

발간등록번호

11-1543000-000940-01

잉여 수산자원을 활용한 기능성소재 및 건강기능식품 개발 사업단

(Center for Development and Industrialization of Health Functional Foods from Surplus Marine Natural Resources)

경희대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “잉여 수산자원을 활용한 기능성 소재 및 건강기능식품 개발사업단” 과제 (1핵심과제 “굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품의 개발 및 제품화”, 2핵심과제 “곰피를 이용한 간기능 개선 건강기능식품의 개발 및 제품화”)의 보고서로 제출합니다.

2015년 06월 02일

주관연구기관명 : 경희대학교산학협력단
주관연구책임자 : 정 세 영
1핵심연구기관명 : 경희대학교산학협력단
1핵심연구책임자 : 정 세 영
협동연구기관명 : 경상대학교산학협력단
협동연구책임자 : 최 영 준
연 구 원 : 하 중 명
협동연구기관명 : (주)파마킹
협동연구책임자 : 전 선 덕
2핵심연구기관명 : 부경대학교
2핵심연구책임자 : 최 재 수
연 구 원 : 장 영 표
협동연구기관명 : (주)네추럴웨이
협동연구책임자 : 최 중 현

요 약 문

I. 제 목

잉여수산자원을 활용한 기능성소재 및 건강기능식품 개발

1핵심과제 - 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품의 개발 및 제품화

2핵심과제 - 곰피를 이용한 간기능 개선 건강기능식품의 개발 및 제품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 잉여 수산자원인 굴과 곰피를 활용한 고부가가치 제품을 개발함으로써 소비되지 않고 잉여 생산된 수산물의 새로운 산업 활로 개척 및 수산어민들의 수익창출에 기여함
- 대부분 수입에 의존하고 있는 혈압조절 및 간기능 개선 건강기능식품소재의 새로운 대체재를 국내 농림수산자원으로부터 개발하고 향후 매년 매출 100억 원 이상의 글로벌 상품으로 발전시킴
- 굴의 가수분해물로부터 혈압조절기능을 갖는 펩타이드 기능소재를 개발하고 식품의약품 안전처의 건강기능식품소재 및 제품허가에 필요한 핵심기술을 연구개발함
- 곰피의 주정추출물로부터 간기능 개선작용을 갖는 기능성소재를 개발하고 식품의약품안전처의 건강기능식품소재 및 제품허가에 필요한 핵심기술을 연구개발함

III. 연구개발 내용 및 범위

- 연구개발내용은 식품의약품안전처 건강기능소재 및 제품 허가에 필요한 기술 자료인 ① 표준화(기준·규격) 자료 ② 효능·독성시험자료 ③ 작용기전 연구 자료를 중심으로 진행하고 ④ 제품화 연구는 참여기업의 주도적 연구로 진행함
- 기능성소재 및 제품의 우수한 품질관리를 위해 기능성소재에 대한 기준 및 규격에 대한 표준시험자료를 확보하며 시제품의 기준 및 시험법에 관한 기술 자료를 개발함
- 확립된 기준 및 시험규격은 공인시험기관의 검증을 통해 최종 허가자료를 완성함
- 표준화된 시료를 대량생산하여 효능시험 및 독성시험, 인체적용시험에 사용함
- 효능시험은 *in vitro*시험과 *in vivo*에서 기능성과 인체적용시험을 위한 효능용량을 결정하며 인체적용시험을 통해 인체에서의 기능성을 평가함
- 독성시험은 공인시험기관이며 GLP기관인 (주)캠온에서 굴 가수분해물에 대하여 일반독성시험을 실시함. 식용으로 사용해온 곰피의 경우는 독성시험이 면제됨
- 작용기전은 각 기능성이 발현되는 기전을 *in vitro*, 동물모델에서 검증함으로써 기능성소재 허가를 위한 기술 자료로 활용함
- 효과적인 기능성뿐만 아니라 다양한 소비자의 기호를 반영한 제형과 제품의 개발을 위해 참여기업주도의 제형개발 및 제품 마케팅 연구를 진행함

IV. 연구개발결과

연구개발결과

가. 1핵심과제 - 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품의 개발 및 제품화

1. 굴 가수분해물 표준화 및 유효성분 탐색

1.1 Pilot 규모로 제조한 혈압조절 기능성 굴 가수분해 분말의 특성과 열 안정성

- 굴 가수분해물은 MTGase로 가교결합하고 Protamex와 Neutrase로 2단 가수분해하여 여과, 농축 및 분무건조의 표준제조공정을 통해 제조함
- 표준공정에 의해 생산된 굴 가수분해물은 어두운 갈색을 지닌 무정형 미세구조로서 낮은 수분함량, 높은 단백질 함량과 작은 크기의 입자 분포를 보였으며, 고품질의 아미노산 프로파일과 pH 7에서 50% 이상의 용해도를 가짐
- 위생지표와 중금속 함량은 식품위생안전처 규정을 충족하였음

