

11-1543
000-002
726-01

발간등록번호
11-1543000-002726-01

새로운
특수의료
용도
식품유형
군 개발
및
산업화

최종보고서
(2019)

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

새로운 특수 의료용도 식품유형군 개발 및 산업화

2019. 03. 29.

주관연구기관/(주)엠디웰아이엔씨
협동연구기관/연세대학교산학협력단
경희대학교산학협력단
참여기업/매일유업(주)

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “새로운 특수의료용도 식품유형군 개발 및 산업화” (개발기간 : 2016. 07. 07. ~ 2019. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 08

주관연구기관명 : ㈜엠디웰아이엔씨 서종원 (인)
협동연구기관명 : 연세대학교 산학협력단 이원용 (인)
경희대학교 산학협력단 이범석 (인)
참 여 기 관 명 : 매일유업(주) 김선희 (인)

주관연구책임자 : ㈜엠디웰아이엔씨 최원선
협동연구책임자 : 연세대학교 강창무
연세대학교 이승민
경희대학교 박유경
참여기관책임자 : 매일유업(주) 김용기

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	316055-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.07.07.~ 2019.12.31	단 계 구 분	3차년도 (최종보고서) / 2년 6개월
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	새로운 특수의료용도 식품유형군 개발 및 사업화			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총 : 21 명 내부 : 21 명 외부 : 0 명	해당단계 연구개발비	정부 : 300,000 천원 민간 : 300,000 천원 계 : 600,000 천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총 : 65 명 내부 : 65 명 외부 : 0 명	총 연구개발비	정부: 780,000 천원 민간: 780,000 천원 계: 1,560,000 천원	
연구기관명 및 소속부서명	(주)엠디웰아이엔씨 연세대학교 산학협력단 경희대학교 산학협력단			참여기업명 매일유업 (주)	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	본 과제를 통해 개발된 제품의 임상연구 결과의 일부분이 현재 논문으로 발표되기 전이며, 공개되지 않은 다양한 노하우를 포함하기 때문에 비공개로 설정하였음
-------------------------	---

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시 설·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록·기탁 번호		10-1775699, 10-1775700									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 췌장암 환자를 대상으로 하여 다양한 케톤 생성식이를 개발하여 환자의 순응도 및 영양상태 개선을 위한 최적의 케톤 : 비케톤의 비율을 임상연구를 통해 확정함
- 위 연구결과를 토대로 상업용 특수의료용도식품 개발에 성공하였음
: 수차례의 관능검사를 통해 최적의 맛을 선정하였으며, 지방함량이 높은 케톤식의 특성상 유화안전성을 높이기 위해 다양한 유화제 및 살균 멸균 조건을 테스트하여 최적 조건 설정
 - 상업용 액상 타입의 특수의료용도 식품을 개발하여 대량이 가능하도록 조건 설정을 완료하였으며, 임상연구를 통해 검증 완료함
- 국내산 향암 식품 소재 (자소엽, 상황버섯, 쑥)를 동물 실험을 통해 향암 효과 검증 완료하였으며, 검토된 향암 소재를 대량 생산화 하여 실제 산업용으로 적용할 수 있도록 조건 설정을 완료함
- 대량생산화된 국내산 향암소재를 상업용 특수의료 용도 식품에 첨가, 대량 생산화 및 임상연구를 통해 효과 검증 완료
- 케톤식을 확장 임상연구를 통해 인지 기능 개선 및 다이어트 식품으로서의 효과 검증 완료

보고서 면수

186

<국문 요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>1. 목적</p> <p>○ 국내 신규 암환자 수는 통계적으로 해마다 20만명 정도씩 발생하고 있습니다. 이들은 다양한 항암치료 및 약물 치료 등에 노출되어 있고, 그로 인해 심각한 식욕 부진 및 영양 불량 상태에 놓이게 됩니다. 또한 이러한 영양불량으로 사망하는 환자의 수는 전체 암환자의 20% 내외로 보고되고 있습니다. 따라서, 본 연구는 이러한 암환자를 위한 전문 특수의료용도식품을 개발하여 그들에게 적절한 영양 공급 및 영양상태를 개선하는데 그 목적이 있습니다.</p> <p>2. 내용</p> <p>○ 1차년도에는 암환자용 전문 특수의료용도식품 개발을 하기 전, 해당도암 환자를 대상으로 50여 종의 다양한 케톤 생성 식이를 개발하였습니다. 본 식이를 활용하여 환자의 순응도 및 케톤 생성 여부를 확인하는 임상연구를 진행하였고, 그 결과 환자의 순응도 및 효과를 고려하여 케톤과 비케톤의 비율을 1.7 : 1로 확정하였습니다.</p> <p>○ 2차년도에는 1차년도에서 확정한 케톤과 비케톤의 비율을 토대로 전문 특수의료용도식품을 개발하였습니다. 개발을 위해 먼저 수 차례의 관능검사를 통해 최적의 맛을 선정하였으며, 특히 지방함량이 높은 케톤식의 특성상 유화안전성을 높이기 위해 다양한 유화제 및 멸균 조건을 테스트하여 최적 조건을 설정하였습니다. 또한, 사용 대상 및 글로벌 트렌드를 반영하여 125ml 무균팩을 사용하였습니다. 이러한 부분들을 반영하여 대량생산 조건을 확립하였고, 임상연구를 통해 검증하였습니다. 임상연구 결과 암환자들의 영양상태 개선에 본 제품이 효과가 있는 것을 확인하였습니다. 또한, 3차년도에 개발 예정인 케톤식 플러스 제품에 사용될 국내산 항암 식품 소재 (자소엽, 상황버섯, 쑥)를 동물 실험을 통해 항암 효과 검증 완료하였으며, 경제성 및 품질 관리 측면 등을 고려하여 자소엽을 선정하였고, 이를 대량 생산화하여 실제 산업용으로 적용할 수 있도록 조건 설정을 완료 하였습니다.</p> <p>○ 3차년도에는 대량생산화된 국내산 항암소재 (자소엽)를 상업용 특수의료용도식품에 첨가, 대량 생산화 및 임상연구를 통해 효과 검증 완료하였습니다. 부가적으로 다양한 케톤식의 활용을 검토하기 위해 인지 기능 개선 및 다이어트 식품으로서의 효과를 임상연구를 통해 검증 하였습니다.</p>
<p>연구개발성과</p>	<p>○ 특허 출원 3건</p> <p>○ 특허 등록 2건 (1건 진행 중)</p> <p>○ 기술이전 1건</p> <p>○ 기술료 납부 1건</p>

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품화 2건 ○ SCI 논문 4건 ○ 비SCI논문 1건 ○ 학술발표 5건 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>○ 본 제품은 현재 케토웰 이라는 이름으로 출시 되어 병원에 판매되고 있습니다. 현재 증가하고 있는 암환자의 식욕 부진이나 영양상태 개선, 환자 삶의 질 향상을 위해 큰 역할을 하고 있으며, 나아가 국내산 농산물 시장의 활성화 및 수출 시장에서도 역할을 할 수 있을 것으로 전망됩니다.</p>				
핵심어	특수의료도 용도등 식품	경장영양	기능성 식이소재	케톤식	대사체분석

<SUMMARY>

Goals and contents of study	<p>1. Goals of study</p> <ul style="list-style-type: none">○ Every year, 200,000 new people are diagnosed with cancer nationally. They are exposed to diverse anti-cancer treatments, and these cause the patients to lose their appetite and become severely malnourished. Plus, around 20% of the patients die reportedly. It is reported that 20% of all cancer patients come to die because of this malnutrition. Thus, the purpose of this research is to develop foods specialized for these cancer patients, which can supply them with well-balanced nutrition and improve their nutritional status. <p>2. Contents of study</p> <ul style="list-style-type: none">○ In the first year, in prior to developing food for special medical purposes specialized to cancer patients, we had developed 50 kinds of diverse Ketogenic diets, targeting the patients of Pancreatobiliary. We have performed clinical research to see the compliance of patients with these diets and whether ketones are formed or not. From the research results, we set the ratio to 1.7: 1 between keto diet and non-keto diet, considering the compliance and effectiveness.○ In the second year, based on the ratio between keto diet and non-keto diet, we have developed a food for special medical purposes. First, we have chosen the best flavor through multiple sensory tests. Since the keto diet is high-fat diet, to increase the emulsion stability of the diet, we have tested diverse emulsifiers and disinfection conditions, and we have reached to set the optimal condition. Also, we used 125ml aseptic package, considering the target users and global trends. Through these activities, we have met the conditions for mass production and proceeded with the verification through the clinical research. It showed that this product works on the improving their nutrition. On top of that, we completed the verification of anticancer effects of domestic anti-cancer ingredients (i.e. <i>Perilla frutescens</i>, <i>Pellinus Linteus</i> and <i>Artemisia princeps</i>) through animal testing. Considering the cost efficiency and the quality management, we have selected <i>Perilla frutescens</i>. Then, we have set up all the environments for mass production of <i>Perilla frutescens</i>.○ In the third year, we have added <i>Perilla frutescens</i> (which is a domestic ingredient and mass-produced) in a commercial food for special medical purposes and mass-produced it. Then we have
-----------------------------	--

	<p>completed the verification of the product by clinical research. Additionally, other effects like the improvement on cognitive function or working as a weight-loss food were also verified through the research.</p>				
Achievement of Goal	<ul style="list-style-type: none"> ○ Application of patents : 3 ○ Registration of patents : 2 ○ Technology transfer : 1 ○ Royalty Payment : 1 ○ Final products : 2 ○ Research article (SCI) : 4 ○ Research article (non SCI) : 1 ○ Presentation at conference : 5 				
Application plan of outcome	<p>○ The product is Ketowell, which has been launched and being sold in hospitals. It has played a big part of improving the appetite, nutrition, and thus the quality of life of cancer patients. Furthermore, it is expected that it will contribute to revitalization of domestic agricultural market and the export industry.</p>				
Key words	Medical food	Enteral Nutrition	functional food	Keton diet	metabolomics

<Agenda>

1. Outline of study-----	10
1-1. Goal and necessity of study-----	10
1-2. Importance of study-----	14
1-3. Implementation strategies and methods of study -----	20
1-4. Scope of study-----	21
2. Contents and results of study-----	34
2-1. Market survey of internal and external products-----	34
2-2. Reference survey-----	42
2-3. Setting up preprocessing methods for analysis of ketone body and metabolome and analysis -----	48
2-4. Development of ketogenic diets for cancer patients and Clinical study-----	58
2-5. Development of Base formula, Setting up a condition of mass production and Clinical study-----	78
2-6. Verification of anticancer effect of domestic anti cancer ingredients in animal study -----	105
2-7. Development of Base formula plus, Setting up a condition of mass production and Clinical study-----	112
2-8. Expanding study of developed products-----	139
2-9. Launching Ketowell-----	161
2-10. Achievements of study-----	165
2-11. Results of study-----	167
3. Achievements of goal and contribution in a relevant subject area-----	175
4. Marketing plan of study results-----	180
Attach. Reference-----	183

< 목 차 >

1장. 연구개발 과제의 개요-----	10
1절. 연구개발 목적 및 필요성-----	10
2절. 연구개발의 중요성-----	14
3절. 연구개발의 추진 전략, 방법-----	20
4절. 연구개발 범위-----	21
2장. 연구 수행 내용 및 결과-----	34
1절. 국내외 관련 제품 시장 현황 조사-----	34
2절. 연구문헌 조사-----	42
3절. 케톤체 및 대사체 분석을 위한 샘플 전처리 방법 정립 및 분석-----	48
4절. 암환자용 케톤식 레시피 개발 및 임상연구-----	58
5절. Base formula 제품 개발, 대량생산 기술 확보 및 임상연구-----	78
6절. 동물실험을 통한 국내산 향암소재의 효과 검증-----	105
7절. Base formula plus 제품 개발, 대량생산 기술 확보 및 임상연구-----	112
8절. 개발된 제품의 추가 확장 연구-----	139
9절. Base formula (케토웰) 출시를 통한 환자식 시장 진출-----	161
10절. 연구개발 성과-----	165
11절. 연구개발 결과-----	167
3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도-----	175
4장. 연구결과의 활용 계획-----	180
붙임. 참고문헌-----	183

1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적 및 필요성

1. 한국인의 사망률 1위, 암환자를 위한 적절한 영양보충 방법의 부재

- 여러 질환 중 특히 급격하게 증가하고 있는 암환자의 수는 1999년 10만명에서 2013년 22만 5천명으로 증가하여 지속적인 증가추세이며, 주된 원인이 생활 습관과 연관되어 있고 특히 음식에 관한 원인이 35%에 차지함
- 이러한 암 환자의 가장 큰 영양문제는 체중감소와 이로 인한 치료 내성 저하 및 면역기능 저하에 의한 합병증 발생임. 암환자의 영양 불량 현상은 비단 국내 암환자만의 문제가 아니고 세계적으로도 전체 환자의 30%에서 90%까지 나타나는 것으로 보고됨. 특히 우리나라의 발병율이 높은 소화기암 환자 (식도암, 위암, 췌장암, 대장암 등)에게서 높은 비율로 나타남. 이들에게서는 수술과 항암치료, 방사선 치료 등에 의한 체중감소, 식욕부진, 구토, 피로, 근손실, 지방 세포 소실 등이 나타나며 심화되면 cancer cachexia로 발전되고 이는 암환자의 주요한 사망 원인이 됨
- 이러한 암 환자 특히 치료 중에 있는 암 환자 영양관리에서 가장 중요한 목표는 적절한 열량 및 단백질 공급을 통해 근육 및 지방조직의 손실을 막고 이를 통해 체중 감소가 일어나지 않도록 하는 것이며, 최근 해외에서는 합병증 발생을 최소화하기 위해 면역기능을 강화할 수 있는 환자용 영양식품이 활발히 상품화되고 있음. 그러나 암환자를 위한 표준 치료식은 개발되지 않은 실정임

2. 케톤식이의 등장과 암치료식으로의 가능성 제기

- 케톤식은 1966년 Hans Krebs에 의해 처음으로 기술되었음. 케톤식은 고지방, 저(혹은 중) 단백질 그리고 저탄수화물로 구성된 식사로 단백질과 탄수화물 대사는 제한된 반면, 지방 대사의 증가로 체내 케톤체(acetoacetate, β -hydroxybutyrate, and acetone)가 다량 생성되어 에너지 대사에 변화를 유발하게 됨
- 케톤 식사는 크게 4가지 종류로 구분하여 설명할 수 있음

가. Long chain triglyceride(LCT)-based diet: 가장 널리쓰이는 식사이며 지방 : 비지

방(단백질과 탄수화물)의 비율을 4:1, 3:1, 2:1 혹은 1:1로 함

나. Medium chain triglyceride(MCT)-based diet: MCT가 LCT에 비해 쉽게 흡수되어 빠르게 간으로 이송되어 케톤체 생성이 빠를 뿐 아니라 지방 함량을 낮추고 단백질과 탄수화물을 높일 수 있기에 식사의 맛을 높일 수 있는 장점을 지님

다. Modified Atkins diet: 덜 제한적이고 맛을 향상시키기 위해 다른 케톤식사에 비해 단백질과 칼로리를 제한하지 않음

라. Low glycemic index diet는 당질지수가 50이하로 낮은 탄수화물 식품의 섭취를 허용하는 식사임

○ 1923년 독일 생화학자인 Otto Warburg가 암세포의 주요 특징으로 암세포가 다량의 글루코즈(glucose)를 이용한다는 비정상적 대사 과정(dysfunctional metabolic process)' 을 제시한 이후 항암치료 방법의 하나로 최근 케톤식사 활용이 활발히 고려되고 있음

○ 글루코오스를 극심하게 제한하고 지방 함량을 높인 케톤식사는 기아 시와 유사한 대사 상태 즉, 혈액 내 케톤체가 많이 생성된 상태를 유발하게 됨. 일반적으로 암세포는 증가된 에너지 요구를 충족하기 위해 반드시 글루코오스를 사용해야 하므로 체내 글루코오스의 절대 부족으로 점점 암세포가 사멸하게 되고 심장, 근육, 두뇌와 같은 기타 정상 세포에서는 대체 에너지 급원으로 케톤체를 사용할 수 있음. 결국 케톤 식사는 이러한 원리 하에 항암 치료 효과를 얻을 수 있다는데 많은 의료인들 및 과학자들의 관심의 대상이 되고 있음

3. 케톤식사를 활용한 사례 연구 보고는 다음과 같음.

○ 1995년 처음으로 더 이상 치료 반응을 보이지 않을 정도로 진행된 두 명의 뇌암 환자에게 중쇄지방산(Medium Chain Triglycerides)을 활용한 케톤식사 요법을 적용한 결과 암세포의 글루코오스 활용이 감소되고 종양의 크기가 줄어드는 것을 PET imaging 검사를 통해 확인했다는 사례가 보고되었음

○ 2007년 독일의 Wuerzburg 대학병원에서 진행된 전이성 뇌암 판정을 받은 16명의 환자들에게 케톤식을 시행한 결과 치료의 부작용을 경험하지 않고 모든 환자에서 삶의 질을 향상시킬 수 있음을 보고하면서 케톤식사가 대부분의 진행된 암환자에게 적절한 치료가 될 수 있다는 결론을 제시함

○ 2010년 이탈리아 Arcispedale Santa Maria Nuova 병원의 사례에 따르면 진행된 성상세포

종(astrocytoma) 진단을 받고 기억력 장애, 두통, 식욕부진을 경험한 65세 여성 환자에게 표준 항암 치료와 함께 케톤식사를 적용한 결과 PET imaging과 MRI 검사로 종양 세포가 완전히 줄어드는 것을 확인함. 또한 케톤식사를 중단한 결과 종양이 재발하기도 하는 등 타 연구와 유사한 반응을 보고한 바 있음

- 2016년 6명의 방사선치료(radiotherapy, RT)를 받는 환자들에게 하루 당질 섭취를 50g 이하로 하고 지방섭취를 올리브유, 코코넛유, 버터, 기(ghee, 버터의 일종), 기름진 생선, 치즈, 고기, 전분함량이 적은 채소로 구성된 케톤식사를 섭취하게 한 결과 근육량 감소 없이 체지방으로 인한 체중 감소와 함께 삶의 질은 안정되면서 초기 질병상태였던 5명의 환자들에게서 종양의 퇴화가 발생하였음

4. 특수의료용도 식품 유형의 다양성 결여

- 현재 우리나라에서 주로 유통되고 있는 특수의료용도 식품은 8가지 (환자용균형영양식, 당뇨병환자용식품, 신장질환환자용식품, 장질환환자용 가수분해식품, 열량 및 영양공급용 의료용도등 식품, 선천성 대사질환환자용 식품, 영유아용 특수조제식품, 연하곤란환자용 점도증진식품)로 구분되어 관리되고 있음

- 병원에서 질환 관련하여 사용되는 특수의료용도등 식품 중 대표적인 영양음료는 4 가지이며 (환자용균형영양식, 당뇨식, 신장질환식, 장질환식), 그 이외에 선천성 대사질환식, 영유아용특수조제식, 연하곤란환자용점도증진식 등이 사용 되고 있으나 매우 제한적이며, 향후 관련 제품의 생산이 더욱 다양하게 세분화, 전문화가 되어야 할 것으로 요구도가 증가 하고 있음

- 국외환자용 영양 식품은 다양한 특정질병 또는 특수목적용을 위한 환자용 영양제품의 개발이 용이한 반면 관련 제품의 특수성 및 다양한 임상연구가 활성화 되지 않아 다양한 환자 집단의 특정질병별 영양식품의 개발이 불가능함

5. 국내 농산물 중 항암 소재의 발굴 및 활용

- 상황버섯 : 소나무 비늘버섯과에 속하는 버섯으로서 뽕나무 줄기에 자생하는 버섯으로 강원도 홍천, 강릉, 정선등지에서 드물게 채취할수 있음. 오래전부터 자궁출혈 및 대하, 월경불순, 장출혈, 위장기능 활성화에 많이 이용 되었으며 최근에 들어 일본의학계에 의해 상황버섯에는 양질의 다당체와 단백질이 다량 함유되어 있다는 사실과 항암효과와, 또한 종양 저지율이 90% 이상 달한다는 보고와 함께 특히 소화기암<위암, 식도암, 십이지장암, 결장암, 직장암,간암>에 효과가 크다는 연구 발표가 있었음

* 상황버섯은 2003.5월 한국식약청으로부터 무독성으로 판명되어 식품으로 변경고시 되었으며 상황버섯 중 자연산인 Phellinus Linteus와 재배산인 Phellinus Baumi 두 종류만 일반인들도 의사 처방이 없이도 먹을 수 있음

○ 껏잎 : 우리나라의 대표 유지작물 중 하나인 들깨는 한반도를 포함한 동부 아시아 지역이 원산지로서 예로부터 집 주변이나 들판에 자생했던 것으로 추정되는 한민족 고유의 작물이며, 들깨잎을 먹는 나라도 전세계적으로 우리나라가 유일함. 들깨는 생선에 많은 오메가-3 지방산을 다량 함유하고 있으며, 특히 오메가-3 지방산은 몸에서 만들지 못해 반드시 섭취해야 하는 필수지방산으로 혈관 청소 기능을 함. 들기름의 지방산 중 오메가-3가 차지하는 비율은 63% 이상으로 이는 식물 기름 중 가장 높은 수치이며, 들기름의 알파 리놀렌산과 껏잎 추출물의 기능성 물질들은 항암 효과가 있어 쥐의 대장암 발생을 53% 줄인다는 연구결과가 있음

* 다방면으로 활용되는 들깨는 한국인들이 유독 좋아하는 작물로 재배면적으로만 볼 때 사과와 비슷하고 종실들깨와 잎들깨의 총 생산액은 약 2847억 원이며, 가공, 유통 및 음식점 등의 부가가치를 감안하면 7000억원이상 될 것으로 추정됨

○ 쑥 : 아르테미신(Artemisin)을 풍부하게 함유하여서 항암효과가 매우 큰 우리나라 농작물임. 본 연구실에서 쑥의 항암효과를 보기 위해 유방암 세포(MCF-7)를 통해 세포 생존율과 미토콘드리아를 통한 세포사멸을 확인해 본 결과 세포 생존율 측정에서는 세포 주기의 sub-G1 단계의 증가와 함께 농도와 시간 의존적으로 감소하는 효과가 있었음. 또한 유방암 세포의 세포사멸을 보기 위한 실험에서는 세포사멸 관련 단백질인 Bax와 Bcl-2 비율의 감소가 세포막에서의 cytochrome c 분비를 증가시키고, 이것은 caspase-3의 활성화 및 PARP 분해를 통해 세포사멸이 유도됨을 밝혔음. 따라서, 강화약쑥은 유방암 세포를 미토콘드리아 경로를 통한 세포 사멸을 유도하여 유방암 세포의 증식을 억제하는 것으로 확인이 된 바 있음

6. 국내 농산물을 첨가한 암환자용 특수의료용도등제품의 개발 및 상업화

○ 상황버섯, 들깨, 쑥 등의 국내 소재에서 활성 기능성 물질을 이용하여 특수의료용도등 제품에 첨가하여 효능을 증진시키는 제품을 개발하여 차별화된 제품을 만드는 것이 목표임. 외국에서 암환자를 위한 제품에는 arginine과 glutamic acid 을 함유한 제품이나, 오메가-3 지방산을 많이 함유한 제품의 개발이 증가되고 있지만 적절한 암환자의 치료식은 아직도 개발되지 않은 실태임. 현재 해외에서 사용되고 있는 케톤유발 영양제품은 3,4가지가 있으며 아래와 같은 구성으로 판매되고 있으므로 국내 개발과 상업화의 전망은 밝을 것으로 예상됨

따라서, 본 연구는 지속적으로 증가하고 있는 암환자에게 항암치료 등 다양한 원인으로 발생

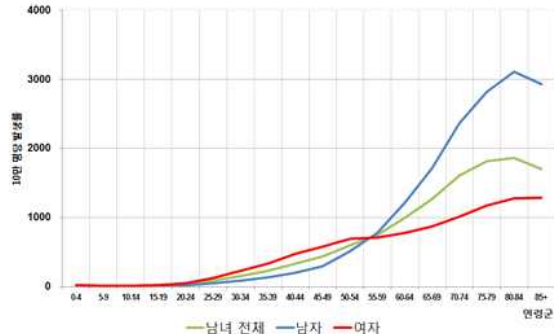
하고 있는 영양불량을 예방하기 위해 임상연구로 검증된 제품을 제공함으로써 암환자의 영양 상태 및 삶의 질을 개선하고 나아가 국내 특수의료용도등 식품 시장 발전을 도모하는데 그 목적과 필요성이 있음

2절. 연구개발의 중요성

1. 암 환자의 급증 추세 및 이로 인한 사회 경제적 파급효과



암발생을 증가 추이

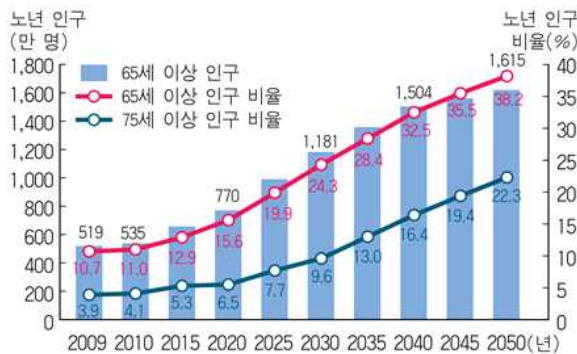


연령별 암 발생률 증가

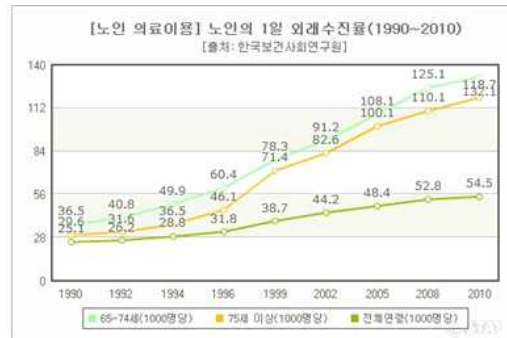
그림 1-2-1. 암발생을 증가 추이 및 연령별 암 발생률 증가

(출처 : 국립암정보센터 통계 자료)

○ 국내 암 환자 발생은 꾸준히 증가하고 있으며, 이는 국내 인구의 고령화와 직접적인 연관이 있는 것으로 사료됨 (그림 1-2-1)



노령 인구 급증 추이



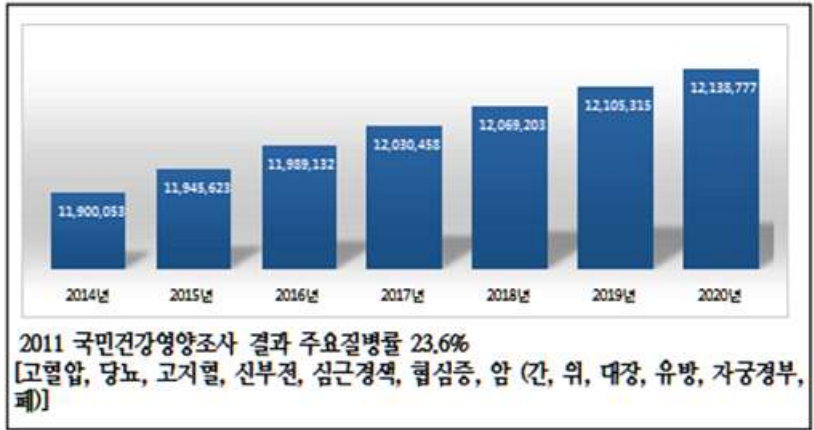
노령 인구 의료 이용 증가 추세

그림 1-2-2. 노령 인구수 및 의료이용 증가 추세

(출처 : 보건복지부 통계 자료)

- 최근 노령 인구 급증 추세는 장기간 이어질 것으로 전망되고 있으며, 이로 인한 암 발생율의 증가로 의료비 증가 및 국가 보건의료 관련 재정 투입액은 기하급수적으로 증가할 것으로 예측됨 (그림 1-2-2)
- 결과적으로 암 환자의 급격한 증가와 이로 인한 사회경제적 파급효과는 국가 경제와 보건의료 관련 주요 이슈로 부각될 것이 분명함

2. 현재의 암 환자 관련 특수의료용도 식품 현황 및 문제점



주요 질병 환자 중 영양 불균형 현황

그림 1-2-3. 주요 질병 환자 중 영양 불균형 현황

(출처 : 국민건강영양조사)

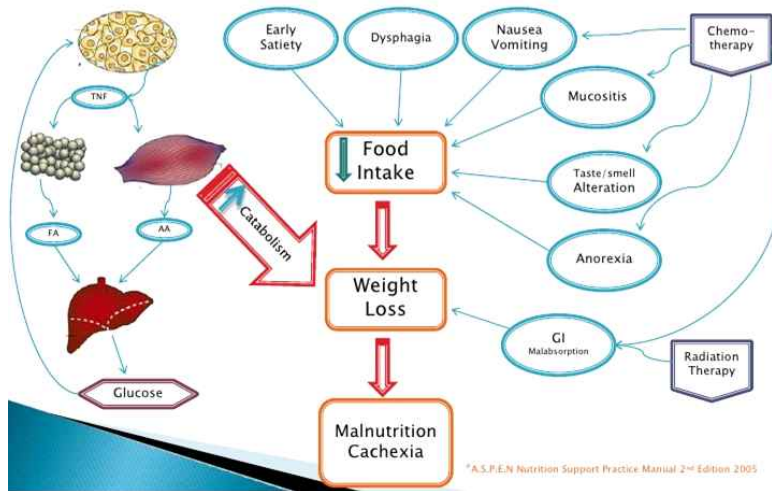
- 인구 고령화로 인하여 각종 주요 질병 발생을 및 유병율이 증가추세에 있지만, 그에 적합한 특수의료용도의 식품의 개발은 속도를 내고 있지 못하며, 특히 임상연구를 토대로 개발된 암 환자를 위한 특수의료용도 식품은 전무한 상황임
- 따라서, 암 환자에 특화된 특수의료용도 식품의 연구개발이 절실히 요구되며, 본 연구진은 케톤식이 관련 항암 효과의 의학적 근거를 기반으로 암환자용 식이 포물러의 개발 및 특수의료용도 식품의 연구 개발에 착수하였음

3. 항암 소재를 기반으로 한 암 환자 특수의료용도 식품의 가능성

가. 암 관련 영양 불균형 발생 기전

○ 암은 발생부터 국소 진행 및 원격 전이까지 암세포의 기하급수적인 성장을 위해 인체의 에너지 대사를 적극 활용하며, 암의 병기가 증가함에 따라 인체의 정상적인 대사 과정을 교란하여 궁극적인 암 관련 영양 불균형을 초래함

○ 이와 같은 암 관련 대사 이상은 암 환자의 악액질(Cachexia)를 유발하여 삶의 질 저하, 합병증 발생, 직접적인 암 관련 사망을 유발하는 직접적인 원인이 됨



암 관련 전신 대사 이상 발생 기전

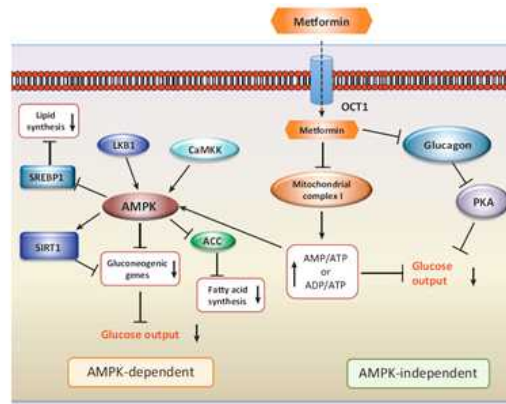
그림 1-2-4. 암 관련 전신 대사 이상 발생 기전

(출처 : 미국정맥경장영양학회 ASPEN 2015 보고서)

○ 따라서, 암 환자의 삶의 질 향상 및 생존 기간 향상을 위한 식이 관련 연구 개발은 필수적이지만 전세계적으로 그에 대한 관심과 연구 성과는 초기 단계임 (그림 1-2-4)

나. 암 대사 관련 표적 치료 현황 및 가능성

○ 한편 암의 특징적 대사 이상을 표적으로 한 대사 관련 치료법이 새로운 영역으로 인정받고 있으며, 전 세계적으로 선도적 연구개발이 이루어지고 있음



당뇨병 치료제 Metformin의 항암작용 기전

그림 1-2-5. 당뇨병 치료제 Metformin 소개

(출처 : 홈페이지)

○ 대표적인 당뇨병 치료약제로 사용되어 온 Metformin(Biguanide계열)은 최근 그 암 예방 기능 및 항암 작용 기전이 알려져 다양한 암에서 임상시험을 통한 검증이 진행되고 있음

○ Metromin은 암 세포의 성장 및 전이를 직접적으로 억제하는 세포내 신호전달 물질 AMPK(AMP-activated protein kinase)의 작용을 촉진시켜 다양한 항암 효과를 가지는 것으로 알려져 있음

○ 또한 암 대사 관련하여 각종 표적 치료제들이 현재 전 세계적으로 임상 시험에 돌입하고 있음

○ 따라서 암 대사 관련 식이요법에 대한 연구 개발은 매우 필수적인 과제이나, 아직 국내외 연구 현황은 증례보고 및 개별 연구자를 통한 소규모 연구에 그치고 있음

다. 암 대사 표적의 식이 요법의 개발

○ 해당과정(Glycolysis)에 집중된 암 조직의 특이적 대사 반응을 타겟으로 한 케톤식이(Ketogenic diet)가 항암 치료 식이 방법으로 주목 받고 있음

○ Ketogenic diet는 암 조직이 이용하기 힘든 ketone body를 체내에 증가시킴으로서 암 대사를 차단하는 것으로 알려짐

- 소수의 연구자들에 의해 암 치료 보조요법으로서의 가능성이 제시되고 있으나 현재까지 대규모 연구 및 검증이 체계적으로 이루어지지 못함
- 따라서 본 연구진은 Ketogenic diet의 치료 식이로서의 가능성을 문헌고찰, 기초실험(In vivo) 및 췌담도암 환자를 대상으로 한 임상시험을 통하여 검증하고자 함
- 특히 암 환자의 외과적 절제술 후의 체내 잔존 미세 암세포의 운명은 최종적인 수술 후 재발을 결정짓는 요소이며, 수술 전 후 환자의 영양 상태는 잔존 미세 암세포의 대사 및 면역 기능에 영향을 미쳐 결국 암 환자의 예후를 결정함
- 암 대사 관련 표적치료에 대한 관심과 연구는 전세계적으로 증가 추세이나, 식이요법을 이용한 항암 전략에 대한 연구는 전무한 수준임
- 현재 임상 진료 가이드라인 하에서는 암 환자가 외과적 절제술을 시행 받은 후 보조 항암 치료를 받기 전까지 약 1~2개월 간 재발 억제를 위한 어떠한 치료도 받고 있지 못하는 실정임
- 본 연구진은 수술 전후 및 항암 치료를 시행받기 전까지 암 환자의 재발을 억제하기 위한 동원 가능한 모든 전략을 수립하고 있으며, 수술 환자에서 식이요법은 매우 중요한 위치를 차지하고 있으며 항암 특수식이요법의 개발은 매우 필요한 과제임
- 따라서 본 연구진은 관련 분야의 포괄적 학문적 업적 구축 및 선도적 특수식이 개발 및 관련 제품 산업화를 통하여 암 환자 생존율 및 삶의 질 향상, 나아가 보건 의료 관련 비용 부담 완화 및 관련 산업의 선도적 발전으로 국가 경제에 이바지 하고자 함

라. 개발된 항암치료식 개발 후 metabolomics를 이용한 암환자 심층 분석

(1) Metabolimcs를 이용한 개발된 암환자 식품섭취에 따른 혈액내 대사체 분석

Metabolomics는 대사체학이라고도 하며, 생체 내 단백질 기능에 의해 나타나는 대사물질들의 생성 및 전환을 종합적으로 연구함. 이는 mRNA발현이나 proteomics가 알려주지 못하는 어떠한 특정 순간에 세포내에서 일어나는 생리학적, 대사적, 화학적 현상에 대한 정보를 제공함. 현재는 인간대사체 연구 프로젝트(Human metabolome project)를 통해 2500개의 대사산물을 포함한 인간 대사체 초본이 완성되었으며 현재 40,000종이 넘는 인간 대사체

정보 및 이중질량분석 (Tandem mass) 스펙트럼 데이터가 METLIN 데이터베이스를 통해 제공되고 있음. 대사체학에서는 가스크로마토그래피(Gas chromatography; GC), 고성능액체크로마토그래피(High performance liquid chromatography; HPLC), 모세관전기이동(Capillary electrophoresis; CE)과 같은 분리기술과 함께 질량분석기(Mass spectrometer; MS), 핵자기공명(Nuclear magnetic resonance; NMR)과 같은 탐지기술 및 다양한 통계적 방법을 사용하여 대사체를 확인하고 목록을 작성하며 스펙트럼을 분석함. 예로, 건강한 사람 5명과 췌장암 환자 5명의 혈장에 대해 GC/TOF-MS, LC/ESI-MS, LC/LTQ-Orbitrap로 metabolomics를 실시함. 췌장암 환자에게서는 arachidonic acid, erythritol, cholesterol, N-methylalanine 등이 증가하였고, glutamine, hydrocinnamic acid, phenylalanine, tryptamine의 수치가 감소하는 것으로 나타남. 또한 건강한 사람 78명과 폐암환자 85명의 혈장에서 NMR로 metabolomics를 실시하였을 때, 암환자와 정상인을 비교하였을 때, acetate, alanine, citrate, glucose 등이 증가하였고, lactate, pyruvate는 감소하는 것으로 나타남. 전립선암 환자 30명과 건강한 성인 30명의 혈장에서 Mass spectrometry analysis를 이용하여 metabolomics를 실시하였을 때, 암환자에게서 dimethylheptanoyl carnitine, arachidonoyl amine 등이 증가하였고, isolithocholic acid, testosterone sulfate 등이 감소하는 것을 관찰함. 따라서 암환자에게 식이를 섭취하게 한 후 metabolomics로 분석하면 혈장에서 어떠한 변화가 나타났는지에 대해 알 수 있고, 또한 그것이 어떠한 유전적 메커니즘의 배경이 되는지에 대해 판단할 수 있는 근거가 될 수 있음

(2) 지방산 분석을 이용하여 암환자 식품섭취에 따른 혈액내 케톤체 분석

케톤식은 매우 소량의 탄수화물과 소량의 단백질, 다량의 지방을 섭취하는 식이로 ATP 합성에서 포도당 대신 지질을 태워 에너지를 생성하는 것. 케톤식을 섭취하게 되면 간에서 산화가 일어나 지방산이 되는데 이때 acetoacetate, β -hydroxybutyrate, acetone와 같은 케톤체를 형성. 케톤은 혈액으로 운반되어 조직에서 acetyl-CoA로 전환되게 되고, 시트르산 회로에서 첫 번째 단계의 기질이 됨. 케톤식의 효과를 측정하는 방법은 혈청과 소변에서 β -hydroxybutyrate의 양을 측정함으로써 확인 가능. C57BL/6 albino 마우스에게 악성 뇌교종을 일으킨 후 케톤식을 섭취하게 하면 종양의 성장을 억제하고 생존률을 높이는 것을 발견. 또한 누드 마우스에 위암세포를 감염시킨 후 케톤식을 섭취하게 하면 종양의 성장을 억제하고 크기도 줄이는 것을 발견함. 암환자들에게 중쇄지방산 triglyceride 60%, 기타 지방 10%, 단백질 20%, 탄수화물 10%로 이루어진 케톤 식이요법을 사용하여 8주간 외래 통원치료를 함. 케톤식이요법을 실시한 7일 후 혈당 수준은 정상 하한까지 떨어졌고, 혈중 케톤체는 20~30배 가량 높아짐. positron emission tomography(PET)촬영법을 이용한 검사에서 종양이 있는 부위에서 포도당 흡수는 평균 21.8% 떨어져, 종양의 발생에 대한 현저한 개선과 장기간의 연명효과가 있었음이 보고됨. 65세 이상의 뇌종양 환자에서 케톤식을 2달간 섭취하게 하였을 때, 뇌의 종양이 FDG-PET와 MRI로 검사하였을 때 더 이상 종양이 나

타나지 않은 것을 보였고(재발하지 않음), 혈중 포도당 농도는 낮아지고 케톤은 증가한 것으로 나타남. 따라서 케톤식을 섭취한 환자의 혈중의 케톤체(지방산)을 측정하여 케톤식이 제대로 적용되었는지 확인하고, 다른 지질에 어떠한 영향을 미쳤는지 확인할 수 있음

3절. 연구개발 추진 전략·방법

1. 1차년도 base 포뮬라 개발을 위해 시장 조사 및 문헌 조사를 통해 제품을 비교 분석하고 임상 연구결과를 확인하여 다양한 data base를 구축함
2. 구축된 data base와 다양한 케톤식이를 개발하여 임상연구를 통해 환자 순응도 및 효과를 검증하여 base formula의 핵심 배합비율을 확정함
3. 상업용 암환자용 케톤생성 식이를 개발하기 위해 다양한 유화 안정성 및 열 안정성이 요구되고, 국내 보다 유화 안정 기술이 우수한 일본 전문가의 조언을 수렴하여 제품 개발에 적극 활용할 예정임, 또한 최신 관능 검사 시스템을 보유하고 있는 매일유업의 장점을 활용하여 유화 안정성과 관능적으로 우수한 제품을 개발함
4. 다양한 설문 조사 및 문헌 조사를 통해 최적의 포장 용기 및 용량을 설정하고 대량생산 시스템 구축을 확립함
5. 개발된 제품을 임상연구를 통해 효능을 검사하고 케톤체 및 대사체를 분석하여 암환자용 제품으로서의 효과를 객관적으로 검증함
6. 국내산 향암 소재를 동물 실험을 통해 검증하고 선정된 향암소재 (자소엽)를 대량 생산 시스템 구축 완료하였으며, 그 원료를 개발된 base formula에 첨가하여 base formula plus를 개발하였으며, 동일하게 임상연구, 케톤체 그리고 대사체 분석을 통해 효과를 확인함
7. 개발된 케톤생성식이를 다이어트 및 인지기능 개선에 효과를 확인하기 위해 확장 연구를 진행하였으며, 임상연구를 통해 관련 분야에 적용 가능성을 확인하였음

* 본 연구개발 추진을 위한 전략은 아래 그림과 같음(그림 1-3-1)

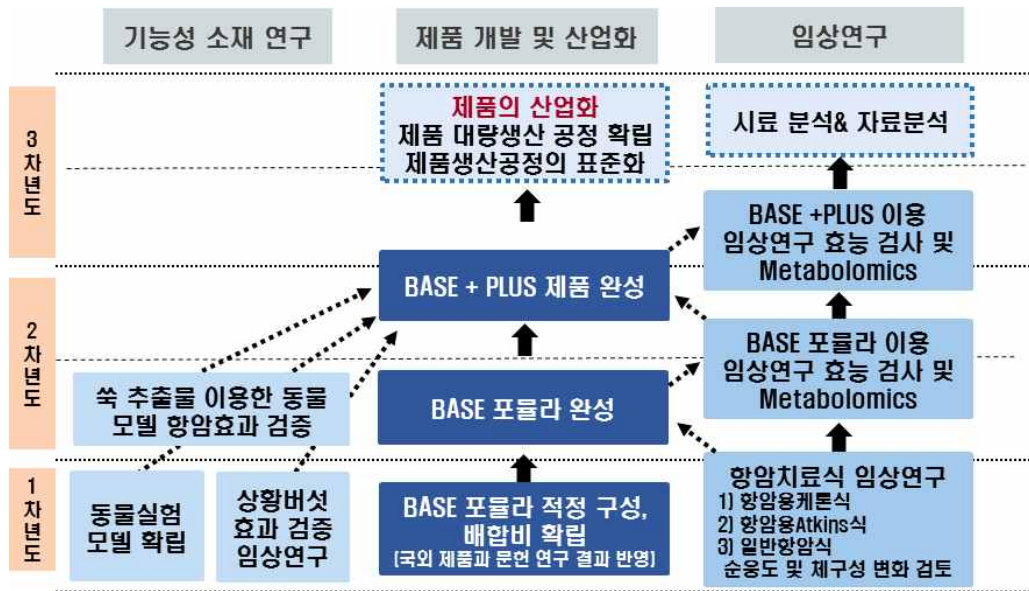


그림 1-3-1. 연차별 단계별 연구내용 및 범위 구조도

4절. 연구개발 범위

1. 1차년도

		코드번호	C-04
연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용	
국내외 관련 항암치료식 적용 가능한 해외 연구 문헌 및 제품의 구성 조사	국내 문헌 검색엔진과 해외 pubmed, medline, cochorane library, clinical trial.com 등의 검색사이트를 통한 총체적인 검색	1) 국내 환자식 시장 및 제품 현황 조사 - 국내 환자식 제품 구매 및 제조사 홈페이지, 검색 엔진을 통한 정보 수집 - 식품 관련 잡지, 시장현황 자료를 통한 정보 수집 2) 해외 환자식 시장 및 제품 현황 조사 - 해외 환자식 제품 구매 및 제조사 홈페이지, 검색 엔진을 통한 정보 수집 3) 문헌조사 - pubmed, google scholar 등의 학술검색엔진 이용	
Base formula 제품 개발	연세대학교의 1차식이 임상연구 결과를 토대로 케톤 : 비케톤 비율이 약 1.7 : 1로 구성된 base formula 설계	1) 문헌 및 국내외 시장조사 결과를 바탕으로 케톤체 형성을 위한 고지방, 저탄수화물 제품 개발을 위해 케톤 : 비케톤 비율을 약 4:1로 구성함을 확인하였으나, 암환자용 식품임으로 고려하고 (암환자의 단백질 요구량), 1차 연세대학교의 임상연구 결과를 토대로 케톤 : 비케톤의 비율을 1.7 : 1로 설계함 2) 문헌조사를 통해 지방 급원 중 MCT oil이 일반적인 유지보다 케톤체 생성에 효율적이라는 결과를 토대로 총 칼로리 중 MCT oil의 비율을 설정함	

		3) 영양성분은 한국인 영양권장량, ESPEN 가이드라인 참고함
관능검사	훈련된 소비자 패널 34인을 대상으로 관능검사 실시	1) 향 선정 - 30가지 향을 곡물향, 과일향, 기타향 3가지 타입으로 grouping 하여 그룹별로 ranking test 실시하여 그룹 별 2가지 향으로 1차 screening 한 후 총 6가지 향 중 최종 3가지 향으로 2차 screening 함. 2) 관능평가 - 대상 : 매일유업 연구소 소비자 패널 34인 - 시료 : Base formula에 최종 선정된 3가지 향을 조합한 샘플 - 방법 : 9점 척도법으로 전체적인 만족도, 향에 대한 만족도/강도, 이미/이취에 대한 강도, 목넘김 후의 뒷맛 깔끔한 정도의 기호도/강도를 측정함. 세 가지 시료의 종합적인 기호도를 고려한 순위 측정함. - 추가적으로 장/단점에 대해 자유기술 하도록 함.
pilot design & lab scale trial	제품의 안전성, 유효 안정성을 고려하여 공정을 설계함	1) 현재 운영되고 있는 환자용 제품들의 제조 기술을 바탕으로 공정 개발 2) pH, brix, 지방 측정 결과를 바탕으로 규격을 설정함
케톤식사 관련 임상연구를 위한 기반 조성 및 연구개시	케톤식사 관련 임상연구 진행	1) 케톤식사 관련 임상연구 IRB 최종 승인 (2016.11.01.) - 세브란스병원 IRB 임상 연구 승인 통보서 (별도 제출) 2) 케톤식사 관련 임상연구 개시 (2016.11.07) - 췌담도암 (췌장암, 십이지장암, 바터씨팽대부암, 원위부 담도암 등) 대상의 임상연구 환자 모집 시작 - 본원 영양과에서 개발한 케톤식사의 췌담도암 환자에서의 적용 및 순응도 관련 연구 [향암용케톤식, 향암용atkins식, 일반향암식] - 표준 식사 환자군 대비 케톤식사군에서의 췌담도암 수술 후 영양지표, 체성분구성, 생화학적 조사, 면역 기능, 수술 관련 합병증 조사 3) 케톤식사 관련 임상연구 임상코호트 구축 - 케톤식사에 참여한 췌담도암 환자의 임상 코호트 구축 및 예후 추적 관찰
성인용 케톤식 레시피 개발	높은 순응도 및 케톤체 검출을 위한 최적 ratio 확인을 위한 레시피 개발	1) 순응도 검사 및 케톤체 검출을 확인하기 위한 다양한 레시피를 개발하였고, 임상을 통해 증명함 2) 대표적인 레시피는 특허출원을 통해 등록 완료됨
대사체 분석에	기존의 연구결과 문헌고찰	1) 대사체 분석에 사용할 혈액 지표로 민감도가 높은 혈청을 적합함

적합한 혈액 지표 선정		<p>2) 대사체학적 바이오마커 탐색 과정에 혈청이 더 적합함</p> <p>3) 보관 시간에 따른 영향을 덜 받는 것으로 보고됨</p> <p>4) 따라서 해당 연구에 적합한 혈액지표는 혈청임을 확인</p>
혈액 샘플 채취 전처리 수행 방법 확립	기존의 연구결과 문헌고찰	<p>* 혈청 전처리 수행 방법 선정</p> <p>1) 혈청은 혈장과 달리 분리과정에서 방치과정이 수반됨</p> <p>2) 민감하게 반응하는 대사체의 차이를 줄이기 위하여 각기 다른 시점에 채취되는 혈액 샘플에 시간과 온도에 따른 영향이 동일하도록 유지시켜야 함</p> <p>3) 방치되는 시간을 기록하고 방치되는 온도를 4℃로 동일하게 유지해야함</p> <p>4) Metabolomic profiling에 적합한 혈청 분리 방법 프로토콜 확립</p>
대사체 분석을 위한 실험조건 조사 및 확립	기존의 연구결과 문헌고찰 및 전문가 자문	<p>1) 대사체 분석의 신뢰도(quality control)를 높이기 위한 실험 조건 수립</p> <p>(가) 대사체 분석에 적합한 내부표준물질을 선정하며 외부표준물질을 analysis batch 중간에 추가하여 대사체학 분석 신뢰도, 재현도 및 정확성 증가 (Normalization에 사용) 시킬 수 있는 실험 조건 확립함</p> <p>(나) 기기에 장착하는 column의 분석능이 뛰어나고 오염이 적음을 확인</p> <p>(다) 대사체 추출 용액으로 이루어진 Blank 물질 분석을 통해 샘플의 노이즈 제거에 활용함</p> <p>(라) Ion mode를 positive(ES+)와 negative(ES-) 모두에서 분석</p> <p>(마) 대사체의 특성에 따라 분석되지 않는 것이 없도록 함</p> <p>2) Pilot 실험을 통한 혈청 대사체 추출 방법 확립</p> <p>(가) 샘플 농축 과정에 질소기체를 이용한 건조 방법과 동결건조기를 활용하여 추출되는 대사체의 차이 비교</p> <p>(나) 동결건조기를 활용한 추출방법은 다양한 대사체 추출할 수 있으며, 실험 수행자에 의한 오차를 줄여줌을 확인</p>
기수집된 혈액 샘플을 대상으로 혈액 샘플	확립된 조건에 따라 UPLC-MS(LTQ-Or bitrap)기기를	-암환자를 위한 대사체 분석과 동일하게 균을 나누어 Pilot 대사체 분석을 수행

	<p>활용하여 혈청 대사체 분리 분석 시행</p>	<table border="1" data-bbox="784 168 1160 560"> <thead> <tr> <th colspan="2">UPLC-MS ES(+)</th> <th colspan="2">UPLC-MS ES(-)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>QC sample</td><td>1</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>2</td><td>QC sample</td><td>2</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>3</td><td>QC sample</td><td>3</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>4</td><td>QC sample</td><td>4</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>5</td><td>QC sample</td><td>5</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>6</td><td>QC sample</td><td>6</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>7</td><td>QC sample</td><td>7</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>8</td><td>QC sample</td><td>8</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>9</td><td>QC sample</td><td>9</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>10</td><td>QC sample</td><td>10</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>11</td><td>Column Check solution</td><td>11</td><td>Column Check solution</td></tr> <tr><td>12</td><td>대조군1</td><td>12</td><td>대조군1</td></tr> <tr><td>13</td><td>대조군2</td><td>13</td><td>대조군2</td></tr> <tr><td>14</td><td>대조군3</td><td>14</td><td>대조군3</td></tr> <tr><td>15</td><td>실험군1</td><td>15</td><td>실험군1</td></tr> <tr><td>16</td><td>QC sample</td><td>16</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>17</td><td>Saline blank</td><td>17</td><td>Saline blank</td></tr> <tr><td>18</td><td>Saline blank</td><td>18</td><td>Saline blank</td></tr> <tr><td>19</td><td>실험군2</td><td>19</td><td>실험군2</td></tr> <tr><td>20</td><td>실험군3</td><td>20</td><td>실험군3</td></tr> <tr><td>21</td><td>QC sample</td><td>21</td><td>QC sample</td></tr> <tr><td>22</td><td>Column Check solution</td><td>22</td><td>Column Check solution</td></tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> - XCalibur(ThermoFisherScientific) software를 사용 - LC-MS(LTQ-Orbitrap)을 구동 - 투입된 샘플의 양은 5µl - 실험조건 m/z range 50-1000 mass 400(FWHM)에 mass resolution 30,000 scan time 0.4s 	UPLC-MS ES(+)		UPLC-MS ES(-)		1	QC sample	1	QC sample	2	QC sample	2	QC sample	3	QC sample	3	QC sample	4	QC sample	4	QC sample	5	QC sample	5	QC sample	6	QC sample	6	QC sample	7	QC sample	7	QC sample	8	QC sample	8	QC sample	9	QC sample	9	QC sample	10	QC sample	10	QC sample	11	Column Check solution	11	Column Check solution	12	대조군1	12	대조군1	13	대조군2	13	대조군2	14	대조군3	14	대조군3	15	실험군1	15	실험군1	16	QC sample	16	QC sample	17	Saline blank	17	Saline blank	18	Saline blank	18	Saline blank	19	실험군2	19	실험군2	20	실험군3	20	실험군3	21	QC sample	21	QC sample	22	Column Check solution	22	Column Check solution																																																																																																																																																																																																																																																																																
UPLC-MS ES(+)		UPLC-MS ES(-)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
1	QC sample	1	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
2	QC sample	2	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
3	QC sample	3	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
4	QC sample	4	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
5	QC sample	5	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
6	QC sample	6	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
7	QC sample	7	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
8	QC sample	8	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
9	QC sample	9	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
10	QC sample	10	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
11	Column Check solution	11	Column Check solution																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
12	대조군1	12	대조군1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
13	대조군2	13	대조군2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
14	대조군3	14	대조군3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
15	실험군1	15	실험군1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
16	QC sample	16	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
17	Saline blank	17	Saline blank																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
18	Saline blank	18	Saline blank																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
19	실험군2	19	실험군2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
20	실험군3	20	실험군3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
21	QC sample	21	QC sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
22	Column Check solution	22	Column Check solution																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
<p>전처리 및 pilot실험 수행</p>	<p>혈청 대사체 profiling 수행</p>	<p>1) 기수집된 혈액 샘플을 통한 pilot실험 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - m/z에 따라 혈청에서 3279개의 compound가 감지 - QC sample을 기준으로 SIEVE software를 사용하여 normalization을 수행한 결과 428개의 물질에 대한 후보물질 발견 <table border="1" data-bbox="580 1075 1356 1444"> <caption>Frame Table: 428 Items</caption> <thead> <tr> <th>CompID</th> <th>ID</th> <th>CompMW</th> <th>Formula</th> <th>MZ</th> <th>Time</th> <th>HiCount</th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>47</td> <td>52</td> <td>60.03225449</td> <td>C2H9O2N4</td> <td>121.071785</td> <td>0.945557296</td> <td>2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="14">Detail Table: 2 Items</td> </tr> <tr> <td></td> <td>CSID</td> <td>Name</td> <td>Formula</td> <td>SMILES</td> <td>MW</td> <td>AvgMass</td> <td>MonoisotopicMass</td> <td>SearchMass</td> <td>DeltaPPM</td> <td>Adduct</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>1143</td> <td>Linea</td> <td>CH4IN2O</td> <td>C(-)N(N)O</td> <td>60.0553</td> <td>60.0553</td> <td>60.032364</td> <td>60.03225449</td> <td>1.824243128</td> <td>comp</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>###</td> <td>N-Nibrosomethanamine</td> <td>CH4IN2O</td> <td>CNN=O</td> <td>60.0553</td> <td>60.0553</td> <td>60.032364</td> <td>60.03225449</td> <td>1.824243128</td> <td>comp</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>405</td> <td>416</td> <td>69.05794769</td> <td>C4H8N1</td> <td>70.06522269</td> <td>1.012925148</td> <td>2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="14">Detail Table: 2 Items</td> </tr> <tr> <td></td> <td>CSID</td> <td>Name</td> <td>Formula</td> <td>SMILES</td> <td>MW</td> <td>AvgMass</td> <td>MonoisotopicMass</td> <td>SearchMass</td> <td>DeltaPPM</td> <td>Adduct</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>6311</td> <td>Isopropyl cyanide</td> <td>C4H7N</td> <td>CC(C)C#N</td> <td>69.1051</td> <td>69.1051</td> <td>69.057846</td> <td>69.05794769</td> <td>1.472587169</td> <td>comp</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>###</td> <td>3,4-Dihydro-2H-pyrimole</td> <td>C4H7N</td> <td>C1CC=NC1</td> <td>69.1051</td> <td>69.1051</td> <td>69.057846</td> <td>69.05794769</td> <td>1.472587169</td> <td>comp</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>431</td> <td>443</td> <td>71.07341248</td> <td>C4H10N1</td> <td>72.08068848</td> <td>1.112132668</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="14">Detail Table: 1 Items</td> </tr> <tr> <td></td> <td>CSID</td> <td>Name</td> <td>Formula</td> <td>SMILES</td> <td>MW</td> <td>AvgMass</td> <td>MonoisotopicMass</td> <td>SearchMass</td> <td>DeltaPPM</td> <td>Adduct</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>###</td> <td>3-Buten-1-amine</td> <td>C4H9N</td> <td>C=CCN</td> <td>71.121</td> <td>71.121</td> <td>71.073502</td> <td>71.07341248</td> <td>1.258591096</td> <td>comp</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>547</td> <td>574</td> <td>85.08909851</td> <td>C5H12N1</td> <td>86.09637451</td> <td>2.367098093</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="14">Detail Table: 1 Items</td> </tr> <tr> <td></td> <td>CSID</td> <td>Name</td> <td>Formula</td> <td>SMILES</td> <td>MW</td> <td>AvgMass</td> <td>MonoisotopicMass</td> <td>SearchMass</td> <td>DeltaPPM</td> <td>Adduct</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>7791</td> <td>Piperidine</td> <td>C5H11N</td> <td>C1CCNCC1</td> <td>85.1475</td> <td>85.1475</td> <td>85.089149</td> <td>85.08909851</td> <td>0.593357812</td> <td>comp</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>576</td> <td>85.08909851</td> <td>C5H12N1</td> <td>86.09637451</td> <td>2.368893267</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="14">Detail Table: 1 Items</td> </tr> <tr> <td></td> <td>CSID</td> <td>Name</td> <td>Formula</td> <td>SMILES</td> <td>MW</td> <td>AvgMass</td> <td>MonoisotopicMass</td> <td>SearchMass</td> <td>DeltaPPM</td> <td>Adduct</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>7791</td> <td>Piperidine</td> <td>C5H11N</td> <td>C1CCNCC1</td> <td>85.1475</td> <td>85.1475</td> <td>85.089149</td> <td>85.08909851</td> <td>0.593357812</td> <td>comp</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>610</td> <td>640</td> <td>89.04755646</td> <td>C5H9N</td> <td>90.05483246</td> <td>0.92386663</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="14">Detail Table: 8 Items</td> </tr> <tr> <td></td> <td>CSID</td> <td>Name</td> <td>Formula</td> <td>SMILES</td> <td>MW</td> <td>AvgMass</td> <td>MonoisotopicMass</td> <td>SearchMass</td> <td>DeltaPPM</td> <td>Adduct</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>2) 두 군에 대한 통계분석 수행</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유의미한 차이가 있는 물질은 3279개 중 26개 - 이 중 후보물질을 찾을 수 있던 물질 428개 중 3개 - pilot실험을 통해 확립된 방법이 암환자의 대사체 분석에 적합함을 확인함 	CompID	ID	CompMW	Formula	MZ	Time	HiCount								47	52	60.03225449	C2H9O2N4	121.071785	0.945557296	2								Detail Table: 2 Items															CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct					1143	Linea	CH4IN2O	C(-)N(N)O	60.0553	60.0553	60.032364	60.03225449	1.824243128	comp					###	N-Nibrosomethanamine	CH4IN2O	CNN=O	60.0553	60.0553	60.032364	60.03225449	1.824243128	comp				405	416	69.05794769	C4H8N1	70.06522269	1.012925148	2								Detail Table: 2 Items															CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct					6311	Isopropyl cyanide	C4H7N	CC(C)C#N	69.1051	69.1051	69.057846	69.05794769	1.472587169	comp					###	3,4-Dihydro-2H-pyrimole	C4H7N	C1CC=NC1	69.1051	69.1051	69.057846	69.05794769	1.472587169	comp				431	443	71.07341248	C4H10N1	72.08068848	1.112132668	1								Detail Table: 1 Items															CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct					###	3-Buten-1-amine	C4H9N	C=CCN	71.121	71.121	71.073502	71.07341248	1.258591096	comp				547	574	85.08909851	C5H12N1	86.09637451	2.367098093	1								Detail Table: 1 Items															CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct					7791	Piperidine	C5H11N	C1CCNCC1	85.1475	85.1475	85.089149	85.08909851	0.593357812	comp					576	85.08909851	C5H12N1	86.09637451	2.368893267	1								Detail Table: 1 Items															CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct					7791	Piperidine	C5H11N	C1CCNCC1	85.1475	85.1475	85.089149	85.08909851	0.593357812	comp				610	640	89.04755646	C5H9N	90.05483246	0.92386663	8								Detail Table: 8 Items															CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct			
CompID	ID	CompMW	Formula	MZ	Time	HiCount																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
47	52	60.03225449	C2H9O2N4	121.071785	0.945557296	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Detail Table: 2 Items																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	1143	Linea	CH4IN2O	C(-)N(N)O	60.0553	60.0553	60.032364	60.03225449	1.824243128	comp																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	###	N-Nibrosomethanamine	CH4IN2O	CNN=O	60.0553	60.0553	60.032364	60.03225449	1.824243128	comp																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
405	416	69.05794769	C4H8N1	70.06522269	1.012925148	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Detail Table: 2 Items																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	6311	Isopropyl cyanide	C4H7N	CC(C)C#N	69.1051	69.1051	69.057846	69.05794769	1.472587169	comp																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	###	3,4-Dihydro-2H-pyrimole	C4H7N	C1CC=NC1	69.1051	69.1051	69.057846	69.05794769	1.472587169	comp																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
431	443	71.07341248	C4H10N1	72.08068848	1.112132668	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Detail Table: 1 Items																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	###	3-Buten-1-amine	C4H9N	C=CCN	71.121	71.121	71.073502	71.07341248	1.258591096	comp																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
547	574	85.08909851	C5H12N1	86.09637451	2.367098093	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Detail Table: 1 Items																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	7791	Piperidine	C5H11N	C1CCNCC1	85.1475	85.1475	85.089149	85.08909851	0.593357812	comp																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	576	85.08909851	C5H12N1	86.09637451	2.368893267	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Detail Table: 1 Items																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	7791	Piperidine	C5H11N	C1CCNCC1	85.1475	85.1475	85.089149	85.08909851	0.593357812	comp																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
610	640	89.04755646	C5H9N	90.05483246	0.92386663	8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Detail Table: 8 Items																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	CSID	Name	Formula	SMILES	MW	AvgMass	MonoisotopicMass	SearchMass	DeltaPPM	Adduct																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
<p>케톤체 분석을 위한 실험조건 조사 및 확립</p>	<p>기존의 연구결과 문헌고찰 및 전문가 자문</p>	<p>* 케톤체 분석을 위한 실험조건</p> <ul style="list-style-type: none"> - 휘발성이 강한 케톤체의 경우 LC로 감지가 어려움 - 이에 따라 LC-MS에서는 분석이 어려움 - LC-MS의 전처리 조건과 유사하게 internal standard, external standard QC sample 등 QC를 위한 방법이 중요하여 이를 위한 전처리 프로토콜 확립 																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												

