반증상을 관찰하였고, 1일 2회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다. 관찰은 투여 1일부터 4주간 실시하였고, 투여개시일 (투여전), 투여 개시 후 주 1회, 부검일에 체중을 측정하였다. 단, 부검일의 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하였다. 투여개시 전의 사료섭취량은 군 분리일부터 투여개시일까지 1일간의 섭취량을 측정하였고, 투여기간에는 7일간의 섭취량을, 투여 4주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

부검전 약 18 시간 이상 절식시킨 후, 부검일에 isoflurane으로 마취하여 배대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액 약 1 ml을 EDTA 함유 tube에 넣은 후, 혈구 분석기 (ADVIA 2120i, SIEMENS, Germany)로 적혈구수 (Total erythrocyte count, RBC), 혈색소량 (Hemoglobin, HGB), 헤마토크리트치 (Hematocrit, HCT), 평균적혈구용적

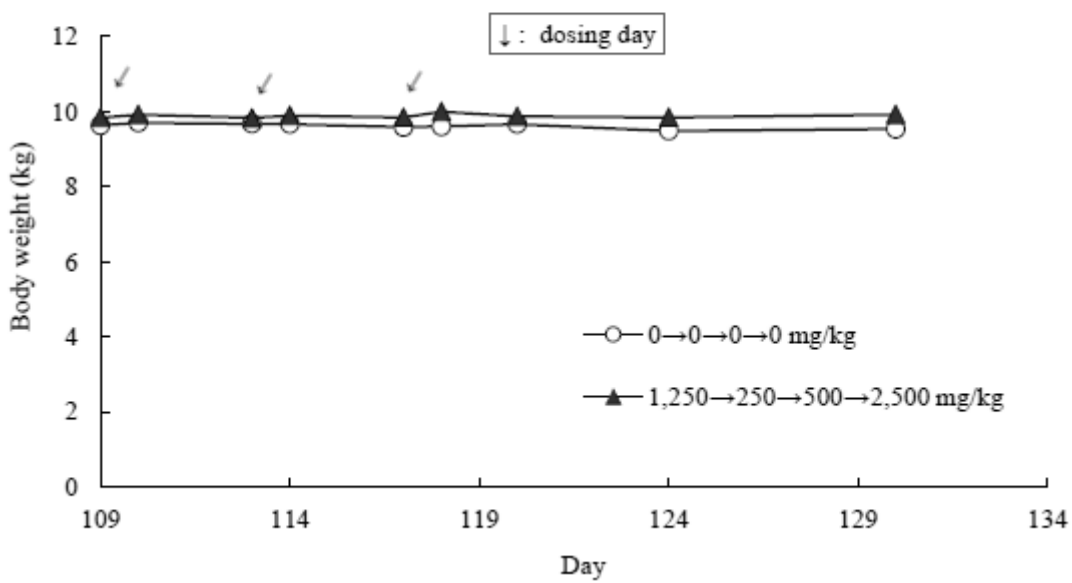
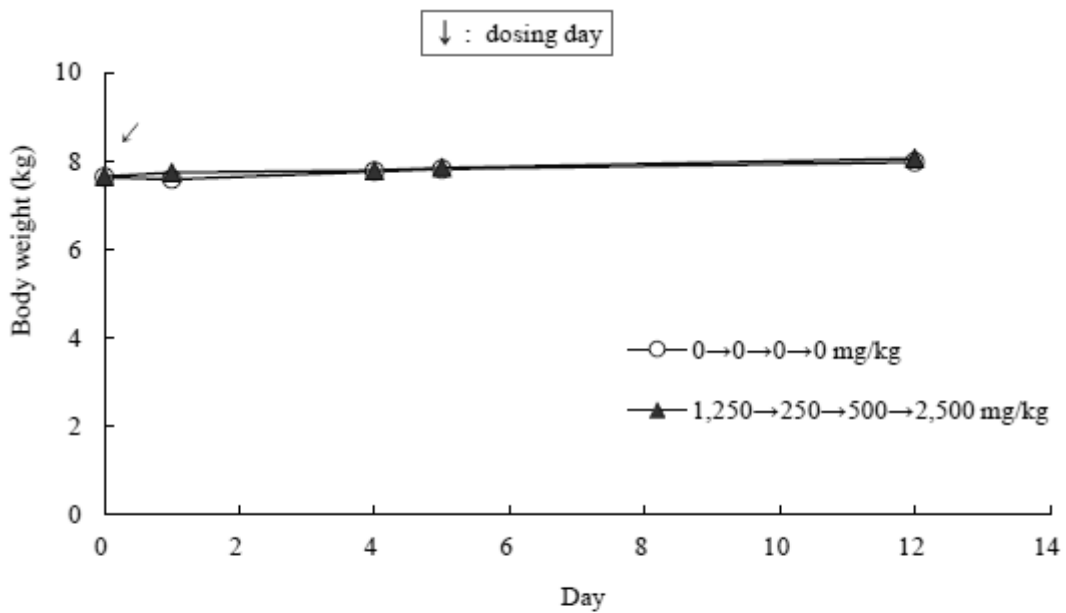


Figure 90. Body weights of Male Beagle Dogs.

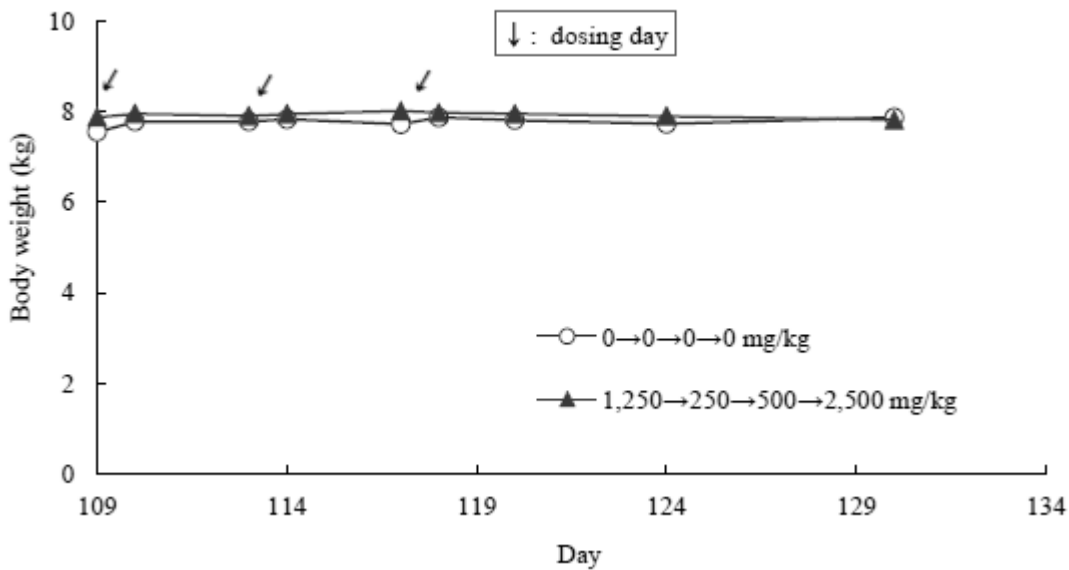
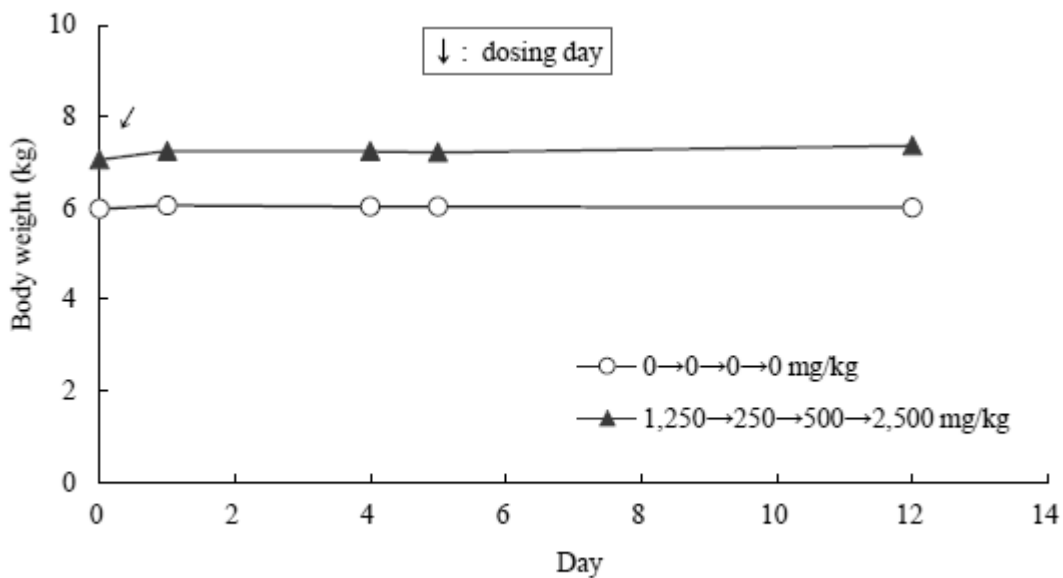


Figure 91. Body weights of Female Beagle Dogs.

Table 37. Body Weights

Sex : Male																
Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day of dosing (kg)														
		0*	1	4	5	12	~	109*	110	113*	114	117*	118	120	124	130
G1 0→0→0→0	1101	7.64	7.59	7.77	7.82	7.98		9.64	9.71	9.68	9.67	9.59	9.61	9.67	9.49	9.54
	N	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1
G2 1,250→250→ 500→2,500	1201	8.06	8.16	8.19	8.30	8.45		10.17	10.24	10.14	10.20	10.25	10.38	10.26	10.22	10.32
	1202	7.25	7.32	7.39	7.40	7.67		9.52	9.62	9.54	9.60	9.45	9.63	9.50	9.48	9.54
	Mean	7.66	7.74	7.79	7.85	8.06		9.85	9.93	9.84	9.90	9.85	10.01	9.88	9.85	9.93
	S.D.	0.57	0.59	0.57	0.64	0.55		0.46	0.44	0.42	0.42	0.57	0.53	0.54	0.52	0.55
	N	2	2	2	2	2		2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sex : Female																
Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day of dosing (kg)														
		0*	1	4	5	12	~	109*	110	113*	114	117*	118	120	124	130
G1 0→0→0→0	2101	5.98	6.06	6.03	6.03	6.01		7.55	7.78	7.78	7.83	7.72	7.87	7.81	7.73	7.87
	N	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1
G2 1,250→250→ 500→2,500	2201	7.00	7.21	7.15	7.14	7.35		8.88	9.02	8.96	9.02	9.06	9.13	9.11	9.10	9.15
	2202	7.12	7.29	7.34	7.30	7.38		6.87	6.89	6.85	6.87	6.97	6.82	6.79	6.70	6.48
	Mean	7.06	7.25	7.25	7.22	7.37		7.88	7.96	7.91	7.95	8.02	7.98	7.95	7.90	7.82
	S.D.	0.08	0.06	0.13	0.11	0.02		1.42	1.51	1.49	1.52	1.48	1.63	1.64	1.70	1.89
	N	2	2	2	2	2		2	2	2	2	2	2	2	2	2

* : dosing day. ~ : Animals were not dosed for drug-free period (Day 15 - 108 of dosing).

(Mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구헤모글로빈량 (Mean corpuscular Hemoglobin, MCH), 평균적혈구헤모글로빈 농도 (Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판수 (Platelet count, PLT) 및 백혈구수 (Total leukocyte count, WBC)를 측정하였다.

또한, 혈액생화학적 검사는 배대동맥에서 채취한 혈액 중 혈액학적 검사용 혈액을 제외한 나머지 혈액을 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리 후 혈청을 취하여 이용하였다. 혈액생화학 분석기 (7180, HITACHI, Japan)로 알라닌 아미노기전이효소 (Alanine aminotransferase, ALT), 아스파테이트 아미노기전이효소 (Aspartate aminotransferase, AST), 알칼라인 포스파타제 (Alkaline phosphatase, ALP), 혈액요소질소 (Blood urea nitrogen, BUN), 크레아티닌 (Creatinine, Crea), 총단백 (Total protein, TP), 알부민 (Albumin, Alb), A/G ratio, 총콜레스테롤 (Total cholesterol, T-Chol), 트리글리세라이드 (Triglycerides, TG), 혈당 (Glucose, Glu)을 측정하였다.

투여 29일에 isoflurane 마취 하에 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다. 부검을 실시한 모든 동물에 대해서 전신의 장기·조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였고, 뇌, 심장, 간, 비장 및 신장에 대한 습중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기중량비를 산출하였다. 좌우가 있는 장기는 좌우를 합하여 무게를 측정하였다.

투여기간 동안, 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다 (Table 38). 시험물질색변 (compound-colored stool)이 500 mg/kg 투여군에서 투여 18 ~ 28일에 수컷 3마리, 투여 23일에 암컷 1마리에서 관찰되었고, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 2 ~ 28일에 암수 모든 동물에서 관찰되었다. 또한, 2,000 mg/kg/day 투여군에서 유연이 투여 7 ~ 28일에 암수 모든 동물에서 투여 후에 관찰되었고, 불규칙호흡 (irregular respiration)이 투여 19 ~ 28일에 수컷 2마리에서 관찰되었다. 이러한 증상은 과량의 시험물질 투여에 의한 변화이거나, 시험물질 자극에 의한 이차적인 변화로 사료되며, 다른 모든 항목에서 시험물질 투여에 기인한 영향이 인정되지 않아 독성변화는 아닌 것으로 판단된다. 그 외, 수컷 대조군에서 좌측 경부의 상처 및 가피형성 (crust formation)이 투여 19 ~ 28일에 1마리에서 관찰되었고, 수컷 500 mg/kg 투여군에서 좌측 배부의 가피형성이 투여 25 ~ 28일에 1마리, 사료섭취량의 감소 (decrease in food consumption) 및 우측 안구의 혼탁 (opacity of eyeball)이 투여 28일에 1마리에서 관찰되었다. 이러한 증상은 대조군에서 관찰되었거나, 용량의존성이 없이 1마리에서만 관찰되어 우발적인 증상으로 시험물질 투여에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다.

투여기간 동안, 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중 (Figure 92, 93, Table 39.), 장기중량 (Table 40, 41.) 및 사료 섭취량 (Table 42) 변화는 관찰되지 않았다. 또한 혈액학적 검사의 모든 항목에서요 대조군과 비교시 유의성 있는 변화를 관찰할 수 없었고 (Table 43), 혈액생화학적 검사의 경우 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다 (Table 44). 그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 경미한 변동으로 연관된 다른 항목의 변화를 동반하지 않았으므로, 독성학적 의미는 없었다. 부검 결과 의미 있는 변화는 발견할 수 없었다.

결론적으로, 안토시아닌 올리고머를 랫드에 4주 경구 반복 투여한 결과, 2,000 mg/kg/day 용량에서 시험물질에 의한 영향이 관찰되지 않았으므로, 13주 반복투여 독성시험의 고용량은 2,000 mg/kg/day로 설정해도 될 것으로 판단된다.

Table 38. Summary of Clinical Signs

Sex: Male			
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected
G1 0	5	Wound (left neck)	1
		Crust formation (left neck)	1
G2 500	5	Compound-colored stool	3
		Crust formation (left back)	1
		Decrease in food consumption	1
		Opacity of eyeball (right eye)	1
G3 1,000	5	Compound-colored stool	5
G4 2,000	5	Compound-colored stool	5
		Salivation (after dosing)	5
		Irregular respiration	2
Sex: Female			
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected
G2 500	5	Compound-colored stool	1
G3 1,000	5	Compound-colored stool	5
G4 2,000	5	Compound-colored stool	5
		Salivation (after dosing)	5

