발 간 등 록 번 호
11-1541000-001072-01

일반과제 109161022SB010

농산물로부터 류마티스성 관절염 개선용 건강기능식품 개발

(Development of health-functional food for the improvement of rheumatoid arthritis from agricultural resources)

충남대학교 산학협력단

농 림 수 산 식 품 부

편집순서 2

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농산물로부터 류마티스성 관절염 개선용 건강기능식품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 4월 9일

주관연구기관명 : 충남대학교 산학협력단
주관연구책임자 : 이 충 재
세부연구책임자 : 이 충 재
협동연구기관명 : 중부대학교 산학협력단
협동연구책임자 : 유 선 균
협동연구기관명 : 충북대학교 산학협력단
협동연구책임자 : 한 상 배
협동연구기관명 : 금산덕원인약영농조합
협동연구책임자 : 고 태 훈

편집순서 3

요 약 문

Ⅰ. 제 목

농산물로부터 류마티스성 관절염 개선용 건강기능식품 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 합성 관절염 치료(조절)제는 여러 가지 부작용을 수반하는 경우가 많으므로, 효력이 강하면서도 비교적 부작용이 적은 관절염 개선 혹은 조절 수단의 개발은 시급하면서도 중대한 과제임.

2. 따라서, 본 연구에서는 전통 동양의학에서 비증(痺症)으로 표현되는 관절염, 관절통 등의 치료를 위해 사용했던 수십 종의 복합 약용식물처방에 관한 정보에 기초하여 탱자나무 열매 등 국내 주요 약용 농산물들을 대상으로, 항염증, 진통, 류마티스성 관절염 모델동물에 대한 효과 검증, 세포 및 분자 수준에서의 약리작용 기전 연구 등을 통해서, 유망한 류마티스성 관절염 개선용 건강기능식품 소재를 개발하고, 궁극적으로 개별 인정형 건강기능식품으로 실용화하기 위한 임상 시험 진입용 최종 제형을 도출하여 국내 약용 농산물의 부가가치를 현격히 증대시킴으로써 영농 관련 산업의 발전과 국민의 보건의료환경 향상에 크게 기여함을 연구목표로 하였음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 수십 종의 약용 농산물로부터 최적의 항염증, 진통 효능을 발현하는 물질(건강기능식품 소재)을 추출/분리(복합 조성물 혹은 단일 물질)하고,

2. 최적 효능을 발현하는 건강기능식품 소재의 류마티스 관절염 동물모델에 대한 다양한 약물 작용점에서의 효능을 평가하며, 동시에 면역계 세포 및 분자 수준에서의 약리작용기전을 규명함으로써 류마티스성 관절염 개선효능을 보유하는 건강기능식품 소재를 도출함.

3. 도출된 소재를 이용, 제형 및 섭취 방법 연구 등을 통하여 개별 인정형 건강기능식품으로 실용화하기 위한 임상 시험 진입용 최종 제형을 도출함.

Ⅳ. 연구개발결과

1. 건강기능식품 소재의 항염증/진통효능 및 안전성을 입증하였음.

2. 류마티스성 관절염 모델 동물에 대한 건강기능식품 소재의 치료(개선) 효능을 입증하였음.

3. 건강기능식품 소재의 세포/분자수준에서의 작용기전을 규명하였음.

4. 이상의 과정을 통하여, 최적의 약효를 보유한 건강기능식품 소재를 도출하고 임상시험 진입용 제형을 구현하였음.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 관련 생명과학 기술분야의 융합/복합적 발전을 유도하였음.
2. 건기식의 원료공급에 있어서도 국내산 약용 농산물을 이용함으로써 수입 의존적 유통구조를 개선할 수 있음.
3. 약 5천억원 규모의 국내시장은 물론이고, 1,190억 달러규모의 세계 시장에서 본 연구의 결과물로 예상되는 건강기능식품이 단 1%만 시장을 점유한다고 가정해도, 약 10억 달러 이상의 수출 증가 효과로 경제적 이득이 추정됨. 이는 원료인 약용 농산물의 국내 영농장려를 통한, 농촌경제 향상 및 식품산업의 발전에 지대한 경제적 공헌을 할 수 있을 것으로 추정됨.
4. 인구구조가 점차 노령화됨에 따라서, 관절염 환자는 앞으로 크게 증가할 전망임. 류마티스 관절염은 노령인구의 삶의 질과 직접적인 관련이 있는 질환으로서, 국내 뿐 만 아니라 세계적으로도 보건의료적 이슈가 될 전망임. 따라서, 국가 기관이 지원하는 본 연구개발을 통하여 류마티스성 관절염 개선효과를 나타내는 약용 농산물에 기원을 둔 건강기능식품의 개발이 가능해 진다면, 이는 국민들의 삶의 질 향상 및 대정부 신뢰도 제고 등의 사회, 문화적 효과도 유발할 수 있을 것으로 추정됨.

편집순서 4

SUMMARY

Ⅰ. Title

Development of health-functional food for the improvement of rheumatoid arthritis from agricultural resources

Ⅱ. Background and purpose of the study

1. It is urgently needed for us to develop an efficient and potent health-functional food candidate for the improvement of rheumatoid arthritis, since synthetic anti-inflammatory agents, disease-modifying agents and biological agents showed various side effects during the treatment of rheumatic arthritis.
2. Therefore, in this study, we tried to examine whether extracts from several herbal medicines based on traditional oriental medicine can be developed as a candiate for health-functional food without severe side effects for the improvement of rheumatoid arthritis.

Ⅲ. Contents of research and methods

1. To isolate and identify the natural product combinations that show anti-inflammatory, analgesic and anti-arthritic effects.

2. To investigate the activities of the natural product combinations on collagen-induced arthritis model animal and try to elucidate action mechanism of them at the celular and molecular levels.

3. To make the optimal preparation type of health-functional food candidate.

Ⅳ. Results

1. The health-functional food candidate (natural product combinations) showed anti-inflammatory and analgesic effects and was not toxic (biologically safe).

2. The health-functional food candidate also showed the biological activities on collagen-induced arthritis model animal.

3. We elucidated the action mechanism of the health-functional food candidate at the celular and molecular levels.

4. Finally, we made the optimal preparation type of health-functional food candidate.

Ⅴ. Applications

1. Making a technological progress in the field of life sciences related to the development of biologically-active compounds.
2. Rasing up the use of inland agricultural resources for supplying raw material for health-functional food.
3. Producing enhancing effect of economy through export of the final type of health-functional food prepared based on the utilization of inland agricultural resources.

편집순서 5

CONTENTS

Chapter 1. Outline of research.....8

Chapter 2. Current status of research related to this field
in the inside and outside of the country.....12

Chapter 3. Contents of research and results.....22

Chapter 4. Achievement of goals of research and contribution
to the related field of research.....111

Chapter 5. Outcome of research and applications of them.....113

Chapter 6. Technological information obtained from overseas sources
during research.....118

Chapter 7. References.....120

편집순서 6

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....8

제 2 장 국내외 기술개발 현황.....12

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....22

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....111

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획.....113

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....118

제 7 장 참고문헌.....120

제 1 장　연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

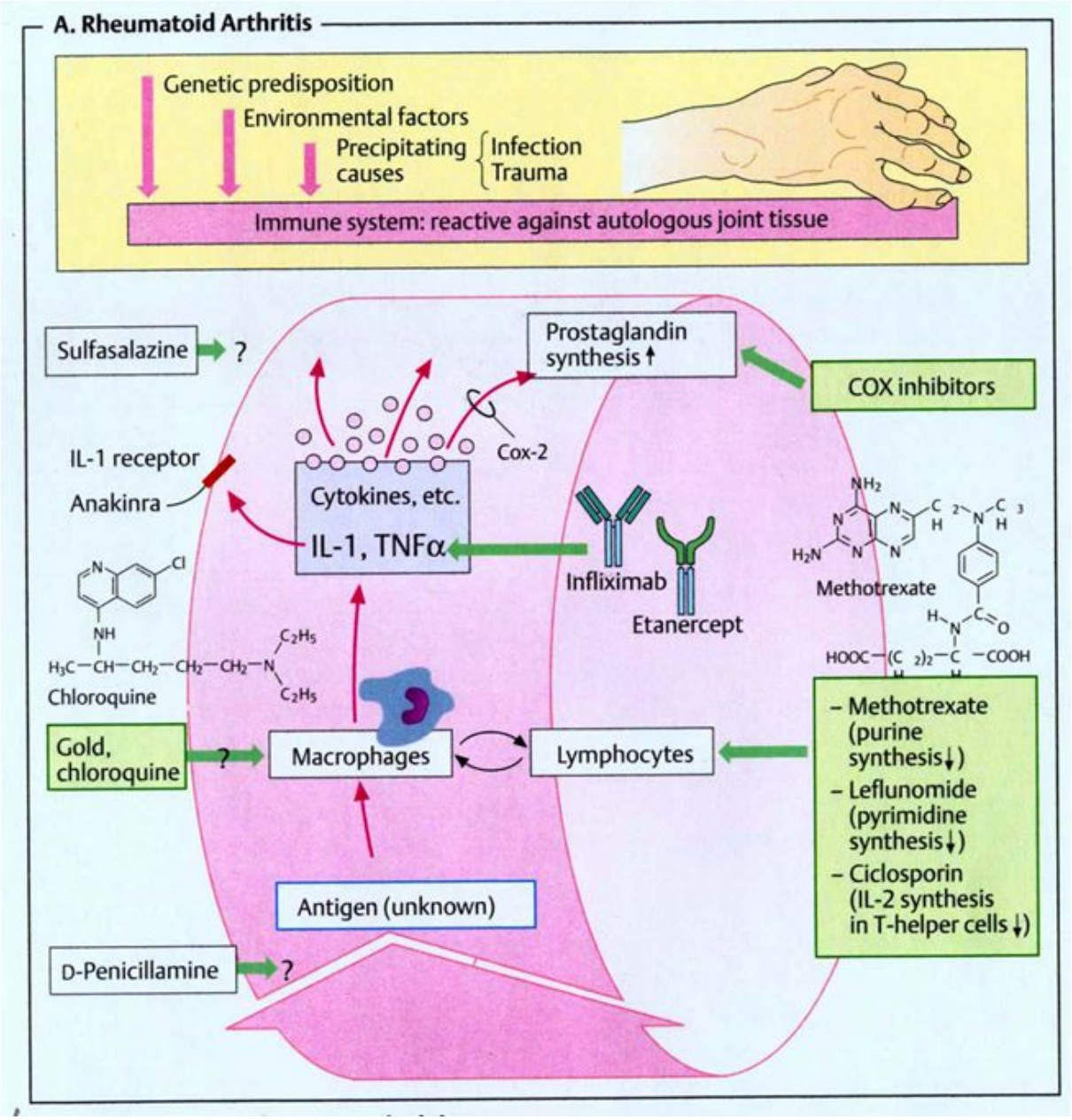
- 관절염(arthritis)이란 관절 부위에 통증(pain)이 2주 이상 지속되는, 부종과 발적 등의 증상을 특징으로 하는 질환으로, 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis)이란, 관절이나 건(힘줄)의 활막에 비세균성 염증 반응이 만성적으로 나타나며, 이로 인해 활막이 증식되고 활액의 양이 증가하여 관절의 부종과 동통, 관절 변형, 기타 증상으로 피로, 무력감, 발열 및 체력쇠약, 근육강직(muscle atrophy)과 근육경축(muscle spasm)을 초래하는 만성, 난치성 질환임.

- 아직 이 질환의 원인을 정확히 모르기 때문에, 원인 제거를 위한 치료를 시행하는 것은 불가능함. 또한 이 질환이 진행하는 과정을 바꾸어서, 진행을 정지시키거나 단기간 동안 경하게 진행하도록 하기 위하여 여러 가지 약물이 시도되고 있으나, 아직 성공적인 것은 없는 실정임(내과학, 1998).

- 현재, 관절염의 치료목표는 관절의 통증과 염증을 감소시키고, 관절의 변형을 방지하는데 있음. 관절염에 대한 근본적인 치료법이 없으므로 기초 치료법으로 물리, 운동 요법을 행하고, 적당한 비스테로이드성 항염증 약물(NSAIDs)을 사용하여 염증을 완화시키며, 염증이 심하면 금염(gold salt) 요법 또는 페니실라민(penicillamine) 요법을 실시하고 있음. 이러한 방법이 효과 없으면, 스테로이드(steroid) 제제를 사용하며, 난치성인 경우 면역 억제제를 사용하고, 변형 관절염으로 이행되면 수술요법을 실시함 (약리학, 2010).

- 그러나, 관절염에 대한 소염진통 작용을 위해 사용되는 비스테로이드성 항염증 약물(NSAIDs)은, 속쓰림, 위궤양 유발 등 위장관에 대한 부작용 이외에 과립백혈구 감소증, 재생불량성 빈혈 등의 혈액학적 이상, 현기증, 정신 착란 등을 유발하며, 스테로이드 제제는 항염증 효과가 빠르고 강하게 나타나며 환자에게 쾌감을 주는 약물로 알려져 있으나, 세균 감염에 대한 저항력 약화, 당뇨병 악화, 쿠싱(Cushing) 증후군, 부신 부전증, 정신장애 유발 등의 부작용이 있어 사용상 대단한 주의를 요함. **이처럼, 합성 관절염 치료(조절)제는 여러 가지 부작용을 수반하는 경우가 많으므로, 효력이 강하면서도 비교적 부작용이 적은 특이적인 관절염 치료제 혹은 개선용 건강기능식품의 개발은 시급하면서도 중대한 과제임.**

- 따라서, 본 연구에서는 '전통 동양의학에서 비증(痺症)으로 표현되는 관절염, 관절통 등의 치료를 위해 사용했던 수십 종의 복합 약용식물처방에 관한 정보에 기초하여 다수의 약용 농산물을 대상으로, 항염증, 진통, 류마티스성 관절염 모델동물에 대한 효과 검증, 세포 및 분자 수준에서의 약리작용 기전 연구 등을 통해서, 유망한 류마티스성 관절염 개선용 건강기능식품 소재를 개발하고, '상품성 있는 건강기능식품'으로 실용화함'을 연구의 최종 목표로 하였음.



2. 경제적 · 산업적 측면

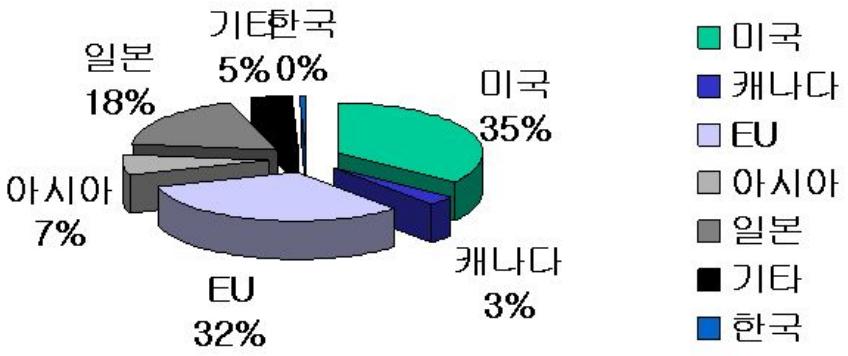
- 미국이나 영국 등에서는 전체 인구의 약 2.5-3%가 류마티스성 관절염으로 고생하고 있는 것으로 알려져 있음. 류마티스성 관절염은 우리나라에서도 매우 흔하며, 발생 빈도는 미국이나 영국의 경우와 비슷한 것으로 알려져 있음.

- 질환의 호발 연령은 30 - 50세 이나 모든 연령층에서 발견되며, 여성이 남성보다 약 3배 가량 더 우세하나 50세 이후에는 성에 따른 빈도가 비슷해짐. 또한 55세 이상의 약 80%, 75세에서는 거의 전 인구가 퇴행성 관절염의 소견을 나타내고 있으며, 이 중 약1/4 정도에서 임상 증세를 나타내는데 나이가 많아질수록 여성에게서 더 많이 그리고 더 심하게 나타나는 경향이 있음.

- 인구구조가 점차 노령화됨에 따라서, 관절염 환자는 앞으로 크게 증가할 전망이며, 류마티스성 관절염은 노령인구의 삶의 질과 직접적인 관련이 있는 질환으로서, 국내 뿐만 아니라 세계적으로도 보건의료적 이슈가 될 전망임. 이러한 상황으로 인해 전 연령층에 걸쳐 관절염 환자들의 삶의 질과 직업 수행능력은 심각하게 저하되며, 이로 인한 직간접적 경제적인 손실이 막대한 것으로 알려져 있음.

세계 건강기능식품 시장 현황

국가별 규모



	미국	EU	일본	캐나다	한국	아시아	기타	계
시장규모 (억불)	708 (35%)	647 (32%)	364 (18.0%)	60 (3.0%)	10 (0.5%)	139 (6.9%)	95 (4.7%)	2,023 (100%)

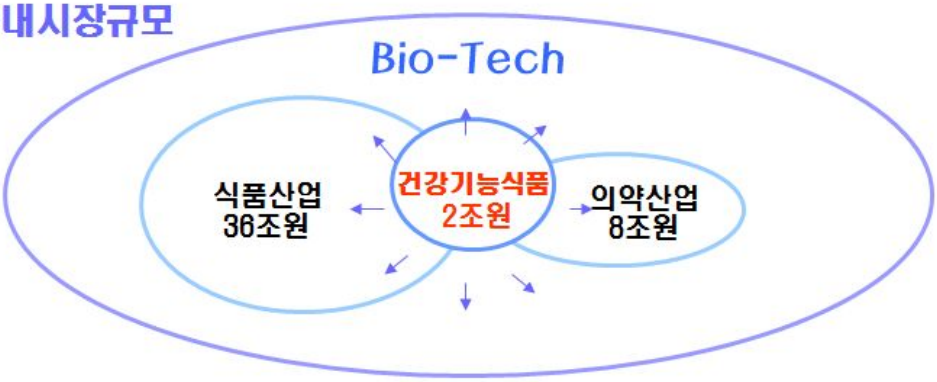
자료 : Nutrition Business Journal(2003), Food Technology(2003)

- 2009년을 기준으로 하여 류마티스성 관절염 치료제의 생산 및 판매와 관련된 시장 현황을 살펴보면, 항염증성 선택적 COX-2 저해제가 15%, 기존의 Steroids/NSAID가 15% 그리고 나머지 60-70%를 새로운 약물인 cytokine modulator나 항체와 같은 생물학적 제제 혹은 저분자 물질 등이 치료제 시장을 차지할 전망임.

국내 건강기능식품관련 시장현황

▷ 고부가가치 미래핵심산업
- 건강기능식품 세계시장규모 2,023억달러, 매년 10% 성장예측(NBJ,2003)
- 미국 시장규모 : 708억불('03), 연평균 신장율 11.7 %
- 일본 시장규모 : 364억불('03), 연평균 신장율 4.9 %

'02 국내시장규모



- 국내 관절염 치료 및 보조제(약물 및 건강기능식품) 시장 규모는 약 5천억원으로 추정되고 있으며, 미국의 경우에는 80억 달러, 즉 약 11조원으로 추정되고, 세계 시장은 약 160억 달러(약22조원)로 추정되고 있음. 이들 시장에서 본 연구의 결과물인 건강기능식품이 전체 시장의 10%만 점유한다고 해도, 약 10억 달러(약 1조 4천억원) 이상의 경제적 이득이 발생될 것으로 추정되며, 궁극적으로, 건강기능식품의 원료인 약용 농산물의 영농관련 산업 수요 촉발을 통한 농촌경제 여건 향상 및 국내 식품 및 제약산업의 발전에 지대한 공헌을 할 수 있을 것으로 추정됨.

제 2 장　국내외 기술개발 현황

제 1 절　국내·외 관련기술의 현황 및 문제점

1. 류마티스성 관절염의 병태생리 및 치료제 개요

- 관절염(arthritis)이란 관절 부위에 통증(pain)이 2주 이상 지속되는, 부종과 발적 등의 증상을 특징으로 하는 질환으로, 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis)이란, 관절이나 건(힘줄)의 활막에 비세균성 염증 반응이 만성적으로 나타나며, 이로 인해 활막이 증식되고 활액의 양이 증가하여 관절의 부종과 동통, 관절 변형, 기타 증상으로 피로, 무력감, 발열 및 체력쇠약, 근육강직(muscle atrophy)과 근육경축(muscle spasm)을 초래하는 만성, 난치성 질환임.

- 아직 이 질환의 원인을 정확히 모르기 때문에, 원인 제거를 위한 치료를 시행하는 것은 불가능함. 또한 이 질환이 진행하는 과정을 바꾸어서, 진행을 정지시키거나 단기간 동안 경하게 진행하도록 하기 위하여 여러 가지 약물이 시도되고 있으나, 아직 성공적인 것은 없는 실정임.

- 따라서, 엄밀하게 말하면, **<u>류마티스성 관절염에는 효과적인 치료법이 개발되지 못한 상태</u>**이며, 현재 류마티스 관절염의 치료목적은 통증제거 및 염증완화에 집중되어 있고. 류마티스성 관절염 치료약물은 크게 3종류로 구분됨.

류마티스 관절염 치료제의 종류 및 특성

구　분	치료 기작	대표 제품명	특징 및 단점
비스테로이드성 항염증제	염증반응에 관련된 사이클로옥시지나아제(cyclooxygenase : COX)라는 효소를 억제	이부프로펜, 나프록센, 인도메타신 등	- 위장장애 - 심혈관계 부작용
부신피질 호르몬제 (소염진통제, 스테로이드)	강력한 소염작용을 통한 염증억제	덱사메타손 등	- 뼈와 연골의 손상을 근본적으로 막지는 못함. - 장기 복용시 심각한 부작용 초래
선택적 COX-2 저해제	염증반응에 관련된 효소인 COX-2만을 억제	셀레브렉스, 바이옥스 등	- 연골 손상을 일부 차단 - 바이옥스의 경우 심혈관계 부작용으로 시장에서 퇴출
종양 괴사인자 알파 저해제	종양 괴사인자 알파를 저해	엔브렐, 레미케이드, 휴미라	- 생명공학기술 이용 - 인체 면역성분과 동일한 항체 제제로 부작용이 적음 - 매우 고가 - 주사제로만 사용 가능

가. steroid 및 NSAID 계열 소염진통제

- 염증을 일으키는 염증 매개 물질인 프로스타글란딘이라는 물질을 형성하지 못하게 하는 약물임. 그러나 이들에는 속쓰림, 구역질, 설사, 복통, 간기능 이상, 신장기능 이상, 단백뇨, 알레르기 반응, 피부 발진 등의 부작용도 많기 때문에 약물 선택과 사용 기간에는 신중한 판단이 필요함.

- 최근에는 선택적인 COX-2 억제제로 많은 부작용을 개선시킨 새로운 약물들이 개발되어 있음. 스테로이드제제는 관절통을 효과적으로 경감시킬 수 있으나 장기간의 치료에 따른 부작용이 너무 많고, 질병의 진행을 억제하지 못한다는 단점이 있음

- 고용량의 스테로이드를 장기간 사용하는 경우 발생될 수 있는 부작용으로는 골다공증, 고혈압, 당뇨병, 녹내장, 동맥경화, 몸통 비만, 안면 홍조 (얼굴이 빨갛게 변화), 체중 증가, 피부 약화, 피부 반점, 여드름, 어린이의 경우에는 성장 장애, 부종 (몸이 붓는 현상), 근력 약화, 면역력 약화에 따른 잦은 감염, 우울증, 정신 장애, 식욕 증가, 백내장, 위 궤양, 골절 등이 발생될 수 있음.

- 스테로이드 제제를 전신적인 부작용을 억제하고 국소에만 선택적으로 작용하도록 증상이 심한 관절 내에 주사할 수 있음. 그러나 이 역시 완전한 치료제가 아니어서 일시적인 효과만을 기대할 뿐이며 다발성이고 재발성인 이 질환에서 관절 내 주사요법은 한계가 있음. 주사후 관절의 변화는 오히려 파괴적인 성상을 나타내므로 반복사용을 제한해야 함.

- 비스테로이드 소염제인 피라조론계, 인돌초산계, 훼닐초산계, 푸로피온계, 에놀산계, 염기성 약제 등 수많은 계열의 항염제들이 개발되고 있르나, 이들 약물은 염증 및 통증은 억제하지만 질환의 경과를 바꾸지는 못함.

나. 항류마티스제제 계열(Disease modifying antirheumatic drugs, DMARDs)

- 류마티스 관절염의 진행을 근본적으로 차단할 수 있는 능력이 있다고 알려진 약물로, 항말라리아제 (hydroxychloroquine), 설파살라진 (sulfasalazine), 디페니실아민 (D-penicillamine), 금제제 (gold compounds), MTX 등이 있음.

- 이런 약물들은 그 효과가 금방 나타나지 않고 2-3개월 후에 나타나므로 장기적으로 투여해야 한함. 과거에는 이러한 항류마티스 약물을 류마티스 관절염으로 확진된 후에만 사용하였으나 최근에는 질병 초기부터 사용해야 질병의 진행을 효과적으로 예방할 수 있다고 알려져서 대부분 초치료부터 사용하는 경향이 증대함.

- 이들은 주로 PMN, macrophages, B cells, T cell등의 면역세포의 기능을 억제하거나 autoantigen presentation을 감소시키는 기능을 나타냄..

다. 면역 억제(조절)제 계열

- 상기 열거한 약물들로도 치료가 잘 안될 때에는 아자치오프린 (azathioprine), 싸이클로포스파마이드 (cyclophosphamide) 등과 같은 강력한 면역억제제를 사용하여 치료함.

- 그러나, 이러한 약물들은 약효가 강력한 만큼 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, 간기능 이상, 신장기능 이상, 피부 발진, 탈모증, 구내염 등의 부작용이 나타날 가능성이 높으므로 정기적으로 혈액검사, 간기능 검사, 소변 검사 등을 시행하여 부작용 발현 여부를 주의깊게 관찰해야 함.

요약해 보면,

1. 관절염 환자는 지속적으로 증가하고 있으며,
2. 현재의 관절염 치료제는 많은 부작용을 나타내고 있으며,
3. 아직까지 관절염을 완벽히 치료할 수 있는 제품은 없다는 것임.

2. 천연물로부터 류마티스성 관절염 치료약물 혹은 개선용 건강기능식품 개발 관련 국내외 연구 현황 개요

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
(주) SK chemical 생명과학 부문	항염증성 3종 생약을 이용한 관절염 치료보조제 '조인스'정을 개발하여 시판하고 있음.	제품 개발 완료 / 시판 중
(주) 신일제약	최근 생약으로부터 관절염치료제를 개발하여 IND 신청을 완료하였음.	임상시험 준비중.
한국생명공학연구원	관절염치료제의 전임상 유효성 평가를 수행하고 있음. 동물실험을 통한 유효성 평가기술 보유.	IND 신청을 위한 유효성 결과를 도출함.
충북대학교 약학대학	관절염을 비롯한 염증억제물질의 작용기전 연구를 수행하고 있음.	IND 신청을 위한 유효성 결과를 도출함.

- 미국, 일본, EU 등은 류마티스성 관절염 치료신약의 개발을 위한 건강기능식품 소재 합성, 약물작용점 발굴, in vitro 및 in vivo 관절염 치료효능 평가모델 확립, 세포 및 분자수준에서의 효능기전 연구 등의 측면에서는 세계 최고의 기술을 보유하고 있으며, 국내의 경우 세계적 수준과 비교하여 약 70% 정도의 기술력을 보유하고 있는 것으로 판단됨.

- **본 연구팀에서는 수십 종의 약용 농산물로부터 SK chemical의 조인스정을 능가하는 관절염 개선작용을 발현하는 건강기능식품 소재 도출을 위한 선행연구를 진행한 결과, 탱자나무 열매 등 수종의 약용 농산물로부터 얻은 생약의 복합조성물이 탁월한 항염증, 진통, 관절염 동물모델에서의 치료작용 등을 발현함을 알게 되었음.** 이러한 결과를 바탕으로, 본 연구의 수행 결과, 최적의 효능을 발현하는 최종 복합조성물을 만들었으며 세포 및 분자수준에서의 작용기전을 규명함으로써 목표한 바 건강기능식품 소재를 개발하였으며, 향후 임상 시험을 통하여 국내 뿐 아니라 글로벌 시장에서도 경쟁력을 보유하는 개별인정형 건강기능식품으로 개발할 예정임.

- 본 연구팀은 관절염 치료제 후보물질의 효능(유효성) 평가 및 작용기전 연구에 대한 많은 경험을 보유하고 있으며, 이를 바탕으로 아래에 서술된 예시를 포함한 다수의 논문과 특허를 보유하고 있음.

(1) 면역억제제인 Prodigiosin의 작용기전 및 관절염 치료효과
- 논문: SB Han, SH Park, YJ Jeon, YK Kim, HM Kim, and KH Yang. Prodigiosin blocks T cell activation by inhibiting IL-2Ralpha expression and delays the progression of autoimmune diabetes and rheumatoid arthritis. J Pharmacol Exp Ther 299(2), 415-425, 2001.

ABSTRACT: Prodigiosin (PDG) was previously reported to be a T-cell specific immunosuppressant. Here we describe the mechanism of action of PDG in T cells and the effect of PDG on autoimmune diseases. PDG selectively suppresses concanavalin A (Con A)-induced T cell proliferation, but has little effect on lipopolysaccharide-induced proliferation of B cells and NO production of macrophages. Although PDG does not block IL-2 production, it efficiently inhibits IL-2Ra expression, and this results in a disruption of the IL-2/IL-2R signaling pathway, on which a great part of the regulation of T cell activation depends. PDG blocks T cell differentiation into effector helper T cells secreting IFN-g and IL-4 as well as into effector cytotoxic T lymphocytes expressing perforin, which is partially at least resulted from inhibition of the IL-2/IL-2R signaling. PDG indirectly blocks STAT activation by inhibiting cytokine signalings in Con A activated T cells, although it does not inhibit the activation of NF-kB, NF-AT, and AP-1. As direct evidence of immunosuppression in vivo, we show that PDG markedly reduced blood glucose levels and cellular infiltration into the pancreatic islets in nonobese diabetic mice, and that it also delays the onset of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. In conclusion, our results demonstrate that PDG has a unique mode of action, namely that it blocks T cell activation by inhibiting primarily IL-2Ra expression in the IL-2/IL-2R signaling, and show that this compound represents a promising immunosuppressant candidate for the treatment of autoimmune diseases.

- 특허: HM Kim, SB Han (한상배), CW Lee, KH Lee, SH Park, SH Lee, HC Kim, YK Kim. Novel use of prodigiosin for treating rheumatoid arthritis.

(2003.7.8. Korean Patent 190392225)

(2003.10.17. JP 2002-582923)

(PCT/KR02/0, 2002.3.25)

본 연구는 신규 면역억제제인 프로디지오신의 약리기전과 관절염 치료효과에 대한 연구이다. 본 연구팀은 프로디지오신이 B cell proliferation과 macrophage NO production은 억제하지 않지만 T cell proliferation을 선택적으로 억제하는 면역억제제임을 처음으로 규명하였다. (그림 1)

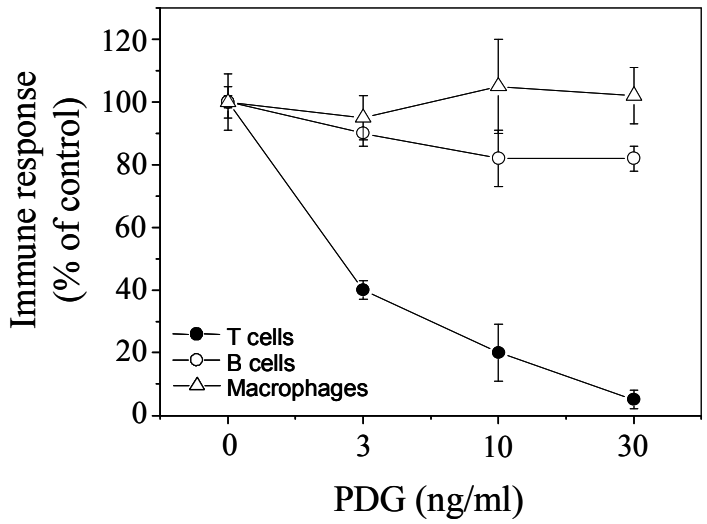


그림 1. 프로디지오신의 면역억제 작용.

PDG selectively inhibits T cell proliferation. Purified splenic T and B cells were activated with 5 mg/ml of Con A and 5 mg/ml of LPS, respectively. After incubation for 72 hr, cellular proliferationwas measured. The CPM values of control were 41,751 + 1,348 (Con A) and 25,493 + 608 (LPS). Peritoneal macrophages were activated with 200 ng/ml of LPS for 24 hr. The supernatants were subsequently isolated and analyzed for nitrite. The amount of nitrite produced by normal macrophages was 64 + 5 nmole/106 cells. PDG was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added at final concentrations of 3~30 ng/ml.

