

발간등록번호

11-1543000-002747-01

지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발 최종보고서

2019. 6. 14.

주관연구기관 / (주)뉴트라팜텍
협동연구기관 / 경희대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발”(개발기간 : 2016. 07. 07. ~ 2018. 12. 31.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 6. 14.

주관연구기관명 : (주)뉴트라팜텍 (대표자)

참여기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자)

주관연구책임자 : 이 성 권

참여기관책임자 : 심 인 섭



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116014-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2018. 01. 01. ~ 2018. 12. 31.	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발			
연구책임자	이 성 권	해당단계 참여연구원 수	총: 9명 내부: 9명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:150,000천원 민간: 66,700천원 계:216,700천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 9명 내부: 9명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:390,000천원 민간:186,700천원 계:576,700천원
연구기관명 및 소속부서명	경희대학교 산학협력단			참여기업명 (주)뉴트라팜텍	
국제공동연구	상대국명: 해당사항 없음			상대국 연구기관명: 해당사항 없음	
위탁연구	연구기관명: 해당사항 없음			연구책임자: 해당사항 없음	
※ 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	Toxico logy Reports 5 (2018) 608-61 4	10-201									
		6-0181									
		118									
		10-201									
		7-0147									
		533									
		10-201									
		7-0147									
		537									
		10-201									
		8-0050									
		019									
		10-189									
4491											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발
 1. 지각 추출물 원료 및 제조공정 표준화
 2. 지각 추출물 원료의 단기·장기 독성시험
 3. 인체적용 시험용 시험식품 생산
 4. 지각 추출물 원료의 임상시험심사위원회 승인 신청
 5. 임상시험용 지각 추출물 제제 생산
 6. 지각 추출물 원료의 기억력 개선 임상시험
 7. 지각 추출물 원료를 이용한 제품의 제형 연구
 8. 지각 추출물 원료의 안정성(stability) 실험을 통한 원료의 유통기한 설정
 9. 지각 추출물의 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 원료 인허가 신청
- 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구
 1. 지각 추출물의 기억력 개선 효능연구(동물실험) 및 섭취량 설정
 2. 기억손상 동물모델에서 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 비교 분석

보고서 면수

181면

<요약문>

<p align="center">연구의 목적 및 내용</p>	<p>기억력 개선 기능성분인 노빌레틴이 다량 함유된 지각 추출물의 기능성 시험 및 인체시험을 통해 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품소재를 개발하고자 함</p>				
<p align="center">연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 기억력 개선 기능성분 고함량 지각 추출물 제조공정 확립 및 원료 표준화 • 기억력 개선 기능성 지각 추출물의 제조방법에 대한 지적재산권 획득 • 인체시험을 통한 지각 추출물의 기억력 개선 기능성 확인 • 지각 추출물의 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 인허가 신청 				
<p align="center">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 기억력 개선 기능성 식품의 신소재 개발 및 기능성 성분 고함량 제조공정의 원천기술 확보 • 특허 및 논문 등 지적재산권의 확보 • 기능성자료 및 안전성자료 등의 확보 및 이를 이용한 기억력 개선 건강기능식품 인정 • 기능성원료 인정 후 국내 소재를 활용한 건강기능식품으로 제품화함과 동시에 높은 매출을 기대 				
<p align="center">국문핵심어 (5개 이내)</p>	지각 추출물	기억력 개선	원료 표준화	인체시험	건강기능식품
<p align="center">영문핵심어 (5개 이내)</p>	Aurantii Fructus Immaturus extract	Improving memory	Standardization	Clinical test	Health functional food

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<Summary>

<p>Purpose & Contents</p>	<p>Development of health functional food material ‘<i>Aurantii Fructus Immaturus</i> extract’, which contains a memory improving function ingredient nobiletin. The memory improving effect of <i>Aurantii Fructus Immaturus</i> extract will be investigated by human clinical study.</p>				
<p>Results</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Standardization of <i>Aurantii Fructus Immaturus</i> extract production. • Acquisition of intellectual property rights on manufacturing method of <i>Aurantii Fructus Immaturus</i> extract. • Investigation on memory improving effect of <i>Aurantii Fructus Immaturus</i> extract by human clinical study. • Completion of health functional food application of <i>Aurantii Fructus Immaturus</i> extract. 				
<p>Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Development of novel memory improving functional food material. • Acquisition of intellectual property rights such as patents and research articles. • Identification of memory improving effect and safety of <i>Aurantii Fructus Immaturus</i> extract. • Commercialization of <i>Aurantii Fructus Immaturus</i> extract for novel memory improving health functional food material. 				
<p>Keywords</p>	<p>Aurantii Fructus Immaturus extract</p>	<p>Improving memory</p>	<p>Standardization</p>	<p>Clinical test</p>	<p>Health functional food</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
1-1. 연구개발 목적	7
1-2. 연구개발의 필요성	7
1-3. 연구개발 범위	9
2. 연구수행 내용 및 결과	12
2-1. 1차년도	12
2-2. 2차년도	74
2-3. 3차년도	99
2-4. 연구개발 성과	152
2-5. 사업화 성과 및 매출실적	168
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	172
3-1. 목표	172
3-2. 목표 달성여부	173
3-3. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책	175
3-4. 관련분야 기여도	175
4. 연구결과의 활용 계획 등	177
붙임. 참고 문헌	178

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

○ 기억력 개선 기능성분인 노빌레틴이 다량 함유된 지각 추출물의 기능성 시험 및 인체시험을 통해 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품소재를 개발하고자 함

1-2. 연구개발의 필요성

가. 새로운 기억력 개선 건강기능식품 소재개발의 필요성

- 뇌는 스트레스, 환경적 요인, 과음, 흡연 등의 원인으로 손상받기 쉬우며 현대인은 이러한 원인에 무방비하게 노출되어 있음.
- 뇌의 손상은 지체장애와 같은 질환으로 등록되어있지 않으나, 기억력 장애를 유발하고 그 증상의 강도에 따라 다양한 문제를 야기함.
- 또한, 고령화 인구의 증가로 뇌기능 개선에 관심이 증대되는 중에 인지증(認知症)의 일차예방으로 식사의 중요성과 뇌 기능 향상에 유효한 성분에 대한 관심이 높아지고 있음.
- 한국치매협회의 발표에 따르면, 2000년도의 국내 치매환자수가 약 28만 명에서 2007년 40만 명으로 급격히 증가했으며, 2010년에는 46만명, 2020년에는 약 70만 명에 달할 것으로 전망됨.
- 또한, 치매는 향후 걱정되는 질병 2위로 조사되는 등 치매에 대한 불안감이 증가되고 있으나 현재로서는 뚜렷한 대비책이 없는 상황임.
- 국내의 과도한 입시 및 교육열풍으로 인하여, 그 효능이 확인되지 않은 기억력 개선소재가 고가의 공부주사로 둔갑하여 어린이 및 수험생에게 시술되는 등 문제점이 발생되고 있음.
- 해외에서는 먼 년 전부터 학생들을 중심으로 ‘스마트 드러그(Smart Drug)’ 유행하여, 고도의 집중력을 필요로 하는 직업군을 중심으로 복용하는 사람들이 증가하고 있음.
 - 스마트 드러그는 집중력 장애 치료제인 아데탈과 리탈린 등의 물질임.
 - 이는 원래 ADHD(주의력결핍과잉행동장애) 환자의 치료를 위해 처방되는 약물이며, 스마트 드러그를 복용하면 뇌의 중추신경이 흥분되어 집중력과 기억력 등 두뇌활동이 일시적으로 증가되지만, 불면증, 식욕 부진, 우울증 등의 부작용이 있으며, 심한 경우에는 돌연사를 유발하기도 함.
 - 국내에서도 ‘공부 잘하는 약’ 등으로 수험생들 사이에서 ADHA 치료제가 사용되는 것으로 알려짐.
- 최근에는 식품이 뇌기능에 미치는 영향을 연구하는 「뇌 영양학」이란 새로운 학문분야가 개척되는 등 식품소재를 활용한 뇌기능 향상에 대한 관심이 높아지고 있음.
- 지금까지 뇌기능 향상 작용이 보고되어 있는 식품소재로는, 포스파티딜콜린(PC), 포스파티딜세린(PS), 식약 구분의 개정으로 금년부터 식품 취급이 된 α -GPC 등의 인지질, DHA, 아라키돈산, 혈류순환 개선 효과 등이 평가되어 있는 은행나무 잎, 테아닌, GABA,

야마브시타케 버섯 등 다방면에 이룸.

- 뇌기능 저하의 억제, 뇌기능 향상/개선 효과가 있는 브레인 푸드의 요구는 국내·외에서 높아지고 있음.
- 현재 많은 기업과 연구소들은 기억력 장애와 같은 뇌손상을 억제하고, 기억력을 개선할 수 있는 건강기능식품 소재를 개발하고 있으며, 그 성과물로 몇 가지 뇌건강 관련 건강기능식품들이 출시되어있음.
- 현재의 뇌건강 관련 건강기능식품은 뇌세포 보호 등의 기능을 가지고 있으나 실제 기억력을 개선하는 건강기능식품은 그 수가 적으며, 기억력 개선 건강기능식품은 그 효능의 탁월함에도 불구하고 대량생산의 어려움과 원료물질의 국내 생산 어려움으로 인해 해결해야 할 문제점을 가지고 있음.
- 기존 기억력 개선 소재에는 소비자의 피로도 누적과 부족한 임상시험 및 작용기전 근거에 의한 불확실성이 존재하여, 이를 개선할 수 있는 안전하고 새로운 기억력 개선 소재의 개발이 필요함.

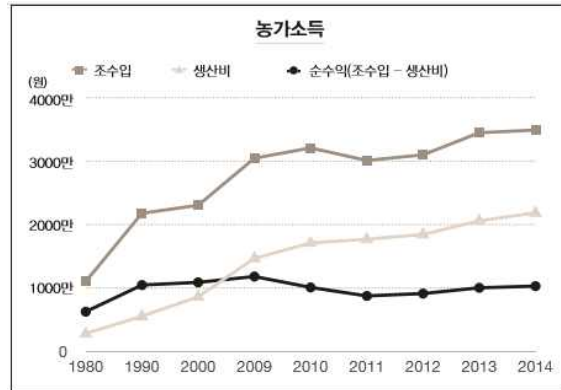
〈기억력 개선 건강기능식품 분야의 NET 분석〉

구분	Needs	Environment	Technology
촉진요인	<ul style="list-style-type: none"> • 기억력 감퇴 증상이 있을 시 치료제 처방보다 간편한 식품을 통한 개선 효과를 선호 • 노인 인구의 신체적·정신적으로 건강한 삶에 대한 욕구가 강함 • 원료의 추출 대상(지각)의 희소성으로 인한 높은 brand royalty 	<ul style="list-style-type: none"> • 인구 고령화에 의한 치매 인구 수 증가 • 높은 학구열에 의한 기억력 개선제품에 대한 강한 선호 • 제한적인 기억력 개선 및 치매 예방에 특화 원료 	<ul style="list-style-type: none"> • 기억력 개선에 사용되지 않았던 새로운 원료의 개발 • 뇌기능 활성화에 의한 기억력 개선효과 • 치매 발생 원인을 억제하여 근본적 원인 개선효과 • 동물실험을 통한 효과 확인
저해요인	<ul style="list-style-type: none"> • 기억력 개선 소재로 강한 이미지가 있는 홍삼과의 경쟁 	<ul style="list-style-type: none"> • 지각 추출물 소재의 식약처 기능성 원료 인정 필요 • 광굴의 국내 생산량이 매우 적음 	<ul style="list-style-type: none"> • 단기적으로 확인한 개선 효과를 제공하는데 한계가 있음

나. 경제 산업적 측면에서의 지각 추출물 소재 개발 필요성

- 현재 국내의 전체 농업생산량은 증가하였으나 농가의 실질적인 소득은 정체하고 있음.
- 농산물 소비 감소와 시장 개방에 의한 농산물 가격 저하가 농가 소득 하락의 주요 원인임.
- 이러한 농촌의 현실 속에서 도농 간 소득격차는 점점 심화되고 있음.

- 농업소득은 1995년 1,046만 9000원에서 2014년에는 1,030만 3,000원으로 감소하였으며, 총 농가소득에서 농업소득이 차지하는 비중도 감소하였음.
- 2003년 이전까지 농업 총수입의 50%를 차지하였던 농업소득은 2013년 32.7%로 감소하여, 농민들이 더 이상 농업만으로는 소득을 창출하기 힘든 상황을 방증하고 있음.



<연도별 농가소득 금액>

- 지각 추출물을 이용한 건강기능식품 개발은 고소득 특용작물인 광굴의 소비시장을 창출하여, 어려움에 처해있는 국내 농가에 새로운 소득창출 소재를 제공할 수 있음.
- 본 과제를 통하여 진피 추출물의 원료 표준화, 작용기전 규명, 인체적용시험을 수행하여 새로운 기억력 개선 건강기능식품 원료로 인허가를 획득하고자 함.
- 건강기능식품 원료 인정 후, 본 원료 및 이를 이용한 기억력 개선 건강기능식품을 상품화하여 국내 및 해외시장에서 판매하고자 함.

1-3. 연구개발 범위

가. 1차년도

○ 주관연구기관 ((주)뉴트라팜텍) : 지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발

1) 지각 추출물 원료 및 제조공정 표준화

- 유사종 및 사용부위의 검토
- 성분시험법의 공인기관 (한국기능식품연구원) 인정서 확보

2) 지각 추출물 원료의 단기·장기 독성시험

- 동물시험을 통한 지각 추출물의 단기·장기 독성시험 Data 확립

3) 인체적용 시험용 시험식품 생산

- 원료 표준화 연구결과 및 유효섭취량 연구결과를 바탕으로 임상시험용 지각 추출물 제제를 생산함

○ 참여기관 (경희대학교) : 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구

1) 지각 추출물의 기억력 개선 효능연구(동물실험) 및 섭취량 설정

- 기억장애 동물모델(TMT)에서 지각 추출물의 기억력 개선 효능의 행동학적 검증

2) 지각 추출물의 기억력 개선 작용기전 연구

- 신경세포증식과 분화촉진 효과 및 세포주 기반 세포신호전달체계 규명
- 세포주 기반 기억력 증진 기전규명
- 세포주 기반 신경세포 보호 및 세포사멸 억제 효과 검증 및 분자기전 연구

나. 2차년도

○ 주관연구기관 ((주)뉴트라팜텍) : 지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발

1) 지각 추출물 원료의 임상시험심사위원회 승인 신청

- 지각 추출물의 독성시험 자료 및 유효성 시험 자료를 바탕으로 하여 임상시험심사위원회 승인 신청

2) 임상시험용 지각 추출물 제제 생산

- 원료 표준화 연구결과 및 유효섭취량 연구결과를 바탕으로 임상시험용 지각 추출물 제제를 생산함

3) 지각 추출물 원료의 기억력 개선 임상시험 시작

- 지각 추출물 기억력 개선 임상시험 CRO 선정
- 임상시험기관 선정 및 임상 프로토콜 작성
- 지각 추출물 기억력 개선 임상시험 개시 및 피험자 모집

○ 참여기관 (경희대학교) : 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구

1) 기억손상 동물모델에서 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 비교 분석

- 지각 추출물 투여 후, 수동회피검사, 수중미로검사를 이용한 공간학습 능력을 측정, 인지능력 및 기억력 개선 효능을 비교분석
- 기억력 개선 신경기전 규명 - 면역조직화학법을 통해 해마 내의 LTP 관련 생리활성 효소인 MAP kinase, CREB, BDNF의 발현 변화를 비교 분석
- 분자영상기술을 활용한 MicroPET/SPECT/CT 생체영상 결과 비교 분석

다. 3차년도

○ 주관연구기관 ((주)뉴트라팜텍) : 지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발

1) 임상 시험 종료 및 결과분석

- 임상시험 자료 분석 및 통계처리
- 임상시험 종료보고서 작성

2) 지각 추출물 원료를 이용한 제품의 제형 연구

- 지각 추출물을 이용하여 환, 정제, 캡슐 등의 제형 연구 실시

3) 지각 추출물 원료의 안정성(stability) 실험을 통한 원료의 유통기한 설정

- 표준화된 방법에 의해 추출 생산된 지각 추출물 원료에 함유된 지표(기능)성분에 대한 안정성 실험 실시

4) 지각 추출물의 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 원료 인허가 신청

- 지각 추출물의 동물시험, 독성, 인체적용시험, 작용기전시험 등의 결과를 바탕으로 식약처 개별인정형 건강기능식품 원료 인허가 신청
- 해당 소재의 건강기능식품 인허가 신청을 위하여, 식약처에서 제시한 in-vivo 바이오마커로 β -amyloid, 모리스 수중미로 시험, 수동회피 시험을 설정하였으며, human 바이오마커로 CERAD 치매 진단검사, 알츠하이머 평가 (ADAS-K), 시각지속검사 (Visual C.P.T), 일상생활활동 평가 (ADCS-ADL), 노인우울척도 (SGDS) 등의 신경인지기능 검사 및 건강기능식품에서는 수행된 예가 없는 기능적 자기공명영상 (fMRI)를 생리적 지표로 설정하여, 임상시험을 수행.
- 건강기능식품 허가신청 전 식약처 미팅을 통하여, 지각추출물의 지표설정 및 안전성 시험결과에 대한 사전검토.

○ 참여기관 (경희대학교) : 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구

1) 지각 추출물의 기억력 개선 작용기전 연구 (in vivo)

- 동물 시험 모델에서 채취한 뇌, 혈액, 신경 조직 분석 기반 기억력 증진 기전규명
- real time PCR, western blot 방법을 이용한 기억력 개선 효능의 분자기전 연구

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 1차년도

가. (주)뉴트라팜텍 (주관연구기관) : 지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능 식품 개발 (세부과제명)

1) 지각의 (*Citrus aurantium*) 추출법 검토

○ 지각 (*Citrus aurantium*)의 추출방법을 검토하기 위하여, 지각을 초임계 추출법과 주정 추출법으로 추출하여, 추출물을 제조하였다.

○ 지각 (*Citrus aurantium*) 과피의 초임계 추출물 제조

- 지각 과피의 건조 분쇄물로부터 신경세포 보호 및 기억력개선 활성이 높은 지각 추출물을 효율적으로 얻기 위하여 초임계 유체 추출 방법을 이용하였다.
- 구체적으로, 지각 과피를 세절하고 세척하여 회수한 다음 건조시키는 사전처리를 통하여 추출원료를 준비하였다.
- 건조된 지각 과피는 건조 중량의 10 내지 20배의 주정에 24시간 침지한 후 여과하여 불순물을 제거하고 감압 농축한 후 다시 건조하였다.
- 이후, 초임계 유체 추출을 위해 상기 지각 과피 분말 200 g 을 초임계 CO₂ 추출기(RTI, Korea) 안에 넣고, 격막식 압축기를 이용하여 원하는 압력까지 CO₂를 압축하였다. CO₂ 압력은 100 내지 1100 bar, 온도는 0 내지 90℃의 조건하에서 추출을 수행하였고 수득된 추출물을 감압 건조하였다.

○ 지각 (*Citrus aurantium*) 과피의 주정 추출물 제조

- 지각 과피 분말 200 g에 함수 에탄올 (에탄올: 70 중량%) 2,000 ml을 첨가하고 실온(약 20 ± 5℃)에서 3일 동안 추출하였다.
- 이후, 추출액을 여과하여 불용성 성분인 잔사를 제거하고, 여과된 추출액을 실온(약 20±5℃) 및 감압 조건하에서 농축하였다.
- 농축된 추출액에 농축된 추출액 약 5배에 해당하는 중량의 물을 첨가하고 약 24시간 동안 정치하여 추출물을 침전시켰다.
- 이후, 3000 rpm에서 약 3분간 원심분리하여 침전물의 형태의 추출물을 수득하였고, 침전물의 형태의 추출물을 건조하여 지각 주정 추출물을 수득하였다.

○ 초임계 추출 조건에 따른 지각 추출물의 성분 변화 확인

- 지각 초임계 추출물은 노란색을 띠며, 약간의 점성이 있는 추출물의 특징을 나타내었다.
- 초임계 유체 추출 조건에 따른 추출 수율 및 노빌레틴(Nobiletin) 함량을 확인하고자, 유체 CO₂ 압력은 100 내지 1100 bar, 온도는 0 내지 90℃로 설정하였다.
- 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 압력이 500 bar 이상인 경우 추출 수율 및 노빌레틴

함량이 급격히 증가하다가 1100 bar에서 감소하는 양상을 나타내었고, 압력이 500 bar 이하인 경우에는 추출되는 함량이 낮은 것을 확인하였다.

- 따라서, 수율 및 노빌레틴 함량 증대에는 초임계 이산화탄소 압력이 500 내지 900 bar의 범위가 적합함을 알 수 있었다.

표 1. 지각 초임계 이산화탄소 압력에 따른 수율변화

함량/추출조건	초임계 이산화탄소 압력조건 (Bar)					
	100	300	600	700	900	1100
수율 (%)	10	19	53	56	60	42
노빌레틴	9.4	12.3	25.6	27.4	28.4	19.8

- 또한, 표 2에 나타난 바와 같이 10 내지 50℃의 온도에서는 추출 수율 및 노빌레틴 함량에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(표 2).
- 오히려 50℃ 이상에서는 감소하는데, 이는 온도상승에 따라 성분의 안정성이 감소하였을 것으로 판단하였다.

표 2. 지각 초임계 이산화탄소 온도에 따른 수율변화

함량/추출조건	초임계 이산화탄소 압력조건 (Bar)					
	0	10	30	50	70	90
수율 (%)	12	49	48	50	12	10
노빌레틴	4.8	29.5	30.7	30.4	5.2	5.8

2) 지각의 (*Citrus aurantium*) 유사종 사용검토

○ 지각 (*Citrus aurantium*)의 유사종의 사용가능 여부를 검토하기 위하여 지각 (*Citrus aurantium*)의 유사종인 진귤 (*Citrus sunki*)과 시퀘샤 (*Citrus depressa*)를 주정 추출법으로 추출하여, 추출물을 제조하였다.

○ 지각 (*Citrus sunki*) 과피의 주정 추출물 제조

- 감귤류 중 진귤 과피(진귤박) 20 g에 200 내지 400 ml의 1% 수산화나트륨(NaOH) 수용액을 처리하고 실온에서 20시간 이상 정치하여 과피의 조직을 약화시켰다.
- 이후, 여과하여 회수한 후 증류수로 세척하고, 50 내지 100% EtOH 수용액에 실온에서 24시간 이상 동안 추출하였으며, 불용성 성분을 여과하고 여과된 추출물을 실온에서 정치하여 농축한 후 증류수를 첨가하고 침전물을 3000 rpm에서 3분간 원심분리하였다.
- 원심분리한 침전물을 여과한 후, 다시 여과한 농축물에 20% 에탄올 수용액을 가한 후 정치

하고 원심분리하여 침전물을 획득한 후 건조시켜 과피 추출물을 수득하였다.

○ 시퀘샤 (*Citrus depressa*) 과피의 주정 추출물 제조

- 감귤류 시퀘샤 (*Citrus depressa*) 과피 500 g을 세척 후, 약 70°C의 증류수 1,800 ml을 가하고, 약 70°C의 뜨거운 물에 넣고 3시간 가열 처리하였다.
- 얻어진 가열 처리물을 보류 입자 지름 3 µm의 여과지를 칸 흡인 여과기를 이용하여 흡인 여과하고 잔류물을 얻었다.
- 잔류물을 압착기로 착즙하여 착즙 잔사 300 g을 정량하고, 드라이어를 사용하여 약 60°C에서 30분간 건조시켜, 건조 껍질 150 g을 얻었다.
- 상기 착즙 잔사에 2배 무게의 30%(v/v) 에탄올을 첨가하여 실온에서 3일간 에탄올 추출하였다.
- 이후, 3 µm의 여과지를 칸 흡인 여과기를 이용하여 흡인 여과하고, 여액을 얻었다.
- 얻어진 여액을 회전식 감압 농축기로 농축하여 농축액을 10 배의 1%(w/v) 수산화나트륨 수용액을 가하여 교반기에서 1일 동안 실온에서 교반하였다.
- 얻어진 불용성 성분을 2배의 물로 세척하였고, 남은 불용성 성분을 5 내지 10배의 100%(v/v) 에탄올로 용출시켰다.
- 이어서 에탄올 용출 성분을 흡인 여과기를 이용하여 침전물을 여과 분리하였다. 얻어진 여액의 농축 건조물을 시험에 이용하였다.

○ 상기 제조된 지각 (*Citrus aurantium*)과 진귤 (*Citrus sunki*), 시퀘샤 (*Citrus depressa*) 과피 주정 추출물의 기억력 개선효과는 경희대학교에서 동물실험을 통하여 확인하였다.

○ 동물실험 결과, 진피 유사종의 주정추출물은 기억력 개선효과를 보이나 대조군과 유의한 차이를 보이지 않는 것으로 확인되었다.

3) 지각 추출물 원료 및 제조공정 표준화

○ 지각 추출물의 제조공정 표준화

- 상기의 연구결과를 바탕으로 지각추출물로부터 유효성분의 함량을 최대로 증대할 수 있는 제조공정을 설정하였다.
- 지각추출물 제조공정은 주정추출, 1차 농축, 정제, 2차 농축, 분무건조, 분쇄, 혼합의 과정을 거쳤다.
- 본 제조공정으로 생산된 지각추출물은 세포실험, 동물실험, 임상시험용 식품의 원료로 사용되었다.

○ 지각 추출물의 유효성분 함량분석법 표준화

- 본 추출공정으로 지각추출물을 3 Lot 생산하였으며, (주)뉴트라팜텍에서 자체적으로 유효성분인 노빌레틴 (Nobiletin) 함량을 분석하였다.

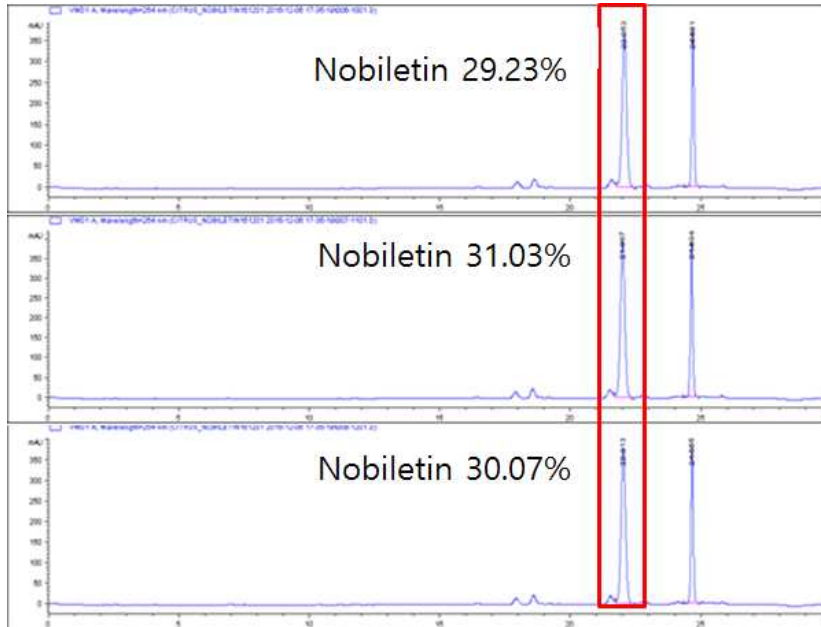
- 지각 추출물의 유효성분 함량은 HPLC를 사용하여 분석되었으며, 분석조건은 표 4와 같다.
- 분석결과, 지각추출물의 노빌레틴 함량은 3 Lot 평균 30.11% 로 확인되었다.
- 지각추출물 유효성분 함량을 자체분석 후, 공인시험기관인 한국기능식품연구원에서 재분석하였다.
- 지각추출물의 공인기관 분석결과, 3 Lot 평균 노빌레틴 함량은 30.7% 로 확인되었다.
- 상기 분석을 통하여 지각추출물 원료 제조공정과 추출물 유효성분의 분석법을 표준화하였다.

표 3. 지각추출물 제조공정 표준화

순서 No.	공 정 별 제 조 방 법	
1	건조	지각 과피를 세절하여 건조
1-1	침지	건조된 지각 과피를 70% 에탄올에 20~30 시간침지
1-2	여과	침지액을 여과하여 분순물 제거
2	농축	감압농축기를 이용하여 농축
3	추출	농축액을 이산화탄소를 용매로 하여 10~50℃, 500~900 bar 조건에서 초임계 추출
4	분쇄	분쇄기를 이용하여 분쇄
5	건조	동결건조기를 사용하여 -70℃, 5mTorr에서 건조
6	보관	저온 보관 (4~10℃)

표 4. 진피추출물 유효성분 함량 HPLC 분석법

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)	분석조건
0	50	50	Wavelength 254nm Temperature 25℃ Flow rate 1ml/min Mobile phase Methanol : D.W Injection volume 10 μl Running time 30min
1	50	50	
20	25	75	
21	10	90	
24	10	90	
25	50	50	
30	50	50	



<그림 1. 지각추출물 유효성분 3 Lot 분석결과>

표 5. 진피추출물 유효성분 함량 HPLC 분석결과

Lot #	Peak Area	Content (mg/ml)	Content (mg/g)	%
1	4407.1	0.147653	295.3066	29.53066
2	4772.2	0.160855	321.7096	32.17096
3	4634.7	0.155883	311.766	31.1766

제 D2016120835 호 **검 사 성 적 서**

검체명	Citrus aurantium extract(Kca-160930)	제조일자 (유통기한)	(2018-09-29)
의뢰인	업체명	주식회사뉴트라팍	
	주소	경기도 용인시 기흥구 동백중앙로 61-19, 301,302호(중동, YELLOW ZONE)	
	성명	최봉근	
제조번호		접수년월일	2016-12-12
검사의뢰목적	재출용	검체접수번호	D2016120835

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
Nobiletin(mg/g)	307.47mg/g	정은숙


분석법-업체제공

2016년 12월 22일

한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 무선 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호: 031-628-0400-1

<그림 3. 지각추출물 유효성분 Lot 별 공인기관 분석결과>

제 D2016120836 호		검 사 성 적 서							
검체명	Citrus aurantium extract(Kca-161010)	제조일자 (유통기한)	(2018-10-09)						
의뢰인	업체명	주식회사뉴트라팜텍							
	주 소	경기도 용인시 기흥구 동백중앙로 61-19, 301,302호(중동, YELLOW ZONE)							
	성 명	최봉근							
제조번호		접수년월일	2016-12-12						
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2016120836						
<p>귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 철 회</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험항목</th> <th style="width: 30%;">결과</th> <th style="width: 30%;">검사담당자</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Nobiletin(mg/g)</td> <td>306.77mg/g</td> <td>정은숙</td> </tr> </tbody> </table> <p>분석법-입체제공</p>				시험항목	결과	검사담당자	Nobiletin(mg/g)	306.77mg/g	정은숙
시험항목	결과	검사담당자							
Nobiletin(mg/g)	306.77mg/g	정은숙							
<p>2016 년 12 월 22 일</p> <p>한국기능식품연구원 </p>									
<p>(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화: 051-629-0400-1</p>									

<그림 4. 지각추출물 유효성분 Lot 별 공인기관 분석결과>

4) 지각 추출물 원료의 단기·장기 독성시험

- 표준화된 제조공정에 의해 생산된 지각추출물의 독성을 GLP 기관인 ‘대구가톨릭 GLP 센터’에서 평가하였다.
 - 독성시험은 단기독성을 평가하기 위한 단회경구투여 독성시험과 장기독성을 평가하기 위한 반복경구투여 독성시험으로 수행되었다.

- 단회경구투여 독성시험
 - 단회경구투여 독성시험은 지각추출물 (*Citrus aurantium* extract)의 단회경구투여에 따른 독성을 평가하기 위하여 8주령 Sprague-Dawley계 랫드에 시험물질을 0.005 mg/kg의 용량으로 군당 암·수 각 5마리에 단회경구투여 하였다.
 - 독성지표를 위해 시험물질 투여 후 14일 동안 사망률, 일반증상관찰, 체중변화를 관찰하였고, 관찰기간 종료 후 부검하여 장기의 육안적 검사를 수행하였다.
 - 시험결과, 본 시험의 조건에서 Sprague-Dawley 랫드에 있어서 지각추출물의 개략치사량은 암·수 모두 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 추정되었다.

- 반복경구투여 독성시험
 - 반복경구투여 독성시험은 지각추출물 (*Citrus aurantium* extract)의 Sprague-Dawley 반복투여에 따른 독성을 평가하기 위하여 6주령 Sprague-Dawley계 랫드에 시험물질을 500, 1000 및 2000 mg/kg의 용량으로 군당 암·수 각 10마리에 90일간 경구투여 하였다.
 - 독성지표를 위해 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안검사, 요검사, 전해질, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검시 장기의 중량측정, 육안적 검사 및 조직병리학적 검사 등이 수행되었다.
 - 시험결과, 지각추출물의 Sprague-Dawley 90일 반복독성시험 결과를 바탕으로 시험의 독성판정 기준에 따라 판정할 때, 암수 모두에서 NOAEL이 2000 mg/kg/day로 판단된다.

4-1) 단회 경구투여 독성시험

○ 시험개요

- ① 지각추출물 (*Citrus aurantium* extract)를 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 단회경구투여를 통해 나타나는 개략치사량 (ALD)을 확인하는 것이 주목적이며, 그 외의 체중변화 및 육안적 독성을 확인하기 위한 목적으로 수행되었다.

② 시험법

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Section 4 Health Effects Test No.420 Acute Oral Toxicity Study - Fixed Dose Procedure (17 December 2001).

○ 시험물질

- (1) 명칭 : 지각추출물
- (2) 로트번호 : Kca-160925
- (3) 성상 : 옅은 노란색 분말
- (4) 부형제 : 0.5% Carboxymethylcellulose sodium salt solution (0.5% CMC-Na)
- (5) 조성

구분	Lot No.	제조사	외관 및 성상	보관조건
Carboxymethylcellulose sodium salt	SLBR1692V	SIGMA -ALDRICH	흰색 가루	실온
멸균증류수	KAI 6056	증외제약	무색 액체	실온

- (6) 조제방법 : CMC-Na를 칭량 후 멸균증류수를 넣고 stirrer로 교반하여 0.5% 농도의 부형제를 조제하였다.

○ 시험계

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

- (2) 성별, 동물 수, 주령 및 체중범위

구분	성별	주령	동물수	체중범위
입수 시	수컷	7주	13수	210.4 g ~ 220.6 g
	암컷		12수	157.9 g ~ 170.9 g
투여개시 시	수컷	8주	10수	233.9 g ~ 251.2 g
	암컷		10수	165.0 g ~ 181.2 g

- (3) 검역 및 순화

- 동물 입수시 입수동물에 대한 검수 및 검역을 실시하였으며, 동물의 순화는 입수 후 7일간 해당 동물실내에서 실시하였다.
- 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하였고, 투여당일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

- (4) 군분리

- 질병이나 상처등의 임상증상을 보이지 않고, 적절한 체중을 나타내는 동물을 선택하여 시험에 사용하였다. 입수한 모든 동물 중 군분리일에 측정된 평균체중에 가장 가까운 암수 각 10마리를 선택하였다. 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2군, 군당 5마리로 군분리 하였다.

○ 시험군 및 투여

(1) 시험군의 구성

군	성별	동물수(마리)	동물번호	투여액량(ml/kg)	투여량(mg/kg/1회)
G1	Male	5	1101~1105	10	0
	Female	5	2101~2105		
G2	Male	5	1201~1205	10	5000
	Female	5	2201~2205		

(2) 투여량 설정

- 본 시험의 물질은 건강기능식품 등록이 목적이므로, 건강기능식품 특성상 높은 임상예정용량이 예상되어 한계용량시험 (Limit test)으로 진행하였다. 예비적으로 암·수 각각 한 마리에 5000 mg/kg으로 투여 후 24시간 뒤 모두 생존하여, 동일한 농도로 본 시험을 진행하였다. 본 시험의 대조군으로는 부형제인 0.5% CMC-Na으로 설정하였다.

○ 관찰 및 검사

(1) 관찰 및 검사항목

■ 일반증상관찰

투여 당일은 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째 관찰하였으며, 익일부터 부검일 까지 1일 1회 일반증상을 관찰하였다.

■ 체중측정

모든 동물의 체중을 입수일, 군분리일 및 투여일에 측정하였고, 이후에는 투여후 1, 3, 7 및 14일 (부검일)에 측정하였다.

■ 부검소견

시험물질 투여 후 14일째 되는 날 전체 동물에 대해 체중을 측정하였고 Isoflurane 마취하에 개복하여 복대동맥 및 정맥을 절단하여 방혈치사 시킨 후 부검을 실시하였다. 육안적으로 모든 내부장기의 이상 유무를 관찰하여 그 소견을 기록하였다.

(2) 통계학적 방법

통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 19.0k를 이용하여 일원배치분산분석 (ANOVA test)을 통해 시험군의 독성지표를 대조군과 비교하였다.

○ 결과

(1) 사망동물 (Table 1)

시험물질 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았다.

(2) 일반증상 (Table 2)

투여날부터 부검일까지 모든 동물에서 이상증상은 관찰되지 않았다.

(3) 체중 (Table 3)

체중변화 (body weight changes) 및 증체량 (weight gains) 측정 결과, 수컷 대조군과 시험물질 투여군은 각각 96.6 ± 6.78 g 과 106.9 ± 19.57 g 증체량을 보였으며, 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 그리고 암컷 대조군과 시험물질 투여군은 각각 56.4 ± 5.30 g 및 49.2 ± 12.92 g 으로 군간 증체량에 있어서 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$).

(4) 부검소견 (Table 4)

관찰기간 동안 생존한 동물에 대한 계획부검 시 이상소견은 관찰되지 않았다.

Table 1-1. Mortality in male rats

Dose (mg/kg)	No. dead/ No. dosed	Days after dosing									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9~14
0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ALD value : > 5000 mg/kg

Table 1-2. Mortality in male rats

Dose (mg/kg)	No. dead/ No. dosed	Days after dosing									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9~14
0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ALD value : > 5000 mg/kg

Table 2-1. Clinical signs of male rats

STUDY : 17-SD0T-002		CLINICAL SIGNS		SEX : MALE
DAY	SIGNS OBSERVED	GROUPS (mg/kg)		
		G1(0)	G2(5000)	
0	Normal	5/5*	5/5	
1	Normal	5/5	5/5	
2	Normal	5/5	5/5	
3	Normal	5/5	5/5	
4	Normal	5/5	5/5	
5	Normal	5/5	5/5	
6	Normal	5/5	5/5	
7	Normal	5/5	5/5	
8	Normal	5/5	5/5	
9	Normal	5/5	5/5	
10	Normal	5/5	5/5	
11	Normal	5/5	5/5	
12	Normal	5/5	5/5	
13	Normal	5/5	5/5	
14	Normal	5/5	5/5	

*: Number of animals with the sign/Number of animals examined.

Table 2-2. Clinical signs of female rats

STUDY : 17-SD0T-002		CLINICAL SIGNS		SEX : FEMALE
DAY	SIGNS OBSERVED	GROUPS (mg/kg)		
		G1(0)	G2(5000)	
0	Normal	5/5*	5/5	
1	Normal	5/5	5/5	
2	Normal	5/5	5/5	
3	Normal	5/5	5/5	
4	Normal	5/5	5/5	
5	Normal	5/5	5/5	
6	Normal	5/5	5/5	
7	Normal	5/5	5/5	
8	Normal	5/5	5/5	
9	Normal	5/5	5/5	
10	Normal	5/5	5/5	
11	Normal	5/5	5/5	
12	Normal	5/5	5/5	
13	Normal	5/5	5/5	
14	Normal	5/5	5/5	

*: Number of animals with the sign/Number of animals examined.

Table 3-1. Body weight changes of male rats

STUDY : 17-SD0T-002		BODY WEIGHT(g)		SEX : MALE
DAY	GROUPS (mg/kg)			
	G1(0)	G2(5000)		
0	242.3±6.12	243.4±7.53		
1	267.0±6.12	266.3±7.26		
3	283.4±5.52	288.1±13.58		
7	305.0±5.50	311.8±16.37		
14	338.9±8.55	350.3±20.51		
GAINS*	96.6±6.78	106.9±19.57		

*: Weight gains are body weight difference between day 14 and day 0.

Table 3-2. Body weight changes of female rats

STUDY : 17-SD0T-002		BODY WEIGHT(g)		SEX : FEMALE
DAY	GROUPS (mg/kg)			
	G1(0)	G2(5000)		
0	173.3±5.45	172.7±6.11		
1	191.9±7.54	190.6±4.41		
3	202.6±7.75	201.8±5.29		
7	211.8±11.19	211.2±6.44		
14	229.7±8.07	221.9±11.44		
GAINS*	56.4±5.30	49.2±12.92		

*: Weight gains are body weight difference between day 14 and day 0.

Table 4-1. Necropsy findings of male rats

STUDY : 17-SD0T-002		SEX : MALE		
GROUPS (mg/kg)	Animal ID	Organ	Necropsy	FATE
G1(0)	1101	-	-	Sacrificed
	1102	-	-	Sacrificed
	1103	-	-	Sacrificed
	1104	-	-	Sacrificed
	1105	-	-	Sacrificed
G2(5000)	1201	-	-	Sacrificed
	1202	-	-	Sacrificed
	1203	-	-	Sacrificed
	1204	-	-	Sacrificed
	1205	-	-	Sacrificed

- = NO abnormality detected

Table 4-2. Necropsy findings of female rats

STUDY : 17-SDOT-002		SEX : FEMALE		
GROUPS (mg/kg)	Animal ID	Organ	Necropsy	FATE
G1(0)	2101	-	-	Sacrificed
	2102	-	-	Sacrificed
	2103	-	-	Sacrificed
	2104	-	-	Sacrificed
	2105	-	-	Sacrificed
G2(5000)	2201	-	-	Sacrificed
	2202	-	-	Sacrificed
	2203	-	-	Sacrificed
	2204	-	-	Sacrificed
	2205	-	-	Sacrificed

'-' = NO abnormality detected

○ 고찰 및 결론

- 본 시험의 시험물질 지각추출물을 Sprague-Dawley계 랫드에 단회경구투여 하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.
- 시험물질 투여용량 5000 mg/kg으로 시험을 실시하였으며, 부형제대조군 (0 mg/kg)을 두어 비교 관찰하였다.
- 군당 10마리 (암·수 각 5마리)에 시험물질을 경구 투여한 후 14일 동안 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였고, 관찰기간 종료 후 부검하여 장기의 육안적 검사를 실시하여 독성지표를 관찰하였다.
- 관찰결과, 사망동물, 일반증상 및 부검소견에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 관찰기간 동안 체중변화 및 증체량을 관찰한 결과, 수컷 대조군과 시험물질 투여군은 각각 96.6 ± 6.78 g 과 106.9 ± 19.57 g 증체량을 보였으며, 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 그리고 암컷 대조군과 시험물질 투여군은 각각 56.4 ± 5.30 g 및 49.2 ± 12.92 g 으로 군간 증체량에 있어서 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$).
- 본 시험 조건에서 지각추출물의 Sprague-Dawley 랫드에 대한 개략치사량 (ADL)은 한계량인 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 추정된다.

시 험 계 약 서		계약번호 제 2016-13 호		
계 약 자	발주처	상호 또는 법인명칭 : (주)뉴트라팜텍 사업자번호 : 주소 : 경기도 용인시 기흥구 동백중앙로 61-19 옐로우존 3층 301호 대표자 : 최봉근 담당자 : 이해진 연락처 : / FAX : E-mail :		
	계약상대자	상호 또는 법인명칭 : 대구가톨릭대학교 산학협력단 주 소 : 경북 경산시 하양읍 하양로 13-13 대표자 : 김민수 담당자 : 이기용 연락처 : / FAX : / E-mail :		
계 약 내 용	시험수행기관	기 관 명 : 대구가톨릭대학교 GLP센터 센 터 장 : 박영철 (인) 주 소 : 경북 경산시 하양읍 하양로 13-13 연락처 : / FAX :		
	계약명	뉴트라팜텍 GLP 독성시험(90일 반복)		
	계약금액	금 오천오백만원 (₩ 55,000,000, VAT 별도)		
	대금지급방법	30,000,000원 (VAT 별도, 계약후 15일 내 1차 지급) 25,000,000원 (VAT 별도, 최종보고서(안) 확인 후 지급)		
	계약기간	약 12개월		
	시험항목	건강기능식품 식약처 허가를 위한 90일 반복투여독성시험 (설치류, 조직병리포함, DRF제외)		
<p>계약당사자는 불임의 계약문서와 시험계획서에 의거 위 연구용역에 대한 계약을 체결하고 신의에 따라 성실히 계약상의 의무를 이행할 것을 확약하며, 이 계약의 증거로 계약서를 2부 작성하여 당사자가 기명날인한 후 각각 1부씩 보관한다.</p> <p>불 임 : 계약조건 1부.</p> <p style="text-align: center;">2016. 11. 7</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> 발주처 (주)뉴트라팜텍 주소 : 경기도 용인시 기흥구 동백중앙로 61-19 옐로우존 3층 301호 대표자 : 최 봉 근 (인) </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> 계약상대자 대구가톨릭대학교 산학협력단 주소 : 경북 경산시 하양읍 하양로 13-13 대표자 : 김 민 수 (인) </td> </tr> </table>			발주처 (주)뉴트라팜텍 주소 : 경기도 용인시 기흥구 동백중앙로 61-19 옐로우존 3층 301호 대표자 : 최 봉 근 (인)	계약상대자 대구가톨릭대학교 산학협력단 주소 : 경북 경산시 하양읍 하양로 13-13 대표자 : 김 민 수 (인)
발주처 (주)뉴트라팜텍 주소 : 경기도 용인시 기흥구 동백중앙로 61-19 옐로우존 3층 301호 대표자 : 최 봉 근 (인)	계약상대자 대구가톨릭대학교 산학협력단 주소 : 경북 경산시 하양읍 하양로 13-13 대표자 : 김 민 수 (인)			

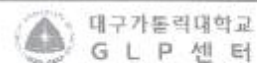
〈그림 5. 독성시험 계약서〉

최 종 보 고 서

지각추출물 (*Citrus aurantium* extract)의
Sprague-Dawley 랫드를 이용한
단회경구투여 독성시험



시 험 번 호 : 17-SDOT-002
최종보고서 발행일 : 2017. 3. 16
시험의뢰기관 : (주) 뉴트라팜텍
경기도 용인시 기흥구 동백중앙로 61-19
옐로우존 301호
시 험 기 관 : 대구가톨릭대학교 GLP센터
경북 경산시 하양읍 하양로 13-13



대구가톨릭대학교
G L P 센터

<그림 6. 단회독성시험 보고서>

4-2) 반복경구투여 독성시험

○ 시험개요

(1) 시험목적

본 시험은 시험물질인 지각추출물을 암수 랫드 (Sprague-Dawley)에 90일간 반복경구투여 하였을 때 발현되는 독성적 특성에 대한 이해를 바탕으로 NOAEL (최대무독성용량)을 설정한다. 그러나, 경우에 따라서 NOEL (최대무영향용량), 그리고 NOAEL (최소독성용량) 설정과 표적장기 징후를 확인한다.

(2) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Section 4 Health Effects Test No.408 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents (03 October 2008).

○ 시험물질

- (1) 명칭 : 지각추출물
- (2) 로트번호 : Kca-160925
- (3) 성상 : 옅은 노란색 분말
- (4) 부형제 : 0.5% Carboxymethylcellulose sodium salt solution (0.5% CMC-Na)
- (5) 조성

구분	Lot No.	제조사	외관 및 성상	보관조건
Carboxymethylcellulose sodium salt	SLBR1692V	SIGMA -ALDRICH	흰색 가루	실온
멸균증류수	KAI 6056	중외제약	무색 액체	실온

(6) 조제방법

- 조제빈도 : 90일 동안 투여 전에 매일 조제하였다. 투여 시 침전물이 없도록 stirrer로 충분히 섞어 사용하였다.
- 조제방법 : 본 시험물질을 중량 그대로 측량하여 조제하였다. 조제 후 1~2시간 내에 투여하는 것을 원칙으로 하며, 90일간 (투여 전 기간) 매일 조제하였다. 고용량군은 부형제 (멸균증류수)를 이용하여 2000 mg/10 ml (20%)로 조제하였고, 중, 저용량군은 동일한 부형제로 단계희석하여 각각 1000 mg/10 ml (10%), 500 mg/10 ml (5%)로 조제하였다.

○ 시험계

- (1) 종 및 계통 : 특정병원체균 부재 (SPF) Sprague-Dawley 랫드

(2) 입수 시 성별, 주령, 동물 수 및 체중범위

수컷 5주령, 48마리 120.3 ~ 134.6 g

암컷 5주령, 48마리 107.7 ~ 124.9 g

(3) 투여개시 시 성별, 주령, 동물 수 및 체중범위

수컷 6주령, 40마리 185.0 ~ 205.3 g

암컷 6주령, 40마리 149.0 ~ 173.5 g

(4) 검역 및 순화

동물 입수 시 입수동물에 대한 검수 및 검역을 실시하였으며, 동물의 순화는 입수 후 수컷 7일, 암컷 8일간 해당 동물실내에서 실시하였다. 동물공급업체에서 제공한 시험계의 병원체검사 성적서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄 요인은 없었다.

순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 투여전일 및 투여일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

(5) 군분리

질병이나 상처 등의 임상증상을 보이지 않고, 적절한 체중을 나타내는 동물을 선택하여 시험에 사용하였다. 입수한 모든 동물 중 군분리일에 측정한 평균체중에 가장 가까운 암수 각 40마리를 선택하였다. 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 4군, 군당 10마리로 군분리 하였다.

○ 시험군 구성 및 투여량 설정

(1) 시험군의 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량 (ml/kg/day)	투여용량 (mg/kg/day)
대조군(G1) ^{a)}	Male	10	1101~1110	10	0
	Female	10	2101~2110	10	0
저용량군(G2)	Male	10	1201~1210	10	500
	Female	10	2201~2210	10	500
중용량군(G3)	Male	10	1301~1310	10	1000
	Female	10	2301~2310	10	1000
고용량군(G4)	Male	10	1401~1410	10	2000
	Female	10	2401~2410	10	2000

a) G1: Vehicle control

(2) 투여량 설정

시험물질은 지각의 주정 추출물로 건강기능식품 개발·등록을 목적으로 개발되었다. 일반적으로 식물유래 건강기능식품의 임상용량은 약물보다 높기 때문에, 고용량으로 임상

시험이 가능하도록 반복투여 독성시험이 수행되는 것이 바람직하다. 의뢰자는 본 시험 물질에 대해 임상예정용량을 60 kg 성인기준 400 mg/day으로 제시하였다. 일반적으로 임상용량의 안전성은 MRSD (Maximum Recommended Starting Dose: 최대추천초기용량) = NOAEL / {10 (안전계수) × 6.2 (HED: 인체등가용량)}의 공식으로 확보된다.

제시된 임상예정용량이 약 6.7 mg/kg/day (400 mg/60 kg/day) 이므로 이를 MRSD로 하면, NOAEL은 약 415.4 mg/kg/day 용량으로 나타난다. 따라서 반복투여독성시험의 용량 설정은 415.4 mg/kg/day (임상예정용량에 따른 NOAEL)를 포함하는 보다 높은 용량이 설정되어야 한다. 하지만, 시험물질이 주정 추출물이기 때문에 농축된 추출성분에 의한 독성이 나타날 우려가 있어 제시된 415.4 mg/kg/day 용량의 약 5배 정도 높은 2000 mg/kg/day를 고용량으로 하여 공비 2를 적용, 1000 mg/kg/day, 500 mg/kg/day를 중, 저용량으로 하여 3단계 용량군으로 설정하였다.

○ 관찰 및 검사항목

(1) 일반증상관찰

모든 동물에 대해서 1일 1회 일반증상의 종류, 발현 및 증상의 정도를 관찰하였으며, 1일 2회 사망 및 빈사동물을 관찰하였다. 관찰은 투여일부터 90일간 실시하였다.

(2) 체중측정

모든 동물의 체중을 투여개시일에 측정하고, 이후에는 주 1회, 부검전일 및 부검일에 측정하였다. 부검일 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하고 부검전일 체중을 평가하였다.

(3) 사료섭취량 설정

투여개시 전의 사료섭취량은 군분리 일부터 투여개시 일까지 1일간의 섭취량을 측정하였다. 투여기간에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균 섭취량을 산출하였다. 투여 13주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

(4) 안검사

동물 도입 시 모든 동물에 대하여 육안으로 눈의 외관 및 전안부를 관찰하였다. 투여 마지막 주에는 모든 동물을 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후, 각 군당 5마리에 대해서는 안구에 산동제 (이슈토 아트로필, 한국알콘, 로트번호: 14K19AF)를 점적하여 안저사진기 (Genesis, Gowa Co. Ltd., Japan)로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰하였다.

(5) 요검사

각 군당 5마리에 대하여 투여 13주에 요검사를 실시하였다. 동물을 대 케이지에 수용하여 3~4시간동안 채뇨한 신선뇨 중 약 1 ml의 취하여 다음 항목을 검사하였으며, 24시간동안 계속 채집한 요로 요총량을 측정하였다.

① 일반검사

약 0.3 ml의 요를 요검사용 시험지에 묻힌 후, 요자동분석기: K-100을 이용하여 다음 항목을 측정하였다.

