

11-15430  
00-00248  
5-01

발간등록번호

11-1543000-002485-01

작두콩을 이용한 면역 조절 기능성을 갖는  
건강기능식품의 개발 최종보고서

2019

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

# 작두콩을 이용한 면역 조절 기능성을 갖는 건강기능식품의 개발 최종보고서

2019. 01. 15.

주관연구기관 / 애경산업(주)

협동연구기관 / 대전대학교 산학협력단

협동연구기관 / (주)노바렉스

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “작두콩을 이용한 면역 조절 기능성을 갖는 건강기능식품의 개발”(개발기간 : 2015. 10. 23. ~ 2018. 10. 22.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 01. 15.

주관연구기관명 : 애경산업(주)	이윤규 (인)
협동연구기관명 : 대전대학교 산학협력단	황석연 (인)
협동연구기관명 : (주)노바렉스	이상준 (인)



주관연구책임자 : 김한영  
협동연구책임자 : 김승형  
협동연구책임자 : 민복기

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	115038-3	해당 단계 연구 기간	2015.10.23. ~ 2018. 10.22.	단 계 구 분	3차년도/ 3차년도
연구 사업 명	단 위 사 업	고부가가치식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구 과 제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	작두콩을 이용한 면역 조절 기능성을 갖는 건강기능식품의 개발			
연구 책임자	김한영	해당단계 참여연구원 수	총: 22명 내부: 22명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 290,000천원 민간: 193,400천원 계: 483,400천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발 비	정부: 870,000천원 민간: 580,300천원 계: 1,450,300천원
연구기관명 및 소속부서명	대전대학교 산학협력단			참여기업명 애경산업(주) (주)노바렉스	
국제공동연구 위탁연구	상대국명: 연구기관명:			상대국 연구기관명: 연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
----------------------	--

### 9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

### 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

<b>요약</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 소재의 표준화 및 대량 생산 공정 확립</li> <li>○ 소재의 안전성 확인</li> <li>○ 작두콩추출물등복합물의 인체적용시험 수행</li> <li>○ 소재의 면역 조절 효능 확인 및 유효성분 규명</li> <li>○ 제형 및 시제품 개발</li> <li>○ 양산화 공정 확립</li> <li>○ 건강기능식품 개별인정형 접수</li> <li>○ 원료 사업화를 위한 소재 제안 및 마케팅 활동</li> </ul>	보고서 면수 336페이지
--	------------------

## <요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 연구의 목적               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선행 연구를 통하여 확보된 소재의 표준화</li> <li>- 효능의 검증 및 성분/기작 규명</li> <li>- 안전성확보 및 인체효능검증 통한 원료의 개별인정형 1건 등록 신청</li> <li>- 부작용이 없고 면역 조절 기능이 우수한 건강기능식품의 개발 및 상용화</li> </ul> </li> <li>○ 연구의 내용               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 확보된 소재의 기준 규격 설정 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등 자료 확보 기능성분 (또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험 방법 확립</li> <li>- 소재의 효능 검증 및 성분/기작 규명 <i>In vitro</i> / <i>In vivo</i> 시험을 통한 효능의 검증 선별된 소재의 지표 성분 및 작용 기작 규명</li> <li>- 안전성확보 및 인체효능검증 유해물질 분석을 통한 안전성 검증 인체 적용 시험을 통한 효능 확인</li> <li>- 개발된 원료의 건강기능식품 개별인정형 등록 신청 추진</li> <li>- 개발된 원료를 이용한 시제품의 개발 및 상용화 연구 소재에 적합한 다양한 제형의 연구 개발</li> </ul> </li> </ul>
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>소재의 표준화 및 대량 생산 공정 확립</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 소재 관련 자료 수집 완료</li> <li>2. 추출법의 scale-up 및 최적 조건 확립</li> <li>3. 활성/지표물질(Lupeol, Isochlorogenic acid A)분리 및 분석법 확립</li> <li>4. 소재의 안정성 확립</li> <li>5. 대량생산 및 시험식품 생산 완료</li> <li>6. 원산지별 원료 수급 및 동등성 확인 : 우영(4곳), 작두콩(3곳)</li> </ol> </li> <li>○ <b>소재의 안전성 확인</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 섭취 관련 자료 수집 완료</li> <li>2. 작두콩추출물등복합물의 7일 반복투여 독성시험 확인</li> <li>3. 위해물질 검사(중금속, 잔류농약, 미생물) 완료</li> </ol> </li> <li>○ <b>작두콩추출물등복합물 (작두콩추출물:우영추출물=1:4)의 인체적용 시험 수행 완료</b></li> <li>○ <b>소재의 면역조절 효능 확인 및 유효성분 규명 / 기작 연구</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 작두콩과 우영 1:4 혼합물(작두콩추출물등복합물)의 면역증진 상승 (synergy)효과 확인</li> </ol> </li> </ul>

2. 작두콩추출물등복합물 섭취에 의한 면역 증진 효과 확인
  - RAW264.7 cell 이용 항염증 인자 ROS 생성량 감소 확인
  - 정상 마우스에서 작두콩추출물등복합물의 면역증진 효과 확인
  - 스트레스유발 부동화 마우스 모델에서 작두콩추출물등복합물 섭취로 스트레스 해소 및 면역증진 효능 확인
  - 마우스 점막자가면역질환 모델인 IBD (inflammatory bowel disease) 마우스 모델에서 작두콩추출물등복합물 섭취로 면역 정상화 효능 확인
  - 전신과민성 식품 알레르기 마우스 모델에서 식품알레르기 반응을 효과적으로 억제하는 효과 확인
  - 종양이식 마우스 모델 (MC38)로부터 작두콩추출물등복합물의 항염, 면역증진, 항암 효과 확인
3. 활성 후보 물질 섭취에 의한 면역 증진 효과 확인
  - RAW264.7 cell 이용 Arctigenin, Isoorientin, Genistin의 면역증진 효능 확인
  - 작두콩추출물 지표성분(Lupeol)과 우엉추출물 지표성분 (Isochlorogenic acid A, chicoric acid, daucosterol)의 면역 활성 및 시너지 효과, 스트레스 해소 효과 확인 (부동화 마우스, IBD마우스)
  - 종양이식 마우스 모델 (MC38)로부터 작두콩추출물 지표성분 (Lupeol)과 우엉추출물 지표성분 (Isochlorogenic acid A, chicoric acid, daucosterol)의 항염증 효과, 면역증진활성 및 항암 효과를 확인.

○ 제형 및 시제품 개발

1. 소재에 적합한 제형 연구
  - 최적화된 부형제 첨가를 통한 안정성 확보
  - 섭취용이성을 고려한 정제, 젤리 제형 개발
2. 시제품 개발
  - 연령층을 고려한 다양한 디자인 시제품 제작

○ 양산화 공정 확립

1. 원료 수급 방안 수립
  - 산지별 원물의 비교 분석하여 동등성 확인
2. 대량 원료화 방안 수립
3. 품질관리 기준 확립
  - 지표성분 함량 분석 및 동등성 확인
  - 중금속, 잔류농약 등 위해 물질 검사

○ 개별인정형 신청 접수

	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 원료 특성에 관한 자료 (영양성분, 성상, 지표성분) 분석</li> <li>2. 유해물질 규격 및 근거 자료 (중금속, 유해물질, 대장균군) 분석</li> <li>3. 기능성 근거 자료 DB 검색 및 문헌 조사</li> <li>4. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 근거 자료 수집</li> <li>5. 식품의약품안전처 개별인정형 원료 신청서 작성 및 접수</li> </ol> <p>○ 원료 산업화를 위한 소재 제안 및 마케팅 활동</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 건강기능식품 유통 업체를 대상으로 기능성 및 특징적인 컨셉 등을 홍보 및 교육</li> <li>2. 국내외 박람회를 통해 원료를 홍보하여 해외 시장으로 확대</li> </ol>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농가소득 증대에 기여 (농민들이 쉽게 경작할 수 있는 식물의 활용)</li> <li>○ 안전성과 인체 효능이 검증된 소재의 개별인정형 등록을 통한 건강기능식품 제품화</li> <li>○ 면역 기능 조절 건강기능식품 개발을 통해 면역 관련 반건강인들의 삶의 질 향상</li> <li>○ 우리나라 천연 식물 자원의 뛰어난 효과 입증으로, 향후 수출 주도형 제품으로 확대</li> <li>○ 우수한 개별인정형 건강기능식품 개발 및 상업화를 통한 관련 시장 활성화</li> <li>○ 면역 증진 기능성 소재를 이용한 고기능성 식품개발로 고부가가치화 실현</li> <li>○ 기존 시장 선도 소재인 홍삼의 단점 극복(재배 기간, 제조의 난이도, 고가)으로 인한 시장 경쟁력 확보</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	면역	건강기능식품	인체적용시험	면역조절	작두콩

## <SUMMARY>

Purpose & Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Purpose of project           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Standardization of materials obtained through previous research.</li> <li>- Verification of efficacy and identification of ingredients / mechanisms.</li> <li>- Application for one individually recognized health functional food after confirming safety and proving human efficacy.</li> <li>- Development and commercialization of health functional foods with no side effects and excellent immune enhancement effect.</li> </ul> </li>   <li>○ Research content           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Setting the standard specifications for already obtained materials Data collection such as country of origin, development process, domestic and international certification status and usage data etc. Establishment of specifications and test methods for functional components (or indicators).</li> <li>- Verification of efficacy of material and identification of ingredient / mechanism. Verification of efficacy through <i>In vitro</i> / <i>In vivo</i> test. Identification of indicators and mechanisms of selected materials.</li> <li>- Ensuring safety and verifying human efficacy Safety verification through analysis of hazardous substances. Identification of efficacy through human clinical trial.</li> <li>- Application for individually recognized health functional food with developed ingredients</li> <li>- Prototype development and commercialization research with developed ingredients Research and development of various formulations suitable for developed ingredients</li> </ul> </li> </ul>
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Standardization of materials and establishment of mass production process</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Collection of material data</li> <li>2. Scale-up of extraction method and establishment of optimum condition</li> </ol> </li> </ul>

3. Establishment of separation and analysis methods of active / indicator substances (Lupeol, Isochlorogenic acid A)
4. Establishment of material stability
5. Mass production and production of test food
6. Supplyment of raw materials by aera and confirmation of equivalence of raw materials : Burdock (4 places), Sword bean (3 places) : Burdock (4 places), Sword bean (3 places)

○ **Confirmation of the material safety**

1. Completion of intake data collection
2. Confirmation of the safety by repeated dose toxicity test of Sword bean extract complex for 7 days.
3. Completion of hazardous material inspection (heavy metal, residual pesticide, microorganism)

○ **Human clinical trial of Sword bean extract complex (sword bean extract:burdock extract=1:4) has completed**

○ **Identification of the immunomodulatory effect of the substance and identification of the active ingredient / mechanism**

1. Identification of the synergic effect for the immune enhancement of sword bean and burdock 1:4 mixture (sword bean extract complex)
2. Identification of immune enhancement effect by ingestion of Sword bean extract complex
  - Reduction of ROS production in anti-inflammatory test using RAW264.7 cells
  - Identification of immune enhancement effects of Sword bean extract complex from normal mice
  - Identification of relieving stress and improve immunity enhancement efficacy by intake of Sword bean extract complex from immobilization stress mouse model
  - Identification of immune function normalization effect by intake of Sword bean extract complex from IBD (inflammatory bowel disease) mouse, intestinal mucosa autoimmune disease mouse model
  - Identification of effective suppression of food allergic reaction in hypersensitive food allergy mouse model
  - Identification of anti-inflammatory, immunostimulatory, and



	<p>anti-cancer effects of Sword bean extract complex from tumor-transplanted mouse model (MC38)</p> <p>3. Identification of immune enhancement effect by active candidate substances ingestion</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Identification of immunostimulatory effect of Arctigenin, Isoorientin and Genistin using RAW264.7 cell</li> <li>- Identification of immunostimulatory and synergic effect, relieving stress effect of Sword bean Extract Indicator (Lupeol) and Burdock Extract Indicators (Isochlorogenic acid A, chicoric acid, and daucosterol)</li> <li>- Identification of anti-inflammatory, immunostimulatory and anti-cancer effects of Sword bean Extract Indicator (Lupeol) and Burdock Extract Indicators (Isochlorogenic acid A, chicoric acid, and daucosterol) in the tumor transplantation mouse model (MC38).</li> </ul> <p>○ <b>Development of formulation and prototype</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Formulation study suitable for the ingredient <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ensurance of stability by adding optimized excipients</li> <li>- Development of tablet and jelly formulation considering ease of ingestion</li> </ul> </li> <li>2. Prototype development <ul style="list-style-type: none"> <li>- Production of various design prototypes considering age</li> </ul> </li> </ol> <p>○ <b>Establishment of mass production process</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Establishment of supply and demand method of raw materials <ul style="list-style-type: none"> <li>- Identification of equivalence by comparative analysis of raw materials by area</li> </ul> </li> <li>2. Establishment of mass production plan of raw materials</li> <li>3. Establishment of quality control standards <ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyzation of the content of indicator substances and identification of equivalence.</li> <li>- Inspection of hazardous materials such as heavy metals, residual pesticides</li> </ul> </li> </ol> <p>○ <b>Application for individually recognized health functional food</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Analysis of raw material characteristics (nutrients, properties, surface components)</li> <li>2. Analysis of hazardous substance standard and evidence</li> </ol>
--	---

	<p>(heavy metals, toxic substances, colon)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3. Functionality database and literature search</li> <li>4. Collecting data to confirm that they are not the same as or similar to those of medicine</li> <li>5. Preparation and reception of the application form of the ingredient for individually recognized health functional food at the Food and Drug Administration</li> </ol> <p>○ <b>Material suggestion and marketing activities for the commercialization of ingredient</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Promotion and education of function and characteristic concept of ingredients for health functional food distributors</li> <li>2. Promotion of ingredient through domestic and overseas exhibitions for overseas market entry</li> </ol>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Contribution to increase farm income (use of plants that farmers can easily cultivate)</li> <li>○ Commercialization of health functional food products through registration of individually recognized health functional food that have proved safety and human efficacy</li> <li>○ Improving the quality of life of immune-related poor-health people through the development of health functional food with control of immune function</li> <li>○ Expansion into export-oriented products with demonstration of excellent effect of natural plant resources in Korea</li> <li>○ Promoting related markets through the development and commercialization of superior individually recognized health functional foods</li> <li>○ Realization of high added value by developing highly functional foods using immunity enhancing functional ingredients</li> <li>○ Securing market competitiveness by overcoming the disadvantages(long cultivation period, manufacturing difficulty, high price) of red ginseng, which is the leading ingredient of existing market.</li> </ul>				
Keywords	immunity	health functional food	clinical trial	immunomodulation	<i>Canavalia gladiata</i>

# < 목 차 >

<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b> .....	<b>14</b>
제 1 절 연구개발과제의 목적 .....	14
제 2 절 연구개발과제의 필요성 .....	14
제 3 절 연구개발 범위 .....	19
1. 연구개발의 목표 및 내용 .....	19
2. 연차별 목표 및 연구개발 내용 .....	19
<b>제 2 장 연구수행 내용 및 결과</b> .....	<b>23</b>
제 1 절 추진전략 및 방법 .....	23
제 2 절 연구개발 추진 체계 .....	25
1. 추진 체계 .....	25
2. 과제 추진 체계 요약 .....	25
제 3 절 연구 개발 접근 방법 .....	26
1. 선행 연구 결과 .....	26
2. 소재의 정보 .....	36
3. 연구 이론적, 실험적 접근 방법 .....	45
4. 연구 방법 .....	50
제 4 절 연구개발 추진 일정 및 결과 요약 .....	63
1. 1차 년도 : 2015년 10월 23일 ~ 2016년 10월 22일 .....	63
2. 2차 년도 : 2016년 10월 23일 ~ 2017년 10월 22일 .....	69
3. 3차 년도 : 2017년 10월 23일 ~ 2018년 10월 22일 .....	78
제 5 절 원료의 표준화 .....	87
1. 원물의 수급선 확보 .....	87
2. 지표물질 분리 및 분석법 확립 .....	87
3. 추출법의 표준화 (Lab. scale) .....	115
4. 추출법의 Scale-up (1) .....	117
5. 추출법의 Scale-up (2) .....	123
6. 대량 생산된 원료의 점검 .....	130
7. 소재의 안정성 확립 .....	133
8. 원물의 원산지별 수급 확보 및 동등성 확인 .....	133
9. 대량 원료화 방안 수립 .....	141
10. 품질관리 기준 확립 .....	142
11. 소재의 안전성 확보 .....	144
12. 최종 소재의 평가를 통한 안전성 및 독성 검사 .....	147
제 6 절 <i>In vitro</i> 및 <i>In vivo</i> 면역증진 효능 평가 .....	150
1. 작두콩추출물 및 우영추출물의 면역증진 효능 검증 .....	150
2. 작두콩추출물등복합물 및 분리된 활성 물질의 효능 검증 .....	197

<b>제 7 절 인체적용시험을 통한 면역 증진 효능 확인</b> .....	<b>233</b>
1. 연구기관 선정 .....	233
2. 인체적용시험 계획 .....	233
3. 인체적용시험 개시 .....	272
4. 건강기능식품 개별인정형 인정 관련 자문 .....	275
5. 인체적용시험 결과 .....	277
6. 인체적용시험 결과 요약 .....	303
<b>제 8 절 제형 및 시제품 개발</b> .....	<b>312</b>
1. 제형 검토 및 시험식품 생산 .....	312
2. 소재에 적합한 제형 연구 .....	315
3. 작두콩추출물등복합물의 시제품 개발 .....	317
<b>제 9 절 건강기능식품 개별인정형 신청</b> .....	<b>322</b>
<b>제 10 절 연구개발 성과</b> .....	<b>324</b>
1. 논문게재 성과 .....	324
2. 특허 성과 .....	325
3. 교육 및 컨설팅 성과 .....	326
4. 전시회 홍보 성과 .....	328
<b>제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도</b> .....	<b>329</b>
<b>제 1 절 연도별 연구개발 목표 및 달성도</b> .....	<b>329</b>
1. 정량적 성과 목표 및 달성도 .....	329
2. 연차별 성과 목표 및 달성도 .....	329
3. 성과 요약 .....	333
<b>제 4 장 연구결과의 활용 계획 등</b> .....	<b>334</b>
<b>제 1 절 연구 결과의 활용 방안</b> .....	<b>334</b>
<b>제 2 절 연구 결과의 기대 성과</b> .....	<b>334</b>
1. 기술적 측면 .....	334
2. 경제적 측면 .....	334
3. 사업화 계획 .....	334

## < Contents >

<b>Chapter 1. Overview of research project</b> .....	<b>14</b>
Section 1. Purpose of the research .....	14
Section 2. The need for research project .....	14
Section 3. The Scope of R&D .....	19
1. R&D objectives and content .....	19
2. Objectives and content by year .....	19
<b>Chapter 2. Contents and Results</b> .....	<b>23</b>
Section 1. Stratage and methods .....	23
Section 2. R&D promotion system .....	25
1. Promotion system .....	25
2. Summery of project promotion system .....	25
Section 3. R & D approach .....	26
1. Previous studies .....	26
2. Material information .....	36
3. Theoretical and experimental approaches of research .....	45
4. Research methods .....	50
Section 4. R&D promotion schedule and summary of research results .....	63
1. 1st year : 2015. 10. 23. ~ 2016. 10. 22. ....	63
2. 2nd year : 2016. 10. 23. ~ 2017. 10. 22. ....	69
3. Third year : 2017. 10. 23. ~ 2018. 10. 22. ....	78
Section 5. Standardization of substances .....	87
1. Establishment of supply and demand method of raw materials .....	87
2. Establishment of separation and analysis method of indicator substances .....	87
3. Standardization of extraction method (Lab. scale) .....	115
4. Scale-up of extraction method (1) .....	117
5. Scale-up of extraction method (2) .....	123
6. Checking mass-produced substances .....	130
7. Establishment of material stability .....	133
8. Establishment of supply and demand method of raw materials and analysis of equivalence .....	133
9. Establishment of mass production plan of substance .....	141
10. Establishment of quality control standard .....	142
11. Ensuring of material safety .....	144
12. Safety and toxicity assessment of final substance .....	147

Section 6. Evaluation of immune enhancement effect through <i>In vitro</i> and <i>In vivo</i> studies .....	150
1. Identification of immune enhancement effect of sword bean extract and burdock extract .....	150
2. Identification of immune enhancement effect of Sword bead extract complex and active candidate substances .....	197
Section 7. Clinical trial .....	233
1. Selection of research institute .....	233
2. Clinical trial plan .....	233
3. Initiation of clinical trial .....	272
4. Consultation for approval of individually recognized health functional food .....	275
5. Results of clinical trial .....	277
6. Summary of clinical trial results .....	303
Section 8. Formulation and prototype development .....	312
1. Formulation and prototype study .....	312
2. Formulation studies suitable for substance .....	315
3. Prototype development of Sword bean extract complex .....	317
Section 9. Application of Individually recognized health functional food ·	322
Section 10. Research achievements .....	324
1. Published papers .....	324
2. Patents .....	325
3. Education and consulting .....	326
4. Promotion of exhibition .....	328
<b>Chapter 3. Goal Attainment and expected contribution of related fields .....</b>	<b>329</b>
Section 1. R&D goals and achievements by year .....	329
1. Quantitative performance goals and achievements .....	329
2. Annual performance goals and achievements .....	329
3. Achievements summary .....	333
<b>Chapter 4. Plan for application of research results .....</b>	<b>334</b>
Section 1. Utilization plan of research results .....	334
Section 2. Expected performance of research results .....	334
1. Technological aspects .....	334
2. Economic aspects .....	334
3. Commercialization plan .....	334

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발과제의 목적

1. 선행 연구를 통하여 확보된 소재의 표준화
2. 효능의 검증 및 성분/기작 규명
3. 안전성확보 및 인체효능검증 통한 원료의 개별인정형 1건 등록 신청
4. 부작용이 없고 면역 조절 기능이 우수한 건강기능식품의 개발 및 상용화

## 제 2 절 연구개발과제의 필요성

면역기능 증강 건강기능식품이란 광범위하게는 면역반응의 이상을 정상화하는데 도움을 줄 수 있는 기능을 나타내는 식품이라고 정의할 수 있으며, 보다 직접적으로는 저하된 면역기능을 증강시킬 수 있는 식품을 의미하고, 정상 면역기능을 증진시키는 경우도 포함함 (미래 질환별 건강기능식품 융복합핵심기술연구개발지원 보건의료기술진흥사업 (보건복지부, 2011)).

산업화, 환경의 오염, 고령화 등으로 자가면역질환 등 면역질환 유병률의 급속한 증가하고, 심각한 만성, 난치성 질환환자가 많아지면서 면역력 저하 인구도 급증하고 있으므로 이에 따른 임상 및 기초연구가 전 세계적으로 진행되고 있으며, 그 필요성 또한 급증하고 있음.

치료방법의 한계성 및 예방의학의 부족으로 자연스럽게 건강기능식품에 대한 관심이 고조되고 있으며, 영양불량이 곧 면역 기능 저하와 직접적 관련이 있다는 연구결과 등 영양과 인체 면역기능 조절과의 긍정적 상관관계 규명에 따른 건강식품에 의한 인체 면역기능조절 관련제품, 특히 면역기능증진제품에 대한 관심이 급증하고 있음.

EU의 경우 “The Functional Food Science in Europe (FUFOSE)”에서 기능성식품에 대한 6가지 생리학 영역 중 그 첫 번째 항목으로 면역증강에 대한 식품 소재개발 및 평가방법에 많은 연구를 진행하고 있으며, 중국에서도 1996년 보건기능식품법과 보건식품을 위한 일반 위생 규칙을 제정하고 이에 24가지 보건 식품의 기능을 정하여 각각 그 기능성에 대한 평가를 하는데, 그 첫 번째 항목을 면역기능증진으로 꼽을 만큼 그 중요성을 강조하고 있음

미국의 소비자 81%는 식품을 선택할 때 건강유지나 증진에 도움을 주는 제품을, 75%는 영양소가 강화된 제품을 선택하고 있는 것으로 파악됨. 특히, 면역력을 증가시킴으로써 발암을 예방하거나 암치료 시 보조 요법제로 사용할 수 있는 소재들에 많은 관심이 증가하고 있음.

이러한 이유로 국내외 면역 증강제품 시장은 10~20%의 높은 성장률은 나타내고 있음 (미래 질환별 건강기능식품 융복합핵심기술연구개발지원 보건의료기술진흥사업 (보건복지부, 2011)).

면역증진기능은 다른 어떤 기능 분야보다도 영양 상태, 섭취하는 식품과 면역능력과의 상호관계가 매우 밀접하다는 연구결과들에 의해서 특히, 다른 분야보다도 건강기능식품제품 개발이 많이 이루어져 있음.

한국건강기능식품협회의 소비자 실태조사(2013년 8월8일 ~ 2014년 7월7일)에서는 소비자가 건강기능식품을 통해 해결하고자 하는 건강문제로 1위 피로회복(31.8%), 2위 면역력증진(26.6%), 3위 전반적인건강증진(14.7%), 4위 영양보충(13.5%), 5위 혈행개선(4.5%)의 순으로 관심도가 조사되었으며, 이는 추후 국내 소비자들의 면역력 강화 제품에 대한 시장의 성장 가능성을 나타내는 것으로 볼 수 있음.

<건강기능식품 구매 시 고려하는 건강 관련 문제> (단위 : %)					<향후 건강기능식품을 통해 개선하고 싶은 건강문제> (단위 : %)			
구분	2010년	2012년	구분	2010년	2012년	2010년(A)	2012년(B)	(B-A)
피로회복	46.5	56.3	골 건강	0.0	3.8	48.1	48.5	0.4
면역력 증진	41.7	43.1	배변활동	0.0	3.6	40.0	38.8	-1.2
전반적 건강증진	24.7	24.9	혈압	3.3	2.9	35.0	27.5	-7.5
혈행 개선	14.2	22.8	스트레스	0.0	2.4	16.7	19.2	2.5
영양보충	19.6	17.5	기억력	2.0	2.2	14.2	15.8	1.6
관절 건강	16.3	16.5	혈당	0.2	1.7	12.8	14.0	1.2
피부 건강	7.3	7.9	지구력 증진	0.0	1.5	20.1	13.8	-6.3
눈 건강	5.3	7.5	당뇨병	0.7	1.4	15.8	13.3	-2.5
콜레스테롤 개선	6.5	6.5	성당	0.0	1.0	13.4	12.0	-1.4
노화방지	5.3	5.8	전립선 건강	1.1	0.9	14.2	11.1	-3.1
체질 개선	6.9	5.3	숙면	0.0	0.5	14.2	10.9	-3.3
장 건강	4.0	5.1	알레르기	0.5	0.3	10.9	10.4	-0.5
체지방 감소	1.5	4.8	구강 건강	0.0	0.2	-	9.5	9.5
간 건강	5.6	4.1	기타	1.3	2.2	10.6	8.2	-2.4
						7.8	6.7	-1.1
						4.9	6.7	1.8
						5.8	6.3	0.5
						4.5	4.8	0.3
						2.7	2.9	0.2
						1.8	2.6	0.8
						-	2.4	2.4
						-	2.3	2.3
						-	2.1	2.1
						-	1.6	1.6
						-	1.1	1.1
						1.6	1.0	-0.6
						-	0.9	0.9
						0.9	1.3	0.4

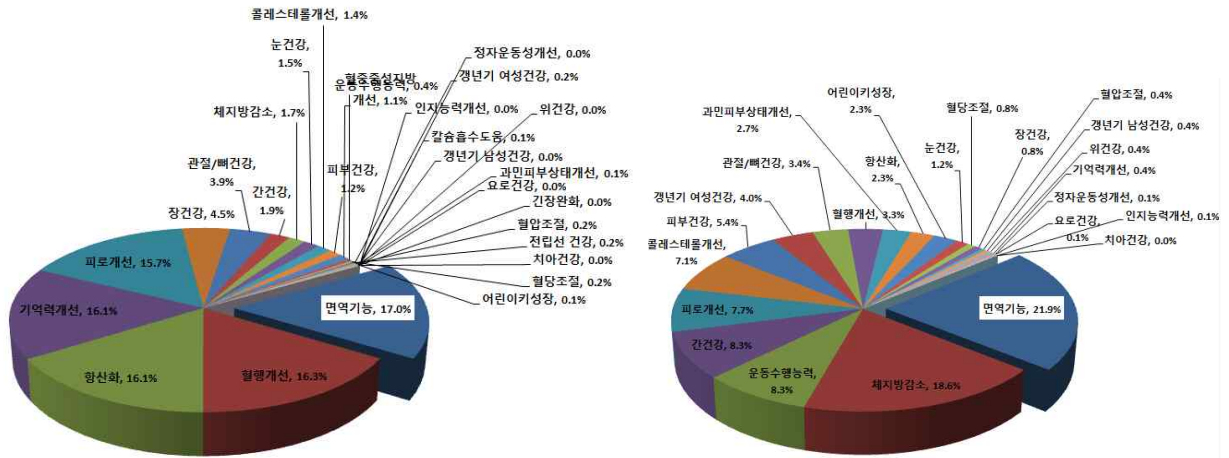
BFN(2013), "2013년 건강기능식품 소비자 실태 및 시장구조 조사"

Fig. 1. 건강기능식품 소비자 실태 조사 결과 (건강기능식품협회, 2014)

국내 소비자들은 면역능력과 관련하여 면역력증가(37.8%), 감기예방(24.3%), 질병예방(15.3%) 등 기대효과를 예상하고 있는 것으로 조사되었음.

2018년 식약처 발표한 2017년도 건강기능식품 매출 실적 점유율 자료에 따르면 건강기능식품의 전체 시장중 면역 기능 개선이 가장 높은 17.0% (1조 1,711억원)로 1위를 차지하고 있으며, 건강기능식품 개별인정형 기능성별 생산실적 자료에 따르면 면역 기능성이 21.9%로 1위를 차지하고 있음.





〈건강기능식품 매출 실적 점유율, 2017, 식약처〉

〈개별인정형 건강기능식품 기능성별 매출 비율, 2017, 식약처〉

Fig. 2. 건강기능식품의 기능성별 매출 비율

건강기능식품 연구진행분야를 보면 면역기능증진은 33.3%로 항산화, 관절건강과 함께 가장 높은 비율을 차지하고 있었으며, 기업을 대상으로 우선 개발해야할 건강기능식품 연구진행 분야를 조사하여 본 결과, 면역기능증진은 28.0%로 높은 순위를 차지하는 것으로 조사됨(미래 질환별 건강기능식품 융복합핵심기술연구개발지원 보건의료기술진흥사업 (보건복지부, 2011)).



Fig. 3. 미래 질환별 건강기능식품 융복합 핵심기술연구개발지원 보건의료기술진흥사업 (보건복지부, 2011)

또한 최근 메르스(MERS) 및 신종 인플루엔자 등과 같은 질병이 확산되면서 면역 기능 증진 관련 식품에 대한 관심이 더욱 증대되었음. 따라서, 이러한 국내외 시장 여건에 따라 체계적인 연구를 통한 우수한 건강기능식품소재의 개발을 절실히 필요로 하고 있음.

현재 식약처에 허가된 면역기능 증진 건강기능식품은 고시형 6종(인삼, 홍삼, 알로에겔, 클로렐라, 알콕시글리세롤함유상어간유, 상황버섯추출물)과 개별인정형 12종(인삼다당체추출물, 금사상황버섯, 표고버섯균사체, 효모베타글루칸, 동충하초주정추출물, 당귀혼합추출물, 청국장균배양정제물, *Enterococcus faecalis* 가열처리 건조분말, L-글루타민, 게르

마늘효모, 스피루리나) 등 총 18종이 인정받아 있음(2016, 식약처).

약 4.5조원대로 예상되는 건강기능식품의 시장 규모 중 면역 기능 증진 건강기능식품은 대략 1.5조원이상으로 예상되며, 이중 홍삼제품이 대부분의 시장 점유율을 갖고 있음.

그러나, 홍삼제품은 5가지 복합 기능성을 갖춘 우수한 소재임에도 불구하고 원재료의 재배 기간이 길고, 제조 방법의 난이도가 높으며, 이로 인해 타 건강기능식품에 비하여 상대적으로 고가로 판매되고 있음.

또한, 면역 기능성에 대한 전체 시장 점유율은 꾸준히 증가하고 있으며, 개별인정형 면역 소재에 대한 시장 점유율도 꾸준히 증가하고 있음. 이에 따라, 시장에서 홍삼 이외의 새로운 면역기능 소재에 대한 소비자의 요구도 증대되고 있음.

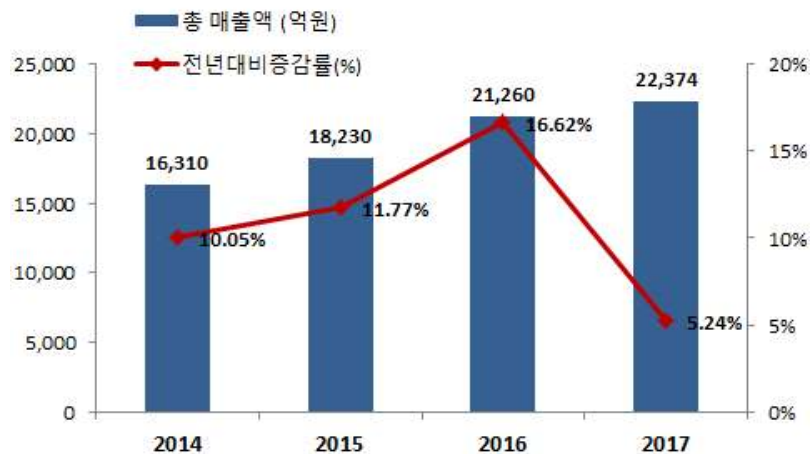


Fig. 4. 국내 건강기능식품 매출실적 현황 (출처: 식약처 '18.08.)

이러한 상황에서, 앞서 언급한 바와 같이 작두콩 추출물은 재배기간이 짧고 물과 저농도 주정과 같은 단순 공정으로도 고기능성을 갖는 소재를 생산할 수 있는 장점이 있기 때문에, 기존 홍삼을 비롯한 버섯, 알로에 소재와 비교하여 가격 및 제품 공급면에서 매우 우위에 설 수 있는 소재가 될 수 있을 것으로 판단됨.

작두콩(*Canavalia gladiata*)은 콩과 한해살이 덩굴성 식물로 동남아시아 열대지방이 원산지이며, 그 모양이 작두를 닮았다고 하여 작두콩 혹은 도두(刀豆)라 부르기도 함. 작두콩에는 urease, hemagglutinine, canavanine, canavalia gibberellin I과 II 등의 약용 성분을 함유하고 있으며, 특히, 일반 두류에는 없는 canavanine과 canavalia gibberellin이라는 성분이 있는데, 이는 강력한 면역 T 세포 증식 및 면역증강을 일으키는 Concanavalin A라는 물질의 isoform으로 알려져 있음. 즉, 작두콩의 학명에서 보듯이 *Canavalia gladiata*으로 Concanavalin A (ConA)와 비슷한데 ConA가 작두콩에서 분리했기 때문임. 또한 대부분 두류에서는 검출되는 daidzin, genistin, daidzein 및 genistein과 같은 flavonoid류가 작두콩에서는 검출되지 않는 특징을 가진다고 알려져 있고, 작두콩의 함유성분이 일반콩과 다른 화학적 구조를 가지고 있을 뿐만 아니라, 항산화

활성 및 탁월한 면역증진이 기대되는 작두콩이 면역증강식품개발의 강점이 있어 경쟁우위점이 있음. 최근, 중국에서 작두콩을 발효시켜 개발한 “진화 851 구복액”이라는 음료가 건강보조제로 국내에 소개된 적이 있고, 일본에서는 작두콩에 질경이, 울무, 산치자, 예덕나무를 배합해 만든 건강차인 “도두과워”가 제품으로 판매되기도 함.

본 과제에서는 이러한 홍삼의 단점을 극복하고, 작두콩의 우수한 효능을 이용하여 짧은 재배 기간 및 제조 방법의 단순화로 소비자들에게 저렴하고 우수한 효능을 갖는 면역 기능 개선 제품을 개발하여 공급하고자 함. 이로 인하여, 재배 농가의 소득증대에도 크게 기여할 수 있을 것으로 보임.

### 제 3 절 연구개발 범위

#### 1. 연구개발의 목표 및 내용

연구개발의 목표	연구개발의 내용
안전성 확보 및 인체적용시험을 통한 효능 확보 / 제품화	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 과제 총괄 계획 수립 및 추진</li> <li>● 원료의 안전성 확보</li> <li>● 인체효능 확보를 위한 인체 적용시험 수행</li> <li>● 최종 제품화 수행</li> </ul>
소재의 효능 평가 및 성분 규명/기작 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 소재의 최적화를 위한 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 효능 평가 연구</li> <li>● 동물에서 효력시험을 통한 임상용량 결정시험 연구</li> <li>● 활성 추적에 따른 유효성분 분리 및 동물 효능 평가</li> <li>● 소재의 작용기전 규명</li> </ul>
원료의 표준화 및 개별인정형 신청 접수 / 제품생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 원료 표준화 확립                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원물 확보, 원물의 추출방법 확립, 대량 추출법 확립</li> <li>- 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등 자료 확보</li> <li>- 기능성분 (또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험 방법 확립</li> </ul> </li> <li>● 개별인정 신청 및 제품 생산                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- “면역 증진에 도움을 줄 수 있음” 기능성으로 개별인정신청 제출 (생리활성기능 2등급 목표)</li> <li>- 개별인정 위한 안전성, 생체유용성, 기능성 자료 확보</li> </ul> </li> <li>● 시제품 개발 및 상용화 연구                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발된 원료를 이용한 시제품의 개발 및 상용화 연구</li> <li>- 소재에 적합한 다양한 제형의 연구 개발</li> </ul> </li> </ul>

#### 2. 연차별 목표 및 연구개발 내용

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	소재 정보 수집	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 소재의 기원 및 개발경위 자료 수집                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기원, 학명, 원산지, 사용부위 등</li> </ul> </li> <li>2. 국내·외 인정·허가 현황 자료 수집</li> <li>3. 국내·외 사용현황 자료 수집                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사용용도, 유통량, 제조회사, 섭취실태 등</li> </ul> </li> <li>4. 섭취량 평가 자료 수집</li> </ol>

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
	원료 표준화	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 원물의 수급선 확보</li> <li>2. 지표물질 및 지표물질 분석법 확립</li> <li>3. 추출법의 scale-up</li> </ol>
	추출법의 표준화	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 원료 제조 및 제조 방법 확립</li> <li>2. 원료 추출법의 표준화 및 원료 추출/공급</li> </ol>
	소재조합 추출물로부터 면역기능 증진 활성 신소재 탐색 및 유효성분 분리	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 항산화활성 및 면역증진 활성 물질(면역기능 조절지표) 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성산소 생성능</li> <li>- 세포독성시험</li> <li>- IgA생성</li> <li>- T/B cell 증식</li> <li>- 면역기능 증진 cytokine 조절능</li> </ul> </li> <li>2. 마우스에서 면역세포 증식 및 면역 단백질의 발현 연구를 통한 기능성 신소재 탐색 및 효능 확인 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fibroblast 증식능</li> <li>- Collagen 발현</li> <li>- Proinflammatory cytokine 발현 조절능</li> </ul> </li> <li>3. 유효성분 분리 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Chemical finger printing을 통하여 소재 특화 주요 지표성분들을 확인함</li> </ul> </li> </ol>
	소재의 안전성 확보	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 섭취 근거 자료 수집</li> <li>2. 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 수집 (알러지 유발 가능성 등 포함)</li> <li>3. 섭취량 평가 자료 수집</li> </ol>
2차년도	인체 효능 검증	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 연구 기관 선정</li> <li>2. 전략 수립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시험 디자인</li> <li>무작위배정 위약대조연구(Randomized, Controlled Trial; RCT)</li> <li>- 프로토콜/CRF 등 개발</li> <li>바이오마커 설정</li> </ul> </li> <li>3. 피험자 모집</li> </ol>

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시험대상 선정 면역기능의 주요 지표인 혈중 백혈구 수가 정상 범위 중 낮은 범위에 속하거나 정상범위보다 다소 낮은 자 등 질병을 가지지 않은 사람</li> <li>4. 인체 적용 시험 식품 제조</li> <li>5. 인체 적용 시험 개시               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 등록기간 : 8개월</li> <li>- 섭취기간 : 8주</li> </ul> </li> </ul>
	<p style="text-align: center;">소재조합 추출물로부터 면역증진 후보물질 선정 및 작용기전 연구</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 최종 후보물질의 공인 기관의 평가 자료를 통한 안전성 및 독성 검사           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 한국 화학융합시험연구원에 의뢰 급성 경구투여 독성/안정성시험 수행</li> </ul> </li> <li>2. 마우스 모델에서 유도체 후보물질처리에 의한 면역세포 활성화기능 증진방법 확립           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 암 및 염증유발 또는 억제인자 조절기능, 항암/항염 활성화 조절기능, 면역세포 활성화 및 침윤능력, 세포독성능(암세포 killing능력)을 통한 면역세포 활성화기능 증진방법 확립.</li> </ul> </li> <li>3. 암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역조절 활성 탐색           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 암 진행정도 측정(survival rate, tumor mass), 면역세포활성 및 침윤능, 자연살해세포 cytotoxicity 기능, 암전이능, 세포자연사 및 cell cycle을 통한 항암효능을 확인</li> </ul> </li> <li>4. 마우스 점막자가면역질환 모델에서 면역조절 활성 및 효능 확인           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 체액성, 세포매개면역 및 점막면역기능 분석, 염증유발유전자 억제기능, 면역세포활성 및 침윤능을 통한 점막자가면역질환 마우스 모델에서 효능을 확인.</li> </ul> </li> </ol>
	<p style="text-align: center;">원료 표준화</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 추출법의 scale-up</li> <li>2. 활성물질 분리 및 분석법 확립</li> <li>3. 소재의 안정성 확립</li> </ol>

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
	소재의 안전성 확보	4. 위해물질 검사 - 중금속, 미생물, 농약 등 분석
3차년도	인체 효능 검증	1. 모니터링 및 데이터 수집 2. 통계 분석 및 데이터 정리 - 통계처리 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정 3. 결과 분석
	최종 후보물질의 delivery system 개발 및 효능검증	1. 염증 및 암 마우스 모델로부터 후보물질의 주사, 경구투여 및 패치타입에 의한 항염 및 항암 효능 확인 - 비장 및 림프절을 적출하여 항염 및 항암 관련 유전자의 발현을 확인하고 유세포 분석기를 이용하여 면역세포들의 활성의 변화를 확인
	개별인정형 허가 추진	1. 원료의 안전성, 생체유용성, 기능성 자료 확보 2. “면역 증진에 도움을 줄 수 있음” 기능성 3. 생리활성기능 2등급 목표로 개별인정 신청
	식품 제형 개발	1. 선정된 소재에 적합한 다양한 제형 개발 - 과립제, 산제, 정제, 캡슐제, 내용액제, 환제 등 2. 안정성 확보를 위한 제형 연구 3. 시제품 개발
	양산화 공정 확립	1. 대량 재배 및 원료 수급 방안 수립 2. 대량 원료화 방안 수립 3. 품질관리 기준 확립

## 제 2 장 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절 추진전략 및 방법

- 애경산업 연구소의 천연물 연구팀은 기존에 천연추출물을 이용하여 발모제를 개발한 성과를 가지고 있는 팀으로 천연물 추출과 분획, 그리고 효능평가 부분에 있어 전문성을 확보하고 있음.(대한민국특허 10-0839704-0000)  
애경산업 연구소는 이를 바탕으로 의약외품 등록을 위한 임상 및 독성 시험을 추진한 경험을 보유하고 있어 확보된 소재를 개별인정형 소재화 하는 목표를 효율적으로 추진할 수 있었음.
- 애경산업 연구소는 기존에 “면역 강화 및 조혈 증진 효능을 가지는 항암 치료 후 부작용 개선 식품 개발”이라는 과제로 농림축산식품부의 고부가가치식품기술개발 사업을 수임하여 성공적으로 추진하였음.  
애경산업 연구소는 상기 과제추진 경험을 바탕으로 본 과제를 효율적으로 총괄 관리하며 추진하였음.
- 애경산업 연구소와 대전대학교 김승형 박사 연구팀은 사전 연구를 통해 조혈 및 면역 증진에 우수한 효과를 갖는 소재를 선별하여 특허등록을 완료하였으며, 이를 바탕으로 인체적용시험을 진행하고 도출된 결과로 건강기능식품 제품화하고자 함.
- 인체적용시험은 전문 CRO인 (주)네오뉴트라 의 컨설팅을 통해 협업으로 진행함.
- 대전대학교 김승형박사 연구팀은 활성추적에 따른 유효성분 규명과, *in vitro* 및 *in vivo* 면역 기전 및 효능 시험에 있어서의 20년 이상의 경험과 노하우를 바탕으로 하여 본 개발소재인 작두콩추출물등복합물의 유효성분 (Lupeol/chicoric acid) 규명 및 작용기전, 임상용량 결정 등의 비임상시험 결과를 성공적으로 확보함.
- 노바렉스는 건강기능식품 개발과 관련하여 다년간의 노하우를 가지고 있으며, 또한 학계 및 공공기관과의 지속적인 연구 네트워크를 통해 원료개발에 대한 정보 수집 및 전문가 확보가 용이한 장점을 가지고 있음.
  - 1) 정보수집 & 타 기관과의 협조
    - 학계 및 공공기관(식약처, 공인분석기관)과의 지속적 교류를 통한 지표물질 분석, 원료 수급, 기타 연구 개발과정에서 발생할 수 있는 애로 사항을 극복
  - 2) 전문가 활용
    - 공인분석기관(건협)과 연계하여, 지표성분 함량 및 위해물질 규격 확립
    - 전문 추출 업체에 소량의 원물을 이용하여 반복 추출 후 세부 추출공정 확립  
: step 별 산물을 제공받아 각 공정별 수율 및 지표물질 함량 분석
    - 지표성분의 분석 및 추출물 내 지표물질의 함량 확립 및 분석법 검증



: validation을 통한 정확한 분석법 검증[특이성, 정확성, 정밀성, 직선성, 범위]



○ 노바렉스는 연구하는 기업으로 성장하기 위한 지속적인 노력을 통해 총 34내 건의 국내 최다 개별인정등록을 보유함. 본 과제를 통해서도 노바렉스의 노하우와 타기관과의 지속적 협조과정을 통해 건강기능성 식품 원료로서의 개발을 위한 원료 표준화와 개별 인정형 원료 등록을 추진 및 완료할 것임. 구체적 방법은 아래와 같음.

1) 개별인정형 원료 신청

- 축적해온 인적, 물적, 지적 자원을 활용하여, 건강기능식품 원료로서의 개발 가능성 극대화

개별인정신청을 위한 자료 check

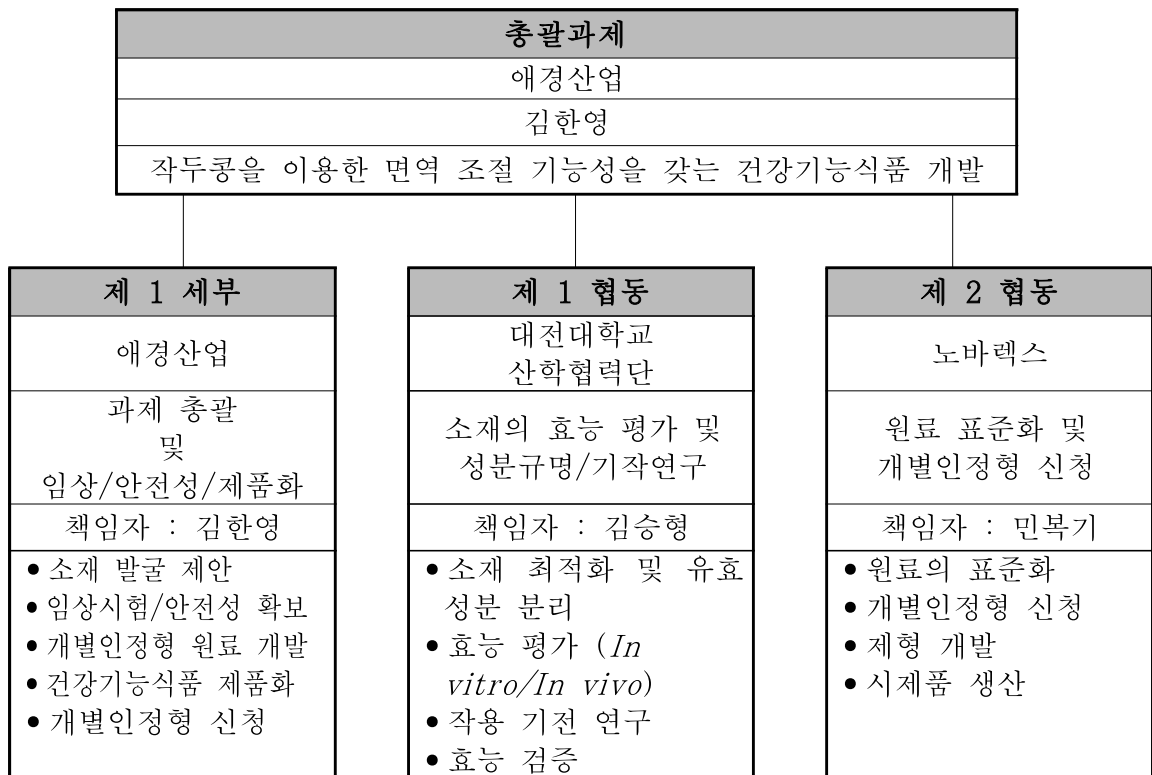
- 국내 대부분의 건강기능식품 유통사와 거래를 하고 있을 뿐만 아니라, 미국

GNC, 호주 blackmores와의 국내 제조 독점을 보유하고 있음.

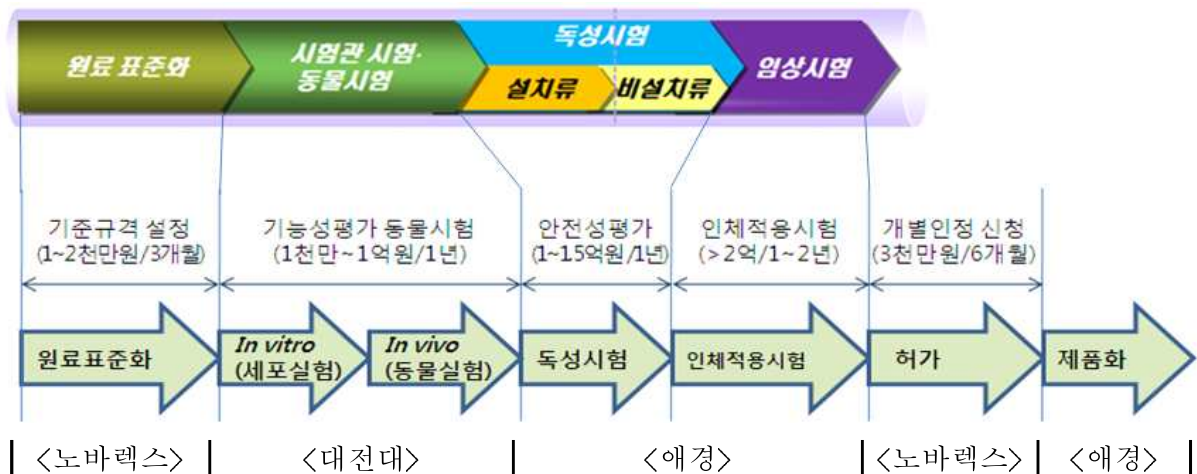
- 따라서, 원료의 개별인정 획득에서 마케팅을 위한 광고심의, 기술적 지원 및 여러 종류의 제품 제조 능력(연간 100개 이상의 제품 리뉴얼)을 보유하여, 원료의 실제 판매에 매우 유리함.

## 제 2 절 연구개발 추진 체계

### 1. 추진 체계



### 2. 과제 추진 체계 요약



(2015년 기능성식품 개발 빨라진다, 농림수산식품부 식품산업정책과, 2011)

제출 자료	수행 기관	소요기간
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본	애경산업	3개월
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등 자료	노바렉스	
3. 제조방법에 관한 자료	노바렉스	
4. 원료의 특성에 관한 자료	노바렉스	
5. 기능성분 (또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험 방법에 관한 자료 및 시험성적서	노바렉스	
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험 방법에 관한 자료	애경산업	1개월
7. 안전성에 관한 자료	애경산업	1년
8. 기능성 내용에 관한 자료	애경산업 대전대학교	3년 (동물1년, 인체 2년)
9. 섭취량, 섭취 방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료	대전대학교	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료	노바렉스	
합계		3~5년

〈개별인정형 건강기능식품 추진을 위한 필요 사항 및 역할 분담〉

년차	연차별 주요 계획	업무 분장
1년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 원료 표준화</li> <li>➤ <i>In vitro/In vivo</i> 시험 (효능 추가 연구 및 용량 결정)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 애경 (주관 기관) <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ 소재 제안, 인체적용시험, 개별인정형 원료 개발, 건강기능식품 출시</li> </ul> </li> <li>➤ 대전대 (참여 기관) <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ 기초 및 기작/효능 연구 / 논문</li> </ul> </li> <li>➤ 노바렉스 (참여 기관) <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ 원료 표준화, 개별인정형 허가작업 지원, 원료 생산 및 공급</li> </ul> </li> </ul>
2년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 인체 적용 시험 시작 (초반)</li> <li>➤ 원료 표준화 및 대량 생산 방법 확립</li> <li>➤ <i>In vitro/In vivo</i> 시험 보충 (기작 및 효능 성분 규명)</li> </ul>	
3년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 인체적용시험 완료 (중반)</li> <li>➤ 제형 개발 및 양산화 공정 확립</li> <li>➤ 개별인정형 허가 작업</li> </ul>	

〈연차별 주요 계획 및 협동 과제별 업무 분장〉

## 제 3 절 연구 개발 접근 방법

### 1. 선행 연구 결과

#### 가. 연구 개요

- 1) 선행 연구 결과는 2011년 8월부터 2014년 8월까지 3년간 농림축산식품부에서 실시한 “고부가가치식품기술개발사업”을 수행하여 얻은 결과로서, “항암치료 후 기력 회복을 위한 보조식품용 소재 개발”이라는 과제를 수행하여 얻은 결과임.
- 2) 선행 연구 과제에서는 방사선 및 화학치료 등의 항암치료 후에 조혈 및 면역력의 약화로 인한 부작용의 개선에 도움을 주는 식품 소재를 *In vitro* 실험을 통하여 선별하여, *In vitro* 및 *In vivo* 실험을 통하여 이의 효능을 검증하였으며, 패널 설문을 통하여 항암 치료 후 기력이 약화된 유병자의 증상 개선을 확인하였음.
- 3) 본 선행 연구 결과를 바탕으로 선별된 소재의 표준화 및 기작 연구, 임상 등의 추가 연구를 통하여 식품의약품안전처의 기준에 맞는 건강기능식품 소재의 개발을 목적으로

본 과제를 추진하고자 하였음.

나. 결과 요약

- 1) 가. 항암치료의 부작용 개선을 위한 천연소재 탐색을 위해 조혈/면역 증진 및 세포 성장 촉진 작용을 하는 천연 식품 소재를 선별하였음.
  - 가) 조혈 및 면역 증진 : 작두콩, 다채썩, 오가피, 우엉
  - 나) 세포성장 촉진 : 유채썩, 들깨썩
- 2) 나. 선별된 개별 소재 및 복합 소재의 효능 검증을 수행하였음.
  - 가) *In vitro*, *In vivo* 효능 검증을 통해 조혈 및 면역 증진에 대한 효능 확인
- 3) 다. 암 환자의 항암치료 후 회복증진에 대한 인체적용 평가를 위해 한의학적 암종별 유병자 대상 인체적용 평가 결과, 피부혈색, 대소변활동원활, 소화기능 개선 확인

다. 관련 등록 특허

등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록 번호	주요 소재
2014	조혈 및 면역 증진용 식품 조성물	애경산업 (주)	대한민국	10-1423380	작두콩, 다채썩
2014	혈액암 또는 간암의 예방 또는 치료용 조성물, 이를 포함하는 건강식품, 이를 제조하는 방법	애경산업 (주)	대한민국	10-1376267	미나리, 숙주, 연줄기
2014	들깨썩 추출물, 유채썩 추출물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 기능성 식품 조성물 및 이의 제조방법	애경산업 (주)	대한민국	10-1408214	들깨썩, 유채썩

라. 시험 결과

1) 선별된 소재의 조혈 증진 효과

가) 조혈증진관련 유전자인 IL-3, SCF, c-kit mRNA의 분석

IL-3 mRNA 유전자 발현은 다채썩과 작두콩을 처리한 경우 3배 이상 현저한 증가를 나타내었음( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ )

다채썩, 시금치, 작두콩은 c-kit mRNA 유전자 발현을 2배 이상 통계학적으로 유의성 있게 증가시켰음( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ )

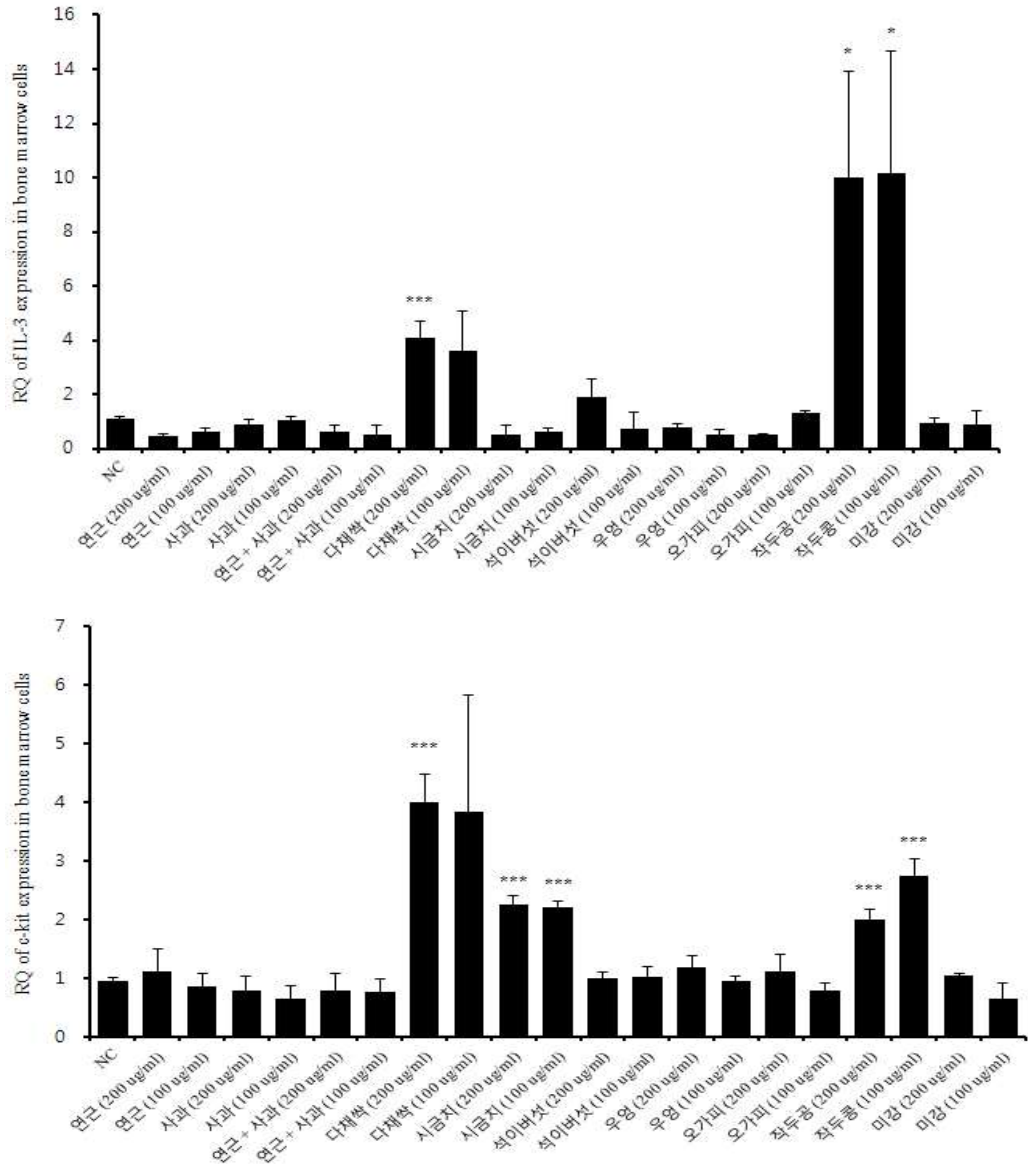


Fig.5. Quantitative Real-Time PCR Using Taqman probe on mouse bone marrow cells. Statistically significant value compared with control group data by T test(\*p<0.05, \*\*p<0.01).

나) 조혈면역줄기세포 (HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효능 검증결과 음성대조군에 비하여 작두콩(CGS)은 농도 의존적으로 EPO (Fig. 6A), IL-3 (Fig. 6B), SCF (Fig. 6C), GM-CSF (Fig.6E), 및 c-kit (Fig. 6D)의 mRNA 발현을 통계학적 유의성 있게 증가시킴.

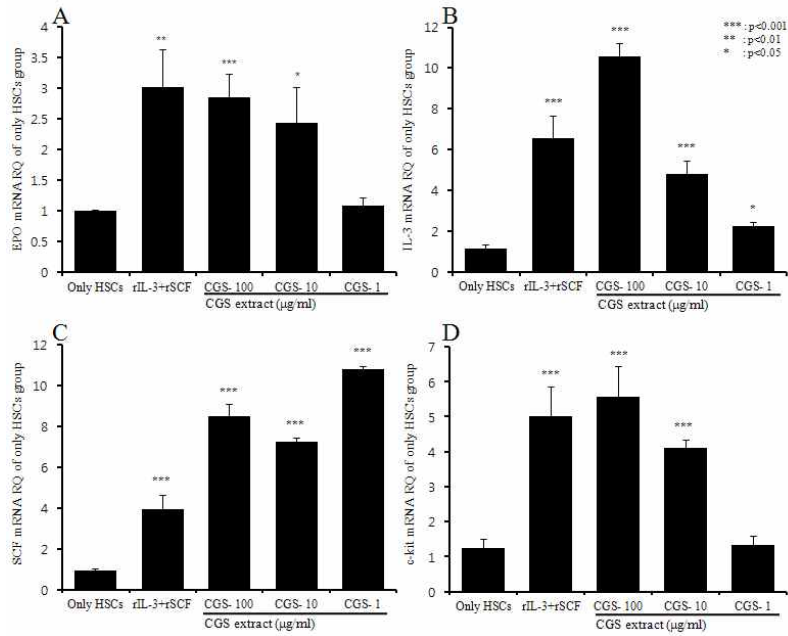


Fig.6. Effects of CGS extract on hematopoietic-related gene mRNA expression in hematopoietic stem cells.

다) 조혈면역모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈면역증진 효과 분석  
음성대조군에 비하여 양성대조군인 rIL-3+rSCF이 IL-3 (Fig. 7A), SCF (Fig. 7B), 그리고 GM-CSF (Fig. 7C)의 생산량이 통계학적 유의성 있게 현저히 증가 ( $p<0.001$ ). 그리고 음성대조군에 비하여 작두콩(CGS)은 100 µg/ml과 10 µg/ml농도에서 IL-3 (Fig. 7A), SCF (Fig. 7B), 그리고 GM-CSF (Fig. 7C)에서 통계학적 유의성 있게 생산량을 증가.

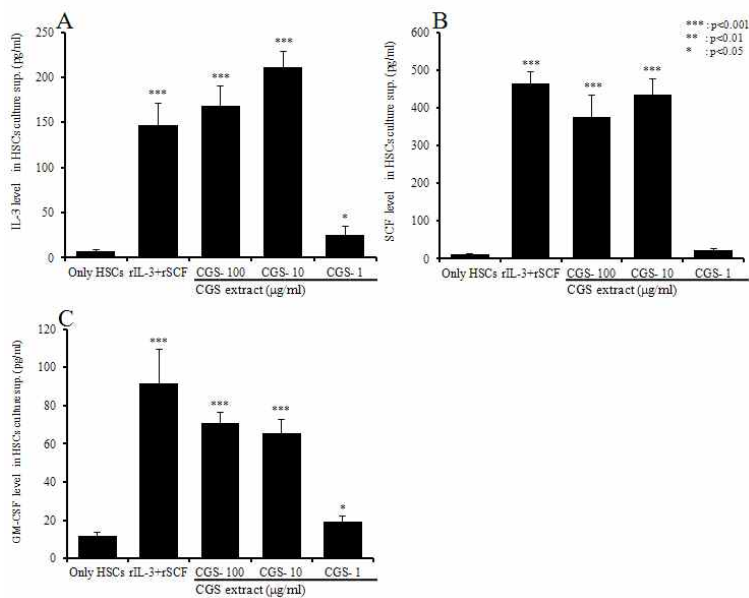


Fig. 7. Effects of CGS extract on hematopoietic-related gene expression production in hematopoietic stem cells.

라) 조혈면역줄기세포(HSCs)에서 GATA-1/STAT-5의 인산화 활성 분석  
 음성대조군에 비하여 양성대조군인 rIL-3+rSCF이 GATA-1/STAT5 경로를 활성 인산화가 증가하였으며, 작두콩(CGD) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 GATA-1/STAT5 경로의 활성 인산화가 증가 (Fig. 8).

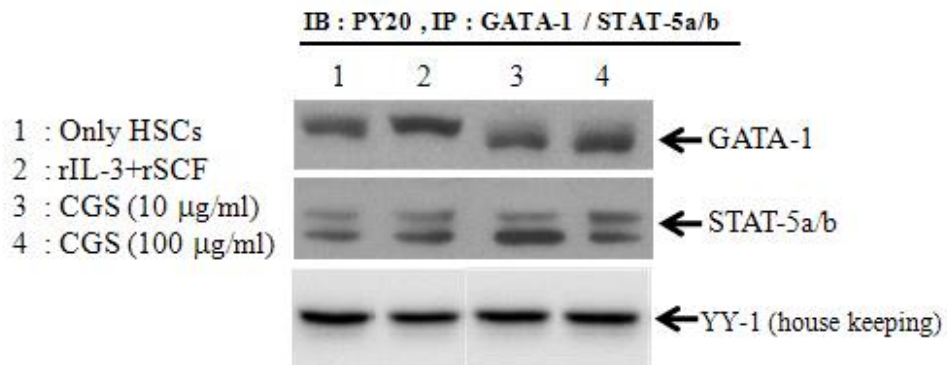


Fig.8. CGS extract promotes the tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of GATA-1 and STAT-5a/b in Sca-1+hematopoietic stem cells.

마) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈면역줄기세포 분화 효과 측정  
 음성대조군에 비하여 대조군인 rIL-3+rEPO처리군의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 수는 12배 이상 증가 하였고, rIL-3+rEPO와 CGS 추출물을 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 군락 수는 대조군인 rIL-3+rEPO에 비하여 2.1배 이상 유의성 있게 증가함 (Fig.9, Fig.10).

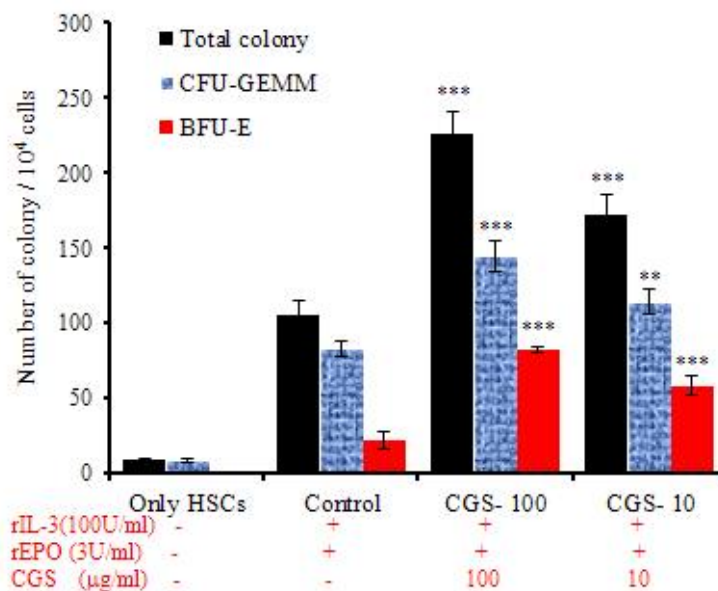


Fig.9. Effects of CGS extract of CFU-GEMM and BFU-E colony formation during 14-day culture in the presence of two different cocktails of recombinant cytokine and CGS extract

Effects of CGD extract to BFU-E colony formation in the presence of recombinant cytokine.

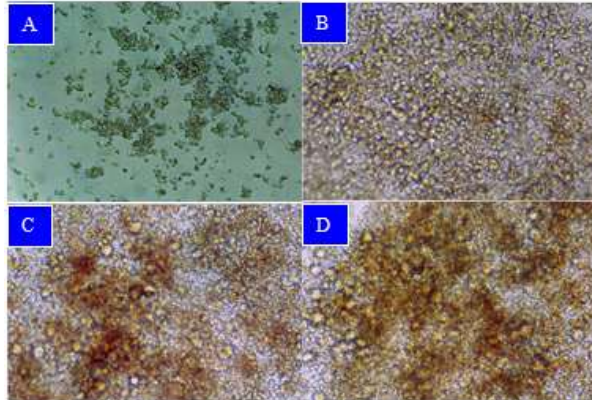


Fig. 10. Effects of CGS extract to CFU-GEMM colony formation in the presence of recombinant cytokine.

2) 선별된 소재의 면역 증진 효과

가) 염증반응 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )의 유전자 발현 억제 확인  
 작두콩 추출물이 LPS에 의해 염증 반응이 유도된 Macrophage에서 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  유전자의 발현을 억제시킴.

순번	시료내역
17	작두콩(100 ug/ml) : <i>Canavalia gladiata</i> DC (CGS, CGD)

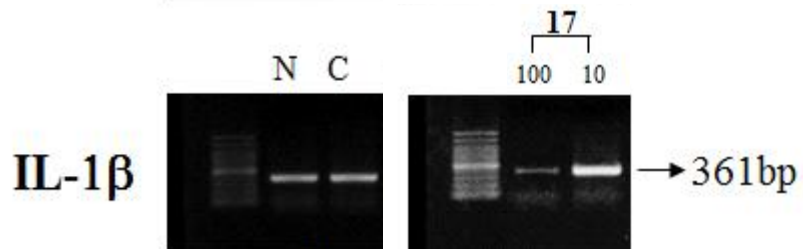


Fig. 11. Inhibitory effects of *Canavalia gladiata* DC extract on IL-1b m-RNA expression in activated mouse macrophages by lipopolysaccharide(LPS).

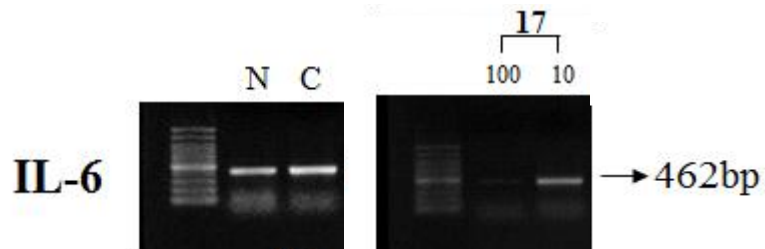


Fig. 12. Inhibitory effects of *Canavalia gladiata* DC extract on IL-6 m-RNA expression in activated mouse macrophages by lipopolysaccharide (LPS).



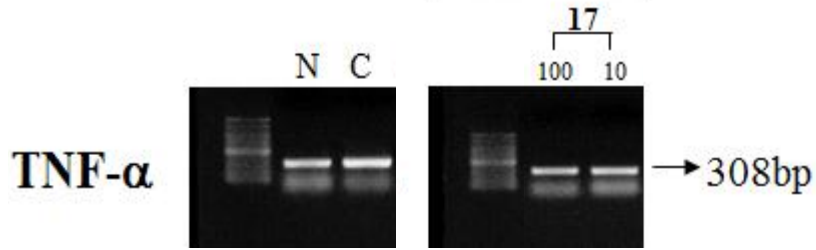


Fig. 13. Inhibitory effects of *Canavalia gladiata* DC extract on TNF- $\alpha$  mRNA expression in activated mouse macrophages by lipopolysaccharide (LPS).

3) LPS로 Cachexia를 유도한 생쥐에서 작두콩 추출물을 첨가한 시험군의 회복 효과

가) LPS처리한 생쥐의 body weight에 미치는 영향

LPS에 의해 cachexia가 유발된 생쥐에서 작두콩추출물을 투여한 군의 몸무게 회복 속도가 증가됨(Fig. 14).

TNF- $\alpha$ 생산량은 작두콩 섭취군이 대조군에 비해 눈에 띄게 적게 생산되었음(Fig. 15).

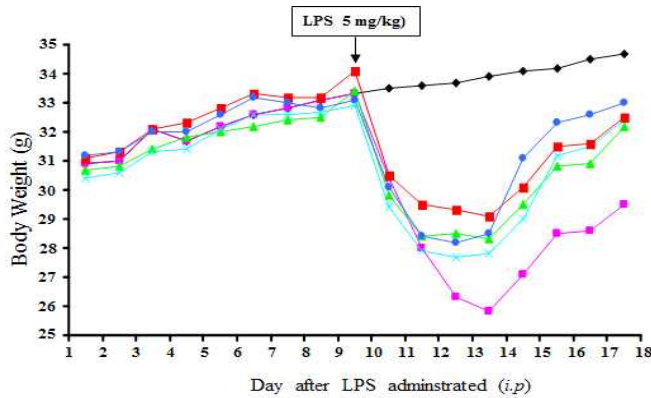


Fig. 14. Effect of *Canavalia gladiata* DC extract and mixture on body weight of LPS- treated mice.

CGD extract (200 mg/kg, ■), Normal mice (◆), LPS-treated mice group (■).

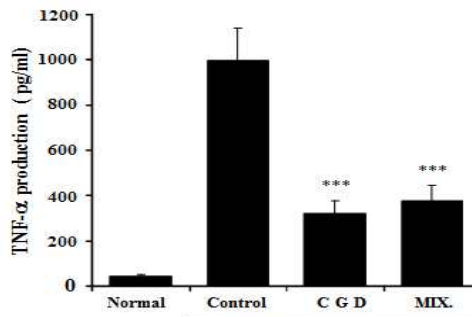


Fig. 15. Effect of *Canavalia gladiata* DC extract and mixture on serum TNF- $\alpha$  level of LPS-treated mice.

4) 암세포(Colon26)로 Cachexia를 유도한 생쥐에서 작두콩 추출물을 포함한 천연 복합 식품 소재가 cachexia syndrome을 억제 효과

- 가) Colon26 세포주로 cachexia를 유도한 생쥐에게 작두콩 추출물을 포함한 천연 혼합 식품 소재를 경구투여 하였을 때 대조군 대비 Body weight의 감소가 둔화됨 (Fig. 16).
- 나) Colon26 세포주로 cachexia를 유도한 생쥐에게 작두콩 추출물을 포함한 천연 혼합 식품 소재를 경구투여 하였을 때 암세포의 대조군 대비 크기가 감소함 (Fig. 17)
- 다) Colon26 세포주로 cachexia를 유도한 생쥐에게 작두콩 추출물을 포함한 천연 혼합 식품 소재를 경구투여 하였을 때 혈액내에 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  단백질의 양이 대조군 대비 크게 감소함 (Fig. 18)
- 라) Colon26 세포주로 cachexia를 유도한 생쥐에게 작두콩 추출물을 포함한 천연 혼합 식품 소재를 경구투여 하였을 때 생쥐의 생존일 수가 증가됨 (Fig. 19)

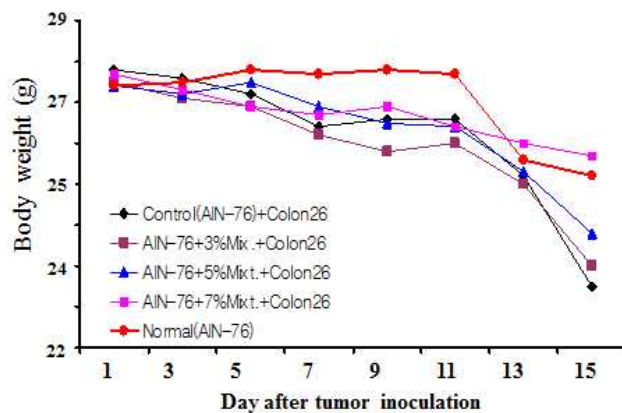


Fig. 16. Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on body weight of colon26 bearing mice  
Natural food materials extract mixture (3% ■, 5% ▲, and 7% ■), (control, ◆), (Normal, ●).

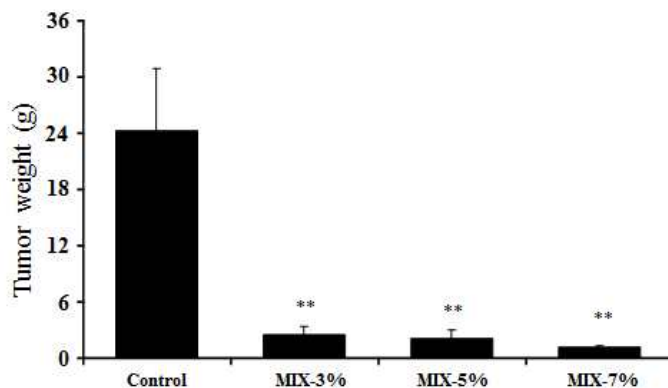


Fig. 17. Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on tumor weight of colon26 bearing mice

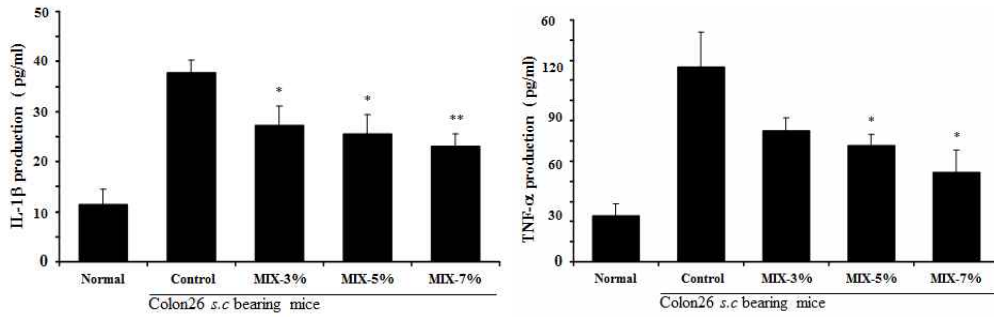


Fig. 18. Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  level of colon26 bearing mice.

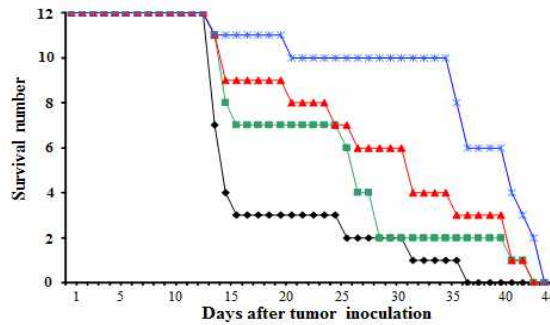


Fig. 19. Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on survival time of colon26 bearing mice.

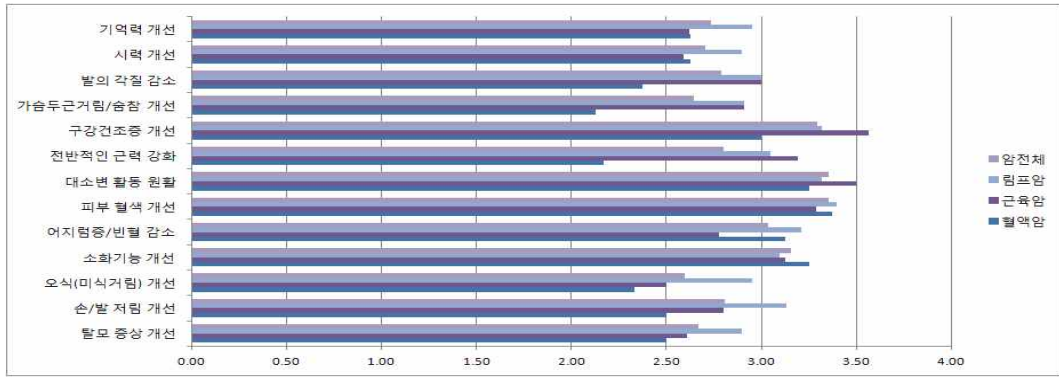
Natural food materials extract mixture (3% ■, 5% ▲, and 7% ×), (control, ◆)

#### 5) 항암치료 후 유병자에 대한 패널 평가

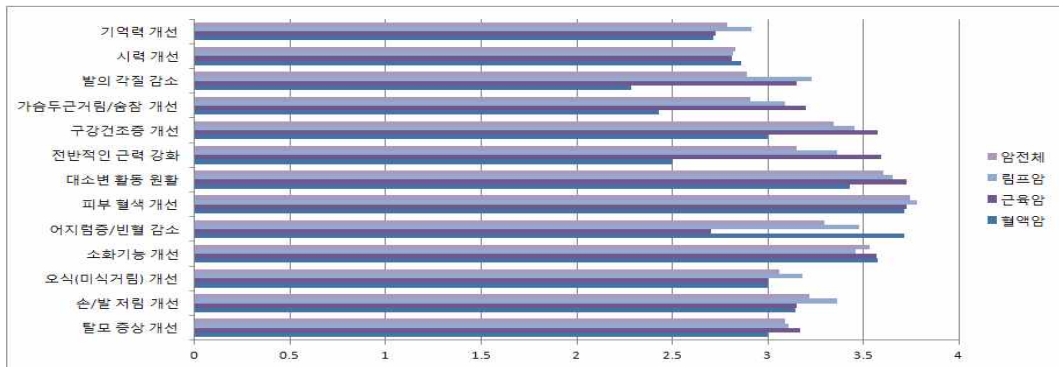
- 가) 항암치료 후 유병자에 대하여 작두콩 추출물을 포함한 천연 혼합 식품 소재를 복용 시 전반적으로 항암치료 후 부작용 증상에 대하여 개선됨을 확인함.
- 나) 피부 혈색 개선에 가장 우수한 결과를 나타내었으며, 대소변 활동 원활, 소화기능 개선에도 우수한 결과를 나타냄.

Table 1. 항암 치료 후 유병자에 대한 패널 평가 결과

항목	전체	여	남
탈모 증상 개선	3.06	2.79	3.42
손/발 저림 개선	3.17	3.11	3.28
오식(미식거림) 개선	3.05	2.78	3.47
소화기능 개선	3.53	3.57	3.65
어지럼증/빈혈 감소	3.35	3.36	3.43
피부 혈색 개선	3.75	3.56	3.98
대소변 활동 원활	3.61	3.55	3.75
전반적인 근력 강화	3.15	2.86	3.45
구강건조증 개선	3.31	3.18	3.48
가슴두근거림/숨참 개선	2.95	2.92	3.16
발의 각질 감소	2.93	2.81	3.05
시력 개선	2.88	2.69	3.22
기억력 개선	2.84	2.72	3.21



〈2주차〉



〈4주차〉

Fig. 20. 항암치료 후 유병자에 대한 패널 평가 섭취 2주차, 4주차 결과

## 6) 지표 성분 분석

가) HPLC-DAD 분석을 통한 작두콩(CGS) 추출물의 지표성분 동정

지표성분으로 확인된 genistin 표준품의 UV spectrum과 머무름 시간이 일치하는 작두콩(CGD) 추출물의 genistin의 패턴을 확인하여 지표성분을 동정하였고, 작두콩(CGS) 추출물의 Genistin 함량은 0.063 mg/g이었음.

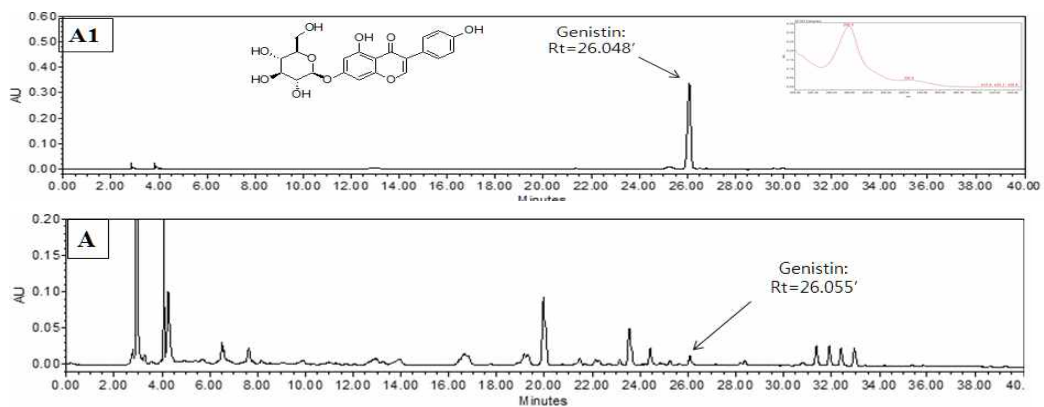


Fig. 21. HPLC chromatograms of standard and extract of *Canavalia gladiata* DC semen.

## 2. 소재의 정보

### 가. 기원 및 개발경위

#### 1) 기원

##### 가) 작두콩 [*Canavalia gladiata*(Jacq.) DC.]

식물도감에 보면 콩과 (Leguminosae) 50속에 해녀콩속 (*Canavalia*) 3종으로 분류되며, 한해살이덩굴성 식물로 6~7월에 꽃이 피고, 8~10월에 열매인 꼬투리를 맺고 늦가을에 열매가 익으며, 열대지방인 동남아와 아프리카에서 야생으로 자라고 있는 *Canavalia virosa* Wight & Am.으로부터 파생된 것으로 추정. 작두콩의 종류로는 꽃과 종실이 흰색인 *Canavalia gladiata*(Jacq.) DC. var. *alba* 와 붉은색인 *Canavalia gladiata*(Jacq.) DC.의 두 종이 있음<sup>Ref 1, 2, 3</sup>.

##### 나) 우엉 [*Arctium lappa* L.]

국화과(Compositae)에 속하는 우엉속(*Arctium*) 식물로서 원산지는 유럽 및 아시아의 온난 지역으로 알려져 있으며, 고대 중국에서도 재배되었고, 현재는 일본에서 많이 재배됨. 생약재로서 성숙한 과실이 우방자라하여 해열, 해독 등의 용도로 사용되었으며, 종자나 잎 부위도 민간에서 이뇨의 목적으로 사용됨. 식품으로는 뿌리를 주로 사용되었으며, 섬유질과 이눌린 형태의 당질이 항산화 및 항염 등의 효과를 나타낸다고 알려짐<sup>Ref 4, 5, 6</sup>.

[출처: 식품의약품안전청, 식품원재료데이터베이스 외]<sup>Ref 7, 8</sup>

원재료명(영문명)	작두콩 ( <i>Canavalia Gladiata</i> fruit extract)	우엉 (Burdock)
생약명	도두	우방자(열매), 우방근(뿌리), 약실경(줄기)
학명	<i>Canavalia gladiata</i> (Jacq.) DC. var. <i>alba</i>	<i>Arctium lappa</i> L
라틴명	Canavaliae semen	Burdock
이명	작두콩	우방근, 약실근, 서점근, 우방자, 약실, 대력자, 우채, 구보, Burdock
식용가능여부	식용가능: 열매 / 불가능: 꼬투리	식용가능: 뿌리, 잎 / 불가능: 씨
용도(사용부위)	식용(열매)	식용(뿌리, 잎)
식용근거	한약재, 민간요법, 논문	한약재, 민간요법, 논문
원산지	충북 진천	충북 제천
주요성분	<i>Canavalia</i> ?????	<i>Arctigenin, Arctiin</i>

#### 2) 개발경위

##### 가) 필요성

면역 관련 기능식품 시장은 1997년 이후로 지속적으로 성장하고 있는 시장으로, 최근 건강기능 식품 개발현황에서 보여지는 바와 같이 국내원료를 활용한 기능성 개발이 증가함에 따라 (Fig. 22) 국내 자생식물인 “작두콩 및 우엉추출물”은 최근 연구를 통해 면역증진에 효능이 있음을 확인한 바 건강기능식품으로 개발 시 사회적, 경제적, 학문적 전 분야에 이바지 할 것으로 판단됨.<sup>Ref 9, 10</sup>

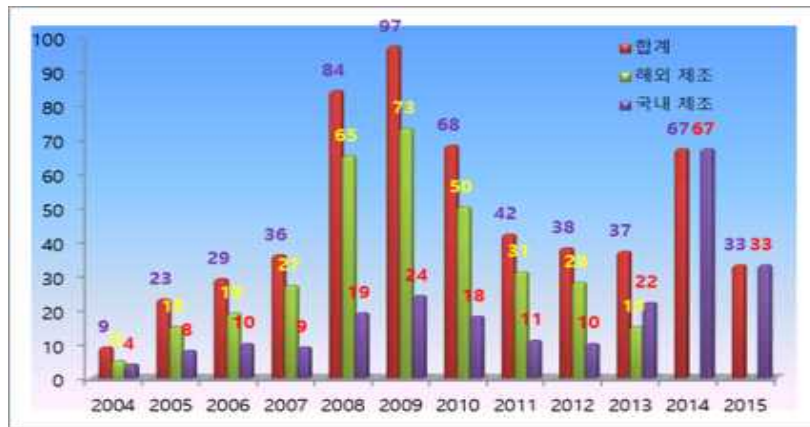


Fig. 22. 건강기능식품 기능성 원료 국내·외 제조 현황(식약처 건강기능식품 통계자료 참고)

(1) 사회적 필요성

- (가) 바이러스성 감염질환이 알려진 이후 1918년 스페인 독감 이후로 괴질이라고 알려진 감염성 질환이 10~40년 주기로 발생했으나, 최근 들어 판데믹 현상이 거의 1~10년 주기로 매우 짧아짐.
- (나) 의학이 발전하고 약품이 발달된 상황에서 빈번한 바이러스 감염 증가로 인해 많은 수의 사망자 발생과 바이러스의 돌연변이가 증가한다는 것, 감염성을 띄는 기간이 짧아졌다는 점 등을 볼 때 이는 외부 환경이나 오염된 물질의 섭취 등으로 인한 인체 내 면역 기능의 저하로 초래하였다고 볼 수 있음.
- (다) 사회가 복잡해지고 생활여건의 인공화와 발전된 산업은 인체의 면역을 떨어뜨려 다양한 질병으로써의 노출을 야기하기 때문에 이에 대응하기 위해 면역증진에 도움을 줄 수 있는 식품 개발이 절실이 필요함.

(2) 학문적 필요성

- (가) 작두콩 및 우엉 추출물은 오랫동안 한약재로 사용되어 왔으며, 최근 두 원료 모두 각각의 원료를 활용하여 항산화, 항염 등 뛰어난 기능성이 확인 된 바 있음.
- (나) 현 진행 된 연구 대부분이 정확한 작용 기전을 밝히는 목적보다는 기초적인 *In vitro*, *in vivo*를 기준으로 한 과학적 결과물로 건강기능식품의 면역증진과 관련된 된 기능성으로 사용되기에는 메커니즘 연구가 매우 부족함.
- (다) 천연물 연구 대부분이 단순 추출물을 활용한 사례들이 많으나 소재혼합 추출물 형태로 원료 개발 함으로써 추후 다른 기능성 원료 개발에 있어 시너지 효과에 대한 실험 메뉴얼로 사용 될 수 있음.

(3) 경제적 필요성

- (가) 국내 고유의 전통 식물을 가지고 과학적 기능성을 밝힘으로써, 식품, 화장품 나아가 의약품 등의 소재로 개발 확대에 기여 할 수 있으며, 이로 인한 경제적 이익을 창출 할 수 있음.

- (나) 식품을 포함한 모든 소재에서 최대한 자국의 원산지로 흡수하려는 세계적으로 흐름에 발 맞추어 국내 소재를 개발함으로써, 자국의 식품 소재에 이바지하고, 농가에는 특약 작물 재배를 통해 고소득을 창출 할 수 있음.
- (다) 면역증진과 관련된 시장은 전세계적으로 성장하고 있는 분야로 작두콩 및 우엉추출물을 면역증진과 관련된 건강기능식품으로 개발 시, 일반 소비자가 안전하게 섭취 및 구매할 수 있다는 장점으로 건강기능식품 시장 활성화를 통한 경제적 이익 창출에 일조할 것으로 기대됨.

#### 다) 우수성

본 연구에서 개발하고자 하는 원료 “작두콩 및 우엉추출물”은, 식품으로써 안전성이 입증 받은 원료로써 최근 다양한 연구를 통해 면역증진에 효능이 있음을 확인한 바 건강기능식품으로 개발 시 일반인 및 환자까지도 식품으로 안전하게 건강을 증진시켜 국민건강에 도움을 줄 수 있으며, 건강식품시장의 확대를 꾀할 수 있음.

##### (1) 전통적 우수성

- (가) 본 연구에서 개발하고자 하는 원료인 작두콩은 전통적으로 종기, 만성신장염, 빈혈, 항균, 항산화, 항당뇨, 조혈 증진 등에 관한 예방효과가 있다고 보고되었으며, 특히 과학적 실험 결과에서도 이와 관련된 효능을 확인함.
- (나) 본 연구에서 개발하고자 하는 원료인 우엉 또한 민간 및 한방에서 이뇨제 등의 목적으로 사용되었으며, 당뇨, 신장질환, 항산화, 항돌연변이 활성, 항염증 등의 효과가 있다고 알려져 있음.

##### (2) 역사문화적 우수성

- (가) 국내 자생식물인 작두콩은 고려시대 왕실에서만 애용하였으나 조선시대 고려 말살 정책에 의해 재배가 금지되기도 했던 토종 작물로 예로부터 민간에서 식용 및 동양 의학에서 다수의 질병을 예방 또는 치료의 목적으로 사용하였으며, 최근에는 이러한 전통적 사용 사례를 기반으로 과학적 연구를 진행하고 있음.
- (나) 본초강목에 따르면 우엉은 오장의 나쁜 사기를 제거하고 손발의 허약함을 치료하며, 중풍, 각기, 머리에 종기, 가래 치료 및 하복부 내장의 통증을 치료한다고 하였으며, 본초비요에서 또한 우엉이 피를 맑게 해주고 열을 내린다고 알려짐. 이를 기반으로 과학적 연구가 다수 진행 됨.

##### (3) 지리적 우수성

- (가) 작두콩은 열대아시아의 해발 1000m이내에서 처음으로 생산되기 시작하여 현재에는 동남아 등 중국, 일본 국내 등에서 생산됨. 본 연구에 사용한 작두콩은 1997년 충북도가 중국 헤이룽장성과 자매결연을 하면서 선물로 받은 작두콩을 가지고 충북도의 종자지원을 받아 본격적으로 생산한 원료임.
- (나) 우엉은 저온에서 잘 견디는 식물이지만 싹이 트려면 20℃ 정도의 온도를 유지해야 하며, 자라는 온도는 25℃정도가 적당하여 국내의 경우 한방의 고장인 충북 제천에서 주로 생산됨.

라) 시대적 요구도

최근 발생한 낙타바이러스인 메르스 등으로 인해 많은 소비자들이 면역과 관련된 식품, 건강기능식품, 의약품 등에 대한 관심이 증가하고 있으며, 게다가 본 연구에서 개발하고자 하는 원료인 “작두콩 및 우엉추출물”은, 최근 면역과 관련 된 기능성이 마스크를 통해 소비자들에게 이슈화됨에 따라 소비자의 니즈가 증가하는 원료임.

단, 현재까지 이와 관련하여 전문적인 결과를 바탕으로 개발한 사례가 없기 때문에 면역증진에 도움을 주는 메커니즘을 규명하고 기능성을 확인 하였을 시, 시장의 니즈를 충족할 수 있는 원료 및 제품으로 성장할 수 있음.

나. 국내·외에서의 인정 및 사용 현황, 기존 섭취량 등에 관한 자료

1) 국내·외 인정현황

가) 국내: 식품 가능 목록에 등재 외 유관 기관에서 인정된 사항 없음.

나) 해외: 해외에서도 인정된 사항 없음 (중국, 일본, 유럽, 미국, 캐나다, 호주 식약처 등).

2) 국내·외 사용현황

가) 건강기능식품: 식품의약품안전처식품안전정보포털 검색결과 국내·외 사용현황 없음.

나) 일반식품: 작두콩 및 우엉 원물을 활용하여 차, 식품 등으로 섭취 (Fig. 23).



Fig. 23. 작두콩 및 우엉 일반식품 활용 사례

다) 의약품: 식품의약품안전처의약품/화장품전자민원창구의 의약품등정보 검색결과 작두콩은 사용현황이 검색되지 않았으며, 우엉은 우방근으로 검색 시 총 4건의 제품 정보 검색 됨 (Fig. 24).



업종분류	-전체-	전문/일반	-전체-	관할청	-전체-
분류번호		주원료검색구분	AND	품목기준코드	
업체명	<input type="text"/>	주원료명1	우방근	주원료명2	<input type="text"/>
제품허가번호	<input type="text"/>	제품명	<input type="text"/>		

총 4 건이 조회되었습니다.

제품명	업체명	허가일	업종	허가번호	품목기준코드	전문/일반	품목분류	허가/신고	
나눔우방근	나눔제약(주)	2011-09-16	피약품	5133	201106607	한약재	기타의 조제용약	신고	제
옥천당우방근	(주)옥천당	2011-12-26	피약품	194	201112044	한약재	기타의 조제용약	신고	제
퓨어마인드우방근	주식회사퓨어마인드농업회사법인	2012-05-16	피약품	455	201204734	한약재	기타의 조제용약	신고	제
한약인우방근	한약인 주식회사	2015-04-14	피약품	219	201502121	한약재	기타의 조제용약	신고	제

Fig. 24. 우영 (우방근) 의약품 사용 사례

라) 해외의 경우 작두콩을 활용한 의약품 및 식품은 확인되지 않았으나, 우영의 경우 프랑스 제약 전문업체 등에서 피토테라피 용도로 앰플, 캡슐 등 다양한 제형 제품이 판매되고 있음 (Table 2). 또한 이와 관련하여 원물에 대한 영양성분을 분석하기도 하였으며, 인슐린 대사, 지사제, 혈당 감소, 체중 조절, 콜레스테롤 조절 등 다양한 부분에 활용됨 (Table 2).

Table 2. 해외에서 우영 원료를 활용한 제품 개발 사례

제조사/제품명	제품사진	용량 (섭취량)	기능성	비고
Solaray Solaray Burdock Root (미국)		100capsule (1cap/3회/1 일)	대사기능개 선, 발한, 능 이뇨 등	425mg
Best Naturals Burdock Root (미국)		180capsule (2cap/2~3회 /일)	간 건강, 면역건강	425mg
HawaiiPharm Burdock (Arctium Lappa) Liquid Extract Tincture (미국)		4Oz (20~30 drop/ 3회/일)	허브 티	차, 음료로 섭취


Burdock 200 tablets (프랑스)		Organic Burdock 200 tablets (2~3정/일)	식이조절	400mg/ 1T
------------------------------	---	---	------	--------------

Table 3. 우영 원료에 대한 영양소 분석 자료 (출처: www.nutrition-and-you.com)

Principle	Nutrient Value	Percentage of RDA
Energy	72 Kcal	3.5%
Carbohydrates	17.34 g	13%
Protein	1.53 g	3%
Total Fat	0.15 g	<1%
Cholesterol	0 mg	0%
Dietary Fiber	3.3 g	8%
<b>Vitamins</b>		
Folates	23 µg	6%
Niacin	0.300 mg	2%
Pantothenic acid	0.321 mg	6%
Pyridoxine	0.240 mg	18%
Riboflavin	0.30 mg	2%
Thiamin	0.010 mg	1%
Vitamin A	0 IU	0%
Vitamin C	3 mg	5%
Vitamin E	0.38 mg	2.5%
Vitamin K	1.6 µg	1%

<b>Electrolytes</b>		
Sodium	5 mg	<1%
Potassium	308 mg	6.5%
<b>Minerals</b>		
Calcium	41 mg	4%
Iron	0.80 mg	10%
Magnesium	38 mg	9%
Manganese	0.232 mg	10%
Phosphorus	51 mg	7%
Selenium	0.7 mg	1%
Zinc	0.33 mg	3%
<b>Phyto-nutrients</b>		
Carotene-α	0 µg	--
Carotene-β	0 µg	--
Crypto-xanthin-β	0 µg	--
Lutein-zeaxanthin	0 µg	--

Burdock root (A.lappa), raw, Nutrition value per 100 g  
(Source: USDA National Nutrient data base)

#### 다. 기능성 원료의 제조방법 및 그에 관한 자료

##### 1) 제조 공정도 & 제조 설명

##### 가) 작두콩 (70% 주정 추출)

(1) 수율: 원물 100kg 기준 9.8% (농축 과정까지)



Fig. 25 작두콩 추출물의 제조 공정도

- (2) 작두콩은 단단하여 pin-mill을 이용한 분쇄가 불가하여 Knife hammer mill을 이용 조분쇄 후, 상수를 첨가하여 팽윤, 연화시킨 후 colloid mill로 2회 순환하며 미분쇄함.
- (3) 잔사를 분리하기 위해 3,800rpm 연속 원심분리기(데칸터), 7,800rpm 연속원심분리기(알파라발)로 직렬 원심분리하여 겉보기에는 청징하지만 분리액 1.5ml \* 13,000rpm 분리 시험 결과, 상기의 사진에서와 같이 그 침전비율이 0.1~0.2%(v/v)임.
- (4) 70%주정추출물은 동결건조 과정에 약 3배로 불규칙 팽윤되고 건조물의 Pin-mill 분쇄가 불가능할 뿐만 아니라 Tray 바닥에 불완전 건조물이 생성됨(최종 건조물 분쇄 불가).
- (5) 주정 추출농축액은 느끼하면서도 감칠맛과 단맛이 있고 거품이 과량 발생하고 분무건조 불가함(기벽 흡습 부착).

나) 우영 (70% 추정)

(1) 수율: 원물 100kg 기준 39.4% (동결건조 과정까지)



Fig. 26. 우영추출물의 제조 공정도

(2) 추출 잔사의 무게는 2.7배 증가하지만 부피는 1/2로 감소함.

(3) 추출액은 75µm, 1µm cartridge 필터 직렬 여과에 의해 청징하고 그 농축액도 100Mesh screen Pass가 용이, 추정 추출농축액은 단맛이 강하고 거품이 과량 발생, 분무건조는 불가함(기벽 흡습 부착).

#### 라. 원료의 특성에 관한 자료

1) 원료의 물리화학적 성질

가) 작두콩: 페일 골덴로드색의 분말

나) 우영: 위트색의 분말

2) 원료의 기능성분 (또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험 방법에 관한 자료

가) 작두콩

(1) 기능성분 (또는 지표성분): 분석중

(2) 시험방법: 확립 중

나) 우영

(1) 기능성분 (또는 지표성분): Arctigenin, Arctiin

(2) 시험방법: II. 원료의 표준화 부분에서 상세 설명함.

#### 마. 안전성 및 그에 관한 자료

- 1) 섭취근거자료
  - 가) '1. 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료' 참조
  - 나) 상기 "1. 기원 및 개발경위" 참조
- 2) 독성시험자료
  - 가) 식품데이터베이스 상, 섭취 가능한 식물 부위이며, 열수추출이기 때문에 독성검사 필요 없음.

#### 바. Reference

- 1) Lim, T.K. *Canavalia gladiata*. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. 569-576 (2011)
- 2) Kim, U.S., Kim, J.Y., Kim, S.J., Moon, K.H and Baek, S.H. Isoflavonoid contents, antibacterial activities, and physiological activities of cheonggukjang made from Sword bean. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 41, 174-181 (2012)
- 3) Vadivel, V., Doss, A and Pugalenth. Evaluation of nutritional value and protein quality of raw and differentially processed Sword bean. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*. 10, 2850-2865 (2010)
- 4) Major characteristics of Burdock (*Arctium lappa* L.) Native to yeong-nam region. *Korean Journal of Plant Resources*. 16, 8-14 (2003)
- 5) Im, D.Y and Lee, K.I. Antioxidative activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions from *Arctium lappa* roots and analysis of phenolic compounds. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 45, 141-146 (2014)
- 6) Duh, P.D. Antioxidant activity of Burdock (*Arctium lappa* Linne): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 455-461 (1998)
- 7) 식품원재료 DB
- 8) 원산지 증명서
- 9) 김정원. 식품의 면역조절 및 면역력 강화관련 특허 동향. 한국 보건산업진흥원 (2011)
- 10) 면역질환치료 개발 현황과 동향. 한국과학기술정보연구원
- 11) Kim, S.H., Kim, K.H., Chi, G.Y., Cho, I.S., Kim, H.Y and Lee, Y.C. Enhancing effect of *Canavalia gladiata* DC semen on the hematopoietic expansion and function of stem cells. *The Korea Journal of Herbology*. 27, 9-16 (2012)

### 3. 연구 이론적, 실험적 접근 방법

#### 가. 소재의 기작 및 효능 성분 규명

##### 1) 주요 바이오 마커

면역 증진 건강 기능성을 확인하기 위한 바이오마커별 측정 가능한 시험연구 유형은 다음과 같음.

Table 4 면역기능 증진 기능성 확인을 위한 바이오 마커

기전	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Human
선천면역	NK세포		○	○
	싸이토카인 (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12)	○	○	○
	탐식능	○		
	NO	○	○	
	iNOS	○		
	COX	○		
	보체계		○	○
적응면역	싸이토카인 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13)	○	○	○
	림프구 아집단 비율	○	○	○
	면역글로블린		○	○
공통	세포 생존율	○		
	비장세포 증식		○	
	조직무게(비장, 흉선)		○	

##### 2) 주요 바이오 마커 개요

###### 가) 세포 생존율

면역세포의 수가 증가할수록 면역기능 증진을 의미함

###### 나) NO(Nitric oxide)

NO는 대식세포의 iNOS(Inducible nitric oxide synthase)효소의 작용에 의하여 생성됨. 생성된 NO는 포식된 미생물 (병원체) 구성분자들의 변형과 Fe-S를 함유하는 효소의 작용을 억제시켜 항 미생물 작용을 나타냄. 또한 NO는 활성화된 대식세포나 호중구들로부터 분비되어 세포의 병원체들을 사멸시킴

###### 다) iNOS(Inducible nitric oxide synthase)

iNOS는 L-arginine을 산화시켜 L-citrulline과 NO를 생성함. iNOS는 거의 모든 세포에서 싸이토카인 등의 자극으로 발현됨.

###### 라) COX2(Cyclooxygenase-2)

COX2는 arachidonic acid를 prostaglandin E2(PGE2)로 전환시키는 효소로, 염증이나 면역자극에 의해 발현됨. 각종 싸이토카인 성장인자 등에 반응하여 유도되어짐.

###### 마) 탐식능(Phagocytosis)

탐식능은 식균작용 이라고도 하며 세균이나 이물질을 제거하기 위해 백혈구 등과 같

은 대식세포가 탐식하는 작용임. 대식세포는 다양한 분자물질에 대한 수용체를 갖고 있으며 이 수용체는 리간드들과 미생물을 만났을 때 상호반응을 일으켜 병원체에 탐식능을 증진시킴.

바) 싸이토카인 (Cytokine)

싸이토카인은 세포사이의 신호전달을 매개하는 단백질로서 인터루킨(Interleukin: IL), 인터페론(Interferon: IFN), 종양괴사인자(Tumor necrosis factors: TNF) 등이 있음. 주로 활성화된 대식세포나 림프구에 의해 생성됨. T<sub>H1</sub>보조 T림프구에서 분비되는 싸이토카인의 종류는 IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  등이 있으며, 이들은 염증성 싸이토카인으로서 세포독성을 나타내며, 세포매개성 면역반응에 관여함.

사) 림프구 아집단 비율

림프구는 조혈모세포가 림프구계 조혈 모세포로 분화 성숙하여 만들어지는 백혈구로서 크게 B림프구, T림프구, NK세포로 나누어짐. T림프구와 B림프구 및 그들 아집단의 구별은 전자현미경에 의한 관찰까지도 포함하여 형태학적으로는 곤란함. 이들의 구별은 각각의 세포들에 특징적인 세포표면 표지자(CD: Cluster of Differentiation)의 항체를 이용함으로써 가능함.

Table 5. 대표적인 림프구 표면 표지자

구분	표면 표지자(CD)
NK 세포	CD3, CD56, CD16, CD94, CD161 등
B 림프구	CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD40 등
T 림프구	CD3
보조 T림프구	CD4
세포독성 T림프구	CD8

아) 조직무게 (비장 흉선)

면역기능 관련 조직으로는 비장, 흉선이 있음. 비장은 림프구 생성, 흉선은 T림프구 분화 및 성숙에 관여하는 조직임. 비장 흉선 조직의 무게는 면역 관련 조직의 체계적 영향을 보기 위해 측정함.

자) 비장세포 증식

비장은 림프구를 만들고 노쇠한 적혈구를 파괴하는 조직임. 시험물질을 섭취한 실험동물에서 분리한 비장세포의 수가 증가할수록 면역기능이 개선됨을 의미함.

차) 면역글로불린 (Immunoglobulin: Ig)

항체의 기능을 갖는 체액성 면역의 주된 역할을 하는 혈청단백질로 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM로 구분됨. 면역기능 증진 기능으로 주로 측정되는 면역글로불린은 IgA, IgG, IgM이다. IgA은 혈청중의 면역글로불린의 약 20%를 차지하고, 타액, 상기도 분비액 등 점액에 존재하여 점막의 감염방어에 관여함. IgG는 4개의 아집단 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4으로 나뉘지며, 독소나 바이러스의 중화, 침강, 응집반응 등에 관여함. IgM은 보체결합성이 있으며, 응집 반응성이 높음. 면역글로불린(IgA, IgG,

IgM) 의 증가는 면역기능 증진을 의미함.

카) 보체계 (Complement)

보체는 혈액, 림프액 속에 함유된 단백질이다. 보체는 면역학적 특이성이 없고 항원과 항체의 복합체에 결합하여 용혈, 용균작용을 하여 물리적 장벽을 통과한 세균과 항원들을 제거함. 보체는 20개 이상의 단백질로 구성되어 있으며, 주로 C3, C4, C5를 측정함. 보체의 활성화는 대식세포나 림프구의 활성화 및 면역기능 증진과 같은 다양한 면역반응과 관련되어 있음.

타) NK세포

NK세포는 선천면역을 담당하는 혈액 속 백혈구로 바이러스에 감염된 세포 또는 스트레스 받은 세포를 인식하여 직접 죽이거나 염증성 싸이토카인을 분비하여 죽이는 세포임. NK세포 활성 변화를 통해 면역기능 증진 여부를 판단할 수 있음.

3) 주요 시험 방법 개요

가) *In vitro* 시험

(1) 세포 생존율

세포 생존율을 측정하기 위해 MTT법 등을 이용하여 측정

(2) NO(Nitric oxide)

대식세포를 시험물질과 함께 배양한 후 배양 상층액을 griess reagent와 혼합하여 흡광도 측정

(3) iNOS(Inducible nitric oxide synthase)

iNOS는 RNA를 추출하여 PCR법 등을 이용하여 측정

(4) COX2(Cyclooxygenase-2)

단백질 전기영동법 PCR 등을 이용하여 측정

(5) 탐식능

대식세포를 RPMI-1640에 *C. albicans*와 함께 넣고 배양 후, 탐식된 세포 개수의 비율로 측정

(6) 싸이토카인(Cytokine)

ELISA, PCR 등을 이용하여 측정

(7) 면역글로블린

세포 배양 상층액을 ELISA 등을 이용하여 측정

(8) FcεRI 및 FcεRI의 아형

시험물질 처리 후 RNA를 추출하여 PCR법을 이용하여 측정

(9) 프로스타글란딘/루코트리엔/히스타민

세포 배양 상층액을 ELISA를 이용하여 측정

나) 동물 시험

(1) 조직무게

적출한 부신, 비장의 무게를 측정

(2) 비장세포 증식

실험동물의 비장을 분리한 후, 단일세포 부유액을 만들어 시험물질 첨가 후 세포



- 증식 측정
- (3) 면역글로블린  
실험동물의 혈액을 이용하여 ELISA 등을 이용하여 측정
- (4) 보체계  
보체계는 Nephelometry, CH<sub>50</sub>등을 이용하여 측정
- (가) Nephelometry  
혈청의 보체의 측정은 Latex응집반응을 응용하여 면역 화학 분석 장치를 이용한 광학적 측정법으로 시행
- (나) CH<sub>50</sub>  
용혈소(hemolysin)로 감작시킨 일정량의 회석혈청을 가한 후, 반응시켜 감작된 면양 적혈구 50%를 용혈시키는데 필요한 혈청의 양을 측정
- (5) NO(Nitric oxide)  
균질화된 조직 상층액 중에 존재하는 NO<sup>2-</sup>의 형태로서 griess reagent를 이용하여 측정
- (6) 싸이토카인(Cytokine)  
균질화된 조직 상층액이나 혈액을 ELISA, PCR 등을 이용하여 측정
- (7) 림프구 아집단 비율/ NK세포  
FACS (Fluorescence-activated cell sorting)등을 이용하여 측정
- (8) FcεRI 및 FcεRI의 아형  
실험동물에서 적출한 조직을 PCR, 면역조직 화학적 검색 등을 이용하여 측정
- (9) 프로스타글란딘/루코트리엔/히스타민  
실험동물의 혈액이나 조직 분쇄액을 이용하여 ELISA 등을 이용하여 측정
- (10) 비만세포 수  
폐, 비장, 소장 등의 조직을 염색하여 현미경 관찰
- (11) 비만세포 탈과립률  
세포윤곽이 불분명하고 세포질 내 과립들이 세포표면으로 돌출되거나 세포주위에 흩어져 있는 탈과립형 세포의 수를 비율로 측정
- (12) MHC class II  
FACS (Fluorescence-activated cell sorting)등을 이용하여 측정
- (13) 호산구, 호중구, 총 백혈구, 단핵백혈구 및 림프구 수  
혈액자동분석기를 이용하여 호산구 호중구 총 백혈구 단핵백혈구 및 림프구 계수

## 나. 소재의 원료 표준화

- 1) Lab 수준에서의 추출법 확인
- 2) 대량 추출기기를 이용한 최소 단위 대량 추출
- 3) 여러 회 추출 및 각 추출에 따른 지표물질 및 프로파일 검사를 통한 추출법 확립
- 4) 위해물질 검사 및 안전성 확보
- 5) 대량 추출을 위한 원물 확보

## 다. 소재의 안전성 확보

- 1) 작두콩은 식품의약품안전처 고시 제2015-4호 식품의 기준 및 규격 (2015. 2. 3 )  
〔별표 1〕 “식품에 사용할 수 있는 원료”의 목록에 기재된 원료로서 본 과제에서는 물추출 또는 주정을 이용한 추출법을 사용할 계획이므로 독성시험 자료가 필요하지 않음.
- 2) 안전성 필요 자료
  - 가) 섭취 근거 자료
  - 나) 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료
  - 다) 섭취량평가자료

## 라. 인체적용 시험을 통한 효능 검증

- 1) 시험대상 선정  
면역기능의 주요 지표인 혈중 백혈구 수가 정상범위 중 낮은 범위에 속하거나 정상범위보다 다소 낮은 자 등 질병을 가지지 않은 사람
- 2) 시험 설계  
무작위배정 위약대조연구(Randomized, Controlled Trial; RCT)를 기본으로 함
- 3) 바이오마커 설정  
한 가지 지표의 변화가 아닌 추측 작용기전에 관여하는 일련의 바이오마커의 변화를 함께 확인하여야 함
- 4) 통계처리  
시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 판정함

## 마. 개별인정형 신청 접수

- 1) 개별인정을 위한 자료 취합: 안전성, 생체유용성, 기능성 자료 제출
- 2) “면역 기능 증진에 도움을 줄 수 있음” 생리활성기능 2등급 인정 목표

## 바. 제형 개발 및 제품화

- 1) 선정된 소재에 적합한 제형 연구 및 개발
  - 가) 섭취용이성을 고려한 제형의 다양화
  - 나) 과립제, 산제, 정제, 캡슐제, 내용액제, 환제, 엘릭실제 등 다양한 제형 검토
- 2) 안정성 확보를 위한 제형 연구
  - 가) 적절한 부형제 등의 처방을 통한 함량 및 보관 안정성 확보
  - 나) 식품첨가물을 적용하여 효능의 극대화 및 안정성 확보
- 3) 양산화 공정 확립
  - 가) 대량 재배 및 원료 수급 방안 수립
  - 나) 대량 원료화 방안 수립
  - 다) 품질관리 기준 확립

#### 4. 연구 방법

##### 가. 주요 소재 관련 자료 조사

###### 1) 소재의 기원 및 개발경위

가. 언제, 어느 나라에서, 어떤 경위로 개발되었는지 자료 조사

나. 기원, 학명, 원산지, 사용부위 등

###### 2) 국내·외 인정·허가 현황

가. 국내·외 및 국제기구에서의 인정·허가 상황, 사용 기준·규격 등의 관련 내용

나. 국제기구에서 검토 중인 경우는 안전성 평가 상황 및 사용기준, 규격 등 관련 내용을 조사

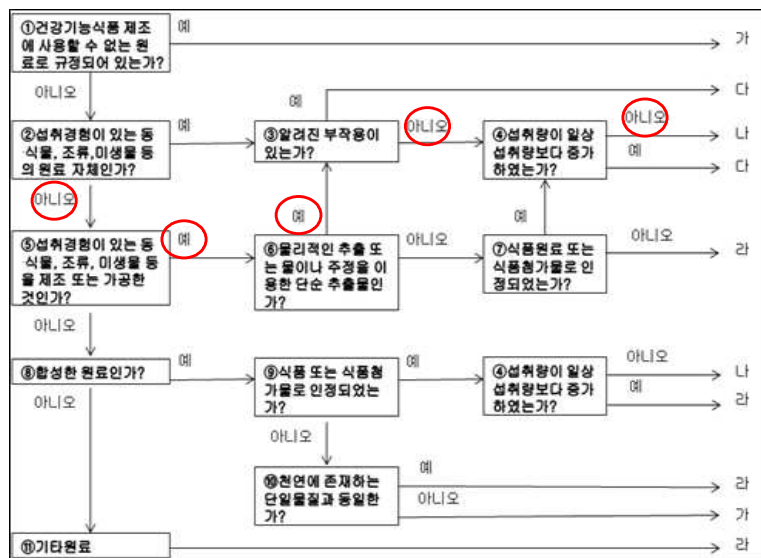
###### 3) 국내·외 사용현황

가. 국내·외에서 식품 등으로 사용실적이 있는 경우 사용용도, 유통량, 제조회사, 섭취실태 등에 관한 자료

###### 4) 섭취량 평가 자료

##### 나. 원료의 안전성 확보

1) 작두콩은 식품의약품안전처 고시 제2015-4호 식품의 기준 및 규격 (2015. 2. 3 ) [별표1] “식품에 사용할 수 있는 원료”의 목록에 기재된 원료로서 본 과제에서는 물추출 또는 주정을 이용한 추출 방법을 사용할 계획이므로 독성 시험 자료가 필요하지 않음.



제출되어야 하는 안전성 자료	가	나	다	라
건강기능식품으로 신청할 수 없음	✓			
섭취 근거 자료		✓	✓	✓
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료		✓	✓	✓
섭취량평가자료		✓	✓	✓
영양평가자료, 생물학적 유용성자료, 인체적용시험자료			✓	✓
독성시험자료				✓

< 「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정」에 따라 제출되어야 하는 안전성 자료의 범위>

Fig. 27. 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도

2) 작두콩은 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도에서 “나”에 해당 되므로 제출해야하는 자료는 다음과 같음

가) 섭취 근거 자료

나) 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료

다) 섭취량평가자료

**다. 원료 제조 및 제조 방법 확립**

1) 원료 추출법의 표준화 및 과제 진행을 위한 원료 추출/공급

2) 원료화를 위한 대량 추출방법 확립

**라. 인체 효능의 검증**

Table 6. 건강기능식품 기능성 검증을 위한 자료 요건

기능성 내용에 관한 자료	가. 기능성 내용 해당 원료의 섭취로 얻어지는 보건용도에 유용한 효과를 기재 한다.
	나. 기능성에 관한 자료는 인체적용시험, 동물시험, 시험관 시험, 총설(review), 메타분석(meta-analysis), 전통적 사용 근거자료 등을 사용할 수 있다. (1) 해당 원료의 인체에서 기능성을 확인하기 위해서는 중재 시험(intervention study) 또는 관찰시험(observational study) 등의 인체적용시험 자료를 제출하여야 한다. (2) 인체적용시험 결과를 과학적으로 뒷받침하기 위해서는 동물 시험, 시험관시험 등의 기반 연구 자료를 제출하여야 한다. (3) 두 가지 이상의 원재료를 혼합한 경우에는 혼합된 원료로서 기능성이 입증되어야 하며, 타당한 혼합 사유 및 그 과학적 근거가 제출 되어야 한다.
	다. 기능성 자료는 국제 임상시험관리기준(Guideline for Good Clinical Practice by International Conference on Harmonization, ICH GCP)에 따라 연구윤리심사위원회의 승인을 받은 인체적용 시험계획에 의해 수행된 인체적용시험의 최종보고서 또는 국내·외 학술지에 게재된 것(게재증명서 포함) 이어야 한다.

