

11-15430
00-00276
0-01

발간등록번호
11-1543000-002760-01

치주질환 예방·개선 고부가가치식품 연구개발 및 산업화 최종보고서

2019

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

치주질환 예방·개선 고부가가치식품 연구개발 및 산업화 최종보고서

2019. 02. 08.

주관연구기관 / (주)파미니티
협동연구기관 / 연세대학교 산학협력단
협동연구기관 / 연세대학교 산학협력단

농림축산식품부

<제출문>

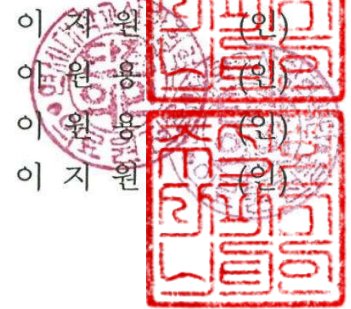
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “치주질환 예방·개선 고부가가치식품 연구개발 및 산업화”(개발기간 : 2016. 07. 07 ~ 2018. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 08.

주관연구기관명 : (주)파미니티
협동연구기관명 : 연세대학교 산학협력단
협동연구기관명 : 연세대학교 산학협력단
참여기관명 : (주)파미니티



주관연구책임자 : 노 유 현
협동연구책임자 : 최 성 호
협동연구책임자 : 박 광 균 / 정원윤 (3년차)
참여기관책임자 : 이 지 원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	316054-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2016. 07. 07~2018. 12. 31	단 계 구 분	1 / 1
연구사업명	단 위 사 업	고부가가치식품기술개발			
	사 업 명	치주질환 예방·개선 고부가가치식품 연구개발 및 산업화			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	치주질환 예방·개선 고부가가치식품 연구개발 및 산업화			
연구책임자	노 유 현	해당단계 참여연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 780,000천원 민간: 260,000천원 계: 1,040,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 780,000천원 민간: 260,000천원 계: 1,040,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)파미니티 / 연구소			참여기업명 (주)파미니티	
국제공동연구	상대국명: 해당 없음	상대국 연구기관명: 해당 없음			
위탁연구	연구기관명: 해당 없음	연구책임자: 해당 없음			

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

보고서 면수

본 연구개발은 **환의 예방 및 개선 연구를 통해 우수 효능 소재를 개발함으로써 고부가가치식품으로 제품화·산업화하여 국민 건강나이 -3.4세 프로젝트와 삶의 질 개선**을 달성하는 하기 위해 과제성과인 DB를 기반으로 최종 성과물로서 곤달비 등 추출복합물 소재 (Tees-10)를 연구 개발하여 대량 생산 공정을 확립하고 이에 관련된 지식재산권 12건 출원, 등록 2건, 기술실시 3건, 제품화 6건, 홍보 전시 32건, 고용창출 6명등의 성과를 달성하였음.

50건 이상의 국내외 천연물 DB를 기반으로 전임상 치주건강 개선 효능 스크리닝을 통해서 곤달비 등 추출복합물을 선정하였음. 본 소재는 치조골 세포의 분화율을 증가시키고 파골세포의 활성도를 감소시키는 것을 확인하였음. 특히, 곤달비 등 추출복합물을 처리한 경우, 인간 치주줄기세포의 활성화를 통해서 줄기세포의 건강도를 향상시키고 치주인대조직으로의 분화율을 향상시켜서 치주조직의 재건에 영향을 미치는 것을 확인하였음. 치주염 동물모델에서도 세포 실험을 통해서 확인 치조골 건강, 조직 재생, 염증 억제등의 효능을 조직분석을 통해서 확인하였음. 이를 기반으로 100건의 피험자를 대상으로 인체적용시험을 수행한 결과, 반건강인의 잇몸, 치주 건강도를 약 35% 이상 개선시키는 것을 확인하였으며 잇몸 및 치주 인대 파괴효소들의 의 증가를 효과적으로 억제함으로써 질환의 예방 및 개선에 효능이 있음을 확인하였음.

본 연구 결과를 기반으로 국내 제품화를 위해 6건 이상의 시제품을 개발중에 있으며 개별인정을 위한 기반 기술을 모두 확보하였으므로 2019년 개별인정형을 신청하고 미국 NDI 승인을 위한 안전성평가를 진행하여 국내외 산업화를 진행하여 국가적 가치를 창출하고 대량생산을 위한 농가 재배 확대를 진행하고자함. 이를 기반으로 국내외 건강기능식품 및 농업 산업규모 확장에 크게 이바지 할 것임.

<p style="text-align: center;">연구의 목적 및 내용</p>	<p>1. 연구 목적</p> <p>본 과제는 치주질환의 예방 및 개선 연구를 통해 우수 효능 소재를 개발함으로써 고부가가치식품으로 제품화·산업화하여 국민 건강나이 - 3.4세 프로젝트와 삶의 질 개선을 달성코자 함. 세부목표로서 관련 특허 5건, 기술이전 2건, 치주건강 개선 효능 소재 기술인증 1건 이상 등의 성과를 달성하고 이를 기반으로 치주질환 개선 식품소재 활용도 제고를 위한 50건 이상의 DB 구축과 3건 이상의 제품화를 통해서 150억원 이상의 수익을 창출하고자 함. 이는 3년 이상의 사전연구 결과를 통해서 곤달비 및 밀싹 등 우수 천연소재 추출물의 치주건강 개선 소재를 이미 확보하여 2.6년의 과제수행 기간 동안 성공적인 산업화 성과를 달성할 수 있는 사전 준비를 갖추고 있기 때문에 가능한 것임. 또한 본 과제 수행의 연구팀은 국내 최초 개별인정형 기능성원료의 인정 경험을 다수 가지고 있는 고부가가치식품 개발 전문 기업 ㈜파미니티와 치주질환 전문인 연세대학교 치과대학/병원으로 구성되어 과제를 성공적으로 수행하여 우수성과를 도출 할 것임.</p> <p>2. 연구 내용</p> <p>가. 1년차: 효능소재의 선정 및 추출법, 기준규격 설정과 치주질환 개선 효능 평가 기술 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 치주질환 완화 활성 초고속탐색 시스템 활성 및 효능 소재 스크리닝 - 민간소재 활용도 제고를 위한 DB구축 - 기능소재의 밸리데이션 및 성분 프로파일링 - 전임상 평가 모델 및 효능 바이오마커 구축 - 유효 소재의 전임상 효능 평가 수행 - 간이임상을 통한 인체적용시험 수행 계획 수립 및 IRB 승인 - 효능 후보군의 인체적용시험 수행 <p>나. 2년차: 효능 소재의 기준규격 확립, 전임상 효능평가 및 인체적용시험 완료, 개별인정형 신청</p> <ul style="list-style-type: none"> - 화학적 동등성 평가 기술 구축 및 기준규격 표준화를 통해 개별인정 신청 보고서 작성 - 전임상 효능 평가 및 작용기전 규명을 통한 논문 및 최종 결과 보고서 작성 - 인체적용시험 효능 평가 및 작용기전 규명을 통한 최종 결과 보고서 작성 - 표준화에 따른 천연물 소재의 프로파일링 결과를 바탕으로 유효성분 탐색 - 소재의 치주건강 개선에 도움을 줄 수 있는 개별인정형 기능성원료 식약처 인정 신청 <p>다. 3년차: 개별인정형 치주건강 개선 효능 소재 승인, 제품화 및 산업화 마케팅</p> <ul style="list-style-type: none"> - 치주건강 개선 효능 소재의 개별인정형 승인 - 승인 소재를 기반으로 제품 적용을 위한 상품화 형태 연구를 통해 3가지 이상 제품화 - 미국 OTC 등록 등을 통해 소재 및 관련 제품의 국제 산업화 - 치주건강 개선 효능 소재의 특허/홍보/논문 발표 - 효능 검증 및 기전 분석을 통한 제품 개선화 연구 수행 - 치약, 구강청결제, 가글액, 껌 등 확대 적용 제품의 효능 평가 연구 수행
<p style="text-align: center;">연구개발성과</p>	<p>1. 핵심기술성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 치태 형성 및 분비 독소에 의한 염증, 구강조직 내 기질분해효소 분비 억제기술 - 치조골건강 및 30%이상의 구강/치주질환 예방과 개선 효능 확보(건강나이 - 3.4세 달성) <p>2. 학술 성과</p>

	<ul style="list-style-type: none"> - 치주질환 예방 및 개선 효능 평가를 위한 바이오마커 구축 및 효능 평가 기준 확립 - 천연소재를 통한 성체치주줄기세포의 증식 활성화 및 분화 조절 기능 규명 - 치주인대세포의 증식 유지 및 작용기전 연구와 치은섬유아세포의 증식활성화 과정 규명 <p>3. 산업화 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 새로운 천연 소재 개발을 통한 농가 소득 창출 - 치주질환 예방 및 개선 관련 건강기능식품 제품 3건 이상 산업화를 통해 매출 150억원 달성 - 구강 건강 관련 해외 상품 대체 효과 및 국제화를 통해 100억원 이상의 가치 창출 <p>4. 적용 목표 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 식품소재의 고부가가치화를 통한 농가산업발전 및 소비구조 활성을 통한 신 고용창출 - 국내 최초 치주건강에 도움을 줄 수 있는 소재의 개별인정 (기준 확립) - 구강건강관련 제품 (치약, 가글액, 구취제거제, 껌 등) 기능소재 적용 제품화 확대 - 해외시장을 대상으로 구강 건강 및 치주건강 개선 제품의 수출 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1. 기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 식품소재를 활용한 치주질환 예방 및 개선 소재 연구개발 기반기술 구축 - 치주 질환/구강 건강 개선 효능 소재의 평가 기준 확립 및 바이오마커 확보 - 새로운 기능성 건강기능식품 소재 개발을 통해 고부가가치식품의 경제성 향상 - 구강건강 관련 제품 전반의 가공제품화 기반 기술 구축 <p>2. 산업/경제적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 치주질환 예방 및 개선 기능성 소재를 활용한 제품화·산업화를 통해 약 1,000억원/년 이상의 시장 가치 창출 (최초 매출 150억원 예상) - 치약, 가글액, 구강청결제, 껌 등의 구강관련 제품으로 확대적용하여 새로운 부가가치창출 (국가적 3,000억원 이상의 경제적 효과 발생) - 국내 기술의 브랜드화 및 수출에 따른 1,000억원 이상의 경제적 효과 발생 - 농업분야 관련 산업분야 활성을 통해 직접적으로 연간 80명 이상의 고용 창출 가능 <p>3. 사회적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 치주질환 예방 및 개선 소재의 광범위적인 제품화를 통해 국민건강 향상 (-3.4세 국민 건강 프로젝트 달성) - 보건의료적 공공성이 매우 강한 연구개발 분야인 만큼 국민 삶의 질 향상에 기여 - 구강건강 분야에 대한 사회적 관심과 국가연구 투자 활성화 - 기능성과 신뢰성이 확보된 새로운 소재의 개발을 통해 침체된 건강기능식품 시장의 활성화에 기여하여 관련 산업의 동반 성장 유도 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	치주질환	구강건강	건강기능식품	개별인정형소재	고부가가치식품
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	periodontal disease	oral health	health functional food	individual approval type of Health supplement	high value food

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	25
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	127
4. 연구결과의 활용 계획 등	131
붙임. 참고 문헌	135

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

1. 연구개발과제의 개요

1장. 연구개발 목적

1절. 연구개발의 개요

치주질환의 예방 및 개선에 유효한 천연물 유래 추출물이 함유된 국민 구강건강개선 및 건강나이 -3.4세를 위한 고부가가치 건강기능식품

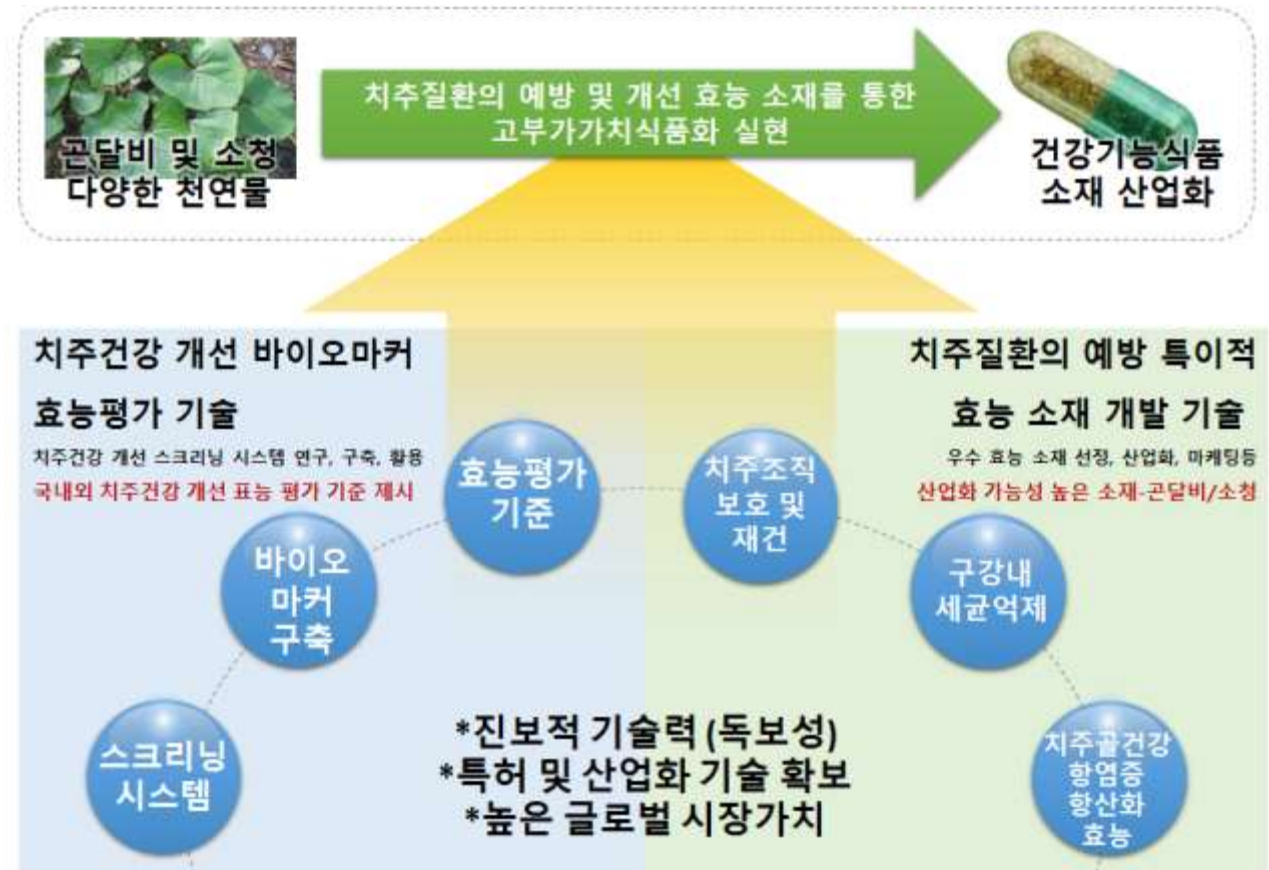


그림 4. 치주질환 예방 및 개선 제품 개념도

1. 핵심기술

가. 핵심기술의 내용

- 치주질환 예방 및 개선 평가 기술: 본 과제를 통해서 치주건강 개선 바이오마커를 구축함으로써 국내외 관련 계통에서 아직까지 제대로 정립되어 있지 않은 치주질환 예방 및 개선의 평가 기술 개발함.
- 치주조직의 보호 및 재건 기술: 최근까지의 연구를 기반으로 아직까지 치주조직의 보호 및 재건에 관한 기술을 거의 규명된 바 없으며, 줄기세포 관련하여 다양한 연구가 진행되고 있으나 이를 평가하고 확인할 수 있는 상세한 연구 성과가 부족한 상황에서 본 과제를 통해서 치주조직을 보호하고 재건할 수 있는 소재와 그 평가 기술을 제시한다면 다양한 연구 분야와 산업계에 활용 할 수 있을 것으로 예상됨.
- 구강 내 특이적 세균의 증식 및 독성분비 억제 기술: 기존의 연구들에서 구강건강

또는 치주건강 효능 소재는 항염증, 뼈 건강, 항산화 효능에 치중되어 있어 치주질환에 특이적인 연구들은 많이 부족한 상황에서 본 과제를 통해서 구강 특이적 세균의 증식을 억제하고 세균에 의한 분비 독성 억제기술을 개발하고자 함.

나. 핵심기술의 용도

- 효능소재의 스크리닝 시스템 구축: 바이오마커 구축을 기반으로 소재를 선별하고 효능을 평가할 수 있는 스크리닝 시스템 구축
- 치주건강 개선에 도움을 줄 수 있는 개별인정형 기능성원료 개발
- 소재를 기반으로 한 3종 이상의 치주건강 및 구강건강 개선 건강기능식품 제품화
- 개발 소재를 활용하여 치약, 구강청결제, 가글액, 껌 등 다양한 구강관련 분야에 적용하여 제품화 확대

2절. 최종 목표



그림 5. 연구개발의 최종목표

치주질환 완화 및 개선 • 활성 연구를 통한 구강건강과 삶의 질 개선 소재 개발 및 고부가가치 식품 산업화

- 치주질환 예방 및 개선 기능성 소재 기술관련 특허 등록 5건
- 치주질환 예방 및 개선 기능성 소재 개발 기술이전 2건
- 치주질환 예방 및 개선에 도움을 줄 수 있는 기능성 개별인정형 소재 1건
- 치주질환 예방 및 개선용 의약외품 2건, 일반식품 2건

- 치주질환 개선 식품소재 활용도 제고를 위한 100건 이상의 DB 구축
- 치주질환 기능성 소재 관련 건강기능식품 제품화 2건 이상을 통해 매출액 150억원 창출
- 치주인대 생성 및 치조골건강 관련 학술적 성과 보고 (SCI 5편 이상, KCI 3편 이상)

1. 핵심기술 달성목표

- 구강 미생물의 치태 (biofilm) 형성 억제를 통한 치주질환 예방 효능
- 특이적 미생물 독소성분 (virulence factor)에 의한 염증 억제 효능
- 구강조직내 기질분해효소 (MMP) 분비 억제를 통한 치주조직 보호 효능
- 치조골내 골흡수 작용 억제를 통한 전체적 구강건강 유지 및 개선
- 30% 이상의 구강 및 치주질환 예방 및 개선 효능 확보를 통한 건강나이 -3.4세 달성

2. 주요 고부가가치식품 개발의 학술적 성과목표

- 치주질환 개선 식품소재 개발을 위한 다양한 천연소재의 활용도 제고를 위한 바이오 마커
- 치주질환 개선 식품소재의 활용도를 위한 100건 이상의 DB 구축
- 사람 치주인대세포의 안정적인 증식 유지를 위한 작용 기전 규명 연구 (신기술화 연구)
- 사람 치은섬유아세포의 증식 활성화를 위한 분자적 신호전달 체계 규명 (신기술화 연구)
- 국내 최초 천연물을 통한 치주질환 개선 특허 확보 및 우수 학술지 게재

3. 주요 산업화 성과목표

- 치주질환 개선 효능을 갖는 천연소재 개발을 통해 새로운 농업분야 개척 및 농가소득 창출
- 국내 최초 치주건강개선 건강기능식품 개발을 통한 새로운 시장 개척
- 치주건강 개선 소재 관련 제품화 3건 이상 달성을 통해 국내외 100억원 매출달성
- 치주질환 예방 및 개선 기능성 소재의 기술 이전을 통해 건강기능식품 관련 산업발전
- 구강건강 관련 해외 상품의 대체효과 및 국제화를 통한 100억원 이상의 가치창출

4. 주요 적용목표 범위

- 치주질환 예방 및 개선 기능성 식품소재의 활용도 고양을 통해 농가산업 발전
- 한국식품의약품안전처로부터 국내 최초 치주건강에 도움을 줄 수 있는 소재 개별인정
- 치주건강 개선 기능성 개별인정 소재를 기반으로 3건 이상의 국내외 제품 기획 및 산업화

- 구강건강 관련 제품 (치약, 가글액, 구취제거제 등)에 기능성 소재를 적용, 제품화 확대
- 해외시장을 대상으로 구강건강 및 치주건강 개선 제품의 수출

3절. 연차별 목표

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표
1차 년도 (2016)	치주질환 예방·개선 소재의 표준화 및 산업화 (㈜파미티)	사전연구를 통해 확보된 곤달비 등 복합물과 밀싹의 저비용/고기능성 분획물 추출을 위한 추출법 최적화
		최적의 추출법 개발을 기반으로 효능 강화 추출물 제조 및 평가
		민간소재 활용도 제고를 위한 1차 DB 구축 (연차별 단계로 DB 구축)
		기능성이 확인 된 천연소재를 기반으로 재현성이 확보된 기기분석법 적용을 통한 밸리데이션
		기능성 확인과 밸리데이션이 완료된 천연소재의 성분 프로파일링
	치주질환 예방·개선 소재의 인체적용시험 효능 평가 (연세대학교 산학협력단)	고부가가치식품소재의 치주건강 예방 및 개선 효능 평가를 위한 인체적용시험 바이오마커 구축
		간이인체적용시험을 통한 천연식의약소재의 치주건강개선 효능 평가 (평가 대상군 및 인원수 기간 등 결정)
		IRB 승인을 통한 개발 기능성 소재의 인체적용시험을 통한 치주건강개선 효능평가 계획
		선행 연구로 확보된 곤달비 등 복합 추출물의 치주질환 예방 및 개선 인체적용시험 효능 평가
	치주질환 예방·개선 소재의 전임상 효능 평가 및 작용기전 규명 (연세대학교 산학협력단)	치주질환 예방 및 개선용 소재 탐색을 위한 스크리닝 시스템 구축 (스크리닝 바이오마커 구축)
		치주질환 예방 및 개선 소재의 기능성 분석 및 효능 평가를 위한 단계별 바이오마커 발굴 (전임상)
		치주질환 및 구강관련 질환 동물 모델 구축 동물효능실험 일반원칙 구축
사전연구로 선정된 밀싹의 치주질환 예방 및 개선 효능 소재 밀싹의 전임상 효능 평가		
주관 연구기관으로부터 도출된 유효 소재의 효능 분석		
2차 년도 (2017)	치주질환 예방·개선 소재의 표준화 및 산업화 (㈜파미티)	제품화를 위한 선정 소재의 기준규격 표준화 확립
		식품의약품안전처 개별인정 신청을 위한 기준규격관련 보고서 작성
		저비용/고기능성 분획물 추출을 위한 추출법최적화를 통해 유효성분 강화 추출물 제조
		선정된 소재의 신표준화/품질관리기술 구축을 위한 표준화 알고리즘 구축
		선정 소재의 식품의약품안전처 개별인정형 신청을 위한 보고서 작성
	의약외품 등 2건 이상 제품군 도출	
	치주질환 예방·개선 소재의 인체적용시험	1년차 연구과정에 이어 확보된 치주질환 및 구강건강 개선 소재 (소청, 곤달비 포함)의 인체적용시험을 통한 효능평가 지속, 신뢰도 높은 결과 확보 (논문개제)
치주건강 개선 관련 유효성이 확보된 소재의 부작용 분석을 위한		

	효능 평가 (연세대학교 산학협력단)	장기 복용 효능 검증 인체적용시험을 통한 작용기전 및 국제화에 적합한 추가 인체적용시험 수행
	치주질환 예방·개선 소재의 전임상 효능 평가 및 작용기전 규명 (연세대학교 산학협력단)	치주질환 예방 및 개선용 소재 탐색을 위한 스크리닝 시스템 구축 치주질환 예방 및 개선 소재의 기능성 분석 및 효능 평가를 위한 단계별 바이 오마커 발굴 치주질환 및 구강관련 질환 동물 모델 구축 주관 연구기관으로부터 도출된 유효 소재의 전임상 효능 분석
3차 년도 (2018)	치주질환 예방·개선 소재의 표준화 및 산업화 (㈜파미니티)	치주질환 예방 및 개선용 건강기능식품의 개별인정 신청 및 승인 선정된 우수 소재를 적용한 다양한 제품개발 컨셉 확정을 통해 3가지 이상 제 품군 도출
		곤달비 및 밀싹 추출복합물의 장단기, 유전 독성평가
		곤달비 및 밀싹 추출복합물을 활용한 치주건강개선에 도움을 줄수 있는 소재 개별인정신청
		개발 소재의 제품 적용을 위한 배합비 및 상품화 형태 연구
		파일럿 공정 개발 및 대량생산 공정 확립
		치주건강 개선에 도움을 줄 수 있는 기능소재를 활용한 본 제품 산업화
		미국 OTC 신청 등을 통해 소재 및 관련 제품의 국제 산업화
		치주건강 개선 효능 소재 관련 특허/홍보/논문 발표
	치주질환 예방·개선 소재의 인체적용시험 효능 평가 (연세대학교 산학협력단)	치주질환 예방 및 개선을 위한 기능성 소재의 생리영향 평가 인체적용시험을 통한 효능 평가 선정 소재 기반 개발 제품의 인체적용시험 효능 검증 및 기전 분석을 통해 제 품 개선 연구
	치주질환 예방·개선 소재의 전임상 효능 평가 및 작용기전 규명 (연세대학교 산학협력단)	선정 소재 기반 개발 제품의 전임상 효능 검증 및 기전 분석을 통해 제품 개선 연구 치주건강 개선 효능 소재 관련 논문 발표 및 국제 우수 성과 발표 선정 소재의 치주질환 예방 및 개선 관련 약리적 효능 자료 구축

2장. 연구개발의 필요성

1절. 국내 기술 수준 및 시장 현황

1. 기술현황

- 1980년대에는 치주질환의 원인균에 대한 항체 또는 항균 물질들에 대한 연구가 이루어짐.
- 1990년대에는 치주 질환의 증상인 부종, 동통, 잇몸 출혈 등을 감소시키는 방향의 연구와 함께 치주염 및 치은염의 원인 및 치주 질환 진행 과정 등에 관한 연구가 진행됨. 또한, 치주 염증을 유발하는 염증성 사이토카인을 낮출 수 있는 천연물탐색 연구가 진행되고 있음.
- 염증성 사이토카인에 의해 치주 조직이 분비하는 MMP가 치주 질환에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려진 이후로 MMP를 억제할 수 있는 물질 개발에 집중되고 있음. 이를 토대로 MMP 저해제인 테트라사이클린에 대한 연구가 이루어짐.
- (주)동국제약에서 치면의 칼슘에 흡착되어 지속적인 효과를 나타낼 수 있는 테트라사이클린계 항생제인 미노사이클린(minocycline)을 함유한 조성물을 개발하여 현재 시판 중에 있음. 그러나 이와 같은 테트라사이클린계 항생제는 장기적으로 복용 시 그람음성균의 빈번한 내성 발현으로 인해 치아의 착색, 설사, 구토, 동통 등의 부작용이 보고되고 있으며, 특히 임산부나 어린이에게는 적용할 수 없는 단점이 있음.
- (주)동국제약의 ‘인사돌’은 옥수수를 비누화 반응 시킨 후 남은 불검화물을 정량적으로 추출한 옥수수불검화정량추출물을 주성분으로 함. 이 옥수수불검화정량추출물에는 식물스테롤인 베타시토스테롤 일부와 대부분은 스쿠알렌, 카로틴, 토코페롤 등의 불검화물로 이루어짐. 특히 비타민D의 전구물인 프로비타민D의 전구물질인 베타-시토스테롤이 효과를 나타내는 것으로 홍보하고 있으나, 이에 대한 효능이 명확히 밝혀지지 않았음. 즉, ‘인사돌’은 비타민D의 효과일 가능성이 크며, 제품의 성분이 단순 영양제에 불과하다는 논란이 계속되고 있음.
- 명인제약(주)에서 개발된 일반의약품인 ‘이가탄’은 비타민E, 비타민C, 염증 및 출혈 억제제로 구성된 제품이므로 치주질환의 근본적인 원인이 해결되지 않은 상태에서 이러한 일반의약품만을 복용할 경우에는 치주건강 개선의 효능을 기대할 수 없으며, 보조적 치료제로서만이 적용됨.
- 국내에서 사용 중인 치주질환치료제의 성분은 ascorbic acid를 포함한 약품이 가장 많으며, herbal 제제, doxycycline 포함 제제, chlorhexidine 제제, 스테로이드 제제 등임. 그러나 이들의 주요 기전은 항염증 작용과 항균 작용이며, 치주질환치료제 단독으로 사용하여 그 효능을 증명한 실험은 거의 없었고, 주로 치과치료 후에 보조제로서의 작용만이 검증됨.

2. 시장현황

가. 국내 식품 시장

- 2014년 국내 식품 시장 전체 규모는 139.14조원으로 최근 5년 연평균성장률 5.02%로 성장함.
- 2014년 식품 생산액은 121.52조원으로 전년대비 0.42% 감소하였으나, 수출액이 전

년대비 0.03% 증가한 6.72조원, 수입액은 3.14% 증가하여 24.34조원을 기록함.

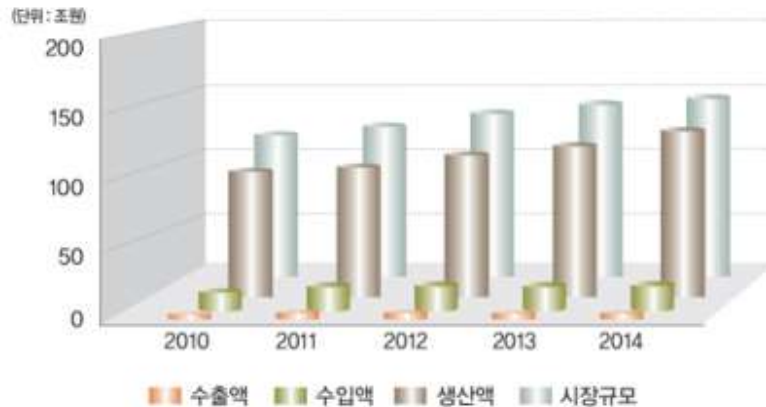


그림 6. 국내 식품 산업 현황
(출처: 식품의약품안전처, 2015 식품의약품 통계연보)

(1) 국내 건강기능식품 시장

- 2014년 국내 건강기능식품 시장 규모는 1.49조원으로 최근 5년간 연평균성장률 10%대를 유지하며, 꾸준히 성장함.
- 2014년 건강기능식품 생산액은 1.12조원으로 전년 대비 7.69% 증가하였으며, 수출액은 12.5% 감소, 수입액은 14.12% 증가함.

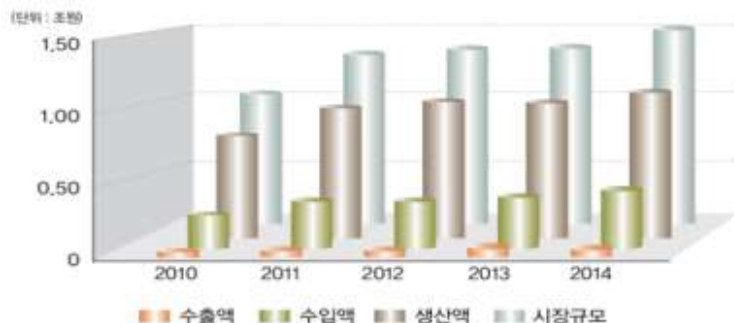


그림 7. 국내 건강기능식품 산업 현황
(출처: 식품의약품안전처, 2015 식품의약품 통계연보)

(2) 국내 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황

- 2004년 기능성 원료 인정 규정이 신설된 이래로 2014년까지 총 529건이 인정됨. 그러나 식약처 인정 기능성 원료의 약 70% 이상이 수입 원료이며, 국내 제조 기능성 원료의 비율은 매우 낮은 현실임. 특히 국내에 원천권리 (특허)가 확보된 기능성 원료는 국내 제조 기능성 원료 중에서도 일부에 불과함.

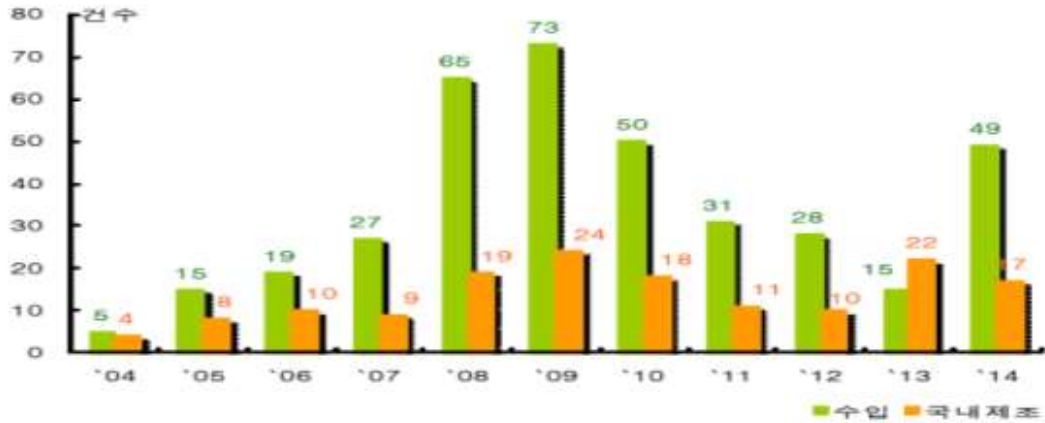


그림 8. 연도별 건강기능식품 기능성 원료 인정 수입/국내제조 현황
(출처: 식품의약품안전처, 2015 식품의약품 통계연보)

- 2014년까지 인정된 기능성 중 구강건강 관련 기능성은 충치발생 기능성 원료 단 1건이며, 본 연구과제의 목표인 치주질환 예방 및 개선과 관련된 기능성 원료는 인정된 바 없음. 최근 소비자들의 니즈 및 건강기능식품 시장 활성화를 위한 신규 기능성의 필요성이 강조되고 있어 치주질환 예방 및 개선과 관련된 기능성 원료의 인정이 가능할 것으로 판단됨.

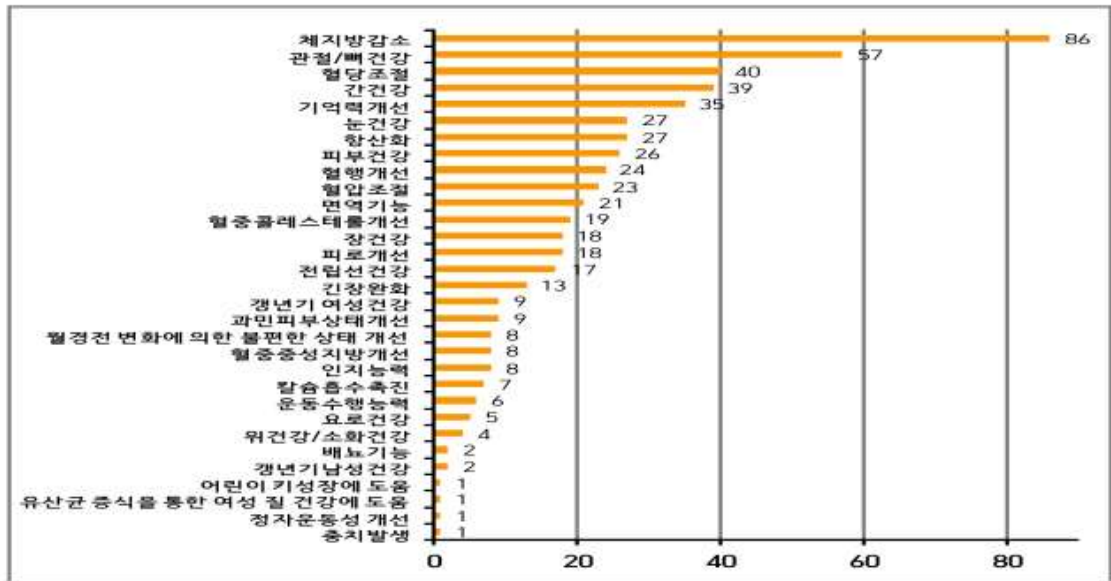


그림 9 식품의약품안전처 기능성 원료 인정 현황 ('04~'14)
(출처: 식품의약품안전처, 2015 식품의약품 통계연보)

(3) 국내 치주건강 치료제 시장 현황

- 치주건강 개선의 기능성으로 인정된 기능성 원료는 없으며, 잇몸치료제인 일반의약품이 치주건강 및 구강건강 관련 시장을 형성하고 있음.
- 치주건강을 포함한 구강질환 일반의약품 시장은 매년 지속적으로 성장하고 있는데, 2013년 잇몸치료제 효과에 논란으로 인해 성장세가 다소 주춤하였으나 기존 치료

- 제에 대한 대안 부재로 인해 여전히 약 1000억원 정도의 규모를 형성하고 있음.
- 대표적인 일반의약품으로는 동국제약의 ‘인사돌’, 명인제약의 ‘이가탄’, 종근당의 ‘이모튼’ 등이 있음. 2014년 인사돌은 전년 보다 20억원 이상 증가한 판매액 약 470억원, 이가탄은 약 200억원의 매출을 기록하며, 관련 시장에서 대표적인 잇몸치료제로서 판매되고 있음.
 - 잇몸치료제에 대한 적극적 홍보를 통해 소비자들에게 가장 많이 알려진 ‘인사돌’의 경우, 1978년 프랑스 라로슈 나바론사에서 수입되었다가 1987년 국내 자체생산에 성공하여 현재 동국제약에서 판매 중임. 명인제약에서 판매 중인 ‘이가탄’ 역시 광고 마케팅을 통해 소비자들에게 대표적인 잇몸치료제로 알려져 있으나, 이 두 제품은 모두 효능에 대한 논란이 계속되고 있음.
 - 프랑스에서 수입한 인사돌은 주성분인 ‘옥수수 불검화정량추출물’이 잇몸질환 치료에 효능이 효능이 부족한 것으로 평가되어 프랑스에서는 2001년부터 약이 아닌 건강기능식품으로 분류되어 판매되고 있고, 이가탄의 주성분으로 일본에서 처음 개발된 염화리소짐은 효과가 입증되지 않아 일본에서는 판매가 중지된 현황임.
 - 내복형 일반의약품 외 치약형 제품도 다수 출시되어 동화약품 ‘잇치’, 광동제약의 ‘과로돈탁스’ 등의 일반의약품과 동국제약 ‘인사덴트 닥터’, 일동제약 ‘덴큐헬스페이스트’ 등의 치약형 의약외품인 이 있음. 이 중 ‘잇치’는 출시 3년만인 2013년 70억원 이상의 매출을 기록하며 크게 성장함. 이들은 일반의약품 형태의 잇몸치료제와는 차별화된 경증에 속하는 치은염을 타겟으로 판매되고 있으나, 이는 효과가 미비하여 치주건강 개선이 아닌 단순 예방 차원의 제품에 불과하여 판매업체에서도 일반의약품과의 병행을 권고하고 있는 실정임.

표 1. 주요 잇몸치료제 (일반의약품, 의약외품) 실적 추이

(단위: 억원)

제품	제조사명	2013년	2014년	2015년
인사돌	동국제약	518	433	311
이가탄에프	명인제약	181	193	211
인사돌플러스	동국제약	-	37	107
잇치	동화약품	77	90	77
덴큐	일동제약	66	91	43
잇몸약 시장 합계		1,073	1,050	961

(출처: IMS데이터)

(4) 경쟁기관현황

- 국내 치주건강 및 구강건강 개선 제품 현황
 - 현재 식약처에서 치주건강 및 구강건강 관련된 기능성 원료는 없으며, 치은염·치조농루에 의한 여러 증상을 완화시킬 수 있는 효능의 일반의약품으로서 명인제약의 ‘이가탄’, 동국제약의 ‘인사돌’, 종근당의 ‘이모튼’이 판매되고 있음.
 - 이 중 잇몸치료제에 대한 적극적 홍보를 통해 소비자들에게 가장 많이 알려진 ‘인사돌’의 경우, 1978년 프랑스 라로슈 나바론사에서 수입되었다가 1987년 국내 자체

생산에 성공하여 현재 동국제약에서 판매 중임. 명인제약에서 판매 중인 ‘이가탄’ 역시 광고 마케팅을 통해 소비자들에게 대표적인 잇몸치료제로 알려져 있으나, 이 두 제품은 모두 효능에 대한 논란이 계속되고 있음.

- 그럼에도 불구하고, 관련 제품의 매출액은 크게 감소하지 않고 있으며, 판매사인 동국제약, 명인제약, 일동제약 등은 매출액 뿐만 아니라 영업이익, 당기순이익 등이 꾸준히 상승하고 있음.

표 2. 치주질환 치료제 판매 제약사 매출현황

(단위: 백만원)

업체명	매출			영업이익			당기순이익		
	2015	2014	증감	2015	2014	증감	2015	2014	증감
동국제약	259,929	226,014	15.0%	33,609	26,553	26.6%	27,273	20,996	29.9%
명인제약	140,800	131,982	6.7%	30,500	30,329	-	24,800	12,566	87.7%
동화약품	223,201	213,472	4.6%	4,813	5,340	-9.9%	5,609	4,937	13.6%
일동제약	476,385	417,517	14.1%	23,726	9,264	156.1%	21,330	11,934	78.7%

(출처: 약사신문, 제약업계 매출현황)

(5) 지식재산권현황

- 치주질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 특허 현황
 - 1980년대에 치주질환을 예방할 수 있는 치약조성물이나 치주질환을 일으키는 원인균에 대한 항체 또는 항균물질에 대한 특허가 출원됨.
 - 1990년대부터 치주 질환의 증상인 부종, 동통, 잇몸 출혈 등을 예방 또는 치료할 수 있는 한약재를 주성분으로 한 조성물에 대한 특허가 다수 출원됨. 치주질환으로 파괴된 치주조직을 재생시키는 활성 조성물에 대한 특허 출원이 증가하는 경향을 보였으며, 치주 질환균에 대한 항균활성 효과를 갖는 식물추출물에 대한 특허 출원도 계속 되고 있음.
 - 그러나 이들은 주로 항균 또는 항염 효과를 통한 치주질환 예방용 조성물이었음. 이보다 더 근본적으로 치주염 및 치은염의 원인을 예방하고 치료할 수 있는 발명이 필요하며, 치주질환 진행 과정 중 일어나는 치주 조직의 손상을 치료하고 치주 건강을 개선시킬 수 있는 기전으로의 접근이 필요함.

(6) 표준화현황

- 치주질환 예방 및 치료용 조성물 개발 및 효능 평가 기술 표준화 현황
 - 국내 다양한 연구기관들을 통해서 치주질환, 구강질환의 예방 및 치료에 대한 연구들이 다수 진행되고 있으나 소재의 개발과정에서 스크리닝을 위한 바이오마커 등이 완전히 구축되어 있지 못한 현황임.
 - 실제 현재 효능소재의 기능 평가가 구강 또는 치주에 특이적인 효능이 아니라 염증억제, 뼈 건강, 관절건강, 지혈작용, 항산화 등과 같이 매우 신체 전반에 작용할 수 있는 일부 바이오마커를 사용하고 있음. 따라서 구강건강에 특이적인 새로운 바이오마커들을 제시하고 평가할 수 있는 표준화 기술을 제공해야 하는 상황.
 - 본 과제 수행의 참여 연구팀은 건강기능식품의 소재 개발과 제품화 전문기업과 치

주질환 예방 및 개선 전문가로 구성된 연구팀이 함께 하면서 소재를 개발하고 한국식품의약품안전처에 개별인정을 획득하는 과정에서 평가 전문기관과 평가지표의 설정부터 평가 방식까지 표준화함으로써 국내 효능평가의 기준을 제시하고자 함.

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- 치주질환에 minocycline, doxycycline과 같은 테트라사이클린계 항생제가 항균력을 나타내는 농도 이하에서 MMP 저해 효능을 갖는 것으로 보고되어 치주 질환 환자에게 사용되고 있음.
- 테트라사이클린을 화학적으로 변형시킨 유도체로서 dimethylamino기를 제거하여 항균작용을 없앤 여러 종류 CMT (chemically modified tetracycline) 유도체들을 이용한 치은의 MMP 활성 저해 효과를 확인하며 임상시험 중에 있음.
- 국외에서도 치주질환 치료제로는 주로 소염제를 활용한 제품과 doxycycline이 주로 치주질환용 치료제로 판매 중이며, 잇몸과 치조골 파괴 억제를 통한 치료제는 아직 제품화되지 않았음.
- 미국에서 doxycycline과 같은 테트라사이클린계 항생제가 항균력을 나타내는 농도 이하에서 MMP를 억제하는 효능이 확인되어 FDA에서 doxycycline을 MMP 억제제로서 허가하여 치주질환 치료제로서 판매 중임. minocycline이 오심, 구토 등 위장관계 이상 및 어지럼증 등의 부작용이 있는 반면, doxycycline은 광과민증 발생 가능성이 낮음. 그러나 doxycycline 역시 항생제로서 내성균의 발현, 소화기 장애 및 과민반응 등의 우려가 있기 때문에 doxycycline 역시 임산부와 어린이에게는 사용이 금지되어 전 연령대의 안전성이 확보되지는 못함.
- 따라서 현재 시판 중인 치주질환 치료제의 부작용 및 높은 가격의 문제점을 해결하고자 부작용이 적으면서도 치주질환을 근본적으로 예방하고 치료할 수 있는 안전한 소재의 개발이 필요함.

(2) 시장현황

(가) 국외 식품 시장

- 2013년 세계 식품시장규모는 약 3조1,165억 달러로 2012년 3조 138억달러 대비 3.4% 가량 성장한 것으로 추정됨.
- 지역별로는 미주지역이 1조585억 달러 (34%)로 가장 큰 시장을 형성하며, 유럽시장이 1조279억 달러 (33%), 아시아-태평양 9,642억 달러 (30.9%), 아프리카 및 중동지역이 539억 달러 순으로 시장을 형성함.
- 국가별로는 미국이 6,366억 달러 (20.4%), 그 다음 중국, 일본, 독일, 브라질 순으로 큰 시장규모를 형성하고 있으며, 한국은 세계 17위로 식품 시장을 형성함.

표 3. 국가별 식품 시장규모 순위

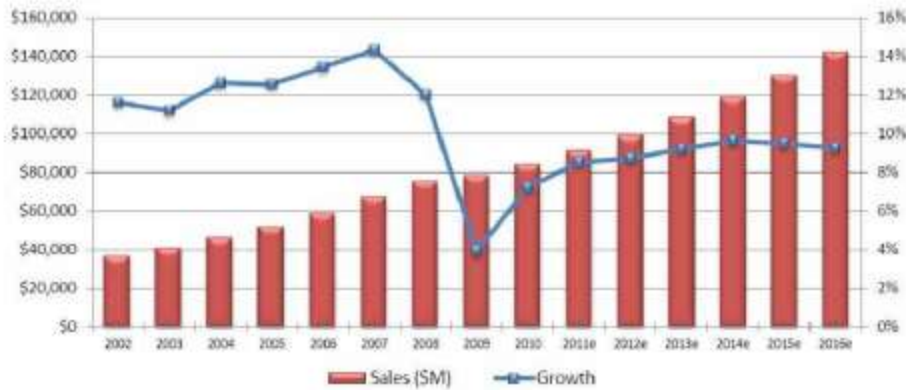
(단위 : 백만달러, %)

순위	국가	2011		2012		2013	
		시장규모	비중	시장규모	비중	시장규모	비중
1	미국	611,438.5	21.0	623,152.8	20.7	636,613.6	20.4
2	중국	408,899.2	14.0	437,642.5	14.5	469,807.9	15.1
3	일본	234,820.8	8.1	237,004.4	7.9	239,200.0	7.7
4	독일	177,123.3	6.1	180,575.0	6.0	183,406.1	5.9
5	스리랑	164,248.9	5.6	171,728.0	5.7	179,222.3	5.8
6	영국	113,629.9	3.9	117,048.4	3.9	120,447.5	3.9
7	프랑스	115,238.1	4.0	117,517.3	3.9	118,896.1	3.8
8	멕시코	106,269.4	3.7	112,414.9	3.7	117,421.9	3.8
9	이탈리아	100,237.5	3.4	102,495.1	3.4	104,036.2	3.3
10	러시아	91,609.0	3.1	95,950.4	3.2	100,109.2	3.2
상위 10개국 합계		2,123,515	72.9	2,195,529	72.8	2,269,161	72.8
상위 20개국 합계		2,526,700.4	86.8	2,615,372.5	86.8	2,705,321.9	86.8
전체 합계		2,911,002.0	100.0	3,013,799.9	100.0	3,116,469.5	100.0

(출처: Datamonitor, Interactive Consumer Database, 2014; 한국보건산업진흥원, 2014년 식품산업 분석 보고서)

(나) 국외 건강기능식품 시장

- Nutrition Business Journal의 자료에 따르면, 2010년 세계 건강기능식품 시장규모는 전년 (802억 달러) 대비 5.4% 성장한 약 845억 달러로 추정됨. 국가별로는 미국이 약 281억 달러로 세계 시장의 33.2%를 차지하며, 다음으로 서유럽 (약 153억 달러, 18.1%), 일본 (약 105억 달러, 12.4%), 호주/뉴질랜드 (약 19억 달러, 2.2%) 등으로 세계 4개 지역이 전체 시장의 72% 이상을 차지함.



Source: Nutrition Business Journal estimates. (\$mil., consumer sales)

그림 10. 세계 건강기능식품 시장 현황

(출처: Nutrition Business Journal, NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report)

(3) 지식재산권현황

- KIPRIS 특허정보넷 (www.kipris.or.kr)에서 키워드 ‘natural*extract*periodontal*disease’ 로 검색한 결과, PCT 특허 6,258건, 미국 특허 11,743건, 일본 특허 67건 등이 검색됨.
- 그러나 이들은 주로 항염 효과가 있는 소재들이었으며, 염증억제는 물론이며 치주

인대 강화까지 종합적인 치주질환 개선용 천연물 지식재산권은 많지 않음.

- 특히 본 연구의 주성분인 곤달비 또는 소청을 주성분으로 한 치주질환 예방 또는 치료용 조성물에 대한 특허는 없음. 또한, 본 연구의 소재는 이미 특허 출원되었으므로 향후 실용화 및 사업화시 분쟁 예상되는 특허는 없음.

2절. 연구개발의 중요성

1. 기술적 측면에서의 기술 개발 중요성 및 필요성

- 현재 치주질환 치료제로는 minocycline, doxycycline 등의 테트라사이클린계 항생제를 MMP 저해제로 활용하여 사용되고 있음. 그러나 이러한 항생제는 내성균의 발현, 소화기 장애 및 과민반응 등의 부작용으로 인해 사용에 주의해야하며, 임산부 및 어린이에게는 사용이 금지되어 제한적으로 사용되고 있음.
- 국내에서 잇몸건강 개선 및 치료제로 판매 중인 일반의약품들은 광고 마케팅을 통해 소비자들에게 많이 알려져 있긴 하지만, 그것들의 주성분은 효능물질이 아닌 단순 영양제이며, 그 효능에 대한 논란이 계속되고 있음.
- 따라서 근본적으로 치주염 및 치은염의 발생 원인을 예방하고, 치료하며, 치주건강을 개선시키며, 장기간 복용에도 부작용이 없고, 안전성이 확보된 천연물 고부가가치 식품 소재의 개발이 필요함.

2. 경제·산업적 측면에서의 기술 개발 중요성 및 필요성

- 국내 잇몸치료제 (일반의약품, 의약외품) 시장은 2015년에 961억원으로 약 1000억원 대 시장을 형성하고 있음. 이 중 잇몸치료제로 소비자들에게 가장 잘 알려진 일반의약품인 인사돌 시리즈와 이가탄이 약 630억원으로 전체 시장의 약 3분의 2를 차지하고 있음. 그러나 인사돌과 이가탄의 성분에 대한 효능에 대한 논란이 지속되고 있어 안전하고 효과적인 소재가 개발되어 제품화된다면, 해당 시장을 충분히 대체할 수 있음.
- 인사돌과 이가탄의 매출액 합계인 630억원의 10%만 차지하더라도 연간 약 60억원 이상의 시장 가치가 있음.

3. 사회문화적 측면에서의 기술 개발 중요성 및 필요성

- 치주질환은 중장년층의 병으로 생각하기 쉽지만, 치주질환을 최초로 경험하는 연령이 점점 낮아지고 있으며, 그 증가세 또한 빨라지고 있음. 국민건강통계 국민건강영양조사에 따르면, 30대에서 남자 20.5%, 여자 12.7%로 젊은 연령에서도 10~20%가 치주질환을 앓고 있으며, 치과 치료를 받지 않아 확인되지 않은 질환자까지 포함하면 그 이상이 될 것으로 예상됨.
- 치주질환은 다른 전신질환을 보다 심화시키거나 발병률을 높이는 것으로 알려져 있음. 특히 당뇨병 환자는 합병증으로 치주질환이 동반되고, 심한 치주염을 갖고 있는 당뇨병 환자는 심혈관계 합병증이 4배 정도 높게 발병하는 것으로 보고됨.
- 치주건강이 악화되면, 잇몸이 녹거나 이빨이 빠지는 등의 증상이 나타날 수 있는데, 치아를 잃게 되면 저작능력이 저하되어 섭취할 수 있는 음식물의 범위가 제한

되고, 소화기관에 부담이 크게 늘어나는 등 전신건강에 영향을 미침. 또한, 구내 악취, 미관상의 문제 등으로 생활 불편이 따르며, 이로 인해 대인관계 기피나 우울증 등 심리적인 문제가 동반되는 경우도 있음.