또한, 프로디지오신은 T cell의 IL-2의 발현은 억제하지 않고 IL-2R alpha의 발현을 선택으로 억제하고 있음을 규명하였는데, 이는 IL-2 발현을 억제하는 기존의 면역억제제인 cyclosporin A와는 작용기전이 상이한 점으로 임상에서 두 물질의 combined therapy를 가능하게 하는 장점이었다. (그림2)

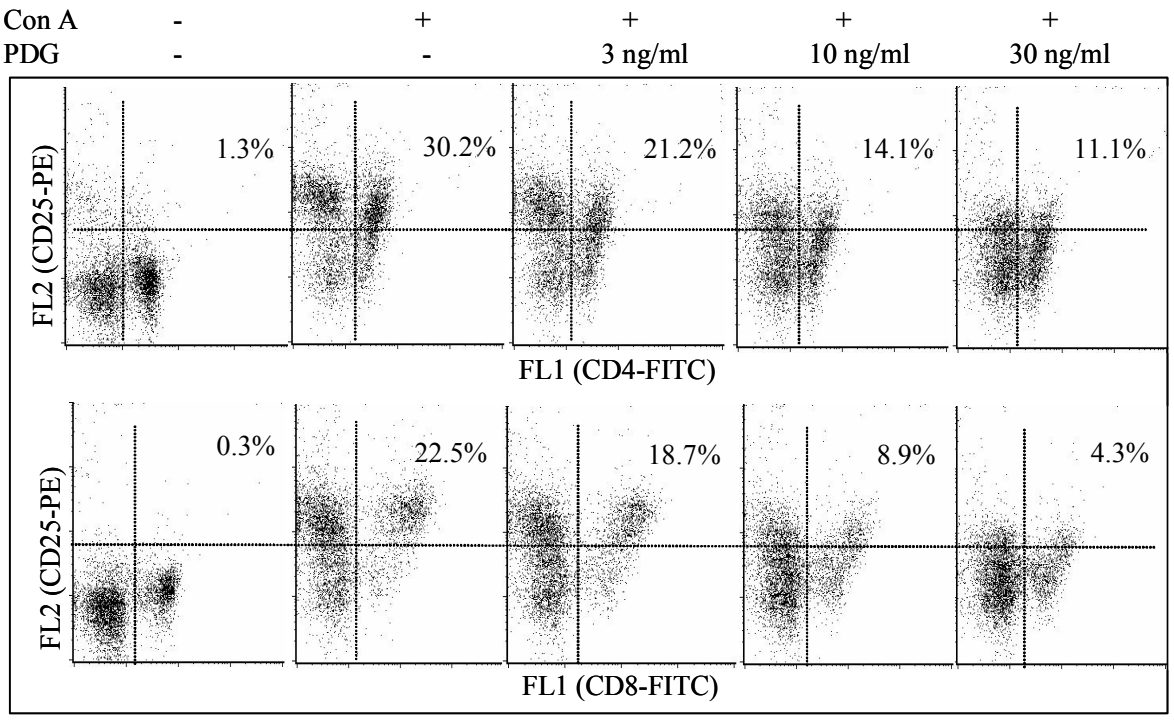


그림 2. PDG inhibits IL-2Ra expression of both Th cells and CTLs. Splenic T cells were activated with Con A (5 mg/ml) for 24 hr. The levels of IL-2Ra expression in CD4+ Th cells and CD8+ CTLs (5,000 cells) were determined with a double staining method using anti-CD25-PE/anti-CD4-FITC or anti-CD25-PE/anti-CD8-FITC antibodies.

이와 같은 작용기전을 같은 프로디지오신은 우수한 관절염 치료효과가 있음을 collagen-induced arthritis model을 이용하여 증명하였다. (그림 3)

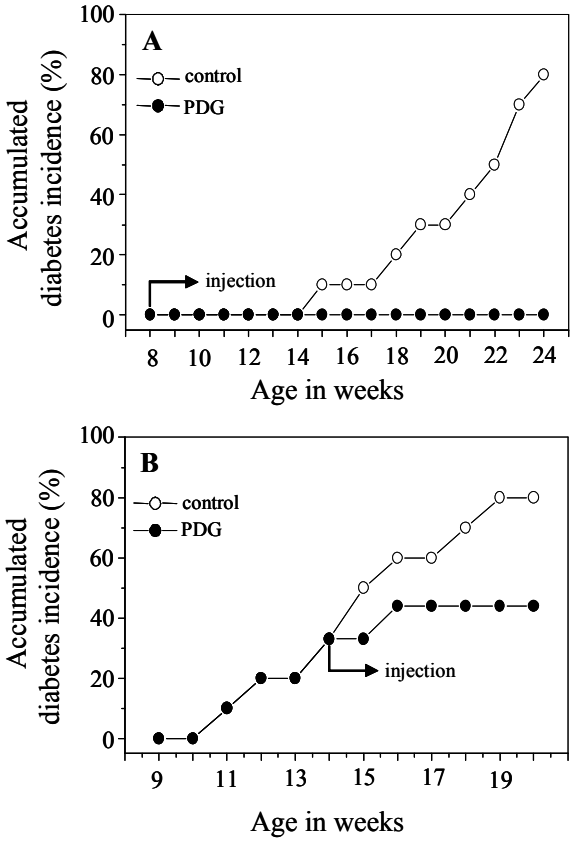


그림 3. PDG delays the progression of collagen-induced arthritis. Male DBA/1 mice (n = 13) were immunized with bovine type II collagen/complete freund's adjuvant emulsion, boosted with bovine type II collagen, and treated with LPS. Mice were treated on alternate days with 10 mg/kg of PDG from the next day of LPS injection. Control DBA/1 mice were treated with 0.4% Tween 80, which was used to dissolve PDG. Mice were examined visually for the appearance of arthritis in the joints. The clinical severity of arthritis was graded on a scale of 0-2 for each paw, according to changes in the redness and swelling, where 0 = no changes, 0.5 = significant swelling and redness, 1.0 = moderate, 1.5 = marked, 2.0 = maximal swelling and redness, and ankylosis. The macroscopic score (mean +/- standard deviation) was expressed as a cumulative value for all paws.

(2) 관절염 치료용 생약의 효능평가

- 생약의 관절염 치료효과를 adjuvant-induced arthritis model, collagen-induced arthritis model, zymosan-induced inflammation model, carrageenan-induced edema, analgesic model에서 규명하였으며, 결과를 국제저명 학술지에 투고함.

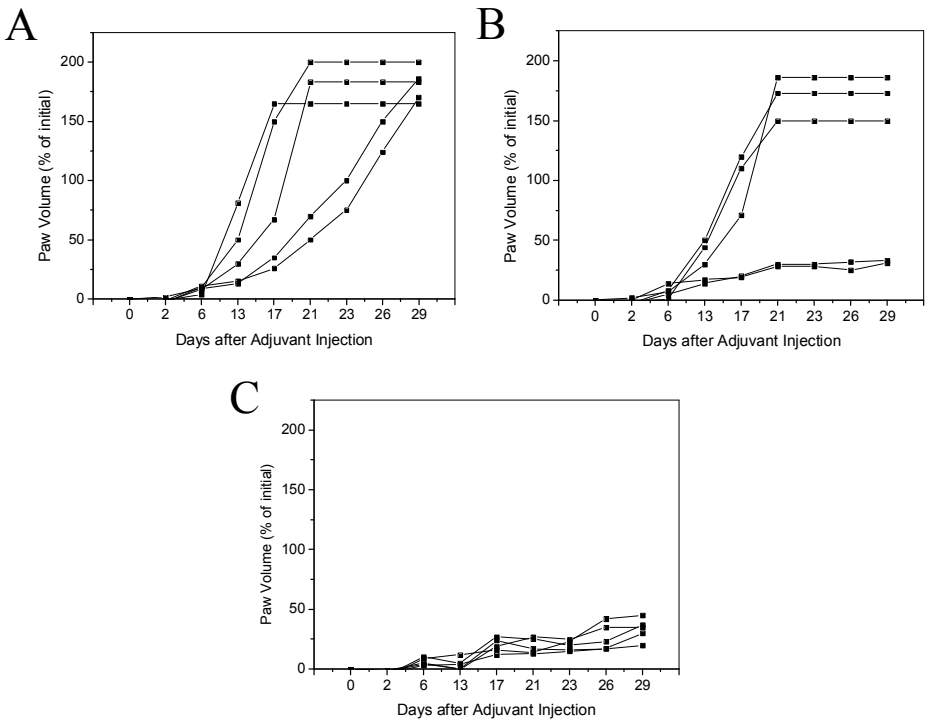


그림 1. Effect of BDX-1 on adjuvant-induced arthritis.
Arthritis was induced by injecting s.c. adjuvant Mycobacterium tuberculosis into the left hind footpad of SD rats (n=5, Day 0). The volumes of right hind paws were measured by water displacement using a rat plethysmometer. Paw volumes on day -1 were used as initial values and results are presented as percentages of initial volume. Rats were orally injected with saline (A), unfermented (B) or unfermented BDX-1 (C) at 500 mg/kg daily from day 0 to day 29.

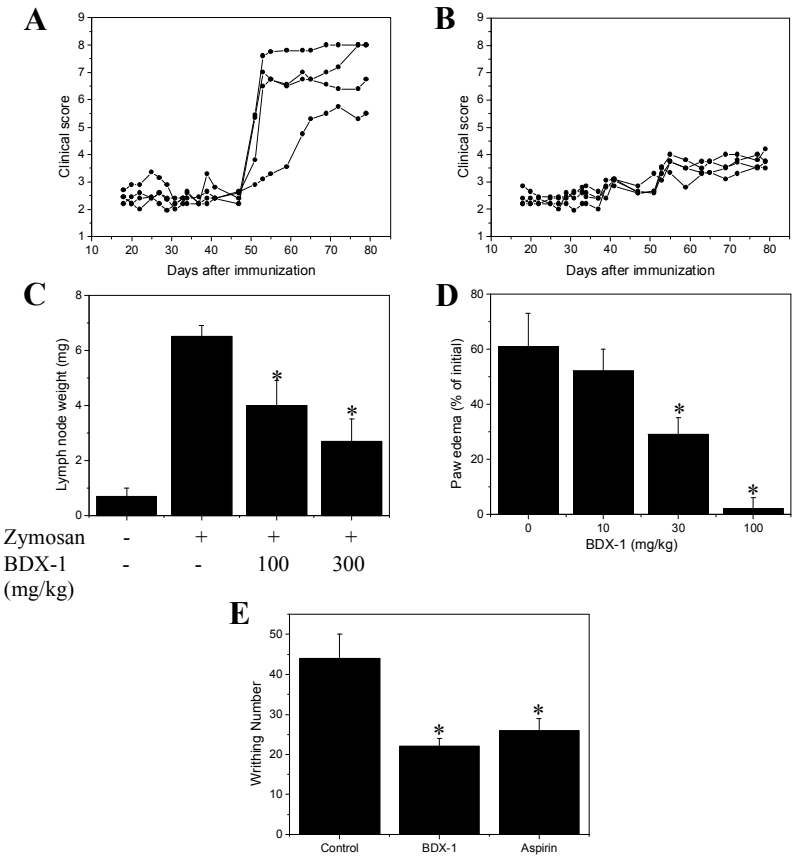


Fig. 3. Effect of BDX-1 on arthritic inflammation.

(A, B) Collagen-induced arthritis. Control DBA/1 mice were treated with saline, which was also used to dissolve BDX-1 (A). DBA/1 mice were then treated orally with 500 mg/kg of BDX-1 from day 0 to day 80 (B). Mice were examined visually for the appearance of arthritis in the joints. The clinical severity of arthritis was graded on a scale of 0-2 for each paw, in terms of redness and swelling, where 0 = no changes, 0.5 = significant swelling and redness, 1.0 = moderate, 1.5 = marked, 2.0 = maximal swelling and redness, and ankylosis. The macroscopic score (mean +/- standard deviation) was defined as the cumulative value for all paws. (C) Zymosan-induced arthritis. Arthritis was induced by the s.c. injection of Zymosan A into hind footpads of C57BL/6 mice. BDX-1 was administered orally from day 0 to day 6. On day 7, popliteal lymph nodes were isolated and weighed. (D) Carrageenan-induced edema. Paw edema was induced by the s.c. injection of carrageenan into mouse left hind paws. Right hind paw volumes were measured by water displacement using a plethysmometer. Paw volumes were measured 2 hr before and 3 hr after carrageenan injection. BDX-1 was administered i.p. 1 hr before carrageenan injection results are presented as percentages of initial volumes. (E) Acetic acid-induced writhing response. Mice were orally injected with BDX-1 (500 mg/kg). One hr after BDX-1 treatment, mice were injected i.p.with acetic acid solution. The number of writhing events was recorded over 15 min after acetic acid injection.

제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

- 국내외의 기술개발 현황을 논문이나 특허 데이터베이스를 통하여 분석해보면, 기존의 관절염 개선 효능 관련 물질에 관한 특허 및 논문은 합성신약 혹은 생물학적 제제의 약리작용 및 그 기전 연구 분야에 치중되어 있음.

- 잘 알려진 바와 같이, 합성신약이나 생물학적 제제들은 그 효능이 현저한 반면 부작용으로 발생되는 유해 작용 또한 뚜렷하여 관절염 환자에게 '양날의 칼 '(double-edged knife)로 작용할 수 있음.

- 한편, 인체의 제반 질환에 사용되던 생약에서 다양한 생리활성 물질들이 발견되고, 그 효능과 작용기전들이 밝혀지면서, 합성신약 혹은 생물학적 제제와는 달리 유해 작용이 미미한 생약(천연물)은 '건강기능식품 소재 혹은 천연물신약 개발'의 중요한 소재로 대두됨.

- 이와 관련하여, 국내에서는 이미 천연물 유래 관절염 치료제인 천연물신약 '조인스'가 (주) SK chemical에 의해 개발되어 시판되고 있음.

- 그러나, 본 연구팀은 수종의 약용 농산물로부터 SK chemical '조인스'의 효능을 능가하는 관절염 개선용 건강기능식품 소재 도출을 위한 선행연구를 진행한 바, 탱자나무 열매 등 수종의 약용 농산물로부터 얻은 생약의 복합조성물이 탁월한 항염증, 진통, 관절염 동물모델에서의 치료작용 등을 발현함을 알게 되었고, 이러한 결과를 바탕으로 **본 연구과제의 수행을 통하여 최적의 효능을 발현하는 최종 복합조성물을 만들고 세포 및 분자수준에서의 작용기전을 규명함으로써 류마티스 관절염 (혹은 퇴행성 골관절염을 포함)의 제반 증상을 개선하는 경쟁력 있는 건강기능식품 소재**를 도출하였음.

- 궁극적으로, **본 연구의 결과물이 식품임상시험 등을 통하여 개별인정형 건기식 등으로 제품화되면 기존의 관절기능 개선 및 관절염 예방 및 개선 목적으로 섭취되고 있는 건기식인 글루코사민 함유제품, 감마리놀렌산 함유제품, EPA/DHA 함유제품과 경쟁하며 시너지 효과를 통한 시장규모 확대를 유발하는 신제품군으로 자리잡을 수도 있으며, 또는 기존 글루코사민, 감마리놀렌산, EPA/DHA 함유 단일 성분 제품의 약효(건강기능성) 보강 성분으로 기존 제품의 관절기능 개선 효능을 극적으로 상승시키는 기능보강형 소재로도 실용화**될 수 있으므로, 이 분야의 국내외 기술개발 분야의 발전 및 관련 산업의 발전에 일익을 담당한 것으로 판단됨.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	**약용 농산물로부터 건강기능성 물질 탐색 및 건강기능식품 소재 분리**	대상 약용 농산물(생약)의 선정 및 추출물 제조 조건 확립	100%	① 전통 동양의학에서 관절염, 관절통, 근육통 등에 사용해 왔던 약용 농산물 유래 생약(본초) 30여종을 효능검색 대상으로 선정함 ② 생약의 열수 추출물 제조 조건 확립 ③ 생약의 용매(에탄올 등) 분획 추출물 제조 조건 확립
	관절염 병태 개선 약리작용 규명	건강기능식품 소재의 항염증, 진통 효능 검색	100%	① 항염증 효능 plethysmometer를 이용한 rat paw edema test 및 기타 필요한 방법론을 적용 ② 진통 효능 Acetic acid-induced writhing test, Hot-plate test 및 기타 필요한 효능검색 방법 적용
	생체 안전성 검증 및 작용 기전 규명	흰쥐에서 건강기능식품 소재의 생체내 안전성 검증 연구 (단회투여 독성연구)	100%	① 단회투여 독성실험을 통한 안전성 검증 - 2g/kg 경구 투여 ② 독성 지표 측정 항목 가. Serum: GOT, GPT, ALP, TG, Cholesterol, glucose, BUN, pH, protein, creatinine 나. Whole blood : RBC, WBC, HCT, Hb, Hct, MCV, MCH 측정 다. Urine: Ketone, Bilirubin, Microscopy, Blood, pH, protein 측정 라. 장기의 병리조직학적 검사
	생체 안전성 검증 및 작용 기전 규명	흰쥐에서 건강기능식품 소재의 생체내 안전성 검증 연구 (반복투여 독성연구)	100%	① 반복투여 독성실험을 통한 안전성 검증 - 0.25, 0.5, 1.0g/kg 4주 반복 경구 투여 ② 독성 지표 측정 항목 가. Serum: GOT, GPT, ALP, TG, Cholesterol, glucose, BUN, pH, protein, creatinine 나. Whole blood : RBC, WBC, HCT, Hb, Hct, MCV, MCH 측정 다. Urine: Ketone, Bilirubin, Microscopy, Blood, pH, protein 측정 라. 장기의 병리조직학적 검사

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	**약용 농산물로부터 건강기능성 물질 탐색 및 건강기능식품 소재 분리**	류마티스 관절염 생쥐 모델의 정립 및 모델에서의 관절염 유발지수/ 유발률/ 비장, 관절, 흉선과 말초 림프절에의 면역세포 침윤 등에 대한 건강기능식품 소재의 효과 검증	100%	① DBA/1J 생쥐 5마리를 한 군으로 하여 류마티스 관절염 생쥐 모델의 제작 ② 건강기능식품 소재의 최적 투여 방법 및 일정 확립, 건강기능식품 소재의 관절염 유발지수/ 유발률/ 비장, 관절, 흉선과 말초 림프절에의 면역세포 침윤 등에 대한 효능 평가
	관절염 병태 개선 약리작용 규명	관절염 유발 생쥐 관절조직의 병리학적 변화 및 생쥐 체내에서의 염증성 사이토카인 생성량에 대한 건강기능식품 소재의 효과 검증	100%	① 관절조직에 대한 최적 염색조건 확립 및 정상 관절조직과 관절염 유발 관절 조직의 조직병리학적 비교 ② 관절염 유발 관절조직의 병리변화에 대한 건강기능식품 소재 장기 투여 후의 치료효능 평가 ③ 건강기능식품 소재가 관절염 유발 생쥐 체내의 TNF-alpha 및 interleukin의 생성량에 미치는 영향 검증
	생체 안전성 검증 및 작용기전 규명	건강기능식품 소재의 T, B, 수지상, 대식세포 기능에 대한 작용 및 세포내 신호전달과정에 대한 영향 검증	100%	① Zymosan-induced 염증 유발 모델을 이용, T cell proliferation, B cell proliferation 및 T cell-derived cytokine production, polyclonal antibody production assay를 이용한 B cell의 antibody production 능력, dendritic cell maturation 및 mature dendritic cell에 의한 T cell activation, macrophage의 NO 생성 능력에 미치는 건강기능식품 소재의 효능 평가 ②면역세포 내 MAPK 신호전달 경로에 미치는 영향 검증
	개별 인정형 건강기능식품으로 실용화하기 위한 임상시험 진입용 최종 제형 연구	개별 인정형 건강기능식품 도출을 위한 임상 시험 시행시 사용될 최적의 건강기능식품 제형 결정	100%	① 건강기능식품 소재의 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있음. ② 최종 제품은 건강기능식품 소재(추출물) 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 류마티스성 관절염 예방 및 치료/개선용 건강기능식품으로 제품화 가능함. 즉, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있음.

제 2 절 연구수행 결과

1. 약용 농산물로부터 건강기능성 물질 탐색 및 건강기능식품 소재 분리

가. 대상 생약의 선정 및 추출물 제조

전통 동양의학에서 관절염, 관절통, 근육통 등에 사용해 왔던 본초들을 위주로, 약용 농산물 유래 생약(본초) 30여종(표.1 참조)을 효능검색 대상으로 선정한 후, 이들의 열수 및 70% 에탄올(ethanol) 추출물을 제조하였다.

가. 열수 추출물은 선정된 생약의 각 건조 중량 100g에 1,000ml의 증류수를 가하여 100℃에서 2.5시간씩 2회 추출하고 이를 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압농축한 다음, 생리식염수 등을 용매로 하여 적절한 농도로 용해, 희석하여 기초적인 항염증, 진통 효능 검색에 사용하였다.

나. 에탄올 추출물은, 각 생약의 건조 중량 100g당 70% 에탄올 2,000ml를 가하여 실온에서 24시간 동안 추출한 후 여과지를 이용, 수차례 여과하였고 이를 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압농축한 후 적절한 용매로 용해 혹은 현탁, 희석하여 기초적인 항염증, 진통 효능 검색에 사용하였다.

나. 선정된 각 생약 추출물의 기초적 항염증 및 진통 효능 검색

가. 연구 방법란에 기술된 방법대로 각 생약의 항염증 및 진통 효능에 대한 기초적 검색 결과, 다음의 표.1에 나타난 결과를 얻었다.

나. 최종 실험 결과, 동일한 생약의 경우 에탄올 추출물이나 열수 추출물을 막론하고, 거의 유사한 정도(효능, 효력 면에서)의 효과가 관찰되었고, 실제로 전통 동양의학에서 제반 약물을 추출(전탕, 달임)할 때에도 열수를 사용해 온 점을 고려하여, 최종적인 추출용매로는 열수(순수 정제수)를 선택하였다.

다. 실험 결과에서 볼 수 있는 바, 다수의 생약에서 유의할 만한 항염증 및 진통 효능이 검색되었으나,

A. 그 중에서 가장 효능이 뛰어나면서도 전통 동양의학적 학문 분야인 본초학, 방제학, 임상 한의학적 관점에서 가장 관절염 치료 효과가 우수할 가능성이 있는 2-3개 생약의 조합,

B. 최종 제품화되었을 때 원료 생약(약용 농산물)의 수급 용이도 및 국내 영농환경에서의 탄력적인 증산, 영농 경제성 등을 고려했을 때의 최적 2-3개 생약의 조합

을 선정 기준으로 하여 **최적의 건강기능식품 소재용 복합 식물추출물의 조합을 선정한 결과, 지실, 금은화, 백지를 각각 동량 혼합 추출한 복합 추출물(JGB라고 명명함, 이하 JGB로 약칭)이 최종 후보 추출물로 선정되었다.**

JGB의 제조과정은 다음과 같았다. 지실, 금은화, 백지를 정선하여 세절한 후 각각의 약재를 1:1:1의 비율(100g : 100g : 100g)로 동량 혼합하고, 탈이온 2차 증류수 3,000ml를 가하여 100℃에서, 2.5시간 동안 2회 간 열수로 추출하였다. 이 추출액을 실온에서 방냉한 후 여과지로 여과한 다음, 이를 감압농축하고 동결 건조하여 최종 고형화된 혼합 추출물을 수득(수득율 10%)하였다.

표 1. 대상 생약 추출물의 항염증 및 진통효능 검색 결과

생약명	항염증 효능	진통 효능
산두근	++	++
지실	+++	+++
감국	+	+
우방자	++	+
천화분	+++	++
강활	++	++
독활	++	+
금은화	+++	+++
현호색	+	++
상지	+	+
연교	++	++
목단피	++	++
모과	++	+
신이	++	+
복분자	+	+
산사	+	+
오매	+	+
익모초	++	+
고삼	+	++
백지	+++	+++
천마	+	+
하고초	+++	++
상엽	+	+
형개	+	++
포공영	+++	++
사간	+	++
토복령	+	++
당귀	+	+
패장초	++	+
천궁	+	+
+: low efficacy	++: moderate efficacy	+++: high efficacy (arbitrary unit)

다. 최종 선정된 건강기능식품 소재 복합 식물추출물인 JGB의 성분 분석

천연물에 기반을 둔 천연물 신약 혹은 건강기능식품은 그 상세한 성분의 분리 동정까지는 필요가 없다고 해도, 적어도 최종 제품의 품질관리(Quality Control) 등을 위해서 고속 액체크로마토그램 분석기(HPLC)를 이용한 전체적인 성분 프로파일 분석 자료 정도는 확보해야한다. 따라서, 본 연구에서도 JGB의 전체적 성분 프로파일을 얻기 위하여 HPLC 및 박막 크로마토그래피(TLC) 등을 이용하여 다음과 같은 데이터를 얻었다.

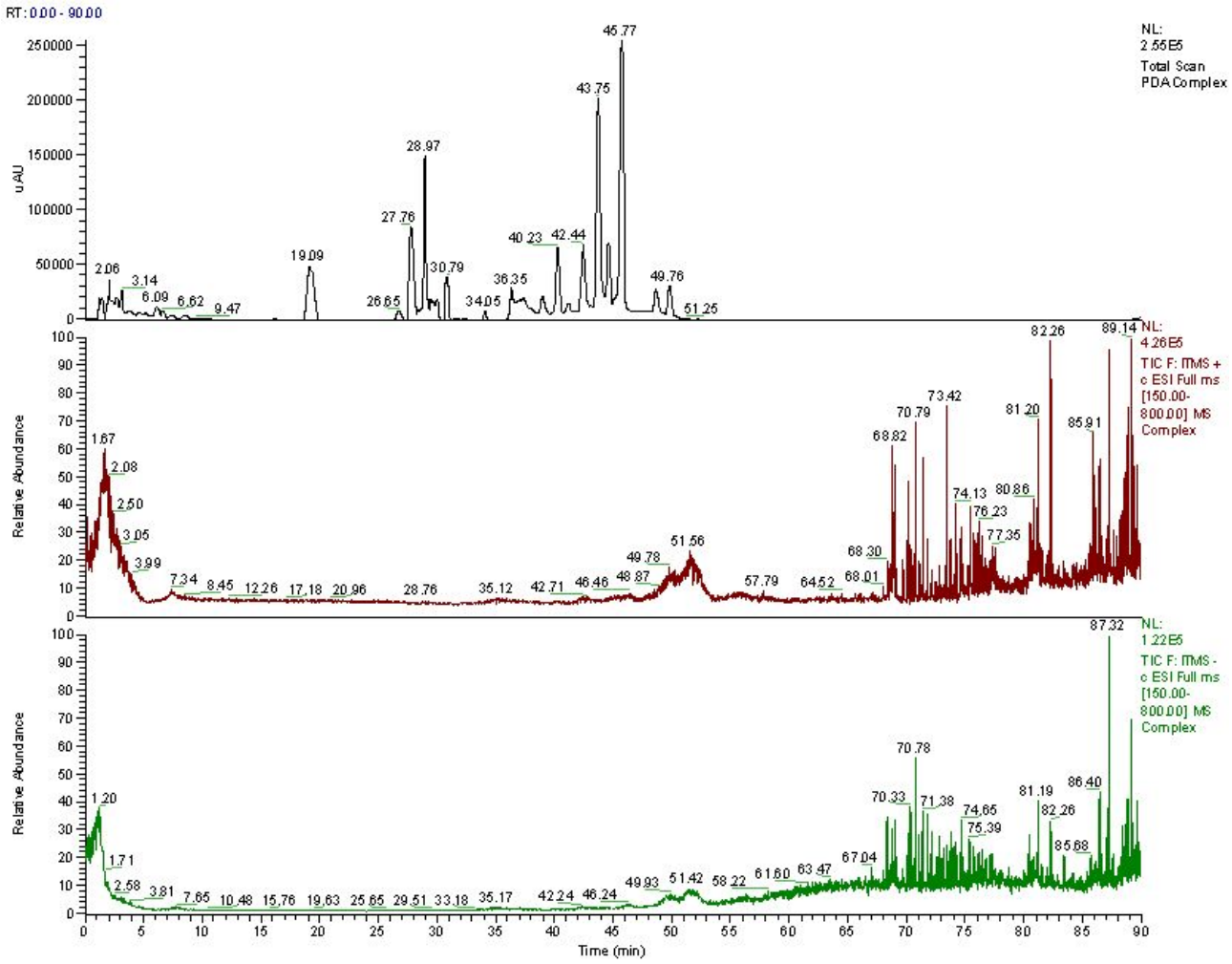


Fig. 1. LC/MS를 이용한 JGB의 성분 프로파일 분석 결과

TLC(thin layer chromatography) pattern
열수 추출물 : MeOH ext. : rutin : chlorogenic acid : quercetin

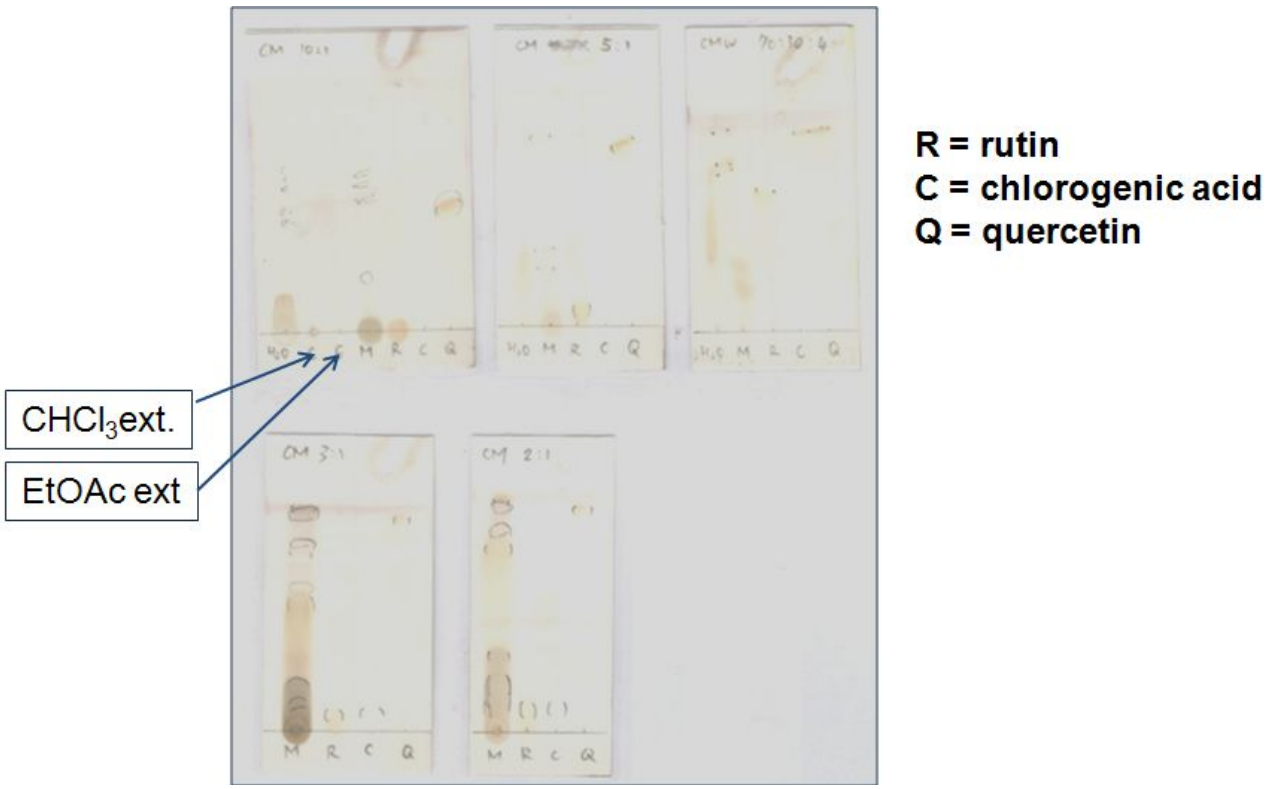


Fig. 2. TLC를 이용한 JGB의 성분 프로파일 분석 결과

상기 LC/MS 및 TLC 분석 데이터를 종합하여 볼 때, JGB는 그 구성 생약 중 금은화로부터 유래되는 chlorogenic acid, 지실로부터 유래되는 naringin, hesperidin, quercetin 및 백지로부터 유래되는 byakangelicol 등을 함유하고 있음을 확인하게 되었다. 이러한 분석 화학적 연구정보는 향후 JGB 최종 제품화 이후 제품의 질 관리(QC)를 위해 필수적으로 요구되는 정보이다.

2. 관절염 병태 개선 약리작용 규명

가. 최종 선정된 건강기능식품 소재 복합 식물추출물인 JGB의 항염증 작용 규명

(1) 항염증 효과의 검증은 문헌(Winter, C. A., Riskey et al., Proc. Soc. Exp. Med. 111, p544, 1962)에 기재된 방법에 준하여 시행하였으며, 체중 200g 정도의 SD계 웅성 흰쥐 6마리를 1군으로 하여 JGB 및 여타 약물을 일정 용량 경구투여하고, 1시간 후 염증유발 물질로서 1% 카라기닌(carrageenin)용액을 0.1ml씩 우측 뒷 발바닥의 중심부에 피하 주사하였다. 카라기닌 주사 후 3시간 뒤에 발생하는 족부 부종의 용적을 부종측정기(plethysmometer)를 이용하여 측정하였고, 부종 억제율을 계산함으로써 JGB의 항염증 효과를 검증하였다. 양성 대조약물로는, 대표적인 비스테로이드성 항염증 약물인 아스피린 200mg/kg 및 이미 만성 류마티스성 관절염 치료제로 출시되어 사용되고 있는 SKI306X (상품명: JOINS) 400mg/kg을 사용하였다.

(2) 실험 결과 (Fig.3), JGB 100mg/kg, 250mg/kg 및 500mg/kg 투여군은 카라기닌 주사 3시간 후에 각각 8%, 14% 및 29%의 부종 억제율을 보였고, 양성 대조약물인 아스피린 200mg/kg 투여군과 SKI306X 400mg/kg 투여군은 각각 48% 및 30%의 억제율을 보였다.

이 결과로, JGB는 500mg/kg 투여 용량에서 합성의약품인 아스피린보다는 약한 항염증 효과를 나타내지만, 기존의 생약 복합 천연물신약인 SKI306X와는 거의 유사한 항염증 효과를 발현하는 것을 확인하였다.