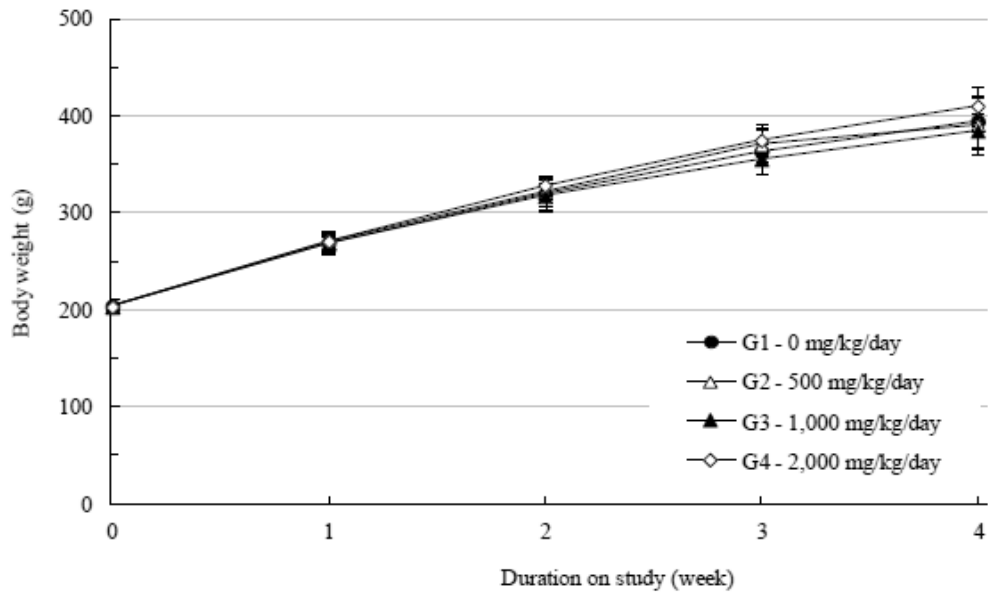


Figure 92. Body weights in Male SD rats

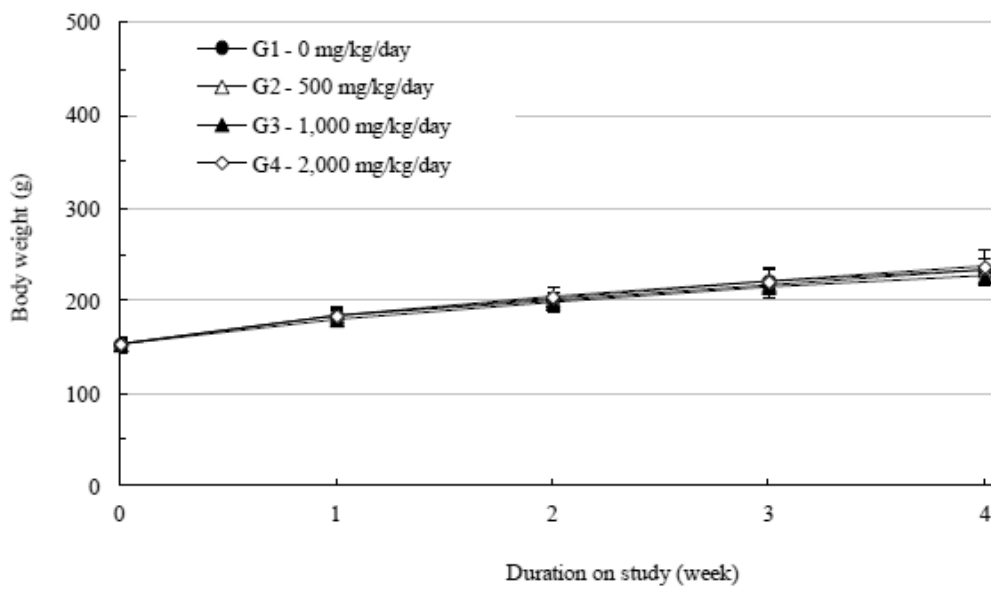


Figure 93. Body weights in Female SD rats

Table 39. Mean body weights

Sex: Male							(g)
Group / Dose (mg/kg/day)		Week					
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	203.6	269.4	319.2	363.3	394.4	
	S.D.	6.5	10.5	17.4	22.1	25.4	
	N	5	5	5	6	6	
G2 500	Mean	203.1	269.7	321.3	370.5	391.2	
	S.D.	5.2	12.5	13.5	17.3	30.2	
	N	5	5	5	6	6	
G3 1,000	Mean	203.4	268.5	317.3	355.6	384.8	
	S.D.	2.4	7.2	14.1	15.6	18.6	
	N	5	5	5	6	6	
G4 2,000	Mean	203.0	270.8	328.5	374.8	410.4	
	S.D.	6.2	6.4	9.5	16.8	20.3	
	N	5	5	5	6	6	
<hr/>							
Sex: Female							(g)
Group / Dose (mg/kg/day)		Week					
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	153.3	183.7	202.6	221.4	234.1	
	S.D.	8.3	10.9	12.9	12.3	13.7	
	N	5	5	5	5	5	
G2 500	Mean	153.1	183.7	201.5	217.9	233.4	
	S.D.	5.7	7.2	7.7	4.7	5.1	
	N	5	5	5	5	5	
G3 1,000	Mean	153.6	180.2	198.0	215.4	226.8	
	S.D.	5.8	6.5	4.6	5.0	7.0	
	N	5	5	5	5	5	
G4 2,000	Mean	153.7	184.3	204.5	221.0	237.0	
	S.D.	6.3	8.4	11.0	16.3	19.0	
	N	5	5	5	5	5	

Table 40. Mean absolute organ weights

Sex: Male		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	360.7	2.05	1.22	11.07	0.76	2.75
	S.D.	21.1	0.07	0.13	1.62	0.07	0.09
	N	5	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	361.2	2.06	1.24	10.92	0.72	2.75
	S.D.	23.4	0.04	0.09	1.12	0.10	0.16
	N	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	353.8	2.00	1.21	10.96	0.73	2.66
	S.D.	16.1	0.08	0.16	0.70	0.09	0.14
	N	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	376.3	2.02	1.28	11.57	0.75	2.81
	S.D.	19.0	0.07	0.09	0.84	0.07	0.21
	N	5	5	5	5	5	5
Sex: Female		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	214.4	1.82	0.82	6.71	0.46	1.72
	S.D.	11.8	0.03	0.07	0.59	0.07	0.23
	N	5	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	216.0	1.83	0.79	6.47	0.50	1.71
	S.D.	2.8	0.06	0.09	0.35	0.05	0.07
	N	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	209.5	1.84	0.78	6.16	0.44	1.68
	S.D.	5.8	0.08	0.03	0.24	0.05	0.09
	N	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	217.7	1.88	0.85	6.61	0.56	1.73
	S.D.	14.8	0.07	0.07	0.58	0.12	0.07
	N	5	5	5	5	5	5

Table 41. Mean Relative organ weights

Sex: Male		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	360.7	0.57	0.34	3.06	0.21	0.76
	S.D.	21.1	0.05	0.03	0.28	0.02	0.03
	N	5	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	361.2	0.57	0.34	3.02	0.20	0.76
	S.D.	23.4	0.04	0.02	0.24	0.02	0.03
	N	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	353.8	0.57	0.34	3.10	0.21	0.75
	S.D.	16.1	0.03	0.04	0.07	0.02	0.05
	N	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	376.3	0.54	0.34	3.08	0.20	0.75
	S.D.	19.0	0.03	0.03	0.24	0.02	0.07
	N	5	5	5	5	5	5
Sex: Female		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	214.4	0.85	0.38	3.12	0.22	0.80
	S.D.	11.8	0.05	0.02	0.12	0.02	0.07
	N	5	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	216.0	0.85	0.37	3.00	0.23	0.79
	S.D.	2.8	0.03	0.04	0.16	0.02	0.03
	N	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	209.5	0.88	0.38	2.94	0.21	0.80
	S.D.	5.8	0.03	0.02	0.16	0.02	0.05
	N	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	217.7	0.87	0.39	3.03	0.26	0.80
	S.D.	14.8	0.09	0.02	0.10	0.04	0.05
	N	5	5	5	5	5	5

Table 42. Mean Food Consumption

Sex: Male		(g/day)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	Mean	28.6	30.5	33.3	34.0	34.0
	S.D.	2.1	2.0	2.9	3.4	3.4
	N	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	29.6	30.4	32.2	34.0	31.6
	S.D.	0.7	1.6	1.4	1.7	7.0
	N	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	30.0	32.2	34.6	33.9	33.3
	S.D.	1.3	1.4	3.5	3.4	3.6
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	28.7	31.5	35.2	36.2	37.5
	S.D.	1.1	1.2	1.8	1.3	1.7
	N	5	5	5	5	5
Sex: Female		(g/day)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	Mean	20.0	21.8	22.0	23.5	23.6
	S.D.	3.6	0.7	0.7	1.4	0.8
	N	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	20.7	22.1	22.1	22.7	24.0
	S.D.	2.7	1.7	1.1	1.6	1.1
	N	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	19.2	20.5	20.3	21.7	22.0
	S.D.	3.3	1.1	2.4	1.8	1.1
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	21.2	21.9	22.8	23.7	24.3
	S.D.	1.5	0.6	2.4	2.9	2.3
	N	5	5	5	5	5

Table 43. Mean hematological parameters

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	8.36	15.1	47.1	56.4	18.1	32.1	975	10.35
	S.D.	0.48	0.6	1.8	2.1	0.7	0.5	184	1.59
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	8.15	15.3	46.8	57.6	18.8	32.6	958	8.63
	S.D.	0.42	0.7	2.0	2.1	0.6	0.4	99	2.01
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	8.12	15.2	46.6	57.4	18.7	32.6	981	10.16
	S.D.	0.27	0.4	1.5	1.8	0.5	0.3	74	2.43
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	7.78	14.6	45.7	58.8	18.8	32.0	978	9.63
	S.D.	0.20	0.4	1.4	2.0	0.7	0.4	68	1.66
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
Sex: Female									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	7.99	15.0	45.2	56.5	18.8	33.3	964	6.30
	S.D.	0.19	0.5	1.3	0.6	0.2	0.5	167	2.79
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	7.91	15.2	45.5	57.5	19.2	33.4	1060	5.12
	S.D.	0.31	0.6	1.6	1.5	0.5	0.4	145	0.93
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	8.17	15.2	46.1	56.4	18.6	32.9	1112	5.92
	S.D.	0.31	0.8	2.7	1.6	0.5	0.8	127	1.52
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	7.80	14.8	44.9	57.6	19.0	32.9	1255	7.33
	S.D.	0.28	0.4	1.2	1.8	0.3	0.6	402	1.84
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 44. Mean clinical chemistry

Sex: Male						
Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)
G1 0	Mean	29.5	96.6	657.5	12.1	0.44
	S.D.	5.7	13.4	127.9	2.2	0.01
	N	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	25.3	77.3	596.3	11.8	0.42
	S.D.	3.5	14.7	132.2	1.3	0.03
	N	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	26.4	83.8	624.7	10.6	0.43
	S.D.	3.3	13.3	109.2	0.5	0.01
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	24.7	79.3	594.3	9.9	0.42
	S.D.	4.3	23.3	124.9	2.1	0.02
	N	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	Glu (mg/dL)
G1 0	Mean	5.8	2.4	0.71	64	46	133
	S.D.	0.2	0.1	0.07	14	18	11
	N	5	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	5.8	2.4	0.70	66	36	124
	S.D.	0.1	0.1	0.04	11	12	12
	N	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	5.7	2.4	0.71	63	46	130
	S.D.	0.1	0.1	0.05	7	11	7
	N	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	5.5 **	2.3	0.75	55	37	123
	S.D.	0.1	0.1	0.03	12	9	3
	N	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Dunnett's t-test: ** p<0.01.

3.2.12.8. 13주 반복투여독성시험 결과

본 시험은 시험물질인 안토시아닌 올리고머를 Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))계 암수 랫드에 13 주간 반복 경구투여 시에 대한 안전성을 평가하고, 4 주의 회복기간 동안의 독성변화의 가역성을 평가하기 위하여 실시하였다.

시험물질은 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 의 3 개의 용량으로 암수 군당 각각 10, 10 및 15 마리에 13 주간 경구 투여하였다. 또한, 대조군 (주사용수)을 설정하여 15 마리에 13 주간 경구 투여하였다. 대조군 및 2,000 mg/kg/day 투여군에는 암수 각 5 마리에 대하여 독성의 가역성을 평가하기 위해 4 주간의 회복기간을 두었다.

관찰기간 동안, 일반증상관찰, 체중 및 사료섭취량 측정, 안과학적 검사, 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

가. 일반증상 (Table 45, 46.)

2,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 1 마리 (개체번호: 1413)가 투여 69 일에 사망 (death)하였다. 사망전의 일반증상으로는 유연 (salivation)이 투여 11 ~ 68 일의 투여 전후에 산발적으로 관찰되었고, 시험물질색변 (compound-colored stool)이 투여 13 ~ 68 일에 관찰된 후, 투여 69 일에 횡와위 (lying on side) 상태로 사망하였다. 부검 결과, 폐의 적색 변색 (discoloration) 및 종대 (enlargement), 흉강 내 흉수 (hydrothorax)가 관찰되었고, 조직병리학적 검사 결과, 기관지의 상피와 폐포에서 적갈색의 물질 (reddish brown material)이 관찰되었다. 이는 시험물질을 강제 경구투여 하는 과정에서 일부가 기관을 통해 폐로 유입되어 사망한 것으로 시험물질에 의한 독성 변화는 아닌 것으로 판단된다.

관찰기간 동안, 암수 대조군에서 사망례 및 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.

투여기간 동안, 500 mg/kg/day 투여군에서 시험물질색변이 수컷은 투여 16 일부터, 암컷은 투여 20 일부터 모든 개체에서 투여 종료시까지 산발적으로 관찰되었다.

1,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질색변이 수컷은 투여 2 일부터, 암컷은 투여 7 일부터 투여 종료시까지 모든 개체에서 산발적으로 관찰되었고, 투여 후 유연이 투여 15 일부터 수컷 1 ~ 4 마리에서, 투여 79 일에 암컷 2 마리에서 관찰되었다.

2,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질색변이 투여 2 일부터 암수 모든 개체에서 투여 종료시까지 산발적으로 관찰되었고, 투여 후 유연이 투여 8 일부터 수컷 2 ~ 9 마리에서, 투여 7 일부터 암컷 1 ~ 10 마리에서 투여 종료시까지 관찰되었으며, 일부 개체 (1 ~ 2 마리)에서는 투여 전에도 관찰되었다. 그 외, 불규칙호흡 (irregular respiration)이 투여 32 ~ 36 일에 수컷 1 ~ 2 마리에서, 사료섭취량의 감소 (decrease in food intake) 및 변량의 감소 (decrease of fecal volume)가 투여 61 일에 암컷 1 마리에서 관찰되었다.

회복기간 동안, 2,000 mg/kg/day 투여군에서 회복 1 일에 시험물질색변이 암수 모든 개체에서 관찰되었고, 유연이 수컷 2 마리에서 관찰되었다.

이러한 증상들은 과량의 시험물질 투여에 의한 변화이거나, 시험물질의 물리화학적 자극에 의한 이차적인 변화로서 독성변화는 아닌 것으로 판단된다.

나. 체중변화 (Fig 94, Fig 95, Table 47, Table 48)

투여기간 동안, 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 통계적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

Table 45. Summary of Clinical Signs (Dosing period)

Sex: Male			
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected
G2 500	10	Compound-colored stool	10
G3 1,000	10	Compound-colored stool Salivation (after dosing)	10 6
G4 2,000	15	Compound-colored stool Salivation (after dosing) Salivation (before dosing) Irregular respiration Irregular respiration (PM) Lying on side Death	15 12 3 2 1 1 1
Sex: Female			
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected
G2 500	10	Compound-colored stool	10
G3 1,000	10	Compound-colored stool Salivation (after dosing)	10 2
G4 2,000	15	Compound-colored stool Salivation (after dosing) Salivation (before dosing) Decrease in food intake Decrease of fecal volume	15 14 2 1 1

Table 46. Summary of Clinical Signs (Recovery period)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected
G4 2,000	4	Compound-colored stool Salivation	4 2

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected
G4 2,000	5	Compound-colored stool	5

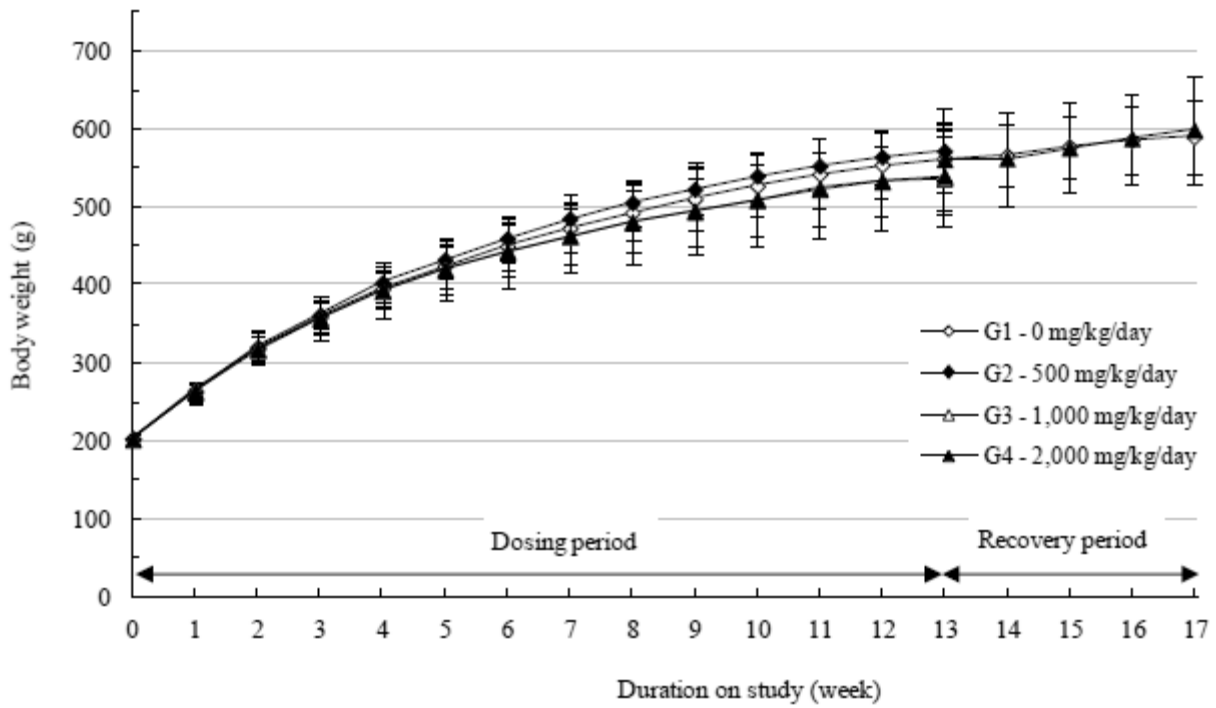


Fig.94. Body Weights in Male SD Rats

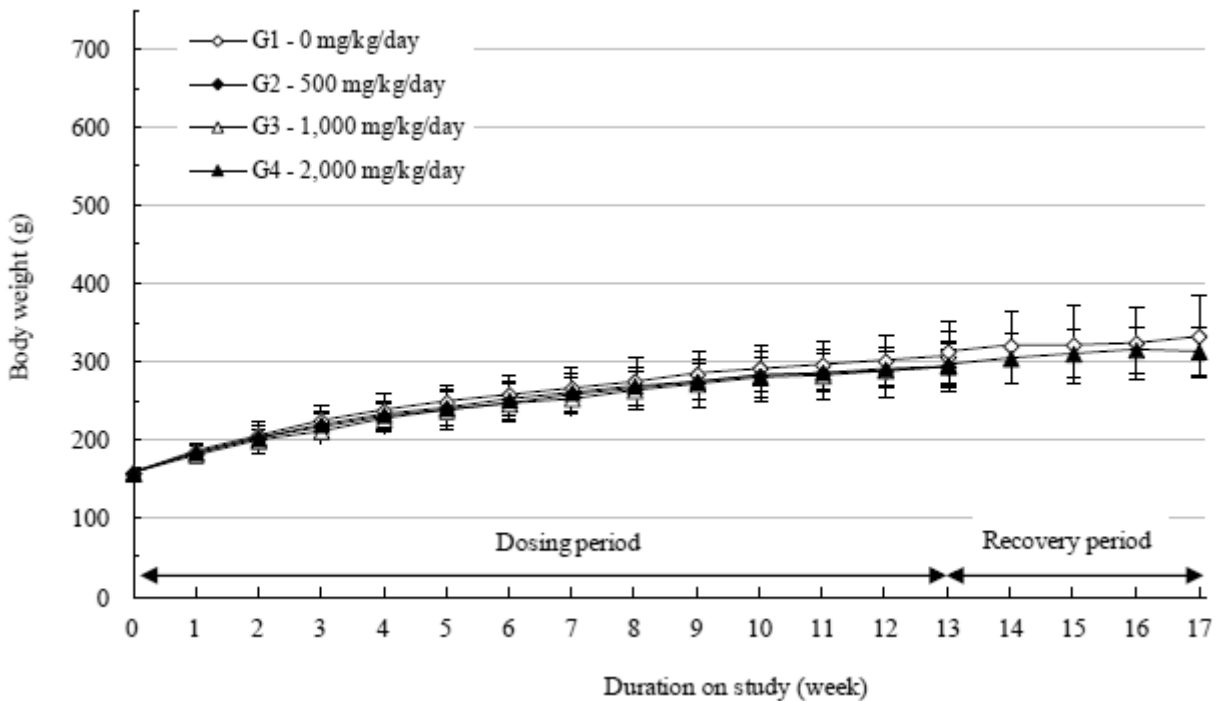


Fig.95. Body Weights in Female SD Rats

Table 47. Mean Body Weights (Dosing period)