- 따라서 치주질환 발병 이전 단계에서부터 이를 예방하는 것이 매우 중요하며, 이를 위해 치주건강을 개선시킬 수 있는 천연물 고부가가치 식품 소재 개발이 매우 필요함.

4. 과학 학술적 측면에서의 기술 개발 중요성 및 필요성

- 현재 치주질환의 치료제로서 많이 사용되고 있는 항생제는 doxycycline과 같은 테트라사이클린계 항생제임. 이 항생제가 항균력을 나타내는 농도 이하에서 MMP를 억제하는 효능이 확인되어 치주질환의 치료제로서 개발되었으며, 세계적으로 치주질환 치료제로서 판매 중임.
- 치주질환치료를 위한 생약제제로는 옥수수불검화추출물, 후박추출물, 은행잎추출물, 대추추출물, 홍화씨추출물 등이 개발되었음. 이 중 옥수수불검화추출물은 인사들의 주성분으로 치조골 흡수, 치주인대 파괴에 대한 예방 및 재생효과, 치아 동요도 감소, 치주낭 깊이 등의 감소 등의 효과가 있는 것으로 광고하고 있으나, 항균력이 떨어지고 잇몸질환 치료 효능이 부족한 것으로 평가되어 논란이 되고 있음. 즉, 현재 개발된 생약제제들은 화학적 치료제 성분에 비해 안전하지만, 과학적 효능 검증에 대한 논란이 계속 되고 있음.
- 따라서 부작용 없이 안전하면서도 과학적으로 치주질환 치료 및 예방에 대한 메커니즘을 규명된 고부가가치 식품 소재의 개발이 과학 학술적 측면에서도 매우 필요함. 또한, 이러한 천연물에서 유래한 고부가가치 식품 소재의 효능을 검증하기 위한 바이오마커의 개발, 소재의 표준화 기술 개발, 성분 프로파일링 등이 향후 다양한 천연물 고부가가치 식품 소재 개발 분야의 과학적 학술적 발전에 기여할 수 있음.

3장. 연구개발 범위



그림 11. 1년차 연구개발 내용 및 범위 개요

1차 년도 (2016)	천연물 DB 구축	<p>다양한 국내외 생산 천연물 확보와 다양한 추출공정을 통한 추출물 DB 구축</p> <p>구축된 DB의 종별 특징과 추출방법별 물성 분석</p> <p>천연물 DB의 원물 정보 확립</p> <p>다양한 관련 지표 분석 제공</p>	<p>- 본 연구를 통해서 총 44종 이상의 국내외 생산 천연물을 다양한 추출방법을 적용하여 생산·확보하고 치주건강 개선 유효성 탐색</p> <p>- 본 연구과정에서 백리향, 루이보스, 영경귀, 뉴그린, 민들레, 알팔파, 캐롭, 밀싹, 곤달비 등의 천연물 분석</p>
	원물 및 추출물의 표준화 규격화	<p>선정된 곤달비, 밀싹, 영경귀 주정 추출물을 활용하여 다양한 배합비 효능 비교 분석을 통한 최적의 복합 방법 선정</p> <p>곤달비의 국내 자생종 분석을 통한 원물정보 확립 및 다양한 관련 지표 분석</p> <p>밀싹의 국내 자생종 분석을 통한 원물정보 확립 및 다양한 관련 지표 분석</p> <p>영경귀의 국내 자생종 분석을</p>	<p>- 천연물 곤달비의 국내 자생종 분석 및 원물 정보 확립과 지표 분석을 통해 추출부위와 학명 뿐만 아니라 생물학적 형태학적 분류 방법을 구체적으로 제시함</p> <p>- 실제 곤달비 원물을 생산하는 과정에서 구체적으로 관리하고 분석할 수 있는 후보지표를 5종 이상 제시함.</p> <p>- 본 연구과정에서 원물과 유사한 작물인 곰취, 동의나물과 비교 분석하여 엽저부위가 곰취와 비교했을 때 V자형으로 매우 뾰족하</p>

		<p>통한 원물 정보 확립 및 다양한 관련 지표 분석</p> <p>본 연구를 통해서 곤달비와 밀싹의 복합 주정추출물을 통해서 치주건강 개선 효능 강화 추출물 확보</p>	<p>며 줄기에 흠이 없어 등근형을 갖는 것을 확인함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 천연물 밀싹의 국내 자생종 분석 및 원물 정보 확립과 추출물의 지표 분석을 통해 추출부위와 학명 등의 분류방법을 구체적으로 제시함 - 밀싹 원물을 생산관리, 분석할 수 있는 후보지표를 5종이상 제시함.
유효 천연소재의 대량 생산 공정 확립	<p>다양한 방법을 통해서 천연물 곤달비 및 밀싹 추출물의 대량 생산 공정 확립</p> <p>곤달비 및 밀싹 원물의 생산 관리와 종별 생산 기준</p>		<ul style="list-style-type: none"> - 효능평가 및 산업화를 위하여 곤달비 및 밀싹 추출물의 대량생산 공정 확립. - 곤달비 및 밀싹 주정추출물의 지표물질 분석 프로토콜 확립
사전 연구	<p>치주건강 효능소개</p> <p>기준규격 추출 공정</p>		<ul style="list-style-type: none"> - 사전연구를 통해 확보된 곤달비의 저비용/고기능성 분획물 추출을 위한 추출법 최적화 - 최적의 추출법 개발을 기반으로 효능 강화 추출물 제조 및 평가 - 다양한 식품소재 대상 국내 최초 치주질환 완화 활성 검증을 위한 초고속탐색(HTS) 신시스템 활용 - 민간소재 활용도 제고를 위한 1차 DB 구축 (연차별 단계로 DB 구축)
인체적용시험	<p>인체적용시험 평가기준 확립</p> <p>인체적용시험 효능평가</p>		<ul style="list-style-type: none"> - 고부가가치식품소재의 치주건강 예방 및 개선 효능 평가를 위한 인체적용시험 바이오마커 구축 - 간이인체적용시험을 통한 천연식의약소재의 치주건강개선 효능 평가 (평가 대상군 및 인원수 기간 등 결정) - IRB 승인을 통한 개발 기능성 소재의 인체적용시험을 통한 치주건강개선 효능평가 - 선행 연구로 확보된 곤달비 추출물의 치주질환 예방 및 개선 인체적용시험 효능 평가
전임상 평가	<p>전임상 평가모델 구축, 효능평가</p>		<ul style="list-style-type: none"> - 치주질환 예방 및 개선용 소재 탐색을 위한 스크리닝 시스템 구축 (스크리닝 바이오마커 구축)

			<ul style="list-style-type: none"> - 치주질환 예방 및 개선 소재의 기능성 분석 및 효능 평가를 위한 단계별 바이오마커 발굴 (전임상, 임상) - 치주질환 및 구강관련 질환 동물 모델 구축 - 사전연구로 선정된 밀짚의 치주질환 예방 및 개선 전임상 효능 평가 - 주관 연구기관으로부터 도출된 유효 소재의 전임상 효능 분석
	천연물을 활용한 DB 구축	메탄올 또는 에탄올로 추출함.	<ul style="list-style-type: none"> - 약용식물을 활용한 추출물 DB 구축완료
	전임상 이틀째 건강 개선 효능 평가	생쥐 골수 대식세포에 RANKL과 함께 추출물을 처리하고 5일간 배양한 후, TRAP 염색을 실시함. 세포내 핵의 수가 3개 이상인 세포를 파골세포로 간주하고 생성된 파골세포의 수를 헤아림.	<ul style="list-style-type: none"> - 약용식물을 활용한 파골세포 형성 억제능을 확인하여 치주질환에 매우 중요한 이틀째들의 건강과 관련된 지표의 변화를 확인하였음.
	전임상 효능 평가	세포 독성은 MTT assay를 수행하여 확인함. 파골세포 형성 억제능은 TRAP 염색을 실시하여 확인함.	<ul style="list-style-type: none"> - 세포 독성결과를 통하여 우수 소재의 기능성을 확인하였으며 이를 통하여 이틀째 건강 개선 효능을 평가하였음
	전임상 효능 스크리닝 시스템 구축 및 평가	LPS 처리 RAW264.7 세포에 대한 독성은 MTT assay로 확인함. LPS와 추출물을 RAW264.7 대식세포에 처리한 후 TNF-alpha의 생성량을 ELISA kit를 이용하여 확인함.	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 약용식물을 활용하여 염증억제 효능평가와 염증인자 분비억제 결과를 보고함



그림 12. 2년차 개발 내용 및 범위 개요

2차 년도 (2017)	선정된 효능 물질의 기준규격 확립	<p>곤달비 및 밀싹의 성분 분석을 통한 기준규격 확립</p> <p>곤달비의 국내 자생종 분석을 통한 원물정보 확립 및 다양한 관련 지표 분석</p> <p>밀싹의 국내 자생종 분석을 통한 원물정보 확립 및 다양한 관련 지표 분석</p> <p>영정귀의 국내자생종 분석을 통한 원물 정보 확립 및 다양한 관련 지표 분석</p> <p>본 연구를 통해서 곤달비와 밀싹의 복합 주정추출물을 통해서 치주건강 개선 효능 강화 추출물 확보</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 천연물 곤달비의 국내 자생종 분석 및 원물 정보 확립과 지표 분석을 통해 추출부위와 학명 뿐만 아니라 생물학적 형태학적 분류 방법을 구체적으로 제시함 - 천연물 밀싹의 국내 자생종 분석 및 원물 정보 확립과 추출물의 지표 분석을 통해 추출부위와 학명 등의 분류방법을 구체적으로 제시함 - 실제 곤달비 원물을 생산하는 과정에서 구체적으로 관리하고 분석할 수 있는 지표를 확립함 - 밀싹 원물을 생산관리, 분석할 수 있는 후보지표를 5종이상 제시함. - HPLC 분석을 통해서 유효 천연물 소재인 곤달비와 밀싹의 여러 가지 성분을 분석하여 지표물질을 발굴
	인체적용시험	<p>인체적용시험 평가기준 확립</p> <p>인체적용시험 효능평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 10명 임상연구 진행 - “치은열구역에 존재하는 바이오파커를 이용한 치주질환의 진단: 문헌적 고찰”을 주제로 종설논문 작성하여 대한진단검사치의학회지에 투고함

			<ul style="list-style-type: none"> - 인체적용시험 바이오마커로서 피험자의 혈액, 침, 치은 열구액 채취를 시행함 - 피험자의 6개 치아를 대상치아로 설정하여 치은지수, 치주낭 탐침 깊이, 치은 출혈지수, 치은 퇴축양 등 임상효능지표를 수집함 - 유효성 평가 변수는 baseline 대비 종료시점 (투약 4주 후)의 혈액 내 평가 변수 (Creatine, ALT, AST, r-GT), 침내 평가 변수 (Osteocalcin, Alkaline phosphatase (ALP), MMP13 (collagenase-3)), 치은열구액 내 평가 변수(ICTP (pyridinoline cross-linked carboxylterminaltelopeptide of type1 collagene), CathepsinB, MMP8(collagenase8), Cystatins)를 측정하여 대조군인 텍스트린 경질 캡슐 복용군에 비하여 시험군의 차이를 평가함
전임상 효능 평가 및 작용기전 규명	전임상 평가 모델 구축		<ul style="list-style-type: none"> - 보유하고 있는 치주인대세포인 DPDL cells에 과산화수소를 농도별로 처리하여 치주인대세포에서 소재 처리 후 독성 평가를 위한 기준 확립 - 치주질환 예방 및 개선에 대한 동물실험을 수행하기 위한 치주염 동물 모델의 제작 및 확립
	추출된 천연물 소재의 효능 평가		<ul style="list-style-type: none"> - 보유하고 있는 치수 줄기세포인 SHED cells에 효능 강화 추출물인 곤달비와 밀싹 추출물을 투여 후 효능 평가를 위한 세포증식 변화 확인 - 보유하고 있는 치주인대세포인 DPDL cells에 과산화수소 300 uM 처리 후, 효능 강화 추출물인 곤달비와 밀싹 추출물을 처리하여 세포 보호 효능 평가를 위한 western blot analysis 수행 - 보유하고 있는 치수 줄기세포인

			<p>SHED cells에 효능 강화 추출물인 곤달비와 밀싹 추출물 처리 후 효능 평가를 위한 western blot analysis 수행</p> <ul style="list-style-type: none"> - 파골세포 억제능 조사 - 조골세포 활성화 조사 - 치주균 유래 LPS 처리시 염증 사이토카인 분비 억제능 조사 - Ligation시 쥐에서 치주염이 유발되는 것을 확인하고 microCT 분석함.
		전임상 효능 스크리닝 시스템 구축	- 치주질환 예방 및 개선 소재의 기능성 분석 및 효능 평가를 위한 관련 바이오마커 발굴
		작용기전규명	- 본 연구를 통해서 개발된 곤달비와 밀싹 추출복합물을 활용하여 치주조직에 존재하는 줄기세포를 활성화시켜 치주조직의 건강도를 증진시키고 전체적인 조직의 재생을 유도할 수 있는 효능 검증을 통해 작용기전을 제시함.



그림 13. 3년차 개발 내용 및 범위 개요

개발된 소재의 제품화 및 산업화	최종 선정된 우수소재를 적용한 다양한 제품개발 컨셉 확정을 통해 제품군 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 한국식품의약품안전처로부터 치주건강 개선 또는 구강건강 개선 소재로서 개별인정형 서류 준비 - 치주건강 개선 또는 구강건강 개
-------------------	--	--

3차 년도 (2018)		<p>선 소비자층 조사를 통한 제품군 도출 자료 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> - 소재의 특성을 반영할 수 있는 제품명 조사 및 상표 등록 (tees-10) - 인정받은 원소재를 활용하여 제품별 품목제조신고 - 치주건강 개선 또는 구강건강 개선 시제품화 수행-제품 디자인 - 연구 성과를 바탕으로 국내외 우수소재의 고부가가치식품개발 및 제품화 성과 도출 - 치주 질환 예방 및 개선 기능성 소재를 활용한 고령층 대상 제품군 생산 - 치주 건강 개선 기능성 소재를 활용한 중장년층 대상 제품군 생산 - 치주건강개선을 통한 구강건강 개선 소재를 활용한 전연령 대상 제품군 생산
	<p>개발 소재의 제품 적용을 위한 상품화 형태 연구 및 파일럿 공정 개발 및 대량 생산 공정 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 치주건강 개선 또는 구강건강 개선 소비자층 조사 및 선호도 자료 조사 - 치주건강 개선 및 구강건강 관련 제형제제 다각화 - 제형제제에 따른 소재의 흡수 작용 영향을 분석을 통해 최적의 상품화 형태 결정 - 경제와 시장상황을 고려한 가격 설정과 이를 기반으로 배합비 결정 - 다양한 상품화 후보군을 대상으로 소비자 선호도 조사 및 시장 반응 확인 - 최종 결정을 반영한 치주건강 개선 또는 구강건강 관련 상품결정 안정적인 생산을 위한 대량생산 예비기술이 각각 적용된 다양한 파일럿 공정 확립 - 온도, pH, 최적 추출시간, 유기용매, 유기산, 열수, 주정 추출에

			<p>따른 파일럿 생산결과 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 각 파일럿 공정별 기준규격 확인 및 간이 효능 평가 수행 - 대량생산을 위한 초기 추출전 천연원물의 확보 기준 확립과 대량수매 - 대량생산의 추출전 천연원료의 효능 유지를 위한 보관/관리 인프라와 기술 구축 - 최적의 수율이 확보되는 대량생산 공정의 확립
임상연구 최종 결과 보고	치주질환 예방 및 개선을 위한 기능성 소재의 생리영향 평가		<ul style="list-style-type: none"> - 선정소재를 활용하여 제품의 안전적 인체영향평가를 위하여 체중 변화 및 배변활동 영향 평가 - 제품 섭취에 의한 체온 및 대사율 영향 평가 수행 - 개발 소재의 효능 관련 혈행, 혈압, 맥박 등 안전적 지표 확인 - 설문을 통한 인체 생리적 증상 영향 평가 수행을 통한 전체적으로 안전적 작용 확인
		선정소재를 기반으로 생산한 본 제품군 3종 이상의 인체적용시험을 통한 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 고령층을 대상으로 한 치주질환 예방 제품의 간이 인체적용시험을 통한 효능 확인 - 중장년층을 대상으로 한 치주건강 개선 제품의 간이 인체적용시험을 통한 효능 확인 - 전연령층을 대상으로 한 구강건강 개선 제품의 간이 인체적용시험을 통한 효능 확인 - 연령별로 차별화된 간이인체적용시험 항목 구성을 통해서 제품의 특성화된 기능성을 반영할 수 있는 연구 결과 제시 - 연령별로 연구기간의 차별화를 통해서 고령층은 장기효능 분석, 중장년층은 중기적 효능분석, 전연령층은 단기적 효능분석을 통해서 섭취 기간 및 농도의 제품별 차별화된 기능성 최적화 효능 분석
	선정 소재 기반 개발 제품의	<ul style="list-style-type: none"> - 다각화된 제품 구성을 확인하기 	

		<p>인체적용시험 효능 검증 및 기전 분석을 통해 제품 개선 연구</p>	<p>위하여 구강청결제, 치약, 가글액, 껌 등 다양화된 상품을 대상으로 간이 인체적용시험 수행</p> <ul style="list-style-type: none"> - 치주질환 예방 및 개선 기능성 소재를 활용한 제품의 치주인대 및 치주조직의 건강개선확인 - 치면세균막지수, 구강내 다형연쇄상 구균수, 치면세균막 pH, 탈회재결정화 촉진지수 확인 - 혈중 칼슘, 인, 구강내 타액에서 침 젖당과산화효소 (salivary Lactoperoxide) 활성 확인 - 구강 내 우식원 세균활성도 및 우식경험도 측정을 통한 효능 평가 - 인체적용시험 중에 무작위 선별 실험군을 대상으로 CT 측정 - 치주조직 및 치주인대 건강 개선 작용기전 분석을 통한 제품의 신뢰도 확보 - 소비자의 연령별 효능 분석을 통해 작용 최적화를 위한 개선안 도출
	<p>전임상 연구결과의 최종 작용기전 및 효능 검증</p>	<p>선정 소재 기반 개발 제품의 전임상 효능 검증 및 기전 분석을 통해 제품 개선 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 인체프라그의 발효성 억제 및 불용성 글루칸 합성 관련성에 대한 작용기전 연구 - 치면세균막 형성 억제 작용기전 및 다형연쇄상 구균 증식 억제 효능 분석을 통한 제품 개선 - 치주인대세포 및 치주섬유아세포의 증식 활성 효능 평가를 통한 과학적 효능 개선안 도출 - 치주인대세포 및 치주섬유아세포의 성체줄기세포 건강도 유지 및 증식 활성 유도 기전 연구 연구를 바탕으로 제품의 효능 개선을 위한 방안 도출 - 다각화된 제품 형태별 효능 분석 및 관련 기전 분석을 통해 최적의 제품 업그레이드 연구
		<p>치주건강 개선 효능 소재 관련 논문 발표 및 국제 우수</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 치주질환 예방 및 개선 효능 소재의 치주인대세포 및 치주섬유

		<p style="text-align: center;">성과 발표</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 아세포의 증식 효능 논문 게재 - 기능성 소재의 구강 박테리아 생성 억제 및 공격 기전 결과의 논문 게재 및 국제 우수성과 발표 - 치주 이대 및 인접 조직 손상의 회복 기전 결과의 논문 및 국제 학술대회 발표 - 치조골의 골소실 억제의 특이적 작용기전 및 효능 규명을 기반으로 성과 보고 및 발표 - 치주 질환의 예방 및 개선 관련 자료 정리를 통해 과학적 우수성과 보고
		<p style="text-align: center;">선정 소재의 치주질환 예방 및 개선 관련 약리적 효능 자료 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 치주질환 및 구강질환의 직접적인 원인인 플라크와 치석 생성의 억제 또는 분해 유도의 약리학적 효능 자료 구축 - 치주조직의 보호 및 건강도 개선 작용에 대한 약리학적 효능 자료 구축 - 치조골의 보호 및 치아 신경 보호를 통한 치주염 억제의 약리학적 작용기전 규명 - 치조골 형성 촉진 작용 및 치주인대 재생작용, 구강상피세포 활성화 작용 등의 약리학적 구강건강 개선 다중작용 자료 구축 - 치은 건강에 작용하는 잇몸의 출혈과 염증 억제의 약리학적 효능 규명

2. 연구수행 내용 및 결과

1장. 연구개발의 추진전략 및 방법

1절. 연구개발의 추진전략

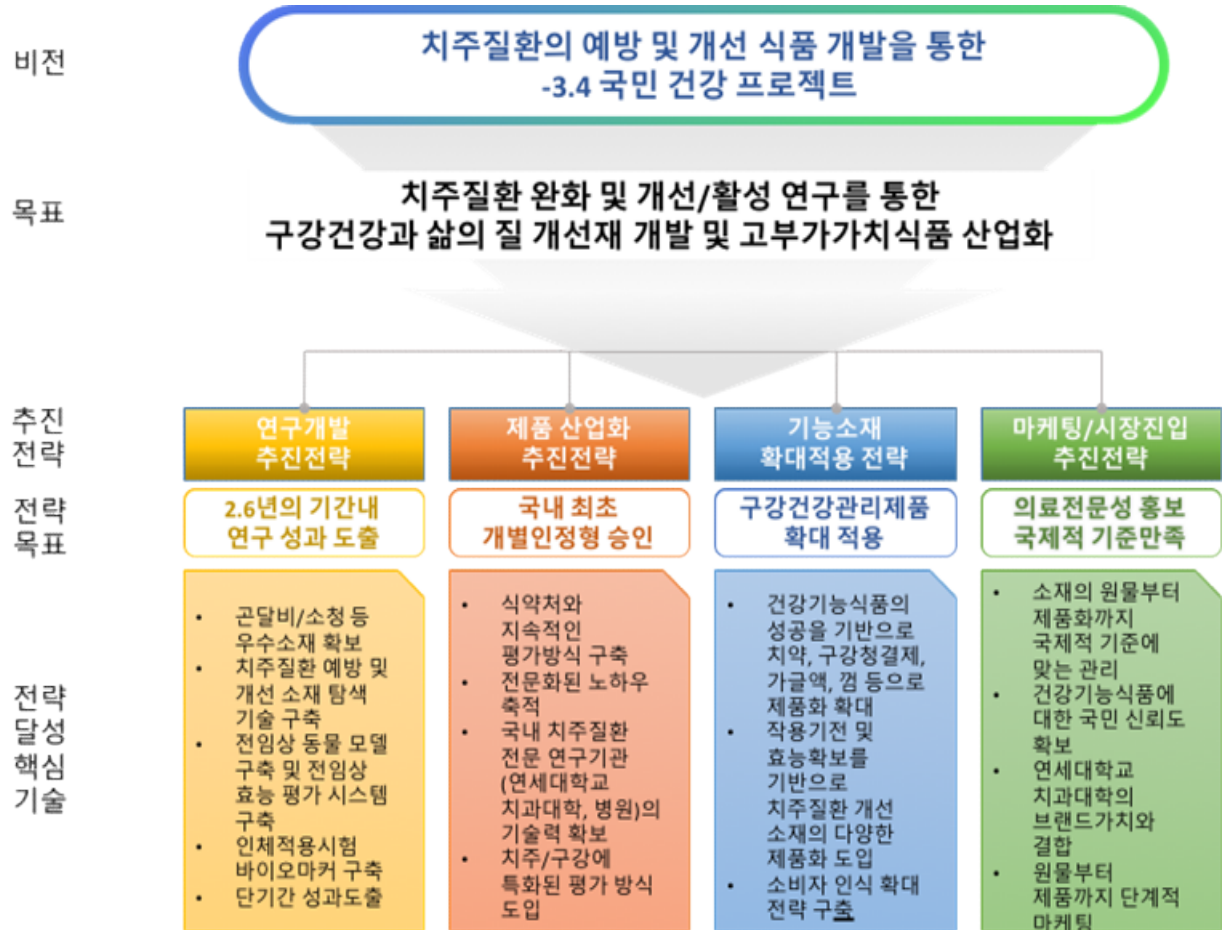


그림 14. 치주질환 예방 및 개선 소재의 연구개발 및 산업화 추진 전략도

1. 치주질환 예방 및 개선 소재 개발을 위한 연구개발 추진전략

가. 국내 최고 기술수준을 통한 치주질환 예방 및 개선 천연 소재 탐색 기술 구축

- 치주질환 예방 및 개선 소재는 국내에서는 아직까지 연구 개발 경험이 거의 전무하므로 사전연구를 통해서 오랜 기간 연구개발 및 스크리닝 시스템을 갖고 있는 연구기관이 참여하는 것이 과제의 성공적인 결과 도출을 위하여 필수 요건임. 따라서 본 과제에 참여하고 있는 주관기관과 제1 협동연구기관, 제 2협동연구기관은 약 3년 동안 치주질환 예방 및 개선 소재 개발을 위하여 다양한 연구를 수행했으며 이를 통해서 두건의 천연 소재에 대한 연구 성과를 도출하고 특허 출원 등의 연구 성과들을 확보하고 있음.
- 치주건강 및 구강건강을 개선시킬 수 있는 다수의 기술력을 가지고 있는 팀이 적극 참여하여 주관기관 (주)파미티에서는 우수 기술력과 전문가, 연구개발방법을 모두 안정적으로 확보함으로써 우수 효능 소재를 개발할 수 있을 것으로 예상됨.

- 치주질환 예방 및 개선을 위한 소재개발은 해당 분야에 특화된 전문연구기관인 연세대학교 치과대학 연구진들이 대거 참여하여 다양한 천연소재들을 스크리닝하고 효능을 평가할 수 있는 바이오마커 구축 기술을 개발함.

나. 국내 최초 개별인정형 치주질환 예방 및 개선 기능성 소재의 개발과 인체효능 평가 바이오마커 구축

- 식품 이외의 분야와 융합적 연구를 수행할 수 있는 연세대학교 치과대학과 치과병원의 치주질환 전문가들이 대거 참여하여 임상의학적으로 효능이 입증된 우수 소재들을 연구 개발하고자 함.
- 치주질환 예방 및 개선을 위한 건강기능소재의 개별인정 과정에서 식약처와 지속적인 회의와 인식공유를 통해서 공인 바이오마커를 개발 구축하고 국내 연구개발 기술의 수준을 향상시킬 수 있을 것으로 예상됨. 이를 통해서 국내 치주건강 개선 효능을 평가하고 개별인정형을 승인해 줄 수 있는 기준을 제시함으로써 국민의 건강을 책임지는 식품의약품안전처의 신뢰도를 확보하고 동시에 국민의 안전한 먹거리와 건강 모두를 개선시킬 수 있는 역할을 할 것으로 기대됨.

다. 사전 연구를 기반으로 2.6년의 연구개발 기간 안에 산업화 성과 도출 전략

- 현실적으로, 2년 6개월간의 과제 수행을 통해서 소재를 탐색하고 우수소재를 선정하여 산업화까지 진행하는 것은 연구비의 수준과 기간으로 봐서 불가능한 미션임. 하지만 본 연구진은 이런 한계에도 불구하고 연구 성과 달성 기간의 단축을 위하여 본 연구팀은 3년간의 사전 연구를 통하여 우수 기능성 소재 2건을 확보하고 있으므로 가장 오랜 시간이 걸리는 스크리닝 단계를 최소로 단축하고 연구 성과 달성 가능성을 최고로 높일 수 있을 것임.
- 우수 효능 소재의 선별 기간을 최소로 줄이고 소재의 전임상 효능 평가와 임상 효능평가 단계를 전체적 연구과정에서 앞당겨 도입함으로써 가장 오랜 시간이 필요한 효능 평가 기간을 최대한 확보하고 2년차 말에 개별인정신청을 완료하는 것을 목표로 연구를 진행함으로써 최종단계에서 치주건강 개선 우수제품의 산업화가 가능할 것이라고 예상됨.

2. 개발된 치주건강 및 구강건강 개선 제품의 산업화 추진 전략

- 식품 이외의 분야와 융합적 연구를 수행할 수 있는 연세대학교 치과대학과 치과병원의 치주질환 연구 전문가들이 대거 참여하여 고부가가치식품 산업화를 수행함.
- 치주질환 예방 개선 소재 개발과 제품화 관련 상용화 경험과 기반 노하우를 다수 확보한 건강기능식품 연구 및 산업화 전문 산업체 (주)파미니티를 주관회사로 제품화 성공 가능성을 극대화 함.
- (주)파미니티는 국내최초 기억력 개선 소재와 남성갱년기 소재를 과제를 통해서 개발하여 개별인정까지 받은 국내 최초를 빈번하게 달성한 건강기능식품 시장의 기술 선도 기업임. 실제 (주)파미니티는 지속적인 시장 확대를 주도하면서 건강기능식품에 대한 신뢰도와 건강기능성을 확대함으로써 다수의 천연물을 고부가가치식품

으로 개발한 경험을 가지고 있는 국내 거의 유일의 기업임.

- 연구개발을 산업화까지 진행함에 있어서 (주)파미니티는 연세대학교의 연구 노하우와 브랜드 가치를 결합시킴으로서 산업화의 신뢰도 구축과 소비자들의 인식 확대를 통해서 국내 개발 소재를 기반으로 새로운 건강기능식품 시장을 개척하고 확대하고자 함.
- 치주 건강 및 구강 건강 개선은 연령별로 증상과 효과가 다른 방식으로 나타나기 때문에 연령별 맞춤 제품화 전략을 통해서 전연령을 대상으로 구강건강을 위주로 한 제품의 생산과 중장년층을 대상으로 구강건강 및 치주질환 예방 제품, 고령층을 대상으로 한 장기간 복용과 다량의 영양소와 조합하여 치주질환 및 치조골 건강 개선용 제품을 제작하여 증상과 연령이 연계된 상품으로 시장에 진입.
- 치주 건강 및 구강 건강 기능성 소재들을 건강기능식품으로 고부가가치화하여 시장으로 진입함으로써 기존의 건강기능식품 시장의 새로운 활력을 불러일으킬 것으로 예상됨.
- 특히 일반의약품으로 판매되고 있는 제품들은 구성물질의 특징상 비타민D의 전구체와 항염증, 항산화제의 수준으로서 보조 영양제로 판매해야 한다는 전문가들의 주장이 확대되고 있는 상황에서 치주질환 예방 및 개선 효능을 갖춘 새로운 건강기능식품 개발 기존의 제품과 차별화 할 수 있도록 임상 효능평가 대상수를 늘리고 효능 물질에 대한 과학적 작용기전 보고 및 신뢰도 구축화 전략을 통해 치주질환에 특화된 제품으로 시장에서 폭발적 수요 증가를 창출할 수 있을 것으로 예상됨.

3. 치주건강 개선을 위한 천연물 유래 기능소재의 상품화 확대

- 구강 건강 및 치주건강 개선 소재들은 건강기능식품 뿐만 아니라 다양한 구강관리 제품으로 확대 적용할 수 있는 특징을 가지고 있으므로 제품군을 치약, 구강청결제, 가글액, 껌 등으로 확대 하여 소재를 제품화함으로써 매출 증진 효과를 가져올 수 있음
- 제품군의 확대로 인해서 수입소재에 의존적이던 다양한 구강관련 제품의 국내화를 가져올 수 있을 것으로 예상되며, 효능 물질을 탐색함으로써 장기적으로 기존에 판매되고 있는 일반의약품 시장으로 확대할 수 있도록 연구와 승인절차를 수행할 예정임.

4. 치주건강 및 구강건강 개선 제품의 국내외 마케팅/시장진입 전략

- 본 과제를 통해서 개발된 천연 소재의 단계적 홍보 전략 수립으로 원물 단계부터 추출물의 제품까지 치주건강 개선 소재로서 인식시킬 수 있는 단계적 시장진입 전략 수립
- 주요 일간지 및 방송매체를 대상으로 단계적 홍보 전략 수립 (2년차부터 3년차까지 원물 홍보부터 제품까지 단계별 홍보를 지속적으로 진행함)
- 홍보과정에서 상품 및 제품화 기업의 인지도 상승효과를 유발하면서 포지셔닝 전략으로서 소비자의 선호 제품 개발에 집중하고 이를 지속적으로 확인하기 위하여

- 자체 제품 선호도 조사와 인식도 조사 등을 통해서 업그레이드 제품화에 집중함
- 국제화를 위하여 미국, 일본, 중국, 유럽 등의 시장을 목표로 각 나라별 특허 진입과 기능성승인절차를 수행하고 국제화기준에 적합한 기준규격과 안전성 평가, 기능성 평가를 수행함
 - 전세계 치주건강 및 구강 건강 제품들은 사전 조사된 것과 같이 대부분 비타민D 전구체를 소재로 사용한 것으로서 수요는 매우 많지만 그에 합당한 유효 소재가 없음. 따라서 본 과제를 통해서 새로운 소재와 효능 물질을 규명하고 이를 국제적으로 승인받음으로서 전 세계 시장을 선도하고 세계 건강기능식품 시장에서 대한민국의 산업적 지휘를 향상시킬 수 있음
 - 국제화를 위하여 각 나라별 치주건강 및 구강건강 관련 시장을 조사하고 소비자들의 요구와 선호도를 체계적으로 조사하여 맞춤형 제품을 개발하고 산업화할 수 있도록 함

2절. 연구개발의 창의성 및 혁신성 확보 전략

1. 기존의 기능소재들과의 기술적 차별성 확보 전략

표 4. 기존 판매중 소재조사를 기반으로 본 연구개발 창의성 및 혁신성 확보 비교 분석

	이가탄	인사돌	이모튼	개발 예상 제품
주요성분	1. 엽화리소자임 100mg: 소염효소재, 염증억제 작용 2. 카르바조크롬 2mg: 지혈작용, 잇몸출혈방지 3. 초산토코페롤(비타민 E)50% 10mg: 항산화제 4. 제피아스코르프산(비타민C) 156mg: 항산화제	1. 옥수수불검화 정량추출물 35mg (베타시스테롤 7mg, 스쿠알렌/카로틴/토코페롤 등 28mg): 옥수수에 함유되어 있는 베타시스테롤이란 성분이 약리작용하는 주성분. 콜레스테롤과 구조가 유사하여 혈액내 콜레스테롤 감소 효능 그 외에 항산화, 항염증, 면역증진 효과 예상	1. 아보카도-소야 불검화 추출물 300mg: 연골기질성분인 콜라겐 및 프로테오글리칸 합성을 촉진하여 연골보호 및 인터루킨 1 억제제를 통해 연골파괴 방지, 손상된 잇몸의 콜라겐 합성 촉진 효능 예상	1. 국내의 기반 특허를 보유한 천연물 소재: 단순히 비타민이나 콜레스테롤 억제 효능을 보이는 관절 건강 개선 소재가 아니라 우수한 기능성을 갖 소재를 제공, 국내의 최초 치주질환 예방 및 개선 원천기술 특허가 확보된 소재를 제시
작용증상	치음염, 치조농루에 의한 여러증상 (잇몸의 발적, 붓기, 출혈, 고름, 통증 등)의 완화	치주질환 (치아지조직질환, 치은염, 치주증-유년형치주염)	골관절염, 치주증(치조농)에 의한 출혈, 통증 보조요법	치주질환 및 구강건강 개선 (치주인대손상, 치주조직 재건, 치은염, 치주증, 치주지조직질환, 출혈, 통증 등 완화) 구강박테리아 증식억제 및 플라크, 치석제거 효능
복용법	1일 3회 1캡슐	1일 3회 2정씩 식전	1일 1회 1캡슐	1일 1회 1캡슐
가격	100캡슐 30,000원 (33일분)	100정 35,000원 (17일분)	30캡슐 25,000원 (30일분)	30캡슐 25,000원 (30일분)
기존소재들의 한계	잇몸질환의 가장 중요한 원인인 구강박테리아와 플라크, 치석 제거를 병행하지 않으면 잇몸영양제 복용의 효과가 없을 가능성이 큼.	서울대임상실험(30명/3개월), 연세대임상실험(87명/16주), 경희대임상실험(30명/60일)의 결과가 있으나 임상실험의 규모가 매우 작고 효과가 미비하여 인사돌의 효능에 의문을 갖는 전문가, 소비자 많은 현실.	잇몸질환의 가장 중요한 원인인 구강박테리아와 플라크, 치석을 제거하지 않는 이상 잇몸영양제 복용의 효과가 없을 가능성이 큼. 실제 성분상 치과보다는 내과에서 관절질환에 처방되고 있는 보조요법제로서	기존의 소재들의 한계를 모두 극복할 수 있는 제품 1. 다수의 인체적용시험을 통한 효능 신뢰도 확보 2. 구강박테리아와 플라크 제거 효능 입증 3. 치주염, 항산화 효과를 넘어서서 실제 치주조직 재

		실제 인사들을 구성하고 있는 성분은 비타민D의 전구체로서 영양제일 뿐 기능성을 특정할 수 없음. 3개월 이상 장기복용 해야 함	구강건강에 특이적인 소재는 아님. 성분은 인사들의 베타시스테놀(비타민D 전구체)임.	권 및 치주인대세포와 치주섬유아세포의 증식 활성 보고 4. 치주건강 개선을 위한 구체적 작용기전 제시 5. 관절질환과 구분되는 치아건강 개선에 특이적인 효능 입증
--	--	---	--	---

- 치주건강 및 구강건강 개선 제품으로 기존에 판매하고 있는 이가탄의 경우, 명인제약을 통해서 1991년 발매한 제품으로서 이제품의 특징은 기능성을 갖는 새로운 소재를 사용한 제품이라기보다는 화학성분 복합처방제제로서 비타민E와 비타민C 그리고 염증 및 출혈 억제제제로 구성된 제품임. 따라서 치주질환의 근본적인 원인인 구강박테리아 독성과 플라크, 치석의 제거가 선제되지 않은 상태에서 이가탄을 섭취함으로써 치주건강 개선의 효능을 기대할 수 없음. 그러므로 잇몸에서 피가나고 염증으로 부어 있을 때 치과 치료를 받으면서 이를 보조적으로 도와 줄 수 있는 제품으로서 기술적 한계를 가지고 있음.
- 동국제약에서 잇몸치료제에 대한 적극적인 홍보를 통해서 이름을 알린 대표적인 구강건강 제품인 인사들의 경우, 1978년 프랑스 라로슈 나바론사에서 수입되었다가 1987년 국산 자체생산에 성공하여 현재까지 적극적 마케팅을 통해 판매하고 있음. 인사들의 경우 옥수수불검화 추출물로서 옥수수를 비누화 반응 시킨 후 남은 불검화물을 정량적으로 추출한 것임. 이는 지질 성분으로 물에 녹지 않고 강한 알칼리와 작용해 가용성 비누를 만들지 않는 순종의 화합물을 불검화물(unsaponifiable matter)이라고 하는데 탄화수소, 지용성 색소, 지용성 비타민 등이 대표적으로 불검화물에 포함됨. 특히 인사들의 주성분인 옥수수불검화정량추출물 35mg에 포함물은 식물스테롤인 베타시토스테롤 7mg이며 나머지는 28mg은 스쿠알렌, 카로틴, 토코페롤 등의 불검화물로 구성되어 있음. 인사들의 효능 효과에 직접적으로 작용하는 것으로 홍보하는 베타-시토스테롤은 가장 널리 분포되어 있는 식물스테롤로서 비타민 D의 전구체인 프로비타민D의 전구체임. 즉, 베타-시토스테롤은 대한민국 식품의약품안전처에서는 단순 건강기능식품 원료로 지정하고 있을 뿐, 기능성을 갖는 소재로 등재되어 있지 않다는 것. 따라서 인사들은 단순 비타민 D의 효과일 가능성이 크다는 것임. 이미 인사들은 단순 영양제라는 많은 주장으로 인해서 식약처에 민원이 접수된 상태임.
- 이모튼 또한 보험이 인정되는 약물로서 판매되고 있는 제품이지만 이는 대부분 관절염환자에 도움을 주는 것으로 알려져 있을 뿐 잇몸질환의 개선에 도움이 자세히 보고된 바 없는 한계를 가지고 있으며 인사들과 생리활성물질이 같은 베타-시토스테롤 (beta-sitosterol)로서 인사들과 동일한 기술상 제품의 문제점이 제시되고 있음.
- 따라서 본 소재는 위와 같이 시장에서 잇몸건강, 구강건강, 치주질환 개선 일반의약품으로 판매되고 있는 제품들의 한계를 극복하고 새로운 치주질환에 특성화된 개선 제품으로 개발하기 위하여 다음과 같은 특징들을 갖는 천연 추출물을 탐색 또는 사전연구를 통해서 우수 기능성 소재 (곤달비, 작상 등) 를 확보해 놓은 상태임.

- ▷ 다수의 인체적용시험을 통한 효능 신뢰도 확보
- ▷ 구강박테리아와 클라크 제거 효능 입증
- ▷ 치주염, 항산화 효과를 넘어서서 실제 치주조직 재건 및 치주인대세포와 치주섬유아세포의 증식 활성 보고
- ▷ 치주건강 개선을 위한 구체적 작용기전 제시
- ▷ 관절질환과 구분되는 치아건강 개선에 특이적인 효능 입증

2. 고기능성 고효율 추출법을 확보한 국내 소재를 기반으로 한 원가 경쟁력 확보

- 기존의 제품들은 대부분 물에는 녹지 않으면서 비누화가 되지 않는 불검화물 (unspionifiable matter)를 추출하기 위한 방법 사용함에 따라서 원물의 추출과정에서 추출 원가 경쟁력이 저하되는 특징을 가지고 있었음. 본 과제를 통해서 추출하고자 하는 공정은 기존의 불검화 추출이 아니라 원가를 많이 낮추면서도 기능성 물질들을 대량 생산할 수 있는 열수, 주정 또는 초임계추출법 등을 활용하여 원가 경쟁력을 확보 할 수 있을 것으로 생각됨.
- 기존에 판매되고 있는 제품들인 인사돌과 이모튼에 사용되고 있는 소재는 옥수수 와 아보타도-소야로서 100% 해외 생산 천연물임. 더욱이 옥수수의 경우 GMO 식물이 일부 사용될 수 있어 시장의 소비자 요구에 부합하지 않음. 따라서 본 연구를 통해서 국내에서 안전하게 생산된 천연물을 기반으로 한 소재를 개발하여 해외 소재를 대체하고 가격 경쟁력을 확보한 제품을 생산할 수 있을 것으로 생각됨.
- 사전연구를 통해 우수 기능성 소재로 선정된 곤달비와 소청의 경우는 건물기준 kg 당 10,000원 이하의 가격경쟁력을 확보하고 있으며 본 과정에서 구입한 금액은 100% 농가의 수익으로 연결되어 국가 경제발전 기여.

3. 국내 최초의 구강건강 및 치주질환 예방과 개선에 도움을 줄 수 있는 식의약소재 개발 창의성

- 치주질환 예방과 개선에 도움을 줄 수 있는 소재를 활용하여 고부가가치식품을 개발하고 산업화를 최초로 진행함으로써 건강기능식품의 새로운 시장을 개척하고 이를 바탕으로 글로벌 시장에서 국가 경쟁력을 확보
- 국내 최초 치주질환 예방과 개선을 통한 제품 개발 사례를 제공하고 창의적 바이오마커와 스크리닝 기술의 구축함으로써 과학적 성과와 산업화 성과를 동시에 달성하고 새로운 고부가가치식품개발의 선도적 사례로 국내외 시장을 창의적 기술력으로 선도할 수 있을 것으로 예상됨

4. 치주건강 개선을 위한 고부가가치식품 개발 기술의 도입을 통해 기술 혁신성 제고

- 본 과제를 통해서 치주질환 개선 식품소재의 활용도를 위한 100건 이상의 유효 성분과 기능 소재 DB를 구축관리하고 온라인을 통해서 제공함으로써 다양한 고부가가치 식품 개발 기술 확대를 가져올 수 있음
- 치주건강 개선 소재의 경우 건강기능식품 뿐만 아니라, 구강건강 관리를 위한 소비

재의 주요소재로서 활용될 수 있는 장점을 가지므로 국내 소재를 다양하게 활용하여 치약, 구강청결제, 가글액, 미백제, 구강치료 보조제 등으로 확대 적용할 수 있으며 이를 통해서 구강건강 관리의 기술 혁신성을 재고하고 국내 산업의 확대발전을 가져올 수 있을 것으로 예상됨.

3절. 연구개발의 추진체계



그림 15. 연구개발 및 산업화 협력 추진 체계도

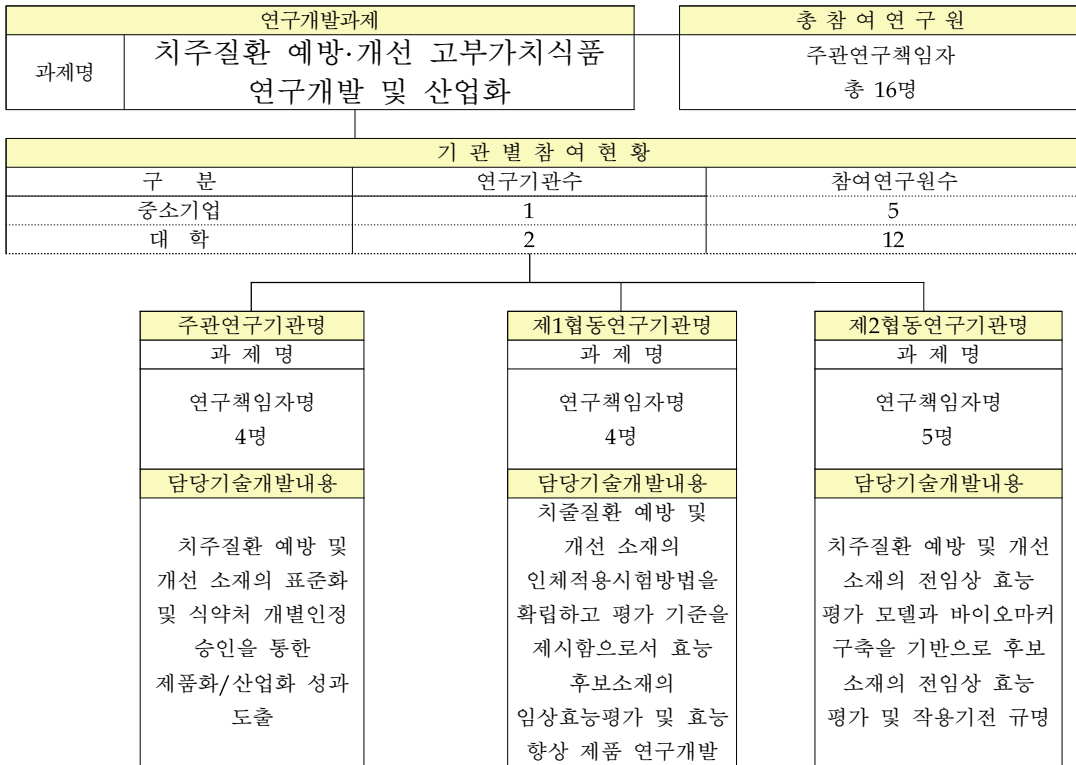


표 5. 연구개발 기관의 구성 및 추진 체계

2장. 연구개발 추진 일정

1절. 1차년도 연구개발의 추진 일정

1차년도									
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정						연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6		
1	사전연구를 통해 확보된 곤달비 및 소청의 저비용/고기능성 분획물 추출을 위한 추출법 최적화							20,000	(주)파미너티
2	최적의 추출법 개발을 기반으로 효능 강화 추출물 제조 및 평가							20,000	(주)파미너티
3	다양한 식품소재 대상 치주질환 완화 활성 검증을 위한 초고속탐색(HTS)시스템 활용							30,000	(주)파미너티
4	민간소재 활용도 제고를 위한 1차 DB 구축							10,000	(주)파미너티
5	가능성이 확인된 천연소재를 기반으로 재형식이 확보된 기기분석법 적용을 통한 밸리데이션							30,000	(주)파미너티
6	가능성 확인과 밸리데이션이 종료된 천연소재의 성분 프로파일링							20,000	(주)파미너티
7	고부가가치식품소재의 치주건강 예방 및 개선효능 평가를 위한 인체적용시험 바이오마커 구축							20,000	연세대학교 치과대학병원
8	간이인체적용시험을 통한 천연식의약소재의 치주건강개선 효능 평가 (평가 대상군 및 인원수 기간 등 결정)							20,000	연세대학교 치과대학병원
9	IRB 승인을 통한 개발 가능성 소재의 인체적용시험을 통한 치주건강개선 효능평가							10,000	연세대학교 치과대학병원
10	선행 연구로 확보된 곤달비 추출물의 치주질환 예방 및 개선 인체적용시험 효능 평가							10,000	연세대학교 치과대학병원
11	치주질환 예방 및 개선용 소재 탐색을 위한 스크리닝 시스템 구축 (스크리닝 바이오마커 구축)							500	연세대학교치과대학
12	치주질환 예방 및 개선 소재의 기능성 분석 및 효능 평가를 위한 단계별 바이오마커 발굴 (전임상, 임상)							500	연세대학교치과대학
13	치주질환 및 구강건강 관련							10,000	연세대학교치과대학

	질환동물 모델 구축																		
14	사전연구로 선정된 소청의 치주질환 예방 및 개선 전임상효능 평가																	10,000	연세대학교치과대학
15	주간 연구기관으로부터 도출된 유효 소재의 전임상 효능 분석																	20,000	연세대학교치과대학

2절. 2차년도 연구개발의 추진 일정

2차년도																			
일련번호	연구내용	추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						
1	표준화 방법을 이용한 화학적 동등성 평가기술 구축																	50,000	(주)파미니티
2	가능성 분획물 추출을 위한 추출법 최적화를 통해 유효성분 강화 추출물 제조																	44,000	(주)파미니티
3	선정된 소재의 신표준화/품질관리기술 구축을 위한 표준화 알고리즘 구축																	50,000	(주)파미니티
4	제품화를 위한 선정 소재의 기준규격 표준화 확립																	55,000	(주)파미니티
5	식품의약품안전처 개별인정형 신청을 위한 보고서 작성																	6,000	(주)파미니티
6	선정 소재의 식품의약품안전처 개별인정형 신청																	5,000	(주)파미니티
7	민간소재 활용도 제고를 위한 2차 DB 구축 - (연차별 단계로 DB 구축)																	10,000	(주)파미니티
8	1년차 연구과정에 이어 확보된 치주질환 및 구강건강 개선 소재 (밀싹, 곤달비 등 복합물 포함)의 인체적용시험을 통한 효능평가 지속, 신뢰도 높은 결과 확보																	30,000	연세대학교치과대학병원
9	치주건강 개선 관련 유효성이 확보된 소재의 부작용 분석을 위한 장기 복용 효능 검증																	30,000	연세대학교치과대학병원
10	인체적용시험을 통한 작용기전 및 국제화에 적합한 추가 인체적용시험 수행																	50,000	연세대학교치과대학병원
11	1차 연구과정에 이어 확보된 치주질환 및 구강건강 개선 소재의 전임상 효능 평가지속,																	20,000	연세대학교치과대학

	신뢰도 높은 결과 확보														
12	1년차 연구과정까지 가능성이 확보된 소재 (밀싹, 곤달비 등 복합물 포함) 작용 기전 연구													30,000	연세대학교 치과대학
13	표준화에 따른 천연물소재 프로파일링 결과를 바탕으로 유효성분 탐색													10,000	연세대학교 치과대학
14	표준화 알고리즘에 의해 관리된 소재의 치주질환 예방 및 개선 활성 확인													10,000	연세대학교 치과대학

3절. 3차년도 연구개발의 추진 일정

3차년도															
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	곤달비 및 밀싹 추출복합물의 장단기, 유전 독성평가													50,000	(주)파미니 티
2	곤달비 및 밀싹 추출복합물을 활용한 치주건강개선에 도움을 줄수 있는 소재 개별인정신청													44,000	(주)파미니 티
3	선정된 우수 소재를 적용한 다양한 제품개발 컨셉 설정을 통해 3가지 이상 제품군 도출													50,000	(주)파미니 티
4	개발 소재의 제품 적용을 위한 배합비 및 상품화 형태 연구													55,000	(주)파미니 티
5	파일럿 공정 개발 및 대량생산 공정 확립													10,000	(주)파미니 티
6	치주건강 개선에 도움을 줄 수 있는 기능소재를 활용한 본 제품 산업화													10,000	(주)파미니 티
7	미국 OTC 신청 등을 통해 소재 및 관련 제품의 국제 산업화													10,000	(주)파미니 티
8	치주건강 개선 효능 소재 관련 특허/홍보/논문 발표													10,000	(주)파미니 티
9	인체적용시험을 통한 효능 평가													30,000	연세대학교 치과대학 학병 원