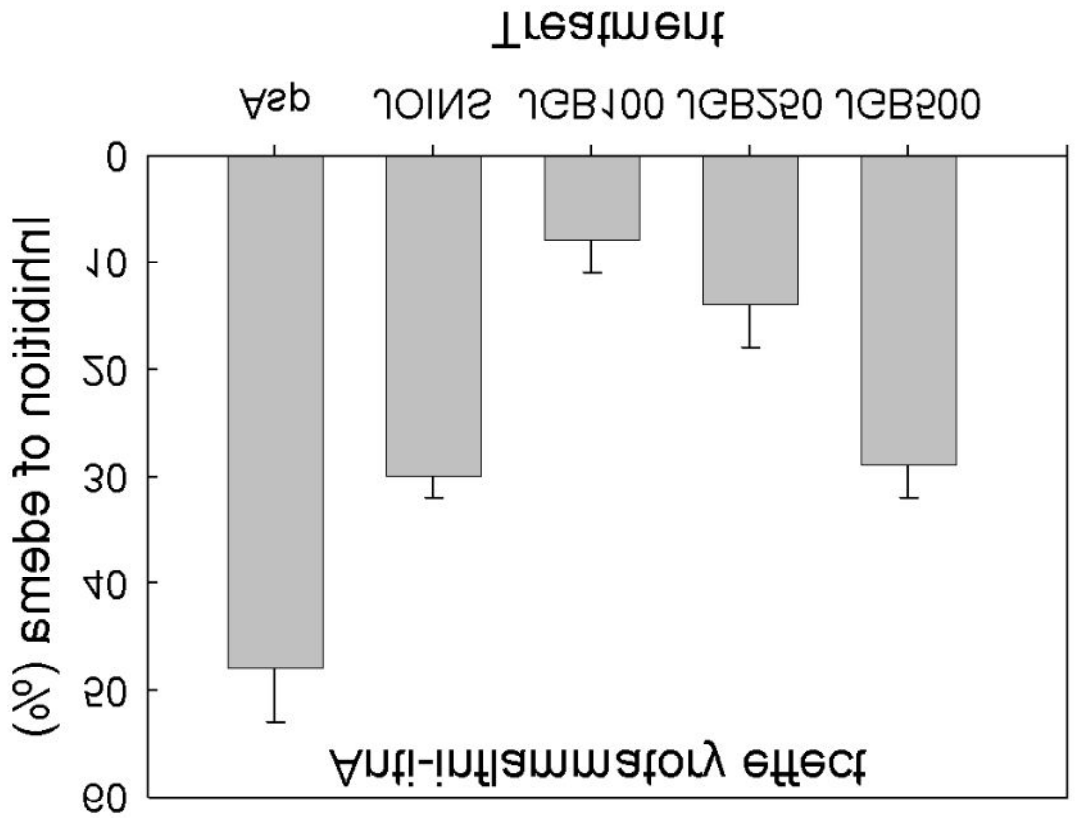


Fig. 3. JGB의 항염증 작용

나. 최종 선정된 건강기능식품소재 복합 식물추출물인 JGB의 진통 작용 규명

(1) 진통 효과 검증은 문헌(Koster, R. et al., Fed. proc., 412, p18, 1985)에 기재된 방법에 준하여 시행하였다. 체중 25g 정도의 ICR계 웅성 생쥐 10마리를 1군으로 하여 JGB 및 여타 약물을 일정 용량 경구투여하고 1시간 후에 생리식염수로 희석한 최종농도 0.6%의 초산을 생쥐 체중 10g 당 0.1ml 용량으로 복강 주사하였다. 주사 후 10분 뒤부터 이어지는 10분간, 각 생쥐가 나타내는 특이적인 뒤틀림(writhing) 반응의 발생횟수를 측정하여, 약물을 투여하지 않은 대조군과 약물 투여군 간에 비교함으로써 JGB에 의한 진통 효과를 검증하였다. 양성 대조약물로는, 대표적인 비스테로이드성 항염증 약물인 아스피린 200mg/kg 및 만성 류마티스성 관절염 치료제로 출시되어 사용되고 있는 SKI306X (상품명: JOINS) 400mg/kg을 사용하였다.

(2) 실험결과 (Fig.4), JGB 100mg/kg, 250mg/kg 및 500mg/kg 투여군은 대조군을 기준으로 각각 18%, 40% 및 76%의 통증 억제율을 보였다. 양성 대조약물인 아스피린 200mg/kg 투여군은 38%의 통증 억제율을 나타내었고, SKI306X 400mg/kg 투여군은 74%의 통증 억제율을 나타내었다. **이 결과로, JGB는 500mg/kg 투여용량에서 합성의약품인 아스피린보다 우수한 진통 효과를 발현하며, 기존의 생약 복합 천연물 신약인 SKI306X와는 거의 유사한 진통 효과를 나타내는 것을 확인하였다.** Hot-plate test 방법을 이용한 진통 작용 측정 결과도 Writhing test 방법을 이용한 결과와 유사하였다.

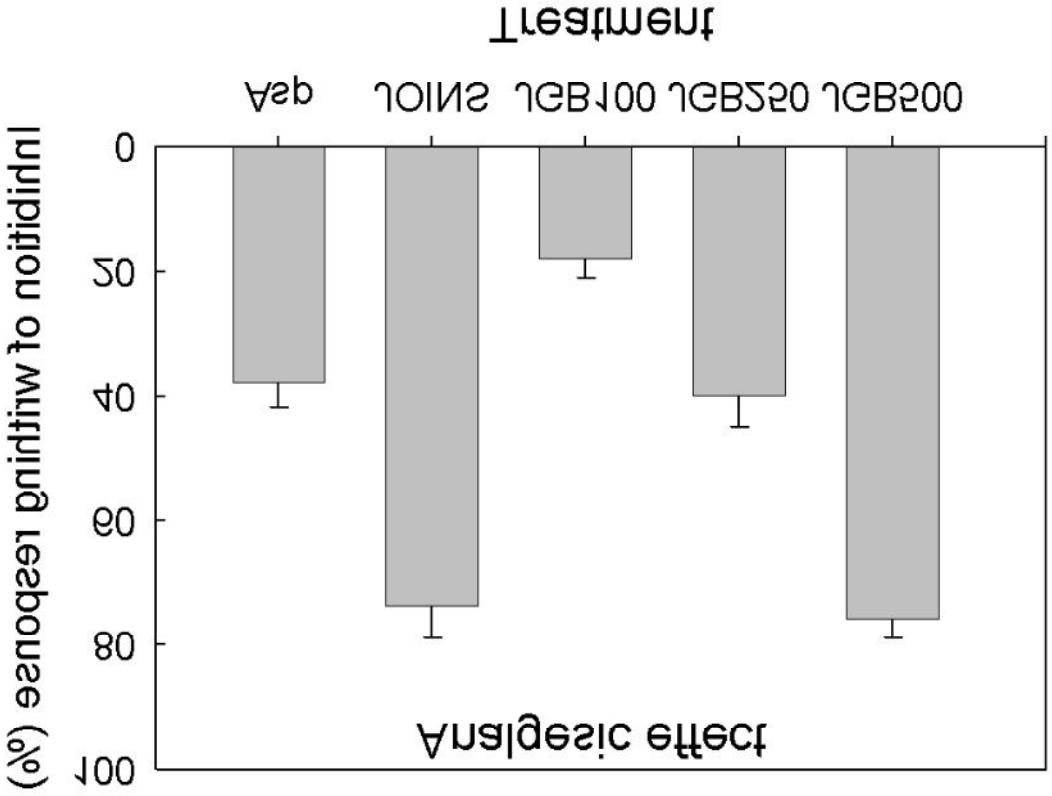


Fig.4. JGB의 진통 작용

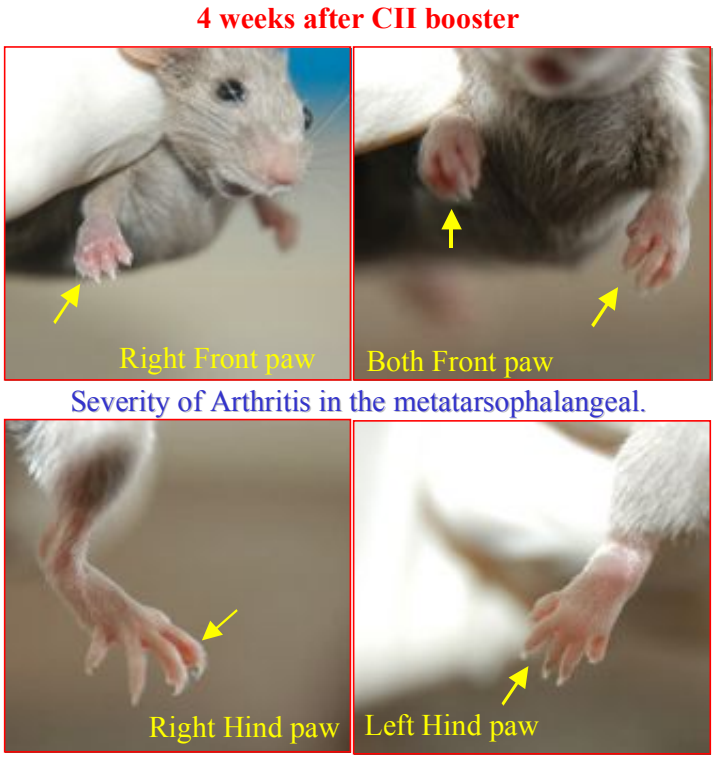
다. 류마티스 관절염 생쥐 (CIA: collagen-induced arthritis) 모델의 제조 및 건강기능식품 소재 (JGB)의 투여

(1) DBA/1J 생쥐 5마리를 한 군으로 하여, 관절염을 유발시키지 않은 정상군, CIA 관절염 유발 후 건강기능식품 소재를 투여하지 않은 관절염 대조군, CIA 관절염 유발 후 건강기능식품 소재 투여군으로 분류하고, 100 ㎍의 bovine type II collagen과 0.1ml Complete Freund's Adjuvants를 혼합하여 생쥐 꼬리의 등위 부분에 피하 주사하고, 21일 후 동량을 boosting 하여 CIA 모델을 제조하였다.

(2) 상기 기준으로 분류된 실험동물들에게 정상군과 관절염 대조군에는 생리식염수, 건강기능식품 소재 투여군에는 건강기능식품 소재를 400 mg/kg의 용량으로 생리식염수에 녹여 각각 0.1ml 씩 매일 복강투여 경로를 이용하여 투여하였다. 양성 대조약물로는 기존에 류마티스성 관절염 조절용 면역억제제로 사용되는 methotrexate (1.3 mg/kg)를 투여하였다.

라. JGB 투여에 의한 관절염 유발지수(Arthritis index(AI)) 및 유발률(incidence) 분석

(1) Type II collagen으로 boosting 후 DBA/1J 생쥐의 각 4개의 발(paw)에서 관절염 징후를 아래의 기준으로 유발률(incidence, %)을 측정하고, CIA유발 정도(지수)를 1 주일 간격으로 기록하였다.



Scheme :Collagen II induced Arthritis mice model

Development of CIA in DBA/1J mice legs

단계	유 발 정 도
0	no arthritis
1	small degree of arthritis
2	light swelling
3	medium swelling
4	severe swelling
5	severe swelling and non-weight-bearing

Fig.5. 관절염 유발지수(Arthritis index(AI)) 및 유발률(incidence) 분석의 준거

(2) 실험 결과, Fig.6에서 볼 수 있듯이 JGB는 관절염 유발지수를 약 50 - 60 % 가량 감소시켰다. 이는 강력한 면역억제제인 양성 대조약물 methotrextate가 나타낸 약 70% 가량의 감소 효과에는 미치지 못하지만, JGB가 천연물임을 감안할 때 이 정도의 효능이라면 인체에서도 현저한 관절염 유발 억제 효과를 나타낼 가능성이 있음을 의미하는 결과로 해석된다.

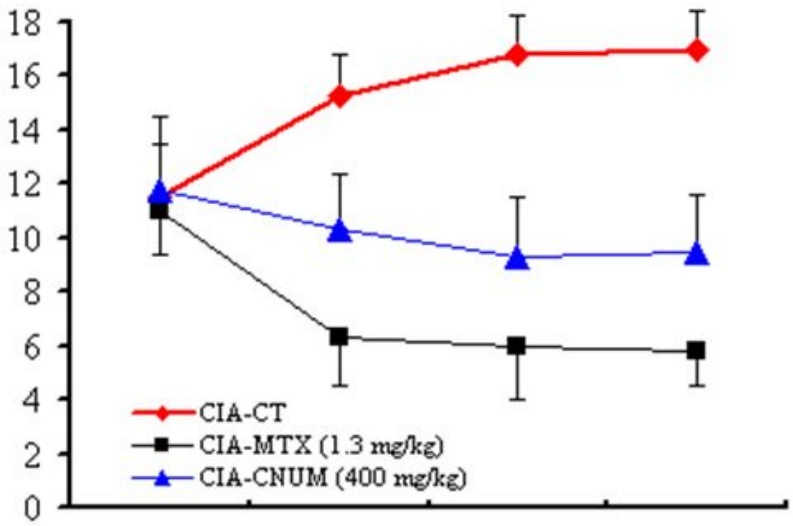


Fig.6. 관절염 유발지수(Arthritis index(AI))에 대한 JGB의 영향
(CNUM = JGB)

(3) 다음으로, Fig.7에 나타나 있듯이 JGB는 관절염 유발률(incidence)도 약 30 - 40 % 가량 감소시켰다. 이는 강력한 면역억제제인 양성 대조약물 methotrextate가 나타낸 약 45% 가량의 감소 효과에는 미치지 못하지만, 이 역시 JGB가 천연물임을 감안할 때 이 정도의 효능이라면 인체에서도 현저한 관절염 유발 억제 효과를 나타낼 가능성이 있음을 의미하는 결과로 해석된다.

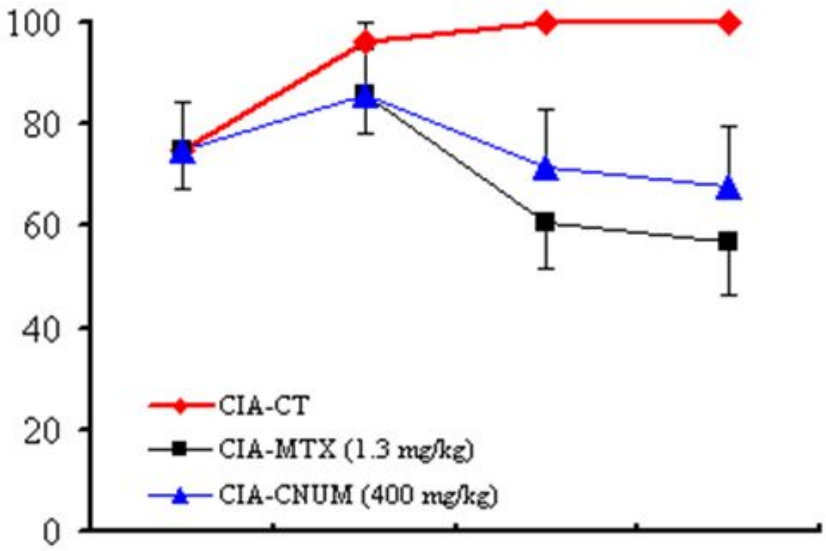


Fig.7. 관절염 유발률(incidence)에 대한 JGB의 영향
(CNUM = JGB)

마. 관절 조직, 말초혈액, 림프절에의 면역 관련 세포의 침윤에 대한 JGB의 억제 효과

(1) 1차 type II collagen 접종 후부터 70일 간의 실험을 종료한 후 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 PLN(말초 림프절), thymus(흉선), joint(관절) 등을 분리하여 총 면역세포 수를 측정하였다. 관절, 말초 림프절(PLN) 침윤세포에 대한 형광 유세포 분석은 다음과 같이 시행하였다. DBA/1J 생쥐에서 비장과 PLN를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리(1,700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 관절(joint)은 잘게 chopping한 후 collagenase 1mg/ml (in 2% FBS + RPMI1640)을 넣고 37 ℃ shaker (180 rpm, 20min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들에 ACK 용액 (8.3g NH4Cl, 1g KHCO3, in 1L of demineralized water + 0.1mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정한 세포를 5 x 10^5 밀도로 조정한 후 4℃에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하는데, 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-CD3e, FITC-anti-CCR5, PE-anti-Gr-1 FITC-anti-CD11b, PE-anti-Gr-1을 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세

한 후 flow cytometer의 분석 프로그램을 이용하여 CD4e+/CD25+, CD3e+/CD69+, CD4+/CD8+, CD3e+/CD69+, CD3e+/CDB220+, CD3e+/CCR5+, CD11b+/Gr-1+세포수를 백분율(%)로 분석한 후, 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수(absolute number)를 산출하였다.

(2) 실험 결과, JGB는 관절 조직에서의 총 면역세포수를 감소시켰다 (Fig.8).

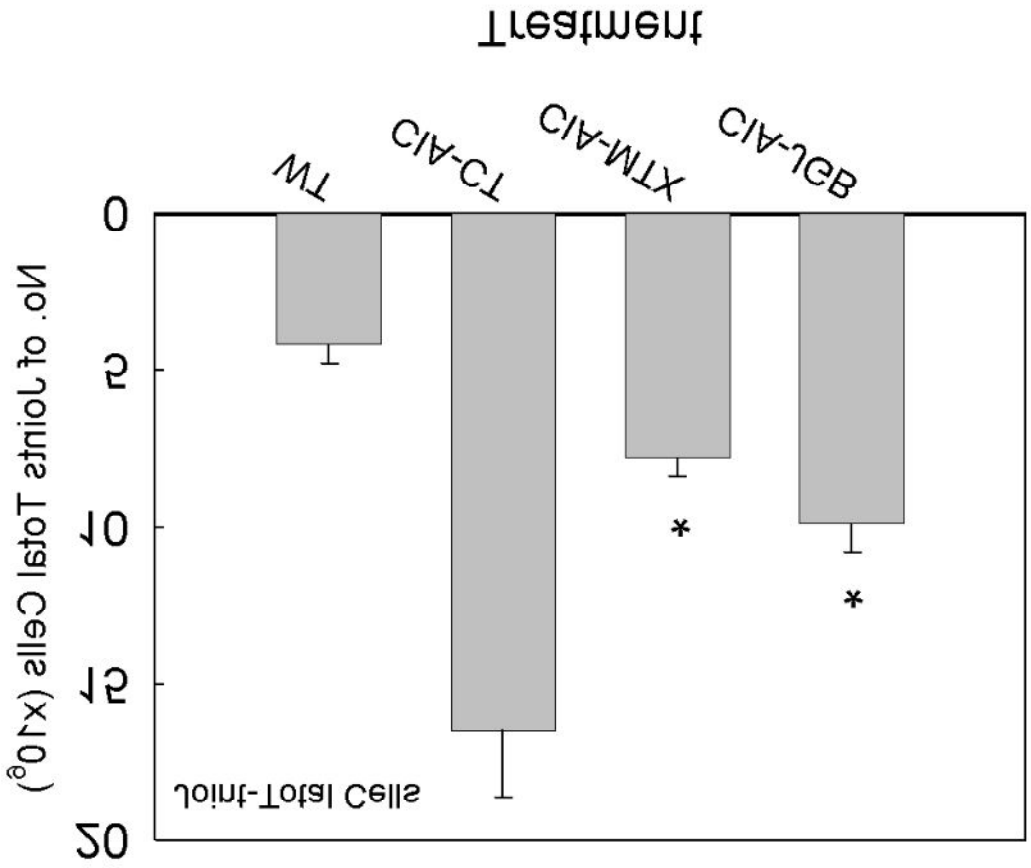


Fig.8. 관절 조직에서의 총 면역세포수에 대한 JGB의 영향

(3) JGB는 관절 조직에서의 활성화된 T 림프구 (activated T cell) 수를 감소시켰다 (Fig.9).

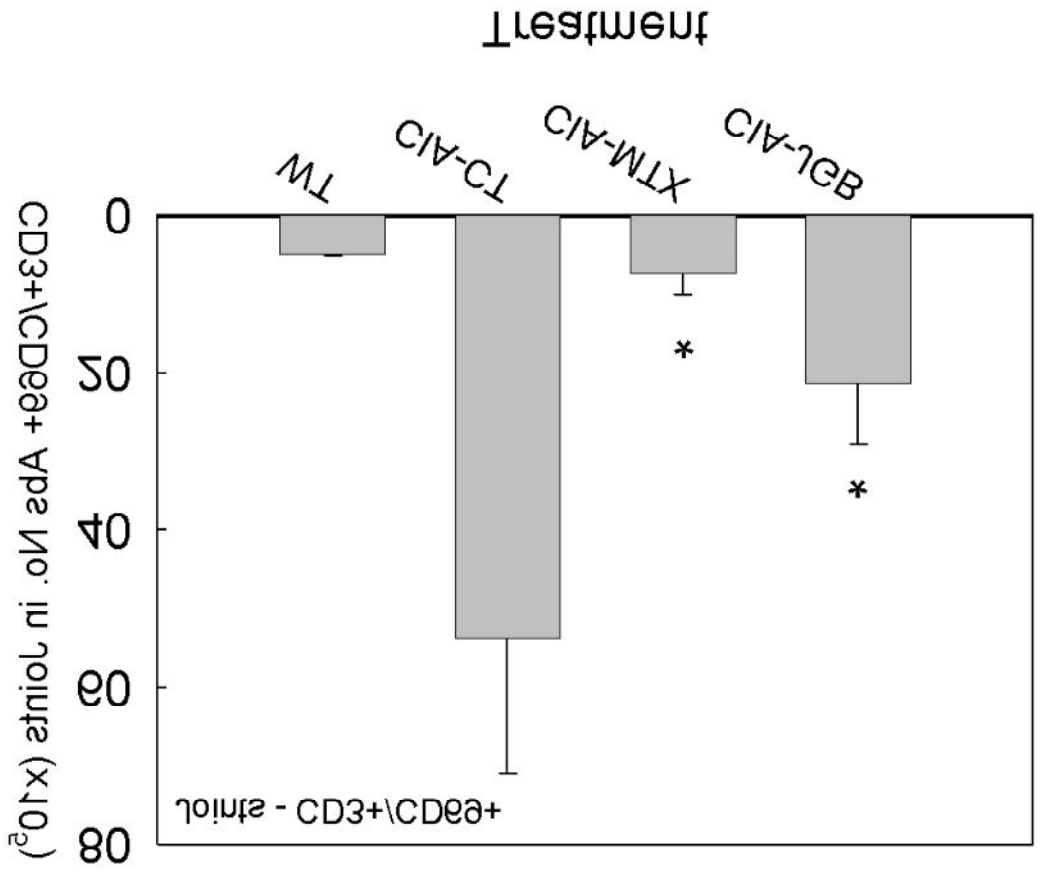


Fig.9. 관절 조직에서의 활성화된 T 림프구 (activated T cell) 수에 대한 JGB의 영향

(4) JGB는 관절 조직에의 과립구/대식세포 침윤을 감소시켰다 (Fig.10).

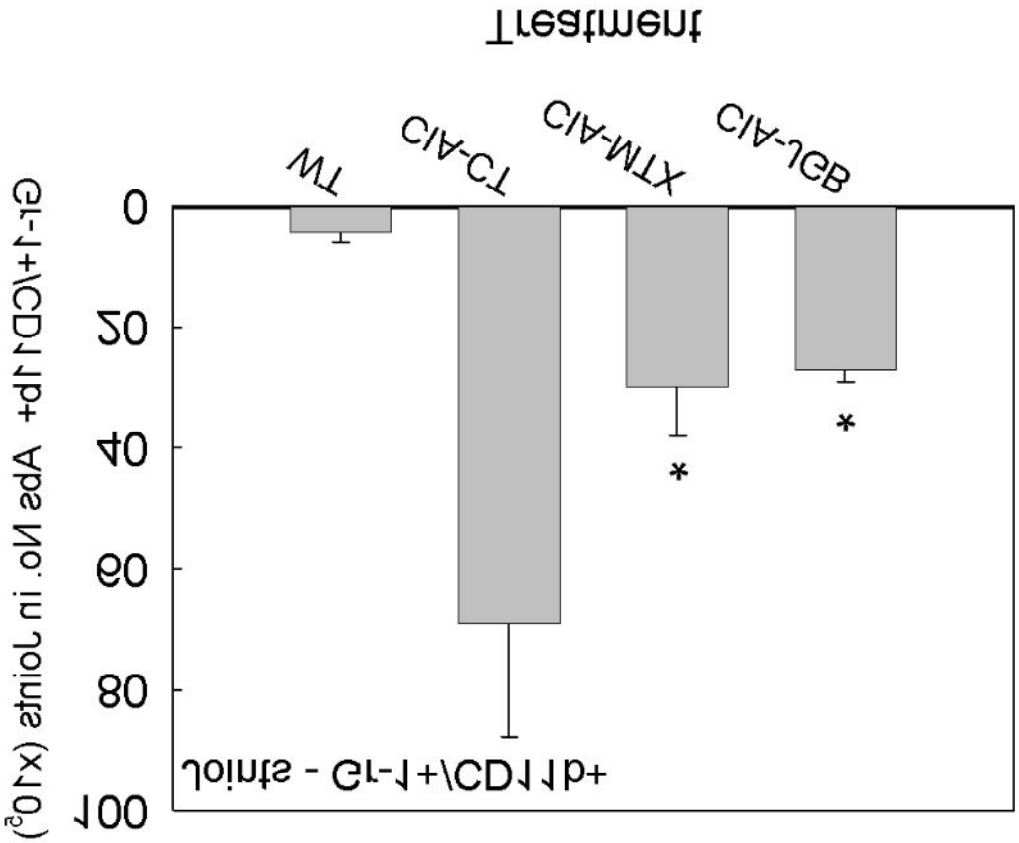


Fig.10. 관절 조직에의 과립구/대식세포 침윤에 대한 JGB의 영향

(5) JGB는 말초혈액에 순환하는 활성화된 T 림프구 (activated T cell) 수를 감소시켰다 (Fig.11).

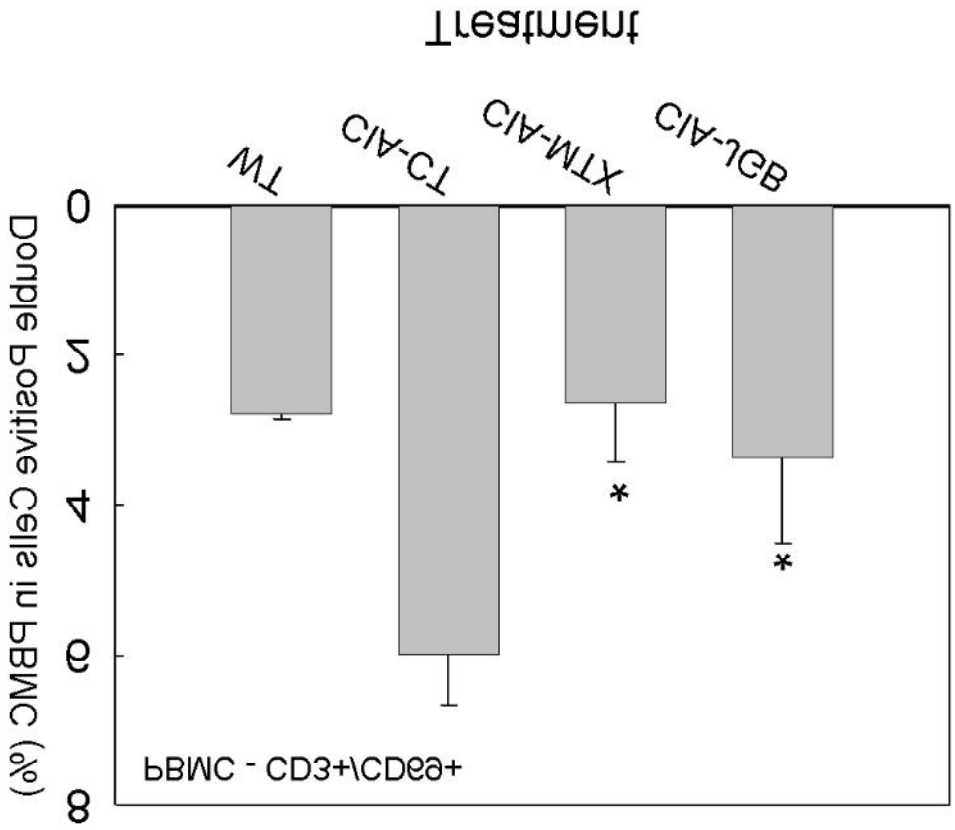


Fig.11. 말초혈액에 순환하는 활성화된 T 림프구 (activated T cell) 수에 대한 JGB의 영향

(6) JGB는 림프절에서의 활성화된 T 림프구 (activated T cell) 수를 감소시켰다 (Fig.12).

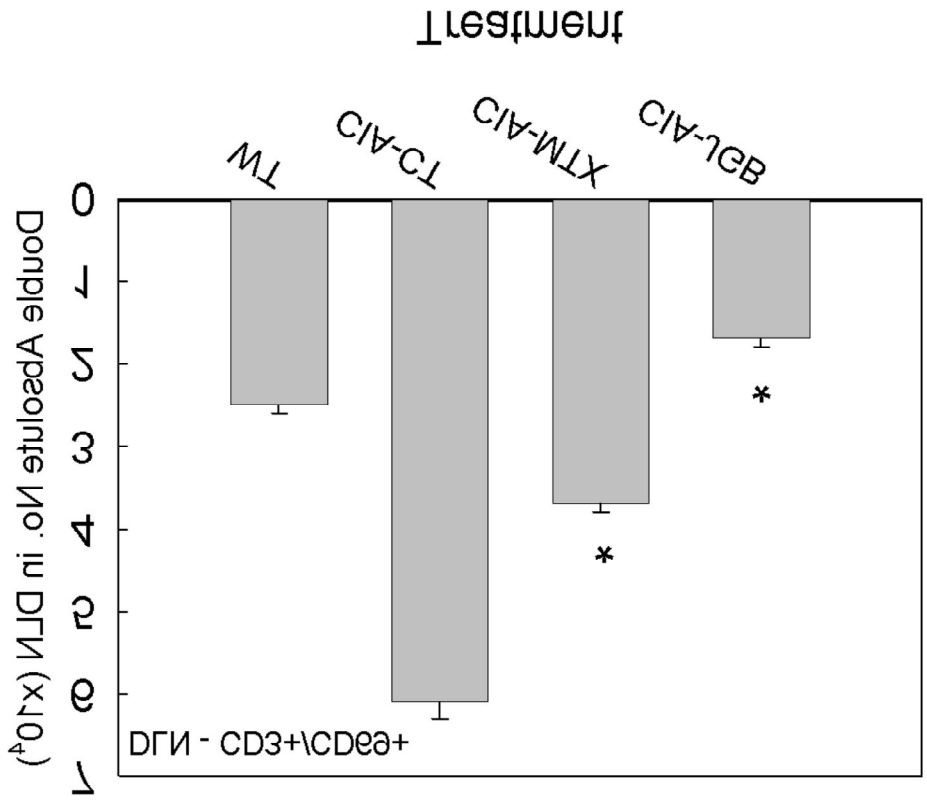


Fig.12. 림프절에서의 활성화된 T 림프구 (activated T cell) 수에 대한 JGB의 영향

이상의 5개 연구결과들을 종합해 보면, **JGB는 염증 및 자가면역 질환에서 관찰되는 면역 관련 세포들의 관절 조직 및 림프절 등에의 침윤을 효과적으로 억제함으로써 류마티스성 관절염의 병인에 작용, 그 임상적 증상을 개선하는 효능을 발현할 가능성이 지대함**을 알 수 있다.

바. JGB 투여 후의 관절염 모델동물 관절조직의 병리학적 변화에 미치는 영향

(1) 약물 투여 40 일 후에 각 동물 군에서 관절을 분리하여 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8 시간 수세한 다음, epoxy 수지에 포매하였다. Microtome을 이용, 절편을 제조하고 표준 방법에 의거하여 Hematoxylin 및 Eosin과 collagen deposition염색인 Masson-Trichrome 염색을 시행하였다.

(2) 실험결과는 다음과 같았다.

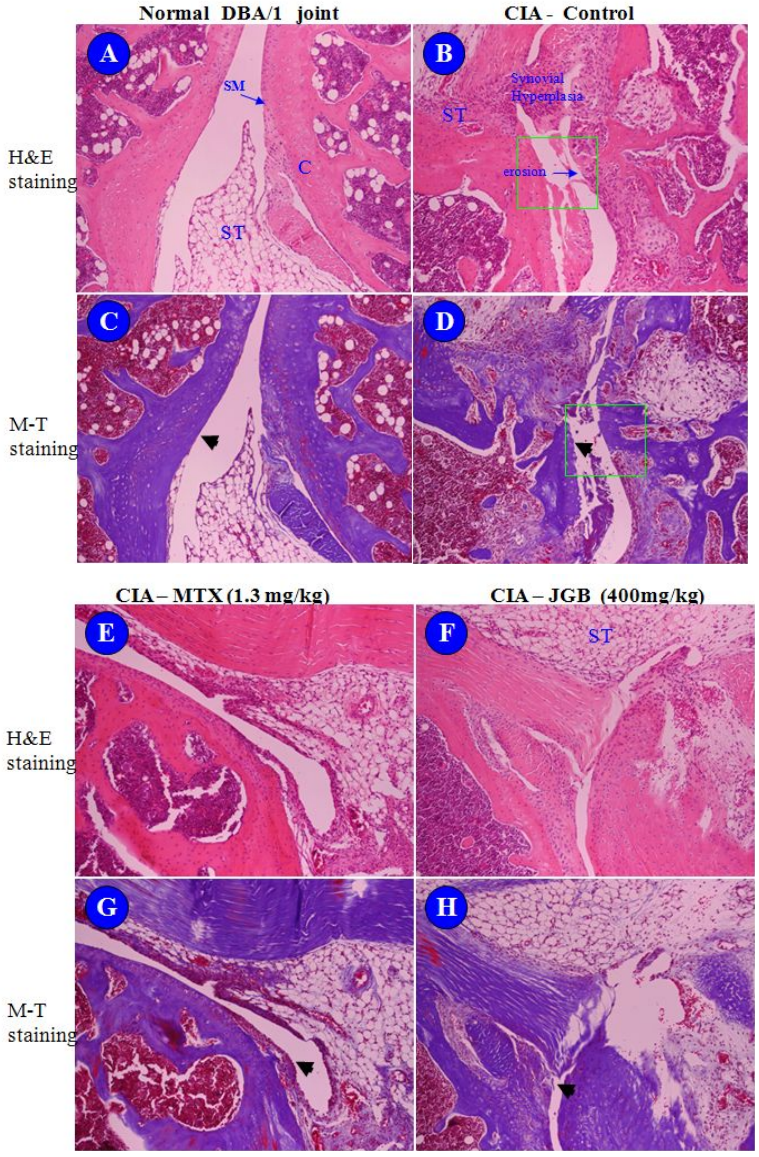


Fig.13. JGB가 관절염 모델동물 관절조직의 병리학적 변화에 미치는 영향

상기 조직 사진에서 관찰할 수 있는 바, **JGB는 관절염이 유발된 동물 관절 조직의 염증, 미란 (erosion) 등 병리학적 변화를 상당 부분 감소시키는 경향을 보여줌으로써 임상적으로 관절염의 증상을 개선할 가능성을 제시**하고 있다.