		<ul style="list-style-type: none"> - 실험조건: 1μl 복원된 샘플 split ratio 4:1 helium gas flow rate 1.5ml/min, V mode m/z range 50-600 scan time 0.99/s initial temp 60$^{\circ}$C injection port temp 230$^{\circ}$C interface temp 290$^{\circ}$C
<p>기수집된 혈액 샘플을 대상으로 혈청 케톤체 분석 수행</p>	<p>확립된 조건에 따라 GC-MS(7890A-5977A) 기기를 활용하여 혈청 케톤체 분석 수행</p>	<p>확립된 조건으로 pilot 실험 수행 후 최종 실험조건 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 여러 QC방법을 통해 장기간 지속되는 케톤체 분석에 적합 - 분석의 신뢰도, 재현도 및 정확성을 높일 수 있는 시험 조건 확립 - pilot 실험을 통해 세 가지 케톤체가 GC-MS를 통해 분석이 가능
<p>식이소재의 기능성 효능 검사를 위한 in vivo 동물 실험 모델 확립</p>	<p>- 본 연구의 식이소재를 활용한 항암효과를 살펴보기 위한 동물모델로는 대장암 실험모델을 선정함</p> <p>- 대장암방 연구는 대장암 세포나 대장암 유발 쥐를 이용해 수행되고 특히 화학적 발암원 azoxymethane (AOM)이나 1,2-dimethylhydrazine (DMH)으로 대장암을 유발시킨 쥐를 이용함</p> <p>- 특히, 대장암화과정의 초기단계로 알려져 있는 대장 이상선와소 (aberrant crypt foci of colonic</p>	<p>1) 동물 사육 및 식이</p> <ul style="list-style-type: none"> - 5주령의 수컷 흰쥐 30 마리를 라온바이오에서 구입한 후, 1주일간 lab-chow식이를 제공하여 적응한 후, 체중에 따라 난괴법에 의해 정상군과 대장암 유발군으로 나눔 - 대장암을 유발하기 위해 대장암 유발군에 1주일에 한번 씩 총 6주간 1,2-dimethylhydrazine (DMH)를 대퇴부에 30mg/kg 농도로 대장암화 과정을 진행시킴 <p>2) Aberrant Crypt Foci (ACF) 와 Aberrant Crypt (AC) 측정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 6 주 후 대장을 맹장에서 직장까지 잘라내어 총 길이를 측정하고 PBS로 대장의 내용물을 제거한 후 직장부분에서 위쪽으로 전체 대장의 50%를 길이로 잘라 펴 이를 10% buffered formalin으로 24시간 고정시킨 후 petri dish에 0.2% methylene blue/saline solution과 함께 5-15분간 방치함 - 이를 Microscope slide에 mucosa를 위로 향하게 놓은 후 광학현미경 ($\times 40$)으로 관찰하여 ACF수와 AC를 측정함 <p>iii) 대장조직 내 DNA 손상의 측정을 위한 comet assay</p>

	mucosa, ACF) 모델을 이용하고자 함.	
--	---------------------------------	--

2. 2차년도

		코드번호	C-04
연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용	
임상시험용 Base formula 포뮬레이션 확정 및 임상연구용 대량 생산 시스템 구축	1차년도 임상연구와 각종 문헌 조사를 통해 base formula 배합비율 확정	<p>1) 암환자의 영양상태 개선을 위해 1차년도 1협동에서 다양한 케톤식이를 개발하였고, 그 효과를 임상연구를 통해 확인하였음, 이를 토대로 협동기관과 주관연구기관이 정기적인 회의를 진행하였고, 다양한 문헌 조사결과 기존 케톤식의 단백질 함량이 암환자의 영양 요구량에 미치지 못해 단백질의 함량을 증가시킨 케톤 : 비케톤 비율 = 1.7:1로 설정을 완료함</p> <p>2) 1차년도 관능 연구 결과를 토대로 누룽지맛, 혼합곡물맛, 딸기맛을 기준으로 1차 샘플을 설계하였으며, 연구진 토의를 거쳐 누룽지 맛이 가장 거부감이 없는 것으로 판단되어 확정함</p> <p>3) 암환자 및 노인환자의 특성상 섭취 가능 볼륨이 적기 때문에 일반적인 열량 비율인 1kcal / ml 보다 농축을 고려하였음. 일반적으로 농축된 제품은 일반 제품에 비해 환자의 순응도가 낮고, 높은 삼투압으로 인한 side effect 문제가 야기될 가능성이 상대적으로 크기 때문에 적절한 농축도가 필요하였음, 문헌 조사결과 암환자 및 노인 환자에게 가장 적합한 칼로리 밀도가 1.2 kcal / ml 이라는 연구결과를 확인하여 최종 열량 밀도를 1.2 kcal / ml로 선정함 (Method for providing nutrition to elderly patients US 5589468 A. PM Lin et al. 2001)</p> <p>4) 따라서, 환자의 순응도, side effect 및 섭취볼륨 등을 고려하여 1.2 kcal/ml (150kcal/125ml)로 선정함</p>	
	최신 문헌 조사, 관련 학회 참석 및 포장재 안전성 검토를 통한 최종 포장용기 선정	<p>1) 기존에는 제품의 특성 및 유통기한을 고려하여 포장용기를 캔으로 진행 예정이었으나, 최근 연구결과 및 문헌 검색결과 아래와 같은 캔의 문제점을 확인하고 무균팩으로 진행함</p> <p>(1) 마이알 반응</p> <p>케톤식의 포장용기 설정을 위해 한국에이지 학회에 참석하였으며, 식품 가공 시 가혹한 열처리로 인한 마이알반응과 그로인해 생성된 AGEs (Advanced Glycation Endproducts)가 노인성 질환의 원인이 됨을 확인하고</p>	

		<p>열처리 공정이 캔에 비해 약한 무균팩으로 선정함</p> <p>(2) 비스페놀 A 캔 포장재는 캔의 부식을 막기 위해 캔 내부 코팅제를 사용하고 있고, 이 코팅제로부터 유래되는 환경호르몬인 비스페놀 A에 대한 안전성 논란이 있어 본 과제를 통해 개발하는 제품은 무균팩으로 선정함.</p>
	<p>생산 공정 셋팅을 통한 대량생산 시스템 구축</p>	<p>1) 제품 생산 시 다양한 생산 조건을 설정이 필요하며, 고지방제품의 특성상 호모믹서 rpm을 1,000 ~ 5,000 사이로 조정하면서 유화 안전성 체크함</p> <p>2) 임상연구용 대량생산을 위해 사전 공장 관계자들과 협의를 진행하였으며, 이때 본 제품에 가장 적절한 용해 조건, 유화 조건 및 멸균 조건을 사전에 협의 완료하였음 특히, 고농축, 고지방 제품의 특성상 일반적인 살균 방식으로는 영양소 파괴 및 유화 안정성 확보가 어려웠으며, Direct steam infusion type의 Ultra high temperature 멸균방식으로 제품의 영양소 파괴 및 성상 파괴를 최소화하였음</p> <p>3) 사전 협의된 조건을 중심으로 QC 공정도를 설정하고, 이를 토대로 임상연구용 제품 생산을 진행함</p>
<p>케톤식사 관련 임상연구(1차년도) 완료</p>	<p>케톤식사 관련 임상연구를 위한 기반 조성 및 진행</p>	<p>1) 1차년도 임상연구 결과를 바탕으로 학술발표 완료함 (별첨1.) - 2017 한국임상영양학회 하계학술대회 포스터 발표(2017.07.01.) - ‘췌담도암 수술 환자에서 항암케톤식 적용에 대한 순응도 평가’ (우수 포스터상 수상)</p> <p>2) 1차년도 개발한 성인용 케톤식 레시피 특허 출원 및 등록 완료함 - ‘케토젤 에그 및 이의 제조 방법’ - ‘케토볼 너트 및 이의 제조 방법’</p>
<p>암 환자 특수식이 BASE 포물라 제품의 임상 연구(2차년도) 개시</p>	<p>췌담도암 수술 후 환자 대상 식사 및 개발된 포물라 섭취율 및 만족도 조사</p>	<p>1) 2차년도 임상연구 개시 - 개발된 BASE 포물라 관련 임상연구 IRB 최종 승인 (2017.08.28) - 개발된 BASE 포물라 관련 임상연구 개시 (2017.09.04.) : 췌담도암 (췌장암, 십이지장암, 바터씨팽대부암, 원위 부 담도암 등) 대상의 임상연구 환자 모집 시작 : 기존 일반식을 섭취하면서 개발된 BASE 포물라를 추가적으로 섭취한 췌담도암 환자에서의 적용 및 순응도 관련 연구 : 표준 식사 환자군 대비 개발된 BASE 포물라 추가 섭</p>

		<p>취군에서의 체담도암 수술 후 영양지표, 체성분구성, 생화학적 조사, 면역기능, 수술 관련 합병증 조사</p> <p>- 개발된 Base formula 관련 임상연구 임상코호트 구축 : Base formula 포물라 관련 임상 연구에 참여한 체담도암 환자의 임상 코호트 구축 및 예후 추적 관찰</p>
<p>케톤식이를 섭취한 암환자 혈청 샘플에서 LC-MS/MS를 이용하여 대사체 분리 분석</p>	<p>1차년도 연구에서 확립된 조건에 따라 LC-MS/MS 기기를 활용하여 혈청 대사체 프로파일링 수행</p>	<p>1) 암환자의 혈청 샘플의 전처리</p> <ul style="list-style-type: none"> - 70%메탄올(30%아세톤)으로 혈청 대사체를 추출하였음. - Quality Control(QC)에 내부표준물질 적용함 : m/z 200~800에 고루 분포되어있는 4가지 물질 (Acetaminophen, Sulfamethoxine, Terfenadine, Reserpine) 을 추가하여 사용 <p>2) LC-MS에서 LC-MS/MS로 분석 방법 변화</p> <ul style="list-style-type: none"> - non-targeted 대사체 분석에서 미확인된 대사체 규명에 더 용이한 분석 방법인 LC-MS/MS를 선택함 - 주입한 샘플의 양은 7µl - 암환자를 섭취한 식이 형태에 따라 군을 나눔. 또한 10 번째 샘플마다 QC sample과 blank 시료를 추가하여 LC-MS/MS 분석의 질을 높였음 <p>3) 대사체 MS/MS분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - XCalibur (Thermo Fisher Scientific) software의 SIEVE 2.2를 이용하여 m/z range 80-1000에서 MS/MS를 진행 - 물질 library로 HMDB (Human Metabolite DataBase), KEGG, LipidMaps, Massbank를 사용함 - MS/MS 분석을 통해 50972개의 compound가 이온화된 형태로 감지되었고, SIEVE 2.2 분석을 통해 non-targeted 대사체 543개를 발견함 - QC를 이용하여 normalization함
<p>Metabolomics 연구 모델 선정 및 잠재적 바이오마커 후보 선출</p>	<p>SIMCA 14.1 소프트웨어를 이용하여 대사체학 분석에 가장 적합한 분석 모델 선정 및 잠재적 바이오마커 후보 선출</p>	<p>1) SIMCA 분석을 위한 데이터 처리</p> <ul style="list-style-type: none"> - Library에 사용되었던 database를 이용하여 대사체 후보물질 규명함 - Scaling 방법은 Pareto 사용 - Transform 형태는 Log를 사용하였으며, intensities가 0 인 경우에 data missing을 피하기 위하여 Log(X+55625.3)을 적용 <p>2) 각 군간 유사성 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> - MAD식이를 섭취한 환자군 (n=8)과 케톤식이를 섭취한 환자 (n=3)의 차이는 PCA와 OPLS-DA 분석에 의하면 유의적인 차이를 보이지 않음을 확인 (R2Y=0.154, Q2=0.0938) 따라서 MAD와 케톤식이를 섭취한 환자를 하나의 그룹화 함

		<p>- Principal Component analysis(PCA)와 Orthogonal partial last squares discriminant anlysis(OPLS-DA)를 이용하여 일반 항암식과 케톤식을 섭취한 군에서의 0주차 (Baseline) 대사체의 차이가 유의적이지 않음을 확인 (R2Y=0.892, Q2=0.269)</p> <p>3) 대사체학 분석에 가장 적합한 분석 모델 선정 및 잠정적 바이오마커 후보 선출</p> <p>- OPLS-DA와 ROC curve를 이용하여 분석 모델 선정함</p> <p>- Baseline과 비교하였을 때 일반 항암식과 케톤식이 종료 후인 2주차 비교하는 분석 모델이 가장 적합함. (R2Y=0.974, Q2=0.513)</p> <p>- 그룹간 유의적인 차이가 나는 대사체를 선정하기 위하여 Variable importance in the projection (VIP) value를 고려하여 선정함. VIP value가 1.0보다 큰 물질은 543종 중 96종 선정</p>
대사 경로 분석	VIP value가 1.0 이상인 물질 96종을 대상으로 MetaboAnalyst 3.0 웹 프로그램을 이용하여 대사경로 분석	<p>1) 대사체 이름의 HMDB와 KEGG에 표시된 형태로 변형</p> <p>- MetaboAnalyst 3.0에서 지원하는 물질의 이름 형태인 HMDB와 KEGG에 등록되어 있는 물질명으로 변환</p> <p>2) MetaboAnalyst 3.0을 이용한 Heatmap 분석</p> <p>- SIMCA 14.1에서 적용한 Scaling과 Transform과 같은 방식으로 적용</p> <p>- Heatmap을 이용해 Baseline과 비교하였을 때 일반 항암식과 케톤식에서 상반되어 보이는 물질로 Acetoacetate, b-hydroxybutyrate를 포함하여 체장암 특이적 대사체 5종을 포함함</p> <p>3) MetaboAnalyst 3.0을 이용한 대사 경로 분석</p>
LC-MS를 이용한 케톤체 정량 분석을 위한 실험 조건 수립 위한 연구 문헌 조사	기존의 연구결과 문헌고찰	<p>1) 문헌 고찰을 통한 케톤체 분석 용이한 분석 기기 선정</p> <p>- 케톤체 분석으로는 GC/TOF-MS, LC-MS/MS-ESI-, LC-MS/MS-ESI+, FIA-MS 등 기기를 사용하여 분석</p> <p>- 케톤체 분석 protocol에 따라 결과, 정확도 등이 달라질 수 있음</p> <p>- 대사체 연구 결과와 함께 분석이 용이하고 재현성이 높은 LC-MS/MS를 이용하여 케톤체 분석을 진행</p>
1차년도 암환자에게서 수집된 혈액 샘플에서 혈청케톤체(acetoacetate, b-hydroxybu-	확립된 조건에 따라 LC-MS/MS(LTQ Orbitrap (micro- LC)) 기기를 활용하여 혈청	<p>1) 1차년도 혈액 샘플을 이용한 LC-MS/MS 정량분석 (Quantative Analysis)</p> <p>- 대표적인 체내 생성 케톤체 3종 중 standard 물질로 유일하게 사용할 수 있는 β-hydroxybutyrate를 이용한 standard curve 측정, 혈청 전처리와 동일한 내부표준물질 및 외부표준물질 사용</p> <p>- 혈청 샘플을 이용하여 LC-MS/MS 분석을 진행하고</p>

tyrate) 정량 분석	케톤체 분석 수행	<p>내부표준물질과 외부표준물질을 이용하여 calibration</p> <ul style="list-style-type: none"> - MS 측정 모드는 Negative(ES-)에서 분석 - 일반 항암식군보다 케톤식이 한 환자군에서 케톤체 형성이 유의하게 높음
식이소재의 기능성 효능 검사를 위한 in vivo 동물실험	<p>- 1차년도 확립된 동물모델을 이용하여 썩, 깻잎, 상황버섯 추출물의 효과 검증</p> <p>- 대장암방 연구는 대장암 세포나 대장암 유발 쥐를 이용해 수행되고 특히 화학적 발암원 azoxymethane (AOM)이나 1,2-dimethylhydrazine (DMH)으로 대장암을 유발시킨 쥐를 이용함</p> <p>- 특히, 대장암화과정의 초기단계로 알려져 있는 대장 이상선화소 (aberrant crypt foci of colonic mucosa, ACF) 측정 후 효과 관정</p>	<p>1) 동물 사육 및 식이</p> <ul style="list-style-type: none"> - 주령의 SD계 수컷 흰쥐 60마리를 라온바이오(주)로부터 구입하여 1주일간 lab-chaw 식이(Harlan 2018S Rodent)를 제공하면서 적응 기간을 거침. - 1주간의 적응 후, 체중에 따라 난괴법에 의하여 총 6군으로 나눔. 실험군은 1차년도 확립된 동물실험 모델을 이용하여 정상대조군(NC), 대장암 유발군(DMH), 대장암 유발+깻잎 섭취군(DMH+PF), 대장암 유발+썩 섭취군(DMH+AP), 대장암 유발+상황버섯 섭취군(DMH+PL), 대장암 유발+복합물 섭취군(DMH+C)으로 나누었음. - 대장암을 유발하기 위해 대장암 유발군에 1주일에 한번씩 총 6주간 1,2-dimethylhydrazine (DMH)를 대퇴부에 30mg/kg 농도로 대장암화 과정을 진행시킴 <p>2) 대장점막 표면에 형성되는 대장 이상선화소(ACF)는 대장암화과정의 초기단계에 관찰하는 지표로서 하나의 대장 이상 선화소(ACF)는 수개~수십 개의 crypt(AC)를 포함하고 있음. 대장암유발군(DMH)은 정상대조군(NC)보다 유의적으로 ACF와 AC의 수가 증가하였으며, 깻잎(DMH+PF), 썩(DMH+AP), 상황버섯(DMH+PL) 및 복합물(DMH+C) 섭취군은 대장암유발군(DMH)보다 유의적으로 ACF와 AC의 수가 감소하였음(ACF: 42-54% 감소, AC: 46-55% 감소, P<0.05)). 따라서, 깻잎, 썩, 상황버섯 및 복합물의 대장암병변 유발 억제효과를 확인하였음.</p> <p>3) 이러한 효과는 Fig. 3(B)의 AC의 수에 따른 ACF를 산출결과에서도 확인하였음. 대장암유발군(DMH)과 비교한 깻잎, 썩, 상황버섯 및 복합물 섭취에 의한 대장암병변 감소 효과는 ACF가 AC 1-3 ($\Sigma \leq 3AC$)에서 37-52% 유의적으로 감소, AC 4이상($\Sigma \geq 4AC$)에서 68-76% 유의적으로 감소하는 것으로 나타났음.</p>

3. 3차년도

		코드번호	C-04
연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용	
항암소재가 첨가된 3차년도 임상 제품 개발 및 대량 생산기술 확보	3차년도 임상연구용 제품 개발	1) 항암 소재 선정 - 2차년도 3협동 연구기관에서 진행한 동물 실험을 통해 유의적인 항암 효과를 보인 3가지 농산물 중 상업성을 고려하여 자소엽 추출물을 선정하였음. - 생산 업체와 협력을 통해 국내산 자소엽 추출 방법 및 lab scale 의 분석방법 확인 후 대량 생산 및 표준화 작업 진행하였음. 2) 임상 제품의 clinical formula 구축 - 임상 시험용 제품의 formula 구축을 위해 동물실험에서 선정된 항암 소재의 인체 적용 용량에 대해 검토하였음. 3) 3차년도 임상연구 수행 제품 개발 - 대량 생산에 적합한 제조공정도 미 제품 규격 작성하여 시험생산 진행하였음. 이를 통해 생산 공정을 검증하고 대량 생산 시스템 구축하였음. 4) 관능 및 보존검사 수행 - 20~30대 건강한 여성 47명을 대상으로 관능평가 수행하였음. 이를 통해 저감미와 부드러운 관능에 있어 기호식품 수준의 높은 점수를 부여 받음.	
2차년도 임상시험제품(케토웰) 출시를 통한 환자식 시장 진출	2차년도 임상연구용 제품(케토웰) 출시	1) 시장 검토를 위한 케톤식의 식품 산업 적용 제품조사 - 다양한 분야의 케톤식이 관련 제품 조사 수행하였음. 식품산업 현황 조사 결과 뇌전증 뿐만 아니라 알츠하이머, 당뇨, 암, 스포츠, 다이어트 등 여러 가지 산업분야에 적용되는 것으로 나타남 - 국내외 케톤식이에 대한 소비자 인지 수준 증가가 관찰되었으며, 이는 시장 요구도가 증가한 것으로 볼 수 있음. 2) 제품 표시사항 기초자료 작성 - 제품 출시 시 필요한 영양정보, 소구점에 대한 기초자료 작성 업무 진행하였음. 3) 특수의료용도등식품 규격 검증 - 생산된 케토웰의 영양정보 및 품질 적합성 확인을 위해 식품의 기준 및 규격에 맞춰 검증 업무 진행하였음.	
암 환자 특수식이 Plus 포물라 제품의 임상 연구 (3차년도) 개시	췌담도암 수술 후 환자 대상 식사 및 개발된 Plus 포물라 섭취율 및 만족도 조사	1) 3차 년도 임상연구 개시 - 개발된 Plus 포물라(Base 포물라 + 자소엽 추출물 1.2%) 관련 임상연구 IRB 최종 승인 (2018.04.12) - 개발된 Plus 포물라 관련 임상연구 개시 (2018.04.30.) : 췌담도암 (췌장암, 십이지장암, 바터씨팽대부암, 원위부 담도암 등) 대상의 임상연구 환자 모집 시작 : 기존 일반식을 섭취하면서 개발된 Plus 포물라를 추	

		<p>가적으로 섭취한 채담도암 환자에서의 적용 및 순응도 관련 연구</p> <p>: 표준 식사 환자군 대비 개발된 Plus 포물라 추가 섭취군에서의 채담도암 수술 후 영양지표, 체성분구성, 생화학적 조사, 면역기능, 수술 관련 합병증 조사</p> <p>- 개발된 Plus formula 관련 임상연구 임상코호트 구축</p> <p>: Plus formula 포물라 관련 임상 연구에 참여한 채담도암 환자의 임상 코호트 구축 및 예후 추적 관찰</p>
암 환자용 BASE 포물라 식품 섭취 후 환자의 샘플 채취	채장암 환자의 Base 포물라 섭취 전, 종료, 이후의 3번 혈액 수집	<p>1) 2차년도 혈액 수집 완료</p> <p>- 개발된 BASE 포물라 관련 임상연구 IRB 승인 이후 BASE 포물라 섭취한 환자의 혈액 샘플 채취 완료 (2018.01.18.)</p>
암 환자용 BASE 포물라 식품 섭취 후 혈액 내 대사체 변화 분석	LC-MS/MS를 이용한 물질 분리 분석 수행 및 SIMCA 14.1 소프트웨어를 이용한 분석 모델 선정 및 잠재적 바이오마커 후보 선출, MetaboAnalyst 4.0을 이용하여 대사경로 분석 수행	<p>1) SIMCA 분석을 위한 데이터 처리</p> <p>- HMDB와 KEGG를 사용하여 대사체 후보물질 규명함</p> <p>- Pareto scaling과 log transform을 사용하여 대사체 분포를 정규화시킴</p> <p>2) 대사체학 분석에 가장 적합한 분석 모델 선정 및 잠재적 바이오마커 후보 선출</p> <p>- Principal Component analysis(PCA)와 Orthogonal partial last squares discriminant anlysis(OPLS-DA)를 이용하여 일반 항암식과 암환자용 BASE 포물라를 섭취한 모든 분석 모델을 확인함.</p> <p>- 그룹간 유의적인 차이가 나는 대사체를 선정하기 위하여 VIP value를 고려하여 선정함</p> <p>3) Pearson 상관관계 분석을 통해 식사를 통한 지방 섭취량과 유의적으로 변하는 대사체 탐색을 진행함. 군간 차이나는 516개 대사체 중 42종이 지방 섭취량과 상관성이 있었음</p> <p>4) Pareto scaling과 log transform을 이용하여 데이터 변환 후 Heatmap을 이용해 대조군과 BASE포물라 섭취군의 3가지 시점을 비교함.</p> <p>5) 42종 대사체를 이용한 대사 경로 분석에서는 Glycerophospholipid metabolism이 유의미한 대사 경로로 분석되었으며 9개 대사체가 관여한 것을 확인함</p>
암 환자용 BASE 포물라 식품 섭취 후 혈액 내 케톤체 변화 분석	LC-MS/MS 정량분석 또는 총 케톤 측정 키트를 이용하여 혈청 내 케	<p>1) LC-MS/MS 정량분석 (Quantative Analysis)</p> <p>- 대표적인 체내 생성 케톤체 3종 중 standard 물질로 유일하게 사용할 수 있는 β-hydroxybutyrate와 이온 형태의 Lithium acetoacetate를 이용하여 혈청 내 케톤체 정량분석을 진행함</p>

	톤체 변화 분석 수행	- MS 측정 모드는 Negative(ES-)에서 분석을 진행함
암 환 자 용 PLUS 식품 섭취 후 환자의 샘플 채취	퀘장암 환자의 Plus 포물라 섭취 전, 종료, 이후의 3번 혈액 수집	1) 3차년도 혈액 수집 완료 - 개발된 PLUS 포물라 관련 임상연구 IRB 승인 이후 PLUS 포물라 섭취한 환자의 혈액 샘플 채취 완료 (2018.12.03.)
암 환 자 용 PLUS 식품 섭취 후 혈액 내 대사체 변화 분석	LC-MS/MS를 이용한 물질 분리 분석 수행 및 SIMCA 14.1 소프트웨어를 이용한 분석 모델 선정 및 잠정적 바이오마커 후보 선출	1) LC-MS/MS를 이용한 혈청 대사체학 분석 - 일반 환자식(CTRL)과 케톤 PLUS 포물라(HFSF) 섭취군의 혈액 LC-MS/MS raw data를 내부표준물질을 이용하여 표준화작업 및 outlier 제거하여 워크셋 구축 - 일반 환자식(CTRL)과 케톤 PLUS 포물라 (HFSF) 섭취군의 시간에 따라 대사체학 분석을 위한 다변량 회귀분석 가능한 모델을 SIMCA14.1을 이용하여 분석 - 선정된 분석 모델을 이용한 다변량 회귀분석 결과, 각각의 분석 모델에서 대사체의 군분류가 명확하게 이루어지는지를 OPLS-DA 회귀분석을 통해 확인함. - VIP>1.0, p-value<0.05 기준으로 잠정적 바이오마커를 선정함.
암 환 자 용 PLUS 식품 섭취 후 혈액 내 케톤체 변화 분석	LC-MS/MS 이 용해 물질 분리 분석하여 혈청 내 케톤체 함량 확인	1) 혈청 내 케톤체 함량 분석 - 혈청 내 케톤체 함량은 LC-MS/MS 대사체 규명을 통해서 상대적 함량을 측정함. 케톤 PLUS 포물라 섭취군 (HFSH)에서 케톤 생성능에 차이가 없는 것을 확인함 - 이는 2차년도 BASE 포물라 섭취군에서와 비슷하게 대조군과 비교하여 총 칼로리 (경구, 비경구 포함)에는 차이가 없지만, 경구로 섭취한 식사량에서 유의적 차이가 나기 때문으로 판단함
다어이트 제품으로서의 확장성 연구	비만인들 대상으로 개발된 효과 검증	1) 임상연구개시 - 개발된 base formula를 활용하여 비만인들을 대상으로 임상연구를 적용 및 순응도 조사 진행하였으며, 효과를 검증하였음
인지기능 개선 제품으로서의 확장성 연구	개발된 제품의 노인들을 대상으로 한 인지 기능 개선 효과 검증	1) 임상연구개시 - 개발된 base formula plus를 활용하여 노인들의 인지 기능 개선 적용 및 순응도 조사 진행하였으며, 효과를 검증하였음

2장. 연구수행 내용 및 결과

1절. 국내의 관련 제품 시장 현황 조사

1. 국내 경쟁영양식 시장 현황

- 국내 경쟁영양식 시장은 년 약7% 이상 성장하고 있으며, 세계적으로 성장률은 3위로 높은 발전가능성이 있다고 시사됨. 국내 영양식 판매회사는 총 5개로 엠디웰 아이엔씨 외 4개 회사 (대상웰라이프, 정식품, 한국메디칼푸드, 케어웰)로 구성되어 있으며, 현재 대상웰라이프에서 출시하고 있는 뉴케어” 는 국내 시장 1위로 선점하고 있으며, 정식품 “그린비아” 는 국내 최초 경쟁영양식을 선보인 회사임. 한국메디칼푸드는 다양한 제형의 제품을 개발, 일본 수입하여 판매하고 있음. 국내 환자용 영양식 매출은 정확한 매출 보고가 되어 있지 않아 추상적이나 약 700억/년으로 추정됨
- 현재 우리나라 특수의료용도 식품은 크게 8가지(환자용균형영양식, 당뇨병환자용식품, 신장질환환자용식품, 장질환환자용 가수분해식품, 열량 및 영양공급용 의료용도등 식품, 선천성 대사질환환자용 식품, 영유아용 특수조제식품, 연하곤란환자용 점도증진식품)로 구분되어 판매되고 있음
- 특수의료용도등 식품의 국내 판매액은 2013년 총 426억으로 보고되고 있으며, 이 중 환자용 균형영양식의 판매액이 300억원으로 특수의료용도등식품 판매액의 70.4%를 차지하였고 다음으로 당뇨병환자용 식품의 판매액이 60억원으로 14.2%를 차지하여, 실제적으로는 환자용 균형영양식과 당뇨병환자용 식품이 가장 많이 판매되고 있음 (표 2-1-1)

표 2-1-1. 특수의료용도등 식품의 식품유형별 국내 판매액

	제품유형	국내 판매액(원)	비율(%)
특수 의료 용도 등 식품	환자용 균형영양식	300억	70.4
	당뇨환자용 식품	60억	14.1
	신장질환환자용 식품	9.5억	2.2
	연하곤란환자용 점도증진식품	0.2억	0.05
	열량 및 영양공급용 의료용도식품	12억	2.8
	선천성 대사질환환자용 식품	6.3억	1.5
	영·유아용 특수조제식품	36억	8.5
	장질환환자용 가수분해식품	1.5억	0.3
	< 소 계 >	426억	100

(출처 : 2013년 식품 및 식품첨가물 통계집)

- 다양한 질환에 대한 영양식품 제공에 한계가 있으며, 그 외에도 제조, 유통, 투여, 보험적용 등 관리체제에 문제점이 있어 개선이 필요한 것으로 지적되어 왔음
- 병원에서 질환 관련하여 주로 사용되는 영양음료는 4 가지이며 (환자용균형영양식, 당뇨식, 신장질환식, 장질환식), 그 이외에 영양공급식, 선천성 대사질환식, 영·유아용특수조제식, 연하곤란환자용점도증진식이 사용이 되고 있으며 향후 관련제품의 생산은 더욱 다양하게 세분화, 전문화가 되어야 할 것임. 2011년, 심평원에 제시된 자료의 국내 EN(경관급식) 국내 발생금액 실태는 아래와 같아 실제 사용금액은 해마다 증가하고 있음 (그림 2-1-1)

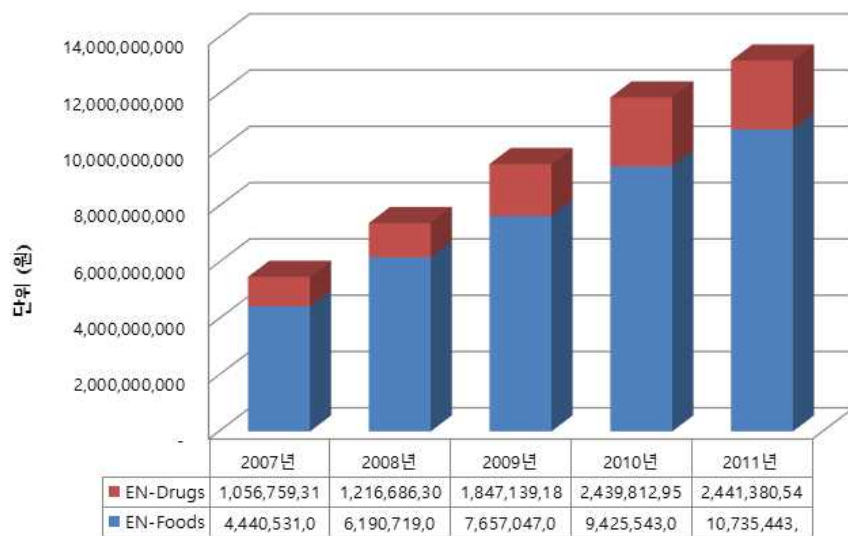


그림 2-1-1. 국내 경관급식 발생금액

(출처 : 2013년 식품 및 식품첨가물 통계집)

2. 국내 암환자용 식품 현황

- 케톤식이 (Ketogenic Diet)는 영양소 구성이 고지방 저탄수화물로 영양소 성분이 조정된 식사로, 종양의 성장을 억제하고 암환자의 생존률을 높이게 된다는 보고가 있음, 이러한 케톤식이 관련 항암 효과의 의학적 근거를 기반으로 한 암환자용 식이 포물라의 개발 및 적합한 특수의료용도등식품의 연구 개발이 절실하게 요구되고 있음
- 국내 시판 중인 특수의료용도식품 중 암환자용 식품의 경우 단순 오메가-3가 강화되어 있는 일반 ONS 타입의 제품으로 암환자용에게 임상을 통해 직접 검증되어 있지는 않음
- 국내 유통되고 있는 케톤식의 경우에도 국내 케톤식 제품은 남양유업의 케토니아가 유일하며, 케톤식이요법이 필요한 난치성 소아간질 아이들을 위한 제품으로 별도의 혼합이나

비율조정 없이 간편하게 바로 섭취가 가능한 액상 케톤 포물라로 암환자의 단백질 요구량, 순응도가 고려되지 않은 제품임

DIRECTIONS FOR PREPARATION AND USE

	Age	Quantity per day	Directions
 Ketonina	Under 1 year	65 - 70 ml per kg of body weight	Divide the daily dose into smaller doses and take 3-5 times a day.
	1-3 years	60 - 65 ml per kg of body weight	
	4-6 years	55 - 60 ml per kg of body weight	
	7-10 years	45 - 50 ml per kg of body weight	
	After 11 years	30 - 35 ml per kg of body weight	

CAUTIONS

- Ⓢ Follow the doctor's instructions regarding the specific dose and the number of feeds.
- Ⓢ Keep in fridge (0-10 °C) or consume it as soon as possible after opening.
- Ⓢ Use a container when heating up in a microwave oven.
- Ⓢ Check up with raw materials for those who are allergic to a particular ingredient.

그림 2-1-2. 국내 케톤식 제품 (케토니아, 액상)

(출처 : 남양유업 홈페이지)

○ 국내 판매되고 있는 특수의료용도식품은 아래와 같으며 대부분 암환자에게 사용되고 있는 제품은 균형영양식 제품으로 ONS (Oral Nutrition Supplement), 고단백, 고열량 제품으로 일반 캔 제형으로 사용하고 있으나, 일반영양보충식 제품으로 암환자에게 임상연구로 검증된 최적의 제품은 아님

표 2-1-2. 국내 특수의료용도식품 현황

회사명	앤디웰	대상	정식품	KMF	KEF	
형태	캔	O	O	O	O	
	테트라팩	O (4각, 8각)	X	O (4각)	O (4각)	
	RTH	O (파우치)	O (파우치)	O (파우치)	O (파우치)	
균형영양식	satandard (withorwitho utfiber)	1)메디웰 RTH(5종) 2)메디웰화이버캔 3)뉴트리웰팩 4)뉴트리웰RTH400 5)뉴트리웰TF1000	1)뉴케어 TF 300 2)뉴케어화이버 (캔,RTH_400,500, 1L)	1)그린비아 TF (캔, 1L팩, RTH250,300,400,500) 2)그린비아화이버 (캔, 1L팩) 3)그린비아장술루션 (캔, 1L팩) 4)플러스케어(tetra)	1)메디푸드 엘디 (캔, 파우더 RTH_400,500) 2)메디푸드스탠다드 (파우더) 3) 메디푸드EN (캔)	1)케어웰 스탠다드TF (캔) 2)케어웰어드밴스(캔, 팩) 3)케어웰오티(파우치) 4)케어웰파우더
	SKU	8	8	11	5	3
	ONS (oralnutrition support)	메디웰 구수한맛	뉴케어 (구수한맛,검은깨맛, 바나나맛, 딸기맛, 커피맛, 단호박맛)	마일드케어 (구수한맛,검은참깨, 단호박, 딸기맛)	1)이엔 소프트 구수한맛 2)미니웰 (2종) 바나나맛, 고구마맛	케어웰 구수한맛
	SKU	1	6	4	3	1
	고단백, 고열량	1) 메디웰 프로틴 1.5 2)뉴트리웰고단백	1) 뉴케어 하이프로틴 2)뉴케어 칼로리1.5	1)그린비아 하이프로틴 2)그린비아고단백솔루션	1)메디푸드 고단백 VHP 2)메디푸드1.5	●1)케어웰 하이프로틴 2)케어웰1.5플러스
SKU	2	2	2	2	2	
질환식	Critical care		1)뉴케어 인텐시브 (AF) 2)뉴케어오메가	그린비아 이문포르테		인텐시브 케어
	당뇨	1)메디웰 RTH DM	1)뉴케어 당뇨식	1) 그린비아 DM	메디푸드 글루트롤	케어웰 DM

		2)메디웰당뇨식캔 3)뉴트리웰당뇨식 4)뉴트리웰당뇨식 1L	2)뉴케어당플랜	2)그린비아당뇨솔루션	(1.0, 1.5cal)	
	신장질환		1) 뉴케어 KD plus (투석식) 2)뉴케어KD (신장식)	1)그린비아 RD plus (투석식) 2)뉴케어RD(신장식)		
	흡수불량				모노웰	
	SKU 및 특징	1개 질환식 보유	3개 질환식 보유	3개 질환식 보유	2개 질환식 보유	2개 질환식 보유
기타	연하장애	비스코엠퍼	1)토로미퍼펙트 2)하이비스코	연하솔루션	1)토로미 파워 스마일 2)토로미엠퍼이 3)티크앤이지	연하케어 (플러스)

(출처 : 각사 홈페이지)

3. 국외 시장 현황

가. 환자용 경장영양식 글로벌 시장 현황

- 일본의 경우 메이지와 모리나가 유업, 미국과 유럽에서는 애보트와 네슬레에서 본 연구에서 진행하고자 하는 특수의료용도등 식품을 연구, 개발 및 생산하고 있음
- Global Industry Analysts(2011)의 보고에 의하면 판매예측 금액은 \$ 9 billion 으로 예측하고 있음 (그림 2-1-3). 외국의 경우는 Nutricia, Nestle, Abbott Laboratory, 등의 선도기업이 다양한 제품을 생산하고 있으나 그 외 규모는 아래와 같음. 미국의 경우에는 정맥영양(PN)보다 경장영양(EN)의 사용이 2배를 우회하고 있음

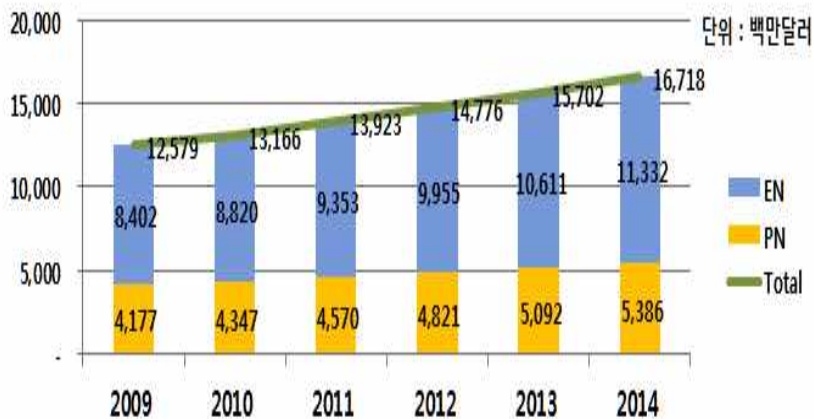


그림 2-1-3. 특수의료용도 식품의 세계 시장 규모

(출처 : Global Industry Analysts, 2011)

- 이외의 경우 고섬유소 함유 제품, 프럭토올리고당 함유 제품, EPA, gamma-linolenic acid 함유 제품, 항산화영양소 함유 제품 등 다양한 제품개발을 통해 환자의 질환 특이성에

부합하는 제품을 제공하여 환자만족도를 높이고 있음

- 세계적으로 영양식품의 생산 및 사용 추세는 환자의 위장관 기능을 가능한 한 보호하고 심리적, 신체적 안정을 주는 효과와 경제적 이점을 중시해 정맥영양제보다는 경장영양제를 3:7의 비율로 더 많이 사용하고 있음

나. 글로벌 케톤식 현황

(1) 해외 환자식 시장 및 제품 현황 조사

- 현재 해외 케톤식 제품은 분말 및 액상형태로 판매되며 케톤:비케톤의 비율이 3:1, 4:1로 구성되어 있음
- 뉴트리시아에서 생산되는 분말제품인 ‘KetoCal 4:1’은 영양적으로 완전한 케톤 포몰라로 지방 : 탄수화물+단백질 비율이 4:1로 1세 이상 섭취 가능한 의료용 식품임. 바닐라향으로 DHA, ARA 및 섬유소가 함유되어 있고, 트랜스 지방산과 아스파탐은 없는 고농축 액상으로 구강 또는 튜브(관)로의 공급이 가능함. 표준 농도는 1 kcal/mL이고 170 mOsm/kg의 삼투압으로 되어 있음 . 영양소 특성은 단백질 8.2 %, 탄수화물 3.1 %, 섬유소 1.5 %, 지방 (LCT 100 %) 88.7 %임. (그림 2-1-4)
- KetoCal 4:1(뉴트리시아)은 영양적으로 완전할 뿐 아니라 바로 섭취가 가능한 케톤 포몰라 액상제품으로 지방 : 탄수화물+단백질 비율이 4:1로 1세 이상 섭취 가능한 의료용 식품임. 바닐라향으로 DHA, ARA 및 섬유소가 함유되어 있음(그림 2-1-4)
- KetoCal 3:1(뉴트리시아)은 지방 : 탄수화물+단백질 비율이 3:1로 1세 이상 섭취 가능한 의료용 식품임. 무향으로 DHA, ARA 및 섬유소가 함유되어 있고, 트랜스지방산 0%, 아스파탐을 사용하지 않은 고농축 액상 제품으로 구강 또는 튜브(관)로 공급이 가능함. 표준 농도는 1 kcal/mL이고 삼투압은 150 mOsm/kg임. 영양성분은 단백질 8.8 %, 탄수화물 4.1 %, 섬유소 1.5 %, 지방 (LCT 100 %) 87.1 %임(그림 2-1-4)

KetoCal 4:1

A nutritionally complete, ketogenic formula in a 4:1 ratio (fat:carbohydrate + protein) for the dietary management of intractable epilepsy; designed for individuals over 1 year of age. A medical food.

Main Features

- Nutritionally complete
- 4:1 ratio
- Vanilla flavor
- Convenient one step preparation with a non-modular approach
- Supplemented with DHA and ARA
- Contains multi-fiber blend (mf6a,c)
- No trans fat
- Aspartame-free (contains sucralose)
- Nutrient dense for children with low energy requirements
- Appropriate for enteral or oral feedings
- Standard dilution = 1 kcal/mL
- Osmolality (at 1 kcal/mL): 170 mOsm/kg
- Energy distribution:
 - Protein 8.2%
 - Carbohydrate 3.1%
 - Fiber 1.5%
 - Fat (LCT 100%) 88.7%
- Displacement 1 mL/g



KetoCal 4:1 LQ

A nutritionally complete, ready-to-feed ketogenic formula in a 4:1 ratio (fat:carbohydrate + protein) for the dietary management of intractable epilepsy; designed for individuals over 1 year of age. A medical food.

Main Features

- Nutritionally complete
- 4:1 ratio
- Convenient ready-to-feed liquid
- Great vanilla flavor or unflavored
- Contains a multi-fiber blend of insoluble and soluble fiber
- Supplemented with DHA and ARA
- Appropriate for enteral or oral feedings
- No trans fat
- Aspartame-free (contains sucralose)
- Nutrient dense for children with low energy requirements
- Osmolality (at 1.5 kcal/mL):
 - Vanilla 260 mOsm/kg
 - Unflavored 280 mOsm/kg
- Energy distribution:
 - Protein 8.2%
 - Carbohydrate 3.1%
 - Fiber 1.5%
 - Fat (LCT 100%) 88.7%
 - Free water 77.8%
- Density 1.01g/mL



KetoCal 3:1

A nutritionally complete, ketogenic formula in a 3:1 ratio (fat:carbohydrate + protein) for the dietary management of intractable epilepsy and other medical conditions where the ketogenic diet is indicated; designed for individuals over 1 year of age. A medical food.

Main Features

- Nutritionally complete
- Supplemented with DHA and ARA
- 3:1 ratio, which supports earlier initiation of the diet
- Unflavored
- Nutrient dense for children with low energy requirements
- Convenient one step preparation with a non-modular approach
- Appropriate for enteral or oral feedings
- Standard dilution = 1 kcal/mL
- Osmolality (at 1 kcal/mL): 150 mOsm/kg
- No artificial sweeteners
- Energy distribution:
 - Protein 8.8%
 - Carbohydrate 4.1%
 - Fat (LCT 100%) 87.1%
- Displacement 1 mL/g



그림 2-1-4. 뉴트리시아 ketocal 제품 현황

(출처 : 뉴트리시아 홈페이지)

○ Liquigen(뉴트리시아)은 케톤 식사, 유미홍증, 지방흡수불량증, 단장증후군 등 중쇄지방산

(MCT ; Medium-Chain Triglyceride) 오일 활용이 가능한 모든 식사 준비 시 사용이 용이한 고에너지 MCT 유화액(emulsion)임. 식사에 바로 첨가할 수 있도록 유화시킨 형태로 50 % MCT/ 50 % water이고, 무향, 4.5 kcal/mL로 구강 또는 튜브(관)로의 공급이 가능함. 음료나 음식에 바로 사용할 수 있으나 정맥으로는 투여할 수 없음(그림 2-1-5)

Liquigen

A high energy medium chain triglyceride (MCT) emulsion for conditions where MCTs are part of dietary management, such as long-chain fatty acid oxidation disorders or conditions managed by the ketogenic diet. A medical food.

Main Features

- Simplifies addition of MCTs to the diet
- Emulsified for better mixing
- 50% MCT/ 50% water
- Unflavored
- High energy: 4.5 kcal/mL
- For oral or enteral use
- Can be used in beverages and foods
- Not for parenteral use



그림 2-1-5. 해외 케톤식 제품 (Liquigen)

(출처 : 뉴트리시아 홈페이지)

- 애보트(Abbott)에서 제조하는 RCF는철분이 함유된 두유 base 제품으로 탄수화물이 추가되지 않은 제품임. 우유 또는 시판 중인 조제분유 내 탄수화물 타입과 당류 함량이 환자와 맞지 않는 경우 또는 케톤식이 필요한 발작 장애의 식이 조절을 위하여 사용 가능함. 농축 액상 형태로 물을 더하여 공급함(그림 2-1-6)

RCF®

No Added Carbohydrate Soy Infant Formula Base With Iron

- For use in the dietary management of patients unable to tolerate the type or amount of carbohydrate in milk or conventional infant formulas; or seizure disorders requiring a ketogenic diet.
- Use under medical supervision.



그림 2-1-6. 해외 케톤식 제품 (RCF)

(출처 : 애보트 홈페이지)

- 비타플로의 CarbZero는 바로 섭취가 가능한 액상의 케톤 포물라로 장쇄지방산 (LCT ; Long chain triglycerides)의 유화액임. 3세 이상 섭취 가능한 의료용 식품이며, 환자의 나이, 체중, 상태에 따라 섭취량을 결정함(그림 2-1-7). 비타플로의 Betaquik은 중쇄지방산 (Medium chain triglycerides; MCT)의 유화액임. 3세이상 섭취 가능한 의료용 식품이며, 환자의 나이와 체중, 상태 따라 섭취량을 결정하고, 잘 흔들어서 차갑게 우유를 섭취하듯이

마시면 됨 (그림 2-1-8)

Carbzero

Description
A medical food intended for use under medical supervision.
Carbzero is a ready to use, liquid emulsion of long chain triglycerides (LCT).

Indications
For use in the ketogenic diet or in the dietary management of conditions requiring a source of LCT. Suitable from 3 years of age.

Dosage and Administration
To be determined by the clinician or dietitian and is dependent on the age, body weight and medical condition of the patient.

PREPARATION GUIDELINES FOR CARBZERO
Shake well before use.
Best served chilled.
Carbzero can be used in a similar way to milk:

- As a drink
- With permitted flavorings
- Added to hot drinks e.g. tea, coffee
- In permitted recipes




그림 2-1-7. 해외 케톤식 제품 (CarbZero)

(출처 : Vitaflo 홈페이지)

Betaquik

Description
A medical food intended for use under medical supervision.
Betaquik is a ready to use, liquid emulsion of medium chain triglycerides (MCT).

Indications
For use in the ketogenic diet or in the dietary management of conditions requiring a source of MCT. Suitable from 3 years of age.

Dosage and Administration
To be determined by the clinician or dietitian and is dependent on the age, body weight and medical condition of the patient.

PREPARATION GUIDELINES
Shake well before use.
Best served chilled.
Betaquik can be used in a similar way to milk:

- As a drink
- With permitted flavorings
- Added to hot drinks e.g. tea, coffee
- In permitted recipes




그림 2-1-8. 해외 케톤식 제품 (Betaquik)

(출처 : Nestle 홈페이지)

2절. 연구 문헌 조사

1. 조사 방법

- Pubmed와 cochrane library, clinicaltrial.org 등의 국외 문헌 검색 도구를 이용하여 1990년~현재까지 검색 진행하였음

2. 조사 결과

- 검색어를 ketone으로 지정하고 검색한 결과 1920년부터 사용되어 온 간질아동의 케톤생성 식이에 대한 연구가 압도적으로 많았으며, 그 외에도 체중감소, 폐질환, alzheimer 등 관련 문헌 들이 검색됨
- 본 연구 목표에 부합한 “ketone” 과 “cancer” 를 연관검색 하였을 때, 항암 치료(보조)로 사용된 ketone 식이에 관한 문헌은 표 2-2-1과 같았음

표 2-2-1. 케톤식을 공급한 동물실험 모델의 항암효과

동물모델	개체수	암	탄단지 비율 (지방급원)	공급기간	효과
C57BL/6 mice	18	B16 melanoma	0:0:100 (PUFA, 식물성유지)	14days	Lung metastatis 감소
BALB/c mice	20	mammary tumor	30:60:5 (식물성유지)	70days	mortality 감소
NMR1 mice	15	colon carcinoma	??:80 (MCT 유지)	20days	50% less wt loss, tumor mass 감소
NMR1 mice	15	colon carcinoma	??:80 (MCT 유지)	9days	36% less wt loss
C57BL/6 mice	6	CT-2A astrocytoma	0/8/92 (lard)	13days	32% less tumor mass
C57BL/6 mice	11	CT-2A astrocytoma	3/17/80 (soy, ketocal)	8days	no significant diff. in tumor wt, survival
BALB/c SCID mice	14	LNCaP prostate cancer	3/17/80 (soy, ketocal)	8days	35% less tumor wt
nu/nu mice	20	LNCaP prostate cancer	10/45/45	63days	longer survival lower IGF-1 level
SCID mice	25	LAPC-4 prostate cancer	0/16/84 (milk fat + lard)	40days	45% less tumor vol 43% less tumor dry wt longer survival
NMRI mice	12	human gastric adenoma	0/14/86 (cheese+MCT+omega-3)	16days	longer survival
C3H/HeN mice	5	squamous cell carcinoma	16/58/26	16days	tumor growth rate 감소 41% less tumor vol
Foxn1nu mice	12	LNT-229 glioma cells	0/13/36 (flaxseed, hempseed oil)	63days	no significant diff. in survival, tumor growth

- 이와 같이 대부분의 동물실험에서는 암의 종류나 실험동물의 종류에 관계없이 최소 8일

부터 종양의 크기와 무게가 감소함을 보였으며 생존률이 증가하였음

- 케톤식을 이용한 암환자 대상의 인체연구는 현재 진행중인 연구가 많으며, 현재 진행중인 연구는 표 2-2-2와 표 2-2-3에 제시함

표 2-2-2. 케톤식을 이용한 암환자 대상의 현재 진행중인 인체 연구

암 종류	중재방법
췌장암	항암약물치료 + 방사선치료 + 케톤식
두경부암	항암약물치료 + 방사선치료 + 케톤식
소세포폐암	항암약물치료 + 방사선치료 + 케톤식
glioblastoma	열량제한 케톤식
유방암	케톤식, low glyceemic 식이
glioblastoma	케톤식
암	케톤식
recurrent glioblastoma	열량제한 케톤식 + 간헐적 단식 + 방사선치료
glioblastoma	항암약물치료 + 방사선치료 + 케톤식

- 케톤식을 이용한 암환자 대상의 인체연구는 많지 않으며, 그 결과는 대부분이 환자의 삶의 질 개선을 확인

표 2-2-3. 케톤식을 이용한 암환자 대상의 인체 연구

대상질환	대상자 (n=)	ketogenic ratio	섭취기간	유효성 지표 결과	저자
간질	아동 (n=30)	대조군: 0.3:1 Atkins 식이: 1.0:1 Atkins+ketocal: 1.8:1	1 mo	atkins + ketocal shows better efficacy but also higher LDL-chol	Hossoff 등, 2011
-	건강한 성인 (n=32)	[KD group] keto diet 1-20days keto diet 20-40days Mediterranean 40-60 [MD group] Mediterranean 1-20days Mediterranean 20-40days Mediterranean 40-60	total 60days	[KD group] ↓ RER in 20-40days ↓ body fat mass ↑ fat loss vs. MD diet [MD group] ↓ body fat mass	Alessandro 등, 2015
Cancer	진행성 암환자 (n=16)	KD diet (less than 70g CHO/day)	3mo + 3mo FU	↑ QOL (improved emotional functioning, less insomnia) No change in blood lipid	Schmidt 등, 2011
Cancer	방사선 치료중 암환자 (n=6)	RT + KD diet (less than 50g CHO/day) 0.8:1 ~1.8:1	40days	might be helpful in preservation of muscle mass (BIA) No change in QOL	Klement & Sweeney, 2016
Cancer	항암치료를 받지 않은 진행성 암환자 (n=17)	KD diet (20-40g CHO/day)	16 weeks	signif. weight loss lipid, biochemical test not changed ↑ QOL	Tan-Shalaby 등, 2016

- 해당과정 (Glycolysis)에 집중된 암 조직의 특이적 대사 반응을 타겟으로 한 케톤식이

항암 치료 식이 방법으로 주목받고 있으나, 아직까지 국내·외 연구 현황은 증례보고 또는 개별 연구자를 통한 소규모 연구에 그치고 있어 체계적인 대규모 연구 및 검증이 필요한 실정임

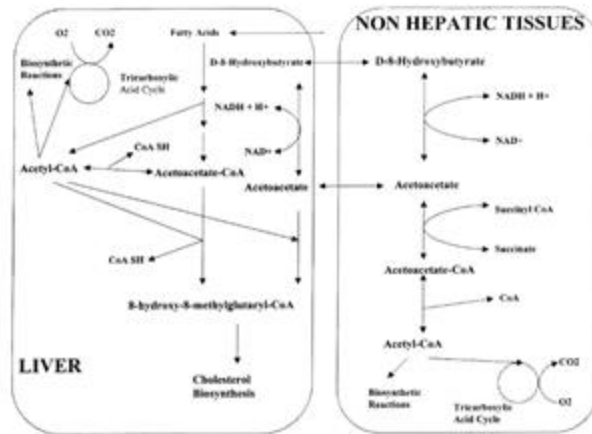


그림 2-2-1. 간에서 케톤체 합성의 대사 기전 및 뇌, 근육에서의 활용에 대한 도식도 ¹⁾

- 케톤식을 섭취하게 되면 간에서 산화가 일어나 지방산이 되고, 이 때 아세토아세테이트 (acetoacetate;AcAc), 아세톤 (acetone), 베타-하이드록시뷰티레이트 (β - hydroxybutyrate; BHB)과 같은 케톤체를 형성함. 케톤체는 혈액으로 운반되어 조직에서 아세틸코에어로 전환 되게 되고, 이것이 TCA 회로가 작동하는 원료로 사용되어 에너지 (ATP 또는 GTP)를 만들 게 됨 (그림 2-2-1)
- 암환자의 에너지 요구량은 체중과 환자 상태에 따라 다르게 적용되며, 약 25-35 kcal/kg 을 공급함. 특히, 성인 암환자의 일일 단백질 요구량은 질소 균형 때문에 중요한데, 최소 1 g/kg을 공급해야 함
- 전형적인 케톤식(Classic ketogenic diet)은 지방 : 탄수화물+단백질 비율을 4 : 1로 엄격히 제한하지만, 중쇄지방산 케톤식(MCT ketogenic diet)은 keton body 형성이 빨라 최소한의 탄수화물 비율이 아닌 적절한 탄수화물과 단백질 함량을 조절할 수 있어, 식이 형태가 다양하고 입맛에 맞게 제품을 설계 할수 있음. 케톤체를 생성시키는 주요 원료는 중쇄지방산 오일로 1000 kcal 당 48 g을 사용함. 저당지수 식이 (Low glycemic index treatment)는 탄수화물 섭취량 뿐만 아니라 탄수화물이 어떻게 혈중 포도당 수준에 영향을 미치는지에 집중 함. 변형된 앳킨스 식이 (Modified Atkins)는 지방 비율이 높고 탄수화물을 엄격히 제한하지만, 지방과 단백질, 칼로리는 제한하지 않아 전형적인 케톤생성식이나 중쇄지방산 케톤생성식 보다는 유동적임 (표 2-2-4)

표 2-2-4. 케톤 식이요법의 종류 및 특성 2)

Questions	Classic ketogenic diet	MCT ketogenic diet	Low glycemic index treatment	Modified Atkins
Is medical supervision required?	Yes	Yes	Yes	Yes
Is diet high in fat?	Yes	Yes	Yes	Yes
Is diet low in carbohydrate?	Yes	Yes	Yes	Yes
What is the ratio of fat to carbohydrate and protein?	4:1, 3:1, 2:1, 1:1	Not diet ratio related. Not able to convert to ratio of fat to carbohydrate and protein. It is because MCT produces more ketosis than LCT. Diet depends on % of calorie from MCT oil to contribute major ketone resource	Approximately 1:1	Approximately 1:1
How much carbohydrate intake per day is allowed on a 1000 kcal diet and a 2000 kcal diet?	1000 kcal diet: 8 g on a 4:1 16 g on a 3:1 30 g on a 2:1 40-60 g on a 1:1 2000 kcal diet: 7 g on a 4:1 22 g on a 3:1 48 g on a 2:1 110 g on a 1:1	1000 kcal diet: 48 g 2000 kcal diet: 95 g	1000 kcal diet and 2000 kcal diet: 40-60 g	1000 kcal diet and 2000 kcal diet: 10 g for the first month Then 20-30 g
How are foods measured?	Weighed	Weighed	Measured or estimated	Estimated
Are meal plans used?	Yes	Yes	Yes	Optional
Where is the diet started?	Hospital	Hospital	Home	Home
Are calories controlled?	Yes	Yes	Yes	No
Are vitamin and mineral supplements required?	Yes	Yes	Yes	Yes
Are fluids restricted?	No	No	No	No
Is pre-diet and during-diet laboratory evaluation required?	Yes	Yes	Yes	Yes
Can there be side effects?	Yes	Yes	Yes	Yes
Urine ketone level?	Can be high up to 160 mg/dL (16 mmol/L.)	Can be high up to 160 mg/dL (16 mmol/L.)	Can be low around 15 mg/dL (1.5 mmol/L.)	Can be low around 15 mg/dL (1.5 mmol/L.)
What is the overall difference in design of these diets?	This is an individualized and structured diet that provides specific meal plans. Foods have to be weighted accurately in gram or decimal gram. The ratio of this diet can be adjusted to affect better seizure control and also liberalized for better tolerance. This diet is also considered a low glycemic therapy and results in steady glucose levels	This is an individualized and structured diet that provides specific meal plans. Foods have to be weighted accurately in gram or decimal gram. It uses exchange lists for meal planning. The percentage of MCT oil, long-chain fat, carbohydrate, and protein can be adjusted to effect better seizure control and also liberalized for better tolerance. This diet is also considered a low glycemic therapy and results in steady glucose levels	This is an individualized but less-structured diet than the classic and MCT ketogenic diets. It uses exchange lists for planning meal and emphasizes complex carbohydrates. The balance of low glycemic carbohydrates in combination with fat result in steady glucose levels	This diet focuses on limiting the amount of carbohydrate while encouraging fat. Carbohydrate may be consumed at any time during the day as long as it is within limits. Standard meal plans are used as a guide. Protein is not limited

Abbreviations: Adapted from Liu *et al.*²²⁶ and modified from Zuperc-Kania²²⁸

- 메타분석을 위해 쥐 압 유발 모델에서 종양 성장을 조사하거나, 최소한 2:1 케톤생성비의 비제한적 케톤생성식을 추가적인 치료 없이 탄수화물 (CHO)로부터 최소 50% 에너지 함량을 주는 표준 식이와 비교시, 종양 성장에 어떠한 영향을 주는지 조사하고, 종말점 (Endpoint)의 정의는 실험 종료 전에 사전 정의된 종양 부피에 달하거나 다른 질병 진행의 조짐이 보일 때, specified endpoint와 생존분석의 시행, 케톤 생성식이와 표준 식이 그룹사이에서 hazard ratio (HR), 또는 mean survival time ratio (MR) 분석을 시행함. 모두에서 케톤생성식은 평균생존시간과 종양 성장 위험률에서 유의한 효과를 보임 (그림 2-2-2)

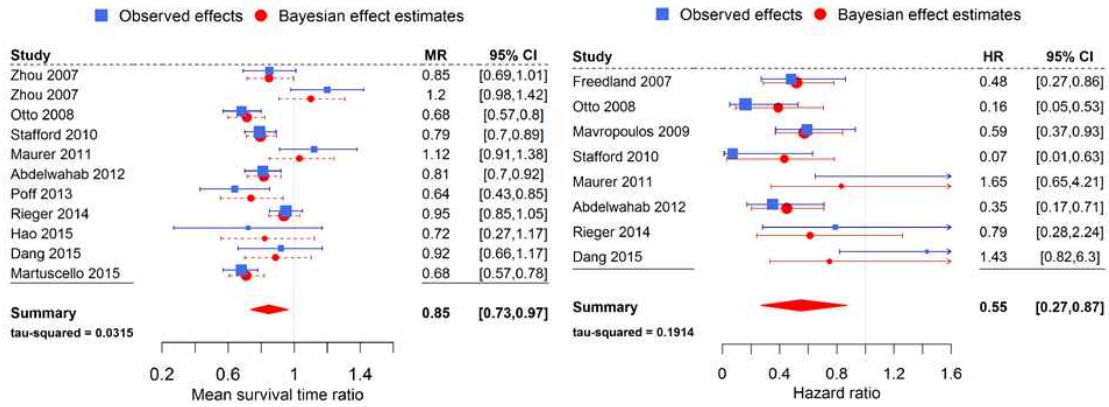


그림 2-2-2. 압 유발 쥐의 종양 성장과 케톤식이의 상관관계 메타분석 결과³⁾

- 저지방 혹은 저탄수화물 식이는 행동학적 치료와 함께 적정 체중감소 결과를 가져옴. 특히 저탄수화물 식이는 중성지방과 초저밀도지단백, 저밀도지단백, 고밀도지단백 수치가 낮았으며, 2세 때 심혈관질환의 위험인자들의 긍정적인 변화를 가져옴 (그림 2-2-3)

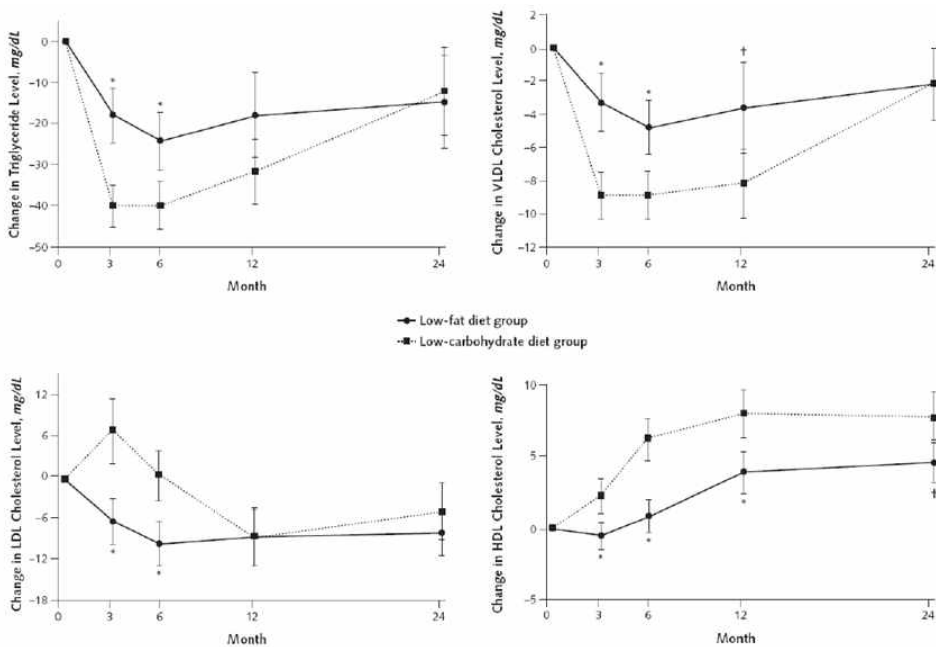


그림 2-2-3. 저지방 식이 vs 저탄수화물식이 체중변화 및 대사 비교 연구⁴⁾

- 포도당과 케톤체가 신경세포와 신경세포에 영양소를 제공하고 지지하는 비신경성 신경아교세포에서 산화 대사를 위해 케토시스를 유발하는 과정을 도식화함. 그림 A는 비케톤생성 일반 식이 섭취 상태에서 포도당과 케톤체사용 대사경로로, 포도당이 산화 대사경로에서 주 연료로 사용됨. 신경세포에서 포도당은 GABA를 생성하는 신경 글루타메이트의 합성에 관여하며, 케톤체는 신경아교세포의 합성 시 기초물질로 사용됨. 그림 B는 케톤생성 식이