항 목	단 위
GLU(glucose)	g/dL
BIL(bilirubin)	mg/dL
KET(ketone body)	mg/dL
LEU(leukocyte)	Leu/ul
OB(occult blood)	Ery/ul
PRO(protein)	mg/dL
URO(urobilinogen)	umol/L
NIT(nitrite)	-
SG(specific gravity)	-
pH	-
Color	-

② 요침사 검사

일반검사 후 남은 요를 1,500rpm 으로 5분간 원심분리 한 후, 그 침전물을 S.M법으로 염색하여 RBC, WBC, Epithelial cell 및 Casts를 관찰하였다.

(6) 부검 및 채혈

부검 전날 절식 (17시간 이상) 한 계획부검 동물에 대하여 부검 당일에 Isoflurane으로 흡입마취하여 복대동맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 이 후 복대동맥 및 복대정맥을 절단하여 방혈/치사시킨 다음, 모든 장기에 대해 부검소견을 관찰한 후 기록지에 기록하였다.

(7) 혈액학적 검사

부검시 채혈한 혈액 일부를 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 vacutainer tube에 주입한 후 자동혈액분석기: K-96로 다음 항목을 측정하였다.

① 일반혈액학적 검사

항 목	단 위	측 정 방 법
㉠ WBC (White blood cell count)	10 ³ /μL	Flowcytometry
㉡ RBC (Red blood cell count)	10 ⁶ /μL	Flowcytometry, Isovolumetry
㉢ HGB (Hemoglobin conc.)	g/dL	Modified CN met-Hb method
㉣ HCT (Hematocrit)	%	(RBC×MCV)÷10
㉤ MCV (Mean corpuscular volume)	fL	Histogram
㉥ MCH (Mean corpuscular hemoglobin)	pg	(HGB÷RBC)×10
㉦ MCHC (Mean corpuscular Hb conc.)	g/dL	[HGB÷(RBC×MCV)]×2500
㉧ RDW (Red cell distribution width)	%	Histogram
㉨ HDW (Hb conc. distribution width)	g/dL	Histogram
㉩ PLT (Platelet)	10 ³ /μL	Flowcytometry
㉪ MPV (Mean platelet volume)	fL	Histogram
㉫ RET (Reticulocyte)	%	Flowcytometry, Isovolumetry

② 백혈구감별개수

항 목	단위	측 정 방 법
㉠ NEU (Neutrophil)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
NEU (Neutrophil)	10 ³ /μL	Flowcytometry, Peroxidase staining
㉡ LYM (Lymphocyte)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
LYM (Lymphocyte)	10 ³ /μL	Flowcytometry, Peroxidase staining
㉢ MONO(Monocyte)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
㉣ EOS (Eosinophil)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
㉤ BASO(Basophil)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
㉦ LUC (Large unstained cells)	%	Noise-Lymph Histogram

(8) 혈액생화학학적 검사

혈액 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube에 주입하고 10~15 분간 상온에 방치하여 응고시켰다. 이 후, 3,000 rpm 으로 10분 동안 원심분리하여 얻은 혈청으로 혈액 생화학분석기: K-97을 사용하여 아래 항목을 측정하였다. 전해질은 전해질 분석기: K-99로 측정하였다.

항 목	단 위	방 법
㉑ AST (Aspartate aminotransferase)	U/L	IFCC법
㉒ ALT (Alanine aminotransferase)	U/L	IFCC법
㉓ ALP (Alkaline phosphatase)	U/L	P-NPP법
㉔ γ -GTP (γ -Glutamyl transpeptidase)	U/L	IFCC법
㉕ BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dL	Jaffe법
㉖ CRE (Creatinine)	mg/dL	UV법
㉗ GLU (Glucose)	mg/dL	Enzyme법
㉘ CHO (Total cholesterol)	g/dL	Biuret법
㉙ PRO (Total protein)	U/L	UV-Rate 법
㉚ CPK (Creatine phosphokinase)	g/dL	BCG 법
㉛ ALB (Albumin)	mg/dL	Evelyn-Malloy법
㉜ BIL (Total bilirubin)	mg/dL	Enzyme법
㉝ TG (Triglyceride)	mg/dL	Enzyme법
㉞ IP (Inorganic phosphorus)	ratio	PRO, ALB로 산출
㉟ A/G ratio (Albumin/Globulin ratio)		
㊱ Ca ²⁺ (Calciumion)	mg/dL	Arsenazo III
㊲ Na ⁺ (Sodiumion)	mmol/L	전극법
㊳ K ⁺ (Potassiumion)	mmol/L	전극법
㊴ Cl ⁻ (Chlorideion)	mmol/L	전극법

㉑-㉙: 혈액생화학분석기를 이용하여 측정.

㉚-㉜: 전해질자동분석기로 측정.

(9) 혈액응고시간 검사

부검시 채혈한 혈액 중 1.8 ml을 3.2% sodium citrate 0.2 ml이 들어있는 vacutainer tube 에 주입한 후, 3,000 rpm 으로 10분 동안 원심분리하여 얻은 혈장으로 PT, APTT를 측정 하였다. 혈액응고시간검사기: K-98을 이용하여 Nephelometric Analysis 방법으로 초 (sec) 단위로 측정하였다.

(10) 장기중량 측정

부검시 다음의 장기를 적출한 후 정밀저울을 이용하여 중량을 측정하였다. 양측성 장기는 양측 장기를 각각 측정하였다. 중량측정 장기에 대하여는 부검시 체중에 대한 상대중량을 산출하였다.

중량측정장기명

난소(ovary), 부신(adrenal gland), 뇌하수체(pituitary), 가슴샘(thymus), 전립샘(prostate), 고환(testis), 부고환(epididymis), 비장(spleen), 신장(kidney), 심장(heart), 폐(lung), 뇌(brain) 및 간(liver)

(11) 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기를 적출하여 10% 중성완충포르말린용액에 고정하였으며, 안구는 Davidson 용액에, 고환과 부고환은 Bouin 용액에 고정하였다.

고정장기명

고환, 부고환, 정낭, 전립샘, 난소, 자궁, 질, 방광, 비장, 위, 췌장, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 장간막림프절, 부신, 신장, 간, 대퇴골, 턱밑림프절, 침샘, 흉골, 가슴샘, 심장, 폐, 대동맥, 흉척수, 혀, 기관, 식도, 갑상샘, 안구, 하더샘, 뇌, 뇌하수체, 피부(젖샘)

고정한 장기·조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하였다. 이후 박절하여 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 잔여 장기·조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존하였다.

조직병리학적 검사에서 나타나는 결과는 중증도 (severity)에 따라 minimal (아주경증), slight (경증), moderate (중증), severe (상당한 중증) 등의 4단계로 구분하여 나타냈다.

○ 통계학적 방법

대조군과 투여군 간의 평균비교에는 모수적인 다중비교 혹은 비모수적인 다중비교를 사용하였으며, 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 19.0k을 이용하였다.

(1) 연속적인 자료의 분석

체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량에 대하여 one-way ANOVA test로 평균치에 대한 유의성 검증하였다. 유의성이 있으면 Levene test로 등분산성을 검정하여 등분산일 경우에는 Duncan multiple range test, 이분산일 경우에는 Dunnett's test를 이용하였다.

(2) 불연속 자료의 분석

요검사 결과에 대해 아래 표와 같이 척도변환을 통해 중증도 (severity)로 나타내어 통계 분석이 이루어졌다.

Kruskal-Wallis' H-test를 실시한 후, 유의성이 있으며, Mann-Whitney U-test를 적용하여 대조군과의 유의성을 확인하였다. 요색조는 Fisher' s exact test를 적용하였다.

Severity	0	1	2	3	4	5
GLU	-	+/-	1+	2+	3+	4+
BIL	-	+/-	1+	2+	3+	
KET	-	+/-	1+	2+	3+	4+
SG (Specific gravity)	1.005	1.010	1.015	1.020	1.025	1.030
PRO	-	+/-	1+	2+	3+	4+
pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	>=9.0
URO (EU/dL)	0.2	1	2	4	>=8	
NIT	-	+				
OB (μmol/L)	-	+/-	1+	2+	3+	
LEU	-	+/-	1+	2+	3+	
RBC	0	+/-	1+	2+	3+	
WBC	0	+/-	1+	2+	3+	
Epithelial cell	0	+/-	1+	2+	3+	
Cast	0	+/-	1+	2+	3+	

○ 독성판정기준

(1) NOEL, NOAEL 그리고 LOAEL의 정의

본 시험의 목적은 시험물질 독성지표를 나타내는 NOEL, NOAEL, LOAEL을 얻는 것이며, 정의는 다음과 같다.

독성지표	정 의
NOEL (No Observed Effect Level)	시험물질에 의한 독성학적 및 약리학적 변화를 유발하지 않는 최대무영향용량
NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)	시험물질에 의한 Adverse effect를 유발하지 않거나 명확한 질환과 연계되지 않는 Non-adverse effect를 유발하는 최대무독성용량
LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level)	시험물질에 의해 Adverse effect를 유발하는 최소독성용량

(2) Adverse effect와 Non-adverse effect 판정기준

① NOEL, NOAEL, LOAEL을 구분하는 핵심적인 판정기준은 시험물질에 의한 Adverse effect와 Non-adverse effect이다. 판정기준은 다음과 같이 규정한다.

판정기준	정의
Adverse effect	<ul style="list-style-type: none"> - 독성(toxicity)과 동일한 의미이다. - 시험물질에 의해 생화학적·형태학적·생리학적 변화를 유발하는 생물학적 영향을 포함하며, 임상병리학적 또는 조직병리학적 지표를 통해 확인된다. - 표적기관독성을 유발할 수 있는 잠재적 변화를 포함한다.
Non-adverse effect	<ul style="list-style-type: none"> - 가역성이 사료되며 경미한 변화를 의미한다. - 임상병리학적 지표의 종합적인 판단을 통해 시험에서 투여된 최고용량보다 더 높은 용량의 노출에서 Adverse effect 유발이 예상되는 변화를 포함한다. - 시험물질에 의한 악리학적 변화를 포함한다.

② 시험물질에 의한 finding을 Adverse effect와 Non-adverse effect로 판정하여 독성지표를 얻기에는 포괄적이며 또한 추상적인 측면이 있다. 따라서 생물학적 및 통계적 유의성, historical data와 용량의존성 강도의 기준을 바탕으로 시험의 결과를 구분할 수 있는 분류체계가 필요하다.

③ 분류체계는 위의 기준에 따라 시험을 통해 얻은 finding을 Weight-based Classification (결과-경중에 따른 분류)에 적용한다.

(3) Weight-based Classification 분류

Weight-based Classification은 참고문헌 (Park et al., Lewis et al., Ness. D.)을 참고하여 시험물질-유래 중요한 변화, 시험물질 유래 경미한 변화 및 비시험물질-유래 변화로 아래와 같이 분류한다.

변화의 종류	분류의 기준
시험물질-유래 중요한 변화	<ul style="list-style-type: none"> - 모든 투여용량에서 용량-의존성을 가진 통계적 및 생물학적 유의성 있는 조직병리학적 변화 - 용량-의존성은 없지만 조직병리학적 변화를 동반한 임상병리학적 변화 - 용량-의존성이 없지만 대조군에서 발생하지 않고 통계적 유의성을 가진 조직병리학적 변화 - 용량-의존성 심각한 체중 감소
시험물질-유래 경미한 변화	<ul style="list-style-type: none"> - 일부 용량에서 경미한 용량의존성 또는 용량-의존성이 없는 특정 투여용량에서의 임상병리학적 및 조직병리학적 변화 - 가역성(reversibility)이 예상되거나 대조군 발생의 조직병리학적 변화 - 시험물질의 악리작용으로 고려되는 통계적, 생물학적 유의성을 지닌 용량의존성 또는 용량비의존성변화 - 20% 이내의 체중 감소 및 고지혈을 동반하지 않은 체중 증가 및 20% 이상의 장기중량변화
비시험물질-유래변화	<ul style="list-style-type: none"> - Historical data 벗어나는 대조군의 결과와의 비교를 통해 얻은 통계적 유의성을 가진 변화 - 실험과정에서 실수로 발생하는 변화와 자연발생적 변화(spurious changes)를 포함

Historical data : 시험을 통해 얻어진 대조군의 범위(Mean±SD).

생물학적 유의성 : 시험계의 정상범위(Historical data)를 벗어나는 대조군과 시험군간의 통계적 유의성.

(4) 독성지표의 판정

① 시험의 목적인 독성지표를 판정하기 위해 finding은 아래와 같이 적용한다.

Weight-based Classification의 분류	독성판정기준	독성지표
시험물질-유래 중요한 변화	Adverse effect	LOAEL
시험물질-유래 경미한 변화	Non-adverse effect	NOAEL
비시험물질-유래 변화	No effect	NOEL

② NOEL, NOAEL 그리고 LOAEL 설정에 있어서 고려 사항

- 모든 투여군에서 시험물질-유래 중요한 변화가 없이 시험물질-유래 경미한 변화가 확인될 경우에는 최고 투여용량을 NOAEL로 설정한다.
- 독성시험의 최종보고서에서 NOEL, NOAEL과 LOAEL 중 어떤 결론을 내려도 상관없다. 그러나 NOEL을 설정할 경우, 임상시험에서 저용량 설정에 기인하여 약리적 유효용량이 NOEL 범위를 상회할 우려가 있으며, LOAEL을 설정할 경우에는 높은 용량 설정으로 인하여 독성이 나타날 가능성이 있다. 따라서 반복투여독성시험에서 NOAEL을 설정하는 것이 바람직하다.

○ 결과

(1) 일반증상 및 사망동물 (Table 1)

- 실험기간 중 대조군을 포함한 모든 시험군에서 사망동물은 없었다.
- 투여기간 중 일반증상 관찰 결과, 암컷 중용량군 (1000 mg/kg/day) 1레 (동물번호: 2302)에서 보행이상 (Abnormal gait)이 나타났지만, 다른 개체에서는 관찰되지 않아, 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 수컷에서는 이상증상이 관찰되지 않았다.

(2) 체중 (Table 2)

- 체중측정 결과는 체중변화 및 투여전 체중과 90일 투여 후 체중의 변화를 측정된 증체량을 바탕으로 판정하였다.
- 수컷 고용량군 증체량에서 대조군과 비교하여 고용량군 (2000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 대조군과 비교하여 26.6%의 증체량 감소가 나타났지만 용량의존성이 없고, 매주 관찰한 체중변화를 볼 때 체중감소가 나타나지 않아 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다 ($p < 0.05$).

(3) 사료섭취량 (Table 3)

- 암수 평균 사료섭취량에서 대조군과 비교하여 모든 시험군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

(4) 안검사 (Table 4)

- 군분리 시 외안검사와 투여 마지막 주에 수행된 안저검사 결과에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

(5) 요검사 (Table 5)

- 요검사 결과, 수컷 pH 수치가 대조군과 비교하여 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 암컷 PRO(Protein) 및 LEU(Leukocyte) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 증가하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다 ($p < 0.05$).

(6) 혈액학적 검사 (Table 6)

- 수컷에서 PLT (Platelet) 수치가 모든 시험군(500, 1000, 2000 mg/kg/day)에서, WBC (White blood cell count), HDW (Hb cone, distribution width) 및 RET (Reticulocyte) 수치가 대조군과 비교하여 중용량군 (1000 mg/kg/day), 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 증가, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p < 0.05$). NEU (Neutrophil) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 증가, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다 ($p < 0.05$). LYM (Lymphocyte) 및 EOS (Eosinophil) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군 (2000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 감소, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다 ($p < 0.05$). MCH (Mean corpuscular hemoglobin) 수치가 대조군과 비교하여 중용량군 (1000 mg/kg/day), 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만 감소폭이 미약하고, 정상범위(historica data)내의 변화로 비시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다 ($p < 0.05$). HGB (Hemoglobin cone.) 및 HCT (Hematocrit) 수치가 중용량군 (1000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 감소하였으나 감소폭이 작고 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 암컷에서 WBC(White blood cell count), RDW(Red cell distribution width), HDW(Hb cone. distribution width), PLT(Platelet), RET(Reticulocyte) NEU(Neutrophil) 및 LUC(Large unstained cells) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 증가, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p < 0.05$). EOS(Eosinophil) 수치가 대조군과 비교하여 모든 시험군(500, 1000, 2000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 감소, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다 ($p < 0.05$). MCH(Mean corpuscular hemoglobin) 수치가 대조군과 비교하여 중용량군 (1000 mg/kg/day), 고용량군(2000 mg/kg/day)에서, MCV(Mean corpuscular volume) 및 MCHC(Mean corpuscular Hb cone.)수치가 대조군과 비교하여 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만 감소폭이 미약하고, 정상범위 (historica data)내의 변화로 비시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p < 0.05$).

(7) 혈액생화학적 검사 (Table 7)

- 수컷에서 AST(Aspartate aminotransferase) 및 ALT(Alanine aminotransferase) 수치가 대

조군과 비교하여 중용량군 (1000 mg/kg/day), 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 증가, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다 (p<0.05). CHO(Total cholesterol) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 증가, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다(p<0.05). BUN(Blood urea nitrogen) 수치가 대조군과 비교하여 중용량군 (1000 mg/kg/day) 에서, PRO(Total protein) 수치는 중용량군(1000 mg/kg/day), 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 증가하였으나 정상범위 (historica data) 내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다(p<0.05). CPK(Creatine phosphokinase) 수치가 대조군과 비교하여 중용량군(1000 mg/kg/day), 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 감소하였으나 정상범위 (historica data) 내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다 (p<0.05).

- 암컷에서 AST (Aspartate aminotransferase) 및 ALT(Alanine aminotransferase) 수치가 대조군과 비교하여 중용량군 (1000 mg/kg/day), 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 증가, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다(p<0.05). CPK(Creatine phosphokinase) 및 GLU(Glucose) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군(2000 mg/kg/day) 통계적으로 유의하게 증가하였으나 정상범위(historica data)내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다(p<0.05). Ca²⁺ (Calciumion) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군(2000 mg/kg/day)에서, GGKy-Glutamyl transpeptidase) 수치가 중용량군 (1000 mg/kg/day), 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 감소하였으나 정상범위(historica data) 내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다(p<0.05).
- 전해질 검사에서 수컷 K⁺(Potassiumion) 수치가 대조군과 비교하여 중용량군(1000 mg/kg/day), 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 증가하였으나 증가폭이 작고 정상범위(historica data)내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다(p<0.05).
- 전해질 암컷 Na⁺(Sodiumion) 수치가 대조군과 비교하여 저용량군 (500 mg/kg/day), 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 감소하였으나 감소폭이 작고 정상범위 (historica data)내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다 (p<0.05).

(8) 혈액응고 검사 (Table 8)

- 수컷 APTT(Activated partial thromboplastin time) 수치가 모든 시험군(500, 1000, 2000 mg/kg/day) 에서 PT(prothrombin time) 수치가 중용량군 (1000 mg/kg/day), 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소하였으나 정상범위 (historica data) 내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다(p<0.05). 이상소견이 관찰되지 않았다.
- 암컷 PT(prothrombin time)수치가 모든 시험군(500, 1000, 2000 mg/kg/day)에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소하였으나 정상범위 (historica data)내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다(p<0.05).

(9) 장기중량 (Table 9)

- 장기중량 결과는 절대중량(Absolute organ weights)과 부검전 체중 대비 상대중량 (Relative organ weights)을 바탕으로 판정하였다.

- 수컷에서 양쪽신장(Kidney) 및 폐(Lung)의 상대중량(Relative organ weights)이 중용량군(1000 mg/kg/day), 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p < 0.05$). 간(Uver)의 상대중량(Relative organ weights)이 모든 시험군(500, 1000, 2000 mg/kg/day)에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p < 0.05$). 뇌(brain) 및 좌측 고환(testis, Lt)의 상대중량(Relative organ weights)이 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였으나 정상범위(historica data) 내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다($p < 0.05$).
- 암컷에서 양쪽신장(Kidney) 및 간(Lung)의 상대중량(Relative organ weights)이 모든 시험군(500, 1000, 2000 mg/kg/day)에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p < 0.05$). 심장(Heart)의 상대중량(Relative organ weights)이 모든 시험군(500, 1000, 2000 mg/kg/day)에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였으나 정상범위(historica data) 내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다($p < 0.05$). 양쪽난소(Ovary) 및 폐(Lung)의 상대중량(Relative organ weights)이 고용량군(2000 mg/kg/day)에서, 비장(Spleen)의 상대중량(Relative organ weights)이 중용량군(1000 mg/kg/day), 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p < 0.05$). 우측 부신(Adrenal, 메이 중용량군(1000 mg/kg/day), 고용량군(2000 mg/kg/day)에서, 좌측부신(Adrenal, 나)은 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였으나 용량의존성이 없고, 정상범위(historica data)내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다($p < 0.05$).

(10) 부검소견 (Table 10)

- 수컷 대조군(0 mg/kg/day) 및 중용량군(1000 mg/kg/day) 각 1레(동물번호: 1101, 1304)에서 고환(Testis) 웨소(Undersized)가 나타났으나 용량의존성이 없고 대조군에서도 관찰되어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다($p < 0.05$). 대조군(0 mg/kg/day) 1레(동물번호: 1103)에서 폐(Lung) 발적(Redness)이 나타났으나 대조군에서만 발생되어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다($p < 0.05$).
- 암컷 고용량군(2000 mg/kg/day) 1레(동물번호: 2401)에서 자궁(Uterus)내 맑은 액체 저류(retention of clear fluid)가 관찰되었지만, 다른 개체에서는 관찰되지 않고 발생빈도가 낮아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

(11) 조직병리학적 검사 (Table 11)

- 조직병리학적 검사에서 나타나는 결과는 중증도(severity)에 따라 “minimal(아주 경증)”, “slight(경증)”, “moderate(중증)”, “severe(상당한 중증)” 등의 4단계로 구분하여 나타냈다.
- 암컷 부신(adrenal gland)에서 염증세포 침윤(inflammatory cells infiltration)이 대조군에서도 “minimal”로 1레(동물번호: 1106)가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 수컷 뇌하수체(Pituitary)에서 낭포(Cyst)가 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 “minimal”로

1 레(동물번호:1403)가 나타났으나 대조군에서도 “minimal” 로 1레(동물번호:1101)가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

- 수컷 고환 (Testis) 에서 생식상피 (germinal epithelium) 에 위축 (atrophy) 이 고용량군 (2000 mg/kg/day) 1 레(동물번호:1403) 에서 “moderate” 로 나타났지만 발생빈도가 낮아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 수컷 신장(Kidney)에서 세뇨관(Renal tubule) 재생(Regeneration)이 고용량군 (2000 mg/kg/day)에서 “minimal” 로 2레(동물번호:1404, 1407), 중용량군(1000 mg/kg/day) 에서 “minimal” 로 2레(동물번호:1304, 1309), 저용량군(500 mg/kg/day)에서 “minimal” 로 1 레(동물번호:1203)가 나타났지만 대조군(0 mg/kg/day)에서도 “minimal” 로 1레 (동물번호:1404, 1407)가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 암컷 신장(Kidney)에서 무기질침착(mineralization)이 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 “minimal” 로 2레(동물번호:2402, 2410), 중용량군(1000 mg/kg/day) 에서 “minimal” 로 4레(동물번호:2304, 2306, 2309, 2310), 저용량군(500 mg/kg/day)에서 “minimal” 로 1레 (동물번호:2204)가 나타났지만 대조군(0 mg/kg/day)에서도 “minimal” 로 3레(동물번호:2101, 2102, 2108)가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 암컷 방광 (Bladder) 에서 염증세포침윤 (inflammatory cells infiltration) 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 “minimal” 로 1 레(동물번호:2407)가 나타났고, 염증반응이 진행된 괴사 (necrosis)가 대조군(0 mg/kg/day)에서 “slight” 로 1레(동물번호:2106)가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 수컷 간(Uver)에서 국소적 염증(focal inflammation)이 고용량군(2000 mg/kg/day) 에서 “minimal” 로 3레(동물번호:1401, 1403, 1409)가 나타났으나 대조군(0 mg/kg/day) 에서도 “minimal” 로 3레(동물번호:1104, 1108, 1110)가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 간세포 공포 (vacuolated hepatocytes) 가 대조군 (0 mg/kg/day)에서 “minimal” 로 1 레(동물번호:1109)가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 섬유화(fibrosis)가 고용량군(2000 mg/kg/day) 1 레(동물번호:1405)에서 “minimal” 로 나타났지만 발생빈도가 낮아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 암컷 간(Liver)에서 국소적 염증(focal inflammation)이 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 “minimal” 로 2레(동물번호:2404, 2405) 가 나타났으나 대조군 (0 mg/kg/day) 에서도 “minimal” 로 3레(동물번호:2101, 2103, 2110)가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 간세포 공포(vacuolated hepatocytes)가 대조군(0 mg/kg/day)에서 “minimal” 로 3 레(동물번호:2102, 2104, 2105, 2106)가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 수컷 폐 (Lung) 에서 폐포 마크로파아지 응집 (Alveolar macrophage accumulation)이 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 “minimal” 로 1 레(동물번호:1410)가 나타났으나 발생빈도가 낮아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 암컷 폐 (Lung) 에서 폐포 마크로파아지 응집 (Alveolar macrophage accumulation)이 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 “minimal” 로 3레(동물번호:2403, 2405, 2407), 중용량군 (1000 mg/kg/day)에서 “minimal” 로 1 레(동물번호:2304)가 나타났으나, 발생 빈도가 낮고 나이든 랫드에서 자연발생적으로 나타날 수 있는 증상으로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

- 수컷 심장 (Heart) 에서 염증세포침윤 (Infiltration of inflammatory cells) 이 대조군 (0 mg/kg/day) 에서 “minimal” 로 2레(동물번호:1102, 1105) 가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 수컷 위(Stomach)에서 염증세포침윤(Inflammatory cells infiltration)이 대조군(0 mg/kg/day) 에서 “minimal” 로 1 레(동물번호:1109)가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 암컷 위 (Stomach) 에서 염증세포침윤 (Inflammatory cells infiltration) 이 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 “minimal” 로 1 레 (동물번호:2402) 가 나타났으나 발생빈도가 낮아 비 시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 암컷 하더샘 (Harderian gland) 에서 염증세포침윤 (Inflammatory cells infiltration) 이 대조군에서 “minimal” 로 1 레 (동물번호:2108) 가 나타났으나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

Table 1-1. clinical signs of male rats

STUDY: 17-RE0-001		CLINICAL SIGNS				SEX: MALE
Days	SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
0	Normal	10 /10 ^{a)}	10 /10	10 /10	10 /10	
1-7	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
8-14	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
15-21	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
22-28	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
29-35	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
36-43	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
44-49	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
50-56	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
57-63	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
64-70	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
71-77	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
78-84	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
85-89	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
90	Terminal Sacrifice	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	

^{a)} Number of animals with the sign / Number of animals examined.

Table 1-2. clinical signs of female rats

STUDY: 17-RE0-001		CLINICAL SIGNS				SEX: FEMALE
Days	SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
0	Normal	10 /10 ^{a)}	10 /10	10 /10	10 /10	
1-7	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
8-14	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
15-21	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
22-28	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
29-31	Normal	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	
32-42	Normal	10 /10	10 /10	9 /10	10 /10	
	Abnormal gait			1 /10		
43-49	Normal	10 /10	10 /10	9 /10	10 /10	
	Abnormal gait			1 /10		
50-56	Normal	10 /10	10 /10	9 /10	10 /10	
	Abnormal gait			1 /10		
57-63	Normal	10 /10	10 /10	9 /10	10 /10	
	Abnormal gait			1 /10		
64-70	Normal	10 /10	10 /10	9 /10	9 /10	
	Abnormal gait			1 /10		
71-77	Normal	10 /10	10 /10	9 /10	10 /10	
	Abnormal gait			1 /10		
78-84	Normal	10 /10	10 /10	9 /10	10 /10	
	Abnormal gait			1 /10		
85-89	Normal	10 /10	10 /10	9 /10	9 /10	
	Abnormal gait			1 /10		
90	Terminal Sacrifice	10 /10	10 /10	10 /10	10 /10	

^{a)} Number of animals with the sign / Number of animals examined.

Table 2-1. Body weight changes of male rats

STUDY: 17-REO-001		BODY WEIGHT (g)			SEX: MALE
WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
0	195.1±4.16	195.6±4.62	195.6±5.14	195.3±5.14	
1	256.4±6.33	257.3±8.87	256.0±9.25	246.4±8.35	
2	310.0±8.15	314.2±13.76	311.1±13.82	300.6±12.55	
3	351.6±11.65	356.7±18.99	357.7±17.62	344.7±17.08	
4	386.3±16.49	392.6±23.27	394.1±22.73	371.4±22.20	
5	411.2±21.67	419.0±27.16	424.3±26.84	392.7±27.14	
6	434.0±23.78	441.4±28.15	446.6±28.53	408.2±34.34	
7	453.4±26.81	458.6±31.45	468.3±31.73	423.7±32.99	
8	472.1±28.05	474.6±33.60	483.7±34.15	430.1±34.99	
9	489.6±31.93	490.3±35.71	501.8±41.55	435.6±36.91	
10	503.6±33.15	504.2±36.17	513.6±38.49	446.4±37.04	
11	520.6±34.93	522.0±38.10	533.6±40.58	459.8±38.20	
12	524.7±36.29	528.4±40.05	535.8±43.42	460.6±42.17	
13	529.4±41.88	533.7±40.43	543.6±44.90	459.2±44.72	
gains ^{a1}	334.2±39.25	338.1±38.27	348.0±41.51	263.9±44.32*	

^{a1} Weight gains are body weight difference between week 13 and week 0.

* Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.

Table 2-2. Body weight changes of female rats

STUDY: 17-RE0-001		BODY WEIGHT (g)			SEX: FEMALE
WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
0	162.1±6.09	161.6±6.99	158.7±7.89	159.0±7.03	
1	186.9±6.36	187.9±8.33	183.9±8.78	184.1±8.11	
2	210.4±8.49	211.7±13.13	205.6±13.32	209.2±13.49	
3	224.6±11.58	227.6±13.96	221.5±16.17	227.1±10.44	
4	241.0±15.74	247.4±15.08	234.4±18.51	243.3±12.60	
5	253.2±18.36	255.0±10.33	245.2±20.80	257.3±13.85	
6	260.5±14.74	269.5±18.92	252.7±21.72	262.6±18.97	
7	268.3±17.13	279.0±20.92	259.8±21.37	269.9±14.86	
8	274.0±18.27	283.3±14.91	270.1±24.86	275.4±16.15	
9	282.0±18.70	280.6±17.73	276.8±28.69	278.9±17.80	
10	287.9±16.98	295.3±16.26	280.6±28.67	284.8±18.36	
11	293.9±17.23	297.5±15.02	282.3±28.55	290.7±16.12	
12	300.0±19.35	304.9±16.98	288.5±29.85	294.4±18.47	
13	303.8±19.87	308.1±20.41	292.5±33.36	292.2±18.52	
gains ^{a)}	141.6±15.50	146.4±14.59	133.8±30.18	133.2±14.58	

^{a)} Weight gains are body weight difference between week 13 and week 0.

Table 3-1. Food consumptions of male rats

STUDY: 17-REO-001		FOOD CONSUMPTIONS (g)			SEX: MALE
WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
0	24.1±0.59	24.9±1.77	25.6±1.52	25.4±1.11	
1	23.4±0.50	23.2±1.17	22.2±0.94	19.8±1.64	
2	25.1±0.70	25.5±1.20	24.5±0.78	23.7±1.37	
3	25.4±0.72	26.1±1.39	26.0±1.09	25.1±1.74	
4	25.4±0.93	26.0±1.69	26.6±1.57	25.2±1.43	
5	26.1±1.35	26.4±1.89	27.7±1.61	26.1±1.73	
6	26.0±1.84	26.7±2.08	28.0±1.50	26.4±1.81	
7	26.2±1.13	26.8±2.45	28.2±1.64	26.6±1.64	
8	26.4±1.41	26.6±2.28	28.0±1.88	25.8±1.82	
9	26.7±1.73	27.0±2.70	27.7±1.90	25.3±2.53	
10	26.6±1.96	26.4±2.39	28.0±1.61	25.9±2.03	
11	26.0±1.76	26.4±2.53	27.4±1.47	25.2±2.48	
12	25.8±1.32	26.8±2.32	28.7±1.69	25.5±3.20	
13	21.2±1.70	21.8±1.99	23.2±1.41	20.4±2.49	
Average	25.3±1.21	25.8±1.88	26.6±1.32	24.7±1.80	

Table 3-2. Food consumptions of female rats

STUDY: 17-REO-001		FOOD CONSUMPTIONS (g)			SEX: FEMALE
WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
0	17.5±0.82	18.5±2.17	17.8±2.25	19.2±1.80	
1	16.0±0.42	16.0±1.05	15.2±1.41	14.3±1.07	
2	16.7±0.77	17.7±1.70	16.8±1.76	17.6±1.17	
3	17.2±1.08	18.2±1.07	17.3±2.51	17.1±1.02	
4	17.9±1.21	8.6±1.47	17.3±2.26	18.7±1.08	
5	19.2±1.60	18.7±2.34	18.3±2.69	19.7±1.11	
6	17.6±0.75	19.7±2.79	17.2±1.80	18.5±0.72	
7	17.9±0.52	20.1±2.59	17.7±1.92	19.0±1.22	
8	17.2±0.51	18.6±0.92	18.0±0.94	18.7±0.82	
9	17.9±1.26	18.4±1.11	18.2±2.50	18.9±1.04	
10	17.8±1.00	19.0±1.61	17.4±2.47	18.9±0.80	
11	17.4±0.56	18.6±1.27	17.2±2.29	18.4±0.72	
12	17.2±0.75	19.0±1.46	17.4±1.16	18.6±1.52	
13	14.8±0.36	16.5±1.89	15.1±1.20	15.5±1.57	
Average	17.3±0.53	18.4±1.52	17.2±1.70	18.1±0.93	

Table 4-1. Ophthalmic findings of male rats

STUDY: 17-RE0-001		OPHTHALMIC FINDINGS				SEX : MALE
SITES	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
Left eye	Normal	5 / 5 ^{a)}	5 / 5	5 / 5	5 / 5	
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	

^{a)} Number of animals with the finding / Number of animals examined.

Table 4-2. Ophthalmic findings of female rats

STUDY: 17-RE0-001		OPHTHALMIC FINDINGS				SEX : FEMALE
SITES	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
Left eye	Normal	5 / 5 ^{a)}	5 / 5	5 / 5	5 / 5	
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	

^{a)} Number of animals with the finding / Number of animals examined.

Table 5-1. Urinalysis of male and female rats

STUDY: 17-REO-001			URINALYSIS							
TESTS	RESULT	SEVERITY	GROUPS (mg/kg/day)							
			MALE				FEMALE			
			G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
			0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
GLU	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
BIL	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
KET	-	0	1	1	2	1	5	5	5	5
	+/-	1	2	4	2	4				
	1+	2	2		1					
SG	1.005	0					1			
	1.010	1	1				1	2	2	
	1.015	2	2	1	1		2		1	
	1.020	3	1	4	2	2	1	2	1	3
	1.025	4			1	2		1		2
	1.030	5	1		1	1			1	
pH	6.5	0				1	1		1	1
	7	1			2	3	1		1	3
	7.5	2	1	1	2	1		1	2	
	8.0	3	2	2	1			1		1
	8.5	4	2	2			3	3	1	
PRO	-	0	1				4	3	4	
	+/-	1	1					2		
	1+	2	2	4	3	2				
	2+	3	1	1	2	3	1			5
	3+	4							1	
URO ^{a)}	0.2	0	5	5	5	5	5	5	5	5
NIT	-	0	4	5	5	5	5	4	5	5
	+	1	1					1		
OB	-	0	2	5	5	5	4	5	4	4
	+/-	1	2						1	1
	1+	2	1							
	2+	3					1			
LEU	-	0	2				4	3	3	
	+/-	1	3	2	1	2		2	1	
	1+	2		2	2		1			2
	2+	3			2	3			1	3
	3+	4		1						
No. of animals			5	5	5	5	5	5	5	5

^{a)} The unit of Urobilinogen is Ehrlich unit /dl

GLU: Glucose BIL: Bilirubin KET: Ketone body SG: Specific gravity PRO: Protein
URO: Urobilinogen NIT: Nitrite OB: Occult blood LEU: Leukocyte

Table 5-2. Urine sediments of rats

STUDY: 17-RE0-001			URINE SEDIMENTS							
TESTS	RESULT	SEVERITY	GROUPS (mg/kg/day)							
			MALE				FEMALE			
			G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
			0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
RBC	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
WBC	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
EPITHELIAL CELL	-	0	3	4	4	5	5	5	4	5
	+/-	1	2	1	1	0	0	0	1	0
CASTS	-	0	4	5	4	4	5	4	5	5
	+/-	1	1	0	1	1	0	1	0	0
No. of animals			5	5	5	5	5	5	5	5

Grade	RBC(mean/field)	WBC (mean/field)	Epithelial Cell	Casts (mean/field)
-	0	0	0 / 20 fields	0
+/-	≤4	≤5	Few / 20 fields	1
1+	5~8	6~20	Around 1 / few field	2~5

Table 5-3. Urine volume and color of rats

STUDY: 17-RE0-001		URINE VOLUME & COLOR				SEX: MALE
TESTS		GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
VOLUME (mℓ)		8.5±4.70	12.5±5.12	15.0±1.75	10.0±1.77	
COLOR-Yellow		5	5	5	5	
No. of animals		5	5	5	5	

STUDY: 17-RE0-001		URINE VOLUME & COLOR				SEX: FEMALE
TEST ITEMS		GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
VOLUME (mℓ)		11.0±2.44	16.0±3.67	13.0±5.77	14.5±2.32	
COLOR-Yellow		5	5	5	5	
No. of animals		5	5	5	5	

Table 6-1. Hematological values of male rats

STUDY: 17-RE0-001		HEMATOLOGICAL VALUES				SEX : MALE
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
WBC	10 ³ / μL	3.68±0.649	3.98±1.071	5.03±1.725*	6.11±1.375*	
RBC	10 ⁶ / μL	8.74±0.347	8.74±0.269	8.74±0.484	8.80±0.269	
HGB	g/dL	14.9±0.38	14.5±0.47	13.9±0.55	14.4±0.55	
HCT	%	45.8±1.38	44.9±1.43	43.9±1.79	45.3±1.91	
MCV	fL	52.4±1.39	51.4±0.83	50.3±1.96	51.6±1.61	
MCH	pg	17.0±0.43	16.6±0.38	16.0±0.74	16.4±0.48	
MCHC	g/dL	32.4±0.30	32.3±0.36	31.8±0.46	31.8±0.30	
RDW	%	13.1±0.51	13.3±0.42	13.8±0.60	13.5±0.28	
HDW	g/dL	2.64±0.106	2.74±0.132	3.03±0.329*	3.02±0.124*	
PLT	10 ³ / μL	932±70.3	1025±81.6*	1146±118.1*	1343±173.8*	
MPV	fL	7.2±0.37	7.2±0.40	7.4±0.42	7.3±0.31	
RET	%	1.79±0.221	2.00±0.254	2.38±0.252*	2.28±0.359*	
NEU	%	21.1±6.43	20.6±7.33	24.4±7.68	35.4±10.48*	
	10 ³ / μL	0.80±0.366	0.79±0.278	1.20±0.428	2.14±0.731	
LYM	%	72.9±7.50	73.9±7.64	69.4±7.54	59.6±10.25*	
	10 ³ / μL	2.66±0.351	2.98±0.956	3.51±1.271	3.66±1.153	
MONO	%	3.1±0.87	2.8±0.84	3.7±0.71	2.9±0.61	
EOS	%	1.6±0.50	1.5±0.56	1.1±0.38	0.6±0.31*	
BASO	%	0.2±0.09	0.2±0.09	0.1±0.07	0.2±0.10	
LUC	%	1.2±0.52	1.0±0.53	1.4±0.48	1.3±0.26	
No. of animals		10	10	10	10	

* Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.

Table 6-2. Hematological values of female rats

STUDY: 17-RE0-001		HEMATOLOGICAL VALUES				SEX : FEMALE
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
WBC	10 ³ /μL	1.51±0.406	1.73±0.460	1.91±0.804	2.46±0.819*	
RBC	10 ⁶ /μL	8.05±0.311	7.88±0.267	7.95±0.360	8.13±0.312	
HGB	g/dL	14.5±0.48	14.0±0.25*	13.8±0.34*	13.8±0.38*	
HCT	%	43.8±1.50	42.4±1.02	42.4±1.28	43.1±1.18	
MCV	fL	54.5±0.99	53.8±1.10	53.4±1.54	53.0±0.82	
MCH	pg	18.1±0.45	17.7±0.61	17.4±0.52	17.0±0.27	
MCHC	g/dL	33.2±0.45	33.0±0.55	32.7±0.47	32.0±0.35	
RDW	%	11.3±0.42	12.0±0.94	11.9±0.44	12.4±0.34*	
HDW	g/dL	2.25±0.072	2.51±0.297	2.41±0.149	2.53±0.116*	
PLT	10 ³ /μL	1003±88.3	992±108.8	1042±131.6	1329±136.2*	
MPV	fL	7.0±0.18	7.1±0.21	7.0±0.32	7.1±0.26	
RET	%	1.87±0.307	2.02±0.272	2.20±0.473	2.51±0.353*	
NEU	%	18.4±7.94	22.2±5.29	20.0±6.08	23.0±8.20	
	10 ³ /μL	0.28±0.150	0.38±0.143	0.38±0.198	0.55±0.217*	
LYM	%	75.9±8.67	72.9±4.66	76.0±6.70	71.8±9.19	
	10 ³ /μL	1.15±0.349	1.26±0.337	1.45±0.635	1.78±0.681	
MONO	%	2.4±0.58	2.5±0.90	1.8±0.68	2.9±1.10	
EOS	%	2.5±1.09	1.3±0.67*	1.3±0.56*	0.9±0.38*	
BASO	%	0.2±0.11	0.1±0.09	0.1±0.12	0.1±0.05	
LUC	%	0.6±0.30	0.9±0.35	0.8±0.50	1.3±0.53*	
No. of animals		10	10	10	10	

* Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.

Table 7-1. Serum biochemical values of male rats

STUDY: 17-RE0-001		SERUM BIOCHEMICAL VALUES				SEX: MALE
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
ALB	g/dl	3.3±0.08	3.4±0.11	3.4±0.08	3.4±0.12	
ALP	U/l	193±27.6	187±26.3	206±15.1	199±19.3	
ALT	U/l	29±3.5	29±7.1	43±12.3*	47±10.6*	
AST	U/l	102±34.0	106±27.0	195±82.2*	375±133.2*	
BIL	mg/dL	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	
BUN	mg/dL	15.0±1.60	14.1±1.57	14.6±2.52	17.6±1.58	
CHO	mg/dL	71±15.1	89±12.1	120±20.3	144±20.0*	
CPK	U/l	423±328.3	422±253.5	299±115.5	364±276.2	
CRE	mg/dL	0.6±0.03	0.6±0.06	0.6±0.04	0.6±0.09	
GGT	U/l	3.3±1.11	3.5±0.65	3.5±0.45	3.9±0.49	
GLU	mg/dL	173±12.0	177±17.0	176±14.0	146±27.0	
IP	mg/dL	5.98±0.408	6.19±0.506	6.81±0.519	7.78±0.695	
PRO	g/dl	6.0±0.22	6.0±0.22	6.1±0.18	6.1±0.31	
TG	mg/dL	49±25.7	32±13.7	40±14.3	32±10.4	
A/G	ratio	1.3±0.08	1.3±0.11	1.2±0.06	1.2±0.06	
Ca ²⁺	mg/dL	9.9±0.32	10.0±0.26	10.2±0.27	10.5±0.27	
Na ⁺	mmol/L	141.0±1.06	137.8±5.76	138.8±0.88	138.3±1.22	
K ⁺	mmol/L	4.2±0.20	4.5±0.37	4.6±0.32	4.8±0.41	
Cl ⁻	mmol/L	105.1±1.07	105.1±1.38	104.6±0.86	105.0±1.71	
No. of animals		10	10	10	10	

* Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.

Table 7-2. Serum biochemical values of female rats

STUDY: 17-RE0-001		SERUM BIOCHEMICAL VALUES				SEX: FEMALE
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
ALB	g/dl	3.4±0.08	3.5±0.13	3.4±0.14	3.4±0.16	
ALP	U/l	167±56.2	143±52.3	127±24.1	129±30.5	
ALT	U/l	22±5.9	23±4.4	31±9.2*	47±11.1*	
AST	U/l	88±24.2	92±21.8	124±45.3*	394±154.7*	
BIL	mg/dL	0.1±0.03	0.1±0.02	0.1±0.02	0.1±0.01	
BUN	mg/dL	14.4±1.39	13.1±2.01	13.6±2.63	15.7±4.78	
CHO	mg/dL	9.8±0.26	10.3±0.26	10.2±0.29	10.4±0.28	
CPK	U/l	69±14.8	121±23.7	132±20.6	188±45.4	
CRE	mg/dL	278±305.2	242±228.7	229±182.7	310±259.2	
GGT	U/l	0.6±0.04	0.6±0.09	0.6±0.05	0.6±0.08	
GLU	mg/dL	3.8±0.54	4.0±0.57	4.0±0.79	5.3±0.91	
IP	mg/dL	140±18.9	140±18.9	144±33.6	131±23.4	
PRO	g/dl	4.95±0.796	5.81±1.035	5.56±0.466	6.41±0.624	
TG	mg/dL	5.9±0.20	6.1±0.29	6.1±0.29	6.2±0.41	
A/G	ratio	29±7.3	34±8.6	37±12.3	36±13.0	
Ca ²⁺	mg/dL	1.4±0.14	1.3±0.07	1.3±0.09	1.2±0.14	
Na ⁺	mmol/L	140.4±1.30	138.5±0.63	139.3±1.07	137.3±1.18	
K ⁺	mmol/L	4.00±0.184	4.06±0.277	3.99±0.296	4.23±0.259	
Cl ⁻	mmol/L	107.2±1.00	106.7±0.30	107.7±0.90	106.8±2.00	
No. of animals		10	10	10	10	

* Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.

Table 8-1. Plasma coagulation values of male rats

STUDY: 17-RE0-001		PLASMA COAGULATION VALUES			SEX: MALE
TESTS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
PT (sec)	10.31±0.653	9.60±0.354	8.94±0.486	8.79±0.285	
APTT (sec)	16.9±1.78	15.8±1.03	14.8±1.82	14.9±1.11	
No. of animals	10	10	10	10	

Table 8-2. Plasma coagulation values of female rats

STUDY: 17-RE0-001		PLASMA COAGULATION VALUES			SEX: FEMALE
TESTS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
PT (sec)	10.24±0.441	9.41±0.580	9.49±0.419	9.00±0.346	
APTT (sec)	14.7±1.52	15.7±0.80	15.4±1.54	14.5±1.21	
No. of animals	10	10	10	10	

Table 9-1. Absolute organ weights of male rats

STUDY NO. : 17-RE0-001		ABSOLUTE ORGAN WEIGHTS (g)			SEX: MALE
ORGAN WEIGHT(g)	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
Adrenal(L)	0.0303±0.00512	0.0323±0.00666	0.0325±0.00428	0.0340±0.00742	
Adrenal(R)	0.0320±0.00641	0.0306±0.00549	0.0325±0.00427	0.0353±0.00673	
Pituitary	0.0132±0.00144	0.0136±0.00069	0.0140±0.00214	0.0126±0.00140	
Testis(L)	2.0003±0.41383	2.1821±0.16674	2.1976±0.53812	2.1197±0.35353	
Testis(R)	2.0036±0.37249	2.1845±0.17849	2.1212±0.60764	2.0352±0.36011	
Epididymis(L)	0.7306±0.10511	0.7527±0.04383	0.7040±0.13855	0.7031±0.09973	
Epididymis(R)	0.7332±0.08328	0.7304±0.04934	0.7436±0.13960	0.6859±0.08953	
Thymus	0.4550±0.08211	0.5563±0.10135	0.4687±0.08770	0.4117±0.08098	
Prostate	0.6613±0.17499	0.5932±0.11506	0.7600±0.15327	0.6085±0.11711	
spleen	0.9475±0.10699	0.9828±0.08225	1.1296±0.20871	0.9056±0.08222	
kidney(L)	1.5509±0.14972	1.6270±0.12662	1.8639±0.16123	1.8374±0.21858	
kidney(R)	1.5681±0.14348	1.6120±0.14568	1.8436±0.16651	1.8451±0.25554	
Heart	1.3961±0.19242	1.4060±0.08568	1.4847±0.12107	1.3644±0.08949	
Lung	1.7836±0.12847	1.8914±0.19785	2.0491±0.26323	1.9137±0.21072	
Brain	2.1585±0.09938	2.1879±0.05292	2.1624±0.06147	2.1014±0.14561	
Liver	13.0270±1.61627	14.3951±1.55977	17.5377±1.85700	18.1179±1.84884	
No. of animals	10	10	10	10	

* Represents a significant difference at $p < 0.05$ level compared with the vehicle control.

Table 9-2. Absolute organ weights of female rats

STUDY NO. : 17-RE0-001		RELATIVE ORGAN WEIGHTS (g)			SEX: MALE
ORGAN WEIGHT (g)	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
Adrenal(L)	0.0060±0.00107	0.0064±0.00153	0.0064±0.00108	0.0081±0.00224	
Adrenal(R)	0.0064±0.00150	0.0061±0.00129	0.0064±0.00103	0.0084±0.00208	
Pituitary	0.0026±0.00039	0.0027±0.00023	0.0028±0.00047	0.0030±0.00020	
Testis(L)	0.3942±0.08144	0.4338±0.05633	0.4301±0.09795	0.5042±0.10832	
Testis(R)	0.3951±0.07229	0.4337±0.05313	0.4151±0.11464	0.4837±0.10610	
Epididymis(L)	0.1444±0.01951	0.1494±0.01608	0.1379±0.02471	0.1670±0.03153	
Epididymis(R)	0.1449±0.01383	0.1450±0.01613	0.1461±0.02785	0.1629±0.03055	
Thymus	0.0902±0.01828	0.1104±0.02338	0.0917±0.01542	0.0976±0.02195	
Prostate	0.1312±0.03562	0.1173±0.02439	0.1488±0.02540	0.1444±0.03487	
spleen	0.1877±0.02311	0.1945±0.01788	0.2213±0.03745	0.2144±0.03029	
kidney(L)	0.3072±0.03128	0.3227±0.03658	0.3659±0.02513*	0.4350±0.07086*	
kidney(R)	0.3104±0.02861	0.3194±0.03494	0.3619±0.02853*	0.4358±0.07027*	
Heart	0.2758±0.03357	0.2781±0.01813	0.2913±0.01623	0.3227±0.03836	
Lung	0.3531±0.02708	0.3731±0.02939	0.4007±0.03067*	0.4523±0.06387*	
Brain	0.4278±0.03105	0.4338±0.03439	0.4260±0.03395	0.4961±0.05349	
Liver	2.5640±0.14417	2.8343±0.11762*	3.4341±0.19146*	4.2660±0.44077*	
No. of animals	10	10	10	10	

* Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.

Table 9-3. Absolute organ weights of female rats

STUDY NO. : 17-REO-001		ABSOLUTE ORGAN WEIGHTS (g)			SEX: FEMALE
ORGAN WEIGHT (g)	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
Adrenal(L)	0.0360±0.00540	0.0414±0.00592	0.0395±0.00626	0.0460±0.00670	
Adrenal(R)	0.0367±0.00418	0.0423±0.00628	0.0371±0.00911	0.0471±0.00441	
Pituitary	0.0147±0.00354	0.0158±0.00225	0.0143±0.00212	0.0148±0.00122	
Ovary(L)	0.0590±0.01952	0.0582±0.01455	0.0593±0.01618	0.0723±0.01302	
Ovary(R)	0.0626±0.01869	0.0590±0.01256	0.0567±0.01764	0.0763±0.01670	
Thymus	0.4367±0.36256	0.3366±0.04871	0.3024±0.08700	0.2706±0.05786	
spleen	0.6296±0.09192	0.6401±0.07093	0.6520±0.09832	0.7177±0.09227	
kidney(L)	0.8520±0.03844	0.9966±0.11552	0.9644±0.12564	1.1280±0.10117	
kidney(R)	0.8573±0.05088	1.0069±0.13680	0.9787±0.11506	1.1367±0.07518	
Heart	0.8558±0.06055	0.9264±0.06513	0.8772±0.10047	0.9603±0.04516	
Lung	1.3525±0.09133	1.3693±0.07453	1.3325±0.14425	1.4823±0.12871	
Brain	1.9810±0.05522	1.9588±0.10465	1.9018±0.05484	1.8807±0.05683	
Liver	6.8097±0.65493	8.4963±0.70705	9.3816±1.64153	12.5470±1.40189	
No. of animals	10	10	10	10	

* Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.

