

발간등록번호

11-1543000-002748-01

하니베리의 비알콜성 간기능개선 건기식 기능성원료 개발 및 제품화 추진

최종보고서

2019. 06. 12.

주관연구기관 / 주식회사 아리바이오
협동연구기관 / 가천대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “하니베리의 비알콜성 간기능개선 건기식 기능성원료 개발 및 제품화 추진”
(개발기간 : 2016. 07. ~ 2018. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 06. 12.

주관연구기관명 : (주) 아리바이오 (대표자) 성수현 (인)

참여기관명 : 가천대학교 산학협력단 (단장) 황보택 (인)

주관연구책임자 : 천운석

참여기관책임자 : 이해정

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

- GMP 시설에서 생산 조건 최적화(제조공정 확립)
- 자사에서 실시한 특이성, 직진성, 정확도, 회수율, 정밀도, 범위에 대한 결과보고서, 제품 안정성 대한 결과보고서 및 관련 공인시험성적서
- in vitro 연구결과 시험군에서 정상 대조군 대비하여 농도 의존적으로 Nrf2 transactivation이 유의적으로 증가 및 전반적 효능 확인.
- in vivo 연구결과 HFD 마우스 대비 간 내 효소들인 AST, ALP, LDH, GGT가 유의적으로 감소하였으며, 항산화지표인 MDA, catalase, SOD가 농도 의존적으로 유의하게 감소 또는 증가 확인.
- GLP-기관 독성 시험 실시 및 보고서(단회투여, 90일 반복투여, 복귀돌연변이, 소핵시험, 염색체이상반응)
- ICH-GCP 기준의 인체적용시험 보고서(실기기관: 남양주 양병원)
- “비알콜성 간기능 손상으로부터 간보호”로 기능성 원료 신청
- 정량적 연구 성과: 지식재산권 특허 출원 2건(3건완료), 특허 등록 2건(0건 완료) 기술실시 1건(1건완료), 제품화 5건(10건완료), 고용창출 18명(18명완료), 기술인증 2건(6건완료), 논문SCI(E)급이상 3편(SCI(E)급 4편, KCI급 2편, 총 6편완료), 학술발표 1건(2건완료), 인력양성 4명(5명완료), 홍보전시 2건(2건완료)
- 성과목표 외 추가성과: 교육지도 2건, 정책활용 1건, 기타 연구활용 1건, 매출액 420백만원

보고서 면수: 150

요 약 문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><연구목적></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 간질환의 증가로 의료비 증가, 사회활동인구 감소 등의 문제로 사회건강성에 악영향을 미치고 있음. ○ 이에 대한 예방으로 건강식품, 건강기능식품, 건강보조제 등에 대한 수요가 늘어나고 있으나, 대부분 수입산에 의존하고 있는 실정임. ○ 국내의 전통적인 건강소재들은 과학적인 기능성검증이 미약하여 고부가가치화에 실패하고 있어 과학적으로 검증된 국내산 건강기능식품, 건강보조제 개발에 대한 필요성이 증대되고 있음. ○ 따라서 강력한 항산화 기능을 가지고 있는 하니베리 추출물을 활용하여 간 기능개선 건강기능식품 개발 및 제품화하는데 목적이 있음. <p><연구내용></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 하니베리에 관한 문헌 수집 및 분석 및 시장조사 ○ 하니베리의 비알콜성 간 기능개선 기능성 및 기전 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 세포실험, 동물실험, 인체적용시험을 통한 기능성 및 기전 확인 - 비알콜성(비만) 간 손상 모델을 통한 간 기능개선 기능성 확보 - 인체적용시험: CRO, CRA, CRC, PI, monitor, DM, insurance가입 등 체계적 수행 - molecular level에서의 gene expression/suppression 기전 확보 ○ 하니베리의 안전성 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 세포실험, 동물실험, 인체적용시험을 통한 안전성 확보 - 독성시험: cell surviability test(MTT), 복귀돌연변이시험, 단회투여 경구독성시험, 반복투여 경구독성시험, 체내소핵시험 ○ 하니베리의 기준규격 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 영양성분(7종), 미생물검사(1종), 잔류농약검사(5종), 중금속검사(4종)를 통한 기준규격 설정(공인시험기관 성적서 포함) - 색상(색, 향, 맛), 지표(기능)성분 설정(공인시험기관 성적서 포함) - 지표성분 밸리데이션(특이성, 정확성, 정밀성, 정량한계, 직진성, 범위 등) 확보 ○ 하니베리의 추출공정 및 제품화공정 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 지표(기능)성분의 함량을 최적화시킨 lab, pilot, mass scale 공정 개발 - 추출 용매, 온도, 시간, 필터, 살균, 건조방법 최적화 설정 - 유통기한 설정: 가혹, 가속시험을 통한 안정한 유통기한 설정 ○ 하니베리의 건강기능식품 기능성원료 인정 신청 <ul style="list-style-type: none"> - 건강기능식품 기능성원료 신청요건 확보 후 기능성원료 인정신청(식약처 인정) ○ 하니베리의 건강기능식품 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - 하니베리를 첨가한 건강기능식품 제품화
------------------------	--

<p>연구개발성과</p>	<p><연구개발성과 목표 및 결과></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 지식재산권 : 출원 2건 (3건 완료) , 등록 2건 (0건 완료) ○ 기술실시 : 기술료 1건 (1건 완료) ○ 제품화 : 5건 (10건 완료) ○ 고용창출 : 18명 (18명 완료) ○ 기술인증 : 2건 (6건 완료) ○ 논문: SCI(E)급이상 3편 (SCI(E)급 4편, KCI급 2편, 총 6편 완료) ○ 학술발표: 1건 (2건 완료) ○ 인력양성: 4명 (5명 완료) ○ 홍보전시: 2건 (2건 완료) ○ 기타(타 연구활용 등): 1건 (2건 완료) <p><성과 목표 외 추가 성과></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 교육지도: 2건 ○ 정책활용: 1건 ○ 논문 비SCI: 2건 ○ 매출액: 420백만원 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 국내산 천연물의 기능우수성을 통한 국내산 원료에 대한 연구개발 투자 증대 - 국내산 천연물의 건기식 기능성원료 인증을 통한 기술력증대로 해외 기능성 인증 신청을 위한 기반 구축 - 기능성 제품을 통한 간 기능 개선으로 건강한 사회구현 - 우수한 품질의 국내산 농산물의 기능성 원료로의 개발을 통한 연구기반 구축과 더불어 다른 우수 농수축산물의 고기능성 제품화 기반 마련 - 천연물의 기능성발굴을 통한 고부가가치 제품개발의 기초데이터 제공 - 국내 건기식 개별인증 로드맵 뿐만 아니라 해외 건기식 인증 로드맵 구축을 통한 다른 원료의 단기간, 저비용으로 인증획득 추진 및 판로 확보 - 기능성 평가를 위한 R&D 모델 및 biomarker 구축을 통한 연구경쟁력 향상 ○ 경제적·산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 천연물 기능성 제품을 통한 건강유지로 의료비 절감 - 천연 원료로 기능성인증을 통한 미국, 일본, 유럽 등에 수출 - 하니베리의 고부가가치화와 재배면적 증가를 통한 농가소득증대 - 하니베리의 생산에 따른 농민들의 안정적인 판로 확보 - 건강기능식품 시장에서 국산제품의 시장 점유율 확대 - 국내 천연기능성원료 개발로 인한 농산물과 기능성 원료의 생산, 유통, 판매 그리고 기계제조업 부분의 고용확대(신규일자리 창출)와 소득 증대 - 전문인력양성 및 채용, 기술력우위를 통한 글로벌 강소기업으로의 도약 ○ 국내농산물의 우수성 확보를 위한 연구 기반 자료 제공 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>하니베리</p>	<p>간기능개선</p>	<p>항산화</p>	<p>건강기능식품</p>	<p>제품화</p>

Summary

Purpose and content of Research	<p><Research Purpose></p> <ul style="list-style-type: none">○ The increase in medical costs and the decrease in the number of socially active population due to the increase of liver disease have an adverse effect on the social health.○ Health foods, health functional foods and health supplements is increasing as a preventive measure, but most depend on imports.○ Korean traditional health food ingredients are not getting high added value because of their lack of scientific function verification.○ The need for the development of scientifically proven domestic health functional foods and dietary supplements is growing.○ Therefore, it is aimed to develop and commercialize health functional foods that improve liver function by using Honeyberry extract which is a powerful antioxidant material. <p><Research Content></p> <ul style="list-style-type: none">○ Literature survey and market research on Honeyberry○ Functional and Mechanism of Non-alcoholic Liver Function Improvement of Hanibary.<ul style="list-style-type: none">- Functional and mechanism confirmation through cell experiment, animal experiment and human body application test- Confirmation of functional improvement of liver function through non-alcoholic (obesity) liver damaged model- Human body application test: Systematically carried out by CRO, CRA, CRC, PI, monitor, DM, insurance- Securing mechanism of gene expression at molecular level.○ Secure Honeyberry Safety<ul style="list-style-type: none">- Ensure safety through cell, animal, and human application tests- Toxicity test: cell surviability test(MTT), reverse mutation test, single dose oral toxicity test, repeated dose oral toxicity test, <i>in vivo</i> micronucleus test○ Secure Honeyberry standard specification<ul style="list-style-type: none">- Establishment of standard specification through nutrient analysis(7 kinds), microbiological examination(1 kind), residual pesticide test(5 kinds), heavy metal inspection(4 kinds) (Including Certificate of Analysis from Certified Testing Organization)- Establishment of characteristics(color, incense and taste) and marker(functional) substance (Including Certificate of Analysis from Certified Testing Organization)
---------------------------------	---

	<ul style="list-style-type: none"> - Ensure marker substance validation (specificity, accuracy, precision, quantitative limit, straightness and range etc.) ○ Secure of extraction process and productization process of honeyberry <ul style="list-style-type: none"> - Develop lab, pilot, and mass scale processes that optimize the content of marker (functional) components - Optimization of extraction solvent, temperature, time, filter, sterilization and drying method - Set expiration date: Stable expiration date through stress and accelerated test ○ Application for 'functional ingredient approval' as health functional food of honeyberry <ul style="list-style-type: none"> - Application for 'functional ingredient approval' after securing application requirement (Ministry of Food and Drug Safety) ○ Productization of honeyberry as health functional food <ul style="list-style-type: none"> - Productization of honeyberry as health functional food
R&D achievement	<p><R&D Performance Goals and Results></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Intellectual Property Right : 2 applications (3 cases completed), 2 entries (0 cases completed) ○ Technical implementation : 1 fee (1 case completed) ○ Productization : 5 cases (10 cases completed) ○ Job creation : 18 people (18 people completed) ○ Technical certification : 2 cases (6 cases completed) ○ Research paper: 3 papers of SCI(E) grade or higher (4 papers of SCI(E) grade or higher, 2 papers of KCI grade, Total 6 papers completed) ○ Academic Presentation: 1 case (2 cases completed) ○ Human resource training: 4 people (5 people completed) ○ Publicity Exhibition: 2 cases (2 cases completed) ○ Other (Other research use): 1 case (2 cases completed) <p><Additional performance beyond goals></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Education guidance: 2 cases ○ Policy use: 1 case ○ Non-SCI grade research paper: 2 papers ○ Sales amount: 4.2 billion
Plan to utilize R&D achievements (Benefits)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Technical aspects <ul style="list-style-type: none"> - Increase R & D investment for domestic raw materials through excellence of domestic natural products - Establishment of foundation for application of overseas functional certification by increasing technology by certifying functional raw materials of health functional foods of domestic natural products

	<ul style="list-style-type: none"> - Implement healthy society by improvement of liver function through functional products - Establishing research base through development of high quality domestic agricultural products as functional raw materials and establishing base for high functional product productization of other excellent agricultural and marine products - Providing basic data on the development of high valuation products through discovering the functionality of natural products - Establishment of a roadmap for certification of overseas health functional foods as well as a road map for domestic health functional individual certification and acquisition of certification for short-term and low-cost of other raw materials - Improving research competitiveness by building R&D model and biomarker for functional evaluation ○ Economic and industrial aspects <ul style="list-style-type: none"> - Reduce medical expenses by maintaining health through natural functional products - Exports to USA, Japan and Europe through functional certification as a natural raw material - Increase of farm household income by high valuation of honeyberry and increase of cultivation area - Securing a stable market for farmers due to the production of honeyberry - Increase market share of domestic products in the health functional food market - Increase in the production of agricultural products and functional raw materials, distribution, sales, employment expansion in the machinery manufacturing sector (creating new jobs) and income due to the development of domestic natural functional raw materials. - Being a global company through professional training and recruitment ○ Provide research-based materials for securing excellence in domestic agricultural products 				
<p style="text-align: center;">Keyword (Within 5)</p>	<p style="text-align: center;">Honeyberry</p>	<p style="text-align: center;">Improvement of liver Function</p>	<p style="text-align: center;">Anti-oxidant</p>	<p style="text-align: center;">Health functional foods</p>	<p style="text-align: center;">Productization</p>

CONTENTS

Chapter 1 Necessity of research and development task	1
Section 1 Overview of R&D	1
1. R&D Overview	1
2. Uses and applications	2
3. Core technology	2
Section 2 Domestic and Foreign Status of R&D Target	2
1. Domestic Technology Level and Market Status	2
2. International Technology Level and Market Status	5
Section 3 Importance and necessity of R&D	7
Chapter 2 Research content and results	10
Section 1 Strategy and method of R&D	10
1. Strategy and method of R&D	10
2. Promotion System and Schedule	12
3. Outline of annual research and summary of research results	15
Section 2 R&D achievement	18
1. Publication performance	18
2. Patent performance	28
3. Human body application test report	31
4. GLP-Institutional Toxicity Test Report	33
5. Certificate Authority test report(Korea Food Research Institute)	34
Section 3 Detailed study results	36
1. 1 st year R&D and results of Main organization(ARIBIO Co., Ltd.)	36
2. 1 st year R&D and Results of Cooperative Institutions(Gachon University Industry-Academic Collaboration Foundation)	47
3. 2 nd year R&D and results of Main organization(ARIBIO Co., Ltd.)	54
4. 2 nd year R&D and Results of Cooperative Institutions(Gachon University Industry-Academic Collaboration Foundation)	68

CONTENTS

5. 3 rd year R&D and results of Main organization(ARIBIO Co., Ltd.)	89
6. 3 rd year R&D and Results of Cooperative Institutions(Gachon University Industry-Academic Collaboration Foundation)	110
7. Promoting products and products	120
8. Further studies (toxicity testing, in vivo efficacy assessment)	123
Section 4 R&D goals and results	131
Chapter 3 Achievement goal and contribution to related field	132
Section 1 Goal	132
1. Final Goal	132
2. Annual performance targets	133
3. R&D performance and evaluation method	135
Section 2 Goal Completeness	137
Section 3 When the goal is not achieved, the cause(reason) and the future measures(necessity of follow-up study)	142
Chapter 4 Plan for utilization of research results	143
■ References	148

목 차

1장 연구개발과제의 필요성	1
1절 연구개발의 개요	1
1. 연구개발 개요	1
2. 용도 및 적용분야	2
3. 핵심기술	2
2절 연구개발 대상의 국내·외 현황	2
1. 국내 기술 수준 및 시장현황	2
2. 국외 기술 수준 및 시장현황	5
3절 연구개발의 중요성 및 필요성	7
2장 연구수행 내용 및 결과	10
1절 연구개발의 추진전략·방법	10
1. 연구개발의 추진전략·방법	10
2. 추진체계 및 일정	12
3. 연차별 연구수행 내용 및 연구결과 요약	15
2절 연구개발성과	18
1. 논문게재 성과	18
2. 특허 성과	28
3. 인체적용시험 보고서	31
4. GLP-기관 독성시험 보고서	33
5. 공인인증기관 시험 성적서(한국기능식품연구원)	34
3절 세부 연구결과	36
1. 1차년도 주관기관((주)아리바이오)연구개발 및 결과	36
2. 1차년도 협동기관(가천대학교 산학협력단) 연구개발 및 결과	47
3. 2차년도 주관기관((주)아리바이오) 연구개발 및 결과	54
4. 2차년도 협동기관(가천대학교 산학협력단) 연구개발 및 결과	68

목 차

5. 3차년도 주관기관((주)아리바이오) 연구개발 및 결과	89
6. 3차년도 협동기관(가천대학교 산학협력단) 연구개발 및 결과	110
7. 시제품 및 제품홍보	120
8. 추가 연구(독성시험, in vivo 효능평가)	123
4절 연구개발의 목표 및 결과	131

3장 목표 달성도 및 관련분야 기여도 132

1절 목표	132
1. 최종목표	132
2. 연차별 성과목표	133
3. 연구개발 성과 및 평가방법	135
2절 목표 달성 여부	137
3절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)	142

4장 연구결과의 활용 계획 등 143

■ 참고문헌 148

1장 연구개발과제의 필요성

1절 연구개발의 개요

1. 연구개발 개요

스트레스, 약물오남용, 간염바이러스 등에 따른 비알콜성 손상으로부터 항산화작용(추정기전)을 통한 간을 보호할 수 있는 식품의약품안전처에서 인정하는 기능성원료 및 이를 주원료로 한 건강기능식품 개발(정제, 캡슐, 분말 등)



Figure 1-1. 연구개발 개요

2. 용도 및 적용분야

- 용도: 간기능 개선용 건기식 주원료 및 부원료, 일반식품의 첨가원료, 의약품 원료, 의약품 보조약물
- 적용분야: 건강기능식품(원료, 완제품), 일반식품(과자, 빵, 음료, 아이스크림, 우유/요거트 등의 부원료), 의약품(혈구 이상변형 개선제), 의약품보조제

3. 핵심기술

- Molecular work 기술: 하니베리의 항산화 메카니즘 규명을 위한 western blot, cytokines, interleukines 측정
- 비알콜성 세포 및 동물모델 기술: 비알콜성 간손상 유발 세포 및 동물모델 유발 가능 및 보유, 동물실험 및 조직병리 전문가 보유
- 간 보호 인체적용시험에 대한 경험 및 다수의 인체적용시험 경험에 따른 노하우 보유(알콜성 간 손상으로부터 간 보호 기능성원료 인증)
- 지표(기능)성분 확보기술: 지표성분을 최단기간에 확보할 수 있는 HPLC, HPLC/MS, HPLC/MSMS, HPLC-ELSD 등 분석장비 보유, 다년간 경험을 쌓은 연구자, 개별인정형 원료의 지표(기능)성분 확보 및 validation 경험 보유
- 추출/농축/건조 연구장비 및 건기식 GMP 생산시설을 보유하여 완제품까지 one-stop 시스템으로 개발기간 단축
- 미량의 그래놀 제조 특허기술: 당성분이 많아 건조가 힘든 원료의 그래놀화 기술 보유로 제형의 다양화 가능
- 'Lab scale 추출·농축·건조방법 확립 / 지표·validation 확보, 기준규격설정 / in vitro·vivo 효능·독성 검사 / pilot·mass scale 추출·농축·건조방법 확립 / 인체적용시험 / 건강기능식품 기능성원료 획득' 일련의 과정을 경험한 다수의 연구자 및 노하우 보유

2절 연구개발 대상의 국내·외 현황

1. 국내 기술 수준 및 시장 현황

가. 기술현황

간 관련 기능성원료 인정현황: 밀크씨슬과 헛개나무과병추출물, 브로콜리스프라우트분말, 표고버섯균사체, 복분자추출분말, 유산균발효다시마추출물이며, 대표적인 원료가 밀크씨슬과 헛개나무과병추출물 임

<Table 1-1> 국내에서 간과 관련된 건강기능식품 기능성원료로 인정된 원료현황

간기능 개선과 관련된 원료	내 용
밀크씨슬	외국산으로서 연구개발이 외국에서 이루어 졌음
헛개나무과병추출물	국내에서 개발, 알코올성 간 손상에 의한 간 보호 효과로 비알콜성 간 손상으로부터의 보호 기전이 다름
브로콜리스프라우트분말	2006년 개발, 인체적용시험을 실시하지 않아 인체에서의 효과를 알 수 없음
복분자추출분말	2010년 국내개발, 기타기능 II, 일일섭취량 3,150mg/day(많은 양을 섭취해야 함)
유산균발효다시마추출물	2011년 국내개발, 알콜성 손상으로부터 간을 보호(비알콜성 간 손상으로 부터 보호 기전 다름)
표고버섯균사체추출분말	2008년 국내개발, 일일섭취량 1.8g, 지표성분이 베타-글루칸으로 면역 증진으로 더 알려짐
<p>▶ 비알코올성 간 손상으로부터 보호할 수 있는 인체적용시험이 완료된 기능성원료가 복분자추출분말 이외에는 없으며, 일일섭취량 3.15g은 많은 양으로 소비자들이 쉽게 접근할 수 있는 가격형성이 되고 있지 않으며, 제품으로 신고된 건도 1건(상품명: 복분자추출분말, 업소명: 리즈바이오텍)으로 대중화가 되고 있지 않음</p>	

나. 시장현황

- (1) 국내 건강기능식품 시장은 1,564,056,002천원(2014년도)이고, 개별인정형 시장은 312,824,932천원(2014년도)임
- (2) 국내 건강기능식품 시장은 연평균 12% 이상의 고성장을 하고 있음
- (3) 건강기능식품 개별인정형 제품은 최근 5년간 연평균 25% 이상의 초고속 성장을 하고 있음
- (4) 대부분의 하니베리는 표목, 열매자체 형태로 판매
- (5) 대형유통 보다는 인터넷에서 소매상인들에 의해 판매
- (6) 가공식품형태로는 H&K bioscience에서 농축액 형태의 일반식품으로 판매 중
- (7) 기존의 간 기능 건강기능식품의 고부가가치화를 위한 부원료로 2개의 제품에서 사용

다. 경쟁기관현황

- (1) H&K bioscience: 로니페롤환(일반식품-기타가공품), 로니세롤(일반식품) - 당사와 특허 기술 이전으로 협력관계임
- (2) 광동제약(주): 광동헛개과워 - 하니베리 농축액(고형분60%, 중국산) 1.15% 함유
- (3) 인성제약(주): 해파포스(건기식) - 밀크씨슬추출물이 주원료로 하니베리 추출물 함유
실큐글리버해파포스(건기식) - 밀크씨슬추출물이 주원료로 하니베리 추출물 함유
- (4) 경쟁원료: 밀크씨슬, 헛개나무과병추출물, 복분자추출분말, 유산균발효다시마추출물, 표고버섯균사체

라. 지식재산권현황

<Table 1-2> 특허 현황

권리자	국내특허	PCT
H&K bioscience	갑상선 개선 1건 (등록 10-1543775)	갑상선(H&K bioscience)
	간기능 개선 2건 (등록 10-0699782, 10-069979)	
	피부용 (출원 10-2015-002660)	
경희대학교	허혈성 뇌혈관 개선 1건 (등록 10-1438879)	허혈성 뇌혈관 개선 1건 (PCT/미국)
아모레퍼시픽	항산화/항노화 화장품조성물 (출원 10-2009-0114593, 거절)	
- H&K bioscience와 당사는 연구개발 및 특허사용권 계약 체결함 - 하니베리는 국내에 잘 알려지지 않은 관계로 특허의 수가 적음		

<Table 1-3> 논문 현황

논문	건수
추출법	1건
독성시험	1건
성분분석	10건
항산화	12건
면역/항암	4건
피부노화	4건
방사선으로부터 보호	1건
항당뇨	2건
- 항산화는 phenolic compound fraction 분리 후 지질과산화, DPPH 소거능 등을 실험함	

마. 표준화현황

- (1) 땃덩이나무는 식약처 식품원료 DB에 식용가능(땃덩이나무: 열매)원료로 등재
- (2) 중국: 중화본초 제5권 7권에 등재: (품목명: 백두산 식용약초[남정과(藍錠果)], 기능성: 간해독, 일일섭취량: 전탕 6-12g)
- (3) Technical Report, 26 June 2018. 전통식품으로 'EFSA'에서 인정

<Table 1-4> 하니베리에 대한 정보

학명	Lonicera caerule L. var. edulis Turcz. ex Herder
일반명	edible honeysuckle
약재명	남정과(藍錠果)
지표성분	cyanidin-3-glucoside (phenolic compound 중 가장 많음. 기능성분으로도 추정)
분포	시베리아, 극동러시아, 중국, 일본(홋카이도), 한국
맛	달지만 약간 시면서 쓰다.
채취	5~6월에 열매가 익었을 때 채취
약리작용	<ul style="list-style-type: none"> • 수렴작용, 항균작용, 이뇨작용 • 긴장향진(hypertonia), 당뇨, 비만, 비타민C 결핍증, 위·간질환에 효능 • 땀샘이나 나무 가지를 달인 물은 여러 원인으로 발생한 부종에 이뇨제로 사용 • 땀샘이나 나무 가지를 달인 물은 후두염 완화, 구강 소독에 이용 • 짓이긴 잎은 상처를 치료하는데 사용 • 단백질을 응고시켜 염증을 제거, 피막을 만들어 보호 • 혈관을 수축시켜 지혈하거나 설사를 저지하는 약효가 있는 작용
기타	<ul style="list-style-type: none"> • 건물수율 약 10% (원물 → 건물) • 당분(대부분 포도당) 2~3%(12~13brix), 지방산(에스테르) 5~10%, 베타인, 카테킨, 안토시아닌, 미네랄, 유기산, 비타민

바. 기타현황

- (1) 아이누족에게 ‘블로장생의 묘약’, ‘환상의 열매’로 알려져 음
- (2) 강원도 약초꾼들에게 물앵두나무와 더불어 최고의 정력제로 사랑받는 나무
- (3) 시장트렌드: 블루베리 -> 아사이베리 -> 아로니아 -> 땀샘이나 나무 열매(하니베리)의 트렌드 진개가 예상됨

2. 국외 기술 수준 및 시장 현황

가. 기술현황

- (1) 유럽에서 국화과 식물인 영경귀(silybum marianum)로부터 간 보호 작용물질인 silymarin의 추출
- (2) 하니베리에 대한 항산화물질(안토시아닌, 폴리페놀) 분리(10건), 단순추출물 및 분리성분의 in vitro 항산화효과 검증(6건), 항염증(4건), 자외선 조사에 의한 피부손상으로부터 보호 작용(4건), 고지혈(1건), 항당뇨(1건) 등으로 아직 연구는 초기 단계임

나. 시장현황

- (1) 전 세계 기능식품 시장규모는 3,464억 달러(350조원, 2012년도)로 추산, 2020년에는 6,394억 달러 예상으로 현재 확장기 진입된 것으로 예상

(2) 전 세계 기능식품 시장은 평균 6% 이상의 고성장을 기록하고 있음

(3) 러시아산, 북한산 하니베리 생과가 시장에서 유통되고 있음

다. 경쟁기관현황

(1) 북한의 백두산에 많이 자생하고 있어 북한산 하니베리 농축액이 국내에 유입

(2) 러시아, 중국산 하니베리가 수입되고 있음

(3) 국내에서는 H&K bioscience에서 대단위 농장을 운영하고 있고, 묘목이 조금씩 보급되고 있는 상황

라. 지식재산권현황

<Table 1-5> 특허(검색어 Lonicera caerulea)

국가	검색건	유효건	내용
미국	38	10건 (간보호 1건)	<ul style="list-style-type: none"> • 간보호: H&K bioscience(11988704): 당사와 특허이전 및 공동개발 계약 체결, • 허혈성 뇌혈관장애: 경희대(14386221) • 피부단백질분해억제: biopharmcopa design international INC. (13782272, 11878978, 12871097), Benoit CYR(14220432), Betty(12112374) • 전이억제: 10526387 • 피부: 12970840, 10533025, 14646049, • 향염:11585819
유럽	9	0건	<ul style="list-style-type: none"> • 미백(등록 01586315)
일본	34	12건 (간보호 1건)	<ul style="list-style-type: none"> • 안건강: ポーラ化成工業株式會社(등록 04848315) • 간보호: H&K bioscience(20521303) • 반모마이신 내성 균주에 대한 항균: 佐久間 和夫(17161969) • 보존제: 佐久間 和夫(20072382) • 향산화제: 株式會社ファンケル(04598740, 03983003, 18256709) - 글루타치온의 세포내 합성을 증가시키는 다양한 식물중에서 1종류를 포함 • 피부: 항노화 株式會社コーセイ 日本新藥株式會社(14195463), 피부염 廣瀨 行博(17022285), 미백(03946418) • 향노화: 株式會社ファンケル(12230166) • 향당뇨: 株式會社セラバリューズ(20282617) • 피로억제: ポーラ化成工業株式會社(17281937) - 눈

마. 표준화현황

- (1) 러시아: 최초로 작물로서 개량
- (2) 캐나다: sakatchewan 대학 러시아산 종자(Lonicera caerulea var. edulis)를 개량함
- (3) 일본: 종자를 개량함(Lonicera caerulea var. emphylocalyx)
- (4) 미국: 오리건 주에서 일본산 종자를 개량함

바. 기타현황

- (1) 일본 홋카이도, 미국 오리건 주에서 많이 재배중
- (2) 페이스트리, 잼, 주스, 와인, 아이스크림, 요거트, 소스, 캔디 등에 사용

3절 연구개발의 중요성 및 필요성

- 간은 우리 몸에서 가장 큰 장기로, 복부 오른쪽 윗부분에 위치. 간은 신체기능 유지에서 주요한 여러 가지 역할을 함. 첫째로 우리 몸의 영양소를 처리하는 대사기능으로 장에서 흡수된 음식물은 간에서 여러 조직에 적합하도록 변화시키고, 노폐물 또한 다시 간으로 운반돼 처리됨. 둘째로 장에서 영양소를 흡수하기 위해 꼭 필요한 ‘담즙산’을 만들고, 담로를 통해 장으로 배출. 셋째로 혈액응고에 필요한 단백질과 혈액 속 수분 함량을 조절하는 알부민을 합성해내고, 마지막으로 술, 약물 등 우리 몸에 해로운 물질이나 몸에서 생긴 독소를 해독하는 역할을 함
- 대한간학회는 1988년부터 2007년까지 강북삼성병원서 건강검진을 받은 성인 75만 명의 데이터를 분석한 결과 1988년에 7%였던 지방간질환 유병률은 2007년 28%까지 증가한 것으로 나타났으며 이는 1990년대 10%대였던 유병률이 지속적으로 증가하여 최근 30%에 달하며 지난 20년간 지방간질환 유병률이 3배 가까이 증가했음. 최근 식약처에서 발표한 보도 자료에도 서울, 경기지역 성인에서 비알콜성 지방간질환의 유병률이 2004년 11.5%에 비해 2010년 23.6%로 2배 정도 증가하였으며, 남자는 31.0%, 여자의 경우 16.0%로 나타났음. 또 다른 국내 연구에서 건강검진 수진자를 대상으로 조사한 결과 비알콜성 지방간질환의 유병률이 17.9~4.7%로 나타났음. 특히 지방간의 가장 확실한 진단검사인 조직검사를 이용한 비알콜성 지방간질환 유병률은 51%로 높게 나타남
- 특히 최근 5년간 남성의 비알콜성 지방간과 알콜성 지방간의 유병률을 비교한 결과 20~30대에서 비슷한 차이를 보이며 증가하다가 40대에서 알콜성 지방간이 급격히 높아지면서 비알콜성 지방간을 크게 역전했다고 보고. 특히 최근에는 비만인구 증가로 인해 20~30대 젊은 성인 남녀, 폐경이후의 여성에게도 비알콜성 지방간 질환 발생 비율이 높아졌으며 50~60대로 갈수록 유병률이 증가하는 추세
- 비알콜성 지방간질환은 비음주자(최근 2년 동안 남자의 경우 일주일에 21잔 이하, 여자의 경우 14잔 이하)에서 조직학적으로 간내 지방 축적을 특징으로 하는 질환으로 염증이나 섬유화가 없는 단순 지방증에서 광범위한 염증 반응이나 섬유화를 동반하는 비알콜성 지방간염, 심한 경우 간경변에 이르기까지 다양한 경과를 보임

- NAFLD는 알콜섭취와 관계없이 간세포에 지방이 과도하게 축적된 단순 지방간 (hepaticsteatosis), 간세포가 괴사되는 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 더 진행된 형태인 간섬유화(liver fibrosis) 및 간경변증(livercirrhosis)을 모두 포함하는 질환(Dowman et al., 2010, Brunt, 2001)
- NAFLD의 증상은 거의 없으나 NAFLD의 세계 유병율은 10~24%로 가장 흔한 간 질환으로 보고되고 있음(Angulo, 2002). NAFLD는 비만(obesity), 제2형 당뇨병(diabetes mellitus), 이상지질혈증(dyslipidemia), 대사증후군(metabolic syndrome) 등과 밀접한 관련이 있으며, 인슐린 저항성(insulin resistance)이 NAFLD의 가장 중요한 유발 인자임(Uyeda & Repa, 2006, Schiff, 2003, Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003, Adams et al., 2005)
- 비만수술을 받은 비만 환자를 대상으로 시행한 연구에서 NAFLD 및 NASH의 유병률은 각각 91%, 37%로 나타났고(Machado, 2006), 제2형 당뇨병 환자 중 69%가 NAFLD를 나타내어, NAFLD는 제2형 당뇨병에서 흔히 동반되는 질병으로 알려져 있음(Leite, 2009)
- 서구화된 식습관, 운동량 부족, 비만 및 제2형 당뇨병 환자의 증가 등으로 NAFLD의 발생 빈도와 유병율이 점차 증가하고 있다(Alisi, 2012, Choi et al., 2009). 우리나라의 NAFLD 유병율은 2004년 11.5%에서 2010년 23.6%로 약 2배 정도 증가하였음(Ministry of Food and Drug Safety, 2012)
- 또한 간암은 2013년 전체 암중 사망률 2위로 보고되었는데, NAFLD가 발전하면 간암으로 진행될 수 있기 때문에 NAFLD의 예방 및 치료에 대한 중요성이 강조되고 있음(Korea National Statistical Office, 2013)
- NAFLD 환자의 60~95%에서 비만의 30~55%에서 2형 당뇨병이 동반되는 등 NAFLD가 대사성 장애와 동반되는 경우가 많아 간 내 인슐린 저항성증가가 NAFLD 발생에 중요한 기전으로 보고되고 있음(Sheth et al., 1997; Sanyal & Marchesini, 2001)
- NAFLD의 병인론은 흔히 ‘Two hit theory’로 설명되는데, 1단계 타격은 유전 요인이나 비만과 같은 환경 요인에 의해 인슐린 저항성이 생기면서 간내 지방이 축적되는 것 (Bugianesi et al., 2004; Marchesini et al., 2003; Chitturi et al., 2002). 여기에 2단계 타격, 즉 산화 스트레스나 간 섬유화 촉진기전이 더해지면서 단순 지방간에서 지방간염, 간경변증으로 진행 됨(Day & James,1998)
- 간 내에 지방이 축적되는 일차적인 손상이 일어난 이후 유리전자(free electron), H2O2, 활성산소(ROS: Reactive Oxygen Species)등에 의한 이차적인 손상이 지방간염을 일으킴 (Pessayre, 2001)
- 이러한 NAFLD는 전 세계적으로 비만 유병율이 증가하면서 NAFLD는 만성 간질환의 주요한 원인이 되고 있으며 우리나라에서도 NAFLD의 유병율이 일반성인 18%까지 보고되고 있고 (Park et al., 2006), 서구화되는 식습관, 운동부족, 생활양식의 변화, 비만인구의 증가로 인해 폭발적으로 증가되어 추후 만성 간질환의 중요한 원인으로 자리 잡을 것으로 판단됨
- 또한 근래에 들어, 비교적 부작용이 적은 천연물 유래의 대사증후군 치료제 개발이 활발히 시도되고 있음(Jung et al., 2011; Kim et al., 2013; Choi et al., 2017)

- 하니베리는 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 *Lonicera caeruleavar. edulis*의 성숙과실로, 북러시아, 중국 및 일본에서 전통 약용식물로 이용되어져 왔으나, 북미 및 유럽에서는 비교적 생소한 열매인(Svarcova et al., 2007). 하니베리는 풍부한 ascorbic acid 및 phenolic component를 포함하고 있으며, 특히 항산화 효과가 비교적 우수한 것으로 알려진 anthocyanins, flavonoids 및 저분자 phenolic acids를 풍부하게 함유하고 있음 (Chaovanalikit et al., 2004; Svarcova et al., 2007)
- 최근 하니베리를 경구 투여하여 이온화 방사선에 대한 방어효과가 마우스 실험을 통해 알려져 있으며(Zhao et al., 2012), 지질 및 당대사 개선효과(Jurgoński et al., 2013), 간 보호 효과(Palíková et al., 2009), 항염효과(Jin et al., 2006; Zdarilová et al., 2010), 갑상선기능 저하증에 대한 치료효과(Park et al., 2016) 역시 알려져 있고, 특히 12종의 유색 berry 중 가장 강력한 항산화효과를 나타내는 것으로 알려지고 있음(Chen et al., 2014)
- 또한 phenolic rich 하니베리 추출물은 in vitro 및 in vivo 실험을 통해 비교적 강력한 항염 및 상처치유 촉진효과를 나타내는 것으로 밝혀졌으며(Jin et al., 2006), 자외선에 대한 피부 보호효과(Svobodová et al., 2008; Vostálová et al., 2013) 역시 잘 알려져 있음
- 보건복지부의 보건복지통계연보(60호)에 따르면 2012년 국민의료비 지출액은 2011년보다 5.9% 증가한 97.1조원으로 추정되면, GDP대비 7.6% 수준. 기능별 국민월비 구성비를 보면 의료서비스(입원, 외래)가 63.4%로 가장 높은 비중을 차지하고 있으며, 다음으로는 의약품이 19.8%를 차지하고 있음
- 고령화가 급속도로 심화됨에 따라 국민연금, 노인의료 및 요양비 등 노인부양을 위한 사회적 지출이 증가하고 있으며, 2010년 건강보험에서 65세 이상 노인에게 지급된 의료비는 13조 7,847억원으로 전체의료비의 31.6%를 차지함. 2005년(24.4%)에 비해 8% 가량 증가한 수치로, 2005년 이래 노인 의료비 증가율은 연평균 18%를 기록하고 있음. 또한 2010년 전체의료비는 전년대비 10.7% 증가한 것에 비해 노인의료비 증가율은 14.5%로 매우 높음(한국조세연구원. 고령화와 노인 의료비 연구, 2011)
- 향후 의료비 상승의 주요 요인으로 신의약기술의 발달, 소득 증가, 고령화 등을 꼽고 있다. 특히 인구구조 변화로 인한 의료비 증가가 건강보험 재정건전성을 위협하는 요인으로 인식하고 있지만 이에 대한 대비가 미흡한 실정. 고령자를 대상 만성질환 수 증가시 환자의 평균 의료비 지출(본인부담금)은 약 70만원가량 상승하고 건강보험 재정이 부담하는 비율이 환자 부담금의 150%라고 가정하였을 때 만성질환 환자 수가 증가할수록 105만원의 건강보험 재정지출이 수반됨(한국조세연구원. 고령화와 노인 의료비 연구, 2011)
- 간질환의 증가로 의료비 증가, 사회활동인구 감소 등의 문제로 사회건전성에 악영향을 미치고 있다. 이에 대한 예방으로 건강식품, 건강기능식품, 건강보조제 등에 대한 수요가 늘어나고 있으나, 대부분 수입산에 의존하고 있는 실정이고, 국내의 전통적인 건강소재들은 과학적인 기능성검증이 미약하여 고부가가치화에 실패하고 있어 과학적으로 검증된 국내산 건강기능식품, 건강보조제 개발에 대한 필요성이 증대되고 있음

2장 연구수행 내용 및 결과

1절 연구개발의 추진전략·방법

1. 연구개발 추진전략·방법

가. 추진전략

- (1) 국내외 건기식 시장분석, 기술분석을 위하여 건기식 컨설팅기관, 건기식 시장분석기관, 박람회, 학술회의 등을 통하여 기술정보를 수집함
- (2) 하니베리 추출물 대량생산을 위한 전문가 풀(농업기술원, 한국발효공학 전문가, 인삼 재배 전문가)을 확보하여, 정기적 자문회의를 통해 최신 지식과 대량생산의 성공가능성을 높임
- (3) In vitro/in vivo 약리기전 탐색 및 검증 및 혈당개선 관련 신규 표적분자 도출을 위한 연구 팀간의 정기적인 journal club을 통해 발표 및 평가
- (4) in vitro/1차 in vivo 효능시험 후 식약처 컨설팅(1차)을 통하여 인증방향 설정을 보완·수정하고, 독성시험 완료 후 2차 식약처 컨설팅을 통하여 인체적용시험 방향을 수정·보완하고, 인체적용 시험 완료 후 모듬토의/방문상담 등을 통하여 건기식 획득을 위한 연구기간 최소화
- (5) 본 연구팀에서 진행되는 validation, 유해물질규격, 유통기한 설정 등을 전문가 풀(경기과학 기술진흥원, 생명연, 카이스트, 대구한의대 등)을 활용하여 설정하고, 공인인증기관을 통하여 공인인증을 획득함
- (6) 추출생산에 관한 전문가를 연구원으로 영입하여 수율, QC, QA 등의 부분 보강

나. 연구개발방법

(1) 1차년도

- 문헌조사: 전문특허분석기관, 독성/효능 자료, 시장현황 등
- 하니베리 추출물의 in vitro 효능검증
- 하니베리 추출물의 지표(기능)성분 선정: 하니베리의 성분분석, 성분분석을 통하여 알려진 지표(기능)성분이 있을 경우 선정하고 없을시 새로운 지표물질을 안정성, 검출가능성시험 등을 통하여 선정
- lab scale에서 최적의 추출조건 선정: 초임계추출, 유기용매추출, 물추출을 통한 최고수율 및 적정수율(경제성·기능성 평가) 설정
- 하니베리 추출물의 규격설정: 미생물, 중금속, 잔류농약 등
- in vitro 효능 탐색 완료를 통한 실험동물모델 선정 및 준비: 동물모델, biomarker, 실험설계, 시약, 소모품준비 등

(2) 2차년도

- 하니베리 추출물의 in vitro 안전성 확보: 균주 *S. typhmuri* TA98, TA100, TA1535, TA1537 or TA97 or TA97a, TA102 or *E. coli* WP2 uvrA or *E. coli* WP2 uvrA(pKM101) 을 사용하여 5단계의 용량으로 첨가하고, S9 mix를 첨가한 대사활성화법을 병행하여 대사활성계 존재 유무에 관계없이 최소 1개 균주에서 평판당 복귀된 집락수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정
- 하니베리 추출물의 구조분석 완료: NMR, GC/LC 등으로 화학구조, 물리화학적 성질, 구조식, 분자식 등
- 하니베리 추출물의 규격설정: 성상, 영양분석(탄수화물, 단백질, 조지방, 열량, 지방산조성 등)
- 하니베리 추출물의 동물모델에서의 안전성 확보(DRF, GLP): DRF독성: 설치류를 이용한 독성시험 용량 가설정을 위하여 non-GLP 기관에서 최고 독성용량 설정. non-GLP 반복투여 독성시험: 12주반복 경구투여독성시험으로 일반증상, 체중, 사료섭취량, 물섭취량, 혈액검사 (RBC, WBC, platelet, hemoglobin, hematocrit, differential WBC, agglutination test, reticulocyte), 혈액생화학검사(protein, albumin, A/G ratio, glucose, cholesterol, triglyceride, bilirubin, BUN, creatinine, AST, ALT, ALP, Cl, Ca, P, K 등), 뇨검사(volume, pH, protein, glucose, ketone body, bilirubin, occult blood, sediment), 안과학적검사, 병리조직학적검사 (피부, 젖샘(유선), 림프절, 침샘(타액선), 골 및 골수(홍골, 대퇴골), 가슴샘(흉선), 기관, 폐 및 기관지, 심장, 갑상샘(선) 및 부갑상샘(선), 혀, 식도, 위, 소장, 대장, 간장 및 담낭, 췌장, 비장, 신장, 부신, 방광, 정낭, 전립샘(선), 고환, 부고환, 난소, 자궁, 질, 뇌, 뇌하수체, 척수, 안구 및 그 부속기, 기타 육안적 병변이 관찰된 장기·조직 등), 확실중독량, 무독성량, 빈사 등
- 하니베리 추출물의 동물모델에서의 효능검증 완료: 선행연구 결과 효능을 보인 하니베리 추출물의 ED50, approximate ED 등을 설정하기 위하여 실험동물(설치류)로서 high fat diet or genetical obese or genetical diabete 모델로서 체중, 사료섭취량, 음수량, 체지방량, 장기중량, 혈액검사, 혈청검사(total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol), 조직면역검사(adiponectin, leptin), 조직병리검사 실시
- 하니베리 추출물의 생산 scale-up(pilot scale) 확립: lab scale에서 선정되어 확립된 추출방법을 pilot scale에서 확립하기 위하여 추출(초임계추출 or 유기용매추출 or 물추출) 용량을 확대한다. 이 과정에서 최고수율 및 적정수율(경제성·기능성 평가) 설정
- 하니베리 추출물의 인체적용시험을 위한 protocol 작성, CRF작성, 시험물질제조, IRB 심사 신청 등 일련의 과정 진행
- 하니베리 추출물의 지표(기능)성분 및 검사법 validation(비공인·공인) 확립: 선정된 지표. 기능물질을 특이성, 정확성, 정밀성, 정량한계, 직진성, 범위 측정의 방법을 통하여 validation을 자사에서 실시하고 이를 공인시험기관(식품위생검사기관-건기식)에 의뢰하여 공인 시험성적서 획득
- 하니베리 추출물의 대량생산 공정개발: 대량생산(원물 80~500kg)을 위하여 pilot test에서 확립된 생산공정을 기존의 설비를 이용하여 수율향상과 공정의 표준화를 위한 지표(기능)성분 검사, 유해물질검사, 성상 검사, 생산공정 process 확립 등을 통하여 대량생산 공정 개발

(3) 3차년도

- 하니베리 추출물의 in vitro 효능기전 검증: HepG2 cell을 이용하여 antioxidant biomarker (SOD, GPx, Catalase, ROS, DPPH 등)등의 실험을 통하여 효능검증 및 기전연구기반제공
- 하니베리 추출물의 인체적용시험을 위한 IRB 심사, 개시미팅, 인체적용시험 실시 등 일련의 과정 진행
- 하니베리 추출물의 인체내에서의 안전성과 효능 확보 (인체적용시험 성공적 완료): 일련의 인체적용시험 process를 통하여 성공적(20% 미만의 탈락율)으로 완료된 인체적용시험의 데이터 입력, 검토, 통계분석을 통하여 완료보고서 작성
- 하니베리 추출물의 제형확립: 추출물의 성상에 따라 capsule, tablet 등의 다양한 형태와 효능용량에 따라 vehicle의 size가 틀려짐으로 추출물의 특성과 효능, 독성용량에 따라 vehicle 선정과 부형제 formulation 실시
- 하니베리 추출물의 건강기능식품 기능성소재 인증: KFDA 건강기능성원료 신청서 서식에 맞게 각종자료를 수집, 자사실험 실험자료, 인증서, 논문 등을 첨가하여 신청서 제출전에 모듬토의 및 방문상담을 실시하여 사전에 예비평가를 통하여 수정보완하고 이후 신청서를 제출하여 기능성 인증 획득
- 시제품 생산: in vitro, in vivo, validation, clinical trial을 통하여 기능성과 안전성, 물질의 안정성 등의 검증, 그리고 시장조사를 통한 가격경쟁력, 제품디자인 등을 고려하여 GMP시설에서 시제품 생산

2. 추진 체계 및 일정

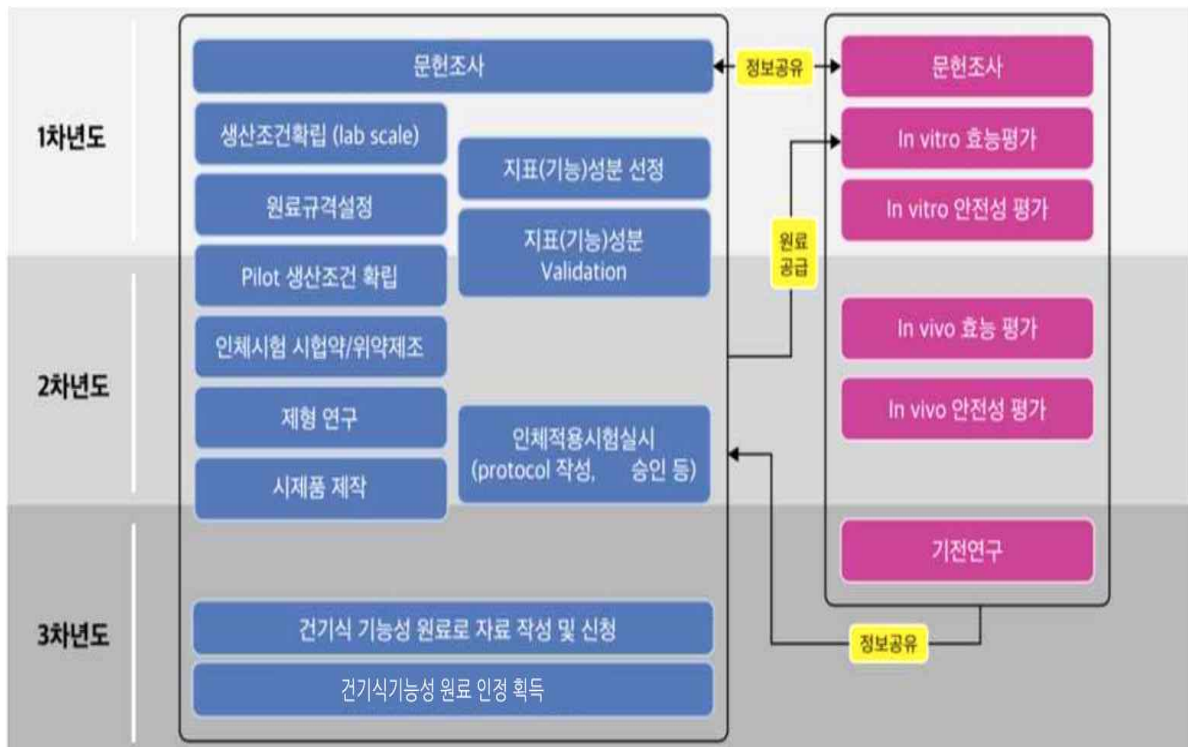


Figure 2-1. 연차별 연구추진 체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	하니베리(땃땃이나무열매)의 간기능 개선 건강기능식품 기능성 원료 인정 및 제품화	주관연구책임자 (천윤석)의 총 11명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
중소기업	1	8
대학	1	4

주관연구기관명
하니베리의 비알콜성 간손상
연구책임자(천윤석)의 7명
담당기술 개발내용
추출생산 공정개발 지표성분설정 지표 validation 설정 유통기한설정 기준규격설정 인체적용시험 수행 건기식기능성원료 신청자료 작성

가천대학교
세포 효능 독성 기전연구
연구책임자 (이해정)의 3명
담당기술 개발내용
<i>In vitro</i> 효능평가, 독성평가 <i>In vivo</i> 효능평가, 독성평가 기전연구

-
-
-
담당기술 개발내용
-

Figure 2-2. 추진 인력 및 담당기술 개발내용

<Table 2-1> 추진일정

1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	계획수립 및 자료조사	■	■												김주완 (주관)
2	생산조건확립(lab scale)		■	■	■	■	■								김주완 (주관)
3	지표(기능)성분설정			■	■	■	■	■	■	■					김주완 (주관)
4	<i>in vitro</i> 독성평가						■	■	■	■	■	■	■	■	이해정 (협동)
5	<i>in vitro</i> 효능평가						■	■	■	■	■	■	■	■	이해정 (협동)
6	원료규격설정 (계속)											■	■	■	김주완 (주관)
2차년도															
1	원료규격설정	■	■	■											김주완 (주관)
2	pilot 생산조건 확립	■	■	■	■	■									김주완 (주관)
3	대량생산조건 확립					■	■	■	■	■					김주완 (주관)
4	인체시험 시험약/위약 제조						■	■	■	■					김주완 (주관)
5	<i>in vivo</i> 효능평가	■	■	■	■	■	■	■	■	■					이해정 (협동)
6	<i>in vivo</i> 독성 평가	■	■	■	■	■	■	■	■	■					이해정 (협동)
7	제형연구										■	■	■	■	김주완 (주관)
8	인체적용시험							■	■	■	■	■	■	■	김주완 (주관)
3차년도															
1	제형연구	■	■	■											천운석 (주관)
2	기전연구	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	이해정 (협동)
3	인체적용시험	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	천운석 (주관)
4	시제품제작	■	■	■	■	■	■								천운석 (주관)
6	기능성원료 신청서 작성 및 인정획득							■	■	■	■	■	■	■	천운석 (주관)
6	<i>in vivo</i> 효능평가	■	■	■	■	■	■	■	■	■					천운석 (주관)
7	GLP 기관 독성시험연구					■	■	■	■	■	■	■	■	■	천운석 (주관)

3. 연차별 연구수행 내용 및 연구결과 요약

<Table 2-2> 연차별 연구수행 내용 및 연구결과 요약

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	독성/효능 자료 조사	특허, 논문, 정부보고서등의 검색	하니베리 추출물은 초기 개발 단계로 관련 자료가 많지 않음. 독성 시험 결과 무독성이고, 강력한 항산화력을 바탕으로 간 질환, 갑상선 기능, 피부등에 효능이 있는 것으로 확인
	기능-지표 물질 선정	지표물질 밸리데이션	후보 지표물질인 Cyanidin-3-glucoside(C3G)의 밸리데이션 결과 C3G는 지표물질로 적합
	추출조건 선정 및 원료 표준화	온도, 용매 등에 따른 추출 조건 확립 및 원산지 별 지표성분 함량 및 수율 확인	여러 조건으로 추출을 한 결과 착즙액에서 지표물질인 C3G의 함량이 열수, 에탄올, 물-에탄올 혼합추출에 높았지만 수율은 다른 추출방법에 비해 약간 낮았고, 열수 추출, 에탄올, 물-에탄올 혼합추출의 세가지 방법에서는 비슷한 양의 지표물질 함량을 나타내었지만 열수추출에서 함량과 수율이 약간 높았다. 물이나 에탄올의 저온 추출에서는 수율이 매우 낮았음
	미생물, 중금속, 잔류농약 등 규격설정	정립된 추출방법을 통한 추출분말의 공인기관 성적서를 통한 규격 설정	추출조건에서 수율과 지표함량이 높은 착즙분말을 공인기관인 기능식품연구원에 분석 의뢰하여 결과 획득함 (일반성분: 열량 355.14Kcal/100g, 탄수화물 83.75%, 조단백 1.99%, 조지방 1.35%, 수분 8.03%, 회분 4.88%, 나트륨 60.05mg/100g, 불포화지방산 0.014g/100g, 중금속: 납 0.41mg/kg, 카드뮴 0.13mg/kg, 비소 0.15mg/kg, 수은 0.001mg/kg, 잔류농약: BHC 불검출, DDT 불검출, aldrin 불검출, dieldrin 불검출, endrin 불검출, 미생물: 일반세균 208/g, 대장균군 음성, 대장균 음성)
	<i>in vitro</i> 효능 검증	GalN or CCl4에 의한 간세포 독성유도, 측정: AST, ALT, TBARS, antioxidant, cytochrom P-450 등	<ul style="list-style-type: none"> · DPPH 활성산소 소거능 측정하여 하니베의 효능 확인 · Law264.7 cell에 LPS처리에 의한 NO생성능을 측정한 결과 효능을 나타냄 · HepG2 cell에 산화적 스트레스 유도물질인 tBHP 처리 후 세포보호 효과를 측정한 결과 우수한 효능을 확인 함. · HepG2 cell에 tBHP처리후 Nrf2의 활성능을 측정한 결과 효능 확인 · cell에서의 AST, ALT 측정보다 <i>in vivo</i>에서의 AST, ALT측정이 효능검증에 더 유효할 것으로 판단됨
<i>in vitro</i> 독성시험	HepG2 cell viability test, 용량은 최대 300µg/ml 까지 safety 검증	HepG2 세포에 3-300µg/mL의 하니베리 처치 결과 대조세포와 비교하여 세포생존율에 변화를 나타내지 않았음. 300µg/ml까지 안전성 검증함. 300µg/ml 이상의 농도에서는 cell death가 관찰되지는 않았으나 추출물의 색으로 인해 측정이 불명확함	

2차 년도 (2017)	원료 규격설정	추출분말의 공인기관 성적서를 통한 규격 설정	국내산 하니베리 상온물추출 건조분말을 국가공인기관인 한국기능식품연구원에 영양성분, 미생물, 중금속, 잔류농약의 분석을 의뢰하여 적합성 확인 (일반성분 : 열량 376.99Kcal/100g, 탄수화물 91.62%, 조단백 0.68%, 조지방 0.87%, 수분 4.80%, 회분 2.03%, 나트륨 16.75mg/100g, 중금속 : 납 0.044mg/kg, 카드뮴 0.005mg/kg, 비소 0.019mg/kg, 수은 0.007mg/kg, 잔류농약 : BHC, DDT, aldrin, dieldrin, endrin 등 총 5종 불검출, 미생물 : 대장균군 음성)
	대량 생산조건 확립	생산규모의 증대를 위한 mass scale 추출제조공정 확립 (80kg, 추출기에서의 추출용매, 추출온도, 추출시간, 추출횟수, 필터방법, 건조방법, 수율 확립)	하니베리 원료(80kg)를 최적의 추출조건과 동일한 추출조건으로 생산규모를 증대하여 동일한 지표물질 (C3G) 함량 및 수율 확인
	인체작용시험용 시험약/위약제조	시험약과 위약의 구분이 유사한 색, 향, 맛으로 제조, 섭취량이 1,960mg/day의 용량으로 66명분 12주 분량	갈색 capsule 제형으로 490mg capsule로 1일 2회, 1회 2capsule 복용 가능한 제형으로 제조
	인체적용시험 IRB신청 및 승인	인체적용시험을 위한 protocol, CRF 작성, IRB 승인신청 및 승인	AST, ALT, GGT가 정상범위 초과(환자기준 초과하지 않음)한 남녀성인 피험자 66명(시험군 33명, 플라시보 33명), 12주간의 RCT, DB, placebo대조시험, 검사항목: 인구학적조사, 음식섭취량, 혈청검사, 지방대사 (FFA, cholesterol 등) /간기능검사(AST, ALT, GGT 등) protocol 작성 후 임상기관-남양주 양병원/CRO-케이제이 파마텍, IRB신청 및 승인 완료
	제형연구	tablet, capsule, powder 등에 대한 formulation 연구	하니베리 추출분말과 덱스트린 등을 혼합하여 capsule 제형으로 개발완료
	<i>in vivo</i> 안전성 평가	독성시험 (정상대조군, 하니베리 추출물 용량 그룹의 단회, 반복투여독성시험: non-GLP)	하니베리 추출물의 500mg/kg, 1,000mg/kg, 2,000mg/kg 세용량을 설정하여 단회·반복 투여 후 체중변화, 장기 무게, 혈액검사, 혈액 생화학검사, 소핵검사 결과 하니베리 추출물은 독성이 없는 안전한 물질임을 확인
	<i>in vivo</i> 효능평가	비알콜성(High fat diet 모델) 간손상 동물모델에서 하니베리 추출물의 효능평가	하니베리 추출물 100, 200, 400mg/kg 용량으로 고지방식이로 비알콜성 간 손상 유도한 동물에게 경구투여 후 체중변화 및 식이 섭취량, 장기무게, 지방량 측정 및 관찰, 혈중 간 기능 개선 지표, 간 조직 지방량 및 직경 측정, 항산화 효소 활성 측정, 혈중 지질 농도 측정, 간조직 당 분해 및 합성효소 측정, 지질 관련 대사 mRNA 발현량을 측정한 결과 하니베리 추출분말의 우수한 항산화 효과와 지방 합성 억제 효능을 바탕으로 간 보호 효과를 확인

3차 년도 (2018)	제형연구	tablet, capsule, powder 등에 대한 formulation 연구	하니베리 추출물과 덱스트린 비율 각각 1:1 혼합 후 동결건조 진행. 이산화규소(1%), 스테아린산 마그네슘(1%)을 첨가하여 capsule 제형으로 개발완료. 이 제형으로 인체적용시험 진행
	시제품제작	건강기능식품 및 기능성 화장품 원료로 제작	건강기능식품 1건, 식품 4건, 기능성 화장품 5건 총 10건의 시제품 제작
	인체적용시험	하니베리 투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용시험; 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구	<ul style="list-style-type: none"> 간기능 1차 유효성 평가변수인 AST에서 시험군의 경우 통계적으로 유의하게 감소하였고, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서도 유의한 차이 확인 간기능 1차 유효성 평가변수인 ALT에서 시험군의 경우 통계적으로 유의한 감소 확인 지방대사 평가변수인 HDL에서 시험군의 경우 통계적으로 유의하게 증가하였고, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서도 유의한 차이 확인 항산화 평가변수인 MDA에서 시험군의 경우 통계적으로 유의하게 감소하였고, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서도 유의한 차이 확인 항산화 평가변수인 SOD에서 시험군의 경우 증가하는 경향을 확인(유의성 없음) 하였지만, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서는 유의한 차이 확인 피로심각척도 문항분석은 '정신적 피로', '졸리움', '신체적부조화', '소진'에서 피로자각도는 유의하게 감소하는 것을 확인 시험물질과 관련된 어떠한 이상반응이나 부작용이 나타나지 않아 안전한 물질로 판단 됨
	기능성원료 신청	비알콜성 간기능 손상으로부터 간보호	<ul style="list-style-type: none"> 하니베리 추출분말로서 1,960mg/일 지표성분: C3G(cyanidin-3-glucoside) 성분: 7.5 mg/g 성상: 덩어리나 무열매 (하니베리) 추출분말로서 이미·이취가 없고 고유의 향미가 있는 붉은색 분말
	기전연구	in vitro, in vivo, 인체적용시험으로 이어지는 기전제시	하니베리 추출물에 의한 AMPK 활성이 야기되어 Nrf2의 transactivation을 유도하여 항산화 및 간기능 개선 관련 유전자의 발현을 증가시켜 동물실험과 인체적용시험의 간 기능 개선의 효과를 나타낸 것으로 판단 됨
추가 연구	in vivo 효능평가	국내산 하니베리 사용 고지방식이(HFD) 간손상 mice 모델 (32.60~36.20g, 6주령)	간조직내 AMPKα1, AMPKα2 유의적 증가에 의한 항산화 활성 증가를 통해 간조직내 지질대사증가와 간내 AST, ALT 효소 감소기전을 확인함
	GLP 기관 독성시험연구	<ul style="list-style-type: none"> 단회투여 반복투여(90일) 복귀돌연변이 소핵시험 염색체 이상시험 	특이한 일반증상, 사망례, 유의한 체중변화 및 육안적 병변 소견 없었으며, 유전독성(복귀돌연변이, 소핵시험, 염색체 이상시험)에서도 독성이 유발되지 않았음. 안전한 식품으로 확인 됨

2절 연구개발성과

1. 논문게재 성과

<Table 2-3> In vitro 연구성과 논문

학술지정보	Nutrition Research and Practice			SCI구분	■ SCI	□ 비SCI
	Vol	12(6)	계재연도	2018	페이지	486-493
논문제목	Evaluation of in vitro anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Korean and Chinese Lonicera caerulea					
연구목적	한국산과 중국산 하니베리 추출물의 간보호 기능 식품으로서의 항산화·항염증 활성 평가					
연구유형	In vitro 실험					
시험계	<ul style="list-style-type: none"> 국내산 하니베리 추출물과 중국산 하니베리 추출물 대조물질을 in vitro에서 인간간암세포주 (HepG2)에 농도별로 처리하여 항산화기능, 항염기능 및 간세포생존율에 미치는 효능을 분석함 국내산 하니베리 추출물과 중국산 하니베리 추출물 대조물질을 in vitro에서 마우스대식세포 (RAW 264.7)에 처리하여 NO 생성과 항산화유전자들의 mRNA발현 및 세포생존율에 미치는 효능을 분석함 					
시험물질	<ul style="list-style-type: none"> 한국산 하니베리: 착즙, 농축, 동결건조과정을 통해 생산된 시험물질 중국산 하니베리: 착즙, 농축, 동결건조과정을 통해 생산된 시험물질 					
대조군	■ control		■ positive control		■ negative control	
시험군	<ul style="list-style-type: none"> 항산화기능: 하니베리 추출물들의 농도별 처리에 따른 항산화기능 분석 간세포생존율: 하니베리 추출물들의 농도별 처리에 따른 간세포생존율 분석 항염기능: LPS로 야기된 NO에 대한 하니베리 추출물들의 농도별 처리에 따른 항염기능 분석 					
바이오마커	DPPH scavenging activity, Nrf2-dependent gene expression, SOD activity, CAT activity, NO production, 간세포생존율					
통계처리	항산화기능, 항염기능, 간세포생존율에 대한 평균(표준편차 산출), 집단간 차이 LSD test, Kruskal-Wallis H test					
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> 한국산, 중국산 하니베리 추출물(10, 30, 100, 300μg/ml)들에 대한 DPPH scavenging activity를 확인한 결과에서 두 가지 추출물 모두 농도 의존적으로 DPPH scavenging activity를 보임(p<0.05) HepG2에 한국산, 중국산 하니베리 추출물을 처리한 시험군(3, 10, 30, 100, 300μg/ml)들 모두에서 간암세포생존율에 미치는 영향이 없음 HepG2에 간독성유발물질 tBHT를 처리한 대조군 대비하여 한국산 하니베리 추출물을 처리한 시험군(30, 100, 300μg/ml)에서는100, 300μg/ml을 처리한 시험군에서 유의적인 생존율의 증가(p<0.05)를 보였으며, 중국산 하니베리 추출물을 처리한 시험군(30, 100, 300μg/ml)에서는 농도 의존적으로 생존율의 증가(p<0.05)를 보였음. 그러므로 두 가지 하니베리 추출물 모두 간세포독성에 대한 회복효과를 보였으나 중국산 하니베리 추출물이 한국산 하니베리 추출물에 비해 간세포독성에 대한 높은 회복효과를 보임 					

- HepG2에 한국산, 중국산 하니베리 추출물을 처리한 시험군(30, 100, 300 μ g/ml)들에서 한국산의 경우 정상 대조군 대비하여 농도 의존적으로 Nrf2 transactivation이 유의적으로 증가하였으며(p<0.05), 중국산의 경우 100, 300 μ g/ml로 처리한 시험군에서 Nrf2 transactivation이 유의적으로 증가함(p<0.05)
- HepG2에 한국산, 중국산 하니베리 추출물을 처리한 시험군(300 μ g/ml)에서 한국산의 경우 정상 대조군 대비하여 Nrf2 의존적 항산화유전자들인 Nqo1, HO-1의 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였고(p<0.05), 중국산의 경우 Nrf2 의존적 항산화 유전자들인 Nqo1, HO-1, Gclc들의mRNA 발현이 유의적으로 증가함(p<0.05)
- HepG2에 한국산, 중국산 하니베리 추출물을 처리한 시험군(300 μ g/ml) 모두에서 정상 대조군 대비 SOD activity가 유의적 증가를 보임(p<0.05)
- HepG2에 한국산, 중국산 하니베리 추출물을 처리한 시험군(300 μ g/ml)에서 정상 대조군 대비 중국산만이 CAT activity가 유의적으로 증가함(p<0.05)
- RAW 264.7에 한국산, 중국산 하니베리 추출물을 처리한 시험군(3, 10, 30, 100, 300 μ g/ml) 모두에서 정상 대조군 대비 세포독성을 보이지 않음
- RAW 264.7에 LPS를 처리하여 세포독성을 유발한 대조군 대비 한국산, 중국산 하니베리 추출물을 처리한 시험군(10, 30, 100, 300 μ g/ml)들에서 한국산, 중국산 하니베리 추출물들 모두 30 μ g/ml 이상에서 유의적인 세포생존율의 증가를 보임(p<0.05)
- RAW 264.7에 LPS를 처리하여 세포독성을 유발한 대조군 대비 한국산, 중국산 하니베리 추출물을 처리한 시험군(10, 30, 100, 300 μ g/ml)들 모두 100 μ g/ml 이상에서 유의적인 NO 생성 감소를 보임(p<0.05)

비고

Nutrition Research and Practice. 2018
 Published online 2018 November 16
 ©2018 The Korean Nutrition Society and the Korean Society of Community Nutrition
<http://e-nrp.org>

Evaluation of in vitro anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Korean and Chinese *Lonicera caerulea*

You-Suk Lee¹, Il Je Cho², Joo Wan Kim³, Sun-Kyoung Lee⁴, Sae Kwang Ku⁵ and Hae-Jeung Lee^{1*}

¹Department of Food and Nutrition, College of BioNano Technology, Gachon University, 1342, Seongnam-daero, Sujeong-gu, Seongnam, Gyeonggi 13120, Korea

²The Medical Research Center for Globalization of Herbal Formulation and Department of Herbal Formulation, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsbuk 38610, Korea

³Department of Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

⁴Department of Life Physical Education, Myongji University, Seoul 03674, Korea

⁵Department of Anatomy and Histology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan, Gyeongbuk 38610, Korea

BACKGROUND/OBJECTIVE: The honeysuckle berry (HB) contains ascorbic acid and phenolic components, especially anthocyanins, flavonoids, and low-molecular-weight phenolic acids. In order to examine the potential of HB as a hepatoprotective medicinal food, we evaluated the *in vitro* anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Korean HB (HBK) and Chinese HB (HBC).