3. 생체 안전성 검증 및 작용기전 규명

가. 흰쥐에서 JGB의 생체내 안전성 검증 - 단회투여 독성 검증

검증시험결과 요약:

본 시험에서는 관절염치료 생약 후보물질의 흰쥐(랫드)에 있어서 단회 경구 투여 독성 시험을 수행하였다. 시험물질은 2,000mg/kg 및 0mg/kg의 용량으로 암, 수 각각에 경구로 1회 투여한 후 14일 동안 관찰하였다.

본 시험을 위해 단회 경구 투여와 함께 14일의 시험기간 내

1. 일일 임상증상 관찰
2. 사료, 음수 섭취율 및 체중 변화
3. 부검 시 장기 육안소견 및 상대 장기 중량 변화
4. 혈액학적 검사 등이 수행· 분석되었다.

상기의 결과를 종합해 보면, 랫드의 모든 시험물질 투여군에서 사망예, 임상증상, 체중변화, 장기의 육안적 소견 및 혈액학적인 변화에서 특기할 만한 이상은 관찰되지 않았으며, 따라서 시험물질의 LD_{50}치를 산출할 수 없었다.

이상의 결과로부터 시험물질인 JGB는 랫드를 이용한 단회투여 경구독성시험에서 어떠한 독성 및 부작용을 유발하지 않는 안전한 제제로 사료된다.

시험 과정 및 결과

1.시험목적

본 시험에서는, 관절염치료 생약 후보물질인 JGB를 설치류인 S. D. rat에 단회 경구투여 후 야기되는 독성여부를 평가하고자 하였다. 이에 본 연구에서는 생체 안전성 여부를 검토하기 위하여 시험물질을 2,000 및 0 mg/kg의 용량으로 단회투여 경구독성시험 실시하였다.

2.시험계

가. 종 및 계통
  1) 종, 계통(공급처) : Rat, Sprague-Dawley rat.
  2) 구입처
    가) 상호 : (주)샘타코바이오코리아
    나) 주소 : 경기 오산시 서랑동 77-1

나. 구입시 동물수(성별), 주령 및 체중범위 : 10마리 (수컷), 5주령, 126 ± 5 g
  10마리 (암컷), 5주령, 120 ± 5 g

다. 투여시 동물수(성별), 주령 및 체중범위 : 10마리 (수컷), 5주령, 196 ± 10 g
  10마리 (암컷), 5주령, 170 ± 5 g

라. 시험계 선정이유 : SD rat은 독성시험 동물로 가장 표준화되고 폭넓게 연구된 모델로서 실험 적용에 있어 재현성과 안정성이 뛰어나고, 독성 시험에 있어 비교할 만한 시험 기초 자료가 축적되어 있어 선택하였다.

3. 동물실험윤리

본 실험은 동물보호법 (제정 1991년 5월 31일 법률 제4397호, 일부개정 2008년 2월 29일 법률 제8852호)를 근거하여 충북대학교 동물시험윤리위원회에 의해 승인되었다.
(승인번호 : CBNUA-118-0907-01)

4. 동물실 환경조건 [CBNU SOP-20-002]

가. 동물실 번호	SPF- 326
나. 사용 사육케이지 종류 및 크기	polysulfon cage (420 x 280 x 200 mm)
다. 설정온도	22 ± 2 ℃
라. 습도	50 ± 20 %
마. 환기방식 및 회수	10회/hr
바. 조명시간 및 명암주기	12hr/day/night
사. 조도	150 - 300 lux

아. 사료 및 음수

실험동물용 쥐사료 (Agribrands Purina Korea Inc. Analysis Service of Central Laboratory; 경기도 평택시 장당동 627)를 자유 공급하고 여과 멸균된 정제수를 폴리카보네이트제 음수병(250 ml)에 넣어 자유섭취시켰다.

5.시험물질및사료

가. 시험물질은 시험의뢰자가 제공한 시험물질을 별도의 처리 없이 그대로 사용하였다.
나. 시험의뢰자가 제공한 시험물질의 안정성 및 균질성 분석은 별도로 시행하지 않았다.
다. 시험물질 및 시험물질과 관련된 아래 정보는 시험 의뢰자 측에서 제공된 정보를 근거로 작성하였다.

시험물질	관절염치료생약후보물질
공급원	충남대
외관 및 성상	갈색 분말
안정성	안정
보관조건	상온 보관
취급 시 주의사항	햇빛에 노출되지 않고 교차 오염을 방지를 위해 밀봉하여 보관하되 시험 소요량만을 필요시 소분하여 사용하였다.
잔여시험물질의 처리	시험 의뢰자측에 반환

라. 사료 및 음수 [CBNU SOP-11-009]

실험동물용 쥐사료 (Agribrands Purina Korea Inc. Analysis Service of Central Laboratory; 경기도 평택시 장당동 627)를 자유 공급하고 여과 멸균된 정제수를 폴리카보네이트제 음수병(250 ml)에 넣어 자유 섭취시켰다.

6.시험군의 구성

군	투여용량	용매 및 투여 액량	동물수	동물번호
대조군	0	생리식염수 / 10 ml/kg	10 (male 5, femal 5)	RTM 1 - RTM 5 RTF 1 - RTF 5
시험물질 투여군	2,000 mg/kg	생리식염수 / 10 ml/kg	10 (male 5, femal 5)	RTM 6 - RTM 10 RTF 6 - RTF 10

R : Rat, T : Toxicity, M : Male, F : Female

7.시험방법

본 시험은 식품의약품안전본부 고시 제2000-60호 “의약품 등의 독성시험기준(2005년 10월 21일 제정)”에 준하여 실시하였다.

가. 검역 및 순화 [CBNU SOP-40-001]

1) 동물입수 시 모든 동물의 일반건강상태에 대한 수의학적 검역을 실시하였다.
2) 시험을 실시하는데 적합하고 건강한 동물을 선별하기 위하여 1주간의 순화기간을 두었다.

나. 군 분리 및 개체식별 [CBNU SOP-40-002, CBNU SOP-40-003]

1) 순화종료 후, 시험물질 투여 직전일에 체중을 측정하여 체중을 기준으로 Z배열법에 따라 군 분리하고 개체식별은 피모 마킹법을 사용하였다.
2) 군 분리된 동물은 사육상자 당 2~5마리 이내로 사육하였다.

다. 시험물질의 조제 [CBNU SOP-40-035]

1) 용매 및 부형제: 생리식염수
2) 용량: 10 ml/kg

라. 시험물질 투여 및 근거 [CBNU SOP-40-014]

1) 12시간 절식 후 sonde를 이용한 위내 투여로 10시에서 12시 사이에 단회투여 하였다.
2) 임상예정 경로: 인체 적용경로가 경구이므로 경구 경로를 택하여, 식품의약품안전청 고시 제2000-60호 “의약품등의 독성시험기준 (2005년 10월 11일 제정)”에 준하여 선택하였다.

마. 투여량 산출

투여량의 산출은 투여 직전의 랫드의 체중을 기준으로 하여, 2,000 mg/kg을 최고용량(투여액량 : 10 ml/kg, B.W.)으로 설정하였다. 용매 대조군에는 생리식염수만을 투여하였다.

바. 일일 임상증상 관찰

1) 투여 후 개별 동물에 대한 임상증상 관찰 및 기록을 실시하였다.,
2) 시험물질 투여 후 최초일은 투여직후 및 2시간, 4시간, 6시간에 일반 상태 관찰 및 기록을 실시하며 그 이후에는 다음날부터 14일까지는 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독증상, 운동성, 외관, 자율신경 및 사망동물의 유무를 주의깊게 관찰하였다.

사. 체중, 음수·사료 소비량 측정 [CBNU SOP-40-004, CBNU SOP-40-005]

1) 체중 측정은 시험물질 투여 직전, 첫 회 투여 24시간 후를 포함하여 주 1회 실시하고

모든 체중 측정은 시험물질 투여 전에 실시하였다.

2) 음수·사료 소비량 측정은 주 1회 실시하고 시험물질 투여 후 공급량을 측정하고 익일 시험물질 투여 후 잔량을 측정하여 cage별 소비량을 산출한 후 cage의 동물 수로 나누어 각 개체별 소비량을 산출하는 방식으로 측정하였다.

아. 사망 및 빈사개체의 처리

1) 시험기간 중 사망한 개체에 대하여는 가능한 정확한 사망시간을 기록하고 부검을 실시하여 소견을 기록하고 병리조직검사를 실시하여 그 결과를 기록하도록 하였다.
2) 빈사상태의 시험동물은 부검하여 조직학적 검사를 실시하도록 하였다.

자. 부검 및 검체의 채취 [CBNU SOP-40-024, CBNU SOP-40-019]

1) 부검시 마취는 diethyl ether를 사용하였다.
2) 혈액검체의 채취는 마취된 동물을 개복하여 복대동맥에서 10 ml 용량의 syringe사용하여 채혈한 후 SST (serum separate tube), Sod. citrate tube, EDTA tube에 나누어 담는다. SST, Sod. citrate tube의 혈액은 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청 및 혈장을 분리하고 동결보관하였다.
3) 채혈이 종료된 동물은 마취가 유지된 상태에서 복대동맥 및 정맥을 절단하여 방혈치사 하였다.
4) 뇌, 간, 비장, 부신, 신장, 고환(자궁), 부고환(난소), 갑상선, 흉선, 심장, 폐를 적출하여 무게측정 후 10% neutral buffered formalin (10% NBF)에 침수 고정하였다.

차. 장기무게 측정

부검 시 육안소견 및 부검장기에 대한 무게 측정을 실시하였다.

카. 조직 병리학적 검사 [CBNU SOP-40-030 - CBNU SOP-40-034]

육안적 이상소견이 관찰된 장기, 조직에 대하여 조직병리학적 검사를 실시하였다.

파. 혈액학적 검사 [CBNU SOP-40-042, CBNU SOP-40-043]

EDTA처리된 whole blood를 Advia 2120(Bayer, Leverkusen, Germany)를 사용하여 RBC, WBC, Lymphocyte, neutrophil, Basophil, Monocyte, Eosinophil, Platelet을 계수하고 Hematocrit, Hemoglobin, MCV, MCH, MCHC를 검사하였다.

8. 통계학적 분석

모든 실험 결과는 평균치 ± 표준편차로 표시하고 모든 자료들에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하며, 분산이 동질성을 갖는 경우 one-way analysis of variance(ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의차가 있는 시험군을 알아내기 위하여 Dunnett's t-test를 실시하였다.

9. 시험결과 및 고찰

(1) 개략의 치사량 (Table 1)

체중 kg 당 2,000mg(투여액량 10 ml/kg B.W.)을 랫드에 경구 투여 시, 사망예가 관찰되지 않아 개략의 치사량치의 산정은 불가능하였다.

(2) 사망율(Table 1)

시험 전기간을 통하여 단회 경구 투여에 있어 랫드의 암·수 모두에서 사망 예는 전혀 관찰되지 않았다.

(3) 임상증상(Table 2)

시험물질 단회 경구 투여 직후와 이후 시험 전 기간을 통하여 시험물질을 투여한 암·수 모든 투여군에서 본 시험물질에 의한 특이한 임상증상은 인정되지 않았다.

(4) 체중변화(Figure 1)

시험 전 기간을 통하여 단회 경구투여에 있어 랫드의 암·수 모두에서, 각 군 간에 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.

(5) 사료 및 음수량 변화 (Figure 2, Figure 3)

시험 전 기간을 통하여 단회 경구투여에 있어 랫드의 암· 수 모두에서, 각 군 간에 유의성 있는 사료 및 음수량 변화는 인정되지 않았다

(6) 부검소견(Table 3)

전 생존동물의 부검에서 본 시험물질의 단회 경구투여에 기인한다고 사료되어지는 어떠한 유의할 만한 육안적인 이상소견은 관찰되지 않았다.

(7) 부검소견(Table 4)

전 생존동물의 부검에서 본 시험물질의 단회 경구투여에 기인한다고 사료되어지는 어떠한 유의할 만한 장기무게 변화는 관찰되지 않았다.

(8) 혈액학적 변화(Table 5)

전 생존동물의 부검에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 혈액학적인 변화는 인정되지 않았다.

본 연구는 JGB의 랫드에 대한 단회투여 경구독성을 조사하기 위하여 수행되었다. 시험물질(JGB)을 생리식염수에 용해시켜, 체중 kg 당 2,000 및 0 mg/k의 용량으로 경구로 암·수 각각에 1회 투여한 후 14일 동안 관찰하였다. 시험결과에 있어 랫드의 모든 시험물질 투여군에서 사망예, 임상증상, 사료, 음수량의 변화, 체중변화, 육안적 소견 및 혈액학적인 변화에서 특기할만한 이상은 관찰되지 않았으며, 따라서 랫드의 LD_{50}치를 산출할 수 없었다. 이에 LD_{50}치는 랫드 암·수 모두에서 체중 kg 당 2,000mg 이상인 것으로 판단되었다.

이상의 결과로부터 JGB는 랫드를 이용한 단회투여 경구독성시험에서 어떠한 독성 및 부작용도 유발하지 않는 안전한 제제로 판단된다.

10.기타사항

가.시험기록및자료의보존[CBNU SOP-40-039]

1) 보존기간 : 시험 종료 후 5년
2) 보존장소 : 충북대학교 실험동물연구지원센터 자료실
3) 보존자료 LIST
   가) 시험계획서 원본 및 변경기록(변경한 경우)
   나) 시험물질 관련 자료
   다) 동물입수 관련 자료
   라) 시험진행 및 결과 관련 자료
   마) 사료 및 음수 분석 결과
   바) 기타

(부록) Figures and Tables

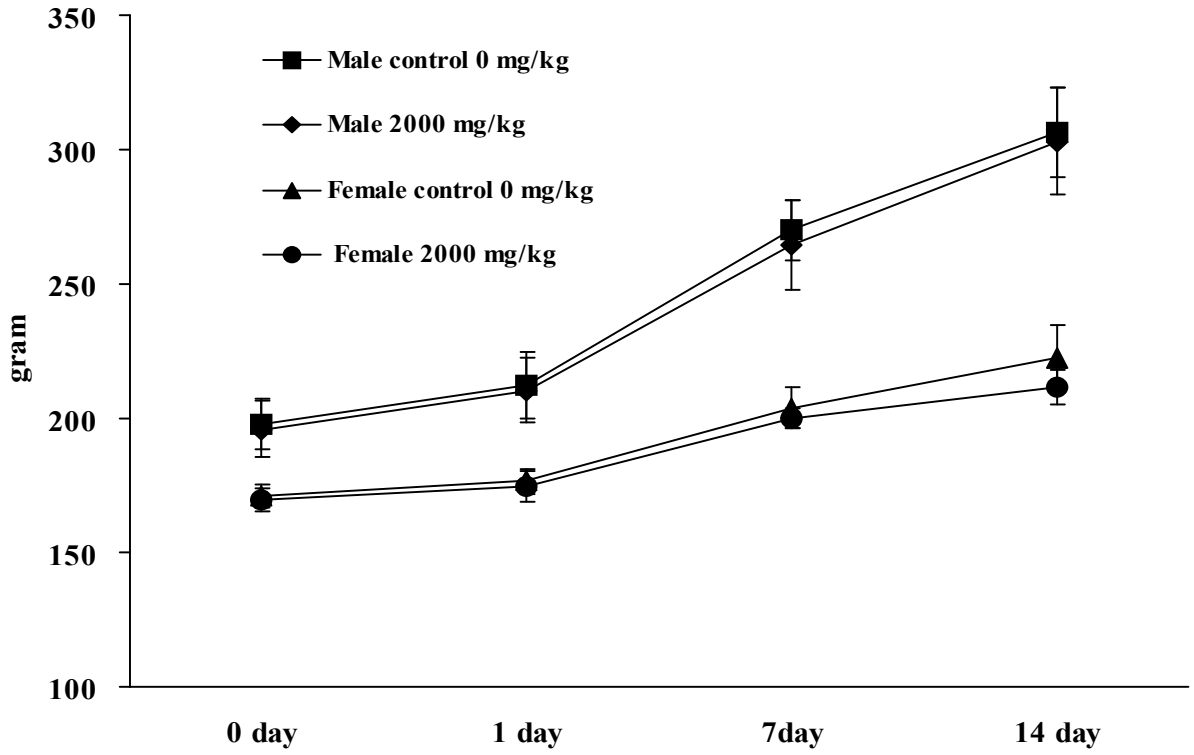


Fig. 1. Changes in body weight of SD-rat treated with test materials 2 weeks. Data are expressed as mean ± SD (n = 5).

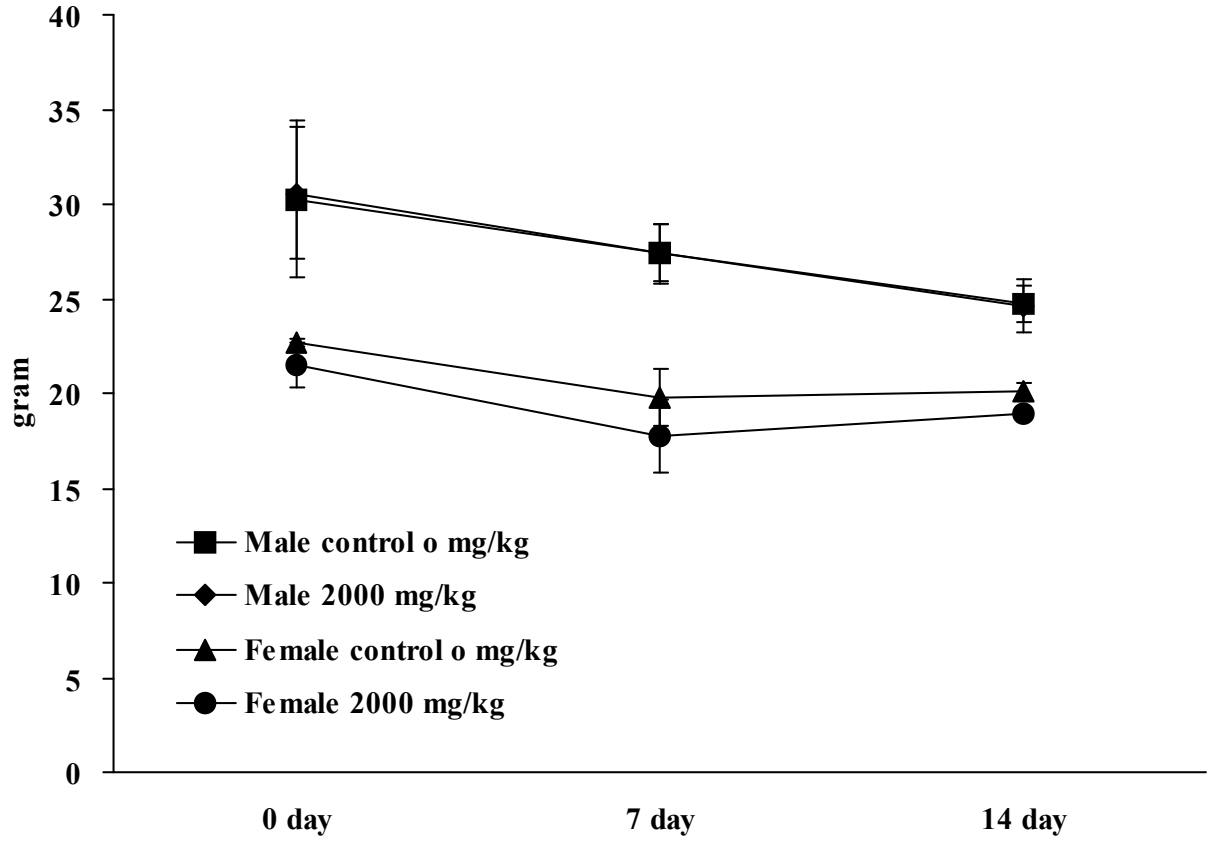


Fig. 2. Changes in food consumption level of SD-rat treated with test materials 2 weeks. Data are expressed as mean ± SD (n = 5).

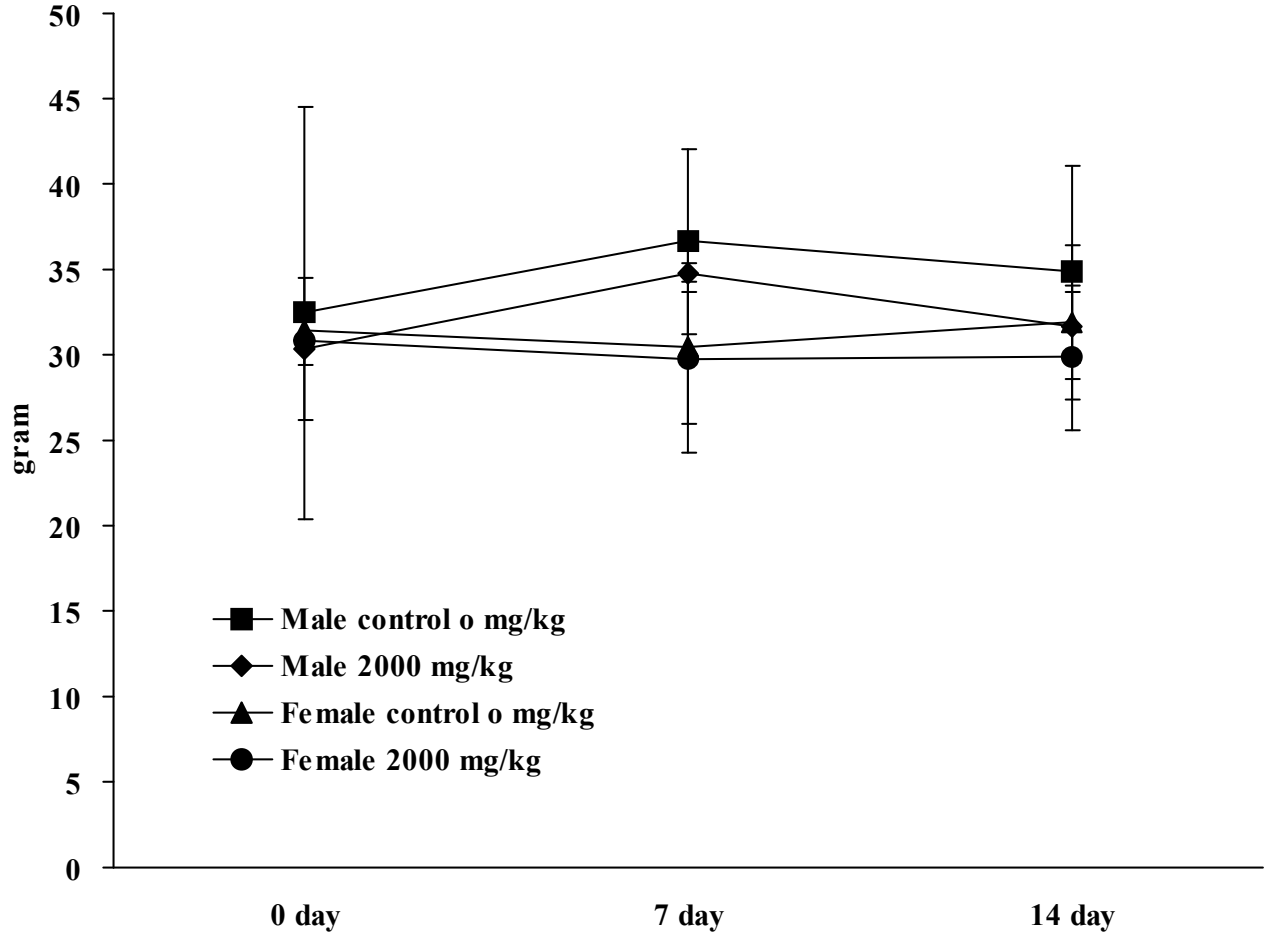


Fig. 3. Changes in water consumption level of SD-rat treated with test materials 2 weeks. Data are expressed as mean ± SD (n = 5).

Table 1. Mortality and clinical findings in SD rats administered orally with test materials

Animal species	Group	Dose (mg/kg)	Final Mortality		Clinical Findings	
			Male	Female	Male	Female
Rats	Test materials	2,000	0/5	0/5	-	-
	Control	0	0/5	0/5	-	-

- : No abnormality was detected

Table 2. Clinical findings in SD rats administered orally with test materials

Sex	Dose (mg/kg)	Hours after treatment							Days after treatment														Mor.
		1	2	3	4	5	6	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
M	2,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	Con.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
F	2,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	Con.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Table 3. Gross Findings of necropsy in SD male rats administered orally with test materials

Organ	Sex	Male		Female	
	Dose(mg/kg B.W.)	2,000	Control	2,000	Control
Brain	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Kidney-Left	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Kidney-Right	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Heart	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Lung	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Spleen	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Liver	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Stomach	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Intestine	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Pancreas	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Adrenal gland (left)	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Adrenal gland (right)	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Pituitary gland	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Testis-L	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Testis-R	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Other organs	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5

NO : No. of observations

NGF : No gross findings

Table 4. Relative organ weight in SD-rats administered orally with test materials

Group	Testis		epididymis		Spleen	Liver	adrenal gland		Kidney		thymus	Heart	thyroid	Lung	Brain
	L	R	L	R			L	R	L	R					
Male control 0 mg/kg	0.699 ±0.093	0.711 ±0.073	0.140 ±0.019	0.145 ±0.014	0.367 ±0.051	4.730 ±0.548	0.009 ±0.001	0.010 ±0.001	0.566 ±0.041	0.549 ±0.044	0.325 ±0.068	0.486 ±0.059	0.063 ±0.009	0.672 ±0.062	0.912 ±0.074
Male 2000 mg/kg	0.730 ±0.024	0.729 ±0.030	0.156 ±0.015	0.146 ±0.010	0.324 ±0.036	4.772 ±0.500	0.009 ±0.001	0.009 ±0.001	0.561 ±0.036	0.549 ±0.041	0.340 ±0.061	0.506 ±0.048	0.057 ±0.005	0.709 ±0.076	0.952 ±0.064

Group	uterus	ovary		Spleen	Liver	adrenal gland		Kidney		thymus	Heart	thyroid	Lung	Brain
		L	R			L	R	L	R					
Female control 0 mg/kg	0.161 ±0.060	0.017 ±0.003	0.019 ±0.001	0.207 ±0.038	2.297 ±0.249	0.010 ±0.001	0.010 ±0.000	0.256 ±0.023	0.265 ±0.022	0.152 ±0.026	0.270 ±0.033	0.033 ±0.005	0.408 ±0.038	0.615 ±0.037
Female 2000 mg/kg	0.126 ±0.022	0.023 ±0.004	0.024 ±0.005	0.207 ±0.027	2.243 ±0.166	0.011 ±0.002	0.010 ±0.002	0.255 ±0.020	0.255 ±0.020	0.146 ±0.018	0.269 ±0.015	0.039 ±0.005	0.437 ±0.036	0.644 ±0.057

Results are mean ± S. D. (n = 5)

Table 5. Complete blood count in SD-rats administered orally with test materials

Group	WBC	RBC	HGB	HCT	RBC index			PLT	WBC difference				
	$\times 10^3/\mu\ell$	$\times 106/\mu\ell$	g/d	%	MCV /fL	MCH /pg	MCHC g/dL	$\times 10^3/\mu\ell$	Neu %	Lym %	Mono %	Eo %	Baso %
Male control 0 mg/kg	5.51 ±0.65	7.32 ±0.37	15.82 ±0.76	37.64 ±1.75	51.44 ±1.32	21.64 ±0.63	42.04 ±0.18	1511.80 ±165.45	1.82 ±0.73	84.82 ±5.01	10.78 ±4.68	0.88 ±0.18	0.02 ±0.04
Male 2000 mg/kg	4.57 ±0.42	7.35 ±0.27	15.98 ±0.61	38.38 ±1.70	52.18 ±0.87	21.76 ±0.24	41.68 ±0.77	1458.20 ±147.34	3.86 ±1.91	85.26 ±2.23	8.74 ±2.76	0.70 ±0.26	0.00 ±0.00
Female control 0 mg/kg	4.52 ±1.20	7.51 ±0.20	16.12 ±0.58	37.16 ±1.24	49.46 ±1.01	21.44 ±0.47	43.36 ±0.53	1485.00 ±128.31	4.14 ±1.79	86.86 ±4.60	6.52 ±2.19	1.56 ±1.01	0.00 ±0.00
Female 2000 mg/kg	4.33 ±1.23	7.78 ±0.39	16.62 ±0.71	38.28 ±1.84	49.22 ±0.52	21.36 ±0.24	43.40 ±0.44	1361.80 ±162.61	7.02 ±9.34	81.56 ±16.20	7.46 ±4.10	2.54 ±2.64	0.00 ±0.00

Results are mean ± S. D. (n = 5)

Body weights

Group	Ani. No.	0 day	1 day	7day	14 day
Male control 0 mg/kg	M1	184.77	196.73	264.66	302.99
	M2	192.28	202.35	259.71	293.92
	M3	201.14	216.69	264.72	294.82
	M4	203.99	220.99	272.87	306.48
	M5	206.8	224.56	287.74	334.57
	Mean	**197.80**	**212.26**	**269.94**	**306.56**
	SD	**9.09**	**12.11**	**11.01**	**16.54**
Male 2000 mg/kg	M6	183.46	198.15	259.6	304.46
	M7	185.56	197.96	237.47	269.86
	M8	204.25	214.21	271.78	314.43
	M9	201.11	215.75	272.81	307.09
	M10	205.27	226.41	280.52	320.39
	Mean	**195.93**	**210.50**	**264.44**	**303.25**
	SD	**10.56**	**12.29**	**16.83**	**19.68**
Female Control 0 mg/kg	F1	164.07	170.62	195.41	208.48
	F2	170.88	179.54	204.34	227.08
	F3	175.26	178.43	201.88	219.74
	F4	171.29	181.67	216.06	241.28
	F5	173.82	172.35	201.01	216.46
	Mean	**171.06**	**176.52**	**203.74**	**222.61**
	SD	**4.31**	**4.78**	**7.62**	**12.39**
Female 2000 mg/kg	F6	164.71	167.68	195.45	203.49
	F7	165.79	169.78	200.62	211.23
	F8	172.21	180.31	204.3	221.2
	F9	169.52	179.15	202.21	213.61
	F10	174.81	177.22	197.61	207.88
	Mean	**169.41**	**174.83**	**200.04**	**211.48**
	SD	**4.25**	**5.72**	**3.54**	**6.63**

Food consumption

Group	Cage No.	0 day	7 day	14 day
Male control 0 mg/kg	1	27.33	26.39	24.05
	2	33.18	28.53	25.46
	Mean	**30.26**	**27.46**	**24.75**
	SD	**4.14**	**1.51**	**0.99**
Male 2000 mg/kg	1	28.13	26.29	23.65
	2	33.04	28.46	25.60
	Mean	**30.58**	**27.37**	**24.63**
	SD	**3.47**	**1.54**	**1.38**
Female control 0 mg/kg	1	22.83	18.72	19.87
	2	22.56	20.81	20.38
	Mean	**22.69**	**19.77**	**20.12**
	SD	**0.19**	**1.48**	**0.36**
Female 2000 mg/kg	1	22.36	19.11	16.08
	2	20.64	16.38	15.79
	Mean	**21.50**	**17.74**	**18.93**
	SD	**1.22**	**1.93**	**0.21**

Water consumption

Group	Cage No.	0 day	7 day	14 day
Male control 0 mg/kg	1	41.00	32.76	30.45
	2	23.91	40.48	39.27
	Mean	**32.45**	**36.62**	**34.86**
	SD	**12.09**	**5.46**	**6.24**
Male 2000 mg/kg	1	30.29	34.39	33.13
	2	24.38	35.17	30.17
	Mean	**30.33**	**34.78**	**31.65**
	SD	**4.18**	**0.55**	**2.10**
Female control 0 mg/kg	1	34.68	26.10	28.74
	2	36.26	34.81	35.08
	Mean	**31.45**	**30.45**	**31.91**
	SD	**1.11**	**6.16**	**4.48**
Female 2000 mg/kg	1	31.84	30.52	29.79
	2	29.85	25.09	23.77
	Mean	**30.85**	**29.80**	**29.84**
	SD	**1.41**	**3.84**	**4.26**

Hematology

Group	No.	WBC ×10³/㎕	RBC ×106/㎕	HGB g/d	HCT %	RBC index			PLT ×10³/㎕	WBC difference				
						MCV /fL	MCH /pg	MCHC g/dL		Neu %	Lym %	Mono %	Eo %	Baso %
Male control 0 mg/kg	M01	5.3	6.93	14.9	35.5	51.3	21.5	41.8	1605	1.1	85.5	9.9	0.9	0
	M02	5.97	7.72	15.9	38	49.2	20.6	41.9	1545	1.1	87.5	9.4	0.7	0
	M03	5.38	7.07	15.6	37	52.3	22.1	42.2	1270	2	84.4	11.5	0.7	0
	M04	6.29	7.71	17	40.3	52.2	22	42.2	1438	2.8	90	5.1	1	0.1
	M05	4.61	7.17	15.7	37.4	52.2	22	42.1	1701	2.1	76.7	18	1.1	0
	Mean	**5.51**	**7.32**	**15.82**	**37.64**	**51.44**	**21.64**	**42.04**	**1511**	**1.82**	**84.82**	**10.78**	**0.88**	**0.02**
	SD	**0.65**	**0.37**	**0.76**	**1.75**	**1.32**	**0.63**	**0.18**	**165.45**	**0.73**	**5.01**	**4.68**	**0.18**	**0.04**
Male 2000 mg/kg	M06	4.59	7.04	15.2	36.3	51.6	21.6	41.9	1570	1.6	81.6	13.6	1.1	0
	M07	4.65	7.49	16.5	38.6	51.5	22.1	42.8	1340	4.8	86.4	7.4	0.6	0
	M08	4.98	7.1	15.5	37.5	52.8	21.9	41.4	1307	4.3	86	7.6	0.8	0
	M09	3.88	7.48	16.1	38.6	51.6	21.5	41.6	1425	2.3	87.4	8.2	0.6	0
	M10	4.77	7.66	16.6	40.9	53.4	21.7	40.7	1649	6.3	84.9	6.9	0.4	0
	Mean	**4.57**	**7.35**	**15.98**	**38.38**	**52.18**	**21.76**	**41.68**	**1458**	**3.86**	**85.26**	**8.74**	**0.70**	**0.00**
	SD	**0.42**	**0.27**	**0.61**	**1.70**	**0.87**	**0.24**	**0.77**	**147.34**	**1.91**	**2.23**	**2.76**	**0.26**	**0.00**
Female control 0 mg/kg	F01	4.39	7.64	16.5	37.8	49.5	21.6	43.5	1329	5.5	85.8	6.7	1	0
	F02	4.38	7.2	15.2	35	48.6	21.1	43.5	1460	5.9	79.3	10.1	3.3	0
	F03	3.58	7.68	16	37.2	48.5	20.8	42.9	1463	2.9	90.1	5.2	0.9	0
	F04	6.56	7.43	16.2	37.9	51	21.8	42.8	1686	1.7	90.4	6.2	1	0
	F05	3.68	7.62	16.7	37.9	49.7	21.9	44.1	1487	4.7	88.7	4.4	1.6	0
	Mean	**4.52**	**7.51**	**16.12**	**37.16**	**49.46**	**21.44**	**43.36**	**1485**	**4.14**	**86.86**	**6.52**	**1.56**	**0.00**
	SD	**1.20**	**0.20**	**0.58**	**1.24**	**1.01**	**0.47**	**0.53**	**128.31**	**1.79**	**4.60**	**2.19**	**1.01**	**0.00**
Female 2000 mg/kg	F06	5.68	7.34	15.9	36.7	50	21.7	43.4	1447	3.3	89	5.4	0.8	0
	F07	4.48	7.5	16	36.7	49	21.3	43.4	1374	2.6	86.8	6.3	2.5	0
	F08	3.92	7.73	16.6	37.9	49.1	21.5	43.9	1155	3.4	90.9	3.6	1.4	0
	F09	2.47	8.32	17.6	41.1	49.4	21.1	42.7	1259	23.7	52.7	14.3	7.1	0
	F10	5.12	8.02	17	39	48.6	21.2	43.6	1574	2.1	88.4	7.7	0.9	0
	Mean	**4.33**	**7.78**	**16.62**	**38.28**	**49.22**	**21.36**	**43.40**	**1361**	**7.02**	**81.56**	**7.46**	**2.54**	**0.00**
	SD	**1.23**	**0.39**	**0.71**	**1.84**	**0.52**	**0.24**	**0.44**	**162.61**	**9.34**	**16.20**	**4.10**	**2.64**	**0.00**