인체적용시험 명칭		안전성, 기능성 평가를 위한 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조 인체적용시험
대상 피험자	인원 수	100명 (2개군-시험군, 대조군)
	선정 기준	말초혈액 백혈구 수치가 $3 \times 10^3$ 이상 $\sim 8 \times 10^3$ cells/ul 미만 인 건강한 성인 등
	제외 기준	질환자 등
시험기관 및 수		대학 또는 대학 부속병원 1처
기간	과제기간	17개월
	시험기간	10개월
	섭취기간	8주
인체적용시험 디자인		단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조시험
위약 및 시험식품의 공급		동일포장, 인체적용시험용 제품이라는 라벨, 무작위 배정에 의한 라벨 등

Fig. 28. 인체 적용 시험 개요

번호	항목	예상 기간(m)	예상 일정	내용
1	Contract for CRO			인체적용시험 CRO 계약 체결
2	Project Setup	1	-	제공된 자료 검토 전략 수립 시험 디자인 연구자/연구기관 선정 프로토콜/CRF 등 개발
3	IRB Submission/Approval (Protocol)	2	-	다기관인경우 다기관 신청 수정/변경은 별도 기간 소요
4	Initiation Activities	1	-	피험자 모집 방안 등 제반 준비 인체적용시험식품 제조 인체적용시험기관 계약 인체적용시험 study material 제작 등 인체적용시험 개시 모임
5	Study Stage	10		등록기간 : 8 개월 섭취기간 : 8주 모니터링
6	Data Management	1	-	DB 구축, 코딩 등
7	Statistical Analysis	1	-	통계분석 및 표/그림 제작
8	Clinical Study Report	1	-	결과보고서 작성 및 연구자 고찰 삽입
9	IRB Submission (CSR)	1		다기관인경우 다기관 신청 수정/변경은 별도 기간 소요

Fig. 29. 예상 일정 계획

### 3) 시험 설계 기준

#### 가) 시험대상 선정

면역기능의 주요 지표인 혈중 백혈구 수가 정상범위 중 낮은 범위에 속하거나 정상범위보다 다소 낮은 자 등 질병을 가지지 않은 사람

#### 나) 시험 설계

무작위배정 위약대조연구(Randomized, Controlled Trial; RCT)를 기본으로 함

#### 다) 바이오마커 설정

한 가지 지표의 변화가 아닌 추측 작용기전에 관여하는 일련의 바이오마커의 변화를 함께 확인하여야 함

#### 라) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 판정함

### 4) 주요 바이오마커

#### 가) NK 세포

NK 세포의 분석은 FACS(유세포분석)를 이용해서 수를, 세포독성 활성법을 이용해서 활성 등을 이용하여 측정

##### (1) 유세포분석(fluorescence-activated cell sorting; FACS)

대상자의 Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)를 분리해서 fluorescence-activated cell sorting (FACS)를 이용하여 측정. 분리한 PBMC를 용기에 넣고, staining buffer로 washing 후에 첫 번째 항체를 붙이고, 다시 washing 후 형광물질이 붙어있는 두 번째 항체(CD3, CD16)을 부착. FACS staining 후, 유세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 형광도를 측정.

##### (2) 세포독성 활성법

대상자의 분리된 PBMC(effector cell, E)와 NK 세포에 대한 감수성이 높은 K562 (target cell, T)을 E/T 비율이 10:1 - 5:1 의 다양한 농도로 조정하여 배양. 이때 사멸능은 MTT법을 이용한 세포활성능을 측정.

#### 나) 싸이토카인

싸이토카인의 양은 ELISA 등을 이용하여 분석. ELISA법은 항체를 coating 용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4°C에서 overnight 함. 각 well을 washing 용액으로 세척한 후 대상자의 혈액을 분주. 실온에서 방치한 다음 washing 용액으로 세척하고, antibody Avidin-HRP conjugated를 처리. 실온에서 방치 및 세척한 다음, TMB 기질을 분주하여 어두운 곳에서 방치한 후 stop 용액을 넣고 흡광도를 측정.

#### 다) 보체계

보체계는 Nephelometry, CH<sub>50</sub> 등을 이용하여 측정.

##### (1) Nephelometry

혈청의 보체의 측정은 Latex 응집반응을 응용하여 면역 화학 분석 장치를 이용

한 광학적 측정법으로 시행. 항 보체의 항체를 polyethylen latex 입자에 감작시켜 제조된 latex 시약과 검체를 cell내에서 혼합 반응시키면 latex 입자에 감작시킨 항 보체 항체와 검체중의 보체가 반응하여 latex 응집반응이 일어남. 이상의 응집반응을 nephelometry 분석장치를 이용하여 파장 660nm에서 탁도(산란광강도) 변화량을 측정.

(2) CH<sub>50</sub>

용혈소(hemolysin)로 감작시킨 일정량의 면양적혈구에 환자의 회석혈청을 가한 후, 일정조건에서 반응시켜 감작된 면양적혈구 50%를 용혈시키는데 필요한 혈청의양을 구함.

라) 림프구 아집단 비율

림프구 아집단 비율은 대상자의 Peripheral blood mononuclear cells(PBM)를 분리해서fluorescence-activated cell sorting(FACS) 등을 이용하여 측정. FACS법은 분리한 PBMC를 용기에 넣고, staining buffer로 washing 후에, 첫 번째 항체를 붙이고, 다시 washing후 형광물질이 붙어있는 두 번째 항체(CD3, CD4, CD8 등을 부착. FACS staining 후, 유세포 분석기(Flow cytometry)를 이용하여 형광도를 측정.

마) 면역글로불린

면역글로불린의 양(IgG, IgM, IgE)은 ELISA 등을 이용하여 분석. ELISA법은 항체를coating용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4℃에서 overnight함. 각 well을 washing 용액으로 세척한 후 대상자의 혈액을 분주함. 실온에서 방치한 다음 washing 용액으로 세척하고, antibody Avidin-HRP conjugated를 처리. 실온에서 방치 및 세척한 다음, TMB 기질을 분주하여 어두운 곳에서 방치한 후 stop용액을 넣고 흡광도를 측정.

바) 프로스타글란딘루코트리맨히스타민

프로스타글란딘, 루코트리엔, 히스타민의 양은 ELISA 등을 이용하여 분석. ELISA법은 항체를 coating 용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4℃에서 overnight함. 각 well을 washing 용액으로 세척한 후 대상자의 혈액을 분주. 실온에서 방치한 다음 washing 용액으로 세척하고, antibody Avidin-HRP conjugated를 처리. 실온에서 방치 및 세척한 다음, TMB 기질을 분주하여 어두운 곳에서 방치한 후 stop용액을 넣고 흡광도를 측정.

사) 호산구, 호중구, 총백혈구, 단핵백혈구 및 림프구 수

혈액자동분석기를 이용하여 호산구, 호중구, 총 백혈구, 단핵백혈구 및 림프구를 계수함.

**마. *In vitro*, *In vivo* 효능의 검증**

1) 세포독성 테스트를 이용한 소재조합 추출물의 *in vitro* 처리

가) 여러 세포에서 소재조합 추출물을 농도별로 처리한 세포현탁액 5X10<sup>5</sup>/ml을 96 시간 동안 배양한 후 세포사의 정도를 MTT방법과 trypan blue exclusion 방법을 이용하여 측정하고 EC50 값을 구함.

나) 이후 모든 *in vitro* 실험에서 세포독성이 없는 소재조합 추출물 농도를 처리함.

2) 소재조합 추출물의 *in vivo* 처리

가) KFDA 의약품등의 독성시험기준을 바탕으로 한국화학융합시험연구원에 의뢰 급성 경구투여 독성/안정성시험 실시 후 소재조합 추출물의 최적 *in vivo* 투여조건을 확립함.

나) WT 마우스에 소재조합 추출물을 20ug/100ul, 100ug/100ul, 500ug/100ul의 농도로 총 3주간 경구투여한 후 마우스의 일반증상관찰(사망 및 특이사항), 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 부검 시 장기별 중량측정 및 육안검사를 실시하여 무독성의 최적의 투여용량을 정하여 *in vivo* 투여조건으로 정함.

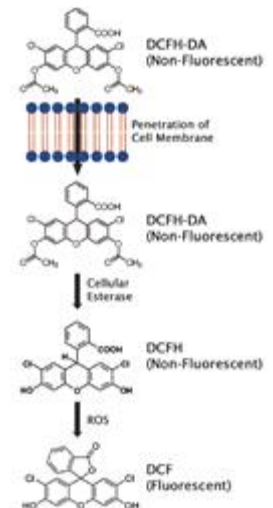
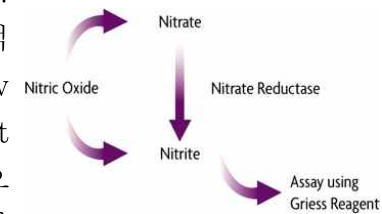
3) ROS(Reactive oxygen species) 및 NO 측정

가) 세포내 redox를 측정하기 위하여 Carboxydichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 사용하는데 DCFH-DA는 비극성 화합물로서 세포에 침투 후 세포내 esterase에 의하여 막 비투과적 non-fluorescent polar 유도체로 전환이 되어짐.

이렇게 전환된 DCHF는 연차적으로 세포내 hydrogen peroxide에 의하여 fluorescent 2', 7'-dichlorofluorescein으로 산화되어짐. 세포내에서 산화

되어진 DCF는 polyphenol을 처리 후 510nm에서 FACSscan(Becton Dickinson, Mountain View, CA)로 측정이 되어짐.

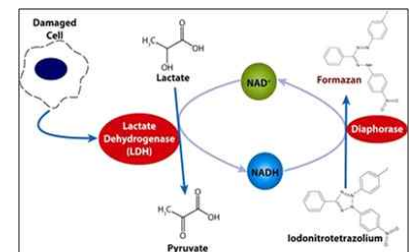
나) NO의 측정은 세포배양액과 동량의 Griess reagent[1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphthylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid]를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정함.



4) 세포독성능 분석(51Cr release assay 및 LDH-release assay)

가) 세포에서 후보물질에 의한 NK 세포독성을 알아보기 위해 후보 물질을 24시간 동안처리하고, NK 세포를 배양.

나) 표적 세포와 recombinant IL-2로 자극한 활성화된 NK 세포와 1:10, 1:2, 1:0.4 등의 비율로 섞어 반응시키고 4시간 후 NK 세포에 의한 암 세포의 specific lysis 비율을 51Cr release assay 또는 LDH-release assay를 이용하여 분석함.



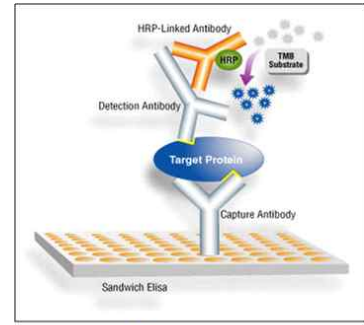
5) 효소연결 분석실험(ELISA)를 이용한 IgA 생성 측정

가) IgA 생성 측정변화를 알아보기 위해, 마우스 혈청을 96well plate에 넣고 1시간동안 코팅한 후 물로 세 번 세척을 함. blocking buffer로 모든 well에 가득넣고 1시



간동안 반응함. 물로 세 번 세척한 후 염증관련 항체를 1시간동안 반응 시킨 후 HRP conjugated 된 항체를 1시간동안 반응 시킴.

나) 물로 세 번 세척 후 기질반응 용액을 넣은 다음 30분 간 반응시켜 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정함.



Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

#### 6) 세포 증식능 분석(cell proliferation assay)

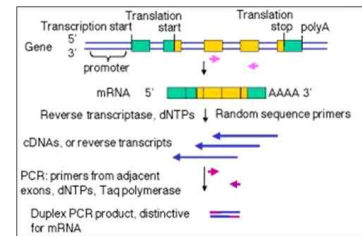
가) 세포의 증식능력을 알아보기 위해, 세포 (5X10<sup>4</sup>cells)를 96well plate에 seeding 하고 식품소재를 농도별로 처리함.

나) 72시간동안 배양 후 Cell Titer 96 AQueous NON-Radioactive cell proliferation assay (Catalog. No.G5430)의 MTS(1 ml)+PMS(50 μl)를 25 μl/well 처리한 후 OD490nm에서 흡광도를 측정하여 세포 증식능을 분석함.

#### 7) 유전자 발현 분석

가) 유전자 발현을 확인하기 위해서, 각 세포로부터 RNAzol B 용액을 이용하여 전체 RNA를 분리한 후 전체 RNA(10 μg)를 역전사효소(RTase), dNTP, PN6, buffer를 첨가한 혼합물을 37°C water bath에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성함.

나) 합성된 cDNA에서 발현을 확인하고자 하는 유전자의 primer를 이용하여 PCR을 통해 증폭시켜 발현을 분석함.



역전사효소를 이용한 유전자 발현 분석

#### 8) 단백질 발현 분석(western blot)

가) 세포에 후보물질을 처리하고 36시간 후 수확하여 protein lysis buffer (20 mM HEPES PH 7.9, 100 mM KCl, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 100 mg/ml aprotinin, and 1 mg/ml leupeptin) 를 이용하여 lysis를 시키고 추출한 단백질(50μg)을 SDS-PAGE을 수행함.

나) SDS-PAGE를 수행한 gel에서 PVDF membrane으로 단백질을 transfer 후 blocking buffer에 2시간 incubation하고 원하는 단백질의 항체를 tagging하고 각각의 단백질의 발현 확인.

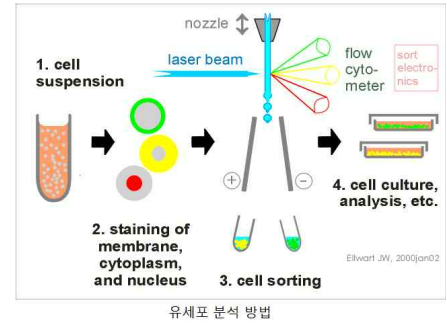
#### 9) 유세포 분석 (flow cytometry analysis)

가) 세포로부터 여러 가지 세포표면 분자들에 대한 항체를 이용하여 면역염색하기 위하여 2-5x10<sup>5</sup> 세포로 조정하여 염색완충용액(1% FBS, 0.01% NaN<sub>3</sub>가 포함된 PBS, pH 7.4)으로 1회 세척 후 ANNEXIN V 또는 PI Propidium Iodide)를 시료에 가하여 4°C에서 15분간 반응시키고 염색 완충용액으로 2회 세척한 후 세포 표면 분자들의 발현을 flow cytometry로 분석함.

10) 세포주기 및 apoptosis 변화 관찰

가) 세포 현탁액  $5 \times 10^5/\text{ml}$ 을 6, 12, 24 시간 동안 배양 한 후 각 세포 그룹을 PBS로 세척하고 75% ethanol 로 24 시간 동안 고정한 후 Propidium iodide(PI) 형광시약으로 DNA를 염색 한 후 flowcytometry를 이용하여 G1, S, G2/M phase등의 세포주기의 변화를 관찰함.

나) Apoptosis 분석을 위해 Annexin V/PI 염색 후 flowcytometry를 이용하여 세포 사멸 정도를 분석함.



11) 마우스 암모델 제작

가) 7주령의 C57BL/6 마우스에  $5-10 \times 10^5$ 의 암세포를 PBS, 100ul에 현탁한 후 피하주사하여 마우스 암모델을 제작함.

나) 최적의 소재조합 추출물을 경구투여한 후, tumor mass, survival rate 등의 항암효과 및 면역세포에 미치는 영향을 분석함.

12) 동물 점막자가면역질환 모델 제작

가) 점막자가면역질환(ulcerative colitis) 유발 마우스모델을 만들기 위하여 7주령의 C57BL/6 마우스에 dextran Sulfate Sodium (DSS, MW 35,000~45,000, ICN Co, USA)를 5% 농도로 음용수에 타서 먹임.

나) DSS를 7일간 음용시킨 후 체중감소와 심한 설사, 창자출혈, 점막손상 증상을 나타내는 마우스들만을 선택하여 연구에 사용함. 본 연구에서는 정상그룹과 염증성 장질환 유발그룹(실험군)으로 나누어 각 그룹 당 5마리를 실험에 배정함.

13) Immunohistochemistry (면역조직화학염색)

가) 세포의 분화상태, 전사인자 그리고 항암조절인자가 조직의 어떤 부위에서 발현되고 변화가 일어나는지 정확히 육안으로 관찰하기 위해 면역조직화학염색을 실시함.

나) 장기를 분리하여 신선한 조직의 냉동절편이나 고정액에 고정된 조직을 파라핀에 굳혀서 3-4micron으로 박절하여 silinated coating 된 slide 혹은 probe on plus slide에 붙임. 냉동절편의 경우는 10% formalin에서 10분간 고정하고  $-20^\circ\text{C}$ 의 Methanol에서 3-5분 방치후  $-20^\circ\text{C}$  아세톤에서 1-3분 고정 후 PBS로 수세하여 조직을 준비하거나,  $-70^\circ\text{C}$ 의 냉동고에 보관하거나 즉시 이용.

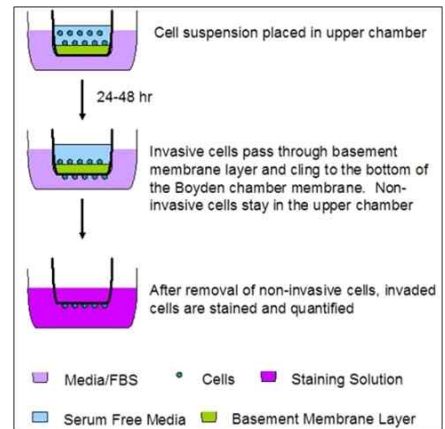
다) 면역조직화학적 염색이 끝난 슬라이드는 대조염색을 시행한 후 현미경을 이용하여 결과를 판독함. 헤마톡실린으로 대조염색을 시행하고 염색한 조직절편을 형광현미경으로 관찰하여 형광을 나타내는 부위에서 양성반응이 관찰되므로 항원의 존재 유무나 존재부위를 확인.

14) 암세포 침윤 분석 (cell invasion assay)

가) 암 세포의 침윤능력을 알아보기 위해, modified boyden chamber를 이용하여

filter의 아랫부분을 chemoattractant로써 5  $\mu$ g의 type I collagen으로 coating 하고 surface에는 matrigel 20  $\mu$ g으로 coating 함.

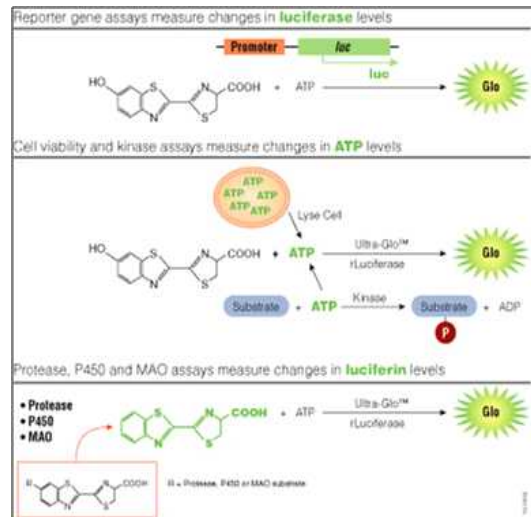
나) 이 chamber를 transwell을 장착, well의 low compartment에 10% FBS을 포함하는 RPMI 1640배지 800  $\mu$ l을 넣고 세포는 10% FBS을 포함하고 있는 RPMI1640 배지에 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 로 transwell의 upper compartment에 seeding 함.



다) 24시간동안 배양 후 완전히 filter로 침투하지 못한 세포들은 cotton swab 으로 닦아 내고 filter의 밑바닥 로 이동한 세포들은 메탄올로 고정 시키고 filter에 있는 세포들을 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 filter 당 random하게 5군데의 microscopic field를 고른 후 염색된 세포의 수를 집계하여 세포의 침윤정도를 측정함.

15) Promoter assay 및 electrophoretic mobility shift assay(EMSA)를 이용한 transcription factor 활성 분석

가) 특정 유전자의 promoter상의 전사조절인자 결합에 대한 후보 물질의 영향을 조사 하기위해 유전자 construct를 세포에 transfection한 후 후보물질을 처리하여 luciferase활성을 측정함.



나) 후보 물질을 처리한 세포로부터 nuclear extract를 분리한 후  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP와 DNA polymerase I의 Klenow 효소를 사용하여 3'-말단을 fill up 하여 probe 를 labeling.

다) DNA와 핵단백질의 결합반응은 5-10  $\mu$ g의 nuclear extract, 2  $\mu$ g의 poly(dI-dC)가 들어 있는 반응액(10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, 250  $\mu$ g/ml BSA)에 competitor 를 첨가하거나 첨가하지 않고 얼음위에서 20-30분간 반응시키고 probe(0.5-1.0 ng, 100,000-200,000 cpm)를 첨가한 후 20-30분간 얼음 위에서 반응시킴.

라) 이 반응액을 6% polyacrylamide gel에 loading한 다음 150 V, 10 mA로 2~3 시간 동안 전기영동하고 vaccum gel dryer에서 건조시킨 후 X-ray film에 노출 시켜 autoradiography를 수행함.

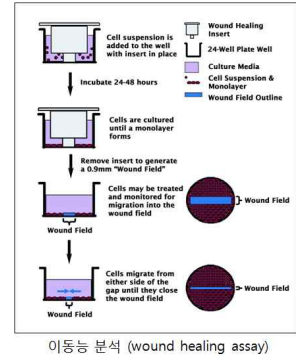
16) 세포이동능 분석(wound healing assay)

가) 세포의 이동능력을 알아보기 위해, wound healing assay를 이용함.

나) 6 cm<sup>2</sup> plate에 10 % FBS을 포함하는 MEM 배지를 5 ml을 넣고 세포를

( $1 \times 10^5$  cells) seeding 하고, 후보 물질을 처리함.

- 다) 세포가 80~90% 자랐을 때, blue tip을 이용하여 scratch 를 내고 배지를 교환한 후 세포를 촬영한 것과 24, 36, 48 시간 후 간극의 간격을 비교하여 세포의 이동정도를 측정 함.



17) 소재혼합물부터 주요 지표성분들의 분리

- 가) ① 작두콩 함유 소재혼합 추출물을 증류수에 분산하고, Hexane, Ethylacetate, Butanol로 분배함.
- 나) ② 각 분획에 대하여 HPLC-PDA를 사용하여 Chemical finger printing을 작성 하고 주요피크들과 알려진 화합물들의 정보를 비교하여 분리를 위한 후보성분들을 도출함

18) 주요성분들의 분리 및 구조 동정

- 가) Chemical finger printing을 통하여 알로에 특화 주요 지표성분들을 확인함.
- 나) 주요 지표성분의 분리는 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물로 순차적으로 용매분획 한 후, 분획물들을 silica gel, sephadex LH-20 등의 오픈칼럼 및 Preparative HPLC 및/또는 재결정 기술을 활용하여 분리함.
- 다) 필요시 분리된 성분의 구조는 Mass로 분자량을 분석하고, 1D&2D-NMR, IR, UV 등의 분광학 적 분석을 통하여 그 화학적 구조를 동정함.

19) 표준품 확보

- 가) 구조가 확인된 성분들 (3종 이상)에 대하여 95%이상 순도로 각 50mg이상을 분리, 정제함
- 나) 표준품 다량 확보를 위하여는 구조동정을 위한 분리시의 분리조건을 참조로 하여 대량으로 용매 분획 및 silica gel, sephadex LH-20, D101 등의 오픈칼럼을 실시한 후, Preparative HPLC 및/또는 재결정기술을 활용하여 분리함.
- 다) 분리 정제된 성분의 순도를 HPLC/UV, ELSD 등으로 결정함
- 라) 분리 정제된 성분의 순도를 HPLC/UV, ELSD 등으로 결정함

**바. 원료 표준화 및 제형 개발 / 제품화**

1) 대량 추출을 위한 원물 확보

- 가) 각 농가 및 지역 협회와의 연계를 통한 대량 원물의 수급 라인 확보
- 나) 단일 지역이 아닌, 여러지역의 원물을 확보하여, 원활한 원물 공급 기반을 확보함과 동시에 표준화 시, 지표물질의 변화를 최소화 할 수 있는 기반 마련
- 다) 추출물로서, 연 3톤 이상 가능하게끔 원물의 확보
- 라) 원물의 수확시기의 표준화를 통하여, 지표물질의 함량 및 일정한 영양 성분이 나올 수 있는 원물 확보

2) 소재의 원료 표준화 및 원료 제형 확립

가) Lab 수준에서의 추출법 확인

- (1) 수 추출 및 주정 추출에 따른 수율 및 지표물질 함량 측정
- (2) 원물과 용액간, 용액과 추출 시간의 최적 비율 확립
- (3) 농축 횟수, 체과(pore size), 원심분리, 멸균 조건, 건조 조건 확립



Fig. 30. 추출 공정 흐름도 예시

나) 여러 회 추출 및 각 추출에 따른 지표물질 양상 및 프로파일 검사를 통한 추출법 확립

- (1) 지표물질 확립: 상업적으로 판매하는 표준물질 확보

(가) 지표물질 분석법 확립

분석 방법의 validation - 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량 한계 시험을 통한 최적 분석법 확립

- (2) 추출법 당 각 3회, lot 당 3반복 지표물질 함량 측정: 균일한 제조공정 확인
- (3) HPLC 혹은 GC법을 통한 분석 최적화 확립

다) 대량 추출기기를 이용한 최소 단위 대량 추출

- (1) 최소 단위 대량 추출공정 시험 진행
- (2) 공정 단위 별, 수율 및 지표물질 변화 체크
- (3) 최종 산물에서의 지표물질 함량 검사를 통한 표준 공정법 확립
- (4) Scale-up 수준의 공정 진행  
: 추후, 기능성시험부터 제품 생산에 사용할 대량 제조 공정법 확립

라) 위해물질 검사 및 안전성 확보

- (1) 중금속 4종 : 납, 수은, 비소, 카드뮴
- (2) 대장균 및 대장균군: 음성

(3) 농약 : 5종 혹은 59종. 각 종마다 기준 함량 다름 (식품공전 기준에 따름)

마) 추출물의 제형화 및 생산 공정 확립

- (1) 추출물의 제품화를 위한 제형 확립
  - : 정제, 하드캡슐, 연질캡슐 등의 제형화 확립
- (2) 각 제형 별, 피막 종류, 피막 색, 빛에 의한 변화를 감안한 제형법 확립
- (3) 각 제형 별, 안정성 테스트
  - : 온도, 공기 노출에 의한 가혹테스트를 거친 안정성 결과 확보
- (4) 4℃, 25℃, 40℃ 등 온도 변화에 의한 안정성 테스트
- (5) 공기 노출, 밀폐 공간, 밀폐 포장 등의 조건에 따른 안전성 테스트
- (6) 각 제형에 따른, 지표성분 분석 시, 검출 정도 확인
- (7) 품질관리 기준 확립

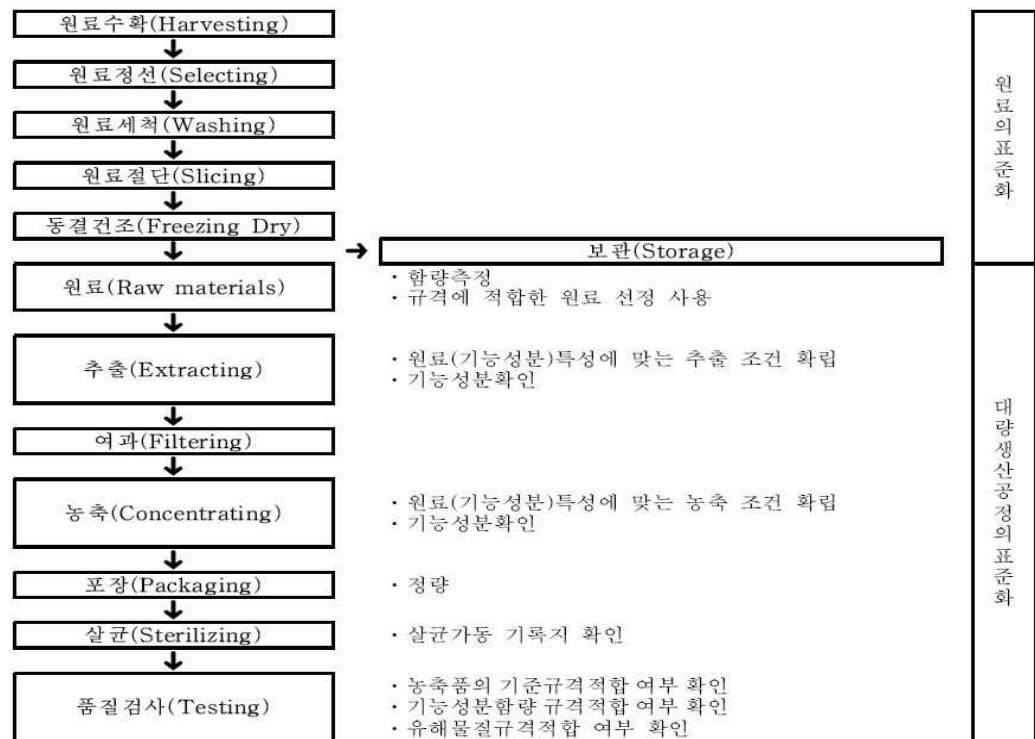


Fig. 31. 생산 공정 흐름도 예시

3) 개별인정을 위한 안전성, 생체유용성, 기능성 자료 확보

가) 안전성

- (1) 작두콩은 식품원재료 데이터 상 식용가능 원료로 등재되어 있고, 추출법 또한 열수 추출로서, 건강기능식품의 개별인정원료로 신청 시, 의사결정도 상 “나”에 해당되어 독성검사가 따로 필요 없을 것으로 판단됨.
- (2) 섭취 근거 및 전문가 자료 검색
  - : FDA EFSA, Health Canada, 전통 한약서(동의 보감 등)에서의 섭취 근거 및 해당 원료에 대한 섭취 자료 확인. 원물 대비 섭취증가량, 부작용 보고서 등

- (3) 독성자료 검색: PDR, Toxnet, Pubmed 등의 해외 유명 기관을 이용하여 해당 원물에 대한 부작용 혹은 독성에 대한 자료 수집
- (4) 해당 원물을 이용한 제품의 국내.외 판매실적자료 검색
- (5) 생체 내 성분의 흡수율 및 유용성 자료 검색
- (6) 최종 개별인정 원료 신청 시, 섭취 시 주의사항에 해당하는 내용 확인

나) 기능성

- (1) 기능성 시험에 대한 요약 제출: *In vitro*, *In vivo*, Clinical trial.
- (2) *In vitro* - 추출물의 효능 기전 확인/ *In vivo* - 기전 및 효과 확인/ Clinical trial - 효과확인
- (3) 모든 기능성 자료는 SCI, SCIE 혹은 KCI 등재 논문에 게재된 자료를 기본으로 함
- (4) Clinical trial의 경우, IRB 심의를 받은 최종 보고서의 형태로도 신청 가능
- (5) 작두콩을 이용한 타 연구기관의 자료 검색 및 근거 자료 확보
- (6) 의약품과의 차별성 및 복약지도가 필요한 지에 대한 전반적 사항 검토
- (7) 국.내외 해당 원료에 대한 근거 자료 모두 검색 및 취합, 제출  
: 미국을 비롯한, 캐나다, 일본, 중국, 유럽 등 전세계 국가기관 및 관련협회, 논문 등에서 해당 원료에 대한 기능성 시험에 대한 모든 정보 검색 및 확인

다) 개별인정형 원료 신청

- (1) 신청에 필요한 자료 최종 검토  
: 원료의 표준화(대량생산, 지표물질 확립)/ 안전성 자료(부작용 및 독성)/ 기능성 자료
- (2) 공인분석기관으로부터, 추출물의 지표성분 함량, 중금속, 대장균, 성상, 영양소 분석
- (3) 추출물 샘플 및 표준 지표물질의 확보
- (4) “면역기능 개선” 기능성으로 “생리활성 기능 2등급”의 개별인정형 원료 인증 목표

라) 원료의 산업화를 위한 소재 및 제품 제안 마케팅 활동

- (1) 과제의 목적에 맞게, 작두콩 추출물의 공정 표준화 및 개별인정형 원료 신청의 완료시점과 동시에, 온/오프라인 대상으로 소재의 소개
- (2) 본 소재를 주원료로 하여 면역기능 제품, 면역+스트레스 개선 제품, 면역+유산균 제품 등 다양한 컨셉의 제품 제안을 통한 판매라인 구축
- (3) 유통업체+벤더업체+홈쇼핑의 최적의 협의체 구성을 통하여, 공격적인 온라인 마케팅 실시
- (4) 기존 오프라인에서 강력한 자사 판매망을 구축하고 있는 네트워크 업체와의 비즈니스 구축을 통하여, 작두콩 추출물의 제품화 및 산업화 촉진  
: ACN, 하이리빙, 한국 티아아이, 애터미 등 강력한 판매망을 구축하고 있는 업계와의 신제품 개발

## 제 4 절 연구개발 추진 일정 및 결과 요약

1. 1차 년도 : 2015년 10월 23일 ~ 2016년 10월 22일

가. 연구 목표 및 연구 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연 구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	작두콩을 이용한 면역 조절 기능성을 갖는 건강기능식 품의 개발  (주관기관 : 애경산업( 주))	소재 정보 수집	1. 소재의 기원 및 개발경위 자료 수집 2. 국내·외 인정·허가 현황 자료 수집 3. 국내·외 사용현황 자료 수집 4. 섭취량 평가 자료 수집	1. 소재의 기원 및 개발 경위 자료 수집 완료 - 기원, 학명, 원산지, 사용부위 등 2. 국내외 인정·허가 현황 자료 수집 완료 3. 국내외 사용현황 자료 수집 완료 - 사용용도, 유통량, 제조회사, 섭취실태 등 4. 섭취량 평가 자료 수집 완료
		소재의 안전성 확보	1. 섭취 근거 자료 수집 2. 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 수집 (알러지 유발 가능성 등 포함) 3. 섭취량 평가 자료 수집	1. 섭취 근거자료 수집 완료 2. 작두콩 및 우영은 30년이상의 식용 근거자료가 다수 있으며, 상세 안전성 정보 자료 (알러지관련)는 2년차 수집 예정 3. 섭취량 평가 자료 수집 완료
	소재조합 추출물의 면역조절 효능 평가 및 성분 규명/기작 연구  (제1협동 : 대전대학교 산학협력단 )	소재조 합 추출물 로부터 면역기 능 증진 활성 신소재 탐색 및 유효성 분 분리	1. 항산화활성 및 면역증진 활성 물질(면역기 능 조절지표) 분석 2. 마우스에서 면역세포 증식 및 면역 단백질의 발현 연구를 통한 기능성 신소재 탐색 및 효능 확인 3. 유효성분 분리 및 효능 확인	1. 항산화 및 면역증진 활성 평가 1) LPS에 의해 증가된 ROS의 양이 작두콩 30%, 70% 주정 추출물을 처리한 군에서 감소하는 것을 확인. 2) NO의 양은 작두콩 수추출물과 70% 주정 추출물에서 유의적으로 감소하는 것을 확인. 2. 작두콩과 우영으로부터 분리한 활성성분 지표 분석 - RAW 264.7 세포주에서 LPS를 처리하여 증가한 ROS를 작두콩과 우영 활성성분을 각각 단독 처리하였을 경우와 홍삼 활성성분을 처리하였을 때보다 작두콩과 우영 활성성분을 혼합처리 하였을 때 유의적으로 ROS를 감소시키는 효과를 보임. 3. 작두콩과 우영 소재조합 추출물의 효능 검증을 위한 마우스 모델 제작 1) 작두콩과 우영을 1:4 비율로 혼합 처리한 마우스 그룹에서 면역증진 효과가 다소 증진되는 것을



구분 (연도)	세부과제명	세부연구 구목표	연구개발 수행내용	연구결과
				<p>확인.</p> <p>2) T/B cell 및 macrophage, dendritic cell 등 면역세포 수와 활성화 및 IgA, IgG의 생성량이 작두콩과 우영의 1:4 비율 혼합투여에서 가장 증가하였으며, 염증반응은 가장 낮음.</p> <p>3) 면역세포의 세포주기 활성화 및 세포사멸의 감소 효과와 collagen의 발현에서도 작두콩을 단독으로 경구투여한 마우스 그룹에 비하여 작두콩과 우영을 혼합 처리한 마우스 그룹에서 증가 하는 것을 확인.</p> <p>4) 위 결과들에 비추어 보았을 때 작두콩과 우영을 1:4 비율로 혼합투여 하였을 때 면역 증진효과가 가장 클 것으로 사료됨.</p> <p>4. 작두콩과 우영 소재조합 추출물의 생리활성 및 면역증진 효능 검증을 위한 부동화 스트레스 유발 마우스 모델 제작</p> <p>1) 면역 관련 지표들의 변화를 확인한 결과, 작두콩과 우영을 혼합 처리한 부동화 마우스 그룹 (1:4)에서 면역증진 효과가 다소 증진.</p> <p>2) T/B cell 및 macrophage, NK cell 등 면역세포수와 활성화 및 IgA, serotonin의 생성량이 작두콩 단독투여에 비해 작두콩과 우영의 혼합투여에 의해 더욱 증가하였으며, 반대로 Cortisol 생산량은 감소시키며, 작두콩과 우영의 혼합투여에서 염증반응은 가장 낮음.</p> <p>3) 작두콩과 우영의 혼합물 100mpk 투여군에서 염증사이토카인 (IL-1beta, IL-6, TNF-a) mRNA 발현이 현저하게 감소 및 면역 T세포 활성화 사이토카인 (IL-2, IL-10, IFN-gamma, IL-12p35/p40) mRNA 발현이 현저하게 증가.</p> <p>4) 위 결과들에 비추어 보았을 때 부동화 스트레스 마우스모델에서도 마찬가지로 작두콩과 우영을 1:4로 혼합투여 하였을 때 면역증진효과가 가장 클 것으로 사료됨.</p> <p>5. 작두콩과 우영 소재조합 추출물의 생리활성 및 면역증진 효능 검증을 위한 DSS 유도 IBD마우스 모델 제작</p> <p>1) DSS 유도 IBD 마우스 모델 체중변화 측정결과, 약물 투여군(작두콩, 우영, 작두콩 우영 혼합물, 홍삼)에서도 정상군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소되는 것을 확인할 수</p>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구 구목표	연구개발 수행내용	연구결과
				<p>있었고, chlorogenic acid와 cichoric acid는 항바이러스, 항균 면역증강 효과를 가지게 하는 물질로 정상군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소되는 것을 확인.</p> <p>2) DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 질병활성도 변화 관찰 결과, chlorogenic acid와 cichoric acid 투여군은 9일에서 7점 이하의 점수를 나타내었고, 이는 통계학적으로 유의성을 나타내었다. 나머지 약물 투여군(우영, 작두콩 우영 혼합물, 홍삼)은 9일에서 chlorogenic acid와 cichoric acid 투여군 점수보다 약간 높은 7점 이상의 점수를 보였고, 통계학적으로 유의성을 확인</p> <p>3) DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 장 길이 변화 관찰결과, DSS를 유도한 지 9일 후에는 약물 투여군 중 작두콩 우영 혼합물 100mpk 투여군과 홍삼투여군, 양성대조군(chlorogenic acid, cichoric acid)에서 DSS 유도 대조군(DSS+0.5% CMC)에 비하여 약간 장 길이가 긴 것을 확인.</p> <p>4) 위 결과들에 비추어 보았을 때 IBD마우스 모델에서도 마찬가지로 작두콩과 우영을 혼합투여 하였을 때 면역증진효과가 가장 클 것으로 사료됨.</p>
	<p>작두콩의 공정표준화 및 면역기능을 갖는 건강기능식품 소재로서의 개발</p> <p>(제2협동 : ㈜노바렉스)</p>	<p>원료 표준화</p>	<p>1. 원물의 수급선 확보</p> <p>2. 지표물질 및 지표물질 분석법 확립</p> <p>3. 추출법의 scale-up</p>	<p>1. 원물의 수급선 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 작두콩: 충북 진천 (콩세상)</li> <li>- 우영: 제천 (갑당약초)</li> <li>- 각각 수급선 확보함</li> </ul> <p>2. 지표물질 및 지표물질 분석법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 작두콩 : Desacyl gladiatoside B(Lupeol)</li> <li>- 우영 : Arctiin, Arctingenin</li> </ul> <p>3. 추출법의 scale-up</p> <p>작두콩 / 우영 각각의 원료를 70%주정 추출방법으로 1차 검토 후 원물 100kg으로 scale-up 진행 완료 함</p>
		<p>추출법의 표준화</p>	<p>1. 원료 제조 및 제조 방법 확립</p> <p>2. 원료 추출법의 표준화 및 원료 추출/공급</p>	<p>1. 원료 제조 및 제조 방법 확립</p> <p>기존 랩실험 방법을 토대로 원료 제조 방법 확립</p> <p>2. 원료 추출법의 표준화 및 원료 추출/공급</p> <p>원료 추출법 관련 하여 표준화 진행, scale-up로 추출한 원료를 각 세부에 제공 함</p>

## 나. 연구 범위 및 구체적인 연구 수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
소재 정보 수집	국내의 DB 및 논문들 자료를 통한 근거 수집	- 국내외 자료를 통하여 소재의 기원 및 개발경위, 국내외 인허가 현황자료, 국내외 사용현황 자료, 섭취량 평가 자료 수집 완료
소재의 안전성 확보	국내의 DB 및 논문들 자료를 통한 근거 수집	- 국내외 자료를 통하여 섭취량 근거 자료, 안전성 자료, 섭취량 평가 자료 수집 완료
<i>In vitro</i> (세포주이용) 작두콩과 우영 추출물로부터 면역기능 증진 활성평가	세포수준(RAW264.7을 비롯한 BV2, HEK293, MC38)에서 LPS 처리 후, 항산화 활성 및 면역증진 활성평가	- 작두콩 및 우영추출물 의 독성 평가 및 적정 처리 농도 설정 - 작두콩 및 우영 추출물들을 RAW264.7 cell 및 여러 가지 세포에 각각 10, 50, 100, 200, 400 µg/ml 의 농도로 처리하여 세포독성 시험 - 작두콩 추출물 처리에 의해 생성된 활성산소 및 NO 측정 - 작두콩 추출물에 따른 ROS 생성량 확인
<i>In vivo</i> 작두콩 추출물의 효능 검증을 위한 마우스 모델 제작	마우스 모델에서 작두콩 추출물 (수추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물) 효능평가	- C57/BL6 마우스에 확립된 조건으로 그룹 별로 3마리 씩 각각 관리 하에 일주일간 작두콩 추출물을 경구 투여 - 마우스의 몸무게 및 기타 장기 (thymus, spleen, lymph node, heart 등) 의 무게 변화와 형태 변화 관찰 - 마우스의 혈청에서 IgA 생성량 확인 - 마우스를 희생하여 각 면역기관 (thymus, spleen, LN, MLN) 에서 세포를 분리 - 분리한 각 면역기관의 세포에서 T cell, B cell, NK cell, macrophage 등 세포의 활성 및 수 변화를 확인하기 위해 각각의 마커가 되는 세포표면 분자들에 대한 항체를 반응 시킨 후 유세포 분석기를 통해 분석 - 분리한 각 면역기관의 세포를 PBS로 세척하고 75% ethanol 로 고정 한 후 propidium 형광 시약으로 DNA를 염색하여 G1, S, G2/M phase 등의 세포주기를 관찰 - 분리한 각 면역기관의 세포에서 apoptosis를 유세포 분석기를 통해 분석
작두콩 : 우영 추출물의 혼합 비율을 <i>in vitro</i> 와 <i>in vivo</i> 수준에서 확정	<i>In vitro</i> (세포주이용)에서 작두콩 : 우영 추출물의 혼합 비율 스크리닝  작두콩 : 우영 추출물 (1:4) 비율 혼합 처리의 면역증진 효능 검증을 위한 마우스 모델 제작	- 작두콩과 우영추출물의 혼합 농도 및 처리 비율 설정하여 작두콩 추출물과 우영 추출물의 비율을 1:1, 1:2, 1:4, 4:1, 2:1 로 설정하고 가장 효과가 좋은 비율을 스크리닝 - RAW264.7 cell에 작두콩 70% 주정 추출물을 각각 50, 100µg/ml의 농도로 고정한 후, 우영 수추출물과 30%, 70% 주정 추출물을 여러 비율로 혼합 처리하여 혼합비율 확정 - 작두콩과 우영 추출물의 혼합물에 의해 생성된 활성산소 및 NO 측정 - 실험군은 8주령 C57/BL6 마우스를 그룹 별로 3마리 씩 각각 정상군 3마리, 작두콩 70% 주정 추출물 군 (J) 3마리, 작두콩 70% 주정 추출물 군 (W) 3마리, 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물을 1:4의 비율로 혼합한 군 (JW)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
		<p>3마리를 확립된 조건으로 3주간 매일 200mg/kg의 농도로 경구 투여</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 작두콩 및 우엉 추출물과 작두콩 : 우엉 추출물 (1:4)을 비율 혼합 경구투여한 마우스 모델에서 면역 증진 효과 확인</li> <li>- 마우스의 혈청에서 IgA, IgG 생성량을 확인하기 위해 마우스의 혈청을 수득하여 96well에 코팅한 후 각각 IgA 항체, IgG 항체와 HRP conjugated 항체를 반응 시켜 ELISA reader 기기로 측정</li> </ul>
<p><i>In vitro</i> (세포주이용) 에서 작두콩과 우엉으로부터 분리한 활성성분 지표 분석</p>	<p>작두콩 및 우엉추출물과 작두콩과 우엉 혼합물, 작두콩과 우엉에서 분리한 활성성분(Arctigenin, Isoorientin, Genistin)의 독성 평가 및 적정 처리 농도 설정</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 작두콩 및 우엉추출물과 작두콩과 우엉 혼합물, 작두콩과 우엉에서 분리한 활성성분(Arctigenin, Isoorientin, Genistin)의 독성 평가 및 적정 처리 농도 설정</li> <li>- RAW264.7 cell 및 여러 가지 세포에 작두콩 (J) 및 우엉 추출물 (W) 과 작두콩과 우엉 혼합물 (JW), 홍삼 (H) 을 각각 10, 50, 100, 200, 400 µg/ml, 활성성분인 Arctigenin (Arc) 을 0.25, 0.5, 1, 2, 4 µg/ml, Isoorientin (Iso) 과 Genistin (Gen)을 1.25, 2.5, 5, 10, 20 µg/ml의 농도로 처리하여 세포독성 시험</li> <li>- 작두콩 추출물과 우엉 추출물 및 활성성분 처리에 의해 생성된 활성산소 및 NO 측정</li> </ul>
<p>작두콩과 우엉 소재혼합 추출물의 생리활성 및 면역증진 효과 검증을 위한 부동화 스트레스 유발 마우스 모델 제작</p>	<p>작두콩 및 우엉 소재혼합 추출물 (1:4)의 효능 검증을 위한 스트레스유발 부동화 마우스 모델 제작</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- C57/BL6 마우스에 확립된 조건으로 그룹 별로 3마리 씩 각각 관리 하에 21일간 작두콩 70% 주정 추출물(CG70%E, 100 mg/kg, 50 mg/kg), 우엉 70% 주정 추출물(AL70%E, 100 mg/kg, 50 mg/kg), 작두콩 70% 주정 추출물과 우엉 70% 주정 추출혼합물 (1:4) (CG+AL 1:4, 100 mg/kg, 50 mg/kg, 25 mg/kg)을 경구투여 후 2시간 뒤에 부동화 튜브에 넣어 2시간 동안 고정하여 매일 2시간씩 21일간 부동화 스트레스 유발</li> <li>- 체중변화 및 혈액에서 WBC 분석</li> <li>- 마우스의 혈청을 수득하여 ELISA를 이용하여 Cortisol, serotonin 측정</li> <li>- 마우스의 혈청에서 IgA 생성량을 확인하기 위해 마우스의 혈청을 수득하여 96well에 코팅한 후 IgA 항체와 HRP conjugated 항체를 반응 시켜 ELISA reader 기기로 측정</li> <li>- 분리한 spleen 에서 RNA를 추출하여 cDNA를 합성, 합성된 cDNA를 이용하여 작두콩 및 우엉 추출물에 의해 변화된 염증 및 면역 관련 cytokine 확인</li> <li>- 작두콩 및 우엉 추출물의 혼합 경구 투여한 마우스 모델에서 면역 증진 효과 확인</li> <li>- 마우스를 희생하여 각 면역기관 (thymus, spleen, LN, MLN) 에서 세포를 분리</li> <li>- 분리한 각 면역기관의 세포에서 T cell, B cell, NK cell, macrophage 등 세포의 활성 및 수 변화를 확인하기 위해</li> </ul>

연구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
		각각의 마커가 되는 세포표면 분자들에 대한 항체를 반응 시킨 후 유세포 분석기를 통해 분석
작두콩과 우영 소재혼합 추출 물의 생리활성 및 면역증진 효능 검증을 위한 DSS 유 도 IBD마우스 모델 제작	작두콩과 우영 소재혼합 추출물의 생리활성 및 면역증진 효능 검증을 위한 DSS 유도 IBD마우스 모델 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DSS 유도 IBD 마우스 모델 체중변화 측정결과, 약물 투여군(작두콩, 우영, 작두콩 우영 혼합물, 홍삼)에서도 정상군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소되는 것을 확인할 수 있었고, chlorogenic acid와 cichoric acid는 항바이러스, 항균 면역증강 효과를 가지게 하는 물질로 정상군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소되는 것을 확인.</li> <li>- DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 질병활성도 변화 관찰 결과, chlorogenic acid와 cichoric acid 투여군은 9일에서 7점 이하의 점수를 나타내었고, 이는 통계학적으로 유의성을 나타내었다. 나머지 약물 투여군(우영, 작두콩 우영 혼합물, 홍삼)은 9일에서 chlorogenic acid와 cichoric acid 투여군 점수보다 약간 높은 7점 이상의 점수를 보였고, 통계학적으로 유의성을 확인</li> <li>- DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 장 길이 변화 관찰결과, DSS를 유도한 지 9일 후에는 약물 투여군 중 작두콩 우영 혼합물 100mpk 투여군과 홍삼투여군, 양성대조군(chlorogenic acid, cichoric acid)에서 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 약간 장 길이가 긴 것을 확인.</li> <li>- 위 결과들에 비추어 보았을 때 IBD마우스 모델에서도 마찬가지로 작두콩과 우영을 혼합투여 하였을 때 면역증진효과가 가장 클 것으로 사료됨.</li> </ul>
원료 표준화	원료의 수급선 확보	- 기존 판매처 현황 및 가격, 원료수급가능여부 확인 후 수급처 확보
	지표물질 및 지표물질 분석법 확립: 실험적, 이론적 접근	- 기존 문헌을 통한 지표물질 탐색 - 추출 및 구조 동정, 분석방법을 통한 지표물질 분석
	추출법의 scale-up: 실험적 접근	- 반복실험적인 실험 방법을 통한 랩실험 추출 조건과 유사한 원료양상을 보이는 조건 확립
추출법의 표준화	원료 제조 및 제조 방법 확립: 실험적 접근	- 대량생산 방법 구축을 통한 원료 제조 및 제조 방법 확립
	원료 추출법의 표준화 및 원료 추출/공급: 실험적 접근	- 원료제조방법확립 및 추출원료 각기관에 공급 제공함

2. 2차 년도 : 2016년 10월 23일 ~ 2017년 10월 22일

가. 연구 목표 및 연구 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구 구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2017)	작 두 콩 을 이용한 면 역 조절 기 능성을 갖 는 건강기 능 식 품 의 개발  (주 관 기 관 : 애 경 산 업 (주))	인체 효능 검증	1. 연구 기관 선정	1. 인체적용시험기관 : 전북대병원 기능성식품임상지원센터 2. CRO : 네오뉴트라(주) 3. 시료 분석 : 녹십자랩셀
			2. 전략 수립 - 시험 디자인 무작위배정 위약대조연구(Randomized, Controlled Trial: RCT) - 프로토콜/CRF 등 개발 바이오마커 설정	1. 시험명 - 면역기능 증진에 대한 작두콩추출물등복합물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험 2. 인체적용시험 전략 수립 완료 - 섭취기간 : 8주 (56일) - 시험기관 : 전북대학교병원 기능성식품임상지원센터 - 책임자 : 전북대학교 의학전문대학원 채수완 교수 - CRO : 네오뉴트라(주) 3. 바이오마커 설정 완료 - NK cell activity (12.5:1, 25:1, 50:1) - 식균작용 (Phagocytosis) - IFN- $\gamma$ (Interferon- $\gamma$ ) - IL-2, IL-10, IL-12 (Interleukin-2, 10, 12) - 백혈구 (WBC) 수 - IgA(Immunoglobulin A), Cortisol, Serotonin - 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가
			3. 피험자 모집 - 시험대상 선정 면역기능의 주요 지표인 혈중 백혈구 수가 정상범위 중 낮은 범위에 속하거나 정상범위보다 다소 낮은 자 등 질병을 가지지 않은 사람	1. 피험자 모집 - 목표 피험자 100명 중 117명을 스크리닝하여 101명 1차 모집 완료 - 최종 94명 최종 선정 후 시험 진행
			4. 인체 적용	1. 인체적용시험용 식품 제조 완료

구분 (연도)	세부과제명	세부연구 목표	연구개발 수행내용	연구결과
			시험 식품 제조	- 1000mg 정제 형태의 시험 식품 제조 완료 - 34정/box, 41정/box 2가지 시료 100박스 제조 완료 및 시험 시 공급
			5. 인체 적용 시험 개시 - 등록기간 : 8개월 - 섭취기간: 8주	1. 인체적용시험 개시 - IRB 승인 : 5/19 - 대상자 모집 : 5월~7월(3개월) - 시험 개시 : 6월 ~
작 두 콩 의 면 역 조 절 효 능 평 가 및 성분 규 명/기작 연 구  (제1협동 : 대전대학교 산 학 협 력 단)	소재조 합 추출물 로부터 면역증 진 후보물 질 선정 및 작용기 전 연구	1. 최종 후보물질의 공인 기관의 평가 자료를 통한 안전성 및 독성 검사 - 한국 화학융합시험 연구원에 의뢰 급성 경구투여 독성/안전성시 험 수행	1. SD rat에 작두콩추출물등복합물의 7일 반복투여 독성시험에 관한 연구 1) 시료 : 작두콩추출물등복합물 (작두콩추출물:우 영추출물 = 1:4) 2) 실험동물 및 투여 용량 - 8주령 SD rat : 암 수 각각 3마리씩, 7일간 각각 200 mg/kg, 400 mg/kg 매일 경구 투 여 3) 일반임상증상 및 사망동물 관찰 - 매일 일반행동 및 변화관찰, 임상증상 및 사망 동물 유무, - 약물 투여 0, 3 7일째 체중변화 측정 4) 부검 및 장기중량 측정 - 7일 후 ethyl ether 마취 후 심장천자로 채혈 - 내부장기 유무 상세히 관찰 후 간, 신장, 비장 무게 측정 5) 혈액 생화학 검사 - 부검 하루전 식이를 제거하여 공복 상태에서 채혈함 - AST, ALT : 간독성, Creatinine : 신장독성 - 혈중 IgE 함량 측정 6) 시험 결과 - 작두콩추출물등복합물 200, 400 mg/kg 투여 군을 랫드에 7일 반복투여하여 독성시험을 실 시한 결과, 7일 후에 임상증상, 치사율, 부검소 견, 체중변화, 장기 중량 변화, 및 혈액 생화학 적 검사 , 그리고 혈중 IgE수준 등에서 독성소 견이 나타나지 않음. 따라서 작두콩추출물등복 합물의 400 mg/kg미만까지 안전성을 확인함.	1. SD rat에 작두콩추출물등복합물의 7일 반복투여 독성시험에 관한 연구 1) 시료 : 작두콩추출물등복합물 (작두콩추출물:우 영추출물 = 1:4) 2) 실험동물 및 투여 용량 - 8주령 SD rat : 암 수 각각 3마리씩, 7일간 각각 200 mg/kg, 400 mg/kg 매일 경구 투 여 3) 일반임상증상 및 사망동물 관찰 - 매일 일반행동 및 변화관찰, 임상증상 및 사망 동물 유무, - 약물 투여 0, 3 7일째 체중변화 측정 4) 부검 및 장기중량 측정 - 7일 후 ethyl ether 마취 후 심장천자로 채혈 - 내부장기 유무 상세히 관찰 후 간, 신장, 비장 무게 측정 5) 혈액 생화학 검사 - 부검 하루전 식이를 제거하여 공복 상태에서 채혈함 - AST, ALT : 간독성, Creatinine : 신장독성 - 혈중 IgE 함량 측정 6) 시험 결과 - 작두콩추출물등복합물 200, 400 mg/kg 투여 군을 랫드에 7일 반복투여하여 독성시험을 실 시한 결과, 7일 후에 임상증상, 치사율, 부검소 견, 체중변화, 장기 중량 변화, 및 혈액 생화학 적 검사 , 그리고 혈중 IgE수준 등에서 독성소 견이 나타나지 않음. 따라서 작두콩추출물등복 합물의 400 mg/kg미만까지 안전성을 확인함.
			2. 마우스 모델에서 유도체 후보물질처리	1. 부동화 마우스모델에서 활성유도체 후보물질 투여 에 의한 면역 활성 증진 확인 1) 시험 조건 - C57/BL6 마우스에 확립된 조건으로 그룹 별

구분 (연도)	세부과제명	세부연구 구목표	연구개발 수행내용	연구결과
			<p>에 의한 면역세포 활성기능 증진방법 확립</p> <p>- 암 및 염증유발 또는 억제인자 조절기능, 항암/항염 활성 조절기능, 면역세포 활성 및 침윤능력, 세포독성능(암 세포 killing능력) 을 통한 면역세포 활성기능 증진방법 확립</p>	<p>로 3마리 씩 각각 관리 하에 21일간 시료를 경 구투여 후 2시간 뒤에 부동화 튜브에 넣어 2시 간 동안 고정하여 매일 2시간씩 21일간 부동화 스트레스 유발</p> <p>- 시료 : Lupeol (작두콩추출물 지표성분), Isochlorogenic acid A (우영추출물 지표성분 1), chicoric acid (우영추출물 지표성분2)</p> <p>2) 시험 내역</p> <p>- 각 면역기관 (PBMC, DLN, spleen) 에서 세 포를 분리하여 T cell, B cell, NK cell, macrophage 등 세포의 활성 및 수 변화를 유 세포 분석기를 통해 분석</p> <p>- 분리한 spleen 에서 RNA를 추출하여 염증 및 면역 관련 cytokine 유전자 발현 확인</p> <p>3) 시험 결과</p> <p>- PBMC, DLN, Spleen에서 Lupeol:Isochlorogenic acid A = 1:4 투여군 이 농도의존적으로 가장 크게 활성화되었으며, CD4+ Th cell, 그리고 CD4+/CD25+ 활성화 세포수가 증가를 나타내었음. 비장에서 NK1.1 / N K G 2 D + 활 성 세 포 수 는 Lupeol:Isochlorogenic acid A = 1:4 10mg/kg과 20mg/kg 투여군에서 농도 의존적 으로 증가</p> <p>- 비장에서는 염증 사이토카인 중 TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IL-1<math>\beta</math> mRNA 유전자 발현은 Lupeol:Isochlorogenic acid A = 1:4 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg 투여군에서 농 도의존적으로 부동화 IM_S-control에 비해 IL-6 (<math>p &lt; 0.05</math>, <math>p &lt; 0.01</math>) 와 IL-1<math>\beta</math> (<math>p &lt; 0.01</math>) mRNA의 발현이 통계적 유의성 있게 감소</p> <p>- IL-2, IFN-<math>\gamma</math>, IL-10, TGF-<math>\beta</math> mRNA의 발현 은 부동화 IM_S-control에 비해 Lupeol 10 mg/kg 투여군과 Lupeol:Isochlorogenic acid A = 1:4 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg 투여 군에서 통계적 유의성 있게 증가</p> <p>- 작두콩 지표성분인 Lupeol과 우영 지표성분 <u>Isochlorogenic acid A가 면역 활성성분으로 예측되고 작두콩 Lupeol:Isochlorogenic acid A = 1:4 혼합시 단독 투여군보다 상승효과 (synergic effect)를 나타냄.</u></p>



구분 (연도)	세부과제명	세부연구 구목표	연구개발 수행내용	연구결과
			<p>3. 암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역조절 활성 탐색</p> <p>- 암 진행정도 측정 (survival rate, tumor mass), 면역세포활성 및 침윤능, 자연살해세포 cytotoxicity 기능, 암전이능, 세포자연사 및 cell cycle을 통한 항암효능을 확인</p>	<p>1. 암 세포주를 활용한 질환 모델에서 작두콩추출물 등복합물 및 활성 유도체 후보물질 (lupeol, chicoric acid (CA), lupeol+CA)의 면역조절 활성</p> <p>1) 시험 내역</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 암 진행정도 (survival rate, tumor mass)</li> <li>- 면역세포활성 및 침윤능</li> <li>- 자연살해세포 cytotoxicity 기능, 암전이능</li> <li>- 세포자연사 및 cell cycle을 통한 항암효능</li> </ul> <p>2) 시험 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동물모델에서 분리한 면역기관 (비장, 림프절, 장간막림프절)의 면역세포 아형을 분석한 결과 작두콩추출물은 활성화된 CD4+T세포, B세포, 대식세포를 증가시킴.</li> <li>- 대장암 모델에서 작두콩추출물등복합물, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA은 대조군과 비교하여 종양 부피와 중량을 감소시킴.</li> <li>- 대장암 모델에서 암조직에 침윤된 면역세포의 아형을 분리한 결과 작두콩추출물등복합물, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA는 대조군에 비하여 CD3+/CD4+, CD3+/CD8+T, CD4+/CD69+, CD8+/CD69+, B220+/CD69+, C11b+/CD69+, NK1.1+/CD69+ 등 세포 수 및 활성세포들이 증가를 나타내었고, 특히 NK세포의 활성이 증가됨.</li> <li>- 대장암 모델에서 작두콩추출물등복합물, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA의 혼합물은 세포주기 중G0/G1기를 증가시켰으나 S기를 감소시킴.</li> <li>- 결과적으로, 작두콩추출물, 작두콩추출물등복합물, 그들의 성분인 lupeol, chicoric acid, lupeol과 chicoric acid의 혼합물은 항염증 효과, 면역증진활성 및 항암 효과를 확인함. 작두콩추출물등복합물의 이러한 효과는 lupeol과 chicoric acid의 효과로 기인함.</li> </ul>
			<p>4. 마우스 점막자가면역 질환 모델에서 면역조절 활성 및 효능 확인</p>	<p>1. 마우스 점막자가면역질환 모델에서 면역조절 활성 효능 확인</p> <p>1) 시험 내역</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- DSS 유도 IBD 마우스 모델에서 작두콩추출물 등복합물 및 활성 후보 물질 (lupeol, chicoric</li> </ul>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구 구목표	연구개발 수행내용	연구결과
			<p>- 체액성, 세포매개면역 및 점막면역기능 분석, 염증유발유전자 억제기능,면역세포활성 및 침윤능을 통한 점막자가면역 질환 마우스 모델에서 효능을 확인.</p>	<p>acid (CA), lupeol+CA)의 면역조절 활성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- DSS 유도 IBD 마우스 모델 체중변화 측정</li> <li>- DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 질병활성도 변화 관찰</li> <li>- DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 장 길이 변화 관찰</li> </ul> <p>2) 시험 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vivo</i>에 작두콩 및 우엉 혼합물을 경구투여 하였을 때 비장의 면역세포들이 증가됨을 확인함. 이러한 결과는 비장의 세포주기가 증가됨을 통해 면역세포들의 증식 및 분화가 증가됨을 의미. 또한 PEC의 B cell의 population이 증가됨을 통해 IgA 및 IgG의 productio이 증가됨</li> <li>- IBD 마우스 모델에서 작두콩 및 우엉의 혼합물을 경구투여 하였을 때, IBD 질환지표들이 개선되었으며, 대장내의 증가된 ROS 및 IgA production이 리커버됨을 확인</li> <li>- <u>Chicoric acid 및 Lupeol의 경구투여에 의해 IBD 질환지표들이 개선됨을 확인함으로써 작두콩 및 우엉 추출물의 유효성분이 chicoric acid 및 lupeol임을 확인함.</u></li> <li>- 비장내의 다양한 면역세포들이 증가됨을 확인하였으며, 특히 주요면역 장기들에서 대식세포의 population이 크게 증가됨을 통해 활성화된 대식세포가 다양한 면역세포의 활성을 증가시키는 것으로 판단됨 (NK 세포독성능 및 IgA production 조절).</li> </ul>
			<p>5. Raw264.7cell line에서 작두콩/우엉 추출물 및 및 활성 후보물질들 처리에 의한 면역활성 확인</p>	<p>1. 대식세포(RAW264.7 cell)에서 작두콩/우엉추출물 및 활성 후보 물질 처리에 의한 면역활성 확인</p> <p>1) 시험 내역</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 작두콩 및 우엉추출물과 작두콩추출물등복합물 (작두콩추출물:우엉추출물 = 1:4), 홍삼, 작두콩와 우엉에서 분리한 활성 후보 물질 (Arctigenin, Isoorientin, Genistin)의 세포독성 시험 및 적정 처리 농도 설정</li> <li>- 작두콩 추출물과 우엉 추출물 및 활성성분 처리에 의해 생성된 활성산소 및 NO 측정</li> <li>- 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리한 후 작두콩추출물등복합물 및 유도체 후보물질(Chicoric acid 및 Lupeol)에 의한 항산화 활성 및 면역증진 활성 확인</li> </ul>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구 구목표	연구개발 수행내용	연구결과
				2) 시험 결과 - 작두콩추출물등복합물은 대식세포 RAW264.7에서 세포 독성을 나타내지 않았으며, Genistin은 높은 농도(20ug/ml)에서 약간의 세포독성을 나타냄. - <u>작두콩추출물등복합물은 RAW264.7 cell이 외부 자극 LPS에 반응하여 생성된 항염증관련 인자인 ROS 생성량을 가장 높게 감소시킴.</u> - <u>작두콩과 우엉추출물의 지표/활성 후보 물질인 lupeol, chicoric acid, lupeol+CA의 혼합물은 대식세포 RAW264.7에서 LPS에 반응하여 항염증관련 인자인 ROS과 NO 생성을 감소시킴.</u>
	작 두 콩 의 공정표준화 및 면역기 능을 갖는 건강기능식 품 소재로 서의 개발  (제2협동 : ㈜노바렉스)	원료 표준화	1. 추출법의 scale-up	1. 추출법의 scale-up - 대량추출 시 발생한 문제점을 해결하기 위해, 타 추출 업체를 선정하여 추출법을 재설정
2. 활성/지표물질 분리 및 분석법 확립			1. 활성/지표물질 분리 및 분석법 확립 - 작두콩 : Lupeol - 우엉 : Isochlorogenic acid A	
3. 소재의 안정성 확립			1. 소재의 안정성 확립 - 외관, 색상, 미생물 이상 없음 확인 - 3개월 경과 지표물질 함량 측정 진행중 - 6개월 경과 지표물질 함량 측정 예정	
4. 대량생산 및 시험식품 생산			1. 대량생산 및 시험식품 생산 - 작두콩 / 우엉 원료의 대량 추출 후 검토된 제형(Tablet)으로 시험식품 생산을 완료함	
5. 원산지별 원료 수급 및 동등성 확인			1. 원산지별 원료 수급 및 동등성 확인 - 우엉(4곳), 작두콩(3곳)의 국내 원산지별 원료를 수급한 후 pilot 추출물을 확보, 각 지표물질의 분석[작두콩은 진행 중]	
소재의 안전성 확보		1. 위해물질 검사 - 중금속, 미생물, 농약 등 분석	1. 위해물질 검사 - 건강기능식품 개별인정 시 필요한 원료 규격 중 위해물질인(중금속, 잔류농약, 미생물)을 시험식품에서 확인	
원료의 산업화		1. 소재 제안 마케팅 (교육지도)	1. 소재 제안 마케팅 - 1, 2차년도에서 조사된 기능성 내용 및 섭취량을 바탕으로 국내 제조&유통회사에 작두콩추출물등 복합물 소재를 제안함 (5건) - 과제수행을 원활히 하기 위해 신규 채용자 및 제형/제제 담당자를 대상으로 교육 실행 (3건)	

나. 연구 범위 및 구체적인 연구 수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
작두콩추출물 등복합물의 인체적용시험 수행	면역관련 바이오마커 설정	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NK cell activity (12.5:1, 25:1, 50:1)</li> <li>- 식균작용 (Phagocytosis)</li> <li>- IFN-<math>\gamma</math> (Interferon-<math>\gamma</math>)</li> <li>- IL-2, IL-10, IL-12 (Interleukin-2, 10, 12)</li> <li>- 백혈구 (WBC) 수</li> <li>- IgA (Immunoglobulin A), Cortisol, Serotonin</li> <li>- 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가</li> </ul>
최종 후보물질의 공인 기관의 평가 자료를 통한 안전성 및 독성 검사	SD rat에 작두콩추출물등복합물의 7일 반복투여 독성시험에 관한 연구	<p>SD rat에 작두콩추출물등복합물의 7일 반복투여 독성시험에 관한 연구</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 작두콩 : 우영 = 1:4</li> <li>2) 실험동물 및 투여 용량 <ul style="list-style-type: none"> <li>- SD rat : 암 수 각각 3마리씩, 7일간 각각 200 mg/kg, 400 mg/kg 매일 경구 투여</li> </ul> </li> <li>3) 일반임상증상 및 사망동물 관찰 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 매일 일반행동 및 변화관찰, 임상증상 및 사망동물 유무</li> <li>- 약물 투여 0, 3, 7일째 체중변화 측정</li> </ul> </li> <li>4) 부검 및 장기중량 측정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 7일 후 ethyl ether 마취 후 심장천자로 채혈</li> <li>- 내부장기 유무 상세히 관찰 후 간, 신장, 비장 무게 측정</li> </ul> </li> <li>5) 혈액 생화학 검사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 부검 하루전 식이를 제거하여 공복 상태에서 채혈함</li> <li>- AST, ALT - 간독성, Creatinine - 신장독성, 혈중 IgE 함량 측정</li> </ul> </li> </ol>
RAW 264.7 세포주에서 LPS 처리 후 작두콩추출물등복합물 및 활성 유도체 후보물질의 항산화 활성 및 면역증진 활성평가	Raw264.7cell line에서 작두콩추출물등복합물 및 활성 후보물질들 처리에 의한 면역활성 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 작두콩 및 우영추출물과 작두콩추출물등복합물, 홍삼, 작두콩와 우영에서 분리한 활성성분 (Arctigenin, Isoorientin, Genistin)의 세포독성 시험 및 적정 처리 농도 설정</li> <li>- 작두콩 및 우영 추출물의 활성 유도체 후보물질인 Chicoric acid 및 Lupeol에 의해 ROS가 감소됨을 확인함</li> <li>- Chicoric acid 및 Lupeol 혼합처리에서도 synergic 효과를 보임을 알 수 있음</li> <li>- 활성 유도체 후보물질인 Chicoric acid 및 Lupeol 그리고 혼합의 처리에 의해 NO의 생산이 감소됨을 확인함</li> </ul>

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>마우스 모델에서 작두콩추출물 등복합물 및 활성 유도체 후보물질 처리에 의한 면역세포 활성화기능 증진 방법 확립</p>	<p>작두콩추출물등복합물, 그리고 활성 성분 후보물질 (lupeol, chicoric acid, lupeol+CA) 처리의 효능 검증을 위한 스트레스유발 부동화 마우스 모델 제작</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- C57/BL6 마우스에 확립된 조건으로 그룹 별로 3마리 씩 각각 관리 하에 21일간 활성 후보 물질 (lupeol, chicoric acid, Isochlorogenic acid A)을 경구투여 후 2시간 뒤에 부동화 튜브에 넣어 2시간 동안 고정하여 매일 2시간씩 21일간 부동화 스트레스 유발.</li> <li>- 마우스를 희생하여 각 면역기관 (PBMC, DLN, spleen) 에서 세포를 분리하여 T cell, B cell, NK cell, macrophage 등 세포의 활성 및 수 변화를 유세포 분석기를 통해 분석</li> <li>- 분리한 spleen 에서 RNA를 추출하여 염증 및 면역 관련 cytokine 확인</li> </ul>
<p>암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역조절 활성 탐색</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>① 7주령의 C57BL/6 마우스에 5-10x10<sup>5</sup>의 암세포를 PBS, 100ul에 현탁한 후 피하주사하여 마우스 암모델을 제작함.</li> <li>② 작두콩추출물등복합물, 그리고 활성 성분 후보물질 (lupeol, chicoric acid, lupeol+CA) 처리에 따른 암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역조절 활성 탐색 및 tumor mass, survival rate 등의 항암효과 및 면역세포에 미치는 영향을 분석함</li> </ol>	<p>암 세포주(MC38)를 활용한 질환 모델에서 작두콩추출물등복합물 및 활성 유도체 후보물질의 면역조절 활성 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 암 진행정도 측정(survival rate, tumor mass),</li> <li>- 면역세포활성 및 침윤능,</li> <li>- 자연살해세포 cytotoxicity 기능, 암전이능,</li> <li>- 세포자연사 및 cell cycle을 통한 항암효능을 확인</li> </ul>
<p>마우스 점막자가면역 질환 모델에서 면역조절 활성 및 효능 확인</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>① 점막자가면역질환 (ulcerative colitis) 유발 마우스모델을 만들기 위하여 7주령의 C57BL/6 마우스에 dextran Sulfate Sodium (DSS)를 5% 농도로 음용수에 타서 먹임.</li> <li>② DSS를 7일간 음용시킨 후 체중감소와 심한 설사, 창자출혈, 점막손상 증상을 나타내는 마우스들만을 선택하여 연구에 사용함. 본 연구에서는 정상그룹과 염증성 장질환 유발그룹(실험군)으로 나누어 각 그룹 당 5마리를 실험에 배정함. 작두콩 및 우영 복합물 (1:4), 그리고 활성 성분후보물질(lupeol, chicoric acid, lupeol+CA)의 생리활성 및</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DSS 유도 IBD 마우스 모델 체중변화 측정결과, 약물 투여군(작두콩, 우영, 작두콩추출물등복합물, 홍삼)에서도 정상군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소되는 것을 확인할 수 있었고, lupeol, chicoric, acid, lupeol+CA는 항바이러스, 항균 면역증강 효과를 가지게 하는 물질로 정상군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소되는 것을 확인.</li> <li>- DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 질병활성도 변화 관찰 결과, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA투여군은 9일에서 7점 이하의 점수를 나타내었고, 이는 통계학적으로 유의성을 나타내었다. 나머지 약물 투여군(우영, 작두콩 우영 혼합물)은 9일에서 lupeol, chicoric acid, lupeol+CA 투여군 점수보다 약간 높은 7점 이상의 점수를 보였고, 통계학적으로 유의성을 확인</li> </ul>

연구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
	면역증진 효능 검증을 위한 DSS 유도 IBD마우스 모델 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 장 길이 변화 관찰결과, DSS를 유도한 지 9일 후에는 약물 투여군 중 작두콩 우영 혼합물 100mpk 투여군과 홍삼투여군, 양성대조군(lupeol, chicoric acid, lupeol+CA)에서 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 약간 장 길이가 긴 것을 확인.</li> <li>- 위 결과들에 비추어 보았을 때 IBD마우스 모델에서도 마찬가지로 작두콩과 우영을 혼합투여 하였을 때 면역증진효과가 가장 클 것으로 사료됨.</li> </ul>
원료 표준화	추출법의 scale-up (대량 추출 공정)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대량추출 시 발생한 문제점(인습)을 해결하기 위해, 추출업체 변경에 따른 추출방법 수정 및 대량 추출공정 확립</li> <li>- 추출업체 : 전남생물산업진흥센터</li> </ul>
	활성/지표물질 분리 및 분석법 확립 (분석법 검증)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성/지표물질 분리 및 분석법 확립</li> <li>- 작두콩 : Lupeol, validation 완료</li> <li>- 우영 : Isochlorogenic acid A</li> </ul>
	대량생산 및 시험식품 생산 (대량 추출 및 제형검토)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 다양한 제형가능성 검토를 통해 인체적용시험에 적용할 제형 선정(tablet)</li> <li>- 선정된 제형에 맞는 배합비 확정</li> <li>- 추출업체에서 대량추출 진행</li> <li>- 인체적용시험용 대조군, 시험군 샘플 제작</li> </ul>
	원산지별 원료 수급 및 동등성 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 원산지별 원물 수급</li> <li>- 각 원료별 소량 추출의뢰</li> <li>- 원료별 HPLC chromatogram 패턴 분석 및 지표성분 함량 변화 확인</li> </ul>
소재의 안전성 확보	위해물질 검사	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 중금속, 잔류농약, 미생물 기준 규격 확인</li> <li>- 각 위해물질 공인분석의뢰</li> </ul>
원료의 산업화	소재 제안 마케팅	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제조&amp;유통회사에 작두콩추출물등 복합물 소재 교육 및 제안(5건)</li> <li>- 각종 원료박람회에 소재 전시</li> </ul>

3. 3차 년도 : 2017년 10월 23일 ~ 2018년 10월 22일

가. 연구 목표 및 연구 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구 목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2018)	작두콩을 이 용한 면역 조절 기능성 을 갖는 건 강 기능 식품 의 개발  (주관기관 : 애 경 산 업 (주))	[1세부 : 애경산업 (주)] 인체 효능 검증	1. 모니터링 및 데이터 수집	1. 15차 모니터링 완료 (주 1회) - 중도탈락 및 부적격자 관리 / 모니터링 2. 패널 데이터 및 분석 데이터 수집 완료
			2. 통계 분석 및 데이터 정리 - 통계처리 : 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정	1. 유효성 분석 - 각각의 지표에 대하여 섭취 전후 변화의 정도를 t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가함. 2. 안전성 분석 1) 이상 반응 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화 한 후 발생률을 산출하여 평가함. 2) 임상병리검사 혈액학적 및 혈액화학적 검사, 뇨검사 Paired t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가함 3) 활력징후(맥박, 혈압, 체온), 체중 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석 4) 심전도 검사 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 분류하여 McNemar test를 이용하여 군내 차이를 비교
			3. 결과 분석	1. 유효성 결과 1) NK cell activity(12.5:1, 25:1, 50:1) 시험군에서 약간 증가하는 양상을 나타내었으나, 통계적으로 유의한 결과를 나타내지 않음. 2) 식균작용(Phagocytosis) 시험군과 대조군에서 모두 감소하였으며, 시험군에서 감소 양상이 낮았으나, 통계적으로 유의한 결과를 나타내지 않음. 3) IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-12, WBC 수, IgA Cytokine의 분석에서 시험군과 대조군에서 큰 차이를 나타내지 않았으며, IgA의 경우 섭취군에서 약간의 증가 (시험군 : 1.09 $\pm$ 21.44 $\mu$ g/ml 증가 ( $p=0.7326$ ), 대조군 : 5.05 $\pm$ 13.03 $\mu$ g/ml 감소 ( $p=0.0137$ ))를 나타내었으나, 통계적으로 유의한 결과를 나타내지 않음. 4) Cortisol, Serotonin Cortisol, Serotonin의 분석에서 시험군과 대조군에서 통계적으로 유의한 결과를 나타내지 않음. 5) 자신에 의한 개선도 평가 2. 안전성 결과 1) 총 101명(시험군 51명, 대조군 50명)의 시 험대상자가 Safety Set에 포함 2) 중대한 이상반응 및 이상반응으로 인한 중 도탈락은 발생하지 않음.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구 목표	연구개발 수행내용	연구결과
				<p>3) 임상병리검사는 스크리닝 방문과 방문3에서 시행되었으며, 검사항목은 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 뇨검사로 나누어 평가됨.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 뇨검사에서 섭취 8주 후 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</li> </ul> <p>4) 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아 작두콩추출물등 복합물 섭취가 인체에 안전한 소재임을 확인함.</p>
	<p>작두콩의 면역조절 효능 평가 및 성분 규명/기작 연구</p> <p>(제1협동 : 대전대학교 산학협력단)</p>	<p>염증 및 암 마우스 모델로부터 후보물질 (작두콩/우영 소재조합 추출물, JW)의 주사, 경구투여 및 패치타입에 의한 항염 및 항암 효능 확인</p>	<p>1. 전신과민성 식품 알레르기 마우스 모델에서의 작두콩 (Canavalia gladiata D.C.) 추출물의 항염 효과</p> <p>2. 마우스 점막자가면역 질환 모델에서 유도체 후보물질처리 (lupeol, daucosterol)에 의한 면역세포 활성화 증진</p>	<p>1. <i>In vivo</i>모델에서 작두콩 추출물의 식품알레르기에 의한 효과를 연구한 결과로, cholera toxin과 땅콩추출물로 유도한 식품알레르기 마우스 모델을 이용하여 작두콩 추출물의 알레르기 억제 효과를 확인하였다.</p> <p>2. cholera toxin로 감각하고, 땅콩추출물로 유도한 마우스 모델에 작두콩을 투여한 실험군의 분리한 비장세포를 배양한 후, 비장세포의 IL-10, IL-4 및 IFN-<math>\gamma</math> cytokine 분비량을 측정하였다.</p> <p>3. 그 결과, 비장세포의 IL-10, IL-4 및 IFN-<math>\gamma</math> 분비량도 작두콩 추출물 투여함에 따라 감소하였다. 작두콩 추출물이 알레르기를 cholera toxin과 땅콩추출물로 유도한 마우스 모델에 혈청에서의 Ara h1 분비능을 확인하였다. 혈청의 항체 분비량 측정 결과, 작두콩 추출물 투여군이 대조군에 비해 유의적으로 낮은 분비량을 보였다.</p> <p>4. 이상의 결과를 통해 작두콩추출물이 Ara h1, 염증 사이토카인의 감소 효과를 통해 식품알레르기 반응을 효과적으로 억제하는 하나의 천연물질로서의 가능성이 있다고 사료된다</p> <p>1. <i>In vivo</i>에 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물을 경구투여 하였을 때 비장의 면역세포들이 증가됨을 확인함. 이러한 결과는 비장의 세포주기가 증가됨을 통해 면역세포들의 증식 및 분화가 증가되었음. 또한 PEC의 B cell의 population이 증가됨을 통해 IgA 및 IgG의 productio이 증가됨.</p> <p>2. IBD 마우스 모델에서 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물을 경구투여 하였을 때 IBD 질환지표들이 개선되었으며, 대장내의 증가된 ROS 및 IgA production을 리커버됨을 확인함.</p> <p>3. Daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물의 경구투여에 의해 IBD 질환지표들이 개선됨을 확인함으로써 작두콩 및 우영 추출물의 유효성분이 lupeol 및 daucosterol 그리고 두 성분을 lupeol+daucosterol 혼합물에서는 상승효과는 뚜렷하지는 않음..</p> <p>4. 비장내의 다양한 면역세포들이 증가됨을 확인하였으며, 특히 주요면역 장기들에서 대식세포의 populatio이 크게 증가됨을 통해</p>



구분 (연도)	세부과제명	세부연구 목표	연구개발 수행내용	연구결과
				<p>활성화된 대식세포가 다양한 면역세포의 활성을 증가시키는 것으로 생각됨 (NK 세포독성능 및 IgA production 조절).</p> <p>5. Foxp3 양성 세포의 감소된 개체 수는 DSS 처리 마우스에서 관찰되었지만 Daucosterol 치료로 회복되었다</p> <p>6. 위 결과들에 비추어 보았을 때 IBD마우스 모델에서도 daucosterol, lupeol, lupeol+ daucosterol 혼합물이 면역반응을 증가시킴으로써 IBD의 질환을 개선시키며, lupeol 및 daucosterol이 그 유효성분임을 검증하였음</p>
			3. MC38 암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체 (daucosterol, lupeol)의 면역조절 활성 탐색	<p>1. 대장암 모델에서 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+ daucosterol 혼합물은 대조군과 비교하여 중앙 부피와 중량을 감소시켰다.</p> <p>2. 대장암 모델에서 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+ daucosterol 혼합물은 세포주기 중G0/G1기를 증가시켰으나 S기를 감소시켰다.</p> <p>3. 이러한 결과로 JW, 그들의 성분인 daucosterol, lupeol, lupeol+ daucosterol 혼합물은 항염증 효과, 면역증진활성 및 항암 효과를 확인하였다.</p> <p>4. JW의 이러한 효과는 lupeol과 daucosterol의 효과로 기인한다는 것을 시사한다. JW는 면역조절관련 질병의 발생을 예방하고 면역력을 높이는데 도움이 되는 하나의 천연물질로서의 가능성이 있다고 사료된다.</p>
		Promoter assay 및 electrophoretic mobility shift assay	4. Promoter assay 및 electrophoretic mobility shift assay(EMSA)를 이용한 transcription factor 활성 분석	<p>1. RAW264.7세포주에서 LPS로 자극 후 JW 혼합물을 50 mg/kg와 100 mg/kg 처리하여 항염 전사인자인 NF-kB와 AP-1의 binding activity를 EMSA로 분석한 결과,</p> <p>2. JW 혼합물을 50 mg/kg와 100 mg/kg 처리군에서 NF-kB와 AP-1의 binding activity가 대조군 (LPS-control)과 큰 차이를 나타내지 않아 직접적인 항염 효과는 나타내지 않았다..</p>
		세포이동능 분석(wound healing assay)	5. 세포의 이동능력을 알아보기 위해, wound healing assay를 이용	<p>1. MC38 (murine colon cancer cell line)에 대한 샘플의 cell migration 억제 효과를 샘플 투여 12시간 후에 확인해본 결과, Control (26.5%), JW (23.82%), Lupeol(36.53%), Daucosterol(35.06%), Lupeol+ Daucosterol (24.93%) 의 migration 퍼센트를 확인하였다.</p> <p>2. Control과 비교하여 Lupeol과 Daucosterol의 cell migration퍼센트는 증가하였지만, JW와 Lupeol+Daucosterol 샘플에서는 p.value는 나오지 않았지만 cell migration이 감소된것을확인하였다.</p> <p>3. 이 결과는 JW, 그들의 성분인 daucosterol, lupeol, lupeol+ daucosterol 혼합물은 항염증 효과, 면역증진활성 및 항암 효과를</p>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구 목표	연구개발 수행내용	연구결과
				<p>확인하였다.</p> <p>4. JW의 이러한 효과는 lupeol과 daucosterol의 효과로 기인한다는 것을 시사한다. JW와 Lupeol+ Daucosterol이 colon cancer의 migration을 억제함을 지지할 수 있다.</p> <p>5. 특히 JW는 면역조절관련 질병의 발생을 예방하고 면역력을 높이는데 도움이 되는 하나의 천연물질로서의 가능성이 있다고 사료된다.</p>
	작두콩의 공정표준화 및 면역기능을 갖는 건강기능식 품 소재로서의 개발  (제2협동 : (주)노바렉스)	개별인정형 허가 추진	<p>1. 원료의 안전성, 생체유용성, 기능성 자료 확보</p> <p>2. “면역 증진에 도움을 줄 수 있음” 기능성</p> <p>3. 생리활성기능 2등급 목표로 개별인정 신청</p>	<p>1. 원료 특성에 관한 자료 (영양성분, 성상, 지표성분) 분석</p> <p>2. 유해물질 규격 및 근거 자료 (중금속, 유해물질, 대장균군) 분석</p> <p>3. 기능성 근거 자료 DB검색 및 문헌조사</p> <p>4. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 근거자료 수집</p> <p>5. 식품의약품안전처 건강기능식품 인정 신청서 양식에 맞추어 작성 완료 및 제출</p>
		식품 제형 개발	<p>1. 선정된 소재에 적합한 다양한 제형 개발 - 과립제, 산제, 정제, 캡슐제, 내용액제, 환제 등</p> <p>2. 안정성 확보를 위한 제형 연구</p> <p>3. 시제품 개발</p>	<p>1. 자체 선호도 평가를 통한 적합한 제형 선택 : 정제, 분말, 스틱젤리, 구미젤리로 자체 선호도 평가를 시행한 결과 선호도와 생산성을 고려하여 정제와 구미젤리가 가장 적합한 제형이라 판단됨</p> <p>1. 선호도 평가 결과를 바탕으로 정제와 구미젤리 제형 생산을 위하여 적절한 부형제를 첨가하여 최적의 배합비를 확립함</p> <p>1. 제형을 고려한 다양한 포장 형태 제작 - 정제의 PTP포장과 삼면포장, 구미젤리의 병 포장</p> <p>2. 연령층을 고려한 시제품 박스 디자인 제작 - 어린이를 위한 귀여운 이미지와 중장년층을 위한 건강한 이미지 2가지 제작</p>
		양산화 공정 확립	<p>1. 대량 재배 및 원료 수급 방안 수립</p> <p>2. 대량 원료화 방안 수립</p> <p>3. 품질관리 기준 확립</p>	<p>1. 작두콩과 우영의 산지별 원물의 비교 분석하여 동등성 확인</p> <p>1. 작두콩과 우영의 3Lots 대량 추출 및 최적 조건 확립</p> <p>1. 원료의 3Lots 3Times 지표성분 함량 분석 및 동등성 확인</p> <p>2. 중금속, 잔류농약 등 유해물질 검사</p> <p>3. 소재의 안전성 확보 (인체적용시험 시험식품 유해물질 규격 확인)</p>

나. 연구 범위 및 구체적인 연구 수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
인체 효능 검증	모니터링 및 데이터 수집	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 모니터링은 처음 1명 Enrollment 후 1회”, “1회/4-5명 enrollment 또는 1회/월”로 모니터링을 실시함.</li> <li>- 모니터링 시 발생하는 쿼리는 방문 당일 날 모두 해결하는 것을 원칙으로 하고, 모니터링 시 시험담당자 항상 배석원칙으로 함.</li> </ul>
	통계 분석 및 데이터 정리 - 통계처리 : 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 p<0.05 수준에서 유의성을 판정	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유효성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>① 각각의 지표에 대하여 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가함.</li> <li>② 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가에 대한 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가</li> </ul> </li> <li>- 안전성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>① 이상 반응 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 이상반응 (treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA preferred term에 따라 Coding 하였으며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화 한 후 발생률을 산출하여 평가함. 각 군간 이상반응이 발생한 시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석</li> <li>② 임상병리검사 혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하였고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석 노검사의 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교</li> <li>③ 활력징후(맥박, 혈압, 체온), 체중 활력징후(혈압, 맥박, 체온), 체중 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석</li> <li>④ 심전도 검사 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 분류하여 표로 제시하였으며, McNemar test를 이용하여 군내 차이를 비교</li> </ul> </li> </ul>
	결과 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유효성 결과의 분석 NK cell activity(12.5:1, 25:1, 50:1), 식균작용(Phagocytosis), IFN-<math>\gamma</math>, IL-2, IL-10, IL-12, WBC 수, IgA, Cortisol, Serotonin에 대한 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 실시하고,</li> </ul>

연구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
		<p>각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하며, 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가에 대한 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가함. 단, 정규성이 심각하게 위배되는 경우 로그변환방법(logarithm transformation) 등의 변수변환을 실시한 후 검정하거나 비모수검정법인 Wilcoxon rank sum test를 실시할 수 있음.</p> <p>- 안전성 결과의 분석</p> <p>① 이상반응 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 이상반응(treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA preferred term에 따라 Coding하며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화 한 후 발생률을 산출하여 평가. 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교</p> <p>② 임상병리검사 섭취 전(스크리닝 방문: week -3)과 섭취 후(방문3: Closing visit, week 8)의 임상병리검사 결과를 비교하여 변화값을 산출함. 혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석한다. 뇨 검사의 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교함.</p> <p>③ 활력징후(맥박, 혈압, 체온), 체중 활력징후(맥박, 혈압, 체온), 체중 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석함.</p> <p>④ 심전도검사 심전도검사 결과는 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 분류하여 표로 제시하며, McNemar 검정을 이용하여 군내 차이를 비교함.</p> <p>⑤ 중간분석 본 인체적용시험에서는 적용하지 않음.</p> <p>⑥ 기타 관찰항목 분석 시험대상자의 섭취 전, 중, 후에 얻어지는 관찰항목(식이조사 등)은 적당한 기술통계량들을 구하고, 연속형 자료는 군별 평균과 표준편차를 제시함. 군별 비교를 위하여 Two sample t-test를 실시하고 유의확률 값을 제시한다. 범주형 자료는 각 수준별로 빈도와 비율을 제시하고 독립성검정을 위한 Chi-square test 혹은 Fisher's exact test를 실시하고 유의확률 값을 제시함.</p> <p>- 혈액학적검사, 혈액화학적검사에서 섭취 8주 후</p>

연구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
		<p>섭취기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 뇨검사 분석 결과 모든 검사항목에서 시험군, 대조군 모두 섭취 전후 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</li> <li>- 수축기압, 이완기압, 맥박, 체온, 체중에서 섭취 8주 후 섭취기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</li> <li>- 심전도검사의 분석 결과 섭취 전후 모두 정상으로 나타남.</li> </ul>
<p>최종 후보물질의 식품알레르기 의 평가 자료를 통한 안전성 및 면역증진 검사</p>	<p>C57bl/6n마우스에 알레르기 감작 물질인 cholera toxin으로 감작시킨 모델에 작두콩에 대한 식품알레르기와 면역증진을 평가함.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 전신과민성 식품 알레르기 마우스 모델에서의 작두콩 (Canavalia gladiata D.C.) 추출물의 항염 효과 C57bl/6n 마우스(n= 4 /group)의 경구를 통하여 0 일, 7 일에 10 µg/mouse의 농도로 투여하여 감작시켜 유발하였다. 또한, 동시 0 일, 7 일에 작두콩추출물(5 mg/kg)을 경구투여하고, 2 1 일에는 작두콩추출물 (10 mg/kg)을 3 0 분 간격으로 2 번 경구투하였다. 3 5 일에는 작두콩추출물 (1 0 mg/kg)을 경구투여와 함께, 1 mg/mouse의 농도로 복강 주사하였다. 마지막 주사 후 마우스를 희생하여 실험을 진행하였다.</li> <li>① cholera toxin 유발 및 시험물질의 투여</li> <li>② cholera toxin 유발 동물모델에서의 직장의 체온변화</li> <li>③ 유세포분석 (FACS analysis)</li> <li>④ Ara h1-specific IgE 생성 억제 측정</li> <li>⑤ 마우스 비장세포의 분리 및 배양</li> <li>⑥ 배양된 마우스 비장세포의 cytokine 생성량 측정</li> <li>⑦ 피부조직 병리학적 관찰</li> </ul> <p>작두콩추출물이 Ara h1, 염증 사이토카인의 감소 효과를 통해 식품알레르기 반응을 효과적으로 억제하는 하나의 천연물질로서의 가능성이 있다고 사료됨.</p>
<p>마우스 점막자가면역 질환 모델에서 면역조절 활성 및 효능 확인</p>	<p>① 점막자가면역질환 (ulcerative colitis) 유발 마우스모델을 만들기 위하여 7주령의 C57BL/6 마우스에 dextran Sulfate Sodium (DSS)를 5% 농도로 음용수에 타서 먹임.</p> <p>② DSS를 7일간 음용시킨 후 체중감소와 심한 설사, 창자출혈, 점막손상 증상을 나타내는 마우스들만을 선택하여 연구에 사용함. 본 연구에서는 정상그룹과 염증성 장질환 유발그룹(실험군)으로 나누어 각 그룹 당</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vivo</i>에 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물을 경구투여 하였을 때 비장의 면역세포들이 증가됨을 확인함. 이러한 결과는 비장의 세포주기가 증가됨을 통해 면역세포들의 증식 및 분화가 증가되었음. 또한 PEC의 B cell의 population이 증가됨을 통해 IgA 및 IgG의 productio이 증가됨.</li> <li>- IBD 마우스 모델에서 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물을 경구투여 하였을 때 IBD 질환지표들이 개선되었으며, 대장내의 증가된 ROS 및 IgA production을 리커버됨을 확인함.</li> <li>- Daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물의 경구투여에 의해 IBD 질환지표들이 개선됨을 확인함으로써 작두콩 및 우엉 추출물의 유효성분이 lupeol 및 daucosterol 그리고 두 성분을 lupeol+daucosterol 혼합물에서는 상승효과는 뚜렷하지는 않음..</li> <li>- 비장내의 다양한 면역세포들이 증가됨을 확인하였으며, 특히 주요면역 장기들에서 대식세포의 populatio이 크게 증가됨을 통해 활성화된 대식세포가 다양한</li> </ul>

연구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
	5마리를 실험에 배정함. JW, lupeol, daucosterol, and lupeol, daucosterol,의 생리활성 및 면역증진 효능 검증을 위한 DSS 유도 IBD마우스 모델 제작	면역세포의 활성을 증가시키는 것으로 생각됨 (NK 세포독성능 및 IgA producion 조절). - Foxp3 양성 세포의 감소된 개체 수는 DSS 처리 마우스에서 관찰되었지만 Daucosterol 치료로 회복되었다 - 위 결과들에 비추어 보았을 때 IBD마우스 모델에서도 daucosterol, lupeol, lupeol+ daucosterol 혼합물이 면역반응을 증가시킴으로써 IBD의 질환을 개선시키며, lupeol 및 daucosterol이 그 유효성분임을 검증하였음
암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역조절 활성 탐색	① 7주령의 C57BL/6 마우스에 5-10x10 <sup>5</sup> 의 MC38 대장암 세포를 PBS, 100ul에 현탁한 후 피하주사하여 마우스 암모델을 제작함. ② 최적의 JW, lupeol, daucosterol, and lupeol, daucosterol 처리에 따른 암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역조절 활성 탐색 및 tumor mass, survival rate 등의 항암효과 및 면역세포에 미치는 영향을 분석함	- MC38 (murine colon caner cell line)에 대한 샘플의 cell migration 억제 효과를 샘플 투여 12시간 후에 확인해본 결과, Control (26.5%), JW (23.82%), Lupeol(36.53%), Daucosterol(35.06%), Lupeol+ Daucosterol (24.93%) 의 migration 퍼센트를 확인하였다. - Control과 비교하여 Lupeol과 Daucosterol의 cell migration퍼센트는 증가하였지만, JW와 Lupeol+Daucosterol샘플에서는 p.value는 나오지 않았지만 cell migration이 감소된것을확인하였다. - 이 결과는 JW, 그들의 성분인 daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물은 항염증 효과, 면역증진활성 및 항암 효과를 확인하였다. ● JW의 이러한 효과는 lupeol과 daucosterol의 효과로 기인한다는 것을 시사한다. JW와 Lupeol+ Daucosterol이 colon cancer의 migration을 억제함을 지지할 수 있다. - 특히 JW는 면역조절관련 질병의 발생을 예방하고 면역력을 높이는 데 도움이 되는 하나의 천연물질로서의 가능성이 있다고 사료된다.
마우스 대식세포주인 RAW264.7세포주를 활용하여 LPS로 염증유도 활성화 시킨 후 항염작용에 대한 신호전달 기전을 EMSA법으로 탐색	①RAW264.7세포주에서 LPS로 자극 후 JW 혼합물을 50 mg/kg와 100 mg/kg 처리함. ② 후보 물질 (작두콩/우영 소재조합 추출물)을 처리한 세포로부터 nuclear extract를 분리한 후 α-32P dCTP와 DNA polymerase I의 Klenow 효소를 사용하여 3'-말단을 fill up 하여 probe를 labeling. ③ NF-kB와 AP-1의 binding activity를 EMSA로 분석함.	- RAW264.7세포주에서 LPS로 자극 후 JW 혼합물을 50 mg/kg와 100 mg/kg 처리하여 항염 전사인자인 NF-kB와 AP-1의 binding activity를 EMSA로 분석한 결과, JW 혼합물을 50 mg/kg와 100 mg/kg 처리군에서 NF-kB와 AP-1의 binding activity가 대조군 (LPS-control)과 큰 차이를 나타내지 않아 직접적인 항염 효과는 나타내지 않았다
대장암세포 (MC38)세포주를 활용하여 세포의	①대장암세포(MC38)세포주에 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+ daucosterol 혼합물 처리하여	- MC38 (murine colon caner cell line)에 대한 샘플의 cell migration 억제 효과를 샘플 투여 12시간 후에 확인해본 결과, Control (26.5%), JW (23.82%), Lupeol(36.53%), Daucosterol(35.06%), Lupeol+ Daucosterol

연구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
이동능력 억제로 항암 효능 확인	동시배양하여 세포이동능 분석(wound healing assay) 함.	(24.93%) 의 migration 퍼센트를 확인하였다. - Control과 비교하여 Lupeol과 Daucosterol의 cell migration퍼센트는 증가하였지만, JW와 Lupeol+Daucosterol샘플에서는 p.value는 나오지 않았지만 cell migration이 감소된것을확인하였다. - 이 결과는 JW, 그들의 성분인 daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물은 항염증 효과, 면역증진활성 및 항암 효과를 확인하였다. ● JW의 이러한 효과는 lupeol과 daucosterol의 효과로 기인한다는 것을 시사한다. JW와 Lupeol+ Daucosterol이 colon cancer의 migration을 억제함을 지지할 수 있다. - 특히 JW는 면역조절관련 질병의 발생을 예방하고 면역력을 높이는데 도움이 되는 하나의 천연물질로서의 가능성이 있다고 사료된다.
개별인정형 허 가 추진	원료의 안전성, 생체유용성, 기능성 자료 확보	- 원료 특성에 관한 자료 (영양성분, 성상, 지표성분) 분석 - 유해물질 규격 및 근거 자료 (중금속, 유해물질, 대장균군) 분석 - 기능성 근거 자료 DB검색 및 문헌조사 - 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 근거자료 수집 - 식품의약품안전처 건강기능식품 인정 신청서 양식에 맞추어 작성 완료 및 제출
	“면역 증진에 도움을 줄 수 있음” 기능성	- 작두콩추출물등복합물 기능성 시험을 수행한 대전대학교에서 게재한 동물시험 논문을 식약처 건강기능식품 인정서 양식에 맞추어 작성
	생리활성기능 2등급 목표로 개별인정 신청	- 건강기능식품 법률에 따르면 현재 소비자의 이해를 돕기 위하여 개별인정형 원료의 등급제가 폐지되고 기존의 2등급 이상의 기준으로 상향 조정됨
식품 제형 개 발	신정된 소재에 적합한 다양한 제형 개발 - 과립제, 산제, 정제, 캡슐제, 내용액제, 환제 등	- 자체 선호도 평가를 통한 적합한 제형 선택 : 정제, 분말, 스틱젤리, 구미젤리로 자체 선호도 평가를 시행한 결과 선호도와 생산성을 고려하여 정제와 구미젤 리가 가장 적합한 제형이라 판단됨
	안정성 확보를 위한 제형 연구	- 선호도 평가 결과를 바탕으로 정제와 구미젤리 제형 생산을 위하여 적절한 부형제를 첨가하여 최적의 배합비를 확립함
	시제품 개발	- 제형을 고려한 다양한 포장 형태 제작 : 정제의 PTP포장과 삼면포장, 구미젤리의 병 포장 - 연령층을 고려한 시제품 박스 디자인 제작 : 어린이를 위한 귀여운 이미지와 중장년층을 위한 건강한 이미지 2가지 제작
양산화 공정 확립	대량 재배 및 원료 수급 방안 수립	- 작두콩과 우영의 산지별 원물의 비교 분석하여 동등성 확인
	대량 원료화 방안 수립	- 작두콩과 우영의 3Lots 대량 추출 및 최적 조건 확립
	품질관리 기준 확립	- 원료의 3Lots 3Times 지표성분 함량 분석 및 동등성 확인 - 중금속, 잔류농약 등 유해물질 검사 - 소재의 안전성 확보 (인체적용시험 시험식품 유해물질 규격 확인)

## 제 5 절 원료의 표준화

### 1. 원물의 수급선 확보

원료산지에 관한 명확한 정보가 제공 가능하고, 원활한 원료 수급처를 확보하고자 원물의 국내 대량 생산 및 유통을 담당하고 있는 수급처를 작두콩 1곳, 우영 1곳을 선정하여 원료 확보함.

각 수급선에서 원료 제공 시 원료 산지 증명서를 발급받아 사용함.

### 원산지증명서

판매상품 내역	품명	적두콩	수량	100	년산	2015년
	규격	kg	납품일자	2016.03.21.		
판매처	(주)콩세상	원산지	국산			
납품회사	상호	노바렉스				
	주소	서울 서초구 서초동 서초대로 78번길50 9층				
생산자	상호	(주)콩세상				
	주소	충북 진천군 초평면 오갑리 350				
<p>상기 품목에 대한 원산지 기재사항이 틀림없으며 해당상품을 노바렉스에 공급함을 증명합니다.</p> <p>2016. 03. 21.</p> <p>대표 : 김옥주 (인)</p>						

### 생산 및 수집판매 증명원

생산년도	품목	원산지	상세
2015년	우영	국내산	충북 제천
비고			

상기 품명은 약재 및 그 수량을 생산 및 수집하여 귀하(귀사)에 납품하였음을 확인합니다.

판매자	업체명	갑당약초	대표자	관춘호
	사업자등록번호	204-86-53893		
	소재지	서울시 동대문구 약령동길 147	전화	02-967-2010

2016년 03월 022일  
판매자 (주)갑당약초

Fig. 32. 원산지 증명

### 2. 지표물질 분리 및 분석법 확립

작두콩 및 우영 70%에탄올 추출물의 지표물질 분석법 확립을 위해 학계와 연계하여 지표성분 종류 및 함량 확인함.

#### 가. 작두콩 추출물의 성분 분석 및 지표 성분 선정

1) TLC를 이용한 추출 조건 및 Scale에 따른 성분 변화 확인

작두콩을 이용하여 추출 조건별 성분 변화, 추출 scale별 성분 비교 등을 진행함.



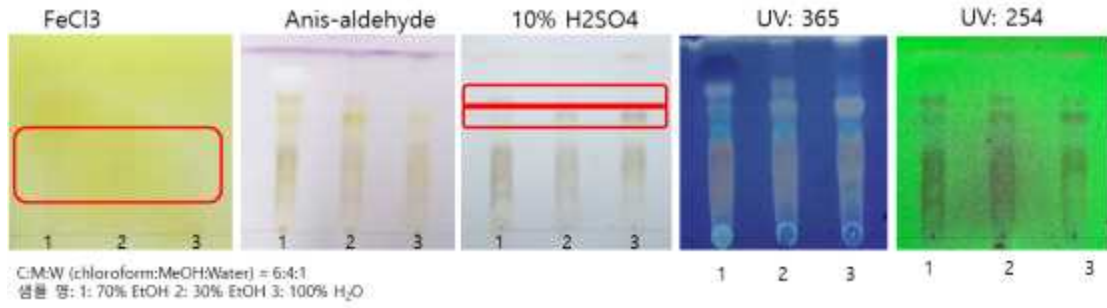


Fig. 33. 추출 용매 조건별 TLC 비교

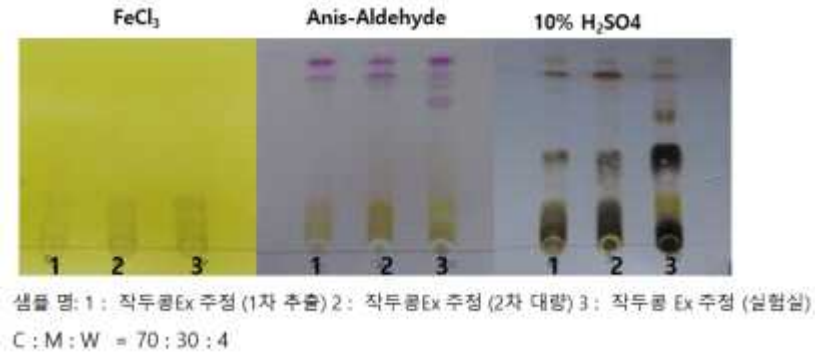


Fig. 34. 추출 scale 별 성분 변화

2) HPLC를 이용한 작두콩 추출물의 분석

가) 작두콩 70% 주정 추출물의 성분 프로파일 분석

(1) 분석조건

- (가) 기기 : Waters e2695 separation module, 2998 photodiode array detector
- (나) 컬럼 : Phenomenex Luna C18(2), 250× 4.6mm, 5 $\mu$ m
- (다) 컬럼 온도 : 40 $^{\circ}$ C
- (라) 샘플 온도 : 25 $^{\circ}$ C
- (마) 주입량 : 20 $\mu$ l
- (바) 유속 : 1 mL/min
- (사) 이동상
  - ① 0.1% trifluoroacetic acid in water
  - ② Acetonitrile

	A	B
0	90	10
10	90	10
60	40	60
61	0	100
75		100
76	90	10
90	90	10

(2) 분석 시료 : 작두콩\_70% 에탄올 추출물 20mg/ml

(3) 분석 결과

(가) 작두콩\_70% 에탄올 추출물 chromatogram (220nm)

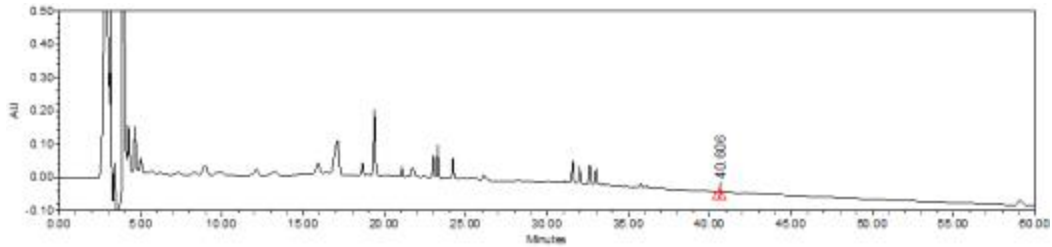


Fig. 35. 작두콩 70% 주정 추출물의 HPLC 분석 결과

(나) 작두콩\_70% 에탄올 추출물의 UV Spectrum (220 nm)

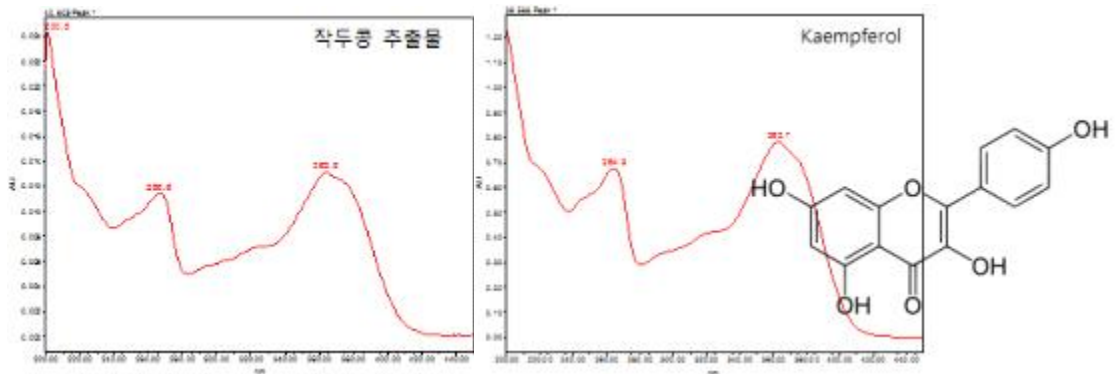


Fig. 36. 작두콩 70% 주정 추출물의 UV 스펙트럼

(다) 주요 성분 RT 및 예상 화합물

Table 7. 작두콩 70% 주정 추출물의 예상 지표 성분

RT	예상 화합물	비고
40.606	Kaempferol	

나) 작두콩 추출물의 지표성분 선정

(1) 분석 조건

(가) 기기 : Waters e2695 separation module, 2998 photodiode array detector

(나) 컬럼 : Phenomenex Luna C18(2), 250× 4.6mm, 5μm

(다) 컬럼 온도 : 40℃

(라) 샘플 온도 : 25℃

(마) 주입량 : 20μl

(바) 유속 : 1 mL/min

(사) 이동상

① 0.1% trifluoroacetic acid in water : A

② Acetonitrile : B

Time(Min)	A	B
0	90	10
10	90	10
60	40	60
61	0	100
75		100
76	90	10
90	90	10

(2) 분석 시료 : 작두콩 70% 에탄올 추출물 20mg/ml

(3) 분석 결과

(가) 작두콩\_70% 에탄올 추출물 chromatogram (220nm)

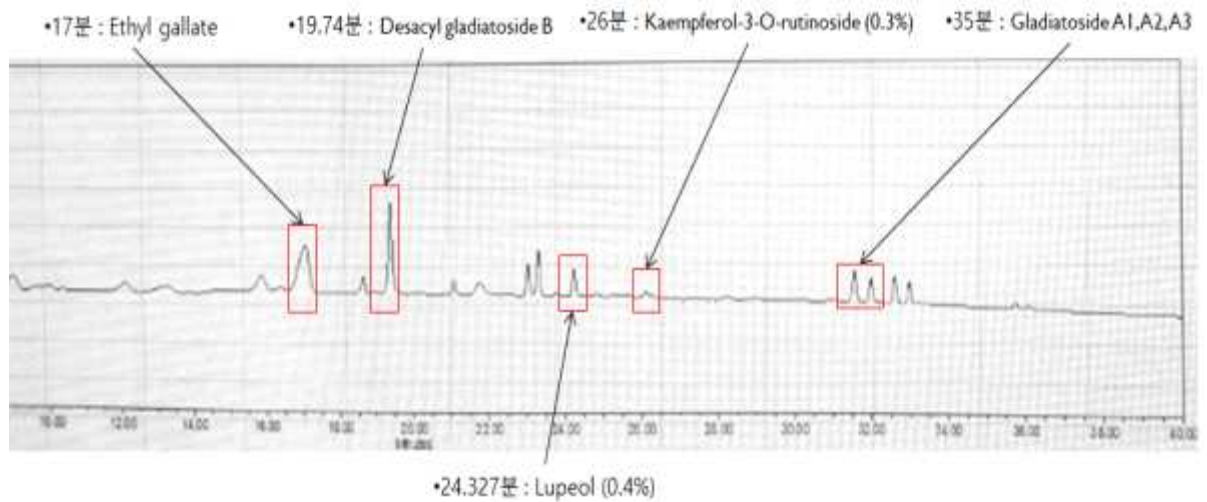
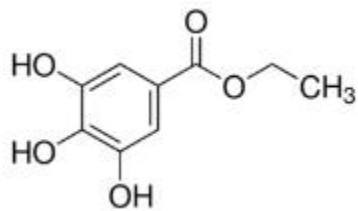
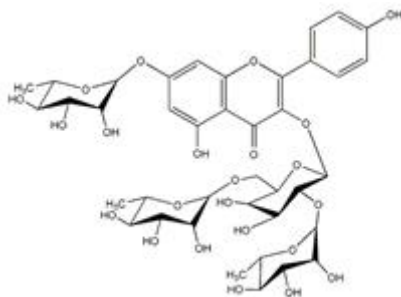


Fig. 37. 작두콩 70% 에탄올 추출물 HPLC분석 결과

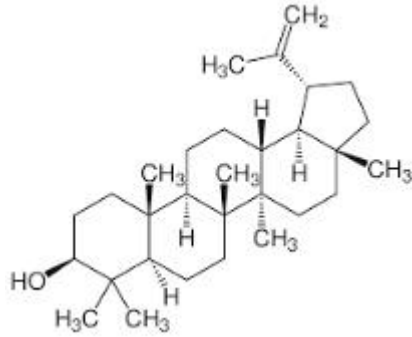
① Ethyl gallate : 17분



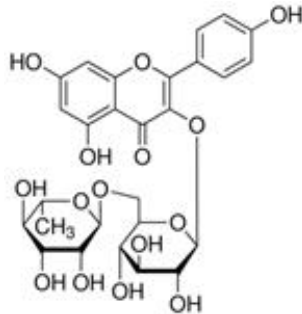
② Desacyl gladioside B : 19.74분



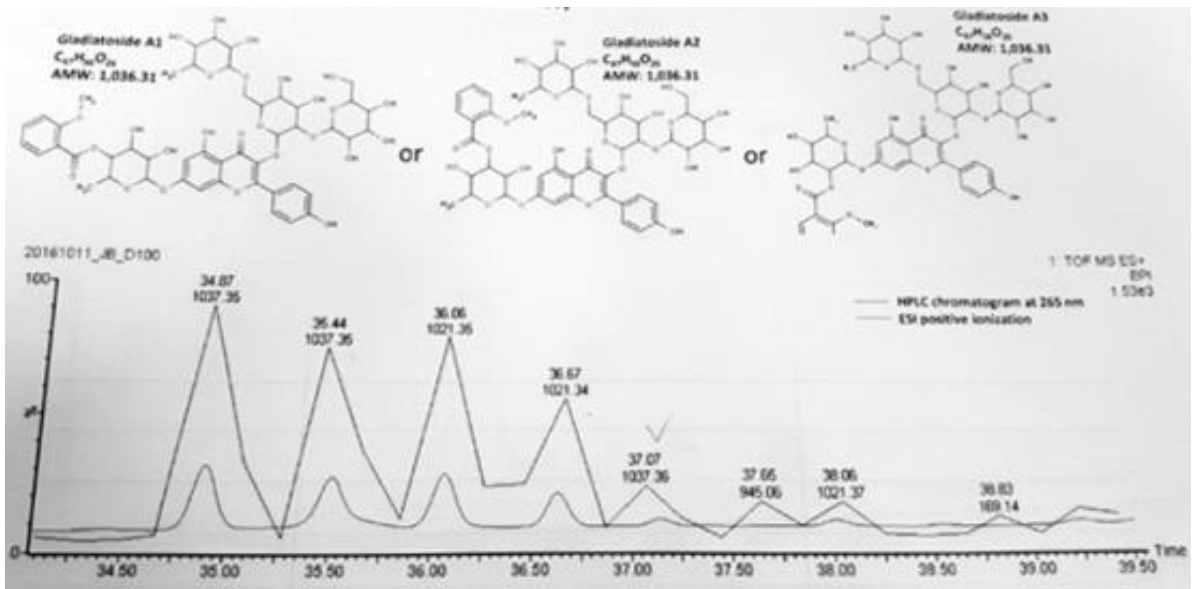
- ③ Lupeol : 24.327분  
 - 함량 : 0.4%



- ④ Kaempferol-3-O-rutinoside : 19.74분  
 - 함량 : 0.03%



- ⑤ Gladioside A1, A2, A3 (Kaempferol 유도체) : 35분 이후 검출



(4) 지표성분의 선정

분석 결과 검출된 성분 중 특이성, 함량, 표준물질 구매 가능 여부를 기준으로 판단하여 **Lupeol**을 최종 지표성분으로 선정함.

2) 작두콩 70% 주정 추출물의 분리 및 구조 동정

작두콩 70% 주정 추출물을 컬럼크로마토그래피를 통한 지표 성분의 분리 및 구조 동정하여 2건을 진행 완료함.

가) Desacyl gladiatoside B

(1) 작두콩을 70% Ethanol을 이용하여 추출한 추출물을 Cellite를 이용해 여과한 후 Water layer를 Sephadex LH-20 와 DaiSogel ODS-B 컬럼크로마토그래피를 이용하여 분리를 진행함. (Fig. 38)

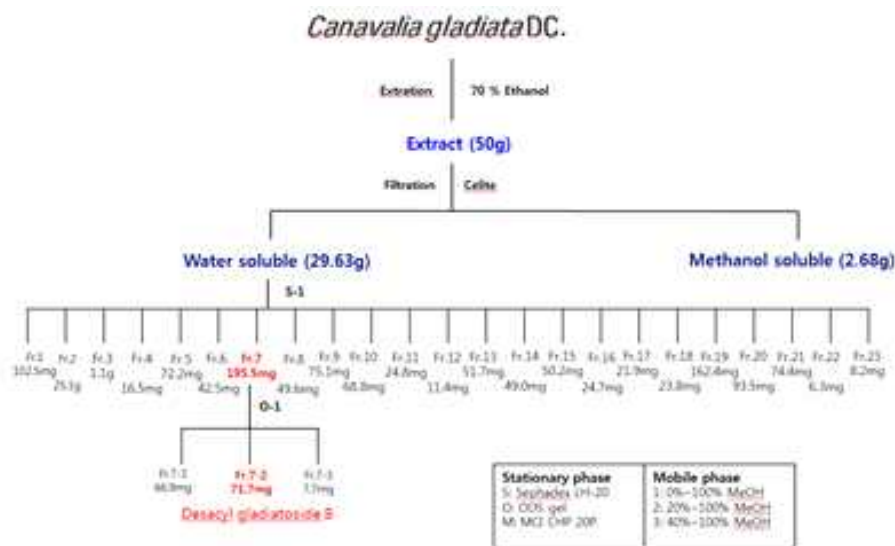


Fig. 38. Desacyl gladiatoside B 분리 Flow chart

- (2) 용매는 H<sub>2</sub>O-MeOH을 0%~100%까지 농도를 높였으며 TLC를 실시하여 1차적인 분리를 진행하였고 DaiSogel ODS-B (H<sub>2</sub>O→100% MeOH, gradient system)을 통해서 Fr. 7-2에서 Desacyl gladiatoside B을 분리하여 얻었음.
- (3) TLC 분석: silica gel TLC plate를 사용하였고, 전개용매는 Chloroform : Methanol : water = 6 : 4 : 1을 이용하여 전개하였으며 TLC plate를 건조한 후 FeCl<sub>3</sub>, Anis-aldehyde sulfuric acid, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 총 3가지의 발색 시약을 이용하여 R<sub>f</sub>치를 확인함. Desacyl gladiatoside B 은 R<sub>f</sub>치 0.38에서 관찰됨.
- (4) 순수하게 분리가 된 물질들은 재결정 가능한 유무에 따라 각각의 결정형, m.p. 및 정색반응 등 각종 물리화학적 성상을 보고 각종 정색 시약(Anis aldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>발색 후 가열, FeCl<sub>3</sub>)에 대해 나타나는 발색반응을 관찰함.
- (5) Anis aldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 발색결과 R<sub>f</sub>치 0.38에서 노란 밴드를 확인할 수 있었으며, FeCl<sub>3</sub> 의 경우 R<sub>f</sub>치 0.38에서 검은색 밴드를 확인할 수 있었음.
- (6) 유효성분의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR 및 각종 Database의 spectral data를 참고하여 검토한 후 최종적으로 각 화합물들의 구조를 결정함.

(가)  $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  0.76(3H, d,  $J=6.1\text{Hz}$ , H-6),  $\delta$  1.03 (3H, d,  $J=6.1\text{Hz}$ , H-6),  $\delta$  1.11(3H, d,  $J=6.1\text{Hz}$ , H-6),  $\delta$  4.35(1H, d,  $J=1.7\text{Hz}$ , H-1),  $\delta$  5.03(1H, d,  $J=1.5\text{Hz}$ , H-1),  $\delta$  5.54(1H, d,  $J=1.9\text{Hz}$ , H-1),  $\delta$  5.57(1H, d,  $J=8.0\text{Hz}$ , H-1),  $\delta$  6.43(1H, d,  $J=2.2\text{Hz}$ , H-6),  $\delta$  6.78(1H, d,  $J=2.2\text{Hz}$ , H-8),  $\delta$  6.88(2H, d,  $J=8.8\text{Hz}$ , H-3'5'),  $\delta$  8.08(2H, d,  $J=8.8\text{Hz}$ , H-2'6')

나) Lupeol

(1) 작두콩을 70% Ethanol을 이용하여 추출한 추출물을 Cellite를 이용해 여과한 후 Water layer를 Sephadex LH-20 와 Slica gel 60(0.040-0.063mm) 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 분리를 진행함. (Fig. 39.)