MATERIALS/METHODS: Antioxidant and anti-inflammatory effects of the extracts were examined in HepG2 and RAW 264.7 cells, respectively. The anti-oxidant capacity was determined by DPPH, SOD, CAT, and ARE luciferase activities. The production of nitric oxide (NO) as an inflammatory marker was also evaluated. The Nrf2-mediated mRNA levels of heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (Nqo1), and glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (Gclc) were measured. The concentrations of HB extracts used were 3, 10, 30, 100, and 300 μ g/mL.

RESULTS: The radical scavenging activity of all HB extracts increased in a concentration-dependent manner ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). SOD ($P < 0.05$) and CAT ($P < 0.01$) activities were increased by treatment with 300 μ g/mL of each HB extract, when compared to those in the control. NO production was observed in cells pretreated with 100 or 300 μ g/mL of HBC and HBK ($P < 0.01$). Treatment with 300 μ g/mL of HBC significantly increased Nqo1 ($P < 0.01$) and Gclc ($P < 0.05$) mRNA levels compared to those in the control. Treatment with 300 μ g/mL of HBK ($P < 0.05$) and HBC ($P < 0.01$) also significantly increased the HO-1 mRNA level compared to that in the control.

CONCLUSIONS: Thus, the Korean and Chinese HBs were found to possess favorable *in vitro* anti-oxidant and anti-inflammatory activities. Nrf2 and its related anti-oxidant genes were associated with both anti-oxidant and anti-inflammatory activities in HB-treated cells. Further studies are needed to confirm these *in vivo* effects.

Nutrition Research and Practice 2018 November 16; pISSN 1976-1457 eISSN 2005-6168

Keywords: Honeysuckle berry, hepatoprotective effect

INTRODUCTION

The liver plays vital roles in several processes, including protein synthesis, glucose homeostasis, detoxification, and cycling of various nutrients [1,2]. Liver damage causes metabolic dysfunctions. If liver injury persists, transient elevation of liver enzymes, hepatic fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma

functional foods that can help prevent and treat liver damage.

Oxidative stress is induced by reactive oxygen species (ROS) that can damage cells and result in diseases such as diabetes, cardiovascular ailments, cancer, and liver damage [5]. Anti-oxidant vitamins and enzymes, such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase, can reduce excessive ROS production [6]. Phytochemicals with distinct

<Table 2-4> In vivo 연구성과 논문 1

학술지정보	International Journal of Molecular Medicine			SCI구분	■ SCI	□ 비SCI
	Vol	42(6)	게재연도	2018	페이지	1-18
논문제목	Anti-obesity and fatty liver-preventing activities of Lonicera caerulea in high-fat diet-fed mice					
연구목적	고지방식이 동물모델의 하니베리 추출물 농도별 경구투여에 의한 비알콜성 간손상 예방과 비만 관련 위험요인 감소 효과 및 기전 규명					
연구유형	동물실험					
Species	Mice	Age	6주령			
Strain	ICR 고지방식이	Sex	□ male ■ female			
시험물질	하니베리 물추출 동결건조물					
투입형태	□ 식이 □ 음료 ■ 강제경구 □ 기타					
시험디자인	대조군	placebo	총 48마리 중 8마리는 고지방식이와 10ml/kg 정제수 경구투여			
		positive	총 48마리 중 8마리는 고지방식이와 Metformin 250mg/kg 경구투여			
		negative	총 48마리 중 8마리는 정상식이와 10ml/kg 정제수 경구투여			
	시험군	시험군 1: 총 48마리 중 8마리는 고지방식이와 하니베리 추출물 400mg/kg				
		시험군 2: 총 48마리 중 8마리는 고지방식이와 하니베리 추출물 200mg/kg 시험군 3: 총 48마리 중 8마리는 고지방식이와 하니베리 추출물 100mg/kg				
디자인	고지방식이 24마리를 무작위로 집단별 8마리씩 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg/일을 84일(12주)동안 섭취	섭취량	시험군 1: 400mg/kg/일 시험군 2: 200mg/kg/일 시험군 3: 100mg/kg/일			
		섭취기간	84일(12주)			
식이조절	정상식이, 고지방식이					
바이오마커	간 내 효소, 혈중 glucose 및 지질(TC, TG, LDL-c, HDL-c), 항산화기능(MDA, glutathione, catalase, SOD), 췌장외벽 zymogen granules, mean islet numbers, mean islet diameter, 당대사 관련 간효소(GK, G6pase, PEPCK), 간섬유화 및 평균 간 직경, 지질대사관련 간 조직 내 유전자 발현(ACCI, AMPKa1, AMPKa2), 지방조직내 유전자발현(leptin, UCP2, adiponectin, C/EBPα, C/EBPβ, SREBP1c)					
통계처리	모든 자료 평균(표준편차), 집단간 차이검증 one-way ANOVA, Bonferroni 검증, 유의검증 수준 p<0.05					
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 간 내 효소들인 AST, ALP, LDH, GGT가 유의적으로 감소하였으며(p<0.05), 다른 간 내 효소인 ALT는 하니베리 추출물 400, 200mg/kg 경구투여 시 HFD시험군 대비 유의적으로 감소함(p<0.05) 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 TC, TG, LDL-c가 유의적으로 감소한 반면(p<0.05), HDL-c는 하니베리 추출물 400, 200mg/kg 경구투여 시 HFD시험군 대비 유의적으로 증가함(p<0.05) 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 간 Zymogen 과립이 유의적으로 증가함(p<0.05) 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 MDA가 의적으로 감소함 (p<0.05) 하니베리 추출물 400, 200mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 catalase, SOD가 유의적으로 증가함(p<0.05) 하니베리 추출물 400mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 glutathione이 유의적으로 증가함(p<0.05) 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 간섬유화, 간평균직경이 유의적으로 감소함(p<0.05) 					

- 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 glucose-6-phosphatase, PEPCK 활성이 유의적으로 감소함(p<0.05)
- 하니베리 추출물 400mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 glucokinase 유의적으로 증가함(p<0.05)
- 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 AMPK α 1 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였으며(p<0.05), AMPK α 2 mRNA 발현은 하니베리 추출물 400, 200mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 mRNA 발현이 유의적으로 증가함(p<0.05)
- 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 ACC1 mRNA 발현이 유의적으로 증가함(p<0.05)
- 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 leptin, C/EBP α , C/EBP β , SREBP1c mRNA 발현이 유의적으로 감소하였고(p<0.05), UCP2 mRNA 발현은 하니베리 추출물 400, 200mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 유의적으로 증가하였으며(p<0.05), 이와 반대로 adiponectin mRNA 발현은 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg 경구투여 시 HFD 마우스 대비 유의적으로 증가함(p<0.05)

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 42: 3047-3064, 2018

Anti-obesity and fatty liver-preventing activities of *Lonicera caerulea* in high-fat diet-fed mice

JOO WAN KIM^{1*}, YOU-SUK LEE^{2*}, DU JIN SEOL¹, IL JE CHO³,
SAE KWANG KU⁴, JAE-SUK CHOI⁵ and HAE-JEUNG LEE²

¹Aribio Co. Ltd., Seongnam, Gyeonggi 13487; ²Department of Food and Nutrition, College of BioNano Technology, Gachon University, Seongnam, Gyeonggi 13120; ³The Medical Research Center for Globalization of Herbal Formulation and Department of Herbal Formulation, College of Oriental Medicine; ⁴Department of Anatomy and Histology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan, Gyeongsangbuk 38610; ⁵Division of Biotechnology, College of Medical and Life Sciences, Silla University, Sasang, Busan 46958, Republic of Korea

Received March 26, 2018; Accepted August 27, 2018

DOI: 10.3892/ijmm.2018.3879

비고

Abstract. Blue honeysuckle (BH, *Lonicera caerulea*) is used as a traditional medicine in Russia, Japan and China, but is not commonly considered as an edible berry in Europe, USA or Korea. BH has been revealed to decrease serum cholesterol and triacylglycerol (triglyceride or TG) levels through the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), thus it is expected to be a health functional food and pharmaceutical agent for the prevention of non-alcoholic liver damage, in addition to effects as a suppressor of hyperlipidemia and as an anti-obesity agent. In the present study, the pharmacological activity of BH extract (BHe) was observed in high-fat diet (HFD)-fed mice. Significant increases in fat pad weight, body weight, fat accumulation (body and abdominal fat density, and thickness of the periovarian and abdominal wall) and serum biochemical levels (aspartate transaminase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, γ -glutamyltransferase, total cholesterol, low-density lipoprotein and TG, with the exception of high-density lipoprotein) were observed in HFD-fed mice. In addition, increases in adipocyte hypertrophy, the area of steatohepatitis and

hepatocyte hypertrophy were observed, whereas decreased zymogen content was identified upon histopathological observation. Increased deterioration of the endogenous antioxidant defense system (liver catalase, glutathione and superoxide dismutase) and hepatic lipid peroxidation was observed. In addition, there were decreases in hepatic glucokinase activity, AMPK α 1 and AMPK α 2 mRNA expression, adipose tissue uncoupling protein 2 expression, and adiponectin mRNA expression, increases in phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase activity, hepatic acetyl-CoA carboxylase 1 mRNA expression, and the expression of leptin, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) α , C/EBP β and sterol-regulatory-element-binding protein 1c mRNA in the periovarian tissue. Furthermore, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and obesity were significantly inhibited by the continuous administration of BHe for 84 days. These results revealed that BHe may be a promising novel drug or functional food candidate for the treatment of obesity and NAFLD.

<Table 2-5> In vivo 연구성과 논문 2



학술지정보	Food Science and Nutrition			SCI구분	■ SCI	□ 비SCI
	Vol	7	계재연도	2018	페이지	1-17
논문제목	Hepatoprotective effects of blue honeysuckle on CCl ₄ induced acute liver damaged mice					
연구목적	CCl ₄ 로 야기된 단발성 간손상 mice모델에게 하니베리 추출물 제조공정 방법에 따른 투여 후 간기능 향상 효과 및 간 조직의 형태학적 변화 규명					
연구유형	동물실험					
Species	Mice	Age	6주령			
Strain	ICR	Sex	■ male □ female			
시험물질	<ul style="list-style-type: none"> • 하니베리 열수추출 동결건조물 • 하니베리 착즙 동결건조물 • 하니베리 효소처리추출 동결건조물 					
투입형태	□ 식이 □ 음료 ■ 강제경구 □ 기타					
시험디자인	대조군	placebo	총 60마리 중 10마리는 정제수 경구투여 10ml/kg + CCl ₄ 복강투여 0.5ml/kg			
		positive	총 60마리 중 10마리는 실리마린 100mg/kg 경구투여 + CCl ₄ 복강투여 0.5ml/kg			
		negative	총 60마리 중 10마리는 정제수 경구투여 + olive oil 복강투여 10ml/kg			
	시험군	시험군 1: 총 60마리 중 10마리는 하니베리 열수추출 동결건조물 200mg/kg + CCl ₄ 복강투여 0.5ml/kg 시험군 2: 총 60마리 중 10마리는 하니베리 착즙 동결건조물 200mg/kg + CCl ₄ 복강투여 0.5ml/kg 시험군 3: 총 60마리 중 10마리는 하니베리 효소처리추출 동결건조물 200mg/kg + CCl ₄ 복강투여 0.5ml/kg				
	디자인	하니베리 추출물의 제조 방법에 따른 CCl ₄ 에 의한 단발성 간손상 회복에 효과를 검증하기 위해 하니베리 열수추출 동결건조물, 하니베리 착즙 동결건조물, 하니베리 효소처리추출 동결건조물을 하루 일회 CCl ₄ 복강투여에 따라 진행	섭취량	시험군 1: 하니베리 열수추출 동결건조물 200mg/kg/일 시험군 2: 하니베리 착즙 동결건조물 200mg/kg/일 시험군 3: 하니베리 효소처리추출 동결건조물 200mg/kg/일		
식이조절						
바이오마커	간 기능 검사 지표: AST (aspartate aminotransferase)와 ALT (alanine aminotransferase) 수치, 간내 항산화기능(MDA, GSH, CAT, SOD), hepatic histological activity index, hepatic percentages of degenerative regions, numbers of degenerative hepatocytes, histopathological profiles					
통계처리	모든 자료 평균(표준편차), 집단간 차이검증 one-way ANOVA, Kruskal-Wallis H 검정, 유의검증 수준 p<0.05					
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> • CCl₄처리 대조군 대비 3가지 하니베리 추출물 시험군 모두에서 체중의 유의적 증가를 보임(p<0.01, p<0.05) • CCl₄처리 대조군 대비 3가지 하니베리 추출물 시험군 모두에서 간 무게의 유의적 감소를 보임(p<0.01) • CCl₄처리 대조군 대비 3가지 하니베리 추출물 시험군 모두에서 지질과산화(Lipid Peroxidation; nM of MDA/mg protein)는 유의적 감소(p<0.01)를 보였으며, 이와 반대로 항산화 관련 인자인 GSH, SOD, CAT는 모두 유의적 증가를 보임(p<0.01) 					

- CCl₄처리 대조군 대비 3가지 하니베리 추출물 시험군 모두에서 간조직의 형태학적변화 (histological activity index, percentage of degenerative regions, number of degenerative hepatocytes, numbers of inflammatory cells infiltrated)를 비교한 결과, CCl₄에 의한 간조직 손상에 의한 형태학적 변화에 유의적 감소를 보임(p<0.01)
- CCl₄처리 대조군 대비 3가지 하니베리 추출물 시험군 모두에서 간 기능 검사 지표인 AST, ALT효소들의 유의적 감소를 보임(p<0.01)
- CCl₄처리 대조군 대비 3가지 하니베리 추출물 시험군 모두에서 세포자멸사(apoptosis) 인자들인 cleaved caspase-3, cleaved poly(ADP-ribose) polymerase, nitrotyrosine, 4-hydroxynonenal에 대한 간 조직 면역조직화학염색(immunohistochemistry)을 진행한 결과, 이들 세포자멸사 인자들의 유의적 감소를 보임(p<0.01)

비교

ORIGINAL RESEARCH WILEY Food Science & Nutrition Open Access

Hepatoprotective effects of blue honeysuckle on CCl₄-induced acute liver damaged mice

You-Suk Lee^{1*} | Il Je Cho^{2*} | Joo Wan Kim³ | Min-Ki Lee⁴ | Sae Kwang Ku⁵ |
Jae-Suk Choi⁶  | Hae-Jeung Lee¹ 

¹Department of Food and Nutrition, College of BioNano Technology, Gachon University, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea
²The Medical Research Center for Globalization of Herbal Formulation, Department of Herbal Formulation, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, Korea
³Aribio Co. Ltd., Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea
⁴Department of Physical Education, Kongju National University, Kongju-si, Chungcheongnam-do, Korea
⁵Department of Anatomy and Histology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, Korea
⁶Division of Bioindustry, College of Medical and Life Sciences, Silla University, Busan, Korea

Correspondence
 Jae-Suk Choi, Department of Food and Nutrition, College of BioNano Technology, Gachon University, Gyeonggi-do, Korea.
 Email: jsc1008@silla.ac.kr

Funding information
 Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through High Value-added Food Technology Development Program funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (grant 116019-3) and Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development funded by Rural Development Administration (Project No. PJ01227802), Republic of Korea

Abstract
 The objective of this study was to evaluate the hepatoprotective effects of blue honeysuckle (BH) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced acute hepatic damage in mice. The experiment used a total of 60 ICR mice, which were divided into six groups. Except for the intact control groups, all groups received a single intraperitoneal injection of CCl₄ after a 7 day pre-treatment period with distilled water, BH extracts, or silymarin. Twenty-four hours after the CCl₄ injection, the following observations, representative of classical oxidative stress-mediated centrilobular necrotic acute liver injuries, were observed: decreased body weight; small nodule formation and enlargement on the gross inspections with related liver weight increase; elevation of serum AST and ALT, increases in hepatic lipid peroxidation and related depletion of endogenous antioxidants and antioxidative enzymes; centrilobular necrosis; increases in apoptotic markers, lipid peroxidation markers, and oxidative stress markers. However, liver damage was significantly inhibited by the pre-treatment with BH extracts. The present study demonstrated that oral administration of BH extracts prior to exposure to CCl₄ conferred favorable hepatoprotective effects. These results demonstrated that BHe possessed suitable properties for use as a potent hepatoprotective medicinal food.

KEYWORDS
 antioxidant, CCl₄, liver, *Lonicera caerulea*, mice

<Table 2-6> In vivo 연구성과 논문 3

학술지정보	Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry			SCI구분	<input type="checkbox"/> SCI	<input checked="" type="checkbox"/> 비SCI
	Vol	22(4)	게재연도	2018	페이지	39-54
논문제목	The hepatoprotective and anti-obesity effects of Korean blue honeysuckle extracts in high fat diet-fed mice					
연구목적	고지방식이 동물모델의 하니베리 추출물 농도별 경구투여에 의한 비알콜성 간손상예방과 비만 관련 위험요인 감소 효과 및 기전 규명					
연구유형	동물시험					
Species	Mice			Age	6주령	
Strain	ICR 고지방식이			Sex	<input type="checkbox"/> male <input checked="" type="checkbox"/> female	
시험물질	하니베리 물추출 동결건조물					
투입형태	<input type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input checked="" type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타					
시험디자인	대조군	placebo	총 48마리 중 8마리는 고지방식이와 10ml/kg 정제수 경구투여			
		positive	총 48마리 중 8마리는 고지방식이와 Metformin 250mg/kg 경구투여			
		negative	총 48마리 중 8마리는 정상식이와 10ml/kg 정제수 경구투여			
	시험군	시험군 1: 총 48마리 중 8마리는 고지방식이와 하니베리 추출물 400mg/kg				
		시험군 2: 총 48마리 중 8마리는 고지방식이와 하니베리 추출물 200mg/kg 시험군 3: 총 48마리 중 8마리는 고지방식이와 하니베리 추출물 100mg/kg				
디자인	고지방식이 24마리를 무작위로 집단별 8마리씩 하니베리 추출물 400, 200, 100mg/kg/day를 84일(12주)동안 섭취			섭취량	시험군 1: 400mg/kg/day 시험군 2: 200mg/kg/day 시험군 3: 100mg/kg/day	
				섭취기간	84일(12주)	
식이조절	고지방식이, 정상식이					
바이오마커	간내효소, 혈중 glucose 및 지질(TC, TG, LDL-c, HDL-c), 항산화기능(MDA, glutathione, catalase, SOD), 췌장외벽 zymogen granules, mean islet numbers, mean islet diameter, 당대사 관련 간효소(GK, G6pase, PEPCK), 간섬유화 및 평균 간 직경, 지질대사관련 간조직내 유전자 발현(ACCI, AMPK α 1, AMPK α 2), 지방조직내 유전자발현(leptin, UCP2, adiponectin, C/EBP α , C/EBP β , SREBP1c)					
통계처리	모든 자료 평균(표준편차), 집단간 차이검증 one-way ANOVA, Kruskal-Wallis H 검증, 유의검증 수준 p<0.05					
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> • 시험군 1, 2, 3 간내 효소(AST, ALT, ALP, LDH, GGT, BUN, creatine) 유의적 감소(HFD 대조군 대비 p<0.05) • 시험군 1, 2, 3 glucose 유의적감소(HFD대조군 대비 p<0.01, p<0.05) • 시험군 1, 2, 3 TC, TG, LDL-c, 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.01), HDL-c 유의적 증가(HFD대조군 대비 p<0.01, p<0.05) • 시험군 1, 2, 3 MDA 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.01), glutathione, catalase, SOD 시험군 1, 2, 3 유의적 증가(HFD대조군 대비 p<0.01, p<0.05) • 시험군 1, 2, 3 zymogen granules 유의적 증가(HFD대조군 대비 p<0.01), mean islet numbers, mean islet diameter 시험군 1, 2, 3 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.01) • 시험군 1, 2, 3 insulin-IR cells, glucagon-IR cells, insulin/glucagon ratio 유의적 감소(HFD 대조군 대비 p<0.01) 					

- 시험군 1, 2, 3 glucokinase 유의적 증가(HFD대조군 대비 $p<0.01$, $p<0.05$), glucose-6-phosphatease, PEPCK 시험군 1, 2, 3 유의적 감소(HFD대조군 대비 $p<0.01$)
- 시험군 1, 2, 3 간 섬유화 평균간 직경 유의적 감소(HFD대조군 대비 $p<0.01$)
- 시험군 1, 2, 3 지질대사관련 간조직내 ACC1 유의적 감소(HFD대조군 대비 $p<0.05$), AMPK α 1, AMPK α 2 유의적 증가(HFD대조군 대비 $p<0.01$, $p<0.05$)
- 시험군 1, 2, 3 지방조직내 UCP2, Adiponectin 유의적 증가(HFD대조군 대비 $p<0.05$, $p<0.01$).
- 지방조직내 leptin, C/EBP α , C/EBP β , SREBP1c 유의적 감소(HFD대조군 대비 $p<0.05$, $p<0.01$)

Received: 2018/12/03, Revised: 2018/12/12, Accepted: 2018/12/12, Published: 2018/12/31

©2018 Yoon-Seok Chun et al. License: Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry. This is an open access article distributed under the terms of the creative commons attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Corresponding author: Namju Lee

Department of Leisure Sports, School of Sports Sciences, Jungwon University, Goeasan-gun, Chungbuk, 28024, Republic of Korea

Tel: +82-10-9216-7865

E-mail: namju1210@gmail.com

©2018 The Korean Society for Exercise Nutrition

Hepatoprotective and anti-obesity effects of Korean blue honeysuckle extracts in high fat diet-fed mice

Yoon-Seok Chun¹ / Se-Kwang Ku² / Jong-Kyu Kim¹ / Sok Park³ / In-ho Cho / Nam-Ju Lee^{5*}

1. Arthro centers Research Institute, Pyeongtaek, Republic of Korea
2. Department of Anatomy and Histology, Daegu Haany University, Gyeongsan, Republic of Korea
3. Keangwool University, Seoul, Republic of Korea
4. Human Performance Laboratory, Korea National Sport University, Seoul, Republic of Korea
5. Department of Leisure Sports, Jungwon University, Goeasan-gun, Republic of Korea

INTRODUCTION

In the past 30 years, the incidence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been increasing owing to changes in dietary habits and Western lifestyles in the Asia-Pacific region¹. Liver damage by NAFLD causes hepatic metabolic dysfunction. NAFLD is the most common chronic liver disease and is associated with an increase in serum alanine transaminase, as well as disorders such as benign macrovesicular hepatosteatosis, non-alcoholic steatohepatitis, hepatic fibrosis, cirrhosis of the liver, and hepatocellular carcinoma²; moreover, increased triglyceride levels are associated with these tissue changes. In particular, the accumulated fat in NAFLD can increase oxidative stress³ in the liver and cause chronic damage to it⁴.

There is a growing interest in berries as a food for reducing oxidative stress caused by reactive oxygen species because berries have both antioxidant vitamins and enzymes such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase, as well as phytochemicals with distinct flavors, odors, and colors and antioxidant functions at the same time⁵. Blue honeysuckle (BH, *Lonicera caerulea* L.) is known to contain higher vitamin C, total phenolic content, and total anthocyanin content than tomato, bilberry, sea-buckthorn, black currant and Siberian rhubarb^{6,7} and to prevent liver damage⁸⁻¹⁰. BH (*L. caerulea*) has been domesticated from 1913; however, an earlier example was reported in 1894 in a horticulture plant in Russia¹¹. BH is known as haskap or hasukappu in Japan and zhimolost in Russia⁷.

Wu and colleagues⁹ evaluated the effects of BH extract on high-fat dietary nonalcoholic liver injury in a mouse model after 45 days of BH extract feeding. They determined the effects of BH on the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) and manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD) up-regulation in nonalcoholic steatohepatitis. However, in the BH extract manufacturing process, Chinese HB extract extracted using 75% of ethanol is limited to use as food. Recently, a high-fat diet treated mouse model was used to directly compare the NAFLD improvement of the AMPK activator Metformin and mild obesity by taking BH extract for 12 weeks. As a result, BH

비고

[Purpose] This study aimed to study the protective effects and mechanism of Blue Honeysuckle (BH) extracts (Berries of *Lonicera caerulea* L.) on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and obesity risk factors in a high fat-diet (HFD) model.


[Methods] Animals adapted to HFD were selected after 1 week of adaption period and divided into 6 groups (8 mice in each group; 40 HFD-fed mice and 8 normal fat pellet diet (NFD)-fed mice). After the end of 12 weeks of continuous oral administrations of 3 different dosages of BH extract, 400, 200 and 100 mg/kg, or metformin 250 mg/kg, dissolved in a volume of 10 mL/kg distilled water, liver hepatoprotective, hypolipidemic, hypoglycemic, nephroprotective, and anti-obesity effects were analyzed.

[Results] The BH extract improved fat density and mass, adipocyte histopathology, hepatocyte hypertrophy, hepatic enzyme activity, lipid metabolism, and related gene expression including ACC1, AMPK α 1 and AMPK α 2 in hepatic tissue, leptin, UCP2, adiponectin, C/EBP α , C/EBP β and SREBP1c in adipose tissue. Especially, 200 mg/kg of BH extract constantly improved NAFLD and obesity risk factors through AMPK upregulation-mediated hepatic glucose enzyme activity, lipid metabolism-related gene expression, and activation of the antioxidant defense system, to a level comparable to that of metformin 250 mg/kg in HFD-fed mice.

[Conclusion] BH extract had the potential to reduce the risk factors associated with obesity. In addition to the remarkable effect of preventing NAFLD, future research will need to be done to determine whether these results are consistent in human studies.

[Key words] Metformin, Berries of *Lonicera Caerulea* L., non-alcoholic fatty liver disease, AMPK (5' adenosine triphosphate-activated protein kinase)

<Table 2-7> 연구성과 논문 1

학술지정보	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters			SCI구분	■ SCI	□ 비SCI
	Vol	27(17)	계재연도	2017	페이지	3968-3973
논문제목	Beneficial effects of a medicinal herb, <i>Cirsium japonicum</i> var. <i>maackii</i> , extract and its major component, cirsimaritin on breast cancer metastasis in MDA-MB-231 breast cancer cells					
연구목적	Cirsium japonicum var.의 에탄올 추출물의 생물학적 활성 maackii(ICF-1)의 주요 구성 요소, 폴리 페놀 cirsimaritin 유방암 가능한 다른 약물에 대한 탐색 및 기전 규명					
연구유형	In vitro 실험					
비고	 <p>Beneficial effects of a medicinal herb, <i>Cirsium japonicum</i> var. <i>maackii</i>, extract and its major component, cirsimaritin on breast cancer metastasis in MDA-MB-231 breast cancer cells</p> <p>Jun Yeon Park^{a,j}, Hyun Young Kim^{b,j}, Takayuki Shibamoto^c, Tae Su Jang^d, Sang Cheon Lee^e, Jae Suk Shim^f, Dae-Hyun Hahm^g, Hae-Jeung Lee^h, Sanghyun Lee^{i,*}, Ki Sung Kang^{a,*}</p> <p>^a College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam 13120, Republic of Korea ^b Department of Food Science, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 52725, Republic of Korea ^c Department of Environmental Toxicology, University of California, Davis, CA 95616, USA ^d Institute of Green Bio Science & Technology, Seoul National University, Pyeong Chang 232-916, Republic of Korea ^e Insil Research Institute of Cheese Science, Insil 566-881, Republic of Korea ^f Insil Herbal Medicine Association, Insil 55955, Republic of Korea ^g Department of Physiology, College of Medicine, Kyung Hee University, 26 Kyungheedae-ro Dongdaemun-gu, Seoul 02447, Republic of Korea ^h Department of Food and Nutrition, College of BioNano Technology, Gachon University, Seongnam 13120, Republic of Korea ⁱ Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea</p> <p>ARTICLE INFO</p> <p>Article history: Received 24 April 2017 Revised 22 July 2017 Accepted 27 July 2017 Available online 29 July 2017</p> <p>Keywords: <i>Cirsium japonicum</i> var. <i>maackii</i> Cirsimaritin Breast cancer Metastasis Natural plant extract</p> <p>ABSTRACT</p> <p>The biological activities of the ethanol extract from <i>Cirsium japonicum</i> var. <i>maackii</i> (ICF-1) and its major component, polyphenol cirsimaritin, were investigated as part of the search for possible alternative drugs for breast cancer. Three <i>in vitro</i> cell-based assays were used: the cell proliferation assay, tube-formation assay, and Western blot analysis. Both the ICF-1 extract and cirsimaritin inhibited the viability of HUVECs in a dose-dependent manner. The inhibition achieved was 36.89% at a level of 200 µg/ml by the ICF-1 extract and 62.04% at a level of 100 µM by cirsimaritin. The ICF-1 extract and cirsimaritin reduced tube formation by 12.69% at level of 25 µg/ml and 32.18% at the levels of 6.25 µM, respectively. Cirsimaritin inhibited angiogenesis by downregulation of VEGF, p-Akt and p-ERK in MDA-MB-231 cells, suggesting that cirsimaritin is potentially useful as an anti-metastatic agent. The present study demonstrated that <i>Cirsium japonicum</i> extract and its active component cirsimaritin is an excellent candidate as an alternative anti-breast cancer drug.</p> <p>© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.</p> <p>Breast cancer is the most diagnosed cancer and the third leading cause of cancer mortality in women. Lifetime risk for breast cancer is one in eight women in developed countries.^{1,2} More importantly, triple-negative breast cancers (TNBCs), which lack the expressions of estrogen/progesterone receptors (ER/PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), are associated with poor prognoses.³ To date, clinically effective drugs for the treatment of TNBC have not been reported.⁴</p> <p>Metastasis of tumors, including breast cancer, involves complex processes, such as tumor cell dissociation, intravasation, extravasation, adhesion, and angiogenesis.⁵ Angiogenesis, which is the process of forming new capillaries, involves extensive interplay among cells, soluble factors, and extra cellular matrices.^{6,7} It also plays an important role in tumor growth.^{7,8} The vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor progression is an absolute regulator of angiogenesis.⁹ VEGF expression has been reported in a number of cancer cell lines and in several clinical specimens derived from cancer tumors. Therefore, the hostility of VEGF can effectively prevent tumor growth via incomplete blood vessel formation.¹⁰</p> <p><i>Cirsium japonicum</i>, a member of the Compositae family, is a wild perennial herb found in Korea, China and Japan. It is listed in the Korean and Chinese pharmacopoeias and has been used as a traditional antihemorrhagic, antihypertensive, antihepatitis, and urtic medicine in Korea.¹¹ <i>C. japonicum</i> contains many medicinal components including cirsimaritin, pectolarinins, pectolarigenin, acetins, thamnoglucosides, ciryneols A-E, heptadecenes, and so on.¹² To date, many studies have been conducted to explore the effects of <i>C. japonicum</i> on various diseases, including cancer. However, there have been virtually no reports on the effects on angiogenesis and its action mechanism.^{13,14}</p> <p>* Corresponding authors. E-mail addresses: slee@cau.ac.kr (S. Lee), kkang@gachon.ac.kr (K. Sung Kang). [†] These two authors contributed equally to the work described in this study.</p> <p>http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.07.070 0960-894X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.</p>					

<Table 2-8> 연구성과 논문 2

학술지정보	Molecules			SCI구분	□ SCI	■ 비SCI
	Vol	22(10)	계재연도	2017	페이지	1583
논문제목	Anti-Inflammatory Phenolic Metabolites from the Edible Fungus <i>Phellinus baumii</i> in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells					
연구목적	<i>P. baumii</i> 의 추출물은 LPS(lipopolysaccharide)로 자극 된 RAW264.7 세포에서의 항염증 효과를 토대로 생물 분석에 의한 분획화. RAW264.7 세포에서 LPS-자극 된 산화질소 (NO) 생성을 저해하는 능력 평가					
연구유형	In vitro 실험					
비고	 <p>Abstract: The edible fungus <i>Phellinus baumii</i> Pilat (Hymenochaetaceae) has been used in Korean traditional medicines for strengthening health and prolonging life. An extract of the fruiting bodies of <i>P. baumii</i> was subjected to bioassay-guided fractionation based on its anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells. The resulting fractions were chemically investigated, leading to isolation of three phenolic compounds (1–3), a sesquiterpene (4), two steroids (5–6), a fatty acid (7), and a cerebroside (8). Spectroscopic analyses including 1D and 2D NMR spectroscopy and LC/MS were used to determine their chemical structures. Compounds 2, 4, 5, 7 and 8 were identified in <i>P. baumii</i> for the first time. Since all compounds were isolated from active fractions with anti-inflammatory activity, their ability to inhibit LPS-stimulated nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cells were evaluated in vitro. Compounds 1, 2, 3, 5 and 7 inhibited LPS-stimulated NO production, and compounds 1–3 had IC₅₀ values <10 μM. Treatment of LPS-stimulated RAW264.7 cells with compounds 1–3 inhibited phosphorylation of IKKα and IκBα. In addition, treatment of compounds 1–3 reduced LPS-induced increases of nuclear factor-kappa B (NF-κB) p65, iNOS and COX-2 protein expressions. Collectively, compounds 1–3 inhibited NF-κB-dependent inflammation in RAW264.7 cells. Thus, <i>P. baumii</i> is a potential source of natural anti-inflammatory agents, and active compounds 1–3 could be promising lead compounds for the development of novel anti-inflammatory agents.</p> <p>Keywords: <i>Phellinus baumii</i>; Hymenochaetaceae; bioactivity-guided isolation; anti-inflammation; NO; NF-kappaB</p>					

2. 특허 성과

<Table 2-9> 특허 출원 성과 1

특허 정보	출원	2017.11.30	출원번호	10-2017-0163406
출원인 명칭	주식회사 아리바이오 (1-2011-003629-0)			
발명의 명칭	하니베리 추출물을 포함하는 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물 및 이의 제조방법			
비고	<div style="text-align: center;"> <p>관 인 생 략</p> <p>출원 번호 통지서</p> <p>출원 일자 2017.11.30 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원 번호 10-2017-0163406 (접수번호 1-1-2017-1199064-35) 출원인 명칭 주식회사 아리바이오(1-2011-003629-0) 대리인 성명 윤대웅(9-2012-000100-1) 발명자 성명 이해정 이유숙 김주원 설두진 정재준 구세광 발명의 명칭 멩당이나무열매 추출물을 포함하는 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물 및 이의 제조방법</p> <p>특 허 청 장</p> <p><< 안내 >></p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ol style="list-style-type: none"> 1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다. 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식 4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다. 5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. ※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선권로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적요청허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다. 6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다. ※ 특허출원 10-2010-00000000, 상표등록출원 40-2010-00000000 7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효 사유가 될 수 있습니다. 8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다. </div>			

<Table 2-10> 특허 출원 성과 2

특허 정보	출원	2017.11.30	출원번호	10-2017-0163407
출원인 명칭	주식회사 아리바이오(1-2011-003629-0)			
발명의 명칭	하니베리 추출물을 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 이의 제조방법			
비고	<div style="text-align: center;"> <p>관인생략</p> <p>출원번호통지서</p> </div> <p>출원 일자 2017.11.30</p> <p>특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)</p> <p>출원번호 10-2017-0163407 (접수번호 1-1-2017-1199065-81)</p> <p>출원인명칭 주식회사 아리바이오(1-2011-003629-0)</p> <p>대리인성명 윤대웅(9-2012-000100-1)</p> <p>발명자성명 김주완 이해정 이유숙 설두진 김종규 정재준 성수현 구세광</p> <p>발명의명칭 명당이나무열매 추출물을 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 이의 제조방법</p> <p style="text-align: center;">특 허 청 장</p> <p style="text-align: center;"><< 안내 >></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ol style="list-style-type: none"> 1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다. 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식 4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의경서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다. 5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. ※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적요원허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다. 6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다. ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000 7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 송계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효 사유가 될 수 있습니다. 8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다. </div>			

<Table 2-11> 특허 출원 성과 3

특허 정보	출원	2017.12.01	출원번호	10-2017-0164556
출원인 명칭	주식회사 아리바이오(1-2011-003629-0)			
발명의 명칭	당당이 추출물을 포함하는 항산화 또는 항염용 약학적 조성물			
비고	<div style="text-align: center;"> <p>관인생략</p> <h2>출원번호통지서</h2> <p>출원일자 2017.12.01 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2017-0164556 (접수번호 1-1-2017-1204588-66) 출원인명칭 주식회사 아리바이오(1-2011-003629-0) 대리인성명 윤대웅(9-2012-000100-1) 발명자성명 이해정 이유숙 김주완 설두진 정재준 구세광 발명의명칭 당당이 추출물을 포함하는 항산화 또는 항염용 약학적 조성물</p> <h3>특 허 청 장</h3> <p><< 안내 >></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ol style="list-style-type: none"> 1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다. 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 경정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식 4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다. 5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. ※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내 ※ 미국특허상표청의 선출결을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출결이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다. 6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다. ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000 7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효 사유가 될 수 있습니다. 8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다. </div> </div>			

3. 인체적용시험 보고서

<Table 2-12> 인체적용시험 IRB 및 결과보고서

IRB		양병원 기관생명윤리위원회 (196452-HR-00008)		
제목		하니베리(땡땡이나무열매) 투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험		
연구목적		건강기능식품 기능성 원료로서 하니베리 추출분말의 인체 섭취 시 안전성 및 간 건강 개선에 대한 기능성 검증		
연구유형		인체적용시험	IRB 구성 및 승인	Y
실험설계		Double-blind	Randomized	Parallel
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	AST: 남; 41-120IU/L, 여; 33-96IU/L, ALT: 남; 42-123, 여; 33-99IU/L, GGT: 남; 72-213IU/L, 여; 43-126IU/L 중 하나 이상의 항목에 해당하는 자		
	특징	33명의 시험군 (신장 172.02±7.83cm, 체중 82.35±16.93kg, BMI 27.69±4.46) 33명의 대조군 (신장 174.56±6.34cm, 체중 86.23±15.53kg, BMI 28.15±3.96)		
시험물질		하니베리 추출분말(1,960mg/day: dextrin 포함)		
시험디자인	대조군	placebo	dextrin, red color, 490mg/2정/2회/day, 1,960mg/day, 33명	
		positive	없음	
		negative	없음	
	시험군	하니베리 추출분말, 490mg/2정/2회/day, 1,960mg/day, 33명		
	디자인	· 성인(n= 66), 1,960g/일, 12주(RCT, DB) · 사전(0주), 사후(12주)에서 바이오마커 및 안정성 측정 · 사전(0주), 6주, 사후(12주)에서 순응도 및 생체징후평가	섭취량	1,960mg/day
		섭취기간	12주	
식이조절		평상시 식이습관 유지, 24시간 회상법으로 식이섭취량 측정		
바이오마커		<ul style="list-style-type: none"> · 간기능검사 I: AST, ALT, GGT · 간기능검사 II: ALP, LDH, albumin, globulin, Total protein · 항염: TNFa, IL-6 · 지방대사검사: FFA, total cholesterol, LDL, triglyceride, adiponectin, HDL · 당대사(혈당검사): glucose, HbA1c, insulin · 항산화검사: MDA, SOD, catalase · 피로심각척도(Fatigue Severity Scale) 		
통계처리		두 군간 연속형 변수의 차이를 검정하기 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 독립 t 검정(independent t-test)을, 그렇지 않을 경우 맨-휘트니 U 검정(Mann-Whitney's U test)을 수행한다. 또, 군 내 시점에 따른 차이 검정을 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 대응 t 검정(paired t-test)을, 그렇지 않을 경우 윌콕슨의 부호순위검정(Wilcoxon's signed rank test)을 수행한다. 연속형 변수의 정규성 검정은 샤피로-윌크 검정(Shapiro-Wilk's test)을 이용함		

시험결과

- 시험군에서 간기능 검사 AST 및 ALT 유의적 감소(p<0.05)
- 시험군에서 지방대사검사 HDL은 유의적 증가(p<0.05)
- 시험군에서 항산화검사 MDA 유의적 감소(p<0.05)
- 시험군에서 피로심각 척도 설문검사의 정신적피로, 졸리움, 신체적부조화 및 소진에서 피로도가 유의하게 감소(p<0.05)
- AST는 그룹과 반복 간 유의한 상호작용 나타남(대조군 대비, p<0.05)
- HDL은 그룹과 반복 간 유의한 상호작용 나타남(대조군 대비, p<0.05)
- MDA 및 SOD는 그룹과 반복 간 유의한 상호작용 나타남(대조군 대비, p<0.05)
- 시험물질과 관련된 어떠한 이상반응이나 부작용이 나타나지 않아 안전한 물질로 판단됨

비고

- 정상 : 하니베리 추출분말로서 이미·이취가 없고 고유의 향미가 있는 붉은색 분말
- C3G(cyanidin-3-glucoside) (기능 또는 지표성분) : 7.5 mg/g
- 영양성분 : 열량 376.99Kcal/100g, 탄수화물 91.62%, 조지방 0.87%, 조단백질 0.68%, 수분 4.80%, 회분 2.03%, 나트륨 16.75mg/100g

결과통지서

2017년 12월 27일에 접수된 인가대상연구 및 인체유래물연구 에 대하여 양병원 생명윤리위원회에서 심의하여 다음과 같이 결정하였음을 통지합니다.

과제번호	196452-HR-00008	관리번호	01
연구과제명	하니베리(당당이나무열매)투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험: 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구		
연구책임자	성명	조애리	소속
		양병원 소화기내과	직위
			과장

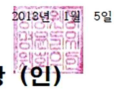
심의대상	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서(신규) <input type="checkbox"/> 연구계획서(시정/보완)		
심의일자	2018년 1월 5일	심의장소	양병원 7층 회의실
심의위원회	양병원 생명윤리위원회		
심의종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정규심의 <input type="checkbox"/> 신속심의		
심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 부결 <input type="checkbox"/> 중지/보류		
승인일자	2018년 1월 5일	승인 유효기간	2018년 1월 5일 - 2019년 1월 4일
승인번호	196452-HR-00008		
심의의견	본 연구는 한국체육대학교 주관으로 양병원이 같이 참여하는 공동연구인 연구대상이자 건강상의 범주라고 생각되며, 연구 프로토콜 상 본 기관에서 진행이 가능한 연구로 판단됨.		
심의인 서류	1. 연구계획서심사신청서 2. 연구계획서 3. 연구계획서요약 4. 연구대상자 설명문 및 동의서 5. 중재기록서 6. 연구책임자 회근이력서 7. 이해상충공개서약서 8. 생명윤리승인서약서 9. 연구윤리교육 이수증 사본		

본 통지서에 기재된 사항은 양병원 생명윤리위원회에 기록된 내용과 일치함을 증명합니다.
본 양병원 생명윤리위원회는 생명윤리 및 안전에 관한 법률과 관련 법규를 준수합니다.
본 연구와 이해상충(Contact of Interest)이 있는 위원이 있을 경우 연구의 심의에서 배제하였습니다.
본 통지서의 사본은 양병원 생명윤리위원회에서 보관합니다.
ver 1.0 (Feb 2014)

* 모든 연구자들은 아래의 사항을 준수하여야 합니다.

- 1) 승인된 계획서에 따라 연구를 수행하여야 합니다.
- 2) 위원회의 승인을 받은 동의서를 사용하여야 합니다.
- 3) 모국어가 한국어가 아닌 연구대상자들에게는 승인된 동의서를 연구대상자의 모국어로 인증된 번역본을 사용할 것이며 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회의 승인을 받아야 합니다.
- 4) 연구진행에 있어 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행하여야 하며 연구대상자들의 보호를 위해 폐쇄된 어떠한 응급상황에서의 변경도 즉각 위원회에 보고하여야 합니다.
- 5) 위원회에서 승인된 계획서에 따라 등록된 어떠한 연구대상자라도 사망, 입원, 심각한 질병에 대하여는 위원회에 서면으로 보고하여야 합니다.
- 6) 연구 또는 연구대상자의 안전에 대해 유해한 영향을 미칠 수 있는 어떠한 새로운 정보도 즉각적으로 위원회에 보고하여야 합니다.
- 7) 위원회의 요구가 있을 때에는 연구의 진행과 관련된 보고를 위원회에 제출하여야 합니다.
- 8) 위원회가 심의한 과제에 대해 조사 및 감독 차원에서 현장점검을 실시할 시 원활한 점검절차 진행을 위해 연구자는 연구진행과 관련된 서류를 준비하고 협조하여야 합니다.
- 9) 연구대상자 모집광고를 사용할 시에는 사용 전에 위원회의 승인을 받아야 합니다.
- 10) 동의는 강제 혹은 부당한 영향이 없는 상태에서 충분한 설명에 근거하여 수행되어야 하며, 잠재적인 연구대상자에게 연구에 참여여부를 고려할 수 있도록 충분한 기회를 제공하여야 합니다.
- 11) 연구자와 그밖에 이해당사자는 연구계획서 승인을 받고나 홍보, 상업적 목적으로 사용할 수 없습니다.
- 12) 위원회의 심의결과 시정요구에 대해 모두 이행 및 충족될 경우에만 연구를 진행할 수 있습니다.
- 13) 위원회가 시정 및 보완을 요구한 경우 시정·보완 계획을 3개월 이내에 본 위원회에 제출하여야 합니다. 심의일로부터 3개월 이내에 시정·보완 계획을 제출하지 않은 경우 심의가 무효화될 수 있습니다.
- 14) 시정계획은 신속심의로 진행되고 보완계획은 정규심의로 진행되며, 승인일과 승인 유효기간은 심의 결과에 따라 결정됩니다.
- 15) 승인기간 이후에도 연구를 지속하기 위해서는 적어도 승인 만료 2개월 전까지 연구의 진행 상황에 대하여 중간보고를 하여야 합니다.
- 16) 연구 종료 후 3개월 이내에 종료보고를 하여야 합니다.
- 17) 연구와 관련된 기록은 연구가 종료된 시점을 기준으로 최소 3년간 보관하여야 합니다.

양 병원 생 명 윤 리 위 원 장 (인)



본 통지서에 기재된 사항은 양병원 생명윤리위원회에 기록된 내용과 일치함을 증명합니다.
본 양병원 생명윤리위원회는 생명윤리 및 안전에 관한 법률과 관련 법규를 준수합니다.
본 연구와 이해상충(Contact of Interest)이 있는 위원이 있을 경우 연구의 심의에서 배제하였습니다.
본 통지서의 사본은 양병원 생명윤리위원회에서 보관합니다.