1.2 굴 가수분해물로부터 안지오텐신 I-전환 효소 저해활성물질 규명

- 혈압조절에 직접적으로 작용하는 안지오텐신 I-전환효소를 사용하여 그 활성을 억제하는 활성펩타이드를 크로마토그래피 기법에 의해 추적 분리함
- 정제 분리된 5개의 펩타이드 중 기능성과 분석의 용이함 등을 종합적으로 고려하여 YA를 지표성분으로 설정함

1.3 굴 효소가수분해물의 지표성분으로서의 tyrosylalanine (YA)의 정량과 검증

- 굴 가수분해물에 있는 혈압조절 기능성 펩타이드인 tyrosylalanine(YA) 정량을 위한 분석 방법을 개발하여 YA함량은 0.072 ~ 0.108 %로 정하였으며 개발한 표준시험법에 의해 Validation 자료를 확보함
- 확립된 표준 YA 분석 방법은 굴 가수분해물의 효능 및 지표물질로서 소재 및 제품의 품질 관리에 적용할 수 있음

2. 굴 가수분해물의 대량생산공정

- 굴 가수분해물 대량생산공정은 신라바이오텍의 GMP 시설장비를 이용하여 수행함
- 냉동 굴의 해동, blanching, 효소처리 (TGase - Protamex - Neutrase), 가열, 여과, 농축, 분무건조의 공정으로 표준공정을 설정함
- 냉동굴 1,000kg의 해동공정에서부터 spray dry까지 완료하여 최종 굴 가수분해물 150kg을 생산하는 표준공정을 완성하였으며 생산 yield는 15%로 나타남

3. 인체적용시험을 위한 효능 및 용량확인시험

- 양성대조군인 정어리펩타이드와 동일한 용량(100 mg/kg)으로 굴 가수분해물을 경구투여하여 *in vivo* 동물실험을 실시하여, 시간에 따른 혈압강하효과, 반복투여에 의한 혈압강하효과, 혈중 ACE, angiotensin- II, hs-CRP농도를 측정함
- 선천성 고혈압쥐 (SHR)를 사용한 *in vivo* 동물실험을 통해 동량의 정어리 펩타이드 (100 mg/kg) 보다 굴가수분해물에서의 혈압강하 효능이 더 우수하였으며 혈청중의 ACE, angiotensin- II, hs-CRP의 양도 유의적으로 감소시킴
- 식약처의 바릴-타이로신 1일 허용 섭취량은 250~400 μg 으로 정어리 펩타이드 1일 섭취량은 500~800 mg임. 이를 바탕으로 굴 가수분해물의 인체적용시험 최저용량을 500 mg으로 설정하였으며, 실제 인체적용시험은 500~800 mg 범위 내에서 예비 실험을 실시하기로 함

4. 굴 가수분해물 및 유래 기능성물질의 혈압조절 작용기전

4.1 굴 가수분해물 및 분리된 굴 펩타이드의 *in vitro* 작용기전

- 굴 가수분해물인 유효성분인 YA를 포함하는 펩타이드 성분들은 ACE 효소를 직접 억제하여 혈압을 조절함
- 분자도킹 및 분자동역학 시뮬레이션연구를 통해 ACE의 작용부위에 활성펩타이드들이 비공유결합을 통해 그 작용을 억제하는 것으로 나타나며 이러한 억제활성은 펩타이드의 C-말단을 트립토판으로 치환할 시 크게 증가함

4.2 *in vivo*에서 혈압강하 작용기전

- 100 mg/kg의 굴 가수분해물과 양성대조군인 정어리 펩타이드 동량을 4주간 경구투여 한 후의 혈압 변화를 측정하였음. 그 결과 굴 가수분해물이 정어리 펩타이드보다 효능이 우수하다는 것을 확인하였음
- 이 때의 혈청 중 ACE 활성을 측정한 결과, 고혈압 대조군의 혈중 angiotensin converting enzyme (ACE)의 활성이 정상군의 약 2배가량 높아진 반면 굴 가수분해물 투여군에서는 유의성 있게 감소함을 확인하였음
- 같은 시료에서의 안지오텐신-II의 농도를 측정한 결과, 고혈압 대조군의 혈중 angiotensin-II의 농도는 정상군의 약 7배가량 높아진 반면 굴 가수분해물 투여군에서는 혈중 angiotensin-II의 농도가 유의적으로 감소함을 확인함
- *in vivo*에서도 ACE 효소 활성 저하가 혈압강하 기전임을 확인할 수 있었음

5. 독성시험

- 굴 가수분해물은 굴소재를 식용 효소를 통해 가수분해한 산물이기 때문에 식용소재로 분류되어 원칙적으로 독성시험자료는 면제이나, 글로벌로 진출할 시 독성시험자료가 요구되어 질수도 있으므로 공인기관에 의뢰하여 독성자료를 확보함
- GLP기관인 (주)켄온에 의뢰하여 단회투여독성 및 반복투여독성시험, 유전독성시험을 완료함
- 굴 가수분해물은 단회투여독성 및 반복투여독성시험 결과 최대 5000 mg/kg의 용량까지 독성이 나타나지 않아 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ADL)은 암수 모두 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단됨
- 복귀돌연변이시험 결과 Salmonella typhimurium의 히스티딘 요구성 4 균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 E. coli의 트립토판 요구성 균주(WP2 uvrA)를 사용하여 최대 5000 μ g/plate로 첨가하였을 때 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 확인됨
- 염색체이상시험 결과 최대 5000 μ g/ml의 농도까지 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 확인됨
- 소핵시험 결과 최대용량 5000mg/kg의 용량까지 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 확인됨