Sex: Male		(g)							
Group / Dose (mg/kg/day)		Week							
		0	1	2	3	4	5	6	
G1 0	Mean	202.9	264.9	318.1	359.0	395.1	424.6	449.7	
	S.D.	6.7	9.3	14.7	19.9	21.9	27.8	29.7	
	N	15	15	15	15	15	15	15	
G2 500	Mean	203.0	262.2	320.4	362.1	403.3	432.6	459.6	
	S.D.	7.3	14.7	20.2	18.8	26.7	25.6	29.3	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G3 1,000	Mean	202.5	264.2	318.3	356.8	391.9	420.4	441.5	
	S.D.	8.5	11.9	21.0	27.9	33.6	39.8	43.3	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G4 2,000	Mean	202.6	262.1	316.3	357.2	393.5	419.3	443.3	
	S.D.	7.9	13.0	16.6	20.7	25.0	29.2	33.7	
	N	15	15	15	15	15	15	15	

Group / Dose (mg/kg/day)		Week							
		7	8	9	10	11	12	13	
G1 0	Mean	473.0	493.0	510.5	527.2	542.4	554.2	562.3	
	S.D.	32.8	35.5	38.4	40.4	44.1	42.8	44.2	
	N	15	15	15	15	15	15	15	
G2 500	Mean	485.2	505.8	522.9	540.1	552.8	564.5	571.9	
	S.D.	31.1	30.3	33.1	32.0	35.2	35.2	36.8	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G3 1,000	Mean	462.4	479.9	495.4	510.0	524.3	533.3	537.3	
	S.D.	45.9	51.4	56.4	59.5	62.7	63.1	63.3	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G4 2,000	Mean	463.1	481.0	494.1	508.7	523.0	532.9	539.8	
	S.D.	35.7	40.3	44.5	46.2	48.7	46.0	49.4	
	N	15	15	15	14	14	14	14	

Table 48. Mean Body Weights (Recovery Period)

Sex: Male							(g)
Group /		Week					
Dose (mg/kg/day)		13	14	15	16	17	
G1 0	Mean	562.5	566.0	577.6	586.1	590.2	
	S.D.	37.1	39.4	41.2	41.6	45.7	
	N	5	5	5	5	5	
G4 2,000	Mean	561.4	562.4	576.1	588.2	598.9	
	S.D.	64.6	59.3	57.9	57.6	68.8	
	N	4	4	4	4	4	

Sex: Female							(g)
Group /		Week					
Dose (mg/kg/day)		13	14	15	16	17	
G1 0	Mean	313.2	320.6	322.0	324.3	333.0	
	S.D.	40.7	46.7	49.0	45.7	52.0	
	N	5	5	5	5	5	
G4 2,000	Mean	296.2	304.6	310.7	315.8	313.4	
	S.D.	28.0	30.6	30.0	28.3	30.4	
	N	5	5	5	5	5	

회복기간 동안, 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 통계적으로 유의한 체중 변화는 관찰되지 않았다.

다. 사료섭취량 (Table. 49, Table 50)

투여기간 동안, 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 통계적으로 유의한 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

회복기간 동안, 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 통계적으로 유의한 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

라. 안과학적 검사 (Table 51, Table 52)

주시험군의 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

마. 뇨검사 (Table 53, Table 54)

주시험군의 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

그 외, 검출 및 빈도의 감소/증가경향이 관찰된 항목 모두 경미한 변동으로서 우발적 분포이거나, 연관된 항목의 변화가 관찰되지 않았으므로 모두 독성학적 의미는 없었다.

바. 혈액학적 검사 (Table 55, Table 56)

주시험군의 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 정상범위 내의 경미한 변동으로 독성학적 의미는 없었다.

회복군의 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 모든 검사 항목에서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

사. 혈액생화학적 검사 (Table 57, Table 58)

주시험군의 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 경미한 변동으로 연관된 항목에서 변화가 관찰되지 않거나, 주시험군에서 관찰되지 않은 변화로 독성학적 의미는 없었다.

아. 장기 중량 (Table 59 ~62)

주시험군의 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 용량상관성이 없거나 경미한 변동이며, 관련된 다른 변화를 동반하지 않아 독성학적 의미는 없었다.

자. 부검

주시험군의 암수 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는

Table 49. Mean Food Consumption (Dosing period)

		(g/day)							
Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)		Week							
		0	1	2	3	4	5	6	
G1 0	Mean	26.3	28.6	30.3	31.3	31.7	32.2	31.8	
	S.D.	2.9	2.1	2.5	3.1	2.8	3.0	3.1	
	N	15	15	15	15	15	15	15	
G2 500	Mean	26.3	28.0	31.2	32.2	33.7	33.2	33.4	
	S.D.	2.8	2.6	2.6	1.5	2.3	3.0	2.6	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G3 1,000	Mean	26.7	30.1	32.0	32.5	33.1	33.5	33.2	
	S.D.	1.7	1.3	3.3	3.8	3.5	3.8	3.6	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G4 2,000	Mean	26.6	29.2	32.0	33.1	34.5	34.2	33.6	
	S.D.	2.6	2.9	2.9	2.8	2.6	4.2	3.8	
	N	15	15	15	15	15	15	15	

Group / Dose (mg/kg/day)		Week							
		7	8	9	10	11	12	13	
G1 0	Mean	31.8	31.2	31.1	30.9	30.8	30.1	29.8	
	S.D.	3.3	2.9	3.0	3.0	3.2	2.9	3.2	
	N	15	15	15	15	15	15	15	
G2 500	Mean	32.6	32.3	31.6	31.5	30.8	30.1	29.8	
	S.D.	2.0	1.8	2.0	1.7	2.0	1.9	2.0	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G3 1,000	Mean	33.2	32.4	32.3	32.3	31.9	31.1	31.2	
	S.D.	3.4	4.8	5.3	4.6	4.6	4.1	4.2	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G4 2,000	Mean	34.0	33.5	31.8	31.8	33.0	32.0	32.0	
	S.D.	3.2	3.8	4.4	4.9	4.0	3.2	3.4	
	N	15	15	15	14	14	14	14	

Table 50. Mean Food Consumption (Recovery period)
Sex: Male (g/day)

Group / Dose (mg/kg/day)		Week			
		14	15	16	17
G1 0	Mean	28.0	29.4	29.7	29.4
	S.D.	2.1	1.9	2.2	1.7
	N	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	29.7	31.3	31.8	31.7
	S.D.	3.3	4.4	4.4	5.2
	N	4	4	4	4

Group / Dose (mg/kg/day)		Week			
		14	15	16	17
G1 0	Mean	20.8	21.3	21.9	21.2
	S.D.	2.8	2.1	2.1	2.0
	N	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	22.0	22.3	22.1	20.0
	S.D.	2.8	2.0	2.8	3.3
	N	5	5	5	5

Table 51. 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 500	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	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 500	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 52. 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	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	4	Normal	4	4	4	4	4	4	4	4

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 2,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 53. Summary of Urinalysis Results (Main group)

Sex		Male				Female			
Group /		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Dose (mg/kg/day)		0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
No. of animals		5	5	5	5	5	5	5	5
Volume (mL)	Mean	12.6	14.8	9.9	8.2	5.0	11.4	4.3	5.9
	S.D.	3.1	6.2	2.4	2.1	2.5	6.1	2.1	4.5
Color	Pale yellow	3	1			1	1		
	Yellow	2	4	5	5	4	4	5	5
Transparency	Clear	5	5	3		5	5	2	4
	Mild turbidity			2	4			3	1
	Turbidity				1				
pH	5								
	6						1		
	6.5			2	1			1	2
	7	2	1		1		2	1	
	8	3	4	2	2	4	2	1	3
	9			1	1	1		2	
Protein (mg/dL)	-	3	3	2		5	3	4	3
	25	2	2	2	4		2	1	2
	75			1	1				
	150								
	500								
Glucose (mg/dL)	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
	50								
	100								
	300								
	1,000								
Ketone body (mg/dL)	-	3	2			4	3	2	1
	5	2	3	4	3	1	2	2	2
	15				1			1	1
	50			1	1				1
	150								
Bilirubin (mg/dL)	-	5	5	5	5	5	5	4	4
	1							1	1
	3								
	6								
Occult blood (Ery/μL)	-	5	4	4	5	5	5	5	4
	10			1					1
	25		1						
	50								
	150								
	250								

Table 54. Summary of Urinalysis Results (Recovery group)

Sex		Male		Female	
Group /		G1	G4	G1	G4
Dose (mg/kg/day)		0	2,000	0	2,000
No. of animals		5	4	5	5
Volume (mL)	Mean	11.2	8.6	6.1	5.3
	S.D.	7.7	1.5	2.6	2.9
Color	Yellow	3	4	5	5
	Amber	2			
Transparency	Clear	1		5	5
	Mild turbidity	2			
	Turbidity	2	4		
pH	5				
	6			1	1
	6.5				1
	7	1	2		1
	8	2	2	4	1
	9	2			1
Protein (mg/dL)	-	1			2
	25	4	3	4	3
	75		1	1	
	150				
	500				
Glucose (mg/dL)	Normal	5	4	5	5
	50				
	100				
	300				
	1,000				
Ketone body (mg/dL)	-				1
	5	3	2	2	3
	15	2	2	3	1
	50				
	150				
Bilirubin (mg/dL)	-	4	2	2	4
	1	1	2	3	1
	3				
	6				
Occult blood (Ery/ μ L)	-	4	1	5	5
	10		3		
	25				
	50	1			
	150				
250					

Table 55. Mean Hematological Parameters (Main group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	8.77	15.3	45.9	52.3	17.5	33.4	883	2.02
	S.D.	0.29	0.7	1.8	1.2	0.5	0.6	108	0.48
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	8.66	15.2	45.5	52.6	17.6	33.4	903	1.89
	S.D.	0.30	0.6	1.6	1.0	0.3	0.6	76	0.37
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	8.72	15.5	46.2	53.0	17.7	33.5	898	1.79
	S.D.	0.32	0.7	1.7	0.9	0.5	0.6	62	0.37
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	8.50	15.1	44.9	52.8	17.7	33.5	934	1.91
	S.D.	0.27	0.5	1.0	1.2	0.5	0.5	108	0.38
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	8.90	20.6	74.1	2.6	1.5	0.3	17.6	16.2
	S.D.	2.52	6.4	7.2	0.8	0.5	0.1	0.7	1.7
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	9.71	19.9	74.0	3.2	1.5	0.3	17.6	16.0
	S.D.	2.09	5.7	6.2	0.9	0.7	0.1	0.8	1.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	10.03	17.9	77.5	2.2	1.4	0.3	17.7	16.0
	S.D.	2.81	6.6	6.8	0.8	0.5	0.1	0.7	1.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	8.84	20.3	75.7	2.0	1.1	0.2 *	18.0	15.0
	S.D.	1.76	2.5	2.7	0.3	0.4	0.1	0.8	1.9
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * p<0.05.

Table 56. Mean Hematological Parameters (Recovery group)

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	8.65	14.3	45.0	52.1	16.5	31.8	877	2.72
	S.D.	0.41	0.4	1.4	2.1	0.6	0.1	120	0.38
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	8.33	14.2	44.5	53.4	17.1	31.9	975	3.12
	S.D.	0.45	1.0	2.5	0.9	0.5	0.5	83	1.24
	N	4	4	4	4	4	4	4	4

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	11.08	20.4	74.3	2.5	1.4	0.4	18.4	15.7
	S.D.	1.35	2.2	2.8	0.7	0.2	0.1	0.3	0.9
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	9.99	19.3	75.1	2.5	1.5	0.3	18.2	17.2
	S.D.	1.34	5.3	5.4	0.2	0.4	0.1	0.9	1.0
	N	4	4	4	4	4	4	4	4

Sex: Female									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	7.77	14.3	44.1	56.8	18.4	32.3	922	2.75
	S.D.	0.40	0.7	2.2	1.2	0.3	0.5	112	0.18
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	8.06	14.7	45.4	56.4	18.2	32.3	881	2.39
	S.D.	0.34	0.4	1.0	1.8	0.7	0.4	92	0.51
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	5.03	18.7	76.0	2.3	1.7	0.3	17.6	14.6
	S.D.	1.42	5.7	5.4	0.5	0.5	0.1	0.8	1.7
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	6.23	15.9	78.9	2.1	1.7	0.3	17.7	15.1
	S.D.	2.03	5.3	5.6	0.4	0.3	0.1	0.5	2.1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 57. Mean Clinical Chemistry (Main group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)
G1 0	Mean	31.8	85.9	335.0	0.52	144	13.4	0.44	0.05	74
	S.D.	3.1	14.1	72.0	0.07	14	1.3	0.02	0.02	20
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	29.5	85.7	283.1	0.57	147	12.1	0.44	0.05	77
	S.D.	5.9	21.3	25.8	0.10	25	1.4	0.03	0.01	27
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	32.0	105.8	333.1	0.56	142	10.8 **	0.44	0.04	67
	S.D.	8.1	30.7	75.1	0.12	14	1.2	0.03	0.01	8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	25.5	91.2	271.6	0.54	139	9.3 **	0.46	0.05	67
	S.D.	4.2	11.8	50.6	0.13	16	1.0	0.02	0.02	10
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		TG (mg/dL)	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	54	6.0	2.3	0.64	6.00	10.0	139.2	4.27	106.9
	S.D.	29	0.3	0.1	0.04	0.33	0.3	0.9	0.28	2.0
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	71	6.0	2.4	0.67	6.04	10.1	138.5	4.29	106.4
	S.D.	28	0.3	0.1	0.04	0.51	0.3	1.0	0.24	1.1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	62	5.8	2.3	0.67	6.16	9.8	138.7	4.43	106.8
	S.D.	26	0.1	0.1	0.04	0.42	0.1	0.9	0.15	1.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	42	5.5 **	2.2	0.69	6.02	9.8	138.5	4.42	107.0
	S.D.	14	0.3	0.2	0.06	0.74	0.4	0.9	0.30	0.8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: ** p<0.01.

Table 58. Mean Clinical Chemistry (Recovery group)

Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)
G1 0	Mean	39.6	113.6	246.2	0.52	148	14.4	0.49	0.07	85
	S.D.	15.8	26.8	18.2	0.21	12	0.8	0.04	0.01	5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	47.9	108.0	230.6	0.64	147	13.0 *	0.48	0.08	86
	S.D.	39.5	42.0	23.3	0.56	10	0.6	0.02	0.02	21
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Group / Dose (mg/kg/day)		TG (mg/dL)	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	66	6.0	2.3	0.63	5.84	9.9	136.7	4.37	105.0
	S.D.	6	0.1	0.0	0.02	0.25	0.2	1.0	0.13	0.7
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	54 *	6.0	2.4	0.64	5.98	9.9	137.1	4.23	105.3
	S.D.	7	0.0	0.1	0.02	0.51	0.1	0.7	0.20	1.5
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)
G1 0	Mean	46.0	116.2	119.3	0.51	130	12.9	0.50	0.08	84
	S.D.	24.2	38.8	14.1	0.24	3	0.8	0.08	0.02	11
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	22.5	79.9	146.9	0.55	138	13.6	0.50	0.09	93
	S.D.	4.9	6.1	55.9	0.33	9	3.2	0.05	0.01	15
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		TG (mg/dL)	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	30	6.6	3.0	0.84	4.59	10.0	138.7	3.94	106.6
	S.D.	13	0.6	0.3	0.03	0.83	0.6	0.5	0.22	1.1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	33	6.4	2.9	0.82	4.75	10.1	138.1	3.90	106.4
	S.D.	19	0.4	0.2	0.04	0.44	0.4	0.7	0.28	0.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Student t-test: * p<0.05.