4. GLP-기관 독성시험 보고서

<p style="text-align: center;">최종 보고서</p> <p style="text-align: center;">Sprague-Dawley 랫드를 이용한 멧돼지 나무 열매 추출물(<i>Lonicera caerulea</i>)의 단위 경구투여 독성시험 (시험번호 : GT18-00015) 2019 년 01 월</p> <p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">the way to trust  한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories 바이오융합연구소</p>	<p style="text-align: center;">최종 보고서</p> <p style="text-align: center;">Sprague-Dawley 랫드를 이용한 멧돼지 나무 열매 추출물(<i>Lonicera caerulea</i>)의 2 주 반복 경구투여 용량결정시험 (시험번호 : NT18-00017) 2018 년 12 월</p> <p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">the way to trust  한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories 바이오융합연구소</p>	<p style="text-align: center;">최종 보고서</p> <p style="text-align: center;">Sprague-Dawley 랫드를 이용한 멧돼지 나무 열매 추출물(<i>Lonicera caerulea</i> L. berry extract)의 13 주 반복 경구투여 독성시험 (시험번호 : GT18-00016) 2019 년 04 월</p> <p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">the way to trust  한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories</p>
<p style="text-align: center;">최종 보고서</p> <p style="text-align: center;">멧돼지 나무 열매 추출물(<i>Lonicera caerulea</i>)의 미생물복귀돌연변이시험 (시험번호 : GT18-00030) 2018 년 12 월</p> <p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">the way to trust  한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories 바이오융합연구소</p>	<p style="text-align: center;">최종 보고서</p> <p style="text-align: center;">포유류 배양세포를 이용한 멧돼지 나무 열매 추출물(<i>Lonicera caerulea</i>)의 염색체이상시험 (시험번호 : GT18-00031) 2018 년 12 월</p> <p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">the way to trust  한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories 바이오융합연구소</p>	<p style="text-align: center;">최종 보고서</p> <p style="text-align: center;">ICR 마우스 골수세포를 이용한 멧돼지 나무 열매 추출물(<i>Lonicera caerulea</i>)의 소핵시험 (시험번호 : GT18-00032) 2018 년 12 월</p> <p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">the way to trust  한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories 바이오융합연구소</p>

Figure 2-3. GLP-기관 독성 시험 보고서

5. 공인인증기관 시험 성적서(한국기능식품연구원)

제 D201812007 호
문서번호

시험·검사성적서

제출명	명령이나부일제수출분할	제출일자 (출원기관)	2017-09-10
의뢰인	업체명 (주)아리리리이오	성명	김수현
주소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 17, 1층 5층 (상행동, 한국세관협력센터2층)	영향	정수현
제품번호		검수년월일	2018-12-10
검사뢰목적	원료용	검수번호	1001812007

귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2018-12-20
 시험·검사 책임자 : 이경우
 검사관련 총 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비
C20(Cyandiolin-3-gluconate-chloride)(mg/g)	7.44mg/g(7.45, 7.44, 7.45)	통계명

원자법-원자배량

2018년 12월 26일

한국기능식품연구원

(사)한국기능식품연구원 부설 분석기능식품연구원 http://www.khsti.or.kr/ 전화번호 010-31302-0400-1

제 D2018120012 호
문서번호

시험·검사성적서

제출명	명령이나부일제수출분할	제출일자 (출원기관)	2017-09-08
의뢰인	업체명 (주)아리리리이오	성명	김수현
주소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 17, 1층 5층 (상행동, 한국세관협력센터2층)	영향	정수현
제품번호		검수년월일	2018-12-10
검사뢰목적	원료용	검수번호	10018120012

귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2018-12-27
 시험·검사 책임자 : 이경우
 검사관련 총 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비
C20(Cyandiolin-3-gluconate-chloride)(mg/g)	7.45mg/g(7.45, 7.41, 7.49)	통계명

원자법-원자배량

2018년 12월 27일

한국기능식품연구원

(사)한국기능식품연구원 부설 분석기능식품연구원 http://www.khsti.or.kr/ 전화번호 010-31302-0400-1

제 D2018120017 호
문서번호

시험·검사성적서

제출명	명령이나부일제수출분할	제출일자 (출원기관)	2017-09-17
의뢰인	업체명 (주)아리리리이오	성명	김수현
주소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 17, 1층 5층 (상행동, 한국세관협력센터2층)	영향	정수현
제품번호		검수년월일	2018-12-10
검사뢰목적	원료용	검수번호	10018120017

귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2018-12-26
 시험·검사 책임자 : 이경우
 검사관련 총 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비
C20(Cyandiolin-3-gluconate-chloride)(mg/g)	7.44mg/g(7.45, 7.43, 7.51)	통계명

원자법-원자배량

2018년 12월 26일

한국기능식품연구원

(사)한국기능식품연구원 부설 분석기능식품연구원 http://www.khsti.or.kr/ 전화번호 010-31302-0400-1



제 D2018120004 호
문서번호

시험·검사성적서

제출명	명령이나부일제수출분할	제출일자 (출원기관)	2017-09-10
의뢰인	업체명 (주)아리리리이오	성명	김수현
주소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 17, 1층 5층 (상행동, 한국세관협력센터2층)	영향	정수현
제품번호		검수년월일	2018-12-10
검사뢰목적	원료용	검수번호	10018120004

귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2018-12-21
 시험·검사 책임자 : 이경우
 검사관련 총 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비
분당(Bcal)(100g)	270.72g(Kcal/100g)	통계명
지방(%)	19.27%	통계명
단백질(%)	12.72%	통계명
수분(%)	10.84%	통계명
수분(%)	8.81%	통계명
회분(%)	2.06%	통계명
나트륨(mg/100g)	19.13 mg/100g	통계명

원자법-원자배량

2018년 12월 21일

한국기능식품연구원

(사)한국기능식품연구원 부설 분석기능식품연구원 http://www.khsti.or.kr/ 전화번호 010-31302-0400-1



제 D2018120005 호
문서번호

시험·검사성적서

제출명	명령이나부일제수출분할	제출일자 (출원기관)	2017-09-10
의뢰인	업체명 (주)아리리리이오	성명	김수현
주소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 17, 1층 5층 (상행동, 한국세관협력센터2층)	영향	정수현
제품번호		검수년월일	2018-12-10
검사뢰목적	원료용	검수번호	10018120005

귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2018-12-13
 시험·검사 책임자 : 이경우
 검사관련 총 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비
분당(Bcal)	118.17 mg/kg	통계명
비스(As)(%)	11202 mg/kg	통계명
비스(Cd)(%)	110055 mg/kg	통계명
수은(Hg)(%)	110040 mg/kg	통계명

원자법-원자배량

2018년 12월 13일

한국기능식품연구원

(사)한국기능식품연구원 부설 분석기능식품연구원 http://www.khsti.or.kr/ 전화번호 010-31302-0400-1



제 D2018120008 호
문서번호

시험·검사성적서

제출명	명령이나부일제수출분할	제출일자 (출원기관)	2017-09-10
의뢰인	업체명 (주)아리리리이오	성명	김수현
주소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 17, 1층 5층 (상행동, 한국세관협력센터2층)	영향	정수현
제품번호		검수년월일	2018-12-10
검사뢰목적	원료용	검수번호	10018120008

귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2018-12-14
 시험·검사 책임자 : 이경우
 검사관련 총 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비
분당(Bcal)	통계명	통계명
지방(%)	통계명	통계명

원자법-원자배량

2018년 12월 14일

한국기능식품연구원

(사)한국기능식품연구원 부설 분석기능식품연구원 http://www.khsti.or.kr/ 전화번호 010-31302-0400-1



제 D2018120006 호
문서번호

시험·검사성적서

제출명	명령이나부일제수출분할	제출일자 (출원기관)	2017-09-10
의뢰인	업체명 (주)아리리리이오	성명	김수현
주소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 17, 1층 5층 (상행동, 한국세관협력센터2층)	영향	정수현
제품번호		검수년월일	2018-12-10
검사뢰목적	원료용	검수번호	10018120006

귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2018-12-18
 시험·검사 책임자 : 이경우
 검사관련 총 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비
BSC(mg/kg)	통계명	통계명
DDT(mg/kg)	통계명	통계명
DDT(mg/kg)	통계명	통계명
DDT(mg/kg)	통계명	통계명
DDT(mg/kg)	통계명	통계명

원자법-원자배량

2018년 12월 18일

한국기능식품연구원

(사)한국기능식품연구원 부설 분석기능식품연구원 http://www.khsti.or.kr/ 전화번호 010-31302-0400-1



Figure 2-4. 공인기관 시험성적서

6. 기업 내부 보고서

<h2 style="text-align: center;">제조지시 및 기록서</h2> <p style="text-align: center;">MANUFACTURING ORDER & RECORD</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr style="background-color: #e0e0e0;"> <td style="width: 15%;">【 제품명 :</td> <td style="width: 60%;">덴덴이나무열매추출분말</td> <td style="width: 5%; text-align: right;">】</td> </tr> <tr> <td>【 제조번호 :</td> <td>ARFD7002</td> <td style="text-align: right;">】</td> </tr> <tr> <td>【 제조일자 :</td> <td>2017.04.26</td> <td style="text-align: right;">】</td> </tr> <tr> <td>【 유통기한 :</td> <td>2019.04.25</td> <td style="text-align: right;">】</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 40px;">  <p>The Bridge of Life Science</p> <p>주식회사 아리바이오 ARIBIO CO.,Ltd</p> </div>	【 제품명 :	덴덴이나무열매추출분말	】	【 제조번호 :	ARFD7002	】	【 제조일자 :	2017.04.26	】	【 유통기한 :	2019.04.25	】	<h2 style="text-align: center;">제조지시 및 기록서</h2> <p style="text-align: center;">MANUFACTURING ORDER & RECORD</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr style="background-color: #e0e0e0;"> <td style="width: 15%;">【 제품명 :</td> <td style="width: 60%;">덴덴이나무열매추출분말 캡슐</td> <td style="width: 5%; text-align: right;">】</td> </tr> <tr> <td>【 제조번호 :</td> <td>ARFC7001</td> <td style="text-align: right;">】</td> </tr> <tr> <td>【 제조일자 :</td> <td>2017.06.08</td> <td style="text-align: right;">】</td> </tr> <tr> <td>【 유통기한 :</td> <td>2019.06.07</td> <td style="text-align: right;">】</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 40px;">  <p>The Bridge of Life Science</p> <p>주식회사 아리바이오 ARIBIO CO.,Ltd</p> </div>	【 제품명 :	덴덴이나무열매추출분말 캡슐	】	【 제조번호 :	ARFC7001	】	【 제조일자 :	2017.06.08	】	【 유통기한 :	2019.06.07	】
【 제품명 :	덴덴이나무열매추출분말	】																							
【 제조번호 :	ARFD7002	】																							
【 제조일자 :	2017.04.26	】																							
【 유통기한 :	2019.04.25	】																							
【 제품명 :	덴덴이나무열매추출분말 캡슐	】																							
【 제조번호 :	ARFC7001	】																							
【 제조일자 :	2017.06.08	】																							
【 유통기한 :	2019.06.07	】																							
<div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 10px;">  덴덴이나무열매추출분말 장기보존시험 결과보고서 Page 1 / 5 </div> <hr style="border: 0.5px solid black;"/> <div style="text-align: center; padding: 10px 0;"> <p>덴덴이나무열매추출분말 장기보존시험 결과보고서</p> </div> <hr style="border: 0.5px solid black;"/> <div style="margin-top: 40px;"> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%; font-size: x-small;">Prepared by:</td> <td style="width: 30%; font-size: x-small;">Name: 김지선 Document Owner</td> <td style="width: 30%; font-size: x-small;">Signature: </td> <td style="width: 25%; font-size: x-small;">Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018</td> </tr> <tr> <td style="font-size: x-small;">Authorized by:</td> <td style="font-size: x-small;">Name: 김동석 Manager</td> <td style="font-size: x-small;">Signature: </td> <td style="font-size: x-small;">Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018</td> </tr> </table> </div> <hr style="border: 0.5px solid black;"/> <div style="font-size: x-small; text-align: center;"> <p>ARIBIO, Inc. F3, Pangyo Seven Venture Valley 1 Bldg. #2, 15 Panggoro 228-gil, Songnam, Gyeonggi-do, Republic of Korea</p> </div>	Prepared by:	Name: 김지선 Document Owner	Signature: 	Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018	Authorized by:	Name: 김동석 Manager	Signature: 	Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018	<div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 10px;">  덴덴이나무열매추출분말 가속시험 결과보고서 Page 1 / 5 </div> <hr style="border: 0.5px solid black;"/> <div style="text-align: center; padding: 10px 0;"> <p>덴덴이나무열매추출분말 가속시험 결과보고서</p> </div> <hr style="border: 0.5px solid black;"/> <div style="margin-top: 40px;"> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%; font-size: x-small;">Prepared by:</td> <td style="width: 30%; font-size: x-small;">Name: 김지선 Document Owner</td> <td style="width: 30%; font-size: x-small;">Signature: </td> <td style="width: 25%; font-size: x-small;">Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018</td> </tr> <tr> <td style="font-size: x-small;">Authorized by:</td> <td style="font-size: x-small;">Name: 김동석 Manager</td> <td style="font-size: x-small;">Signature: </td> <td style="font-size: x-small;">Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018</td> </tr> </table> </div> <hr style="border: 0.5px solid black;"/> <div style="font-size: x-small; text-align: center;"> <p>ARIBIO, Inc. F3, Pangyo Seven Venture Valley 1 Bldg. #2, 15 Panggoro 228-gil, Songnam, Gyeonggi-do, Republic of Korea</p> </div>	Prepared by:	Name: 김지선 Document Owner	Signature: 	Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018	Authorized by:	Name: 김동석 Manager	Signature: 	Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018								
Prepared by:	Name: 김지선 Document Owner	Signature: 	Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018																						
Authorized by:	Name: 김동석 Manager	Signature: 	Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018																						
Prepared by:	Name: 김지선 Document Owner	Signature: 	Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018																						
Authorized by:	Name: 김동석 Manager	Signature: 	Date (MM/DD/YYYY): 06/20/2018																						



Figure 2-5. 제조공정 및 validation, 안정성 분석

3절 세부 연구결과

1. 1차년도 주관기관((주)아리바이오) 연구개발 및 결과

1차년도 개발 목표
○ 주관연구기관((주)아리바이오) : 문헌조사, lab scale추출공정개발, 지표성분설정(지표 함량-공인시험성적서), 원료규격설정(성상, 영양성분, 유해성분 - 공인시험성적서)

가. 문헌조사

<Table 2-13> 특허, 논문, 정부보고서등의 자료 조사

원료명	출처	관련 문헌 근거
하니베리 추출물	Toxicol. Res. Vol. 31, No. 1. 61-68 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Single Oral Dose Toxicity Test of Blue Honeysuckle Concentrate in Mice - 하니베리 추출물의 단회 독성 시험 결과 2,000mg/kg 이상으로 무독성 물질로 확인

하니베리 추출물	출원번호 10-2014-0078865	▶ 하니베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물 - 하니베리 추출물은 MMP-1 생성억제효과, 콜라겐 생합성효과, 멜라닌 생성억제효과, 염증성 사이토카인 발현 억제 효과, 항산화효과, 방부효과, 보습효과, 피부 주름개선 효과, 피부 탄력 개선, 피부 항노화 효과
하니베리 추출물	출원번호 10-2009-0130140	▶ 하니베리를 이용한 기능성 건강 식품 및 그 제조방법 - 하니베리를 이용한 기능성 건강 식품은 간단하게 제조할 수 있으면서 숙취 해소에 우수한 효과.
하니베리 추출물	출원번호 10-2015-0026660	▶ 하니베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부용 조성물 - 하니베리(Lonicera caerulea) 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화 방지, 피부 재생, 피부 주름 개선, 피부 미백 또는 피부 보습에 효과
하니베리 추출물	출원번호 10-2012-0027697	▶ 하니베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 또는 개선용 약학적 조성물 또는 건강식품 - 하니베리 추출물은 신경세포 보호효과를 가져 허혈성 뇌혈관 질환에 의한 신경행동학적 결손 및 경색 용적을 현저하게 감소
하니베리 추출물	출원번호 10-2014-0019294	▶ 하니베리 추출물을 유효성분으로 포함하는 갑상선 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 - 항산화방어 system의 조절을 통해 갑상선기능 및 관련 간과 생식기 손상에 매우 유효한 효과
하니베리 추출물	출원번호 10-2005-0063031	▶ 하니베리 추출물을 포함하는 간 기능 회복용 식품 조성물 - HepG2 세포주에서 하니베리 추출물 투여에 의하여 ALT, AST 수치가 감소하며 더 나아가, 급성 간염을 유발시킨 마우스에 하니베리 추출물을 투여하면 ALT, AST 수치는 기존의 약제인 실리마린을 투여한 경우보다 25% 이상 회복능
하니베리 추출물	출원번호 10-2005-0063026	▶ 하니베리 추출물을 포함하는 간 질환 예방 및 치료효과를 가지는 약제학적 조성물 - 하니베리 추출물은 독성 등의 부작용이 없으면서 우수한 간기능 회복 및 성장 회복능

결론

하니베리(댕댕이나무열매) 추출물은 초기 개발 단계로 관련 자료가 많지 않음. 독성 시험 결과 무독성이고, 강력한 항산화능을 바탕으로 간 질환, 갑상선 기능, 피부 등에 효능이 있는 것으로 확인되었음

나. lab scale에서의 생산조건(추출용매, 추출온도, 추출시간, 추출횟수, 건조방법, 지표함량의 최적추출조건)확립

(1) 하니베리 최적 추출 조건을 확립하기 위하여, 여러 가지 추출조건(열수추출, 주정추출, 주정-물 혼합 용매 추출, 착즙)으로 실험함

(가) 열수 추출

분쇄한 상태의 하니베리 100g을 1리터의 증류수에 가하여 잘 교반한 다음 90~95°C를 유지하는 추출온도에서 3시간 동안 환류 추출한 후 여액을 분리하였고, 55~65°C로 추출물을 감압농축한 후, 동결 건조하여 건조분말 20.8g을 얻었음

(나) 에탄올 추출

분쇄된 하니베리 100g에 1 리터의 에탄올을 가해 잘 교반한 다음, 열을 가해 75~85°C를 유지하는 추출온도에서 3시간 동안 환류 추출한 후 여액을 분리하였고, 55~65°C에서 추출물을 감압농축한 후, 동결 건조하여 건조분말 17.5g을 얻었음

(다) 물-에탄올 혼합 용매 추출

분쇄된 하니베리 100g에 1리터의 25% 에탄올을 가해 잘 교반한 다음, 열을 가해 80~90°C를 유지하는 추출온도에서 3시간 동안 환류 추출한 후 여액을 분리하였고, 55~65°C에서 추출물을 감압농축한 후, 동결 건조하여 건조분말 18.1g을 얻었음

(라) 착즙 추출

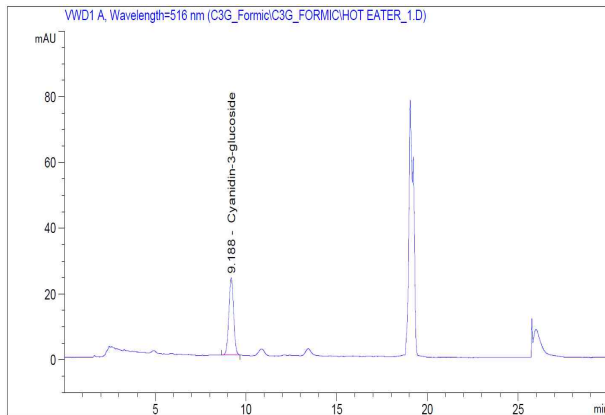
하니베리 생물 100g을 착즙한 후 여액을 분리하였고, 55~65°C에서 추출물을 감압농축한 후, 동결 건조하여 건조분말 19.1g을 얻었음

(마) 물 저온 추출

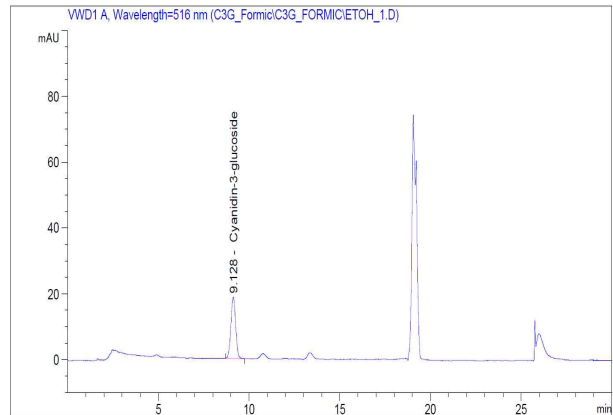
분쇄된 하니베리 100g에 1리터의 물을 가해 잘 교반한 다음, 실온 20~30°C를 유지하는 온도에서 3일 동안 추출한 후 여액을 분리하였고, 55~65°C에서 추출물을 감압농축한 후, 동결 건조하여 건조분말 7.5g을 얻었음

(바) 에탄올 저온 추출

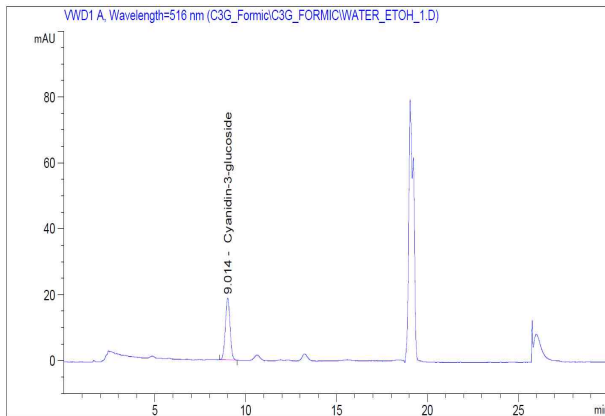
분쇄된 하니베리 100g에 1리터의 에탄올을 가해 잘 교반한 다음, 실온 20~30°C를 유지하는 온도에서 3일 동안 추출한 후 여액을 분리하였고, 55~65°C에서 추출물을 감압농축한 후, 동결 건조하여 건조분말 8.1g을 얻었음



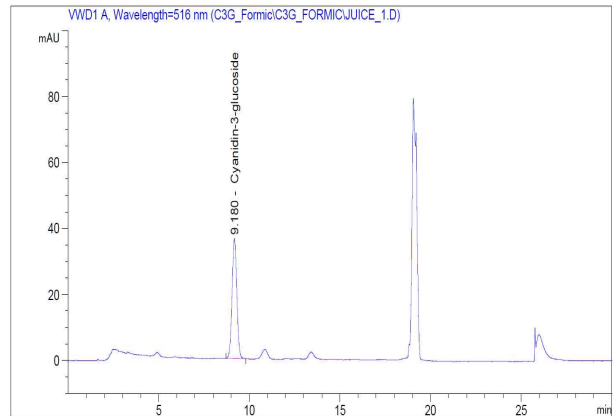
열수추출



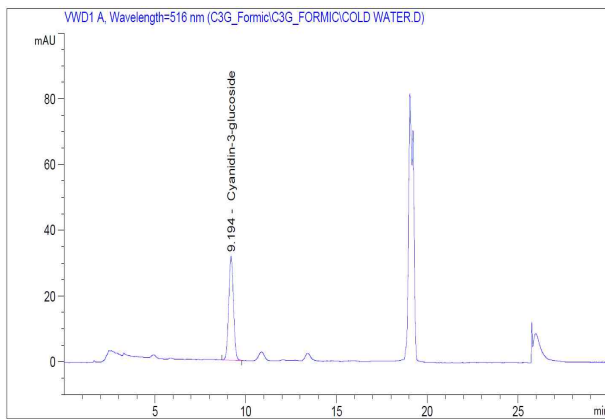
에탄올추출



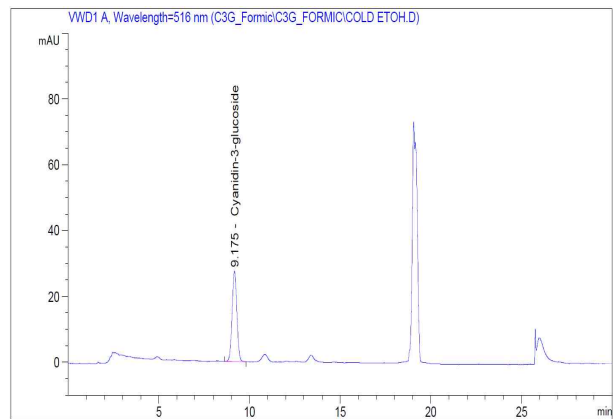
물-에탄올혼합용매추출



착즙추출



물저온추출



에탄올저온추출

Figure 2-6. 추출방법에 따른 HPLC 크로마토그램

결론

여러 조건으로 추출을 한 결과 착즙액에서 지표물질인 C3G의 함량이 열수, 에탄올, 물-에탄올 혼합 추출에 비해 높았지만 수율은 다른 추출방법에 비해 약간 낮았고, 열수 추출, 에탄올, 물-에탄올 혼합 추출의 세가지 방법에서는 비슷한 양의 지표물질 함량을 나타내었지만 열수추출에서 함량과 수율이 약간 높았다. 물이나 에탄올의 저온 추출에서는 수율이 매우 낮았음

다. 지표성분 설정(밸리테이션을 통한 지표물질 설정의 정당성 확인)

(1) 하니베리 추출물 밸리테이션 결과

농도 보정 Factor	표준품 순도 (%/100)	0.984	0.984
	표준품 분자량	1.00	
	유효성분 분자량	1.00	

(2) 특이성

■ 결과 : 추출용매가 정량시험 결과에 영향을 주지 않음을 확인하여 입증

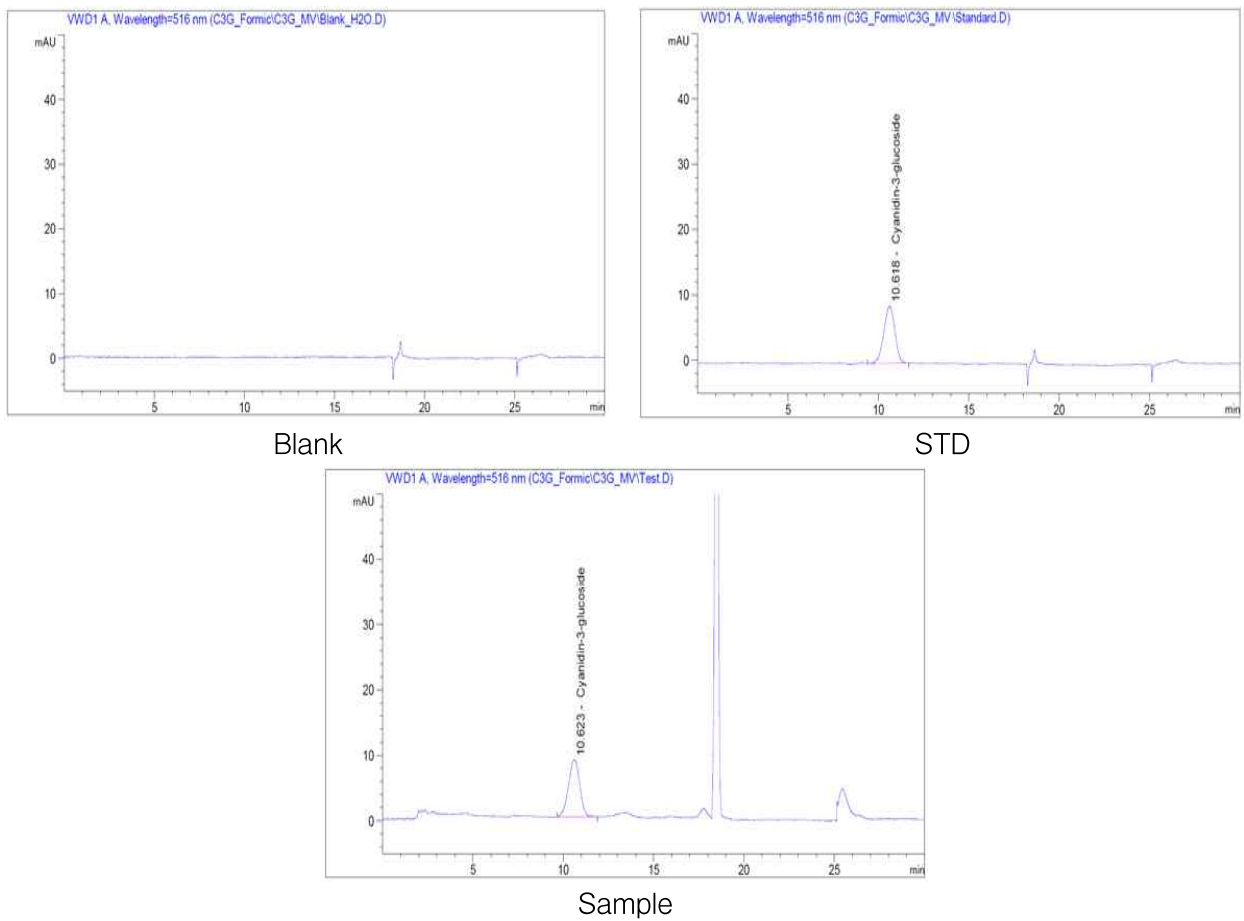
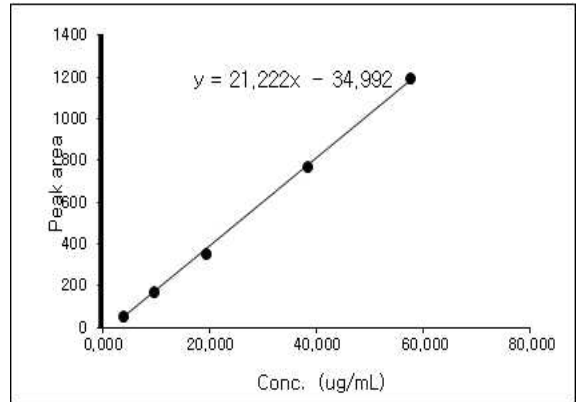


Figure 2-7. 지표물질의 특이성

(3) 직선성

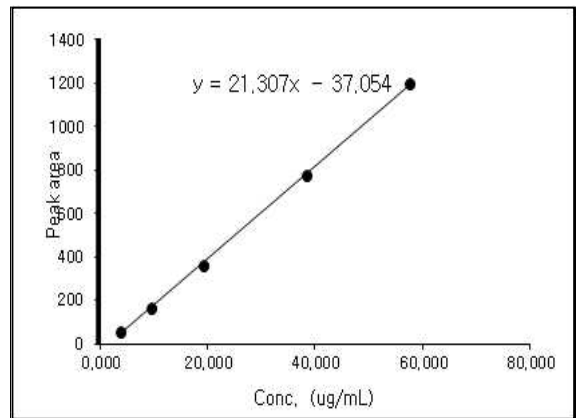
검량선 1차

표준품 채취량(mg)		1.30	
	농도(ug/mL)	보정농도(ug/mL)	분석값
1	3.90	3.84	57.2
2	9.75	9.59	175.0
3	19.50	19.19	353.3
4	39.00	38.38	771.1
5	58.50	57.56	1196.7
Slope			21.22
Intercept			-34.99
Correlation coefficient (r2)			0.99923



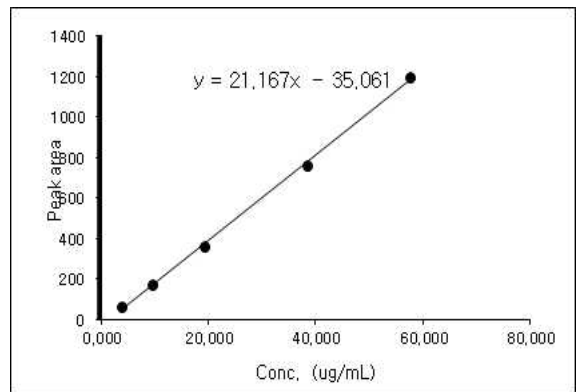
검량선 2차

표준품 채취량(mg)		1.30	
	농도(ug/mL)	보정농도(ug/mL)	분석값
1	3.90	3.84	56.6
2	9.75	9.59	166.8
3	19.50	19.19	358.4
4	39.00	38.38	775.6
5	58.50	57.56	1196.6
Slope			21.31
Intercept			-37.05
Correlation coefficient (r2)			0.99955



검량선 3차

표준품 채취량(mg)		1.30	
	농도(ug/mL)	보정농도(ug/mL)	분석값
1	3.90	3.84	60.1
2	9.75	9.59	168.8
3	19.50	19.19	359.2
4	39.00	38.38	760.1
5	58.50	57.56	1197.7
Slope			21.17
Intercept			-35.06
Correlation coefficient (r2)			0.99905



Mean of Slope	21.23	Y = 21.23 X -35.7, Y: 피크면적, X: 농도
Mean of Intercept	-35.70	
SD of Slope	0.07	
SD of Intercept	1.17	

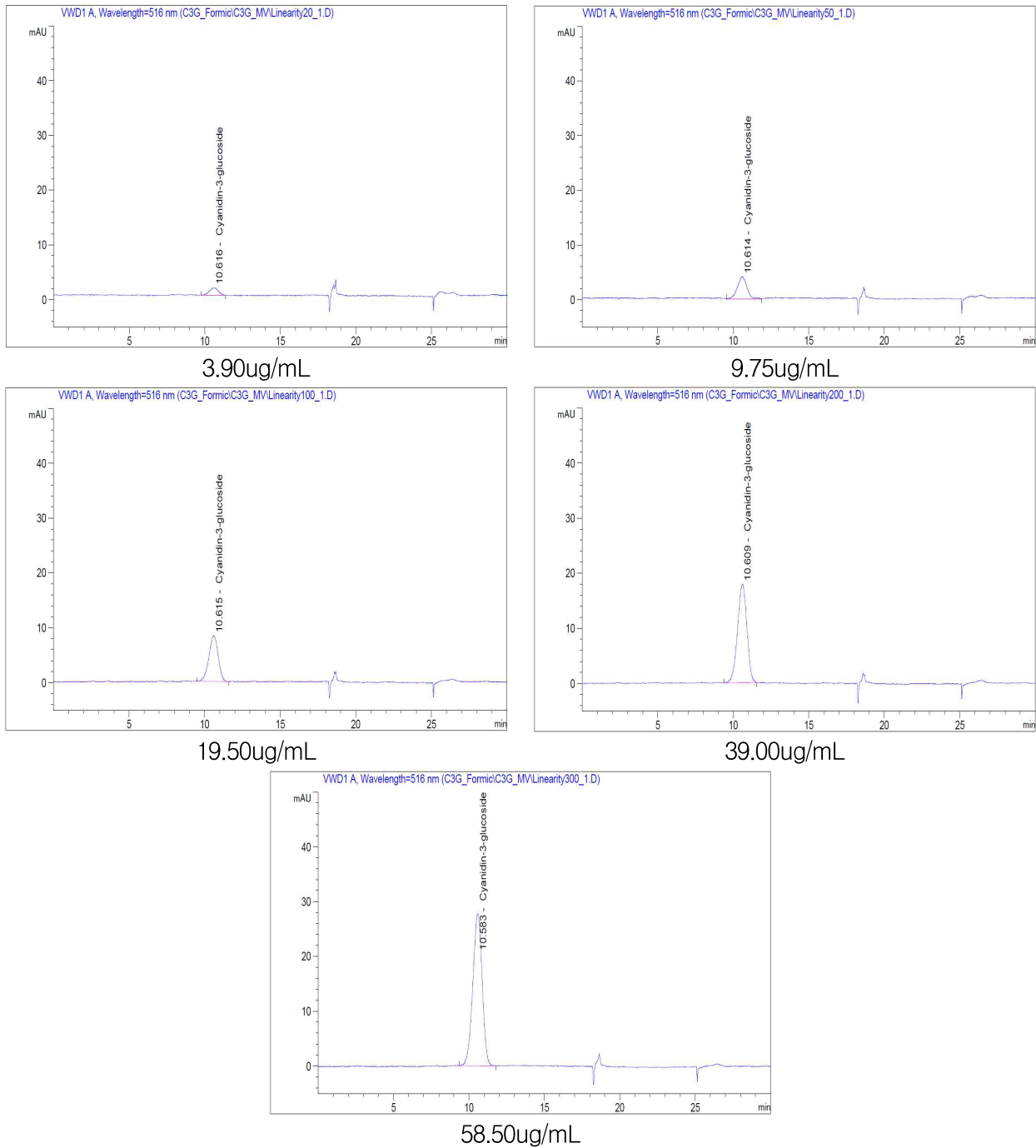


Figure 2-8. 지표물질의 직선성

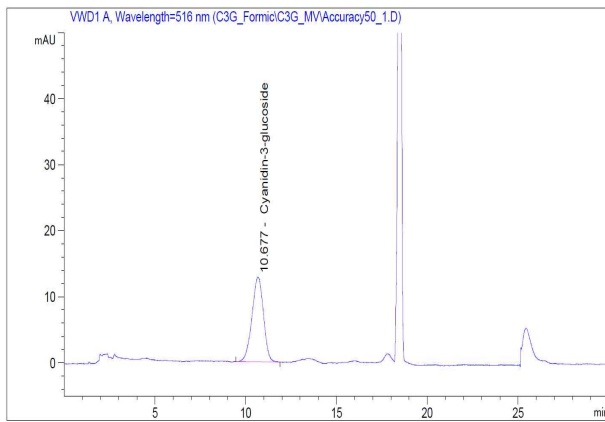
(4) 정확성

STD	이론값 (ug/mL)	이론값 보정농도 (ug/mL)	Peak Area	참값 (ug/mL)	회수율 (%)	Difference (%)
1	29.54	29.38	565.3	28.30	96.3	0.490
			554.8	27.81	94.6	0.003
			544.5	27.33	93.0	0.487
			평균값	27.81	94.7	0.327
			표준편차	0.489	1.663	0.280

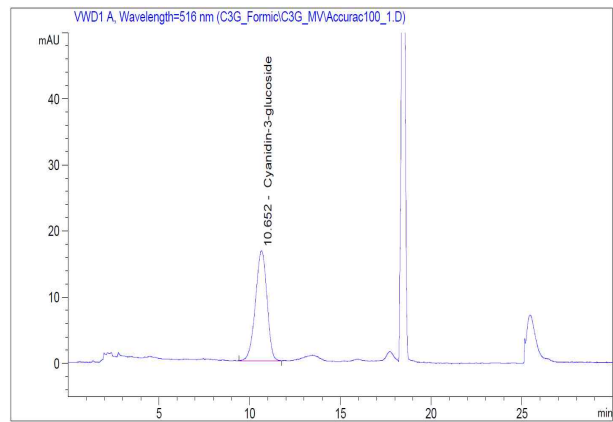
2	39.15	38.84	730.7	36.10	92.9	0.169
			726.6	35.90	92.4	0.025
			724.0	35.78	92.1	0.000
			평균값	35.93	92.5	0.065
			표준편차	0.158	0.407	0.091

3	48.85	48.38	923.9	45.20	93.4	0.000
			917.7	44.91	92.8	0.000
			923.6	45.18	93.4	0.000
			평균값	45.09	93.2	0.000
			표준편차	0.163	0.338	0.000

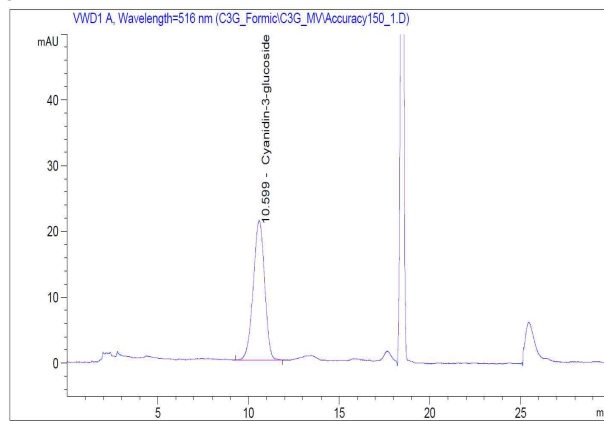
	회수율(%)		Differece(%)	
전체 평균값	93.46		0.130	
전체 표준편차	1.292		0.210	
표본의 크기	9		9	
95% 신뢰구간	92.46	94.45	-0.0311	0.2921



29.54ug/mL



39.15ug/mL

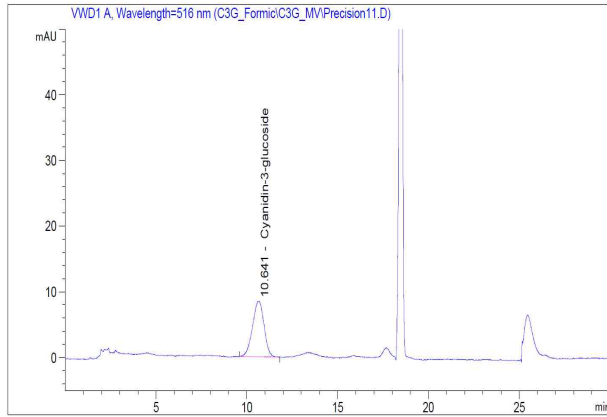


48.85ug/mL

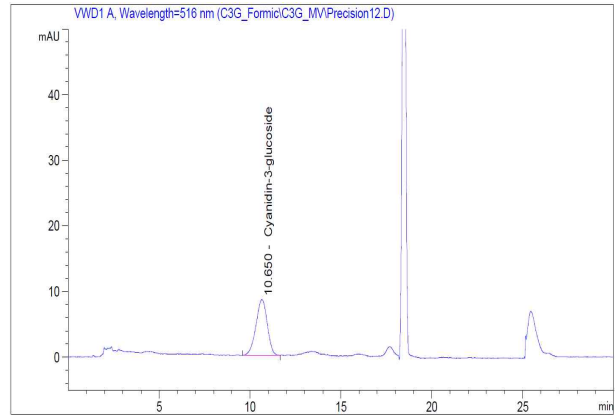
Figure 2-9. 지표물질의 정확성

(5) 반복성

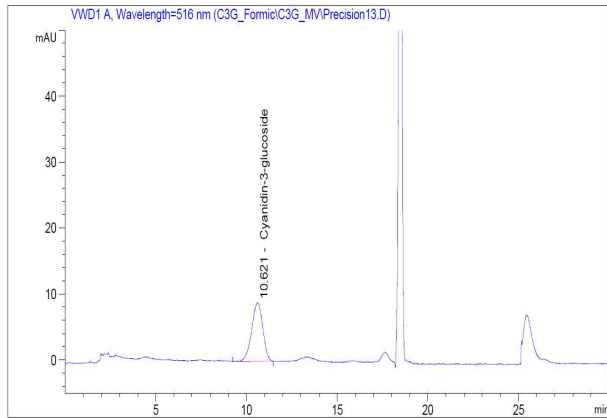
검체		측정값	평균	표준편차	상대표준 편차
농도	측정회수				
50 mg/ml	1	372.3	376.4	8.646536301	2.297
	2	366.8			
	3	379.9			
	4	390.6			
	5	378.9			
	6	369.8			



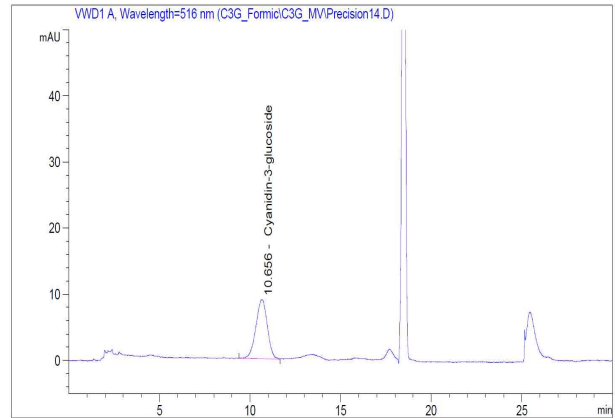
1회



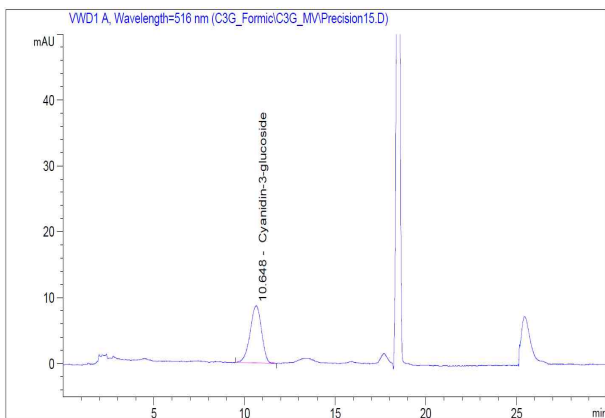
2회



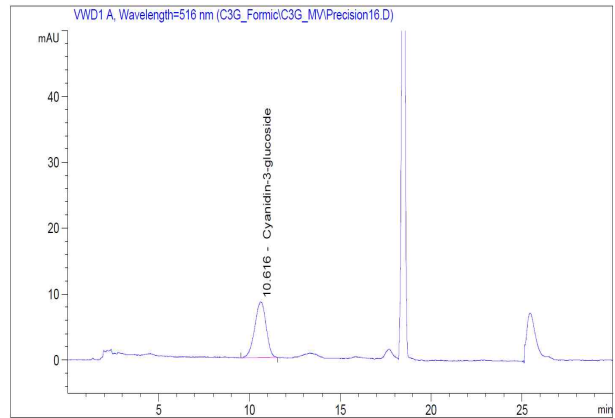
3회



4회



5회



6회

Figure 2-10. 지표물질의 반복성

(6) 정량한계(범위 선정을 위한)

“의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인’에 ’따라 다음의 방법 중 적합한 방법을 택하여 구하고 필요에 따라 그 근거를 제시함

(가) 시각적 평가에 근거하는 방법

(나) 시그널 대 노이즈에 근거하는 방법 (10:1의 시그널 대 노이즈 비에 해당하는 농도

(다) 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법

계산식 : $QL=10 \times \sigma / S$

σ (standard deviation of intercept) = 1.1713 S (mean of slope) = 21.232

Quantitation Limit = 0.182 ug/mL

결론

후보 지표물질인 Cyanidin-3-glucoside(C3G)의 밸리데이션 결과 C3G는 지표물질로 적합한 것으로 확인 되었다.

라. 원료규격설정(성상, 영양성분, 미생물, 중금속, 잔류농약의 건기식 원료 적합 및 국가공인성적서

lap scale에서 정립된 하니베리의 추출조건으로 추출된 추출분말을 국가공인기관인 한국기능식품 연구원에 의뢰하여 지표성분 공인성적서를 확보하였음

제 00016122474 호		
검사성적서		
업체명	행림이수출물품-001	제조일자 (출발기준)
업체명	[주식회사]이수출물	
주 소	경기도 성남시 분당구 황보로228번길 15, 2층 301호 (공평동, 행교세전백화점역11)	
성 명	검량물	검량일
제조번호	001-002	검량일
검사뢰뢰처명	제출물	검량일
귀하가 우리 연구원에 검사뢰뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사완료 후 해당기관 및 본 시험항목 결과 검사담당자		
C3G(cyanidin-3-glucoside chloride)(mg/g)	1.23mg/g	유재명
분석법-시험조건		
2017년 1월 6일 한국기능식품연구원		

제 00016122475 호		
검사성적서		
업체명	행림이수출물품-002	제조일자 (출발기준)
업체명	[주식회사]이수출물	
주 소	경기도 성남시 분당구 황보로228번길 15, 2층 301호 (공평동, 행교세전백화점역11)	
성 명	검량물	검량일
제조번호	001-002	검량일
검사뢰뢰처명	제출물	검량일
귀하가 우리 연구원에 검사뢰뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사완료 후 해당기관 및 본 시험항목 결과 검사담당자		
C3G(cyanidin-3-glucoside chloride)(mg/g)	1.23mg/g	유재명
분석법-시험조건		
2017년 1월 6일 한국기능식품연구원		

제 00016122476 호		
검사성적서		
업체명	행림이수출물품-003	제조일자 (출발기준)
업체명	[주식회사]이수출물	
주 소	경기도 성남시 분당구 황보로228번길 15, 2층 301호 (공평동, 행교세전백화점역11)	
성 명	검량물	검량일
제조번호	001-002	검량일
검사뢰뢰처명	제출물	검량일
귀하가 우리 연구원에 검사뢰뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사완료 후 해당기관 및 본 시험항목 결과 검사담당자		
C3G(cyanidin-3-glucoside chloride)(mg/g)	1.23mg/g	유재명
분석법-시험조건		
2017년 1월 6일 한국기능식품연구원		

Figure 2-11. 공인기관 지표성분 함량분석 결과

제 D2016120106 호			
검 사 성 적 서			
검체명	맹방이수출분말-005	제출일자 (유통기한)	
의뢰인	업체인명 (주)이리비이오		
주 소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 15, 2층 301호 (삼평동, 판교서본벤처빌리1)		
성 명	정수원, 이정일		
제출번호	HB-005	검수년월일	2016-12-01
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2016120106
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희			
시험항목	결과	검사담당자	
Biazinon(mg/kg)	불검출	김용수	
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Biflorfenoxym(mg/kg)	불검출	김용수	
Malathion(mg/kg)	불검출	김용수	
Methoxyf(mg/kg)	불검출	이진미	
Methoxyfenoside(mg/kg)	불검출	이진미	
Methidathion(mg/kg)	불검출	김용수	
Thiometon(mg/kg)	불검출	이진미	
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	이진미	
Azinphosmethyl(mg/kg)	불검출	이진미	
Azinphosmethyl(mg/kg)	불검출	김용수	
Ethion(mg/kg)	불검출	김용수	
Ethion(mg/kg)	불검출	김용수	
Inaati(mg/kg)	불검출	김용수	
Isochlorogenicacid(mg/kg)	불검출	김용수	
Iprodione(mg/kg)	불검출	이진미	
Carbaryl(mg/kg)	불검출	이진미	
Carbofuran(mg/kg)	불검출	이진미	
Captaf(mg/kg)	불검출	김용수	
Baifenox(mg/kg)	불검출	김용수	
Chlorothalonil(mg/kg)	불검출	김용수	

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희			
시험항목	결과	검사담당자	
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	김용수	
Chlorpyrifos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수	
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	김용수	
Toxofenoxym(mg/kg)	불검출	김용수	
Triadimenol(mg/kg)	불검출	김용수	
Triazophos(mg/kg)	불검출	김용수	
Triphenol(mg/kg)	불검출	김용수	
Triphenol(mg/kg)	불검출	김용수	
Thiobenzox(mg/kg)	불검출	이진미	
Parathion(mg/kg)	불검출	김용수	
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	김용수	
Piclobutrazol(mg/kg)	불검출	김용수	
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenar(mol(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenitrothion(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenoxiprop(mg/kg)	불검출	김용수	
Phenac(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenproquater(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenbenc(mg/kg)	불검출	이진미	
Phenox(mg/kg)	불검출	김용수	
Proxym(mg/kg)	불검출	김용수	
Prochlor(mg/kg)	불검출	김용수	
Profl(mg/kg)	불검출	김용수	
Flub(mg/kg)	불검출	이진미	
Flufen(mg/kg)	불검출	이진미	
Phac(mg/kg)	불검출	이진미	
Pyr(mg/kg)	불검출	이진미	
Pir(mg/kg)	불검출	김용수	
Flud(mg/kg)	불검출	김용수	
Bio(mg/kg)	불검출	김용수	

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희			
시험항목	결과	검사담당자	
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	김용수	
Chlorpyrifos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수	
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	김용수	
Toxofenoxym(mg/kg)	불검출	김용수	
Triadimenol(mg/kg)	불검출	김용수	
Triazophos(mg/kg)	불검출	김용수	
Triphenol(mg/kg)	불검출	김용수	
Triphenol(mg/kg)	불검출	김용수	
Thiobenzox(mg/kg)	불검출	이진미	
Parathion(mg/kg)	불검출	김용수	
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	김용수	
Piclobutrazol(mg/kg)	불검출	김용수	
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenar(mol(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenitrothion(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenoxiprop(mg/kg)	불검출	김용수	
Phenac(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenproquater(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenbenc(mg/kg)	불검출	이진미	
Phenox(mg/kg)	불검출	김용수	
Proxym(mg/kg)	불검출	김용수	
Prochlor(mg/kg)	불검출	김용수	
Profl(mg/kg)	불검출	김용수	
Flub(mg/kg)	불검출	이진미	
Flufen(mg/kg)	불검출	이진미	
Phac(mg/kg)	불검출	이진미	
Pyr(mg/kg)	불검출	이진미	
Pir(mg/kg)	불검출	김용수	
Flud(mg/kg)	불검출	김용수	
Bio(mg/kg)	불검출	김용수	

Figure 2-12. 공인기관 잔류농약 분석 결과

제 D2016120106 호			
검 사 성 적 서			
검체명	맹방이수출분말-005	제출일자 (유통기한)	
의뢰인	업체인명 (주)이리비이오		
주 소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 15, 2층 301호 (삼평동, 판교서본벤처빌리1)		
성 명	정수원, 이정일		
제출번호	HB-005	검수년월일	2016-12-01
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2016120106
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희			
시험항목	결과	검사담당자	
납(mg/kg)	0.4168mg/kg	유미진	
카드뮴(mg/kg)	0.1345mg/kg	유미진	
비소(mg/kg)	0.1572mg/kg	유미진	
수은(mg/kg)	불검출	조용	
열량(Kcal/100g)	355.86Kcal/100g	한아름	
탄수화물(%)	82.79%	한아름	
조단백질(%)	2.44%	남은진	
조지방(%)	1.66%	이수경	
수분(%)	8.26%	박혜민	
회분(%)	4.85%	박혜민	
나트륨(mg/100g)	56.05mg/100g	김세미	
불포화지방산(g/100g)	0.01g/100g	이수경	
BHC(mg/kg)	불검출	박가희	
DDT(mg/kg)	불검출	박가희	
Aldrin(mg/kg)	불검출	박가희	
Dieldrin(mg/kg)	불검출	박가희	
Endrin(mg/kg)	불검출	박가희	
일반세균수(/g)	320/g	노희영	
대장균군	음성	노희영	
대장균	음성	노희영	

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희			
시험항목	결과	검사담당자	
납(mg/kg)	0.4168mg/kg	유미진	
카드뮴(mg/kg)	0.1345mg/kg	유미진	
비소(mg/kg)	0.1572mg/kg	유미진	
수은(mg/kg)	불검출	조용	
열량(Kcal/100g)	355.86Kcal/100g	한아름	
탄수화물(%)	82.79%	한아름	
조단백질(%)	2.44%	남은진	
조지방(%)	1.66%	이수경	
수분(%)	8.26%	박혜민	
회분(%)	4.85%	박혜민	
나트륨(mg/100g)	56.05mg/100g	김세미	
불포화지방산(g/100g)	0.01g/100g	이수경	
BHC(mg/kg)	불검출	박가희	
DDT(mg/kg)	불검출	박가희	
Aldrin(mg/kg)	불검출	박가희	
Dieldrin(mg/kg)	불검출	박가희	
Endrin(mg/kg)	불검출	박가희	
일반세균수(/g)	320/g	노희영	
대장균군	음성	노희영	
대장균	음성	노희영	

Figure 2-13. 공인기관 일반성분(영양성분, 중금속, 미생물, 잔류농약 5종) 분석 결과

결론

일반성분: 열량 355.14Kcal/100g, 탄수화물 83.75%, 조단백 1.99%, 조지방1.35%, 수분 8.03%, 회분 4.88%, 나트륨 60.05mg/100g, 불포화지방산 0.014g/100g, 중금속: 납 0.41mg/kg, 카드뮴 0.13mg/kg, 비소 0.15mg/kg, 수은 0.001mg/kg, 잔류농약: BHC 불검출, DDT 불검출, aldrin 불검출, dieldrin 불검출, endrin 불검출, 미생물: 일반세균 208/g, 대장균군 음성, 대장균 음성으로 확인됨

2. 1차년도 협동기관(가천대학교 산학협력단) 연구개발 및 결과

1차년도 개발 목표

- 협동기관 (가천대학교 산학협력단) : 문헌조사, in vitro 효능평가, in vitro 독성평가

1. 실험방법

1-1. 세포배양

- 마우스 유래 대식세포주, Raw 264.7 세포와 인간 유래 간신히세포주, HepG2 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여, 10% FBS, 100µg/mL streptomycin, 100U/mL penicillin이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 계대 배양하며 실험에 사용하였음
- 모든 실험은 Raw 264.7 세포와 HepG2 세포를 실험목적에 따라 다양한 multi-well plate에 분주하여 80-90%의 confluency가 될 때까지 배양한 후, serum이 없는 DMEM 배지로 교환하여 12 시간 동안 추가 배양하였음

1-2. 활성산소 소거능 측정

- 시료 10µL에 ethanol 40µL와 50µL의 DPPH/ethanol 용액 50µL를 첨가 혼합하여 20분간 실온에 반응 시킨 후 DPPH 라디칼 소거능을 흡광도 517nm에서 측정하였음
- Blank는 DPPH 대신 ethanol을 사용하고 control은 시료 대신 ethanol을 사용하였음. DPPH 활성산소 소거능(%)은 다음과 같이 계산하였음
- 활성산소 소거능(%) = $(1 - ((\text{Sample 흡광도} - \text{Blank 흡광도}) / \text{Control 흡광도})) \times 100$

1-3. Nitric oxide 생성 측정

- Raw264.7 세포에서 생성되어 배양액에 유리된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 농도를 측정할 수 있는 Griess reagent(5% sulphanimide, 0.1% N-[1-naphtyl]-ethylene diamine dihydrochloride, 5% phosphoric acid)를 이용하여 측정함
- Raw 264.7 세포를 1×10⁵/mL 농도로 24-well plate에 분주 배양한 후 10-300µg/mL의 BH-KW, BH-KJ를 각각 1시간 동안 전처리한 후, 1µg/ml LPS를 18시간 처리한 후, 배양액을 회수하여 15,000×g에서 3 분간 원심분리하여 배양액 내 혼재된 세포를 제거하였음.
- 96-well plate에 배양액 100µL와 Griess reagent 100µL를 첨가하여 15분 동안 반응시킨 후, automated microplate reader (Tecan)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였음

1-4. 리포터 유전자 분석

- Antioxidant response element-luciferase reporter gene construct인 pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro]를 Fugene HD를 이용하여 HepG2 세포에 형질도입한 후, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hygromycin을 이용하여 리포터 유전자를 안정적으로 발현하는 HepG2 세포를 선별하였음
- 선별된 세포에 30-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KW, BH-KJ를 24시간 처치한 후 세포를 용해하고 세포 용해액 내 존재하는 luciferase 활성을 Promega사의 luciferase assay system와 automated microplate reader(Tecan)를 이용하여 측정하였음. 측정된 luciferase 활성은 세포 용해액 중의 총 단백질 함량으로 보정하였음

1-5. 세포 생존율 측정

- 하니베리 열수 추출분말(BH-KW)과 하니베리 착즙 분말(BH-KJ)의 세포독성을 MTT assay로 평가하였음
- Raw264.7 세포에서 LPS에 의한 세포독성에 BH-KW, BH-KJ의 효과를 평가하기 위하여 10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KW, BH-KJ를 1시간 동안 전처리 후 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS를 18시간 동안 처치하였음
- 또한, HepG2 세포에서 tBHP에 의한 세포 독성에 BH-KW, BH-KJ의 효과를 평가하기 위하여 10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KW, BH-KJ를 1시간 동안 전처리 후 150 μM tBHP를 12시간 동안 처치하였음
- 처치가 완료된 배지에 0.2mg/mL MTT 용액 200 μL 를 첨가한 후 2 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 추가 배양하였음. 이후 배양액을 제거하고 세포에 축적된 formazan 결정을 DMSO를 이용하여 용해시킨 후 automated microplate reader(Infinite 200 Pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였음
- 세포 생존율은 다음과 같은 수식에 의해 무처리 세포의 생존율과 비교하여 계산하였음
- Relative Cell Viability(% of control)
= $100 \times (\text{absorbance of treated cells})/(\text{absorbance of control cells})$

2. 실험결과

2-1. 활성산소 소거능

- 하니베리 열수추출분말(BH-KW), 착즙분말(BH-KJ)의 활성산소 소거능을 DPPH를 이용하여 측정한 결과, BH-KW, BH-KJ 모두 농도 의존적으로 활성산소 소거능이 증가하였음
- 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KW는 7.99 \pm 7.56, 15.11 \pm 5.90, 33.91 \pm 5.88, 86.05 \pm 2.2%의 DPPH 활성산소 소거능을 나타내었으며, 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KJ는 3.82 \pm 8.15, 9.08 \pm 9.30, 32.17 \pm 4.55, 79.13 \pm 0.85%의 DPPH 활성산소 소거능을 나타내었으며, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KW, BH-KJ 대조군에 비해 통계적으로 유의하였음

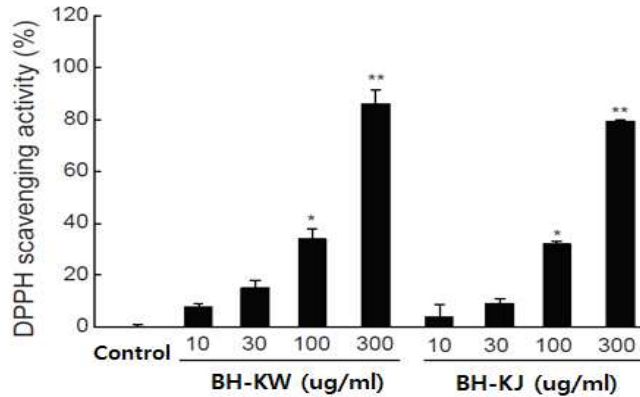


Figure 2-14. 하니베리 추출물의 활성산소 소거능 평가

2-2. Nitric oxide 생성

○ BH-KW, BH-KJ를 LPS로 활성화된 Raw264.7세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 평가한 결과 $1\mu\text{g/mL}$ 의 LPS는 NO 생성을 대조세포 대비 2.19 ± 0.19 배 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 10, 30, 100, $300\mu\text{g/mL}$ 의 BH-KW 전처치에 의하여 NO 생성이 1.90 ± 0.16 , 1.96 ± 0.08 , 2.27 ± 0.15 , 2.02 ± 0.16 배였으며, 10, 30, 100, $300\mu\text{g/mL}$ 의 BH-KJ 전처치는 NO 생성을 2.02 ± 0.06 , 2.12 ± 0.10 , 2.12 ± 0.11 , 2.29 ± 0.20 배였음

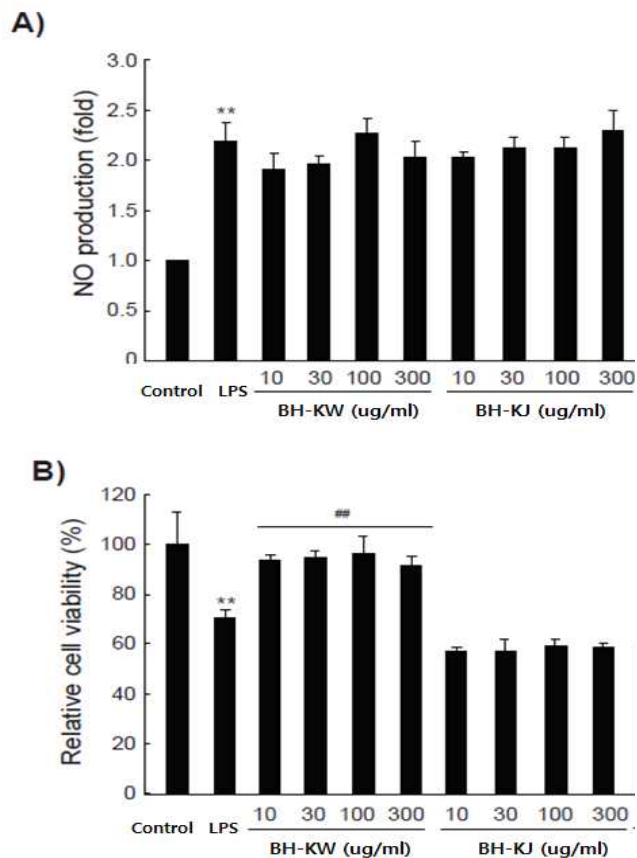


Figure 2-15. LPS로 활성화된 Raw264.7 세포에서 하니베리 추출물의 NO 생성 억제 및 세포 보호 효능 평가

- BH-KW, BH-KJ가 Raw264.7 세포에서 LPS에 의한 세포독성에 미치는 영향을 평가한 결과, BH-KJ에 비해 BH-KW에서 세포 보호 효능이 있음을 확인하였음. 1 μ g/mL의 LPS는 세포생존율을 대조군 대비 70.98 \pm 2.53%로 통계적으로 유의하게 감소시켰으며, 10, 30, 100, 300 μ g/mL의 BH-KW 전처치에 의한 세포생존율은 93.86 \pm 1.91, 94.93 \pm 2.60, 96.33 \pm 6.79, 92.00 \pm 6.79%였으며, 10, 30, 100, 300 μ g/mL의 BH-KJ 전처치에 의한 세포생존율은 57.11 \pm 2.03, 57.20 \pm 4.64, 59.38 \pm 2.34, 58.73 \pm 1.51%였음

2-3. 리포터 유전자 분석

- HepG2 세포에서 tBHP 유도성 산화적 스트레스에 대한 보호 효능평가
- HepG2 세포에서 BH-KW, BH-KJ가 tBHP에 의한 세포독성에 미치는 영향을 평가한 결과 BH-KW, BH-KJ 모두 세포보호 효능이 있음을 확인하였음
- 150 μ M tBHP 처치는 세포 생존율을 대조군보다 23.56 \pm 3.41%로 유의하게 감소시켰으며, 30, 100, 300 μ g/mL의 BH-KW 전처치에 의하여 세포 생존율은 74.95 \pm 9.32, 84.29 \pm 4.44, 87.36 \pm 1.53%였으며, 30, 100, 300 μ g/mL의 BH-KW 전처치에 의하여 세포 생존율은 69.56 \pm 14.16, 87.54 \pm 5.13, 89.99 \pm 3.91%였음. 30-300 μ g/mL의 BH-KW, BH-KJ 처치군 중 30 μ g/mL의 BH-KJ 처치군을 제외하고 모두 tBHP 처치군과 비교하여 통계적으로 유의하게 세포 생존율을 증가시켰으며, 최고농도인 300 μ g/mL에서의 세포 보호 효능은 BH-KJ, BH-KW순으로 우수하였음

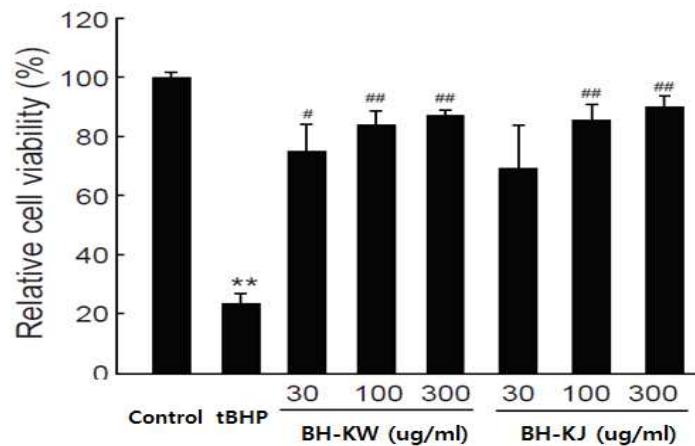


Figure 2-16. 하니베리 추출물의 tBHP 유도성 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효능