섭취상태에서 포도당과 케톤체 사용 대사경로로, 케토시스가 유발하는 동안 포도당 이용은 감소하고, 케톤체 이용은 증대됨 (그림 2-2-4)

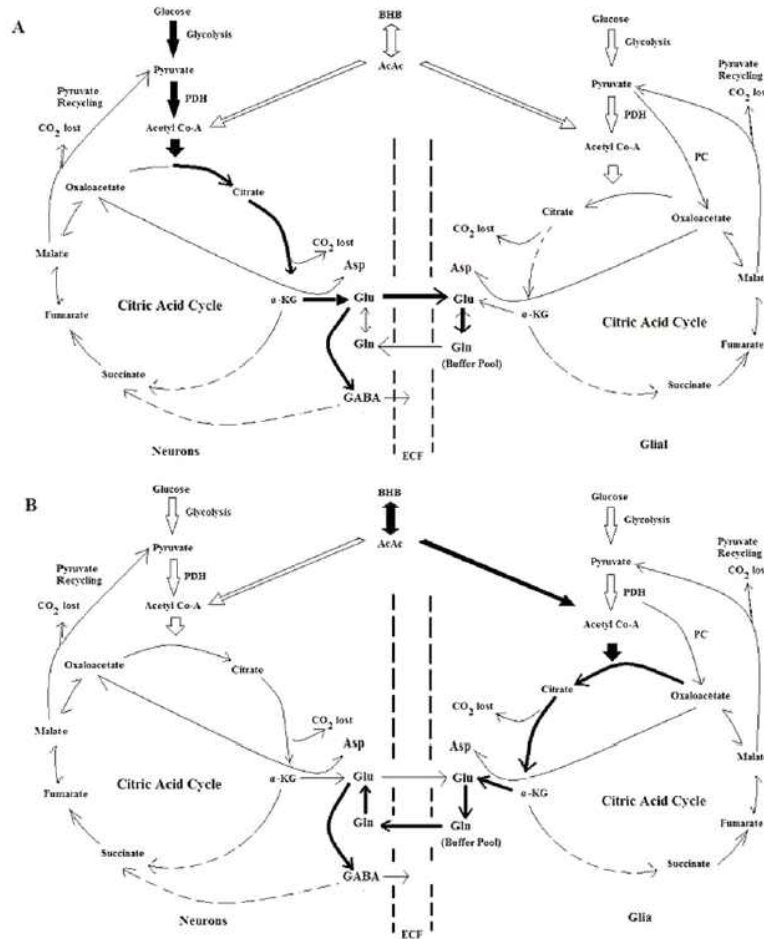


그림 2-2-4. 케토시스 유발 대사과정⁵⁾

○ 방사선 치료 중에 케톤생성식을 시행한 6명의 암 환자들의 임상적인 변화를 관찰함. 케톤 생성식 중재 연구의 주연구결과로 체지방량 감소로 인한 체중 감소가 있었지만 방사선치료 기간 동안에 환자에게서 관찰되는 양상이며 혈액학적으로도 부정적인 변화는 없었음. 이론적으로 케톤생성식은 식욕 자극 혹은 감소 기전 모두를 갖게 되는데, 환자 기록에서도 전체적으로 식욕부진 물질 영향을 더 받는 것으로 보임. 케톤 생성식은 “cancer-specific diet” 이라 할 수 있는데, 단백질 대사와 관련해서 영양적으로 완전치 못한 암환자에게서 케토시스는 요 중 질소 및 근육량 손실률을 감소시키며, 단백질 급원에 따라 net nitrogen utilization (NNU)이 달라지기 때문에 질 좋은 단백질 섭취가 중요하며, 본 연구에서는 케톤 생성비를 1:1-2:1 범위로 유지하면서 sample 단백질을 섭취하게 하였고, 중쇄지방산이 풍부한 액상형 케톤생성식을 제안하여 케톤체를 쉽게 증가시키게 함. 다만, 대부분의 암 환자에게서 나타나는 체중 감소, 근육량 소실, 당뇨, 다른 대사 동반질환의 형태가 다양하여, 이상적인 케톤 생성비는 현재로서는 불확실함. 케톤과 혈중 포

도당의 비율을 극대화하는 것이 중요시되고 있는데, 이 비율을 최대로 낮추고, 근육 조직을 유지하기 위해 질 좋은 단백질과 에너지를 충분히 제공하는 것, 그리고 부가적인 칼로리 제한이 잘 절충되어야 한다고 보여짐

3절. 케톤체 및 대사체 분석을 위한 샘플 전처리 방법 정립 및 분석

1. 연구 개발 목표

- 가. 개발된 암환자 케톤식이 섭취 후 환자의 혈액 샘플 전처리
- 나. 케톤식이 섭취에 따른 환자의 혈청 대사체 분석
- 다. 케톤식이 섭취에 따른 환자의 케톤체 분석

2. 연구 개발 결과

가. 개발된 암환자 케톤식이 섭취 후 환자의 혈액 샘플 전처리

(1) 대사체 분석에 적합한 혈액 지표 선정

- 인체 유래물 임상 연구에 자주 사용되는 혈액 지표로 혈장과 혈청이 있음. 두 지표는 구성이 유사하지만 어떤 혈액 지표를 선택하느냐에 따라 metabolic profiling의 재현도, 민감도, 정확도 등이 달라짐
- 문헌 검색도구를 통해 대사체 분석에 적합한 혈액지표 조사
- 2010년 이후 문헌 검색을 통해 연구 모델에 적합한 논문을 정리하여 표 2-3-1에 제시함

표 2-3-1. 대사체 분석 실험에서의 혈액지표인 혈장과 혈청의 적합성 비교 조사

대상자	profiling method	유효성 지표	결과	저자
51-84세 (n=377)	FIA-MS	163가지 대사체 QC 샘플의 변동계수 반복측정의 상관계수	분석의 재현도는 혈청과 혈장 모두 좋으나, 혈청의 대사체 농도가 더 높아, Biomarker 검출에 더 민감함	Zhonghao Yu, 등, 2011
22-43세 정상인 (n=15)	GC/TOF-MS	72가지의 대사체 37°C 1-4h 보관에 따른 대사체 파괴정도 관찰	50%의 대사체가 채취 방법에 따라 농도의 차이가 있으며 대체로 혈청에서 더 높았음 혈청이 실험시간에 따른 영향을 덜 받음	Liu, Linsheng, 등, 2010
22-52세정 상인 (n=22)	ESI-LC-MS/MS	188가지의 대사체 변동계수와 상관계수 대사체 파괴유도 실험	대사체 분석의 신뢰성 및 안정성(농도)은 혈장보다 혈청에서 유의하게 높음	Breier, Michaela, 등, 2014
소세포성 폐암환자 (n=22)	GC/TOF-MS UHPLC/MS-ESI- UHPLC/MS-ESI+	분석 방법에 따른 반복측정 가능성, 임상적 예후와 대사체의 상관성	두 혈액지표간의 차이는 적으나 몇 가지의 대사체의 감지에 차이가 있음 임상적 예후를 판단하는데 혈장이 적합함	DC Wedge, 등, 2011

- 이와 같이 대부분의 연구에서 혈청과 혈장을 활용한 대사체 분석은 유사한 결과를 나타

내 신뢰성이 있음

- 하지만 혈청은 대사체 농도가 높지만 실험과정에 따른 변화가 적어 혈액 Biomarker 검출에 더 적합함
- UPLC-MS(LTQ-Orbitrap)기기와 GC-MS(7890A-5977A)기기를 활용한 해당 연구에는 혈청이 더 적합함

(2) 혈액 샘플 채취 전처리 수행 방법 확립

- 혈청은 혈장과 달리 분리과정에서 방치과정이 수반되며 샘플마다 방치되는 시간과 온도가 달라질 경우 대사체가 파괴되는 정도에 영향을 미칠 수 있음
- 장기적으로 진행되며 각기 다른 시점에 채취되는 혈액 샘플이여도 시간과 온도에 따른 영향이 동일하도록 혈액 샘플 전처리 수행 방법을 동일하게 유지시키는 것이 적합함
- 혈액 응고를 위한 방치 시간을 1h로 동일하게 유지, 기록하고, 방치되는 온도를 4℃ 로 동일하게 유지

(3) 진단적 바이오마커로 췌장암 관련 혈액 대사체에 관한 문헌조사

- (가) 문헌 검색 도구를 이용하여 2010년 이후 본 연구의 목표에 부합한 “Pancreatic cancer“와 ” metabolite profiling“을 검색하였을 때 췌장암 환자의 대사체를 정상인이나 췌장염 환자의 것과 비교한 것이 많았음 이에 관한 결과는 표 2-3-2에 제시함

표 2-3-2. 진단적 바이오마커로서 췌장암 관련 혈액 대사체 관련 연구

샘플 유형	연구 목적	대상	N	혈액 채취횟수	Profiling Method	저자
혈청 혈장	췌장암 진단 Biomarker	췌장암	(5)	1	GC-TOF-MS Hilic-LC/MS RP-LC/MS	Shiro urayama, 등, 2010
		췌장염	(5)			
혈청	췌장암 진단 Biomarker	췌장암	(20)	1	GC/MS	Shin Nishiumi, 등, 2010
		정상인	(9)			
혈청	췌장암 예후 판단	췌장암	(42)	1	GC/MS	Takashi Kobayashi, 등, 2013
		췌장염	(23)			
		정상인	(41)			
혈청	췌장암 진단 Biomarker	췌장암	(40)	1	API 3000 MS / MS	Leichtle, Alexander. 등, 2013
		췌장염	(26)			
		정상인	(40)			
혈청	췌장 및 담도 병변의 진단	양성간담질환	(43)	1	GC/MS LC/MS	Bathe, Oliver F, 등, 2011
		췌장암	(56)			
혈장	췌장암 진단 방법	췌장암	(19)	1	NMR	Lin Zhang, 등, 2012
		만성췌장염	(20)			

		정상인	(20)			
혈청	퀘장암 혈청 종양 마커 개발	퀘장암	(40)	1	LC-MS/MS	Di Gangi, Iole Maria, 등, 2016
		정상인	(40)			
혈장	퀘장암 종양 마커 개발	퀘장암	(100)	1	LC-TOFMS	Guo xie, 등, 2015
		정상인	(100)		GC-TOFMS	

(나) 이와 같이 대부분의 연구가 환자대조군 연구였기 때문에 해당 연구를 통해 발견된 바이오마커들은 진단적 의미의 바이오마커 뿐임 따라서 케톤식이의 유효성을 판단하는 예측적 의미의 바이오마커를 활용해야하는 해당 연구의 조사대상이 되는 대사체를 기존의 연구를 토대로 하여 선정하는 것은 불가능하므로 global(non-target) metabolite profiling을 실시하는 것이 바람직함

나. 케톤식이 섭취에 따른 환자의 혈청 대사체 분석

(1) 대사체 분석을 위한 실험조건 조사 및 확립

(가) UPLC-MS (LTQ Qorbitrap) 기기를 사용한 재현가능한 대사체 분석을 위한 조건 조사 및 확립

(나) 액체 크로마토 그래피 질량 분석기(LC-MS)를 사용한 대사체 분석을 위한 전처리 방법에 대한 문헌조사를 실시하였으며 구체적인 내용은 표 2-3-3에 제시함

표 2-3-3. 액체 크로마토 그래피 질량 분석기(LC-MS)를 사용한 대사체 분석을 위한 전처리 방법 비교

샘플 유형	연구의 목적	열처리 유무	Internal standard	단백질 침전방법	농축 방법
Serum	인간 혈청 대사체 프로젝트 (HUSERMET)	No heat	O	메탄올(1:3, V/V)	lyophilization
Plasma	대사체학 및 지질학을 위한 Orbitrap mass spectrometer 성능 평가	Heat	X	아세트 니트릴 (1:4, V/V)	X
Serum	Mouse에서 아세트 아미노펜 간독성의 기전에 관한 연구	No heat	O	66% 아세트 니트릴 (1:20, V/V)	X
Plasma	대사 증후군 조사	Heat	X	메탄올	N2 gas
Serum	대장암의 진단 및 질병의 이해	Heat	O	아세트 니트릴 62.5% 메탄올 37.5% (1:2, V/V)	Vacuum dry at room temperature
Plasma	대사체학을 통한 전립선암의 진단방법에 관한 연구	No heat	X	메틸 알코올, 아세톤, 아세트 니트릴	lyophilization
Serum	이온화 방법을 이용한 대사체 연구 범위에 관한 연구	Heat	O	80% 메틸 알코올	X
Plasma	강직성 척추염의 진단에 관한 연구	Heat	X	아세트 니트릴 (1:3, V/V)	lyophilization
Serum	장 누공의 진단	No heat	O	아세트 니트릴 (1:4, V/V)	lyophilization
Dried blood, Plasma	샘플 전처리 방법 비교	heat(40)	O	메탄올 25% (1:8, V/V)	N2 gas
Plasma, Serum	Plasma 및 Serum의 비교	No heat	O	메탄올 (1:3, V/V)	lyophilization

Plasma	포유동물의 혈액 대사 물질에 대한 장내 미생물의 효과		X	메탄올 (1:4, V/V)	SpeedVac drying
Plasma, 뇌척수액	분석 및 생물 다양성의 조사	No heat	X	메탄올 (1:4, V/V)	evaporation to dryness

(2) 예비실험을 통해 혈청 대사체 추출 방법 비교

(가) 위의 표를 바탕으로 가장 많이 활용되는 전처리 방법인 질소기체를 사용하는 방법과 동결건조기를 활용하는 방법 두 가지에 대한 예비실험을 통해 혈청 대사체 추출에 더 적합한 전처리 방법 확립 (표 2-3-4)

표 2-3-4. 액체 크로마토 그래피 질량 분석기(LC-MS)를 사용한 대사체 분석을 위한 전처리 방법 예비실험 결과

방법	profiling method	Total FrameID	Average FrameID per sample	peak intensities higher than counterpart
N2 gas	UPLC-MS	5888	4240.6	85
lyophilization	UPLC-MS	5888	5995.3	5801

(나) 동일한 profiling method로 2가지 전처리 방법을 비교한 결과, 동결건조기를 활용한 방법이 기체질소를 활용한 방법보다 더 다양한 대사체를 검출할 수 있었으며 그 강도 또한 더 높았으며, 이때의 차이는 t-test 분석 결과 3267개(p<0.05) 1423개(p<0.01) 282개(p<0.001)의 물질에서 통계적으로 유의하였음

(라) 위의 결과를 바탕으로 Dunn, Warwick B., 등, (2011)의 논문에서 사용된 액체 크로마토 그래피 질량 분석기(LC-MS를 활용한 대사체 분석이 UPLC - MS(LTQ-Orbitrap)기기와 GC-MS(7890A-5977A)기기를 활용한 대사체 분석을 실시하는 해당 연구와 가장 유사하고 신뢰성이 있음을 확립

(마) 대사체 분석의 신뢰도(quality control)를 높이기 위한 실험 조건 확립

- ① 샘플 전처리 시, 안에 동일한 isotope chemical인 internal standards 첨가
- ② External standard, saline blank를 analysis batch 중간에 추가 하고 이를 통해 기기에 장착하여 사용하고 있는 column의 분석능이 뛰어나고 오염이 발생하고 있지 않음을 주기적으로 확인
- ③ Pooled QC sample을 만들고 분석 초기와 중간에 주기적으로 분석을 수행하여 오랜 시간 계속적으로 이루어지는 분석 값이 시간의 영향을 받지 않음을 확인
- ④ Ion mode를 positive(ES+)와 negative(ES-)에서 분석하여 대사체의 특성에 따라 분석되지

않거나 그 값이 달라지는 것이 없도록 함

- ⑤ LC-MS 분석이 완료된 후 saline blank, internal standard, external standard 그리고 지속적으로 측정된 QC sample의 결과값을 SIEVE software를 통해 normalization을 실시하여 분석의 신뢰도를 높임

(3) 기존의 타 연구에서 기수집된 혈액 샘플을 이용하여 혈청 대사체 pilot 실험 수행

(가) 확립된 실험 조건에 따라 LC-MS 분석을 위한 혈청 샘플 전처리 pilot 실험을 수행

(그림 2-3-1)

(나) 확립된 조건에 따라 UPLC-MS(LTQ-Orbitrap)기기를 활용하여 혈청 metabolite profiling 수행

- ① XCalibur(ThermoFisherScientific) software 사용
- ② LC-MS(LTQ-Orbitrap)을 구동하였으며 투입된 샘플의 양은 5 μ l
- ③ 이때의 실험조건 m/z range 50-1000, mass 400(FWHM), mass resolution 30,000, scan time 0.4s



그림 2-3-1. 사용 분석 장비 (Ultimate 3000 RS-LTQ Orbitrap XL connected to UPLC)

(다) 실제 암환자를 대상으로 진행 예정인 대사체 분석과 유사하게 균을 나누어 대사체 분석을 수행

(라) 본 실험과 동일하게 QC sample, Column check solution, saline blank 등 normalization을 위해 요구되는 샘플을 분석 대상이 되는 샘플과 함께 분석 수행 (표 2-3-5)

표 2-3-5. Analysis orders used for UPLC-LTQ/Orbitrap-MS

UPLC-MS ES(+)		UPLC-MS ES(-)	
1	QC sample	1	QC sample
2	QC sample	2	QC sample
3	QC sample	3	QC sample
4	QC sample	4	QC sample
5	QC sample	5	QC sample
6	QC sample	6	QC sample
7	QC sample	7	QC sample
8	QC sample	8	QC sample
9	QC sample	9	QC sample
10	QC sample	10	QC sample
11	Column Check solution	11	Column Check solution
12	대조군1	12	대조군1
13	대조군2	13	대조군2
14	대조군3	14	대조군3
15	실험군1	15	실험군1
16	QC sample	16	QC sample
17	Saline blank	17	Saline blank
18	Saline blank	18	Saline blank
19	실험군2	19	실험군2
20	실험군3	20	실험군3
21	QC sample	21	QC sample
22	Column Check solution	22	Column Check solution

(마) 기수집된 혈액 샘플을 통한 pilot실험 결과를 통해 확립된 방법의 적합성, 재현성, 신뢰도에 관한 분석을 통해 채장암 환자의 대사체 분석에 확립된 방법이 적합함을 확인

① retention time에 따른 대사체의 M/Z 분포를 gel view를 통해 확인

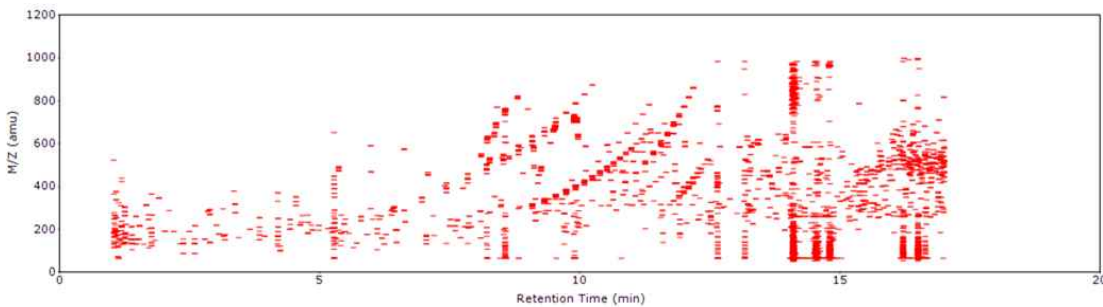


그림 2-3-2. Gel view of metabolites according to retention time

② retention time에 따른 peak alignment 결과

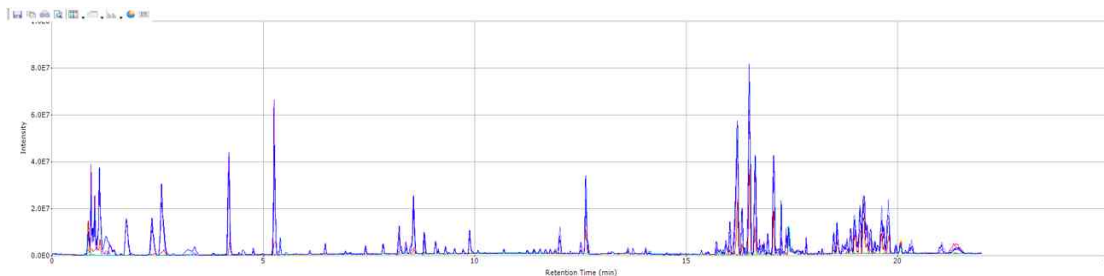


그림 2-3-3. peak alignment results

③ Column check solution의 세 가지 물질 Dodecanamide Cortisone L-thyroxine이 감지

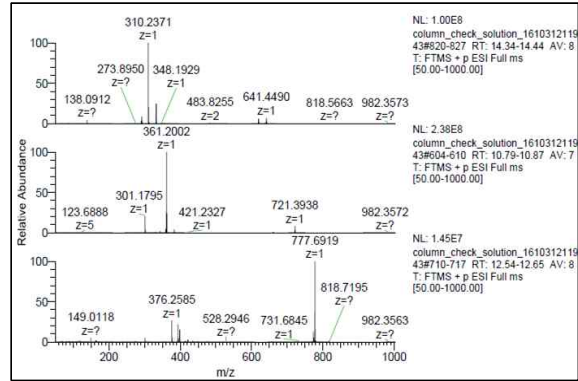
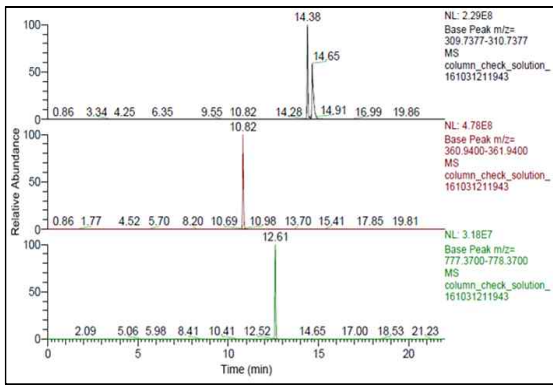


그림 2-3-4. Column check solution(Dodecanamide, Cortisone, L-thyroxine) detection

④ Saline blank와 QC sample에 대한 변동계수가 대부분이 50이하로 낮음

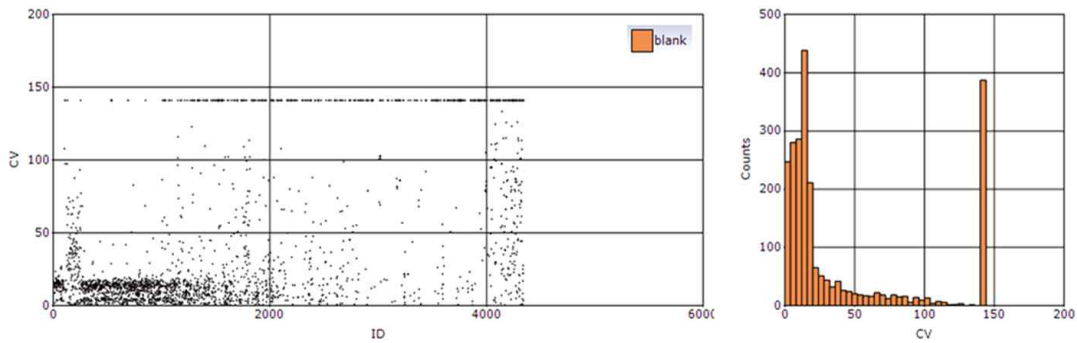


그림 2-3-5. Coefficients of variation(CVs) of saline blank

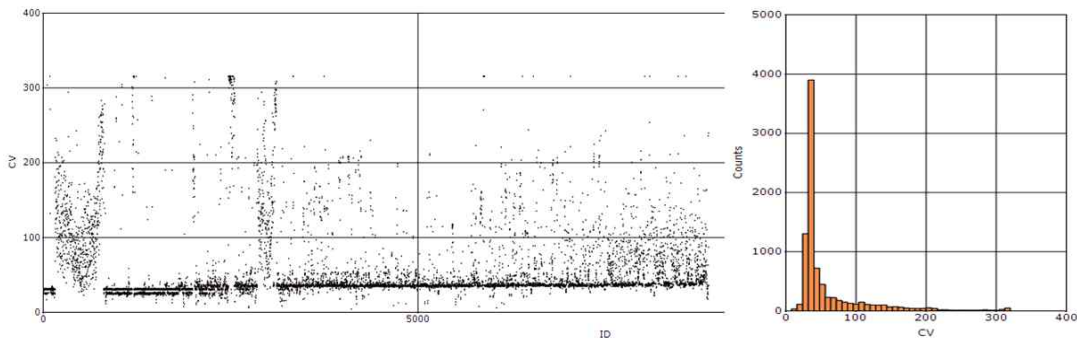


그림 2-3-6. Coefficients of variation(CVs) of QC samples

⑤ 확립된 프로토콜에 따라 LC-MS 분석 후, metabolite pathway analysis 수행

PathwayID	Matches	PathwayName	CompID	KEGG_ID	CompoundName	MaxChange	Avg_C	Avg_exp	Avg_blank
map01100	83	Metabolic pathways	812	C00106	Uracil	2.39	344395	144386	17613
map01110	59	Biosynthesis of secondary metabolites	814	C00791	Creatinine	2.55	13265217	5210691	7144
map01120	42	Microbial metabolism in diverse environments	815	C06593	epsilon-Caprolact...	1.56	329765	515906	288910
map01060	33	Biosynthesis of plant secondary metabolites	826	C00183	L-Valine	2.41	86912678	36036148	383581
map00232	14	Caffeine	826	C00715	Betaine	2.41	86912678	36036148	383581
map00460	14	Cyanamino	877	C00180	Benzoate	1.39	879179	631048	270096
map01210	13	2-Oxocarboxylic acid metabolism	877	C00633	4-Hydroxybenzal...	1.39	879179	631048	270096
map00380	12	Tryptophan	877	C06202	Salicylaldehyde	1.39	879179	631048	270096
map01063	12	Biosynthesis of alkaloids derived from shikimate pathway	939	C11354	2-Hydroxy-cis-hex...	1.97	1569665	794824	96622
map01220	12	Degradation of aromatic compounds	948	C04281	L-Pyrroline-3-hy...	1.77	8936665	5053665	79209

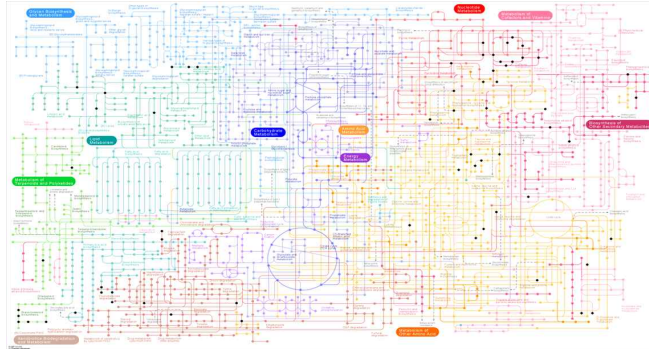


그림 2-3-7. Metabolite pathway analysis

(바) 두 군으로 나눈 군에 대한 통계적 분석

- ① 두 군 간의 유의미한 차이가 있는 물질은 3279개 중 26개 이었으며 아래는 그 중 한 물질을 XCMS software를 활용하여 그림화 한 것을 그림 2-3-8 로 제시함

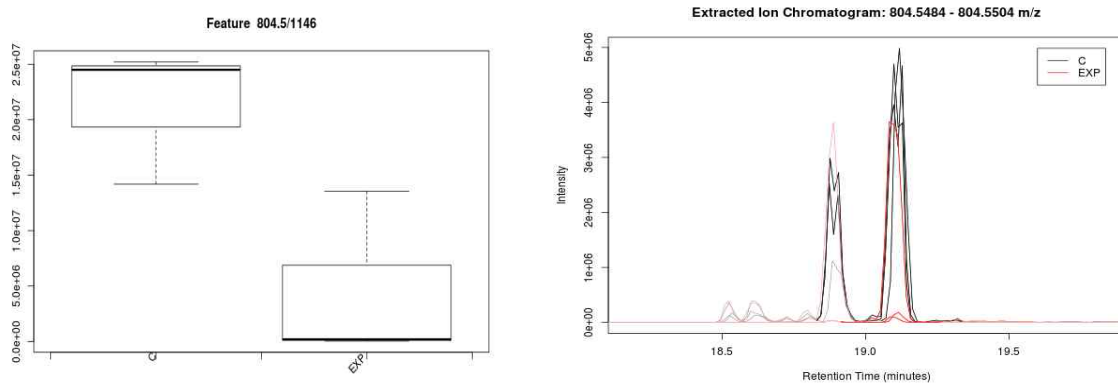


그림 2-3-8. Box and whisker plot and EIC of metabolite detected as m/z of 804.5 from XCMS software

- ② 두군 간의 값의 차이가 1.5배 이상인 대사체를 cloud plot으로 나타낸 것을 그림 2-3-9 에 제시함 (초록색은 기준이 되는 군에 대하여 그 값이 증가한 대사체, 빨간색은 그 값이 감소한 대사체)

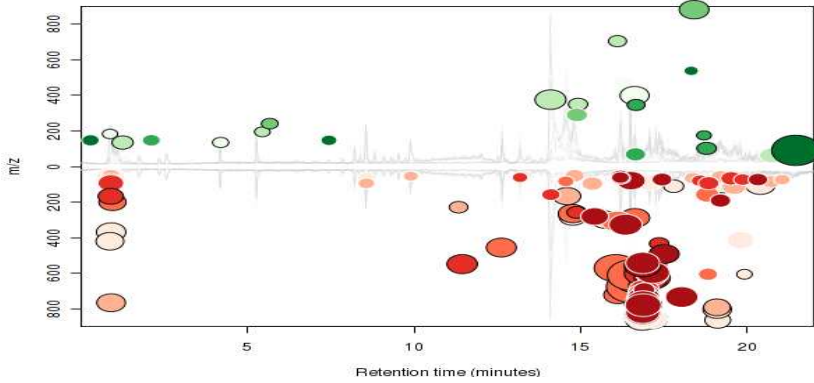


그림 2-3-9. Cloud plot of random two groups

- ③ 이중 후보물질을 찾을 수 있던 물질 428개 중 3개 였음
- ④ PCA plot을 통해서도 알 수 있듯이 두 군의 대사체에는 차이가 있었음 (그림 2-3-10)

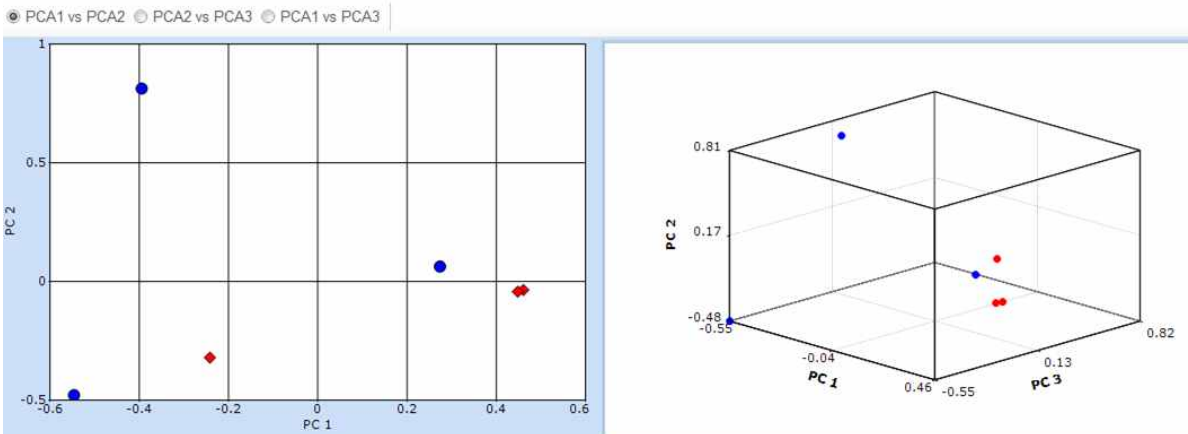


그림 2-3-10. PCA plot of random two groups

다. 케톤식이 섭취에 따른 환자의 케톤체 분석

(1) 케톤체 분석을 위한 실험조건 조사 및 확립

(가) 휘발성이 강한 케톤체의 경우 LC로 감지가 어렵기에 GC-MS를 통한 분석이 요구됨

(나) 기체 크로마토 그래피 질량 분석기(GC-MS)를 사용한 대사체 분석을 위한 전처리 방법에 대한 문헌조사를 실시하였으며 구체적인 내용은 표 2-3-6에 제시함

표 2-3-6. 기체 크로마토 그래피 질량 분석기(GC-MS)를 사용한 대사체 분석을 위한 전처리 방법 비교

샘플 유형	연구의 목적	Heat	Internal standard	단백질 침전방법	농축 방법	저자
Serum Plasma	인간 혈청 대사체 프로젝트 (HUSERMET)	Heat	O	메탄올(1:3, V/V)	Lyophilize	Dunn, Warwick B., 등, 2011
Serum urine	대사체 protocol 확립	No heat	X	메탄올-아세트니트릴 (7:3, V/V)	Lyophilize	Dunn, Warwick B 등, 2008
Serum	혈청 크레아티닌 측정 개발	No heat	O	에탄올 (1:3, V/V)	Lyophilize	Nathan G. Dodder, 등, 2007

(다) 위의 결과를 바탕으로 Dunn, Warwick B., 등, (2011)의 논문에서 사용된 기체 크로마토 그래피 질량 분석기(GC-MS)를 활용한 대사체 분석이 UPLC - MS(LTQ-Orbitrap)기기와 GC-MS(7890A-5977A)기기를 활용한 대사체 분석을 실시하는 해당 연구와 가장 유사하고 신뢰성이 있음

(2) 기존의 타 연구에서 기수집된 혈액 샘플을 이용하여 케톤체 pilot 실험 수행

(가) 확립된 실험 조건에 따라 GC-MS 분석을 위한 혈청 샘플 전처리 pilot 실험을 수행

(나) 확립된 조건에 따라 GC-MS(7890A-5977A)기기를 활용하여 혈청 케톤체

- ① EZChrom Elite(Aglient Technologies) software를 사용
- ② GC-MS(7890A-5977A)를 구동하였으며 투입된 샘플의 양은 1µl
- ③ 이때의 실험조건 V mode m/z range 50-600 scan time 0.99/s
- ④ Initial temperature 60°C injection port temperature 230°C interface temperature 290°C
- ⑤ Split ratio 4:1 helium gas flow rate 1.5ml/min

(다) 본 실험과 동일하게 QC sample, Column check solution, saline blank 등 normalization을 위해 요구되는 샘플을 분석 대상이 되는 샘플과 함께 분석 수행

(라) 기수집된 혈액 샘플을 통한 pilot실험 결과 (그림 2-3-11)

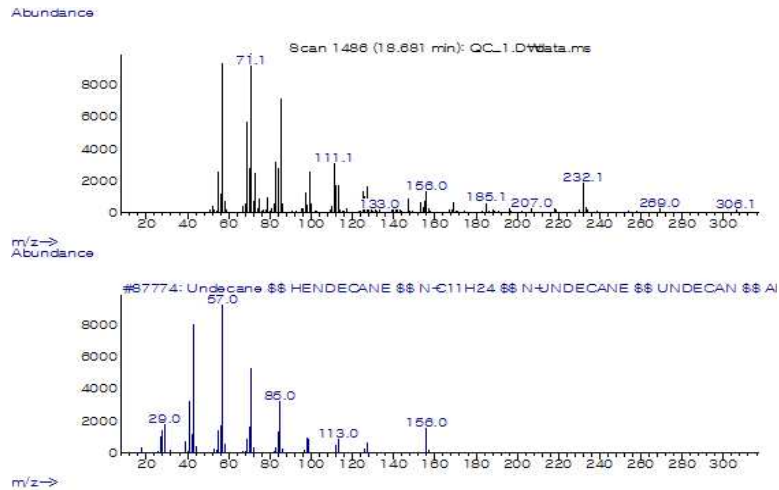


그림 2-3-11. metabolite example identified as Undecane

4절. 암환자용 케톤식 레시피 개발 및 임상연구

1. 목적

케톤식 특수의료용도 식품을 개발하기 앞서, 환자의 순응도를 평가하고 또한, 개발된 레시피를 적용하였을 때 케톤체 형성여부를 확인함으로써, 최적의 케톤 : 비케톤의 ratio를 확정하는데 그 목적이 있음

2. 연구범위

가. 레시피 개발

기존에 본원에서 개발된 소아 간질환자용 레시피북 및 각종 케톤식 레시피를 활용하여 전문가와 함께 성인 암환자용 케톤식 레시피 30개 이상을 음식 종류별(주식, 간식, 음료 등)로 개발 진행함

나. 임상연구를 통한 레시피 검증

3. 연구수행방법(이론적, 실험적 접근방법)

가. 이론적 접근방법

(1) 항암 환자용 케톤식 1일 영양기준량 설정

○ 1일 영양소 구성 (60 kg 성인 환자 기준, 표 2-4-1)

에너지: 현재 체중 유지를 위한 최소 요구량 제공 목표: 20~25 kcal/kg

단백질: 체단백 손실 예방을 위한 최소 요구량 수준; 1.0 g/kg

표 2-4-1. 제공된 케톤식의 영양구성표

케톤: 비케톤 비율	식이단위당 열량(kcal)	1일 총 식이단위수	탄수화물(g)		단백질(g)		지방(g)		에너지 (kcal)
1.7	19.8	75.9	15.95	4%	60.00	16%	132.91	80%	1500

(2) 항암케톤식용 식품군 정리

- 고지방, 저탄수화물 구성된 식사: 탄수화물 급원인 곡류군 식품을 제외한 모든 식품군의 탄수화물, 단백질, 지방량을 고려하여 식단 및 레시피 구성
- 식품군별로 식품 1g당 지방과 탄수화물+단백질량 함량으로 DB를 만들고, 동량의 지방 또는 탄수화물+단백질을 포함한 식품의 양을 설정하여 ‘간이 케톤식 교환단위표’를 작성하여 레시피별 영양소 비율 조정에 활용함.
- ✓ 농촌진흥청 및 미국 농무부(USDA) 식품성분표 Database를 이용함.

나. 실험적 접근방법

- (1) 여러 조리 관련 서적과 웹상에서 찾을 수 있는 레시피 중 케톤식에 준한 영양소 구성이 가능할 것으로 생각되는 메뉴를 선정
- (2) 일반 식사와 케톤식의 영양소구성과 맛, 제공량 등의 차이를 고려하여 1일 3끼와 간식의 메뉴 구성을 설정하고 필요한 메뉴를 선정
- (3) 선정된 메뉴의 레시피 재료를 기준으로 1차 영양가분석 실시
- (4) 1차 분석 결과의 열량, 영양소 구성을 설정한 케톤식 1일 영양기준량에 준하도록 재료의 양과 종류를 조정하여 2차 분석결과 산출 (간이 케톤식 교환단위표 활용)
- (5) 2차 분석결과를 토대로 실험조리 실시
- (6) 실험조리 실시 중의 필요재료와 조리방법을 고려하여 재료와 조리법을 확정
- (7) 실험조리 실시한 경험을 바탕으로 이후에 추가로 영양소 구성 조정이 필요한 경우 조리결과물의 맛과 색, 질감 등을 고려하여 최종 레시피 확립
- (8) 최종 레시피 영양소 분석 실시
- (9) 개발된 레시피를 조합하여 환자에게 제공할 1일 식단 구성 (유동식과 연식)

다. 구체적인 내용

(1) 메뉴 레시피 개발 완료

(가) 최종 개발 메뉴 (약 50개 메뉴 개발)

개발된 레시피의 수는 수프 (6종), 계란찜 (10종, 단백질 토핑 다양화), 포타주 (2종), 스투/탕 (5종), 일품요리 (8종), 미트볼/어묵/완자 (5종), 국 (6종), 김치 4종, 간식스프 (6종), 음료드링크 (1종), 유동식 가능메뉴 (2종)

(나) 메뉴별 목표 영양소 구성

- ① C+P:F ratio : >1.75
- ② 메뉴별 총 열량 대비 영양소비율
: 탄수화물 : 단백질 : 지방 = 4% : 16% : 80%
- ③ 개발된 항암 케톤식을 해당도암 환자에게 적용 및 순응도 연구를 위한 1일 식단 구성
: 조식 (수프, 계란찜, 허브티), 간식 (간식스프), 중식 (스튜/탕, 일품요리, 허브티), 간식 2 (간식스프), 석식 (미트볼/어묵/완자, 김치, 국, 허브티), 간식3 (드링크)
- ④ 설정한 케톤식 1일 영양기준량에 맞도록 메뉴 그룹의 개발메뉴를 조합하여 최종 식단 구성함 (그림 2-4-1, 그림 2-4-2)



그림 2-4-1. 개발된 케톤식 식단의 예 (main dish)

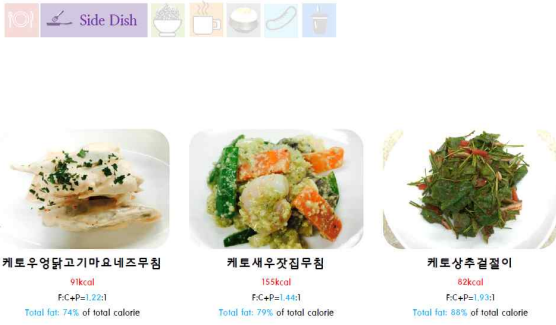


그림 2-4-2. 개발된 케톤식 식단의 예 -2

4. 임상 연구

가. 임상 연구명

췌담도암 수술 환자에서 항암케톤식 적용에 대한 순응도 평가

나. 연구 목적

최근 해당과정에 집중된 암 조직의 특이적 대사 반응을 근거로 케톤식의 암 치료 보조 요법으로서의 가능성이 제시되고 있어 췌담도암 수술 후 환자를 대상으로 항암케톤식의 순응도를 평가하고자 함

다. 연구 대상 및 방법

- (1) 췌담도암으로 근치적 절제술을 시행 받은 19세 이상 성인 환자 30명 대상 (지방 80% 케톤식 섭취군(AK1군), 지방70% 케톤식 섭취군(AK2군)과 대조군에 각 10명씩 배정)
- (2) 케토시스를 유발하면서 순응도가 높은 당질과 지방비율을 결정하기 위해 실험조리를 통해 각 메뉴별 2가지 지방비율의 항암케톤식 레시피 50여가지를 개발함

(3) 2가지 지방비율의 항암케톤식(유동식, 연식)을 3끼 식사와 3회 간식으로 구성 (그림 2-4-3)



그림 2-4-3. 항암케톤식 연식 상차림 예시

(4) 연구 대상자의 일반사항은 의무기록을 통해 수집하였고 수술 전과 연식 섭취 3일째, 퇴원 시, 2주 후 외래 방문 시 키, 체중 측정, 임피던스 이용한 체성분 분석 시행, 혈액 및 소변검사 결과 수집함

(5) 식사섭취상태는 환자의 자가 기록지와 면담을 통해 평가함

라. 연구 결과

(1) 연구참여에 동의한 환자 30명을 군 별로 10명씩 배정했고, 수술 후 합병증, 동의 철회 등으로 중도 탈락한 대상자를 제외한 20명(대조군 9명, AK1군 8명, AK2군 3명)의 자료를 분석함

(2) 수술 전 세 군의 성별, 연령, 영양상태는 차이가 없었고 세 군의 요구량에 대한 에너지 섭취율은 식사섭취시작 1일째와 7일째에 유의적으로 높았음 (대조군 : AK1군 : AK2군; 1일째, $18.7 \pm 8.4\%$: $50.5 \pm 8.9\%$: $48.0 \pm 14.6\%$, $p < 0.05$; 7일째, $33.2 \pm 11.1\%$: $69.7 \pm 20.2\%$: $86.8 \pm 16.7\%$, $p < 0.05$) (그림 2-4-4)

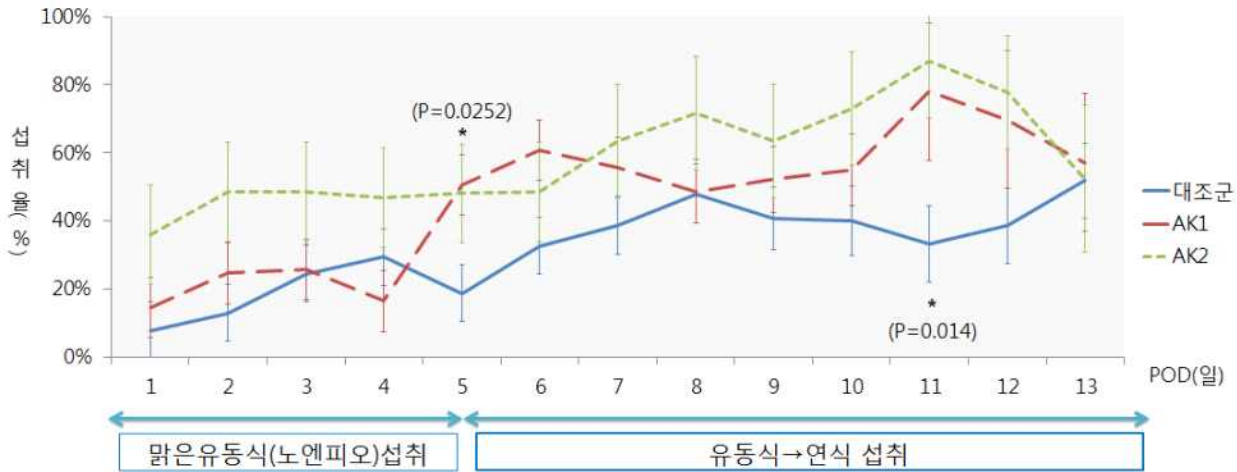


그림 2-4-4. 재원기간 중 세 군의 일별 에너지 섭취율 (에너지 섭취량/에너지 요구량, %) 추이

- (3) 식사만족도 평가는 연식 섭취 3일째 조사지를 배부하여 10점 척도로 평가함
 식사만족도는 ‘음식의 양’ 과 ‘소화용이도’ 에서 대조군에 비해 두 실험군이 더 높았음(각각 p=0.001, p=0.004) (그림 2-4-5)

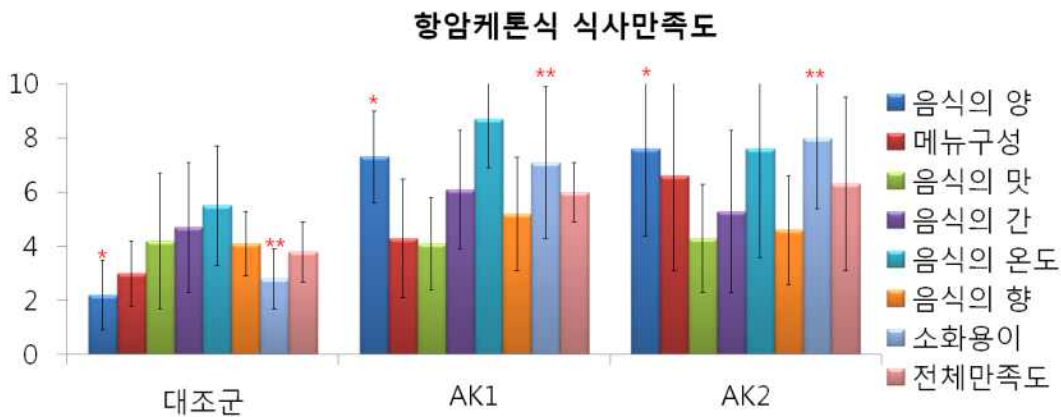


그림 2-4-5. 항암케톤식 식사 만족도

- (4) 체중은 세 군 모두 퇴원 시에 의미 있는 감소를 보였으나 체중감소량은 차이 없었음.
 대조군과 AK1군 모두 퇴원 시 체세포량, 골격근량이 유의적으로 감소했지만 체지방량은 변화가 없었음
- (5) 소변 내 케톤체 검출은 퇴원 시 대조군에 비해 항암케톤식을 섭취한 두 군에서 높았음

(p=0.035) (그림 2-4-6)

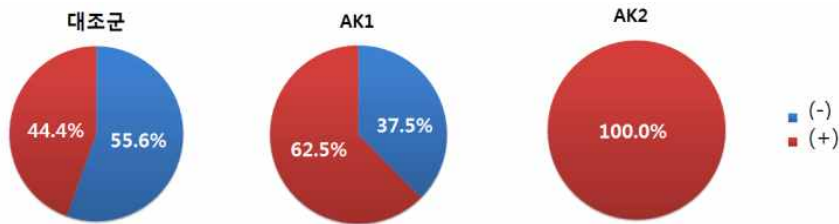


그림 2-4-6. 퇴원 시 소변 내 케톤체 검출 결과

(6) 수술 전후 혈중 LDL콜레스테롤 농도는 대조군은 차이가 없었으나 두 실험 군에서는 유의적으로 감소함 (p=0.041)

(7) 췌담도암 환자의 췌장절제술 후에도 케톤식은 안전하게 수술 후 회복단계부터 섭취가 가능하였으며 기존 식사에 비해 에너지 섭취율과 식사만족도를 높일 수 있었고, 체내 케토시스 유발의 가능성을 확인할 수 있었음. 이를 바탕으로 수술 후 제공되는 항암케톤식의 종양학적인 의미에 대한 전향적 연구의 가능성을 제시함

5. 케톤체 및 대사체 분석

가. 연구 개발 결과

(1) 암환자 케톤식이(일반 항암식, 케톤식이) 섭취 전/후로 환자의 혈액 샘플 수집

(가) 개발된 암환자 케톤식이 섭취 전/후로 환자의 혈액 샘플 수집 완료

① IRB 승인 이후 1차년도 암환자의 혈액 샘플 수집

② 혈액 보관 전 노출되는 환경에 따른 대사체 변화의 차이를 줄이기 위하여 혈청 분리 후 -80°C 보관

표 2-4-2. Ketone diet 환자 혈액 샘플 수집

	분석에 사용된 시료
일반식사	9
Modified Atkins diet(MAD)	8
Ketogenic diet(KD)	3
Total	20

③ 대사체 분석 과정 중 PCA 분석과 OPLS-DA 분석에 따르면 AK1 2주차 혈액과 AK2 2주차 혈액의 차이가 없음이 밝혀져, 본 연구에서는 AK1 섭취군과 AK2 섭취군을 KD 1개 군으로 연구를 진행함

(2) 암환자 케톤식이 섭취 전/후 환자의 혈청 대사체 분석

① LC-MS/MS 기기를 활용하여 혈청 대사체 프로파일링 수행

㉞ LC-MS/MS 분석 순서는 아래의 그림과 같은 순서로 진행하였으며, 대사체 분석의 신뢰성을 높이기 위하여 QC 샘플과 blank를 10번째 샘플마다 분석하였음

표 2-4-3. LC-MS/MS 분석 순서

LC-MS/MS 분석 순서									
순서	샘플이름	순서	샘플이름	순서	샘플이름	순서	샘플이름	순서	샘플이름
1	Blank	15	N5C	29	N9C	43	M6A	57	M10A
2	N1A	16	N6A	30	N10A	44	M6B	58	M10B
3	N1B	17	N6B	31	N10B	45	M6C	59	M10C
4	N1C	18	N6C	32	N10C	46	M7A	60	QC
5	N2A	19	N7A	33	M2A	47	M7B	61	Blank
6	N2B	20	N7B	34	M2B	48	QC	62	M11A
7	N2C	21	N7C	35	M2C	49	Blank	63	M11B
8	N4A	22	N8A	36	QC	50	M7C	64	M11C
9	N4B	23	N8B	37	Blank	51	M8A	65	M17A
10	N4C	24	QC	38	M3A	52	M8B	66	M17B
11	N5A	25	Blank	39	M3C	53	M8C	67	M17C
12	QC	26	N8C	40	M4A	54	M9A	68	M20A
13	Blank	27	N9A	41	M4B	55	M9B	69	M20B
14	N5B	28	N9B	42	M4C	56	M9C	70	M20C

㉞ LC-MS/MS 분석에 의해 총 50972개의 이온화된 물질이 감지되었고, non-targeted metabolomics 분석이 가능한 물질로 543개를 최종 선정함

㉞ 총 감지된 50972개의 물질의 peak intensities는 내부표준물질을 이용하여 normalization함

② Metabolomics 연구 모델 선정 및 잠정적 바이오마커 후보 선출

㉞ SIMCA 14.1 소프트웨어 분석을 위한 데이터 처리

SIMCA에 적용할 수 있는 형태로 Peak intensities를 form을 만듦. 아래에 제시된 그림과 같이 data 형태를 조절하여 각각의 대사체의 정규분포 곡선의 형태로 분포하게끔 하여 물질과 군에 따라 편중되지 않은 분석을 시행함. Scaling 방법은 Pareto를 사용하였으며 가장 기본적인 Log 형태의 ransform을 진행함. peak intensities가 0인 경우에는 data missing이 일어나기 때문에, auto transform을 적용하여 최종적으로 “=Log(X+55625.3)”의 수식을 적용하여 data transforming을 수행 함. 이는 후에 사용되는 MetaboAnalyst 3.0에서도 동일하게 적용됨

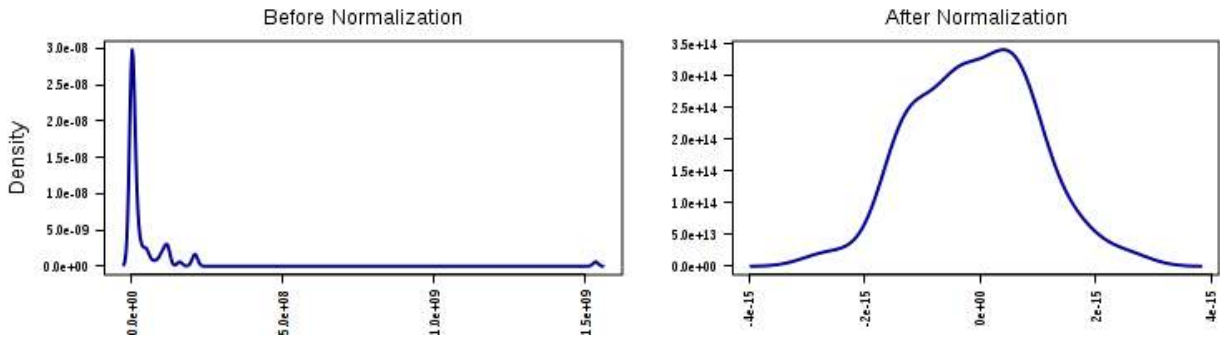


그림 2-4-7. scaling and transformation of peak intensities in MetaboAnalyst 3.0

㉞ SIMCA 14.1 software (Umetrics)를 이용한 대사체 분석

○ 본 연구에 참여한 암환자들은 일반 항암식을 섭취한 GD군 (n=9)와 AK1 군 (n=8)과 AK2 섭취한 군 (n=3)로 나눌 수 있음. 케톤식을 섭취한 AK2 군의 샘플 수가 적어서 AK1 군과의 차이를 비교함. PCA와 OPLS-DA 분석을 통하여 두 군의 차이가 보이지 않음을 확인함. 그림을 통해 보는 OPLS-DA는 항상 구획이 나뉘어져 보이지만, 통계적으로 분석하였을 때에는 그렇지 않은 경우가 있음. R2Y와 Q2은 각각 0.5 이상일 때 좋은 분석 모델로, 0.8 이상일 때 매우 좋은 분석 모델로 고려됨. 다음 그림의 PCA 분석에 의하면 두 군은 전혀 차이가 나지 않음을 알 수 있음 (p=1). 또한 OPLS-DA 분석의 R2Y값이 0.966으로 각 군의 대사체의 분포는 매우 잘 분포되어 있음을 알 수 있지만, Q2값이 -0.0189로 군의 샘플 수가 매우 부족하여 군 간 대사체의 예측을 하는 것이 의미가 없음을 보여줌. 따라서 본 연구에서는 AK1 섭취군과 AK2 섭취군을 하나의 케톤식이 섭취군(KD)라고 정의하여 분석 연구를 진행하였음 (그림 2-4-8)

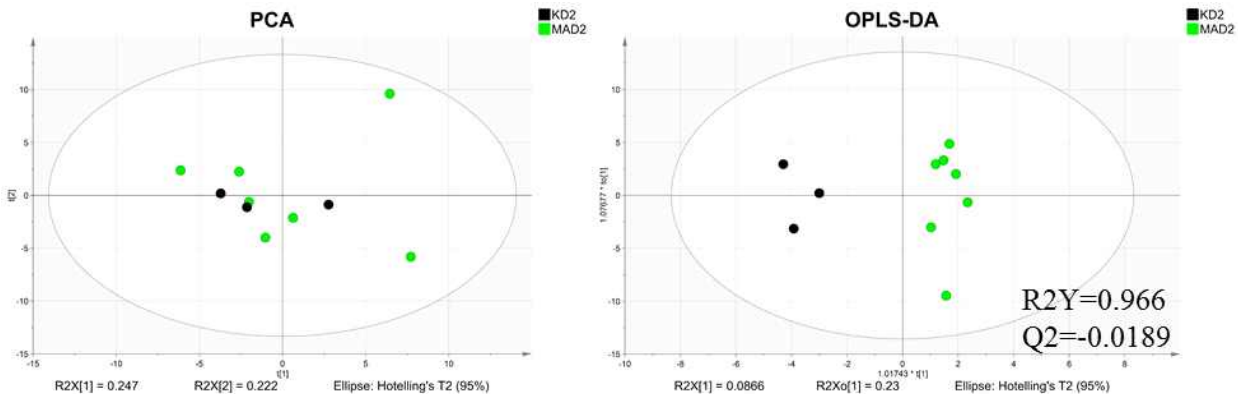


그림 2-4-8. PCA and OPLS-DA of 2 week sample of MAD and KD

○ 본 연구에 참여한 암환자들의 characteristic 통계 분석 중 군간 연령의 차이가 있었음 (p=0.030). 따라서 각 군의 baseline의 대사체 차이가 없음을 PCA와 OPLS-DA를 이용하여 확인함. 일반 항암식과 케톤식을 섭취한 군에서의 0주차 (Baseline) 대사체의 차이

가 유의적이지 않음을 확인함. 다음 그림에서 알 수 있듯이 PCA 분석은 GD군과 KD군의 baseline이 구분되어있지 않음을 확인할 수 있음. 또한 OPLS-DA는 군간 분리가 되어 보이지만 전체 대사체를 ANOVA 분석하였을 때 p-value는 0.317으로 유의적인 차이가 없다고 보임. 즉, 각 군의 baseline 비교에서 R2Y는 0.892로 0.8보다 높다 매우 잘 분포된 모델로 보이지만, Q2이 0.269로 0.5에 현저히 미치지 못하므로 분석모델로 사용하기에 적합하지 않고 두 군이 유사함을 보여주고 있음 (그림 2-4-9)

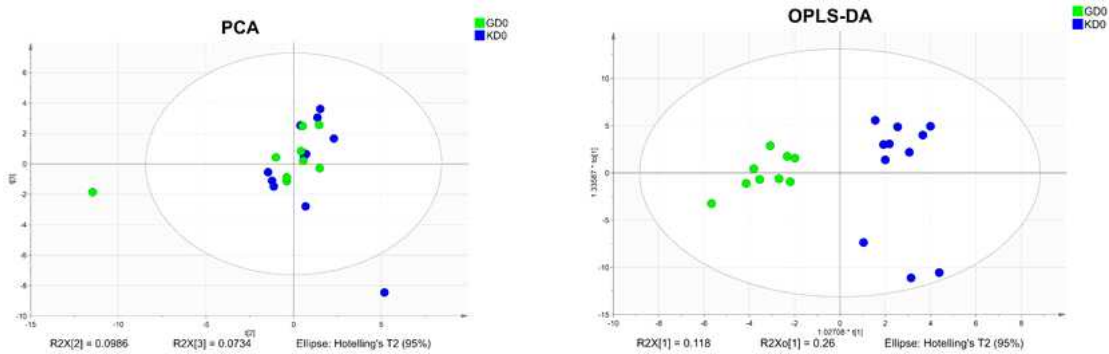


그림2-4-9. PCA and OPLS-DA between baseline of GD and KD

㉔ Metabolomics 분석에 가장 적합한 분석 모델 선정 및 잠정적 바이오마커 후보 선출

○ SIMCA 14.1 소프트웨어를 이용하여 분석하기에 가장 적합한 분석 모델을 선정하기 위하여 기준을 OPLS-DA의 R2Y값과 Q2값이 높고, R2Y/Q2 비율이 1에 가까운 모델을 우선순위에 두고, ROC curve에서 중앙의 y=x 와 만나지 않고, Area under curve (AUC)가 높은 순으로 고려함

○ 가능한 분석 모델의 OPLS-DA 분석 결과 baseline vs. GD2 (R2Y=0.836, Q2=0.594), baseline vs. GD4 (R2Y=0.746, Q2=0.44), GD2 vs. GD4 (R2Y=0.932, Q2=0.548), baseline vs. KD2 (R2Y=0.91, Q2=0.753), baseline vs. KD4 (R2Y=0.963, Q2=0.368), KD2 vs. KD4 (R2Y=0.693, Q2=0.41), GD0 vs. KD0 (R2Y=0.154, Q2=0.0938), GD2 vs. KD2 (R2Y=0.999, Q2=0.516), GD4 vs. KD4 (R2Y=0.991, Q2=0.423)이었음. 이 중 R2Y와 Q2가 모두 0.5 이상인 모델의 ROC curve 분석 결과는 baseline vs. GD2 (AUC=0.736, 중앙선에 걸침), GD2 vs. GD4 (AUC=0.810), baseline vs. KD2 (AUC=0.863), GD2 vs. KD2 (AUC=0.913)임. 결과적으로 baseline과 KD2 그리고 GD2와 KD2 비교 분석 모델이 적합하다고 판단. baseline vs. GD2 vs. K2의 분석 결과는 OPLS-DA (R2Y=0.974, Q2=0.513), ROC curve (AUC (baseline)=0.958, AUC (GD2)=0.889, AUC (KD2)=0.959) 로 최종 분석 모델로 선정 (그림 2-4-10)

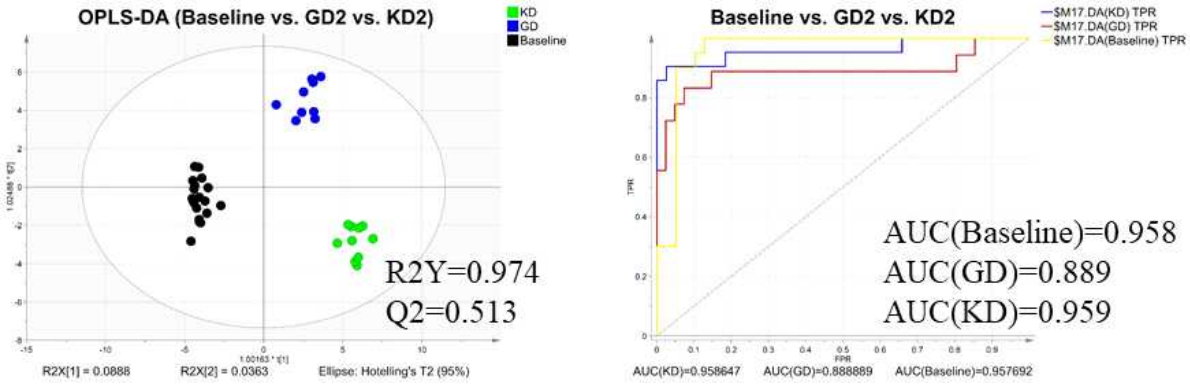


그림 2-4-10. OPLS-DA and ROC curve of analysis model baseline vs. GD2 vs. KD2

○ 분석 모델에서 그룹 간 유의적인 차이가 나는 대사체를 선정하여 잠재적인 바이오마커 후보로 선정. 총 543개 대사체 중 VIP value가 1.0보다 큰 물질은 96종이 분석되었고, acetoacetate와 β -hydroxybutyrate를 포함하고 있음. 췌장암 특이적 바이오마커 5개를 포함하고 있음 (그림 2-4-11)

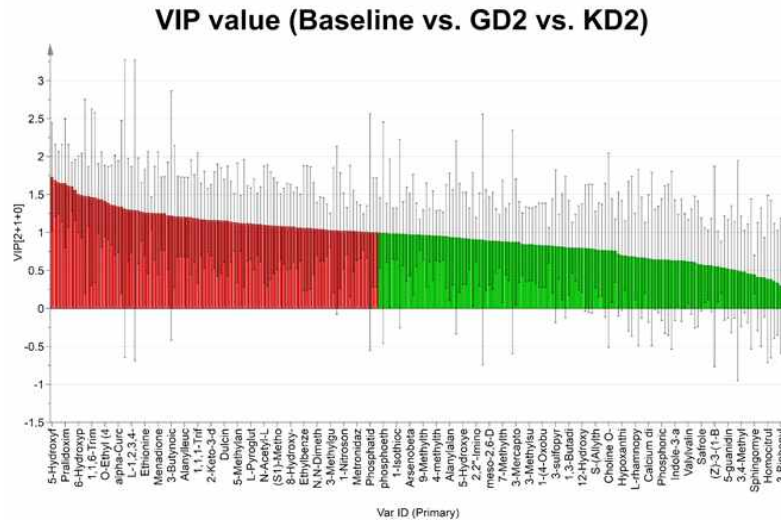


그림 2-4-11. VIP value of baseline vs. GD2 vs. KD2

○ 췌장암 특이적 바이오마커 연구 중 혈청/혈장과 타액으로 실험한 결과를 다음 표에 정리함 (표 2-4-4)

표 2-4-4. pancreatic cancer specific biomarker

샘플 종류 /분석 방법	바이오마커	저자
Saliva /Capillary electrophoresis MS	<p>Cadaverine, A-aminobutyric acid, Alanine, Putrescine, Methylimidazoleacetic acid, Trimethylamine, Leucine+Isoleucine, Phenylalanine, Tyrosine, Histidine, Proline, Lysine, Glycine, Ornithine, C17H26N4O5, Pro-Gly-Pro or Pro-Pro-Gly, Burinamide, Ethanolanine, G-aminobutyric acid, Aspartic acid, Valine, Trpophan, B-Alanine, Citrulline, Glutamic acid, Threonine, Serine, Glutamine, Hypoxanthine, Choline, Carnitine, C5H11NO2</p> <p>Taurine, Glycerophosphocholine</p>	masahiro sugimoto, 등, 2009
Serum	Vinylalkyl glycerol(16:1/20:4), diethylbutenyl malonate, glyceryl caprylate, hydroxymethyldecaadienoyl glucopyranose, ceramide(18:1/24:6)(OH),	Shawn A

/FI-FTICR-MS	채장암에서 감소	TG(Ac/18:0/18:1)(OH), oleic acid, 9-deoxy-9-methylene-PGE2 LysoPC(20:5), Phosphatidalethanolamine, carboxymethylpropyl furanpropanoic acid, phenyl-b-D-glucopyranoside, TG(18:1/22:0/22:0)(OH), TG(20:4/22:0/22:0)(OH)	Ritchie, 등, 2013
	채장암에서 증가	CA19-9(ELISA), isoleucine	
Review	채장암에서 감소	1,5-andyde-ro-d-glucitol, 3-hydroxybutyrate, alanine, glutamine, histidine, methionine, palmitic acid, PC-594(tendem MS), threonine, tyrosine, valine	Khyati Y. Mehta, 등, 2017
	변화가 확실하지 않음	asparagine, choline, glutamate, lactate, leucine, lysine, LysoPC(18:2), phenylalanine	
Serum /GC-MS	채장암에서 증가	arabinose, ribulose	Shiro
	채장암에서 감소	valine, 2-aminoethanol, n-caprylic acid, threonine, nonanoic acid, methionine, creatinine, asparagine, glutamine, PE, glycyL-glycine, 1,5-anhydro-D-glucitol, lysine, histidine, tyrosine, uric acid	Urayama, 2015
Plasma /LC-MS, GC-MS	악성 채장암에서 증가	LysoPC(16:0), 2-hydroxybutyric acid, Docosa-hexanoic acid, Arachidonic acid, 4-hydroxybutyric acid, Elaïdic acid, 2,3-propanoic acid	S.Battini, 등, 2017
	악성 채장암에서 감소	pentadecanoic acid, parmitic acid, myristic acid, lauric acid, stearic acid, Glutamine, Arginine, Serine, Threonine, Isoleucine, Tyrosine, Uric acid, Tryptophan, Phenylalanine, Methionine, Lysine, oleic acid,	

○ 대사체 543종 중 채장암 특이적 바이오마커에 해당하는 물질은 12종이 있고, VIP value >1.0인 대사체 중에는 5개가 해당하였음. 12종의 일반항암식과 케톤식이 섭취군에서의 peak intensities를 비교한 결과는 다음과 같음. VIP value >1.0인 대사체는 진한 글씨로 표기하였음 (표2-4-5)

표 2-4-5. Metabolites level of pancreatic cancer specific biomarker

Pancreatic cancer biomarker	Difference peak intensities compared to baseline		p- value
	GD group	KD group	
Beta-hydroxybutyric acid	23133800±9864266	103244000±13902985	0.0133*
L-Arginine	-3569900±-5698933	2246700±-4465136	0.3997
L-Citrulline	-37672800±-1898466	-25262600±5050916	0.5702
L-Glutamic acid	13717000±3049620	9209000±426294	0.4800
Hypoxanthine	-263410±-202679	1888920±493457	0.0583
L-Methionine	255170000±66790000	130250000±-61624253	0.8174
phosphoethanolamine (16:1/22:6)	376800000±64977000	745110000±22542296	0.2126
L-Phenylalanine	6060000±4016700	6249000±-6120050	0.9919
Phosphatidylcholine (18:1/18:2)	-351740000±-47779333	-392520000±-93640733	0.8934
Sphingomyelin (18:1/24:1)	7847200000±1636786666	4914900000±204520307	0.6108
L-Tryptophan	-52358100±-3725466	-65481900±-9383805	0.5241
Uric acid	-1416580000±221483333	869050000±218797991	0.0644

③ MetaboAnalyst 3.0을 이용한 대사체학 분석

㉔ 식이 섭취 종류에 따른 채장암 환자 특이적 대사체 분석

○ 식이 섭취 종류에 따른 대사체 변화를 살펴보기 위하여 VIP value가 1.0이상인 대사체 96종을 이용하여 MetaboAnalyst 3.0의 통계 분석을 진행함. baseline 대비 GD2, KD2의 fold change를 비교하였음. 이 중 OPLS-DA 분석을 통해 GD2와 KD2에서 Correlation 값이 0.5이상 -0.5이하인 물질 14종의 fold change를 비교 분석하였음. 다음 그림에 제시된 것과 같이 일반 항암식보다 케톤식에서 많은 양이 존재하는 대사체는 L-Hexahydro-3-imino-1,2,4-oxadiazepine-3-carboxylic acid, 3,4-dihydroxymandelic

acid, vanilpyruvic acid, acetoacetate, capryloylglycine, b-hydroxybutyrate, xi-p-Menth-3-ene, D-alanyl-D-serine가 있고, 케톤식이 섭취군보다 일반 항암식 섭취군에서 많이 발견된 대사체로 S-methyl-1-thio-D-glycerate, 2-acetyl-3-methylpyrazine, aspartyl-alanine, a-ketoglutaramate, sulfurol, cacodylic acid 가 있었음.