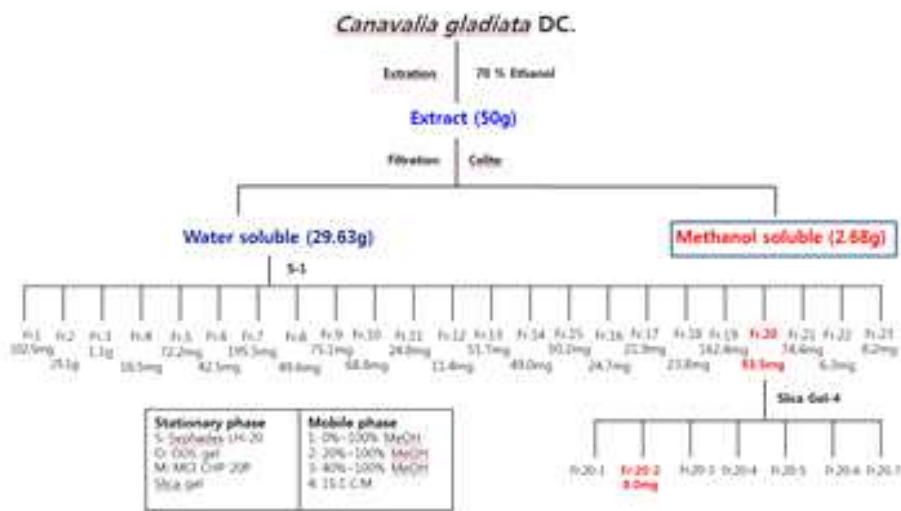


Fig. 39. Lupeol 분리 Flow chart

- (2) 용매는  $\text{H}_2\text{O-MeOH}$ 을 0%~100%까지 농도를 높였으며 TLC를 실시하여 1차적인 분리를 진행하였고 Silica gel ( $\text{Chloroform} : \text{MeOH} = 15 : 1$  isocratic system)을 통해서 Fr.20-2에서 Lupeol을 분리하여 얻었음.
- (3) TLC 분석: silica gel TLC plate를 사용하였고, 전개용매는  $\text{Chloroform} : \text{Methanol} = 15 : 1$ 을 이용하여 전개하였으며 TLC plate를 건조한 후  $\text{FeCl}_3$ , Anis-aldehyde sulfuric acid, 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  총 3가지의 발색시약을 이용하여 Rf치를 확인함. Lupeol 은 Rf치 0.65 에서 관찰됨.
- (4) 순수하게 분리가 된 물질들은 재결정 가능한 유무에 따라 각각의 결정형, m.p. 및 정색반응 등 각종 물리화학적 성상을 보고 각종 정색 시약( $\text{Anis aldehyde-H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 발색 후 가열,  $\text{FeCl}_3$ )에 대해 나타나는 특이한 발색반응을 관찰함.
- (5) Anis aldehyde- $\text{H}_2\text{SO}_4$  발색 결과 Lupeol 은 Rf치 0.65에서 자주색 밴드를 확인할 수 있었으며,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  발색 결과 Lupeol 은 Rf치 0.65에서 갈색 밴드를 확인 하였고,  $\text{FeCl}_3$  에서는 발색되지 않았음.

(6) 구조는 NMR 및 각종 Database의 spectral data를 참고하여 검토한 후 최종적으로 각 화합물들의 구조를 결정함.

(가)  $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Pyridin- $d_6$ + $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  5.19 (1H, s, Hb-29), 5.04 (1H, s, Ha-29), 3.76 (1H, dd,  $J=9.5, 6.0$  Hz, Ha-3), 2.04 (3H, brs, Me-30), 1.54, 1.35, 1.34, 1.28, 1.18, 1.13 (Me-27, Me-26, Me-25, Me-24, Me-23, Me-28).

(나)  $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, Pyridin- $d_6$ + $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  151.1(C-20), 110.0(C-29), 78.2(C-3), 55.9(C-5), 50.8(C-9), 48.6(C-18), 48.3(C-19), 43.3(C-17), 43.1(C-14), 41.2(C-8), 40.3(C-22), 39.6(C-13), 39.3(C-4), 38.4(C-1), 37.5(C-10), 35.8(C-16), 34.7(C-7), 30.2(C-21), 28.7(C-23), 28.3(C-15), 27.8(C-12), 25.6(C-2), 21.2(C-11), 19.5(C-30), 18.8(C-6), 18.2(C-28), 16.5(C-25), 16.4(C-26), 16.2(C-24), 14.8(C-27)

#### 나. 우영 추출물의 성분 분석 및 지표성분 선정

1) TLC를 이용한 추출 조건 및 Scale에 따른 성분 변화 확인

우영을 이용하여 추출 조건별, 문헌상의 지표 성분에 대한 TLC 비교 진행함.

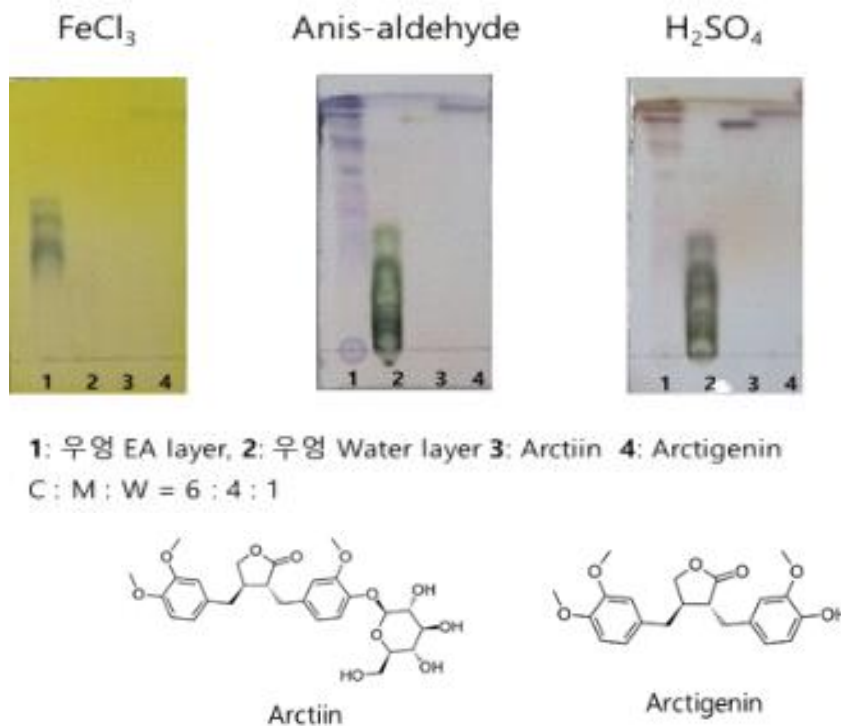


Fig. 40. 단일 지표 가능 물질과 비교 TLC

2) HPLC를 이용한 우영추출물의 분석

우영은 대량 추출 시, 문헌상에서 지표 성분으로 알려진 Arctiin과 Arctigenin과 추가적으로 TLC와 HPLC, LC 등을 통해 확인 추가 지표성분을 확인함.

가) 우엉 70% 주정 추출물의 성분 프로파일 분석

(1) 분석 조건

(가) 기기 : Waters e2695 separation module, 2998 photodiode array detector

(나) 컬럼 : Phenomenex Luna C18(2), 250× 4.6mm, 5μm

(다) 컬럼 온도 : 40℃

(라) 샘플 온도 : 25℃

(마) 주입량 : 20μl

(바) 유속 : 1 mL/min

(사) 이동상

③ 0.1% trifluoroacetic acid in water

④ Acetonitrile

	A	B
0	90	10
10	90	10
60	40	60
61	0	100
75		100
76	90	10
90	90	10

(2) 분석 시료 : 우엉\_70% 에탄올 추출물 20mg/ml

(3) 분석 결과

(가) 우엉\_70% 에탄올 추출물 chromatogram (330nm)

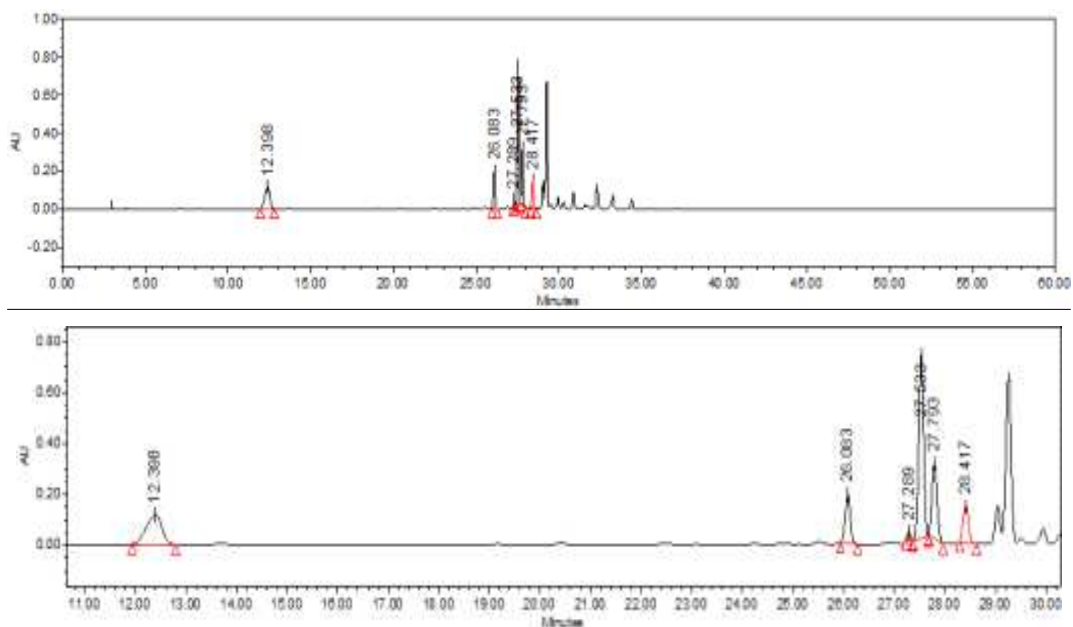


Fig. 41. 우엉 70% 주정 추출물의 HPLC 분석 결과



(나) 우영\_70% 에탄올 추출물의 UV Spectrum (330nm)

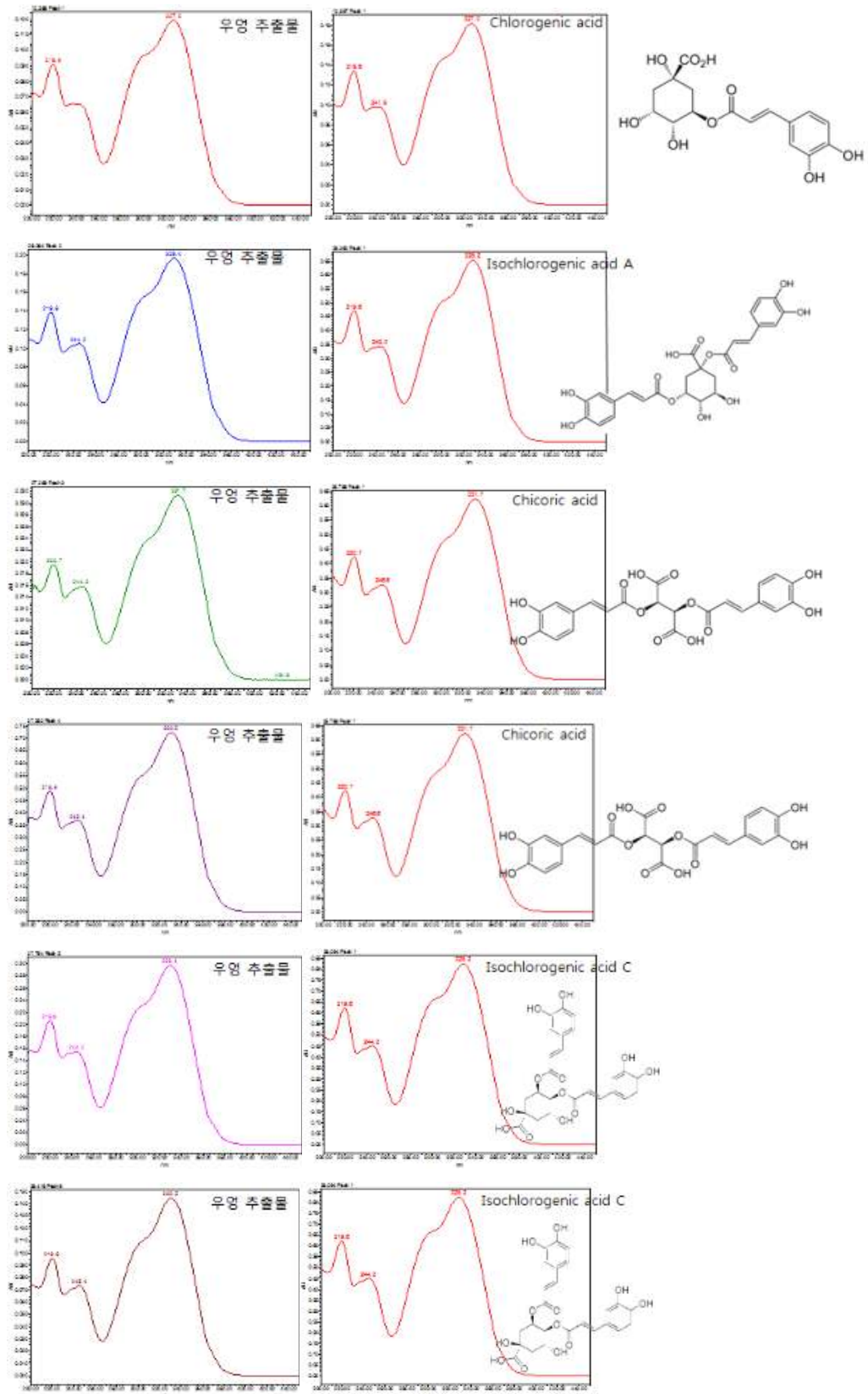


Fig. 42. 우영 70% 주정 추출물의 UV스펙트럼

(다) 주요 성분 RT 및 예상 화합물

Table 8. 우영 70% 주정 추출물의 예상 지표 성분

RT	예상 화합물	비고
12.396	Chlorogenic acid	
26.084	Isochlorogenic acid A	
27.287	Chicoric acid	
27.532	Chicoric acid	
27.792	Isochlorogenic acid C	
28.418	Isochlorogenic acid C	

나) 우영 추출물의 지표성분 선정

(1) 분석 조건

(가) 기기 : Waters e2695 separation module, 2998 photodiode array detector

(나) 컬럼 : Phenomenex Luna C18(2), 250× 4.6mm, 5 $\mu$ m

(다) 검출 : 각 시료의 최대 흡수 파장에서 chromatogram을 확보함

(라) 컬럼 온도 : 40 $^{\circ}$ C

(마) 샘플 온도 : 25 $^{\circ}$ C

(바) 주입량 : 10 $\mu$ l and 20 $\mu$ l

(사) 유속 : 0.5 mL/min

(아) 이동상

① 0.1% trifluoroacetic acid in water : A

② Acetonitrile : B

Time(Min)	A	B
0	90	10
10	90	10
60	<b>70</b>	<b>30</b>
61	0	100
80		100
81	90	10
90	90	10

(2) 분석 시료

(가) 우영 주정 추출물 20mg/ml (주입량 20 $\mu$ l)

(나) STD(5) 0.1mg/ml (주입량 10 $\mu$ l) : 각각의 표준품을 0.1mg/ml의 농도로 섞음

(3) 분석 결과

(가) STD(5) 0.1mg/ml (주입량 10ul) 과 우영 주정추출물 20mg/ml (주입량 20ul)의 Chromatogram (UV 330nm) 비교 (연두색: STD(5) 검정색: 우영 주정추출물)

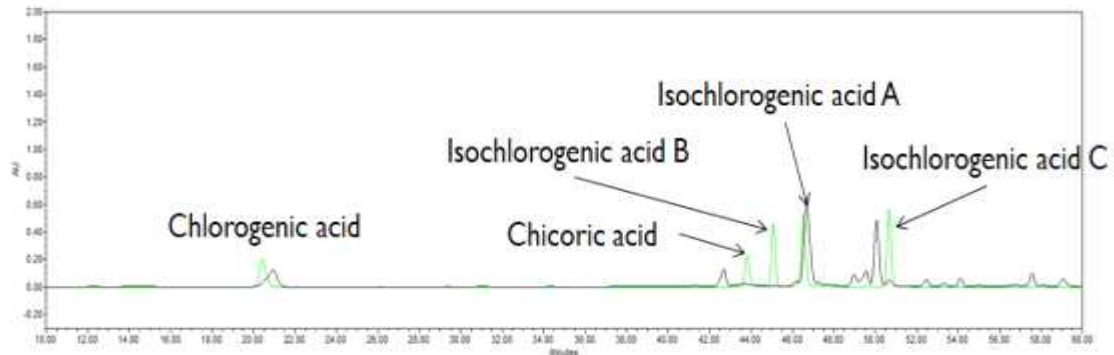


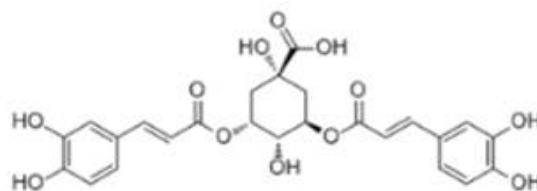
Fig. 43. 우영 70% 에탄올 추출물 HPLC분석 결과

Table 9. 우영 70% 에탄올 추출물 분석 결과

시료명	RT. (min)	UV (nm)	Con. (mg/ml)	Area	inj. (ul)	함량 (%)	함량 (mg/g)
<b>Chlorogenic acid</b>	20.442		0.1	4775169	10		
우영주정추출물	20.952		20	4410906	20	0.231	2.309
<b>Chicoric acid</b>	43.975		0.1	3452755	10		
우영주정추출물	43.632		20	484526	20	0.035	0.351
<b>Isochlorogenic acid B</b>	45.074	330	0.1	6176226	10		
우영주정추출물	45.145		20	68127	20	0.003	0.028
<b>Isochlorogenic acid A</b>	46.542		0.1	7512123	10		
우영주정추출물	46.672		20	11710568	20	0.390	3.897
<b>Isochlorogenic acid C</b>	50.667		0.1	768769	10		
우영주정추출물	50.694		20	592415	20	0.193	1.927

(4) 지표성분의 선정

(가) 우영추출물을 HPLC분석을 통한 UV Spectrum분석 결과 예상된 5가지 성분  
에 대하여 표준 물질을 구매하여 우영추출물의 peak과 비교 분석하였음.  
(나) 분석결과 우영추출물에 함유된 5가지 성분의 함량을 산출하였으며, 특이성,  
함량, 표준물질 구매 가능 여부를 기준으로 판단하여 **Isochlorogenic acid A**  
를 최종 지표성분으로 선정함



<Isochlorogenic acid A>

3) 우영추출물의 추가 지표성분 분석

1차로 우영추출물의 분석을 통하여 Isochlorogenic acid A를 지표성분으로 선정 하였으나, 우영추출물에 대한 특이성이 더 우수한 지표성분을 선정하기 위하여 추가 지표성분 분석을 실시하였음.

우영추출물 분획을 HPLC를 분석을 실시하여 하나의 peak여부를 확인하였고(Fig. 45), <sup>1</sup>H-NMR (Fig. 46)과 <sup>13</sup>C-NMR (Fig. 47) 분석을 실시하였음. 그 결과 M. Khanavi (Z Naturforsch C. 2013 Sep-Oct;68(9-10):367-75) 등의 데이터와 비교하여 Daucoesterol임을 알 수 있었으며, 우영의 70% 에탄올 추출물에 있는 Daucoesterol의 함량을 알아보기 위하여 우영 에탄올추출물과 Daucoesterol을각 각 CHCl<sub>3</sub>/MeOH=1:1 용매에 녹여서 UPLC를 실시하여 본 결과, Fig. 48에서와 같이 우영의 70% 에탄올 추출물 1gram 속에 Daucoesterol 약 7mg이 함유되어있 다고 판단됨. Daucoesterol은 추출용매에 용해도가 낮아서 실제 함량에 비하여 적 게 분석되는 경향이 있으므로, 추가 연구를 통해 최적의 분석법을 확립할 예정임. 본 결과에 따라 daucoesterol을 이용하여 추가적인 효능 평가를 진행하였음.

가) HPLC 분석 조건

- (1) HPLC: Waters e2695 separation module, 2998 PDA Detector
- (2) Column: Phenomenex Luna C18(2), 250×4.6mm, 5μm
- (3) Column temperature : 40°C
- (4) Sample temperature : 25°C
- (5) Sample injection volume : 20μl
- (6) Flow rate: 1ml/min
- (7) Mobile phase: A) 0.1% trifluoroacetic acid in water, B) Acetonitrile

T(min)	A	B
0	90	10
10	90	10
60	40	60
61	0	100
72	90	10
90	90	10

나) UPLC 분석 조건

- (1) UPLC : Waters UPLC (ACQUITY™ Ultra Performance LC)
- (2) Detector : ACQUITY™ QDA Detector
- (3) Column : Waters ACQUITY™ UPLC BEH C18 , 1.7μm, 2.1x100 mm
- (4) Sample injection volume : 시료: 50 mg/ml (dry weight basis), 5μl
- (5) Mobile phase : A) 0.1% Formic acid in water,  
B) 0.1% Formic acid in Acetonitrile
- (6) Gradient method of Mobile phase

T(min)	Flow(ml/min)	%A	%B
	0.400	20	80
1	0.400	20	80
10	0.400	0	100
13	0.400	0	100
13.30	0.400	20	80
15.00	0.400	20	80

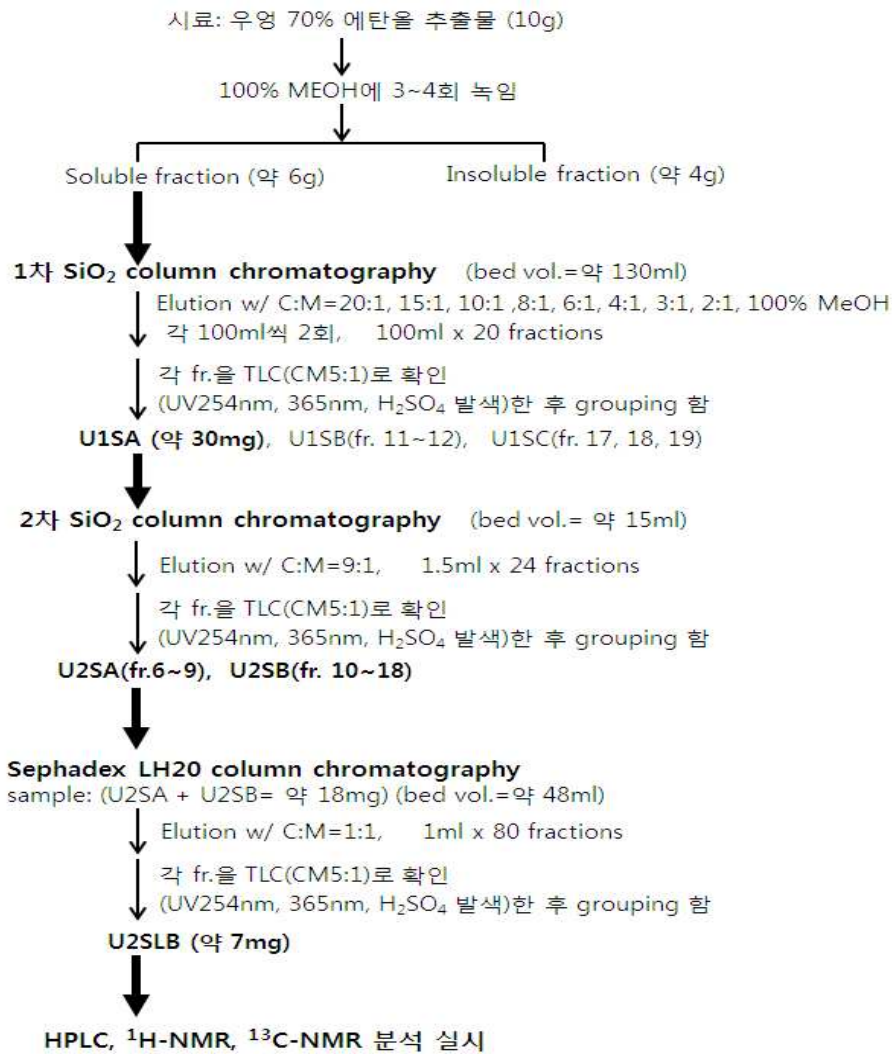


Fig. 44. 우영추출물 지표성분 분석 과정

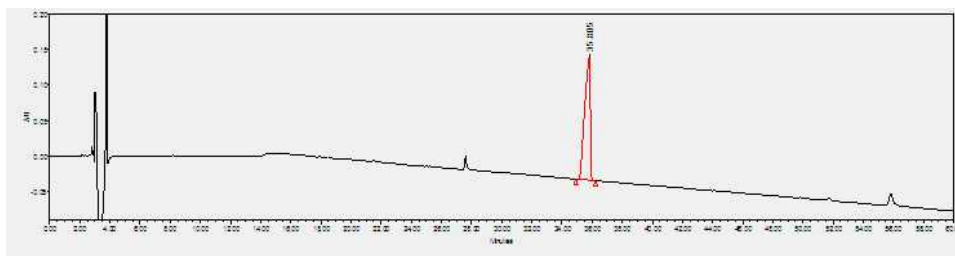


Fig. 45. HPLC 분석 프로파일 (UV<sub>230</sub>)

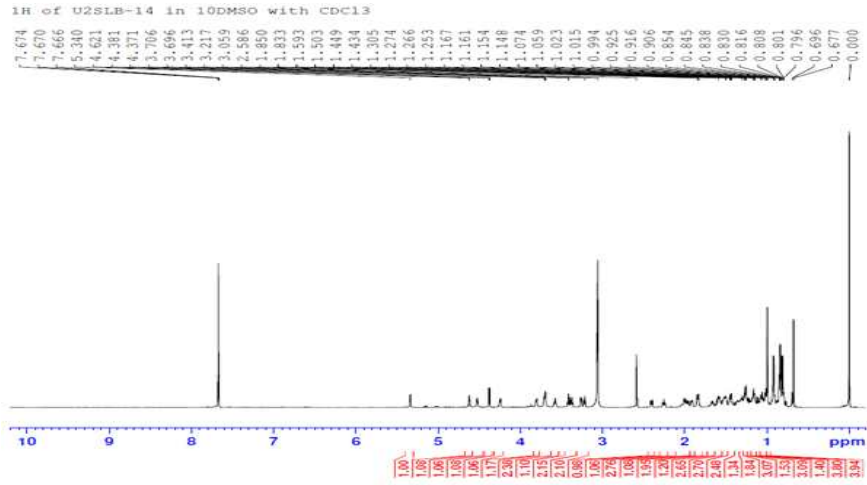


Fig. 46.  $^1\text{H}$ -NMR분석 결과

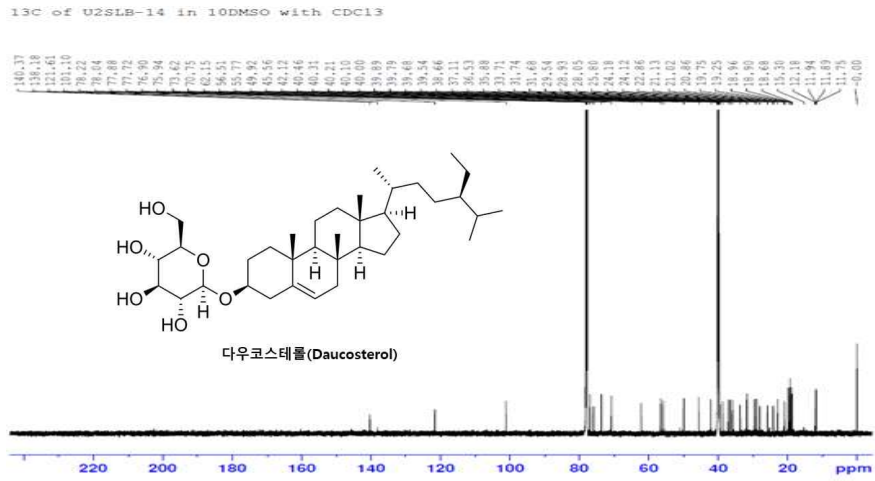


Fig. 47.  $^{13}\text{C}$ -NMR분석 결과

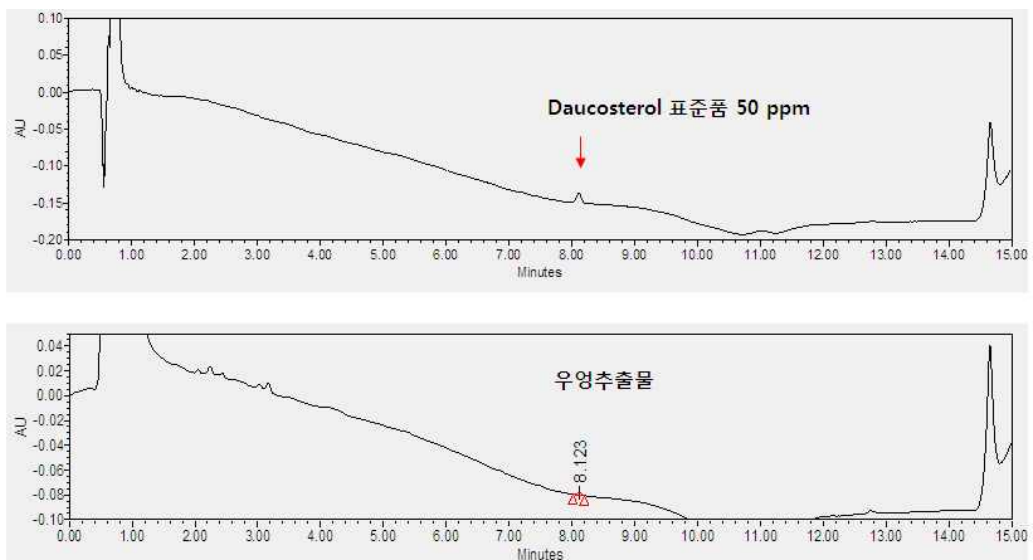


Fig. 48. 우영추출물의 daucosterol 표준품과 비교 UPLC 분석 결과

## 다. 지표물질의 분석법 확립

### 1) 작두콩 추출물의 지표물질 및 분석법 확립

작두콩 추출물의 성분으로 분석된 Desacyl gladiatoside B와 Lupeol의 분석법 확립 및 밸리데이션을 진행하였음. Desacyl gladiatoside B의 경우 표준품의 구매가 어려워 지표물질로 삼아 관리하기에 어려우나, 이에 비하여 Lupeol은 분석한 지표가능 물질 중 표준품을 구하기가 쉬우며 추출물 기준 0.1% 이상의 함량을 보임. 또한, 기존 문헌에 의하면 Lupeol은 항염, 항암 작용을 가지고 있는 Triterpene으로 Geetha 등은 관절염 동물모델에서 대식세포 및 T-림프구의 활성을 조절하며, 염증성 인자의 생성을 억제하는 등의 효과를 보였으며 다양한 세포/동물 실험에서 그 활성이 입증되었음(Mohammad Saleem, 2009). 따라서, 작두콩의 지표성분으로 Lupeol을 선정하고 분석법을 확립함.

### 가) Desacyl gladiatoside B의 분석법 확립 및 validation

#### (1) 실험 용액 제조

모든 표준용액 및 시료용액은 0.22um nylon(PA) syringe filter를 사용하여 여과한 후 사용함.

#### (가) 표준용액의 제조

- ① Desacyl gladiatoside B 1mg을 정밀히 무게를 달아 30% Methanol 1mL에 녹인 것을 표준용액으로 하고, 이 표준용액을 희석하여 제조하여 사용함.
- ② 모든 표준용액은 0.22um nylon(PA) syringe filter를 사용하여 여과한 후 사용함.

#### (나) 시료용액의 제조

- ① Desacyl gladiatoside B 분석 시료용액: 작두콩을 70% Ethanol을 통해 추출해 얻은 Extract를 Desacyl gladiatoside B의 시료용액으로 함.

#### (2) HPLC 분석조건

- (가) 사용한 HPLC 장치는 Waters 600 controller, Waters 600 Pump, Waters 486 Tunable Absorbance Detector, Waters, In-Line Degasser AF, Waters(미국) 이었으며, 컬럼은 HPLC column (Kromasil 100-5C18, 250 \* 4.6mm, 5 $\mu$ m) 을 사용하였다. 전개온도는 25 $^{\circ}$ C 였으며, 유속을 1.0ml/min으로 하여 Desacyl gladiatoside B은 Table 10.의 조건으로 분석하였으며 사용된 모든 시약은 HPLC등급을 이용함. Waters 486 Tunable Absorbance Detector를 이용하여 280nm에서 검출함.

Table 10. HPLC instrument

Instrument	Condition
HPLC System	Waters 600 controller, Waters 600 Pump, Waters 486 Tunable Absorbance Detector, Waters, In-Line Degasser AF, Waters
Column	HPLC column (Kromasil 100-5C18, 250 * 4.6mm, 5µm)
Column Temperature	25°C
Mobile phase	A:Acetic Acid B: Acetonitrile
Injection volume	10µl

Table 11. HPLC condition

Desacyl gladioside B HPLC 분석조건								
기원식물	Canavalia gladiata							
분석방법 및 결과	Mobile phase	0min	3min	60min	70min	75min	85min	
	Solvent A (Acetic Acid)	95	95	0	0	95	95	
	Solvent B (ACN)	5	5	100	100	5	5	
	Flow rate	1ml/min						
	UV	280nm						
	Retention Time	18.7min						

(3) 특이성

(가) Desacyl gladioside B

- ① 작두콩 70%주정 추출액의 크로마토그램을 비교하여 Desacyl gladioside B의 피크가 분리되는 지를 확인한 결과, 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리됨.
- ② 표준용액의 머무름 시간은 18.7 분, 작두콩 추출액의 머무름 시간은 18.7분으로 표준용액의 피크 유지시간과 작두콩 추출액의 피크 유지시간이 일치한 것을 확인함으로써 특이성을 검증함.

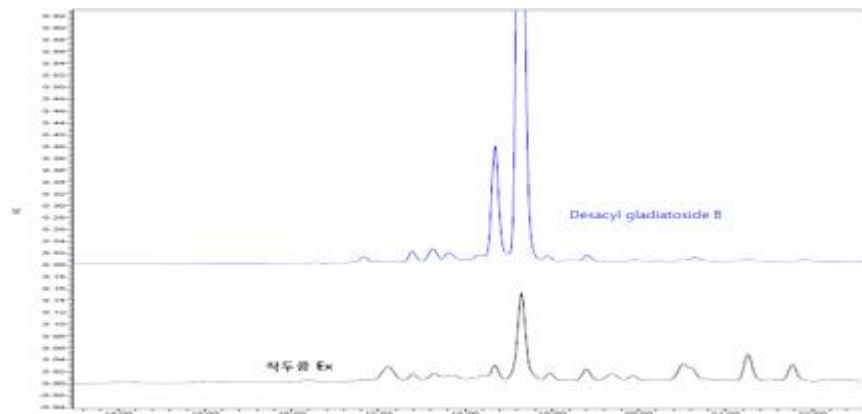
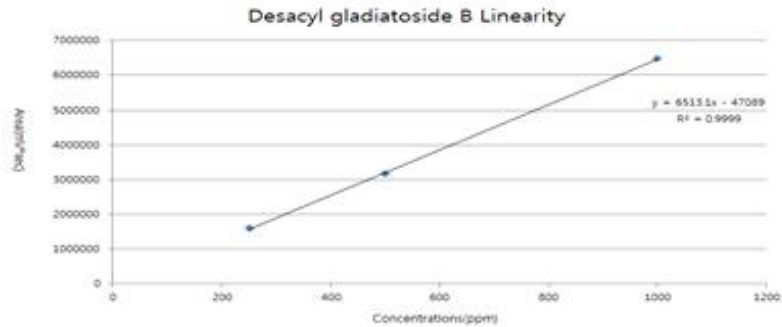


Fig. 49. Specificity of Desacyl gladioside B



(4) 직선성, 범위 및 정량한계

(가) Desacyl gladiatoside B 표준용액을 검량선 작성을 위하여(calibration curve) 메탄올 용액으로 희석하여 3개의 범위로 제조하였으며, 각기 1000, 500, 250 ug/mL이 되도록 용액을 만들어서 측정하여 얻은 피크면적을 Y축으로 표준액의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하여 나타냄.



\* y: peak area, x: concentration, R<sup>2</sup>: Correlation coefficient

Fig. 50. Linearity of Desacyl gladiatoside B

(나) Desacyl gladiatoside B의 표준용액을 1000, 500, 250 µg/mL로 단계적으로 희석한 후 HPLC로 분석하여 작성한 검량선의 직선식은  $Y=6513.1X-47089$ 이며, 검량선의 상관계수(R<sup>2</sup>)는 0.9999로 높은 직선성을 보여 본 농도를 범위(range)로 설정되었으며, 정량한계(LOQ)는 227.15ug/mL으로 설정됨.

(5) 정밀성 및 정확성

(가) Desacyl gladiatoside B 표준용액을 3개의 농도(1000, 500, 250 µg/mL) 범위에서, 각 농도당 일간 반복성시험(3일간), 일내 반복성시험(1일 3회) 반복성 시험을 진행하였음. 정확성은 실제값(actual value)과 측정값(measured value)간의 일치되는 정도를 나타내는 것으로 90~110% 이내로 양호한 값을 나타내었으며, 정밀성은 하나의 균질화 된 시료로부터 취한 여러개의 등분체로 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 개개 측정치의 근접성을 말하는데 모든 c.v.값이 2% 이내로 양호함을 확인함.

Table 12. Precision and accuracy of analytical results

Compound	Conc. (ug/ml)	Accuracy (%)		Precision (c.v., %)	
		Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day
Desacyl gladiatoside B	1000	99.81	100.11	0.33	0.47
	500	99.52	100.15	0.01	1.12
	250	99.99	100.65	0.28	1.18

\* Intra-day: three times per day., Inter-day: one time analysis of standards per day for three days., c.v.: Coefficient of variation.

(6) 함량

Desacyl gladiatoside B의 작두콩 추출물의 건조함량은 0.38%임을 확인함.

Table 13. Contents of compounds

	함량(Ex)
Desacyl gladiatoside B	0.38%

나) Lupeol의 분석법 확립 및 validation

(1) Lupeol의 분석조건

Table 14. Lupeol 분석조건

Waters 600 controller, Waters 600 Pump, Waters 486 Tunable Absorbance Detector, Waters, In-Line Degasser AF, Waters																							
성분명	추출물(70% EtOH) 중 Lupeol																						
기원식물	작두콩( <i>Canavalia Gladiata</i> DC.)																						
분석방법	표준품	Lupeol (Sigma, CAS Number 545-47-1)																					
	Column	Kromasil 100-5C18, 250 * 4.6mm, 5 um																					
	Mobile phase	(A: water, B: Acetonitrile) <table border="1"><thead><tr><th>Time (min)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>4</td><td>96</td></tr><tr><td>5</td><td>4</td><td>96</td></tr><tr><td>65</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>80</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>85</td><td>4</td><td>96</td></tr><tr><td>90</td><td>4</td><td>96</td></tr></tbody></table>	Time (min)	A (%)	B (%)	0	4	96	5	4	96	65	0	100	80	0	100	85	4	96	90	4	96
	Time (min)	A (%)	B (%)																				
	0	4	96																				
	5	4	96																				
	65	0	100																				
	80	0	100																				
	85	4	96																				
	90	4	96																				
	Flow rate	1 mL/min																					
Temperature	컬럼온도 25℃																						
UV	210.5 nm																						
Injection volume	10 uL																						
Run time	90 min																						
Retention time	약 67.2 min																						

(가) 표준품 조제방법

- ① Lupeol은 검량선 작성을 위해 1mg/ml의 농도로 30% MeOH에 녹여 0.22μm syringe filter로 여과하여 사용함.
- ② 희석농도: 125, 250, 500, 750, 1000 ug/mL로 단계적 희석하여 사용 조제함.
- ③ Lupeol의 함량을 구하기 위하여 표준용액의 크로마토그램에서 얻은 피크의 농도 별 면적에 대하여 검량선을 작성함.

(나) 샘플 조제방법

- ① 시료를 20mg 칭량하여 30% MeOH 1mL에 넣어 용해(농도: 20mg/mL), 0.22µm syringe filter로 여과하여 사용함.

(다) Lupeol 함량계산

- ① 표준품의 양의 피크면적을 통하여 작성된 검량선에 의해 추출물 내 시료 중 Lupeol 의 농도를 분석함.

$$\text{Lupeol의 양(mg)} = \text{시험용액의 농도}(\mu\text{g/ml}) \times \text{최종부피(ml)}/\text{시료채취량(mg)} \times \text{희석배수(필요 시)} = \text{결과값(mg/g)}$$

(2) 작두콩 중 Lupeol 분석법의 밸리데이션 및 함량평가

Lupeol를 대상으로 한 HPLC 분석법 1건, 분석법에 대한 validation 연구 1건을 진행완료 및 대량생산 시스템을 통한 추출물 확보 및 지표 성분의 함량평가 1건을 진행 완료함.

(가) 실험 용액 제조

모든 표준용액 및 시료용액은 0.22µm nylon(PA) syringe filter를 사용하여 여과한 후 사용함

① 표준용액의 제조

Lupeol 1mg을 정밀히 무게를 달아 30% Methanol 1mL에 녹인 것을 표준용액으로 하고, 이 표준용액을 희석하여 제조하여 사용함.

모든 표준용액은 0.22µm nylon(PA) syringe filter를 사용하여 여과한 후 사용함.

② 시료용액의 제조

Lupeol 분석 시료용액: 작두콩을 70% Ethanol을 통해 추출해 얻은 Extract를 Lupeol의 시료용액으로 함.

(나) HPLC 분석조건

사용한 HPLC 장치는 Waters 600 controller, Waters 600 Pump, Waters 486 Tunable Absorbance Detector, Waters, In-Line Degasser AF, Waters(미국) 이었으며, 컬럼은 HPLC column (Kromasil 100-5C18, 250 \* 4.6mm, 5µm) 을 사용하였음. 전개온도는 25°C 였으며, 유속을 1.0ml/min으로 하여 Lupeol은 아래 표의 조건으로 분석하였으며 사용된 모든 시약은 HPLC등급을 이용함. Waters 486 Tunable Absorbance Detector를 이용하여 210.5nm에서 검출함.

Lupeol HPLC 분석조건							
기원식물		<i>Canavalia Gladiata DC.</i>					
Mobile phase		0min	5min	65min	80min	85min	90min
분석방법 및 결과	Solvent A (Water)	4	4	0	0	4	4
	Solvent B (ACN)	96	96	100	100	96	96
	Flow rate	1mL/min					
	UV	210.5nm					
	Retention Time	67.2 min					
HPLC Condition							
HPLC system	Waters 600 controller, Waters 600 Pump, Waters 486-Tunable Absorbance Detector, Waters, In-Line Degasser AF, Waters(미국)						
Column	Kromasil 100-5C18, 250 * 4.6mm, 5µm						
Column Temperature	25°C						
Mobile phase	A : Water B : ACN						
Injection volume	10µL						

Fig. 51. Lupeol의 HPLC 분석조건

(다) 특이성

작두콩 70%주정 추출액의 크로마토그램을 비교하여 Lupeol의 피크가 분리되는지를 확인한 결과, 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리됨. 표준용액의 머무름 시간은 67.2 분, 작두콩 추출액의 머무름 시간은 67.2분으로 표준용액의 피크 유지시간과 작두콩 추출액의 피크 유지시간이 일치한 것을 확인함으로써 특이성을 검증함.

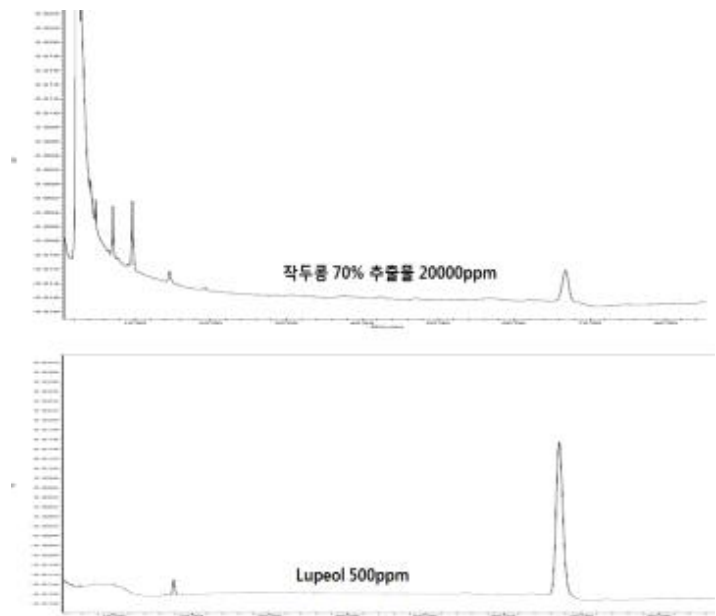


Fig. 52. Lupeol의 특이성

(라) 회수율

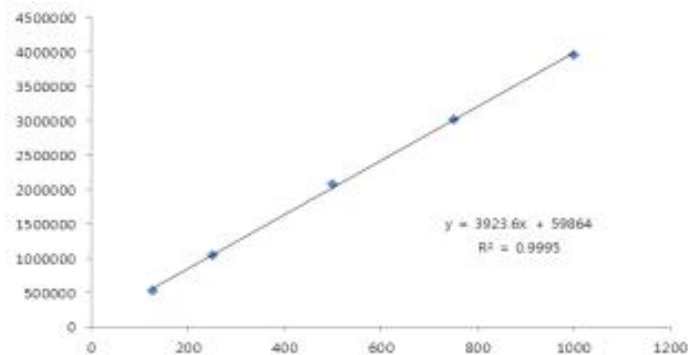
회수율은 불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력이며, 기지의 양을 혼합하여 정량적으로 회수 되는지 확인함. 작두콩 추출물과 지표물질을 혼합하여, 최종적으로 추출물 20000ppm, 지표물질 500ppm를 통해 회수율 실험을 진행하였음. (혼합물 농도 - 추출물 농도) / 지표물질 농도 \*100%) 최종 회수율은 95.30% 임.

Table 15. Lupeol의 회수율

	회수율
Lupeol	95.30%

(마) 직선성

Lupeol 표준용액을 검량선 작성을 위하여(calibration curve) 메탄올 용액으로 희석하여 5개의 범위로 제조하였으며, 각기 1000, 750, 500, 250, 125 ug/mL이 되도록 용액을 만들어서 측정하여 얻은 피크면적을 Y축으로 표준액의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하여 나타냄.



\* y: peak area, x: concentration, R<sup>2</sup>: Correlation coefficient

Fig. 53. Lupeol의 직선성

(바) 범위 및 정량한계

Lupeol의 표준용액을 1000, 750, 500, 250, 125 µg/mL로 단계적으로 희석한 후 HPLC로 분석하여 작성한 검량선의 직선식은 Y=3923.6X+59864이며, 검량선의 상관계수(R<sup>2</sup>)는 0.9995로 높은 직선성을 보여 본 농도를 범위(range)로 설정되었으며, 정량한계(LOQ)는 23.83ug/mL으로 설정됨.

(사) 정밀성 및 정확성

Lupeol표준용액을 5개의 농도(1000, 750, 500, 250, 125 µg/mL) 범위에서, 각 농도당 일간 반복성시험(3일간), 일내 반복성시험(1일 3회)반복성 시험을 진행하였음. 정확성은 실제값(actual value)과 측정값(measured value)간의 일치되는 정도를 나타내는 것으로 90~110% 이내로 양호한 값

을 나타내었으며, 정밀성은 하나의 균질화 된 시료로부터 취한 여러개의 등분체로 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 개개 측정치의 근접성을 말하는데 모든 c.v.값이 2% 이내로 양호함을 확인함.

Table 16. Lupeol 분석의 정밀성 및 정확성

Compound	Conc. (ug/ml)	Accuracy (%)		Precision (c.v., %)	
		Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day
Lupeol	1000	0.8838	0.5714	100.984	100.669
	750	0.8808	0.4367	98.859	99.669
	500	0.3270	1.3059	98.267	97.766
	250	0.5965	0.2115	99.486	99.647
	125	0.7238	1.7656	106.642	106.281

\* Intra-day: three times per day., Inter-day: one time analysis of standards per day for three days., c.v.: Coefficient of variation.

(3) 작두콩추출물 중 Lupeol의 함량 분석

Lupeol의 작두콩 추출물의 함량은 0.306%임을 확인함.

Table 17. 작두콩추출물 중 Lupeol의 함량

	함량(Ex)
Lupeol	0.306%

2) 우영 추출물의 지표물질 및 분석법 확립

우영 추출물의 성분으로 문헌상에 기재된 Actiin, Arctigenin과 성분으로 분석된 Isochlorogenic acid A의 분석법 및 밸리데이션을 진행하였음. Actiin, Arctigenin의 경우 표준품의 구매가 어려우며, 그 함량이 너무 낮아(Actiin : 0.014%, Arctigenin : 0.008%) 지표물질로 삼아 관리하기에 어려움이 따름. 따라서, 우영의 새로운 지표물질을 선정하여 분석법을 확립함. Isochlorogenic acid A는 Chlorogenic acid의 유도체로, Chlogenic acid는 T-cell과 B-cell의 증식을 보조하는 효과를 가지며(한용문, 2010), 항산화, 항염 작용 등이 보고된 성분임(Hwang, 2014). 각 Chlorogenic acid의 유도체 함량을 분석한 결과를 바탕으로 Isochlorogenic acid A를 최종 지표물질로 선정하여 분석법을 확립함.

가) Arctiin, arctigenin의 분석법 확립 및 validation

(1) 실험 용액 제조

모든 표준용액 및 시료용액은 0.22um nylon(PA) syringe filter를 사용하여 여과한 후 사용함.

(가) 표준용액의 제조

- ① Arctiin, arctingenin 1mg을 정밀히 무게를 달아 100% Methanol 1mL에 녹인 것을 표준용액으로 하고, 이 표준용액을 희석하여 제조하여 사용함.
- ② 모든 표준용액은 0.22um nylon(PA) syringe filter를 사용하여 여과한 후 사용함.

(나) 시료용액의 제조

- ① Arctiin, arctingenin 분석 시료용액: 우영을 주정을 통해 추출해 얻은 Extract를 Arctiin, arctingenin의 시료용액으로 함.

(2) HPLC 분석조건

(가) 사용한 HPLC 장치는 Waters 600 controller, Waters 600 Pump, Waters 486 Tunable Absorbance Detector, Waters, In-Line Degasser AF, Waters(미국) 이었으며, 컬럼은 HPLC column (Kromasil 100-5C18, 250 \* 4.6mm, 5 $\mu$ m) 을 사용하였다. 전개온도는 25 $^{\circ}$ C 였으며, 유속을 1.0ml/min으로 하여 Desacyl gladiatoside B은 Table 18.의 조건으로 분석하였으며 사용된 모든 시약은 HPLC등급을 이용함. Waters 486 Tunable Absorbance Detector를 이용하여 280nm에서 검출함.

Table 18. HPLC instrument

Instrument	Condition
HPLC System	Waters 600 controller, Waters 600 Pump, Waters 486 Tunable Absorbance Detector, Waters, In-Line Degasser AF, Waters
Column	HPLC column (Kromasil 100-5C18, 250 * 4.6mm, 5 $\mu$ m)
Column Temperature	25 $^{\circ}$ C
Mobile phase	A:Acetic Acid B: Acetonitrile
Injection volume	10 $\mu$ l

Table 19. HPLC condition

Arctiin 및 arctingenin의 HPLC 분석조건								
Mobile phase	0min	10min	15min	28min	40min	50min	55min	65min
Solvent A (ACN)	3	10	25	30	100	100	5	5
Solvent B (Acetic Acid)	97	90	75	70	0	0	95	95
Flow rate	1ml/min							
UV	280nm							

(3) 특이성

(가) Arctiin, arctingenin

- ① 우영 주정 추출액의 크로마토그램을 비교하여 Arctiin 및 arctingenin의 피크가 분리되는 지를 확인한 결과, 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리됨.

- ② 표준용액의 머무름 시간은 18.7 분, 작두콩 추출액의 머무름 시간은 18.7분으로 표준용액의 피크 유지시간과 작두콩 추출액의 피크 유지시간이 일치한 것을 확인함으로써 특이성을 검증함.

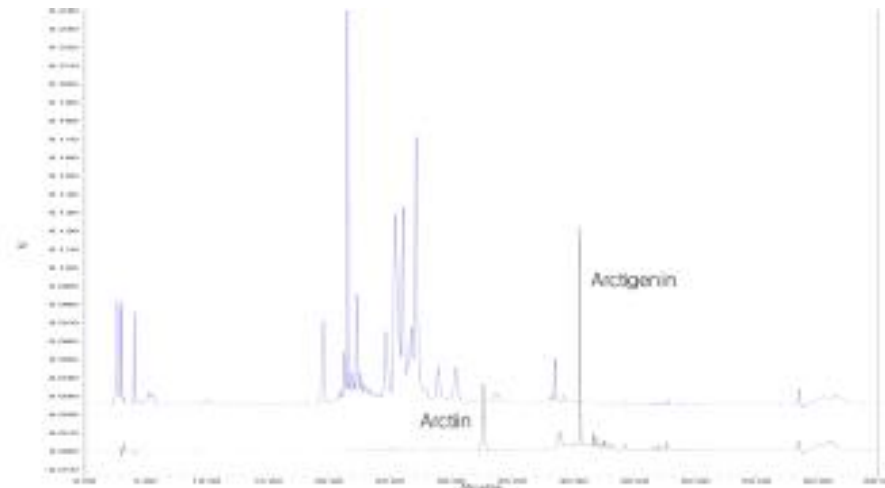
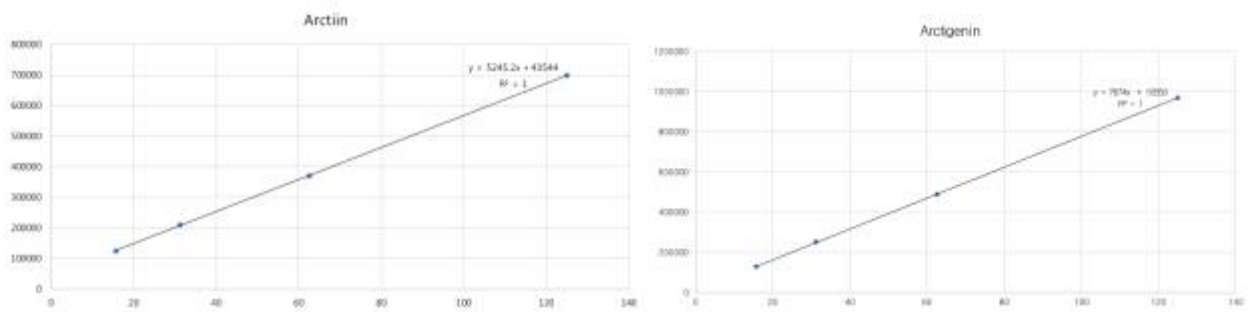


Fig. 54. Specificity of Arctiin and arctigenin

(4) 직선성, 범위 및 정량한계

- (가) Arctiin, arctigenin 표준용액을 검량선 작성을 위하여(calibration curve) 메탄올 용액으로 희석하여 4개의 범위로 제조하였으며, 각기 125, 62.5, 31.25, 15.625 ug/mL이 되도록 용액을 만들어서 측정하여 얻은 피크 면적을 Y축으로 표준액의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하여 나타냄.



\* y: peak area, x: concentration, R<sup>2</sup>: Correlation coefficient

Fig. 55. Linearity of standards

- (나) Arctiin의 검량선의 직선식은  $Y=5245.2X+43544$ 이며, 검량선의 상관계수 ( $R^2$ )는 0.9999로 높은 직선성을 보여 본 농도를 범위(range)로 설정되었으며, 정량한계(LOQ)는 11.79ug/mL으로 설정됨. Arctigenin의 검량선의 직선식은  $Y=7674X+10550$ 이며, 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 1로 높은 직선성을 보여 본 농도를 범위(range)로 설정되었으며, 정량한계(LOQ)는 8.92ug/mL으로 설정됨.



(5) 정밀성 및 정확성

(가) Arctiin, arctingenin 표준용액을 4개의 농도(125, 62.5, 31.25, 15.625  $\mu$ g/mL) 범위에서, 각 농도당 일간 반복성시험(3일간), 일내 반복성시험(1일 3회) 반복성 시험을 진행하였음. 정확성은 실제값(actual value)과 측정값(measured value)간의 일치되는 정도를 나타내는 것으로 90~110% 이내로 양호한 값을 나타내었으며, 정밀성은 하나의 균질화 된 시료로부터 취한 여러개의 등분체로 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 개개 측정치의 근접성을 말하는데 모든 c.v.값이 2% 이내로 양호함을 확인함.

Table 20. Precision and accuracy of analytical results

Compound	Conc. (ug/ml)	Accuracy (%)		Precision (c.v., %)	
		Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day
Arctiin	125	100.06	99.99	0.15	0.12
	62.5	99.83	100.25	0.78	0.61
	31.25	99.37	98.79	0.64	0.79
	15.625	101.47	101.49	1.28	1.17
Arctigenin	125	100.05	99.97	0.16	0.11
	62.5	100.15	100.42	0.93	0.76
	31.25	100.59	99.38	1.63	1.17
	15.625	99.97	100.54	1.78	1.24

\* Intra-day: three times per day., Inter-day: one time analysis of standards per day for three days., c.v.: Coefficient of variation.

(6) 함량

(가) Arctiin, arctingenin

Arctiin, arctingenin의 우영 추출물의 건조함량은 0.014% 및 0.008%임을 확인함.

Table 21. Contents of compounds

	함량(Ex)
Arctiin	0.014%
Arctigenin	0.008%

나) Isochlorogenic acid A의 분석법 확립 및 validation

(1) Isochlorogenic acid A의 분석조건

Table 22. Isochlorogenic acid A 분석조건

HPLC Waters e2695 separation module, 2998 photodiode array detector		
성분명	추출물(70% EtOH) 중 Isochlorogenic acid A	
기원식물	우영	
분석방법	표준품	Isochlorogenic acid A (Santa cruz, CAS Number 2450-53-5)

Column	Phenomenex Luna C18(2), 250 * 4.6mm, 5 um		
Mobile phase	(A: 0.1% trifluoroacetic acid + water B: Acetonitrile)		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	90	10
	10	90	10
	60	70	30
	61		100
	80		100
	81	90	10
	90	90	10
Flow rate	0.5 mL/min		
Temperature	컬럼온도 40℃, 샘플온도 25℃		
UV	330 nm		
Run time	90 min		
Retention time	약 46.672 min		

(가) 표준품 조제방법

- ① Isochlorogenic acid A는 검량선 작성을 위해 0.5mg/ml의 농도로 80% MeOH에 녹여 0.45μm syringe filter로 여과하여 사용함.
- ② 희석농도: 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL로 단계적으로 희석하여 사용 조제함
- ③ Isochlorogenic acid A의 함량을 구하기 위하여 표준용액의 크로마토그램에서 얻은 피크의 농도 별 면적에 대하여 검량선을 작성함.

(나) 샘플 조제방법

- ① 시료를 칭량하여 80% MeOH에 넣어 용해, 0.45μm syringe filter로 여과하여 사용
- ② 추출물 10 mg/ml (in 80% MeOH), 주입량 10 uL
- ③ Isochlorogenic acid A ~0.5 mg/ml (in 80% MeOH), 주입량 10 uL

(다) Isochlorogenic acid A 함량계산

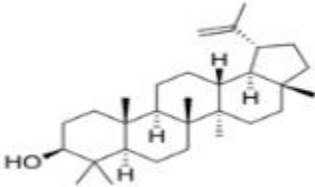
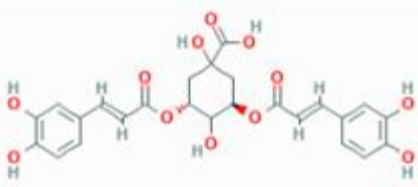
표준품의 양의 피크면적을 통하여 작성된 검량선에 의해 추출물 내 시료 중 Isochlorogenic acid A 의 농도를 분석함.

$$\text{Isochlorogenic acid A의 양(mg)} = \text{시험용액의 농도}(\mu\text{g/ml}) \times \text{최종부피 (ml)}/\text{시료채취량(mg)} \times \text{희석배수 (필요 시)} = \text{결과값(mg/g)}$$

라. 작두콩 및 우영의 지표물질 타당성 검토

최근 식약처에서 지표물질의 특이성과 대표성을 강조하고 있기 때문에 각 지표물질에 대한 고찰이 필요함. 각 지표물질은 기존에 식약처에서 인정한 건강기능식품 원료의 지표성분이 아니나, 소스를 확인해본 결과 특이성이 부족한 성분이기에 개별인정형 신청 시 식약처에서 요구하는 다른 근거자료의 제시가 필요할 것으로 판단됨. 따라서, 추가로 daucosterol성분을 분석으로 확인하였으며, daucosterol에 대해서는 추가 연구를 통해 표준화를 진행할 예정임.

Table 23. 작두콩추출물등 복합물의 지표성분

작두콩추출물등 복합물		
원물	작두콩	우영
지표물질	Lupeol	Isochlorogenic acid A
구조		
분자식	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>
Source	Occurs in many plants, e.g. Ficus, Manilkara spp. First isol. in 1889 from <i>Lupinus luteus</i> . One of the most widespread of the pentacyclic triterpenes	globe artichoke ( <i>Cynara scolymus</i> ), quince fruit ( <i>Cydonia oblonga</i> ), Caucasian whortleberry ( <i>Vaccinium arctostaphylos</i> ), <i>Aster scaber</i> and <i>Ipomoea batatas</i> (sweet potato) tubers
판매처	Sigma aldrich	Sigma aldrich, ChemFaces
비고	망고, 아카시아, 민들레 등 많은 종류의 식물체에 포함됨(특이성이 부족함). 단, 기존에 식약처에서 인정한 원료 중 Lupeol을 지표성분으로 한 원료가 없음.	Chlorogenic acid의 유도체로 특이성이 부족함. 단, 기존에 식약처에서 인정한 원료 중 Isochlorogenic acid A를 지표성분으로 한 원료가 없음.

### 3. 추출법의 표준화 (Lab. scale)

#### 가. 작두콩추출물 추출법 확립

##### 1) 추출방법

##### 가) EtOH 70%추출물

- (1) 작두콩 원물 200g을 믹서기로 2분간 파쇄하여 분말화
- (2) 70%에탄올(V/V)에 1000ml 함침한 후, 30℃ 진탕배양기에서 2일간 추출
- (3) 추출용액을 Watman paper로 감압하여 filtering함
- (4) Watman paper로 거른 추출용액을 40℃에서 rotary evaporator로 농축 후, 최종 잔여의 물은 60℃에서 1시간 농축

##### 나) EtOH 30%추출물

- (1) 작두콩 원물 200g을 믹서기로 2분간 파쇄하여 분말화
- (2) 30%에탄올(V/V)에 1000ml 함침한 후, 30℃ 진탕배양기에서 2일간 추출
- (3) 추출용액을 Watman paper로 감압하여 filtering함
- (4) Watman paper로 거른 추출용액을 40℃에서 rotary evaporator로 농축 후, 최종 잔여의 물은 60℃에서 1시간 농축

##### 다) 수추출물

수추출 시는 파쇄한 분말을 증류수에 함침시켜 놓을 경우 부패의 우려가 있으므로, 작두콩을 증류수에 swelling시킨 후 믹서기로 사용함.

작두콩을 24시간 증류수에 swelling하면, 건조된 원물 무게의 2배 정도의 무게가 되며, 너무 오랜 시간 동안 swelling하면 작두콩에서 짝이 틀 수 있으므로 24시간 정도만 swelling 해줌.



Fig. 56 증류수로 swelling 후 작두콩 크기 변화

- (1) 작두콩 원물 200g을 상온에서 증류수 1000ml에 함침하여 24시간 동안 불려줌
- (2) 24시간 함침 후, 작두콩을 수거하여 최초 원물무게에 1000ml의 증류수를 넣고 믹서기로 2분간 갈아줌
- (3) 믹서기로 갈은 용액을 40mesh(425um) 메쉬로 걸러서 추출액을 얻음
- (4) 추출액을 원심분리기로 1500g에서 15분간 원심분리 후, 상등액을 취함
- (5) 상등액을 Watman paper로 다시 걸러서 잔여 부유물을 제거함
- (6) 걸러진 추출용액을 40℃에서 rotary evaporator로 농축 후, 최종 잔여의 물은 60℃에서 1시간 농축

2) 추출물 내역 및 수율

Table 24. 작두콩 추출물의 용매별 추출 수율

원물 무게	추출용매	용매량	수득량	수득률
200g	EtOH 70% (V/V)	1000ml	14.78g	7.39%
200g	EtOH 30% (V/V)	1000ml	26.19g	13.09%
200g	증류수	1000ml	39.69g	19.85%

나. 우영추출물 추출법 확립

1) 추출방법

가) EtOH 70%추출물

- (1) 절단된 건조 우영 원물 200g을 70%에탄올(V/V)에 1000ml 함침한 후, 30℃ 진탕배양기에서 2일간 추출
- (2) 추출용액을 Watman paper로 감압하여 filtering함
- (3) Watman paper로 거른 추출용액을 40℃에서 rotary evaporator로 농축 후, 최종 잔여의 물은 60℃에서 1시간 농축

나) EtOH 30%추출물

- (1) 절단된 건조 우영 원물 200g을 30%에탄올(V/V)에 1000ml 함침한 후, 30℃ 진탕배양기에서 2일간 추출
- (2) 추출용액을 Watman paper로 감압하여 filtering함
- (3) Watman paper로 거른 추출용액을 40℃에서 rotary evaporator로 농축 후, 최종 잔여의 물은 60℃에서 1시간 농축

다) 수추출물

수추출 시 절단된 건조 우영을 증류수에 장시간 함침시켜 놓을 경우 부패의 우려가 있으므로, 건조 우영을 증류수에 상온에서 24시간 swelling시킨 후 믹서기로 갈아서 사용함.

- (1) 절단된 건조 우영 원물 200g을 상온에서 증류수 1500ml에 함침하여 24시간 동안 불려줌
- (2) 24시간 함침 후, 믹서기로 2분간 갈아줌
- (3) 믹서기로 갈은 용액을 40mesh(425um) 메쉬로 걸러서 추출액을 얻음
- (4) 추출액을 원심분리기로 1500g에서 15분간 원심분리 후, 상등액을 취함
- (5) 상등액을 Watman paper로 다시 걸러서 잔여 부유물을 제거함
- (6) 걸러진 추출용액을 40℃에서 rotary evaporator로 농축 후, 최종 잔여의 물은 60℃에서 1시간 농축

2) 추출물 내역 및 수율

Table 25. 우영 추출물의 용매별 추출 수율

원물 무게	추출용매	용매량	수득량	수득률
200g	EtOH 70% (V/V)	1000ml	81.23g	40.6%
200g	EtOH 30% (V/V)	1000ml	84.8g	42.4%
200g	증류수	1500ml	83.65g	41.8%

#### 4. 추출법의 Scale-up (1)

작두콩 및 우엉 70%에탄올 추출물의 대량생산시스템 구축을 위해 기존 실험실에서 추출한 방법을 바탕으로 점진적으로 추출 공정에 사용되어지는 샘플의 양을 증가시켜 최대한 실험실 조건과 유사한 조건의 대량생산시스템을 구축하였음.

작두콩과 우엉 두 원료 모두 천연물원료를 다년간 추출 및 공정 확립해 온 (주)테코스에 의뢰하였으며, 최종 70%주정추출물로 scale-up 진행하였으며, 각 원료에 제조보고서를 제공 받음.

#### 가. 작두콩 추출물의 제조 방법

##### 1) 작두콩 70%주정 추출물 제조 방법 요약

Table 26. 작두콩 70% 주정추출물의 제조 공정도

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3)기능/지표성분 함량변화(mg/L)	(4) 수율(%)
원재료	Canavalia gladiata DC		100kg
↓			
조분쇄	Knife hammer mill 분쇄기(20mm 타공판 장착)를 이용하여 10mm 이하로 조분쇄		
↓			
팽윤 및 미분쇄	원물 대비 3배 상수 300ℓ를 투입, 24시간 (2.5배 팽윤) -> Colloid mill로 2회 미분쇄		
↓			
추출	발효주정 840ℓ, 27~30℃, 46시간 교반 추출		미분쇄 작두콩 405kg
↓			
잔사 분리 및 여과	1차 데칸터(3,800rpm), 2차 알파라발(7,800rpm) 원심 분리, 1μm cartridge 필터 여과		여과액 1,080ℓ
↓			
농축 및 여과	40℃, 농축액 66kg 동결건조, 선반 -40℃ 12시간 시료 동결, 16시간 승화 건조, 선반 40℃이하에서 3일 건조		수율 9.8%
↓			
포장			
↓			
원료			

##### 2) 작두콩 70%주정 추출물 제조 설명

가) 원물 조분쇄 : 작두콩 100kg(비중 0.625)을 Knife hammer mill 분쇄기(20mm 타공판 장착)를 이용하여 10mm 이하로 조분쇄 (비중 0.55)



Fig. 57 작두콩의 조분쇄

나) 팽윤(Swelling) : 원물 대비 3배의 상수 300ℓ를 투입하여 24시간 정지 Swelling(2.5배 팽윤)



Fig. 58. 작두콩의 팽윤

다) 미분쇄 : 팽윤된 조분쇄 작두콩을 Colloid mill 멧돌로 2회 미분쇄 -> 콩물 제조



Fig. 59. 작두콩의 미분쇄

라) 추출 : 2m<sup>3</sup> 교반조에 미분쇄 작두콩 405kg과 96% 발효주정 840ℓ(최종 70.4%EtOH(주정) 1,145ℓ, 원물대비 11.4배)를 투입 후 액온 27~30℃, 46시간 교반 추출



Fig. 60. 작두콩의 추출

- 마) 잔사분리 : 교반 추출액(침전비율 약 20%(v/v)) → 데칸터(3,800rpm) 1차 원심 분리 → 분리 잔사 148.8kg(부피 약 300ℓ) + 1차 분리액(우유빛, 침전비율 1.3~2.0%(v/v)) → 알파라발(7,800rpm) 2차 원심분리 → 2차 분리액(미갈색의 청징액, 침전비율 0.1~0.2%(v/v))

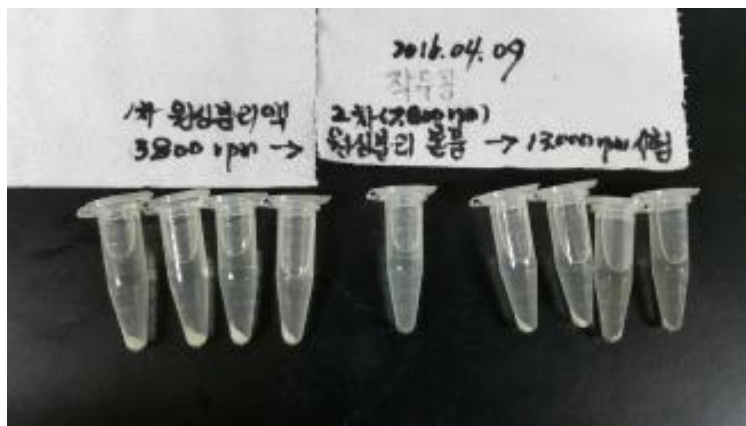


Fig. 61. 작두콩 추출액의 잔사 분리

- 바) 여과 : 2차 분리액 → 1 $\mu$ m cartridge 필터 여과 → 여과액 1,080ℓ(청징액)  
 사) 농축 : 여과액을 액온 40℃ 설정 후 자연순환농축기와 교반농축기를 이용하여 농축 → 100Mesh screen Pass → 농축액 66kg \* 14.9 Bx(B고형량 9.8kg, 수율 9.8%)  
 아) 동결건조 : 건조실과 Tray를 80%EtOH(발효주정)으로 spray 소독 후 선반을 예비냉동하며 농축액을 Tray에 분주 → 선반 -40℃ 12시간 시료 동결 → 16시간 승



- 화 건조 -> 선반 40℃이하에서 3일 건조 -> 건조물 9.4kg + 건조 불량(용해?) 4.3kg = 13.7kg
- 자) 건조물 분쇄 : 건조물 9.4kg -> 1mm 타공판 장착 Pin-mill 분쇄 -> 시료의 용해로 분쇄 불가 -> 분쇄 불가 건조물 8.15kg + 분쇄물 0.47kg + 분쇄 수작업 회수 0.47kg = 9.09kg

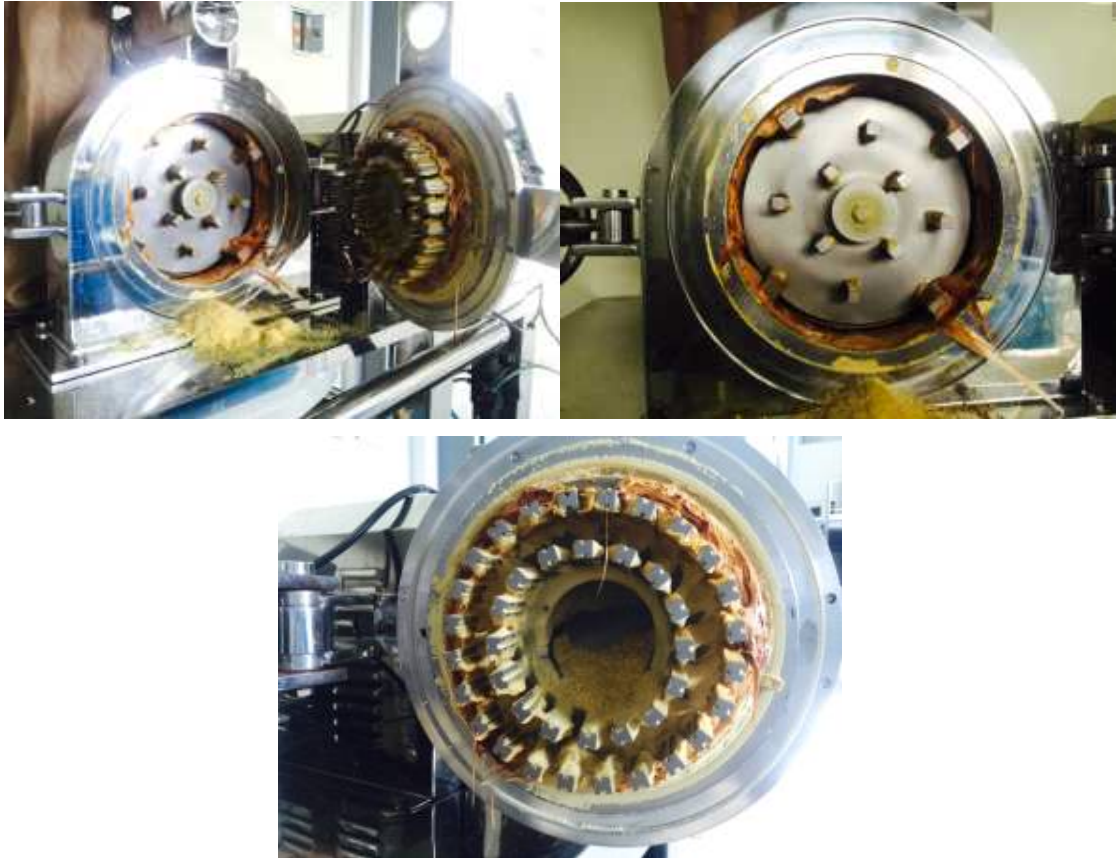


Fig. 62. 동결건조된 작두콩 추출물의 분쇄

- 차) 포장 : (분쇄 불가 건조물 8.15kg + 분쇄물 0.47kg + 분쇄 수작업 회수 0.47kg = 9.09kg + 건조 불량 4.3kg = 13.39kg)/(무인쇄지대 + 2중 비닐봉투)
- 카) 분쇄물 미생물 시험(건조 필름법) : 대장균군 음성, 일반세균 450cfu/g
- 3) 작두콩 70%주정 추출 후 상수추출물 제조 설명
- 가) 2차 추출 : 70%주정 교반 추출 후 데칸터 1차 원심분리 침전 잔사 148.8kg(부피 300ℓ) + 상수 1,200ℓ(최종 3.0%EtOH 1,254ℓ, 원물 대비 12.5배) 투입 후 액온 18~20℃, 2시간 교반 추출
- 나) 잔사분리 : 상수 교반 추출액 -> 데칸터(3,800rpm) 1차 원심분리 -> 분리 잔사 폐기 + 2차 분리액(우유빛, 침전비율 1.0~6.0%(v/v)) -> 알파라발(7,800rpm) 2차 원심분리 -> 2차 분리액(엷은 우유빛)
- ▷ 알파라발 2차 분리액



Fig. 63. 작두콩 70%주정 추출 후 상수추출물 제조

- 다) 여과 : 2차 분리액 -> 1 $\mu$ m cartridge 필터 여과 -> 여과액 1,368 l (얇은 우유빛)
- 라) 농축 : 여과액을 액온 50 $^{\circ}$ C 설정 후 자연순환농축기와 교반농축기를 이용하여 농축 -> 100Mesh screen Pass 불가 -> Direct 수기 -> 농축액 76.2kg \* 18.9 Bx(B 고형량 14.4kg, 수율 14.4%)
- 마) 동결건조 : 건조실과 Tray를 80%EtOH(발효주정)으로 spray 소독 후 선반을 예비냉동하며 농축액을 Tray에 분주 -> 선반 -40 $^{\circ}$ C 6시간 시료 동결 -> 16시간 승화 건조 -> 선반 40 $^{\circ}$ C이하에서 3일 건조 -> 건조물 13.3kg
- 바) 건조물 분쇄 : 상수 추출 건조물 13.3kg -> 1mm 타공판 장착 Pin-mill 분쇄 -> 분쇄 건조물 12.95kg + 분쇄 수작업 회수 0.15kg = 13.1kg
- 사) 포장 : (분쇄 건조물 12.95kg + 분쇄 수작업 회수 0.15kg = 13.1kg)/(무인쇄지대 + 2중 비닐봉투)

#### 4) 참고 사항

- 가) 작두콩은 단단하여 Pin-mill을 이용한 분쇄가 불가하여 Knife hammer mill을 이용하여 조분쇄 -> 상수를 첨가하여 팽윤, 연화시킨 후 colloid mill 멧돌로 2회 순환하며 미분쇄함.
- 나) 침전 비율 20%(v/v)의 70%EtOH(발효주정) 교반추출액에서 잔사를 분리하기 위해 3,800rpm 연속 원심분리기(데칸터) -> 7,800rpm 연속원심분리기(알파라발)로 직렬 원심분리하여 겉보기에는 청징하지만 분리액 1.5ml \* 13,000rpm 분리 시험 결과, 상기의 사진에서와 같이 그 침전비율이 0.1~0.2%(v/v)임.
- 다) 70%EtOH(발효주정) 추출 잔사의 상수 교반 추출액은 원심분리와 1 $\mu$ m cartridge 필터 여과에 의해서도 청징액으로의 분리가 불가(얇은 우유빛, 침전비율 1.0%(v/v) 이내)하고 그 농축액에는 결정성 응집물이 생성되고 점도가 높아서 100Mesh screen Pass가 불가함.
- 라) 상수 추출물은 동결건조와 건조물의 분쇄가 양호하지만 70%주정추출물은 동결건조 과정에 약 3배로 불규칙 팽윤되고 건조물의 Pin-mill 분쇄가 불가능할 뿐만 아니라 Tray 바닥에 불완전 건조물이 생성됨(선반 온도 40 $^{\circ}$ C에 의한 용해?)
- 마) 주정 추출농축액은 느끼하면서도 감칠맛과 단맛이 있고 거품이 과량 발생하고 분무 건조 불가함(기벽 흡습 부착).

## 나. 우엉 추출물의 제조 방법

### 1) 우엉 70%주정 추출물 제조 방법

Table 27. 작두콩 70% 주정추출물의 제조 공정도

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3)기능/지표성분 함량변화(mg/L)	(4) 수율(%)
원재료	<i>Arctium lappa</i> L		100kg
↓			
추출	1차 추출: 19~38℃, 24시간, 2차 추출: 23~39℃, 24시간		추출1차: 597ℓ, 2차: 584ℓ
↓			
농축	40℃, 농축액 223.6kg		수율 44.5%
↓			
동결건조	선반 -36℃ 10시간 시료동결, 16시간 승화 건조, 선반 40℃이하에서 3일 건조		수율 39.4%
↓			
포장			
↓			
원료			

### 2) 우엉 70%주정 추출물 제조 설명

가) 원물 추출 소분 : 우엉 건조 Slice(두께 ~5mm \* 직경 ~30mm) 100kg을 4~5kg/위생추출포 \* 위생추출포 21개 추출소분 후 1m<sup>3</sup> 순환 추출기에 700ℓ 추출KG와 함께 투입(비중 0.179)



Fig. 64. 건조 우엉 원물

나) 1차 추출 : 추출소분 우엉 건조 Slice의 순환추출기에 70.5%EtOH(발효주정) 740ℓ (원물대비 7.4배) 투입 후 액온 19~38℃, 24시간 순환 추출 -> 추출 여액 597ℓ 분리

2차 추출 : 1차 추출 잔사 + 70.3%EtOH(발효주정) 600ℓ (원물대비 6.0배) 투입 후 액온 23~39℃, 24시간 순환 추출 -> 추출 여액 584ℓ 분리

다) 여과 : 1차 + 2차 70%주정 추출액 -> 75μm -> 1μm cartridge 필터 직렬 여과 -> 여과액 1,181ℓ (청징액)

라) 농축 : 여과액을 액온 40℃ 설정 후 자연순환농축기를 이용하여 농축 -> 100Mesh screen Pass -> 농축액 223.6kg \* 19.9 Bx(B고형량 44.5kg, 수율 44.5%)

마) 동결건조 : 건조실과 Tray를 80%EtOH(발효주정)으로 spray 소독 후 선반을 예

- 비냉동하며 농축액을 Tray에 분주 → 선반 -36℃ 10시간 시료 동결 → 16시간 승화 건조 → 선반 40℃이하에서 3일 건조 → 건조물 39.4kg(수율 39.4%)
- 바) 건조물 분쇄 : 건조물 39.4kg → 1mm 타공판 장착 Pin-mill 분쇄 → 분쇄 건조물 38.6kg + 분쇄 수작업 회수 0.5kg = 39.1kg
- 사) 포장 : #1/2-분쇄 건조물 20.0kg/(무인쇄지대 + 2중 비닐봉투) + #2/2-(분쇄 건조물 18.6kg + 분쇄 수작업 회수 0.5kg = 19.1kg)/ (무인쇄지대 + 2중 비닐봉투)
- 아) 분쇄물 미생물 시험(건조 필름법) : 대장균군 음성, 일반세균 260cfu/g

### 3) 우영 70%주정 추출 후 상수추출물 제조 설명

- 가) 3차 추출 : 우영 70%주정 순환 추출 잔사 + 상수 400ℓ (최종 18.4%EtOH 약 543ℓ, 원물 대비 5.4배) 투입 후 액온 21~26℃, 2시간 순환 추출 → 추출 여액 355ℓ 분리
- 나) 여과 : 3차 상수 추출액 → 75μm → 1μm cartridge 필터 직렬 여과 → 여과액 355ℓ (청징액)
- 다) 농축 : 여과액을 액온 40℃ 설정 후 자연순환농축기와 교반농축기를 이용하여 농축 → 100Mesh screen Pass → 농축액 49.0kg \* 17.6 Bx(B고형량 8.6kg, 수율 8.6%)
- 라) 동결건조 : 건조실과 Tray를 80%EtOH(발효주정)으로 spray 소독 후 선반을 예비냉동하며 농축액을 Tray에 분주 → 선반 -36℃ 8시간 시료 동결 → 16시간 승화 건조 → 선반 40℃이하에서 3일 건조 → 건조물 7.4kg(수율 7.4%)
- 마) 건조물 분쇄 : 건조물 7.4kg → 1mm 타공판 장착 Pin-mill 분쇄 → 분쇄 건조물 6.9kg + 분쇄 수작업 회수 0.18kg = 7.08kg
- 바) 포장 : (분쇄 건조물 6.9kg + 분쇄 수작업 회수 0.18kg = 7.08kg)/ (무인쇄지대 + 2중 비닐봉투)

### 4) 참고 사항

- 가) 추출 잔사의 무게는 2.7배 증가하지만 부피는 1/2로 감소함.
- 나) 추출액은 75μm → 1μm cartridge 필터 직렬 여과에 의해 청징하고 그 농축액도 100Mesh screen Pass가 용이, 주정 추출농축액은 단맛이 강하고 거품이 과량 발생, 분무건조는 불가함(기벽 흡습 부착).
- 다) 상수 추출물은 동결건조가 양호하지만 70%주정추출물은 동결건조 과정에 약 5배로 팽윤, Pin-mill 분쇄 용이함.

## 5. 추출법의 Scale-up (2)

1차 Scale-up으로 추출한 추출물이 장기 보관 시 딱딱하게 굳어 사용할 수 없는 상태가 됨에 따라, 새로운 제조업체를 선정하여 추출물을 반복 제조함. 추출 및 동결건조가 가능한 업체를 수배하여 제조의뢰를 하던 중 많은 업체에서 기존 제조공정대로 추출물을 만들 수 없다는 의견을 받아 기존 제조공정을 대량추출이 가능한 보편적인 제조공정으로 조건을 조정함.

Table 28. 작두콩의 제조공정 변화

작두콩			
	테코스	하티	전남생물산업진흥센터
원물조분쇄	Knife hammer mill	불가능	불가능
▽			
팽윤	상수투입, 24시간	상수투입, 24시간	상수투입, 24시간
▽			
미분쇄	Colloid mill 멧돌	조분쇄, 미분쇄	회전절단 슬라이스
▽			
추출	46시간 교반추출	48시간 교반추출	48시간 추출
▽			
잔사분리	1차 3,800 rpm 2차 7,800 rpm	7,800 rpm	대량추출 시 7800 rpm 불가능 여과과정에서 잔사분리가 일어나므로 과정 생략
▽			
여과			
▽			
농축	40℃		70℃이하 농축
▽			
		여과과정 추가	여과과정 추가
동결건조			
▽			
건조물 분쇄			
최종수율	9.8%	5.1%	10.2%*

\* 소규모 추출 기준

Table 29. 우영의 제조공정 변화

우영			
	테코스	하티	전남생물산업진흥센터
추출	1차: 24시간(19~38℃) 2차: 24시간(23~39℃)	1차: 24시간(33-35℃) 순환추출 2차: 24시간	1차: 24시간(상온) 2차: 24시간
▽			
여과			
▽			
농축	40℃	40℃ 이하 농축	70℃이하 농축
▽			
		여과과정 추가	여과과정 추가
동결건조			Brix 14 이하로 희석
▽			
건조물 분쇄			
최종수율	39.4%	42.64%	37.5%*

\* 소규모 추출 기준

가. 신규 추출물 제조업체 검토

1) (주)하티

기존 대량 추출시 문제점인 불완전 건조물과 건조과정중 불규칙한 팽윤이 일어나지 않음.

Table 30. 작두콩, 우영 추출농축 제조공정도 및 제조보고서

작두콩 추출농축 제조공정도 (FD)	우영 추출농축 제조공정도 (FD/SD)																																																																														
<p><b>작두콩 추출농축 제조공정도</b></p> <p>원료 투입: 작두콩 10kg                      조분쇄: 작두콩 10kg                      추출: 100% 에탄올 100kg, 60°C, 2시간, 100rpm, 100°C, 100rpm, 100°C, 100rpm                      침사분리: 침사분리기 100rpm                      여과: 100µm 여과지 (Dowling)                      농축: 60°C, 100rpm                      건조(동결건조, SD 건조): 100°C, 100rpm                      분쇄: 100µm</p> <p>○ 생산일지                      - 작두콩추출농축  <table border="1"> <thead> <tr> <th>항목</th> <th>투입량</th> <th colspan="3">생산</th> </tr> <tr> <th></th> <th></th> <th>수량</th> <th>수량</th> <th>수율(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>작두콩추출농축</td> <td>10kg</td> <td>17.00kg</td> <td>1.70kg</td> <td>17%</td> </tr> </tbody> </table> <p>- 작두콩추출농축(동결건조, SD건조)  <table border="1"> <thead> <tr> <th>항목</th> <th>원료투입량</th> <th>원료투입량</th> <th colspan="3">생산</th> </tr> <tr> <th></th> <th></th> <th></th> <th>수량</th> <th>수량</th> <th>수율(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>작두콩추출농축</td> <td>10kg</td> <td>17.00kg</td> <td>1.70kg</td> <td>1.00kg</td> <td>5.9%</td> </tr> <tr> <td>작두콩추출농축</td> <td>10kg</td> <td>17.00kg</td> <td>1.70kg</td> <td>1.00kg</td> <td>5.9%</td> </tr> </tbody> </table> <p>작성일자: 2016.11.16                      제조업체: (주)하티</p> </p></p>	항목	투입량	생산					수량	수량	수율(%)	작두콩추출농축	10kg	17.00kg	1.70kg	17%	항목	원료투입량	원료투입량	생산						수량	수량	수율(%)	작두콩추출농축	10kg	17.00kg	1.70kg	1.00kg	5.9%	작두콩추출농축	10kg	17.00kg	1.70kg	1.00kg	5.9%	<p><b>우영 추출농축 제조공정도</b></p> <p>원료 투입: 우영 10kg                      1차 추출: 원료(우영) 10kg, 70% 에탄올 100kg, 60°C, 2시간, 100rpm                      2차 추출: 70% 에탄올 100kg                      여과: 100µm 여과지 (Dowling)                      농축: 60°C, 100rpm                      여과: 100µm 여과지 (Dowling)                      건조(동결건조, SD 건조): 100°C, 100rpm                      분쇄: 100µm                      포장</p> <p>○ 생산일지                      - 우영추출농축  <table border="1"> <thead> <tr> <th>항목</th> <th>투입량</th> <th colspan="3">생산</th> </tr> <tr> <th></th> <th></th> <th>수량</th> <th>수량</th> <th>수율(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>우영추출농축</td> <td>10kg</td> <td>16.20kg</td> <td>1.62kg</td> <td>16.2%</td> </tr> </tbody> </table> <p>- 우영추출농축(동결건조, SD건조)  <table border="1"> <thead> <tr> <th>항목</th> <th>원료투입량</th> <th>원료투입량</th> <th colspan="3">생산</th> </tr> <tr> <th></th> <th></th> <th></th> <th>수량</th> <th>수량</th> <th>수율(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>우영추출농축</td> <td>10kg</td> <td>16.20kg</td> <td>1.62kg</td> <td>1.00kg</td> <td>6.16%</td> </tr> <tr> <td>우영추출농축</td> <td>10kg</td> <td>16.20kg</td> <td>1.62kg</td> <td>1.00kg</td> <td>6.16%</td> </tr> </tbody> </table> <p>작성일자: 2016.11.16                      제조업체: (주)하티</p> </p></p>	항목	투입량	생산					수량	수량	수율(%)	우영추출농축	10kg	16.20kg	1.62kg	16.2%	항목	원료투입량	원료투입량	생산						수량	수량	수율(%)	우영추출농축	10kg	16.20kg	1.62kg	1.00kg	6.16%	우영추출농축	10kg	16.20kg	1.62kg	1.00kg	6.16%
항목	투입량	생산																																																																													
		수량	수량	수율(%)																																																																											
작두콩추출농축	10kg	17.00kg	1.70kg	17%																																																																											
항목	원료투입량	원료투입량	생산																																																																												
			수량	수량	수율(%)																																																																										
작두콩추출농축	10kg	17.00kg	1.70kg	1.00kg	5.9%																																																																										
작두콩추출농축	10kg	17.00kg	1.70kg	1.00kg	5.9%																																																																										
항목	투입량	생산																																																																													
		수량	수량	수율(%)																																																																											
우영추출농축	10kg	16.20kg	1.62kg	16.2%																																																																											
항목	원료투입량	원료투입량	생산																																																																												
			수량	수량	수율(%)																																																																										
우영추출농축	10kg	16.20kg	1.62kg	1.00kg	6.16%																																																																										
우영추출농축	10kg	16.20kg	1.62kg	1.00kg	6.16%																																																																										
작두콩 추출농축 제조공정도 (FD)	우영 추출농축 제조공정도 (FD/SD)																																																																														


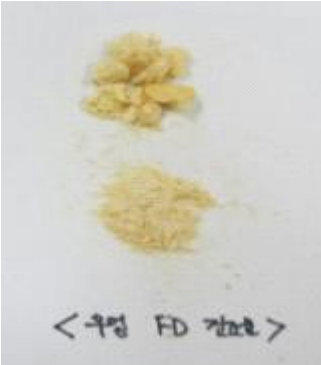
Table 31. 작두콩FD, 우영FD/SD 추출물

구분	우영 동결건조(FD)	우영 분무건조(SD)	작두콩 동결건조(FD)
이미지			
수율	42.63%	16.20%	5.1%
성상	미색의 고운 분말로 우영 특유의 향이 남, 당이 많아 공기 중에 방치 시 수분을 흡수하여 엉겨붙음.	FD 추출물에 비해 우영차 향이 조금 더 강하게 남.	연듯빛의 고운 가루로 인습이 강하여 손에 달라붙음. 특유의 비린향과 맛을 가짐.

2) 전남식품산업연구센터



테코스와 마찬가지로 기인정된 건강기능식품 원료의 추출 및 농축 과정을 진행하고 있는 업체 중 하나로 오랜기간 쌓아온 노하우가 있어 추출업체로 선정하게 됨. 제조 공정 및 표준화를 위해 소규모추출 1회, 산지별 우영 소규모 추출 2회, 인체적용시험 시험식품 제작을 위한 대량추출 1회 및 산지별 작두콩 소규모 추출 진행함.

Table 32. 작두콩 FD 추출물, 우영 FD 추출물

성 상	
작두콩 FD 추출물	우영 FD 추출물
	
연둣빛이 도는 미색의 고운 분말로 콩비린 맛이 약간 나며 맛에서 기호성이 떨어지는 것으로 생각됨.	미색의 분말로 약간 거친 느낌이 있으며 첫맛은 달고 우영 특유의 아린 맛이 남. 고유의 향미를 가지며, 당이 많아 수분 기 있는 손에 닿으면 엉겨붙는 성질이 있음.
뜨거운 물, 차가운 물에 일부 녹으나 잘 녹지 않고 분포됨 (뜨거운 물에 녹일 경우 겉면에 하얗게 떠오름).	뜨거운 물, 차가운 물에 녹음 특유의 향이 강해짐 (우영차 향).

나. 소규모 추출 제조보고서

- 1) 제조장 : 전남식품산업연구센터
- 2) 사용장비

	
추출기	농축기

가) 추출기 : 열수추출기 pilot / 모델명: YC-EC-50\*2 / 제조사: YENCHEN(대만)

나) 농축기 : 원심박막농축기 pilot / 모델명: CEP-LABO / 제조사: OKAWARA(일본)

3) 우영추출물

가) Input : 건조우영 4.5 kg

나) 추출 : 1, 2차 추출, 25~35℃

(1) 1차추출 : 원물대비 7.3배수(w/w) 70% 주정(33 kg) 침지

(2) 2차추출 : 원물대비 6.4배수(w/w) 70% 주정(29 kg) 침지

다) 추출 후 필터(55 um)

라) 농축 : 70℃, 1,200 rpm

(1) 1차추출액 농축 : 6.04 kg(19.1brix /건조감량:17.5%) - brix 기준수율: 25.6%

(2) 2차추출액 농축 : 3.28 kg(18.9brix/건조감량:17.5%) - brix 기준수율: 13.8%

마) 농축 후 필터(55 um)

바) 동결건조 : 1차+2차 농축액 혼합 후 정제수로 희석하여 brix를 14.5 birx로 보정함

**문제점**

→ 농축 시 일부 튀는 현상이 발생하였으나 수율 40%대로 예측됨

→ 당이 많아서 동결이 잘 되지 않음

→ FD 액상제품의 경우 통상적으로 20brix 이하로 맞추나 우영농축액의 경우 다른 농축액 제품에 비하여 동결이 잘 되지 않음

**※ 최종수율 : 37.5% (input : 4.5 kg | final product : 1.76 kg)**

4) 작두콩추출물

가) Input : 작두콩 8 kg

나) 팽윤 : 정제수 22kg, 24hr [익일 작두콩 무게 21.16kg으로 측정됨]

다) 절단 : 회전절단기

라) 추출 : 원물대비 10배수(w/w) 70% 주정 침지, 48hr, 22~30℃

마) 농축 : 4.06 kg(21.0brix /건조감량:23.9%) - brix 기준수율: 10.7%, 70℃, 1,200 rpm

바) 농축 후 필터(55 um)

사) 동결건조

**※ 최종수율 : 10.2% (input : 8 kg | final product : 0.821 kg)**

**다. 대량 생산 제조보고서**

1) 제조장 : 전남식품산업연구센터

2) 사용장비

가) 추출기: 열수추출기/ 모델명: YC-EC-1250/ 제조사: YENCHEN(대만)

나) 농축기: 원심박막농축기/ 모델명: CEP-20S/ 제조사: OKAWARA(일본)



3) 작두콩추출물

가) Input : 작두콩 105 kg

나) 팽윤: 작두콩 105kg+상수 300kg 회전절단 →

슬라이스277kg/침지수113kg(2.0brix)

다) 추출(침지): 26.3~30℃/ 48시간 침지/ 주정 70% (원물대비 10배수/ 1,053L)

라) 추출 후 필터(50 um)

마) 농축: 70℃ 이하, 1,200rpm (원심박막농축기는 통상적으로 45~55℃에서 작업)

57kg(19.6brix /건조감량:19.9%) - brix 기준수율: 10.6%

바) 농축 후 필터(55 um)

사) 동결건조

※ 최종수율 : 10.3% (input : 105 kg | final product : 10.9 kg), 건조감량 2.74%

4) 우영추출물

동결건조 일정이 맞지 않아 타 업체에서 동결건조를 진행하였음. 동결건조기 용량에 한계가 있어 희석액 중 일부를 폐기하였기 때문에 정확한 수율이 나오지 않음.

가) Input : 건조우영 100 kg

나) 추출 : 1, 2차 추출, 25~35℃

다) 추출 후 필터(55 um)

라) 농축 : 70℃이하, 1,200 rpm, 농축 후 필터(55 um)

마) 희석 : 20kg\*16 + 13.6kg = 333.6kg(16.0brix) - brix 기준수율: 53.3%

바) 동결건조 (일신바이오)

라. 산지별 우영 1차, 2차 추출 제조보고

○ 우영(건조) 침지 및 농축 pilot															의뢰업체 : 노바텍스	
구분	양리 (kg)	일지	침지(잠수추출기pilot)						농축(원심박막농축기2kg)					비고		
			차수	주정(70%)		농축 조건	주정 수		추출량 (kg)	상자	농축 조건	추출량 (kg)	Brix		수율 (%)	
				배수	중량(kg)		HR	Emx								
노바텍스	1.02	2/21	1차	7.4	7.5	24시간 침지 (6.1~13.1℃)	24hr	23.5	5.92	2/23	70~75℃ 1200rpm	2.52	15.4	39.6	2.60kg 15.4brix 대량용 43kg	
		2/22	2차	6.4	6.5	24시간 침지 (12.0~14.6℃)	24hr	22.1	6.42 박막용 2.88kg						2.52	15.4
부영농산	1.05	2/21	1차	7.1	7.5	24시간 침지 (6.1~13.3℃)	24hr	23.5	6.32	2/23	70~75℃ 1200rpm	3.20	15.0	46.2	3.20kg 15.3brix 대량용 43kg	
		2/22	2차	6.1	6.5	24시간 침지 (12.0~14.6℃)	24hr	21.9	6.62 박막용 1.98kg						3.20	15.0
영지농원 & 미촌	1.02	2/21	1차	7.4	7.5	24시간 침지 (6.1~13.2℃)	24hr	22.6	6.74	2/23	70~75℃ 1200rpm	1.68	14.8	24.4	1.68kg 14.8brix 대량용 39kg	
		2/22	2차	6.4	6.5	24시간 침지 (12.0~14.6℃)	24hr	21.6	6.38 박막용 1.84kg						1.68	14.8
금일약초	1.02	2/21	1차	7.4	7.5	24시간 침지 (6.1~13.3℃)	24hr	22.3	6.6	2/23	70~75℃ 1200rpm	1.52	14.7	21.9	1.52kg 14.7brix 대량용 37kg	
		2/22	2차	6.4	6.5	24시간 침지 (12.0~14.6℃)	24hr	21.6	6.42 박막용 1.88kg						1.52	14.7

주) 1. 부속도 사용하지 않음  
 2. 여과: 추출후 55# 백필터로 여과 -> 농축후 55# 여과  
 3. 농축: 잠재수분 추가 투입하여 노바텍스용 농축 -> 동결여과 잘 되자 않음

Fig. 65. 1차 추출(1kg) \*햇살담은 자연마을

○ 우영(건조) 침지 및 농축 pilot

의뢰업체 : 노태렉스

생산 자원팀(07-03-06)

구분	요료 (kg)	일차	침지(원수추출(2배))							농축(원수추출(2배) 농축(2배))					동결건조(180℃/17.07-18.0)
			차수	추진(70%)		추진 조건	추출 후		추출량 (kg)	일사	농축 조건	농축량 (kg)	Brix	수율 (%)	
				배수	시간(kg)		Hr	Brix							
(A) 노태렉스	4.5	7/3	1차	7.3	33.0	24시간 침지	24hr	22.2	28.34	7/5	70~75℃ 1200rpm	14.26	14.0	44.4	원수추출량 1.98kg
		7/4	2차	6.4	29.0	24시간 침지	24hr	19.7	29.28						원수추출량 1.4kg 원수율70.3% 추진 1%
(B) 갑당약초	4.5	7/3	1차	7.3	33.0	24시간 침지	24hr	21.4	29.06	7/5	70~75℃ 1200rpm	11.92	13.9	36.8	원수추출량 1.55kg
		7/4	2차	6.4	29.0	24시간 침지	24hr	19.5	28.88						원수추출량 1.29kg 원수율75.7% 추진 0.6%
(C) 영재농원	4.5	7/5	1차	7.3	33.0	24시간 침지	24hr	21.1	29.4	7/7	70~75℃ 1200rpm	14.94	14.7	48.8	원수추출량 2.19kg
		7/6	2차	6.4	29.0	24시간 침지	24hr	20.0	28.94						원수추출량 1.54kg 원수율70.3% 추진 0.7%
(D) 햇살담은 자연마을	4.5	7/5	1차	7.3	33.0	24시간 침지	24hr	22.3	27.4	7/7	70~75℃ 1200rpm	14.22	14.6	46.1	원수추출량 2.07kg
		7/6	2차	6.4	29.0	24시간 침지	24hr	19.7	29.18						원수추출량 1.55kg 원수율75.9% 추진 0.2%

주1. 부피로 사용하자 밀도 / 수율기준 30~35%

주2. 예과: 추출후 55㎫ 액밀타로 예과 -> 농축후 55㎫ 예과

주3. 농축: 약 400x까지 농축 후 정제수를 추가 투입하여 브릭스를 낮춤 -> 동결여 불 되지 않음

Fig. 66. 2차 추출(4.5kg) \*부용농산

동일한 원산지의 추출원료의 1차, 2차 수율이 다른 부분은 1차 추출의 경우 실험실 수준의 소량 추출이며 겨울에 상온에서 추출하였기 때문에 추출온도가 낮은 것이 그 요인 중 하나가 될 수 있음. 기존의 pilot test와 대량 추출의 수율 역시 2차 추출의 수율과 비슷하므로 2차 추출물로 지표물질 함량 분석을 할 필요가 있음 확인.

Table 33. 원산지별 우영 추출 수율

	갑당약초		부용농산			영재농원			햇살담은 자연마을		
1차 수율	21.2%		42%			22.4%			37.7%		
2차 수율	36.6%		31.1%			34.2%			35.3%		
평균	28.9%	± 8%	36.6%	± 5%	28.3%	± 6%	36.5%	± 1%			

아래 표와 같이 우영과 작두콩의 추출 수율에 편차가 있기 때문에, 추가적인 대량 추출을 진행하여 제조공정을 확립할 필요가 있으므로 추가 연구를 진행하였음.

Table 34. 우영(갑당약초), 작두콩(콩세상)의 추출 수율

		작두콩(추출수율, %)	우영(추출수율, %)
1	테코스	9.8%	39.4%
2	하티	<u>5.1%</u>	42.6%
3	전남	10.2%	37.5%
4	전남	10.3%	<u>21.2%</u>
5	전남		36.6%
평균		8.85% (±2%)	35.46% (±8%)

\*밀줄 친 추출의 경우 평균치에 미달되는 추출 수율을 보임

## 6. 대량 생산된 원료의 점검

가. 대량생산한 원료의 성상, 영양 성분, 유해물질 여부를 확인하기 위해 건강기능식품연구원에 의뢰하여 최종 물질의 유해성이 없음을 확인함

- 1) 대장균군 : 음성
- 2) 농약 : 불검출

나. 제형화 가능성을 검토를 통하여 위해 스틱 젤리 또는 연질캡슐을 활용한 제형화 가능 여부 확인 함



제 D2016042397 호			
<b>검 사 성 적 서</b>			
업체명	작두콩70%주정추출물	제조일자 (유통기한)	
업체명	(주)노바텍스		
주 소	충북 청원군 오창읍 각리1길 94		
성 명	권석형		
제조번호	Lot #1	검수년월일	2016-04-29
검사의뢰목적	제출용	검체검수번호	D2016042397
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. <span style="float: right;">검사관련 총 책임자: 김 선 희</span>			
	시험항목	결과	검사담당자
대장균군		음성	허태영
			
2016년 5월 4일 한국기능식품연구원 			
<small>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <a href="http://www.khsi.re.kr">http://www.khsi.re.kr</a> 전화 031-829-0600-1</small>			

Fig. 67. 작두콩 70% 주정추출물의 대장균 시험 성적서

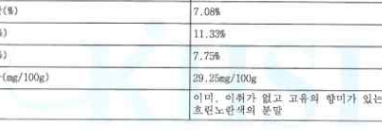

제 D2016042388 호			
<b>검 사 성 적 서</b>			
업체명	작두콩70%주정추출물	제조일자 (유통기한)	
업체명	(주)노바텍스		
주 소	충북 청원군 오창읍 각리1길 94		
성 명	권석형		
제조번호	Lot #1	검수년월일	2016-04-29
검사의뢰목적	제출용	검체검수번호	D2016042388
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. <span style="float: right;">검사관련 총 책임자: 김 선 희</span>			
	시험항목	결과	검사담당자
열량(Kcal/100g)		359.08Kcal/100g	한아름
단수화물(%)		34.63%	한아름
조단백질(%)		39.21%	김은영
조지방(%)		7.08%	이선정
수분(%)		11.33%	이지연
회분(%)		7.75%	이지연
나트륨(mg/100g)		29.25mg/100g	김세미
성상		이비, 이취가 없고 고유색 향미가 있는 프린노란색의 분말	박상진
			
2016년 5월 16일 한국기능식품연구원 			
<small>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <a href="http://www.khsi.re.kr">http://www.khsi.re.kr</a> 전화 031-829-0600-1</small>			

Fig. 68. 작두콩 70% 주정추출물의 영양성분 성적서

제 D2016042389 호      **검 사 성 적 서**

검체명	작두콩 70% 주정추출물	제조일자 (유통기한)	
업체명	(주)노바비스		
의뢰인	주소 충북 청원군 오창읍 가리1길 94		
성명	권석형		
제조번호	Lot #:1	접수년월일	2016-04-29
검사의뢰목적	재출송	검체접수번호	D2016042389

귀하가 우리 연구원에 검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자: 김 원 희

시험항목	결과	검사담당자
BHC(mg/kg)	불검출	박기화
DDT(mg/kg)	불검출	박기화
Aldrin(mg/kg)	불검출	박기화
Dieldrin(mg/kg)	불검출	박기화
Endrin(mg/kg)	불검출	박기화

2016년 5월 13일  
한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsti.re.kr> 전화 031-628-0400-1

Fig. 69. 작두콩 70% 주정추출물의 잔류농약 성적서

제 D2016042402 호      **검 사 성 적 서**

검체명	우영 70% 주정추출물	제조일자 (유통기한)	
업체명	1주)노바비스		
의뢰인	주소 충북 청원군 오창읍 가리1길 94		
성명	권석형		
제조번호	Lot #:1	접수년월일	2016-04-29
검사의뢰목적	재출송	검체접수번호	D2016042402

귀하가 우리 연구원에 검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자: 김 원 희

시험항목	결과	검사담당자
대장균군	음성	최태영

2016년 5월 4일  
한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsti.re.kr> 전화 031-628-0400-1

Fig. 70. 우영 70% 주정추출물의 대장균 시험 성적서

제 D2016042398 호      **검 사 성 적 서**

검체명	우영 70% 주정추출물	제조일자 (유통기한)	
업체명	(주)노바비스		
의뢰인	주소 충북 청원군 오창읍 가리1길 94		
성명	권석형		
제조번호	Lot #:2	접수년월일	2016-04-29
검사의뢰목적	재출송	검체접수번호	D2016042398

귀하가 우리 연구원에 검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자: 김 원 희

시험항목	결과	검사담당자
열량(Kcal/100g)	363.04kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	69.94%	한아름
조단백질(%)	14.07%	김은영
조지방(%)	3.00%	이선정
수분(%)	7.37%	이지연
회분(%)	5.62%	이지연
나트륨(mg/100g)	117.07mg/100g	김세비
성상	이비, 이취가 있고 고유의 향미가 있는 밝은 회황색의 분말	박상진

2016년 5월 12일  
한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsti.re.kr> 전화 031-628-0400-1

Fig. 71. 우영 70% 주정추출물의 영양 성분 성적서

제 D2016042399 호			
검 사 성 적 서			
검체명	우영70%주정추출물	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명 (주)노바텍스 주 소 충북 청원군 오창읍 사리1길 94 성 명 권석형	검사년월일	2016-04-29
제조번호	Lot #12	검체접수번호	D2016042399
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2016042399
귀하가 우리 연구원에 검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자 김 원 의			
시험항목	결과	검사담당자	
BHC(mg/kg)	불검출	박가화	
DDT(mg/kg)	불검출	박가화	
Aldrin(mg/kg)	불검출	박가화	
Dieldrin(mg/kg)	불검출	박가화	
Endrin(mg/kg)	불검출	박가화	
2016년 5월 13일			
한국기능식품연구원			
(사)한국기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <a href="http://www.kbsi.re.kr">http://www.kbsi.re.kr</a> 전화 031-628-0400-1			

제 D2016042401 호			
검 사 성 적 서			
검체명	우영70%주정추출물	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명 (주)노바텍스 주 소 충북 청원군 오창읍 사리1길 94 성 명 권석형	검사년월일	2016-04-29
제조번호	Lot #12	검체접수번호	D2016042401
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2016042401
귀하가 우리 연구원에 검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자 김 원 의			
시험항목	결과	검사담당자	
Diazinon(mg/kg)	불검출	김용수	
DDT(mg/kg)	불검출	김용수	
Dicofol(mg/kg)	불검출	김용수	
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	김용수	
Malathion(mg/kg)	불검출	김용수	
Methomyl(mg/kg)	불검출	이선미	
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출	이선미	
Methidathion(mg/kg)	불검출	김용수	
Boscalid(mg/kg)	불검출	이선미	
BHC(mg/kg)	불검출	김용수	
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	김용수	
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	이선미	
Azoxystrobin(mg/kg)	0.0002mg/kg	이선미	
Atrazine(mg/kg)	불검출	김용수	
Ethion(mg/kg)	불검출	김용수	
Endosulfan(mg/kg)	불검출	김용수	
Imazalil(mg/kg)	불검출	김용수	
Isoprothiolane(mg/kg)	불검출	김용수	
Iprodione(mg/kg)	불검출	김용수	
Carbaryl(mg/kg)	불검출	이선미	
Carbofuran(mg/kg)	불검출	이선미	
Captan(mg/kg)	불검출	김용수	

귀하가 우리 연구원에 검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자 김 원 의			
시험항목	결과	검사담당자	
Quintozene(mg/kg)	불검출	김용수	
Chlorothalonil(mg/kg)	불검출	김용수	
Chlorpyrifos(mg/kg)	0.0007mg/kg	김용수	
Chlorpyrifos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수	
Chlorfenvinphos(mg/kg)	불검출	김용수	
Toxofenox-methyl(mg/kg)	불검출	김용수	
Triadimefon(mg/kg)	불검출	김용수	
Triazophos(mg/kg)	불검출	김용수	
Trifluralin(mg/kg)	불검출	김용수	
Triflumuron(mg/kg)	불검출	김용수	
Thiamethoxam(mg/kg)	불검출	이선미	
Parathion(mg/kg)	불검출	김용수	
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	김용수	
Paclobutrazol(mg/kg)	불검출	김용수	
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenarimol(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenitrothion(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenvalerate(mg/kg)	불검출	김용수	
Phenthoate(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenpropathrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenhexamid(mg/kg)	불검출	이선미	
Phosmet(mg/kg)	불검출	김용수	
Procymidone(mg/kg)	불검출	김용수	
Prochloraz(mg/kg)	불검출	김용수	
Profenofos(mg/kg)	불검출	김용수	
Flubendiamide(mg/kg)	0.0004mg/kg	이선미	
Flufenoxuron(mg/kg)	불검출	이선미	
Pyraclostrobin(mg/kg)	0.0002mg/kg	이선미	
Pyrimethanil(mg/kg)	0.0001mg/kg	이선미	
Pirimicarb(mg/kg)	불검출	김용수	
Pirimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수	
Fludioxonil(mg/kg)	불검출	김용수	
Dimethoate(mg/kg)	불검출	김용수	

Fig. 72. 우영 70% 주정추출물의 잔류농약 성적서

## 7. 소재의 안정성 확립

건강기능식품의 경우 의약품과 달리 안정성 시험기준이 확립되어 있지 않으며, 본 제품은 정제(Tablet)로 우선 개발할 예정이므로 제품 보관온도인 “실온 온도(1~35°C, 식품공전기준)”에서 안정성을 확인하기로 함. 건조분말을 타정한 형태인 정제는 일반적으로 수분함량이 낮아 세균과 같은 미생물이 번식하기 힘들고 잔류농약 등의 위해물질은 원물로부터 유래하기에 최초 1번만 진행하기로 함(소재의 안전성 확보-위해물질 검사 결과 확인). 따라서, 안정성시험의 항목을 ‘지표물질의 함량’으로 확인하고자 함.

- 1) 조건
- 2) 안정성시험 항목 : 지표물질 함량
- 3) 시험기간 : 약 6개월간

번호	항목	생산완료(17.05)	3개월	6개월
1	대장균군	ND (자체검사)	ND	ND (자체검사)
2	Lupeol	*	-	-
3	Isochlorogenic acid A	*	-	-
4	성상	외견상 변화 없음	외견상 변화 없음	외견상 변화 없음
5	기타			
	항목	잔류농약 5종	잔류농약 58종	총균
	결과	적합	적합	적합

## 8. 원물의 원산지별 수급 확보 및 동등성 확인

농산물 등 천연물 원료의 경우 재배되는 토양과 수확시기, 재배환경 등에 영향을 받기 쉬우므로 각 산지별 원물의 수급 및 그 동등성을 확인할 필요가 있다고 판단되어 추가 연구를 수행함.

### 가. 원물의 원산지별 수급

작두콩은 다모작 식물이 아니며 주로 10월 중순에 수확하여 건조 후 사용됨. 따라서 재배지별 원물을 수급하여 지표물질의 함량을 분석하고자 함. 우영의 경우 주로 8~10월 사이에 수확을 하며 파종시기(봄/가을)에 따라 수확시기가 달라짐. 따라서 먼저 재배지별 원물의 지표성분 함량을 분석 후, 수확시기별 분석을 진행할 예정임. 이에 아래와 같이 주요 재배지 및 판매산지 별 작두콩/우영을 구매하여 추출한 후 각각의 지표물질 함량을 분석하여 원료간의 동등성을 확인함.

Table 35. 원물의 국내 재배지

<p>〈작두콩〉 주요 재배지</p>	<p>〈우엉〉 주요 재배지</p>
<p>- 주요 재배지 없음. 소규모 재배</p>	<p>- 경북지역[낙동강 유역]이 주요 재배지. 그 외 소규모 재배</p>

출처 : AT FIS 식품산업통계정보

Table 36. 원물 수급 업체 및 원산지

NO	원료명	업체명	사진	원산지	원산지증명서	비고
1	작두콩	(주)콩세상		충북 진천		기존사용원료
2	작두콩	함초닷컴		전남 화순		
3	작두콩	부안동진농장		전북 부안		

4	우영	갑당약초		충북 제천		기존사용원료
5	우영	제천영재농원		경기 여주		
6	우영	햇살담은자연 마을영농조합		경남 진주		
7	우영	부용농산		경북 안동		

**나. 작두콩 원산지별 수급 및 추출**

작두콩은 국내산 원물로 충북 진천, 전남 화순, 전남 부안 3곳의 원물을 구입하여 전남식품연구센터에서 추출을 진행하였음.

Table 37. 작두콩 산지별 원물 비교




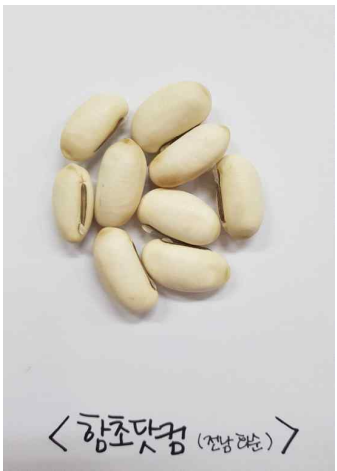



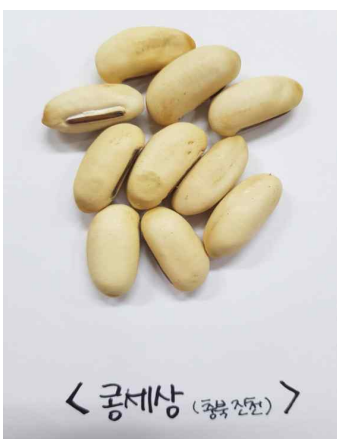

함초닷컴 (전남 화순)	부안동진농장 (전북 부안)	콩세상 (충북 진천)
		
산지별로 원물에서 육안상 차이가 있음. 추출 수율 또는 지표성분 함량 분석을 통해 차이를 분석할 필요가 있음.		



Table 38. 작두콩 산지별 원물 및 추출물

원료명	원산지	원물	추출물	기타사항
작두콩	함초닷컴 (전남 화순)			최종 수율 11.0%
	부안동진농장 (전북 부안)			최종 수율 10.5%
	콩세상 (충북 진천)			최종 수율 11.5%
산지별 작두콩을 추출한 결과 최종 수율에서 약간의 차이가 있었음.				

다. 작두콩 원산지별 추출물의 동등성 확인

국내산 원산지 3곳의 원물 추출물을 완료한 후 지표물질 Lupeol 함량 분석 완료함.