- HepG2 세포에서 하니베리 추출물의 Nrf2 활성화능 평가
- 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 작용에 관여하는 핵심 전사인자 중 하나는 Nrf2임
- HepG2 세포에서 ARE-luciferase를 이용한 리포터 유전자 분석을 통해 하니베리 추출물이 Nrf2 활성화에 미치는 영향을 평가한 결과, BH-KW, BH-KJ 모두 농도 의존적으로 ARE-luciferase 활성을 증가시켰음
- 30, 100, 300 μ g/mL BH-KW 처치에 의한 ARE-luciferase 활성은 대조세포와 비교하여 1.27 \pm 0.17, 2.24 \pm 0.33, 4.59 \pm 0.09배 었으며, 30, 100, 300 μ g/mL BH-KJ 처치에 의한 ARE-luciferase 활성은 대조세포와 비교하여 1.15 \pm 0.12, 1.65 \pm 0.12, 3.19 \pm 0.21배 었으며, 30, 100, 300 μ g/mL, 100, 300 μ g/mL의 BH-KW, BH-KJ 처치에 의한 ARE-luciferase

활성은 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였음

- 최고농도인 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서의 ARE-luciferase 활성은 BH-KW, BH-KJ 순으로 우수하였으나, 추출물간 통계적 차이는 나타나지 않았음

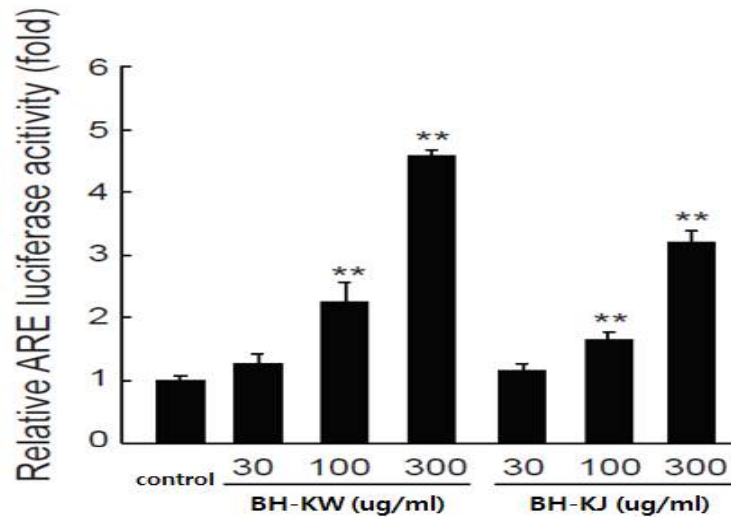


Figure 2-17. 하니베리 추출물의 Nrf2 활성화능

2-4. 세포 생존율 측정

- BH-KW, BH-KJ 세포독성을 Raw264.7과 HepG2 세포에서 MTT assay법에 의해 평가하였음. Raw264.7 세포에 10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KW, BH-KJ를 각각 처치한 결과, 대조군과 비교하여 세포생존율에 변화를 나타내지 않았음
- 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KW는 99.07 \pm 1.00, 99.31 \pm 2.93, 102.1 \pm 3.89, 103.39 \pm 5.39, 106.33 \pm 4.86%였으며, 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KJ는 98.68 \pm 2.00, 98.05 \pm 1.18, 95.48 \pm 0.96, 98.35 \pm 4.94, 100.74 \pm 5.57%였음
- HepG2 세포에 10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KW, BH-KJ를 각각 처치한 결과, 대조군 비교하여 세포생존율에 변화를 나타내지 않았음. 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KW는 110.81 \pm 3.48, 110.85 \pm 1.76, 110.25 \pm 3.89, 105.39 \pm 4.66, 97.21 \pm 13.97%였으며, 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BH-KJ는 101.73 \pm 0.97, 102.24 \pm 1.80, 100.12 \pm 2.85, 99.51 \pm 1.72, 93.06 \pm 5.35%였음

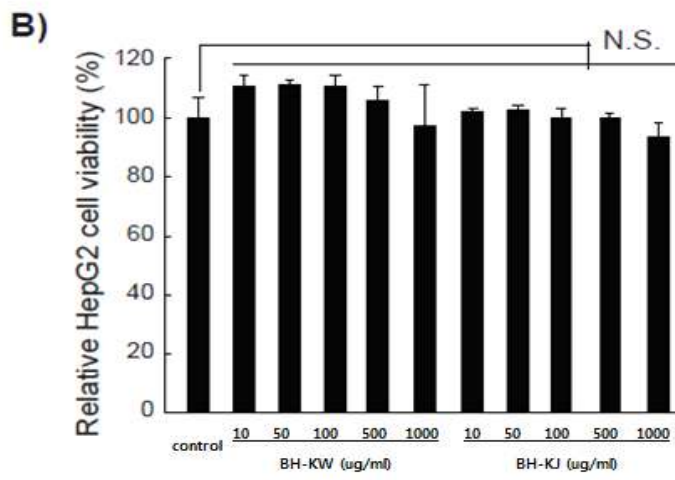
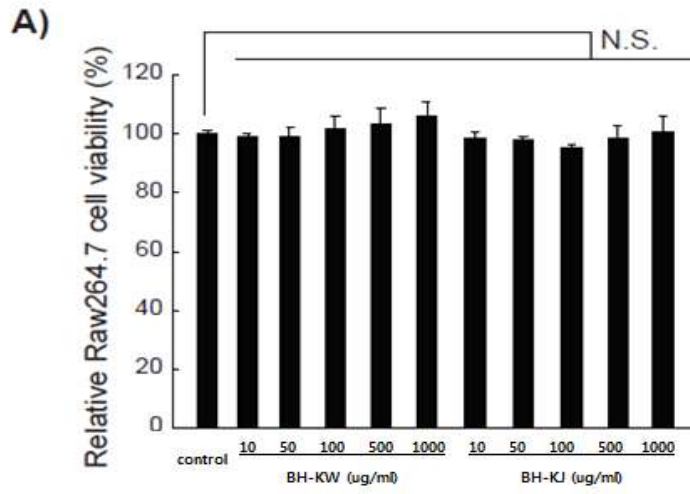


Figure 2-18. 하니베리 추출물의 세포독성 평가

결론

하니베리 추출물에 대한 *in vitro* 효능을 활성산소 소거능, NO 생성능, Nrf2 활성을 평가하였음. DPPH 라디칼 소거능은 식품 추출물의 항산화능을 측정할 때 많이 사용되는 방법으로 본 연구에서 하니베리 추출물의 활성산소 소거능이 농도 의존적으로 증가하였음. 세포 내 강력한 항산화 신호계에 속하는 nuclear factor E2-related factor 2(Nrf2)의 표적 인자인 anti-oxidant response element(ARE)-driven reporter gene들은 산화적 스트레스와 NO의 생성을 조절하여 염증 반응으로부터 세포를 보호하는 작용을 함. Nrf2는 정상적인 산화-환원 조건 하에서, 세포질에서 Nrf2의 대표 억제인자인 Keap1에 결합한 상태로 존재함. 그러나 활성 산소나 스트레스에 노출되면 Nrf2는 Keap1에서 해리되고 핵으로 이동하며 세포 보호 및 항산화 효소 관련 유전자들의 전사 활성을 촉진시킴. 본 연구에서는 하니베리 추출물에 의해 ARE-luciferase 활성이 하니베리 추출물 농도 의존적으로 증가되어지는 것을 확인하였음. 대식세포(macrophage)는 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)등에 의해 활성화되어 염증반응을 일으키는데, 이 때 대식세포는 염증매개인자(pro-inflammatory mediators)인 nitric oxide (NO)를 분비하여 세포를 방어함

하니베리 추출물의 *in vitro* 안전성 평가를 위해 간손상 유도 물질인 tBHP와 하니베리 추출물을 같이 처리한 후 세포생존률을 측정함. 측정 결과 하니베리 추출물 자체에 세포 독성이 없음을 확인하였음. LPS와 tBHP 처리로 인해 세포 생존율이 감소하였는데 반해 하니베리 추출물에 의해 세포생존률이 회복되어짐을 확인하였음. 이는 활성산소 소거능과 Nrf2 활성, 항염증성 활성이 있는 하니베리 추출물이 세포를 방어하여 세포생존률에 영향을 미쳤을 것으로 사료됨

3. 2차년도 주관기관((주)아리바이오) 연구개발 및 결과

2차년도 개발 목표
○ 주관연구기관((주)아리바이오) : Pilot생산 조건 확립, 대량생산 조건 확립, 원료규격설 정확립, 지표 validation확립, 인체시험용 시험약/위약제조, 인체시험 IRB신청 및 승인, 제형연구

가. Pilot 생산 조건 확립

<Table 2-14> 각종 베리류의 추출 후 수율

시료명	원료 투입량	분쇄 후 압착액	감압농축 후	동결건조	건조 수율
냉동 black berry (국산)	500g	393g (7 brix)	103g (28 brix)	33g	6.60 %
냉동 아사이베리 (브라질)	300g	233g (5 brix)	36g (30 brix)	10g	3.33 %
냉동 아로니아 (국산)	300g	222g (10 brix)	82g (31 brix)	27g	9.00 %
냉동 오디 (국산)	500g	419g (12 brix)	163g (28 brix)	57g	11.40 %
냉동 blue berry (국산)	398g	311g (9 brix)	94g (30 brix)	32g	8.04 %
냉동 Black currant (폴란드)	496g	314g (11 brix)	116g (29 brix)	40g	8.06 %
냉동 복분자 (국산)	493g	346g (9 brix)	108g (29 brix)	38g	7.71 %
냉동 야생 blue berry (미국산)	503g	419g (9 brix)	126g (31 brix)	41g	8.15 %
냉동 blue berry (칠레산)	440g	369g (12 brix)	125g (31 brix)	43g	9.77 %
냉동 딸기 (국산)	484g	381g (7 brix)	117g (26 brix)	33g	6.82 %
하니베리 (중국산)	502g	396g (10 brix)	124g (29 brix)	41g	8.17 %
하니베리 (국산, 착즙)	515g	400g (10 brix)	130g (29 brix)	45g	8.74 %
하니베리 (국산, 열수추출)	580g	2.1L (1.5 brix)	152g (30 brix)	66g	11.38 %

- 압착 추출: 각각의 베리를 분쇄 후 압착하여 착즙하였음. 착즙액을 55-65도에서 30±5brix로 감압 농축한 후, -35±5℃에서 동결 건조 하여 하니베리 건조분말을 획득하였음
- 열수 추출: 정제수 3배수를 넣고 100도에서 3시간 환류 추출 후 실온으로 냉각하여 여과하였음. 여과액을 45도에서 30±5 brix 감압농축한 후, -35±5℃에서 동결건조 하여 건조분말을 획득하였음

결론

시판 베리류의 압착추출 후 동결건조분말의 수율은 국산 오디와 국산 하니베리(열수추출)가 약 11.4%의 수율로 가장 높았고 대부분의 시판 베리류의 동결건조 분말의 수율은 원물 대비 8~9%로 유사하게 측정되었음. 단지, 냉동 아사이베리의 경우 분쇄물 형태의 제품을 구매하여 여과 후 동결건조분말의 수율이 3.3%로 매우 낮게 측정되었음

<Table 2-15> 각종 베리류의 추출 후 지표물질 함량

시료명	C3G (%)
냉동 Black berry (국산)	0.37
냉동 아사이베리 (브라질)	0.03
냉동 아로니아 (국산)	0.02
냉동 오디 (국산)	0.14
냉동 Blue berry (국산)	0
냉동 Black currant (폴란드)	0.36
냉동 복분자 (국산)	0.42
냉동 야생 Blue berry (미국산)	0.01
냉동 Blue berry (칠레산)	0.01
냉동 딸기 (국산)	0.01
하니베리 (국산, 착즙)	0.6
하니베리 (국산, 열수추출)	0.09
하니베리 (중국산)	0.13

결론

지표물질로 설정한 C3G의 경우 국산 하니베리 착즙이 0.6%로 가장 높았고, 딸기와 블루베리에서 0.01%로 하니베리에 비해 매우 낮은 함량을 나타내었으나, 모든 베리류에서 C3G가 검출되었음

나. 하니베리의 대량 생산조건 확립

<Table 2-16> 제조공정도

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3)기능/지표성분 함량변화(mg/g)	(4) 수율(kg)
원재료	하니베리 원물		80
↓			
파쇄	원물 파쇄 진행		
↓			
가수 및 추출	원물 대비 물 5배수 첨가 후 상온 25℃ 3-5시간 추출	0.09	4 480
↓			
착즙 및 여과	5 μ m 여과포 사용, 착즙 및 여과 진행	0.12	450
↓			
원심분리	고속 원심분리기 사용 12,000rpm 원심분리 진행 (2-3brix)	0.13	443
↓			
농축 및 살균	55-65℃에서 농축 및 살균 (10brix)	0.66	79.32
↓			
동결건조	하니베리 추출 농축액의 고형분 함량으로 덱스트린 첨가 후 동결건조 진행(하니베리 추출 농축액 100g(10brix) 당 덱스트린 9.96g)	7.6 mg/g	15.8
↓			
혼합	동결건조물 (98%), 이산화규소 (1%), 스테아린산 마그네슘 (1%) 혼합	7.5 mg/g	16.12
↓			
원료	포장		

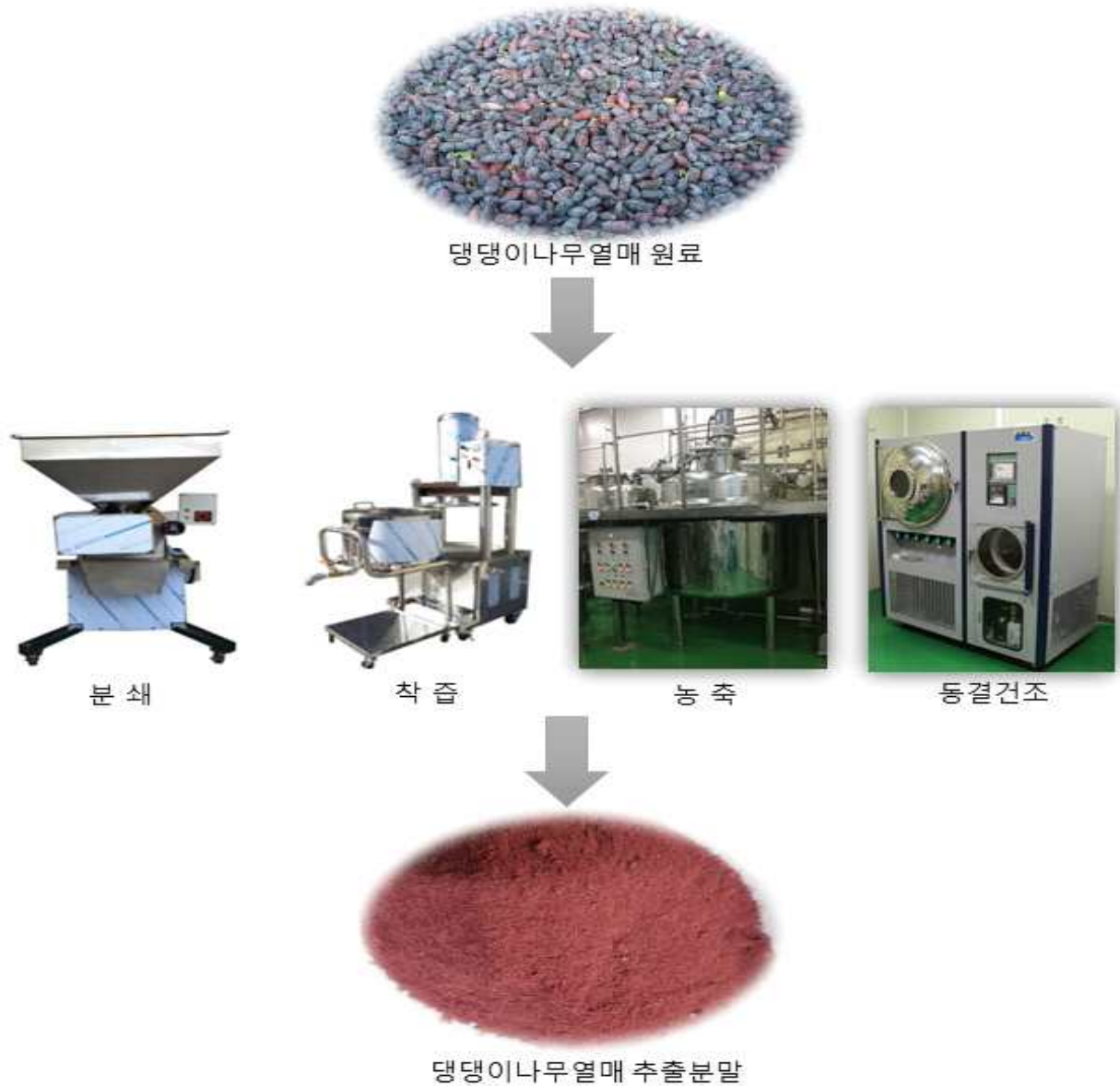


Figure 2-19. 제조 과정

결론

간 보호 효능평가에서 우수한 효과를 나타낸 하니베리 추출물의 대량 생산공정은 하니베리 원물을 수세하여 불순물을 제거하고, 상온 물추출을 진행 후 농축, 동결건조단계를 거쳐 분말화(dextrin 첨가) 하였음

진행 공정은 실험실 공정과 동일하게 55-65도에서 농축하고 동결건조를 진행한 결과, 실험실 공정과 비슷한 수율과 지표물질 함량(C3G : 7.5mg/g)을 나타내었음

다. 원료규격설정확립을 위한 공인분석결과(분석기관: 한국기능식품연구원)

제 D2018120904 호 분석확인																											
시험·검사성적서																											
제품명	델델이나무열매추출분말	제조일자 (유통기한)	2017-04-10																								
의뢰인	업체명	(주)아리바이오	성명																								
	주소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 17, 1동 5층 (삼평동, 판교세온벤처빌리2)	상주원																								
제조번호		검수년월일	2018-12-10																								
검사의뢰목적	광고용	검수번호	D2018120904																								
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일: 2018-12-21 시험·검사 책임자: 이경구 검사관련 총 책임자: 김원희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>열량(Kcal/100g)</td> <td>376.72 Kcal/100g</td> <td>변아름</td> </tr> <tr> <td>단수화물(%)</td> <td>91.57 %</td> <td>변아름</td> </tr> <tr> <td>총단백질(%)</td> <td>0.72 %</td> <td>김정숙</td> </tr> <tr> <td>코카페인(%)</td> <td>0.84 %</td> <td>이수경</td> </tr> <tr> <td>수분(%)</td> <td>4.81 %</td> <td>김명</td> </tr> <tr> <td>회분(%)</td> <td>2.05 %</td> <td>김명</td> </tr> <tr> <td>나트륨(mg/100g)</td> <td>19.31 mg/100g</td> <td>박상현</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 분석은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 식약처 부속별 경우 시험·검사 및 결과받은 범위로 작성 가능합니다. ※ 분석목적은 광고용 일체입니다. 시험·검사는 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 사용될 수 없으며, 자가품질검사 또는 경쟁기관 외 제3자에게 활용될 수 없습니다.</p> <p>2018년 12월 21일 한국기능식품연구원</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	열량(Kcal/100g)	376.72 Kcal/100g	변아름	단수화물(%)	91.57 %	변아름	총단백질(%)	0.72 %	김정숙	코카페인(%)	0.84 %	이수경	수분(%)	4.81 %	김명	회분(%)	2.05 %	김명	나트륨(mg/100g)	19.31 mg/100g	박상현
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																									
열량(Kcal/100g)	376.72 Kcal/100g	변아름																									
단수화물(%)	91.57 %	변아름																									
총단백질(%)	0.72 %	김정숙																									
코카페인(%)	0.84 %	이수경																									
수분(%)	4.81 %	김명																									
회분(%)	2.05 %	김명																									
나트륨(mg/100g)	19.31 mg/100g	박상현																									



영양분석

제 D2018120908 호 분석확인												
시험·검사성적서												
제품명	델델이나무열매추출분말	제조일자 (유통기한)	2017-04-10									
의뢰인	업체명	(주)아리바이오	성명									
	주소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 17, 1동 5층 (삼평동, 판교세온벤처빌리2)	상주원									
제조번호		검수년월일	2018-12-10									
검사의뢰목적	광고용	검수번호	D2018120908									
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일: 2018-12-14 시험·검사 책임자: 이경구 검사관련 총 책임자: 김원희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>대장균</td> <td>출생</td> <td>김진영</td> </tr> <tr> <td>질산</td> <td>어떠, 어찌가 없고 고유의 향이 있는 붉은색의 분말</td> <td>이이진</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 분석은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 식약처 부속별 경우 시험·검사 및 결과받은 범위로 작성 가능합니다. ※ 분석목적은 광고용 일체입니다. 시험·검사는 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 사용될 수 없으며, 자가품질검사 또는 경쟁기관 외 제3자에게 활용될 수 없습니다.</p> <p>2018년 12월 14일 한국기능식품연구원</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	대장균	출생	김진영	질산	어떠, 어찌가 없고 고유의 향이 있는 붉은색의 분말	이이진
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원										
대장균	출생	김진영										
질산	어떠, 어찌가 없고 고유의 향이 있는 붉은색의 분말	이이진										



미생물

제 D2018120905 호 분석확인																		
시험·검사성적서																		
제품명	델델이나무열매추출분말	제조일자 (유통기한)	2017-04-10															
의뢰인	업체명	(주)아리바이오	성명															
	주소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 17, 1동 5층 (삼평동, 판교세온벤처빌리2)	상주원															
제조번호		검수년월일	2018-12-10															
검사의뢰목적	광고용	검수번호	D2018120905															
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일: 2018-12-13 시험·검사 책임자: 이경구 검사관련 총 책임자: 김원희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>납(mg/kg)</td> <td>0.0413 mg/kg</td> <td>김미진</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>0.0202 mg/kg</td> <td>김미진</td> </tr> <tr> <td>비소(mg/kg)</td> <td>0.0055 mg/kg</td> <td>김미진</td> </tr> <tr> <td>수은(mg/kg)</td> <td>0.0040 mg/kg</td> <td>조종</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 분석은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 식약처 부속별 경우 시험·검사 및 결과받은 범위로 작성 가능합니다. ※ 분석목적은 광고용 일체입니다. 시험·검사는 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 사용될 수 없으며, 자가품질검사 또는 경쟁기관 외 제3자에게 활용될 수 없습니다.</p> <p>2018년 12월 13일 한국기능식품연구원</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	납(mg/kg)	0.0413 mg/kg	김미진	카드뮴(mg/kg)	0.0202 mg/kg	김미진	비소(mg/kg)	0.0055 mg/kg	김미진	수은(mg/kg)	0.0040 mg/kg	조종
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																
납(mg/kg)	0.0413 mg/kg	김미진																
카드뮴(mg/kg)	0.0202 mg/kg	김미진																
비소(mg/kg)	0.0055 mg/kg	김미진																
수은(mg/kg)	0.0040 mg/kg	조종																



중금속

제 D2018120906 호 분석확인																					
시험·검사성적서																					
제품명	델델이나무열매추출분말	제조일자 (유통기한)	2017-04-10																		
의뢰인	업체명	(주)아리바이오	성명																		
	주소	경기도 성남시 분당구 판교로228번길 17, 1동 5층 (삼평동, 판교세온벤처빌리2)	상주원																		
제조번호		검수년월일	2018-12-10																		
검사의뢰목적	광고용	검수번호	D2018120906																		
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일: 2018-12-18 시험·검사 책임자: 이경구 검사관련 총 책임자: 김원희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BHC(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>한효주</td> </tr> <tr> <td>DPT(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>한효주</td> </tr> <tr> <td>Adri(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>한효주</td> </tr> <tr> <td>Diadr(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>한효주</td> </tr> <tr> <td>Endr(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>한효주</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 분석은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 식약처 부속별 경우 시험·검사 및 결과받은 범위로 작성 가능합니다. ※ 분석목적은 광고용 일체입니다. 시험·검사는 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 사용될 수 없으며, 자가품질검사 또는 경쟁기관 외 제3자에게 활용될 수 없습니다.</p> <p>2018년 12월 18일 한국기능식품연구원</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	BHC(mg/kg)	불검출	한효주	DPT(mg/kg)	불검출	한효주	Adri(mg/kg)	불검출	한효주	Diadr(mg/kg)	불검출	한효주	Endr(mg/kg)	불검출	한효주
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																			
BHC(mg/kg)	불검출	한효주																			
DPT(mg/kg)	불검출	한효주																			
Adri(mg/kg)	불검출	한효주																			
Diadr(mg/kg)	불검출	한효주																			
Endr(mg/kg)	불검출	한효주																			



잔류농약

Figure 2-20. 공인기관 성분(영양성분, 중금속, 미생물, 잔류농약 5종) 분석 결과

결론

미생물과 잔류농약은 불검출이었고, 열량은 376.99Kcal/100g, 나트륨 16.75mg/100g, 탄수화물 91.62%, 조단백질 0.68%, 조지방 0.87%, 회분 2.03%, 납 0.044 PPM, 카드뮴 0.005 PPM, 비소 0.019 PPM, 수은 0.007 PPM로 분석되었음

라. 지표성분 설정(밸리데이션을 통한 지표물질 설정의 정당성 확인)

(1) 시험방법

1. 장비와 재료

1.1 실험실 장비 및 소모품

1.1.1 부피플라스크(10 mL, 20 mL)

1.1.2 HPLC용 유리병

1.1.3 용매용 일회용 실린지

1.1.4 여과용 멤브레인필터(PVDF, 0.45 μ m)

1.1.5 초음파진탕기

1.1.6 진탕기(Vortex)

1.2 분석장비

1.2.1 고속액체크로마토그래프

1.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector), 다이오드어레이 검출기(Diode Array Detector)

1.2.3 Shiseido capcell pak C18 UG 120 (4.6mm I.D. \times 250 mm, 5 μ m)

2. 표준물질 및 일반시약

2.1 표준물질

2.1.1 Cyanidin-3-glucoside chloride

분자식 : $C_{21}H_{21}O_{11}$, 분자량 : 484.83, CAS No. : 7084-24-4

2.2 일반시약

2.2.1 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

2.2.2 포름산(Formic acid, Extra grade)

2.2.3 증류수(Distilled water)

3. 시험과정

3.1 표준용액 제조

3.1.1 표준물질 10 mg을 정밀하게 달아 10 mL 용량플라스크에 넣고 이동상(A:B=9:1)으로 녹여 표준원액으로 사용

3.1.2 상기 용액을 진탕하여 녹인 후 이동상(A:B=9:1)으로 희석하여 표준용액으로 한다.
(0.0036, 0.018, 0.036, 0.054 0.18 mg/mL)

3.2 시험용액 제조

3.1.1 검체 약 85 mg 을 취한 후 20 mL 부피플라스크에 주입

3.1.2 이동상(A:B=9:1)으로 표선까지 맞춤

3.1.3 초음파진탕기에서 충분히 녹인 후 상온에서 식힘

3.1.4 상기용액을 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액 사용

4. 분석 및 계산

4.1 기기분석

다음 표 1의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 조정이 필요할 수 있음

<Table 2-17> 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건
주입량	10 µL
칼럼온도	30℃
이동상	A 용매 - 5% 포름산 B 용매 - 아세토니트릴
유속	1.0 mL/분
검출기 파장	516 nm

<Table 2-18> 이동상 조건

시간 (분)	용매	
	A (%)	B (%)
0	90	10
15	90	10
16	0	100
22	0	100
23	90	10
30	90	10

4.2 계산

$$C3G \text{ 함량(mg/g)} = C \times V / W$$

C : 시험용액중의 C3G 농도(mg/mL)

V : 시험용액의 전량(mL)

W : 시료채취량(g)

(2) 특이성

정의: 불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력

- 표준용액과 시험용액의 크로마토그램 등을 통해 간섭물질에 대한 영향이 없음을 확인함
- 표준용액과 시험용액에서 해당 성분에 대한 머무름 시간 및 스펙트럼의 패턴이 일치함을 확인함

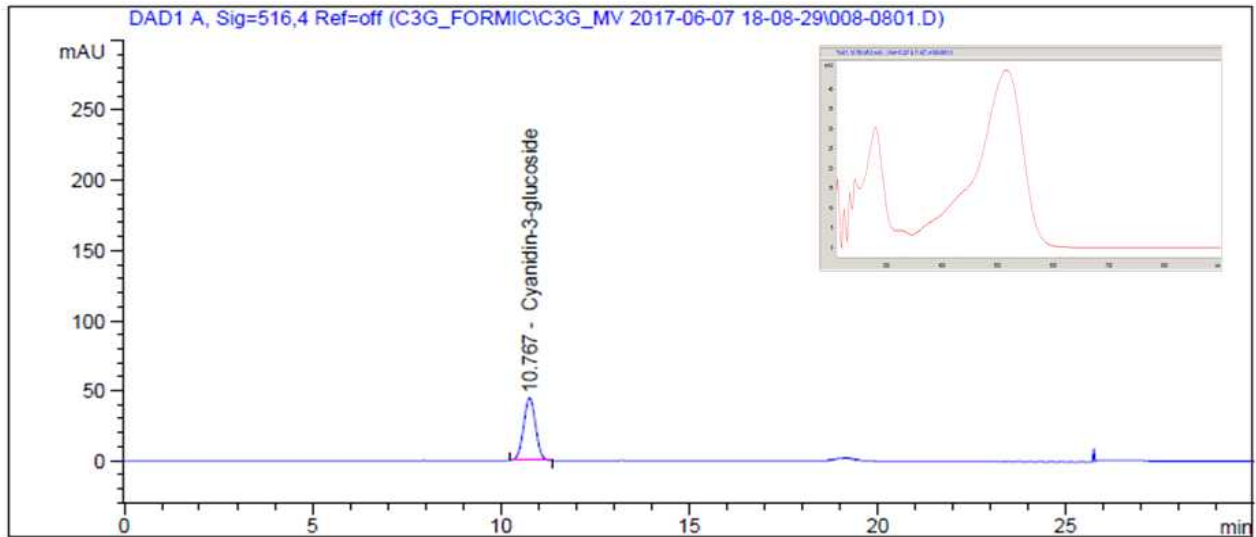


Figure 2-21. 표준용액의 HPLC 크로마토그램 및 스펙트럼

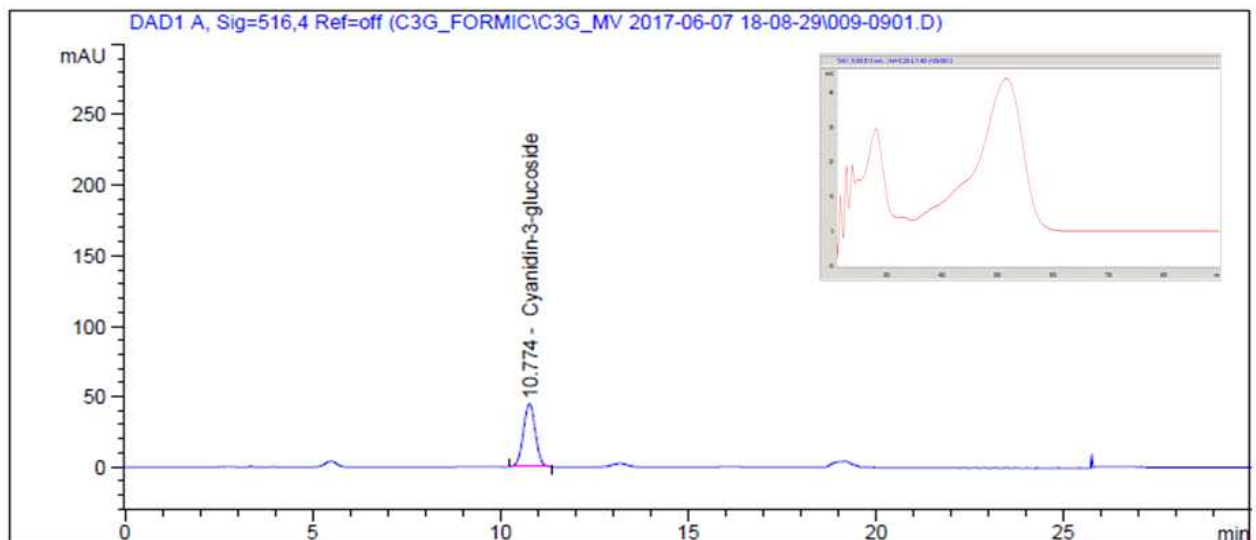


Figure 2-22. 시험용액의 HPLC 크로마토그램 및 스펙트럼

(3) 정확도

정의: 측정값이 이미 알고 있는 참조값에 근접한 정도

- 검체 중 이미 알고 있는 분석물질 함량의 50%, 100% 및 150% 등 3개 이상으로 첨가하여 3회 이상 반복 측정하고, 회수율을 구함

- 반복 측정의 경우 전처리부터 분석까지 일련의 과정 포함

<p>* 회수율 계산식</p> $\text{회수율}(\%) = C_f / C_u \times 100$ <p>C_f ; 분석한 분석대상물질의 함량</p> <p>C_u ; 첨가한 분석대상물질의 함량</p>
--

<Table 2-19> 반복측정에 따른 회수율

	함량(µg/mL)		
	18 (50%)	36 (100%)	54 (150%)
1	96.7	97.6	98.7
2	97.6	99.2	99.6
3	98.0	98.2	98.7
4	98.3	98.4	99.6
5	96.8	96.7	98.6
함량별 평균회수율(%)	97.5	98.0	99.0
전체 평균회수율(%)	98.2		
회수율 구간(%)	97.5~99.0		

(4) 정밀도

정의: 균일한 검체로 부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)

<Table 2-20> 반복성

	검체량		
	42.5 mg	85 mg	127.5 mg
1	7431.38	7633.18	7599.99
2	7634.14	7672.08	7561.02
3	7515.31	7566.50	7504.01
4	7728.49	7561.72	7569.22
5	7434.34	7553.37	7564.18
6	7524.82	7562.19	7612.77
분석값(µg/g)	7544.75	7591.51	7568.53
RSD(%) [검체 측정값에 대한 RSD]	1.55	0.65	0.50
RSD 구간(%)	0.50~1.55		

<Table 2-21> 재현성

	실험실	
	A	B
1	7633.18	7570.90
2	7672.08	7632.45
3	7566.50	7586.35
4	7561.72	7638.93
5	7553.37	7628.87
6	7562.19	7522.77
분석값(μg/g)	7591.51	7596.71
RSD(%) [검체 측정값에 대한 RSD]	0.60	

(5) 정량한계

정의: 적절한 정밀도와 정확도를 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량

- 검량선의 기울기(S) 및 표준편차(σ)를 이용
(정량한계 = 10×σ/S)

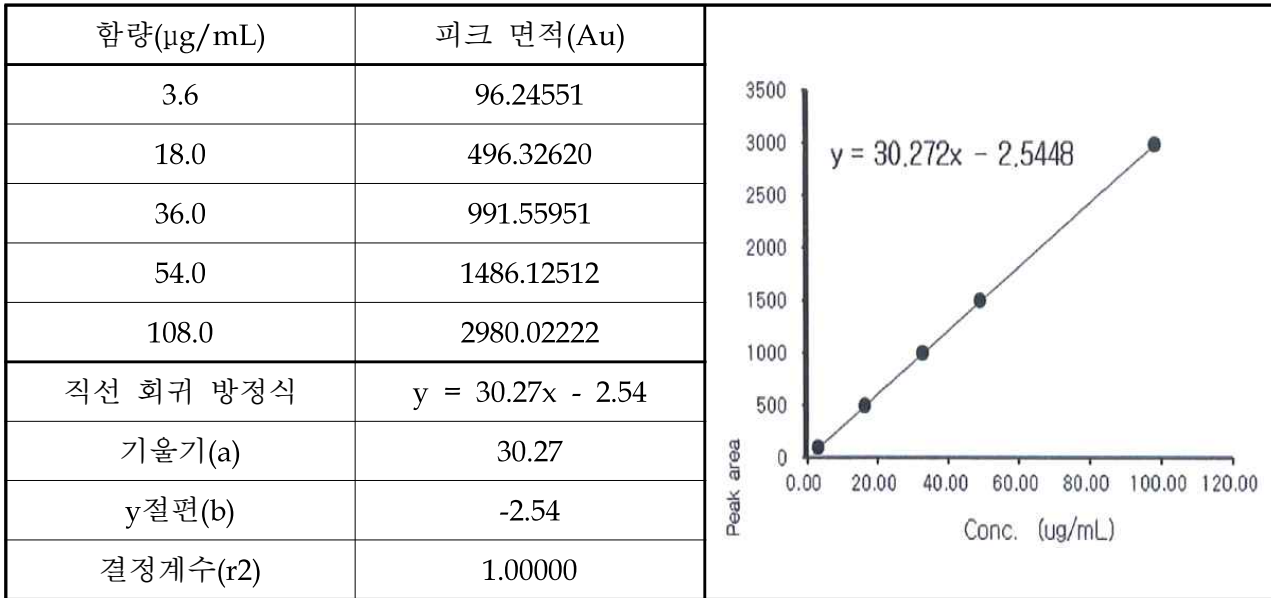
<Table 2-22> 검량선의 기울기 및 표준편차 이용

1		2		3	
함량(μg)	피크 면적(Au)	함량(μg)	피크 면적(Au)	함량(μg)	피크 면적(Au)
3.6	96.24551	3.6	92.71236	3.6	93.68751
18.0	496.32620	18.0	493.77521	18.0	497.14200
36.0	991.55951	36.0	988.88489	36.0	992.61029
54.0	1486.12512	54.0	1482.57544	54.0	1486.64966
108.0	2980.02222	108.0	2981.61450	108.0	2982.52539
기울기	30.27	기울기	30.32	기울기	30.31
y절편	-2.54	y절편	-6.67	y절편	-3.68
기울기 평균(s)	30.30		y절편의 표준편차(σ)	2.130	
정량한계	0.703				

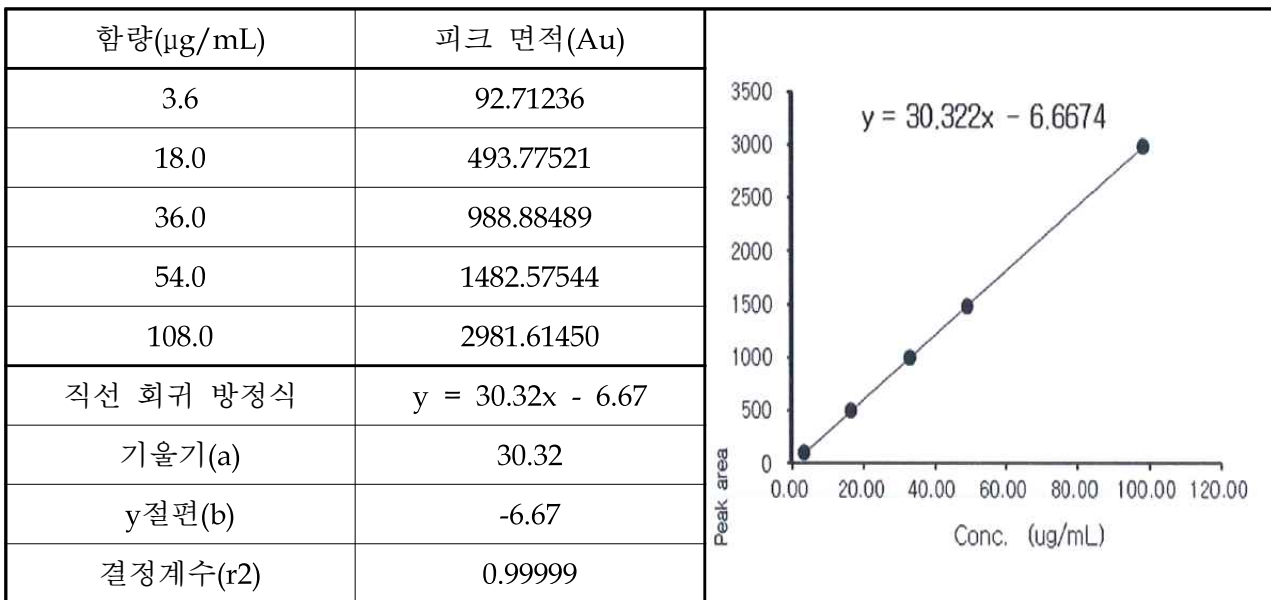
(6) 직선성

정의: 적절한 정밀도, 정확도 등을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력

<Table 2-23> 직선성 1차



<Table 2-24> 직선성 2차



<Table 2-25> 직선성 3차

함량(µg/mL)	피크 면적(Au)
3.6	93.68751
18.0	497.14200
36.0	992.61029
54.0	1486.64966
108.0	2982.52539
직선 회귀 방정식	$y = 30.31x - 3.68$
기울기(a)	30.31
y절편(b)	-3.68
결정계수(r2)	1.00000

	해당 함량
정확도 함량	- 해당 성분 36.0 µg/mL 함량의 시료에 18.0, 36.0, 54.0 µg 을 각각 첨가하여 측정
정밀도 함량	- 해당 성분 36.0 µg/mL 의 시료 반복 분석

결론

일반적으로 C3G는 항비만, 항당뇨, 생식능력 등의 연구에 많이 적용되고 있으며, 최근 연구에서는 항산화작용 및 암과 관련된 연구도 활발히 진행되고 있음. 또한, 식품 및 영양소 간에 특별한 이상반응이나 부작용 및 영양소 간 상호작용이 보고되지 않아 안전한 것으로 판단된다. C3G 분석결과 일정 함량이 유지되고 있으며, 기능(또는 지표)성분의 표준품도 일반적으로 상용화 되어 있으므로 추후 품질관리에 용이한 성분임을 확인함

마. 인체적용시험

(1) 인체적용시험용 제형 개발

- 캡슐제형 : 원활한 인체적용시험을 위한 제품으로 하니베리 분말이 포함된 캡슐형태의 제형 개발
- 1일 2회, 1회 2capsule 복용 490mg의 갈색 capsule로 제작

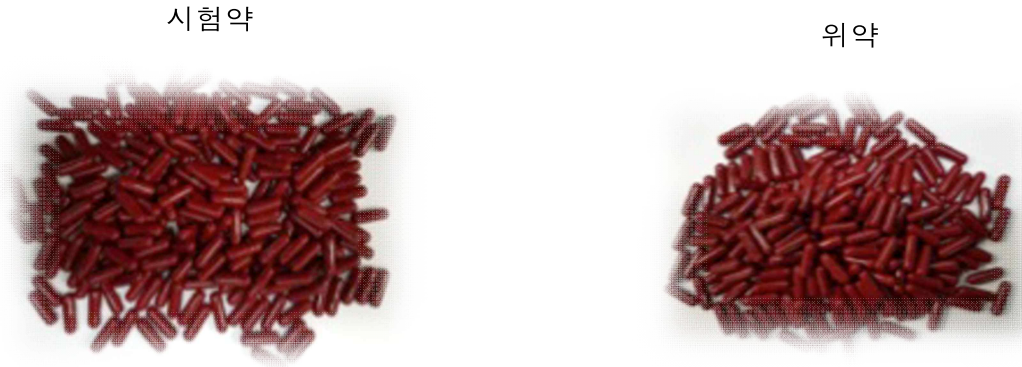


Figure 2-23. 인체적용시험용 식품

(2) 인체적용시험 계획서

<p>(주)아리바이오 Protocol No.: ARIBIO_DDE</p> <p>Confidential</p> <p style="text-align: center;">인체적용시험 계획서</p> <p style="text-align: center;">댕댕이나무열매(Lonicera caerulea L.) 투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험; 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">시험식품</td> <td>댕댕이나무열매 추출분말</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 책임자</td> <td>조애리 (내과 전문의)</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 공동연구자</td> <td>조인호 교수</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 실시기관</td> <td>양병원 경기도 남양주시 경춘로 933</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 지원기관</td> <td>농림축산식품부 농림식품기술기획평가원 고부가가치식품기술개발사업(11619-03)</td> </tr> </table> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p>본 인체적용시험은 국제 임상시험관리기준(ICH GCP)에 준하여 시행되었습니다. 본 보고서의 포함된 모든 정보는 인체적용시험 책임자의 서면 동의없이 공개될 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">Confidentiality statement</p> </div> <p style="text-align: center;">(주)아리바이오</p>	시험식품	댕댕이나무열매 추출분말	인체적용시험 책임자	조애리 (내과 전문의)	인체적용시험 공동연구자	조인호 교수	인체적용시험 실시기관	양병원 경기도 남양주시 경춘로 933	인체적용시험 지원기관	농림축산식품부 농림식품기술기획평가원 고부가가치식품기술개발사업(11619-03)	<p style="text-align: center;">인체적용시험시험 계획서 요약</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%;">인체적용시험 제목</td> <td>댕댕이나무열매 투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험; 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 계획서 번호</td> <td>Protocol No.: ARIBIO_DDE Version No.: 1.0</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 실시기관</td> <td>남양주 양병원 경기도 남양주시 경춘로 933</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 책임자</td> <td>남양주 양병원 내과의 조애리</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 공동연구자</td> <td>한국체육대학교 조인호 교수</td> </tr> <tr> <td>단계 및 디자인</td> <td>단 계 : 기타 (건강기능식품) 디자인 : 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 대상</td> <td>스크리닝 검사 시 혈중 AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 또는 GGT(γ-GTP)가 실시 기관의 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배 이하의 범위에 있는 자 (AST: 남 41-120U/L, 여 39-96U/L, ALT: 남 42-123, 여 33-99U/L, GGT: 남 72-213U/L, 여 43-126U/L) 중 하나 이상의 항목에 해당하는 자</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 식품</td> <td>시험식품 : 댕댕이나무열매 추출분말 대조식품 : Placebo</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 식품 섭취방법</td> <td>• 시험식품: 1일 2회, 1회 2캡슐(1,960mg, C3G: 7.5mg/day) • 대조식품: 시험식품과 동일한 방법으로 섭취</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 목적</td> <td>건강기능식품 기능성 원료로서 댕댕이나무열매 추출분말의 섭취 시 안전성 및 비알콜성 간기능 손상으로부터 간보호에 미치는 영향 규명</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험 방법</td> <td>본 시험은 이중눈가림, 무작위배정, 대조식품 비교, 병행설계 인체적용시험, 모집공고를 통해 본 시험에 지원한 자가 시험에 대해 충분히 이해하고 자의에 의해 참여할 것을 서면으로 동의하면, 혈액학적 검사 실시 후 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자에 한하여 시험군 또는 대조군에 1:1로 무작위 배정한다. 무작위 배정된 연구대상자는 시험용 식품을 배부 받고 매일 2회 고지린 방법으로 복용한다.</td> </tr> </table>	인체적용시험 제목	댕댕이나무열매 투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험; 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구	인체적용시험 계획서 번호	Protocol No.: ARIBIO_DDE Version No.: 1.0	인체적용시험 실시기관	남양주 양병원 경기도 남양주시 경춘로 933	인체적용시험 책임자	남양주 양병원 내과의 조애리	인체적용시험 공동연구자	한국체육대학교 조인호 교수	단계 및 디자인	단 계 : 기타 (건강기능식품) 디자인 : 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조	인체적용시험 대상	스크리닝 검사 시 혈중 AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 또는 GGT(γ -GTP)가 실시 기관의 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배 이하의 범위에 있는 자 (AST: 남 41-120U/L, 여 39-96U/L, ALT: 남 42-123, 여 33-99U/L, GGT: 남 72-213U/L, 여 43-126U/L) 중 하나 이상의 항목에 해당하는 자	인체적용시험 식품	시험식품 : 댕댕이나무열매 추출분말 대조식품 : Placebo	인체적용시험 식품 섭취방법	• 시험식품: 1일 2회, 1회 2캡슐(1,960mg, C3G: 7.5mg/day) • 대조식품: 시험식품과 동일한 방법으로 섭취	인체적용시험 목적	건강기능식품 기능성 원료로서 댕댕이나무열매 추출분말의 섭취 시 안전성 및 비알콜성 간기능 손상으로부터 간보호에 미치는 영향 규명	인체적용시험 방법	본 시험은 이중눈가림, 무작위배정, 대조식품 비교, 병행설계 인체적용시험, 모집공고를 통해 본 시험에 지원한 자가 시험에 대해 충분히 이해하고 자의에 의해 참여할 것을 서면으로 동의하면, 혈액학적 검사 실시 후 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자에 한하여 시험군 또는 대조군에 1:1로 무작위 배정한다. 무작위 배정된 연구대상자는 시험용 식품을 배부 받고 매일 2회 고지린 방법으로 복용한다.
시험식품	댕댕이나무열매 추출분말																																
인체적용시험 책임자	조애리 (내과 전문의)																																
인체적용시험 공동연구자	조인호 교수																																
인체적용시험 실시기관	양병원 경기도 남양주시 경춘로 933																																
인체적용시험 지원기관	농림축산식품부 농림식품기술기획평가원 고부가가치식품기술개발사업(11619-03)																																
인체적용시험 제목	댕댕이나무열매 투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험; 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구																																
인체적용시험 계획서 번호	Protocol No.: ARIBIO_DDE Version No.: 1.0																																
인체적용시험 실시기관	남양주 양병원 경기도 남양주시 경춘로 933																																
인체적용시험 책임자	남양주 양병원 내과의 조애리																																
인체적용시험 공동연구자	한국체육대학교 조인호 교수																																
단계 및 디자인	단 계 : 기타 (건강기능식품) 디자인 : 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조																																
인체적용시험 대상	스크리닝 검사 시 혈중 AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 또는 GGT(γ -GTP)가 실시 기관의 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배 이하의 범위에 있는 자 (AST: 남 41-120U/L, 여 39-96U/L, ALT: 남 42-123, 여 33-99U/L, GGT: 남 72-213U/L, 여 43-126U/L) 중 하나 이상의 항목에 해당하는 자																																
인체적용시험 식품	시험식품 : 댕댕이나무열매 추출분말 대조식품 : Placebo																																
인체적용시험 식품 섭취방법	• 시험식품: 1일 2회, 1회 2캡슐(1,960mg, C3G: 7.5mg/day) • 대조식품: 시험식품과 동일한 방법으로 섭취																																
인체적용시험 목적	건강기능식품 기능성 원료로서 댕댕이나무열매 추출분말의 섭취 시 안전성 및 비알콜성 간기능 손상으로부터 간보호에 미치는 영향 규명																																
인체적용시험 방법	본 시험은 이중눈가림, 무작위배정, 대조식품 비교, 병행설계 인체적용시험, 모집공고를 통해 본 시험에 지원한 자가 시험에 대해 충분히 이해하고 자의에 의해 참여할 것을 서면으로 동의하면, 혈액학적 검사 실시 후 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자에 한하여 시험군 또는 대조군에 1:1로 무작위 배정한다. 무작위 배정된 연구대상자는 시험용 식품을 배부 받고 매일 2회 고지린 방법으로 복용한다.																																

Figure 2-24. 인체적용시험 계획서

(3) IRB 승인

<p style="text-align: center;">양병원 생명윤리위원회 [IRB 제12-1호 서식] 1쪽</p> <p style="text-align: center;">결과통지서</p> <p>2017년 12월 27일에 접수된 인간대상연구 및 인체유래물연구 에 대하여 양병원 생명윤리위원회에서 심의하여 다음과 같이 결정하였음을 통지합니다.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%;">과제번호</td> <td style="width: 30%;">196452-HR-00008</td> <td style="width: 20%;">관리번호</td> <td style="width: 30%;">01</td> </tr> <tr> <td>연구과제명</td> <td colspan="3">하니메리(당당이나무영매)투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험: 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중실 연구</td> </tr> <tr> <td>연구책임자</td> <td>성명</td> <td>포에리 소속</td> <td>양병원 소화기내과</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>직위</td> <td>과장</td> </tr> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%;">심의대상</td> <td colspan="3"> <input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서(신규) <input type="checkbox"/> 연구계획서(시정/보완) </td> </tr> <tr> <td>심의일자</td> <td>2018년 1월 5일</td> <td>심의장소</td> <td>양병원 7층 회의실</td> </tr> <tr> <td>심의위원회</td> <td colspan="3">양병원 생명윤리위원회</td> </tr> <tr> <td>심의종류</td> <td colspan="3"> <input checked="" type="checkbox"/> 정규심의 <input type="checkbox"/> 신속심의 </td> </tr> <tr> <td>심의결과</td> <td colspan="3"> <input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 부정 <input type="checkbox"/> 중지/보류 </td> </tr> <tr> <td>승인일자</td> <td>2018년 1월 5일</td> <td>승인 유효기간</td> <td>2018년 1월 5일 - 2019년 1월 4일</td> </tr> <tr> <td>승인번호</td> <td colspan="3">196452-HR-00008</td> </tr> <tr> <td>심의의견</td> <td colspan="3"> 본 연구는 한국체육대학교 주판으로 양병원이 같이 참여하는 공동연구임. 연구대상자가 건강인의 범주라고 생각되며, 연구 프로토콜 상 본 기관에서 진행이 가능한 연구로 판단됨. </td> </tr> <tr> <td>심의된 서류</td> <td colspan="3"> 1. 연구계획서의신청서 2. 연구계획서 3. 연구계획서요약 4. 연구대상자 설명문 및 동의서 5. 응대기록서 6. 연구책임자 최근이력서 7. 이해상충공개서약서 8. 생명윤리준수서약서 9. 연구윤리교육 이수증 사본 </td> </tr> </table> <p style="font-size: small;">본 통지서에 기재된 사항은 양병원 생명윤리위원회에 기록된 내용과 일치함을 증명합니다. 본 양병원 생명윤리위원회는 생명윤리 및 안전에 관한 법률과 관련 법규를 준수합니다. 본 연구와 이해상충(Conflict of Interest)이 있는 위원회 있을 경우 연구의 심의에서 배제하였습니다. 본 통지서 사본은 양병원 생명윤리위원회에서 보관합니다. ver 1.0 (Feb 2014)</p>	과제번호	196452-HR-00008	관리번호	01	연구과제명	하니메리(당당이나무영매)투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험: 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중실 연구			연구책임자	성명	포에리 소속	양병원 소화기내과			직위	과장	심의대상	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서(신규) <input type="checkbox"/> 연구계획서(시정/보완)			심의일자	2018년 1월 5일	심의장소	양병원 7층 회의실	심의위원회	양병원 생명윤리위원회			심의종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정규심의 <input type="checkbox"/> 신속심의			심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 부정 <input type="checkbox"/> 중지/보류			승인일자	2018년 1월 5일	승인 유효기간	2018년 1월 5일 - 2019년 1월 4일	승인번호	196452-HR-00008			심의의견	본 연구는 한국체육대학교 주판으로 양병원이 같이 참여하는 공동연구임. 연구대상자가 건강인의 범주라고 생각되며, 연구 프로토콜 상 본 기관에서 진행이 가능한 연구로 판단됨.			심의된 서류	1. 연구계획서의신청서 2. 연구계획서 3. 연구계획서요약 4. 연구대상자 설명문 및 동의서 5. 응대기록서 6. 연구책임자 최근이력서 7. 이해상충공개서약서 8. 생명윤리준수서약서 9. 연구윤리교육 이수증 사본			<p style="text-align: center;">양병원 생명윤리위원회 [IRB 제12-1호 서식] 2쪽</p> <p>* 모든 연구자들은 아래의 사항을 준수하여야 합니다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 승인된 계획서에 따라 연구를 수행하여야 합니다. 2) 위원회의 승인을 받은 동의서를 사용하여야 합니다. 3) 모국어가 한국어가 아닌 연구대상자들에게는 승인된 동의서를 연구대상자의 모국어로 인쇄된 번역본을 사용할 것이며 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회의 승인을 받아야 합니다. 4) 연구진행에 있어 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행하여야 하며 연구대상자들의 보호를 위해 취해진 어떠한 응급상황에서의 변경도 즉각 위원회에 보고하여야 합니다. 5) 위원회에서 승인된 계획서에 따라 등록된 어떠한 연구대상자라도 사망, 입원, 심각한 질병에 대하여는 위원회에 사전으로 보고하여야 합니다. 6) 연구 또는 연구대상자의 안전에 대해 유해한 영향을 미칠 수 있는 어떠한 새로운 정보도 즉각적으로 위원회에 보고하여야 합니다. 7) 위원회의 요구가 있을 때에는 연구의 진행과 관련된 보고를 위원회에 제출하여야 합니다. 8) 위원회가 심의한 과제에 대해 조사 및 감독 차원에서 현장점검을 실시할 시 원활한 점검결과 진행을 위해 연구자는 연구진행과 관련된 서류를 준비하고 협조하여야 합니다. 9) 연구대상자 모집광고를 사용할 시에는 사용 전에 위원회의 승인을 받아야 합니다. 10) 동의는 강제 혹은 부당한 영향이 없는 상태에서 충분한 설명에 근거하여 수행되어야 하며, 잠재적인 연구대상자에게 연구에 참여부담을 고려할 수 있도록 충분한 기회를 제공하여야 합니다. 11) 연구자와 그밖에 이해당사자는 연구계획서 승인을 광고나 홍보, 상업적 목적으로 사용할 수 없습니다. 12) 위원회의 심의결과 시정요구에 대해 모두 이행 및 충족될 경우에만 연구를 진행할 수 있습니다. 13) 위원회가 시정 및 보완을 요구한 경우 시정/보완 계획을 3개월 이내에 본 위원회에 제출하여야 합니다. 심의일로부터 3개월 이내에 시정/보완 계획을 제출하지 않은 경우 심의가 무효화될 수 있습니다. 14) 시정계획은 신속심의로 진행되고 보완계획은 정규심의로 진행되며, 승인일과 승인 유효기간은 심의 결과에 따라 결정됩니다. 15) 승인기간 이후에도 연구를 지속하기 위해서는 적어도 승인 만료 2개월 전까지 연구의 진행 상황에 대하여 중간보고를 하여야 합니다. 16) 연구 종료 후 3개월 이내에 종료보고를 하여야 합니다. 17) 연구와 관련된 기록은 연구가 종료된 시점을 기준으로 최소 3년간 보관하여야 합니다. <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> 2018년 1월 5일 </div> <p style="text-align: center;">양 병원 생 명 윤 리 위 원 장 (인)</p> <p style="font-size: x-small;">본 통지서에 기재된 사항은 양병원 생명윤리위원회에 기록된 내용과 일치함을 증명합니다. 본 양병원 생명윤리위원회는 생명윤리 및 안전에 관한 법률과 관련 법규를 준수합니다. 본 연구와 이해상충(Conflict of Interest)이 있는 위원회 있을 경우 연구의 심의에서 배제합니다. 본 통지서 사본은 양병원 생명윤리위원회에서 보관합니다.</p>
과제번호	196452-HR-00008	관리번호	01																																																		
연구과제명	하니메리(당당이나무영매)투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험: 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중실 연구																																																				
연구책임자	성명	포에리 소속	양병원 소화기내과																																																		
		직위	과장																																																		
심의대상	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서(신규) <input type="checkbox"/> 연구계획서(시정/보완)																																																				
심의일자	2018년 1월 5일	심의장소	양병원 7층 회의실																																																		
심의위원회	양병원 생명윤리위원회																																																				
심의종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정규심의 <input type="checkbox"/> 신속심의																																																				
심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 부정 <input type="checkbox"/> 중지/보류																																																				
승인일자	2018년 1월 5일	승인 유효기간	2018년 1월 5일 - 2019년 1월 4일																																																		
승인번호	196452-HR-00008																																																				
심의의견	본 연구는 한국체육대학교 주판으로 양병원이 같이 참여하는 공동연구임. 연구대상자가 건강인의 범주라고 생각되며, 연구 프로토콜 상 본 기관에서 진행이 가능한 연구로 판단됨.																																																				
심의된 서류	1. 연구계획서의신청서 2. 연구계획서 3. 연구계획서요약 4. 연구대상자 설명문 및 동의서 5. 응대기록서 6. 연구책임자 최근이력서 7. 이해상충공개서약서 8. 생명윤리준수서약서 9. 연구윤리교육 이수증 사본																																																				

Figure 2-25. IRB 승인서

결 론

비음주자 중 AST, ALT가 정상범위 초과(환자기준 초과하지 않음)한 남녀성인 피험자 66 (시험군 33명, 플라시보 33명), 12주간의 RCT, DB, placebo대조시험, 검사항목: 인구학적조사, 음식섭취량, 혈청검사, 지방대사(FFA, cholesterol 등)/간기능검사(AST, ALT, GGT, ALP등) protocol 작성 후 임상기관-남양주 양병원/ CRO-케이제이파마텍, IRB신청 및 승인 완료

4. 2차년도 협동기관(가천대학교 산학협력단) 연구개발 및 결과

2차년도 개발 목표

- 협동기관(가천대학교 산학협력단) : in vivo 안전성 평가, in vivo 효능평가

가. In vivo 안전성 평가

1. 실험 내용

- 1-1. 실험동물 및 군 분류 (5주령 수컷, 암컷 ICR 마우스, 총 4개군, 군 당 5마리)

<Table 2-26> 실험군 분류

실험군	개체수	
	암컷	수컷
Control (D.W투여)	5	5
BH 500mg/kg.BW	5	5
BH 1000mg/kg.BW	5	5
BH 2000mg/kg.BW	5	5

* BH = Blue honeysuckle (Berries of *Lonicera caerulea* L., Caprifoliaceae)

1-2. 투여 기간 및 방법

- 단회 독성 시험을 위해 1회 경구투여, 2주 관찰 주 경구투여, 1일 1회
- 반복 독성 시험을 위해 12주 경구투여, 1일 1회, 12주 관찰

1-3. 측정항목 : 단회/ 반복독성 시험 동일

- 체중 측정
- 뇨검사
- 장기의 육안적 관찰, 무게 측정
- 혈액 검사 : 전혈검사 (complete blood count)는 ADIVIA® 2120i (Hematology system, SIEMENS, Germany)를 사용하여 WBC (white blood cell), HGB (hemoglobin), HCT (hematocrit), PLT (platelet) NE (neutrophil) LYP (percent of lymphocyte)

- 혈액 생화학검사 : Accute TBA-40FR (Toshiba Medical Systems Co., Japan)를 이용하여 총 17종 Glucose, BUN, Creatinine, Total protein, Albumin, A/G ratio, Total bilirubin, LDH, Cholesterol, Triglycerides, AST, ALT, ALP, Mg, Ca, Na, K 분석
- 소핵 검사 (micronucleus test) : 염색체 구조 이상을 쉽고 빨리 검색할 수 있는 방법

1-4. 통계 방법 : 모든 자료의 통계 분석은 SPSS software (SPSS 23, SPSS Inc., USA)을 이용하여 평균(mean)과 표준편차(S.D)로 나타내었음. 정상대조군, BH 500mg/kg, BH 1000 mg/kg, BH 2000mg/kg의 집단 간 차이검증은 t-test를 이용하여 분석하였으며 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였음

2. 단회 독성 시험 결과

2-1. 폐사율 및 임상조건

- 하니베리 동결건조 추출물을 각 농도별(500mg/kg, 1000mg/kg, 2000mg/kg)로 2주간 경구투여 후 암수 ICR mouse의 사망개체수를 관찰한 결과는 Table 2-27과 같음. 실험 기간 동안 대조군 및 시험물질 투여군에서 암수 마우스 모두 폐사 및 기타 임상증상(설사, 다뇨, 연변, 활동 저하현상, 진전 및 부종 등)이 관찰되지 않았음

<Table 2-27> Mortality and clinical signs of 2 weeks repeated oral dose toxicity studies of the BH.