6. 인체적용 시험용 시제품 생산을 위한 제형연구

6.1 건강기능식품으로서 굴 가수분해물의 용해도와 유효활성

- 굴 가수분해물의 용해도 증강을 위해 pH와 이온강도 의존성을 확인하고, 유효제, co-solvent의 첨가가 용해도에 미치는 영향을 조사함

- 굴 가수분해물 분말은 pH 3-4의 범위에서 가장 낮은 용해도 값을 나타내었고 pH 7.0까지 pH 증가와 더불어 용해도는 증가하는 경향을 보임
- 굴 가수분해물의 용해도는 NaCl의 농도가 증가함에 따라 0.3 M NaCl 농도까지 다소 감소하였으나 유의적인 크게 영향을 받지 않음
- 물에 대한 굴 가수분해물의 용해도는 co-solvent에서 오히려 감소한 반면, 표면활성제인 레시틴은 0.15% 이상, Tween 80은 0.32%의 이상의 농도에서 용해도가 증가하는 경향을 보임

6.2 제품화 연구

- 굴 가수분해물의 시제품생산을 위한 제형으로서 정제, 캡슐제, 액제 등이 고려되어 다양한 formulation에 따라 제조함
- 정제의 경우 미결정셀룰로오스를 부형제의 주성분으로 포함하는 조성으로 결정하고 소량의 타정이라 hopper대신 feeder에 바로 주입하여 타정함
- 캡슐제의 경우도 미결정셀룰로오스, 스테아르산 마그네슘 등을 포함하는 부형제와 원료를 배합하여 충전하는 공정으로 제조함
- 액제의 경우 1 g의 원료가 100 ml의 물에 완전히 용해되어 제형개발에 문제없음이 확인됨
- 굴 특유의 비린향이 제품에 나타나는 것을 감소시키기 위해 다양한 향료를 사용하여 냄새를 마스킹 하는 연구를 진행하였으나 향을 통한 마스킹은 적절하지 않은 것으로 나타남
- 다양한 제형에 대한 소비자 기호도 조사 결과 시각, 미각, 후각적으로 가장 우수한 캡슐타입 최종제형으로 선정하였고 시제품인 하늘색계열의 캡슐이 시각적으로 부정적인 이미지라는 의견을 수렴하여 갈색의 컬러를 적용함

6.3 굴 가수분해물의 캡슐화를 위한 liposome-in-alginate 시스템연구

- Liposome-in-alginate 시스템 제조를 위한 최적 조건을 조사한 결과, 75%의 캡슐 효율을 위한 최적조건은 95.4 mg EDL, 0.5 M CaCl₂, 3% sodium alginate인 것으로 나타남
- Liposome-in-alginate 시스템이 경구 투여를 위한 캡슐화에 효과적이며, 지속적으로 YA 혹은 굴 가수분해물을 유리하여 기능성을 향상시킬 것으로 판단됨

7. 굴 가수분해물의 혈압개선 인체적용시험

7.1 굴 가수분해물의 예비 인체적용시험 (경희의료원)

- 굴가수분해물의 혈압 강하 효과를 연구하기 위하여 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 평행 인체적용시험을 수행함
- 굴가수분해물은 혈압강하를 시키기는 하나 위약대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보이지 않았음. 임상대상자 수가 적었던 관계로 향후 본 시험에서 적절한 임상 대상자수의 산정과 750mg 이상의 투여량으로 시험 진행을 해야 한다는 정보를 얻을 수 있었음
- 예비 인체적용시험의 혈액 생화학적 분석 및 vital sign의 분석을 통하여 굴가수분해물은 상대적으로 안전한 식품임을 확인할 수 있었음

7.2 굴 가수분해물의 본 인체적용시험 (단국대병원)

- 본 시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험으로 시험의 목적은 혈압이 높은 정상인에서 굴 가수분해물을 경구 복용하게 하여 수축기 및 이완기 혈압과 혈중 Angiotensin I & II 등의 검사를 수행하여 혈압 강하에 미치는 굴 가수분해물의 기능성 및 안전성을 확인하고자 실시하였음