Table 59. Mean Absolute Organ Weights (Main group)

Sex: Male		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	534.3	2.13	0.0132	1.50	1.76	13.54
	S.D.	47.0	0.12	0.0017	0.15	0.15	2.26
	N	10	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	544.7	2.18	0.0123	1.52	1.71	13.76
	S.D.	35.6	0.09	0.0011	0.17	0.09	1.29
	N	10	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	510.6	2.20	0.0119	1.45	1.62	12.85
	S.D.	61.3	0.17	0.0019	0.23	0.11	2.17
	N	10	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	507.1	2.13	0.0123	1.40	1.70	11.81
	S.D.	41.7	0.10	0.0015	0.12	0.28	0.99
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	0.87	3.16	0.0628	3.55	0.68
	S.D.	0.15	0.37	0.0084	0.24	0.16
	N	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	0.92	3.02	0.0612	3.83	0.63
	S.D.	0.13	0.24	0.0117	0.26	0.07
	N	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	0.86	3.06	0.0590	3.53	0.62
	S.D.	0.14	0.35	0.0086	0.35	0.13
	N	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	0.88	2.87	0.0629	3.57	0.58
	S.D.	0.12	0.25	0.0085	0.19	0.13
	N	10	10	10	10	10

Sex: Female

(g)

Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	283.1	1.94	0.0165	0.92	1.16	6.99
	S.D.	27.0	0.05	0.0021	0.10	0.08	0.90
	N	10	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	274.8	1.98	0.0165	0.93	1.18	7.03
	S.D.	30.6	0.07	0.0022	0.06	0.11	0.84
	N	10	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	275.6	1.95	0.0162	0.94	1.18	7.11
	S.D.	23.2	0.09	0.0036	0.09	0.11	1.13
	N	10	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	275.7	1.97	0.0156	0.94	1.26	6.98
	S.D.	22.2	0.13	0.0024	0.08	0.26	0.70
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	0.51	1.77	0.0691	0.0773	0.80
	S.D.	0.08	0.21	0.0062	0.0119	0.29
	N	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	0.54	1.74	0.0713	0.0795	0.73
	S.D.	0.07	0.12	0.0093	0.0141	0.23
	N	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	0.53	1.78	0.0679	0.0728	0.72
	S.D.	0.10	0.20	0.0118	0.0109	0.24
	N	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	0.54	1.79	0.0677	0.0840	0.70
	S.D.	0.08	0.18	0.0091	0.0135	0.21
	N	10	10	10	10	10

Table 60. Mean Absolute Organ Weights (Recovery group)

Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
(g)							
G1 0	Mean	563.5	2.22	0.0130	1.53	1.75	13.92
	S.D.	44.0	0.09	0.0008	0.12	0.07	1.40
	N	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	565.7	2.25	0.0124	1.48	1.85	14.58
	S.D.	66.7	0.09	0.0023	0.13	0.15	2.90
	N	4	4	4	4	4	4
Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate	
G1 0	Mean	0.93	3.41	0.0628	3.78	0.49	
	S.D.	0.12	0.33	0.0070	0.30	0.11	
	N	5	5	5	5	5	
G4 2,000	Mean	0.98	3.36	0.0651	3.82	0.46	
	S.D.	0.13	0.41	0.0070	0.07	0.10	
	N	4	4	4	4	4	
(g)							
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	311.6	2.02	0.0190	1.05	1.24	7.99
	S.D.	49.6	0.08	0.0049	0.15	0.05	1.19
	N	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	297.7	1.89 *	0.0175	0.92	1.25	7.79
	S.D.	28.2	0.08	0.0034	0.07	0.24	0.78
	N	5	5	5	5	5	5
Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus	
G1 0	Mean	0.55	2.01	0.0711	0.0759	0.75	
	S.D.	0.04	0.12	0.0082	0.0147	0.18	
	N	5	5	5	5	5	
G4 2,000	Mean	0.56	1.88	0.0798	0.0798	0.75	
	S.D.	0.09	0.21	0.0110	0.0132	0.22	
	N	5	5	5	5	5	

Significantly different from control by Student t-test: * $p < 0.05$.

Table 61. Mean Relative Organ Weights (Main group)

Sex: Male

(g/100 g body weight)

Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	534.3	0.40	0.0025	0.28	0.33	2.52
	S.D.	47.0	0.03	0.0002	0.02	0.01	0.24
	N	10	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	544.7	0.40	0.0023	0.28	0.31	2.53
	S.D.	35.6	0.01	0.0003	0.02	0.02	0.15
	N	10	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	510.6	0.44	0.0024	0.28	0.32	2.51
	S.D.	61.3	0.07	0.0002	0.03	0.04	0.18
	N	10	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	507.1	0.42	0.0024	0.28	0.34	2.33 *
	S.D.	41.7	0.03	0.0002	0.02	0.05	0.10
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	0.16	0.59	0.0118	0.67	0.13
	S.D.	0.02	0.04	0.0016	0.07	0.03
	N	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	0.17	0.56	0.0112	0.71	0.12
	S.D.	0.02	0.02	0.0020	0.03	0.01
	N	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	0.17	0.60	0.0117	0.70	0.12
	S.D.	0.02	0.05	0.0022	0.10	0.02
	N	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	0.17	0.57	0.0125	0.71	0.11
	S.D.	0.02	0.03	0.0020	0.07	0.03
	N	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * $p < 0.05$.

Sex: Female

(g/100 g body weight)

Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	283.1	0.69	0.0058	0.33	0.41	2.47
	S.D.	27.0	0.07	0.0005	0.02	0.03	0.20
	N	10	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	274.8	0.73	0.0060	0.34	0.43	2.56
	S.D.	30.6	0.09	0.0006	0.02	0.07	0.20
	N	10	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	275.6	0.71	0.0058	0.34	0.43	2.57
	S.D.	23.2	0.04	0.0010	0.02	0.02	0.25
	N	10	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	275.7	0.72	0.0057	0.34	0.46	2.54
	S.D.	22.2	0.08	0.0011	0.03	0.10	0.20
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	0.18	0.63	0.0245	0.0274	0.29
	S.D.	0.02	0.05	0.0024	0.0041	0.12
	N	10	10	10	10	10
G2 500	Mean	0.20	0.64	0.0261	0.0290	0.27
	S.D.	0.02	0.05	0.0034	0.0044	0.09
	N	10	10	10	10	10
G3 1,000	Mean	0.19	0.65	0.0246	0.0265	0.26
	S.D.	0.03	0.04	0.0038	0.0036	0.09
	N	10	10	10	10	10
G4 2,000	Mean	0.20	0.65	0.0247	0.0308	0.25
	S.D.	0.03	0.06	0.0034	0.0065	0.08
	N	10	10	10	10	10

Table 62. Mean Relative Organ Weights (Recovery group)

Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	563.5	0.39	0.0023	0.27	0.31	2.47
	S.D.	44.0	0.03	0.0002	0.02	0.03	0.11
	N	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	565.7	0.40	0.0022	0.26	0.33	2.56
	S.D.	66.7	0.03	0.0002	0.02	0.02	0.25
	N	4	4	4	4	4	4

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	0.17	0.61	0.0112	0.67	0.09
	S.D.	0.03	0.05	0.0020	0.05	0.02
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	0.17	0.60	0.0116	0.68	0.08
	S.D.	0.01	0.06	0.0016	0.10	0.02
	N	4	4	4	4	4

Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	311.6	0.66	0.0062	0.34	0.40	2.58
	S.D.	49.6	0.10	0.0019	0.04	0.04	0.30
	N	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	297.7	0.64	0.0060	0.31	0.42	2.61
	S.D.	28.2	0.08	0.0015	0.02	0.09	0.07
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	0.18	0.65	0.0230	0.0247	0.25
	S.D.	0.03	0.07	0.0027	0.0052	0.09
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	0.19	0.63	0.0269	0.0269	0.25
	S.D.	0.02	0.02	0.0036	0.0040	0.08
	N	5	5	5	5	5

결과는 없었다.

2,000 mg/kg/day 투여군의 폐에서 좌측엽의 흑갈색 변색 (discoloration) 또는 병소 (focus) 가 수컷 2 마리 및 암컷 1 마리에서 관찰되었으나, 좌측엽에만 국한된 국소적인 변화로 독성학적 의미는 없었다. 그 외, 관찰된 육안소견은 자연발생적이거나 우발적인 변화로 판단하였다.

회복군의 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

수컷 2,000 mg/kg/day 투여군의 사망동물 (개체번호: 1413)에 대한 부검 결과, 흉강 내 흉수 (hydr-othorax), 폐의 암적색 변색 및 종대 (enlargement)가 관찰되었다.

차. 조직병리학적 검사

암수 시험물질 투여군에서 십이지장, 장간막 림프절, 위 및 폐 (기관지포함)에서 시험물질 투여에 기인한 변화가 관찰되었으나, 시험물질 처리과정에서 나타난 생체반응이거나, 종 특이적인 반응 또는 조제물 특성 (높은 점도)에 의한 변화로 판단하여 모두 독성학적 의미는 없었다.

① 십이지장

주시험군의 수컷 1,000 mg/kg/day 이상 투여군 및 암컷 500 mg/kg/day 이상 투여군의 십이지장에서 고유판의 가염소성 조직구 침윤 (infiltration) 소견이 미미한 정도 (minimal)에서 중등도 (moderate)까지 관찰되었다 (Table 63).

해당 소견은 대조군에서는 관찰되지 않고, 시험물질 투여군에서만 관찰되었기에 시험물질에 의한 영향으로 판단된다. 그러나, 염증세포 침윤이나 조직 손상이 관찰되지 않았기에 시험물질 처리과정에서 나타난 생체반응으로 추정되어 독성학적 의미는 없었다.

회복군의 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서도 고유판의 가염소성 조직구 침윤 소견이 미미한 정도에서 경도 (slight)로 여전히 관찰되었다 (Table 64).

그러나, 발생 빈도 및 정도가 주시험군 보다 감소하였고 일부 회복하였기에, 회복과정 중에 있는 것으로 판단하였다.

Table 63. Incidence and severity of Remarkable Microscopic Findings in the Duodenum in the Main Group

Tissue/Finding Sex	Group	Male				Female			
		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
		Dose (mg/kg/day)				Dose (mg/kg/day)			
Duodenum									
Number examined		10	10	10	10	10	10	10	10
Infiltration, tingible body histiocyte, lamina propria									
Minimal		0	0	5	0	0	3	3	1
Slight		0	0	1	2	0	0	2	5
Moderate		0	0	0	8	0	0	0	4
Total Number of affected		0	0	6	10	0	3	5	10

Table 64. Incidence and severity of Remarkable Microscopic Findings in the Duodenum in the Recovery Group

Tissue/Finding Sex	Group	Male		Female	
		G1	G4	G1	G4
		Dose (mg/kg/day)		Dose (mg/kg/day)	
		0	2,000	0	2,000
Duodenum					
Number examined		5	4	5	5
Infiltration, tingible body histiocyte, lamina propria					
Minimal		0	3	0	0
Slight		0	1	0	4
Total Number of affected		0	4	0	4

② 장간막 림프절

암수 500 mg/kg/day 이상 투여군의 장간막 림프절에서 가염소성 조직구의 증가 (increased) 소견이 미미한 정도에서 중등도까지 관찰되었다 (Table 65).

해당 소견은 용량의준적으로 관찰되어 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단하였다. 그러나, 이 외 다른 소견이 관찰되지 않았기에 시험물질 처리과정에서 나타난 생체반응으로 추정되어 독성학적 의미는 없었다.

회복군의 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서도 가염소성 조직구의 증가가 미미한 정도에서 정도로 여전히 관찰되었다 (Table 66).

그러나, 발생 빈도 및 정도가 주시험군 보다 감소하였고 일부 회복하였기에, 회복과정 중에 있는 것으로 판단하였다.

Table 65. Incidence and severity of Remarkable Microscopic Findings in the Mesenteric Lymph Node in the Main Group

Tissue/Finding Sex	Group	Male				Female			
		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
		Dose (mg/kg/day)				Dose (mg/kg/day)			
		0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
Mesenteric lymph node									
Number examined		10	10	10	10	10	10	10	10
Increased, tingible body histiocyte									
Minimal		0	5	6	1	0	2	5	5
Slight		0	0	3	6	0	0	0	4
Moderate		0	0	0	2	0	1	0	0
Total Number of affected		0	5	9	9	0	3	5	9

Table 66. Incidence and severity of Remarkable Microscopic Findings in the Mesenteric Lymph Node in the Recovery Group

Tissue/Finding Sex	Group	Male		Female	
		G1	G4	G1	G4
		Dose (mg/kg/day)		Dose (mg/kg/day)	
		0	2,000	0	2,000
Mesenteric lymph node					
Number examined		5	4	5	5
Increased, tingible body histiocyte					
Minimal		0	3	0	3
Slight		0	0	0	2
Total Number of affected		0	3	0	5

③ 위

수컷 1,000 mg/kg/day 및 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 경계능의 과다각화증을 동반한 편평세포 과다 형성 (Squamous cell hyperplasia)이 미미한 정도에서 중등도까지 관찰되었다 (Table 67).

해당 소견은 대조군에서도 관찰되었으나, 발생 빈도 및 정도가 증가하였기에 시험물질에 의한 영향으로 판단하였다. 다만, 위의 경계능은 사람에서는 존재하지 않는 구조로 종 특이적인 반응으로 판단된다.

회복군의 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서도 경계능의 과다각화증을 동반한 편평세포 과다 형성이 미미한 정도에서 경도로 여전히 관찰되었고 (Table 68), 암컷은 회복되어 관찰되지 않았다.

그러나, 발생 빈도 및 정도가 주시험군 보다 감소하였고 일부 회복하였기에, 회복과정 중에 있는 것으로 판단하였다.

Table 67. Incidence and severity of Remarkable Microscopic Findings in the Stomach in the Main Group

Tissue/Finding Sex	Group	Male				Female			
		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
		Dose (mg/kg/day)				Dose (mg/kg/day)			
		0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
Stomach									
Number examined		10	10	10	10	10	10	10	10
Squamous cell hyperplasia, with hyperkeratosis, limiting ridge									
Minimal		1	0	4	2	1	0	0	3
Slight		0	0	2	6	0	0	0	0
Moderate		0	0	0	2	0	0	0	0
Total Number of affected		1	0	6	10	1	0	0	3

Table 68. Incidence and severity of Remarkable Microscopic Findings in the Stomach in the Recovery Group

Tissue/Finding	Sex	Male		Female	
		Group	G1	G4	G1
	Dose (mg/kg/day)	0	2,000	0	2,000
Stomach					
Number examined		5	4	5	5
Squamous cell hyperplasia, with hyperkeratosis, limiting ridge					
Minimal		0	1	0	0
Slight		0	1	0	0
Total Number of affected		0	2	0	0

④ 폐 (기관지 포함)

주시험군의 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 폐포대식세포 응집 (aggregation) 소견이 4례 관찰되었고, 암컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 기관지폐포의 염증 (inflammation) 소견이 1례 관찰되었다. 가염소성 대식세포가 기관지 주변에만 한정적으로 관찰되었고, 고용량 투여군의 일부 개체에서만 관찰된 것으로 보아, 고용량군 조제물의 높은 점성으로 인하여 시험물질을 강제 경구투여 하는 과정에서 일부가 기관지로 유입되어 대식세포가 시험물질을 탐식한 것으로 추정되며, 이는 시험물질에 의한 독성 변화는 아닌 것으로 판단하였다.

⑤ 사망례

수컷 2,000 mg/kg/day 투여군의 사망동물 (개체번호: 1413)에 대한 조직병리학적 검사 결과, 기관지의 상피와 폐포에서 적갈색의 물질 (reddish brown material)이 관찰되었다. 이는 조제물의 높은 점성으로 인하여 시험물질을 강제 경구투여 하는 과정에서 일부가 기관을 통해 폐로 유입되어 사망한 것으로 추정되어 시험물질에 의한 독성 변화는 아닌 것으로 판단하였다.

카. 결론

본 시험 조건하에서, 안구건조증 개선용 안토시아닌 올리고머에 대한 암수 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험을 실시한 결과, 무독성량 (NOAEL)은 암수 모두 2,000 mg/kg/day를 상회하는 것으로 판단된다.

3.2.13. 임상에서의 안토시아닌 올리고머의 안구건조증 개선 효능 검토 결과

3.2.13.1. 유효성 평가 결과

가. 분석에 포함할 피험군의 선정

본 임상시험의 유효성 분석은 PP(PER Protocol)을 분석 대상으로 하였다. 본 임상시험에서 안구건조증 증상이 있는 피험자 108명(시험군 54명, 대조군54명)이 무작위배정 되었다. PP분석 방법을 통하여 본 임상시험을 완료한 총 107명(시험군 53명, 대조군54명)의 피험자를 대상으로 본 연구에서 건강보조식품의 유효성을 평가하였다.

나. 피험자의 인구학적 정보 및 기타 복용 전 특성에 대한 비교

임상시험에 참여한 피험자의 인구학적 정보 및 기타 복용 전 특성을 Table 69에 요약 정리 하였다. 본 임상시험에 참여한 피험자의 인구학적 정보를 포함한 복용 전의 모든 특성을 투여군별로 비교하여 투여군별 차이가 있는 요인을 확인하고자 하였다.

Table 69. Demographics of study patients. (N=108)

	Oligomeric anthocyanin	Placebo	P value*
Number(N)	54	54	82.109±2.634
Gender(Male/Female)	22/32	24/30	
Visual Acuity (Log MAR±SEM [†])	0.012±0.006	0.010±0.005	0.73
Age(year±SD [‡])	50.87±12.36	47.93±12.04	0.21
Body Weight(Kg±SD)	63.62±10.06	63.92±11.03	0.88

*: Statistical significance was tested by T-test

[†]: Standard error of the mean

[‡]: Standard deviation.

임상시험에 참여한 피험자의 성별은 시험군은 남성 22명(40.74%), 여성 32명(59.25%), 대조군은 남성은 24명(44.44%), 여성은 30명(55.55%)이었다. 평균 연령은 시험군은 50.87±12.36세, 대조군은 47.93±12.04세 였다(P=0.21). 체중은 시험군은 63.62±10.06kg, 대조군은 63.92±11.03kg이었다(P=0.88). 상기항목에 대한 군간 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

다. 유효성 평가 결과의 제시 및 분석

(1) 분석의 일반적인 원칙

본 임상시험의 유효성 평가 변수는 쉬르머 I 검사(Schirmer test), 눈물막 파괴시간(NIKBUT, BUT), 최대교정시력, 안압, 안구표면질환지수(OSDI: Ocular Surface Disease Index)이다. 피험자의 임상시험용 건강기능식품 투여 전후의 최종 평가 자료를 이용하여 안토시아닌 올리고머의 유효성을 평가하였다.

(2) 유효성 평가변수에 대한 분석

ㄱ. 쉬르머 I 검사(Schirmer test)

Table 70, Fig. 96은 0주, 4주, 8주, 12주에 측정한 쉬르머 I 검사(Schirmer test) 계측치에 대한 변화를 분석한 결과이다.

Table 70. Change of Schirmer test values between OA(Oligomeric anthocyanin) and Placebo.

	Week 0(Baseline)	Week 4	Week 8	Week 12	p-value*
Oligomeric anthocyanin	8.32±0.38	8.74±0.42	9.55±0.40	10.33±0.40	P<0.001
Placebo	7.85±0.35	8.39±0.41	7.71±0.38	7.64±0.32	P=0.49

*: Compared at 12 weeks from baseline

Values are expressed as Average±SEM

안토시아닌 올리고머를 섭취한 군(OA)에서 8주 후 쉬르머 I 검사(Schirmer test) 계측치는 9.55±0.40로 Baseline에 비하여 증가되었으며 통계적으로 Baseline과 비교하였을 때 유의한 증가가 나타났다. 또한 12주후의 계측치는 10.33±0.40로 역시 증가되었으며 통계적으로 Baseline과 유의한 차이가 있었다. 이에 반하여 위약(Placebo)을 섭취한 군에서는 전 기간동안 Baseline과 비교하였을 때 유의한 변화가 없었다.