Group	S/N*	Signs after 2 wks
Control	Male 0/5	None
	Female 0/5	None
500mg/kg BH	Male 0/5	None
	Female 0/5	None
1000mg/kg BH	Male 0/5	None
	Female 0/5	None
2000mg/kg BH	Male 0/5	None
	Female 0/5	None

S/N: Number of animals with the Sign/Number of animals examined.

2-2. 체중 측정

- 하니베리(BH) 추출물을 농도별로 경구투여 후 체중의 변화를 관찰한 결과는 Table 2-28과 같음. 2주간 체중 변화를 관찰한 결과 대조군과 하니베리를 투여한 시험군 모두에서 시간 경과에 따라 체중이 증가하였음

<Table 2-28> Body weight of male and female ICR mouse in 2 weeks oral dose toxicity study of the BH.

Group	Sex	Body Weight (g)					Weight Gain
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 7	Day 14	
Control	Male	31.62 ± 2.24	31.98 ± 2.66	32.30 ± 2.75	33.05 ± 0.78	35.40 ± 2.86	0.98 ± 4.18
	Female	24.88 ± 1.33	25.14 ± 0.80	24.80 ± 0.54	25.80 ± 0.72	26.73 ± 1.12	1.85 ± 1.65
500mg/kg BH	Male	32.90 ± 1.49	32.96 ± 1.58	33.18 ± 1.71	32.88 ± 3.50	36.04 ± 1.03	3.14 ± 0.6
	Female	25.54 ± 0.69	25.25 ± 0.91	25.00 ± 0.89	26.22 ± 1.00	27.46 ± 1.48	1.92 ± 0.93
1000mg/kg BH	Male	31.56 ± 1.86	31.44 ± 1.83	31.72 ± 2.22	33.02 ± 2.34	33.88 ± 3.14	2.32 ± 1.44
	Female	25.98 ± 2.71	26.08 ± 2.30	26.26 ± 2.18	26.72 ± 1.78	28.28 ± 2.63	2.30 ± 1.55
2000mg/kg BH	Male	30.82 ± 2.69	30.84 ± 2.85	31.28 ± 3.11	32.04 ± 2.91	32.12 ± 3.73	1.30 ± 1.28
	Female	27.18 ± 1.29	27.08 ± 1.10	26.90 ± 1.43	28.30 ± 1.28	29.15 ± 1.59	1.97 ± 1.27

Data are presented as mean ± standard deviation; Data were compared by the Student's t-test. Statistical significance was considered to be $p < 0.05$.

2-3. 조직의 절대적 무게

- 단회 독성 시험을 위해 경구투여 후 조직의 절대적 무게를 비교한 결과 암수 마우스 대조군과 시험물질 투여군 모두에서 간, 부신, 좌 우 정소, 좌 우 난소, 심장, 폐, 신장, 좌 우 부신, 신장, 자궁 심장 폐 비장 침샘의 무게가 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 투여 용량 의존적인 이상 변화도 관찰되지 않았음(Table 2-29)

<Table 2-29> Absolute organ weights of male and female ICR mouse in 2 weeks oral dose toxicity studies of the BH.

Group	Sex	Organ Weight (g)					
		Liver	Adrenal (Left)	Adrenal (Right)	Testis/Ovary (Left)	Testis/Ovary (Right)	Spleen
Control	Male	2.1774 ± 0.2029	0.0036 ± 0.0003	0.0039 ± 0.0007	0.1136 ± 0.0147	0.1207 ± 0.0108	0.1172 ± 0.0146
	Female	1.3644 ± 0.1343	0.0036 ± 0.0016	0.0046 ± 0.0007	0.0061 ± 0.0014	0.0064 ± 0.0015	0.1334 ± 0.0237
500 mg/kg BH	Male	1.9603 ± 0.1356	0.0028 ± 0.0007	0.0035 ± 0.0007	0.1195 ± 0.0139	0.1183 ± 0.0189	0.1126 ± 0.0145
	Female	1.2164 ± 0.0487	0.0026 ± 0.0005	0.0039 ± 0.0005	0.0072 ± 0.0008	0.0054 ± 0.0014	0.1997 ± 0.0110
1000 mg/kg BH	Male	1.9959 ± 0.2029	0.0032 ± 0.0003	0.0033 ± 0.0007	0.1074 ± 0.0147	0.1085 ± 0.0108	0.1000 ± 0.0146
	Female	1.4327 ± 0.2420	0.0044 ± 0.0007	0.0035 ± 0.0006	0.0087 ± 0.0036	0.0078 ± 0.0023	0.1347 ± 0.0367
2000 mg/kg BH	Male	1.9964 ± 0.3638	0.0032 ± 0.0005	0.0035 ± 0.0004	0.1000 ± 0.0211	0.1078 ± 0.0185	0.1027 ± 0.0133
	Female	1.3869 ± 0.1439	0.0046 ± 0.0007	0.0045 ± 0.0012	0.0092 ± 0.0043	0.0070 ± 0.0031	0.1346 ± 0.0172

Group	Sex	Organ Weight (g)				
		Kidney	Uterus	Heart	Lung	Salivary gland
Control	Male	0.2736 ± 0.0202	x	0.1408 ± 0.0067	0.1949 ± 0.0063	0.1061 ± 0.0133
	Female	0.1570 ± 0.0429	0.1321 ± 0.0637	0.1147 ± 0.0054	0.1791 ± 0.0137	0.0640 ± 0.0070
500 mg/kg BH	Male	0.2897 ± 0.0176	x	0.1307 ± 0.0083	0.1974 ± 0.0076	0.1065 ± 0.0110
	Female	0.1608 ± 0.0103	0.1442 ± 0.0645	0.1126 ± 0.0086	0.1697 ± 0.0071	0.0708 ± 0.0106
1000 mg/kg BH	Male	0.2597 ± 0.0336	x	0.1367 ± 0.0099	0.1878 ± 0.0142	0.0931 ± 0.0097
	Female	0.1636 ± 0.0125	0.0826 ± 0.0080	0.1143 ± 0.0078	0.1809 ± 0.0135	0.0808 ± 0.0172
2000 mg/kg BH	Male	0.2720 ± 0.0352	x	0.1346 ± 0.0199	0.1929 ± 0.0229	0.1024 ± 0.0155
	Female	0.1770 ± 0.0103	0.1699 ± 0.0791	0.1320 ± 0.0206	0.1940 ± 0.0175	0.0699 ± 0.0079

Data are presented as mean ± standard deviation; Data were compared by the Student's t-test. Statistical significance was considered to be $p < 0.05$.

2-4. 조직의 상대적 무게

- 조직의 상대적 무게를 비교한 결과 암수 마우스 대조군과 시험물질 투여군 모두에서 간, 부신, 좌 우 정소, 좌 우 난소, 심장, 폐, 신장, 좌 우 부신, 신장, 자궁, 심장, 폐, 비장, 침샘의 무게가 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 투여 용량 의존적인 이상 변화도 관찰되지 않았음(Table 2-30)

<Table 2-30> Relative organ weights of male and female ICR mouse in 2 weeks oral dose toxicity studies of the BH.

Group	Sex	Organ Weight (%)					
		Liver	Adrenal (Left)	Adrenal (Right)	Testis/Ovary (Left)	Testis/Ovary (Right)	Spleen
		2 weeks	2 weeks	2 weeks	2 weeks	2 weeks	2 weeks
Control	Male	6.1065±0.6424	0.0112±0.0026	0.0119±0.0025	0.3312±0.0445	0.3695±0.0419	0.3612±0.0547
	Female	5.1194±0.4744	0.0135±0.0057	0.0171±0.0029	0.0231±0.0052	0.0239±0.0057	0.5011±0.0919
500mg/kg BH	Male	5.5342±0.2229	0.0079±0.0017	0.0127±0.002	0.3323±0.0461	0.3283±0.0524	0.3174±0.0419
	Female	4.8424±0.3398	0.0096±0.002	0.0152±0.0016	0.0254±0.003	0.0208±0.0056	0.7624±0.023
1000mg/kg BH	Male	5.8903±0.2504	0.0098±0.0008	0.0116±0.0021	0.3215±0.0674	0.3247±0.0606	0.2981±0.0607
	Female	5.0447±0.4848	0.0155±0.0018	0.0125±0.0018	0.0309±0.0124	0.0281±0.0096	0.4718±0.0987
2000mg/kg BH	Male	6.2121±1.0062	0.0108±0.0022	0.0125±0.0022	0.3118±0.0634	0.3369±0.0587	0.3202±0.0243
	Female	4.7483±0.2023	0.0159±0.0025	0.0155±0.0044	0.0315±0.0127	0.0245±0.0100	0.4608±0.0365

Group	Sex	Organ Weight (%)				
		Kidney	Uterus	Heart	Lung	Salivary gland
		2 weeks	2 weeks	2 weeks	2 weeks	2 weeks
Control	Male	0.7920±0.0631	-	0.4352±0.0502	0.6005±0.0399	0.3253±0.0270
	Female	0.5885±0.1573	0.4947±0.2382	0.4307±0.0218	0.6717±0.038	0.2406±0.0303
500mg/kg BH	Male	0.8034±0.0309	-	0.4035±0.0149	0.5978±0.0137	0.2963±0.039
	Female	0.5874±0.0576	0.5197±0.2119	0.4103±0.0289	0.6191±0.0393	0.2584±0.0408
1000mg/kg BH	Male	0.7671±0.072	-	0.4044±0.0172	0.5560±0.0343	0.3265±0.0348
	Female	0.5793±0.0178	0.295±0.0443	0.4053±0.0259	0.6407±0.0206	0.2834±0.0354
2000mg/kg BH	Male	0.8473±0.0648	-	0.4193±0.0359	0.6009±0.0298	0.3202±0.0419
	Female	0.6084±0.0401	0.5762±0.2127	0.4555±0.0763	0.6683±0.074	0.2410±0.0315

Data are presented as mean ± standard deviation; Data were compared by the Student's t-test. Statistical significance was considered to be p < 0.05.

2-5. 혈액 검사

- 혈액 중 헤모글로빈(HGB), 헤마토크릿(HCT), 백혈구(WBC), 중성구(Neut), 림프구(Lymph), 혈소판(PLT)을 측정 한 결과 대조군과 시험군에서 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 2-31)

<Table 2-31> Hematological values of male and female ICR mouse in 2 weeks oral dose toxicity studies of the BH.

Group	Sex	Hematological values after 2wks					
		HGB (g/dL)	HCT (%)	WBC (K/μL)	Neut (K/μL)	Lymph (K/μL)	PLT (K/μL)
Control	Male	13.35±0.32	47.05±0.88	5.71±1.29	0.98±0.18	3.9±1.01	1120.0±132.5
	Female	14.34±1.37	51.16±5.39	3.17±0.6	0.45±0.12	1.97±0.8	790.2±183.09
500 mg/kg BH	Male	12.46±1.21	43.68±3.65	4.31±0.96	0.69±0.11	3.31±0.8	1130.6±116.37
	Female	13.16±3.71	48.36±2.79	2.5±1.57	0.42±0.14	2.03±1.34	784.6±150.00
1000 mg/kg BH	Male	12.01±1.33	41.16±5.94	4.83±1.29	0.78±0.09	3.92±1.3	1107.7±249.85
	Female	13.72±4.94	49.36±7.23	2.53±1.72	0.41±0.22	1.84±1.16	696.8±148.07
2000 mg/kg BH	Male	12.74±3.11	47.38±13.27	4.39±1.84	0.76±0.21	3.36±1.43	1140.2±270.73
	Female	13.36±4.95	46.32±7.21	3.85±1.76	0.45±0.26	3.09±1.37	907.2±160.00

Data are presented as mean ± standard deviation; Data were compared by the Student's t-test. Statistical significance was considered to be p < 0.05.

HGB: hemoglobin, HCT: hematocrit, WBC: white blood corpuscles, Neut: neutrophil, Lymph: lymphocyte, PLT: platelet.

2-6. 생화학적 검사

- 생화학적 검사에서 혈중 질소량(BUN), 알부민(ALB), 글로블린(Globulin), 알부민과 글로

블린의 비율(AG), 크레아틴(CREA), 총빌리루빈의 양(T_BIL), 포도당(GLU), 총콜레스테롤 수치(CHOL)를 대조군과 하니베리 500mg/kg, 1000mg/kg, 2000mg/kg 투여군에서 비교한 결과 유의적인 차이를 보이지 않았음. 또한 간 기능지표인 AST, ALT와 ALP, CPK와 칼슘, 인, 총 단백질 함량, 나트륨, 칼륨의 함량을 비교한 결과, AST 수치는 수컷에서 대조군과 비교해 하니베리 투여 세군에서 유의적으로 낮은 수치를 보였으며, ALT 수치는 암컷에서 하니베리 500mg/kg 투여군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음. 그 외 다른 지표들은 대조군과 시험물질 투여군 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 2-32)

<Table 2-32> Biochemistry analysis of male and female ICR mouse in 2 weeks oral dose toxicity studies of the BH.

Group	Sex	Serum Biochemistry values after 2wks								
		BUN	ALB	Globulin	AG	CREA	T_BIL	GLU	TG	CHOL
Control	Male	23.70±7.39	4.70±1.25	0.76±0.31	5.69±1.99	0.00±0.00	0.68±0.11	324±83.17	198±64.46	184±22.99
	Female	18.80±3.21	4.30±0.91	0.75±0.24	5.11±1.94	0.00±0.00	0.80±0.4	223±23.87	175±48.66	110±15.00
500 mg/kg BH	Male	23.20±2.84	4.70±0.76	1.14±0.24	5.64±0.47	0.00±0.00	0.77±0.18	327±51.91	191±36.12	183±34.21
	Female	15.30±2.80	4.70±0.76	1.02±0.43	5.12±1.63	0.00±0.00	0.60±0.19	258±42.22	172±21.68	112±25.98
1000 mg/kg BH	Male	22.88±1.18	4.20±0.57	0.79±0.26	5.66±1.36	0.00±0.00	0.78±0.07	308±53.69	190±64.71	153±36.84
	Female	14.00±3.69	4.20±0.27	0.93±0.24	4.81±1.46	0.00±0.00	0.58±0.17	251±33.05	174±40.99	99±21.33
2000 mg/kg BH	Male	21.00±5.10	4.20±0.84	0.89±0.25	5.83±0.65	0.00±0.00	0.79±0.19	319±109.0	182±44.94	149±52.37
	Female	15.63±3.33	3.38±1.6	0.93±0.25	4.98±2.38	0.00±0.00	0.94±0.22	251.25±83.4	175±41.43	94±39.66

Group	Sex	Serum Biochemistry values after 2wks								
		AST	ALT	ALP	CPK	CA	PHOS	TP	Na	K
Control	Male	57.90±5.6	39.60±6.0	87.00±15.25	146.00±55.05	8.00±4.40	37.87±21.7	5.46±1.54	170.00±18.71	4.20±1.20
	Female	49.20±17.08	30.20±4.11	97.00±28.42	104.00±76.76	14.00±5.76	14.34±5.91	5.05±1.00	174.00±5.84	6.70±2.14
500 mg/kg BH	Male	41.80±8.66*	32.00±3.6	66.00±30.90	110.00±50.12	10.40±5.21	18.48±10.9	5.84±0.99	180.00±17.1	5.20±1.15
	Female	43.00±15.25	23.90±4.5†	102.00±17.89	120.00±42.57	22.30±10.61	17.21±6.85	5.72±1.15	150.00±12.25	5.00±0.71
1000 mg/kg BH	Male	35.60±10.53*	33.10±8.8	86.00±31.30	107.00±10.95	10.10±8.12	16.18±7.22	4.99±0.83	173.00±9.24	4.70±0.76
	Female	42.90±3.93	24.40±5.72	99.00±16.36	110.00±34.53	23.80±11.94	18.28±11.9	5.13±0.34	165.00±6.12	5.80±0.45
2000 mg/kg BH	Male	33.60±11.60*	29.20±6.3	57.00±24.65	100.00±18.84	13.70±8.26	13.30±4.32	5.09±1.07	164.00±6.64	4.00±2.21
	Female	31.25±7.80	25.25±7.2	66.25±39.24	98.75±21.75	19.63±13.37	16.15±5.40	4.30±1.53	167.78±7.27	5.86±2.00

Data are presented as mean ± standard deviation; Data were compared by the Student's t-test. Statistical significance was considered to be p < 0.05.

* indicating a significant difference between the male groups(p<0.05)

† indicating a significant difference between the female groups(p<0.05).

BUN: blood urea nitrogen, ALB: albumin, AG: Albumin/Globulin, CREA: creatinine, T_BIL: Total bilirubin, GLU: glucose, TG: triglyceride, CHOL: cholesterol, AST: glutamic oxaloacetic transaminase, ALT: glutamic pyruvic transaminase, ALP: alkaline phosphatase, CPK: creatine phosphokinase, CA: calcium, PHOS: Phosphorus, TP: total protein, Na: sodium, K: potassium.

2-7. 소핵시험

- 하니베리 추출물 투여에 따른 돌연변이 유발성을 평가하기 위한 분석으로 소핵시험 (micronucleus test)을 실시하였음. 소핵시험 결과 시험물질 투여량 증가에 따른 독성은 보이지 않는 것으로 확인되었음(Figure 2-26)

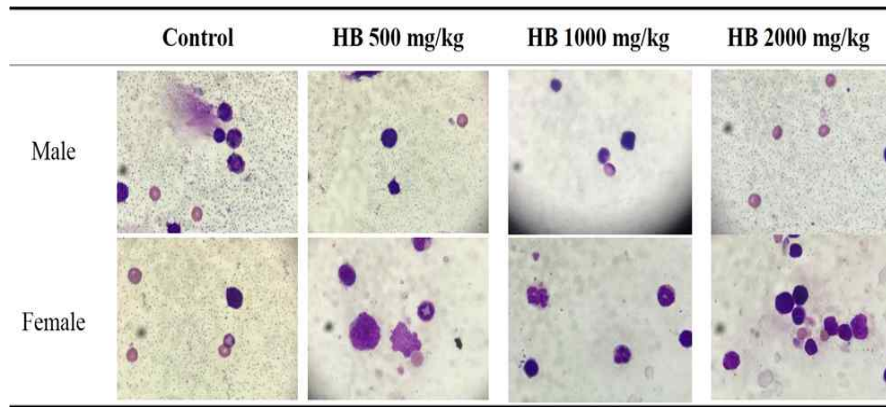


Figure 2-26. Micronucleus test of 2 weeks oral dose toxicity studies of the BH.

3. 반복 독성 시험 결과

3-1. 폐사율 및 임상조건

- 하니베리 동결건조 추출물을 각 농도별(500mg/kg, 1000mg/kg, 2000mg/kg)로 12주간 경구투여 후 암수 ICR mouse의 사망개체수를 관찰한 결과는 아래 표에 나타내었음. 실험기간 동안 암수 마우스 모두 대조군 및 시험물질 투여군에서 폐사 및 기타 임상증상(설사, 다뇨, 연변, 활동 저하현상, 진전 및 부종 등)이 관찰되지 않았음(Table 2-33)

<Table 2-33> Mortality and clinical sign of 12 weeks repeated oral dose toxicity studies of the BH.

Group	S/N*	Signs after 12 wks
Control	Male 0/5	None
	Female 0/5	None
500mg/kg BH	Male 0/5	None
	Female 0/5	None
1000mg/kg BH	Male 0/5	None
	Female 0/5	None
2000mg/kg BH	Male 0/5	None
	Female 0/5	None

*S/N: Number of animals with the Sign/Number of animals examined

3-2. 체중 측정

- 암수 마우스에게 하니베리 추출물을 농도별로 경구투여 후 체중의 변화를 관찰한 결과 12주간 체중 변화를 관찰한 결과 대조군과 하니베리를 투여한 시험군 모두에서 시간 경과에 따라 체중이 증가하였음(Table 2-34)

<Table 2-34> Body weight of male and female ICR mouse in 12 weeks repeated oral dose toxicity study of the BH.

Group	Sex	Body Weight (g)	Weight Gain
-------	-----	-----------------	-------------

		Day 0	Week 1	Week 4	Week 8	Week 12	
Control	Male	31.08 ± 0.65	31.64 ± 0.78	36.12 ± 1.88	39.16 ± 2.33	41.86 ± 2.23	10.8±2.2
	Female	26.3 ± 1.52	27.10 ± 1.61	31.48 ± 2.79	32.73 ± 2.05	34.33 ± 2.48	7.9±1.5
500mg/kg BH	Male	31.76 ± 2.42	33.36 ± 3.39	37.38 ± 3.73	39.80 ± 4.29	42.36 ± 4.61	10.6±2.4
	Female	25.72 ± 1.07	26.58 ± 0.64	29.94 ± 1.53	32.92 ± 1.80	33.40 ± 1.50	7.7±1.2
1000mg/kg BH	Male	34.16 ± 2.25	36.64 ± 2.34	40.12 ± 2.07	43.28 ± 2.13	41.40 ± 1.93	10.6±1.2
	Female	26.46 ± 2.18	27.28 ± 1.98	30.34 ± 3.12	32.84 ± 2.77	34.42 ± 2.78	8.0±1.7
2000mg/kg BH	Male	31.3 ± 1.22	34.44 ± 1.58	38.16 ± 2.24	40.58 ± 2.65	42.60 ± 2.72	11.3±1.8
	Female	26.3 ± 0.88	27.80 ± 1.47	31.58 ± 1.70	34.28 ± 1.80	34.12 ± 2.87	7.8±2.5

Data are presented as mean ± standard deviation; Data were compared by the Student's t-test. Statistical significance was considered to be p < 0.05.

3-3. 조직의 절대적 무게

○ 반복 독성 시험을 위해 12주 경구투여 후 조직의 절대적 무게를 비교한 결과 암수 마우스 대조군과 시험물질 투여군에서 간, 부신, 좌측 정소, 좌 우 난소, 심장, 폐, 신장, 좌 우 부신, 신장, 자궁, 심장, 폐, 비장, 침샘의 무게가 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 투여 용량 의존적인 이상 변화도 관찰되지 않았음(Table 2-35). 그러나 수컷의 2000mg/kg 투여군에서 우측 정소에서만 유의적으로 낮은 무게를 나타냈음. 추가적으로 정자의 운동성 및 활동성을 측정하기 위해 CASA(Computer Assisted Sperm Analysis) 이용하여 정자수를 측정한 결과 대조군에 비해 하니베리 투여군의 정자수가 유의적인 차이를 보이지 않았음 (Figure 2-27)

<Table 2-35> Absolute organ weights of male and female ICR mouse in 12 weeks repeated oral dose toxicity studies of the BH.

Group	Sex	Organ Weight (g)					
		Liver	Adrenal (Left)	Adrenal (Right)	Testis/Ovary (Left)	Testis/Ovary (Right)	Spleen
Control	Male	2.0926 ± 0.1048	0.0031 ± 0.0023	0.0034 ± 0.0013	0.1291 ± 0.0097	0.1349 ± 0.0096	0.1100 ± 0.0220
	Female	1.4865 ± 0.1525	0.0059 ± 0.0017	0.0046 ± 0.0023	0.0158 ± 0.0041	0.0137 ± 0.0091	0.1351 ± 0.0305
500mg/kg BH	Male	2.1083 ± 0.2197	0.0024 ± 0.0006	0.0029 ± 0.0011	0.1279 ± 0.0103	0.1353 ± 0.1261	0.3195 ± 0.0591
	Female	1.4327 ± 0.2420	0.0066 ± 0.0035	0.0068 ± 0.0060	0.01389 ± 0.0030	0.0084 ± 0.0030	0.1724 ± 0.0836
1000mg/kg BH	Male	2.2399 ± 0.2279	0.0022 ± 0.0014	0.0023 ± 0.0014	0.1342 ± 0.0129	0.1403 ± 0.0131	0.1272 ± 0.0267
	Female	1.5417 ± 0.2080	0.0232 ± 0.0194	0.0138 ± 0.0117	0.0140 ± 0.0166	0.0152 ± 0.0151	0.1587 ± 0.0379
2000mg/kg BH	Male	2.0381 ± 0.1743	0.0035 ± 0.0013	0.0033 ± 0.0010	0.1091 ± 0.0220	0.1079 ± 0.0122*	0.1263 ± 0.0242
	Female	1.5442 ± 0.2506	0.0071 ± 0.0053	0.0062 ± 0.0076	0.0118 ± 0.0069	0.0150 ± 0.0079	0.1501 ± 0.0377

Group	Sex	Organ Weight (g)				
		Kidney	Uterus	Heart	Lung	Salivary gland
Control	Male	0.3251 ± 0.0187	x	0.1737 ± 0.0120	0.1806 ± 0.0387	0.1320 ± 0.0296
	Female	0.2194 ± 0.0104	0.1397 ± 0.0440	0.1595 ± 0.0088	0.1922 ± 0.0227	0.1117 ± 0.0214
500mg/kg BH	Male	0.3195 ± 0.0591	x	0.1858 ± 0.0266	0.1920 ± 0.0226	0.1445 ± 0.0204
	Female	0.2070 ± 0.0166	0.1854 ± 0.0622	0.1387 ± 0.0207	0.1930 ± 0.0190	0.1041 ± 0.0326
1000mg/kg BH	Male	0.3252 ± 0.1239	x	0.1876 ± 0.0235	0.2382 ± 0.0406	0.1449 ± 0.0160
	Female	0.2027 ± 0.0703	0.2258 ± 0.1389	0.1676 ± 0.0384	0.2099 ± 0.0400	0.1444 ± 0.0471
2000mg/kg BH	Male	0.3392 ± 0.0545	x	0.1823 ± 0.0223	0.2065 ± 0.0098	0.1519 ± 0.0154
	Female	0.1998 ± 0.0398	0.1660 ± 0.0254	0.4934 ± 0.7659	0.1877 ± 0.0214	0.0933 ± 0.0076

Data are presented as mean ± standard deviation; Data were compared by the Student's t-test. Statistical significance was considered to be p < 0.05.

* indicating a significant difference between the male groups(p<0.05)

† indicating a significant difference between the female groups(p<0.05).

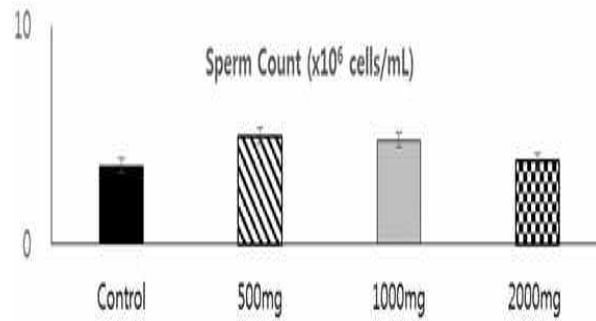


Figure 2-27. Sperm count after 12 wks administration of Honeyberry

3-4. 조직의 상대적 무게

○ 조직의 상대적 무게를 비교한 결과 암수 마우스 대조군과 시험물질 투여군 모두에서 간, 부신, 좌측 정소, 좌 우 난소, 심장, 폐, 신장, 좌 우 부신, 신장, 자궁, 심장, 폐, 비장, 침샘의 무게가 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 투여 용량 의존적인 이상 변화도 관찰되지 않았음. 수컷의 절대적 정소 무게가 하니베리 2000mg/kg 투여군에서 낮게 나타난 것과 같이 상대적 무게도 유의적으로 낮게 나타났으나, 정자 수에 영향을 미치지 않음을 확인하였음(Table 2-36)

<Table 2-36> Relative organ weights of male and female ICR mouse in 12 weeks repeated oral dose toxicity studies of the BH.

Group	Sex	Organ Weight (%)					
		Liver	Adrenal (left)	Adrenal (Right)	Testis/Ovary (Left)	Testis/Ovary (Right)	Spleen
		12 Weeks	12 Weeks	12 Weeks	12 Weeks	12 Weeks	12 Weeks
Control	Male	5.0043±0.2382	0.0073±0.005	0.008±0.0025	0.3081±0.0089	0.3222±0.0097	0.2625±0.0497
	Female	4.3406±0.1715	0.0175±0.0062	0.0138±0.0075	0.0465±0.0136	0.0406±0.0278	0.3918±0.0639
500mg/kg BH	Male	4.9822±0.2155	0.0058±0.0022	0.007±0.0033	0.3091±0.0411	0.3214±0.0332	0.3023±0.0732
	Female	4.4844±0.2644	0.0163±0.0136	0.0169±0.0193	0.0464±0.0083	0.0251±0.017	0.5127±0.2402
1000mg/kg BH	Male	4.9932±0.3716	0.003±0.0036	0.0051±0.003	0.3007±0.0389	0.3141±0.0385	0.2841±0.0601
	Female	4.4711±0.3691	0.0698±0.0647	0.0384±0.0305	0.0389±0.0434	0.0428±0.0394	0.4594±0.0877
2000mg/kg BH	Male	4.7835±0.269	0.0083±0.0032	0.0076±0.0022	0.2551±0.041*	0.2529±0.0156*	0.2969±0.0586
	Female	4.5446±0.8266	0.0204±0.014	0.0175±0.0204	0.0349±0.0188	0.045±0.0249	0.4437±0.1232

Group	Sex	Organ Weight (%)				
		Kidney	Uterus	Heart	Lung	Salivary gland
		12 Weeks	12 Weeks	12 Weeks	12 Weeks	12 Weeks
Control	Male	0.7784±0.0631	-	0.4152±0.0233	0.429±0.0761	0.3148±0.0665
	Female	0.643±0.0344	0.4153±0.1476	0.4692±0.0516	0.5635±0.067	0.3277±0.0638
500mg/kg BH	Male	0.7597±0.1541	-	0.4415±0.0684	0.4579±0.0743	0.343±0.0517
	Female	0.6199±0.0441	0.5558±0.1851	0.4147±0.0537	0.5774±0.046	0.3116±0.0953
1000mg/kg BH	Male	0.7309±0.281	-	0.4192±0.053	0.5298±0.0706	0.3232±0.0303
	Female	0.5783±0.1742	0.654±0.3774	0.4832±0.079	0.6067±0.0759	0.4303±0.1849
2000mg/kg BH	Male	0.7933±0.0879	-	0.4275±0.0403	0.4863±0.037	0.358±0.0466
	Female	0.5915±0.1346	0.4901±0.092	1.5286±2.4519	0.5502±0.0413	0.2736±0.0114

Data are presented as mean ± standard deviation; Data were compared by the Student's t-test. Statistical significance was considered to be p < 0.05.

* indicating a significant difference between the male groups(p<0.05)

† indicating a significant difference between the female groups(p<0.05).

3-5. 혈액 수치

- 반복 독성을 관찰하기 위해 12주간 하니베리를 경구투여한 후 혈액에서 헤모글로빈(HGB), 헤마토크릿(HCT), 백혈구(WBC), 중성구(Neut), 림프구(Lymph), 혈소판(PLT)을 측정된 결과 대조군과 하니베리 투여군에서 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 2-37)

<Table 2-37> Hematological values of male and female ICR mouse in 12 weeks repeated oral dose toxicity studies of the BH.

Group	Sex	Hematological values after 12wks					
		HGB (g/dL)	HCT (%)	WBC (K/ μ L)	Neut (%)	Lymph (%)	PLT (K/ μ L)
Control	Male	12.35±0.99	44.28±1.99	3.47±1.44	10.43±2.78	80.20±6.46	1284.25±269.72
	Female	13.20±1.41	46.06±5.34	4.43±0.79	11.84±3.63	79.54±4.55	1291.80±124.78
500mg/kg BH	Male	12.33±0.6	44.87±2.34	3.79±1.51	10.60±8.31	76.03±6.54	1509.33±70.61
	Female	13.50±0.25	43.23±2.97	4.20±0.91	12.43±1.76	77.61±1.56	1655.75±130.58
1000mg/kg BH	Male	13.35±0.52	45.73±1.56	3.33±2.16	12.20±2.60	75.63±2.99	1520.25±102.92
	Female	13.92±1.18	46.18±4.35	4.77±2.43	11.00±1.98	80.04±5.55	1313.00±245.37
2000mg/kg BH	Male	12.53±0.97	43.00±2.23	3.79±1.40	13.65±3.92	77.70±7.14	1342.75±320.24
	Female	13.20±0.49	44.30±0.57	4.19±0.03	11.35±1.45	74.55±4.28	1237.50±128.34

Data are presented as mean \pm standard deviation; Data were compared by the Student's t-test. Statistical significance was considered to be $p < 0.05$.

HGB: hemoglobin, HCT: hematocrit, WBC: white blood corpuscles, Neut: neutrophil, Lymph: lymphocyte, PLT: platelet.

3-6. 생화학적 검사

- 생화학적 검사에서 혈중 질소량(BUN), 알부민(ALB), 글로블린(Globulin), 알부민과 글로블린의 비율(AG), 크레아틴(CREA), 총빌리루빈의 양(T_BIL), 포도당(GLU), 총콜레스테롤 수치(CHOL)를 대조군과 하니베리 500mg/kg, 1000mg/kg, 2000mg/kg 투여군에서 유의적으로 차이를 보이지 않았음. 또한 간 기능 지표인 AST, ALT와 ALP, CPK, 무기질인 칼슘, 인, 총 단백질 함량, 나트륨, 칼륨의 함량을 측정된 결과 대조군과 시험물질 투여군 사이에 유의적인 보이지 않았음. 특히 AST 수치는 암컷의 경우 하니베리 2000mg/kg 투여군에서만 대조군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보였음(Table 2-38)

<Table 2-38> Biochemistry values of male and female ICR mouse in 12 weeks repeated oral dose toxicity studies of the BH.

Group	Sex	Serum Biochemistry values after 12wks								
		BUN	ALB	Globulin	AG	CREA	T_BIL	GLU	TG	CHOL
Control	Male	49.64±8.97	3.30±0.38	1.70±0.21	1.25±0.23	0.10±0.01	0.53±0.28	252.40±26.74	187.80±30.14	142.20±22.73
	Female	50.28±12.03	3.20±0.14	1.72±0.21	2.14±0.35	0.04±0.05	0.34±0.08	225.20±26.72	153.20±25.52	94.00±25.81
500 mg/kg BH	Male	47.74±2.00	3.36±0.24	1.69±1.21	1.32±4.26	0.12±0.05	0.44±0.07	265.40±25.3	179.20±7.73	167.00±7.71
	Female	50.64±4.99	3.28±0.11	1.72±0.25	2.06±0.29	0.04±0.07	0.28±0.14	236.80±26.71	141.60±59.74	94.40±28.51
1000 mg/kg BH	Male	49.08±6.94	3.32±0.23	1.60±0.07	1.28±0.17	0.13±0.03	0.49±0.26	274.40±32.66	211.20±72.8	143.60±23.64
	Female	50.12±7.44	3.20±0.28	1.68±0.29	2.04±0.28	0.04±0.08	0.29±0.13	241.60±46.57	128.80±15.53	90.00±16.91
2000 mg/kg BH	Male	50.68±8.49	3.24±0.26	1.76±0.22	1.38±0.36	0.11±0.02	0.50±0.13	271.20±32.56	198.00±27.46	138.00±15.56
	Female	49.24±6.95	2.96±0.26	1.70±0.20	2.25±0.18	0.03±0.05	0.30±0.15	205.60±36.4	124.00±33.41	106.40±63.08

		AST	ALT	ALP	CPK	CA	PHOS	TP	Na	K
Control	Male	34.02±6.51	37.85±4.15	27.80±10.62	29.00±6.89	29.04±7.87	7.21±2.15	5.14±0.31	146.80±2.39	7.24±0.60
	Female	35.84±5.85	25.84±3.01	30.80±4.04	29.60±11.44	33.68±11.54	10.73±2.59	4.72±0.27	153.20±9.65	7.08±0.98
500 mg/kg BH	Male	37.08±3.56	36.84±3.94	34.00±14.69	30.00±5.36	27.66±1.27	8.17±1.23	5.05±1.05	151.00±7.28	7.84±2.31
	Female	31.10±2.69	28.60±4.03	36.40±8.57	23.20±7.69	38.64±46.23	11.97±1.95	5.2±0.33	147.00±2.65	7.04±0.63
1000 mg/kg BH	Male	34.08±13.56	41.80±7.10	30.08±4.82	31.2±4.15	23.80±10.54	9.83±1.35	5.02±0.24	151.00±5.70	6.70±0.20
	Female	29.84±6.56	22.44±5.44	33.20±6.57	26.40±2.61	36.84±39.62	13.07±2.57	4.88±0.47	148.20±6.65	7.22±0.91
2000 mg/kg BH	Male	28.2±6.2	32.48±7.00	33.25±8.67	27.61±4.10	26.52±6.46	8.80±1.06	5.00±0.16	151.20±6.8	6.94±0.60
	Female	23.76±4.04†	27.92±13.55	32.80±7.54	27.60±3.29	23.08±8.15	11.38±1.33	5.16±0.33	146.94±9.35	7.08±1.91

Data are presented as mean ± standard deviation; Data were compared by the Student's t-test. Statistical significance was considered to be p < 0.05.

† indicating a significant difference between the female groups(p<0.05).

BUN: blood urea nitrogen, ALB: albumin, AG: Albumin/Globulin, CREA: creatinine, T_BIL: Total bilirubin, GLU: glucose, TG: triglyceride, CHOL: cholesterol, AST: glutamic oxaloacetic transaminase, ALT: glutamic pyruvic transaminase, ALP: alkaline phosphatase, CPK: creatine phosphokinase, CA: calcium, PHOS: Phosphorus, TP: total protein, Na: sodium, K: potassium.

3-7. 소핵시험

- 하니베리 추출물 12주간 경구투여에 따른 돌연변이 유발성을 평가하기 위한 분석으로 소핵시험(micronucleus test)을 실시하였음. 소핵시험 결과 골수 다염적혈구(bone marrow polychromatic erythrocytes, PCE)(Cells/102 PCEs)의 소핵 형성이 각 군간 거의 보이지 않았으며 특히 수컷 하니베리 추출물 500, 1000mg/kg 투여군과 암컷 마우스 그룹 모두에서 소핵 형성을 전혀 확인할 수 없었음(Table 2-39)

<Table 2-39> Micronucleus test of male and female ICR mouse in 12 weeks repeated oral dose toxicity studies of the BH.

Group	Micronucleus Frequency (mean± SE)		
	Sex		Total
	Male	Female	(Male+Female)
Control	0.50±0.71	0.00±0.00	0.50±0.71
500mg/kg BH	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
1000mg/kg BH	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2000mg/kg BH	0.25±0.35	0.00±0.00	0.25±0.35

Data are presented as mean ± standard deviation; Data were compared by the Student's t-test. Statistical significance was considered to be p < 0.05.

결론

하니베리 추출물의 500mg/kg, 1,000mg/kg, 2,000mg/kg 세 용량을 설정하여 단회·반복 투여 후 체중변화, 장기무게, 혈액검사, 혈액 생화학검사, 소핵검사 결과 하니베리 추출물은 독성이 없는 안전한 물질임을 확인하였음

나. In vivo 효능평가

1. 실험 내용

1-1. 실험 동물 및 군 분류 (6주령 암컷 ICR 마우스, 총 6개군, 군 당 8마리)

- 정상대조군 (Normal diet)
- HFD 대조군 (45%Kcal High Fat Diet)
- HFD + Metformin 250mg/kg 투여 (약물대조군)
- HFD + BHc 400mg/kg 투여
- HFD + BHc 200mg/kg 투여
- HFD + BHc 100mg/kg 투여

※ Metformin은 지방간 억제에 효과적으로 보고됨(Hepat Mon.2012;12(8):e6099). 지방간은 혈당 조절이 잘되지 않게 함으로 당뇨관련 지표도 함께 고려

1-2. 투여 기간 및 방법 : 12주 경구투여, 1일 1회(투여용량 10mg/kg)

1-3. 통계 방법 : 모든 자료의 통계 분석은 SPSS software(SPSS 23, SPSS Inc., USA)을 이용하여 평균(mean)과 표준편차(S.D)로 나타내었음. 정상대조군, HFD 대조군, Metformin 250mg/kg, BHc 400mg/kg, BHc 200mg/kg, BHc 100mg/kg의 집단 간 차이검증은 ANOVA를 이용하여 분석하였으며 사후 검증으로 Duncan's multiple range test에 따라 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였음

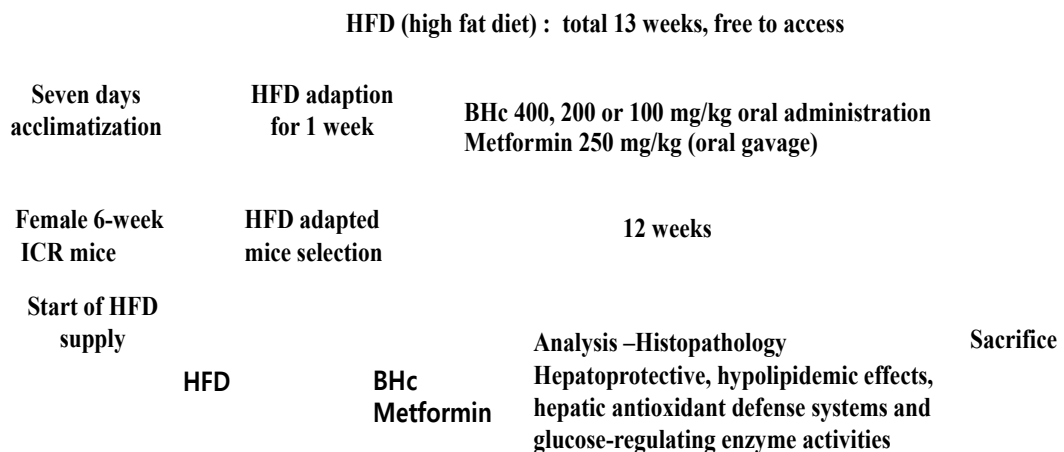


Figure 2-28. Experimental design

2. 실험 결과

2-1. 체중변화 및 식이 섭취량

- HFD(고지방식이군) 사료 공급 1주 후 일정한 체중 증가를 나타내는 실험동물만을 선별하였으며, 고지방식이군에서는 정상대조군에 비해 유의미한 체중의 증가가 고지방사료 공급 7일 후부터 나타났고, 1주일간의 HFD 적응기간을 거쳐 12주간 실험물질 투여하였음. 체중은 정상대조군에

비해 고지방식이에 의해 유의하게 증가하였음(Table 2-40)

- 한편 metformin 250mg/kg, BHc 400 및 200mg/kg 투여군에서는 각각 투여시작 28일 후부터, BHc 100 mg/kg 투여군에서는 투여시작 42일 후부터 고지방식이군에 비해 유의한 체중의 감소가 시작하였으며, metformin 250mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 고지방식이군에 비해 12주간의 실험물질 투여기간에 의해 유의한 체중 증가량 감소를 나타내었음(Table 2-40)
- 평균 사료섭취량은 정상대조군에 비해 HFD에서 유의적으로 감소되었으며, HFD군과 BHc 투여군간의 유의적인 차이는 없었음(Table 2-40).

<Table 2-40> Changes on body weight gains and food consumption in mice fed ND or HFD

Times	Body weights (g) at days after initial test substance treatment				Body weight gains during		Mean Daily Food Consumption (g)
	8 days before [A]	1 day before [B]	0 day* [C]	84 days* [D]	Adapt period [B-A]	Administration period [D-C]	
Controls							
ND	27.86±0.52 ^{ns}	28.34±0.57 ^b	25.36±0.67 ^b	30.13±1.59 ^e	0.48±0.15 ^b	4.76±1.30 ^e	4.63±0.32 ^b
HFD	27.88±0.84	31.03±0.90 ^a	28.25±0.73 ^a	51.75±1.85 ^a	3.15±0.26 ^a	23.50±1.68 ^a	3.87±0.21 ^a
Reference							
Metformin	27.91±0.45	31.09±0.58 ^a	28.21±0.45 ^a	40.66±1.30 ^d	3.18±0.21 ^a	12.45±1.00 ^d	3.90±0.25 ^a
Test material - BHc							
400 mg/kg	27.89±0.60	31.03±0.63 ^a	28.15±0.69 ^a	40.81±0.92 ^d	3.14±0.05 ^a	12.66±1.03 ^d	3.90±0.22 ^a
200 mg/kg	27.85±0.74	31.03±0.75 ^a	28.36±0.62 ^a	44.51±1.79 ^c	3.18±0.20 ^a	16.15±1.81 ^c	3.86±0.25 ^a
100 mg/kg	27.89±0.82	31.01±0.77 ^a	28.20±1.10 ^a	46.54±3.39 ^b	3.13±0.15 ^a	18.34±2.71 ^b	3.89±0.23 ^a

Values are expressed as Mean ± SD of eight mice

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

ND = Normal diet; HFD = 45%Kcal high fat diet

BH = Blue honeysuckle (Berries of Lonicera caerulea L., Caprifoliaceae)

BHc = Imported BH concentrated juice lyophilized powders (contains 13% dextrin)

Metformin were administrated at a dose level of 250mg/kg

2-2. 조직 무게 (절대적/ 상대적)

- 간조직을 절대적 무게로 비교해본 결과 정상식이군(ND)에 비해 HFD군의 간 무게가 유의적으로 높았으며, HFD군에 비해 BHc 투여군에서 간 무게가 유의적으로 감소하였음. 췌장의 무게는 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았음. 난소 주위의 지방량의 무게를 비교한 결과 ND군에 비해 HFD군의 난소 주위 지방의 양이 유의적으로 높았고, BHc 투여군에서는 용량 의존적으로 지방량이 감소하였음. 복벽의 지방량은 HFD군에 비해 BHc 투여군에서 유의적으로 지방량이 감소하였으며 BHc 100mg/kg과 200mg/kg 군간에서 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 2-41)
- 조직을 상대적 무게로 비교해 본 결과 간조직은 군간 유의적인 차이를 보이지 않았고, 췌장의 무게는 ND군에 비해 HFD군의 무게가 유의적으로 낮았으며, BHc 투여군 중 400mg/kg과 100mg/kg 투여군에서 유의적인 차이를 보였음. 난소주위 지방량을 비교해 본 결과 ND에 비해 HFD군은 유의적으로 지방량이 높았으며, BHc 용량 의존적으로 난소 주위 지방량이 통계적으로 유의성 있게 감소하였음. 복벽 지방량 비교 결과 ND군에 비해 HFD군의 지방량은 유의적으로 높았으며, BHc 투여군에서는 400mg/kg이 100mg/kg 투여군 보다 유의적 수준으로 낮은 지방량을 나타냈음(Table 2-42)

<Table 2-41> Changes on Absolute Organ Weights in mice fed ND or HFD

Organs Groups	Absolute organ weights (g)			
	Liver	Pancreas	Periovarian fat pads	Abdominal wall fat pads
Controls				
ND	1.073±0.096 ^e	0.205±0.014 ^{ns}	0.089±0.027 ^e	0.076±0.031 ^d
HFD	1.774±0.085 ^a	0.202±0.014	0.775±0.110 ^a	0.564±0.105 ^a
Reference				
Metformin	1.415±0.090 ^d	0.204±0.012	0.220±0.069 ^d	0.194±0.052 ^c
Test material - BHc				
400mg/kg	1.413±0.028 ^d	0.204±0.015	0.236±0.054 ^d	0.217±0.092 ^c
200mg/kg	1.509±0.092 ^c	0.206±0.009	0.350±0.097 ^c	0.307±0.053 ^b
100mg/kg	1.596±0.061 ^b	0.206±0.010	0.498±0.130 ^b	0.377±0.073 ^b

Values are expressed as Mean ± SD of eight mice

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

ND = Normal diet; HFD = 45%Kcal high fat diet

BH = Blue honeysuckle (Berries of *Lonicera caerulea* L., Caprifoliaceae)

BHc = Imported BH concentrated juice lyophilized powders (contains 13% dextrin)

Metformin were administrated at a dose level of 250mg/kg

<Table 2-42> Changes on Relative Organ Weights in mice fed ND or HFD

Organs Groups	Relative organ weights (% of body weights)			
	Liver	Pancreas	Periovarian fat pads	Abdominal wall fat pads
Controls				
ND	3.563±0.300 ^{ns}	0.680±0.057 ^a	0.297±0.094 ^c	0.252±0.104 ^c
HFD	3.429±0.140	0.390±0.035 ^d	1.500±0.226 ^a	1.091±0.208 ^a
Reference				
Metformin	3.483±0.246	0.502±0.040 ^b	0.541±0.172 ^d	0.479±0.134 ^d
Test material - BHc				
400mg/kg	3.464±0.098	0.500±0.038 ^b	0.577±0.129 ^d	0.533±0.235 ^{cd}
200mg/kg	3.398±0.288	0.463±0.032 ^{bc}	0.784±0.211 ^c	0.690±0.121 ^{bc}
100mg/kg	3.446±0.291	0.443±0.034 ^c	1.077±0.314 ^b	0.813±0.162 ^b

Values are expressed as Mean ± SD of eight mice

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

ND = Normal diet; HFD = 45%Kcal high fat diet

BH = Blue honeysuckle (Berries of *Lonicera caerulea* L., Caprifoliaceae)

BHc = Imported BH concentrated juice lyophilized powders (contains 13% dextrin)

Metformin were administrated at a dose level of 250mg/kg

2-3. 지방량 측정 및 관찰

- 전체 체지방 밀도(body fat density)를 비교한 결과 ND군에 비해 HFD군에서 유의적으로 체지방량이 높았으며, HFD군과 비해 BHc 투여군 세군 모두에서 지방량이 감소하였음. 양성대조군인 metformin 250mg/kg군과 BHc 400mg/kg, 200mg/kg 군간의 지방량 무게는 유의적인 차이를 보이지 않았음. 복부 지방 밀도(abdominal fat density)를 측정된 결과 ND군에 비해 HFD군에서 유의적으로 복부 지방량이 높았으며, HFD군과 비교해보면 BHc 투여군 세군 모두에서 복부 지방량이 감소하였음(Figure 2-29)
- BHc 400mg/kg 투여군의 지방량이 100mg/kg 투여군의 지방량보다 유의적으로 낮게 나타났음. 체지방과 난소주위의 지방 축적을 Gross Image와 Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA)로 촬영한 결과 ND군에 비해 HFD군에서 지방량 증가가 관찰되었고, BHc 400mg/kg, 200mg/kg에 비해 BHc 100mg/kg 투여군에서 지방량의 증가가 관찰되었음(Figure 2-30)

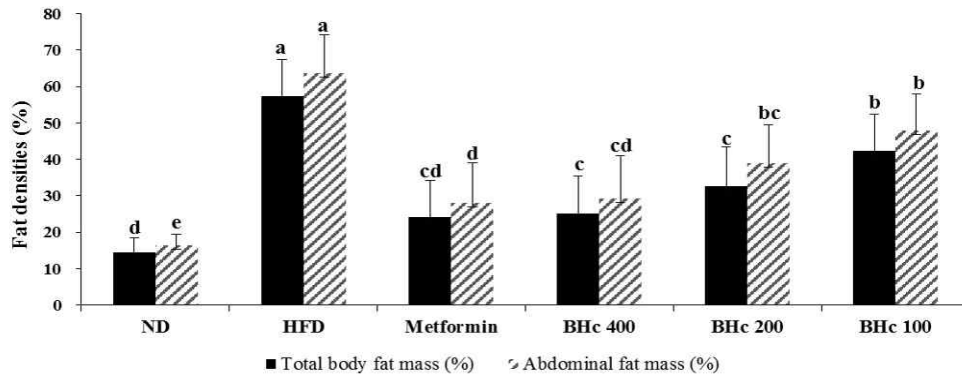


Figure 2-29. Total body and Abdominal Fat Densities in mice fed ND or HFD

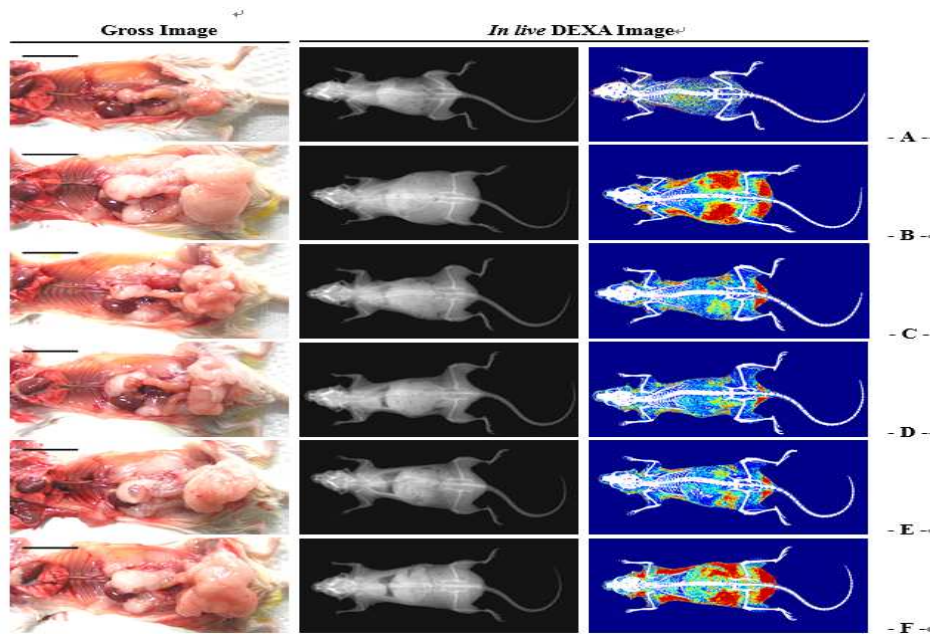


Figure 2-30. Representative Gross Body Mass and Abdominal Fat Pads with Whole Body DEXA Images in mice fed ND or HFD

2-4. 혈중 간 기능 개선 지표 측정

- 고지방식이군은 정상대조군에 비해 혈중 AST함량이 유의적으로 증가하였으며, BHc 100, 200, 400mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 고지방식이군에 비해 혈중 AST함량이 유의하게 감소되었음(Table 2-43)
- 고지방식이군은 정상대조군에 비해 유의성 있는 혈중 ALT 함량의 증가를 나타내었으나, BHc 투여 세군 모두에서 고지방식이군에 비해 유의성 있는 ALT 함량 감소를 보였음 (Table 2-43)
- 고지방식이군의 경우, 정상대조군에 비해 유의성 있는 혈중 ALP함량의 증가를 나타내었고, BHc 100, 200, 400mg/kg을 포함한 모든 시험물질 투여군에서는 고지방식이군에 비해 혈중 ALP 함량이 유의하게 감소되었으며, 양성대조군인 metformin 250mg/kg와 BHc 100mg/kg, 200mg/kg군에서 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 2-43)

- 정상대조군에 비해 고지방식이군에서 혈중 LDH 함량이 유의적으로 증가하였으며, metformin 250mg/kg을 포함한 모든 시험물질 투여군에서는 고지방식이군에 비해 혈중 LDH 함량이 유의하게 감소하였음. BHc 200, 400mg/kg 투여군에서는 metformin 250mg/kg과 비슷한 수준으로 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 2-43)
- 고지방식이군의 경우, 정상대조군에 비해 혈중 GGT 함량을 유의하게 증가시켰고, BHc 400mg/kg을 포함한 모든 시험물질 투여군에서는 혈중 GGT 함량이 고지방식이군에 비해 유의하게 감소시켰음. 양성대조군인 metformin 250mg/kg의 혈중 GGT 함량 증가 억제 효과는 BHc 200, 400mg/kg 투여군과 비슷하였음. BHc의 용량이 100mg/kg 보다 400mg/kg 경우에서 더 효과적이었음(Table 2-43)

<Table 2-43> Effects of honeyberry on serum AST, ALT, ALP, LDH, GGT and Creatine Levels in mice fed ND or HFD

Items Groups	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	LDH (IU/L)	GGT (IU/L)	Creatinine (mg/dl)
Controls						
ND	65.38±12.93 ^c	32.25±10.71 ^d	72.50±17.06 ^d	600.63±258.42 ^d	1.88±0.83 ^d	0.46±0.18 ^d
HFD	198.63±18.10 ^a	126.63±18.32 ^a	228.00±33.72 ^a	3239.63±912.2 ^a	9.88±2.03 ^a	2.05±0.24 ^a
Reference						
Metformin	116.13±26.18 ^{cd}	70.25±21.63 ^c	162.63±25.91 ^{bc}	1513.50±462.28 ^c	4.25±1.67 ^c	0.86±0.18 ^c
Test material - BHc						
400mg/kg	111.63±17.18 ^d	69.63±14.17 ^c	155.25±21.37 ^c	1375.50±363.23 ^c	4.13±1.36 ^c	0.80±0.26 ^c
200mg/kg	132.75±17.73 ^c	81.63±13.67 ^c	173.25±17.19 ^{bc}	1660.50±283.42 ^c	5.63±1.51 ^{bc}	1.03±0.27 ^c
100mg/kg	162.88±13.60 ^b	102.13±14.23 ^b	186.25±18.98 ^b	2169.25±342.83 ^b	6.88±1.73 ^b	1.54±0.24 ^b

Values are expressed as Mean ± SD of eight mice

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

ND = Normal diet; HFD = 45%Kcal high fat diet

BH = Blue honeysuckle (Berries of Lonicera caerulea L., Caprifoliaceae)

BHc = Imported BH concentrated juice lyophilized powders (contains 13% dextrin)

Metformin were administrated at a dose level of 250mg/kg

2-5. 간 조직 지방량 및 직경 측정

- 고지방식이군의 경우, 고지방식을 통해 간 조직내 지방축적으로 인한 간비대 현상을 보였고, 정상대조군에 비해 유의성 있는 간 지방 변화율이 증가 되었으며, BHc 100, 200 400mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 고지방식이군에 비해 유의성 있는 간 지방변화율의 감소를 나타내었음. BHc 200, 400mg/kg 투여군과 양성대조군 metformin 250mg/kg은 비슷한 수준의 지방축적 감소현상이 일어났음(Table 2-44)
- 간세포 직경을 비교해보면, 고지방식이군의 경우, 정상대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였으며, BHc 200, 400mg/kg군에서 양성대조군 metformin 250mg/kg과 유의적인 차이 없는 수준으로 간세포 직경이 감소하였음(Table 2-44)

<Table 2-44> Changes on histopathology-histomorphometry of the liver in mice fed ND or HFD