Table 9-4. Relative organ weights of female rats(% BODY WEIGHT)

STUDY NO. : 17-REO-001		RELATIVE ORGAN WEIGHTS (g)			SEX: FEMALE
ORGAN WEIGHT (g)	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	
Adrenal(L)	0.0127±0.00176	0.0144±0.00197	0.0151±0.00363	0.0174±0.00281	
Adrenal(R)	0.0129±0.00150	0.0147±0.00179	0.0141±0.00363	0.0178±0.00210	
Pituitary	0.0052±0.00122	0.0055±0.00076	0.0054±0.00084	0.0056±0.00064	
Ovary(L)	0.0208±0.00663	0.0202±0.00465	0.0221±0.00517	0.0273±0.00515*	
Ovary(R)	0.0220±0.00618	0.0205±0.00420	0.0212±0.00592	0.0286±0.00533*	
Thymus	0.1546±0.13348	0.1171±0.01720	0.1122±0.02703	0.1026±0.02551	
spleen	0.2209±0.02184	0.2233±0.03086	0.2448±0.02509*	0.2709±0.03710*	
kidney(L)	0.3005±0.01440	0.3456±0.02785*	0.3632±0.03328*	0.4260±0.04576*	
kidney(R)	0.3021±0.01135	0.3489±0.03598*	0.3695±0.03806*	0.4289±0.03192*	
Heart	0.3018±0.02021	0.3218±0.01503	0.3299±0.01493	0.3624±0.02304	
Lung	0.4773±0.03583	0.4770±0.03821	0.5024±0.03758	0.5607±0.06668*	
Brain	0.7005±0.05681	0.6818±0.04456	0.7260±0.11336	0.7108±0.05394	
Liver	2.3989±0.19873	2.9508±0.16492*	3.5186±0.40656*	4.7280±0.48349*	
No. of animals	10	10	10	10	

* Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.

Table 10-1. Necropsy findings of male rats

STUDY: 17-RE0-001		SEX: MALE			
ORGANS	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)
Testis	Undersized	1	0	1	0
Lung	Redness	1	1	0	0
No. of animals		10	10	10	10

Table 10-2. Necropsy findings of female rats

STUDY: 17-RE0-001		SEX: FEMALE			
ORGANS	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)
Uterus	Retention of clear fluid	0	0	0	1
No. of animals		10	10	10	10

Table 11-1. Histopathological findings of male rats

STUDY: 17-RE0-001		SEX: MALE			
ORGANS	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)
Adrenal gland	Inflammatory cells infiltration	1			-
Pituitary gland	Cyst, pars distalis	1			1
Testis	Atrophy	-			1
Kidney	Regeneration	1	1	2	2
Liver	Focal inflammation	3			3
	Vacuolated hepatocytes	1			-
	Fibrosis	-			1
Lung	Alveolar macrophage accumulation	-	-	-	1
Heart	Inflammatory cells infiltration	2			-
Stomach	Inflammatory cells infiltration	1			-
No. of animals		10	10	10	10

" - " = no finding , " " = no slide

Table 11-2. Histopathological findings of female rats

STUDY: 17-RE0-001		SEX: FEMALE			
ORGANS	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)
Kidney	Mineralization	3	1	4	2
Bladder	Inflammatory cells infiltration	-			1
	Necrosis	1			-
Liver	Focal inflammation	3			2
	Vacuolated hepatocytes	4			
Lung	Alveolar macrophage accumulation	-	-	1	3
Stomach	Inflammatory cells infiltration	-			1
Harderian gland	Inflammatory cells infiltration	1			-
No. of animals		10	10	10	10

" - " = no finding , " " = no slide

○ 결과의 요약

(1) 결과 요약

① 수컷의 시험물질-유래 변화

결과의 경중-따른 분류	측정지표	투여용량 (mg/kg/day)
시험물질-유래 중요한 변화	없음	
시험물질-유래 경미한 변화	체중 감소	2000
	요검사(pH 증가)	2000
	혈액학(PLT 증가)	500, 1000, 2000
	혈액학(WBC, HDW, RET 증가)	1000, 2000
	혈액학(NEU 증가)	2000
	혈액학(LYM, EOS 감소)	2000
	생화학(AST, ALT 증가)	1000, 2000
	생화학(CHO 증가)	2000
	장기중량(양쪽신장, 폐 증가)	1000, 2000
	장기중량(간 증가)	500, 1000, 2000
비시험물질-유래 변화	혈액학(HGB, HCT 감소)	1000
	혈액학(MCH 감소)	1000, 2000
	생화학(BUN 증가)	1000
	생화학(PRO 증가)	1000, 2000
	생화학(CPK 감소)	1000, 2000
	전해질(K ⁺ 증가)	1000, 2000
	응고(APTT 감소)	500, 1000, 2000
	응고(PT 감소)	1000, 2000
	장기중량(뇌, 좌측고환 증가)	2000
	부검소견(고환 왜소)	0, 1000
	부검소견(폐 발적)	0
	조직병리(부신 염증세포 침윤)	0
	조직병리(뇌하수체 낭포)	0, 2000
	조직병리(고환 생식세포 위축)	2000
	조직병리(신장 세노관 재생)	0, 500, 1000, 2000
	조직병리(간 국소적 염증)	0, 2000
	조직병리(간 간세포 공포)	0
	조직병리(간 섬유화)	2000
	조직병리(폐 폐포 마트로파아지 응집)	2000
	조직병리(심장 염증세포침윤)	0
조직병리(위 염증세포침윤)	0	

② 암컷의 시험물질-유래 변화

결과의 경중-따른 분류	측정지표	투여용량 (mg/kg/day)
시험물질-유래 중요한 변화	없음	
시험물질-유래 경미한 변화	요검사(PRO, LEU 증가)	2000
	혈액학(WBC, RDW, HDW, PLT, RET, NEU, LUC 증가)	2000
	혈액학(EOS 감소)	500, 1000, 2000
	생화학(AST, ALT 증가)	1000, 2000
	장기중량(양쪽신장, 간 증가)	500, 1000, 2000
	장기중량(양쪽난소, 폐 증가)	2000
	장기중량(비장 증가)	1000, 2000
비시험물질-유래 변화	일반증상(보행이상)	1000
	혈액학(MCH 감소)	1000, 2000
	혈액학(MCV, MCHC 감소)	2000
	생화학(CPK, GLU 증가)	2000
	생화학(Ca ²⁺ 감소)	2000
	생화학(GGT 감소)	1000, 2000
	전해질(Na ⁺ 감소)	500, 2000
	응고(PT 감소)	500, 1000, 2000
	장기중량(심장 증가)	500, 1000, 2000
	장기중량(우측부신 증가)	1000, 2000
	장기중량(좌측부신 증가)	2000
	부검소견(자궁 맑은액체 저류)	2000
	조직병리(신장 무기질침착)	0, 500, 1000, 2000
	조직병리(방광 염증세포침윤)	2000
	조직병리(방광 괴사)	0
	조직병리(간 국소적 염증)	0, 2000
	조직병리(간 간세포 공포)	0
	조직병리(폐 폐포 마트로파아지 응집)	1000, 2000
	조직병리(위 염증세포침윤)	2000
	조직병리(하더선 염증세포침윤)	0

(2) 독성판정

- ① 암수 모두에서 시험물질-유래 중요한 변화 없이 시험물질-유래 경미한 변화가 2000 mg/kg/day에서 확인되어 시험의 독성판정 기준에 따라 Sprague-Dawley 랫드에 있어서 지각추출물의 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대무독성용량)은 2000 mg/kg/day로 판단된다.
- ② 따라서, 지각추출물은 암수 모두에서 NOAEL이 2000 mg/kg/day로 판단되며, 표적장기는 관찰되지 않았다.

○ 고찰

- 본 시험은 지각추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 90일 반복 경구투여하였을 때 나타나는 독성 정도를 알아보기 위해 수행되었다. 개발되는 건강기능식품의 높은 임상예정용량에 맞게 2000 mg/kg/day 를 최고농도로 하여 공비2를 두어 1000, 500 mg/kg/day로 투여량을 설정하였다.
- 시험의 결과, 독성판정기준에 따라 지각추출물은 암수 모두에서 NOAEL(최대무독성용량)이 2000 mg/kg/day로 판단되었다.
- 수컷에서 NOAEL(최대무독성용량)의 판단기준이 되는 시험물질-유래 경미한 변화는 체중, 생화학, 혈액학, 장기중량, 요검사 결과에서 나타났다.
수컷 체중의 증체량 (weight gains) 에서 대조군과 비교하여 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 대조군과 비교하여 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 21.0%의 증체량 감소가 나타났지만 저용량군(500 mg/kg/day) 및 중용량군 (1000 mg/kg/day)에서는 미약하게 증체량이 증가하여 용량의존성이 없었고, 매주 측정된 체중 결과에서 체중의 감소가 나타나지 않아 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.
수컷 생화학 검사에서 AST (Aspartate aminotransferase) 및 ALT(Alanine aminotransferase) 수치가 대조군과 비교하여 중용량군 (1000 mg/kg/day) 및 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. AST(Aspartate aminotransferase)는 중용량군 및 고용량군에서 각각 48.3%, 62.1% 증가하였고, ALT(Alanine aminotransferase)는 각각 91.2%, 267.6% 증가하는 등 용량의존적인 증가를 보였다. 하지만 간(Liver) 의 조직병리 검사 결과, 국소적인 염증 (focal inflammation), 간세포 공포 (vacuolated hepatocytes), 섬유화 (fibrosis) 등이 관찰되었지만 랫드에서 일반적으로 발생하는 증상으로 간독성으로 판단하기는 힘들었다. 따라서 AST (Aspartate aminotransferase) 및 ALT(Alanine aminotransferase) 수치증가는 가역적인 변화가 예상되는 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. CHO(Total cholesterol) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 102.8%로 증가하였으며, 용량의존성도 나타났다. 하지만 지질대사 이상을 판단할 TG(Triglyceride) 수치에서 이상변화가 관찰되지 않았으며, 이외 특이 병변이 관찰되진 않아 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.

수컷 혈액학 검사에서 PLT(Platelet) 수치가 모든 시험군(500, 1000, 2000 mg/kg/day)에서 증가하였다. PLT(Platelet) 증가의 원인은 적혈구 증가증과 출혈 등이 있는데 검사결과에서 볼 때 적혈구 수치가 정상적이며, 부검 소견 등에서 시험군의 출혈 증상은 관찰되지 않아 PLT(Platelet) 수치는 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. WBC(White blood cell count)와 NEU(Neutrophil) 수치가 대조군과 비교하여 중, 고용량군(1000, 2000 mg/kg/day) 및 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 각각 증가하였고, LYM(Lymphocyte) 및 EOS (Eosinophil) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 감소하였는데, 원인이 되는 세균성 감염 또는 염증성 반응을 보이는 조직병리학적 소견과 부검소견이 관찰되지 않아 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 그 밖에 RET(Reticulocyte) 및 HDW(Hb cone, distribution width) 수치 상승, MCH(Mean corpuscular hemoglobin) 수치 감소는 빈혈 및 적혈구 수치와 같은 연관된 검사결과에서 특이점이 없어 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.

장기중량 결과, 부검전 체중 대비 상대중량 (Relative organ weights)에서 양쪽 신장(kidney) 및 폐 (Lung) 의 중량이 중용량군 (1000 mg/kg/day), 고용량군 (2000 mg/kg/day)에서 증가하였다. 신장의 경우 중용량군에서 19.1%(Lt), 16.6%(Rt), 고용량군에서 41.6%(Lt), 40.4%(Rt) 증가하였다. 하지만 조직병리검사에서 재생(regeneration)등의 증상이 대조군과 함께 나타나는 등 시험물질에 의한 병변이 관찰되지않아 신장의 장기중량 증가는 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 폐의 경우 중용량군에서 13.5%, 고용량군에서 28.1% 증가하였다. 하지만 폐의 조직병리 검사에서 폐포 마크로파아지 응집 (Alveolar macrophage accumulation)이 수컷 고용량군 1례에서만 나타났으며, 이는 랫드가 나이가 들어감에 따라 자연발생적으로 나타날 수 있는 증상으로 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 간(Liver)의 상대중량 (Relative organ weights)이 대조군과 비교하여 모든 시험군(500, 1000, 2000 mg/ kg/ day) 에서 각각 10.5% , 33.9% , 66.4% 증가하였다. 간독성의 판단하기 위한 조직병리검사서 간의 국소적인 염증 (focalinflammation) 이 고용량군에서 3 례가 관찰되었지만 대조군에서도 3례 가 관찰되어 독성으로 판단하기 어려워 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.

- 암컷에서 NOAEL(최대무독성용량)의 판단기준이 되는 시험물질-유래 경미한 변화는 생화학, 혈액학, 장기중량, 요검사 결과에서 나타났다.

암컷 생화학 검사에서 AST (Aspartate aminotransferase) 및 ALT(Alanine aminotransferase) 수치가 대조군과 비교하여 중용량군 (1000 mg/kg/day) 및 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. AST(Aspartate aminotransferase)는 중용량군 및 고용량군에서 각각 40.9%, 113.6% 증가하였고, ALT(Alanine aminotransferase)는 각각 40.9%, 347.7% 증가하는 등 용량의존적인 증가를 보였다. 하지만 간 (Liver) 의 조직병리 검사 결과, 국소적인 염증 (focal inflammation), 간세포 공포(vacuolated hepatocytes) 등이 관찰되었지만 랫드에서 일반적으로 발생하는 증상으로 간독성으로 판단하기는 힘들었다. 따라서 AST(Aspartate aminotransferase) 및 ALT(Alanine aminotransferase) 수치증가는 가역적인 변화가 예상되는 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.

암컷 혈액학 검사에서 WBC(White blood cell count), NEU(Neutrophil), LUC(Large

unstained cells) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군 (2000 mg/kg/day)에서 증가하였고, EOS(Eosinophil) 수치가 대조군과 비교하여 모든 시험군(500, 1000, 2000 mg/kg/day)에서 감소하였는데, 원인이 되는 세균성 감염 또는 염증성 반응을 보이는 조직병리학적 소견과 부검소견이 관찰되지 않아 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. RDW(Red cell distribution width), PLT(Platelet), RET(Reticulocyte) 및 HDW(Hb cone, distribution width) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군 (2000 mg/kg/day)에서 증가 하였는데, 증가의 원인은 빈혈, 적혈구증가증 및 출혈 등이 있다. 검사결과에서 볼 때 이를 뒷받침 할 적혈구 수치, 부검 소견 및 조직병리 결과에서 이상소견이 관찰되지 않아 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.

장기중량 결과, 부검전 체중 대비 상대중량 (Relative organ weights)에서 양쪽 신장(kidney) 및 간(Uver)의 중량이 모든 시험군(500, 1000, 2000 mg/kg/day)에서 증가하였다. 신장의 경우 저용량군에서 15.0%(Lt), 15.5%(Rt), 중용량군에서 20.9%(Lt), 22.3%(Rt), 고용량군에서 41.8%(Lt), 42.0%(Rt) 증가하였다. 하지만 조직병리 검사에서 무기질침착 (mineralization)등의 증상이 대조군과 함께 나타나는 등 시험물질에 의한 병변이 관찰되지 않아 신장의 장기중량 증가는 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 간(Liver)의 경우 모든 시험군에서 각각 23.0%, 46.7%, 97.1% 증가하였다. 간독성의 판단하기 위한 조직병리 검사에서 간의 국소적인 염증(focal inflammation)이 고용량군에서 2례가 관찰되었지만 대조군에서도 3례가 관찰되어 독성으로 판단하기 어려워 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 양쪽난소(Ovary) 및 폐(Lung)의 상대중량 (Relative organ weights)이 고용량군(2000 mg/kg/day)에서, 비장(Spleen)의 상대중량 (Relative organ weights)이 중용량군(1000 mg/kg/day), 고용량군 (2000 mg/kg/day) 에서 증가하였다. 양쪽난소의 경우 조직병리 검사에서 이상소견이 관찰되지 않아 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 폐의 경우 고용량군에서 17.5%의 중량 증가가 나타났으며, 조직병리검사에서 마크로파아지 응집(Alveolar macrophage accumulation)이 중용량군에서 1례, 고용량군에서 3례가 나타났다. 이는 랫드가 나이가 들어감에 따라 자연발생적으로 나타날 수 있는 증상으로 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 비장의 경우 중, 고용량군에서 각각 10.8%, 22.6% 증가하였지만, 조직병리 검사에서 이상소견이 관찰되지 않아 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.

요검사에서 PRO(Protein) 및 LEU(leukocyte)수치가 고용량군(2000 mg/kg/day)에서 증가하였지만 신장 및 방광의 조직병리 검사에서 시험물질에 의한 이상소견이 관찰되지 않아 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.

- NOAEL(최대무독성용량) 의 판단기준이 되는 시험물질-유래 경미한 변 화 이외에 통계적 유의성은 있었지만 시험물질 투여에 의 한 변화가 아 닌 비시험물질-유 래 변화가 암수 모두에서 혈액학, 생화학, 응고 및 전해질검사와 부검소견, 장기중량 및 조직병리검사 등에서 관찰되었다. 이러한 결과들은 용량의존성이 없거나 감소폭이 작은 정상범위 (histories data) 내의 변화이거나 대조군에서 관찰되는 자연발생적 증상으로 본 시험물질의 투여로 인한 결과로 판단할 수 없어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 조직병리검사에서 고용량군에서 뇌하수체, 고환, 방광, 위 등에서 병변이 나타났으나 대 조군에서도 나타나는 개체특이적 현상이거나 나이가 많아짐에 따라 나타나는 자연발생

적 병변으로 판단되었다. 수컷 신장과 암컷 신장의 중량이 유의한 변화를 보였으나 조직 검사 결과, 수컷 신장에 나타난 재생(regeneration)은 시험물질 농도에 비례하여 나타나지는 않았다. 암컷 신장에서 나타난 무기질침착(mineralization)은 랫드의 배경 병변으로 자주 나타나는 증상으로 본 시험에서도 시험물질 농도에 비례하여 나타나지는 않았다. 간장 중량이 시험물질의 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였으나, 조직병리검사 결과에서는 시험물질에 의한 특이한 병변은 없었다. 폐에서 나타난 폐포 마크로파아지응집(Alveolar macrophage accumulation)이 수컷 고농도군 1마리와 암컷 중농도군 1마리와 고농도군 3 마리에서 나타났으나 폐포 마크로파아지 응집은 랫드가 나이가 들어감에 따라 자연발생적으로 나타날 수 있는 증상으로 시험물질에 의한 영향으로 판단하기에는 병변 발생 개체수가 적은 것으로 판단되었다. 조직검사 결과로 보아 본 시험에서는 시험물질에 의한 뚜렷한 표적장기는 없었다.

- 따라서, 지각추출물은 암수 모두에서 NOAEL이 2000 mg/kg/day로 판단되며, 표적장기는 관찰되지 않았다.

최 종 보 고 서

지각추출물(*Citrus aurantium* extract)의
Sprague-Dawley 랫드를 이용한
90일 반복경구투여 독성시험

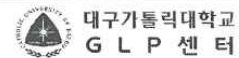


시 험 번 호 : 17-RE0-001

최종보고서 발행일 : 2017. 11. 13

시 험 의뢰 기 관 : ㈜ 뉴트라팜텍
경기도 용인시 기흥구 동백중앙로 61-19
옐로우존 301호

시 험 기 관 : 대구가톨릭대학교 GLP센터
경북 경산시 하양읍 하양로 13-13



<그림 7. 반복독성시험 보고서>

5) 인체적용 시험용 시험식품 생산 준비

- 지각추출물의 기억력개선 임상시험 수행을 위하여 지각추출물을 원료로 하는 인체적용 시험용 시험식품 생산을 위하여, 지각추출물 함량 및 제형의 성분 비 등을 설정하였다.
- 임상시험용 식품의 지각추출물 함량은 원료 표준화 연구결과 및 유효섭취량 연구결과를 바탕으로 유효농도 100 mg/kg 로 설정하였음.
- 임상시험용 식품은 (주)RP Corp과 생산계약을 체결하였다.
- 임상시험용 식품과 대조식품의 배합비율은 다음과 같이 설정하였다.

▪ 시험식품 원재료 및 배합비율:

원료명	함량(mg)	배합비율(%)
지각추출물	200.0025	44.445
유당	54.000	12.000
결정셀룰로오스	140.648	31.255
카르복시메틸셀룰로오스-칼슘	13.500	3.000
히프로멜로오스프탈레이트	22.500	5.000
글리세린지방산에스테르	2.250	0.500
아산화티타늄	4.500	1.000
코치닐색소	1.350	0.300
이산화규소	2.250	0.500
스테아린산마그네슘	9.000	2.000
합계	450	100

▪ 대조식품 원재료 및 배합비율:

원료명	함량(mg)	배합비율(%)
덱스트린	200.0025	44.445
유당	54.000	12.000
결정셀룰로오스	140.648	31.255
카르복시메틸셀룰로오스-칼슘	13.500	3.000
히프로멜로오스프탈레이트	22.500	5.000
글리세린지방산에스테르	2.250	0.500
아산화티타늄	4.500	1.000
코치닐색소	1.350	0.300
이산화규소	2.250	0.500
스테아린산마그네슘	9.000	2.000
합계	450	100

나. 경희대학교 (참여기관) : 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구 (세부과제명)

1) 지각 추출물의 기억력 개선 효능연구(동물실험) 및 섭취량 설정

○ 기억력개선 효과탐색을 위한 시험동물 제작

- 6주령의 SD-rat(Male)을 구입한 후 1주일 동안 동물사육실의 환경 안에서 순화시킨 후, 건강한 개체를 선별하여 실험에 사용하였다. 온도($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$), 상대습도($50 \pm 20\%$), 환기횟수 10~15회/시간, 조명주기 12시간(8:00~20:00)의 사육 환경으로 설정된 사육실에서 사료와 음용수를 급여하였으며, 순화 및 시험기간 동안 격리사육을 실시하였다.
- 기억력 감퇴 유발을 위해 PBS에 녹인 스코폴라민(Scopolamine)을 1 mg/kg의 농도로 조제하여 상기 실험동물에 복강투여하였다. 스코폴라민은 중추신경계의 콜린성 신경의 손상에 의해 나타나는 현상과 유사한 기억력감퇴를 나타낸다.

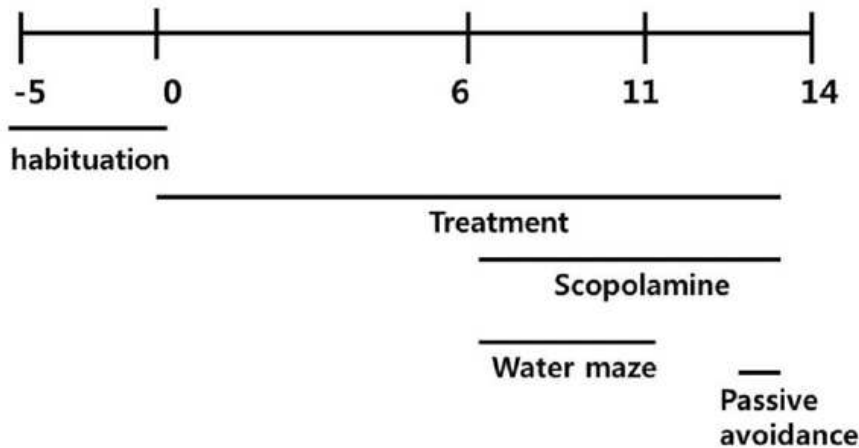
○ 지각 및 유사종 추출물의 기억력 개선 효과 검증실험

- 실험군은 다음 표 6에 나타난 바와 같이, 무처리군(Normal), 스코폴라민만을 투여한 대조군(Control), 지각 주정 추출물, 진굴 주정 추출물, 시퀘샤 주정추출물 또는 지각 초임계 추출물을 투여한 실험군으로 구성하였다.
- 각 추출물을 DMSO에 용해하여 12.5, 25, 50 또는 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 제조한 후 실험에 사용하였다.

표 6. 기억력 개선 실험군 구성

실험군	시험물질	동물 수
무처리군	-	7
대조군	Scopolamine (1mg/kg)	7
지각 주정추출물	Scopolamine (1mg/kg) + 추출물 (100 mg/kg)	7
진굴 주정추출물	Scopolamine (1mg/kg) + 추출물 (100 mg/kg)	7
시퀘샤 주정추출물	Scopolamine (1mg/kg) + 추출물 (100 mg/kg)	7
지각 초임계추출물1	Scopolamine (1mg/kg) + 추출물 (50 mg/kg)	7
지각 초임계추출물2	Scopolamine (1mg/kg) + 추출물 (100 mg/kg)	7

- 실험 스케줄은 그림 10에 나타난 바와 같이, 14일간 24시간 간격으로 시험물질을 투여하였으며(treatment), 투여 6일 차부터 1 mg/kg의 스코폴라민을 복강투여 하였다. 스코폴라민을 투여와 함께 4일간 인지능력평가(Water maze test)를 실시하였으며, 이후 행동평가(Passive avoidance test)를 수행하였다.



<그림 10. 동물시험 과정>

(1) 모리스 인지능력 평가(Morris water maze test)

- 스코폴라민의 투여로 인한 기억력 감퇴에 있어서 상기 지각 초임계 추출물 및 진굴 주정추출물, 시퀘샤 주정추출물, 지각 주정추출물의 투여를 통해 인지능력 및 기억력 개선 효과를 확인하고자 모리스 인지능력 평가를 실시하였다.

- 구체적으로, 지름 180 cm 및 높이 50 cm의 수중 미로 장치에서 탈출 플랫폼(white platform)의 지름은 6 cm로 구성되었다. 온도가 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 되는 물이 30 cm 높이로 채워지게 하였으며, 미로 주변은 비디오카메라, 실험대 그리고 수조 주위 벽면에 걸려 있는 각종 도형 모양의 공간단서(Cue)들을 일정하게 유지하였다.

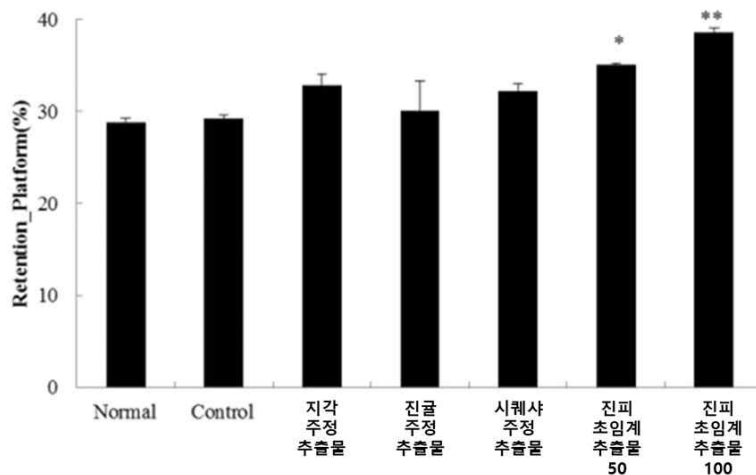
미로에 물의 높이가 30 cm가 되도록 물을 채우고 마우스가 플랫폼을 볼 수 없도록 플랫폼을 물 높이의 1 cm 밑에 설치하였다. 수중 미로는 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)의 사분면으로 구분되고, 이중 북동 사분원의 중심부에 도피대가 놓여지며, 나머지 중 하나가 출발 위치로 사용되었다. 실험동물은 하루에 180초간 4행씩 4일간 훈련을 받으며(Acquisition test), 4일째 마지막 시행이 끝나면 자유수영 검사가 시행되는데(Retention test) 이때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하게 하였다. 모든 동물들의 행동은 비디오 카메라로 녹화하였으며, 훈련 시행에서는 출발에서부터 도피대에 올라가는데 걸린 시간을 S-MART 프로그램(Pab Lab, spain) 이용하여 측정하였다.

- 그 결과, 표 7에 나타낸 바와 같이 4일 동안 도피대에 도달하기까지 걸리는 시간을 측정하는 획득시행에서 1일째 무처리군은 119.88 ± 17.0 초, 대조군은 176.67 ± 12.5 , 진피 주정추출물 투여군은 173.60 ± 19.3 초, 진굴 주정추출물 투여군은 177.89 ± 5.6 초, 시퀘샤 주정추출물 투여군은 175.32 ± 12.3 초, 지각 초임계추출물 50 mg/kg 투여군은 160.90 ± 9.3 초, 지각 초임계추출물 100 mg/kg 투여군은 165.33 ± 11.8 초로 유의성 없이 비슷하게 나타났다.

표 7. 지각 및 유사종 추출물 투여에 의한 자유수영검사 결과

시험물질	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
무처리군	119.88	79.21	25.63	19.5
대조군	176.67	145.07	92	55.53
지각 주정추출물 100 mg/kg	173.6	127.33	69.87	47.47
진굴 주정추출물 100 mg/kg	177.89	154.35	88.45	52.21
시퀘샤 주정추출물 100 mg/kg	175.32	132.35	75.31	49.56
진피 초임계추출물 50 mg/kg	160.9	105.9	68.48	38.76
진피 초임계추출물 100 mg/kg	165.33	110.58	50	34.75

- 반면, 학습이 진행됨에 따라 4일째에는 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 무처리군은 19.50 ± 11.0 초였으며, 대조군은 55.53 ± 16.2 초로 지각 주정추출물, 진굴 주정추출물 또는 시퀘샤 주정추출물 투여군은 대조군과 비교하여 유의성 없이 비슷한 결과를 보였으나, 지각 초임계추출물 50 mg/kg 투여군은 38.76 ± 10.6 , 지각 초임계추출물 100 mg/kg 투여군은 34.75 ± 16.32 초로 도피대에 도달하는 시간이 점차 감소하여 학습 수행에 따른 인지 능력의 유의한 증진효과가 관찰되었다($P < 0.05$).
- 또한, 수중 미로 학습에서 마지막 날인 4일째에 도피대를 제거하고 도피대가 있었던 사분면이 머무르는 정도를 측정하여 도피대의 위치에 대한 기억을 보유하고 있는지 확인하였다.
- 그 결과, 그림 11에 나타난 바와 같이 무처리군은 $28.83 \pm 0.5\%$, 대조군은 $29.21 \pm 0.4\%$ 였으며, 지각 주정추출물 투여군은 $32.86 \pm 1.2\%$, 진굴 주정추출물 투여군은 $30.1 \pm 3.2\%$, 시퀘샤 주정추출물 투여군은 $32.2 \pm 0.8\%$ 로 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다.
- 반면, 지각 초임계추출물 50 mg/kg 투여군은 $35.04 \pm 0.2\%$, 지각 초임계추출물 100 mg/kg 투여군은 $36.57 \pm 0.5\%$ 로 대조군에 비해 증가된 경향을 나타내어, 공간기억력에 대한 증진효과가 있음을 확인하였다($P < 0.05$).



<그림 11. 지각 추출물의 공간기억력 증진효과>

○ 기억장애 동물모델(TMT)에서 지각 추출물의 기억력 개선 효능의 행동학적 검증

(1) 수동적 회피반응 실험(Passive avoidance test)

- 스코폴라민의 투여로 인한 기억력 감퇴에 있어서 상기 지각 초임계추출물 및 지각 주정추출물, 진굴 주정추출물, 시퀘샤 주정추출물의 투여로 인한 기억력 개선 효과를 확인하고자 하였다.
- 구체적으로, 본 실험 8시간 전 밝은 불빛이 드는 챔버(chamber)와 어두운 챔버가 작은 통로로 연결되어 있는 상황에서, 밝은 불빛이 드는 챔버에 실험동물을 놓아두었다. 실험동물은 본능적으로 어두운 챔버로 들어가게 되지만, 어두운 챔버에서는 전기쇼크(Electric shock)와 같은 혐오자극을 주어 공포학습을 시켰다. 학습 8시간 후, 밝은 빛의 챔버에 실험동물을 두었을 때, 어두운 암소의 챔버에 들어갈 때까지의 시간, 즉 수동회피반응시간(Step latency; sec)을 측정하여 이를 수치화하였다.
- 그 결과, 표 8에 나타낸 바와 같이 무처리군에 비해서 스코폴라민의 투여로 인한 기억력 감퇴를 유발시킨 대조군의 경우 수동회피반응시간이 감소하였다. 반면, 비교예 1, 2 또는 3의 추출물을 투여하거나 실시예 1의 추출물 투여한 경우 수동회피반응시간이 증가하였으며, 특히 실시예 1의 추출물을 투여한 경우 농도 의존적으로 수동회피반응시간이 증가하여 무처리군과 유사하게 개선되었다 ($P < 0.05$).

표 8. 지각 추출물 투여에 의한 수동회피반응시험 결과

시험물질	수동회피 반응시간 (sec)	개선률 (%)
무처리군	32.1	-
대조군	15.7	0
Scopolamine (1mg/kg) + 지각 주정추출물 100 mg/kg	22.4	30
Scopolamine (1mg/kg) + 진굴 주정추출물 100 mg/kg	18.5	25.2
Scopolamine (1mg/kg) + 시퀘샤 주정추출물 100 mg/kg	21.8	28
Scopolamine (1mg/kg) + 진피 초임계추출물 50 mg/kg	26.5	41
Scopolamine (1mg/kg) + 진피 초임계추출물 100 mg/kg	30.9	49.2

2) 지각 추출물의 기억력 개선 작용기전 연구

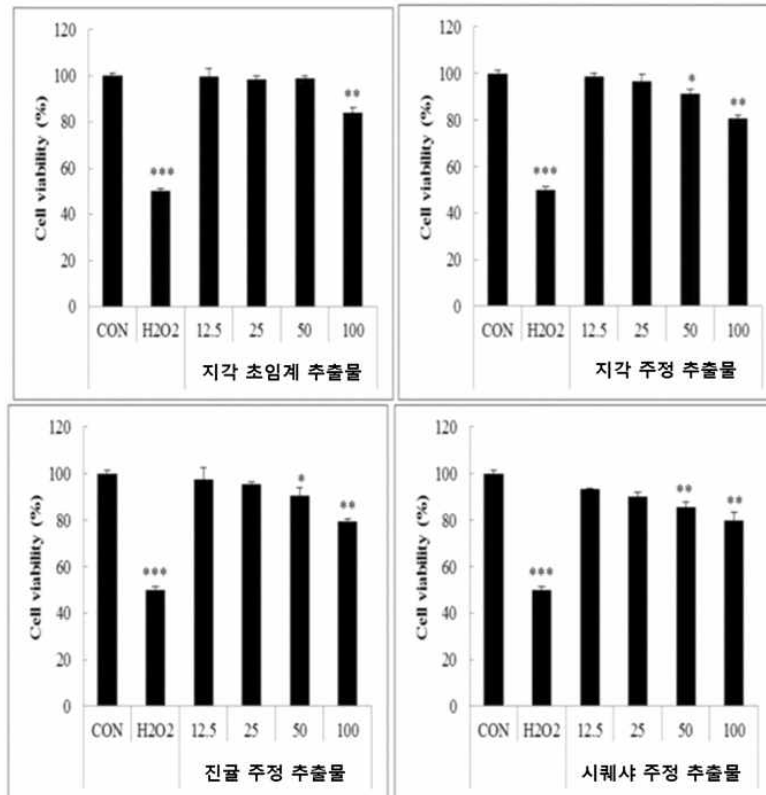
○ 세포주 기반 신경세포 보호 및 세포사멸 억제 효과 검증 및 분자기전 연구

(1) 지각추출물의 신경세포 보호 효과 확인

- 지각 초임계추출물 및 지각 주정추출물, 진굴 주정추출물, 시퀘샤 주정추출물이 과산화수소로 유발된 세포독성에 미치는 영향을 확인하기 위해 다음의 실험을 수행하였다.
- 구체적으로, 생쥐 해마 유래 HT22 세포주는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였으며,

10% 소태아 혈청(Fetal bovine serum), 페니실린(Penicillin) 및 스트렙토마이신(Streptomycin)을 함유한 DMEM 배지에서 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포 생존률 측정을 위해, HT22 세포를 5×10^4 과산화수소(H₂O₂)를 처리하고 실험군으로써 지각 초임계추출물 및 지각 주정추출물, 진굴 주정추출물, 시퀘샤 주정추출물을 농도별(12.5, 25, 50, 100 µg/ml)로 처리하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건으로 12시간 동안 배양한 후 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; sigma-aldrich Co.) 분석을 통해 세포독성을 계산하였다. 세포 생존률은 MTT 시약(5 mg/ml)을 20 µl/well로 첨가하고 2시간 동안 배양한 후, 배양 상등액을 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO(Dimethyl sulfoxide, Wako)로 녹인 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- 상기 실험방법에 의해 배양된 세포에 세포 독성 유발을 위해 800 µM의 과산화수소(H₂O₂)를 처리하였다. 이후, 지각 초임계추출물 및 지각 주정추출물, 진굴 주정추출물, 시퀘샤 주정추출물을 농도별(12.5, 25, 50 µg/ml)로 처리하였으며, 대조군으로써 DMSO를 처리하였다. 이후 세포 생존률을 측정하였다.
- 그 결과, 그림 12에 나타난 바와 같이 지각 초임계 추출물의 방법으로 추출된 추출물 처리는 농도 의존적으로 과산화수소로 유발된 산화독성으로부터 세포를 보호하는 효과가 확인되었으나, 지각 주정추출물, 진굴 주정추출물 또는 시퀘샤 주정추출물이 처리된 세포에서는 세포 보호 효과를 확인할 수 없었다.



<그림 12. 지각 추출물의 세포 보호 효과>

2-2. 2차년도

가. (주)뉴트라팜텍 (주관연구기관) : 지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능 식품 개발 (세부과제명)

1) 지각 추출물 원료의 임상시험심사위원회 승인 신청

○ 지각추출물의 기억력개선 임상시험 계획 설정

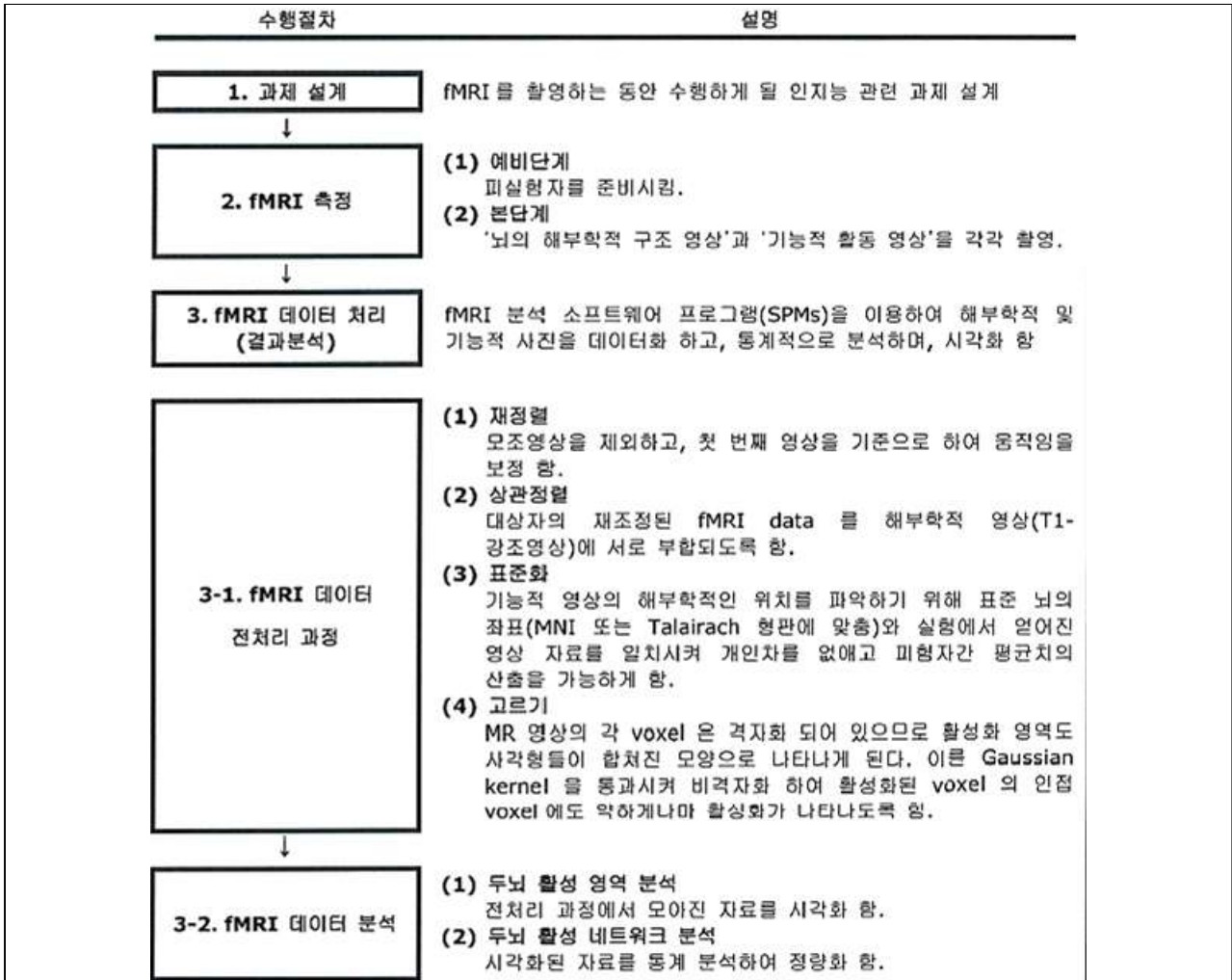
(1) 인체적용시험 진행 방법 및 측정 바이오 마커 설정

- 인체적용시험 Protocol synopsis를 다음과 같이 설정하였음.

시험목적	만 55세 이상~만 85세 이하의 경도인지저하자를 대상으로 지각추출물을 섭취하였을 때 대조식품(placebo)과 비교하여 인지기능을 포함하는 학습능력 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위함
시험디자인	다기관, 무작위, 이중눈가림, 위약대조
시험대상	만 55세 이상~만 85세 이하의 경도인지저하자
시험대상자수	100명 (시험군 50명, 대조군 50명)
섭취기간	12주 (1일 섭취량: 지각추출물로서 400 mg)
선정기준	(1) 만 55세 이상~ 만 85세 이하의 기억력 저하를 호소하는 남·녀 (2) 국문 해독이 가능한 자 (3) CERAD-K 기억력 점수가 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD 이상 감소한 자(CERAD word list memory or word delayed recall or word recognition) (4) 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)에 서명한 자
유효성 평가변수	ADAS-cog 총점, ADAS-cog 기억력, ADAS-K, Visual C.P.T, ADCS-ADL, SGDS, fMRI
안전성 평가변수	(1) 이상반응 (2) 임상병리검사(혈액학적/ 혈액화학적검사, 뇨검사) (3) 활력징후(맥박, 혈압), 체중 (4) 심전도 검사
연구기관	다기관(기관 수: 2(공동기관명: 건국대학교병원), 경쟁등록

- 본 인체적용시험에서는 지각추출물이 뇌에 작용하는 것을 시각적으로 판단하기 위하여, Functional MRI (fMRI)를 측정 지표로 추가하였음.

- ① 측정목적 : 기억력이 손상된 성인이 working memory task(예; n-back working memory task)를 수행하는 동안 fMRI를 이용하여 cortical BOLD response 패턴을 확인하여 활성화된 뇌 부위를 측정하는 것을 목적으로 한다.
- ② fMRI를 이용한 인지는 측정시험 과정은 다음과 같다.



③ 과제설계 : fMRI를 촬영하는 동안 인지능과 관련된 과제를 수행하게 되는데, 어떤 과제를 어떻게 수행할지 결정하였다.

1. 시험패러다임 설정

1.1 Block design 설정

대부분의 fMRI 연구는 일정한 활성화 시간 동안 여러번의 과제를 반복 시행 하도록 하는 블록설계를 사용하고 있음



그림 1. 블록 설계의 원리(Huettel et al., 2004)

활성화 과제를 고안하는 방법으로 감산법(subtraction method)이 있는데, 이것은 활성

화 과제에 원하는 뇌 기능을 포함하도록 고안하고 대조과제(Control task)에서는 이 기능을 포함시키지 않고 fMRI를 촬영 후 활성화 과제와 대조과제에서 나타난 자기공명 신호변화의 차이를 구하여 활성화된 영역을 확인하기 위해 이용함

1.2 인지능 검사의 Block design에서 주로 이용되는 시험

1.2.1 N-back task(working memory task)



그림 2. N-back task 예시

- n번째 보여진 문자나 숫자를 암기하는 것으로 E-prime 이라는 software에서 제공 받을 수 있음
- 대조과제에서는 주로 0-back task가 이용되며, 활성화과제에서는 주로 2-back task가 이용됨

④ fMRI 측정 : fMRI는 다음과 같은 단계로 진행된다.

■ 영상촬영은 예비단계와 본 단계 두단계로 나뉨

1. 예비단계

1.1 장비셋팅

시험 진행용 head coil screen 설치(n-back task 가 반투명 화면에 보여짐), 대상자가 과제수행 중 누를 button 설치 등.

1.2 피험자 교육

- 피험자에게 진행될 시험에 대하여 설명 함.
- Foam padding을 이용하여 머리의 움직임을 최소화함



2. 본단계

2.1 영상촬영(Raw data)

2.1.1 뇌의 해부학적 구조영상 촬영

→ working memory task를 수행하기 전에 뇌의 구조를 촬영하는 것

2.1.2 기능적 활동 영상 촬영

→ Block design의 과제 수행 중 촬영하여 뇌의 활성 영상을 얻는것



⑤ 데이터처리 : fMRI 분석 소프트웨어 프로그램을 이용하여 해부학적 및 기능적 사진을 데이터화 하고, 통계적으로 분석하며, 시각화 한다.

1. fMRI 데이터 전처리 과정

1.1 재정렬(realignment)

1.2 상관정렬(co-register)

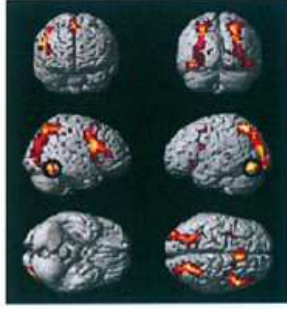
1.3 표준화(normalization)

1.4 고르기(smoothing)



2. fMRI 데이터 분석

2.1 두뇌 활성 영역 분석: 전처리 과정에서 모아진 자료를 시각화 및 도표화



○ 지각 추출물의 독성시험 자료 및 유효성 시험 자료를 바탕으로 하여 임상시험심사위원회 승인 신청

(1) 지각 추출물 원료의 임상시험심사위원회 승인 신청

- 지각 추출물의 기억력 개선 임상시험을 위하여 경희대학교병원과 건국대학교병원을 임상시험 기관으로 선정, 각 기관에 임상시험심사위원회 승인을 신청하여, 각 기관의 임상시험심사위원회로부터 임상시험 승인을 허가 받았다.

연구심의 신청 Part I

접수처 기재 (IRB에서 기재하는 항목입니다.)

IRB File No.		접수처 확인	
--------------	--	--------	--

e-IRB 사용권한 (아래의 내용은 e-IRB에서 조회, 신청이 가능한 권한을 부여합니다.)

연구책임자	+조회	백종우	정신건강의학과	경희대학교병원	☑
담당오너	+조회	정승미	임상팀	네오뉴트라	☑
연구담당자	+조회	문지영	정신건강의학과	경희대학교병원	☑

연구 과 제 명	구분	경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 CAE의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 평, 위약대조 인체적용시험
	영문	Evaluation of CAE on the Mild Cognitive Impairment for the Efficacy and Safety; A Double-blind, Placebo-Controlled Clinical Trial
과제등록코드		Study Nick Name

▼ 연구관련자 정보

No	구분	성명	소속	휴대전화	유선전화	e-
1	연구책임자	백종우	경희대학교병원			
2	공동연구자	강원섭	경희의료원			
3	공동연구자	이경미	경희의료원			
4	공동연구자	김혁기	경희의료원			
5	연구담당자	문지영	경희대학교병원			
6	연구담당자	이상미	경희대학교병원			
7	모니터	정승미	네오뉴트라			

연구 구분 의약품 임상시험(생동 포함) 의료기기 임상시험 임상시험 외 연구 PMS

임상시험용 의약품 관리약사가 관리하는가? YES NO

연구주체 연구자 주도 의뢰자 주도



연구 종류

분류1	<input type="checkbox"/> 약물	<input type="checkbox"/> 생물학적 제제	<input type="checkbox"/> 세포치료제	<input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품
	<input type="checkbox"/> 의료기기 (<input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급)			<input type="checkbox"/> 해당사항 없음
분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구	<input type="checkbox"/> 인체유래물(검체)연구	<input type="checkbox"/> 의무기록 연구	<input type="checkbox"/> 유전자
	<input type="checkbox"/> 배아 연구	<input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구	<input type="checkbox"/> 줄기세포주연구	<input type="checkbox"/> 기타
분류3	<input checked="" type="radio"/> 전향적 연구 <input type="radio"/> 후향적 연구 <input type="radio"/> 전향적 & 후향적 병행연구			
분류4	<input checked="" type="checkbox"/> 중재연구	<input type="checkbox"/> 설문조사	<input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구	<input type="checkbox"/> 기타
	<input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단면연구 <input type="checkbox"/> 환자대조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구)			
분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical)			

일련번호 상품명 CAE

질문분류

〈그림 13. 경희대학교 IRB 신청서〉

	<p>건국대학교병원 기관생명윤리위원회</p> <hr/> <p>연구계획심의의뢰서 (SOP 제 23 조) 서식 7-1</p>	
---	---	---

과제번호	<i>(2017-가-연구자 대상서식)</i>			
과제명	(국문) 경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 CAE의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험			
	(영문) Evaluation of CAE on the Mild Cognitive Impairment for the Efficacy and Safety; A 12week, Multi-center, Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Clinical Trial			
	Protocol No.	NPT_CAE-1	Version No.	1.0
연구자		소속(임상과)	직급	성명
	책임연구자	정신건강의학과	교수	유승호
	관리약사	임상약국	약사	김은영 <i>(서명)</i>
		임상약국	약사	박소미 <i>(서명)</i>
연구코디네이터	정신건강의학과	연구간호사	김보라 <i>(서명)</i>	
생명윤리법에 따른 분류	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물연구 <input type="checkbox"/> 배아줄기세포주이용연구 <input type="checkbox"/> 배아연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물은행			
연구 대상	<input checked="" type="checkbox"/> 인간 (<input checked="" type="checkbox"/> 건강인 <input type="checkbox"/> 환자 <input type="checkbox"/> 취약한 연구대상자) • 취약한 연구대상자 범주 <input type="checkbox"/> 미성년자 <input type="checkbox"/> 임산부 <input type="checkbox"/> 태아 <input type="checkbox"/> 신생아 <input type="checkbox"/> 손상된 동의능력을 가진 성인 <input type="checkbox"/> 연구 기관, 책임 기관, 의뢰자 등의 피고용자 <input type="checkbox"/> 연구자의 연구원이나 학생 <input type="checkbox"/> 집단 시설에 수용 중인 자(예: 시설에 수용된 (수감자) 등) (집단시설종류:) (※ 약사법/의료기기법에서 총리령으로 정한 집단 시설로 [의약품 등의 안전에 관한 규칙] 및 [의료기기법 시행규칙]에 따른 집단 시설을 말한다.) <input type="checkbox"/> 인체유래물 (<input type="checkbox"/> 전향적 인체유래물 수집 <input type="checkbox"/> 보관된 인체유래물) <input type="checkbox"/> 후향적 의무기록 <input type="checkbox"/> 기타 ()			

<그림 14. 건국대학교 IRB 신청서>

(2) 지각 추출물 원료의 임상시험심사위원회 승인 신청

■ 임상세부 내용

- 임상시험 제목 : 경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 CAE의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
- 임상시험 기간 : IRB의 인체적용시험 승인일로부터 12개월
- 임상시험 대상 : 만 55세 이상 ~ 만 85세 이하의 경도인지저하자
- 임상시험 목적 : 만 55세 이상 ~ 만 85세 이하의 경도인지저하자를 대상으로 CAE를 섭취했을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 인지기능을 포함하는 학습능력 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.
- 임상시험용 식품 : 시험식품 - 지각추출물 (CAE), 대조식품 - Placebo
- 임상시험용 식품 섭취방법 : 시험식품 - 1일 2회, 1회 1정씩 아침, 저녁 식후 30분 후 섭취 (지각추출물로써 400mg/day)
대조식품 - 시험군과 동일한 방법으로 섭취
- 임상시험용 식품 섭취기간 : 12주
- 임상시험 대상자 수

	시험군	대조군	총 시험대상자 수
최종 평가 레수 (PP)	40	40	80
Drop-out(20%) 고려예수	50	50	100

· 선정기준 :

- ① 만 55세 이상 ~ 만 85세 이하의 기억력 저하를 호소하는 남·녀
- ② 국문해독이 가능한 자
- ③ CERAD-K 기억력 점수가 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD 이상 감소한 자 (CERAD Word list memory or Word delayed recall or Word recognition)
- ④ 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서 (Informed consent)에 서명한 자

- ADAS-cog 총점
- ADAS-cog 기억력
- ADAS-K
- Visual C.P.T
- ADCS-ADL
- SGDS

· 목표한 인체적용시험대상자의 수 및 산정근거

- 인체적용시험대상자 수
인체적용시험대상자 선정, 제외기준에 적합한 100명을 확보하여 섭취하도록 하고, Protocol에 명시된 PP기준에 적합한 최종 유효성 평가 레수로 80명 이상(군당 40명 이상)을 분석하

기로 계획한다.

- 산정근거

본 인체적용시험의 목적은 시험군에서 투여기간 12주 후 ADAS-cog의 개선도가 대조군과 비교하여 우월하다는 것을 증명하고자 함이다.

H0 : $\mu_t = \mu_c$ (시험 후 시험군의 평가변수 변화값이 대조군의 값과 같다.)