ㄴ. 눈물막 파괴시간

- 비침습성눈물막 파괴시간의 측정

안토시아닌 올리고머를 섭취한 군에서 4주, 8주, 12주 후 NIKBUT(Non-Invasive Keratograph Break-Up Time)의 측정치는 각각 5.83±0.23, 7.20±0.25, 7.85±0.22으로 측정되어 Baseline 측정치인 4.75±0.19보다 모두 유의하게 증가하였다. 위약을 섭취한 군에서는 이러한 변화가 관찰되지 않았다 (Table 71, Fig. 97).

Table 71. Change of NIKBUT values between OA(Oligomeric anthocyanin) and Placebo.

	Week 0(Baseline)	Week 4	Week 8	Week 12	p-value*
Oligomeric anthocyanin	4.75±0.19	5.83±0.23	7.20±0.25	7.85±0.22	P<0.001
Placebo	5.12±0.21	5.25±0.20	5.14±0.19	4.72±0.17	P=0.79

*: Compared at 12 weeks from baseline

Values are expressed as Average±SEM

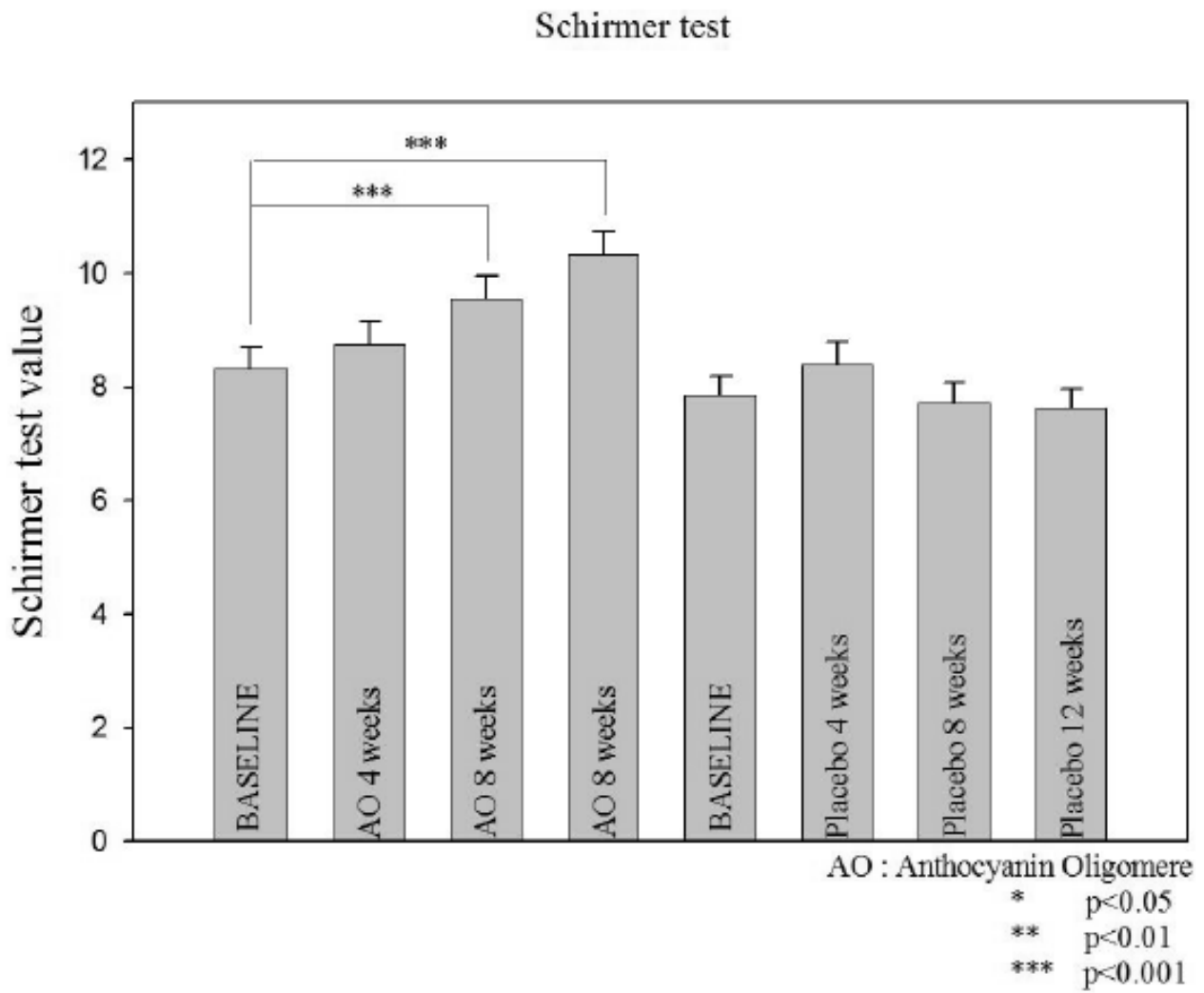


Fig.96. Change of Schirmer test values between OA(Oligomeric anthocyanin) and Placebo.

NIK BUT (Non-Invasive Keratograph Break-Up Time)

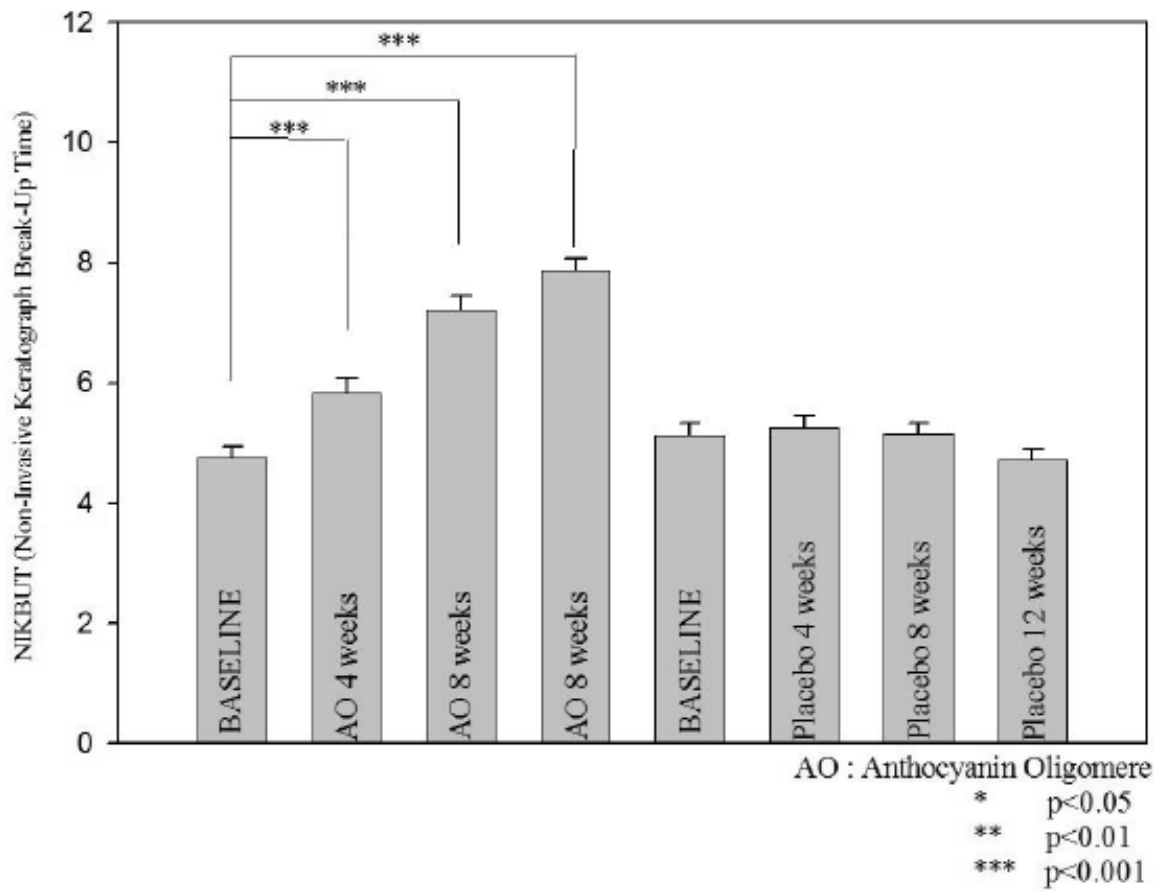


Fig.97. Change of NIK BUT values between OA(Oligomeric anthocyanin) and Placebo.

-의료진에 의하여 측정된 TBUT

안토시아닌 올리고머를 섭취한 군에서 4주, 8주, 12주 후 연구진에 의하여 측정된 T (Tear Break-Up Time)의 측정치는 각각 5.78 ± 0.13 , 6.94 ± 0.16 , 7.32 ± 0.14 으로 측정되어 Baseline 측정치인 4.57 ± 0.16 보다 모두 유의하게 증가하였다. 반면에 위약을 섭취한 군에서는 이러한 변화가 관찰되지 않았다(Table 72, Fig. 98).

Table 72. Change of Tear Break Up Time(TBUT) between OA and Placebo.

	Week 0(Baseline)	Week 4	Week 8	Week 12	p-value*
Oligomeric anthocyanin	4.57 ± 0.16	5.78 ± 0.13	6.94 ± 0.16	7.32 ± 0.14	$P < 0.001$
Placebo	4.54 ± 0.13	5.29 ± 0.13	4.88 ± 0.14	4.575 ± 0.10	$P = 0.06$

*: Compared at 12 weeks from baseline

Values are expressed as Average \pm SEM

ㄷ. 안압(Intraocular Pressure)

안토시아닌 올리고머를 섭취한 군에서 4주, 8주, 12주 후 안압의 측정치는 각각 13.97 ± 0.30 , 13.88 ± 0.27 , 13.98 ± 0.27 으로 측정되어 안토시아닌 올리고머 섭취군에서 안압의 하강이 관찰되었다. 이러한 측정치는 Baseline인 14.84 ± 0.27 와 모두 유의하게 달랐다. 위약을 섭취한 군에서는 4주와 8주에 유의하게 안압의 하강이 관찰되었으나 12주에는 Baseline과 유의한 차이가 없었다(Table 73, Fig. 99).

Table 73. Change of Intraocular Pressure between OA(Oligomeric anthocyanin) and Placebo.

	Week 0(Baseline)	Week 4	Week 8	Week 12	p-value*
Oligomeric anthocyanin	14.84 ± 0.27	13.97 ± 0.30	13.88 ± 0.27	13.98 ± 0.27	$P < 0.001$
Placebo	14.77 ± 0.35	13.84 ± 0.27	13.85 ± 0.27	14.06 ± 0.27	$P = 0.54$

*: Compared at 12 weeks from baseline

Values are expressed as Average \pm SEM

ㄹ. 안구표면질환지수(OSDI:Ocular Surface Disease Index)

안구표면질환지수 점수를 측정한 결과 안토시아닌 올리고머와 위약을 섭취한 군 모두에서 4주, 8주, 12주후의 OSDI의 유의한 감소가 나타났다. 단, 안토시아닌 올리고머를 섭취한 군에서는 Baseline과 비교하였을 때 12주후 OSDI의 감소의 폭이 더 컸다(Table 74, Fig. 100).

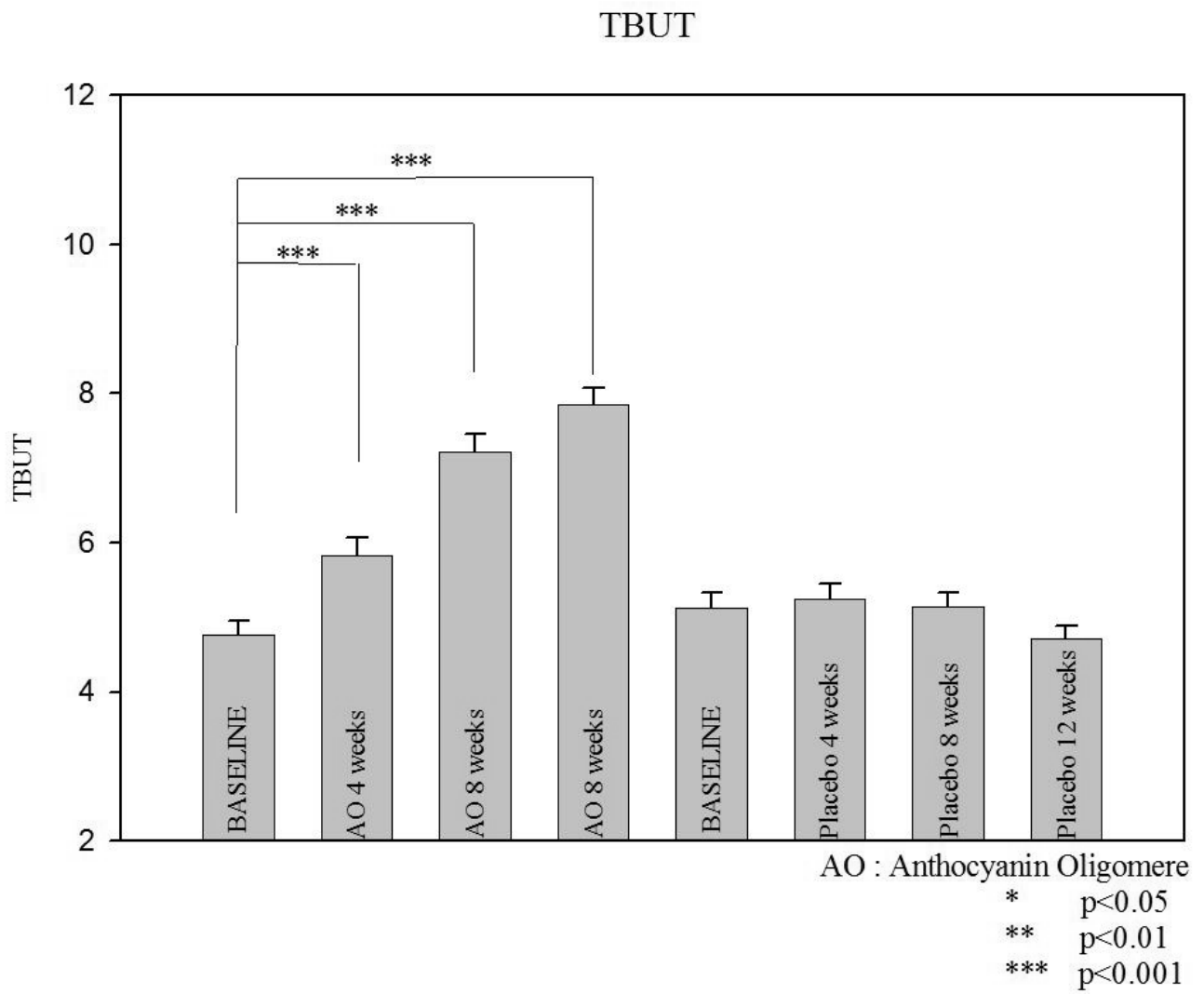


Fig.98. Change of Tear Break Up Time(TBUT) between OA and Placebo.

Intraocular Pressure

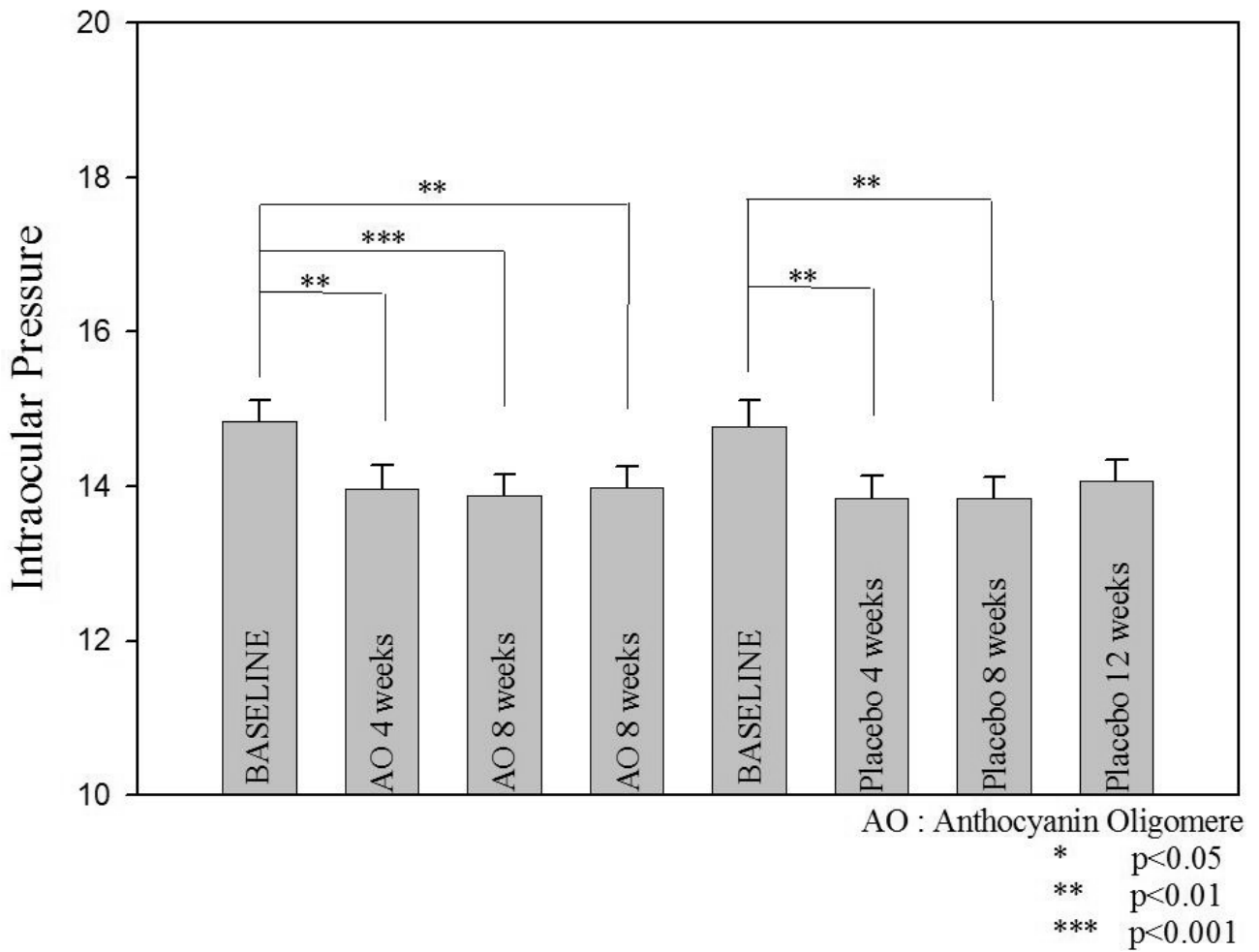


Fig.99. Change of Intraocular Pressure between OA(Oligomeric anthocyanin) and Placebo.