- 유효성에 대한 자료는 처음에 배정받은 대상자 (66명, 각 군 33명씩) 전체에 대한 ITT 분석과 중도 탈락한 2명을 제외한 PP분석을 모두 시행함
- 그 결과 1) 실험군과 위약 대조군의 수축기혈압, 이완기혈압 및 심박수의 변화를 관찰한 결과 4주 복용 후 두 군 모두에서 수축기 및 이완기 혈압이 의미 있는 저하를 나타냄. 2) 실험군의 변화를 위약대조군과 비교한 결과 수축기 및 이완기 혈압의 감소정도는 양군간에 유의성 있는 차이가 없음. 3) 실험군과 대조군 모두에서 4주 복용 후 Angiotensin I, II는 통계적으로 의미 있는 증가나 감소를 보이지 않았고, 군 간의 차이도 없음

8. 굴 가수분해물 원료의 유통기한 설정

- 굴 가수분해물 원료의 저장 중 수분, pH, 색의 변화, ACE 저해활성, 지표물질로서 YA의 함량과 대장균 및 일반세균의 변화를 측정함으로써 원료와 유통기한을 설정함
- 다양한 온도(4~40℃)에서 18개월까지 보관하며 각종 지표에 관한 변화를 측정함
- 식약처에서 제시한 유통기한 설정 식에 따라, 각종 지표의 연간변화 반응속도상수(K')로부터 산출한 원료의 유통기한은 24개월로 결정함
- 최종제품의 유통기한은 제품출시에 맞춰 결정예정임

9. 고혈압 예방 건강기능식품 출시를 위한 시장조사 및 전략 컨설팅

- 혈압조절 건강기능식품 출시를 위한 시장현황조사 및 전략 컨설팅을 통해 제품의 마케팅 전략을 수립함
- 고혈압 예방에 대한 needs와 trend를 형성시키고 중년을 위협하는 고혈압예방에 효과적인 천연성분의 기능성 소재(통영의 청정이미지 부각)라는 핵심메세지를 강조
- 파마킹의 유통채널인 약국을 중심으로 백화점, 유통점, 홈쇼핑 등의 다각적인 유통망을 활용하여 소비자에게 노출시킴
- 적정가격은 50,000이하/개월로 결정함

10. 제품허가를 위한 공인인증 시험

- 식약처 공인인증시험기관인 한국식품연구소에 의뢰하여 외관, 지표성분의 함량, 수분, 열량, 영양성분, 중금속, 대장균 등에 관한 공인시험서를 확보함
- 지표성분의 함량은 본 사업단의 결과와 동일한 결과로 나타남

11. 식약처 허가서류 ((주)에스에프씨 기능성식의약품상지원센터)

- 식약처 허가서류에 필요한 다음의 모든 사항을 정리하여 제출본을 완성함
- 제출자료 전체의 총괄 요약본
- 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
- 제조방법 및 그에 관한 자료
- 원료의 특성에 관한 자료
- 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 안전성에 관한 자료
- 기능성 내용 및 그에 관한 자료

- 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
- 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

나. 2핵심과제 - 곰피를 이용한 간기능 개선 건강기능식품의 개발 및 제품화

1. 곰피추출물 표준화 및 유효성분 탐색

- 곰피에 함유된 유효성분들 중 특이성, 대표성, 용이성, 안정성 등의 기준시험법 개발지표에 가장 적합한 dieckol을 지표성분으로 설정함
- 곰피추출물의 기능 및 지표성분인 dieckol의 정량을 위한 분석방법을 개발하여 표준시험법에 의해 Validation 자료를 확보함
- 확립된 dieckol의 표준분석 방법은 곰피추출물의 효능 및 지표물질로서 원료 및 제품의 품질관리에 적용할 수 있음
- 다양한 곰피 추출물 batch로부터 HPLC fingerprint 비교분석 결과 각 피크들의 상관계수는 0.9이상으로 나타나 우수한 품질 동등성을 나타냄
- 곰피추출물에서 dieckol의 평균 함량은 19.16mg/g 이었고 시험농도의 80~120% 범위를 일반적으로 함량기준으로 설정하므로 15.32~22.99mg/g으로 원료규격을 설정하였음

2. 곰피추출물의 대량생산공정

- 곰피 주정추출물의 대량생산공정은 신라바이오텍의 GMP 시설장비를 이용하여 수행함
- 곰피의 수세 및 검사(이물질 혼입여부), 건조(통풍, 음건), 수침, 70% 주정추출, 증발농축, 동결건조의 공정으로 표준공정을 설정함
- 건조한 곰피 1,500kg을 수침하는 과정부터 시작하여 동결건조하여 최종 곰피추출물 327.5kg을 생산하는 표준공정으로 최종 yield는 18.5%로 나타남