- 아래의 표는 잠정적 췌장암 특이적 바이오마커 후보들의 baseline과의 변화와 표준편차를 나타내며, Fold change ratio는 각 군의 baseline과의 fold change를 이용하여 ratio를 계산하였으며, KD/GD 값을 의미함 (표2-4-6)

표 2-4-6. Putative pancreatic cancer specific biomarker

	GD change compare to baseline		KD change compare to baseline		Fold change ratio*
	Mean	SE	MEAN	SE	
1 L-Hexahydro-3-imino-1,2,4-oxadiazepine-3-carboxylic acid	-45268	16176	2478559	2582200	152.6065
2 3,4-Dihydroxymandelic acid	684070	3440480	43612290	.30452100	27.2231
3 Vanilpyruvic acid	2500	2424540	-8338900	16283500	4.6356
4 acetoacetic acid	96281200	245047000	397119200	398597000	4.2639
5 Capryloylglycine	220995	914919	1674260	1701560	2.9618
6 b-Hydroxybutyric acid	23133800	55800400	103244000	70172700	2.5278
7 xi-p-Menth-3-ene	1180475	3089494	7168905	2680312	1.7885
8 D-Alanyl-D-serine	3423400	18453900	43340700	36680300	1.6543
9 S-Methyl-1-thio-D-glycerate	-2005703	1977078	-2155696	-364021	0.8171
10 2-Acetyl-3-methylpyrazine	1919826	320584	-1661990	-1500336	0.6850
11 Aspartyl-Alanine	-28251325	49434492.67	-61357776	16878270.8	0.6598
12 alpha-Ketoglutaramate	-5790	1334220	-934270	824667	0.6174
13 Sulfurol	-2604200	61971	-5758354	63737	0.2031
14 Cacodylic acid	-136473	341743	-300499	0	0.0560

㉞ 대사 경로 (Metabolic pathway) 분석

○ MetaboAnalyst 3.0의 pathway analysis를 이용하여 대사 경로 분석을 진행함. KEGG ID, HMDB ID, compound name 중 가장 많은 물질을 인식할 수 있었던 물질명을 이용하여 분석 진행. 대사 경로 분석 알고리즘으로 Fisher's exact test를 사용함. 아래 그림은 96개 VIP list 대사체와 관련된 대사 경로를 간략하게 표현한 그래프임. Pathway Impact는 topology analysis에서의 영향력을 의미하고, 이는 대사체 혹은 화합물의 상대적인 중요성을 평가하기 위해 사용됨. 특히 pathway impact값이 0.5 이상인 경우엔 영향력이 매우 강력하다고 말하고 있음. 본 연구에서는 케톤체 신생 및 분해 과정 (synthesis and degradation of ketone bodies)이 유일하게 pathway impact값이 0.5를 넘은 대사 경로였음. 또한, p value는 enrichment analysis에 의해 생성된 raw p value를 의미함. p value가 0.05 이하는 -log(p)값이 1.3 이상인 경우임. p value가 0.05보다 작아 유의적인 대사 과정은 아래 그림에서 주황색~빨간색으로 표시되어 있음(그림2-4-12)

○ 관련 있는 대사경로로는 synthesis and degradation of ketone bodies, butanoate metabolism, phenylalanine tyrosine and tryptophan biosynthesis, nitrogen metabolism, tryptophan metabolism, alanine aspartate and glutamate metabolism, lysine biosynthesis, aminoacyl-tRNA biosynthesis, glutathione metabolism, arginine and proline metabolism, nicotinate and nicotinamide metabolism, D-glutamine and D-glutamate metabolism, lysine degradation, linoleic acid metabolism로 14개의 대사 경로가 관련되어 있었음. FDR은 False discovery rate의 줄임말로, 대사체와 hit된 대사 경로가 관련 없을 확률을 뜻하며, 0.05보다 작은 대사 경로는 무의미함. 본 연구에서는 FDR이 0.05보다 작은 대사 경로가 없었음. 각각의 대사 경로와 Hit metabolites에 대한 정보는 아래 제시된 표에서 확인할 수 있음 (표2-4-7)

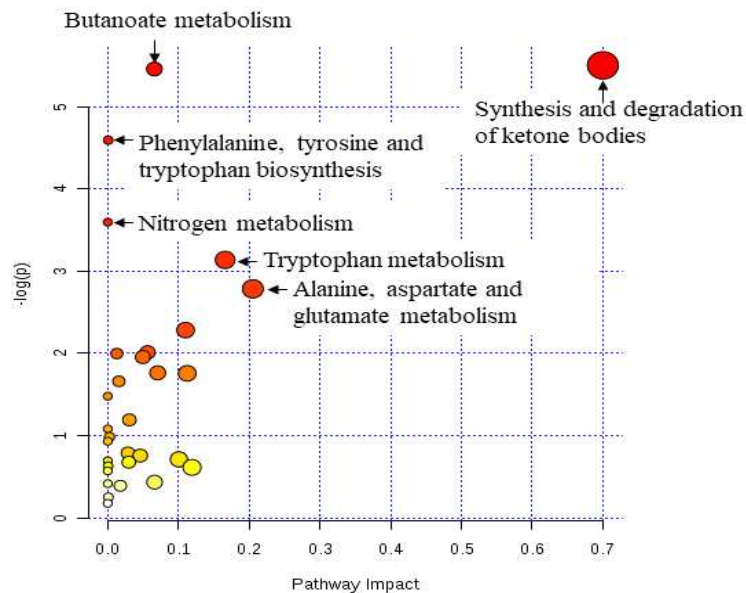


그림 2-4-12. Metabolic pathway overview of VIP list

표 2-4-7. Metabolic pathway analysis

Metabolic pathway	Hit metabolites (Matchstatus)	-logP	FDR	Impact
Synthesis and degradation of ketone bodies	Acetoacetate Beta-hydroxybutyrate (2/6)	5.5048	0.17011	0.7
Butanoate metabolism	3-Butyrate beta-hydroxybutyrate Acetoacetate L-glutamic acid (4/40)	5.4602	0.17011	0.06587
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	Indole L-Phenylalanine L-Tryptophan (3/27)	4.5947	0.26947	0.00062
Nitrogen metabolism	L-Phenylalanine L-Tryptophan L-Glutamic acid	3.5964	0.54847	0

	(3/39)			
Tryptophan metabolism	L-Tryptophan Indole L-Kynurenine 3-Methylindolepyruvate (4/79)	3.1375	0.69425	0.16587
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	L-Glutamic acid 2-Ketoglutaramic acid (2/24)	2.7854	0.82273	0.20513
Lysine biosynthesis	Aminoadipic acid L-2,3-Dihydrodipicolinate (2/32)	2.2837	1	0.10999
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	L-Phenylalanine L-Tryptophan L-Glutamic acid (3/75)	2.0128	1	0.05634
Glutathione metabolism	L-Glutamic acid Pyroglutamic acid (2/38)	1.9977	1	0.01285
Arginine and proline metabolism	L-Glutamic acid N-Acetyl-L-alanine N-Acetylmethionine (3/77)	1.9556	1	0.04952
Nicotinate and nicotinamide metabolism	2,6-Dihydroxypseudooxynicotine 6-hydroxypseudooxynicotine (2/44)	1.7632	1	0.07053
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	L-Glutamic acid (1/11)	1.7572	1	0.1123
Lysine degradation	N6-Acetyl-L-Lysine Aminoadipic acid (2/47)	1.6607	1	0.01563
Linoleic acid metabolism	Phosphatidylcholine (1/15)	1.4794	1	0
Caffeine metabolism	Xanthine (1/21)	1.1909	1	0.0305
Thiamine metabolism	6-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazole (1/24)	1.0811	1	0
Tyrosine metabolism	3,4-Dihydroxymandelate Acetoacetate (2/76)	0.98424	1	0.00242
Alpha-Linolenic acid metabolism	Phosphatidylcholine (1/29)	0.93094	1	0
Propanoate metabolism	Acetoacetate (1/35)	0.78905	1	0.02848
Purine metabolism	Xanthine Uric acid (2/92)	0.75608	1	0.04586
Glycerophospholipid metabolism	Phosphatidylcholine (1/39)	0.71119	1	0.10053
Valine, leucine and isoleucine degradation	Acetoacetate (1/40)	0.6934	1	0
Galactose metabolism	2-Dehydro-3-deoxy-D-galactonate (1/41)	0.67622	1	0.02962
Histidine metabolism	L-Glutamic acid (1/44)	0.628	1	0.00051
Phenylalanine metabolism	L-Phenylalanine (1/45)	0.61296	1	0.11906
Glycine, serine and threonine metabolism	L-Tryptophan (1/48)	0.57056	1	0
Pyrimidine metabolism	dUMP (1/60)	0.43405	1	0.06616
Arachidonic acid metabolism	Phosphatidylcholine (1/62)	0.4154	1	0
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1-Nitronaphthalene (1/65)	0.38919	1	0.0177
Drug metabolism-cytochrome P450	5-Phenyl-1,3-oxazinane-2,4-dione (1/86)	0.2512	1	0.00073
Porphyrim and chlorophyll metabolism	L-Glutamic acid (1/104)	0.17552	1	0

㉔ 암환자 케톤식이 섭취 전/후 환자의 혈청 케톤체 분석

○ LC-MS를 이용한 케톤체 정량 분석을 위한 실험 조건 수립 위한 연구 문헌 조사

및 protocol 확립

- 기존에 제시한 혈액 내 케톤체 분석 방법인 GC-MS에서는 스탠다드 물질의 정량분석이 용이하지만, 혈액 내 케톤체 3종을 함께 안정적으로 분석하기에 적합하지 않음
- 기존 대사체 분석에 사용된 protocol을 케톤체 분석에 용이하게 수정된 형태로 분석 가능

○ 케톤체 분석으로는 GC/TOF-MS, LC-MS/MS-ESI-, LC-MS/MS-ESI+, FIA-MS 등 기기를 사용하여 분석

○ FIA-MS, GC/TOF-MS에 비하여 UPLC/MS-EST가 혈청 및 혈장 기반으로한 대사 프로파일에 대한 대사산물 분석이 수백 수천가지 대사산물에서 민감하고 재현 가능한 검출을 제공하기에 적합함

○ 따라서 우리의 대사체 연구 결과와 함께 분석하기에 용이하고 대사체 및 케톤체 연구 모델에 적합한 UPLC-MS(LTQ-Orbitrap)을 이용하여 정량 분석을 진행

○ 1차년도 암환자에게서 수집된 혈액 샘플에서 혈청케톤체 정량 분석 (acetoacetate, β -hydroxybutyrate)

- 1차년도 혈액 샘플을 이용한 LC-MS/MS 정량분석 (Quantative Analysis)
- 70% 메탄올과 30% 아세톤으로 구성된 용매를 이용하여 혈청 케톤체를 추출함
- 대표적인 체내 생성 케톤체 3종 중 standard 물질로 유일하게 사용할 수 있는 β -hydroxybutyrate를 이용한 standard curve 측정, 혈청 전처리와 동일한 내부표준물질 및 외부표준물질 사용
- 혈청 샘플을 이용하여 LC-MS/MS 분석을 진행하고 내부표준물질과 외부표준물질을 이용하여 calibration

: 분석 시료의 증가로 인한 Peak의 delay가 일어나게 되고, 이를 보정하기 위하여 Alignment을 수행하는데 이때 내부표준물질 및 외부표준물질 이용

: 대사체 분석과 동일하게 내부표준물질인 Acetaminophen, Sulfamethoxine, Terfenadine, Reserpine을 사용함

: MS 측정 모드는 Negative(ES-)에서 분석

: 액체 크로마토그래피를 이용한 대사체 분석의 신뢰성 증가를 위해 내부표준물질과 Quality Control (QC)인 외부 표준 물질 사용하여 10번째 샘플마다 Blank (마지막 희석 용액)와 QC sample을 이용하여 LC-MS/MS 분석의 신뢰도와 분석의 질을 높임

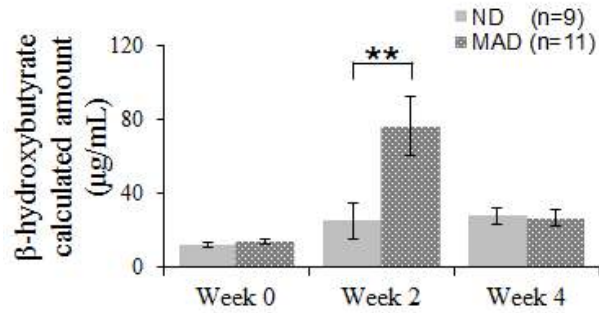


그림 2-4-13. Difference in β -hydroxybutyrate in serum between time periods

- 수술 후 혈액 내 케톤체(β -hydroxy butyrate)가 Normal diet보다 Modified atkins diet에서 유의한 차이를 보여 케톤식을 한 환자군은 일반 항암식군보다 케톤체 형성이 잘 되었다는 것을 확인 (그림2-4-13)

6. 별첨

가. 특허 2건 등록

- 1차년도 임상연구 시 개발하여 연구에 활용한 성인용 케톤식 레시피 중 2개에 대하여 연구자인 이송미, 강창무를 발명자로 다음과 같이 특허 출원 및 등록을 함.

(1) 일정 : 특허 출원(2017.01.30.) 및 등록(2017.08.31.)

(2) 특허명칭

(가) ‘케토볼 너트 및 이의 제조 방법’

(출원번호 : 10-2017-0014013, 등록번호 : 10-1775699-0000)

(나) ‘케토젤 에그 및 이의 제조 방법’

(출원번호 : 10-2017-0014014, 등록번호 : 10-1775700-0000)

특허증
CERTIFICATE OF PATENT



특허 Patent Number	제 10-1775700 호
출원번호 Application Number	제 10-2017-0014014 호
출원일 Filing Date	2017년 01월 31일
등록일 Registration Date	2017년 08월 31일

발명의 명칭 Title of the Invention
케토겔에그 및 이의 제조방법

특허권자 Patentee
연세대학교 산학협력단(274171-*****)
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

 특허청
Korean Intellectual Property Office

2017년 08월 31일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

성 운 보

특허증
CERTIFICATE OF PATENT



특허 Patent Number	제 10-1775699 호
출원번호 Application Number	제 10-2017-0014013 호
출원일 Filing Date	2017년 01월 31일
등록일 Registration Date	2017년 08월 31일

발명의 명칭 Title of the Invention
케토플루르 및 이의 제조방법

특허권자 Patentee
연세대학교 산학협력단(274171-*****)
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

 특허청
Korean Intellectual Property Office

2017년 08월 31일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

성 운 보

나. IRB 자료



연세의료원 세브란스병원 연구심의위원회
Yonsei University Health System, Severance Hospital, Institutional Review Board
 서울특별시 서대문구 연세로 50-1 (우) 03722
 Tel.02 2228 0430-4, 0450-4 Fax.02 2227 7888-9 Email. irb@yuhs.ac

심 의 일 자 2017년 8 월 28 일
 과 제 승 인 번 호 4-2017-0625

세브란스병원 연구심의위원회의 심의 결과를 다음과 같이 알려 드립니다.

Protocol No.

연구 제 목 해당도안 수술 환자를 위해 개발된 영양 보조 식품의 임상적 유효성 검증

연구 책임 자 김창무 / 세브란스병원 간담체외과

의 외 자 세브란스병원

연구예정기간 2017.08.28 ~ 2018.08.27

지속심의 빈도 12개월마다

과 제 승 인 일 2017.08.28

위험 수 준 Level 1 최소위험

심 의 유 질의담변

- 심 의 내 용
- 계획서 및 설명문에 폐기 방안 추가하였습니다.
 - 동의서 5.에 잠재적 위험 기재하였고, 오기 수정하였습니다.
 - 동의서 7.에 사례비 구체적 기술하였습니다.(120정 1통)
 - [변경후] 임상 연구계획서(국문) 삭제
 - [변경후] 대상자 설명문 및 동의서(국문) 삭제
 - [변경후] 임상 연구계획서(국문) 추가
 - [변경후] 대상자 설명문 및 동의서(국문) 추가

IRB 회 의 재5위원회

참 석 위 원 재5위원회 신속심의자

심 의 결 과 승인

심 의 의 견 -

Ver 4.1 / 누적 출력 횟수 1

Severance Hospital [2010.11.01] 1/2



※ 세브란스병원 연구심의위원회는 국제 임상시험 통일안(CH-GCP) 및 임상시험 관리기준(KGCP), 생명윤리 및 안전에 관한 법률을 준수합니다.
연구책임자 및 연구담당자가 IRB 위원인 경우, 해당 위원은 위 연구의 심의과정에 참여하지 않습니다.

연세의료원 세브란스병원
연구심의위원회 위원장



* 유의사항 *

1. 세브란스병원 임상연구보호프로그램 규정을 준수하여 주십시오.

세브란스병원에서 수행되는 모든 임상 연구는 임상연구보호프로그램 규정을 준수하여야 합니다. 연구책임자께서는 모든 연구 관련자들이 규정을 이행할 수 있도록 협조하여 주시기 바랍니다.

2. 질의답변

승인 통보 받지 않은 과제는 연구 진행할 수 없으며, 관련 질의에 대한 답변서와 질의 사항에 따른 변경 및 수정된 자료가 있다면 첨부하여 심의일로부터 6개월 이내 제출하여야 합니다.

3. 연구의 승인 유효기간

관련법령에 따라 승인의 연구의 유효기간은 최대 1년을 넘을 수 없습니다. 연구자께서는 승인 인로일 최소 한 달전에 중간보고를 제출하여 승인 유효기간을 갱신하셔야 합니다. 유효기간이 만료된 연구는 새로운 대상자를 등록하실 수 없습니다.

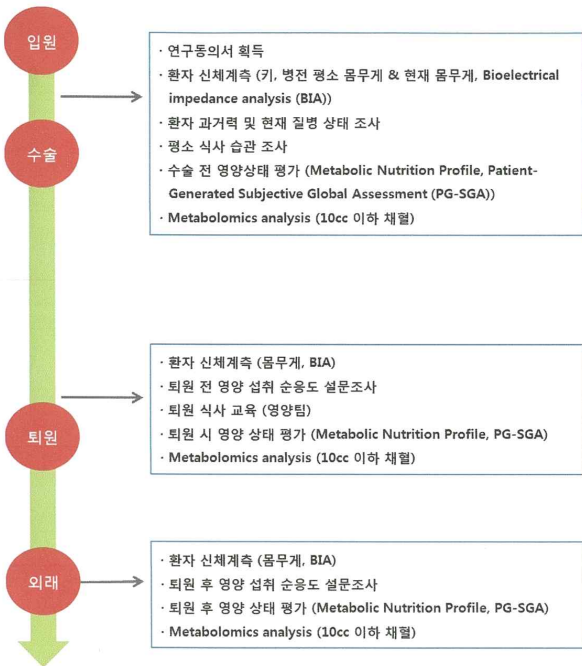
4. 계획 변경

연구 절차, 대상자 수 IRB로부터 승인 받은 내용에 변경 또는 추가 사항이 있을 경우에는 반드시 IRB의 승인을 득한 후에 적용하실 수 있습니다.

5. 연구자는 심의결과에 이의가 있을 경우 이의신청을 통해 심의관련 의견제시가 가능합니다. 관련 질의에 대한 의견제시와 충분한 근거를 첨부자료로 제출하여야 합니다. 자료 미흡 또는 근거가 불충분할 경우 연구자에게 추가자료를 요청할 수 있습니다.



<<임상연구 절차 요약 및 일정표>>



5절. Base formula 제품 개발, 대량생산 기술 확보 및 임상연구

1. 연구개발 목표

- 1차년도 1협동의 케톤식 메뉴개발에 대한 비율을 대한 기술이전 받아 그 비율을 토대로 액상 타입의 상업용 특수의료용도식품을 개발 및 대량생산 시스템을 구축하고 임상연구를 통해 최종 환자에게 적용하여 효과를 측정하기 위함

2. 연구 개발 결과

가. Base formula 개발 및 임상연구용 대량 생산 시스템 확립

(1) 배합비율 확정

1차년도 1협동의 케톤식 메뉴 개발 및 임상연구 결과 (순응도 및 케톤체 분석 등)를 고려하여 케톤과 비케톤의 비율을 설정함, 또한 임상연구용 제품의 주 타겟인 암환자의 단백질 요구량 (ESPEN, 암환자의 단백질 섭취량 가이드라인, 1 g/kg/day) 등을 고려하였을 때 기존의 케톤식의 단백질 함량 (약 2g/100ml)이 암환자의 영양상태 개선 및 섭취 가이드 라인에 대비 부족한 부분임을 확인함

따라서, 본 base formula의 단백질 함량은 4.8g / 100ml로 최종 제품 내 케톤 : 비케톤의 비율을 1.7 : 1 로 설정 진행함

(2) 관능 보완

(가) 관능검사 방법

- ① 관능검사 패널 : 매일유업 연구소에서 관능평가 관련 교육을 이수한 소비자 패널 31명으로 구성
- ② 시료 : 20~25℃로 3가지 시료를 각 50 mL 이상 제공함.
- ③ 9점 척도법으로 전체적인 만족도, 향에 대한 만족도/강도, 이미/이취에 대한 강도, 목넘김 후의 뒷맛 깔끔한 정도의 기호도/강도를 측정함. 세 가지 시료의 종합적인 기호도를 고려한 순위 측정함. 추가적으로 장/단점에 대해 자유기술 하도록 함 (그림2-5-2)
- ④ 1차와 2차 스크리닝을 통해 base formula에 부향시켜 베이스와의 조화, 느끼함의 정도, 지속적인 섭취 가능여부를 판단하여 3가지 향으로 2차 screening 함(누룽지, 혼합곡물, 딸기)

(나) 관능검사 결과

- ① 종합기호도는 mean 기준으로 세 제품 간 유의차를 나타내지 않음
- ② 특유향미(누룽지, 혼합곡물, 딸기) 기호와 희망강도에서 유의차를 나타내며 누룽지향, 혼합곡물향이 딸기향 보다 높은 평가를 받음
- ③ 순위 측정 결과 1순위는 누룽지향(35%), 2순위는 혼합곡물향(29%), 3순위는 딸기향 (6%)

		문서번호 :			
관능조사 결과 보고서					
검사제목 : 농기평(IPET)과제 액상케톤식 개발관련 pilot제품 3종 관능평가 결과					
조사목적 : 기타	담당자 : 이유영				
조사방법 : 선호도, 특성 조사	검사시료 : 샘플1_누룽지향 외 2 품목				
패널유형 : MIC 소비자패널	검사일시 : 2016.11.09				
결과요약 : 종합기호 mean 기준으로 3 제품간 유의차를 나타내지 않음 (5% 유의수준)					
	샘플1_누룽지향	샘플2_혼합곡물향	샘플3_딸기향	P value	SIGNIFICANT
종합기호	4.9	4.7	3.9	0.052	No
종합기호 Top4%	35 %	29 %	6 %	-	-
시료명	샘플1_누룽지향	샘플2_혼합곡물향	샘플3_딸기향		
이미지					
유형	케톤식	케톤식	케톤식		
포장	200 ml CAN	200 ml CAN	200 ml CAN		
제조일자	2016.11.08	2016.11.08	2016.11.08		
유통기한	N/A	N/A	N/A		
보관조건	실온(1~35°C)	실온(1~35°C)	실온(1~35°C)		

그림 2-5-1. 관능조사 결과 보고서

(2.7점) 뒷맛이 가장 깔끔하지 않음. 향후 이에 대한 관능 품질 개선이 이루어 질 경우 기호도가 상승할 것으로 예상됨 (그림 2-5-3)

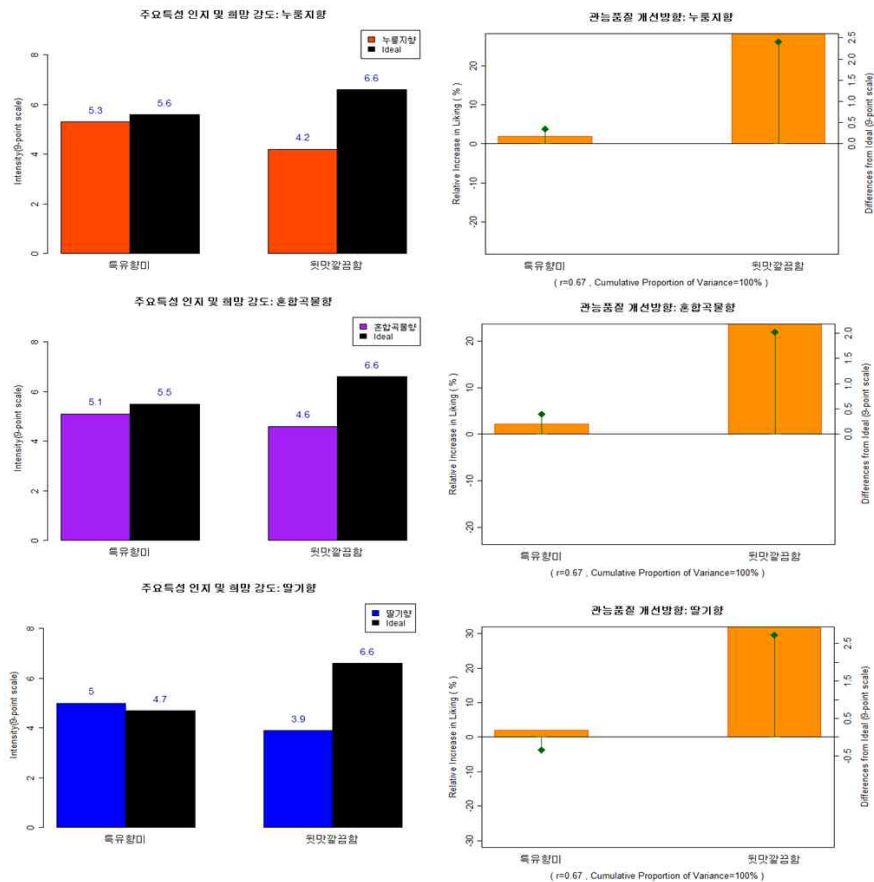


그림 2-5-3. 관능조사 결과

(다) 1차년도 관능 연구결과를 토대로 누룽지맛, 혼합곡물맛, 말기맛을 기준으로 1차 샘플을 설계하였으며, 연구진 토의를 거쳐 누룽지 맛이 가장 거부감이 없는 것으로 판단되어 설계하게 되었으며, 2차년도내 국내외 케톤식 제품과 비교 관능 검사를 통해 본 연구에서 개발된 base formula의 우수성 확인함

(라) 기 기획된 200ml(200kcal)의 경우, 암환자가 섭취하기에 많은 용량임을 확인됨 (1차년도 임상 식이시 문제 제기됨), 따라서, 암환자 및 노인환자의 특성상 섭취가능 볼륨이 적기 때문에 일반적인 열량 비율인 1kcal / ml 보다 농축을 고려함

(마) 일반적으로 농축된 제품은 일반 제품에 비해 환자의 순응도가 낮고 높은 삼투압으로 인한 side effect 문제가 야기될 가능성이 상대적으로 크기 때문에 적절한 농축도가 필요

하였으며, 암환자 및 노인 환자에게 가장 적합한 칼로리 밀도를 문헌 검색한 결과 1.2 kcal / ml 이라는 연구결과로 설정함⁶⁾ (표2-5-1)

표2-5-1. Base formula 배합비율

원부자재명	배합비율(%)
카제인나트륨	
분리대두단백	
L-아르기닌	
고올레익해바라기유	
카놀라유	
MCT유	
유화제	
말토덱스트린	
대두화이버	
정백당	
난소화성말토덱스트린	
구연산삼나트륨	
제2인산칼슘	
제3인산칼슘	
구연산칼륨	
염화마그네슘	
황산제1철	
염화칼륨	
제2인산칼륨	
수크랄로스	
혼합비타민	
타우린합성	
L-카르니틴	
염화콜린	
바닐라향	
로스트라이스향	
정제수	
합계	100

(2) 케톤식 제품의 제형 개발

(가) 임상적으로 사용되는 특수의료용도 식품은 제형화에 있어 섭취 형태를 개발부터 시장성을 고려하는 것까지 포함되는 중요한 사항임. 특수의료용도 식품의 가장 기본이 되는 제형은 경구 투여이며 액상, 분말 제품 등이 존재함

(나) 국내외 특수의료용도 식품을 살펴보았을 때 환자들의 편의를 고려한 액상의 제품 비율이 높은 것으로 나타남. 또한 특수의료용도식품의 영양 중재를 실시한 임상 연구의 순응도를 살펴보았을 시 분말 제품에 비해 액상 제품이 순응도가 높은 것을 알 수 있음

(다) 특히 암환자의 경우 암 세포 성장에 기인한 cachexia는 다양한 대사적 변화를 동반하게 되는데 이로 인해 식욕 감퇴가 일어나게 됨. 암 환자들은 치료 중 복부 팽만, 변비, 오심, 구토, 입안 마름 등의 증상을 호소하며 암 환자의 46%가 맛 변화를 경험하여 식품섭취량 저하가 초래되고 궁극적으로는 체중감소에 영향을 미치는 것으로 알려져 있음

(라) 케톤식은 암 환자의 순응도 및 영양섭취를 고려해 농축한 액상 제품으로 이는 케톤식 제품의 원부자재의 물리학적, 화학적 특성을 고려하였을 때 지방의 비율이 높으므로 유통 중 안정성, pH 안정화, 용해도, 용질의 분산에 있어 적합한 것으로 사료됨

(3) 포장용기 선정

(가) 케톤식 제품은 환자용 영양식 특성상 유통기한 6개월 이상 상온에서 보존이 가능해야 하며, 농축 제품 특성 상 100 ~ 200ml 내외의 볼륨을 담을 수 있는 용기가 필요하여 연구 초기 캔 제품으로 검토를 진행하였음

(나) Base formula를 캔 용기에 적용 검토 하던 중 아래와 같은 캔 제품에 대한 최신 연구 결과를 확인하고, 그로 인해 본 과제에서는 캔 대신 무균팩을 활용하여 임상연구용 제품을 생산하였음

① 마이알 반응에 의한 AGEs 생성

캔 제품의 경우 non aseptic filling 공법을 사용하기 때문에 후살균인 레토르트 공정을 반드시 진행해야 하나, 무균팩의 경우 aseptic filling 이 가능하여 내용물 멸균 후 별도의 후살균 공정 필요 없이 상대적으로 마일드한 열처리 공정을 거치게 됨. 따라서, 레토르트 캔 제품은 고온 열처리로 인한 마이알 반응 이 무균팩 제품보다 과도하게 발생 되며, 이로 인해 보다 많은 양의 최종당화생성물, AGEs (advanced glycation end products)가 발생하게 됨, 이는 다양한 노인성질환 (당뇨, 신장 질환, 혈관 질환 등)의 원인이 된다는 연구결과를 확인함, 이를 방지하기 위해 무균팩으로 선정하게 됨. 또한, 한국에이치학회 창립학술대회 (2017.08.26.)에 참석하여 최근 연구 동향 및 연구결과를 확인함 ⁷⁾

② 비스페놀 A

캔 제품은 캔의 부식을 막기 위해 다양한 코팅제를 사용하고 있으며, 그 코팅제로부터 소량의 비스페놀 A가 검출된다는 연구결과를 확인하여 캔에 비해 안전한 무균팩으로 변경하여 진행하기로함 ⁸⁾

(다) 대량생산 진행

○ 대량 생산 전 다양한 조건에서 lab 테스트를 진행하였으며, 고지방제품의 특성상 호모

믹서를 이용하여 회전 속도별 (rpm) 지방의 유화정도를 확인하여 표준 RPM을 3,000 ~ 4,000 rpm 으로 설정함

- 임상연구용 대량생산을 위해 사전 공장 관계자들과 정기적인 협의를 진행하였으며, 이 때 본 제품에 가장 적절한 용해 조건, 유화 조건 및 멸균 조건을 협의 완료하였음. 특히, 고농축, 고지방 제품의 특성상 일반적인 살균 방식으로는 영양소 파괴 및 유화 안정성 확보가 어려웠으며, Direct steam infusion type 의 UHT (Ultra high temperature) 멸균방식으로 제품의 영양소 파괴 및 성상 파괴를 최소화하였음
- 사전 협의된 조건을 중심으로 QC 공정도를 설정하고 이를 토대로 임상연구용 제품 생산을 진행하여 대량생산 시스템을 구축함 (표 2-5-2)

(라) 임상연구용 제품 검증

- 임상연구용으로 제작된 제품의 영양조성 및 지방산 조성을 분석하여 임상연구 전 검증을 진행함 (표 2-5-3, 표 2-5-4)

표 2-5-2. Base formula 제조 공정도

공정	설비	원료 및 조건	비고
1 원부자재 계량	전자저울		* 원부자재 계량기록 * 1회 10,000 kg 이하 조유
2 정제수 가온	스팀가온기	00~00°C (가온 후 교속 교반)	* 스팀 가온 후 온도유지
3 용해/혼합	용해 TK, 호모믹서	조유순서 1) 호모 TK(A) ① 유지류 투입 용해 : 고올레익해바라기유, 카놀라유, MCT유, 유화제 ② 라인믹서기 순환용해 00min 이상 ③ 카제인나트륨, 분리대두단백 투입 ④ 대두화이버, 난소화성말토덱스트린 투입 ⑤ 말토덱스트린, 정백당, 수크랄로스 투입 ⑥ 라인믹서기 순환용해 00min 이상 ⑦ 용해 확인 후 냉각 ⑧ 0,000TK로 이송 후 정제수 투입 표준화(00°C 이하) 2) 호모 TK(B) ① 카제인나트륨, 분리대두단백, 대두화이버, 난소화성말토덱스트린, 말토덱스트린, 정백당 잔량 투입 ② 라인믹서기 순환용해 00min 이상 ③ 용해 확인 후 냉각 ④ 0,000TK로 이송 후 정제수 투입 표준화(00°C 이하) ⑤ 용해 확인 후 냉각 ⑥ 미네랄 및 기타 자재 투입 (00~00°C) : 제2인산칼슘, 제3인산칼슘, 구연산칼륨, 황산화제, 염화칼륨, 제2인산칼륨, 구연산나트륨, 타우린, L-카르니틴, L-아르기닌, 염화콜린 투입 ⑦ 라인믹서기 순환용해 00min 이상 ⑧ 용해 확인 후 냉각 ⑨ 사제 TK : 정제수(00°C 이하)에 혼합비타민 용해 후 호모TK(B) 투입(00°C 이하) ⑩ 염화마그네슘 투입(00°C 이하) ⑪ 바닐라향, 로스트타이스향 투입 ⑫ 0,000TK로 이송 후 정제수 투입 표준화(00°C 이하)	* 라인믹서 및 Almix를 통해 원료투입 * 자재투입 후 자재 용해 확인 필수 * 조유일보 기록 및 용해/유화(교속교반)확인 : 00-00°C 온도유지, 유지 유화 00min 이상, 자재 용해 00 min 이상 * 대두화이버는 불용자재이므로 용해되지 않고 분산형으로 존재.
4 표준화(조함액 검사)	Blending TK	* 조유액 검사 규격 TS : 16.9 ± 0.5 Brik : 7.9 ± 1.0 pH : 7.0 ± 0.2 비중 : 1.015 ± 0.005 지방 : 10.83 ± 0.2	* 혼합비타민은 질 성분과 만나는 경우 조유액 색상이 검게 변하므로 혼입 금지 * 혼합비타민은 별도 용해 탱크에서 잔물 용해 후 투입 : 호모믹서에서 비타민 산화되어 영양성분 손실 커지므로 블렌딩TK로 신속히 이동 * 반드시 필터 확인 후 성상 이상 유무 확인할 것 * 염화마그네슘은 단백질 성상에 영향을 미치므로 별도 용해후 최종 첨가 * 조유일보 기록 및 용해확인-냉각수 밸브Open/00°C이하 냉각
5 여과	라인필터	04 스트레이너	
6 예열	VT-000	00±5°C, Tubular 방식	* 온도 확인
7 탈기	디에레이터	진공압 -0.0bar 이하	
8 균질	균질기	000bar(1st 000bar, 2nd 00bar)	* 압력계 확인
9 멸균	VT-000	000±5°C/00±1초	* 온도 확인
10 냉각	VT-000	00±5°C, Tubular Type	* 온도 확인
11 저장	Aseptic Tank	교반 ON	* Mushroom dolly 사용, Sealing 상태확인
12 충전/포장	Tetra Pak A3/CompactFlex iLine™	TPA 125ml 충전	* 제품용량 확인 * 유통기한 인쇄상태 확인 포장기 설정 시 : 분 년, 월, 일
13 중간제품 검사		* 완제품 검사 규격 성상 : 탁황색의 균일한 액체로 이미, 이취가 없어야 한다 TS : 16.6 ± 0.5 Brik : 15.9 ± 1.0 pH : 6.85 ± 0.2 비중 : 1.013 ± 0.005 지방 : 10.83 ± 0.2	* 검사결과 기록
14 저장 및 보관			* 유통기한 인쇄상태 확인
15 최종제품검사	외박스 포장기	항온실 전수검사	* 실온보관

표 2-5-3. Base formula 지방산 분석 결과

Fatty acid	Unit	Result
C4:0 Butyric acid	%of fatty acids	0.00
C6:0 Caproic acid	%of fatty acids	0.00
C23:0 Tricosanoic acid	%of fatty acids	0.00
C22:2 cis-Docosadienoic acid	%of fatty acids	0.00

C22:6n-3 cis-Docosahexaenoic acid	%of fatty acids	0.00
C14:1 Myristoleic acid	%of fatty acids	0.00
C16:1 Palmitoleic acid	%of fatty acids	0.12
C20:3n-3 cis-Eicosatrienoic acid	%of fatty acids	0.00
C24:1 Nervonic acid	%of fatty acids	0.07
C16:0 Palmitic acid	%of fatty acids	3.77
C15:0 Pentadecanoic acid	%of fatty acids	0.00
C15:1 cis-Pentadecanoic acid	%of fatty acids	0.00
C12:0 Lauric acid	%of fatty acids	0.04
C21:0 Heneicosanoic acid	%of fatty acids	0.00
C17:1 cis-Heptadecenoic acid	%of fatty acids	0.00
C18:3n-6 gamma Linoleic acid	%of fatty acids	0.00
C18:0 Stearic acid	%of fatty acids	1.85
C20:4n-6 Arachidonic acid	%of fatty acids	0.00
C18:2n-6 cis-Linoleic acid	%of fatty acids	13.07
C22:1n-9 Erucic acid	%of fatty acids	0.05
C20:3n-6 cis-Eicosatrienoic acid	%of fatty acids	0.00
C10:0 Caprylic acid	%of fatty acids	7.97
C20:0 Arachidic acid	%of fatty acids	0.30
C24:0 Lignoceric acid	%of fatty acids	0.14
C20:1 cis-Eicosenoic acid	%of fatty acids	0.76
C18:3n-3 alpha-Linolenic acid	%of fatty acids	3.51
C13:0 Tridecanoic acid	%of fatty acids	0.00
C14:0 Myristic acid	%of fatty acids	0.08
C8:0 Caprylic acid	%of fatty acids	19.99
C17:0 Heptadecanoric acid	%of fatty acids	0.06
C18:2n-6, trans Linolelaidic acid	%of fatty acids	0.24
C22:0 Behenic acid	%of fatty acids	0.36
C18:1n-9 trans Elaidic acid	%of fatty acids	0.12
C20:5n-3 cis-Eicosapentaenoic acid	%of fatty acids	0.00
C18:1n-9 cis-Oleic acid	%of fatty acids	47.44
C20:2 cis-Eicosadienoic acid	%of fatty acids	0.05

표 2-5-4. Base formula 영양성분표 (125ml/1pack)

Nutrient	Content	Nutrient	Content	Nutrient	Content
Energy(kcal)	150	I(μg)	25	Vit A(μgRE)	140
Protein(g)	6	Mg(mg)	45	Vit D(μg)	2
Fat(g)	13.3	Zn(mg)	2	Vit E(mg α-TE)	2
Carbohydrate(g)	1.7	Cu(mg)	0.13	Vit K1(μg)	14
Fiber(g)	0.5	Mn(mg)	0.6	Pantothenic acid(mg)	1
Ca(mg)	120	Vit B ₁ (mg)	0.3	Niacin(mgNE)	3
P(mg)	110	Vit B ₂ (mg)	0.3	Folic acid(μg)	80
Na(mg)	140	Vit B ₆ (mg)	0.3	Biotin(μg)	6.5
Fe(mg)	1.7	Vit B ₁₂ (μg)	0.5	β-carotene(μg)	100
K(mg)	260	Vit C(mg)	20	L-arginine(mg)	300

나. Base formula 임상연구를 통한 효과 검증

(1) 임상연구명

- 췌담도암 수술 환자를 위해 개발된 영양 보조 식품의 임상적 유효성 검증

(2) 연구의 목적

- 개발한 영양보충음료가 췌담도암 수술 환자들의 경구 섭취량을 증가시키는 지 분석한다.
- 개발한 영양보충음료가 췌담도암 수술 환자들의 영양상태, 체성분, 생화학적 검사 결과를 개선시키는 지 분석함
- 개발한 영양보충음료의 섭취 순응도 및 만족도를 분석함
- 대사체학 기법을 이용한 base formula 섭취군과 대조군의 혈청케토체 및 대사체 분석함

(3) 서론

췌장암은 2015년 기준 국내에서 암 발생률의 3.0%를 차지하고 있으며, 담도암은 2.9%를 차지한다. 또한 사망률은 전체 암 중에서 췌장암이 5번째(7.2%)로 높고 담도암이 그 뒤를 이어 6번째(5.6%)를 차지하고 있음⁹⁾

췌장은 영양소 소화와 흡수에 있어서 중요한 역할을 하며 췌십이지장 절제 시 여러 소화기관을 함께 절제하면서 소화기능 및 영양상태의 문제를 가져오며 영양흡수불량과 외분비 및 내분비 기능 손상을 초래한다.¹⁰⁻¹²⁾ 췌담도암의 수술 치료 중 근치적 절제술은 수술을 통해 종양을 완전히 제거하여 암 재발을 방지하고 생존율을 높이는데 기여할 수 있는 치료법이다. 하지만 수술 후에도 잔존하는 암세포에 의해 재발할 수 있고 수술 전후 환자의 영양 상태가 이러한 암세포에 영향을 미쳐 암환자의 예후를 결정하게 되어 장기적인 관찰이 필요함¹³⁻¹⁴⁾

Pancreatoduodenectomy (PD) 혹은 pylorus-preserving pancreatoduodenectomy (PPPD)의 경우 수술 후 외분비능 감소로 체중의 회복이 어렵다. 수술 직후 초기에 수술로 인한 위장관운동 장애, 흡수 및 분비이상으로 심한 설사가 나타나고 소화 흡수 장애로 인해 지방변과 변으로 과다한 수분 소실이 발생한다. 이러한 설사, 지방변, 대변으로의 수분 소실은 체중감소로 이어져 과거 보고에서는 30~40%의 체중감소가 있으며 체중유지가 매우 중요한 문제가 됨¹⁵⁾

암환자의 경우 식욕부진으로 영양 섭취량이 감소하고 출혈, 감염 등으로 인해 영양불량 위험이 높으며¹⁶⁾ 소화기계통 수술 환자들은 수술 후 소화불량, 조기포만감, 복부 팽만감 등의 문제가 발생하고 1회 섭취량이 감소하며 식사에 대한 두려움으로 인해 경구 섭취량이 줄어들어 영양불량에 빠질 위험이 크다.¹⁷⁾

Braga M 의 연구¹⁸⁾에서는 수술 후 대상자들의 53-55%만이 경구 섭취 요구량을 충족하였고 순응도가 낮을수록 합병증 발생과 연관된다고 보고하고 있다. 이로 인해 수술 후 환자의 조기 사회 복귀 및 보조항암요법과 같은 추가적인 치료의 주요한 지연 사유가 되고 있음

영양불량 상태의 암환자와 수술 환자, 염증성 장질환, 장절제, 췌장염 등의 환자들에게 영양지원이 유용하게 이용된다.¹⁹⁾ 특히 영양불량 환자들에게 영양 보충을 통해 영양상태를 개선시켜 합병증과 감염 발생 위험을 낮추며 영양보충음료를 섭취하였을 때 영양 상태가 개선되면서 여러 신체계측 및 생화학적 검사 결과들이 개선되었다고 보고되고 있음²⁰⁻²²⁾

ESPEN(The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism)에서도 암환자들이 영양불량 상태에 빠지지 않도록 필요시 경구영양보충음료를 제공할 것을 권고하고 있음²³⁾

한편 최근 암 치료의 보조요법으로 케톤생성식이요법을 사용하는 사례들이 제시되고 있다.²⁴⁻²⁵⁾ 케톤생성식이요법은 고지방, 저-중정도의 단백질, 저탄수화물로 구성된 식사로 케톤생성식이요법을 섭취하면 간에서 지방산 산화가 이루어지면서 acetoacetate, β -hydroxybutyrate(BHB), acetone과 같은 케톤체가 형성된다. 케톤체는 혈액으로 운반되어 조직에서 acetyl-CoA로 전환되게 되고 이것이 TCA 회로에 사용되어 에너지를 만들게 됨²⁶⁾

이러한 케톤생성식이요법이 종양의 성장을 억제하고 암환자의 생존율을 높인다는 보고들이 있다.²⁷⁻³⁰⁾ Warburge 에 의하면 암세포는 정상세포와 달리 포도당만을 의존적으로 대사에 이용하며 해당과정이 매우 높게 발생한다.³¹⁾ 암세포는 대사과정에 포도당만을 사용하기 때문에 탄수화물을 제한하고 고지방 식사요법을 시행할 경우 케톤체들이 암세포에서 산화스트레스를 유발하여 항암 효과를 나타낸다고 추정하고 있음³²⁾

해당과정에 집중된 암 세포의 특이적 대사 반응을 타겟으로 한 케톤생성식이요법이 항암 치료의 보조적인 방법으로 주목받고 있고 있으나 아직 국내외 연구현황은 증례보고 또는 소규모 연구에 그치고 있어 체계적인 대규모 연구 및 검증이 필요함

췌담도암 수술 환자를 대상으로 변형된 케톤생성식이요법의 영양구성을 기반으로 한 맞춤형

출형 식사를 제공한 선행연구³³⁾에서 식사로 인한 부작용 없이 안전하게 섭취가 가능하며 체지방 및 콜레스테롤 감소, 소변 내 케톤체 검출 증가 경향 등을 확인함으로써 변형된 케톤생성식사를 기반으로 한 영양소 조정 식사의 웨담도암 수술 후 치료식사로서 가능성을 확인하였다. Klement와 Sweeney의 연구³⁴⁾에서도 방사선치료를 받는 환자들을 대상으로 고전적 케톤생성식이요법 4:1이 아닌 케톤:비케톤의 비가 0.8~1.8:1 인 변형된 케톤생성 식사를 제공하였을 때 특별한 식사 부작용 없이 실험군의 체지방량이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었음

(4) 연구대상 및 방법

(가) 연구기간 및 대상자

2017년 9월부터 2018년 1월까지 세브란스 병원에 입원한 만 19세 이상의 성인 환자 중 웨담도 계통의 암(웨장암 / 십이지장암 / 원위부 담도암 / 바터씨팽대부암)으로 웨십이지장 절제술 혹은 원위부 웨장절제술 예정인 환자를 대상으로 하였다. 임상연구 참여를 거부한 환자, 취약한 피험자(의사결정 능력이 결여된 자, 임산부, 미성년자 등), 동의서를 읽을 수 없는 문맹 혹은 외국인, 당뇨 합병증을 동반한 중증 당뇨병환자, 심혈관계 합병증을 동반한 고지혈증 환자, 신장 기능 저하 환자 (정상 GFR 범위의 70% 이하), 수술 전 현격한 영양 불균형 상태로 평가된 환자 (PG-SGA grade C)는 대상자에서 제외하였다. 본 연구의 목적과 방법을 설명한 후 자발적으로 동의한 환자를 등록하였고 연구 참여에 동의한 대상자들은 등록 순서에 따라 일반식을 섭취하면서 추가적으로 개발된 영양보충음료를 하루 3팩씩 섭취하는 실험군(Case group)과 일반식만 섭취하는 대조군(Control group)으로 배정되었다. 15명의 실험군이 등록되었으나 3명이 중도 탈락하여 3명을 제외한 12명을 자료 분석에 포함하였고, 환자들의 등록 거부로 인해 대조군 모집이 어려워 동일한 조건으로 대상자를 모집했던 본 연구의 선행연구³³⁾의 대조군 9명의 자료를 분석에 이용함 (그림 2-5-4)

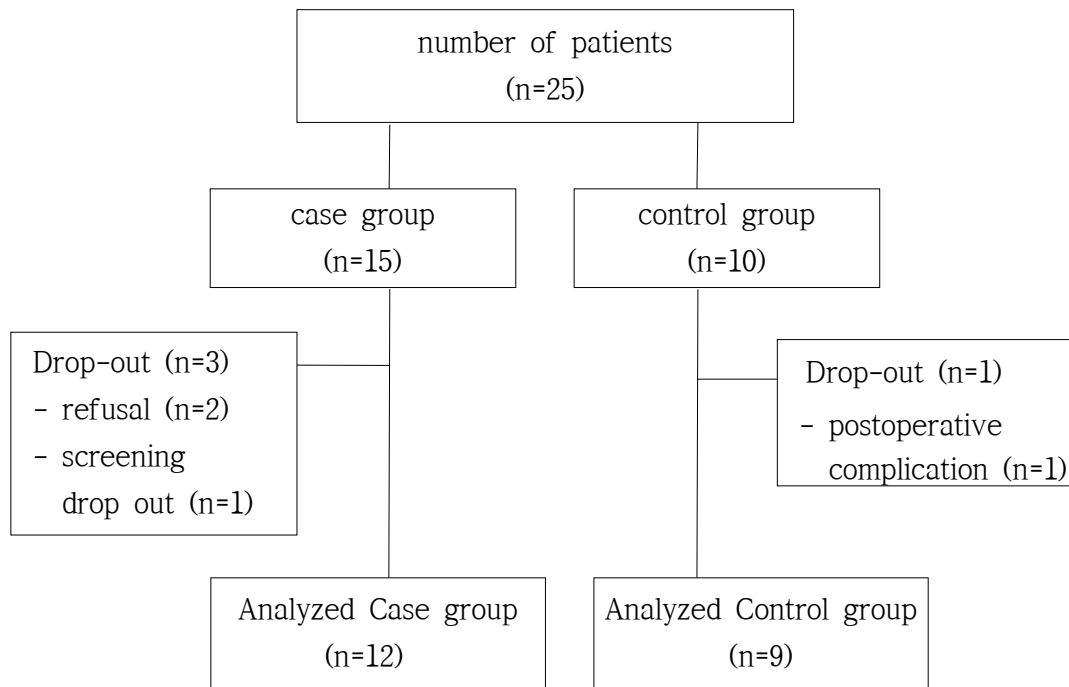


그림 2-5-4. Flow chart of patient enrollment

(나) 췌담도암 수술 환자를 위해 개발한 영양보충음료 및 적용 식사

대조군과 실험군 모두에게 기존 췌담도암 수술 후 환자에게 제공되었던 수술 후 환자식을 제공하였다. 실험군은 개발한 영양보충음료를 매끼 1팩씩 추가로 제공하여 하루 총 3팩을 원하는 시간에 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였음

모든 대상자들의 수술 후 식사는 간담췌외과의 수술 후 식사처방 프로토콜에 따라 이루어졌다. 유문부 보존 췌십이지장 절제술을 시행한 경우 수술 후 4일째 되는 날까지는 당질 보충음료(노엔피오, 대상)를 하루 3캔(200ml/캔) 섭취하였고, 수술 후 5일째 되는 날 아침은 유동식, 점심부터는 연식을 제공하였다. 원위부 췌장절제술을 시행한 경우는 수술 후 바로 다음날 중식부터 연식을 섭취하였다. 대조군과 실험군에게 제공되었던 식사의 영양소 구성은 다음과 같음 (표 2-5-5)

표 2-5-5. Nutrient composition of meal.

	Energy(kcal)	Glucose(g)	Protein(g)	Fat(g)	C:P:F ratio (%)
CLD (NO-NPO)	300	25	0	0	100:0:0
FLD	1200	190	45	30	55-65:7-20:15-30
SD	1700	230	65	45	55-65:7-20:15-30

(CLD; Clear Liquid Diet, NO-NPO; commercial products by Daesang Wellife, FLD; Full Liquid Diet, SD; Soft diet, C:P:F ratio; Carbohydrate:Protein:Fat ratio)

실험군의 경우 유동식을 섭취하는 시점부터 영양보충음료를 매끼 1팩씩 제공하였고 퇴원 후 첫 외래 방문일까지 하루 3팩 섭취하도록 하였다. 즉, 유문부 보존 췌십이지장 절제술 환자의 경우는 수술 후 5일째 되는 날 아침부터, 원위부 췌장절제술 환자의 경우 수술 후 1일째 점심부터 연구 종료시점까지 영양보충음료를 섭취하였음

(다) 연구방법

본 연구는 전향적 실험-대조군 연구로 연구 참여에 동의한 환자들을 순차적으로 실험군과 대조군으로 배정하였다. 연구 동의서를 받은 수술 전일을 baseline으로 하여 모든 대상자들의 신체계측, 체성분 분석, 생화학적 검사를 시행하였고 영양사가 면담을 통해 평소 섭취량과 생활습관을 평가하였다. 또한 PG-SGA 평가를 통해 환자의 영양상태를 평가하였고 대상자들의 과거력, 약물 복용 여부 등의 정보는 전자 의무기록을 통해 조사하였다. 두 군 모두 수술 후 퇴원 전일, 퇴원 후 첫 외래방문 시 추적 관찰을 진행하였음

수술 후 간담췌외과의 식사처방 프로토콜에 따라 환자식이 제공되었고 대상자들은 주치의의 판단에 따라 수술 후 정맥영양을 공급받았고 공급량과 제제는 전자의무기록을 통해 수집하였음

수술 후 퇴원 시까지 모든 대상자들에게 매일 식사섭취기록지를 제공하여 모든 식사 섭취량을 조사하였다. 수술 후 퇴원하기 전까지 식사와 관련된 문제(저혈당, 고지혈증, 신장결석 관련 합병증 등)나 영양보충음료 섭취로 인한 문제, 수술 후 합병증 발생 여부를 확인하였다. 실험군 대상자들에게는 매일 3팩의 영양보충음료를 추가로 섭취하도록 교육하였으며 실험군은 식사 외에도 제공된 영양보충음료의 섭취량 역시 기록하게 하였다. 수술 후 연식을 섭취한 지 3일째 되는 날, 설문조사를 통해 개발된 영양보충음료의 1차 만족도 조사를 시행하였음

퇴원 전일에는 신체계측, 체성분 분석, 생화학적 검사, PG-SGA 등 수술 전일과 동일한 지표를 재평가하였고 췌담도암 수술 후 식사요법에 대한 교육을 실시하였으며 퇴원 후 첫 외래방문일까지의 기간 동안 식사일기를 작성해오도록 하였다. 실험군의 경우 수술 후 유동식을 섭취하는 날부터 퇴원 후 첫 외래 방문 시까지 영양보충음료를 섭취해야하기 때문에 퇴원 이후에 섭취해야할 음료는 필요한 수량만큼 자택으로 배송하였고 영양보충음료 섭취조사지를 추가로 제공하였음

퇴원 후 첫 외래방문 시 대상자가 작성해온 식사일기와 영양보충음료 섭취조사지로 섭취량을 모니터링하였고, 신체계측, 체성분 분석, 생화학적 검사, PG-SGA를 재평가하였으며 실험군 대상자들에게는 영양보충음료 2차 만족도조사를 실시하였음

또한 대사체학 기법을 이용한 암환자 base formula 섭취에 따른 혈청 케톤체와 대사체를 분석 실시하였음

(라) 연구 결과

① 경구 섭취 평가

수술 후 재원기간 약 2주 동안의 각 군별 일별 에너지 섭취율을 분석하였다. (표 2-5-6, 그림 2-5-5) 두 군의 수술 후 14일 동안의 일별 에너지 섭취율을 비교분석하였을 때, 경구식사와 영양보충음료 섭취를 시작한 수술 후 5일째 되는 날의 실험군의 에너지 섭취율이 52.1%, 대조군의 섭취율이 18.2%로 실험군의 에너지 섭취율이 유의적으로 높았고 (p=0.001), 6일째 날(p=0.034), 10일째 날(p=0.040) 13일째 날(p=0.042)의 실험군의 에너지 섭취율이 유의적으로 높았다. 2주(14일)동안의 평균 에너지 섭취율을 비교하였을 때도 실험군은 54.2±26.3%, 대조군은 27.7±10.5%로 실험군의 섭취율이 통계적으로 유의하게 높았음 (p=0.015)

표 2-5-6. Comparison of daily energy intake rate between control group and case group during diet period(~POD#14)

		Control	Case	p-value
POD#	1	7.7±6.8 ¹⁾	11.2±8.7	0.508
	2	12.8±10.5	15.8±14.6	0.754
	3	24.0±21.9	22.0±16.9	0.917
	4	28.7±22.1	22.8±21.5	0.310
	5	18.2±19.5	52.1±17.8	0.001*
	6	32.3±35.8	54.7±21.6	0.034*
	7	38.3±31.8	46.3±24.8	0.656
	8	45.9±34.1	56.1±31.8	0.545
	9	36.1±29.7	70.3±37.7	0.070
	10	32.4±35.4	76.9±45.0	0.040*
	11	22.5±36.5	74.9±38.8	0.073
	12	28.0±32.5	75.6±44.2	0.109
	13	40.3±34.0	95.6±33.6	0.042*
	14	20.0±26.9	84.4±32.6	0.143
Total (POD#1~#14)		27.7±10.5	54.2±26.3	0.015*

¹⁾ Values are presented as means±standard deviations

(* significantly different between 2 groups by Mann-whitney test at P<0.05, POD: Postoperative day)

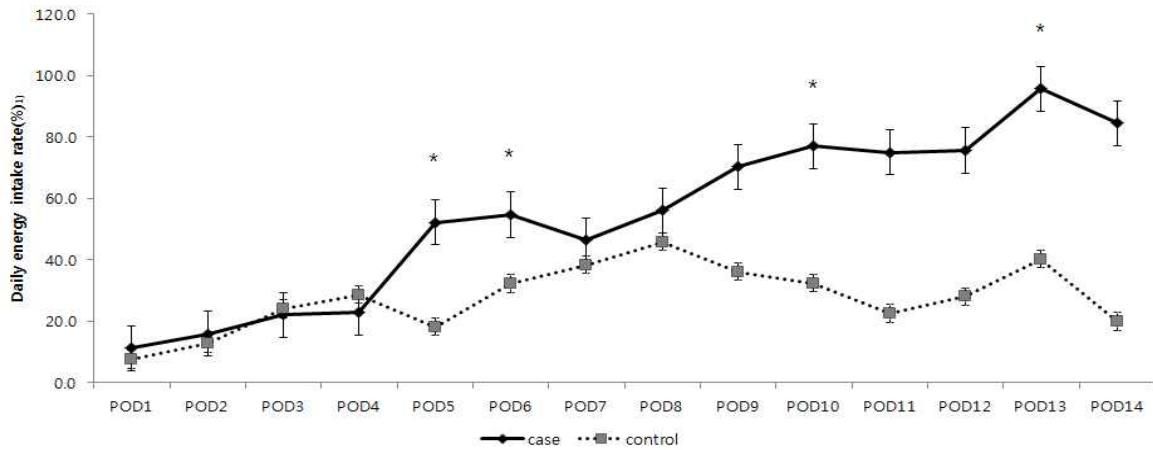


그림 2-5-5. Daily energy intake rate (%) during diet period. Values are presented as means±se

¹⁾ Daily energy intake rate(%)=(daily energy intake of each day)/(energy requirements)*100(%)

* significantly different between 2 groups by Mann-whitney test at P<0.05 (POD; Postoperative Day)

두 군의 세 시점(수술 전일, 퇴원전일, 첫 외래방문일)별 요구량 대비 에너지 및 단백질 섭취율을 비교하여 (표 2-5-7, 그림 2-5-6)에 제시하였다.