Ocular Surface Disease Index (OSDI)

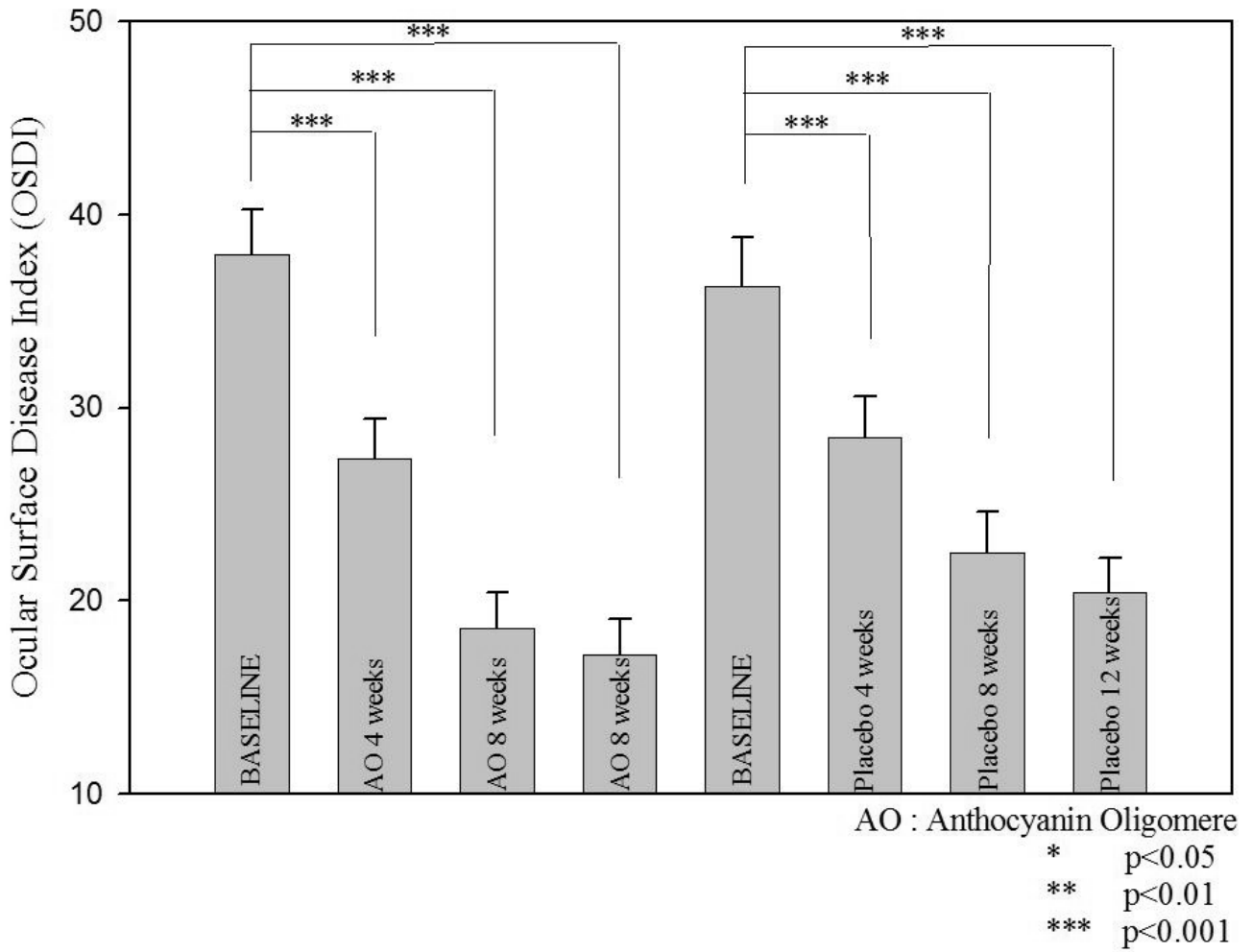


Fig.100. Change of Ocular Surface Disease Index between OA and Placebo.

Table 74. Change of Ocular Surface Disease Index between OA and Placebo.

	Week 0(Baseline)	Week 4	Week 8	Week 12	p-value*
Oligomeric anthocyanin	37.97±2.30	27.40±2.0 4	18.56±1.8 4	17.22±1.8 3	P<0.001
Placebo	36.31±2.53	28.43±2.1 8	22.50±2.0 9	20.42±1.8 2	P=0.17

*: Compared at 12 weeks from baseline

Values are expressed as Average±SEM

ㄱ. 간독성지표(GOT/GPT)변화

- GOT의 변화

12주후의 Aspartate aminotransferase (AST, GOT) 의 변화는 안토시아닌 올리고머 섭취군과 위약군에서 모두 변화가 없었다(Table 75, Fig. 101).

Table 75. Change of GOT between OA(Oligomeric anthocyanin) and Placebo.

	Week 0(Baseline)	Week 12	p-value*
Oligomeric anthocyanin	22.33±0.78	22.77±1.4 0	P=0.74
Placebo	22.94±0.81	22.66±1.0 5	P=0.75

*: Compared at 12 weeks from baseline

Values are expressed as Average±SEM

- GPT의 변화

12주후의 Alanine Aminotransferase (ALT, GPT)의 변화는 안토시아닌 올리고머 섭취군과 위약군에서 모두 변화가 없었다(Table 76, Fig. 102).

Table 76. Change of GPT between OA(Oligomeric anthocyanin) and Placebo.

	Week 0(Baseline)	Week 12	p-value*
Oligomer anthocyanin	21.79±1.30	23.60±2.5 7	P=0.49
Placebo	21.83±1.12	22.35±1.7 9	P=0.74

*: Compared at 12 weeks from baseline

Values are expressed as Average±SEM

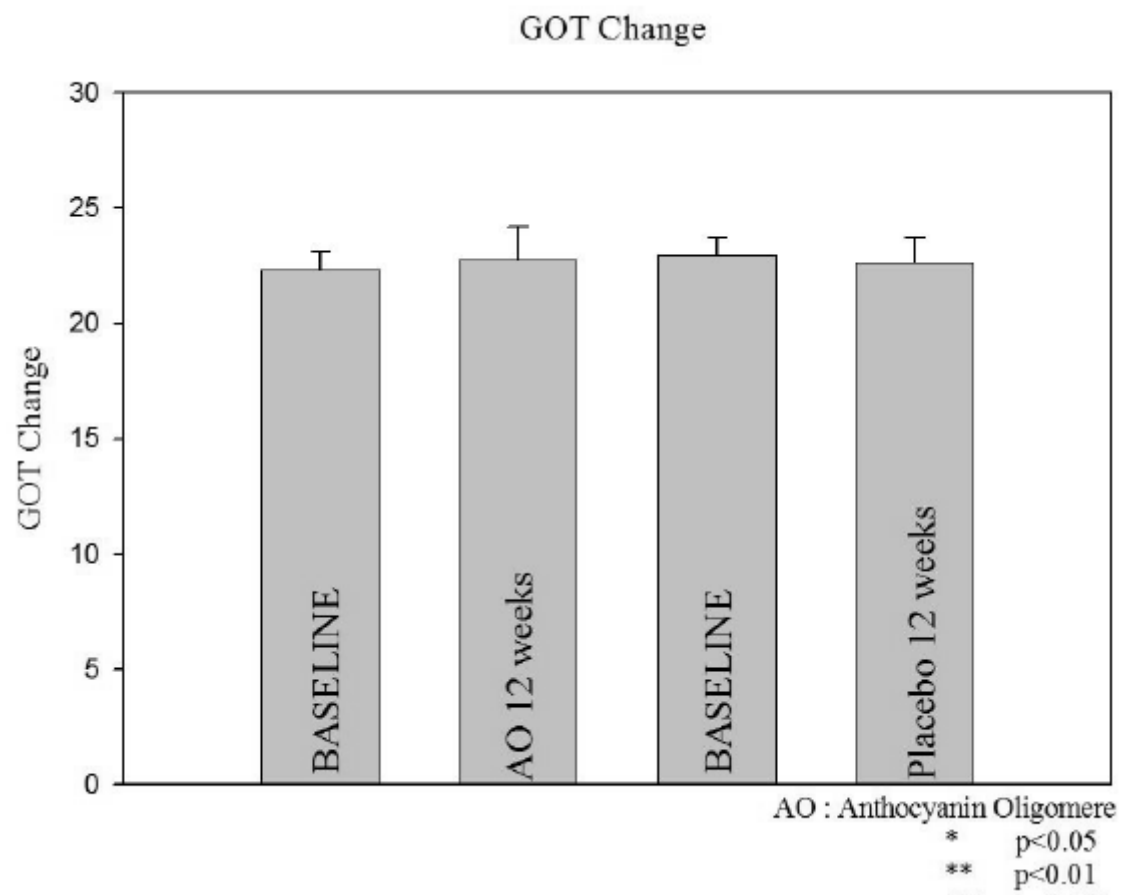


Fig.101. Change of GOT between OA(Oligomeric anthocyanin) and Placebo.

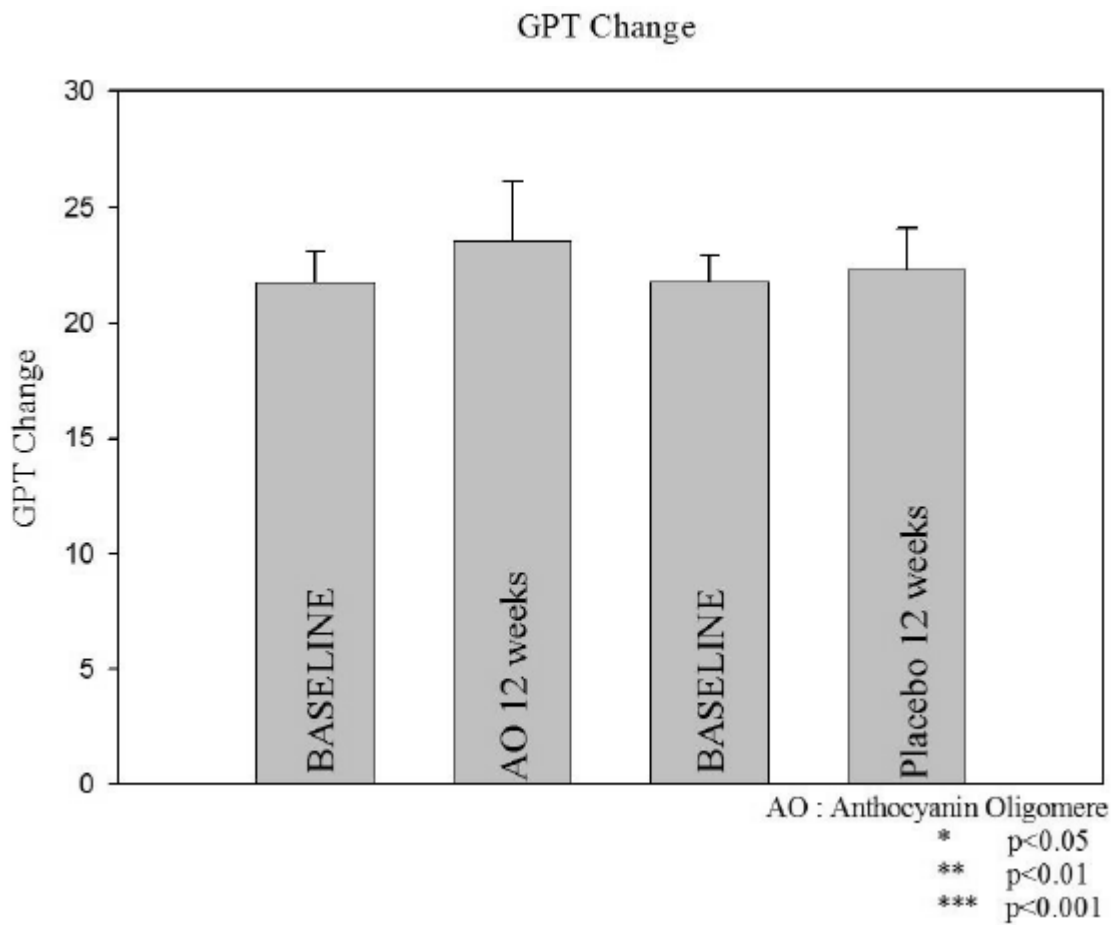


Fig.102. Change of GPT between OA(Oligomeric anthocyanin) and Placebo.

3.2.13.2. 안전성 평가 결과

안전성 평가는 임상시험에 무작위배정 후 임상시험용 건강기능식품이 투여된 108명의 피험자 중 탈락자 1명을 제외한 총 107명(시험군 53명, 대조군 54명)에 대하여 분석을 실시하였다. 분석 대상자는 무작위배정되어 임상시험용 건강기능식품을 적어도 한번 이상 투여한 피험자 중 안전성 관련 정보가 수집된 피험자이다. 이상반응 종류 및 발생율을 평가하였으며, 임상병리검사(GOT/GPT)를 분석하였다. 단 임상시험용 건강기능식품을 투여 받은 피험자 총 108명 (Safety set)에 대하여 무작위배정 이후 발생한 이상반응을 분석하였다.

가. 이상반응

(1) 이상반응에 대한 요약

시험자는 이상반응을 발견해야 할 의무가 있으므로 매 방문 시마다 피험자의 이상반응 유무를 확인하도록 하였고, 여기서 발견된 모든 이상반응에 대한 추적 관찰은 해당 이상반응이 사라지거나, 안정화 되거나 혹은 그 상황이 설명 가능한 시점이 될 때까지 진행될 수 있도록 하였다. 그리고 관찰된 모든 이상반응은 MedDRA preferred term(ver.9.2)에 따라 Coding 되었다.

본 임상시험 기간 동안 발생한 모든 이상반응을 각각 발생자수와 발생건수의 두 가지로 산출하여 비교하였으며, 임상시험용 건강기능식품과 관련성(시험식품 및 대조식품) 및 이상반응의 심각성을 각각 분석하여 제시하였다.

임상시험 기간 동안 각 투여군에서 발생한 이상반응은 Table 77와 같다. 이상반응을 경험한 피험자는 시험군 1명(1.85%, 1건), 대조군(0.00%, 0건)으로 조사되었으며, 군간 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 본 임상시험에서 이상반응이 발현된 피험자는 대조군 0명(0.00%, 0건)으로 조사되었고, 발생한 이상반응으로 인한 중도탈락은 시험군 1명(1.85%, 1건)으로 두 군간 통계적으로 유의한 차이는 모두 없었다.

Table 77. 이상반응 발생 요약 (Safety set).

	시험군(안토시아닌 올리고머) N=54			대조군 (Placebo) N=54			p-value*
	n	발생율(%)	례수	n	발생율(%)	례수	
	이상반응(AE)	1	(1.85)	1	0	(0.00)	
중대한 이상반응(SAE)	0	(0.00)	0	0	(0.00)	0	‡
이상반응으로 인한 중도탈락	1	(1.85)	1	0	(0.00)	0	‡

†: p-value by Chi-square test

‡: p-value by Fisher's exact test

(2) 이상반응 제시

본 임상시험에서 보고된 이상반응은 Epigastric pain이 1.85%(1건)로 발현된 것으로 조사되었다.

(3) 이상반응의 분석

Table 78은 피험자가 경험한 이상반응 중 증증정도와 임상시험용 건강기능식품과의 관련성을 요약한 것이다.

본 임상시험기간 동안 발생한 이상반응 중 무작위배정 이후 발생한 이상반응을 통계분석하였으며, 시험자가 평가한 임상시험용 건강기능식품과의 관련성에 따라 ‘관련 있을 가능성 있음’, ‘관련 있다고 생각됨’, ‘명확히 관련 있음’, ‘불명’으로 보고된 경우를 임상시험용 건강기능식품과 관련성이 있는(related) 이상반응으로, ‘관련이 없다고 생각됨’, ‘명확히 관련이 없음’으로 보고된 경우를 임상시험용 건강기능식품과 관련성이 없는(not related) 이상반응으로 평가하여 분석하였다. 증증정도를 분석했을 때 이상반응을 경험한 피험자의 정도는 경도(Mild)이었으며 경도를 경험한 피험자는 시험군 1건(1.85%)이었다. 증증도(Moderate), 증증(Severe)의 증증을 경험한 피험자는 없었다. 두 군간 비교했을 때 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 78. 이상반응의 증증정도 및 임상시험용 건강기능식품과의 관련성 (Safety set).

		시험군(안토시아닌 올리고머) N=54		대조군 (Placebo) N=54		합계 N=108		p-value
		례수	발생율(%)	례수	발생율(%)	례수	발생율(%)	
증상 정도	경도(Mild)	1	(1.85)	0	(0.00)	1	(1.85)	‡
	중증도(Moderate)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	
	중증(Severe)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	
임상 시험 용 건강 기능 식품 과의 관련 성	명확히 관련 있음 (Definitely related)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	†
	관련 있다고 생각됨 (Probably related)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	
	관련 있을 가능성 있음 (Possibly related)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	
	관련이 없다고 생각됨 (Probably not related)	1	(1.85)	0	(0.00)	1	(1.85)	
	명확히 관련이 없음 (Definitely not related)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	
	불명 (Unknown)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	

†: p-value by Chi-square test

‡: p-value by Fisher's exact test

나. 중대한 이상반응 및 기타 중요한 이상반응

(1) 중대한 이상반응 요약

본 임상시험 기간 중 중대한 이상반응은 발현하지 않았다.

다. 실험실적 이상반응 평가

본 임상시험에서 실험실 검사는 방문1(Screening visit, week-0)과 방문5(Closing visit, week 12)에서 시행되었다. 실험실 검사는 혈액화학적검사로 평가되었다.