10	치주질환 예방 및 개선을 위한 기능성 소재의 생리영향 평가														10,000	연세대학교 치과대학 병원
11	선정 소재 기반 개발 제품의 인체적용시험 효능 검증 및 기전 분석을 통해 제품 개선 연구														10,000	연세대학교 치과대학 병원
12	선정 소재 기반 개발 제품의 전임상 효능 검증 및 기전 분석														10,000	연세대학교 치과대학
13	선정 소재의 치주질환 예방 및 개선 관련 약리적 효능 자료 구축														15,000	연세대학교 치과대학
14	치주건강 개선 효능 소재 관련 논문 발표														1,000	연세대학교 치과대학
15	우수 성과 발표														1,500	연세대학교 치과대학

3장. 연구개발성과

1절. 특허성과

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	치주조직 재생 촉진용 조성물	대한민국	(주)파미 니티	2016.12 .30	102016018 3603	(주)파미 니티	2017.07 .05	101756740 0000	100
2	치주질환예방 및 개선용 조성물	대한민국	(주)파미 니티	2016.4. 28	102016005 2504	(주)파미 니티	2017.05 .26	101742482 0000	100
3	골질환의 예방 또는 치료용 식물 추출물 조성물	대한민국	연세대 학교 산학협 력단	2017.10 .30	102017014 2651				100
4	치주조직 재생 촉진용 조성물	대한민국	(주)파미 니티	2017.11 .22	PCT/KR20 17/013257				100
5	치주조직 재생 촉진, 치주질환 예방 및 개선용 조성물	대한민국	(주)파미 니티	2017.12 .28	PCT/KR20 17/015599				100
6	COMPOSITION FOR PROMOTING PERIODONTAL REGENERATION	미국	(주)파미 니티	2018.02 .16	PCT/KR20 17/013257				100
7	COMPOSITION FOR PROMOTING PERIODONTAL REGENERATION	중국	(주)파미 니티	2018.02 .27	PCT/KR20 17/013257				100
8	歯周組織の再生促 進用組成物	일본	(주)파미 니티	2018.02 .28	PCT/KR20 17/013257				100
9	COMPOSITION FOR PROMOTING PERIODONTAL REGENERATION	유럽연합	(주)파미 니티	2018.02 .28	PCT/KR20 17/013257				100
10	골질환의 예방 또는 치료용 식물 추출물 조성물	대한민국	연세대 학교 산학협 력단	2018.10 .24	102018012 7115				100

2절. 해외 성과 홍보

1. 국내외 논문 게재

No	논문명 (건별 각각 기재)	국내외구 분	학술지명	권(호); 페이지	SCI구분	Impact Factor	기여율
1	치은열구액에 존재하는 바이오마커를 이용한 치주질환의 진단: 문헌적고찰	국내전문 학술지	Laboratory & Diagnosis Dentistry(대 한진단검사 치의학회지)	1(1);28-33	비SCI	-	100
2	Platycarya strobilacea leaf extract inhibits tumor necrosis factor-alpha production and bone loss induced by Porphyromonas gingivalis-derived lipopolysaccharide	국외전문 학술지	Archives of oral biology	96;46-51	SCI	2.05	100

2. 국내 및 국제학술회의 발표

No	발표제목 (건별 각각 기재)	국내외구 분 및 개최장소	학술회의명	인쇄물명	발표일	발표자	기여율
1	The Effect of the Extracts and Active Components of Nelumbo Nucifera on Bone Resorption and Tumor Necrosis Factor-a Production	국내 (대한민 국, 군산)	The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuti- als & Functional Foods	ISNFF 2017 Abstract Book	2017.10.23		100
2	A simple method for identification of caffeic and rosmarinic acid in Thymus vulgaris by using HPLC	국내 (ICC JEJU)	제121회 대한화학회 학술발표회	121st General Meeting of th Korean Chemical Society	2018.04.19		100
3	Genotoxicity Assessment of a Mixture of Cirsium japonicum and Brassica oleracea Extract Named as	국내 (COEX, Seoul)	2018 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular	2018 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular	2018.09.18		100

	the Toscare		Biology	Biology			
4	The Protective Effects of Ethanolic Extract of Clematis terniflora against Corticosterone-Induced Neuronal Damage via the AKT and ERK1/2 Pathway	국내 (COEX, Seoul)	2018 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology	2018 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology	2018.09.19		100
5	Neferine inhibits osteoclast differentiation and inflammatory bone loss	국내 (서울대학교 치의학대학원 연건캠퍼스 6층 강당)	2018년 제17회 대한기초치의학 학술대회	2018년 제17회 대한기초치의학 학술대회	2018.11.09		100
6	Neferine inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis and TNF- α stimulated by Porphyromonas gingivalis-derived lipopolysaccharide	국내 (연세대학교 치과대학 서병인홀)	제 18회 연세치의학 학술대회	제 18회 연세치의학 학술대회	2018.11.30		100

3. 국내외 박람회 성과 홍보

No	참여품목 (건별 각각 기재)	행사유형	행사명칭	국내외구분 및 개최장소	행사일자	주관기관	기여율
1	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	바이오코리아 2017	국내 (서울 코엑스)	2017.04.12.~ 2017.04.14.	충청북도, 한국보건산업진흥원	100
2	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	HEALTH&BEAUTY WEEK 2017	국내 (서울 코엑스)	2017.04.27.~ 2017.04.29	(주)한국국제 전시	100
3	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	Vitafoods Europe 2017	국외 (스위스 제네바)	2017.05.09.~ 2017.05.11.	Informa Exhibitions	100
4	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	AGRI.TECH COMMERCIALIZATION & TRANSFER PROMOTION MATCHING	국외 (베트남 하노이)	2017.07.08.~ 2017.07.11.	농업기술실용화재단	100
5	치주건강개선 소재 (곤달비 등	박람회	2017 농업기술박	국내 (서울	2017.08.14.~ 2017.08.15.	농촌진흥청	100

	추출복합물) 등		람회	코엑스)			
6	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	SupplySide West 2017	국외 (미국 라스베가스)	2017.09.25.~ 2017.09.29.	Informa Exhibitions	100
7	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	Tokyo Health Industry Show2018	국외 (동경 빅사이트 전시장)	2018.01.31.~ 2018.02.02.	UBM	100
8	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	BIO KOREA	국내 (서울 코엑스 C홀)	2018.05.09.~ 2018.05.11.	한국보건산 업진흥원	100
9	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	Vitafoods Europe 2018	국외 (스위스 제네바)	2018.05.14.~ 2018.05.20.	GLOBAL HEALTH & NUTRITION NETWORK	100
10	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	2018 대한민국 소비재 수출대전	국내 (서울 코엑스 C홀)	2018.06.04.~ 2018.06.05.	KOTRA 유통전자상 거래팀	100
11	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	2018 농생명기술 산업대전	국내 (서울 코엑스 C홀)	2018.06.08.~ 2018.06.10.	농업기술실 용화재단	100
12	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	CPHI KOREA	국내 (서울 코엑스 D홀)	2018.08.28.~ 2018.08.30.	UBM	100
13	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	글로벌 비즈니스 소싱페어	국내 (일산 킨텍스 제1전시관)	2018.08.30.~ 2018.08.31.	중소벤처기 업부/중소기 업진흥공단	100
14	치주건강개선 소재 (곤달비 등 추출복합물) 등	박람회	Supply Side West 2018	국외 (미국 라스베가스)	2018.11.08.~ 2018.11.10.	KSM-66 Ashwagandh a	100

3절. 산업화 성과

1. 개발 기술 이전 실적

No	기술실시 계약명 (건별 각각 기재)	기술실시권 유형	실시기술 유형	기술실시 대상기관명	기술실시일	유·무상 여부	기여율
1	치주조직 재생 촉진용 조성물	통상실시권	특허등록	(주)네이처센 스농업회사 법인	2017.10.12	유상	100
2	치주질환 예방 및 개선용 조성물	통상실시권	특허등록	(주)네이처센 스농업회사 법인	2018.11.09	유상	100
3	치주질환 예방 및 개선용 조성물	통상실시권	특허등록	(주)네이처센 스농업회사 법인	2018.12.14	유상	100

2. 시제품 개발 성과

No	시제품명 (건별 각각 기재)	사업화명	사업화형태	사업화 여부	제품용도	시제품 사진	기여율
1	덴탈큐	치주조직 재생 촉진용 조성물을 함유한 건강기능식품 개발	기술보유자의 직접사업화_ 기존업체-상 품화	사업화 예정	건강기능 식품	 <p>The image shows two items related to '덴탈큐' (Dental Care). The top item is a box of '덴탈큐' (Dental Care) tooth powder, featuring a smiling woman's face and the text '국내 최초 잇몸조직 재생 물질 첨가' (First in Korea to contain gum tissue regeneration material). The bottom item is a brochure titled '오늘 하루 스마일' (Smile Today), which includes illustrations of people and text about oral health and the product's benefits.</p>	100
2	리덴탈	치주조직 재생 촉진용 조성물을 함유한 구강청결제 시제품 개발	기술보유자의 직접사업화_ 기존업체-상 품화	사업화 예정	구강청결 제	 <p>The image shows a box of 'REDENTAL' mouthwash. The box features a heart-shaped tooth icon and the text '국내 최초 잇몸조직 재생 물질 첨가' (First in Korea to contain gum tissue regeneration material). Below this, there is a list of benefits: '충치예방' (Cavity prevention), '차은염 예방' (Gingivitis prevention), '입냄새 제거' (Bad breath removal), and '프라그 제거' (Plaque removal). The box also mentions '화학물질 무첨가, 저자극' (No chemicals, low irritation) and '150ml'.</p>	100

3	리코덴탈	치주조직 재생 촉진용 조성물을 함유한 구강청결제 시제품 개발	기술보유자의 직접사업화_ 기존업체-상품화	사업화 예정	구강청결제		100
4	하니문 구강청정 스프레이	치주조직 재생 촉진용 조성물을 함유한 구강청정 스프레이 시제품 개발	기술보유자의 직접사업화_ 기존업체-상품화	사업화 예정	구강청정 스프레이		100
5	덴탈Q	치주조직 재생 촉진용 조성물을 함유한 츄잉껌 개발	기술보유자의 직접사업화_ 기존업체-상품화	사업화 예정	츄잉껌		100

6	REDENTAL	치주조직 재생 촉진용 조성물을 함유한 치약 시제품 개발	기술보유자의 직접사업화_ 기존업체-상 품화	사업화 예정	치약		100
---	----------	--	----------------------------------	-----------	----	--	-----

3. 상표 및 성과 등록

No	발명의 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	Tees-10_제05류	대한민국	(주)파미 니티	2019.02 .07	1-2006-01 8161-6				100
2	Tees-10_제29류	대한민국	(주)파미 니티	2019.02 .07	1-2006-01 8161-6				100
3	Tees-10_제30류	대한민국	(주)파미 니티	2019.02 .07	1-2006-01 8161-6				100

4절. 기술요약 정보

- SCI 논문 1편 게재 비SCI 1편 게재, 추가 1편 투고, 지식재산권 12건 출원, 2건 등록, 학술대회 발표 6건, 제품화성과 6건, 고용창출 6건, 홍보 및 전시 32건
- 뼈 흡수 및 염증 억제 효능이 우수한 식물 추출물 및 유효성분 발굴
- 치주염 특이 바이오마커 후보군 도출
- 최종 치주 건강 개선 효능 소재, 곤달비등 추출복합물 개발
- 곤달비 등 추출 복합물의 전임상 효능 평가 완료 (치주 세포 건강도 증진, 치주 인대 줄기세포의 분화율 증진, 치주염 동물 모델을 통한 질환 개선)
- 곤달비 등 추출복합물의 임상, 전임상 작용기전 규명
- 곤달비 등 추출복합물의 인체적용시험을 통한 질환 개선 효능 검증 완료
- 곤달비 등 추출복합물의 인체적용시험을 통한 치주 건강 작용기전 규명

4장. 연구결과

1절. 국내외 천연물들을 통한 치주건강 개선 유효평가를 위한 DB

1. 치주건강 개선 효능 스크리닝을 위한 천연물 DB 구축

표 13. 천연물 데이터베이스 구성

천연물DB번호	식물명	추출부위	학명	추출조건
GingPeri-1	가죽나무	잎	<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle for. <i>Altissima</i>	에탄올추출
GingPeri-2	거제딸기	잎	<i>Rubus longisepalus</i> var. <i>tozawai</i> (Nakai) T.B.Lee	에탄올추출
GingPeri-3	굴피나무	잎	<i>Platycarya strobilacea</i> Siebold & Zucc. var. <i>strobilacea</i> for. <i>strobilacea</i>	에탄올추출
GingPeri-4	금마타리	지상부	<i>Patrinia saniculaefolia</i> Hemsl.	에탄올추출
GingPeri-5	냉이	지상부+꽃	<i>Capsella bursapastoris</i> (L.) L.W.Medicus	에탄올추출
GingPeri-6	담쟁이덩굴	잎+줄기	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> (Siebold & Zucc.) Planch.	에탄올추출
GingPeri-7	말냉이	잎+줄기	<i>Thlaspi arvense</i> L.	에탄올추출
GingPeri-8	바위말발도리나무	잎+꽃	<i>Deutzia grandiflora</i> var. <i>baroniana</i> Diels	에탄올추출
GingPeri-9	벼룩이자리	잎+줄기+종자	<i>Arenaria serpyllifolia</i> L.	에탄올추출
GingPeri-10	보골지	뿌리	<i>Psoralea corylifolia</i> L.	에탄올추출
GingPeri-11	보리	꽃	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i> (L.) Asch.	에탄올추출
GingPeri-12	보리	뿌리	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i> (L.) Asch.	에탄올추출
GingPeri-13	보리	잎+줄기	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i> (L.) Asch.	에탄올추출
GingPeri-14	뽕나무	줄기	<i>Morus alba</i> L.	에탄올추출
GingPeri-15	사스레피나무	잎	<i>Eurya japonica</i> Thunb.	에탄올추출
GingPeri-16	산딸나무	잎	<i>Cornus kousa</i> F.Buerger ex Miquel	에탄올추출
GingPeri-17	산부추	지상부	<i>Allium thunbergii</i> G.Don	에탄올추출
GingPeri-18	산조팝나무	잎	<i>Spiraea blumei</i> G.Don	에탄올추출
GingPeri-19	삼개시호	지상부	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	에탄올추출
GingPeri-20	소리쟁이	열매	<i>Rumex crispus</i> L.	에탄올추출
GingPeri-21	소사나무	잎	<i>Carpinus turczaninovii</i> Hance	에탄올추출
GingPeri-22	애기똥풀	잎+줄기	<i>Chelidonium majus</i> var. <i>asiaticum</i> (Hara) Ohwi	에탄올추출
GingPeri-23	예덕나무	잎	<i>Mallotus japonicus</i> (Thunb.) Muell. Arg.	에탄올추출
GingPeri-24	완도호랑가시나무	잎	<i>Ilex x wandoensis</i> C.F.Miller	에탄올추출
GingPeri-25	개모시풀	잎	<i>Boehmeria platanifolia</i> Franch. et Sav	에탄올추출
GingPeri-26	왕벚나무	잎	<i>Prunus yedoensis</i> Matsum	에탄올추출
GingPeri-27	으름	잎	<i>Akebia quinata</i> (Thunb.) Decne.	에탄올추출
GingPeri-28	자리공	잎	<i>Phytolacca esculenta</i> VanHoutte	에탄올추출
GingPeri-29	잔털벚나무	잎	<i>Prunus serrulata</i> var. <i>pubescens</i> (Makino) Nakai	에탄올추출
GingPeri-30	조팝나무	꽃	<i>Spiraea prunifolia</i> for. <i>simpliciflora</i> Nakai	에탄올추출
GingPeri-31	밀짓	잎	<i>Triticum aestivum</i> L.	에탄올추출
GingPeri-32	영경귀	전초	<i>Cirsium japonicum</i> var. <i>maackii</i> (Maxim.) Matsum.	에탄올추출
GingPeri-33	보리지	어린전초	<i>Borago officinalis</i> L.	에탄올추출
GingPeri-34	곤달비	잎	<i>Ligularia stenocephala</i> (Maxim.) Matsum. & Koidz.	열수추출
GingPeri-35	루이보스	잎	<i>Aspalathus linearis</i> (Burm.f.) R.Dahlgren.	에탄올추출
GingPeri-36	백리향	잎	<i>Thymus vulgaris</i> L.	에탄올추출
GingPeri-37	뉴그린	잎	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> aut <i>italiana</i> L.	에탄올추출
GingPeri-38	민들레	전초	<i>Taraxacum platycarpum</i> Dahlst.	열수추출
GingPeri-39	일년봉	어린지상부	<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.	에탄올추출
GingPeri-40	알팔파	지상부	<i>Medicago sativa</i> L.	에탄올추출
GingPeri-41	꾸지뽕	잎	<i>Cudrania tricuspidata</i> (Carr.) Bur. ex Lavallee	에탄올추출

GingPeri-42	레몬그라스	지상부	Cymbopogon citratus (DC. ex Nees) Stapf syn. Andropogon citratus DC. ex Nees (이명)	열수추출
GingPeri-43	마리골드	꽃	Calendula arvensis L.	에탄올추출
GingPeri-44	캐롭	과실	Ceratonia siliqua (L.) Taub.	에탄올추출

- 본 연구를 통해서 총 44종 이상의 천연물 유래 추출물을 확보하고 치주건강개선 유효성 탐색과 추출방법 제공을 통해서 DB로 구축하여 실제 천연물의 고부가가치화 연구 성과를 공유하고 확대할 수 있도록 하였음. 매우 의미 있는 연구 결과로서 이후 다양한 기능성 연구에 활용할 수 있을 것으로 예상됨.

2. 천연물 유래 추출물들의 HPLC 물성 분석을 통해서 가능성 지표 분석

- 본 연구진은 확보된 DB내 다양한 천연물들의 표준화 지표들을 분석하여 자료로 활용함. 이후 다양한 기능성 연구와 고부가가치화 자료로서 활용하여 산업화 연구 성과를 효율적으로 달성할 수 있을 것임.
- 다음은 백리향 (*Thymus vulgaris*) 추출물을 HPLC 분석하여 지표물질로 활용하거나 유효성분으로서 연구할 수 있는 가능성 후보 물질들을 확인한 결과임.

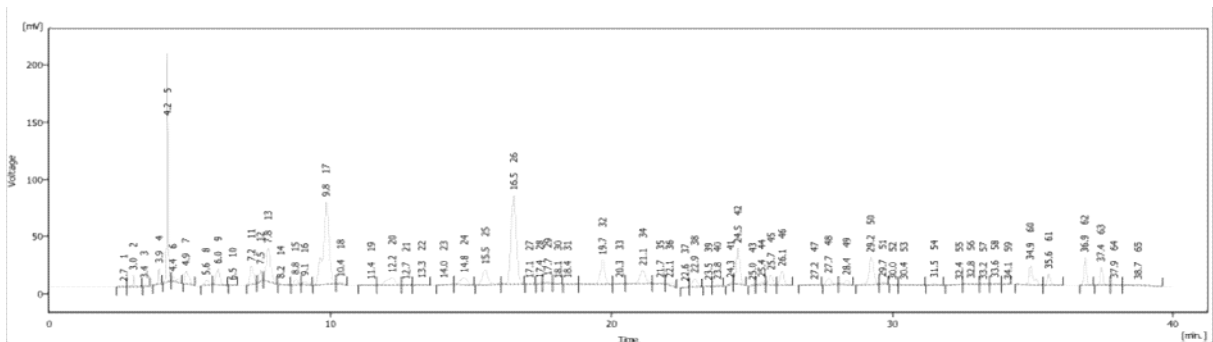


그림 22. 백리향추출물 함유 물질 분석 결과

- 다음은 루이보스 (*Aspalathus linearis* (Burm.f.) R. Dahlgren.) 추출물을 HPLC 분석하여 지표물질로 활용하거나 유효성분으로 연구 할 수 있는 기능성 후보 물질들을 확인한 결과임.

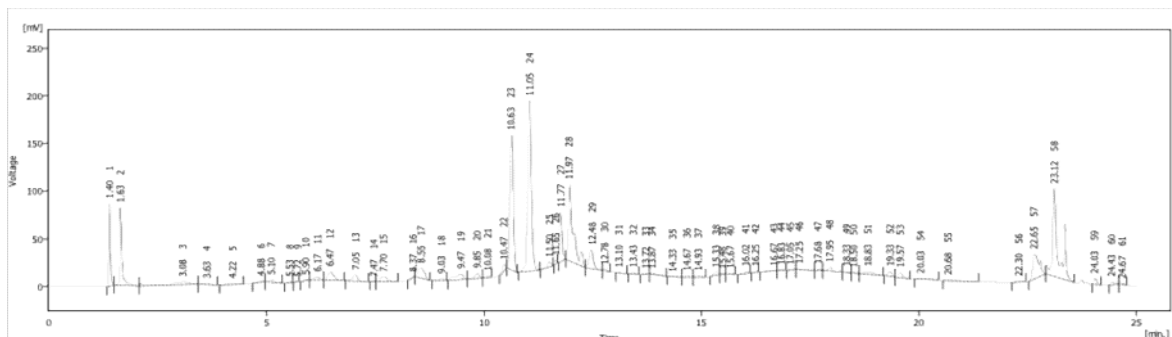


그림 23. 루이보스추출물 함유 물질 분석 결과

- 다음은 국내산 엉겅퀴 (*Cirsium japonicum*) 추출물을 HPLC 분석하여 지표물질로 활

용하거나 유효성분으로 연구 할 수 있는 기능성 후보 물질들을 확인한 결과임.

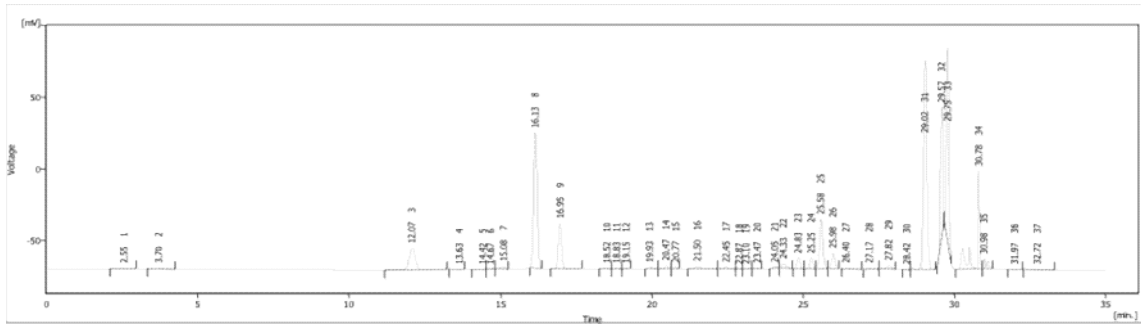


그림 24. 영정귀추출물 함유 물질 분석 결과

- 다음은 국내산 뉴그린 (*Brassica oleracea* var. *botrytis* aut *italiana* L.) 추출물을 HPLC 분석하여 지표물질로 활용하거나 유효성분으로 연구 할 수 있는 기능성 후보 물질들을 확인한 결과임.

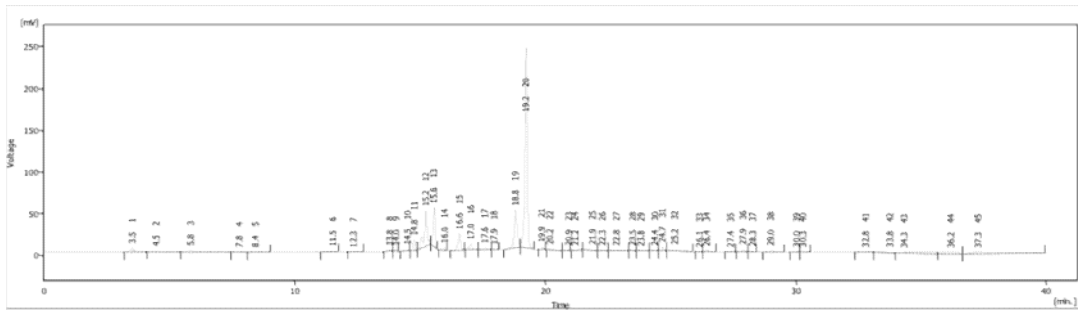


그림 25. 뉴그린추출물 함유 물질 분석결과

- 다음은 국내산 민들레 (*Taraxacum platycarpum* Dahlst.) 추출물을 HPLC 분석하여 지표물질로 활용하거나 유효성분으로 연구 할 수 있는 기능성 후보 물질들을 확인한 결과임.

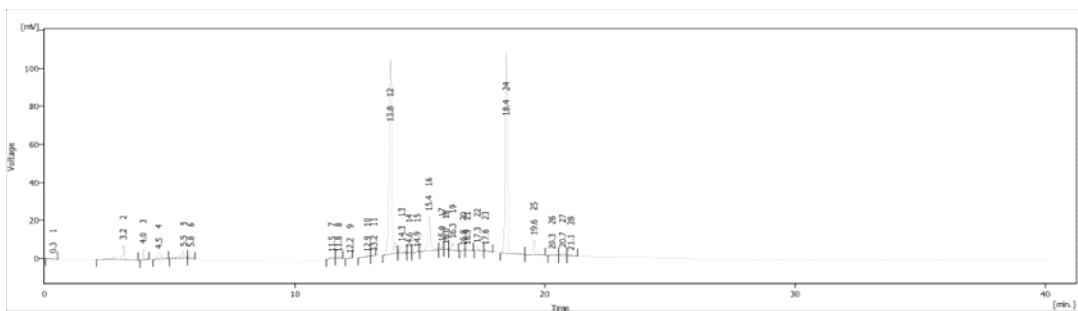


그림 26. 민들레추출물 함유 물질 분석결과

- 다음은 알팔파 (*Medicago sativa* L.) 추출물을 HPLC 분석하여 지표물질로 활용하거나 유효성분으로 연구 할 수 있는 기능성 후보 물질들을 확인한 결과임.

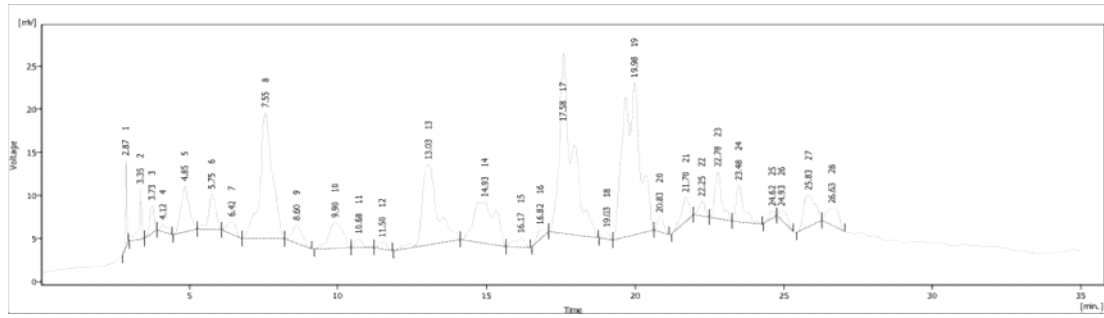


그림 27. 알팔파추출물 함유 물질 분석 결과

- 다음은 캐롭 (*Ceratonia siliqua* (L.) Taub.) 추출물을 HPLC 분석하여 지표물질로 활용하거나 유효성분으로 연구 할 수 있는 기능성 후보 물질들을 확인한 결과임.

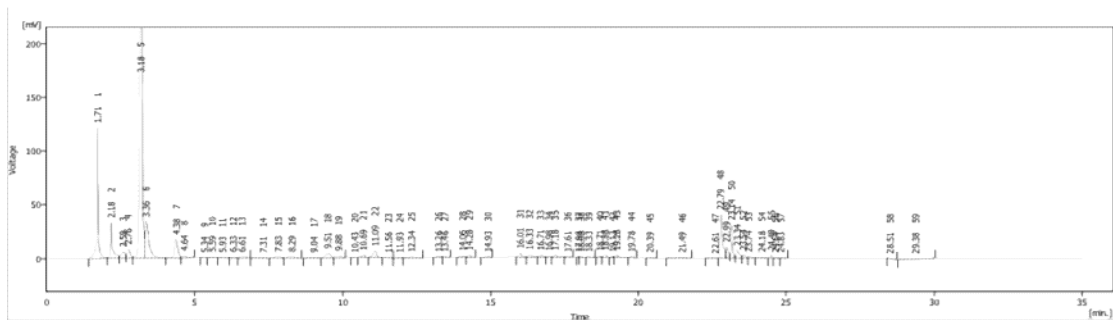


그림 28. 캐롭추출물 함유 물질 분석 결과

- 다음은 밀싹 (*Triticum aestivum* L.) 추출물을 HPLC 분석하여 지표물질로 활용하거나 유효성분으로 연구 할 수 있는 기능성 후보 물질들을 확인한 결과임.

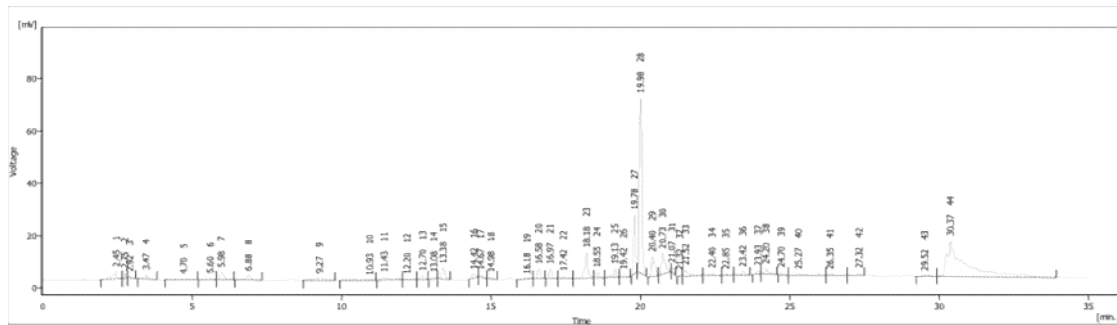


그림 29. 밀싹추출물 함유 물질 분석 결과

- 다음은 곤달비 (*Ligularia stenocephala*) 추출물을 HPLC 분석하여 지표물질로 활용하거나 유효성분으로 연구 할 수 있는 기능성 후보 물질들을 확인한 결과임.

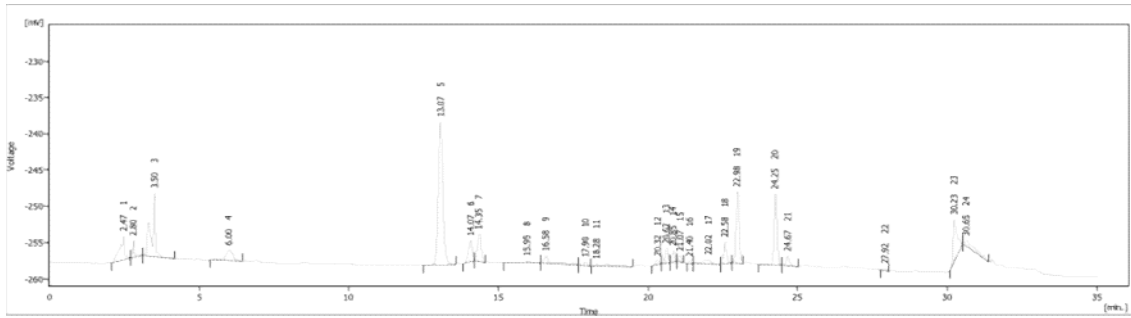


그림 30. 곤달비추출물 함유 물질 분석 결과

3. 다양한 추출물들의 치조골 건강 개선 효능 소재 스크리닝을 통한 최적의 물질 선정
 가. 생쥐의 골수 대식 세포 분리 및 배양

- 3주령의 수컷 ICR 생쥐 (㈜ 나리바이오텍, 대한민국)를 경추 탈골을 통해 죽인 뒤, 검좌를 이용하여 뒷다리 외피를 벗기고, 수술용 가위로 외피가 벗겨진 뒷다리를 절단하여 무혈청 α -MEM (minimum essential medium alpha; Gibco, USA)에 보관함. 또한, 핀셋을 이용하여 근육 속의 뼈를 분리한 뒤, 새로운 α -MEM에 옮긴 뒤 주사기 (syringe)에 600 μ l의 α -MEM을 담아 분리된 다리뼈의 중앙 척수 부분에 삽입하고 2 내지 3회 분사하여 골수 세포를 적출함. 적출된 골수세포는 원심분리 (centrifuge)를 통하여 상층액을 제거한 뒤, 새로운 α -MEM을 넣고 골수세포로부터 골수 대식세포를 분리할 수 있도록 하는 분리 배지인 히스토파크 (histopaque; Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 골수 대식세포를 최종적으로 분리함.
- 분리된 골수 대식세포는 1%의 항생-항균 용액 (antibiotic-antimycotic; Gibco, USA), 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum (FBS); Gibco, USA) 및 M-CSF (macrophage-colony stimulating factor; R&D system Inc., USA) 30 ng/ml 이 포함되어 있는 α -MEM 영양배지로 37°C, 5 % CO2 배양기 내에서 배양함.

나. 추출물의 파골세포 형성 억제능 확인

- 3주령 ICR 생쥐에서 골수대식세포를 분리함. 골수대식세포를 M-CSF, RANKL, 세포독성이 없는 농도의 추출물 또는 활성 화합물이 포함된 10% FBS- α -MEM 배지에서 5일 동안 배양한 후 Acid Phosphatase Leukocyte kit의 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색 용액으로 염색함. 핵이 3개 이상인 세포를 파골세포로 간주하고 수를 헤아림.
- 10, 20 μ g/ml에서 파골세포 형성 억제능을 조사하였고 그중 효능이 뛰어난 8가지 추출물을 선정하여 다음 실험을 수행하였음.

표 14. 천연물 유래추출물의 파골세포 형성 억제능 평가 결과

번호	추출물 농도 (μ g/ml)	파골세포로의 분화 억제율(%)
7-1	10	세포독성 있음

	20	세포독성 있음
7-2	10	40
	20	47.1
7-3	10	65.9
	20	100
7-4	10	59.8
	20	67.5
7-5	10	42.3
	20	60.4
7-6	10	72.1
	20	100
7-7	10	13
	20	28.4
7-8	10	100
	20	100
7-9	10	23.1
	20	31.2
7-10	10	36.1
	20	36.4
7-11	10	28.7
	20	34.5
7-12	10	25.3
	20	40.3
7-13	10	19
	20	7.77
7-14	10	39.9
	20	27
7-15	10	0
	20	24.2
7-16	10	100
	20	100
7-17	10	10.6
	20	28.1
7-18	10	4.2
	20	6
7-19	10	28.1
	20	23.1
7-20	10	99.1
	20	100
7-21	10	85
	20	100
7-22	10	8.1

	20	15
7-23	10	0
	20	12.6
7-24	10	15
	20	52.5
7-28	10	99.4
	20	100
7-29	10	71.8
	20	86
7-30	10	29
	20	37
7-31	10	33
	20	35
7-32	10	20
	20	52
7-33	10	18.2
	20	68.4

다. 8종 추출물의 세포 독성 확인

- 96-웰 플레이트 각각의 웰에 2×10^4 개의 생쥐 골수 대식세포를 분주하고, 추출물 및 영양배지를 넣고 24시간 동안 배양한 뒤, 세포를 고정하고 헤리스 헤마톡실린 (Harris hasematoxylin, sigma-aldrich, USA)을 넣어 핵 염색 후, 세포 핵의 수를 현미경을 이용해 측정함.
- 바위말달도리 잎 및 꽃 추출물, 소사나무 잎, 왕벚나무 잎 및 산딸나무 잎은 $20 \mu\text{g/ml}$ 에서 독성을 나타내었고, 개모시풀의 경우 $10 \mu\text{g/ml}$ 에서 독성을 나타낼 수 있는 것을 확인하였음.

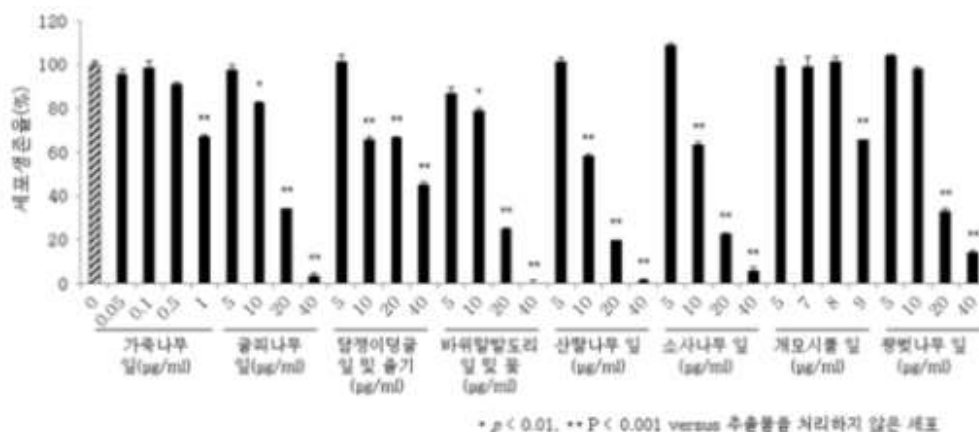


그림 31. 8종 추출물의 세포 독성 평가 결과

라. 8종 추출물의 파골세포 형성 억제능 확인

- 가죽나무 잎 추출물 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 32%, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에는 68%, 굴피나무 잎 추출물 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 67%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에는 95%, 담쟁이덩굴 잎 및 줄기 추출물 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 91%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에는 100%, 바위말발도리 잎 및 꽃 추출물 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 94%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에는 100%, 산딸나무 잎 추출물 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 97%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에는 100%, 소사나무 잎 추출물 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 38%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에는 83%, 개모시풀 잎 추출물 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 2%, 9 $\mu\text{g/ml}$ 에는 34%, 왕벚나무 잎 추출물 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 47%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에는 64%의 파골세포 분화가 억제되었음. 각 추출물들이 파골세포 형성 억제능을 각 각 가지고 있는 것을 확인하였으며, 각 추출물들은 독성이 없는 농도에서 산딸나무 잎, 굴피나무 잎, 바위말발도리 잎 및 꽃, 담쟁이덩굴 잎 및 줄기, 왕벚나무 잎, 소사나무 잎, 가죽나무 잎, 왕모시풀 잎 추출물의 순서로 파골세포의 억제능에 대한 효과가 좋았음.

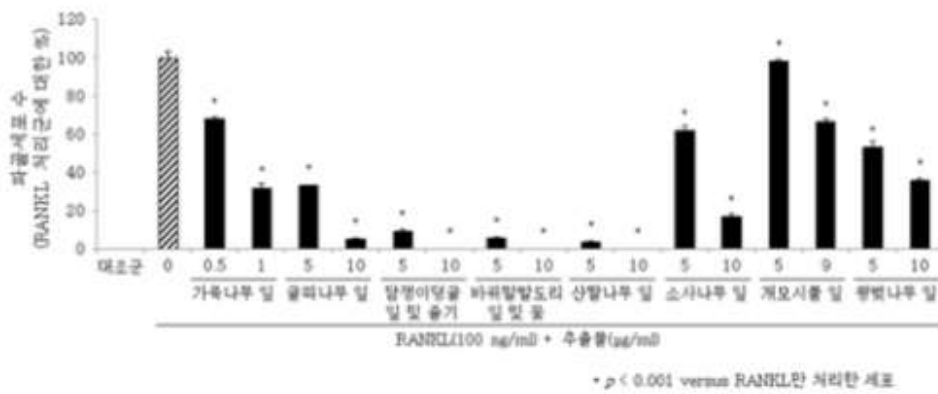


그림 32. 파골세포의 분화 및 생존을 확인

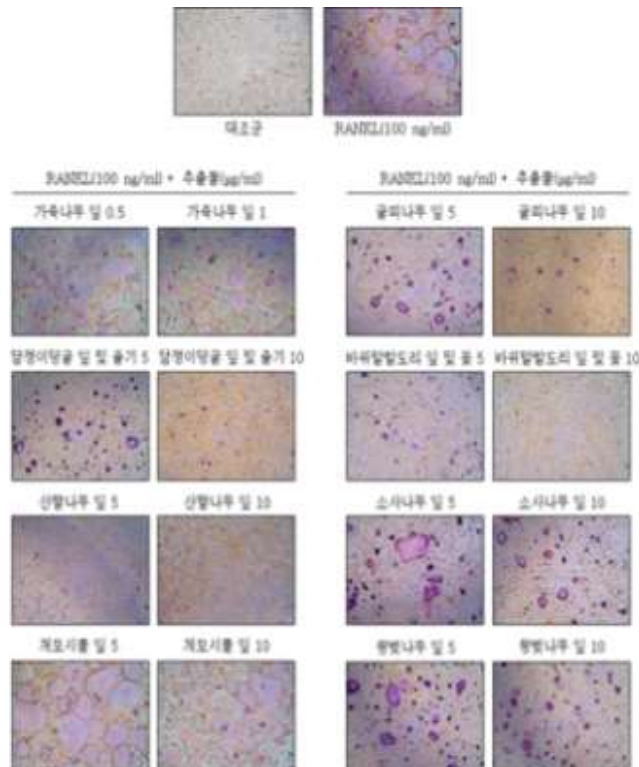


그림 33. 8종 추출물의 파골세포 형성 억제능

마. 8종 추출물의 골흡수 및 뼈 기질 분해 효소의 활성 억제능

- 생쥐 골수 대식세포를 칼슘-인으로 코팅된 BioCoat Osteologic Multitest Slides에 넣고 M-CSF, RANKL이 포함된 10% FBS- α -MEM 배지에서 5일간 배양하였음. 추출물 또는 활성 화합물이 함유된 같은 배지에서 10일간 더 배양하였음. 배지는 2일마다 신선한 배지로 교체함. 4% sodium hypochlorite로 처리하여 세포를 제거하고 slide를 증류수로 2회 세척한 후 현미경으로 흡수와를 관찰함. 세포배양액은 모아 배양액내 cathepsin K는 kit를 이용하여 정량하고 MMP-2와 9의 활성은 gelatin zymography로 확인하였음.
- RANKL을 처리하고 배양한 양성대조군의 경우에는 음성대조군과 비교하여 흡수 구멍의 생성이 현저히 증가하였음. 각 추출물을 첨가한 그룹에 대해서는, 가죽나무 잎 추출물 0.5 μ g/ml에서 5%, 1 μ g/ml에는 8%, 굴피나무 잎 5 μ g/ml에서 10%, 10 μ g/ml에는15%, 담쟁이덩굴 잎 및 줄기 5 μ g/ml에서3%, 10 μ g/ml에는 8%, 바위말발도리 잎 및 꽃 5 μ g/ml에는 26%, 10 μ g/ml에는41%, 산딸나무 잎 5 μ g/ml에서30%, 10 μ g/ml에는 51%, 소사나무 잎 5 μ g/ml에서2%, 10 μ g/ml에는 6%, 개모시풀 잎 5 μ g/ml에서3%, 9 μ g/ml에는 9%, 왕벚나무 잎 5 μ g/ml에서9%, 10 μ g/ml에는 11%로 양성대조군에 비해 파골세포에 의해 형성 되는 흡수 구멍의 생성이 감소하였음. 바위말발도리 잎 및 꽃과 산딸나무 잎 추출물의 경우, 파골세포의 형성뿐만 아니라 성숙한 파골세포에 의한 골기질에 존재하는 무기성분의 흡수를 현저히 억제하여 골 흡수를 억제하는 것으로 생각됨.

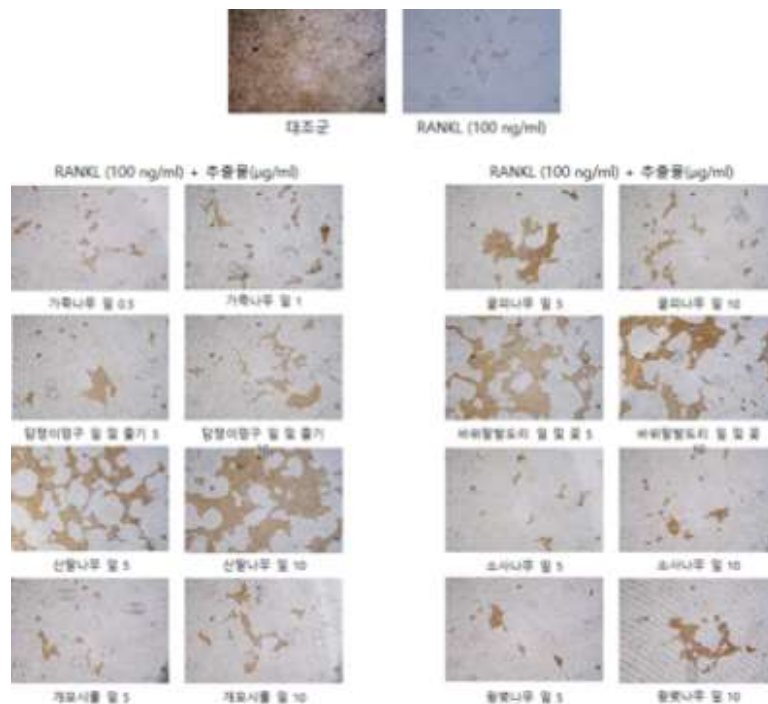


그림 34. 추출물의 골흡수 (흡수 및 형성) 억제능 평가 결과

- RANKL을 처리하고 배양한 양성대조군의 경우에는 음성대조군과 비교하여 MMP-2

의 활성화와 MMP-9의 활성의 형성을 크게 증가하는 것을 확인 할 수 있음. RANKL과 함께 담쟁이덩굴 잎 및 줄기 5 $\mu\text{g/ml}$, 왕모시풀 잎 9 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 경우에는 양성대조군에 비해 MMP-9의 활성의 감소를 각각 29%, 53%로 유도하였음. 그 외의 추출물들은 양성대조군에 비해 MMP-2 및 MMP-9 활성의 변화를 유도하지는 않았음.

- RANKL과 함께 굴피나무 잎 10 $\mu\text{g/ml}$ 및 소사나무 잎 추출물 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 경우에는 각각 17%, 25%의 카텡신 K 활성 감소를 유도하였음. 그 외의 추출물에 대해서는 양성대조군에 비해 카텡신 K 활성화에 큰 영향을 주지 않는 것을 확인하였음.

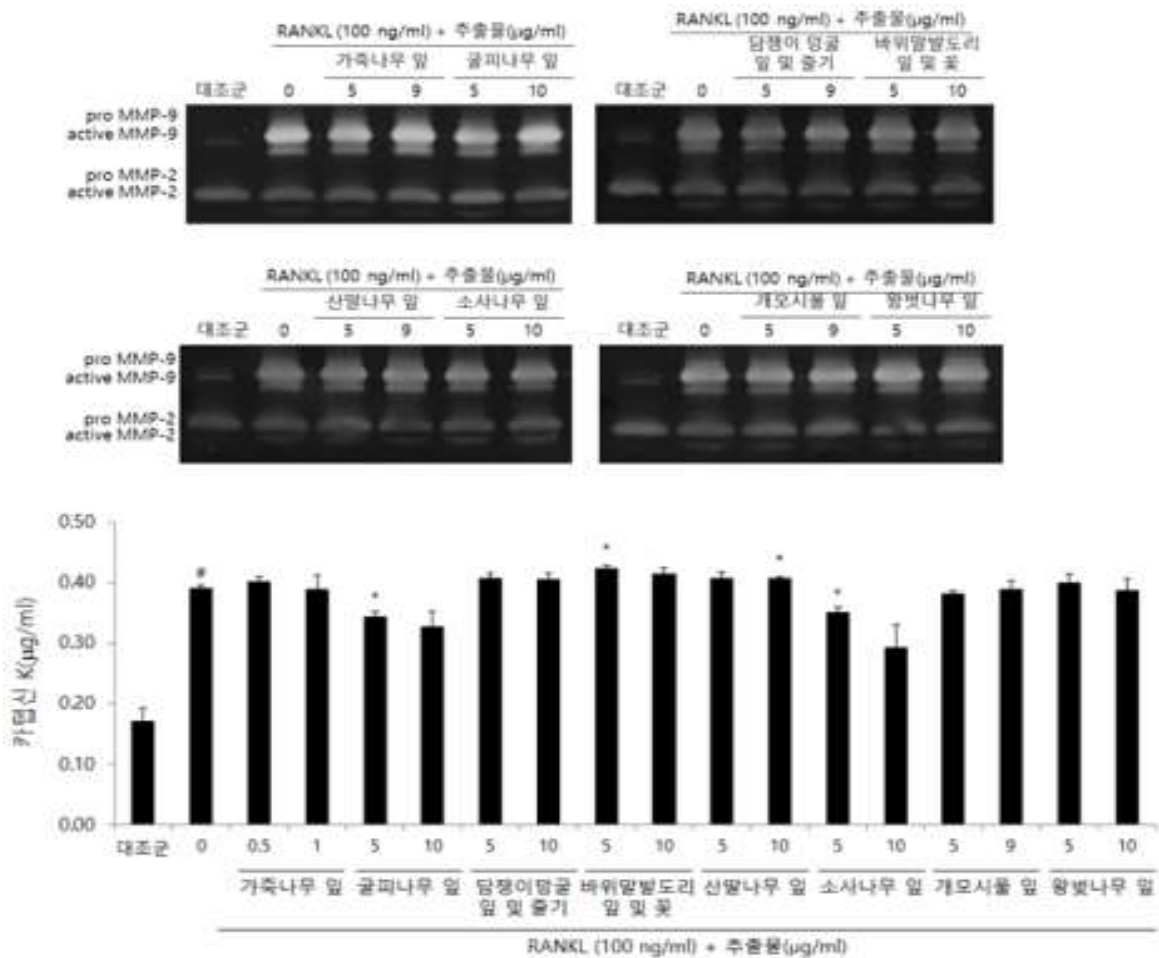


그림 35. 추출물의 뼈 기질 단백질 분해 효소 (MMP-2, MMP-9, 카텡신 K)의 활성 억제능 평가 결과

바. 치주균 유래 lipopolysaccharide (LPS)로 자극한 생쥐 대식세포에서 추출물의 세포독성 및 TNF- α 생성 억제능 확인

- 지질 다당류 (LPS)로 자극한 생쥐 대식세포에 가죽나무 잎 추출물은 1 $\mu\text{g/ml}$, 굴피나무 잎 추출물은 40 $\mu\text{g/ml}$, 담쟁이덩굴 잎 및 줄기 추출물은 20 $\mu\text{g/ml}$, 바위말발도리 잎 및 꽃 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$, 산딸나무 잎 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$, 소사나무 잎 추출물은 80 $\mu\text{g/ml}$, 왕모시풀 잎 추출물은 20 $\mu\text{g/ml}$, 왕벚나무 잎 추출물은 20 $\mu\text{g/ml}$

g/ml 농도까지 처리하였을 때 세포생존율이 70% 이상으로 세포독성을 나타내지 않았으나 그 이상의 농도로 처리하였을 경우 세포 독성이 관찰되었음.

- 지질다당류 (LPS)를 처리한 생쥐 대식세포에 가죽나무 잎 추출물 5 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서 56 %, 굴피나무 잎 추출물 20 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서 53 %, 40 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서는 83 %의 TNF- α 생성이 억제되었음.
- 가죽나무 잎 추출물과 굴피나무 잎 추출물은 치주염균에 의한 염증 사이토카인의 생성을 억제하고 파골세포 형성을 억제하여 치주염 및 치주염에 치조골 손상을 억제할 수 있음. 반면, 가죽나무 잎 추출물 0.5, 1 $\mu\text{g/ml}$, 바위말밭도리 잎 및 꽃 추출물 5, 10 $\mu\text{g/ml}$, 산딸나무 잎 추출물 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 은 TNF-의 생성을 현저히 증가시키는 것으로 보아 면역반응을 촉진하는 것으로 생각됨.