Items	Liver steatosis (%/mm ² ofhepatic tissues)	Mean hepatocyte diameters (μm/cell)
Groups		
Controls		
ND	7.20±2.87 ^d	13.36±1.04 ^d
HFD	78.84±10.03 ^a	34.30±2.65 ^a
Reference		
Metformin	45.65±10.12 ^c	22.64±3.75 ^c
Test material - BHc		
400mg/kg	42.87±10.51 ^c	22.71±4.25 ^c
200mg/kg	53.03±10.05 ^{bc}	24.04±4.66 ^{bc}
100mg/kg	60.33±12.81 ^b	27.31±2.34 ^b

Values are expressed as Mean ± SD of eight mice

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

ND = Normal diet; HFD = 45%Kcal high fat diet

BH = Blue honeysuckle (Berries of Lonicera caerulea L., Caprifoliaceae)

BHc = Imported BH concentrated juice lyophilized powders (contains 13% dextrin)

Metformin were administrated at a dose level of 250mg/kg

2-6. 항산화 효소 활성 측정

- HFD 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.05) 간 지질 과산화의 증가, 즉 MDA 함량의 증가를 나타내었으며, BHc 100mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 유의성 있는 간조직의 지질 과산화의 감소를 보였고, BHc 투여군에서는 용량 의존적인 간 조직내 MDA 함량의 감소가 나타났으며, BHc 400mg/kg 투여군에서는 metformin 250mg/kg과 비교할만한 HFD 유발 간 지질 과산화 증가 억제 효과를 나타내었음(Table 2-45)

<Table 2-45> Effects of Blue honeysuckle on the liver lipid peroxidation and antioxidant defense systems in mice fed ND or HFD

Items	Lipid peroxidation		Antioxidant defense system	
	Malondialdehyde (nM/mg tissue)	Glutathione (μM/mg tissue)	Catalase (U/mg tissue)	SOD (U/mg tissue)
Groups				
Controls				
ND	9.66±3.22 ^d	56.47±14.77 ^a	58.77±13.89 ^a	8.38±1.84 ^a
HFD	54.74±11.12 ^a	10.04±3.60 ^e	11.26±2.74 ^d	0.75±0.29 ^d
Reference				
Metformin	23.79±6.63 ^c	30.49±14.70 ^b	38.77±10.01 ^b	4.24±1.47 ^b
Test material - BHc				
400mg/kg	22.68±3.77 ^c	32.25±10.14 ^b	40.67±15.90 ^b	4.37±1.25 ^b
200mg/kg	30.58±10.14 ^{bc}	25.44±11.94 ^b	31.71±11.73 ^{bc}	3.08±0.77 ^{bc}
100mg/kg	38.42±10.33 ^b	20.34±8.49 ^{bc}	24.95±11.54 ^c	2.32±1.02 ^c

Values are expressed as Mean ± SD of eight mice

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

ND = Normal diet; HFD = 45%Kcal high fat diet

BH = Blue honeysuckle (Berries of Lonicera caerulea L., Caprifoliaceae)

BHc = Imported BH concentrated juice lyophilized powders (contains 13% dextrin)

Metformin were administrated at a dose level of 250mg/kg

- HFD 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있는 간 조직내 내인성 항산화제인 GSH 함량이 감소되었음, metformin 250mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 현저한 간 조직내 GSH 함량의 증가를 나타내었음. 세 용량의 BHc 투여군에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, BHc 400mg/kg 투여군의 GSH 감소 억제 효과가 가장 높은 수준을 나타내었음(Table 2-45)

- HFD 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있는 간 조직내 내인성 항산화 효소인 CAT 활성이 감소되었으며, BHc 100mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 유의적으로 CAT 활성이 증가되었고, 100mg/kg BHc 투여군에 비해 200, 400mg/kg은 metformin 250mg/kg과 비슷한 수치를 보였으나, 100mg/kg와 200mg/kg에서 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 2-45)
- HFD 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있는 SOD 활성의 감소를 보였으나, BHc 400mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.05$) SOD 활성의 증가가 나타났음. BHc 200, 400mg/kg 투여군에서는 metformin 250mg/kg과 비교할만한 HFD 유발 내인성 항산화 효소, SOD 활성 감소 억제 효과를 나타내었음(Table 2-45)

2-7. 혈중 지질 농도 측정

- 고지방식이군의 경우, 정상대조군에 비해 유의성 있는 혈당의 증가가 보였으나, BHc 400mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 유의적으로 혈당의 감소가 각각 인정되었고, BHc 투여군에서는 용량 의존적인 혈당의 감소를 보였으나 200과 400mg/kg 투여군에서 유의적인 차이를 보이지는 않았음(Table 2-46)
- 고지방식이군의 경우, 정상대조군에 비해 유의성 있는 혈중 TC 함량의 증가가 나타났고, BHc 100mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 고지방식이군에 비해 유의적으로 혈중 TC 함량의 감소가 나타났고, 특히 BHc 투여군에서 투여 용량이 높은 군에서 혈중 TC 함량 감소 현상을 보였으나 100mg/kg과 200mg/kg에서 유의적인 차이를 보이지 않았음. BHc 400mg/kg 투여군에서는 metformin 250mg/kg과 비교할만한 HFD 유발 혈중 TC 함량 증가 억제 효과를 나타내었음(Table 2-46)

<Table 2-46> Effects of Blue honeysuckle on blood glucose levels and serum lipid contents in mice fed ND or HFD

Items	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	Low density lipoprotein (mg/dl)	High density lipoprotein (mg/dl)
Controls					
ND	92.75±20.48 ^e	103.88±19.58 ^d	61.25±12.73 ^d	15.63±3.38 ^d	96.13±19.90 ^a
HFD	327.25±59.44 ^a	282.50±29.32 ^a	212.50±29.77 ^a	66.25±11.54 ^a	21.50±10.99 ^d
Reference					
Metformin	167.75±18.87 ^d	167.00±15.98 ^c	117.75±22.58 ^c	30.75±10.11 ^c	63.88±19.21 ^b
Test material - BHc					
400mg/kg	175.25±17.84 ^{cd}	168.25±34.08 ^c	119.38±26.50 ^c	31.13±10.58 ^c	60.50±15.73 ^b
200mg/kg	204.13±29.31 ^c	195.00±24.88 ^b	138.00±25.53 ^c	39.38±10.25 ^c	52.00±10.39 ^{bc}
100mg/kg	250.25±24.42 ^b	210.38±23.77 ^b	167.63±21.25 ^b	49.50±10.20 ^b	40.38±10.47 ^c

Values are expressed as Mean ± SD of eight mice

Means with the different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

ND = Normal diet; HFD = 45%Kcal high fat diet

BH = Blue honeysuckle (Berries of *Lonicera caerulea* L., Caprifoliaceae)

BHc = Imported BH concentrated juice lyophilized powders (contains 13% dextrin)

Metformin were administrated at a dose level of 250mg/kg

- 고지방식이군의 경우, 정상대조군에 비해 유의성 있는 혈중 TG 함량의 증가가 나타났고, metformin 250mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 고지방식이군에 비해 유의성 있는 혈중 TG 함량의 감소를 보였고, 200, 400mg/kg의 BHc 투여군에서는 metformin 250mg/kg과 비교할만한 HFD 유발 혈중 TG 함량 증가 억제 효과를 나타내었음(Table 2-46)
- 고지방식이군의 경우, 정상대조군에 비해 유의성 있는 혈중 LDL함량의 증가가 나타났으나, BHc 100mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 고지방식이군에 비해 유의성 있는 혈중 LDL함량의 감소가 나타났으며, BHc 200, 400mg/kg 투여군에서 metformin 250mg/kg과 비슷한 수준의 LDL 함량 증가 억제 효과를 나타내었음(Table 2-46)
- 고지방식이군의 경우, 정상대조군에 비해 유의성 있는 혈중 HDL 함량의 감소를 보였으나, BHc 100mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 고지방식이군에 비해 유의성 있는 혈중 HDL 함량의 증가를 보였으며, BHc 200, 400mg/kg 투여군에서는 metformin 250mg/kg과 비교할만한 HFD 유발 혈중 HDL 함량 감소 억제 효과를 나타내었으며, 100mg/kg와 200mg/kg 투여군에서 유의적인 차이는 나타나지 않았음(Table 2-46)

2-8. 간조직 당분해 및 합성효소 측정

- HFD 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있는 당 분해효소인 간 GK활성의 감소가 나타났으나, BHc 200mg/kg을 포함한 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 유의성 있는 간 GK활성의 증가를 보였고, BHc 400mg/kg 투여군에서는 metformin 250mg/kg과 비교할만한 HFD 유발 간 조직내 당분해효소, GK활성 감소 억제 효과를 나타내었음(Table 2-47)
- HFD 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있는 당 합성 효소인 간 G6pase 활성의 증가가 나타났으나, BHc 100mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 유의성 있는 간 G6pase 활성의 감소를 보였고, 특히 세 용량의 BHc 투여군에서는 용량 의존적으로 간 조직내 G6pase 활성의 감소 나타났으며, BHc 400mg/kg 투여군에서 가장 증가폭이 컸으나, metformin 250mg/kg과 유의적인 수준의 차이를 보이지 않았음 (Table 2-47)
- HFD 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있는 당 합성 효소인 간 PEPCK 활성의 증가가 나타났으나, metformin 250mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 유의성 있는 간 PEPCK 활성 감소를 보였고, 200mg/kg과 400mg/kg의 농도에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며, BHc 400mg/kg 투여군과 metformin 250mg/kg군은 비슷한 억제 효과를 나타내었음(Table 2-47)

<Table 2-47> Effects of Blue honeysuckle on the hepatic glucose-regulating enzyme activities in mice fed ND or HFD

Items Groups	Glucokinase (nM/min/mg protein)	Glucose-6-phosphatase (nM/min/mg protein)	PEPCK (nM/min/mg protein)
Controls			
ND	3.91±1.17 ^a	118.63±19.56 ^c	1.51±0.47 ^c
HFD	1.20±0.32 ^c	272.48±33.18 ^a	5.94±0.87 ^a
Reference			
Metformin	2.31±0.41 ^b	151.73±29.80 ^d	2.34±0.45 ^d
Test material - BHc			
400mg/kg	2.29±0.47 ^b	156.97±18.57 ^{cd}	2.47±0.43 ^{cd}
200mg/kg	1.81±0.23 ^{bc}	180.71±28.36 ^{bc}	3.21±1.17 ^c
100mg/kg	1.65±0.22 ^c	204.90±26.70 ^b	4.13±1.00 ^b

Values are expressed as Mean ± SD of eight mice

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

ND = Normal diet; HFD = 45%Kcal high fat diet

BH = Blue honeysuckle (Berries of *Lonicera caerulea* L., Caprifoliaceae)

BHc = Imported BH concentrated juice lyophilized powders (contains 13% dextrin)

Metformin were administrated at a dose level of 250mg/kg

2-9. 지질 관련 대사 mRNA 발현

- HFD군에 비해 BHc 투여군에서 간 조직내 ACC1 mRNA 발현량이 유의적으로 감소하였고 BHc 400mg/kg, 200mg/kg 투여군은 metformin 250mg/kg과 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 2-48)
- HFD 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의적으로 간 조직내 AMPKα1 mRNA 발현이 감소되었고, BHc 100, 200 400mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 유의적으로 간 AMPKα1 mRNA 발현이 증가되었음. BHc 200mg/kg 투여군과 400mg/kg 투여군 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 200mg/kg과 100mg/kg 투여군간에도 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 2-48)
- 간 조직내 AMPKα2 mRNA 발현 측정 결과는 BHc 100mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 유의적으로 (p<0.05) 간 AMPKα2 mRNA 발현의 증가되었음. 세 용량 중 BHc 400mg/kg 투여군은 BHc 100 mg/kg 투여군과 유의적인 수준으로 AMPKα2 mRNA 발현이 증가하였음(Table 2-48)
- HFD 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있는 지방 조직내 leptin mRNA 발현 증가를 보였으나, BHc 100mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 지방 조직 leptin mRNA 발현이 유의적으로 감소되었고, BHc 투여군에서는 용량 의존적으로 leptin mRNA 발현이 감소되었음(Table 2-48)
- HFD 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의적 수준으로 지방 조직내 UCP2 mRNA 발현이 감소되었으나, BHc 100mg/kg, 200mg/kg과 400mg/kg 투여군에서 HFD 대조군에 비해 유의적 수준에서 지방 조직 UCP2 mRNA 발현이 증가되었고, BHc 400mg/kg의 UCP2 mRNA 발현 증가는 100mg/kg 투여군과 유의적인 차이를 보였음(Table 2-48)

<Table 2-48> Changes on Lipid Metabolism-related Gene mRNA Expressions in mice fed ND or HFD, Realtime RT-PCR Analysis

Groups Items	Controls		Reference	Test material - BHc		
	ND	HFD	Metformin	400mg/kg	200mg/kg	100mg/kg
Hepatic tissue						
ACC1	1.01±0.13 ^d	4.38±1.22 ^a	1.73±0.33 ^c	1.76±0.47 ^c	2.29±0.51 ^c	2.98±0.23 ^b
AMPKα1	1.00±0.09 ^a	0.48±0.10 ^d	0.83±0.12 ^b	0.84±0.08 ^b	0.73±0.13 ^{bc}	0.66±0.13 ^c
AMPKα2	1.01±0.12 ^a	0.54±0.09 ^e	0.87±0.12 ^b	0.83±0.11 ^{bc}	0.73±0.11 ^{cd}	0.66±0.04 ^d
Adipose tissue						
Leptin	0.96±0.08 ^e	5.94±1.08 ^a	1.89±0.76 ^d	1.95±0.50 ^d	2.79±0.72 ^c	3.64±0.89 ^b
UCP2	0.99±0.06 ^a	0.24±0.07 ^e	0.61±0.12 ^b	0.58±0.18 ^{bc}	0.47±0.12 ^{cd}	0.39±0.08 ^d
Adiponectin	1.00±0.12 ^a	0.15±0.08 ^d	0.67±0.20 ^b	0.63±0.13 ^b	0.47±0.10 ^c	0.36±0.10 ^c
C/EBPα	1.00±0.08 ^d	1.89±0.23 ^a	1.27±0.14 ^c	1.28±0.12 ^c	1.35±0.11 ^{bc}	1.46±0.15 ^b
C/EBPβ	0.98±0.06 ^d	3.23±0.72 ^a	1.62±0.33 ^c	1.52±0.33 ^c	1.89±0.26 ^{bc}	2.28±0.37 ^b
SREBP-1c	1.03±0.16 ^d	2.29±0.42 ^a	1.44±0.13 ^c	1.37±0.21 ^c	1.53±0.26 ^{bc}	1.77±0.24 ^b

Values are expressed as Mean ± SD of eight mice

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

ND = Normal diet; HFD = 45%Kcal high fat diet

BH = Blue honeysuckle (Berries of *Lonicera caerulea* L., Caprifoliaceae)

BHc = Imported BH concentrated juice lyophilized powders (contains 13% dextrin)

Metformin were administrated at a dose level of 250mg/kg

RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction

UCP = Mitochondrial uncoupling protein

C/EBP = CCAAT-enhancer-binding protein

SREBP = Sterol regulatory element-binding protein

ACC1 = Acetyl-CoA carboxylase 1

AMPK = 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase

GAPDH = Glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase

- HFD 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있는 지방 조직내 adiponectin mRNA 발현이 감소되었으나, BHc 100mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 유의성 있는 지방 조직 adiponectin mRNA 발현 증가를 보였고, BHc 400mg/kg 투여군에 비해 200, 100mg/kg 투여군에서 adiponectin mRNA 발현이 유의적으로 낮게 나타났음(Table 2-48)
- HFD 군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의적으로 지방 조직내 C/EBPα, C/EBPβ, SREBP1c mRNA 발현이 증가되었고, BHc 100mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.05) 지방 조직 C/EBPα C/EBPβ, SREBP1c mRNA 발현이 감소되었음. BHc 400mg/kg 투여군과 BHc 100mg/kg 군간의 C/EBPα C/EBPβ, SREBP1c mRNA 발현양 차이는 통계적으로 유의하게 나타났음(Table 2-48)

결론

비알콜성 지방간 in vivo 동물모델에서 하니베리 추출물의 효능 평가를 위해 고지방식이와 하니베리 추출물 100, 200, 400mg/kg을 경구투여하였음, 실험 결과, 하니베리 추출물 투여한 군에서 체중과 지방 축적이 감소되어짐을 확인하였음. 하니베리 추출물 투여군에서 혈중의 간 기능 지표인 AST, ALT, ALP, LDH, GGT 함량이 감소되었고, 항산화 효소인 MDA 함량이 감소되었으며, glutathione, catalase, SOD 활성이 증가되었음. 또한 혈중의 glucose, TG, TC, LDL 농도가 하니베리 추출물 투여에 의해 감소되었으며, HDL 농도는 증가되었음. 간조직의 당분해, 합성효소 (GK, G6Pase, PECK)가 감소하였고, 지질 관련 mRNA 발현이 간조직과 지방조직에 지방 축적을 감소하는 유전자들의 발현이 증가되었음. 이상의 결과는 하니베리 추출물이 AMPK 활성을 증가시켜 지방산 산화를 유도하여 지방구 생성과 포도당 생성을 억제하였을 것으로 생각되어짐. 또한 AMPK signaling pathway 관련 지방생성 유전자인 C/EBP α , C/EBP β , SREBP1c 발현이 감소하였고, 열발생 관련 UCP2, AMPK α 1, AMPK α 2 유전자 발현이 증가되었음. AMPK upregulation은 항산화 효소(glutathione, catalase, SOD) 함량을 증가시키고, 포도당 조절 효소(GK, G6Pase, PECK)를 감소시킨 것으로 사료됨

5. 3차년도 주관기관((주)아리바이오) 연구개발 및 결과

3차년도 개발 목표
○ 주관연구기관((주)아리바이오) : 제형연구, 인체적용시험실시, 기능성원료 신청, 시제품 제작

가. 제형연구

- 인체적용시험에 사용된 시료의 제형은 하니베리 원재료에 물을 5배 첨가하여 상온 추출 진행, 착즙 및 여과 진행 후 원심분리과정과 농축을 진행하고, 하니베리 추출물과 텍스트린 비율 각각 1:1 혼합 후 동결건조 진행. 함습 방지를 위해 이산화규소(1%), 스테아린산 마그네슘(1%)을 첨가하여 제조된 것을 캡슐로 포장하여 사용하였다(하니베리 추출물 49%, 텍스트린 49%, 이산화규소 1%, 스테아린산 마그네슘 1%)

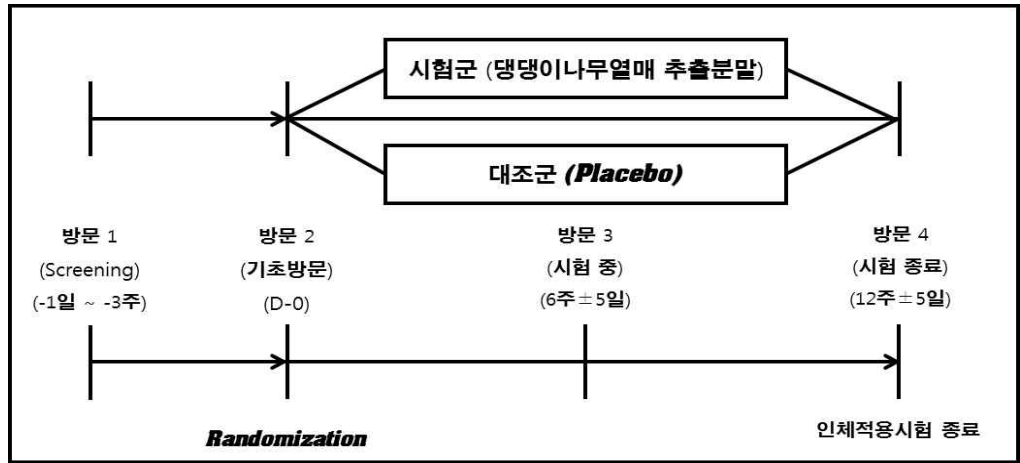
<Table 2-49> 식품의 성분, 함량, 제형

성분명/ 함량/ 제형	시험식품		대조식품	
	배합비율(%)	함량(mg)	배합비율(%)	함량(mg)
하니베리 추출분말	49%	240.1mg	-	-
텍스트린	49%	240.1mg	97%	475.3mg
이산화규소	1%	4.9mg	1%	4.9mg
스테아린산 마그네슘	1%	4.9mg	1%	4.9mg
색소	-	-	1%	4.9mg
총 함량	100%	490mg	100%	490mg
제형	캡슐		좌동	
성상	분말			
복용방법	1일 2회, 1회 2캡슐			
포장단위	490mg			
저장방법	실온			
사용기간	2년			

나. 인체적용시험

<Table 2-50> 하니베리 투여가 비알콜성 간 기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험

인체적용시험 계획 및 결과	
인체적용시험 제목	하니베리 투여가 비알콜성 간 기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험; 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구
인체적용시험 계획서 번호	Protocol No.: ARIBIO_DDE
인체적용시험 실시기관	남양주 양병원 경기도 남양주시 경춘로 933
인체적용시험 책임자	남양주 양병원 내과 전문의 조애리
인체적용시험 공동연구자	한국체육대학교 조인호 교수
인체적용시험 기간	인체적용시험 시작일: 2018.01.05.(첫 대상자 스크리닝일) 인체적용시험 종료일: 2018.10.29.(마지막 대상자 시험완료일)
단계 및 디자인	단 계 : 기타 (건강기능식품) 디자인 : 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
인체적용시험 대상	스크리닝 검사 시 혈중 AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 또는 GGT(γ -GTP)가 실시기관의 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배 이하의 범위에 있는 자 (AST: 남; 41-120IU/L, 여; 33-96IU/L, ALT: 남; 42-123, 여; 33-99IU/L, GGT: 남; 72-213IU/L, 여; 43-126IU/L) 중 하나 이상의 항목에 해당하는 자
인체적용시험 식품	시험식품 : 땃땃이나무열매(하니베리) 추출분말 대조식품 : Placebo
인체적용시험 식품 섭취방법	<ul style="list-style-type: none"> • 시험식품: 1일 2회, 1회 2캡슐(1,960mg, C3G: 7.5mg/g) • 대조식품: 시험식품과 동일한 방법으로 섭취
인체적용시험 목적	건강기능식품 기능성 원료로서 하니베리 추출분말의 섭취 시 안전성 및 비알콜성 간 기능 손상으로부터 간 보호에 미치는 영향 규명
인체적용시험 방법	본 시험은 이중눈가림, 무작위배정, 대조식품 비교, 병행설계 인체적용시험. 모집공고를 통해 본 시험에 지원한 자가 시험에 대해 충분하게 이해하고 자의에 의해 참여할 것을 서면으로 동의하면, 혈액학적 검사 실시 후 선정 기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자에 한하여 시험군 또는 대조 군에 1:1로 무작위 배정한다. 무작위 배정된 연구대상자는 시험용 식품을 배부 받고 매일 2회 고지된 방법대로 복용함



0주(baseline), 12주째 유효성 및 안전성 평가변수에 대한 측정 및 검사를 실시하고 그 결과에 대하여 분석함

인체적용시험 대상자 수

계획된 인체적용시험 대상자 수

	시험군	대조군	합계
최종평가 사례수 (PP Set)	27	27	54
Drop-out(20%)고려 사례수	33	33	66

결과분석에 포함된 인체적용시험 대상자 수

	시험군	대조군	합계
Safety Set	33	33	66
FA Set	30	30	60
PP Set	27	27	54

선정기준

- 만 19세 이상의 성인 남성 또는 여성
- 스크리닝 검사 시 혈중 AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 또는 GGT(γ -GTP)가 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배 이하의 범위에 있는 자(AST: 남; 41-120IU/L, 여; 33-96IU/L, ALT: 남; 42-123, 여; 33-99IU/L, GGT: 남; 72-213IU/L, 여; 43-126IU/L) 중 하나 이상의 항목에 해당하는 자
- 정상적인 신체활동이 가능하고, 본 시험의 대상자로서 시험동의서에 서면 동의한 자

제외기준

- 시험용 식품의 성분에 대한 알레르기가 있는 자
- 임상의 판단에 의해 조절되지 않는 당뇨병 환자

	<ol style="list-style-type: none"> 3. 바이러스성 간 질환 및 인체적용시험의 결과에 영향을 줄 수 있는 간 질환을 가진 대상자(HBs Ag 또는 HCV Ab 양성인 자) 단, 항바이러스성 약제를 투약 받지 않은 HBV 또는 HCV 보균자는 연구 책임자가 시험에 영향을 주지 않는다고 판단할 시 등록할 수 있다. 4. Child-Pugh 등급 B 또는 C의 비대상성 간경변 대상자 5. 간암 및 악성종양 등으로 최근 6개월 이내 항암치료 및 방사선치료를 받은 경험이 있는 자 6. 담석증을 진단 받은 자 7. 시험 시작 예정일 기준 4주 이내에 간 기능에 영향을 미치는 약물(INH, valproic acid, tetracycline, allopurinol, phenytoin, phenelzine, sertraline, naproxen, diclofenac) 기타 간독성을 유발할 가능성이 있는 약물을 복용한 자 8. 시험 시작 예정일 기준 4주 이내에 이담제, 담석용해제, 간보호제 (Cholagogues, Cholelitholytics & Hepatic Protectors), 해독제, 약물 의존성 치료제(Antidotes, Detoxifying Agents & Drugs Used in Substance Dependence)를 복용한 자 9. 알콜 중독자 또는 남자는 168g/주, 여자는 112g/주 이상의 지속적인 음주를 하는 자 10. 신장 질환이 있거나 혈청 creatinine 2.0mg/dL 초과인 경우 11. 조절되지 않는 고혈압 환자나 협심증·심근경색증 등의 심장질환이 있는 자 12. 위장관 절제술을 받은 병력이 있는 자(충수돌기염 수술 제외) 13. 정신과 질환으로 약물을 복용하고 있는 자 단, 수면장애로 인해 간헐적 투약을 하는 경우는 제외 함 14. 지난 2개월간 한약 복용력이 있는 자 15. 인체적용시험 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물을 계속 복용해야 하는 자 16. 임신부 및 수유부(가임기 여성의 경우, 불임수술을 받지 않았거나 시험 기간 동안 효과적인 피임방법을 사용할 의지가 없는 자) 17. 스크리닝일 기준 1개월 이내 다른 인체적용시험에 참여한 자 18. 본 시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 시험을 진행할 수 없다고 연구자가 판단하는 자 19. 최근 4주 동안 간 건강 관련 건강기능식품 섭취 자 20. 초음파 검사 후 간경화 등 인체적용시험 참여가 부적합 한 자
<p>유효성 평가</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 간기능검사 I: AST, ALT, GGT 2. 간기능검사 II: ALP, LDH, albumin, globulin, Total protein 3. 항염: TNF-α, IL-6 4. 지방대사검사: FFA, total cholesterol, LDL, triglyceride, adiponectin, HDL 5. 당대사(혈당검사): glucose, HbA1c, insulin 6. 항산화검사: MDA, SOD, catalase 7. 피로심각척도(Fatigue Severity Scale)

<p>안전성 평가</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 혈액학검사: CBC 8종(RBC, WBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelet, MCH, MCV, MCHC), WBC differential 2. 혈액화학검사: BUN, Creatinine, Uric acid, Bilirubin(total, direct), Na, K, Cl, P, Ca 3. 면역혈청검사: HbsAg/Ab, anti-HCV 4. 뇨검사: Protein, Urobilinogen, Bilirubin, Gravity, RBC, WBC, pH, Nitrite, Ketone, Glucose 5. 심전도 검사
<p>통계분석방법</p>	<p>두 군간 연속형 변수의 차이를 검정하기 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 독립 t 검정(independent t-test)을, 그렇지 않을 경우 맨-휘트니 U 검정(Mann-Whitney's U test)을 수행한다. 또, 군 내 시점에 따른 차이 검정을 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 대응 t 검정(paired t-test)을, 그렇지 않을 경우 윌콕슨의 부호순위검정(Wilcoxon's signed rank test)을 수행. 연속형 변수의 정규성 검정은 샤피로-윌크 검정(Shapiro-Wilk's test)을 이용. 통계적 유의성 검정을 위한 유의수준은 5%로 하며 주 평가변수에 영향을 미칠 수 있는 식이섭취량과 음주력, 운동량 변수는 군 간 차이가 있을 경우 통제변수로 고려해 공변량분석을 수행한다. 연속형 자료, 인체적용시험 실험실 검사치, 생체징후변수들에 대하여 기초상태 (baseline), 각 방문시점, 최종 평가시점, 그리고 기초상태에서 최종평가 시점까지의 변화량에 대하여 기술 통계량(연구 참여자 수, 평균, 표준편차)을 제시. 범주형 자료에 대하여는 분할표를 제공한다. 추가적으로, 필요한 경우 95%신뢰구간이 계산될 것임</p> <p>1. 유효성</p> <p>유효성 평가변수인 간 기능검사(AST, ALT, GGT, ALP, LDH, albumin, globulin, Total protein), 항염(TNF-α, IL-6), 지방대사검사(FFA, total cholesterol, LDL, triglyceride, adiponectin, HDL), 당대사(glucose, HbA1c, insulin), 항산화검사(MDA, SOD, catalase)의 주 분석법은 반복측정 자료의 분산분석법(Repeated measures ANOVA)을 이용함. 또한 섭취 전 후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 변화 정도에 대한 섭취군 간의 차이는 독립 Two sample t-test를 이용하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지를 평가함</p> <p>2. 안전성</p> <p>1) 이상반응</p> <p>인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 이상반응(Treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 각 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험 대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석</p>

	<p>2) 인체적용시험 병리검사(혈액학적/혈액화학적, 면역혈청검사, 뇨검사) 섭취 전 (방문 2: 0주)과 섭취 후(방문 4: 12주)의 임상병리검사 결과를 비교하여 변화 값을 산출. 혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석. 면역혈청검사와 뇨검사의 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 MC Nemar 검정을 실시하여 군내 차이를 비교</p> <p>3) 생체징후(맥박, 혈압, 체온) 생체징후(맥박, 혈압, 체온) 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석</p> <p>4) 심전도 검사 심전도검사 결과는 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 분류하여 섭취 전과 후의 군내 변화에 차이가 있는지 MCNemar test를 이용하여 확인</p>
<p>결과</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 유효성 평가 결과 <p>본 인체적용시험의 유효성 평가 변수는 간 기능 검사 I (AST, ALT, GGT), 간 기능 검사 II (ALP, LDH, albumin, globulin, Total protein), 항염(TNF-α, IL-6), 지방대사검사(FFA, total cholesterol, LDL, triglyceride, adiponectin, HDL), 당대사(glucose, HbA1c, insulin), 항산화검사(MDA, SOD, catalase)를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가</p> <p>AST 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(33.52\pm8.49IU/L)에 비하여 복용 12주 후(28.85\pm12.15IU/L) 변화량은 -4.67\pm10.90IU/L 만큼 통계적으로 유의하게 감소함($p=0.035$). 대조군은 제품 복용 전(28.22\pm9.78IU/L)에 비하여 복용 12주 후(29.81\pm10.30IU/L) 변화량은 1.59\pm9.58IU/L 만큼 증가하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타남 ($p=0.029$)</p> <p>ALT 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(53.70\pm20.98IU/L)에 비하여 복용 12주 후(42.11\pm23.66IU/L) 변화량은 -11.59\pm22.88IU/L 만큼 통계적으로 유의하게 감소함($p=0.014$). 대조군은 제품 복용 전(44.78\pm21.65IU/L)에 비하여 복용 12주 후(42.30\pm24.34IU/L) 변화량은 -2.48\pm20.42IU/L 만큼 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음</p> <p>GGT 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(81.48\pm37.54IU/L)에 비하여 복용 12주 후(72.04\pm47.00IU/L) 변화량은 -9.44\pm35.34IU/L 만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전(73.70\pm30.22IU/L)에 비하여 복용 12주 후(73.37\pm45.38IU/L)로 변화량은 -0.33\pm27.98IU/L 만큼 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음.</p>

ALP 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($72.85 \pm 15.99 \text{ IU/L}$)에 비하여 복용 12주 후($73.70 \pm 15.61 \text{ IU/L}$) 변화량은 $0.85 \pm 11.41 \text{ IU/L}$ 만큼 증가하였고, 대조군은 제품 복용 전($77.56 \pm 27.17 \text{ IU/L}$)에 비하여 복용 12주 후($78.37 \pm 25.79 \text{ IU/L}$) 변화량은 $0.81 \pm 10.44 \text{ IU/L}$ 만큼 증가 하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

LDH 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($397.41 \pm 249.22 \text{ IU/L}$)에 비하여 복용 12주 후($353.37 \pm 63.17 \text{ IU/L}$) 변화량은 $-44.04 \pm 241.78 \text{ IU/L}$ 만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전($363.15 \pm 61.63 \text{ IU/L}$)에 비하여 복용 12주 후($342.07 \pm 46.85 \text{ IU/L}$) 변화량은 $-21.07 \pm 47.27 \text{ IU/L}$ 만큼 통계적으로 유의하게 감소하였음($p=0.029$). 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

albumin 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($4.53 \pm 0.25 \text{ g/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($4.59 \pm 0.21 \text{ g/dL}$) 변화량은 $0.07 \pm 0.28 \text{ g/dL}$ 만큼 증가하였고, 대조군은 제품 복용 전($4.62 \pm 0.23 \text{ g/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($4.67 \pm 0.23 \text{ g/dL}$)로 변화량은 $0.05 \pm 0.25 \text{ g/dL}$ 만큼 증가하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

globulin 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($2.76 \pm 0.36 \text{ g/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($2.72 \pm 0.30 \text{ g/dL}$) 변화량은 $-0.04 \pm 0.16 \text{ g/dL}$ 만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전($2.74 \pm 0.26 \text{ g/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($2.73 \pm 0.25 \text{ g/dL}$)로 변화량은 $-0.01 \pm 0.21 \text{ g/dL}$ 만큼 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

Total protein 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($7.61 \pm 0.35 \text{ g/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($7.53 \pm 0.30 \text{ g/dL}$) 변화량은 $-0.07 \pm 0.30 \text{ g/dL}$ 만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전($7.63 \pm 0.34 \text{ g/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($7.57 \pm 0.35 \text{ g/dL}$)로 변화량은 $-0.06 \pm 0.32 \text{ g/dL}$ 만큼 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

TNF- α 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($1.90 \pm 0.91 \text{ pg/m}$)에 비하여 복용 12주 후($1.72 \pm 0.67 \text{ pg/m}$) 변화량은 $-0.18 \pm 0.69 \text{ pg/m}$ 만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전($2.62 \pm 2.37 \text{ pg/m}$)에 비하여 복용 12주 후($1.92 \pm 1.02 \text{ pg/m}$) 변화량은 $-0.70 \pm 2.66 \text{ pg/m}$ 만큼 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

IL-6 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($2.48 \pm 1.81 \text{ pg/m}$)에 비하여 복용 12주 후($2.23 \pm 2.04 \text{ pg/m}$) 변화량은 $-0.25 \pm 1.33 \text{ pg/m}$ 만큼 감소하였고,

대조군은 제품 복용 전($2.67 \pm 1.86 \text{ pg/m}$)에 비하여 복용 12주 후($2.12 \pm 1.79 \text{ pg/m}$) 변화량은 $-0.55 \pm 2.30 \text{ pg/m}$ 만큼 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

FFA 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($309.89 \pm 144.06 \mu\text{Eq/L}$)에 비하여 복용 12주 후($402.48 \pm 218.74 \mu\text{Eq/L}$) 변화량은 $32.59 \pm 255.67 \mu\text{Eq/L}$ 만큼 증가하였고, 대조군은 제품 복용 전($440.89 \pm 177.00 \mu\text{Eq/L}$)에 비하여 복용 12주 후($450.11 \pm 142.81 \mu\text{Eq/L}$) 변화량은 $9.22 \pm 179.69 \mu\text{Eq/L}$ 만큼 증가하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

Total cholesterol 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($197.77 \pm 39.93 \text{ mg/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($205.22 \pm 38.85 \text{ mg/dL}$) 변화량은 $7.45 \pm 24.75 \text{ mg/dL}$ 만큼 증가하였고, 대조군은 제품 복용 전($207.97 \pm 36.00 \text{ mg/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($216.12 \pm 33.71 \text{ mg/dL}$) 변화량은 $8.16 \pm 34.12 \text{ mg/dL}$ 만큼 증가하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

LDL 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($126.04 \pm 33.75 \text{ mg/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($128.37 \pm 37.81 \text{ mg/dL}$) 변화량은 $2.33 \pm 24.58 \text{ mg/dL}$ 만큼 증가하였고, 대조군은 제품 복용 전($135.96 \pm 33.31 \text{ mg/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($133.85 \pm 28.96 \text{ mg/dL}$) 변화량은 $-2.11 \pm 28.13 \text{ mg/dL}$ 만큼 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

Triglyceride 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($184.89 \pm 90.15 \text{ mg/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($169.22 \pm 133.95 \text{ mg/dL}$) 변화량은 $-15.67 \pm 132.67 \text{ mg/dL}$ 만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전($207.52 \pm 92.88 \text{ mg/dL}$)에 비하여 복용 12주 후($260.04 \pm 169.75 \text{ mg/dL}$) 변화량은 $52.52 \pm 118.79 \text{ mg/dL}$ 만큼 통계적으로 유의하게 증가하였음($p=0.030$). 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

adiponectine 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($7.37 \pm 2.86 \mu\text{g/mL}$)에 비하여 복용 12주 후($7.28 \pm 3.13 \mu\text{g/mL}$) 변화량은 $-0.09 \pm 2.09 \mu\text{g/mL}$ 만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전($6.05 \pm 1.92 \mu\text{g/mL}$)에 비하여 복용 12주 후($5.70 \pm 2.17 \mu\text{g/mL}$) 변화량은 $-0.35 \pm 1.06 \mu\text{g/mL}$ 만큼 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

HDL 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($55.93 \pm 14.94 \text{ pg/m}$)에 비하여 복용 12주 후($60.63 \pm 17.04 \text{ pg/m}$) 변화량은

4.70±11.29pg/m 만큼 통계적으로 유의하게 증가하였음($p=0.040$). 대조군은 제품 복용 전(55.00±13.26pg/m)에 비하여 복용 12주 후(51.81±12.65pg/m) 변화량은 -3.19±7.30pg/m 만큼 통계적으로 유의하게 감소하였음($p=0.032$). 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타났음($p=0.004$)

glucose 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(106.67±13.86mg/dL)에 비하여 복용 12주 후(104.96±16.55mg/dL) 변화량은 -1.70±10.07mg/dL 만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전(106.33±12.98mg/dL)에 비하여 복용 12주 후(103.63±13.99mg/dL) 변화량은 -2.70±8.84mg/dL 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

HbA1c 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(5.61±0.61%)에 비하여 복용 12주 후(5.59±0.53%) 변화량은 -0.01±0.23% 만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전(5.59±0.61%)에 비하여 복용 12주 후(5.58±0.43%) 변화량은 -0.01±0.35pg/m 만큼 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

insulin 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(10.70±6.41μU/mL)에 비하여 복용 12주 후(9.66±5.48μU/mL) 변화량은 -1.04±4.95μU/mL 만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전(11.33±5.50μU/mL)에 비하여 복용 12주 후(12.00±7.07μU/mL) 변화량은 0.67±5.26μU/mL 만큼 증가하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 또한, 그룹과 반복 간에서도 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

MDA 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(90.18±37.04pmol/mL)에 비하여 복용 12주 후(75.36±25.64pmol/mL) 변화량은 -14.82±36.25pmol/mL 만큼 통계적으로 유의하게 감소하였다($p=0.043$). 대조군은 제품 복용 전(69.43±27.92pmol/mL)에 비하여 복용 12주 후(77.97±32.69pmol/mL) 변화량은 8.54±39.05pmol/mL 만큼 증가하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타났음($p=0.027$)

SOD 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(1.83±0.57pmol/mL)에 비하여 복용 12주 후(1.91±1.00pmol/mL) 변화량은 0.08±0.54pmol/mL 만큼 증가하였고, 대조군은 제품 복용 전(1.93±0.93pmol/mL)에 비하여 복용 12주 후(1.70±1.01pmol/mL) 변화량은 -0.23±0.34pmol/mL 만큼 통계적으로 유의하게 감소하였음($p=0.002$). 그룹과 반복 간에도 유의한 상호작용이 나타났음($p=0.016$)

catalase 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전($33.19 \pm 9.70 \text{ nmol/min/mL}$)에 비하여 복용 12주 후($32.88 \pm 16.07 \text{ nmol/min/mL}$) 변화량은 $-0.31 \pm 16.53 \text{ nmol/min/mL}$ 만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전($39.03 \pm 15.01 \text{ nmol/min/mL}$)에 비하여 복용 12주 후($28.79 \pm 12.74 \text{ nmol/min/mL}$) 변화량은 $-10.24 \pm 20.51 \text{ nmol/min/mL}$ 만큼 통계적으로 유의하게 감소하였음($p=0.015$). 그룹과 반복 간에서는 유의한 상호작용이 나타나지 않았음

피로심각척도 분석은 '정신적 피로'에서 시험군의 0주, 6주는 12주에서 통계적으로 유의하게 감소하였다($p=0.013$). '졸리움'에서 시험군의 0주는 6주와 12주에서 통계적으로 유의하게 감소하였음($p<0.001$). '신체적부조화'에서 시험군의 0주는 6주와 12주에서 통계적으로 유의하게 감소하였음($p<0.001$). '소진'에서 시험군의 0주는 12주에서 통계적으로 유의하게 감소하였음($p=0.031$)

- 안전성 결과

안전성 평가는 무작위 배정되어 인체적용시험용 식품을 적어도 한번 이상 섭취한 시험대상자를 분석 대상자(Safety Set)로 하였으며, 총 66명(시험군 33명, 대조군 33명)의 인체적용시험 대상자가 Safety Set에 포함되었음

인체적용시험용 식품의 섭취 6주, 섭취 12주 후 시험군, 대조군 모두에서 중대한 이상반응은 발생하지 않았음

본 인체적용시험에서 안전성 평가를 위한 인체적용시험 병리검사는 방문 1과 방문 4에서 시행되었음. 검사항목은 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 면역혈청검사, 뇨검사로 나누어 평가되었음

혈액학적 검사에서 섭취 12주 후 RBC, WBC, Hemoglobin, Platelet, MCH, Monocyte, Eosinophil, Basophil는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. Hematocrit(39-51%), MCV(82-102fL), MCHC(30-35g/dL), Neutrophil Seg(40-70%), Lymphocyte(20-50%)에서는 통계적으로 유의한 차이가 나타났지만, 정상범위 내에서 통계적 유의성이 나타나 안전성에는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 판단됨

혈액화학적검사에서 섭취 12주 후 섭취군간 BUN, Creatinine, Uric acid, Total Bilirubin, Direct Bilirubin, K(Potassium), Phosphorus, Calcium은 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. Na($136-145 \text{ mmol/L}$), Chloride($98-107 \text{ mmol/L}$)에서는 통계적으로 유의한 차이가 나타났지만, 정상범위 내에서 통계적 유의성이 나타나 안전성에는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 판단됨

면역혈청검사(HbsAg, HbsAb, anti-HCV) 분석 결과 섭취 12주 후 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음

뇨검사(Protein, Urobilinogen, Bilirubin(total, direct), Gravity, RBC, WBC, pH, Nitrate, Ketone, Glucose) 분석 결과 섭취 12주 후 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음

심전도 검사 분석결과 섭취 12주 후 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음

생체징후 분석 결과(이완기혈압, 맥박, 체온) 방문 2, 방문 3, 방문 4에서 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 수축기혈압 대조군에서 통계적으로 유의한 차이가 나타났지만, 정상범위 내에서 통계적 유의성이 나타나 안전성에는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 판단됨

본 인체적용시험 기간 동안에 발생한 이상반응의 증상정도 조사에서 총 66명의 인체적용시험 대상자에서 시험군과 대조군에서 경도 (Mild) 1건씩, 총 2건으로 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. 이 2건의 경미한 이상반응은 인체적용시험용 식품과의 관련성에서 시험군과 대조군 모두 '관련이 없다고 생각됨'으로 시험책임자에 의해 판단되었으며, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

인체적용시험에 참여한 인원 중 중대한 이상반응 발생은 없었으며, 시험물질과 관련된 어떠한 이상반응이나 부작용이 나타나지 않아 안전한 물질로 판단됨

1. 분석에 포함될 인체적용시험 대상자군의 선정

2018년 12월 12일 본 인체적용시험의 분석군 판정을 진행하였고, 2018년 12월 13일 윤가림 해제를 진행하였다. 본 인체적용시험의 유효성은 PP(Per- Protocol)을 주 분석으로 하고, ITT (Intention-To-Treat) 원칙에 따라 FA Set(Full Analysis Set)을 분석하였음

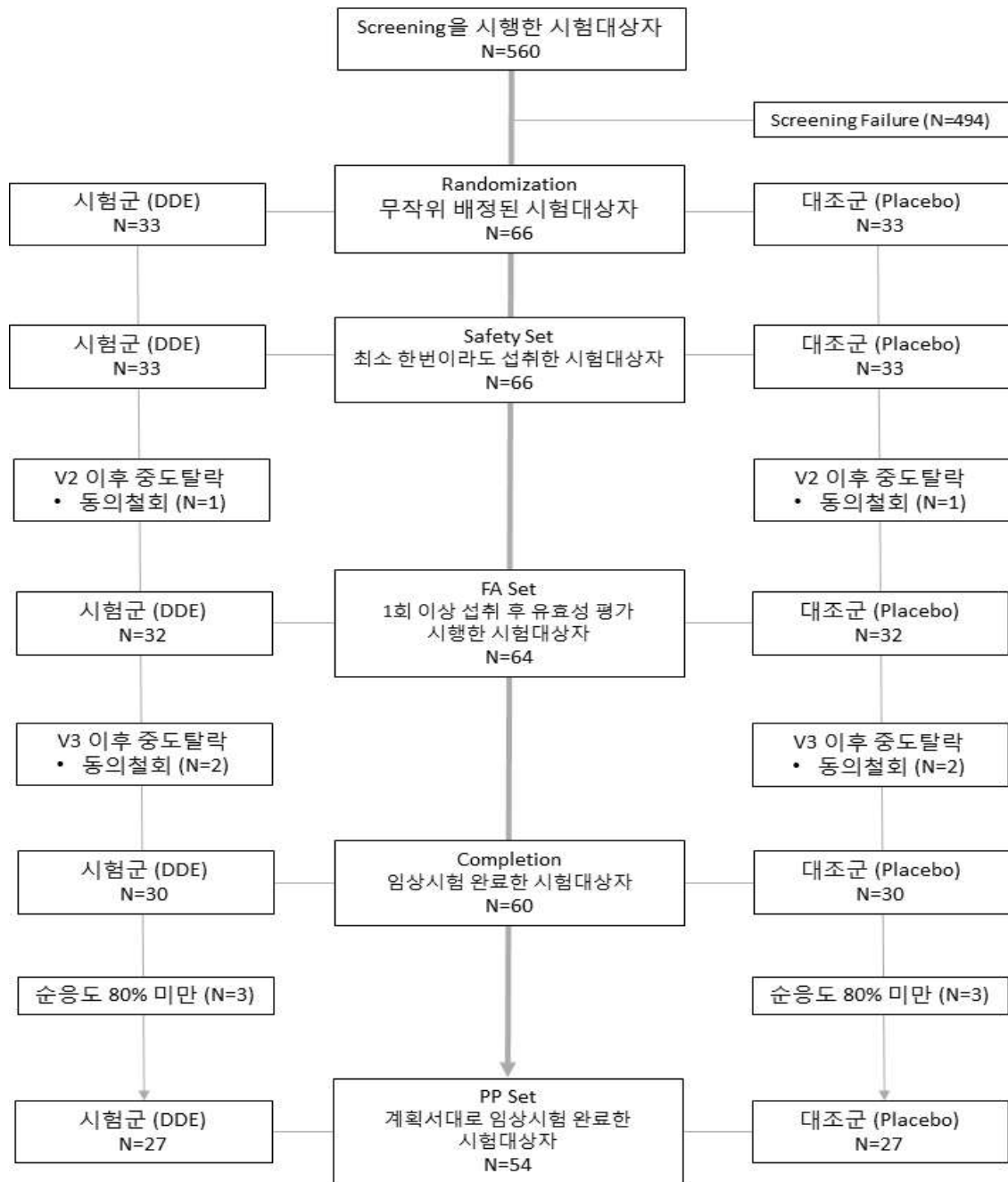


Figure 2-31. 인체적용시험 대상자의 참여 상태 및 분석군 정리

2. 유효성 평가 결과

2-1. 간기능 검사(1)

<Table 2-51> 간기능 검사 차이 분석 결과

variable	group	visit 1(n=54)	visit 4(n=54)	difference	t(p)*	F (p)#
		mean±SD	mean±SD	mean±SD		
AST (IU/l)	시험군	33.52±8.49	28.85±12.15	-4.67±10.90	2.224(0.035)	5.020 (0.029)
	대조군	28.22±9.78	29.81±10.30	1.59±9.58	-0.863(0.396)	
	t(p)**	2.126(0.038)	-0.314(0.755)			
ALT (IU/l)	시험군	53.70±20.98	42.11±23.66	-11.59±22.88	2.633(0.014)	2.383 (0.129)
	대조군	44.78±21.65	42.30±24.34	-2.48±20.42	0.631(0.533)	
	t(p)**	1.538(0.130)	-0.028(0.977)			
γ-GTP (IU/L)	시험군	81.48±37.54	72.04±47.00	-9.44±35.34	1.389(0.177)	1.103 (0.298)
	대조군	73.70±30.22	73.37±45.38	-0.33±27.98	0.062(0.951)	
	t(p)**	0.839(0.406)	-0.106(0.916)			

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

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

: Compared between groups; p-value by Repeated measure ANOVA

2-2. 지방대사검사

<Table 2-52> 지방대사검사 분석 결과

variable	group	visit 1(n=54)	visit 4(n=54)	difference	t(p)*	F (p)#
		mean±SD	mean±SD	mean±SD		
FFA (μEq/L)	시험군	369.89±144.06	402.48±218.74	32.59±255.67	-0.662(0.514)	0.151 (0.699)
	대조군	440.89±177.00	450.11±142.81	9.22±179.69	-0.267(0.792)	
	t(p)**	-1.617(0.112)	-0.947(0.348)			
Total cholesterol (mg/dL)	시험군	197.77±39.93	205.22±38.85	7.45±24.75	-1.564(0.130)	0.008 (0.931)
	대조군	207.97±36.00	216.12±33.71	8.16±34.12	-1.242(0.225)	
	t(p)**	-0.985(0.329)	-1.101(0.276)			

variable	group	visit 1(<i>n</i> =54)	visit 4(<i>n</i> =54)	difference	<i>t</i> (<i>p</i>)*	F (<i>p</i>) [#]
		mean±SD	mean±SD	mean±SD		
LDL (mg/dL)	시험군	126.04±33.75	128.37±37.81	2.33±24.58	-0.493(0.626)	0.382 (0.539)
	대조군	135.96±33.31	133.85±28.96	-2.11±28.13	0.390(0.700)	
	<i>t</i> (<i>p</i>)**	-1.088(0.282)	-0.598(0.552)			
triglyceride (mg/dL)	시험군	184.89±90.15	169.22±133.95	-15.67±132.67	0.614(0.545)	3.958 (0.052)
	대조군	207.52±92.88	260.04±169.75	52.52±118.79	-2.297(0.030)	
	<i>t</i> (<i>p</i>)**	-0.908(0.368)	-2.182(0.034)			
adiponectin (µg/mL)	시험군	7.37±2.86	7.28±3.13	-0.09±2.09	0.236(0.815)	0.325 (0.571)
	대조군	6.05±1.92	5.70±2.17	-0.35±1.06	1.719(0.097)	
	<i>t</i> (<i>p</i>)**	1.987(0.052)	2.152(0.037)			
HDL (pg/m)	시험군	55.93±14.94	60.63±17.04	4.70±11.29	-2.165(0.040)	9.300 (0.004)
	대조군	55.00±13.26	51.81±12.65	-3.19±7.30	2.268(0.032)	
	<i>t</i> (<i>p</i>)**	0.241(0.811)	2.158(0.036)			

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

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

: Compared between groups; *p*-value by Repeated measure ANOVA

2-3. 항산화검사

<Table 2-53> 항산화검사 분석 결과

variable	group	visit 1(<i>n</i> =54)	visit 4(<i>n</i> =54)	difference	<i>t</i> (<i>p</i>)*	F (<i>p</i>) [#]
		mean±SD	mean±SD	mean±SD		
MDA (pmol/mL)	시험군	90.18±37.04	75.36±25.64	-14.82±36.25	2.124(0.043)	5.190 (0.027)
	대조군	69.43±27.92	77.97±32.69	8.54±39.05	-1.137(0.266)	
	<i>t</i> (<i>p</i>)**	2.324(0.024)	-0.327(0.745)			
SOD (pmol/mL)	시험군	1.83±0.57	1.91±1.00	0.08±0.54	-0.758(0.455)	6.263 (0.016)
	대조군	1.93±0.93	1.70±1.01	-0.23±0.34	3.494(0.002)	
	<i>t</i> (<i>p</i>)**	-0.505(0.616)	0.742(0.461)			

variable	group	visit 1(n=54)	visit 4(n=54)	difference	t(p)*	F(p)#
		mean±SD	mean±SD	mean±SD		
catalase (nmol/min/ mL)	시험군	33.19±9.70	32.88±16.07	-0.31±16.53	0.097(0.924)	3.838 (0.055)
	대조군	39.03±15.01	28.79±12.74	-10.24±20.51	2.594(0.015)	
	t(p)**	-1.696(0.097)	1.038(0.304)			

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

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

: Compared between groups; p-value by Repeated measure ANOVA

2-4. 피로심각척도 설문(피로 자각도)

<Table 2-54> 피로심각 척도 설문

variable	group	visit 1(n=54)	visit 3(n=54)	visit 4(n=54)	F(p)*	Post-hoc**
		mean±SD	mean±SD	mean±SD		
정신적 피로	시험군	2.33±0.66	2.10±0.59	1.97±0.64	7.091(0.013)	a,b>c
	대조군	2.15±0.73	2.14±0.70	2.12±0.72	0.095(0.760)	-
	t(p)***	0.980(0.332)	-0.209(0.835)	-0.795(0.430)		
신경계 기능 장애	시험군	2.21±0.97	1.91±0.69	2.02±0.83	0.939(0.341)	-
	대조군	1.85±0.71	2.05±0.76	1.94±0.56	0.354(0.557)	-
	t(p)***	1.546(0.128)	-0.690(0.493)	0.449(0.655)		
졸리움	시험군	2.79±0.70	2.36±0.81	2.33±0.78	12.606(<0.001)	a>b,c
	대조군	2.66±0.76	2.59±0.67	2.54±0.79	0.969(0.334)	-
	t(p)***	0.671(0.505)	-1.133(0.262)	-0.969(0.337)		
신체적 부조화	시험군	2.81±0.77	2.48±0.85	2.31±0.79	21.972(<0.001)	a>b,c
	대조군	2.59±0.61	2.47±0.65	2.42±0.73	1.894(0.180)	-
	t(p)***	1.178(0.244)	0.036(0.972)	-0.533(0.596)		

variable	group	visit 1(<i>n</i> =54)	visit 3(<i>n</i> =54)	visit 4(<i>n</i> =54)	F(<i>p</i>) [*]	Post-hoc ^{**}
		mean±SD	mean±SD	mean±SD		
소진	시험군	2.38±0.75	2.26±0.85	2.10±0.84	5.230(0.031)	a>c
	대조군	2.27±0.80	2.26±0.88	2.22±0.93	0.155(0.697)	-
	t(<i>p</i>) ^{***}	0.526(0.601)	0.000(1.000)	-0.512(0.611)		

*: Compared groups: p-value by Reapeated measure ANOVA

**: Post-hoc: a: visit1, b: visit2, c: visit3

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

3. 이상반응

3-1. 이상반응 증상정도 및 시험용 식품과의 관련성

<Table 2-55> 인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응 상세

대상자 번호	Preferred term	무작위 배정일	발생시점	소실시점	증상 정도 ^a	인과 관계 ^b	관련 조치 ^c	경과 ^d
NY-R020	Vomiting	2018-01-26	2018-03-10	2018-03-10	1	4	3	1
NY-R043	Diarrhea	2018-03-28	2018-05-04	2018-05-05	1	4	3	1

a 1: 경도, 2: 중등도, 3: 중증

b 1: 명확히 관련이 있음, 2: 관련이 있다고 생각됨, 3: 관련 가능성이 있음, 4: 관련 없다고 생각됨, 5: 명확히 관련이 없음, 6: 알수 없음

c 1: 없음, 2: 감량, 3: 일시중단 후 재투여, 4: 투여중단

d 1: 완전치유(후유증 없음), 2: 치유, 3: 진행중, 4: 영구적 손상, 5: 사망

3-2. 이상반응 검사

이상반응 검사항목은 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 면역혈청검사, 뇨검사로 나누어 평가하였고, 모든 항목이 정상범위 내에서 변화량이 나타나 안전성에는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 시험 책임자(내과 전문의)에 의해 판단되었음

Confidential

인체적용시험 결과보고서

댕댕이나무열매(Lonicera caerulea L.) 투여가 비알콜성 간 기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험; 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구

시험식품	댕댕이나무열매 추출분말
인체적용시험 시작일	2018.01.05
인체적용시험 종료일	2018.10.29
인체적용시험 책임자	조애리 (내과 전문의)
인체적용시험 공동연구자	조민호 교수
인체적용시험 실시기관	양병원
인체적용시험 종료보고 승인일	2019.01.
인체적용시험 지원기관	농림축산식품부 농림식품기술기획평가원 고부가가치식품기술개발사업(11619-03)

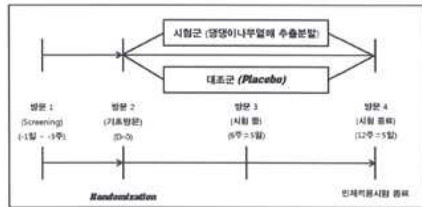
본 인체적용시험은 국제 임상시험관리기준(ICM-GCP)에 준하여 시행되었습니다. 본 보고서의 포함된 모든 정보는 인체적용시험 책임자의 서면 동의 없이 공개될 수 없습니다.

Confidentiality statement

(주)아리바이오

연구수행방법

본 시험은 이중눈가림, 무작위배정, 대조식품 비교, 병행성계 인체적용시험, 모집공고 등을 통해 본 시험에 지원한 자가 시험에 대해 충분히 이해하고 자의에 의해 참여할 것을 서면으로 동의하면, 혈액학적 검사 실시 후 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자에 한하여 시험군 또는 대조군에 1:1로 무작위 배정한다. 무작위 배정된 연구대상자는 시험용 식품을 배부 받고 매일 2회 고지된 방법대로 복용한다.



0주(baseline), 12주째 유효성 및 안전성 평가변수에 대한 측정 및 검사를 실시하고 그 결과에 대하여 분석한다.

연구결과 요약

- 유효성 평가 항목
 - 유효성 평가변수 중 AST, ALT, HDL, MDA, SOD, 피로심각척도 항목에서 통계적 유의성을 나타내어, 12주간 댕댕이나무열매 추출분말 섭취는 비알콜성 간기능 개선에 긍정적인 효과가 나타났다.
 - 피로심각척도 설문지에서 정신적 피로, 출리움, 신체적부조화, 소진 항목에서 피로자각도는 유의하게 감소하는 것으로 나타났다.
- 안전성 평가 항목
 - 안전성에 관해서는 중대한 이상반응 및 기타 중요한 이상반응의 검사 소견이 나타나지 않아 댕댕이나무열매 추출분말은 안전한 것으로 확인하였다.