라. 안전성에 대한 최종결론

안전성 평가는 무작위배정되어 임상시험용 건강기능식품을 적어도 한번 이상 투여한 피험자 중 안전성 관련 정보가 수집된 피험자를 분석 대상으로 하였다.

임상시험용 건강기능식품을 투여한 이후 이상반응을 경험한 피험자는 시험군 1명(1.85%, 1건)으로 보고되었다. 중대한 이상반응은 발생되지 않았지만 발생한 이상반응으로 인한 중도탈락은 시험군 1명(1.85%, 1건)으로 조사되었다. 보고된 이상반응 중 임상시험용 건강기능식품과의 관련성을 배제 할 수 없는(related) 이상반응은 두군 모두 없는 것으로 보고되었다.

임상병리검사(혈액화학적검사)에 대한 분석에서 군내 및 군간에서 통계적으로 유의한 변화가 없었다.

3.2.13.3. 고찰 및 전반적인 결론

본 임상시험은 경증의 안구건조증이 있는 자를 대상으로 안토시아닌 올리고머제제를 투여했을 때 안구건조증 증상 개선이 대조군(Placebo)과 비교하여 우월한 효과가 있음을 입증하기 위하여 디자인되었다. 안토시아닌 올리고머제제의 유효성 및 안전성 평가를 위해 임상시험용 건강기능식품을 1일 2회, 1회 2캡셀, 총 4캡셀씩 12주간 섭취하는 형태로 이중맹검, 무작위배정, 위약대조 임상시험을 실시하였다. 전체 108명(시험군 54명, 대조군 54명)의 피험자가 무작위배정 되었으며, 이중 1명의 피험자가 중도 탈락되어 PP분석은 107명(시험군 53명, 대조군 54명)의 피험자에 대하여 실시되었다.

유효성 평가변수를 통하여 안토시아닌 올리고머 섭취군과 대조군을 비교하였을 때 안토시아닌 올리고머는 안구건조증의 정도를 평가하는 지표인 비침습적눈물막과괴시간(NIKBUT)과 관찰자에 의한 눈물막과괴시간(TBUT)을 유의하게 증가시켰다. 이러한 변화는 대조군에서 관찰되지 않았으며 특히 비침습적눈물막과괴시간은 기계에 의한 객관적인 측정을 통하여 얻어진 지표로 본 연구의 객관성을 뒷받침한다. 관찰자에 의한 눈물막과괴시간의 측정에서도 안토시아닌 올리고머를 섭취한 군에서 유효한 측정값의 증가가 관찰되었다. 또한 눈물의 양을 측정하는 쉬르머 I 검사(Schirmer test)에서도 안토시아닌 올리고머 섭취군에서 유의한 쉬르머 I 검사의 측정값의 증가가 관찰되었다. 이는 대조군과 비교되는 결과로 안토시아닌 올리고머의 섭취가 안구건조증의 지표에 개선에 긍정적인 역할을 한다는 것을 뒷받침하는 것이다. 안압 측정의 경우 4주와 8주에 두군(안토시아닌 올리고머와 대조군) 모두에서 안압의 하강이 관찰되었으나 12주에서는 안토시아닌 올리고머를 섭취한 군에서 안압의 하강이 유지된 반면 대조군에서는 안압의 하강이 Baseline과 차이가 없음을 관찰하였다. 안토시아닌 올리고머의 섭취 후 감소된 안압의 폭은 통상적인 안압의 일변화 및 환자상태의 변화로 설명되기에는 무리가 있는 변화폭으로 안압의 하강은 안토시아닌 올리고머의 효과로 판단이 된다. 안구표면질환지수(OSDI: Ocular Surface Disease Index) 설문 점수는 두 군 모두에서 감소하였다. 안토시아닌 올리고머군에서 안구건조증과 관련된 지표의 개선과 동반하여 안구표면질환지수의 감소(안구건조증 완화)는 건강기능식품의 복용으로 인한 것으로 판단이 되나 대조군에서도 안구표면질환지수의 감소는 설명하기 어려운 점이 있으나 위약효과로 판단된다. 특히 설문조사의 특징상 위약효과가 결과에 많은 영향을 미쳤을 가능성이 크다. 건강기능식품의 안정성부분에서는 본 연구에서는 대표적인 안정성지표인 GOT, GPT를 측정하였고 두 군에서 상기 지표의 증가는 나타나지 않았다.

3.3. 논문 및 특허 실적

3.3.1. 논문 실적

① 2017. Biosynthesis of Oligomeric Anthocyanins from Grape Skin Extracts, Jin-Woo Hwang Sithranga Boopathy Natarajan , Yon-Suk Kim , Eun-Kyung Kim, JaeWoong Lee, Sang-Ho Moon, Byong-Tae Jeon and Pyo-Jam Park, *molecules*, 2017, 22(497)



molecules



Article

Biosynthesis of Oligomeric Anthocyanins from Grape Skin Extracts

Jin-Woo Hwang ^{1,2}, Sithranga Boopathy Natarajan ², Yon-Suk Kim ^{1,2}, Eun-Kyung Kim ^{1,3}, Jae Woong Lee ², Sang-Ho Moon ^{1,3}, Byong-Tae Jeon ^{1,3} and Pyo-Jam Park ^{1,2,*}

¹ Korean Nokyong Research Center, Konkuk University, 380-701 Chungju, Korea; croucard@kku.ac.kr (J.-W.H.); kimyonsuk@kku.ac.kr (Y.-S.K.); eunkyungkim@kku.ac.kr (E.-K.K.); moon0204@kku.ac.kr (S.-H.M.); hannokwon@kku.ac.kr (B.-T.J.)

² Department of Biotechnology, Konkuk University, 380-701 Chungju, Korea; nsboopathy@gmail.com (S.B.N.); ehdzld112@naver.com (J.W.L.)

³ Division of Food Bioscience, Konkuk University, 380-701 Chungju, Korea

* Correspondence: parkpj@kku.ac.kr; Tel.: +82-43-840-3588; Fax: +82-43-852-3616

Academic Editors: Giancarlo Cravotto and Francisco J. Barba

Received: 3 January 2017; Accepted: 10 March 2017; Published: 21 March 2017

Abstract: We synthesized oligomeric anthocyanins from grape skin-derived monomeric anthocyanins such as anthocyanidin and proanthocyanidin by a fermentation technique using *Aspergillus niger*, crude enzymes and glucosidase. The biosyntheses of the oligomeric anthocyanins carried out by the conventional method using *Aspergillus niger* and crude enzymes were confirmed by ESI-MS. The molecular weight of the synthesized anthocyanin oligomers was determined using MALDI-MS. The yield of anthocyanin oligomers using crude enzymes was higher than that of the synthesis using *Aspergillus* fermentation. Several studies have been demonstrated that oligomeric anthocyanins have higher antioxidant activity than monomeric anthocyanins. Fermentation-based synthesis of oligomeric anthocyanins is an alternative way of producing useful anthocyanins that could support the food industry.

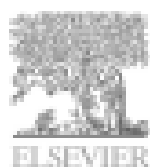
Keywords: oligomeric anthocyanin; fermentation; crude enzyme; *Aspergillus niger*; glucosidase

1. Introduction

Anthocyanins are naturally occurring water-soluble plant pigments belonging to the group of phytochemicals known as flavonoids [1]. Anthocyanins are present in many plants which display colorful flowers, and different kinds of fruits and vegetables [2–4]. The quality and nutritional value of fruits and their products is commonly associated with the color that is derived from anthocyanins [5,6]. Anthocyanins are very useful for the food industry, due to their good water solubility and safety. They have been recognized internationally for their applications, including the replacement of synthetic colorants [7,8]. Anthocyanins have antioxidant activity which contributes to many biological activities such as anticancer, cardiovascular protection, ocular protection and protection against some other chronic diseases [9–12]. Several studies have been demonstrated that the oligomeric derivatives of anthocyanin have higher activity than the monomeric versions. For example, the anthocyanin oligomers derived from bilberry fruit such as small anthocyanidin glycoside polymers, particularly in the form of dimers, trimers, tetramers and pentamers have higher antioxidant activity than the monomers. These compounds are highly hydro- and liposoluble in nature and are not known to accumulate in the human body [13].

The biosynthesis of oligomeric anthocyanins is the best alternative to overcome the problem of deficiency. At present, studies on the synthesis of anthocyanin oligomers are scarce, and only one related paper is available [13]. *Aspergillus* species such as *Aspergillus niger*, *A. sojae* and *A. oryzae* have

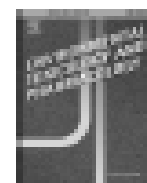
© 2017. Ocular promoting activity of grape polyphenols—A review. Sithranga Boopathy Natarajan, Jin-Woo Hwang, Yon-Suk Kim, Eun-Kyung Kim, Pyo-Jam Park. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 50



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Toxicology and Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/etap



Review or Mini-review

Ocular promoting activity of grape polyphenols—A review



Sithranga Boopathy Natarajan^a, Jin-Woo Hwang^{a,b}, Yon-Suk Kim^{a,b}, Eun-Kyung Kim^{a,b}, Pyo-Jam Park^{a,b,*}

^aDepartment of Biotechnology, Konkuk University, Chungju 280-701, Republic of Korea

^bWolpyong Research Centre, Konkuk University, Chungju 280-701, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 September 2016

Received in revised form 5 December 2016

Accepted 8 December 2016

Available online 9 December 2016

Keywords:

Ocular promotion

Grape polyphenols

Eye disease

Diabetes

Hypertension

ABSTRACT

The eye is a sensitive organ with complex optical system involved in the perception of light. Although it has several protective mechanisms by itself, various physiological and metabolic disorders are detrimental to the proper functioning of the visual system. Grape juice has long been used worldwide for its potent medicinal values including ocular promotion. Bioactivities of grape products are highly attributed to the presence of health promoting phytochemicals in them. Some phytochemicals present in the grape juice have been involved in the maintenance of intra-ocular pressure, regulation of glucose metabolism and suppression of pro-inflammatory cytokines in the system. Particularly, the grape derived phytochemicals involve in minimizing various eye defects such as macular degeneration, cataract formation, red eye, diabetic retinopathy and so on. However, only limited number of studies has been conducted so far focusing the ocular promoting activity of grape polyphenols. In this review, we discuss the role of grape polyphenols in ocular promotion relating their anti-oxidant, anti-microbial, anti-aging, anti-hypertensive and anti-inflammatory properties.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

Contents

1. Introduction.....	83
2. Chemical profile of grape polyphenols (GPP).....	84
3. Ocular promoting activity of GPP.....	84
4. Ocular promotion through antioxidant activity of GPP.....	85
5. Ocular promotion through anti-aging activity of GPP.....	85
6. Ocular promotion through anti-inflammatory activity of GPP.....	86
7. Ocular promotion through antimicrobial activity of GPP.....	87
8. Ocular promotion through anti-diabetes activity of GPP.....	87
9. Ocular promotion through anti-hypertensive activity of GPP.....	88
10. Mechanism of action.....	88
11. Conclusion.....	89
Conflicts of interest.....	89
Funding.....	89
Acknowledgment.....	89
References.....	89

1. Introduction

The eye is an important organ for vision in most of the living organisms. The human eye is a complex organ made up of

complicated tissue systems. The eye health reflects the overall health conditions of an organism because it is interconnected to all other metabolic activities. In general, eyes have several protective mechanisms against various biotic and abiotic factors. For example, eye tears containing several chemicals that could protect the eyes from microbial infection, dust, and other external invaders. However, human eyes are vulnerable to internal defects due to some genetic and/or physiological abnormalities. One such example is the formation of cataract in the eye, the major cause of ocular mal-

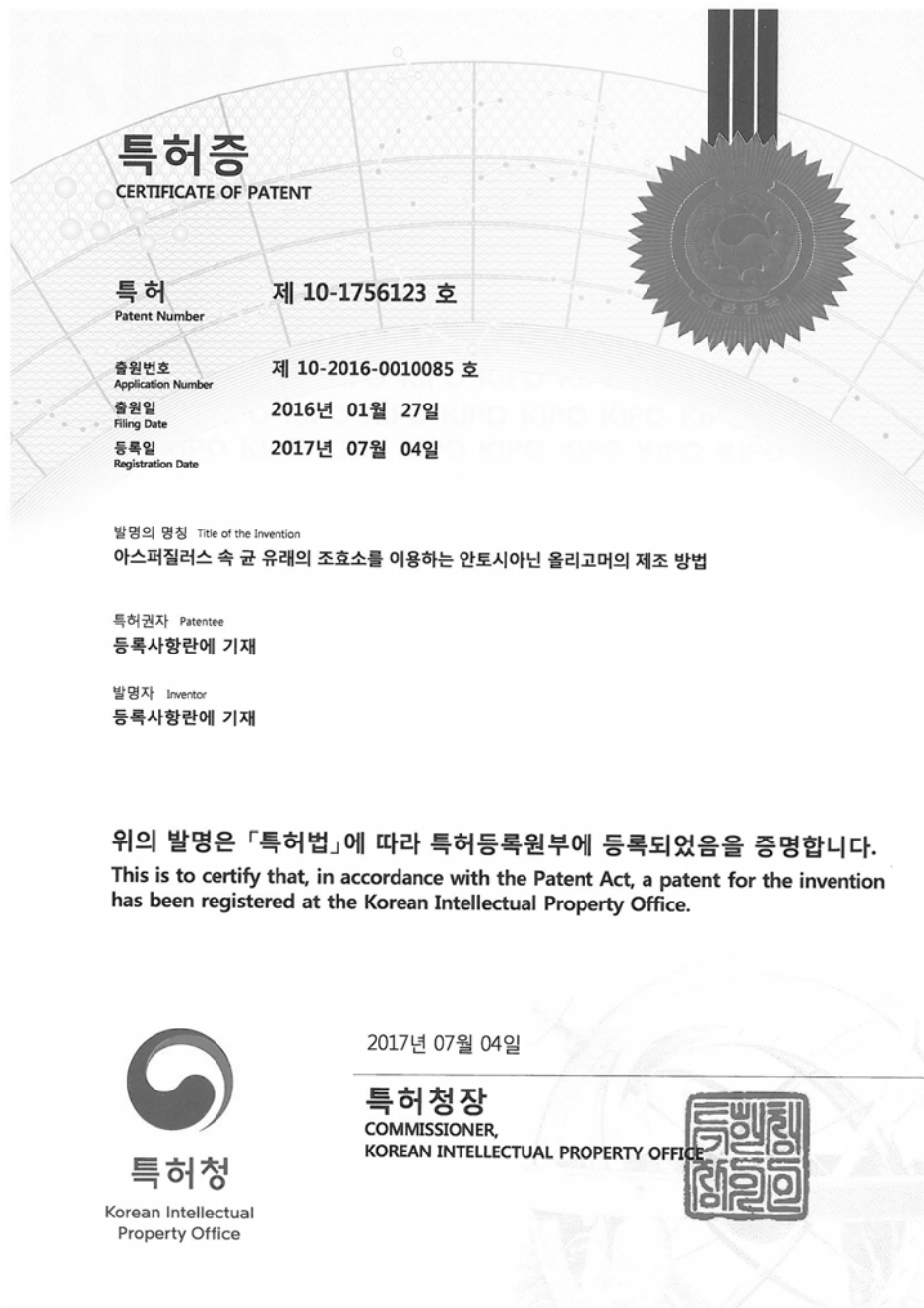
* Corresponding author at: Department of Biotechnology, Konkuk University, Chungju 280-701, Republic of Korea.

E-mail address: pyojam@kku.ac.kr (P.-J. Park).

③ [소명자료 1] 전문 학술지 : 본 연구 결과물로 현재 2편의 논문이 각각 Molecules와 Environmental Toxicology and Pharmacology에 게재되었다. 본 학술지의 IF는 각각 2.861과 2.313이며 최근 5년간 IF는 2.988과 2.405로 저명한 학술지라 할 수 있다. 이 외에도 현재 1편의 논문이 Biotechnology and Bioprocess Engineering 학술지에 투고 (제목: Biosynthesis of oligomer-rich anthocyanins using viscozyme L and its protective effect against oxidative stress on ARPE-19 cells) 중이며, 임상 연구가 끝난 후 한편의 논문을 더 준비하여 투고할 계획을 가지고 있다.