H1 : $\mu_t \neq \mu_c$ (시험 후 시험군의 평가변수 변화값이 대조군의 값과 다르다.)

유효한 인체적용시험대상자 수를 산정하기 위하여 다음을 가정한다.

- (1) 평가변수의 통계적 가설검정은 양측검정으로 한다.
- (2) 유의수준은 5%로 한다.
- (3) 제 2종 오류(β)는 0.2로 하여 검정력은 80%를 유지한다.
- (4) 시험군과 대조군의 시험예수의 비율은 1. 즉, nt (시험군의 예수) = nc (대조군의 예수), 1:1로 한다.
- (5) 기존의 연구 중 본 인체적용시험과 동일한 평가변수인 ADAS-cog에서 효과를 보인 인체적용시험인 Wilkinson D et al. (2001)의 논문의 결과를 이용하여 인체적용시험대상자의 수를 산정 하였다. 본 논문의 결과에서 다음과 같은 평가변수의 변화 양상을 확인할 수 있었다. 합동표준편차는 두 집단의 표준편차 중 최대값인 6.63을 사용하였다. 위의 1) - 5)를 가정하였을 때 인체적용시험에 필요한 시험예수는 다음과 같다. (양측검정)

$$n = 2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times \sigma^2 / \Delta^2$$

상기 식으로부터 군당 표본의 크기(n)를 구하면 다음과 같다.

$$n = 2 \times (1.96 + 0.84)^2 \times 6.63^2 / -4.2^2 \\ \approx 40$$

상기 식으로 인체적용시험대상자의 수를 계산하면, 최소 인체적용시험대상자 수는 군당 40명이다. 여기에 탈락률 20%를 고려하면, 유효성 평가를 위해 군당 등록할 인체적용시험대상자의 수는 50명이며, 총 인원은 100명으로 한다.

• 무작위배정

방문 2에서 선정/제외기준에 적합한 모든 인체적용시험대상자에 대하여 인체적용시험기관에 따라 블록화 무작위배정법의 할당코드에 의하여 각 군으로 배정한다.

무작위비정표는 SAS system의 Randomization program으로 발생된 난수의 순열을 인체적용시험대상자 번호 1번부터 순차적으로 적용시킨 것으로 SAS를 통해 인체적용시험 전에 미리 고안하여 생성한다. 의뢰자는 인체적용시험용 식품 포장 시 무작위 배정표에 따라 인체적용시험용 식품 라벨을 부착한 후, 인체적용시험시작 인체적용시험기관에 공급한다.

2) 임상시험용 지각 추출물 제제 생산

○ 원료 표준화 연구결과 및 유효섭취량 연구결과를 바탕으로 임상시험용 지각 추출물 제제를 생산하였다.

(1) 임상시험용 지각추출물 제제의 생산은 (주)RP Corp.에 의뢰하였으며, 시험식품과 대조식품의 정보는 다음과 같다.

■ 시험식품 (CAE)

- 주성분명 : 지각추출물 (CAE)
- 성상 및 제형 : 장방형 제피정제
- 함량 : 450 mg/1정 (지각추출물로써 200mg/1정)
- 용법 및 용량 : 1일 2회, 1회 1정씩 아침, 저녁 식후 30분 후 섭취 (지각추출물로써 400mg/day)
- 보관방법 : 실온 (직사광선을 피해서 서늘한 곳에 보관)

■ 대조식품 (Placebo)

- 주성분명 : 덱스트린
- 성상 및 제형 : 장방형 제피정제
- 함량 : 450 mg/1정 (지각추출물로써 200mg/1정)
- 용법 및 용량 : 1일 2회, 1회 1정씩 아침, 저녁 식후 30분 후 섭취 (지각추출물로써 400mg/day)
- 보관방법 : 실온 (직사광선을 피해서 서늘한 곳에 보관)

"Better Life Better Aging"



주식회사 뉴트라팜텍

수신 (주) 알피코프
(경유)

제목 지각추출물 인체적용시험 식품 생산 의뢰 건

1. 귀 사의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 회사는 인체적용시험 식품 생산을 아래와 같이 의뢰합니다.
 - 1) 의뢰 시험식품 개요

	시험식품	대조식품
주성분 용량	지각추출물 200 mg	알토덱스트린 200 mg
의뢰량(Loss 포함)	3만 정	2만 정
타입	장방형 제피정제 10구 PTP	정제 10구 PTP

2) 원재료 및 배합비율

- 시험식품

원료명	배합비율(%)	함량(mg)
지각추출물	44.445	200.0025
유당	12.000	54.000
결정셀룰로오스	31.255	140.648
카르복실메틸셀룰로오스-칼슘	3.000	13.500
히프로엘로오스프탈레이트	5.000	22.500
글리세린지방산에스테르	0.500	2.250
아산화티탄	1.000	4.500
코치날색소	0.300	1.350
이산화규소	0.500	2.250
스테아린산마그네슘	2.000	9.000
합계	100	450

- 대조식품

원료명	배합비율(%)	함량(mg)
덱스트린	44.445	200.0025
유당	12.000	54.000
결정셀룰로오스	31.255	140.648
CMC-ca	3.000	13.500
HPMCP	5.000	22.500
글리세린지방산에스테르	0.500	2.250
아산화티탄	1.000	4.500
코치날색소	0.300	1.350
이산화규소	0.500	2.250
스테아린산마그네슘	2.000	9.000
합계	100	450

<그림 15. 인체적용시험식품 생산요청 공문>



<그림 16. 인체적용시험식품>

3) 지각 추출물 원료의 기억력 개선 임상시험 시작

○ 지각 추출물 기억력 개선 임상시험 CRO 선정

지각추출물의 기억력 개선 임상시험을 관리할 CRO로 ‘(주)네오뉴트라’를 선정하였다.

○ 임상시험기관 선정 및 임상 프로토콜 작성

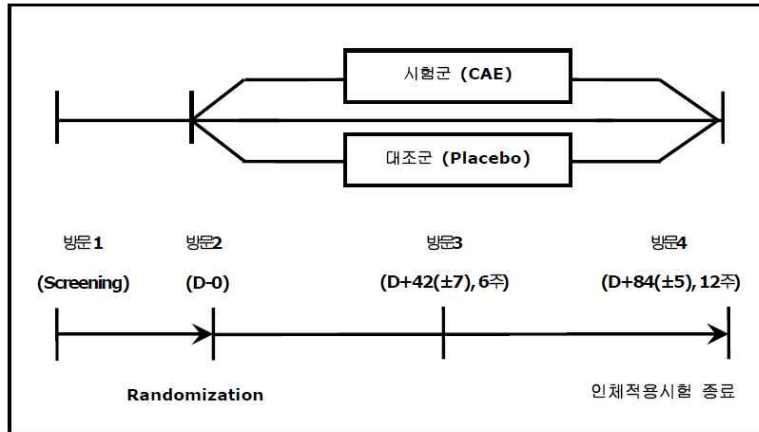
임상시험기관으로 경희대학교 병원과 건국대학교 병원을 선정하였다.

지각추출물의 기억력개선 임상시험을 위한 프로토콜은 다음과 같다.

(1) 인체적용시험계획 요약

- 제목 : 경도인지저하자에서 인지기능향상에 미치는 CAE의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 약대조인체적용시험
- 인체적용시험용 식품 : 지각추출물 (CAE)
- 인체적용시험 시험책임자 : 백종우 (경희대학교병원 정신건강의학과 부교수)
유승호 (건국대학교병원 정신건강의학과 교수)
- 인체적용시험 실시기관 : 경희대학교병원 건국대학교병원
- 인체적용시험 기간 : 임상시험심사위원회(IRB)의 인체적용시험승인일로부터 12개월
- 인체적용시험 대상 : 만 55세 이상 ~ 만 85세 이하의 경도인지저하자
- 인체적용시험 목적 : 만 55세 이상 ~ 만 85세 이하의 경도인지저하자를 대상으로 CAE를 섭취했을 때 대조식품 (Placebo)과 비교하여 인지기능을 포함하는 학습능력 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.

- 인체적용시험 단계 및 디자인 : 단계 : 기타 (건강기능식품)
디자인 : 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
- 인체적용시험용 식품 : 시험식품 : 지각추출물 (CAE)
대조식품 : Placebo
- 인체적용시험용 식품 섭취기간 : 12주
- 인체적용시험 방법



인체적용시험대상자(또는법정대리인)는 자의로 인체적용시험동의서에 서명 후, 방문 평가를 통해 선정/제외기준 적합여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위 배정한다.배정된 인체적용시험대상자는 12주간 인체적용시험용식품(시험식품, 대조식품)을 섭취한다.

- 인체적용시험대상자수

	시험군	대조군	총 시험대상자 수
최종 평가 레수(PP)	40	40	80
Drop-out(20%) 고려예수	50	50	100

- 선정기준
 - (1) 만 55 세 이상 ~만 85 세 이하의 기억력 저하를 호소하는 남 · 녀
 - (2) 국문해 독이 가능한 자
 - (3) CERAD-K 기억력 점수가 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD 이상 감소한 자 (CERAD Word list memory or Word delayed recall or Word recognition)
 - (4) 인체적용 시험이 시작되기 전에 본 인체적용 시험의 참여를 동의하고 , 서면 동의서 (Informed consent)에 서명한 자
- 유효성 평가지표
 - (1) ADAS-cog 총점
 - (2) ADAS-cog 기억력
 - (3) ADAS-K
 - (4) Visual C.P.T

(5) ADCS-ADL

(6) SGDS

■ 통계분석

1. 유효성

유효성평가변수인 ADAS-cog 총점, ADAS-cog 기억력, ADAS-K, Visual C.P.T, ADCS-ADL, SGDS의 섭취 전 후 변화의 정도는 Paired t-test를 실시하고, 각 시점에서
의 구간변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 단, 정규성이 심각하게 위배되는 경우로 그 변환방법 (logarithm transformation) 등의 변수변환을 실시한 후 검정하거나 비모수검정법인 Wilcoxon rank sum test를 실시할 수 있다.

2. 안전성

1) 이상반응

인체적용시험용식품섭취 후 발생한 이상반응(treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA preferred term에 따라 Coding 하며, 인체적용시험용식품섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가한다.

각 구간 이상반응이 발생한 인체적용시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정 (Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교분석한다.

2) 임상병리검사

혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 구간비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석한다. 뇨검사의 일부측정변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내차이를 비교한다.

3) 활력징후(맥박 · 혈압), 체중

활력징후(맥박, 혈압), 체중검사치에 대하여 해당방문 시 검사하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 구간비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석한다.

4) 심전도검사

심전도검사결과는 임상적유의성에 따라 정상과 비정상으로 분류하여 표로 제시하며, McNemar 검정을 이용하여 군내차이를 비교한다.

■ 인체적용시험 진행일정

Period		Screening ¹⁾	Active Treatment		
Visit		1	2	3	4
Week		-2	0	6	12
Window period ¹⁾				+/- 7	+/- 5
서면동의서		✓			
인구학적 조사 ²⁾		✓			
병력 및 약물투여력 ³⁾		✓	✓		
이학적 검사		✓		✓	✓
활력징후 (맥박, 혈압)		✓		✓	✓
신체계측 ⁴⁾			✓	✓	✓
식사지도 및 식이조사 ⁵⁾			✓	✓	✓
생활습관지도 ⁶⁾		✓	✓	✓	
임상병리검사 ⁷⁾		✓			✓
임신반응검사 ⁷⁾		✓			
심전도 검사 ⁸⁾		✓			✓
CERAD-K		✓			
유효성 검사	ADAS-K		✓		✓
	Visual C.P.T		✓		✓
	ADCS-ADL		✓		✓
	SGDS		✓		✓
fMRI ⁹⁾			✓		✓
인체적용시험대상자 적합성 평가		✓	✓		
무작위배정			✓		
인체적용시험용 식품의 처방			✓	✓	
이상반응 확인				✓	✓
순응도 확인 ¹⁰⁾				✓	✓
병용약물 및 병용요법 변화 확인				✓	✓

○ 지각 추출물 기억력 개선 임상시험 개시 및 피험자 모집

■ 시험 시작일 : 지각 추출물 기억력 개선 임상시험의 첫 시험대상자는 2017. 4. 17.에 스크리닝 되었다.

■ 피험자 모집

- 경희대학교병원

목표 : 30명

Screened 32명, Randomized 30명, / 7개월 (마지막 시험대상자 2017년 10월 10일에 등록됨)

Screened	Screening Failure	Randomized	Ongoing	Dropped-out	Completed
32	2	30	1	4	25

- 건국대학교병원

목표 : 70명

Screened 85명, Randomized 70명, / 8개월 (마지막 시험대상자 2017년 11월 29일에 등록됨)

Screened	Screening Failure	Randomized	Ongoing	Dropped-out	Completed
85	15	70	18	9	43

- 양 임상시험기관에서 목표하였던 피험자를 2차 년도에 모두 모집하였다.

나. 경희대학교 (참여기관) : 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구 (세부과제명)

1) 기억손상 동물모델에서 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 비교 분석

지각 추출물 투여 후, 수동회피검사, 수중미로검사를 이용한 공간학습 능력을 측정, 인지 능력 및 기억력 개선 효능을 비교분석

1-1) 이론적, 실험적 연구 방법 및 내용

가. 실험적 방법을 통한 학습 및 기억 장애를 유발하여 타당한 동물모델 확립

(1) Trimethyltin (organotin compound, 6mg/kg, single dose)을 SD male rat 복강내 투여에 의한 변연계 손상을 시사하는 이상 신경행동 유발과 신경 병리학적으로 해마의 과립세포, 아몬각의 추체세포, 신피질, 편도핵 등 특정부위 신경세포의 선택적 손상을 관찰하였다.

(2) Beta-amyloid injection 유도 알츠하이머 모델. 정상동물 mouse(C57BL/6Jmice)에게 Beta-amyloid(25-35)를 icv(intracerebroventricular) injection(bregma로부터 AP -0.2mm, ML 1.0mm, DV -2.4mm 위치)하여 알츠하이머를 유도하였다. Beta-amyloid(25-35)는 3mg/ml로 sterile saline solution에 녹여 4일간 37°C 에서 보관 후 mice 당 3µl injection 하여 유발하였다.

나. 기억장애 동물 모델에서의 행동학적 변화에 관한 연구.

(1) Morris water maze (수중미로검사)를 이용한 공간 학습 능력 측정.

수중미로(water maze; 1.8m diam and 0.5m high, filled with milky water, 22±2°C range)를 균등하게 4등분하고 한 구역 중간에 2 cm 정도 수면 아래에 원형 플랫폼(12cm diam)이 위치하게 하였다. 물에는 물감을 타서 플랫폼을 보이지 않게 한다. 수중미로의 주변은 비디오카메라 그리고 공간단서들을 일정하게 유지하였다. 행동검사 1주일 중 6일 동안은 획득시행 (acquisition test)을 실시하여 하루에 4시행씩 훈련을 하고 학습능력을 평가하며, 7일째는 과지시행(retention test)을 실시하여 자유 수영 검사를 통해 실험동물의 학습능력과 기억력을 테스트 하였다. 모든 동물들의 행동은 비디오카메라로 녹

화하고 컴퓨터 프로그램을 이용하여(PanLab, S-Mart program), 훈련 시행에서는 출발에서부터 도피대로 올라가는데 걸린 시간을 측정하였고, 60초간의 자유 수영 검사 시행에서는 훈련 시에 도피대가 있었던 사분원에 머문 시간을 측정하여 분석하였다.

다. 기억장애 동물 모델에서의 신경 화학적, 분자생물학적 변화에 관한 연구

(1) Hippocampus에서 면역조직염색법을 통한 활성 관찰

- 해마부위에서 면역조직염색을 시행하여 기억 관련 지표를 확인하였다. ChAT와 CREB의 primary antibody IgG로 72시간 동안 4°C에서 1차 처리 후, Secondary antibody (anti-rabbit IgG)로 실온에서 2시간 동안 2차 처리하였다. 이후, avidin biotin complex로 실온에서 2시간 동안 incubation 한 다음 DAB을 이용하여 발색 후 세포의 발현을 현미경으로 확인하였다.

(2) Hippocampus에서 ChAT (Choline acetyltransferase) 조직염색법을 통한 활성 정도를 관찰

- ChAT 염색은 뇌조직 절편을 PBS에 3회 세척한 후 0.1M sodium hydrogen phosphate buffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 6.0) 325ml에 acetylcholine iodide 250mg을 녹인 용액에 0.1M sodium citrate 25ml, 30mM copper sulfate 50ml, 5mM potassium ferricyanide 50ml, 증류수 50ml을 넣어 혼합한 후 수초가 지나면 옅은 녹색을 나타내는데 이때 뇌 조직을 넣고 실온에서 30분~1시간 동안 배양하였다. 모든 처리를 거친 뇌 조직을 슬라이드에 고정하고 현미경으로 관찰하였다.

(3) Hippocampus에서 pCREB 조직염색법을 통한 활성 정도를 관찰

- pCREB 염색은 뇌조직 절편을 PBS에 3회 세척한 후 0.1M sodium hydrogen phosphate buffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 6.0) 325ml에 acetylcholine iodide 250mg을 녹인 용액에 0.1M sodium citrate 25ml, 30mM copper sulfate 50ml, 5mM potassium ferricyanide 50ml, 증류수 50ml을 넣어 혼합한 후 수초가 지나면 옅은 녹색을 나타내는데 이때 뇌 조직을 넣고 실온에서 30분~1시간 동안 배양하였다. 모든 처리를 거친 뇌 조직을 슬라이드에 고정하고 현미경으로 관찰하였다.

1-2) 연구결과

가. Trimethyltin 투여 기억장애 동물모델 확립과 행동 및 신경학적 기전연구

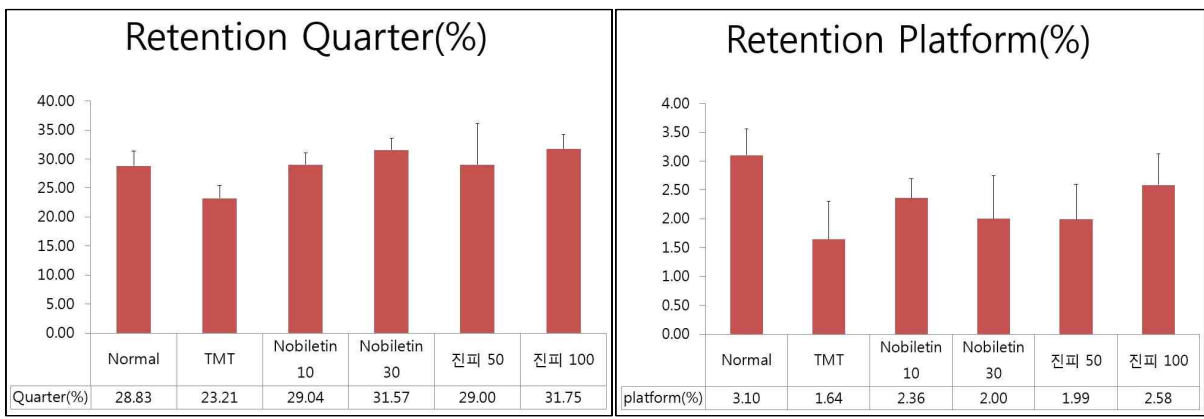
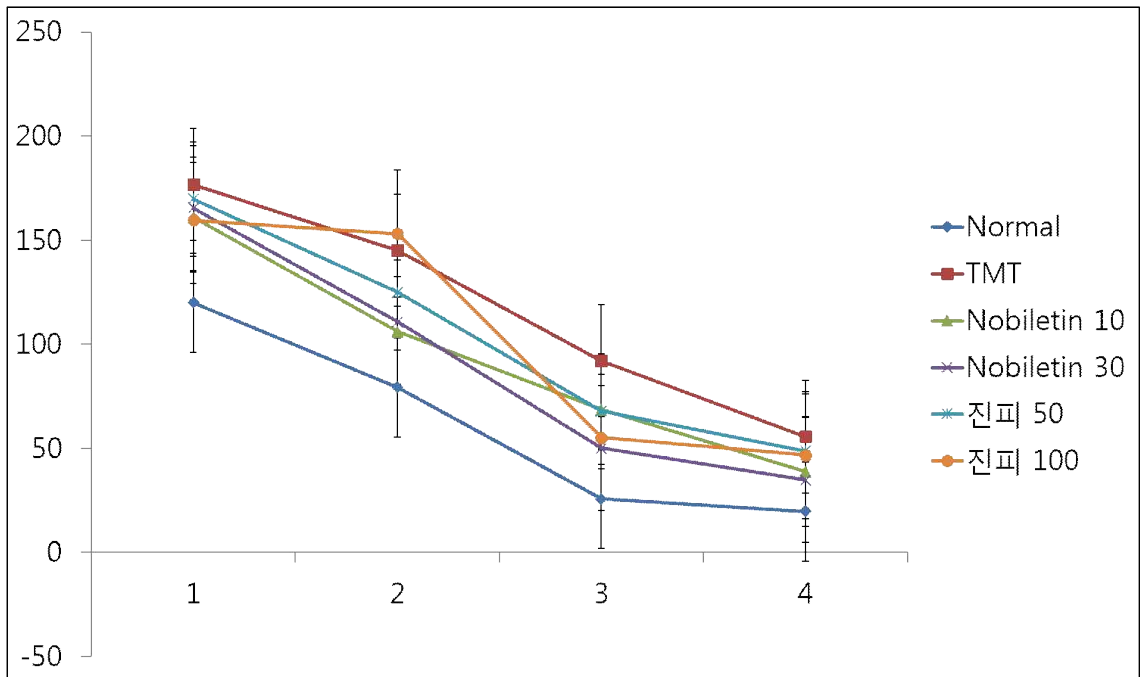
(1) Trimethyltin (8mg/kg)을 복강으로 1회 투여한 후 Morris Water Maze 검사에서 Normal 군과 TMT 대조군이 큰 차이를 보이므로 TMT 투여 모델은 학습 및 기억력이 감소됨을 확인하였다.

- 약물투여 결과, TMT 대조군에 대해 Nobiletin 투여군들이 기억력이 증가하는 경향을 나타내었다 (그림 17).

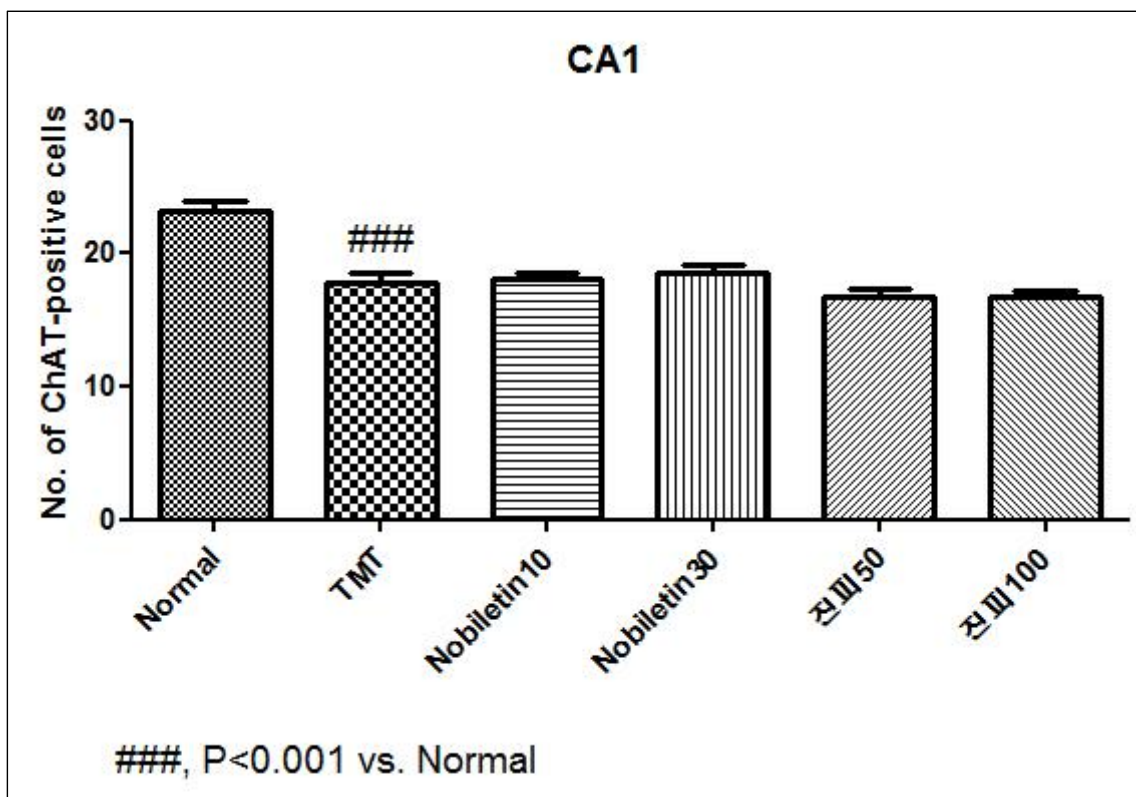
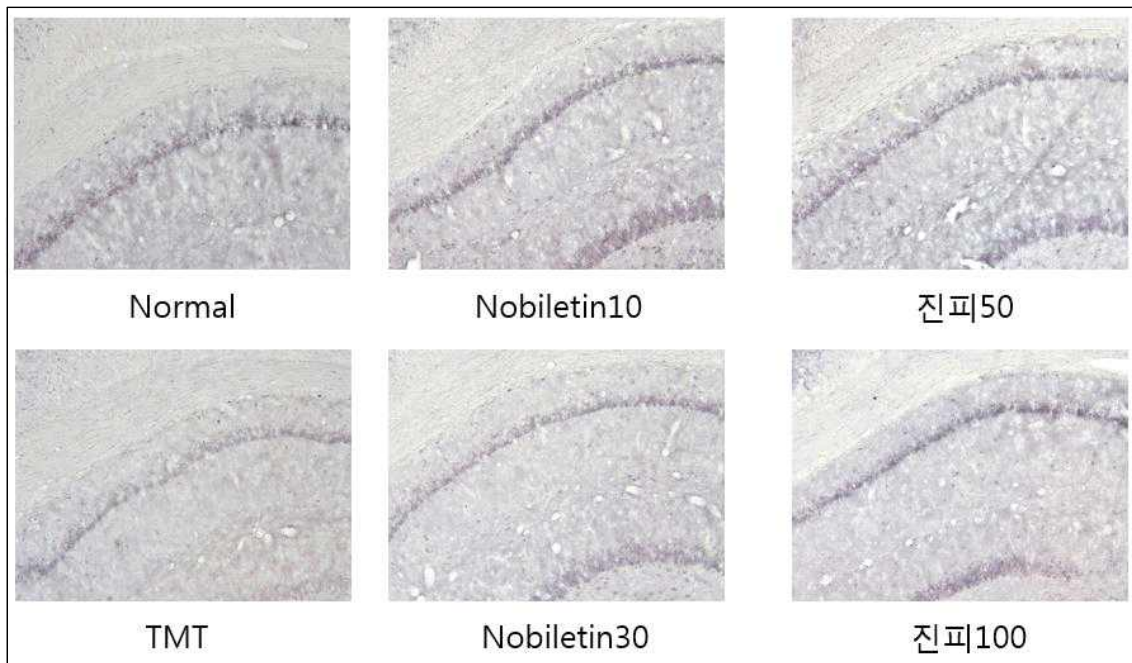
(2) Hippocampal CA1과 CA3에서 ChAT의 발현 확인

- Trimethyltin으로 인해 CA1에서 ChAT의 발현이 감소함을 확인하였음. Nobiletin30 투여군이 TMT 대조군에 대해 상대적으로 발현이 증가한 경향성을 보였다 (그림 18).

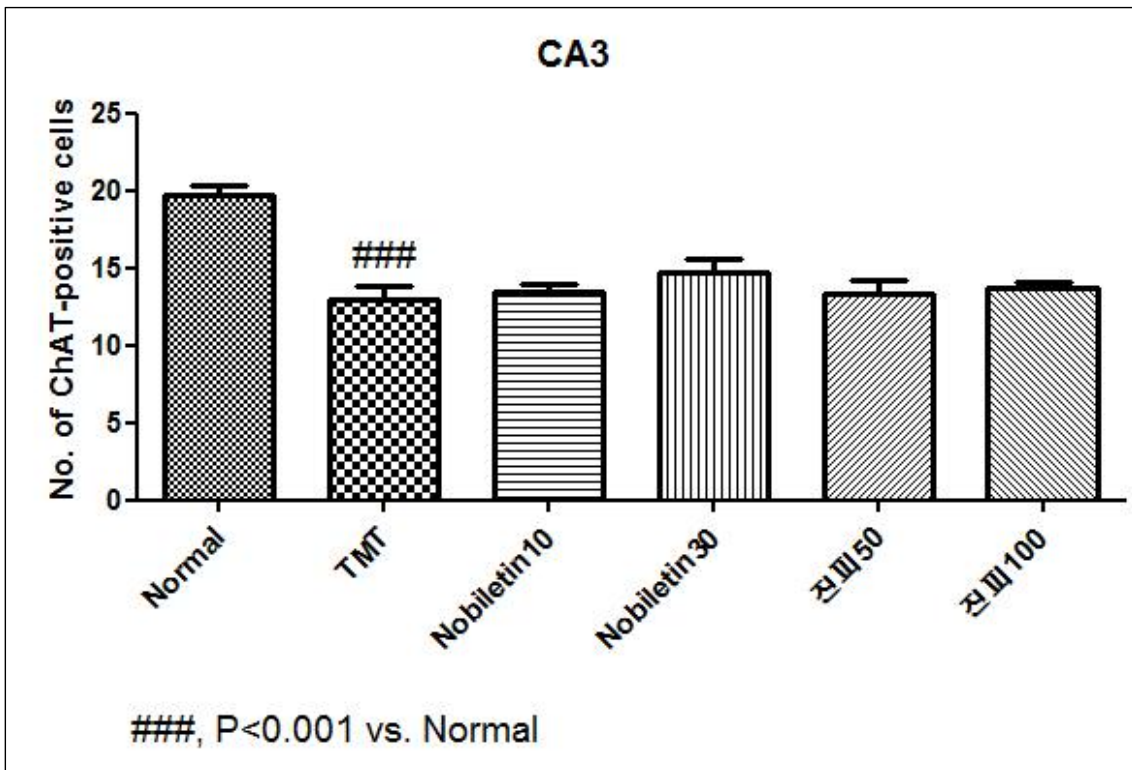
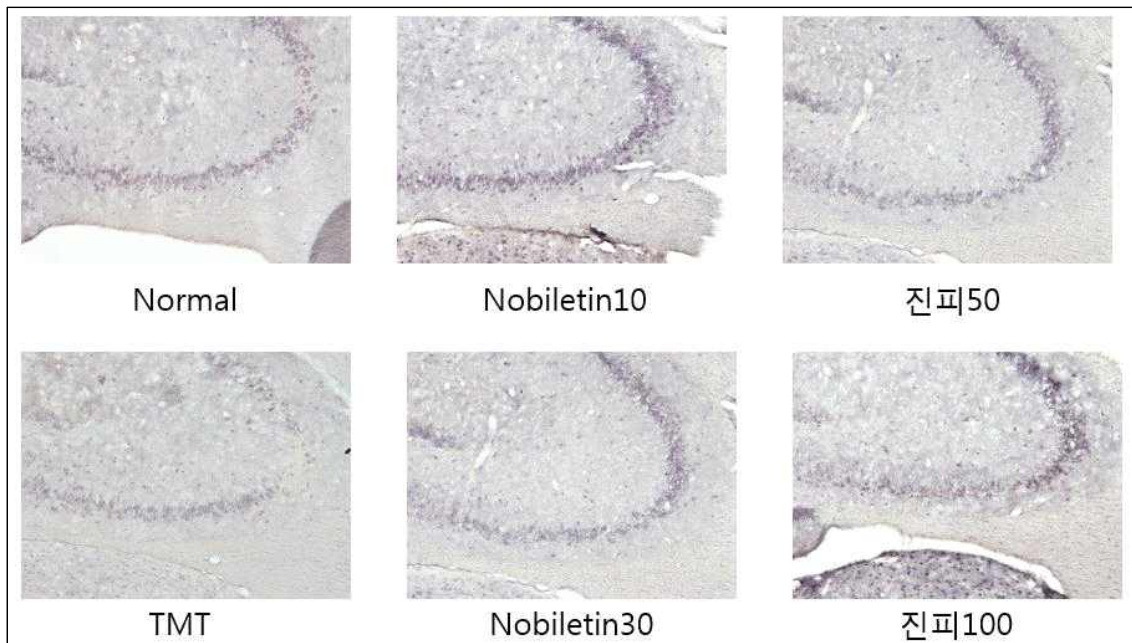
- Trimethyltin으로 인해 CA3에서 ChAT의 발현이 감소함을 확인 하였음. Nobiletin30 투여군이 TMT대조군에 대해 상대적으로 발현이 증가한 경향성을 보였다 (그림 19).



<그림 17. 진피추출물의 기억력개선 행동시험 결과>



<그림 18. Hippocampal CA1에서 ChAT의 발현 확인 결과>

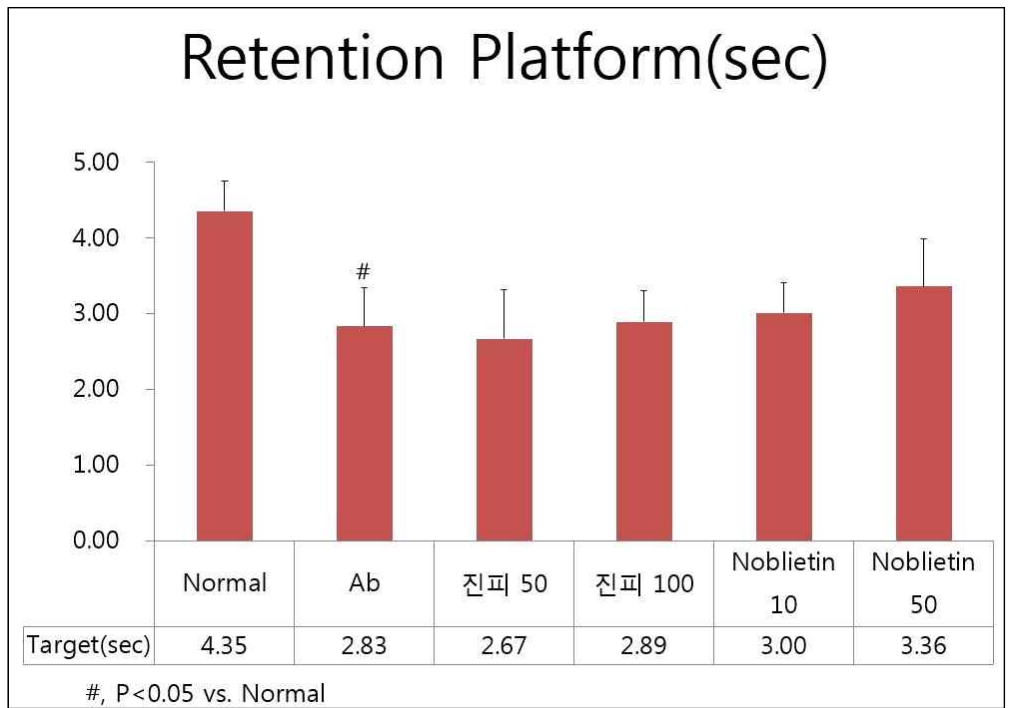
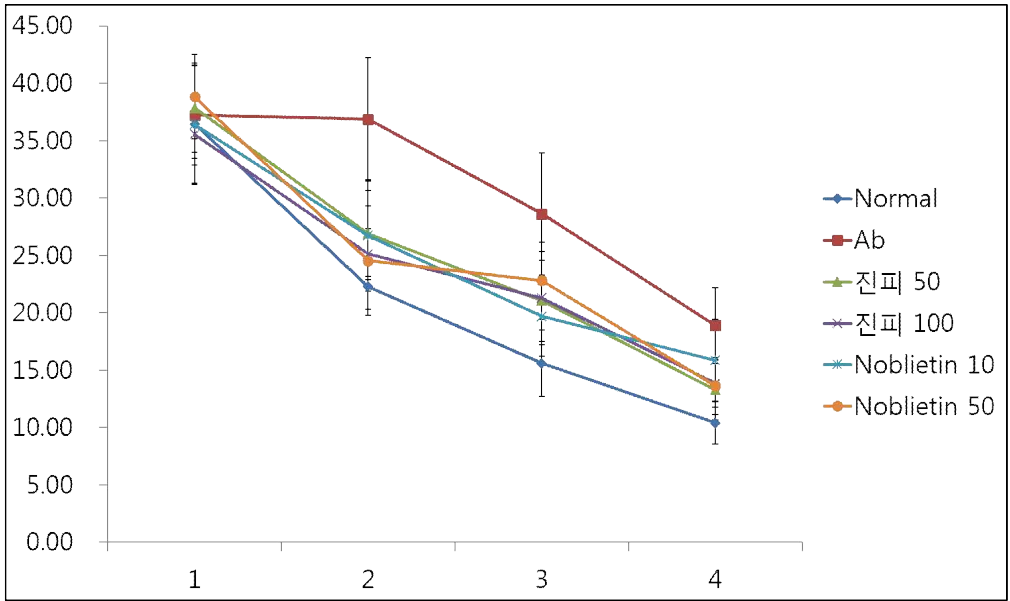


<그림 19. Hippocampal CA3에서 ChAT의 발현 확인 결과>

나. Beta-amyloid injection 유도 알츠하이머 동물모델 확립과 행동 및 신경학적 기전연구

(1) Beta-amyloid injection 유도 알츠하이머 동물모델의 Morris Water Maze 검사에서 Normal군과 대조군이 큰 차이를 보이므로 Beta-amyloid injection 동물모델은 학습 및 기억력이 감소됨을 확인하였다.

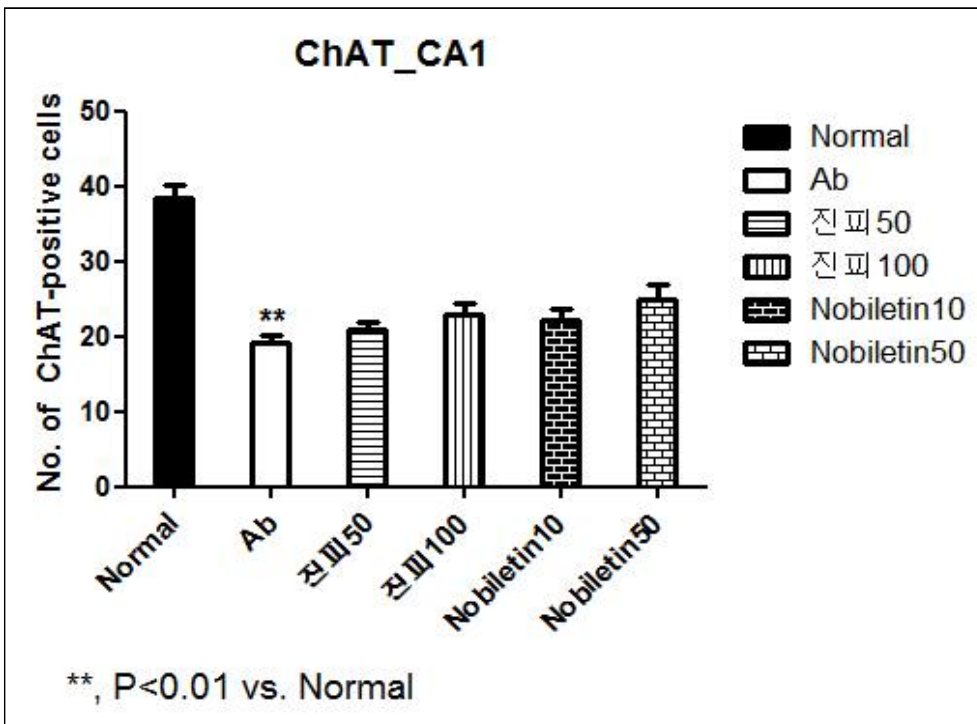
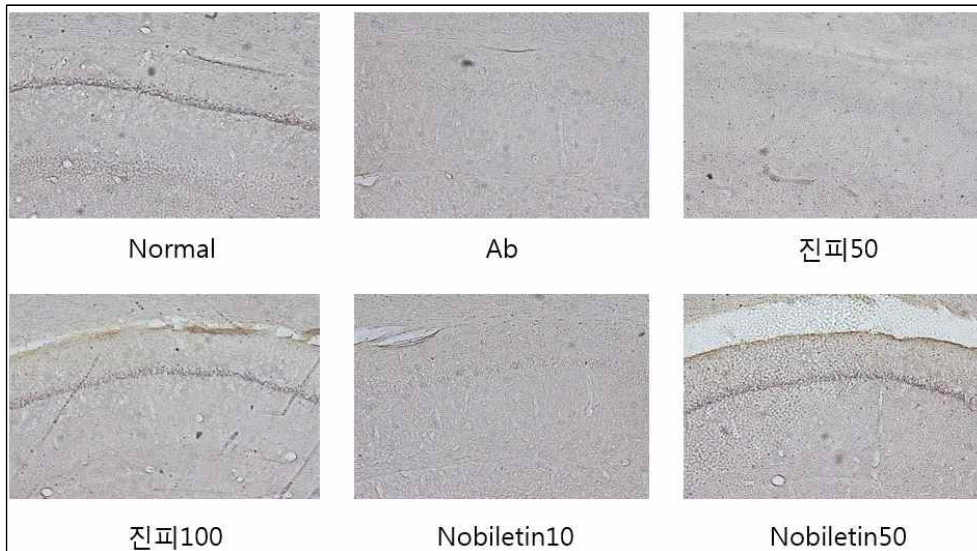
- 약물투여 결과, Beta-amyloid 대조군에 대해 Nobiletin 및 진피 투여군들이 농도 의존적으로 기억력이 향상되는 경향성을 보였다 (그림 20).



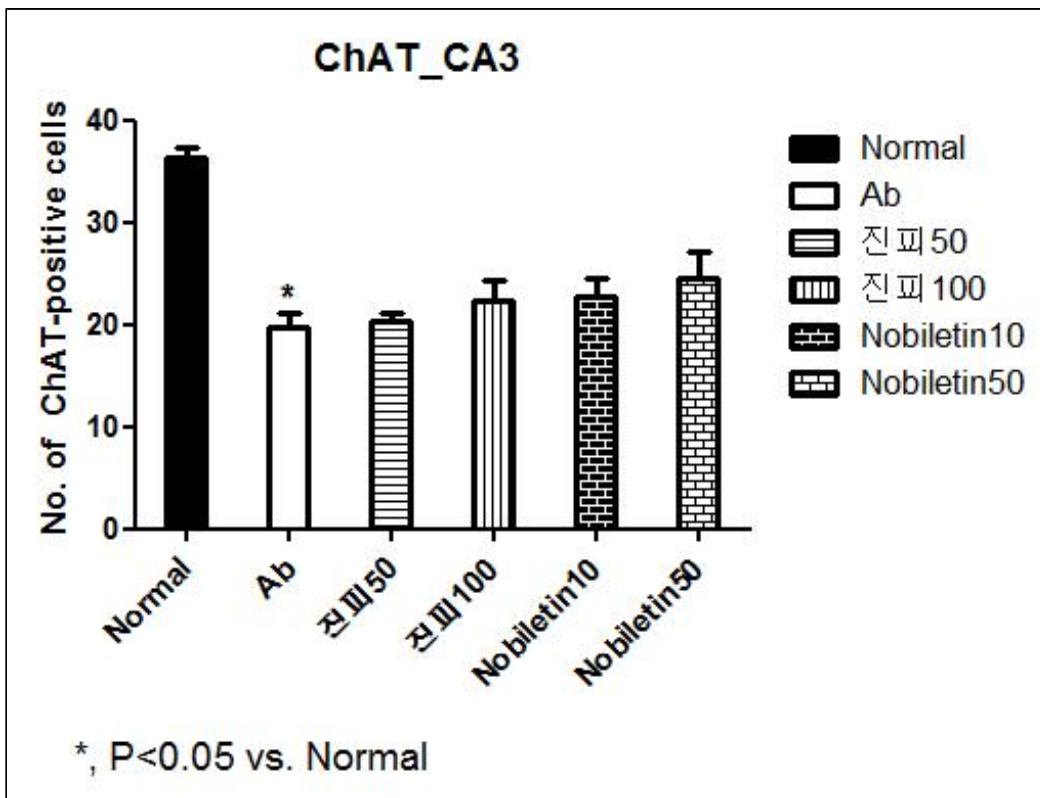
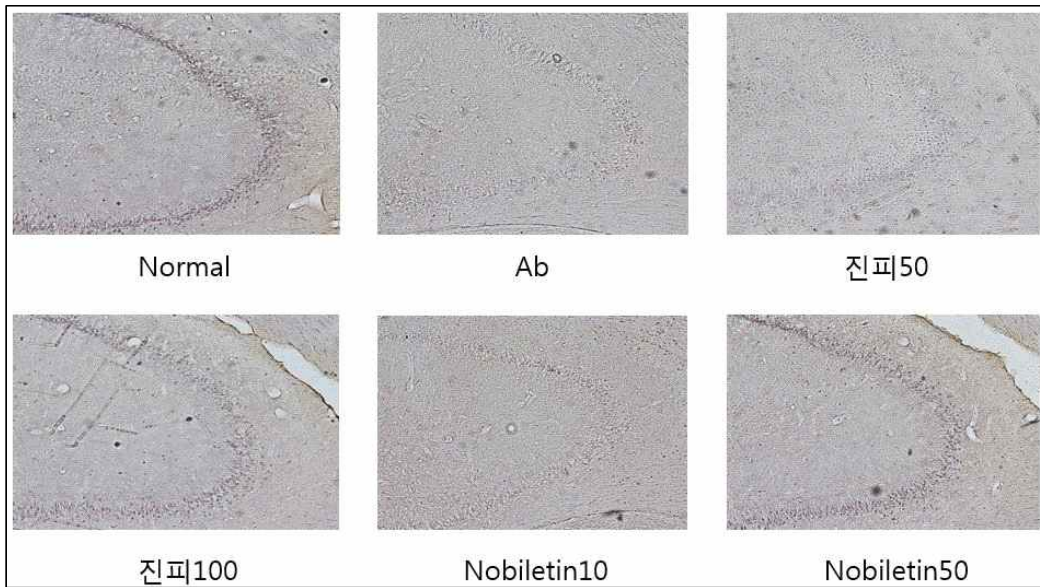
<그림 20. HBeta-amyloid injection 유도 알츠하이머 동물모델의 기억력개선 실험>

(2) Hippocampal CA1과 CA3에서 ChAT의 발현 확인

- Beta-amyloid로 인해 CA1에서 ChAT의 발현이 감소함을 확인하였음. 진피 및 Nobiletin 투여군에서 농도의존적 발현증가 경향성을 보였다 (그림 21).
- Beta-amyloid로 인해 CA3에서 ChAT의 발현이 감소함을 확인하였음. 진피 및 Nobiletin 투여군에서 농도의존적 발현증가 경향성을 보였다 (그림 22).



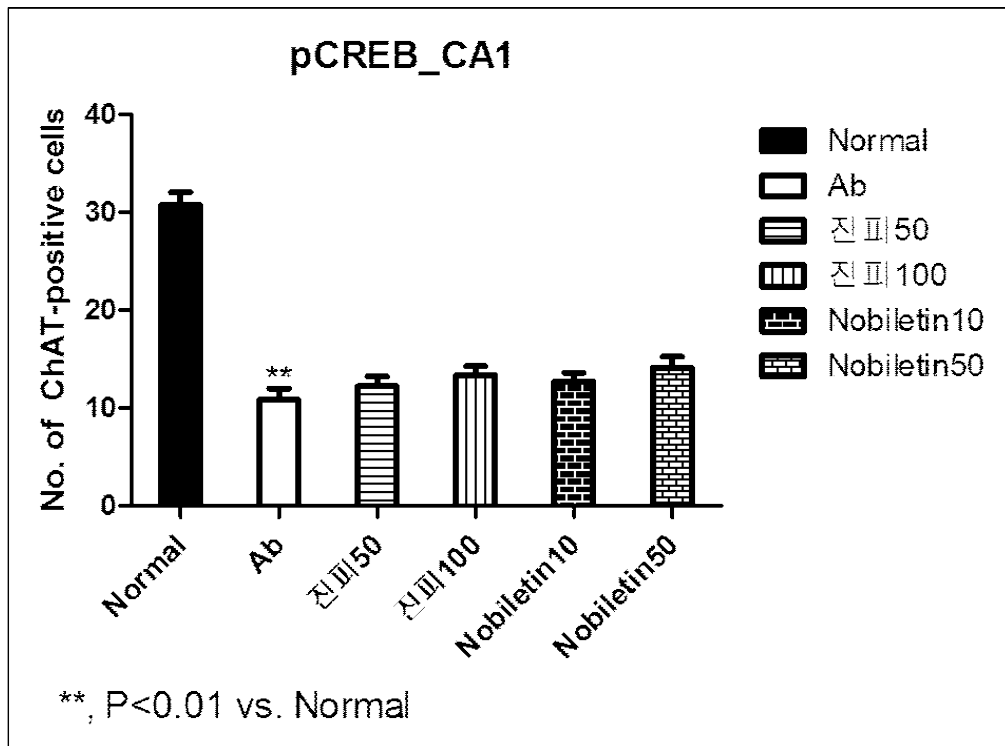
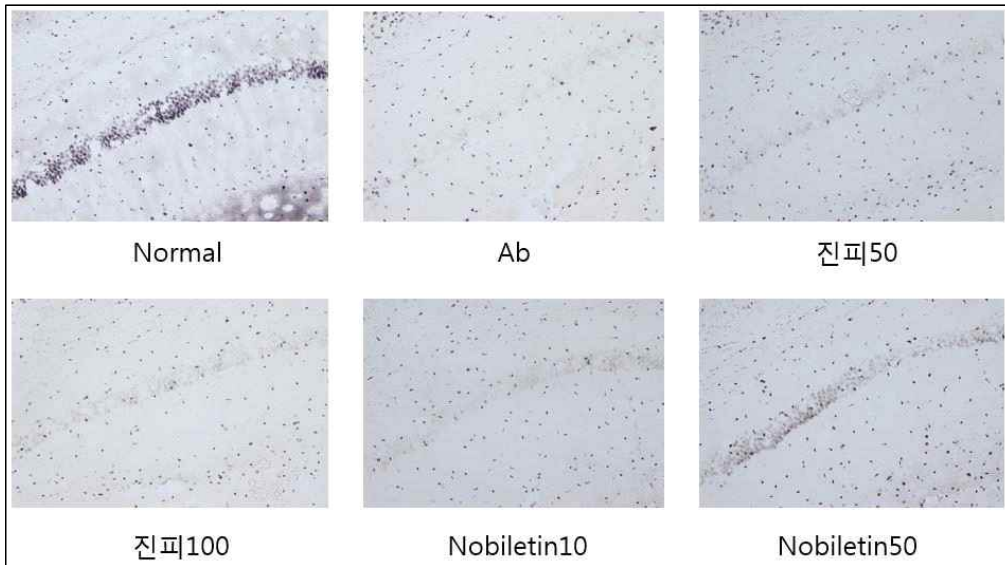
<그림 21. 알츠하이머 동물모델에서의 Hippocampal CA1에서 ChAT의 발현 확인>



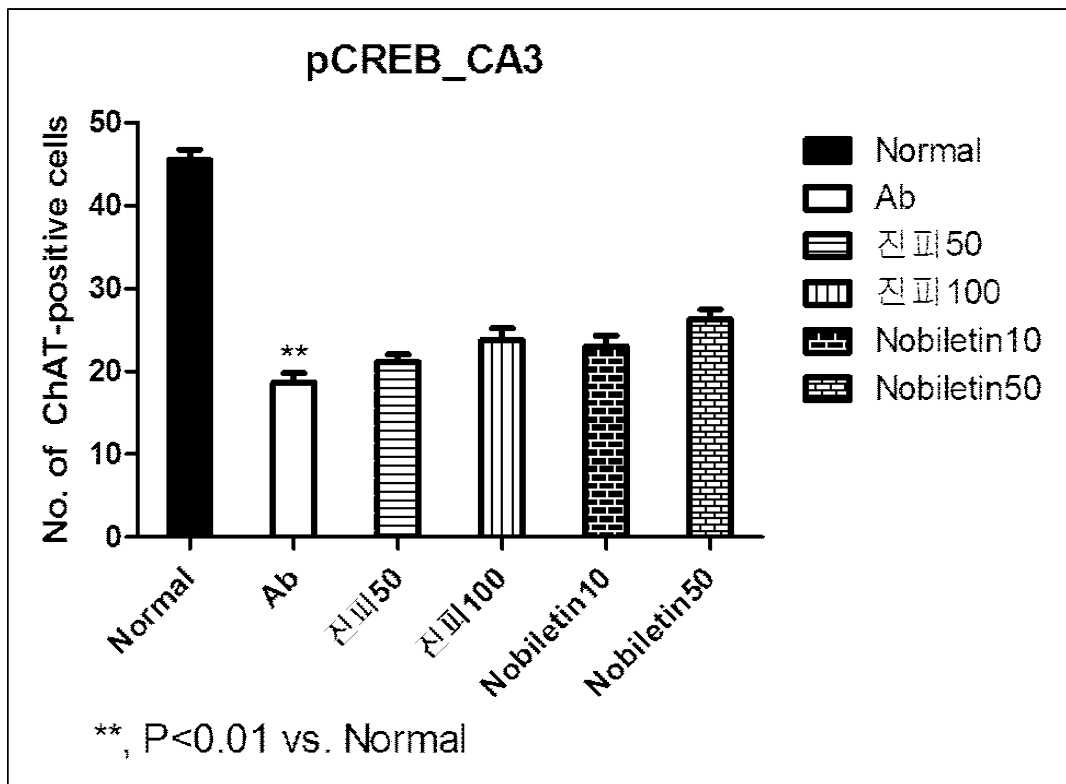
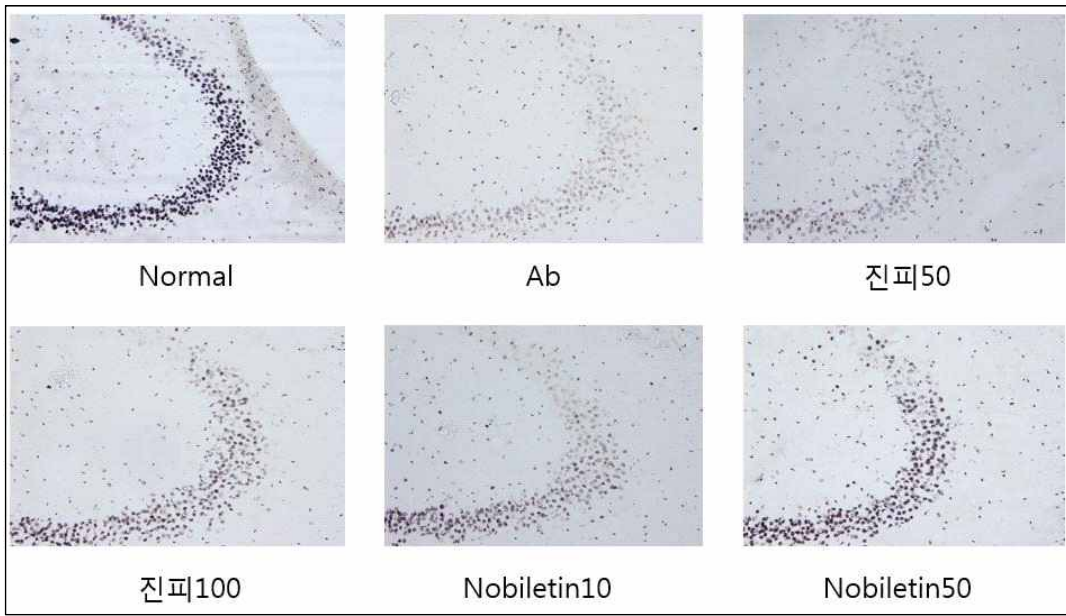
<그림 22. 알츠하이머 동물모델에서의 Hippocampal CA3에서 ChAT의 발현 확인>

(3) Hippocampal CA1과 CA3에서 pCREB의 발현 확인

- Beta-amyloid로 인해 CA1에서 pCREB의 발현이 감소함을 확인하였음. 진피 및 Nobiletin 투여군에서 발현증가 경향성을 보였다 (그림 23).
- Beta-amyloid로 인해 CA3에서 pCREB의 발현이 감소함을 확인하였음. 진피 및 Nobiletin 투여군에서 발현증가 경향성을 보였다 (그림 24).