Table 39. 작두콩 추출물의 지표물질 함량 및 Chromatogram

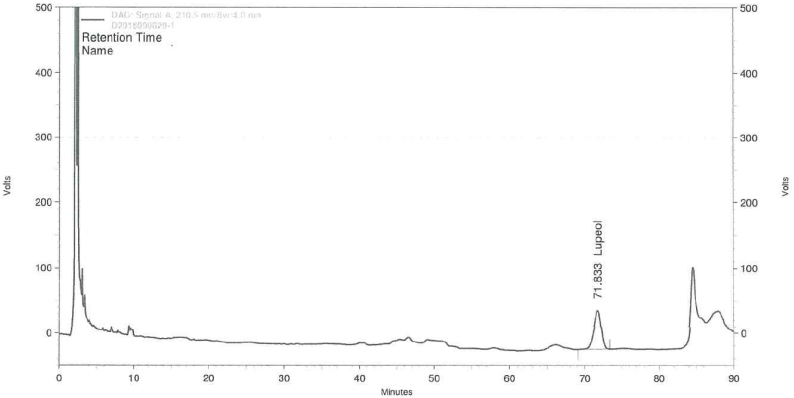
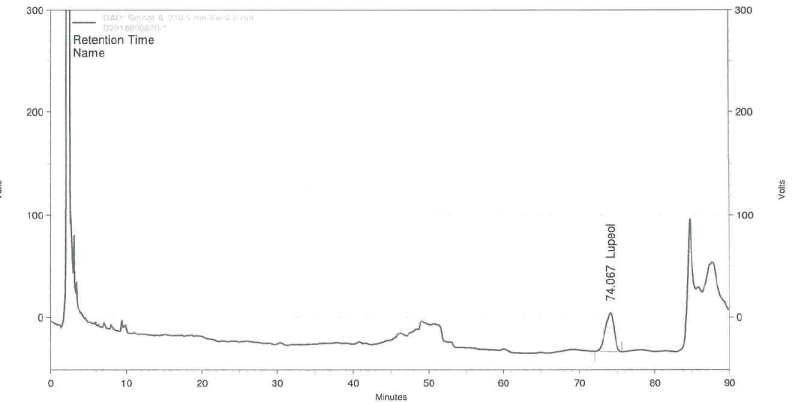
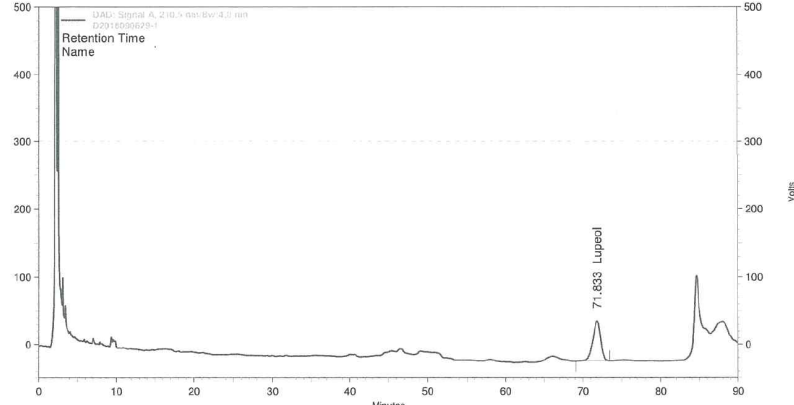
<p>함초닷컴 (전남 화순)</p>		
	<p>Lupeol</p>	<p>1.75mg/g</p>
<p>부안동진농장 (전북 부안)</p>		
	<p>Lupeol</p>	<p>0.90mg/g</p>
<p>콩세상 (충북 진천)  -기존 원료-</p>		
	<p>Lupeol</p>	<p>2.48mg/g</p>
<p>산지별 작두콩 추출물의 지표물질 함량을 비교 분석한 결과 함량에는 약간 차이가 있지만 chromatogram에서는 비슷한 패턴과 피크를 가짐</p>		

Table 40. 작두콩 지표물질 함량 성적서

<p style="text-align: center;"><b>함초닷컴</b> (전남 화순)</p>	<p style="text-align: center;"><b>부안동진농장</b> (전북 부안)</p>	<p style="text-align: center;"><b>콩세상</b> (충북 진천)</p>																																																															
<p>제 ID201806028 호 문서번호: 시형-검사성적서</p> <table border="1"> <tr> <td>제명명: <b>작두콩(산란종)</b></td> <td>제품명: (주)화순농산</td> <td>제조일자: 2017-07-01</td> </tr> <tr> <td>원산지: (주)화순농산</td> <td>성명: 이영준</td> <td></td> </tr> <tr> <td>주소: 순창 동원로 60길 194</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>제조번호: 2018-09-07</td> <td>검사일자: 2018-09-07</td> <td>검사번호: 2018-09-07</td> </tr> <tr> <td>검사뢰주명: 함초닷컴</td> <td>검사번호: ID201806028</td> <td></td> </tr> </table> <p>이해가 주의 인가없이 시험-검사목적만 결과는 다음과 같습니다.          시험 - 검사 일자: 2018-10-01          시험 - 검사 대상: 작두콩          검사방법: 이온크로마토그래피          검사기관: 한국농수산식품연구원</p> <table border="1"> <tr> <th>시험 - 검사항목</th> <th>시험 - 검사 결과</th> <th>시험-검사비</th> </tr> <tr> <td>Isoprenol(mg/g)</td> <td>1.75mg/g</td> <td>당대당</td> </tr> </table> <p>본시험-검사비용</p> <p>2018년 10월 1일  <b>한국농수산식품연구원</b>          (사)한국농수산식품연구원 품질 관리부(농산물부) http://www.knfr.or.kr/ 전화번호: 02-9708-0900-1</p>	제명명: <b>작두콩(산란종)</b>	제품명: (주)화순농산	제조일자: 2017-07-01	원산지: (주)화순농산	성명: 이영준		주소: 순창 동원로 60길 194			제조번호: 2018-09-07	검사일자: 2018-09-07	검사번호: 2018-09-07	검사뢰주명: 함초닷컴	검사번호: ID201806028		시험 - 검사항목	시험 - 검사 결과	시험-검사비	Isoprenol(mg/g)	1.75mg/g	당대당	<p>제 ID201806030 호 문서번호: 시형-검사성적서</p> <table border="1"> <tr> <td>제명명: <b>작두콩(산란)</b></td> <td>제품명: (주)부안농산</td> <td>제조일자: 2017-09-10</td> </tr> <tr> <td>원산지: (주)부안농산</td> <td>성명: 이영준</td> <td></td> </tr> <tr> <td>주소: 순창 동원로 60길 194</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>제조번호: 2018-09-07</td> <td>검사일자: 2018-09-07</td> <td>검사번호: ID201806030</td> </tr> <tr> <td>검사뢰주명: 함초닷컴</td> <td>검사번호: ID201806030</td> <td></td> </tr> </table> <p>이해가 주의 인가없이 시험-검사목적만 결과는 다음과 같습니다.          시험 - 검사 일자: 2018-10-01          시험 - 검사 대상: 작두콩          검사방법: 이온크로마토그래피          검사기관: 한국농수산식품연구원</p> <table border="1"> <tr> <th>시험 - 검사항목</th> <th>시험 - 검사 결과</th> <th>시험-검사비</th> </tr> <tr> <td>Isoprenol(mg/g)</td> <td>0.20mg/g</td> <td>당대당</td> </tr> </table> <p>본시험-검사비용</p> <p>2018년 10월 1일  <b>한국농수산식품연구원</b>          (사)한국농수산식품연구원 품질 관리부(농산물부) http://www.knfr.or.kr/ 전화번호: 02-9708-0900-1</p>	제명명: <b>작두콩(산란)</b>	제품명: (주)부안농산	제조일자: 2017-09-10	원산지: (주)부안농산	성명: 이영준		주소: 순창 동원로 60길 194			제조번호: 2018-09-07	검사일자: 2018-09-07	검사번호: ID201806030	검사뢰주명: 함초닷컴	검사번호: ID201806030		시험 - 검사항목	시험 - 검사 결과	시험-검사비	Isoprenol(mg/g)	0.20mg/g	당대당	<p>제 ID201806028 호 문서번호: 시형-검사성적서</p> <table border="1"> <tr> <td>제명명: <b>작두콩(산란)</b></td> <td>제품명: (주)콩세상</td> <td>제조일자: 2017-07-01</td> </tr> <tr> <td>원산지: (주)콩세상</td> <td>성명: 이영준</td> <td></td> </tr> <tr> <td>주소: 순창 동원로 60길 194</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>제조번호: 2018-09-07</td> <td>검사일자: 2018-09-07</td> <td>검사번호: ID201806028</td> </tr> <tr> <td>검사뢰주명: 함초닷컴</td> <td>검사번호: ID201806028</td> <td></td> </tr> </table> <p>이해가 주의 인가없이 시험-검사목적만 결과는 다음과 같습니다.          시험 - 검사 일자: 2018-10-01          시험 - 검사 대상: 작두콩          검사방법: 이온크로마토그래피          검사기관: 한국농수산식품연구원</p> <table border="1"> <tr> <th>시험 - 검사항목</th> <th>시험 - 검사 결과</th> <th>시험-검사비</th> </tr> <tr> <td>Isoprenol(mg/g)</td> <td>0.24mg/g</td> <td>당대당</td> </tr> </table> <p>본시험-검사비용</p> <p>2018년 10월 1일  <b>한국농수산식품연구원</b>          (사)한국농수산식품연구원 품질 관리부(농산물부) http://www.knfr.or.kr/ 전화번호: 02-9708-0900-1</p>	제명명: <b>작두콩(산란)</b>	제품명: (주)콩세상	제조일자: 2017-07-01	원산지: (주)콩세상	성명: 이영준		주소: 순창 동원로 60길 194			제조번호: 2018-09-07	검사일자: 2018-09-07	검사번호: ID201806028	검사뢰주명: 함초닷컴	검사번호: ID201806028		시험 - 검사항목	시험 - 검사 결과	시험-검사비	Isoprenol(mg/g)	0.24mg/g	당대당
제명명: <b>작두콩(산란종)</b>	제품명: (주)화순농산	제조일자: 2017-07-01																																																															
원산지: (주)화순농산	성명: 이영준																																																																
주소: 순창 동원로 60길 194																																																																	
제조번호: 2018-09-07	검사일자: 2018-09-07	검사번호: 2018-09-07																																																															
검사뢰주명: 함초닷컴	검사번호: ID201806028																																																																
시험 - 검사항목	시험 - 검사 결과	시험-검사비																																																															
Isoprenol(mg/g)	1.75mg/g	당대당																																																															
제명명: <b>작두콩(산란)</b>	제품명: (주)부안농산	제조일자: 2017-09-10																																																															
원산지: (주)부안농산	성명: 이영준																																																																
주소: 순창 동원로 60길 194																																																																	
제조번호: 2018-09-07	검사일자: 2018-09-07	검사번호: ID201806030																																																															
검사뢰주명: 함초닷컴	검사번호: ID201806030																																																																
시험 - 검사항목	시험 - 검사 결과	시험-검사비																																																															
Isoprenol(mg/g)	0.20mg/g	당대당																																																															
제명명: <b>작두콩(산란)</b>	제품명: (주)콩세상	제조일자: 2017-07-01																																																															
원산지: (주)콩세상	성명: 이영준																																																																
주소: 순창 동원로 60길 194																																																																	
제조번호: 2018-09-07	검사일자: 2018-09-07	검사번호: ID201806028																																																															
검사뢰주명: 함초닷컴	검사번호: ID201806028																																																																
시험 - 검사항목	시험 - 검사 결과	시험-검사비																																																															
Isoprenol(mg/g)	0.24mg/g	당대당																																																															

국내산 원산지 3곳 (전남 화순, 전북 부안, 충북 진천)의 원물을 추출한 결과, 원물과 추출 수율에서 차이가 있었음. 또한, 지표성분 함량 분석 결과 함량 차이가 있었음. 이 같은 산지별 차이는 원물에서부터 해결해야 되는 것으로 판단되며, 과제 종료 후에도 계약 재배 등의 방법으로 원물의 가격을 낮추고 품질을 일정하게 유지하는 방법을 모색할 계획임.

**라. 우영 원산지별 추출물의 동등성 확인**

국내산 원산지 4곳(충북 제천, 경기 여주, 경남 진주, 경북 안동)의 추출 완료 후 지표물질인 Isochlorogenic acid A 함량 분석 완료함. 1, 2차 분석, 산지별 원물에 따라 추출 수율과 지표물질인 Isochlorogenic acid A의 함량에 차이가 있어 새로운 추출물로 반복실험을 진행함. 추출을 완료한 후 공인시험기관인 한국농수산식품연구원을 통해 지표물질인 Isochlorogenic acid A 함량 분석을 진행함.

Table 41. 1차 원산지별 우영 추출물의 Isochlorogenic acid A 함량

<p>갑당약초 (충북 제천)</p>		
	<p>Isochlorogenic acid A 함량</p>	<p>5.01 mg/g (0.5%)</p>
	<p>추출 수율</p>	<p>21.2%</p>

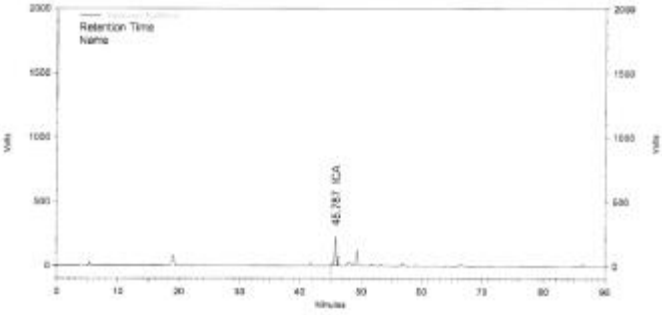
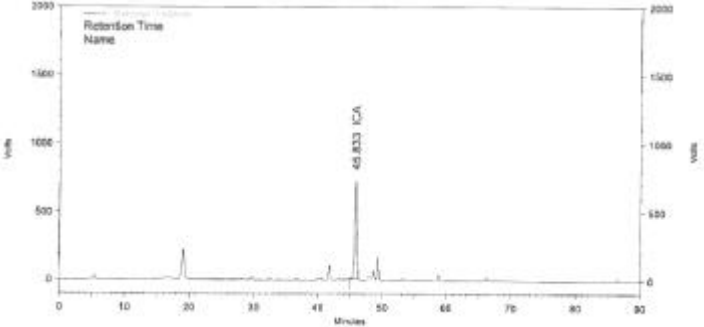
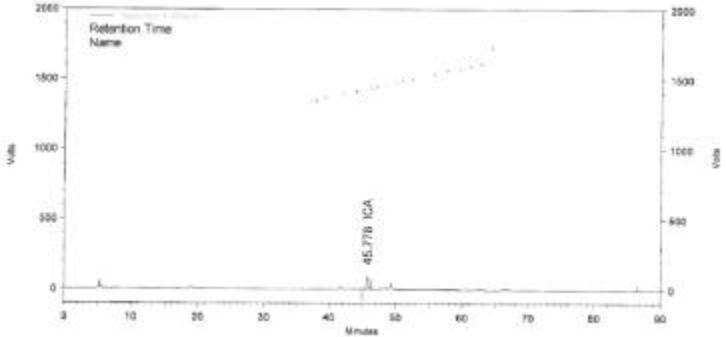
제천영재농원 (경기여주)		
	Isochlorogenic acid A 함량	1.77 mg/g (0.18%)
	추출 수율	22.4%
햇살담은자연마을 (경남진주)		
	Isochlorogenic acid A 함량	5.83 mg/g (0.58%)
	추출 수율	37.7%
부용농산 (경북안동)		
	Isochlorogenic acid A 함량	0.62 mg/g (0.06%)
	추출 수율	42.0%
비고	<p>감당약초의 경우 기존과도 추출 수율이 다르게 나왔기 때문에 추가 추출의뢰를 통해 결과에 대한 확인이 필요함. 2차 추출 후 동일한 실험을 반복할 예정</p>	

Table 42. 2차 원산지별 우엉 추출물의 Isochlorogenic acid A 함량

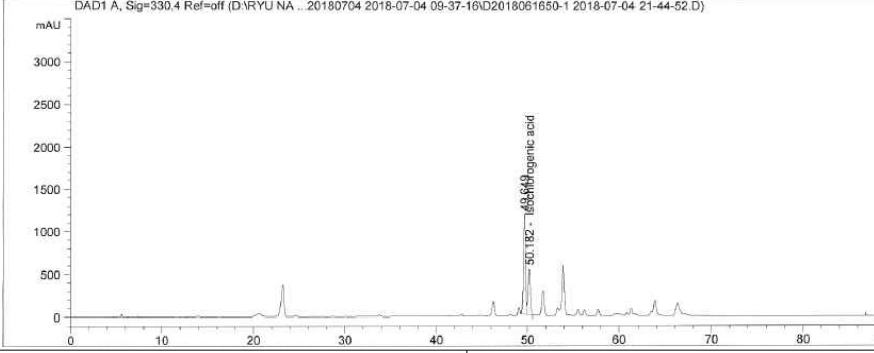
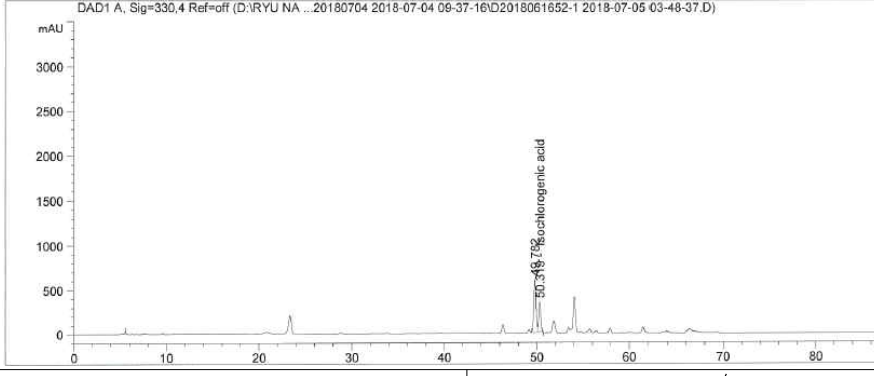
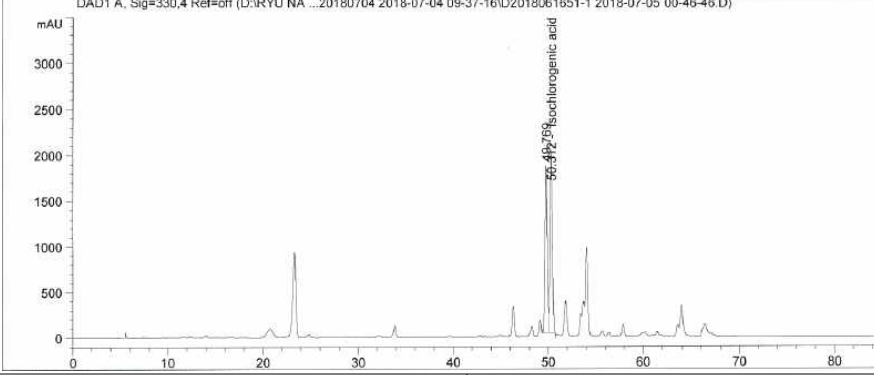
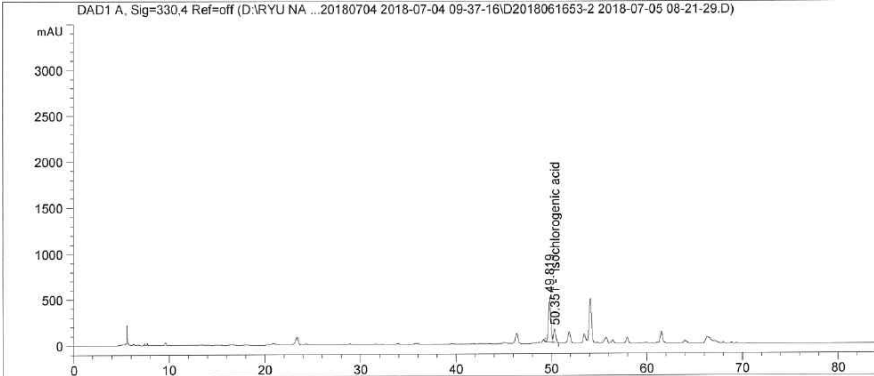
<p>갑당약초 (충북 제천)</p>	 <p style="text-align: center;">Isochlorogenic acid A      2.29mg/g</p>
<p>제천영재농원 (경기 여주)</p>	 <p style="text-align: center;">Isochlorogenic acid A      1.44mg/g</p>
<p>햇살담은 자연마을 (경남 진주)</p>	 <p style="text-align: center;">Isochlorogenic acid A      9.16mg/g</p>
<p>부용농산 (경북 안동)</p>	 <p style="text-align: center;">Isochlorogenic acid A      0.32mg/g</p>
<p>전년도 추출한 산지별 우엉 추출물의 지표물질 함량을 비교 분석한 결과 함량에는 차이가 있지만 Chromatogram에서는 비슷한 패턴과 피크를 가짐</p>	

Table 43. 우영 지표물질 함량 성적서

갑당약초 (충북 제천)	제천영재농원 (경기 여주)	햇살담은 자연마을 (경남 진주)	부용농산 (경북 안동)
<p>제 10200405000 호 우영약재</p> <p>시험·검사성적서</p> <p>제천 영재농원 (충북 제천) 2023-07-11</p> <p>시험일자 2023-07-11</p> <p>시험품명 100% 우영약재</p> <p>시험목적 100% 우영약재의 품질을 확인하기 위함</p> <p>시험방법 한국농림수산식품시험법 제 100-00-00</p> <p>시험장소 제천 영재농원 (충북 제천) 10200405000</p> <p>시험결과</p> <p>시험일자 2023-07-11</p> <p>시험품명 100% 우영약재</p> <p>시험목적 100% 우영약재의 품질을 확인하기 위함</p> <p>시험방법 한국농림수산식품시험법 제 100-00-00</p> <p>시험장소 제천 영재농원 (충북 제천) 10200405000</p> <p>시험결과</p> <p>2023년 7월 11일 한국농식품연구원</p>	<p>제 10210000000 호 우영약재</p> <p>시험·검사성적서</p> <p>제천 영재농원 (경기 여주) 2023-07-11</p> <p>시험일자 2023-07-11</p> <p>시험품명 100% 우영약재</p> <p>시험목적 100% 우영약재의 품질을 확인하기 위함</p> <p>시험방법 한국농림수산식품시험법 제 100-00-00</p> <p>시험장소 제천 영재농원 (경기 여주) 10210000000</p> <p>시험결과</p> <p>시험일자 2023-07-11</p> <p>시험품명 100% 우영약재</p> <p>시험목적 100% 우영약재의 품질을 확인하기 위함</p> <p>시험방법 한국농림수산식품시험법 제 100-00-00</p> <p>시험장소 제천 영재농원 (경기 여주) 10210000000</p> <p>시험결과</p> <p>2023년 7월 11일 한국농식품연구원</p>	<p>제 10210000000 호 우영약재</p> <p>시험·검사성적서</p> <p>햇살담은 자연마을 (경남 진주) 2023-07-11</p> <p>시험일자 2023-07-11</p> <p>시험품명 100% 우영약재</p> <p>시험목적 100% 우영약재의 품질을 확인하기 위함</p> <p>시험방법 한국농림수산식품시험법 제 100-00-00</p> <p>시험장소 햇살담은 자연마을 (경남 진주) 10210000000</p> <p>시험결과</p> <p>시험일자 2023-07-11</p> <p>시험품명 100% 우영약재</p> <p>시험목적 100% 우영약재의 품질을 확인하기 위함</p> <p>시험방법 한국농림수산식품시험법 제 100-00-00</p> <p>시험장소 햇살담은 자연마을 (경남 진주) 10210000000</p> <p>시험결과</p> <p>2023년 7월 11일 한국농식품연구원</p>	<p>제 10210000000 호 우영약재</p> <p>시험·검사성적서</p> <p>부용농산 (경북 안동) 2023-07-11</p> <p>시험일자 2023-07-11</p> <p>시험품명 100% 우영약재</p> <p>시험목적 100% 우영약재의 품질을 확인하기 위함</p> <p>시험방법 한국농림수산식품시험법 제 100-00-00</p> <p>시험장소 부용농산 (경북 안동) 10210000000</p> <p>시험결과</p> <p>시험일자 2023-07-11</p> <p>시험품명 100% 우영약재</p> <p>시험목적 100% 우영약재의 품질을 확인하기 위함</p> <p>시험방법 한국농림수산식품시험법 제 100-00-00</p> <p>시험장소 부용농산 (경북 안동) 10210000000</p> <p>시험결과</p> <p>2023년 7월 11일 한국농식품연구원</p>

국내산 원산지 4곳 (충북 제천, 경기 여주, 경남 진주, 경북 안동) 추출물의 지표물질 함량을 분석한 결과 함량에 큰 차이가 있었음. 작두콩과 동일하게 원물의 동등성 입증은 과제 종료 후에도 지속적으로 원물을 구입하여 추가적으로 분석해야할 계획임. 또한, 계약 재배 등의 방법으로 원물의 가격을 낮추고 품질을 일정하게 유지하는 방법을 모색할 계획임.

### 9. 대량 원료화 방안 수립

추출 업체는 인체적용시험식품 제작을 위해 대량추출을 진행하였던 전남식품산업연구센터에서 최적 조건 확립 및 3Lot 대량 추출을 진행함. 이는 전년도 대량 추출 당시 조건 확립을 완료하였으며, 시험식품 생산 시 특이 사항이 없었던 점과 기존의 제형의 배합비 검토 시 활용하였던 추출물이 전남식품산업연구센터에서 추출하였던 추출물인 점을 고려하여 최종 추출업체로 선정함.

#### 가. 작두콩과 우영의 3Lot 대량 추출 및 최적 조건 확립

##### 1) 작두콩 추출 (3Lot, 1Lot/100kg 원물)

- 가) 원물 : 작두콩 100kg (충북 진천)
- 나) 팽윤 : 작두콩 100kg (원물대비 상수 3배 투입 및 팽윤, 24시간)
- 다) 원료 투입 : 회전절단기 슬라이스
- 라) 추출 : 원물대비 10배 70% 주정 48시간 침지, 추출온도 22~30℃
- 마) 여과 : 55µm 필터
- 바) 농축 : 70℃이하 농축, 1200rpm - 21.0 brix (brix 기준 수율 10.7%)
- 사) 여과 : 55µm, 살균 무
- 아) 동결 건조 (최종 수율 10.2%)
- 자) 분쇄

- 2) 우영 추출 (3Lot, 1Lot/100kg 원물)
- 가) 원물 : 우영 100kg (충북 제천)
  - 나) 1차 추출 : 원물대비 7.3배 70% 주정 24시간 침지, 추출온도 33~36℃
  - 다) 2차 추출 : 원물대비 6.4배 70% 주정 24시간 침지, 추출온도 33~36℃
  - 라) 여과 : 1차 + 2차 추출물, 55µm 필터
  - 마) 농축 : 70℃이하 농축, 1200rpm - 1차 : 19 brix (brix 기준 수율 25.6%)  
2차 : 19 brix (brix 기준 수율 13.8%)
  - 바) 여과 : 55µm, 살균 무
  - 사) 동결건조 (14.5 brix로 보정, 최종 수율 37.5%)

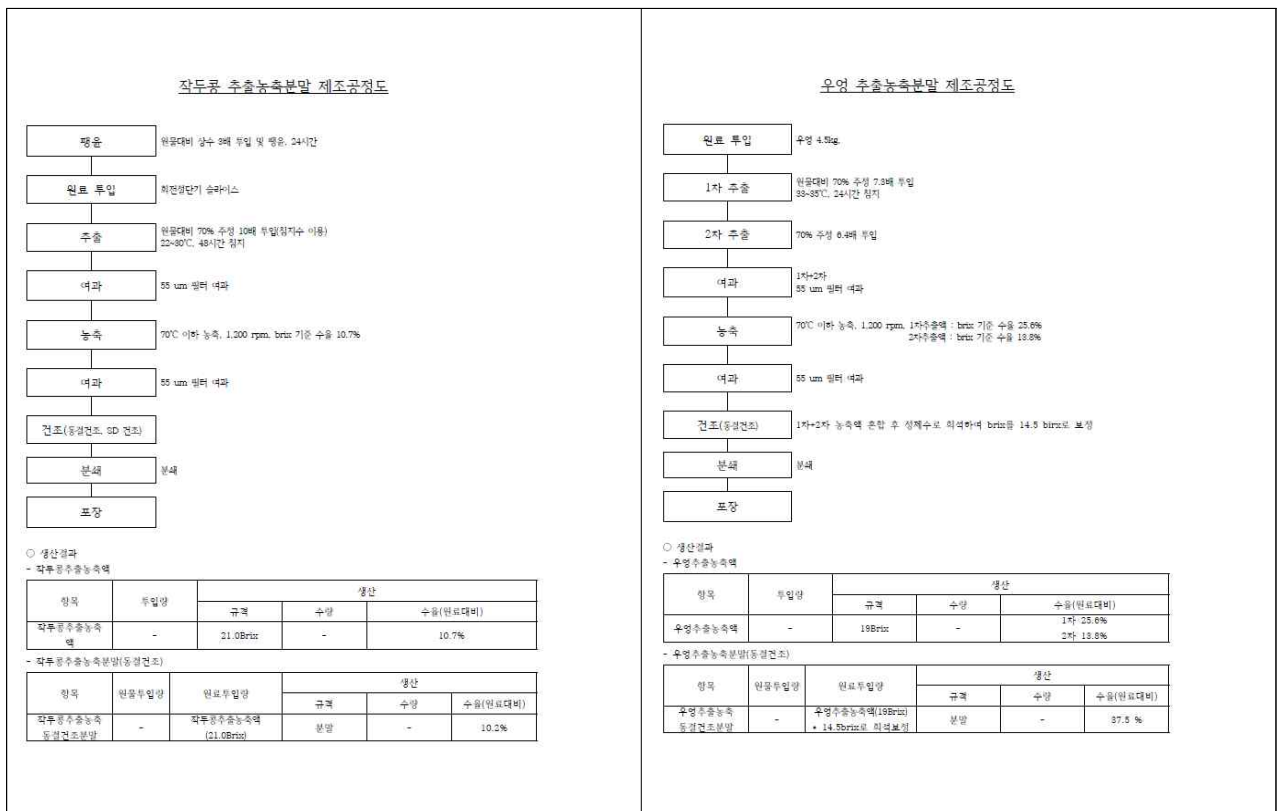


Fig 63. 작두콩 및 우영 제조공정도

## 10. 품질관리 기준 확립

작두콩 및 우영의 3Lot 대량 추출을 완료한 후 작두콩 및 우영의 각 지표물질 성분과 유해물질 (중금속, 잔류농약, 대장균군) 분석을 통해 원료의 품질관리 기준을 확립하고자 함. 식품의약품안전처 개별인정신청서 제출 시 자료로 활용함.

### 가. 원료의 3Lot 지표물질 함량 분석

작두콩추출물등복합물 (작두콩:우영=1:4)로서 지표물질 함량을 분석하기 위해 공인 시험기관인 한국기능식품연구원을 통해 작두콩 지표물질인 Lupeol과 우영 지표물질인 Isochlorogenic acid A 분석을 진행함.

Table 44. 작두콩추출물등복합물의 지표물질 함량 및 Chromatogram

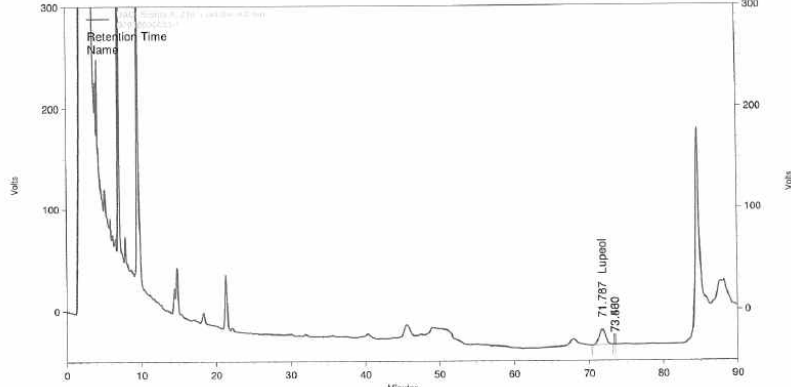
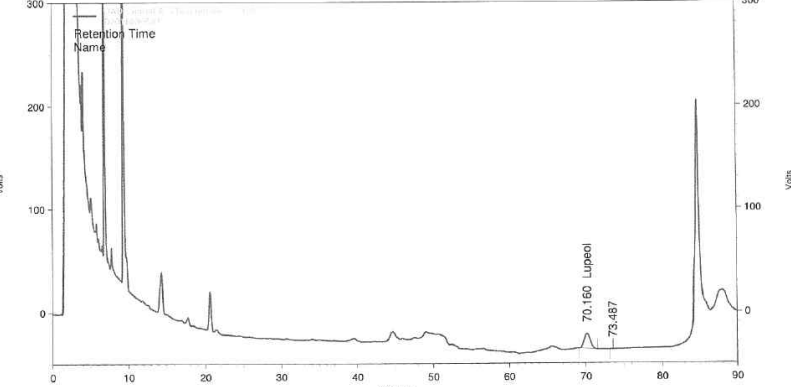
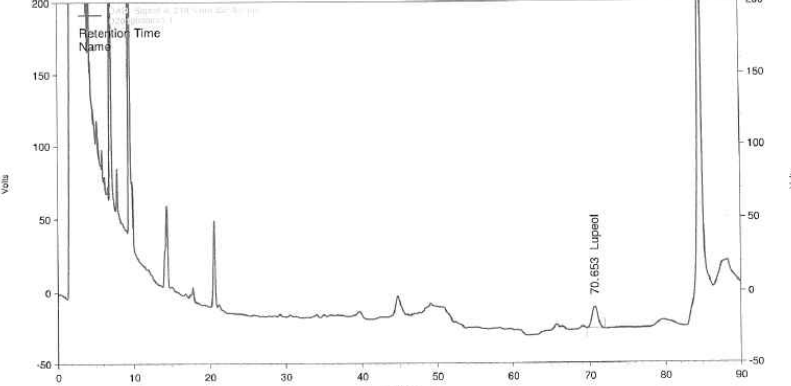
제조번호	결과	
001-18		
	Lupeol 0.20mg/g	Isochlorogenic acid A -
002-18		
	Lupeol 0.19mg/g	Isochlorogenic acid A -
003-18		
	Lupeol 0.18mg/g	Isochlorogenic acid A -
<p>작두콩추출물등복합물에서 작두콩 지표물질인 Lupeol 함량은 일정하게 분석됨. 반면, 우엉 지표물질인 Isochlorogenic acid A 함량은 “실험 불가” 결과가 도출된 점으로 과제 종료 후에도 분석법 검토 및 추가적인 연구를 할 계획임.</p>		



Table 45. 작두콩추출물등복합물 지표물질 함량 성적서

제조번호 001-18	제조번호 002-18	제조번호 003-18																																																																														
<p>제 D2018090333 호 문서화면</p> <p>시험·검사성적서</p> <table border="1"> <tr> <td>제출명</td> <td>작두콩추출물등복합물</td> <td>제출인명 (출원기관)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>원재료명</td> <td>(주)노베리스</td> <td>성명</td> <td>이장준</td> </tr> <tr> <td>주소</td> <td>충청북도청주광역시금강로 94</td> <td>주 소</td> <td>충북 청원군 오창읍 의대1리 94</td> </tr> <tr> <td>제조번호</td> <td>001-18</td> <td>검수년월일</td> <td>2018-09-07</td> </tr> <tr> <td>검사뢰의뢰일자</td> <td>제출일</td> <td>검수번호</td> <td>D2018090333</td> </tr> </table> <p>제외가 우리 연구소에 시험·검사뢰어진 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 원료명: 2018-10-01          시험·검사 책임자: 이장준          검사기관 총 책임자: 김은희</p> <table border="1"> <tr> <td>시험·검사항목</td> <td>시험·검사 결과</td> <td>시험·검사비</td> </tr> <tr> <td>LiponKmg/g</td> <td>0.079mg/g(0.19,0.19,0.20)</td> <td>합계</td> </tr> </table> <p>본시험·검사에대함</p> <p>2018년 10월 1일          한국기능식품연구원</p> <p>※ 위 표방출 이외의 시험·검사 결과는 제공되지 않습니다.          ※ 시험에 유관한 경우 시험·검사 및 검체유출 책임은 본시험·검체유출자에게 있습니다.</p> <p>2018년 10월 1일          한국기능식품연구원</p> <p>※ 위 표방출 이외의 시험·검사 결과는 제공되지 않습니다.          ※ 시험에 유관한 경우 시험·검사 및 검체유출 책임은 본시험·검체유출자에게 있습니다.</p> <p>2018년 10월 1일          한국기능식품연구원</p> <p>※ 위 표방출 이외의 시험·검사 결과는 제공되지 않습니다.          ※ 시험에 유관한 경우 시험·검사 및 검체유출 책임은 본시험·검체유출자에게 있습니다.</p>	제출명	작두콩추출물등복합물	제출인명 (출원기관)		원재료명	(주)노베리스	성명	이장준	주소	충청북도청주광역시금강로 94	주 소	충북 청원군 오창읍 의대1리 94	제조번호	001-18	검수년월일	2018-09-07	검사뢰의뢰일자	제출일	검수번호	D2018090333	시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비	LiponKmg/g	0.079mg/g(0.19,0.19,0.20)	합계	<p>제 D2018090339 호 문서화면</p> <p>시험·검사성적서</p> <table border="1"> <tr> <td>제출명</td> <td>작두콩추출물등복합물</td> <td>제출인명 (출원기관)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>원재료명</td> <td>(주)노베리스</td> <td>성명</td> <td>이장준</td> </tr> <tr> <td>주소</td> <td>충청북도청주광역시금강로 94</td> <td>주 소</td> <td>충북 청원군 오창읍 의대1리 94</td> </tr> <tr> <td>제조번호</td> <td>002-18</td> <td>검수년월일</td> <td>2018-09-07</td> </tr> <tr> <td>검사뢰의뢰일자</td> <td>제출일</td> <td>검수번호</td> <td>D2018090339</td> </tr> </table> <p>제외가 우리 연구소에 시험·검사뢰어진 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 원료명: 2018-10-01          시험·검사 책임자: 이장준          검사기관 총 책임자: 김은희</p> <table border="1"> <tr> <td>시험·검사항목</td> <td>시험·검사 결과</td> <td>시험·검사비</td> </tr> <tr> <td>LiponKmg/g</td> <td>0.179mg/g(0.18,0.20,0.20)</td> <td>합계</td> </tr> </table> <p>본시험·검사에대함</p> <p>2018년 10월 1일          한국기능식품연구원</p> <p>※ 위 표방출 이외의 시험·검사 결과는 제공되지 않습니다.          ※ 시험에 유관한 경우 시험·검사 및 검체유출 책임은 본시험·검체유출자에게 있습니다.</p> <p>2018년 10월 1일          한국기능식품연구원</p> <p>※ 위 표방출 이외의 시험·검사 결과는 제공되지 않습니다.          ※ 시험에 유관한 경우 시험·검사 및 검체유출 책임은 본시험·검체유출자에게 있습니다.</p> <p>2018년 10월 1일          한국기능식품연구원</p> <p>※ 위 표방출 이외의 시험·검사 결과는 제공되지 않습니다.          ※ 시험에 유관한 경우 시험·검사 및 검체유출 책임은 본시험·검체유출자에게 있습니다.</p>	제출명	작두콩추출물등복합물	제출인명 (출원기관)		원재료명	(주)노베리스	성명	이장준	주소	충청북도청주광역시금강로 94	주 소	충북 청원군 오창읍 의대1리 94	제조번호	002-18	검수년월일	2018-09-07	검사뢰의뢰일자	제출일	검수번호	D2018090339	시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비	LiponKmg/g	0.179mg/g(0.18,0.20,0.20)	합계	<p>제 D201809045 호 문서화면</p> <p>시험·검사성적서</p> <table border="1"> <tr> <td>제출명</td> <td>작두콩추출물등복합물</td> <td>제출인명 (출원기관)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>원재료명</td> <td>(주)노베리스</td> <td>성명</td> <td>이장준</td> </tr> <tr> <td>주소</td> <td>충청북도청주광역시금강로 94</td> <td>주 소</td> <td>충북 청원군 오창읍 의대1리 94</td> </tr> <tr> <td>제조번호</td> <td>003-18</td> <td>검수년월일</td> <td>2018-09-07</td> </tr> <tr> <td>검사뢰의뢰일자</td> <td>제출일</td> <td>검수번호</td> <td>D201809045</td> </tr> </table> <p>제외가 우리 연구소에 시험·검사뢰어진 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 원료명: 2018-10-01          시험·검사 책임자: 이장준          검사기관 총 책임자: 김은희</p> <table border="1"> <tr> <td>시험·검사항목</td> <td>시험·검사 결과</td> <td>시험·검사비</td> </tr> <tr> <td>LiponKmg/g</td> <td>0.179mg/g(0.18,0.19,0.20)</td> <td>합계</td> </tr> </table> <p>본시험·검사에대함</p> <p>2018년 10월 1일          한국기능식품연구원</p> <p>※ 위 표방출 이외의 시험·검사 결과는 제공되지 않습니다.          ※ 시험에 유관한 경우 시험·검사 및 검체유출 책임은 본시험·검체유출자에게 있습니다.</p> <p>2018년 10월 1일          한국기능식품연구원</p> <p>※ 위 표방출 이외의 시험·검사 결과는 제공되지 않습니다.          ※ 시험에 유관한 경우 시험·검사 및 검체유출 책임은 본시험·검체유출자에게 있습니다.</p> <p>2018년 10월 1일          한국기능식품연구원</p> <p>※ 위 표방출 이외의 시험·검사 결과는 제공되지 않습니다.          ※ 시험에 유관한 경우 시험·검사 및 검체유출 책임은 본시험·검체유출자에게 있습니다.</p>	제출명	작두콩추출물등복합물	제출인명 (출원기관)		원재료명	(주)노베리스	성명	이장준	주소	충청북도청주광역시금강로 94	주 소	충북 청원군 오창읍 의대1리 94	제조번호	003-18	검수년월일	2018-09-07	검사뢰의뢰일자	제출일	검수번호	D201809045	시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비	LiponKmg/g	0.179mg/g(0.18,0.19,0.20)	합계
제출명	작두콩추출물등복합물	제출인명 (출원기관)																																																																														
원재료명	(주)노베리스	성명	이장준																																																																													
주소	충청북도청주광역시금강로 94	주 소	충북 청원군 오창읍 의대1리 94																																																																													
제조번호	001-18	검수년월일	2018-09-07																																																																													
검사뢰의뢰일자	제출일	검수번호	D2018090333																																																																													
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비																																																																														
LiponKmg/g	0.079mg/g(0.19,0.19,0.20)	합계																																																																														
제출명	작두콩추출물등복합물	제출인명 (출원기관)																																																																														
원재료명	(주)노베리스	성명	이장준																																																																													
주소	충청북도청주광역시금강로 94	주 소	충북 청원군 오창읍 의대1리 94																																																																													
제조번호	002-18	검수년월일	2018-09-07																																																																													
검사뢰의뢰일자	제출일	검수번호	D2018090339																																																																													
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비																																																																														
LiponKmg/g	0.179mg/g(0.18,0.20,0.20)	합계																																																																														
제출명	작두콩추출물등복합물	제출인명 (출원기관)																																																																														
원재료명	(주)노베리스	성명	이장준																																																																													
주소	충청북도청주광역시금강로 94	주 소	충북 청원군 오창읍 의대1리 94																																																																													
제조번호	003-18	검수년월일	2018-09-07																																																																													
검사뢰의뢰일자	제출일	검수번호	D201809045																																																																													
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비																																																																														
LiponKmg/g	0.179mg/g(0.18,0.19,0.20)	합계																																																																														

11. 소재의 안전성 확보

인체적용시험 시험식품의 위해물질 규격 확인을 위해 건강기능식품 기준 및 규격의 위해물질(중금속, 미생물(대장균군), 잔류농약58종, 잔류농약 5종 등)에 대해 공인분석을 수행함.

[별표 2]

유해물질규격설정항목(제14조제6호가목 관련)

원료	항목	규격	비고	
모든 원료	중금속	납	< 10.8µg/일	
		총비소	< 150µg/일	
		카드뮴	< 3.0µg/일	
		총수은	< 2.1µg/일	
	미생물	대장균군	음성	
세균수		≤ 100/g	액상제품에 한함	

Fig. 74. 식품의약품안전처, 유해물질규격설정항목(건강기능식품)

가. 원료의 유해물질 분석

작두콩추출물등복합물 (작두콩:우엉 = 1:4)로서 유해물질을 분석하기 위해 공인시험기관인 한국기능식품연구원을 통해 중금속 5종 (납, 총비소, 카드뮴, 총수은), 잔류농





## 12. 최종 소재의 평가를 통한 안전성 및 독성 검사

### 가. SD rat에 작두콩추출물등복합물 (작두콩추출물:우엉추출물=1:4)의 7일 반복투여 독성시험

#### 1) 임상증상 및 체중변화 및 식이섭취량효율 분석

- 가) 작두콩추출물등복합물 200, 400 mg/kg 투여군에서 이상행동 및 독성증상 없었음.  
 나) 작두콩추출물등복합물 200, 400 mg/kg 투여군에서 사망 동물 없었음.  
 다) 작두콩추출물등복합물 200, 400 mg/kg 투여군과 정상대조군에 투여개시 직전 0일, 3일, 및 7일 동안의 체중 변화를 관찰한 결과, 경구 투여 후, 작두콩추출물등복합물 투여군은 정상군과 비교하여 체중변화가 없었고 (Fig. 75), 투여개시 직전 0일, 투여 후 3일, 및 7일에서 정상대조군과 각각 작두콩추출물등복합물 투여군 간의 유의적인 체중변화의 차이는 나타나지 않았다. 그리고 식이섭취량과 식이효율을 비교 분석한 결과는 작두콩추출물등복합물의 200, 400 mg/kg의 체중조절 효과가 나타났지만 유의적인 차이는 없었다 (Table 47, Fig. 75).

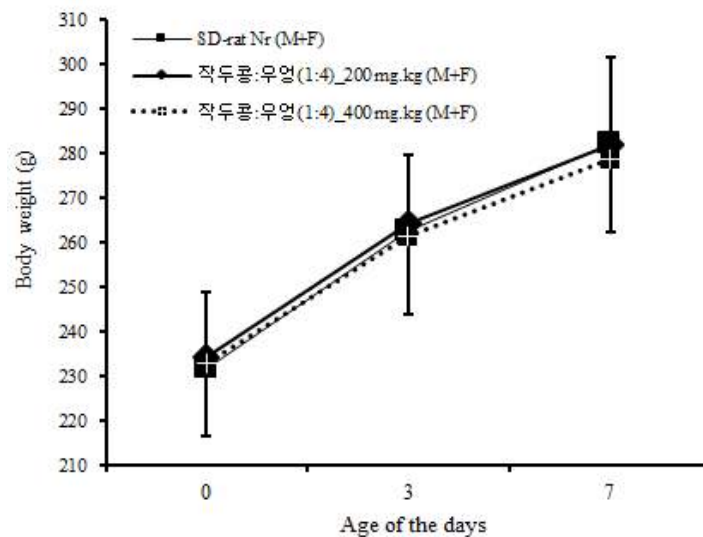


Fig. 75. 작두콩추출물등복합물 투여에 의한 SD rat의 체중 변화  
 - 작두콩추출물등복합물 200 mg/kg, 400 mg/kg  
 - M+F : male 3 rats + female 3 rats

Table 47. 60% 고지방 사료를 7일간 섭취시킨 SD rat의 정상군과 작두콩추출물등복합물 200, 400 mg/kg 섭취군과의 먹이 섭취량, 몸무게, 식이효율 비교

Group	Food intakes	Body weight gain	Food efficiency
	(g/day)	(g/day)	ratio (FER, %)
SD-rat Nr (M+F)	13.29	7.21±0.77	54.3±5.76
작두콩:우엉(1:4)_200 mg.kg (M+F)	14.13	6.82±1.16	40.9±7.86
작두콩:우엉(1:4)_400 mg.kg (M+F)	13.41	6.59±1.48	32.5±11.9

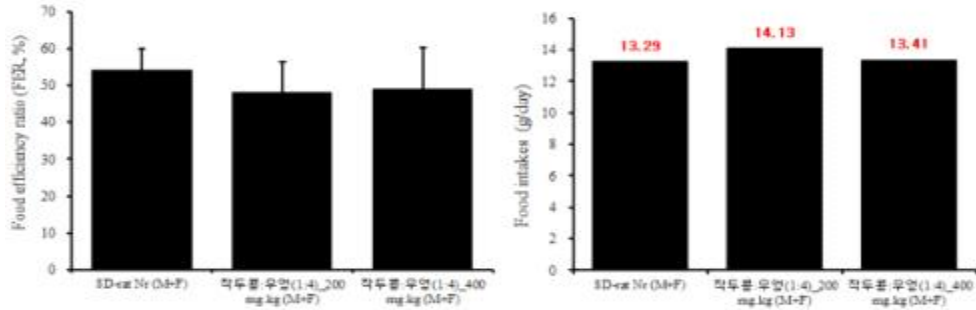


Fig. 76. 작두콩추출물등복합물 투여에 의한 SD rat의 식이 효율  
 - 작두콩추출물등복합물 200 mg/kg, 400 mg/kg  
 - M+F : male 3 rats + female 3 rats

2) 매일 일반행동 및 변화관찰, 임상증상 및 사망동물 유무 및 부검 및 장기중량 측정

- 가) 실험 종료시, 모든 랫드를 부검하여 주요 내부장기의 육안적 소견을 관찰한 결과, 각각 작두콩추출물등복합물 200, 400 mg/kg 투여군과 정상대조군 모두에서 심장, 폐, 흉선, 간, 신장, 위, 비장, 대장 등 주요 내부 장기에 대한 외관상의 어떠한 이상 병변도 발견되지 않았다.
- 나) 각각 작두콩추출물등복합물 200, 400 mg/kg 투여군과 정상대조군의 모두 간, 신장, 그리고 비장의 중량을 비교하였을 때, 모두 유의적인 차이가 나타나지 않았다.
- 다) 독성을 평가하는 지표에 있어 손상여부를 반영하는 여러 지표들이 있으나 가장 중요하다고 사료되는 간독성지표인 AST, ALT, (Fig. 77) 그리고 신장독성지표인 creatinine (Fig. 78)을 측정된 검사 결과, 각각 작두콩추출물등복합물 200, 400 mg/kg 투여군과 정상대조군과 비교할 때 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 특히, 혈청중 알레르기 지표 마커인 total IgE 수준을 측정된 결과 정상대조군과 차이가 없었다 (Fig. 79).

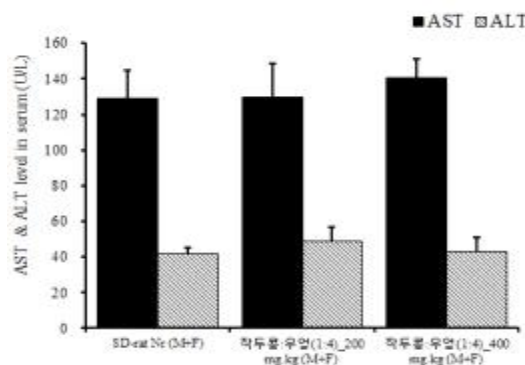


Fig. 77. 작두콩추출물등복합물 200 mg/kg, 400 mg/kg섭취에 의한 SD rat에서 혈중 AST와 ALT level의 변화  
 - M+F : male 3 rats + female 3 rats  
 - Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT)  
 - Values are expressed as means  $\pm$  S.E

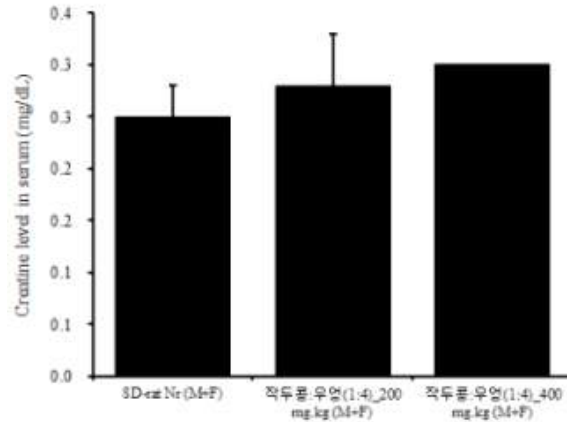


Fig. 78. 작두콩추출물등복합물 섭취에 의한 SD rat의 혈청 중 creatinine level 변화  
 - 작두콩추출물등복합물 200 mg/kg, 400 mg/kg  
 - M+F : male 3 rats + female 3 rats  
 Values are expressed as means  $\pm$  S.E

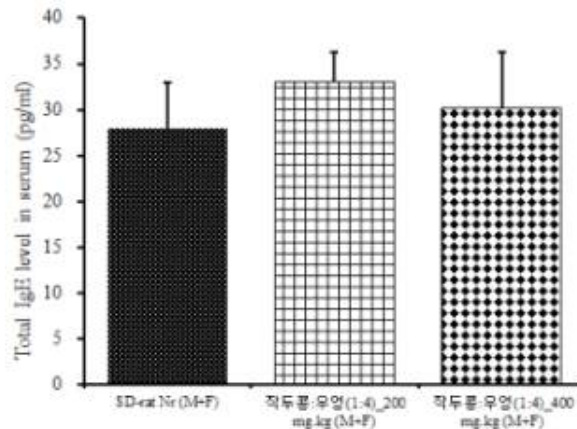


Fig. 79. 작두콩추출물등복합물 섭취에 의한 SD rat의 혈청중 total IgE level 변화  
 - 작두콩추출물등복합물 200 mg/kg, 400 mg/kg  
 - M+F : male 3 rats + female 3 rats  
 - Values are expressed as means  $\pm$  S.E

## 나. 독성 시험 결론

본 연구에서는 각각 작두콩추출물등복합물 (작두콩추출물:우염추출물=1:4) 200, 400 mg/kg 투여군을 랫드에 7일 반복투여하여 독성시험을 실시한 결과, 7일 후에 임상증상, 치사율, 부검소견, 체중변화, 장기 중량 변화, 및 혈액 생화학적 검사, 그리고 혈중 IgE수준 등에서 독성소견이 나타나지 않았다. 따라서 작두콩추출물등복합물은 400 mg/kg미만까지 안전함을 확인할 수 있었다.

## 제 6 절 *In vitro* 및 *In vivo* 면역증진 효능 평가

### 1. 작두콩추출물 및 우영추출물의 면역증진 효능 검증

#### 가. *In vitro* (세포주이용) 작두콩과 우영 추출물로부터 면역기능 증진 활성평가

세포수준[RAW264.7을 비롯한 BV2, HEK293, MC38]에서 LPS 처리 후, 작두콩 및 우영 추출물의 항산화 활성 및 면역증진 활성평가함.

#### 1) 세포주(RAW264.7, BV2, HEK293, MC38)를 이용한 작두콩 및 우영 추출물의 독성 평가 및 적정 처리 농도 설정

가) 작두콩 및 우영 추출물의 안정성을 평가하기 위해 주 시험 세포주인 RAW264.7을 비롯한 BV2, HEK293, MC38 등의 세포를 확보하고 시험에 이용하기 위해 일주일 이상 배양을 하여 안정화시킨 후, 다양한 세포주에 농도별로 처리한 후 작두콩 및 우영 추출물의 독성을 확인하고 적정 시험 농도를 확립하고자 함.

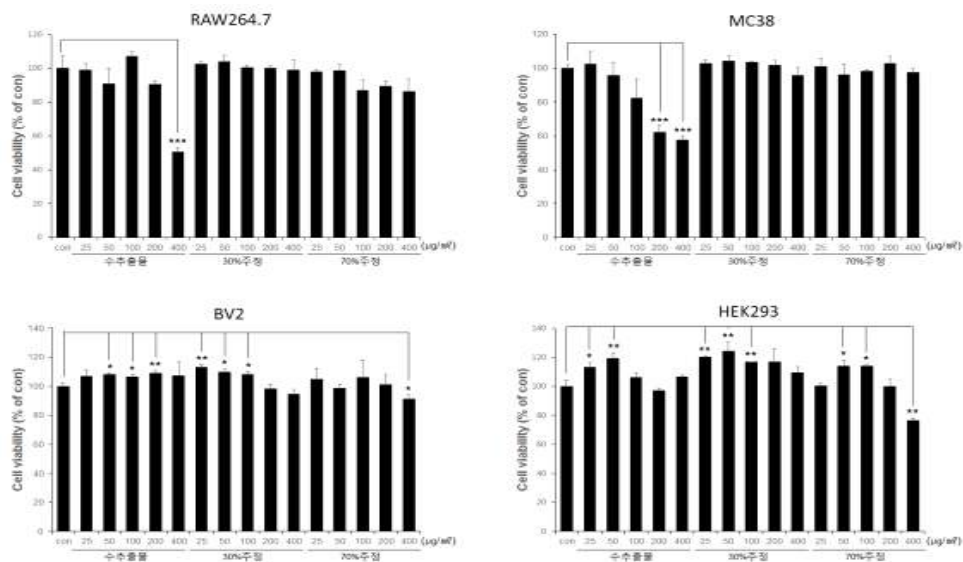


Fig. 80. 다양한 세포주에서 작두콩 추출물의 독성 시험

나) 제공받은 작두콩 및 우영 추출물 (작두콩 수 추출물, 작두콩 30% 주정 추출물, 작두콩 70% 주정 추출물, 우영 수 추출물, 우영 30% 주정 추출물, 우영 70% 주정 추출물)들을 각각 1X PBS에 10mg/ml의 농도로 녹여 준비하여, RAW264.7 cell 및 여러 가지 세포에 각각 10, 50, 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 처리 96시간 후에 MTT assay를 수행하여 나온 수치를 토대로 EC50 값을 확정함 (Fig. 80, 71).

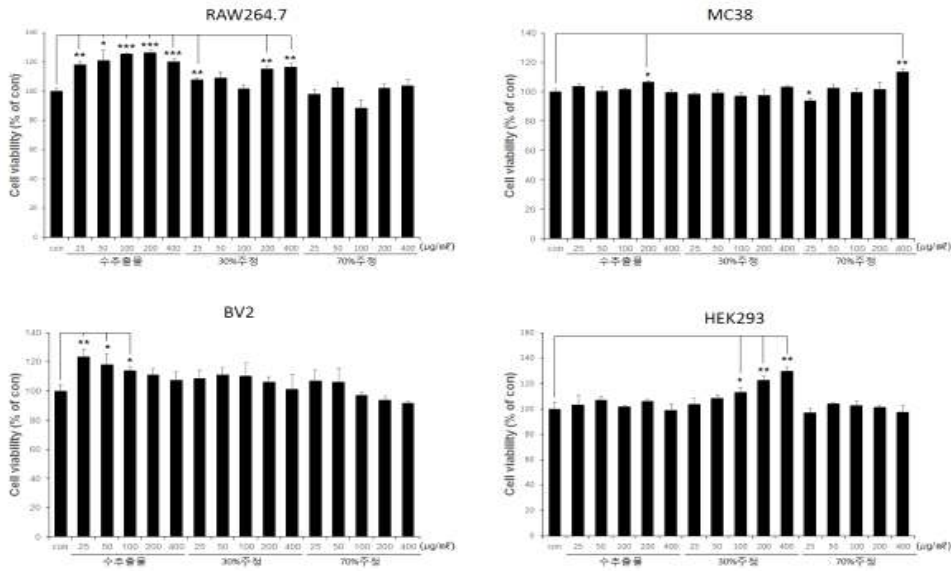


Fig. 81. 다양한 세포주에서 우영 추출물의 독성 시험

다) 작두콩 및 우영 추출물의 독성을 확인하고 적정 시험 농도를 확립하기 위해 다양한 세포주에 농도별로 처리한 후 48시간 뒤에 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 우영 추출물은 고농도에서도 독성이 보이지 않았으나 작두콩 추출물은 일부 세포주에서 독성을 나타내어 이후 모든 *in vitro* 실험에서 적정농도를 10, 50, 100 (µg/ml)로 설정하여 실험을 진행하였다 (Fig. 80, 81).

## 2) 작두콩 추출물 처리에 의해 생성된 활성산소 및 NO 측정

가) 작두콩 추출물에 의한 면역세포의 활성화를 확인하기 위해 RAW264.7 세포주에 작두콩 추출물을 농도별로 처리하고 ROS 측정 시약인 DCFH-DA 10mM로 반응시킨 후, FACSscan 장비로 측정하여 작두콩 추출물에 따른 ROS 생성능을 확인 (Fig. 82). RAW264.7 cell에 작두콩 추출물을 농도별로 처리한 후 24 시간 뒤에 세포 배양액을 수확하여 96well plate에 옮기고 NO kit의 동량의 griess reagent를 혼합하여 흡광도 540nm에서 NO를 측정함 (Fig. 82).



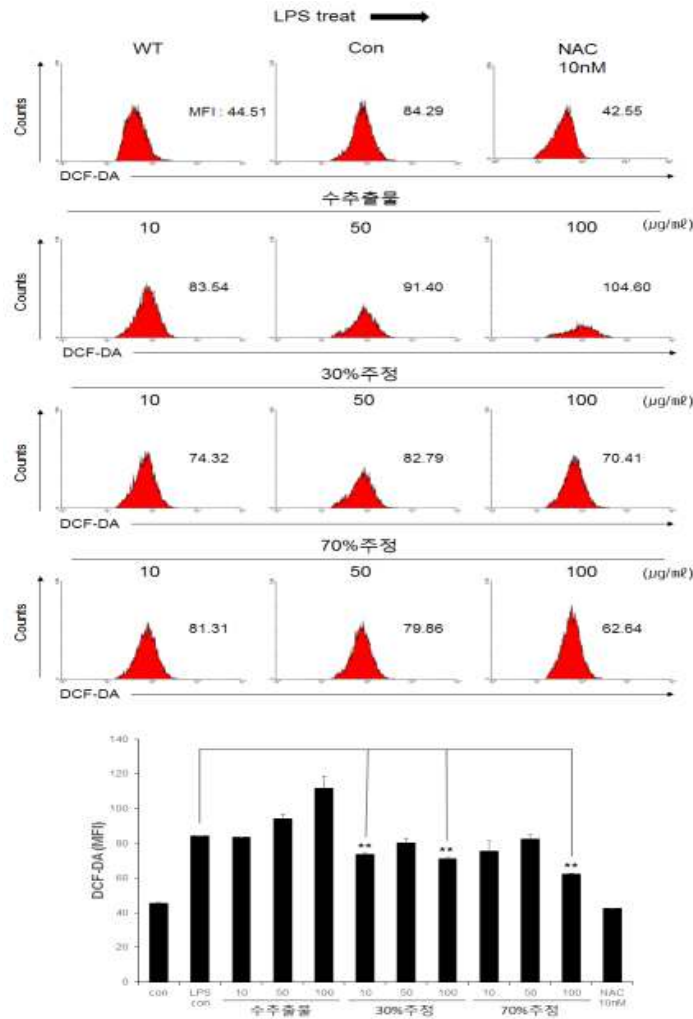


Fig. 82.. RAW264.7 cell에서 작두콩 추출물에 의한 ROS 생성량 측정

나) 작두콩 추출물에 의한 면역 활성화 지표 물질을 확인하기 위해 RAW264.7 세포주에 작두콩 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 뒤에 ROS와 NO를 측정하였다. 그 결과 대조군과 비교 하여 유의적인 차이가 보이지 않아 ROS와 NO의 생성을 촉진시킬 수 있는 LPS (500ng/ml)를 처리하여 LPS에 의해 증가된 ROS의 양이 작두콩 30%, 70% 주정 추출물을 처리한 군에서 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 82). NO의 양은 작두콩 수추출물과 70% 주정 추출물에서 유의적으로 감소하는 것을 확인 하였다 (Fig. 83).

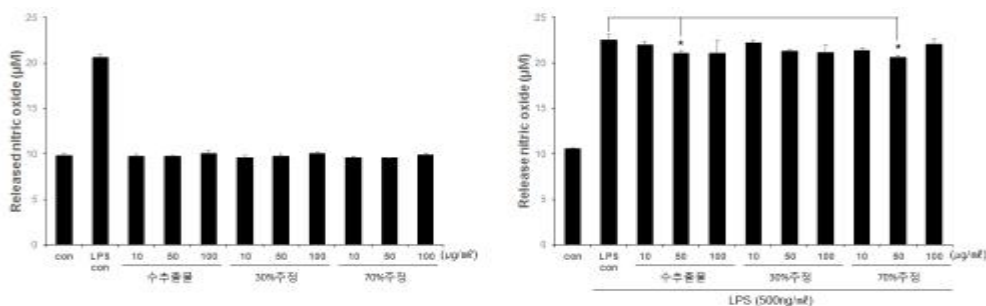


Fig. 83. RAW264.7 cell에서 작두콩 추출물에 의한 NO 생성량 측정

나. *In vivo* 마우스 모델을 통한 작두콩 추출물의 효능 검증

1) 마우스 모델에서 작두콩 추출물 (수추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물) 효능평가

실험군은 8주령 C57/BL6 마우스를 그룹 별로 3마리 씩 각각 정상군 3마리, 작두콩 수추출물 군 (J1) 3마리, 작두콩 30% 주정 추출물 군 (J2) 3마리, 작두콩 70% 주정 추출물군 (J3) 3마리를 확립된 조건으로 일주일간 매일 200mg/kg의 농도로 경구 투여.

가) 마우스의 몸무게 및 기타 장기 (thymus, spleen, lymph node, heart 등) 의 무게 변화와 형태 변화 관찰을 통해 작두콩 추출물 독성의 유무 확인.

작두콩 수추출물 (J1), 30% 주정추출물 (J2), 70% 주정추출물 (J3)을 8주령 C57/BL6 마우스에 일주일간 매일 200mg/kg 의 농도로 경구 투여한 뒤에 마우스를 희생하여 장기(kidney, heart, lung, stomach, MLN, LN, thymus, liver, spleen, small intestine, large intestine)를 분리한 후 각각 무게 및 길이를 측정하여 작두콩 추출물로 인한 독성은 없는 것을 확인하였다 (Fig. 84).

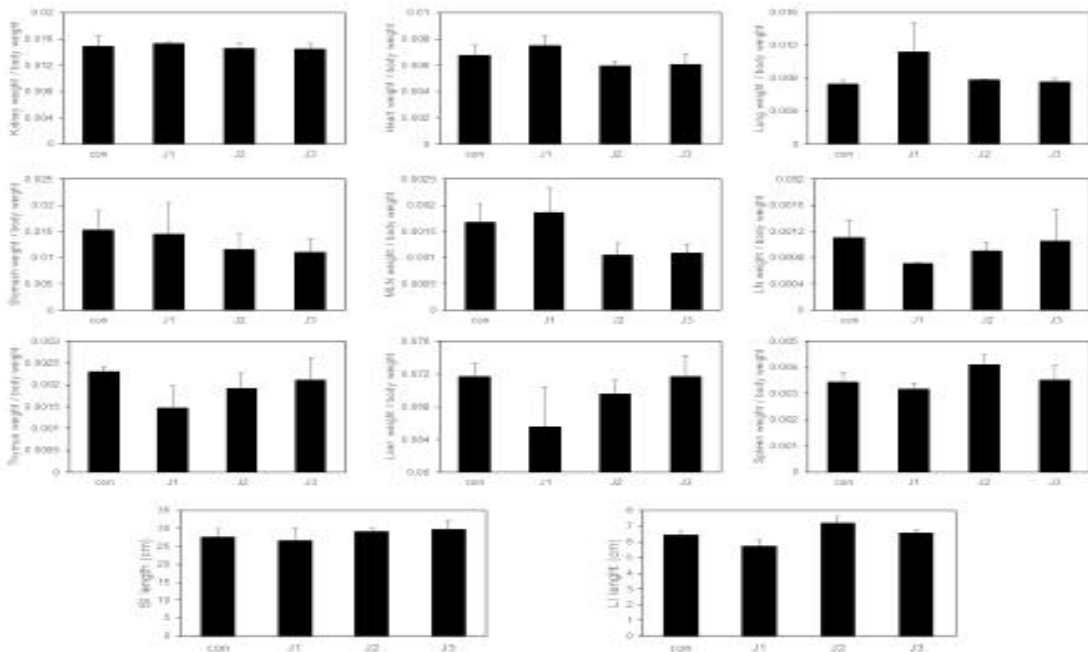


Fig. 84. 작두콩 추출물 경구 투여한 마우스의 주요 장기 무게 및 장 길이

나) 마우스 모델에서 추출한 혈액에서 WBC 수 및 혈청에서 IgA 생성량 확인

(1) 마우스 모델에서 추출한 혈액에서 WBC의 수를 count하고, 마우스의 혈청을 수득하여 96well에 코팅한 후 IgA 항체와 HRP conjugated 항체를 반응 시켜 ELISA reader 기기로 측정함.

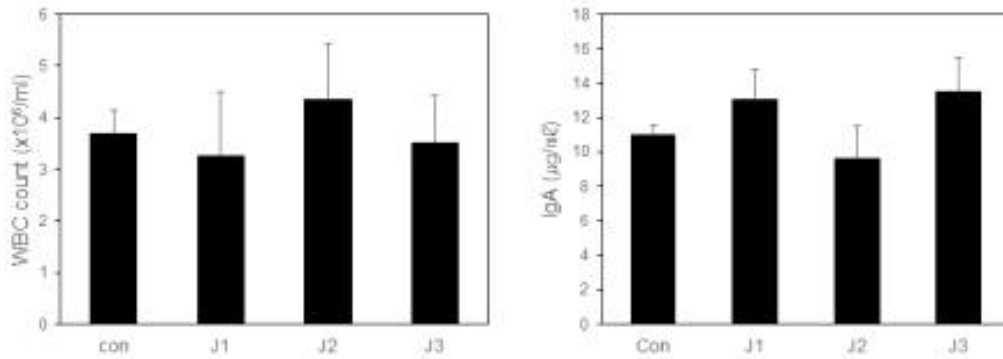


Fig. 85. 작두콩 추출물 경구 투여 모델에서 WBC 수 및 IgA 생성량

(2) 마우스 모델에서 추출한 혈액에서 백혈구와 혈청에서 IgA 생성량은 대조군과 작두콩 추출물을 경구 투여한 마우스 간에 차이가 없었다 (Fig. 85).

다) PEC(복강침출세포)에서 B cell의 활성 및 수 변화를 확인하기 위한 FACS 분석

작두콩 추출물을 경구 투여한 마우스 모델에서 PEC (복강침출세포)를 추출하여 B220 (B cell marker)과 CD69 (activation marker) 항체로 형광 염색하여 flow cytometry로 분석하였다. 그 결과 작두콩 70% 주정 추출물에서 B cell의 수와 활성이 증가 되어있는 것을 확인하였다 (Fig. 86).

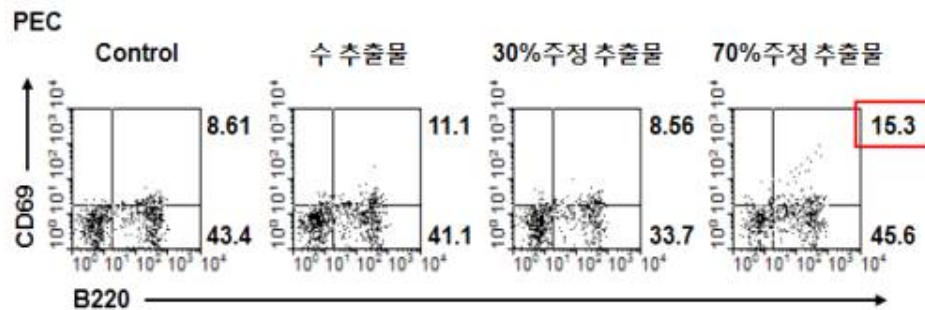


Fig. 86. 작두콩 추출물 경구 투여 모델에서 분리한 PEC(복강침출세포)의 B cell 변화

라) 각 면역기관 (MLN, Spleen, LN) 에서 세포를 분리하여 FACS 분석

(1) 마우스에서 분리한 각 면역기관의 세포에서 T cell, B cell, NK cell, macrophage 등 세포의 활성 및 수 변화를 확인하기 위해 각각의 마커가 되는 세포표면 분자들에 대한 항체를 반응 시킨 후 유세포 분석기(FACS)를 통해 분석 (Fig. 87, 88, 89).

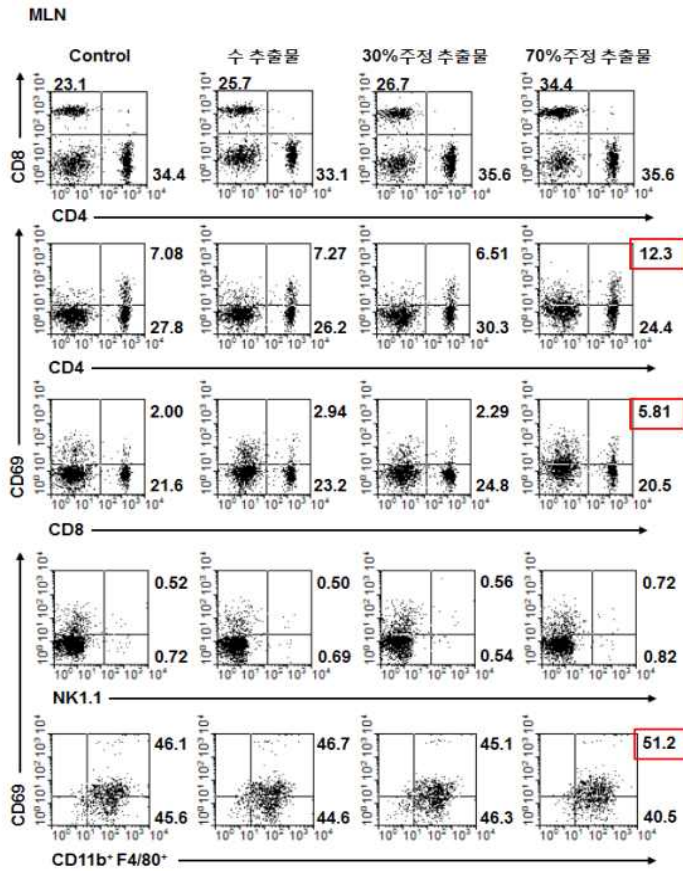


Fig. 87. 작두콩 추출물 경구 투여 모델에서 분리한 MLN에서 면역 세포의 활성 확인

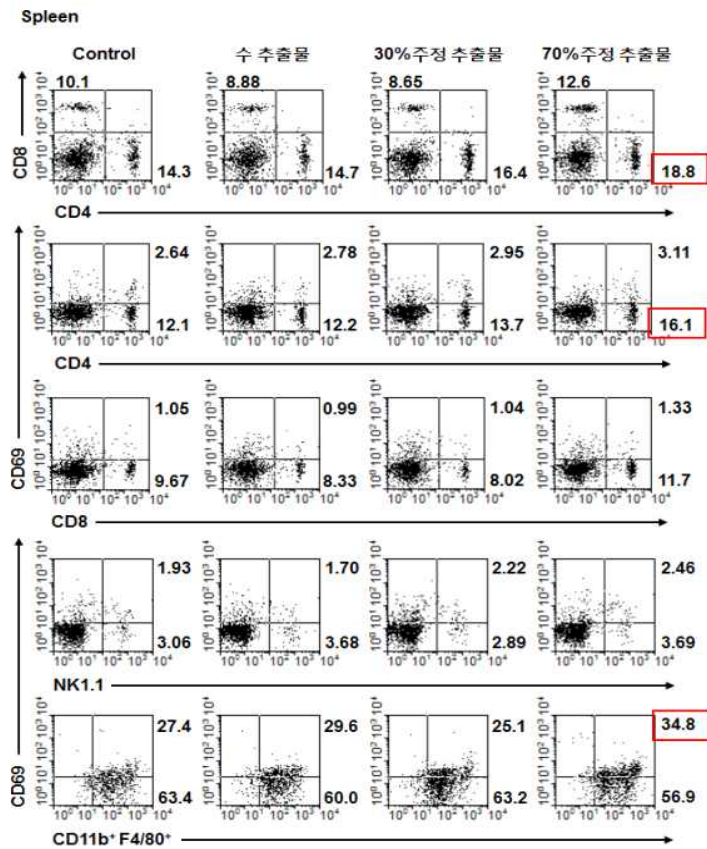


Fig. 88. 작두콩 추출물 경구 투여 모델에서 분리한 spleen에서 면역 세포의 활성 확인

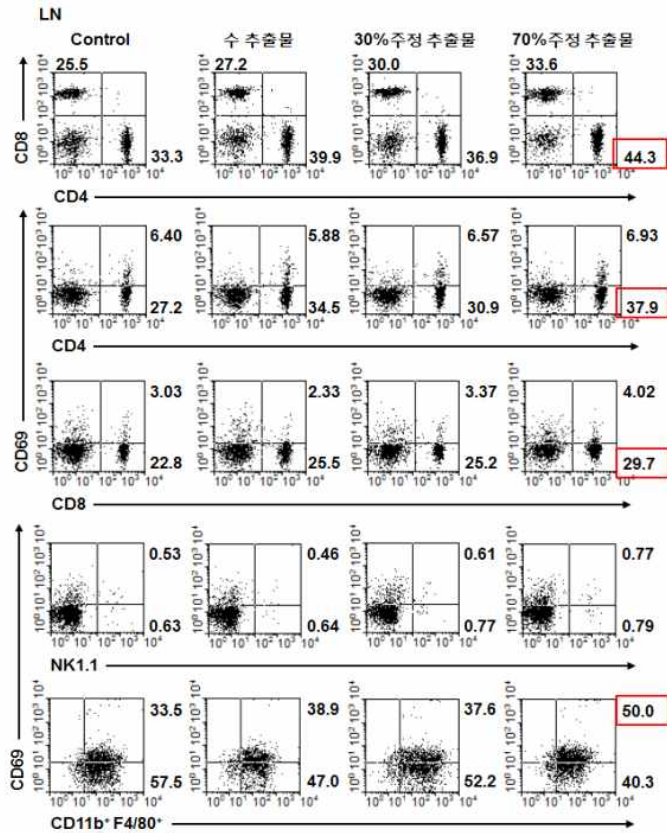


Fig. 89. 작두콩 추출물 경구 투여 모델에서 분리한 LN에서 면역 세포의 활성 확인

(2) 작두콩 추출물을 경구 투여한 마우스에서 주요 면역기관인 spleen, LN, MLN 을 추출하여 세포를 분리한 뒤 CD4 (CD4 T cell marker), CD8 (CD8 T cell marker), NK1.1 (NK cell marker), CD11b+F4/80 (macrophage marker) 항체로 형광 염색하여 flow cytometry로 분석하였다. 그 결과 작두콩 70% 주정 추출물을 경구투여한 마우스 군의 spleen, LN, MLN에서 CD4, CD8 T cell, macrophage의 수와 활성이 증가 되어있는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 87, 88, 89).

마) 면역기관인 Spleen에서 세포 사멸(apoptosis) 변화 관찰

마우스에서 분리한 spleen 세포를 Annexin V/ PI 로 염색하여 세포의 apoptosis 를 유세포 분석기를 통해 분석 70% 주정 추출물이 가장 낮은 세포 사멸을 나타냄.

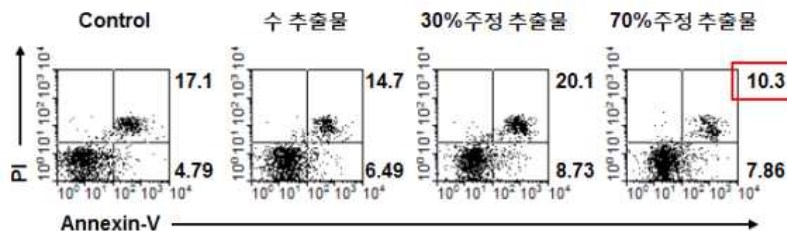


Fig. 90. 작두콩 추출물 경구 투여 모델에서 분리한 spleen에서 세포 사멸 변화

## 2) 면역기관인 Spleen에서 세포주기(cell cycle) 변화 관찰

가) 마우스에서 분리한 각 면역기관의 세포를 PBS로 세척하고 75% ethanol 로 고정 한 후 propidium 형광 시약으로 DNA를 염색하여 G1, S, G2/M phase 등의 세포주기를 관찰함.

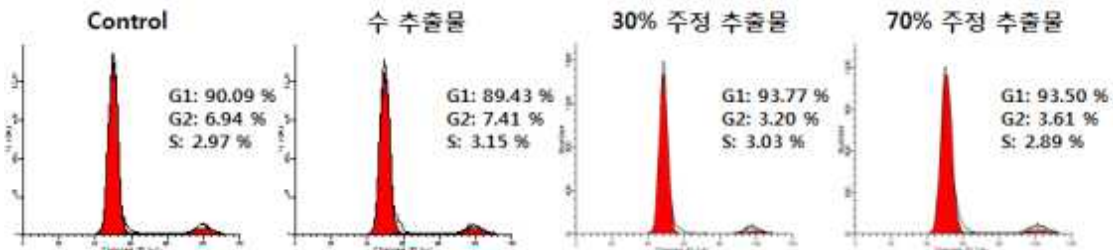


Fig. 91. 작두콩 추출물 경구 투여 모델에서 분리한 spleen에서 세포 주기 변화

나) PI 와 Annexin-V로 염색 하여 세포 사멸을 분석한 결과에서는 작두콩 70% 주정 추출물을 경구투여한 마우스 군에서 세포 사멸이 감소되어 있는 것을 확인하였다 (Fig. 91). 반면 세포주기에서는 유의성 있는 차이를 볼 수 없었다 (Fig. 91).

## 3) RT-PCR을 통해 작두콩 추출물 투여에 의해 변화된 염증 cytokine 및 면역 관련 유전자, 세포 사멸 및 세포 주기와 관련된 유전자 발현 변화 확인

가) 염증 cytokine 및 면역 관련 유전자, 세포 사멸 및 세포 주기와 관련된 유전자 발현을 확인하기 위하여 spleen에서 Trizol B 용액으로 RNA를 추출한 후 역전사 효소법을 이용해 cDNA를 합성함. 흡광도 측정기를 이용하여 합성된 cDNA의 양을 측정하고 염증 cytokine 및 면역 관련 유전자들의 primer를 제작. cDNA를 이용하여 RT-PCR을 통해 작두콩 추출물 투여에 의해 변화된 염증 cytokine 및 면역 관련 유전자, 세포 사멸 및 세포 주기와 관련된 유전자 발현 변화 확인

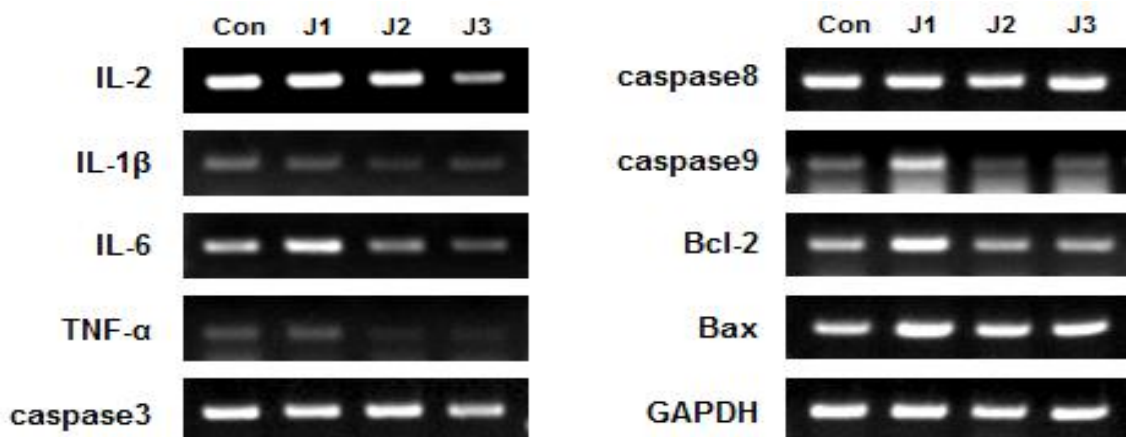


Fig. 92. 작두콩 추출물 경구 투여 모델에서 분리한 spleen의 유전자 발현 변화

나) 작두콩 추출물의 경구 투여 모델에서 분리한 spleen에서 염증 cytokine 및 면역 관련 유전자, 세포 사멸 및 세포 주기와 관련된 유전자 발현 변화를 RT-PCR로 분석하였다. 그 결과 염증 cytokine 및 면역 관련 유전자와 세포 사멸 및 세포주기 억제와 관련된 유전자의 발현이 작두콩 수추출물 (J1), 30% 주정추출물 (J2)을 각각 경구 투여한 마우스 군보다 작두콩 70% 주정 추출물을 경구 투여한 마우스 군 (J3)에서 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 92).

#### 4) 작두콩 및 우엉 추출물의 *in vitro* 및 *in vivo* 연구 결과의 의의 및 고찰

세포주와 동물 모델을 이용한 실험에서 모두 면역관련 지표와 세포의 현저한 차이는 보이지 않았다. 하지만 이는 외부 자극이 없는 상태이기 때문이라는 것을 세포주에 외부 자극인 LPS를 처리하였을 때 보다 큰 변화가 관찰됨을 통해 알 수 있었다. 특히 작두콩 70% 주정 추출물은 세포주에서 NO와 ROS의 감소 효과를 보여 주었고, 동물 모델에서는 B/T cell 및 macrophage의 활성을 증가 시키는 것을 보여 주었다. 특히 주목 할 만 한 점은 NK cell이나 CD8 T cell의 변화는 거의 보이지 않는 반면에 B cell과 CD4 T cell의 변화가 많이 보였다는 점이다. Helper T cell과 B cell은 체액성 면역 (Humoral immunity)에 중요한 역할을 함에 있어 작두콩 추출물이 선천성 면역보다는 체액성 면역에서 역할을 할 가능성이 높다고 사료된다.

#### 다. 작두콩 : 우엉 추출물의 혼합 비율을 *in vitro*와 *in vivo* 수준에서 확정

##### 1) *In vitro* (세포주이용)에서 작두콩 : 우엉 추출물의 혼합 비율 스크리닝

작두콩과 우엉추출물의 혼합 농도 및 처리 비율 설정하여 작두콩 추출물과 우엉 추출물의 비율을 1:1, 1:2, 1:4, 4:1, 2:1 로 설정하고 가장 효과가 좋은 비율을 스크리닝함.

가) RAW264.7 cell에 작두콩 70% 주정 추출물을 50 $\mu$ g/ml과 100 $\mu$ g/ml의 농도로 고정된 후, 우엉 수추출물과 30%, 70% 주정 추출물을 여러 비율로 혼합 처리하여 혼합비율 확정

작두콩과 우엉 추출물의 혼합 비율을 확정하기 위해 RAW264.7 세포주에 작두콩 70% 주정 추출물을 각각 50, 100 $\mu$ g/ml의 농도로 고정된 후, 작두콩과 우엉 추출물의 비율을 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1로 우엉 수추출물과 30%, 70% 주정 추출물을 혼합하여 처리하고 24시간 뒤에 ROS를 측정하였다. ROS를 측정하기 12시간 전에 ROS의 생성을 촉진 시킬 수 있는 LPS (500ng/ml)를 처리하였을 때, LPS에 의해 증가된 ROS의 양이 작두콩과 우엉 70%주정 추출물을 1:4의 비율로 혼합하였을 때 가장 많이 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 93, 94).

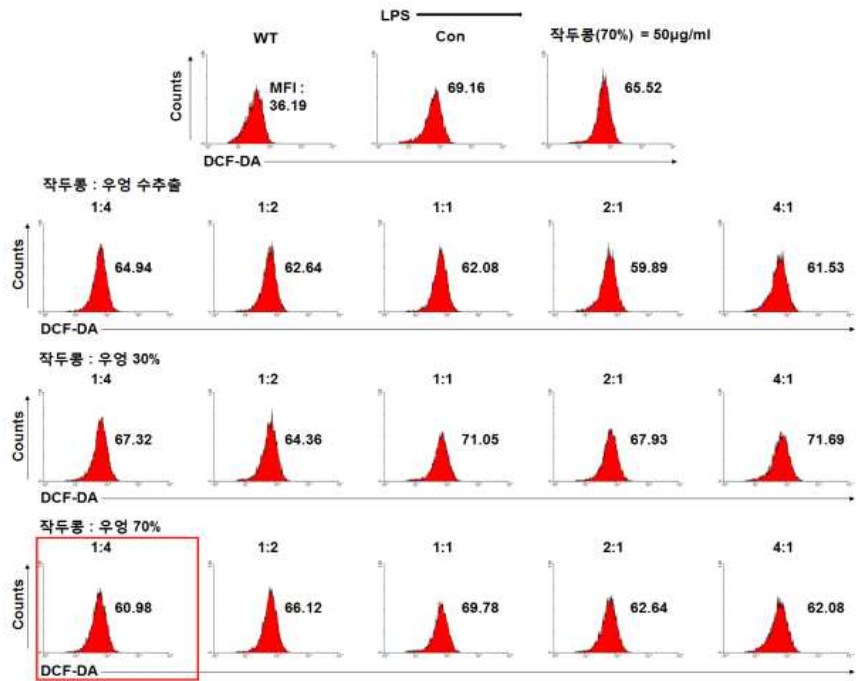


Fig. 93. RAW264.7 cell에서 작두콩 : 우영 추출물 혼합 처리에 의한 ROS 생성량 측정

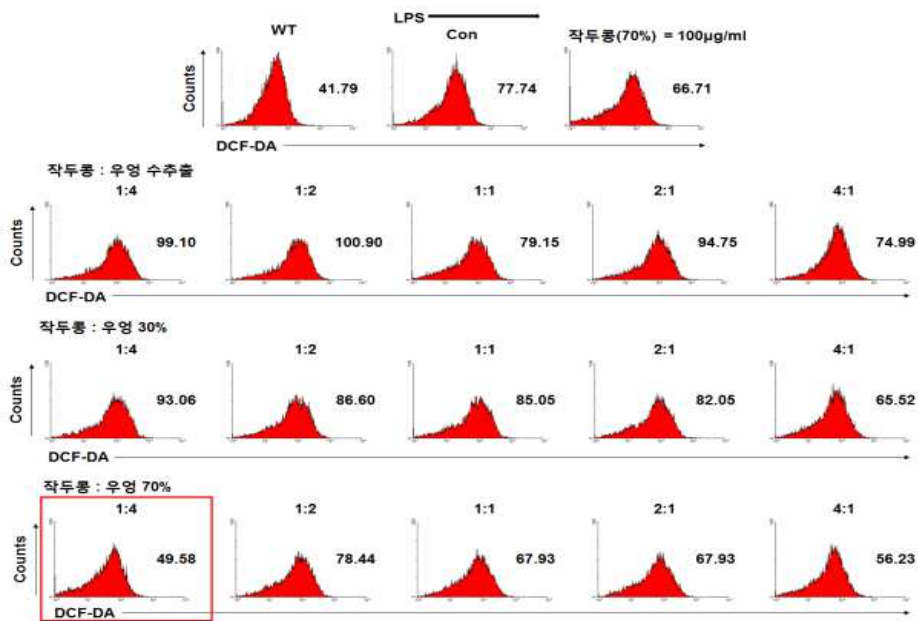


Fig. 94. RAW264.7 cell에서 작두콩:우영 추출물 혼합 처리에 의한 ROS 생성량 측정

나) RAW264.7 cell에 작두콩 70% 주정 추출물을 100µg/ml의 농도로 고정된 후, 우영 70% 주정 추출물을 여러 비율로 세분화 하여 혼합 처리하여 혼합비율 확정

적정 농도를 확정하기 위해 우영 70% 주정 추출물을 단독으로 처리한 경우와, 작두콩과 우영 70% 주정 추출물의 비율을 세분화해서 처리한 경우에도 1:4의 비율에서 ROS가 가장 많이 감소하는 것을 확인하였다. (Fig. 95).



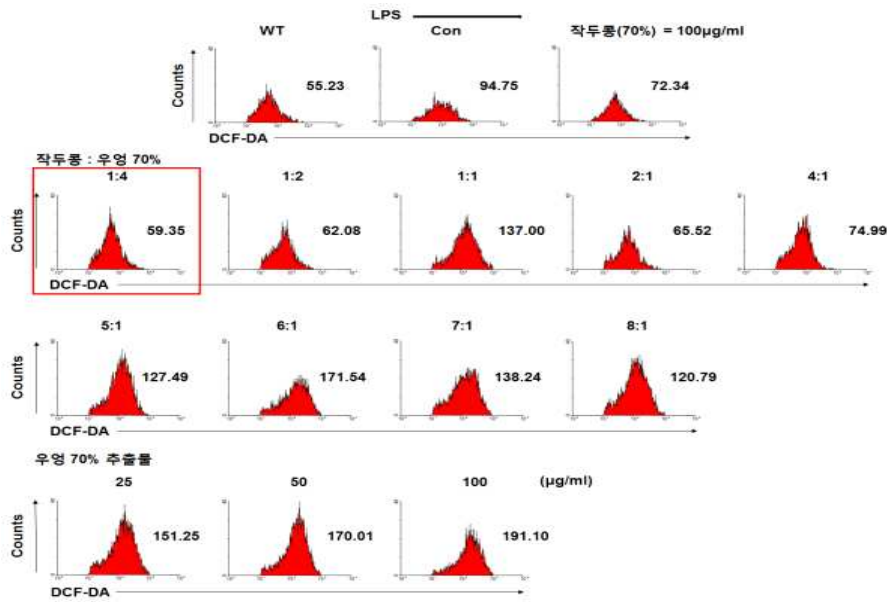


Fig. 95. RAW264.7 cell에서 작두콩 : 우영 70% 주정 추출물 혼합 처리에 의한 ROS 생성량 측정

다) 작두콩과 우영 추출물의 혼합물에 의해 생성된 활성산소 및 NO 측정

작두콩과 우영 70% 주정 추출물을 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1의 비율로 혼합하여 RAW264.7 세포주에 처리하여 NO 생성량을 확인하였다. LPS를 처리하여 NO생성을 촉진하였을 때, 1:4의 비율에서 NO 생성량이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 96).

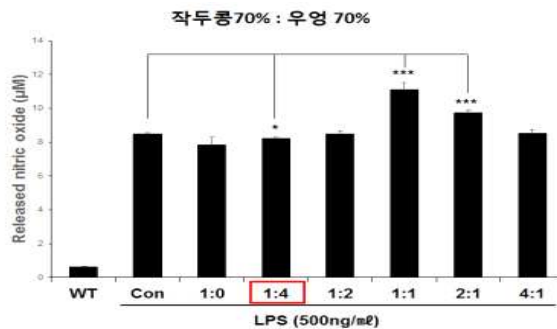


Fig. 96. RAW264.7 cell에서 작두콩 : 우영 추출물 혼합 처리에 의한 NO 생성량 측정

라) 작두콩 : 우영 추출물 혼합비율의 *in vitro* 연구 결과의 의의 및 고찰

RAW264.7 cell 세포주에 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 수추출물, 30%, 70% 주정 추출물을 여러 비율(1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1)로 각각 처리하고, LPS로 ROS와 NO 생성을 자극하였을 때 작두콩과 우영 70% 주정 추출물을 1:4의 비율로 혼합하였을 때 ROS와 NO생성량이 가장 많이 감소하는 효과를 보였다. 따라서 이후 *in vivo* 실험에서는 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물을 1:4의 비율로 혼합한 비율을 사용하였다.

## 2) 마우스 모델을 통한 작두콩 : 우영 추출물 (1:4) 비율 혼합 처리의 면역증진 효능 검증

가) 작두콩 및 우영 추출물과 작두콩 : 우영 추출물 (1:4)을 비율 혼합 경구투여한 마우스 모델에서 면역 증진 효과 비교

실험군은 8주령 C57/BL6 마우스를 그룹 별로 3마리 씩 각각 정상군 3마리, 작두콩 70% 주정 추출물 군 (J) 3마리, 우영 70% 주정 추출물 군 (W) 3마리, 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물을 1:4의 비율로 혼합한 군 (JW) 3마리를 확립된 조건으로 3주간 매일 200mg/kg의 농도로 경구 투여

나) 마우스 모델에서 추출한 혈청에서 IgA, IgG 생성량 확인

(1) 마우스의 혈청에서 IgA, IgG 생성량을 확인하기 위해 마우스의 혈청을 수득하여 96well에 코팅한 후 각각 IgA 항체, IgG 항체와 HRP conjugated 항체를 반응 시켜 ELISA reader 기기로 측정

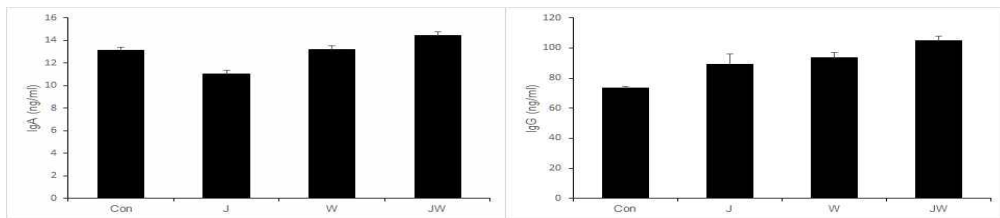


Fig. 97. 작두콩 : 우영 추출물 (1:4) 비율 혼합 경구투여 모델에서 IgA 및 IgG 생성량

(2) 작두콩 70% 주정 추출물 군 (J), 우영 70% 주정 추출물 군(W), 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 군 (JW)을 8주령 C57/BL6 마우스에 3주일간 매일 200mg/kg의 농도로 경구 투여한 뒤 마우스를 희생하여 추출한 혈액의 혈청에서 IgA와 IgG의 생성량을 측정하였다. 그 결과 단독으로 작두콩 70% 주정 추출물 (J)과 우영 70% 주정 추출물 (W)만 투여한 군보다 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 군 (JW)에서 IgA와 IgG 생성량이 대조군에 비해 가장 많이 증가한 것을 확인하였다 (Fig. 97).

다) PEC(복강침출세포)에서 B cell의 활성 및 수 변화를 확인하기 위한 FACS 분석

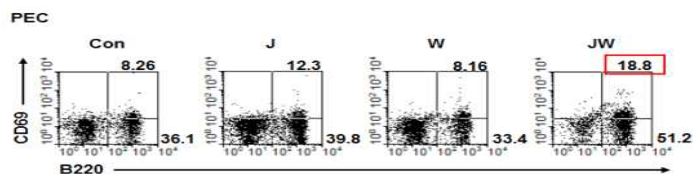


Fig. 98. 작두콩 : 우영 추출물 (1:4) 비율 혼합 경구투여 모델에서 분리한 PEC(복강침출세포)에서의 B cell 변화

작두콩 및 우영 추출물을 경구투여한 마우스 모델에서 PEC 세포를 추출하여 B220 (B cell marker)과 CD69 (activation marker) 항체로 형광 염색하여 flow cytometry로 분석한 결과, 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 군 (JW)에서 B cell의 수와 활성이 가장 많이 증가 되어있는 것을 확인하였다 (Fig. 98).

라) 각 면역기관 (MLN, Spleen, LN) 에서 세포를 분리하여 FACS 분석

(1) 마우스에서 분리한 각 면역기관의 세포에서 T cell, B cell, NK cell, macrophage 등 세포의 활성 및 수 변화를 확인하기 위해 각각의 마커가 되는 세포표면 분자들에 대한 항체를 반응 시킨 후 유세포 분석기(FACS)를 통해 분석 (Fig. 99, 100, 101).

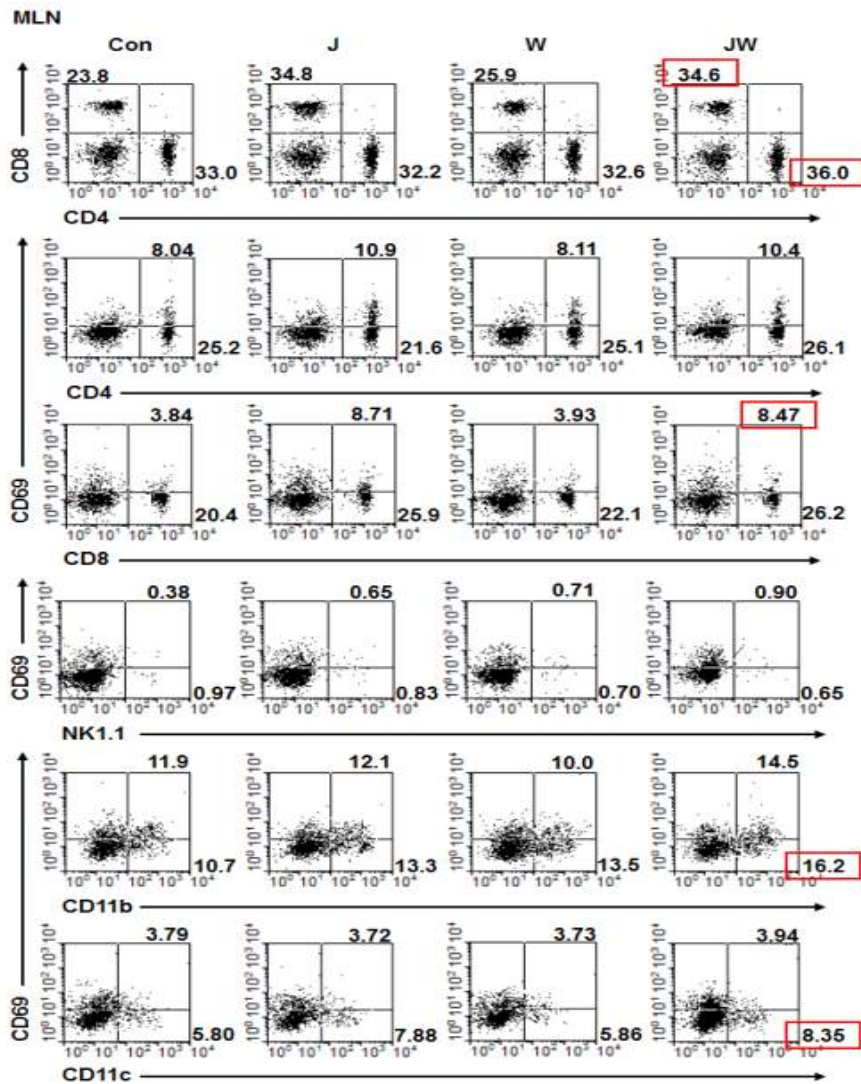


Fig. 99. 작두콩 : 우영 추출물 (1:4) 비율 혼합 경구투여 모델에서 분리한 MLN에서 면역 세포의 활성 확인

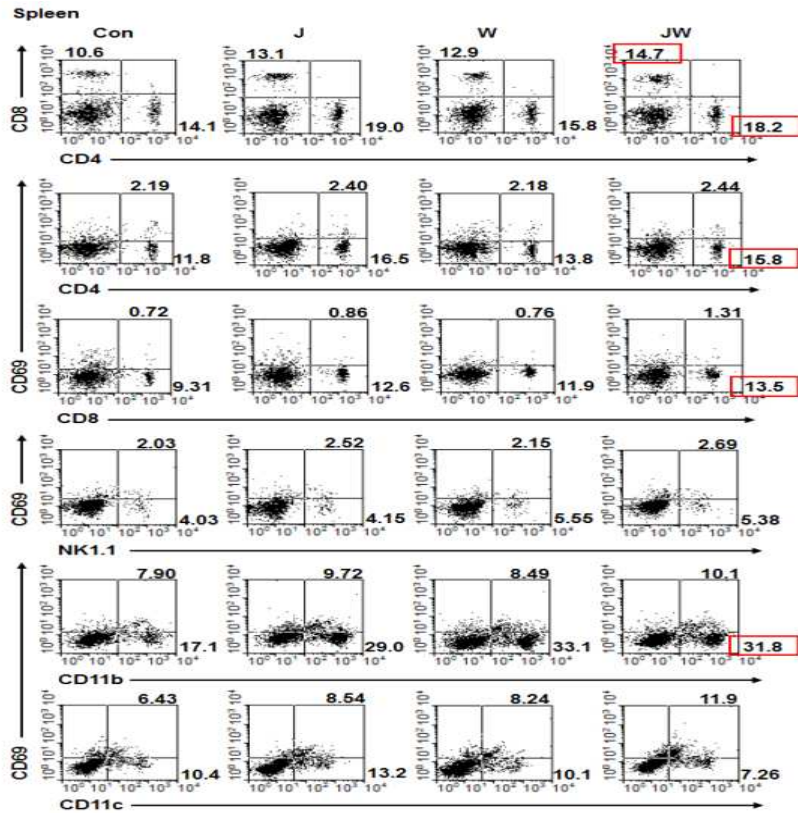


Fig. 100. 작두콩 : 우영 추출물 (1:4) 비율 혼합 경구투여 모델에서 분리한 spleen에서 면역 세포의 활성 확인

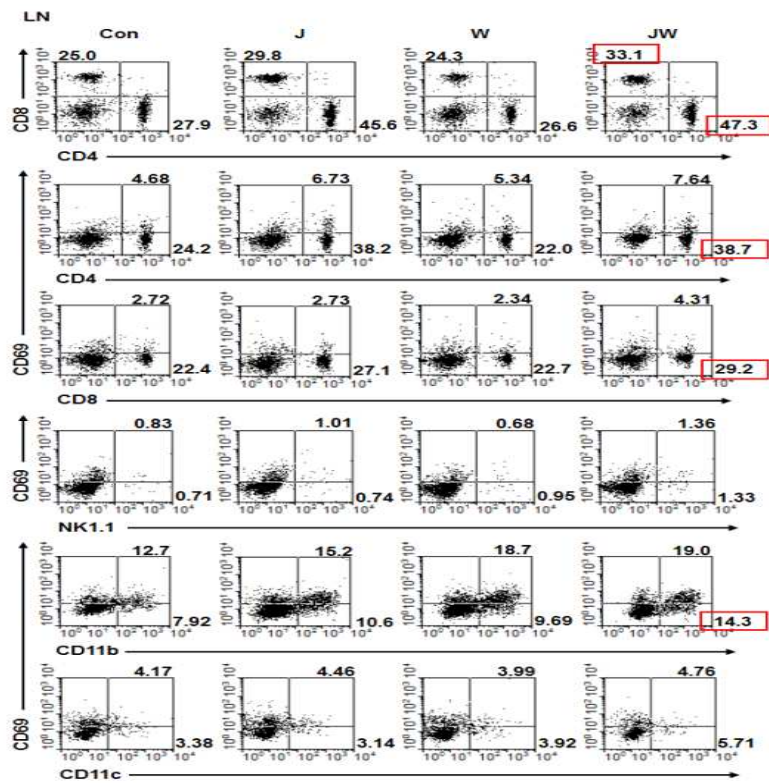


Fig. 101. 작두콩 : 우영 추출물 (1:4) 비율 혼합 경구투여 모델에서 분리한 LN에서 면역 세포의 활성 확인

(2) 작두콩 및 우엉 추출물을 경구투여한 마우스에서 주요 면역기관인 spleen, LN, MLN을 추출하여 세포를 분리한 뒤 CD4 (CD4 T cell marker), CD8 (CD8 T cell marker), NK1.1 (NK cell marker), CD11b (macrophage marker), CD11c (dendritic cell marker) 항체로 형광 염색하여 flow cytometry로 분석하였다. 그 결과 작두콩 70% 주정 추출물과 우엉 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 군 (JW)에서 CD4, CD8 T cell, macrophage, dendritic cell의 수와 활성이 증가 되어있는 것을 확인하였다 (Fig. 99, 100, 101).

마) 면역기관인 Spleen에서 세포 사멸(apoptosis) 변화 관찰

(1) 마우스에서 분리한 spleen 세포를 Annexin V/ PI 로 염색하여 세포의 apoptosis를 유세포 분석기를 통해 분석

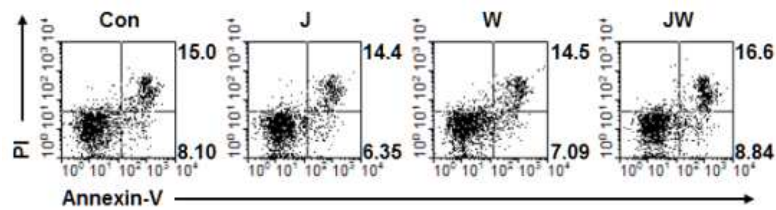


Fig. 102. 작두콩 : 우엉 추출물 (1:4) 비율 혼합 경구투여 모델에서 분리한 spleen에서 세포 사멸 변화

(2) 작두콩 및 우엉 추출물 경구투여 모델에서 분리한 spleen 세포에 PI와 Annexin-V로 염색하여 세포 사멸을 분석한 결과에서는 유의성 있는 차이를 볼 수 없었다 (Fig. 102).

바) 면역기관인 Spleen에서 세포주기(cell cycle) 변화 관찰

(1) 마우스에서 분리한 각 면역기관의 세포를 PBS로 세척하고 75% ethanol 로 고정 한 후 propidium 형광 시약으로 DNA를 염색하여 G1, S, G2/M phase 등의 세포주기를 관찰

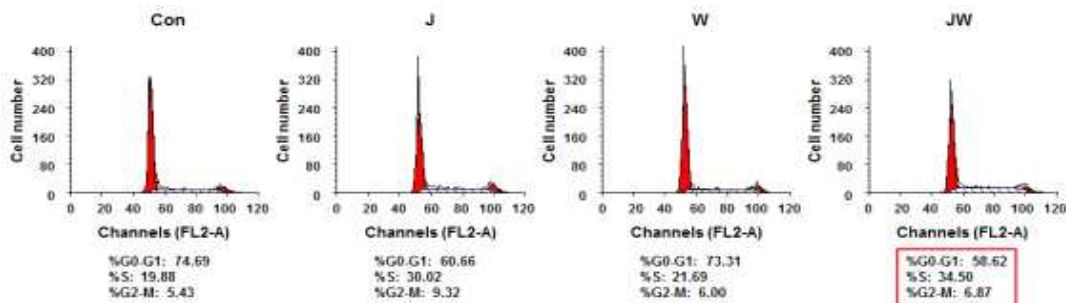


Fig. 103. 작두콩 : 우엉 추출물 (1:4) 비율 혼합 경구투여 모델에서 분리한 spleen에서 세포 주기 변화

(2) PI 염색을 통해 세포주기를 분석한 결과, 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 군 (JW)에서 S phase 의 비율이 가장 높게 나타남을 확인하였다 (Fig. 103).

사) RT-PCR을 통해 작두콩 : 우영 추출물 (1:4) 비율 혼합 투여에 의해 변화된 collagen 관련 유전자 발현 변화 확인

(1) Collagen 발현을 확인하기 위하여 근육에서 Trizol B 용액으로 RNA를 추출한 후 역전사 효소법을 이용해 cDNA를 합성함. 흡광도 측정기를 이용하여 합성된 cDNA의 양을 측정하고 collagen 발현 관련 유전자들의 primer를 제작. cDNA를 이용하여 RT-PCR을 통해 작두콩 및 우영 추출물에 의해 변화된 collagen 관련 유전자 발현 변화 확인 (Fig. 104).

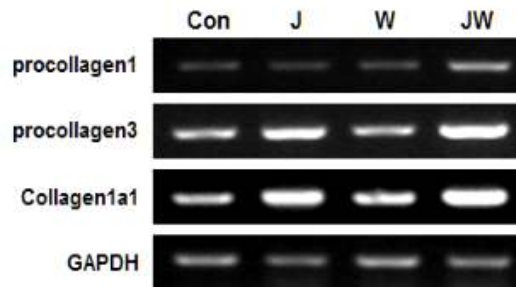


Fig. 104. 작두콩 : 우영 추출물 (1:4) 비율 혼합 경구투여 모델에서 collagen 관련 유전자 발현 확인

(2) 작두콩 및 우영 추출물의 경구투여 모델에서 collagen 관련 유전자 발현 변화를 RT-PCR로 분석하였다. 그 결과, 근육에서 collagen과 관련된 유전자 발현이 작두콩과 우영을 각각 경구투여한 마우스 군(J, W)보다 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 군 (JW)에서 증가된 것을 확인하였다 (Fig. 104).

아) RT-PCR을 통해 작두콩 : 우영 추출물 (1:4) 비율 혼합 투여에 의해 변화된 염증 cytokine 및 면역 관련 유전자, 세포 사멸 및 세포 주기와 관련된 유전자 발현 변화 확인

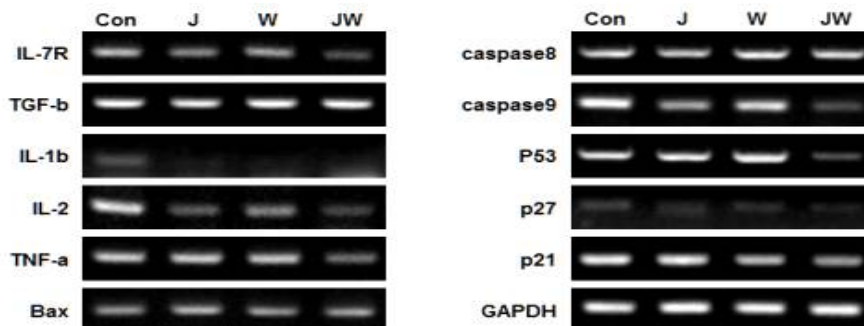


Fig. 105. 작두콩 : 우영 추출물 (1:4) 비율 혼합 경구투여 모델에서 분리한 spleen의 유전자 발현 변화

작두콩 및 우엉 추출물의 경구투여 모델에서 분리한 spleen에서 유전자 발현 변화를 RT-PCR로 분석하였다. Spleen에서 염증과 세포 사멸 및 세포 주기와 관련된 유전자들의 발현을 확인하였다. 염증 관련 유전자와 세포 사멸 및 세포주기 억제와 관련된 유전자의 발현이 작두콩과 우엉을 각각 경구투여한 마우스 군(J, W)보다 작두콩 70% 주정 추출물과 우엉 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 군 (JW)에서 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 105).

자) 작두콩 : 우엉 추출물 (1:4) 비율 혼합 처리의 효능 검증을 위한 *in vivo* 연구 결과의 의의 및 고찰

작두콩 및 우엉 추출물을 마우스에 경구 투여하여 면역 관련 지표들의 변화를 확인한 결과, 작두콩과 우엉을 단독으로 경구 투여한 마우스 그룹(J, W)에 비하여 작두콩과 우엉을 1:4 비율로 혼합 처리한 마우스 그룹(JW)에서 면역증진 효과가 다소 증진되는 것을 확인하였다. 특히, 선행 연구결과에서 확인하였던 T/B cell 및 macrophage, dendritic cell 등 면역세포의 수와 활성화 및 IgA, IgG의 생성량이 작두콩의 단독투여에 비해 작두콩과 우엉의 1:4 비율 혼합투여에 의해 더욱 증가하였으며, 이에 따라 작두콩과 우엉의 혼합투여에서 염증반응은 가장 낮은 것을 관찰하였다. 또한 면역세포의 세포주기 활성화 및 세포사멸의 감소 효과와 collagen의 발현에서도 작두콩을 단독으로 경구투여한 마우스 그룹에 비하여 작두콩과 우엉을 혼합 처리한 마우스 그룹에서 증가 하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 위 결과들에 비추어 보았을 때 작두콩과 우엉을 1:4 비율로 혼합투여 하였을 때 면역증진효과가 가장 클 것으로 사료된다.

라. *In vitro* (세포주이용)에서 작두콩과 우엉으로부터 분리한 활성성분 지표 분석

1) 작두콩 및 우엉추출물과 작두콩과 우엉 혼합물, 작두콩과 우엉에서 분리한 활성성분 (Arctigenin, Isoorientin, Genistin)의 독성 평가 및 적정 처리 농도 설정

가) RAW264.7 cell 및 여러 가지 세포에 작두콩 (J) 및 우엉 추출물 (W) 과 작두콩과 우엉 혼합물 (JW), 홍삼 (H) 을 각각 10, 50, 100, 200, 400 µg/ml, 활성성분인 Arctigenin (Arc)을 0.25, 0.5, 1, 2, 4 µg/ml, Isoorientin (Iso) 과 Genistin (Gen)을 1.25, 2.5, 5, 10, 20 µg/ml의 농도로 처리하여 세포독성 시험 진행 (Fig. 106).

나) 작두콩 및 우엉 추출물과 작두콩과 우엉에서 분리한 활성성분의 독성을 확인하고 적정 시험 농도를 확립하기 위해 다양한 세포주에 농도별로 처리한 후 48시간 뒤에 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 독성을 보이는 농도를 제외하고 작두콩과 우엉 추출물, 작두콩과 우엉 혼합물, 홍삼을 각각 100, 200 µg/ml, Arctigenin을 0.1, 1 µg/ml, Isoorientin과 Genistin을 5, 10 µg/ml 의 농도로 처리하여 이후 실험을 진행하였다 (Fig. 106).

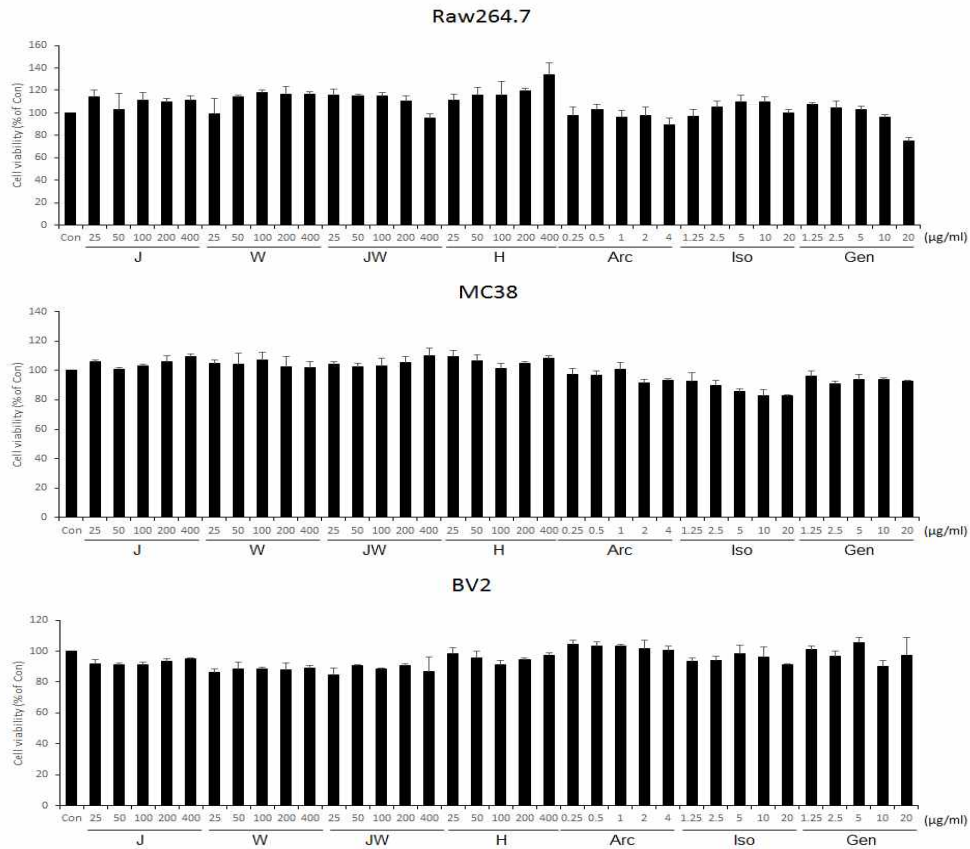


Fig. 106. 다양한 세포주에서 작두콩 및 우영 추출물, 작두콩과 우영 혼합물, 홍삼과작두콩와 우영에서 분리한 활성성분 처리에 의한 독성 시험

## 2) 작두콩 추출물과 우영 추출물 및 활성성분 처리로 생성된 활성산소 및 NO 측정

작두콩 추출물에 의한 면역 활성 지표 물질을 확인하기 위해 RAW264.7 세포주에 작두콩과 우영 추출물, 작두콩과 우영 혼합물, 홍삼과 작두콩와 우영에서 분리한 활성성분 들을 각각 농도별로 처리하고 LPS (500ng/ml)를 함께 처리하였다. LPS에 의해 증가한 ROS 생성량이 각각의 처리 물질에 의해 유의적으로 감소하였고, 작두콩과 우영을 혼합한 물질을 처리 하였을 때 가장 많이 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 107). 하지만 NO 생성량에서는 통계학적 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 107).

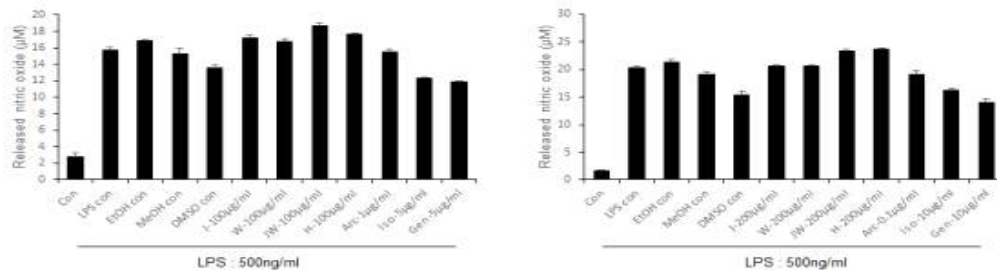


Fig. 107. 작두콩 및 우영 추출물, 작두콩과 우영 혼합처리, 홍삼과 작두콩와 우영에서 분리한 활성성분 처리에 의한 NO 생성량 측정



3) 다양한 세포주에서 작두콩 및 우영 추출물, 작두콩과 우영 혼합물, 홍삼과 작두콩  
 와 우영에서 분리한 활성성분 처리 결과의 의의 및 고찰

RAW 264.7 세포주에서 LPS를 처리하여 증가한 ROS를 작두콩과 우영 활성성분을  
 각각 단독 처리하였을 경우와 홍삼 활성성분을 처리하였을 때보다 작두콩과 우영  
 활성성분을 혼합처리 하였을 때 유의적으로 ROS를 감소시키는 효과를 보였다.

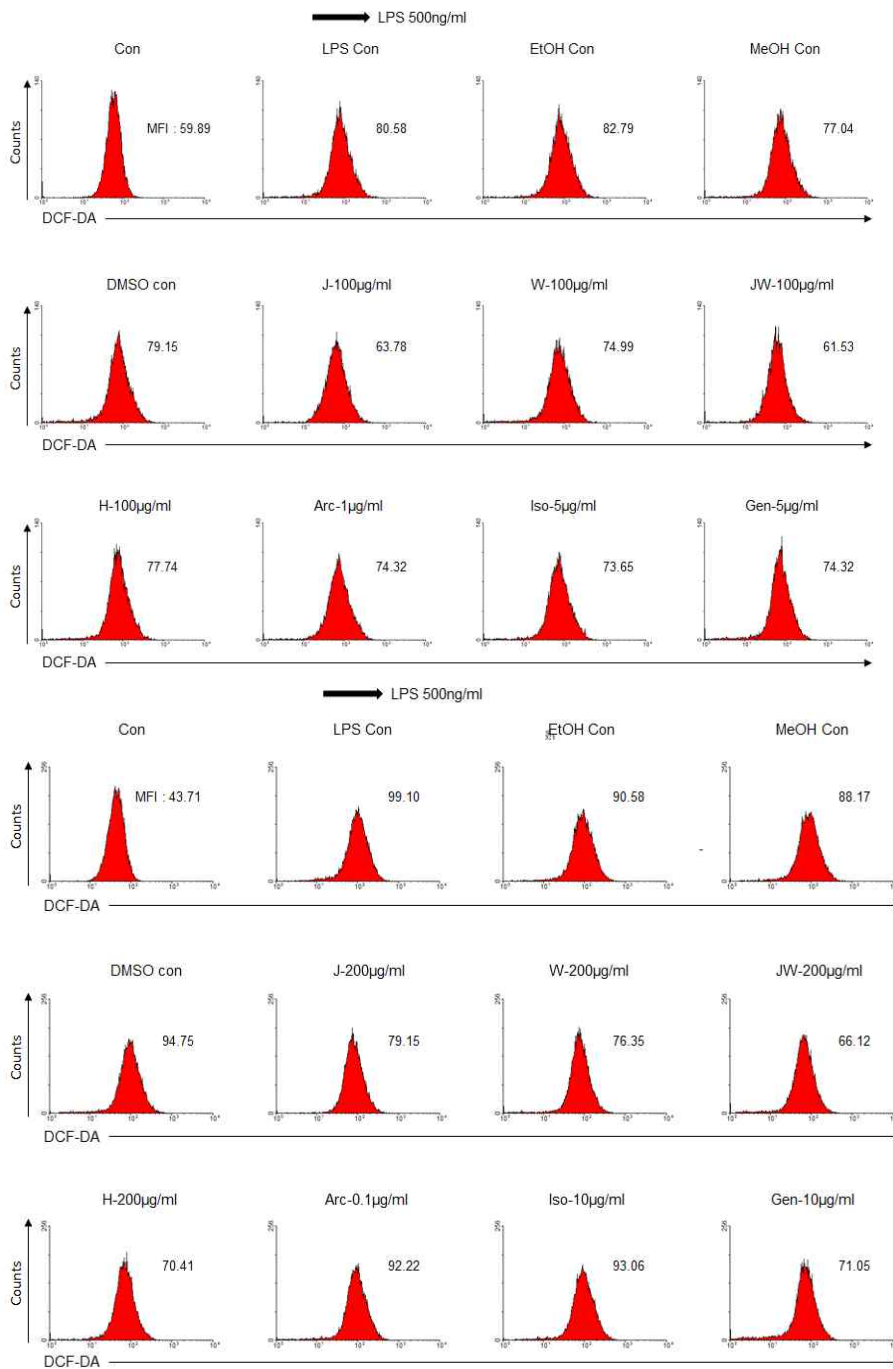


Fig. 108. 작두콩 및 우영 추출물, 작두콩과 우영 혼합처리, 홍삼과 활성성분 처리에 의한 ROS  
 생성량 측정

마. 부동화 스트레스 유발 마우스 모델을 통한 작두콩과 우영 소재혼합 추출물 (1:4)의 생리활성 및 면역증진 효능 검증

1) 스트레스유발 부동화 마우스 모델 제작

C57/BL6 마우스에 확립된 조건으로 그룹 별로 3마리 씩 각각 관리 하에 21일간 작두콩 70% 주정 추출물(CG70%E, 100 mg/kg, 50 mg/kg), 우영 70% 주정 추출물 (AL70%E, 100 mg/kg, 50 mg/kg), 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출혼합물 (1:4) (CG+AL 1:4, 100 mg/kg, 50 mg/kg, 25 mg/kg)을 매일 경구투여 후 2시간 뒤에 부동화 튜브에 넣어 2시간 동안 고정하여 매일 2시간씩 21일간 부동화 스트레스를 유발함 (Fig. 109).