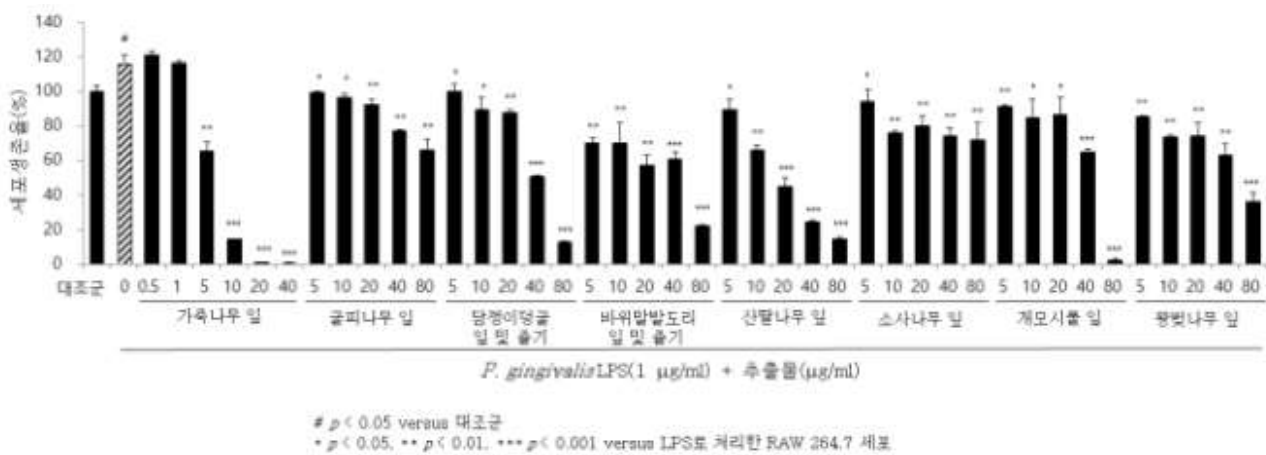


그림 36. 치주균 유래 LPS로 처리한 RAW264.7 대식세포에서 추출물의 세포독성 평가 결과

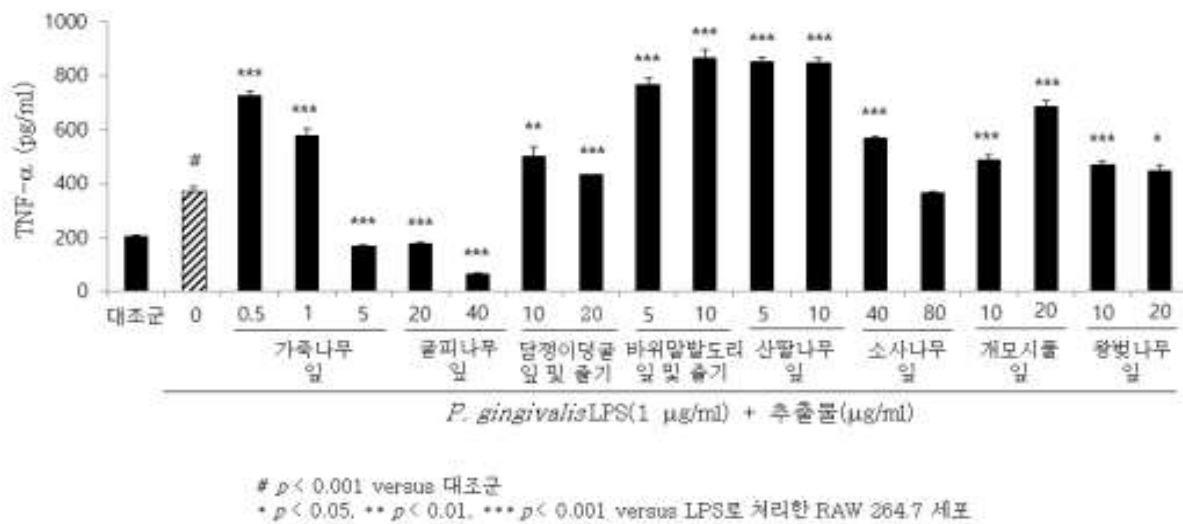


그림 37. 치주균 유래 LPS로 처리한 RAW264.7 대식세포에서 추출물의 TNF- α 생성 억제능 평가 결과

사. 마 추출물의 세포 독성 확인

- 마 뿌리줄기 추출물을 0.1, 0.5, 1, 5, 10 및 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 희석하였음. 96-웰 플레이트의 각 웰에 5×10^4 개의 생쥐 골수 대식세포를 첨가한 후, 희석된 추

출물이 첨가되어 있는 α -MEM을 각각 200 μ l씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂조건의 세포 배양기에서 생쥐 골수 대식세포를 배양하였음. 이 후, 이틀마다 추출물이 포함된 새로운 α -MEM(1%의 항생-항균 용액, 10% FBS, 30ng/ml의 M-CSF 첨가)으로 교환해주며 5일간 배양하였음. 5일 뒤, 5mg/ml MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 용액을 각 웰당 20 μ l씩 넣고 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에 넣어 4시간 동안 반응시킴. 배지를 제거하고 난 뒤, DMSO 100 μ l씩 넣고 쉐이커에서 20분간 용해시켜 ELISA 리더기를 이용해 570nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율 및 시료의 독성 유무를 확인함.

- 마 뿌리줄기는 10 μ g/ml 이하의 농도에서 세포 생존율이 70% 이상이 됨을 확인하였음.

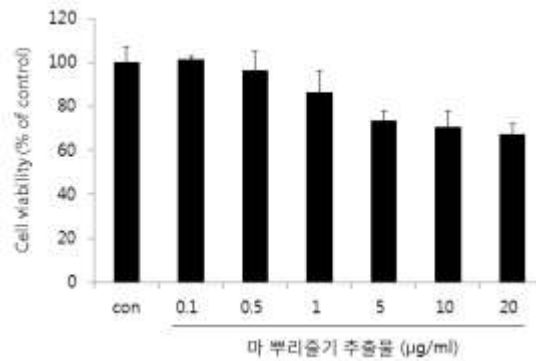


그림 38. 추출물의 세포 독성 평가 결과

아. 마 추출물의 파골세포 형성 억제능 확인

- 3주령 ICR 생쥐에서 골수대식세포를 분리함. 골수대식세포를 M-CSF, RANKL, 세포 독성이 없는 농도의 추출물이 포함된 10% FBS- α -MEM 배지에서 5일 동안 배양한 후 Acid Phosphatase Leukocyte kit의 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) 염색 용액으로 염색함. 핵이 3개 이상인 세포를 파골세포로 간주하고 수를 헤아림.
- 마 뿌리줄기는 5 μ g/ml에서 7%, 10 μ g/ml에서는 41%의 파골세포 분화가 억제되었음.

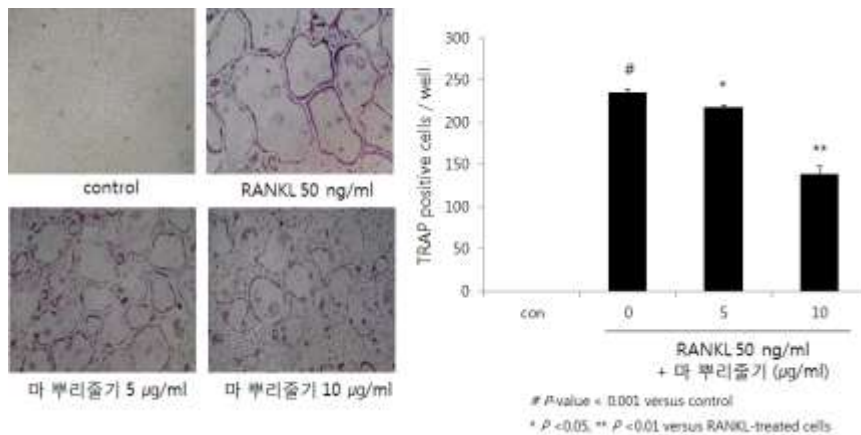


그림 39. 추출물의 파골세포 형성 억제능

자. 마 추출물의 골흡수 및 뼈 기질 분해 효소의 활성 억제능

- 생쥐 골수 대식세포를 칼슘-인으로 코팅된 96-웰 플레이트 (Corning® Osteo Assay Surface)의 각 웰에 1X10⁴개씩 넣고 M-CSF, RANKL이 포함된 10% FBS- α -MEM 배지에서 4일간 배양하였음. 추출물이 함유된 같은 배지에서 2일간 더 배양하였음. 배지는 2일마다 신선한 배지로 교체함. 4% sodium hypochlorite로 처리하여 세포를 제거하고 웰을 증류수로 2회 세척한 후 현미경으로 흡수 정도를 관찰함. 세포 배양액은 모아서 MMP-2와 9의 활성을 gelatin zymography로 확인하였음.
- RANKL을 처리하고 배양한 양성대조군의 경우에는 음성대조군과 비교하여 흡수 구멍의 생성이 현저히 증가하였음. 마 뿌리줄기는 5 μ g/ml에서 7%, 10 μ g/ml에서는 30%로 양성대조군에 비해 파골세포에 의해 형성되는 흡수 구멍의 생성이 감소하였음. 이는 파골세포의 형성뿐만 아니라 성숙한 파골세포에 의한 골 기질에 존재하는 무기성분의 흡수를 현저히 억제하여 골 흡수를 억제하는 것으로 생각됨.

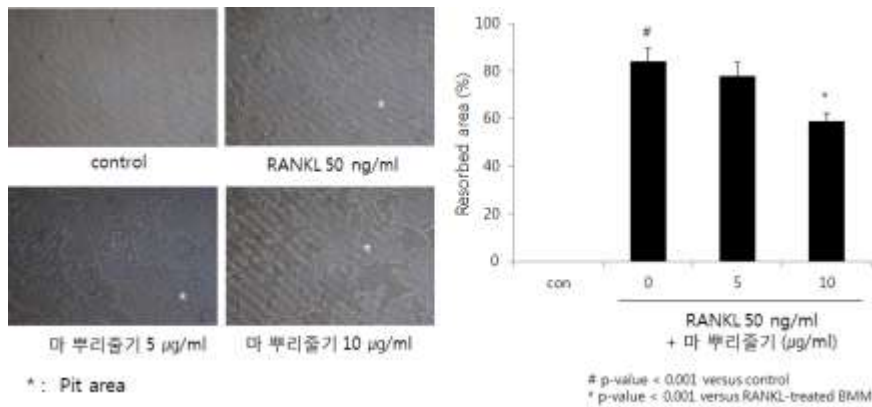


그림 40. 추출물의 골흡수 (흡수 및 형성) 억제능 평가 결과

- RANKL을 처리하고 배양한 양성대조군의 경우에는 음성대조군과 비교하여 MMP-2의 활성과 MMP-9의 활성의 형성이 크게 증가하는 것을 확인 할 수 있음. 그러나 마 뿌리줄기는 양성대조군에 비해 MMP-2 및 MMP-9 활성의 변화를 유도하지는 않았음.

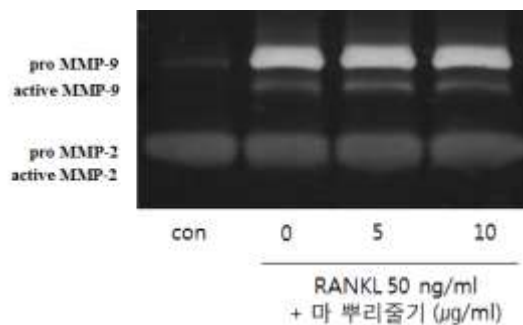


그림 41. 추출물의 뼈 기질 단백질 분해 효소 (MMP-2, MMP-9)의 활성 억제능 평가 결과

차. 치주균 유래 lipopolysaccharide (LPS)로 자극한 생쥐 대식세포에서 마 추출물의 세포 독성 및 TNF- α 생성 억제능 확인

- Porphyromonas gingivalis에서 얻은 지질다당류 (lipopolysaccharide, LPS)로 자극된 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포에서 마 뿌리줄기 추출물의 세포독성을 확인함. 추출물은 1, 5, 10, 20, 40 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 희석하였음. 배양 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (1%의 항생-항균 용액, 10% FBS)을 사용하여 96-웰 플레이트의 각 웰에 1×10^4 개의 마우스 대식세포를 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였음. 마우스 대식세포가 배양된 96-웰 플레이트에 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 와 함께 각 추출물을 농도 별로 넣고 24시간 동안 배양하였음. 24시간 후, 각 웰당 20 μl 씩 넣고 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에 넣어 4시간 동안 반응시킴. 배지를 제거하고 난 뒤, DMSO 100 μl 씩 넣고 쉐이커에서 20분간 용해시켜 ELISA 리더기를 이용해 570nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율 및 시료의 독성 유무를 확인함.
- 마 뿌리줄기 추출물은 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 처리하였을 때 세포생존율이 70% 이상으로 세포독성을 나타내지 않았으나 그 이상의 농도로 처리하였을 경우 세포 독성이 관찰되었음.
- 지질다당류 (LPS)를 처리한 마우스 대식세포에 마 뿌리줄기 추출물 1, 10 및 20 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 후 24시간 후의 세포 배양액을 모아 TNF- α 의 농도를 확인함. 마 뿌리줄기 추출물 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 TNF- α 의 생성이 감소하였으나, 10 및 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 TNF- α 의 생성을 현저히 증가시키는 것으로 보아 면역반응을 촉진하는 것으로 생각됨.

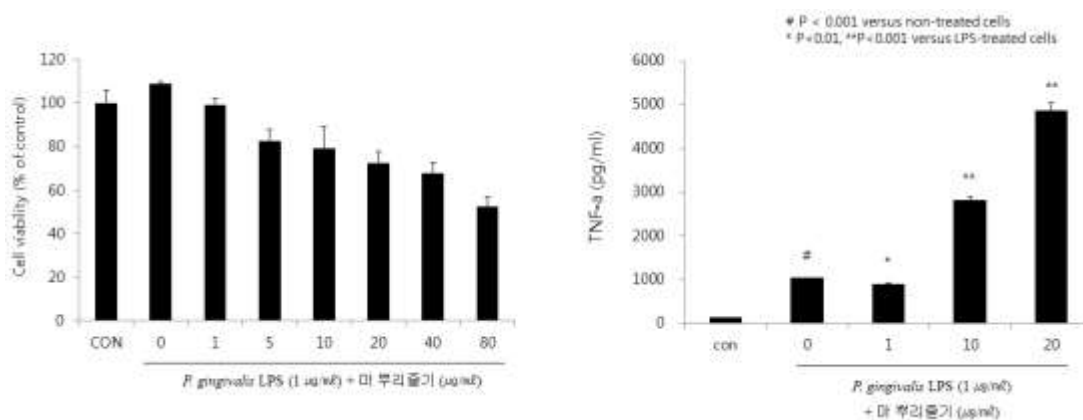


그림 42. 치주균 유래 LPS로 처리한 RAW264.7 대식세포에서 추출물의 세포독성 평가 결과 및 TNF-alpha 생성 억제능 평가 결과

카. 마우스 조골세포에서 굴피나무 및 마 추출물의 세포독성 및 골분화능 확인

- 굴피나무 잎과 마 뿌리줄기 추출물의 마우스 조골세포에서의 세포독성을 확인하고 자 생후 1일째 마우스의 두개골로부터 조골세포를 분리하여 배양하고, 각각의 추출물은 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 및 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 희석하였음. 배양 배지는 α

- MEM(1%의 항생-항균 용액, 10% FBS) 배지를 사용하여 96-웰 플레이트의 각 웰에 4X10³개의 마우스 조골세포를 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 7일간 배양하였음. 7일 후, 각 웰당 20 μl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에 넣어 4시간 동안 반응시킴. 배지를 제거하고 난 뒤, DMSO 100 μl씩 넣고 셰이커에서 20분간 용해시켜 ELISA 리더기를 이용해 570nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율 및 시료의 독성 유무를 확인함.
- 굴피나무 잎과 마 뿌리줄기 추출물은 1 μg/ml 농도까지 처리하였을 때 세포생존율이 70% 이상으로 세포독성을 나타내지 않았음.

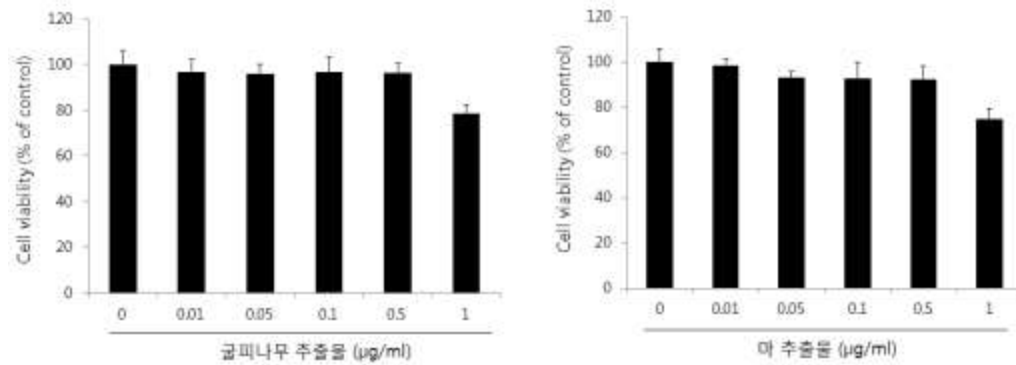


그림 43. 마우스 조골세포에서 추출물의 세포 독성 평가 결과

- 추출물의 골재생 능력을 확인하고자 12-웰 플레이트에 5X10⁴의 마우스 조골세포를 분주하고, 골분화 유도 인자인 아스코르브산 (50 μg/ml)과 베타-글리세로포스페이트 (10 mM)가 첨가된 α-MEM 배지에 세포 독성이 없는 농도의 추출물을 처리하고 14일 동안 배양한 후 Alizarin red S 염색을 통해 칼슘 축적을 확인하였음. 이를 정량하기 위해 10% cetylpyridinium chloride를 넣어 1시간 동안 반응시킨 후 ELISA 리더기를 이용해 570nm에서 흡광도를 측정함.

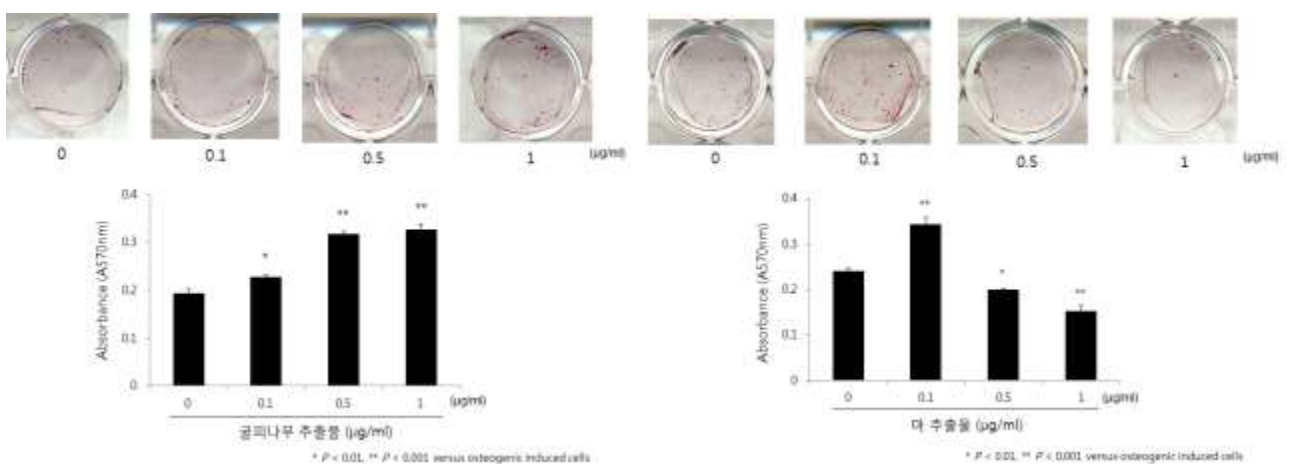


그림 44. 마우스 조골세포에서 추출물의 골분화능 결과

타. 치주질환 예방·개선 소재로서 굴피나무 추출물의 효능 평가

(1) 치주균 유래 지질다당체로 유도한 TNF-α 생성에 대한 억제능

- 굴피나무 잎 추출물을 RAW264.7 세포에 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 처리하였을 때 세포생존율이 70% 이상으로 세포독성을 나타내지 않았으나 그 이상의 농도로 처리하였을 경우 세포 독성이 관찰됨. 지질다당류 (LPS)를 처리한 생쥐 대식세포에서 TNF- α 는 1.8배 증가하지만, 굴피나무 잎 추출물 20 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 TNF- α 의 생성은 control 정도로 감소하였고, 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 TNF- α 의 생성을 83%까지 억제시킴.

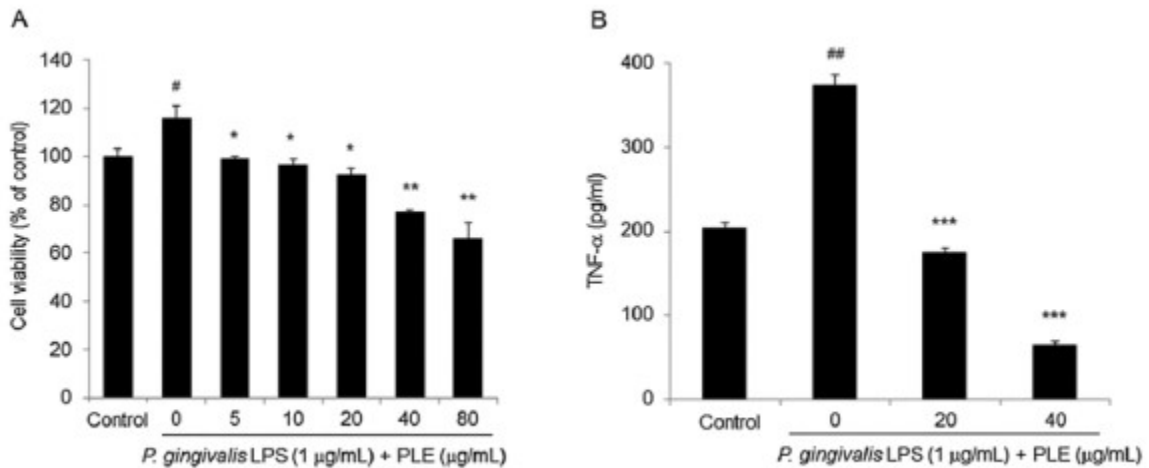


그림 45. 치주균 유래 LPS를 처리한 RAW264.7 대식 세포에서 굴피나무 잎 추출물의 TNF- α 생성에 대한 억제능 A. 추출물의 세포 독성, B. TNF- α 생성에 대한 억제능

(2) 파골세포 분화 및 활성화에 대한 억제능

- 굴피나무 잎 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포 생존율이 80% 이상으로 세포독성이 거의 없음. 굴피나무 잎 추출물은 파골세포의 분화를 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 67%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 95%까지 억제함. 또한 굴피나무 잎 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 파골세포 분화와 관련된 유전자인 *nfatc1*, *DCSTAMP*, *ctsk*의 발현을 감소시킴.

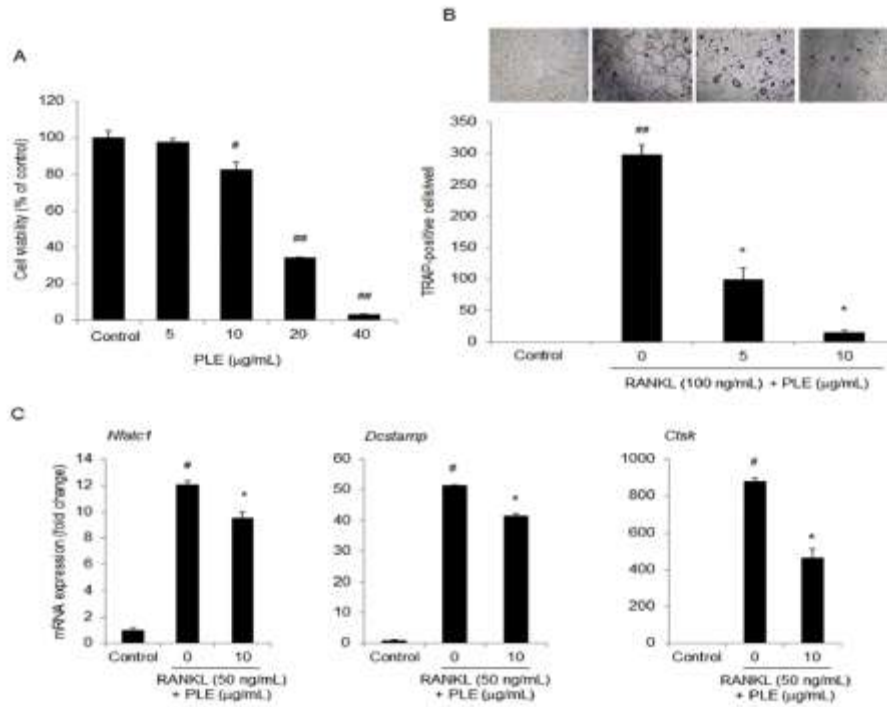


그림 46. 굴피나무 잎 추출물의 파골세포 형성 억제능. A. 추출물의 세포 독성, B. 추출물의 파골세포 형성 억제능, C. 파골세포 분화 관련 유전자 발현 억제능

- 굴피나무 잎 추출물은 5 μg/ml에서 16%, 10 μg/ml에서는 44%까지 파골세포에 의한 흡수와 생성을 억제하였음. 또한 굴피나무 잎 추출물은 pro 및 active MMP-9 활성을 억제하고 카텡신 K 활성을 억제시킴. 굴피나무 잎 추출물은 파골세포의 형성뿐만 아니라 성숙한 파골세포에 의한 골기질에 존재하는 무기성분의 흡수를 현저히 억제하여 골 흡수를 억제하는 것으로 생각됨.

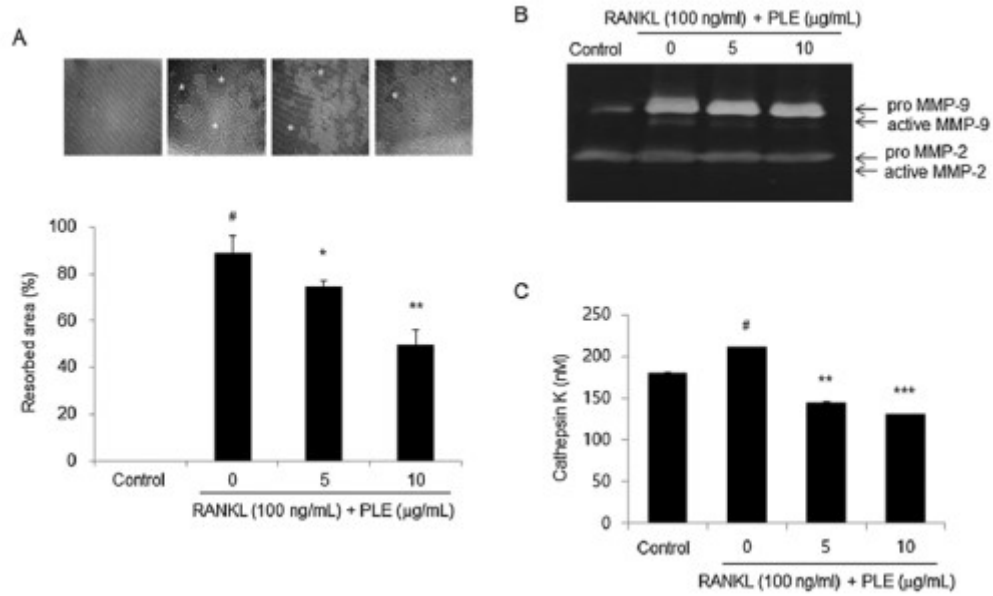


그림 47. 굴피나무 잎 추출물의 골흡수 억제능

- A. 추출물의 골흡수 억제능
- B. 추출물의 뼈 기질 단백질 분해 효소의 활성 억제능
- C. 카텡신K 활성 억제능

(3) 조골세포 활성화능

- 생쥐 조골전구세포에 분화배지 및 굴피나무 잎 추출물을 처리하였을 때 alkaline phosphatase (ALP) 활성과 칼슘의 생성이 증가함. 굴피나무 잎 추출물은 조골세포를 활성화하는 효능이 있음.

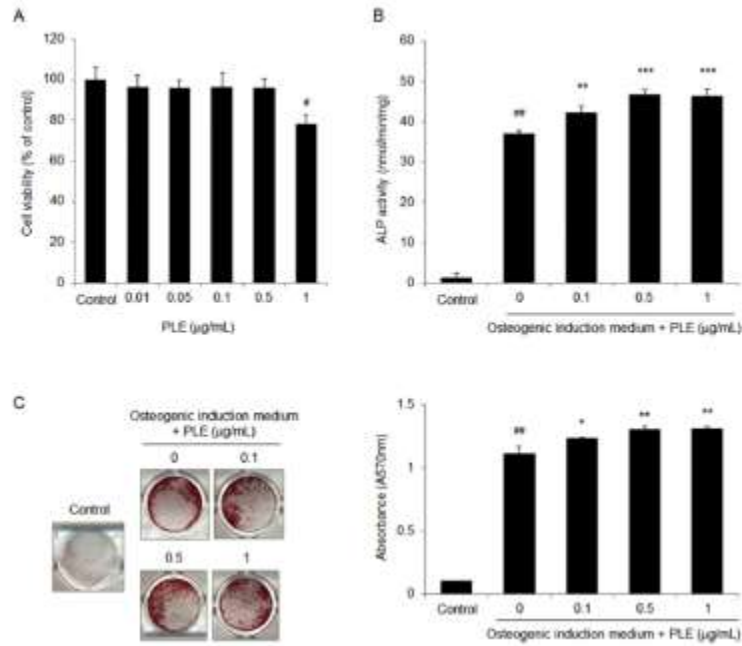


그림 48. 조골세포 활성화능

- A. 추출물의 세포 독성
- B. alkaline phosphatase (ALP) 활성 측정
- C. 골분화로 생성된 칼슘의 양 측정

파. 치주질환 예방·개선 소재로서 마 추출물의 효능 평가

(1) 파골 세포에 대한 효능

- 마 뿌리줄기 추출물은 20 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포 생존율이 70% 이상으로 세포독성이 거의 없음. 마 뿌리줄기 추출물은 파골세포의 분화를 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 7%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 41%까지 억제함.

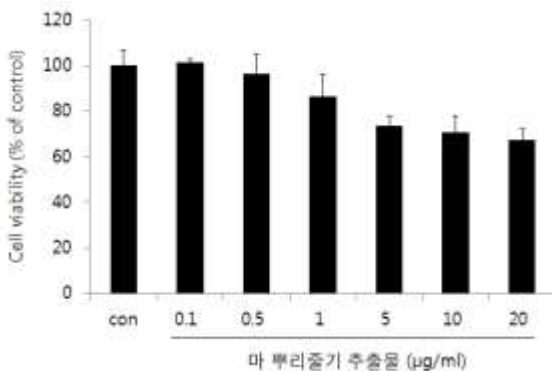


그림 49. 추출물의 세포 독성

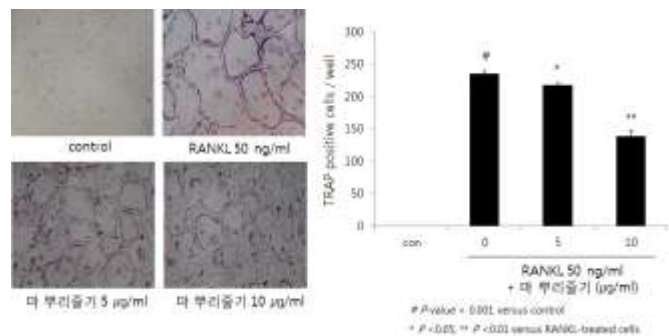


그림 50. 추출물의 파골세포 형성 억제능

- 추출물은 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 7%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 30%까지 파골세포에 의한 흡수와 생성을 억제하였으나 MMP-2 및 MMP-9 활성은 억제하지 않았음. 마 뿌리줄기 추출물은 파골세포의 형성뿐만 아니라 성숙한 파골세포에 의한 골기질에 존재하는 무

기성분의 흡수를 현저히 억제하여 골 흡수를 억제하는 것으로 생각됨.

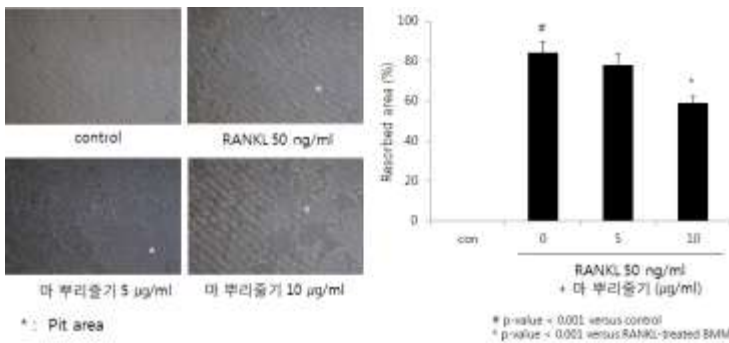


그림 51. 추출물의 골흡수 (흡수와 형성) 억제능

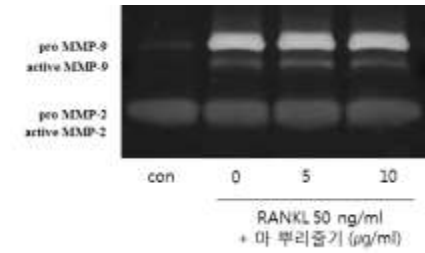


그림 52. 추출물의 뼈 기질 단백질 분해 효소의 활성 억제능

(2) 치주균 유래 지질다당체로 유도한 TNF- α 생성에 대한 억제능

- 마 뿌리줄기 추출물을 RAW264.7세포에 20 μ g/ml 농도까지 처리하였을 때 세포생존율이 70% 이상으로 세포독성을 나타내지 않았으나 그 이상의 농도로 처리하였을 경우 세포 독성이 관찰되었음. 지질다당류 (LPS)를 처리한 생쥐 대식세포에서 마 뿌리줄기 추출물 1 μ g/ml 처리시 TNF- α 의 생성이 감소하였으나, 10 및 20 μ g/ml에서는 TNF- α 의 생성을 현저히 증가시켰음. 염증을 억제시키는 것보다 면역반응을 촉진시키는 것을 목적으로 하는 소재로 개발이 바람직한 것으로 생각됨.

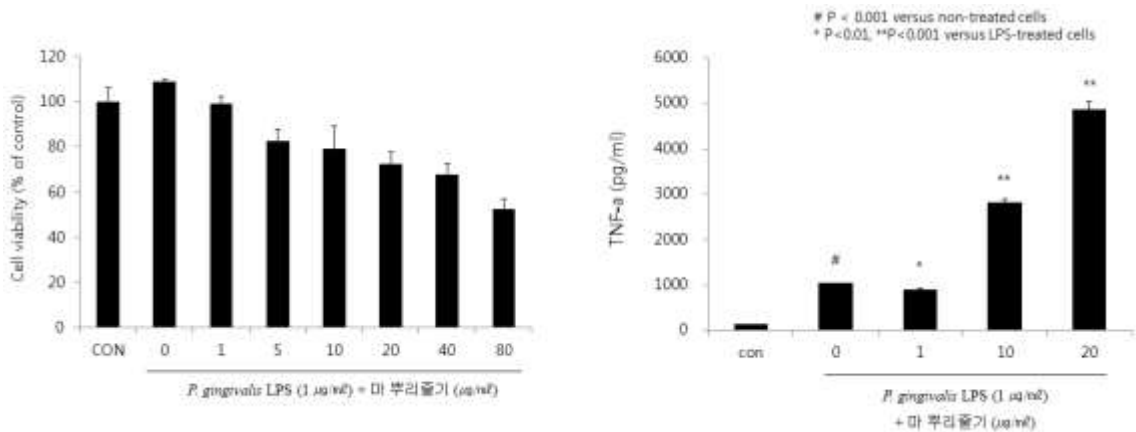


그림 53. 치주균 유래 LPS로 처리한 RAW264.7 대식세포에서 추출물의 세포독성 및 TNF- α 생성 억제능

하. 치주질환 예방·개선 소재로서 연 (*Nelumbo nucifera*)의 유효성분 neferine 효능 평가 및 작용기작

(1) 치주균 유래 지질다당체로 유도한 TNF- α 생성에 대한 억제능

- Neferine을 RAW264.7 세포에 5 μ g/ml 농도까지 처리하였을 때 세포생존율이 70% 이상으로 세포독성을 나타내지 않았으나 그 이상의 농도로 처리하였을 경우 세포 독성이 관찰되었음. 지질다당류 (LPS)를 처리한 생쥐 대식세포에서 TNF- α 는 증가

하지만, neferine을 함께 처리하였을 때 TNF- α 의 생성은 감소함.

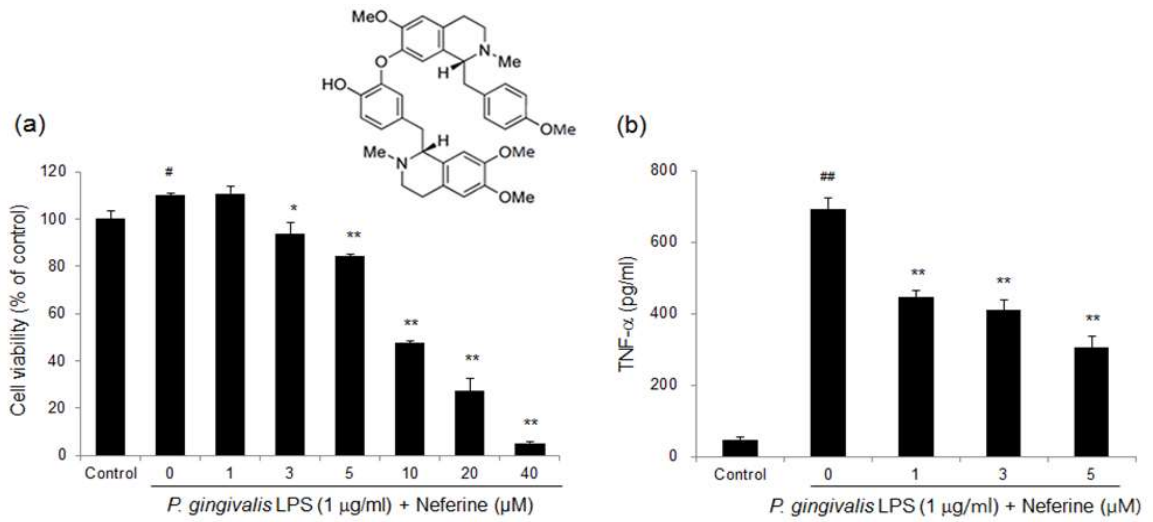


그림 54. 치주균 유래 LPS로 처리한 RAW264.7 대식 세포에서 neferine의 TNF- α 생성에 대한 억제능. a. neferine의 세포 독성, b. TNF- α 생성에 대한 억제능

(2) 파골세포 분화 및 활성화에 대한 억제능

- Neferine의 처리로 세포독성은 나타나지 않았으며, neferine 1 μ M 처리는 파골세포 형성을 증가시키나 3 μ M부터는 감소시키며, 5 μ M에서는 파골세포 분화를 29%까지 억제함. 또한 neferine은 3 또는 5 μ M에서 파골세포 분화와 관련된 유전자인 nfatc1, c-fos, DCSTAMP, ctsk의 발현을 감소시킴.

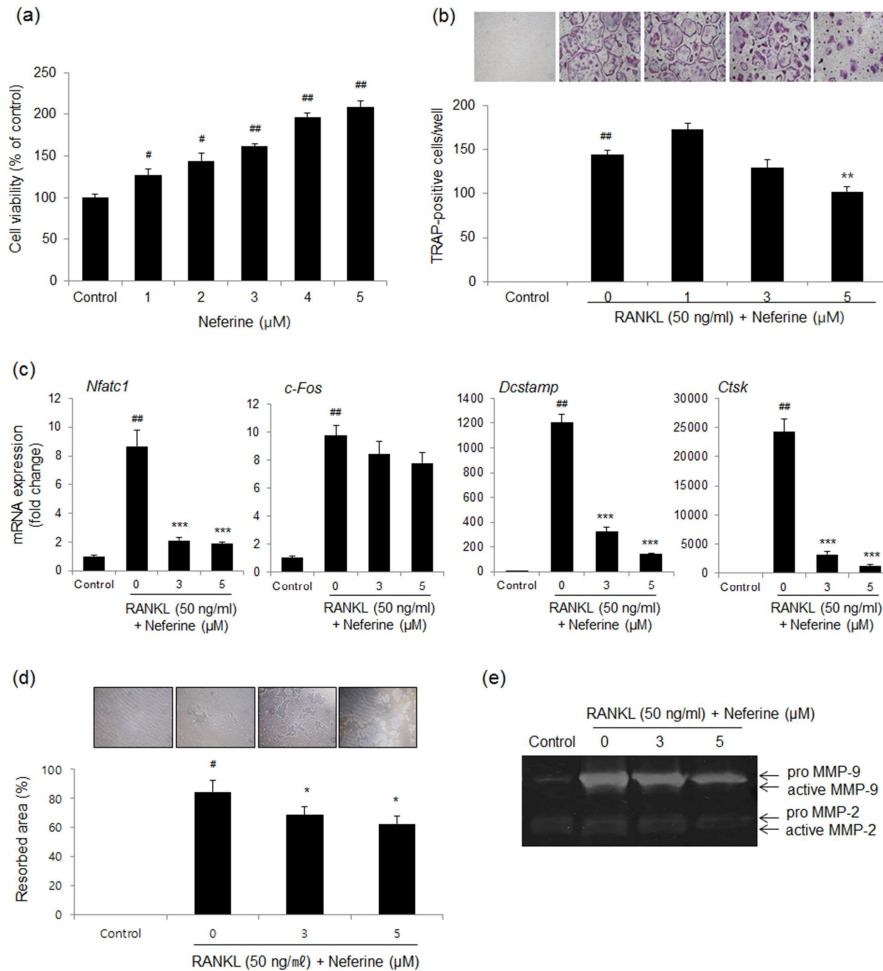


그림 55. neferine의 파골세포 형성 및 활성 억제능

a. neferine의 세포 독성

b. neferine의 파골세포 형성 억제능

c. 파골세포 분화 관련 유전자 발현 억제능

d. neferine의 골흡수 억제능

e. neferine의 뼈 기질 단백질 분해 효소의 활성 억제능

2절. 국내외 천연물들을 통한 치주건강 개선 기능성 평가를 위한 새로운 바이오마커 구축

1. 천연물 유래 치주건강 개선 기능성평가 방법 및 기술

가. 천연물의 세포 독성 조사

- 생쥐 골수 대식세포, 생쥐 조골전구세포, 생쥐 대식세포 RAW264.1 세포에 천연물을 농도별로 처리하고 MTT assay를 수행하여 세포생존율을 조사함.

나. 뼈 흡수 억제능 평가를 위해 파골세포 분화 억제능 조사

- 생쥐에서 골수 대식세포를 분리한 후, RANKL과 천연물을 처리하여 5일 동안 파골세포의 분화를 유도함. TRAP 염색을 진행하여 핵을 3개 이상 가진 세포 (파골세포)

의 수를 헤아림.

다. 파골세포 분화 관련 유전자 발현 억제능 조사

- 생쥐 골수 대식세포에 RANKL과 천연물을 48시간 처리한 후 세포들을 모아 mRNA를 분리함. Real time PCR을 수행하여 *nfatc1*, *c-fos*, *DCSTAMP*, *ctsk* 유전자의 발현을 조사함.

라. 뼈 흡수 억제능 평가를 위해 파골세포 분화 억제능 조사

- Calcium-phosphate로 코팅하여 뼈와 유사하게 만든 플레이트에서 RANKL을 처리하여 파골세포 분화를 유도한 후, 천연물을 농도별로 처리함. 세포배양액을 모아 zymography로 단백질 분해효소 MMPs의 활성을 측정함. 세포를 제거한 플레이트에서 흡수와 (resorption pit)의 면적을 측정하여 파골세포에 의한 뼈 흡수를 평가함.

마. 뼈 형성능 평가를 위해 조골세포 활성화능 조사

- 생쥐 조골전구세포에 분화배지 및 천연물을 7일간 처리한 후, 세포를 용해시킴. 원심분리하여 상등액을 얻어 cell lysate내 alkaline phosphatase (ALP) 활성을 kit를 이용하여 측정함. 분화배지와 천연물을 14일간 처리한 후 alizarin red S로 세포를 염색하여 생성된 칼슘의 양을 측정함.

바. 치주균 유래 독소 LPS 처리시 염증 사이토카인 분비 억제능 조사

- *Porphyromonas gingivalis* 치주염균 유래 LPS와 천연물을 생쥐 대식세포 RAW264.7에 24시간 동안 처리한 후, 배지내 염증성 사이토카인 TNF- α 의 양을 ELISA kit를 이용하여 측정함.

2. 치주질환 예방 및 개선소재의 기능성분석 및 효능 평가를 위한 단계별 전임상 바이오마커 발굴
가. 환자에서 분리한 치주균 *Porphyromonas gingivalis* (PG)와 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA)의 지질다당체로 치주인대 줄기세포와 치수 줄기세포를 자극한 후, 배지내로 분비된 케모카인을 array kit를 이용하여 분석함.

나. 지질다당체 처리시 분비가 유의적으로 증가된 케모카인의 파골세포, 조골세포, 염증 사이토카인 분비에 대한 작용을 조사함.

다. 환자에서 분리한 치주균 *P. gingivalis* (PG)와 *A. actinomycetemcomitans* (AA)의 지질다당체 (LPS)로 치주인대 줄기세포와 치수 줄기세포를 자극한 후 분비가 증가하는 케모카인 확인

- 환자 (1-3)에서 분리한 치주균 *P. gingivalis* (PG)와 환자 (4-6)에서 분리한 *A. actinomycetemcomitans* (AA)의 지질다당체 (LPS) 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 치주인대 줄기세포와

치수 줄기세포 각각에 24시간 처리한 후 분리된 케모카인을 멤브레인 어레이로 확인함. 치주인대 줄기세포에서는 PG-LPS에 의해 IL-6, Aa-LPS에 의해 IL-6 및 CXCL1이 증가함. 치수 줄기세포에서는 PG-LPS에 의해서는 증가된 케모카인이 없으나 Aa-LPS에 의해서는 IL-6를 비롯하여 CXCL5, CXCL10, CCL7이 증가함.

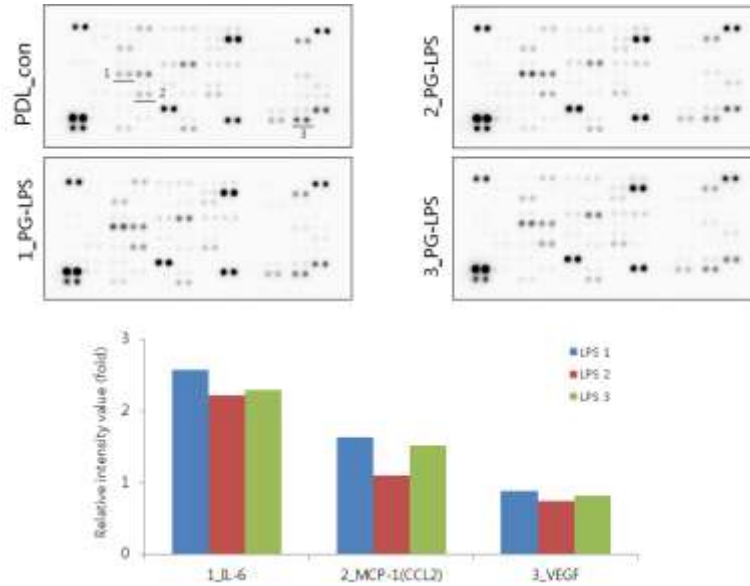


그림 56. P. gingivalis (PG)에서 분리된 LPS 처리 후 치주인대 줄기세포에서 분비되는 케모카인

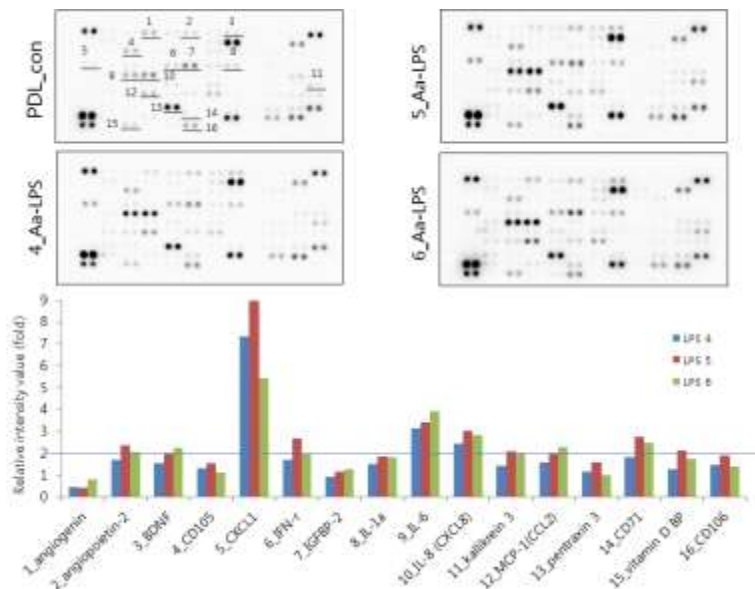


그림 57. A.actinomycetemcomitans (AA)에서 분리된 LPS 처리 후 치주인대 줄기세포에서 분비되는 케모카인

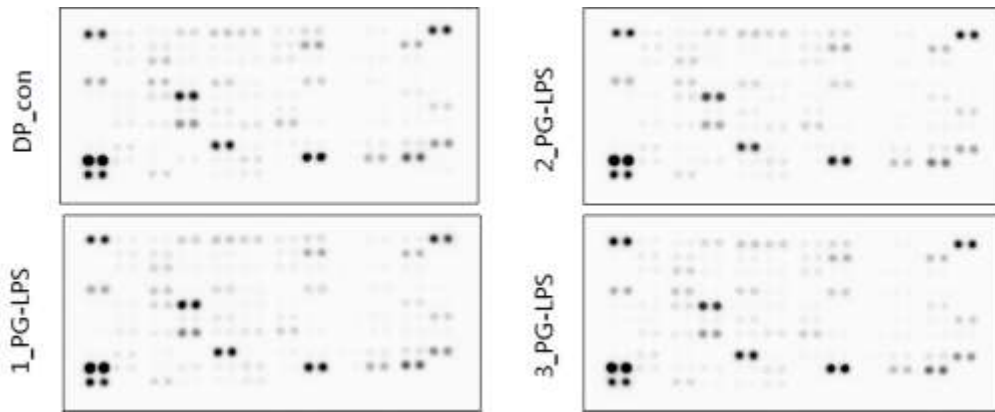


그림 58. *P. gingivalis* (PG)에서 분리된 LPS 처리 후 치수 줄기세포에서 분비되는 케모카인

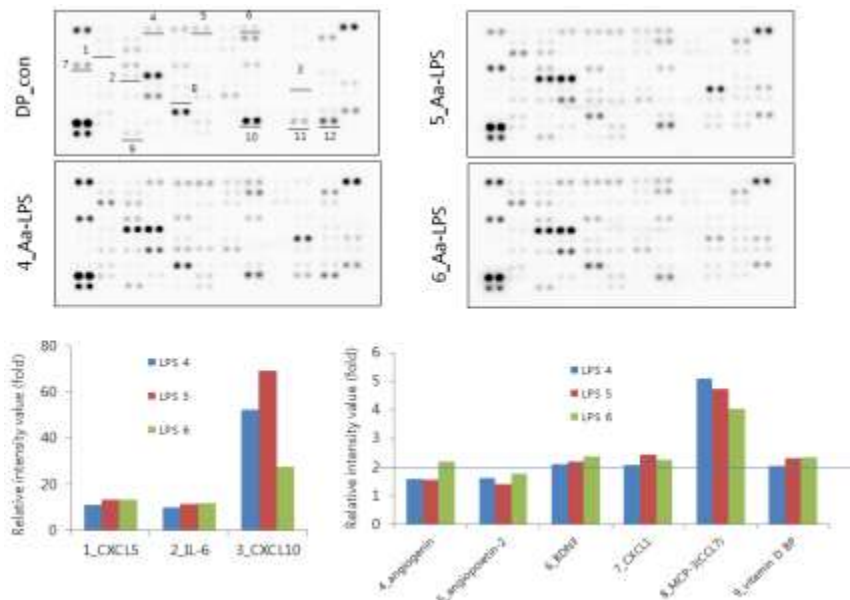


그림 59. *A. actinomycetemcomitans* (AA)에서 분리된 LPS 처리 후 치수 줄기세포에서 분비되는 케모카인

라. 선별된 케모카인의 조골세포, 염증 사이토카인 분비에 대한 작용 조사

- 치주인대 줄기세포와 치수 줄기세포에서 LPS 처리 시 분비되는 CXCL1, CXCL5, CXCL10, CCL7, IL-6의 농도를 측정된 결과, LPS를 처리하지 않은 군에 비해 모두 증가함.