Absolute organ weights

(g)

Group	No.	Body weight	Testis		epididymis		Spleen	Liver	adrenal gland		Kidney		thymus	Heart	thyroid	Lung	Brain
			L	R	L	R			L	R	L	R					
Male control	M01	294	1.344	1.333	0.263	0.277	0.719	10.380	0.017	0.019	1.111	1.139	0.712	0.995	0.141	1.415	1.919
	M02	283.53	1.483	1.466	0.337	0.306	0.684	9.565	0.018		1.191	1.144	0.639	0.927	0.141	1.415	1.917
	M03	287.29	1.549	1.656	0.330	0.352	0.869	9.062	0.019	0.019	1.138	1.084	0.823	1.005	0.118	1.362	1.875
	M04	295.41	1.307	1.443	0.263	0.307	0.733	9.787	0.022	0.020	1.229	1.171	0.512	1.010	0.118	1.362	1.875
	M05	321.26	1.678	1.602	0.286	0.289	0.864	11.037	0.024	0.024	1.308	1.256	0.719	1.184	0.142	1.527	2.031
	Mean		**1.472**	**1.500**	**0.296**	**0.306**	**0.774**	**9.966**	**0.020**	**0.021**	**1.195**	**1.159**	**0.681**	**1.024**	**0.132**	**1.416**	**1.923**
	SD		**0.152**	**0.130**	**0.036**	**0.028**	**0.087**	**0.763**	**0.003**	**0.003**	**0.078**	**0.063**	**0.115**	**0.095**	**0.013**	**0.067**	**0.064**
Male 2000 mg/kg	M06	291.89	1.525	1.541	0.359	0.293	0.754	8.674	0.018	0.021	1.194	1.127	0.670	1.015	0.101	1.571	1.911
	M07	254.86	1.484	1.452	0.311	0.284	0.632	9.245	0.017	0.017	1.056	1.007	0.539	0.899	0.119	1.244	1.771
	M08	304.32	1.422	1.437	0.304	0.321	0.650	9.027	0.018	0.019	1.124	1.087	0.619	0.983	0.109	1.495	2.103
	M09	296.66	1.497	1.521	0.318	0.312	0.674	11.166	0.020	0.019	1.210	1.217	0.845	1.120	0.132	1.334	1.900
	M10	307.58	1.483	1.448	0.289	0.274	0.573	10.334	0.017	0.017	1.110	1.133	0.779	1.116	0.118	1.545	1.979
	Mean		**1.482**	**1.480**	**0.316**	**0.297**	**0.657**	**9.689**	**0.018**	**0.019**	**1.139**	**1.114**	**0.690**	**1.027**	**0.116**	**1.438**	**1.933**
	SD		**0.038**	**0.047**	**0.026**	**0.020**	**0.066**	**1.033**	**0.001**	**0.001**	**0.063**	**0.076**	**0.123**	**0.094**	**0.012**	**0.142**	**0.121**

(g)

Group	No.	Body weight	uterus	ovary		Spleen	Liver	adrenal gland		Kidney		thymus	Heart	thyroid	Lung	Brain
				L	R			L	R	L	R					
Female control	F01	196.11	0.406	0.054	0.057	0.546	5.878	0.030	0.029	0.736	0.757	0.418	0.665	0.099	1.064	1.734
	F02	214.61	0.279	0.058	0.050	0.586	6.570	0.032	0.029	0.802	0.832	0.523	0.852	0.072	1.316	1.872
	F03	208.39	0.494	0.043	0.054	0.477	7.133	0.029	0.028	0.748	0.724	0.439	0.785	0.099	1.185	1.805
	F04	232.97	0.410	0.049	0.057	0.792	7.641	0.028	0.033	0.786	0.828	0.484	0.892	0.094	1.217	1.861
	F05	206.30	0.830	0.046	0.069	0.668	6.737	0.032	0.033	0.712	0.774	0.370	0.793	0.126	1.253	1.819
	Mean		**0.484**	**0.050**	**0.057**	**0.614**	**6.792**	**0.030**	**0.030**	**0.756**	**0.783**	**0.447**	**0.797**	**0.098**	**1.207**	**1.818**
	SD		**0.208**	**0.006**	**0.007**	**0.121**	**0.656**	**0.002**	**0.002**	**0.037**	**0.046**	**0.059**	**0.086**	**0.019**	**0.094**	**0.055**
Female 2000 mg/kg	F06	199.52	0.349	0.063	0.079	0.642	6.675	0.032	0.025	0.728	0.737	0.413	0.759	0.089	1.119	1.788
	F07	206.11	0.302	0.061	0.053	0.594	6.258	0.035	0.031	0.723	0.722	0.389	0.746	0.114	1.210	1.892
	F08	203.22	0.465	0.081	0.074	0.519	6.681	0.032	0.037	0.711	0.705	0.436	0.839	0.124	1.273	1.903
	F09	203.05	0.417	0.051	0.048	0.667	6.760	0.026	0.026	0.789	0.780	0.505	0.772	0.121	1.349	1.898
	F10	203.24	0.298	0.077	0.091	0.576	6.150	0.030	0.032	0.752	0.745	0.374	0.795	0.122	1.400	1.840
	Mean		**0.366**	**0.066**	**0.069**	**0.599**	**6.505**	**0.031**	**0.030**	**0.741**	**0.738**	**0.423**	**0.782**	**0.114**	**1.270**	**1.864**
	SD		**0.073**	**0.012**	**0.018**	**0.058**	**0.279**	**0.003**	**0.005**	**0.031**	**0.028**	**0.051**	**0.037**	**0.015**	**0.111**	**0.050**

Relative organ weights

(%)

Group	No.	Testis		epididymis		Spleen	Liver	adrenal gland		Kidney		thymus	Heart	thyroid	Lung	Brain
		L	R	L	R			L	R	L	R					
Male control 0 mg/kg	M01	0.685	0.680	0.134	0.141	0.367	5.293	0.009	0.009	0.567	0.581	0.363	0.507	0.072	0.721	0.978
	M02	0.691	0.683	0.157	0.142	0.319	4.457	0.009		0.555	0.533	0.298	0.432	0.066	0.659	0.893
	M03	0.744	0.795	0.158	0.169	0.417	4.349	0.009	0.009	0.546	0.520	0.395	0.482	0.057	0.654	0.900
	M04	0.561	0.619	0.113	0.132	0.315	4.201	0.009	0.009	0.527	0.503	0.220	0.434	0.051	0.585	0.805
	M05	0.813	0.777	0.139	0.140	0.419	5.350	0.012	0.012	0.634	0.609	0.348	0.574	0.069	0.740	0.985
	Mean	**0.699**	**0.711**	**0.140**	**0.145**	**0.367**	**4.730**	**0.009**	**0.010**	**0.566**	**0.549**	**0.325**	**0.486**	**0.063**	**0.672**	**0.912**
	SD	**0.093**	**0.073**	**0.019**	**0.014**	**0.051**	**0.548**	**0.001**	**0.001**	**0.041**	**0.044**	**0.068**	**0.059**	**0.009**	**0.062**	**0.074**
Male 2000 mg/kg	M06	0.764	0.772	0.180	0.147	0.378	4.347	0.009	0.010	0.598	0.565	0.336	0.509	0.050	0.787	0.958
	M07	0.720	0.705	0.151	0.138	0.307	4.485	0.008	0.008	0.512	0.489	0.262	0.436	0.058	0.603	0.859
	M08	0.700	0.707	0.149	0.158	0.320	4.442	0.009	0.009	0.553	0.535	0.304	0.484	0.054	0.736	1.035
	M09	0.737	0.749	0.157	0.154	0.332	5.499	0.010	0.009	0.596	0.599	0.416	0.552	0.065	0.657	0.936
	M10	0.730	0.712	0.142	0.135	0.282	5.084	0.008	0.009	0.546	0.557	0.383	0.549	0.058	0.760	0.974
	Mean	**0.730**	**0.729**	**0.156**	**0.146**	**0.324**	**4.772**	**0.009**	**0.009**	**0.561**	**0.549**	**0.340**	**0.506**	**0.057**	**0.709**	**0.952**
	SD	**0.024**	**0.030**	**0.015**	**0.010**	**0.036**	**0.500**	**0.001**	**0.001**	**0.036**	**0.041**	**0.061**	**0.048**	**0.005**	**0.076**	**0.064**

(%)

Group	No.	uterus	ovary		Spleen	Liver	adrenal gland		Kidney		thymus	Heart	thyroid	Lung	Brain
			L	R			L	R	L	R					
Female control 0 mg/kg	F01	0.138	0.018	0.019	0.186	1.999	0.010	0.010	0.250	0.257	0.142	0.226	0.034	0.362	0.590
	F02	0.098	0.020	0.018	0.207	2.317	0.011	0.010	0.283	0.293	0.184	0.300	0.025	0.464	0.660
	F03	0.172	0.015	0.019	0.166	2.483	0.010	0.010	0.260	0.252	0.153	0.273	0.034	0.412	0.628
	F04	0.139	0.017	0.019	0.268	2.586	0.009	0.011	0.266	0.280	0.164	0.302	0.032	0.412	0.630
	F05	0.258	0.014	0.022	0.208	2.097	0.010	0.010	0.222	0.241	0.115	0.247	0.039	0.390	0.566
	Mean	**0.161**	**0.017**	**0.019**	**0.207**	**2.297**	**0.010**	**0.010**	**0.256**	**0.265**	**0.152**	**0.270**	**0.033**	**0.408**	**0.615**
	SD	**0.060**	**0.003**	**0.001**	**0.038**	**0.249**	**0.001**	**0.000**	**0.023**	**0.022**	**0.026**	**0.033**	**0.005**	**0.038**	**0.037**
Female 2000 mg/kg	F06	0.120	0.022	0.027	0.220	2.287	0.011	0.009	0.249	0.252	0.141	0.260	0.031	0.383	0.613
	F07	0.119	0.024	0.021	0.233	2.456	0.014	0.012	0.284	0.283	0.153	0.293	0.045	0.475	0.742
	F08	0.153	0.027	0.024	0.170	2.195	0.011	0.012	0.234	0.232	0.143	0.276	0.041	0.418	0.625
	F09	0.140	0.017	0.016	0.225	2.279	0.009	0.009	0.266	0.263	0.170	0.260	0.041	0.455	0.640
	F10	0.097	0.025	0.030	0.187	1.999	0.010	0.011	0.245	0.242	0.122	0.258	0.040	0.455	0.598
	Mean	**0.126**	**0.023**	**0.024**	**0.207**	**2.243**	**0.011**	**0.010**	**0.255**	**0.255**	**0.146**	**0.269**	**0.039**	**0.437**	**0.644**
	SD	**0.022**	**0.004**	**0.005**	**0.027**	**0.166**	**0.002**	**0.002**	**0.020**	**0.020**	**0.018**	**0.015**	**0.005**	**0.036**	**0.057**

12.참고문헌

1. 식품의약품안전청고시 제2000-60호 “의약품 등의 독성시험기준(2005년 10월 21일 제정)”

나. 흰쥐에서 JGB의 생체내 안전성 검증 - 반복투여 독성 검증

검증시험 결과 요약:

본 시험에서는 JGB의 암 • 수 랫드에 있어서 4주 반복 경구 투여 독성 시험을 수행하였다. 시험물질은 고농도 1,000 mg/kg, 중농도 500 mg/kg 및 저농도 250 mg/kg의 용량으로 암, 수 각각에 경구로 1일 1회, 주 7회로 4주 경구 투여 하여 28일 동안 관찰하였다.

본 시험을 위해 4주 반복 경구 투여와 함께 28일의 시험기간 내

1. 일일 임상증상 관찰
2. 체중 변화
3. 사료 및 음수 섭취량
4. 부검 시 장기 육안 소견 및 조직병리 검사
5. 절대 장기 및 상대장기 중량 변화
6. 혈액학적 및 혈액 생화학 검사
7. 뇨검사 등이 수행·분석되었다. 모든 시험방법은 식품의약품안전청 고시 제2000-60호 "의약품 등의 독성시험기준(2005년 10월 21일 제정)"에 준하여 실시하였다.

상기의 결과를 종합해 보면 암 • 수 랫드의 모든 시험물질 투여군에서 사망예, 임상증상, 체중변화, 장기의 육안적 소견 및 조직병리 검사, 혈액학적인 변화 및 혈액생화학적인 검사에서 시험물질 투여에 기인한다고 사료되는 특기할 만한 이상 및 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터, 시험물질인 JGB는 랫드를 이용한 반복투여 경구독성시험에서 어떠한 독성 및 부작용도 유발하지 않는 안전한 제제로 판단된다.

시험 과정 및 결과

1.시험목적

본 시험에서는, 관절염치료 생약 후보물질인 JGB를 설치류인 암 • 수 랫드를 이용하여 4주 반복 경구투여 후 야기되는 독성여부를 평가하고자 하였다.이에 본 연구에서는 생체의 안전성 여부를 검토하기 위하여 시험물질을 1,000, 500 및 250 mg/kg의 투여용량으로 설정하고 경구 독성시험을 실시하였다.

2.시험계

가. 종 및 계통

1) 종, 계통(공급처) : Rat, Sprague-Dawley rat.

2) 구입처

가) 상호 : (주)샘타코바이오코리아

나) 주소 : 경기 오산시 서랑동 77-1

나. 구입시동물수(성별), 주령 및 체중범위 : 10마리 (수컷), 5주령, 126 ± 5 g
10마리 (암컷), 5주령, 120 ± 5 g

다. 투여시동물수(성별), 주령 및 체중범위 : 10마리 (수컷), 5주령, 196 ± 10 g
10마리 (암컷), 5주령, 170 ± 5 g

라. 시험계 선정이유 : SD rat은 독성시험 동물로 가장 표준화되고 폭넓게 연구된 모델로서 실험 적용에 있어 재현성과 안정성이 뛰어나고, 독성 시험에 있어 비교할 만한 시험 기초 자료가 축적되어 있어 선택하였다.

3. 동물실험윤리

본 실험은 동물보호법 (제정 1991년 5월 31일 법률 제4397호, 일부개정 2008년 2월 29일 법률 제8852호)를 근거하여 충북대학교 동물시험윤리위원회에 의해 승인되었다.
(승인번호 : CBNUA-118-0907-01)

4. 동물실 환경조건 [CBNU SOP-20-002]

가. 동물실 번호	SPF- 326
나. 사용 사육케이지 종류 및 크기	polysulfon cage (420 x 280 x 200 mm)
다. 설정온도	22 ± 2 ℃
라. 습도	50 ± 20 %
마. 환기방식 및 회수	10회/hr
바. 조명시간 및 명암주기	12hr/day/night

사. 조도 150 - 300 lux

5.시험물질및사료

가. 시험물질은 시험의뢰자가 제공한 시험물질을 별도의 처리 없이 그대로 사용하였다.

나. 시험의뢰자가 제공한 시험물질의 안정성 및 균질성 분석은 별도로 시행하지 않았다.

다. 시험물질 및 시험물질과 관련된 아래 정보는 시험 의뢰자 측에서 제공된 정보를 근거로 작성하였다.

시험물질	**관절염 치료 생약후보물질**
공급원	충남대
외관 및 성상	갈색 분말
안정성	안정
보관조건	상온 보관
취급 시 주의사항	햇빛에 노출되지 않고 교차 오염을 방지를 위해 밀봉하여 보관하되 시험 소요량만을 필요시 소분하여 사용하였다.
잔여시험물질의 처리	시험 의뢰자측에 반환

라. 사료 및 음수 [CBNU SOP-11-009]

실험동물용 쥐사료 (Agribrands Purina Korea Inc. Analysis Service of Central Laboratory; 경기도 평택시 장당동 627)를 자유 공급하고 여과 멸균된 정제수를 폴리카보네이트제 음수병(250 ml)에 넣어 자유 섭취시켰다.

6.시험군의구성 (R : Rat, T : Toxicity, M : Male, F : Female)

군	투여용량	투여 액량	동물수	동물번호
대조군	0	10 ml/kg	10 (male 5, female 5)	RTM 1 - RTM 5 RTF 1 - RTF 5
시험물질 투여군	250 mg/kg	10 ml/kg	10 (male 5, female 5)	RTM 6 - RTM 10 RTF 6 - RTF 10
	500 mg/kg	10 ml/kg	10 (male 5, female 5)	RTM 11 - RTM 15 RTF 11 - RTF 15
	1000 mg/kg	10 ml/kg	10 (male 5, female 5)	RTM 16 - RTM 20 RTF 16 - RTF 20

7. 시험 방법

본 시험은 식품의약품안전청 고시 제2000-60호 "의약품 등의 독성시험기준(2005년 10월 21일 제정)"에 준하여 실시하였다.

가. 검역 및 순화 [CBNU SOP-40-001]

1) 동물입수 시 모든 동물의 일반건강상태에 대한 수의학적 검역을 실시하였다.
2) 시험을 실시하는데 적합하고 건강한 동물을 선별하기 위하여 1주간의 순화기간을 두었다.

나. 군 분리 및 개체식별 [CBNU SOP-40-002, CBNU SOP-40-003]

1) 순화종료 후, 시험물질 투여 직전 일에 체중을 측정하여 체중을 기준으로 Z배열법에 따라
군 분리하고 개체식별은 피모 마킹법을 사용하였다.
2) 군 분리된 동물은 사육 상자 당 2 ~ 5마리 이내로 사육하였다.

다. 시험물질의 조제 [CBNU SOP-40-035]

1) 용매 및 부형제: 생리식염수
2) 용량: 10 ml/kg

라. 시험물질 투여 및 근거 [CBNU SOP-40-014]

1) 12시간 절식 후 sonde를 이용한 위내투여로 10시에서 12시 사이에 1일 1회 1주간에 7회, 4주 반복 투여하였다.
2) 임상예정 경로: 인체 적용경로가 경구이므로 경구 경로를 택하여, 식품의약품안전청 고시 제2000-60호 "의약품등의 독성시험기준 (2005년 10월 11일 제정)"에 준하여 선택하였다.

마. 투여량 산출

투여량의 산출은 투여 직전의 랫드의 체중을 기준으로 하여, 1,000 mg/kg을 최고용량(투여액량 : 10 ml/kg, B.W.)으로 설정하고 공비 0.2로 중용량군과 저용량군을 설정하였다. 용매 대조군에는 생리식염수만을 투여하였다.

바. 일일 임상증상 관찰 [CBNU SOP-40-006]

1) 투여 후 개별 동물에 대한 임상증상 관찰 및 기록을 실시하였다.,
2) 시험물질 투여 후 최초일부터 8일까지는 매일 2회씩 일반상태의 변화, 중독증상, 운동성, 외관, 자율신경 및 사망동물의 유무를 주의깊게 관찰하였다.

사. 체중, 음수·사료 소비량 측정 [CBNU SOP-40-004, CBNU SOP-40-005]

1) 체중 측정은 시험물질 투여 직전, 첫 회 투여 24시간 후를 포함하여 주 1회 실시하고 모든 체중 측정은 시험물질 투여 전에 실시하였다.

2) 음수·사료 소비량 측정은 주 1회 실시하고 시험물질 투여 후 공급량을 측정하고 익일 시험물질 투여 후 잔량을 측정하여 cage별 소비량을 산출하는 방식(g/cage/day)으로 측정하였다.

아. 사망 및 빈사개체의 처리

1) 시험기간 중 사망한 개체에 대하여는 가능한 정확한 사망시간을 기록하고 부검을 실시하여 소견을 기록하고 병리조직검사를 실시하여 그 결과를 기록하도록 하였다.
2) 빈사상태의 시험동물은 부검하여 조직학적 검사를 실시하도록 하였다.

자. 부검 및 검체의 채취

1) 부검 시 마취는 diethyl ether를 사용하였다.
2) 혈액검체의 채취는 마취된 동물을 개복하여 복대동맥에서 10ml 용량의 syringe사용하여 채혈한 후 SST (serum separate tube), Sod. citrate tube, EDTA tube에 나누어 담은 후, SST, Sod. citrate tube의 혈액은 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청 및 혈장을 분리하고 분석 시까지 동결 보관하였다.
3) 채혈이 종료된 동물은 마취가 유지된 상태에서 복대동맥 및 정맥을 절단하여 방혈치사 하였다.
4) 뇌, 간, 비장, 부신, 신장, 고환(자궁), 부고환(난소), 갑상선, 흉선, 심장, 폐를 적출하여 무게측정 후 10% Neutral buffered formalin(10% NBF)에 침수 고정하였다.

차. 장기무게 측정 및 조직 병리학적 검사 [CBNU SOP-40-030 - CBNU SOP-40-034]

1) 부검 시 육안소견 및 부검장기에 대한 무게 측정을 실시하였다.
2) 10% NBF에 고정된 조직은 대조군, 고농도 투여군과 임상증상에서 특이사항이 관찰된 개체를 포함하여 고정 후 조직처리, 포매, 박절의 과정을 거쳐 4μm의 절편을 얻어 Hematoxylin and Eosin stain을 실시하여 광학현미경상에서 관찰하였다.
3) 먼저 고농도 군에서 조직병리 검사를 수행하고, 고농도 군에서 독성이 확인되는 경우에는 아랫 단계의 농도에 대하여 순차적으로 조직 병리검사를 수행하기로 하였다.

파. 혈액학적 및 혈액생화학적 검사 [CBNU SOP-40-042, CBNU SOP-40-043]

1) EDTA처리된 whole blood를 advia 2120(Bayer, Leverkusen, Germany)를 사용하여 RBC, WBC, lymphocyte, neutrophil, basophil, monocyte, eosinophil, platelet을 계수하고 hematocrit, hemoglobin, MCV, MCH, MCHC를 검사하였다.

- 총적혈구수 (Total erythrocyte count : RBC) $\times 10^6/\mu\ell$
- 혈색소량 (Hemoglobin concentration : Hb) g/dℓ
- 헤마토크리트치 (Hematocrit : Hct, PCV) %
- 적혈구지수 (RBC indices)

- 평균적혈구용적 (Mean cell volume : MCV) fL

- 평균적혈구헤모글로빈량 (Mean cell hemoglobin : MCH) pg
- 평균적혈구헤모글로빈농도 (Mean cell hemoglobin concentration : MCHC) g/dℓ

· 총백혈구수 (Total leucocyte count : WBC) $\times 10^3/\mu\ell$
· 혈소판수 (Platelet : PLT) $\times 10^3/\mu\ell$

2) HITACHI 7080 autoanalyzer(HITACHI, Tokyo, Japan)를 사용하여 혈청 glucose, total protein, albumin, triglyceride, total cholesterol, AST, ALT, ALP, creatinine, blood urea nitrogen, total-bilirubin, calcium, phosphorus를 측정하였다.

· 알라닌 아미노기전이효소 (Alanine aminotransferase : ALT) U/L
· 아스파테이트 아미노기전이효소 (Aspartate aminotranferase : AST) U/L
· 알칼린 포스파타제 (Alkaline phosphatase : ALP) U/L
· 감마글루타밀트란스펩티다제 (ã -glutamyltranspeptidase : ã-GT) U/L
· 락테이트탈수소효소 (Lactate dehydrogenase: LDH) U/L
· 혈액요소질소 (Blood Urea nitrogen : BUN) mg/dL
· 크레아티닌 (Creatinine: CRE) mg/dL
· 총빌리루빈 (Total bilirubin : T-Bili) mg/dL
· 총단백 (Total protein : TP) g/dL
· 총콜레스테롤 (Total cholesterol : T-Chol) mg/dL
· 트리글리세라이드 (Triglycerides : TG) mg/dL
· 인 (Phosphorus : P) mg/dL
· 칼슘 (Calcium : Ca) mg/dL

하. 혈액 응고계 검사 [CBNU SOP-40-044]

ACL1000 Coagulation System(Beckman Coulter, California, USA)와 Sod. citrate 처리된 혈장을 사용하여 APTT(Activated partial thromboplastin time) 및 PT(Prothrombin time)를 검사하였다.

타. 뇨검사 [CBNU SOP-40-045]

Clinictek 500(Bayer, Leverkusen, Germany)을 사용하여 specific gravity, pH, leukocyte, nitrite, protein, glucose, ketone, urobilinogen, bilirubin, blood, hemoglobin 치를 검사하였다.

8. 통계학적 분석

모든 실험 결과는 평균치 ± 표준편차로 표시하고 모든 자료들에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하며, 분산이 동질성을 갖는 경우 one-way analysis of variance(ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군 과의 유의차가 있는 시험군을 알아내기 위하여 Dunnett's t-test를 실시하였다.

9. 시험결과 및 고찰

(1) 사망률(Table 1)

체중 kg 당 1,000mg(투여액량 10 ml/kg B.W.)을 고용량으로 랫드에 경구 투여시, 랫드의 암·수 모두에서 사망예가 관찰되지 않아 사망율 산정은 불가능하였다.

(2) 임상증상(Table 2- Table 3)

시험물질의 경구 투여 직후와 이후 시험 전 기간을 통하여 시험물질을 투여한 암·수 모든 투여군에서 본 시험물질에 의한 특이한 임상증상은 나타나지 않았다.

(3) 체중변화(Figure 1)

시험 전 기간을 통하여 랫드의 암·수 모든 처치군에서, 각 군 간에 유의성 있는 체중변화는 나타나지 않았다.

(4) 사료 및 음수량 변화(Figure 2, Figure 3)

시험 전 기간을 통하여 랫드의 암·수 모든 처치군에서, 각 군 간에 유의성 있는 사료 및 음수량 변화는 나타나지 않았다.

(5) 육안 부검 소견(Table 4)(Figure 4 - Figure 10 - 장기 사진 원본-파일용량 관계로 첨부 못함 -필요시 추후 별도의 경로로 원본사진 파일 제시 가능)

전 생존동물의 부검에서 본 시험물질의 4주 반복 경구 투여에 기인한다고 사료되어지는 어떠한 유의할 만한 육안적인 이상소견은 관찰되지 않았다.

(6) 장기무게(Table 5 - Table 8)

전 생존동물의 부검에서 본 시험물질의 4주 반복 경구 투여에 기인한다고 사료되어지는 어떠한 유의할 만한 장기무게 변화는 관찰되지 않았다.

(7) 혈액생화학적 변화(Table 9 - Table 10)

암·수 모든 처치군과 대조군의 혈액생화학적인 검사에서 암컷 고농도 처치군인 1000 mg/kg군에서 대조군과의 비교 시 glucose의 유의성 있는 증가가 나타났다($P < 0.05$). 하지만 다른 암컷 다른 군에서 농도 의존적인 모습이 나타나지 않았고, 수컷 처치 군 등에서 유의할만한 변화가 나타나지 않는 점으로 보아 시험물질 투여에 기인하는 것으로 생각할 수는 없었다.

기타 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 혈액생화학적인 변화는 인정되지 않았다.

(8) 혈액학적 변화(Table 11 - Table 12)

암·수 모든 처치군과 대조군의 혈액학적인 검사에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 혈액학적인 변화는 인정되지 않았다.

(9) 혈액 응고계 검사(Table 13)

암·수 모든 처치군과 대조군의 혈액 응고계 검사에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 변화는 인정되지 않았다.

(10) 뇨검사(Table 14)

암·수 모든 처치군과 대조군의 각 뇨검사 측정항목에 있어서 대부분 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었다

(11) 조직병리 검사(Figure 11 - Figure 20 - 조직병리사진 원본 첨부 완료)

육안적 소견상 농도에 따른 변화가 인정되지 않아 고농도군과 대조군의 간, 심장, 비장, 폐, 뇌, 고환, 갑상선, 흉선 등에 대하여 병리조직 검사를 실시하였다. 전 장기의 독성병리학적인 검사에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 변화는 인정되지 않았다.

본 연구는 관절염치료 생약 후보물질의 랫드에 대한 반복 투여 경구독성을 조사하기 위하여 관절염치료 생약 후보물질을 생리식염수에 용해시켜, 체중 kg 당 1,000 mg/kg을 고농도로, 500 mg/kg을 중농도로, 250 mg/kg을 저농도로 설정한 후 경구로 암·수 각각에 1일 1회 주 7회, 4주 투여한 후, 총 투여기간 28일 동안 관찰하였다. 시험결과에 있어 랫드의 모든 시험물질 투여군에서 사망예, 임상증상, 사료, 음수량의 변화, 체중변화, 육안적 소견 및 뇨검사 변화, 혈액학적인 변화, 혈액생화학적인 변화, 혈액 응고계 검사 및 조직병리 검사에서 시험물질 투여에 의해 기인한다고 사료되는 특기할 만한 이상은 관찰되지 않았다.

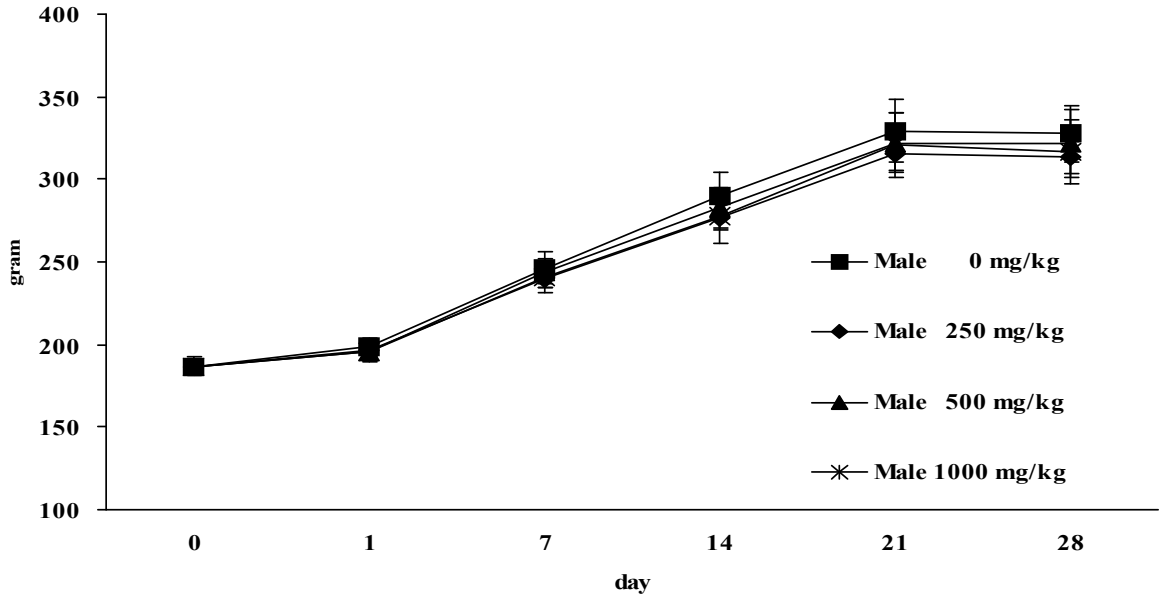
이상의 결과로부터 JGB의 4주간 반복 경구투여 독성시험을 랫드를 이용하여 실시한 결과, 본시험의 조건하에서는 어떠한 독성 및 부작용을 유발하지 않는 안전한 제제로 사료된다.