**Material and Method**

➤ 8 week C57bl/6n mice, 20-22 g were used for each experimental group.

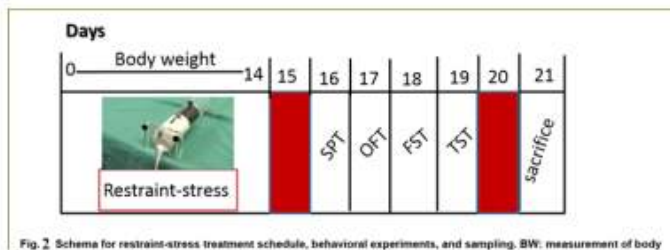


Fig. 2. Schema for restraint-stress treatment schedule, behavioral experiments, and sampling. BW: measurement of body

**Experimental group:**

- Normal 8 week C57bl/6n mice (Naïve/Normal)
- immobilization stress-stress C57bl/6n mice receiving Vehicle (CTL)
- immobilization stress-stress + *Canavalia gladiata* 100 & 50 mg/kg (p.o) C57bl/6n mice
- immobilization stress-stress + *Arctium lappa* 100 & 50 mg/kg (p.o) C57bl/6n mice
- immobilization stress-stress + CG +AL complexes 100, 50, 25 mg/kg (p.o) C57bl/6n mice

Fig. 109. 스트레스유발 부동화 마우스 모델 제작 방법

2) 부동화 스트레스유발 마우스 모델 체중변화 측정

Fig. 110은 체중변화를 나타낸 것으로 부동화대조군 (IM\_S-CTL)은 정상군에 비하여 체중 감소가 나타났고, 작두콩 70%주정 추출물 (CG70%E) 100 mg/kg, 우영 70% 주정 추출물(AL70%E) 100 mg/kg, 그리고 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합 추출물 (CG+AL, 1:4) 100mg/kg 투여군이 부동화대조군 (IM\_S-CTL)에 비하여 체중감소가 적게 나타났다 (Fig. 110).

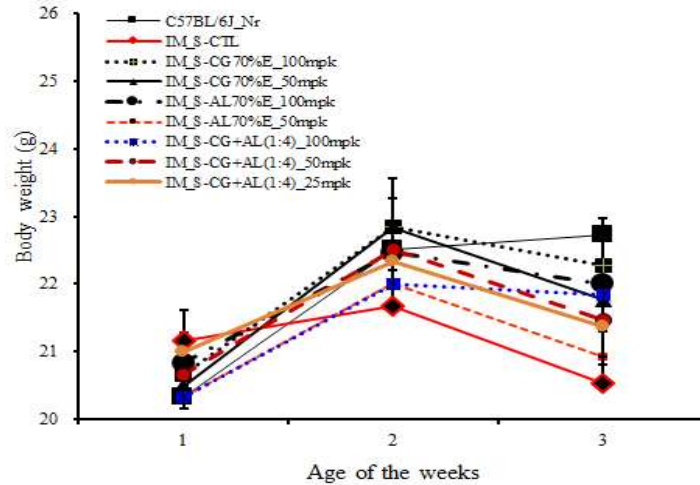


Fig. 110. 부동화 스트레스유발 생쥐에서 작두콩과 우영 소재혼합 추출물의 체중변화

### 3) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 추출한 혈청에서 IgA 생성량 확인

가) 마우스의 혈청에서 IgA 생성량을 확인하기 위해 마우스의 혈청을 수득하여 96well 에코팅한 후 IgA 항체와 HRP conjugated 항체를 반응 시켜 ELISA reader 기기로 측정함.

나) 작두콩 70% 주정 추출물 (CG70%E), 우영 70% 주정 추출물 (AL70%E), 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합 추출물 (CG+AL, 1:4)을 부동화 스트레스를 매일 2시간씩 21일간 부동화로 스트레스유발 8주령 C57BL/6에 매일 200mg/kg의 농도로 경구 투여하였다. Fig.111은 혈청 중 IgA 수준을 측정한 결과로, 작두콩 70%주정 추출물 (CG70%E) 100 mg/kg ( $p < 0.05$ ) 그리고 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합 추출물(CG+AL, 1:4) 100 mg/kg ( $p < 0.01$ ), 50 mg/kg ( $p < 0.05$ ) 투여군이 부동화대조군 (IM\_S-CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 IgA 수준이 증가를 나타냈다 (Fig. 111).

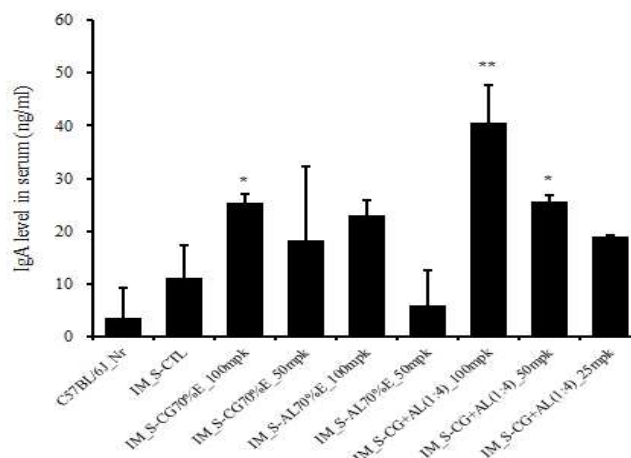


Fig. 111. 부동화 스트레스유발 생쥐에서 작두콩과 우영 소재혼합 추출물에 의한 혈중 IgA 수준 변화

#### 4) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 추출한 혈청에서 Cortisol, serotonin 생성량 확인

가) 부동화 스트레스유발 마우스 모델의 혈청을 수득하여 스트레스 호르몬인 Cortisol, serotonin을 ELISA를 이용하여 측정함.

나) 작두콩 70% 주정 추출물 (CG70%E), 우영 70% 주정 추출물 (AL70%E), 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합 추출물 (CG+AL, 1:4)을 부동화 스트레스를 매일 2시간씩 21일간 부동화로 스트레스유발 8주령 C57BL/6에 매일 200mg/kg의 농도로 경구투여 하였다. Fig.112-A는 혈청중 Cortisol 수준을 측정한 결과로, 작두콩 70%주정 추출물 (CG70%E) 100 mg/kg ( $p < 0.05$ ) 그리고 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합 추출물 (CG+AL, 1:4) 100 mg/kg ( $p < 0.01$ ), 50 mg/kg ( $p < 0.05$ ) 투여군이 부동화대조군 (IM\_S-CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 Cortisol 수준이 감소를 나타냈다 (Fig. 112). Fig.112-B는 혈청 중 Serotonin 수준을 측정한 결과로, 작두콩 70%주정 추출물 (CG70%E) 100 mg/kg ( $p < 0.05$ ) 그리고 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합 추출물 (CG+AL, 1:4) 100 mg/kg ( $p < 0.01$ ), 50 mg/kg ( $p < 0.05$ ) 투여군이 부동화대조군 (IM\_S-CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 Serotonin 수준이 증가를 나타냈다 (Fig. 112).

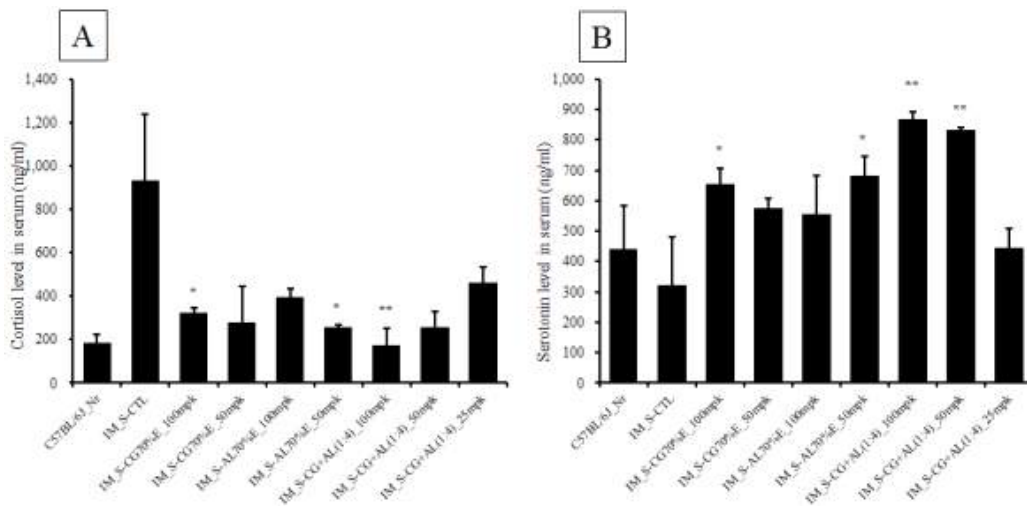


Fig. 112. 부동화 스트레스유발 생쥐에서 작두콩과 우영 소재혼합 추출물에 의한 혈중 Cortisol, Serotonin 생산량 변화

#### 5) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 추출한 혈액에서 WBC 수 확인

가) 부동화 스트레스유발 마우스 모델의 혈액을 수득하여 백혈구(WBC)의 수를 count 함.

나) 작두콩 70% 주정 추출물 (CG70%E), 우영 70% 주정 추출물 (AL70%E), 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합

추출물 (CG+AL, 1:4)을 부동화 스트레스를 매일 2시간씩 21일간 부동화로 스트레스유발 8주령 C57BL/6에 매일 200mg/kg의 농도로 경구 투여하였다. Fig.113는 혈액 중 WBC 숫자를 측정된 결과로, 부동화대조군 (IM\_S-CTL)에 비하여 모든 시료 투여군에서 WBC 숫자의 증가가 유의성 있게 나타났고, 특히, 우영 70% 주정 추출물 (AL70%E) 100 mg/kg ( $p<0.001$ ) 그리고 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합 추출물 (CG+AL, 1:4) 100 mg/kg ( $p<0.01$ ), 50 mg/kg ( $p<0.05$ ) 투여군이 부동화대조군 (IM\_S-CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 WBC 숫자가 증가를 나타냈다 (Fig. 113).

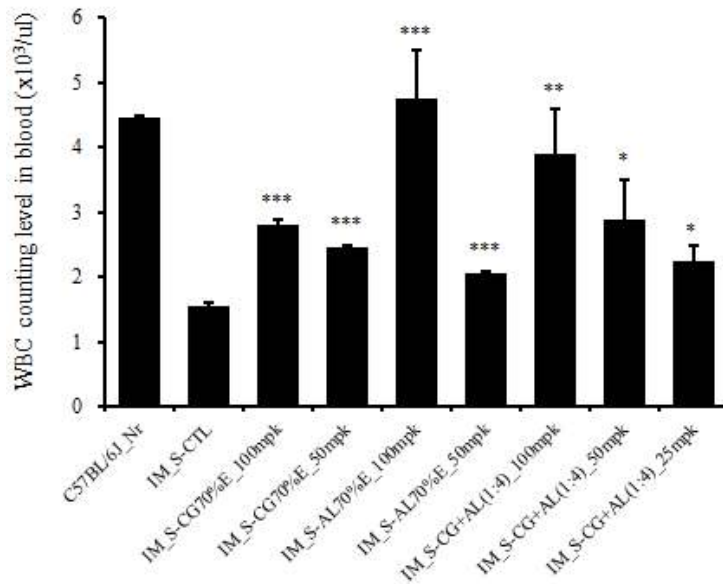


Fig. 113. 부동화 스트레스유발 생쥐에서 작두콩과 우영 소재혼합 추출물에 의한 백혈구 수 (WBC) 생산량 변화

## 6) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 각 면역기관 (DLN, MLN, Spleen, thymus) 세포를 분리하여 FACS 분석

가) 부동화 스트레스유발 마우스에서 분리한 각 면역기관의 세포에서 T cell, B cell, NK cell, macrophage 등 세포의 활성 및 수 변화를 확인하기 위해 각각의 마커가 되는 세포표면 분자들에 대한 항체를 반응 시킨 후 유세포 분석기(FACS)를 통해 분석

나) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 DLN 세포에서 CD4 (CD4 T cell marker) & CD8 (CD8 T cell marker) 세포의 활성 및 수 변화

DLN에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 CD4 (CD4 T cell marker) CD8 (CD8 T cell marker)이 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 작두콩 추출물, 우영 추출물, 작두콩 우영 1:4 혼합물 투여군에서는 모두 control에 비해 CD4 CD8가 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 114).

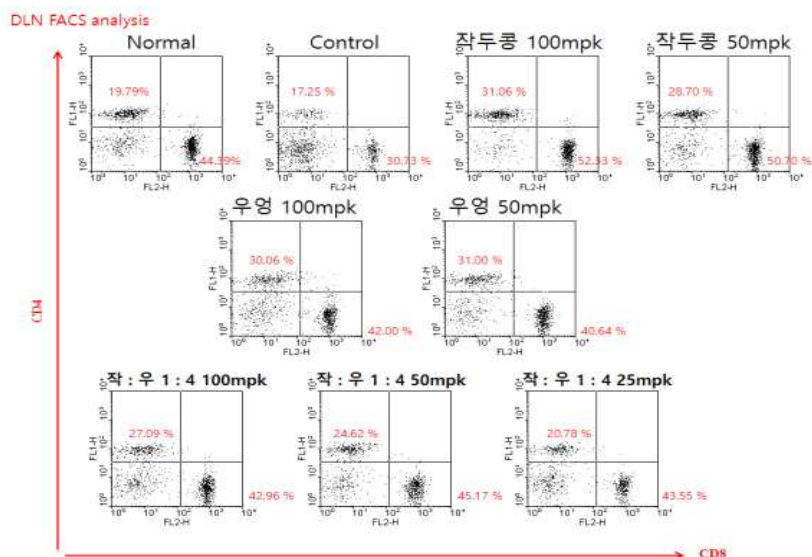


Fig. 114. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 DLN에서 CD4+ & CD8+ 면역 세포의 활성화 확인

다) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 DLN 세포에서 CD4+/CD69+ 세포의 활성화 및 수 변화

DLN에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 활성화된 CD4+/CD69+가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 작두콩 추출물, 우영 추출물, 작두콩 우영 1:4 혼합물 투여군에서는 모두 control에 비해 활성화된 CD4+/CD69+가 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 작두콩 우영 1:4 혼합물 100mpk 투여군에서 가장 활성화된 CD4+/CD69+가 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 115).

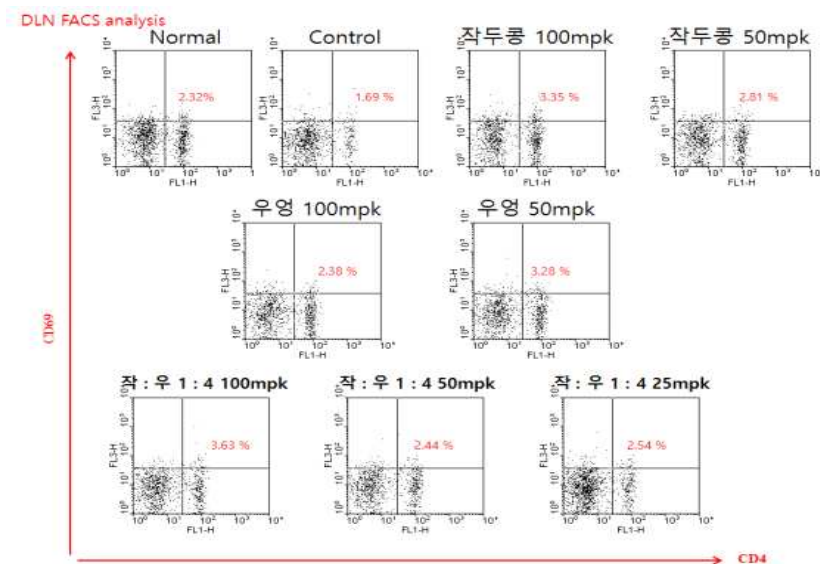


Fig. 115. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 DLN에서 CD4+CD69+ 면역 세포의 활성화 확인

라) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 DLN 세포에서 CD8+/CD69+ 세포의 활성화 및 수 변화

DLN에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 활성화된 CD8+/CD69+가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 작두콩 추출물, 우영 추출물, 작두콩 우영 1:4 혼합물 투여군에서는 모두 control에 비해 활성화된 CD8+/CD69+가 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 작두콩 우영 1:4 혼합물 100mpk 투여군에서 가장 활성화된 CD8+/CD69+가 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 116).

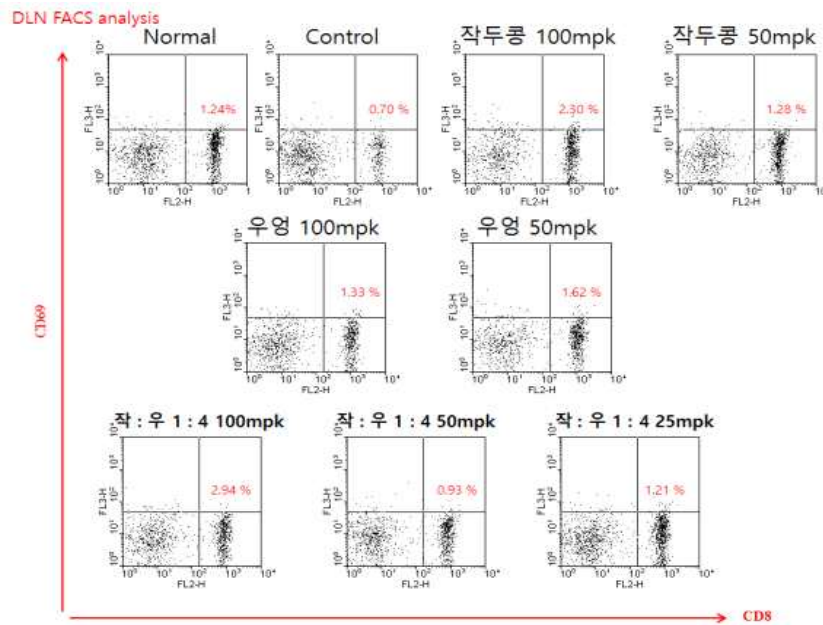


Fig. 116. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 DLN에서 CD8+CD69+ 면역 세포의 활성화 확인

마) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 DLN 세포에서 NK1.1+/CD69+ 세포의 활성화 및 수 변화

DLN에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 활성화된 NK1.1+/CD69+가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 작두콩 추출물, 우영 추출물, 작두콩 우영 1:4 혼합물 투여군에서는 모두 control에 비해 활성화된 NK1.1+/CD69+가 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 작두콩 우영 1:4 혼합물 100mpk 투여군에서 가장 활성화된 NK1.1+/CD69+가 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 117).

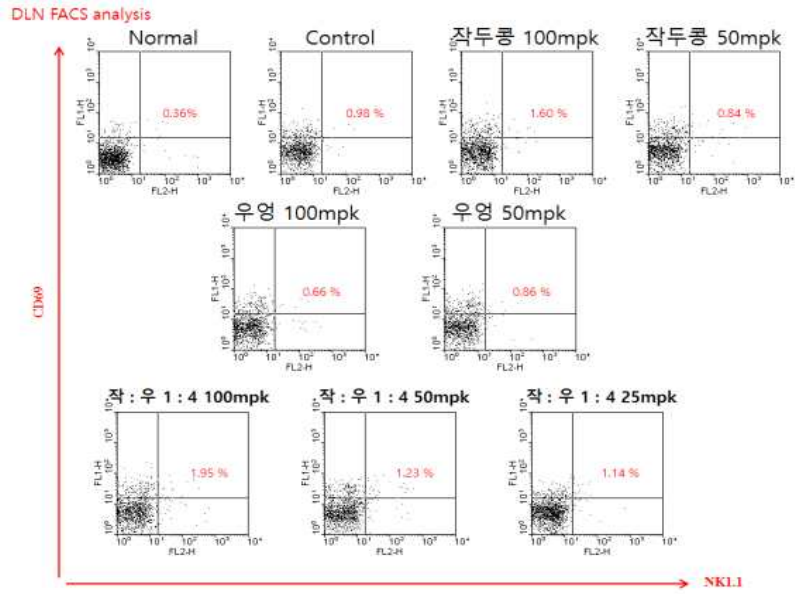


Fig. 117. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 DLN에서 NK1.1+CD69+ 면역 세포의 활성화 확인

바) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 DLN 세포에서 B220+CD69+ 세포의 활성화 및 수 변화

DLN에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 B세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 작두콩 추출물, 우영 추출물, 작두콩 우영 1:4 혼합물 투여군에서는 control에 비해 B세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 작두콩 우영 1:4 혼합물 100mpk 투여군에서 가장 B세포 활성이 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 118).

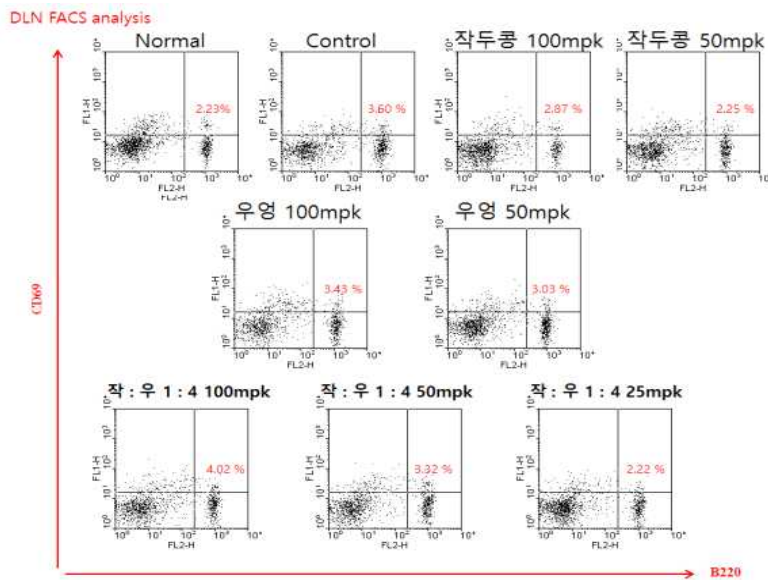


Fig. 118. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 DLN에서 B220+CD69+ 면역 세포의 활성화 확인



사) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 MLN 세포에서 CD4+ & CD8+ 세포의 활성 및 수 변화

MLN에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 CD4 T세포 활성이 감소하며 CD8 T세포 활성이 증가 되는 것을 확인할 수 있었고, 작두콩 우영 1:4 혼합물 투여군의 100 mg/kg에서는 control에 비해 CD4 T세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 119).

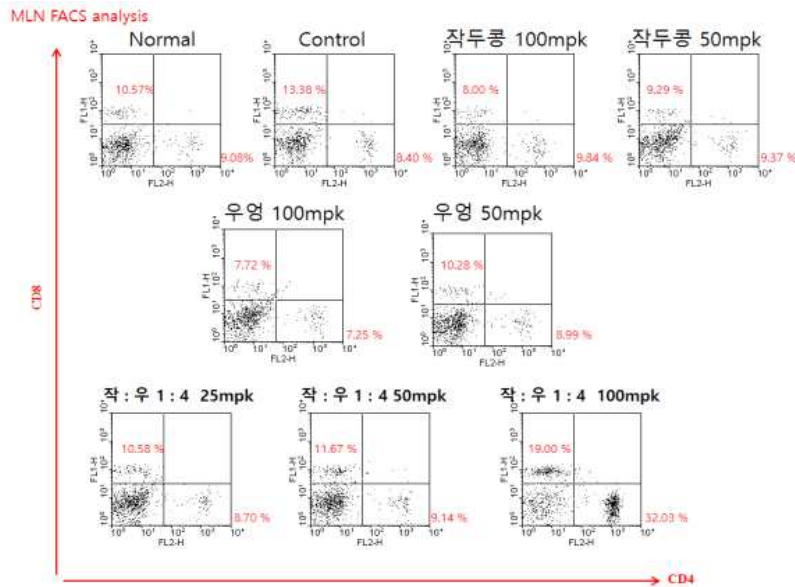


Fig. 119. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 MLN에서 CD4+ & CD8+ 면역 세포의 활성 확인

아) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 MLN 세포에서 CD4+/CD69+ 세포의 활성 및 수 변화

MLN에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 CD4+/CD69+ Th세포 활성이 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 작두콩 100mpk, 우영 100mpk, 작두콩 우영 1:4 혼합물 25mpk를 제외한 나머지 투여군에서는 control에 비해 CD4+/CD69+ Th세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 작두콩 우영 1:4 혼합물 100mpk 투여군에서 가장 활성화된 CD4+CD69+가 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 120).

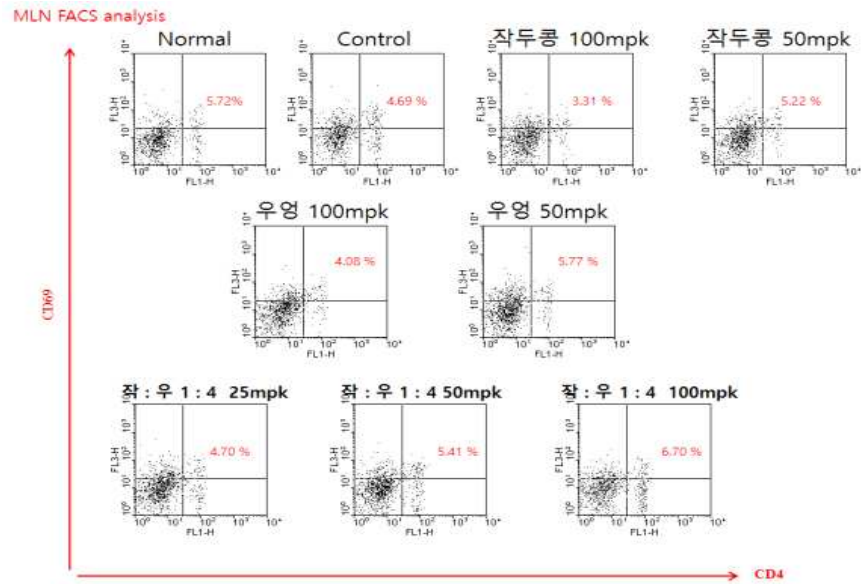


Fig. 120. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 MLN에서 CD4+/CD69+ 면역 세포의 활성화 확인

자) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 MLN 세포에서 CD8+/CD69+ 세포의 활성화 및 수 변화

MLN에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 CD8+/CD69+ Th세포 활성이 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 작두콩 100mpk를 제외한 나머지 투여군에서는 control에 비해 CD8+/CD69+ Th세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 작두콩 우영 1:4 혼합물 100mpk 투여군에서 가장 활성화된 CD8+/CD69+가 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 121).

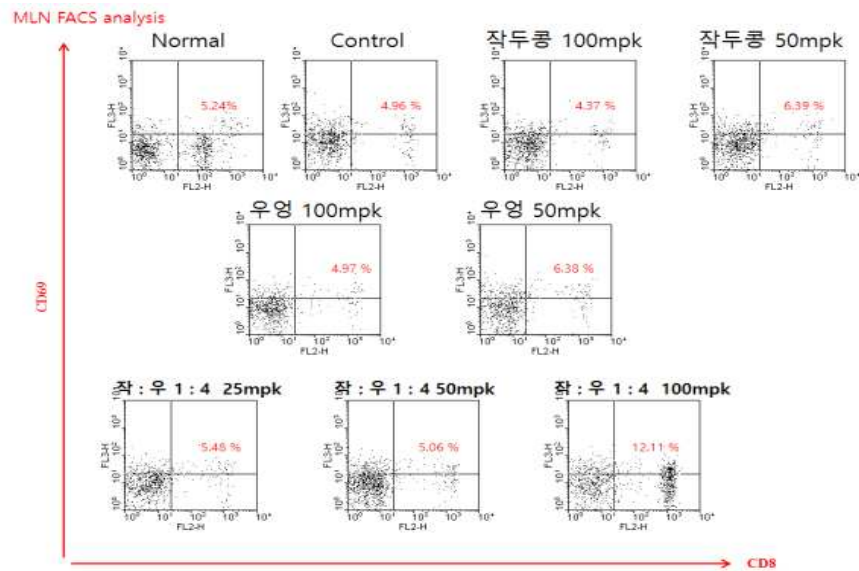


Fig. 121. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 MLN에서 CD8+/CD69+ 면역 세포의 활성화 확인

차) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 MLN 세포에서 NK1.1+/CD69+ 세포의 활성 및 수 변화

MLN에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 NK1.1+/CD69+ 세포 활성이 차이가 없었고, 작두콩 추출물, 우영 추출물, 작두콩 우영 1:4 혼합물 투여군에서도 control에 비해 NK1.1+/CD69+ Th세포 활성에서 큰 차이를 볼 수 없었다 (Fig. 122).

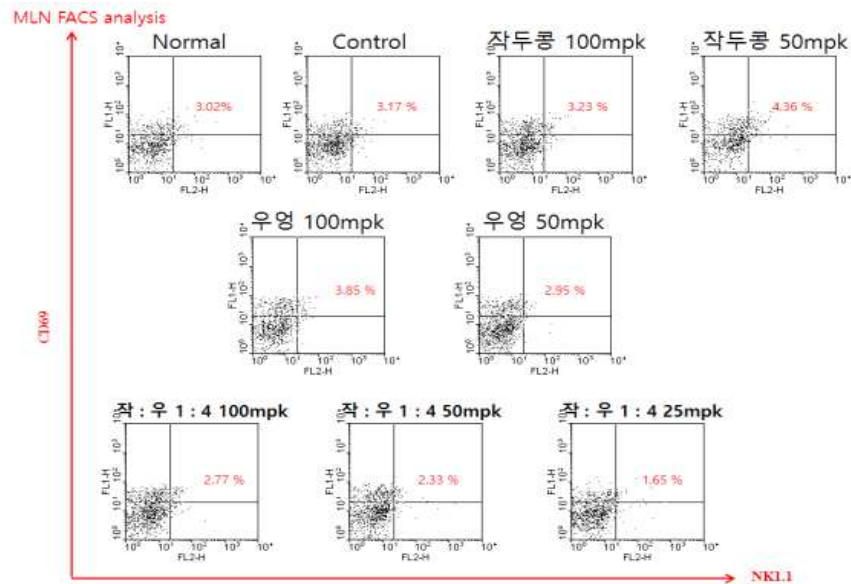


Fig. 122. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 MLN에서 NK1.1+/CD69+ 면역 세포의 활성 확인

카) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 spleen 세포에서 CD4+ & CD8+ 세포의 활성 및 수 변화

Spleen에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 CD4+ & CD8+ T 활성세포수가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 모든 투여군에서 control에 비해 CD4+ & CD8+ T세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서 작두콩 우영 1:4 혼합물 100mpk 투여군에서 CD8+가 가장 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 123).

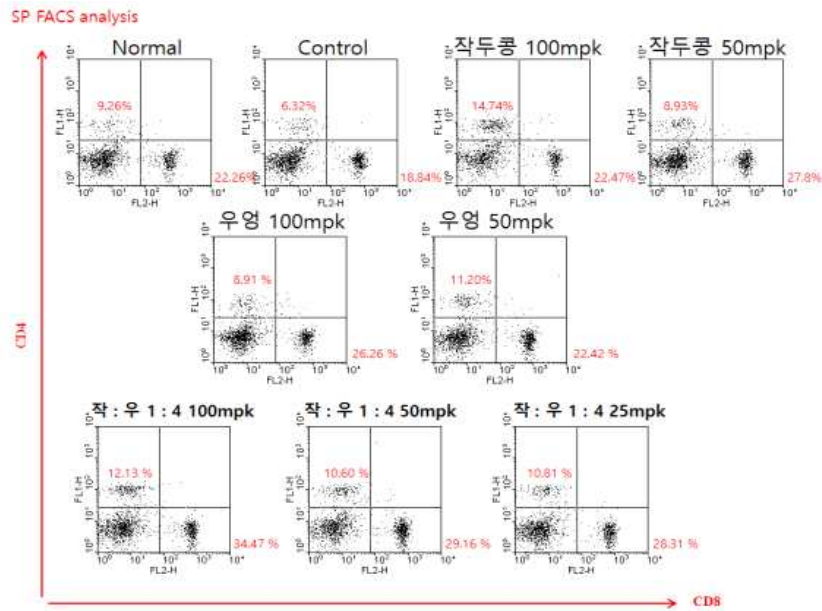


Fig. 123. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 spleen에서 CD4+ & CD8+ 면역 세포의 활성화 확인

타) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 spleen 세포에서 CD4+/CD69+ 세포의 활성화 및 수 변화

Spleen에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 CD4+/CD69+ T 활성화세포수는 차이를 볼 수 없었지만, 우영 추출물 100mpk와 작두콩 우영 1:4 혼합물 25mpk를 제외한 나머지 투여군에서는 control에 비해 CD4+/CD69+ T세포 활성화가 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 124).

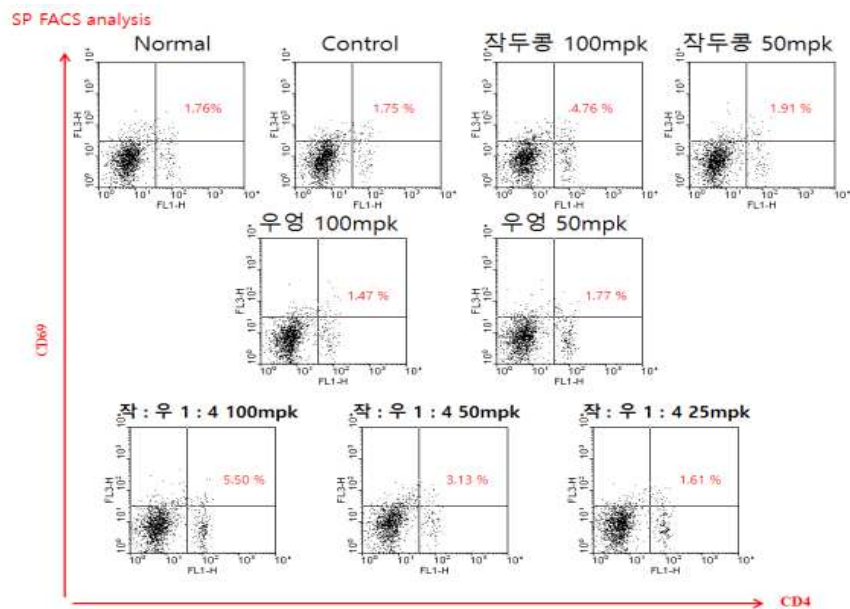


Fig. 124. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 spleen에서 CD4+/CD69+ 면역 세포의 활성화 확인

과) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 spleen 세포에서 CD8+/CD69+ 세포의 활성 및 수 변화

Spleen에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 CD8+/CD69+ T 활성세포수가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 모든 투여군에서 control에 비해 CD8+/CD69+ T세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 작두콩 우영 1:4 혼합물 100mpk 투여군에서 CD8+/CD69+ 활성 세포수가 가장 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 125).

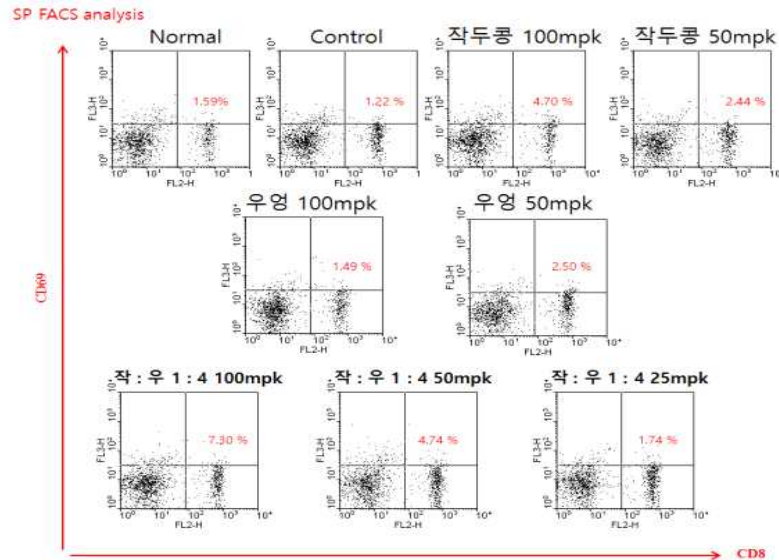


Fig. 125. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 spleen에서 CD8+/CD69+ 면역 세포의 활성 확인

하) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 spleen 세포에서 NK1.1+/CD69+ 세포의 활성 및 수 변화

Spleen에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 NK1.1와 NK1.1+/CD69+ NK 활성세포수가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 나머지 투여군에서는 control에 비해 농도 의존적으로 NK1.1와 NK1.1+/CD69+ NK 세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 작두콩 우영 1:4 혼합물 100mpk 투여군에서 NK1.1와 NK1.1+/CD69+ NK활성 세포수가 가장 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 126).

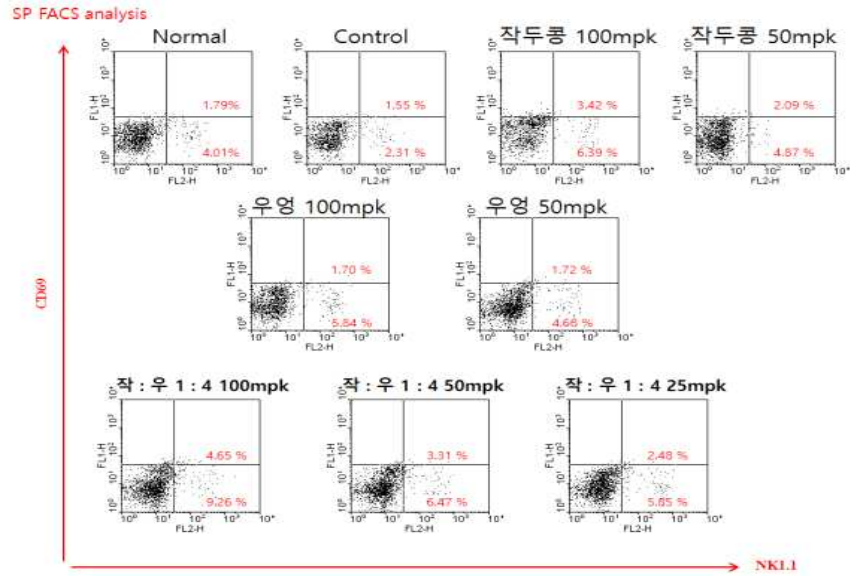


Fig. 126. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 spleen에서 NK1.1+/CD69+ 면역 세포의 활성 확인

가) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 spleen 세포에서 CD11b+/CD69+ 세포의 활성 및 수 변화

Spleen에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 CD11b+/CD69+ 활성세포수가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 나머지 투여군에서는 control에 비해 농도 의존적으로 CD11b+/CD69+ 세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 작두콩 우영 1:4 혼합물 100mpk 투여군에서 CD11b+/CD69+ 활성세포수가 가장 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 127).

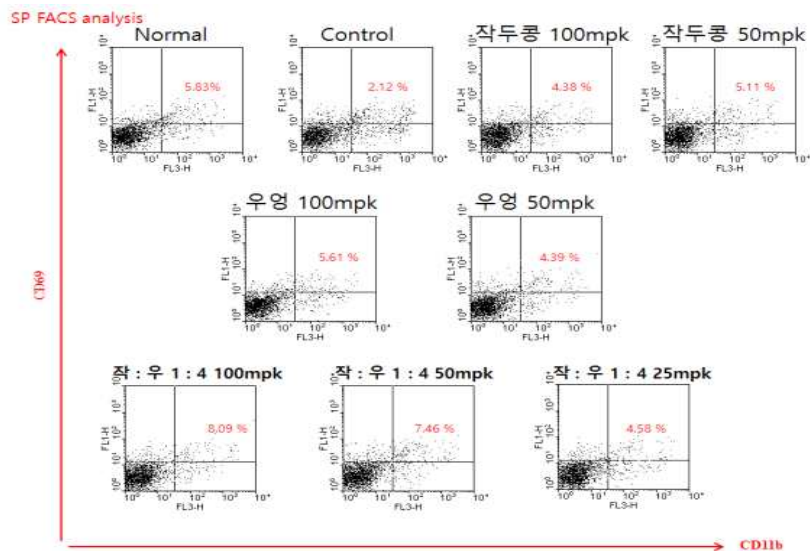


Fig. 127. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 spleen에서 CD11b+/CD69+ 면역 세포의 활성 확인

너) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 thymus 세포에서 CD4+ & CD8+ 세포의 활성 및 수 변화

흉선 (thymus)에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 CD4+ & CD8+ 세포수가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 나머지 투여군에서 control에 비해 농도의존적으로 CD4+ & CD8+ 세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 작두콩 우영 1:4 혼합물 100mpk 투여군에서 CD4+ & CD8+ 세포수가 가장 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 128).

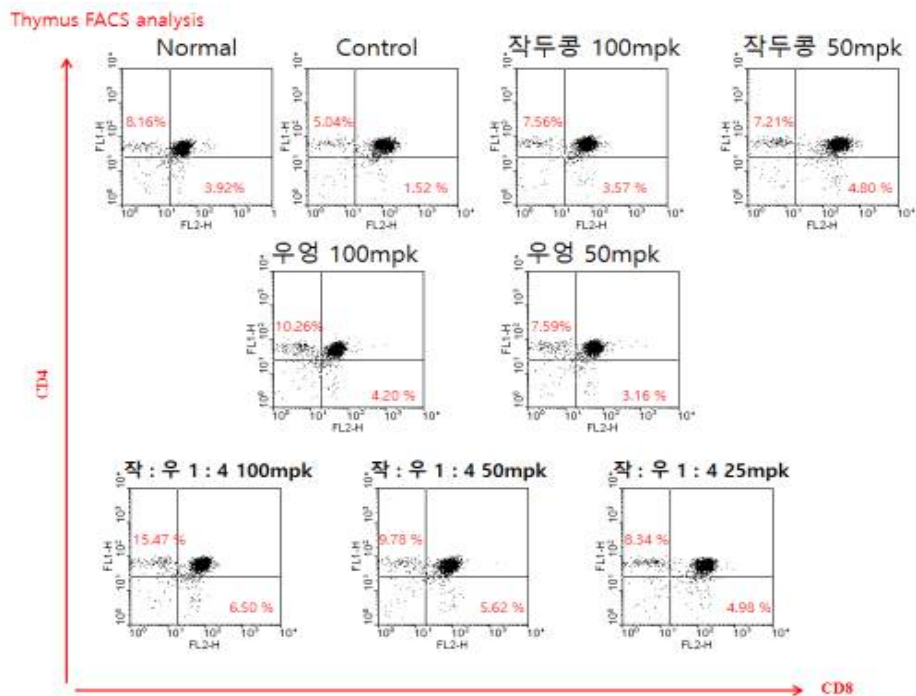


Fig. 128. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 Thymus (흉선)에서 CD4+ & CD8+ 면역 세포의 활성 확인

더) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 각 면역기관 (DLN, MLN, spleen thymus)의 세포에서 T cell, B cell, NK cell 등 세포의 활성 및 수 변화 결과의 의의 및 고찰

작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 경구투여한 마우스에서 주요 면역기관인 spleen, LN, MLN을 추출하여 세포를 분리한 뒤 CD4 (CD4 T cell marker), CD8 (CD8 T cell marker), NK1.1 (NK cell marker), CD11b (macrophage marker), CD11c (dendritic cell marker) 항체로 형광 염색하여 flow cytometry로 분석하였다. 그 결과 작두콩 및 우영을 혼합 처리한 마우스 군에서 CD4, CD8 T cell, macrophage, dendritic cell의 수와 활성이 가장 증가 되어있는 것을 확인하였다.

7) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 작두콩과 우영 소재혼합 추출물 경구투여에 의해 변화된 비장의 염증 cytokine 관련 유전자 발현 변화 확인 (RT-PCR)

비장에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 염증 싸이토카인 (IL-1beta, IL-6, TNF-a) mRNA 유전자 발현이 증가를 확인할 수 있었고, IL-1beta의 발현은 후보 물질 투여군중 작두콩 70% 주정 추출물 (CG70%E) 100mpk와 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합 추출물 (CG+AL, 1:4) 100mpk와 25mpk 투여한 그룹에서 통계학적으로 유의성 있게 정상그룹 수준 정도로 회복되는 것을 확인하였다. IL-6의 발현은 후보 물질 투여군중 우영 70% 주정 추출물 (AL70%E) 100mpk 투여군과 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합 추출물 (CG+AL, 1:4) 50mpk를 제외한 나머지 그룹에서 감소하였지만 통계적 유의성은 볼 수 없었다. 반면 TNF-a의 발현은 후보 물질 투여군중 작두콩 70% 주정 추출물 (CG70%E) 100mpk와 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합 추출물 (CG+AL, 1:4) 100mpk 투여군에서 통계학적으로 유의성 있게 정상그룹 수준 정도로 회복되는 것을 확인하였다 (Fig. 129).

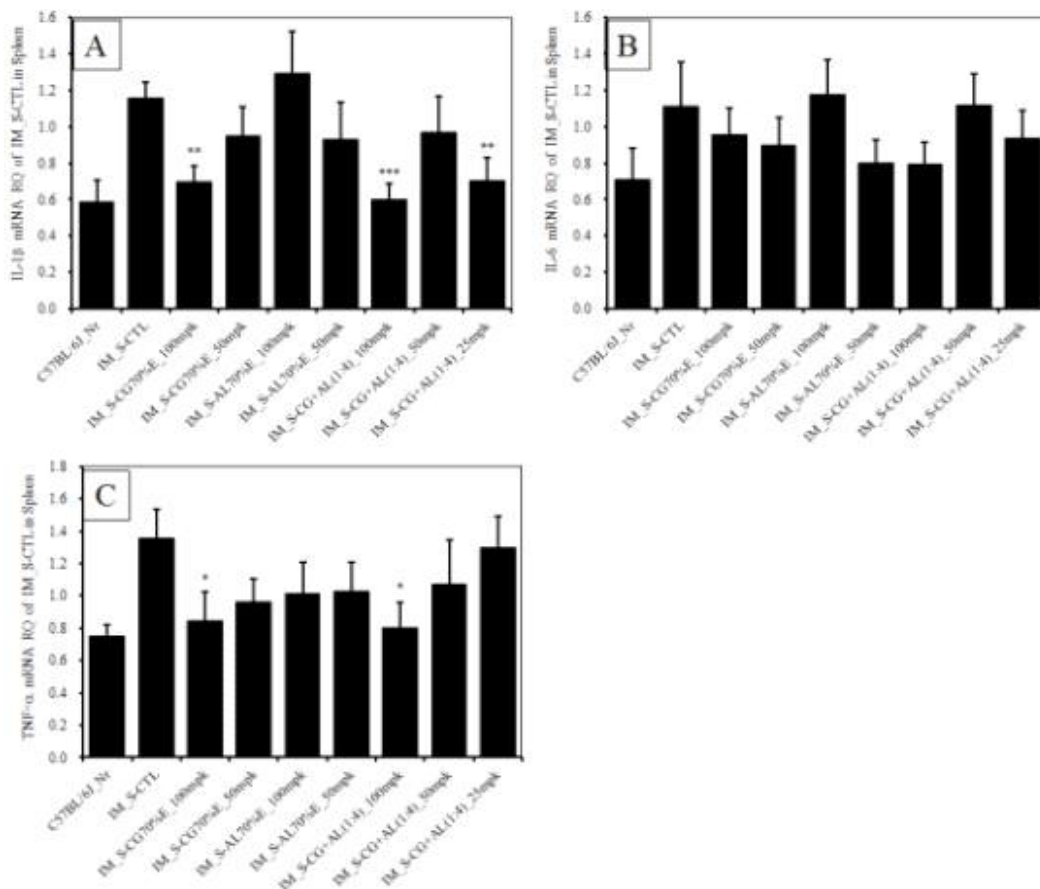


Fig. 129. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 비장에서 염증 싸이토카인 유전자 발현



8) 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 작두콩과 우영 소재혼합 추출물 경구투여에 의해 변화된 비장의 면역 T세포 활성화 cytokine 관련 유전자 발현 변화 확인 (RT-PCR)

비장에서는 Normal에 비해 부동화를 시킨 control에서 면역 T세포 활성화 사이토카인 (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12p35/p40) mRNA 유전자 발현이 감소를 확인할 수 있었고, 후보 물질 투여군중에서는 control에 비하여 물질 투여 농도 의존적으로 면역 T세포 활성화 사이토카인 (IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-12p35/p40) mRNA 유전자 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 작두콩 70% 주정 추출물과 우영 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 소재혼합 추출물 (CG+AL, 1:4) 100mpk 투여군에서는 control에 비해 면역 T세포 활성화 사이토카인 (IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-12p35/p40) mRNA 유전자 발현이 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 130).

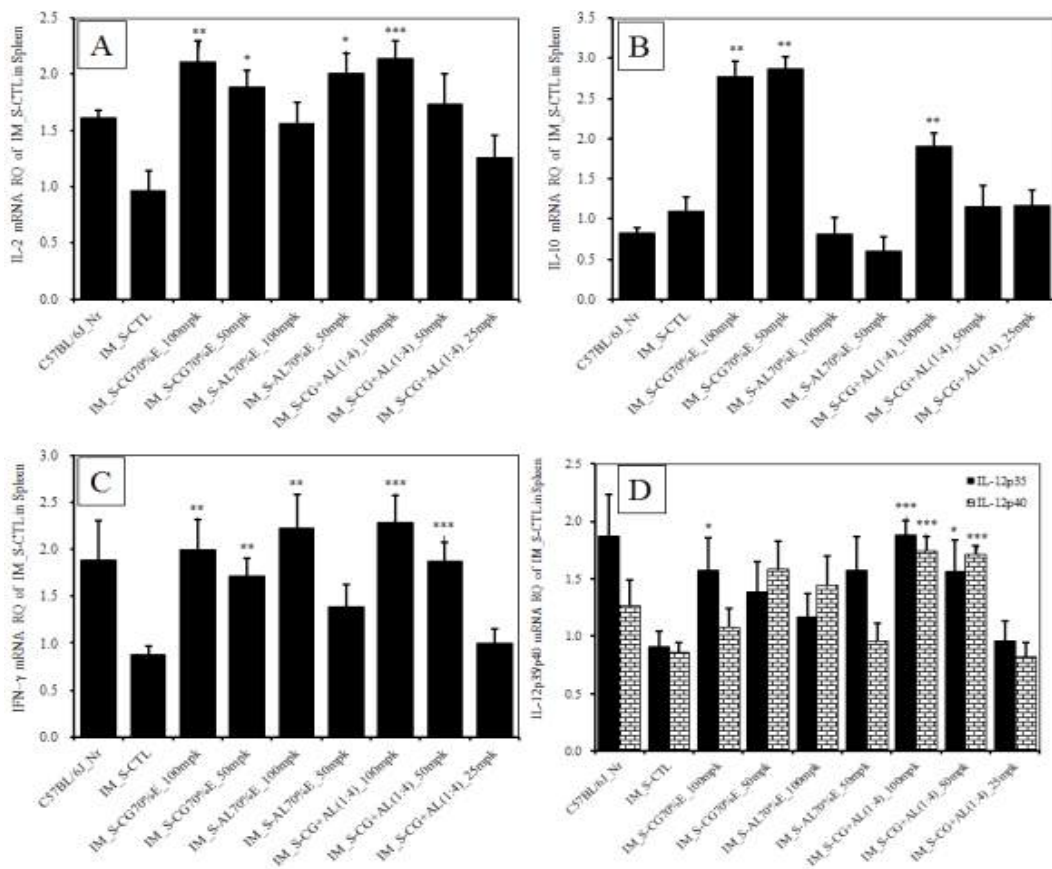


Fig. 130. 작두콩과 우영 소재혼합 추출물을 투여한 부동화 스트레스유발 생쥐에서 분리한 비장에서 면역활성 T 세포 사이토카인 유전자 발현

9) 작두콩 및 우영 소재혼합 추출물 (1:4)의 효능 검증을 위한 스트레스유발 부동화 마우스 모델에서 연구 결과의 의의 및 고찰

작두콩 및 우영 추출물을 부동화 스트레스 마우스모델에 경구투여하여 면역 관련 지표들의 변화를 확인한 결과, 작두콩을 단독으로 경구투여한 마우스 그룹에 비하여

작두콩과 우영을 혼합 처리한 마우스 그룹 (1:4)에서 면역증진 효과가 다소 증진되는 것을 확인하였다. 특히, 선행 연구결과에서 확인하였던 T/B cell 및 macrophage, NK cell 등 면역세포의 수와 활성화 및 IgA, serotonin의 생성량이 작두콩 단독투여에 비해 작두콩과 우영의 혼합투여에 의해 더욱 증가하였으며, 반대로 Cortisol 생산량은 감소시켰다. 이에 따라 작두콩과 우영의 혼합투여에서 염증반응은 가장 낮은 것을 관찰하였다. 또한 작두콩과 우영의 혼합물 100mpk 투여군에서 염증사이토카인 (IL-1beta, IL-6, TNF-a) mRNA 유전자 발현이 현저하게 감소 및 면역 T세포 활성화 사이토카인 (IL-2, IL-10, IFN-gamma, IL-12p35/p40) mRNA 유전자 발현 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 작두콩을 단독으로 경구투여한 마우스 그룹에 비하여 작두콩과 우영을 혼합 처리한 마우스 그룹에서 증가 하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 위 결과들에 비추어 보았을 때 작두콩과 우영을 혼합투여 하였을 때 면역증진효과가 가장 클 것으로 사료된다.

## 바. DSS 유도 IBD 마우스 모델을 통한 작두콩과 우영 소재혼합 추출물 (1:4)의 생리활성 및 면역증진 효능 검증

### 1) DSS 유도 IBD 마우스 모델 제작

IBD는 장내 염증 및 궤양에 기인한 염증성 장 질환으로, 피 묻은 설사, 장 운동 장애에 대장 길이 감소 등의 병적인 증상이 특징이다. 실험 연구에서, DSS 유도 IBD 모델은 IBD를 위한 치료 방법의 효능을 테스트하는데 널리 사용되는 표준 모델이다. 기존 실험 논문에 따르면 DSS를 처리한지 6 일 후에는, IBD 심각도에 따른 질병활성도 증가 및 염증성 사이토카인의 발현 증가가 알려져있다. IBD의 치료에 사용되는 약물은 항생제, 면역 억제제, 항염증 약물 치료법을 포함하므로 다음과 같은 기작을 포함하는 약물의 효능 검증에도 사용된다.

### 2) DSS 유도 IBD 마우스 모델 체중변화 측정

Fig. 131은 체중변화를 나타낸 것으로 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 정상군에 비하여 체중 감소가 나타났고, 나머지 약물 투여군(작두콩, 우영, 작두콩 우영 혼합물, 홍삼)에서도 정상군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 chlorogenic acid와 cichoric acid는 항바이러스, 항균 면역증강 효과를 가지게 하는 물질로 양성대조군으로 사용되었는데, 양성대조군에서도 정상군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 131).

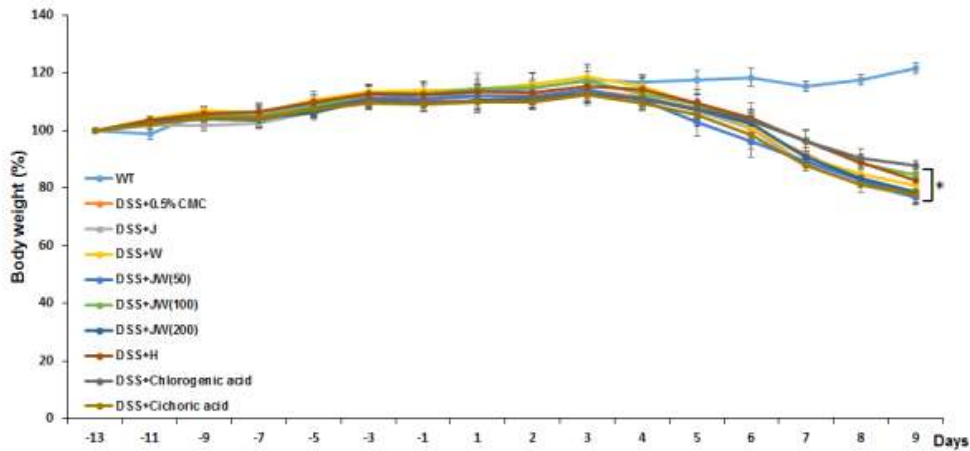


Fig. 131. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 작두콩과 우영 소재혼합 추출물 투여에 따른 체중변화

### 3) DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 질병활성도 변화 관찰

Fig. 132은 질병활성도 (disease activity index, DAI) 변화를 그래프로 나타낸 것이다. DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 DSS를 유도한 지 5일, 7일에서 정상군에 비하여 낮은 점수를 나타냈지만, 9일에서는 정상군과 비슷한 점수를 나타내었다. 하지만 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다. 양성대조군인 chlorogenic acid와 cichoric acid 투여군은 9일에서 7점 이하의 점수를 나타내었고, 이는 통계학적으로 유의성을 나타내었다. 나머지 약물 투여군(우영, 작두콩 우영 혼합물, 홍삼)은 9일에서 양성대조군 점수보다 약간 높은 7점 이상의 점수를 보였고, 통계학적으로 유의성을 확인할 수 있었다. 또한 우영 투여군은 9일에서 정상군 수준의 점수를 나타내었지만 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다 (Fig. 132).

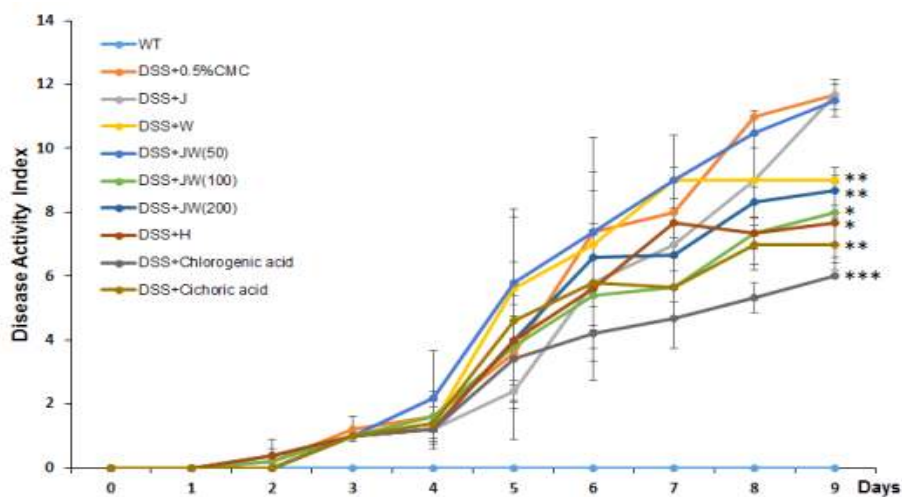


Fig. 132. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 작두콩과 우영 소재혼합 추출물 투여에 따른 질병활성도 변화 관찰

#### 4) DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 장 길이 변화 관찰

Fig. 133은 IBD 마우스 모델의 장 길이의 변화를 육안으로 나타낸 것이다. DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 DSS를 유도한 지 6일, 9일 후에서 정상군에 비하여 짧은 장길이를 확인할 수 있었다. 하지만 DSS를 유도한 지 6일 후에서 나머지 약물 투여군 (작두콩, 우영, 작두콩 우영 혼합물, 홍삼)과 양성대조군의 장길이는 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 크게 차이를 보이지 않았다. DSS를 유도한 지 9일 후에서는 약물 투여군 중 작두콩 우영 혼합물 100mpk 투여군과 홍삼투여군, 양성대조군(chlorogenic acid, cichoric acid)에서 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 약간 장 길이가 긴 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 133).

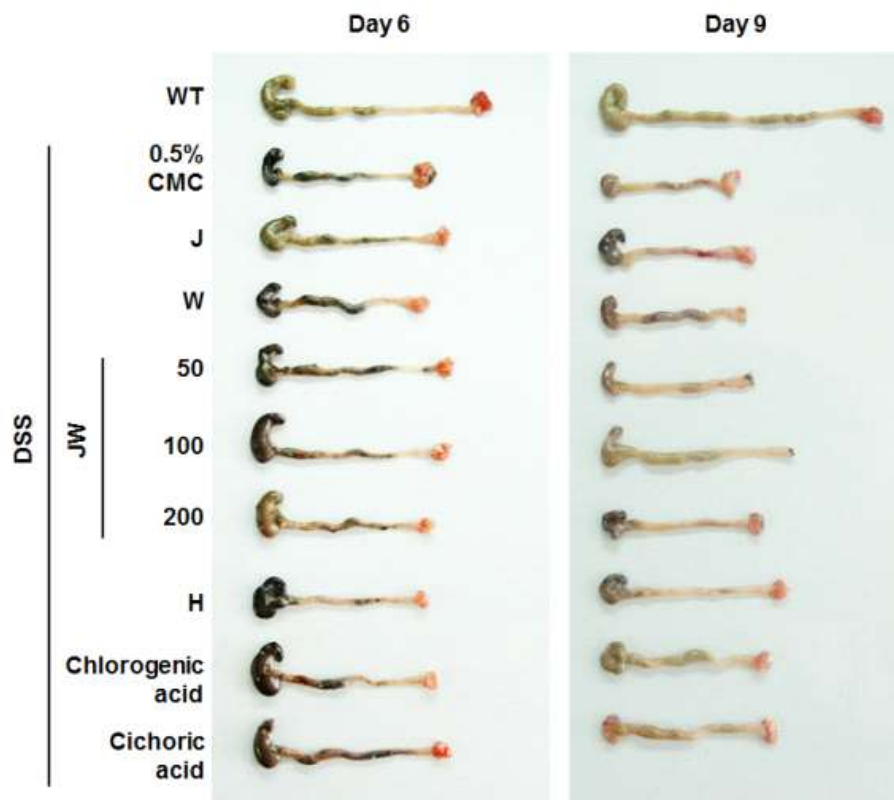


Fig. 133. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 작두콩과 우영 소재혼합 추출물 투여에 따른 장 길이 변화 관찰

#### 5) DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 장 길이 변화 그래프

Fig. 134은 IBD 마우스 모델의 장 길이의 변화를 그래프로 나타낸 것이다. DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 DSS를 유도한 지 6일, 9일 후에서 정상군에 비하여 짧은 장길이를 나타냈다. DSS를 유도한 지 6일 후에서 나머지 약물 투여군 (작두콩, 우영, 작두콩 우영 혼합물, 홍삼)과 양성대조군의 장길이는 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 큰 차이를 보이지 않았다. DSS를 유도한 지 9

일 후에는 홍삼투여군과 양성대조군(chlorogenic acid, cichoric acid)에서 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 약간 장 길이가 증가하는 것을 확인할 수 있고, 이는 통계학적으로 유의성을 나타내었다. 약물 투여군 중 우영 투여군과 작두콩 우영 혼합물 100mpk 투여군에서도 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 약간 장 길이가 증가하는 것을 확인할 수 있었지만, 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다 (Fig. 134).

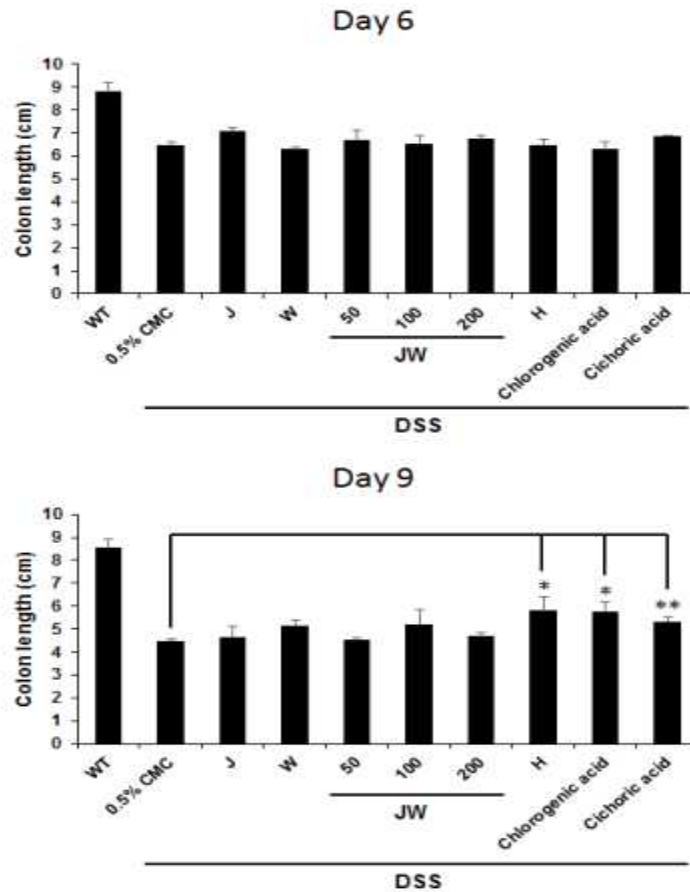


Fig. 134. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 작두콩과 우영 소재혼합 추출물 투여에 따른 장 길이 변화 그래프

사. 염증 및 암 마우스 모델로부터 후보물질 (작두콩/우영 소재조합 추출물, JW)의 주사, 경구투여 및 패치타입에 의한 항염 및 항암 효능 확인

### 1) Cholera toxin 유발 동물모델에서의 직장의 체온변화

CGE의 cholera toxin 유발된 실험동물에서의 직장 체온변화를 조사하기 위하여 마지막 투여일에 디지털 체온계인 YTI - 43 TG Telethermometer을 이용하여 측정하였다. 모든 군에서 통계적인 차이를 보이지 않았지만, cholera toxin으로 감각하여 땅콩을 투여한 군에서 직장체온이 30분 경과시에 체온이 감소함을 나타냈다 (Fig. 135).

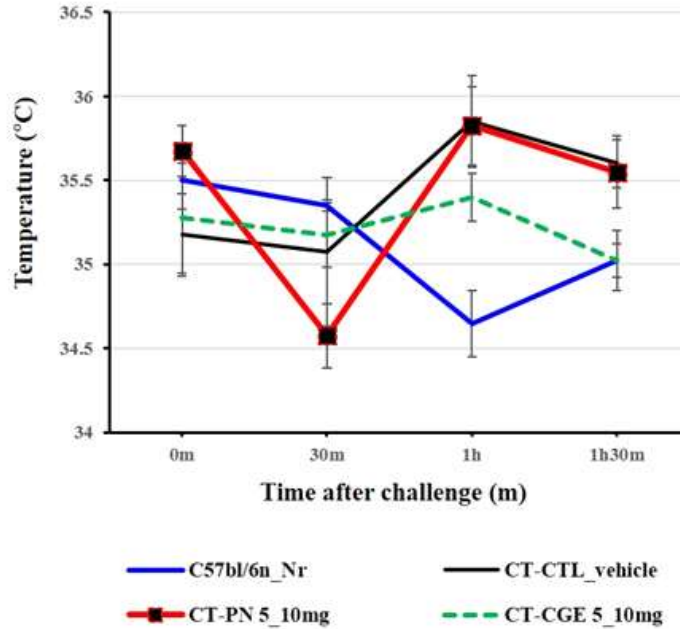


Fig. 135. Changes in rectal temperature (°C) in cholera toxin induced systemic anaphylaxis mice. The effects of CGE on the cholera toxin-induced changes temperature in rectal. C57bl/6n\_Nr: normal; CT\_CTL: cholera toxin-induced control; CT-PN 5\_10mg: cholera toxin-induced Peanut extract; CT-CGE 5\_10mg: cholera toxin-induced *Canavalia gladiata* extract. Data were expressed as the mean  $\pm$ SEM.

## 2) Cholera toxin에 의해 유도된 마우스 모델에서 작두콩 추출물의 처리에 따른 Ara h1 특이 IgE와 염증 사이토카인 조사

땅콩의 단백 항원은 Ara h1에서 Ara h8까지 8개가 알려져 있으며, 가장 지배적인 주 항원은 Ara h1, Ara h2, Ara h3로 알려져 있다. 그리하여 혈청을 분리하여 Ara h1 특이 IgE를 측정하였고, BAL fluid에서 ELISA를 통해 염증유발인자 IFN- $\gamma$ , IL-10, 그리고 IL-4의 생산량을 측정한 결과 cholera toxin을 유발한 대조군의 BAL fluid에서 IFN- $\gamma$ , IL-10, 그리고 IL-4 정상군 대비하여 생산량이 모두 증가하였다. 그러나 땅콩을 투여한 투여군에서는 두드러지는 증가를 확인할 수 있었고, IL-10, IL-4의 생산량은 통계적으로 유의한 수준으로 증가가 나타났다. 작두콩 투여군에서 투여한 실험군에서는 IFN- $\gamma$ , IL-10, 그리고 IL-4의 생산량이 감소함을 확인하였다. 알레르기 기전에 의한 만성질환으로 IFN- $\gamma$ 의 생성능이 감소하여 있고, IL-4의 생성능이 증가하여 있다. IFN- $\gamma$ 와 IL-4로 대변되는 Th1/Th2 세포의 불균형으로 인하여 IgE 생성이 증가하는 것으로 알려져 있는데, IgE의 증가는 알러지의 주요한 문제점으로 알려져 있다 (Fig. 136).

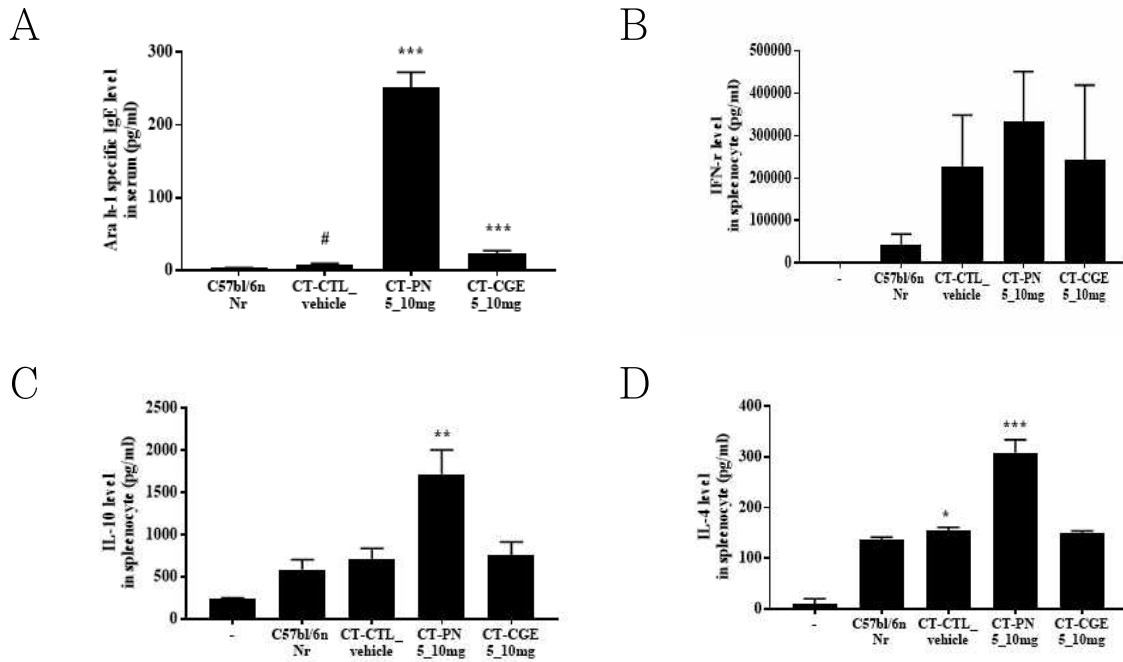


Fig. 136. Cholera toxin-induced Peanut extract *Canavalia gladiata* Extracts through inhibiting expression of IL-4, IL-10, and IFN- $\gamma$  in spleenocyte of cholera toxin-induced mice model. The production of Ara h1-specific IgE in serum(A), IFN- $\gamma$  (B), IL-10 (C), and IL-4 (D) in spleenocyte were measured by ELISA. Data are shown as mean $\pm$ SEM. ##p<0.005, ###p<0.0005 vs Nor; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 vs CTL.

### 3) Cholera toxin에 의해 유도된 마우스 모델에서 총 세포수 조사

마우스의 PBMC 세포와 비장 세포, MLN 세포의 총 세포 수를 관찰한 결과 cholera toxin에 의해 유도된 마우스 그룹에서 MLN과 비장의 전체 세포 수가 증가하였으며, 증가된 MLN과 비장의 전체 세포 수가 작두콩 추출물을 경구 투여한 마우스 그룹에서 농도별로 감소됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 137).

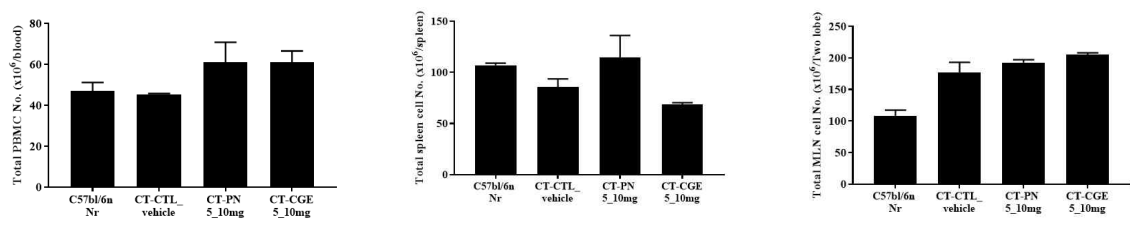


Fig. 137. Total PBMC, spleen, MLN cells in each treatment group by the *Canavalia gladiata* Extracts of cholera toxin-induced mice model. The total PBMC (A), spleen cells (B) and MLN cells (C) were counted using flow cytometry. Granulocytes total cells No. in PBMC, spleen cells and MLN cells. Data are shown as mean $\pm$ SEM. ##p<0.005, ###p<0.0005 vs Nor; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 vs CTL.

#### 4) Cholera toxin에 의해 유도된 마우스 모델에서 작두콩 추출물의 처리에 의한 염증 증상 개선

마우스에 cholera toxin의 유도와 작두콩 추출물을 투여한 동물모델에서 귀 염증 증상의 개선 효과를 관찰하였다. Toluidine Blue 염색법을 통하여 표피의 진피 내 mast cell의 분포 및 탈과립 양상을 광학현미경으로 관찰하였다. 처치한 대조군과 peanut 대조군에서는 mast cell의 발현이 높은 것으로 보였으며, 작두콩 실험군은 상대적으로 mast cell의 발현이 확연히 줄어들었음을 보였다(Fig. 138).

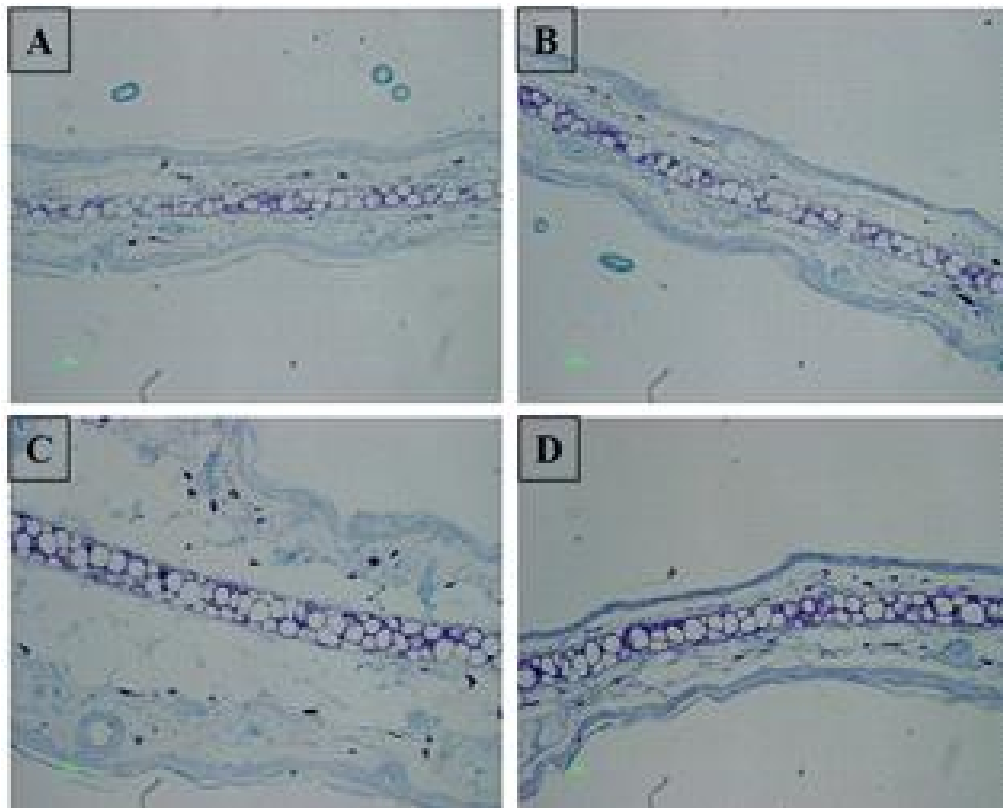


Fig. 138. Histopathology of ear tissue (Toluidine Blue staining) in Mast cells of SB-induced systemic anaphylaxis. The thickness of ear tissue was measured by Toluidine Blue staining assay. C57bl/6n\_Nr: normal; CT\_CTL: cholera toxin-induced control; CT-PN 5\_10mg: cholera toxin-induced Peanut extract; CT-CGE 5\_10mg: cholera toxin and Peanut extract -induced *Canavalia gladiata* extract.



## 5) Cholera toxin에 의해 유도된 마우스 모델에서 PBMC의 절대 총 세포수

마우스의 PBMC 세포에서 flow cytometry 분석을 통해 세포빈도를 Lymph.&Neutrophils 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 총 세포 수를 산출하였다. 그 결과 cholera toxin 유도하여, 땅콩추출물을 처리한 대조군의 PBMC에서 Neutrophils이 3 배정도 증가하였고, 작두콩을 처리한 군에서는 정상군과 비슷한 수준으로 감소를 보임을 확인하였다 (Fig. 139).

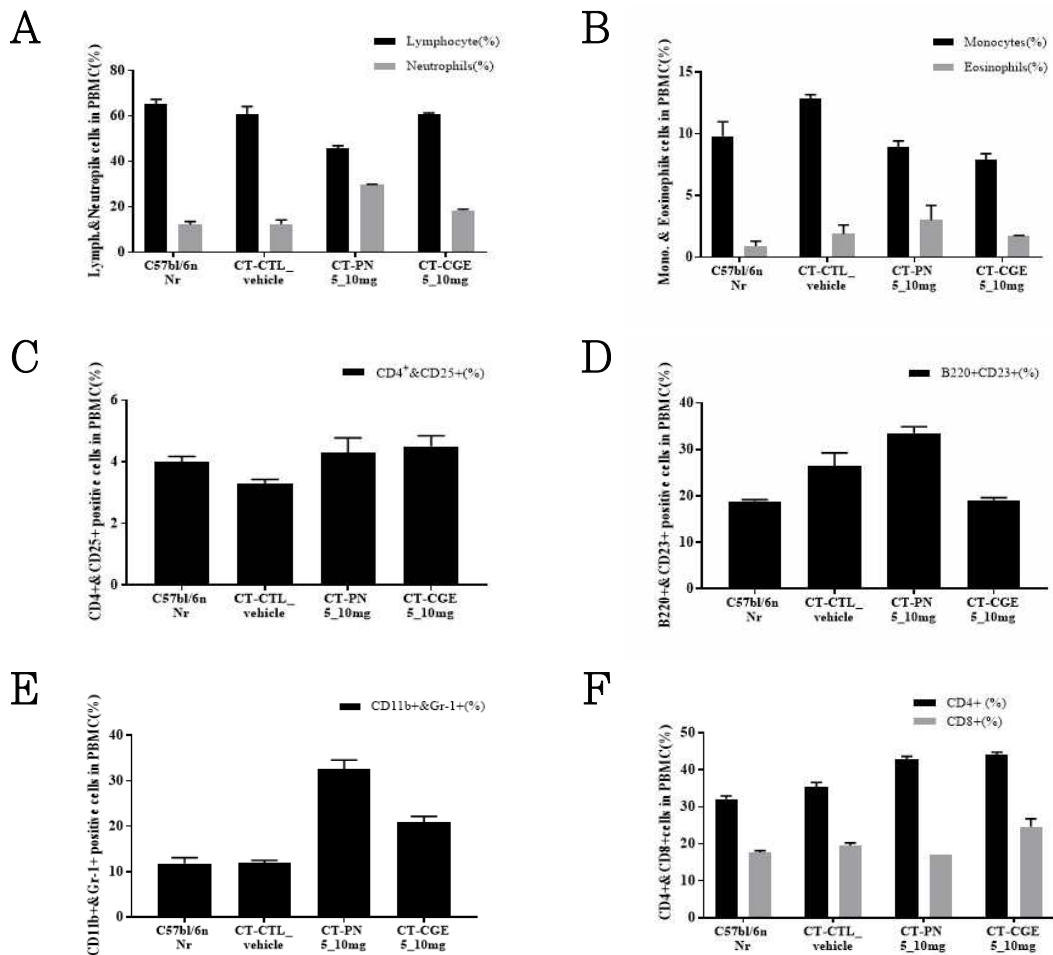


Fig. 139. Effects of CGE treatment on the changes in total absolute numbers of T cells in the PBMC of C57bl/6 mice with cholera toxin-induced systemic anaphylaxis food allergy mouse model. The PBMC cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were isolated from the systemic anaphylaxis food allergy mice, washed twice with PBS, and analyzed by flow cytometry. Total absolute numbers of CD4+CD8+ (A), (B) and CD4+CD25+ (C), (D) and B220+CD23+ (C), (D) cells in the C57bl/6n mice. C57bl/6n\_Nr: normal; CT\_CTL: cholera toxin-induced control; CT-PN 5\_10mg: cholera toxin-induced Peanut extract; CT-CGE 5\_10mg: cholera toxin-induced *Canavalia gladiata* extract. ## $p < 0.005$ , ### $p < 0.0005$  vs Nor; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs CTL.

## 6) Cholera toxin에 의해 유도된 마우스 모델에서 MLN의 절대 총 세포수

마우스의 MLN 세포에서 flow cytometry 분석을 통해 세포빈도를 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 총 세포 수를 산출하였다. 그 결과 cholera toxin 유도하여, 땅콩추출물을 처리한 대조군의 MLN의 Eosinophil 증가하였으며, 작두콩을 처리한 군에서는 감소를 보임을 확인하였다. B220+CD23+ 세포 또한 이와 같은 경향을 나타냈다 (Fig. 140).

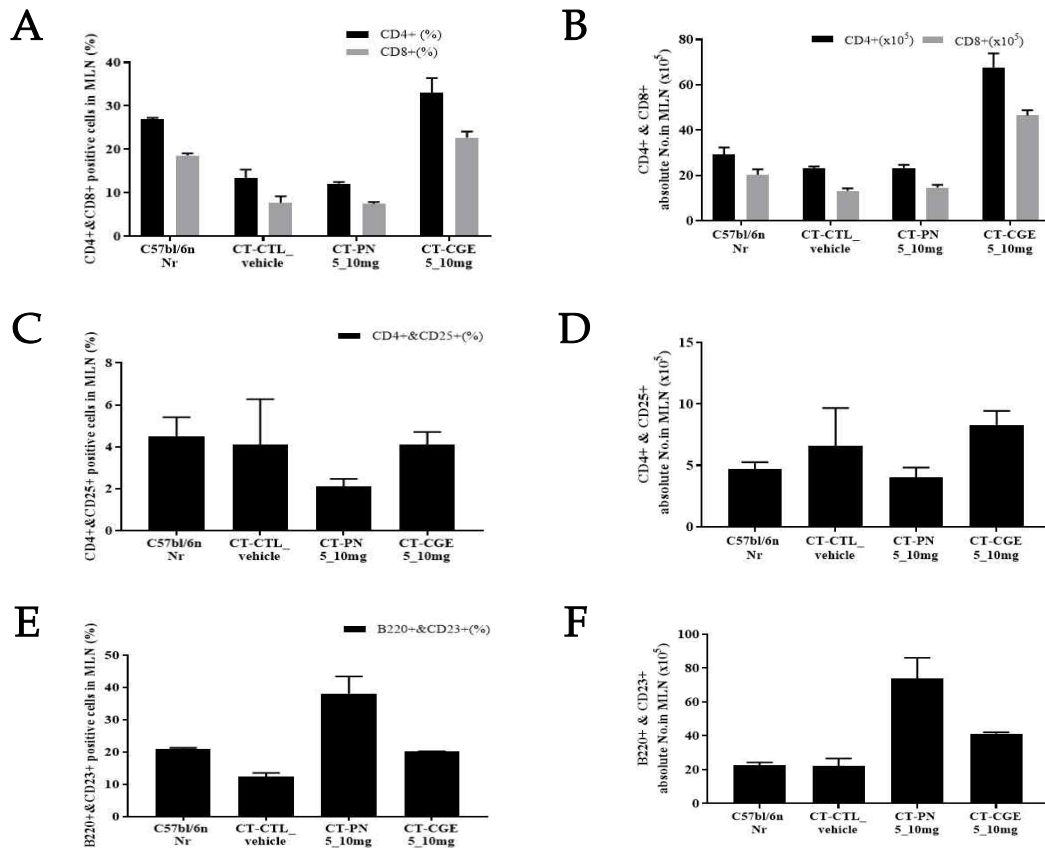


Fig. 140. Effects of CGE treatment on the changes in total absolute numbers of T cells in the MLN of C57bl/6 mice with cholera toxin-induced systemic anaphylaxis food allergy mouse model. The MLN cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were isolated from the systemic anaphylaxis food allergy mice, washed twice with PBS, and analyzed by flow cytometry. Total absolute numbers of CD4+CD8+ (A), (B) and CD4+CD25+ (C), (D) and B220+CD23+ (E), (F) cells in the C57bl/6n mice. C57bl/6n\_Nr: normal; CT\_CTL: cholera toxin-induced control; CT-PN 5\_10mg: cholera toxin-induced Peanut extract; CT-CGE 5\_10mg: cholera toxin-induced *Canavalia gladiata* extract. ## $p < 0.005$ , ### $p < 0.0005$  vs Nor; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs CTL.

## 7) Cholera toxin에 의해 유도된 마우스 모델에서 spleen의 절대 총 세포수

마우스의 분리한 비장세포에서 flow cytometry 분석을 통해 세포빈도를 백분율 (%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 총 세포 수를 산출하였다. 그 결과 cholera toxin 유도하여, 땅콩추출물을 처리한 대조군의 MLN의 CD11b+/Gr-1+ 세포가 증가하였으며, 작두콩을 처리한 군에서는 감소를 보임을 확인하였다 (Fig. 141).

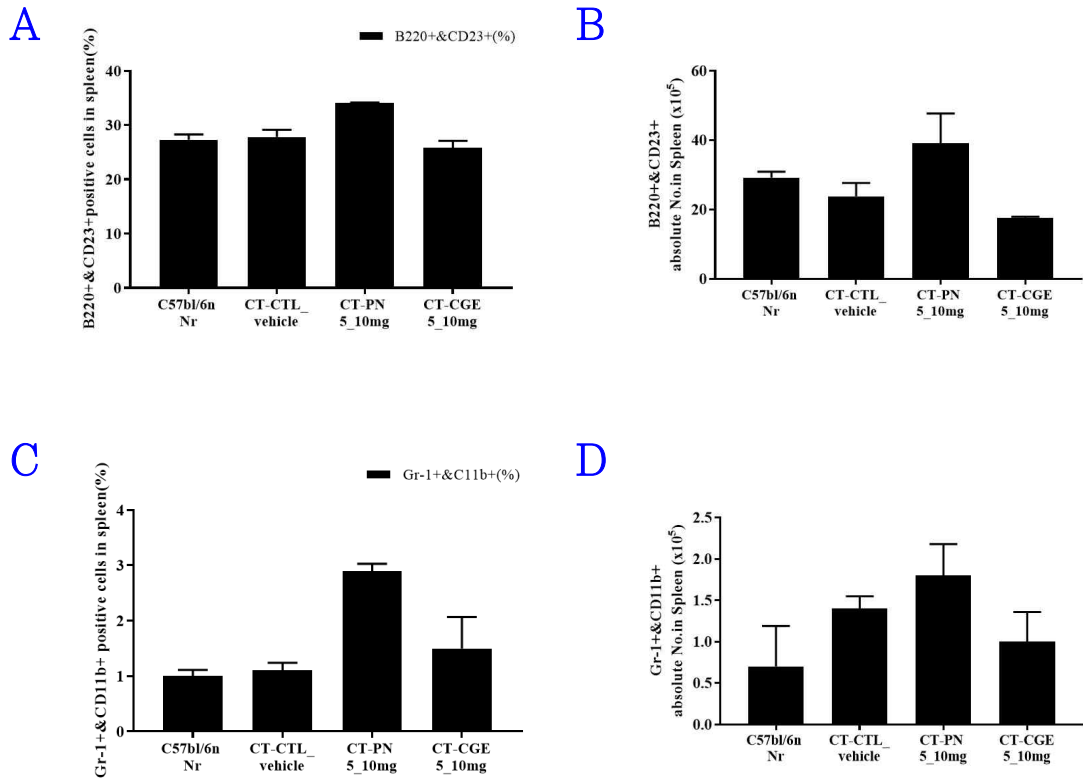


Fig. 141. Effects of CGE treatment on the changes in total absolute numbers of T cells in the spleen of C57bl/6 mice with cholera toxin-induced systemic anaphylaxis food allergy mouse model. The spleen cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were isolated from the systemic anaphylaxis food allergy mice, washed twice with PBS, and analyzed by flow cytometry. Total absolute numbers of B220+CD23+ (A), (B) and CD11b+Gr-1+ (C), (D) cells in the C57bl/6n mice. C57bl/6n\_Nr: normal; CT\_CTL: cholera toxin-induced control; CT-PN 5\_10mg: cholera toxin-induced Peanut extract; CT-CGE 5\_10mg: cholera toxin-induced *Canavalia gladiata* extract. ## $p < 0.005$ , ### $p < 0.0005$  vs Nor; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs CTL.

아. Promoter assay 및 electrophoretic mobility shift assay(EMSA)를 이용한 transcription factor 활성 분석

- 1) 후보 물질 (작두콩/우엉 소재조합 추출물)을 처리한 세포로부터 nuclear extract를 분리한 후  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP와 DNA polymerase I의 Klenow 효소를 사용하여 3'-말단을 fill up 하여 probe를 labeling.
- 2) RAW264.7세포주에서 LPS로 자극 후 JW 혼합물을 50 mg/kg와 100 mg/kg 처리하여 항염 전사인자인 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 binding activity를 EMSA로 분석한 결과, 우리의 결과에서는 JW 혼합물을 50 mg/kg와 100 mg/kg 처리군에서 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 binding activity가 대조군 (LPS-control)과 큰 차이를 나타내지 않아 직접적인 항염 효과는 나타내지 않았다.

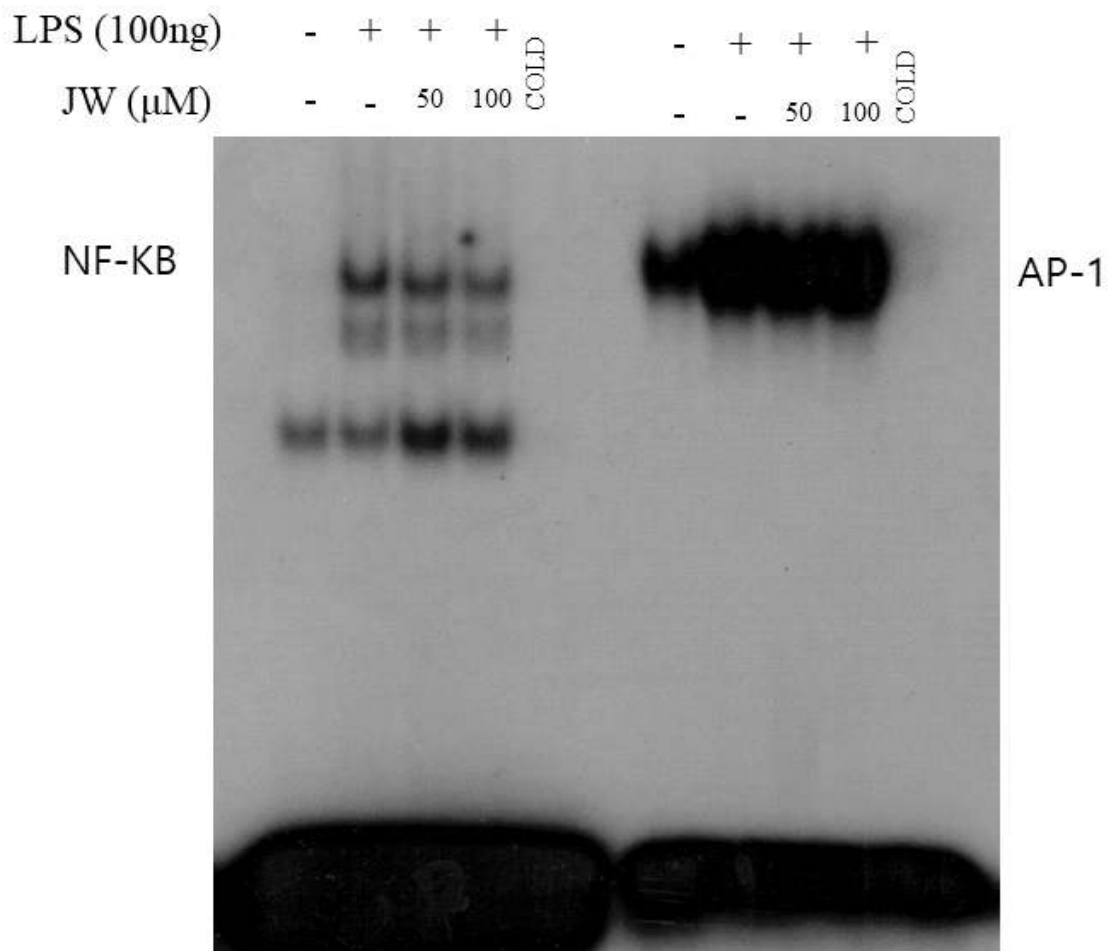


Fig. 142. Effect of JW extract on NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in LPS-induced RAW264.7 macrophages. (a) RAW264.7 cells were pretreated with JW (50, or 100  $\mu$ g/mL) for 1 h and then stimulated with LPS for 2 h. Nuclear extracts were prepared and evaluated for NF- $\kappa$ B and AP-1 using EMSA. JW: CGE and ALE mixture at 1:4 ratio.

## 자. 세포이동능 분석(wound healing assay)

- 1) 세포의 이동능력을 알아보기 위해, wound healing assay를 이용함.
- 2) MC38 (murine colon cancer cell line)에 대한 샘플의 cell migration 억제 효과를 샘플 투여 12시간 후에 확인해본 결과, Control (26.5%), JW (23.82%), Lupeol(36.53%), Daucosterol(35.06%), Lupeol+ Daucosterol (24.93%) 의 migration 퍼센트를 확인하였다. Control과 비교하여 Lupeol과 Daucosterol의 cell migration퍼센트는 증가하였지만, JW와 Lupeol+Daucosterol 샘플에서는 p.value는 나오지 않았지만 cell migration이 감소된 것을 확인하였다. 이 결과는 JW, 그들의 성분인 daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물은 항염증 효과, 면역증진활성 및 항암 효과를 확인하였다. JW의 이러한 효과는 lupeol과 daucosterol의 효과로 기인한다는 것을 시사한다. JW와 Lupeol+ Daucosterol이 colon cancer의 migration을 억제함을 지지할 수 있다.

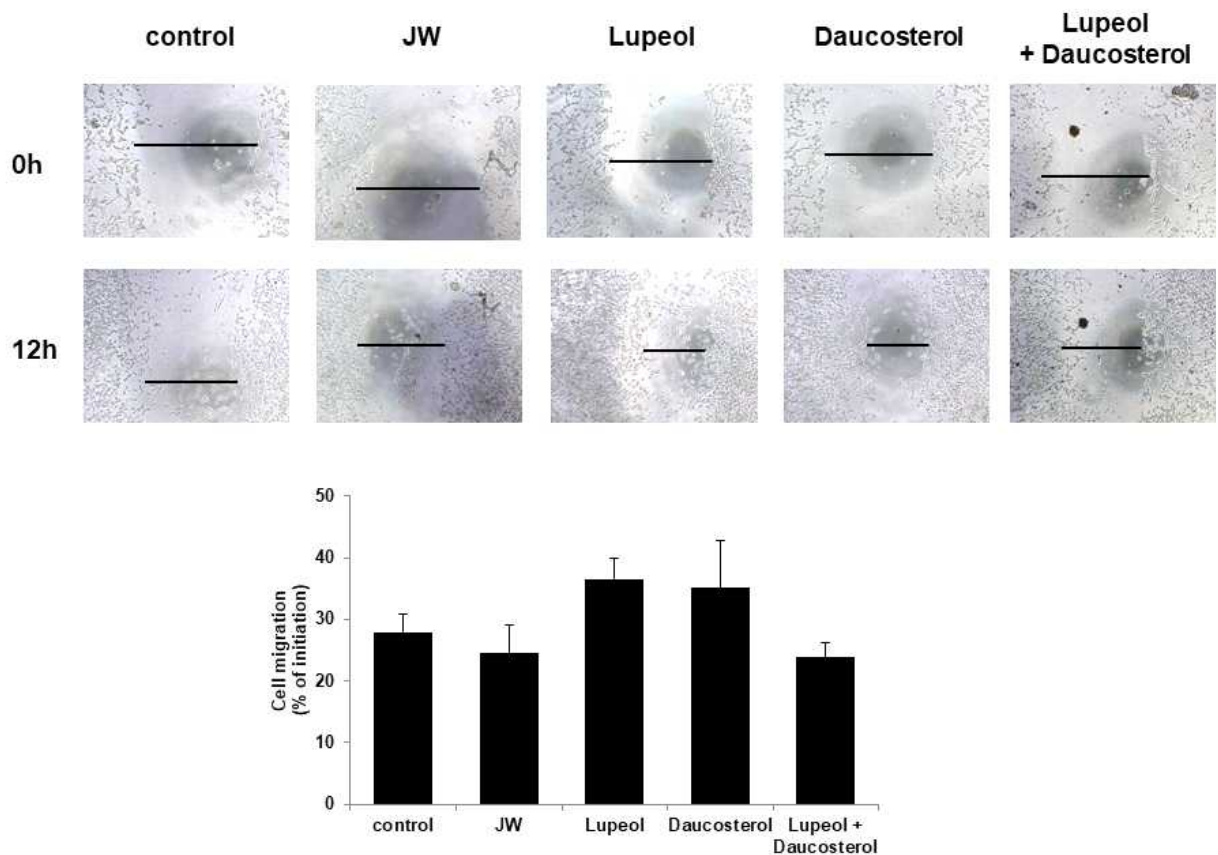


Fig. 143. Image-based monitoring of MC38 cell line migration. Imaging was performed over 20 hr using phase contrast and 4x magnification. Kinetic images shown for cells treated with JW: CGE and ALE mixture at 1:4 ratio. JW: daucosterol. luepol+daucosterol: lepeol and daucosterol mixture at 1:4 ratio. Data were expressed as the mean  $\pm$ SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.05$  vs Con.

## 2. 작두콩추출물등복합물 및 분리된 활성 물질의 효능 검증

가. RAW 264.7 세포주에서 LPS 처리 후 작두콩추출물등복합물 및 활성 유도체 후보 물질의 항산화 활성 및 면역증진 활성평가

1) 작두콩추출물 및 우엉추출물과 작두콩추출물등복합물, 작두콩과 우엉에서 분리한 활성 후보 성분(Arctigenin, Isoorientin, Genistin)의 세포독성 평가 및 처리 농도 설정

가) RAW264.7 cell 및 여러 가지 세포에 작두콩 (J) 및 우엉 추출물 (W) 과 작두콩 추출물등복합물 (작두콩추출물:우엉추출물=1:4) (JW), 홍삼 (H) 을 각각 10, 50, 100, 200, 400 µg/ml, 활성 후보 성분인 Arctigenin (Arc)을 0.25, 0.5, 1, 2, 4 µg/ml, Isoorientin (Iso) 과 Genistin (Gen)을 1.25, 2.5, 5, 10, 20 µg/ml의 농도로 처리하여 세포독성 시험 진행 (Fig. 144).

나) 작두콩추출물 및 우엉 추출물과 작두콩과 우엉에서 분리한 활성 후보 성분의 독성을 확인하고 적정 시험 농도를 확립하기 위해 다양한 세포주에 농도별로 처리한 후 48시간 뒤에 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 독성을 보이는 농도를 제외하고 작두콩과 우엉추출물, 작두콩추출물등복합물 (작두콩추출물:우엉추출물=1:4), 홍삼을 각각 100, 200 µg/ml, Arctigenin을 0.1, 1 µg/ml, Isoorientin과 Genistin을 5, 10 µg/ml 의 농도로 처리하여 이후 실험을 진행하였다 (Fig. 145).

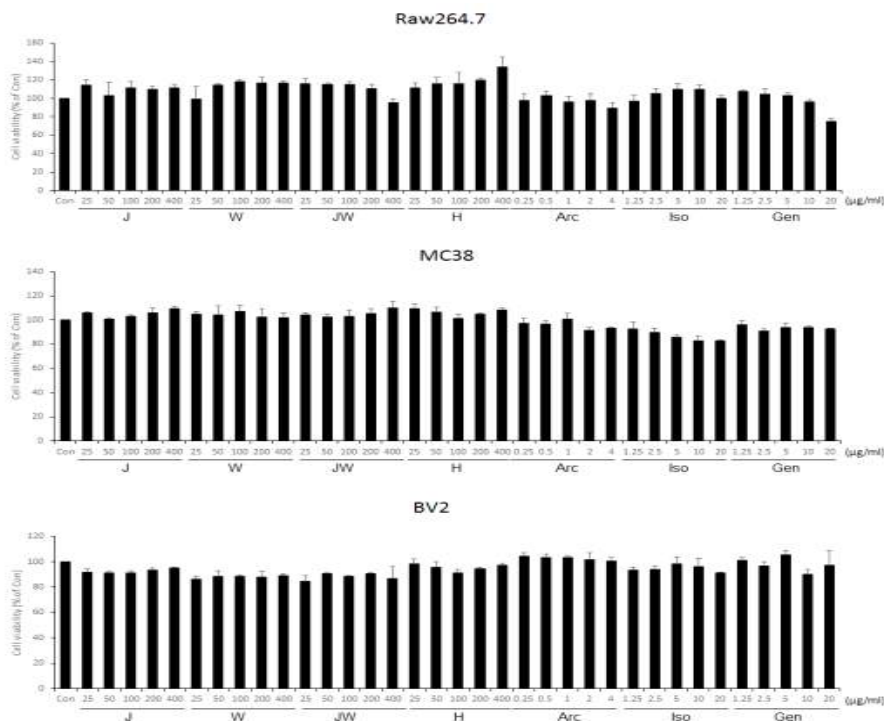


Fig. 144. 다양한 세포주에서 작두콩추출물 및 우엉 추출물, 작두콩추출물등복합물, 홍삼과 작두콩과 우엉에서 분리한 활성성분 처리에 의한 독성 시험

2) 작두콩 및 우영추출물과 작두콩추출물등복합물, 작두콩과 우영에서 분리한 활성 후보 성분(Arctigenin, Isoorientin, Genistin)의 ROS 및 NO 생성량 평가

작두콩 추출물에 의한 면역 활성 지표 물질을 확인하기 위해 RAW264.7 세포주에 작두콩과 우영 추출물, 작두콩추출물등복합물, 홍삼과 작두콩과 우영에서 분리한 활성 후보 성분 들을 각각 농도별로 처리하고 LPS (500ng/ml)를 함께 처리하였다. LPS에 의해 증가한 ROS 생성량이 각각의 처리 물질에 의해 유의적으로 감소하였고, 작두콩추출물등복합물을 혼합한 물질을 처리 하였을 때 가장 많이 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 145). 하지만 NO 생성량에서는 통계학적 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 Genistin이 ROS 생성량과 NO 생성량이 가장 감소 효과를 나타냄 (Fig. 146).

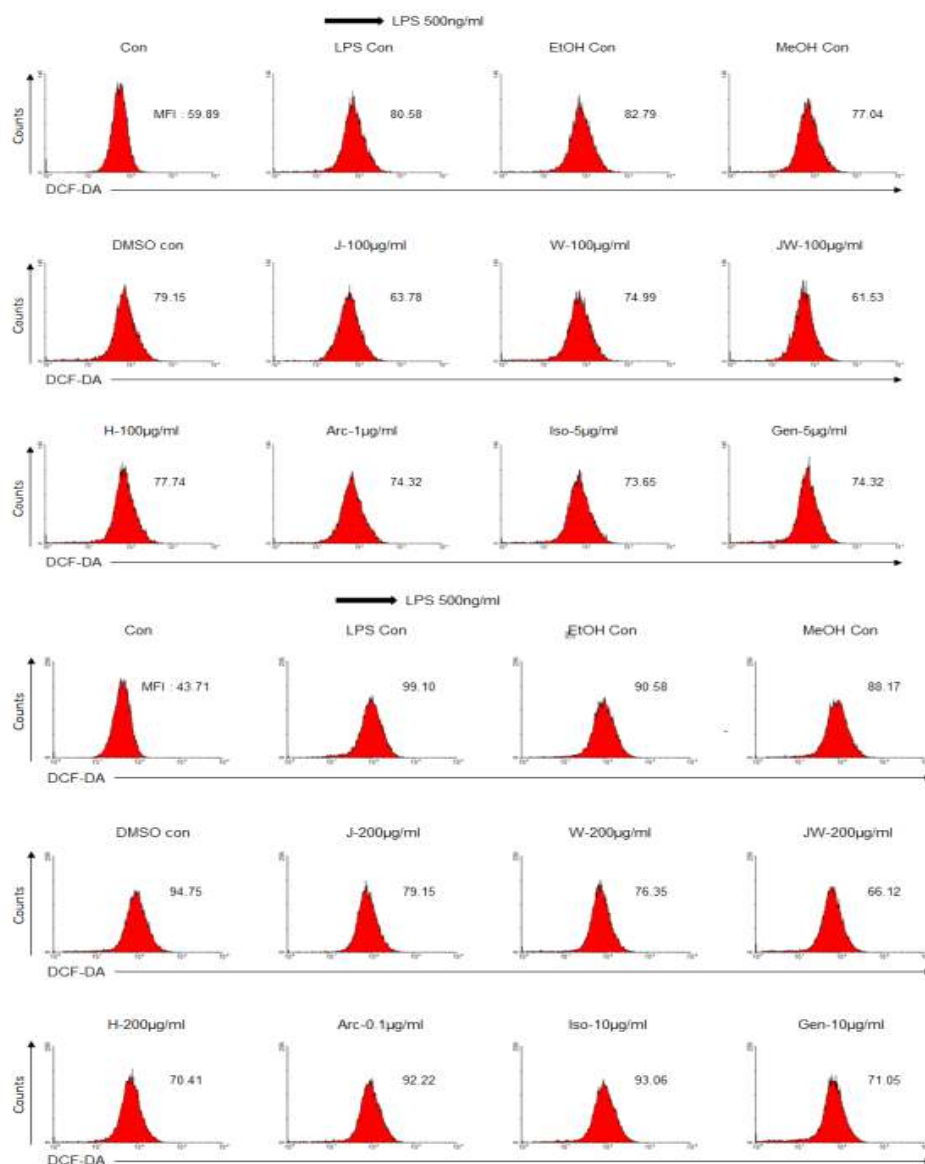


Fig. 145. 작두콩 및 우영 추출물, 작두콩추출물등복합물, 홍삼과 활성성분 처리에 의한 ROS 생성량 측정

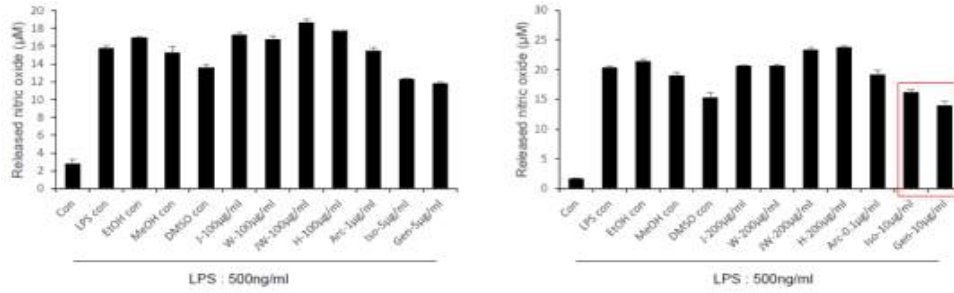


Fig. 146. 작두콩 추출물과 우영 추출물 및 활성성분 처리에 의해 생성된 활성산소 및 NO 측정

### 3) 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS 처리 후 작두콩추출물등복합물 및 활성 물질 (Chicoric acid 및 Lupeol)에 의한 항산화 활성 및 면역증진 활성

가) 작두콩추출물등복합물에 의한 면역세포의 활성화를 확인하기 위해 RAW264.7 세포주에 작두콩추출물등복합물을 농도별로 처리하고 ROS 측정 시약인 DCFH-DA 10mM로 반응시킨 후, FACScallibur 장비로 측정하여 작두콩추출물등복합물에 따른 ROS 생성능을 확인하였고 RAW264.7 cell에 작두콩추출물등복합물을 농도별로 처리한 후 24 시간 뒤에 세포 배양액을 수확하여 96well plate에 옮기고 NO kit의 동량의 griess reagent를 혼합하여 흡광도 540nm에서 NO를 측정함 (Fig. 147).

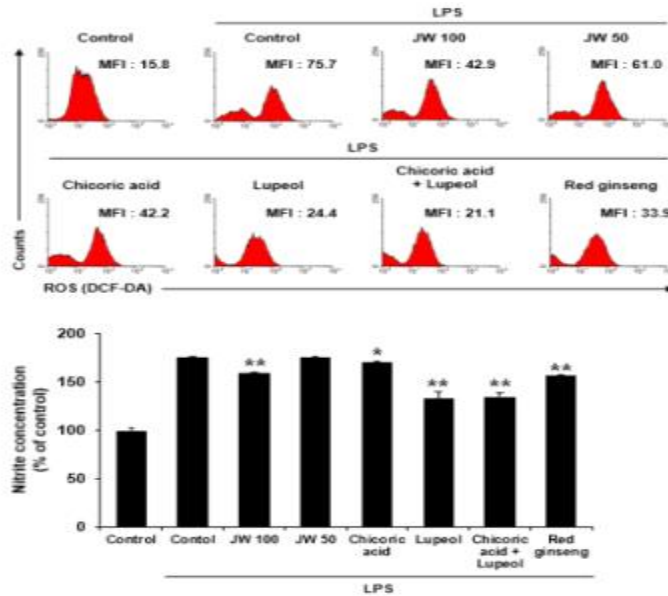


Fig. 147. 작두콩추출물등복합물 및 효능 유도체 후보물질에 의한 ROS 및 NO 생산의 변화 확인

나) 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리한 후 작두콩추출물등복합물 (작두콩추출물:우영추출물=1:4) 및 유도체 후보물질에 의한 항산화 활성 및 면역증진 활성을 확인하였음. 그 결과, LPS에 의해 증가된 ROS가 작두콩추출물등복합물의 처리에 의해 감소됨을 확인함 (Fig. 147). 또한 작두콩 및 우영 추출물의 활성 유도체 후보물질인 Chicoric acid 및 Lupeol에 의해 ROS가 감소됨을 확인함. 작두콩추출물등복합물이 작두콩 및 우영 추출물의 단독 처리와 비교하여 synergic



효과를 보이는 것과 마찬가지로, Chicoric acid 및 Lupeol 혼합처리에서도 synergic 효과를 보임을 알 수 있음. 또한 LPS에 의해 증가된 NO 생산이 작두콩 추출물등복합물에 의해 감소되었으며, 활성 유도체 후보물질인 Chicoric acid 및 Lupeol의 처리에 의해 NO의 생산이 감소됨을 확인함 (Fig. 147). ROS의 결과와 마찬가지로, LPS에 의해 증가된 NO 생산이 Chicoric acid 및 Lupeol의 혼합처리에 의해 감소됨을 확인하였음 (Fig. 147).

다) 이 결과를 통해 작두콩추출물등복합물 (작두콩추출물:우영추출물=1:4) 및 활성 유도체 후보물질인 Chicoric acid와 Lupeol 항산화 및 면역증진 활성을 가지고 있음을 알 수 있음.

## 나. 부동화 마우스 모델에서 유도체 후보 물질 처리에 의한 면역세포 및 면역 관련 사이토카인 활성 증진 확인

### 1) 작두콩과 우영 지표성분의 면역 증진 효능 검증을 위한 부동화 마우스 모델 제작 가) 부동화 마우스 모델 제작

#### (1) 시험 방법

(가) C57/BL6 마우스에 확립된 조건으로 그룹 별로 5마리 씩 각각 관리 하에 21일간 작두콩 지표성분(Lupeol, 10 mg/kg), 우영 지표성분 (Chicoric acid, 10 mg/kg), 우영 지표성분 (Isochlorogenic acid A, 10 mg/kg), 작두콩 지표성분 : 우영 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) (5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg)을 매일 경구 투여

(나) 2시간 뒤에 부동화 튜브에 넣어 2시간 동안 고정하여 매일 2시간씩 21일간 부동화 스트레스를 유발

#### (2) 시험 시료

(가) 시료 1: 작두콩 지표성분(Lupeol) (농도 10 mg/kg)

(나) 시료 2: 우영 지표성분(Chicoric acid) (농도 10 mg/kg)

(다) 시료 3: 우영 지표성분(Isochlorogenic acid A) (농도 10 mg/kg)

(라) 시료 4: 작두콩 지표성분 : 우영 지표성분(Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4)

(농도 5mg/kg 10mg/kg, 20mg/kg),

#### (3) 시료 투여량

(가) 작두콩추출물 내 Lupeol 함량 : 1.87%

(나) 우영추출물 내 Isochlorogenic acid A 함량 : 0.4%

(다) 최종 투여량 환산

⑤ 작두콩추출물 :  $1/5 \times 1.87 = 0.374$

⑥ 우영추출물 :  $4/5 \times 0.4 = 0.32$

⑦ 혼합성분 투여량이 10mg/kg일때 Lupeol (5.4mg) + Chicoric acid(4.6mg)/kg으로 투여

2) 부동화 마우스 모델에서 PBMC와 각 면역기관 (PBMC, DLN, spleen) 세포를 분리하여 FACS 분석

부동화 마우스 모델에서 분리한 각 면역기관의 세포에서 T cell, B cell, NK cell, macrophage 등 세포의 활성화 및 수 변화를 확인하기 위해 각각의 마커가 되는 세포표면분자들에 대한 항체를 반응 시킨 후 유세포 분석기(FACS)를 통해 분석함.

가) 부동화 마우스의 PBMC에서는 C57bl/6\_Nr과 부동화 IM\_S-IM\_S-control에 비해 작두콩과 우영의 지표성분을 투여한 모든 실험군에서 활성화된 CD4+/CD25+가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 작두콩 지표성분:우영 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) 20mg/kg 투여군에서 가장 크게 활성화된 CD4+/CD25+가 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 148).

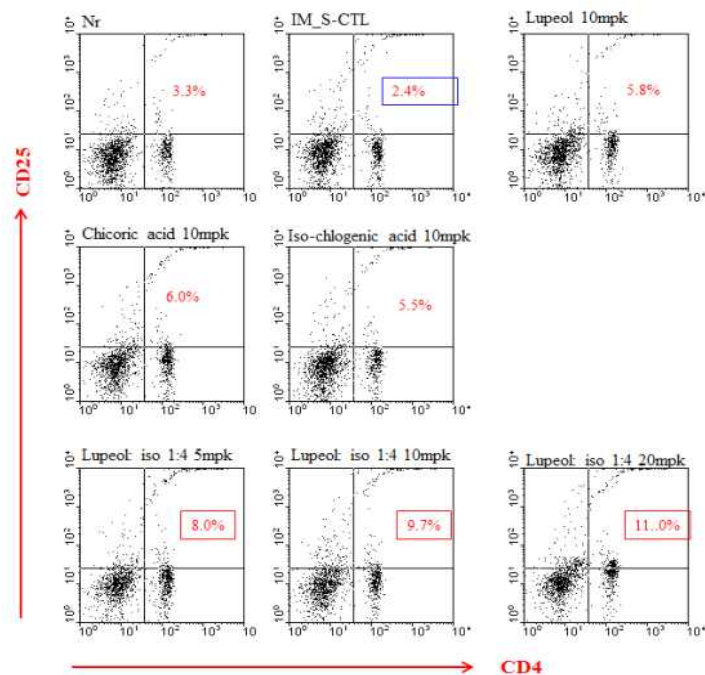


Fig. 148. 작두콩과 우영 지표성분을 투여한 부동화 마우스에서 분리한 PBMC에서 CD4+ & CD25+ 면역 세포의 활성화 확인

나) 부동화 마우스의 DLN에서는 C57bl/6\_Nr에 비해 작두콩 지표성분 : 우영 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A)을 1:4비율로 5 mg/kg, 10mg/kg, 10mg/kg을 투여한 모든 실험군에서 CD4 (CD4 Th cell marker)이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 작두콩 지표성분 : 우영 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) 20mg/kg 투여군에서 가장 CD4+와 CD8+ 활성세포수가 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 149).

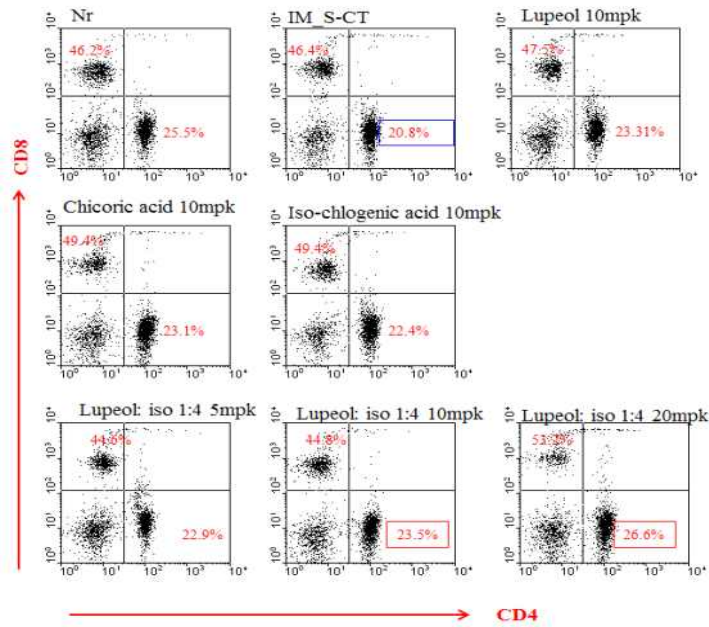


Fig. 149. 작두콩과 우영 지표성분을 투여한 부동화 마우스에서 분리한 DLN에서 CD4+ & CD8+ 면역 세포의 활성화 확인

다) 부동화 마우스의 DLN에서는 IM\_S-control에 비해 작두콩 지표성분:우영 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A)을 1:4비율로 5mg/kg, 10 mg/kg, 20mg/kg을 투여한 모든 실험군에서 CD4+/CD25+가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 작두콩 지표성분 : 우영 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A=1:4) 20mg/kg 투여군에서 가장 CD4+/CD25+ 활성이 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 150).

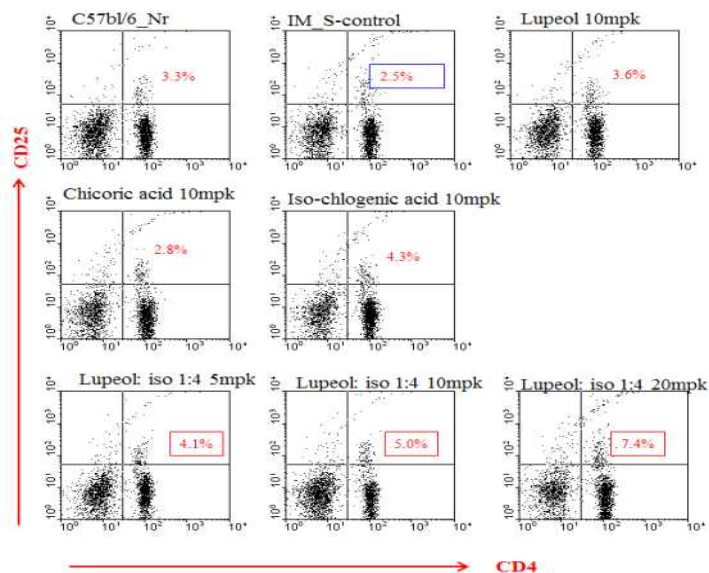


Fig. 150. 작두콩과 우영 지표성분을 투여한 부동화 마우스에서 분리한 DLN에서 CD4+ & CD25+ 면역 세포의 활성화 확인

라) 부동화 마우스의 spleen에서는 C57bl/6\_Nr에 비해 작두콩 지표성분 : 우영 지표 성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A)을 1:4비율로 5 mg/kg, 10mg/kg, 10mg/kg을 투여한 모든 실험군에서 CD4 (CD4 Th cell marker)이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 작두콩 지표성분 : 우영 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A=1:4) 10mg/kg과 20mg/kg 투여군에서 가장 CD4+ 활성세포수가 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 151).

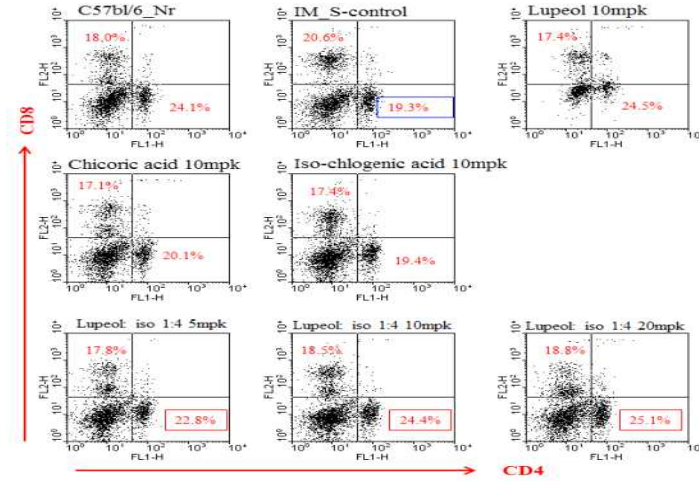


Fig. 151. 작두콩과 우영 지표성분을 투여한 부동화 마우스에서 분리한 spleen에서 CD4+ & CD8+ 면역 세포의 활성 확인

마) 부동화 마우스의 spleen에서는 C57bl/6\_Nr에 비해 작두콩과 우영의 지표성분을 투여한 모든 실험군에서 NK1.1+/NKG2D+가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 작두콩 지표성분(Lupeol, 10 mg/kg)과 우영 지표성분(Isochlorogenic acid A, 10 mg/kg) 투여군에서 NK1.1+ / NKG2D+가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 작두콩 지표성분 : 우영 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) 10mg/kg과 20mg/kg 투여군에서 가장 NK1.1+/NKG2D+ 활성세포수가 농도의존적으로 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 152).