3.3.2. 특허 실적

① 2016, 아스퍼질러스 속 균 유래의 조효소를 이용하는 안토시아닌 올리고머의 제조 방법, 주식회사 키토라이프 건국대학교 글로벌산학협력단, 대한민국, 1020160010085



② 2017, 안토시아닌 올리고머를 포함하는 안과 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물, 건국대학교 글로컬산학협력단, 대한민국, 10-2017-0182804

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2017.12.28
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(1063461)
출원번호 10-2017-0182804 (접수번호 1-1-2017-1306225-78)
출원인명칭 건국대학교 글로컬산학협력단(1-2015-074813-0) 외 1명
대리인성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)
발명의명칭 안토시아닌 올리고머를 포함하는 안과 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자격고환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 송계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

③ 기술이전 계약 체결 : 2018, 아스퍼질러스 속 균 유래의 조효소를 이용하는 안토시아닌 올리고머의 제조방법, (주)키토라이프

기술이전 계약서(특허지분양도)

계약명: “아스퍼질러스 속 균 유래의 조효소를 이용하는 안토시아닌 올리고머의 제조방법”에 대한 기술이전

2018년 04월 25일

계약당사자

‘갑’

주소 : 충청북도 충주시 충원대로 268
(단월동, 건국대학교 글로벌캠퍼스)

기관 : 건국대학교 글로벌산학협력단

단장 : 이 승 현

연구개발책임자 : 박 표 잠 교수

담당자: 신 흥 수

043-840-3942

‘을’

주소 : 경기도 평택시 산단로 197번길 73
(칠괴동)

상호 : (주) 키토라이프

대표 : 정 특 래

담당자: 양현필

031-666-7805, 010-6778-9134



3.4. 연구 성과

3.4.1. 기술적 성과

- 안토시아닌 올리고머 생산에서의 문제점 해결
- 안토시아닌 올리고머의 항산화, 항염증 활성 규명
- 안토시아닌 올리고머의 안구건조증 개선 효능 규명

3.4.2. 경제적 성과

- 안토시아닌 올리고머 산업화를 통한 고부가가치 제품 생산 기대
- 안토시아닌 올리고머 생산을 통한 수출 증대 기대

3.5. 사업화 계획

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		1년		
	소요예산(백만원)		50		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0	30	100
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	20	50
		국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4.1. 목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	달성도 (%)	달성 내용
안토시아닌 올리고머의 효능 검증	100	안토시아닌 올리고머의 항산화, 항염증 활성을 전자스핀공명기기를 사용한 라디칼 소거능, 지질과산화 억제 효능, NO 분석으로 검증.
안토시아닌 올리고머의 중합효소 유전자 탐색	100	안토시아닌 올리고머 중합효소를 탐색·확정
안토시아닌 올리고머의 중합효소 생산 체제 확립	100	안토시아닌 올리고머 중합효소의 생산에 실패. 같은 역할을 수행하는 산업화된 중합효소를 탐색하여 연구에 사용.
안토시아닌 올리고머의 동물모델에서의 항산화 효능 검증	100	- GOT, GPT, 중성지방, 항산화 효소 분석 - 200 mg/kg에서 효능 확인.
안토시아닌 올리고머의 동물모델에서의 항염증 효능 검증	100	- CD4, CD8, IgE, IgA, 사이토카인 측정 분석하여 항염증 효능을 검증하였음.
안토시아닌 올리고머의 안전성 평가	100	안토시아닌 올리고머의 안전성 평가를 수행하여 안전성을 검증. - 소핵시험, 염색체이상시험, 복귀돌연변이 시험, 단회투여독성시험 (rat, 비글견), 4주 반복 용량결정 시험, 13주 반복투여독성시험
막반응기 및 HPLC를 이용한 안토시아닌 올리고머의 효율적인 분획	80	HPLC 시스템을 이용한 안토시아닌 올리고머의 분획 방법을 확립.
안토시아닌 올리고머의 임상에서의 효능 검증	80	4주 동안 안토시아닌 올리고머 복용 후 유의적인 개선 효과 확인
분자량별 안토시아닌 올리고머 생리활성 검증	100	분자량별 분획의 어려움으로 인한 분획별 항산화, 항염증 활성을 ABTS, FRAP, NO assay 법으로 검증.
안토시아닌 올리고머의 생리기능성 작용기작 규명 검토	100	Western Blot을 이용한 작용기작 규명
안토시아닌 올리고머 생산 공정 확립	100	안토시아닌 올리고머의 대량 생산 공정을 확립 -Viscozyme L, 25℃, 7일
안토시아닌 올리고머를 이용한 제품 개발 및 산업화	80	안토시아닌 올리고머의 제품 개발을 하였으며, 임상 시험 종료 시 산업화를 추진할 계획임.

4.2. 관련분야 기여도

안토시아닌 올리고머는 안토시아닌 모노머보다 활성 및 안정성이 높다고 알려져 있다. 기존 안토시아닌 올리고머의 합성은 곰팡이균을 사용하여 합성하기 때문에 기업의 입장에서 안토시아닌 올리고머의 생산에 많은 문제를 포함하고 있었다. 이런 문제로 인하여 현재 안토시아닌에

대한 연구는 이루어지고 있으나 안토시아닌 올리고머에 대한 연구는 이루어지지 않고 있는 상황이다. 그러나 본 연구를 통하여 안토시아닌 올리고머의 생산에서 문제가 되었던 부분을 해결하였기 때문에 안토시아닌 올리고머를 사용한 많은 제품들이 개발될 것으로 판단되고, 안토시아닌 올리고머에 대한 연구가 보다 활발히 이루어질 것으로 기대된다. 또한, 안토시아닌 올리고머를 통한 국민의 건강 증진에 도움이 될 것으로 판단된다.

5. 연구결과의 활용계획

현재 전 세계적으로 안토시아닌에 대한 연구는 진행되고 있지만 안토시아닌 올리고머에 대한 연구는 진행되고 있지 않습니다. 본 연구를 통하여 안토시아닌 올리고머의 새로운 합성 방법이 제시되었기 때문에 앞으로는 기존에 진행되어온 연구에 안토시아닌 올리고머를 접목시켜 연구를 진행한다면 많은 연구를 진행할 수 있을 것으로 판단됩니다. 또한, 본 연구를 통하여 안토시아닌 올리고머의 합성에 뛰어난 효소를 찾아 연구를 진행하였지만 안토시아닌 합성 연구에서 보듯이 다양한 합성 과정이 존재하기 때문에 더 다양한 안토시아닌 올리고머의 합성 요소들을 찾는 연구도 진행해야 할 것으로 판단됩니다. 또한, 본 연구에서는 기본적인 항산화와 항염증 활성, 안구건조 개선 효능에 대한 연구를 통하여 얻은 연구결과를 기반으로 다른 활성에 대한 연구도 진행하고자 합니다.

추가로, 본 연구를 통하여 안토시아닌 올리고머의 합성 방법을 특허 제출하여 등록하였고 이를 바탕으로 참여기업과 산업화를 추진하고자 합니다.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

현재, 국내외적으로 안토시아닌 올리고머에 대한 연구는 진행되고 있지 않으며, 안토시아닌의 합성 및 그 활성과 작용기작에 대한 연구들이 이루어지고 있다. 다음은 연구를 진행하고 있는 동안 발표된 안토시아닌 관련 연구 논문들이다.

1. Recent advances in understanding the anti-obesity activity of anthocyanins and their biosynthesis in microorganisms. 2018. Trends in Food Science & Technology. 72(13-24)
2. Subcritical water extraction, UPLC-Triple-TOF/MS analysis and antioxidant activity of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. 2018. Food Chemistry. 249(119-126)
3. Influence of fruit juice processing on anthocyanin stability. 2017. Food Research International. 100(3)
4. Effect of blanching on enzyme activity, color changes, anthocyanin stability and extractability of mangosteen pericarp: A kinetic study. Journal of Food Engineering. 2016. 178(12-19)
5. Anthocyanins profile and antioxidant capacity of red cabbages are influenced by genotype and vegetation period. 2014. Journal of Functional Foods. 7(201-211)
6. Anthocyanins and antioxidant activity in coloured waxy corn at different maturation stages. 2014. Journal of Functional Foods. 9(109-118)

7. 연구개발결과의 보안등급

- 해당사항 없음

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없음

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

9.1. 기술적 위험요소 분석

- 연구 중 사용하는 시약의 무의식적인 사용 -> 주기적인 안전 교육을 통한 인식 개선.
- 곰팡이균 사용에 따른 환경 오염 -> 안전을 위해 보호 장비를 착용 후 클린 벤치에서 연구를 수행하였으며, 연구 수행 후 70% 알코올과 락스를 사용하여 곰팡이균으로 인한 피해를 제거하였음.

9.2. 안전관리대책

- 참여연구원의 안전 확보를 위해, 연 2회 정기 안전교육을 실시하며, 월 1회 자체 안전교육을 실시하고 있으며 연구실 안전시설 및 안전 장비함을 확보하고 있음.

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

구분 번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지 / 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Biosynthesis of Oligomeric Anthocyanins from Grape Skin Extracts	건국대학교 산학협력단	교신저자	Molecules	2.86	2017.03.21	단독	SCI
2	논문	Ocular promoting activity of grape polyphenols—A review	건국대학교 산학협력단	교신저자	Environmental Toxicology and Pharmacology	2.313	2017.05	단독	SCI
3	특허	아스퍼질러스 속 균 유래의 조효소를 이용하는 안토시아닌 올리고머의 제조 방법	건국대학교글로벌산학협력단	발명가	대한민국		2016.08.01		등록

4	특허	안토시아닌 올리고머를 포함하는 안과 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물	건국대학교글로컬산학협력단	발명가	대한민국		2017.12.28		출원
---	----	--	---------------	-----	------	--	------------	--	----

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음		

12. 참고문헌

- Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000. 49: 3-8.
- Lepock JR, Arnold LD, Torrie BH, Andrews B, Kruuv J. Structural analyses of various Cu21 and Zn21 superoxide dismutases by differential scanning calorimetry and Raman spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985. 241: 243-251.
- Blasco B, Ríos JJ, Leyva R, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi MM, Rosales MA, Ruiz JM, Romero L. Does Iodine Biofortification Affect Oxidative Metabolism in Lettuce Plants? 2010. 69: 584-588.
- Brozovic A, Ambriović-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit. Rev. Toxicol.* 2010 40 :347-359.
- Burris RL, Xie CH, Thampi P, Wu X, Melnyk SB, Nagarajan S. Dietary rice protein isolate attenuates atherosclerosis in apoE-deficient mice by upregulating antioxidant enzymes. *Atherosclerosis* 2010. 212: 107-115.
- Chiarugi V, Magnelli L, Turchetti A, Cinelli M, Cavari S, Ruggiero M. Cell survival and death programmes. *Pharmacol. Res.* 1994. 29; 101-110.
- Crouch R, Priest DG, Duke EJ. Superoxide dismutase activities of bovine ocular tissues. *Exp. Eye Res.* 1978. 27: 503-509.
- Françoise S, Marie-Hélène MB, Jacqueline J, Jacques C, Pierre J. Complete amino acid sequence of human vitamin D-binding protein (group-specific component): evidence of a three-fold internal homology as in serum albumin and α -fetoprotein. *Bioch. Biophysic. Acta* 1986. 871: 189-198.
- Fridovich, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 1999. 893: 13-18.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Gene Dev.* 1999. 13: 1899-1911.
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 1996. 16: 33-50.

Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* 1999. 31: 261-272.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* 1989. 169: 59-72.

Irene S. Schrank, Paul F.G. Sims, Stephen G. Oliver. Functional expression of the yeast Mn-superoxide dismutase gene in *Escherichia coli* requires deletion of the signal peptide sequence. *Gene* 1988. 73, 121-130.

Itoh K, Matsushima H, Nozaki Y, Osako K, Matubayasi N. Studies on the composition of mullet *Mugil cephalus* roe and Karasumi produced in Nagasaki. *Nippon Suisan Gakkaishi. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 2006. 72: 70-75.

Iwasaki M, Harada, R. Proximate and amino acid composition of the roe and muscle of selected marine species. *Food Sci.* 1985. 50: 1585-1587.

Kato I, Tanaka T, Yokokura M. Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* 1999. 21: 121-131.

Karpuzoglu Ebru, Ahmed S. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric Oxide* 2006. 15: 177-186.

Kevin A. Cockell, Alan R. Brash, Raymond F. Burk. Influence of selenium status on activity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat liver and testis in comparison with other selenoproteins. *J. Nutri. Biochem.* 1996. 7: 333-338.

Kim EK, Lee SJ, Moon SH, Jeon BT, Kim B, Park TK, Han JS, Park PJ. Neuroprotective effects of a novel peptide purified from venison protein. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. 20: 700-707.

Kim EK, Lee WB, Moon SH, Jeon YJ, Ahn CB, Kim B, Kim BH, Park PJ, Jeon BT. Free radical scavenging activity by ESR spectroscopy and neuroprotective effect on H₂O₂-induced damage in PC-12 cells of enzymatic extracts from Korean elk velvet antler. *J. Food Biochem.* 2009. 33: 895-912.

Kim EK, Lee SJ, Moon SH, Jeon BT, Ahn CB, Kim B, Lim BO, Park PJ. Free radical scavenging activity and comparative proteomic analysis of antioxidative protein against H₂O₂-induced oxidative stress in neuronal cells. *Food Chem.* 2009. 117: 232-240.

Lee J, Whang JB, Youn NR, Lee SY, Lee HJ, Kim YJ, Koh KH. Antioxidant and oxygen radical scavenging capacities of the extracts of pear cactus, mulberry and Korean black raspberry fruits. *J. Food Sci. Nutr.* 2009. 14: 188-194.

Lim BO, Yamada K, Nonaka M, Kuramoto Y, Hung P, Sugano M. Dietary fibers modulate indices of intestinal immune function in rats. *J. Nutr.* 1997. 127: 663-667.

Mitsuda H, Yuasumoto K, Iwami K. Antioxidation action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo* 1966. 19: 210-214.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997. 88: 355-365.

Arihara K. Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science* 2006. 74: 219-229.

Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K 1979 Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction; *Anal. Biochem.* 95: 351-358.

Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1995, pp. 44-45.

Park PJ, Heo SJ, Park EJ, Kim SK. Reactive oxygen scavenging effect of enzymatic extracts from *Sargassum thumbergia*. *J. Agric. Food Chem.* 2005. 53: 6666-6672.

Peter J. van Bladeren, Ben van Ommen. The inhibition of glutathione S-transferases: Mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits. *Pharmacol. Therapeut.* 1991. 51: 35-46.

Rajapakse N, Mendis E, Byun HG, Kim SK. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J. Nutr. Biochem.* 2005. 16: 562-569.

Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite virulence and disease. *Immunol. Rev.* 1989. 106: 161-182.

Shirai NH, Suzuki S, Wada S. Spawning and season affect lipid content and fatty acid composition of ovary and liver in Japanese catfish (*Silurus asotus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 2001. 129B: 185-195.

Simin N, Ha WK. Immunologic effects of yogurt-4. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000. 71: 861-872.

Rotti L, Brostoff J, Male V. *Immunology*. 3rd Ed. 1993. St. Louis Mo. Mosby.

Stefan L. Marklund, Rolf Adolfsson, Carl Gerhard Gottfries, Bengt Winblad. Superoxide dismutase isoenzymes in normal brains and in brains from patients with dementia of Alzheimer type. *J. Neurol. Sci.* 1985. 67: 319-325.

Valentine JS, Hart PJ. Misfolded CuZnSOD and ALS *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. 100: 3617-3622.

Yamaguchi N, Yokoo Y, Fujimaki M. Studies on antioxidative activities of amino compounds on fats and oils. Part II. Antioxidative activities of dipeptides and their synergistic effects on tocopherol. *Nip. Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 1975. 22: 425-430.

Yamane H, Tomonaga S, Tsuneyoshi Y, Denbow DM, Furuse M. Reduced glutathione decreases energy expenditure in chicks exposed to separation stress. *Anim. Sci. J.* 2009. 80: 291-295.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 2002. 33: 337-349.

Cumby N, Zhong Y, Naczek M, & Shahidi F. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 2008. 109: 144-48.

- Grimble GK. The significance of peptides in clinical nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 1994. 14: 419-447.
- Heo SJ, Park EJ, Lee KW, & Jeon YJ. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*. 2005. 96: 1613-1623.
- Hettiarachchy NS, Glenn KC, Gnanasambandam R, & Johnson MG. Natural antioxidant extracts from fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) for ground beef patties. *Journal of Food Science*. 1996. 61: 516-519.
- Jung MY, Kim SK, & Kim SY. Riboflavin-sensitized photo oxidation of ascorbic acid: Kinetics and amino acid effects. *Food Chemistry*. 1995. 3: 397-403.
- Kawashima K, Itoh H, Miyoshi M, & Chibata I. Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 1979. 27: 1912-1916.
- Kim EK, Lee SJ, Jeon BT, Moon SH, Kim BK, Park TK, Han JS, & Park PJ. Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein. *Food Chemistry*. 2009. 114: 1365-1370.
- Kumar SS, Chaubey RC, Devasagayam TPA, Priyadarsini KI, & Chauhan PS. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. *Mutation Research*. 1999. 425: 71-79.
- Lee YU, & Nam HK. A study of the bio-nutritional evaluation of duck meat. *Korean Journal of Nutrition*. 1981. 14: 16-25.
- Marcuse R. Antioxidant effect of amino acids. *Nature*. 1960. 186: 886-887.
- Martinez GR, Loureiro AP, Marques SA, Miyamoto S, Yamaguchi LF, Onuki J, Almeida EA, Garcia CCM, Barbosa LF, Medeiros MHG, & Mascio PD. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutation Research*. 2003. 544: 115-127.
- Moskovitz J, Yim KA, & Choke PB. Free radicals and disease. *Arch Biochem. Biophys*. 2002. 397: 354-359.
- Nam HK. Studies on the effect of duck-meat on human blood cholesterol. *Journal of Korea Society Nutrition*. 1979. 8: 137-142.
- Park PJ, Heo SJ, Park EJ, Kim SK, Byun HG, Jeon BT. Reactive oxygen scavenging effect of enzymatic extracts from sargassum thunbergii. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005. 53: 6666-6672.
- Qian ZJ, Jung WK, & Kim SK. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana Shaw*. *Bioresource Technology*. 2008. 99: 1690-1698.
- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*. 2006. 40: 1250-1258.
- Wettasinghe M, & Shahidi F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis L.*) seeds, *Food Chemistry*. 1999. 67: 399-414.
- Xinyan P, Youling L, & Baohua K. Antioxidant activity of peptide fractions from whey

protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*. 2009. 113: 196-201.

Yamaguchi N, Yokoo Y, & Fujimaki M. Studies on antioxidative activities of amino compounds on fats and oils. Part II. Antioxidative activities of dipeptides and their synergistic effects on tocopherol. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 1975. 22: 425-430.

Yeung SY, Lan WH, Huang CS, Lin CP, Chan CP, & Chang MC. Scavenging property of three cresol isomers against H₂O₂, hypochlorite, superoxide and hydroxyl radicals. *Food and Chemical Toxicology*. 2002. 40: 1403-1413.

You H J, Oh DH, Choi CY, Lee DG, Hahm KS, Moon AR. Protective effect of metallothionein-III on DNA damage in response to reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002. 1573: 33-38.

Lee, Jonghyun, Lee, Hyung K, Kim, Chan Y, Hong, Young J, Choe, Chul M, et al. Purified high-dose anthocyanoside oligomer administration improves nocturnal vision and clinical symptoms in myopia subjects. *The British Journal of Nutrition*. 2005; 93: 6: 895-9.

JinWoo Hwang, EunKyung Kim, SeungJae Lee, YonSuk Kim, Sang-Ho Moon, ByongTae Jeon, SiHeung Sung, EunTae Kim, and PyoJam Park. Antioxidant Activity and Protective Effect of Anthocyanin Oligomers on H₂O₂-Triggered G2/M Arrest in Retinal Cells. *J Agric Food Chem*. 2012; 60: 17:4282-8

A. Riva, S. Togoni, F. Franceschi, S. Kawada, Y. Inaba, R. Eggenhoffner, L. Giacomelli. The effect of a natural, standardized bilberry extract (Mirtoselect®) in dry eye: a randomized, double blinded, placebo-controlled trial. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2017; 21: 2518-2525.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.