10.기타사항

가.시험기록및자료의보존[CBNU SOP-40-039]

1) 보존기간 : 시험종료 후 5년
2) 보존장소 : 충북대학교 실험동물연구지원센터 자료실
3) 보존자료 LIST
   가) 시험계획서 원본 및 변경기록(변경한 경우) 나) 시험물질 관련 자료
   다) 동물입수 관련 자료 라) 시험진행 및 결과 관련 자료
   마) 사료 및 음수 분석 결과 바) 기타

(부록) Figures and Tables



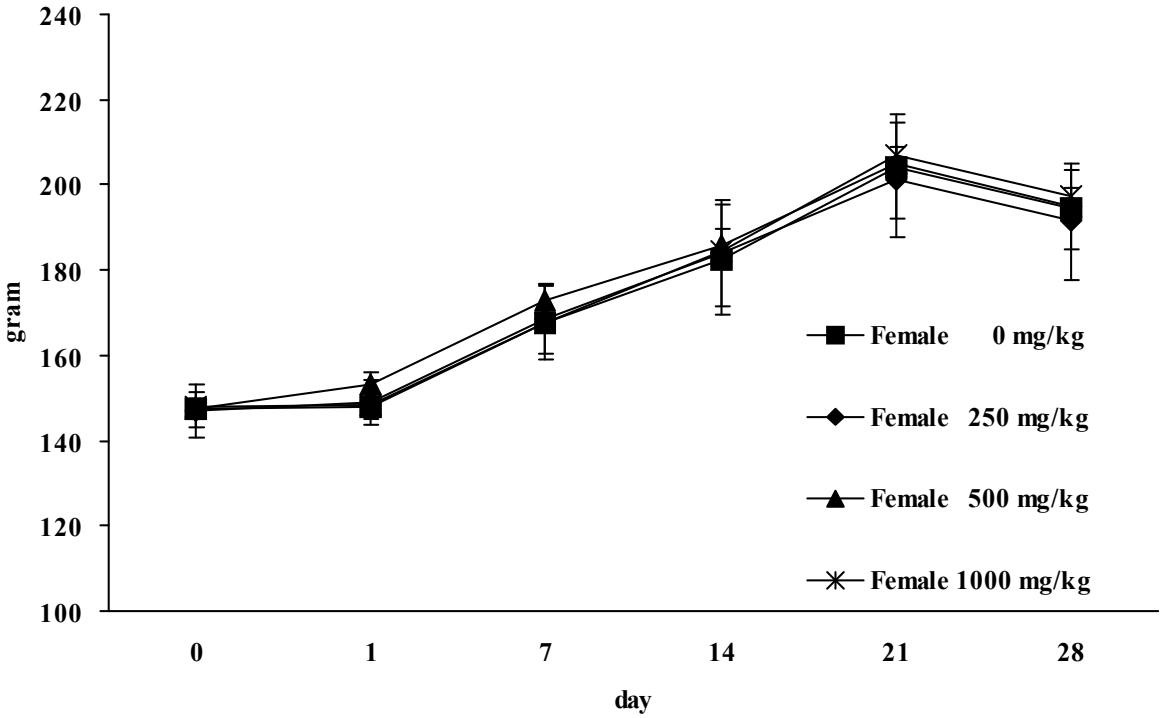
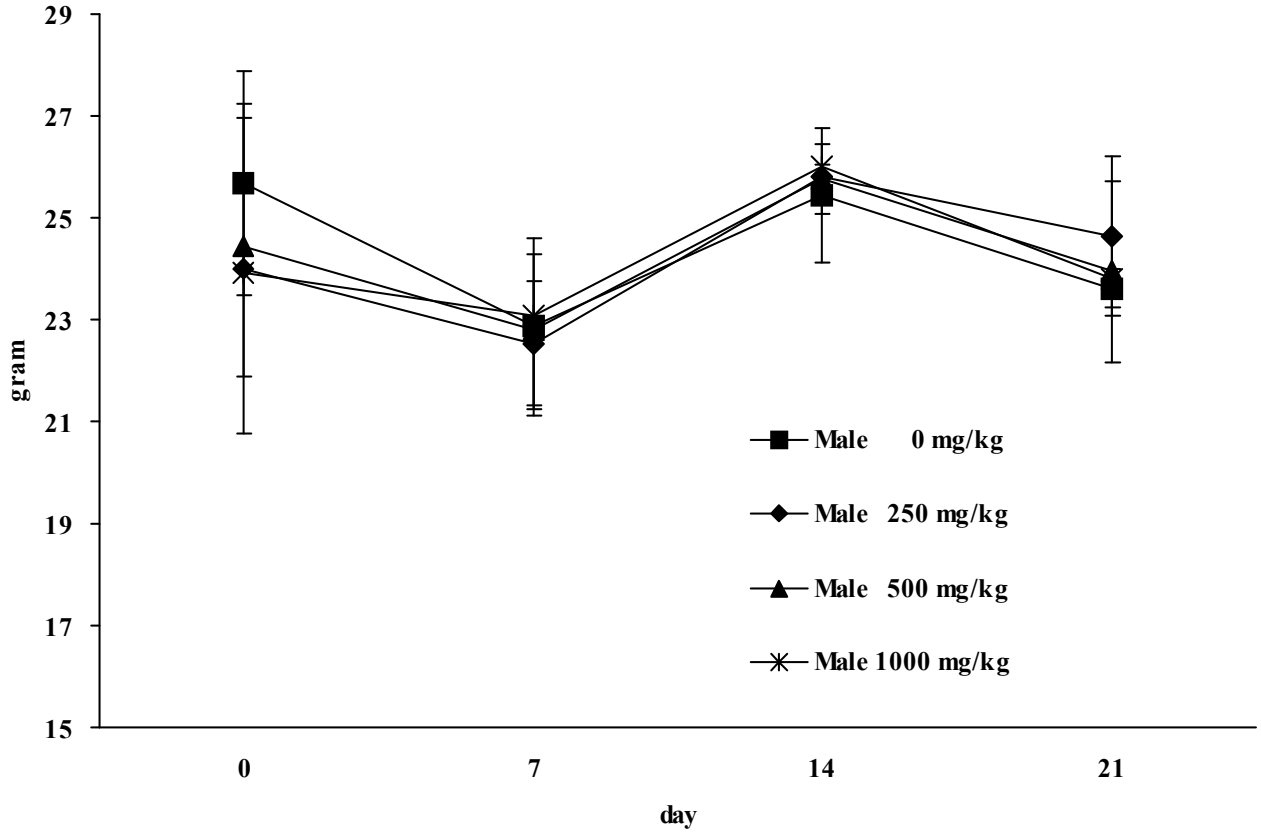


Fig. 1. Changes in body weight of SD-rat treated with test materials 4 weeks. Data are expressed as mean ± SD (n = 5).



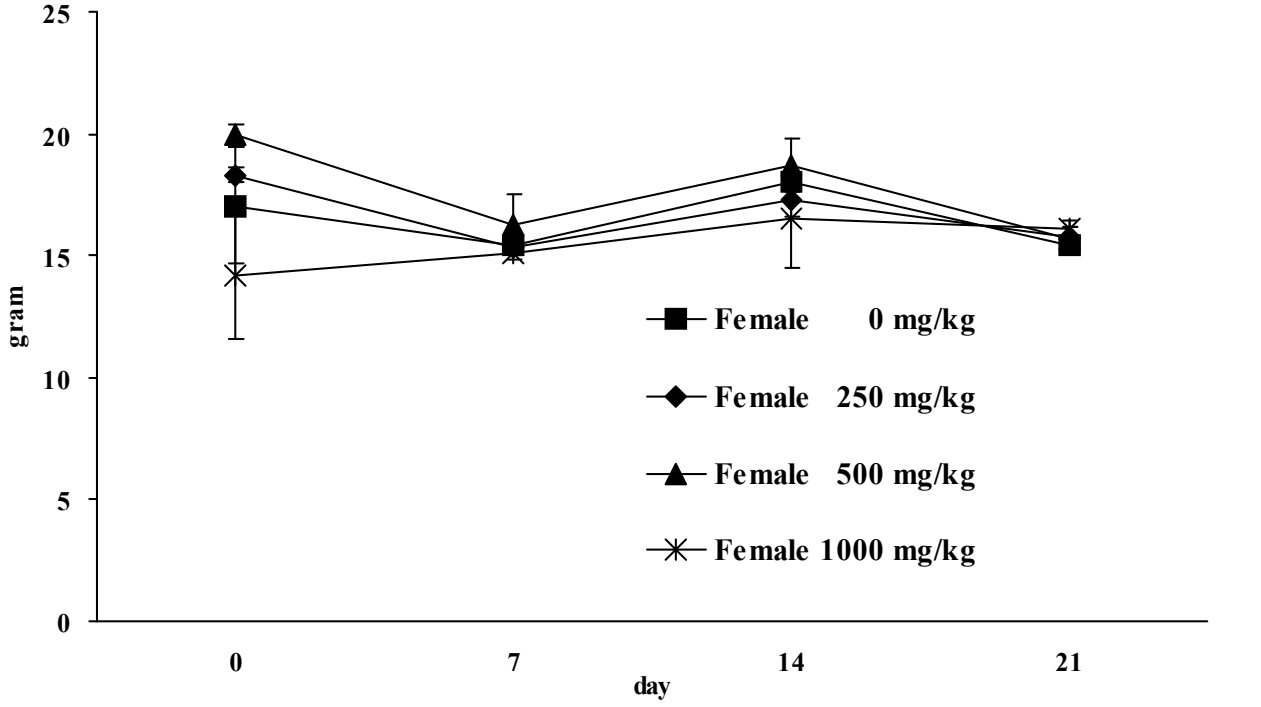


Fig. 2. Changes in food consumption level of SD-rat treated with test materials 4 weeks. Data are expressed as mean ± SD (n = 5).

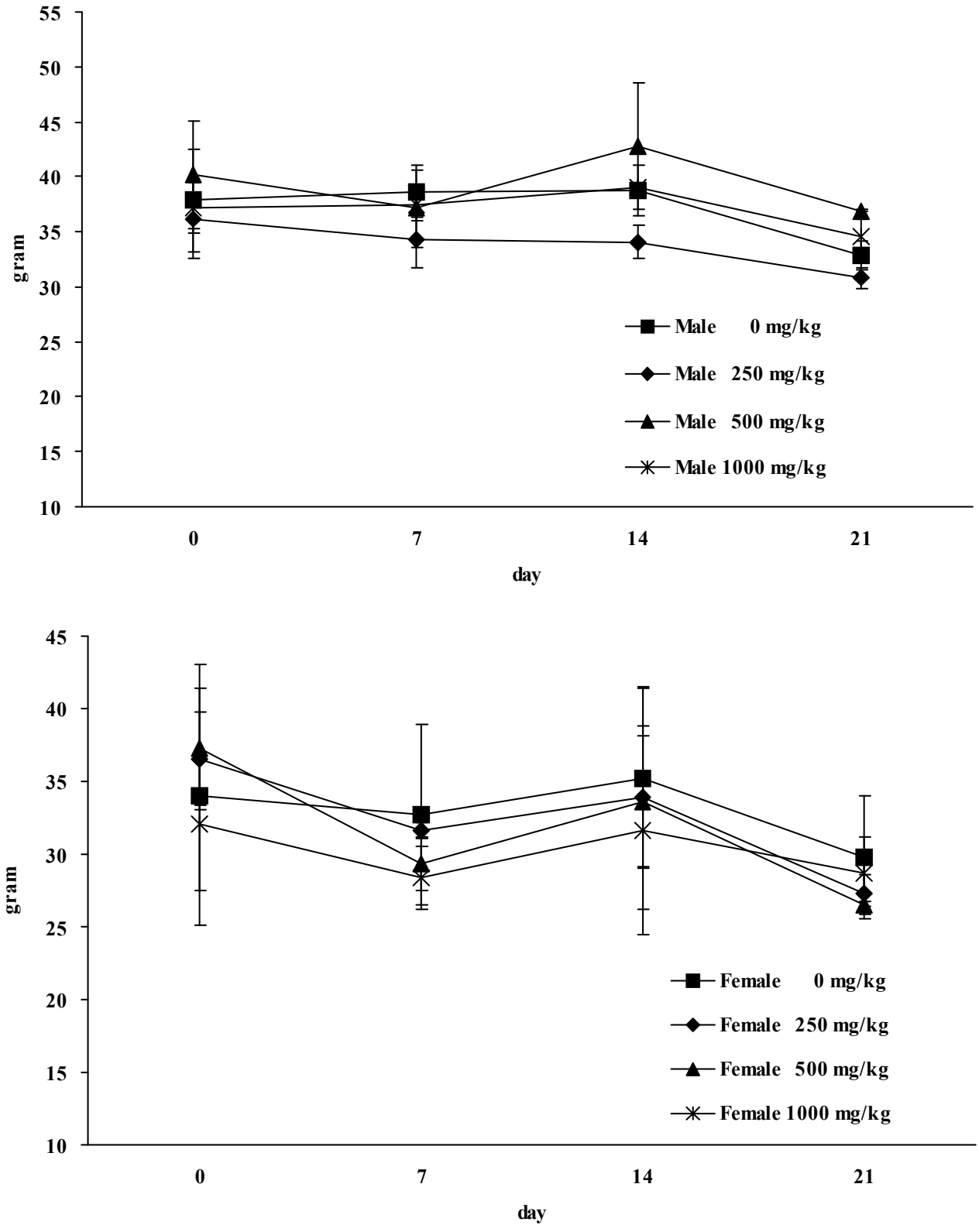


Fig. 3. Changes in water consumption level of SD rat treated with test materials 4 weeks. Data are expressed as mean ± SD (n = 5).

Table 1. Mortality in SD rats administered orally with test materials for 4 weeks

Animal species	Group	Dose (mg/kg)	Final Mortality		Total mortality(%)
			Male	Female	
Rats	Test materials	1,000	0/5	0/5	0
		500	0/5	0/5	0
		250	0/5	0/5	0
	Control	0	0/5	0/5	0

Table 2. Clinical findings in male SD rats administered orally with test materials for 4 weeks

Treatment day	Dose (mg/kg)			
	1000	500	250	0 (Control)
1 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
2 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
3 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
4 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
5 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
6 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
7 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
8 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
9 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
10 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
11 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
12 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
13 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
14 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5

Treatment day	Dose (mg/kg)			
	1000	500	250	0 (Control)
15 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
16 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
17 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
18 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
19 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
20 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
21 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
22 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
23 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
24 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
25 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
26 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
27 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
28 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5

Table 3. Clinical findings in female SD rats administered orally with test materials for 4 weeks

- : No abnormality was detected

Treatment day	Dose (mg/kg)			
	1000	500	250	0 (Control)
1 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
2 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
3 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
4 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
5 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
6 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
7 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
8 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
9 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
10 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
11 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
12 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
13 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
14 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5

Treatment day	Dose (mg/kg)			
	1000	500	250	0 (Control)
15 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
16 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
17 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
18 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
19 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
20 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
21 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
22 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
23 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
24 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
25 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
26 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
27 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5
28 day				
No. of observations	5	5	5	5
No gross findings	5	5	5	5

Table 4. Gross Findings of necropsy in SD male rats administered orally with **test materials**

Organ	Sex	Male		Female	
	Dose(mg/kg B.W.)	2,000	Control	2,000	Control
Brain	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Kidney-Left	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Kidney-Right	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Heart	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Lung	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Spleen	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Liver	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Stomach	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Intestine	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Pancreas	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Adrenal gland (left)	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Adrenal gland (right)	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Pituitary gland	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Testis-L	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Testis-R	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5
Other organs	No. of observations	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5

NO : No. of observations

NGF : No gross findings

Table 5. Absolute organ weight in male SD-rats administered orally with **test materials**

(Unit : g)

Organs	Dose (mg/kg)			
	1000	**500**	**250**	**0 (control)**
Final weights	316.938 ± 19.760	321.866 ± 20.474	313.256 ± 9.750	327.694 ± 16.599
Testis-L	1.825 ± 0.056	1.816 ± 0.155	1.766 ± 0.076	1.828 ± 0.091
Testis-R	1.865 ± 0.090	1.848 ± 0.161	1.774 ± 0.092	1.830 ± 0.089
Epidermidis-L	0.494 ± 0.027	0.507 ± 0.034	0.484 ± 0.029	0.456 ± 0.039
Epidermidis-R	0.481 ± 0.019	0.502 ± 0.021	0.482 ± 0.035	0.457 ± 0.032
Spleen	0.704 ± 0.102	0.701 ± 0.076	0.634 ± 0.077	0.658 ± 0.078
Liver	9.916 ± 1.234	10.362 ± 1.226	9.521 ± 0.291	10.259 ± 1.089
Adrenal-L	0.019 ± 0.006	0.023 ± 0.004	0.020 ± 0.002	0.025 ± 0.004
Adrenal-R	0.022 ± 0.004	0.030 ± 0.013	0.020 ± 0.002	0.024 ± 0.003
Kidney-L	1.107 ± 0.066	1.161 ± 0.113	1.166 ± 0.031	1.174 ± 0.076
Kidney-R	1.123 ± 0.091	1.178 ± 0.069	1.182 ± 0.038	1.190 ± 0.060
Thymus	0.513 ± 0.099	0.512 ± 0.076	0.529 ± 0.078	0.504 ± 0.072
Heart	1.191 ± 0.116	1.158 ± 0.082	1.112 ± 0.073	1.147 ± 0.107
Thyroid	0.130 ± 0.017	0.134 ± 0.012	0.115 ± 0.016	0.133 ± 0.017
Lung	1.551 ± 0.121	1.456 ± 0.100	1.439 ± 0.066	1.515 ± 0.136
Brain	1.820 ± 0.060	1.842 ± 0.027	1.852 ± 0.065	1.808 ± 0.037

Table 6. Absolute organ weight in female SD-rats administered orally with **test materials**

(Unit : g)

Organs	Dose (mg/kg)			
	1000	**500**	**250**	**0 (control)**
Final weights	197.478 ± 11.405	195.136 ± 4.077	191.370 ± 13.833	194.328 ± 9.276
Uterus	0.628 ± 0.375	0.559 ± 0.284	0.558 ± 0.114	0.771 ± 0.301
Obary-L	0.058 ± 0.012	0.062 ± 0.009	0.062 ± 0.013	0.059 ± 0.009
Obary-R	0.057 ± 0.011	0.059 ± 0.002	0.063 ± 0.012	0.060 ± 0.013
Spleen	0.547 ± 0.038	0.529 ± 0.062	0.551 ± 0.083	0.509 ± 0.095
Liver	5.743 ± 0.376	5.711 ± 0.305	5.384 ± 0.509	5.548 ± 0.583
Adrnal-L	0.027 ± 0.006	0.028 ± 0.002	0.029 ± 0.005	0.031 ± 0.004
Adrnal-R	0.029 ± 0.007	0.028 ± 0.002	0.029 ± 0.002	0.028 ± 0.002
Kidney-L	0.674 ± 0.021	0.709 ± 0.047	0.687 ± 0.082	0.680 ± 0.040
Kidney-R	0.697 ± 0.030	0.706 ± 0.054	0.691 ± 0.038	0.654 ± 0.043
Thymus	0.381 ± 0.043	0.322 ± 0.050	0.333 ± 0.025	0.335 ± 0.050
Heart	0.783 ± 0.053	0.773 ± 0.038	0.785 ± 0.058	0.803 ± 0.041
Thyroid	0.094 ± 0.018	0.080 ± 0.032	0.087 ± 0.026	0.102 ± 0.009
Lung	1.138 ± 0.047	1.163 ± 0.037	1.171 ± 0.064	1.183 ± 0.106
Brain	1.691 ± 0.046	1.743 ± 0.073	1.682 ± 0.063	1.702 ± 0.038

Table 7. Relative organ weight in male SD-rats administered orally with **test materials**

(Unit : %)

Organs	Dose (mg/kg)			
	1000	**500**	**250**	**0 (control)**
Testis-L	0.577 ± 0.031	0.565 ± 0.046	0.564 ± 0.035	0.558 ± 0.024
Testis-R	0.590 ± .038	0.574 ± 0.038	0.567 ± 0.043	0.559 ± 0.030
Epidermidis-L	0.156 ± 0.009	0.158 ± 0.015	0.154 ± 0.007	0.139 ± 0.009
Epidermidis-R	0.152 ± 0.014	0.157 ± 0.013	0.154 ± 0.012	0.140 ± 0.010
Spleen	0.222 ± 0.028	0.218 ± 0.014	0.203 ± 0.026	0.201 ± 0.023
Liver	3.122 ± 0.242	3.211 ± 0.181	3.041 ± 0.118	3.126 ± 0.218
Adrnal-L	0.006 ± 0.002	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.000	0.008 ± 0.001
Adrnal-R	0.007 ± 0.001	0.009 ± 0.004	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001
Kidney-L	0.350 ± 0.021	0.361 ± 0.025	0.373 ± 0.021	0.358 ± 0.017
Kidney-R	0.354 ± 0.022	0.366 ± 0.011	0.377 ± 0.015	0.363 ± 0.013
Thymus	0.163 ± 0.035	0.160 ± 0.026	0.168 ± 0.021	0.154 ± 0.019
Heart	0.375 ± 0.015	0.360 ± 0.006	0.355 ± 0.014	0.350 ± 0.024
Thyroid	0.041 ± 0.005	0.042 ± 0.004	0.037 ± 0.005	0.041 ± 0.005
Lung	0.489 ± 0.014	0.453 ± 0.024	0.459 ± 0.014	0.464 ± 0.058
Brain	0.576 ± 0.042	0.574 ± 0.042	0.591 ± 0.019	0.552 ± 0.022

Table 8. Relative organ weight in female SD-rats administered orally with **test materials**

(Unit : %)

Organs	Dose (mg/kg)			
	1000	**500**	**250**	**0 (control)**
Uterus	0.311 ± 0.171	0.287 ± 0.149	0.293 ± 0.065	0.399 ± 0.158
Obary-L	0.029 ± 0.005	0.032 ± 0.004	0.032 ± 0.006	0.030 ± 0.004
Obary-R	0.029 ± 0.005	0.030 ± 0.001	0.033 ± 0.005	0.031 ± 0.006
Spleen	0.278 ± 0.026	0.272 ± 0.036	0.289 ± 0.040	0.261 ± 0.038
Liver	2.909 ± 0.120	2.926 ± 0.117	2.810 ± 0.081	2.853 ± 0.243
Adrnal-L	0.014 ± 0.003	0.014 ± 0.001	0.015 ± 0.002	0.016 ± 0.002
Adrnal-R	0.015 ± 0.003	0.014 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.015 ± 0.001
Kidney-L	0.342 ± 0.020	0.363 ± 0.021	0.358 ± 0.022	0.351 ± 0.024
Kidney-R	0.353 ± 0.014	0.361 ± 0.023	0.362 ± 0.014	0.337 ± 0.022
Thymus	0.193 ± 0.014	0.165 ± 0.023	0.175 ± 0.019	0.172 ± 0.021
Heart	0.397 ± 0.036	0.396 ± 0.015	0.410 ± 0.010	0.413 ± 0.023
Thyroid	0.048 ± 0.008	0.041 ± 0.017	0.045 ± 0.013	0.052 ± 0.004
Lung	0.577 ± 0.016	0.596 ± 0.019	0.613 ± 0.034	0.608 ± 0.035
Brain	0.859 ± 0.059	0.893 ± 0.032	0.881 ± 0.039	0.878 ± 0.054

Table 9. Biochemical serum values in male SD-rats administered orally with test materials for 4 weeks

Items	Dose (mg/kg)			
	1000	500	250	0 (control)
Albumin (g/dl)	3.78 ± 0.33	3.78 ± 0.79	3.44 ± 0.35	3.86 ± 0.18
ALP (IU/L)	299.58 ± 43.37	332.18 ± 65.65	292.44 ± 51.76	359.68 ± 64.53
Calcium (mg/dl)	10.12 ± 0.90	9.58 ± 1.42	8.16 ± 0.92	9.34 ± 0.32
Creatinine (mg/dl)	0.42 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.36 ± 0.05	0.44 ± 0.05
Glucose (mg/dl)	108.22 ± 9.24	109.00 ± 10.22	101.14 ± 8.65	95.74 ± 9.19
AST (IU/L)	102.82 ± 19.38	88.06 ± 21.34	95.44 ± 10.44	127.34 ± 34.70
ALT (IU/L)	48.78 ± 7.14	44.92 ± 7.53	41.70 ± 6.01	49.14 ± 7.38
LDH (U/L)	706.66 ± 197.95	598.76 ± 285.02	985.48 ± 234.37	1342.02 ± 600.98
Phosphorous (mg/dl)	7.16 ± 0.17	6.70 ± 0.96	6.64 ± 0.84	7.20 ± 0.78
T-Bilirubin (mg/dl)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Cholesterol (mg/dl)	89.24 ± 13.52	90.62 ± 11.2	73.02 ± 12.03	84.44 ± 7.04
T-Protein (g/dl)	6.26 ± 0.63	6.26 ± 0.77	5.44 ± 0.72	6.24 ± 0.25
Triglyceride (mg/dl)	47.92 ± 13.58	44.36 ± 5.44	48.84 ± 9.82	48.48 ± 6.44
BUN (mg/dl)	21.68 ± 2.50	22.80 ± 2.67	20.70 ± 2.00	23.42 ± 2.26

Results are mean ± S.D.(n=5).

ALP; alkaline phosphatase, ALT; alanine aminotransferase, AST; aspartate aminotransferase, BUN; urea nitrogen in blood, LDH; lactate dehydrogenase

Table 10. Biochemical serum values in female SD-rats administered orally with **test materials for 4 weeks**

Items	Dose (mg/kg)			
	1000	**500**	**250**	**0 (control)**
Albumin (g/dl)	4.18 ± 0.11	4.22 ± 0.34	3.76 ± 0.32	3.92 ± 0.16
ALP (IU/L)	200.64 ± 33.31	182.70 ± 20.16	207.70 ± 50.89	236.96 ± 59.29
Calcium (mg/dl)	9.88 ± 0.35	10.02 ± 1.22	8.36 ± 0.87	9.16 ± 0.44
Creatinine (mg/dl)	0.54 ± 0.05	0.54 ± 0.15	0.44 ± 0.09	0.46 ± 0.05
Glucose (mg/dl)	115.28 ± 11.48*	112.10 ± 25.40	78.64 ± 9.53	86.98 ± 8.79
AST (IU/L)	123.94 ± 27.39	150.76 ± 38.21	133.70 ± 45.03	110.10 ± 15.63
ALT (IU/L)	40.36 ± 9.14	38.10 ± 6.26	38.52 ± 10.34	38.88 ± 7.14
LDH (U/L)	935.22 ± 545.41	1653.12 ± 645.54	1637.58 ± 728.69	1292.68 ± 661.06
Phosphorous (mg/dl)	6.72 ± 0.47	6.46 ± 0.80	5.84 ± 1.02	6.12 ± 0.76
T-Bilirubin (mg/dl)	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Cholesterol (mg/dl)	95.20 ± 7.33	91.40 ± 3.71	86.52 ± 15.77	93.22 ± 17.08
T-Protein (g/dl)	6.12 ± 0.40	6.18 ± 0.61	5.48 ± 1.43	6.04 ± 0.33
Triglyceride (mg/dl)	25.58 ± 9.02	25.02 ± 11.64	20.56 ± 4.19	25.94 ± 14.32
BUN (mg/dl)	25.78 ± 3.50	24.24 ± 3.99	23.78 ± 4.74	21.80 ± 2.09

* Significant differences as compared with control : $p < 0.05$.

Table 11. Hematology in male SD-rats administered orally with **test materials for 4 weeks**

Items	Dose (mg/kg)			
	1000	**500**	**250**	**0 (control)**
WBC ($\times 10^3$cells/$\mu\ell$)	7.79 ± 0.87	7.51 ± 1.13	8.63 ± 0.81	6.39 ± 2.12
RBC ($\times 10^6$cell/$\mu\ell$)	8.55 ± 0.25	8.44 ± 0.36	8.40 ± 0.27	8.50 ± 0.28
HGB (g/dL)	16.32 ± 0.33	16.06 ± 0.65	15.98 ± 0.69	16.32 ± 0.37
HCT (%)	46.86 ± 0.90	46.82 ± 1.79	45.98 ± 1.76	47.66 ± 0.64
MCV (fL)	54.84 ± 1.22	55.50 ± 1.21	54.72 ± 0.91	56.10 ± 1.79
MCH (pg)	19.14 ± 0.67	19.04 ± 0.44	19.04 ± 0.30	19.18 ± 0.42
MCHC (g/dL)	34.86 ± 0.62	34.28 ± 0.15	34.80 ± 0.44	34.22 ± 0.99
PLT ($\times 10^3$cells/$\mu\ell$)	1387.80 ± 111.44	1362.80 ± 168.11	1354.00 ± 128.17	1167.00 ± 112.81
Neu (%)	9.56 ± 2.59	10.92 ± 2.36	9.94 ± 2.00	12.96 ± 1.97
Lym (%)	85.22 ± 2.49	82.84 ± 5.25	84.76 ± 2.51	80.98 ± 3.85
Mono (%)	3.18 ± 0.38	2.50 ± 0.70	3.14 ± 0.21	2.40 ± 0.70
Eos (%)	0.66 ± 0.11	0.66 ± 0.18	0.76 ± 0.18	0.74 ± 0.13
Baso (%)	0.14 ± 0.05	0.12 ± 0.04	0.16 ± 0.05	0.08 ± 0.04

Table 12. Hematology in female SD-rats administered orally with **test materials for 4 weeks**

Items	Dose (mg/kg)			
	1000	**500**	**250**	**0 (control)**
WBC ($\times 10^3$cells/$\mu\ell$)	5.26 ± 1.00	4.81 ± 0.88	4.78 ± 0.97	4.83 ± 0.64
RBC ($\times 10^6$cell/$\mu\ell$)	8.17 ± 0.09	8.37 ± 0.37	8.57 ± 0.24	8.38 ± 0.22
HGB (g/dL)	15.42 ± 0.33	15.80 ± 0.41	15.68 ± 0.36	16.02 ± 0.19
HCT (%)	42.52 ± 0.43	44.14 ± 1.16	44.30 ± 1.20	45.12 ± 0.78
MCV (fL)	52.06 ± 0.54	52.80 ± 1.30	51.68 ± 1.07	53.92 ± 0.97
MCH (pg)	18.92 ± 0.37	18.88 ± 0.58	18.32 ± 0.63	19.24 ± 0.30
MCHC (g/dL)	36.30 ± 0.46	35.78 ± 0.34	35.38 ± 0.72	35.68 ± 0.18
PLT ($\times 10^3$cells/$\mu\ell$)	1454.60 ± 152.57	1372.80 ± 168.23	1445.20 ± 191.56	1268.80 ± 239.64
Neu (%)	13.06 ± 2.41	15.46 ± 8.87	11.56 ± 2.42	10.34 ± 4.07
Lym (%)	81.18 ± 3.47	79.26 ± 7.71	83.28 ± 2.07	83.76 ± 4.09
Mono (%)	3.02 ± 1.28	3.10 ± 1.51	2.84 ± 0.72	3.46 ± 0.48
Eos (%)	0.98 ± 0.36	0.54 ± 0.28	0.76 ± 0.25	0.86 ± 0.39
Baso (%)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.10	0.20 ± 0.10	0.10 ± 0.07

Table 13. Coagulation time in SD-rats administered orally with **test materials for 4 weeks**

Sex/dose(mg/kg B.W)		Items	
		PT (sec)	aPTT (sec)
Male	1000	13.30 ± 0.52	16.78 ± 1.20
	500	12.84 ± 0.71	16.98 ± 1.67
	250	13.04 ± 0.71	17.30 ± 1.67
	0	12.48 ± 0.64	16.62 ± 0.74
Female	1000	13.28 ± 0.54	17.14 ± 1.67
	500	13.42 ± 0.90	18.56 ± 1.73
	250	13.52 ± 0.65	18.28 ± 2.38
	0	13.32 ± 0.60	17.16 ± 1.92

Table 14. Urine analysis results in SD-rats administered orally with **test materials for 4 weeks**

Items	Sex	Male				Female			
	Dose (㎍/kg)	1000	500	250	0	1000	500	250	0
Specific gravity	1.000								
	1.005	2		1		1	2		2
	1.010	2	3	3	1	1	2	3	1
	1.015	4	6	5	7	7	4	5	7
	1.020	2	1	1	2	1	2	2	
	1.025								
	1.030								
pH	5								
	6	1	4	2	4	2	1	2	2
	7	5	5	7	4	7	7	6	7
	8	4	1	1	2	1	2	2	1
	9								
Leukocytes (leuko/㎕)	neg	9	7	6	6	8	9	9	8
	10-25	1	3	4	4	2	1	1	2
	75								
	500								
Nitrite	neg	7	9	9	10	8	7	8	7
	pos	3	1	1		2	3	2	3
Protein (mg/dl)	neg	8	10	9	10	9	7	8	8
	30	2		1		1	2	2	2
	100						1		
	500								
Glucose (mg/dl)	normal	8	10	9	6	6	7	9	9
	50	2		1	4	3	3	1	1
	100					1			
	300								
	1000								
Ketone	neg	8	3	8	9	8	9	8	9
	+	2	7	2	1	2	1	2	1
	++								
	+++								
Urobilinogen (mg/dl)	normal	5	9	8	6	7	8	7	7
	1	4	1	2	4	2	1	3	2
	4	1				1	1		1
	8								
	12								
Bilirubin (mg/dl)	neg	7	9	7	7	8	9	9	9
	+	3	1	3	3	2	1	1	1
	++								
	+++								
Blood (Ery/㎕)	neg	6	6	6	7	8	7	7	8
	5-10	4	4	4	3	2	3	3	2
	50								
	250								
Hgb (Ery/㎕)	neg	7	8	9	9	9	7	6	8
	10	3	2	1	1	1	3	3	2
	50							1	
	250								

(A; male 0 mg/kg, B; male 1000 mg/kg, C; female 0 mg/kg, D; female 1000 mg/kg)

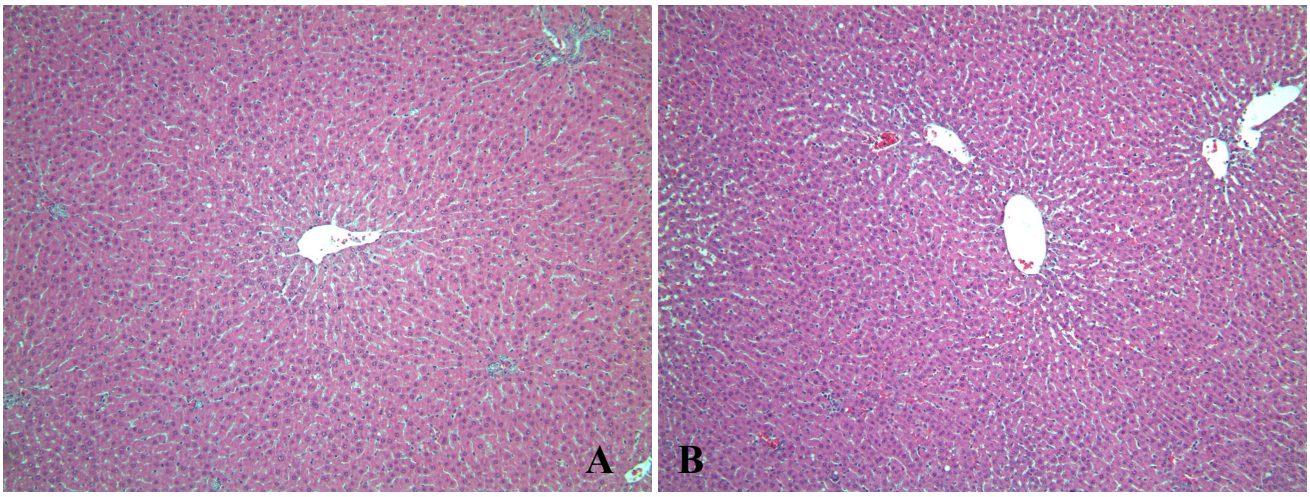


Fig. 4. Histopathological finding of liver from SD male rat treated with test materials 4 weeks. No lesion was observed. Hematoxylin and Eosin (H & E). x 100.
(A; 0 mg/kg, B; 1000 mg/kg)