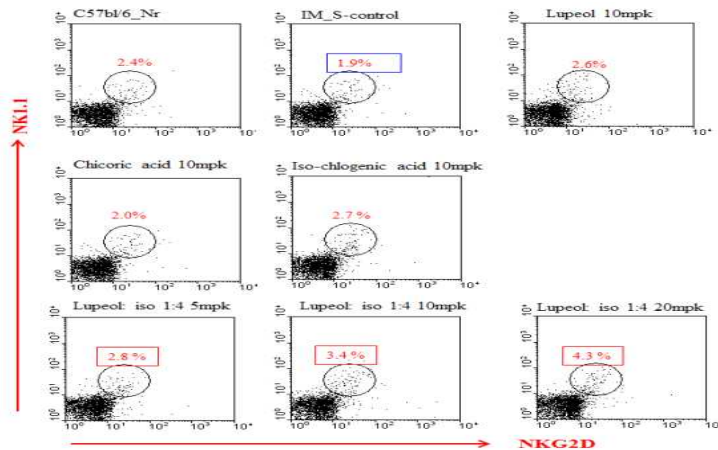


Fig. 152. 작두콩과 우영 지표성분을 투여한 부동화 마우스에서 분리한 spleen에서 NK1.1+ & NKG2D 면역 세포의 활성 확인

3) Real-Time PCR을 통해 부동화 마우스 모델에서 작두콩과 우영 지표성분 투여에 의한 비장의 염증 cytokine 관련 유전자 발현 변화 확인

비장에서는 염증 사이토카인 중 TNF- $\alpha$ , IL-6, 그리고 IL-1 $\beta$  mRNA에서 C57bl/6\_Nr에 비해 부동화 IM\_S-control에서 mRNA 유전자 발현이 증가를 확인할 수 있었다. TNF- $\alpha$  mRNA의 발현은 부동화 IM\_S-control에 비해 작두콩 지표성분(Lupeol, 10 mg/kg)을 투여한 군에서 통계학적으로 유의성 있게 정상그룹 수준 정도로 회복되는 것을 확인하였다 ( $p < 0.01$ , Fig. 153A). 또한 작두콩 지표성분 : 우영 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) 5mg/kg, 10mg/kg 투여군에서도 부동화 IM\_S-control에 비해 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 통계적 유의성 있게 감소를 나타내었다 (Fig. 153A). IL-6와 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현은 부동화 IM\_S-control에 비해 작두콩 지표성분(Lupeol, 10 mg/kg)을 투여한 군에서 정상그룹 수준 정도로 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 153B, C). 또한 작두콩 지표성분 : 우영 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg 투여군에서도 농도의존적으로 부동화 IM\_S-control에 비해 IL-6 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) 와 IL-1 $\beta$  ( $p < 0.01$ ) mRNA의 발현이 통계적 유의성 있게 감소를 나타내었다 (Fig. 153B, C).

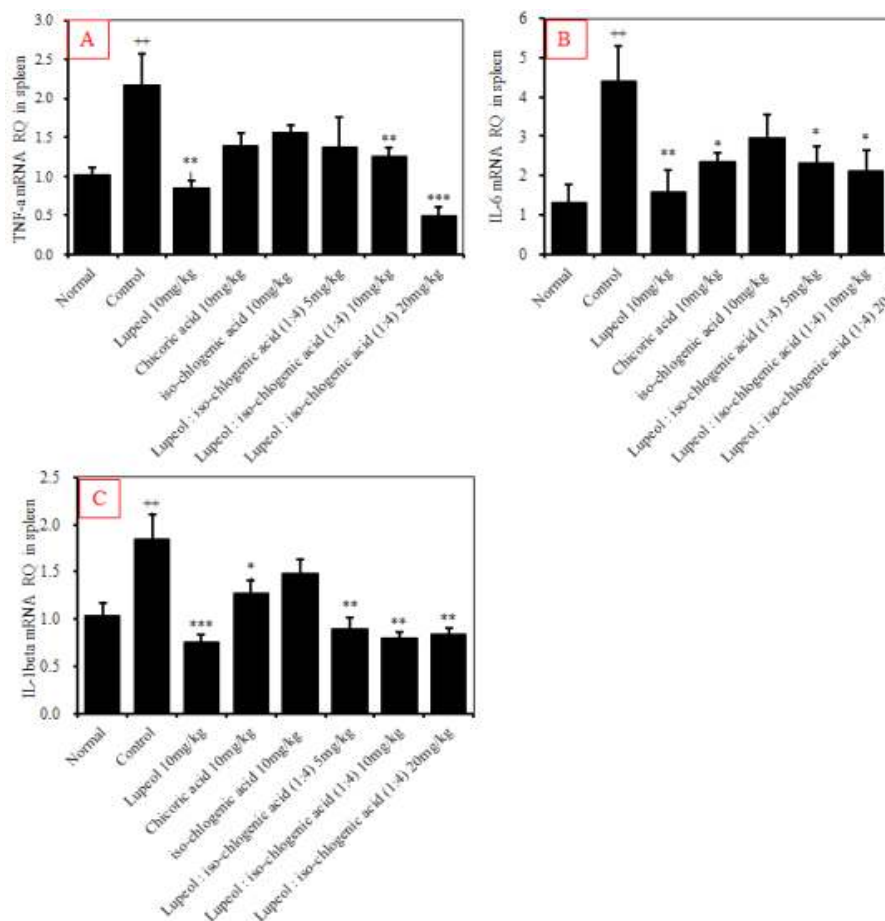


Fig. 153. 작두콩과 우영 지표성분을 투여한 부동화 마우스에서 분리한 spleen에서 염증 사이토카인 유전자 발현

4) Real-Time PCR을 통해 부동화 마우스 모델에서 작두콩과 우영 지표성분 투여에 의한 비장의 면역 T세포 활성화 cytokine 관련 유전자 발현 변화 확인

비장에서는 면역 T세포 활성화 사이토카인 (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ )중 IL-2 (Fig. 154C), IFN- $\gamma$  (Fig. 154A), IL-10 (Fig. 154D), 그리고 TGF- $\beta$  (Fig. 154B) mRNA에서 C57bl/6\_Nr에 비해 부동화 IM\_S-control에서 mRNA 유전자 발현이 감소를 확인할 수 있었다. 그리고 IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$  mRNA의 발현은 부동화 IM\_S-control에 비해 작두콩 지표성분(Lupeol, 10 mg/kg)투여군과 작두콩 지표성분 : 우영 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg 투여군에서 통계적 유의성 있게 증가를 나타내었다 (Fig. 154 A-D).

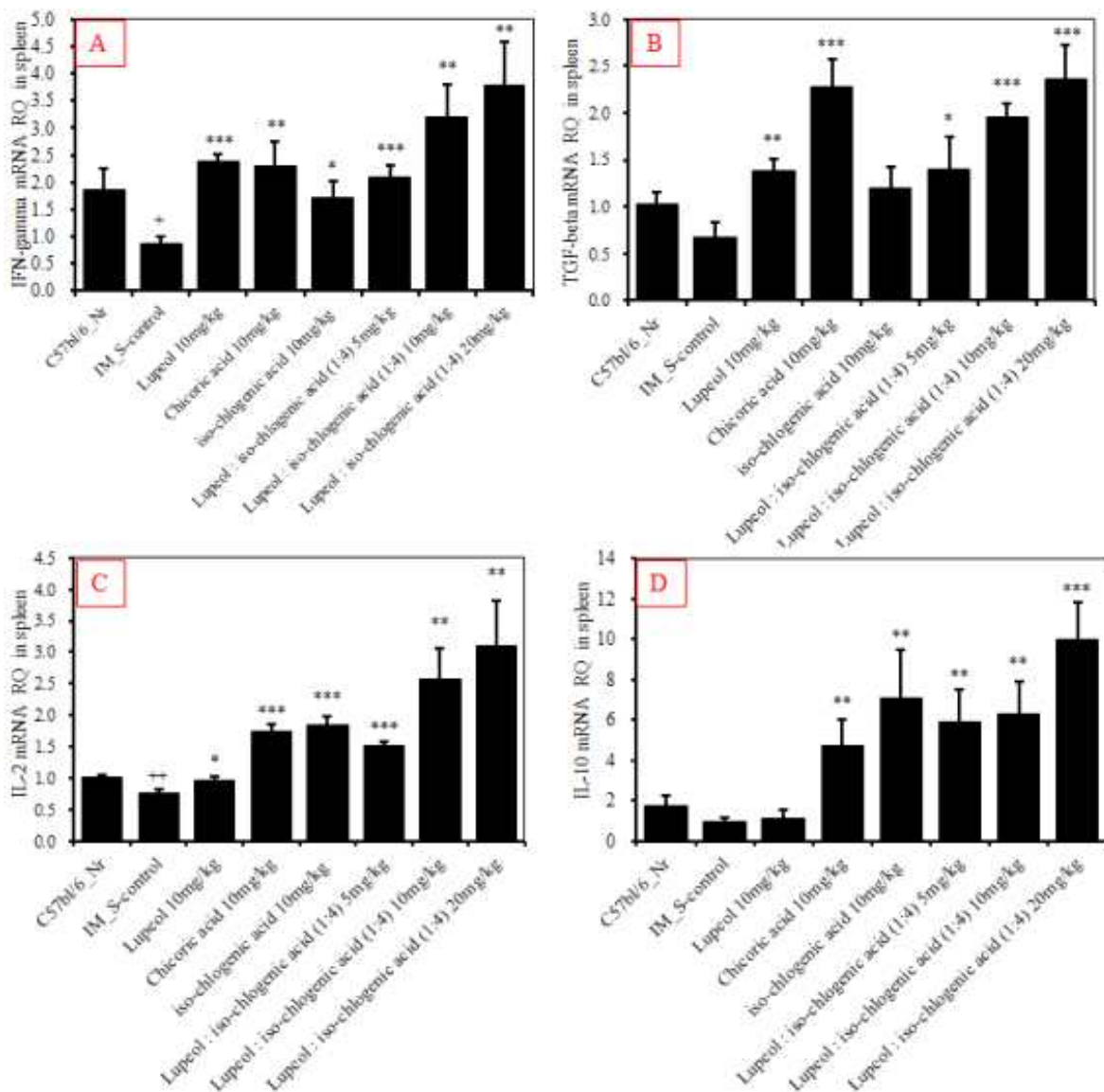


Fig. 154. 작두콩과 우영 지표성분을 투여한 부동화 마우스에서 분리한 spleen에서 면역활성 T 세포 사이토카인 유전자 발현

## 5) 부동화 마우스를 이용한 효능 성분의 연구 결과 의의 및 고찰

가) 부동화 동물모델에 작두콩 지표성분(Lupeol, 10 mg/kg), 우엉 지표성분 (Chicoric acid, 10 mg/kg), 우엉 지표성분 (Isochlorogenic acid A, 10 mg/kg), 작두콩 지표성분 : 우엉 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) (5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg) 투여 면역증진을 확인함.

나) 그 결과, PBMC, Spleen, DLN에서 작두콩 지표성분:우엉 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) 투여군이 농도의존적으로 가장 크게 활성화되었으며, CD4+ Th cell, 그리고 CD4+/CD25+ 활성세포수가 증가를 나타내었음. 특히, 비장에서 NK1.1+/NKG2D+ 활성세포수는 작두콩 지표성분 : 우엉 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) 10mg/kg과 20mg/kg 투여군에서 농도의존적으로 증가된 것을 확인할 수 있었다. 그리고 비장에서는 염증 싸이트 카인 중 TNF- $\alpha$ , IL-6, 그리고 IL-1 $\beta$  mRNA 유전자 발현은 작두콩 지표성분 : 우엉 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg 투여군에서도 농도의존적으로 부동화 IM\_S-control에 비해 IL-6 (p<0.05, p<0.01) 와 IL-1 $\beta$  (p<0.01) mRNA의 발현이 통계적 유의성 있게 감소를 나타내었다. 그리고 IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$  mRNA의 발현은 부동화 IM\_S-control에 비해 작두콩 지표성분(Lupeol, 10 mg/kg)투여군과 작두콩 지표성분 : 우엉 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4) 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg 투여군에서 통계적 유의성 있게 증가를 나타내었다.

다) 따라서, 작두콩 지표성분인 Lupeol과 우엉 지표성분 Isochlorogenic acid A이 활성성분으로 예측되고 작두콩 지표성분 : 우엉 지표성분 (Lupeol : Isochlorogenic acid A = 1:4)이 혼합시 단독 투여군보다 상승효과 (synergic effect)를 나타냄을 알 수 있었다.

다. 암 세포주를 활용한 질환 모델에서 작두콩추출물등복합물 및 활성성분의 면역조절 활성 탐색

1) 작두콩과 우엉 추출물의 혼합물과 그들의 성분의 항염증, 면역 활성 등 면역조절에 대한 효과와 항암 효과 평가

가) 작두콩추출물(CGЕ)의 세포생존율, ROS 및 NO 생성에 미치는 영향

(1) 작두콩추출물(CGЕ)의 항염증 효과를 조사하기 위하여 RAW264.7 세포에서 LPS 유도에 의해 생성되는 ROS와 NO에 대한 억제 효과를 관찰하였다. ROS 생성량은 DCF-DA의 산화에 따른 DCF의 형광도 측정방법을 이용하여 측정하였다.

(2) LPS 처리군의 DCF 형광도는  $82.29 \pm 2.00$ 로 RAW264.7 세포만 배양한 대조군의 DCF 형광도  $47.33 \pm 2.82$ 에 비해 유의하게 ROS생성이 증가된 것을 확인하였다 ( $p < 0.001$ ). CGE 15, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 DCF 형광도는 각각  $78.55 \pm 2.77$ ,  $82.46 \pm 2.60$ ,  $61.55 \pm 1.10$ 로 측정되었으며, LPS 처리군과 비교시 CGE 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 ROS 생성이 유의하게 감소되었다 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 155A and B). NO 방출량을 측정한 결과, RAW264.7 세포만 배양한 대조군의 NO농도는  $9.96 \pm 0.22 \mu\text{M}$ , LPS 처리군의 NO 농도는  $27.32 \pm 0.47 \mu\text{M}$ 로 LPS 자극에 의해 통계적으로 유의하게 NO 생성 증가한 것을 확인하였다 ( $p < 0.005$ ). CGE은 10, 50, 100 ( $\mu\text{g/ml}$ )에서 각각  $25.19 \pm 0.73 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ),  $24.93 \pm 0.20 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ),  $23.97 \pm 0.27 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ )로 나타나, LPS 처리군과 비교시 유의하게 NO 방출이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 155C). CGE의 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CGE을 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 처리 후, 세포 생존율을 측정한 결과 대조군의 세포생존율 100%을 기준으로 CGE 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $97.83 \pm 1.53\%$ ,  $98.55 \pm 3.70\%$ ,  $86.88 \pm 3.70\%$ ,  $89.31 \pm 3.38\%$ ,  $86.34 \pm 7.50\%$ 의 세포 생존율을 나타내 세포의 생존율에 변화가 없었다 (Fig. 155D).

(3)

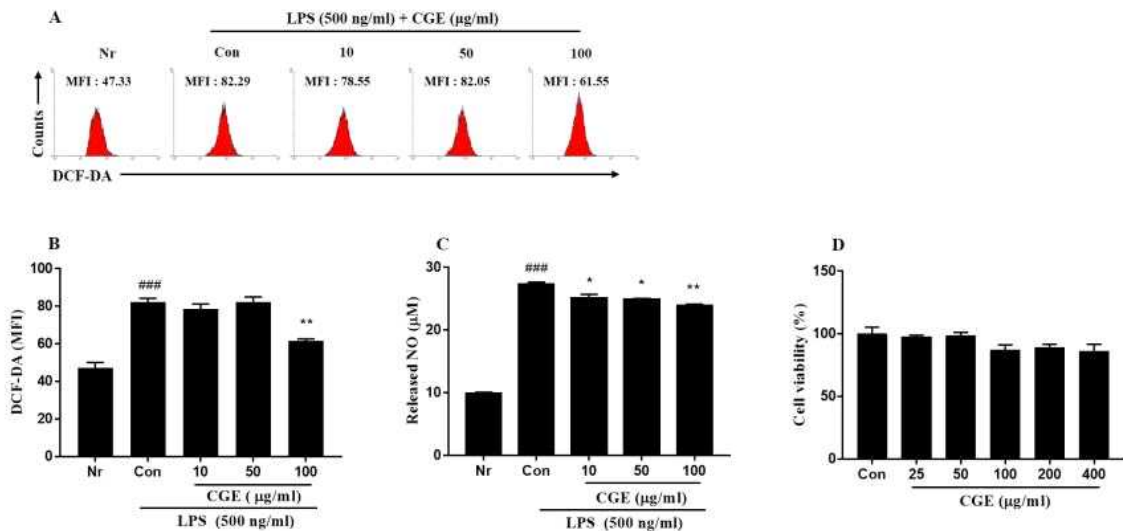


Fig. 155. The effects of CGE on the LPS-induced ROS and NO production, and cell viability in RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells were treated with CGE at various concentration in absence or presence of 500 ng/ml LPS for 24h. (A) Flow cytometry and (B) fluorescence intensity of ROS were analysed by flow cytometry after staining with DCFH-DA. (C) Released NO was analyzed by Griess reagent. (D) Cell viability was measured using MTS assay. Nr: normal; Con: control; CGE: *Canavalia gladiata* extract. Data were expressed as the mean  $\pm$ SD.  $^{###}p < 0.005$  vs Nr;  $^{**}p < 0.01$  vs Con.

(4)



## 나) 작두콩추출물(CGЕ)의 면역증진에 미치는 영향

(1) 작두콩추출물(CGЕ)의 면역 증진에 대한 영향을 조사하기 위해 CGЕ을 경구투여한 마우스에서 비장, 림프절, 장간막림프절 및 복강침출세포 (PEC)에서 각각 세포를 분리한 후 유세포 분석기를 이용하여 면역세포의 population을 확인하였다.

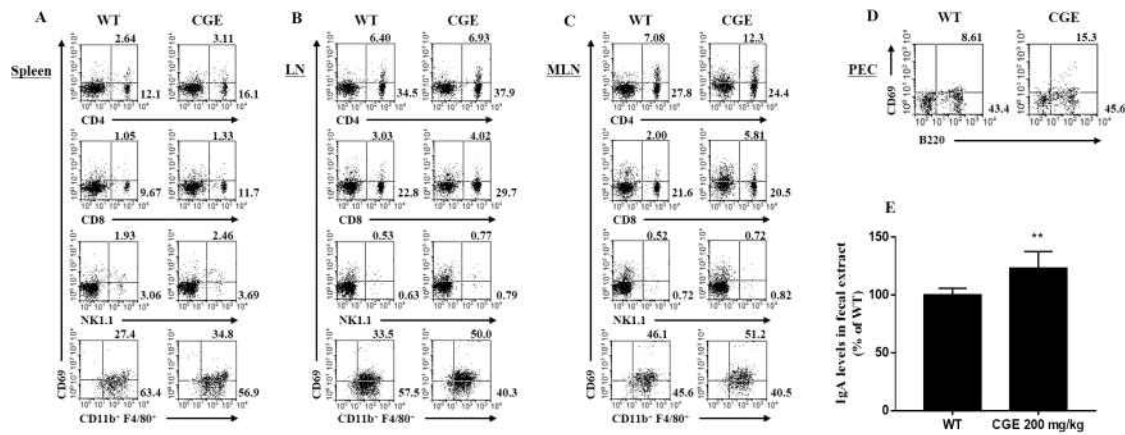


Fig. 156. The distributions of immune cells in the various immune tissues and production of immunoglobulins of mice administered with CGE.

The total cells were isolated from (A) Spleen, (B) Lymph node (LN), (C) Mesenteric lymph node (MLN), (D) Peritoneal exudate cells (PEC) of CGE-treated mice. The flow cytometry analysis was performed after staining with the indicated antibodies. The numbers in each quadrant indicate the cell percentages. (E) IgA levels in feces extract were measured by ELISA assay after interacting with anti-mouse IgA-HRP antibody. WT: normal mice; CGE: *Canavalia gladiata* extract. Data were expressed as the mean  $\pm$ SD. \*\* $p < 0.01$  vs WT.

(2) 대조군과 CGE 200 mg/kg 투여군의 비장세포에서 CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>T세포는 각각 2.64%와 3.11%로, CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>T세포는 각각 1.05%와 1.93%로, NK1.1<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포는 각각 1.93%와 2.46%로, CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포는 각각 27.4%와 34.8%로 나타났으며, CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>T세포와 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포가 증가됨을 확인하였다 (Fig. 156A). 림프절 세포에서 대조군과 CGE 200 mg/kg 투여군의 CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>T세포는 6.40%와 6.93%를, CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>T세포는 3.03%와 4.02%, NK1.1<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포는 0.53%와 0.77%를, CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포는 33.4%와 50.0%를 각각 차지하였으며, CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>T세포, CD69<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T세포와 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포가 증가됨을 확인하였다 (Fig. 156B). 장간막림프절세포에서 대조군과 CGE 200 mg/kg 투여군의 CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>T세포는 7.08%와 12.3%로, CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>T세포는 2.00%와 5.81%로, NK1.1<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포는 0.52%와 0.72%로, CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포는 46.1%와 51.2%로 나타났으며, 림프절세포에서와 유사하게

CD4+/CD69+ T세포, CD8+/CD69+ T세포와 활성화된 대식세포가 증가됨을 확인하였다 (Fig. 156C). 하지만 NK세포는 대조군과 비교하여 CGE 200 mg/kg 투여에 의한 population의 차이는 관찰되지 않았다. PEC에서의 B세포는 대조군과 도두 투여군 각각 8.61%와 15.3%로 나타났으며, 대조군과 비교하여 CGE 200 mg/kg가 PEC복강침출세포에서 B세포를 증가시키는 것을 확인하였다 (Fig. 156D). 또한, 대변에서 CGE 200 mg/kg 투여군의 IgA의 농도는 대조군을 기준으로  $123.32 \pm 14.41\%$ 로 유의하게 증가되는 것을 확인하였다 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 156E).

#### 다) 작두콩추출물(CGЕ)와 우영추출물(ALE) 혼합물 (CGAL)에 의한 ROS 및 NO 생성에 미치는 영향

- (1) CGE와 ALE의 혼합 비율을 확정하기 위하여, RAW264.7 세포에서 ROS와 NO 생성을 측정하였다.

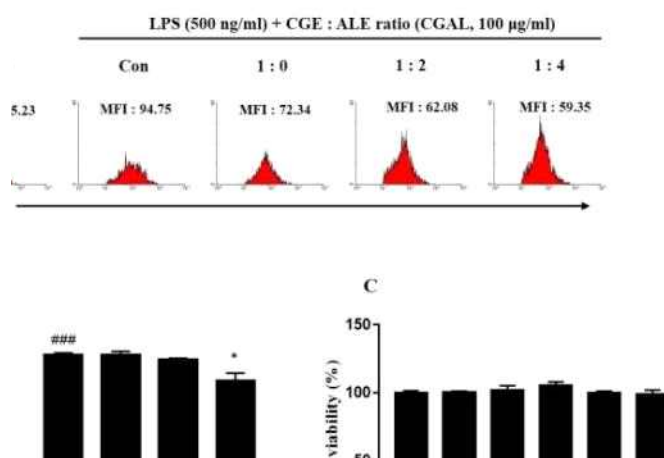


Fig. 157. The effects of CGE and ALE mixture (CGAL) on ROS and NO production in RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells were treated with CGE and ALE (CGAL) at various mixture ratio in absence or presence of 500 ng/ml LPS for 24h. (A) The production of ROS was analysed by flow cytometry after staining with DCFH-DA. (B) The released NO was analyzed by Griess reagent systems. Nr: normal; Con: control; CGE: *Canavalia gladiata* extract. ALE: *Arctium lappa* extract. Data were expressed as the mean  $\pm$  SD.  $###p < 0.005$  vs Nr;  $*p < 0.05$  vs Con.

- (2) CGE와 ALE의 혼합비율을 1:0, 1:2, 1:4의 비율로 처리하였다. ROS 생성량을 측정한 결과 LPS 처리군의 DCF 형광도는 94.75로 RAW264.7세포만 배양한 대조군의 DCF 형광도 55.23에 비해 ROS생성이 증가된 것을 확인하였다. CGE와 ALE의 1:0, 1:2, 1:4의 비율 혼합 처리 시 DCF 형광도는 각각 72.34, 62.08, 59.35로 측정되었으며, LPS 처리군과 비교 시 CGE와 ALE을 1:4의 비율로 혼합하여 처리하였을 때 ROS의 생성량이 확연히 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 157A). NO 방출량을 측정한 결과, RAW264.7 세포만 배양한 대조군의 NO농도는  $0.62 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 였고, LPS 처리군의 NO 농도는  $8.46 \pm 0.09 \mu\text{M}$ 로 LPS 자극에 의해 유의하게 NO 방출이 증가되었다 ( $p < 0.005$ ).

CGE와 ALE을 1:0, 1:2, 1:4 비율로 혼합하여 처리하였을 때 NO방출량은 각각  $8.46 \pm 0.20 \mu\text{M}$ ,  $8.21 \pm 0.08 \mu\text{M}$ ,  $7.18 \pm 0.52 \mu\text{M}$ 로 측정되었고 LPS 처리군과 비교시 NO방출량 또한 CGE와 ALE를 1:4의 비율로 혼합하여 처리하였을 때 유의적으로 감소함을 확인하였다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 157B). ALE의 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 우영 추출물을 25, 50, 100, 200, 400 ( $\mu\text{g/ml}$ )의 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 대조군 100%를 기준으로 ALE 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $100.59 \pm 0.94\%$ ,  $102.29 \pm 4.19\%$ ,  $105.58 \pm 3.52\%$ ,  $100.20 \pm 1.50\%$ ,  $99.24 \pm 3.91\%$ 로 세포의 생존율에 변화가 없었다 (Fig. 157C).

라) 작두콩추출물:우영추출물=1:4 혼합물 (CGAL14) 및 성분 lupeol, chicoric acid, luepol과 chicoric acid (CA)의 혼합물 (lupeol+CA)의 ROS 및 NO 생성에 미치는 영향

- (1) 작두콩추출물(CGЕ) 및 우영추출물(ALE)의 성분인 lupeol과 chicoric acid의 ROS와 NO 생성에 미치는 영향을 확인함.
- (2)

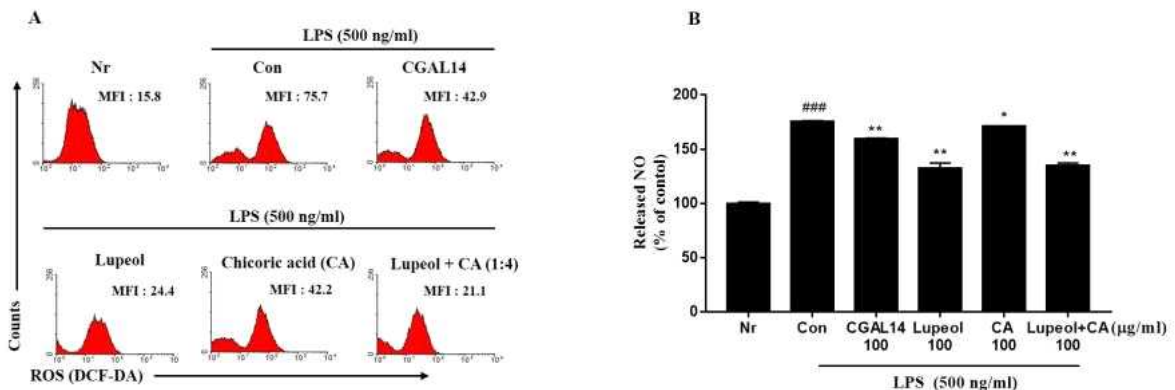


Fig. 158. The effects of CGAL, lepeol, chicoric acid, and lepeol+CA on ROS and NO production in RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells were treated with CGAL, lepeol, CA, and lepeol and CA mixture (lupeol+CA) contractionin absence or presence of 500 ng/ml LPS for 24h. (A) The production of ROS was analysed by flow cytometry after staining with DCFH-DA. (B) The released NO was analyzed by Griess reagent systems. Nr: normal; Con: control; CGAL14: CGE and ALE mixture at 1:4 ratio. CA: chicoric acid. CA: chicoric acid. lepeol+CA: lepeol and chicoric acid mixture at 1:4 ratio. Data were expressed as the mean  $\pm$ SD. ### $p < 0.005$  vs Nr; \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs Con.

- (3) LPS 처리군의 DCF 형광도는 75.7로 대조군의 DCF 형광도 15.8에 비해 현저하게 ROS생성이 증가된 반면, CGAL14에서 DCF 형광도 42.9로 유의하게 ROS 생성이 감소함을 확인하였다. 또한, lupeol, chicoric acid, lupeol과 chicoric acid의 1:4 혼합물 (lupeol+CA)에서 각각 42.2, 24.4, 21.1로 나타

나 ROS의 생성량이 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 158A). ROS 생성 결과와 유사하게 NO 방출량 역시 대조군을 기준으로 LPS 유도에 의해 NO방출량이  $175 \pm 1.19\%$ 로 증가하였고 ( $p < 0.005$ ), CGAL14  $100 \mu\text{g/ml}$ , lupeol, chicoric acid, lupeol+CA  $100 \mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $156.80 \pm 0.48\%$  ( $p < 0.01$ ),  $132.76 \pm 7.88\%$  ( $p < 0.01$ ),  $171.18 \pm 0.38\%$  ( $p < 0.05$ ),  $135.05 \pm 3.88\%$  ( $p < 0.01$ ) 로 NO방출량이 LPS 처리군과 비교 시 유의적으로 감소함을 확인하였다 (Fig. 158B).

마) 대장암 모델에서 작두콩추출물:우영추출물=1:4 혼합물 (CGAL14), 성분 lupeol, chicoric acid(CA), lupeol+CA의 항암 효과

(1) 대장암 세포주 MC38를 이식한 대장암 동물모델에서 CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA투여에 의한 종양 부피와 중량의 결과임.

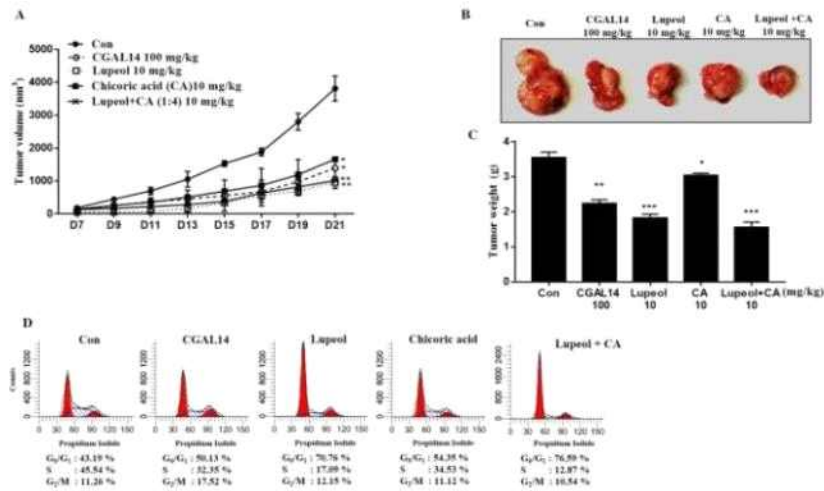


Fig. 159. The effects of CGAL, lupeol, chicoric acid, and lupeol+CA on tumor volume, weight and cell cycles in tumor bearing mice.

The mice were injected subcutaneously with MC38 murine colon cancer cell lines. (A) Tumor volume, (B) Representative picture of tumor, (C) Tumor weight. (D) The cell cycle progression was analyzed by flow cytometry after staining with PI. The cells were isolated from MC38 tumor. Con: tumor bearing mice injected with murine colon cancer cell lines MC38; CGAL14: CGE and ALE mixture at 1:4 ratio. CA: chicoric acid. lupeol+CA: lupeol and chicoric acid mixture at 1:4 ratio. Data were expressed as the mean  $\pm$ SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.05$  vs Con.

(2) 종양의 부피는 종양 대조군과 비교 시 CGAL14  $100 \text{ mg/kg}$ , lupeol  $10 \text{ mg/kg}$ , chicoric acid  $10 \text{ mg/kg}$ , c  $10 \text{ mg/kg}$  투여 후 감소를 나타내어 투여 21일 후에는 유의성 있는 종양 부피의 감소를 확인하였다 (Fig. 159A). 종양의 무게는 종양대조군에서  $3.55 \pm 0.27\text{g}$ , CGAL14  $100 \text{ mg/kg}$  투여군에서는  $2.25 \pm 0.18\text{g}$  ( $p < 0.01$ )를 보여 종양 무게가 유의하게 감소되었다. lupeol  $10 \text{ mg/kg}$  투여군, chicoric acid  $10 \text{ mg/kg}$  투여군, lupeol+CA  $10 \text{ mg/kg}$  투여군에서 각각  $1.83 \pm 0.18\text{g}$  ( $p < 0.005$ ),  $3.04 \pm 0.10\text{g}$  ( $p < 0.1$ ),  $1.57 \pm 0.24\text{g}$  ( $p < 0.005$ )

를 나타냈으며 이들의 투여에 의해 중앙대조군과 비교 시 유의하게 중앙 무게가 감소됨을 확인하였다 (Fig. 159B, C). CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA를 투여한 동물의 암 조직에서 분리한 세포에서 세포주기를 분석한 결과, G0/G1기는 대조군에서 46.19%를, CGAL14 100 mg/kg 투여군에서는 50.13%를 보였으며, lupeol 100 mg/kg 투여군, chicoric acid 100 mg/kg 투여군, lupeol+CA 100 mg/kg 투여군에서 각각 70.76%, 54.35%, 76.59%를 나타내 이들의 투여에 G1의 세포 분포가 증가하는 것을 확인하였다. S기는 대조군에서 45.54%를, CGAL14 100 mg/kg 투여군에서는 32.35%를 보였으며, lupeol 투여군 10 mg/kg, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군에서 각각 17.09%, 34.53%, 12.87%를 보였으며, 이들의 투여에 의해 S기 세포가 감소함을 확인하였다. G2/M기는 대조군에서 12.26%를, CGAL14 100 mg/kg 투여군에서는 17.52%를 보였으며, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군에서 각각 12.15%, 11.12%, 10.54%로 투여군간 차이가 없음을 확인하였다 (Fig. 159D).

**바) 대장암 모델에서 CGAL14, 성분 lupeol, chicoric acid, lupeol+CA에 의한 암 조직의 면역 활성화에 미치는 영향**

- (1) CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA 투여에 의한 대장암 조직으로 침윤된 면역세포의 population 결과임.
- (2) CD3+/CD8+T세포는 대조군에서 6.38%이었고 각각 8.17%, 8.53%, 8.76%, 10.1%로 나타나 이들의 투여에 의해 CD4+T세포 population이 증가됨을 확인하였다. CD3+/CD4+T세포는 대조군에서 1.80%, CGAL14 100 mg/kg 투여군, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군에서 각각 3.01%, 2.01%, 2.75%, 2.22%를 차지하고 있는 것이 관찰되었고 이들의 투여에 의해 CD8+T의 population이 증가됨을 확인하였다. CD8+/CD69+T세포는 대조군에서 2.29%이었고 CGAL14 100 mg/kg 투여군, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군에서 각각 8.17%, 8.53%, 8.76%, 10.1%로 이들 투여에 의해 CD8+의 활성이 증가된 것을 확인하였다. B220+/CD69+세포는 대조군이 1.76%, CGAL14 100 mg/kg 투여군, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군은 각각 1.75%, 1.26%, 2.14%, 1.80%로, chicoric acid 투여에 의해 B세포가 활성화됨을 확인하였다. CD11b+F4/80+/CD69+세포는 대조군이 23.4%, CGAL14 100 mg/kg 투여군, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군은 각각 32.4%, 36.9%, 35.2%, 37.2%를 나타내어 이들 투여에 의해 활성화된 대식세포가 증가됨을 확인하였다 (Fig. 160A). NK1.1+/CD69+세포는 대조군에서 7.58%이었고 CGAL14 100 mg/kg 투여군, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군은 각각

12.9%, 11.5%, 8.61%, 10.7%로 이들의 투여에 의해 활성화된 NK세포가 증가함을 확인하였다 (Fig. 160B). 또한, CGAL14 100 mg/kg, lupeol 10 mg/kg, chicoric acid 10 mg/kg, lupeol+CA 10 mg/kg를 투여한 동물의 비장에서 분리한 NK세포와NK-sensitive 세포인 YAC-1세포를 동시에 배양 후, YAC-1의 살해 활성을 측정된 결과 정상대조군에서  $37.65 \pm 2.13\%$ , 중앙대조군에서  $17.39 \pm 1.61\%$  ( $p < 0.005$ ) 를 보였으며 CGAL14 100 mg/kg 투여군, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군은 각각  $29.22 \pm 1.31\%$  ( $p < 0.005$ ),  $25.35 \pm 0.86\%$  ( $p < 0.01$ ),  $25.83 \pm 2.57\%$  ( $p < 0.01$ ),  $25.54 \pm 1.79\%$  ( $p < 0.01$ )를 보여 정상대조군과 비교 시 중앙세포의 세포 독성 능력이 유의하게 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 160C).

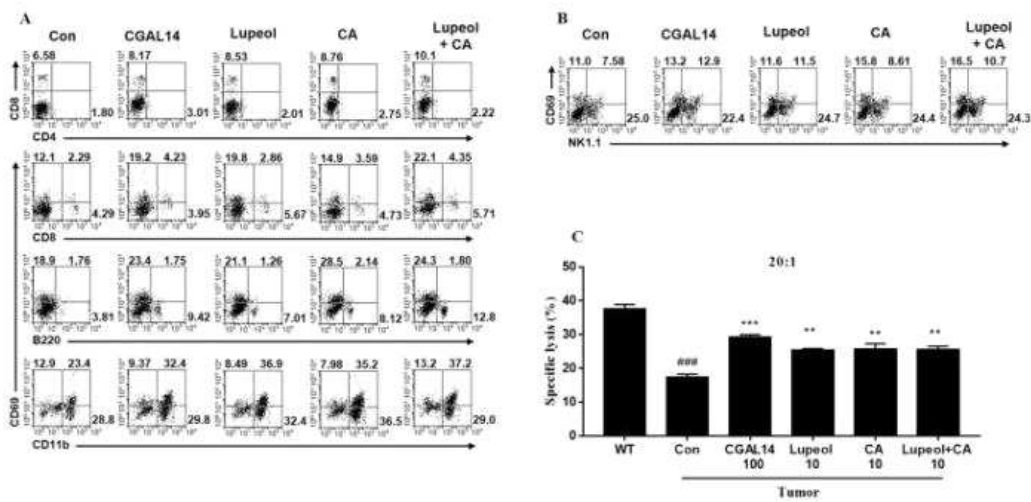


Fig. 160. The effects of CGAL, lupeol, chicoric acid, and lupeol and chicoric acid mixture on distributions of immune cells in the tumor of and NK cell activity in spleen of tumor bearing mice.

The mice were injected subcutaneously with MC38 murine colon cancer cell lines. The infiltrated cells were isolated from MC38 tumor at 21day after tumor injection.(A) The flow cytometry analysis ofCD4<sup>+</sup>T,CD8<sup>+</sup>T cell B cell and macrophages was performed after staining with the indicated antibodies. (B) The flow cytometry analysis of NK cell. The numbers in each quadrant indicate the cell percentages. (C) NK cell activity was determined by lactate dehydrogenase assay after splenocyte isolated from tumor bearing mice and YAC-1 cell were incubated for 4h. WT: normal mice;Con: tumor bearing mice injected with murine colon cancer cell lines MC38; CGAL14: CGE and ALE mixture at 1:4 ratio. CA: chicoric acid. lupeol+CA: lupeol and chicoric acid mixture at 1:4 ratio. Data were expressed as the mean  $\pm$ SD.### $p < 0.005$  vs WT; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.05$  vs Con.

## 2) 대장암 마우스 모델에서 작두콩추출물등복합물 및 활성성분의 항암 및 면역 효과 연구 결과의 의의 및 고찰

가) 본 연구는 면역기능에의 불균형에 의한 질병을 예방하기 위해 인체에 안전하면서도

면역기능을 증진시킬 수 있는 식품 소재로 도두와 우엉을 선정하여, *in vitro*와 *in vivo*모델에서 작두콩추출물(CGE), 작두콩추출물등복합물(CGAL14, 작두콩추출물:우엉추출물=1:4 혼합물), 이들의 성분인 lupeol, chicoric acid, lupeol+CA에 의한 항염증, 면역증진 및 항암효과를 연구한 결과는 다음과 같다.

## 나) 결과

- (1) 작두콩추출물등복합물(CGAL14, 작두콩추출물:우엉추출물=1:4 혼합물) 및 활성 유도체 후보물질의 면역조절 및 항암 효능을 확인하기 위해 마우스 대장암 세포주인 MC38 세포를 이용한 종양이식 마우스 모델을 제작하였음. 종양이식 마우스 모델을 제작하기 전 작두콩추출물등복합물 및 활성 유도체 후보물질을 2주 동안 경구 투여 하였으며, 이후 대장암 세포주를 이식 후 3주간 더 경구 투여 하였음. 3주간 종양의 크기를 관찰하였으며, 이후 마우스를 희생하여 면역조절 및 항암 효능을 분석하였음. 그 결과, 대조군과 비교하여 작두콩추출물등복합물을 경구 투여한 마우스 그룹에서 종양의 크기 및 무게가 감소되었으며, 활성 유도체 후보물질인 Chicoric acid 및 Lupeol을 경구 투여한 또한 종양의 크기 및 무게가 감소되었음. 또한 활성 유도체 후보물질의 단독 경구 투여한 그룹과 비교하여 혼합 경구 투여한 그룹에서 종양의 크기 및 무게가 크게 감소됨을 확인함. 이에 종양이식 마우스 모델의 종양조직으로부터 세포를 분리한 후 세포주기의 변화를 확인한 결과, 대조군과 비교하여 작두콩추출물등복합물을 경구 투여한 그룹에서 S-phase가 감소됨을 확인하였으며, 활성 유도체 후보물질인 Chicoric acid 및 Lupeol을 경구 투여한 그룹 또한 S-phase가 억제됨을 확인함. 활성 유도체 후보물질의 단독 경구 투여한 그룹과 비교하여 혼합 경구 투여한 그룹에서 S-phase가 크게 감소되었음. 이 결과를 통해, 작두콩추출물등복합물 및 활성 유도체 후보물질이 종양 이식 마우스 모델에서 암세포의 세포주기를 억제함으로써 항암 효능을 보이는 것으로 생각되며, 작두콩추출물등복합물과 마찬가지로 활성 유도체 후보물질의 단독 처리와 비교하여 혼합 처리가 synergic 효과를 보임을 알 수 있었음.
- (2) 종양이식 마우스 모델로부터 분리한 종양조직에서 면역세포의 침윤능력을 확인하기 위해 flow cytometry를 이용하여 다양한 면역세포들의 population을 확인하였음. 그 결과, 대조군과 비교하여 작두콩추출물등복합물을 경구 투여한 마우스 그룹에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 population 및 활성이 증가되었으며, 활성 유도체 후보물질인 Chicoric acid 및 Lupeol을 경구 투여한 그룹 또한 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 population 및 활성이 증가되었음. NK 세포 및 B 세포의 population 및 활성 또한 작두콩추출물등복합물과 활성 유도체 후보물질을 경구 투여한 그룹에서 모두 증가되었으며, 대식세포의 population 및 활성에서 같은 결과를 보임을 알 수 있었음. 이 결과를 통해, 작두콩추출물등복합물 및 활성 유도체 후보물질이 다양한 면역세포의 활성을 증가시키고 종양 조직으로의 침윤능력을 증가시키는 것으로 생각되어짐.

라. 마우스 점막 자가면역질환 모델에서 작두콩추출물등복합물 및 활성성분의 면역조절 활성 및 효능 확인

1) IBD 마우스 모델 제작을 통한 작두콩추출물등복합물의 면역 증진 효능 검증

가) DSS 유도 IBD 마우스 모델 제작

IBD는 장내 염증 및 궤양에 기인한 염증성 장 질환으로, 피 묻은 설사, 장 운동 장애 대장 길이 감소 등의 병적인 증상이 특징이다. 실험 연구에서, DSS 유도 IBD 모델은 IBD를 위한 치료 방법의 효능을 테스트하는데 널리 사용되는 표준 모델이다. 기존 실험 논문에 따르면 DSS를 처리한지 6 일 후에는, IBD 심각도에 따른 질병활성도 증가 및 염증성 사이토카인의 발현 증가가 알려져 있다. IBD의 치료에 사용되는 약물은 항생제, 면역 억제제, 항염증 약물 치료법을 포함하므로 다음과 같은 기작을 포함하는 약물의 효능 검증에도 사용된다.

나) DSS 유도 IBD 마우스 모델 체중변화 측정

DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 정상군에 비하여 체중 감소가 나타났고, 나머지 약물 투여군(작두콩, 우영, 작두콩추출물등복합물, 홍삼)에서도 정상군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 chlorogenic acid와 chicoric acid는 항바이러스, 항균 면역증강 효과를 가지게 하는 물질로 양성대조군으로 사용되었는데, 양성대조군에서도 정상군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 161).

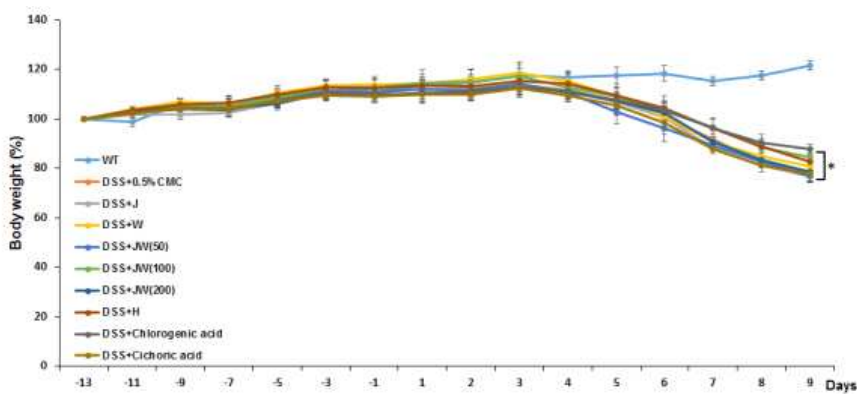


Fig. 161. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 작두콩추출물등복합물 투여에 따른 체중변화

다) DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 질병활성도 변화 관찰

Fig. 162은 질병활성도 (disease activity index, DAI) 변화를 그래프로 나타낸 것이다. DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 DSS를 유도한 지 5일, 7 일에서 정상군에 비하여 낮은 점수를 나타냈지만, 9일에서는 정상군과 비슷한 점



수를 나타내었다. 하지만 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다. 양성대조군인 chlorogenic acid와 chicoric acid 투여군은 9일에서 7점 이하의 점수를 나타내었고, 이는 통계학적으로 유의성을 나타내었다. 나머지 약물 투여군(우엉, 작두콩 우엉 혼합물, 홍삼)은 9일에서 양성대조군 점수보다 약간 높은 7점 이상의 점수를 보였고, 통계학적으로 유의성을 확인할 수 있었다. 또한 우엉 투여군은 9일에서 정상군 수준의 점수를 나타내었지만 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다 (Fig. 162).

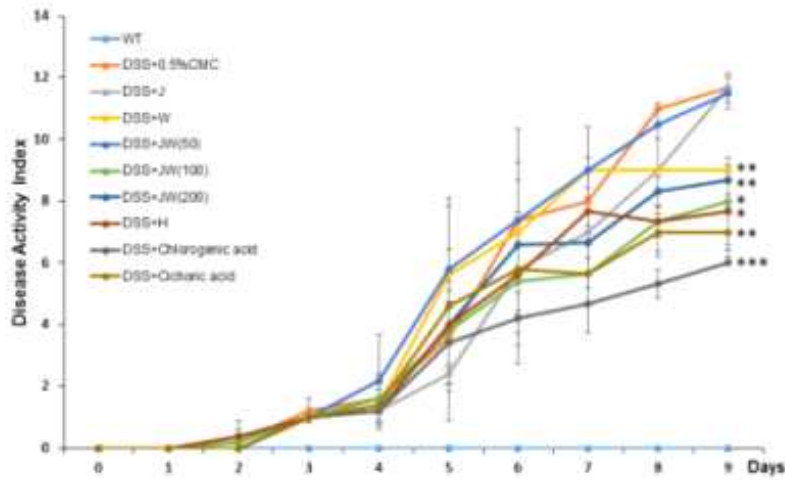


Fig. 162. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 작두콩과 우엉 복합물 투여에 따른 질병활성도 변화 관찰

라) DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 장 길이 변화 관찰

DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 DSS를 유도한 지 6일, 9일 후에서 정상군에 비하여 짧은 장길이를 확인할 수 있었다. 하지만 DSS를 유도한 지 6일 후에서 나머지 약물 투여군 (작두콩, 우엉, 작두콩 우엉 혼합물, 홍삼)과 양성대조군의 장길이는 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 크게 차이를 보이지 않았다. DSS를 유도한 지 9일 후에서는 약물 투여군 중 작두콩추출물등 복합물 100mpk 투여군과 홍삼투여군, 양성대조군(chlorogenic acid, chicoric acid)에서 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 약간 장 길이가 긴 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 163).

마) DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 장 길이 변화 그래프

Fig. 164는 IBD 마우스 모델의 장 길이의 변화를 그래프로 나타낸 것이다. DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 DSS를 유도한 지 6일, 9일 후에서 정상군에 비하여 짧은 장길이를 나타냈다. DSS를 유도한 지 6일 후에서 나머지 약물 투여군 (작두콩, 우엉, 작두콩추출물등복합물, 홍삼)과 양성대조군의 장길이는 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 큰 차이를 보이지 않았다.

DSS를 유도한 지 9일 후에는 홍삼투여군과 양성대조군(chlorogenic acid, chicoric acid)에서 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 약간 장 길이가 증가하는 것을 확인할 수 있고, 이는 통계학적으로 유의성을 나타내었다. 약물 투여군 중 우영 투여군과 작두콩추출물등복합물 100mpk 투여군에서도 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 약간 장 길이가 증가하는 것을 확인할 수 있었지만, 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다 (Fig. 164).

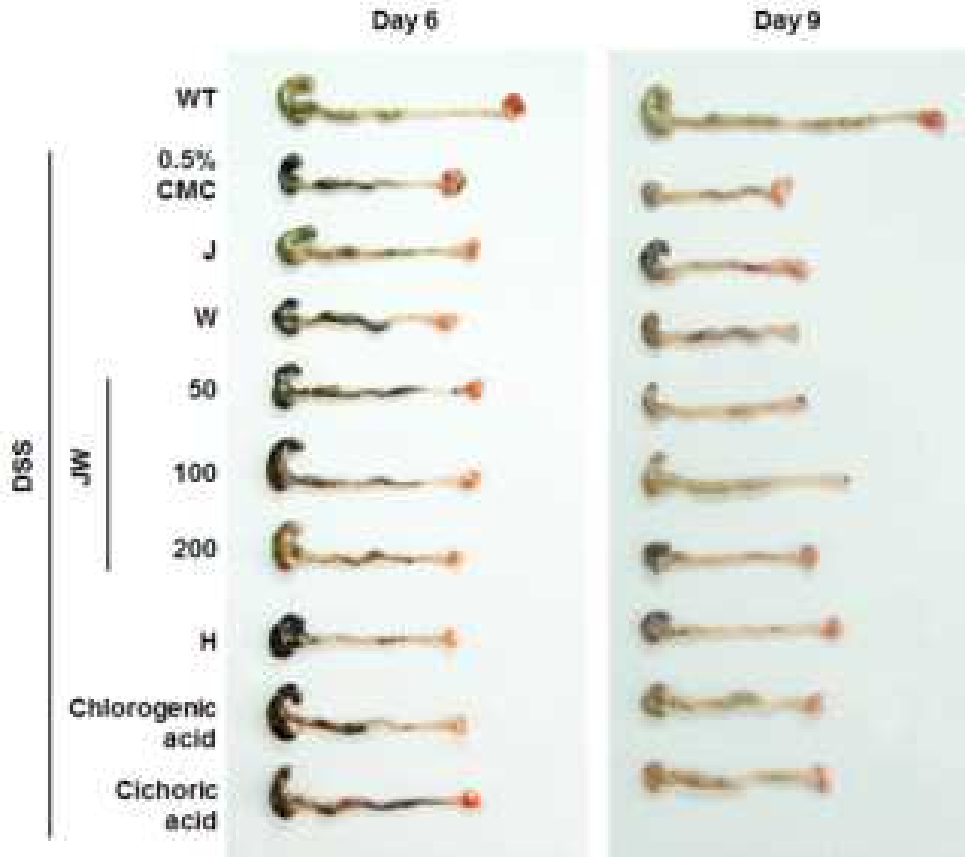


Fig. 163. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 작두콩추출물등복합물 투여에 따른 장 길이 변화 관찰

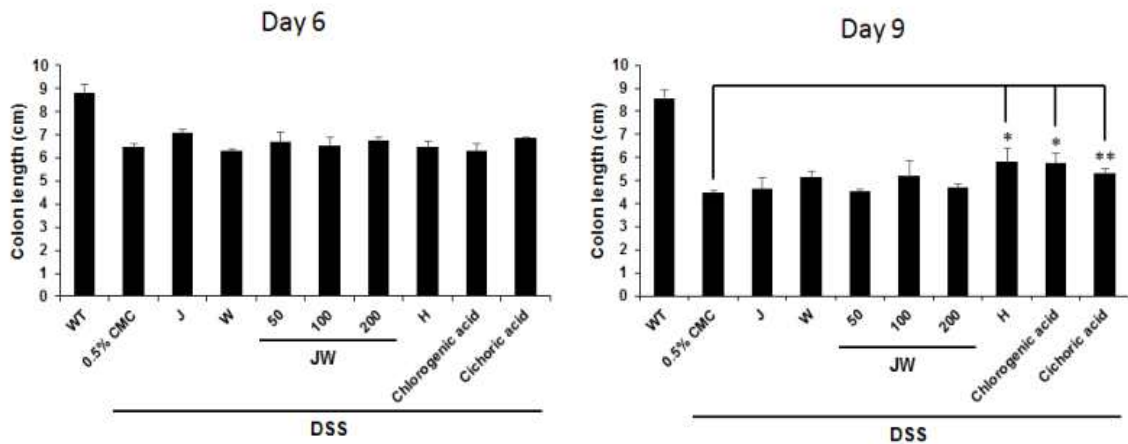


Fig. 164. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 작두콩과 우영 복합물 투여에 따른 장 길이 변화 그래프

## 2) IBD 마우스 모델에서 작두콩추출물등복합물의 질환 억제 효과

IBD 마우스 모델에서 작두콩추출물등복합물(작두콩추출물:우엉추출물=1:4 혼합물)을 경구투여 하였을 때 IBD 질환지표들이 개선되었으며, 대장내의 증가된 ROS 및 IgA production을 리커버됨을 확인함 (Fig. 165A~H).

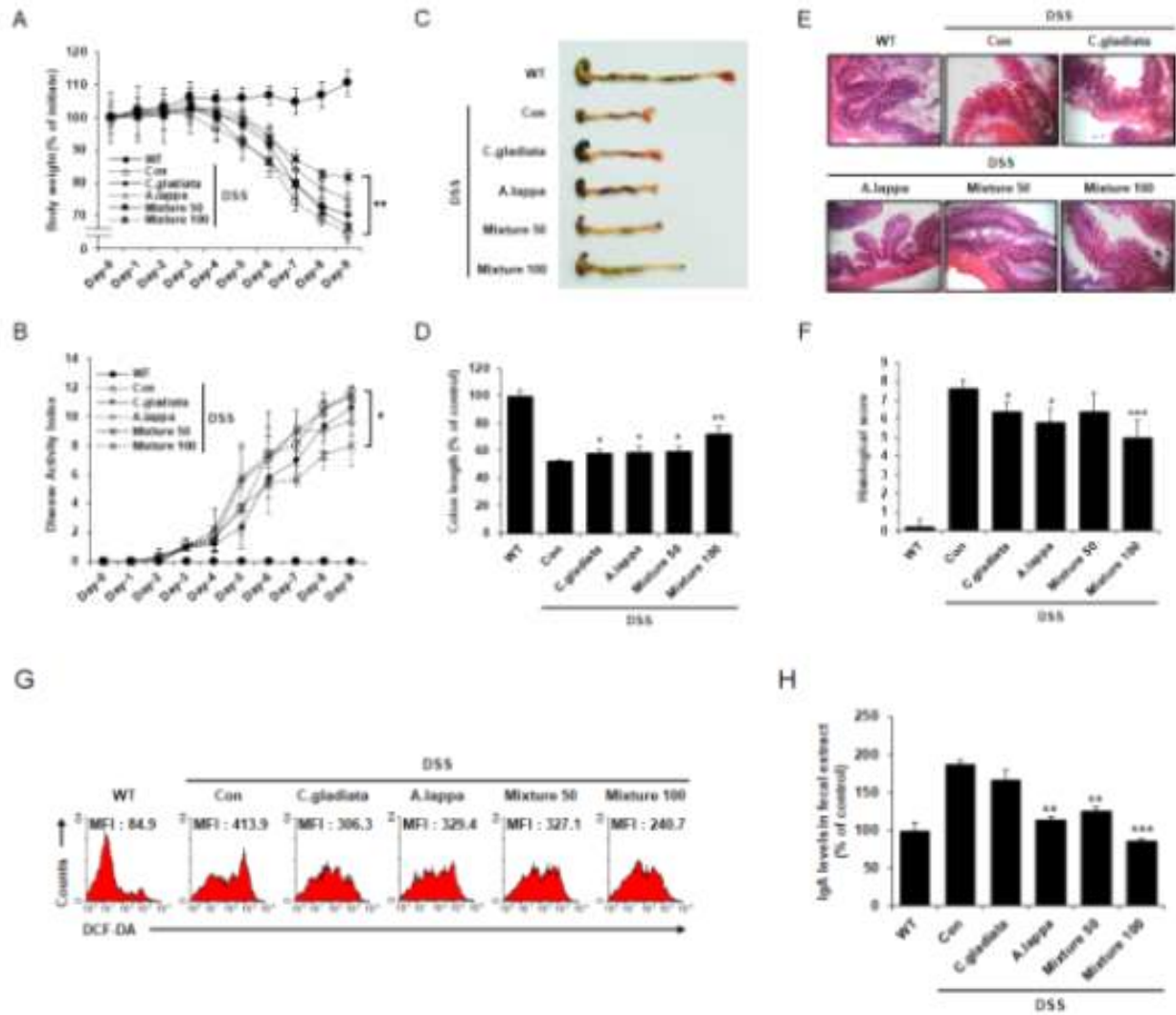


Fig. 165. Mixture of *Canavalia gladiata* and *Arctium lappa* prevented clinical signs of DSS-induced IBD. (A) Changes of body weights were measured from WT mice, control mice, C.glabdiata-treated mice, A.lappa-treated mice and C.glabdiata and A.lappa mixture-treated mice. Data are represented as a percentage of body weight relative to initial body weight. (B) The DAI was calculated as described in Materials and Methods. (C) Macroscopic image of large intestines. (D) Colon length was measured and represented as a percentage of control. (E) Microscopic views of colon tissue (200X) were represented after staining with H&E. (F) Histological score was calculated as described in the Materials and Methods. (G) The ROS level of large intestines were investigated by flow cytometry after staining with DCF-DA. (H) The IgA productions were analyzed by ELISA assay after extracted from feces. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM and representative of three independent experiments (n = 9). Significant (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001) difference between value for control and mixture of C.glabdiata and A.lappa.

### 3) IBD 마우스 모델에서 chicoric acid 및 lupeol 복합물 (mixture)의 질환 억제 효과

Chicoric acid 및 Lupeol의 경구투여에 의해 IBD 질환지표들이 개선됨을 확인함으로써 작두콩 및 우엉 추출물에서 lupeol 및 chicoric acid가 유효성분임을 확인함 (Fig. 166A~D).

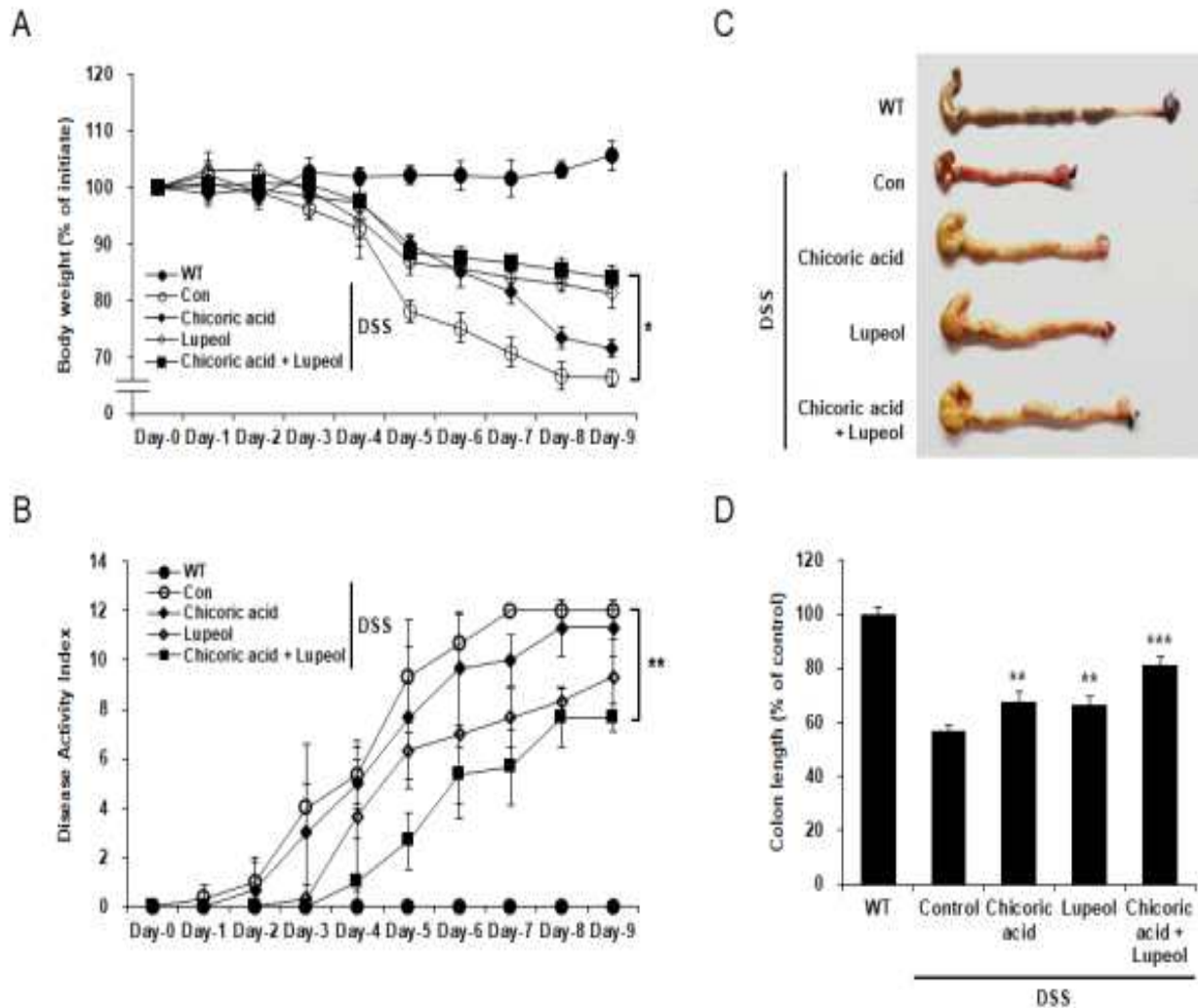


Fig. 166. Mixture of Chicoric acid and Lupeol prevented clinical signs of DSS-induced IBD. (A) Changes of body weights were measured from WT mice, control mice, Chicoric acid-treated mice, Lupeol-treated mice and Chicoric acid and Lupeol mixture-treated mice. Data are represented as a percentage of body weight relative to initial body weight. (B) The DAI was analyzed as described in Materials and Methods. (C) Macroscopic image of large intestines. (D) Colon length was measured and represented as a percentage of control. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM and representative of three independent experiments (n = 9). Significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ) difference between value for control and mixture of Chicoric acid and Lupeol.

#### 4) IBD 마우스 모델에서 chicoric acid 및 lupeol 복합물 (mixture)의 질환 억제 효과

비장내의 다양한 면역세포들이 증가됨을 확인하였으며, 특히 주요면역 장기들에서 대식세포의 population이 크게 증가됨을 통해 활성화된 대식세포가 다양한 면역세포의 활성을 증가시키는 것으로 생각됨 (NK 세포독성능 및 IgA production 조절) (Fig. 167A~C).

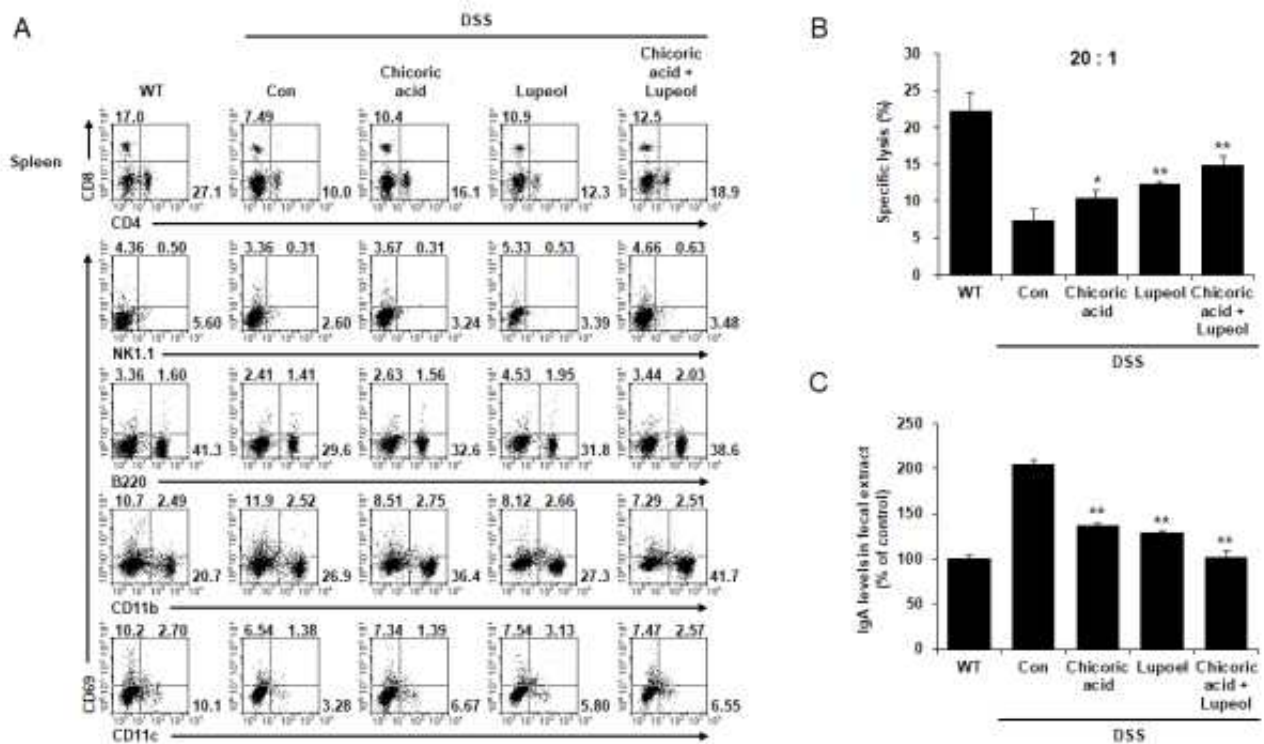


Fig. 167. Mixture of Chicoric acid and Lupeol restored functional defects of various immune cells and excessive production of IgA in DSS-induced IBD mice. (A) The total cells of spleen isolated from mice were stained by indicated antibodies, and the population was analyzed by flow cytometry. The numbers in each quadrant indicate the cell percentages. (B) NK cytotoxicity was investigated by LDH-release assay using NK cells isolated from the spleen as effector cells and Yac-1 cells as target cells at 20:1 (E:T) ratio. (C) Total IgA concentrations from fecal extracts were analyzed by ELISA. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM and representative of three independent experiments (n = 9). Significant (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01) difference between value for control and mixture of Chicoric acid and Lupeol.

#### 5) 결론

- 가) 작두콩 및 우엉 추출물이 면역반응을 증가시킴으로써 IBD의 질환을 개선시키며, chicoric acid 및 lupeol이 그 유효성분임을 검증하였음.
- 나) Chicoric acid와 lupeol의 시너지 효과를 확인하였음.

마. 마우스 점막자가면역질환 모델에서 활성 후보 물질 처리 (lupeol, daucosterol)에 의한 면역세포 활성화기능 증진

1) 작두콩/우엉 소재조합 추출물 (JW) 및 활성 유도체 후보물질(lupeol, daucosterol, lupeol+daucosterol)의 면역 증진 효능 검증을 위한 IBD 마우스 모델 제작

가) DSS 유도 IBD 마우스 모델 제작

IBD는 장내 염증 및 궤양에 기인한 염증성 장 질환으로, 피 묻은 설사, 장 운동 장애 대장 길이 감소 등의 병적인 증상이 특징이다. 실험 연구에서, DSS 유도 IBD 모델은 IBD를 위한 치료 방법의 효능을 테스트하는데 널리 사용되는 표준 모델이다. 기존 실험 논문에 따르면 DSS를 처리한지 6 일 후에는, IBD 심각도에 따른 질병활성도 증가 및 염증성 사이토카인의 발현 증가가 알려져있다. IBD의 치료에 사용되는 약물은 항생제, 면역 억제제, 항염증 약물 치료법을 포함하므로 다음과 같은 기작을 포함하는 약물의 효능 검증에도 사용된다.

나) DSS 유도 IBD 마우스 모델 체중변화 측정

DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 정상군에 비하여 체중 감소가 나타났고, 나머지 약물 투여군(JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물)에서도 정상군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 168).

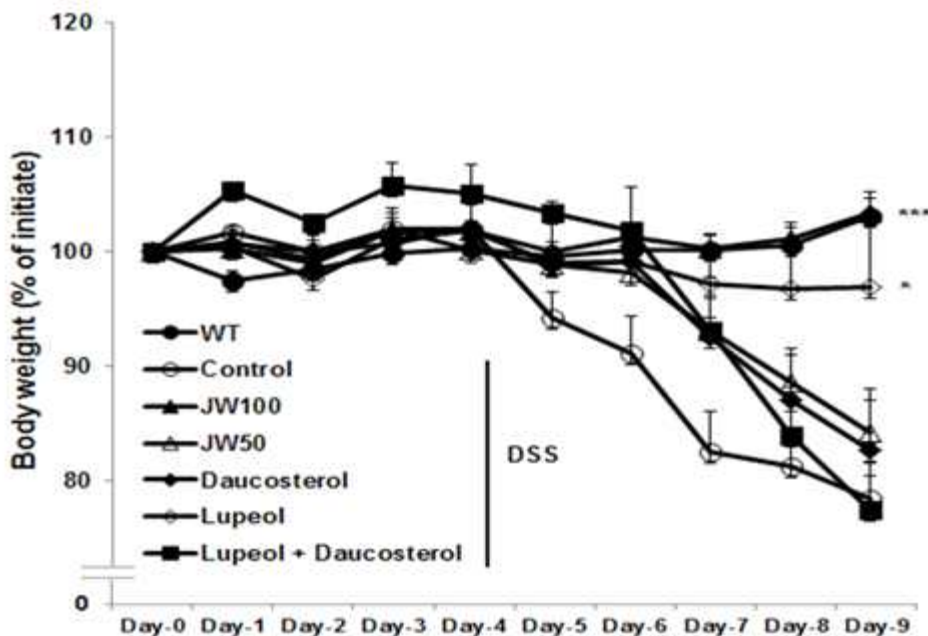


Fig. 168. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 작두콩과 우엉 복합물 투여에 따른 체중변화

다) DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 질병활성도 변화 관찰

Fig. 169는 질병활성도 (disease activity index, DAI) 변화를 그래프로 나타낸 것이다. DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 DSS를 유도한 지 5일, 7일에서 정상군에 비하여 낮은 점수를 나타냈지만, 9일에서는 정상군과 비슷한 점수를 나타내었다. 하지만 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다. 실험군인 JW와 lupeol+daucosterol 투여군은 9일에서 7점 이하의 점수를 나타내었고, 이는 통계학적으로 유의성을 나타내었다. 나머지 약물 투여군(daucosterol, lupeol,)은 9일에서 JW 투여군 점수보다 약간 높은 7점 이상의 점수를 보였고, 통계학적으로 유의성을 확인할 수 있었다 (Fig. 169).

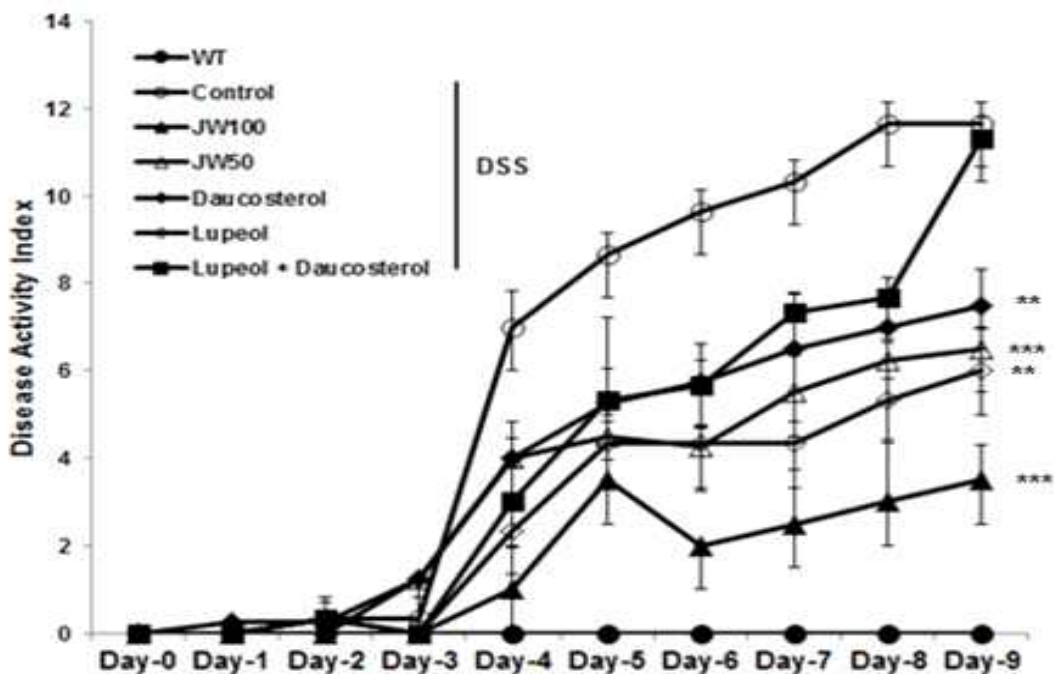


Fig. 169. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물 투여에 따른 질병활성도 변화 관찰

라) DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 장 길이 변화 관찰

Fig. 170은 IBD 마우스 모델의 장 길이의 변화를 육안으로 나타낸 것이다. DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 DSS를 유도한 지 6일, 9일 후에서 정상군에 비하여 짧은 장길이를 확인할 수 있었다. 하지만 DSS를 유도한 지 6일 후에서 나머지 약물 투여군 (JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물)의 장길이는 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 약간 장 길이가 긴 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 170).

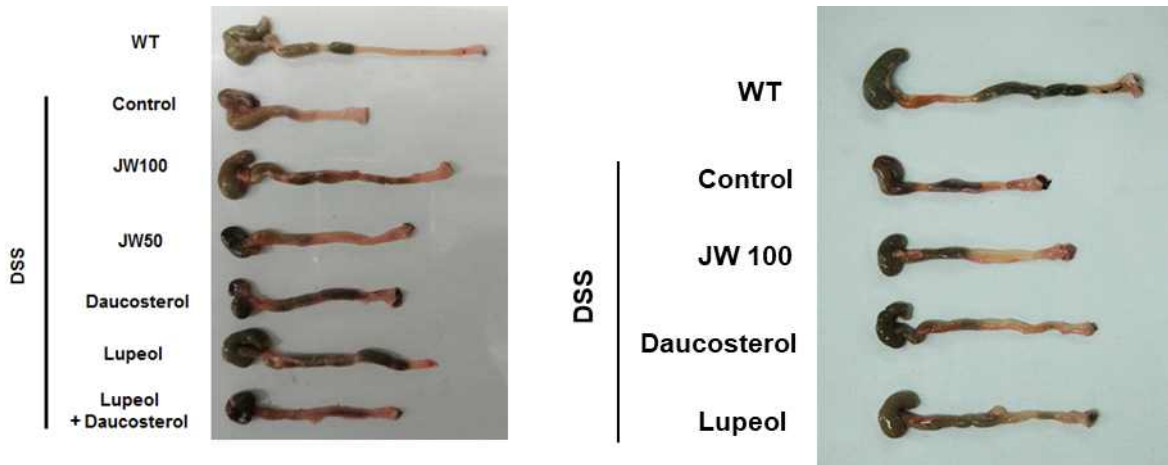


Fig. 170. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물 투여에 따른 장 길이 변화 관찰

마) DSS 유도 IBD 마우스 모델에서의 장 길이 변화 그래프

Fig. 171는 IBD 마우스 모델의 장 길이의 변화를 그래프로 나타낸 것이다. DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)은 DSS를 유도한 지 6일, 9일 후에서 정상군에 비하여 짧은 장길이를 나타냈다. DSS를 유도한 지 6일 후에서 나머지 약물 투여군 (작두콩, 우엉, 작두콩 우엉 혼합물, 홍삼)과 양성대조군의 장길이는 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 큰 차이를 보이지 않았다. DSS를 유도한 지 9일 후에는 실험군 (JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물)에서 DSS 유도 대조군 (DSS+0.5% CMC)에 비하여 약간 장 길이가 증가하는 것을 확인할 수 있고, 이는 통계학적으로 유의성을 나타내었다.(Fig. 171).

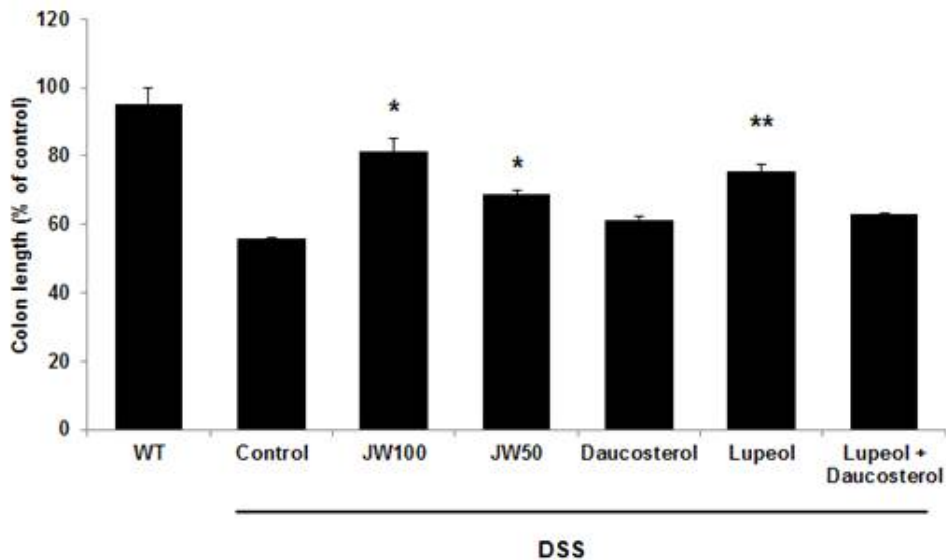


Fig. 171. DSS 유도 IBD 생쥐 모델에서 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물 투여에 따른 장 길이 변화 그래프



## 2) IBD 마우스 모델에서 작두콩 및 우영 복합물 (mixture)의 억제효과

Fig. 172의 결과를 바탕으로 IBD 마우스 모델에서 JW, daucosterol, lupeol, 그리고 lupeol+daucosterol 혼합물을 경구투여 하였을 때 IBD 질환지표들이 개선 되었으며, 대장내의 증가된 ROS 및 IgA production을 리커버됨을 확인함, 즉 IBD 마우스 모델에서 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물을 경구투여 하였을 때 IBD 질환지표들이 개선되었으며, 대장내의 증가된 ROS 및 IgA production을 리커버됨을 확인함. (Fig. 172).

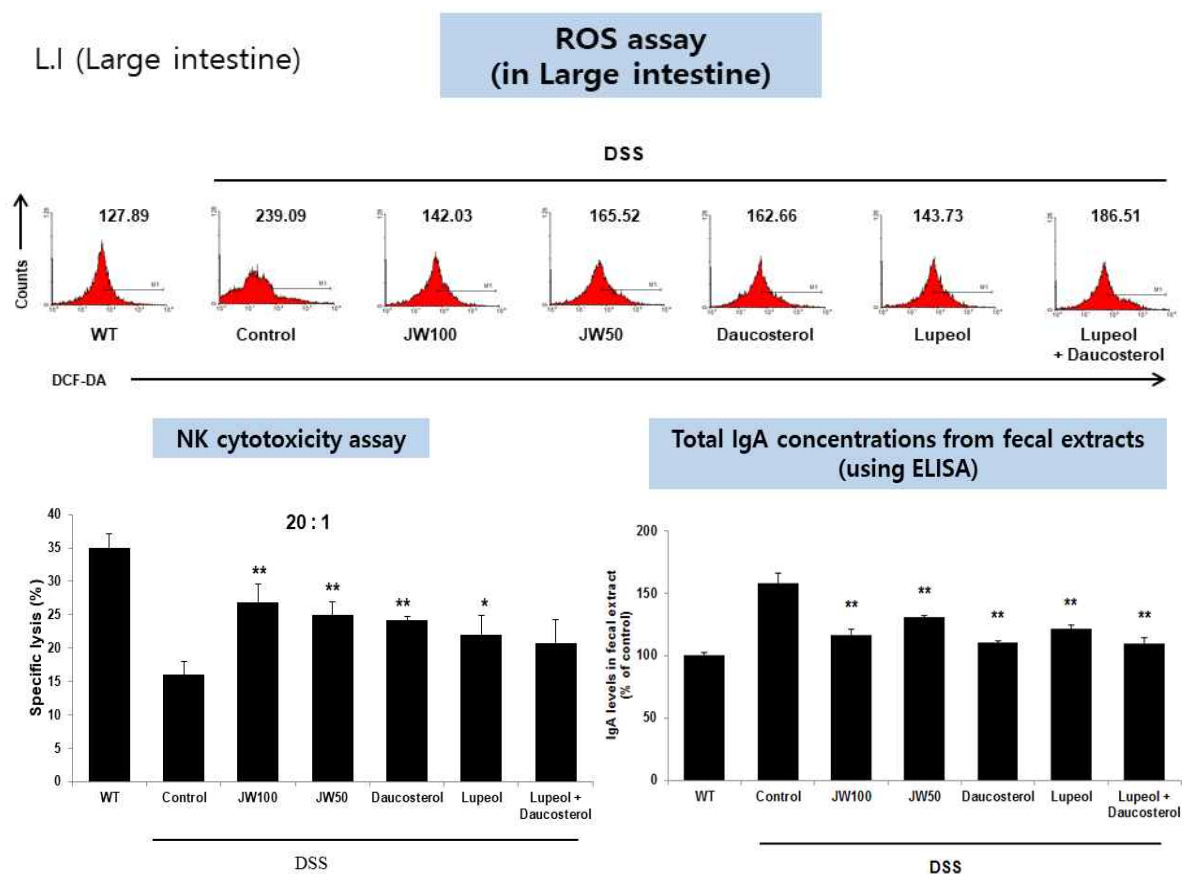


Fig. 172. Mixture of *Canavalia gladiata* and *Arctium lappa* prevented clinical signs of DSS-induced IBD. (A) Changes of body weights were measured from WT mice, control mice, *C.glabriata*-treated mice, *A.lappa*-treated mice and *C.glabriata* and *A.lappa* mixture-treated mice. Data are represented as a percentage of body weight relative to initial body weight. (B) The DAI was calculated as described in Materials and Methods. (C) Macroscopic image of large intestines. (D) Colon length was measured and represented as a percentage of control. (E) Microscopic views of colon tissue (200X) were represented after staining with H&E. (F) Histological score was calculated as described in the Materials and Methods. (G) The ROS level of large intestines were investigated by flow cytometry after staining with DCF-DA. (H) The IgA productions were analyzed by ELISA assay after extracted from feces. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM and representative of three independent experiments (n = 9). Significant (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001) difference between value for control and mixture of *C.glabriata* and *A.lappa*.

### 3) IBD 마우스 모델에서 daucosterol 및 lupeol 복합물 (mixture)의 억제효과

Daucosterol과 lupeol,의 경구투여에 의해 IBD 질환지표들이 개선됨을 확인함으로써 JW 추출물의 유효성분이 Daucosterol과 lupeol,임을 확인함 (Fig. 173).

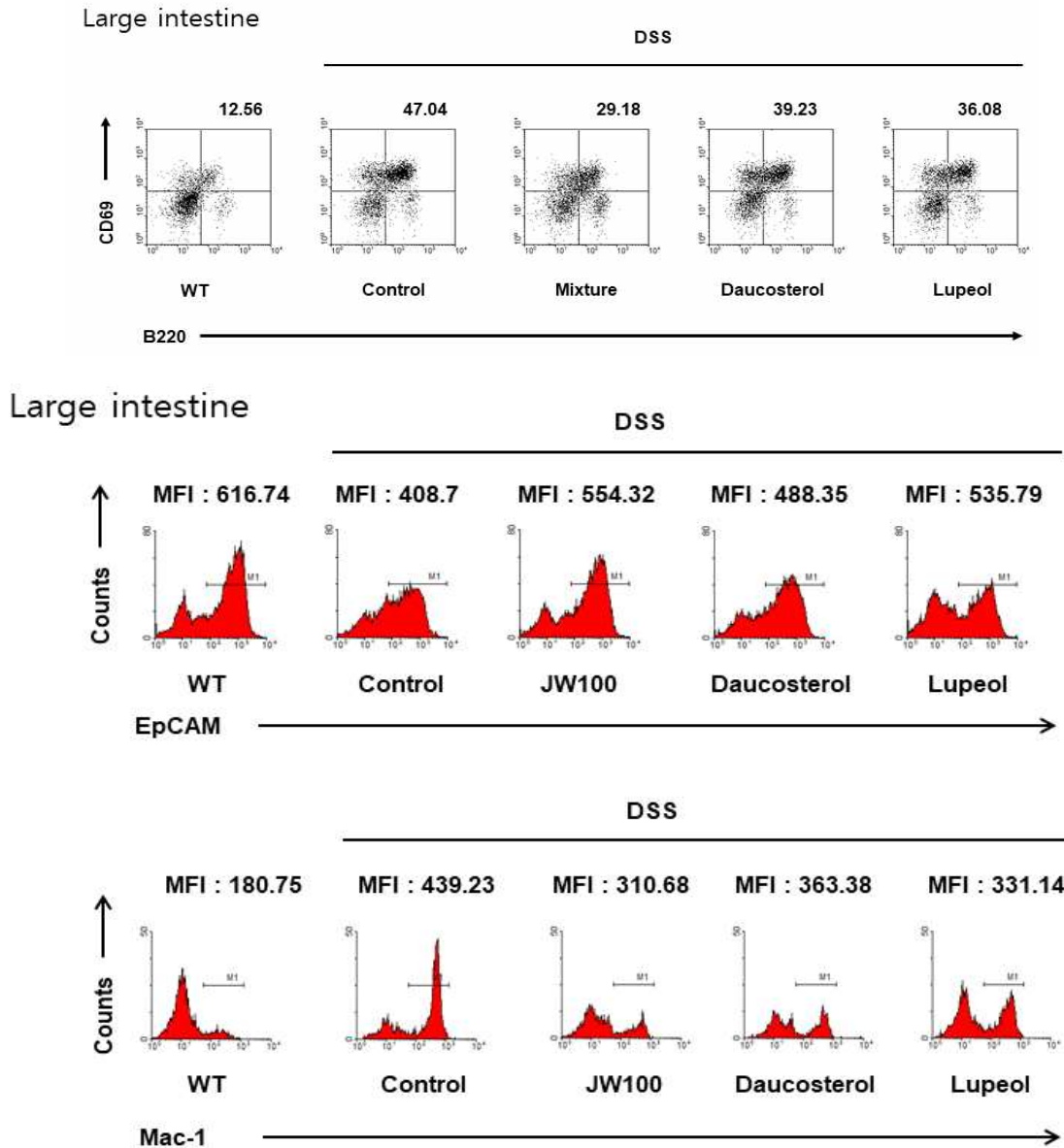
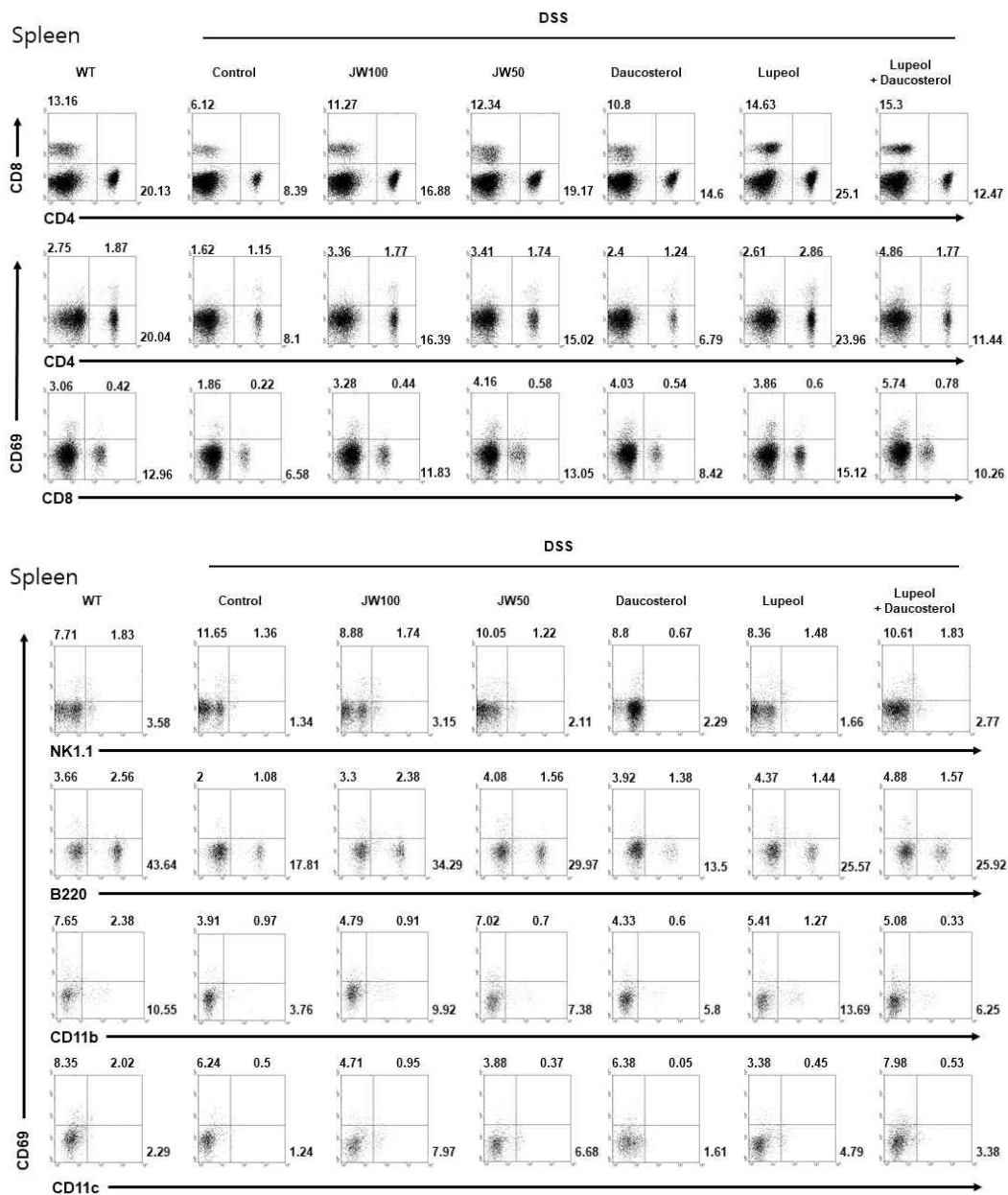
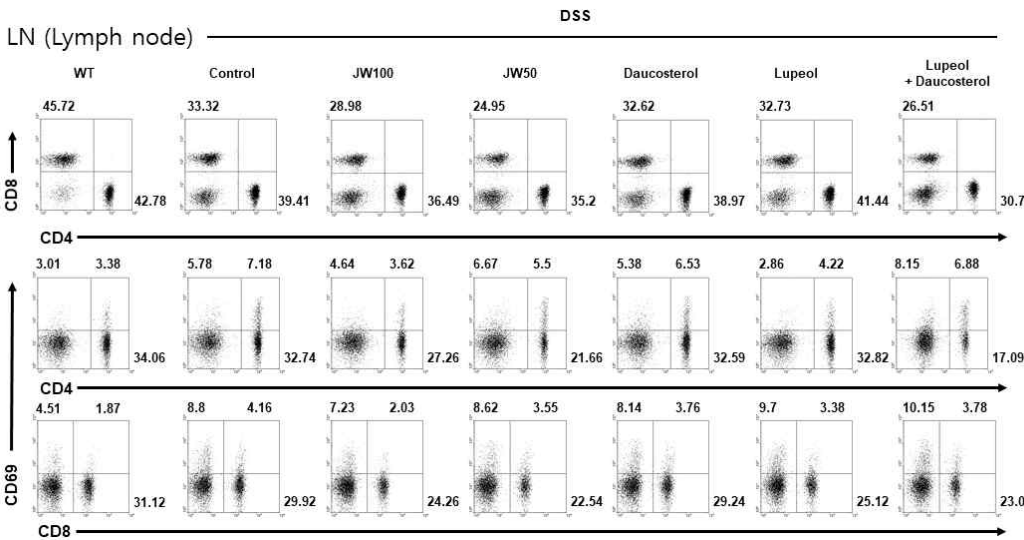
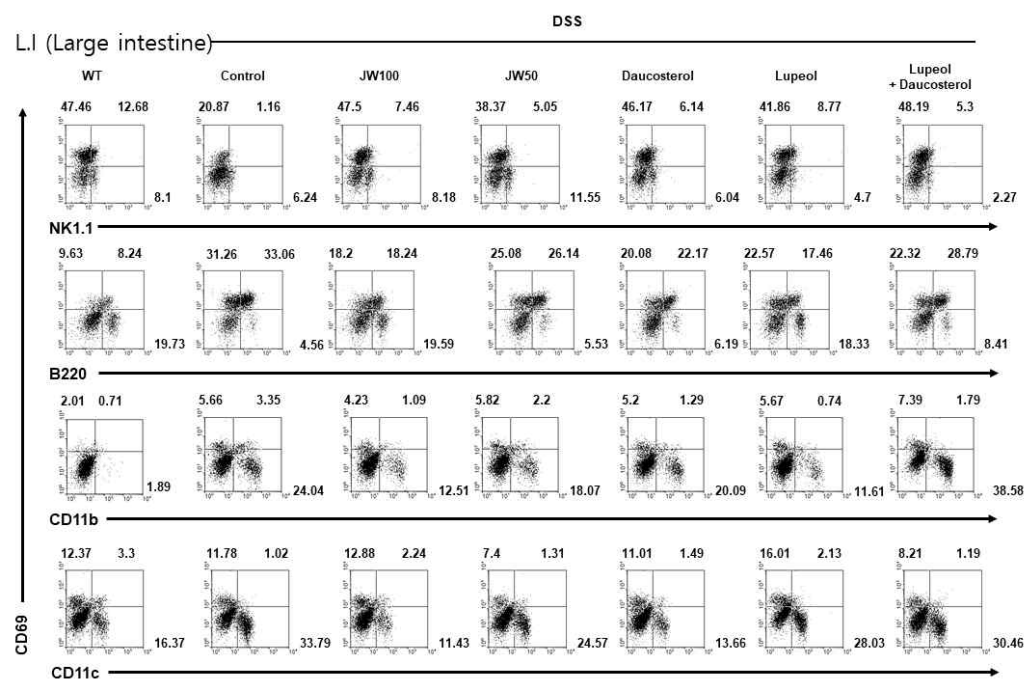
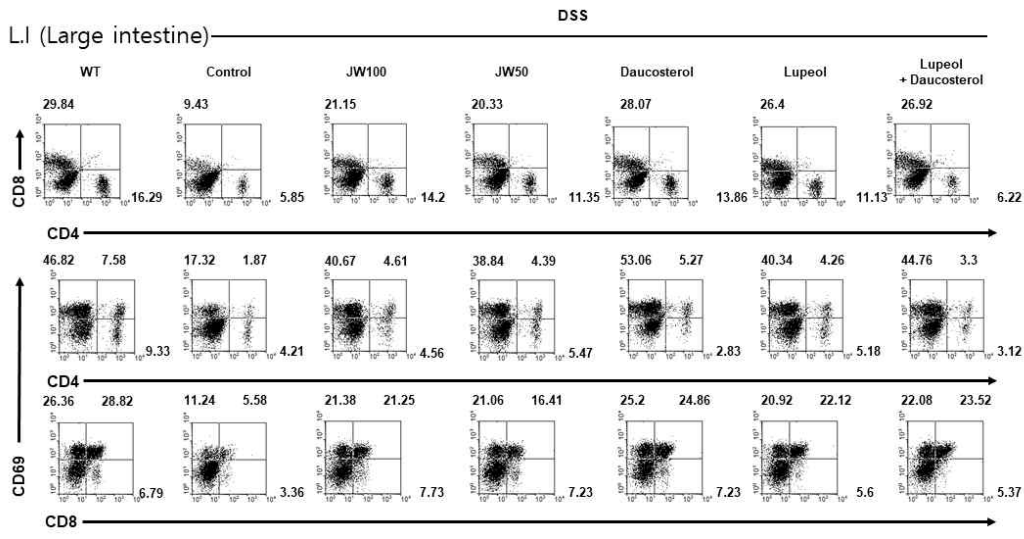


Fig. 173. Mixture of daucosterol, lupeol, daucosterol+lupeol mixture prevented clinical signs of DSS-induced IBD. (A) Changes of body weights were measured from WT mice, control mice, daucosterol-treated mice, Lupeol-treated mice and daucosterol, lupeol, daucosterol+lupeol mixture mixture-treated mice. Data are represented as a percentage of body weight relative to initial body weight. (B) The DAI was analyzed as described in Materials and Methods. (C) Macroscopic image of large intestines. (D) Colon length was measured and represented as a percentage of control. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM and representative of three independent experiments (n = 9). Significant (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001) difference between value for control and mixture of daucosterol, lupeol, daucosterol+lupeol mixture.

#### 4) IBD 마우스 모델에서 JW, daucosterol, lupeol, 그리고 lupeol + daucosterol 혼합물의 억제효과

비장내의 다양한 면역세포들이 증가됨을 확인하였으며, 특히 주요면역 장기들에서 대식세포의 populatio이 크게 증가됨을 통해 활성화된 대식세포가 다양한 면역세포의 활성을 증가시키는 것으로 생각됨 (NK 세포독성능 및 IgA production 조절), 또한 Foxp3 양성 세포의 감소된 개체 수는 DSS 처리 마우스에서 관찰되었지만 Daucosterol 치료로 회복되었다 (Fig. 174).





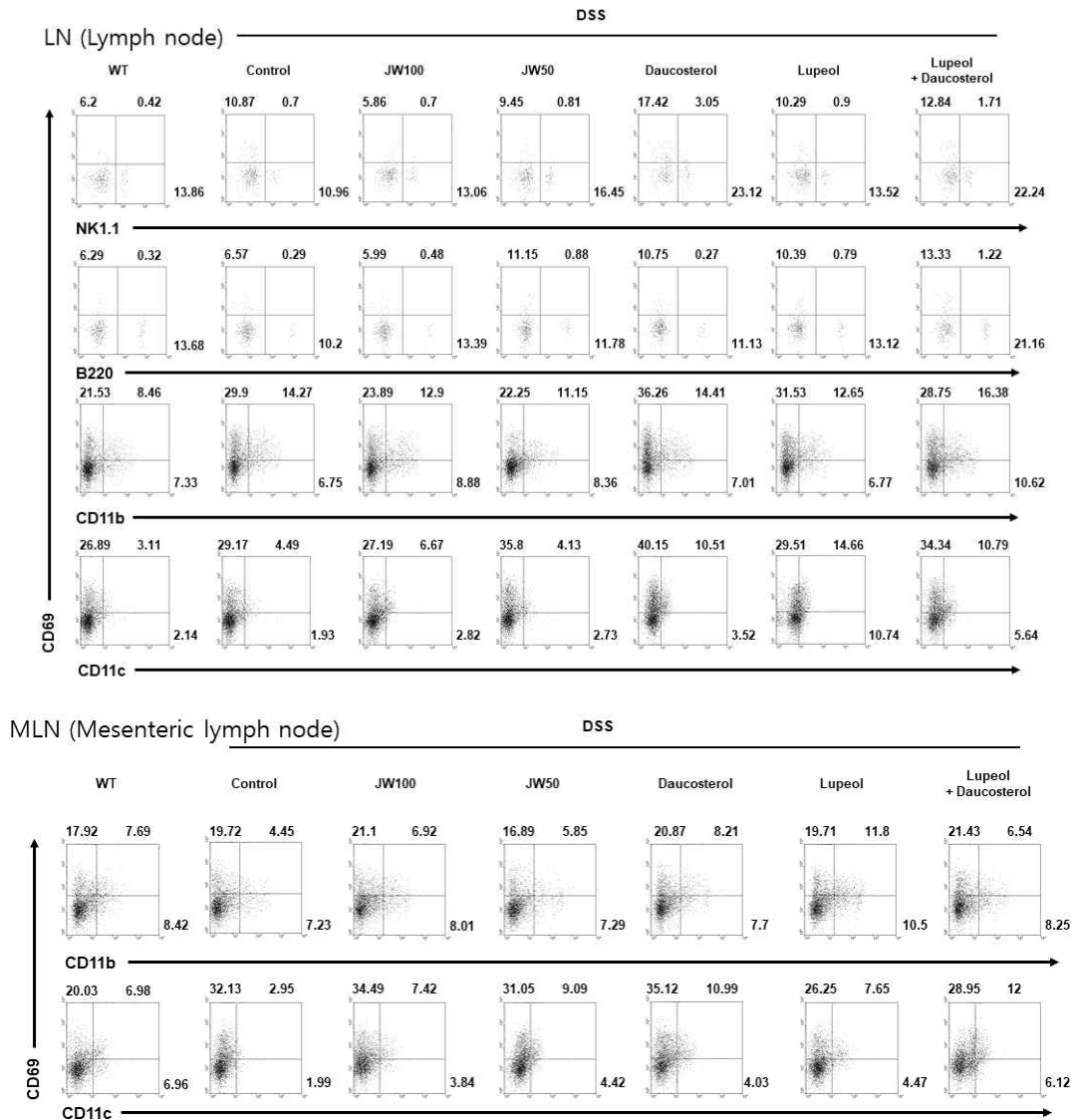


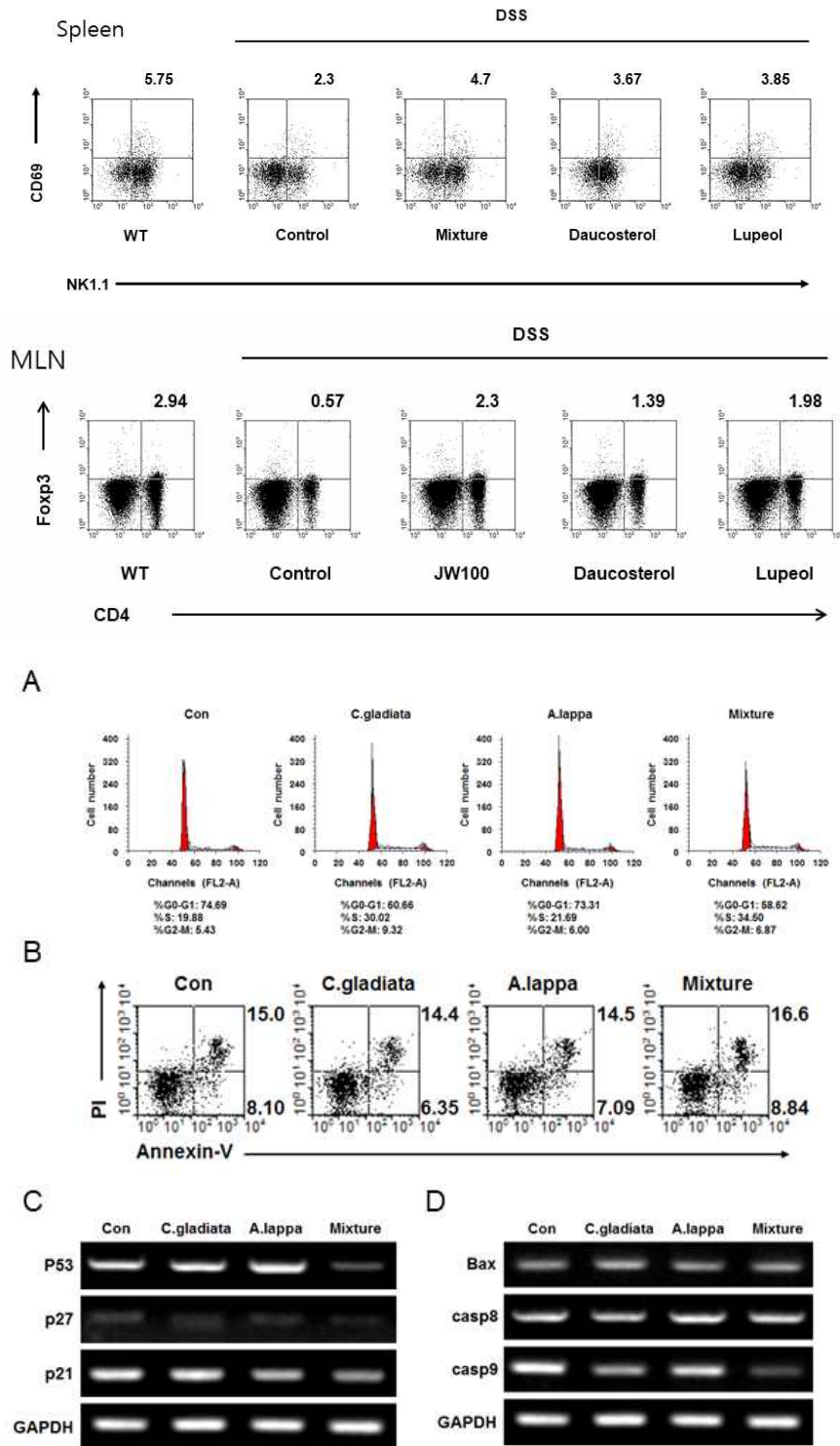
Fig. 174. Mixture of daucosterol, lupeol, daucosterol+lupeol mixture restored functional defects of various immune cells in DSS-induced IBD mice. (A) The total cells of spleen isolated from mice were stained by indicated antibodies, and the population was analyzed by flow cytometry. The numbers in each quadrant indicate the cell percentages. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM and representative of three independent experiments (n = 9). Significant (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01) difference between value for control and mixture of daucosterol, lupeol, daucosterol+lupeol mixture.

### 5) IBD 마우스 모델에서 JW, daucosterol, lupeol, 그리고 lupeol + daucosterol 혼합물의 면역세포 활성화효과

Daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물의 경구투여에 의해 IBD 질환 지표들이 개선됨을 확인함으로써 작두콩 및 우영 추출물의 유효성분이 lupeol 및 daucosterol 그리고 두 성분을 lupeol+daucosterol 혼합물에서는 상승효과가 있음. 위 결과들에 비추어 보았을 때 IBD마우스 모델에서도 daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물이 면역반응을 증가시킴으로써 IBD의 질환을 개선시

키며, lupeol 및 daucosterol이 그 유효성분임을 검증하였음(Fig. 175).

결과적으로 작두콩 및 우엉 추출물이 면역반응을 증가시켰으므로 IBD의 질환을 개선시키며, daucosterol 및 lupeol이 그 유효성분임을 검증하였고 lupeol+daucosterol 혼합물로 투여했을 때 각각 투여했을 때 보다도 상승효과가 있음을 확인함.



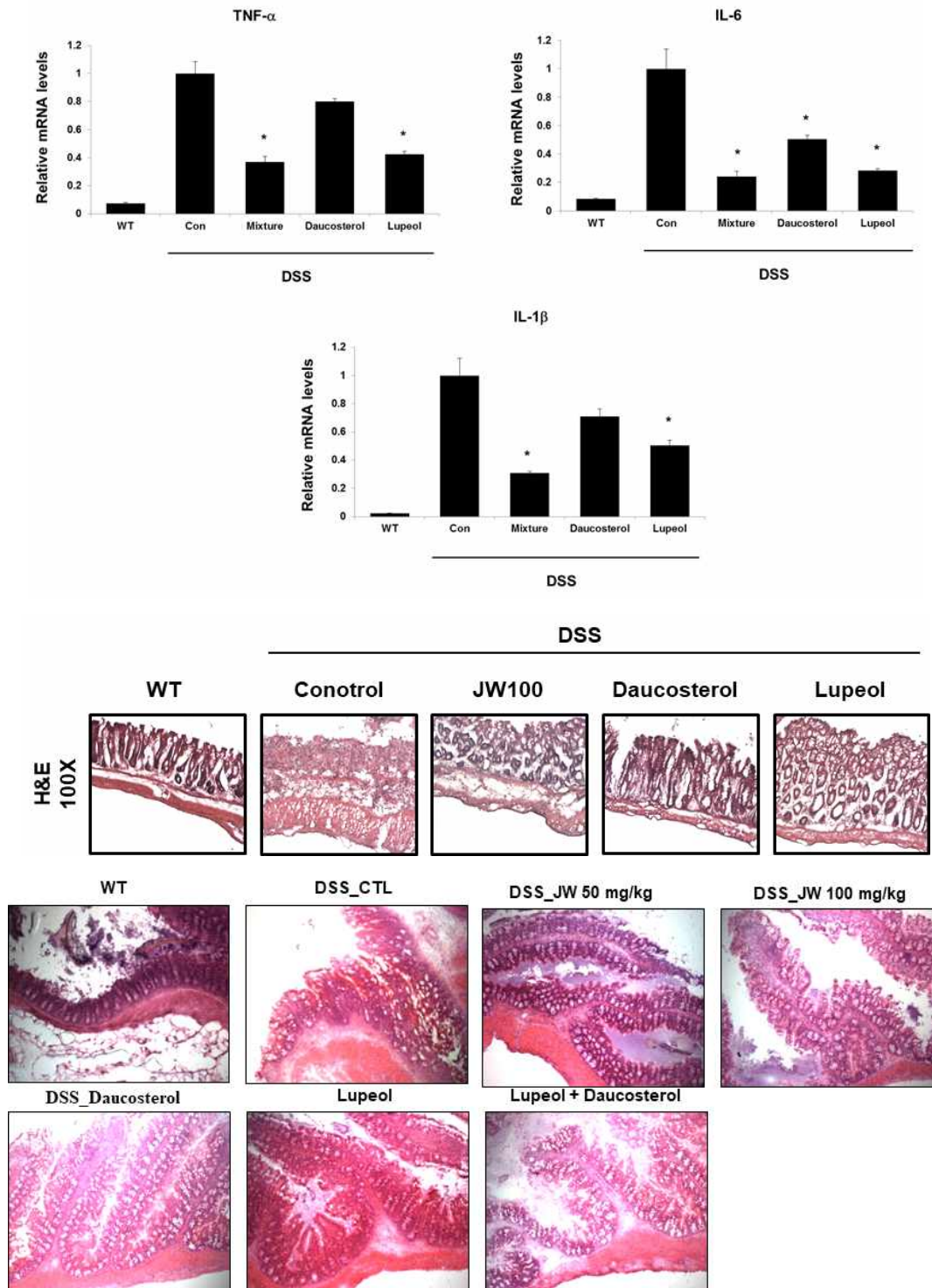


Fig. 175. Mixture of daucosterol, lupeol, daucosterol+lupeol mixture restored functional defects of various immune cells in DSS-induced IBD mice. (A-B) The cell cycle progression was analysed in the total cells isolated from the spleen of mice and using flow cytometry after staining with PI. (C) The expression of cell cyclerealted genes was examined using RT-PCR Data are shown as the mean  $\pm$  SEM and representative of three independent experiments (n = 9). Significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ) difference between value for control and mixture of daucosterol, lupeol, daucosterol+lupeol mixture.

바. MC38 암 세포주를 활용한 질환 모델에서 활성물질의 면역조절 활성 탐색

1) 대장암 세포주 MC38를 이식한 대장암 동물모델에서 JW, daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물 투여에 의한 종양 부피와 중량의 결과임.

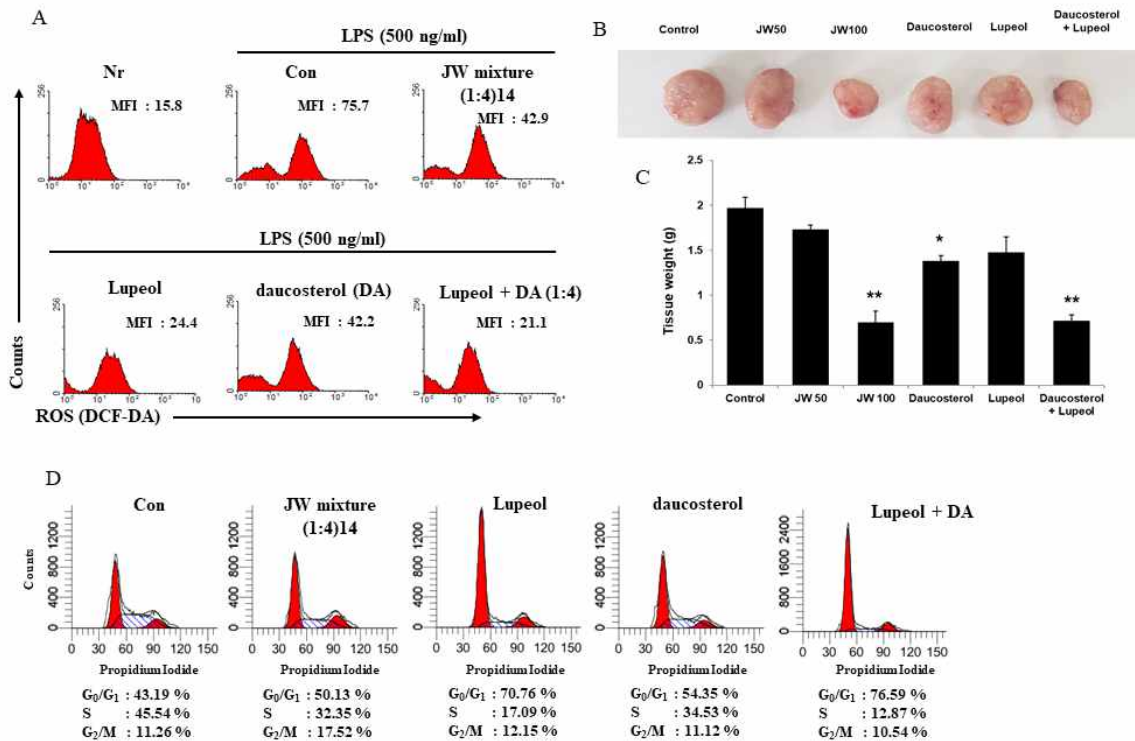


Fig. 176. The effects of JW, lepeol, daucosterol, and luepol+daucosterol on tumor volume, weight and cell cycles in tumor bearing mice.

The mice were injected subcutaneously with MC38 murine colon cancer cell lines. (A) ROS, (B) Representative picture of tumor, (C) tissue weight analysis graph (D) The cell cycle progression was analyzed by flow cytometry after staining with PI. The cells were isolated from MC38 tumor. Con: tumor bearing mice injected with murine colon cancer cell lines MC38; JW: CGE and ALE mixture at 1:4 ratio. JW: daucosterol. luepol+daucosterol: lepeol and daucosterol mixture at 1:4 ratio. Data were expressed as the mean  $\pm$ SD. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.05 vs Con.

2) 종양의 부피는 종양 대조군과 비교시 JW\_100 mg/kg, 그리고 lupeol+daucosterol 10 mg/kg, c 10 mg/kg 투여 후 감소를 나타내어 투여 21일 후에는 유의성 있는 종양 부피가 감소됨을 확인하였다 (Fig. 176). 종양의 무게는 종양대조군에서  $3.55 \pm 0.27g$ , JW 100 mg/kg 투여군에서는  $2.25 \pm 0.18g$  ( $p < 0.01$ )를 보여 종양 무게가 유의하게 감소되었다. lupeol+daucosterol 10 mg/kg 투여군에서  $1.57 \pm 0.24g$  ( $p < 0.005$ )를 나타냈으며 이들의 투여에 의해 종양대조군과 비교시 유의하게 종양 무게가 감소됨을 확인하였다 (Fig. 176). JW, lupeol, daucosterol, lupeol+daucosterol를 투여한 동물의 암 조직에서 분리한 세포에서 세포주기 분석한 결과, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기는 대조군에서 46.19%를, JW 100 mg/kg 투여군에서는 50.13%



를 보였으며, lupeol 10 mg/kg 투여군, daucosterol 10 mg/kg 투여군, luepol+daucosterol 10 mg/kg 투여군에서 각각 70.76%, 54.35%, 76.59%를 나타내 이들의 투여에 G1의 세포 분포가 증가하는 것을 확인하였다. S기는 대조군에서 45.54%를, JW 100 mg/kg 투여군에서는 32.35%를 보였으며, lupeol 투여군 10 mg/kg, daucosterol 10 mg/kg 투여군, luepol+daucosterol 10 mg/kg 투여군에서 각각 17.09%, 34.53%, 12.87%를 보였으며, 이들의 투여에 의해 S기 세포가 감소함을 확인하였다. G2/M기는 대조군에서 12.26%를, JW 100 mg/kg 투여군에서는 17.52%를 보였으며, lupeol 10 mg/kg 투여군, daucosterol 10 mg/kg 투여군, luepol+daucosterol 10 mg/kg 투여군에서 각각 12.15%, 11.12%, 10.54%로 투여군간 차이가 없음을 확인하였다 (Fig. 176).

- 3) 이러한 결과로 JW, 그들의 성분인 daucosterol, lupeol, lupeol+daucosterol 혼합물은 항염증 효과, 면역증진 활성 및 항암 효과를 확인하였다. JW의 이러한 효과는 lupeol과 daucosterol의 효과로 기인한다는 것을 시사한다. JW는 면역조절관련 질병의 발생을 예방하고 면역력을 높이는데 도움이 되는 하나의 천연물질로서의 가능성이 있다고 사료된다.

## 제 7 절 인체적용시험을 통한 면역 증진 효능 확인

### 1. 연구기관 선정

#### 가. 인체적용시험명

면역기능 증진에 대한 작두콩추출물등복합물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

#### 나. 섭취기간 : 8주 (56일)

#### 다. 시험기관 및 책임자

- 1) 시험기관 : 전북대학교병원 기능성식품임상지원센터
- 2) 책임자 : 전북대학교 의학전문대학원 채수완 교수

#### 라. CRO : 네오뉴트라(주)

### 2. 인체적용시험 계획

#### 가. 인체적용시험의 명칭 및 단계

##### 1) 명칭

면역기능 증진에 대한 작두콩추출물등복합물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

##### 2) 단계 : 기타 (건강기능식품)

#### 나. 시험자 및 실시기관지원조직

- 1) 인체적용시험 실시기관 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 (전북 전주시 덕진구 건지로 20)
- 2) 인체적용시험 책임자 : 채수완 (전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 교수)
- 3) 인체적용시험 의뢰자 : 애경산업(주) 대표이사 고광현, 서울시 구로구 가마산로 242
- 4) 인체적용시험 수탁기관 (Contract Research Organization, CRO) : 네오뉴트라(주), 서울시 종로구 대학로 44(효제동 20) 우일빌딩 4층

#### 다. 인체적용시험의 목적 및 배경

##### 1) 인체적용시험의 목적

본 인체적용시험은 면역기능이 저하된성인을 대상으로 작두콩추출물등복합물을 섭취하였을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 면역기능 증진에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.

##### 2) 인체적용시험의 배경

산업화, 환경의 오염, 고령화 등으로 자가면역질환 등 면역질환 유병률이 급속적으로 증가하고 있으며, 심각한 만성 난치성 질환자가 많아지면서 면역력 저하 인구도 급증하고 있다. 이에 따른 임상 및 기초 연구가 전 세계적으로 진행되고 있으며, 그

필요성 또한 급증하고 있다.

치료방법의 한계성 및 예방의학의 부족으로 자연스럽게 건강기능식품에 대한 관심이 고조되고 있으며, 영양불량이 곧 면역기능 저하와 직접적 관련이 있다는 연구결과 등 영양과 인체 면역기능조절과의 긍정적 상관관계 규명에 따른 건강식품에 의한 인체 면역기능조절 관련제품, 특히 면역기능증진제품에 대한 관심이 급증하고 있다.

EU의 경우 "The Functional Food Science in Europe (FUFOSE)"에서 기능성식품에 대한 6가지 생리학 영역 중 그 첫 번째 항목으로 면역증강에 대한 식품 소재개발 및 평가방법에 많은 연구를 진행하고 있으며, 중국에서도 1996년 보건 기능식품법과 보건 식품을 위한 일반 위생 규칙을 제정하고 이에 24가지 보건 식품의기능을 정하여 각각 그 기능성에 대한 평가를 하는데, 그 첫 번째 항목을 면역기능증진으로 꼽을 만큼 그 중요성을 강조하고 있다.

면역기능증진은 다른 어떤 기능 분야보다도 영양 상태, 섭취하는 식품과 면역능력과의 상호관계가 매우 밀접하다는 연구결과들에 의해서 특히, 다른 분야보다도 건강기능식품 제품 개발이 많이 이루어지고 있다.