퇴원 시 실험군의 에너지 섭취율은 87.9%, 대조군은 63.5%로 대조군에 비해 실험군의 에너지 섭취율이 유의적으로 높게 나타났고(p=0.016), 외래방문 시점의 실험군 에너지 섭취율 역시 84.9%로 대조군에 비해 유의하게 높게 나타났다(p=0.041). 요구량 대비 단백질 섭취율은 수술 후 퇴원 시점에 대조군 68%에 비해 실험군 101%로 유의적으로 높게 나타났음 (p=0.047)

표 2-5-7. Comparison of dietary intake rate(%) during study period

Variable		Control	Case	p-value
Energy intake rate(%) ²⁾	SD#3	39.5±35.9 ¹⁾	54.7±22.7	0.310
	DC	63.5±12.9	87.9±25.2	0.016*
	OPD	67.1±12.0	84.9±21.0	0.041*
Protein intake rate(%) ³⁾	SD#3	42.8±42.6	61.7±34.9	0.345
	DC	67.9±17.7	101.3±36.1	0.047*
	OPD	83.3±26.1	103.0±29.5	0.148

¹⁾ Values are presented as mean±standard deviations

²⁾ Total energy intake(kcal/d)/Energy requirements(kcal/d)*100(%; values of energy

requirements are calculated by Mifflin-St, Jeor equation with body weight before surgery)

³) Total protein intake(g/d)/Protein requirements(g/d)*100(%) ; Value of protein requirements are calculated 1g/kg of body weight before surgery)

* significantly different between 2 groups by Mann-Whitney test at P<0.05

(SD#3; 3rd day of soft diet intake, DC; discharge, OPD; first outpatient visit)

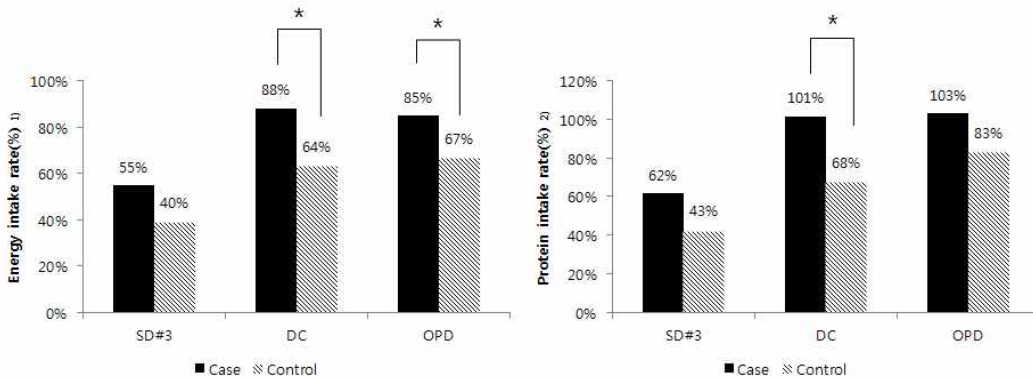


그림 2-5-6. Dietary intake rate(%) during study period.

¹) Total energy intake(kcal/d)/Energy requirements(kcal/d)*100(%) ; Values of energy requirements are calculated by Mifflin-St, Jeor equation with body weight before surgery)

²) Total protein intake(g/d)/Protein requirements(g/d)*100(%) ; Values of protein requirements are calculated 1g/kg of body weight before surgery

* significantly different between 2 groups by Mann-Whitney test at P<0.05

(SD#3; 3rd day of soft diet intake, DC; discharge, OPD; first outpatient visit)

② 경구 섭취 평가

㉠ 실험군의 영양보충음료 섭취율 및 만족도 조사

실험군의 경구 섭취량 중에서 제공된 영양보충음료를 통해 섭취한 비율과 식사를 통해 섭취한 비율을 세 시점별로 비교하였으며 세 시점의 평균 식사 및 영양보충음료 섭취율을 대조군과 비교하였음 (그림 2-5-8)

실험군의 연식 섭취 3일째 요구량 대비 식사를 통한 에너지 섭취율은 40%, 영양보충음료를 통한 에너지 섭취율은 14%이었고 퇴원 시점의 식사를 통한 요구량 대비 에너지 섭취율은 68%, 영양보충음료를 통한 에너지 섭취율은 20%, 외래방문시점의 식사를 통한 요구량 대비 에너지 섭취율은 69%, 영양보충음료를 통한 에너지 섭취율은 16%였다. 세 시점의 실험군의 에너지 섭취율의 평균값과 대조군의 식사를 통한 에너지 섭취율을 비교한 결과, 실험군은 식사를 통해 요구량 대비 59%, 대조군은 식사를 통해 요구량 대비 57% 섭취하였고 실험군은 영양보충음료를 통해 요구량 대비 17%만큼 추가적인 열량 섭취가 가능하여 총 에너지 섭취율은 76%로 대조군에 비해 유의하게 높았음 (p=0.015)

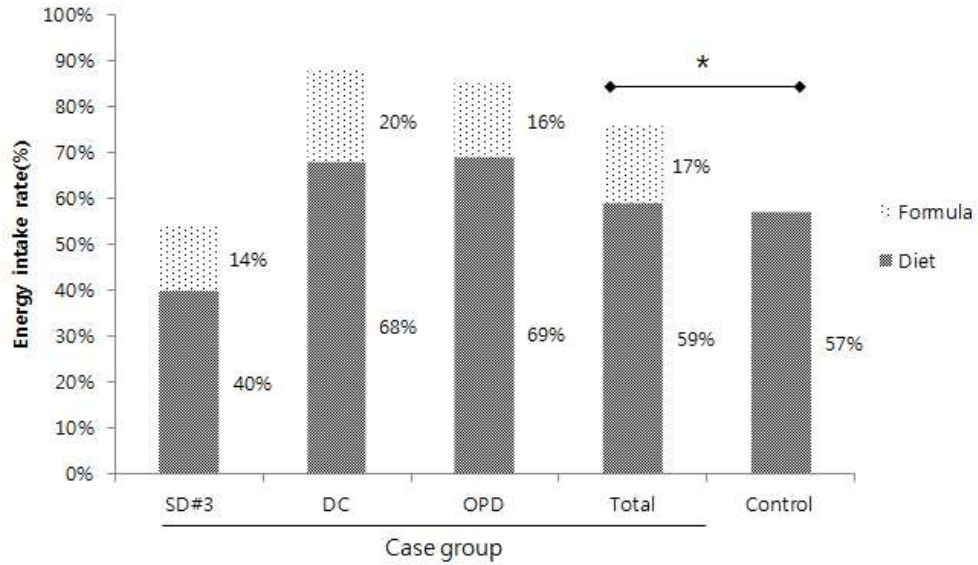


그림 2-5-8. Energy intake rate of diet and formula (%) during study period in case group.

(Diet; Energy intake of only Diet(kcal/d)/Energy requirements(kcal/d)*100(%), Formula; Energy intake of Formula(kcal/d)/Energy requirements(kcal/d)*100(%), Total; Average of SD#3, DC and OPD energy intake rate(%), SD#3; 3rd day of soft diet intake, DC; discharge, OPD; first outpatient visit)

* significantly different between 2 groups by Mann-Whitney test at P<0.05

또한 영양보충음료의 순응도를 평가하기 위해 연식 섭취 3일째, 퇴원 시점, 첫 외래방문 시 실험군 대상자들의 영양보충음료 공급량 대비 섭취율을 비교하여 그림 2-5-9에 제시 하였음

연구기간 동안 12명의 실험군 대상자들에게 하루 3팩의 영양보충음료를 제공하였고 평균적으로 23.5일 동안 섭취하였다. 연식 3일 째는 하루 제공량 3팩(450kcal) 대비 65.8%인 2.0팩(296.1kcal), 퇴원 시점에는 2.2팩(334.4kcal), 첫 외래방문일에는 약 1.7팩(261kcal) 섭취하였고 세 시점의 평균값은 하루 제공량 3팩(450kcal) 대비 66.1%인 약 2팩(300kcal)을 섭취하였음

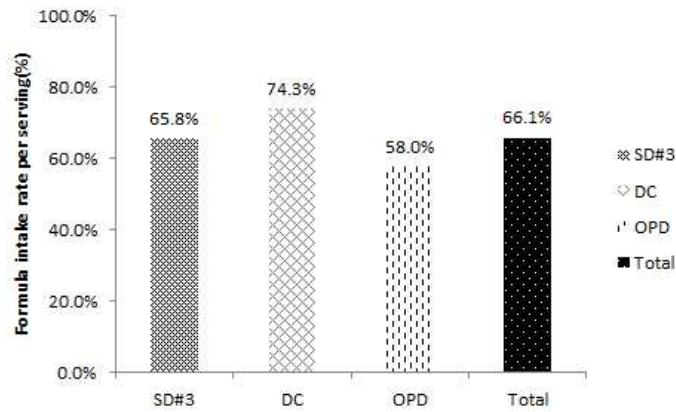


그림 2-5-9. Percentage of formula intake per serving(450kcal/375ml).

(SD#3; 3rd day of soft diet intake, DC; discharge, OPD; first outpatient visit)

수술 후 본원 간담췌외과의 식사처방 프로토콜에 따라 식사를 제공한 후 경구 식사 및 영양보충 음료를 섭취한지 3일째 되는 날과 연구 종료시점인 첫 외래방문일 총 2회 각 대상자에게 영양보충음료 만족도 조사지를 제공하여 만족도를 평가하였고 그 결과는 그림 2-5-10와 같음

총 8개의 항목으로 10점 척도로 평가하였고 영양보충음료가 식사량감소에 영향을 주지 않고 연구 종료 후 지속적으로 섭취할 의향이 있음을 확인할 수 있었으며 대상자들의 전반적인 만족도가 8.2점으로 높게 나타났음

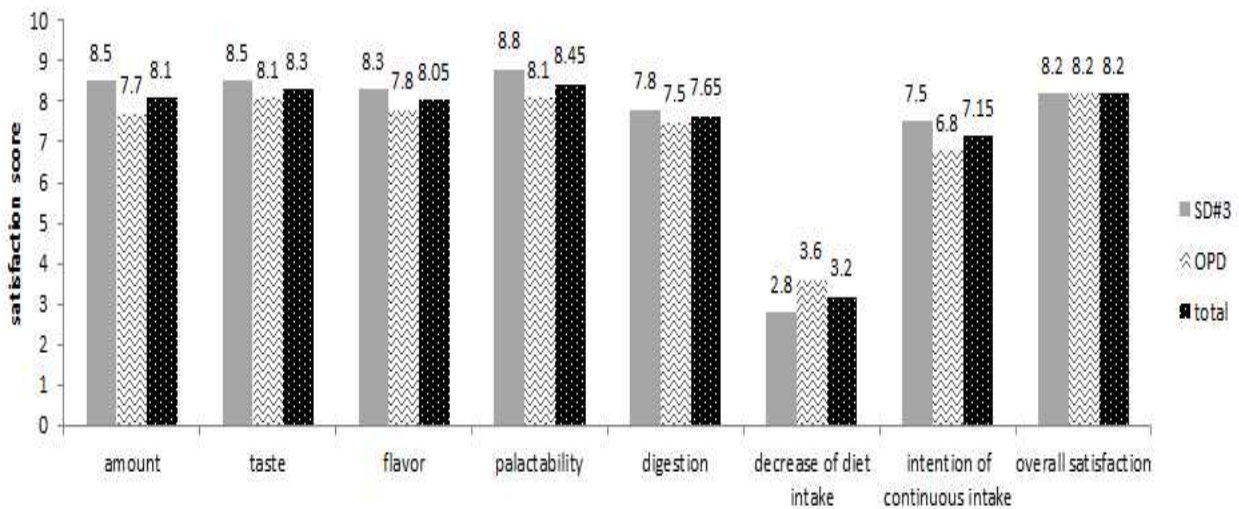


그림 2-5-10. Formula satisfaction survey

(SD#3; 3rd day of soft diet intake, OPD; first outpatient visit, total : average of SD#3&OPD satisfaction survey)

③ 체성분 비교

연구기간동안 두 군의 각 시점별 체질량지수(BMI), 체세포량(BCM), 체지방량(BFM), 골격근량(SMM), 위상각(Phase angle) 값을 표 2-5-8에 제시하였고 군 별 수술 전일과 퇴원 전일, 퇴원전일과 첫 외래방문일, 수술 전일과 첫 외래방문일의 측정치의 변화값은 표 2-5-9에 제시하였음

체지방량을 제외한 시점별 체성분 측정값은 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 체지방량은 baseline인 수술 전일부터 연구종료시점인 첫 외래 방문일까지 실험군의 측정값이 대조군에 비해 유의하게 높게 나타났음 (p=0.023, 0.028, 0.049)

세 시점의 체성분 측정치 변화값을 비교한 결과 두 군 모두에서 체중, 체세포량, 골격근량이 유의적으로 감소 (p<0.05)하였지만 그 감소량은 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 체지방량의 경우 대조군에서 수술 후 다소 증가하는 경향을 보였으나 (p>0.1) 실험군에서는 수술 전과 퇴원 시점 비교 시 감소하는 경향을 보였음 (p=0.091)

각 군 내에서는 수술 후부터 첫 외래 방문 시점까지 시점에 따른 유의적인 변화들이 있었지만 두 군 간 시점에 따른 모든 측정치의 변화량에는 유의적인 차이가 없었음

표 2-5-8. Comparison of body composition between 2 groups during study period.

Variable		Control	Case	p-value ²⁾
BMI	preOP	22.2±0.9 ¹⁾	23.7±0.8	0.095
	DC	21.3±0.8	22.9±0.7	0.082
	OPD	20.9±0.8	22.5±0.7	0.058
BCM	preOP	27.5±1.7	29.9±1.5	0.345
	DC	25.7±1.6	28.6±1.4	0.422
	OPD	24.5±1.6	27.4±1.4	0.277
BFM	preOP	13.8±2.0	19.1±1.8	0.023*
	DC	14.0±1.9	18.3±1.6	0.028*
	OPD	14.3±1.9	18.6±1.7	0.049*
SMM	preOP	23.0±1.5	25.2±1.3	0.345
	DC	21.4±1.4	24.0±1.3	0.422
	OPD	20.3±1.4	23.0±1.2	0.277
PA	preOP	5.4±0.2	5.3±0.2	0.808
	DC	5.2±0.3	5.0±0.3	0.464
	OPD	4.6±0.2	4.6±0.2	0.808

¹⁾ Means±standard deviations

²⁾ significantly different between 2 groups by Mann-Whitney test at P<0.05

(BMI; Body mass index, BCM; Body cell mass, BFM; Body fat mass, SMM; Skeletal muscle mass, PA; Phase angle, preOP; Measurements of day before surgery, DC; Measurements of day before discharge, OPD; Measurements of first outpatient visit)

표 2-5-9. Change of body composition.

Variable		Control	Case	p-value ⁵⁾ (group*time)
BMI	$\Delta 1^{2)}$	$-0.9 \pm 0.6^{1)}$	-0.9 ± 0.8	0.863
	$\Delta 2^{3)}$	-0.5 ± 0.8	-0.3 ± 0.4	
	$\Delta 3^{4)}$	-1.4 ± 0.8	-1.2 ± 0.9	
BCM	$\Delta 1$	-1.8 ± 0.8	-1.3 ± 1.3	0.473
	$\Delta 2$	-1.2 ± 0.8	-1.1 ± 0.5	
	$\Delta 3$	-3.0 ± 1.3	-2.4 ± 1.6	
BFM	$\Delta 1$	0.2 ± 0.9	-0.8 ± 1.7	0.367
	$\Delta 2$	0.2 ± 1.7	0.4 ± 1.3	
	$\Delta 3$	0.5 ± 1.6	-0.4 ± 2.3	
SMM	$\Delta 1$	-1.6 ± 0.7	-1.2 ± 1.2	0.462
	$\Delta 2$	-1.1 ± 0.7	-1.0 ± 0.5	
	$\Delta 3$	-2.7 ± 1.2	-2.2 ± 1.4	
PA	$\Delta 1$	-0.2 ± 0.6	-0.3 ± 0.5	0.562
	$\Delta 2$	-0.6 ± 0.4	-0.4 ± 0.4	
	$\Delta 3$	-0.8 ± 0.4	-0.7 ± 0.4	

¹⁾ Means \pm standard deviations

²⁾ $\Delta 1$; (DC data)-(preOP data)

³⁾ $\Delta 2$;(OPD data)-(DC data)

⁴⁾ $\Delta 3$;(OPD data)-(preOP data)

⁵⁾ p-value by repeated Measured ANOVA (effects of group*time interaction)

(BMI; Body mass index, BCM; Body cell mass, BFM; Body fat mass, SMM; Skeletal muscle mass, PA; Phase angle, preOP; Measurements of day before surgery, DC; Measurements of day before discharge, OPD; Measurements of first outpatient visit)

④ 영양상태 변화

연구기간동안 PG-SGA 점수에 따라 영양상태를 grade A,B,C 3단계로 평가하여 그림 2-5-11에 제시하였다. 세 시점별 대조군 및 실험군의 영양상태는 유의적인 차이가 없었음
수술 전과 퇴원 시점 간 영양상태가 양호한 A단계에 속한 대상자와 영양중재가 필요한 B, C 단계에 속한 대상자의 비율을 비교하였을 때, 두 군 모두 퇴원시점에 영양상태 개선이 필요한 대상자의 분포가 증가하였으나 유의적인 차이는 없었음 (p=0.063, 0.098)

수술 전과 첫 외래방문시점의 PG-SGA grade 비율을 비교하였을 때, 실험군의 경우 수술 전 영양상태가 양호한 A단계에 속한 대상자의 비율이 83%이었고 외래시점에 A단계 대상자가 33%로 감소하였지만 통계적으로 유의적이지 않았고, 대조군의 경우 수술 전 78%의 대상자가 A단계였으나 첫 외래방문시점에 A단계인 대상자의 비율이 33%로 감소하

고 B단계에 속한 대상자의 비율이 67%로 유의적으로 증가(p=0.046)하였다. 즉, 실험군에 비해 대조군이 연구종료시점인 첫 외래방문일에 영양중재가 필요한 영양불량 위험이 높은 경향이 있었음

각 시점에서의 두 군의 PG-SGA 점수 분포는 그림 2-5-12에 제시하였다. 수술 전일에 비해 퇴원 시점의 PG-SGA 값은 두 군 모두에서 유의하게 증가(p=0.003, p=0.021)하였으나 두 시점 간 점수의 증가량은 군 간 유의적인 차이가 없었음

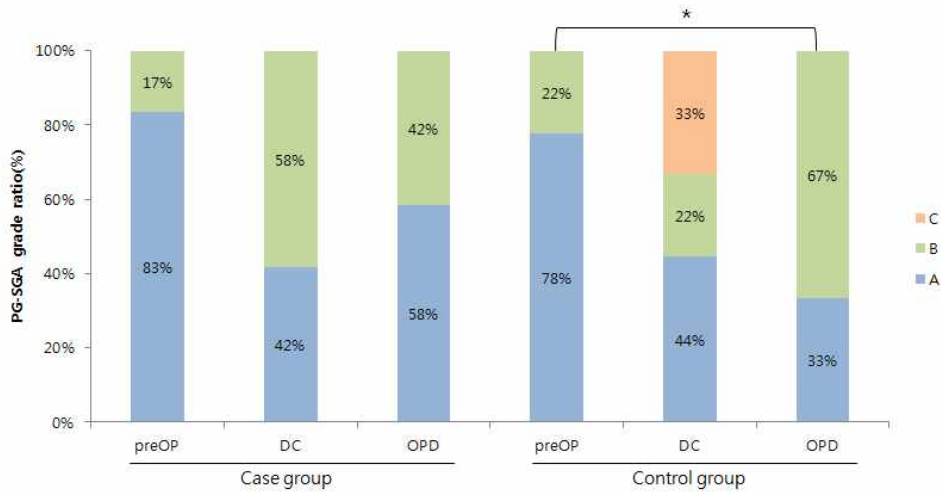


그림 2-5-11. Change of PG-SGA grade between groups

* significantly different between preOP and OPD in control group by McNemar test at p<0.05

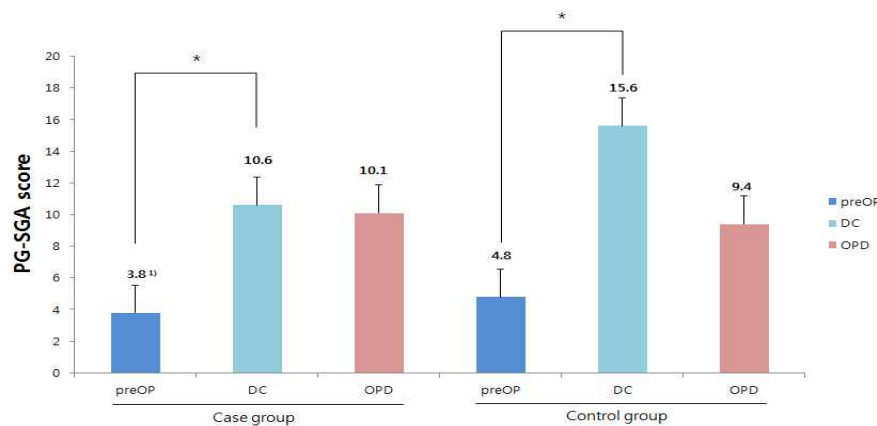


그림 2-5-12. Change of PG-SGA score between case and control group

¹⁾ Value are means

* significantly different between preOP and DC by Wilcoxon signed rank test at p<0.05

⑤ Urine ketone 검출 결과

수술 전과 퇴원시점, 첫 외래방문 시점의 소변 내 케톤 검출 결과를 표 2-5-10에 제시하

였다. 퇴원시점에 실험군에서는 8.3%(1명), 대조군은 22.2%(2명)의 대상자의 소변에서 케톤이 검출되었으나 군 간 유의적인 차이는 없었고, 외래 시점에서 실험군은 58.3%(7명), 대조군은 22.2%(2명)의 대상자의 소변에서 케톤이 검출되었으나 군 간 유의적인 차이가 없었음 (p=0.184)

표 2-5-10. Comparison of urine ketone detection between two groups.

Variable	Control	Case	p-value ^{1)}
preOP	Urine ketone, n(%)		0.486
	negative	9(100.0)	10(83.3)
	positive	0(0.0)	2(16.7)
DC	Urine ketone, n(%)		0.553
	negative	7(77.8)	11(91.7)
	positive	2(22.2)	1(8.3)
OPD	Urine ketone, n(%)		0.184
	negative	7(77.8)	5(41.7)
	positive	2(22.2)	7(58.3)

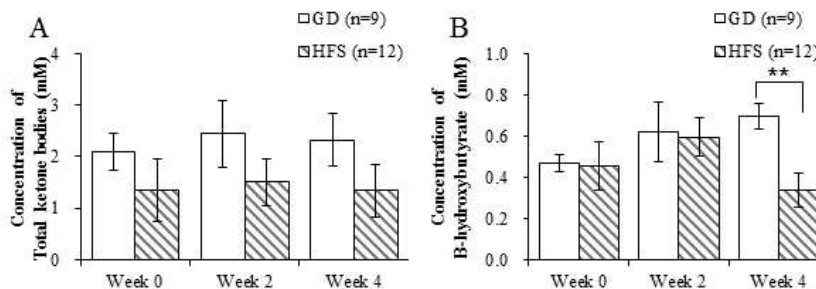
^{1)} p-value by Fisher's exact test between Control and Case group (significantly different at p<0.05)

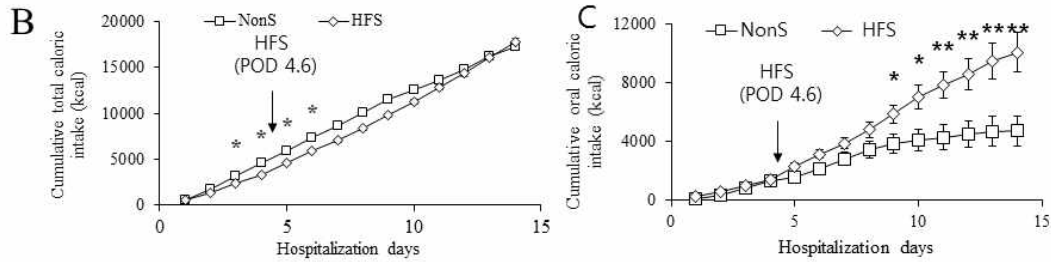
다. 대사체학 기법을 이용한 암환자 BASE 포물라 섭취에 따른 혈청 케톤체와 대사체 분석

(1) 혈청 내 케톤체 함량 분석

혈청 내 케톤체 함량은 1차년도와 동일하게 측정하였음. base formula 섭취군(HFS)에서 케톤 생성능이 낮은 것을 확인하였으며, 이는 4주차에서 군간 차이가 유의적으로 차이났음 (p=0.004)

이는 BASE 포물라 섭취군에서 대조군과 비교하여 총 칼로리(경구, 비경구 포함)에는 차이가 없지만, 경구로 섭취한 식사량에서 유의적 차이가 나기 때문으로 판단됨





(2) LC-MS/MS를 이용한 혈청 대사체학 분석

일반 환자식(GD)과 케톤 BASE 포물라(HFS) 섭취군의 시간에 따라 대사체학 분석을 위한 다변량 회귀분석 가능한 모델을 SIMCA14.1을 이용하여 분석하였음

표 2-5-11. OPLS-DA parameters and permutation test for distinguishing between NONS and HFS groups.

Group	OPLS-DA				
	Components ^a	Q ²	R ²	Q ² /R ²	p-value ^b
NONS0-HFS0	1+3	0.542	0.992	0.55	0.142
NONS2-HFS2	1+1	0.601	0.842	0.71	0.003*
NONS4-HFS4	1+3	0.326	0.974	0.33	0.668
NONS0-NONS2	1+5	0.486	0.999	0.49	0.603
NONS0-NONS4	1+6	0.721	1	0.72	0.221
NONS2-NONS4	1+6	0.640	1	0.64	0.397
HFS0-HFS2	1+0	-0.099	0.567	-	N/A
HFS0-HFS4	1+2	0.399	0.942	0.42	0.121
HFS2-HFS4	1+1	0.183	0.735	0.25	0.375

OPLS-DA, orthological partial least squares-discriminant analysis; Q², predictive capability, R², correlation coefficients.

^aThe number of components BASEd on Q2 indicates the best classifier of OPLS-DA using a 7-fold cross-validation method.

^bp-value was determined by CV-ANOVA of OPLS-DA in SIMCA 14.1. *p-value<0.05 by CV-ANOVA were considered significant

분석 결과 1차년도와 동일하게 베이스라인에서 두 군의 혈청 대사체 차이가 없었으나, 포물라 섭취 이후에는 혈청 대사체 변화가 뚜렷한 것을 확인하였음 (R²=0.842, Q²=0.601, p-value=0.003) (표2-5-11)

(나) 위에서 선정된 분석 모델을 이용한 다변량 회귀 분석 결과

(OPLS-DA plot, 500 permutation analysis)

베이스라인, 포물라 섭취 후(2주) 그리고 4주차에서 각각 대사체의 군분류가 명확하게 이루어지는지를 OPLS-DA 회귀분석을 통해 확인하였음. 2주차에서는 각 대사체가 outlier 없이

군 분류가 유의적으로 잘 이루어짐을 확인하였음. 또한, 500 permutation analysis를 진행한 결과로 2주차의 대사체 분석 모델이 유의미한 분석 모델임을 확인함 (그림 2-5-13)

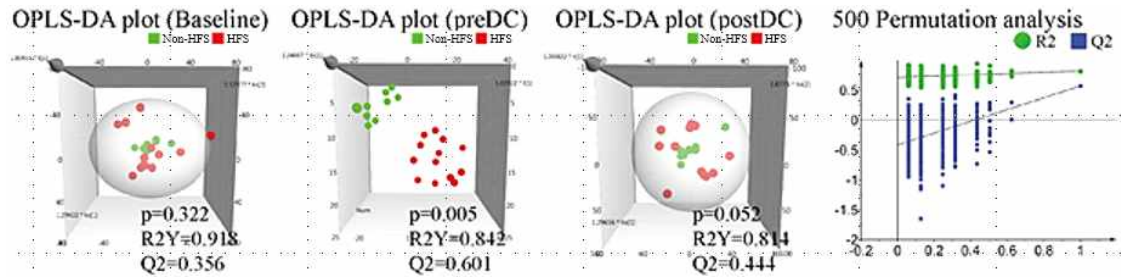


그림 2-5-13. Multivariate analysis between Non-HFS and HFS group

(다) OPLS-DA에서 잠재적 바이오마커는 $VIP > 1.0$, $p\text{-value} < 0.05$ (Mann-Whitney U test)를 기준으로 516개 피크와 195개 대사체를 확인하였으며, 히트맵을 통해 시각적으로 군간 차이를 확인하였음. 케톤 BASE 포물라를 섭취하지 않은 군과 비교하였을 때, 19개 대사체는 감소하는 경향을, 나머지 176개 대사체는 증가하는 경향을 보였음 (그림 2-5-14)

(라) 195개 대사체 중에서 경구로 섭취한 지방량과 유의적 상관성이 있는 대사체 42개를 선별하였음 (표 2-5-12, 그림 2-5-15)

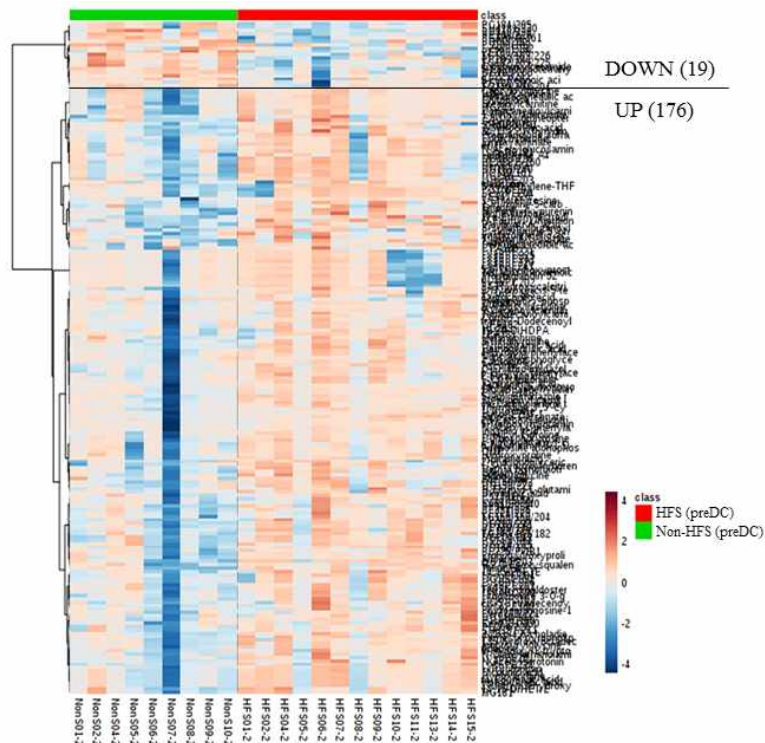


그림 2-5-14. Heatmap of total metabolites at preDC(2-week)

표 2-5-12. The detailed statistical and database information of 42 metabolites correlated with oral fat intake (kcal).

m/z	RT(min)	Metabolite	HMDB	VIP	Log2FC	p-value	Superpathway	Pathway
187.0572	0.66	2-Phosphoglyceric acid	HMDB00362	1.02	1.37	0.007	Carbohydrate	Glycolysis / Gluconeogenesis
211.1047	0.82	Vanillic acid	HMDB11714	1.49	1.36	0.000	Carbohydrate	Pyruvate metabolism
114.0662	0.62	1-Pyrroline-5-carboxylic acid	HMDB01301	1.25	0.52	0.001	Amino acid	Alanine, aspartate and glutamate metabolism
132.1016	1.65	Hydroxyproline	HMDB00725	1.10	0.50	0.033	Amino acid	Arginine and proline metabolism
229.1193	10.92	Prolylhydroxyproline	HMDB06695	1.44	1.27	0.011	Amino acid	Arginine and proline metabolism
215.0673	7.10	Methyl bisnorbiotinyl ketone	HMDB04822	1.29	0.79	0.002	Amino acid	Biotin metabolism
175.0861	1.98	Dehydroascorbic acid	HMDB01264	1.23	0.33	0.002	Amino acid	Catecholamine Biosynthesis
177.0736	7.68	N-Formyl-L-methionine	HMDB01015	1.16	1.59	0.002	Amino acid	Cysteine and methionine metabolism
225.0094	4.50	L-3-Hydroxykynurenine	HMDB11631	1.14	1.33	0.002	Amino acid	Tryptophan metabolism
237.0905	11.51	N-Formylkynurenine	HMDB01200	1.19	0.72	0.001	Amino acid	Tryptophan metabolism
216.0140	0.57	3-Chlorotyrosine	HMDB01885	1.13	1.01	0.006	Amino acid	Tyrosine metabolism
173.0917	0.65	S-(3-Methylbutanoyl)-dihydroipoamide-E	HMDB06867	1.12	0.90	0.001	Amino acid	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
339.2885	16.49	14,15-DiHETE	HMDB02265	1.27	1.10	0.007	Lipid	Arachidonic acid metabolism
371.1881	14.48	3-Oxo-4,6-choladienoic acid	HMDB00476	1.64	1.50	0.003	Lipid	Fatty acid metabolism
326.3770	14.34	N-Oleoyl ethanolamine	HMDB02088	1.52	0.97	0.001	Lipid	Fatty acid metabolism
299.9109	0.82	Pristanic acid	HMDB00795	1.11	0.70	0.005	Lipid	Fatty acid metabolism
605.5411	19.38	Diglyceride(15:0/20:3)	HMDB07081	1.27	1.07	0.002	Lipid	Glycerolipid metabolism
637.4938	15.65	Diglyceride(18:3/20:5)	HMDB07288	1.03	-0.48	0.000	Lipid	Glycerolipid metabolism
431.3510	17.70	Monoglyceride(24:6)	HMDB11590	2.07	2.51	0.002	Lipid	Glycerolipid metabolism
495.4036	16.95	Lysophosphatidylcholine(16:0)	HMDB110382	1.53	1.12	0.007	Lipid	Glycerophospholipid metabolism
478.3288	18.46	Lysophosphatidylethanolamine(18:2)	HMDB11477	1.06	-0.85	0.009	Lipid	Glycerophospholipid metabolism
779.5785	19.08	Phosphatidylcholine(14:0/22:6)	HMDB07892	1.12	-1.44	0.007	Lipid	Glycerophospholipid metabolism
746.6061	19.04	Phosphatidylethanolamine(14:0/22:1)	HMDB08842	1.07	0.82	0.004	Lipid	Glycerophospholipid metabolism
812.6154	18.98	Phosphatidylethanolamine(20:4/22:6)	HMDB09408	1.15	0.96	0.002	Lipid	Glycerophospholipid metabolism
840.7011	19.84	Phosphatidylethanolamine(22:4/22:6)	HMDB09605	1.37	0.78	0.001	Lipid	Glycerophospholipid metabolism
749.5317	18.53	16:1	HMDB05780	1.01	-0.83	0.004	Lipid	Glycerophospholipid metabolism
747.6013	18.03	Phosphatidylglyceride(16:0/18:2)	HMDB10575	1.57	1.42	0.001	Lipid	Glycerophospholipid metabolism
867.6848	21.51	Phosphatidylinositol(16:0/20:0)	HMDB09785	1.25	-1.47	0.002	Lipid	Glycerophospholipid metabolism
813.6184	18.98	Sphingomyelin(d18:1/24:1)	HMDB12107	1.14	0.82	0.002	Lipid	Glycerophospholipid metabolism
841.7137	20.38	Triglyceride(15:0/16:0/20:4)	HMDB11702	1.20	0.65	0.007	Lipid	Glycerophospholipid metabolism
489.3117	17.07	7-Sulfocholic acid	HMDB02421	1.16	0.81	0.006	Lipid	Steroid biosynthesis
383.1970	15.01	Farnesyl pyrophosphate	HMDB00961	1.64	1.11	0.003	Lipid	Steroid biosynthesis
297.1901	6.72	17 α -Ethinylestradiol	HMDB01926	1.44	1.46	0.001	Lipid	Steroid hormone biosynthesis
270.9576	0.82	Estrone	HMDB00145	1.20	1.03	0.007	Lipid	Steroid hormone biosynthesis
277.0829	11.54	Biotin sulfone	HMDB04818	1.29	0.42	0.009	Metabolism of cofactors and vitamins	Biotin metabolism
124.0472	1.21	Nicotinic acid	HMDB01488	1.16	0.76	0.006	Metabolism of cofactors and vitamins	Nicotinate and nicotinamide metabolism
472.8281	16.03	5-Formiminotetrahydrofolic acid	HMDB01534	1.34	-1.01	0.001	Metabolism of cofactors and vitamins	One carbon pool by folate
327.1059	1.65	6,7-Dimethyl-8-(1-D-riboyl)lumazine	HMDB03826	1.36	0.48	0.018	Metabolism of cofactors and vitamins	Riboflavin metabolism
266.1384	12.08	Thiamine	HMDB00235	1.91	0.79	0.002	Metabolism of cofactors and vitamins	Thiamine metabolism
299.1615	12.61	7-Methylguanosine	HMDB01107	1.26	0.74	0.024	Nucleotide metabolism	Purine metabolism
347.1482	1.64	Adenosine mono phosphate	HMDB00045	1.49	0.78	0.009	Nucleotide metabolism	Purine metabolism
261.1439	5.36	L-alpha-glutamyl-L-hydroxyproline	HMDB11161	1.42	0.94	0.003	Signal transduction	HIF-1 signaling pathway

42 metabolites had VIP>1.0, p-value <0.05, and correlation with oral fat intake (kcal). Metabolite identification was identified based on accurate mass data, retention time, experimental MS/MS spectra, and library MS/MS spectra in HMDB, MyCompoundID. Fold change was calculated by dividing the value of metabolites in NONS 2 week by HFS 2 week. p-value was determined by Mann-Whitney U test compared with the preDC of NONS and HFS. Pathway information was extracted from KEGG, HMDB, and SMPDB. VIP, Variable importance in projection; FC, fold change.

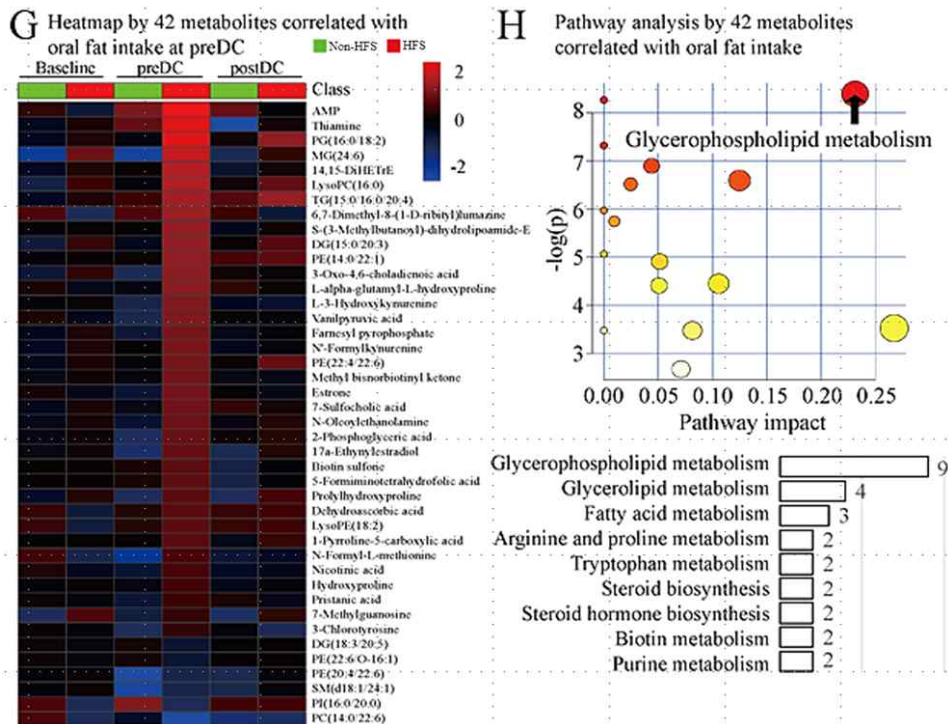


그림 2-5-15. Heatmap and pathway analysis by 42 metabolites correlated with oral fat intake

(kcal) at preDC

42개 대사체들은 베이스라인에서는 군간 차이가 없지만, 일부 대사체는 4주차까지도 대사체 차이가 2주차와 비슷한 경향을 띠는 것을 히트맵을 통해 확인할 수 있음. 또한 42개 대사체중 9개 대사체는 Glycerophospholipid metabolism에 유의적으로 hit되었음.

(마) 42개 대사체 중 영양지표 NRI에 경구 지방 섭취만 영향을 미치는 대사체로 LysoPC(16:0) 과 SM(d18:1)임을 확인함 (그림 2-5-16)

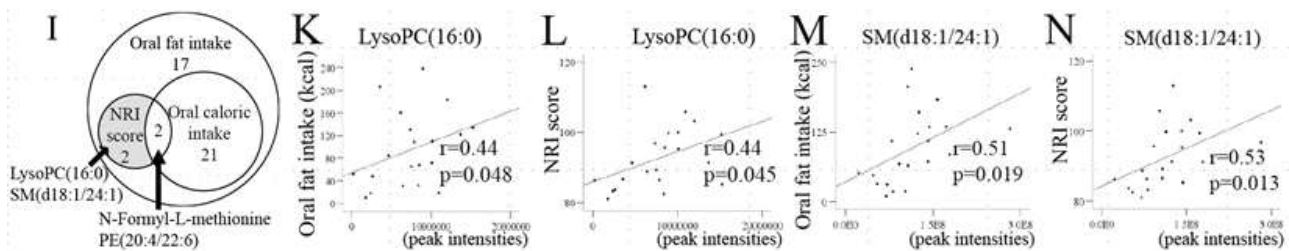


그림 2-5-16. Venn diagrams and correlation plots representing metabolites correlated with oral fat intake(kcal) or nutritional risk index(NRI) among 42 metabolites

췌장암 특이적 대사체 중 하나인 LysoPC(18:2)는 췌장암 환자에서 하향 조절되어 있음. 1차년도 환자들의 케톤생성식이 섭취군이 LysoPC(18:2)를 상향조절한 것과 비슷하게 BASE 포플라 섭취군에서 LysoPC(18:2)가 상향조절되었음. 이는 BASE 포플라 섭취가 케톤생성능에 영향을 미치지 않았지만 다른 경로를 통해 LysoPC(18:2)가 증가함을 추측할 수 있음.

(5) 결론

본 연구에서 사용한 영양보충음료는 1회 제공량의 부피를 줄이기 위해 단위 중량당 열량을 1.2배로 개발하여 일반적인 경구 영양보충음료의 양인 200ml/캔보다 적은 125ml/팩으로, 적은 양을 제공하여도 많은 에너지를 섭취할 수 있도록 하였다. 췌담도암 수술 후 환자들은 수술 후 식사에 대한 어려움을 호소하기 때문에 소량씩 자주 섭취할 수 있도록 개발하여 실험군 대상자들이 평균적으로 공급량(3팩) 대비 약 66%(2팩)를 섭취하여 비교적 순응도가 높았음을 확인할 수 있었다.

개발한 영양보충음료를 섭취한 실험군의 경구 섭취량이 대조군에 비해 유의적으로 많았다. 췌담도암 수술 환자들의 경우 수술 후 섭취량이 감소하는 경우가 많은데 영양보충음료를 섭취함으로써 식사량에 영향을 주지 않고 영양보충음료를 통해 약 300kcal 정도의 추가적인 에너지 섭취가 가능하였다. 또한 PG-SGA 결과를 비교하였을 때 영양보충음료를 섭취한 대상자들의 수술 후 영양불량의 위험율이 실험군에 비해 적다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 개발된 영양보충음료의 수술 후 암환자들을 위한 경구 영양지원 용도로의 적용 가능성

을 확인할 수 있었다.

통상적으로 췌장 관련 수술 후 지방 소화와 흡수의 문제로 지방을 무조건적으로 제한하며 영양밀도가 낮은 식사를 제공했던 것과 비교하였을 때, 본 연구를 통해 지방함량을 높여 영양밀도를 높인 영양보충음료가 환자들의 경구 섭취량을 높이고 만족도를 높이면서 임상적인 지표들에는 큰 영향을 주지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

또한 변형된 케톤생성식이요법 기반으로 개발된 영양보충음료를 섭취한 실험군과 대조군의 체성분이나 생화학적 지표, 케톤 검출 여부, 수술 후 합병증 여부 등 유의적인 차이가 발생하지 않았다.

두 군 간 소변 내 케톤체 검출 결과의 유의적인 차이가 없었던 것은 지방 80%인 1.7:1의 케톤생성비로 개발된 영양보충음료를 섭취하였지만 일반식과 함께 섭취하여 케톤생성비의 비율이 깨졌기 때문일 것으로 추정된다.

대사체 및 케톤체 분석결과에서 췌장암 환자에서 베이스 포물라 섭취는 경구 식품 섭취를 유의적으로 증가시켰으며, 이는 결과적으로 혈청 내 케톤량에 영향을 미치지 못함. 하지만 췌장암 환자에게서 특이적 낮은 수준을 유지하는 lysoPC(16:0), LysoPC(20:4)이 베이스 포물라 섭취 후 상향조절된 것을 확인하였음. 또한 지방 섭취량과 NRI와 동시에 상관관계를 갖는 대사체 SM(d18:0/24:1)는 베이스 포물라 섭취 후 상향조절되었으며, 이는 추후 연구에서 주의 깊게 살펴볼 잠재적 바이오마커로 생각해볼 수 있음

6절. 동물 실험을 통한 국내산 항암소재의 효과 검증

1. 식이소재의 기능성 효능 검사를 위한 in vivo 동물 실험 모델 확립

가. 동물 사육 및 식이

- (1) 5주령의 수컷 흰쥐 30 마리를 라온바이오에서 구입한 후, 1주일간 lab-chow식이를 제공하여 적응한 후, 체중에 따라 난괴법에 의해 정상군과 대장암 유발군으로 나눔
- (2) 대장암을 유발하기 위해 대장암 유발군에 1주일에 한번 씩 총 6주간 1,2-dimethylhydrazine (DMH)를 대퇴부에 30mg/kg 농도로 대장암화 과정을 진행시킴
- (3) 정상대조군은 DMH 대신에 동일한 양의 식염수를 대퇴부에 주사하였음
- (4) 실험식이는 2018S Teklad global 18% protein rodent diet를 자유롭게 공급함
(그림 2-6-1)

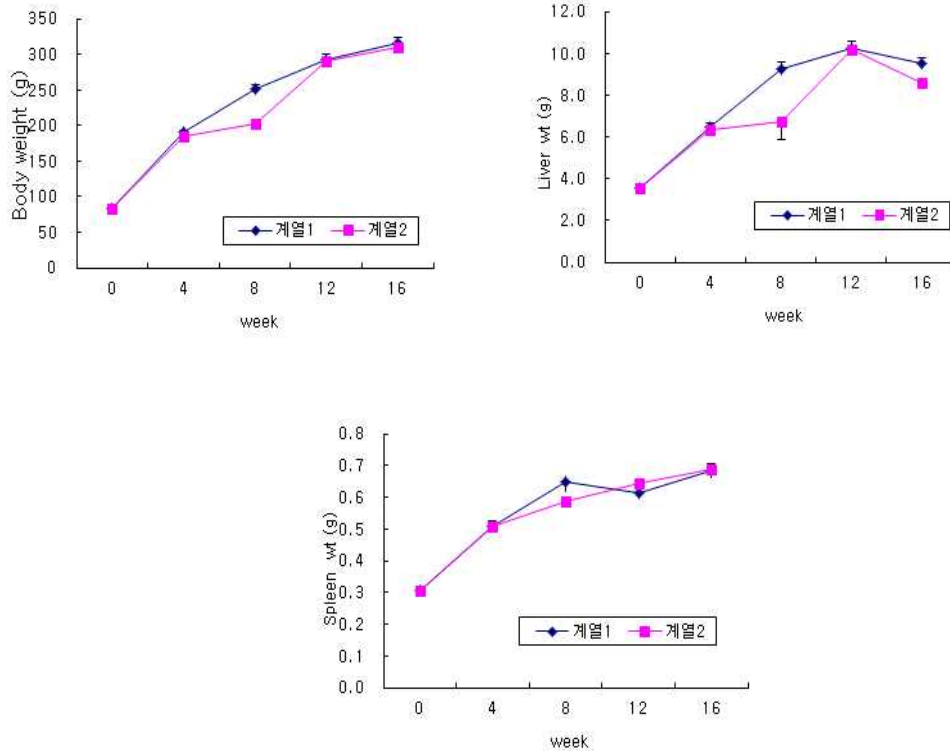


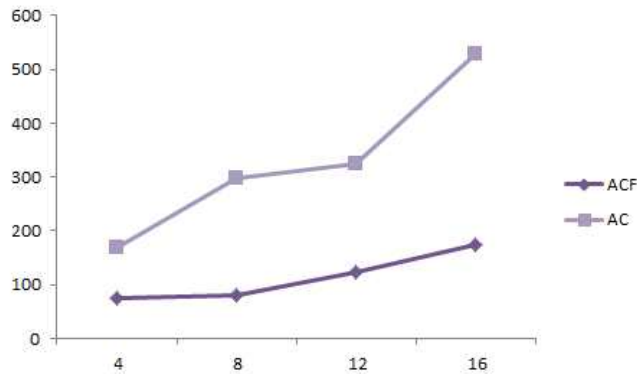
그림 2-6-1. 동물 체중변화 및 간과 비장 무게의 변화
(계열 1: 정상대조군, 계열 2: 대장암유도군)

나. Aberrant Crypt Foci (ACF) 와 Aberrant Crypt (AC) 측정

- (1) 6 주 후 대장을 맹장에서 직장까지 잘라내어 총 길이를 측정하고 PBS로 대장의 내용물을 제거한 후 직장부분에서 위쪽으로 전체 대장의 50%를 길이로 잘라 펴 이를 10% buffered formalin으로 24시간 고정시킨 후 petri dish에 0.2% methylene blue/saline solution과 함께 5-15분간 방치함
- (2) 이를 Microscope slide에 mucosa를 위로 향하게 놓은 후 광학현미경 (×40)으로 관찰하여 ACF수와 AC를 측정함
- (3) 실험 결과, DMH를 주사하였을 때, 주 1회씩 DMH를 투여한 4주째부터 ACF와 AC가 전체 대장의 절반이상을 덮었고, 용종의 형태가 16주에는 170여개가 생성됨을 확인함 (그림 2-6-2)

그림 2-6-2. Colonocyte의 % tail DNA (계열 1: 정상대조군, 계열 2: 대장암유도군)

다. 대장조직 내 DNA 손상의 측정을 위한 comet assay



- (1) 해부 시 직장 쪽 조직의 일부를 잘라내어 HBSS buffer로 세척한 뒤 proteinase K (4mg/ml in HBSS buffer)를 37 ° C에서 30분간 shaking incubator에서 반응시킨 후 HBSS buffer에 담가 조직으로부터 대장세포를 분리함
- (2) 대장 세포를 수집하기 위해 1000×g에서 8분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 대장세포의 개수가 2×10⁴/ml가 되도록 HBSS buffer로 희석하여 comet assay를 실시함
- (3) Comet assay는 대장세포와 0.7% low melting agarose gel (LMA)를 섞은 후, 0.5% normal melting agarose (NMA)가 precoating된 fully frosted slide 위로 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4 ° C 냉장고에 보관함. Gel 이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75μl로 한 겹 더 덮어 gel을 완성함
- (4) 각 샘플 당 슬라이드는 총 4개를 제작하여 그 중 2개의 슬라이드는 DNA에 산화적 스트레스를 가하기 위해 50 μM H₂O₂를 함유한 염색 jar에 담가 5분간 처리한 뒤 PBS로 세척하고, Cell lysis를 위해 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM tris)에 사용직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 double strand를 풀
- (5) Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 4 ° C의 차가운 buffer (300mM NaOH, 10mM Na₂EDTA)를 채워 unwinding 시키고, 20분 후 25V/300±3mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였고, 전기영동이 끝난 후 0.4M Tris 완충용액 (pH 7.4)으로 충분히 세척하고 20 μl/ml 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 형광현미경상에서 확인함
- (6) CCD camera를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 comet image analyzing system (Komet 5.0, Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 함. DNA 손상 정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편 내 DNA 함량 (% Tail DNA)의 값을 측정하여 나타내었으며 각 샘플

당 2개의 slide를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 임파구에서 DNA 손상정도를 측정함

(7) 동물의 DNA 손상정도는 약 8 주에서 가장 높았으며, 실험진행기간 내내 정상대조군에 비해서는 높은 DNA 손상정도를 보였음 (그림 2-6-3)

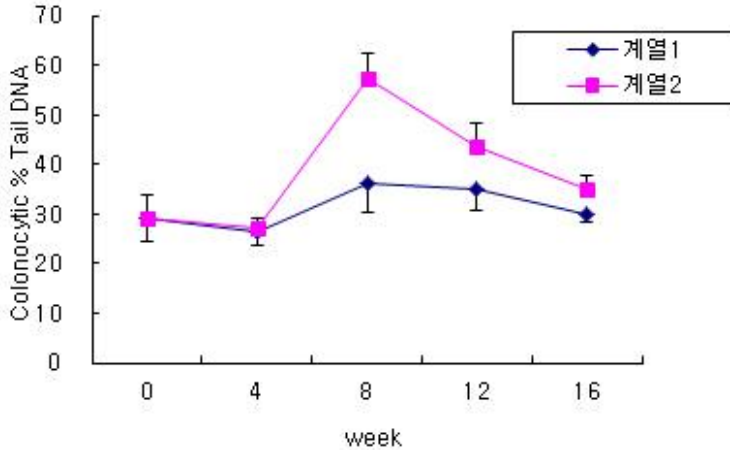


그림 2-6-3. Colonocyte의 % tail DNA (계열 1: 정상대조군, 계열 2: 대장암유도군)

2. 동물실험을 통한 항암 효과 확인

가. 연구개발 목표

(1) 연구개발 목표

암유발 쥐에서의 쑥, 상황버섯 추출물 공급시의 항암효과 확인

(2) 연구개발 결과

(가) 대암 동물모델을 이용한 쑥, 갯잎, 상황버섯의 대장암 억제 효능 분석

① 동물 사육 및 식이

○ 4주령의 SD계 수컷 흰쥐 60마리를 라온바이오(주)로부터 구입하여 1주일간 lab-chaw 식이(Harlan 2018S Rodent)를 제공하면서 적응 기간을 거침

○ 1주간의 적응 후, 체중에 따라 난괴법에 의하여 총 6군으로 나눔. 실험군은 1차년도 확립된 동물실험 모델을 이용하여 정상대조군(NC), 대장암 유발군(DMH), 대장암 유발 + 갯잎 섭취군(DMH+PF), 대장암 유발 + 쑥 섭취군(DMH+AP), 대장암 유발 + 상황버섯 섭취군(DMH+PL), 대장암 유발 + 복합물 섭취군(DMH+C)으로 나누었음

○ 대장암 유발은 대퇴부에 dimethyl-hydrazine(DMH) 40 mg/kg을 주 2회씩 2주간 (총 160 mg/kg BW) 주사함. 정상대조군은 동량의 식염수를 주사하였음

- 실험동물은 AIN-93을 기본으로 한 대장암을 유발하기 쉬운 고지방-저섬유소 식이를 8주간 공급하였고 (Table 1), 깻잎, 썬, 상황버섯 투여군은 각각 300 mg/kg BW, 복합물 투여군은 깻잎, 썬, 상황버섯을 100 mg씩 동량으로 혼합한 후 300 mg/kg BW을 제공하였음
- 실험동물은 동물실험실에서 개개의 케이지에서 사육하였고, 증류수는 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 사육기간 동안 사육실의 온도는 20℃, 습도는 55%를 유지하였고, 명암은 12시간(07:00 ~ 19:00)을 주기로 자동 조절하였음(표 2-6-1)
- 식이섭취량은 매일 기록하였고, 매 7일마다 체중을 측정하였음.

표 2-6-1. 고지방 저섬유소 식이 조성 및 실험 동물

Ingradients	%
casein	23.2
corn starch	12
sucrose	34.1
corn oil	23
cellulose	2
vitamin mix	1.2
mineral mix	4
choline bitartrate	0.2
DL-methionine	0.3
BHT	0.001
Total	100.00



② 체중증가량, 식이섭취량, 식이섭취효율

㉑ 모든 그룹에서 식이급여에 따라 체중이 증가하였으며, 최종 체중은 그룹간의 유의적 차이가 없었음 (그림 2-6-4)

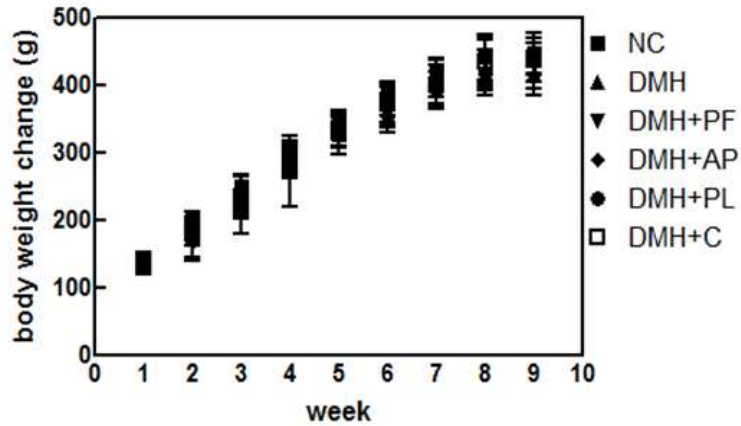


그림 2-6-4. 주별 체중 변화 비교

㉒ 체중증가량과 식이섭취량은 정상대조군(NC)보다 대장암유발군(DMH)에서 다소 감소하는 경향을 나타내었으나, 식이섭취효율은 그룹간의 유의적인 차이가 나타나지 않았음 (표 2-6-2)

표 2-6-2. 최종 체중, 체중증가량, 식이섭취량 및 식이섭취효율 비교

	NC	DMH	DMH+PF	DMH+AP	DMH+PL	DMH+C
Final weight (g)	460.1±24.0 ^{ns}	438.5±23.8	457.8±40.4	436.8±28.8	446.8±39.9	448.3±36.3
Weight gain (g)	336.3±29.5 ^b	300.8±22.4 ^{ab}	322.1±38.8 ^{ab}	301.2±30.1 ^a	311.1±39.4 ^{ab}	312.7±36.0 ^{ab}
Food intake (g/d)	16.9±1.0 ^b	15.4±1.4 ^a	16.2±1.1 ^{ab}	15.0±0.9 ^a	15.5±1.5 ^a	15.5±1.3 ^a
FER (%)	31.2±2.4 ^{ns}	30.8±2.3	31.0±2.5	31.3±2.3	31.4±2.3	31.6±2.3

③ 장기무게

㉑ 장기무게는 정상대조군(NC)보다 대장암유발군(DMH)에서 간과 비장의 무게가 다소 증가하였으나, 통계적 유의성은 나타나지 않았으며, 깻잎, 쑥, 상황버섯 및 복합물 섭취에 의한 효과는 없었음. 또한 심장과 신장의 무게는 그룹간의 유의적인 차이가 없었음 (표 2-6-3)

표 2-6-3. 각 그룹별 장기 무게 비교

(g/100g bw)

	NC	DMH	DMH+ PF	DMH+ AP	DMH+ PL	DMH+ C
Liver	3.28±0.27 ^{bc}	3.36±0.31 ^c	3.14±0.15 ^{abc}	3.20±0.17 ^{bc}	3.11±0.24 ^{ab}	2.97±0.18 ^a
Heart	0.29±0.03 ^{ns}	0.30±0.02	0.30±0.02	0.29±0.02	0.30±0.02	0.30±0.02
Kidney	0.70±0.09 ^{ns}	0.66±0.09	0.71±0.07	0.73±0.05	0.69±0.05	0.67±0.07
Spleen	0.17±0.02 ^{ab}	0.19±0.03 ^b	0.18±0.02 ^{ab}	0.17±0.02 ^a	0.18±0.02 ^{ab}	0.18±0.03 ^{ab}

④ 대장암병변 측정지표(Aberrant Crypt Foci (ACF) 및 Aberrant Crypt (AC))

○ 대장은 맹장에서 직장까지 잘라내어 생리식염수로 세척한 후, 직장부위에서 위쪽으로 5cm 길이를 분리하여 대장내막이 위로 향하도록 놓고 얇게 펼치고, 10% buffered formalin으로 최소 4시간 이상 고정시킨 후, 0.2% methylene blue로 염색하여 관찰하였음

○ ACF와 AC는 광학현미경 (×40)으로 관찰하여 그 수를 측정하였음

○ 대장점막 표면에 형성되는 대장 이상선와소(ACF)는 대장암화과정의 초기단계에 관찰하는 지표로써 하나의 대장 이상선와소(ACF)는 수개~수십 개의 crypt(AC)를 포함하고 있음. 그림 2-6-5 (A)은 그룹별 ACF와 AC의 수를 나타내었음. 대장암유발군(DMH)은 정상대조군(NC)보다 유의적으로 ACF와 AC의 수가 증가하였으며, 깻잎(DMH+PF), 쭈(DMH+AP), 상황버섯(DMH+PL) 및 복합물(DMH+C) 섭취군은 대장암유발군(DMH)보다 유의적으로 ACF와 AC의 수가 감소하였음(ACF: 42-54% 감소, AC: 46-55% 감소, P<0.05). 따라서, 깻잎, 쭈, 상황버섯 및 복합물의 대장암병변 유발 억제효과를 확인하였음

○ 이러한 효과는 그림 2-6-5 (B)의 AC의 수에 따른 ACF를 산출결과에서도 확인하였음. 대장암유발군(DMH)과 비교한 깻잎, 쭈, 상황버섯 및 복합물 섭취에 의한 대장암병변 감소 효과는 ACF가 AC 1~3 ($\Sigma \leq 3AC$)에서 37-52% 유의적으로 감소, AC 4이상($\Sigma \geq 4AC$)에서 68-76% 유의적으로 감소하는 것으로 나타났음 (그림 2-6-5)

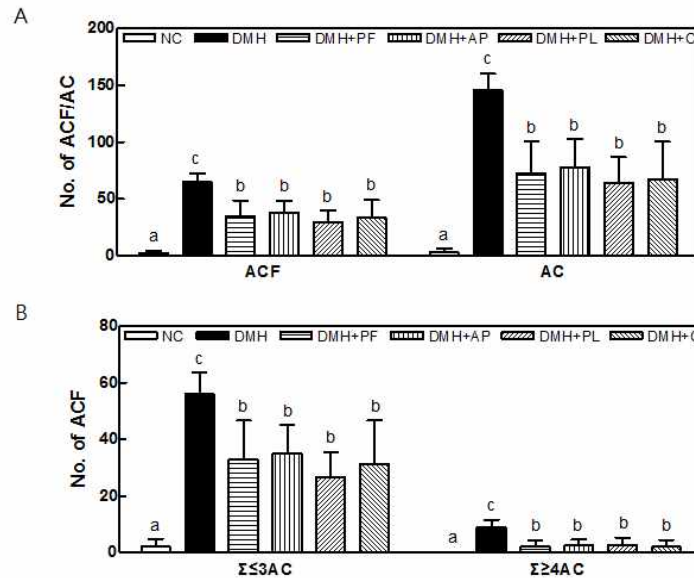


그림 2-6-5. 대장 점막 내 aberrant crypt foci (ACF)와 aberrant Crypt(AC) 수 비교

⑤ 간 기능 지표

○ 혈장내 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase) 는 생화학 적 분석 kit(JW Pharmaceutical, Korea)를 사용하여 기질과 효소반응을 이용한 비색법으 로 측정하였음

○ 혈장 AST는 그룹 간의 유의적인 차이가 나타나지 않았음

○ 대장암유발군(DMH)은 정상대조군(NC) 보다 혈장 ALT가 증가하였으며, 이는 표 2-6-3 에서 나타난 DMH로 유발된 대장암병변이 간 무게를 증가시킨 결과와 유사한 결과임

○ 껌(DMH+PF), 쑥(DMH+AP), 상황버섯(DMH+PL) 및 복합물(DMH+C) 섭취군은 대장 암유발군(DMH) 보다 혈장 ALT가 유의적으로 감소하였으며, 이를 통해 껌, 쑥, 상황버섯 및 복합물이 DMH로 유발된 간독성을 억제하는 효과를 확인하였음. 따라서, 껌, 쑥, 상황버섯 및 복합물 섭취는 대장암 모델에서 간 기능을 회복시키는 생리활성 물질 로서 작용할 수 있을 것으로 기대됨

7절. Base formula plus 제품 개발, 대량생산 기술 확보 및 임상연구

1. 연구 목표

○ 2차년도 임상연구 제품에 국내산 항암소재가 첨가된 Base formula plus을 개발, 대량생산 기술 확보 및 임상연구를 통한 유효성 검증

2. 향암 소재 선정

○ 자소엽, 썬, 상항버섯 추출물을 대장암 유발 물질을 적용한 마우스 5군에 적용하였으며, 동물실험에서 자소엽, 썬, 상항버섯 추출물간에 향암 효과는 유의하게 나타났으나, 소재 간의 유의적인 차이는 나타나지 않음. 따라서, 공정상의 수율, 일정한 품질관리, 제품 공급의 용이성, 상업화 시 경제성을 고려하였음. 원료 업체 검토 결과 국내산 자소엽은 물량이 일정하며, 국내외 공정서에 기원이 명확하여 일정한 품질 관리와 공급이 상대적으로 용이할 것으로 판단됨. 이에 따라 자소엽 단일 소재로 결정함

3. 향암 소재 대량 생산 및 표준화

○ 생산 업체와 협력을 통해 국내산 자소엽으로 향암 유효 성분 추출 방법 및 Lab scale 의 분석방법을 확인하여 대량 생산 및 표준화 작업 진행 (그림 2-7-1).