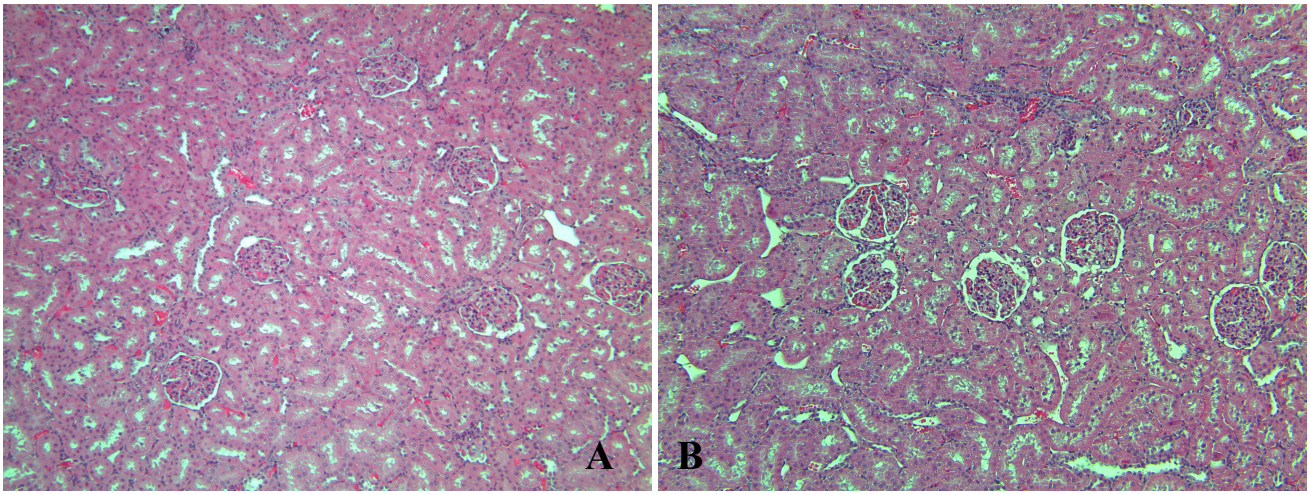


Fig. 5. Histopathological finding of kidney from SD male rat treated with test materials 4 weeks. No lesion was observed. Hematoxylin and Eosin (H & E). x 100.
(A; 0 mg/kg, B; 1000 mg/kg)

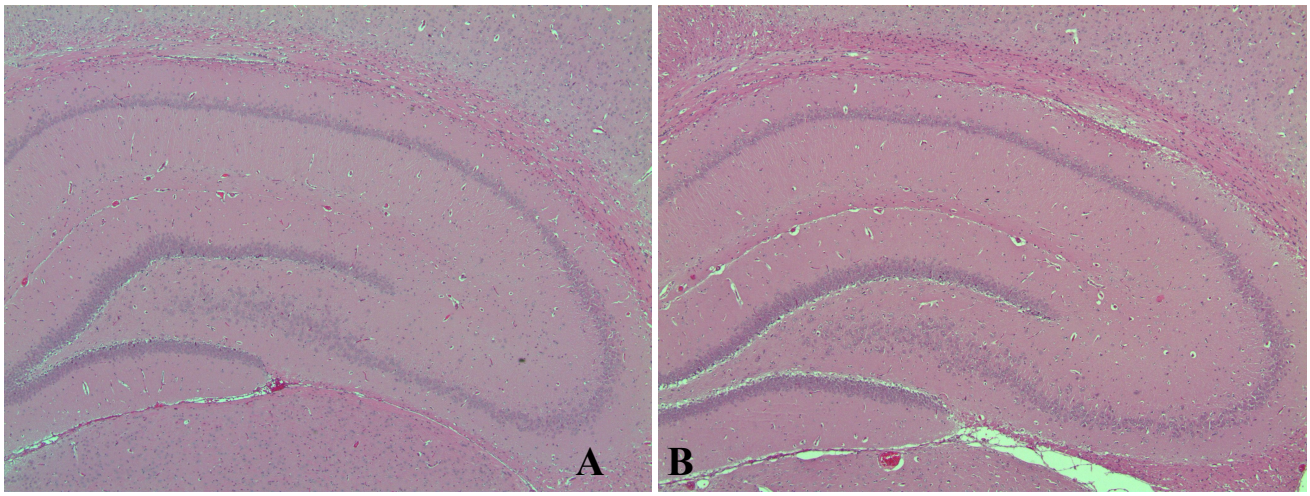


Fig. 6. Histopathological finding of brain from SD male rat treated with test materials 4 weeks. No lesion was observed. Hematoxylin and Eosin (H & E). x 100.

(A; 0 mg/kg, B; 1000 mg/kg)

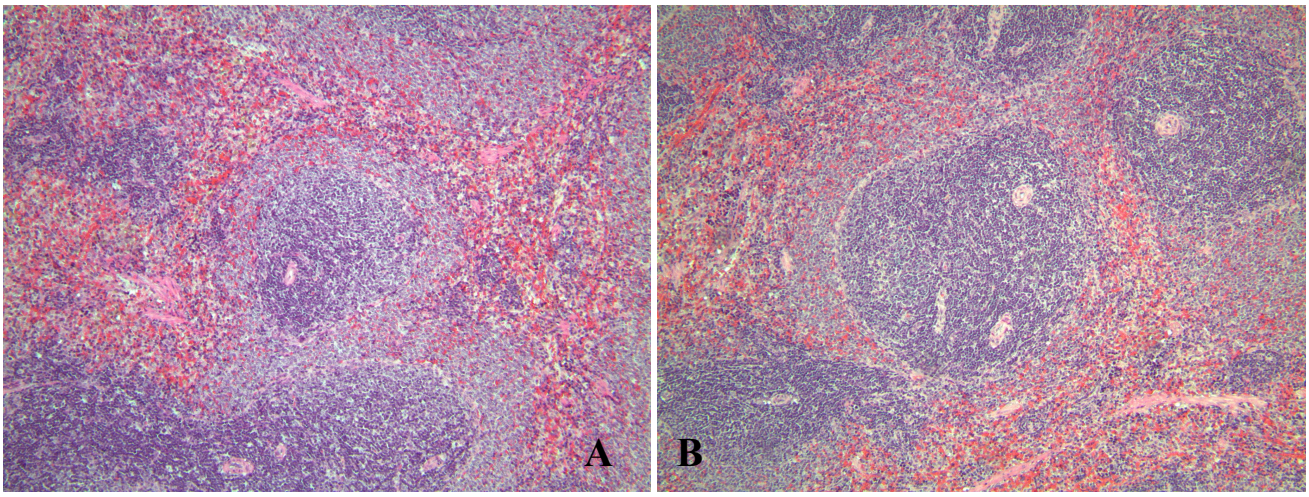


Fig. 7. Histopathological finding of spleen from SD male rat treated with test materials 4 weeks. No l esion was observed. Hematoxylin and Eosin (H & E). x 100.

(A; 0 mg/kg, B; 1000 mg/kg)

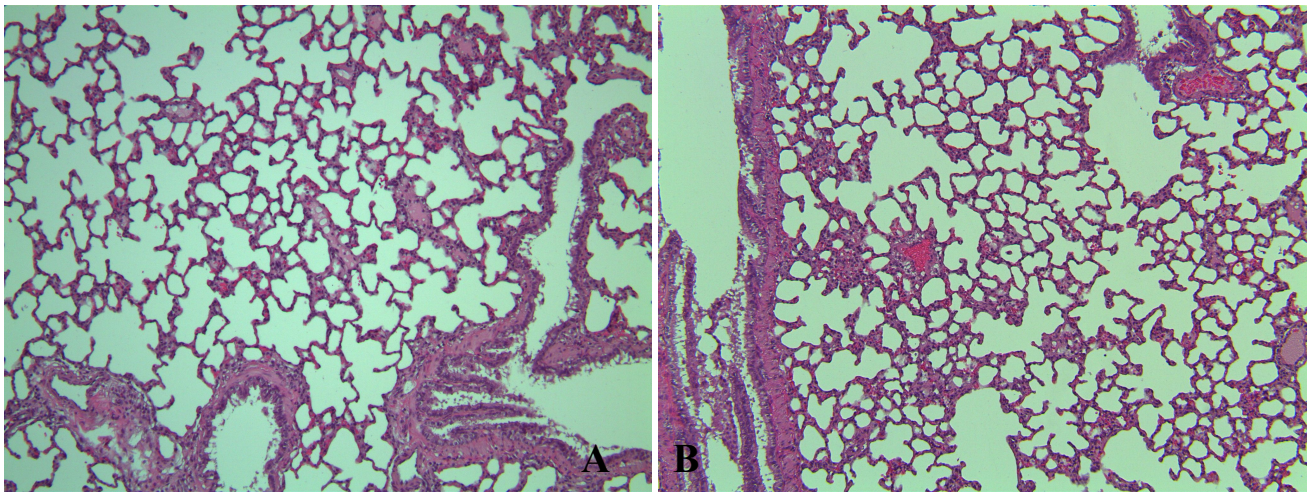


Fig. 8. Histopathological finding of lung from SD male rat treated with test materials 4 weeks. No lesion was observed. Hematoxylin and Eosin (H & E). x 100.

(A; 0 mg/kg, B; 1000 mg/kg)

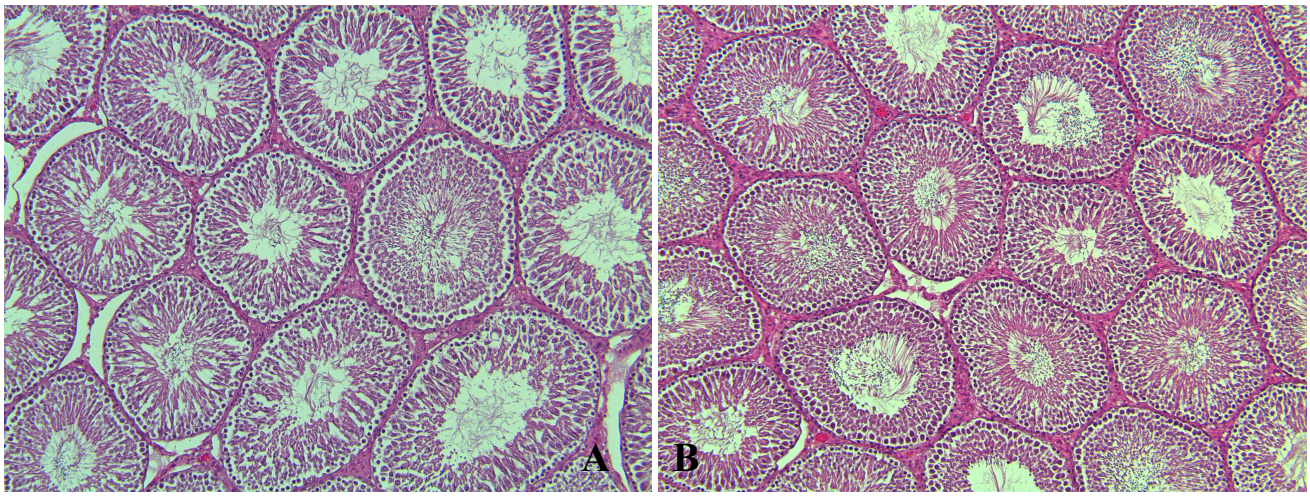


Fig. 9. Histopathological finding of testis from SD male rat treated with test materials 4 weeks. No lesion was observed. Hematoxylin and Eosin (H & E). x 100.

(A; 0 mg/kg, B; 1000 mg/kg)

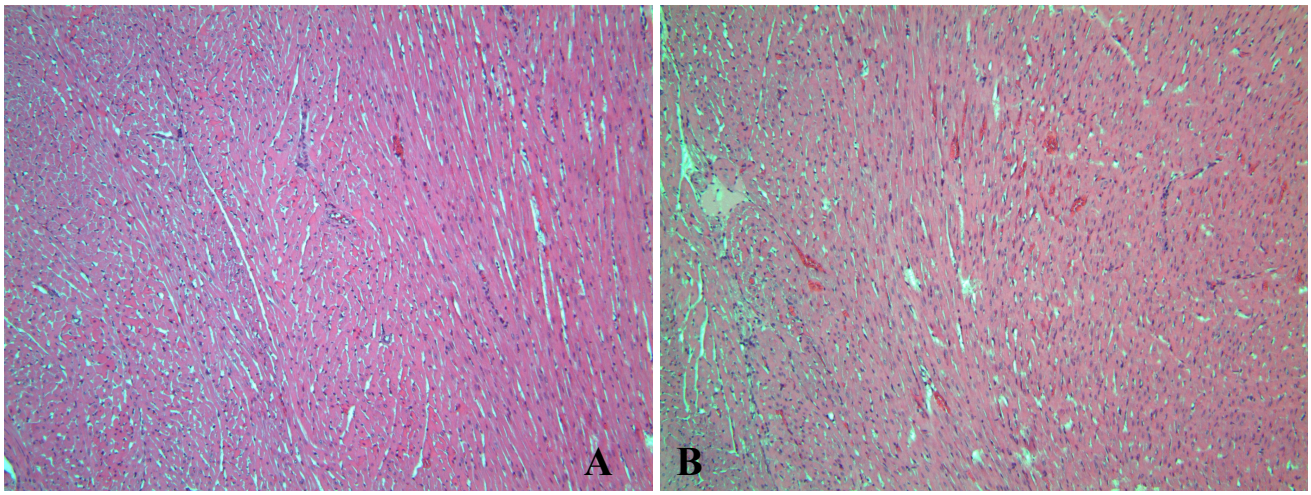


Fig. 10. Histopathological finding of heart from SD male rat treated with test materials 4 weeks. No lesion was observed. Hematoxylin and Eosin (H & E). x 100.

(A; 0 mg/kg, B; 1000 mg/kg)

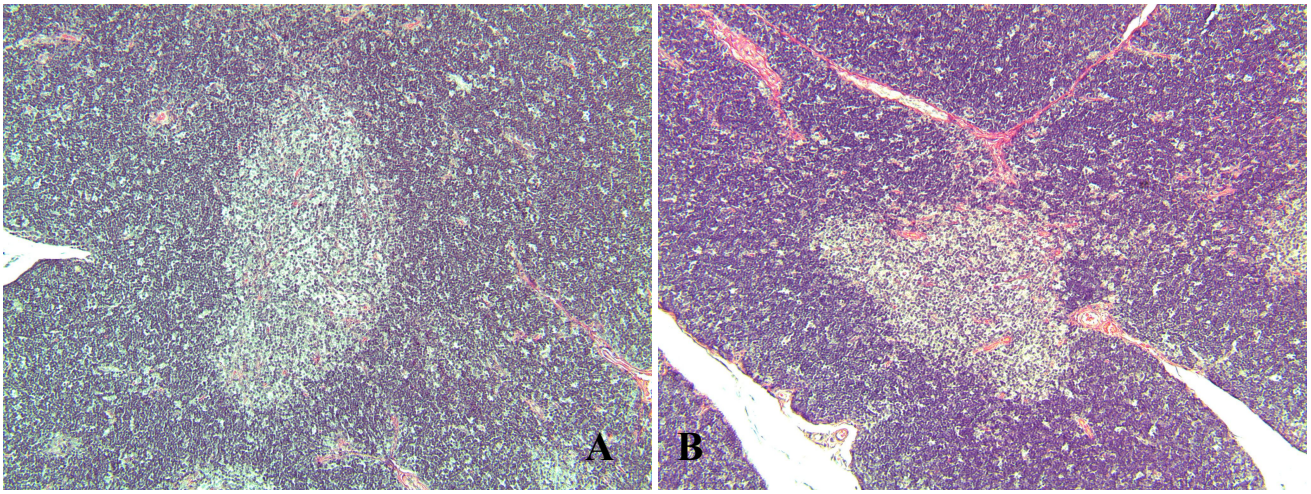


Fig. 11. Histopathological finding of thymus from SD male rat treated with test materials 4 weeks. No lesion was observed. Hematoxylin and Eosin (H & E). x 100.

(A; 0 mg/kg, B; 1000 mg/kg)

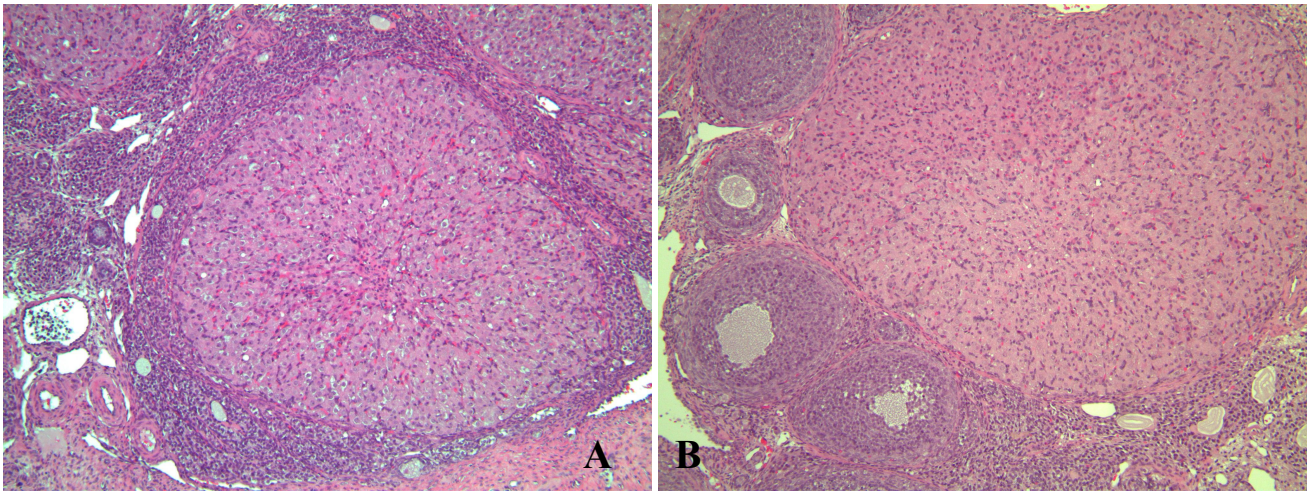


Fig. 12. Histopathological finding of ovary from SD female rat treated with test materials 4 weeks. No lesion was observed. Hematoxylin and Eosin (H & E). x 100.
(A; 0 mg/kg, B; 1000 mg/kg)

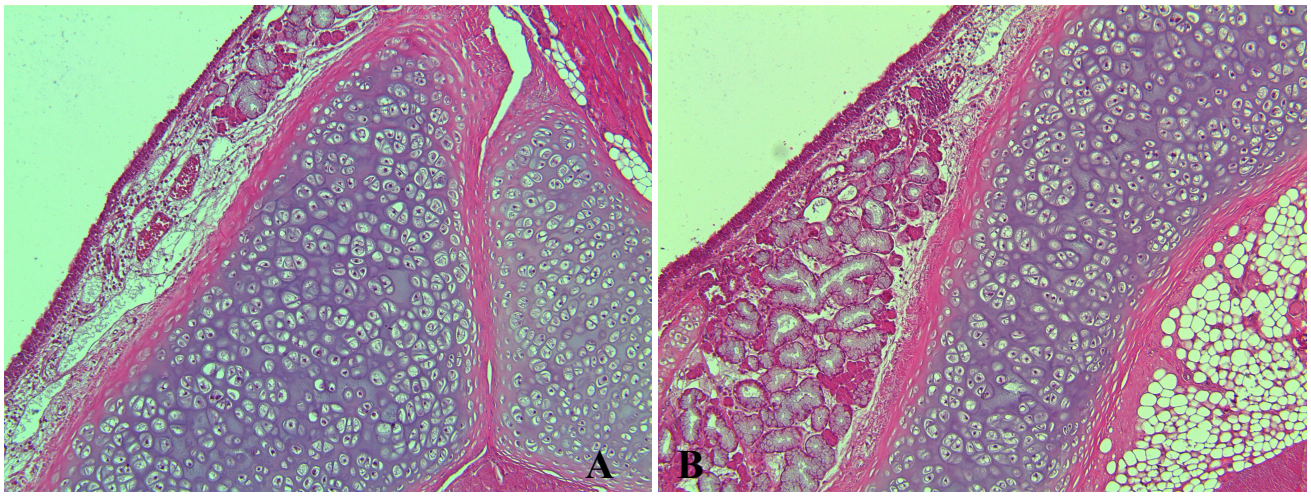


Fig. 13. Histopathological finding of thyroid gland from SD male rat treated with test materials 4 weeks. No lesion was observed. Hematoxylin and Eosin (H & E). x 100.
(A; 0 mg/kg, B; 1000 mg/kg)

12. 참고문헌

1. 식품의약품안전청고시 제2000-60호 "의약품 등의 독성시험기준(2005년 10월 21일 제정)"

다. 세포 및 분자 수준에서의 JGB의 작용기전 규명

(1) Zymosan 유도성 염증 모델의 작성

Mouse는 C57BL/6로서 6-7주령인 것을 사용하였다. 동물 사육실의 온도는 20~24 ℃, 습도는 40~60% 그리고 12 시간 light/dark cycle을 유지하였고 시험을 실시하는데 적합하고 건강한 동물을 선별하기 위하여 1 주간의 순화 기간을 두었다. Mouse의 염증 유도를 위해 오른쪽 발바닥에 zymosan을 30mg/kg, 200 ㎕로 이식한 후 JGB를 10, 30 그리고 100 mg/kg, 200 ㎕로 5일 동안 복강 투여하였다. 매일 mouse 몸무게, 발바닥 두께를 측정하고 5일째 부검한 후 pLN (poplieal lymph node)을 분리해 무게 측정을 하고 cell을 분리해 RT-PCR과 Western blotting을 하였다. pM (peritoneal macrophage)의 분리는 Mouse의 복강에 zymosan을 3 mg/kg, 50 ㎕로 투여 후, JGB를 100 mg/kg, 200 ㎕의 농도로 5일 동안 복강 투여하였다. 5일째 복강에서 peritoneal macrophage를 분리하여 이후 과정을 진행하였다.

(2) Zymosan 유도성 염증 모델에서의 JGB의 염증 억제작용

5일 동안 체중의 변화는 없었으므로 시료가 독성이 없음을 확인하였고 (Fig. 1), JGB를 투여하면서 발바닥의 두께를 잰 결과 zymosan만 투여한 군에 비해 JGB를 투여한 군이 농도 의존적으로 발 두께가 감소함을 확인하였다 (Fig. 2). 5일 후 mouse를 부검하여 pLN (popliteal lymph node, 무릎 뒤쪽의 림프절)의 무게를 측정한 결과 zymosan 군에 비해 JGB군이 농도 의존적으로 무게감소를 보임으로써 JGB의 항염증 작용을 재차 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

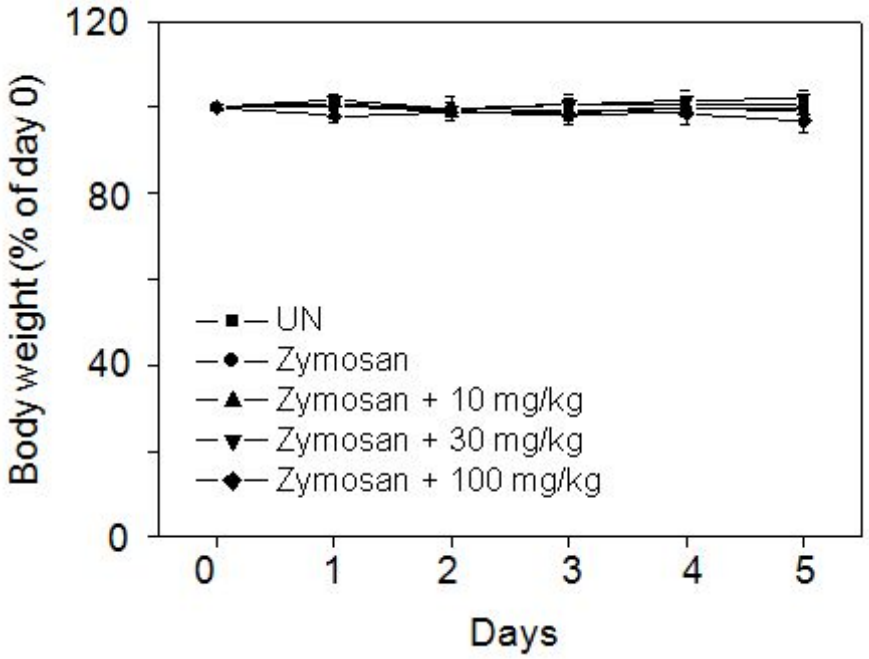


Fig. 1. Cytotoxicity of JGB.

Mice were injected i.p. with JGB dissolved in 200 ㎕ saline 30 min prior to an injection of 60 ㎍ zymosan in 50 ㎕ saline into the right hind footpad. JGB was injected on days 0, 1, 2, 3, 4, and 5 after zymosan injection into footpad. Body weight was serially measured during the experimental period at every 5 days.

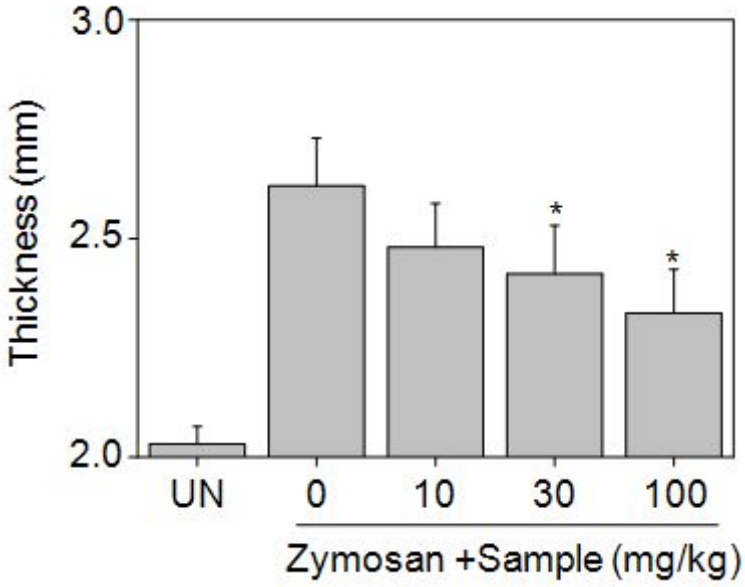


Fig. 2. Effects of JGB on zymosan-induced footpad edema.

Mice were injected i.p. with JGB dissolved in 200 ㎕ saline 30 min prior to an injection of 60 ㎍ zymosan in 50 ㎕ saline into the right hind footpad. JGB was injected on days 0, 1, 2, 3, 4, and 5 after zymosan injection into footpad. Inside 5 all every 24 hours, footpad thickness was measured. The increase in footpad thickness was calculated by subtracting the thickness of the left, from that of right hind footpad.

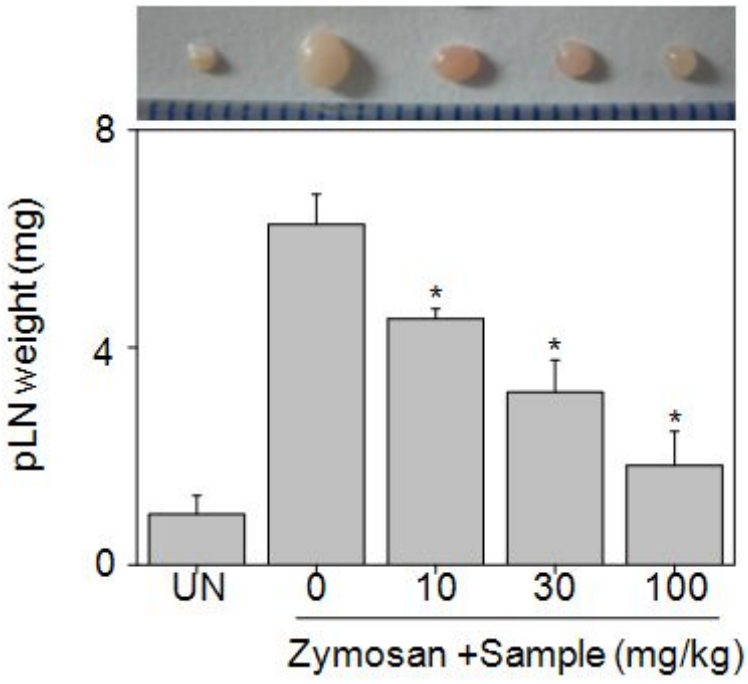


Fig. 3. JGB inhibited zymosan-induced inflammation in mice.

Mice were injected i.p. with JGB dissolved in 200 ㎕ saline 30 min prior to an injection of 60 ㎍ zymosan in 50 ㎕ saline into the right hind footpad. JGB was injected on days 0, 1, 2, 3, 4, and 5 after zymosan injection into footpad. The popiteal lymph node was excised and weighed. Each column shows the mean ± S.E.M. of 4 mice. $*p < 0.05$.

(3) pLN (popliteal lymph node)에서의 T 세포와 B 세포의 비율(세포 표현형)에 대한 JGB의 영향

(가) 세포의 표현형 분석은 유세포 측정기 (FACS calibur flow cytometer)를 이용하였다. 세포($1x10^6$ cells/㎖)를 0.5% BSA/PBS로 세척해 상층액을 제거하고 단일클론 항체가 들어간 50 ㎕의 0.5% BSA/PBS를 넣고 4 °C에서 20분간 염색하였다. 500 ㎕의 0.5% BSA/PBS로 다시 세척한 후 500 ㎕의 BSA/PBS를 넣고 현탁시켰다. 데이터 분석은 WinMDI soft ware를 이용하여 시행하였다.

(나) Zymosan을 처리한 군은 처리하지 않은 군에 비해 T cell의 비율이 70%에서 40%로 감소하고 상대적으로 B cell의 비율은 24%에서 54%로 증가하였다. Zymosan을 처리 후 JGB를 처리한 군은 농도 의존적으로 T cell의 비율은 43%, 50% 그리고 55%로 증가하고 B cell의 비율은 50%, 46% 그리고 39%로 감소함을 확인하였다(Fig. 4).

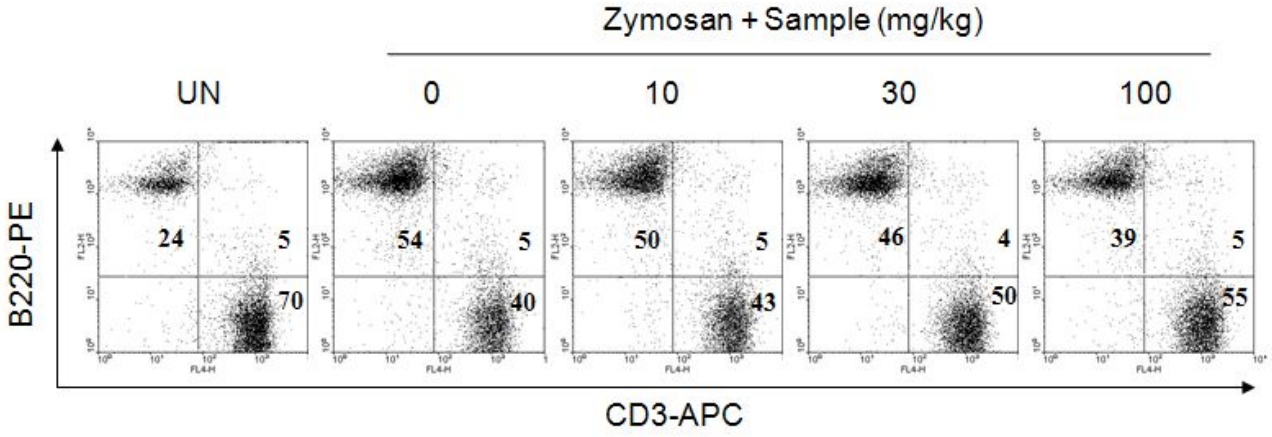


Fig. 4. Flow cytometry of popliteal lymph node from JGB-injected mice.

Mice were injected i.p. with JGB dissolved in 200 ㎕ saline 30 min prior to an injection of 60 ㎍ zymosan in 50 ㎕ saline into the right hind footpad. JGB was injected on days 0, 1, 2, 3, 4, and 5 after zymosan injection into footpad. After this period, pLN cells were separated and stained with mAbs to identify the CD4+ or B220+ cells in a FACScan flow cytometer, as described in Material and methods. Figure shows a typical result obtained from two different experiments, with four mice.

(4) pLN (popliteal lymph node)에서의 T 세포와 B 세포의 증식 (proliferation)에 대한 JGB의 영향

(가) pLN cell을 1x10^6 cells/㎖이 되도록 맞춘 후 96well에 200 ㎕씩 분주하였다. 1 μg/ml의 농도로 LPS와 ConA를 처리하여 활성화 시킨 B 세포와 T 세포의 증식을 측정하였다. 37 °C 배양기에서 4 시간 배양 후 thymidine을 1 μCi/well의 농도로 처리하고 다시 18시간 배양 후 cell harvester를 이용하여 glass fiber filter에 harvest 하여 2시간 동안 건조시켰다. 건조시킨 glass fiber filter를 sample bag에 넣어준 후 scintillation cocktail로 filter를 충분히 적셔주고 밀봉하였다. 이 glass fiber filter를 beta counter를 이용하여 세포의 DNA 내로 유입된 방사능의 양을 측정하였다.

(나) Mouse에서 pLN을 분리하여 세포의 B 세포와 T 세포의 증식에 JGB가 어떤 영향을 주는지 확인하였다. 우선 pLN을 분리해 세포증식을 확인한 결과 JGB를 처리하였을 때 농도 의존적으로 zymosan을 처리한 군에 비해 세포 증식이 억제됨을 확인하였다 (Fig. 5A). LPS와 ConA를 각각 처리해 B 세포와 T 세포를 활성화 시켜 각각의 세포증식을 확인한 결과, B 세포와 T 세포 모두 JGB에 의해 농도 의존적으로 세포증식이 억제됨을 확인하였다(Fig. 5B).