한국건강기능식품협회의 소비자 실태조사(2013년 8월 8일 ~ 2014년 7월 7일)에서는 소비자가 건강기능식품을 통해 해결 하고자하는 건강문제로 1위 피로회복(31.8%), 2위 면역력증진(26.6%), 3위 전반적건강증진(14.7%), 4위 영양보충(13.5%), 5위 혈행개선 (4.5%)의 순으로 관심도가 조사 되었으며, 이는 추후 국내 소비자들의 면역력 강화 제품에 대한 시장의 성장 가능성을 나타내는 것으로 볼 수 있다<sup>1)</sup>.

한국식품안전관리인증원의 자료에 따르면, 2015년 국내 건강기능식품의 매출 중 면역기능 관련 소재의 매출이 약 8,700억원 이었고, 점유율은 약 17.4%로 나타나 향산화에 이어 두번째로 높은 매출을 기록한 기능성 분야로 나타났다<sup>2)</sup>.

다양한 소재 중 작두콩과 우영은 재배기간이 짧고 물과 주정과 같은 단순 공정으로도 고기능성을 나타낼 수 있는 우수성을 가지고 있다.

작두콩(*Canavalia gladiata*)은 콩과 한해살이 덩굴성 식물로 동남아시아 열대지방이 원산지이며, 그 모양이 작두를 닮았다고 하여 작두콩 혹은 도두(刀豆)라 부르기도 한다. 작두콩은 Urease, Hemagglutinine, Canavanine, Canavalia gibberellin I과 II 등의 약용 성분을 함유하고 있으며, 특히 일반 두류에는 없는 Canavanine과 Canavalia gibberellin이라는 성분이 있는데, 이는 강력한 면역 T세포 증식 및 면역증강을 일으키는 Concanavalin A(ConA)라는 물질의 Isoform으로 알려져 있다. 이는 작두콩의 학명인 *Canavalia gladiata*과 유사성을 보이는데 ConA가 작두콩에서 분리되었기 때문이다. 또한, 작두콩에서는 대부분 두류에서는 검출되는 Daidzin, Genistin, Daidzein 및 Genistein과 같은 Flavonoid류가 검출되지 않는 특징이 있으며, 작두콩의 함유성분이 일반콩과 다른 화학적 구조를 가지고 있는 부분에서 기존의 두류와 차별화 될 수 있다. 그 뿐만 아니라 *In vitro*, *In vivo* 실험을 통해 작두콩의 향산화 활성 및 면역증진 효과를 확인하였으며, 이는 면역증강식품 개발에 있어 경쟁 우위성을 지닐 것으로 사료된다.

최근 중국에서 작두콩을 발효시켜 개발한 “진화 851 구복액”이라는 음료가 건강보조제로 국내에 소개된 적이 있고, 일본에서는 작두콩에 질경이, 울무, 산치자, 예덕나무를 배합해 만든 건강차인 “도두과워”가 제품으로 판매되고 있다.

우엉(*Arctium lappa* L.)은 쌍떡잎식물 초롱꽃목 국화과의 두해살이풀로서 높이 50~150cm 이며, 곧은 뿌리가 30~60cm까지 자라고 끝에서 줄기가 나온다. 뿌리에 달린 잎은 무더기로 나오고 잎자루가 길고 줄기에서는 어긋나며 심장 모양이다. 겉면은 짙은 녹색이지만 뒷면에 흰 솜털이 뽁뽁이 나며, 가장자리에 이 모양의 톱니가 있다.

유럽 원산의 귀화식물로서, 품종으로는 뿌리가 길고 굵은 농야친과 육질이 좋고 뿌리가 짧은 사친 등이 있다. 조리법은 장아찌를 만들거나 조림을 하여 반찬으로 먹고, 뿌리에는 이눌린(Inulin)과 약간의 팔미트산(Palmitic acid)이 들어 있어 유럽에서는 이노제와 발한제로 쓰고 종자는 부기가 있을 때 이노제로 사용하며, 인후통과 독충(毒蟲)의 해독제로 사용되고 있다. 일본에서 많이 재배하며 유럽, 시베리아, 중국 동북부에 야생한다.

전임상시험을 통해 작두콩추출물과 우엉추출물의 최적의 혼합 비율을 확인하여 작두콩추출물등복합물을 표준화 하였으며, 부동화로 스트레스를 유발시켜 면역기능을 약화시킨 마우스에게 작두콩추출물등복합물의 투여는 면역세포의 수 및 활성을 증가시키는 것으로 나타났다.

따라서 본 인체적용시험은 면역기능이 저하된 성인을 대상으로 면역관련 지표인 NK cell activity, 식균작용(Phagocytosis), IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-12, IgA, Cortisol, Serotonin, WBC 수의 면역관련 지표들과 시험대상자 개선도평가를 통해 면역기능 증진 효과를 확인하고자 하였다.

## 라. 인체적용시험용 식품

### 1) 인체적용시험용 식품의 개요

#### 가) 시험식품(작두콩추출물등복합물)

- (1) 주성분명: 작두콩추출물등복합물
- (2) 성상 및 제형: 정제
- (3) 중량: 1000mg/정
- (4) 용법 및 용량: 1일 1회, 1회 1정 (작두콩추출물등복합물로서 600mg/day)
- (5) 보관방법: 서늘한 곳에 보관
- (6) 원료 및 배합비율: 1정(1000mg) 당

Table 48. 인체적용시험용 식품 처방 내역

No.	원료명	배합비율 (%)	합량 (mg)
1	작두콩추출물등복합물	60.0000	600.000
2	결정셀룰로오스	34.8000	348.000
3	이산화규소	1.0000	10.000
4	스테아린산마그네슘	1.0000	10.000
5	히드록시프로필메틸 셀룰로오스	1.9605	19.605
6	이산화티타늄	0.6861	6.861
7	카라멜색소	0.4574	4.574
8	글리세린지방산에스테르혼합제	0.0960	0.960
	<b>합계</b>	100	1000

## 나) 대조식품 (Placebo)

- (1) 주성분명: 결정셀룰로오스
- (2) 성상 및 제형: 정제
- (3) 중량: 1000mg/정
- (4) 용법 및 용량: 1일 1회, 1회 1정
- (5) 보관방법: 서늘한 곳에 보관
- (6) 원료 및 배합비율: 1정(1000mg) 당

Table 49. 인체적용시험용 대조 식품 처방 내역

No.	원료명	배합비율 (%)	합량 (mg)
1	결정셀룰로오스	60.8000	608.000
2	텍스트린	30.0000	300.000
3	카라멜색소	5.4574	54.574
4	이산화규소	1.0000	10.000
5	스테아린산마그네슘	1.0000	10.000
6	히드록시프로필메틸 셀룰로오스	0.9605	9.605
7	이산화티타늄	0.6861	6.861
8	글리세린지방산에스테르혼합제	0.0960	0.960
	<b>합계</b>	100	1000

## 2) 인체적용시험용 식품의 생산/포장 및 라벨링

인체적용시험용 식품(시험식품 및 대조식품)은 의뢰자가 제조 후, 포장하여 시험자에게 공급하였다.

인체적용시험용 식품으로 생산되는 제품은 각 식품의 외형 및 성상이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않아야 하며, 중량 차이도 크지 않아야 한다. 또한 시험식품과 대조식품은 동일한 라벨을 부착함으로써 시험대상자 및 시험자에 대하여 눈가림(Blind)이 유지되도록 하였다.

인체적용시험용 식품 라벨의 기재는 의약품 등 안전에 관한 규칙 제69조 제6항에 따르며 군별 차이가 노출되지 않도록 제조번호(Lot No.)는 시험식품, 대조식품 제조번호를 함께 병기하였다. 눈가림을 위한 샘플의 생산과 유지방법은 다음과 같다.

가) 분리보관 : 시험식품과 대조식품들은 라벨링 작업 전까지 제조번호별로 섞이지 않게 별도 보관하였다.

나) 라벨링: 아래의 내용이 포함된라벨을 제작하였다.

1. 무작위배정번호
2. 고유코드번호
3. "인체적용시험용"이라는표시
4. 인체적용시험계획서 번호: AKY\_CAEC
5. 성분명/코드명: 작두콩추출물등복합물 또는 작두콩추출물등복합물 위약
6. 제조번호
7. 인체적용시험계획 승인을받은 자의 상호와 주소, 전화번호
8. 보관방법
9. 유효기간 또는 재검사일자
10. 섭취방법
11. "인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없음"이라는 표시
12. 유아의 손에 닿지 않는 곳에 보관

다) 포장 및 고유 코드의 기록: 인체적용시험용 식품을 각각 4주분 씩 소분 포장한 후, 무작위배정표에 따라 고유코드를 포장 라벨지에 기록하였다.

### 3) 인체적용시험용 식품의 교부

인체적용시험용 식품의 불출은 인체적용시험책임자의 위임을 받은 인체적용시험 담당자가 배부하였다. 이 때, 인체적용시험 시험자의 서명이 있는 처방전에 의해 행해져야 하며 방문일, 인체적용시험용 식품 처방 수 등이 기록되어야 한다.

### 4) 인체적용시험용 식품의 관리·기록

인체적용시험책임자의 위임을 받은 인체적용시험 담당자는 수불대장에 인체적용시험대상자의 무작위배정번호, 처방일, 인체적용시험용 식품 불출 수량, 인체적용시험용 식품 재고량 등을 기록하여야 한다. 인체적용시험용 식품의 입고가 필요한 경우 인체적용시험 수탁기관의 모니터요원에게 이를 알려야 하며, 모니터요원은 인체적용시험 의뢰자에게 이를 요청하였다. 또한, 모니터요원은 정기적으로 관리·기록된 수불대장을 확인하였다.

### 5) 인체적용시험용 식품의 회수 및 폐기

인체적용시험 담당자는 인체적용시험대상자로부터 인체적용시험용 식품을 회수해야 하며, 모니터요원은 회수된 인체적용시험용 식품 및 미사용된 인체적용시험용 식품을 의뢰자에게 반납하였다.

### 6) 이중눈가림의 유지

이중눈가림 유지를 위하여 2)항 인체적용시험에 사용되는 제품의 생산/포장 및 라벨링에서 언급된 내용 이외에, 각 군별로그우코드의 할당 내역(눈가림 봉투)은

인체적용시험 시험자가 봉인된 상태로 관리하며, 중대한 이상약물반응 발생으로 부득이하게 해당 코드 열람이 필요한 경우\*를 제외하고는 인체적용시험 종료 시까지 공개하지 않는다. 인체적용시험 시험자는 선정된 인체적용시험대상자의 섭취 배정번호와 일치하는 고유코드 식품을 시험대상자에게 공급하며, 시험/대조식품의 결손 및 파손 시에는 여분(고유코드별)을 사용함으로써 눈가림을 유지하였다.

\* 눈가림해제절차: 인체적용시험대상자에게 중대한 이상약물반응이나 기타 중요한 임상적 상황으로 투여된 시험약의 균을 확인해야 하는 상황이라고 시험자의 판단이 들면 즉시, 전화나 Fax로 이 사실을 인체적용시험 수탁기관의 모니터에게 알린다. 이 사실을 전달 받은 모니터는 의뢰사에 알리고 시험 관련자들과 눈가림 해제가 꼭 필요한 사항인지 논의를 통하여 눈가림 해제 여부를 결정 후 시험자에게 결과를 통지해 준다.

시험자는 눈가림 해제 수락을 통보 받은 경우에 한하여, 보관된 눈가림 봉투 중 해당 인체적용시험대상자의 배정번호와 일치하는 봉투를 개봉하여 시험식품인지 대조식품인지 확인 후, 필요하다면 그에 따른 처치를 실시하도록 한다. 눈가림해제 시에는 해당 인체적용시험대상자 정보와 해제 사유를 무작위배정 코드 파기 기록지에 기록하도록 하며, 무작위배정 코드가 해제된 인체적용시험대상자는 인체적용시험을 지속 할 수 없다.

#### 마. 인체적용시험 기간

IRB 승인일로부터 12개월

#### 바. 시험대상자의 선정기준, 제외기준 및 목표 대상자의 수

##### 1) 시험대상자 : 면역기능이 저하된 성인

##### 가) 선정기준

다음 기술된 조건에 부합되는 사람을 시험대상자로 선정하였다.

- (1) 만 25세 ~ 만 75세의 성인 남, 녀
- (2) 스크리닝 검사에서 측정된 말초혈액 백혈구 수치가  $3 \times 10^3$  이상 ~  $8 \times 10^3$  cells/ul 미만인 자
- (3) 스트레스 자각 정도가 "많음" 이상인 자 (4단계 척도 ; 전혀 없음, 약간 있음, 많음, 아주 많음)
- (4) 시험 시작 전 1년 이내에 2회 이상 상기도감염\* 또는 상기도감염을 초래할 수 있는 대표적인 질환인 감기 증상이 있었던 자  
(\*편도염(tonsillitis), 인두염(pharyngitis), 후두염(laryngitis), 부비강염(sinusitis), 중이염(otitis media), 비염(rhinitis) 등)
- (5) 본 시험에 참여할 것을 동의하고 서면 동의서에 시험대상자(또는 법정 대리인)가 자의로 서명한 자

나) 제외기준

다음 기술된 조건에 해당되는 사람은 시험대상자에서 제외하였다.

- (1) 임상적으로 유의한 급성 또는 만성 심뇌혈관계, 면역계, 호흡기계, 간담도계, 신장 및 비뇨기계, 신경계, 근골격계 질환, 정신성, 감염성 및 혈액·종양성 질환 등으로 현재 치료 중이거나 과거력이 있는 자
- (2) (단, 시험대상자의 상태를 고려하여 시험책임자의 판단에 따라 시험에 참여 가능하다.)
- (3) 조절되지 않는 고혈압이 있는 자 (160/100mmHg 이상, 시험대상자 10분 안정 후 측정기준)
- (4) 당뇨병이 있는 자(공복혈당이 해당기관 정상치 이상 또는 과거에 당뇨로 인해 약제를 복용하였거나 복용하고 있는 경우)
- (5) 스크리닝 전 3개월 이내에 예방접종을 실시한 자
- (6) AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 혈중치가 해당기관 정상 상한치의 3배 이상인 자
- (7) Creatinine 혈중치가 해당기관 정상치 이상인 자
- (8) 스크리닝 전 2주 이내에 면역에 영향을 미칠 수 있는 건강기능식품을 섭취했거나 섭취중인 자
- (9) 속쓰림, 소화불량 등의 심한 위장관 증상을 호소하는 자
- (10) 임신, 수유 중이거나 본 연구 기간 동안 임신 계획이 있는 자
- (11) 본 인체적용시험 중에 다른 시험에 참가할 계획이 있는 자
- (12) 본 인체적용시험 시작 8주 이내에 다른 인체적용시험에 참여했던 자
- (13) 시험자가 본 인체적용시험에 부적합하다고 판단하는 자
- (14) 본 인체적용시험용 식품에 민감하거나 알레르기가 있는 자

2) 목표한 시험대상자의 수 및 산정근거

가) 시험대상자 수

Table 50. 인체적용시험용 대조 식품 처방 내역

	시험군 (작두콩추출물등복합물)	대조군 (Placebo)	총 시험대상자 수
최종 평가 예수(PP)	40	40	80
Drop-out(20%) 고려예수	50	50	100

인체적용시험대상자 선정, 제외기준에 적합한 100명 이상을 확보하여 섭취하도록 하고, Protocol에 명시된PP기준에 적합한 최종 유효성 평가 예수로 80명 이상(군당 40명 이상)을 분석하기로 계획하였다.



나) 산정근거

본 인체적용시험의 목적은 투여기간 8주 후 NK cell activity의 증가가 시험군(작두콩추출물등복합물)이 대조군(placebo)과 비교하여 우월하다는 것을 증명하고자 하였다.

$H_0 : \mu_t = \mu_c$  (시험 종료 후 시험군과 대조군의 NK cell activity의 평균은 같다.)

$H_1 : \mu_t \neq \mu_c$  (시험 종료 후 시험군과 대조군의 NK cell activity의 평균은 다르다.)

유효한 인체적용시험대상자 수를 산정하기 위하여 다음을 가정하였다.

- (1) 우위성시험(Superiority test)
- (2) 유의수준(Level of significance) 5%, 양측검정
- (3) 제 2종 오류( $\beta$ )는 0.2로 하여 검정력(Power of the test)은 80%를 유지
- (4) 시험군과 대조군의 시험 예수의 비율은 1로 함. 즉,  $n_t$ (시험군의 시험대상자 수) =  $n_c$ (대조군의 시험대상자 수)이다.
- (5) 기존의 연구 중 본 인체적용시험과 동일한 평가변수에서 효과를 보인 참고문헌 3)의 결과를이용하여 인체적용시험대상자의 수를 산정하였다. 본 논문의 결과에서 다음과 같은 평가변수의 변화 양상을 확인할 수 있었다. 평가변수의 차이는 기존연구의 효과의 임상적 유용 정도를 고려하여 약 85% 수준인 6.53을 사용하였다.

Table 51. 인체적용시험용 대조 식품 처방 내역

평가지표	시험대상자 수(명)		평균(baseline-복용 후)		표준편차(S.D)		S
	placebo	Test	placebo	Test	placebo	Test	
Cytotoxicity of NK cells	31	31	-0.28	7.4	10.7	10.0	10.4

- 통계적검정력과 유의 수준은 각각 80%와 5% 임
- 시험약/위약의 복용 전, 후 차이에 대한 표준편차 값은 주어져 있지 않아 복용 전, 후 값의 상관계수가 0.25라고 가정하고 추정하였음.

위의 (1) - (5)를 가정하였을 때 인체적용시험에 필요한 시험 예수는 다음과 같다(양측검정)

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times \sigma^2 \times 2}{\Delta^2}$$

여기서,

$Z_{\alpha/2}$  : 표준정규분포에서 오른쪽 꼬리부분 면적이  $\alpha/2$  가 되는 임계치 혹은 분위수

- $Z_{\beta}$  : 표준정규분포에서 오른쪽 꼬리부분 면적이  $\beta$ 가 되는 임계치 혹은 분위수
- $\alpha$  : 제1종 오류의 크기
- $\beta$  : 제2종 오류의 크기
- $\sigma$  : 표준편차
- $\Delta$  : 임상적으로 의미가 있는 시험군과 대조군 간의 평균변화 차이

상기 식으로 대상자의 수를 계산하면, 군당 최소 대상자 수는 군당 약 40명 이다.

$$40 \approx \frac{(1.96 + 0.84)^2 \times 10.4^2 \times 2}{6.53^2}$$

따라서 본 연구에서 유효성 평가 변수인 NK cell activity를 이용하여 계산된 대상자 수 40명을 군당 시험대상자 수로 정하고 탈락률(20%)를 고려하면 군당 등록할 인체적용시험대상자 수는 50명이며, 총 인원은 100명으로 하였다.

### 사. 인체적용시험 방법

#### 1) 인체적용시험의 설계

본 인체적용시험은 이중눈가림, 무작위배정, 위약대조 병행시험으로 디자인 되었다. 자의(또는 법정 대리인)에 의해 인체적용시험 동의서에 서명 후 인구학적 조사, 병력/약물투여력 조사, 이학적검사, 신체계측, 활력징후, 임상병리검사(임신반응 검사 포함), WBC 수, 스트레스 설문 등의 방문 평가를 실시하여 선정기준에 적합하고, 제외기준에 적합하면 시험군 및 대조군 중 한 군으로 무작위 배정되었다. 배정된 대상자는 총 8주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취하였다. 각 군의 배정비율은 시험군 : 대조군 = 1 : 1로 하였다.

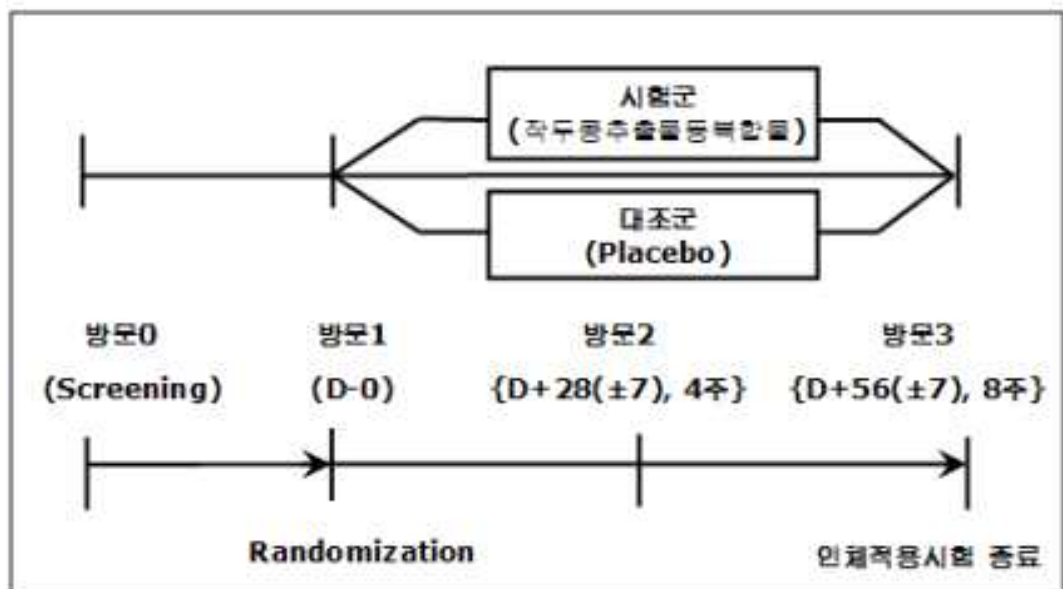


Fig. 177. 인체적용시험 설계

## 2) 섭취량, 섭취방법 및 섭취기간

### 가) 1일 섭취량 및 섭취방법

- (1) 시험군(작두콩추출물등복합물): 1일 1회, 1회 1정 (작두콩추출물등복합물로써 600mg/day)
- (2) 대조군(Placebo): 시험군과 동일한 방법으로 섭취

### 나) 섭취기간

시험식품 또는 대조식품을 8주(56일)간 섭취

### 다) 섭취량 설정사유

- (1) 섭취량: 작두콩추출물등복합물로써 600mg/day
- (2) 근거내용

#### (가) Mouse에서의 유효함량 산출

부동화로 스트레스를 유발시켜 면역력을 약화시킨 C57/BL6 마우스에게 작두콩추출물등복합물을 100mg/kg을 경구 투여한 결과 T/B cell 및 Macrophage, NK cell 등 면역세포의 수와 활성 및 IgA, Serotonin의 생성량이 작두콩 단독투여에 비해 작두콩과 우영의 혼합투여에 의해 더욱 증가하였으며, 반대로 Cortisol 생산량은 감소시키는 것을 확인 되었다. 또한, 100mg/kg 투여군에서 염증 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) mRNA 유전자 발현이 현저하게 감소 및 면역 T세포 활성 사이토카인(IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-12p35/p40) mRNA 유전자 발현이 현저하게 증가하였다.

#### (나) 인체대상 적용 예측량 산출

C57/BL6 마우스의 전환계수는 12.3이고, 이를 바탕으로 면역력 약화 마우스 모델에서의 인체대상 적용 예측량은 다음과 같다<sup>4)</sup>.

Table 52. 인체적용시험용 대조 식품 처방내역

유효함량	100mg/kg
인체적용변환 계산 = 100mg/kg $\div$ 12.3 x 60(kg)	600mg 설정

동물시험에서의 유효 용량을 근거로 시험대상자가 성인 60 kg임을 감안했을 때 약 487.7mg/일로 산출됨에 따라, 효과의 극대화과 경제성 모두를 고려하였을 때, 인체 대상 적용량을 600mg/일 (작두콩 : 우영 = 1 : 4)로 설정 하였다.

### 3) 병용금지약물 및 식품

- 가) 다음 약물 및 식품의 사용은 안전성, 내약성 또는 유효성의 평가를 방해할 수 있다. 따라서, 다음에 열거하는 약물은 인체적용시험기간 동안 병용 투여를 금지하였다.
- (1) 면역 관련 건강기능식품 및 식품 (예: 홍삼, 인삼, 클로렐라, 알코시글리세롤 함유 상어간유, 알로에 겔, 한약 등)
  - (2) 비타민이 포함된 건강기능식품
  - (3) 면역 관련된 예방접종 (예: Influenza 등)
- 나) 시험기간 동안 시험대상자가 이들 약물 및 식품 중 어느 것이라도 투여한 경우에는 인체적용시험 모니터요원에게 즉시 알리도록 하였다. 인체적용시험 모니터요원에게 연락될 때까지는 시험대상자를 인체적용시험에서 중도탈락 시켜서는 안 된다.
- 다) 인체적용시험용 식품 섭취를 시작한 후에 새로운 약물을 투여한 경우 시험자(또는 담당자)에게 보고하도록 시험대상자를 교육하였다. 시험대상자의 인체적용시험용 식품 섭취 이후의 모든 약물 투여 및 유의한 비약물 치료(물리치료 및 수혈 포함)를 증례기록서 '약물투여력/병용약물 확인(Drugs/Concomitant drugs)'에 기재하였다.

### 4) 무작위배정

- 가) 본 인체적용시험은 시험군 또는 대조군을 무작위배정하여 병행시험으로 진행하며, 필요한 시험대상자 수는 탈락율(20%)을 고려하여 각 군당 50명씩 총 100명이었다.
- 방문1(Baseline Visit, Week 0)에서 선정/제외기준에 적합한 모든 연구대상자에 대하여 블록화 무작위배정법의 할당코드에 의하여 각 군으로 배정하였다.
- 나) 무작위배정표는 SAS® system의 Randomization program으로 발생한 난수(A, B 의 Random number)의 순열을 인체적용시험대상자 번호 1번부터 순차적으로 적용시킨 것으로 SAS®를 통해 인체적용시험 전에 미리 고안하여 생성하였다. 의뢰자는 인체적용시험용 식품 포장 시 무작위 배정표에 따라 인체적용시험용 식품 라벨을 부착한 후, 인체적용시험 시작 전에 시험기관에 공급하였다.
- 다) 시험기관에서는 동의서에 서명하고, 스크리닝 검사를 시행하는 대상자에게 다음의 스크리닝 번호를 부여하였다.
- AA-S ZZZ {AA: 기관코드, S: Screening의 첫글자, ZZZ: 일련번호(001, 002~)}
- 라) 이후, 방문1에서 해당 대상자가 본 시험의 대상자로 적합한 경우에 다음의 대상자 번호를 순서대로 부여하고, 이때 일련번호와 같은 번호의 시험/대조식품을 섭취하도록 하였다.
- AA-R ZZZ {AA: 기관코드, R: Randomization의 첫글자, ZZZ: 일련번호(001, 002~)}
- 마) 시험기관 기관코드는 다음과 같다.
- 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터: CB

5) 시험대상자 모집 방법

본 인체적용시험은 만 25세 이상 만 75세 이하의 남녀 중 스크리닝 검사에서 측정된 말초혈액 백혈구 수치가  $3 \times 10^3$  이상 ~  $8 \times 10^3$  cells/ul 미만이고, 스트레스 자각 정도가 많음 이상이며, 시험시작 1년 이내 2회 이상 상기도감염 또는 상기도감염을 초래할 수 있는 대표적인 질환인 감기 증상이 있었던 사람으로 원내에 방문한 사람 중 시험계획서와 시험자의 임상적 판단에 따라 시험대상자를 모집할 계획이다. 또한 원내 포스터, 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 홈페이지 등을 이용하여 모집할 예정이며, 이를 통해 100명의 시험대상자가 등록될 때까지 지속하였다.

아. 인체적용시험 진행일정, 관찰 및 임상검사 항목과 방법

1) 인체적용시험 진행 일정

Table 53. 인체적용시험용 진행 일정표

Period		Screening <sup>1)</sup>	Active Treatment		
Visit		0	1	2	3
Week		-3~0	0	4	8
Window period (day) <sup>1)</sup>				±7	±7
서면동의서		✓			
인구학적 조사 <sup>2)</sup>		✓			
병력/약물 투여력 조사 <sup>3)</sup>		✓	✓		
이학적검사		✓		✓	✓
신체계측(신장, 체중) <sup>4)</sup>		✓		✓	✓
활력징후(혈압, 맥박) 측정		✓		✓	✓
체온 측정		✓	✓	✓	✓
임상병리검사 <sup>5)</sup>		✓			✓
임신반응검사 <sup>5)</sup>		✓			✓
심전도검사 <sup>6)</sup>		✓			✓
생활습관 지도 <sup>7)</sup>		✓	✓	✓	
식사지도 및 식이조사 <sup>8)</sup>			✓	✓	✓
스트레스 자각 평가 <sup>9)</sup>		✓			
상기도 감염 발생여부 조사		✓			
유효성 평가 <sup>5)</sup>	NK cell activity		✓	✓	✓
	식균작용(Phagocytosis)		✓		✓
	IFN- $\gamma$ <sup>10)</sup>		✓	✓	✓
	IL-2, IL-10, IL-12 <sup>10)</sup>		✓	✓	✓
	WBC 수	✓		✓	✓
	IgA, Cortisol, Serotonin <sup>10)</sup>		✓	✓	✓
	시험대상자 자신에 의한 개선도 평가			✓	✓

인체유래물검사(IL-6, TNF-α)		√		√
시험대상자 적합성 평가	√	√		
무작위배정		√		
시험식품 및 대조식품 처방		√	√	
병용약물 및 병용요법 확인			√	√
이상반응 확인			√	√
순응도 확인 <sup>11)</sup>			√	√

- 가) 스크리닝 후 3주일 이내 방문1이 시행되었다. 방문2, 3의 방문일은 지정된 날짜 전 · 후 7일을 허용하였다. 만약 스크리닝 방문의 검사가 누락된 경우, 방문1 Randomization 전까지 누락된 검사를 실시할 수 있도록 하였다.
- 나) 스크리닝 방문에 시험대상자의 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 면역질환 관련 증상 가족력, 음주여부, 흡연여부, 운동여부 등을 조사하여 기록하였다.
- 다) 스크리닝 방문에 스크리닝 시점을 기준으로 6개월 이내의 외과적 수술력을 포함한 병력과 4주 이내의 약물투여력을 조사하여 기록하였다(단, 당뇨로인해 약제는 과거의 복용 유무를 확인하였다).
- 라) 신장은 스크리닝 방문에 측정하며, 체중은 스크리닝 방문, 방문2, 3에서 측정하여 기록하였다. 신장과 체중은 반올림하여 0.1cm, 0.1kg단위까지 측정하였다.
- 마) 시험대상자는 매 방문 시 12시간 금식상태로 내원하여 검사를 실시하였다(단, 방문 2, 3 당일에는 시험용 식품을 물과 함께 섭취할 수 있도록 하였다). 임상병리검사는 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 재검사를 시행할 수 있으며, 스크리닝 시 14일 이내에 시행된 검사결과로 대체가 가능하다. 임상병리검사 항목은 다음과 같다.
- (1) 혈액학적검사(10종): WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelet count, Seg. Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil
  - (2) 혈액화학적검사(9종): AST(GOT), ALT(GPT), Total protein, Glucose, Total cholesterol, BUN, Creatinine, Uric acid, Triglyceride
  - (3) 소변검사(10종): Specific gravity, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Nitrite, RBC(Blood), Urobilinogen, WBC(Leukocyte)
  - (4) 임신반응검사(소변): Urine HCG (스크리닝 방문과 방문3에 가임기 여성만 해당)
- 바) 스크리닝 방문의 심전도검사는 스크리닝 시점을 기준으로 1개월 이내 검사 결과가 있을 경우 대체 가능하다.
- 사) 시험담당자는 각 다음방문 전날까지 음주, 심한 운동 등 평소와 다른 식사와 활동을 하지 않도록 시험대상자를 스크리닝 방문, 방문1, 2에 교육하였다.
- 아) 시험기간 동안 작두콩 및 우영 관련 식품 섭취를 자제하도록 시험대상자를 교육하며, 방문1, 3에 시험대상자 본인이 하루 전날 섭취한 식사를 식사기록법으로 조사하였다.
- 자) 스크리닝 방문에 4단계 척도(전혀 없음, 약간 있음, 많음, 아주 많음)를 이용하여

시험대상자에게 평상 시의 스트레스 자각 정도에 관하여 평가하였다.

- 차) 혈액 채취 후 혈청을 분리하여 분석 전까지 냉동보관 하여 중앙검사실에서 분석하였다.
- 카) 방문2, 3에 시험대상자가 지참하고 온 인체적용시험용 식품의 잔량을 비교하여 시험담당자가 점검 및 기록하였다(‘인체적용시험용 식품 처방 다음날 ~ 다음방문 당일’ 섭취).

## 2) 관찰 및 평가항목

### 가) 인체적용시험대상자 동의 및 인구학적 조사

인체적용시험에 들어가기 전, 본 인체적용시험의 목적과 내용에 대하여 시험대상자(또는 법정 대리인)에게 상세히 설명하고, 인체적용시험대상자에게 서면 동의를 받는다. 서면 동의는 인체적용시험 대상자가 자의로 서명하였다. 서면 동의를 받는 순서에 따라 스크리닝 번호를 부여한 후 인구학적 정보를 조사하였다.

인구학적 정보 조사의 기록사항은 서면 동의 여부 및 동의일자와 시험대상자의 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 면역질환 관련 증상 가족력, 음주여부, 흡연여부, 운동여부 등을 조사하였다.

### 나) 병력/약물 투여력 조사, 병용약물 및 병용요법

스크리닝 방문과 방문1에서 문진과 과거 진료 기록 점검 등을 통하여 조사하였다. 스크리닝 시점을 기준으로 6개월 이내 외과적 수술력을 포함한 병력을 상세히 조사하여 기록하였다. 과거력 및 현 병력에 대하여 발생시기(발생년도 또는 발생년월), 치료기간, 지속여부, 시험자의 의견 등을 기재하였다. 약물 투여력은 스크리닝 시점을 기준으로 4주 이내의 선행약물을 모두 확인하였다(단, 당뇨로 인해 약제는 과거의 복용 유무를 확인하였다).

인체적용시험용 식품 섭취 이후 방문2와 방문3에서 병용약물 및 병용요법을 확인하였다.

### 다) 이학적검사

스크리닝 방문, 방문2, 3에 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 대사/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관에 대한 대상자의 임상적 상태를 근거로 이학적검사를 시행하였다.

### 라) 신체계측(신장, 체중)

신장은 스크리닝 방문에 측정하며, 체중은 스크리닝 방문, 방문2, 3에서 측정하여 기록하였다. 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 동일한 담당자가 측정할 수 있도록 최선을 다하였다. 가벼운 옷차림 상태에서 신장과 체중은 반올림하여 0.1cm, 0.1kg단위까지 측정하였다.

마) 활력징후(혈압, 맥박, 체온) 측정

활력징후는 시험대상자에게 안정상태를 유지시킨 후 혈압, 맥박을 스크리닝 방문, 방문2, 3에 측정하였다. 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 동일한 시간대에 동일한 시험기관 담당자가 동일한 팔을 측정할 수 있도록 최선을 다하였다. 담당자가 다른 경우 담당자를 동일하게 교육하여 편차를 최소화하였다. 이상반응 점검을 위해 매 방문 때마다 체온을 측정하였다.

바) 임상병리검사

스크리닝 방문과 방문3에서 임상병리검사를 실시하여 시험대상자의 전신적인 건강상태를 평가하였다. 시험자는 시험대상자로 하여금 검사 전 12시간 금식상태로 내원하도록 지시하였다(단, 방문3 당일에는 시험용 식품을 물과 함께 섭취할 수 있도록 하였다). 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 재검사를 시행할 수 있으며, 스크리닝 시 임상병리검사는 14일 이내에 시행된 검사결과로 대체가 가능하다. 검사 항목에는 다음이 포함되었다.

- (1) 혈액학적 검사(10종): WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelet count, Seg. Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil
- (2) 혈액화학적 검사(9종): AST(GOT), ALT(GPT), Total protein, Glucose, Total cholesterol, BUN, Creatinine, Uric acid, Triglyceride
- (3) 소변검사(10종): Specific gravity, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Nitrite, RBC(Blood), Urobilinogen, WBC(Leukocyte)
- (4) 임신반응검사(소변): Urine HCG (스크리닝 방문과 방문3에 가임기 여성만 해당)

주목할 만한 임상병리학적 비정상치 기준을 벗어나는 임상병리검사 결과는 시험대상자의 증례기록서(CRF) 시험자 소견(Comments)란에 평가를 기재하고, 시험자가 적절하다고 판단하는 경우 추가 평가를 실시하였다. 임상병리학적 비정상치로 인하여 임상적 징후/증상이 야기되거나 치료 중재술이 필요한 경우 대상자의 증례기록서(CRF)의 '이상반응' 페이지에 진단 또는 의학적 상태를 입력하였다.

사) 심전도검사

스크리닝 방문과 방문3에서 심전도 검사를 실시하였다.

결과의 해석은 자격을 갖춘 의사가 실시해야 하며 증례기록서(CRF)에 기록해야 하였다. 임상적으로 유의한 비정상치는 시험대상자의 증례기록서의 '이상반응' 페이지에 기록해야 하였다. 시험대상자를 등록하기 전에 임상적으로 유의한 결과를 네오뉴트라(주) 모니터요원과 상의해야 하였다. 단, 스크리닝 방문의 심전도검사는 스크리닝 시점을 기준으로 1개월 이내 검사 결과가 있을 경우 대체 가능하다.



아) 생활습관지도

시험담당자는 각 다음방문 전날까지 음주, 심한 운동 등 평소와다른 식사와 활동을 하지 않도록 시험대상자를 스크리닝 방문, 방문1, 2에 교육하였다.

자) 식사지도 및 식이조사

- (1) 인체적용시험대상자로 적합하다고 판정될 경우, 시험기간 동안 대상자에게 평소 섭취하던 일반적인 식사형태, 식이섭취량을 유지하도록 권고하며, 작두콩 및 우엉 관련 식품 섭취를 자제하도록 교육하였다. 시험대상자에게 방문1, 2에 배부된 섭취빈도 조사지에 시험기간 동안 자신이 섭취한 작두콩 및 우엉 관련 식품 제품의 빈도수를 매주 1회 기록하도록 교육하였다.
- (2) 인체적용시험기간 동안 시험대상자의 평상시 식이를 조사하기 위해 방문1, 3에 시험대상자 본인이 하루 전날 섭취한 식품의 종류와 양, 음식명(조리명)을 스스로 상세히 작성, 기록하는 식사기록법으로 식이조사를 실시하였다.
- (3) 인체적용시험기간 동안 작성된 식이조사지는 한국영양학회의 CAN program을 이용하여 식품 및 영양소 섭취량을 분석하였다.

차) 스트레스 자각 평가

스트레스 자각 평가는 4단계 척도(전혀 없음, 약간 있음, 많음, 아주 많음)를 이용하여 시험대상자에게 평상 시의 스트레스 자각 정도에 관하여 평가하였다. 스크리닝 평가에서 스트레스 척도가 '많음', '아주 많음'인 사람이 시험에 참여하였다.

카) NK cell activity (Natural Killer cell 활성화, 자연살해세포 활성화)

- (1) NK cell(자연살해세포)는 림프구 중의 하나로 면역력을 나타내는 지표이다. 종양세포 또는 virus 감염세포를 항체의 사용 없이도 선택적으로 파괴하는 작용이 있으며, 또한 자연발생 종양이나 발암물질에 의해서 발생하는 종양에 대하여 면역학적 감시기능의 역할을 담당하는 세포로 중요시 되고 있으며, NK cell 활성화 작용이 면역력을 증강시킨다고 보고되었다<sup>5)</sup>.
- (2) NK cell은 large granular lymphocytes(LGLs)로서 특정의 암세포나 바이러스에 감염된 세포 등을 파괴하며 종양의 형성이나 바이러스 감염에 대해 숙주방어에 관여할 뿐만 아니라 체액성 면역이나 조혈작용에도 매우 중요한 역할을 하고 있다<sup>6-8)</sup>.
- (3) 특히, NK cell은 림프구의 극히 일부분이지만 면역 방어기전에 중요한 부분을 차지하는데 T림프구와 B림프구와는 달리 특별히 항원에 의한 면역이 만들어져 그에 대한 기억이 되어 있지 않아도 어떤 암세포나 바이러스에 감염된 세포들을 자발적으로 공격하는 세포독성을 나타내 표적세포를 살해함으로써 감염이나 이형성세포의 증식으로부터 우리 몸을 보호한다. 또한 항원과의 반응을 방해하여 일차적인 면역반응을 조절할 뿐 아니라 B림프구의 면역 글로블린 생산을 조절하는 면역계의 억제 세포(suppressor cells)이다<sup>9-12)</sup>.
- (4) NK cell 활성화가 약해지거나 없어지는 것은 질환을 나타내는 신호라 볼 수 있어

이는 치료 중의 호흡기 감염 등의 합병증을 방지하기 위한 면역기능을 판단하는데 예측인자가 되기도 한다<sup>13-15)</sup>.

- (5) 자연살해세포활성은 CytoTox 96W Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega Co., WI, USA)로 구한다. 헤파린 처리된 정맥혈을 비중원침법으로 PBMC(Peripheral Blood Mononuclear Cell)를 분리한 후 자연살해세포매개 파괴능을 측정한다. 측정방법은 LDH(lactate dehydrogenase) assay 방법으로 표적세포는 K562 (human leukemia cell line)을 사용하며, 주효세포와 표적세포비는 12.5:1, 25:1, 50:1을 사용한다. 자연방출과 최대방출을 같이 실시하여 cytotoxicity(%)를 아래의 방법으로 구한다. 방문1, 2, 3에 측정하였다.

$$\text{자연살해세포활성(\%)} = (\text{Experimental} - \text{Effector Spontaneous} - \text{Target Spontaneous}) / (\text{Target Maximum} - \text{Target Spontaneous}) \times 100$$

#### 타) 백혈구 수 (White Blood Cell 수)

- (1) 백혈구 수는 말초혈액 검사의 하나로 말초혈액에서 보는 과립구계(호중구, 호산구, 호염기구), 림프계 및 단핵구계 세포의 혈액 단위 용적당 총수를 말한다. 생리적인 변동이 생기기 쉬워 운동 등의 스트레스, 저녁, 임신, 오심, 구토, 동통, 불안 시 증가한다. 정맥혈 채혈의 경우 채혈 후 6시간 이내에 측정해야 정확도가 높아지므로 가급적이면 일정한 시각(오전)에 앉은 상태에서 6시간 이내에 백혈구 검사를 시행하도록 추천한다. 말초혈중 백혈구 수의 증감을 보이는 질환 및 상태는 다음과 같다.

(가) 증가 (>10,000 cells/ul) : 세균감염, 조직파괴, 폐암, 위암, 자궁암, 급성 및 만성 백혈병, 악성림프종, 비장 적출 후, 급성 출혈 후, 만성특발성 호중구증가증, 신부전, 간부전, 갑상선질환, 임신중독증, 자간, 당뇨병성 ketoacidosis, 알러지, 스트레스, 운동, 임신, 분만, 식후 등

(나) 감소 (<4,000 cells/ul) : 속립결핵, 중증감염증, typhus fever, malaria, ADIS, 골수염, 암의 골수전이, 비정형백혈병, 악성림프종, 심한 철결핍성 빈혈, 수혈 후, 자가면역성호중구감소증, 교원병, 점액수종, hyperglycinemia, 방사선, 진통제, 항암제, 항경련약, 항갑상선약, 항히스타민약, 항생물질, 간경변, 약액질, 심한 영양불량 등

- (2) 본 시험에서는 말초혈액 중 백혈구 수치가  $3 \times 10^3$  이상 ~  $8 \times 10^3$  cells/ul 미만인 성인을 시험대상자의 선정기준으로 하였으며, 스크리닝 방문, 방문2, 3에 측정하였다.

#### 파) IFN- $\gamma$ (Interferon- $\gamma$ )

- (1) T세포에 작용하여 Th1세포의 분화를 촉진시킴과 동시에 Th2세포의 증식을 억

제한다. IFN- $\gamma$ 는 대식세포를 활성화하여 대식세포의 미생물 살해능력을 증가시키며, Th1세포의 분화를 촉진하는 IL-12를 만들어내기도 한다. 또한 B세포를 활성화시켜 IgE 항체를 생성시키게 하는 IL-4의 생성을 조절한다. IL-4와 IFN- $\gamma$ 에 의한 면역 체계의 불균형이 여러 질환을 일으키는 원인이 되기도 한다.

- (2) IFN- $\gamma$  농도 측정을 위해 Luminex assay 시스템(Luminex 200TM(Millipore, USA))을 이용하여 Multiplex 분석을 시행한다. Luminex assay 시스템은 colored bead를 사용한 flowmetry 기반의 multiplex detection 시스템으로서 소량의 검체에서 Cytokine/ Chemokine 등을 동시에 검출하고 정량화 할 수 있으며, 민감도가 높은 장점이 있다. 방문1, 2, 3에 혈청을 분리하여 분석 전까지 냉동보관 하여 중앙검사실에서 분석하기로 하였으나, 방문1, 3에만 분석을 진행하였다.

하) IL-2, IL-10, IL-12 (Interleukin-2, 10, 12)

- (1) Cytokine은 당단백, 극미량에서 작용을 발휘한다. 그 작용을 발휘하기 위해서는 세포표면에 있는 특이수용체와 결합하여 작용하며 다중성과 상승성이 있다. 하나의 cytokine이 생산되면 다음의 cytokine이 생산되는 cytokine network가 존재한다. 생체의 항상성 유지에 불가결하지만 염증 같은 질환에서는 과잉으로 생산되어 병태를 형성한다는 특징이 있다. Cytokine은 생체에서 단독으로 작용하는 것이 아니라 항상 다른 cytokine과 협조하여 작용한다. 또한 그 활성을 억제하는 물질도 체내 (특히 혈중)에서는 대량으로 존재하여 항상성을 유지한다. Luminex assay 시스템(Luminex 200TM(Millipore, USA))을 이용하여 Multiplex 분석을 시행한다. Luminex assay 시스템은 colored bead를 사용한 flowmetry 기반의 multiplex detection 시스템으로서 소량의 검체에서 Cytokine/ Chemokine 등을 동시에 검출하고 정량화 할 수 있으며, 민감도가 높은 장점이 있다. 방문1, 2, 3에 혈청을 분리하여 분석 전까지 냉동보관 하여 중앙검사실에서 분석하기로 하였으나, 방문1, 3에만 분석을 진행하였다.

- (가) IL-2: T림프구에서 생산되어 T림프구 뿐만 아니라 NK세포나 Killer T세포 활성화, B세포 증식이나 분화에 관여한다. 즉, 생체방어와 조혈에 중요한 역할을 수행한다. 각종cytokine을 생산하는 helper T세포 증식을 촉진하는 것으로 IL-2 측정을 통해 helper T세포 기능 뿐만 아니라 면역응답능을 추측할 수 있다. SLE(Systemic lupus erythematosus), Rheumatoid arthritis, Hodgkin's병, 제 1형 당뇨, Condyloma acuminatum에서 IL-2 생산능이 저하된다.

- (나) IL-10: T세포, CD5+세포, B세포, 단핵구 등에 의해 생산된다. T, B 세포 등에 대해 다양한 활성이 있는데 특히 단핵구, macrophage계 세포의 IL-1, 6, TNF- $\alpha$  생산을 억제하는 것으로 항염증성 cytokine으로서의 역할이 주목되고 있다.

- (다) IL-12: 활성화 B세포나 단핵구, macrophage계 세포 등에서 생산된다. 사람 T세포의 IFN- $\gamma$ 유도활성이 있어서 NK활성도 증강하기 때문에 natural

killer stimulatory factor (NKSF)로도 알려져 암치료의 응용이 기대되고 있다.

#### 거) 식균작용 (Phagocytosis)

- (1) 식세포활동(식균작용, Phagocytosis)은 침입한 항원을 탐식하여 파괴하는 작용으로 숙주의 주요한 방어능력이다. 비정상적 식균작용은 다양한 임상적 이상을 유발하며, 이러한 결함은 호중구 자체 또는 면역글로불린, 보체 결함과 관련이 있을 수 있다. 선천적 결함은 actin dysfunction, tuftsin deficiency 그리고 보체 수용체 C3bi 결핍 등이다. 이러한 결핍은 결과적으로 호중구 식세포작용의 결함으로 인한 감염의 민감도를 증가시킨다. 식세포 활성화와 관련이 있는 결함은 trauma, 당뇨병, 신장 장애 그리고 감염에서 관찰되며, 재발성 세균성 감염, 비강 기관지 전염 환자 및 화상으로 인한 상처 감염 환자, AIDS 환자, 신생아와 노년층에서 식세포 활성화의 감소가 확인된다.
- (2) *In vitro* 및 *In vivo* 시험에서는 다양한 면역조절제(IL-2 및 INF- $\gamma$  등의 cytokine)가 호중구 및 단핵세포의 식세포 활성을 증가시키는 것으로 보고 되고 있다.
- (3) 본 시험에서는 헤파린 처리된 정맥혈을 사용하며 PHAGOTEST™ (ORPEGEN Pharma, Germany)의 방법을 시행하여 구하였다. 방문1, 3에 측정하였다.

#### 너) IgA (Immunoglobulin A)

IgA 항체는 주로 몸의 분비물(우유, 침, 눈물, 호흡기 및 장 분비물)에 존재하는 주요 항체이며 단량체 또는 2개의 단량체가 결합한 이량체 형태로 존재한다. IgA 분자는 장, 기관지, 젖샘이나 침샘 등을 감싸고 있는 상피세포에서 분비될 때 secretory component(SC)라 불리는 70 kDa의 당단백사슬과 결합하여 분비된다. SC는 상피세포에서 만들어져서 상피세포의 바깥쪽(내강의 반대쪽)에 노출되어 있으면서 IgA 이량체 분자의 수용체 역할을 한다. 수용체와 결합된 IgA 이량체는 상피세포 내로 세포내 이입이 일어나 상피세포의 내강쪽 형질막과 결합하여 일부가 효소에 의해 분해되면서 IgA 분자가 분비된다. 인체 내 IgA는 IgA1, IgA2 서브클래스로 구분되며 분비물 내 주요 IgA는 IgA2이다. IgA는 외부점막, 표피에 주로 존재하므로 외부환경으로부터 유래되는 병원균에 대한 첫 번째 방어막 역할을 하며, 점막에서 병원균이 부착하는 것을 방해하는 작용을 하는 것으로 생각되고 있다. 분비 IgA는 음식물 항원과도 반응하여 혈액 내 흡수를 차단함으로써 알레르기 반응을 감소시키기도 한다. 또한 대체경로(alternative pathway)를 통해 보체를 활성화시키고, 대식세포의 Fc 수용체에 결합하여 탐식작용을 위한 옵소닌 역할을 하며, 호산구 탈과립을 유발하여 기생충 감염에 방어한다<sup>16)</sup>.

방문1, 2, 3에 혈청을 분리하여 분석 전까지 냉동보관 하여 중앙검사실에서 분석하였다.

#### 더) Cortisol

Cortisol은 부신에 의해 생산되는 호르몬이다. Cortisol의 생산과 분비는 머리 속의 뇌 하부에 위치하는 작은 기관인 뇌하수체에서 생산되는 호르몬인 부신피질자극호르몬에 의해 자극된다. Cortisol은 몸 안에서 여러 역할을 한다. 단백질, 당, 지질을 분해하고, 혈압을 유지하고 면역체계를 조절하는 것을 돕는다. 열, 추위, 감염, 외상, 스트레스, 운동, 비만, 만성질환은 Cortisol 농도에 영향 미칠 수 있다. Cortisol은 하루 주기로 분비되어, 이른 아침에 증가하여 오전 8시를 전후하여 정점에 이르고 저녁에 떨어진다<sup>17)</sup>.

ARCHITECT Cortisol Kit(Abbott, USA)로 Architect i2000SR (Abbott, Singapore) 분석기기를 이용하여 CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay)로 분석하였다.

방문1, 2, 3에 혈청을 분리하여 분석 전까지 냉동보관 하여 중앙검사실에서 분석하였다.

#### 러) Serotonin

Serotonin은 아미노산인 트립토판에서 유도된 화학물질로서, 혈액이 응고할 때 혈소판으로부터 혈청 속으로 방출되는 혈관 수축작용을 하는 물질이다. 뇌·내장조직·혈소판(血小板)·비만세포에 들어 있으며, 5-하이드록시트립타민이라고도 한다. 인간과 동물의 위장관과 혈소판, 중추신경계에 주로 존재하며 행복의 감정을 느끼게 해주는 분자로, 호르몬이 아님에도 행복니스 호르몬 (happiness hormone)이라 불리기도 한다.

인체에서 전체 세로토닌의 약 80%는 소화관 내의 장크롬친화세포에 존재한다. 특히 회맹부(回盲部)에서의 카르티노이드 중앙 시에 뚜렷하게 증가한다. 세로토닌은 기분을 조절할 뿐만 아니라, 식욕, 수면, 근수축과 관련한 많은 기능에 관여한다. 또한 사고기능과 관련하기도 하는데 기억력, 학습에 영향을 미치며, 혈소판에 저장되어 지혈과 혈액응고 반응에 관여한다. L-트립토판으로부터 짧은 경로를 통하여 합성되며, 트립토판 하이드록실라제와 아미노산 탈카복실화 효소가 이 반응에 관여한다. 따라서 세로토닌이 모자라면 우울증, 불안증 등이 생긴다. 또한 식욕 및 음식물 선택에 있어서 중요한 조절자로 작용하며 탄수화물 섭취와 가장 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 국소적으로 세로토닌이 증가하면 식욕이 떨어지게 되고, 감소할 경우에는 반대 현상이 나타난다<sup>18)</sup>.

Serotonin Kit(Recipe, Germany)로 HPLC(Waters, USA) 분석기기를 이용하여 HPLC (High performance liquid chromatography)로 분석하였다.

방문1, 2, 3에 혈청을 분리하여 분석 전까지 냉동보관 하여 중앙검사실에서 분석하였다.

#### 머) 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가

방문2, 3에 섭취 전(스크리닝 방문)과 비교하여 시험대상자 자신이 다음과 같은 5단계로 면역기능 증진 개선도 평가를 실시하였다.

Table 54. 인체적용시험 자가 개선도 평가표

점수	구분	기준
1	매우 우수	전반적으로 증상의 현저한 개선
2	우수	전반적으로 증상의 개선
3	불변	섭취 전과 차이 없음
4	악화	전반적으로 증상의 악화
5	매우 악화	전반적으로 증상의 현저한 악화

버) 면역관련지표 (IL-6, TNF- $\alpha$  등)

유효성 평가항목 외에 추후 면역관련 지표(IL-6, TNF- $\alpha$  등)를 추가적으로 분석할 수 있음에 따라 방문1과 방문3 시에 샘플을 수집하여 보관한 후 분석하고자 하였다. 추가 면역관련 지표는 본 연구의 유효성 및 안전성 평가항목 분석 후 시험책임자의 판단 또는 학술발표에의 활용 등에 의해 분석 여부를 판단할 예정이었으며, 본 연구에서는 분석이 진행되지 않았다. 시험대상자가 2차적 사용을 위한 제공여부에 동의하지 않으면 시험대상자의 추가분석을 위한 샘플은 수집되지 않았다. 추가분석을 위한 샘플은 시험대상자가 작성할 동의서에 기재된 기간만큼 냉동보관되며, 분석 종료 후 즉시 폐기 또는 기재된 기간 종료 후(3년 이내) 폐기 하도록 하였다. 또한 시험대상자가 본 연구를 조기 종료하는 경우에도 추가분석을 위한 샘플을 폐기 요청할 수 있었으며, 이에 따른 어떠한 불이익도 받지 않을 것임을 보장하였다.

방문1, 3에 면역관련 지표(IL-6, TNF- $\alpha$  등) 분석을 위하여 2mL의 혈액을 채취하고, 실온에 방치 후 3000rpm, 10분 동안 원심분리 하였다. 분리된 혈청은 냉동(-70°C) 보관하였다.

서) 선정기준/제외기준 확인 (시험대상자 적합성 평가)

스크리닝 방문에 이루어진 대상(또는 법정 대리인) 동의여부와 인구학적 조사, 병력 조사, 약물투여력 조사, 이학적검사, 신체계측, 활력징후, 임상병리검사, WBC 수 결과, 스트레스 자각 평가, 상기도감염 발생여부 조사 결과를 종합하여 선정기준/제외기준에 적합한 시험대상자인지를 스크리닝 방문, 방문1에 평가하여 기록하였다.

어) 무작위배정 및 섭취

스크리닝 방문, 방문1에서 선정기준 및 제외기준에 적합하다고 평가가 이루어진 대상자를 대상으로 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정 하고, 무작위배정번호에 따라 섭취하였다. 섭취방법은 인체적용시험용 식품을 받은 다음날부터 섭취하도록 하며, 다음 방문 당일까지 섭취하도록 지도하였다.

저) 이상반응 점검

이상반응에 대한 정보는 무작위배정 방문 이후부터 시험대상자에게 우회적으로 질문(Non-directive questioning)하여 탐색하였다. 또한 방문 시 또는 방문

기간 사이에 시험대상자가 자발적으로 보고하거나 이학적 검사, 임상병리검사 또는 기타 평가를 통하여 확인하였다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 인체적용시험용 식품과 관련하여 취해진 조치 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계, 인체적용시험용 식품 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함되었다.

이상반응으로 분류되는 대표적인 증상 조사에 대하여 아래에 기술하였다.

(1) 발열에 대한 점검

발열은 체온을 기록하고 발현 정도를 이상반응 평가기준에 따라 기록하며, 약제 투여 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계를 평가하였다.

(2) 자.타각적 증상에 대한 점검

자.타각적 증상은 시험자의 진료를 통하여 이상반응 발현 여부를 조사하고, 평가 기준에 따라 발현 정도를 기록하며, 약제 투여 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계도 평가하였다.

(3) 임상병리검사에 대한 점검

임상병리검사에서 어떤 비정상적인 변화는 발현 증상에 대한 예상원인과 임상병리검사 시 검사내용에 지장을 줄 수 있는 요인(심각한 피로 등)이 있었는지 면담을 통하여 기록하였다. 약제투여 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계도 평가 하였다.

처) 순응도 확인

시험/대조식품의 섭취상황에 대하여 방문1, 2에 시험/대조식품 처방 후 시험담당자가 기록하고, 방문2, 3에 시험대상자가 지참하고 온 시험/대조식품의 잔량 및 분실량을 확인하여 시험담당자가 점검하였다. '시험/대조식품 처방 받은 다음날 ~ 다음 방문 당일' 섭취함을 원칙으로 하며, 남은 식품은 시험담당자에게 반납하였다. 순응도 확인 시 섭취율(%)은 반올림하여 소수점 1자리까지 표기하였다.

$$\text{섭취 순응도}(\%) = \text{실제 섭취한 식품 수} / \text{섭취해야 하는 식품 수} \times 100$$

3) 관찰 검사 방법 (방문별)

가) 스크리닝 방문 (Screening visit, week -3 이내)

본 인체적용시험에 참가하는 시험대상자는 인체적용시험에 대한 설명을 듣고, 다음 평가를 받았다.

- (1) 시험 참여 전에 시험 과정을 설명하고, 시험대상자에게 서면 동의서를 받았다.
- (2) 시험대상자는 순서대로 스크리닝 번호를 지정 받았다.

- (3) 시험대상자의 인구학적 정보, 병력(외과적 수술력을 포함한 과거력 및 현병력) 및 약물 투여력을 조사하였다.
- (4) 이학적검사를 실시하였다.
- (5) 스트레스 자각평가를 실시하였다.
- (6) 상기도 감염 발생여부를 조사하였다.
- (7) 활력징후(혈압, 맥박, 체온) 및 신체계측(신장, 체중)을 실시하였다.
- (8) WBC 검사를 실시하였다.
- (9) 임상병리검사를 실시하였다.
- (10) 가임기 여성 시험대상자의 경우 임신반응 검사를 실시하였다.
- (11) 심전도검사를 실시하였다.
- (12) 생활습관 지도를 실시하였다.
- (13) 선정/제외 기준에 대해 1차적으로 적합성을 판정하였다.
- (14) 시험대상자의 다음 방문일을 지정하였다.

나) 1차 방문 (Randomization visit, week 0)

이 방문은 최초 방문일 이후 21일 이내에 이루어지고, 다음 평가를 받았다.

- (1) 지난 방문과 비교하여 병력/약물 투여력의 변화여부를 확인하였다.
- (2) 이제까지의 모든 검사 및 평가결과를 종합하여 선정기준/제외기준의 적합성을 평가하였다.
- (3) 무작위배정하여 배정번호를 부여하였다.
- (4) 유효성 평가(NK cell activity, 식균작용, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-12, IgA, Cortisol, Serotonin)를 실시하였다.
- (5) 체온을 측정하였다.
- (6) 생활습관 지도를 실시하였다.
- (7) 식사기록법으로 식이조사를 실시하고, 작두콩 및 우영 관련 식품의 섭취 빈도를 조사하였다.
- (8) 1차 시험/대조식품을 처방하고, 섭취 방법에 대하여 교육하였다.
- (9) 시험대상자의 다음 방문일을 지정하였다.

다) 2차 방문(Interim visit, Week 4)

이 방문은 방문1 이후 28일( $\pm 7$ 일)에 이루어지고, 다음 평가를 받았다.

- (1) 이상반응 유무를 확인하였다.
- (2) 지난 방문과 비교하여 병용약물 및 병용요법을 확인하였다.
- (3) 활력징후(혈압, 맥박, 체온) 및 체중을 측정하였다.
- (4) 이학적검사를 실시하였다.
- (5) 생활습관 지도를 실시하였다.



- (6) 유효성평가(NK cell activity, IFN- $\gamma$ , WBC수, IL-2, IL-10, IL-12, IgA, Cortisol, Serotonin, 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가)를 실시하였다.
- (7) 작두콩 및 우엉 관련 식품의 섭취 빈도를 조사하였다.
- (8) 1차 시험/대조식품 반납을 확인하고 섭취 및 순응도를 확인하였다.
- (9) 2차 시험/대조식품을 처방하고, 섭취방법을 다시 한 번 설명하였다.
- (10) 시험대상자의 다음 방문일을 지정하였다.

라) 3차 방문 (Closing visit, Week 8)

이 방문은 방문1 이후 56일( $\pm$ 7일)에 이루어지고, 다음 평가를 받았다.

- (1) 이상반응 유무를 확인하였다.
- (2) 지난 방문과 비교하여 병용약물 및 병용요법을 확인하였다.
- (3) 활력징후(혈압, 맥박, 체온) 및 체중을 측정하였다.
- (4) 이학적검사를 실시하였다.
- (5) 임상병리검사를 실시하였다.
- (6) 가임기 여성 시험대상자의 경우 임신반응 검사를 실시하였다.
- (7) 심전도검사를 실시하였다.
- (8) 유효성평가(NK cell activity, 식균작용, IFN- $\gamma$ , WBC수, IL-2, IL-10, IL-12, IgA, Cortisol, Serotonin, 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가)를 실시하였다.
- (9) 식사기록법으로 식이조사를 실시하고, 작두콩 및 우엉 관련 식품의 섭취 빈도를 조사하였다.
- (10) 2차 시험/대조식품 반납을 확인하고 섭취 및 순응도를 확인하였다.

마) 추가방문 (필요시)

추가방문은 예정된 방문 외에 시험대상자 또는 법정 대리인의 요청 또는 시험자의 판단에 의해 필요하다고 판단될 때 수시로 이루어질 수 있다. 인체적용시험대상자가 예정되지 않은 날에 방문한 경우에는 이상반응, 병용약물, 시행한 검사의 결과 및 그에 따른 의학적 처치 등을 증례기록서에 기록하여야 하였다. 본 인체적용시험 중 추가방문은 진행되지 않았다.

**자. 인체적용시험용 식품의 사용상 주의사항**

현재 특별히 알려진 부작용은 없으나 천연물 소재의 추출물 복용 시 있을 수 있는 경미한 소화기계 이상반응이 발생할 수 있으므로 주의하였다. 또한 특이체질, 알레르기 체질의 경우 성분을 확인하고 섭취해야 하며 시험대상자에게 이상반응이 발생할 경우 시험자 또는 시험담당자에게 보고하도록 교육을 시행하였다.

**차. 시험중지 및 탈락기준, 분석 제외 기준**

## 1) 시험중지 및 탈락기준

인체적용시험에 참여하는 모든 시험대상자의 시험 완료 여부를 기록하고, 인체적용시험용 식품 섭취나 관찰이 중단된 경우에는 그 이유를 기록하였다. 인체적용시험이 진행중인 대상자에 대하여 시험을 중단할 수 있는 경우는 다음과 같았다.

- 가) 선정기준/제외기준에 위배된 경우
- 나) 면역 관련 건강기능식품 및 의약품을 섭취하는 경우
- 다) 시험대상자에게 중대한 이상반응(Serious Adverse Events)이 발생한 경우 혹은 이상반응(Adverse Events)으로 인하여 시험대상자가 시험 중단을 요구하는 경우
- 라) 섭취 전 검사에서 발견치 못한 전신질환이 발견된 시험대상자
- 마) 시험 기간 중 만족스럽지 못한 치료 효과로 인하여 시험대상자(또는 법정 대리인)가 시험 중단을 요구하는 경우
- 바) 시험대상자(또는 법정 대리인)가 시험 참가 동의를 철회한 경우
- 사) 시험대상자의 추적이 안되는 경우
- 아) 시험대상자에게 인체적용시험용 식품을 섭취하는데 문제가 있는 경우
- 자) 시험 기간 동안 담당의사의 지시 없이 시험 결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 및 식품 등을 투여한 경우
- 차) 시험자의 판단에 의해 시험의 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우
- 카) 임신이 확인되는 경우

시험자가 어떤 사유로든 시험대상자에게 최선이라고 결론을 내린 경우에는 언제든지 시험대상자를 탈락시켜야 한다. 계획서 위반이 시험대상자의 안전성에 유의한 위험이 되지 않으면, 계획서 위반 때문에 대상자를 탈락시키지 말아야 한다.

시험대상자는 언제든지 어떤 사유로든 시험을 자발적으로 중단할 수 있다. 시험대상자가 중단할 의사를 표현한 경우, 방문을 하지 않은 경우, 또는 어떤 사유로든 추적조사에 실패한 경우 탈락으로 간주된다.

조기 탈락이 발생하게 되면, 시험자는 시험대상자가 시험에서 조기 탈락하게 된 일차 사유를 결정하여 이 정보를 증례기록서 '시험종결'에 기재하여야 한다.

시험대상자의 정해진방문일의 window period 3배수까지 추적을 진행하여 추적에 실패한 시험대상자는 탈락시킬 수 있다. 추적조사에 실패한 시험대상자(즉, 중단 의사를 표시하지 않고 시험 방문에 나타나지 않아서 시험대상자의 상태가 불분명한 대상자)에 대해서는 시험대상자에게 연락하기 위해 취한 조치(예: 전화한 날짜, 등기 우편 등)를 근거 문서에 기록함으로써 "책임을 다했음"을 보여야 한다.

## 2) 준응도와 시험계획서 위반에 대한 처리

- 가) 본 시험의 시험책임자와 시험담당자는 시험계획서의 위반이 발생하지 않도록 계획

서에 대해 충분히 숙지하고 철저히 이행하여야 한다. 본 시험에서 시험대상자는 처방된 인체적용시험용 식품을 지시된 사용방법을 준수하여 사용하도록 교육한다. 인체적용시험용 식품의 정확한 사용과 방문 일정 준수를 위하여 시험자는 시험계획서에서 정한 방문 계획에 따라 방문할 수 있도록 적절한 조치, 예컨대 차기 방문시간에 대한 서면 통보나 전화 모니터링 등을 필히 실시해야 한다. 반면, 부득이하게 발생된 계획서 위반 사항에 대해서는 다음에 따라 처리한다.

- 나) 중대한 시험계획서 위반의 경우, 예컨대, 대상자 중지/탈락 기준에 해당하거나, 시험대상자 선정/제외기준 위반, 동의서 미취득, 섭취하지 않은 경우 등 시험대상자의 안전과 시험결과에 중대한 영향을 미칠 수 있는 위반의 경우 해당 시험대상자를 시험자와 협의 후 시험에서 탈락처리(Drop-out) 할 수 있다.
- 다) 선정/제외기준 위반으로 중도 탈락 시에는 시험대상자 등록 목표 레수에 포함되지 않으므로 추가로 시험대상자를 등록해야 한다.
- 라) 기타 경미한 위반 사항은 위반 또는 지연 정도와 사유를 정확히 기재하고 결과분석 시 시험에 영향을 주었는지 고찰한다.

#### 카. 평가변수 및 평가방법 (통계 분석 방법)

##### 1) 유효성 평가

###### 가) 유효성 평가변수

- (1) NK cell activity (12.5:1, 25:1, 50:1)
- (2) 식균작용(Phagocytosis)
- (3) IFN- $\gamma$
- (4) IL-2, IL-10, IL-12
- (5) WBC 수
- (6) IgA, Cortisol, Serotonin
- (7) 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가

###### 나) 유효성 평가방법

섭취 전(스크리닝 방문, 방문1: week -3, 0)과 섭취 후(방문2, 3: week 4, 8) 평가한 NK cell activity, 식균작용(Phagocytosis), IFN- $\gamma$ , WBC 수, IL-2, IL-10, IL-12, IgA, Cortisol, Serotonin, 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가의 평균을 비교하고, 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석, 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

##### 2) 안전성 평가

###### 가) 안전성 평가변수

- (1) 이상반응
- (2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)
- (3) 활력징후 (혈압, 맥박, 체온), 체중
- (4) 심전도 검사

나) 안전성 평가방법

이상반응, 활력징후(혈압, 맥박, 체온), 체중, 임상병리검사를 실시하여 섭취 전후 각 군간의 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. 또는 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 있는지 분석하였다.

3) 통계분석 방법

가) 결과분석의 일반적 원칙

- (1) 본 인체적용시험의 대상자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety Set 분석, FAS(Full Analysis Set)분석과 PPS(Per Protocol Set)분석의 세 가지 형태로 이루어졌다.
- (2) Safety Set 분석은 인체적용시험용 식품을 한번이라도 섭취한 시험대상자 집단을 대상으로 이루어졌다.
- (3) 본 인체적용시험에 무작위배정을 받은 모든 대상자를 분석 대상으로 하는 원칙(ITT)에 따라 FAS 분석은 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행한 시험대상자이며 주요 선정기준 위반에 해당되지 않는 집단을 대상으로 이루어졌다.
- (4) PPS 분석은 FAS 중에서 인체적용시험을 종료하고, 인체적용시험결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항(선정/제외기준 위반 등)이 없는 시험대상자 집단을 대상으로 이루어졌다.
- (5) 유효성에 대한 자료는 PPS 분석을 주 분석법으로 하고, FAS 분석을 추가적으로 실시한다. 영양분석 및 인구학적에 대한 자료는 PPS 분석을 주 분석법으로 하고, 안전성에 대한 자료는 Safety Set 분석을 주 분석법으로 실시하였다.
- (6) 결측치가 발생한 경우, 결측치가 발생한 시점을 기준으로 가장 최근에 얻어진 자료를 이용하여 보정(LOCF)하여 분석하였다.
- (7) 본 인체적용시험에서 얻은 자료는 적당한 기술통계량으로 평균(Mean)과 표준편차(Standard deviation)를 산출하여 제시하며, 차이(Difference)에 대한 유의성은 양측검정으로  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

나) 인구통계학적 기초자료

시험대상자의 인구통계학적 혹은 임상학적 특성을 파악하기 위하여 시험 전 시험대상자의 특성에 대하여 기술하였다. 인구통계학적 자료에 따라서 적당한 기술통계량들을 구하고, 연속형 자료는 군별 평균과 표준편차를 제시하였다. 군별 비교를 위하여 Two sample t-test를 실시하고 유의확률 값을 제시하였다. 범주형 자료는 각 수준별로 빈도와 비율을 제시하고 독립성검정을 위한 Chi-square test 혹은 Fisher's exact test를 실시하고 유의확률 값을 제시하였다.

다) 유효성 변수에 대한 분석

NK cell activity(12.5:1, 25:1, 50:1), 식균작용(Phagocytosis), IFN- $\gamma$ ,

IL-2, IL-10, IL-12, WBC 수, IgA, Cortisol, Serotonin에 대한 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 실시하고, 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하며, 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가에 대한 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

라) 안전성 변수에 대한 분석

안전성 평가는 크게 임상적으로 측정된 이상반응 여부, 임상병리 검사 결과, 활력징후(맥박, 혈압, 체온) 및 체중 결과, 심전도검사 결과의 이상에 근거하였다.

(1) 이상반응

인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 이상반응(treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA preferred term에 따라 Coding하며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화 한 후 발생률을 산출하여 평가하였다. 각 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석하였다.

(2) 임상병리검사

(가) 섭취 전(스크리닝 방문: week -3)과 섭취 후(방문3: Closing visit, week 8)의 임상병리검사 결과를 비교하여 변화값을 산출하였다.

(나) 혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석하였다. 뇨 검사의 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였다.

(3) 활력징후(맥박, 혈압, 체온), 체중

활력징후(맥박, 혈압, 체온), 체중 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석하였다.

(4) 심전도검사

심전도검사 결과는 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 분류하여 표로 제시하며, McNemar 검정을 이용하여 군내 차이를 비교하였다.

마) 중간분석

본 인체적용시험에서는 적용하지 않았다.

## 타. 이상반응을 포함한 안전성 평가방법, 평가기준 및 보고방법

### 1) 안전성 관련 용어의 정의

#### 가) 이상반응 (Adverse Event, AE)

인체적용시험용 식품을 투여한 시험대상자에게 발생한 모든 유해하고 의도하지 않은 증후(症候, Sign, 실험실 실험 결과의 이상 등을 포함한다), 증상(症狀, Symptom) 또는 질병을 말하며, 해당 인체적용시험용 식품과 반드시 인과관계를 가져야 하는 것은 아니다.

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

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

#### 다) 중대한 이상반응 • 이상약물반응 (Serious AE • ADR)

인체적용시험용 식품의 임의 용량에서 발생한 이상반응 또는 이상약물반응 중에서 다음 어느 하나에 해당하는 경우를 말한다.

- (1) 사망
- (2) 생명을 위협
- (3) 입원 또는 입원기간의 연장
- (4) 지속적 또는 의미 있는 불구나 기능저하 초래
- (5) 선천성 기형 또는            이상 초래
- (6) 기타 의학적으로 중요한 상황

#### 라) 예상하지 못한 이상약물반응 (Unexpected Adverse Drug Reaction)

인체적용시험자자료집 또는 의약품의 첨부문서 등 이용가능한 의약품 관련 정보에 비추어 이상약물반응의 양상이나 위해의 정도에서 차이가 나는 것을 말한다.

마) 위에서 열거한 상황이 아니더라도 의학적으로 시험대상자의 안위와 건강상태에 중대한 영향을 미칠 것으로 사료되는 상황이 발생한 경우, 담당의사 및 관련 전문가의 의학적 판단에 따라 중대한 이상반응으로 간주할 것인가의 여부를 결정하고 이에 따라 적절한 조치를 취한다.

### 2) 평가 방법

가) 본 인체적용시험에서 이상반응 평가는 시험 시작 전에 관찰되지 않은 증상이 섭취 기간 중에 새로이 나타난 증상으로서 인체적용시험용 식품과의 인과관계에 상관 없이 의도하지 않았던 증후(임상병리검사상 비정상치 포함) 및 증상과 인체적용시험용 식품 사용과 관련된 일시적인 현상 등을 총칭한다.

나) 인체적용시험용 식품의 이상반응으로 예상되는 현상(증세 및 증상, 시작일, 지속기

간 등)은 이상반응 조사서에 빠짐없이 기록되어야 하며, 기록되지 않은 것은 주관적인 증상으로 분류된다.

다) 이상반응 정도에 대한 평가는 연구자가 평가기준을 참고하여 증상의 경중에 따라 단계별로 평가하는 것을 원칙으로 한다.

라) 인체적용시험용 식품과의 인과관계는 담당의사가 평가기준에 따라 6단계로 분류하여 평가를 시행한다.

(1) Definitely related (명확히 관련이 있음)

(가) 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우

(나) 이 인체적용시험용 식품 섭취가 다른 어떤 이유보다 가장 개연성 있게 설명되는 경우

(다) 섭취 중단으로 이상반응이 사라지는 경우

(라) 재섭취(Rechallenge, 가능한 경우에만 실시) 결과가 양성인 경우

(마) 이상반응이 이 인체적용시험용 식품 또는 동일계열의 이 식품에 대해 이미 알려져 있는 정보와 일관된 양상을 보이는 경우

(2) Probably related (관련이 있다고 생각됨)

(가) 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우

(나) 이 인체적용시험용 식품 섭취와 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우

(다) 이상반응이 다른 원인보다 이 인체적용시험용 식품 섭취에 의해 더욱 개연성 있게 설명되는 경우

(라) 섭취 중단으로 이상반응이 사라지는 경우

(3) Possibly related (관련이 있을 가능성이 있음)

(가) 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우

(나) 이 인체적용시험용 식품 섭취와 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우

(다) 이상반응이 다른 가능성 있는 원인들과 같은 수준으로 본체에 기인한다고 판단되는 경우

(라) 섭취중단으로(실시된 경우) 이상반응이 사라지는 경우

(4) Probably not related (관련이 없다고 생각됨)

(가) 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 없는 경우

(나) 이상반응에 대해 보다 가능성 있는 다른 원인이 있는 경우

(다) 섭취 중단 결과(실시된 경우)가 음성이거나 모호한 경우

(5) Definitely not related (명확히 관련이 없다고 생각됨)

(가) 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 없는 경우

(나) 이상반응에 대해 가장 개연성 있게 설명되는 다른 어떤 이유가 있는 경우

(다) 섭취 중단결과(실시된 경우)으로 이상반응이 소실되지 않는 경우

(6) Unknown (불명)

### 3) 평가기준

가) 발열

발열은 체온을 측정하며, 다음과 같은 평가기준에 따라 단계별로 평가한다.

Table 55. 발열 평가 기준

등급기준	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
발열(℃)	none	< 38.7	38.7 ~ 40	> 40.0	Fever with hypotension

나) 자·타각적 증상

자·타각적 증상의 정도는 시험연구자의 진료를 통하여 검사항목의 이상에 대한 기준이 있는 경우(WHO 이상반응 평가기준 등) 이들 기준에 따라 그 경중을 단계별로 나누어 평가하고, 기준 적용이 적절치 않을 경우는 Spilker 등의 3단계 분류법 및 다음의 일반 기준 분류법을 적용하여 평가한다. 그리고 기록상의 혼선을 방지하기 위하여 이상반응의 정도에 대한 분류는 다음과 같이 통일하도록 한다.

Table 56. 자·타각적 증상 평가 기준

일반기준 분류법	없음(0)	경증(1)	중등도(2)	중증(3)	SAE(4)
WHO	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Spilker 분류법	None	Mild	Moderate	Severe	

(1) 일반기준 분류법

- Mild(1) : 쉽게 견딜 수 있는 이상반응
- Moderate(2) : 일상 생활에 상당한 지장을 주는 이상반응
- Severe(3) : 정상적인 일상 생활을 할 수 없을 정도의 이상반응

(2) WHO 5 단계 분류법

- Grade 0 : 어떤 구속 없이 정상적인 활동을 수행할 수 있는 상태
- Grade 1 : 보행 및 일을 수행할 수 있으나 육체적으로 격한 활동이 제한되는 상태
- Grade 2 : 보행 및 자기보호가 가능하나 깨어 있는 시간의 50% 이상 어떤 일을 수행할 수 없는 상태
- Grade 3 : 오직 제한된 자기 보호가 가능하고 깨어 있는 시간의 50% 이상을 침대나 의자에 의존하는 상태
- Grade 4 : 자기 보호가 불가능하고 의자에 전적으로 의존하고 상태

(3) Spilker 등의 3단계 분류법

- Mild(1) : 처치가 필요치 않고 대상자의 정상생활(기능)을 크게 저해치 않는 경우
- Moderate(2) : 대상자의 정상생활(기능)을 유의하게 저해하며, 처치가 필요할 수도 있으며 처치 후 회복되는 경우
- Severe(3) : 심한 이상반응으로 고도의 처치가 필요하며, 후유증이 남는 경우

4) 인체적용시험용 식품과의 인과관계

이상반응 발현 시 인체적용시험용 식품과의 연관성 여부는 담당의사가 다음과 같이



분류하고, 필요 시 시험연구자의 견해를 부가한다.

(위의 인과관계 판정기준 참조)

- (1) 명확히 관련이 있음
- (2) 관련이 있다고 생각됨
- (3) 관련이 있을 가능성이 있음
- (4) 관련이 없다고 생각됨
- (5) 명확히 관련이 없다고 생각됨
- (6) 불명

## 5) 보고방법

### 가) 이상반응의 보고

- (1) 시험책임자는 시험담당자 및 시험대상자에게 시험/대조식품 섭취 후 나타날 수 있는 모든 이상반응에 대하여 교육을 실시하고 섭취 후 나타나는 모든 현상에 대하여 보고하도록 교육을 시행한다.
- (2) 시험/대조식품 사용 후 전신적 또는 임상병리학적으로 나타나는 제반 증상에 대하여 종류, 발생시간, 정도, 처치, 치료약제, 경과, 시험/대조식품과의 인과관계 등에 대한 기록 및 보관은 인체적용시험 관리기준에 준하도록 시험대상자 증례기록서에 기입한다.
- (3) 시험책임자는 인체적용시험 결과보고 시 인체적용시험 기간 중 발생된 모든 증상에 대하여 서술하고 평가를 실시하며, 인체적용시험기간 중 "중대한 이상반응·이상약물반응"(Serious AE·ADR)" 발생 시에는 기능성식품임상시험심사위원회(IRB)에 보고하여 시험의 지속 또는 중단 여부를 결정하고, 신속 보고가 필요한 경우 의뢰자를 통해서 각 항에서 정한 기간 내에 신속히 시험기관 IRB에 보고하도록 한다.
- (4) 시험자에 의해 명확히 본제와의 관련성이 없음으로 판단된 이상반응의 추적조사 기간은 해당 시험대상자의 마지막 방문 후 14일(2주)로 정한다.
- (5) 본제와의 인과관계가 있다고 판단된 추가적인 안전성 정보는 주기적으로 해당 이상약물 반응이 종결(해당 이상약물반응의 소실 또는 추적조사의 불가 등)될 때까지 보고하여야 한다.
- (6) 시험책임자는 인체적용시험을 시행함에 있어서 모든 제반 사항을Declaration of Helsinki(부록 1)에 준하여 시행한다.

### 나) 신속 보고

#### (1) 목적

시험자 및 기타 관계자로 하여금 중대한 이상약물반응에 대한 새롭고 중요한 정보를 알게 하기 위함이다.

(2) 보고 대상

(가) 중대하고 예상하지 못한 이상약물반응의 단일 증례

(나) 신속한 의사소통이 필요한 경우

각각의 상황에서는 적절한 의학적, 과학적 판단이 이루어져야 한다. 일반적으로 건강기능식품의 위험<sup>5</sup>편익 평가에 영향을 줄 수 있는 정보, 건강기능식품 섭취에 변화를 줄 수 있는 정보 또는 아래에 예로 들은 상황들이 이에 해당한다.

- ① 예상된 중대한 이상약물반응의 경우 임상적으로 중요하게 판단되는 발현률의 증가
- ② 시험대상자에게 심각한 해를 끼칠 수 있는 경우
- ③ 새로 시행된 동물실험에서 중요한 안전성 정보를 알게 된 경우 (예: 발암성)

(3) 보고 시기

시험기간 중 중대하고 예상하지 못한 식품이상반응 등이 발생한 경우 시험책임자는 기능성식품임상시험심사위원회(IRB)에 보고하여 시험의 지속 또는 중단 여부를 결정하도록 한다.

(가) 사망을 초래하거나 또는 생명을 위협하는 예상하지 못한 이상약물반응은 신속히 보고하여야 한다. 시험책임자는 전화, 팩스, 문서를 통해 시험기관 IRB의 규정에 따라 신속/정기 보고하고, 완전한 보고서를 제출하여야 한다.

(나) 다른 모든 중대하고 예상하지 못한 이상약물반응의 경우에는 이 사실을 보고 받거나 알게 된 날로부터 시험기관 IRB의 규정에 따라 보고한다.

(4) 보고를 위한 최소기준

(가) 이상반응의 보고를 위한 최종 기술 및 평가에 대한 정보는 상기 보고시기 내에 얻지 못할 수 있다. 그러나 정해진 상기 보고시기 내에 초회 보고를 하여야 한다.

(나) 추적 조사 정보는 상세히 조사, 제출되어 활용될 수 있도록 한다.

다) 보고 방법

이상반응 신속 보고 시에는 시험기관 IRB의 중대한 이상반응 보고서 양식을 이용하며, 신속보고 시점에서 모든 정보를 얻을 수는 없더라도 가능한 많은 정보를 얻기 위해 최대한 노력을 기울여야 한다.

6) 예상하지 못한 중대한 이상약물반응 발생 시 조치 사항

본 시험기간 중 인체적용시험책임자, 시험담당자는 시험대상자의 안전에 만전을 기하여야 하며, 예상하지 못한 중대한 이상약물반응 발생 시에는 시험을 중지하고 신속하고 적절한 조치를 취하여 이상반응을 최소화하여야 한다.

인체적용시험 중 “예상하지 못한 중대한 이상약물반응” 발생 시 각 담당자의 의무는

다음과 같다.

가) 인체적용시험 책임자의 의무

인체적용시험책임자는 인체적용시험 중 예상하지 못한 중대한 이상약물반응이 발생한 때에는 즉시 기능성식품임상시험심사위원회(IRB) 및 인체적용시험 의뢰자에게 보고하고 별도의 지시가 있을 때까지 해당 인체적용시험용 식품에 대한 인체적용시험의 일부 또는 전부를 중지하여야 한다.

나) 인체적용시험 담당자의 의무

인체적용시험 담당자는 인체적용시험 실시 중에 예상하지 못한 중대한 이상약물반응 등이 발생한 경우에는 즉시 인체적용시험 책임자 및 인체적용시험 의뢰자에게 보고하여야 한다.

다) 기능성식품임상시험심사위원회(IRB)의 의무

기능성식품임상시험심사위원회(IRB)는 예상하지 못한 중대한 이상약물반응이 나타난 경우에는 인체적용시험의 일부 또는 전부에 대하여 중지명령 등 필요한 조치를 인체적용시험책임자에게 하여야 한다.

라) 의뢰자의 의무

의뢰자는 인체적용시험 책임자, 인체적용시험 공동연구자, 인체적용시험 담당자로부터 예상하지 못한 중대한 이상약물반응 보고를 받은 경우 이상반응보고서에 인체적용시험 책임자, 인체적용시험 공동연구자, 인체적용시험 담당자로부터 제출 받은 보고서 사본을 식품의약품안전처장에게 제출하여야 한다. 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고받거나 알게 된 날로부터 7일 이내에 보고하고, 상세한 정보를 최초 보고일로부터 8일 이내에 추가로 보고하여야 한다. 그 밖의 중대하고 예상하지 못한 이상약물반응의 경우 의뢰자가 해당 사실을 보고받거나 알게 된 날부터 15일 이내 제출하여야 한다.

**파. 동의서, 보상 규약, 시험 후 대상자 진료 및 치료**

1) 동의서 설명문 및 동의서 양식

시험책임자 및 시험책임자의 위임을 받은 공동연구자는 본 인체적용시험의 실시에 있어 시험대상자에게 인체적용시험 내용 및 인체적용시험용 식품의 효과, 이상반응에 대해 사전에 충분히 설명하고 시험대상자(또는 법정대리인)의 동의를 얻는다.

2) 보상에 대한 규약

## 피해 보상에 대한 규약

### 1. 목적

- (1) 해경산업㈜은 시험대상자의 신체적인 손상(사망 포함)에 대해 보상한다.
- (2) 손상의 원인이 인체적용시험용 식품의 결취로 인해 발생하였을 때 해경산업㈜은 시험대상자에게 보상한다.
- (3) 지속적이고 불구가 될 수 있을 정도의 손상뿐만 아니라 일시적 통증 또는 쉽게 치료할 수 있는 손상에 대해서도 보상한다.
- (4) 인체적용시험용 식품에 의해 생긴 이상반응 또는 발현된 이상반응의 고경 치료 과정에서 발생한 손상의 경우, 인체적용시험용 식품이 직접적인 원인이 된 손상에 대하여 보상한다.

### 2. 다음 경우에는 보상하지 아니한다

- (1) 해경산업㈜의 주관 하에 집행되지 않았거나 해경산업㈜에서 제공하지 않은 인체적용시험용 식품으로 발생한 이상반응에 의한 손상
- (2) 인체적용시험용 식품 적용중에 대한 효과 또는 해악을 제공하지 못한다에 대한 보상
- (3) 서로 합의한 연구계획서(프로토콜)에서 이탈함으로써 야기된 손상
- (4) 대상자 또는 보호자의 부주의에 의하여 초래된 손상(예: 인체적용시험대상자의 부주의로 일어난 교통사고)

### 3. 보상평가 기준

- (1) 보상수준은 손상의 본질, 그 정도, 지속성 여부 등에 적절한 액수여야 하며, 국내 제 법규 및 판례 등에 의해 유사 손상들에 대해 일반적으로 지급되는 것과 동일해야 한다.
- (2) 보상수준에 대해서 본인 또는 법정대리인과 해경산업㈜ 사이에 이견이 있을 경우, 양자가 수용할 수 있는 전문가의 자문을 구하여야 한다.

해경산업㈜은 앞에서 언급한 여러 제반 내용을 참고하여, 시험대상자가 본 연구에 의해 어떠한 불이익이라도 받지 않도록 주의하며, 만약 본 연구에 의해 문제가 발생할 경우 피해 보상규약에 의거하여 책임을 질 것을 서약합니다.

2017년 2월 28일

해경산업㈜ 대표이사 고광현 (인)

Fig. 178. 인체적용시험 피해 보상에 대한 규약

### 3) 인체적용시험 후 시험대상자 진료 및 진료기준

인체적용시험에서 탈락되거나 반응이 없는 시험대상자는 다른 적절한 치료를 받을 수 있도록 지도하며, 인체적용시험이 종료된 시험대상자는 기대하지 않았던 지연 이상반응 발생에 대비하여 담당의사의 지시에 따라 언제든지 진료를 받을 수 있도록 한다.

## 하. 시험대상자의 안전 보호에 관한 대책

### 1) 인체적용시험 실시기관

인체적용시험 실시기관의 장은 각 인체적용시험 단계별로 해당 인체적용시험의 실시에 필요한 시험실 및 전문인력을 갖추고, 해당 인체적용시험을 적정하게 실시할 수 있도록 준비에 완벽을 기해야 한다.

### 2) 인체적용시험계획서의 승인 및 수정

인체적용시험의 승인을 얻거나 승인 받은 인체적용시험을 변경하여 실시하고자 하는 경우, 인체적용시험 단계별로 계획서 또는 변경 계획서에 대하여 기능성식품임상시험심사위원회(IRB)의 승인을 받는다. 승인 이전에 시험대상자를 인체적용시험에 참여 시킬 수 없다.

### 3) 인체적용시험계획서의 숙지

본 시험은 헬싱키 선언에 입각하여 시험대상자의 권리와 복지를 염두에 두고 준비된 것으로서, 시험자가 시험계획을 정확히 분석 및 숙지하고, 인체적용시험대상자의 문제점을 적극적으로 대응한다.

### 4) 인체적용시험의 동의

인체적용시험에 들어가기 전에 시험대상자에게 시험내용 및 인체적용시험용 식품의 효과, 이상반응 및 안전성에 대한 모든 사항을 설명한 후 시험대상자 자신이 자발적으로 본 인체적용시험에 참여하겠다는 동의서를 받고 시험에 들어간다.

### 5) 적합한 시험대상자의 선정

본 인체적용시험에 앞서 시험대상자와의 충분한 면담 및 검사를 통하여 시험대상자 적합여부에 대하여 철저히 평가한다.

### 6) 인체적용시험의 진행 점검

시험책임자는 의뢰자에게 주기적으로 이상반응, 시험진행, 상황, 결과 등에 대하여 보고하며, 인체적용시험 의뢰자는 주기적으로 인체적용시험 진행 상황에 대하여 점검을 시행할 수 있다.

### 7) 인체적용시험 실시기관의 모니터링

가) 시험대상자의 권리와 복지 보호, 보고된 인체적용시험 관련 자료가 근거문서와 대조하여 정확하고, 완전하며, 검증이 가능한지 여부 확인, 인체적용시험이 승인된 계획서, 의약품임상시험관리기준 및 의약품 등 안전에 관한 규칙 제30조의 규정에 따라 수행되는지의 여부 확인을 위하여 모니터링을 시행한다.

나) 인체적용시험에 대한 모니터링은 애경산업(주)에서 인체적용시험 업무를 의뢰한 네오뉴트라(주) 모니터요원의 정기적인 시험기관 방문과 전화를 통해서 이루어 질 것이다. 방문 시 모니터요원은 기본적으로 시험대상자기록 원본, 인체적용시험용 식품

관리 기록 및 기본문서 등을 확인한다. 또한, 모니터요원은 인체적용시험 진행과정을 잘 살피고, 문제가 있을 경우 시험자와 상의한다.

- 다) 이들 방문의 적절한 시간은 시험자와 모니터요원과 협의하여 시행될 것이다. 시험자는 ICH-GCP에 정의된 것과 같이, 모니터요원이 증례기록서(CRF)에 기입된 자료들을 확인할 수 있는 시험대상자의 원 자료들(Source documents: 병원 또는 개인 차트, 실험실 결과 기록, 예약 기록 등)을 볼 수 있도록 해주어야 한다.

#### 8) 시험대상자의 비밀유지

시험대상자의 신원을 파악할 수 있는 기록은 비밀로 보장될 것이며, 인체적용시험의 결과가 출판될 경우에도 시험대상자의 신원을 비밀상태로 유지한다. 구체적인 내용은 다음과 같다.

본 시험에 관련된 의뢰자, 모니터 및 점검자는 본 시험의 모니터링과 점검 및 진행사항 관리를 위한 목적으로 대상자의 기록을 열람할 수 있다. 시험자는 본 인체적용시험의 계약이 체결됨과 함께 인체적용시험 의뢰자 또는 인체적용시험수탁기관의 모니터요원 및 점검자가 근거문서와 증례기록서 기록을 검증하기 위하여 해당 문서를 검토하거나 복사할 수도 있음을 숙지하여야 한다. 이러한 정보들은 기밀로 보관되어야 하며, 기밀 보관을 위한 시설과 그 관리 기준을 갖추고 있어야 한다.

한편, 증례기록서 등 인체적용시험에 관련된 모든 서류에는 시험대상자 이름이 아닌 시험대상자식별코드 (일반적으로 시험대상자 이니셜)로 기록하고 구분한다.

#### 9) 인체적용시험용 식품 관리

- 가) 인체적용시험용 식품은 밀폐용기에 넣어 서늘한 곳에 보관하며 시험책임자의 지시(처방) 없이는 사용할 수 없도록 한다.
- 나) 의뢰자는 인체적용시험용 식품 등을 시험책임자와 협의하여 시험책임자 또는 시험담당자에게 교부하여야 하며 인수증을 받아 보존하여야 한다. 이 때 인체적용시험용 식품에는 "인체적용시험용"이라는 표시가 있어야 한다.
- 다) 시험연구자는 인체적용시험용 식품 등이 인체적용시험 이외의 목적으로 사용되지 않도록 보관, 관리하여야 한다.
- 라) 의뢰자는 인체적용시험 실시 중 인체적용시험용 식품 등의 수량 및 보관상태 등을 확인하고 인체적용시험이 적절히 진행될 수 있도록 조치하여야 한다.
- 마) 의뢰자는 인체적용시험의 중지 및 종료 또는 시험자가 계획서에 따라 시험을 실시하지 않는 경우 미사용 인체적용시험용 식품 등을 회수하여 폐기하도록 한다. 이 때 시험책임자 또는 시험담당자는 시험책임자와 협의 후, 미사용 인체적용시험용 식품을 의뢰자에게 반납하고 그 반납증을 보존하여야 한다.

#### 10) 이상반응 발생 시 조치

이상반응 발생 시 시험자로부터 필요검사 및 치료를 받을 수 있도록 관리한다. 중대한 이상약물반응 발생시는 시험을 중지하고 12.5항 및 12.6항의 이상반응 발생 시

조치사항에 따라 신속하고 적절한 조치를 취한다.

#### 거. 기타 시험을 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항

인체적용시험 실시와 관련된 각종 자료 및 기록을 잘 보존하도록 보관하는 장소가 따로 준비되어 있고 보안을 유지하도록 한다. 인체적용시험 실시기관의 장은 심사위원회 및 시험책임자로부터 인계 받은 기록 및 자료를 보관책임자를 정하여 보관하여야 한다. 문서는 결과보고서가 작성 완료되어 제출된 후 3년 동안 보관하도록 한다.

#### 너. References

- 1) 한국건강기능식품협회, 2013년 건강기능식품 시장 현황 및 소비자 실태 조사
- 2) 한국식품안전관리인증원, 2015 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석
- 3) 금사상항버섯 추출물이 사람의 natural killer 세포 활성화에 미치는 영향. 한국식품과학회지 2006; 38(5) : 717-19
- 4) Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Pharmacology and Toxicology, 2005
- 5) 원산지별 홍삼투여에 따른 백서의 자연살해세포 활성화도 변화에 대한 연구, 대한한방내과학회지 29(4) : 1075-1082, 2008
- 6) Natural killer cells in human health and disease. Clin. Immunol. 118:1-10, 2006
- 7) Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2-and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NFkappaB. Biol. Pharm. Bull. 27:1656-1562, 2004
- 8) Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitric oxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 309:399-407, 2003
- 9) Natural killer cells: their roles in defense against disease. Science 214: 24, 1981
- 10) Dendritic cells that have interacted with antigen are targets for natural killer cells. J Exp Med 162: 625-36, 1985
- 11) Human natural killer clones enhance *in vitro* antibody production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. Scand J. Immunol 32: 153-62, 1990
- 12) Suppressive effect of human natural killer cells on Epstein-Barr virus-induced immunoglobulin synthesis. J Immunol. 137: 1462-7, 1986

- 13) Quantifying the stress induced by distress in patients with lumbar disc herniation in terms of natural killer cell activity measurements: chromium release assay versus multiparameter flow cytometric assay. *Spine* 27: 2095-100, 2002
- 14) Pain and immunologic response to root canal treatment and subsequent health outcomes. *Psychosom Med* 63: 453-62, 2001
- 15) Chronic social stress, social status, and susceptibility to upper respiratory infections in nonhuman primates. *Psychosom Med* 59: 213-21, 1997
- 16) 대한진단검사의학회편. 진단검사의학 제5판 758.
- 17) 대한진단검사의학회편. 진단검사의학 제5판 445-6.
- 18) 시사상식사전, 박문각
- 19) 식품의약품안전처, 식품원재료데이터베이스  
(<https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/foodMaterial/foodMaterialDB.do> menu\_no=294&menu\_grp=MENU\_GRP01)
- 20) 식품의약품안전처, 생약종합정보시스템  
(<https://www.mfds.go.kr/herbmed/index.do>)
- 21) Lymphocyte proliferation studies of *Canavalia gladiata* lectin, Sadasivan Nair LAIJA., Sivan Pillai MAHESH, Leela Sasikumar SMITHA, Prathapan REMANI, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2010, 8(2):51-55
- 22) *In Vitro* and *In Vivo* Anti-Allergic Effects of *Arctium lappa* L., Knipping K., van Esch E. C., Wijering S. C., van der Heide S., Dubois A. E., Garssen J., *Experimental biology and medicine / Society for Experimental Biology and Medicine*, 2008, 233(11):1469-1477
- 23) 작두콩(*Canavalia gladiata*) 추출물의 화학적 특성 및 항산화 활성 화합물의 단리·구조해석. 학위논문. 김종필. 2014년 2월. 1~86p
- 24) Effects of *Canavalia* lectins on Acute Inflammation in Sensitized and Non-sensitized Rats, Pinto N. V., Cavada B. S., Brito L. F., Pereira R. I., da Silva M. T., Castro R. R., de Freitas Pires A., Assreuy A. M., *Inflammation*, 2013, 36(3):713-722
- 25) Effects of *Arctium lappa* L. (Burdock) root tea on inflammatory status and oxidative stress in patients with knee osteoarthritis, Maqhsoumi-Norouzabad L., Allipoor B., Abed R., Eftekhar Sadat B., Mesqari-Abbasi M., Asqhari Jafarabadi M., *International Journal of Rheumatic Diseases*, 2016, 19(3):255-261



### 3. 인체적용시험 개시

#### 가. 시험 견본 내역

Table 57. 인체적용시험 시험 견본 내역

인체적용시험용 식품명	규격/단위	수량
작두콩추출물등복합물 또는 작두콩추출물등복합물 위약(1차) Expirydate:2019.05.08. LotNo.:7001또는7002	34정/1box 1정/day (27일분+여유분7일)	1차분 : 100boxes (CB-R001-1~CB-R100-1)
	1정/1pack(1일분)	1차분 : 100packs (CB-R001-1~CB-R010-1)
작두콩추출물등복합물 또는 작두콩추출물등복합물 위약(2차) Expiry date : 2019.05.08 Lot No. : 7001 또는 7002	41정/1box 1정/day (27일분+여유분14일)	2차분 : 100boxes (CB-R001-2~CB-R100-2)
	1정/1pack(1일분)	2차분 : 100packs (CB-R001-2~CB-R100-2)


#### 나. 시험 견본 이미지



다. 유효성 평가

- 1) 외부 수탁 기관 : 녹십자랩셀
- 2) 검사항목 : IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-12, IgA, Cortisol, Serotonin
- 3) 검체 보관 방법 : 전처리 후 -20도 이하에서 냉동보관







Table 58. 시험 검체 검사 항목 및 운송 방법

검사항목	채혈		운송	보관
IFN- $\gamma$ IL-2, IL-10, IL-12	8.5ml SST 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 채취후진도혼합되도록가볍게흔들어준다.</li> <li>• 30분간 Standing</li> <li>• 즉시 3000rpm, 10분원심분리</li> <li>• 분리된상층액일부를 Transfertube 에 옮긴다.</li> </ul>	2.0ml Whitetransfertube (검체량:1.5ml)	냉동
IgA			2.0ml Pinktransfertube (검체량:1.0ml)	
Cortisol			2.0ml Yellowtransfertube (검체량:1.0ml)	
Serotonin			2.0ml Bluetransfertube (검체량:1.0ml)	

라. Sample 수거 : 1주 단위 수거

마. 방문 별 품목내역

Table 59. 방문별 품목 내역 및 수량

품목	SST 8.5ml	2.0ml Transfer Tube	21G Needle	Pipette	Holder	Label	검체인수 확인증
사진		Whitetube1개 Pinktube1개 Yellow tube1개 Bluetube1개					
수량	1	4	1	1	1	4	1

바. 유효성 평가 방법

- 1) NK cell activity (12.5:1, 25:1, 50:1)
  - 가) LDH(lactate dehydrogenase) assay 방법으로 측정
- 2) 식균작용 (Phagocytosis)
  - 가) PHAGOTEST™ (ORPEGEN Pharma, Germany)의 방법을 시행
- 3) IFN- $\gamma$ 
  - 가) Luminex LX 200 LX 200™ 시스템을 이용하여 Multiplex 분석
- 4) IL-2, IL-10, IL-12
  - 가) Luminex LX 200 LX 200™ 시스템을 이용하여 Multiplex 분석
- 5) WBC수

- 6) IgA, Cortisol, Serotonin
- 7) 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가
- 8) IBR 심사 통지서

### 심사결과 통지서

수신	의회기관	매경산업㈜					
	책임연구자	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 채수원					
연구과제명		면역기능 증진에 대한 작두콩추출물동복함물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조 인체적용시험					
		Protocol No.	AKY_CAEC		Version No.	1.0	
		IRB No.	2017-02-005				
연구담당	책임연구자	소속	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	직위	교수	성명	채수원
		소속	전북대학교병원 기능성식품임상 시험지원센터	직위	연구교수	성명	최은경
연구내용		■기능성식품(식품명: 작두콩추출물동복함물) □기구 □기타 ( )					
연구 예정 기간		IRB 승인 후 1년					
심사내용		<input checked="" type="checkbox"/> 정식심사 <input type="checkbox"/> 신속심사 <input checked="" type="checkbox"/> 연구심의신청서(■ 초기심의 □ 재심의 ) <input type="checkbox"/> 심사의견에 대한 답변서 <input type="checkbox"/> 연구계획변경신청서 <input type="checkbox"/> 중간보고서 <input type="checkbox"/> 중지신청서 <input type="checkbox"/> 중대한이상반응보고서 <input type="checkbox"/> 종료보고서 <input type="checkbox"/> 결과보고서 <input type="checkbox"/> 연차지속심의보고서 <input type="checkbox"/> 기타 ( )					
심사일시		2017년 04월 04일		중간보고주기		개월	
심사결과		<input checked="" type="checkbox"/> 승인/시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 중지/부결 1. 제목 수정 요청합니다. -작두콩/우영추출물 복합물, 작두콩추출물동복함물, 작두콩/우영 복합추출물에서 일체의 상의하여 수정요청 바랍니다. 2. 정확한 섭취시간을 명시해 주시기 바랍니다. 3. 기능성을 면역기능 증진으로 제출했는데 동물실험 기전은 스트레스지표가 관련이 있습니다. 면역과 연관된 자료 추가 요청합니다. 4. 모집공고문에 연구제목 추가해 주시고 교통비를 사례비로 수정해 주시기 바랍니다. <div style="text-align: center;">시정승인</div>					
승인 유효기간 (승인일로부터 1년):		년 월 일 ~ 년 월 일					
<small>           *보편을 요하는 "보완", "시정승인"시에는 1개월 이내에 심사의견에 대한 답변서를 제출하시기 바랍니다.            *승인 유효기간은 승인일로부터 1년으로 1년에 1회씩 연차지속심의보고서를 제출해야 합니다.            *중간보고주기에 맞추어 연구진행현황을 보고해야 합니다. 중간보고주기가 12개월인 경우 별도로 중간보고서를 제출하지 않고, 연차지속심의보고서를 1년에 1회 제출해야 합니다.            *연구대상자 모집 종료 시에는 종료보고서를, 연구 종료 시에는 결과보고서를 작성하여 제출해야 합니다.            *연구 중에 중대한 이상반응(Severe Adverse Event)발생시 책임연구자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.         </small>							
<b>전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회위원장</b>							

Fig. 179. 인체적용시험 설계

사. 대상자 모집 및 등록: 2017년 5월 ~ 2017년 7월 (약 3개월)

Table 60. 대상자 모집 및 등록 인원

Planned Enrollment	Screening	Screening Fail	Randomized n(%)	Active	D/O	Completed
101*	117	16	101(100%)	0	7	94



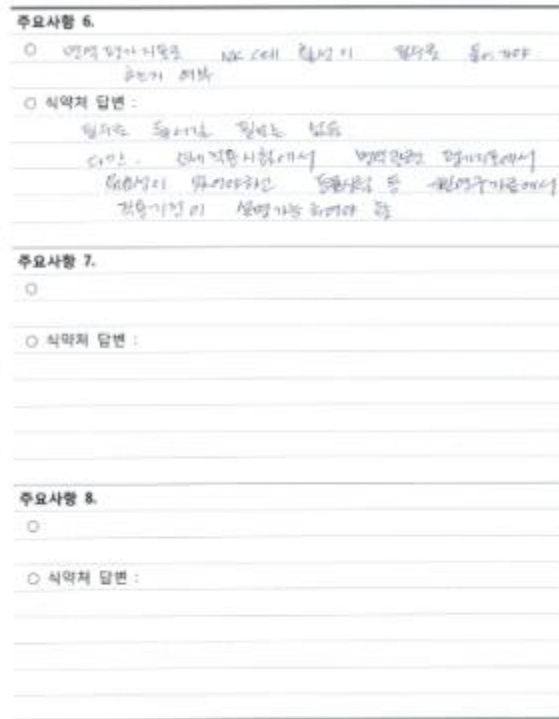


Fig. 181. 식약처 모뎀 토의 회의록

2) 주요 내용

가) 우영 표준물질 선정시 Isochlorogenic acid A 선정 가능 여부

(8) 클로로겐산과 유사한 것으로 특이성이 없어 보이나, 지표성분 선정 타당성, 원료 관리 방안을 제시해야 함.

나) 신청 원료의 안전성 자료 제출 범위

(1) 작두콩과 우영이 식품원료로 사용 가능하고 70% 추정 추출물이기에 '나'로 분류되어 독성 자료가 요구되어지지 않을 가능성이 있지만, 안전성DB, 섭취 근거자료, 섭취량 평가 자료 등 모든 안전성 자료 검토 후 최종 결정됨.

다) 혈액 건본 지표 분석 시 ELISA 방법 대신 Luminex시스템을 이용한 Multiplex 분석 가능 여부

(1) Multiplex 분석 결과가 ELISA분석 결과와 상관성 여부, Multiplex 사용 시 장단점 등 충분히 검토 후 판단 가능함

라) 동물모델(부동화)과 인체적용시험 모델이 일치해야 하는지 여부

(1) 인체적용시험 결과를 기반연구자료에서 작용기전등을 설명하고 과학적으로 뒷받침할 수 있어야 함.

(2) 기반연구자료에서는 가능한 다양한 모델, 평가지표를 보는 것도 중요하나 일반적 모델, 평가지표 선정 역시 중요함.

마) 면역 평가 지표로 NK cell 활성이 필수로 들어가야 하는지 여부

(1) 필수로 들어갈 필요는 없음.

(2) 다만, 인체적용시험에서 면역관련 평가지표에서 유효성이 있어야 하고 동물시험 등 기반연구자료에서 작용기전이 설명 가능하여야 함

## 5. 인체적용시험 결과

### 가. 시험대상자

#### 1) 시험대상자의 인체적용시험 참여상태

본 인체적용시험은 2017년 05월 22일 첫 시험대상자가 스크리닝 되었고, 2017년 08월 04일 마지막 시험대상자의 시험이 완료되었다.

본 인체적용시험에서는 적합한 시험대상자를 선정하기 위해 총 117명에 대해서 Screening 평가를 실시하였으며, 스크리닝 탈락 16명으로 총 101명(시험군 51명, 대조군 50명)이 무작위배정되었다. 이중 시험군에서 동의철회 3명, 대조군에서 동의철회 3명, 선정기준 위반 1명으로 총 7명이 중도탈락하여 인체적용시험을 완료한 시험대상자는 총 94명이었다(시험군 48명, 대조군 46명).

무작위배정된 모든 시험대상자의 참여상태는 Table 4, 5에 정리하였다.

Table 61. 시험대상자 참여상태 (무작위배정된 모든 시험대상자)

시험기관명(기관코드)	시험자	인체적용시험대상자 수		
		시험군 (작두콩추출물등 복합물)	대조군 (Placebo)	Total
전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터(CB)	채수완	51	50	101

Table 62. 무작위배정 후 탈락된 시험대상자

Group	Randomization No.	Date of termination	Category of reason	
섭취후 탈락	시험군	CB-R032	2017-06-07	동의철회(V1 이후)
		CB-R063	2017-06-26	동의철회(V1 이후)
		CB-R097	2017-06-16	동의철회(V1 이후)
대조군		CB-R004	2017-07-21	동의철회(V1 이후)
		CB-R034	2017-06-01	선정기준 위반
		CB-R095	2017-08-01	동의철회(V2 이후)
		CB-R096	2017-06-16	동의철회(V1 이후)

#### 2) 분석에 포함될 시험대상군의 선정

2018년 3월 23일 본 인체적용시험의 분석군 판정을 위한 연구자 모임을 진행하였다. 본 인체적용시험의 유효성은 PP Set을 주 분석으로 하고, FA Set을 추가적으로 분석하였다.

Safety Set은 인체적용시험에 무작위배정된 후 시험용 식품을 1회 이상 섭취한 시험대상자로 시험군 51명, 대조군 50명이 분석에 포함되었다.

FA Set은 계획서에 기술하였던 대로 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행하고 주요 선정기준 위반에 해당되지 않는 시험대상자 집단을 대상으로 이루어졌다. 따라서 무작위배정된 시험대상자 101명(시험군 51명, 대조군 50명) 중 중도탈락되어 유효성 평가를 실시하지 않은 6명(시험군 3명, 대조군 3명)이 제외되어 총 95명(시험군 48명, 대조군 47명)이 FA Set에 포함되었다.

PP Set은 FA Set 분석에 포함된 시험대상자 중에서 인체적용시험을 종료하고, 인체적용시험 결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항이 없는 시험대상자로서 분석군 판정을 통해 시험군에서 섭취 순응도 80% 미만 2명이 제외되었으며, 대조군에서 섭취 순응도 80%미만 1명, 1차 시험용 식품 미반납 1명, 방문2 이후 중도탈락한 1명이 제외됨에 따라 총 90명(시험군 46명, 대조군 44명)이 PP Set에 포함되었다.

Figure 2는 인체적용시험 시작 이후부터 완료 시점까지의 시험대상자의 인체적용시험 참여상태 및 분석군 정리를 요약한 것이다.

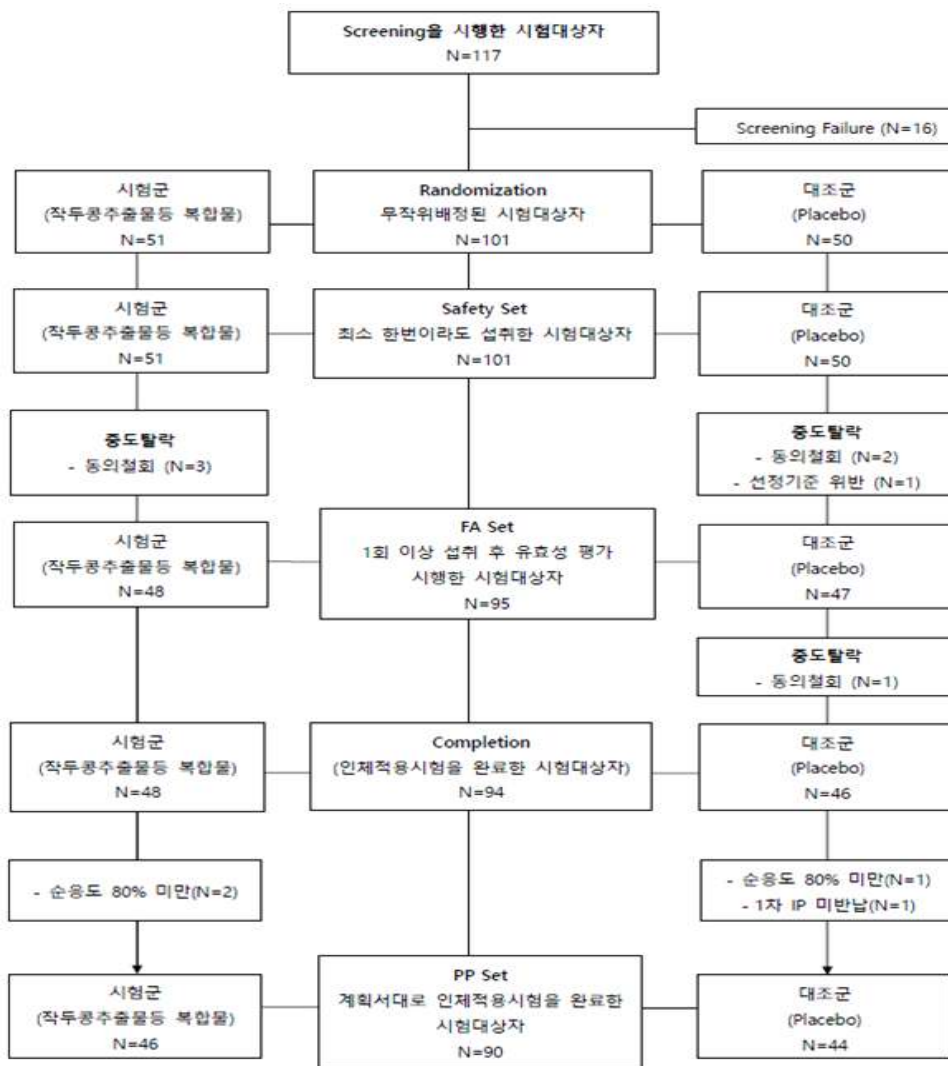


Fig. 182. 시험대상자의 인체적용시험 참여상태 및 분석군 정리

### 3) 시험대상자의 인구학적 정보 및 기타 섭취 전 특성에 대한 비교

Table 63은 시험대상자의 인구학적 정보 및 섭취 전 특성을 비교한 것이다. 본 인체적용시험에 참여한 시험대상자의 인구학적 정보를 포함한 섭취 전의 모든 특성을 섭취 군별로 비교하여 차이가 있는 요인을 확인하고자 하였다.

성별에서는 시험군의 경우 남성이 11명(23.91%), 여성이 35명(76.09%)이 포함되었고, 대조군의 경우 남성이 7명(15.91%), 여성이 37명(84.09%) 포함되었으며, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다( $p=0.3427$ ).

연령에서는 시험군이 평균  $58.52\pm 5.29$ 세, 대조군이 평균  $57.50\pm 4.09$ 세로 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다( $p=0.3101$ ).

그 밖에 면역질환 관련 증상 가족력, 흡연여부, 흡연량, 흡연기간, 음주여부, 운동여부에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 63. 시험대상자의 인구학적 정보 및 섭취 전 특성 (PP Set)

		시험군 N=46	대조군 N=44	p-value
성별 n(%)	남	11 (23.91)	7 (15.91)	0.3427 <sup>+</sup>
	여	35 (76.09)	37 (84.09)	
연령 (세)	Mean±SD	58.52±5.29	57.50±4.09	0.3101 <sup>*</sup>
	Min, Max	50.00, 71.00	50.00, 67.00	
면역질환 관련	있음	0 (0.00)	0 (0.00)	-
증상 가족력 n(%)	없음	46 (100.00)	44 (100.00)	
흡연여부 n(%)	아니오	45 (97.83)	44 (100.00)	1.0000 <sup>*</sup>
	Ex-Smoker(6개월 이상 금연)	0 (0.00)	0 (0.00)	
	Smoker	1 (2.17)	0 (0.00)	
흡연량	흡연하는 대상자 중, (____)개비/1일			



		시험군 N=46	대조군 N=44	p-value
	Mean±SD	20.00	-	-
	Min, Max	20.00, 20.00	-	-
흡연하는 대상자 중, (____)년				
흡연기간	Mean±SD	25.00	-	-
	Min, Max	25.00, 25.00	-	-
음주여부	아니오	31 (67.39)	31 (70.45)	
	끓었다	0 (0.00)	0 (0.00)	
	1병 미만/일주일	12 (26.09)	11 (25.00)	1.0000*
	1병~3병/일주일	3 (6.52)	2 (4.55)	
	4병 이상/일주일	0 (0.00)	0 (0.00)	
운동여부 n(%)	아니오	14 (30.43)	12 (27.27)	
	3회 미만/주 or 30분 미만/회	7 (15.22)	5 (11.36)	0.7711†
	3회 이상/주 or 30분 이상/회	25 (54.35)	27 (61.36)	

\*: p-value by Two sample t-test

†: p-value by Chi-square test

‡: p-value by Fisher's exact test

이학적검사는 신체기관별로 '정상', '비정상'으로 분류하여 비교하였으며, 두 군 모두 정상으로 확인되었다(Table 64).

Table 64. 이학적검사 (PP Set)

신체기관명		시험군 N=46, n(%)	대조군 N=44, n(%)	합계 N=90, n(%)	p-value‡
심혈관계	정상	46 (100.00)	44 (100.00)	90 (100.00)	-
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
폐 및 호흡기계	정상	46 (100.00)	44 (100.00)	90 (100.00)	-
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	

위장관/간 및 담도계	정상	46 (100.00)	44 (100.00)	90 (100.00)	-
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
대사/내분비계	정상	46 (100.00)	44 (100.00)	90 (100.00)	-
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
신장/요로계	정상	46 (100.00)	44 (100.00)	90 (100.00)	-
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
생식기계	정상	46 (100.00)	44 (100.00)	90 (100.00)	-
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
근골격계	정상	46 (100.00)	44 (100.00)	90 (100.00)	-
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
피부 및 결합조직	정상	46 (100.00)	44 (100.00)	90 (100.00)	-
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
신경계	정상	46 (100.00)	44 (100.00)	90 (100.00)	-
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
정신계	정상	46 (100.00)	44 (100.00)	90 (100.00)	-
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
기타	정상	46 (100.00)	44 (100.00)	90 (100.00)	-
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	

†: p-value by Chi-square test 또는 Fisher's exact test

스크리닝 시점을 기준으로 6개월 이내의 시험대상자들의 동반질환 및 병력 조사(Table 65)에서 병력이 있는 시험대상자는 시험군에서 11명(23.91%)이며, 대조군에서 11명(25.00%)으로 조사되었고, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다( $p=0.9045$ ). 조사된 모든 동반질환 및 병력은 MedDRA의 SOC(System organ class)에 따라 Coding되었다.

Table 65. 동반질환 및 병력 조사 (PP Set)

		시험군	대조군	합계	p-value†
		N=46, n(%)	N=44, n(%)	N=90, n(%)	
병력	유	11 (23.91)	11 (25.00)	22 (24.44)	0.9045
	무	35 (76.09)	33 (75.00)	68 (75.56)	

	시험군 N=46, n(%)	대조군 N=44, n(%)	합계 N=90, n(%)	p-value <sup>†</sup>
Gastrointestinal disorders	5 (33.33)	6 (37.50)	11 (35.48)	
Infections and infestations	0 (0.00)	2 (12.50)	2 (6.45)	
Injury, poisoning and procedural complications	2 (13.33)	0 (0.00)	2 (6.45)	
Musculoskeletal and connective tissue disorders	1 (6.67)	0 (0.00)	1 (3.23)	
Reproductive system and breast disorders	1 (6.67)	0 (0.00)	1 (3.23)	
Skin and subcutaneous tissue disorders	0 (0.00)	1 (6.25)	1 (3.23)	
Vascular disorders	6 (40.00)	7 (43.75)	13 (41.94)	
합계*	15 (100.00)	16 (100.00)	31 (100.00)	

\*: 누적집계(건수)

†: p-value by Chi-square test

스크리닝 시점을 기준으로 6개월 이내의 시험대상자들의 수술력 조사(Table 66)에서 수술력이 있는 시험대상자는 시험군에서 1명(2.17%)이며, 대조군에서 1명(2.27%)으로 조사되었고, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다(p=1.0000). 조사된 모든 수술력은 MedDRA의 SOC(System organ calss)에 따라 Coding되었다.