원뉴메드 귀중

업 체 명	다미에프엔에프		
제 품 명	자소엽추출물	유 형	규격 외 일반가공식품/기타가공품
< 제 조 방 법 >			
관 경 명	제 조 방 법		
일 고 · 보 관	원부재료의 외관상태 등을 확인하고 정상제품만 해당공고에 일고·보관한다.(또는 세척 및 이물질 등을 제거한 선별된 원료를 받는다.)		
1차 추출	상기 원료에 원료대비 20배수의 정제수를 가한 후 95±5℃로 3시간 이상 가온 가압 추출한다.		
2차 추출	상기 원료에 원료대비 20배수의 정제수를 가한 후 95±5℃로 3시간 이상 가온 가압 추출한다.		
여 과	상기 1차, 2차 추출액을 저장병크로 이송하면서 여과한다. (1차 200Mesh, 2차 100Mesh, 3차 25μ)		
농 속	상기 여과액을 연속식 농축기를 이용하여 55±5℃에서 감압 가온 농축하여 기동성 고형분 함량 50% 이상이 될 때까지 농축한다.		
살 균	상기 농축액을 90℃ 이상에서 10분 이상 가열 살균 처리 후 냉각한다.		
검 사 및 포 포	품질검사가 끝난 제품은 식물위생생기에 규격대로 포장한다.		
보 관 · 출 하	외포장된 원재물은 규정된 공고에 보관·출하한다.		

공 명	자소엽추출물	발 행 번 호	17-0123-02
제 조 일 자	2018년 01월 08일	시 험 일 자	2018년 01월 08일
성 상	말린액의 배상이며, 자소엽(차즈기) 특유의 맛과 향취		

검 사 항목 (Analysis Item)	상 분 규 격 (Standard of ingredient)	검 사 결 과 (Analysis Result)	판 정 (Judgement)
성 상	고유미 선택과 향미를 카제고 이비·이취가 없어야 한다.	적 합 (관동검사)	적 합
BRIX (가용성 고형분)	50 BRIX 이상	50.6 BRIX (디지탈당도계측법)	적 합
고형분	40 % 이상 (저사규격)	44.2 % (수분속질기 측정)	적 합
이 품	자사규격	불검출 (100마이크론체)	적 합
대장균균	음식	음식	적 합
검사결과	적 합		

다 미 에 프 엔 에

본사 및 공장 : 경기도 안성시 보개면 안성로 11-6

TEL : (031) 676-7211

FAX : (031) 676-7213

그림 2-7-1. 자소엽 추출물 제조 공정도 및 성분 규격

4. 임상 시험용 제품의 clinical formula 구축

○ 임상 시험용 제품의 formula 구축을 위해 2차년도 동물실험에서 선정된 향암 소재의 인체 적용 용량에 대해 검토하였음

○ Food and Drug Administration (FDA)는 동물 실험에서 사용된 용량을 인체에 정확히 적용하기 위해 mg/m² 단위의 body surface area(BSA)를 활용함. Human equivalent dose(HDE)는 해당 식에 따라 더 적합하게 계산되어짐

Formula for Dose Translation Based on BSA	
$HED (mg/kg) = \text{Animal dose (mg/kg)} \text{ multiplied by}$	$\frac{\text{Animal } K_m}{\text{Human } K_m}$

- BSA로 체중(kg)을 나눈 K_m factor는 실험에서 사용된 mg/kg 용량을 mg/m^2 으로 변환시 사용됨. K_m 지수는 인체, 원숭이, 개, 토끼, 기니피크, 마우스 등 평균 BSA 계산에 기반하고 있음 (표 2-7-1)

표 2-7-1. Conversion of animal doses to HED based on BSA

Species	Weight (kg)	BSA (m ²)	K_m factor
Human			
Adult	60	1.6	37
Child	20	0.8	25
Baboon	12	0.6	20
Dog	10	0.5	20
Monkey	3	0.24	12
Rabbit	1.8	0.15	12
Guinea pig	0.4	0.05	8
Rat	0.15	0.025	6
Hamster	0.08	0.02	5
Mouse	0.02	0.007	3

BSA (body surface area); HED(human equivalent dose)

- 위의 식에 따라 2차년도 수행한 동물 실험에서 사용된 300mg/kg를 인체 적용시 60kg 성인에 한해 3g/day로 환산됨. Lab scale 의 배합 테스트를 통해 물성의 안전성, 유화력과 환자의 영양 요구량, 질병 상태에 따라 clinical formula는 125ml 기준 4팩에 동물 실험을 통해 도출된 자소엽의 하루 용량을 섭취하도록 함. clinical formular 125ml당 자소엽 추출물은 고형분 함량 0.75g을 함유하였음
- Clinical formula 배합비 최종안 (표 2-7-2), 영양정보 (표 2-7-3)

표 2-7-2. 3차년도 케톤식 plus 배합비 최종 안

원부자재명	배합비율
카제인나트륨	
분리대두단백	
L-아르기닌	
고올레익해바라기유	
카놀라유	
MCT유	
유화제	
말토덱스트린	
대두화이버	
정백당	
난소화성말토덱스트린	
구연산삼나트륨	
제2인산칼슘	
제3인산칼슘	
구연산칼륨	
염화마그네슘	
황산제1철	
염화칼륨	
제2인산칼륨	
수크랄로스	
혼합비타민	
타우린합성	
L-카르니틴	
염화콜린	
바닐라향	
로스트라이스향	
자소엽 추출물	
정제수	

표 2-7-3. Base formula plus 영양 정보 (125ml/pack)

Nutrient	Content	Nutrient	Content	Nutrient	Content
Calorie(kcal)	150				
Protein(g)	6	Mg(mg)	45	Vit C(mg)	20
Fat(g)	13.3	Zn(mg)	2	Vit D(μ g)	2
Carbohydrate(g)	1.7	Cu(mg)	0.13	Vit E(mg α -TE)	2
Fiber(g)	0.5	Mn(mg)	0.6	Vit K1(μ g)	1
Ca(mg)	120	L-Carnitine	15	Pantothenic acid(mg)	1
P(mg)	110	Vit A(μ gRE)	140	Niacin(mgNE)	3
Na(mg)	140	Vit B ₁ (mg)	0.3	Folic acid(μ g)	80
Fe(mg)	1.7	Vit B ₂ (mg)	0.3	Biotin(μ g)	6.5
K(mg)	260	Vit B ₆ (mg)	0.3	β -carotene(μ g)	100
I(μ g)	25	Vit B ₁₂ (μ g)	0.5	L-arginine(mg)	300

5. 3차년도 임상연구 수행 제품 개발

- 대량 생산에 적합한 제조공정도 및 제품 규격 작성하여 시험생산 진행하였음. 또한 제품의 영양정보 확인을 위한 영양정보 분석 진행. 임상 연구 시 정확한 영양정보 제공 및 시장 진출 시 영양정보 기초 자료 확보를 위하여 표기하고자 하는 전 영양성분의 분석을 진행하였음. 이에 환자용 식품 법규와 동일한 기준을 적용하였으며 분석 결과 전 영양성분 적합한 것으로 판단됨

6. 관능 및 보존검사 수행

- 3차년도 임상 연구 제품은 내부 관능조사를 수행하였음. 20에서 30대의 건강한 여성 47명을 대상으로 수행하였으며 향미의 기호와 강도, 단맛의 기호와 강도, 텍스처의 기호와 강도, 종합기호에 대한 설문을 수행하였음



문서번호 : D180920-006

관능조사 결과 보고서

검사제목 : 자소엽 추출물 첨가 액상 케톤식 (농기평 과제 관련) 개발 결과 보고 목적의 시제품 관능평가 결과

조사목적 : 기타	담당자 : 김진민
조사방법 : 선호도, 특성 조사	검사시료 : 케토웰 자소엽 (시제품) 외 0 품목
패널유형 : MIC 소비자패널_주부패널	검사일시 : 2018.09.04~2018.09.05

그림 2-7-2. 케토웰 플러스 관능조사 결과 보고서

- 수행 결과 단맛의 강도에 대해서 낮은 점수를 받았으나, 단맛의 기호에 대해서는 높은 점수를 받음. 특히 텍스처의 기호와 강도를 살펴보았을 때 목넘김의 농도, 부드러움의 기호와 강도에서 높은 점수를 부여받음. 종합적으로 관능 결과를 살펴보았을 때, 종합 기호도는 타 기호식품(과일 주스, 가공유 등)에 비해 낮으나 저감미와 부드러운 관능에 있어 기호식품 수준의 높은 점수를 부여받음으로써 섭취 시 환자들의 순응도에 긍정적인 영향을 주는 것으로 판단됨

7. 임상연구 진행

가. 임상연구명

- 췌담도암 수술 환자에서 플러스 영양보충음료(Plus ONS)의 임상적 유효성 검증 연구

나. 연구의 목적

- (1) 개발한 영양보충음료를 제공함으로써 췌담도암 수술 환자의 경구 섭취량 증가에 기여할 수 있는지 분석함
- (2) 개발한 영양보충음료를 제공함으로써 췌담도암 수술 환자들의 영양상태, 체성분, 생화학적 검사 결과 및 면역 기능 개선에 기여할 수 있는지 분석함

(3) 개발한 영양보충음료의 순응도 및 만족도를 평가함

(4) 대사체학 기법을 이용한 base formula plus 섭취에 따른 혈청 케톤체와 대사체를 분석함

다. 연구 대상 및 방법

(1) 연구기간 및 대상자

본 연구는 세브란스병원 연구심의위원회(Institutional Review Board, IRB)의 승인을 받았음
2018년 4월부터 2018년 12월까지 세브란스 병원에 입원한 만 19세 이상의 성인 환자 중
췌담도 계통의 암(췌장암, 십이지장암, 원위부 담도암, 바터씨 췌대부암)으로 췌십이지장절제
술 혹은 원위부 췌장절제술 예정인 환자를 대상으로 하였다. 당뇨 합병증을 동반한 중증 당
뇨환자, 심혈관계 합병증을 동반한 고지혈증 환자, 신장 기능 저하 환자 (정상 GFR 범위의
70% 이하), 수술 전 현격한 영양 불균형 상태로 평가된 환자 (PG-SGA grade C), 연구 참여
를 거부한 환자, 취약한 피험자(의사결정 능력이 결여된 자, 임산부, 미성년자 등), 동의서를
읽을 수 없는 문맹 혹은 외국인은 대상자에서 제외하였음

해당 연구의 목적과 방법을 설명한 후 자발적으로 동의한 31명의 환자를 대상자로 등록했
고 연구 참여에 대한 동의 철회와 개발한 영양보충음료 섭취의 어려움으로 중도 탈락한 3
명을 제외한 28명을 자료 분석에 포함하였음 (그림 2-7-3)

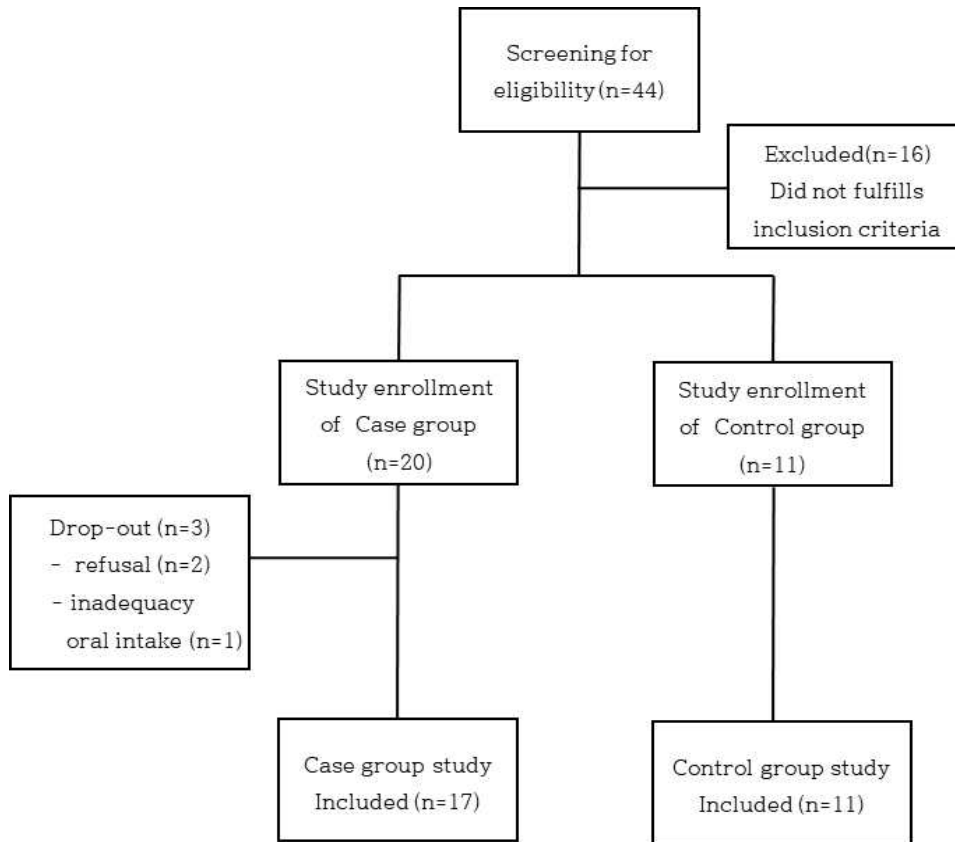


그림 2-7-3. Flow chart of patient enrollment

(2) 연구방법

본 연구는 전향적 환자-대조군 연구(prospective case control study)이며, 연구 참여에 동의한 환자들을 개발된 영양보충음료를 섭취하는 실험군과 대조군으로 순차적으로 배정하였음

연구자는 수술 전날 연구대상자들의 영양상태 평가를 위해 신체계측, 24시간 회상법을 통한 평소 식습관 조사, PG-SGA, 생체전기저항분석법을 이용한 인바디 체성분 분석을 시행했고, 고지방식 섭취로 인한 혈중 지질농도 변화, 염증성 반응 개선에 대한 효과 평가를 위해 트랜스페린, 프리알부민, C-반응성단백질, NK cell activity 검사 결과를 확인했다. 또한 전자 의무기록을 통하여 질병력, 약물 복용 여부 등의 정보를 확인하였음

수술 후 식사는 두 군 모두 세브란스병원 간담췌외과의 수술 종류에 따른 식사 처방 프로토콜에 따라 제공했으며, 실험군에게는 유동식을 섭취하는 날부터 퇴원 후 처음 외래를 방문할 때까지 개발한 영양보충음료를 하루 3팩씩 섭취하도록 했다. 유문부 보존 췌두십이지장 절제술(pylorus preserving pancreatoduodenectomy, PPPD)을 시행한 경우 수술 후 4일째까지 당질보충음료(뉴케어 노엔피오®, 대상 웰라이프)를 하루 3캔(200ml/캔) 제공하고, 수술 후 5일째 조식은 일반유동식, 중식부터 일반식 연식을 제공하였다. 원위부췌장절제술 (Distal pancreatectomy, DP)을 시행한 경우 수술 후 1일째 중식부터 일반식 연식을 제공하였다. 제

공된 식사의 영양소 기준량은 표 2-7-4와 같음

퇴원 전일과 첫 외래 방문 시에 신세계측, PG-SGA, 생체전기저항분석법을 이용한 체성분 분석, 생화학 검사, NK cell activity 등 수술 전날과 동일한 지표를 재평가하였다. 퇴원 후 식사 섭취량 평가는 환자가 작성해온 식사일기를 토대로 진행하였다. 1주일의 3일(평일 2일, 주말 1일)씩 섭취한 음식명·식재료·분량·끼니·시간·장소 등을 자세하게 기록하도록 하였음

표 2-7-4. Nutrient compositions of hospital diet

	Energy(kcal)	Glucose(g)	Protein(g)	Fat(g)	C:P:F ratio (%)
CLD (NO-NPO)	300	25	0	0	100:0:0
FLD	1200	190	45	30	55-65:7-20:15-30
SD	1700	230	65	45	55-65:7-20:15-30

(CLD; Clear Liquid Diet, NO-NPO; Carbohydrate supplement liquid product, Daesang Wellife(Co), FLD; Full Liquid Diet, SD; Soft diet, C:P:F ratio; Carbohydrate:Protein:Fat ratio)

(3) 자료 수집

(가) 일반사항

전자 의무기록을 통해 대상자의 성별, 연령, 진단명, 수술명, 과거력 등의 일반적인 특성을 수집하였고, 수술 후 정맥영양 제제 및 공급량, 재원기간, 수술 후 합병증 발생 여부 등의 정보를 수집하였음

(나) 섭취량 평가

식품군별 영양소 섭취량은 훈련된 영양사가 24시간 회상법을 이용하여 조사하였다. 수술 후 식사 섭취량 조사는 식사섭취조사지를 제공하여 대상자 또는 대상자의 보호자가 매일 기록하고, 병원식 이외에 추가로 섭취한 식품의 종류와 양도 기록하도록 교육하였다. 플러스 영양보충음료(ONS)를 섭취하는 실험군에게는 영양보충음료 섭취량과 관련해서 불편함이 있는 지를 추가로 기록하도록 하고, 면담 시마다 그 내용을 확인했다. 첫 외래 방문 시까지 섭취가 유지될 수 있도록 섭취해야 할 개수만큼 자택으로 배송하였음

대상자의 1일 식품 및 영양소 섭취량은 세브란스병원 급식지침서의 표준 레시피를 근거로 하여 CAN-pro 4.0(Computer Aided Nutritional Analysis Program for Professionals, 한국영양학회)을 이용하여 각 메뉴별 1회제공량의 식품 및 영양소 분석을 한 후, 대상자의 섭취율(%)을 반영하여 산출하였음

퇴원 후 첫 외래 방문 시까지의 식품 및 영양소 섭취량은 대상자가 작성해온 식사일기와 영양보충음료 섭취조사지를 통해 조사하였다. 이에 따른 식품 및 영양소 섭취량 분석은 CAN pro 4.0을 이용하여 열량 및 3대 영양소(탄수화물, 단백질, 지방) 섭취량으로 산출하였

음

섭취량에 대한 평가는 환자별 에너지와 단백질 섭취 권장량에 대한 실제 에너지 및 단백질 섭취량 비율(%)을 평가하였다. 개인별 에너지 섭취 권장량은 Mifflin-St. Jeor equation을 이용한 안정 시 에너지소비량(resting energy expenditure, REE) 값에 활동계수 25%를 곱한 값으로 산출하였고, 단백질 요구량(g/d)은 체중 1kg당 1g으로 산출하였음

(다) 플러스 영양보충음료(ONS)에 대한 만족도 조사

실험군이 개발한 영양보충음료를 섭취한지 3일째 되는 날과 첫 외래 방문일 2회 실시하였다. 설문지는 기존의 문헌을 바탕으로 음료의 양, 맛, 향, 목넘김, 소화 용이성, 연구 종료 후 지속섭취의향, 전체 만족도의 8가지 항목을 10점 척도로 구성했고, 대상자가 작성하도록 하였음

(라) PG-SGA 평가

영양상태 평가는 수술 전일, 퇴원 전일, 첫 외래 방문 시에 암환자의 영양상태 평가 방법으로 타당성이 입증된[24,25] PG-SGA(Patient-Generated Subjective Global Assessment)를 이용하였다. 이는 체중변화, 섭취량 및 음식 형태 변화, 섭취에 영향을 미치는 증상들, 활동 정도를 환자 스스로 기록한 후, 영양사가 질병, 대사적 스트레스 정도, 체지방 및 근육량을 평가하여 총점이 9점 이상이면 영양사의 집중적인 영양관리 및 중재가 필요한 것으로 판단하며, 전반적인 결과를 고려하여 A 영양상태 양호군, B 중등도 영양불량, C 심한 영양불량의 세 단계로 평가하였음

(마) 신체계측

수술 전일 환자와의 면담을 통해 평소 체중(수술 1개월 전 체중)을 확인하였고 수술 전일, 퇴원 전일, 첫 외래 방문 시에 신장과 체중을 측정하여 이를 바탕으로 체질량지수(Body Mass Index, BMI)를 계산하였음

(바) 체성분 분석

체성분 분석은 수술 전일, 퇴원 전일, 첫 외래 방문 시에 inbody S10 (Biospace, Seoul, Korea)을 이용하여 측정하였다. 체세포량 (body cell mass, BCM(kg)), 체지방량 (body fat mass, BFM(kg)), 골격근량 (skeleton muscle mass, SMM(skeletal muscle mass,kg), 위상각 (phase angle, PA) 값을 분석에 사용하였음

(사) 생화학적 검사

생화학적 검사는 수술 전일, 퇴원 전일, 첫 외래 방문 시의 검사결과를 전자의무기록을 통하여 수집하였다. 고지방 영양보충음료 섭취에 따른 혈중 지질 상태 및 체내 대사에 미치는

영향을 파악하기 위하여 혈청 총 콜레스테롤(cholesterol), 혈청 중성지방(triglyceride, TG), 혈청 고밀도콜레스테롤(High Density Lipo-protein cholesterol, HDL-C), 혈청 저밀도콜레스테롤(Low Density Lipoprotein cholesterol, LDL-C), 혈청 리포단백질(lipoprotein), 소변 내 케톤 검출 자료를 수집하였다. 더불어 염증 반응 중증도에 대한 지표인 혈청 트랜스페린(transferrin), C-반응성 단백질(C-reactive protein, CRP), 프리알부민(pre-albumin) 자료를 수집하였음

(아) NK cell activity

첨가된 자소엽 추출물에 의한 항암 면역 효과를 파악하고자 수술 전일, 퇴원 전일, 첫 외래 방문 시에 NK cell activity 검사를 시행하였음

(자) 대사체학 기법을 이용하여 암환자용 base formula plus 섭취군과 대조군의 혈청 케톤체와 대사체 분석을 시행함

(차) 통계 분석 방법

수집된 자료는 SAS software (version 9.4, SAS Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분석하였다. 대상자의 일반사항 중 연속형 변수는 평균과 표준편차로 표시했다. 군 별 비교는 student t-test를 활용하였고, 범주형 변수는 chi-square test로 비교하고, 빈도와 백분율로 표시하였음

또한 암 병기(Tumor-stage)와 소변 내 케톤체 검출 결과는 Fisher's exact test를 이용하여 비교하였다. 신체계측 변화, 체성분 변화, 경구 섭취량 변화, 생화학적 검사 변화 등의 각 여러 시점에 대한 각 군의 변화에 대해서는 Linear Mixed Model(LMM)를 이용하였다. 또한 각 시점에 대한 PG_SGA 점수와 grade에 대한 분석은 Generalized estimating equations(GEE)를 이용하였다. 모든 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였음

(4) 결과

(가) 일반사항

분석에 포함된 대상자 28명의 일반사항 및 특성은 표 2-7-5 에 제시하였다. 실험군은 17명 대조군은 11명이었으며 성별, 영양상태, 진단명, 암 병기(Tumor-stage), 수술 방법 및 종류, 재원기간, 에너지 및 단백질 요구량에는 두 군간에 유의적인 차이가 없었음

입원 전 1개월 간 5% 이상 체중 감소를 보인 환자의 비율은 두 군 간에 차이가 없었으나 (실험군 2명(11.8%), 대조군 3명(27.2%), 실제 체중 감소량은 실험군 $-0.25 \pm 3.0\text{kg}$ 과 대조군 $-4.4 \pm 6.4\text{kg}$ 으로 대조군의 체중 감소가 유의적으로 더 컸다($p=0.030$).

㉞ 2-7-5. Baseline characteristics of the subjects

Variables	Case (n=17)	Control (n=11)	p-value
Sex (M:F, n(%)) ^{2)}	12(70.6):5(29.4)	5(45.5):6(54.6)	0.184
Age (year) ^{1)}	59.0±11.2	64.6±6.8	0.167
BMI (kg/m ²) ^{1)}	24.6±4.1	23.5±1.7	0.408
Wt loss by 1 month(kg) ^{1)}	-0.25±3.0	-4.4±6.4	0.030
Wt loss by 1 month, n(%) ^{2)}			0.507
> 5%	2(11.8)	3(27.2%)	
≤ 5%	15(87.2)	8(72.8)	
PG-SGA score ^{1)}	2.6±0.5	3.5±0.7	0.320
PG-SGA grade, n(%) ^{2)}			0.543
A	16(94.1)	9(81.8)	
B	1(5.9)	2(18.2)	
C	0(0.0)	0(0.0)	
Diagnosis, n(%) ^{2)}			0.392
Pancreatic cyst	5(29.5)	0(0)	
Pancreatic mass(cancer)	4(23.5)	4(36.4)	
Ampulla of Vater cancer	6(35.3)	2(18.2)	
Common bile duct cancer	2(11.8)	3(27.3)	
Klatskin tumor	0(0)	1(9.1)	
Periampullary cancer	0(0)	1(9.1)	
Tumor-stage (%) ^{3)}			0.459
1	2(16.7)	2(18.2)	
2	1(8.3)	3(27.3)	
3	9(75.0)	6(54.6)	
Operation Name, n(%) ^{2)}			
DP	3(35.3)	2(18.2)	
PPPD	14(82.3)	9(81.8)	
Operation type, n(%) ^{2)}			0.954
Open surgery	6(22.2)	4(36.4)	
Laparoscopic surgery	11(64.7)	7(63.6)	
LOS (day) ^{1)}	15.9±6.9	14.5±3.9	0.539
Energy requirement (kcal/d) ^{1)}	1729.4±244.3	1507.3±232.2	0.849
Protein requirement (g/d) ^{1)}	68.2±12.6	60.8±6.4	0.237

^{1)} p-value by t-test between Control and Case group.

^{2)} p-value by chi-square test between Control and Case group.

^{3)} p-value by Fisher' s exact test between Control and Case group.

(2) 두 군 간의 에너지와 단백질 섭취율 비교

수술 후 10일 동안 두 군 간의 일별 에너지와 단백질 섭취 권장량에 대한 섭취율을 비교하였다. 수술 후 재원기간 10일 동안의 일별 에너지 섭취율을 비교하였을 때, 수술 후 7일째 실험군의 에너지 섭취율이 57.6%, 대조군의 에너지 섭취율이 35.6%로 실험군의 에너지 섭취

율이 유의적으로 높았다(p=0.017). 이후 10일째까지 실험군의 에너지 섭취율이 대조군의 에너지 섭취율에 비하여 유의적으로 높게 유지되었음

수술 후 재원기간 10일 동안의 일별 단백질 섭취율을 비교하였을 때, 수술 후 7일째 실험군의 단백질 섭취율이 50.9%, 대조군의 단백질 섭취율이 24.4%로 실험군의 단백질 섭취율이 유의적으로 높았다(p=0.026). 이후 9일째까지 실험군의 단백질 섭취율이 대조군의 단백질 섭취율에 비하여 유의적으로 높았음

표 2-7-6. Comparison of daily energy intake rates(%) between the case group and the control group during the first postoperative 10 days

		Case ¹⁾	Control	p-value ²⁾
POD	1	9.6±5.6	10.6±7.0	0.907
	2	15.5±5.6	17.4±7.0	0.838
	3	22.4±5.6	29.7±7.0	0.416
	4	21.5±5.6	24.3±7.0	0.76
	5	57.0±5.6	43.3±7.0	0.126
	6	50.9±5.6	33.7±7.2	0.060
	7	57.6±5.7	35.6±7.2	0.017*
	8	68.2±6.0	38.3±7.2	0.002*
	9	60.0±6.0	40.5±7.5	0.043*
	10	69.8±6.3	49.4±7.7	0.043*

¹⁾ Values are presented as means±se by Linear mixed model.

²⁾ *, Significantly different between 2 groups by Bonferroni correction for multiple test at P<0.05. (POD: Postoperative Day)

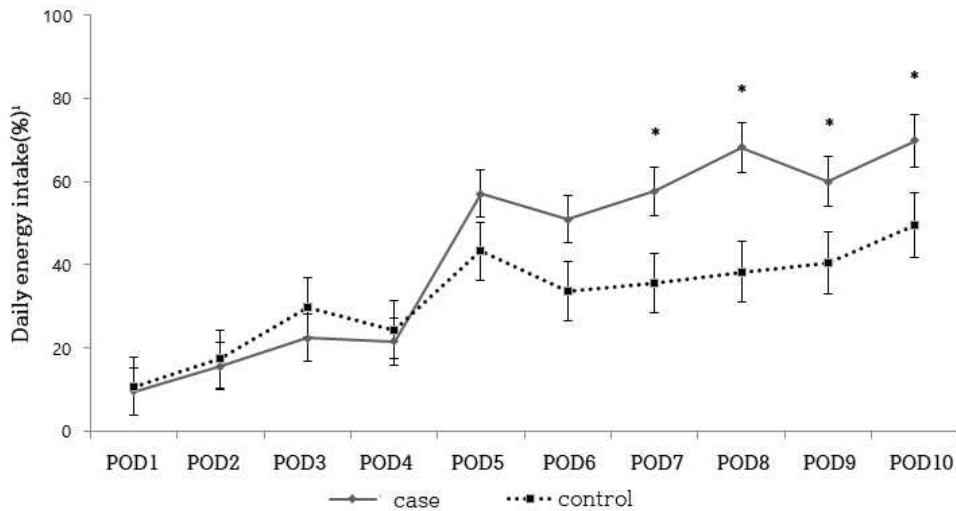


그림 2-7-4. Daily energy intake rate (%) from diet during the first postoperative 10 days

¹⁾ Daily energy intake rate(%)=(daily energy intake)/(daily energy requirements)*100(%)

* Significantly different between 2 groups by Bonferroni correction for multiple test at P<0.05 (POD: Postoperative Day)

표 2-7-7. Comparison of daily protein intake rates between the case group and the control group during the first postoperative 10 days

POD	Case ¹⁾	Control	p-value ²⁾
1	1.6±5.4	0.6±6.7	0.895
2	3.0±5.4	4.0±6.7	0.870
3	9.6±5.4	12.7±6.7	0.517
4	9.1±5.4	8.7±6.7	0.870
5	43.0±5.4	28.5±6.7	0.330
6	39.3±5.4	24.2±7.0	0.256
7	50.9±5.5	24.4±7.0	0.026*
8	57.2±5.8	31.6±7.0	0.035*
9	50.4±5.8	25.1±7.2	0.048*
10	59.3±6.1	36.0±7.5	0.083

¹⁾ Values are presented as means±se by Linear mixed model.

²⁾ *, Significantly different between 2 groups by Bonferroni correction for multiple test at P<0.05. (POD: Postoperative Day)

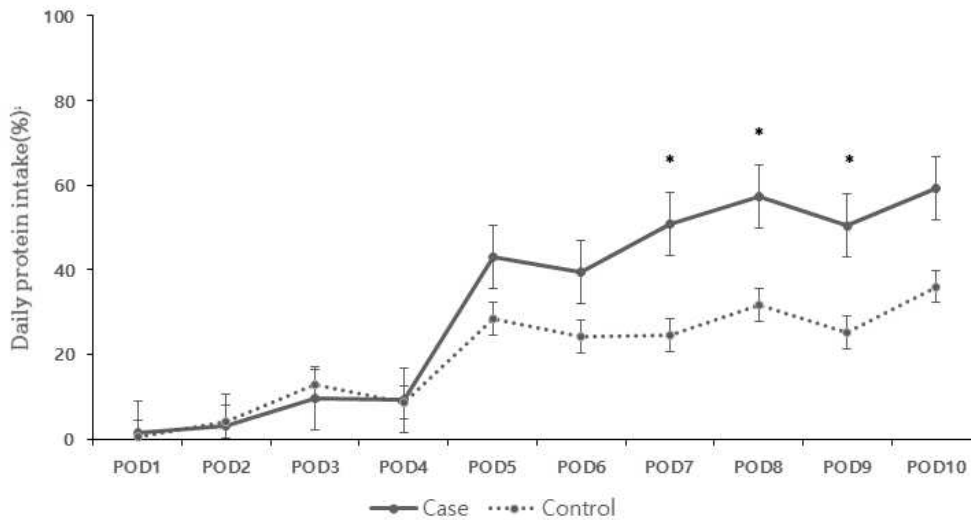


그림 2-7-5. Daily protein intake rate (%) from diet during the first postoperative 10 days

¹⁾ Daily protein intake rate(%)=(daily protein intake)/(daily protein requirements)*100(%)

* Significantly different between 2 groups by Bonferroni correction for multiple test at P<0.05 (POD: Postoperative Day)

두 군의 연식 섭취 3일째, 퇴원 전일, 첫 외래 방문 시 에너지 및 단백질 요구량에 대한 섭취율을 비교하였음

연식 섭취 3일째, 퇴원 전일의 요구량에 대한 에너지 섭취율은 실험군이 61%, 대조군이 40%로 실험군에서 높은 경향을 보였으나, 통계적으로 유의적인 차이는 아니었다.(p=0.059) 단백질 요구량에 대한 섭취율도 실험군이 74%, 대조군이 50%로 실험군에서 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 아니었다.(p=0.142) 또한 퇴원 전일 에너지 요구량 대비 섭취율은 실험군이 75%, 대조군이 61%였고, 단백질 요구량 대비 섭취율은 실험군이 96%, 대조군이 85%로 유의적인 차이는 없었다. 퇴원 후 첫 외래 방문 시의 에너지와 단백질 요구량에 대한 섭취량의 비율은 두 군 간의 차이가 없었음

표 2-7-8. Comparison of dietary intake rates(%) during study period

Variables		Case	Control	p-value
Energy intake rates(%) ²⁾	SD#3	60.6±6.6 ¹⁾	40.2±8.2	0.059
	DC	74.7±6.6	61.3±8.2	0.209
	1 st OPD	81.6±6.6	80.3±8.2	0.901
Protein intake rates(%) ³⁾	SD#3	74.0±10.1	49.9±12.6	0.142
	DC	96.4±10.1	84.6±12.6	0.469
	1 st OPD	94.9±10.1	96.2±12.6	0.929

- ¹) Values are presented as means±se by Linear mixed model.
- ²) Total energy intake(kcal/d)/Energy requirements(kcal/d)*100(%); values of energy requirements are calculated by Mifflin-St, Jeor equation with body weight before surgery
- ³) Total protein intake(g/d)/Protein requirements(g/d)*100(%); Value of protein requirements are calculated 1g/kg of body weight before surgery
- * Significantly different between 2 groups by Bonferroni correction for multiple test at P<0.05 (SD#3; 3rd day of soft diet intake, DC; discharge, 1st OPD; first outpatient visit)

(3) 실험군의 영양보충음료 순응도 및 만족도 조사

실험군은 제공받은 플러스 영양보충음료 중 평균 66.1%를 섭취하였고, 이는 평균 2팩에 해당하는 양이었음

영양보충음료의 만족도를 평가하기 위하여 경구 식사 및 영양보충음료를 섭취한지 3일째와 첫 외래 방문 시에 실험군에게 영양보충음료 만족도 조사지를 작성하도록 했다. 만족도 조사지는 총 8개의 항목으로 10점 척도로 평가를 진행하였고, 그 결과는 그림 2-7-6에 제시하였음

조사결과 기호성(palatability), 섭취량(amount)에 대한 만족도가 가장 높았으며 전반적인 만족도가 7.9점으로 비교적 높게 나타났음

그 외 대상자들의 플러스 영양보충음료에 대해 상태 악화로 식사 섭취량이 적을 때 간식으로 섭취하니 든든하다는 의견이 있었고, 수술 후 식사와 병행하기에 부담스럽다는 의견도 있었다. 외래 방문 시의 만족도 조사의 기타 의견으로는 지속적으로 섭취하니 고소하고 담백하며 든든함이 오래 유지되고, 이로 인하여 체중 감소가 적었던 것 같다. 기존의 영양보충음료에 비하여 용량이 적어 섭취하기 부담스럽지 않아서 동일한 제품이 출시된다면 계속 섭취하겠다는 의견이 있었음

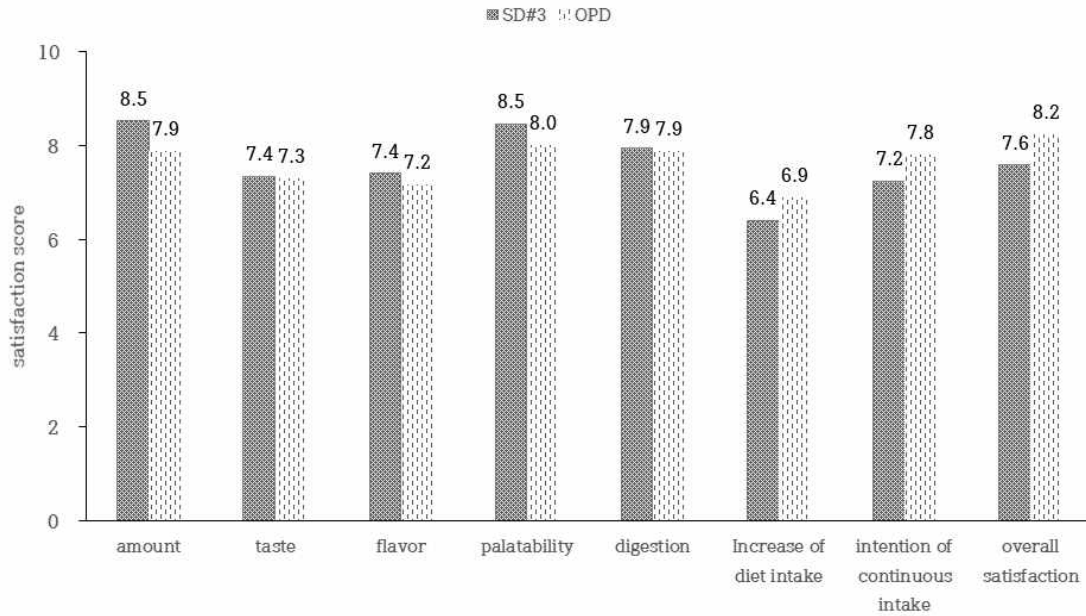


그림 2-7-6. Plus ONS satisfaction scores at the 3rd day of soft diet and the 1st OPD (SD#3; The 3rd day of soft diet, 1st OPD; The first outpatient visit)

(4) 영양상태 평가

두 군의 시점(수술 전일, 퇴원 전일, 첫 외래 방문 시)별 PG_SGA 점수와 영양 상태 평가 결과는 그림 2-7-7과 같음

두 군 모두 수술 전에 비해 퇴원 전 그리고 첫 외래 방문 시에 영양불량(PG_SGA grade B)의 비율이 증가했으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다,(실험군 6%, 23%, 23%, 대조군 18%, 40%, 27%) 두 군의 시점(수술 전일, 퇴원 전일, 첫 외래 방문 시)별 PG-SGA 점수는 그림 2-7-8 과 같다. 수술 전일에 비해 퇴원 시점의 PG-SGA 점수는 두 군 모두 증가하였으나, 점수의 증가량은 두 군 간에 유의적인 차이가 없었음

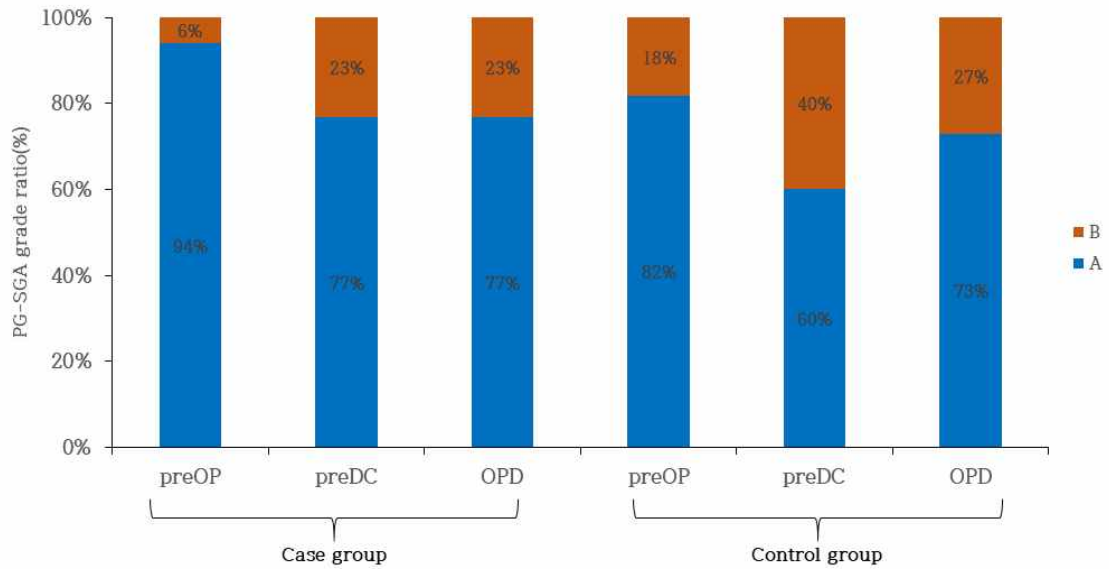


그림 2-7-7. Comparison of PG-SGA grade rates between the case and the control group

* Analysis using by generalized estimating equations(GEE) between 2 groups.

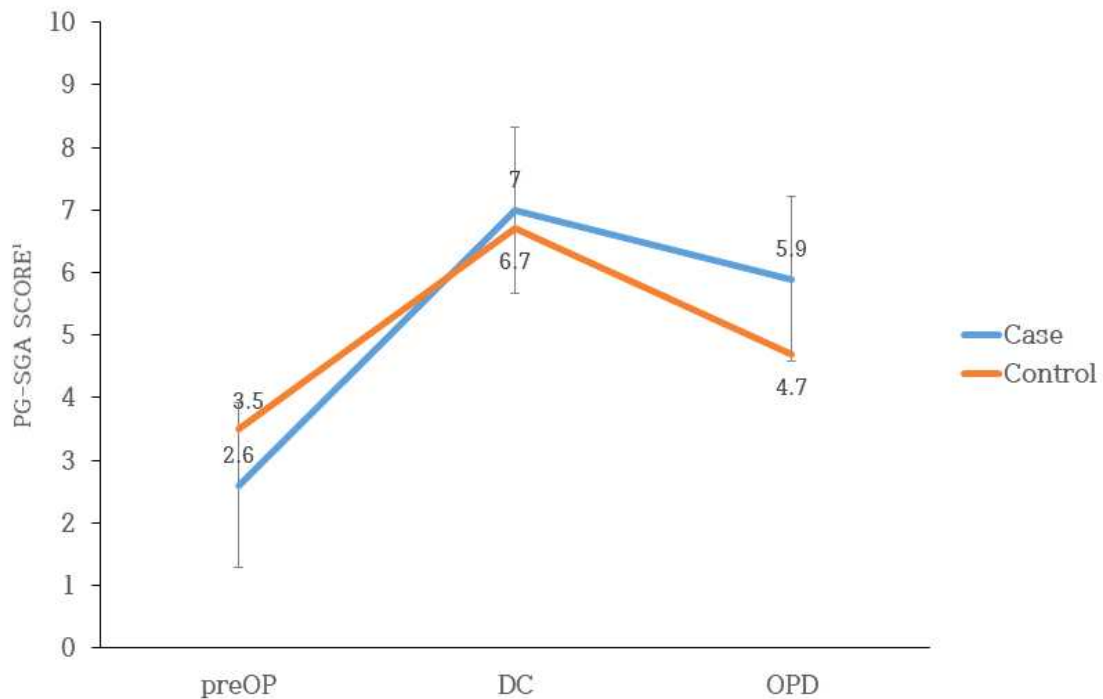


그림 2-7-8. Comparison of PG-SGA scores between the case and control group

¹) Least square mean ± se.

* Analysis using by generalized estimating equations(GEE) between 2 groups.

(5) 체성분 분석

두 군의 수술 전일과 퇴원 전일, 퇴원전일과 첫 외래방문일, 수술 전일과 첫 외래방문일의 체세포량(BCM), 체지방량(BFM), 골격근량(SMM), 위상각(Phase angle) 측정치와 그 변화량을 표 2-7-9, 표 2-7-10에 각각 제시하였음

체세포량, 골격근량, 위상각은 수술 전일에만 두 군 간의 유의적인 차이가 있었고,(p=0.044,p=0.043, p=0.014) 이를 제외한 시점별 체성분 측정값은 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 시점별 체성분 측정치 변화값을 비교한 결과 체지방량을 제외하고 감소하는 경향을 보였으나, 그 감소량은 두 군 간의 유의적인 차이가 없었다. 체지방량의 경우 두 군에서 퇴원 후 다소 증가하는 경향을 보였으나, 그 증가량은 두 군 간의 유의적인 차이가 없었음

표 2-7-9. Comparison of body composition data between 2 groups during study period.

	Variables	Case	Control	p-value ^{2)}
BMI	preOP	24.6±0.9 ^{1)}	23.5±1.0	0.395
	DC	23.6±0.8	22.7±1.0	0.492
	1 st OPD	22.8±0.8	22.3±1.0	0.690
BCM	preOP	32.0±1.2	28.2±1.4	0.044.
	DC	31.1±1.2	27.4±1.4	0.051
	1 st OPD	29.4±1.2	26.4±1.4	0.106
BFM	preOP	18.9±1.9	17.0±2.3	0.523
	DC	17.2±1.9	15.9±2.3	0.662
	1 st OPD	17.8±1.9	16.6±2.3	0.689
SMM	preOP	27.1±1.1	23.7±1.3	0.043.
	DC	26.3±1.1	23.0±1.3	0.051
	1 st OPD	24.8±1.1	22.1±1.3	0.106
PA	preOP	5.8±0.2	5.1±0.2	0.014.
	DC	5.5±0.2	5.0±0.2	0.059
	1 st OPD	5.2±0.2	4.8±0.2	0.138

^{1)} Values are presented as means±se by Linear mixed model.

^{2)} significantly different between 2 groups by Bonferroni correction for multiple test at P<0.05.

(BMI; Body mass index, BCM; Body cell mass, BFM; Body fat mass, SMM; Skeletal muscle mass, PA; Phase angle, preOP; Measurements of day before surgery, DC; Measurements of day before discharge, 1st OPD; Measurements of first outpatient visit)

표 2-7-10. Changes of body composition data

	Variables	Case	Control	p-value ⁵⁾ (group*time)
BMI	$\Delta 1^{2)}$	$-1.0 \pm 0.2^{1)}$	-0.8 ± 0.2	0.084
	$\Delta 2^{3)}$	-0.7 ± 0.2	-0.3 ± 0.2	
	$\Delta 3^{4)}$	-1.8 ± 0.2	-1.2 ± 0.2	
BCM	$\Delta 1$	-0.9 ± 0.3	-0.8 ± 0.4	0.252
	$\Delta 2$	-1.6 ± 0.3	-1.0 ± 0.4	
	$\Delta 3$	-2.6 ± 0.3	-1.8 ± 0.4	
BFM	$\Delta 1$	-1.7 ± 0.5	-1.1 ± 0.6	0.637
	$\Delta 2$	0.6 ± 0.5	0.7 ± 0.6	
	$\Delta 3$	-1.1 ± 0.5	-0.4 ± 0.6	
SMM	$\Delta 1$	-0.8 ± 0.3	-0.7 ± 0.4	0.258
	$\Delta 2$	-1.5 ± 0.3	-0.9 ± 0.4	
	$\Delta 3$	-2.3 ± 0.3	-1.6 ± 0.4	
PA	$\Delta 1$	-0.3 ± 0.1	-0.1 ± 0.2	0.357
	$\Delta 2$	-0.3 ± 0.1	-0.2 ± 0.2	
	$\Delta 3$	-0.6 ± 0.1	-0.3 ± 0.2	

¹⁾ Least square mean \pm se.

²⁾ $\Delta 1$; (DC data)-(preOP data)

³⁾ $\Delta 2$; (1st OPD data)-(DC data)

⁴⁾ $\Delta 3$; (1st OPD data)-(preOP data)

⁵⁾ group*time interaction by Bonferroni correction for multiple test at P<0.05.

(BMI; Body mass index, BCM; Body cell mass, BFM; Body fat mass, SMM; Skeletal muscle mass, PA; Phase angle, preOP; Measurements of day before surgery, DC; Measurements of day before discharge, 1st OPD; Measurements of first outpatient visit)

(6) 생화학적 검사

두 군의 수술 전일과 퇴원 전일, 퇴원전일과 첫 외래방문일, 수술 전일과 첫 외래방문일의 측정치과 변화 값을 표 2-7-11와 표 2-7-12에 각각 제시하였음

수술 전일과 퇴원 전일의 생화학적 검사를 비교하였을 때, 총 콜레스테롤은 두 군 모두 감소하였으나, 감소량은 두 군 간에 유의적인 차이는 없었다. 또한 HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, Lipoprotein, Transferrin 역시 두 군 모두 감소하였으나, 감소량은 두 군 간에 유의적인 차이는 없었다. CRP는 두 군 모두에서 증가하였으나, 두 군 간에 증가량에 대한 유의적인 차이는 없었다. 하지만 Prealbumin의 경우 두 군 모두 감소하였고, 실험군의 변화량이 대조군에 비하여 유의적으로 컸다.(p=0.033) 하지만 수술 전과 첫 외래 방문 시의 생화학 적 검사를 비교하였을 때, prealbumin이 대조군에서 보다 실험군에서 유의적으로 큰 감소를

보였다. 다른 생화학적 지표들의 시점에 따른 변화량은 두 군 간에 유의적인 차이가 없었음
 이는 고지방 영양보충음료 섭취에 따른 혈중 지질 상태 및 염증 반응에 부정적인 영향을
 미치지 않는다는 것을 알 수 있었음

표 2-7-11. Comparison of biochemical data between 2 groups during study period

Variables		Case	Control	p-value ^{2)}
Cholesterol	preOP	171.6±9.1 ^{1)}	165.0±11.3	0.648
	DC	121.7±9.1	139.1±11.3	0.236
	1 st OPD	146.5±9.1	156.7±11.3	0.487
TG	preOP	134.8±14.5	121.8±18.0	0.259
	DC	109.7±14.5	127.8±18.0	0.438
	1 st OPD	112.2±14.5	128.5±18.0	0.485
HDL	preOP	42.7±2.4	47.6±2.9	0.205
	DC	30.1±2.4	28.2±2.9	0.610
	1 st OPD	39.9±2.4	40.2±2.9	0.937
LDL	preOP	105.4±7.3	100±9.1	0.644
	DC	70.6±7.3	85.5±9.1	0.208
	1 st OPD	83.2±7.3	96.1±9.1	0.274
Lipoprotein	preOP	23.2±4.6	16.5±5.8	0.369
	DC	21.2±4.6	15.0±5.8	0.407
	1 st OPD	24.6±4.6	14.9±5.8	0.195
Transferrin	preOP	226.5±10.2	234.7±12.7	0.614
	DC	165.0±10.2	171.9±12.7	0.674
	1 st OPD	217.1±10.2	234.6±12.7	0.288
CRP	preOP	2.1±7.1	10.0±8.9	0.492
	DC	46.0±7.1	23.6±8.9	0.055
	1 st OPD	7.4±7.1	1.9±8.9	0.626
Pre-albumin	preOP	243.5±13.2	233.1±16.4	0.624
	DC	147.7±13.2	190.8±16.4	0.045
	1 st OPD	211.8±13.2	278.5±16.4	0.003

^{1)} Values are presented as means±se by Linear mixed model.

^{2)} significantly different between 2 groups by Bonferroni correction for multiple test at P<0.05.

(TG; Triglyceride, HDL; High Density Lipoprotein Cholesterol, LDL; Low Density Lipoprotein Cholesterol, CRP; C-reactive Protein, preOP; Measurements of day before surgery, DC; Measurements of day before discharge, 1st OPD; measurements of first outpatient visit)

☒ 2-7-12. Changes of biochemical data

Variables		Case	Control	p-value ⁵⁾ (group*time)
Cholesterol	$\Delta 1^{2)}$	$-49.9 \pm 10.5^{1)}$	-25.8 ± 13.0	0.343
	$\Delta 2^{3)}$	24.9 ± 10.5	17.6 ± 13.0	
	$\Delta 3^{4)}$	-25.1 ± 10.5	-8.2 ± 13.0	
TG	$\Delta 1$	-25.1 ± 17.1	6.0 ± 21.2	0.447
	$\Delta 2$	2.5 ± 17.1	0.6 ± 21.2	
	$\Delta 3$	-22.6 ± 17.1	6.6 ± 21.2	
HDL	$\Delta 1$	-12.6 ± 2.4	-19.4 ± 3.0	0.212
	$\Delta 2$	9.8 ± 2.4	12.0 ± 3.0	
	$\Delta 3$	-2.8 ± 2.4	-7.4 ± 3.0	
LDL	$\Delta 1$	-34.8 ± 7.4	-14.5 ± 9.2	0.176
	$\Delta 2$	12.6 ± 7.4	10.6 ± 9.2	
	$\Delta 3$	-22.2 ± 7.4	-3.9 ± 9.2	
Lipoprotein	$\Delta 1$	-2.0 ± 3.6	-1.5 ± 4.5	0.805
	$\Delta 2$	3.4 ± 3.6	-1.6 ± 4.5	
	$\Delta 3$	1.4 ± 3.6	-0.1 ± 4.5	
Transferrin	$\Delta 1$	-61.5 ± 8.2	-62.8 ± 10.1	0.678
	$\Delta 2$	52.1 ± 8.2	62.7 ± 10.1	
	$\Delta 3$	-9.4 ± 8.2	-0.2 ± 10.1	
CRP	$\Delta 1$	43.8 ± 9.8	13.6 ± 12.2	0.166
	$\Delta 2$	-38.5 ± 9.8	-21.7 ± 12.2	
	$\Delta 3$	5.3 ± 9.8	-8.1 ± 12.2	
Prealbumin	$\Delta 1$	-95.7 ± 15.3	-42.3 ± 19.1	0.009
	$\Delta 2$	64.1 ± 15.3	87.6 ± 19.1	
	$\Delta 3$	-31.6 ± 15.3	45.4 ± 19.1	

¹⁾ Least square mean \pm se

²⁾ $\Delta 1$; (DC data)-(preOP data)

³⁾ $\Delta 2$; (1st OPD data)-(DC data)

⁴⁾ $\Delta 3$; (1st OPD data)-(preOP data)

⁵⁾ group*time interaction by Bonferroni correction for multiple test at $P < 0.05$.

(TG; Triglyceride, HDL; High Density Lipoprotein Cholesterol, LDL; Low Density Lipoprotein Cholesterol, CRP; C-reactive Protein, preOP; Measurements of day before surgery, DC; Measurements of day before discharge, 1st OPD; Measurements of first outpatient visit)

(7) Urine ketone 검출 결과

두 군의 시점(수술 전일, 퇴원 전일, 첫 외래 방문 시)에 따른 소변 내 ketone 검출 결과를 표 2-7-13에 제시하였음

퇴원 전일 실험군 35.3%(6명), 대조군 45.4%(5명)의 소변 내 ketone 검출 결과를 보였으나, 두 군 간의 유의적인 차이는 없었다. 또한 첫 외래 방문 시 실험군 52.9%(9명), 대조군 9.1%(1명)의 소변 내 ketone 검출 결과를 보였으나, 두 군 간의 유의적인 차이는 없었음

케톤생성을 기반으로 하는 플러스 영양보충제품을 섭취한 실험군에서는 퇴원 전날에 비해 첫 외래 방문 시에 소변 케톤체가 검출된 환자의 비율이 50% 증가하였고, 대조군의 경우 80% 감소하여 유의적인 차이를 보였음 (p=0.019)

표 2-7-13. Comparison of urine ketone detection between two groups.

Urine ketone	Case n(%)	Control n(%)	p-value ¹⁾
preOP			
negative	14(82.4)	11(100.0)	0.206
positive	3(17.6)	0(0.0)	
DC			
negative	11(64.7)	6(54.5)	0.287
positive	6(35.3)	5(45.5)	
1 st OPD			
negative	8(47.1)	10(90.9)	0.184
positive	9(52.9)	1(9.1)	

¹⁾ significantly different between 2 groups by Fisher's exact test at P<0.05.

(8) NK cell activity

두 군의 시점(수술 전일, 퇴원 전일, 첫 외래 방문 시)에 따른 NK cell activity 검사 결과와 그 변화 값을 표 2-7-14, 그림 2-7-9 에 제시하였음

수술 전일과 퇴원 전일의 NK cell activity 검사를 비교하였을 때, 두 군 모두 감소하였으나 감소량은 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 또한 수술 전과 첫 외래 방문 시의 NK cell activity 검사를 비교하였을 때, 두 군 모두 증가하였으나 증가량은 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 반면에 실험군에서 첫 외래 방문 시의 NK cell activity가 수술 전과 퇴원 전일에 비해 통계적으로 유의적인 증가를 보였고(p<0.001), 대조군에서도 퇴원 일에 비해 첫 외래 방문 시에 유의적으로 증가하였음 (p=0.005)

표 2-7-14. NK cell activity data.

	Case	Control	P-value
pre OP	14.38 ± 2.32 ^a	21.15 ± 2.89	0.0737
DC	13.91 ± 2.32 ^b	17.67 ± 2.89 ^c	0.3141
1 st OPD	21.39 ± 2.32 ^{a,b}	24.57 ± 2.89 ^c	0.3941

Same letters within a column represent significant difference by Bonferroni correction for multiple test

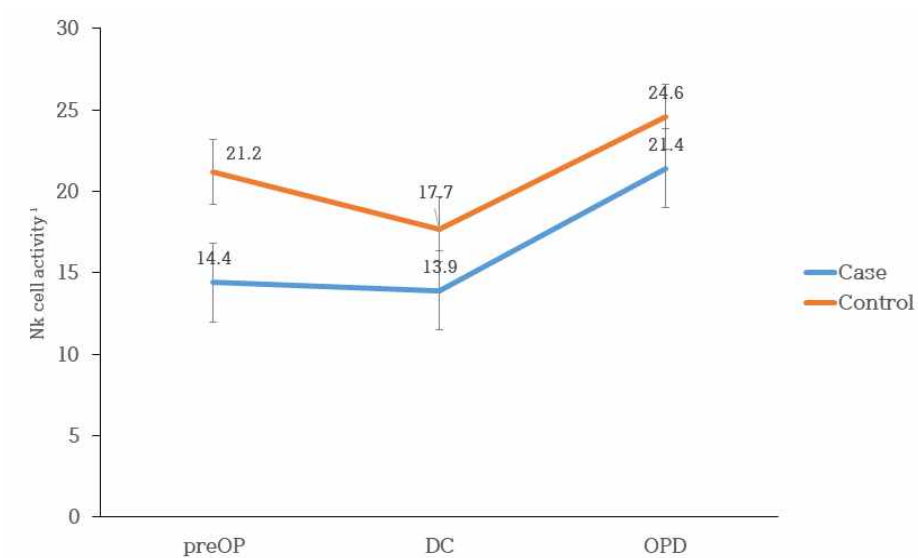


그림 2-7-9. Comparison of NK cell activity between case and control group

Values are presented as means ± se by Linear mixed model.

7. 대사체학 기법을 이용한 암환자 PLUS 포물라 섭취에 따른 혈청 케톤체와 대사체 분석

(1) 혈청 내 케톤체 함량 분석

(가) 혈청 내 케톤체 함량은 LC-MS/MS 대사체 규명을 통해서 상대적 함량을 측정하였음. 케톤 PLUS 포물라 섭취군(HFSH)에서 케톤 생성능에 차이가 없는 것을 확인하였음

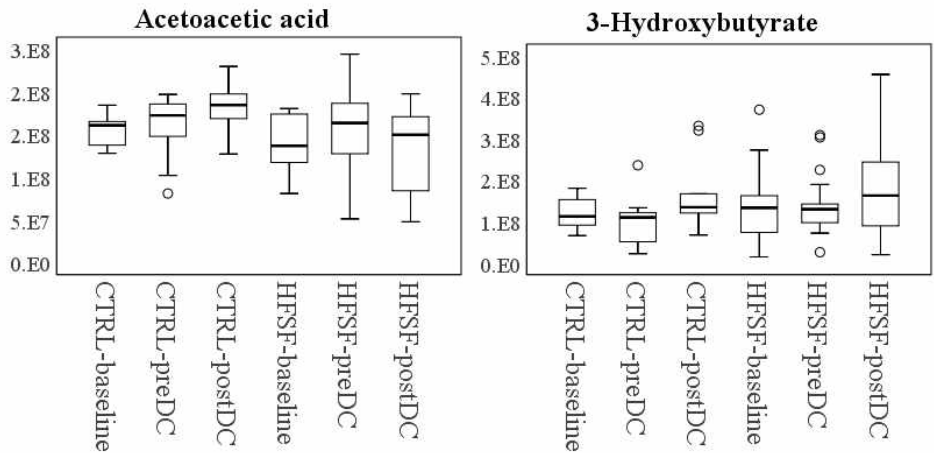


그림 2-7-10. Box plot showing relative peak intensities in serum ketone(acetoacetate, 3-hydroxybutyrate) using qualitative analysis of LC-MS/MS

이는 BASE 포물라 섭취군(2차년도 환자 혈액)에서와 비슷하게 대조군과 비교하여 총 칼로리(경구, 비경구 포함)에는 차이가 없지만, 경구로 섭취한 식사량에서 유의적 차이가 나기 때문으로 판단됨

(2) LC-MS/MS를 이용한 혈청 대사체학 분석

(가) 일반 환자식(CTRL)과 케톤 PLUS 포물라(HFSF) 섭취군의 혈액 LC-MS/MS Raw data를내부 표준물질을 이용하여 표준화작업 및 Outlier 제거하여 워크셋 구축 (그림 2-7-11)

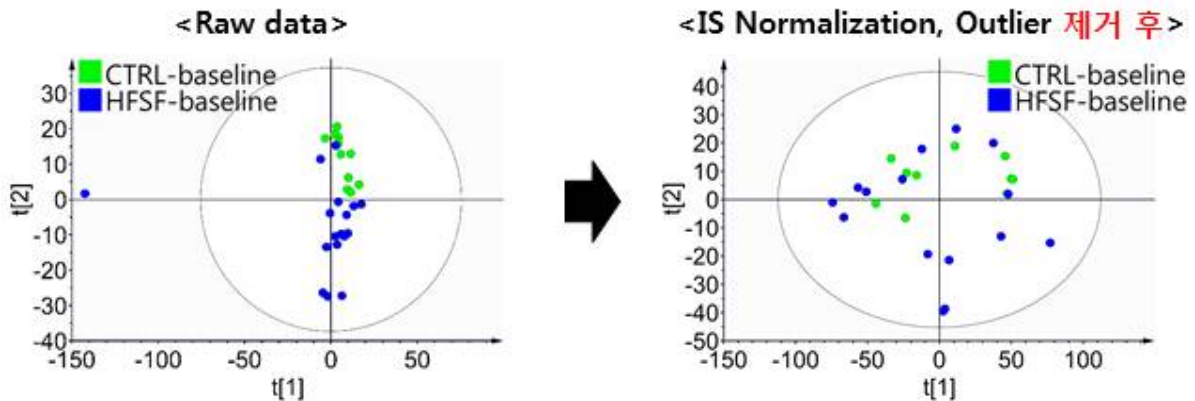


그림 2-7-11. 내부표준물질을 사용한 표준화 작업과 outlier제거가 다변량 분석에 미치는 영향

나. 일반 환자식(CTRL)과 케톤 PLUS 포물라(HFSF) 섭취군의 시간에 따라 대사체학 분석을 위한 다변량 회귀분석 가능한 모델을 SIMCA14.1을 이용하여 분석하였음

표 2-7-15. OPLS-DA parameters and permutation test for distinguishing between CTRL and HFSF groups.