<그림 23. 알츠하이머 동물모델의 Hippocampal CA1에서 pCREB의 발현 확인>



<그림 24. 알츠하이머 동물모델의 Hippocampal CA3에서 pCREB의 발현 확인>

2-3. 3차년도

가. (주)뉴트라팜텍 (주관기관) : 지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발 (세부과제명)

1) 임상 시험 종료 및 결과분석

○ 임상시험 종료

2017년 4월 17일에 시작된 지각추출물의 기억력 개선 임상시험은 2018년 2월 23일에 마지막 시험대상자의 시험이 완료되어 종료되었다.

○ 인체적용시험계획서의승인

본 인체적용시험은 실시 전, 인체적용시험계획서 및 동의서에 대하여 2개 인체적용시험 실시기관의 독립된 임상시험심사위원회(IRB)의 승인을 받았으며, 인체적용시험 실시기관의 임상시험심사위원회(IRB)의 검토와 승인하에 수행되었다. 건국대학교병원에서 2017년 04월 17일에 최초 인체적용시험 대상자의 스크리닝 방문이 시행되었으며, 2017년 04월 18일에 첫 인체적용 시험대상자가 등록되었다. 각 실시기관의 임상시험심사위원회(IRB) 승인일 및 개시모임일과 첫 인체적용시험대상자 스크리닝일 및 등록일을 표 9에 제시하였다.

표 9. 인체적용시험 승인 및 개시

실시기관명	승인일	최초 승인된		첫 시험대상자 스크리닝일	첫 시험대상자 등록일
		protocol version	개시모임일		
경희대학교병원	2017.03.03	Ver. 1.0	2017.03.29	2017.05.24	2017.05.31
건국대학교병원	2017.03.02	Ver. 1.0	2017.04.12	2017.04.17	2017.04.18

인체적용시험계획서의 변경에 대한 심의가 각 임상시험심사위원회(IRB)에서 실시되었다(표 10)

표 10. 인체적용시험계획서 변경에 대한 임상시험심사위원회(IRB)의 승인일

실시기관명	승인일	승인된	
		protocol version	주 변경내용
경희대학교병원	2017.05.04	Ver. 2.0	1) 제외기준 변경: 약성종양 병력자도 시험자 판단하에 참여 가능하도록 변경
건국대학교병원	2017.05.18	Ver. 2.0	1) 제외기준 변경: 약성종양 병력자도 시험자 판단하에 참여 가능하도록 변경
	2018.02.08	Ver. 3.0	2) 연구기간 연장

○ 관찰항목, 임상검사 항목 및 방법

(1) 관찰항목

① 인체적용시험대상자 동의 및 인구학적 조사

서면 동의를 받는 순서에 따라 스크리닝 번호를 부여한 후 인구학적 정보를 조사하였다.

인구학적조사의 기록사항은 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 결혼상태, 교육수준, 직업, 운동여부, 흡연여부, 음주여부, 스트레스 자각 정도였다.

② 병력/약물투여력 조사, 병용약물 및 병용요법

방문1, 2에 문진과 과거 진료 기록 점검 및 면담 등을 통하여 조사하였다. 외과적 수술력을 포함한 병력은 스크리닝 시점을 기준으로 6개월 이내 병력을 상세히 조사하여 기록하였다. 과거력 및 현 병력에 대하여 발생시기(발생년도 또는 발생년월), 지속여부, 임상적 의미 등을 기재하였다. 약물투여력은 스크리닝 시점을 기준으로 3개월 이내에 선행약물을 모두 확인하였다. 인체적용시험용 식품 섭취 이후 방문3와 방문4에서 병용약물 및 병용요법을 확인하였다

③ 이학적검사

방문1, 3, 4에서 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 대사/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관에 대한 인체적용시험대상자의 임상적 상태를 근거로 이학적검사를 실시하였다.

④ 활력징후(혈압, 맥박), 신체계측(신장, 체중)

혈압, 맥박은 방문1, 3, 4에서 측정하였다. 신장은 방문2에서 측정하였으며, 체중은 방문2, 3, 4에서 측정하여 기록하였다. 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 활력징후, 신체계측을 동일한 인체적용시험기관 담당자가 측정할 수 있도록 최선을 다하였다.

가벼운 옷차림 상태에서 공복상태를 기준으로 신장은 0.1cm, 체중은 0.1kg 단위까지 반올림하여 측정하였다.

⑤ 심전도검사

방문1, 4에서 심전도 검사를 시행하였으며, 방문1의 심전도검사는 방문1 기준 3주(21일) 이내의 검사 결과가 있다면 적용 가능하도록 하였다. 결과의 해석은 자격을 갖춘 의사가 실시하여 증례기록서(CRF)에 기록하였다. 임상적으로 유의한 비정상치는 인체적용시험대상자의 증례기록서의 ‘이상반응’ 페이지에 기록하였다. 인체적용시험대상자를 등록하기 전에 임상적으로 유의한 결과를 (주)네오뉴트라 모니터요원과 상의하였다.

⑥ 생활습관지도

방문1, 2, 3에서 시험담당자는 인체적용시험대상자에게 방문 전 음주 및 무리한 운동 등 평소 생활과 다른 행동을 금지하고 충분한 수면 후 방문하도록 교육하였다.

⑦ 식사지도 및 식이조사

인체적용시험대상자로 적합하다고 판정될 경우, 인체적용시험기간 동안 인체적용시험대상자에게 평소 섭취하던 일반적인 식사형태, 신체활동량, 식이섭취량을 유지하고, 지각 관련 식품 및 건강기능식품을 정기적으로 먹거나 마시지 않도록 권고하였다. 이에 대한 지난 1주일간의 섭취여부를 방문2에 조사하였다. 또한, 인체적용시험대상자에게 인체적용시험 기간 동안 자신의 식이조사지에 자신이

섭취한 지각 관련 식품의 빈도수를 매주 1회 기록하도록 교육하였다.

방문2에서는 인체적용시험대상자의 평상시 식이조사를 위해 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상 방법으로 인체적용시험 담당자가 기록하였다.

인체적용시험기간 동안 인체적용시험대상자의 평상시 식이를 조사하기 위해 방문2, 3에 인체적용시험대상자에게 식이조사지를 배부하였다. 인체적용시험대상자는 식이조사지에 다음 방문일 전 최근 일주일 중 3일 동안(가능하면 주말 1일 포함) 평소의 식사와 유사한 날의 식사를 기록하였다. 방문3, 4에 인체적용시험 담당자는 작성된 인체적용시험대상자의 식이조사지를 확인하였다.

인체적용시험기간 동안 작성된 식이조사지는 한국영양학회의 Can pro program을 이용하여 식품 및 영양소 섭취량을 분석하였다.

⑧ CERAD 치매진단검사 (CERAD-K)

방문1에서 실시하였으며, 인지기능의 포괄적이고 객관적인 평가를 위해 2002년에 표준화된 CERAD-K(Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease-Korean version)¹⁾에 포함된 신경심리 검사집을 사용하여 평가하였다(Lee et al., 2004; Lee et al., 2002)²⁾. 이 검사의 평가자간 신뢰도는 Pearson 상관계수가 0.97-1로 매우 높다. 각 검사의 1개월 간격 검사/재검사 신뢰도도 Pearson 상관계수가 0.54-0.98로 상당히 높았다. CERAD-K는 언어유창성 검사, 보스톤 이름대기 검사, 간이 정신상태 검사, 단어목록기억/회상/인식검사, 구성행동 검사, 구성회상 검사, 길 만들기 검사로 구성되어 있어서 언어기능 평가, 전두엽기능 평가, 언어기억력 평가, 공간지각력 평가, 공간기억력 평가, 집중력 평가 등 여러 인지영역을 한 번에 검사할 수 있도록 구성되어 있다. 언어 유창성 검사, 보스톤 이름대기 검사, 단어목록기억/회상/인식 검사, 구성행동 검사, 구성회상 검사의 점수를 합해 총점을 계산하도록 되어 있으며 총점은 100점이다.

본 연구에서는 기억요인과 관련된 검사인 단어목록기억/회상/인식검사(Word list memory, Word delayed recall, Word recognition)를 통해 인체적용시험대상자 선정기준에 적합한지 확인하였다.

⑨ 알츠하이머병 평가척도 (ADAS-K)

치매 환자의 조기 진단과 치매 환자의 질병 진행에 따른 인지기능 저하를 민감하게 평가해 주는 종합적인 인지기능 평가도구로서 ADAS-K(Alzheimer's Disease Assessment Scale-Korean version)는 원래 경미한 인지기능장애를 보이는 치매 환자를 정확하게 감지해 내고, 치매 환자의 시간에 따른 기능 저하 정도를 측정하기 위하여 개발된 평가 도구이다. 이 도구는 치매치료약물의 인체적용 약물시험에서 인지기능 영역의 인체적용효과를 밝히는 데 표준 평가 도구로서도 사용되고 있다.

본 인체적용시험에서는 원저자 Richard C. Mohs의 개정을 따라 ADAS-non cog의 한 항목을 추가한 ADAS-K를 측정하였다. ADAS-K는 원저자의 허락을 받은 후, 한국의 문화와 언어의 특성에 맞도록 제작되었다. 척도 표준화 연구에서 ADAS-K-cog는 높은 신뢰도와 타당도를 보였다.

한국어판 본 척도 ADAS-K는 인지기능 평가도구로서, 인지 소척도 ADAS cog(Cognitive subscale of the ADAS)의 11개 항목에 비인지 소척도 ADAS-non cog(Noncognitive subscale of the ADAS)의 1개 항목을 추가하여 12개 항목으로 구성되어 있다. 점수범위는 0~75점이며, 각 항목의 오류 점수를 합산하므로 고득점을 할수록 장애 정도가 심함을 의미한다.

인지 소척도 ADAS-cog는 기억력 4항목(단어재생, 지남력, 단어재인, 검사지시), 언어능력 5항목(언어 구사능력, 언어의 청각적 이해, 대화 중 언어발견곤란, 구두 명령 따르기, 손가락 및 물건이름 말하기), 수행능력 2항목(구성행위, 관념행동)으로 3개의 영역으로 구성되어 있다.

비인지 소척도 ADAS-non cog는 관찰을 통하여 행동을 평가하는 1개 항목(집중력/주의산만)으로 구

성되어 있다. 방문2, 4에 실시하였다.

⑩ 시각지속검사 (Visual C.P.T)

뇌기능 검사로 감별할 수 없는 인지장애의 진단은 피검사자의 치료방향을 정하는 중요한 수단이나 채점과 기록의 객관성이 보장되지 않는다면, 피검사자의 장애를 정확하게 분류하고 진단하기 어렵다. 이러한 문제점을 극복하고자 개발된 전산화 신경인지기능검사(CNT: Computerized Neuro-Cognitive Function Test)는 컴퓨터를 이용하기 때문에 검사자의 훈련정도나 검사환경의 통제 여부와 관계없이 정확한 채점과 기록이 가능하고 검사가 끝나면 바로 결과가 처리되므로 진단이나 해석시간을 줄여주고 검사 즉시 치료방향을 수립할 수 있는 장점이 있다. 전산화 신경인지기능검사는 18개의 소검사로 이루어져 있으며, 그 중 본 인체적용시험 평가에 적절하다고 여겨지는 시각 지속 검사(Visual continuous performance test, Visual C.P.T)를 선택하여 사용하기로 하였다. Visual C.P.T는 주의력 검사(Attention test) 중 시각자극에 대한 지속적인 주의력을 평가하는 검사이다. 예를 들어 검사방법은 여러 가지 자극 중 '3'이라는 숫자가 화면으로 제시될 때, 반응키를 누르게 하는 방법으로 진행한다. '3'이라는 자극이 제시되었을 때 반응한 반응시간(Reaction time)과 표준편차, '3'이라는 자극이 제시되었는데 반응하지 않은 누락오류(Omission error), '3'이라는 자극이 제시되지 않았을 때 반응한 과잉반응(Commission error), 그리고 '3'이라는 자극이 제시되었을 때 정확하게 반응한정반응(Correct response)를 측정하였다.

본 연구에 사용되는 CNT 검사는 하규섭 외(2002년)의 '한국 성인 인지기능 평가를 위한 전산화 검사도구의 개발과 표준화 과정 및 요인분석'에서 한국 성인 남녀에서 신뢰성 있고 타당성 있게 사용할 수 있다라고 하였고, 성인뿐 아니라 학령기 정상아동에서 그 타당도 및 신뢰도 분석(이종범 외, 2003, 정신신체의학 11(2))에서도 입증되었다. 방문2, 4에 실시하였다.

⑪ 일상생활활동 평가 (ADCS-ADL)

알츠하이머병의 임상시험에 사용할 목적으로 개발된 현재 사용하고 있는 기능평가 척도 중 하나인 ADCS-ADL(Alzheimer's Disease Cooperative Study-Activities of Daily Living)5-6)을 사용하여 일상생활활동을 평가하였다. ADCS-ADL은 식사, 보행, 화장실에서 대소변의 해결, 목욕하기, 몸단장, 옷입기, 전화 사용, 쇼핑(장보기), 여가활동 등 23개 문항으로 일상생활에 필요한 기술과 기능을 측정하도록 되어있다. 방문2, 4에 실시하였다.

⑫ 노인우울척도 (SGDS)

Yesavage 등에 의해 개발된 30문항의 자기 보고형 우울척도로서, 예/아니오로 간단히 대답할 있는 응답방식의 채택과 우울증의 신체 증상을 묻는 문항이 포함되지 않는 등의 특징들을 지고 있어서 노인층에서의 우울증상을 선별하고 측정하는데 유용하게 사용되고 있다. GDS(Geriatric Depression Scale)는 지역사회 대상군, 정신건강의학과 입원 환자군 등 다양한 노인 인체적용군이나 지역사회 노인 대상군에서 우울증상 측정 도구로서의 신뢰도와 진단적 타당도가 널리 입증되어 왔다. SGDS(Short form of Geriatric Depression Scale)는 Sheikh와 Yesavage가 기존의 GDS에 대한 진단적 타당도 연구를 바탕으로 해서 GDS의 문항 중에서 우울증상과 상관관계가 가장 높은 문항을 15문항 선택해서 축소 제작하였는데 GDS와 SGDS가 상당히 높은 상관관계가 있음을 보고하였다($r=0.84$, $p<0.001$). 이후 다른 연구들에서 다소 차이는 있지만 두 도구가 서로 밀접한 상관관계가 있고 또한 SGDS가 GDS의 적절한 대안이 될 수 있다고 보고되었으며, 가장 적절한 절단점은 6~7점으로 추정되었다. SGDS 문항 모두가 GDS문항에 포함되어 있으므로 본 연구에서는 배재남과 조맹제(1999) 등 많은 연구자들이 국내에서 타당화한 한국어판 GDS 중 SGDS 문항만을 사용하였다. 방문2, 4에

실시하였다.

⑬ 기능적 자기공명영상(functional Magnetic Resonance Imaging; fMRI)

fMRI(functional Magnetic Resonance Imaging)는 1개 기관(경희대학교병원)에서 20명의 인체 적용시험 대상자에 한해 방문2, 4에 시행하였다. 무작위배정 된 순으로 fMRI 측정에 동의한 시험 대상자 20명을 대상으로 시행하였다. 경희대학교병원 영상의학과에서 Nordic Brain Program을 이용하여 분석하였다.

기능적 자기공명영상술(functional Magnetic Resonance Imaging, fMRI)은 1992년 Ogawa 등에 의해 기술적 가능성이 처음으로 제시되었다¹³). fMRI는 방사선 조사의 위험이 없고 공간 및 시간적 해상력(temporal and spatial resolution)이 매우 좋으므로 인간의 뇌 기능을 정확히 연구할 수 있는 방법으로 각광을 받고 있는 최첨단의 뇌 영상 방법이다. 기능적 뇌 영상방법은 운동 감각 영역 뿐 아니라 언어, 기억, 주의력 및 시지각 능력 등 고도의 인지 기능에 대한 뇌 영역과 기전을 연구하는데 많이 쓰여지고 있으며 또한 뇌의 가소성(plasticity)과 재조직에 대한 연구에도 활발히 활용되고 있다. fMRI는 뇌신경의 활동성을 자기공명의 신호변화로 나타내어 이를 시각화 하여 보여주는 영상 방법이다. 이 때 뇌신경의 활동성은 국소적인 뇌 혈액량(Cerebral Blood Volume, CBV), 뇌 혈류(Cerebral Blood Flow, CBF), 또는 산소섭취(Oxygenation)의 변화에 의하여 간접적으로 파악되어지는 변화를 말한다.

(2) 관찰 검사 방법 (방문별)

■ 1차 방문 (Screening Visit, Week -2)

본 인체적용시험에 참가하도록 인체적용시험대상자는 인체적용시험에 대한 설명을 들었고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- ① 인체적용시험대상자를 인체적용시험에 참여시키기 전에 인체적용시험 과정을 설명하고, 인체적용시험대상자에게 서면 동의서를 받았다.
- ② 인체적용시험대상자는 스크리닝 번호를 지정 받았다.
- ③ 인체적용시험대상자의 인구학적 조사를 시행하였다.
- ④ 인체적용시험대상자의 병력 및 약물투여력 조사를 실시하였다.
- ⑤ 이학적검사를 실시하였다.
- ⑥ 활력징후(혈압, 맥박)를 측정하였다.
- ⑦ 임상병리검사를 실시하였다.
- ⑧ 임신반응검사(가임기 여성)를 실시하였다.
- ⑨ 심전도검사를 실시하였다.
- ⑩ CERAD-K 검사를 실시하였다.
- ⑪ 생활습관지도를 실시하였다.
- ⑫ 1차 인체적용시험대상자의 적합성 평가 후 다음 방문 일을 지정하였다.

■ 2차 방문 (Baseline Visit, Week 0)

이 방문은 최초 방문일 이후 14일 이내에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- ① 병력 및 약물투여력 변화를 조사하여 기록하였다.

- ② 신체계측(신장, 체중)을 실시하였다.
- ③ ADAS-K 검사를 실시하였다.
- ④ Visual C.P.T 검사를 실시하였다.
- ⑤ ADCS-ADL 검사를 실시하였다.
- ⑥ SGDS 검사를 실시하였다.
- ⑦ 식사지도 및 식이조사를 실시하였다.
- ⑧ 생활습관지도를 실시하였다.
- ⑨ 1, 2차 방문 평가결과를 종합하여 선정기준/제외기준의 적합성을 평가하였다.
- ⑩ 무작위배정 하였다.
- ⑪ 인체적용시험용 식품을 처방하고, 섭취 방법에 대하여 교육하였다.
- ⑫ fMRI 측정에 동의한 인체적용시험대상자에 한해 시행하였다.
- ⑬ 인체적용시험대상자의 다음 방문일을 지정하였다.

■ 3차 방문 (Interim Visit, Week 6)

3차 방문은 2차 방문일 이후 42일(±7) 이내에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- ① 이상반응 유무를 확인하였다.
- ② 병용약물 및 병용요법 변화를 확인하였다.
- ③ 이학적검사를 실시하였다.
- ④ 활력징후(혈압, 맥박) 및 체중을 측정하였다.
- ⑤ 식사지도 및 식이조사를 실시하였다.
- ⑥ 섭취 순응도를 확인하였다.
- ⑦ 인체적용시험용 식품을 처방하고, 섭취방법을 다시 한 번 설명하였다.
- ⑧ 생활습관지도를 실시하였다.
- ⑨ 인체적용시험대상자의 다음 방문일을 지정하였다.

■ 4차 방문 (Closing Visit, Week 12)

4차 방문은 2차 방문일 이후 84일(±5) 이내에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- ① 이상반응 유무를 확인하였다.
- ② 병용약물 및 병용요법 변화를 확인하였다.
- ③ 이학적검사를 실시하였다.
- ④ 활력징후(혈압, 맥박) 및 체중을 측정하였다.
- ⑤ 임상병리검사를 실시하였다.
- ⑥ 심전도검사를 실시하였다.
- ⑦ ADAS-K 검사를 실시하였다.
- ⑧ Visual C.P.T 검사를 실시하였다.
- ⑨ ADCS-ADL 검사를 실시하였다.
- ⑩ SGDS 검사를 실시하였다.

- ⑪ 방문2에 fMRI를 측정할 인체적용시험대상자에 한해 시행하였다.
- ⑫ 식이조사를 실시하였다.
- ⑬ 섭취 순응도를 확인하였다.

■ 추가방문 (필요 시)

추가 방문은 예정된 방문 외에 인체적용시험대상자 요청 또는 시험자의 판단에 의해 필요하다고 판단될 때 수시로 이루어지도록 하였다. 인체적용시험대상자가 예정되지 않은 날에 방문한 경우에는 이상반응, 병용약물, 시행한 검사의 결과 및 그에 따른 의학적 처치 등을 증례기록서에 기록하였다. 중도탈락으로 인한 추가방문 시 인체적용시험대상자에게 마지막 방문에서 시행하는 모든 검사를 실시할 수 있도록 하였다.

○ 인체적용시험대상자

(1) 인체적용시험대상자의 인체적용시험 참여상태

본 인체적용시험은 2017년 4월 17일 첫 인체적용시험대상자가 스크리닝 되었고, 2018년 2월 23일 마지막 인체적용시험대상자의 시험이 완료되었다.

본 인체적용시험에서는 적합한 인체적용시험대상자를 선정하기 위해 총 117명의 인체적용시험대상자에 대해서 Screening 평가를 실시하였다. 스크리닝 탈락 17명으로 총 100명(시험군 49명, 대조군 51명)이 무작위배정되었다. 이 중 시험군에서 동의철회 7명, 이상반응 1명, 대조군에서 동의철회 6명, 추적실패 1명으로 총 15명이 중도탈락하여 인체적용시험을 완료한 인체적용시험대상자는 총 85명이었다(시험군 41명, 대조군 44명).

무작위배정된 모든 인체적용시험대상자의 참여상태는 표 11과 표 12에 정리하였다.

표 11. 인체적용시험대상자 참여상태 (무작위배정된 모든 인체적용시험대상자)

시험기관명(기관코드)	시험자	인체적용시험대상자 수		
		시험군 (CAE)	대조군 (Placebo)	Total
경희대학교병원(01)	백종우	14	16	30
건국대학교병원(02)	유승호	35	35	70
Total		49	51	100

표 12. 무작위배정 후 탈락된 인체적용시험대상자

Group	Randomization	Date of termination	Category of reason	
	No.			
섭취 후 탈락	시험군	01-R002	2017-09-14	동의철회(방문3 이후 탈락)
		01-R015	2017-10-16	동의철회(방문2 이후 탈락)
		02-R017	2017-08-25	동의철회(방문3 이후 탈락)
		02-R020	2017-07-13	동의철회(방문2 이후 탈락)
		02-R023	2017-07-26	이상반응(방문2 이후 탈락)
		02-R039	2017-08-28	동의철회(방문2 이후 탈락)
		02-R058	2017-12-30	동의철회(방문3 이후 탈락)
		02-R059	2017-11-30	동의철회(방문2 이후 탈락)
	대조군	01-R016	2017-09-15	동의철회(방문2 이후 탈락, 추 가방문하여 유효성 평가 실시)
		01-R027	2017-11-06	동의철회(방문3 이후 탈락)
		02-R006	2017-09-29	동의철회(방문3 이후 탈락)
		02-R027	2017-09-04	동의철회(방문3 이후 탈락)
		02-R028	2017-08-30	동의철회(방문3 이후 탈락)
		02-R037	2017-09-29	추적실패(방문3 이후 탈락)
	02-R063	2017-11-08	동의철회(방문2 이후 탈락)	

(2) 분석에 포함될 시험대상군의 선정

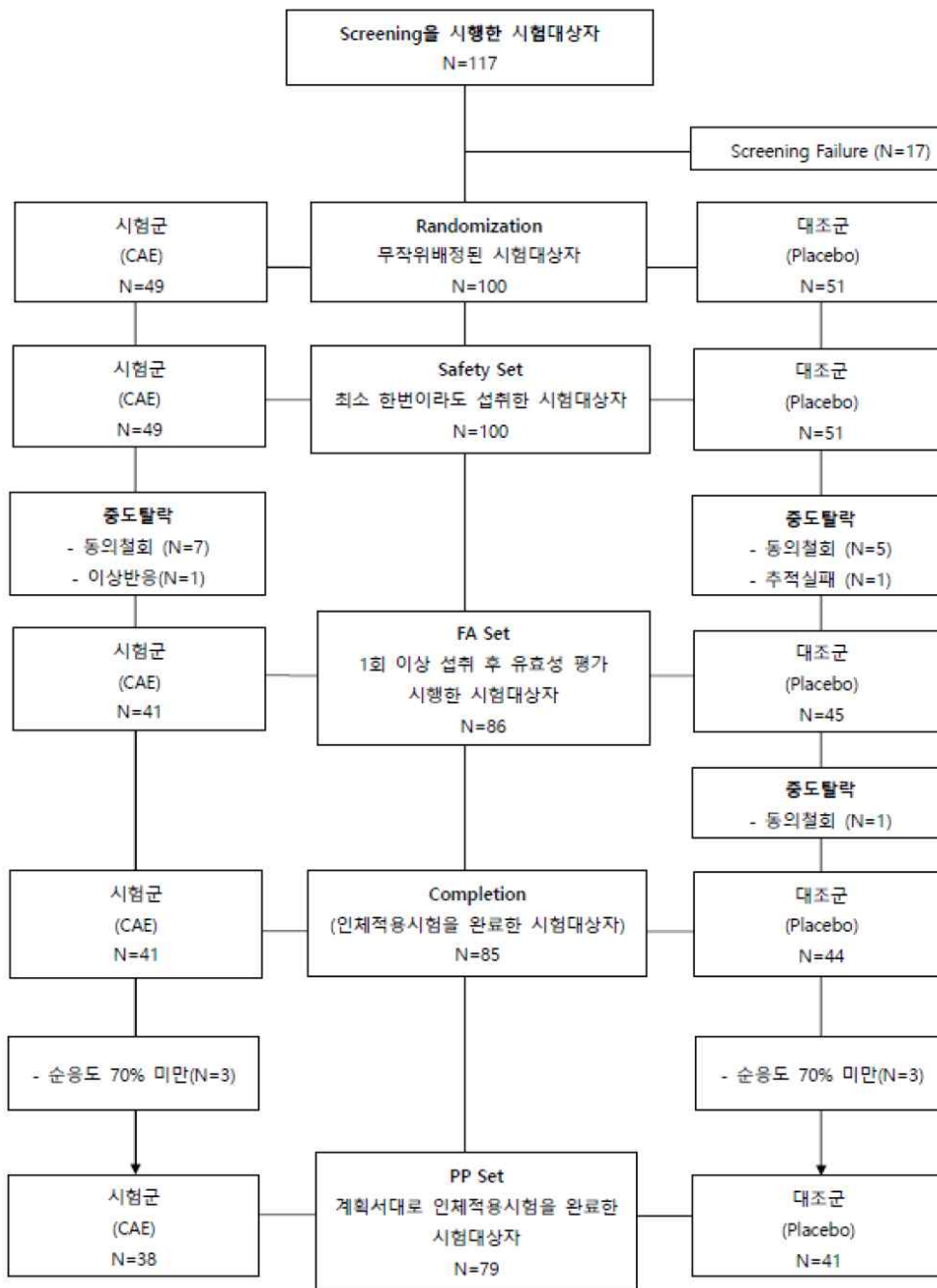
2018년 6월 21일 본 인체적용시험의 분석군 판정을 위한 연구자 모임을 진행하였다. 본 인체적용시험의 유효성은 PP Set을 주 분석으로 하고, FA Set을 추가적으로 분석하였다.

Safety Set은 인체적용시험에 무작위배정된 후 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 인체적용시험대상자 중 안전성 관련 정보가 수집된 시험군 49명, 대조군 51명이 분석에 포함되었다.

FA Set은 계획서에 기술하였던대로 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행하고, 주요 선정/제외기준 위반에 해당되지 않는 인체적용시험대상자 집단을 대상으로 이루어졌다. 따라서 중도탈락되어 유효성 평가를 실시하지 않은 14명(시험군 8명, 대조군 6명)을 제외하여 총 86명(시험군 41명, 대조군 45명)이 FA Set에 포함되었다.

PP Set은 사전에 FA Set 분석에 포함된 인체적용시험대상자 중에서 인체적용시험을 종료하고, 인체적용시험결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항이 없는 인체적용시험대상자로서 분석군 판정을 통해 시험군에서 평균 순응도 70% 미만 3명이 제외되었으며, 대조군에서 평균 순응도 70% 미만 3명, 동의철회 1명이 제외됨에 따라 총 79명(시험군 38명, 대조군 41명)이 PP Set에 포함되었다.

그림 25는 인체적용시험 시작 이후부터 완료 시점까지의 인체적용시험대상자의 인체적용시험 참여 상태 및 분석군 정리를 요약한 것이다.



〈그림 25. 인체적용시험대상자의 인체적용시험 참여상태 및 분석군 정리〉

(3) 분석에 포함될 시험대상군의 선정

인체적용시험대상자의 인구학적 정보 및 기타 섭취 전 특성에 대한 비교 Table 7은 인체적용시험대상자의 인구학적 정보 및 섭취 전 특성을 비교한 것이다. 본 인체적용시험에 참여한 인체적용시험대상자의 인구학적 정보를 포함한 섭취 전의 모든 특성을 섭취 군별로 비교하여 차이가 있는 요인을 확인하고자 하였다.

섭취 전 시험대상자들의 인구학적 정보와 특성에 대하여 조사한 결과 성별에서는 시험군의 경우 남성이 12명(31.58%), 여성이 26명(68.42%)이 포함되었고, 대조군의 경우 남성이 13명(31.71%), 여성이 28

명(68.29%) 포함되었다(p=0.9902).

연령에서는 시험군이 평균 71.18± 5.61세, 대조군은 평균 71.66± 5.08세였다(p=0.6944).

그 밖에 결혼상태, 교육수준, 직업, 운동여부, 흡연여부, 음주여부, 스트레스 자각 정도, 신장에서 섭취 구간 차이가 없었다.

스크리닝 시점을 기준으로 6개월 이내의 인체적용시험대상자들의 동반질환 및 병력 조사에서 병력이 있는 인체적용시험대상자는 시험군에서 23명(60.53%)이며, 대조군에서는 25명(60.98%)으로 조사되었다(p=0.9674). 조사된 모든 동반질환 및 병력은 MedDRA에 따라 Coding되었다.

섭취 전 시험대상자들의 수술력 조사에서 수술력이 있는 대상자는 없는 것으로 조사되었다.

○ 유효성 평가 결과

(1) 유효성 평가변수에 대한 분석 결과

■ ADAS-Cog 총점

ADAS-Cog는 기억력 4항목(단어재생, 지남력, 단어재인, 검사지시), 언어능력 5항목(언어 구사능력, 언어의 청각적 이해, 대화 중 언어발견곤란, 구두 명령 따르기, 손가락 및 물건 이름 말하기), 수행능력 2항목(구성행위, 관념행동)으로 3개의 영역으로 구성되어 있다. 각 항목의 오류 점수를 합산하므로 점수가 높을수록 인지기능장애 정도가 심함을 의미한다.

표 13은 0주, 12주에서 측정된 ADAS-Cog 총점(기억력, 언어능력, 수행능력의 합계 점수) 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다.

ADAS-Cog 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 1.17± 2.79점 감소하였고(p=0.0140), 대조군은 1.41± 2.83점 감소하였다(p=0.0028).

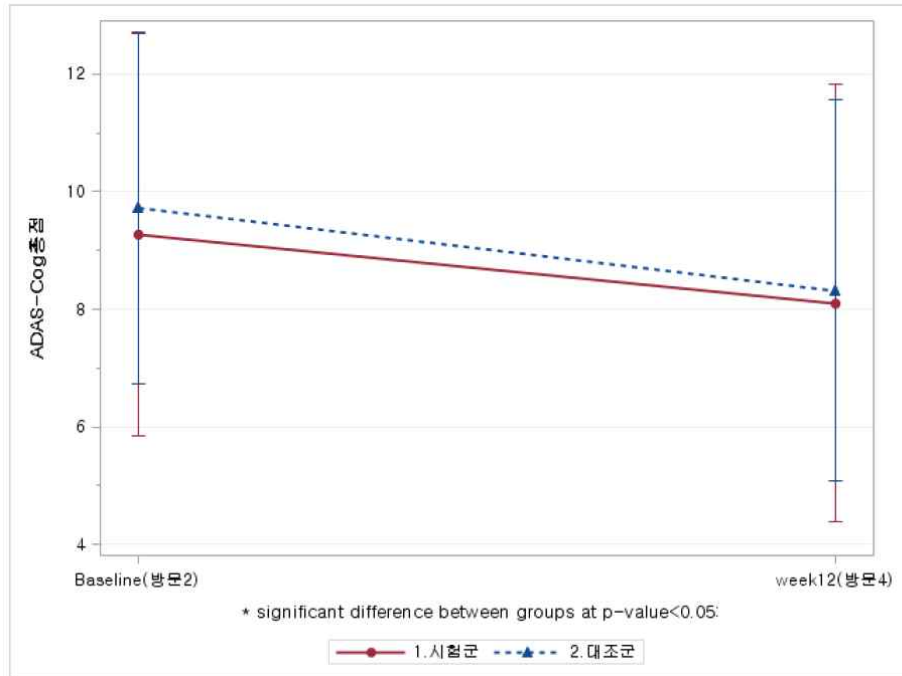
표 13. 방문별 ADAS-Cog 총점 변화량 (PP Set)

	시험군		대조군		p-value*	p-value [§]
	N=38		N=41			
	n	Mean±SD	n	Mean±SD		
Baseline(방문2)	38	9.27±3.41	41	9.72±2.99	0.5332	
12 주(방문4)	38	8.11±3.73	41	8.32±3.24		
Change from baseline	38	-1.17±2.79	41	-1.41±2.83	0.7044	0.8572
p-value**		0.0140		0.0028		

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§: Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



<그림 26. 방문별 ADAS-Cog 총점(PP set)>

표 14는 0주, 12주에서 측정한 ADAS-Cog 총점 변화를 FA Set으로 분석한 결과이다. ADAS-Cog 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 1.21 ± 2.77 점 감소하였고($p=0.0078$), 대조군은 1.38 ± 2.70 점 감소하였다($p=0.0013$).

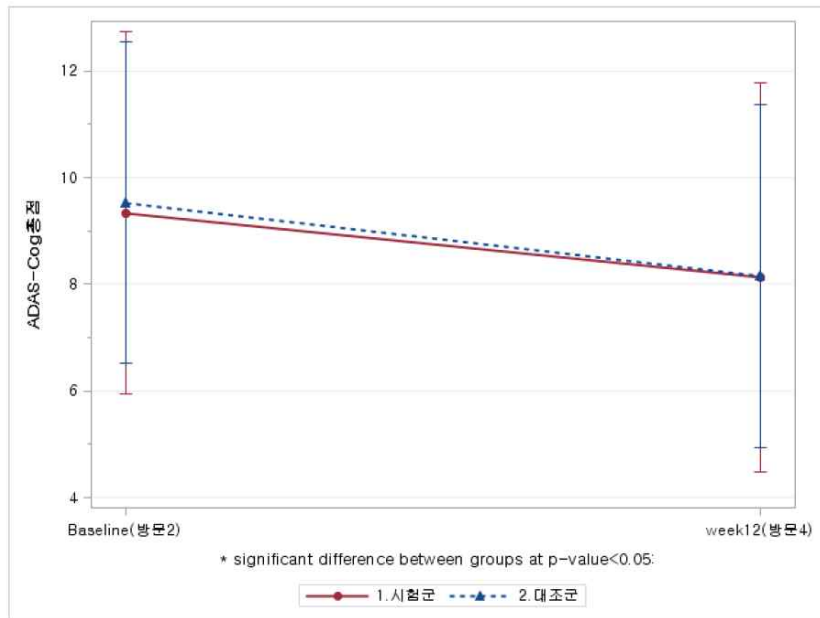
표 14. 방문별 ADAS-Cog 총점 변화량 (FA Set)

	시험군		대조군		p-value*	p-value [§]
	N=41		N=45			
	n	Mean±SD	n	Mean±SD		
Baseline(방문2)	41	9.34±3.39	45	9.53±3.01	0.7824	
12 주(방문4)	41	8.13±3.65	45	8.15±3.21		
Change from baseline	41	-1.21±2.77	45	-1.38±2.70	0.7770	0.8419
p-value**		0.0078		0.0013		

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§ : Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



<그림 27. 방문별 ADAS-Cog 총점(FA set)>

■ ADAS-K

ADAS-K는 인지 소척도 ADAS-Cog(Cognitive subscale of the ADAS)의 11개 항목에 비인지 소척도 ADAS-Noncog(Noncognitive subscale of the ADAS)의 1개 항목을 추가하여 12개 항목으로 구성되어 있다. 점수범위는 0~75점이며, 각 항목의 오류 점수를 합산하므로 점수가 높을수록 인지기능장애 정도가 심함을 의미한다.

표 15는 0주, 12주에서 측정된 ADAS-K 총점 변화량 PP Set으로 분석한 결과이다.

ADAS-K 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 1.22 ± 2.90 점 감소하였고 ($p=0.0136$), 대조군은 1.41 ± 2.96 점 감소하였다($p=0.0041$).

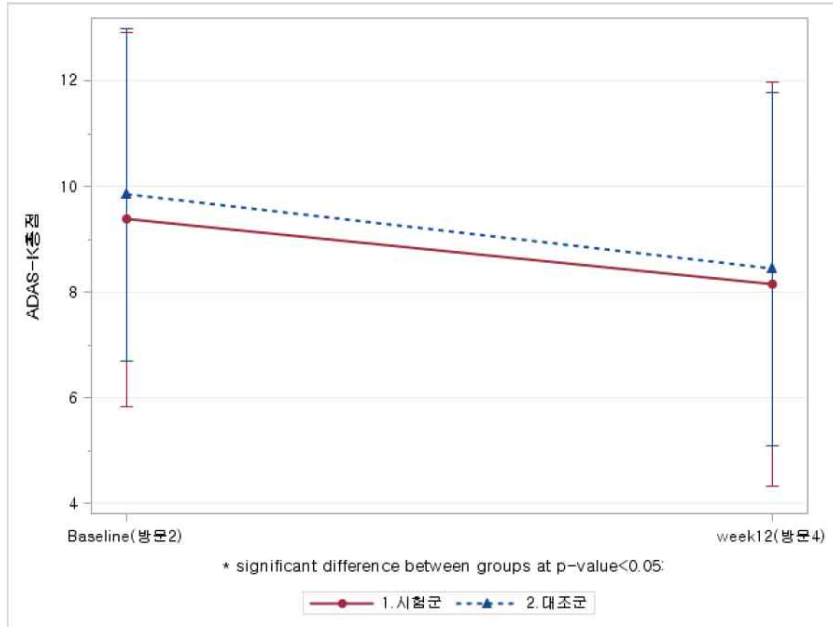
표 15. 방문별 ADAS-K 총점 변화량 (PP Set)

		시험군		대조군		p-value*	p-value [§]
		N=38		N=41			
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
	Baseline(방문2)	38	9.38±3.54	41	9.85±3.14	0.5357	
ADAS-K	12 주(방문4)	38	8.16±3.83	41	8.44±3.35		
총점	Change from baseline	38	-1.22±2.90	41	-1.41±2.96	0.7761	0.9438
	p-value**		0.0136		0.0041		

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§: Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



<그림 27. 방문별 ADAS-cog 총점(PP set)>

표 16은 0주, 12주에서 측정된 ADAS-K 총점 변화를 FA Set으로 분석한 결과이다. ADAS-K 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 1.28 ± 2.88 점 감소하였고 ($p=0.0069$), 대조군은 1.40 ± 2.83 점 감소하였다($p=0.0018$).

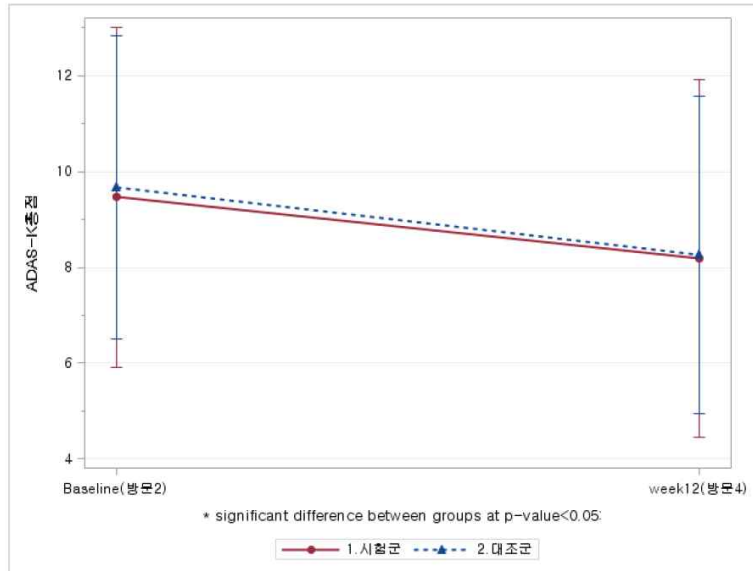
표 16. 방문별 ADAS-K 총점 변화량 (FA Set)

		시험군		대조군		p-value*	p-value [§]
		N=41		N=45			
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
	Baseline(방문2)	41	9.46±3.55	45	9.67±3.17	0.7803	
ADAS-K	12 주(방문4)	41	8.18±3.74	45	8.27±3.31		
총점	Change from baseline	41	-1.28±2.88	45	-1.40±2.83	0.8502	0.9261
	p-value**	0.0069		0.0018			

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§: Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



<그림 27. 방문별 ADAS-cog 총점(FA set)>

■ ADAS-K 세부항목

표 17은 0주, 12주에서 측정된 ADAS-K 세부항목 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다. ADAS-Cog 기억력 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.59 ± 2.55 점 감소하였고($p=0.1644$), 대조군은 1.21 ± 2.36 점 감소하였다($p=0.0021$).

ADAS-Cog 기억력 개별항목 중 단어재생 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.21 ± 1.24 점 감소하였고($p=0.2999$), 대조군은 0.39 ± 1.17 점 감소하였다($p=0.0388$).

지남력 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.00 ± 0.00 으로 변화가 없었으며, 대조군은 0.02 ± 0.27 점 감소하였다($p=0.5701$).

단어재인 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.45 ± 1.68 점 감소하였고($p=0.1102$), 대조군은 0.48 ± 1.49 점 감소하였다($p=0.0448$).

검사지시 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.07 ± 0.43 점 증가하였고($p=0.3231$), 대조군은 0.32 ± 0.82 점 감소하여($p=0.0176$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0101^*$).

ADAS-Cog 언어능력 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.42 ± 0.95 점 감소하였고($p=0.0095$), 대조군은 0.15 ± 1.09 점 감소하였다($p=0.3931$).

ADAS-Cog 언어능력 개별항목 중 대화 중 언어발견곤란 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.03 ± 0.16 점 감소하였고($p=0.3238$), 대조군은 0.10 ± 0.37 점 증가하여($p=0.1031$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0271$).

ADAS-Cog 수행능력 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.16 ± 0.75 점 감소하였고($p=0.2049$), 대조군은 0.05 ± 0.63 점 감소하였다($p=0.6230$).

ADAS-Noncog(집중력 및 주의산만 정도) 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.05 ± 0.32 점 감소하였고($p=0.3238$), 대조군은 0.00 ± 0.39 점으로 변화가 없었다($p=1.0000$).