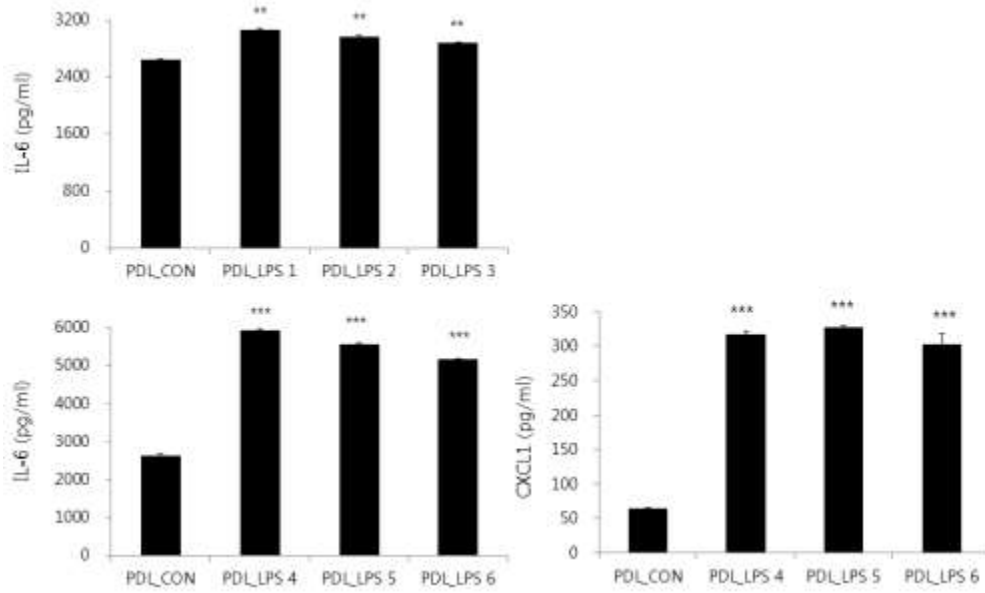


그림 60. PG-LPS 및 Aa-LPS로 자극된 치주인대 줄기세포에서 분비되는 염증 사이토카인의 양 측정

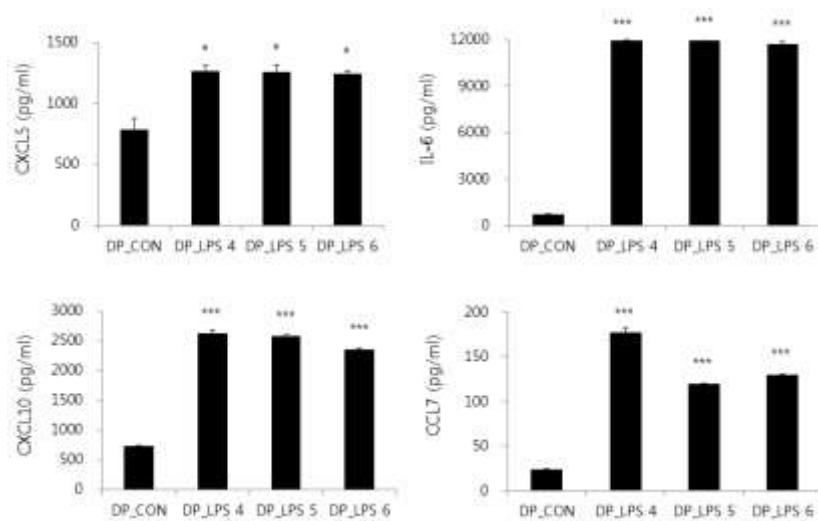


그림 61. Aa-LPS로 자극된 치수 줄기세포에서 분비되는 염증 사이토카인의 양 측정

- 휴먼조골세포 세포주인 hFOB1.19 세포에 선별된 케모카인을 각 농도별로 처리한 후 RANKL과 OPG의 농도를 측정하고, RANKL/OPG ratio를 확인함. CXCL1, CXCL5, CCL7, IL-6 처리 시 RANKL/OPG ratio가 감소함. 따라서 위 케모카인들은 조골세포로의 분화에 영향을 주는 인자로 생각됨.

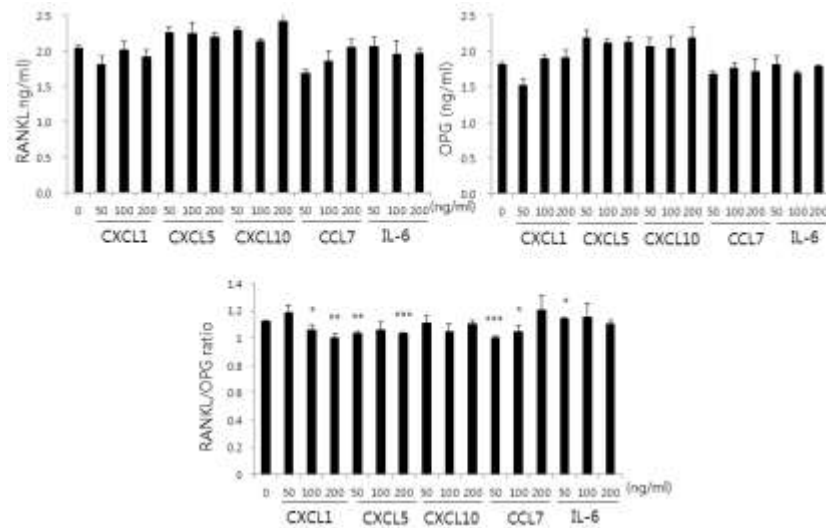


그림 62. hFOB1.19 세포주에서 분비된 RANKL/OPG ratio

3. 치주질환 및 구강관련 질환 동물 모델 구축

- SD rat 6 주령 암컷의 제 1 대구치와 2 대구치 사이에 치실을 묶어서 10일 동안 유지하여 치주염으로 인한 골손실 동물 모델을 확립함.

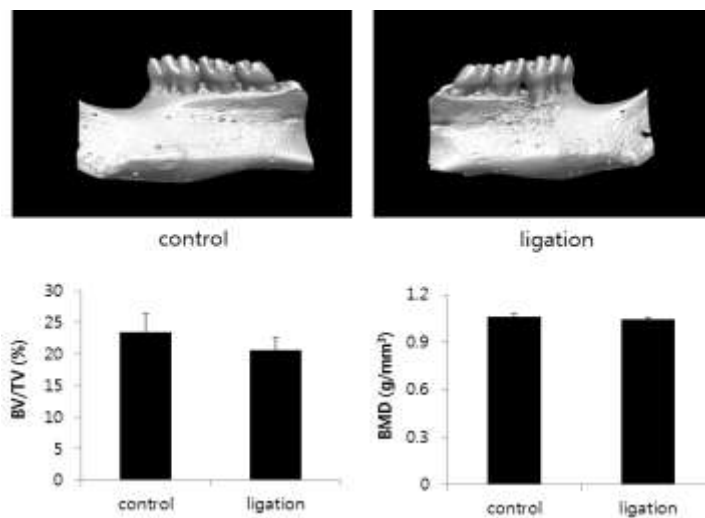


그림 63. ligation으로 유도한 치주염 동물 모델 결과

가. 치주염 동물 모델의 제작 및 확립

- 본 연구진은 치주질환 예방 및 개선에 대한 동물실험을 수행하기 위해 치주염 동물 모델을 제작하고, 확립하였음. 사용한 동물로는 6-8주령의 수컷 SD 랫드로 총 10주간 진행함. 치주염을 유발하기 위한 방법으로는 랫드의 어금니 주위로 코튼 실을 묶어서 치은열구 내로 삽입하여 미생물의 점착을 유도하여 치석을 만든 후, 치주염 유발을 증폭시키기 위하여 5주차부터 6주간 6차례 LPS 3 ul (10ug/ul)을 투여하였고, 치주염 유발 여부를 확인하기 위하여 LPS 투여 1주차부터 주 1회 간격으로

치은 치태를 확인하였음(그림 55).

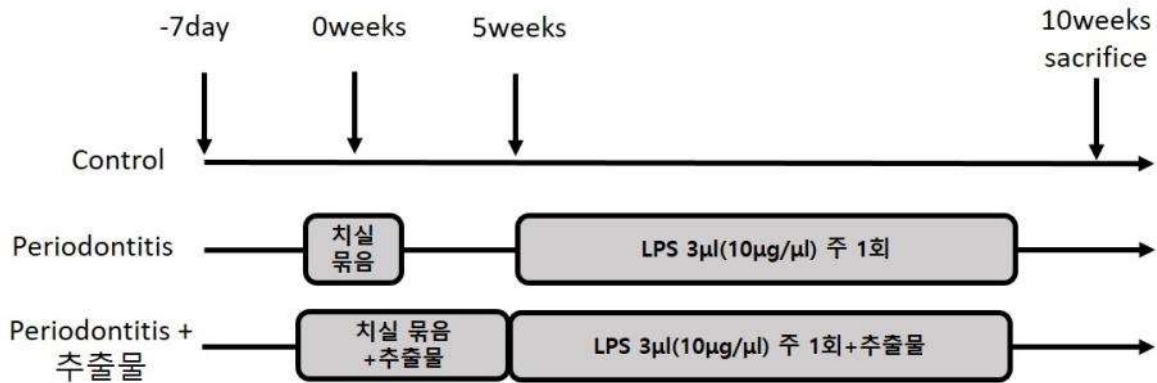


그림 64. 치주염 동물 모델 제작 방법

4. 치주질환 예방 및 개선 효능 평가를 위한 임상 바이오마커 구축 및 효능 평가 기준 확립

가. 유효성 평가를 위하여 치은지수, 치은출혈지수, 치태지수, 치주낭 탐침깊이, 임상부착 수준, 치은퇴축량, 미생물 분포를 확인하여 효능 평가함.

나. 유효성 평가를 위하여 침액 (saliva), 혈청 (serum), 치은열구액 (gingival Crevicular Fluid)를 각각 채취하고 각 지표들을 분석하여 임상시험에 사용되는 천연물의 안전성과 유효성을 각각 평가함.

다. 혈액 내 치주질환 예방 및 개선 효능 평가를 위한 바이오마커 확립

라. 임상시험용 천연 식품 추출물을 4주 동안 섭취 후 혈청 내 MMP9 (gelatinasae), Cystatins, Lysosome, Platelet activating factor (PAF) 등의 지표 변화를 확인하고자 함.

마. 침 내 치주질환 예방 및 개선 효능 평가를 위한 바이오마커 확립

- 임상시험용 천연 식품 추출물을 4주 동안 섭취 후 침내 Osteocalcin, Alkaline phosphatase (ALP)의 수치 변화를 확인함.

바. 치은열구액 내 치주질환 예방 및 개선 효능 평가를 위한 바이오마커 확립

- 임상시험용 천연 식품 추출물을 4주 동안 섭취 후 치은열구액 내 MMP8 (collagenase8), Cystatins의 수치 변화를 확인함.

3절. 치주건강 개선 효능 개선 천연물의 표준화 및 대량생산

1. 천연물 곤달비의 국내 자생종 분석 및 원물 정보 확립과 지표 분석

표 15. 곤달비의 국내 자생종 분석 결과

원재료명	학명	원재료	식품원료 사용가능여부	특성	비고
곤달비	<i>Ligularia stenocephala</i> (Maxim.) Matsum. &Koidz Ligularia: 곰취속	식물	있	국화과(Asteraceae)의 여러 해살이풀. 높이는 60~100센티미터이 며 어린잎은 먹고 뿌리는 부인병 치료에 사용되는 것으로 알려져 있음. 깊은 산의 습지에서 자라 며 한국의 전남, 일본, 타 이완, 중국 등지 분포함	식용 외 용도(이용부위): 약용(뿌리)

- 곤달비는 본 연구과정에서 밝혀진 것과 같이 치주건강개선에 매우 유효한 기능성을 보임을 확인하였음. 따라서 본 연구에서 국내 자생종에 대한 다양한 분석을 통해서 식약처 개별인정 승인 및 산업화를 위한 연구 자료를 확보하였음.

표 16. 곤달비의 생물학적 분류

생물학 적 분류	계	식물	Plantae
	문	피자식물문	Angiospermae
	강	쌍떡잎식물강	Dicotyledoneae
	목	초롱꽃목	
	과	국화과	Compositae
	속	곰취속	Ligularia

- 최근 다양한 원인에 의하여 건강기능식품 및 일반식품의 원재료에 대한 신뢰도의 확보가 중요한 만큼 본과제를 수행하는 과정에서 정확한 원물에 대한 정의와 과학적 분류가 매우 중요함. 식물은 특히 유사종이 다양하게 재배되고 있으며 그 형태학적 유전적 분류를 명확하게 하여 원물의 재배부터 철저하게 관리할 수 있는 기준을 마련하는 것이 매우 중요한 만큼 본 연구 과제를 통해 규명함.
- 다음의 분석 자료를 통해서 확인할 수 있는 것과 같이 국내 재배되는 곤달비의 정확한 형태학적 분류를 위해서 유사종으로 분류되는 동의나물이나 곰취와 비교 분석하였음. 분석 자료에서 확인할 수 있는 것과 같이 재배과정에서 엽저 부위가 곰취와 비교했을 때, V자형으로 매우 뾰족하며 줄기에 흠이 없이 둥근형을 갖는 것을 확인해볼 수 있음. 또한 잎자루 전체에 흠이 있고 자주빛인 곰취에 비해서 곤달비는 잎자루에 흠이 없고 녹색을 띠는 것을 확인할 수 있었음. 전체적으로 잎의 광택에 있어서도 동의나물이 가장 광택을 많이 가지며 곤달비는 광택이 적고 잎의 후면도 동의나물에 비해서 광택이 적은 것을 확인해볼 수 있음.

- 다음의 표는 곤달비의 지표선정을 통한 표준화 진행과정에서 추출방법에 따른 후보 compound와 함유량을 조사 연구하였음.

표 17. 곤달비와 유사종들의 후보 지표 연구조사 결과

No.	학명	Compound	Solvent	Content (mg/g)
1	<i>Ligularia stenocephala</i>	3,4-DQ	MeOH	14.5
		3,5-DmQ		77.8
		3,5-DQ		72.5
		5-CQ		194
		3-pCQ(3-O-p-coumaroyl-caffeoylquinic acids)		63.1
2	<i>Ligularia fischeri</i>	5-CQA	70% MeOH	26.7
		3,4-DCQA		17
		3,5-DCQA		49
		4,5-DCQA		9
3	<i>Ligularia fischeri</i>	Hyperoside	MeOH	0.387
		2"-Acetylhyperoside		0.526
4	<i>Ligularia fischeri</i>	Hyperoside 2"-Acetylhyperoside	MeOH	활성실험이라 함량분석은 없음.

2. 천연물 밀싹의 국내 자생종 분석 및 원물 정보 확립과 지표 분석

표 18. 밀싹의 국내 자생종 분석 결과

원재료명	학명	이명	원재료	식품원료 사용가능여부	특성	비고
밀	<i>Triticum aestivum</i> L.	소맥, wheat, 밀싹	식물	씨/싹		식용외 용도(이용부위): 약용(열매)

- 밀싹은 본 연구과정에서 밝혀진 것과 같이 치주건강개선에 매우 유효한 기능성을 갖음을 확인하였음. 따라서 본 연구에서 국내 자생종에 대한 다양한 분석을 통해서 식약처 개별인정 승인 및 산업화를 위한 연구 자료를 확보하였음.

표 19. 밀싹의 생물학적 분류

생물학적 분류	계	식물	Plantae
	문	현화식물문	Anthophyta
	강	외떡잎식물	Monocotyledoneae

	목	벼목	Poales
	과	화분과	Poaceae
	속	밀속	Triticum

- 최근 다양한 원인에 의하여 건강기능식품 및 일반식품의 원재료에 대한 신뢰도의 확보가 중요한 만큼 본 과제를 수행하는 과정에서 정확한 밀싹에 대한 정의와 과학적 분류가 매우 중요한 만큼 원물의 종자와 생산과 관리 기준을 마련함.
- 다음의 표는 밀싹 추출물의 지표선정을 통한 표준화 진행과정에서 추출방법에 따른 후보 compound와 함유량을 조사 연구하였음.

표 20. 밀싹 유사종들의 추출물내 후보 지표 연구조사 결과

No.	학명	Compound	Solvent	Content (mg/g)
1	<i>Triticum aestivum</i> L.	Chlorogenic acid	Hexane	0.3
		Rutin		3.5
		Gallic acid	Chloroform	5.5
		Tocopherol	MeOH	191.7
		Cinnamic acid	Water	1.5
2	<i>Triticum aestivum</i> (Linn.)	Quercetin	Water	Chromatographic study
3	<i>Triticum aestivum</i> L.	Triticumoside	MeOH	Unknown
		isoorientin		
4	<i>Triticum aestivum</i> L.	Caffeic acid	EtOH	1.0 ± 0.4 µg/g
		Syringic acid		196.4 ± 6.9 µg/g
		p-Coumaric acid		2.2 ± 0.5 µg/g
		Ferulic acid		13.1 ± 1.1 µg/g
		Sinapic acid		48.8 ± 1.9 µg/g
5	<i>Triticum aestivum</i> L. cv Orso	4-hydroxybenzoic acid	MeOH	1.26 µg/g
		vanillic acid		2.42 µg/g
		caffeic acid		2.24 µg/g
		syringic acid		2.27 µg/g
		p-coumaric acid		18.8 µg/g
		trans-ferulic acid		225.7 µg/g

4. 천연물 곤달비 추출물의 지표분석 방법 및 결과
가. 실험 방법 구축

- ① 시료 약 0.2g을 취함.
- ② 30% MeOH 로 25 mL을 가함.
- ③ 위의 용액을 30분 동안 초음파 추출함.
- ④ 추출이 끝난 후 실온에서 냉각시킴.
- ⑤ 초음파 추출 후 용액을 충분히 냉각시킴.
- ⑥ 0.45 μ m filter로 여과 후 시험용액으로 사용함.

표 21. 곤달비추출물 HPLC 분석 조건

■ HPLC 분석조건			
Instrument:	YL9100 HPLC system		
Detector:	UV detector		
Wavelength:	330nm		
Column:	Supelco discovery C18(250mm x 4.6mm, 5 μ m)		
Column temperature:	40°C		
Injection volume:	5 μ L		
Flow rate:	1.4 ml/min		
Mobile phase:	Solvent A: Phosphoric acid/D.W=0.5/99.5 (v/v) Solvent B: Phosphoric acid/Acetonitrile=0.5/99.5 (v/v)		
	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
	0	95	5
	7	95	5
	27	70	30
	28	10	90
	30	10	90
	31	95	5
	40	95	5

- 본 과제를 수행하는 과정에서 곤달비 내 다양한 지표 가능 성분들의 성분분석을 위한 분석방법을 구축 완료하였음.

나. 곤달비 분석을 통한 다양한 함유 성분 분석

표 22. 곤달비추출물 내 다양한 지표성분 후보군의 함량 분석

No.	검 체 명	지표성분	함량 (mg/g)
1	곤달비 추출물	Chlorogenic acid	1.493
2		Caffeic acid	0.159
3		Rutin	1.107
4		Rosmarinic acid	0.113

6. 천연물 밀싹 추출물의 지표분석 방법 및 결과

가. 실험 방법 구축

- ① 시료 약 0.2g을 취함.
- ② 50% MeOH 로 25ml을 가함.
- ③ 위의 용액을 30분 동안 초음파 추출함.
- ④ 추출이 끝난 후 실온에서 냉각 시킴.
- ⑤ 초음파 추출 후 용액을 충분히 냉각시킴.
- ⑥ 0.45 um filter로 여과 후 시험용액으로 사용함.

표 23. 밀싹추출물 HPLC 분석 조건

■ HPLC 분석조건																									
Instrument:	YL9100 HPLC system																								
Detector:	UV detector																								
Wavelength:	330nm																								
Column:	Supelco discovery C18(250mm x 4.6mm, 5 μm)																								
Column temperature:	40°C																								
Injection volume:	5 uL																								
Flow rate:	1.4 ml/min																								
Mobile phase:	Solvent A: Phosphoric acid/D.W=0.5/99.5 (v/v) Solvent B: Phosphoric acid/Acetonitrile=0.5/99.5 (v/v)																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>Solvent A (%)</th> <th>Solvent B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>27</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>28</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	0	95	5	7	95	5	27	70	30	28	10	90	30	10	90	31	95	5	40	95	5
Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)																							
0	95	5																							
7	95	5																							
27	70	30																							
28	10	90																							
30	10	90																							
31	95	5																							
40	95	5																							

- 본 과제를 수행하는 과정에서 밀싹 내 다양한 지표 가능 성분들의 성분분석을 위한 분석방법을 구축 완료하였음.

나. 밀싹 분석을 통한 다양한 함유 성분 분석

표 24. 밀싹추출물 내 다양한 지표성분 후보군의 함량 분석

No.	검 체 명	지표성분	함량 (mg/g)
1	밀싹 추출물	Chlorogenic acid	0.256
2		Caffeic acid	0.101
3		Rutin	0.537
4		Rosmarinic acid	0.083

7. 확보한 천연물 소재의 지표물질로서 Rosmarinic acid 분석

- 본 연구진은 HPLC 분석결과에서 곤달비 추출물과 Rosmarinic acid 표준품 분석 그래프 (파란색)와 비교하여 곤달비 추출물 단독 분석 그래프 (빨간색)에서 Rosmarinic acid 동일 피크를 확인할 수 있었음. 이를 정량화한 결과, 곤달비 추출물은 Rosmarinic acid을 0.113mg/g 농도로 함유하고 있는 결과를 나타냈음 (그림 62).
- 본 연구진은 HPLC 분석결과에서 밀싹 추출물과 Rosmarinic acid 표준품 분석 그래프 (파란색)와 비교하여 밀싹추출물 단독 분석 그래프 (빨간색)에서 Rosmarinic acid 동일 피크를 확인할 수 있었음. 본 연구결과에서 밀싹 추출물 내 Rosmarinic acid가 미량 검출 되었으며 이를 정량화한 결과, 밀싹추출물은 Rosmarinic acid를 0.083mg/g 농도로 함유하고 있는 결과를 나타냈음 (그림 63).
- 결론적으로 곤달비 추출물과 밀싹 추출물 모두 Rosmarinic acid를 미량 함유하고 있으므로 지표물질로 적당하지 않음.

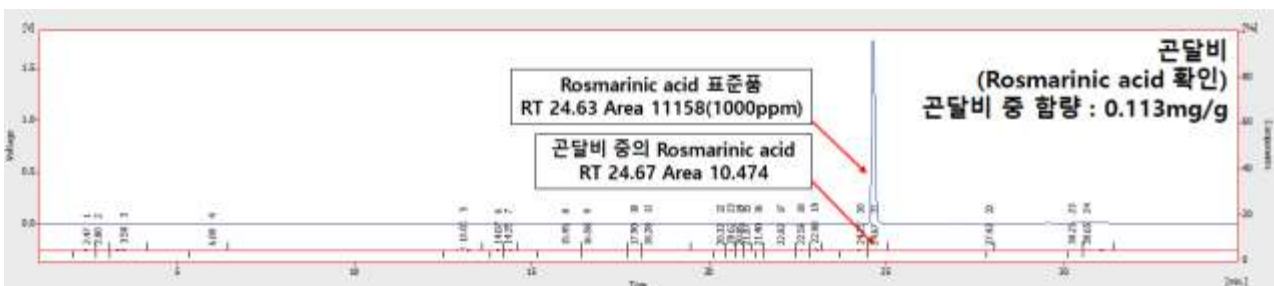


그림 65. 곤달비 추출물 내 Rosmarinic acid 분석 결과

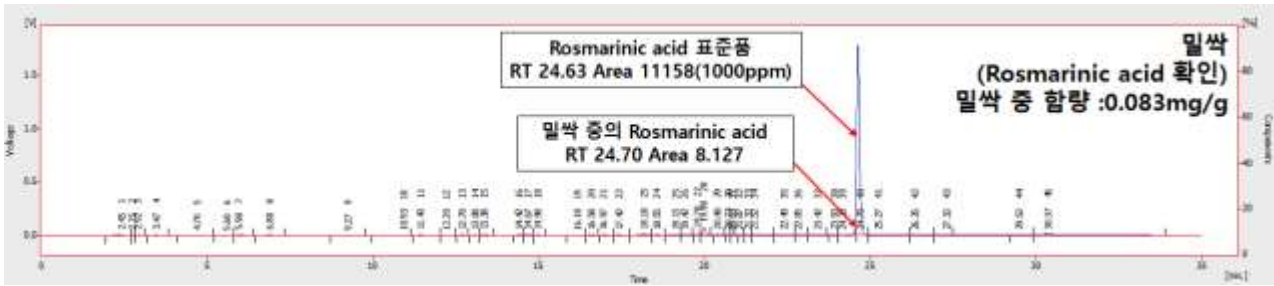


그림 66. 밀싹 추출물 내 Rosmarinic acid 분석 결과

8. 확보한 천연물 소재의 지표물질로서 Rutin 분석

- 본 연구진은 HPLC 분석결과에서 곤달비 추출물과 Rutin 표준품 분석 그래프(파란색)와 비교하여 곤달비 추출물 단독 분석 그래프(빨간색)에서 Rutin 동일 피크를 확인할 수 있었음. 이를 정량화한 결과, 곤달비 추출물은 Rutin을 1.017mg/g 농도로 함유하고 있는 결과를 나타냈음 (그림 64).
- 본 연구진은 HPLC 분석결과와 같이 밀싹 추출물과 Rutin 표준품 분석 그래프(파란색)와 비교하여 밀싹 추출물 단독 분석 그래프(빨간색)에서 Rutin 동일 피크를 확인할 수 있었음. 본 연구결과에서 밀싹 추출물 내 Rutin이 미량 검출 되었으며 이를 정량화한 결과, 밀싹 추출물은 Rutin을 0.537mg/g 농도로 함유하고 있는 결과를 나타냈음 (그림 65).
- 결론적으로 곤달비 추출물과 밀싹 추출물 모두 Rutin을 함유하고 있으므로 지표물질로 적당하지 않음.

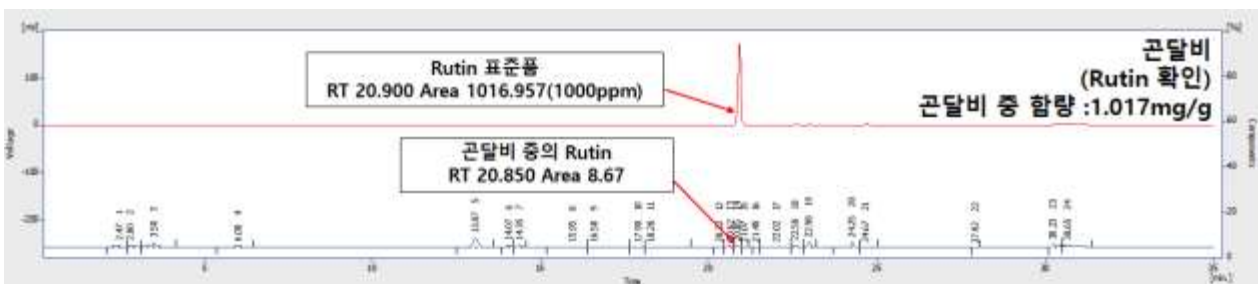


그림 67. 곤달비 추출물 내 Rutin 분석 결과

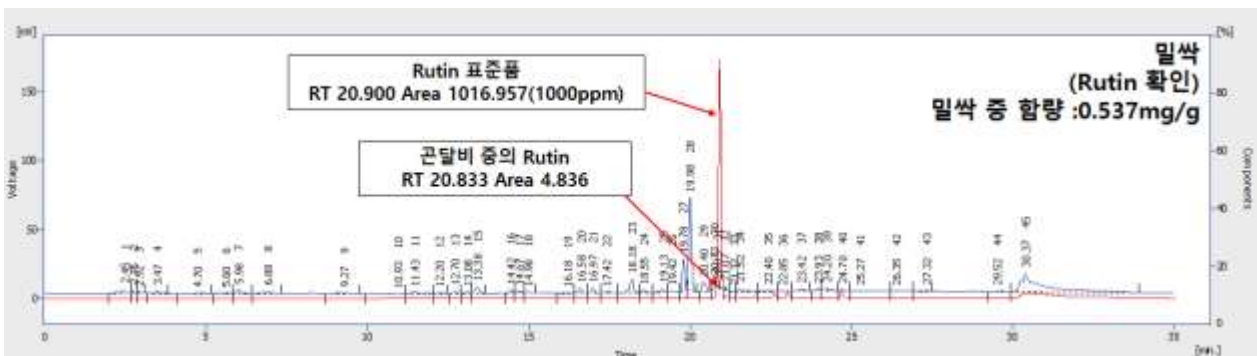


그림 68. 밀싹 추출물 내 Rutin 분석 결과

9. 확보한 천연물 소재의 지표물질로서 Caffeic acid 분석

- 본 연구진은 HPLC 분석결과에서 곤달비 추출물과 Caffeic acid 표준품 분석 그래프 (빨간색)와 비교하여 곤달비 추출물 단독 분석 그래프 (파란색)에서 Caffeic acid 동일 피크를 확인할 수 있었음. 이를 정량화한 결과, 곤달비 추출물은 Caffeic acid를 0.159mg/g 농도로 함유하고 있는 결과를 나타냈음 (그림 66).
- 본 연구진은 HPLC 분석결과에서 밀싹 추출물과 Caffeic acid 표준품 분석 그래프 (빨간색)와 비교하여 밀싹 추출물 단독 분석 그래프(파란색)에서 Caffeic acid 동일 피크를 확인할 수 있었음. 본 연구결과에서 밀싹 추출물 내 Caffeic acid이 미량 검출 되었으며 이를 정량화한 결과, 밀싹 추출물은 Caffeic acid을 0.101mg/g 농도로 함유하고 있는 결과를 나타냈음 (그림 67).
- 결론적으로 곤달비 추출물과 밀싹 추출물 모두 Caffeic acid를 미량 함유하고 있으므로 지표물질로 적당하지 않음.

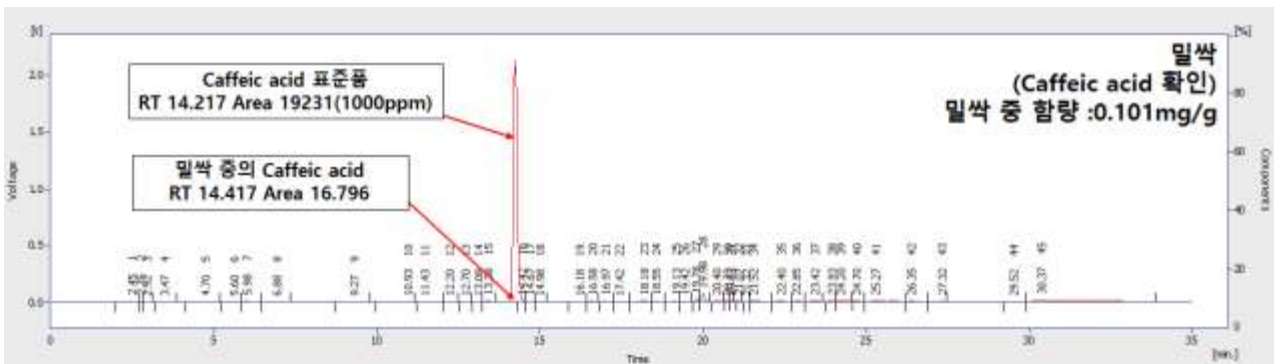


그림 69. 밀싹 추출물 내 Caffeic acid 분석 결과

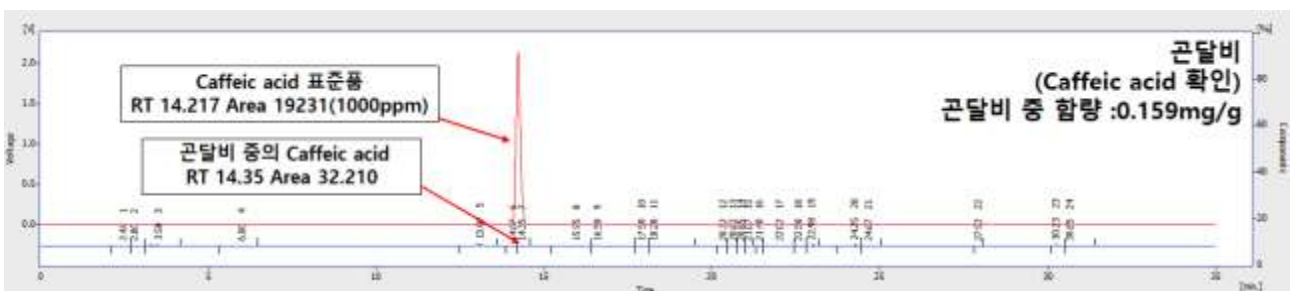


그림 70. 곤달비 추출물 내 Caffeic acid 분석 결과

10. 확보한 천연물 소재의 지표물질로서 Chlorogenic acid 분석

- 본 연구진은 HPLC 분석결과에서 곤달비 추출물과 Chlorogenic acid 표준품 분석 그래프 (파란색)와 비교하여 곤달비 추출물 단독 분석 그래프 (빨간색)에서 Chlorogenic acid 동일 피크를 확인할 수 있었음. 이를 정량화한 결과, 곤달비 추출물은 Chlorogenic acid를 1.493mg/g 농도로 함유하고 있는 결과를 나타냈음 (그림 68).

- 본 연구진은 HPLC 분석결과에서 밀싹 추출물과 Chlorogenic acid 표준품 분석 그래프 (파란색)와 비교하여 밀싹 추출물 단독 분석 그래프 (빨간색)에서 Chlorogenic acid 동일 피크를 확인할 수 있었음. 본 연구결과에서 밀싹 추출물 내 Chlorogenic acid가 미량 검출 되었으며 이를 정량화한 결과, 밀싹 추출물은 Chlorogenic acid를 0.256mg/g 농도로 함유하고 있는 결과를 나타냈음 (그림 69).
- 결론적으로 곤달비 추출물과 밀싹 추출물 모두 Chlorogenic acid를 미량 함유하고 있으므로 지표물질로 적당하지 않음.

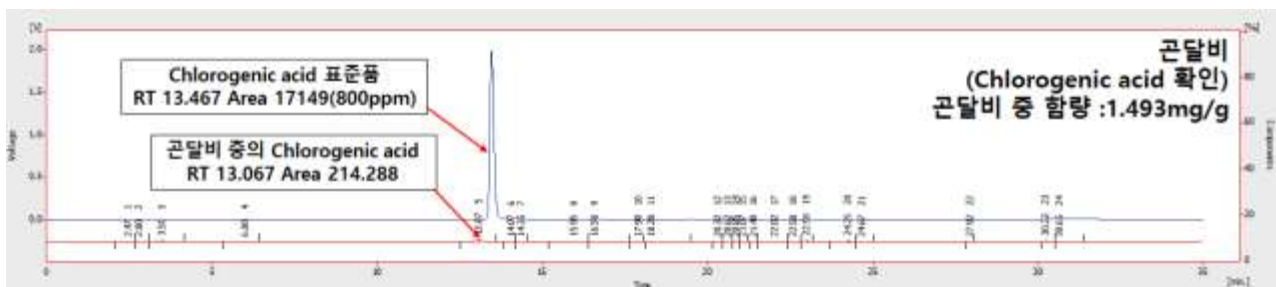


그림 71. 곤달비 추출물 내 Chlorogenic acid 분석 결과

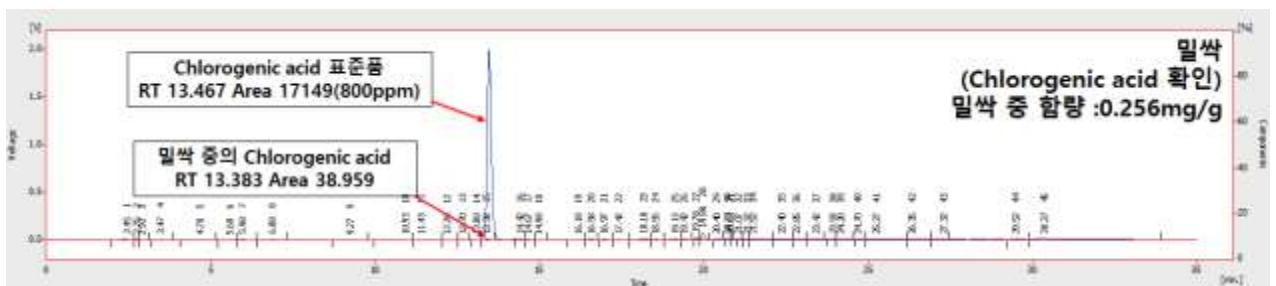


그림 72. 밀싹 추출물 내 Chlorogenic acid 분석 결과

11. 확보한 천연물 소재의 지표물질로서 Hyperoside 분석

- 본 연구진은 HPLC 분석결과에서 곤달비 추출물과 Hyperoside 표준품 분석 그래프 (파란색)와 비교하여 곤달비 추출물 단독 분석 그래프 (빨간색)에서 Hyperoside 동일 피크를 확인할 수 있었음. 이를 정량화한 결과, 곤달비 추출물은 Hyperoside를 1.005mg/g 농도로 함유하고 있는 결과를 나타냈음 (그림 70).
- 본 연구진은 HPLC 분석결과에서 밀싹 추출물과 Hyperoside 표준품 분석 그래프 (빨간색)와 비교하여 밀싹 추출물 단독 분석 그래프 (파란색)에서 Hyperoside 동일 피크를 확인할 수 있었음. 본 연구결과에서 밀싹 추출물 내 Hyperoside가 미량 검출 되었으며 이를 정량화한 결과, 밀싹 추출물은 Hyperoside를 2.317mg/g 농도로 함유하고 있는 결과를 나타냈음 (그림 71).
- 결론적으로 곤달비 추출물과 밀싹 추출물 모두 Hyperoside를 미량 함유하고 있으므

로 지표물질로 적당하지 않음.

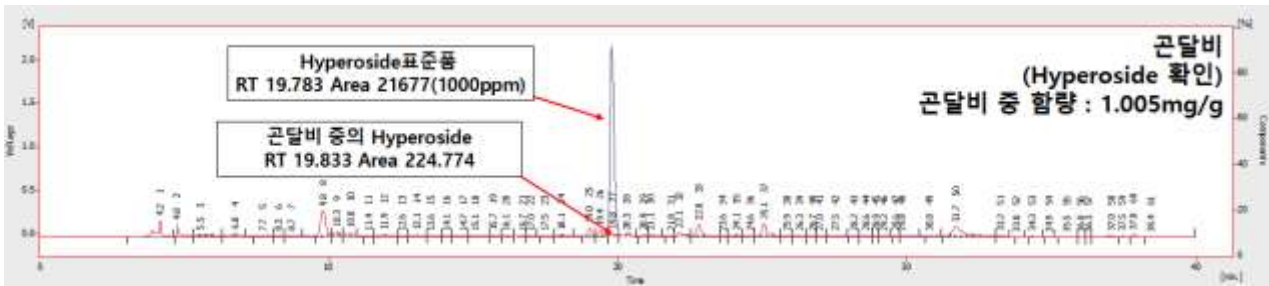


그림 73. 곤달비 추출물 내 Hyperoside 분석 결과

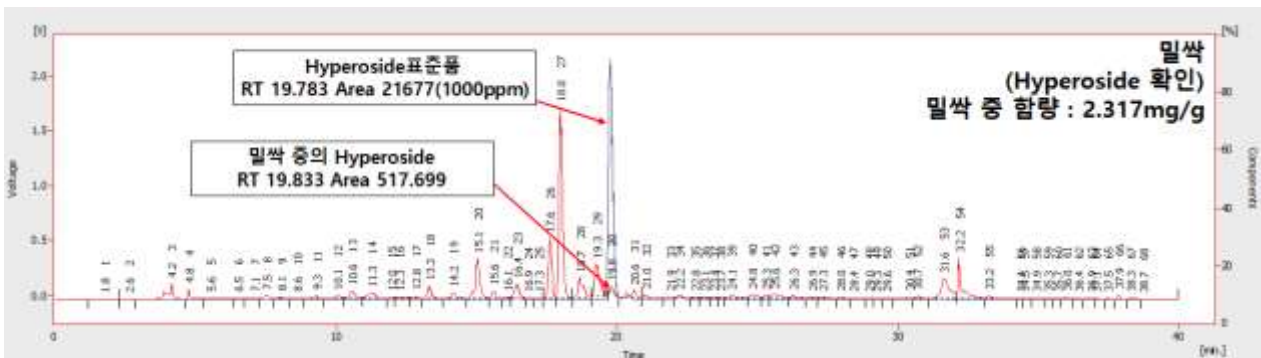


그림 74. 밀삭 추출물 내 Hyperoside 분석 결과

12. 확보한 천연물 소재의 지표물질로서 Vitexin 분석

- 본 연구진은 HPLC 분석결과에서 곤달비 추출물과 Vitexin 표준품 분석 그래프 (파란색)와 비교하여 곤달비 추출물 단독 분석 그래프 (빨간색)에서 Vitexin 동일 피크를 확인할 수 없었으므로 불검출된 결과를 나타냈음 (그림 72).
- 본 연구진은 HPLC 분석결과에서 밀삭 추출물과 Vitexin 표준품 분석 그래프 (파란색)와 비교하여 밀삭 추출물 단독 분석 그래프 (빨간색)에서 Vitexin 동일 피크를 확인할 수 있었음. 본 연구결과에서 밀삭 추출물 내 Vitexin이 검출 되었으며 이를 정량화하려고 했으나, Peak 분리가 되지 않아 정량은 하지 못함 (그림 73).
- 따라서 곤달비 추출물에서는 Vitexin이 검출되지 않았지만 밀삭 추출물은 Vitexin을 함유하고 있고, 또한 밀삭 추출물의 Vitexin peak와 Vitexin 표준품 UVspectrum 패턴이 일치하므로 (그림 74) Vitexin이 밀삭 추출물의 지표 후보 물질로 타당함.



그림 75. 곤달비 추출물 내 Vitexin 분석 결과

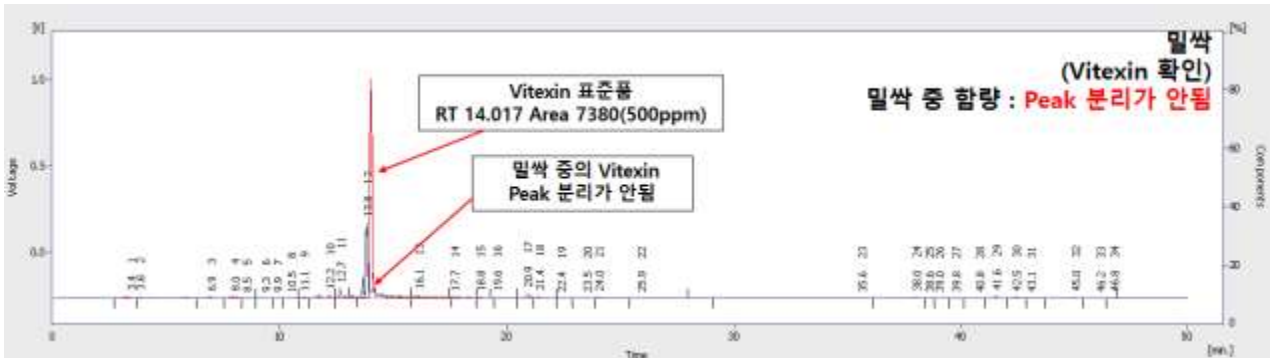


그림 76. 밀삭 추출물 내 Vitexin 분석 결과

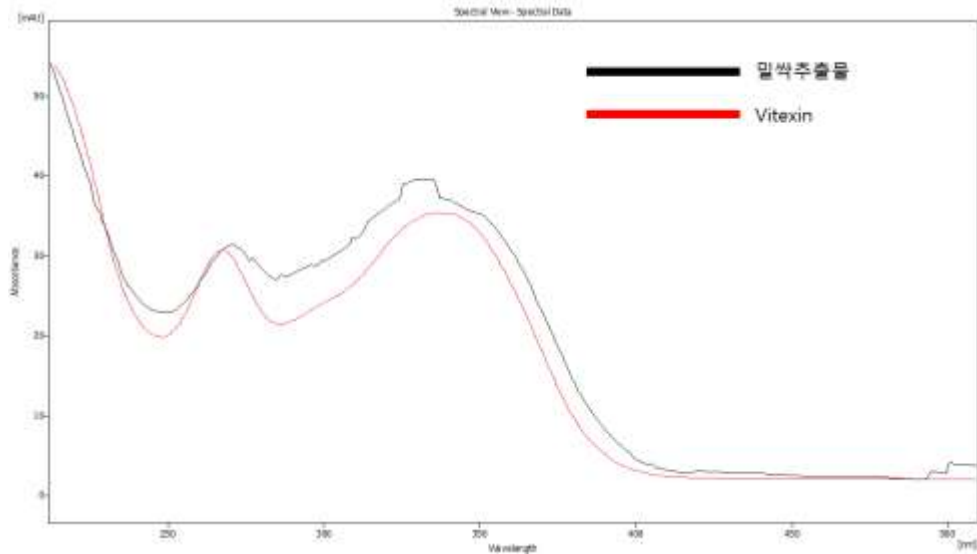


그림 77. 밀삭 추출물 내 Vitexin peak와 Vitexin 표준품 UV spectrum 비교 분석

표 25. 곤달비, 밀삭 지표물질 후보군들의 검토내용 요약표

Compound 명	검토결과		함량 (mg/g)		결론
	곤달비	밀삭	곤달비	밀삭	
1 Rosmarinic acid	곤달비 밀삭에 미량 함	곤달비 밀삭에 미량	0.113mg/g	0.083mg/g	불가

	Compound 명	검토결과		함량 (mg/g)		결론
		곤달비	밀싹	곤달비	밀싹	
		유 (곤달비에 1.0 mg/g 미만의 미량으로 함유되어 지표성분으로 타당하지 않음)	함유 (밀싹에 1.0 mg/g 미만의 미량으로 함유되어 지표성분으로 타당하지 않음)			
2	Rutin	밀싹에 미량 함유	곤달비에도 있음 (밀싹에 1.0 mg/g 미만의 미량으로 함유되어 지표성분으로 타당하지 않음)	1.017mg/g	0.537mg/g	불가
3	Caffeic acid	곤달비 밀싹에 미량 함유 (곤달비에 1.0 mg/g 미만의 미량으로 함유되어 지표성분으로 타당하지 않음)	곤달비 밀싹에 미량 함유 (밀싹에 1.0 mg/g 미만의 미량으로 함유되어 지표성분으로 타당하지 않음)	0.159mg/g	0.101mg/g	불가
4	-	밀싹에 있음	곤달비에 있음 (밀싹에 1.0 mg/g 미만의 미량으로 함유되어 지표성분으로 타당하지 않음)	1.493mg/g	0.256mg/g	불가
5	Hyperoside	밀싹에 있음	곤달비에 있음	1.005mg/g	2.317mg/g	불가
6	-	불검출	밀싹에서 검출 곤달비에서 불검출	불검출	검출되었으나 Peak분리가 안되어 정량불가	가능

Compound 명	검토결과		함량 (mg/g)		결론	
	곤달비	밀싹	곤달비	밀싹		
7	Vanillin	곤달비 밀싹에 미량 함유 (곤달비에 1.0 mg/g 미만의 미량으로 함유되어 지표성분으로 타당하지 않음)	곤달비 밀싹에 미량 함유 (밀싹에 1.0 mg/g 미만의 미량으로 함유되어 지표성분으로 타당하지 않음)	0.0594mg/g	0.0411mg/g	불가
8	Ursolic acid					불가
9	Oleanolic acid					불가

3절. 최종 선정된 곤달비 및 밀싹 추출 복합물의 전임상 효능

1. 치주인대세포 (DPDL cells) 배양 및 독성 평가 기준 확립

- 본 연구진은 ‘세포바이오’에서 치주인대세포인 DPDL cells를 구입하여 세포배양접시에 부착시키고, penicillin, streptomycin 및 amphotericin-B가 함유된 1% antibacterial-antifungal solution과 10% FBS를 첨가한 PDL을 배지로 하여, 세포의 상태에 따라 2-3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 5계대까지 배양하여 실험에 사용하였음. 세포 배양 시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 5% 이산화탄소를 포함한 공기 조건에서 배양함.
- 천연물 소재에 대한 치주인대세포에서의 독성 시험 평가를 수행하기 위해 치주인대세포에 DNA 손상, Lipid peroxidation, 단백질 손상, 효소산화 및 pro-inflammatory cytokine 유리 등을 통하여 조직 손상을 야기하는 것으로 알려져 있는 활성산소의 종류인 과산화수소를 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 uM 농도 별로 처리한 후, WST를 이용한 EZ-CYTOX를 통해 치주인대세포의 세포생존력을 관찰함으로써 독성 시험 평가에서 세포생존력의 기준이 될 수 있는 과산화수소의 농도를 결정함.
- 치주인대세포는 과산화수소에 대해 농도에 의존하여 세포생존력이 점점 감소하는

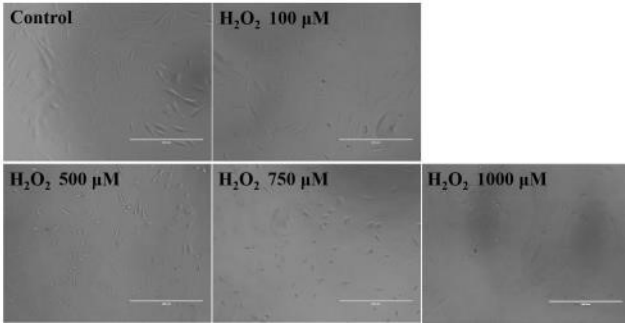


그림 78. 농도별 과산화수소 처리 6시간 후, 치주인대세포의 변화

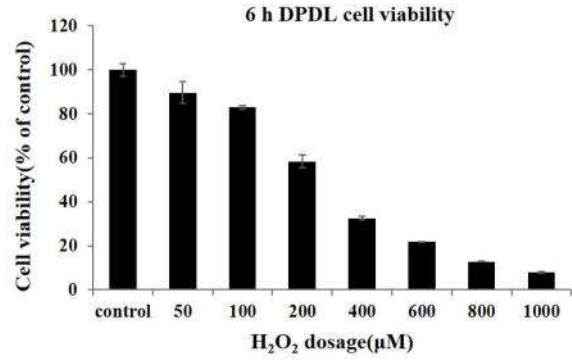


그림 79. 농도별 과산화수소 처리 6시간 후, 치주인대세포의 생존력 변화

결과를 나타냈으며, 따라서 실험에 적절하게 활용할 과산화수소의 농도는 세포생존력이 약 50% 정도로 나타날 것으로 보이는 300 uM으로 결정함 (그림 78-79).

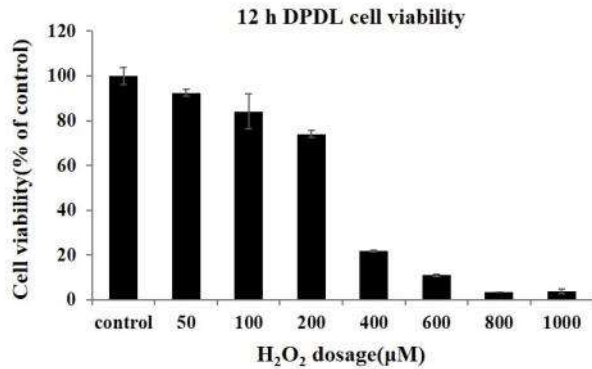


그림 80. 농도별 과산화수소 처리 12시간 후, 치주인대세포의 생존력 변화

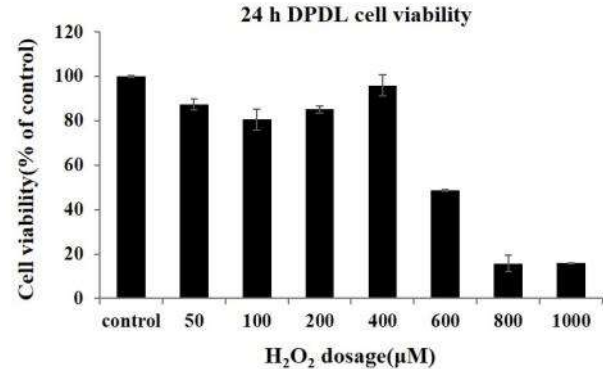


그림 81. 농도별 과산화수소 처리 24시간 후, 치주인대세포의 생존력 변화

2. 치수 줄기세포 (SHED cells) 배양 및 시료 투여 후 효능 평가

- 본 연구진은 ‘세포바이오’에서 치수 줄기세포인 SHED cells를 구입하여 세포배양접시에 부착시키고, penicillin, streptomycin 및 amphotericin-B가 함유된 1% antibacterial-antifungal solution과 10% FBS를 첨가한 DPSC을 배지로 하여, 세포의 상태에 따라 2-3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 5계대까지 배양하여 실험에 사용하였음. 세포 배양 시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 5% 이산화탄소를 포함한 공기 조건에서 배양함.
- 천연물 소재로서 곤달비와 밀싹 추출물에 대한 효능 평가를 수행하기 위해 치수 줄기세포에 10, 20, 50, 100, 200, 400 ug/ml의 다양한 농도의 곤달비+밀싹 추출물을 처리하고 6시간, 12시간, 24시간에 따른 세포증식 결과를 확인하였음.

- 다양한 농도의 곤달비+밀짚 추출물 처리 후 6시간에서의 치수 줄기세포 증식 결과는 농도에 따라 약간의 증가가 나타나기는 했지만 대조군과 비교하여 크게 유의성 있는 결과를 나타내지는 않았음 (그림 79). 그러나 곤달비+밀짚 추출물 처리 후 12시간에서는 대조군 결과에 비교하여 세포 증식이 나타났고, 24시간에서는 곤달비+밀짚 추출물을 처리한 군에서 확연히 치수 줄기세포가 증식된 결과를 보였음 (그림 79-82). 200 ug/ml의 곤달비+밀짚 추출물을 처리했을 때 세포가 가장 많이 증식되었고, 그 이상인 400 ug/ml에서는 대조군에 비해서 세포 증식이 증가하긴 했지만 200 ug/ml을 처리한 군 보다는 증식률이 확연히 줄어든 결과를 보였음. 이러한 연구결과를 통해 천연물 소재인 곤달비+밀짚 추출물의 세포 증식 효능을 확인함.