Group	OPLS-DA				
	Components ^a	Q ²	R ²	Q ² /R ²	p-value ^b
CTRL0-HFSF0	1+6	0.734	0.996	0.737	0.142
CTRL2-HFSF2	1+2	0.614	0.933	0.658	<0.001*
CTRL4-HFSF4	1+1	0.595	0.786	0.757	<0.001*
CTRL0-CTRL2	-	-	-	-	-
CTRL0-CTRL4	1+3	0.460	0.992	0.464	0.338
CTRL2-CTRL4	1+4	0.508	0.997	0.510	0.351
HFSF0-HFSF2	1+4	0.641	0.996	0.644	0.002*
HFSF0-HFSF4	1+4	0.602	0.993	0.606	0.007*
HFSF2-HFSF4	1+2	0.575	0.900	0.639	<0.001*

OPLS-DA, orthological partial least squares-discriminant analysis; Q², predictive capability, R², correlation coefficients.

^aThe number of components BASEd on Q2 indicates the best classifier of OPLS-DA using a 7-fold cross-validation method.

^bp-value was determined by CV-ANOVA of OPLS-DA in SIMCA 14.1. *p-value<0.05 by CV-ANOVA were considered significant

분석 모델링 결과 일반 환자식을 먹었던 CTRL 그룹에서는 유의미한 대사체 변화가 이루어지지 않았지만(CTRL0-HFSF0, CTRL0-CTRL2, CTRL0-CTRL4, CTRL2-CTRL4 모델), 암환자 PLUS 포플라 섭취가 환자 혈액 대사체 변화에 영향을 미쳤음을 확인하였음 (CTRL2-HFSF2, CTRL4-HFSF4, HFSF0-HFSF2, HFSF0-HFSF4, HFSF2-HFSF4 모델). 특히 암환자 PLUS 포플라 섭취는 이전 연구와 다르게 병원식이 아닌 환자의 평소 식단 섭취시에도 지방섭취량과 혈청 대사체에서 유의적인 변화를 가져왔다는 점이 의미가 있음 (표 2-7-15)

다. 위에서 선정된 분석 모델을 이용한 다변량 회귀분석 결과 (OPLS-DA plot, 500 permutation analysis)

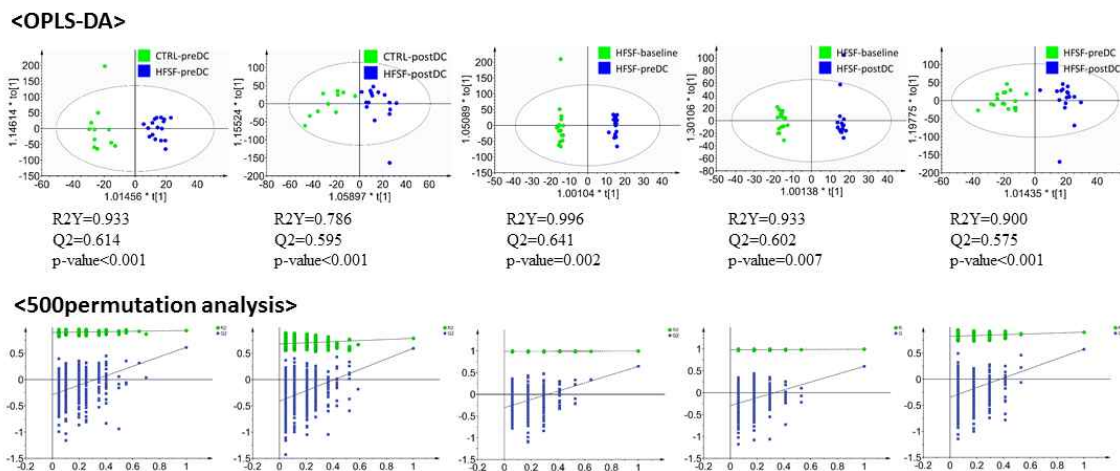


그림 2-7-12. Validation of analysis model using multivariate regression analysis

각각의 분석 모델에서 대사체의 군분류가 명확하게 이루어지는지를 OPLS-DA 회귀분석을 통해 확인하였음. 또한, 500 permutation analysis를 진행한 결과로 5개 대사체 분석 모델이 모두 유의미한 분석 모델임을 확인함 (그림 2-7-12)

라. OPLS-DA분석을 통해 얻은 VIP값을 이용하여 잠재적 바이오마커를 선정하였음.

VIP>1.0, p -value<0.05 (Mann-Whietney U test)를 기준으로 CTRL2-HFSF2(모델1) 646개 피크, CTRL4-HFSF4(모델2) 881피크를 확인하였음. 그중에서 229개 피크가 공통적으로 발견되었음. 케톤 PLUS 포물라 섭취군(HFSF) 내에서 시간에 따라 유의적으로 차이 나는 피크는 각각 805개 (Baseline-preDC, 모델3), 718개 (Baseline-postDC, 모델4) 그리고 650개 (preDC-postDC, 모델5) 이었음

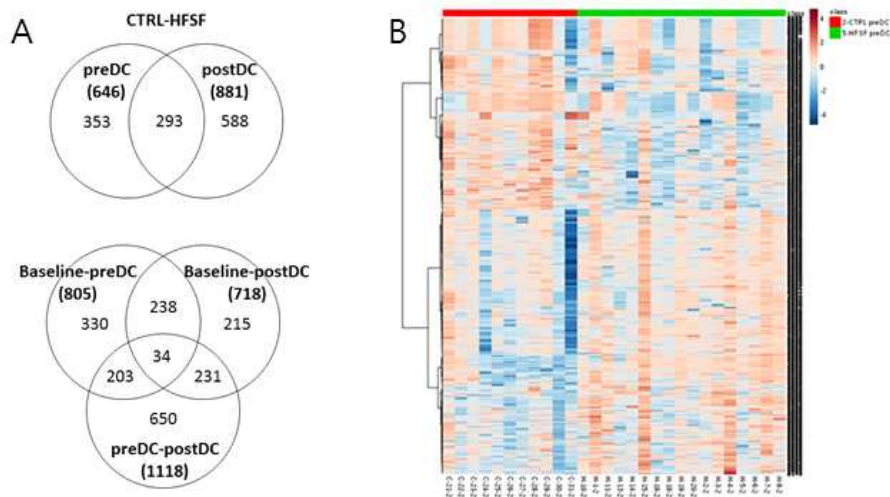


그림 2-7-13. Visual representation of metabolites that change significantly after PLUS formula ingestion. A) Venn diagram, B) Heat map

마. 고찰

본 연구는 채식도암 환자에게 변형된 케톤생성식이요법 영양소 구성을 기반으로 하여 항암 효과가 있는 것으로 보고되고 있는 자소엽의 기능성 추출물을 첨가하여 개발한 “플러스 영양 보충음료 (Plus ONS)” 에 대한 환자의 순응도를 평가하고 영양상태 개선에 기여하는지를 평가 하였음

연구에 사용된 “플러스 영양보충음료”는 췌담도암 수술 후 환자들의 식사 섭취에 대한 어려움을 해결하고자 1회 제공량의 부피를 줄이고, 단위 중량당 열량을 1.2배로 농축하여 150kcal/125ml로 개발함으로써 에너지 요구량 대비 섭취량 비율을 증가시킬 수 있도록 하였다. 본 연구에서 실험군의 대상자들이 1일 공급량(3팩, 450kcal/day) 대비 66.1%(약 2팩, 300kcal/day)를 섭취하여 수술 후 7일째부터 실험군의 에너지와 단백질 섭취율이 대조군에 비해 유의적으로 높았음을 확인할 수 있었다. 또한 영양보충음료의 섭취가 식사량에 영향을 주지 않으면서 추가적인 에너지 및 단백질 섭취 증가에 기여할 수 있음도 확인할 수 있었음

췌담도암 수술 후 지방 소화 및 흡수의 문제로 통상적으로 지방을 제한하고 영양 밀도가 낮은 ‘저지방식’을 제공하고 있는 것과 비교하였을 때, 지방 함량과 더불어 영양 밀도를 높인 영양보충음료는 체성분 변화에는 영향을 미치지 않으면서 에너지와 단백질 요구량에 대한 섭취율을 높일 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 실험군의 혈중 지질 농도의 변화는 대조군과 유의적인 차이가 없어 본 연구에서 개발한 고지방영양보충음료의 섭취로도 혈중 지질 농도가 안정적으로 유지됨을 확인할 수 있었음

소변 내 ketone 검출 결과는 두 군에서 유의적인 차이가 없었는데, 이는 개발한 플러스 영양보충음료는 케톤생성 가능한 비율인 1.7:1로 구성했으나 식사는 일반적인 식사의 케톤:비케톤성 영양소의 비율로 섭취하여 전체 영양소의 조성은 케톤생성식사요법과 차이가 있었기 때문인 것으로 생각된다. 본 연구를 통해 플러스 영양보충음료의 순응도가 양호하고, 의학적인 개입이 필요한 중증의 수술 후 합병증이나 혈중 지질 이상을 유발하지 않으면서 섭취율이 양호했음을 확인하였으므로, 이를 기반으로 향후 항암치료의 보조 요법으로 ‘플러스 영양보충음료’를 병행한 연구가 가능할 것으로 사료되었음

두 군 간의 NK Cell activity 결과에서 실험군은 수술 전일과 퇴원 전일에 비해 첫 외래 방문 시에, 대조군은 퇴원 전일에 비해 첫 외래 방문 시에 증가하였다. 이는 자소엽 추출물이나 영양 공급량의 차이보다는 수술 후 스트레스로부터 회복에 의한 변화인지 추가적인 분석이나 연구가 필요할 것으로 사료됨

전반적인 연구 기간이 약 3~4주로 짧았기에 체성분 분석, 영양상태평가, 생화학적 검사에 미치는 영향을 평가하기에는 한계가 있었다. 뿐만 아니라 대상자 모집에 대한 어려움으로 인하여 무작위 배정이 이루어지지 않아 보다 의미 있는 결과를 예측하기에는 많은 어려움이 있었다. 하지만 사전 연구를 바탕으로 개발하여 본 연구에 사용된 “플러스 영양보충음료”는 영양소 비율에 있어서 기존의 영양보충음료와 차이가 있으며, 암환자의 전반적인 상태를 고려하여 개발된 영양보충음료라는 것에 의미가 있다. 또한 췌담도암 환자에게 기존에 저지방식 원칙으로 제공하던 수술 후 식사와는 달리 지방 함량을 높여 단위 부피당 에너지 함량을 높인 농축된 영양보충음료를 제공함으로써 의학적인 치료가 필요한 수술 후 부작용 없이 에너지 및 단백질 섭취량을 증가시킬 수 있음을 확인하였음

본 연구를 통하여 자소엽을 첨가한 변형된 케톤생성식이요법 영양소 구성을 기반으로 한 “플러스 영양보충음료”가 암환자의 영양상태 및 면역력 개선에 대한 가능성을 확인을 위해

전향적인 대규모 무작위배정 연구가 필요할 것으로 사료됨

8절. 개발된 제품의 추가 확장 연구

1. 다이어트 제품 가능성 검토

가. 연구개발 목표

개발된 케톤음료의 인체적용 시험을 통해 케톤식 액상영양식(Base 포블러)을 2주 동안 섭취한 후, 체성분과 혈액성분을 비교하여 효과를 평가하고 케톤식 비율 (3.7:1 vs. 1.7:1) 에 따른 순응도와 체구성 혈액성분의 차이를 확인하고자 함

나. 연구 진행

- (1) 대상자 : 총 48명의 대상자들이 연구에 지원하였으나, 선정 기준에 부합하지 않는 2명이 제외되어 46명이 연구에 참여함
- (2) 디자인 : 대상자들은 성별의 분포를 세 그룹에 동일하게 한 후 층화 무작위방법에 따라 아래 3 군으로 배정됨
 - (가) 케톤/비케톤 비율[지방(g)/(탄수화물(g)+단백질(g))] 4:1인 케톤생성영양음료4:1 그룹 (Ketogenic Nutrition Drink 4:1, KD4:1)
 - (나) 케톤/비케톤비율이 1.7:1인 케톤생성영양음료1.7:1 그룹 (Ketogenic Nutrition Drink 1.7:1, KD1.7:1)
 - (다) 영양균형음료 그룹 (Balanced Nutrition Drink, BD)
- (3) 연구대상자 flow (그림 2-8-1)

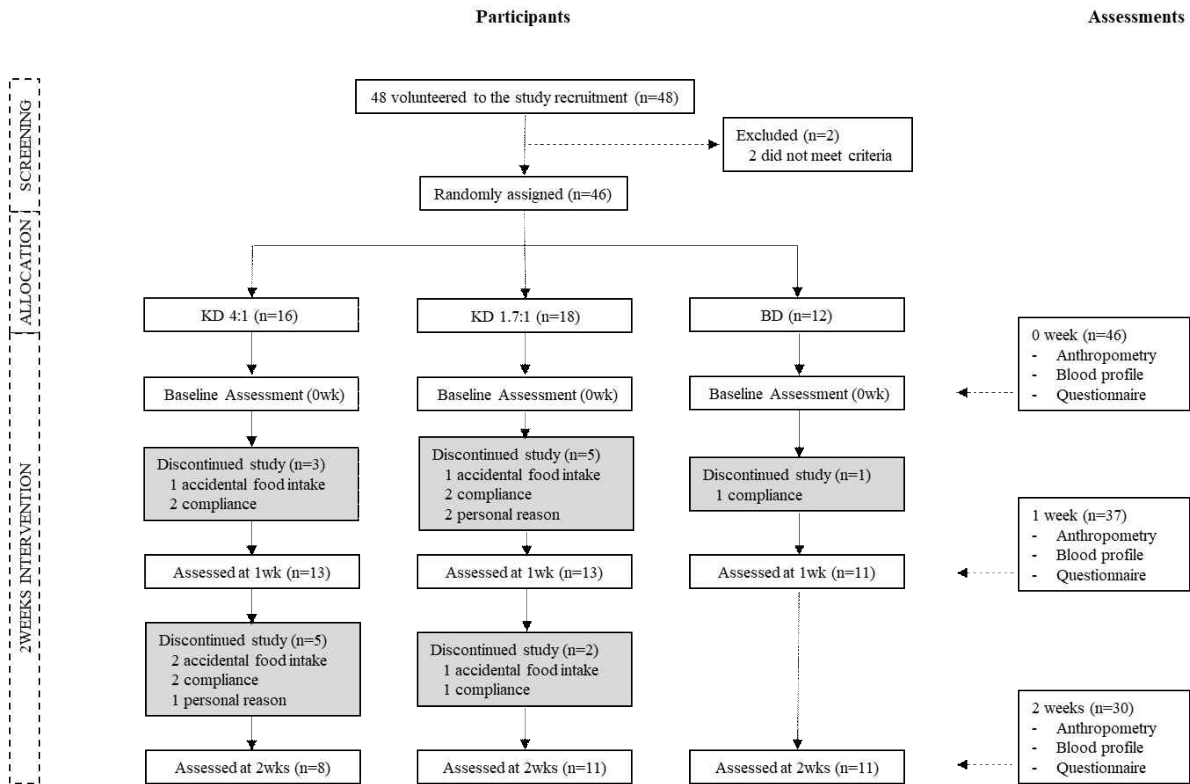


그림 2-8-1. 연구대상자 flow

(3) 연구 방법

(가) 영양중재 및 신체활동 모니터링

① 영양음료를 통한 영양중재

○ 모든 대상자들의 열량 처방은 Harris Benedict 공식에 따라 각 개인의 연령, 신장, 체중 및 활동 정도를 고려하여 1일 필요 열량을 산출함

○ 개인별 식이 권장 섭취량은 체중감량을 위해 1일 필요 열량의 70% 수준으로 처방하여 약 -600 kcal를 목표로 설정함

○ 하루에 섭취해야하는 영양음료의 양, 섭취 방법, 주의사항에 대해 설명하였고, 하루에 섭취하는 영양음료의 양을 기록하게 함

② 신체활동 모니터링

○ 모든 대상자들의 신체활동을 평소수준으로 연구기간 동안에 유지하도록 안내하였으며 신체활동량의 변화여부를 모니터링하기 위해 국제신체활동설문 (International Physical Activity Questionnaires, IPAQ) 중 단문형 자가기입식 설문지를 이용하여 연구 전 (중재 시작 전 0주), 중 (중재 실시 후 1주), 후 (중재 실시 후 2주) 총 3번 조사

(나) 체성분 및 신체계측 분석

① 체성분 및 신체계측 분석은 연구 전 (중재 시작 전 0주), 중 (중재 실시 후 1주), 후 (중

재 실시 후 2주) 총 3번 측정함

○ 체성분 측정 시 각 대상자들은 검사 전 8시간 이상 공복 상태로 체성분분석기(Inbody 270, Biospace, Korea)를 이용하여 체중, 체수분, 단백질, 무기질, 골격근량, 체지방량을 측정

○ 신장은 대상자들의 자가보고로 조사하였고, 허리둘레는 배꼽 위로 2.5 cm 부위를 측정하였고, 엉덩이둘레는 엉덩이의 가장 높은 부위를 소수점 첫째 자리까지 cm 단위로 2번 측정한 후 평균을 나타냄.. 체질량지수는 신장과 체중을 이용하여 [체중(kg)/신장(m²)]의 공식을 이용하여 산출함

(다) 혈액 분석

① 혈액 분석은 연구 전 (중재 시작 전 0주), 중 (중재 실시 후 1주), 후 (중재 실시 후 2주) 총 3번 측정하였고, 항응고제가 처리되지 않은 용기에 혈액 5 ml 채취 후 상온에서 30분 이상 응고시킨 후, 3,500 rpm에서 7분동안 원심분리하여 분리된 혈청을 Microtube에 1 ml씩 옮긴 후 냉동 보관함

② 냉동 보관된 혈청은 (주)녹십자의료재단에 의뢰하여 다음 항목을 측정함. Total cholesterol, Triglyceride, LDL cholesterol, HDL cholesterol은 Kit, Ketone body (Total ketone, Acetoacetate, β -Hydroxybutyric acid)를 분석함

(라) 설문조사

① 신체증상변화 조사

연구를 진행하는 동안 나타날 수 있는 증상과 어려움에 대해 알아보기 위해 신체증상 변화 설문 조사는 총 15문항으로 구성하여 5 점 리커트 척도 양식 (전혀 그렇지 않다 1, 그렇지 않다 2, 보통 3, 그렇다 4, 매우 그렇다 5)으로 점수화하여 연구 전 (중재 시작 전 0주), 중 (중재 실시 후 1주), 후 (중재 실시 후 2주) 총 3번 측정함

② 스트레스 조사

일상생활에서 발생하는 스트레스를 알아보기 위하여 Perceived Stress Questionnaire (PSQ)을 사용함. 이는 일상생활에서 발생하는 스트레스를 측정하는데 적합하며 총 10문항으로 구성되었고 스트레스에 대한 주관적 지각을 강조함과 동시에 문항수가 적어 부담이 없는 장점을 지님

○ 본 설문은 5 점 리커트 척도 양식 (거의 없다 1, 드물게 있다 2, 때때로 있다 3, 상당히 자주 있다 4, 매우 자주 있다 5)으로 점수화하였으며 긍정적 문항 4, 5, 7, 8에서 역점수로 채점하였다. 스트레스 조사는 연구 전 (중재 시작 전 0주), 중 (중재 실시 후 1주), 후 (중재 실시 후 2주) 총 3번 측정 함

③ 배변 상태 조사

고형물을 섭취하지 않고 영양음료만을 섭취하는 경우 배변상태에 변화가 생길 것으로 예상되어 Lee27)가 고안하여 제작한 배변활동설문을 실시하였고, 설문은 총 8문항으로 구

성 되어 있으며, 배변 상태 조사는 연구 전 (중재 시작 전 0주), 중 (중재 실시 후 1주), 후 (중재 실시 후 2주) 총 3번 측정함

④ 영양음료 제품 만족도 평가

음료 개발 시 사용되는 제품 만족도 평가 양식을 사용하여 제품들의 만족도를 조사하였고 문항은 종합만족도, 향과 맛에 대한 평가, 입안 느낌에 대한 평가로 총 8문항으로 구성함. 이는 ‘매우 싫다 1’ ~ ‘좋지도 싫지도 않다 5’ ~ ‘매우 좋다 9’ 로 설정되었고, 대상자들이 영양음료를 종이컵 1잔 (약50ml) 섭취하며 품질평가서의 해당되는 란에 표시하도록 함

(마) 식욕변화 조사

○ 영양음료 섭취 후 대상자들의 주관적인 식욕변화정도는 Visual Analogue Scale (VAS) 설문을 이용하여 조사함

○ 설문지는 총8문항으로 구성되었으며 각 문항마다10 cm 선을 설정하여 영양음료 섭취 전 후 식욕상태를 나타내도록 하였음. 각 문항의 10 cm 선 양쪽 끝에는 ‘매우 그렇다 0 cm’ ~ ‘전혀 그렇지 않다 10 cm’ 로 설정하여 대상자들이 직접 펜을 이용하여 식욕정도를 나타내도록 하였음. 대상자들은 영양음료 섭취 전 식욕변화 설문지를 작성한 후, 처방된 하루 열량에서 1/4정도의 양을 영양음료로 섭취한 후 30분, 60분, 90분, 120분 총 5회에 걸쳐 조사함

(바) 소변 케톤체 조사

○ 케톤체 생성 및 유지가 되는지 확인하기 위해 간이 검사지인 소변 케톤체 검사용 시험지 (Uriscan ketone strip, 영동제약, Korea)를 이용하여 대상자들에게 매일 아침, 점심, 저녁 3번 이상으로 나누어 소변의 케톤체를 측정하도록 하였음. 소변 케톤체 검사용 시험지는 소변 케톤체 농도에 따라 색깔이 달라지며 소변 케톤체 검사용 시험지의 시험부분을 소변에 적신 후 1분 후 용기에 부착된 비색표로 비교하여 소변 케톤체 자가 기록지의 해당되는 란 (음성, ±5, +10, ++50, +++100)에 표시하도록 함

(사) 통계분석

○ 모든 자료는 통계분석프로그램 Statistical Package for the Social Science Version (SPSS) 23.0 (IBM, Seoul, South Korea)을 이용하였으며 연속 변수 (Continuous variable)는 평균 (Mean)과 표준편차 (Standard Deviation, SD)로, 비연속 변수 (Discrete variable)는 N(%)로 표시함

○ 연구 전, 중, 후의 변화값은 대응표본검정 (Paired t-test)과 반복 측정 분산 분석 (Repeated measure design two-way ANOVA)을 이용하여 분석하였으며 유의하게 나타난 항목에 대한 개별 분석은 Paried t-test, Wilcoxon signed rank test을 이용함

○ 비연속 빈도 간의 유의성은 교차 검정 (Chi-square test, χ^2 -test)를 이용하여 분석하였

고, 세 그룹간의 차이는 One-way ANOVA와 비모수 검정인 Kruskal-Wallis test를 통해 분석하였다. 모든 통계분석 결과는 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증함

(4) 연구결과

(가) 대상자의 일반사항

○ 대상자들의 평균 연령, 성별, 평균 신장, 평균 체수분, 평균 단백질, 평균 무기질, 평균 체중, 평균 골격근량, 평균 체지방량, 평균 BMI, 평균 허리둘레와 엉덩이둘레, 평균 Total cholesterol, 평균 Triglyceride, 평균 LDL cholesterol, 평균 HDL cholesterol 값 모두 세 그룹 간의 유의적인 차이가 나타나지 않음(표 2-8-1)

표 2-8-1. Baseline characteristics of the study participants

Variables	KD4:1 ³⁾ (n=13)	KD1.7:1 ⁴⁾ (n=13)	BD ⁵⁾ (n=11)	p-value ⁹⁾
Age(yr)	29.5±9.0 ¹⁾	24.5±4.8	26.0±7.5	0.141
Sex(%)				
Female	4(30.8) ²⁾	5(38.5)	4(36.4)	0.739
Male	9(69.2)	8(61.5)	7(63.6)	
Height(cm)	170.3±12.4	169.9±10.0	171.1±7.6	0.962
Body Composition				
Body water(L)	41.8±8.9	41.1±9.1	41.7±7.9	0.974
Protein(kg)	11.3±2.5	11.2±2.5	11.3±2.2	0.975
Mineral(kg)	4.0±0.9	4.0±0.9	4.0±0.7	0.998
Body weight(kg)	87.3±17.1	82.9±14.3	85.8±14.8	0.764
Skeletal muscle(kg)	32.2±7.4	31.6±7.6	32.1±6.5	0.974
Body fat mass(kg)	30.2±10.1	26.7±7.3	28.8±7.6	0.862
BMI(kg/m ²) ⁶⁾	30.0±4.2	28.5±2.8	29.2±4.0	0.779
Waist circumference(cm)	100.0±11.3	94.2±7.3	96.3±10.1	0.318
Hip circumference(cm)	107.9±7.5	108.6±6.2	108.7±7.2	0.950
Blood lipid Profile				
Total cholesterol(mg/dL)	184.9±31.2	179.8±30.2	182.8±28.9	0.912
Triglyceride(mg/dL)	142.4±69.6	106.2±45.8	101.5±63.4	0.218
LDL cholesterol(mg/dL) ⁷⁾	116.2±28.4	111.4±31.3	120.3±23.3	0.742
HDL cholesterol(mg/dL) ⁸⁾	50.8±9.5	57.9±11.7	52.6±16.0	0.331

1) Values are means ± SD 2) Values are N(%)

3) KD4:1 : Ketogenic nutrition drink 4:1 4) KD1.7:1 : Ketogenic nutrition drink 1.7:1

5) BD : Balanced nutrition drink

6) BMI : Body mass index 7) LDL : Low density lipoprotein 8) HDL : High density lipoprotein

9) Significantly different at $p < 0.05$ by chi-square test, Fisher's exact test, ANOVA test, Kruskal Wallis test.

(나) 연구중재 기간 동안의 평균 섭취량

- 2주간의 연구 중재 기간 동안 대상자들의 평균 열량 섭취량은 KD4:1그룹 1159.1±416 kcal, KD1.7:1그룹 1280.8±262.2 kcal, BD그룹 1357.1±292.5 kcal이었고 1일 필요 열량과 연구 중재 기간 동안의 섭취한 열량의 평균 차이는 KD4:1그룹 799.7±373.2 kcal, KD1.7:1그룹 743.8±157.5 kcal, BD그룹 716.2±94.4 kcal이었다. 모두 세 그룹간의 유의적인 차이가 나타나지 않음.
- 평균 탄수화물 섭취량은 KD4:1그룹 9.7±3.5 g, KD1.7:1그룹 14.5±3.0 g, BD그룹 190.0±40.9 g이었고, 평균 식이섬유 섭취량은 KD4:1그룹 0.0±0.0 g, KD1.7:1그룹 4.3±0.9 g, BD그룹 6.8±1.5 g이었음
- 평균 단백질 섭취량은 KD4:1그룹 19.3±6.9 g, KD1.7:1그룹 51.2±10.5 g, BD그룹 54.3±11.7 g, 평균 지방 섭취량은 KD4:1그룹 115.9±41.6 g, KD1.7:1그룹 113.6±23.2 g, BD그룹 47.5±10.2 g이었음. 평균 포화지방 섭취량은 KD4:1그룹 24.1±8.7 g, KD1.7:1그룹 0.0±0.0 g, BD그룹 13.6±2.9 g이었고 모두 세 그룹간의 유의적인 차이가 나타남 (표 2-8-2)

표 2-8-2. Average daily dietary intake in each group during 2 weeks intervention

	KD4:1 ²⁾ (n=8)	KD1.7:1 ³⁾ (n=11)	BD ⁴⁾ (n=11)	p-value ⁶⁾
Energy(kcal)	1159.1±416.1 ¹⁾	1280.8±262.2	1357.1±292.5	0.583
Energy deficit ⁵⁾	799.7±373.2	743.8±157.5	716.2±94.4	0.765
Carbohydrate(g)	9.7±3.5 ^c	14.5±3.0 ^b	190.0±40.9 ^a	0.000
Fiber(g)	0.0±0.0 ^c	4.3±0.9 ^b	6.8±1.5 ^a	0.000
Protein(g)	19.3±6.9 ^b	51.2±10.5 ^a	54.3±11.7 ^a	0.000
Fat(g)	115.9±41.6 ^a	113.6±23.2 ^a	47.5±10.2 ^b	0.000
Saturated fat(g)	24.1±8.7 ^a	0.0±0.0 ^c	13.6±2.9 ^b	0.000

1) Values are means ± SD

2) KD4:1 : Ketogenic nutrition drink 4:1 3) KD1.7:1 : Ketogenic nutrition drink 1.7:1

4) BD : Balanced nutrition drink

5) Deficit of energy requirements and energy

6) Significantly different at p<0.05 by Kruscal Wallis test, Mann Whitney U test (post hoc test).

(다) 체성분 및 신체계측 변화

- 체수분, 단백질, 무기질, 체중, 골격근량, 체지방량, BMI, 허리둘레, 엉덩이둘레의 변화는 0주와 2주사이에 모든 그룹에서 유의적인 차이가 나타났고, 체수분, 무기질 변화는 0주와 1주사이에 모든 그룹에서 유의하게 감소하였고, 1주와 2주사이에는 유의적인 차이가 나타나지 않음.

○ 단백질, 골격근량 변화는 0주와 1주, 1주와 2주사이에 KD4:1그룹과 BD그룹에서 유의하게 감소하였고, KD1.7:1그룹에서는 유의적인 차이가 나타나지 않음. 특히 체중, 체지방량, BMI 변화는 0주와 1주, 1주와 2주사이에 모든 그룹에서 유의하게 감소하였음(표 2-8-3)

표 2-8-3. Changes in anthropometry and body composition by each group

	KD4:1 ²⁾			KD1.7:1 ³⁾			BD ⁴⁾		
	$\Delta 0w-1w^{5)}$ (n=13)	$\Delta 1w-2w^{6)}$ (n=8)	$\Delta 0w-2w^{7)}$ (n=8)	$\Delta 0w-1w$ (n=13)	$\Delta 1w-2w$ (n=11)	$\Delta 0w-2w$ (n=11)	$\Delta 0w-1w$ (n=11)	$\Delta 1w-2w$ (n=11)	$\Delta 0w-2w$ (n=11)
Body water(L)	2.2±1.3 ¹⁾	0.5±0.8	2.8±1.1 []]	1.1±1.4 [†]	0.3±1.0	1.5±1.1 [‡]	1.2±0.7 []]	0.3±0.5	1.5±0.8 []]
Protein(kg)	0.5±0.3 []]	0.2±0.2 [†]	0.7±0.3 []]	0.3±0.4	0.1±0.3	0.4±0.3 [‡]	0.3±0.2 []]	0.1±0.2 [†]	0.4±0.2 []]
Mineral(kg)	0.2±0.1 []]	0.0±0.1	0.3±0.1 [‡]	0.1±0.1 [†]	0.0±0.1	0.2±0.1 []]	0.1±0.1 []]	0.1±0.1	0.2±0.1 [‡]
Body weight(kg)	3.9±1.4 []]	1.7±0.7 []]	5.9±1.8 []]	3.3±1.2 []]	1.0±1.1 [†]	4.4±1.5 []]	2.3±1.0 []]	1.1±0.7 []]	3.4±1.3 []]
Skeletal muscle(kg)	1.5±1.0 [†]	0.4±0.5 [†]	2.1±0.8 []]	0.7±1.2	0.3±0.8	1.0±1.0 [‡]	0.9±0.5 []]	0.3±0.4 [†]	1.2±0.6 []]
Body fat mass(kg)	1.1±1.0 [†]	1.0±0.8 [‡]	2.2±1.4 []]	1.8±2.0 [‡]	0.5±0.8 [†]	2.5±1.9 [‡]	0.8±0.5 [‡]	0.6±0.6 [†]	1.3±0.7 [‡]
BMI(kg/m ²) ⁸⁾	1.4±0.5 []]	0.5±0.2 []]	2.1±0.6 [†]	1.1±0.4 []]	0.3±0.4 [†]	1.5±0.5 []]	0.8±0.3 [‡]	0.4±0.3 [‡]	1.2±0.4 [‡]
Waist circumference (cm)	3.5±2.5 []]	1.4±1.7	4.8±2.1 []]	3.7±2.6 []]	0.8±2.2	4.6±3.9 [‡]	3.0±1.9 [‡]	1.5±1.7 [†]	4.5±2.0 [‡]
Hip circumference (cm)	2.0±1.8 [‡]	2.0±1.5 [‡]	3.9±2.0 [‡]	1.8±1.8 [‡]	1.1±0.9 [‡]	3.1±1.0 []]	1.2±0.8 [‡]	0.9±1.5	2.1±1.6 [‡]

1) Values are means ± SD

2) KD4:1 : Ketogenic nutrition drink 4:1 3) KD1.7:1 : Ketogenic nutrition drink 1.7:1 4) BD : Balanced nutrition drink

5) Difference between 0week and 1week 6) Difference between 1week and 2weeks 7) Difference between 0week and 2weeks 8) BMI : Body mass index

* Significance as determined by Paired t-test, Wilcowon signed rank test. P-value less than
 † p<0.05, ‡ p<0.01,] p<0.001

(라) 혈액검사

Total cholesterol 변화는 0주와 2주사이에 KD4:1 그룹은 유의적인 차이가 나타나지 않았고, KD1.7:1그룹과 BD그룹에서는 유의하게 감소함. 0주와 1주사이에는 모든 그룹에서 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 1주와 2주사이에는 모든 그룹에서 유의하게 감소하였으나, 반면에 Triglyceride 변화는 0주와 1주, 1주와 2주, 0주와 2주에서 모든 그룹이 유의적인 차이가 나타나지 않음. LDL cholesterol 변화는 0주와 2주사이에 KD4:1그룹은 유의적인 차이가 나타나지 않았고, KD1.7:1그룹과 BD그룹은 유의하게 감소하였다. 0주와 1주사이에는 모든 그룹에서 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 1주와 2주사이에는 모든 그룹에서 유의하게 감소함. HDL cholesterol 변화는 시간에 관계없이 그룹에 관계없이 유의적

인 차이가 나타나지 않았음. BD그룹은 0주와 1주, 0주와 2주에서 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 1주와 2주 사이에서 유의하게 감소하였음 (표 2-8-5)

표 2-8-4. Changes in blood lipids by each group

	KD4:1 ²⁾			KD1.7:1 ³⁾			BD ⁴⁾		
	$\Delta 0w-1w$ ⁵⁾ (n=13)	$\Delta 1w-2w$ ⁶⁾ (n=8)	$\Delta 0w-2w$ ⁷⁾ (n=8)	$\Delta 0w-1w$ (n=13)	$\Delta 1w-2w$ (n=11)	$\Delta 0w-2w$ (n=11)	$\Delta 0w-1w$ (n=11)	$\Delta 1w-2w$ (n=11)	$\Delta 0w-2w$ (n=11)
Total cholesterol (mg/dL)	-2.5±21.9 ¹⁾	23.0±15.1‡	18.3±22.0	-1.3±18.9	18.9±18.2‡	14.0±13.9‡	-2.6±16.0	14.6±17.2‡	11.9±15.2‡
Triglyceride (mg/dL)	18.4±99.9	-7.4±57.8	27.7±43.9	7.9±44.3	5.0±30.1	14.3±33.9	8.4±44.6	-7.2±22.6	1.2±40.9
LDL cholesterol (mg/dL) ⁸⁾	-8.2±20.6	24.5±15.3‡	11.6±22.6	-3.4±17.4	15.5±18.2‡	9.6±13.2‡	-4.6±13.9	15.0±14.8‡	10.4±9.2‡
HDL cholesterol (mg/dL) ⁹⁾	1.5±10.6	-0.6±6.8	0.6±13.7	2.8±5.9	0.1±3.8	2.3±3.8	0.8±6.8	2.9±3.2‡	3.7±8.2

1) Values are means ± SD

2) KD4:1 : Ketogenic nutrition drink 4:1 3) KD1.7:1 : Ketogenic nutrition drink 1.7:1 4) BD : Balanced nutrition drink

5) Difference between 0week and 1week 6) Difference between 1week and 2weeks 7) Difference between 0week and 2weeks

8) LDL : Low density lipoprotein 9) HDL : High density lipoprotein

* Significance as determined by Paired t-test, Wilcowon signed rank test. P-value less than
 † p<0.05, ‡ p<0.01, § p<0.001

(마) 소변 케톤체 조사

○ Total ketone, Acetoacetate, β -Hydroxybutyric acid 변화는 연구 전 (중재 시작 전 0주), 중 (중재 실시 후 1주), 후 (중재 실시 후 2주)의 시간에 따라 각 그룹에서 유의적인 차이가 나타났고, Total ketone, β -Hydroxybutyric acid 변화는 시간에 따라 그룹간의 유의적인 상호작용 효과가 나타났으며 Acetoacetate 변화는 시간에 따라 그룹간의 유의적인 상호작용 효과가 나타나지 않음

○ Total ketone, Acetoacetate, β -Hydroxybutyric acid 변화는 0주와 1주사이에서 유의적으로 증가하였다가 1주와 2주사이에서 유의적인 차이가 나타나지 않음 (표 2-8-6, 그림 2-8-2)

2-8-5. Changes in ketone body biomarkers of each group at 0week, 1week and 2weeks

	KD4:1 ²⁾ (n=8)	p-value Time	KD1.7:1 ³⁾ (n=11)	p-value Time	BD ⁴⁾ (n=11)	p-value Time	p-value ⁵⁾ Time x Group
Total ketone(mmol/L)							
0week	0.12±0.05 ¹⁾		0.20±0.14		0.18±0.07		
1weeks	1.67±1.04	0.003	1.20±0.58	0.000	0.25±0.23	0.018	0.001
2weeks	2.05±1.55		1.33±0.85		0.46±0.36		
Acetoacetate(mmol/L)							
0week	0.05±0.02		0.09±0.06		0.08±0.04		
1weeks	0.48±0.37	0.03	0.42±0.19	0.000	0.12±0.12	0.024	0.124
2weeks	0.60±0.54		0.47±0.27		0.24±0.20		
β-Hydroxybutyric acid(mmol/L)							
0week	0.07±0.03		0.11±0.08		0.10±0.03		
1weeks	1.19±0.76	0.002	0.78±0.48	0.003	0.13±0.12	0.047	0.001
2weeks	1.44±1.12		0.86±0.73		0.22±0.21		

1) Values are means ± SD

2) KD4:1 : Ketogenic nutrition drink 4:1 3) KD1.7:1 : Ketogenic nutrition drink 1.7:1

4) BD : Balanced nutrition drink

5) Significantly different at p<0.05 by Repeated measures ANOVA

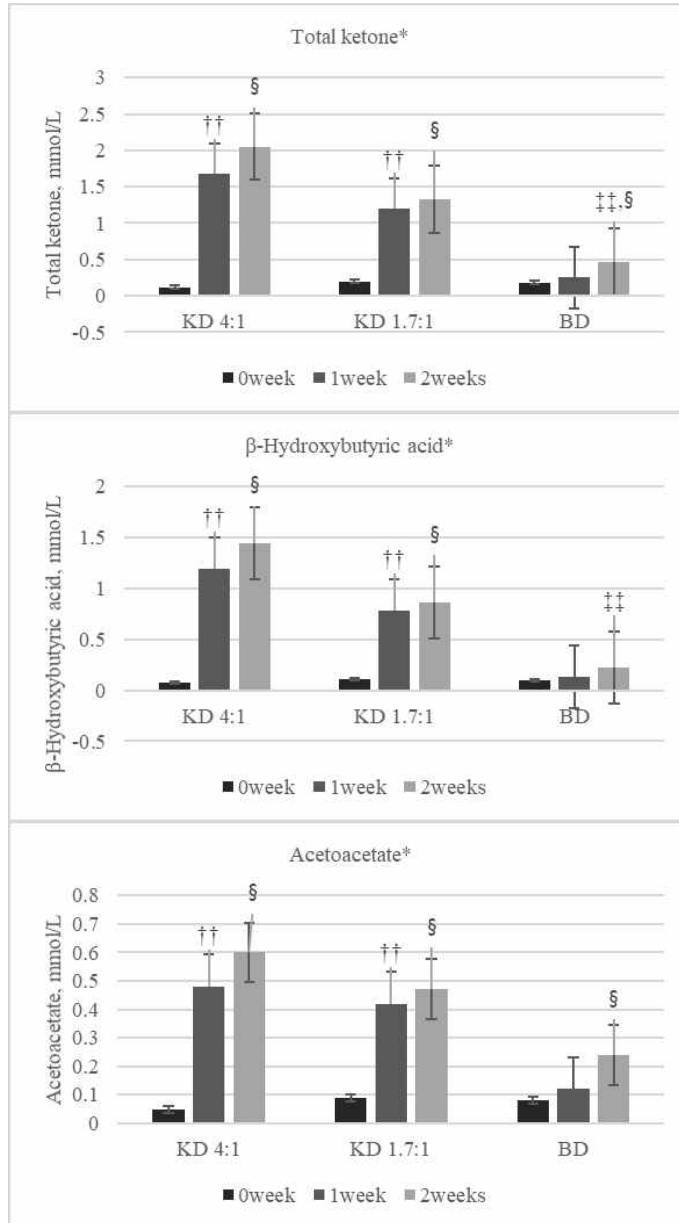


그림 2-8-2. Changes in ketone body biomarkers by each group at 0week, 1week and 2weeks

* : Significant difference time and main effect by Repeated Measured ANOVA
 ++ : Significant difference between 0week and 1week by Paired t-test, Wilcowon signed rank test.
 ++ : Significant difference between 1week and 2weeks by Paired t-test, Wilcowon signed rank test.
 § : Significant difference between 0week and 2weeks by Paired t-test, Wilcowon signed rank test.

(바) 신체증상 변화

○ 메스꺼움, 식욕감퇴 변화는 KD4:1, KD1.7:1그룹에서 연구 전 (중재 시작 전 0주), 중 (중재 실시 후 1주), 후 (중재 실시 후 2주)의 시간에 따라 유의적인 차이가 나타남. 변비, 짜

증•신경질 변화는 KD4:1그룹에서 시간에 따라 유의적인 차이가 나타났고, 복부팽만감, 무기력 변화는 KD1.7:1그룹에서 시간에 따라 유의적인 차이가 나타나짐. 포만감 변화는 BD 그룹에서 시간에 따라 유의적인 차이가 나타남

- 식욕감퇴 변화만 KD4:1, KD1.7그룹에서 시간에 따른 유의적인 차이가 그룹간에 나타났고, 나머지 증상들에서는 시간에 따른 유의적인 차이가 그룹간에 나타나지 않음. 식욕감퇴 변화는 KD4:1, KD1.7:1그룹에서만 0주와 1주사이에 유의적으로 증가하였다가 1주 2주 사이에 유지됨 (그림 2-8-3)

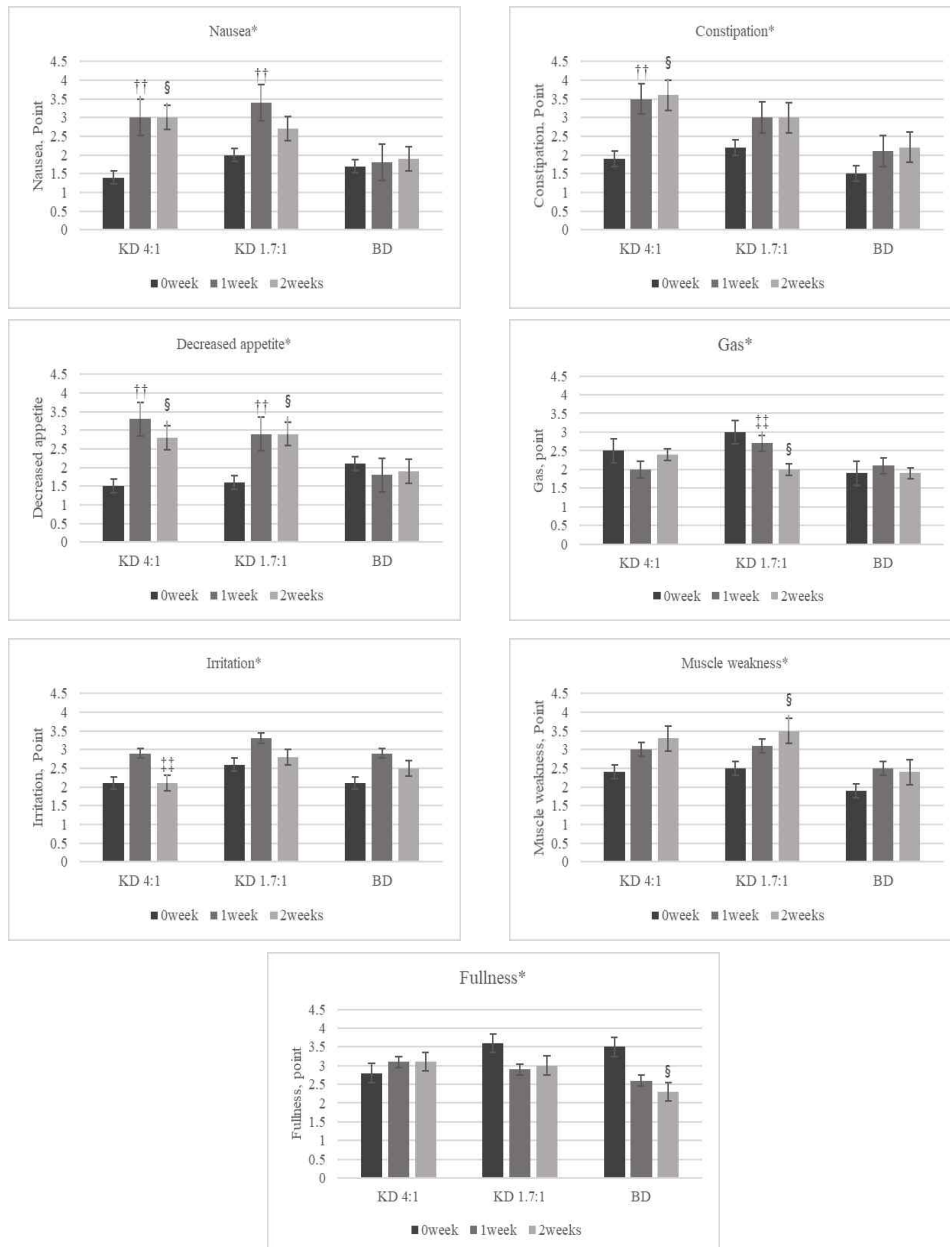


그림 2-8-3. Changes in symptom scores(side effects) reported by each group

- * : Significant difference time and main effect by Repeated Measured
- ++ : Significant difference between 0week and 1week by Paired t-test, Wilcowon signed rank test.
- ≠≠ : Significant difference between 1week and 2weeks by Paired t-test, Wilcowon signed rank test.
- § : Significant difference between 0week and 2weeks by Paired t-test, Wilcowon signed rank test.

(5) 고찰

- 본 연구에서는 체중감량을 위해 1일 필요 열량의 70% 수준으로 처방하여 약 -600 kcal를 목표로 모든 그룹에 동일한 방법으로 영양중재를 하였고, 다량 영양소 조성 비율이 각각 다른 영양음료를 준비하여 2주간의 영양음료 섭취를 하는 영양 중재를 진행함

- 1일 필요 열량과 연구 중재 기간 동안의 섭취한 열량의 평균 차이는 KD4:1그룹 799.7 ± 373.2 kcal, KD1.7:1그룹 743.8 ± 157.5 kcal, BD그룹 716.2 ± 94.4 kcal이었음. 이는 열량 섭취를 제한하지 않아도 자발적으로 식사량이 감소되는 것은 혈중 케톤체에 의한 식욕 억제 효과, 선택할 수 있는 음식 종류의 감소로 인한 영향이 함께 작용한 결과라고 여겨 짐

- 본 연구에서는 대상자들의 Total cholesterol, LDL cholesterol변화를 살펴보면 0주와 2주 사이에서 KD1.7:1그룹과 BD그룹만 유의하게 감소하였고, HDL cholesterol변화를 살펴보면 0주와 2주 사이에서 모든 그룹에서 유의한 차이가 나타나지 않았으며, BD그룹에서만 1주와 2주 사이에 유의하게 감소함

- 연구를 진행하는 동안 발생할 수 있는 일상생활에서 발생하는 자가 표시한 스트레스 변화를 살펴 보면 본 연구에서는 BD그룹에서 시간에 따라 유의적인 감소가 나타났으며, KD4:1, KD1.7:1그룹에서는 시간에 따라 유의적인 차이가 나타나지 않아 케톤음료의 섭취가 섭취량 제한 이외에 추가적인 스트레스를 유발하지는 않은 것으로 나타남

2. 인지 기능 개선 제품 가능성 검토

가. 연구 목표

- 개발된 포물라가 인지기능이 저하된 노인의 영양상태에 미치는 효과 및 순응도 평가

나. 연구 목적

각각 완전균형영양식과 케톤식 액상영양식(최종 개발 포물러)을 3주 동안 섭취한 후, 인지 기능이 저하된 노인의 영양상태, 일상생활 수행능력 및 인지기능설문 결과를 비교하여 효과를 평가하고, 연구 액상음료의 순응도를 평가한다.

다. 연구 개발 결과

- 만 60세 이상 노인대상으로 3주간의 개발된 케톤 음료의 인체적용 시험

다. 연구계획

(1) 연구기간: 2018. 05 ~ 2018.12 (8개월)

(2) 대상자 선정 : 만 60세 이상 노인 총 30명 (비교군 15명, 실험군 15명)

* 대상자 선정기준 (아래 항목 중 i)을 필수로 포함하며, 그 밖에 하나 이상 항목에 해당되는 자)

- i) 만 60-91세 남녀 노인
- ii) BMI 18 이상인 자
- iii) K-Mini-Mental State Exam(K-MMSE) 점수가 24점 미만인 자
- iv) 식사준비를 포함한 일상생활 도움을 줄 수 있는 동거가족 혹은 보호자가 있는 자
- v) 치매위험인자(치매가족력, 흡연, 과도한 음주, 사회적 고립)을 가지고 있는 자
- * 대상자 제외기준 (아래 항목 중 하나 이상 해당되는 자는 제외)
 - i) 대사관련 문제로 저탄수화물·고지방 식사를 할 수 없는 자
 - ii) 감각기관의 장애가 심한 자
 - iii) 당뇨 인슐린주사 투여, 이살지질혈증의 과거력이 있는 대상자
 - iv) 최근 24개월 간 CT 혹은 MRI 검사결과에서 암종, 골격장애, 퇴행성 질환을 보이는 자
 - v) 치매치료제 및 기타질환(당뇨, 이살지질혈증 등)으로 약물을 복용하고 있는 자
- * 중도 탈락 기준
 - i) 3주 간 제공하는 액상영양음료(시험음료 혹은 완전균형영양음료)의 지속 섭취의 중단 시
 - ii) 건강상의 문제가 생겨 연구를 지속하지 못하는 경우
 - iii) 영양교육 총 5회 중 2회 이상을 불참하는 경우
 - iv) 대상자가 불편함을 느끼는 경우

(3) 각 그룹별 적용 음료 영양 정보 (표 2-8-6)

표 2-8-6. 각 그룹별 영양성분 비교

영양성분	케톤음료(3pk/day)		일반	완전균형음료 (2can/day)
	함량 (g/125ml)	열량 (kcal)	함량 (g/200ml)	열량 (kcal)
탄수화물	2.6	10.6	27	108
단백질	9.6	38.4	8	32
지방	21.3	191.5	7	63
합계		240.5		200
케톤/비케톤	1.7 : 1			
탄:단:지	4:16:80		53:16:31	

(4) 분석 지표

urine strip, inbody, K-MMSE (Korean-Mini Mental State Exam), 일상 신체활동 검사 (약력, 눈감고 외발서기, 4m 보행속도), 설문지(기분감정, 피로감, 배고픔, 불면증, 신체변화(증상), 신체활동, 식욕변화)

라. 연구진행

- (1) 2018.05 경희대학교 생명윤리심의위원회 신청하였으며 6월에 승인 완료

경희대학교 생명윤리심의위원회 심의결과서

수신	연구책임자	성명	박 유 경	소속	동서의학대학원
승인번호	KHSIRB-18-015				
연구과제명	저탄수화물·고지방식(케톤식)이 인지기능이 저하된 노인의 영양상태에 미치는 효과 평가 및 순응도 연구				
연구종류	<input checked="" type="checkbox"/> 인간자체 <input checked="" type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 관찰연구 <input type="checkbox"/> 행동연구 <input checked="" type="checkbox"/> 임상연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물 등 (<input type="checkbox"/> 보관된 검체 사용 <input type="checkbox"/> 새로운 검체 수집·보관·이용) <input type="checkbox"/> 유전자연구 <input checked="" type="checkbox"/> 개인정보 <input type="checkbox"/> 기타()				
심의종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정규심의 <input type="checkbox"/> 신속심의 <input type="checkbox"/> 지속심의 <input type="checkbox"/> 면제				
심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 조건부승인 <input type="checkbox"/> 보완추재심의 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 심의면제 <input type="checkbox"/> 승인된 인간, 인체유래물등 대상 연구 등의 중지 또는 보류				
심의날짜	2018 년 6 월 29 일	승인유효기간 (최대 1년)	2019 년 6 월 28 일 까지		

※ 승인된 연구 프로토콜 및 관련 서류의 변경사항이 있는 경우 위원회에 변경신청서를 제출하여야 함
 ※ 연구종료 6개월 이내에 종료보고를 하여야 하며 돌이행 시에는 돌이막을 받을 수 있음

경희대학교 생명윤리심의위원회 위원장



(2) 연구 대상자 모집 방법 : 2018.06 연구대상자 모집 공고를 이용하여 모집하고, 연구의 목적과 방법을 설명한 후 연구대상자 선정기준과 제외기준에 부합하는 자 중, 자발적으로 연구에 동의하는 자를 모집함

(3) 취약 대상자 대책 : 본 연구는 인지기능이 저하된 노인이라는 취약한 대상자를 포함하는 연구이므로, 연구 대상자의 자발적 참여를 원하는 경우만 참여시키고, 이해력이나 판단력의 저하를 감안하여 모든 대상자는 직계가족이나 동거인과 같은 보호자(법정대리인)의 연구동의를 같이 받는 보호조치를 취함

(4) 최종 대상자: 총 31명(남 8명, 여 23명) 진행 완료 (1명 병원입원으로 인해 중간점검 이전 중도탈락)

마. 연구 방법

(1) 대상자의 분류

1군- 케톤증유발 시험음료+케톤식사군, **KK group**(ketogenic drink & ketogenic diet)

2군-완전균형영양음료+일반식사군, **NN group**(nutrition drink & normal diet)

(2) 연구 프로토콜

(가) 3주 기간 동안, 연구 대상자들은 배정된 음료를 배정된 양 [완전균형영양음료 2can/day(400kcal), 케토웰 3pk/day(450kcal)] 섭취하며, Control group 대상자들은 평소 일반식사를, Case group 대상자들은 ketogenic 식사를 유지함

(나) 모든 연구 대상자들은 연구 기간동안 매일 하루 섭취식사와 섭취 음료량을 기록하게 하고, Case group 대상자들은 urine strip을 이용하여 매일 3회(기상직후, 점심 혹은 저녁 식전, 취침 직전) 케톤체측정을 측정하여 기록함

(다) 모든 연구 대상자들에게 3주 동안 일주일에 2회씩 총 6회의 영양교육 및 영양상담을 진행한다. 일반 완전 균형영양식을 섭취하는 대상자들에게는 60세 이상 어르신을 위한 일반영양교육을 진행하고, 케톤식 연구음료를 섭취하는 대상자들에게는 저탄수화물 고지방식사의 식이변경에 도움이 되는 영양교육을 진행함

(라) 사전, 중간, 최종 점검을 위해 3회 방문 시, inbody를 통한 체성분 측정, 일상신체활동 검사, 설문지 조사를 시행하고, K-MMSE설문을 이용한 인지기능 검사는 사전과 최종점검에 별도의 분리된 공간에서 1 대 1로 진행함

(3) 식사기록

○ 상세한 식재료 및 재료량을 포함한 식사일지 작성에 어려움이 있을 것이라는 가정 하에, 별도 제작한 식사일지 스티커책자를 이용하여, 하루에 섭취한 단백질류, 채소류, 탄수화물류, 오일류, 물, 견과류, 과일류, 그리고 유제품류의 섭취와 함께 제공 영양음료의 섭취량을 기록하게 함

(4) 영양교육

○ 영양교육은 연구대상자와 시간 및 장소를 조율하여 일주일 2회 ppt 등을 이용하여 진행하였음 (표 2-8-7, 표 2-8-8)

표 2-8-7. KK group 영양교육 진행 일정표

차수	교육내용	교육방법 및 시간
1차	저탄수화물·고지방 식사의 개념, 알려진 효능 및 활용 가능한 레시피 제시	강의 / 15-20 min
2차	탄수화물의 종류 및 저탄수화물·고지방 식단에서 피해야 하는 음식 교육	강의 / 15-20 min
3차	지방의 종류 및 저탄수화물·고지방 식사에 활용 가능한 지방 제안 및 레시피 제시	강의 / 15-20 min
4차	Ketogenic diet 식이 유지 시 주의점 및 보충해주면 좋은 영양소 교육	강의 / 15-20 min
5차	어려웠던 점 및 신체변화 상담 및 대안(개선)책 제시	1:1 상담 / 15min

표 2-8-8. NN group 영양교육 진행 일정표

차수	교육내용	교육방법 및 시간
1차	영양소 골고루 섭취하기, 식품구성 자전거 교육	강의 / 15-20 min
2차	대표적인 노인성 질환의 종류와 노인영양의 문제점 알기	강의 / 15-20 min
3차	싱겁게 먹고 건강하게 살기 (저염교육)	강의 / 15-20 min
4차	식품첨가물 및 영양성분 표시 알기	강의 / 15-20 min
5차	당(sugar) 많은 음식 알고, 혈당조절 교육 (저당교육)	강의 / 15-20 min

(5) 소변 케톤농도 검사 기록

- 케톤체 검사용 시험지의 끝에 위치한 시험부분에 소변을 완전히 적신 뒤, 1분 후 케톤체 검사시험지 용기에 부착된 비색표에 비교하여 작성한다 (그림 2-8-4)

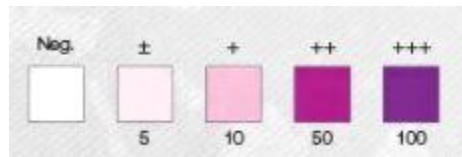


그림 2-8-4. URISCAN 1 Ketones strip 비색표

- 배부받은 케톤검사 기록지에 측정 시간과 농도를 기록함

(6) 배부 고지방 간식

- Case group 대상자들에게 매주 1회 저탄수화물 고지방 식이로의 변경에 도움이 되는 필수지방산이 많이 함유된 간식을 제공함
 - i) 닥터넛츠 (1 주차) - 아몬드, 개슈넛, 호두, 피칸, 피스타치오 함유 / 28g * 7 팩 제공 (표 2-8-9)

표 2-8-9. 닥터넛츠 1팩(28g) 영양성분표

1팩	탄수화물	당류	식이섬유	지방	트랜스지방	포화지방	콜레스테롤	단백질	나트륨	칼슘	인	철	아연	vit B1	vit E	나이아신
28g	6g (2%)	1g (1%)	3g (12%)	15g (28%)	0g	2g (13%)	0mg (0%)	5g (9%)	0mg (0%)	33.3mg (5%)	15.6mg (2%)	1.2mg (10%)	0.8mg (9%)	2.04mg (170%)	0.6mg αTE(5%)	0.3mgNE(2%)

- 참치통조림 (2 주차) - 동원 마일드 참치 150g * 2 캔 제공 (표 2-8-11)

표 2-8-10. 동원 마일드 참치통조림 (100g) 영양성분표

1회 제공량	탄수화물	당류	지방	트랜스지방	포화지방	콜레스테롤	단백질	나트륨
100g, 135kcal	0g (0%)	0g (0%)	7g (13%)	0g	0.5g (4%)	45mg (15%)	18g (33%)	410mg (21%)

- 제조 올리브드레싱 (3 주차) - 350ml 제공

올리브유 350ml, 된장 17g, 마늘 17g, 아몬드 10g, 레몬 70g, 꿀 20g, 쪽파 소량, 레몬즙 소량 (표 2-8-12)

표 2-8-11. 제조 올리브드레싱 1통 (350ml) 영양성분표

350ml	탄수화물	지방	식물성지질	동물성지질	단백질	콜레스테롤	총지방산	포화지방산	단일불포화지방산	다불포화지방산
3375kcal	8g	361g	361g	0g	7g	0mg	334g	43g	253g	38g

(7) 연구 점검

(가) 사전점검 (0일차)

- : 연구의 목적과 수행방법에 대하여 설명
- : 14 일분의 액상영양음료 제공
- : 연구기간 내 섭취 식사와 순응도 평가를 위한 식사일지 제공
- : 케톤체 생성 및 농도 확인을 위한 소변케톤 스트립 전달(KK group)
 - ⊙ 설문조사
 - 인구학적 개인정보 확인을 위한 설문
 - 인지기능 검사를 위한 K-MMSE 설문검사
 - 기분·감정 검사를 위한 설문검사
 - ⊙ 일상생활 신체활동 능력 검사 (악력, 눈감고 외발서기, 4m 보행속도)
 - ⊙ inbody270 을 이용하여 체성분 검사
 - ⊙ 식이조사 - 제공하는 식사일지에 식사섭취량 기록방법 교육

(나) 중간점검 (10 일차)

- : 나머지 7 일 분의 액상영양식을 전달
 - ⊙ 설문조사
 - 배변상태, 식욕 등을 포함한 신체변화를 확인하기 위한 설문
 - 기분·감정 검사를 위한 설문검사
 - ⊙ 일상생활 신체활동 능력 검사 (악력, 눈감고 외발서기, 4m 보행속도)
 - ⊙ inbody270 을 이용하여 체성분 검사
 - ⊙ 식이조사 - 지난 7 일(day1 - day7)의 식사섭취를 기록한 식사일지 수거
 - ⊙ 케톤체검출 조사 - 지난 7 일(day1 - day7)의 케톤소변검사 기록지 수거

(다) 최종점검(21 일차)

- ⊙ 설문조사
 - 인지기능 검사를 위한 K-MMSE 설문검사
 - 기분·감정 검사를 위한 설문검사
 - 배변상태, 식욕 등을 포함한 신체변화를 확인하기 위한 설문
- ⊙ 일상생활 신체활동 능력 검사 (악력, 눈감고 외발서기, 4m 보행속도)
- ⊙ inbody270 을 이용하여 체성분 검사
- ⊙ 식이조사 - 지난 14 일(day8 - day21)의 식사섭취를 기록한 식사일지

수거

◎ 케톤체검출 조사 - 지난 14 일(day8 - day21)의 케톤소변검사 기록지

수거

(8) 관찰, 검사 항목 및 방법

(가) 일반사항 조사 : 연구대상자들의 키, 체중, 생년월일, 성별 등과 같은 인구학적 정보 조사

(나) 건강 관련 일반사항 조사 : 가족력, 운동, 식습관, 최근 체중변화 등 정보조사

(다) 시험 제품 복용순응도 조사 : 식사일지에 하루 섭취 음료량 기록하게 하여 섭취량 체크

(라) 기능성 평가지표

* 주유효지표 : K-MMSE

* 부유효지표 : 인바디를 이용한 체성분량 / 인지기능검사를 위한 K-MMSE / 기분, 감정 검사를 위한 설문검사 / 악력검사(Grip strength, kg) / 눈감고 외발서기(one leg balance with eyes closed, sec) / 4m 보행속도 검사(4m walking speed, sec)

① K-MMSE : 총 30문항으로 이루어진 검사로, <지남력>, <기억력>, <주의집중력과 계산능력>, <언어와 시공간 구성능력>을 평가하는 항목들로 구성되어있으며, 각 항목의 점수 총 합은 30점이다. MMSE 총점에 따라 24~30점은 인지적 손상없음, 18~23점은 경도의 인지기능장애, 그리고 0~17점은 분명한 인지기능장애로 분류하고 있다.

② 악력측정 : 악력계는 Jamar® Plus+ Digital Hand Dynamometer(미국, 제조사 Preston)를 이용하여 측정하였고, 오른손, 왼손 각각 3회씩 측정하였다.

③ 눈감고 외발서기 : 자연스럽게 선 상태에서 양손을 허리에 붙이고 임의의 한쪽 발을 들어 균형을 유지하도록 지시한다. 시작과 함께 양쪽 눈을 감고 균형을 유지한 시간을 기록. 이때 지지하는 발이 움직이거나 허리에 붙인 손이 떨어지거나 눈이 뜬 지점에서 균형을 잃은 것으로 간주

④ 4m 보행속도 검사 : 지면에 4m 출발선과 도착선을 만든 후, 시작과 함께 평소 걸음걸이 속도로 걷게 하여 양방이 끝 선을 통과하는 소요시간을 기록. 스탱워치는 CL-055(대만, 제조사 TOPPA)을 사용함.

바. 연구 결과

(1) 자료수집 및 기록방법

대상자의 설문기록, 식사일지, 전후 신체검사 결과 등을 취합한 후 엑셀에 입력함

(2) 결과 평가기준 및 통계분석, 해석방법

영양중재 전 baseline (0일) 대비 종료 시점(3주)의 영양상태(MNA), 인지기능(K-MMSE) 설문점수, 체구성(골격근량, 체지방률 등) 그리고 신체활동능력 검사 등을 기술통계량 분석을 하여 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고, baseline 대비 각 지표들의 총점 변화치의 통계적 유의성은 (paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test)를 이용해 검정할 예정이다. 특히 영양중재 시행 전 baseline (0일) 대비 종료 시점(3주)의 inbody 검사를 통한 골격근량의 변화를 제 1 주유효지표로 그 변화정도를 확인하였다.