표 17. 방문별 ADAS-K 세부항목 변화량 (PP Set)

		시험군 N=38		대조군 N=41		p-value*	p-value [§]	
		n	Mean±SD	n	Mean±SD			
기 역 력	총점	Baseline(방문2)	38	7.75±2.95	41	7.99±2.44	0.6868	
		12주(방문4)	38	7.16±3.29	41	6.78±2.62		
		Change from baseline	38	-0.59±2.55	41	-1.21±2.36	0.2614	0.2976
		p-value**		0.1644		0.0021		
	단어재생	Baseline(방문2)	38	4.68±1.42	41	4.83±1.53	0.6446	
		12주(방문4)	38	4.46±1.46	41	4.44±1.39		
		Change from baseline	38	-0.21±1.24	41	-0.39±1.17	0.5092	0.6153
		p-value**		0.2999		0.0388		
	지남력	Baseline(방문2)	38	0.03±0.16	41	0.05±0.22	0.6072	
		12주(방문4)	38	0.03±0.16	41	0.02±0.16		
		Change from baseline	38	0.00±0.00	41	-0.02±0.27	0.5701	0.7840
		p-value**		-		0.5701		
	단어재인	Baseline(방문2)	38	2.98±1.87	41	2.67±1.33	0.4044	
		12주(방문4)	38	2.54±1.99	41	2.19±1.55		
		Change from baseline	38	-0.45±1.68	41	-0.48±1.49	0.9251	0.6565
		p-value**		0.1102		0.0448		
검사지시	Baseline(방문2)	38	0.06±0.23	41	0.44±0.90	0.0123		

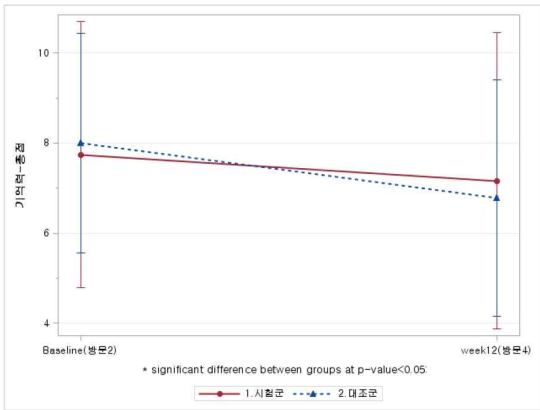
		시험군 N=38		대조군 N=41		p-value*	p-value [§]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
	12주(방문4)	38	0.13±0.47	41	0.12±0.33		
	Change from baseline	38	0.07±0.43	41	-0.32±0.82	0.0101	0.3728
	p-value**		0.3231		0.0176		
총점	Baseline(방문2)	38	0.66±0.99	41	0.63±1.07	0.9189	
	12주(방문4)	38	0.24±0.63	41	0.49±0.87		
	Change from baseline	38	-0.42±0.95	41	-0.15±1.09	0.2361	0.1117
언어 구사능력	Baseline(방문2)	38	0.03±0.16	41	0.05±0.22	0.6072	
	12주(방문4)	38	0.03±0.16	41	0.02±0.16		
	Change from baseline	38	0.00±0.23	41	-0.02±0.27	0.6712	0.9705
언어 이해	Baseline(방문2)	38	0.08±0.36	41	0.17±0.44	0.3162	
	12주(방문4)	38	0.03±0.16	41	0.07±0.26		
	Change from baseline	38	-0.05±0.40	41	-0.10±0.54	0.6768	0.3112
언어 표현	Baseline(방문2)	38	0.03±0.16	41	0.02±0.16	0.9573	
	12주(방문4)	38	0.00±0.00	41	0.12±0.33		
	Change from baseline	38	-0.03±0.16	41	0.10±0.37	0.0585	0.0271
구두 명령 따르기	Baseline(방문2)	38	0.47±0.73	41	0.34±0.62	0.3844	
	12주(방문4)	38	0.16±0.44	41	0.27±0.50		
	Change from baseline	38	-0.32±0.66	41	-0.07±0.65	0.1038	0.1439
손가락 및 물건 이름 대기	Baseline(방문2)	38	0.05±0.23	41	0.05±0.22	0.9388	
	12주(방문4)	38	0.03±0.16	41	0.00±0.00		
	Change from baseline	38	-0.03±0.28	41	-0.05±0.22	0.6929	0.3040
수	총점	38	0.87±0.84	41	1.10±0.66	0.1820	

행 이 적		시험군		대조군		p-value*	p-value [§]
		N=38		N=41			
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
구 성 행 위	12주(방문4)	38	0.71±0.80	41	1.05±0.77		
	Change from baseline	38	-0.16±0.75	41	-0.05±0.63	0.4864	0.1806
	p-value**		0.2049		0.6230		
	Baseline(방문2)	38	0.32±0.53	41	0.41±0.50	0.3936	
	12주(방문4)	38	0.26±0.50	41	0.49±0.60		
	Change from baseline	38	-0.05±0.32	41	0.07±0.47	0.1671	0.0975
	p-value**		0.3238		0.3233		
	Baseline(방문2)	38	0.55±0.50	41	0.68±0.47	0.2386	
	12주(방문4)	38	0.45±0.50	41	0.56±0.50		
관 념 행 동	Change from baseline	38	-0.11±0.65	41	-0.12±0.51	0.8988	0.5147
	p-value**		0.3238		0.1334		
	Baseline(방문2)	38	0.11±0.31	41	0.12±0.33	0.8184	
Non -cog	집중력 및	38	0.05±0.23	41	0.12±0.33		
	주의산만 정도	38	-0.05±0.32	41	0.00±0.39	0.5163	0.2967
	p-value**		0.3238		1.0000		

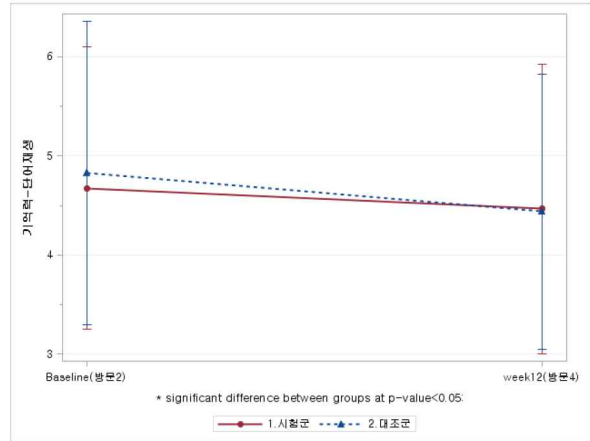
*: Compared between groups; p-value by Two sample t -test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

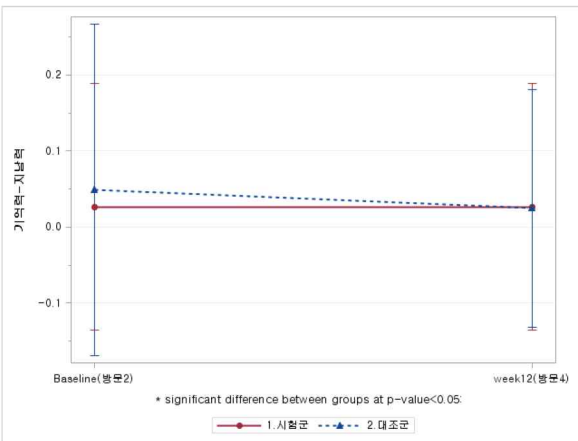
§ : Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



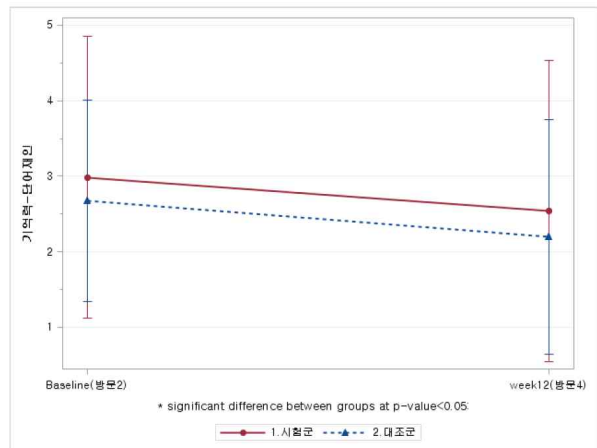
<그림 28. 방문별 기억력-총점(PP set)>



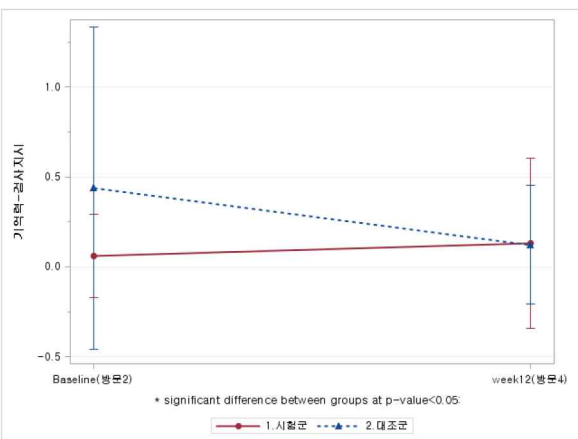
<그림 29. 방문별 기억력-단어재생(PP set)>



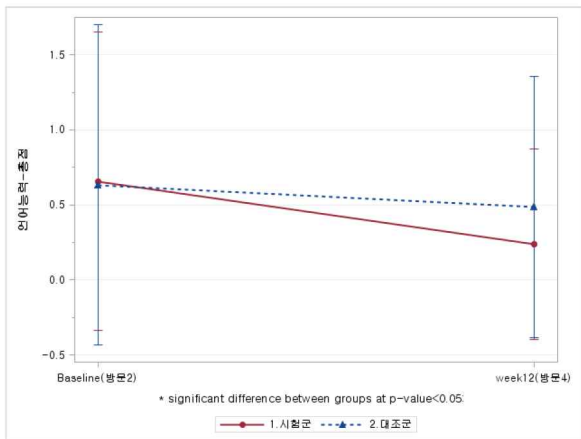
<그림 30. 방문별 기억력-지남력(PP set)>



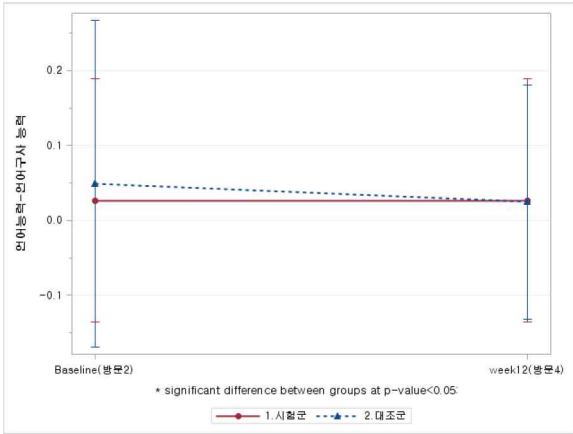
<그림 31. 방문별 기억력-단어재인(PP set)>



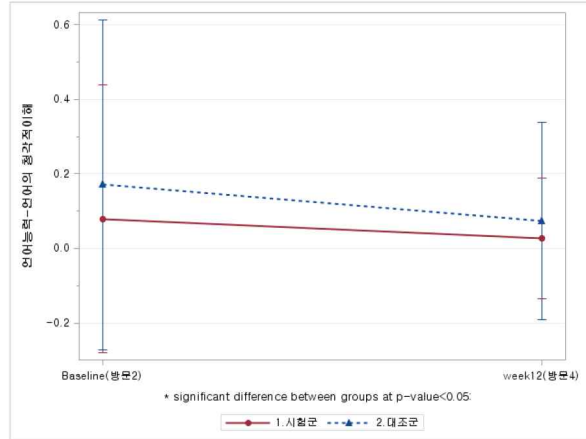
<그림 32. 방문별 기억력-검사지시(PP set)>



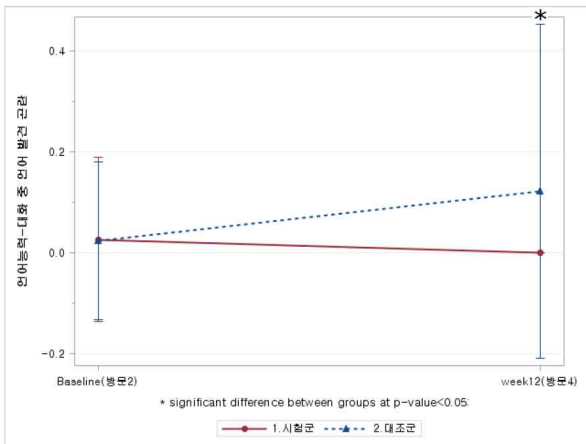
<그림 33. 방문별 언어능력-총점(PP set)>



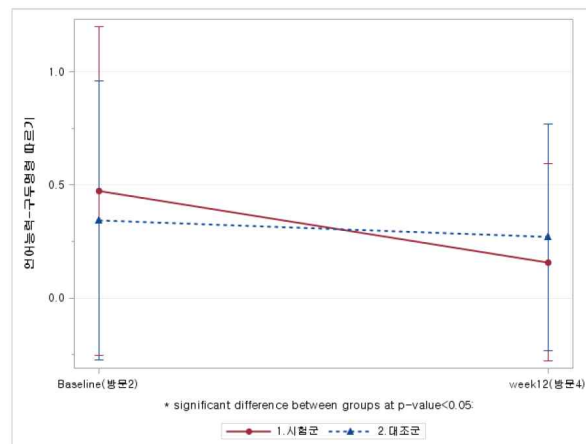
<그림 34. 방문별 언어능력-언어 구사능력(PP set)>



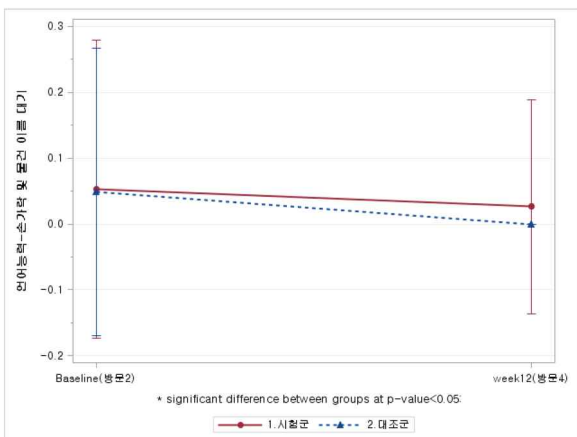
<그림 35. 방문별 언어능력-언어의 청각적 이해(PP set)>



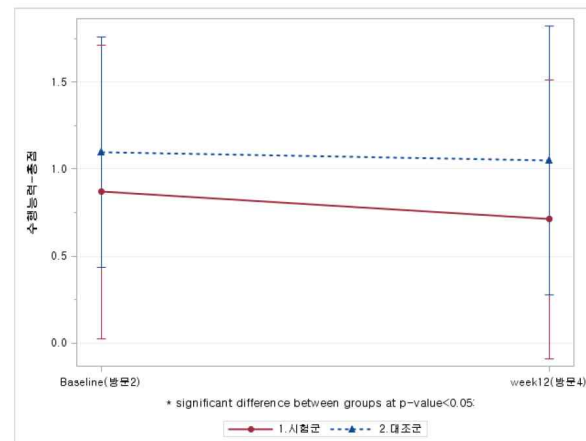
<그림 36. 방문별 언어능력-대화중 언어 발견곤란(PP set)>



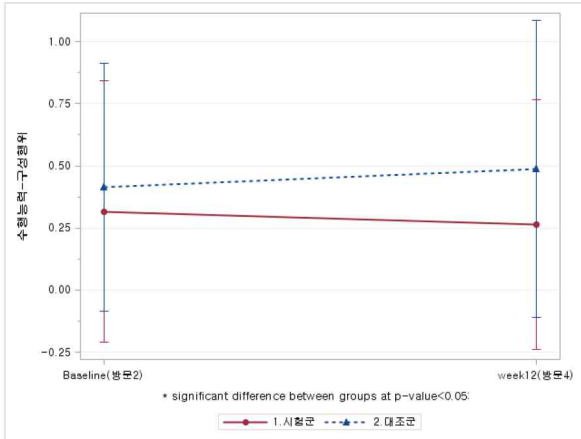
<그림 37. 방문별 언어능력-구두명령 따르기(PP set)>



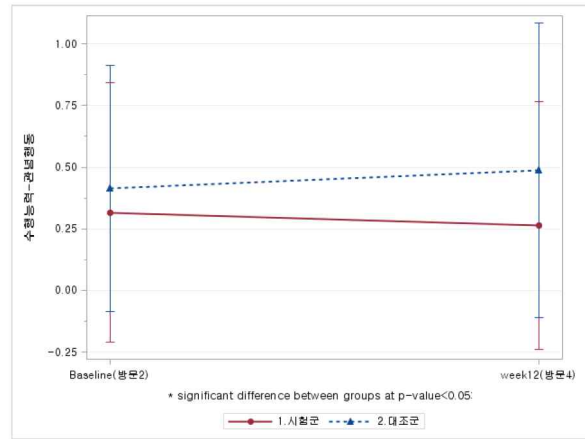
<그림 38. 방문별 언어능력-손가락 및 물건 이름 말하기(PP set)>



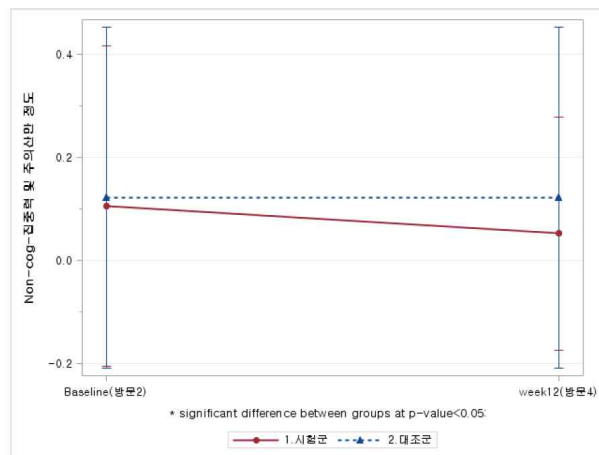
<그림 39. 방문별 수행능력-총점(PP set)>



<그림 40. 방문별 수행능력-구성행위(PP set)>



<그림 41. 방문별 수행능력-관념행동(PP set)>



<그림 42. 방문별 Non-cog 집중력 및 주의산만 정도(PP set)>

표 18은 0주, 12주에서 측정한 ADAS-K 세부항목 변화를 FA Set으로 분석한 결과이다. ADAS-Cog 기억력 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.67 ± 2.49 점 감소하였고($p=0.0900$), 대조군은 1.22 ± 2.25 점 감소하였다($p=0.0007$). ADAS-Cog 기억력 개별항목 중 단어재생 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.20 ± 1.22 점 감소하였고($p=0.3110$), 대조군은 0.46 ± 1.16 점 감소하였다($p=0.0110$). 지남력 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.00 ± 0.00 으로 변화가 없었으며, 대조군은 0.02 ± 0.26 점 감소하였다($p=0.5695$). 단어재인 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.54 ± 1.67 점 감소하였고($p=0.0427$), 대조군은 0.47 ± 1.42 점 감소하였다($p=0.0298$). 검사지시 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.07 ± 0.42 점 증가하였고($p=0.3226$), 대조군은 0.27 ± 0.81 점 감소하여($p=0.0323$) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이가 나타났

다(p=0.0182*).

ADAS-Cog 언어능력 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.44± 0.92점 감소하였고 (p=0.0041), 대조군은 0.13± 1.04점 감소하였다(p=0.3925).

ADAS-Cog 언어능력 개별항목 중 대화 중 언어발견곤란 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.02± 0.16점 감소하였고(p=0.3233), 대조군은 0.09± 0.36점 증가하여(p=0.1031) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p=0.0289\$).

ADAS-Cog 수행능력 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.10± 0.83점 감소하였고 (p=0.4565), 대조군은 0.02± 0.62점 감소하였다(p=0.8115).

ADAS-Noncog(집중력 및 주의산만 정도) 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.07± 0.35점 감소하였고(p=0.1829), 대조군은 0.02± 0.40점 감소하였다(p=0.7100).

표 18. 방문별 ADAS-K 세부항목 변화량 (FA Set)

		시험군		대조군		p-value*	p-value [§]	
		n	Mean±SD	n	Mean±SD			
기 역 력	총점	Baseline(방문2)	38	7.75±2.95	41	7.99±2.44	0.6868	
		12주(방문4)	38	7.16±3.29	41	6.78±2.62		
		Change from baseline	38	-0.59±2.55	41	-1.21±2.36	0.2614	0.2976
		p-value**		0.1644		0.0021		
	단어재생	Baseline(방문2)	38	4.68±1.42	41	4.83±1.53	0.6446	
		12주(방문4)	38	4.46±1.46	41	4.44±1.39		
		Change from baseline	38	-0.21±1.24	41	-0.39±1.17	0.5092	0.6153
		p-value**		0.2999		0.0388		
	지남력	Baseline(방문2)	38	0.03±0.16	41	0.05±0.22	0.6072	
		12주(방문4)	38	0.03±0.16	41	0.02±0.16		
		Change from baseline	38	0.00±0.00	41	-0.02±0.27	0.5701	0.7840
		p-value**		-		0.5701		
단어재인	Baseline(방문2)	38	2.98±1.87	41	2.67±1.33	0.4044		
	12주(방문4)	38	2.54±1.99	41	2.19±1.55			
	Change from baseline	38	-0.45±1.68	41	-0.48±1.49	0.9251	0.6565	
	p-value**		0.1102		0.0448			
검사지시	Baseline(방문2)	38	0.06±0.23	41	0.44±0.90	0.0123		

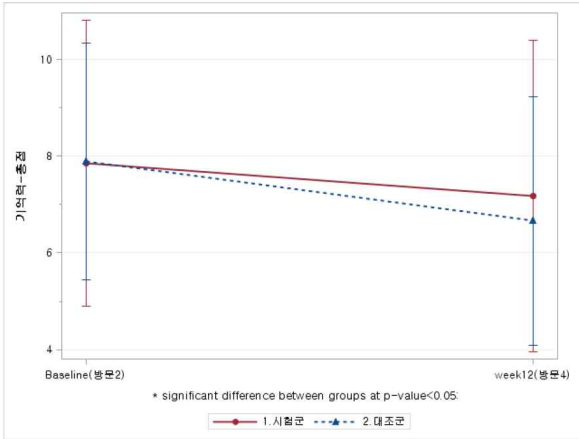
		시험군		대조군		p-value*	p-value [‡]	
		N=38		N=41				
		n	Mean±SD	n	Mean±SD			
	12주(방문4)	38	0.13±0.47	41	0.12±0.33			
	Change from baseline	38	0.07±0.43	41	-0.32±0.82	0.0101	0.3728	
		p-value**		0.3231		0.0176		
총점	Baseline(방문2)	38	0.66±0.99	41	0.63±1.07	0.9189		
	12주(방문4)	38	0.24±0.63	41	0.49±0.87			
	Change from baseline	38	-0.42±0.95	41	-0.15±1.09	0.2361	0.1117	
			p-value**		0.0095		0.3931	
언어 구사능력	Baseline(방문2)	38	0.03±0.16	41	0.05±0.22	0.6072		
	12주(방문4)	38	0.03±0.16	41	0.02±0.16			
	Change from baseline	38	0.00±0.23	41	-0.02±0.27	0.6712	0.9705	
			p-value**		1.0000		0.5701	
언어 능 력	Baseline(방문2)	38	0.08±0.36	41	0.17±0.44	0.3162		
	12주(방문4)	38	0.03±0.16	41	0.07±0.26			
	청각적 이해	38	-0.05±0.40	41	-0.10±0.54	0.6768	0.3112	
			p-value**		0.4215		0.2531	
대화 중 언어발견곤란	Baseline(방문2)	38	0.03±0.16	41	0.02±0.16	0.9573		
	12주(방문4)	38	0.00±0.00	41	0.12±0.33			
	Change from baseline	38	-0.03±0.16	41	0.10±0.37	0.0585	0.0271	
			p-value**		0.3238		0.1031	
구두 명령 따르기	Baseline(방문2)	38	0.47±0.73	41	0.34±0.62	0.3844		
	12주(방문4)	38	0.16±0.44	41	0.27±0.50			
	Change from baseline	38	-0.32±0.66	41	-0.07±0.65	0.1038	0.1439	
			p-value**		0.0056		0.4737	
손가락 및 물건 이름 대기	Baseline(방문2)	38	0.05±0.23	41	0.05±0.22	0.9388		
	12주(방문4)	38	0.03±0.16	41	0.00±0.00			
	Change from baseline	38	-0.03±0.28	41	-0.05±0.22	0.6929	0.3040	
			p-value**		0.5706		0.1598	
수	총점	Baseline(방문2)	38	0.87±0.84	41	1.10±0.66	0.1820	

		시험군 N=38		대조군 N=41		p-value*	p-value [§]		
		n	Mean±SD	n	Mean±SD				
행 이 표	구 성 행 위	12주(방문4)	38	0.71±0.80	41	1.05±0.77			
		Change from baseline	38	-0.16±0.75	41	-0.05±0.63	0.4864	0.1806	
		p-value**		0.2049		0.6230			
	구 성 행 위	Baseline(방문2)	38	0.32±0.53	41	0.41±0.50	0.3936		
		12주(방문4)	38	0.26±0.50	41	0.49±0.60			
		Change from baseline	38	-0.05±0.32	41	0.07±0.47	0.1671	0.0975	
	구 성 행 위	p-value**		0.3238		0.3233			
		관 념 행 동	Baseline(방문2)	38	0.55±0.50	41	0.68±0.47	0.2386	
			12주(방문4)	38	0.45±0.50	41	0.56±0.50		
	Change from baseline		38	-0.11±0.65	41	-0.12±0.51	0.8988	0.5147	
	관 념 행 동	p-value**		0.3238		0.1334			
		Non - cog	Baseline(방문2)	38	0.11±0.31	41	0.12±0.33	0.8184	
12주(방문4)			38	0.05±0.23	41	0.12±0.33			
Change from baseline	38		-0.05±0.32	41	0.00±0.39	0.5163	0.2967		
Non - cog	p-value**		0.3238		1.0000				

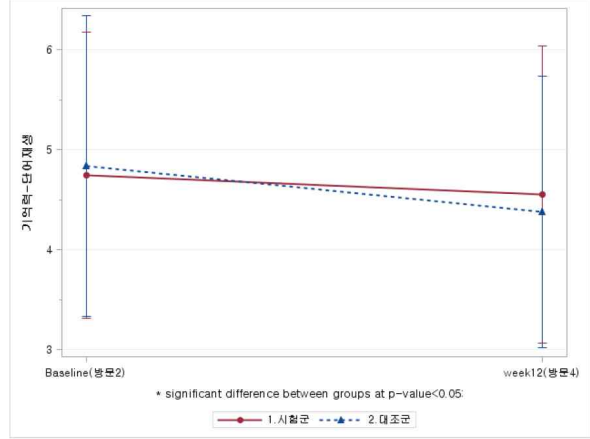
*: Compared between groups; p-value by Two sample t -test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

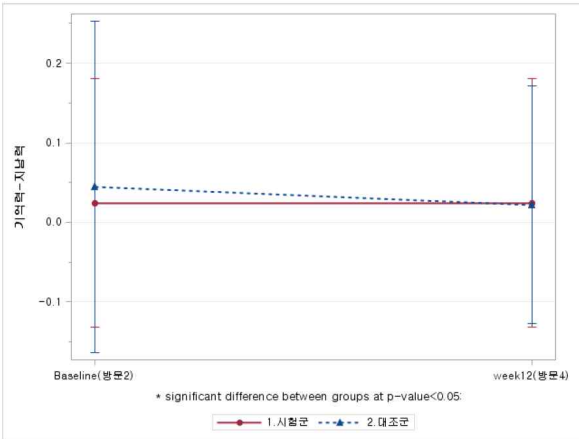
§: Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



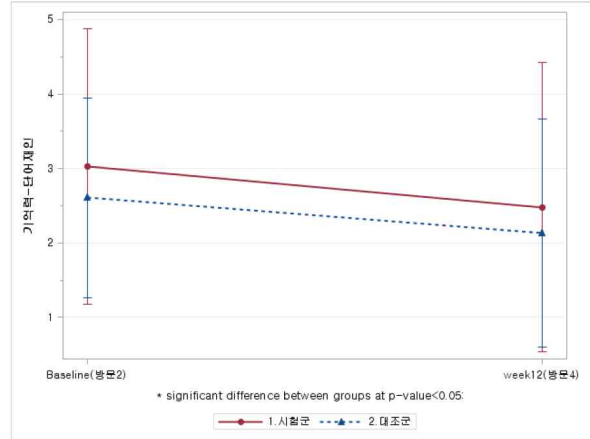
<그림 43. 방문별 기억력-총점(FA set)>



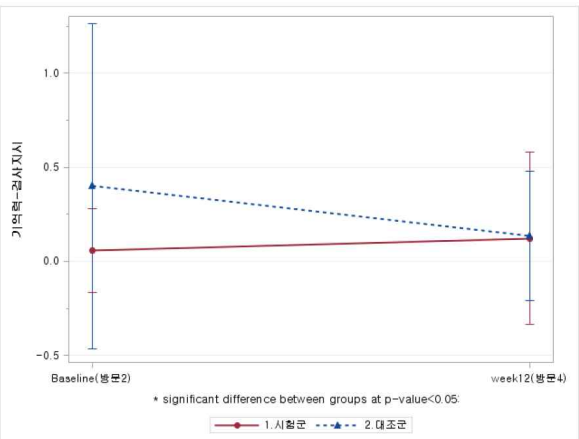
<그림 44. 방문별 기억력-단어재생(FA set)>



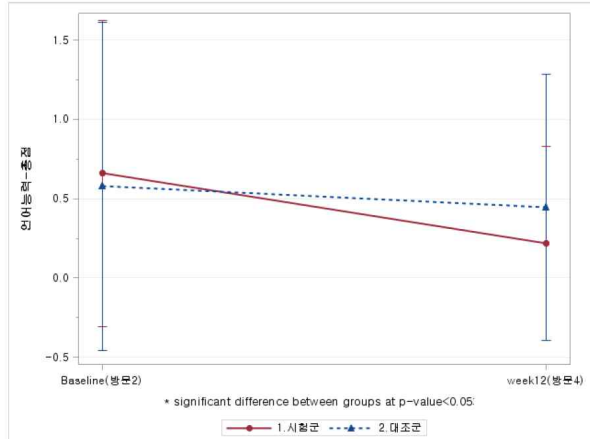
<그림 45. 방문별 기억력-지남력(FA set)>



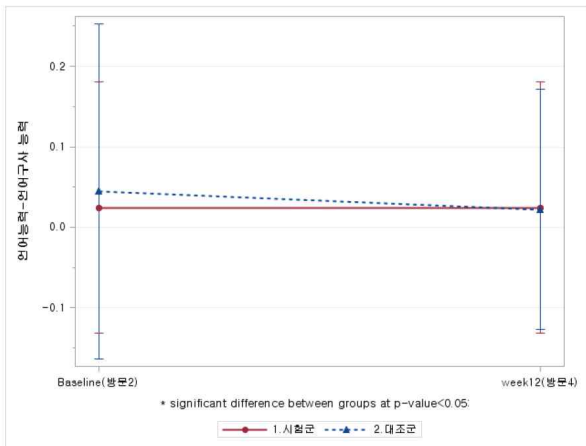
<그림 46. 방문별 기억력-단어재인(FA set)>



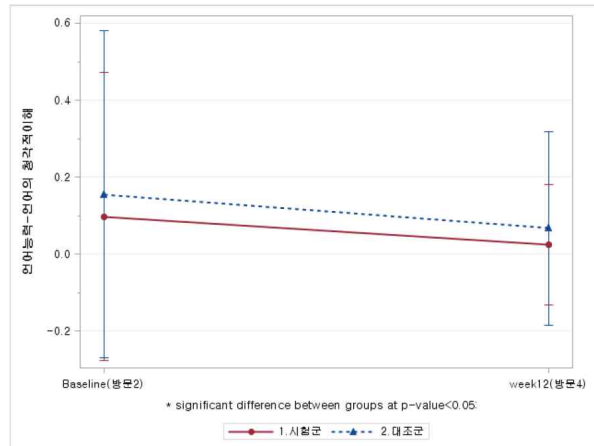
<그림 47. 방문별 기억력-검사지시(FA set)>



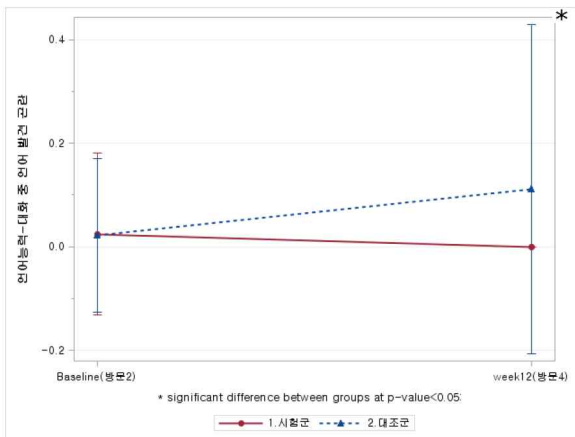
<그림 48. 방문별 언어능력-총점(FA set)>



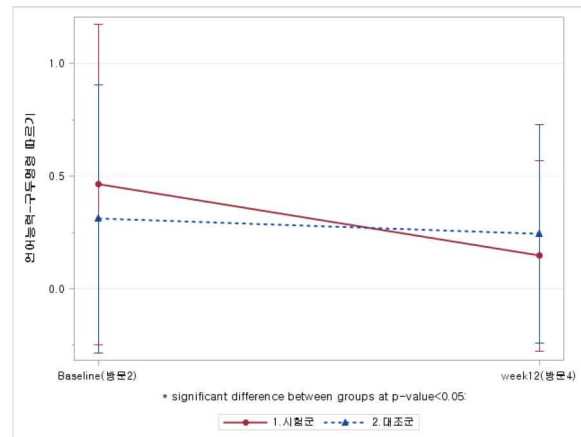
<그림 49. 방문별 언어능력-언어 구사능력(FA set)>



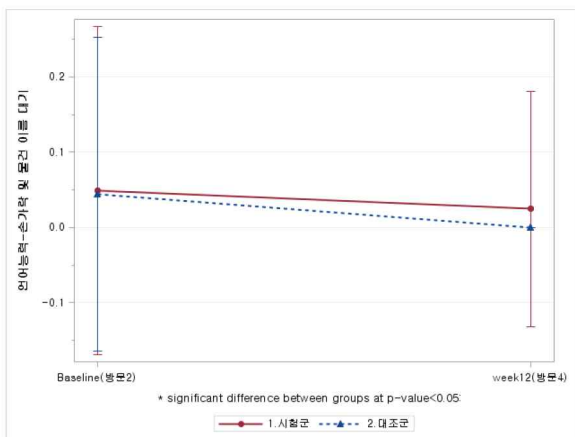
<그림 50. 방문별 언어능력-언어의 청각적 이해(FA set)>



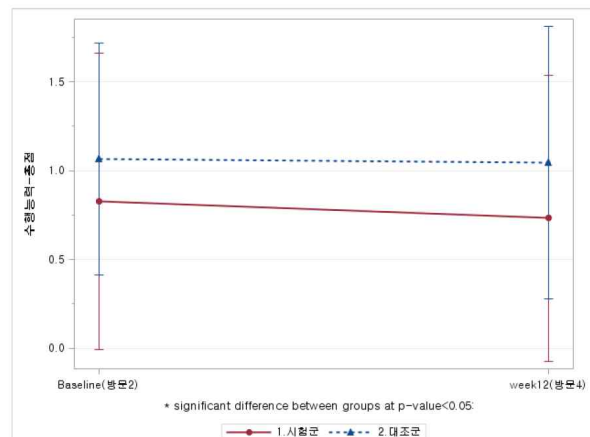
<그림 51. 방문별 언어능력-대화중 언어발견곤란(FA set)>



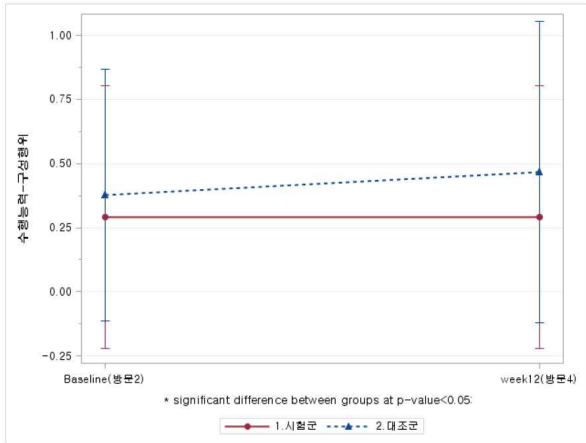
<그림 52. 방문별 언어능력-구두명령 따르기(FA set)>



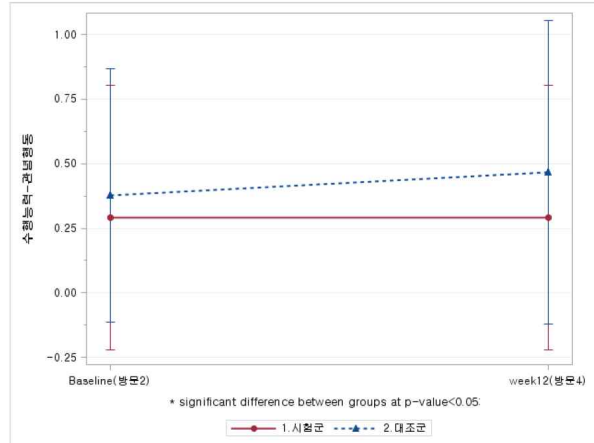
<그림 53. 방문별 언어능력-손가락 및 물건 이름 말하기(FA set)>



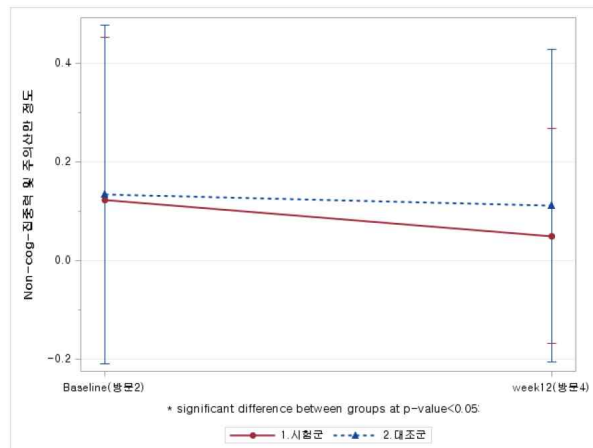
<그림 54. 방문별 수행능력-총점(FA set)>



<그림 55. 방문별 수행능력-구성행위(FA set)>



<그림 56. 방문별 수행능력-관념행동(FA set)>



<그림 57. 방문별 Non-cog 집중력 및 주의산만 정도(FA set)>

■ Visual C.P.T

Visual C.P.T는 자극이 제시되었을 때 반응한 반응시간(Reaction time), 자극이 제시되었는데 반응하지 않은 누락오류(Omission error)수, 자극이 제시되지 않았을 때 반응한 과잉반응(Commission error)수, 그리고 자극이 제시되었을 때 정확하게 반응하는 정반응(Correct response)수를 측정하는 검사로, 정반응시간과 표준편차로 결과를 제시하였다. 정반응수를 제외한 누락오류수, 과잉반응수, 정반응시간과 표준편차는 결과치가 높을수록 정도가 심함을 의미한다.

표 19는 0주, 12주에 측정한 Visual C.P.T (시각지속검사) 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다.

정반응수 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.05 ± 14.67 회 감소하였고($p=0.9825$), 대조군은 2.24 ± 13.14 회 감소하였다($p=0.2806$).

누락오류수 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.05 ± 14.67 회 증가하였고($p=0.9825$), 대조군은 2.24 ± 13.14 회 증가하였다($p=0.2806$).

과잉반응수 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.84 ± 11.84 회 증가하였고($p=0.6635$), 대조군은

2.22± 7.47회 감소하였다(p=0.0644).

정반응시간 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.01± 0.09sec 증가하였고(p=0.5286), 대조군은 0.00± 0.03sec으로 변화가 없었다(p=0.6956).

표준편차 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.00± 0.03sec으로 변화가 없었으며(p=0.8521), 대조군은 0.01± 0.03sec 감소하였다(p=0.0203).

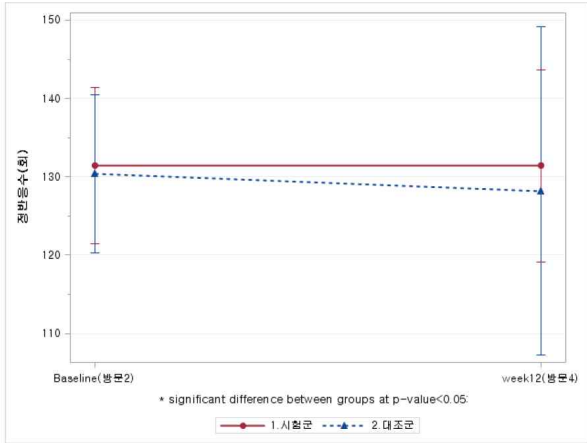
표 19. 방문별 Visual C.P.T 변화량 (PP Set)

		시험군 N=38		대조군 N=41		p- value*	p- value [§]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
정반응수(회)	Baseline(방문2)	38	131.45±10.03	41	130.41±10.12	0.6504	
	12주(방문4)	38	131.39±12.28	41	128.17±20.95		
	Change from baseline	38	-0.05±14.67	41	-2.24±13.14	0.4859	0.4951
	p-value**		0.9825		0.2806		
누락오류수(회)	Baseline(방문2)	38	3.55±10.03	41	4.59±10.12	0.6504	
	12주(방문4)	38	3.61±12.28	41	6.83±20.95		
	Change from baseline	38	0.05±14.67	41	2.24±13.14	0.4859	0.4951
	p-value**		0.9825		0.2806		
과잉반응수(회)	Baseline(방문2)	38	4.16±4.35	41	5.85±8.29	0.2545	
	12주(방문4)	38	5.00±11.35	41	3.63±3.50		
	Change from baseline	38	0.84±11.84	41	-2.22±7.47	0.1779	0.3701
		시험군 N=38		대조군 N=41		p- value*	p- value [§]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
			0.6635		0.0644		
정반응시간 (sec)	Baseline(방문2)	38	0.44±0.09	41	0.47±0.06	0.1040	
	12주(방문4)	38	0.45±0.06	41	0.47±0.05		
	Change from baseline	38	0.01±0.09	41	0.00±0.03	0.4729	0.5934
	p-value**		0.5286		0.6956		
표준편차(sec)	Baseline(방문2)	38	0.07±0.03	41	0.08±0.04	0.0695	
	12주(방문4)	38	0.07±0.02	41	0.07±0.03		
	Change from baseline	38	0.00±0.03	41	-0.01±0.03	0.1336	0.6453
	p-value**		0.8521		0.0203		

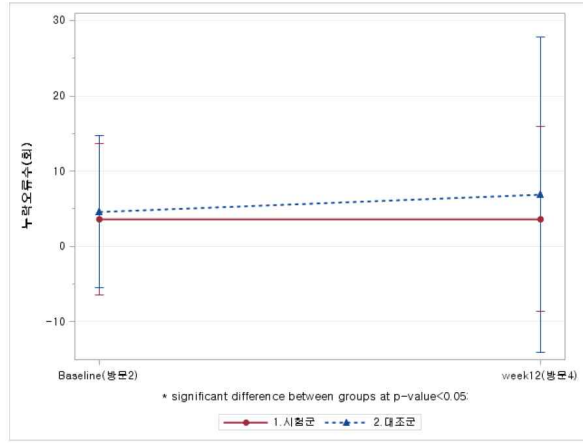
*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

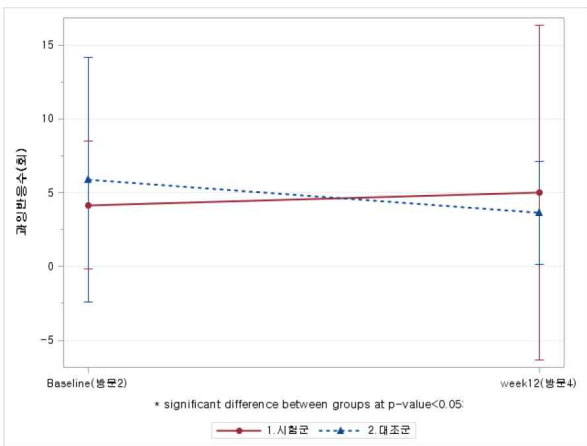
§: Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



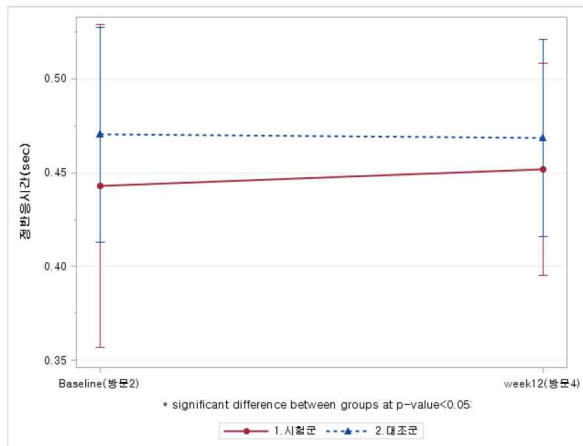
<그림 58. 방문별 정반응수(회)(PP set)>



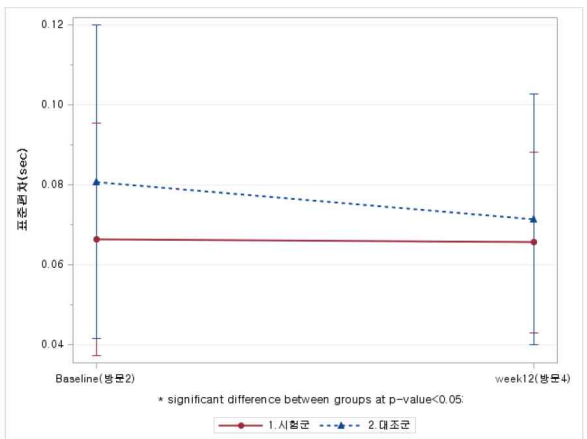
<그림 59. 방문별 누락오류수(회)(PP set)>



<그림 60. 방문별 과잉반응수(회)(PP set)>



<그림 61. 방문별 정반응시간(sec)(PP set)>



<그림 62. 방문별 표준편차(sec)(PP set)>

표 20은 0주, 12주에 측정한 Visual C.P.T (시각지속검사) 변화를 FA Set으로 분석한 결과이다. 정반응수 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.12 ± 14.12 회 감소하였고($p=0.9562$), 대조군은 1.87 ± 12.62 회 감소하였다($p=0.3264$).
 누락오류수 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.12 ± 14.12 회 증가하였고($p=0.9562$), 대조군은 1.87 ± 12.62 회 증가하였다($p=0.3264$).
 과잉반응수 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.76 ± 11.73 회 증가하였고($p=0.6819$), 대조군은 2.22 ± 7.21 회 감소하였다($p=0.0447$).
 정반응시간 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.01 ± 0.08 sec 증가하였고($p=0.4010$), 대조군은 0.00 ± 0.03 sec으로 변화가 없었다($p=0.5012$).
 표준편차 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.00 ± 0.03 sec으로 변화가 없었으며($p=0.8075$), 대조군은 0.01 ± 0.02 sec 감소하였다($p=0.0183$).

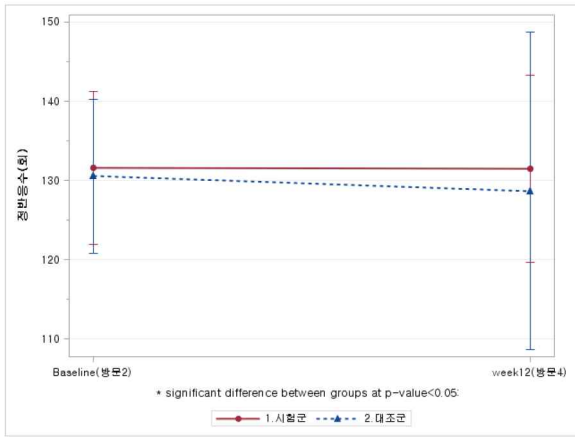
표 20. 방문별 Visual C.P.T 변화량 (FA Set)

		시험군		대조군		p-value*	p-value [§]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
정반응수(회)	Baseline(방문2)	41	131.61±9.67	45	130.53±9.68	0.6078	
	12주(방문4)	41	131.49±11.82	45	128.67±20.04		
	Change from baseline	41	-0.12±14.12	45	-1.87±12.62	0.5468	0.5563
	p-value**		0.9562		0.3264		
누락오류수(회)	Baseline(방문2)	41	3.39±9.67	45	4.47±9.68	0.6078	
	12주(방문4)	41	3.51±11.82	45	6.33±20.04		
	Change from baseline	41	0.12±14.12	45	1.87±12.62	0.5468	0.5563
	p-value**		0.9562		0.3264		
과잉반응수(회)	Baseline(방문2)	41	4.41±4.43	45	5.71±8.01	0.3509	
	12주(방문4)	41	5.17±11.17	45	3.49±3.40		
	Change from baseline	41	0.76±11.73	45	-2.22±7.21	0.1655	0.2751
	p-value**		0.6819		0.0447		
정반응시간(sec)	Baseline(방문2)	41	0.44±0.08	45	0.47±0.06	0.0802	
	12주(방문4)	41	0.45±0.06	45	0.47±0.05		
	Change from baseline	41	0.01±0.08	45	0.00±0.03	0.3147	0.8228
	p-value**		0.4010		0.5012		
표준편차(sec)	Baseline(방문2)	41	0.07±0.03	45	0.08±0.04	0.0905	
	12주(방문4)	41	0.07±0.02	45	0.07±0.03		
	Change from baseline	41	0.00±0.03	45	-0.01±0.02	0.1445	0.6167
	p-value**		0.8075		0.0183		

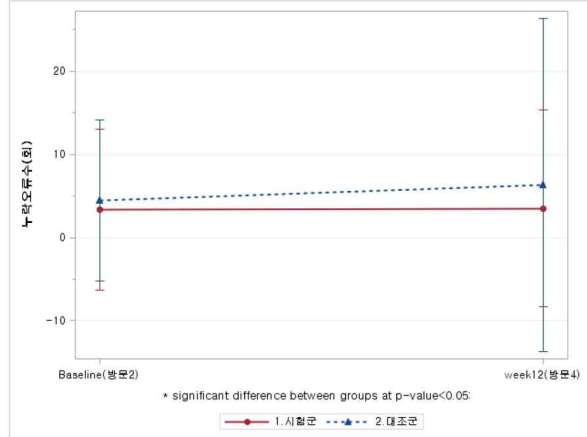
*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

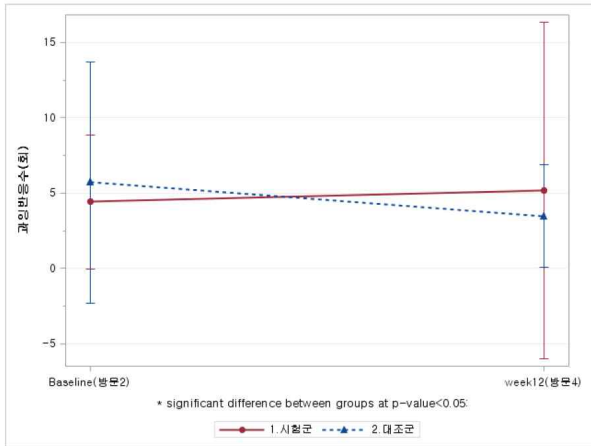
§ : Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



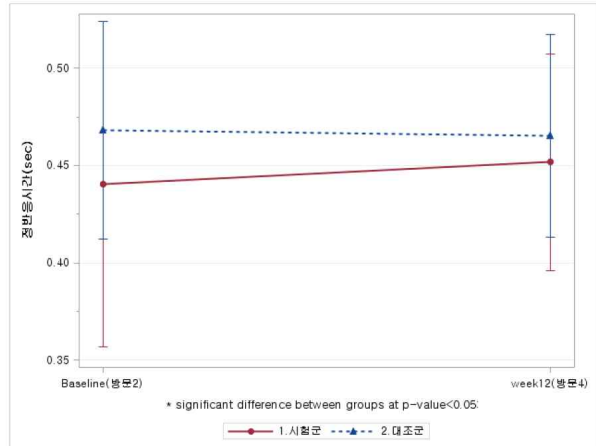
<그림 63. 방문별 정반응수(회)(FA set)>



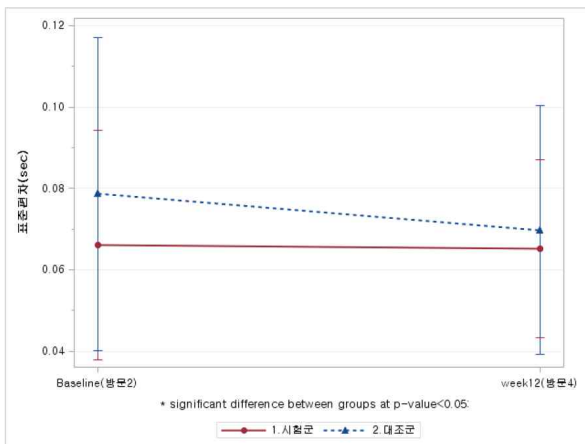
<그림 64. 방문별 누락오류수(회)(FA set)>



<그림 65. 방문별 과잉반응수(회)(FA set)>



<그림 66. 방문별 정반응시간(sec)(FA set)>



<그림 67. 방문별 표준편차(sec)(FA set)>

■ ADCS-ADL

ADCS-ADL은 일상생활에 필요한 기술과 기능을 측정하는 검사로, 식사, 보행, 화장실에서 대소변의 해결, 목욕하기, 몸단장, 옷입기, 전화 사용, 쇼핑(장보기), 여가활동 등 23개 문항으로 구성되어 있으며, 점수가 낮을수록 일상생활 활동장애 정도가 심함을 의미한다.

표 21은 0주, 12주에서 측정한 ADCS-ADL(일상생활 활동 평가지수) 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다.

ADCS-ADL 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.00 ± 2.24 으로 변화가 없었으며 ($p=1.0000$), 대조군은 0.39 ± 2.28 증가하였다($p=0.2794$).

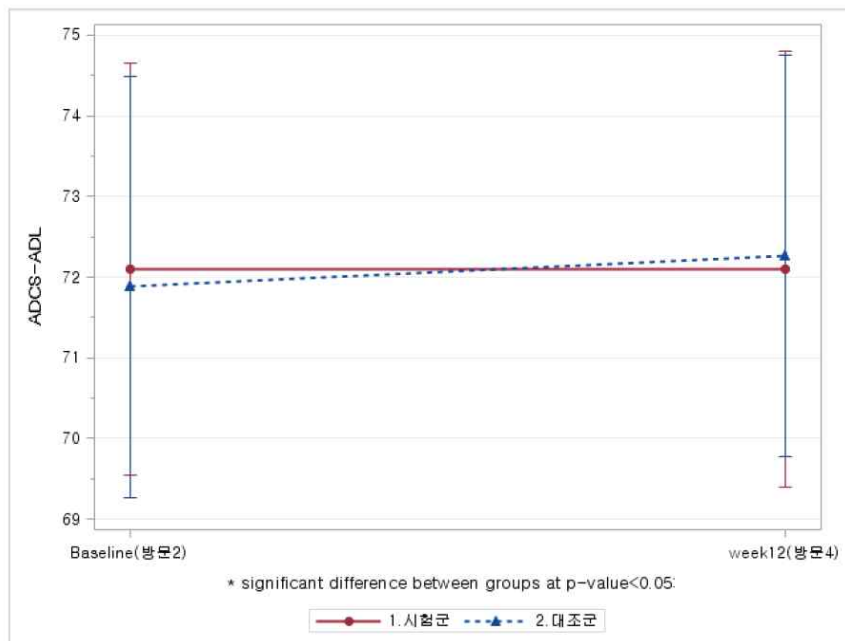
표 21. 방문별 ADCS-ADL 총점 변화량 (PP Set)

		시험군		대조군		p-value*	p-value [§]
		N=38		N=41			
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
ADCS-ADL 총점	Baseline(방문2)	38	72.11±2.56	41	71.88±2.62	0.6978	
	12 주(방문4)	38	72.11±2.70	41	72.27±2.49		
	Change from baseline	38	0.00±2.24	41	0.39±2.28	0.4458	0.5126
	p-value**		1.0000		0.2794		

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§: Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



<그림 68. 방문별 ADCS-ADL 총점(PP set)>

표 22는 0주, 12주에서 측정된 ADCS-ADL(일상생활 활동 평가지수) 변화를 FA Set으로 분석한 결과이다.

ADCS-ADL 총점 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.02 ± 2.16 증가하였고($p=0.9428$), 대조군은 0.38 ± 2.22 증가하였다($p=0.2595$).

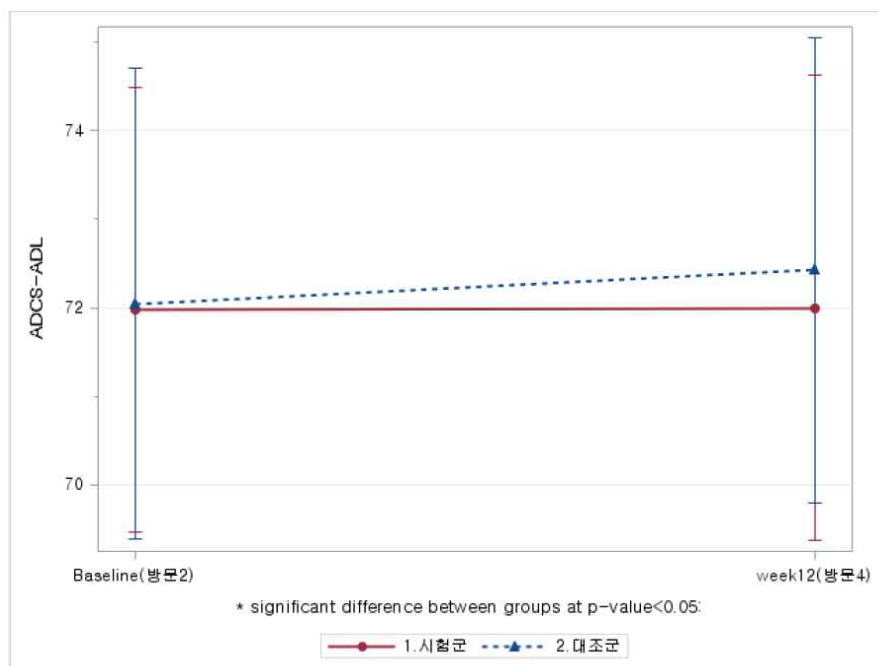
표 22. 방문별 ADCS-ADL 총점 변화량 (FA Set)

		시험군		대조군		p-value*	p-value [§]
		N=41		N=45			
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
	Baseline(방문2)	41	71.98±2.50	45	72.04±2.65	0.9021	
ADCS-ADL	12 주(방문4)	41	72.00±2.63	45	72.42±2.62		
총점	Change from baseline	41	0.02±2.16	45	0.38±2.22	0.4573	0.3889
	p-value**		0.9428		0.2595		

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§: Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



<그림 69. 방문별 ADCS-ADL 총점(FA set)>

■ SGDS

SGDS는 30문항의 자기 보고형 우울척도로서, 예/아니오로 간단히 대답할 수 있는 응답방식의 채택과 우울증의 신체 증상을 묻는 문항이 포함되지 않는 등의 특징들을 가지고 있어서 노인층에서의 우울증상을 선별하고 측정하는데 유용하게 사용되고 있으며, 점수가 높을수록 우울정도가 심함을 의미한다.

Table 23은 0주, 12주에서 측정한 SGDS(노인우울척도) 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다.