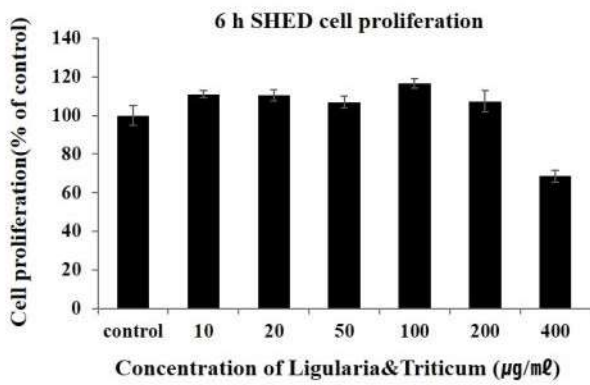


그림 82. 농도별 추출물 처리 6시간 후, 치수 줄기세포 증식률 변화

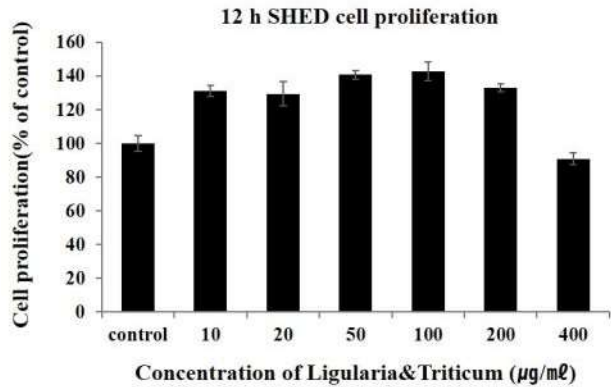


그림 83. 농도별 추출물 처리 12시간 후, 치수 줄기세포 증식률 변화

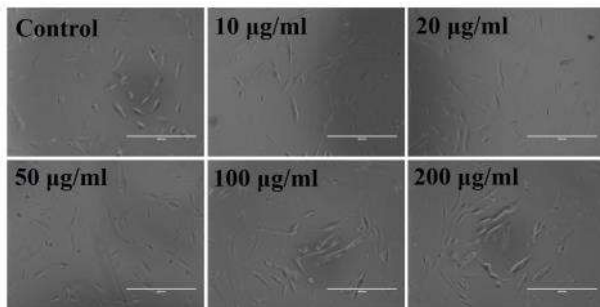


그림 84. 농도별 추출물 처리 24시간 후, 치수 줄기세포 증식 변화

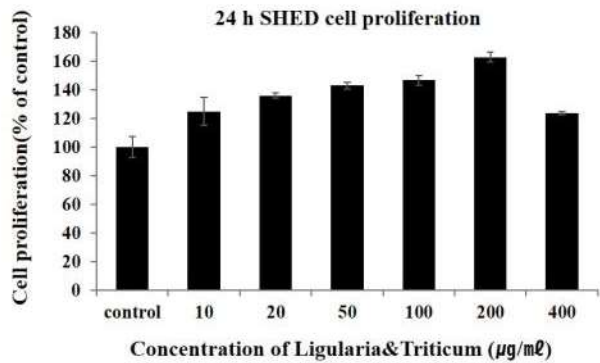


그림 85. 농도별 추출물 처리 24시간 후, 치수 줄기세포 증식률 변화

3. 치수 줄기세포에 천연물 소재 처리 후 효능 평가를 위한 western blot 분석법 시행

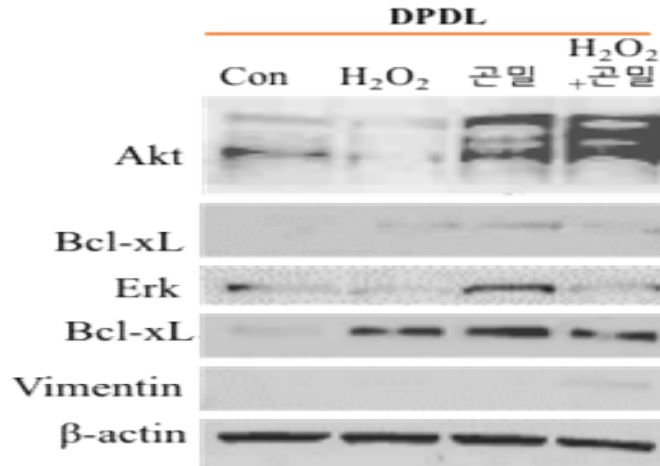


그림 86. 과산화수소 및 천연물소재 처리 후 증식활성화 분자적 발현 양상 분석

- 본 연구진은 곤달비와 밀싹의 추출 복합물 처리에 의해서 치주건강개선 작용기전을 확인하는 과정에서 줄기세포의 활성화를 통해서 조직재생을 촉진하는 결과를 확인하였음. 이에 줄기세포의 증식 개선에 어떤 작용기전을 통해서 발생하는 지 확인하기 위하여 다양한 분자적 단백질 발현을 확인하였음. 이에 Akt의 발현이 곤달비와 밀싹 추출복합물을 처리한 경우 대조군 및 과산화수소 처리군 대비 현저히 증가하는 것을 확인하였음. 또한 Erk의 발현도 통계적으로 유의하게 증가함으로써 줄기세포의 증식에 영향을 미치는 것으로 확인하였음.

4. 밀싹 및 곤달비에 대한 파골세포 형성 억제능 조사

- 세포독성과 파골세포 형성 억제능은 위와 같은 실험 방법으로 진행함. 밀싹 및 곤달비 추출물은 20, 40, 60, 80 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 희석하고 세포배양에 처리함. 밀싹, 곤달비 및 혼합물은 추출물을 처리하지 않은 군에 비해 모두 100% 이상 세포 생존율을 보였으며 (그림 84), 이 중 10, 20, 40 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 처리하여 파골세포 형성 억제능을 살펴봄. 밀싹을 처리한 군은 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의하게 파골세포 형성이 억제되었으나, 40 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 유의한 감소를 보이지 않음. 곤달비 및 밀싹과 곤달비의 혼합물을 처리한 군은 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의하게 파골세포 형성이 억제되었으나, 20 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 유의한 감소를 보이지 않음 (그림 85).
- 골흡수 및 뼈 기질 분해 효소의 활성 억제능도 위와 같은 실험 방법으로 진행함. 밀싹 및 곤달비 추출물은 20 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 희석하고 세포배양에 처리함. RANKL을 처리한 군의 경우에는 음성대조군과 비교하여 흡수 구멍의 생성이 현저히 증가하였음. 밀싹, 곤달비 및 그 혼합물을 처리한 군에서 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 19%, 18%, 28 %로 RANKL을 처리한 군에 비해 파골세포에 의해 형성되는 흡수 구멍의 생성이 감소하였음 (그림 86). MMP-2의 활성과 MMP-9의 활성은 zymography로 확인함. RANKL을 처리하고 배양한 양성대조군의 경우에는 음성대조

군과 비교하여 MMP-2의 활성과 MMP-9의 활성의 형성이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있음. 그러나 밀싹 및 곤달비를 처리한 군은 양성대조군에 비해 MMP-2 및 MMP-9 활성의 변화를 유도하지는 않았음 (그림 87).

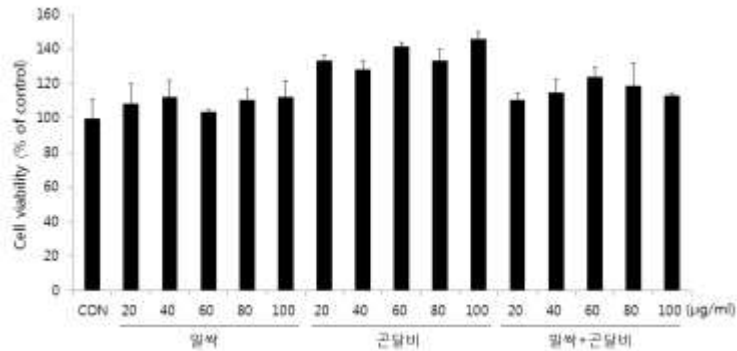


그림 87. 추출물의 세포 독성 평가 결과

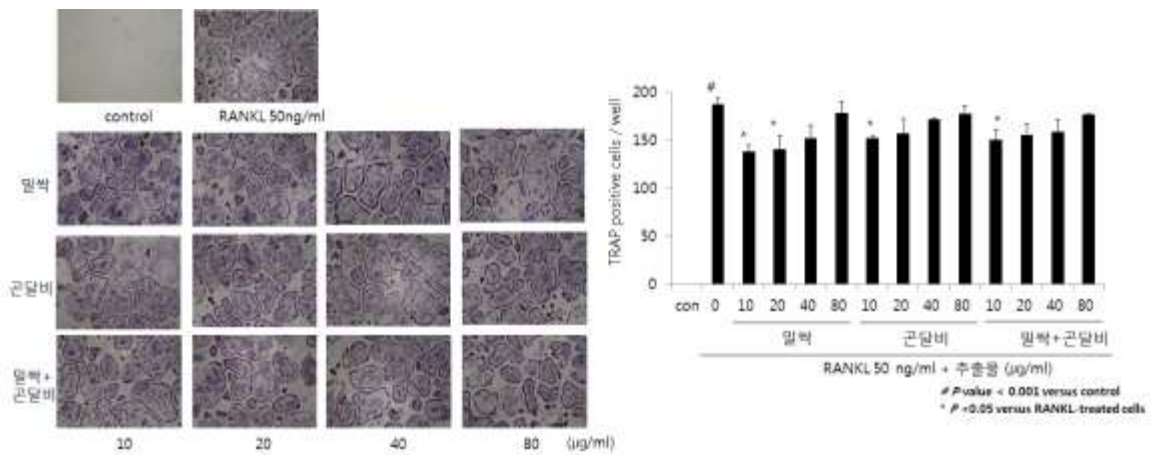


그림 88. 추출물의 파골세포 형성 억제능

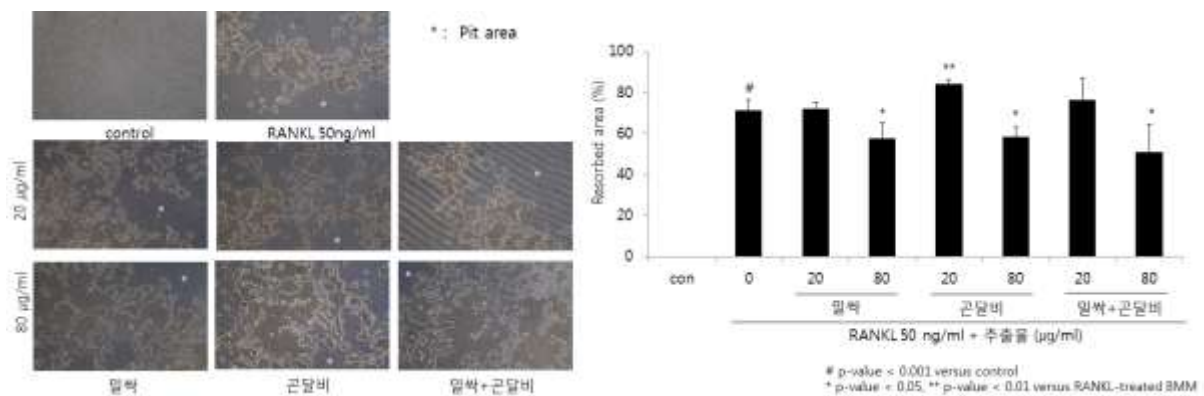


그림 89. 추출물의 골흡수 (흡수 및 형성) 억제능 평가 결과

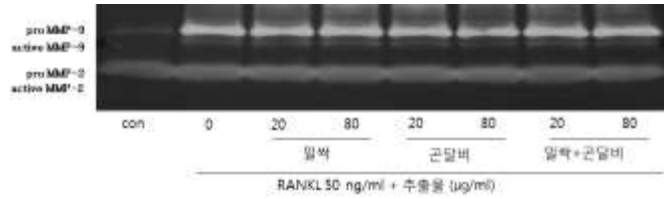


그림 90. 추출물의 뼈 기질 단백질 분해 효소 (MMP-2, MMP-9)의 활성 억제능 평가 결과

5. 밀착 및 곤달비에 대한 치주균 유래 LPS 처리시 염증 사이토카인 분비 억제능 조사
 - Porphyromonas gingivalis에서 얻은 지질다당류 (lipopolysaccharide, LPS)로 자극된 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포에서 밀착 및 곤달비의 세포독성을 확인하고, TNF- α 의 농도를 확인함. 추출물은 20, 40, 60, 80 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 희석하였음. 밀착, 곤달비 및 혼합물은 추출물을 처리하지 않은 군에 비해 모두 100% 이상 세포 생존율을 보였으며, 이 중 20, 40 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 처리하여 TNF- α 의 농도를 확인함. 실험 방법은 위의 방법과 동일하게 시행함.
 - 밀착, 곤달비 및 그 혼합물 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 TNF- α 의 생성이 유의성 있게 증가하였으나, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의성은 없으나 감소하는 경향을 보임 (그림 88).

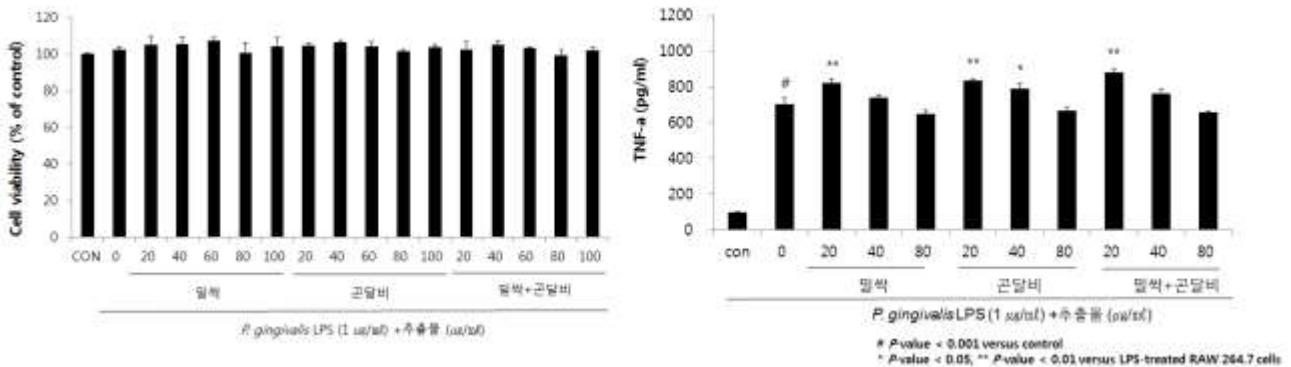


그림 91. 치주균 유래 LPS로 처리한 RAW264.7 대식세포에서 추출물의 세포독성 평가 결과 및 TNF-alpha 생성 억제능 평가 결과

6. 밀착 및 곤달비에 대한 조골세포 활성화능 조사
 - 밀착 및 곤달비의 마우스 조골세포에서의 세포독성을 확인하고자 생후 1일째 마우스의 두개골로부터 조골세포를 분리하여 배양하고, 각각의 추출물은 1, 3, 5, 10, 20, 40, 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 희석하였음. 실험 방법은 위의 방법과 동일하게 시행함 (그림 89). 세포독성이 없는 농도인 20 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하여 골분화를 유도하였음. 골분화 유도 인자인 아스코르브산 (50 $\mu\text{g/ml}$)과 베타-글리세로포스페이트 (10 mM)가 첨가된 α -MEM 배지에 세포 독성이 없는 농도의 추출물을 처리하고 14일 동안 배양한 후 Alizarin red S 염색을 통해 칼슘 축적을 확인하였음. 이를 정량하기 위해 10% cetylpyridinium chloride를 넣어 1시간 동안 반응시킨 후 ELISA 리더기를 이용해 570nm에서 흡광도를 측정함 (그림 90). 조골세포의 골형성

촉진인자인 alkaline phosphatase (ALP)의 활성을 확인하고자 12-웰 플레이트에 5X10⁴의 마우스 조골세포를 분주하고, 골분화 유도 배지에 세포 독성이 없는 농도의 추출물을 처리하고 7일 동안 배양한 후 ALP activity kit를 가지고 활성도를 확인하였음 (그림 91).

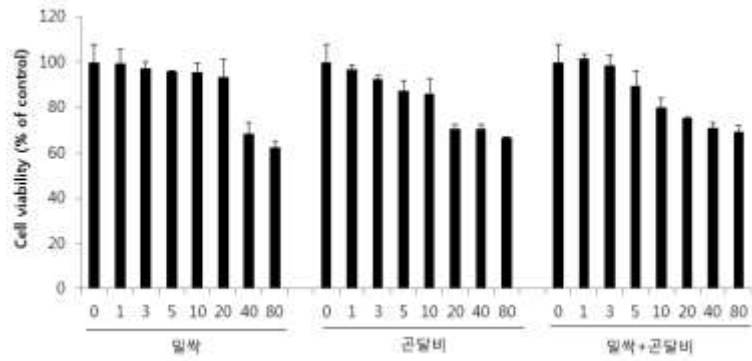


그림 92. 마우스 조골세포에서 추출물의 세포 독성 평가 결과

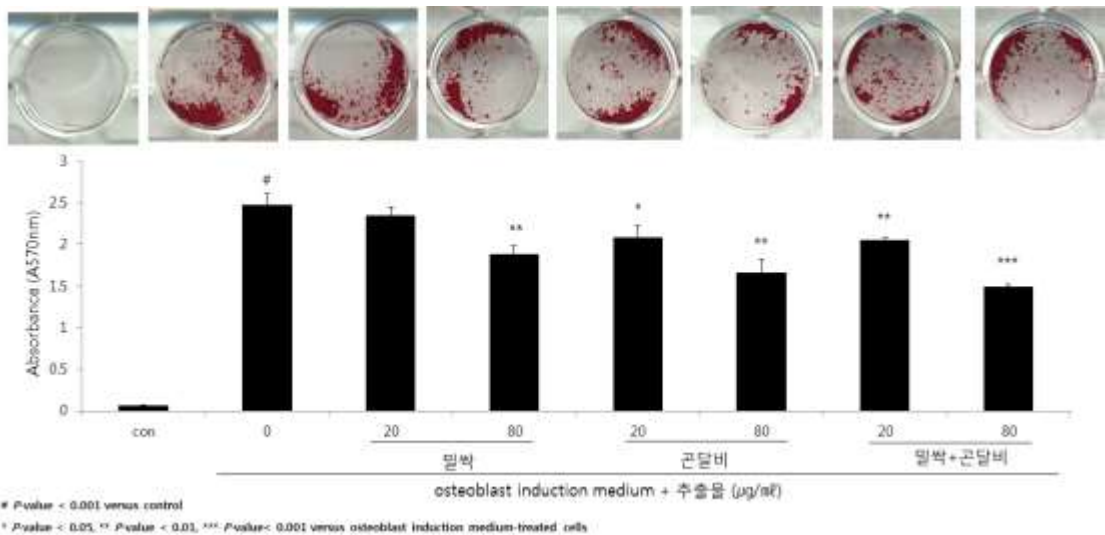


그림 93. 마우스 조골세포에서 추출물의 골분화능 결과

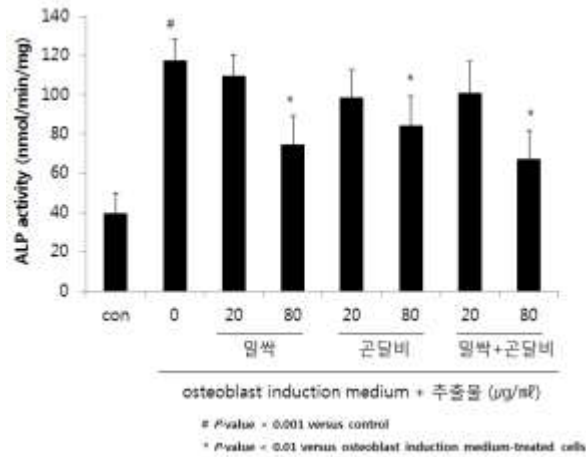


그림 94. 마우스 조골세포에서 추출물의 ALP 활성화도 결과

7. 주관 연구기관으로부터 도출된 유효 소재의 전임상 효능 분석

가. 밀싹 및 곤달비의 파골세포 형성 억제능 조사

- 밀싹, 곤달비 및 혼합물은 처리한 추출물 농도에서는 세포독성을 보이지 않았으며 파골세포 형성도 용량 의존적으로 억제하지 않았음. 반면, 밀싹, 곤달비 및 그 혼합물을 처리한 군에서 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 19%, 18%, 28 %로 RANKL을 처리한 군에 비해 파골세포에 의한 흡수와 생성이 감소하였으나 MMP-2 및 MMP-9 활성은 감소되지 않았음.

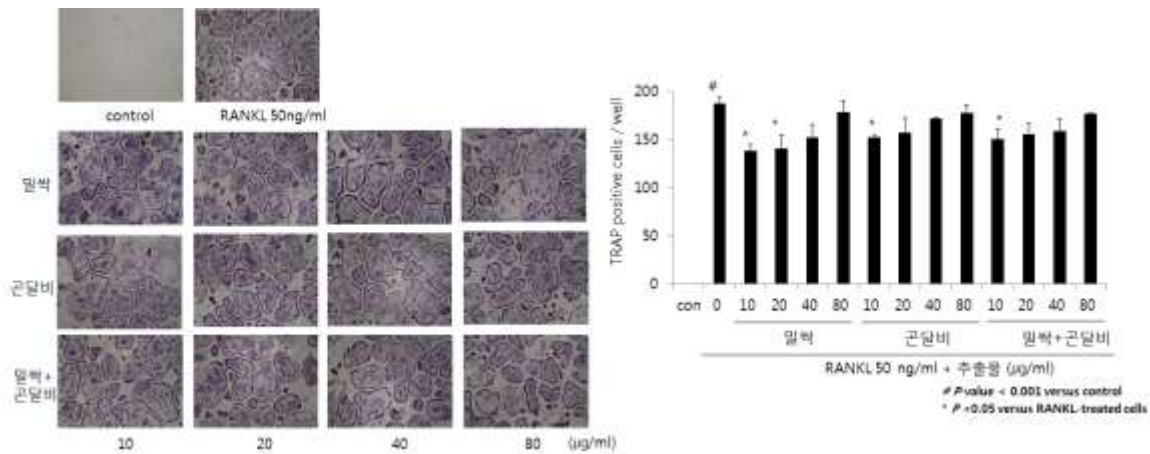


그림 95. 파골세포 형성 억제능

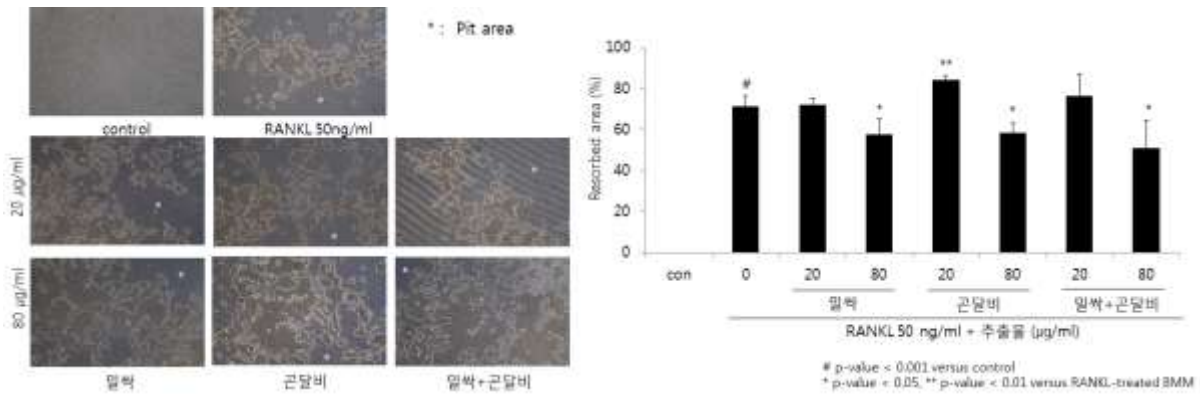


그림 96. 추출물의 골흡수(흡수 및 형성) 억제능

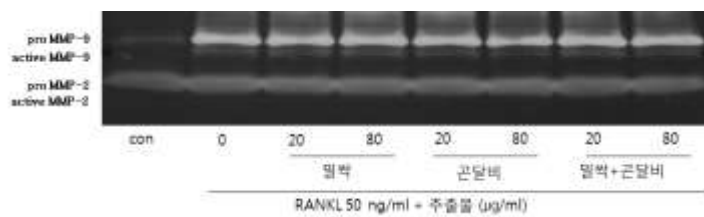


그림 97. 추출물의 뼈 기질 단백질 분해 효소(MMP-2, MMP-9)의 활성 억제능

나. 밀싹 및 곤달비의 조골세포 활성화능 조사

- 세포독성이 없는 농도인 20 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하여 조골전구세포에서 ALP 활성을 측정 한 결과 활성이 증가되지 않았음.

다. 밀싹 및 곤달비의 치주균 유래 LPS에 의한 염증 사이토카인 분비 억제능 조사

- Porphyromonas gingivalis에서 얻은 지질다당류 (lipopolysaccharide, LPS)로 자극된 생쥐 대식세포인 RAW264.7 세포에서 밀싹 및 곤달비의 세포독성을 확인하고, TNF- α 의 농도를 확인함. 밀싹, 곤달비 및 그 혼합물 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 TNF- α 의 생성이 증가하였으나, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 감소하는 경향을 보임

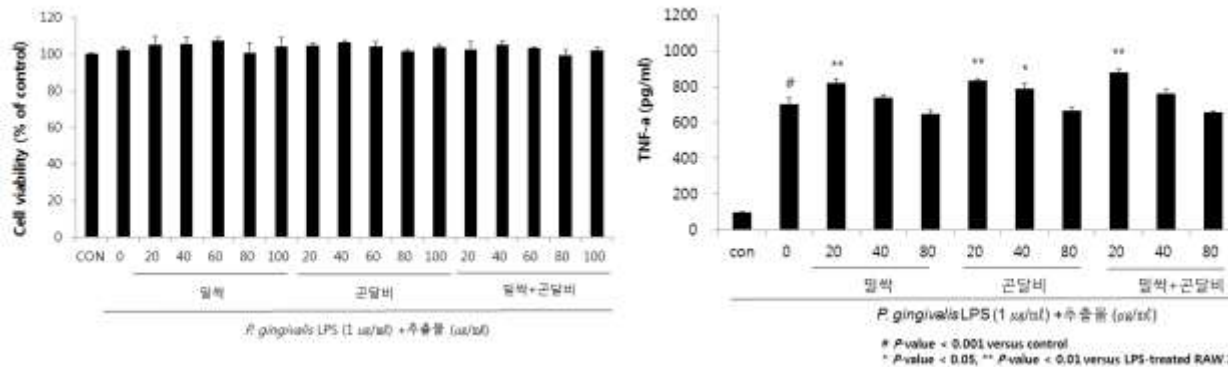


그림 98. 치주균 유래 LPS로 처리한 RAW264.7 대식세포에서 추출물의 세포독성 및 TNF- α 생성 억제능

- 따라서 밀씩, 곤달비 추출물은 직접적으로 파골세포 형성을 억제하고 조골세포를 활성화하는 효능은 크지 않으나 치주염균에 의한 염증을 억제함으로써 치조골 흡수를 억제할 수 있을 것으로 생각됨.

라. LPS로 유도된 치주염증에 대한 곤달비 밀씩 추출물의 염증 보호 효과

- 치주질환은 치근면에 부착된 치태성분 혹은 그람음성균의 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 치주조직 손상과 치아 손실이 초래되는 염증성 질환이다. 치근과 치조사이의 치주공간을 차지하는 치밀한 섬유조직인 치주인대세포 (Human Periodontal ligament cells)에 LPS에 의한 세포 사멸을 유도하여 곤달비 밀씩추출물의 염증 보호효과를 확인하였다.

(1) Cell culture

- 치주인대세포(Periodontal Ligament Cell, PDL cell)은 Cell Engineering For Origin (CEFOTM, Seoul, Korea)에서 공급받았으며, 100U/ml penicillin-100ug/ml streptomycin (CEFOgroTM, Seoul, Korea)이 포함된 Human Periodontal Ligament Cell Growth Medium (CEFOgroTM, Seoul, Korea)를 배양액으로 사용하여 37°C, 5% CO2Incubator에서 배양하였다. 2일 간격으로 배양액을 교체해주고 90%가 자란 시점에 계대 배양을 진행하였으며 본 실험에서는 4-6계대 배양한 세포를 사용하였다.
- LPS를 DMSO에 녹인 후 24시간동안 서로 다른 농도의 LPS (0.1, 0.5, 1, 10, 100 μ M)을 첨가하여 적절한 농도를 결정하였다. DMSO의 최종 농도는 0.1 % (v / v) 미만이었다. 곤달비 밀씩의 염증 억제 효과를 연구하기 위해 PDL 세포를 무 처리 대조군, LPS (1 μ M) 처리군 및 곤달비 밀씩추출물 (50 또는 100 μ g/ml) + LPS (1 μ M) 처리 군으로 나누었다.

(2) Cell viability

- 치주인대세포를 96well plate에 0.8 \times 10³cell/well로 분주하고 24시간 후 배양액을

제거하고 곤달비밀싹추출물 및 LPS(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 가 농도별로 처리된 배양액을 처리하여 세포독성을 EZ-Cytox Cell viability assay kit(Daeil Lab Service Co., Seoul, Korea)로 확인하였다. 24시간동안 추출물 및 LPS가 처리된 배양액의 10%에 해당하는 EZ-Cytox를 각 well에 2시간동안 처리한 후 Infinite M200 PRO NanoQuant microplate reader (TECAN, Zurich, Switzerland)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Western blot analysis

- 각 치주인대세포 (PDL cell)는 100mm dish에 1×10^6 cell로 분주하여 24시간동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 안정화시킨 후 LPS (1 μg/ml)와 곤달비밀싹추출물 (50 μg/ml, 100 μg/ml)을 처리하였다. 24시간 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 세포 내 단백질은 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), 1% protease inhibitor cocktail, NP40 Cell Lysis Buffer (Invitrogen, Grand Island, NY)를 사용하여 용해 후 13000rpm으로 4°C에서 5분동안 원심분리하였다. 상등액을 분리한 후 Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Invitrogen)를 사용하여 단백질 정량 하였다. 30 μg의 단백질을 Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels을 사용하여 전기영동한 후 겔 기질의 nitrocellulose membrane인 건식 iBlot® Transfer Stack (Invitrogen)에 iBlot® Gel Transfer Device (Invitrogen)를 사용하여 이동하였다. 각각의 membrane은 5% skim milk를 사용하여 1시간동안 상온에서 blocking하였고, 0.1% TBST buffer (TBS in 0.1% tween20)로 3회 washing하였다. 일차항체 COX-2(1:1000, abcam), NF-κB(1:1000, Cell signaling), c-FOS(1:1000, SantaCruz), Akt(1:1000, abcam), p-Akt(1:1000, abcam), pERK (1:1000, Cell signaling), ERK (1:1000, Cell signaling), pSTAT1 (1:1000, SantaCruz), PPAR γ(1:1000, Cell signaling), BDNF(1:1000, abcam) 처리 후 4°C 냉장고에서 밤새 반응하였다. 이차항체는 HRP-conjugated IgG(1:10000 dilution)를 사용하여 상온에서 1시간동안 반응하였다. 3회 washing 후 단백질 발현양은 SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 사용하여 확인하였다.

(4) 결과

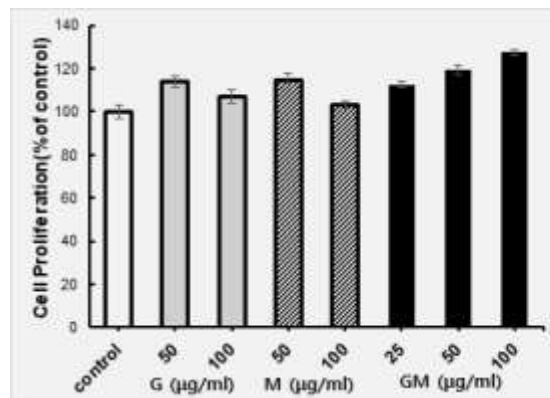


그림 99. 농도별 추출물 처리 24시간 후 치주인대세포의 증식을 변화

- 곤달비 밀싹 추출물이 치주인대세포의 성장률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 곤달비, 밀싹 단독 추출물과 곤달비 밀싹 혼합 추출물을 농도별 (25, 50, 100 μ g/ml)로 처리하여 EZ-cytox로 치주인대세포의 proliferation을 확인하였다. 24시간동안 처리한 결과 곤달비 단독 추출물(G) 50 μ g/ml에서는 113.92%, 100 μ g/ml에서는 106.98%의 성장률이 확인 되었다. 밀싹 추출물 (M) 50 μ g/ml에서는 114.48%, 100 μ g/ml에서는 103.02%의 성장률이 확인 되었으며 혼합추출물 (GM) 25, 50, 100 μ g/ml에서는 각각 112.56%, 119.26%, 127.40%의 성장률을 확인할 수 있었다. 또한 단독 추출물보다 혼합추출물에서 더 높은 성장률을 가짐을 확인 할 수 있었다.

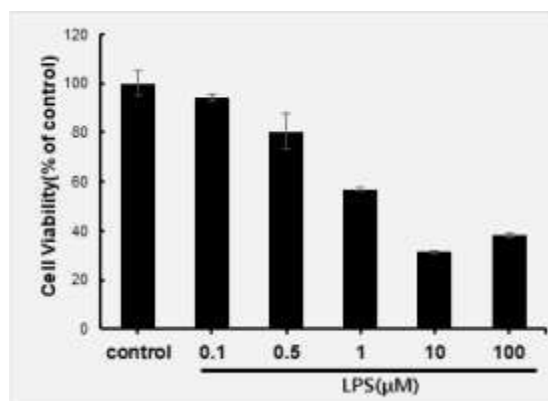


그림 100. 농도별 LPS 처리 후 치주인대세포의 생존력 변화

- LPS의 자극에 의한 치주인대세포의 생존율을 확인하기 위하여 농도별로 처리하고 EZ-cytox로 세포생존율을 확인하였다. 그 결과 LPS를 0.1, 0.5, 1, 10, 100 μ M로 24시간 처리하였을 때 LPS의 농도가 증가함에 따라 0.1 μ M에서 94.28%, 0.5 μ M에서 80.48%, 1 μ M에서 57.02%, 10 μ M에서 31.35% 100 μ M에서 38.16% 로 세포의 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 24시간 57.02%의 세포의 생존율을 보이는 1 μ M을 적정 염증 농도로 설정하여 실험을 진행하였다.

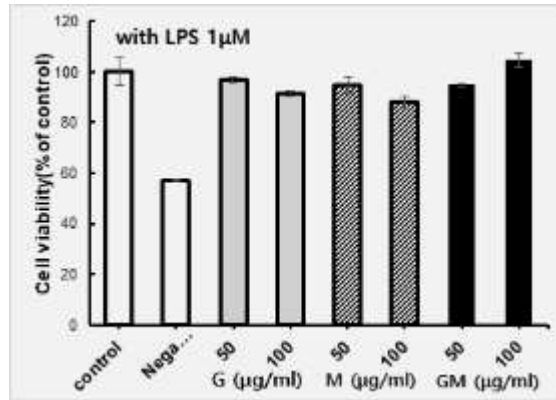


그림 101. LPS를 처리한
치주인대세포에서 추출물의 세포독성

- LPS로 유도된 염증으로부터 곤달비 밀짚 추출물의 보호 효과를 확인하기 위하여 치주인대세포에 LPS 1µM를 처리 후 곤달비 밀짚 단독, 혼합 추출물을 농도별로 처리하여 EZ-cytox로 확인하였다. 그 결과 LPS 단독 처리에서는 57.02%의 생존율을 보인 반면, 곤달비 단독 추출물 처리 50 µg/ml에서는 96.70%, 100 µg/ml에서는 91.56%, 밀짚 단독 추출물 처리 50 µg/ml에서는 94.58%, 100 µg/ml에서는 88.07%의 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 곤달비 밀짚 혼합추출물 50 µg/ml에서는 94.72%, 100 µg/ml에서는 104.60%의 세포 생존율을 확인할 수 있었으며 이를 통하여 곤달비 밀짚 추출물이 LPS에 의한 염증으로부터 세포를 보호함을 확인 할 수 있었다. 또한 단독추출물보다 혼합추출물에서 더 높은 보호효과를 가짐을 확인 할 수 있었다.

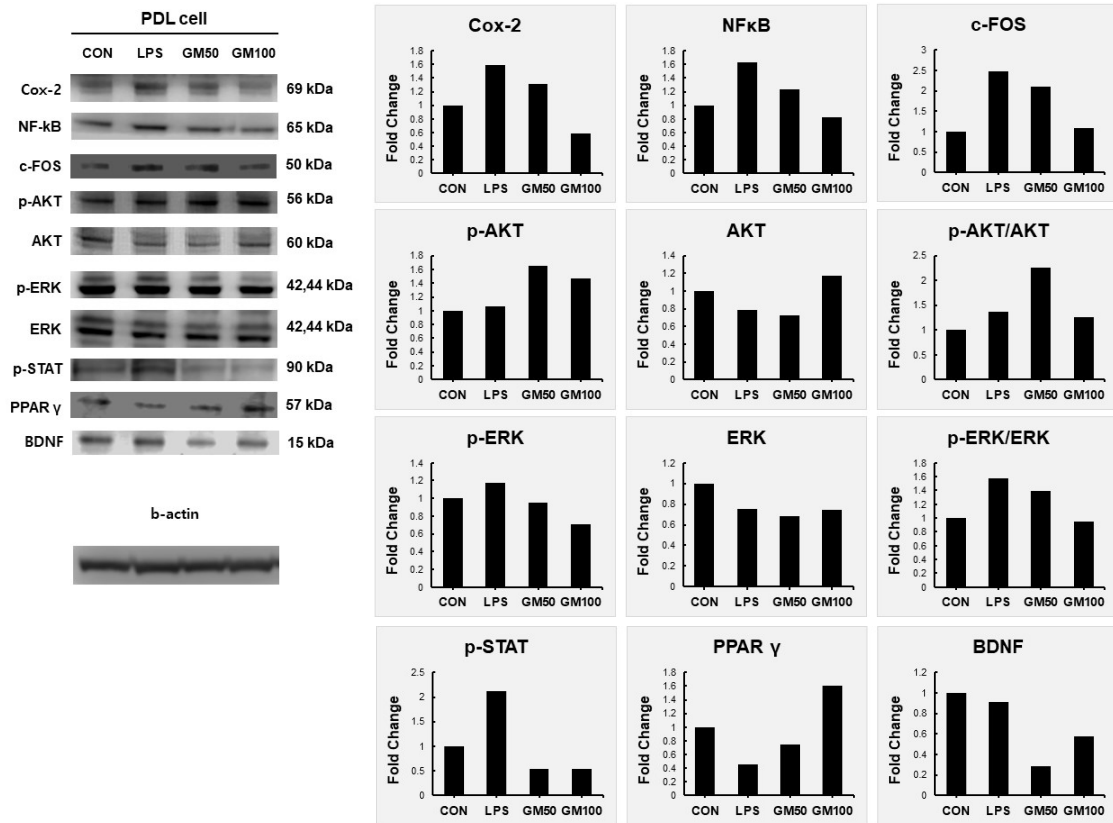


그림 102. LPS 및 추출물 처리 후 분자적 단백질 발현 양상

- LPS로 유도된 치주인대세포에서 곤달비 밀싹 추출물 처리가 COX-2, NF- κ B, c-FOS 및 Akt, ERK, p-STAT, PPAR γ , BDNF의 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하였다. COX-2 발현은 정상군에 비해 LPS 처리군에서 약 1.6배 증가하였으며, 곤달비 밀싹 추출물 처리군 50 μ g/ml에서는 1.3배 100 μ g/ml에서는 0.6배인 것을 확인할 수 있었다. LPS로 유도된 COX-2 단백질 과발현이 곤달비 밀싹 추출물 처리에 의해 유의적으로 감소된 것을 확인하였다. NF- κ B 역시 정상군에 비해 LPS 처리군에서 1.6배 증가하였으며 곤달비 밀싹 처리군에서 1.2배 0.8배로 LPS 처리군과 비교하여 감소된 것을 확인할 수 있었다. c-FOS의 단백질 발현은 정상군과 비교하여 LPS 처리군에서 2.5배, 곤달비 밀싹 처리군 50 μ g/ml에서 2배 100 μ g/ml에서 1.1배로 발현되었다. p-Akt / Akt를 확인한 결과 정상군과 비교하여 LPS 처리군은 1.4배 증가하였고, 곤달비 밀싹 처리군 중 50 μ g/ml에서는 2.2배가 증가하였다. 반면 LPS 처리군과 비교하여 곤달비 밀싹 처리군 중 100 μ g/ml에 1.2배로 감소한 것을 확인할 수 있었다. pERK / ERK 를 확인한 결과 정상군과 비교하여 LPS 처리군에서는 1.6배, 곤달비 밀싹 처리군 50 μ g/ml에서는 1.4배, 100 μ g/ml에서는 0.9배인 것을 확인하였다. p-STAT 발현 또한 LPS를 처리한 군(2.1배) 보다 곤달비 밀싹 추출물 처리군 50 μ g/ml (0.54배), 100 μ g/ml (0.53배)에서 감소함을 확인하였다. PPAR γ 의 발현은 LPS 처리군에서는 0.45배, 곤달비 밀싹 추출물 처리군 50 μ g/ml에서 0.74배 100 μ g/ml에서 1.6배로 증가하는 경향을 확인하였다. 세포 자멸 및 염증반응에 중요한 역할을 하는 COX-2, NF- κ B, c-FOS, p-STAT의 발현이 LPS를 처리한 군과 비교하여 곤달비 밀싹 추출물 처리군에서 유의적으로 감소하고, ERK의 인산화가 감

소됨을 확인하였으며 항염증 반응인 PPAR γ 발현을 증가함을 확인하였다. 이를 통하여 곤달비 밀짚 추출물이 LPS에 의한 염증을 억제, 보호함을 확인하였다.

마. 치주질환 예방 및 개선을 위한 고부가가치식품 소재의 임상 시험

(1) Saliva

- Saliva collecting tube를 사용하여 collecting tube안의 목화솜(Absorben Swab)을 어금니로 chewing하여 충분히 saliva를 모은다. Saliva가 충분히 흡수된 검체(목화솜)를 Inner tube에 넣은 후 봉하여 즉시 -70°C 에 보관하였다. 실험 전 collecting tube를 $10000\times\text{g}$ 로 5분 원심분리하여 Outer tube에 saliva가 모이도록 하고 각 실험별로 희석배수를 다르게 하여 실험을 진행하였다.
- 제조사의 프로토콜에 따라 Human Lactoferrin ELISA Kit, Human MATRIX METALLOPROTEINASE-8 ELISA Kit (BioVendor, Modrice, Czech Republic), Human Cystatin C Immunoassay, Human Myeloperoxidase Immunoassay, Human MMP-9 (total) Immunoassay (R & D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 saliva에서 lactoferrin, MMP-8, Cystatin C, MPO, MMP-9을 측정하였다. 각 kit에 맞게 Saliva를 각각 1000배, 5배, 20배, 100배, 100배로 희석하여 실험에 사용을 하였다. 일반적으로 Antibody가 코팅된 Microtiter Strip plate 에 $100\ \mu\text{l}$ 씩 분주하고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 세척하였다. Detection antibody를 well당 $100\ \mu\text{l}$ 씩 넣고 상온에서 1시간동안 반응하였다. 다시 세척 후 Streptavidin-HRP Conjugate를 well당 $100\ \mu\text{l}$ 씩 넣고 상온에서 30분 방치한 후 4회 세척을 하였다. Substrate Solution을 well당 $100\ \mu\text{l}$ 씩 넣고 실온에서 10분 방치한 후 마지막으로 stop solution을 $10\ \mu\text{l}$ 씩 넣어 반응을 중지시키고 흡광도를 Infinite M200 PRO NanoQuant microplate reader (TECAN, Zurich, Switzerland)에서 $450\ \text{nm}$ (보정 파장은 $630\ \text{nm}$ 로 설정)로 측정하였다.

(2) 치은열구액

- 치은열구액은 Perio paper strip을 사용하여 채취할 부위의 치태를 제거 후 치주낭 내로 1mm 정도 넣고 30초~1분동안 둔 후 멸균된 tube에 paper strip을 넣어서 실험전까지 -70°C 에 보관하였다. Paper strip으로부터 치은열구액을 추출하기 위해 PBS를 $300\ \mu\text{l}$ 처리한 후 4°C 에서 12시간 반응 시켰다. 반응 후 $3000\times\text{g}$ 로 5분 원심분리 후 상등액을 수집하여 사용하였다. 추출된 치은열구액은 -20°C 에 보관을 하였으며 냉해동 반복은 피하였다.
- 제조사의 프로토콜에 따라 Human ICTP ELISA Kit, Human CTSB ELISA Kit (Aviva systems biology, San Diego, CA), Human platelet activating factor (PAF) ELISA kit (BIOMATIK, Wilmington, USA), Cystatin C ELISA Kit (MyBioSource, San Diego, CA, USA)를 사용하여 치은열구액의 ICTP, CTSB, PAF, Cystatin C 수준을 측정 하였다. 각 샘플을 ICTP, CTSB, PAF에 비특이적인 친화성 다클론 항체로 미리 코팅한

micro plate well에 첨가 하였다. 세정 후, 특이적인 효소 결합된 다 클론 항체 및 기질 용액을 well에 첨가 하였다. 반응에 의한 색 변화를 확인 후 (15~30분) 중지 용액을 추가하고 흡광도를 Infinite M200 PRO Nano Quant microplate reader (TECAN, Zurich, Switzerland)에서 450 nm (보정 파장은 540 nm로 설정)로 측정하였다. 샘플 값은 표준 곡선을 사용하여 계산되었다. 사이토카인의 수준은 pg/ml로 표현하였다.

바. 치수줄기세포에서 곤달비 밀싹의 분화 증가 효과

(1) Cell culture

- 유치치수줄기세포(Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous, SHED cell)은 Cell Engineering For Origin (CEFOTM, Seoul, Korea)에서 공급받았으며, 100U/ml penicillin-100ug/ml streptomycin (CEFOgroTM, Seoul, Korea)이 포함된 Human Permanent Teeth-derived Dental Pulp Stem Cell Growth Medium (CEFOgroTM, Seoul, Korea)을 배양액으로 사용하여 37°C, 5% CO₂Incubator에서 배양하였다. 2일 간격으로 배양액을 교체해주고 90%가 자란 시점에 계대 배양을 진행하였으며 본 실험에서는 4-6계대 배양한 세포를 사용하였다.
- 지방 및 골세포로 분화시키기 위하여 분화유도배지인 Human MSC Differentiation Medium Adipogenesis, Osteogenesis (CEFOgroTM, Seoul, Korea)를 사용하였다. 2일 간격으로 배지를 교체하여 분화를 유도하였다.

(2) Cell viability

- 치수줄기세포를 96well plate에 0.5×10^3 cell/well로 분주하고 24시간 후 배양액을 제거하고 곤달비 밀싹추출물을 농도별로 처리하여 세포 성장률을 EZ-Cytox Cell viability assay kit(Daeil Lab Service Co., Seoul, Korea)로 확인하였다. 72시간동안 추출물 처리하고 배양액의 10%에 해당하는 EZ-Cytox를 각 well에 2시간동안 처리한 후 Infinite M200 PRO NanoQuant microplate reader (TECAN, Zurich, Switzerland)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Flow cytometry

- 치수줄기세포를 100mm dish에 0.8×10^6 cell로 분주하고 24시간 안정화 후 배양액을 교체하여 Control군 곤달비 밀싹 (GM) 처리군, Adipogenesis 분화군, Adipogenesis 분화+GM 처리군, Osteogenesis분화군, Osteogenesis분화 + GM 처리군으로 나누어 배양하였다. 줄기세포 확인 및 분화여부를 확인하기 위하여 유세포분석을 하였다. PBS로 세척 후 cell dissociation buffer를 사용하여 세포를 해리하여 FACS buffer (PBS+ 2% FBS)를 사용하여 수집한 뒤 1500rpm으로 3분 원심 분리하였다. 2회 반복으로 세척한 후 1차 항체 BV421 Mouse Anti-Human CD73 (BD) , Anti-CD146 antibody - Phycoerythrin (abcam), Anti-CD105 antibody - FITC (abcam) 를 1시간동안 반응시켰다. FACS buffer를 사용하여 3회 세척 후 CytoFLEX

(Beckman Coulter, Inc., Kraemer Blvd. USA)를 사용하여 분석하였다.

(4) 결과

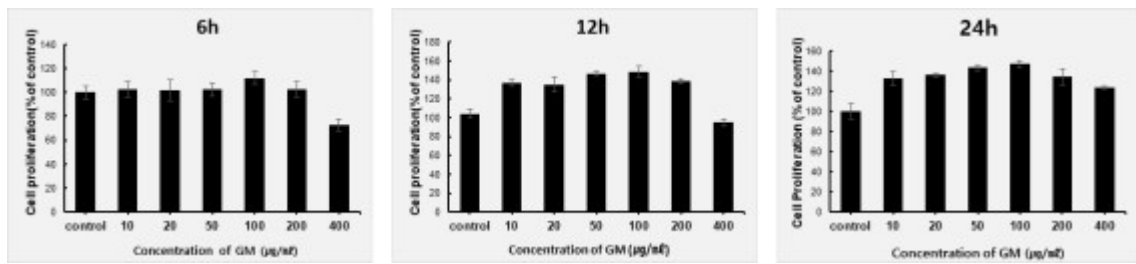


그림 103. 추출물 처리 후 치주 줄기세포의 증식을 변화

- 곤달비 밀싹 추출물이 줄기세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 곤달비 밀싹 추출물을 농도 및 시간을 다르게 처리하여 확인하였다. 6시간 처리를 하였을 때, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml에서 각각 102.5%, 101.6%, 102.3%, 111.8%, 102.5% 으 로 세포 성장률이 비슷하였지만 12시간 처리시 136.3%, 134.9%, 146.5%, 148.6%, 138.5% 24시간 처리시 132.7%, 136.1%, 143.1%, 146.8%, 134.1%로 곤달비 밀싹 추출 물의 농도따라 세포 성장률이 증가함을 확인할 수 있었다.

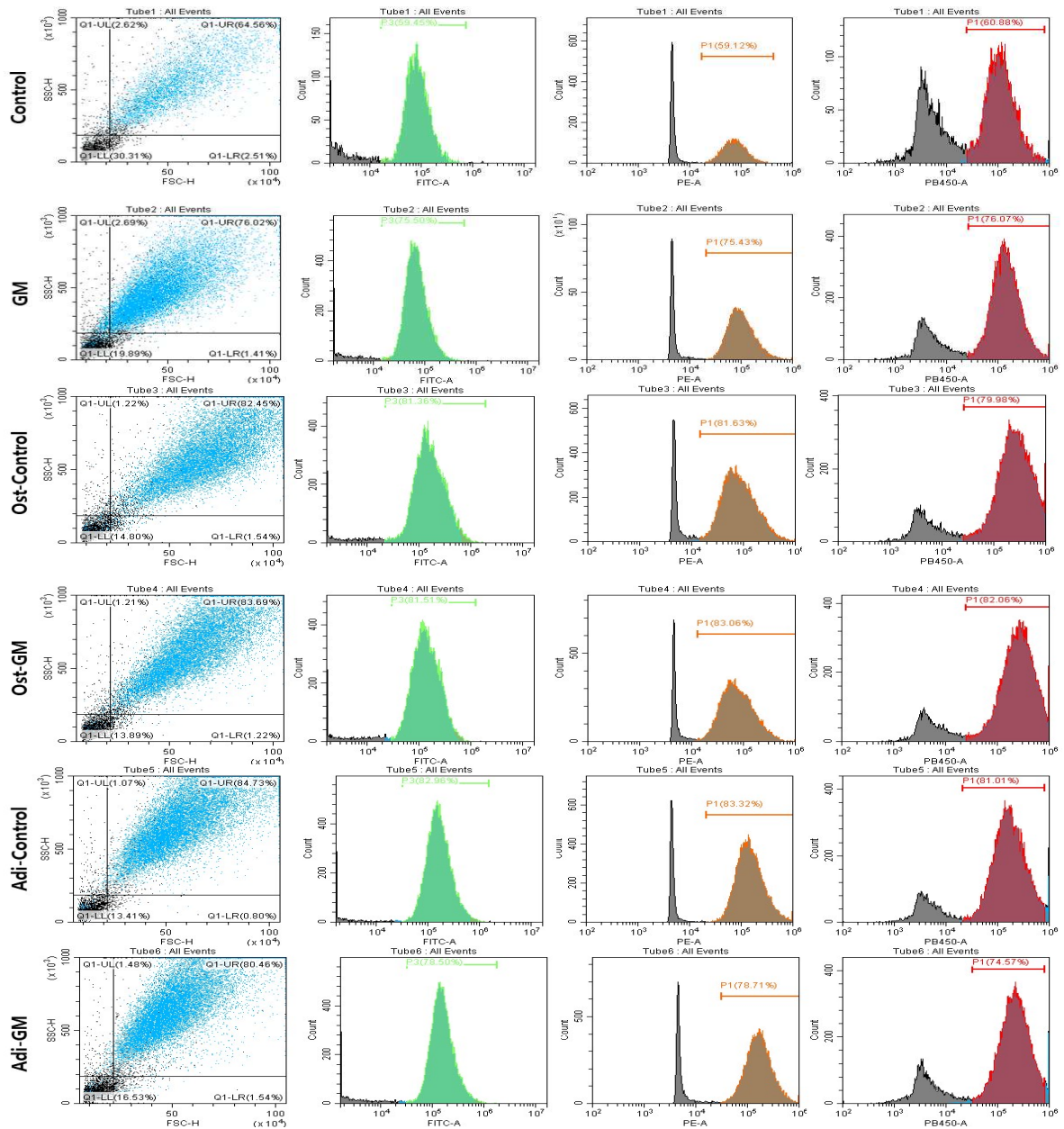


그림 104. 추출물 처리 후 치수줄기세포, 지방세포 및 골세포의 분화도

- 곤달비 밀삭 추출물을 분화시키지 않은 치수줄기세포와 각각 지방세포 및 골세포로 분화를 유도한 세포에 처리하여 분화 증가 여부를 확인하였다. 분화 시키지 않은 치수줄기세포와 비교하여 세포 성장이 증가한 것을 확인할 수 있었으며 골분화를 유도한 세포에서 곤달비 밀삭을 처리하였을 때 분화가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 반면 지방세포로 분화시킨 세포에서는 곤달비 밀삭 추출물을 처리한 것과 비교시 큰 차이가 없음을 확인 할 수 있었다.