☒ 2-8-12. Characteristics of groups by T-test

	KK (n=15)	NN (n=16)	<i>p</i> -value
Age	71.07±4.92	64.88±4.03	.001
Height	157±8.69	155.06±7.52	.514
Weight change	3.53±.990	3.5±1.10	.930
Exercise (times/wk)	3.07±.96	2.81±1.38	.558
Exercise time (min)	52±21.11	33.75±25.26	.037

☒ 2-8-13. Anthropometric measurement

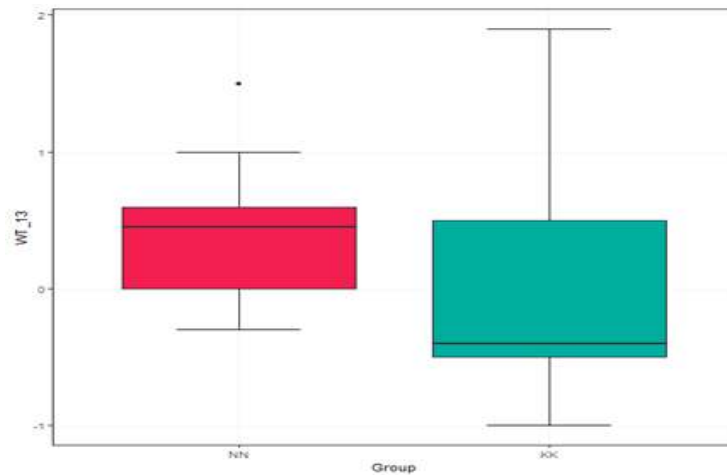
	KK (n=15)			NN (n=15)		
	Baseline	10 days	21 days	Baseline	10 days	21 days
Weight	62.5± 8.4	62.4±8.1	62.2±8.6	61.1±6.7	61.1±6.7	61.2±6.9
SMM (skeletal muscle mass)	23.01±4.08	22.99± 4.35	22.96±4.33	21.45±3.37	20.23±6.35	20.39±6.50
BFM (body fat mass)	20.06±6.22	20.03±6.09	19.94±6.26	21.54±3.63	19.69±6.50	19.63±6.65
BMI (body mass index)	25.34±2.94	25.30±2.80	25.04±2.84	25.22±2.25	23.57±6.87	23.60±6.89
PBF (percent body fat)	31.88±8.02	32.03±8.20	31.90±8.13	35.33±5.02	32.25±9.94	32.09±10.13
WHR (waist-hip ratio)	0.86±0.05	0.86±0.06	0.85±0.05	0.89±0.02	0.84±0.23	0.84±0.23
VFL (visceral fat level)	9.07±3.54	9.07±3.77	9.00±3.60	10.07±2.28	9.00±3.44	9.07±3.56

☒ 2-8-14. Descriptive Statistics of changes of K-MMSE

	KK		NN		p-value
	Baseline (n=15)	21days (n=13)	Baseline (n=16)	21days (n=15)	
K-MMSE	24.5 ± 3.8	26.3 ± 3.0	25.3 ± 2.9	25.9 ± 3.0	.007

☒ 2-8-15. Weight difference between baseline and 21days

	KK (n=13)	NN (n=14)	p-value
Difference_wt	0.393 ± 0.503	-0.046 ± 0.834	.0411



☒ 2-8-16. K-MMSE difference between baseline and 21days

	KK (n=13)	Median	NN (n=15)	Median	p-value
Difference_KMMSE	2.00 ± 2.71	1	0.93 ± 2.58	0	.0363

2-8-17. BMI difference between baseline and 21days

	KK (n=13)	Median	NN (n=15)	Median	p-value
difference_BMI	0.164 ± 0.198	-0.1	-0.00 ± 0.353	0.2	.0397

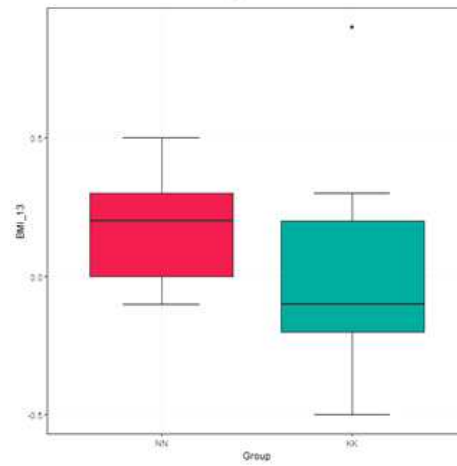
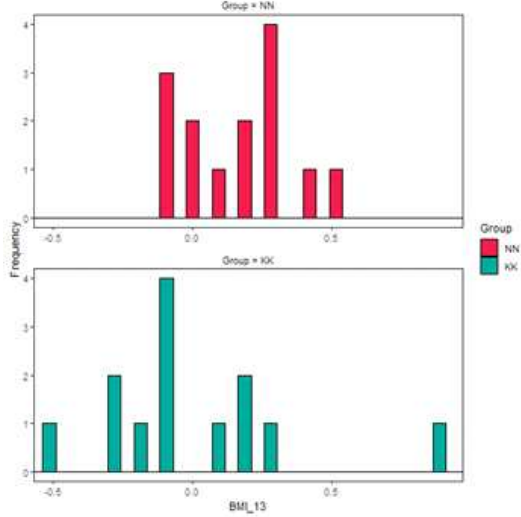
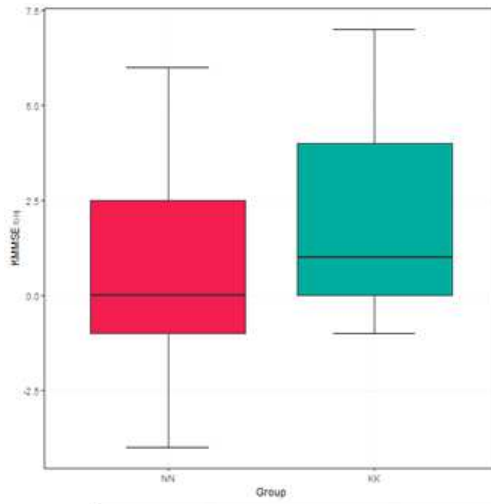
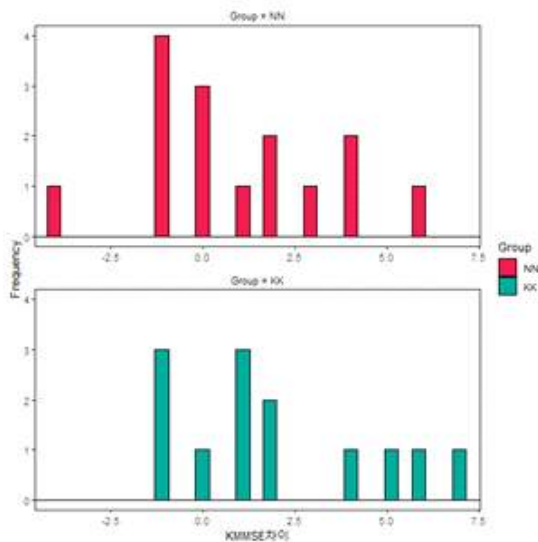
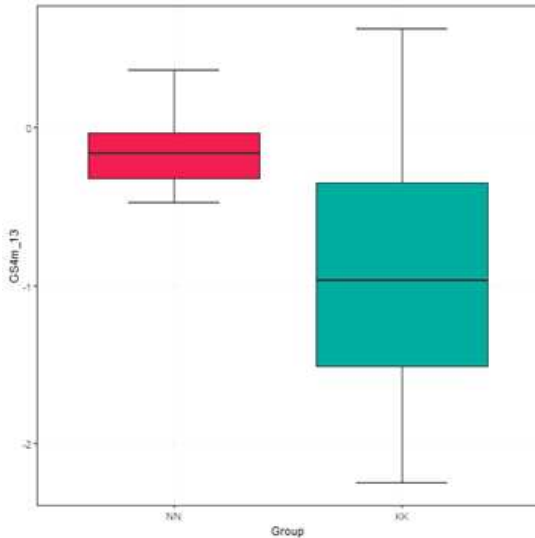


표 2-8-18. 4m Gait speed (sec) between baseline and 21days

	KK (n=13)	Median	NN (n=15)	Median	p-value
Difference_4m gait speed	-0.83± 0.88	-0.97	-0.13 ±0.24	-0.16	.0129



사. 고찰

○ 자료분석 결과, 만 60세 이상 노인 총 30명을 대상으로 한 연구에서 3주간의 케톤음료는 체중감소, BMI 감소, 등의 효과를 보였으며 이는 대조군의 전후차이에 비해 통계적으로 유의한 (p=0.0411) 결과였으며, 인지기능 검사지표인 K-MMSE에서도 평균 2점 정도의 상승을 하여 인지기능이 대조군에 비해 개선되는 효과를 보였다.

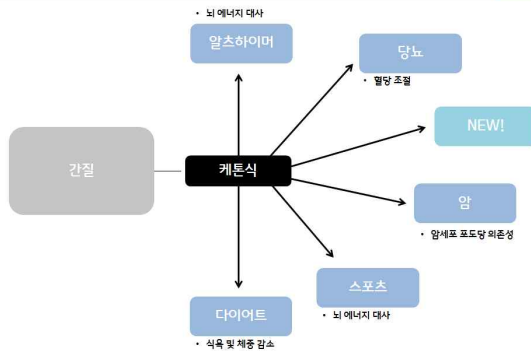
○ 이 외에도 4m 걷기의 속도가 케톤음료군에서 약 0.8초 감소된 것을 볼 수 있었다. 이는 체중감소가 있었음에도 불구하고 근육량의 손실은 없었던 것으로 설명될 수 있을 것이다.

9절. Base formula (케토웰) 출시를 통한 환자식 시장 진출

1. 시장 검토를 위한 케톤식의 식품 산업 적용 제품 조사

○ 해당 연구를 통해 개발된 Ketogenic diet인 케토웰의 출시를 위한 경쟁사 및 다양한 분야의 케톤식이 관련 제품조사 수행하였음. 이를 통해 케토웰의 연구결과 활용도를 높이고, 개발 제품의 시장 진출의 성공 가능성을 높이기 위한 자료 검토 수행하였음. 케톤식이의 식품 산업 현황 조사 결과 기존에 사용되는 뇌전증 분야 뿐만아니라 알츠하이머, 당뇨, 암, 스포츠, 다이어트 등 여러 가지 산업 분야에 적용되는 것으로 나타남. 특히 국외 제품의 경우, 건강한 사람들을 대상으로 하는 다이어트, 스포츠 제품의 경우 외인성 케톤보충제(beta-hydroxybutyrate)를 사용함으로써 소비자가 케톤식을 하지 않아도 혈중 케톤체를 높여주는 제품이 판매되고 있음.

케톤식의 식품 산업 적용



Maeil 케톤식과 알츠하이머

Accera Axona

회사 특징

- 스위스 내슈레의 자회사인 미국 Accera는 알츠하이머 치매 등 퇴행성 뇌질환에 특화된 신약 개발 기업

제품 특징

- Mild-to-moderate Alzheimer's disease 대상
- 포도당 대사가 부족하여 뇌신경 세포가 손상된 치매 환자에게 뇌에서 필요로 하는 유일한 대체 에너지원인 **Ketone** 공급
- 특정 genotype (ApoE4 negative)을 가진 대상에 효과
- 40 gram(17kcal) 30/Box \$280 (on-line 정기)/Once a day
- 구제되지 않음

구성 성분 특징 (구제되지 않음)

- Medium-chain triglycerides (MCTs)
- Contains milk and soy
- Gluten-free
- 추정분: Caprylic triglyceride (코코넛 오일, 밀핵유 유래)

섭취방법

- 음식 혹은 약제와 혼합
- 간헐 단제일 섭취를 권장함
- 같이 섭취 시 소화 불량 감소

섭취군은 대조군에 비하여 **치매 평가의 평균점수가 4.77 차이로 개선되었음.**

Study of the ketogenic agent AC-1332 in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial 2019

케톤식과 다이어트&운동

Maeil 케톤식과 스포츠

pruvit (multi-level marketing)

- 케톤은 신체에서 자연적으로 발생하는 내인성과 외부로 섭취하는 외인성
- 'Pruvia Keto OS(ketone operating system)'는 외인성 케톤보충제로 소비자가 케톤식을 하지 않아도 케톤증을 만들어줌
- 에너지 증가, 전문 선수 도움, 식욕 감소등을 내세우며 하루 1-2회 권장
- 신체내에 가장 효과적인 beta-hydroxybutyrate가 사용됨.
- 2주 비용은 180 달러임.
- 쇼변에서 케톤제를 측정할 수 있는 진단 키트(미국 구매)로 케톤증을 스스로 진단할 수 있도록 함. 섭취 시 1시간 이내 도달.

케톤제 확인

케톤식 교육 동영상

제품말함만 케톤식 레시피

PRE WORKOUT | WEIGHT LOSS | KETO | GENERAL HEALTH | PROTEIN

HOW DOES KETO HYDRATE INCREASE PERFORMANCE?

Nutrition Facts

1 Serving Per Container	
Serving Size	30 fl oz (888 ml)
Amount Per Serving	
Calories	35
Total Fat 1%	% Daily Value*
Sodium 1%	8%
Total Carbohydrate 1%	1%
Protein 1%	1%
Cholesterol 1%	1%
Magnesium 1%	1%
*Percent Daily Values are based on a diet of other people's secrets.	
**This % Daily Value is only a guide. It is not intended to be used for general nutrition advice.	

KETO HYDRATE BLEND

Cosmos Beta Hydroxybutyrate	1000 mg
Potassium Beta Hydroxybutyrate	1000 mg
Sodium Beta Hydroxybutyrate	1000 mg
Magnesium Beta Hydroxybutyrate	1000 mg

그림 2-9-1. 케톤식의 산업적 응용 예

○ 이는 국외에서 케톤식이에 대한 소비자 인지 수준이 높아짐에 따라, 스포츠와 다이어트 등 일반 식품 분야에서도 케톤식이에 대한 소비자의 요구도가 증가한 것으로 해석할 수 있음.

2. 제품 출시를 위한 제품 표시사항 기초자료 검토 및 논의

○ 제품 출시를 위해 표시하고자 하는 영양정보 및 소구점을 논의하는 기초자료 작성하였음. 적용 사항은 식품의 표시기준에 따른 영양정보, 살균조건, 소비자안전을 위한 주의 표시사항, 영양정보 표기사항 등 제품에 표기하고자 하는 전 항목이 해당됨. 또한 제품의 출시를 위한 사전광고 심의를 진행함

3. 특수의료용도식품 규격 검토 및 케토웰 적합여부 검증

○ 생산된 케토웰 성분확인 및 품질의 적합성 확인을 위해 「식품위생법」 제7조에 따른 「식품의 기준 및 규격」에 의거하여 특수의료용도식품 중 환자용 식품의 규격 및 시험방법을 적용하여 실시하였음. 또한 시험생산 시 설립한 제조공정에 따라 본생산을 진행하였음.

○ 본 제품 분석 및 검토 결과 표시하고자 하는 영양정보 및 환자용 식품 규격 시험항목에 대하여 모두 적합하였으며, 안정적인 생산이 진행되었음을 입증하였음.

표 2-9-1. 환자용식품 규격 (식품공전)

환자용식품 규격		
항목	단위	법적기준
수분		10 이하 (분말제품에 한함)
열량		-
조단백질		표시량 이상이어야 한다. (다만, 질환의 특성상 제한할 필요가 있으면 표시량 이하)
조지방		표시량 이상이어야 한다. (다만, 질환의 특성상 제한할 필요가 있으면 표시량 이하)
비타민		표시량 이상이어야 한다. (비타민 A, B1, B2, B6, C, D, E, 나이아신, 엽산에 한하여 적용한다)
무기질		표시량 이상이어야 한다. (칼슘, 철, 아연에 한하여 적용한다)
불소		0.2 mg/100kcal 이하이어야 한다.(불소 함유 식품첨가물을 사용한 경우에 한함)
대장균군		n=5, c=0, m=0
세균수		n=5, c=1, m=10, M=100 (분말제품은 n=5, c=2, m=1,000, M=10,000)
타르색소		불검출
바실러스세레우스		n=5, c=0, m=100
성상		이미, 이취 없음
풍미		이미, 이취 없음
이물		금속 이물 10mg/kg 이하
외관		
내용량		
Lot 확인		
식중독균		
	g 당	살모넬라 : 음성 장염비브리오 : 음성 리스테리아 모노사이토제네스 : 음성 장출혈성 대장균 : 음성 캄필로박터 제주니/콜리 : 음성 여시니아 엔테로콜리티카 : 음성 클로스트리디움 퍼프린젠스 : 음성 황색포도상구균 : 음성



시험 성적서

제품명	케토웰 초도분생산 181005		
제조사	매일유업(주) 광주공장		
공급사	매일유업(주)		
제품유형	환자용식품	원산지	한국
시험접수일	2018.10.16	제품용량	125ml
제조일자	2018.10.05	유통기한	2019.04.04
의뢰목적	제품검사	의뢰인	유아식 연구팀 김진민

귀하가 시험 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사항목	단위	분석결과	기준규격	시험방법	판정
탄수화물	g/125ml			식품공전 일반성분시험법	적합
단백질	g/125ml		표시량 이상	식품공전 일반성분시험법	적합
지방	g/125ml		표시량 이상	식품공전 식품별 규격확인시험법	적합
포화지방	g/125ml			식품공전 GC정량법	적합
트랜스지방	g/125ml			식품공전 GC정량법	적합
콜레스테롤	mg/125ml			식품공전 GC정량법	적합
나트륨	mg/125ml			식품공전 ICP법	적합
비타민A	ugRE/125 ml		표시량 이상	식품공전 HPLC정량법	적합
비타민B1	mg/125ml		표시량 이상	식품공전 비타민 B군동시분석법	적합
비타민B12	ug/125ml		표시량 이상	식품공전 미생물학적시험법	적합
비타민B2	mg/125ml		표시량 이상	식품공전 비타민 B군동시분석법	적합
비타민B6	mg/125ml		표시량 이상	식품공전 비타민 B군동시분석법	적합
비타민C	mg/125ml		표시량 이상	식품공전 HPLC정량법	적합
비타민D	ug/125ml		표시량 이상	식품공전 HPLC정량법	적합

검사항목	단위	분석결과	기준규격	시험방법	판정
비타민E	mg α-Toc/125ml	5.7	표시량 이상	식품공전 HPLC정량법	적합
비타민K	ug/125ml			식품공전 HPLC정량법	적합
칼슘	mg/125ml		표시량 이상	식품공전 비타민 B군동시분석법	적합
나리아신	mg/125ml		표시량 이상	식품공전 비타민 B군동시분석법	적합
비오틴	ug/125ml		표시량 이상	식품공전 미생물학적시험법	적합
판토텐산	mg/125ml			식품공전 HPLC정량법	적합
칼슘	mg/125ml		표시량 이상	식품공전 ICP법	적합
철	mg/125ml		표시량 이상	식품공전 ICP법	적합
아연	mg/125ml		표시량 이상	식품공전 ICP법	적합
마그네슘	mg/125ml			식품공전 ICP법	적합
칼륨	mg/125ml			식품공전 ICP법	적합
요오드	ug/125ml			식품공전 ICPMS법	적합
말산	mg/125ml			식품공전 ICP법	적합
몰핀	mg/125ml			식품공전 GC정량법	적합
구리	mg/125ml			식품공전 ICP법	적합
L-카르니틴	mg/125ml			GB 29989-2013	적합
면	mg/125ml			식품공전 ICP법	적합
수분	%			식품공전 상열건조법	해당사항없음
회분	%			식품공전 열안정시험법	해당사항없음
알류	g/125ml			식품공전 유기분석법	적합
과당				식품공전 기기분석법	해당사항없음
유당				식품공전 기기분석법	해당사항없음
맥아당				식품공전 기기분석법	해당사항없음
저당				식품공전 기기분석법	해당사항없음
포도당				식품공전 기기분석법	해당사항없음
갈락토오스				식품공전 기기분석법	해당사항없음
세포발육	형상	유성	유성	식품공전 계균발육시험법	적합
광사능(세균 134+137)	Bq/kg	불검출	1000이하	식품공전 라듐핵분열성기법	적합

그림 2-9-2. 케토웰 시험성적서

4. 유통기한 연장 및 다양한 향미 제품 개발

○ 케토웰 제품은 멸균 공정을 통해 생산되었으며, 차단성이 우수한 테트라팩으로 포장되어 있는 있습니다. 현재 유통기한은 보존검사 기간을 고려하여 6개월로 산정되어 있으나, 제품의 특성상 유통기한의 연장 검토가 필요하여 장기 보존테스트를 진행하고 있음.

○ 현재 동일한 유형의 제품군 (환자용식품) 중에 동일한 멸균 방식을 사용하고 있는 제품의 유통기한이 6~12개월인 점과 고지방 제품의 특성을 고려하여 지속적인 안전성 테스트 (물성, 물리화학적, 미생물학적 특성 등) 및 검증을 통해 유통 기한을 연장 검토하고, 유통 효율성을 증대하고자 함

○ 신제품 및 예상 판매량을 고려하여 소비자가 익숙하고, 순응도가 높은 누룽지 맛 한가지 맛을 출시하였으나, 여러 가지 맛의 제품을 필요로 하는 ONS (oral nutrition supplement)의 특성상 다양한 맛 출시가 반드시 이루어 져야 함, 따라서, 개발 과정에서 같이 검토되었던, 다양한 맛을 기반으로 라인업 확장을 지속적으로 검토 진행예정임

5. 학회 홍보 및 미디어 언론 활용

○ 케토웰 출시 후 제주도에서 개최된 국제 학회인 ‘제 6차 케톤생성 식이치료 글로벌 심포지움(KETO 2018)’에 참여하였음. 해당 학회는 전 세계 전문가들이 모여 케톤생성 식이치료법에 대한 노하우를 공유하고 토론하는 학술 행사로, 2008년 미국에서 시작되어 영국, 캐나다와 같이 북미와 유럽 대륙에서 개최된 글로벌 학회임. 학회 부스지원을 통해 케토웰에 대한 연구 자료를 발표하여 제품을 홍보하였으며, 해당 성과를 약 10여 편에 이르는 언론 홍보 자료를 배포하였음.



그림 2-9-2. KETO 2018 언론 홍보 자료

10절. 연구 개발 성과

1. 논문 성과

가. SCI 논문

No	내용	
1	논문명	Different biological behaviors in left-sided pancreatic cancer according to Yonsei criteria: Proposal of a modified Yonsei criteria score
	저자명	Seoung Yoon Rho, Mijin Yun, Chang Moo Kang, Sung Hwan Lee, Ho Kyoung Hwang, Woo Jung Lee
	학술지명	Pancreatology
	Vol. (NO.)	18(8) 990-995
	국내외 구분	해외
2	논문명	Potential Impact of Phellinus linteus on Adherence to Adjuvant Treatment After Curative Resection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Outcomes of a Propensity Score-Matched Analysis
	저자명	Sung Hwan Lee, Ho Kyoung Hwang, Chang Moo Kang, and Woo Jung Lee
	학술지명	Integrative Cancer Therapies
	Vol. (NO.)	Article first published online: December 3, 2018
	국내외 구분	해외

3	논문명	The Potential Use of a Ketogenic Diet in Pancreatobiliary Cancer Patients After Pancreatectomy
	저자명	Ju Hye Ok, Ho Sun Lee, Hae Yun CHUNG, Sung Hwan Lee, Eun Jeong Choi, Chang Moo Kang and Song Mi Lee
	학술지명	ANTICANCER RESEARCH
	Vol. (NO.)	38: 6519-6527
	국내외 구분	해외
4	논문명	Two-Week Exclusive Supplementation of Modified Ketogenic Nutrition Drink Reserves Lean Body Mass and Improves Blood Lipid Profile in Obese Adults: A Randomized Clinical Trial
	저자명	Hae-Ryeon Choi, Jinmin Kim, Hyojung Lim, Yoo Kyoung Park 1
	학술지명	nutrients
	Vol. (NO.)	10(12)
	국내외 구분	해외

나. 비SCI 논문

No	내용	
1	논문명	Rationale, Feasibility and Acceptability of Ketogenic Diet for Cancer Treatment
	저자명	Hae-Yun Chung¹ and Yoo Kyoung Park²
	학술지명	암예방학회
	Vol. (NO.)	22
	국내외 구분	국내

다. 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국임상영양학회 동계학술대회	박유경	2016.11.26	중앙대학교	한국
2	한국임상영양학회 하계학술대회	옥주혜	2017.07.01	서울아산병원	한국
3	한국식품영양과학회	박유경	2017.11.08	경주화백컨벤션센터	한국
4	6 th global symposium on ketogenic therapies for neurological disorders	강창무	2018.10.5	제주컨벤션센터	한국
5		이송미	2018.10.5	제주컨벤션센터	한국

2. 특허

가. 등록

등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2017	케토볼너트 및 이의 제조 방법	연세대학교 산학협력단	대한민국	10-1775699
2018	케토젤에그 및 이의 제조 방법	연세대학교 산학협력단	대한민국	10-1775700

나. 출원

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원 번호
2018	수술 후 환자 영양불량 예방 또는 영양상태 회복 촉진용 식품 조성물	(주)엠디웰 아이엔씨, 연세대학교 산학협력단	대한민국	10-2018-0143577

3. 기술 이전

년도	계약명	계약 당사자
2018	특수 의료용도 식품 Ratio 노하우	(주)엠디웰 아이엔씨 & 연세대학교 산학협력단

11절. 연구 개발 결과

1. 기술적 성과

가. 기술수준

: 2018년 10월 연구과제를 통해 암환자용 식품 케토웰을 출시하였음, 현재 국내 특수의료용도 식품 중 암환자용 식품으로 구분되어 있는 제품은 케토웰을 포함하여 2제품이 있고, 그 제품과 비교분석 진행함

: 국외 케톤생성식의 경우 소아간질 환자 대상의 제품으로 본 자료에서는 비교 우위성을 어 언급하지 않음

	케토웰	D사	차별성
용량	125ml	200ml	<ul style="list-style-type: none"> - 암환자의 대부분이 노인 분들이고, 실제 병원 방문 시 200ml를 다 못드시는 분들이 대부분임 - 이는 암환자의 고질적인 문제인 식욕부진으로 인한 현상이며, 케토웰은 125ml에 농축한 제품으로 경쟁사의 200ml 제품과 비교시 암환자의 일회 섭취 볼륨을 고려하여 만족도를 높였음
포장 용기	무균팩	레토르트캔	<ul style="list-style-type: none"> - 무균팩을 사용하고 있어 관능의 선호도가 캔 제품에 비해 높고, 취약 계층인 암환자를 대상으로 하는 제품으로 안전성에서도 비교 우위를 보임
임상 연구	유	무	<ul style="list-style-type: none"> - D사의 암환자용 제품은 단순 오메가-3를 첨가하여 암환자용 제품으로 인정을 받았으며, 별도의 임상 연구는 거치지 않았음, 그러나 오메가-3의 경우 팩당 0.46g으로 액상 식품의 특성상 캡슐타입으로 먹는 건강기능식품에 비해 함량이 적고, 특유의 취가 있어 암환자의 영양상태를 개선 및 선호도에서는 부족함 - 케토웰의 경우 암환자를 대상으로 직접 임상연구를 진행하였고, 그 효과를 확인한 제품이며, 그 임상연구를 근거로 암환자용 제품으로 사전 광고심의를 받았음
설계 근거	강	약	<ul style="list-style-type: none"> - 케토웰은 암세포가 탄수화물을 주 에너지 원으로 사용한다는 특성을 활용하여, 저탄수화물, 고지방 식품으로 설계하였으며, 그 관련 연구는 점차 활발해 지고 있는 반면, D사의 암환자용 식품은 오메가-3가 암환자의 영양상태 개선에 도움을 주는 근거로 제품을 개발하였으나, 위에서 말씀드린바와 같이 오메가-3 함량이 낮음

나. 상품화 제품

- 1) 제품 출시일 : 2018.10
- 2) 제품명 : 케토웰
- 3) 케토웰 리플렛

암환자의 영양 관리

1. 암환자의 영양불량 문제

- 암환자의 **약 70~80%가 영양불량** 상태임
- 암환자의 **22%가 영양불량으로 사망함**

<p>입원한 암환자의 영양상태 조사 연구</p> <p>김은경* · 양영희** · 최스미***</p> <p>하였으며 Grant와 Ropka(1996)는 암환자의 영양불량 륜은 31%에서 87%에 이르고 말기 암환자는 80% 정도 가 영양불량 상태라고 하였다. 또한 이러한 영양불량 상태는 암의 치료받 제한하게 되고 합병증 발생을 증가시키 는 결과를 가져와 암환자 사망의 주원인으로 작용하 게 되어 암환자의 22% 정도가 영양불량으로 사망한다 고 보고하였다.</p>	<p>암환자 10명중 7명 '영양불량' 상태</p> <p>국립암센터 위경애 임상영양실장과 서울대 보건대학원 정효지 교수는 지난해 국립암 센터에 입원한 암환자 1만4,678명을 대상으로 전수조사를 실시한 결과, 환자의 34.7% 가 '심한 영양불량', 30.1%가 '영양불량' 상태였다고 20일 밝혔다.</p>
---	---

Ref 1) 김은경, 양영희, 최스미, 입원한 암환자의 영양상태 조사 연구, 대한간호학회지 제 29 : 271~280

2. 식욕 부진 발생

- 다양한 항암 치료는 **환자의 식욕 부진을 발생** 시키며, 이로 인한 **영양불량은 면역기능저하, 근육기능 저하, 기능 저하, 삶의 질 저하 등으로 나타난다.**

Ref) Van cutsem E., Arends J. The causes and consequences of cancer-associated malnutrition, European journal of oncology nursing 9(suppl.2) : S61-68 (2006)

The causes and consequences of cancer-associated malnutrition

Eric Van Cutsem* & Jean Arends**

Summary

Cancer-associated malnutrition can result from local effects of a tumour, the host response to the tumour and anticancer therapies. Although cancer patients often have reduced food intake (due to systemic effects of the disease, local tumour effects, psychological effects or adverse effects of treatment), alterations in nutrient metabolism and resting energy expenditure (REE) may also contribute to nutritional status. Several agents produced by the tumour directly, or systemically in response to the tumour, such as pro-inflammatory cytokines and hormones, have been implicated in the pathogenesis of malnutrition and cachexia. The consequences of malnutrition include impairment of immune functions, performance status, muscle function, and quality of life. In addition, responses to chemotherapy are decreased, chemotherapy-induced toxicity and complications are more frequent and severe, and survival times are shortened. Depression, fatigue and malaise also significantly impact on patient well-being. In addition, cancer-related malnutrition is associated with significant healthcare-related costs. Nutritional support, addressing the specific needs of this patient group, is required to help improve prognosis, and reduce the consequences of cancer-associated nutritional decline.

암환자의 영양 관리

3. 열량과 단백질 부족

- 암환자는 일반 노인 환자에 비해 열량 및 단백질 요구량이 20% 이상 증가
- 암환자의 경우 **열량과 단백질의 섭취량이 권장량에 크게 미치지 못함**

	열량 필요량	단백질 필요량
암환자	25~30 kcal / kg	1~1.5 g / kg
일반 노인환자	20~30 kcal / kg	1~1.2 g / kg

3. 암환자 영양관리를 위한 정보

07 암환자용 식품 선택을 위한 정보

1 사용 목적

암환자용 식품은 암의 발생 및 진행으로 인한 영양소와 에너지 부족을 보완할 수 있는 영양소, 영양제로 중의 중의 식품이므로 영양소와 에너지의 요구량이 일반인보다 높고, 암환자의 영양소와 에너지를 보충하는 데 사용된다. 암환자용 식품은 암환자와 단백질 섭취를 증가시켜서 영양소와 에너지를 보충하는 데 사용된다.

2 암환자의 영양적 고려사항

영양소	영양적 고려사항
열량	<ul style="list-style-type: none"> • 암환자는 열량 부족을 피하기 위해 25~30 kcal/kg의 열량 섭취를 권장함 • 부족해지면 체중 감소를 초래하며, 이는 암환자의 생존율과 삶의 질을 저하시킬 수 있음
단백질	<ul style="list-style-type: none"> • 암환자는 현재 체중 1kg당 1~1.5g의 단백질을 섭취할 것 권장 • 노인 암환자의 경우는 1kg당 1.2g의 단백질을 섭취할 것 권장 • 신장/간기능 장애가 있는 암환자는 1kg당 0.8g의 단백질을 섭취할 것 권장 • 암환자용 식품의 단백질 함량은 1kg당 1.5g 이상을 함유하고 있다

항암화학요법을 받는 암환자의 에너지섭취량과 피로

변미숙 · 김나현*
영양대학원 석사, *영양학과 석사과정

추측해 볼 수 있다 더욱 심각한 것은 암환자들의 경우 암질환 자체로 인한 대사량이 정상인보다 현저하게 증가해 있는 상태이므로 (Winningham, 2001) 에너지부족의 문제뿐만 아니라 체내 단백질 소모단계까지 (Jun & Wang, 2002) 우려된다. 게다가 본 연구대상자들의 단백질 섭취량 역시 평균 43.62g으로 한국인 일일 단백질 권장량에 크게 못 미치며 특히 암환자의 하루 단백질 섭취량인 1.5g/kg에 비해서는 절대량이 부족하므로 면역결핍의 문제와 더불어 (Jun & Wang, 2002) 에너지섭취량 부족으로 인해 체중이 감소하고 심할 경우 임 약액질 상태에 이를 수 있음을 (Bosacius et al, 2002) 알 수 있다.

Ref 1) 보건 의료 전문가를 위한 환자용 식품 선택 정보집, 식약처 (2018)
 Ref 2) 변미숙, 김나현, 항암화학요법을 받는 암환자의 에너지 섭취량과 피로, 기초간호학회지 14(4):268-268 (2012)

암환자의 영양관리를 위한 제품, 케토웰

- 국가 연구과제를 통해 개발된 제품 (2년 6개월간 15.6억원의 연구비)**

 - : 농림수산식품기술기획평가원 (과제 번호 : 316055-3)
 - : 엠디웰, 매일유업, 연세대학교, 경희대학교 공동연구 및 임상연구 완료 (특허 3건 보유, SCI 논문 3건 투고 중)
- 국내 유일의 125ml 암환자용 식품 125ml/150kcal**

 - : 다양한 항암 요법과 항암제 투여로 인해 식욕이 떨어진 환자를 고려한 소용량 농축 제품
 - Ref) Method for providing nutrition to elderly patients US 6689468 A. FM Lin et al. 2001
 - Ref) 보건의료 전문가를 위한 환자용 식품 선택 정보집, 식약처 (2018)
- 제품의 맛 보장**

 - : 최신 관능검사 시스템을 보유한 매일 유업에서 개발
 - : 임상 기간 동안 하루 2팩 이상의 높은 섭취율 보임 -> 논문 발표 예정
- 하루 2팩 섭취 시 암 환자의 총 필요 열량과 단백질의 각각 20% 섭취 가능**

 - : 1일 영양소 기준치 대비 (체중 60kg 기준)
- 식욕증진을 통해 영양상태 개선의 효과가 있는 MCT Oil 사용**

 - Ref) Y. Yoshimura, et al GHRELIN ACTIVATION BY INGESTION OF MEDIUM-CHAIN TRIGLYCERIDES IN HEALTHY ADULTS: A PILOT TRIAL. J Aging Res Clin Practice 7:42-46 (2018)
- 암세포 성장억제를 위한 저탄수화물 제품 (1.7 g/150 kcal)**

<영양 성분표>

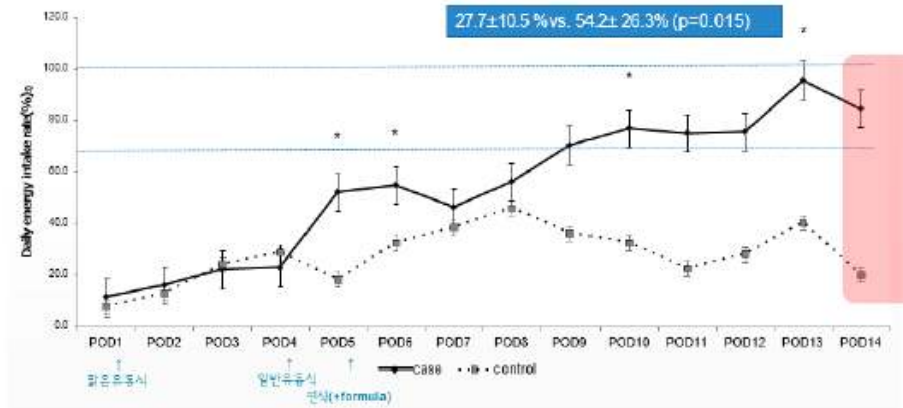


성분	단위	량	%	성분	단위	량	%	성분	단위	량	%
용량	mL	125		비타민K	μg	14	20	인	mg	110	16
열량	Kcal	150	1	비타민B ₁	mg	0.3	25	철	mg	1.7	14
탄수화물	g	1.65	1	비타민B ₂	mg	0.3	21	아연	mg	2	24
당류	g	0	0	비타민B ₃	mg	0.3	20	마그네슘	mg	45	14
식이성유	g	0.15	1	비타민B ₁₂	μg	0.5	21	칼륨	mg	260	7
단백질	g	6	11	비타민C	mg	20	20	요오드	μg	25	17
지방	g	13.3	25	엽산	μg	80	20	망간	mg	0.6	20
나트륨	mg	140	7	나이아신	mg NE	3	20	구리	mg	0.13	16
비타민A	μg RE	140	20	비오틴	μg	6.5	22	L-아르지닌	mg	500	20
비타민D	μg	2	20	판토텐산	mg	1	20	L-카르니틴	mg	15	16
비타민E	mg α-TE	2	18	칼슘	mg	120	17	폴린	mg	90	

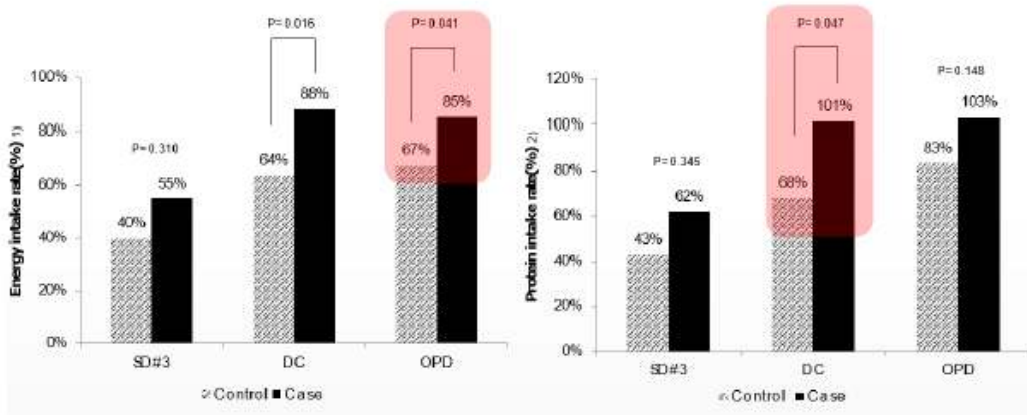
임상연구를 통해 효과를 입증한 케토웰

- 연세대학교에서 임상연구 검증 완료
 - 특허 번호 (특허출원 제10-2018-0143577호)
 - SCI 논문 투고 중

입원 중 에너지 요구량에 대한 섭취량의 비율이 약 27% 향상



퇴원 시와 외래 방문 시 에너지 섭취율 24%와 18% 향상
퇴원 시 단백질섭취율이 약 30% 이상 향상



임상연구를 통해 효과를 입증한 케토웰

- 연세대학교에서 임상연구 검증 완료
- 특허 번호 (특허출원 제10-2018-0143577호)

실험군에서 수술전과 비교하여 퇴원 시 PG-SGA 점수가 유의적으로 높음
 실험군에서 PG-SGA 점수가 유지되는 경향을 보임

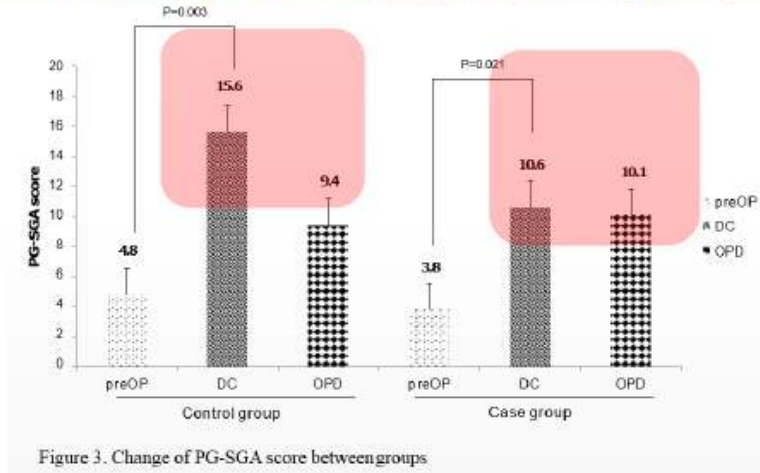


Figure 3. Change of PG-SGA score between groups

PG-SGA 분석결과 실험군에서 심한 영양불량 환자 0%

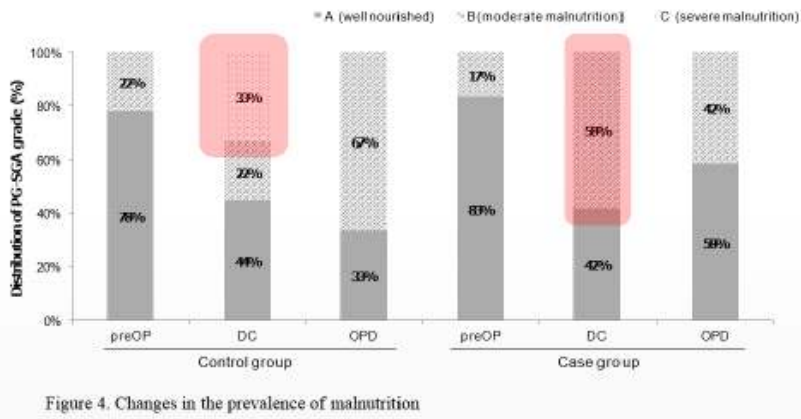


Figure 4. Changes in the prevalence of malnutrition

다. 사업화 성과 및 매출 실적

1) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.1 억원	
			향후 3년간 매출	40 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	- 억원	
			향후 3년간 매출	- 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 10 % 국외 : - %	
			향후 3년간 매출	국내 : 70 % 국외 : - %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %	
			향후 3년간 매출	국내 : - % 국외 : - %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			10 위 (케톤식)
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			1 위 (케톤식)

2) 사업화 계획 및 성과

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2년		
	소요예산(백만원)		약 7억		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0.05억	40억	100억
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	10%	70%	90%
		국외	-	1%	5%
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		다이어트 제품과 인지기능 개선 제품으로 확장 예정			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0.01억	30억	50억	
	수 출	-	10억	50억	

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1. 연구 성과 요약

<단위 : 건수>

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전 시	
												SCI	비 SCI						
최종목표	3	3		1	1	2						3	3	5					
1차년도	목표													1					
	실적													1					
2차년도	목표	2	2		1	1							1	2					
	실적	2	2			1							1	2					
3차년도	목표	1	1			1	1					3	2	2					
	실적	1	진행중		1	1	1					4	0	2					
소계	목표	3	3		1	1	2					3	3	5					
	실적																		
합계		3	2		1	1	2					4	1	5					

2 연차별 연구개발 목표 달성도

가. 1차년도

		코드번호	C-05-03
성과목표	자 체 평 가		
국내외 관련 제품 시장 현황 및 문헌조사	국내외 환자식 제품 현황 조사 및 해외 케톤식 제품조사를 통해 제품 개발 방향성을 설정하여 성과목표 100% 달성함.		
Formulation 및 제품 설계	케톤 : 비케톤 비율이 약 1.7 : 1로 구성된 액상 케톤식 base formular 설계가 완료되어 성과목표 100% 달성함.		
관능검사	30가지 향 중 전체적인 선호도를 기준으로 ranking test(순위법)를 실시하여 최종 3가지 향을 선정함. 소비자 패널 34인을 대상으로 선정된 3가지 향 과 base formula를 조합한 샘플로 관능검사를 진행하여 성과목표 100% 달성함.		
pilot design & lab scale trial	lab scale의 배합테스트 완료 및 pilot 생산을 위한 공정 설계 및 규격 설정을 완료하여 성과목표 100% 달성함.		
케톤식사 관련 임상연구를 위한 기반 조성 및 연구개시	케톤식사 관련 임상연구 IRB 최종 승인받아 임상연구 개시하여 성과목표 100% 달성함.		
상황버섯 항암 효과 검증	최근까지 상황버섯 추출물 투여된 췌장암 환자에 대한 데이터베이스 구축하여 통계적으로 유의한 상황버섯 항암 효과 확인하여 성과목표 100% 달성함.		
성인용 케톤식 레시피 개발	기준에 본원에서 개발된 소아 간질환자용 레시피 및 각종 케톤식 레시피를 활용하여 전문가와 함께 성인 암환자용 케톤식 레시피 30개 이상을 음식 종류별(주식, 간식, 음료 등)로 개발완료하여 성과목표 100% 달성함.		
개발된 암환자 식이 섭취 후 환자의 혈액 샘플 채취	혈액 샘플 채취에 대한 자료조사를 통하여 수행 방법이 확립되었고 pilot 실험을 통해 확립된 방법의 적절성을 확인하였음. 케톤식이 혈액 샘플 채취 완료함 성과목표 100% 달성함		
식이 섭취에 따른 환자의 혈청 대사체 분석	췌장암 환자들 대상으로 진행된 대사체학 연구에 대한 자료조사를 통하여 UPLC-MS(LTQ-orbitrap)기기를 활용한 대사체 분석 방법이 확립되었고 기수집된 혈액 샘플을 대상으로 수행된 pilot 실험을 통해 확립된 방법의 적절성을 확인하였음. 케톤식이 섭취에 따른 암환자의 혈청 대사체의 변화에 대한 실험 및 분석 완료함 성과목표 100% 달성함		
식이 섭취에 따른 환자의 케톤체 분석	케톤식이 섭취에 따른 암환자의 혈청 케톤체의 변화에 대한 실험은 LC-MS/MS를 이용하여 negative모드에서 정량 분석 완료함 성과목표 100% 달성함		
케톤식의 활용에 대한 문헌고찰, 학술발표	국내외 문헌검토를 통한 케톤식의 항암연구의 방향성을 확인하였으며 학술발표 1건을 하여, 성과목표 100% 달성함.		
based formulation 설계완성	pilot 연구를 시작할 수 있는 시제품의 설계가 주관기관(1세부)과의 수차례의 회의를 통해 완성되어 성과목표 100% 달성함.		

대장암 모델 동물실험 모델 확립	대장암 유도쥐를 이용하여 대장암 모델(동물 ACF, AC 등 증가, DNA 손상도 증가)이 확립되어 목표달성이 성과목표 100% 달성함 .
-------------------	--

나. 2차년도

성과목표	자 체 평 가
임상연구용 base formula 개발 완료 및 대량 생산 시스템 구축	임상연구용 제품개발 완료 및 대량생산 시스템을 구축하여 현재 순조롭게 임상연구를 진행 중임 특히, 환자의 순응도가 높아서 거부감 없어 개발 완료함 성과 목표 대비 100% 달성함
항암소재를 접목한 차별화된 암환자용 제품 개발	3협동에서 국내산 항암소재 (쑥, 상황버섯)의 항암효과 연구를 마무리하여 3차년도 제품 적용에도 문제없이 진행 중 성과 목표 대비 100% 달성함
케톤식사 관련 임상연구 학술발표	케톤식사 관련 임상연구 결과 바탕으로 학술발표 1건 완료하여 성과 목표 대비 100% 달성함
성인용 케톤식 레시피 특허 출원	성인 암환자용 케톤식 레시피 개발하여 특허 출원 2건 및 등록 2건 완료함. 성과 목표 대비 100% 달성함
암 환자 특수 식이 BASE 포물라 제품의 임상 연구를 위한 기반 조성 및 연구개시	개발된 BASE 포물라 관련 임상연구 IRB 최종 승인받아 임상연구 개시하여 성과 목표 대비 100% 달성함
1차년도에 개발된 암환자 케톤식이(일반 항암식, 케톤식이) 섭취 전/후로 환자의 혈액 샘플 수집	1차년도 암환자 혈액 샘플 채취가 완료 되었음. 성과 목표 대비 100% 달성함
1차년도에 개발된 암환자 케톤식이 섭취 전/후 환자의 혈청 대사체/케톤체 분석	췌장암 환자를 대상으로 LC-MS/MS 혈청 대사체학 연구가 진행되었음. 잠정적인 바이오마커를 선정하였으며, 케톤식이에 의해 변화하는 체내 에너지 대사 경로의 변화를 확인함. 케톤체 분석은 LC-MS/MS 정량 분석을 이용하여 수행하였고, 식이 섭취 여부에 따른 케톤체 생성량이 뚜렷한 변화를 확인함. 성과목표 100% 달성함
2차년도 base formula 섭취에 따른 환자의 혈액 수집	IRB 승인 후 췌장암 환자의 Base formula 섭취 전, 종료, 후의 3번의 혈액 수집이 끝난 환자는 총 3명이고, 3명의 환자 혈액 수집 중임. 성과목표 100% 달성함
2차년도 base formula 섭취에 따른 환자의 혈청 대사체 및 케톤체 분석	임상연구 시작이 전체적으로 지연으로 인해 늦어졌으나, 목표대비 진행 중임. 성과목표 100% 달성함
암유발 쥐에서의 쑥, 상황버섯 추출물 공급시의 항암효과 확인	대장암 유도쥐를 이용하여 쑥, 깻잎, 상황버섯 추출물을 8주동안 실험동물에게 공급한 후 실험동물의 ACF, AC 등의 변화를 측정하여 목표달성이 성과목표 100% 달성함 .
[당초계획 이외의 추가실험] 개발된 base 포물라의 인체적용 시험 진행	당초계획에는 포함되지 않으나, 개발된 base 포물라를 암환자에게 직접 적용하기 전에 정상인에서의 체내 변화를 살펴보기 위하여 인체적용 연구를 구상하여 경희대학교 인

	체윤리위원회 심의 과정을 거쳤으며 승인을 받은 후 연구를 개시하여 진행중 임 (연구목표 초과달성)
학술 및 특허 성과	목표대비 100% 달성 - 학술발표 2건 - 비SCI 논문 게재 1건 완료 - 특허 2건 : 성인 암환자용 케톤식 레시피 개발 (특허 출원 2건 및 등록 2건)

다. 3차년도

성과목표	자 체 평 가
항암 소재가 첨가된 ketogenic diet의 대량 생산 기술 확보	3차년도 임상 연구용 제품개발 완료 및 대량생산 시스템을 구축하여 임상 연구 진행 중. 성과 목표 대비 100% 달성함.
항암 소재가 첨가된 ketogenic diet의 임상연구를 통한 검증	임상연구 진행완료하여 목표 대비 100% 달성함
항암 소재가 첨가된 ketogenic diet의 관능평가를 통한 기호도 검증	3차년도 임상 연구용 제품개발 완료 하여 관능 평가를 통해 저감미와 부드러운 관능에 있어 기호식품 수준의 높은 점수를 부여 받음. 성과 목표 대비 100% 달성함.
2차년도 ketogenic diet 제품 출시	2차년도 임상 연구용 제품의 출시 작업을 진행하여 2018.10 제품 출시함. 또한 KETO 2018 글로벌 학회에서 부스 지원하여 제품 홍보 진행하였으며 10여 건의 언론 홍보 자료 진행함. 성과 목표 대비 초과 달성함.
암 환자 특수식이 BASE 포물라 plus 제품의 임상 연구를 위한 기반 조성 및 연구개시	개발된 BASE 포물라 plus 관련 임상연구 IRB 최종 승인받아 임상연구 개시하여 성과 목표 대비 100% 달성함
암환자용 BASE 포물라 식품 섭취 후 환자의 샘플 채취	2차년도 암환자 혈액 샘플 채취가 완료 되었음. 성과목표 100% 달성함
암환자용 BASE 포물라 식품 섭취 후 혈액 내 대사체 변화 분석	BASE 포물라 식품을 섭취한 췌장암 환자를 대상으로 LC-MS/MS 혈청 대사체학 연구가 진행되었음. 성과목표 100% 달성함
암환자용 BASE 포물라 식품 섭취 후 혈액 내 케톤체 변화 분석	BASE 포물라 섭취군에서 케톤생성능은 LC-MS/MS를 이용한 정량분석과 총케톤 측정 키트를 이용하여 정량분석이 완료됨. 성과목표 100% 달성함
암환자용 PLUS 식품 섭취 후 환자의 샘플 채취	3차년도 암환자 혈액 샘플 채취가 완료 되었음. 성과목표 100% 달성함
암환자용 PLUS 식품 섭취 후 혈액 내 대사체 변화 분석	일반 환자식(CTRL)과 케톤 PLUS 포물라(HFSF) 섭취군간의 분석 모델링 결과, 암환자 PLUS 포물라 섭취가 환자 혈액 대사체 변화에 영향을 미친 것을 확인. OPLS-DA 분석을 통해 얻은 VIP값을 이용해 잠정적 바이오마커를 선정함. 3차년도 암환자 혈액 샘플 채취 완료일 (2018.12.03.)이 늦어

	저 분석도 늦어졌으나 목표대비 진행 중임. 성과목표 80% 달성함
암환자용 PLUS 식품 섭취 후 혈액 내 케톤체 변화 분석	케톤 PLUS 포물라 섭취군에서 케톤 생성능에 차이가 없는 것을 확인함. 이는 BASE 포물라 섭취군과 비슷하게 대조군과 비교하여 총 칼로리에는 차이가 없지만, 경구로 섭취한 식사량에서 유의적 차이가 나기 때문으로 판단됨. 성과목표 100% 달성함
[당초계획 이외의 추가실험] 개발된 base 포물라 plus 제품의 인체적용 시험 진행	당초계획에는 포함되지 않으나, 개발된 base 포물라 plus 제품을 인지 기능 개선 가능성을 살펴보기 위해 경희대학교 인체윤리위원회 심의 과정을 거쳤으며 승인을 받은 후 연구를 개시하여 진행중 임 (연구목표 초과달성)

3. 관련 분야 기여도

가. 산업화 방향

- 현재 개발된 암환자용 케톤식 제품은 수차례의 관능 검사를 바탕으로 암환자에게 최적의 맛을 제공할 수 있었으며, 고질적인 암환자의 식욕부진인 상태에서도 임상연구 기간 동안 2팩을 섭취하는 높은 순응도를 보임
- 지방 함량이 높은 케톤식의 특성상 유화 문제가 실제로 대두되고 있으나, 매일유업의 연구원의 오랜 노하우를 활용하여 유통기한내 유화 안정성을 확보하였음
- 동물 실험을 통해 검증된 국내산 향암 소재를 단독으로 활용할 수 있으며 또한, 여러 식품에 첨가하여 암환자용 제품으로 활용성을 증대 시킬 수 있음
- 또한, 3차년도에 개발된 케톤식 plus 제품의 경우 동물실험을 통해 검증된 국내산 향암소재를 2차년도에 개발한 케톤식에 유효성이 입증된 양을 첨가한 제품으로 암환자에게 보다 적합한 케톤식 제품임
- 본 제품은 암환자를 대상으로 한 특수의료용도식품으로 종합병원, 암전문요양병원 등의 주 거래처로 마케팅을 진행할 예정임
- 본 제품은 직접 암환자를 대상으로 임상연구를 진행한 제품으로 관련 제품과 암환자의 영양상태 개선이 입증된 부분을 부각시킬 예정이며, 현재 증가하고 있는 암환자의 식욕 부진이나 영양상태 개선, 환자의 삶의 질 향상을 위해 큰 역할을 할 것으로 기대됨
- 케톤식을 암환자에 접근한 연구는 해외에서도 아직 활발하지 않은 수준이며, 임상연구를 진행한 케토웨이 관련 시장에서 선도의 역할을 할 수 있음
- 글로벌 제품으로 진화하기 위해 모회사인 대응제약 해외 지사 및 매일유업 수출팀과 협업하여 수출 방안을 지속 모색할 예정이며, 이는 국내 수출 시장에도 역할을 할 수 있을 것으로 전망됨

4장. 연구 성과 활용 계획

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치																			
최종목 표	3	3		1	1	2						3	3	5					
연구기간 내 달성실적	3	2		1	1	2						4	1	5					
달성율 (%)	100%	67%		100%	100%	100%						130%	33%	100%					

1. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	암환자의 순응도 및 케톤체를 생성할 수 있는 최적의 케톤 : 비케톤의 ratio
②	국내산 항암소재 검증 (상황버섯, 쑥, 자소엽) 및 대량 생산 시스템 구축
③	암환자를 위한 케톤생성식 개발
④	국내산 항암소재가 첨가된 케톤생성식 개발

2. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 부 제	외국기술 소 화 흡 수	외국기술 개 선 개 량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		v				v				
②의 기술										v
③의 기술		v				v	v			
④의 기술	v	v				v	v			

3. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	암환자들이 집에서 검증된 식단을 손쉽게 활용할 수 있도록 다양한 교육 프로그램과 쿠킹 클래스를 검토하고 있으며, 이는 암환자의 삶의 만족도 개선 및 영양상태 개선이 가능함, 이로 인해 다양한 항암치료가 가능하며, 환자의 암 치료에도 간접적으로 기여할 수 있음
②의 기술	국내산 항암소재의 활용성을 높였으며, 단독으로 또는 다양한 식품에 첨가하여 활용할 수 있도록 활용도를 높일 계획을 가지고 있으며, 암환자들의 삶의 질 개선 및 암치료에 간접적으로 기여할 수 있음
③의 기술	현재 제품을 출시하여 판매 진행하고 있음, 현재 종합병원과 요양병원 등에서 긍정적인 피드백을 받고 있으며, EBM (evidence based marketing)을 통해 환자의 신뢰도 향상하고 있으며, 환자의 다양한 항암 치료의 효과를 키울 수 있음. 이는 실제로 암환자의 경제적 부담 경감 및 의료보험 재정 부담 경감 등을 기대할 수 있음
④의 기술	본 제품은 국내산 항암 소재가 첨가된 케톤생성식이로 임상연구를 통해 그 효과를 검증하였음, 이는 암환자를 위한 특수의료용도 식품의 새로운 지표로서 활용이 가능하며, 추가적인 연구도 뒷받침이 필요함, 본 제품이 활성화 시 글로벌 제품으로 성장성이 충분히 가능하며, 국내 농산물 시장 활성화 까지 기대할 수 있음

4. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균 IF			학술발표	정책활용	
단위	건	건	건	건	건	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	3	3		1	1	2					3	3	5						
연구기간 내달성 실적	3	2		1	1	2					4	1	5						
연구종료 후 성과창출계획	3	3		1	1	2	40억	10억	20		6	1	5						

5. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	특수 의료용도 식품 Ratio 노하우		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	4,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	즉시 이전 및 판매 개시일로부터 10년	실용화예상시기 ³⁾	2018.10 출시
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	기술 이전료 지급, 전용 실시권 보장, 기밀 유지		

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

붙임. 참고문헌

- 1) Clinical Guide to Oncology Nutrition / Oncology Nutrition Dietetic Practice Group, American Dietetic Association; 2nd Edition, 2016)
- 2) Medium-chain Triglyceride Ketogenic Diet, An Effective Treatment for Drug-resistant Epilepsy and A Comparison with Other Ketogenic Diets. Biomed J 36: 9-15, 2013)
- 3) Anti-Tumor Effects of Ketogenic Diets in Mice: A Meta-Analysis. PLoS ONE 11(5): e0155050 (2016)
- 4) Weight and Metabolic Outcomes After 2 Years on a Low-Carbohydrate Versus Low-Fat Diet: A Randomized Trial. Ann Intern Med. 153(3): 147-157, (2010)
- 5) Decreased carbon shunting from glucose towards oxidative metabolism in diet-induced ketotic rat brain. J Neurochem 132(3): 301-312, (2015)
- 6) Method for providing nutrition to elderly patients US 5589468 A. PM Lin et al. (2001)
- 7) Advanced glycoxidation end products in commonly consumed Foods, Teresia G et al, Journal of the American dietetic association, 1287~1291 (2004)
- 8) Human exposure to bisphenol A (BPA), Laura N.V. et al., Reproductive Toxicology 24 : 139-177 (2007)
- 9) National Cancer Information Center annual report: National cancer registration statistics. (2015)
- 10) McLeod RS, Taylor BR, O'Connor BI, Greenberg GR, Jeejeebhoy KN, Royall D, et al. Quality of life, nutritional status, and gastrointestinal hormone profile following the Whipple procedure. Am J Surg 1995;169(1):179-85
- 11) Jalleh RP, Williamson RC. Pancreatic exocrine and endocrine function after operations for chronic pancreatitis. Ann Surg 1992;216(6):656-62.
- 12) Traverso LW, Longmire WP, Jr. Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy a

follow-up evaluation. *Ann Surg* 1980;192(3):306-10.

13) Hartwig, W., et al., Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome. *Annals of surgery*, 2011. 254(2): p. 311-319.

14) Berry, A.J., Pancreatic surgery: indications, complications, and implications for nutrition intervention. *Nutrition in Clinical Practice*, 2013. 28(3): p. 330-357.

15) 김호각, 췌장절제 후 췌장기능의 변화 및 경구용 소화효소제의 역할, *한국간담췌외과학회 학술대회지 제34차*, 2010.4, 131-136 (6 pages)

16) Murray F. Brennan. Uncomplicated Starvation versus Cancer Cachexia. *Cancer Res* 37:2359,1977

17) Marc Schiesser et al, Assessment of a novel screening score for nutritional risk in predicting complications in gastro-intestinal surgery. *Clinical Nutrition* (2008) 27, 565-570

18) Braga M, Pecorelli N, Ariotti R, Capretti G, Greco M, Balzano G, et al. Enhanced recovery after surgery pathway in patients undergoing pancreaticoduodenectomy. *World J Surg* 2014;38(11):2960-6

19) Meguid MM, Campos AC, Hammond WG. Nutrition support in surgical practice: Part I, *Am J Sur* 59:345,1990

20) Delmi M et al. Dietary supplementation in elderly patients with fractured neck of the femur. *Lancet* 335:1013-1016,1990

21) Disbrow DD. The costs and benefits of nutrition services : a literature review. *J Am Diet Assoc* 90:547-552,1989

22) Reilly JJ, Hull SF, Alber N, Waller A, Bringardener S. Economic impact of malnutrition : a model system for hospitalized patients. *J Par&Ent Nutr* 12 :371-376,1988

23) Arends J et al. ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. *Clinical Nutrition* 2016:1-38.

24) Bryan G. Allen, Sudershan K.Bhatia et al. Ketogenic diets as an adjuvant cancer therapy: History and potential mechanism. *Redox Biology* 2 (2014) 963-970

25) Schmidt, M., Pfetzer, N., Schwab, M., Strauss, I., & Kämmerer, U. (2011). Effects of a

ketogenic diet on the quality of life in 16 patients with advanced cancer: A pilot trial. *Nutrition & metabolism*, 8(1), 1.

26) The Clinical Guide to oncology nutrition/oncology nutrition dietetic practice group, American Dietetic Association;2nd Edition(2006)

27) M. Schmidt, N. Pfetzer, M. Schwab, I. Strauss, U. Kämmerer, Effects of a ketogenic diet on the quality of life in 16 patients with advanced cancer: a pilot trial, *Nutrition & Metabolism* 8 (1) (2011) 54.

28) G.D. Maurer, D.P. Brucker, O. Bähr, P.N. Harter, E. Hattingen, S. Walenta, W. Mueller-Klieser, J.P. Steinbach, J. Rieger, Differential utilization of ketone bodies by neurons and glioma cell lines: a rationale for ketogenic diet as an experimental glioma therapy, *BMC Cancer* 11 (2011) 315.

29) T.N. Seyfried, T.M. Sanderson, M.M. El-Abbadi, R. McGowan, P. Mukherjee, Role of glucose and ketone bodies in the metabolic control of experimental brain cancer, *British Journal of Cancer* 89 (7) (2003) 1375–1382.

30) P. Stafford, M.G. Abdelwahab, Y. Kim, M.C. Preul, J.M. Rho, A.C. Scheck, The ketogenic diet reverses gene expression patterns and reduces reactive oxygen species levels when used as an adjuvant therapy for glioma, *Nutrition & Metabolism* 7 (2010) 74.

31) Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*, 1927. 8(6): p. 519.

32) Bryan G. Allen, Sudershan K. Bhatia et al. Ketogenic diets as an adjuvant cancer therapy: History and potential mechanism. *Redox Biology* 2 (2014) 963–970

33) Juhye Ok, An evaluational study on compliance of customized meal based on ketogenic diet in postoperative pancreaticobiliary cancer patients. Yonsei university. 2017

34) Rainer J. Klement and Reinhart A. Sweeney. Impact of a ketogenic diet intervention during radiotherapy on body composition: I Initial clinical experience with six prospectively studied patients. *BMC Res Notes* (2016) 9:143

주 의

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