SGDS 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.58 ± 2.72 점 감소하였고($p=0.1972$), 대조군은 0.29 ± 2.57 점 감소하였다($p=0.4704$).

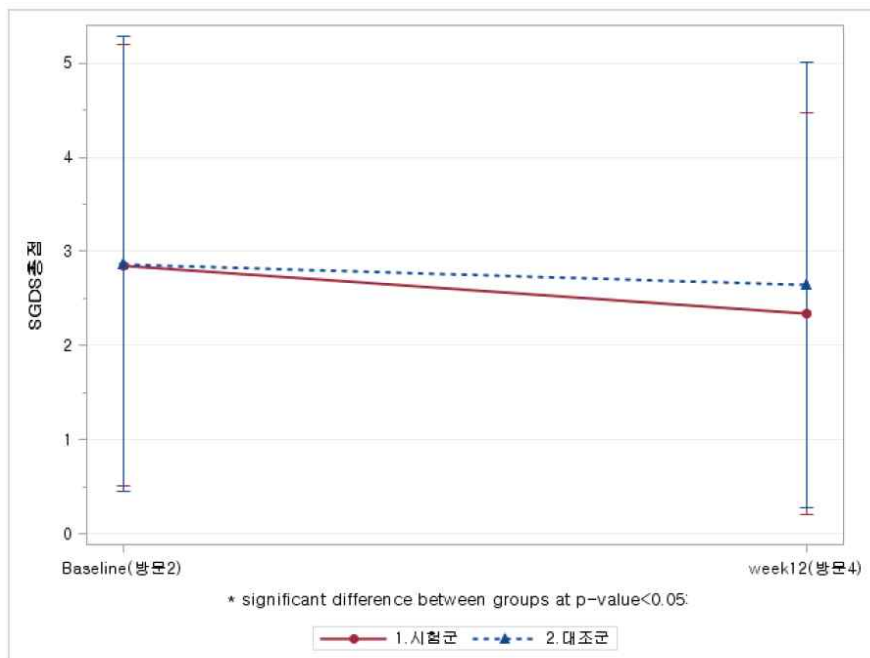
표 23. 방문별 SGDS 총점 변화량 (PP Set)

		시험군 N=38		대조군 N=41		p-value*	p-value [§]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
	Baseline(방문2)	38	2.87±2.41	41	2.98±2.42	0.8443	
SGDS	12 주(방문4)	38	2.29±2.15	41	2.68±2.38		
총점	Change from baseline	38	-0.58±2.72	41	-0.29±2.57	0.6318	0.4600
	p-value**		0.1972		0.4704		

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§: Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



<그림 70. 방문별 SGDS 총점(PP set)>

표 24는 0주, 12주에서 측정한 SGDS(노인우울척도) 변화를 FA Set으로 분석한 결과이다. SGDS 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.51 ± 2.67 점 감소하였고($p=0.2258$), 대조군은 0.22 ± 2.48 점 감소하였다($p=0.5502$).

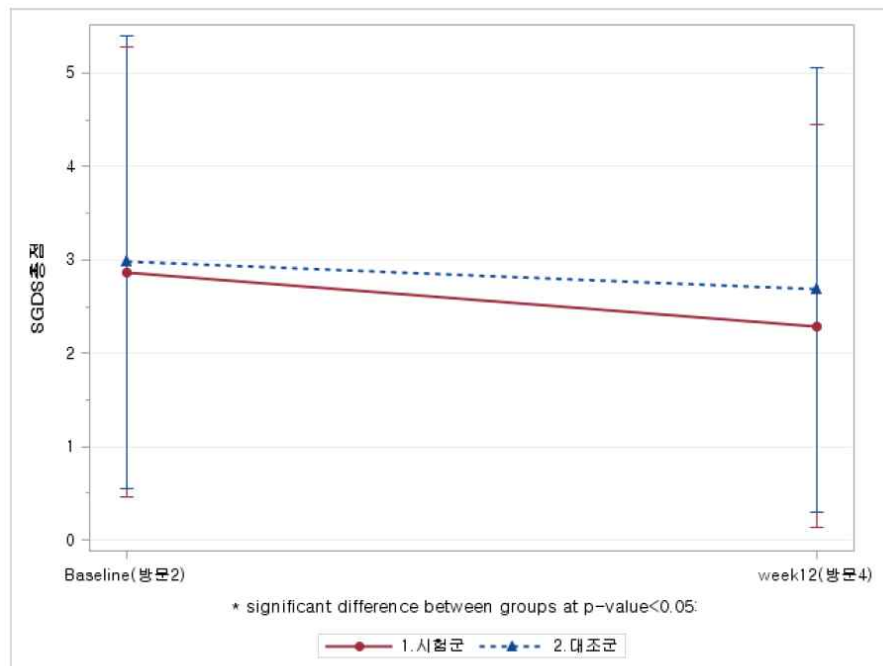
표 24. 방문별 SGDS 총점 변화량 (FA Set)

		시험군 N=41		대조군 N=45		p-value*	p-value [§]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
SGDS	Baseline(방문2)	41	2.85±2.34	45	2.87±2.42	0.9799	
총점	12 주(방문4)	41	2.34±2.13	45	2.64±2.37		
	Change from baseline	41	-0.51±2.67	45	-0.22±2.48	0.6024	0.5110
p-value**			0.2258		0.5502		

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§: Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline



<그림 71. 방문별 SGDS 총점(FA set)>

■ fMRI

fMRI는 뇌신경의 활동성을 자기공명의 신호변화로 나타내어 이를 시각화하여 보여주는 영상 방법이며, 이 때 뇌신경의 활동성은 국소적인 뇌 혈액량(Cerebral Blood Volume, CBV), 뇌 혈류(Cerebral Blood Flow, CBF), 또는 산소섭취(Oxygenation)의 변화에 의하여 간접적으로 파악되어지는 변화를 의미한다. 경희대학교병원 영상의학과에서 Nordic Brain Program을 이용하여 분석하였다.

표 25는 0주, 12주에 측정한 fMRI (기능적 자기공명영상) 변화를 PP Set으로 분석한 결과이다.

Hippocampus 부위의 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 1.20± 6.66 증가하였고(p=0.5814), 대조군은 0.43± 3.74 감소하였다(p=0.7721).

Temporal lobe 부위의 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 1.92± 16.00 증가하였고(p=0.7134), 대조군은 1.53± 4.59 감소하였다(p=0.4109).

Posterior cingulate gyrus 부위의 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.25± 5.17 감소하였고(p=0.8830), 대조군은 3.11± 3.99 감소하였다(p=0.0631).

표 25. 방문별 fMRI 변화량 (PP Set)

평가변수	시험군 N=38		대조군 N=41		p-value*	p-value\$
	n	Mean±SD	n	Mean±SD		
	Hippocampus					
Baseline(방문2)	10	0.21±6.91	7	1.19±1.29	0.6697	
12주(방문4)	10	1.41±1.19	7	0.76±3.74		
Change from baseline	10	1.20±6.66	7	-0.43±3.74	0.5680	0.5913
p-value**		0.5814		0.7721		
Temporal lobe						
Baseline(방문2)	10	-2.41±13.05	7	1.71±4.13	0.3704	
12주(방문4)	10	-0.49±7.57	7	0.18±1.24		
Change from baseline	10	1.92±16.00	7	-1.53±4.59	0.5320	0.7468
p-value**		0.7134		0.4109		
Posterior cingulate gyrus						
Baseline(방문2)	10	0.40±4.77	8	2.98±2.89	0.1984	
12주(방문4)	10	0.15±1.76	8	-0.13±1.54		
Change from baseline	10	-0.25±5.17	8	-3.11±3.99	0.2161	0.9385
p-value**		0.8830		0.0631		

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value by Paired t-test

\$: Compared between groups; p-value by ANCOVA adjusted by baseline

○ 유효성에 대한 최종 결론

본 인체적용시험의 유효성 평가는 ADAS-cog 총점, ADAS-cog 기억력, ADAS-K, Visual C.P.T, ADCS-ADL, SGDS의 변화량으로 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

ADAS-Cog 총점(기억력, 언어능력, 수행능력의 합계 점수) 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.17 ± 2.79 점 감소하였고($p=0.0140$), 대조군은 1.41 ± 2.83 점 감소하였다($p=0.0028$).

ADAS-Cog 총점(기억력, 언어능력, 수행능력의 합계 점수) 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.21 ± 2.77 점 감소하였고($p=0.0078$), 대조군은 1.38 ± 2.70 점 감소하였다($p=0.0013$).

ADAS-K 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.22 ± 2.90 점 감소하였고($p=0.0136$), 대조군은 1.41 ± 2.96 점 감소하였다($p=0.0041$).

ADAS-K 총점 변화를 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.28 ± 2.88 점 감소하였고($p=0.0069$), 대조군은 1.40 ± 2.83 점 감소하였다($p=0.0018$).

ADAS-Cog 기억력 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.59 ± 2.55 점 감소하였고($p=0.1644$), 대조군은 1.21 ± 2.36 점 감소하였다($p=0.0021$).

ADAS-Cog 기억력 개별항목들 중 검사지시 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.07 ± 0.43 점 증가하였고($p=0.3231$), 대조군은 0.32 ± 0.82 점 감소하여($p=0.0176$) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0101^*$).

FA Set 분석도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

Visual C.P.T(시각지속검사) 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 정반응수는 섭취 12주 후 시험군이 0.05 ± 14.67 회 감소하였고($p=0.9825$), 대조군은 2.24 ± 13.14 회 감소하였다($p=0.2806$).

누락오류수 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.05 ± 14.67 회 증가하였고($p=0.9825$), 대조군은 2.24 ± 13.14 회 증가하였다($p=0.2806$).

과잉반응수 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.84 ± 11.84 회 증가하였고($p=0.6635$), 대조군은 2.22 ± 7.47 회 감소하였다($p=0.0644$).

정반응시간 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.01 ± 0.09 sec 증가하였고($p=0.5286$), 대조군은 0.00 ± 0.03 sec으로 변화가 없었다($p=0.6956$).

표준편차 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.00 ± 0.03 sec으로 변화가 없었으며($p=0.8521$), 대조군은 0.01 ± 0.03 sec 감소하였다($p=0.0203$).

FA Set 분석도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

ADCS-ADL(일상생활 활동 평가지수) 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.00 ± 2.24 으로 변화가 없었으며($p=1.0000$), 대조군은 0.39 ± 2.28 증가하였다($p=0.2794$).

FA Set 분석도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

SGDS(노인우울척도) 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.58 ± 2.72 점 감소하였고($p=0.1972$), 대조군은 0.29 ± 2.57 점 감소하였다($p=0.4704$).

FA Set 분석도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.

fMRI(기능적 자기공명영상) 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 Hippocampus 부위는 섭취 12주 후

시험군이 1.20 ± 6.66 증가하였고($p=0.5814$), 대조군은 0.43 ± 3.74 감소하였다($p=0.7721$).

Temporal lobe 부위의 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 1.92 ± 16.00 증가하였고($p=0.7134$), 대조군은 1.53 ± 4.59 감소하였다($p=0.4109$).


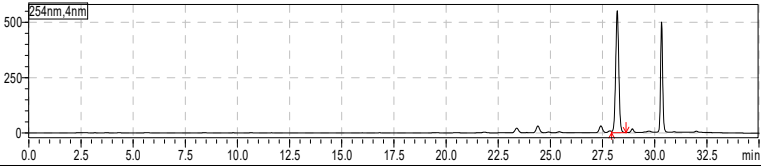

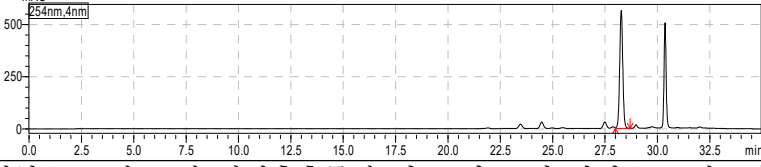

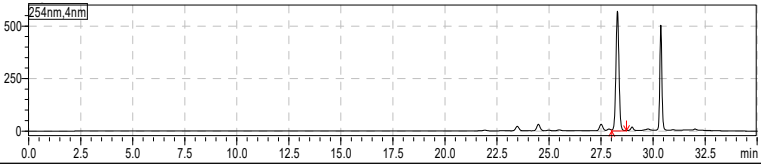
Posterior cingulate gyrus 부위의 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.25 ± 5.17 감소하였고($p=0.8830$), 대조군은 3.11 ± 3.99 감소하였다($p=0.0631$).


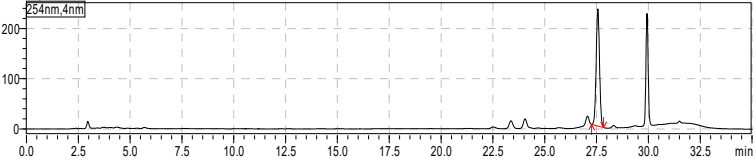

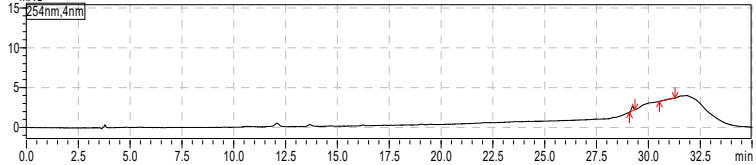

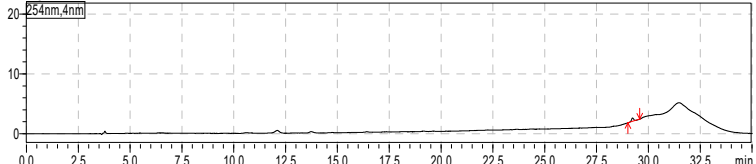

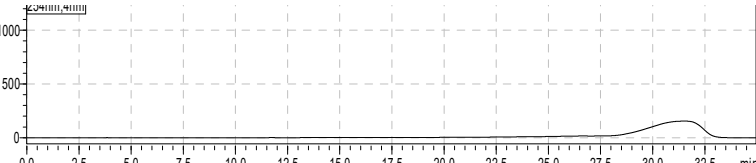
2) 지각 추출물 원료를 이용한 제품의 제형 연구

○ 지각추출물을 이용한 건강기능식품 제품화를 위하여, 다양한 제형의 제품을 제조, 분석하였음.

■ 지각 추출물을 사용하여, 정제, 연질캡슐, 젤리, 액상, 겔 제형을 제조하여, 지각추출물의 기준 및 규격에 설정된 분석방법을 통해 일일 표시량 대비 비교 확인하여 제형의 적합성을 확인하였다.

■ 제형연구 결과

제형 NO.	사진	비고
1		본 제형으로 제조 시 진피추출물의 기준 및 규격 방법으로 지표성분 분석 결과 일일 표시량 대비 약 102% 로 확인되어 적합한 제형임 
2		본 제형으로 제조 시 진피추출물의 기준 및 규격 방법으로 지표성분 분석 결과 일일 표시량 대비 약 98% 로 확인되어 적합한 제형임. 
3		본 제형으로 제조 시 진피추출물의 기준 및 규격 방법으로 지표성분 분석 결과 일일 표시량 대비 약 101% 로 확인되어 적합한 제형임 
4		본 제형으로 제조 시 진피추출물의 기준 및 규격 방법으로 지표성분 분석 결과 일일 표시량 대비 약 60% 수준으로 확인되며 추가적인 추출 공정이 필요하므로 적합하지 않음

		
5		<p>본 제형으로 제조 시 진피추출물의 기준 및 규격 방법으로 지표성분 분석 결과 지표성분의 peak를 확인 할 수 없었으므로 적합하지 않음</p> 
6		<p>본 제형으로 제조 시 진피추출물의 기준 및 규격 방법으로 지표성분 분석 결과 지표성분의 peak를 확인 할 수 없었으므로 적합하지 않음</p> 
7		<p>본 제형으로 제조 시 진피추출물의 기준 및 규격 방법으로 지표성분 분석 결과 지표성분의 peak를 확인 할 수 없었으므로 적합하지 않음</p> 

■ 현재 건강기능식품에 적용되고 있는 다양한 제형으로 지각추출물 샘플을 제조하여, 각 제형별로 지표성분을 분석한 결과, 정제가 가장 적합한 것으로 확인되었다.

3) 지각 추출물 원료의 안정성(stability) 실험을 통한 원료의 유통기한 설정

○ 표준화된 방법에 의해 추출 생산된 지각추출물 원료에 함유된 지표(기능)성분에 대한 안정성을 확인하기 위하여, 가속시험법으로 지각추출물의 유통기한 설정시험을 수행하였다.

(1) 원료명 : 지각추출물

(2) 성 상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황색 분말

(3) 안정성 시험

- 시험기준 : 가속시험

- 시험조건 : 상온, 35℃, 40℃[상대습도 75%] 에서 6개월간 저장시키면서 실험 주기는 2개월 간격으로 시험
- 시험기간 : 2018. 02. 15 ~ 2018. 10. 22
- 시험방법 : 지각추출물 기준 및 규격 시험방법에 따라 진행하였음

(4) 지표성분 시험결과

조건	25℃		35℃		40℃	
	Nobiletin	지각성분	Nobiletin	지각성분	Nobiletin	지각성분
0	28.732	확인	28.732	확인	28.732	확인
1	27.513	확인	27.796	확인	27.875	확인
2	27.104	확인	27.267	확인	27.133	확인
3	26.971	확인	26.890	확인	26.785	확인
4	26.335	확인	26.130	확인	26.035	확인
5	26.106	확인	25.952	확인	25.895	확인
6	26.063	확인	25.659	확인	25.641	확인

(5) 유통기한 산출

위 가속시험에서 기능성분(또는 지표성분)중 Nobiletin의 함량 결과에 따라 “지각추출물”의 유통기간을 다음과 같이 산출함.

품질지표	반응차수	온도(℃)	회귀방정식 (Y = KX + B)	결정계수
Nobiletin	0차 ¹⁾	25	Y = -0.41393x + 28.21664	0.89012
		35	Y = -0.50157x + 28.42271	0.96188
		40	Y = -0.51182x + 28.40682	0.95113
	1차 ²⁾	25	Y = -0.012803x + 3.8706	0.8406
		35	Y = -0.027301x + 3.8836	0.9046
		40	Y = -0.073330x + 3.9006	0.8177

1) Y = KX + B (Y : 저장기간(X)중의 시험항목의 결과값 X : 저장기간, K : 반응속도상수)

2) Y = KX + B (Y=LnAe, B=LnA0, Ae : 저장기간 중의 시험항목의 결과값 , A0 : 저장 전 제품의 시험항목값, X : 저장기간, K : 반응속도상수)

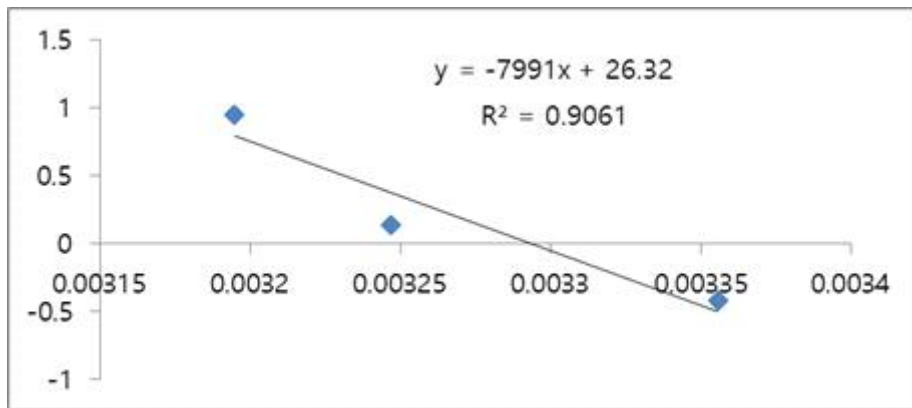
▶ 위 도출된 결과에서 0차 반응에서 가장 높은 결정계수를 가지므로 0차 반응식을 따르는 것을 알 수 있다. 따라서 Nobiletin 의 0차 반응식의 반응속도상수(K)인 K_{25℃}=-0.41393, K_{35℃}=-0.50157, K_{40℃}=-0.51182 을 이용하여 활성화에너지(Ea)를 산출한다.

(6) 온도에 대한 품질지표의 활성화에너지(Ea) 산출

- 앞서 도출한 0차 반응식의 반응속도상수(K)를 아레니우스 반응식을 활용하여 활성화에너지(Ea)를 아래와 같이 구한다.

온도 (°C)	온도 (K)	1/T	K	LnK	R (기체상수)	r ² (결정계수)	LnK = -(Ea/R)(1/T) + LnA	
저장 온도	25	298	0.0033557	0.4139 3	-0.4182 4	1.987	0.93512	LnK= -7991X + 26.32 (R ² =0.9061) Ea/R = -7991 (R=1.987) Ea(Kcal/mole) =-15878.117
	35	308	0.0032468	0.5015 7	0.13606			
	40	313	0.0031949	0.5118 2	0.95138			

* 아레니우스 반응식 : (A : 아레니우스상수, Ea : 활성화에너지(call/mol), R : 기체상수, T : 절대온도(=°C +273), K : 반응속도상수)



(7) 실험하지 않은 온도 구간의 반응속도상수(K) 산출

- 실험제품이 1년간 우리나라 실온에 유통된다고 가정한다면, 현재 실험한 온도구간(25, 35, 40°C)은 우리나라 1년 유통온도를 모두 반영한 것이 아니므로, 품질지표의 연간 변화량을 산출하기 위해서는 우리나라 월평균 온도를 기준으로 대표성을 갖는 온도구간을 정하고, 그 온도구간에서의 온도 유지일수를 산출하여 실험하지 않은 구간에 대한 반응속도상수 산출이 필요하다.

지역	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
서울	-0.9	1.0	6.3	13.3	18.9	23.6	25.8	26.3	22.4	15.5	8.9	1.6
인천	-0.8	1.2	5.4	12.5	17.0	21.8	24.5	25.8	22.5	16.0	9.4	2.4
대전	0.0	1.9	7.2	13.3	19.5	23.4	25.4	26.4	21.7	15.5	10.1	3.1
대구	2.3	3.8	9.2	14.6	21.7	22.9	25.0	26.0	20.6	15.8	11.0	4.5
광주	1.7	3.0	8.0	13.9	19.4	22.5	25.4	26.0	22.0	16.9	11.6	5.3
울산	3.5	4.5	8.9	13.8	20.0	21.5	24.4	26.4	21.1	16.6	12.4	6.5
부산	4.7	5.4	9.5	13.9	18.8	21.0	23.	26.1	22.1	18.1	13.6	7.9
강릉	2.2	3.1	8.2	12.1	20.0	21.0	23.8	25.8	20.2	16.0	9.9	4.9
제주	7.4	7.3	10.4	15.1	18.8	22.0	25.6	26.4	23.2	19.2	15.2	10.0
평균	2	3	8	14	19	22	25	26	21	17	11	5

▶ 조사결과 1월, 2월, 3월, 11월, 12월(5개월:152일)의 평균기온은 0~11℃, 4월 13℃, 5월과 10월 (2개월:61일)은 17~19℃, 6월과 9월(2개월:61일)은 21~22℃, 7월과 8월(2개월:61일)은 25~26℃ 인 것으로 나타났다.

이에 따라 실온 유통 시 1년간 온도 별 예상 유통일수는 10℃(152일), 15℃(30일), 20℃(61일), 25℃(61일), 30℃(61일)로 하여 유통기간 산출의 근거로 사용하였다.

온도(℃)	온도(K)	1/T	Ea/R	LnA	LnK	K
10	283	0.003534	-7991	26.32	-1.920194	0.1465791
15	288	0.003472			-1.42475	0.2405685
20	293	0.003413			-0.95328	0.3854745
25	298	0.003356			-0.4978	0.6078664
30	303	0.003300			-0.0503	0.9509440

* 산출과정 : 아레니우스 반응식()을 이용하여 반응속도상수(K)를 산출

예) $\text{Ln}K_{10^\circ\text{C}} = -(-9853.8789 \times 0.003534) + 32.4702 = -2.35345$, $K_{10^\circ\text{C}} = = 0.0950411$

저장온도(℃)	국내 연간온도별 예상 유통일수	국내 연간온도별 예상 개월수(A)	반응속도상수(B)	연간변화량 (AxB)
10	152	5	0.1465791	0.7328955
15	30	1	0.2405685	0.2405685
20	61	2	0.3854745	0.770949
25	61	2	0.6078664	1.2157328
30	61	2	0.9509440	1.901888
누계	365일			4.8620338

최소함량(A)	품질규격(B)	A-B	연간 변화량◎	[(A-B)/C]*365
28.732	20	8.732	4.8620338	655.524 (21.85개월)

4) 지각 추출물의 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 원료 인허가 신청

○ 1, 2, 3년차 연구를 통하여 얻어진 원료표준화, 지표성분 설정, 독성시험결과, 인체유효성시험결과, 작용기전시험결과 등을 바탕으로 개별인정형 건강기능성식품 원료 인허가 신청을 완료하였다.

(1) 인허가 제출자료

지각추출물의 개별인정형 건강기능성식품 인허가를 위하여 다음과 같은 자료를 제출하였다.

연번	제출자료
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본	
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료	
2.1	기원
2.2	개발경위
2.3	국내·외 인정·허가 현황
2.4	국내·외 사용 현황
3. 제조방법 및 그에 관한 자료	
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명

3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	
3.5	주요공정별 수율 변화	
4. 원료의 특성에 관한 자료		
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	
4.3	영양성분정보자료	
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료		
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)	
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)	
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료		
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거	
	※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)	
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 : 나)		
7.1	섭취근거 정보	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	
7.3	섭취량 평가 정보	
7.4	인체적용시험 정보	
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험
		3개월 반복투여독성시험
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료		
8.1	시험관시험	

8.2	동물시험
8.3	인체적용시험
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료	
9.1	섭취량 및 근거
9.2	섭취방법 및 근거
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료	
10.1	1. 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부
10.2	2. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

(2) 인허가 신청 요약

지각추출물의 개별인정형 건강기능성식품 인허가신청 내용은 다음과 같다.

항 목	주요 내용	
1. 원료명	지각 추출물	
2. 원재료	Bitter orange (학명:Citrus aurantium, 사용부위 : Peel)	
3. 기능 (지표)성분	Nobiletin	
4. 제조 공정	원재료(Citrus aurantium L.의 과피) → 세척 → 추출 → 여과 → 농축 → 분무건조 → 분체 → 신청 원료	
5. 규격 및 시험방법	1) 정상 : 고유의 향미가 있는 갈색의 분말이다 2) 기능 또는 지표성분 : Nobiletin 232~347 mg/g 3) 납(mg/kg) : 3.0 이하 4) 총비소(mg/kg) : 2.0 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 1.0 이하 6) 총수은(mg/kg) : 0.1 이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능(지표) 성분 시험법	자사 시험방법이며, 시험방법에 대한 타당성(밸리데이션)자료를 공인시험기관을 통해 구비함
	규격 외 (잔류농약)	-잔류농약: 58종 (톨크로포스-메칠 (0.1 ppm), 파클로부트라졸 (0.09 ppm), 이마자릴 (0.51 ppm)을 제외한 항목에서 모두 불검출 건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정()에 따라 “수입식품 등 검사에 관한 규정” 별표 3. 정밀검사 대상 잔류농약 검사항목에 따라 58종을 식품공전 제 10. 일반시험법, 4. 식품 중 잔류농약 분석법, 4.1.3 다성분분석법에 따른다.

6. 안전성	의사결정도	의사결정도 ‘나’ 에 해당
	섭취 근거	<p><인정현황></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦국내 <ul style="list-style-type: none"> - 건강기능식품 기능성원료 개별인정 1건 - 대한약전의한약(생약)규격집 내 등재 ◦국외 <ul style="list-style-type: none"> - 영국의 식품표준청 (Food standards agency)의 health claim list에서 “citrus aurantium“은 식욕조절, 대사질환/체중조절 등으로 등재 - 캐나다 보건부의 “Natural health products ingredients data base“ 상에서 “Citrus aurantium“이 등재
	안전성 정보	<ul style="list-style-type: none"> ◦안전성 정보 DB : 신청원료 지각추출물 및 citrus aurantium(bitter orange)의 국내외 보고서, 국제기구 보고서 및 관련 데이터베이스 검색결과, 대부분의 경우 안전성에 문제가 없다고 명시되어 있으나, 많은 양의 bitter orange feel 을 섭취한 어린이의 경련과 사망에 대한 보고가 있었다. 그러나, 정확한 섭취량이나 원인관계가 밝혀져 있지 않았고(명확한 reference가 없음) 본 자료 이후에 나온 자료들에 따르면, 안전성에 대한 많은 연구가 진행되었고 안전성에 문제가 없는 것으로 확인되었음
	섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 섭취량: 지각추출물로서 400mg/일 ◦ 신청원료의 원물섭취량: 0.99~2.32g/일 ◦ 시판되는 원료의 원물 섭취량: <ul style="list-style-type: none"> - ‘혈당조절에 도움’ 의 기능성(인정번호 제2010-33호, (주)지엠피바이오)의 지각 상업 추출 혼합물의 경우 지각의 일일 섭취량이 약 1.4g/일 이었으나 본 신청 원료인 지각 추출물은 일일 섭취량이 400mg/일 이므로 기 허가의 기능성 원료보다 1일 섭취량이 낮음. ◦ 상기와 같은 근거로 신청 섭취량은 안전하다고 판단됨. ◦ 또한 신청원료의 인체적용시험에서도 일일 섭취량은 400mg/일 임 ◦ 13주 반복투여 시험결과 NOEL값은 2,000mg/kg/일 이상으로 보고되었으며 이를 60kg 성인의 ADI 값으로 환산(Safety factor = 100)하게 되면 “1200mg 이상” 임. <p>⇒ 이에 신청원료 “지각추출물 ‘의 일일 섭취량은 안전하다고 판단된다.</p>
	인체적용 시험	<p>시험물질과 연관된 중대한 이상반응 및 부작용은 보고되지 않았음 (400mg/day)</p>
	독성 시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 90일 반복투여 독성시험(랫드): <ul style="list-style-type: none"> - 투여기간 중 사망동물은 없었으며, 증상관찰에서도 시험물질에 기인하는 특이 사항은 없었음 - “지각추출물” 의 NOEL 값은 2,000mg/kg/day로 보고 되었음 ◦ 단회 투여 독성 시험(랫드): <ul style="list-style-type: none"> - 시험물질 5,000mg/kg 용량까지 독성학적 이상 소견이 관찰되지 않았고, 암수 모두에서 ALD값이 5000mg/kg을 상회하는 것으로 보고 되었음. <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bitter orange (Citrus aurantium L)의 NOEL 값은 300 mg/kg, NOEAL 값은 암/

		수 모두 1,000 mg/kg/day로 판단됨
	기타 사항	- 해당사항 없음
	섭취 시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 섭취시 주의사항 <p>임산부 및 수유부는 섭취 시 주의 바랍니다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 근거내용 <p>신청원료로 시험된 인체적용시험의 제외기준 상 공통적으로 “임산부 및 수유부”는 제외한다고 보고됨.</p>
7. 기능성	신청 기능성	인지능력 개선에 도움
	신청 일일섭취량	지각추출물로서 400 mg/일
	시험관시험	<p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 사람 신경세포종 SH-SY5Y 세포에서 Nobiletin의 신경세포 보호효과 세포자살을 이끌어내는 것으로 알려진 H₂O₂를 신경세포종 SH-SY5Y세포에 12h 동안 처리하였을 때, 세포의 60-70%가 사멸하였음. 그러나, Nobiletin 10-30OM을 함께 처리하였을 때에는, 사멸한 세포수가 유의적으로 감소하였으며, Hoechst 33342 staining을 하여 DNA ladder 형성을 확인한 결과 Nobiletin 첨가로 감소함. ◦ PC12D 세포에서 Nobiletin의 신경돌기 성장 효과 <p>Rat의 갈색세포종 cell line으로 알려진 PC12D 세포에 Nobiletin(10, 30, 100 OM)을 함께 처리하였을 때, 유의적인 신경돌기의 성장을 확인하였다. 또한, Nobiletin에 의해 기억이나 시냅스 가소성과 관련된 다양한 유전자의 프로모터 부위에 결합하는 CREB를 활성화시켰다.</p>
	동물시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Ab 1-42로 기억손실유도 마우스 모델, 신청원료 지각추출물 (50, 100 mg/kg/day), 4주 - 지각추출물 50 및 100 mg/kg 섭취군은 수동회피능을 유의적으로 증가시킴 (vs Ab(1-42), p<0.01 and p<0.05) - 지각추출물 50 및 100 mg/kg 섭취군은 escape latency를 유의적으로 감소시킴 (vs Ab(1-42), p<0.01 and p<0.05) - 지각추출물 50 및 100 mg/kg 섭취군은 swim distance를 유의적으로 감소시킴 (vs Ab(1-42), p<0.01 and p<0.05) - 지각추출물 50 및 100 mg/kg 섭취군은 probe trial에서 crossing number을 유의적으로 증가시킴 (vs Ab(1-42), p<0.05) - 지각추출물 50 및 100 mg/kg 섭취군은 대뇌피질 및 해마조직 내 AchE activity를 유의적으로 감소시킴(vs Ab(1-42), p<0.01 and p<0.05) - 지각추출물 50 및 100 mg/kg 섭취군은 대뇌피질 및 해마조직 내 세포사멸 관련 단백질 발현 (Bax, cleaved caspase-3)은 감소, Bcl-2 단백질 발현은 유의적으로 증가시킴 (vs Ab(1-42), p<0.01 and p<0.05)

	인체적용 시험	<p>[신청원료]</p> <p>◦건강한 성인(n=100), 400mg/일, 12 주(RCT, DB)</p> <p>- ADAS-cog 총점 및 ADAS-cog 기억력유의적 증가(대조군 대비, p<0.05)</p> <p>※인체적용시험기관 : 경희대학교 병원 ('18), 시험책임자 : 백건우 건국대학교 병원 ('18), 시험책임자 : 유승호</p> <p>유효성 평가는 ADAS-cog 총점, ADAS-cog 기억력, ADAS-K, Visual C.P.T, ADCS-ADL, SGDS의 변화량으로 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.</p> <p>ADAS-Cog 총점(기억력, 언어능력, 수행능력의 합계 점수) 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.17± 2.79점 감소하였고(p=0.0140), 대조군은 1.41± 2.83점 감소하였다(p=0.0028).</p> <p>ADAS-Cog 총점(기억력, 언어능력, 수행능력의 합계 점수) 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.21±2.77점 감소하였고(p=0.0078), 대조군은 1.38±2.70점 감소하였다(p=0.0013).</p> <p>ADAS-K 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.22± 2.90점 감소하였고(p=0.0136), 대조군은 1.41± 2.96점 감소하였다(p=0.0041).</p> <p>ADAS-K 총점 변화를 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.28± 2.88점 감소하였고(p=0.0069), 대조군은 1.40± 2.83점 감소하였다(p=0.0018).</p> <p>ADAS-Cog 기억력 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.59± 2.55점 감소하였고(p=0.1644), 대조군은 1.21± 2.36점 감소하였다(p=0.0021).</p> <p>ADAS-Cog 기억력 개별항목들 중 검사지시 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.07± 0.43점 증가하였고(p=0.3231), 대조군은 0.32± 0.82점 감소하여(p=0.0176) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p=0.0101*).</p> <p>FA Set 분석도 PP Set 분석과 유사한 결과를 보였다.</p>
	기타 사항	- 해당사항 없음

나. 경희대학교 (참여기관) : 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구 (세부과제명)

1) 지각추출물의 기억력 개선 작용기전 연구 (in vivo)

지각추출물의 기억력 개선 효능검증을 위하여, amyloid beta 1-42 (Ab1-42)로 공간학습능력장애와 기억장애가 유도된 마우스에 지각추출물을 투여한 후 개선되는 정도를 판별하였다.

○ 기억장애 마우스모델에서의 지각추출물의 기억력 개선 효능검증 시험

(1) 시험방법

■ 시험샘플

시험에 사용된 지각추출물은 초임계추출법으로 제조된 지각추출물을 사용하였다. 대조물질로는 기억력 증진효과가 확인된 노빌레틴 (nobiletin)을 사용하였다.

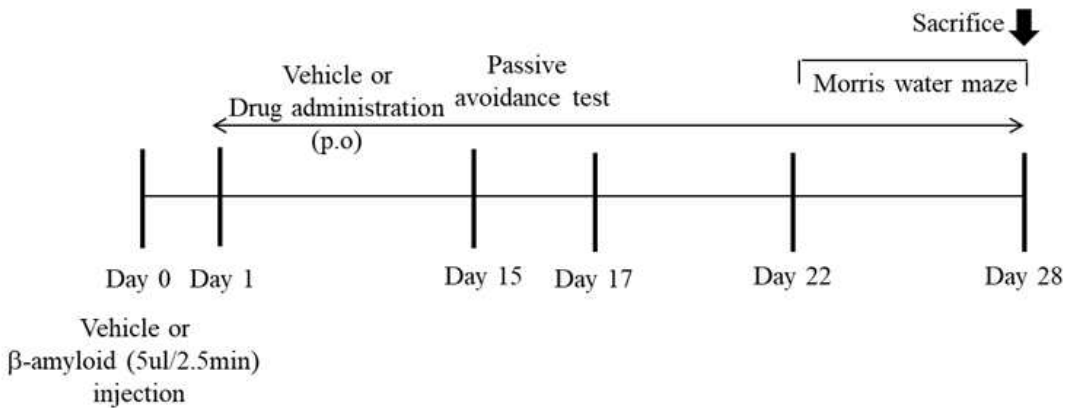
■ 시험동물

시험동물로는 8주령 수컷 C57BL / 6J 마우스를 사용하였으며, 7일 동안 순응 한 후에 실험에 사용했다. 마우스를 12 시간의 명암주기와 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 15\%$ 조건에서 사육하였다.

■ 기억력 손상유도

마우스의 기억력 손상유발을 위하여 $A\beta$ 1-42를 투여하였다. 마우스를 마취시킨 후 $A\beta$ 1-42 또는 대조물질을 주입한 후, 5개의 그룹으로 나누었다.

1) 대조군 (Vehicle), 2) $A\beta$ 1-42 단독 군, 3) $A\beta$ 1-42 + 지각추출물 (50 mg/kg) 군, 4) $A\beta$ 1-42 + 지각추출물 (100 mg/kg) 군, 5) $A\beta$ 1-42 + Nobiletin (30 mg / kg) 군. 모든 마우스에게 4 주간 (28 일) 각 약물을 경구 투여했다. 모든 마우스는 3일 째 수동회피 시험을 수행하였고, 7일 간 수중미로 시험을 수행한 후, 28일 째에 희생되어, 뇌조직 분석에 사용되었다.



<그림 72. 동물 기억력 개선시험 과정>

■ 수동회피시험

수동 회피 테스트는 중간이 격벽으로 2개의 구획으로 나뉘어져있는 아크릴 박스에서 수행되었다. 격실은 빛이 있는 격실과 빛이 없고 전기 충격을 주기 위한 바닥이 있는 격실로 구성되었다. 시험은 24시간 간격으로 3일 연속으로 실시되었다. 15일째, 동물은 2분 동안 비 조명 구역에 머물러 있다가 조명구역으로 다시 옮겨진다. 비 조명 구역으로 이동하면 즉시 배제되어, 조명이 설치된 구획에 적응하도록 훈련되었다. 마우스들은 60 초 동안 조명구역과 비 조명구역에 자유롭게 접근할 수 있었다. 적응 시간이 끝난 후, 16일

째에 마우스는 두 구역 사이를 120 초 동안 이동 가능하지만, 비 조명구역으로 들어갔을 경우, 중앙격벽의 문이 자동으로 닫히고 2 초 동안 전기충격을 주었다. 17 일째, 마우스를 조명구역에 놓고 문을 연 후, 비 조명구역으로 이동한 시간을 측정하였다.

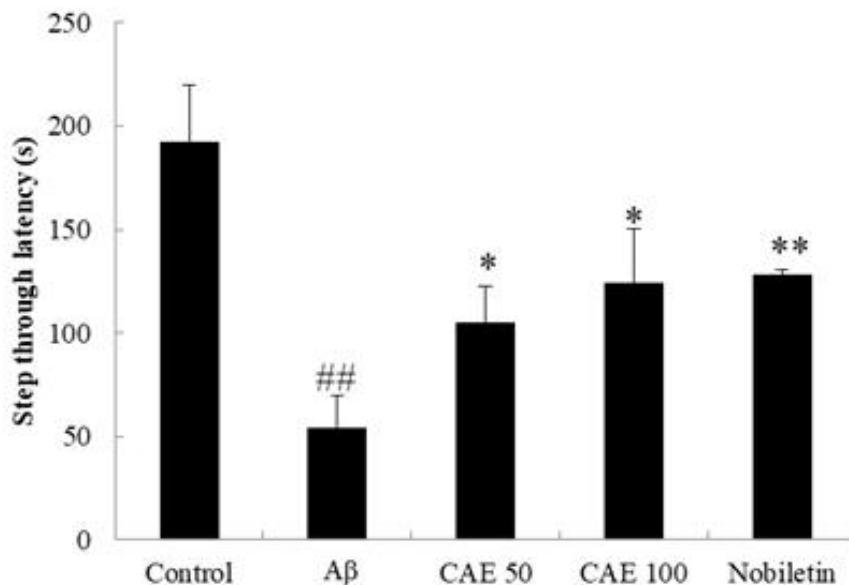
■ 모리스 수중미로 시험

Morris 수중미로 시험은 22일째부터 수행되었다. 수조를 네 구역으로 나누고 플랫폼을 구역 중 하나에 무작위로 배치하였다. 마우스들은 60 초 동안 플랫폼을 찾을 수 있도록 훈련 받았다. 마우스가 플랫폼에 도달하면 플랫폼에서 30 초 동안 머무르도록 허용하고, 60초 동안 플랫폼을 찾지 못하면, 30 초 동안 수중미로에 둘러놓았다. 모든 마우스는 하루 두 번씩 수중미로 시험을 수행하였으며, 원형 수조에서 플랫폼의 위치는 무작위로 변경되었다. 수중미로 시험은 2일간의 훈련 (training), 4일간의 습득시험 (acquisition test) 및 1일간의 검사시험 (probe trial)으로 구성되어 플랫폼을 찾는 시간을 기록했다. 검사시행을 위해 플랫폼을 제거하고 마우스들이 1분 동안 플랫폼을 찾도록 하였으며, 28일째에 이전 플랫폼이 있던 위치를 가로 지르는 횟수를 측정하였다.

(2) 시험결과

■ 기억력장애 마우스에서의 수동회피능력 시험

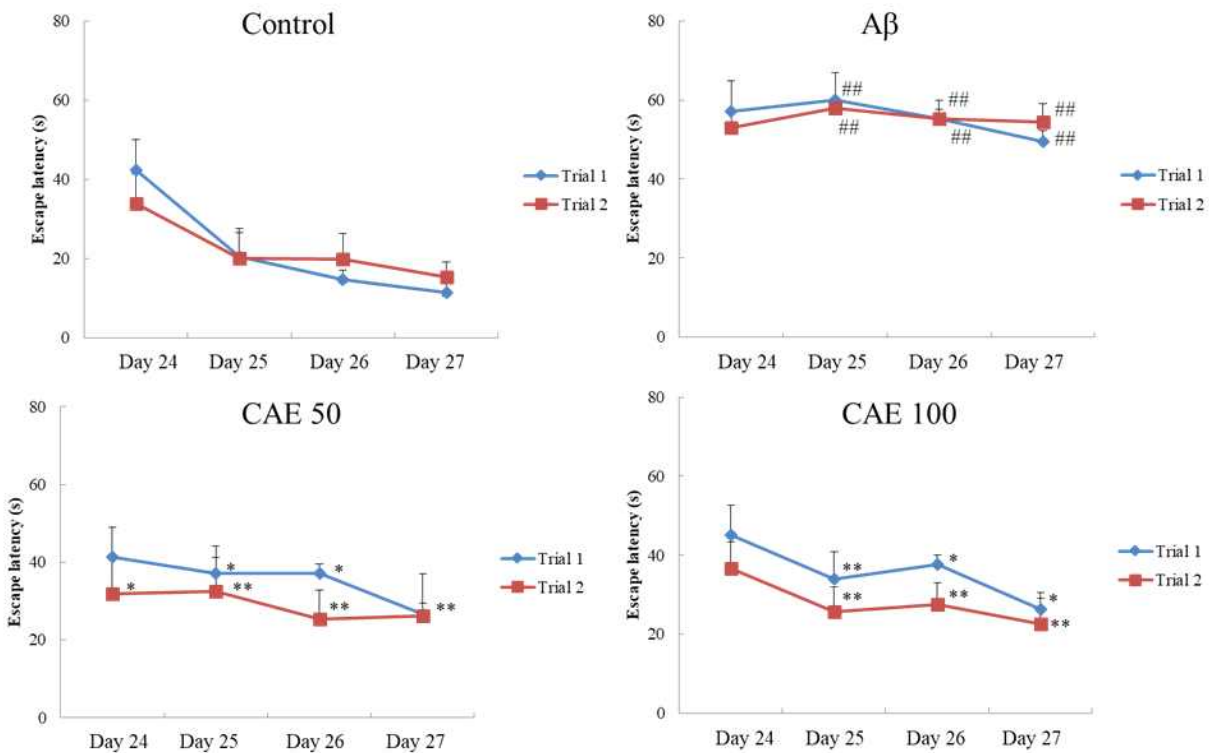
Aβ1-42 유도 기억손상에 대한 지각추출물과 노빌레틴의 개선효과는 수동회피시험을 통하여 분석되었다. Aβ1-42만 처리한 군의 수동회피지연 (step through latency) 시간은 Aβ1-42를 처리하지 않은 대조군에 비하여 유의하게 단축되었다. Aβ1-42의 투여에 의하여 감소된 수동회피 지연시간은 지각추출물과 노빌레틴의 투여에 의하여 유의하게 회복되었다. 지각추출물 50 및 100 mg/kg 투여는 지연시간을 각각 49.7% (105.06±17.75), 57.3% (123.92±26.20) 증가 시켰으며 노빌레틴은 58.8% (128.32±2.43) 증가시켰다.



<그림 73. 기억력장애 마우스에서의 수동회피능력 시험결과>

■ 기억력장애 마우스에서의 수중미로시험 시험

Aβ1-42에 의한 공간기억력 손상 후 지각추출물과 노빌레틴을 투여하여 개선효능을 확인하였다. 탈출지연 (escape latency) 평가는 하루에 두 번 수행되었다. 시험기간 동안 두 번째 시험에서 모든 시험그룹의 첫 번째 시험에서보다 탈출지연 평가시간이 약간 감소했다. 기억력 손상 마우스의 4일간의 탈출지연 시간에는 차이가 없었으며, 대조군은 4일 동안 2회의 시험동안 탈출지연 시간이 현저하게 감소하여, Aβ1-42의 투여에 의한 기억력 손상으로 탈출지연 시간이 증가된 것을 확인하였다. 지각추출물 50 및 100 mg/kg 투여군은 Aβ1-42 만 투여 된 군보다 25일에서 27일까지의 탈출지연 시간이 유의하게 감소하였다.



<그림 74. 기억력장애 마우스에서의 수중미로 시험결과>

■ 기억력장애 마우스에서의 수중미로 내 수영거리 측정

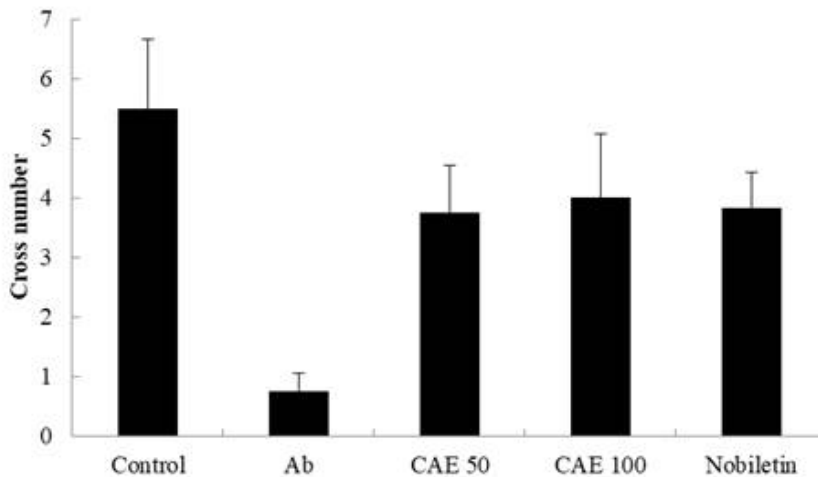
수중미로 시험에서 플랫폼을 찾기 위해 수영한 거리에 대한 지각추출물과 노빌레틴 투여군의 효과는 표 26과 같다. 대조군 그룹 마우스는 훈련된 플랫폼 위치를 신속하게 찾았다. 그러나 기억력 장애군은 플랫폼을 찾는 데 어려움이 있으며 수영 거리가 대조군에 비해 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 지각추출물 50 및 100 mg/kg 투여 군의 수영 거리는 훈련 기간 중 Aβ1-42 군의 경우와 비교하여 유의하게 감소되었다.

표 26. 기억력장애 마우스에서의 수중미로 내 수영거리 측정

DISTANCE (mm)				
	DAY 24	DAY 25	DAY 26	DAY 27
Control	1033.69±167.08	539.00±179.58	454.69±114.75	339.88±67.56
Aβ	1297.44±152.80	1570.13±83.02 ^{##}	1449.63±109.44 ^{##}	1232.38±116.74 ^{##}
CAE 50	910.69±199.40	935.13±158.16 ^{**}	869.88±230.11 [*]	637.06±136.15 ^{**}
CAE 100	1056.81±172.04	663.75±105.84 ^{**}	791.06±87.19 ^{**}	610.38±142.27 ^{**}
Nobiletin	923.19±131.32	847.94±121.70 ^{**}	752.50±210.10 [*]	512.81±187.10 ^{**}

■ 기억력장애 마우스에서의 수중미로 검사시험 (probe trial)

마우스의 공간기억력을 평가하기 위한 검사시험에서 28일째에 플랫폼위치의 교차 수를 측정했다. 그림 에서 볼 수 있듯이, Aβ1-42 투여군은 대조군에 비교하여 학습 및 기억 장애를 보였다. 그러나, 지각추출물 50 mg/kg 및 100 mg/kg의 투여군은 Aβ1-42 처리군과 비교하여 플랫폼위치의 교차수를 5배 및 5.33배 증가되었고, 노빌레틴 투여군은 5.17배 증가되었다. 본 결과는 지각추출물이 공간인지, 학습 및 기억 기능에 Aβ1-42에 의한 기억손상에 대한 개선 효과가 있음을 보여준다.



<그림 75. 기억력장애 마우스에서의 수중미로 probe trial 결과>

■ 지각추출물의 대뇌피질과 해마 내 AchE 억제효과

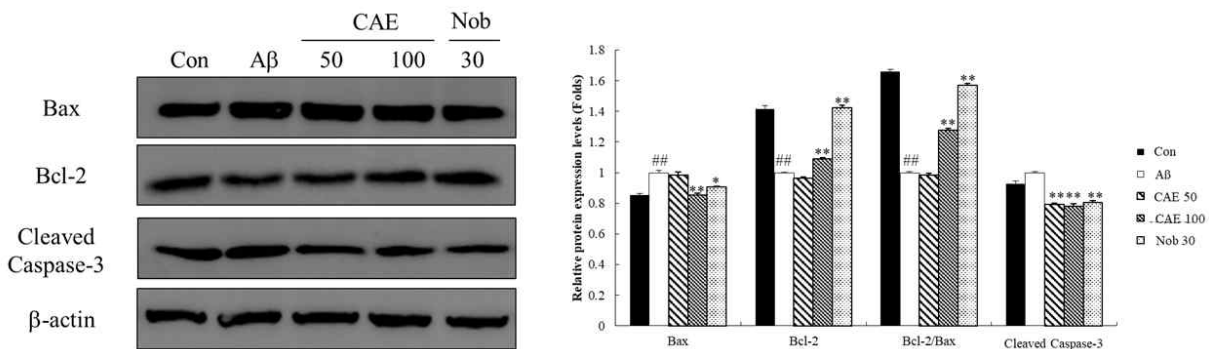
뇌 조직에서 지각추출물과 nobiletin의 신경 보호효과를 확인하기 위해 대뇌피질과 해마에서 AchE 활성을 측정 하였다 (표 27). Aβ1-42 처리군의 AchE 활성은 대조군과 비교하여 유의하게 증가했다. 지각추출물 50 mg/kg 및 100 mg/kg 투여군은 Aβ1-42 투여군과 비교하여 AchE 활성을 대뇌피질에서 각각 56.6%, 58.8% 감소시켰으며, 해마에서 각각 8.8% 및 35.6% 감소시켰다. 노빌레틴 투여군의 AchE 활성은 대뇌피질에서 56.5%, 해마에서 72.2%로 유의하게 감소하였다.