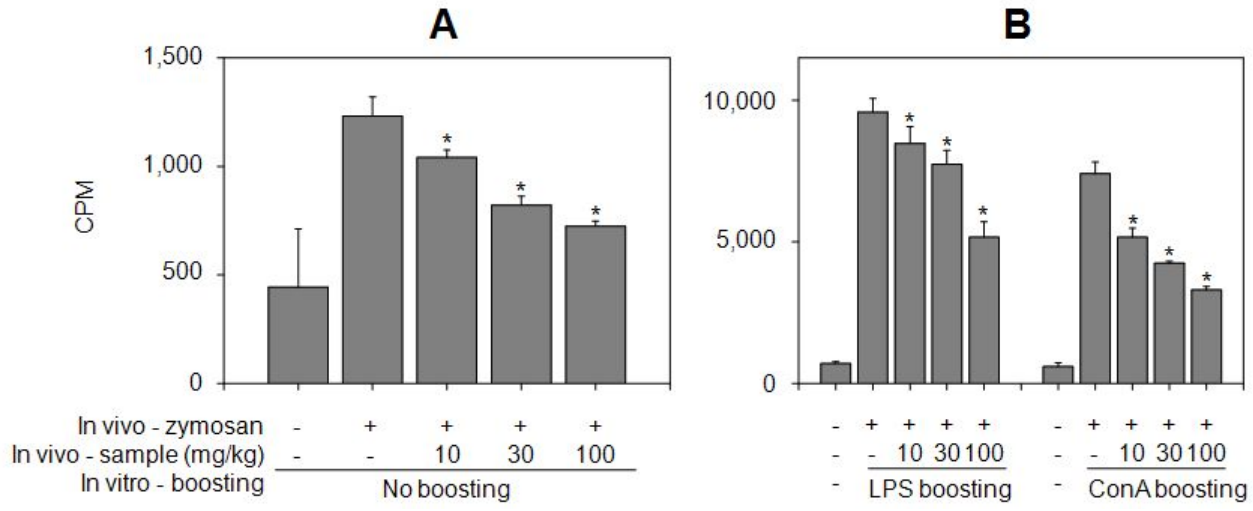


Fig. 5. Proliferative capacity of popiteal lymph node from JGB-injected mice.

Popiteal lymph node cells measured incorporation of [3H]thymidine into replicating cells(A). Also, popiteal lymph node cells were stimulated with mitoen from ConA or LPS, and the incorporation of [3H]thymidine into replicating cells was measured(B). Statistically significant difference: *.$P < 0.05$.

(5) pLN에서의 염증성 사이토카인 유전자 발현과 MAPKinase 신호전달 경로에 대한 JGB의 영향

(가) Mouse에서 분리한 pLN을 세포 분리하여 각 군을 2 x 10^6 cells의 농도로 맞춘 후 PBS로 한번 세척하고 TRIZOL reagent를 이용하여 RNA를 분리하였다. RNA 0.3 ㎍을 이용하여 cDNA를 42 ℃에서 60분, 94 ℃에서 5분간 합성하였다. 만들어진 cDNA 3㎕와 10 pM의 primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)를 수행하였다. Primer마다 annealing 온도를 54 ℃ ~ 58 ℃ 사이로 다르게 하였고 b-actin은 annealing 온도를 54 ℃로 25 cycle 수행하였다. PCR 생성물은 1% agarose gel에 8 ㎕씩 loading한 후 50V로 전기영동 하였다. 올리고 sequence는 다음과 같았다. b-actin ; sense : 5′-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAAC-3′, antisense : 5′-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3′, TNF-a ; sense : 5′-AGG TTC TGT CCC TTT CAC TCA CTG-3′, antisense : 5′-AGA GAA CCT GGG AGT AGA CAA GGT A-3′, IFN-a ; sense : 5′-TCT GAT GCA GCA GGT GGG-3′, antisense : 5′-AGG GCT CTC CAG ACT TCT GCT CTG-3′, INF-b ; sense : 5′-CCA CAG CCC TCT CCA TCA ACT ATA AGC-3′, antisense : 5′-AGC TCT TCA AGT GGA GAG CAG TTG AGG-3′, IFN-r ; sense : 5′-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3′, antisense : 5′-GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG-3′, IL-1b ; sense : 5′-ATG GCA ATG TTC CTG AAC TCA ACT-3′, antisense : 5′-CAG GAC AGG TAT AGA TTC TTT CCT TT-3′, IL-2 ; sense : 5′-CTT GCC CAA GCA GGC CAC AG-3′, antisense : 5′-GAG CCT TAT GTG TTG TAA GC-3′, IL-4 ; sense : 5′-GAA TGT ACC AGG AGC CAT ATC-3′, antisense : 5′-CTC AGT ACT ACG AGT AAT CCA-3′, iNOS ; sense : 5′-CCT TCC GAA GTT TCT GGC AGC AGC-3′, antisense : 5′-GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G-3′

(나) 분리한 세포를 PBS로 세척 후 total lysis buffer를 이용하여 총 단백질을 얻어 ERK, JNK 그리고 P38의 시료에 의한 인산화 정도를 확인하였다. 일정량의 단백질을 SDS-gel loading buffer와 혼합하여 95 ℃에서 5분간 가열하여 불활성화 시키고 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 그리고 SDS-polyacrylamide gel을 70V에서 100 분간 PVDF membrane으로 이동시키고 5% skim milk에서 1시간 bloking 하였다. 일차 항체를 24시간 동안 반응시키고 1X TTBS 용액으로 세척한 후 primary-specific secondary antibody를 2시간 동안 반응시키고 세척하였다. 마지막으로 membrane을 ECL 용액으로 반응시키고 각각의 band를 분석하였다.

(다) Mouse를 부검하여, 분리한 pLN에서 RNA를 뽑은 후 염증 관련 cytokine 유전자 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였다. T 세포 관련 cytokine인 IFN-r, IL-2 그리고 IL-4가 JGB에 의

해 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 6). 또한 pLN을 분리 후 total protein을 뽑아 MAPKinase (ERK, P38, JNK)의 인산화에 미치는 영향을 확인하였다. JGB는 ERK, JNK의 인산화에는 영향을 미치지 않았으나 P38의 인산화는 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 7)

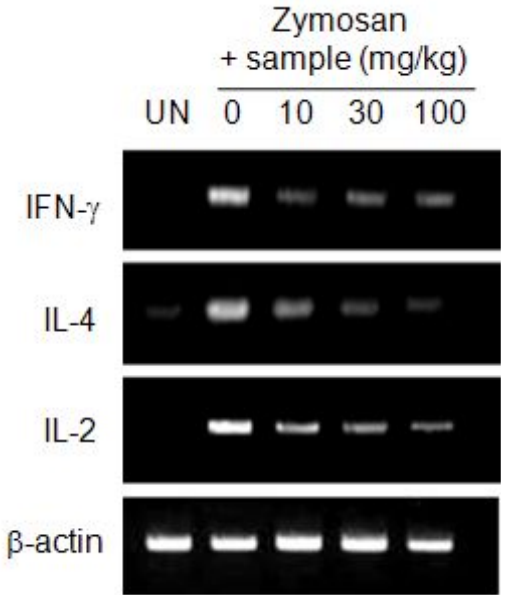


Fig. 6. Effects of JGB on zymosan-induced cytokine gene expression in popliteal lymph node.

Total RNAs were isolated from popliteal lymph node, and the mRNA levels of IFN-ɣ, IL-4, and IL-2 were measured by RT-PCR.

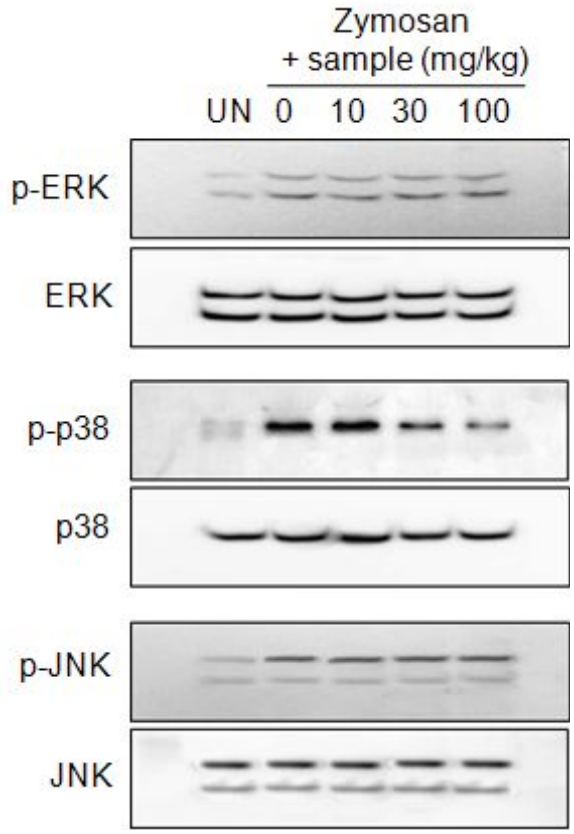


Fig. 7. Effects of JGB on MAPK signaling pathway in popliteal lymph node.

Popliteal lymph node cell lysates were separated by 10% SDS-PAGE and examined by western immunoblot. The extracts were analyzed for MAPK activation using the antibodies against phophorylated ERK, P38, and JNK.

(6) 복강 대식세포 (peritoneal macrophage)의 증식과 대식세포로부터의 산화질소(NO) 생성에 대한 JGB의 영향

(가) Mouse의 복강에 zymosan과 JGB를 복강투여 후 5일 후 복강에서 peritoneal macrophage를 분리하였다. 분리한 세포가 macrophage인지를 확인하기 위해 유세포 측정기를 통해 세포 표현형을 분석하였다. 측정결과 분리한 세포는 90% 정도의 macrophage cell 임을 확인하였다(Fig. 8A). 분리한 세포를 세포수 1 X 10^6 cells/ml로 맞춘 후 JGB가 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였다.

(나) NO assay는 다음과 같이 시행하였다. 복강에서 분리한 peritoneal macrophage cell을 5x10^5 cells/㎖이 되도록 맞춘 후 96well에 200 ㎕씩 분주하였다. 2hr 세포를 안정화 시킨 후 LPS를 1μg/ml의 농도로 처리하였다. 24hr이 지난 뒤에 상층액 100 ㎕를 새 96well에 옮겼다. (남은 세포는 MTT assay에 이용함.) Griess A, B 시약을 1:1의 비율로 섞어 각 well에 100 ㎕씩 넣어주고 5분이 지난 후 540 ㎚에서 OD값을 측정하였다. 확인 결과, Zymosan을 처리하였을 때 증가한 NO의 생성이 시료를 처리한 후 확연하게 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 8B).

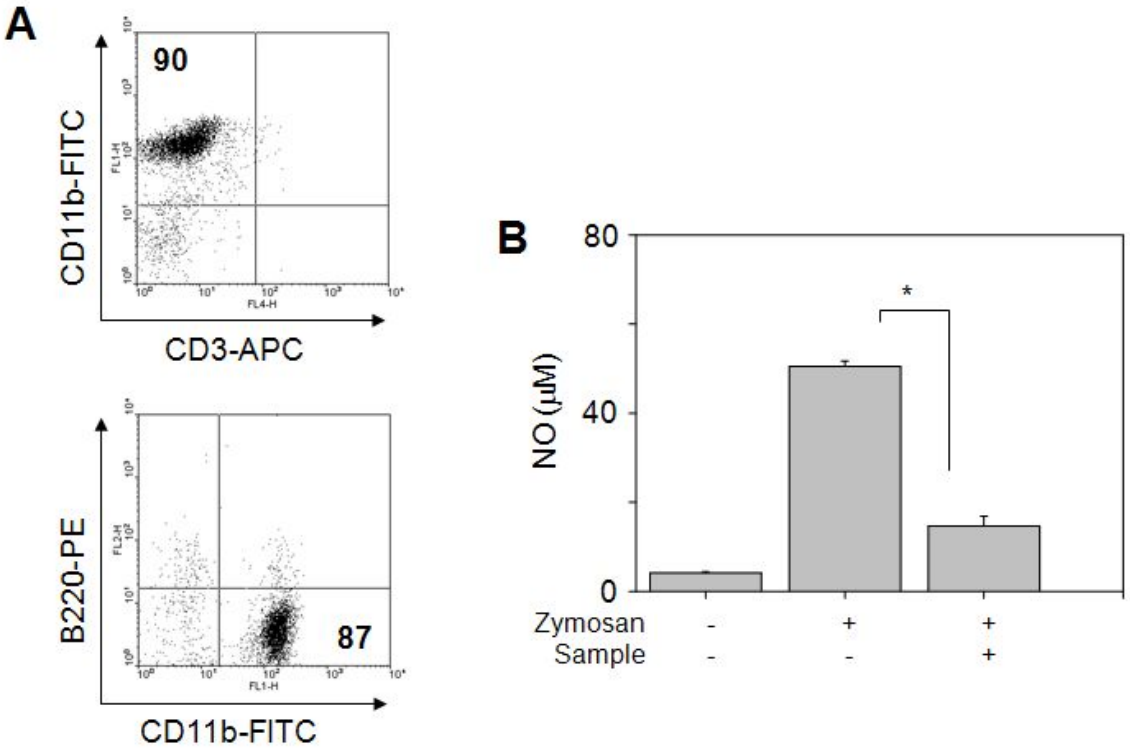


Fig. 8. Flow cytometry of peritoneal macrophage and NO production from JGB-injected mice.

Mice were injected i.p. with JGB dissolved in 200 ㎕ saline 30 min prior to an injection of 60 ㎍ zymosan in 50 ㎕ saline into the peritoneal cavity. JGB was injected on days 0, 1, 2, 3, 4, and 5 after zymosan injection into peritoneal cavity. After this period, peritoneal macrophage was separated and stained with mAbs to identify the CD11b+, CD 3+, or B220+ cells in a FACScan flow cytometer, as described in Materials and methods. Figure shows a typical result obtained from two different experiments, with four mice.

(7) 복강 대식세포에서의 염증성 사이토카인 유전자 발현과 MAPKinase 신호전달 경로에 대한 JGB의 영향

(가) 복강에서 분리한 peritoneal macrophage에서 RNA를 뽑은 후 cytokine 유전자 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 실험 결과 Macrophage 관련 cytokine인 TNF-a, IL-1β 그리고 iNOS가 JGB에 의해 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다(Fig. 9). 또한, peritoneal macrophage에서 total protein을 뽑은 후 MAPKinase (ERK, P38, JNK)의 인산화에 미치는 영향을 확인하였다. JGB는 ERK, P38 그리고 JNK의 인산화를 모두 억제함을 확인하였다(Fig. 10).

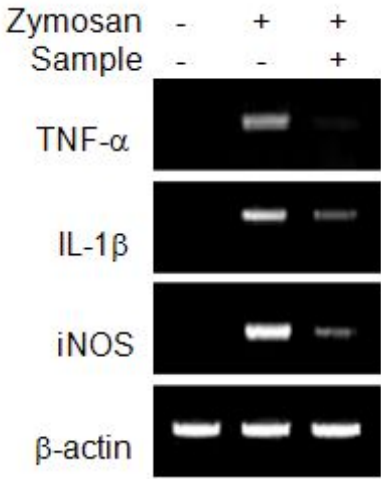


Fig. 9. Effects of JGB on zymosan-induced cytokine gene expression in peritoneal macrophage.

Total RNAs were isolated from peritoneal macrophage, and the mRNA levels of TNF-α, IL-1β, and iNOS were measured by RT-PCR.

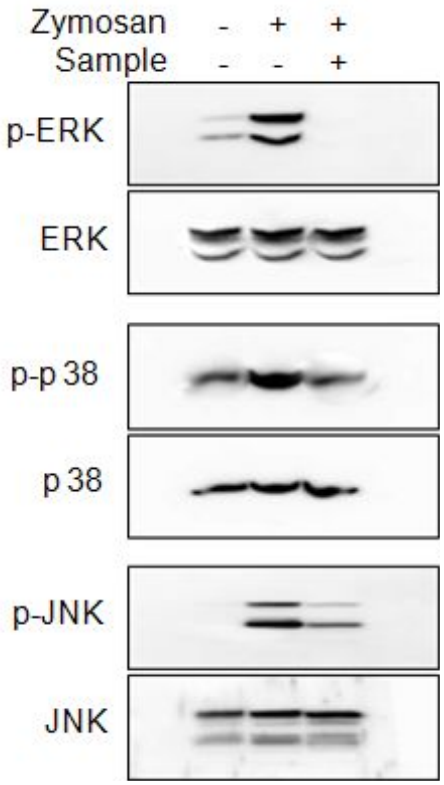


Fig. 10. Effects of JGB on MAPK signaling pathway in peritoneal macrophage.

Peritoneal macrophage lysates were separated by 10% SDS-PAGE and examined by western immunoblot. The extracts were analyzed for MAPK activation using the antibodies against phophorylated ERK, P38, and JNK.

4. 개별 인정형 건강기능식품으로 실용화하기 위한 임상 시험 진입용 최종 제형 연구

가. 상기의 과정을 통해 도출된 건강기능식품 소재는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 등의 경구형 제형으로 개발, 사용될 수 있음. 건강기능식품 소재를 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있을 수 있음.

나. 제형 결정(제제화)의 경우에는, 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제함. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제 가능함. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용됨. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있음.

다. 최종 개발된 건강기능식품의 바람직한 투여량은, 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 제형, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 해당 전문가에 의해 적절하게 선택될 수 있음. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여하는 것이 좋으며, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있음.

라. 본 연구의 결과로 도출된 결과물은, 건강기능식품 소재(추출물) 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 류마티스성 관절염 예방 및 치료/개선용 건강기능식품을 제공함. 본 연구의 결과물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있음. 또한, 류마티스성 관절염 예방 및 치료/개선 효과를 목적으로 다른 식품 또는 음료에 첨가될 수 있음. 이 때, 식품 또는 음료 중의 최종 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있음.

마. 본 연구 결과 최종 제품으로서의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 건강기능식품 소재를 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있음. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이며, 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있음. 상기 천연 탄수화물의 비율은 조성물 100㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g임.

바. 상기 외에 건강기능식품 소재는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 그밖에 추출물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있음. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있고, 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지는 않으나 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적임.

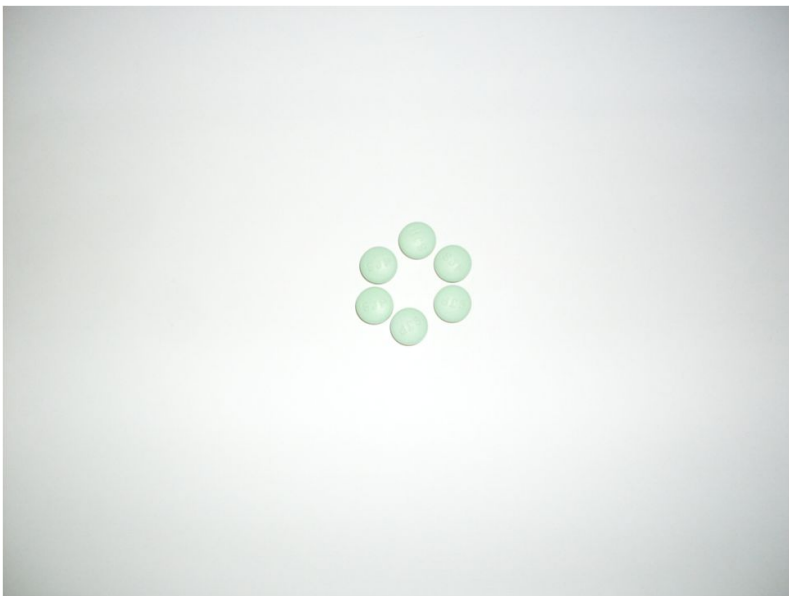
사. 본 연구의 결과물인 건강기능식품 소재는 아래와 같은 제형으로 제제화 되었으며, 향후 임상시험용으로 투여될 수 있음.

(1) 과립제

(2) 환제

(3) 단순 정제 (나정)

(4) 필름코팅형 정제



(5) 캡슐제

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

제 1 절 연구 목표 달성도

구분	연도	세부 연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도
1차 년도	2009	○대상 약용 농산물의 선정 및 추출물 제조	15%	최적 조성의 복합추출물 혹은 단일 추출물 제조 성공 여부	100%
		○건강기능식품 소재의 항염증 효능 검색	25%	최고의 항염증 효능 보유 추출물 검색 여부	100%
		○건강기능식품 소재의 진통 효능 검색	25%	최고의 진통 효능 보유 추출물 검색 여부	100%
		○건강기능식품 소재의 생체 안전성 검증 (독성 평가)	35%	최종 약효보유 추출물의 생체 안전성 입증 여부	100%
2차 년도	2010	○류마티스성 관절염 생쥐모델에서의 관절염유발지수/유발률에 대한 건강기능식품 소재의 효능 검증	25%	관절염 유발 지수 및 유발률 감소 효능 검증 여부	100%
		○류마티스성 관절염 생쥐모델에서의 관절조직 등에의 면역세포 침윤/병리적 관절조직에의 회복에 대한 건기식 소재의 효능 검증	25%	면역세포 침윤/병리적 변화에 대한 회복 효능 검증 여부	100%
		○ 건강기능식품 소재의 면역계 세포 (T, B, 대식세포) 기능, 염증성 사이토카인 생성 및 MAPK 신호전달 과정에 대한 작용 규명	35%	건강기능식품 소재의 세포/분자수준의 작용 규명 여부	100%
		○건강기능식품 소재를 이용한 최적의 투여 (섭취)제형 도출 및 최종 제품화	15%	최종 제형 도출 성공 여부	100%
최종 평가		○건강기능식품 소재의 항염증/진통효능 및 안전성 연구	25%	최종 효능 검증 성공 여부	100%
		○류마티스 모델 동물에 대한 건강기능식품 소재의 치료(개선) 효능 연구	25%	최종 치료효능 검증 성공 여부	100%
		○ 건강기능식품 소재의 세포/분자수준의 작용기전 연구	25%	세포 내 작용기전 규명 여부	100%
		○최적의 약효를 보유한 건강기능식품 소재 도출	25%	건강기능식품 소재 도출 성공 여부	100%

제 2 절 관련 분야 기술 발전에의 기여도

1. 이 분야와 관련된 기존의 특허는 합성신약 혹은 생물학적 제제의 물질 특허 혹은 용도 특허, 기존의 논문은 합성신약 혹은 생물학적 제제의 약리작용 기전 연구 분야에 치중되어 있었으나, 본 연구의 결과 천연물(약용 농산물)에 기원을 둔 관절염 개선용 건강기능식품 소재를 개발하고 그 약리학적 작용 및 기전을 규명하게 되어 특허를 출원하였으며, 참여기업을 통한 제품 출시를 앞두고 있음.

2. 본 연구의 결과, 효과가 뛰어나면서도 부작용이 적은 건강기능식품 소재를 개발할 수 있었으며 이를 통하여 관련 생명과학 기술 분야의 융합/복합적 발전을 유도할 수 있음.

3. 본 연구의 결과, 천연물의 약효검색 기술과 관련된 새로운 접근 방법 및 기술의 발전을 유도하였으며, 건기식의 원료공급에 있어서도 국내 약용 농산물을 이용함으로써 수입 의존적 유통구조를 개선할 수 있음.

4. 결론적으로, 합성 관절염 치료(조절)제는 여러 가지 부작용을 수반하는 경우가 많으므로, 효력이 강하면서도 비교적 부작용이 적은 특이적인 관절염 개선 혹은 조절 수단의 개발은 시급하면서도 중대한 기술적 과제임.

5. 따라서, 본 과제의 수행결과, 류마티스성 관절염 개선용 건강기능식품 소재를 성공적으로 개발한 바, 향후 '상품성 있는 건강기능식품'으로 실용화함으로써, 국내 약용 작물 관련 영농산업을 고부가가치 산업으로 전환시키는 계기가 되며, 국가 보건의료기술 향상에도 크게 기여할 수 있는 계기를 마련하였음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 결과의 활용목표 대비 성과 현황

1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	달성	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2차년도	목표	1	1	0	0	0	0	0	1	4	
	달성	2	0	0	0	0	0	0	2	6	
계	목표	1	1	0	0	0	0	0	1	5	
	달성	2	0	0	0	0	0	0	2	6	
	%	200 %	0	0	0	0	0	0	200 %	120 %	

2. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1	1	1	1	
	달성	0	1	1	1	1	

제 2 절 세부 항목별 성과 및 성과활용 계획

1. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Oleanolic acid and ursolic acid suppress epidermal growth factor and phorbol ester-induced MUC5AC production and gene expression from human airway epithelial cells	1	1	2	Phytotherapy Research	online publication (2011.3.28.)	국외	SCI
2011	Inhibition of Secretion, Production and Gene Expression of Mucin from Cultured Airway Epithelial Cells by Prunetin	1	1	2	Phytotherapy Research	online publication (2011.2.9.)	국외	SCI
2011	Daidzein regulates secretion, production and gene expression of mucin from airway epithelial cells stimulated by proinflammatory factor and growth factor	1	1	2	Pulmonary Pharmacology & Therapeutics	24(1)	국외	SCIE
2011	Effect of Ambroxol on Secretion, Production and Gene Expression of Mucin from Cultured Airway Epithelial Cells	1	1	1	Biomolecules & Therapeutics	19(1)	국내	SCIE

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Inhibition of airway MUC5AC mucin production and gene expression induced by epidermal growth factor or phorbol ester by glycyrrhizin and carbenoxolone	1	1	2	Phytomedicine	online publication (2010.12.9.)	국외	SCIE
2010	Regulation of Tumor Necrosis Factor-α-induced Airway Mucin Production and Gene Expression by Carbenoxolone, Prunetin, and Silibinin	1	1	1	Tuberculosis and Respiratory Diseases	69(5)	국내	학진등재지
2010	Effect of Platycodin D on Airway MUC5AC Mucin Production and Gene Expression Induced by Growth Factor and Proinflammatory Factor	1	1	2	Biomolecules & Therapeutics	18(3)	국내	SCIE
2010	Effects of Baicalin, Baicalein and Schizandrin on Airway Mucin Production Induced by Epidermal Growth Factor and Phorbol Ester	1	1	2	Biomolecules & Therapeutics	18(4)	국내	SCIE

2. 특허 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2010	매미눈꽃동충하초 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역반응 증강용 조성물	충북대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0116828
2010	지실, 금은화 및 백지혼합물로부터의 생약 혼합 추출물을 함유하는 류마티스성 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물	충남대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0135670

3. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계
0	0	100,000,000원/년	100,000,000원/년

4. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해연도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
관절기능 개선용 개별인정형 건기식 개발	본 연구 결과물을 이용하여 개별인정형 건기식으로 제품 출시 구현	금산덕원 인삼약초 영농조합	고태훈	10	직영/중소기업	0	향후 연 10억 이상의 매출을 예상하고 있음.	0

5. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

	지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
		7	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
계획	7	2	4	1	0	4	3	0	7	0
실적	7	박사과정 계속 이수중	3	1	0	4	3	0	7	0

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외
해당 사항 없음.	해당 사항 없음.	해당 사항 없음.	2010 AACR 국제 학술대회 참가-천연물의 생리활성 연구결과 발표 (참여연구원 이현재)

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
생약에서 건기식 소재 개발 전략 수립 방안	천연물 생리활성 응용 방법론 교육	충남대/중부대/ 금산덕원인삼약초영농조합	2	10	10

6. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
1	0	0	1	0	0	0

7. 추가 연구에의 활용 계획

- 최종 도출된 건강기능식품 소재인 JGB 구성 주요물질(성분)인 chlorogenic acid, naringin, hesperidin, quercetin, byakangelicol 등의 기능성 인정을 위한 추가적 보완 연구를 통하여, 주요물질(성분)의 산업화를 위한 준비를 진행하며 최종 실용화를 향하여 세부적 연구계획 수립 및 추진을 실행할 예정임.

- 본 연구를 통하여 전반적으로 식품 임상시험 연구 단계에서 필요한 전임상 연구자료를 축적함으로써 향후 임상연구에 필수불가결한 자료로 활용될 수 있음.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

- 관절염 치료 및 조절 약물/개선용 건강보조식품(nutritional supplement)과 관련하여, 국내에서 판매되는 제품과 유사한 다양한 제품이 해외 시장에도 출시되어 있다.

- 세계적인 의약품 컨설팅기관 디시전리소스(Decision Resources)는 류마티스 관절염 치료제 시장은 엔브렐(Enbrel)과 휴미라(Humira)의 시장확대와 새로운 메커니즘으로 생성된 신약의 출시로 10년 안에 100억 달러 이상의 매출을 달성할 것이라고 발표하였다. 특히 오렌시아(Orencia)와 리툭산/맙테라(Rituxan/MabThera)를 포함하여 새로운 기전의 바이오 의약품 시장이 크게 성장할 것으로 기대된다고 밝혔다 (http://www.ebn.co.kr/news/n_view.html?id=363492).

- 가장 최근에 개발되어 큰 관심을 받고 있는 약품은 종양 괴사인자 알파(Tumour ecrosis Factor-alpha : TNF-알파) 저해제이다. 이들 약품들은 류마티스 관절염에서 나타나는 자가면역에 의한 염증 및 관절조직의 파괴를 일으키는 주요 물질이 TNF-알파라는 것이 밝혀지면서 근본적인 원인에 접근하는 치료제로 개발이 진행되었다. 현재 류마티스 관절염 시장에서는 가격이 높은 TNF-알파 저해제인 암젠/와이어스/다케다의 엔브렐과 애보트/에자이의 휴미라가 매출을 늘려서 시장의 구동력이 되고 있다.

- 또한 BMS의 오렌시아, 바이오젠 아이덱/제넨텍/쥬가이/젠야쿠 공업의 리툭산과 로슈의 맙테라와 같이 새로운 기작을 갖는 높은 가격의 신규 바이오 의약품의 출시도 시장확대에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다. 이들 치료제들의 성장으로 10년 후인 2015년에는 현 매출의 2배 이상인 100억 달러를 초과할 것으로 평가되고 있다.
(http://www.kdra.or.kr/rnd/r_result/result_d_joi.htm).

- 기존 제품 중에서 애보트의 휴미라가 현재 9억 2,400만 달러에서 2015년 27억 달러로 가장 높은 성장이 예상되며 존슨&존슨의 자회사인 센토코어의 레미케이드는 매출이 약간 감소할 것으로 전망하고 있다. 엔브렐의 경우 증가율이 다소 둔화돼 현재 19억 5,000만 달러에서 2015년 25억5000만 달러를 기록할 것으로 예상된다. 상대적으로 약점이 많은 레미케이드는 현재 17억 달러에서 2015년 11억 달러로 오히려 감소할 것으로 보고서는 내다보고 있다.

- 휴미라와 엔브렐은 1990년대 말부터 인기를 누려왔으며, 환자 자신이 허벅지나 팔뚝에 직접 투여 할 수 있다는 장점도 있다. 그리고 장기적인 약물의 효과와 안전성에 대해 잘 알려졌기 때문에 앞으로도 의사들이 처방을 늘릴 것이라고 평가하고 있다. 반면에, 레미케이드는 정맥에 투여해야 한다는 불편함과 안정성에 대한 불안이 매출의 장애요인이 되고 있다. 따라서 센토코어는 쉐링과 공동으로 레미케이드의 뒤를 이를 TNF-알파 저해제인 고리무맵(Golimumab)을

개발하고 있다. 이 약물이 출시되면 2015년에 3억 5000만 달러의 매출을 올릴 것으로 추정되며, 같은 TNF-알파 저해제인 UCB 파마의 심지아(Cimzia)도 조만간 출시가 예상되어 2015년 매출은 5억200만 달러로 추정되고 있다. (Techno Leaders' Digest (TLD)』 제 110호 2006/07/04).

- 최근에 출시된 류마티스 관절염 치료제인 BMS의 오렌시아와 리툭산도 호조세를 보일 것으로 전망되고 있다. 오렌시아는 T세포 공동자극 조절제로 분류되는 새로운 계열의 약품으로 지난 2월 미국에서 출시됐으며 2015년 11억 달러의 매출이 기대된다. 리툭산과 맙테라는 비호지킨 림프종 치료제로 97년부터 판매 중인 약품으로 항체를 생산하는 CD20-양성 B세포를 저해하는 기작을 갖고 있으며, 승인은 받지 못했지만 이전부터 류마티스 관절염에 처방되어 왔으며 2015년 류마티스 관절염에 대한 예상 매출액은 3억 1,800만 달러이다 (www.chebigen.com/home/?doc=bbs/gnuboard.php&bo_table=news&page=2&wr_id=93&PHPSESSID=f3c9df28e4338d390309f41223c738ac).

- 건강기능식품(건강보조식품, 영양보충용식품, nutritional supplement)으로 분류된 외국의 경우, 관절염 관련 건기식 제품은 국내와 유사한 제품군의 글루코사민, 콘드로이틴, 오메가 3, EPA/DHA 류 제품이 출시되어 있으며, 전 세계 시장규모는 1천억불 이상으로 추정되고 있다 (http://www.hankyung.com/news/app/newsview.php?aid=2008121709976&type=4&nid=920&skin=snapshot&itemcode=083790).

제 7 장　참고문헌

내과학, 서울의대 내과학교실 편, 고려의학, 서울, 1998

식품의약품안전청고시 제2000-60호 “의약품 등의 독성시험기준(2005년 10월 21일 제정)”

약리학 (Katzung's Basic and Clinical Pharmacology) 제11판, 전국의대 약리학 교실편, 고문사, 서울, 2010

http://www.ebn.co.kr/news/n_view.html?id=363492

http://www.hankyung.com/news/app/newsview.php?aid=2008121709976&type=4&nid=920&skin=snapshot&itemcode=083790

http://www.kdra.or.kr/rnd/r_result/result_d_joi.htm

Techno Leaders' Digest (TLD)』 제 110호 2006/07/04

www.chebigen.com/home/?doc=bbs/gnuboard.php&bo_table=news&page=2&wr_id=93&PHPSESSID=f3c9df28e4338d390309f41223c738ac

편집순서 8

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발 사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.