Table 66. 수술력 조사 (PP Set)

		시험군 N=46, n(%)	대조군 N=44, n(%)	합계 N=90, n(%)	p-value <sup>‡</sup>
수술력	유	1 (2.17)	1 (2.27)	2 (2.22)	1.0000
	무	45 (97.83)	43 (97.73)	88 (97.78)	
Surgical and medical procedures		1 (100.00)	1 (100.00)	2 (100.00)	
합계*		1 (100.00)	1 (100.00)	2 (100.00)	

\*: 누적집계(건수)

‡: p-value by Fisher's exact test

스크리닝 시점을 기준으로 4주 이내의 시험대상자들의 약물투여력 조사에서(Table 67)에서 약물을 복용 하였거나 건강기능식품을 섭취한 시험대상자는 시험군에서 8명(17.39%), 대조군에서 10명(22.73%)으로 조사되었고, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다 (p=0.5270). 시험군과 대조군 모두 심혈관계 약물이 가장 많았으며, 섭취 군간 통계적으로 유의 한 차이는 나타나지 않았다.

조사된 모든 약물투여력은 ATC code에 따라 분류 및 요약되었다.

Table 67. 스크리닝 4주 이내 약물투여력 (PP Set)

			시험군 N=46	대조군 N=44	합계 N=90	p-value <sup>†</sup>		
약물사용여부	유	n(%)	8 (17.39)	10 (22.73)	18 (20.00)	0.5270		
	무	n(%)	38 (82.61)	34 (77.27)	72 (80.00)			
<b>ALIMENTARY TRACT AND METABOLISM</b>			<b>1</b>	<b>9.09</b>	<b>1</b>	<b>8.33</b>	<b>2</b>	<b>8.70</b>
ANTIDIARRHEALS, INTESTINAL ANTIINFLAMMATORY/ANTIINFECTIVE AGENTS			1	9.09	0	0.00	1	4.35
MINERAL SUPPLEMENTS			0	0.00	1	8.33	1	4.35
<b>ANTIINFECTIVES FOR SYSTEMIC USE</b>			<b>0</b>	<b>0.00</b>	<b>1</b>	<b>8.33</b>	<b>1</b>	<b>4.35</b>
ANTIBACTERIALS FOR SYSTEMIC USE			0	0.00	1	8.33	1	4.35
<b>BLOOD AND BLOOD FORMING ORGANS</b>			<b>1</b>	<b>9.09</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	<b>1</b>	<b>4.35</b>
ANTITHROMBOTIC AGENTS			1	9.09	0	0.00	1	4.35
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>			<b>7</b>	<b>63.64</b>	<b>7</b>	<b>58.33</b>	<b>14</b>	<b>60.87</b>
AGENTS ACTING ON THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM			5	45.45	6	50.00	11	47.83
CALCIUM CHANNEL BLOCKERS			0	0.00	1	8.33	1	4.35
PERIPHERAL VASODILATORS			1	9.09	0	0.00	1	4.35
VASOPROTECTIVES			1	9.09	0	0.00	1	4.35
<b>MUSCULO-SKELETAL SYSTEM</b>			<b>1</b>	<b>9.09</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	<b>1</b>	<b>4.35</b>
DRUGS FOR TREATMENT OF BONE DISEASES			1	9.09	0	0.00	1	4.35
<b>NERVOUS SYSTEM</b>			<b>1</b>	<b>9.09</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	<b>1</b>	<b>4.35</b>

	시험군 N=46		대조군 N=44		합계 N=90		p-value <sup>†</sup>
OTHER NERVOUS SYSTEM DRUGS	1	9.09	0	0.00	1	4.35	
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	<b>2</b>	<b>16.67</b>	<b>2</b>	<b>8.70</b>	
ANTI-HISTAMINES FOR SYSTEMIC USE	0	0.00	1	8.33	1	4.35	
COUGH AND COLD PREPARATIONS	0	0.00	1	8.33	1	4.35	
<b>SYSTEMIC HORMONAL PREPARATIONS, EXCL. SEX HORMONES AND INSULINS</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	<b>1</b>	<b>8.33</b>	<b>1</b>	<b>4.35</b>	
CORTICOSTEROIDS FOR SYSTEMIC USE	0	0.00	1	8.33	1	4.35	
합계*	11	100.00	12	100.00	23	100.00	

\*: 누적집계(건수)

†: p-value by Chi-square test

## 나. 유효성 평가 결과

### 1) 유효성 평가 변수에 대한 분석 결과

#### 가) NK cell activity (12.5:1, 25:1, 50:1)

Table 68은 0주, 4주, 8주에서 측정된 NK cell activity(12.5:1, 25:1, 50:1) 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다.

NK cell activity(12.5:1) 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은  $1.40 \pm 4.64\% p$  감소하였고( $p=0.0462$ ), 대조군은  $1.25 \pm 6.54\% p$  감소하였으나( $p=0.2127$ ) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 8주 후 시험군은  $0.04 \pm 5.18\% p$  증가하였고( $p=0.9549$ ), 대조군은  $0.72 \pm 5.49\% p$  감소하였으나( $p=0.3906$ ) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

NK cell activity(25:1) 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은  $0.30 \pm 7.57\% p$  감소하였고( $p=0.7877$ ), 대조군은  $2.38 \pm 7.52\% p$  감소하였으나( $p=0.0415$ ) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 8주 후 시험군은  $0.11 \pm 8.42\% p$  감소하였고( $p=0.9279$ ), 대조군은  $2.09 \pm 8.50\% p$  감소하였으나( $p=0.1109$ ) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

NK cell activity(50:1) 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은

1.39±8.03%p 증가하였고(p=0.2459), 대조군은 0.67±7.92%p 감소하였으나(p=0.5802) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 8주 후 시험군은 0.21±7.80%p 증가하였고(p=0.8553), 대조군은 1.93±7.04%p 감소하였으나(p=0.0765) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

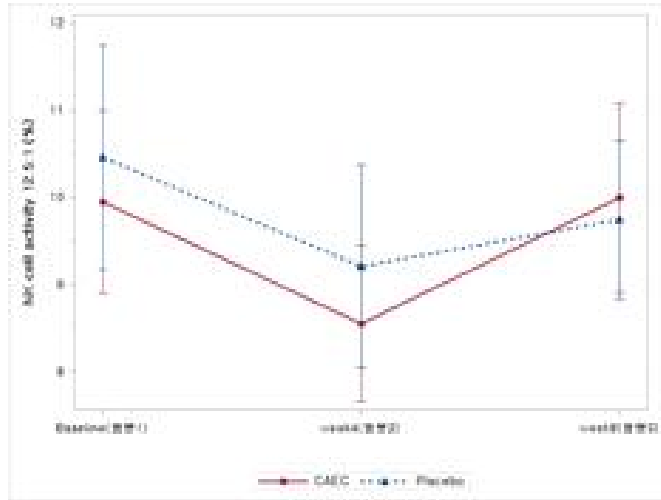
Table 68. 방문별 NK cell activity(12.5:1, 25:1, 50:1) 변화량 (PP Set)

		시험군	대조군		
		N=46	N=44	p-value*	p-value <sup>§</sup>
		Mean±SD	Mean±SD		
NK cell activity 12.5:1 (%)	Baseline (방문1)	9.95±7.13	10.46±8.58	0.7587	
	4주 (방문2)	8.55±6.06	9.21±7.74		
	Change from baseline	-1.40±4.64	-1.25±6.54	0.8979	0.7387
	p-value**	0.0462	0.2127		
	8주 (방문3)	9.99±7.39	9.74±6.01		
	Change from baseline	0.04±5.18	-0.72±5.49	0.5001	0.5484
	p-value**	0.9549	0.3906		
NK cell activity 25:1 (%)	Baseline (방문1)	18.10±11.15	18.86±13.60	0.7711	
	4주 (방문2)	17.80±10.24	16.48±10.73		
	Change from baseline	-0.30±7.57	-2.38±7.52	0.1944	0.1782
	p-value**	0.7877	0.0415		
	8주 (방문3)	17.98±11.92	16.78±9.84		
	Change from baseline	-0.11±8.42	-2.09±8.50	0.2717	0.2732
	p-value**	0.9279	0.1109		
NK cell activity 50:1 (%)	Baseline (방문1)	25.38±12.38	26.17±14.96	0.7869	
	4주 (방문2)	26.78±13.19	25.50±14.44		
	Change from baseline	1.39±8.03	-0.67±7.92	0.2246	0.2383
	p-value**	0.2459	0.5802		
	8주 (방문3)	25.60±13.48	24.24±12.85		
	Change from baseline	0.21±7.80	-1.93±7.04	0.1764	0.1827
	p-value**	0.8553	0.0765		

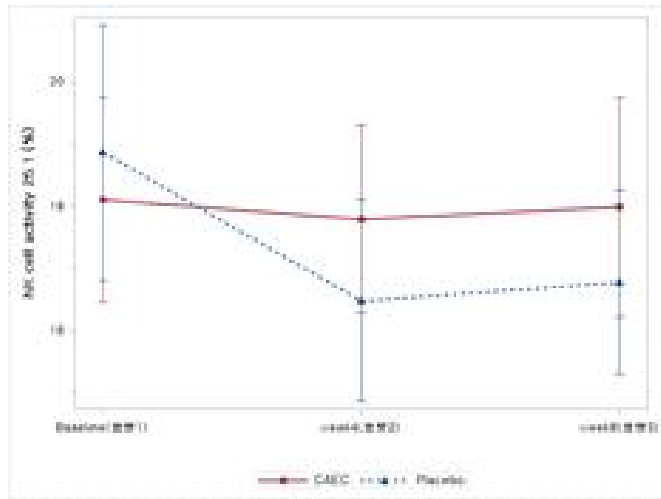
\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

\*\* : Compared within groups; p-value by Paired t-test

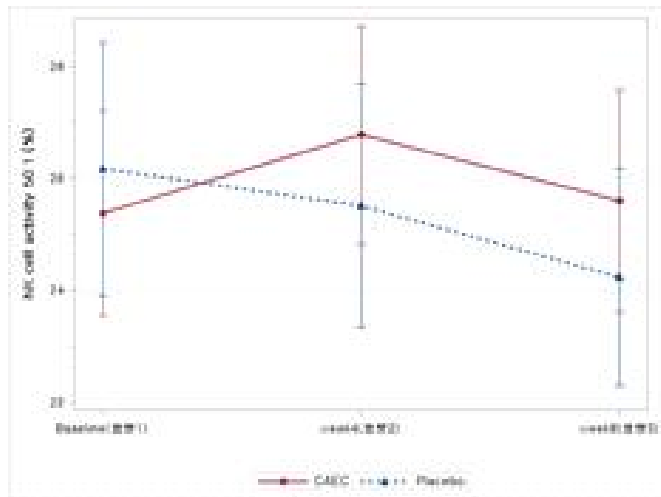
§: Compared between groups; p-value for ANCOVA adjusted baseline



방문별 NK cell activity(12.5:1) (PP Set)



방문별 NK cell activity(25:1) (PP Set)



방문별 NK cell activity(50:1) (PP Set)

Fig. 183. 방문별 NK cell activity

나) 식균작용 (Phagocytosis)

Table 69는 0주, 8주에서 측정된 식균작용의 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다.

식균작용 변화량 분석에서 섭취 8주 후 시험군은  $0.61 \pm 2.75$  감소하였고( $p=0.1377$ ), 대조군은  $0.93 \pm 3.18$  감소하였으나( $p=0.0586$ ) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 69. 방문별 식균작용(Phagocytosis) 변화량 (PP Set)

	시험군	대조군	p-value*	p-value <sup>§</sup>
	N=46	N=44		
	Mean±SD	Mean±SD		
Baseline (방문1)	98.40±1.48	98.08±1.73	0.3422	
8주 (방문3)	97.79±2.23	97.15±3.08		
Change from baseline	-0.61±2.75	-0.93±3.18	0.6110	0.3093
p-value**	0.1377	0.0586		

\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

\*\* : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§: Compared between groups; p-value for ANCOVA adjusted baseline

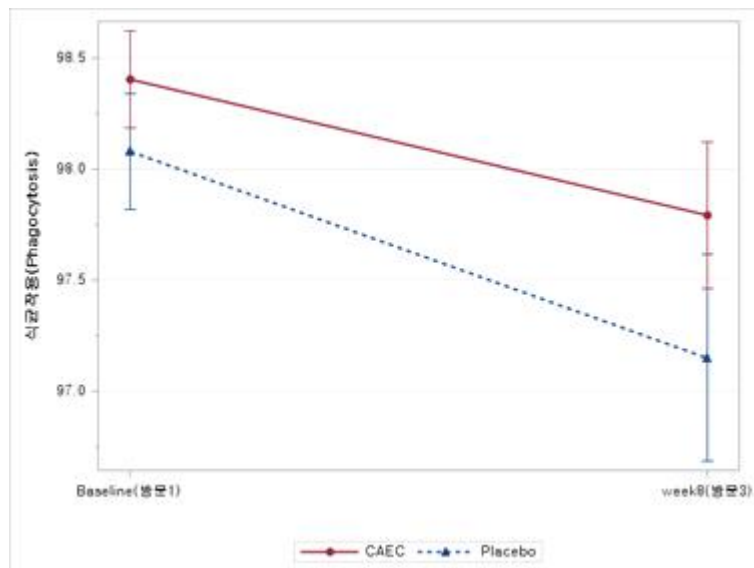


Fig. 184. 방문별 식균작용(Phagocytosis) (PP Set)

다) IFN- $\gamma$

Table 70은 0주, 8주에서 측정된 IFN- $\gamma$ 의 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다.



IFN- $\gamma$  변화량 분석에서 섭취 8주 후 시험군은  $0.74\pm 3.05\text{pg/ml}$  감소하였고 ( $p=0.1064$ ), 대조군은  $0.32\pm 3.58\text{pg/ml}$  증가하였으나( $p=0.5574$ ) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 70. 방문별 IFN- $\gamma$  변화량 (PP Set)

		시험군	대조군	p-value*	p-value <sup>§</sup>
		N=46	N=44		
		Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD		
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	Baseline (방문1)	24.74 $\pm$ 11.85	23.65 $\pm$ 8.62	0.6177	
	8주 (방문3)	24.00 $\pm$ 12.09	23.97 $\pm$ 8.58		
	Change from baseline	-0.74 $\pm$ 3.05	0.32 $\pm$ 3.58	0.1336	0.1496
	p-value**	0.1064	0.5574		

\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

\*\* : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§: Compared between groups; p-value for ANCOVA adjusted baseline

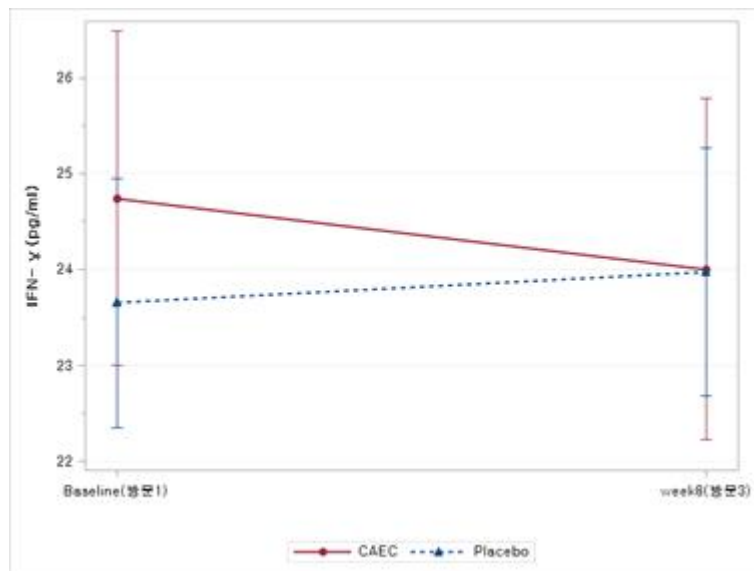


Fig. 185. 방문별 IFN- $\gamma$  (PP Set)

라) IL-2, IL-10, IL-12

Table 71은 0주, 8주에서 측정된 IL-2, IL-10, IL-12 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다.

IL-2 변화량 분석에서 섭취 8주 후 시험군은  $0.27\pm 0.69\text{pg/ml}$  감소하였고( $p=0.0111$ ), 대조군은  $0.11\pm 0.47\text{pg/ml}$  감소하였으나( $p=0.1421$ ) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

IL-10 변화량 분석에서 섭취 8주 후 시험군은  $0.19\pm 7.23\text{pg/ml}$  증가하였고( $p=0.8614$ ), 대조군은  $0.15\pm 5.35\text{pg/ml}$  증가하였으나( $p=0.8542$ )

섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

IL-12 변화량 분석에서 섭취 8주 후 시험군은  $0.13 \pm 1.07 \text{ pg/ml}$  감소하였고( $p=0.4140$ ), 대조군은  $0.47 \pm 2.35 \text{ pg/ml}$  감소하였으나( $p=0.1891$ ) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

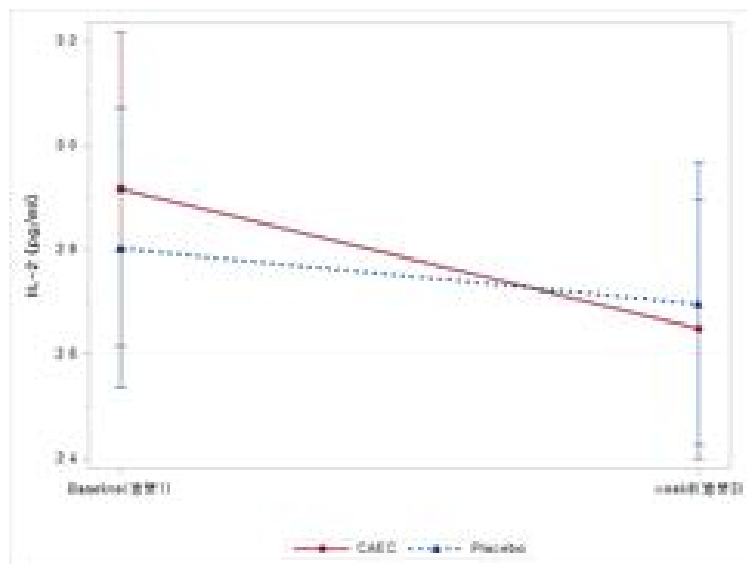
Table 71. 방문별 IL-2, IL-10, IL-12 변화량 (PP Set)

		시험군 N=46 Mean±SD	대조군 N=44 Mean±SD	p-value*	p-value <sup>§</sup>
IL-2 (pg/ml)	Baseline (방문1)	2.92±2.04	2.80±1.79	0.7809	
	8주 (방문3)	2.65±1.69	2.70±1.79		
	Change from baseline	-0.27±0.69	-0.11±0.47	0.1944	0.1955
	p-value**	0.0111	0.1421		
IL-10 (pg/ml)	Baseline (방문1)	27.47±26.54	25.09±20.70	0.6386	
	8주 (방문3)	27.65±26.43	25.24±22.36		
	Change from baseline	0.19±7.23	0.15±5.35	0.9776	0.9668
	p-value**	0.8614	0.8542		
IL-12 (pg/ml)	Baseline (방문1)	7.84±4.59	9.57±10.04	0.3033	
	8주 (방문3)	7.71±4.41	9.09±8.17		
	Change from baseline	-0.13±1.07	-0.47±2.35	0.3794	0.8617
	p-value**	0.4140	0.1891		

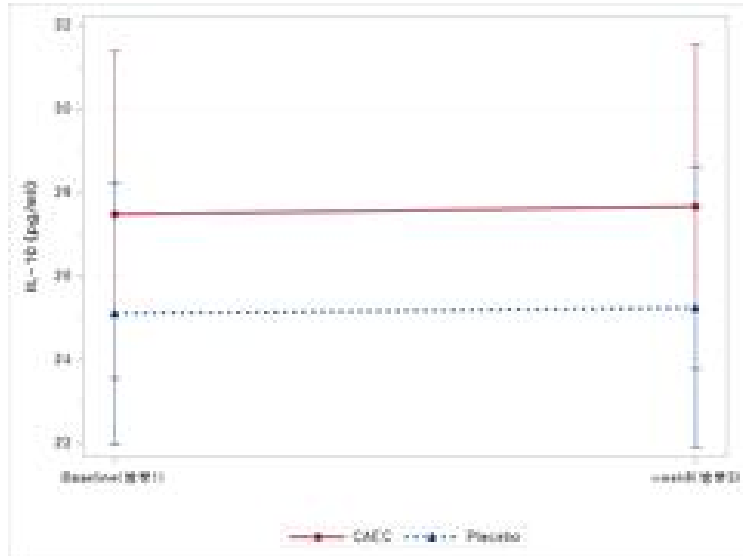
\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

\*\* : Compared within groups; p-value by Paired t-test

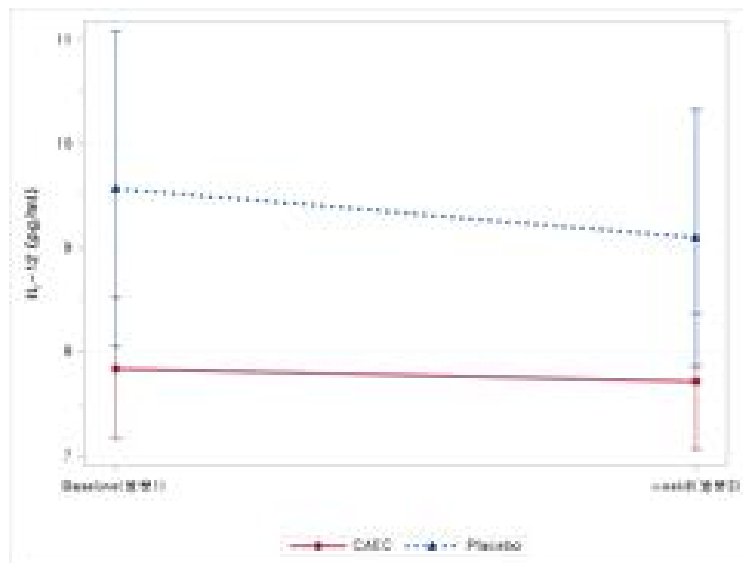
§: Compared between groups; p-value for ANCOVA adjusted baseline



방문별 IL-2 (PP Set)



방문별 IL-10 (PP Set)



방문별 IL-12 (PP Set)

Fig. 186. 방문별 interleukin 변화량

마) WBC 수

Table 72는 0주, 4주, 8주에서 측정된 WBC 수 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다.

WBC 수 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은  $0.18 \pm 0.82 \times 10^3/\mu\text{l}$  감소하였고 ( $p=0.1333$ ), 대조군은  $0.23 \pm 0.77 \times 10^3/\mu\text{l}$  감소하였으나 ( $p=0.0528$ ) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 8주 후 시험군은  $0.48 \pm 0.78 \times 10^3/\mu\text{l}$  감소하였고 ( $p=0.0002$ ), 대조군은  $0.20 \pm 0.93 \times 10^3/\mu\text{l}$  감소하였으나 ( $p=0.1656$ ) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 72. 방문별 WBC 수 변화량 (PP Set)

	시험군	대조군	p-value*	p-value <sup>‡</sup>
	N=46	N=44		
	Mean±SD	Mean±SD		
Baseline (방문0)	5.37±1.00	5.25±1.14	0.6183	
4주 (방문2)	5.18±1.00	5.02±1.12		
Change from baseline	-0.18±0.82	-0.23±0.77	0.7849	0.6196
p-value**	0.1333	0.0528		
8주 (방문3)	4.89±0.98	5.06±1.37		
Change from baseline	-0.48±0.78	-0.20±0.93	0.1262	0.1494
p-value**	0.0002	0.1656		

\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

\*\* : Compared within groups; p-value by Paired t-test

‡ : Compared between groups; p-value for ANCOVA adjusted baseline

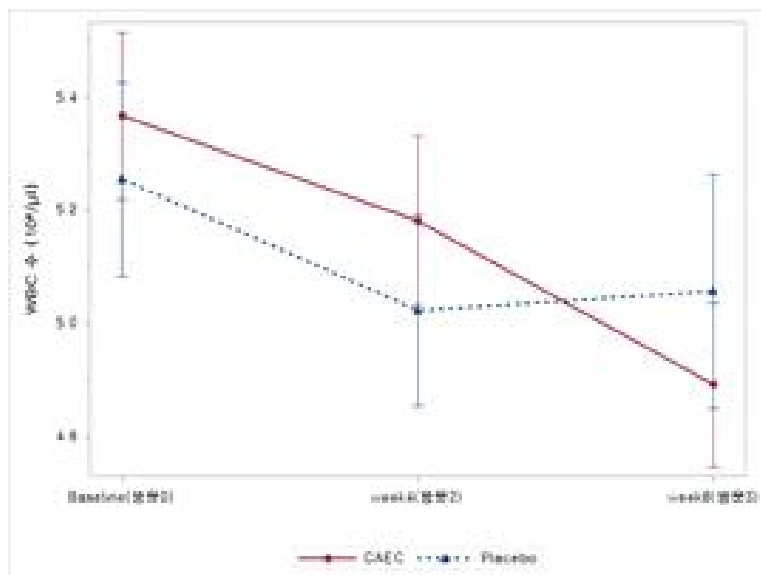


Fig. 187. 방문별 WBC 수 (PP Set)

바) IgA, Cortisol, Serotonin

Table 73은 0주, 4주, 8주에서 측정한 IgA, Cortisol, Serotonin 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다.

IgA 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은 2.07±21.48μg/ml 증가하였고(p=0.5176), 대조군은 0.14±15.53μg/ml 증가하였으나(p=0.9523) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 8주 후 시험군은 1.09±21.44μg/ml 증가하였고(p=0.7326), 대조군은 5.05±13.03μg/ml 감소하였으나(p=0.0137) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Cortisol 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은 1.62±4.12μg/dl

감소하였고(p=0.0104), 대조군은 1.22±4.90µg/dl 감소하였으나(p=0.1068) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 8주 후 시험군은 1.22±4.07µg/dl 감소하였고(p=0.0473), 대조군은 1.25±4.91µg/dl 감소하였으나(p=0.0996) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

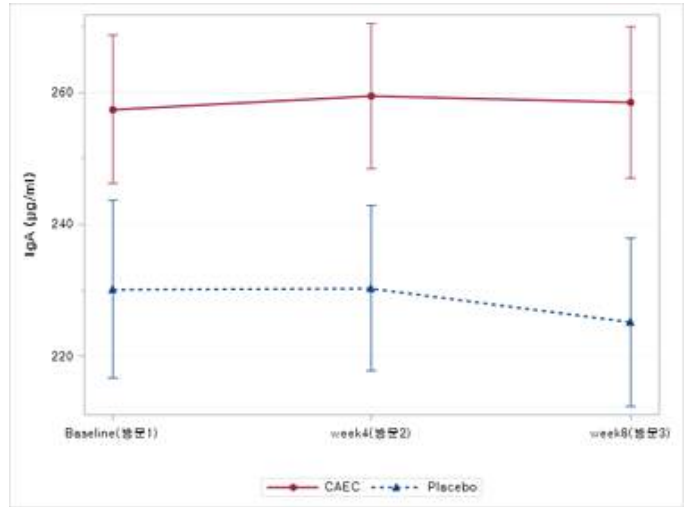
Serotonin 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은 5.71±23.29ng/ml 감소하였고(p=0.1034), 대조군은 2.86±23.36ng/ml 증가하였으나(p=0.4213) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 8주 후 시험군은 12.08±22.99ng/ml 감소하였고(p=0.0009), 대조군은 6.92±23.17ng/ml 감소하였으나(p=0.0540) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 73. 방문별 IgA, Cortisol, Serotonin 변화량 (PP Set)

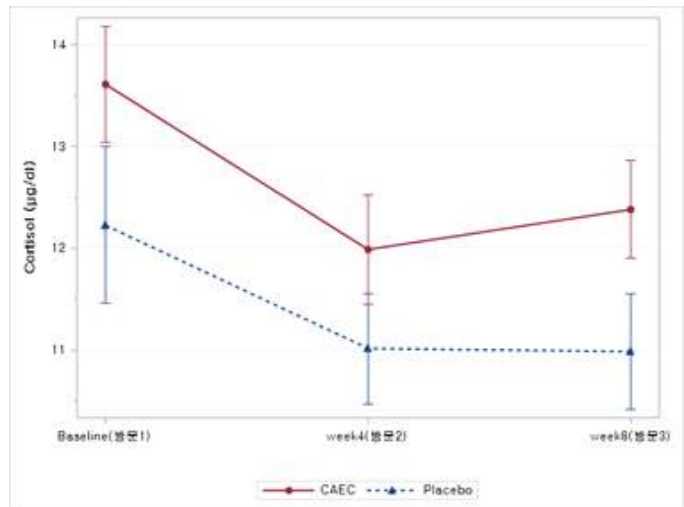
		시험군 N=46 Mean±SD	대조군 N=44 Mean±SD	p-value*	p-value <sup>§</sup>
IgA (µg/ml)	Baseline (방문1)	257.46±76.62	230.16±89.17	0.1224	
	4주 (방문2)	259.52±74.57	230.30±83.09		
	Change from baseline	2.07±21.48	0.14±15.53	0.6264	0.3036
	p-value**	0.5176	0.9523		
	8주 (방문3)	258.54±78.22	225.11±84.81		
	Change from baseline	1.09±21.44	-5.05±13.03	0.1033	0.0573
	p-value**	0.7326	0.0137		
Cortisol (µg/dl)	Baseline (방문1)	13.61±3.85	12.23±5.09	0.1499	
	4주 (방문2)	11.99±3.62	11.02±3.60		
	Change from baseline	-1.62±4.12	-1.22±4.90	0.6709	0.4551
	p-value**	0.0104	0.1068		
	8주 (방문3)	12.39±3.29	10.99±3.77		
	Change from baseline	-1.22±4.07	-1.25±4.91	0.9819	0.1654
	p-value**	0.0473	0.0996		
Serotonin (ng/ml)	Baseline (방문1)	107.35±38.70	108.08±38.34	0.9286	
	4주 (방문2)	101.64±41.18	110.94±39.43		
	Change from baseline	-5.71±23.29	2.86±23.36	0.0850	0.0758
	p-value**	0.1034	0.4213		
	8주 (방문3)	95.27±39.67	101.16±34.26		
	Change from baseline	-12.08±22.99	-6.92±23.17	0.2917	0.2475
	p-value**	0.0009	0.0540		

\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

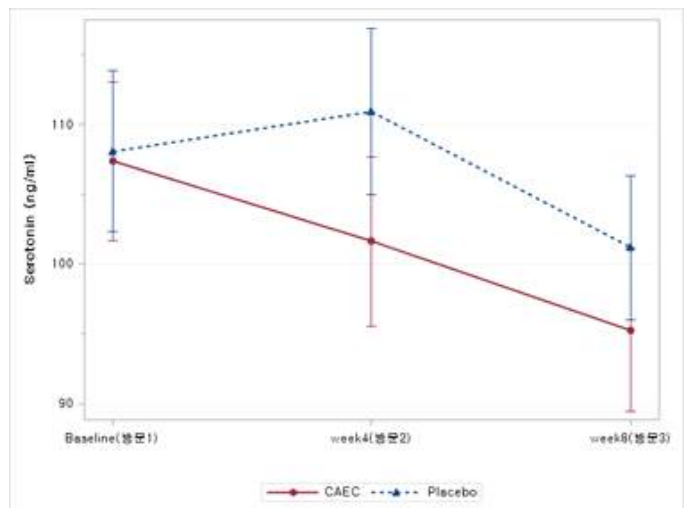
\*\* : Compared within groups; p-value by Paired t-test



방문별 IgA (PP Set)



방문별 Cortisol (PP Set)



방문별 Serotonin (PP Set)

Fig. 188. 방문별 IgA, Cortisol, Serotonin (PP Set)

사) 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가

Table 74는 4주, 8주에서 측정한 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가를 PP Set으로 분석한 결과이다.

섭취 4주 후의 개선도 평가 점수는 시험군이 2.89±0.43, 대조군이 2.84±0.43으로 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 8주 후의 개선도 평가 점수는 시험군이 2.76±0.57, 대조군이 2.70±0.51으로 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 74. 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가 (PP Set)

		시험군	대조군	p-value*
		N=46	N=44	
		Mean±SD	Mean±SD	
개선도 평가	방문2	2.89±0.43	2.84±0.43	0.5806
	방문3	2.76±0.57	2.70±0.51	0.6212

\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

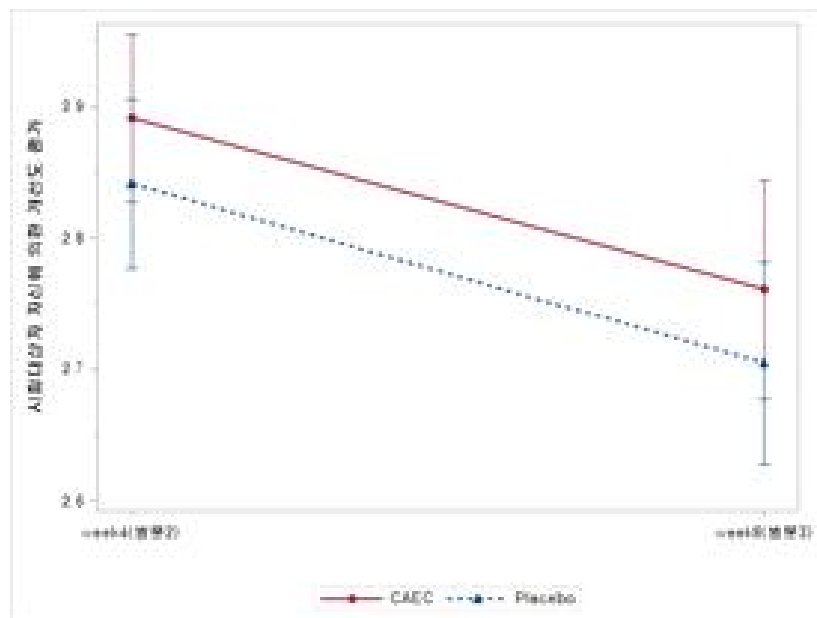


Fig. 189. 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가 (PP Set)

## 2) 섭취 순응도

Table 26, 27은 본 인체적용시험에 참여한 시험대상자의 군별 섭취 순응도를 PP Set, FA Set으로 분석한 결과이다. 인체적용시험 기간 중 인체적용시험용 식품에 대한 순응도는 실제 시험대상자가 섭취한 식품의 수를 원칙적으로 섭취해야 하는 식품의 수로 나누어 계산하였다.

$$\text{섭취 순응도(\%)} = \text{실제 섭취한 식품 수} / \text{섭취해야 하는 식품 수} \times 100$$

섭취 순응도를 PP Set으로 분석한 결과 시험군의 전체 섭취 순응도는 100.44±8.46%이며, 대조군의 전체 섭취 순응도는 104.02±9.56%로 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 75. 섭취 순응도 (PP Set)

	시험군	대조군	
	N=46	N=44	p-value*
	Mean±SD	Mean±SD	
방문2	100.88±6.79	100.88±8.41	0.9973
방문3	100.00±14.27	107.16±13.89	0.0180
Total	100.44±8.46	104.02±9.56	0.0631

\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

#### 다. 안전성 평가 결과

안전성 평가는 Safety Set 분석을 주 분석으로 시행하였으며, 인체적용시험에 무작위배정된 후 인체적용시험용 식품을 한 번 이상 섭취한 시험대상자로서 시험군 51명, 대조군 50명이 분석에 포함되었다. 이상반응 종류 및 발생율을 평가하였다. 또한, 임상병리검사(혈액학적검사, 혈액화학검사, 뇨검사), 활력징후(맥박, 혈압, 체온), 체중, 심전도검사 결과를 분석하였다.

##### 1) 이상반응

###### 가) 이상반응에 대한 요약

시험자는 이상반응을 발견해야 할 의무가 있으므로 방문2 및 방문3에 시험대상자의 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 System Organ Class에 따라 Coding 되었다.

본 인체적용시험 기간 동안 발생한 모든 이상반응을 각각 발생자수와 발생건수의 두 가지로 산출하여 비교하였으며, 인체적용시험용 식품과의 관련성(시험식품 및 대조식품) 및 이상반응의 심각성을 각각 분석하여 제시하였다. 시험자에 의하여 인체적용시험용 식품과 이상반응의 관련성이 '관련 있을 가능성 있음(Possibly related)', '관련 있다고 생각됨(Probably related)', '명확히 관련 있음(Definitely related)', '불명(Unknown)'으로 판단된 이상반응에 대해서는 인체적용시험용 식품과 관련성이 있는 이상반응으로 평가하여 상세한 정보를 별도로 제시하였다.

시험군에서 총 1명의 시험대상자에게서 3건의 이상반응이 있었으며, 이 중 중대한 이상반응 및 이상반응으로 인한 중도탈락은 발생하지 않았다(Table 28)



Table 76. 이상반응 발생 요약 (Safety Set)

	시험군			대조군			p-value*
	n	발생율(%)	례수	n	발생율(%)	례수	
이상반응(AE)	1	1.96	3	0	0.00	0	1.0000
중대한 이상반응(SAE)	0	0.00	0	0	0.00	0	-
이상반응으로 인한 중도탈락	0	0.00	0	0	0.00	0	-

\*†: p-value by Fisher's exact test

## 나) 이상 반응의 분석

Table 30은 이상반응의 증상정도 및 인체적용시험용 식품과의 관련성을 나타낸 표이다.

본 인체적용시험 기간 동안에 시험군에서 발생한 3건의 이상반응 증상정도 조사에서 경도(Mild) 1건, 중등도(Moderate) 2건이었다.

시험군에서 발생한 이상반응의 인체적용시험용 식품과의 관련성에서 '관련있을 가능성 있음'이 2건, '명확히 관련이 없음'이 1건 으로 시험자에 의해 판단되었다.

Table 77. 이상반응의 증상정도와 인체적용시험용 식품과의 관련성 (Safety Set)

	시험군		대조군		합계		P-value	
	N=51		N=50		N=101			
	례수	발생율(%)	례수	발생율(%)	례수	발생율(%)		
증상정도	경도 (Mild)	1	33.33	0	0.00	1	33.33	-
	중등도 (Moderate)	2	66.67	0	0.00	2	66.67	
	중증 (Severe)	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
인체적용 시험용 식품과의 관련성	명확히 관련 있음	0	0.00	0	0.00	0	0.00	-
	관련 있다고 생각됨	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
	관련 있을 가능성 있음	2	66.67	0	0.00	2	66.67	
	관련이 없다고 생각됨	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
	명확히 관련이 없음	1	33.33	0	0.00	1	33.33	
	불명	0	0.00	0	0.00	0	0.00	

†: p-value by Chi-square test 또는 Fisher's exact test

Table 78 및 Table 79는 인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응 요약 및 시험대상자별로 상세하게 제시한 표이다.

인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응은 시험군 1명 (CB-R026)에서 2건 발생하였으며, 피부 및 피하조직 계통의 이상반응이었고 관련 조치 없이 완전 치유 되었다

Table 78. 인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응 요약 (Safety Set)

System organ class	Preferred term	시험군		대조군	
		N=51		N=50	
		례수	발생율(%)	례수	발생율(%)
<b>Skin and subcutaneous tissue disorders</b>		<b>2</b>	<b>100.00</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>
	Dermatitis	1	50.00	0	0.00
	Pruritus	1	50.00	0	0.00

Table 79. 인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응 상세 (Safety Set)

대상자 번호	Preferred term	무작위 배정일	발생시점	소실시점	증상 정도 <sup>a</sup>	인과 관계 <sup>b</sup>	관련 조치 <sup>c</sup>	경과 <sup>d</sup>
시험군								
CB-R026	Pruritus	2017-05-31	2017-06-07	2017-06-21	1	3	1	1
CB-R026	Dermatitis	2017-05-31	2017-07-13	2017-07-15	2	3	1	1

a 1: 경도, 2: 중등도, 3: 중증

b 1: 명확히 관련이 있음, 2: 관련이 있다고 생각됨, 3: 관련 가능성이 있음, 4: 불명

c 1: 없음, 2: 감량, 3: 일시중단 후 재투여, 4: 투여중단

d 1: 완전치유(후유증 없음), 2: 치유(후유증 있음), 3: 진행중, 4: 영구적 손상, 5: 사망

## 2) 중대한 이상반응 및 기타 중요한 이상반응

### 가) 중대한 이상반응 요약

인체적용시험용 식품의 섭취 기간 동안 시험군, 대조군 모두에서 중대한 이상반응은 발생하지 않았다.

## 3) 임상병리검사 결과

본 인체적용시험에서 안전성 평가를 위한 임상병리검사는 스크리닝 방문과 방문3에서 시행되었다. 검사항목은 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 뇨검사로 나누어 평가되었다.

### 가) 혈액학적, 혈액화학적검사

Table 80 및 Table 81은 혈액학적, 혈액화학적검사 결과를 분석한 표이다.

혈액학적, 혈액화학적검사 결과에서 섭취 8주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 80. 방문별 혈액학적검사 (Safety Set)

		시험군 N=51 Mean±SD	대조군 N=50 Mean±SD	p-value*
WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	Baseline (방문 0)	5.35±1.06	5.34±1.30	0.9824
	8 주 (방문 3)	4.89±1.00	5.16±1.49	
	Change from baseline	-0.46±0.75	-0.18±0.89	0.0915
	p-value**	<.0001	0.1524	
RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	Baseline (방문 0)	4.47±0.32	4.45±0.31	0.7456
	8 주 (방문 3)	4.42±0.32	4.37±0.30	
	Change from baseline	-0.05±0.16	-0.08±0.15	0.2623
	p-value**	0.0396	0.0002	
Hb (g/dL)	Baseline (방문 0)	13.69±1.13	13.57±0.98	0.5895
	8 주 (방문 3)	13.57±1.12	13.36±0.90	
	Change from baseline	-0.12±0.43	-0.21±0.43	0.2822
	p-value**	0.0529	0.0010	
Hct (%)	Baseline (방문 0)	40.98±3.06	40.67±2.74	0.5856
	8 주 (방문 3)	40.34±2.97	39.82±2.52	
	Change from baseline	-0.64±1.46	-0.85±1.15	0.4365
	p-value**	0.0029	<.0001	
Platelet (10 <sup>3</sup> /μL)	Baseline (방문 0)	261.27±58.06	246.26±46.69	0.1557
	8 주 (방문 3)	251.12±53.89	243.18±49.82	
	Change from baseline	-10.16±24.00	-3.08±26.33	0.1610
	p-value**	0.0039	0.4121	
Neutrophil (%)	Baseline (방문 0)	51.49±7.40	51.93±7.67	0.7665
	8 주 (방문 3)	51.52±7.24	53.72±7.24	
	Change from baseline	0.03±5.94	1.79±7.29	0.1872
	p-value**	0.9684	0.0889	
Lymphocyte (%)	Baseline (방문 0)	37.50±7.42	38.43±7.09	0.5194
	8 주 (방문 3)	37.36±7.64	36.21±6.87	
	Change from baseline	-0.14±5.64	-2.22±6.46	0.0869
	p-value**	0.8628	0.0187	
Monocyte (%)	Baseline (방문 0)	7.19±2.14	6.91±1.66	0.4632
	8 주 (방문 3)	6.94±2.02	7.03±2.07	
	Change from baseline	-0.25±1.66	0.12±2.04	0.3215
	p-value**	0.2879	0.6821	
Eosinophil (%)	Baseline (방문 0)	3.23±2.25	2.30±1.96	0.0285
	8 주 (방문 3)	3.57±2.48	2.42±1.69	
	Change from baseline	0.34±2.20	0.13±1.70	0.5995
	p-value**	0.2821	0.5926	
Basophil (%)	Baseline (방문 0)	0.61±0.44	0.43±0.25	0.0125
	8 주 (방문 3)	0.61±0.38	0.50±0.31	
	Change from baseline	0.00±0.26	0.07±0.29	0.2113
	p-value**	0.9699	0.1045	

\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

\*\*: Compared within groups; p-value by Paired t-test

Table 81. 방문별 혈액화학적검사 (Safety Set)

		시험군 N=51 Mean±SD	대조군 N=50 Mean±SD	p-value*
AST(GOT) (IU/L)	Baseline (방문 0)	24.53±9.79	22.94±5.55	0.3174
	8 주 (방문 3)	23.65±8.94	21.44±5.07	
	Change from baseline	-0.88±4.47	-1.50±4.48	0.4897
	p-value**	0.1649	0.0220	
ALT(GPT) (IU/L)	Baseline (방문 0)	22.73±9.63	21.76±9.19	0.6073
	8 주 (방문 3)	20.37±9.24	20.74±7.77	
	Change from baseline	-2.35±7.73	-1.02±7.79	0.3901
	p-value**	0.0345	0.3590	
Total Protein (g/dl)	Baseline (방문 0)	7.43±0.37	7.41±0.40	0.7620
	8 주 (방문 3)	7.46±0.40	7.36±0.37	
	Change from baseline	0.02±0.27	-0.05±0.26	0.1795
	p-value**	0.5347	0.2026	
BUN (mg/dl)	Baseline (방문 0)	15.61±4.53	15.44±3.80	0.8407
	8 주 (방문 3)	15.86±4.24	15.62±3.59	
	Change from baseline	0.25±3.35	0.18±3.45	0.9121
	p-value**	0.5895	0.7138	
Creatinine (mg/dl)	Baseline (방문 0)	0.64±0.13	0.64±0.15	0.8408
	8 주 (방문 3)	0.63±0.11	0.64±0.14	
	Change from baseline	-0.02±0.06	0.00±0.07	0.2062
	p-value**	0.0762	0.8658	
Uric acid (mg/dl)	Baseline (방문 0)	4.63±0.86	4.65±1.13	0.9184
	8 주 (방문 3)	4.89±0.98	4.84±1.09	
	Change from baseline	0.26±0.58	0.19±0.44	0.4787
	p-value**	0.0020	0.0032	
Total cholesterol (mg/dl)	Baseline (방문 0)	202.75±34.08	201.58±32.81	0.8614
	8 주 (방문 3)	204.59±33.38	197.44±32.89	
	Change from baseline	1.84±21.24	-4.14±18.31	0.1331
	p-value**	0.5384	0.1164	
Triglyceride (mg/dl)	Baseline (방문 0)	113.49±42.47	121.32±47.25	0.3830
	8 주 (방문 3)	118.02±46.95	125.52±54.31	
	Change from baseline	4.53±41.64	4.20±40.62	0.9680
	p-value**	0.4410	0.4682	
Glucose (mg/dl)	Baseline (방문 0)	85.78±8.15	86.64±7.69	0.5889
	8 주 (방문 3)	86.63±10.08	85.54±6.55	
	Change from baseline	0.84±7.00	-1.10±6.26	0.1447
	p-value**	0.3935	0.2200	

\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

\*\*: Compared within groups; p-value by Paired t-test

나) 뇨검사

검사 결과치에 대하여 정상/비정상으로 나누어 McNemar test를 이용하여 군내 차이를 비교하였다.

섭취 8주 후 뇨검사에서 시험군, 대조군 모두 섭취 전후 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

4) 활력징후(혈압, 맥박, 체온) 및 체중

체온은 섭취 4주 후 시험군이  $0.01 \pm 0.26^\circ\text{C}$  감소하였고( $p=0.8739$ ), 대조군이  $0.14 \pm 0.30^\circ\text{C}$  감소하여( $p=0.0027$ ) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으나( $p=0.0237$ ) 이는 정상 범위 이내의 변화였다.

수축기압, 이완기압, 맥박, 체온, 체중에서 섭취 8주 후 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

5) 심전도검사

Table 82는 방문별 심전도검사 결과를 나타낸 표이다.

검사 결과치에 대하여 정상/비정상으로 나누어 시험대상자의 섭취 전후 변화를 비교하였다. 심전도검사의 분석 결과 섭취 전후 모두 정상으로 나타났다

Table 82. 방문별 심전도검사 (Safety Set)

Baseline (방문0)		8주 (방문3)		N
		정상	비정상	
시험군	정상	51 (100.00)	0 (0.00)	51 (100.00)
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
	p-value <sup>§</sup>	-		51 (100.00)
대조군	정상	50 (100.00)	0 (0.00)	50 (100.00)
	비정상	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
	p-value <sup>§</sup>	-		50 (100.00)

-: Not Applicable

§: p-value by McNemar test

6) 안전성에 대한 최종 결론

안전성 평가는 무작위배정되어 인체적용시험용 식품을 적어도 한번 이상 섭취한 시험대상자를 분석 대상자(Safety Set)로 하였으며, 총 101명(시험군 51명, 대조군 50명)의 시험대상자가 Safety Set에 포함되었다.

본 인체적용시험 기간 동안 1명의 시험대상자(시험군)에게서 3건의 이상반응이 있었으며, 이 중 중대한 이상반응 및 이상반응으로 인한 중도탈락은 발생하지 않았다.

총 3 건의 이상반응 증상정도 조사에서 경도(Mild)는 1 건, 중등도(Moderate)는 2 건이었다. 인체적용시험용 식품과의 관련성에서 '관련있을 가능성 있음'이 2 건, '명확히 관련이 없음'이 1 건 으로 시험자에 의해 판단되었다.

인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응은 2 건이며, 피부 및 피하조직 계통의 이상반응이었고 관련 조치 없이 완전 치유 되었다.

본 인체적용시험에서 안전성 평가를 위한 임상병리검사는 스크리닝 방문과 방문3에서 시행되었다. 검사항목은 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 뇨검사로 나누어 평가되었다.

혈액학적검사, 혈액화학적검사에서 섭취 8주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

뇨검사 분석 결과 모든 검사항목에서 시험군, 대조군 모두 섭취 전후 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

체온 분석 결과에서 섭취 4주 후 시험군은  $0.01 \pm 0.26^{\circ}\text{C}$  감소하였고( $p=0.8739$ ), 대조군은  $0.14 \pm 0.30^{\circ}\text{C}$  감소하여( $p=0.0027$ ) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으나( $p=0.0237$ ) 이는 정상 범위 이내의 변화였다.

수축기압, 이완기압, 맥박, 체온, 체중에서 섭취 8주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

심전도검사의 분석 결과 섭취 전후 모두 정상으로 나타났다.

## 라. 인체적용시험의 고찰 및 전반적인 결론

작두콩(*Canavalia gladiata*)에는 일반 두류에 없는 특정 유효성분들이 함유되어 있으며, *In vitro* 및 *in vivo* 등의 전임상시험을 통해 항산화 활성과 면역증진의 효과가 확인되었다.

이러한 선행연구들을 토대로 면역기능 증진 소재를 탐색하기 위한 연구가 진행되었으며, 작두콩추출물과 우엉추출물이 기능성 소재로 선정되었다.

최적의 혼합비율을 찾기 위한 스크리닝 실험을 통해 2가지 추출물의 혼합 비율을 선정하여 동물시험을 실시한 결과, 부동화로 스트레스를 유발한 마우스에서 면역세포의 수 및 활성을 증가시키는 것을 확인하였다.

이에 스트레스 등으로 면역기능이 다소 저하되어 있는 성인을 대상으로 작두콩추출물 등 복합물 섭취에 의한 인체에서의 면역 관련 지표{NK cell activity, 식균작용(Phagocytosis), IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-12, IgA, Cortisol, Serotonin, WBC 수} 변화를 확인하고자 하였다.

주요 유효성 평가변수인 NK cell activity는 주효세포와 표적세포비를 12.5:1, 25:1, 50:1 농도를 사용하여 측정하였으며, 12.5:1과 50:1 농도에서 섭취 8주 후 시험군에서 증가하고 대조군에서는 감소하는 경향이 나타났으나 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 이외의 식균작용(Phagocytosis), IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-12, IgA, Cortisol, Serotonin, WBC 수의 유효성 평가에서도 섭취 8주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

특히 면역기능과 관련된 연구는 개개인의 환경을 통제하여 외적 영향을 최소화하는 것이 정확한 연구 결과를 도출하는데 필요할 수 있으나, 이를 동일하게 유지하는데 한계가 있었으며 이러한 사항들이 결과에 영향을 미칠 가능성을 배제할 수 없다. 또한 식품으로 수행하는 연구의 특성 상 단회의 시험만으로 효능을 평가하는 것은 무리가 있을 수 있으며 향후 대상자 선정 등의 시험 디자인 및 섭취 기간, 유효성 평가 시기 등을 보강하여 추가 인체적용시험이 필요하다고 판단된다. 비록 이번 연구에서 작두콩추출물등 복합물 섭취가 면역기능 증진에 유효함을 증명할 수 없었지만, 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아 작두콩추출물등 복합물 섭취가 인체에 안전한 소재임을 확인할 수 있었다.

6. 인체적용시험 결과 요약

인체적용시험 제목	면역기능 증진에 대한 작두콩추출물등복합물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 계획서번호	Protocol No.: AKY_CAEC Version No.: 1.1
인체적용시험 실시기관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 전북 전주시 덕진구 건지로 20
인체적용시험 의뢰자	애경산업(주) 서울시 구로구 가마산로 242
인체적용시험 시험책임자	채수완 교수(전북대학교 의과대학 약리학교실 교수)
인체적용시험 공동연구자	최은경 교수(전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 교수)
시험기간	인체적용시험 시작일: 2017.05.22 (첫 시험대상자 스크리닝일) 인체적용시험 종료일: 2017.08.04 (마지막 시험대상자 시험완료일)
단계 및 디자인	단계: 기타 (건강기능식품) 디자인: 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
인체적용시험 대상자	면역기능이 저하된 성인
인체적용시험 용 식품	시험식품 : 작두콩추출물등 복합물 대조식품 : Placebo
용량 및 섭취방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>시험식품: 1일 1회, 1회 1정 섭취(작두콩추출물등복합물로써 600mg/day)</li> <li>대조식품: 시험식품과 동일한 방법으로 섭취</li> </ul>
인체적용시험 목적	본 인체적용시험은 면역기능이 저하된 성인을 대상으로 작두콩추출물등복합물을 섭취하였을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 면역기능 증진에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.
인체적용시험 방법	<p>The flowchart illustrates the trial design. It starts at 방문0 (Screening). At 방문1 (D-0), randomization occurs, splitting participants into two groups: the 시험군 (작두콩추출물등 복합물) and the 대조군 (Placebo). Both groups proceed to 방문2 (D+28(±7), 4주) and then to 방문3 (D+56(±7), 8주). The trial concludes at the end of 방문3 (인체적용시험 종료).</p>



	<p>인체적용시험대상자(또는 법정 대리인)는 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명 후 방문 평가를 통해 선정기준/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 시험대상자에 한해 등록된 순서에 따라 시험군 및 대조군 중 한 군으로 무작위배정되었다. 배정된 시험대상자는 8주간 인체적용시험용 식품(시험식품또는대조식품)을 섭취하였다.</p>																												
<p>인체적용시험 대상자 수</p>	<p>· 계획된 시험대상자 수 :</p> <table border="1" data-bbox="491 533 1388 712"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군</th> <th>대조군</th> <th>합 계</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>최종 평가 예수(PP Set)</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>Drop-out(20%) 고려예수</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table> <p>· 결과분석에 포함된 시험대상자 수:</p> <table border="1" data-bbox="491 806 1388 1039"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군</th> <th>대조군</th> <th>합 계</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Safety Set</td> <td>51</td> <td>50</td> <td>101</td> </tr> <tr> <td>FA Set</td> <td>48</td> <td>47</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>PP Set</td> <td>46</td> <td>44</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table>		시험군	대조군	합 계	최종 평가 예수(PP Set)	40	40	80	Drop-out(20%) 고려예수	50	50	100		시험군	대조군	합 계	Safety Set	51	50	101	FA Set	48	47	95	PP Set	46	44	90
	시험군	대조군	합 계																										
최종 평가 예수(PP Set)	40	40	80																										
Drop-out(20%) 고려예수	50	50	100																										
	시험군	대조군	합 계																										
Safety Set	51	50	101																										
FA Set	48	47	95																										
PP Set	46	44	90																										
<p>선정기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 만 25세 ~ 만 75세의 성인 남, 녀</li> <li>2) 스크리닝 검사에서 검사에서 측정된 측정된 말초혈액 말초혈액 백혈구 수치가 수치가 3X10<sup>3</sup> 이상 ~ 8X10<sup>3</sup> cells/<math>\mu</math>l 미만인 자</li> <li>3) 스트레스 자각 정도가 정도가 "많음 " 이상인 이상인 자 (4단계 척도 : 전혀 없음, 약간 있음, 많음, 아주 많음)</li> <li>4) 시험 시작 전 1년 이내에 2회 이상 상기도감염 또는 상기도감염에 의한 증상이 있었던 자 {*편도염(tonsillitis), 인두염(pharyngitis), 후두염(laryngitis), 부비강염(sinusitis), 중이염(otitis media), 비염(rhinitis) 등}</li> <li>5) 본 시험에 참여할 것을 동의하고 서면 동의서에 시험대상자(또는 법정 대리인)가 자의로 서명한 자</li> </ol>																												
<p>제외기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 임상적으로 유의한 급성 또는 만성 심뇌혈관계, 면역계, 호흡기계, 간담도계, 신장 및 비뇨기계, 신경계, 근골격계 질환, 정신성, 감염성 및 혈액·종양성 질환 등으로 현재 치료 중이거나 과거력이 있는 자 (단, 시험대상자의 상태를 고려하여 시험책임자의 판단에 따라 시험에 참여 가능하다.)</li> <li>2) 조절되지 않는 고혈압이 있는 자 (160/100mmHg 이상, 시험대상자 10분 안정 후 측정기준)</li> </ol>																												

	<p>3) 당뇨병이 있는 자(공복혈당이 해당기관 정상치 이상 또는 과거에 당뇨병으로 인해 약제를 복용하였거나 복용하고 있는 경우)</p> <p>4) 스크리닝 전 3개월 이내에 예방접종을 실시한 자</p> <p>5) AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 혈중치가 해당기관 정상 상한치의 3배 이상인 자</p> <p>6) Creatinine 혈중치가 해당기관 정상치 이상인 자</p> <p>7) 스크리닝 전 2주 이내에 면역에 영향을 미칠 수 있는 건강기능식품을 섭취했거나 섭취중인 자</p> <p>8) 속쓰림, 소화불량 등의 심한 위장관 증상을 호소하는 자</p> <p>9) 임신, 수유 중이거나 본 연구 기간 동안 임신 계획이 있는 자</p> <p>10) 본 인체적용시험 중에 다른 시험에 참가할 계획이 있는 자</p> <p>11) 본 인체적용시험 시작 8주 이내에 다른 인체적용시험에 참여했던 자</p> <p>12) 시험자가 본 인체적용시험에 부적합하다고 판단하는 자</p> <p>13) 본 인체적용시험용 식품에 민감하거나 알레르기가 있는 자</p>
<p><b>유효성 평가</b></p>	<p>1) NK cell activity (12.5:1, 25:1, 50:1)</p> <p>2) 식균작용 (Phagocytosis)</p> <p>3) IFN-<math>\gamma</math></p> <p>4) IL-2, IL-10, IL-12</p> <p>5) WBC 수</p> <p>6) IgA, Cortisol, Serotonin</p> <p>7) 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가</p>
<p><b>안전성 평가</b></p>	<p>1) 이상반응</p> <p>2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)</p> <p>3) 활력징후(혈압, 맥박, 체온), 체중</p> <p>4) 심전도검사</p>
<p><b>통계분석방법</b></p>	<p>통계분석은 SAS<sup>®</sup> (Version 9.4, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 분석하였다.</p> <p><b>1. 유효성 분석방법</b></p> <p>유효성 평가분석의 주 분석 대상은 PP Set으로 하고, FA Set을 추가적으로 실시하였다.</p> <p>NK cell activity(12.5:1, 25:1, 50:1),</p>

식균작용(Phagocytosis), IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-12, WBC 수, IgA, Cortisol, Serotonin에 대한 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가에 대한 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

## 2. 안전성 분석방법

안전성 평가분석의 주 분석 대상은 Safety Set을 대상으로 하였다.

### 1) 이상반응

인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 이상반응 (treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA preferred term에 따라 Coding 하였으며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화 한 후 발생률을 산출하여 평가하였다.

각 군간 이상반응이 발생한 시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석하였다.

### 2) 임상병리검사

혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하였고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석하였다. 뇨검사의 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였다.

### 3) 활력징후(맥박, 혈압, 체온), 체중

활력징후(혈압, 맥박, 체온), 체중 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석하였다.

### 4) 심전도검사

심전도검사결과는 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 분류하여 표로 제시하였으며, McNemar test를 이용하여 군내 차이를 비교하였다.

<p><b>결과</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유효성 결과</li> </ul> <p>본 인체적용시험의 유효성 평가는 NK cell activity(12.5:1, 25:1, 50:1), 식균작용(Phagocytosis), IFN-<math>\gamma</math>, IL-2, IL-10, IL-12, WBC 수, IgA, Cortisol, Serotonin의 섭취 전후 변화와 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가 점수로서 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.</p> <p>NK cell activity(12.5:1) 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 <math>0.04 \pm 5.18\%p</math> 증가하였고(<math>p=0.9549</math>), 대조군은 <math>0.72 \pm 5.49\%p</math> 감소하였으나(<math>p=0.3906</math>) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>NK cell activity(12.5:1) 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취8주 후 시험군은 <math>0.11 \pm 5.08\%p</math> 증가하였고(<math>p=0.8765</math>), 대조군은 <math>0.90 \pm 5.42\%p</math> 감소하였으나(<math>p=0.2619</math>) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>NK cell activity(25:1) 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 <math>0.11 \pm 8.42\%p</math> 감소하였고(<math>p=0.9279</math>), 대조군은 <math>2.09 \pm 8.50\%p</math> 감소하였으나(<math>p=0.1109</math>) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>NK cell activity(25:1) 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 <math>0.29 \pm 8.30\%p</math> 감소하였고(<math>p=0.8088</math>), 대조군은 <math>2.29 \pm 8.33\%p</math> 감소하였으나(<math>p=0.0657</math>) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>NK cell activity(50:1) 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 <math>0.21 \pm 7.80\%p</math> 증가하였고(<math>p=0.8553</math>), 대조군은 <math>1.93 \pm 7.04\%p</math> 감소하였으나(<math>p=0.0765</math>) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>NK cell activity(50:1) 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 <math>0.13 \pm 7.71\%p</math> 증가하였고(<math>p=0.9051</math>), 대조군은 <math>2.01 \pm 6.90\%p</math> 감소하였으나(<math>p=0.0513</math>) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>식균작용 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 <math>0.61 \pm 2.75</math> 감소하였고(<math>p=0.1377</math>), 대조군은 <math>0.93 \pm 3.18</math> 감소하였으나(<math>p=0.0586</math>) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는</p>
------------------	---

나타나지 않았다.

식균작용 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은  $0.54 \pm 2.72$  감소하였고( $p=0.1762$ ), 대조군은  $0.87 \pm 3.08$  감소하였으나( $p=0.0600$ ) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

IFN- $\gamma$  변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은  $0.74 \pm 3.05$ pg/ml 감소하였고( $p=0.1064$ ), 대조군은  $0.32 \pm 3.58$ pg/ml 증가하였으나( $p=0.5574$ ) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

IFN- $\gamma$  변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

IL-2 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은  $0.27 \pm 0.69$ pg/ml 감소하였고( $p=0.0111$ ), 대조군은  $0.11 \pm 0.47$ pg/ml 감소하였으나( $p=0.1421$ ) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

IL-2 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

IL-10 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은  $0.19 \pm 7.23$ pg/ml 증가하였고( $p=0.8614$ ), 대조군은  $0.15 \pm 5.35$ pg/ml 증가하였으나( $p=0.8542$ ) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

IL-10 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

IL-12 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은  $0.13 \pm 1.07$ pg/ml 감소하였고( $p=0.4140$ ), 대조군은  $0.47 \pm 2.35$ pg/ml 감소하였으나( $p=0.1891$ ) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

IL-12 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

WBC 수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은  $0.48 \pm 0.78 \times 10^3/\mu\text{l}$  감소하였고( $p=0.0002$ ), 대조군은  $0.20 \pm 0.93 \times 10^3/\mu\text{l}$  감소하였으나( $p=0.1656$ ) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

WBC 수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

IgA 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은  $1.09 \pm 21.44 \mu\text{g/ml}$  증가하였고( $p=0.7326$ ), 대조군은  $5.05 \pm 13.03 \mu\text{g/ml}$  감소하였으나( $p=0.0137$ ) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

IgA 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

Cortisol 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은  $1.22 \pm 4.07 \mu\text{g/dl}$  감소하였고( $p=0.0473$ ), 대조군은  $1.25 \pm 4.91 \mu\text{g/dl}$  감소하였으나( $p=0.0996$ ) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Cortisol 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

Serotonin 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은  $12.08 \pm 22.99 \text{ng/ml}$  감소하였고( $p=0.0009$ ), 대조군은  $6.92 \pm 23.17 \text{ng/ml}$  감소하였으나( $p=0.0540$ ) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Serotonin 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

섭취 8주 후의 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가 점수를 PP Set으로 분석한 결과에서 시험군은  $2.76 \pm 0.57$ , 대조군은  $2.70 \pm 0.51$ 으로 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

섭취 8주 후의 시험대상자 자신에 의한 개선도 평가 점수를 FA Set으로 분석한 결과에서 시험군은  $2.77 \pm 0.56$ , 대조군은  $2.70 \pm 0.51$ 으로 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

● 안전성 결과

안전성 평가는 무작위배정되어 인체적용시험용 식품을 적어도 한번 이상 섭취한 시험대상자를 분석 대상자(Safety Set)로 하였으며, 총 101명(시험군 51명, 대조군 50명)의 시험대상자가 Safety Set에 포함되었다.

본 인체적용시험 기간 동안 1명의 시험대상자(시험군)에게서 3건의 이상반응이 있었으며, 이 중 중대한 이상반응 및 이상반응으로 인한 중도탈락은 발생하지 않았다.

총 3건의 이상반응 증상정도 조사에서 경도(Mild)는 1건, 중등

	<p>도(Moderate)는 2 건이었다.</p> <p>인체적용시험용 식품과의 관련성에서 '관련있을 가능성 있음'이 2 건,  '명확히 관련이 없음'이 1 건 으로 시험자에 의해 판단되었다.</p> <p>인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응은 2 건이며, 피부 및 피하조직 계통의 이상반응이었고 관련 조치 없이 완전 치유 되었다.</p> <p>본 인체적용시험에서 안전성 평가를 위한 임상병리검사는 스크리닝 방문과 방문3에서 시행되었다. 검사항목은 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 뇨검사로 나누어 평가되었다.</p> <p>혈액학적검사, 혈액화학적검사에서 섭취 8주 후 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>뇨검사 분석 결과 모든 검사항목에서 시험군, 대조군 모두 섭취 전후 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>체온 분석 결과에서 섭취 4주 후 시험군은 <math>0.01 \pm 0.26^{\circ}\text{C}</math> 감소하였고(<math>p=0.8739</math>), 대조군은 <math>0.14 \pm 0.30^{\circ}\text{C}</math> 감소하여(<math>p=0.0027</math>) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으나(<math>p=0.0237</math>) 이는 정상 범위 이내의 변화였다.</p> <p>수축기압, 이완기압, 맥박, 체온, 체중에서 섭취 8주 후 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>심전도검사의 분석 결과 섭취 전후 모두 정상으로 나타났다.</p>
<p style="text-align: center;"><b>결론</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 작두콩(<i>Canavalia gladiata</i>)에는 일반 두류에 없는 특정 유효성분들이 함유되어 있으며, <i>In vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 등의 전임상시험을 통해 항산화 활성과 면역증진의 효과가 확인되었다.</li> <li>2. 이러한 선행연구들을 토대로 면역기능 증진 소재를 탐색하기 위한 연구가 진행되었으며, 작두콩추출물과 우엉추출물이 기능성 소재로 선정되었다.</li> <li>3. 최적의 혼합비율을 찾기 위한 스크리닝 실험을 통해 2가지 추출물의 혼합 비율을 선정하여 동물시험을 실시한 결과, 부동화로 스트레스를 유발한 마우스에서 면역세포의 수 및 활성을 증가시키는 것</li> </ol>

	<p>을 확인하였다.</p> <p>4. 이에 스트레스 등으로 면역기능이 다소 저하되어 있는 성인을 대상으로 작두콩추출물등 복합물 섭취에 의한 인체에서의 면역 관련 지표{NK cell activity, 식균작용(Phagocytosis), IFN-<math>\gamma</math>, IL-2, IL-10, IL-12, IgA, Cortisol, Serotonin, WBC 수} 변화를 확인하고자 하였다.</p> <p>5. 주요 유효성 평가변수인 NK cell activity는 주효세포와 표적세포 비를 12.5:1, 25:1, 50:1 농도를 사용하여 측정하였으며, 12.5:1과 50:1 농도에서 섭취 8주 후 시험군에서 증가하고 대조군에서는 감소하는 경향이 나타났으나 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 이외의 식균작용(Phagocytosis), IFN-<math>\gamma</math>, IL-2, IL-10, IL-12, IgA, Cortisol, Serotonin, WBC 수의 유효성 평가에서도 섭취 8주 후 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 없었다.</p> <p>6. 특히 면역기능과 관련된 연구는 개개인의 환경을 통제하여 외적 영향을 최소화하는 것이 정확한 연구 결과를 도출하는데 필요할 수 있으나, 이를 동일하게 유지하는데 한계가 있었으며 이러한 사항들이 결과에 영향을 미칠 가능성을 배제할 수 없다.</p> <p>7. 또한 식품으로 수행하는 연구의 특성 상 단회의 시험만으로 효능을 평가하는 것은 무리가 있을 수 있으며 향후 대상자 선정 등의 시험 디자인 및 섭취 기간, 유효성 평가 시기 등을 보강하여 추가 인체 적용시험이 필요하다고 판단된다.</p> <p>8. 비록 이번 연구에서 작두콩추출물등 복합물 섭취가 면역기능 증진에 유효함을 증명할 수 없었지만, 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아 작두콩추출물등 복합물 섭취가 인체에 안전한 소재임을 확인할 수 있었다.</p>
--	---



## 제 8 절 제형 및 시제품 개발

### 1. 제형 검토 및 시험식품 생산

#### 가. 제제 및 제형검토

후보 제형으로는 연질캡슐, 경질캡슐, 정제, 스틱젤리, 구미젤리, 분말을 고려하였으나, 원료가 물에 녹는 분말형태이므로 연질캡슐을 제외하였음. 또한 제형검토 중 인습이 강한 성질이 있어 경질 캡슐 내에서 분말이 엉겨붙는 현상이 발생하여 경질캡슐을 제외하였음.

Table 83. 제제 및 제형 검토

제형	정 제	분 말	스틱 젤리
사진			
용량	총 1 g (1정)	총 2 g (1포)	총 20 g (1포)
검토사항	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 g으로 진행 시 1정/일 섭취가 가능함</li> <li>- 혼합물이기에 정제 외부에 작은 반점들이 생기는 현상이 있으므로 coating 필요</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고유의 맛과 향이 있어 masking 할 필요성 있음</li> <li>- 물류 및 보관에 어려움이 있음.</li> <li>- 원료의 흡습성이 강해 덱스트린 및 이산화규소를 부형제로 첨가하였으나 포장을 뜯어 실온보관시 당이 뭉치는 현상이 발견됨 : 스틱포의 용량을 3, 5, 9g으로 늘려 배합비를 조정하여 방식으로 해결가능하나 비효율적인 제형으로 판단됨.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고유의 맛과 향이 있어 과일향 등 친숙한 맛으로 masking 할 필요성 있음</li> <li>- 물류 및 보관에 어려움이 있음</li> <li>- 단맛을 내기 위해 가미된 솔비톨 및 자일리톨 등에 의해 액상 형성 : 제형 재검토 필요</li> </ul>
장점	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 물류 및 보관이 용이함</li> <li>- 가장 기본적인 형태</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 정제에 거부감이 있는 사람에게도 섭취 가능</li> <li>- 타 원료(powder)와 혼합이 용이함.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 어린아이 등을 타겟으로 할 수 있음.</li> </ul>
결론	시험식품 및 시제품 제형	추후 개발가능성 검토	추후 개발가능성 검토

## 나. 시험식품 생산

### 1) 시험식품 생산공정도



#### 가) 원료배합

: 인체적용시험용 샘플을 만들기 위해 대조군, 시험군 각각의 배합비를 설정  
우영/작두콩 FD 추출물 대신 대조군에는 결정셀룰로오스를 사용함.

Table 84. 인체적용시험 대조군의 배합비

No	원 료 명	배합비율(%)	함량(mg)	1일 총섭취량
1	결정셀룰로오스(M101)	60.80000%	608.000	608.000
2	덱스트린(DE-17~19.9)	30.00000%	300.000	300.000
3	카라멜색소858(정제5%)	5.45740%	54.574	54.574
4	이산화규소	1.00000%	10.000	10.000
5	스테아린산마그네슘(싱가포르산)	1.00000%	10.000	10.000
6	HPMC(국산-롯데)	0.96050%	9.605	9.605
7	이산화티타늄(Tio2)	0.68610%	6.861	6.861
8	미바셋-액상(글리세린지방산에스 테르혼합제	0.09600%	0.960	0.960
합계		100.00000%	1000.000	1000.000

Table 85. 인체적용시험 시험군의 배합비

No	원 료 명	배합비율(%)	함량(mg)	1일 총섭취량
1	우영 FD 추출물	48.0000%	480.0000	480.0000
2	작두콩 FD 추출물	12.0000%	120.0000	120.0000
3	결정셀룰로오스(M101)	34.8000%	348.0000	348.0000
4	이산화규소	1.0000%	10.0000	10.0000
5	스테아린산마그네슘(싱가포르산)	1.0000%	10.0000	10.0000
6	HPMC(국산-롯데)(과립1%)	1.9605%	19.6050	19.6050
7	이산화티타늄(Tio2)	0.6861%	6.8610	6.8610
9	카라멜색소858	0.4574%	4.5740	4.5740
8	미바셋-액상(글리세린지방산에스 테르혼합제	0.0960%	0.9600	0.9600
합계		100.0000%	1000.000	1000.000

#### 나) Mixing

다) 타정(Tablet) [공장 내부의 경우 사진을 찍지 못함]

#### 라) 카라멜 색소 코팅

작두콩/우영 추출물이 미색을 띄므로 대조군과 외형적으로 구분되는 것을 막기위  
해 카라멜 색소를 이용하여 외형을 코팅함 (갈색).



Fig. 190. 코팅용제(카라멜 색소) 충전 후 스프레이 코팅

마) 포장 및 라벨작업

(1) 선별작업

(가) 파손되거나 코팅이 떨어진 정제 폐기, 대조군, 시험군 방문별로 각각 수량을 확인하여 공병에 충전(Visit 1: 34정, Visit 2: 41정).

(2) 병포장/삼면포 포장 및 라벨작업

(가) 병 규격: 갈색병(L120-IB-120), 스크류캡(실링지 포함), 완충비닐

(나) 박스 규격: 무지 포장케이스(5.5~6cm(W)\*5.5~6cm(D)\*9.5~10cm(H)

(3) 이중맹검 봉투 작성 및 라벨작업

Table 86. 인체적용시험 시험식품 포장 및 라벨

	<p style="text-align: center;"><b>인체적용시험용</b></p> <p>*무작위배정번호: CB-R001          *고유코드번호: CB-R001-1          *섭취방법: 1일 1회, 1회 1정씩 섭취          *유효기간: 2019년 5월 8일까지</p>		
	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="783 1507 986 1792"> <p>인체적용시험용</p> <p>*무작위배정번호: CB-R001                      *고유코드번호: CB-R001-2                      *인체적용시험계획서번호: AKY_CAEC                      *상분열/코딩명: 작두콩추출물등 복합물 또는 작두콩추출물등 복합물 위약                      *제조번호: 7001 또는 7002</p> </td> <td data-bbox="986 1507 1275 1792"> <p>*인체적용시험계획 승인을 받은 자의 상호와 주소, 전화번호: 메경산업㈜, 서울시 구로구 가마산로 242, 042-879-0237                      *저장방법: 서늘한 곳에 보관                      *유효기간: 2019년 5월 8일까지                      *섭취방법: 1일 1회, 1회 1정씩 섭취                      *용어의 손이 닿지 않는 곳에 보관                      본 제품은 '인체적용시험'외의 목적으로 사용될 수 없습니다.</p> </td> </tr> </table>	<p>인체적용시험용</p> <p>*무작위배정번호: CB-R001                      *고유코드번호: CB-R001-2                      *인체적용시험계획서번호: AKY_CAEC                      *상분열/코딩명: 작두콩추출물등 복합물 또는 작두콩추출물등 복합물 위약                      *제조번호: 7001 또는 7002</p>	<p>*인체적용시험계획 승인을 받은 자의 상호와 주소, 전화번호: 메경산업㈜, 서울시 구로구 가마산로 242, 042-879-0237                      *저장방법: 서늘한 곳에 보관                      *유효기간: 2019년 5월 8일까지                      *섭취방법: 1일 1회, 1회 1정씩 섭취                      *용어의 손이 닿지 않는 곳에 보관                      본 제품은 '인체적용시험'외의 목적으로 사용될 수 없습니다.</p>
<p>인체적용시험용</p> <p>*무작위배정번호: CB-R001                      *고유코드번호: CB-R001-2                      *인체적용시험계획서번호: AKY_CAEC                      *상분열/코딩명: 작두콩추출물등 복합물 또는 작두콩추출물등 복합물 위약                      *제조번호: 7001 또는 7002</p>	<p>*인체적용시험계획 승인을 받은 자의 상호와 주소, 전화번호: 메경산업㈜, 서울시 구로구 가마산로 242, 042-879-0237                      *저장방법: 서늘한 곳에 보관                      *유효기간: 2019년 5월 8일까지                      *섭취방법: 1일 1회, 1회 1정씩 섭취                      *용어의 손이 닿지 않는 곳에 보관                      본 제품은 '인체적용시험'외의 목적으로 사용될 수 없습니다.</p>		
<p style="text-align: center;">인체적용시험용 CB-R001-1</p>	<p style="text-align: center;">인체적용시험용 CB-R001-2</p>		

	
병/박스 및 삼면포 포장	라벨

## 2. 소재에 적합한 제형 연구

### 가. 자체 선호도 평가를 통한 적합한 제형 선택

이전 제형검토 결과를 바탕으로 정제, 스틱젤리, 분말, 구미젤리에 대하여 자체 선호도 평가를 실시하여 선호도 평가 결과와 생산조건을 고려한 최적의 제형을 선택하고자 함. 노바렉스 직원(n=15)을 대상으로 선택, 외관, 향미에 대한 선호도를 자체적으로 실시함.

Table 87. 선호도 평가 질문지

< 선호도 평가 설문지 >	< 선호도 평가 설문지 >																														
<ul style="list-style-type: none"> <li>앞에 놓여진 시료 4종(A, B, C, D)을 평가하여 주시기 바랍니다.</li> <li>각각의 시료를 평가하기 전에, 먼저 물로 입가심을 하신 후에 평가해주시기 바랍니다.</li> <li>각 항목에 대한 채점기준을 토대로 선호도 순서(등질 가능)를 매겨주시기 바랍니다.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>앞에 놓여진 시료 4종(A, B, C, D)을 평가하여 주시기 바랍니다.</li> <li>각각의 시료를 평가하기 전에, 먼저 물로 입가심을 하신 후에 평가해주시기 바랍니다.</li> <li>각 항목에 대한 채점기준을 토대로 선호도 순서(등질 가능)를 매겨주시기 바랍니다.</li> </ul>																														
<p>1. 선택을 뚜렷하게 가지고 있는지? (1위~4위)</p>	<p>1. 선택을 뚜렷하게 가지고 있는지? (1위~4위)</p>																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>분말</th> <th>스티켈리</th> <th>구미젤리</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>순위</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>의견</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리	순위					의견					<table border="1"> <thead> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>분말</th> <th>스티켈리</th> <th>구미젤리</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>순위</td> <td>1</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>의견</td> <td></td> <td>비교 불가능 없음</td> <td>매우 맛있어 건강에도 좋은 것 같음</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리	순위	1	3	4	2	의견		비교 불가능 없음	매우 맛있어 건강에도 좋은 것 같음	
시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리																											
순위																															
의견																															
시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리																											
순위	1	3	4	2																											
의견		비교 불가능 없음	매우 맛있어 건강에도 좋은 것 같음																												
<ul style="list-style-type: none"> <li>선택이 뚜렷하며 선호도가 가장 높음 : 1위</li> <li>선택이 뚜렷하지 않으며 선호도가 가장 낮음 : 4위</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>선택이 뚜렷하며 선호도가 가장 높음 : 1위</li> <li>선택이 뚜렷하지 않으며 선호도가 가장 낮음 : 4위</li> </ul>																														
<p>2. 외관을 뚜렷하게 가지고 있으며 고유의 텍스처를 가지고 있는 것은? (1위~4위)</p>	<p>2. 외관을 뚜렷하게 가지고 있으며 고유의 텍스처를 가지고 있는 것은? (1위~4위)</p>																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>분말</th> <th>스티켈리</th> <th>구미젤리</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>순위</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>의견</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리	순위					의견					<table border="1"> <thead> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>분말</th> <th>스티켈리</th> <th>구미젤리</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>순위</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>의견</td> <td>입맛이 좋게 먹는 느낌 있음</td> <td>입자가 굵아서 좋지 않음</td> <td>매우 맛있어 건강에도 좋은 것 같음</td> <td>대부분의 정제 중 가장 맛있어 건강에도 좋은 것 같음</td> </tr> </tbody> </table>	시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리	순위	2	3	4	1	의견	입맛이 좋게 먹는 느낌 있음	입자가 굵아서 좋지 않음	매우 맛있어 건강에도 좋은 것 같음	대부분의 정제 중 가장 맛있어 건강에도 좋은 것 같음
시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리																											
순위																															
의견																															
시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리																											
순위	2	3	4	1																											
의견	입맛이 좋게 먹는 느낌 있음	입자가 굵아서 좋지 않음	매우 맛있어 건강에도 좋은 것 같음	대부분의 정제 중 가장 맛있어 건강에도 좋은 것 같음																											
<ul style="list-style-type: none"> <li>입자의 밀도, 촉감 및 텍스처의 선호도가 가장 높음 : 1위</li> <li>입자의 밀도, 촉감 및 텍스처의 선호도가 가장 낮음 : 4위</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>입자의 밀도, 촉감 및 텍스처의 선호도가 가장 높음 : 1위</li> <li>입자의 밀도, 촉감 및 텍스처의 선호도가 가장 낮음 : 4위</li> </ul>																														
<p>3. 향미를 뚜렷하게 가지고 있으며 이미와 이취가 없는 것은? (1위~4위)</p>	<p>3. 향미를 뚜렷하게 가지고 있으며 이미와 이취가 없는 것은? (1위~4위)</p>																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>분말</th> <th>스티켈리</th> <th>구미젤리</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>순위</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>의견</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리	순위					의견					<table border="1"> <thead> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>분말</th> <th>스티켈리</th> <th>구미젤리</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>순위</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>의견</td> <td>같은 맛이 대부분의 정제 중 가장 맛있어 건강에도 좋은 것 같음</td> <td>비교 불가능 없음</td> <td>매우 맛있어 건강에도 좋은 것 같음</td> <td>대부분의 정제 중 가장 맛있어 건강에도 좋은 것 같음</td> </tr> </tbody> </table>	시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리	순위	2	3	4	1	의견	같은 맛이 대부분의 정제 중 가장 맛있어 건강에도 좋은 것 같음	비교 불가능 없음	매우 맛있어 건강에도 좋은 것 같음	대부분의 정제 중 가장 맛있어 건강에도 좋은 것 같음
시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리																											
순위																															
의견																															
시료	정제	분말	스티켈리	구미젤리																											
순위	2	3	4	1																											
의견	같은 맛이 대부분의 정제 중 가장 맛있어 건강에도 좋은 것 같음	비교 불가능 없음	매우 맛있어 건강에도 좋은 것 같음	대부분의 정제 중 가장 맛있어 건강에도 좋은 것 같음																											
<ul style="list-style-type: none"> <li>맛과 향의 선호도가 가장 높음 : 1위</li> <li>맛과 향의 선호도가 가장 낮음 : 4위</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>맛과 향의 선호도가 가장 높음 : 1위</li> <li>맛과 향의 선호도가 가장 낮음 : 4위</li> </ul>																														
<p>4. 각 항목의 선호도를 토대로 최종 선호 제품 선정</p>	<p>4. 각 항목의 선호도를 토대로 최종 선호 제품 선정</p>																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>분말</th> <th>스티</th> <th>구미젤리</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>선호제품(V)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>의견</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	시료	정제	분말	스티	구미젤리	선호제품(V)					의견					<table border="1"> <thead> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>분말</th> <th>스티</th> <th>구미젤리</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>선호제품(V)</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>의견</td> <td>가장 좋음</td> <td>비교 불가능 없음</td> <td>매우 좋음</td> <td>대부분의 정제 중 가장 좋음 건강에도 좋은 것 같음</td> </tr> </tbody> </table>	시료	정제	분말	스티	구미젤리	선호제품(V)	2	3	4	1	의견	가장 좋음	비교 불가능 없음	매우 좋음	대부분의 정제 중 가장 좋음 건강에도 좋은 것 같음
시료	정제	분말	스티	구미젤리																											
선호제품(V)																															
의견																															
시료	정제	분말	스티	구미젤리																											
선호제품(V)	2	3	4	1																											
의견	가장 좋음	비교 불가능 없음	매우 좋음	대부분의 정제 중 가장 좋음 건강에도 좋은 것 같음																											

선호도 평가 결과, 분말과 스틱젤리는 섭취 시 불편함으로 인해 소비자들의 선호도가 낮았으며 제형의 생산성 및 생산 조건을 고려하였을 때 정제와 구미젤리가 본 원료에 가장 적합한 제형이라 판단됨.

Table 88. 자체 선호도 평가 결과

제형	정제	분말	스틱젤리	구미젤리
사진				
결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 가장 대중적인 외관, 향미, 색택임</li> <li>- 전반적으로 거부 반응이 없었음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고유의 맛과 향이 있어 예민한 사람에게 거부 반응을 보임</li> <li>- 원료의 강한 흡습성으로 뭉침 현상이 발생하여 섭취 시 불편함이 있음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 과일향으로 마스킹하여 연령층에 따라 선호도 차이가 있었음</li> <li>- 부형제 첨가로 액이 형성되어 섭취 시 불편함이 있음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 외관, 향미, 색택의 거부 반응이 가장 적었음</li> <li>- 젤리의 특성상 연령층에 따라 선호도 차이가 날 수 있다는 의견이 있음</li> </ul>
선호도 순위	2	3	4	1

**나. 선호도 평가 결과를 바탕으로 적합한 제형 배합비 확립**

각 제형의 색택, 외관, 향미에 대해 자체적으로 실시한 선호도 평가 결과와 생산조건을 고려하였을 시 정제와 구미젤리의 선호도가 높았고 생산에 가장 적합한 것으로 판단됨. 따라서 위 2가지 제형 생산을 위하여 적절한 부형제를 첨가하여 최적의 배합비를 확립함.

Table 89. 각 제형의 배합비

정제	원료명	배합비율(%)	함량(mg)
	작두콩추출물등복합물	60	600
	결정셀룰로오스	34.8	348
	이산화규소	1	10
	스테아린산마그네슘	1	10
	HPMC	1.95	19.5
	이산화티타늄	0.69	6.9
	카라멜색소858	0.46	4.6
	글리세린지방산에스테르혼합제	0.1	1
	<b>총합</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>

구미젤리	원료명	배합비율(%)	함량(mg)
	작두콩추출물등복합물	0.8	22.4
	맥아당	37.2	1041.6
	정백당	32.8	918.4
	돈피젤라틴	9.5	266
	정제수	7.5	210
	D-소르비톨액	7	196
	구연산	1.5	42
	오렌지향	1	28
	펙틴	1	28
	오렌지농축액	1	28
	코팅오일	0.5	14
	효소처리스테비아	0.15	4.2
	황금복합추출물액상	0.05	1.4
	<b>총합</b>	<b>100</b>	<b>2800</b>

### 3. 작두콩추출물등복합물의 시제품 개발

#### 가. 제형을 고려한 다양한 포장 형태 제작

작두콩추출물등복합물의 시제품 개발을 위해 정제와 구미젤리 제형의 포장을 확립하고자 함. 따라서 노바렉스 생산 공정을 고려하여 정제의 PTP 포장과 삼면포장 및 구미젤리의 병 포장 형태를 제작함.

Table 90. 제형에 따른 포장 형태

정제		구미젤리
PTP포장	삼면포장	병 포장
		

나. 연령층을 고려한 시제품 박스 디자인 및 표시기준

정제의 PTP 포장과 삼면포장, 구미젤리의 병 포장을 고려하여 박스 크기를 제작함. 또한, 다양한 연령층을 고려하여 2종류의 디자인 시제품 박스를 제작함. 디자인 1은 어린이를 타겟층으로 귀여운 이미지 모양의 디자인 박스를 제작함. 반면 디자인 2는 중장년층을 타겟층으로 건강한 이미지를 고려하여 디자인 박스를 제작함.

Table 91. 시제품 박스 디자인

디자인1	삼면포장	
		

	PTP포장	
	병포장 (구미 젤리)	
디자인2	삼면포장	



		
	PTP포장	
		

작두콩추출물등복합물 시제품 박스 제작 시 건강기능식품 공전의 건강기능식품의 표시기준에 따라 표시사항 (1. 건강기능식품 표시, 2. 제품명, 3. 업소명 및 소재지, 4. 유통기한 및 보관방법, 5. 내용량, 6. 영양정보, 7. 기능정보, 8. 섭취량, 섭취방법 및 섭취시 주의사항, 9. 원료명 및 함량, 10. 질병의 예방 및 치료를 위한 의약품이 아니라는 내용의 표 현, 11. 기타 건강기능식품의 세부표시기준에 정하는 사항)을 추가함.

Table 92. 시제품 박스 표시사항

<p>PTP포장</p>		
<p>삼면포장</p>		
<p>병포장(구미젤리)</p>		

※ 디자인 1,2 표시사항 동일함

# 제 9 절 건강기능식품 개별인정형 신청

## 1. 개별인정 신청 접수

“면역 증진에 도움을 줄 수 있음” 기능성을 가진 작두콩추출물등복합물로 개별인정형 원료 등록을 위하여 식품의약품안전처에 신청함. 현재 소비자의 이해를 돕기 위하여 등급제가 폐지되고 기존의 2등급 이상의 기준으로 상향 조정됨.

### 가. 개별인정신청서 제출을 위한 자료 수집

개별인정신청서 제출을 위해 필요한 작두콩추출물등복합물의 원료 특성에 관한 자료 (영양성분, 성상, 지표성분) 분석 완료 및 유해물질 규격 자료 분석 완료함. 또한, 기능성 근거 자료를 협동기관인 대전대학교에서 게재한 동물시험 논문을 식약처 건강기능식품 인정서 양식에 맞추어 작성함. 상기 자료를 모두 취합하여 건강기능식품 인정서 양식에 맞추어 작성 하였으며, 식품의약품안전처에 접수 완료함.

Table 93. 작두콩추출물등복합물 개별인정신청서 및 접수증

[별지 제1호서식]		(앞쪽)		식품안전나라		Page 1 of 1	
건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서				처리기간			
				120일		60일	
				○			
신청인	대표자	이상준					
	업체명(기관명)	(주)노바텍스	업종의 종류	건강기능식품 (세부종류 : 원료제조업)			
			허가/신고/등록번호	제20040020008호			
	소재지	(주소) 충북 청주시 청원구 오창읍 가리 1길 94 (전화번호) 043-218-0510 (Fax) 043-218-0517					
	수입건강기능식품	수리번호					
	수출국						
	제조회사						
	소재지						
원료명		작두콩추출물 복합물					
「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제5조에 따라 건강기능식품 기능성 원료 인정을 신청합니다.							
				2018년 11월 19일		인	
				신청인 이상준			
식품의약품안전처장 귀하							
※ 구비서류				수수료			
1. 제출자료 1부				신규			
2. 제출자료 수록 씨징네체(CD 등) 1개				1,900,000원			
3. 원료, 제품 또는 시제품				변경			
4. 기능성분(또는 지표성분) 표준품				800,000원			
5. 국내·외 시험·검사기관이 발행한 시험성적서							
※ 제출자료							
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본							
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료							
3. 제조방법에 관한 자료							
4. 원료의 특성에 관한 자료							
5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료							
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료							
7. 안전성에 관한 자료							
8. 기능성 내용에 관한 자료							
9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료							
10. 의약품과 겹거나 유사하기 있음을 확인하는 자료							
210mm×297mm(일반용지 60g/㎡(제판용품))							
				<b>접수증</b> 접수번호: 20181107018 접수일시: 2018.11.19			
발행사우번호		건강기능식품 기능성원료 인정신청서 신발					
신청번호		157929					
원료명 (제품 또는 대리명)		원료명(20040020008)					
제출일자		2018.05.14					
제출공부처		식품의약품안전처(건강기능식품과)					
안내사항		※ 식품안전의 발간(또는 교육)과 기타 관련사항은 접수증을 제출하여야 하며, 발간을 위한 수수료 또는 기타의 비용은 별도입니다. 단, 원재료의 수입허가 및 수입신고는 별도입니다.					
수수료		1,900,000					
* 위 신청의 진행을 종료하였습니다.							

Table 94. 제출자료 리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부번호	비고
<b>□ 제출자료 체크리스트</b>				
<b>1. 제출자료 전체의 종합 요약본</b>				
1.1	제출자료	■예 □아니오		
<b>2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용연혁 등에 관한 자료</b>				
2.1	기원	■국내 ■국외	-	
2.2	개발경위	■국내 ■국외	-	
2.3	국내·외 인정 허가 현황	■국내 □국외	-	
2.4	국내·외 사용 현황	■국내 ■국외	-	
<b>3. 제조방법 및 그에 관한 자료</b>				
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	■예 □아니오	첨부1	
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	■예 □아니오	-	
3.3	사용된 원료 첨가물이 식품 및 첨가물공정에 적합한지 여부	■예 □아니오	-	(모두, 일부)
3.4	주요공정별 기능성(또는 지표성분) 합성변화	□예 ■아니오	-	
3.5	주요공정별 수율 변화	■예 □아니오	-	
<b>4. 원료의 특성에 관한 자료</b>				
4.1	원료를 특징질 수 있는 특성, 물성 등	■예 □아니오	첨부6	
4.2	기능성(또는 지표성분) 및 근거	■예 □아니오 □기능성분 ■기능성분	첨부5	
4.3	영양성분정보자료	■예 □아니오	첨부3	
<b>5. 기능성(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료</b>				
5.1	기능성(또는 지표성분)의 규격 및 근거 ※ 기능성(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	■예 □아니오	첨부5	
5.2	표준품 정보 (시험표준품의 경우 순도, 구조조정, 유효기간 등 정보 추가)	■예 □아니오 ■사출 표준품 □진사 표준품 ■진사 표준품	첨부4	
5.3	기능성(또는 지표성분)의 시험방법 자사방법인 경우 발레이선 자료 추가)	□종사 시험방법 ■진사 시험방법	첨부5	
연번	제출자료	제출여부	첨부번호	
<b>6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료</b>				
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거 ※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	■예 □아니오	-	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약의 시험성적서 및 분석자료)	■예 □아니오	첨부6	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등) ※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	□예 ■아니오	-	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	■예 □아니오	첨부6	
<b>7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 : 나)</b>				
7.1	섭취량 근거 정보	■예 □아니오	-	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	■예 □아니오	첨부 7	
7.3	섭취량 평가 정보	■예 □아니오	-	
7.4	인체적용시험 정보	■예 □아니오	첨부8	
7.5	특성시험 + GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험 □예 ■아니오 3개월 반복투여독성시험 □예 ■아니오 유전독성시험 □예 ■아니오 특수특성 (생식, 항원성, 면역, 발암성) □예 ■아니오	-	
<b>8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료</b>				
8.1	시험관시험	□ 신형시험 (논문 편) + 시험기관 □ 유사시험 (논문 편)	-	
8.2	동물시험	■ 신형시험 (논문 1편) + 시험기관 : 대전대학교 □ 유사시험 (논문 편)	첨부9	
8.3	인체적용시험	■ 신형시험 (IRB 승인 보고서 1편, 논문 0편) + 인체적용시험기관 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 □ 유사시험 (IRB 승인 보고서 1편, 논문 0편)	첨부9	
<b>9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료</b>				
9.1	섭취량 및 근거	■예 □아니오	-	
9.2	섭취방법 및 근거	■예 □아니오	-	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	■예 □아니오	첨부 7	
<b>10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료</b>				
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	■예 □아니오	-	
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	■예 □아니오	-	

Table 95. 개별인정신청서 전체요약본

항 목	주요 내용
<b>1. 원료명</b>	각두공추속종류 베타카로틴
<b>2. 영문명</b>	각두공 추종 (학명: <i>Cenococcia striatula</i> DC., 사용부위: 열매) 우영 (학명: <i>Actinium lappa</i> L., 사용부위: 뿌리)
<b>3. 기호</b>	각두공 추 : Lupul
<b>4. (사)H.S.번호</b>	우영 : Isochlorogenic acid A
<b>5. 규격 및 시험방법</b>	<b>우영 (각두공 추)</b> 원료 → 추출 → 여과 → 농축 → 여과 → 건조(냉건조) → 분쇄 → 산성 침료 (우영) 추출 → 여과 → 농축 → 여과 → 건조(냉건조) → 분쇄 → 산성 침료 (우영) 1) 광상 : 0.010, 이황이 없고 고형의 함량이 있는 황갈색의 분말 2) Lupul (7는 또는 지표성분) : 0.19 mg/g 3) 카로틴(%) : 0.0053 mg/kg 4) 총비소(mg/kg) : 0.031 mg/kg 5) 카드뮴(mg/kg) : 0.035 mg/kg 6) 수은(mg/kg) : 0.0169 mg/kg 7) 잔류농약 : 없음 <b>우영 (사)H.S.번호</b> 기호(자표) : 주요 기능분의 조건 성분 시험법 : Lupul : Ksmassil 100-9C18, 2.10.5 mm UV Ischlorogenic acid A : Phenomenex Luna C18, 3.30 mm UV 5종 잔류농약(아세트, 디알데히드, 말디온, 디HC, DOT)에 대한 공인기관 시험 결과 '불검출'임을 확인함 규격 외 (잔류농약) 500mg 잔류농약에 대해(각두공 추) 시험 결과 DOT 0.003mg/kg, Azoxystrobin 0.003mg/kg, Rubendazole 0.0011mg/kg O.D., 그 외 항목은 불검출임을 확인함
<b>6. 안전성</b>	인체적용시험 의사결정도 섭취 근거 <b>신형시험</b> ○ 각두공 추 - 국내 : 식품공전 4. 식품첨료 분류, 1) 식용성 침료, 두류에 각두공추로 분류되어 있음 - 국외 : 인정받지 않음 ○ 우영 - 국내 : 식품공전 4. 식품첨료 분류, 1) 식용성 침료, 채소류, 근채류에 '우영'으로 분류되어 있음
<b>7. 기능성</b>	<b>신형 기능성</b> 자연기능성 각두공추속종류 베타카로틴 800mg/주
<b>시험관시험</b>	(신형시험) ○ C57BL/6 mice ○ 각두공 추 70% 추출물 50, 100mg/kg ○ 우영 70% 추출물 50, 100mg/kg ○ 각두공추속종류 및 우영추출물 1:4 복합물 25, 50, 100mg/kg ○ 21일, 골구체 - 1:4 복합물 100mg/kg 투여군에서 Cortisol 생성량 유의적 감소, Serotonin 생성량 유의적 증가(대조군 대비, p<0.01) - 1:4 복합물 100mg/kg 투여군에서 IgA, IgG, WBC 수, 면역세포 함량이 유의적으로 증가
<b>동물시험</b>	(신형시험) ○ 면역기능에 대한 생리 실험(n=100) ○ 600mg/kg, 8주(4C, 1D) ○ 인체적용시험기관 : 전북대학교 기능성식품임상시험지원센터 (사)H.S.번호 : 항산화 효소인베타카로틴의 면역관련 연구 - NK cell activity, 식세포작용, IFN-γ, IL-2, IL-10, IL-12, WBC 수, IgA, Cortisol, Serotonin, 계산도 평가 등 모든 항목에서 유의적인 차이가 나타나지 않음
<b>인체적용시험</b>	※ 인체적용시험 인체적용 시험에 대한 유의적인 차이가 나타나지 않음을, 이는 면역 반응과 침투하는 것이 강력한 연구 결과를 증명한다. 입증할 수 있으나, 이를 증명하기 위해서는 한계가 있을 수 있음. 반복 투여를 증명할 수 없었지만, 임상시험이나 신약개발에 관여하지 않아, 각두공추속종류 베타카로틴을 섭취하기 위해 안전한 소재임을 확인할 수 있음.
<b>기타 사항</b>	
<b>안전성 정보</b>	○ 우영 - 국내 : 우영 차 등용에 사용에 관여되고 있음 - 국외 : 신형시험의 우영추출물 함유 제품이 사용에 관여되고 있음 ○ 각두공 추 - 안전성 정보 DB - 발암평가 항목, 피부암 외 심각한 부작용 사례는 보고되지 않음 - 섭취 시 주의사항 - 수율 최소 2주 반복 투여 가능 - 당뇨치료제 복용 중인 자는 섭취에 주의 - 국외과 알러지 가진 자 섭취 주의 - 출생전 기간 자 섭취 주의 - 건강기능식품 섭취량 : 각두공추속종류 베타카로틴 800mg/주 (각두공추추출물 : 우영추출물 = 1:4) ○ 각두공 추 성분 1인 1일 평균섭취량 : 0.00g(국민건강영양조사, '14) ○ 국내, 우영추출물 함유제 각두공 추 평균섭취량 : 평균 10g/일(이른 각두공 추 15~30g/일) ○ 우영 성분 1인 1일 평균섭취량 : 0.67g(국민건강영양조사, '14) ○ 제1안정 최대 섭취량은 특성시험(우영추출물 함유) 결과 유사하다고는 3배 (0.0010g)고, 제2안정섭취량 '발암시험(우영추출물 함유) 결과 800mg/일용 기준 2배(0.0010g) 이하로, 안전성 자료(신형시험, 임상시험결과, 발암시험, 체중, 신장도) 등에서 모두 정상범위였으며, 신형시험의 미흡함을 보고는 없었음
<b>섭취량 평가</b>	해당사항 없음
<b>인체적용시험</b>	해당사항 없음
<b>특성 시험</b>	해당사항 없음
<b>기타 사항</b>	해당사항 없음
<b>섭취 시 주의사항</b>	○ Natural medicines DB 참고 ○ 수율 최소 2주 반복 투여 가능 - 당뇨치료제 복용 중인 자는 섭취에 주의하시기 바랍니다. - 국외과 알러지 가진 자는 섭취에 주의하시기 바랍니다. - 출생 전 기간 자는 섭취에 주의하시기 바랍니다.
<b>신형 기능성</b>	자연기능성 각두공추속종류 베타카로틴 800mg/주
<b>신형 발암시험</b>	각두공추속종류 베타카로틴 800mg/주

## 제 10 절 연구개발 성과

### 1. 논문게재 성과

#### 가. 논문

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	부동화스트레스유도 마우스 모델에서 작두콩·우영 복합물의 면역증진 작용	대한본초학회지	이지은	31권6호	대한민국	대한본초학회	비SCI	2016년11월	Kor. J. Herbol. 2016 ; 31(6) : 1-20
2	종양이식 생쥐모델에서 도두, 우영근 추출물의 대장암 억제 효과	대한본초학회지	장지혜	32권5호	대한민국	대한본초학회	비SCI	2017년9월30일	Kor. J. Herbol. 2017 ; 32(5) : 27-38
3	<i>Canavalia gladiata</i> and <i>Arctium lappa</i> extracts ameliorate DSS-induced IBD by enhancing immune responses	Journal of Functional Foods	Kon-Young Ji	45 (2018) 24 - 33		Elsevier	SCI	2018년 3월 12일	Journal of Functional Foods 45 (2018) 24 - 33
4	Anti-inflammatory Effects of <i>Canavalia gladiata</i> Semen Extracts in a Systemic Anaphylaxis Food Allergy Mouse Model	대한본초학회지	양원경	33권1호	대한민국	대한본초학회	비SCI	2019년1월30일	게재예정 증명서 첨부
5	Immunoregulatory activity by Daucosterol ameliorates the DSS-induced colitis in mice	International Immunopharmacology	장진	submission 완료			SCI		

## 나. 국내 및 국제 학술 회의 발표 성과

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2016년 덴마크 코펜하겐에서 9차 미국/유럽 Joint Natural Product Conference 2016 (2016.07.24.~07.27)	김승형	2016.07.27	덴마크 Copenhagen Tivoli congress center 1층 poster section P1107	덴마크
2	2017 한국생물공학회 추계학술대회 및 국제심포지엄 새창보기 (접수 확인 첨부)	김승형	2017.10.12	부산 벅스코 (BEXCO)	대한민국
3	2018 The American Society of Pharmacognosy Annual Meeting(2018년 미국생약학회)	김승형	2018.07.22	Hilton Lexington Downtown Lexington, Kentucky	미국

## 2. 특허 성과

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	면역 증진용 조성물	대한민국	애경산 업(주)	2016/0 8/19	10-2016- 0105623				100%
2	스트레스 완화용 조성물	대한민국	애경산 업(주)	2016/0 8/19	10-2016- 0105624				100%
3	면역 증진용 조성물, 이를 포함하는 기능성 식품 및 약제학적 조성물	대한민국	애경산 업(주)	2017/0 8/07	10-2017- 0099428				100%
4	스트레스 완화용 조성물, 이를 포함하는 기능성 식품 및 약제학적 조성물	대한민국	애경산 업(주)	2017/0 8/07	10-2017- 0099427				100%
5	스트레스 완화용 식품 조성물	대한민국				애경산업( 주)	2018.0 7.13.	10-18802 45	100%
6	면역 증진용 조성물	대한민국				애경산업( 주)	2018.0 8.29.	10-18950 24	100%
7	스트레스 완화용 조성물, 이를 포함하는 기능성 식품 및 약제학적 조성물	대한민국				애경산업( 주)	2018.0 9.19.	10-19025 10	100%

8	면역 증진용 조성물, 이를 포함하는 기능성 식품 및 약제학적 조성물	대한민국				애경산업(주)	2018.1.01.	10-1916271	100%
9	스트레스 완화용 조성물, 이를 포함하는 기능성 식품 및 약제학적 조성물	대한민국	애경산업(주)	2018.08.23.	10-2018-0098632				
10	면역 증진용 조성물	대한민국	애경산업(주)	2018.1.27.	10-2018-0148578				

### 3. 교육 및 컨설팅 성과

No	교육 및 컨설팅명	교재명	참석대상	인원	교육기간
1	CJ 면역관련 신규 원료 소개	구두 발표	CJ 건강기능식품 개발부	9인	2016년 1월 20일
2	웅진식품 개별인정 원료 및 신규 원료 제안	구두 발표	웅진식품 건강기능식품 개발팀	5인	2016년 2월 2일
3	코리아나 개별인정원료 교육 및 신규 원료 소개	구두 발표	코리아나 마케팅팀	3인	2016년 3월 29일
4	조아라 피로회복, 면역증진 관련 원료 교육 및 신규 원료 소개	구두 발표	조아라 영업부	5인	2016년 3월 30일
5	타파웨어 건강기능식품 및 개별인정원료 교육	구두 발표	타파웨어 건강기능식품 개발부	5인	2016년 7월 19일
6	대상 면역기능 관련 신규원료 제안	구두 발표	대상 웰라이프사업부	10인	2016년 8월 30일
7	종근당건강 면역관련 신규 원료 소개 및 건기식 시장현황 교육	PPT/구두 발표	종근당건강 2인 및 노바렉스 상무이사 민복기, 정재철, 개별인정팀 2인	7인	2016년 12월 8일
8	노바렉스 작두콩추출물등 복합물 소재 교육 및 제형, 시장성 리뷰	PPT/구두 발표	노바렉스 영업부, 체제연구부, 개별인정팀	42인	2017년 2월 17일
9	대상 면역기능 관련 신규원료 및 부원료 제안	PPT/구두 발표	대상 건강소재팀 3인, 대상 well life 사업부 3인, 노바렉스 개별인정팀 3인	11인	2017년 3월 22일
10	건강기능식품 법률 및 개별인정소재 가이드라인 관련 교육	PPT/건강기능식품 공전, 가이드라인/구두 발표	노바렉스 개별인정팀 3인 (신규입사자 1인 포함)	4인	2017년 3월 29일
11	오리온 건강기능식품에 대한 개론 교육 및 신규원료 제안	PPT/구두 발표	: 오리온 건강기능식품사업부 3인, 노바렉스 상무이사 민복기, 개별인정팀 1인	6인	2017년 5월 25일

12	해피L&B 건강기능식품에 대한 이해 및 면역기능 소재 교육	PPT/Kuby 번역학 7판/구두 발표	해피L&B 영업부 12인, 화장품사업부 3인, 노바렉스 영업부 3인, 개별인정팀 2인	22인	2017년 5월 26일
13	제이영 헬스케어(주) 건강기능식품 산업계 동향 및 신규 소재 제안	PPT/2016 건강기능식품 소비자 실태조사/구두 발표	제이영 헬스케어(주) 영업부 2인, 노바렉스 상무이사 민복기, 개별인정팀 과장 홍충의	5인	2017년 6월 15일
14	건강기능식품 법률 및 개별인정소재 가이드라인 관련 교육	PPT/건강기능식품공전, 가이드라인/구두 발표	노바렉스 개별인정팀 4인 (신규입사자 1인 포함)	5인	2017년 7월 19일
15	LG생활건강 신규 원료 소개 및 건기식 시장현황 교육	PPT/구두 발표	LG생활건강 영업부서, 노바렉스 개발전략팀 김화연 사원, 윤성호 차장, 민복기 상무이사	10인	2017년 11월09일
16	투에버 면역관련 신규 원료 소개 및 건기식 시장현황 교육	PPT/구두 발표	투에버 영업부, 노바렉스 개발전략팀 홍충의 과장, 윤성호 차장	42인	2017년 12월12일
17	노바렉스 제제팀 작두콩추출물등복합물의 원료 특성 소개	PPT/구두 발표	노바렉스 제제연구팀, 개발전략팀 하예진 사원, 김화연 사원, 윤성호 차장	13인	2018년 01월11일
18	투에버 노바렉스 개발 원료 및 작두콩추출물등복합물 업데이트 사항 소개	PPT/구두 발표	투에버 영업부, 노바렉스 개발전략팀 홍충의 과장, 윤성호 차장	30인	2018년 02월27일
19	익수제약 면역관련 신규 원료 소개 및 작두콩추출물등복합물 원료 특성 소개	PPT/구두 발표	익수제약 3인, 노바렉스 개발전략팀 하예진 사원, 윤성호 차장	5인	2018년 03월09일
20	건강기능식품 법률 및 개별인정소재 가이드라인 관련 교육 (신규입사자 대상)	PPT/건강기능식품공전/구두 발표	노바렉스 구매부 및 영업부 신규입사자, 개발전략팀 윤성호 차장, 민복기 상무이사	5인	2018년 04월26일
21	원료 표준화를 위한 기초분석장비 실습 교육	PPT/서적/구두발표	노바렉스 개발전략팀 하예진 사원, 김화연 주임	2인	2018년 07월10일
22	TCI社에 면역관련 신규 원료 소개 및 한국 건기식 시장현황 교육	PPT/구두 발표	TCI社 R&D부서, 노바렉스 개발전략팀 강주연 과장, 해외사업부 박정수 부장	10인	2018년 07월19일
23	작두콩추출물등복합물의 제품화를 위한 이미지썬킹 제품기획 워크샵	PPT/서적	노바렉스 개발전략팀 하예진 사원, 김화연 주임, 강주연 과장	3인	2018년 07월31일
24	건강기능식품 법률 및 개별인정소재 가이드라인 관련 교육 (신규입사자 대상)	PPT/건강기능식품공전	노바렉스 신해외사업부 및 영업부, 개발전략팀 윤성호 차장, 민복기 상무이사, 이상준 대표이사	15인	2018년 08월13일



#### 4. 전시회 홍보 성과

No	행사명칭	홍보일	홍보유형	참가품목	국내외	장소
1	Supply Side WEST 2017	2017.09.25.	박람회	작두콩추출물등 복합물	국외	Expo Hall, Las Vegas
2	Vitafoods Asia	2018.09.11.	박람회	작두콩추출물등 복합물	국외	Sands Expo & Convention Center at Marina Bay Sands, Singapore
3	Thaifex-World of Food Asia	2018.05.29.	박람회	작두콩추출물등 복합물	국외	Impact Exhibition and Convention Center Bangkok, Thailand
4	제남한국우수상품박람회	2018.07.06.	박람회	작두콩추출물등 복합물	국외	제남순경국제컨벤션센터, 중국
5	CPHI China	2018.06.20.	박람회	작두콩추출물등 복합물	국외	신국제전람중심 전시장, 중국 상해
6	2018 바이오코리아	2018.05.09.	박람회	작두콩추출물등 복합물	국내	서울 COEX



# 제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

## 제 1 절 연도별 연구개발 목표 및 달성도

### 1. 정량적 성과 목표 및 달성도

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SC I	비 SC I						
최종목표	6	2		1		5	5				1	3	3	2	70	4		45	
1차년도	목표	2											1		5				
	실적	2											1	1	6				
2차년도	목표	2										1	1	1	5				
	실적	2										1	1	1	8			1	
3차년도	목표	2	2		1							1	1	1	10			5	
	실적	2	4		1							1	1	1	10			5	
소계	목표	6	2		1							2	3	2	20			5	
	실적	6	4		1							2	3	3	24			6	
종료 1차년도						1	1				1	1			10			5	
종료 2차년도						1	1								10	1		5	
종료 3차년도						1	1								10	1		10	
종료 4차년도						1	1								10	1		10	
종료 5차년도						1	1								10	1		10	
소계						5	5				1	1			50	4		40	
합계		6	2		1		5	5			1	3	3	2	70	4		45	

### 2. 연차별 성과 목표 및 달성도

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
1차년도	소재 정보 수집	1. 소재의 기원 및 개발경위 자료 수집 - 기원, 학명, 원산지, 사용부위 등 2. 국내·외 인정·허가 현황 자료 수집 3. 국내·외 사용현황 자료 수집 - 사용용도, 유통량, 제조회사, 섭취실	100%

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
		태 등 4. 섭취량 평가 자료 수집	
	원료 표준화	1. 원물의 수급선 확보 2. 지표물질 및 지표물질 분석법 확립 3. 추출법의 scale-up	100%
	추출법의 표준화	1. 원료 제조 및 제조 방법 확립 2. 원료 추출법의 표준화 및 원료 추출/공급	100%
	소재조합 추출물로부터 면역기능 증진 활성 신소재 탐색 및 유효성분 분리	1. 항산화활성 및 면역증진 활성 물질(면역기능 조절지표) 분석 - 활성산소 생성능 - 세포독성시험 - IgA생성 - T/B cell 증식 - 면역기능 증진 cytokine 조절능 2. 마우스에서 면역세포 증식 및 면역 단백질의 발현 연구를 통한 기능성 신소재 탐색 및 효능 확인 - Fibroblast 증식능 - Collagen 발현 - Proinflammatory cytokine 발현 조절능 3. 유효성분 분리 - Chemical finger printing을 통하여 소재 특화 주요 지표성분들을 확인함	100%
	소재의 안전성 확보	1. 섭취 근거 자료 수집 2. 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 수집 (알러지 유발 가능성 등 포함) 3. 섭취량 평가 자료 수집	100%
2차년도	인체 효능 검증	1. 연구 기관 선정 2. 전략 수립 - 시험 디자인 무작위배정	100%

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
		<p>위약대조연구(Randomized, Controlled Trial; RCT)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 프로토콜/CRF 등 개발</li> <li>바이오마커 설정</li> </ul> <p>3. 피험자 모집</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시험대상 선정</li> </ul> <p>면역기능의 주요 지표인 혈중 백혈구 수가 정상범위 중 낮은 범위에 속하거나 정상범위보다 다소 낮은 자 등 질병을 가지지 않은 사람</p> <p>4. 인체 적용 시험 식품 제조</p> <p>5. 인체 적용 시험 개시</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 등록기간 : 8개월</li> <li>- 섭취기간 : 8주</li> </ul>	
	<p>소재조합 추출물로부터 면역증진 후보물질 선정 및 작용기전 연구</p>	<p>1. 최종 후보물질의 공인 기관의 평가 자료를 통한 안전성 및 독성 검사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 한국 화학융합시험연구원에 의뢰 급성 경구투여 독성/안정성시험 수행</li> </ul> <p>2. 마우스 모델에서 유도체 후보물질치리에 의한 면역세포 활성화기능 증진방법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 암 및 염증유발 또는 억제인자 조절기능, 항암/항염 활성화 조절기능, 면역세포 활성화 및 침윤능력, 세포독성능(암세포 killing능력)을 통한 면역세포 활성화기능 증진방법 확립.</li> </ul> <p>3. 암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역조절 활성화 탐색</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 암 진행정도 측정(survival rate, tumor mass), 면역세포활성 및 침윤능, 자연살해세포 cytotoxicity 기능, 암전이능, 세포자연사 및 cell cycle을 통한 항암효능을 확인</li> </ul> <p>4. 마우스 점막자가면역질환 모델에서 면역조절 활성화 및 효능 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 체액성, 세포매개면역 및 점막면역기</li> </ul>	<p>100%</p>

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
		능 분석, 염증유발유전자 억제기능, 면역세포활성 및 침윤능을 통한 점막 자가면역질환 마우스 모델에서 효능을 확인.	
	원료 표준화	1. 추출법의 scale-up 2. 활성물질 분리 및 분석법 확립 3. 소재의 안정성 확립	100%
	소재의 안전성 확보	1. 위해물질 검사 - 중금속, 미생물, 농약 등 분석	100%
3차년도	인체 효능 검증	1. 모니터링 및 데이터 수집 2. 통계 분석 및 데이터 정리 - 통계처리 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정 3. 결과 분석	100%
	최종 후보물질의 delivery system 개발 및 효능검증	1. 염증 및 암 마우스 모델로부터 후보물질의 주사, 경구투여 및 패치타입에 의한 항염 및 항암 효능 확인 - 비장 및 림프절을 적출하여 항염 및 항암 관련 유전자의 발현을 확인하고 유세포 분석기를 이용하여 면역세포들의 활성의 변화를 확인	100%
	개별인정형 허가 추진	1. 원료의 안전성, 생체유용성, 기능성 자료 확보 2. “면역 증진에 도움을 줄 수 있음” 기능성 3. 생리활성기능 2등급 목표로 개별인정 신청	100%
	식품 제형 개발	1. 선정된 소재에 적합한 다양한 제형 개발 - 과립제, 산제, 정제, 캡슐제, 내용액제, 환제 등	100%

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
		2. 안정성 확보를 위한 제형 연구 3. 시제품 개발	
	양산화 공정 확립	1. 대량 재배 및 원료 수급 방안 수립 2. 대량 원료화 방안 수립 3. 품질관리 기준 확립	100%

### 3. 성과 요약

- 성과 항목
  - 선행 연구를 통하여 확보된 소재의 표준화
  - 효능의 검증 및 성분/기작 규명
  - 안전성 확보 및 인체효능검증 통한 원료의 개별인정형 1건 등록 신청
  - 부작용이 없고 면역 조절 기능이 우수한 건강기능식품의 개발 및 상용화
- 성과 목표
  - 지식재산권 : 특허 출원 6건, 특허 등록 2건
  - 기술 실시 : 1건
  - 학술성과 : 논문 5건 (비SCI : 3건, SCI : 2건), 학술 발표 2건
  - 교육지도 : 20건
  - 홍보전시 : 5건
- 가중치
  - 소재의 표준화 : 20%
  - 효능의 검증 및 성분/기작 규명 : 30%
  - 개별인정형 등록 신청 : 50%
- 달성치
  - 지식재산권 : 특허 출원 6건 (목표 6건 대비 100% 달성)  
특허 등록 4건 (목표 2건 대비 200% 달성)
  - 학술성과 : 논문 5건 - 비SCI: 3건, SCI: 2건 (목표 5건 대비 100% 달성)  
학술 발표 3건 (목표 2건 대비 150% 달성)
  - 교육지도 : 24건 (목표 20건 대비 125% 달성)
  - 홍보전시 : 6건 (목표 5건 대비 120% 달성)
  - 기술실시 : 1건 (목표 1건 대비 100% 달성)
  - 개별인정형 등록 신청 접수 완료

### 4. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 해당 사항 없음.

## 제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

### 제 1 절 연구 결과의 활용 방안

- 면역 증진을 필요로 하는 반건강인을 위한 건강기능식품 개발
- 연구개발 결과로 도출된 소재 및 완제품을 활용한 제품화 실시
- 협동 기관을 통한 원료 및 제품 양산화
- 추후 복합 기능성 제품의 개발 및 상용화
- 면역 증진 기능성 소재를 이용한 고기능성 식품개발로 고부가가치화 실현
- 기술이전을 통하여 직접 사업화 예정
- 본 연구개발 과제에 도출 결과를 바탕으로 추가 인체적용시험 진행을 통한 인체 유효성 결과를 보장하여 개별인정형 건강기능식품 인정을 추진
  - 추가 인체적용시험 추진 계획 : 2019년 1월 ~ 2019년 12월
  - 개별인정형 건강기능식품 인정 추진 : 2020년

### 제 2 절 연구 결과의 기대 성과

#### 1. 기술적 측면

- 가. 건강기능식품 개별인정형 추진을 통한 국내 농산물의 기능성 규명
- 나. 우수한 효능을 갖는 소재의 개발을 통해 국내 면역 기능성 연구 기술 수준의 향상
- 다. 기존 시장 선도 소재(홍삼)의 단점 극복 (재배 기간, 제조의 난이도, 고가)
- 라. 면역 증진을 필요로 하는 반건강인들의 삶의 질 향상에 도움
- 마. 건강기능식품 시장의 기반 확충
- 바. 기존 시장 선도 소재에 비하여 생산단가가 낮아서 가격 경쟁력이 있으며, 일일 섭취량이 적어서 소비자들에게 편리함을 제공하고 다양한 제형에 적용하기에 유리한 장점 확보

#### 2. 경제적 측면

- 가. 우수한 효능을 갖는 소재의 개발을 통해 면역 조절 시장의 활성화
- 나. 국내 농산물의 소재화를 통한 농민 경제 활성화에 기여
- 다. 국내외 업체와의 제휴를 통한 국내 건강기능식품 소재 시장의 활성화
- 라. 우수한 국내 건강기능식품 소재 개발을 통한 세계 시장에서의 경쟁력 제고
- 마. 우리나라 천연 식물 자원의 뛰어난 효과 입증으로 향후 수출 주도형 제품으로 확대 가능
- 바. 업체 협력을 통한 건강기능식품 산업 발전 제고 및 고용 활성화

#### 3. 사업화 계획

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(백만원)	400			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	50	100	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내			
		국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	<p>다양한 제형의 제품과 타 기능성 원료와 혼합하여, 복합 기능성 제품을 개발할 계획임.</p> <p>또한, 본 연구에서 언급된 스트레스 해소 기능성을 추가로 취득하여 이중 기능성 소재로 활용할 계획임.</p>				



### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.