사. 치주염 동물 모델에서 곤달비 추출물 및 밀삭 추출물의 염증 억제 효과 확인

- 본 연구에서는 실험동물의 대구치 결찰을 통해 치주염 모델을 제작하였고, 치주염 모델 제작 후 천연물 추출물을 일정 기간 동안 투여한 후 치주염 증상에 대한 완

화 효능을 조직병리학적으로 관찰하였음.

(1) 치주염 동물 모델 제작

- 치주염 유발을 위한 동물로는 수컷 Sprague-Dawley rats를 사용하였음. SD rats에 마취제인 졸레틸:럼폰을 4:1로 섞은 후, 1 ml/kg의 용량으로 투여하였고, 마취가 완전히 된 동물은 멸균된 3-0호 봉합사를 이용하여 우측 아래턱쪽 제 1 대구치를 결찰 하였음. 치주염 동물 모델 제작은 총 36마리를 진행하였고, 대조군 (치주염 유발 후 음용수 투여), 곤달비 추출물 투여군 (G 그룹), 밀짚 추출물 투여군 (M 그룹), 곤달비 추출물+밀짚 추출물 투여군 (GM 그룹)에 각각 9마리씩 배치하였음.

(2) 천연물 시료 투여

- 본 연구에서 사용된 시료는 곤달비 추출물과 밀짚 추출물로써 대구치 결찰 다음날 부터 일정한 시간에 일정한 용량 (50 mg/kg)으로 4주간 경구투여 방법을 통하여 투여되었음.

(3) 조직 처리 과정

- 치은조직 (gingival tissue) 및 아래턱 조직을 포함하여 제 1 대구치를 결찰한 부위를 잘라낸 후 5일간 decalcification 과정을 거쳤음. 그 후 제 1 대구치 부위 부분만을 다시 trimming 하여 고정액에 담귀 24시간 동안 후고정을 시켜주었고, 후고정된 조직은 조직병리학적으로 관찰할 수 있도록 paraffin block으로 제작하였음. 이러한 과정은 아래 모식도로 나타냄.

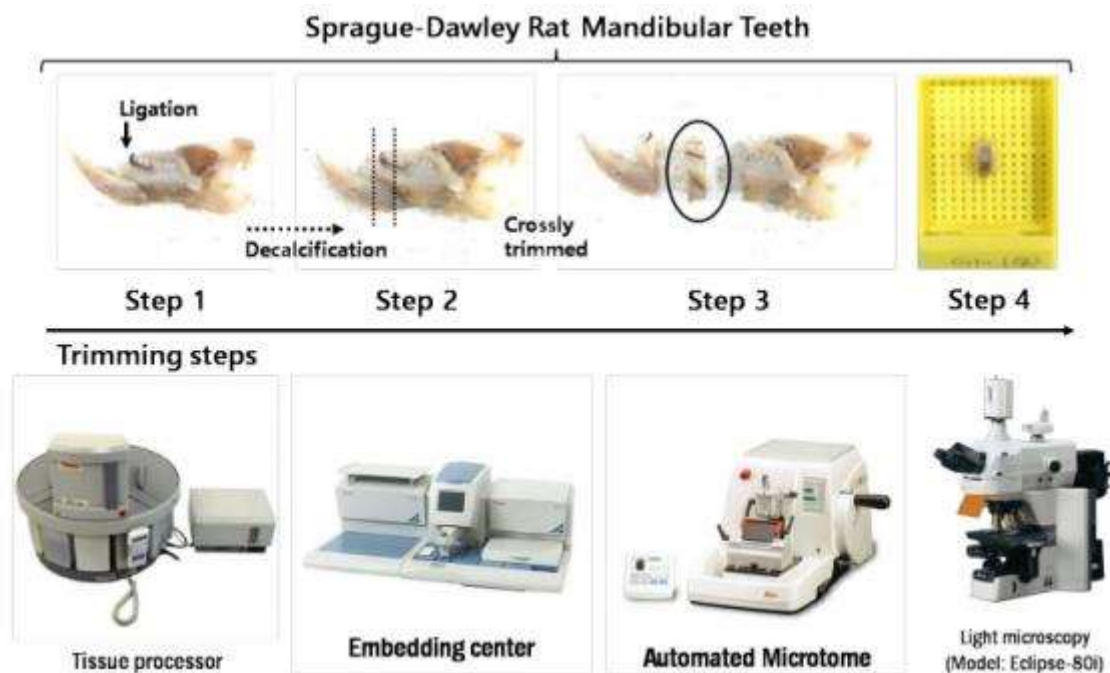


그림 105. SD rats의 아래턱 조직 처리 과정

(4) Histomorphometry (조직형태계측법)

- 조직을 통한 조직염색뿐만 아니라 더 자세한 변화를 관찰하기 위하여 대구치 결찰 부위를 광학현미경을 통해 inflammatory cell influx, alveolar process 와 cementum integrity의 상태를 고려하여 0점부터 3점까지의 스코어를 나타냈음. 스코어의 기준은 아래 표로 나타냄.

표 26. 실험으로 유도된 치주염의 조직학적 스코어

Scores	Remarks
0	Absence or only a discrete cellular infiltration (inflammatory cell infiltration is sparse and restricted to the region of the marginal gingival), preserved alveolar process and cementum
1	Moderate cellular infiltration (inflammatory cellular infiltration present all over the insert gingival), some but minor alveolar process resorption and intact cementum
2	Accentuated cellular infiltration (inflammatory cellular infiltration present in both gingival and periodontal ligament), accentuated degradation of the alveolar process and partial destruction of cementum
3	Accentuated cellular infiltrate, complete resorption of the alveolar process and severe destruction of cementum

Max = 3, Modified from Menezes et al. [2005]
 EPD = Experimental periodontitis
 EPD and related alveolar bone loss was induced by ligation placement around cervix of mandibular first molar teeth

- 또한 gingival sulcus에 있는 infiltrated inflammatory cells 수와 periodontal ligament, inner gingival limits(%) 사이의 alveolar process volumes과 inner alveolar process 표면에 있는 osteoclast 및 osteoblast의 평균값을 컴퓨터 이미지 프로그램 (iSolution FL ver 9.1)을 이용하여 측정하였음.



그림 106. Autommated image analyzer (iSolution FL ver 9.1)

(5) Histomorphometrical analysis 및 H-E staining

- Histomorphometrical analysis 결과는 table 2에 나타냈고, H-E staining 결과는 figure 1에 나타냈음.
- 치은 조직에 염증 세포(주로 polymorphoneutrophils)침투와 alveolar process 재흡수와 관련된 osteoclast의 증가 및 osteoblast의 감소는 정상군에 비하여 대구치 결찰 치주염 동물 모델 군에서 조직병리학적으로 눈에 띄게 증가한 결과를 보였음. 이러

한 결과는 조직 형태 계측 분석적으로 치은 부위에 침투된 염증 세포의 수에 대한 histological 스코어의 증가, alveolar process volume과 osteoblast 세포 수의 감소, 그리고 alveolar process에 있는 osteoclast 세포의 증가를 확인함으로써 대구치 결찰 실험동물에서 치주염이 유발되어 alveolar bone의 유실이 일어나는 것을 확인하였음.

- 그러나 본 연구의 시험물질인 곤달비 추출물, 밀싹 추출물, 곤달비+밀싹 추출물을 치주염 유발 실험동물에 꾸준히 투여한 결과, 밀싹 추출물을 투여한 군을 제외하고는 alveolar bone 소실과 관련되어 있는 침투된 염증세포가 치주염 유발 후 음용수를 투여한 군에 비해 유의적으로 감소하는 결과를 나타냈음. 또한 곤달비 추출물 투여군과 곤달비+밀싹 추출물 투여가 치주염 유발 후 나타나는 변화인 alveolar process 표면에 존재하는 osteoblast 세포의 감소와 osteoclast 세포의 증가를 유의적으로 억제하는 효과를 보이는 것을 조직병리학적으로 관찰하였음.
- 치주염 유발 후 음용수를 투여한 군에서는 histological 스코어가 정상군에 비해 1122.22% 증가하였지만 곤달비 추출물, 밀싹 추출물, 곤달비+밀싹 추출물을 투여한 군에서는 음용수를 투여한 군에 비해 각각 63.64, 36.36, 63.64% 감소되었음.
- 치은 조직에 침투한 염증 세포의 평균수는 치주염 유발 후 음용수를 투여한 군에서 정상군에 비해 1425.33% 증가 되었지만 곤달비 추출물, 밀싹 추출물, 곤달비+밀싹 추출물을 투여한 군에서는 음용수를 투여한 군에 비해 65.83, 32.35, 67.76% 감소되었음.
- Alveolar process의 평균 volume은 치주염 유발 후 음용수를 투여한 군에서 정상군에 비해 49.01%가 감소하였지만 곤달비 추출물, 밀싹 추출물, 곤달비+밀싹 추출물을 투여한 군에서는 음용수를 투여한 군에 비해 63.67, 50.56, 70.76%가 증가하였음.
- Alveolar process 표면에 존재하는 osteoclast 세포의 평균수는 치주염 유발 후 음용수를 투여한 군에서 정상군에 비해 295.83%가 증가하였지만 곤달비 추출물, 밀싹 추출물, 곤달비+밀싹 추출물을 투여한 군에서는 음용수를 투여한 군에 비해 63.74, 56.73, 66.08%가 증가하였음.
- 마지막으로 Alveolar process 표면에 존재하는 osteoblast 세포의 평균수는 치주염 유발 후 음용수를 투여한 군에서 정상군에 비해 79.99%가 감소하였지만 곤달비 추출물, 밀싹 추출물, 곤달비+밀싹 추출물을 투여한 군에서는 음용수를 투여한 군에 비해 205.45, 91.52, 209.09%가 증가하였음.

Values are expressed as Mean \pm SD of nine histological fields, except for intact control, in which five histological fields were analyzed.

표 27. Histomorphometrical Analysis on the Mandible First Molar Teeth Regions, Taken from Intact or EPD Rats

Index Groups	Histological scores (Max = 3)*	Inflammatory cell numbers (cells/mm ² of gingival tissues)	Alveolar process volumes (%)	Osteoclast cell numbers (cells/mm ² of alveolar gingival tissues)	Osteoblast cell numbers (cells/mm ² of alveolar gingival tissues)
정상군	0.20±0.45	27.20±8.20	70.93±6.50	9.60±4.56	91.60±15.65
EPD+음용수	2.44±0.73 ^a	414.89±280.59 ^d	36.17±12.20 ^d	38.00±9.27 ^a	18.33±7.14 ^a
EPD+곤달비 추출물	0.89±0.60 ^{bc}	141.78±69.39 ^{df}	59.20±3.77 ^{df}	13.78±3.53 ^c	56.00±13.86 ^{ac}
EPD+밀씩 추출물	1.56±0.53 ^{ac}	280.67±243.53 ^d	54.46±7.17 ^{df}	16.44±6.15 ^{bc}	35.11±7.42 ^{ac}
EPD+곤달비 밀씩 추출물	0.89±0.33 ^{bc}	133.78±50.35 ^{df}	61.77±5.39 ^{ef}	12.89±3.89 ^c	56.67±12.49 ^{ac}

EPD = Experimental periodontitis

EPD and related alveolar bone loss was induced by ligation placement around cervix of mandibular first molar teeth

* Histological scoring systems were listed in Table 1

^ap<0.01 and ^bp<0.05 as compared with intact control by Least-significant differences multi-comparison test

^dp<0.01 and ^ep<0.05 as compared with intact control by Mann-Whitney U test

^cp<0.01 as compared with EPD control by Least-significant differences multi-comparison test

^fp<0.01 as compared with EPD control by Mann-Whitney U test

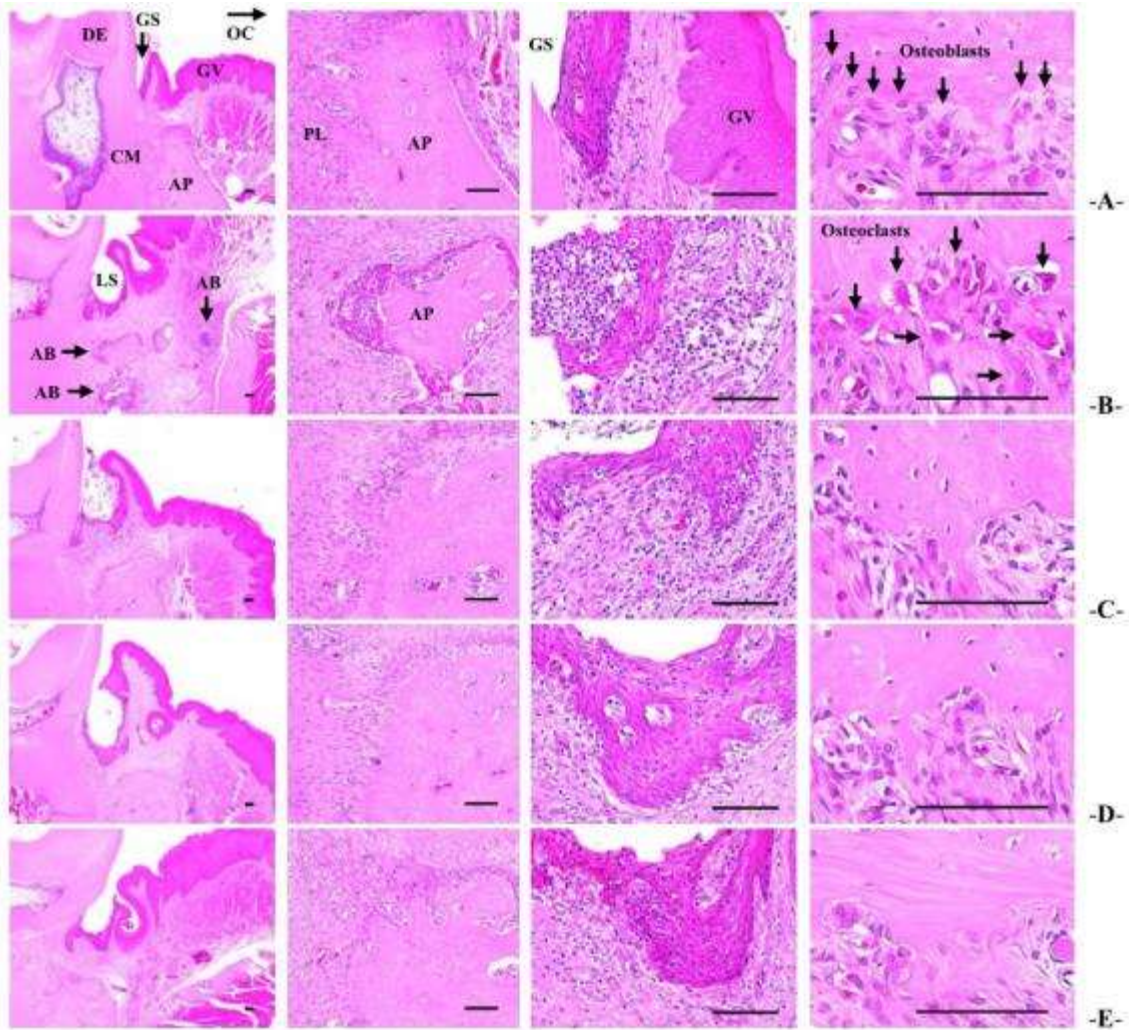


그림 107. H-E staining 결과

Scale bars = 100 μ m

- A = Intact control rat mandible first molar teeth region
- B = EPD control rat mandible first molar teeth region
- C = G(곤달비 추출물) treated EPD rat mandible first molar teeth region
- D = GM(곤달비+밀싹 추출물) treated EPD rat mandible first molar teeth region
- E = M(밀싹 추출물) treated EPD rat mandible first molar teeth region

EPD = Experimental periodontitis

EPD and related alveolar bone loss was induced by ligation placement around cervix of mandibular first molar teeth

* Histological scoring systems were listed in Table 1

AB = Abscess; AP = Alveolar process; CM = Cementum; DE = Dentin; GS = Gingival sulcus; GV = Gingiva; LS = Ligation placed region; OC = Oral cavity; PL = Periodontal ligament

(6) 결론

- EPD 대조군에서는 현저한 치은부위 염증세포, 주로 다형 중성호성 백혈구 (polymorphneutrophil)의 침윤과 하부 치조골 돌기 표면 뼈모세포의 감소 및 뼈파괴 세포의 증가와 관련된 치조골 돌기 재흡수의 증가 즉, 전형적인 치아경부 결찰 EPD 및 이와 관련된 치조골 소실이 인정되었으며, 조직형태 계측학적으로도 EPD

대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($P < 0.01$) 조직병리학적 score와 치은부위 침윤 염증세포의 수적 증가, 치조골 돌기 량의 감소, 치조골 돌기 표면 뼈모세포의 수적 감소 및 뼈파괴세포의 수적 증가가 각각 인정되었음. 한편 이러한 치아경부 결찰에 의한 EPD 및 이와 관련된 치조골 소실에 대한 조직병리학적 소견이, EPD 대조군에 비해 유의성 없는 감소를 나타낸 밀씩 추출물 투여군의 치은부위 침윤 염증세포 수를 제외하고, 모든 3 종류의 곤달비 추출물, 곤달비+밀씩 추출물 및 밀씩 추출물의 추가적인 투여에 의해 유의성 있게 ($P < 0.01$) 현저히 억제되었음. 적어도 본 실험의 조직병리학적 검사 조건 하에서 곤달비 추출물, 곤달비+밀씩 추출물 투여군에서 서로 유사한 정도로 밀씩 추출물 투여군에 비해 더 우수한 EPD 및 관련 치조골 소실 억제 활성이 각각 인정되었음. 이러한 결과는 적어도 본 실험의 조직병리학적 검사 조건하에서 곤달비 추출물, 곤달비+밀씩 추출물 및 밀씩 추출물이 각각 치아경부 결찰 래드 EPD 및 관련 치조골 소실을 효과적으로 억제하는 직접적인 증거로 판단되며, 전체적으로 곤달비 추출물, 곤달비+밀씩 추출물 투여군 투여군에서, 서로 유사한 정도로, 밀씩 추출물 투여군보다 비교적 더 우수한 EPD 및 이와 관련된 치조골 소실 억제 활성이 각각 인정되었음.

- 따라서 곤달비 추출물, 곤달비+밀씩 추출물 및 밀씩 추출물의 적절한 처리, 특히 곤달비 추출물과 곤달비+밀씩 추출물은 추후 좀더 세밀한 기전 및 약효 평가 실험을 통해 보다 효과적인 새로운 치은염 및 관련 치조골 소실 치료 수단으로 충분한 개발 가치가 있을 것으로 기대됨.

4절. 최종 선정된 곤달비 및 밀씩 추출 복합물의 임상 효능

1. 치주질환 예방 및 개선 효능평가를 위한 인체적용시험 연구 방법 확립

가. 피험자 선정기준 확립

- 18~80세의 성인남녀
- 현존 자연치아 수가 최소 18개 이상인자
- 첫 내원 시 치주낭 탐침깊이(probing depth, PD)가 4mm 이상인 자
- 첫 내원 시 치낭탐침으로 전치부를 제외한 1 sextant 중 적어도 두 개 치아에서 출혈이 있는 자.
- 치은염 및 만성 경증 및 중증 등 치주염으로 진단된 자

나. 피험자 제외기준

- 서면동의를 하지 않은 자
- 임산부 또는 수유부
- 조절되지 않은 고혈압, 당뇨 등의 전신질환을 앓고 있는 환자
- 방문일 이전 3개월 이내에, 다른 임상시험약물을 투여 받은 경험이 있는 환자
- 출혈성 병력이나 질환을 가진 환자, 또는 이의 예방을 위해 항혈소판제제 또는 항응고제를 복용하고 있는 환자

- 5년 이내에 암이 발현된 환자
- 최근 1개월 이내 항생제를 복용한 경험이 있는 환자
- 최근 6개월 이내 예방적 치과 치료 외의 치주 치료를 받은 환자
- 구강 내 연조직에 심각한 병적 소견을 보이는 환자 (구강암 환자)
- 기타 임상치의의 판단에 적합하지 않다고 판단되는 환자
- 과거 동일 제제 (함유성분 포함)에 대해 과민성이 일어난 환자
- 하루 반 갑 이상의 흡연자

다. 시험대상자 수 산출 및 결정

- 본 연구의 목적 일차적인 목적은 천연물, 곤달비 등 복합추출물 (곤달비와 밀싹의 복합추출물)을 통한 치주질환의 증상개선을 증명하고자 하는 것임. 따라서 이를 평가하기 위한 실험설계는 대조시험물질을 섭취하는 집단과 시험물질을 섭취하는 집단을 분리하여 한 집단은 한 가지 추출물만을 섭취하는 평행설계 방법을 선택하였으며 연속형 변수이므로 귀무가설을 통해서 개선 여부를 반영하여 효능 차이를 평가할 계획을 세움. 이에 대조군피험자수와 시험군 피험자수의 산출 공식은 다음과 같음.
- 연구에 적당한 피험자 수 산정을 위하여 치주질환 증상을 호소하는 피험자를 대상으로 기능성원료를 1개월 섭취 후 치은지수의 개선을 연구한 사전 간이인체적용시험 연구(pilot study) 결과를 활용하였음. 사전연구에서는 점수 개선율에 대한 평균 \pm 표준편차(점)가 곤달비 등 복합추출물 섭취 실험군의 경우 $11.83 \pm 6.23\%$ (n=10), 위약대조군의 경우 $1.06 \pm 2.33\%$ (n=10)의 경과를 보여 유의한 증상개선을 보였음 ($p < 0.05$).
- 본 연구의 유효성 평가를 위한 피험자수를 산정하기 위하여 다음을 가정하여 산출하였음.
 - 1) 두 군 간의 평행설계
 - 2) 유의수준 (level of significance), 5%, 단측검정
 - 3) 제 2종 오류(β)는 0.2로 하여 검정력(power of the test)은 80%를 유지
 - 4) 시험군과 대조군의 시험예수의 비율은 1
 - 5) 시험식품 섭취 후 시험군과 대조군의 기능성 평가변수 비교
- 이를 검증하기 위한 인체적용시험의 가설은 1) 차이검정, 2) 비열등성검정, 3) 동등성 검정의 세 가지 경우가 가능하므로 각각의 경우에 대한 피험자수를 다음과 같이 도출하여 산출하였음.
 - 1) 차이검정의 경우

$$n_c = kn_t, n_t = \frac{(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \sigma^2 (1 + 1/k)}{(\mu_t - \mu_c)^2}$$

(평행설계-1차기능성 평가변수가 연속형 변수인 경우 산출 공식)

- 다음의 식을 통해서 $(1.96+0.84)^2(217.23)(1+1/1)/(10.77)^2$ 로 피험자 수는 군 당 29.3명으로 총 60명이상으로 피험자를 산출하여 실험 설계하여야 함.

2) 비열등성 검정의 경우 (비열등성 한계를 0으로 잡는 경우)

$$n_c = kn_t, n_t = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma^2 (1 + 1/k)}{(\mu_t - \mu_c - \delta)^2}$$

(평행설계-비열등성검정/우울성 검정 하에 1차 기능성 평가변수가 연속형 변수인 경우 산출 공식)

- 다음 식을 통해서 $(1.645+0.84)^2(217.23)(1+1/1)/(10.77)^2$ 로 피험자 수는 군당 23.1명으로 총 48명 이상의 피험자를 산출.

3) 동등성 검증의 경우 (동등성 한계를 0으로 잡는 경우)

$$n_c = kn_t, n_t = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta/2})^2 \sigma^2 (1 + 1/k)}{(|\mu_t - \mu_c| - \delta)^2}$$

(평행설계-동등성검정하에 1차 기능성 평가변수가 연속형 변수인 경우 산출 공식)

- 다음 식을 통해서 $(1.645+1.645)^2(217.23)(1+1/1)/(10.77-0)^2=10.13$ 로 피험자 수는 군당 40.5명으로 총 82명이상의 피험자를 산출하여 실험 설계하여야 함.

- 결과적으로, 본 실험은 연속형 변수, 두 군간 평행설계를 통해서 곤달비 등 복합추출물의 효능을 입증하고자 차이검정, 비열등성검정, 동등성 검정을 모두 다 만족할 수 있는 군당 40.5명 이상을 피험자로 선정하여 연구하고자 실험 설계하였다. 이에 본 연구는 다양한 지표들을 모두 만족해야하기 때문에 82명을 최종 목표로 설정하였음. 대상 피험자는 무작위로 41명을 실험군으로 하였고 나머지 41명을 대조군으로 이중맹검방법을 통해 연구하는 것으로 계획함.

- 최종적으로 본 임상 연구는 약 20% 가량의 탈락율을 예측하고 최종 피험자 100인은 대상으로 연구를 진행함.

라. 인체적용시험 계획 확립

표 28. 치주건강 개선 효능 평가를 위한 인체적용시험 계획

Period	스크리닝&사전검사		관찰	
	1	2	3	
Visit	1	2	3	
Day	Day 0	Day 28 ± 3	Day 56 ± 3	
대상자서면 동의서	✓			
스크리닝 번호 부여	✓			
인구학적 조사	✓			
신장 및 체중	✓		✓	
병력 및 약물 투여력 조사	✓			
활력징후	✓		✓	
신체검사	✓		✓	
선정/제외기준	✓			
혈액, 침, 치은열구액 샘플 채취		✓	✓	
무작위 배정	✓			
섭취시료 배부 (섭취 시작)		✓		
전화 모니터링		✓	✓	
이상반응 확인	✓	✓	✓	
병용양물 조사		✓		

2. IRB 신청 및 승인

- 현재 연세대학교 IRB 신청 완료, 승인.

3. 치주질환 예방 및 개선 소재의 인체적용시험 효능평가를 위한 관련 바이오마커 발굴

- 본 연구진은 오랜 문헌조사와 연구결과를 바탕으로 인체적용시험 효능 평가를 위한 바이오마커 탐색과 간이 임상시험 결과를 기준으로 지표를 설정하여 관련 내용을 국내 학술지에 투고 완료하였음.

4. 치주질환 예방 및 개선 소재의 인체적용시험 효능 평가 계획 수정

해당목차	세부목차	Page	변경 전 내용	변경 후 내용
연구계획서	연구담당자 추가	1	없음	배형철 연구담당자/ 박주현 관리약사 추가 / 이준영 연구담당자 삭제
연구계획서	8.1.1선정기준	3	4mm 이상	3~5mm

			두 개 치아	한 개 치아
연구계획서	9.1.1 초진	6	초진 시 치석제거술	삭제
연구계획서	9.1.1 baseline	6	초진 치석제거술 시행 4주일 후	스크리닝 및 사전검사 4주일 후
연구계획서	9.1.5투여 방법 및 투여 기간	6	1캡슐	2캡슐
연구계획서	9.2.4 치은출혈지수	7	9.2.4 치은출혈지수	삭제
연구계획서		7	없음	치태지수 (Plaque Index) -협면, 설면을 대상으로 치면에 있는 치태두께만을 측정한다. 0 : No plaque 1 : Separate flecks of plaque at the cervical margin of the tooth 2 : A thin continuous band of plaque (up to one mm) at the cervical margin of the tooth 3 : A band of plaque wider than one mm but converging less than one-third of the crown of the tooth 4 : Plaque covering at least one-third but less than two-third of the crown of the tooth 5: Plaque covering two-thirds or more of the crown of the tooth
연구계획서	10.2 임상시험의	9	치은출혈지수	출혈지수

	유효성 평가			
연구계획서	10.2 임상시험의 유효성 평가		없음	1차 유효성 평가 : Gingival Index, BOP 2차 유효성 평가 : PD, CAL, Plaque Index, BOP, GR, Saliva , 치 은열구액 안정성평가 : 이상반응, 활력징후(혈압, 맥박), 체중 ,임상병리검사(혈 액학적/ 혈액화학적 검 사, 뇨검사)
연구계획서	10.3.2.인구학 적 조사 및 병력	9	-인구학적 조 사 : 성명, 생 명월일, 나이, 교육수준, 직 업, 성별 -신체 크기와 활력중후 : 체 중, 신장, 체질 량지수, 혈압, 맥박	-인구학적 조사 : 성명, 생명월일, 나이, 성별 -신체 크기와 활력중후 : 체중, 신장, 혈압, 맥 박
연구계획서	10.3.4	9	* 피험자 식별 코드는 다음과 같은 방법에 따라 기입함. - 실시기관 코 드: 연세대학 교병원 (YSH) - 피험자 식별 코드: 실시기 간코드-실시년 도-시험일련번 호-등록된 순 서 [예]연세대 학교병원 2017 년 첫 번째 승 인된 임상시험 에서 다섯 번 째 등록된 피	임상시험 참여에 동의 하고, 인구학적 조사, 병력 / 치과력 조사 문 진 등을 통하여 피험자 선정 및 제외기준에 적 합한 피험자에 한하여 피험자 식별코드 'B-SXXX' 로 부여함.

			협자: YSH-17-01-05]	
연구계획서	10.3.6	10	시험자는 임상 시험에 사용되는 시료 섭취 후 나타나는 이상반응 여부를 최초 섭취 이후 일주마다 피험자에게 전화 문진표를 통해서 확인하고 관찰하여 임상시험 시료와의 인과관계에 대하여 증례기록서에 기록함.	시험자는 임상시험에 사용되는 시료 섭취 후 나타나는 이상반응 여부를 최초 섭취 이후 매 방문시 문진 및 전자기록 (EMR)으로 확인하고 증례기록서에 기록함
연구계획서	15.연구수행 일정표	12	무작위 배정 : V1 병용약물 조사 : V2 혈액 채취 : V2,3 유효성 평가변수 : 없음 파노라마 (Panorama) : 없음	무작위 배정 : V2 병용약물 조사 : V2, V3 혈액 채취 : V1,3 유효성 평가변수 : 추가 파노라마 (Panorama) : 추가
연구계획서	15.연구수행 일정표	12	Day 28+-3 / Day 56+-3	Day 28+-7 / Day 56+-7
증례기록서	임상시험 일정	3	무작위 배정 : V1 병용약물 조사 : V2 혈액 채취 : V2,3 유효성 평가변수 : 없음	무작위 배정 : V2 병용약물 조사 : V2, V3 혈액 채취 : V1,3 유효성 평가변수 : 추가 파노라마(Panorama) : 추가

			파노라마 (Panorama) : 없음	
증례기록서	Visit 1	4, 7, 8		유효성 평가 (PD , BOP), 임상병리검사 추가
증례기록서	Visit 3	13		스켈링 시행 추가
증례기록서	임상병리검사	16		임신반응검사 추가
증례기록서		10, 16	치은지수(GI), 치태지수(PI), 유효성 평가표	유효성 평가표
동의서	4.임상시험에 서 받게될 각종 절차나 검사	2	없음	첫 번째 방문 시 Probing을 통해 적응증 확인 후 혈액 채취를 실시
동의서	임상시험 참여기간	3	무작위 배정 : V1 병용약물 조사 : V2 혈액 채취 : V2,3	무작위 배정 : V2 병용약물 조사 : V2, V3 혈액 채취 : V1,3 유효성 평가변수 : 추 가 파노라마(Panorama) : 추가
동의서	선정기준	4	4mm이상	3~5mm
동의서	11.임상시험에 따른 혜택 및 비용	6	없음	10만원 상당의 교통비 가 지원됩니다.

- 본 연구는 최초로 치주조직 건강 및 질환 예방을 위한 천연물 유래 식의약소재의 인체적용시험 효능평가의 기준을 마련하는 연구로서 실험과정 중에 기준에 대한 다양한 변수가 존재하고 있었음. 따라서 연구 진행과정에서 지속적인 시행착오를 겪으면서 최종 연구 기준을 확립하였음.
 - 이에 인체적용시험은 현재 20명의 피험자를 모집하여 연구수행 중에 있으며 추가 피험자 대상 연구를 수행하고 있음.
5. 인체적용시험을 통해 치주질환의 바이오마커의 구축 및 기준 확립
- 치주 질환을 진단할 수 있는 기준으로서 치주낭깊이 3mm 이상과 탐침시 출혈 10% 이상 지표의 맥네마 검정

표 29. 치주낭깊이를 통한 진단과 탐침시출혈을 통한 진단 비교 평가

PD를 통한 진단	BOP를 통한 진단	
	정상	질환
정상	15	17
질환	0	67

표 30. PD질환진단과 BOP질환진단간의 맥네마검정

검정 통계량 ^a	PD질환진단 & BOP질환진단
	N
정확 유의확률 (양측)	.000 ^b

a McNemar 검정

b 이항분포를 사용함.

- 치주질환을 진단하는 가장 대표적인 지표는 6개의 치아를 통해서 확인한 치주낭 깊이가 3mm 이상 또는 탐침시 출혈이 10% 이상인 경우임. 이두가지 진단 방법이 과연 동일한 진단 결과를 보여줄 수 있는지 확인해보기위해서 100명의 피험자를 통해서 맥네마 검정을 진행한 결과 두 진단 방법이 다른 결과를 보여줄 수 있음을 확인할 수 있었음. 따라서 두 가지 진단법 별로 질환을 예측할 수 있는 바이오마커를 구축하는 것이 중요할 것으로 예상됨.

6. 치주낭깊이(PD)를 통한 치주질환 평가 바이오마커 구축 (100명 대상)

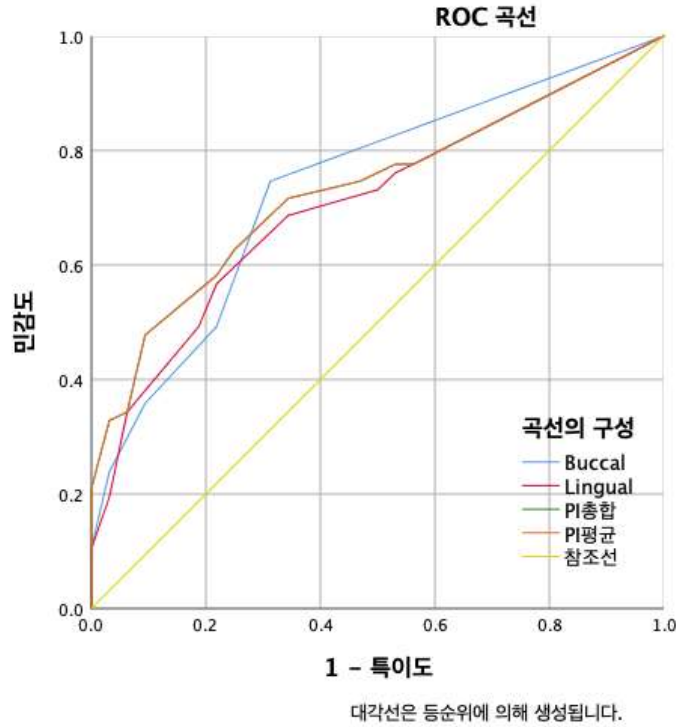


그림 108. 치주낭깊이 3mm 이상 치주질환의 진단을 위한 치은염증(PI) 지표 분석 ROC 곡선

표 31. 치주질환과 치은염증 지표 ROC 곡선 아래영역 분석

검정결과변수	영역	표준화오류 ^a	근사유의확률 ^b	근사 95% 신뢰구간	
				하한	상한
PI (협면)	0.736	0.052	0.000	0.633	0.838
PI (설면)	0.707	0.053	0.001	0.603	0.810
총 PI	0.732	0.050	0.000	0.634	0.830
평균 PI	0.732	0.050	0.000	0.634	0.830

검정 결과 변수: PI (설면), PI(협면), PI총합, PI평균에는 실제 양의 반응 집단과 실제 음의 반응 집단 사이에 하나 이상의 등순위가 있습니다. 통계량은 편향될 수 있습니다.

a. 비모수 분포 가정

b. 영가설: 실제영역 = 0.5

- 치주질환의 지표인 치주낭깊이 3mm 이상의 질환군을 진단할 수 있는 바이오마커로서 치은염증 지수 (PI)을 총 6개의 치아에서 확인하여 협면 PI 값 평균, 설면 PI 값 평균, 총 PI값, 평균 PI 값과의 질환 진단 ROC 곡선을 확인한 결과 유의확률이 통계학적으로 유의함을 확인할 수 있었음. 즉, PI 값은 치주건강을 진단할 수 있는 좋은 바이오마커로서 충분히 사용될 수 있음을 보여주는 것임.

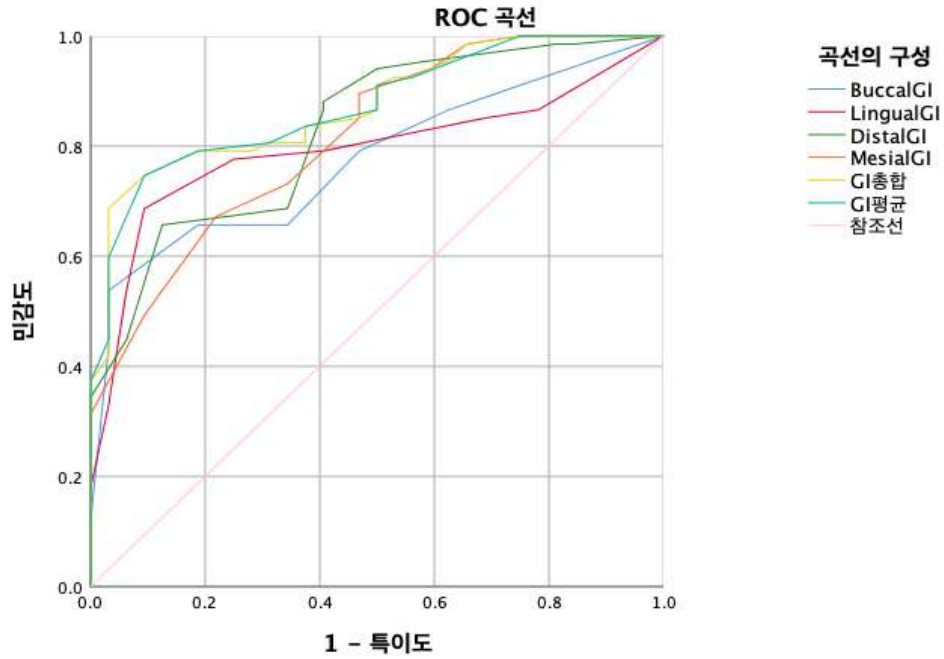


그림 109. 치주낭깊이 3mm 이상 치주질환의 진단을 위한 치은지수 (GI) 지표 분석 ROC 곡선

표 32. 치주질환과 치은지수 지표 ROC 곡선 아래영역 분석

검정결과변수	영역	표준화오류 ^a	근사유의확률 ^b	근사 95% 신뢰구간	
				하한	상한
GI (협면)	0.773	0.047	0	0.681	0.866
GI (설면)	0.796	0.046	0	0.706	0.886
GI (원심면)	0.824	0.044	0	0.738	0.91
GI (근심면)	0.817	0.045	0	0.729	0.904
총 GI	0.878	0.034	0	0.812	0.945
평균 GI	0.876	0.035	0	0.808	0.944

검정 결과 변수: BuccalGI, LingualGI, DistalGI, MesialGI, GI총합, GI평균에는 실제 양의 반응 집단과 실제 음의 반응 집단 사이에 하나 이상의 등순위가 있습니다. 통계량은 편향될 수 있습니다.

a. 비모수 분포 가정

b. 영가설: 실제영역 = 0.5

- 치주질환의 지표인 치주낭깊이 3mm 이상의 질환군을 진단할 수 있는 바이오마커로서 치은지수 (GI)을 총 6개의 치아에서 확인하여 협면 GI 값 평균, 협면 GI 값 평균, 원심면 GI 값 평균, 근심면 GI 값 평균, 총 GI값, 평균 GI 값과의 질환 진단 ROC 곡선을 확인한 결과 유의확률이 통계학적으로 유의함을 확인할 수 있었음. 즉, GI 값은 치주건강을 진단할 수 있는 좋은 바이오마커로서 충분히 사용될 수 있음을 보여주는 것임.

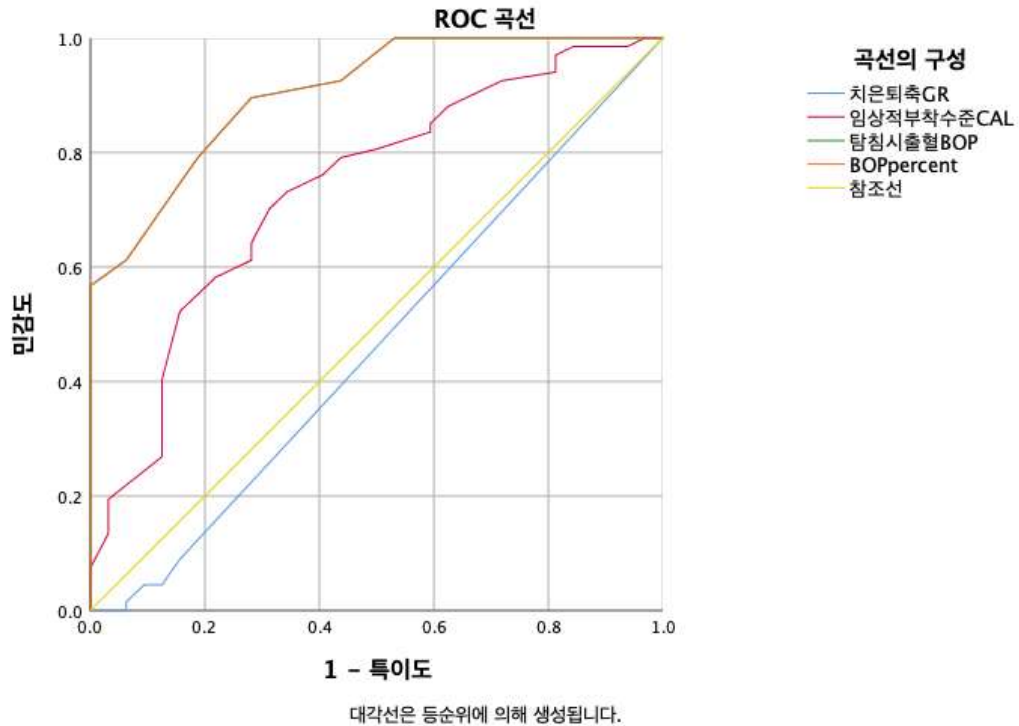


그림 110. 치주낭깊이 3mm 이상 치주질환의 진단을 위한 치은퇴축, 임상적부착수준, 탐침시출혈, 탐침시출혈율 분석 ROC 곡선

표 33. 치주질환과 치은퇴축, 임상적부착수준, 탐침시출혈, 탐침시출혈율 지표 ROC 곡선 아래 영역 분석

검정결과변수	영역	표준화오류 ^a	근사유의확률 ^b	근사 95% 신뢰구간	
				하한	상한
치은퇴축(GR)	0.48	0.065	0.761	0.352	0.608
임상적부착수준(CAL)	0.754	0.053	0	0.651	0.858
탐침시출혈(BOP)	0.898	0.032	0	0.835	0.96
BOP(%)	0.898	0.032	0	0.835	0.96

검정 결과 변수: 치은퇴축GR에는 실제 양의 반응 집단과 실제 음의 반응 집단 사이에 하나 이상의 등순위가 있습니다. 통계량은 편향될 수 있습니다.

a. 비모수 분포 가정

b. 영가설: 실제영역 = 0.5

- 치주질환의 지표인 치주낭깊이 3mm 이상의 질환군을 진단할 수 있는 바이오마커로서 치은지수 (GI)을 총 6개의 치아에서 확인하여 치은퇴축, 임상적부착수준, 탐침시출혈, 탐침시출혈율(BOP, %)과의 질환 진단 ROC 곡선을 확인한 결과 치은퇴축은 통계학적 유의성이 없었지만 다른 지표들은 모두 유의확률이 통계학적으로 유의함을 확인할 수 있었음. 즉, 임상적부착수준, 탐침시출혈, 탐침시출혈율은 치주건강을 진단할 수 있는 좋은 바이오마커로서 충분히 사용될 수 있음을 보여주는 것임.

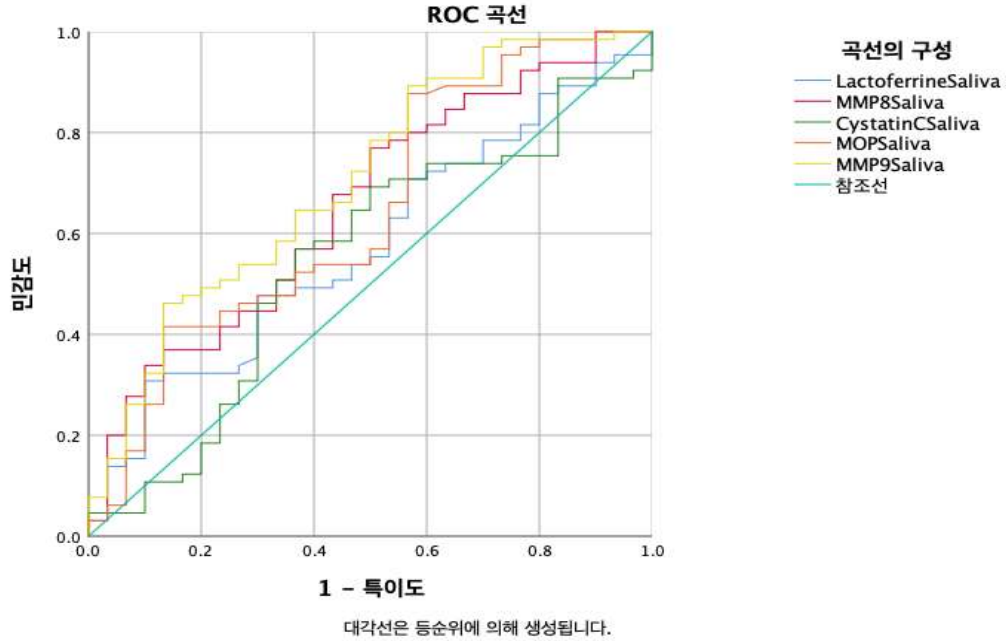


그림 111. 치주낭깊이 3mm 이상 치주질환의 진단 위한 침 (saliva)에서의 Lactoferrine, MMP 8, Cystatin C, MOP, MMP 9 분석 ROC 곡선

표 34. 치주질환과 침 (saliva)에서의 Lactoferrine, MMP 8, Cystatin C, MOP, MMP 9 지표 ROC 곡선 아래영역 분석

검정결과변수	영역	표준화오류 ^a	근사유의확률 ^b	근사 95% 신뢰구간	
				하한	상한
Lactoferrine (Saliva)	0.562	0.062	0.338	0.44	0.684
MMP8 (Saliva)	0.659	0.061	0.014	0.54	0.777
Cystatin C (Saliva)	0.551	0.065	0.434	0.422	0.679
MOP (Saliva)	0.653	0.063	0.018	0.53	0.776
MMP9 (Saliva)	0.706	0.059	0.001	0.591	0.821

검정 결과 변수: LactoferrineSaliva, MOPSaliva에는 실제 양의 반응 집단과 실제 음의 반응 집단 사이에 하나 이상의 등순위가 있습니다. 통계량은 편향될 수 있습니다.

a. 비모수 분포 가정

b. 영가설: 실제영역 = 0.5

- 치주질환의 지표인 치주낭깊이 3mm 이상의 질환군을 진단할 수 있는 바이오마커로서 침 (saliva)에서의 Lactoferrine, MMP 8, Cystatin C, MOP, MMP 9과의 질환 진단 ROC 곡선을 확인한 결과 Lactoferrine과 Cystatin C 은 통계학적 유의성이 없었지만 다른 지표들은 모두 유의확률이 통계학적으로 유의함을 확인할 수 있었음. 즉, MMP 8, MOP, MMP 9은 치주건강을 진단할 수 있는 좋은 바이오마커로서 충분히 사용될 수 있음을 보여주는 것임.

7. 탐침시출혈 (BOP)를 통한 치주질환 평가 바이오마커 구축 (100명 대상)

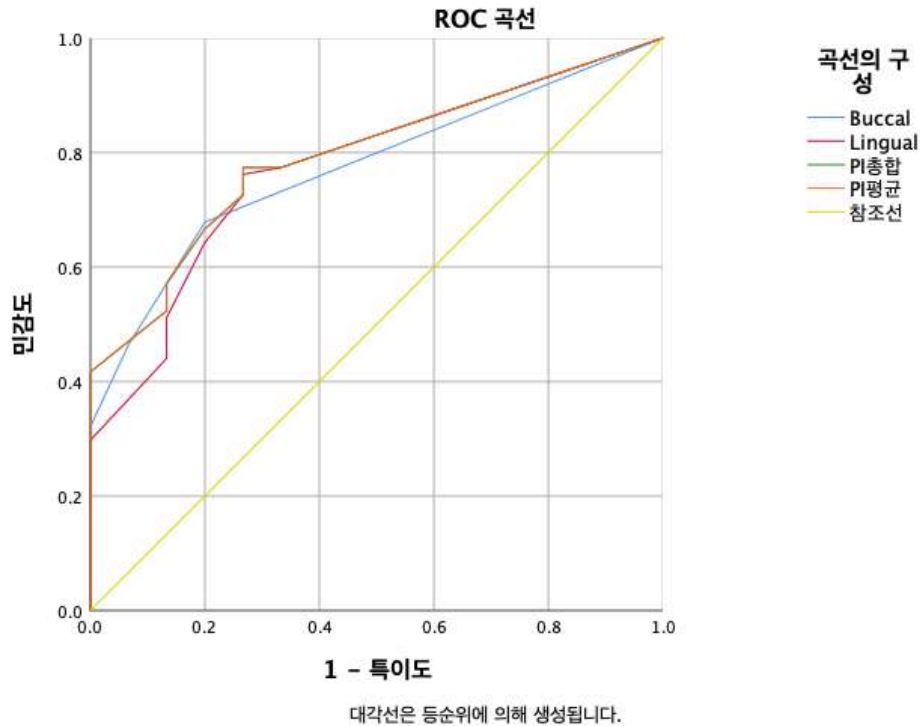


그림 112. 탐침시출혈을 10% 이상 치주질환의 진단을 위한 치은염증(PI) 지표 분석 ROC 곡선

표 35. 치주질환과 치은염증 지표 ROC 곡선 아래영역 분석

검정결과변수	영역	표준화오류 ^a	근사유의확률 ^b	근사 95% 신뢰구간	
				하한	상한
PI (협면)	0.774	0.053	0.001	0.67	0.878
PI (설면)	0.776	0.058	0.001	0.662	0.889
총 PI	0.793	0.052	0	0.692	0.894
평균 PI	0.793	0.052	0	0.692	0.894

검정 결과 변수: PI (설면), PI(협면), PI총합, PI평균에는 실제 양의 반응 집단과 실제 음의 반응 집단 사이에 하나 이상의 등순위가 있습니다. 통계량은 편향될 수 있습니다.

a. 비모수 분포 가정

b. 영가설: 실제영역 = 0.5

- 치주질환의 지표인 탐침시출혈을 10% 이상의 질환군을 진단할 수 있는 바이오마커로서 치은염증 지수 (PI)을 총 6개의 치아에서 확인하여 협면 PI 값 평균, 설면 PI 값 평균, 총 PI값, 평균 PI 값과의 질환 진단 ROC 곡선을 확인한 결과 유의확률이 통계학적으로 유의함을 확인할 수 있었음. 즉, PI 값은 치주건강을 진단할 수 있는 좋은 바이오마커로서 충분히 사용될 수 있음을 보여주는 것임.