3. 인체적용시험을 위한 효능 및 용량확인시험

- Human hepatoma (HepG2) 세포를 이용하여 간세포 보호능, 간세포 손상지표 (AST/ALT), 과산화지질 생성량을 측정한 결과 곰피추출물 및 phlorotannin성분들 (dieckol 및 phlorofuofuroeckol-A)에서 실리마린보다 우수한 효능을 보임
- 에탄올을 투여하여 간독성을 유발한 실험동물에 곰피 추출물을 투여하였을 때 혈중 GOT/GPT의 활성이 중용량(100mg/kg)에서 양성대조군인 실리마린(100mg/kg)과 동등하게 감소시키는 결과를 나타냄. 혈청에서의 지질 농도를 측정한 결과 FFA, TG 및 TC의 수치는 용량 의존적으로 유의성 있게 감소하였으며 HDL-C 및 HDL-C/TC 비율은 증가하는 효과를 나타냄. 양성대조군인 실리마린(100mg/kg)과 곰피 주정추출물 중용량(100mg/kg)에서 동등한 보호효능을 확인함
- 간에서 지질을 추출한 후 분석한 결과, 혈액 중에서 분석한 지질의 농도변화와 같은 경향을 나타냄
- 간조직 Oil-Red O 염색을 통하여 곰피 추출물 경구투여에 의해 지방구의 크기와 수가 감소되었음
- 양성대조군인 실리마린 100mg/kg과 곰피 추출물 100mg/kg(중용량)에서 동등한 효능을 보이므로 곰피 추출물의 인체적용시험 용량을 실리마린과 비슷한 용량에서 실시하도록 결

정하였음. 식약처의 실리마린 1일 허용 기준량은 130mg으로 dieckol을 같은 농도로 섭취하였을 때 곰피 추출물의 1일 섭취량은 130~180mg임. 인체적용시험 최저용량을 130mg으로 설정하였음

4. 곰피추출물의 간 보호 효능 작용기전

4.1. *in vitro*에서의 작용기전 연구

- Human hepatoma (HepG2) 세포를 이용하여 세포보호능, AST/ALT 측정, 과산화지질, nitric oxide (NO) 및 ROS 생성량 측정을 진행한 결과 모든 기능성 면에서 곰피추출물 및 phlorotannin성분별 (eckol, dieckol 및 phlorofuofuroeckol-A) 시료 모두 농도 의존적으로 유의성 있는 결과를 나타내었으며 그 중 phlorofucofuroeckol-A의 효능이 가장 뛰어남을 확인함
- 에탄올 유발 산화 스트레스에 의한 간독성에서 곰피 추출물 및 phlorotannins의 간보호 효능 작용기전을 확인하기 위해 항산화 인자인 heme oxygenase-1 (HO-1)과 Nrf-2, TNF- α 의 단백질 변화를 western blot을 통해 확인함. Dieckol 및 phlorofucofuroeckol-A에 의해 HO-1과 TNF- α 의 발현이 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였으며, Nrf-2는 nuclear fraction에서 시료를 처리한 모든 세포에서 농도의존적으로 증가한 것을 확인할 수 있었음. 이들 결과를 통해 곰피 추출물의 간보호 효능은 dieckol 및 phlorofucofuroeckol-A에 의한 것임을 확인함
- 에탄올 유발 산화스트레스 환경에서 곰피 추출물 및 phlorotannins은 항산화 반응 인자를 조절하는 Nrf-2의 nuclear에서의 발현을 증가시켜 phase II enzyme 중의 하나인 HO-1의 발현을 증가시킴으로써 간보호 효능을 나타냄. 특히, 3종의 phlorotannins 중에 dieckol 및 phlorofucofuroeckol-A에 의해 HO-1의 발현증가가 나타난 것으로 보아 곰피 추출물의 간보호 효능은 dieckol 및 phlorofucofuroeckol-A에 의한 것으로 판단되어 짐
- 곰피에서 분리한 fucosterol은 hepatic glutathione 농도를 증가시키고 ROS 생성을 감소시켜 간손상을 방지하고 ALT와 AST 활성을 증가시켜 간보호효과를 나타내며 산화적 스트레스로 인한 간독성에 대한 예방 및 치료제로서의 활용 가능성을 보임

4.2 *in vivo*에서의 작용기전 연구

- 곰피 추출물의 간보호효과를 확인하기 위하여 간 조직 내 산화스트레스 관련인자(SOD, catalase 및 glutathione)의 활성이 증가하였으며 효소활성 증가에 따라 MDA의 수치가 개선됨을 확인함
- 곰피 추출물의 만성알코올성 지방간 개선 기전연구를 위하여 Real-time PCR 기법을 통한 간조직에서의 지방산 생성에 관여하는 유전자 발현을 확인함
- 곰피 추출물은 유리지방산의 중성지방으로의 전환을 억제하고 미토콘드리아 내부로의 지방산 유입을 용이하게 함(CPT-1). 또한 미토콘드리아 내부로 유입된 지방산 사슬의 산화를 촉진하는 효소 (LCAD, MCAD)의 발현을 증가시켜 beta-oxidation을 증가시키고 간조직에서 혈중으로 초고밀도 콜레스테롤 (VLDL)을 운반하는 MTP (microsomal triglyceride transfer protein)의 민감도를 감소시킴으로서 간 및 혈중 지질 농도를 개선함
- 곰피 추출물은 간 조직 내 산화스트레스 관련인자의 활성을 증가시키고, lipogenesis에 관련된 유전자의 발현을 조절함으로써 알코올성 지방간을 개선시키는 것으로 판단되어 짐