첨부문서
 결과보고서 논문 학술대회발표자료
 기타: _____

연구(조기)종료 보고서

기본정보				
과제 관리번호	196452-HR-00008			
연구 과제명	댕댕이나무열매 투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선효과에 미치는 인체적용 시험; 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구			
연구 책임자	성명	소속	직위	전공분야
	조애리	양병원	전문의	내과

보고 내용	
<input type="checkbox"/> 조기 종료보고 <input checked="" type="checkbox"/> 종료보고	
종료보고 요약	<p>본 임상시험의 유효성은 PP(Per- Protocol)을 주 분석으로 하고, ITT(Intention-To-Treat) 원칙에 따라 FAS(Full Analysis Set)를 분석하는 것으로 계획되었다.</p> <p>Safety Set은 임상시험에서 무작위배정된 후 임상시험용 식품을 1회 이상 섭취한 임상시험 대상자로서 시험군 33명, 대조군 33명이 분석에 포함되었다.</p> <p>FAS(Full Analysis Set)는 계획서에 기술하였던 대로 첫 방문 후 최소한 1회 이상의 1차 또는 2차 유효성 평가변수를 시행하고, 주요 선정/제외기준 위반에 해당되지 않는 임상시험 대상자 집단으로 이루어 졌다. 따라서 동의철회 하여 유효성 평가를 실시하지 않은 임상시험대상자 6명(시험군 3명, 대조군 3명)이 제외됨에 따라 총 60명(시험군 30명, 대조군 30명)이 FA Set 에 포함되었다.</p> <p>PP(Per-Protocol)는 FA Set 분석에 포함된 임상시험 대상자 중에서 임상시험을 종료하고, 임상시험결과에 영향을 미치는 중대한 위반 사항이 없는 대상자로서 총 60명(시험군 30명, 대조군 30명)중 분석군 편성을 통해 순응도 80%미만 6명이 제외됨에 따라 총 54명(시험군 27명, 대조군 27명)이 PPset에 포함되었다.</p>
연구 결과 요약	
연구수행기간	연구 예정 기간 위원회 승인일 이후 ~ 1년 실제 연구 기간 2018년 1월 5일 ~ 2019년 01월 4일

연구대상자 관련 사항			
예상 연구대상자 수	기관:	명 (전체 명)	
등록 현황	연구 등록 연구대상자 수:	54 명 (전체: 66 명)	
세부 현황	스크리닝 (560)명 = 스크리닝 탈락(494)명 + 등록(66)명		
연구대상자 등록 현황 (보고일 현재)	등록(66)명 = 중도탈락(6)명 + 진행중(6)명 + 완료(54)명		
중도 탈락 사유 (* 필요시 간수가 후 기입)	스크리닝 탈락 사유	선정기준미달: 494 명 기 타: 명	
	구 분	세부내용	
	동의철회	6명 방문불가	
	이상반응발생	2명 시험군 1명, 대조군 1명 총 2명의 이상반응(경도) 발생/일 시중단후 세부여/완전치유	
	기 타	6명 순응도미달	
연구대상자 안전 관련 보고 사항	중대한 이상반응	건	
	예상치 못한 중대한 이상반응	건	
	예상치 못한 문제	건	
중대한 이상반응 요약 (* 필요시 간수가 후 기입)	이상반응	연구와의 연관성	예상 여부 결과
기 타	계획서 위반/이탈	<input type="checkbox"/> 예: _____ <input type="checkbox"/> 아니요	
	연구대상자의 불만사항	<input type="checkbox"/> 예: _____ <input type="checkbox"/> 아니요	

위와 같이 (조기)종료보고서를 제출합니다.

* 첨부서류(결과보고서)

신청일자: 2019년 1월 11일

연구책임자: 조애리



Figure 2-32. 인체적용시험 결과보고서 및 연구종료승인서

결론

본 인체적용시험에서 실시한 시험군(하니베리 추출분말), 대조군의 12주간 투여 후 비알콜성 간 기능 개선에 미치는 영향과 안전성을 평가한 결과 아래와 같은 결론을 확인하였음

1. 유효성 평가변수 결과

- 1) 간 기능 1차 유효성 평가변수인 AST에서 시험군의 경우 통계적으로 유의하게 감소하였고, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서도 유의한 차이가 나타났음
- 2) 간 기능 1차 유효성 평가변수인 ALT에서 시험군의 경우 통계적으로 유의하게 감소하였음
- 3) 지방대사 평가변수인 HDL에서 시험군의 경우 통계적으로 유의하게 증가하였고, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서도 유의한 차이가 나타났음
- 4) 항산화 평가변수인 MDA에서 시험군의 경우 통계적으로 유의하게 감소하였고, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서도 유의한 차이가 나타났음
- 5) 항산화 평가변수인 SOD에서 시험군의 경우 증가하는 경향을 확인(유의성 없음) 하였지만, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서는 유의한 차이가 나타났음
- 6) 피로심각척도 문항분석은 '정신적 피로', '졸리움', '신체적부조화', '소진'에서 피로자각도는 유의하게 감소하는 것으로 나타났음

2. 안전성 결과

본 인체적용시험 기간 동안 총 66명에서 2건, 시험군 1명(1건), 대조군 1명(1건)의 이상반응(경도 1)이 나타났지만, 인체적용시험용 식품과의 관련성에서 시험군과 대조군 모두 '관련이 없다고 생각됨'으로 시험책임자에 의해 판단되었으며, 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. 또한, 이 2명(2건)의 피험자들은 투여를 일시중단(1-2일) 후 완전치유를 확인하고, 재 투여 하여 12주 인체적용시험을 완료하였음. 이상반응 검사항목은 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 면역혈청검사, 뇨검사로 나누어 평가하였고, 모든 항목이 정상범위 내에서 변화량이 나타나 안전성에는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 판단됨. 인체적용시험에 참여한 인원 중 중대한 이상반응 발생은 없었으며, 시험물질과 관련된 어떠한 이상반응이나 부작용이 나타나지 않아 안전한 물질로 판단됨

다. 기능성 원료 신청

<Table 2-56> 기능성원료 신청 자료

기능성 원료 신청 내용 요약	
1. 원료명	댕댕이나무열매 추출분말
2. 원재료	댕댕이나무열매 (학명: <i>Lonicera caerulea</i> L.), 사용부위 : 열매

3. 기능(지표)성분	C3G(cyanidin-3-glucoside) 성분 : 7.5 mg/g	
4. 제조공정	땃땃이나무열매 → 껍질 → 추출 → 착즙 및 여과 → 원심분리 → 농축 → 건조(첨가: 텍스트린) → 혼합 → 신청 원료	
5. 규격 및 시험방법	1) 성장 : 땃땃이나무열매 추출분말로서 이미·이취가 없고 고유의 향미가 있는 붉은색 분말 2) C3G(cyanidin-3-glucoside) (기능 또는 지표성분) : 7.5 mg/g 3) 납(mg/kg) : 1 이하 4) 총비소(mg/kg) : 1 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 0.5 이하 6) 총수은(mg/kg) : 0.5 이하 7) 대장균군 : 음성 8) 영양성분 : 열량 376.99Kcal/100g, 탄수화물 91.62%, 조지방 0.87%, 조단백질 0.68%, 수분 4.80%, 회분 2.03%, 나트륨 16.75mg/100g	
	기능(지표) 성분 시험법	자사 시험방법 HPLC UV 516 nm, C18 4.6 × 250 mm, 5 μm
	규격 외 (잔류농약)	「수입식품등 검사에 관한 규정」에 신청원료에 대한 농약의 잔류허용기준은 없으며, 이에 따라 5종 잔류농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)에 대하여 국내 식품위생검사기관 시험결과 ‘불검출’ 임을 확인함
6. 안전성	의사결정도	섭취경험이 있는 <i>Lonicera caerulea</i> L.의 땃땃이나무열매를 물로 추출한 것(특성 성분이 분리·정제되지 않음)으로, 알려진 부작용이 없으며, 섭취량이 일상 섭취량 혹은 전통적 섭취량, 유통 판매 섭취량 보다 증가하지 않았으므로 의사결정도 ‘나’에 해당
	섭취 근거	<인정현황> ◦ 한국 : 식품의 기준 및 규격, 식품원료목록 ‘땃땃이나무’로 등재 ◦ 유럽 : Technical Report, 26 June 2018. 전통식품으로 ‘EFSA’에서 인정 ◦ 일본 : 농산물 식품분류로 ‘후생방위성 식품안전부’ 2015. 8판에 등재 <사용현황> ◦ 국내 : 신청원료 함유 제품 생산 및 유통 ◦ 일본, 중국, 캐나다 등 : 유사원료 함유 제품 생산 및 유통 ◦ 중국 : 중화본초 제5권 7권에 등재 (품목명: 백두산 식용약초[남정과(藍錠果)], 기능성: 간해독, 일일섭취량: 전탕 6-12g)
	안전성 정보	◦ 안전성 정보 DB : 신청원료와 관련되어 안전성, 이상반응, 독성평가의 내용은 보고되지 않았음 ◦ 식품 및 영양소 간 상호작용 DB검색 결과 신청원료 및 유사 원료에 대한 자료의 내용은 보고되지 않았음
	섭취량 평가	◦ 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 1,960 mg/일 ● 신청원료 땃땃이나무열매 원물로 환산시, 9.72 g/일에 해당 ● 유사원료의 시중 유통제품 (기타가공품) : 36 g/일 ● 문헌에 의한 전통적(통상)섭취량: 12 g/일 ⇒ 제안된 최대 섭취량은 원재료(땃땃이나무열매)로서 “1일 9.72g”을 섭취하는 것에 해당하며, 전통적 사용량 또는 유통판매 섭취량보다 증가하지 않았음
인체적용시험	◦ 성인 남녀(66명)에게 신청원료 1,960mg/일을 12주간 섭취시킨 결과, 안전성	

		<p>지표(혈액학적 검사, 혈액화학적검사, 면역혈청검사, 뇨검사, 심전도검사 및 활력징후검사)의 수치가 모두 정상 범위내에서 분포하는 것으로 나타남</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 시험군 경도 1건, 위약군 경도 1건 총 2건의 경미한 이상반응이 나타났음. 2명 모두 별도의 교정치료 없이 임상시험용 식품을 일시 중단하였고, 완전치유 후 재투여 하여, 12주 인체적용시험을 완료하였음 ◦ 이상반응으로 인한 중도탈락자 및 중대한 이상반응은 없는 것으로 나타나 땡땡이나무열매 추출분말은 안전한 물질로 판단됨
	독성 시험	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 단회 및 반복 투여시험에서 이상반응 및 독성 나타나지 않았음 ◦ 유전독성시험 결과, 독성이 관찰되지 않았음
	기타 사항	- 의사결정도 “나”에 해당되지만, 독성 연구를 진행 하였음.
	섭취 시 주의사항	<p>“땡땡이나무열매”에 대한 특이체질, 알러지 체질, 임산부 및 수유부의 경우 성분을 확인하고 섭취하시기 바람</p> <ul style="list-style-type: none"> • 땡땡이나무열매는 독성학적 보고나 이상반응은 보고되지 않았다. 하지만, 동물실험(독성)에서는 안전성이 입증되었다 하더라도 특정성분에 대한 알레르기 체질이나 임산부, 수유부의 경우 섭취에 주의할 필요는 있을 것으로 판단됨
	신청 기능성	비알콜성 간기능 손상으로부터 간보호
	신청 일일섭취량	땡땡이나무열매 추출분말 로서 1,960 mg/일
	시험관시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 간암세포주(HepG2) <ul style="list-style-type: none"> - 대조군: 정상대조군 - 시험군 1:중국산 땡땡이나무열매 추출물 3, 10, 30, 100, 300ug/ml - 시험군 2:국내산 땡땡이나무열매 추출물 3, 10, 30, 100, 300ug/ml ◦ 대조군 대비 시험군의 Nrf2 transactivation이 유의하게 증가(p<0.05) ◦ 대조군 대비 시험군의 SOD, catalase activity가 유의하게 증가하였음(p<0.05) ◦ 대조군 대비 시험군의 세포독성은 나타나지 않았음 ◦ 간세포생존률 결과 간독성유발물질 tBHT처리군 대비 시험군 세포의 유의한 생존율 증가(p<0.05) <p>※시험물질 : 땡땡이나무열매 추출물</p>
	동물시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 고지방식이(HFD) 간손상 mice 모델(6주령), 100, 200, 400mg/kg/일, 경구투여 84일 <ul style="list-style-type: none"> - 간내 효소(AST, ALT, ALP, LDH, GGT, BUN, creatine) 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.05) - glucose 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.01, p<0.05) - TC, TG, LDL-c, 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.01), HDL-c 유의적 증가(HFD대조군 대비 p<0.01, p<0.05) - MDA 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.01), glutathione, catalase, SOD 유의적 증가(HFD대조군 대비 p<0.01, p<0.05) - zymogen granules 유의적 증가(HFD대조군 대비 p<0.01), mean islet numbers, mean islet diameter 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.01) - insulin-IR cells, glucagon-IR cells, insulin/glucagon ratio 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.01)

결론

상기와 같은 근거로, “쭈아리바이오”는 안전하고 유효한 “맹맹이나무열매 추출분말”로 “비알콜성 손상으로부터 간 보호”에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 기능성원료로 신청하였음

6. 3차년도 협동기관(가천대학교 산학협력단) 연구개발 및 결과

3차년도 개발 목표

- 협동기관(가천대학교 산학협력단) : 기전연구

1. 실험방법

1-1. 세포 배양 및 지방간 유도

- HepG2 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 분양 받았으며, 배지는 10% FBS (GIBCO, CA, USA)를 포함하는 DMEM 배지에 1% antibiotic-antimycotic (GIBCO, CA, USA)을 첨가하여 조제하였음
- 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 실시함. 1mM free fatty acid(FFA, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 비알콜성 손상(비알콜성 지방간)을 유도하였음

1-2. 세포 생존율 측정

- 세포 생존율은 CCK-8 assay로 측정하였음. HepG2 cell을 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 2×10⁴ cell/mL의 농도로 96-well plate에 well 당 100 μL 씩 분주한 뒤 24시간 동안 전 배양하여 세포를 부착시킨 뒤 시험물질을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였음
- 배양이 끝난 뒤 각 well에 CCK-8 용액을 10 μL 가한 후 알루미늄 호일로 밀폐하여 2시간 동안 다시 배양한 뒤 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였음

1-3. 세포 내 지방 축적도 측정

- 유리지방산(FFA)을 이용하여 지방축적을 유도하였으며 세포 내 축적된 지방은 Oil red O staining 염색법을 이용하여 측정하였음
- HepG2 세포를 1×10⁴ cells/well의 농도로 12 well plate에 분주하여 세포 밀도가 80%에 도달할 때까지 배양한 다음, 세포의 추가적인 성장이 억제된 상태에서 지방축적을 유도하기 위해 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지로 교체하여 24시간동안 배양하였음

- 각 well에 하니베리 추출물 (Honeyberry extract, HBE)을 농도 별로 처리하여 2시간 동안 배양한 후, 10% FBS 용액에 희석시킨 FFA solution을 최종 농도가 1mM이 되도록 첨가하여 24시간동안 배양하였음
- 배양이 끝난 HepG2 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 4% formaldehyde를 처리하여 30분간 상온에서 고정하였음. 고정한 세포에 0.4 μm filter로 여과한 Oil-Red O 염색시약을 20분간 처리한 뒤 증류수로 Oil-Red O 염색시약을 충분히 세척하고 현미경에서 $\times 100$ 배로 확대하여 사진촬영을 하였음
- 사진촬영 후 isopropanol을 처리하여 염색된 세포 지방구에서 Oil-Red O 염색약을 추출한 뒤 500 nm에서 흡광도를 측정하였음

1-4. RNA 추출 및 RT-PCR

- RNA 추출은 HepG2 세포와 간조직을 PBS로 2회 세척한 후 수득하여 RNA extraction kit (17221, iNtRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)을 이용하여 total RNA를 분리하였음
- 분리된 RNA 50ng을 cDNA로 합성한 후 (Promega, Madison, USA) SYBR Green Master Mix (TaKaRa Bio, Otsu, Japan)를 사용하여 ABI QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Foster City, USA) 장비로 qRT-PCR 분석을 수행하였음

1-5. Western blot 분석

- HepG2 세포와 간조직의 단백질을 40 μg 을 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 전기영동으로 분리된 단백질은 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane(Merck Millipore, Bedford, MA, USA)에 transfer하였음
- Transfer된 membrane을 5% skim milk에 1시간 동안 blocking한 다음, 1차 항체를 membrane에 4°C에서 overnight 반응시키고 TBS-T (Tris-buffered saline in 1% Tween 20)로 3회 washing 한 후 1차 항체에 대한 특이적 2차 항체를 실온에서 1 시간 동안 반응시킴
- Membrane은 3회 washing한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagent (16028, iNtRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)으로 발색한 후 ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)으로 촬영 및 분석하였음

1-6. 통계처리

- 모든 자료의 통계 분석은 SPSS software(SPSS 23, SPSS Inc., USA)을 이용하여 평균 (mean)과 표준편차(S.D)로 나타내었음
- 각 실험 군 간의 유의성 검증을 위하여 일원 배치 분산 분석(one-way ANOVA)으로 분석하였으며 사후 검증으로 Tukey's test에 따라 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였음

2. 실험결과

2-1. 세포 생존율

- FFA로 지방축적을 유도한 HepG2 세포에 HBE를 각각 125, 250, 500, 750, 1000 μ g/mL 농도로 처리하여 24시간동안 배양한 후 세포독성을 측정하였음
- 측정 결과 모든 농도에서 유의적인 차이가 나타나지 않아 HBE가 모든 농도(125-1000 μ g/mL)에서 세포 독성이 없음을 확인하였음(Figure 2-33)

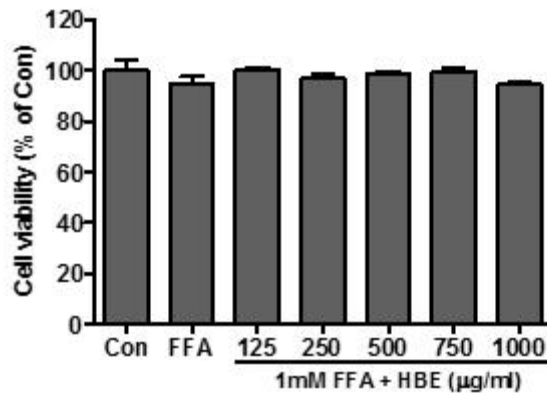


Figure 2-33. Effect of Honeyberry extract (HBE) on the viability of HepG2 cells.

Con: control, FFA: free fatty acid. All experiments were repeated at least three times and data represent means \pm SD.

2-2. 지방 축적 및 중성지방량

- 하니베리 추출물이 지방 분화에 미치는 효과를 알아보기 위해 1mM FFA와 HBE(250, 500, 1000 μ g/ml)를 함께 처리한 후 HepG2 cell의 지방구를 염색한 결과 FFA만 처리한 군에 비해 HBE군이 농도 의존적으로 지방구 형성이 억제되는 것을 확인하였음
- Oil Red O 염색 후 지방 축적량을 측정한 결과 Con 군에 비해 FFA만 처리한 군에서는 지방 축적량이 증가하였음($p < 0.001$). FFA만 처리한 군에 비해 HBE 250 μ g/ml($p < 0.01$), 500 μ g/ml와 1000 μ g/ml($p < 0.001$)의 세군 모두에서 지방축적량이 감소하였음(Figure 2-34)
- HepG2 cell의 총 중성지방량을 측정한 결과 Con에 비해 FFA만 처리한 군에서는 지방 축적량이 현저하게 증가하였음(823%, $p < 0.001$). FFA만 처리한 군에 비해 HBE 250 μ g/ml 농도에서는 지방축적량이 32%($p < 0.01$) 감소하였고, 500 μ g/ml 농도에서는 31%($p < 0.001$), 1000 μ g/ml 농도에서는 14%($p < 0.001$) 감소하였음(Figure 2-34)

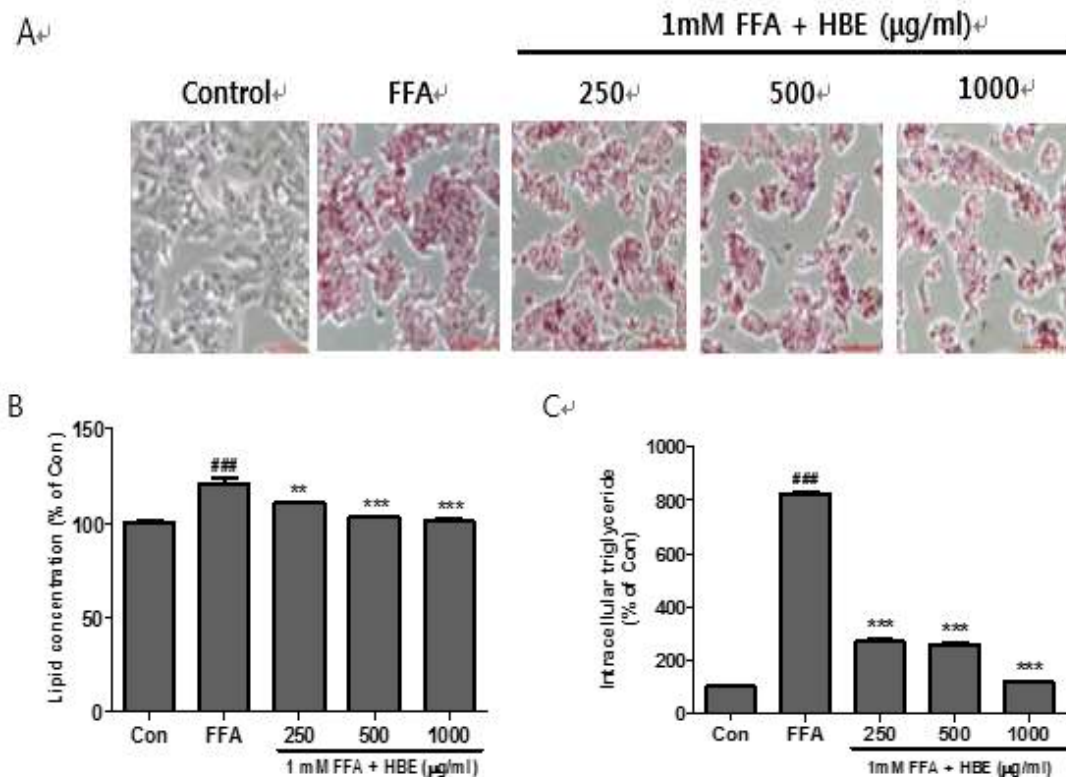


Figure 2-34. Effect of HBE on Oil Red O staining and lipid accumulation in HepG2 cells. Lipid droplets in HepG2 cells were dyed red(magnification 200X). (A) Oil Red O staining images of HepG2 cells treated with 1mM FFA and exposed to various concentration of HBE with 1mM FFA for 24h. Control (Con) cells were incubated with 1% fat-free fetal bovine serum. (B) Quantitative lipid accumulation of Oil Red O contents at 500 nm. (C) Total intracellular triglyceride in HepG2 cells treated with HBE and 1mM FFA.

Data represent means \pm SD. ### p < 0.001 vs. Con; ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. FFA.

2-3. HepG2 세포의 SREBP-1c, C/EBP α , PPAR γ , FAS mRNA 및 단백질 발현량

- 지방세포 분화 과정에서는 sterol regulatory element-binding protein-1c(SREBP-1c), CCAAT-enhancer-binding proteins α (C/EBP α), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR γ)와 Fatty acid synthase FAS)은 발현량이 증가하면 지방 생성이 증가하는 대사에 관여함
- SREBP-1c, C/EBP α , PPAR γ , FAS mRNA 발현량을 측정한 결과, 지방축적이 되지 않은 Con 군에 비해 지방축적을 유도한 FFA군에서 현저하게 유전자 발현량이 증가하였음
- 지방축적이 된 HepG2 cell에 HBE를 처리한 결과 FFA군에 비해 지방 생합성에 관련된 유전자 모두가 유의하게 감소되었음. SREBP-1c, C/EBP α , FAS mRNA 발현량은 HBE (250, 500, 1000 μ g/ml) 모두에서 유의하게 감소하였고, PPAR γ mRNA 발현량은 HBE (500, 1000 μ g/ml)에서 유의하게 감소하였음(p<0.001, Figure 2-35)

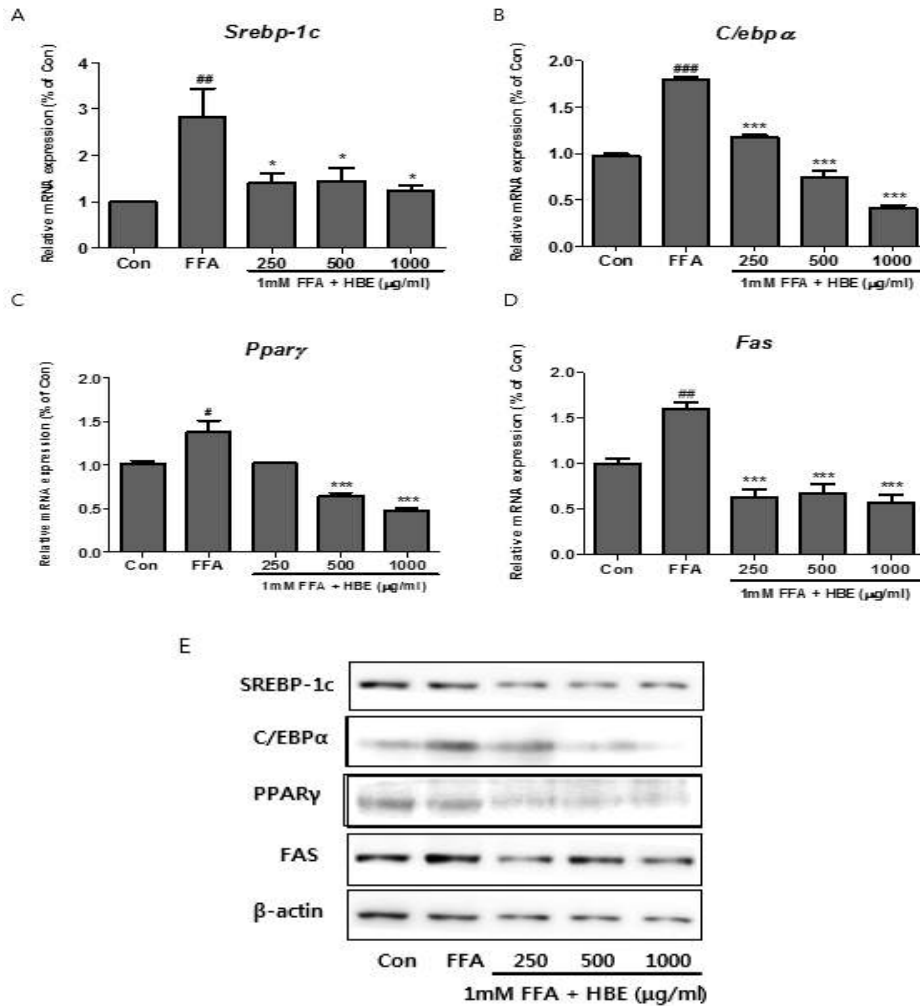


Figure 2-35. Effects of HBE on the expression of genes associated with lipogenesis in HepG2 cells. The expression of SREBP-1c, C/EBPα, PPARγ, and FAS were quantified by real-time PCR and normalized by β-actin as an internal control.

Data represent means ± SD. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs. Con; ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. FFA.

2-4. HepG2 세포의 AMPK, ACC, CPT1, PPARα mRNA 발현 및 단백질 발현량

- 지방 대사에 있어서 중요한 신호전달 물질인 AMP-activated protein kinase(AMPK), acetyl-CoA carboxylase(ACC), peroxisome proliferator-activated receptor α(PPARα) carnitine palmitoyl transferase-1(CPT1)의 유전자 발현을 western blot 분석을 통해 측정하였음
- CPT1 단백질 발현량은 Con 군에 비해 FFA만 처리한 군에서 유의적으로 증가하였으며 (p<0.001), FFA군에 비해 HBE 500μg/ml, 1000μg/ml 농도에서 발현량이 유의적인 증가를 보였음(p<0.001, Figure 2-36)
- PPARα 발현은 FFA만 처리한 군에 비해 HBE 모든 농도에서 증가하였으나 500μg/ml와 1000μg/ml 농도에서 유의적인 증가를 보였음(p<0.001, p<0.01). ACC 대비 pACC 발현량은 하니베리 추출물 처리군에서 모두 증가하였으나 250μg/ml(p<0.05)와 1000μg/ml (p<0.001) 농도에서 유의적인 증가를 보였고, 특히 1000μg/ml 농도에서 발현량이 크게 증가됨을 확인 하였음(Figure 2-36)

○ AMPK 대비 pAMPK 단백질 발현량은 FFA만 처리한 군에 비해 HBE 모든 농도에서 증가하였으나, HBE 1000 μ g/ml 농도에서만 유의적인 차이($p < 0.05$)를 보였음(Figure 2-36)

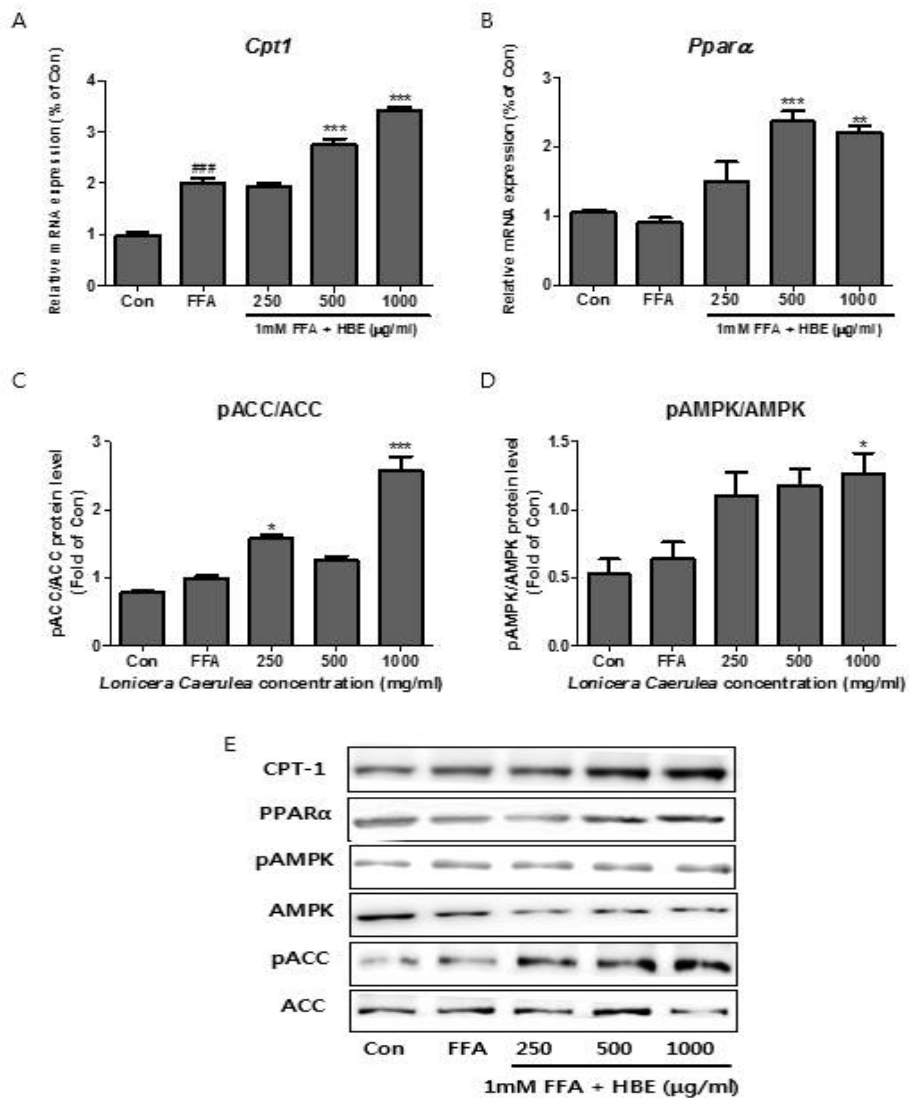


Figure 2-36. Effects of HBE on AMPK, ACC, PPAR α , and CPT1 expression in FFA treated HepG2 cells. Western blot analysis of pAMPK/AMPK, pACC/ACC protein in HepG2 cells treated with FFA with or without HBE. AMPK and ACC were used as a protein loading control of phosphorylated AMPK and phosphorylated ACC, respectively. The expression of CPT1 and PPAR α was quantified by real-time PCR and normalized by β -actin as an internal control. CPT1 and PPAR α protein was detected by western blot analysis and quantified by densitometric analysis. p-AMPK, phosphorylated AMPK; pACC, phosphorylated ACC.

Data represent means \pm SD. ### $p < 0.001$ vs. Con; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. FFA.

2-5. 간조직 내 SREBP-1c, C/EBP α , PPAR γ , FAS mRNA 및 단백질 발현량

- 하니베리 추출물(HBE) 투여한 동물모델의 간조직 내 지방 합성 관련 유전자인 SREBP-1c, C/EBP α , PPAR γ , FAS mRNA 발현량을 측정하였음
- Con군에 비해 고지방 식이군(HFD)에서 SREBP-1c(p<0.001), C/EBP α (p<0.001), FAS (p<0.01) mRNA 발현량이 현저하게 증가하였으나, HBE 투여군인 LH(HFD-supplemented 0.5% HBE)군과 MH(HFD-supplemented 1% HBE)군에서 SREBP-1c, C/EBP α , FAS와 PPAR γ mRNA 발현량은 HFD군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였음(Figure 2-37)

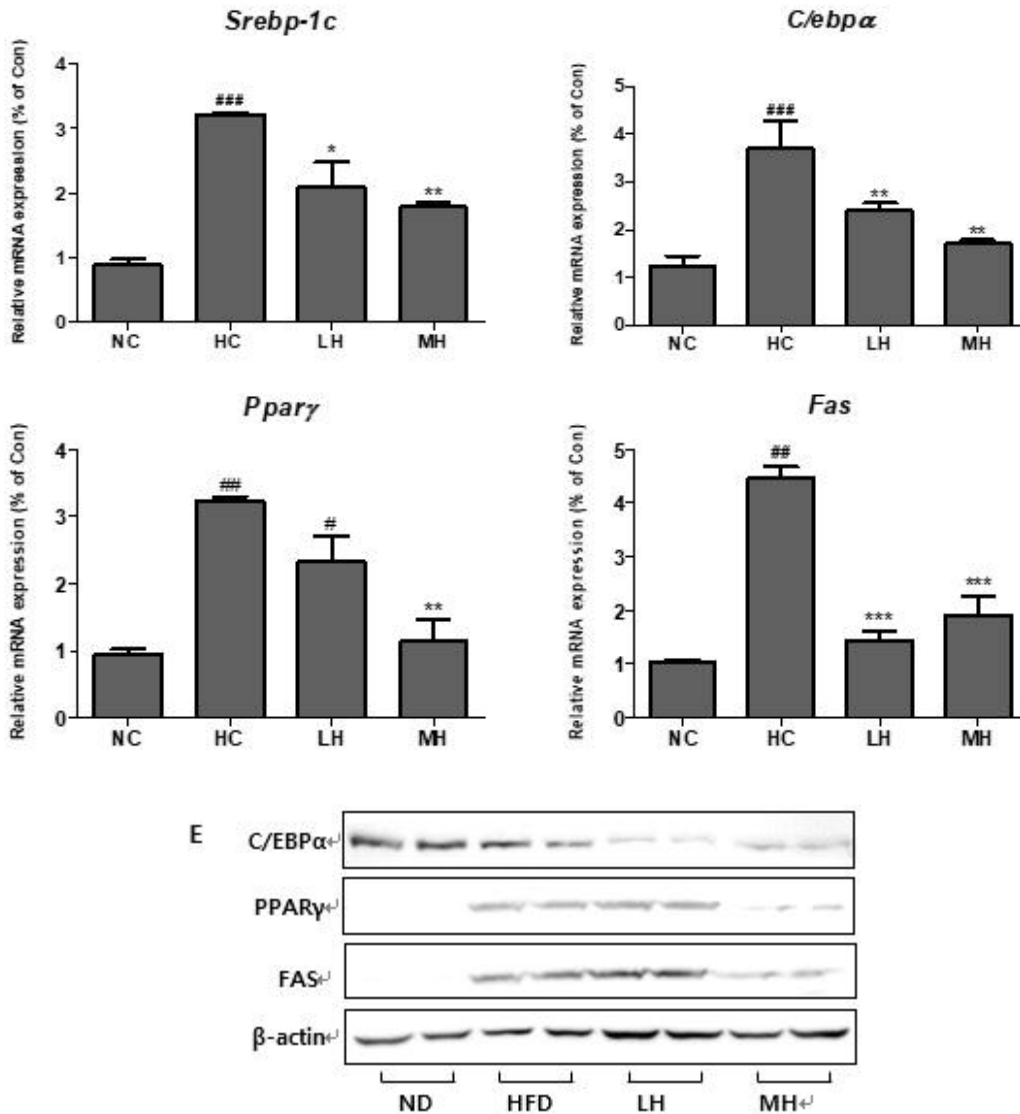


Figure 2-37. Effects of HBE on the expression of genes associated with lipogenesis in HFD-fed mice. The expression of SREBP-1c, C/EBP α , PPAR γ , and FAS were quantified by real-time PCR and normalized by β -actin as an internal control. ND; normal diet control, HFD; High-fed diet, LH; HFD-supplemented 0.5% HBE, MH; HFD-supplemented 1% HBE. Animal experiments analyses were carried out using Duncan's multiple range test.

Data represent means \pm SD. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs. Con; ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. HFD.

2-6. 간조직 내 AMPK, ACC, CPT1, PPAR α mRNA 및 단백질 발현량

○ 간조직 내 지방 대사의 중요 신호전달 물질인 AMP-activated protein kinase(AMPK), acetyl-CoA carboxylase(ACC), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) carnitine palmitoyl transferase-1(CPT1)의 유전자와 단백질 발현량을 측정하였음

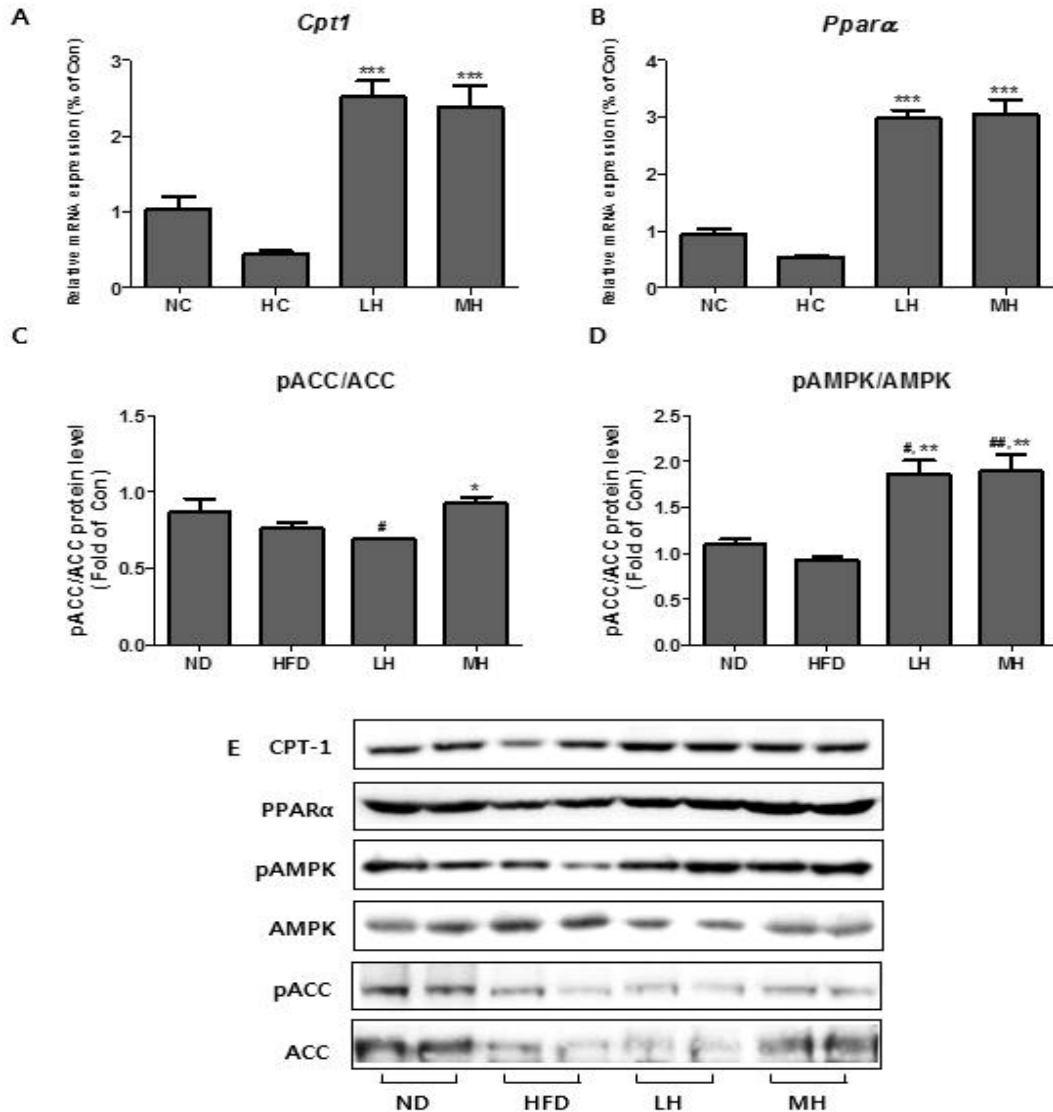


Figure 2-38. Effects of HBE on AMPK, ACC, PPAR α , and CPT1 expression in HFD fed mice. Western blot analysis of pAMPK/AMPK, pACC/ACC protein in HFD fed mice. AMPK and ACC were used as a protein loading control of phosphorylated AMPK and phosphorylated ACC, respectively. The expression of CPT1 and PPAR α was quantified by real-time PCR and normalized by β -actin as an internal control. CPT1 and PPAR α protein was detected by western blot analysis and quantified by densitometric analysis. p-AMPK, phosphorylated AMPK; pACC, phosphorylated ACC.

Data represent means \pm SD. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Con; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. HFD.

- CPT1와 PPAR α mRNA 발현량이 HBE 투여군인 LH(HFD-supplemented 0.5% HBE) 군과 MH(HFD-supplemented 1% HBE)군에서 통계적으로 유의적인 증가를 보였음 ($p < 0.001$, Figure 2-38)
- ACC 대비 pACC 발현량은 하니베리 추출물 투여군에서 증가되었음. 각 군간 비교해 보면 Con군과 LH군간, MH군과 HDF군간에서 pACC 발현량이 통계적으로 유의적인 차이를 나타냈음($p < 0.05$, Figure 2-38)
- AMPK 대비 pAMPK 단백질 발현량은 HBE를 투여한 LH군과 MH군에서 Con과 HFD 군과 비교할 때 유의적인 차이를 나타냈음(Figure 2-38)

2-7. 최종 결론 및 추측기전

- 결론적으로 *in vitro* / *in vivo* 비알콜성 지방간 모델에서 하니베리 추출물의 효능 평가 및 안전성 평가를 수행한 결과 하니베리 추출물은 활성산소 소거와 Nrf2 transactivation을 유도하며 지방과 포도당의 에너지 대사에 관여하는 AMPK upregulation을 유도하여 에너지 대사를 조절함으로써 간 기능 개선 효과를 확인하였음

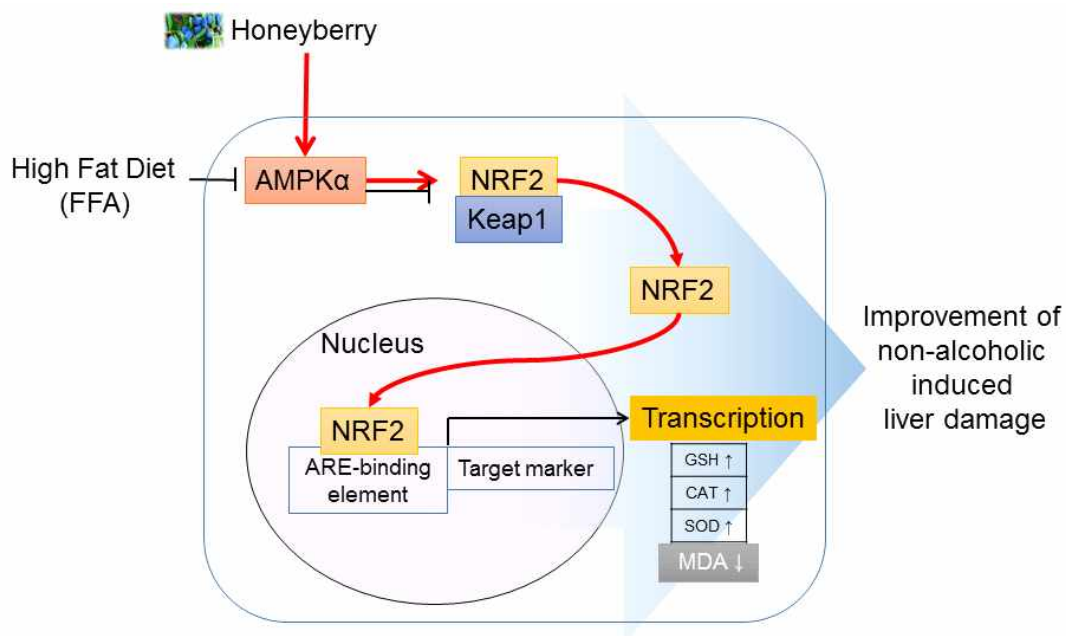


Figure 2-39. 추측기전 모식도






결론

하니베리 추출물의 비알콜성 지방간 개선 효과 기전을 확립하기 위해 HepG2 세포를 유리 지방산으로 지방 축적을 유도한 후 세포생존율 및 지질 관련 mRNA 유전자 발현과 단백질 발현량을 측정하였음. 그 결과 하니베리 추출물에 의해 지방구 형성이 억제되었고, 지방 축적량도 감소하였음. 지방 생성에 관여하는 SREBP-1c, C/EBP α , PPAR γ , FAS mRNA 발현이 하니베리 추출물 처리군에서 감소하였고, 지방대사에 있어서 중요한 신호 전달 물질인 AMPK, ACC, CPT1, PPAR α 의 단백질 발현량은 증가하였음. 또한, 동물의 간조직내 SREBP-1c, C/EBP α , PPAR γ , FAS mRNA 발현이 고지방식이 섭취군에 비해 감소하였고, 항산화 효능을 가지는 CPT1와 PPAR α 단백질 발현이 하니베리 추출물 투여군에서 증가하였을 뿐만 아니라 ACC 대비 pACC 발현량과 AMPK 대비 pAMPK 단백질 발현량이 하니베리 추출물 투여군에서 증가하였음. 하니베리 추출물은 인산화된 AMPK를 증가시키고 증가된 AMPK는 ACC 인산화를 유도하여 lipogenesis 관련 유전자 발현을 감소시킴으로 지방 생성과 지방 축적이 감소되었을 것으로 생각됨. ACC 인산화는 미토콘드리아 내막으로 장쇄지방산 이동에 필요한 미토콘드리아 외막에 존재하는 CPT1의 활성을 높여서 지방의 산화를 유도하였을 것으로 사료됨. 또한 하니베리 추출물에 의한 AMPK 발현량 증가는 지방 합성 transcription factor인 SREBP1 Ppar γ , C/ebp α 합성과 FAS 단백질 합성 억제에 영향을 주었을 것으로 생각되어짐

7. 시제품 및 제품홍보

<Table 2-57> 제품 개발 및 시제품

	제품명	제품사진	기능성 여부
1	마이톡스 리라이트닝 앰플		피부 미백, 주름개선
2	마이톡스 프로페셔널 링클 앰플		피부 미백, 주름개선
3	마이톡스 프로 에센스		피부 미백
4	마이톡스 프로페셔널 리라이트닝 앰플		피부 미백, 주름개선
5	마이톡스 프로 크림		피부 미백, 주름개선

6	Y자임		-
7	바이탈 파워		<ul style="list-style-type: none"> ① 면역증진 ② 피로개선 ③ 혈액흐름 개선 ④ 기억력 개선 ⑤ 항산화 도움
8	실큐 글리버 땡땡		-
9	[시제품] 하니베리금강송		-
10	[시제품] 땡땡이나무열매 분말		기능성원료 신청

○ 2017 박람회 : 제천국제한방바이오산업엑스포

- 일시 : 2017.09.22. ~ 2017.10.10.
- 장소 : 제천 한방엑스포공원 일원
- 제품전시 ; 하니베리금강송, 하니베리 분말

○ 2018 박람회 : 제천국제한방바이오산업엑스포

- 일시 : 2018.10.05. ~ 2018.10.10.
- 장소 : 제천 한방 엑스포공원 일원
- 제품 전시 : 글리머 땀땀이, 바이탈과워, Y자임, 마이톡스 프로페셔널 리라이트닝 앰플, 마이톡스 프로페셔널 링클 앰플, 마이톡스 프로 에센스, 마이톡스 프로페셔널 리라이트닝 앰플, 마이톡스 프로 크림

2017년



2018년



Figure 2-40. 제품홍보(제천국제한방바이오산업엑스포)

8. 추가 연구(독성시험, in vivo 효능평가)

가. GLP기관 독성시험 연구

<Table 2-58> GLP기관 독성시험자료 요약

시험종류		종 및 계통	투여방법	투여기간	시험물질, 용량	시험결과
단회 투여	설치류	SD Rat (M 20, F 20)	경구	단회	· 투여량: (0, 625, 1,250, 2,500mg/kg/bw)	· 특이한 일반증상, 사망례, 유의한 체중변화 및 육안적 병변 소견 없음. · ALD > 2,500mg/kg
	90일 반복 투여	설치류	SD Rat (M 40, F 40)	경구	91일	· 투여량: (0, 625, 1,250, 2,500mg/kg/bw)
유전 독성	복귀 돌연변이	· S. typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 · E. coli WP2 uvrA	· 대사활성법 · 직접법	20분	· 투여량: (0, 62, 185, 556, 1667, 5000µg/plate)	· 음성: 복귀돌연변이를 유발하지 않음.
	소핵시험	ICR 마우스 골수세포	경구	1회/일/2일	· 투여량: (0, 625, 1,250, 2,500mg/kg)	· 음성: 마우스의 골수세포에 대한 소핵을 유발하지 않음.
	염색체 이상시험	CHO-k1 cells	· 직접법 (-S9 mix, 24시간 연속처리) · 직접법 (-S9 mix, 6시간 처리 18시간 회복) · 대사활성법 (+S9 mix, 6시간 처리 18시간 회복)		· 멩 멩 이 나무 열매 추출물 · 투여량: (555.56, 1666.67, 5000µg/ml)	· 음성: CHO 세포에 염색체 이상을 유발하지 않음.

(1) 단회투여 독성시험자료 요약서(설치류)

<Table 2-59> 단회투여 독성시험 내용 및 결과

1. 원료명	댕댕이나무열매 추출물(Lonicera caerulea)									
2. 시험기관	한국건설생활환경시험연구원 바이오융합연구소									
3. 자료	<input checked="" type="checkbox"/> GLP 기관보고서 <input type="checkbox"/> 논문 <input type="checkbox"/> 기타									
4. 시험물질 (배합비 포함)	댕댕이나무열매 추출물									
5. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 기타 ()								
	계통	Sprague-Dawley				주령	8주령			
	동물수	수컷	20		암컷	20				
6. 투여경로	<input checked="" type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 기타 ()									
7. 관찰 기간	<input checked="" type="checkbox"/> 14일 <input type="checkbox"/> 기타 ()일									
8. 실험내용	실험군	(1)		(2)		(3)		(4)		
	투여용량 (mg/kg)	0		625		1,250		2,500		
	실험동물	암	수	암	수	암	수	암	수	
	군당 동물수	5	5	5	5	5	5	5	5	
	사망동물수	0	0	0	0	0	0	0	0	
9. 평가항목	<input checked="" type="checkbox"/> 사망 개체 수 <input checked="" type="checkbox"/> 임상증상 <input checked="" type="checkbox"/> 체중측정 <input checked="" type="checkbox"/> 육안적 소견 <input type="checkbox"/> 병리조직학적검사 <input type="checkbox"/> 기타 ()									
10. 시험결과 (치사량 포함)	- 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았음 - 암·수 모든 시험군에서 유의한 체중변화는 관찰되지 않았음 - 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았음									
11. 시험자결론	시험물질을 단회 경구 투여한 결과, 사망동물은 관찰되지 않았고, 시험물질 투여와 관련된 특이한 변화는 관찰되지 않았음. 따라서 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 2,500mg/kg 이상으로 판단됨									

(2) 90일 반복투여 독성시험자료 요약서(설치류)

<Table 2-60> 반복투여 독성시험 내용 및 결과

1. 원료명	땃땃이 나무 열매 추출물(<i>Lonicera caerulea L. berry extract</i>)											
2. 시험기관	한국건설생활환경시험연구원 바이오융합연구소											
3. 자료의 요건	<input checked="" type="checkbox"/> GLP 기관보고서 <input type="checkbox"/> 논문 <input type="checkbox"/> 기타											
4. 투여기간/ 횟수	13주간/91회					<input checked="" type="checkbox"/> 7회/주 <input type="checkbox"/> 기타 (회/주)						
5. 시험물질 (배합비 포함)	땃땃이나무열매 추출물											
6. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 기타 ()										
	계통	Sprague-Dawley				주령	6 주령					
	동물수	수컷	40			암컷	40					
7. 투여경로	<input checked="" type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 기타 ()											
8. 실험내용	실험군	(1)		(2)		(3)		(4)		(5)		
	투여용량 (mg/kg)	0		625		1,250		2,500				
	실험동물	암	수	암	수	암	수	암	수	암	수	
	군당 동물수	10	10	10	10	10	10	10	10			
	사망동물수	0	0	0	0	0	0	0	0			
9. 평가항목	<input checked="" type="checkbox"/> 사망 개체 수	<input checked="" type="checkbox"/> 체중			<input checked="" type="checkbox"/> 사료섭취량			<input type="checkbox"/> 물 섭취량		<input checked="" type="checkbox"/> 혈액학적검사		
	<input checked="" type="checkbox"/> 혈액생화학검사	<input checked="" type="checkbox"/> 뇨검사			<input checked="" type="checkbox"/> 안해학검사			<장기무게>				
	<input checked="" type="checkbox"/> 조직병리검사	<input type="checkbox"/> 회복성 및 지연성 독성 검토(회복군 여부)						<input checked="" type="checkbox"/> 심장, <input checked="" type="checkbox"/> 간장, <input checked="" type="checkbox"/> 폐, <input checked="" type="checkbox"/> 비장 <input checked="" type="checkbox"/> 신장, <input checked="" type="checkbox"/> 부신, <input checked="" type="checkbox"/> 전립선 <input checked="" type="checkbox"/> 고환, 부고환 <input checked="" type="checkbox"/> 난소, <input checked="" type="checkbox"/> 뇌 <input checked="" type="checkbox"/> 하수체, <input checked="" type="checkbox"/> 흉선				
10. 시험결과 (무독성량 포함)	<ul style="list-style-type: none"> - 일반증상 : 시험물질 투여에 의한 일반증상은 관찰되지 않았다. - 체중 및 사료 : 암컷 투여군에서 부형제대조군에 비하여 체중이 감소하였으나 사료섭취량 감소의 경향과 본 시험물질이 항비만 효력을 나타내는 약리적인 반응으로 판단되어 독성학적 의미는 없었다. - 안검사 : 시험물질 투여에 의한 이상반응은 관찰되지 않았다. - 임상병리학적 검사(요검사, 혈액학적검사, 생화학검사, 혈액응고검사) : 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. - 장기중량 : 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. - 조직병리 : 시험물질에 의한 이상병변은 관찰되지 않았다. 											
11. 시험자결론	시험물질에 의한 전신적인 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 무독성량(NOEL, No observed adverse effect level)은 2,500 mg/kg/day로 판단되었고, 표적장기(target organ)는 관찰되지 않았다.											

(3) 유전독성 시험자료 요약서: 복귀돌연변이시험

<Table 2-61> 복귀돌연변이시험 내용 및 결과

1. 원료명	땃땃이나무열매 추출물(Lonicera caerulea)					
2. 시험기관	한국건설생활환경시험연구원 바이오융합연구소					
3. 자료	<input checked="" type="checkbox"/> GLP 기관보고서 <input type="checkbox"/> 논문 <input type="checkbox"/> 기타					
4. 시험물질 (배합비 포함)	땃땃이나무열매 추출물					
5. 시험계	균 주		종 류			
	<i>Salmonella typhimurium</i>		TA98, TA100, TA1535, TA1537			
	<i>Escherichia coli</i>		WP2uvrA			
6. 실험내용	처리 농도		S9 mix(-) : 0, 62, 185, 556, 1667, 5000 μ g/plate			
			S9 mix(+) : 0, 62, 185, 556, 1667, 5000 μ g/plate			
	시 험 법		Preincubation 방법			
	처리 시간		20 분			
7. 대조군	S9mix	균주	양성대조군	용량 (μ g/ plate)	음성대조군	용량 (μ g/ plate)
	(+)	TA98	AF-2	0.1	멸균증류수	0
		TA100	AF-2	0.01	멸균증류수	0
		TA1535	NaN ₃	0.5	멸균증류수	0
		TA1537	9-AA	80	멸균증류수	0
		WP2uvrA	4-NQO	0.25	멸균증류수	0
	(-)	TA98	BP	10	멸균증류수	0
		TA100	2-AA	1	멸균증류수	0
		TA1535	2-AA	2	멸균증류수	0
		TA1537	2-AA	2	멸균증류수	0
		WP2uvrA	2-AA	10	멸균증류수	0
8. 시험결과	시험결과, 대사활성법과 직접법의 경우, 모든 균주에서 음성대조군과 비교하여 양성으로 판단할 만한 복귀집락 수의 증가를 관찰할 수 없었음					
9. 시험자결론	땃땃이나무열매 추출물(Lonicera caerulea)은 본 시험조건 하에서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단됨.					

(4) 유전독성 시험자료 요약서: 소핵시험

<Table 2-62> 소핵시험 내용 및 결과

1. 원료명	댕댕이나무열매 추출물(Lonicera caerulea)				
2. 시험기관	한국건설생활환경시험연구원 바이오융합연구소				
3. 자료	<input checked="" type="checkbox"/> GLP 기관보고서 <input type="checkbox"/> 논문 <input type="checkbox"/> 기타				
4. 시험물질 (배합비 포함)	댕댕이나무열매 추출물				
5. 시험동물	종	<input checked="" type="checkbox"/> 마우스 <input type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기타()			
	계 통	CrljOri:CD1(ICR)마우스		주 령	8 주령
	동물수	수 컷	예비시험 (12 마리) 본시험 (25 마리)	암 컷	예비시험 (12 마리)
6. 처리농도	0, 625, 1250, 2500mg/kg bw/day				
7. 투여경로	<input checked="" type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 기타()				
8. 실험내용	대조군	음성대조군	멸균증류수	용 량	0mg/kg/10ml
		양성대조군	Mitomycin C	용 량	2mg/kg/10ml
	처리시간	시험물질은 24시간 간격으로 1 회/일, 2 일 동안 투여한 후 마지막 투여 후 18 ~ 24 시간에 부검 실시			
	판정기준	(1) 음성판정기준 : 다음과 같은 기준을 모두 만족하면 음성으로 판정하였음 ① 음성대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보이는 시험물질 처리농도가 존재하지 않아야 함. ② 모든 농도단계의 시험결과가 음성대조군의 허용범위 내에 존재해야 함. (2) 양성판정기준 : 다음과 같은 기준을 모두 만족하면 양성으로 판정하였음 ① 소핵 유발빈도(MNPCE/4000 PCEs, Mean±SD, %)가 통계학적으로 유의하여야 함. ② 소핵 유발빈도가 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성반응을 나타내야 함. ③ 결과 값이 Historical 음성대조군 값의 분포를 벗어나야 함.			
9. 시험결과	<ul style="list-style-type: none"> - 예비시험과 본시험의 경우, 부형제 대조군과 비교하여 특이한 일반증상은 관찰되지 않았음 - 각 군의 투여후의 체중을 비교한 결과 부형제 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았음 - 시험물질 투여군에서 부형제 대조군과 비교하여 뚜렷한 골수세포의 증식억제는 나타나지 않았음 - 시험물질을 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 부형제 대조군에 비해 모든 투여군에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았음 				
10. 시험자결론	댕댕이나무열매 추출물(Lonicera caerulea)은 본 시험의 조건하에서 마우스의 골수세포에 대한 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료됨.				



(5) 유전독성 시험자료 요약서: 염색체이상시험



<Table 2-63> 염색체이상시험 내용 및 결과

1. 원료명	땃땃이나무열매 추출물(Lonicera caerulea)					
2. 시험기관	한국건설생활환경시험연구원 바이오융합연구소					
3. 자료	<input checked="" type="checkbox"/> GLP 기관보고서 <input type="checkbox"/> 논문 <input type="checkbox"/> 기타					
4. 시험물질 (배합비 포함)	땃땃이나무열매 추출물					
5. 시험계	세포주	<input checked="" type="checkbox"/> CHO <input type="checkbox"/> CHL <input type="checkbox"/> V79				
6. 실험내용	처리 농도	직접법 (-S9 mix, 24 시간 연속처리군) : 555.56, 1666.67, 5000 μ g/ml 직접법 (-S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복군) : 555.56, 1666.67, 5000 μ g/ml 대사활성법 (+S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복군) : 555.56, 1666.67, 5000 μ g/ml				
	시험법	직접법 (-S9 mix, 24 시간 연속처리) 직접법 (-S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복) 대사활성법 (+S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복)				
	처리 시간	직접법 (-S9 mix, 24 시간 연속처리) 직접법 (-S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복) 대사활성법 (+S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복)				
	세포수거시간	시험물질 처리 후 24시간에 세포 수거				
7. 대조군	S9mix	세포주	양성대조군	용량 (μ g/ml)	음성대조군	용량 (μ g/ml)
	(+)	CHO	Cyclophosphamide	10	멸균증류수	0
	(-)	CHO	Mitomycin C	0.04	멸균증류수	0
8. 시험결과	시험물질에 의한 염색체의 구조적 이상을 알아보기 위해 시험물질을 처리하여 이상중기상을 계수한 결과, 직접법 및 대사활성법의 모든 처리군에 있어서 이상중기상의 빈도를 음성대조군과 비교하였을 때 통계학적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었음					
9. 시험자결론	시험물질인 땃땃이나무열매 추출물(Lonicera caerulea)은 본 시험의 조건하에서 CHO 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료됨.					