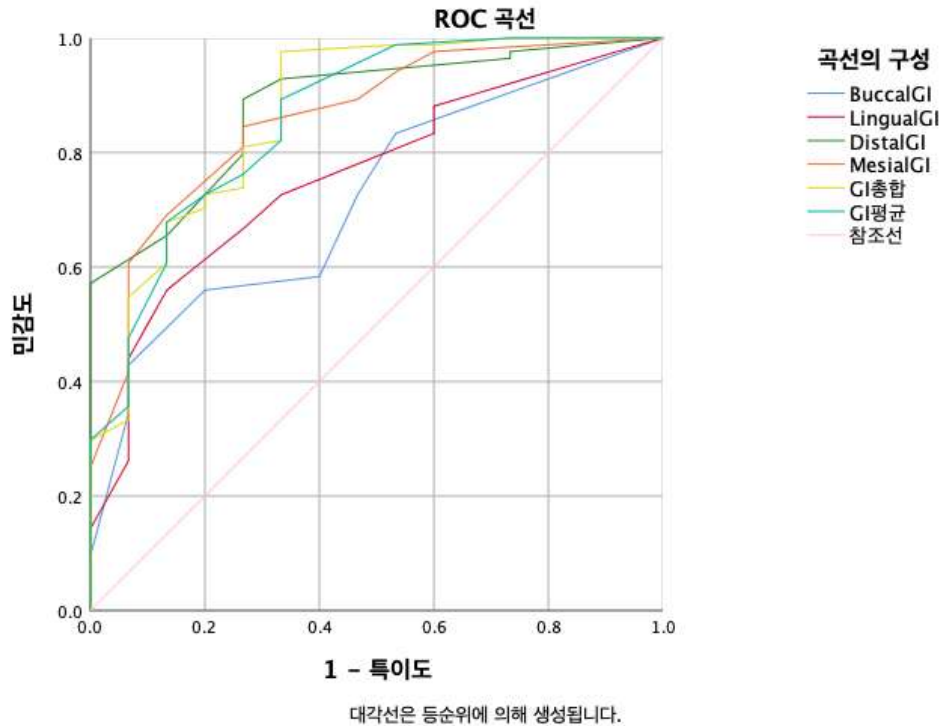


그림 113. 탐침시출혈을 10% 이상치주질환의 진단을 위한 치은지수 (GI) 지표 분석 ROC 곡선

표 36. 치주질환과 치은지수(GI) 지표 ROC 곡선 아래영역 분석

검정결과변수	영역	표준화오류 ^a	근사유의확률 ^b	근사 95% 신뢰구간	
				하한	상한
GI (협면)	0.718	0.065	0.007	0.591	0.846
GI (설면)	0.759	0.061	0.001	0.639	0.879
GI (원심면)	0.881	0.041	0	0.801	0.962
GI (근심면)	0.86	0.05	0	0.761	0.958
총 GI	0.87	0.054	0	0.764	0.976
평균 GI	0.861	0.054	0	0.755	0.967

검정 결과 변수: BuccalGI, LingualGI, DistalGI, MesialGI, GI총합, GI평균에는 실제 양의 반응 집단과 실제 음의 반응 집단 사이에 하나 이상의 등순위가 있습니다. 통계량은 편향될 수 있습니다.

a. 비모수 분포 가정

b. 영가설: 실제영역 = 0.5

- 치주질환의 지표인 탐침시출혈을 10% 이상의 질환군을 진단할 수 있는 바이오마커로서 치은지수 (GI)을 총 6개의 치아에서 확인하여 협면 GI 값 평균, 협면 GI 값 평균, 원심면 GI 값 평균, 근심면 GI 값 평균, 총 GI값, 평균 GI 값과의 질환 진단 OC 곡선을 확인한 결과 유의확률이 통계학적으로 유의함을 확인할 수 있었음. 즉, GI 값은 모두 치주건강을 진단할 수 있는 좋은 바이오마커로서 충분히 사용될 수 있음을 보여주는 것임.

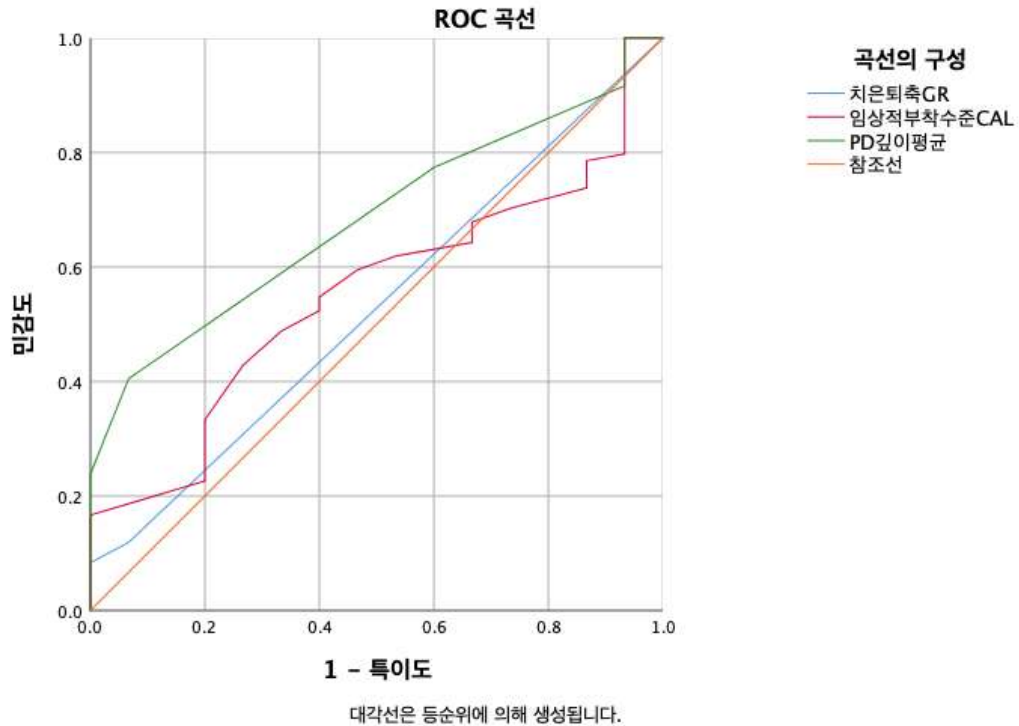


그림 114. 탐침시출혈을 10% 이상 치주질환의 진단을 위한 치은퇴축, 임상적부착수준, PD깊이 평균 분석 ROC 곡선

표 37. 치주질환과 치은퇴축, 임상적부착수준, PD평균 깊이 지표 ROC 곡선 아래영역 분석

검정결과변수	영역	표준화오류 ^a	근사유의확률 ^b	근사 95% 신뢰구간	
				하한	상한
치은퇴축(GR)	0.525	0.081	0.769	0.366	0.684
임상적부착수준(CAL)	0.538	0.074	0.652	0.392	0.684
PD의 평균깊이	0.679	0.064	0.033	0.554	0.805

검정 결과 변수: 치은퇴축GR, 임상적부착수준CAL, PD깊이평균에는 실제 양의 반응 집단과 실제 음의 반응 집단 사이에 하나 이상의 등순위가 있습니다. 통계량은 편향될 수 있습니다.

a. 비모수 분포 가정

b. 영가설: 실제영역 = 0.5

- 치주질환의 지표인 탐침시출혈을 10% 이상의 질환군을 진단할 수 있는 바이오마커로서 치은지수 (GI)을 총 6개의 치아에서 확인하여 치은퇴축, 임상적부착수준, PD 평균깊이와의 질환 진단 ROC 곡선을 확인한 결과 치은퇴축과 임상적부착수준은 통계학적 유의성이 없었지만 PD 평균깊이는 치주건강을 진단할 수 있는 좋은 바이오마커로서 충분히 사용될 수 있음을 보여주는 것임.

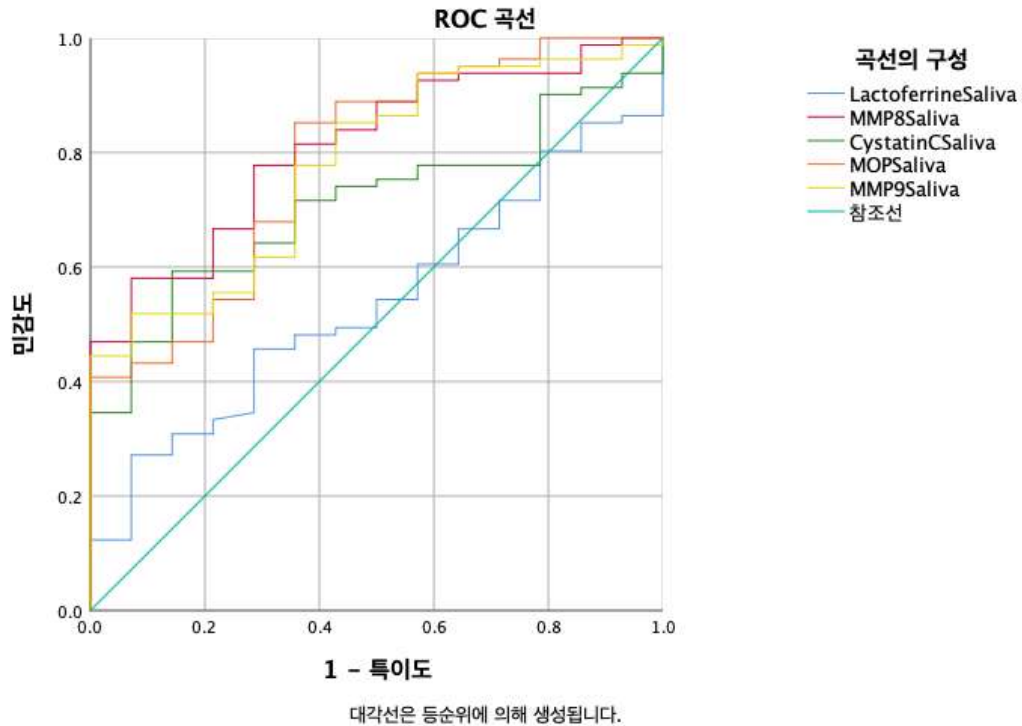


그림 115. 탐침시출혈을 10% 이상 치주질환의 진단 위한 침 (saliva)에서의 Lactoferrine, MMP 8, Cystatin C, MOP, MMP 9 분석 ROC 곡선

표 38. 치주질환과 침 (saliva)에서의 Lactoferrine, MMP 8, Cystatin C, MOP, MMP 9 지표 ROC 곡선 아래영역 분석

검정결과변수	영역	표준화오류 ^a	근사유의확률 ^b	근사 95% 신뢰구간	
				하한	상한
Lactoferrine (Saliva)	0.525	0.072	0.769	0.384	0.665
MMP8 (Saliva)	0.814	0.054	0	0.709	0.919
Cystatin C (Saliva)	0.712	0.058	0.012	0.598	0.825
MOP (Saliva)	0.793	0.064	0.001	0.669	0.918
MMP9 (Saliva)	0.777	0.061	0.001	0.658	0.896

검정 결과 변수: LactoferrineSaliva에는 실제 양의 반응 집단과 실제 음의 반응 집단 사이에 하나 이상의 등순위가 있습니다. 통계량은 편향될 수 있습니다.

a. 비모수 분포 가정

b. 영가설: 실제영역 = 0.5

- 치주질환의 지표인 탐침시출혈을 10% 이상의 질환군을 진단할 수 있는 바이오마커로서 침 (saliva)에서의 Lactoferrine, MMP 8, Cystatin C, MOP, MMP 9과의 질환 진단 ROC 곡선을 확인한 결과 Lactoferrine은 통계학적 유의성이 없었지만 다른 지표들은 모두 유의확률이 통계학적으로 유의함을 확인할 수 있었음. 즉, MMP 8, Cystatin C, MOP, MMP 9은 치주건강을 진단할 수 있는 좋은 바이오마커로서 충분히 사용될 수 있음을 보여주는 것임.

8. 본 연구를 통해 최종 개발된 곤달비 등 추출복합물의 인체적용시험 효능 평가 결과

가. 곤달비 등 추출복합물 (tees-10) 섭취에 의한 치주 질환 개선 효능 평가
 (1) 곤달비 등 추출복합물 섭취에 의한 PD 3mm 이상 질환군 비율 개선 효능

표 39. 곤달비 등 추출복합물 (tees-10) 섭취에 의한 치주질환 개선 효능

		대조군		실험군	
		섭취전	섭취후	섭취전	섭취후
PD 3mm 이상	정상	19	12	14	26
	질환	31	37	36	21
전체		50	49	50	47

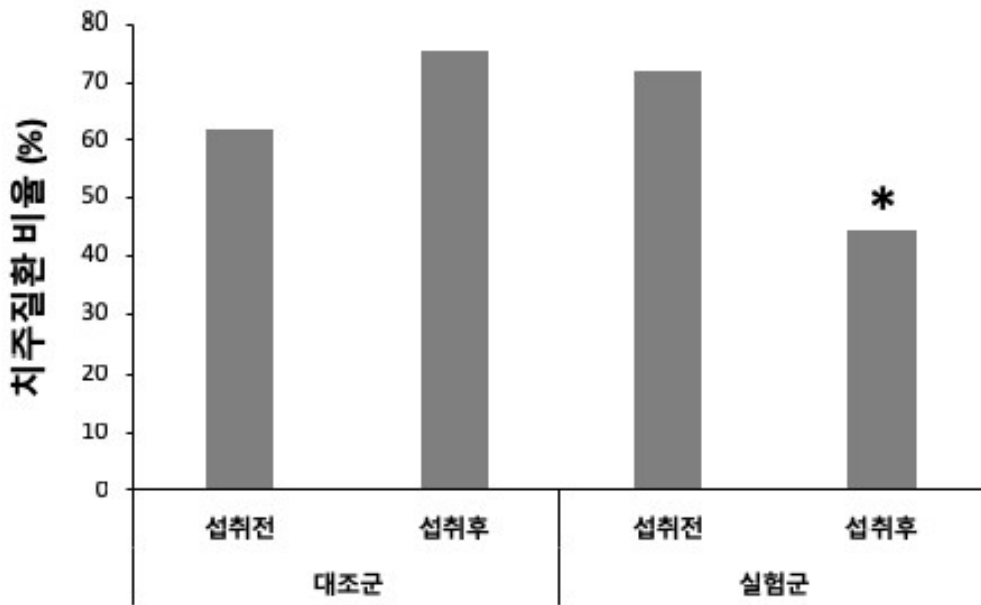


그림 116. 곤달비 등 추출복합물 처리에 의한 PD 3mm 이상의 질환 개선 효능

- 곤달비 등 추출복합물 (tees-10)를 한달간 섭취한 피험자들의 경우 대조군과 비교하여 섭취전후 통계적으로 유의한 개선을 확인할 수 있었음 ($p < 0.05$). 대조군의 경우 오히려 섭취전후 약 5% 가량의 질환군 (PD 3mm 이상의 질환군) 비율이 증가되었지만 tees-10을 섭취한 경우 **약 38% 가량**의 통계적으로 유의미한 질환군 비율이 관찰되었음. 섭취 전 비율은 실험군과 대조군 간의 통계학적 차이를 보이지 않았음. 위 통계는 피어슨 카이제곱검정과 피셔의 정확검정 모두에서 섭취전후 분명한 차이를 보였으며 섭취 후 실험군과 대조군간에도 뚜렷한 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었음.
- 각 비율의 위험도 추정값에 있어서도 올바른 신뢰 구간 안에서 유의한 차이를 보였음.

(2) 곤달비 등 추출복합물 섭취에 의한 BOP 10mm 이상 질환군 비율 개선 효능

표 40. 곤달비 등 추출복합물 (tees-10) 섭취에 의한 치주질환 개선 효능

		대조군		실험군	
		섭취전	섭취후	섭취전	섭취후
BOP 10% 이상	정상	10	8	6	17
	질환	40	41	44	30
전체		50	49	50	47

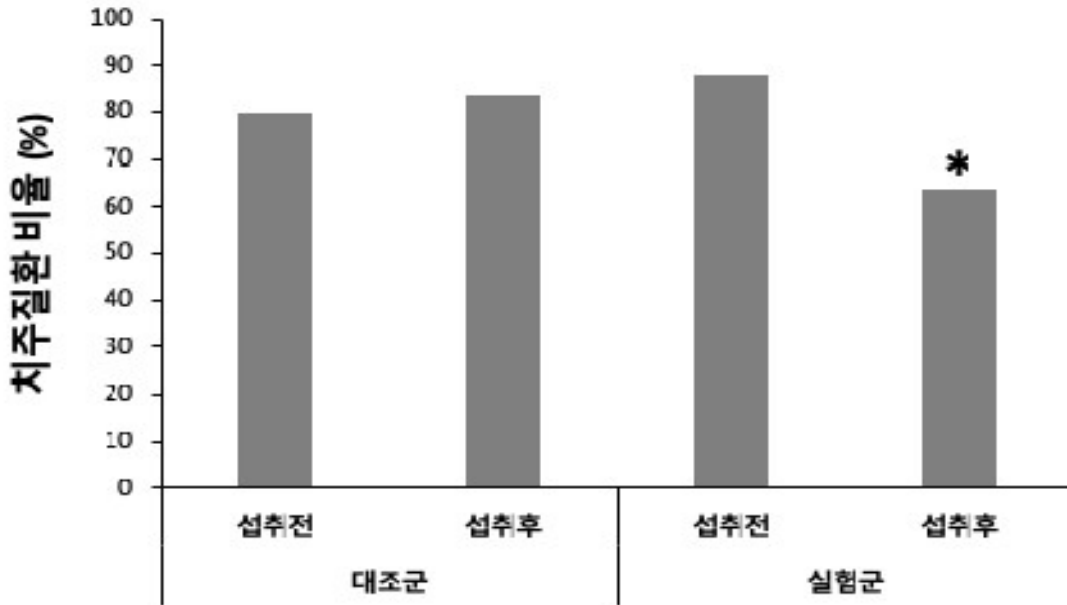


그림 117. 곤달비 등 추출복합물 처리에 의한 BOP 10% 이상의 질환 개선 효능

- 곤달비 등 추출복합물 (tees-10)를 한달간 섭취한 피험자들의 경우 대조군과 비교하여 섭취전후 통계적으로 유의한 개선을 확인할 수 있었음 ($p < 0.05$). 대조군의 경우 오히려 섭취전후 약 5% 가량의 질환군 (BOP 10% 이상의 질환군) 비율이 증가되었지만 tees-10을 섭취한 경우 **약 27% 가량**의 유의한 질환군 비율 개선이 관찰되었음. 섭취 전 비율은 실험군과 대조군 간의 통계학적 차이를 보이지 않았음. 위 통계는 피어슨 카이제곱검정과 피셔의 정확검정 모두에서 섭취전후 분명한 차이를 보였으며 섭취 후 실험군과 대조군간에도 뚜렷한 차이를 보이는 것을 확인 할 수 있었음.
- 각 비율의 위험도 추정값에 있어서도 올바른 신뢰 구간 안에서 유의한 차이를 보였음.

(2) 결론

- 곤달비 등 추출복합물을 한달간 섭취한 실험군과 위약을 섭취한 대조군에서 섭취 전후 비교한 결과 PD 3mm 이상의 질환군 비율이 약 38% 가량 개선되는 것을 확인할 수 있었으며 이는 치주 및 잇몸 질환의 발병을 효과적으로 억제하고 더 이상

- 의 잇몸 및 치주 조직 손상을 효과적으로 막아 질환을 개선시킬 수 있음을 보여주는 것임.
- BOP 10% 이상의 질환군을 대상으로 대조군과 실험군을 비교분석한 결과에 있어서도 PD 3mm 이상을 기준으로 진단한 기준으로 판단한 결과와 비슷한 연구결과를 도출할 수 있었음. 곤달비 등 추출복합물을 섭취한 실험군의 경우 약 27% 가량의 질환군의 비율이 개선됨을 확인할 수 있었으며 대조군과 비교하여 통계학적으로 약 32% 가량의 뚜렷한 질환군 비율 개선을 보여주었음.
 - 곤달비 등 추출복합물을 개선을 본 과제를 통해서 한국인의 맞춤형 치주 바이오마커 개선정도를 확인해보기 위해서 saliva 칩에서 잇몸 및 치주조직 파괴 인자 억제 효과를 확인하였음. 결과적으로 곤달비 등 추출복합물은 치주질환군에서 주로 나타나는 잇몸 및 치주조직 파괴인자의 효소 활성 증가를 0 % 수준으로 극단적으로 억제하고 감소시키는 것을 관찰 할 수 있었음. 이는 치주조직의 손상을 막고 동시에 잇몸 염증 등을 억제할 수 있는 작용기전을 전체적으로 보여주는 결과라고 할 수 있음.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1장. 목표

1절. 핵심기술 달성목표

1. 구강 미생물의 치태 (biofilm) 형성 억제를 통한 치주질환 예방 효능
2. 특이적 미생물 독소성분 (virulence factor)에 의한 염증 억제 효능
3. 구강조직내 기질분해효소 (MMP) 분비 억제를 통한 치주조직 보호 효능
4. 치조골내 골흡수 작용 억제를 통한 전체적 구강건강 유지 및 개선
5. 30% 이상의 구강 및 치주질환 예방 및 개선 효능 확보를 통한 건강나이-3.4세 달성

2절. 주요 고부가가치식품 개발의 학술적 성과목표

1. 치주질환 개선 식품소재 개발을 위한 다양한 천연소재의 활용도 제고를 위한 바이오 마커
2. 치주질환 개선 식품소재의 활용도를 위한 100건 이상의 DB 구축
3. 사람 치주인대세포의 안정적인 증식 유지를 위한 작용 기전 규명 연구
4. 사람 치은섬유아세포의 증식 활성화를 위한 분자적 신호전달 체계 규명
5. 국내 최초 천연물을 통한 치주질환 개선 특허 확보 및 우수 학술지 게재

3절. 주요 산업화 성과목표

1. 치주질환 개선 효능을 갖는 천연소재 개발을 통해 새로운 농업분야 개척 및 농가소득 창출
2. 국내 최초 치주건강개선 건강기능식품 개발을 통한 새로운 시장 개척
3. 치주건강 개선 소재 관련 제품화 3건 이상 달성을 통해 국내외 100억원 매출달성
4. 치주질환 예방 및 개선 기능성 소재의 기술 이전을 통해 건강기능식품 관련 산업발전
5. 구강건강 관련 해외 상품의 대체효과 및 국제화를 통한 100억원 이상의 가치창출

2장. 목표 달성여부

1 절. 목표달성도

표 41. 연구목표 및 연구개발목표의 달성

연구목표	세부 연구목표	달성도
국내 천연물 유래 치주질환 예방 및 개선용 소재 연구를 위한 핵심 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 구강 미생물의 치태 (biofilm) 형성 억제를 통한 치주질환 예방 효능 - 특이적 미생물 독소성분 (virulence factor)에 의한 염증 억제 효능 - 구강조직내 기질분해효소 (MMP) 분비 억제를 통한 치주조직 보호 효능 - 치조골내 골흡수 작용 억제를 통한 전체적 구강건강 유지 및 개선 - 30% 이상의 구강 및 치주질환 예방 및 개선 효능 확보를 통한 건강나이-3.4세 달성 	100
국내 천연물 유래 치주질환 예방 및 개선용 소재의 고부가가치 식품화를 위한 학술적 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 치주질환 개선 식품소재 개발을 위한 다양한 천연소재의 활용도 제고를 위한 바이오마커 - 치주질환 개선 식품소재의 활용도를 위한 100건 이상의 DB 구축 - 사람 치주인대세포의 안정적인 증식 유지를 위한 작용 기전 규명 연구 - 사람 치은섬유아세포의 증식 활성화를 위한 분자적 신호전달 체계 규명 - 국내 최초 천연물을 통한 치주질환 개선 특허 확보 및 우수 학술지 게재 	100
국내 천연물 유래 치주질환 예방 및 개선용 소재의 고부가가치 식품 산업화	<ul style="list-style-type: none"> - 치주질환 및 개선 효능을 갖는 천연소재의 국내외 효능 및 안전성 승인 - 치주질환 개선 효능을 갖는 천연소재 개발을 통해 새로운 농업분야 개척 및 농가소득창출 - 국내 최초 치주건강개선 건강기능식품 개발을 통한 새로운 시장 개척 - 치주건강 개선 소재 관련 제품화 3건 이상 달성을 통해 국내외 100억원 매출달성 - 치주질환 예방 및 개선 기능성 소재의 기술 이전을 통해 건강기능식품 관련 산업발전 - 구강건강 관련 해외 상품의 대체효과 및 국제화를 통한 100억원 이상의 가치창출 	90

2 절. 관련분야 기여도

1. 치주질환 예방·개선 소재의 전임상 효능 평가 및 작용기전 규명
 - 염증 및 치조골 흡수 억제 천연물 소재 발굴을 위한 연구기법을 확립하여 지속적인 소재 발굴이 가능함.
 - 치주염 특이 바이오마커 후보군을 제시하여 효능이 우수한 소재를 효과적으로 개발할 수 있음.
 - 본 과제를 통해서 구축된 효능 평가 DB를 기반으로 치주질환 예방·개선 소재로 개발가능성이 높은 천연물 소재를 다수 확보함.

2. 국내 임상 연구를 기반으로 한국인에 최적화된 치주건강 개선 효능평가 지표 개발
 - 국내 피험자를 대상으로 질환의 평가를 위한 바이오마커를 구축하고 이를 논문화 함으로서 국내 건강기능식품소재 및 치주 건강 개선 소재 효능 평가 기준을 마련 함
 - 최근 다양한 국가 연구 기관에서 제대로 된 치주건강 개선 소재를 개발하고 제품 화하고자하는 노력을 기울이고 있으나 국내 연구를 기반으로 한 최초의 진단 기준 을 제시한 결과임.
 - 약 100건 이상의 바이오마커를 검증하고 다양한 통계검증 과정으로 통해서 최적의 치주건강 진단 바이오마커를 제시함.

3. 최초로 치주 및 잇몸 건강 개선에 도움을 줄 수 있는 국내 천연물유래 소재개발함 으로서 다양한 산업적 가치를 창출함
 - 국내 천연물에서 유래한 치주건강 개선에 효능을 갖는 소재를 최초로 개발하여 고 부가가치화 다양한 제품군으로 개발 가능함 (현재 치약, 껌, 구강청결제, 구취제거 제, 구강살균스프레이 등으로 개발 중임.)
 - 국내 최초로 개별인정을 신청하고자함. 이를 통해서 국내 건강기능식품 시장을 확 대하고 국민건강 개선에 직간접적으로 영향을 줄 수 있음.
 - 해외 NDI 등을 진행 중에 있으므로 국내 소재를 기반으로 해외 수출을 이뤄냄으로 서 국가적 가치를 창출 할 수 있을 것으로 예상됨.
 - 국내 천연물을 통해서 기능성 소재를 개발함으로써 국내 농가수익 창출

3장. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

1절. 국내외 승인완료 미달성 원인

- 본 과제를 통해서 국내 개별인정형 승인 1건을 달성하는 것이 목표였으나 본 과제 진행과정에서 인체적용시험 100건을 달성하기 위하여 IRB 승인부터 완료까지 30개월이 걸렸음.
- 기존의 다른 기능성 평가 인체적용시험과 달리 피험자 선정 스크리닝이 매우 어렵고 사전 스케일링 등 통증을 수반한 다양한 전 처리 과정이 있으므로 중도 탈락률이 매우 높아서 피험자 모집이 어려웠음.
- 기존의 치주 건강 개선 평가는 치주 및 잇몸에 특성화된 지표 방법이 없었으므로 평가 지표 선정부터 지표 분석 방법까지 처음부터 본 과제를 통해서 기준을 만들어야 했으므로 오랜 기간이 소요됨.
- 지표 분석을 위한 국내 분석기기 및 시료가 없었으므로 시료를 수입하고 기기를 구입 (이를 위해 주관과제의 출자로 기기를 새로 구입함) 하여야 했음.
- 하지만 모든 결과 분석이 완료되었으므로 2월 임상시험 종료보고와 승인 후, 모든 자료가 준비되었으므로 개별인정 신청을 진행할 예정임.

2절. 후속 연구

1. 국내 식약처에 치주 및 잇몸 건강에 개선을 줄 수 있는 개별인정형 소재로서 승인
 - 승인을 위한 모든 결과를 확보하였음.
 - 서류 완비를 통해 2019년 3월 개별인정형 승인
 - 2019년까지 개별인정형 승인을 받는 것을 목표로 하고 있음.
2. 미국 FDA NDI 승인을 위한 후속 연구
 - 국내 생산 천연물 유래 소재를 통해서 해외 성과 도출을 위해서는 미국 FDA-NDI 등재가 매우 중요함
 - 국내 소재를 통해서 해외 승인을 받기 위해서는 단회, 반복, 장기, 대동물 독성 시험이 필수적이므로 2019년 본 성과를 기반으로 개발된 Tees-10의 안전성평가 진행 예정

4. 연구결과의 활용 계획

1. 치주질환 예방 및 개선 소재의 기능성 분석 및 효능 평가를 위한 관련 바이오마커 발굴
 - 본 연구진은 세포실험 및 동물실험에서 치주질환 예방 및 개선에 대한 천연물 소재의 효능 평가를 수행하기 위해서 관련 선행 연구 결과를 참고하면서 최신 트렌드에 맞춘 치주질환 관련 바이오마커를 지속적으로 발굴하고 있음. 치주인대세포와 치수 줄기세포의 증식이나 분화에 관련된 마커들 뿐만 아니라 치주염 동물 모델에서도 조직을 확보하여 치주질환 예방 및 개선에 대한 천연물 소재의 효능 평가 수행에 있어서 지표가 될 수 있는 바이오마커를 발굴하여 연구에 적용할 예정임.
2. 본 연구과제를 통해서 연구개발한 치주질환 예방 및 개선 조성물인 곤달비와 밀싹 추출복합물을 활용한 구강청결제 제품화 연구 수행
 - 가. 국내 구강청결제 시장조사
 - (1) 구강보조용품 중 치약과 칫솔을 제외하고 구강청결제의 사용 비율이 가장 높음

표 42. 구강보조용품 사용비율

구분	치약과 칫솔	구강청결제	치간 칫솔	치실	전동 칫솔	혀클리너	기타	합계
사용비율 (%)	44.5	17.3	11.8	11.1	8.8	5.6	0.9	100




(국민구강건강실태조사, 보건복지부, 2012)

- (2) 구강청결제 시장 규모가 2009년 약 200억원에서 2012년 300억원으로 증가 (헬스오 2012년)
- (3) 국내 대형마트와 약국 등에서 판매되고 있는 ‘구강청결제’ 15개 제품 중 뮤탄스 살균력이 99.9% 이상인 제품은 10제품(67%) - 출처:한국소비자원 www.kca.go.kr

표 43. 시판되고 있는 구강청결제 제품 15종

제품명	가그린 레귤러	가그린 마일드	가그린 스트롱
제품			
판매원	동아제약(주)	동아제약(주)	동아제약(주)
뮤탄스균 살균력	↑	↑	↑

(↑: 높음, ↓: 낮음)			
pH	6.4	6.3	6.6
타르색소	불검출	불검출	불검출
불소농도(mg/kg)	89	93	95
알코올 함량(%)	5.2	0	15.6
주요 효능 · 효과	충치예방, 구취제거, 프라그제거, 치은염예방, 구강정화		

제품명	송염 마우스워시	유한 덴탈케어가글 마일드	유한 덴탈케어가글 스트롱
제품			
판매원	(주)아모레퍼시픽	(주)유한양행	(주)유한양행
뮤탄스균 살균력 (↑: 높음, ↓: 낮음)	↑	↓	↑
pH	5.5	7.2	7.3
타르색소	청색1호, 황색5호, 황색203호	불검출	청색1호
불소농도(mg/kg)	134	101	100
알코올 함량(%)	0	0	18.5
주요 효능 · 효과	충치예방, 구취제거, 프라그제거, 입안청결	충치예방, 구취제거, 프라그억제, 치은염 치주염(치조농루) 예방, 치주질환예방	

제품명	시스템아 덴탈워시 메디칼 마일드	시스템아 덴탈워시 메디칼 클	시스템아 젠틀검 덴탈워시
제품			
판매원	(주)CJ라이온	(주)CJ라이온	(주)CJ라이온

뮤탄스균 살균력 (↑: 높음, ↓: 낮음)	↓	↓	↓
pH	6.0	6.1	6.1
타르색소	불검출	불검출	불검출
불소농도(mg/kg)	103	101	103
알코올 함량(%)	2.6	8.3	2.9
주요 효능·효과	충치예방, 구취제거, 프라그억제, 치은염 치주염(치조농루) 예방, 치주질환예방		

제품명	페리오 46cm 가글 아이스클민트	페리오 멀티 포물라 가글	페리오 센서티브 포물라 가글
제품			
판매원	(주)LG생활건강	(주)LG생활건강	(주)LG생활건강
뮤탄스균 살균력 (↑: 높음, ↓: 낮음)	↑	↑	↑
pH	6.4	6.4	6.3
타르색소	불검출	불검출	불검출
불소농도(mg/kg)	95	96	103
알코올 함량(%)	5.0	5.1	4.8
주요 효능·효과	충치예방, 구취제거, 프라그제거, 치은염예방, 치석침착예방, 시린이 예방 및 감소		

제품명	페리오 나이트 포물라 가글	덴티스테 내추럴 오랄린스	리스테린 티쓰 앤드 겐 디펜스
제품			
판매원	(주)LG생활건강	실란트로(주)	(유)한국존슨앤드존슨
뮤탄스균 살균력 (↑: 높음, ↓: 낮음)	↑	↓	↑
pH	6.4	6.7	4.3

타르색소	불검출	청색1호, 황색4호	녹색3호, 황색203호
불소농도(mg/kg)	94	95	100
알코올 함량(%)	4.9	5.2	18.6
주요 효능·효과	충치예방, 구취제거, 프라그제거, 치은염예방, 치석침착예방, 시린이 예방 및 감소	충치예방, 구취제거	충치예방, 구취제거, 프라그 및 치은염 예방, 치석 예방, 구강유해균 억제

나. 구강청결제 개발 및 제조

(1) 구강청결제 성분

- 의약외품인 구강청결제는 성분 및 안정성에 관한 세부 기준이 없어 ‘한국산업표준(KS) 권장기준’을 참고함

(가) PH : 한국산업표준(KS) 권장기준(PH3.0~10.5) *구강청결제는 PH5.0 이하인 경우 치아부식(또는 탈회) 시험을 통과하도록 권장

(나) 불소(플루오르화나트륨) : 한국산업표준(KS) 구강청결제의 총 불소 농도 기준 1,500mg/kg 이하

표 44. 구강청결제 레시피

성분	규격	분량(100ml중)	비고
플루오르화나트륨	KP	20mg	치아부식방지, 치아를 단단하게 함
세틸피리디늄염 화물수화물	USP	50mg	항균성분, 구취억제 (유해균증식억제, 프라그생성 예방)
레보멘톨	BP	34.4mg	청량감 및 구취억제
벤조산	KFDA	의약외품으로서 0.5%이하	보존료
곤달비, 밀싹 추출물			

다. 구강청결제 허가 기준

- (1) 기원 또는 발견 및 개발경위
- (2) 기준 및 시험방법에 관한자료
- (3) 안정성에 관한자료
- (4) 독성에 관한 자료
- (5) 효능효과 입증자료
- (6) 외국의 사용현황에 관한자료
- (7) 국내 유사제품과의 비교검토

3. 치주건강 개선 소재의 Tees-10 의 개별인정 및 제품화 계획
 - 가. 연세대학교 치과대학의 인체적용시험 최종 종결 보고서 제출 및 승인
 - 나. 의약외품 및 가글액, 구강 청결 관련 제품으로 우선 제품화
 - 다. 개별인정관련 서류 작성 및 식품의약품안전처 개별인정형 신청
 - 라. 2019년 치주건강 관련 제품의 건강기능식품 제품화 및 산업화
 - 마. 국제 기준에 맞는 안전성 평가 시험 (2019년 3월 시작됨-단회, 반복, 장기, 대동물 독성 평가, 유전독성 평가 진행)
 - 바. 미국 FDA NDI 등재를 위한 자료 구성 및 심의 평가서 제출

붙임. 참고문헌

- Algate, K., Haynes, D. R., Bartold, P. M., Crotti, T. N., & Cantley, M. D. (2016). The effects of tumour necrosis factor-alpha on bone cells involved in periodontal alveolar bone loss; osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. *Journal of Periodontal Research*, *51*, 549-566.
- Babu, D., Lee, J. S., Park, S. Y., Thapa, D., Choi, M. K., Kim, A. R., et al. (2008). Involvement of NF-kappaB in the inhibitory actions of Platycarya strobilacea on the TNF-alpha-induced monocyte adhesion to colon epithelial cells and chemokine expression. *Archives of Pharmacal Research*, *31*, 727-735.
- Barbato, L., Francioni, E., Bianchi, M., Mascitelli, E., Marco, L. B., & Tonelli, D. P. (2015). Periodontitis and bone metabolism. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, *12*, 174-177.
- Ching, H. S., Luddin, N., Rahman, I. A., & Ponnuraj, K. T. (2017). Expression of Odontogenic and Osteogenic Markers in DPSCs and SHED: A Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*, *12*, 71-79.
- Cochran, D. L. (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of Periodontology*, *79*, 1569-1576.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 치주질환 예방·개선 고부가가치식품 연구개발 및 산업화				
	(영문) Research and development of high value-added food for periodontal health				
주관연구기관	(주) 파미니티		주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주) 파미니티	
참 여 기 업	(주) 파미니티			(성명) 노 유 현	
총연구개발비 (1,040,000천원)	계	1,040,000천 원	총 연 구 기 간	2016. 07. 07 ~ 2018. 12. 31(2년 6개월)	
	정부출연 연구개발비	780,000천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	17명
	기업부담금	260,000천원		내부인원	17명
	연구기관부담금	해당 없음		외부인원	해당 없음

○ 연구개발 목표 및 성과

본 연구개발 목표는 치주질환의 예방 및 개선 연구를 통해 우수 효능 소재를 개발함으로써 고부가가치 식품으로 제품화·산업화하여 국민 건강나이 +3.4세 프로젝트와 삶의 질 개선을 달성하는 것으로서 세부목표로 관력 특허 5건, 기술이전 2건, 치주건강개선 효능 소재 기술인증 1건 이상 등의 성과를 달성하고 이를 기반으로 치주질환 개선 식품소재 활용도 제고를 위한 50건 이상의 DB 구축과 3건이상의 제품화를 통해서 산업화를 달성하는 것임. 본 과제성과인 DB를 기반으로 최종 성과물로서 곤달비 등 추출복합물 소재 (Tees-10)를 연구 개발하여 대량 생산 공정을 확립하고 이에 관련된 지식재산권 12건 출원, 등록 2건, 기술실시 3건, 제품화 6건, 홍보 전시 32건, 고용창출 6명 등의 성과를 달성하였음.

○ 연구내용 및 결과

50건 이상의 국내외 천연물 DB를 기반으로 전임상 치주건강 개선 효능 스크리닝을 통해서 곤달비 등 추출복합물을 선정하였음. 본 소재는 치조골 세포의 분화율을 증가시키고 파골세포의 활성도를 감소시키는 것을 확인하였음. 특히, 곤달비 등 추출복합물을 처리한 경우, 인간 치주줄기세포의 활성화를 통해서 줄기세포의 건강도를 향상시키고 치주인대조직으로의 분화율을 향상시켜서 치주조직의 재건에 영향을 미치는 것을 확인하였음. 치주염 동물모델에서도 세포 실험을 통해서 확인 치조골 건강, 조직 재생, 염증 억제 등의 효능을 조직분석을 통해서 확인하였음. 이를 기반으로 100건의 피험자를 대상으로 인체적용시험을 수행한 결과, 반건강인의 잇몸, 치주 건강도를 약 35% 이상 개선시키는 것을 확인하였으며 잇몸 및 치주인대 손상 효소들의 활성 증가를 효과적으로 억제함으로써 질환의 예방 및 개선에 효능이 있음을 확인하였음.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

본 연구 결과를 기반으로 국내 제품화를 위해 6건 이상의 시제품을 개발중에 있으며 개별인정을 위한 기반 기술을 모두 확보하였으므로 2019년 개별인정형을 신청하고 미국 NDI 승인을 위한 안전성평가를 진행하여 국내외 산업화를 진행하여 국가적 가치를 창출하고 대량생산을 위한 농가 재배 확대를 진행하고자 함. 이를 기반으로 국내외 건강기능식품 및 농업 산업규모 확장에 크게 이바지 할 것임.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		316054-03	
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야	식품/식품영양/기능성식품 및 소재		과제구분		단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	치주질환 예방·개선 고부가가치식품 연구개발 및 산업화		과제유형	개발	
연구기관	(주)파미니티		연구책임자	노 유 현	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016. 07. 07. ~ 2016. 12. 31	180,000	60,000	240,000
	2차연도	2017. 01. 01. ~ 2017. 12. 31	300,000	100,000	400,000
	3차연도	2018. 01. 01. ~ 2018. 12. 31	300,000	100,000	400,000
	계	2016. 07. 07. ~ 2018. 12. 31	780,000	260,000	1,040,000
참여기업	(주)파미니티				
상대국	해당 없음	상대국연구기관	해당 없음		

2. 평가일 : 2019. 02. 19

3. 평가자(연구책임자) : 노 유 현

소속	직위	성명
(주)파미니티	연구소장	노 유 현

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
-----------	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (~~아주우수~~, ~~우수~~, ~~보통~~, ~~미흡~~, ~~불량~~)

본 과제는 최초로 국내 천연물 유래 치주건강 개선용 소재를 개발하고 국내 지식재산권이 확보된 소재를 통해 전임상, 인체적용시험 효능 평가까지 완료하였으며 산업화를 위한 기반 기술까지 연구 개발하였음. 더욱이 국내 최초로 평가 전문기관 (치과대학과 치과병원)을 통해 100건 이상의 인체적용시험을 수행하고 치주건강 개선 효능이 평가하였으며 지표까지 연구개발하였으므로 창의성과 결과 우수성이 모두 확보되었음. 더욱이 기존의 염증, 뼈건강에 국한되어있는 치주건강 개선 영양제 시장에서 최초로 작용기전이 규명되고 치주조직 재건을 위한 줄기세포 활성화 효능이 있는 소재를 개발하였으므로 창의성이 높음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (~~아주우수~~, ~~우수~~, ~~보통~~, ~~미흡~~, ~~불량~~)

본 과제를 통해서 치주건강을 평가할 수 있는 전임상, 임상 평가 방법과 바이오마커를 최종 선정하였으므로 위 기술을 기반으로 객관적으로 다양한 천연물을 평가할 수 있을 것으로 예상됨. 국내 최초로 염증 개선, 뼈건강 개선 지표가 아니라 치주조직 재건 및 보호를 위한 다양한 바이오마커를 제시함으로써 학술적 다양한 파급효과를 가져올 수 있을 뿐아니라 산업계에도 새로운 소재 개발에 도움을 줄 수 있을 것으로 예상됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (~~아주우수~~, ~~우수~~, ~~보통~~, ~~미흡~~, ~~불량~~)

본 연구 결과는 국내 천연물을 활용함으로써 국내에서 생산된 원물을 고부가가치화 시킴으로서 과제의 원래 목표를 달성하고 직접적으로 농가의 수익에 기여하는데 적극 활용할 수 있을 것으로 예상됨. 과제에서 개발된 소재를 통해서 껌, 구강청결제, 건강기능식품 등으로 다양하게 제품화연구를 진행함으로써 다양한 제품화 성과를 도출할 수 있을 것으로 예상되며 추후 개별인정과 미국 FDA-NDI 등재를 통해서 국내외 산업성과를 도출 할 수 있을 것으로 예상됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (~~아주우수~~, ~~우수~~, ~~보통~~, ~~미흡~~, ~~불량~~)

연구개발의 과정에서 대부분의 목표를 초과 달성하였으며 추후 연구를 통해서 다양한 파급효과를 도출할 수 있을 정도로 기술적 기반도 확립한 만큼 연구개발의 수행노력의 성실도가 매우 높다고 할 수 있음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (~~아주우수~~, ~~우수~~, ~~보통~~, ~~미흡~~, ~~불량~~)

해외 특허 등록이 완료되지 않은 상태에서 본 연구의 핵심기술이 기반된 논문은 아직까지 1편 밖에 게재 하지 못하였지만 과제 종료 후 2019년 산업화를 위한 논문 3편이상이 추가로 게재될 것임. 지적 소유권은 산업화를 위하여 본래 계획보다 초과달성하였으며 발표회 등 공개 발표된 대부분의 연구개발 성과 또한 초과 달성되었음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
치주질환 예방 및 개선 평가 기술: 본 과제를 통해서 치주건강 개선 바이오마커를 구축함으로써 국내외 관련 계통에서 아직까지 제대로 정립되어 있지 않은 치주질환 예방 및 개선의 평가 기술 개발함.	10	10	전임상, 임상 바이오마커를 새롭게 추측하여 치주건강에 특화된 지표들을 제시하였으며 기존에 판매되고 있는 다양한 제품들을 넘어설 수 있는 치주조직 보호 및 재생 평가 바이오마커 및 기반 기술을 개발함.
치주조직의 보호 및 재건 기술	10	10	치주줄기세포의 증식 및 건강도 증진 기술을 개발하였으며 이를 기반으로 치주조직을 재건하고 손상을 억제할 수 있는 기술 확보함.
구강 내 특이적 세균의 증식 및 독성분비 억제 기술	10	8	50종의 DB를 기반으로 세균 증식 및 독소 분비 억제 소재를 개발하였지만 전임상 수준에서 스크리닝하고 작용기전을 보고하였음.
효능소재의 스크리닝시스템 구축: 바이오마커 구축을 기반으로 소재 선별하고 효능을 평가할 수 있는 스크리닝 시스템 구축	10	10	50종 이상의 스크리닝 시스템을 구축 완료하여 치주건강에 가장 큰 효능을 보이는 새로운 소재 선별하고 효능을 평가 완료하였음.
치주건강 개선에 도움을 줄 수 있는 개별인정형 기능성원료 개발	20	18	개별인정형 기능성 원료 승인을 위한 기반기술을 모두 개발하였으며 서류화 중에 있으므로 원래 개발은 모두 완성된 것으로 생각됨.
소재를 기반으로 한 3종 이상의 치주건강 및 구강건강 개선 건강기능식품 제품화	20	18	소재를 기반으로 6종의 시제품을 연구개발하였으나 개별인정승인 후 본제품으로 산업화 할 계획임
개발 소재를 활용하여 치약, 구강청결제, 가글액, 껌 등 다양한 구강관련 분야에 적용하여 제품화 확대	20	18	연구개발된 곤달비등 추출복합물을 통해서 치약, 구강청결제, 가글액, 껌 등 다양한 구강관련 분야에 적용하기 위한 제품화 기술을 완료함.
합계	100점	92점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구개발은 국내 식물자원을 활용하여 치주건강 개선용 기능소재를 스크리닝하고 표준화, 대량생산공정 확립, 전임상 효능평가, 전임상(동물) 작용기전 규명, 인체적용시험 효능 평가를 모두 수행하여 우수한 소재인 곤달비 등 추출복합물을 연구개발하였으며 산업화를 위한 기반 기술을 모두 확보하였음. 따라서 다양한 분야에 활용 가능하고 국내외 고부가가치로 개발할 수 있을 것으로 예상됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

국내 최초로 개별인정 승인을 받기위한 소재 개발 및 제품화 연구에 있어서 30개월은 매우 짧은 기간임. 인체적용시험에 있어서 매우 오랜 시간이 소요됨. 따라서 개별인정정 신청 및 승인 성과를 완료하지 못한 부분에 있어서는 많은 고려가 필요함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

연구과제 종료 후 국내 식약처에 치주 및 잇몸 건강에 개선을 줄수 있는 개별인정형 소재로서 승인을 받고 시제품화된 다양한 형태의 산업화를 달성하고자함.
해외 수출을 위해서는 국내 생산 천연물 유래 소재를 통해서 해외 성과 도출을 위해서는 미국 FDA-NDI 등재가 매우 중요하여 이를 위해서는 단회, 반복, 장기, 대동물 독성 시험이 필수적이므로 2019년 본 성과를 기반으로 개발된 Tees-10의 안전성평가 진행예정

IV. 보안성 검토

해당없음.

1. 연구책임자의 의견

해당없음.

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당없음.

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	식품/식품영양/기능성식품 및 소재	
연구과제명	치주질환 예방·개선 고부가가치식품 연구개발 및 산업화			
주관연구기관	(주)파미니티		주관연구책임자	노 유 현
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	780,000,000	260,000,000	해당 없음	1,040,000,000
연구개발기간	2016. 07. 07 ~ 2018. 12. 31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 치주질환 예방 및 개선 평가 기술: 본 과제를 통해서 치주건강 개선 바이오마커를 구축함으로써 국내외 관련 계통에서 아직까지 제대로 정립되어 있지 않은 치주질환 예방 및 개선의 평가 기술 개발함.	전임상, 임상 바이오마커를 새롭게 추측하여 치주건강에 특화된 지표들을 제시하였으며 기존에 판매되고 있는 다양한 제품들을 넘어설 수 있는 치주조직 보호 및 재생 평가 바이오마커 및 기반 기술을 개발함.
② 치주조직의 보호 및 재건 기술 개발	치주줄기세포의 증식 및 건강도 증진 기술을 개발하였으며 이를 기반으로 치주조직을 재건하고 손상을 억제할 수 있는 기술 확보함.
③ 구강 내 특이적 세균의 증식 및 독성분비 억제 기술	50종의 DB를 기반으로 세균 증식 및 독소 분비 억제 소재를 개발하였지만 전임상 수준에서 스크리닝하고 작용기전을 보고하였음.
④ 효능소재의 스크리닝시스템 구축: 바이오마커 구축을 기반으로 소재를 선별하고 효능을 평가할 수 있는 스크리닝 시스템 구축	50종 이상의 스크리닝 시스템을 구축완료하여 치주건강에 가장 큰 효능을 보이는 새로운 소재를 선별하고 효능을 평가 완료하였음.
⑤ 치주건강 개선에 도움을 줄 수 있는 개별인정형 기능성원료 개발	개별인정형 기능성 원료 승인을 위한 기반기술을 모두 개발하였으며 서류화 중에 있으므로 원래 개발은 모두 완성된 것으로 생각됨.
⑥ 소재를 기반으로 한 3종 이상의 치주건강 및 구강건강 개선 건강기능식품 제품화	소재를 기반으로 6종의 시제품을 연구개발하였으나 개별인정승인 후 본제품으로 산업화할 계획임
⑦ 개발 소재를 활용하여 치약, 구강청결제, 가글액, 껌등 다양한 구강관련 분야에 적용하여 제품화 확대	연구개발된 곤달비등 추출복합물을 통해서 치약, 구강청결제, 가글액, 껌등 다양한 구강관련 분야에 적용하기 위한 제품화 기술을 완료함.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	15		10	10	10			10				5	10				10		
최종목표	7	3	0	2	20	3	0	0	2	0	1	4	3	2	5	0	0	0	4	0
연구기간내 달성실적	12	2	0	3	20	6	0	0	6	0	0	1	1	2	6	0	0	0	32	
달성율(%)	17 1.4	66. 7		15 0	10 0	20 0			30 0		0	25	33	10 0	12 0				80 0	

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	치주질환 예방 및 개선 고부가가치 식품 소재 스크리닝 기술
②	치주조직 보호 및 재건 효능 평가 바이오마커 개발
③	치주질환 예방 및 개선 고부가가치 식품 소재인, 곤달비등 추출복합물

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		V			V			V		
②의 기술	V				V		V	V	V	
③의 기술	V					V	V			

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	국내 식물 자원을 확대 적용하여 다양한 고부가가치 자원 확보
②의 기술	현재까지 뼈건강 및 염증 개선 등의 지표로 한정되어 있는 소재 개발 기술을 진보시켜서 치주조직 보호 및 재건 효능 평가 기준을 제시함.
③의 기술	개별인정형, FDA-NDI 승인 및 등재 후, 다양한 형태로 제품, 산업화

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	10	15		10	10	10			10		10			5	10			10	
최종목표	7	6	0	4	40	4	5,000	58,000	2	0	1	4	3	5	0	0	0	7	0
연구기간내 달성실적	12	2	0	3	20	6	0	0	6	0	0	1	1	2	6	0	0	0	32
연구종료후 성과창출 계획	0	3	0	2	20	1	5,000	58,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	곤달비 등 추출복합물을 통한 치주질환 예방 및 개선 고부가가치식품 개발		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	200,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2개월	실용화예상시기 ³⁾	2019. 12. 01
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	(주)파미니티 자체 생산 제품과 품목이 달라야 함.		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)