5. 독성시험

- 곰피는 식약처 식품공전에 식품원료로 등재되어 있으므로 독성시험은 면제임

6. 인체적용 시험용 시제품 생산을 위한 제형연구

- 건강기능식품의 제형 중 정제, 분말, 과립, 정환, 캡셀 중 적절한 투과성과 용해도를 갖추는 제형에 대하여 봉해도 실험을 실시한 결과 정제, 정환, 캡셀의 형태는 용해도가 낮은 반면 분말 및 과립에서 높은 용해도를 보임
- 연질캡슐 제형에서는 유효성분의 분석이 용이하지 않았으며 정제는 타정 시 지표성분의 함량이 저하될 가능성이 있음
- 최종 제형은 시각, 미각, 후각적으로 섭취하기 좋으면서 소비자 선호도가 좋은 과립, 스틱형으로 선정함
- 곰피의 과립제형에 관한 특허를 출원함

7. 곰피추출물의 간기능개선 인체적용시험

- 곰피 주정추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한 인체적용 시험을 순천향대학교 서울병원에서 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험의 방법으로 진행하고 있음
- 2015년 5월 22일 까지 25명의 시험대상자가 선정되어 인체적용시험이 진행 중임
- 추후 다음 일정으로 인체적용시험이 완료될 예정임
- 추가 시험대상자 모집 완료 : 12 주 (2015.08)
- 시험식품 섭취 : 12주 (2015.11)
- 간기능 개선 유효성 평가 biomarker 및 안전성 검사 : 2주 (2015.12)
- 통계분석 및 결과보고서 작성 4주 (2016. 01)
- IRB 결과보고 승인 (2016.02)

8. 곰피추출물 원료 및 제품의 유통기한 설정

- 제품의 유통기한은 $25 \pm 5^\circ\text{C}$, $35 \pm 5^\circ\text{C}$, $45 \pm 5^\circ\text{C}$ 의 세 가지 조건으로 6개월 동안 30일 간격으로 7회 품질 지표를 분석하였음. 품질지표는 dieckol의 함량변화로 확인함
- 시험 결과, 미생물 검사에서 모든 기간, 보관온도 조건에서 대장균이 검출되지 않았고 성상 또한 모든 기간, 보관온도 조건에서 변화가 없었음
- 지표성분인 dieckol은 1.9%의 함량이 전 기간에 걸쳐 일정하게 유지됨을 확인함
- 식약처에서 제시한 유통기한 설정 식에 따라, 품질 지표의 연간변화 반응속도상수(K')로부터 산출한 원료의 유통가능기한은 145개월 이었으므로 최종 유통기한을 24개월로 설정하였음

9. 간 기능성 건강기능식품 출시를 위한 시장조사 및 마케팅전략 수립

- 간 기능성 건강기능식품 시장조사를 통해 개별인정원료의 생산점유율이 지속적으로 증가추세에 있으며 상위 10여개의 원료들 중 간건강에 관련된 원료가 3개를 차지할 정도로 시장성이 높음을 확인

- 마케팅전략 - OEM/ODM : 참여기업인 (주)네추럴웨이의 대기업 인프라를 통한 OEM/ODM 전략을 수립하여 간 건강에 도움을 줄 수 있는 새로운 원료로 시장을 개척
- 소재판매 - 곰피소재에 대한 특허 및 개별인정을 통해 식품제조업체 및 유통업체들에 새로운 기능성 소재로 판매함으로써 독자적 원료로서의 시장을 형성함
- 직접유통 - (주)네추럴웨이는 현재 별도의 방문판매법인인 엘파인을 필두로 자사의 제품을 시장에 유통하고 있음. 이를 통해 시제품 및 테스트마켓용으로 제품을 출시하여 제품의 효과 및 개선점을 도출. 2015년 3사분기 3여년간의 연구 끝에 개발한 제품이 홈쇼핑을 통해 런칭할 예정이며, 이를 성공요소로 차후에 곰피에 관한 제품을 홈쇼핑을 통해 판매할 예정. 뿐만 아니라 홈플러스 PB상품으로 새로운 제품의 입점이 확정됨에 따라 차후 본격적인 일반 소비재시장으로의 진출이 더욱 수월해질 것임
- 판로확대 등 시장개척 계획 - 인터넷 쇼핑몰 구축, TV 홈쇼핑 광고, 소셜미디어 및 검색 엔진 최적화, 오프라인 프로모션 등을 통해 판로를 확대함
- Sales & Public Relations - 국내외 원료전시회를 통한 제품의 홍보, 개별인정형 획득 후 곰피 원료의 보도자료 작성 및 배포를 통해 홍보강화, 파워블로거 및 SNS 수단을 활용하여 제품 및 원재료의 직간접적 마케팅 및 홍보, 국내외 기능성식품 기업 (한국야쿠르트, CJ 등)과 제휴하여 곰피를 소재로 한 새로운 브랜드의 간보호제품 출시