표 27. 대뇌피질과 해마 내 AchE 활성 분석결과

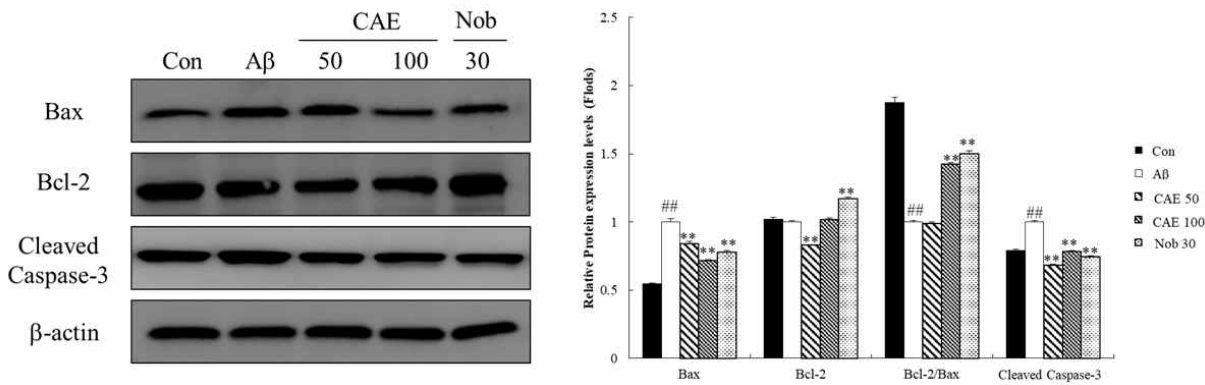
Groups	U/mg protein	
	Cortex	Hippocampus
Control	38.2902±3.8548	24.7195±4.0319
A β	90.2940±10.2591 ##	45.6556±2.3807#
CAE 50	40.7787±3.9846*	41.5168±2.5505
CAE 100	38.0118±1.5175*	29.8937±2.7889*
Nobiletin	39.2531±2.1394**	12.7880±0.4159**

■ 대뇌피질과 해마 내 Bax, Bcl-2, Cleaved caspase-3 발현량 측정

지각추출물과 노빌레틴이 Bcl-2 계열 및 caspase 경로에 미치는 영향을 대뇌피질과 해마에서 조사하였다. 그림 76에 나타낸 바와 같이, 대뇌피질 및 해마 내 Bax 및 Cleaved caspase-3 단백질 발현 수준은 A β 1-42 처리군이 대조군에 비해 감소하였다. 반면, 대뇌피질과 해마 내 Bcl-2 단백질 발현 수준은 A β 1-42 처리군에 비해 대조군에서 높게 확인되었다. 해마에서 지각추출물 100 mg/kg과 노빌레틴 투여군의 Bax 단백질 발현 수준은 A β 1-42투여군 대비 15 %, 10 % 유의하게 감소하였고 Bcl-2의 단백질 발현 수준은 지각추출물 100과 노빌레틴 투여군에서 A β 1-42투여군 대비 1.4 및 2 배 증가하였다. 지각추출물 50, 100 mg/kg 및 노빌레틴 처리군은 해마 내 Cleaved caspase-3 발현 수준을 A β 1-42투여군 대비 각각 21%, 22%, 20% 낮추었다 (그림 76). 대뇌피질 내 단백질 발현은 해마와 유사한 패턴을 나타내었다. 대뇌피질 내 Bax와 Cleaved caspase-3 단백질 발현 수준은 지각추출물 50, 100 및 노빌레틴 투여에 의해 감소하였고 Bcl-2 및 Bcl-2/Bax 단백질 발현 수준은 A β 1-42 투여군보다 높았다 (그림 77).



<그림 76. 해마 내 Bax, Bcl-2, Cleaved caspase-3 발현량 분석결과>



<그림 77. 해마 내 Bax, Bcl-2, Cleaved caspase-3 발현량 분석결과>

(3) 결론

상기의 시험을 통하여, 지각추출물은 뇌 내 아세틸콜린 에스터레이즈 (AChE)의 활성을 억제하여 신경을 보호하고, 대뇌피질과 해마 내에서 Bax와 Cleaved caspase-3의 발현을 억제하고, Bcl-2의 발현을 증가시키며, Bcl-2/Bax의 비율을 증가시켜 뇌세포의 apoptosis를 조절하는 기전으로 기억력 증진효과를 보이는 것으로 확인되었다.

2-4. 연구개발 성과

가. 개별인정형 건강기능성식품 원료 인허가 신청
1)

[별지 제1호서식]

(앞쪽)

건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서		처리기간		
		120일	60일	
		V		
신청인	대표자	최 봉 근		
	업체명(기관명)	㈜뉴트라팜텍	영업의 종류	수입식품등 수입·판매업
			허가/신고/등록번호	제20160006213호
	소재지	(주소) 경기도 성남시 중원구 갈매치로 5차 A동 905호 (전화번호) 031-	성남우림라이온스밸리 (Fax) 031-	
	수입 건강 기능 식품	수리번호	201700181945	
수출국		FRANCE		
제조회사		KPLC		
소재지		au capital de 2.100.00 Euros, 1 bis rue de l'Eglise, 51390 Coulommès-la-Montagne FRANCE		
원료명		지각추출물		
<p>「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제5조에 따라 건강기능식품 기능성 원료 인정을 신청합니다.</p> <p style="text-align: right;">2018 년 02월 07 일</p> <p style="text-align: right;">신청인 최 봉 근 (서명 또는 인)</p> <p style="text-align: center;">식품의약품안전처장 귀하</p>				
<p>※ 구비서류</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 제출자료 1부 2. 제출자료 수록 저장매체(CD 등) 1개 3. 원료, 제품 또는 시제품 4. 기능성분(또는 지표성분) 표준품 5. 국내·외 시험·검사기관이 발행한 시험성적서 		<p>수수료</p> <p>신규 1,900,000원</p> <p>변경 800,000원</p>		
<p>※ 제출자료</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료 				

210mm×297mm[일반용지 60g/m²(재활용품)]

2)

[식품안전나라](#) | [공공데이터](#) | [우리회사 안전관리](#)


식품의약품안전처
통합민원상담서비스

[홈 \(나의민원\)](#) | [로그아웃](#)

[전자민원](#) / [종합상담센터](#) / [부경분량식품신고](#) / [건강기능식품 이상신고](#) / [이동안내](#) / [민원명록 열람/제출/제보](#)

[홈](#) / [전자민원](#) / [나의 민원](#)

나의 민원

민원접수번호	<input type="text"/>	민원사우형	<input type="text"/>
품목명	<input type="text"/>		
<input type="checkbox"/> 취약 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 음력 <input type="checkbox"/> 미등록 <input type="checkbox"/> 처리완료 <input type="checkbox"/> 신청 <input type="checkbox"/> 임시(저장(미제출))			
<input type="button" value="검색"/>			

번호	민원사우형	접수번호	신청일	중앙서 출력여부	신청시일	처리결과
	신청기관		접수일		상세내역	
1	건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)	2024090620	2024-02-08	-	신청	-
	식품의약품안전청가온 영양기능연구팀		-			

나. 논문실적

1)

Journal of Medicinal Food

Journal of
MEDICINAL FOOD

Journal of Medicinal Food: <http://mc.manuscriptcentral.com/jmfkorea>

Ameliorative effect of Citrus aurantium peel extract on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver in mice

Journal:	<i>Journal of Medicinal Food</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Han, Hyounq-Yun; Korea Institute of Toxicology; Chungnam National University Lee, Sung-Kwon ; Nutrapharm Tec Choi, Bong-Keun ; Nutrapharm Tec Lee, Dong-Ryung ; Nutrapharm Tec Lee, Hae Jin ; Nutrapharm Tec Kim, Tae-Won ; Chungnam National University
Keywords:	herbal extract
Manuscript Keywords (Search Terms):	Cholesterol, polymethoxyflavone, triglyceride

SCHOLARONE™
Manuscripts

Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Reports

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

Cissus quadrangularis extract (CQR-300) inhibits lipid accumulation by downregulating adipogenesis and lipogenesis in 3T3-L1 cells

Hae Jin Lee^a, Bao Le^c, Dong-Ryung Lee^b, Bong-Keun Choi^b, Seung Hwan Yang^{a,*}

^a Department of Biotechnology, Chonnam National University, Yosu 59626, Republic of Korea

^b Nutraceutical Tech, Jungwon-gu, Seongsan, Gyeonggi 13201, Republic of Korea



ARTICLE INFO

Keywords:
Adipocytes
Adipogenesis
Anti-obesity
Cissus quadrangularis extract (CQR-300)
Lipogenesis

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the anti-obesity activity and the action mechanism of *Cissus quadrangularis* extract (CQR-300) in 3T3-L1 adipocytes. *Cissus quadrangularis* was extracted with hot water, resulting in CQR-300. The anti-obesity activity of CQR-300 in 3T3-L1 adipocytes was examined by Oil-red O staining. Possible mechanisms of CQR-300 in 3T3-L1 adipocytes were determined by real-time PCR and western blot. Treatment with CQR-300 inhibited lipid accumulation without showing cytotoxicity to 3T3-L1 adipocytes. Furthermore, CQR-300 decreased adipogenesis/lipogenesis-related mRNA expression levels of fatty acid binding protein (aP2), fatty acid synthase (FAS), lipoprotein lipase (LPL), stearyl-CoA desaturase-1 (SCD-1), and acetyl-CoA carboxylase (ACC). CQR-300 also down-regulated expression levels of adipogenesis/lipogenesis-associated proteins, including peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), and FAS. It's also up-regulated the expression level of phosphorylated-AMPK (p-AMPK). Collectively, these results suggested that CQR-300 might have an anti-obesity effect by its ability to decrease expression levels of adipogenesis/lipogenesis-related genes and proteins.

1. Introduction

Obesity is a serious world-wide health problem. Its occurrence has been increasing in both developed and developing countries [1]. It has been estimated that worldwide overweight and obese population is about 6 billion. This figure is expected to increase to over 10 billion by 2025 [2]. Obesity is a multi-factorial disease. Diet with high calories, genetics, lifestyle, culture, and environment all play important roles in the development of obesity [3]. It can lead to metabolic syndromes such as cardiovascular disease, dyslipidemia, atherosclerosis, stroke, hypertension, dyslipidemia, type II diabetes mellitus, and various types of cancer [1,4,5]. Recently, people have recognized the need to prevent obesity and manage weight [4]. Obesity is characterized by increased adipose tissue mass associated with increased fat cell number and size [5]. Adipocytes are important cellular components of fatty tissues. Excessive amounts of lipid (triglycerides) can accumulate in adipose tissues accompanied by increased expression levels of adipogenesis/

lipogenesis and enhanced the body weight gain [6]. Obesity and its related diseases are closely related to adipocyte differentiation and fat accumulation [7]. 3T3-L1 cells are widely used in anti-obesity studies to investigate key molecular markers of adipocyte differentiation [4,8].

Cissus quadrangularis Linn has been used as a common medicinal plant in Africa and Asia for more than a century [9]. Its stem and leaf have been used in food preparation and raw drug in India for treating various diseases [10]. Several reports have demonstrated the anti-obesity effect of *C. quadrangularis* in animals and humans with lipase, amylase, and α -glucosidase inhibition activities [9,11,12].

However, the mechanisms involved in the effect of *C. quadrangularis* on adipocytes related to adipogenesis and lipogenesis have not been reported yet. Therefore, the objective of the present study was to examine the effect of *C. quadrangularis* extract (CQR-300) on adipocytes differentiation and lipid accumulation and its regulatory mechanisms in 3T3-L1 adipocytes.

Abbreviations: ACC, acetyl-CoA carboxylase; AMPK, AMP-activated protein kinase; aP2, fatty acid binding protein (aP2); BCS, bovine calf serum; C-EBP α , CCAAT/enhancer-binding protein α ; CQR-300, *Cissus quadrangularis* extract; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FAS, fatty acid synthase; FAS- α , fatty acid synthase; FBS, fetal bovine serum; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; LPL, lipoprotein lipase; MDI, medium dependent interface; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; ORO, Oil-red O; p-AMPK, phosphorylated-AMPK; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; RPD, radioimmuno-precipitation assay buffer; SCD-1, stearyl-CoA desaturase-1; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein-1c; TG, triglycerides

* Corresponding author.

E-mail address:

<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.02.008>

Received 13 January 2018; Received in revised form 9 February 2018; Accepted 27 February 2018

Available online 30 March 2018

2214-7500/ © 2018 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

다. 특허출원

1)

출원번호통지서

1의 3페이지

관인생략

출원번호통지서



출원일자 2016.12.28
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2016-0181118 (접수번호 1-1-2016-1285613-18)
 출원인명칭 주식회사 뉴트라팜텍(1-2014-039313-2)
 대리인성명 이원희(9-1998-000385-9)
 발명자성명 최봉근 이동령 이성권 이해진
 발명의명칭 지각 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 기억력 또는 인지 기능 개선용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

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

관 인 생 략

출원번호통지서

출원일자 2017.11.07
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2017-0147533 (접수번호 1-1-2017-1104944-05)
 출원인명칭 주식회사 뉴트라팜텍(1-2014-039313-2)
 대리인성명 이원희(9-1998-000385-9)
 발명자성명 최봉근 이동령 이성권 이해진
 발명의명칭 지각 조임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

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

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2017.11.07
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2017-0147537 (접수번호 1-1-2017-1104978-46)
 출원인명칭 주식회사 뉴트라팜텍(1-2014-039313-2)
 대리인성명 이원희(9-1998-000385-9)
 발명자성명 최봉근 이동령 이성권 이해진
 발명의명칭 지각 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

특 허 청 장

<<안내>>

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

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2018.04.30
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2018-0050019 (접수번호 1-1-2018-0428544-66)
 출원인명칭 주식회사 뉴트라팜텍(1-2014-039313-2)
 대리인성명 이원희(9-1998-000385-9)
 발명자성명 최봉근 이동령 이성권 이해진
 발명의명칭 지각 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 기억력 또는 인지
 기능 개선용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

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

라. 특허등록
1)

공개특허 10-2018-0077106

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0077106
	(43) 공개일자 2018년07월06일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A23L 33/10 (2016.01)	(71) 출원인 주식회사 뉴트라팜텍
(52) IPC특허분류 A23L 33/10 (2016.08) A23V 2002/00 (2013.01)	경기도 성남시 중원구 갈매치로 302, 905호(상대원동, 성남우림라이온스밸리5차)
(21) 출원번호 10-2018-0050019(분합)	(72) 발명자 최봉근
(22) 출원일자 2018년04월30일 심사청구일자 2018년04월30일	(74) 대리인 이동명 (잇면에 계속) 이원희
(62) 원출원 특허 10-2016-0181118 원출원일자 2016년12월28일 심사청구일자 2016년12월28일	

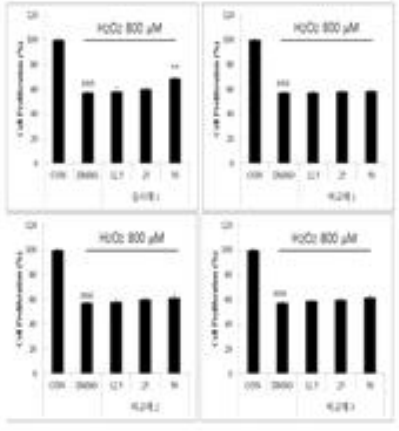
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 지각 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 기억력 또는 인지 기능 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 이산화탄소 용매를 이용한 초임계 지각 추출물이 기억력 또는 인지 기능 개선용 건강기능식품에 관한 것으로, 상기 초임계 추출방법을 통해 제조된 지각 추출물은 다른 추출방법을 통해 제조된 지각 추출물과 비교하여 신경세포 보호 효과가 크며, 스코폴라민으로 유발된 기억력 손상 동물모델의 기억력 및 인지능력을 더욱 효과적으로 개선시키는 것을 확인하였다.

대표도 - 도3



마. 기술실시

농림축산식품 연구개발사업 운영규정

기술실시보고서						
(단위 : 원)						
연구개발과제 현황	사업명	고부가가치식품기술개발사업		연구과제번호	116014-03-3-SB010	
	연구과제명	지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발				
	연구기관명	(주)뉴트라팜텍	연구책임자	이성권	참여기업명 (주)뉴트라팜텍	
	연구협약일	2016.7.7	연구기간	2016.7.7. - 2018. 12. 31		
	연구개발비	정부출연금	기업부담금	기타 ()	계	
	390,000,000	186,700,000		576,700,000		
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	지각추출물을 이용한 기억력 또는 인지기능 개선 건강기능식품 개발				
	계약(활용)일	2020.12.31	실시(활용)기간	2018.10.24.-2021.12.31		
	지재산 종류	특허등록	실시권 유형	직접 실시		
	* 지재산이 특허(출원,등록)인 경우	명 칭	지각 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 기억력 또는 인지기능 개선용 조성물			
		번호	10-1894491-0000	일 자	2018.08.28	
	실시(활용)기관	기관명	(주)뉴트라팜텍		기관유형	중소기업
		주 소	경기도 성남시 중원구 갈매치로 302 우림라이온스벨리 5차 A동 905호		대 표 자	최봉근
사업자번호				전화번호		
부새담당자	연구개발부(이재진)		e-mail			
기술요산정내역	정부출연금 390,000,000원 * 10% (중소기업) * 20% (참여 중소기업 감면) * 70% (일시납부 감면) = 5,460,000원					
기 술 료	정액기술료		정상기술료		기타 조건	
	정수(납부)예정일	정수(납부)금액	착수기본료	정수(납부)예정일 정수(납부)금액		
	2018.11.09	5,460,000원	매출에 따른 기술료	정수(납부)시작일	결산월	
				정수(납부)종료일	정수율	
	계				매출액의 ()%	
기타특기사항						
<p>국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p style="text-align: center;">2018년 11월 09일 주관연구기관 (주)뉴트라팜텍 의 대표 농림식품기술기획평가원장 귀하</p>						



바. 고용창출
1)



재 직 증 명 서

인적사항	성명	한글	이경민	주민등록번호
		영문	Lee kyung min	
	주소	서울특별시 강남구 개포동 1265-2 공은빌 302호		
재직사항	회사명	주식회사 뉴트라팜텍	사업자등록번호	
	부서		직위	
	입사일	2016년 7월 1일	근속기간	6개월
발급용도	재직증명용			

상기인은 재직증명서 발급일 현재 위와 같이 당사에 재직하고 있음을 증명합니다.



NutraPharmTech

2016년 12월 29일

주식회사 뉴트라팜텍 대표이사



2)

재 직 증 명 서

인적사항	성명	이 상 합	주민등록번호	
	주소	서울시 송파구 문정동 620 송파푸르지오시티 1391호		
재직사항	회사명	주식회사 뉴트라팜텍	사업자등록번호	
	부 서	연구개발부	직 위	연구원
	입사일	2017 년 09 월 01 일	재직기간	- 년 2 개월
	퇴사일	-		
발급용도	재직 증명용			

상기 근무자는 위와 같이 당사에 재직중임을 증명합니다.



NutraPharmTech

2017 년 11 월 08 일

경기도 성남시 중원구 갈매치로 302, 성남우림라이온스밸리5차 A동 905호

주식회사 뉴트라팜텍 대표이사



3)

재 직 증 명 서

인적사항	성명	이 순 식	주민등록번호	
	주소	경기도 성남시 중원구 사기막골로31번길 34. 102동 601호		
재직사항	회사명	주식회사 뉴트라팜텍	사업자등록번호	
	부 서	관리부	직 위	주입
	입사일	2018년 01 월 01 일	재직기간	5 개월
	퇴사일	-		
발급용도	재직 증명용			

상기 근무자는 위와 같이 당사에 재직중임을 증명합니다.



NutraPharmTech

2018 년 05월 30일

경기도 성남시 중원구 갈마치로 302, 성남우림라이온스밸리5차 A동 905호

주식회사 뉴트라팜텍 대표이사



사. 전시회 참가

1) 2018 보건산업 성과교류회 (2018.11.01.~2018.11.02.)



(주)뉴트라팜텍

사업 분야 : 건강기능식품, 약약품, 의료기기

Contact info
-인사 : 02-2600-1111 -영업 : 02-2600-1112
-전화번호 : [] -팩스 : []

회사소개

- 대표 : 최근
- 주 소 : 경기도 성남시 용현구 갈매로 332, 뉴트라팜테크(주) 3층 302호
- 사업 소개

건강을 지키는 수호, 자주 상담에 따라 정보 요청과 상담 후 기원하신 희망하는 건강기능식품을 생산하여 소비자 건강을 위해 노력

- 설립 목적 : 뉴트라팜(주) 뉴트라팜테크(SI,PICT) 설립
- 홈페이지 : www.nutrafarmtech.com • 전자우편 :
- 대표 전화 :
- 주요 실적

2018. 04.	기능성식품 제조(건강기능식품)
2015. 04.	건강기능식품 제조(가) GMP 인증
2015. 04.	식품위생법 제정(제정)
2014. 11.	가정용 건강기능식품(제정)
2014. 04.	수입 식품을 수입 판매(제정)
2013. 11.	식품첨가물(제정)
2012. 11.	다기능 건강 기능식품(제정)

주요 제품 소개

• 지각 추출물 간 기능 개선 건강기능식품 개발

지각 추출물을 이용한 간 기능개선 건강기능식품에 활용할 수 있는 기술로서 기존의 소재인 밀크아몬드추출물과 현미나무 껍질 추출물보다 뚜렷한 효과를 나타내는 것을 입증하였습니다

본래 지각 추출물 간의 기능개선 효과를 입증하여 건강기능식품에 활용하는 것은 안전하며, 건강기능식품의 간 기능개선 효과를 향상 시킬 수 있습니다

효능

- 지각 추출물 함유
- 항산화 및 항염증 효과
- 간 기능 개선 효과

효능

- 항산화, 항염증 (간염 예방 효과)을 나타내며
- 간기능 개선에 효과적임 입증
- 간기능 개선 효과

기존제품과의 차별성 및 핵심기술

1. 생약소재 지각으로부터 Nobiletin 함량이 특대량 추출물 제조기술
2. 정량적으로 Nobiletin의 함량을 측정할 수 있는 분석기술
3. 추출물 제형 시 포함되는 수용성 유해물질 Synephrine 제거 기술

노노의알레르겐 사전연구를 통하여 노노의알레르겐 지각 추출물 제조공정기술 개발

노노의알레르겐 사전연구

노노의알레르겐 사전연구 결과

노노의알레르겐 사전연구 결과

노노의알레르겐 사전연구 결과

노노의알레르겐 사전연구 결과

노노의알레르겐 사전연구 결과

• 지각 추출물 기억력 개선 건강기능식품 개발

+ 건강상 단기 기억 손상 유발 물질 함유식품 관련
+ 대가산 인체실험시험을 시행 신청 중

본래 지각 추출물 간의 기능개선 효과를 입증하여 건강기능식품에 활용하는 것은 안전하며, 건강기능식품의 간 기능개선 효과를 향상 시킬 수 있습니다

효능

- 기억력 개선 효과
- 항산화 및 항염증 효과
- 간 기능 개선 효과

효능

- 기억력 개선 효과
- 항산화, 항염증 (간염 예방 효과)을 나타내며
- 간기능 개선에 효과적임 입증
- 간기능 개선 효과

• 불과 추정(노노의알레르겐)을 이용하여 Nobiletin 함량 특대량 추출물 제조기술

• Nobiletin과 Synephrine의 복합체(복합체)를 이용한 Synephrine 제거 기술

• 추출물 정제(단순화)로 제조시간 단축 및 비용 감소

• 추출물 제형 효율성, 안전성이 높음

건강기능식품 관련



의료기기 관련









아. 사업화 실적

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명		지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발					
주관연구기관		(주)뉴트라팜텍		참여기관	경희대학교		
책임자		이성권		연구기간	2016년 7월 ~ 2018년 12월(총 3년)		
정부출연금		540,000,000원	기업부담금	180,000,000원	총계	720,000,000원	
기술이전명		-		기술실시대상기관	-		
기술료		-		기술실시일	-		
구분		기술실시 업체 결산액 (단위 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		해당기술을 통한 사업화 실적			
실 적	자산 총계	1,168		제품건수	1		
	자본 총계	610.5					
	부채 총계	447.4		기술개발성과활용 매출액	11,567,000원		
	매출액 총계	471					
제품별 실적							
구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
1	Citrus aurantium extract (지각추출물)		2017.0 4.17.	11.567	2.5%	한국	-

2017년 10월 27일

연구책임자 : 이 성 권 (서명 또는 인)



인체적용시험 결과보고서

경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 **CAE**의

유효성 및 안전성을 평가하기 위한

12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

시험식별	지각추출물 (CAE)
인체적용시험 의뢰자	뉴뉴트라팜텍 대표이사 최봉근 경기도 성남시 중원구 갈매치로 302
인체적용시험 시작일	2017.04.17 (첫 인체적용시험대상자 스크리닝일)
인체적용시험 종료일	2018.02.23 (마지막 인체적용시험대상자 시험완료일)
인체적용시험 책임자	백종우 (경희대학교병원 정신건강의학과 부교수) 유승호 (건국대학교병원 정신건강의학과 교수)
인체적용시험 실시기관	경희대학교병원 (서울특별시 동대문구 경희대로 23) 건국대학교병원 (서울특별시 광진구 능동로 120-1)
인체적용시험 결과보고서 작성일	2018.08.17

본 인체적용시험은 국제 임상시험관리기준(ICH GCP)에 준하여 시행되었습니다.
본 보고서에 포함된 모든 정보는 뉴뉴트라팜텍의 서면 동의없이 공개될 수 없습니다.

2-5. 사업화 성과 및 매출실적

가. 사업화 성과

- 지각추출물 원료를 제품화하여 일본의 Okinawa Research Center Co, Ltd.에 수출하여, 매출을 창출하였다.

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도
							국내	국외	
1	제품화	기타	국외	지각추출물 제품화 (원료판매)	지각추출물 일본수출	Okinawa Research Center Co, Ltd.		10 (천\$)	2017
2	매출창출	기타	국외	지각추출물 매출창출 (원료판매)	지각추출물 일본수출	Okinawa Research Center Co, Ltd.		10 (천\$)	2017

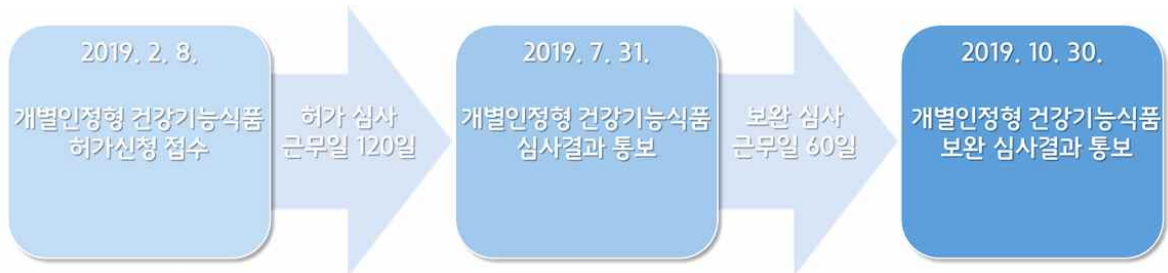
나. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	6			
	소요예산(백만원)	1,000			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.1	45	60	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	10	15
		국외	-	10	15
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	지각추출물추출물을 활용하여, 기억력개선 이외의 다른 기능성의 건강기능성식품 개발을 계획하고 있음.			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	45	60	
	수 출	0.1	10	11	

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.1 억원
			향후 3년간 매출	45 억원
		관련제품	개발후 현재까지	- 억원
			향후 3년간 매출	- 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 10% 국외 : 10%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : -% 국외 : -%
			향후 3년간 매출	국내 : -% 국외 : -%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		-위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		-위

○ 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 인정획득 계획

1) 일정 및 전략



- 지각추출물 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 인정허가는 2019년 2월 8일에 접수되어 현재 심사진행 중에 있음.
- 개별인정형 건강기능식품 인정허가 심사기간은 근무일로 120일로, 지각 기억력 개선 소재의 심사결과 통보 예정일은 2019년 7월 31일 임.
- 개별인정형 건강기능식품 1차 심사결과에 대하여 수정보완이 가능하며, 보완자료 제출 후 보완심사기간은 근무일로 60일 임. 따라서 지각 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 허가심사의 최종결과 통보일은 2019년 10월 30일로 예상됨.

- 지각추출물의 개별인정형 건강기능식품 허가심사 시 임상시험 결과의 유효성 여부와 유효성분 및 지표성분 설정의 당위성 등에 관하여 추가 자료 또는 설명이 요구될 것으로 예상됨.
- 임상시험 결과 지각추출물은 뇌 전두엽과 측두엽을 활성화 시키는 것으로 확인되었음. 또한 모든 ADAS-Cog 세부지표에서 대조군 대비 개선 결과를 보이지는 않았으나, 언어능력과 수행능력, 우울척도 등에서 대조군 대비 뚜렷한 개선활성을 보였으므로, 이를 근거로 지각추출물의 인지기능 개선 활성을 주장할 계획임.
- 지각추출물의 유효성분 및 지표성분 관련 사항은, 지각추출물의 유효/지표 성분인 노빌레틴의 기억력 개선 효능에 관하여 많은 연구가 수행되어있어, 해당 논문자료를 근거로 대응할 것임. 지표성분 설정의 근거는 본 과제를 통하여 도출된 지표성분 밸리데이션 자료를 근거로 설정이유 및 함량설정 근거로 대응할 것임.
- 지각추출물 개별인정형 건강기능식품 1차 심사 후, 다음의 보완자료가 요구될 가능성이 높으며, 아래 같이 대응할 계획임.
 - 지각의 국내외 사용현황 : 한약재로 사용되고 있는 근거자료 제출
 - 지각추출물의 제조공정 및 수율변화량 : 원료제조사의 제조공정 및 제품성적서 제출
 - 지각원료의 성상, 물성 및 지표성분 설정 자료 : 본 연구과제에서 도출된 지표성분 분석자료 제출
 - 지각추출물의 지표성분 규격 및 설정근거 자료 : 본 연구과제에서 도출된 지표성분 밸리데이션자료 제출

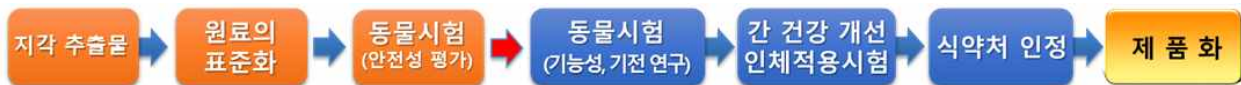
2) 개별인정형 건강기능식품 허가 획득 또는 실패 시 대응전략

- 지각추출물의 개별인정형 건강기능식품 허가 획득 시
 - 본 연구과제 수행 결과, 지각추출물의 제품제형은 정제형태일 때 가장 안전한 것으로 분석되었음. 따라서 인허가 획득 후 지각추출물을 정제형태의 기억력개선 건강기능식품으로 자체 상품화하여 홈쇼핑 및 온라인 쇼핑몰에서 판매할 계획이며, 해당 제품에 인지도가 축적되면 오프라인 매장에서도 판매가 가능할 것으로 판단하고 있음.
 - 또한, 타 건강기능식품제조업체에 원료형태로 지각추출물을 판매하여, 기억력개선 건강기능식품 시장에서 지각추출물의 점유율을 증가시켜 나갈 계획임.
- 지각추출물의 개별인정형 건강기능식품 허가 획득 실패 시
 - 현재, 임상시험 유효성 결과가 지각추출물의 개별인정형 건강기능식품 허가 획득에 가장 큰 장애요인으로 판단됨.
 - 보완 심사결과에서도 허가 획득이 실패된다면, 지각추출물의 기억력 개선 임상시험을 다시 수행할 계획임.
 - 본 연구과제에서 수행된 임상시험의 분석지표 및 시험항목에는 문제가 없는 것으로 판단되어, 재시험 시 동일한 방법으로 수행될 것임.
 - 하지만, 기 진행된 임상시험의 대조식품에 기억력에 영향을 줄 가능성이 있는 유당 및 텍스트린 등이 함유되어 있어, 임상시험 결과에 영향을 주었을 가능성이 있으므로, 임상시험 재수행 시에는 해당성분이 제외되도록 시험용 제품을 생산할 것임.
 - 재 임상시험은 보완심사 이후인 2020년도로 예상하고 있음.

- 재 임상시험과는 별개로 지각 추출물을 일반식품으로서 개발, 판매도 고려하고 있음. 일반식품에서는 기억력 개선 기능성을 표방할 수 없으므로, 지각 추출물의 높은 항산화 활성을 기반으로 차, 음료, 젤리 등의 제품 또는 일반식품 첨가물로서 개발이 가능할 것으로 판단됨.
- 현재, 지각은 일반식품 원료로 사용가능하나, 지각 추출물은 일반식품 원료로 등재되어 있지 않기 때문에, 지각 추출물을 일반식품에 사용하기 위해서는 지각 추출물을 일반식품원료로 등재하는 허가심사가 우선되어야 함.
- 일반식품원료 등재심사에는 섭취근거 및 안전성자료가 필수적이며, 지각 추출물의 섭취근거가 없으므로, 안전성을 입증한 후 제한적 식품원료로 등록 후 사용이 가능할 것으로 판단됨.

3) 응용제품을 통한 산업화 연구계획

- 지각 추출물 유효성분인 노빌레틴은 간기능 개선 및 간 보호에도 효과가 있음이 여러 연구를 통해서 보고되어 있음.
- 간 건강 개선 건강기능성식품 원료로는 밀크씨슬 추출물, 헛개나무 추출물 등이 등록되어 있으며, 약 1,300억 원 규모의 시장을 형성하고 있음.
- 자체연구결과에서 지각 추출물의 알콜성 지방간 개선 효과가 확인되었으며, 지각 추출물의 간 건강 개선 건강기능성식품 원료로서의 개발 가능성이 매우 높은 것으로 판단됨.
- 본 연구과제를 통하여 지각 추출물의 안전성 자료가 확보되었으므로, 간 기능 개선 동물실험 및 기전연구자료가 확보되면, 임상시험 수행이 가능할 것으로 판단됨.
- 추 후 지각 추출물의 간 기능 개선 동물실험 및 기전연구를 수행하여, 임상시험 필요자료를 확보한 후, 간 건강 개선 임상시험을 통하여 인체효능을 검증.
- 지각 추출물의 간 건강 개선 개별인정형 건강기능성식품 원료 허가획득 후, 간 건강 개선 건강기능성식품 제품으로 산업화를 계획하고 있음.



3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 1차년도

○ 주관연구기관 ((주)뉴트라팜텍) : 지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발

- 1) 지각 추출물 원료 및 제조공정 표준화
- 2) 지각 추출물 원료의 단기·장기 독성시험
- 3) 인체적용 시험용 시험식품 생산

○ 참여기관 (경희대학교) : 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구

- 1) 지각 추출물의 기억력 개선 효능연구(동물실험) 및 섭취량 설정
- 2) 지각 추출물의 기억력 개선 작용기전 연구

나. 2차년도

○ 주관연구기관 ((주)뉴트라팜텍) : 지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발

- 1) 지각 추출물 원료의 임상시험심사위원회 승인 신청
- 2) 임상시험용 지각 추출물 제제 생산
- 3) 지각 추출물 원료의 기억력 개선 임상시험 시작

○ 참여기관 (경희대학교) : 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구

- 1) 기억손상 동물모델에서 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 비교 분석

다. 3차년도

○ 주관연구기관 ((주)뉴트라팜텍) : 지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발

- 1) 임상 시험 종료 및 결과분석
- 2) 지각 추출물 원료를 이용한 제품의 제형 연구
- 3) 지각 추출물 원료의 안정성(stability) 실험을 통한 원료의 유통기한 설정

4) 지각 추출물의 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 원료 인허가 신청

○ 참여기관 (경희대학교) : 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구

1) 지각 추출물의 기억력 개선 작용기전 연구 (in vivo)

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성여부	달성도	가중치
1차 년도 (2016)	지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발	지각 추출물 원 료 및 제조공정 표준화	<ul style="list-style-type: none"> 유사종 및 사용부위의 검토 성분시험법의 공인기관 (한국기능식품연구원) 인정서 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 공인기관 분석 완료 	100%	15
		지각 추출물 원료 의 단기·장기 독 성시험	<ul style="list-style-type: none"> 동물시험을 통한 지각 추출물의 단기·장기 독성시험 Data 확립 	<ul style="list-style-type: none"> GLP 공인기관 계약 완료 	100%	25
		인체적용 시험용 시험식품 생산	<ul style="list-style-type: none"> 원료 표준화 연구결과 및 유효섭취량 연구결과를 바탕으로 임상시험용 지각 추출물 제제를 생산함 	<ul style="list-style-type: none"> 생산 의뢰 및 계약 완료 	100%	20
	지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구	지각 추출물의 기 억력 개선 효능연 구(동물실험) 및 섭취량 설정	<ul style="list-style-type: none"> 기억장애 동물모델(TMT)에서 지각 추출물의 기억력 개선 효능의 행동학적 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 기억력 개선 (공간 학습) 행동학 시험 완료 유효 농도 설정 완료 	100%	20
		지각 추출물의 기 억력 개선 작용기 전 연구	<ul style="list-style-type: none"> 신경세포증식과 분화촉진 효과 및 세포주 기반 세포신호전달체계 규명 세포주 기반 기억력 증진 기전규명 세포주 기반 신경세포 보호 및 세포사멸 억제 효과 검증 및 분자기전 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 신경세포 보호 및 사멸 억제 효능 평가 완료 	100%	20

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성여부	달성도	가중치
2차 년도 (2017)	지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품	지각 추출물 원 료의 임상시험심 사위원회 승인 신청	<ul style="list-style-type: none"> 지각 추출물의 독성시험 자료 및 유효성 시험 자료를 바탕으로 임상시험심사위원회 승인 신청 	<ul style="list-style-type: none"> 경희대학교 병원, 건국대학교 병원 임상시험심사위원회의 임상 	100%	20

개발	임상시험용 지각 추출물 제제 생산	<ul style="list-style-type: none"> 원료 표준화 연구결과 및 유효섭취량 연구결과를 바탕으로 임상시험용 지각 추출물 제제를 생산함 	<ul style="list-style-type: none"> 시험 허가 지각 추출물 200 mg을 함유하는 임상시험용 제제 생산 	100%	20
	지각 추출물 원료의 기억력 개선 임상시험 시작	<ul style="list-style-type: none"> 지각 추출물 기억력 개선 임상시험 CRO 선정 임상시험기관 선정 및 임상 프로토콜 작성 지각 추출물 기억력 개선 임상시험 개시 및 피험자 모집 	<ul style="list-style-type: none"> CRP 선정 완료 임상 프로토콜 작성완료 피험자 모집 완료 	100%	30
	지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구	<ul style="list-style-type: none"> 기억손상 동물모델에서 지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 비교 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 지각 추출물 투여 후, 수동회피검사, 수중미로검사를 이용한 공간 학습 능력을 측정, 인지능력 및 기억력 개선 효능을 비교분석 기억력 개선 신경기전 규명 - 면역조직화학법을 통해 해마 내의 LTP 관련 생리활성 효소인 MAP kinase, CREB, BDNF의 발현 변화를 비교 분석 분자영상기술을 활용한 MicroPET/SPECT/CT 생체영상 결과 비교 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 뇌손상 마우스 모델을 이용한 기억력 개선 시험 진행 	100%

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성여부	달성도	가중치
3차년도 (2018)	지각추출물을 이용한 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 개발	임상시험 종료 및 결과분석	<ul style="list-style-type: none"> 임상시험 자료 분석 및 통계처리 임상시험 종료보고서 작성 	<ul style="list-style-type: none"> 임상시험 종료보고서 완료 	100%	25
		지각추출물 원료를 이용한 제품의 제형 연구	<ul style="list-style-type: none"> 지각추출물을 이용하여 환, 정제, 캡슐 등의 제형연구 실시 	<ul style="list-style-type: none"> 제형연구 완료 	100%	10
		지각 추출물 원료의 안정성(stability) 실험을 통한 원료	<ul style="list-style-type: none"> 표준화된 방법에 의해 추출 생산된 지각 추출물 원료에 함유된 지표 	<ul style="list-style-type: none"> 유통기한설정 완료 	100%	10

		의 유통기한 설정	(기능)성분에 대한 안정성 실험 실시			
		지각 추출물의 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 원료 인허가 신청	<ul style="list-style-type: none"> • 지각 추출물의 동물시험, 독성, 인체적용시험, 작용기전시험 등의 결과를 바탕으로 식약처 개별인정형 건강기능식품 원료 인허가 신청 	<ul style="list-style-type: none"> • 개별인정형 건강기능식품 원료 인허가 신청 완료 	100%	25
	지각 추출물의 기억력 개선 효능검증 및 기전연구	지각 추출물의 기억력 개선 작용기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 동물 시험 모델에서 채취한 뇌, 혈액, 신경 조직 분석 기반 기억력 증진 기전규명 • real time PCR, western blot 방법을 이용한 기억력 개선 효능의 분자기전 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 동물 시험을 통하여 진피 추출물의 기억력 증진 기전규명 완료 	100%	30

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

과제계획 시 설정하였던 목표를 달성하였음.

3-4. 관련분야 기여도

○ 새로운 소재를 이용한 고부가가치 기억력 개선 건강기능식품 소재 개발

- 최근 식품이 뇌기능에 미치는 영향을 연구하는 「뇌 영양학」 이란 새로운 학문분야가 개척되는 등 식품소재를 활용한 뇌기능 향상에 대한 관심이 높아지고 있음.
- 지금까지 뇌기능 향상 작용이 보고되어 있는 식품소재로는, 포스파티딜콜린(PC), 포스파티딜세린(PS), 식약 구분의 개정으로 금년부터 식품 취급이 된 α -GPC 등의 인지질, DHA, 아라키돈산, 혈류순환 개선 효과 등이 평가되어 있는 은행나무 잎, 테아닌, GABA, 야마브시타케 버섯 등 다방면에 이룸.
- 뇌기능 저하의 억제, 뇌기능 향상/개선 효과가 있는 브레인 푸드의 요구는 국내·외에서 높아지고 있음.
- 현재 많은 기업과 연구소들은 기억력 장애와 같은 뇌손상을 억제하고, 기억력을 개선할 수 있는 건강기능식품 소재를 개발하고 있으며, 그 성과물로 몇 가지 뇌건강 관련 건강기능식품들이 출시되어있음.
- 현재의 뇌건강 관련 건강기능식품은 뇌세포 보호 등의 기능을 가지고 있으나 실제 기억력을 개선하는 건강기능식품은 그 수가 적으며, 기억력 개선 건강기능식품은 그 효능의 탁월함에도 불구하고 대량생산의 어려움과 원료물질의 국내 생산 어려움으로 인해 해결해야

할 문제점을 가지고 있음.

- 국내산 지각을 이용하여 고부가가치 건강기능성 식품 원료를 개발하여 식품산업의 발전을 도모하고, 제주도 지역에서 지각 대량 생산을 계획하고 있다. 국내산 원료를 활용한 고부가가치 식품기술개발을 위하여 기능성 신소재의 발굴과 새로운 건강기능성 식품 개발을 위하여, 새로운 추출방법의 개발 및 소재의 작용기전 연구, 임상시험 등의 과학적 기술을 접목하여 고부가가치의 창출에 기여하였음.

○ 새로운 농업 소재 개척

- 현재 국내의 전체 농업생산량은 증가하였으나 농가의 실질적인 소득은 정체하고 있음.
- 2003년 이전까지 농업 총수입의 50%를 차지하였던 농업소득은 2013년 32.7%로 감소하여, 농민들이 더 이상 농업만으로는 소득을 창출하기 힘든 상황을 방증하고 있음.
- 본 과제를 통하여 진피 추출물의 원료 표준화, 작용기전 규명, 인체적용시험을 수행하여 새로운 기억력 개선 건강기능식품 원료를 개발하였음.
- 지각 추출물을 이용한 건강기능식품 개발은 고소득 특용작물인 광굴의 소비시장을 창출하여, 어려움에 처해있는 국내 농가에 새로운 소득창출 소재를 제시하였음.

○ 활용실적

가. 학술지 발표 3건

1. *Cissus quadrangularis* extract (CQR-300) inhibits lipid accumulation by downregulating adipogenesis and lipogenesis in 3T3-L1 cells, *Toxicology reports* (2018), 5:608-614
2. Ameliorative effect of *Citrus aurantium* peel extract on highfat diet-induced non-alcoholic fatty liver in mice, *Journal of Medicinal Food* (2018)
3. Ameliorating effects of *Citrus aurantium* peel ethanol extracts and Nobiletin on memory impairment in b-amyloid (1-42) treated mice (심사 중)

나. 원료소재 수출 1건

1. 지각추출물 원료를 제품화하여 일본의 Okinawa Research Center Co, Ltd.에 수출하여, 매출을 창출하였으며, 11,567,000원의 매출액을 발생시켰음.

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 지각추출물을 원료로 새로운 건강기능성의 탐색 및 산업화가 기대됨
 - 기억력 개선 이외의 건강기능성 식품 원료등재를 위한 기초연구가 될 것으로 기대됨.

- 기능성자료 및 안전성자료 등의 확보 및 이를 이용한 기억력 개선 건강기능성식품 인정 기대
 - 작용기전 및 안전성, 효능 입증자료를 통하여 새로운 기억력 개선 건강기능성식품으로서 허가가 기대됨
 - 개별인정형 기능성원료 인정 후 국내 소재를 활용한 건강기능식품으로 제품화함과 동시에 높은 매출을 기대

붙임. 참고문헌

- 1) Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E, Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome, Arch Neurol. 1999 Mar;56(3), 3-8.
- 2) Lee JH, Lee KU, Lee DY, Kim KW, Jhoo JH, Kim JH, et al. Development of the Korean version of the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease Assessment Packet (CERAD-K): clinical and neuropsychological assessment batteries. J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci 2002; 57, 47-53.
- 3) Suh GH, Kang CJ. Validation of the Severe Impairment Battery for patients with Alzheimer's disease in Korea, International Journal of Geriatric Psychiatry. 2006 21(7), 626-32.
- 4) 하규섭, 한국 성인 인지기능 평가를 위한 전산화 검사도구의 개발과 표준화 과정 및 요인분석, 신경정신의학 제41권 제3호 통권 제168호 (2002. 5), 551-562.
- 5) Galasko D, Bennett D, Sano M, Ernesto C, Thomas R, Grundman M, Ferris S. An inventory to assess activities of daily living for clinical trials in Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. Alzheimer Disease and Associates Disorders. 1997;11 Suppl 2:S33-9.
- 6) Galasko D, Schmitt F, Thomas R, Jin S, Bennett D; Alzheimer's Disease Cooperative Study. Detailed assessment of activities of daily living in moderate to severe Alzheimer's disease. Journal of the International Neuropsychological Society. 2005 Jul;11(4):446-53
- 7) Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O, Huang V, Adey M, Leirer VO. Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. J Psychiatr Res. 1982-1983;17(1):37-49.
- 8) Sheikh VI, Yesavage VA(1986) : Geriatric Depression Scale(GDS) : Recent evidence and development of shorter version. In TL Brink(Ed), Clinical Gerontology ; A guide to assessment and intervention, New York Haworth Press, 165-174.
- 9) Alden D, Austin C, Sturgeon R(1989) : A correlation between the geriatric depression scale long and short forms. Journal of Gerontology 44 : 124-125.
- 10) Cwikel J, Ritchie K(1988) : The short GDS : Evaluation in a heterogeneous, multilingual population. Clinical Gerontologist 8 : 63-71.

- 11) Leshner EL, Berryhill JS(1994) : Validation of the geriatric depression scale-short form among inpatients. *J of Clin Psychol* 50 : 256-260.
- 12) 조맹제, 배재남, 서국희, 함봉진, 김장규, 이동우, 강민희, DSM-III-R 주요 우울증에 대한 한국어판 Geriatric Depression Scale(GDS)의 진단적 타당성 연구, *J Korean Neuropsychiatr Assoc* 1999. 38(1), 48-63.
- 13) Ogawa S, Tank DW, Menon R, Ellermann JM, Kim SG, Merkle H, Ugurbil K. Intrinsic signal changes accompanying accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5951-5.
- 14) Le Bihan D, Karni A. Applications of magnetic resonance imaging to the study of human brain function, *Current Opinion in Neurobiology*, 5, 231-237 (1995).
- 15) Ogawa S, Menon RS, Tank DW, Merkle H, Ellermann JM, Ugurgill K. Functional brain mapping by blood oxygenation level-dependent contrast magnetic resonance imaging. A comparison of signal characteristics with a biophysical model, *Biophys J*, 64, 803-808 (1993).
- 16) Yun-Hee Kim. Usefulness of Functional MRI for the Study of Brain Function, *한국 뇌학회지*, Vol. 1, No. 1, pp. 65-76, June 2001
- 17) Galantamine: a randomized, double-blind, dose comparison in patients with Alzheimer's disease. Wilkinson D1, Murray J. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2001 Sep;16(9):852-7
- 18) Erin M, Julia A et al., (2011). Nobiletin attenuates VLDL overproduction dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 60: 1446-1457.
- 19) 안덕균, 한국본초도감. 서울: 교학사. 1999년: 462.
- 20) Gilbert R, Howard M, Harry G, Sidney J. (2013). A 60 day double -blind placebo-controlled safety study involving *Citrus aurantium* (bitter orange) extract. *Food Chem. Toxicol*, 55:358-362.
- 21) Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. (2007). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 22:659-661.
- 22) Akao Y, Itoh T, Ohguchi K, Iinuma M, Nozawa Y. (2008) Interactive effects of polymethoxy flavones from *Citrus* on cell growth inhibition in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Bioorg Med Chem*, 16(6):2803-2810.

- 23) Nagase H, Yamakuni T, Matsuzaki K, Maruyama Y, Kasahara J, Hinohara Y, Kondo S, Mimaki Y, Sashida Y, Tank AW, Fukunaga K, Ohizumi Y. (2005). Mechanism of neurotrophic action of nobiletin in PC12D cells. *Biochemistry*, 44(42):13683–13691.
- 24) Nagase H, Omae N, Omori A, Nakagawasai O, Tadano T, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y. (2005). Nobiletin and its related flavonoids with CRE-dependent transcription-stimulating and neuritegenic activities. *Biochem Biophys Res Commun*, 337:1330–1336.
- 25) Nakajima A, Yamakuni T, Haraguchi M, Omae N, Song SY, Kato C, Nakagawasai O, Tadano T, Yokosuka A, Mimaki Y, Sashida Y, Ohizumi Y. (2007). Nobiletin, a citrus flavonoid that improves memory impairment, rescues bulbectomy-induced cholinergic neurodegeneration in mice. *J Pharmacol Sci*, 105(1):122–126.
- 26) Matsuzaki K, Yamakuni T, Hashimoto M, Haque AM, Shido O, Mimaki Y, Sashida Y, Ohizumi Y. (2006). Nobiletin restoring β -amyloid-impaired CREB phosphorylation rescues memory deterioration in Alzheimer's disease model rats. *Neurosci Lett*, 400(3): 230–234.
- 27) Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y. (2008). Nobiletin, a Citrus Flavonoid, Improves Memory Impairment and Ab Pathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 326(3):739–744.
- 28) Nakajima A, Yamakuni T, Matsuzaki K, Nakata N, Onozuka H, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Ohizumi Y. (2007). Nobiletin, a citrus flavonoid, reverses learning impairment associated with N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by activation of extracellular signal regulated kinase signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 321:784–790
- 29) Yamamoto Y, Shioda N, Han F, Moriguchi S, Nakajima A, Yokosuka A, et al. (2009). Nobiletin improves brain ischemia induced learning and memory deficits through stimulation of CaMKII and CREB phosphorylation. *Brain Res* 1295:218–229
- 30) Nakajima A, Aoyama Y, Nguyen TT, Shin EJ, Kim HC, Yamada S, Nakai T, Nagai T, Yokosuka A, Mimaki Y, Ohizumi Y, Yamada K. (2013). Nobiletin, a citrus flavonoid, ameliorates cognitive impairment, oxidative burden, and hyperphosphorylation of tau in senescence-accelerated mouse. *Behav Brain Res* 250:351–360.
- 31) Arbo MD, Schmitt GC, Limberger MF, Charão MF, Moro AM, Ribeiro GL,

- Dallegrave E, Garcia SC, Leal MB, Limberger RP. (2009) Subchronic toxicity of *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) extract and p-synephrine in mice. *Regul Toxicol Pharmacol.* 54(2):114-117
- 32) Judy W, Stogsdill W, Judy D, Judy J, Sharma P, Evans M, Guthrie N. (2010). Efficacy of Diabetinol on glycemic control in insulin resistant hamsters and subjects with impaired fasting glucose—a pilot study. *J. Func. Foods*, 2:171-178.
- 33) Malkanthi Evans, Prachi Sharma and Najla Guthrie (2012). Bioavailability of Citrus Polymethoxylated Flavones and Their Biological Role in Metabolic Syndrome and Hyperlipidemia, Readings in Advanced Pharmacokinetics.
- 34) Peixoto JS, Commar JF, Moreira CT, Soares AA, de Oliveira AL, Bracht A, Peralta RM. (2012). Effects of *Citrus aurantium* (bitter orange) fruit extracts and p-synephrine on metabolic fluxes in the rat liver. *Molecules*, 16;17(5):5854-5869.
- 35) Sidney J, Harry G, Mohd S. (2012). A review of the human clinical studies involving *Citrus aurantium* (Bitter orange) Extract and its primary protoalkaloid p-synephrine. *J Med. Sci*, 9(7)527-538.
- 36) Sidney J. (2010). Assessment of the adverse event reports associated with *Citrus aurantium* (bitter orange) from April 2004 to October 2009. *J. Func. Foods*, 2:235-238.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발 사업의 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.