나. In vivo 효능평가: 국내산 하니베리 사용

<Table 2-64> 국내산 하니베리의 in vivo 효능평가 및 연구성과물

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 33%;">Study No.</th> <th style="width: 33%;">Study Type</th> <th style="width: 33%;">Confidentiality</th> </tr> <tr> <td>ARM054-BHd HFD</td> <td>Efficacy: HFD Supplied Mice</td> <td>RELATIVE HIGH</td> </tr> </table> <p style="font-size: small;">Department of Anatomy and Histology, College of Korean Medicine, DAEGU HAANY UNIVERSITY</p> <h3 style="text-align: center;">Hepatoprotective and Various Beneficial Effects of Domestic Blue Honeysuckle Extracts on the 45%Kcal High Fat Diet (HFD) Supplied Mice</h3> <p>Date of Reporting : August 08, 2018 Reporter : Prof. Sae Kwang Ku, DVM, Ph.D. Periods of study : February 21, 2018 - August 06, 2018 No. of Study : ARM054-BHd HFD File Source Report : ARM054-BHd HFD.DOC Data : ARM054-BHd HFD [FOLD]</p> <p>Signature Sae Kwang Ku, DVM, Ph. D. Professor Department of Anatomy and Histology DATE: 2018. 08. 07 <i>Sae Kwang Ku</i></p> <p style="text-align: center;">  Department of Anatomy and Histology, College of Korean Medicine DAEGU HAANY UNIVERSITY </p> <p style="text-align: right; font-size: x-small;">ARM054-BHd HFD</p>	Study No.	Study Type	Confidentiality	ARM054-BHd HFD	Efficacy: HFD Supplied Mice	RELATIVE HIGH	<p>[ARM054-BHd HFD: Hepatoprotective and Beneficial Effects of BHd on HFD Supplied ICR Mice] Department of Anatomy and Histology, College of Korean Medicine, DAEGU HAANY UNIVERSITY</p> <p>ANNEX III. Certification of Approval of Animal Experiment by the Institutional Animal Care and Use Committee in Daegu Haany University</p> <div style="border: 1px solid black; width: fit-content; margin: 10px auto; padding: 2px;"> 승인번호 DHUJ2018-008 </div> <h2 style="text-align: center;">동물실험계획 승인서</h2> <p style="text-align: center;">45%kcal 고지방사료 공급으로 유발된 당뇨 비만 마우스 모델에서 국내산 땃땃이나무 열매 추출물의 비만 및 당뇨 관련 합병증 개선 효과 평가</p> <p>연구책임자: 구세광 연구자: 박상민 소속: 한의예과</p> <p style="text-align: center;">  대구한의대학교 동물실험윤리위원회 Daegu Haany University IACUC </p> <p style="text-align: right; font-size: x-small;">DHUJ2018-008</p>
Study No.	Study Type	Confidentiality					
ARM054-BHd HFD	Efficacy: HFD Supplied Mice	RELATIVE HIGH					
<p>시험물질</p>	<p style="text-align: center;">하니베리 추출물</p>						
<p>시험동물</p>	<p>고지방식이(HFD) 간손상 mice 모델(32.60~36.20g, 6주령)</p>						
<p>시험 디자인</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 정상대조군: 정상사료공급 매체 투여군 · HFD대조군: 45% Kcal HFD 공급매체투여군 · Metformin 대조군: 250mg/kg 투여+HFD · 시험군 1: HFD+400mg/kg 하니베리 추출물 · 시험군 2: HFD+200mg/kg 하니베리 추출물 · 시험군 3: HFD+100mg/kg 하니베리 추출물 · 군당 8수 						
<p>섭취방법 (섭취량/기간)</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 하니베리 추출물 100, 200, 400mg/kg/일 · 경구투여 · 84일 						
<p>평가지표</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 체중의 변화 · 평균사료섭취량 · 간의 무게 변화 · 간내 효소(AST, ALT, ALP, LDH, GGT, BUN, creatine) 변화 · 혈중 glucose 및 지질(TC, TG, LDL-c, HDL-c) 변화 						

	<ul style="list-style-type: none"> · 항산화기능(MDA, glutathione, catalase, SOD)변화 · 췌장외벽 zymogen granules, mean islet numbers, mean islet diameter 변화 · 당대사관련 간효소변화(GK, G6pase, PEPCK) · 간섬유화 및 평균 간 직경 변화 · 지질대사관련 간조직내 유전자 발현(ACCI, AMPKa1, AMPKa2) · 지방조직내 유전자발현(leptin, UCP2, adiponectin, C/EBPa, C/EBPβ, SREBP1c)
<p>결과</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 시험군 1, 2, 3 체중 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.05) · 시험군 1, 2, 3 평균사료섭취량 유의적 변화없음(HFD대조군 대비 p>0.05) · 시험군 1, 2, 3 간 무게 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.05) · 시험군 1, 2, 3 간내 효소(AST, ALT, ALP, LDH, CGT, BUN, creatine) 유의적감소(HFD대조군 대비 p<0.05) · 시험군 1, 2, 3 glucose 유의적감소(HFD대조군 대비 p<0.01, p<0.05) · 시험군 1, 2, 3 TC, TG, LDL-c, 유의적감소(HFD대조군 대비 p<0.01), HDL-c 유의적 증가 (HFD대조군 대비 p<0.01, p<0.05) · 시험군 1, 2, 3 MDA 유의적감소 (HFD대조군 대비 p<0.01), glutathione, catalase, SOD 시험군 1, 2, 3 유의적 증가(HFD대조군 대비 p<0.01, p<0.05) · 시험군 1, 2, 3 zymogen granules 유의적 증가(HFD대조군 대비 p<0.01), mean islet numbers, mean islet diameter 시험군 1, 2, 3 유의적감소(HFD대조군 대비 p<0.01) · 시험군 1, 2, 3 insulin-IR cells, glucagon-IR cells, insulin/glucagon ratio 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.01) · 시험군 1, 2, 3 glucokinase 유의적 증가(HFD대조군 대비 p<0.01, p<0.05), glucose-6-phos p hatease, PEPCK 시험군 1, 2, 3 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.01) · 시험군 1, 2, 3 간 섬유화 평균간 직경 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.01) · 시험군 1, 2, 3 지질대사관련 간조직내 ACC1 유의적 감소(HFD대조군 대비 p<0.05), AMPKa1, AMPKa2 유의적 증가(HFD대조군 대비 p<0.01, p<0.05) · 시험군 1, 2, 3 지방조직내 UCP2, Adiponectin 유의적증가(HFD대조군 대비 p<0.05, p<0.01) · 지방조직내 leptin, C/EBPa, C/EBPβ, SREBP1c 유의적감소(HFD대조군 대비 p<0.05, p<0.01)
<p>결론</p>	<p>간조직내 AMPKa1, AMPKa2 유의적 증가에 의한 항산화기능 강화를 통해 간조직내 지질대사증가와 간내 AST, ALT 효소 감소기전을 확인함</p>
<p>비고</p>	<p style="text-align: center;">Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry, 22(4), 39–54 (2018)</p> <div style="text-align: center;">   </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="694 1489 853 1624" style="width: 45%;"> <p>Received: 2018/12/12, Revised: 2018/12/21, Accepted: 2018/12/27, Published: 2018/12/29</p> <p>Original Article Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry, 22(4), 39–54 (2018) https://doi.org/10.1007/s12576-018-0556-4</p> <p>Copyright © 2018 The Korean Society for Exercise Nutrition</p> </div> <div data-bbox="877 1489 1141 1534" style="width: 50%;"> <p>Hepatoprotective and anti-obesity effects of Korean blue honeysuckle extracts in high fat diet-fed mice</p> <p>Youn-Seok Chum¹ / Se-Kwang Kim¹ / Jong-Kyu Kim¹ / Suk Park² / In-Ho Cho³ / Nam-Jin Lee^{4*}</p> <p>¹ School of Exercise Science, Aju University, Republic of Korea ² Department of Anatomy and Histology, Dongguk University, Gyeongju, Republic of Korea ³ School of Health Science, Dongguk University, Gyeongju, Republic of Korea ⁴ Department of Life Science, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan, Republic of Korea</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> <div data-bbox="694 1635 853 1904" style="width: 45%;"> <p>Abstract This study aimed to study the protective effects and mechanism of blue honeysuckle (BH) extract (Lonicera caerulea L.) on liver damage and obesity in high fat diet (HFD) mice. HFD mice were divided into HFD and HFD+BH groups. Body weight, food intake, and body fat were measured. Liver weight, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transaminase (GGT), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), glucose, insulin, and leptin were measured. Liver histology and immunohistochemistry were performed. BH extract (100 mg/kg) significantly reduced body weight, food intake, and body fat. BH extract (100 mg/kg) significantly reduced liver weight, serum ALT, AST, GGT, TC, TG, LDL-C, and insulin. BH extract (100 mg/kg) significantly increased HDL-C and glucose. BH extract (100 mg/kg) significantly reduced leptin. BH extract (100 mg/kg) significantly reduced liver damage and obesity in HFD mice.</p> </div> <div data-bbox="877 1635 1141 1904" style="width: 50%;"> <p>INTRODUCTION</p> <p>In the past 50 years, the incidence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been increasing owing to changes in dietary habits and Western lifestyles in the Asia-Pacific region. Liver damage by NAFLD causes hepatic metabolic dysfunction. NAFLD is the most common chronic liver disease and is associated with an increase in serum alanine transaminase, as well as disorders such as benign macrovesicular hepatomegaly, non-alcoholic steatohepatitis, hepatic fibrosis, cirrhosis of the liver, and hepatocellular carcinoma. Moreover, increased body weight levels are associated with these liver changes. In particular, the accumulated fat in NAFLD can increase oxidative stress in the liver and cause chronic damage to it.</p> <p>There is a growing interest in berries as a food for reducing oxidative stress caused by reactive oxygen species because berries have both antioxidant vitamins and enzymes such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase, as well as phytochemicals with strong flavonoid, phenol, and color and antioxidant functions at the same time. Blue honeysuckle (BH, <i>Lonicera caerulea</i> L.) is known to contain higher vitamins C, total phenolic content, and total antioxidant capacity than tomato, bilberry, sea-buckthorn, black currant and Siberian ginseng and to prevent liver damage. BH (L. caerulea) has been domesticated from 1913; however, an earlier example was reported in 1894 in a horticultural plant in Russia. BH is known as hawthorn or honeysuckle in Europe and rhododendron in Russia.</p> <p>We and colleagues⁸ evaluated the effects of BH extract on high-fat dietary nonalcoholic liver injury in a mouse model after 45 days of BH extract feeding. They determined the effects of BH on the nuclear factor-κB (NF-κB) pathway (p38, IκB, and IκB kinase) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling in nonalcoholic steatohepatitis. However, in the BH extract manufacturing process, Chinese HB extract extracted using 75% of ethanol is limited to use as food. Recently, a high-fat diet treated mouse model was used to directly compare the NAFLD improvement of the ALEDC extract, Metformin, and mild obesity by taking BH extract for 12 weeks. As a result, BH</p> </div> </div>

4절 연구개발의 목표 및 결과

○ 사업화성과 및 매출실적

<Table 2-65> 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	- 억원
			향후 3년간 매출	15 억원
		관련제품	개발후 현재까지	4.2 억원
			향후 3년간 매출	12 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %
			향후 3년간 매출	국내 : - % 국외 : - %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %
			향후 3년간 매출	국내 : - % 국외 : - %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		- 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		- 위

<Table 2-66> 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2019년 개별인정형 기능성 원료 획득 후 1년 이내			
	소요예산(백만원)	제품 홍보 및 원료 수급방안 마련: 300백원			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		4.2억원	27억원	50억원	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	-	-
국외		-	-	-	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	국내 시장 점유율은 단독으로 기능성 원료를 진행 중에 있어, 경쟁기업이 당분간 없을 것으로 판단된다. - 추후, "체지방 감량 개선"으로 추가 기능성 인증 추진 - 2019년 "NDI" 신청 자료 작성 중 연내 신청 추진			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	-	-	
	수 출	-	-	-	

3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절 목표

1. 최종 목표

<Table 3-1> 최종 연구개발 목표

<p>▶ 하니베리 추출물의 간기능개선 건강기능식품 기능성원료 인정 및 제품화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 비알콜성 간기능 손상으로부터 간보호 기능성원료 확보(<i>in vitro, in vivo</i> 실험에서 대조군 대비 유의한(P<0.05) 효과 확보) - 인체적용시험에서 2가지 이상의 biomarker에서 placebo 대비 유의한(P<0.05) 효과 확보 - 식약처 인정 건강기능식품 기능성 원료 신청 	
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> - 생산공정 확립: 용매, 시간, 온도, 추출횟수, 지표함량변화, 수율, 유해성검사 (3 lot 이상)등이 포함된 제조공정서 확립(~80kg 이상 생산scale) - 기준규격 확보: 영양성분, 유해성분에 대한 공인시험기관의 성적서 제시 - In vitro safety: HepG2 cell에서 10%이하의 cell toxicity dose 1mg/ml 이상 - In vivo safety: 단회 및 반복투여 경구독성시험 NOAEL 1000mg/kg 이상(rodent) - In vitro efficacy: HepG2 cell - In vivo efficacy: stress 유발군에 비하여 유의한(P<0.05) 개선효과(dose 500mg/kg 이하), SCI급 논문 1편 - 지표성분, validation 확보: 지표성분 1건 이상 확보 이에 대한 공인시험성적서 확보, 지표 밸리데이션 자사수행보고서 1건(시스템적합성, 특이성, 직선성 등) - 인체적용시험에서 biomarker 2개 이상의 대조군 대비 유의한(P<0.05) 효과로서 성공적 완료, 임상시험기관의 완료 보고서

<Table 3-2> 최종 성과목표

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문							
												SCI	비SCI			학술 발표	정책 활용		홍보 전시
최종목표	2	2		1	5				18		2	3		1		4		2	1

2. 연차별 성과목표

가. 1차년도

(1) 개발 목표

- 주관연구기관((주)아리바이오): 문헌조사, lab scale추출공정개발, 지표성분설정(지표함량-공인시험성적서), 원료규격설정(성상, 영양성분, 유해성분: 공인시험성적서)
- 협동기관 (가천대학교 산학협력단): 문헌조사, in vitro 효능평가, in vitro 안전성평가

(2) 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관((주)아리바이오): 문헌조사(특허, 논문, 정부보고서, 공인기관 site 등), lab scale에서의 생산조건(추출용매, 추출온도, 추출시간, 추출횟수, 건조방법, 지표함량의 최적추출조건)확립, 지표성분 설정(식약처 지표성분설정 가이드라인에 따른 설정: HPLC로 측정 가능한 열안정성을 가지고 타원료와 구분되는 지표 또는 우월적 함량의 2가지 이상의 지표), 원료표준화(식물종, 사용부위, 채취시기, 원산지설정) 원료규격설정(성상, 영양성분, 미생물, 중금속, 잔류농약의 건기식 원료 적합 및 국가공인성적서), 원료의 표준화 (식약처 ‘건강기능식품 개발자를 위한 기능성 원료 표준화 지침서’에 따른 설정)
- 협동기관 (가천대학교) : 문헌조사(특허, 논문, 정부보고서, 공인기관 site 등), in vitro 효능평가(HepG2 cell에서 비알콜성 간손상에서 하니베리 추출물의 항산화효과검증; GalN or CCl4에 의한 간세포 독성유도, 측정: AST, ALT, TBARS, antioxidant, cytochrom P-450등), in vitro 안전성평가 (HepG2 cell surviability test, 용량은 최대 1mg/ml까지 safety 확보)

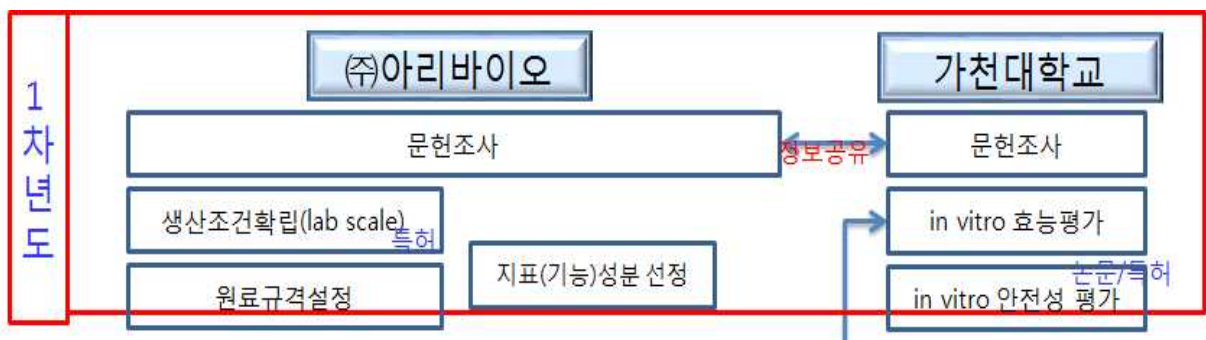


Figure 3-1. 1차년도 연구개발 목표

나. 2차년도

(1) 개발 목표

- 주관연구기관((주)아리바이오): Pilot생산 조건 확립, 대량생산 조건 확립, 원료규격설정확립, 지표 validation확립, 인체시험용 시험약/위약제조, 인체시험 IRB신청 및 승인, 제형연구
- 협동기관 (가천대학교 산학협력단): in vivo 안전성 평가, in vivo 효능평가

(2) 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관((주)아리바이오): 원료규격설정(중금속, 잔류농약의 건기식 원료 적합 및 국가 공인성적서), 지표성분의 validation 실시(특이성, 직진성, 정확도, 회수율, 정밀도 등에 대한 지표validation), 생산규모의 증대를 위한 pilot, mass scale 추출 제조공정 확립(80kg, 3 lot, 추출용매, 추출온도, 추출시간, 추출횟수, 필터방법, 건조방법, 수율 확립), 인체시험기관 선정 (IRB 보유 병원), 인체적용시험용 시험약/위약 제조(시험약과 위약의 구분이 유사한 색, 향, 맛으로 제조, 섭취량이 1,960mg/day 용량으로 66명분 12주 분량), 인체적용시험을 위한 protocol(스크리닝 검사 시 혈중 AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 또는 GGT(γ -GTP)가 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배 이하의 범위에 있는 자, 시험군 33명, 플라시보 33명), 12주 간의 RCT, DB, placebo대조시험, 검사항목: 인구학적조사, 음식섭취량, 혈청검사 등, CRF 작성, 임상기관/PI 선정 및 IRB승인신청 및 승인(임상기관/PI선정, IRB신청 및 승인획득), 제형연구 (tablet, capsule, powder)등에 대한 formulation 연구.
- 협동기관(가천대학교 산학협력단): in vivo 효능평가 비알콜성(CCl₄ or High fat diet 모델) 간손상 동물모델에서 하니베리 추출물의 효능평가: 실험동물-설치류, 군분류-normal control, obese control, positive control(기인증원료), 하니베리 추출물 투여군 high dose, middle dose, low dose, 투여- 1일 1~2회 강제경구투여 4주 이상, 관찰항목-체중, 식이섭취량, 장기검사, 혈청 바이오마커, 조직검사 등), in vivo 독성시험(정상대조군, 하니베리 추출물 용량 그룹의 단회, 반복 투여독성시험: non-GLP)

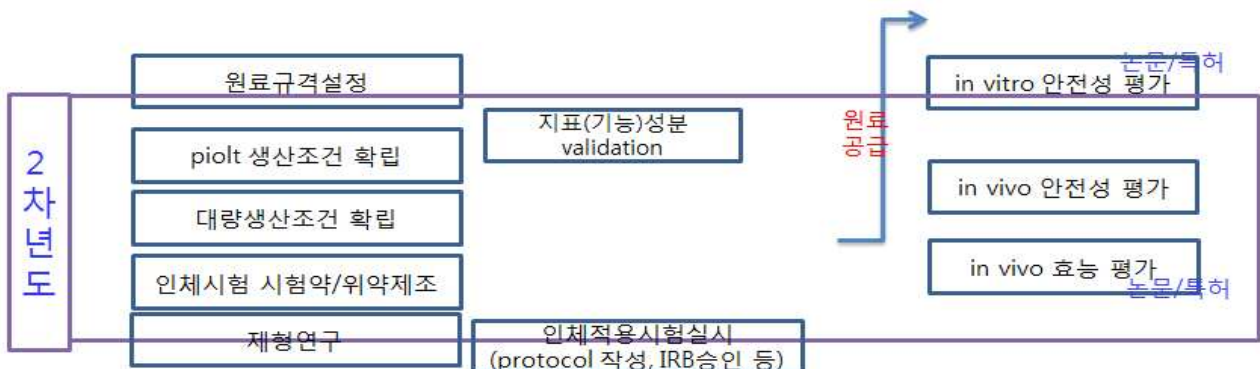


Figure 3-2. 2차년도 연구개발 목표

다. 3차년도

(1) 개발 목표

- 주관연구기관(주)아리바이오: 제형연구, 인체적용시험실시, 기능성원료 신청, 시제품 제작
- 협동기관 (가천대학교 산학협력단): 기전연구

(2) 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관((주)아리바이오): 제형연구(tablet, capsule, powder)등에 대한 formulation 확립, 인체적용시험실시(보험가입, 개시미팅, 피험자 모집, monitor, data management, data coding, biomarker, food consumption statistical analysis) 및 성공적 결과확보, 건기식 기능성원료 신청자료 작성 및 기능성원료 인정획득, 시제품(간기능 개선 기능성원료 원료제품, 완제품-PTP포장, 30일/60일 복용분)
- 협동기관(가천대학교 산학협력단): 기전연구 HepG2 cell의 비알콜성 손상에 대한 molecular target 기전확립: 지방대사(Acetyl-CoA, AKT2, LXR, mTOR, SREBP-1c), 인슐린대사(Foxa2, insulin)등 관련 인자 연구

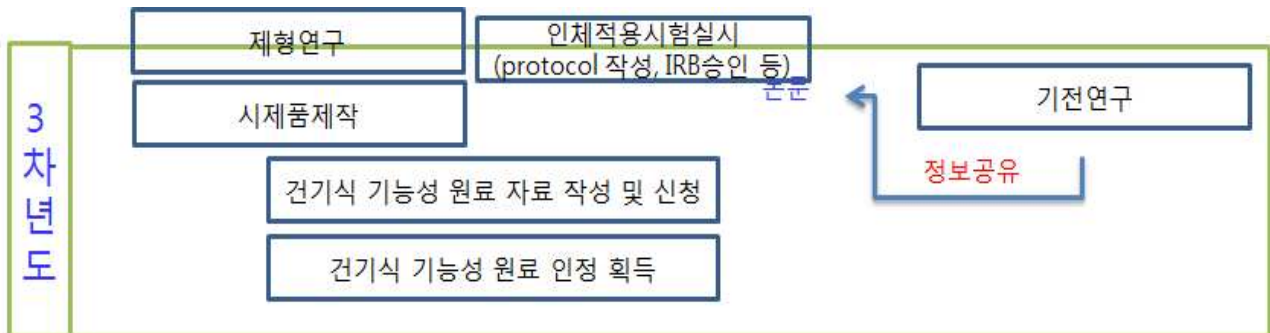


Figure 3-3. 3차년도 연구개발 목표

3. 연구개발 성과 및 평가방법

<Table 3-3> 연구개발 성과 평가방법

연구개발 성과 및 평가방법
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Pilot scale 생산공정개발 <ul style="list-style-type: none"> - lab scale 과정에서 확립된 추출공정을 pilot 생산 공정에 적용·실시한다. 또한 각 단계별 기능(지표)물질의 함량과 함께 수율변화를 측정함 ▶ 대량 생산 조건 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 80kg 이상 3 lot 대량생산 추출조건(용매, 온도, 시간), 수율, filtering 조건, 분말화조건 등의 설정 그리고 각 단계별 기능(지표)물질의 함량과 함께 수율변화를 측정함 이에 대한 보고서

- ▶ 기준규격설정 (성상, 영양분석 등)
 - 식품공전, 건강기능식품공전, 식품첨가물공전의 규격에 부합하는 성상(색, 형태, 물성 등), 영양분석(단백질, 탄수화물, 지방, Na, 회분 등)의 결과보고서 및 공인시험 성적서 제시
- ▶ 기능(지표)성분 및 검사법 validation(비공인·공인) 확립
 - 공인분석기관에서 발행한 지표성분 함량 성적서
 - 자사에서 실시한 특이성, 직진성, 정확도, 회수율, 정밀도, 범위에 대한 실험을 실시한 결과보고서
- ▶ *In vitro* 안전성 확보(non-GLP)
 - *S. typhimurium*, *E. coli*의 복귀돌연변이 시험(시험성적서)
- ▶ *In vivo* 안전성 확보(non-GLP)
 - non-GLP(DRF) 경구투여 독성시험을 실시하여 안전용량 설정, 유전독성(소핵시험) *in vivo* 안전성 확보
- ▶ *In vitro* 효능 평가
 - HepG2를 이용하여 항산화 표적분자 Nrf2 transactivation, anti-oxidant gene expression, SOD activity, CAT activity의 효능 검증 및 SCI급 논문 1편
- ▶ *In vivo* 효능 평가
 - 비알콜성(비만형) 간손상 모델에서의 체중, 혈청화학검사, 조직검사 등을 실시하여 간 손상 개선의 효능 검증 및 SCI급 논문 1편
- ▶ 간 보호 기전 확보
 - 하니베리의 간보호에 관여하는 표적분자 및 신호네트워크에 대한 효능을 세포수준에서 검증하고 효능기전을 확보함
- ▶ 인체적용시험을 위한 protocol 작성, CRF작성, 시험물질제조, IRB 승인, 성공적 완료
 - 인체적용시험 Protocol, CRF 작성: 임상기관 IRB 승인서
 - 시험물질 제조 완료: 시험물질과 placebo 물질의 제조
 - 인체적용시험 준비: 보험가입(보험증서), 피험자모집공고(포스트 등)
 - 인체적용시험 성공적 완료기준: 탈락율 20% 미만, 피험자 모집율 80%이상, 1,960mg/day 투여용량에서 biomarker 2개 이상 유의성 확보, 심각한 이상증상 없이 인체시험 기간내에 시험완료한 임상기관 보고서
- ▶ 제형확립
 - GMP 시설에서 생산, 식약청 건강기능식품 기준규격에 맞는 부형제, 제품 type, 유통기한 등 (인체적용시험용)
- ▶ 건강기능식품 기능성 원료 신청
 - 식약처에 건강기능식품 기능성 원료 신청

<p>▶ 시제품 생산</p> <p>- GMP시설에서 확립된 제형의 시제품 생산, type(tablet or capsule)</p>
--

<Table 3-4> 연구개발 성과 및 평가 비중 산정

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)		비중 (%)
제조공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> 대량 생산 조건 최적화 GMP 시설 제조 	5
지표(기능)성분설정, 원료 규격 설정 (공인기관 시험성적서)	<ul style="list-style-type: none"> 기준규격설정(성상, 영양분석 등) 기능(지표)성분 및 검사법 validation(비공인·공인) 확립 안정성 평가 	10
전임상 효능평가 및 기전확인	<ul style="list-style-type: none"> in vitro 효능평가 in vivo 효능평가 기전 연구 	20
in vitro, in vivo 독성평가	<ul style="list-style-type: none"> in vitro 독성평가 in vivo 독성평가 	20
인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 Protocol, CRF 작성: 임상기관 IRB 승인서 보험가입(보험증서), 피험자모집공고(포스터 등) 인체적용시험 성공적 완료 	20
시제품제작	<ul style="list-style-type: none"> 제형확립 시제품 생산 	5
기능성원료 신청서 작성 및 신청		20
합계		100점

2절 목표 달성 여부

<Table 3-5> 연차별 연구개발 목표 달성도

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)	연구결과
1차 년도 (2016)	독성/효능자료 조사	특허, 논문, 정부보고서 등의 검색	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 독성 조사 ○ 과거(전통적) 섭취량 조사 ○ 효능조사
	기능·지표물질 선정	지표물질 밸리데이션	100	○ C3G의 밸리데이션 결과 C3G는 지표 물질로 적합한 것으로 분석 되었음
	추출조건 선정 및 원료 표준화	온도, 용매 등에 따른 추출 조건 확립 및 원 산지 별 지표성분	100	○ 여러 조건으로 추출을 한 결과 착즙액에서 지표물질인 C3G의 함량이 열수, 에탄올, 물-에탄올 혼합 추출에 높았지만 수율은

		합량 및 수율 확인		<p>다른 추출방법에 비해 약간 낮았음</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 열수 추출, 에탄올, 물-에탄올 혼합 추출의 세가지 방법에서는 비슷한 양의 지표물질 함량을 나타내었지만 열수추출에서 함량과 수율이 약간 높았다. 물이나 에탄올의 저온 추출에서는 수율이 매우 낮았음
	미생물, 중금속, 잔류농약 등 규격설정	정립된 추출방법을 통한 추출분말의 공인기관 성적서를 통한 규격 설정	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 추출조건에서 수율과 지표함량이 높은 착즙분말을 공인기관인 기능식품연구원에 분석 의뢰하여 결과 획득함 ○ 일반성분: 열량 355.14Kcal/100g, 탄수화물 83.75%, 조단백 1.99%, 조지방 1.35%, 수분 8.03%, 회분 4.88%, 나트륨 60.05mg/100g, 불포화지방산 0.014g/100g ○ 중금속: 납 0.41mg/kg, 카드뮴 0.13mg/kg, 비소 0.15mg/kg, 수은 0.001mg/kg ○ 잔류농약: BHC 불검출, DDT 불검출, aldrin 불검출, dieldrin 불검출, endrin 불검출 ○ 미생물: 일반세균 208/g, 대장균군 음성, 대장균 음성
	<i>in vitro</i> 효능 검증	GalN or CCl4에 의한 간세포 독성유도, 측정: AST, ALT, TBARS, anti oxidant, cytochrom P-450 등	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ DPPH 활성산소 소거능 측정하여 효능을 확인함 ○ Law264.7 cell에 LPS처리에 의한 NO 생성능을 측정한 결과 효능을 나타냄 ○ HepG2 cell에 산화적 스트레스 유도물질인 tBHP처리 후 세포보호효과를 측정한 결과 효능을 확인함 ○ HepG2 cell에 tBHP처리후 Nrf2의 활성능을 측정한 결과 효능을 확인 함 ○ cell에서의 AST, ALT 측정보다 <i>in vivo</i>에서의 A S T, ALT측정이 효능검증에 더 유효할 것으로 판단됨
	<i>in vitro</i> 독성시험	HepG2 cell viability test, 용량은 최대 300µg/ml까지 safety 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ HepG2 세포에 3~300µg/mL를 각각 처치한 결과, 대조세포와 비교하여 세포생존율에 변화를 나타내지 않았음 ○ 300µg/ml까지 안전성 검증함 ○ 300µg/ml이상의 농도에서는 cell death가 관찰되지는 않았으나 추출물의 색으로 인해 측정이 불명확함
2차년도 (2017)	원료 규격설정	추출분말의 공인기관 성적서를 통한 규격 설정	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내산 하나베리 상온 물추출 건조분말을 국가공인기관인 한국 기능식품연구원에 영양성분, 미생물, 중금속, 잔류농약의 분석을 의뢰하여 적합성 확인 ○ 일반성분: 열량 376.99Kcal/100g, 탄수화물 91.62%, 조단백 0.68%, 조지방 0.87%, 수분 4.80%, 회분 2.03%, 나트륨 16.75mg/100g ○ 중금속: 납 0.044mg/kg, 카드뮴 0.005mg/kg, 비소 0.019mg/kg, 수은 0.007mg/kg ○ 잔류농약: BHC, DDT, aldrin, dieldrin, endrin 등 총 5종 불검출 ○ 미생물: 대장균군 음성

	대량 생산조건 확립	생산규모의 증대를 위한 mass scale 추출제조공정 확립(80kg, 추출기에서의 추출용매, 추출온도, 추출 시간, 추출횟수, 필터방법, 건조방법, 수율 확립)	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 하니베리 원료(80kg)를 최적의 추출조건과 동일한 추출조건으로 생산규모를 증대하여 동일한 지표물질(C3G) 함량 및 수율의 확인
	인체시험용 시험약/위약제조	시험약과 위약의 구분이 유사한 색, 향, 맛으로 제조, 섭취량이 1,960mg/day의 용량으로 66명분 12주 분량	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 갈색 capsule 제형 ○ 490mg capsule로 1일 2회, 1회 2capsule 복용 가능한 제형으로 제조
	인체시험 IRB신청 및 승인	인체적용시험을 위한 protocol, CRF 작성 IRB승인신청 및 승인	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ AST, ALT, GGT가 정상범위 초과(환자 기준 초과하지 않음)한 남녀성인 피험자 66(시험군 33명, 플라시보 33명) ○ 12주간의 RCT, DB, placebo대조시험, 검사항목: 인구학적조사, 음식섭취량, 혈청검사, 지방대사(FFA, cholesterol 등)/간기능검사(AST, ALT, GGT 등) protocol 작성 ○ 임상기관-남양주 양병원/ CRO-케이제이파마텍, IRB신청 및 승인 완료
	제형연구	tablet, capsule, powder 등에 대한 formulation 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 하니베리 추출분말과 텍스트린 등을 혼합하여 capsule 제형으로 개발완료
	in vivo 안전성 평가	독성시험(정상대조군, 하니베리 추출물 용량 그룹의 단회, 반복투여 독성시험: non-GLP)	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 하니베리 추출물의 500mg/kg, 1,000mg/kg, 2,000mg/kg 세용량을 설정하여 단회 반복 투여 후 체중변화, 장기무게, 혈액검사, 혈액 생화학검사, 소화검사 결과 하니베리 추출물은 독성이 없는 안전한 물질임을 확인
	in vivo 효능평가	비알콜성(High fat diet 모델) 간손상 동물모델에서 하니베리 추출물의 효능평가	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 하니베리 추출물 100, 200, 400mg/kg 용량으로 고지방식으로 비알콜성 간 손상 유도한 동물에게 경구투여 후 체중변화 및 식이 섭취량, 장기무게, 지방량 측정 및 관찰, 혈중 간 기능 개선 지표, 간 조직 지방량 및 직경 측정, 항산화 효소 활성 측정, 혈중 지질 농도 측정, 간조직 당 분해 및 합성효소 측정, 지질 관련 대사 mRNA 발현량을 측정한 결과 하니베리 추출분말의 우수한 항산화 효과와 지방 합성 억제 효능을 바탕으로 간 보호 효과를 확인
3차년도 (2018)	제형연구	tablet, capsule, powder 등에 대한 formulation 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 하니베리 추출물과 텍스트린 비율 각각 1:1 혼합 후 동결건조 진행. 이산화규소(1%), 스테아린산 마그네슘(1%)을 첨가하여 capsule 제형으로 개발완료. 이 제형으로 임상 진행

	시제품제작	건강기능식품 및 기능성 화장품 원료로 제작	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 건강기능식품 1건 ○ 식품 4건 ○ 기능성화장품 5건 ○ 총 10건의 시제품 제작
	인체적용시험	하니베리 투여가 비알콜성 간기능 손상의 개선 효과에 미치는 인체적용 시험 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 간기능 1차 유효성 평가변수인 AST에서 시험군의 경우 통계적으로 유의하게 감소하였고, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서도 유의한 차이 확인 ○ 간기능 1차 유효성 평가변수인 ALT에서 시험군의 경우 통계적으로 유의한 감소 확인 ○ 지방대사 평가변수인 HDL에서 시험군의 경우 통계적으로 유의하게 증가하였고, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서도 유의한 차이 확인 ○ 항산화 평가변수인 MDA에서 시험군의 경우 통계적으로 유의하게 감소하였고, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서도 유의한 차이 확인 ○ 항산화 평가변수인 SOD에서 시험군의 경우 증가하는 경향을 확인(유의성 없음) 하였지만, 시기와 그룹간의 상호작용효과에서는 유의한 차이 확인 ○ 피로심각척도 문항분석은 '정신적 피로', '졸리움', '신체적부조화', '소진'에서 피로 자각도는 유의하게 감소하는 것을 확인 ○ 시험물질과 관련된 어떠한 이상반응이나 부작용이 나타나지 않아 안전한 물질로 판단됨
	기능성원료 신청	비알콜성 간기능 손상으로 부터 간보호	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 하니베리 추출분말 로서 1,960mg/일 ○ 지표성분: C3G(cyanidin-3-glucoside) 성분: 7.5mg/g ○ 성장: 하니베리 추출분말로서 이미.이취가 없고 고유의 향미가 있는 붉은색 분말
	기전연구	in vitro, in vivo, 인체적용시험으로 이어지는 기전제시	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 하니베리 추출물에 의한 AMPK 활성화 야기되어 Nrf2의 transactivation을 유도하여 항산화 및 간기능 개선 관련 유전자의 발현을 증가시켜 동물실험과 인체적용시험의 간 기능 개선의 효과를 나타낸 것으로 판단됨
추가 연구	in vivo 효능평가	국내산 하니베리 사용 고지방식이(HFD) 간손상 mice 모델 (32.60-36.20g/6주령)	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 간조직내 AMPKα1, AMPKα2 유의적 증가에 의한 항산화기능 강화를 통해 간조직내 지질대사증가와 간내 AST, ALT 효소 감소기전을 확인함
	GLP 기관 독성시험연구	<ul style="list-style-type: none"> • 단회투여 • 반복투여(90일) • 복귀돌연변이 • 소핵시험 • 염색체 이상시험 	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 특이한 일반증상, 사망례, 유의한 체중 변화 및 육안적 병변 소견 없었으며, 유전독성(복귀돌연변이, 소핵시험, 염색체 이상시험)에서도 독성이 유발되지 않았음. ○ 안전한 식품으로 확인 됨

<Table 3-6> 최종 연구개발 목표 달성도

성과목표	목표 달성여부	첨부
제조공정 확립 [달성률 100%]	<ul style="list-style-type: none"> ○ 하니베리 원재료에 물을 5배 첨가하여 상온추출 진행. 착즙 및 여과 진행 후 원심분리과정과 농축을 진행하고, 하니베리 추출물과 텍스트린 비율 각각 1:1 혼합 후 동결건조 진행. 합습 방지를 위해 이산화규소(1%), 스테아린산 마그네슘(1%)을 첨가하여 최종원료 제조 ○ 제조보고서 및 3 lot 생산한 작업지시서 첨부하였음 	첨부-01
지표(기능)성분설정, 원료 규격 설정 [달성률 100%]	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식품공전, 건강기능식품공전, 식품첨가물공전의 규격에 부합하는 성상(색, 형태, 물성 등), 영양분석(단백질, 탄수화물, 지방, Na, 회분 등)의 공인시험 성적서 및 시험방법 첨부하였음 ○ C3G 함량을 분석한 결과, 7.5mg/g 일정 함량이 유지되고 있으며, 기능(또는 지표)성분의 표준품도 일반적으로 상용화 되어 있으므로 추후 품질관리에 용이한 성분임을 확인하였음. ○ 자사에서 실시한 특이성, 직진성, 정확도, 회수율, 정밀도, 범위에 대한 결과보고서 ○ 자사에서 실시한 안정성에 대한 보고서 	첨부-02 첨부-03 첨부-04
전임상 효능평가 및 기전확인 [달성률 100%]	<ul style="list-style-type: none"> ○ HepG2를 이용하여 항산화 표적분자 Nrf2 transactivation, anti-oxidant gene expression, SOD activity, CAT activity의 효능을 검증하여 SCI급 논문 1편을 게재하였음 ○ 비알콜성(비만형) 간손상 모델에서의 체중, 혈청화학검사, 조직검사 등을 실시하여 간 손상 개선의 효능을 확인하여 SCI급 논문 2편, 국내 논문 1편을 게재하였음. ○ in vitro/in vivo 기전제시: 활성산소 소거와 Nrf2 transactivation을 유도하며 지방과 포도당의 에너지 대사에 관여하는 AMPK upregulation을 유도하여 에너지 대사를 조절함으로 간 기능 개선 효과를 확인하였음 	첨부-05 첨부-06 첨부-07 첨부-08
in vitro, in vivo 독성평가 [달성률 100%]	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기존 목표 non-GLP 기관에서의 자료는 모두 가천대학교에서 완성하였음 ○ 추가적으로 주관기관 아리바이오에서는 GLP 기관에서 단회, 90일 반복, 복귀돌연변이, 소핵시험, 염색체이상시험을 실시하여 하니베리는 안전한 원료임을 확실히 입증하였음 	첨부-09 첨부-10 첨부-11 첨부-12 첨부-13
인체적용시험 [달성률 100%]	<ul style="list-style-type: none"> ○ 탈락율 20% 미만, 피험자 모집율 80%이상, 1,960mg/day 투여용량에서 biomarker 2개 이상 유의성 확보, 심각한 이상증상 없이 인체시험 기간 내에 시험완료한 임상기관 보고서 	첨부-14
시제품제작 [달성률 100%]	<ul style="list-style-type: none"> ○ GMP시설에서 확립된 제형의 시제품 생산(건강기능식품 및 기능성화장품), 품목제조보고서 	첨부-15
기능성 인증 [달성률 100%]	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식약처 개별인정형 기능성 인정 신청 서류 작성 ○ “비알콜성 간기능 손상으로부터 간보호”로 신청 	첨부-16

<Table 3-7> 연구성과 목표 대비 실적

(단위 : 건수, 백만원)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	2	2			1	5	-		18		2	3	-	1	-	4	-	2	1
1차년도	-	-			-	-	-		2		1	-	-	-	-	-	-	-	-
2차년도	3	-			-	8	360		8		5	1	1	2	2	2	1	1	1
3차년도	-	-			1	2	60		8		-	3	1	-	-	3	-	1	1
소 계	3	0			1	10	420		18		6	4	2	2	2	5	1	2	2

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

- 목표 미달성 시 원인(사유): 미달성 된 목표 없음
- 모든 연구개발성과 및 성과목표 완료
- 후속연구로는 본 연구성과를 바탕으로 in vitro 효능실험과 비만인을 대상으로 인체적용시험을 통하여 하니베리의 체지방 감량 기능성 규명을 위한 연구 계획 중
- 식약처 개별인정형 “체지방 감량”으로 추가 인증을 비롯하여 FDA의 “NDI” 승인을 위한 연구 진행 중

4장 연구결과의 활용 계획 등


<Table 4-1> 연구결과 활용 계획

구분	구체적인 내용
활용계획 및 활용방안	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 활용실적 및 기술인증 측면 활용방안 <ul style="list-style-type: none"> - 식약처에 건강기능식품 기능성 원료 신청(비알콜성 간기능 손상으로부터 간보호) 완료 - 추후, “체지방 감량 개선”으로 추가 기능성 인증 추진 - <u>2019년 “NDI” 신청 자료 작성 중 연내 신청 추진</u> ▶ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 국내산 천연물의 기능우수성을 통한 국내산 원료에 대한 연구개발 투자증대 - 국내산 천연물의 건기식 기능성원료 인증을 통한 기술력증대로 해외 기능성 인증 획득을 위한 기반구축 - 기능성 제품을 통한 간기능 개선으로 건강한 사회구현 - 우수한 품질의 국내산 농산물의 기능성원료로의 개발을 통한 연구 기반 구축과 더불어 다른 우수 농수축산물의 고기능성화 기반마련 - 천연물의 기능성발굴을 통한 고부가가치 제품개발의 기초데이터 제공 - 국내 건기식 개별인증 로드맵 뿐만 아니라 해외 건기식 인증 로드맵 구축을 통한 다른 원료의 단기간, 저비용으로 인증획득 및 판로확보 - 기능성 평가를 위한 R&D 모델 및 biomarker 구축을 통한 연구경쟁력 향상 ▶ 경제적·산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 천연물 기능성 제품을 통한 건강유지로 의료비 절감 - 천연 원료로 기능성인증을 통한 당뇨인구가 많은 선진국 (미국, 일본, 유럽) 관심국에 수출 - 하니베리의 고부가가치화와 재배면적 증가를 통한 농민소득증대 - 하니베리의 생산에 따른 농민들의 안정적인 판로확보 - 건강기능식품시장에서 국산제품의 시장 점유율 확대 - 국내 천연기능성원료 개발로 인한 농산물과 기능성원료의 생산, 유통, 판매 그리고 기계제조업 부분의 고용확대(신규일자리 창출)와 소득증대 - 전문인력양성 및 채용, 기술력우위를 통한 참여기업의 글로벌 강소기업으로의 도약

	<ul style="list-style-type: none"> - 국내산 천연물의 기능우수성을 통한 국내산 원료에 대한 연구개발 투자증대 - 국내산 천연물의 건기식 기능성원료 인증을 통한 기술력증대로 해외 기능성 인증 획득을 위한 기반구축 - 기능성 제품을 통한 간기능 개선으로 건강한 사회구현 - 우수한 품질의 국내산 농산물의 기능성원료로의 개발을 통한 연구 기반 구축과 더불어 다른 우수 농수축산물의 고기능성화 기반마련 - 천연물의 기능성발굴을 통한 고부가가치 제품개발의 기초데이터 제공 <p>▶ 활용계획</p> <table border="1" data-bbox="430 705 1412 1220"> <thead> <tr> <th colspan="2">구분</th> <th>활용 분야</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">제품 화</td> <td>원 료</td> <td>- 기존의 건기식 제품에 기능성 증강을 위한 첨가로 리뉴얼되는 제품 - 일반식품에 기능성 원료 첨가제품: 건강기능식품 (간기능 개선용), 우유 및 유제품류(요거트, 치즈 등), 대용식(인스턴트음식), 음료류</td> </tr> <tr> <td>완 제 품</td> <td>하니베리를 주성분으로 하는 건강기능식품</td> </tr> <tr> <td>신산업</td> <td colspan="2">간질환 치료제</td> </tr> <tr> <td>원천기술</td> <td colspan="2">비알콜성 (스트레스, 약물, 비만 등) 간손상에 대한 실험모델 확립 및 이를 통한 건강기능식품 기능성원료 개발 및 천연물신약 효능평가 모델로 활용</td> </tr> <tr> <td>후속연구</td> <td colspan="2">하니베리의 기능성분 확보 및 이 성분의 천연물신약 (간염치료제)으로 개발</td> </tr> </tbody> </table>	구분		활용 분야	제품 화	원 료	- 기존의 건기식 제품에 기능성 증강을 위한 첨가로 리뉴얼되는 제품 - 일반식품에 기능성 원료 첨가제품: 건강기능식품 (간기능 개선용), 우유 및 유제품류(요거트, 치즈 등), 대용식(인스턴트음식), 음료류	완 제 품	하니베리를 주성분으로 하는 건강기능식품	신산업	간질환 치료제		원천기술	비알콜성 (스트레스, 약물, 비만 등) 간손상에 대한 실험모델 확립 및 이를 통한 건강기능식품 기능성원료 개발 및 천연물신약 효능평가 모델로 활용		후속연구	하니베리의 기능성분 확보 및 이 성분의 천연물신약 (간염치료제)으로 개발	
구분		활용 분야																
제품 화	원 료	- 기존의 건기식 제품에 기능성 증강을 위한 첨가로 리뉴얼되는 제품 - 일반식품에 기능성 원료 첨가제품: 건강기능식품 (간기능 개선용), 우유 및 유제품류(요거트, 치즈 등), 대용식(인스턴트음식), 음료류																
	완 제 품	하니베리를 주성분으로 하는 건강기능식품																
신산업	간질환 치료제																	
원천기술	비알콜성 (스트레스, 약물, 비만 등) 간손상에 대한 실험모델 확립 및 이를 통한 건강기능식품 기능성원료 개발 및 천연물신약 효능평가 모델로 활용																	
후속연구	하니베리의 기능성분 확보 및 이 성분의 천연물신약 (간염치료제)으로 개발																	
<p>추가 연구의 필요성 및 타 연구 응용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 후속 연구의 필요성 <ul style="list-style-type: none"> - 비만 인구의 증가 - 본 과제를 통해 in vivo 효능연구에서 하니베리의 체지방감량에 긍정적 영향 확인 - “비알콜성 간보호”와 “체지방 감량”의 2중 기능성 획득을 통해 시장 진입 교두보로써 활약 기대 ▶ 후속 연구내용 <ul style="list-style-type: none"> - In vitro 추가 연구 진행 - 비만인을 대상으로 인체적용시험 진행 																	
<p>기업화 추진방안</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 상용화 형태 : 건강기능식품 ▶ 수요처 : GS홈쇼핑, 네이처스팜, CJ제일제당, CJ healthcare, 굿지앤 																	

	<ul style="list-style-type: none"> - CJ 제일제당 건강기능식품파트 건강식품센터와 개발소재에 대한 의견 교환 - 여성건강부분에 대한 개발요구 - CJ healthcare: 제품개발센터와 건식원료(갑상선개선)에 대한 미팅 - 신규소재 및 기능성에 대한 관심이 높음 - 롯데홈쇼핑: 식품생활팀 MD(GS홈쇼핑 MD)와 신규소재에 대한 미팅진행, 임상시험 제품 및 섭취를 기반으로 한 제품구성(예상 1일 2회, 1회 2정, 12주 복용분) - 네이처스팜: 대표이사과 약국전문유통에 대한 제품개발 의견교환 - 굿지앤: 스타 마케팅(현재 신동엽, 신현준) 활약 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 예상 단가 : 5만원(1개월 분) ▶ 개발 투입인력 및 기간 : 개발인력 20명, 개발기간 1년
사업화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 본사(제천)에 건강기능식품 GMP 제조시설 보유 ▶ 본사에 건강기능식품 제품개발실 보유 ▶ 본사에 제품디자인실 운영
사업화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 기능성원료 인정획득 후 완제품의 인정획득까지 3개월 이상이 소요됨으로 과제종류 후 1차년도에 완제 시제품이 나옴. 과제 종료전에 원료제품과 하니베리 추출물이 부원료로 첨가된 건기식 제품 출시 ▶ 소비자들의 반응분석과 시제품개선작업을 통하여 과제종류 후 2년차에 본격적인 상품판매를 개시함
비즈니스 모델	<ul style="list-style-type: none"> ▶ BM 수립 배경: 알콜성 간손상 뿐만 아니라 비알콜성 간손상 질환자가 급격히 증가되고 있으나 이에 대한 건강기능식품에 대한 연구는 활발하지 못함 ▶ BM 목표 및 핵심경쟁요인 <ul style="list-style-type: none"> - BM 목표: 간질환을 우려하는 사람들이 우선적으로 고려하는 제품 - 핵심경쟁요인: 기존에 나와 있는 제품의 경우, 알콜성 손상에 한정되거나 과학적인 근거가 부족하거나, 수입품인 경우이다. 그러나 하니베리는 국내에서 생산되고 과학적인 근거제시와 광범위한 간기능 개선으로서 영문으로도 친근하게 느껴지고 사랑스럽게 느껴지는 하니베리로서 향산화능력이 다른 베리에 비하여 월등하기 때문에 효능면에서도 우수함 ▶ 목표 시장 구조 <ol style="list-style-type: none"> (1) 경쟁기업 현황 <ul style="list-style-type: none"> - 생명의 나무: 호간보 제품에 헛개나무열매 독점공급 - 뉴메드: 헛개나무열매 개발회사로서 최근 고시형 전환을 앞두고 있어 다른 소재 개발 및 연구 중 (2) 경쟁구조 <ul style="list-style-type: none"> - 개별인정형 원료인 경우 독점적인 공급 이점이 있기에 개발회사가 우선인경우가 많음

	<ul style="list-style-type: none"> - 시장접근성이 제한되어 있어 시장성이 높은 원료를 가진 회사가 우월적 지위를 가짐 <p>(3) 시장진입 장벽</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유통시장에서 기존의 원료에 대한 신뢰성과 신규원료에 대한 의문성 - 홈쇼핑시장에서는 신규원료에 대한 호응이 높음 - 하니베리의 국내산 공급이 부족함 <p>▶ 수익 확보 전략</p> <p>(1) 주요 고객군</p> <ul style="list-style-type: none"> - 스트레스와 과로가 많은 직장인, 수험생, 승진준비자, 노화 진행자, 비만자 등 <p>(2) BM의 수익창출 방안</p> <ul style="list-style-type: none"> - 직접수익(원료와 제품의 판매)
<p>일반식품으로서의 산업화 추진방안</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 상용화 형태 : 일반식품(가공식품, 간편식, 음료 등) ▶ 수요처 : 네이처스팜, 지오영, 굿지앤 - 네이처스팜: 기존 하니베리 농축액이 함유되어 있는 “Y자임”과 “글리버 댕댕”을 만들어 사업화를 진행 중에 있었으며, 추후 더 많은 제품을 출시 할 계획을 가지고 있음 <div style="text-align: center;">  </div> <ul style="list-style-type: none"> - 지오영 : 아리바이오는 국내 약국 유통회사 “지오영”과 업무협약을 진행하여, 제품개발부터 홍보/마케팅까지 시장진출을 성공적으로 이끌 수 있는 통합 비즈니스 형태를 갖추고 있음. 이에 하니베리를 활용하여 제품개발 및 판매까지 지오영과 협업 진행

	 <p>- 굿지앤 : 스타 마케팅(현재 신동엽, 신현준)을 활용하여, 제품 홍보 진행 현재 일반 식품으로 2개 제품(강황 및 숙취음료)이 개발되었으며, 추후 하니베리가 함유된 식품으로 시장 진출을 위해 협업 진행</p>
<p>국내산 하니베리의 원물확보 방안</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 기업간 연계(공급계약) <ul style="list-style-type: none"> - H&K bioscience에서는 국내산 하니베리의 사업화를 위한 하니베리 농장을 확보하고 있으며, 당사에서는 H&K bioscience에서 원료 수급을 계약하였음 ▶ 제천시 관계부처와 연계(계약재배) <ul style="list-style-type: none"> - 제천시: 농가에서 땀땀이나무열매 재배 기반마련 및 홍보 - 농가: 시범사업에 참여하여 농가수익증대 방안 및 재배 노하우 습득 - 아리바이오 & 제천시: 업무협약을 통한 계약재배 및 유관기관협조 체계 구축 - 아리바이오: 추가 기능성을 획득하여 하니베리의 기능성을 과학적으로 입증하고, 이를 토대로 홍보 및 마케팅 진행 - 2019년 제천시에서 600평의 농지를 확보하여 시범생산을 시작으로 매년 재배 면적을 증가하기로 계약 하였음 ▶ 강원도(평창) 재배 농지 확장 방안(자체 생산) <ul style="list-style-type: none"> - 아리바이오에서는 국내산 하니베리 생산량 증가를 위해 강원도에 하니베리 재배를 위한 농지 수급도 검토 중에 있으며, 기존 아리바이오 농장(청옥산: 평창)에도 하니베리를 재배하려는 계획을 추진하고 있음.

■ 참고문헌

- Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ*, 2005, 172, 899-905.
- Alisi A, Nobili V. Non-alcoholic fatty liver disease in children now: Lifestyle changes and pharmacologic treatments. *Nutrition*, 2012, 28, 722-726.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 2002, 346, 1221-1231.
- Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis*, 2001, 21, 3-16.
- Bugianesi, E., Manzini, P., D'Antico, S., Vanni, E., Longo, F., Leone, Massarenti, P., Piga, A., Marchesini, G & Rizzetto, M. (2004). Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology*, 39, 179-187.
- Chen L, Xin X, Yuan Q, Su D, Liu W. Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. *J Sci Food Agric*. 2014, 94, 180-188.
- Chitturi, S., Abeygunasekera, S., Farrell, G. C., Holmes-Walker, J., Hui J. M., Fung, C., Karim, R., Lin, R., Samarasinghe, D., Liddle, C., Weltman, M & George, J. (2002). NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*, 35, 373-379.
- Choi JS, Kim JW, Park JB, Pyo SE, Hong YK, Ku SK, Kim MR. Blood glycemia-modulating effects of melanian snail protein hydrolysates in mice with type II diabetes. *Int J Mol Med*. 2017, 39, 1437-1451.
- Choi SY, Kim D, Kim HJ, et al. The relation between non-alcoholic fatty liver disease and the risk of coronary heart disease in Koreans. *Am J Gastroenterol*, 2009, 104, 1953-1960.
- Day, C. P., James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two hits? *Gastroenterology*, 114, 842-845.
- Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM: An International Journal of Medicine*, 2010, 103, 71-78
- Jin XH, Ohgami K, Shiratori K, Suzuki Y, Koyama Y, Yoshida K, Ilieva I, Tanaka T, Onoe K, Ohno S. Effects of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Exp Eye Res*. 2006, 82, 860-867.
- Jung YM, Lee SH, Lee DS, You MJ, Chung IK, Cheon WH, Kwon YS, Lee YJ, Ku SK. Fermented garlic protects diabetic, obese mice when fed a high-fat diet by antioxidant effects. *Nutr Res*. 2011, 31, 387-396.
- Jurgoński A, Juśkiewicz J, Zduńczyk Z. An anthocyanin-rich extract from Kamchatka honeysuckle increases enzymatic activity within the gut and ameliorates abnormal

- lipid and glucose metabolism in rats. *Nutrition*. 2013, 29, 898–902.
- Kim CM, Yi SJ, Cho IJ, Ku SK. Red-koji fermented red ginseng ameliorates high fat diet-induced metabolic disorders in mice. *Nutrients*. 2013, 5, 4316–4332.
- Korea National Statistical Office. The cause of death statistics. Annual Report on the Cause of Death Statistics, 2013.
- Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int*, 2009, 29, 113–119.
- Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol*, 2006, 45, 600–606.
- Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., Natale, S., Vanni, E., Villanova, N., Melchionda, N & Rizzetto, M. (2003). Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*, 37, 917–923.
- Ministry of Food and Drug Safety. Influence of dietary intake on non-alcoholic fatty liver disease in Korean. Cheongwon, Korea: Ministry of Food and Drug Safety, 2012.
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2003, 37, 1202–1219.
- Palíková I, Valentová K, Oborná I, Ulrichová J. Protectivity of blue honeysuckle extract against oxidative human endothelial cells and rat hepatocyte damage. *J Agric Food Chem*. 2009, 57, 6584–6589.
- Park SI, Lee YJ, Choi SH, Park SJ, Song CH, Ku SK. Therapeutic effects of blue honeysuckle on lesions of hyperthyroidism in rats. *Am J Chin Med*. 2016, 44, 1441–1456.
- Park, S. H., Jeon, W. K., Kim, H. J., Park, D. I., Cho, Y. K., Sung, I. K., Sohn, C. I & Keum, B. I.(2006). Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol*, 21, 138–143.
- Pessayre, D., Berson, A., Fromenty, B., & Mansouri, A. (2001). Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis*, 21, 57–69.
- Sanyal, A.J., Campbell-Sargent, C., Mirsajji, F., Rizzo, W.B., Contos, M.J., Sterling, R.K., Luketic, V.A., Shiffman, M.L & Clore, J.N.(2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 120, 1183–1192.
- Schiff ER, Orrell MF, Maddrey WC. Schiff's diseases of the liver. 9th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2003, p. 1261
- Sheth SG, Gordon FD & Chopra S. (1997). Nonalcoholic steato-hepatitis. *AnnIntern Med*, 126, 137–145.
- Svarcova I, Heinrich J, Valentova K. Berry fruits as a source of biologically active compounds: the case of *Lonicera caerulea*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2007, 151, 163–174.
- Svobodová A, Rambousková J, Walterová D, Vostálová J. Protective effects of phenolic

- fraction of blue honeysuckle fruits against UVA-induced damage to human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2008, 300, 225–233.
- Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab*, 2006, 4, 107–110.
- Zdarilová A, Rajnochová Svobodová A, Chytilová K, Simánek V, Ulrichová J. Polyphenolic fraction of *Lonicera caerulea* L. fruits reduces oxidative stress and inflammatory markers induced by lipopolysaccharide in gingival fibroblasts. *Food Chem Toxicol.* 2010, 48, 1555–1561.
- Zhao H, Wang Z, Ma F, Yang X, Cheng C, Yao L. Protective Effect of Anthocyanin from *Lonicera caerulea* var. *edulis* on Radiation-Induced Damage in Mice. *Int J Mol Sci.* 2012, 13, 11773–82.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 “고부가가치식품 기술개발사업”의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 “고부가가치식품기술개발사업”의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.