10. 제품허가를 위한 공인인증 시험

- 식약처 공인인증시험기관인 한국기능식품연구원에 의뢰하여 곰피 주정추출물에 대한 성상, 중금속, 대장균군, 농약함유량 및 지표성분인 dieckol의 함량에 관한 공인시험서를 확보함
- 지표성분의 함량은 본 사업단의 결과와 동일한 결과로 나타남

11. 식약처 허가서류 ((주)네오뉴트라)

- 식약처 허가서류에 필요한 다음의 모든 사항을 정리하여 제출본을 완성함
- 제출자료 전체의 총괄 요약본
- 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
- 제조방법 및 그에 관한 자료
- 원료의 특성에 관한 자료
- 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 안전성에 관한 자료
- 기능성 내용 및 그에 관한 자료
- 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
- 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 연구를 통해 굴 가수분해물과 곰피 주정추출물을 건강기능식품으로 식약처 개별인정 받기 위한 과학적 증거와 기술적인 자료를 구축하였음
- 인체적용시험의 지연으로 인해 굴가수분해물의 혈압조절 개별인정 허가신청은 2015년에, 곰피 주정추출물의 간기능개선 개별인정 허가신청은 2016년에 실시할 예정임

- 본 사업을 통해 굴 가수분해물과 곰피 추출물에 대한 국내 특허출원 3건, 등록 1건, 해외 PCT 출원 1건과 미국 개별국가 출원 1건의 특허성과를 달성하였음
- 특히 해외 PCT 출원 (안지오텐신-I 전환효소 저해능을 나타내는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 심혈관계질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물) 및 미국 개별국가 출원은 글로벌 기능성식품 개발 및 진출을 위한 핵심성과라 할 수 있음
- 본 사업을 통해 총 12건의 SCI 저널에 연구결과를 투고하여 4건이 이미 출판되었으며 8건은 현재 심사 진행 중임. 그 외 3건의 비SCI 저널에도 연구 성과를 출판하였음
- 본 연구사업단의 총괄책임자가 통영시의 중국 시장개척단에 직접 참가하여 굴의 간보호 기능성에 대한 연구결과 발표 - 중국수출을 위한 굴 수출업체와 중국기업과의 MOU체결 (산동성 순화국제호텔그룹, 북경 청향각, 75억원 규모)
- 중국과의 사업성과 설명회 및 MOU 체결 후 통영굴의 중국으로의 수출액 증가 (5억원에서 100억 원으로 증가)
- 국내 수산자원을 활용한 고부가가치 제품개발의 성공사례로 TV 뉴스 등 국내외 언론에 10건 이상 소개됨
- 기능성소재의 제품화를 위한 국내외 우수기업(한국야쿠르트, 중국 식품기업 등)과의 협력관계 구축
- 잉여수산자원인 굴과 곰피로부터 새로운 가치를 지닌 기능성성분을 분리하고 잠재적인 고부가가치 상품으로 개발됨으로써 수산 어민의 소득증대 및 수입대체 효과를 지닐 것으로 기대됨

SUMMARY

(영문요약문)

I. Project Title

Development and Industrialization of Health Functional Foods from Surplus Marine Natural Resources

Core Project I – Development and Industrialization of Blood Pressure Regulating Health Functional Food from Enzyme–hydrolyzed Oyster

Core Project II – Development and Industrialization of Liver Function Supporting Health Functional Food from Brown Algae, *Ecklonia stolonifera*

II. Purposes

- To provide a new monetary values for surplus marine resources such as frozen oyster and brown algae, *Ecklonia stolonifera*
- To provide attractive ingredients for health functional foods industry where most of sources are from abroad
- To develop a blood pressure regulating functional food ingredient from enzyme–hydrolyzed oyster and establish technical documents for health functional food application to the Ministry of Food and Drug Safety
- To develop a liver function supporting functional food ingredient from *Ecklonia stolonifera* and establish technical documents for health functional food application to the Ministry of Food and Drug Safety

III. Scope of Research and Development

- Establishment of technical documents for the Health Functional Food Application
 - ① Manufacturing Methods and relating data
 - ② Specification on functional component (or marker component) and data on test method
 - ③ Specification on detrimental substance and data on test method
 - ④ Safety data including GLP certified toxicological study
 - ⑤ Functionality contents and related data including Human study
- Manufacturing Methods and relating data - Establishment of standard manufacturing process for functional ingredient and functional food product
- Specification on functional component (or marker component) and data on test method - Elucidation of functional component and/or marker component from marine natural resources and the establishment of standard test method for qualification and quantification of functional components
- Specification on detrimental substance and data on test method - Official specification data for the detrimental substance including heavy metal contents will be prepared from domestic certified food examination laboratory

- Safety data including GLP certified toxicological study - Safety data will be prepared from GLP certified examination laboratory to meet the official regulation for health functional food ingredient
- Functionality contents and related data including Human study - Useful effect on health purposes from consumption of these ingredient will be listed from the evidences of human study and animal studies
- Formulation study for final products and the establishment of marketing strategy

IV. Research and Development Results

A. Development and Industrialization of Blood Pressure Regulating Health Functional Food from Enzyme-hydrolyzed Oyster

1. Standardization of Oyster hydrolysate and elucidation of functional component

- Frozen oyster was hydrolyzed with the series of enzyme reaction of Protamex and Neutrase and then filtered and lyophilized to produce the active ingredient
- Pilot-scale production of enzyme hydrolysate of oyster was performed in GMP certified facility and the protocol was standardized for mass production
- Dipeptide, tyrosylalanine (YA) was elucidated as a functional component of hydrolyzed oyster and the method for quantification of YA was established and validated

2. Standard protocol for mass production of functional ingredient

- Pilot scale (1,000 Kg of frozen oyster) production was performed in GMP facility and final yield of functional ingredient was 20%
- Standard protocol was established and documented according to the official guide

3. Efficacy evaluation and determination of daily dose for human study

- Evaluation of blood pressure related parameters including ACE, angiotensin-II, CRP contents comparing with sardine peptide (valine-tyrosine) as a positive control
- YA represented more potent activity as sardine peptide and the effective dose for oyster hydrolysate was determined as 100 mg/kg in rodent model

4. Action mechanism study of functional component of oyster hydrolysate

- Oyster hydrolysate represented antioxidative activities on SD rat plasma and liver homogenate
- Oyster hydrolysate significantly reduce the contents of total cholesterol and neutral lipid as well as superoxide and hydroxyl radical

- Five active peptides were isolated from oyster hydrolysate and their structure–activity relationship was studied and tryptophan masked derivatives were synthesized and compared their ACE inhibition potential

5. Toxicology study

- General toxicity and genotoxicity was tested by GLP laboratory of Chemon company
- Oyster hydrolysate did not represent any significant toxicity according to the results

6. Formulation study for sample product for human study

- The solubility of oyster hydrolysate and their emulsifying activity were studied with various condition of pH, emulsifying agents, co–solvents
- The optimal parameters of emulsion formular was established
- Liposome–in–alginate system was tested for the capsulation of oyster hydrolysate
- Liposome–in–alginate system provide effective condition for the capsulation and sustainable release of oyster hydrolysate through oral administration

7. Human study of oyster hydrolysate on the regulation of blood pressure

- Human study of oyster hydrolysate on the efficacy of reducing blood pressure was designed and performed by appropriate institution and protocol
- The protocol was designed as double–blinded with placebo and parallel study and evaluated by IRB and approved

8. The establishment of expiry date for the functional ingredient and functional food product

- The stability test for oyster hydrolysate was performed to establish the expiry date
- Water content, ACE inhibition activity, marker component content, color change were monitored during long term storage of oyster hydrolysate
- The expiry date for oyster hydrolysate was estimated as 28.7 month according to the annual change constant K'

B. Development and Industrialization of Liver Function Supporting Health Functional Food from Brown Algae, *Ecklonia stolonifera*

1. Standardization of *Ecklonia stolonifera* and elucidation of functional component

- The standard HPLC chromatogram was established to reveal the chemical profile

of ethanol extract of *Ecklonia stolonifera*

- Phlorotannin was elucidated as active component of *Ecklonia stolonifera* and dieckol was identified as functional and marker component

2. Standard protocol for mass production of functional ingredient

- Pilot scale (1,500 Kg of fresh *Ecklonia stolonifera*) production was performed in GMP facility and final yield of functional ingredient was about 20%
- Standard protocol was established and documented according to the official guide

3. Efficacy evaluation and determination of daily dose for human study

- Ethanol extract of *Ecklonia stolonifera* significantly reduced the contents of various parameters for hepatic function
- GOT/GPT levels were similarly reduced as positive control of silymarin and free fatty acid, triacyl glycerol, total cholesterol contents were significantly reduced by the treatment with *Ecklonia stolonifera*
- The human study dose was determined as 100mg/kg which is same with the case of silymarin

4. Action mechanism study of functional component of *Ecklonia stolonifera*

- Ethanol extract of *Ecklonia stolonifera* significantly reduced GOT/GPT level in *in vitro* and *in vivo* model
- The plasma level of FFA, TG and TC significantly reduced by the treatment of *Ecklonia stolonifera* in concentration dependent manner, and HDL-C and HDL-C/TC ratio was elevated significantly
- The activity of SOD, catalase and glutathione were increased and the level of MDA was improved
- The cytoprotective activity, AST/AST level, hyperoxidation lipid and nitric oxide levels were improved in concentration dependent manner
- Among the phlorotannin, phlorofuocofuroeckol-A represented most potent protective activity
- Ethanol extract of *Ecklonia stolonifera* significantly improved various parameters in chronic fatty liver animal model
- Fucosterol isolated from *Ecklonia stolonifera* represented potent protective activity against oxidative stress in liver

5. Toxicology study

- Toxicological study was waived for *Ecklonia stolonifera* because this marine product has been used as food for a long time

6. Formulation study for sample product for human study

- Various formulation was tested including soft capsule, tablet and final formulation was determined as granule type in stick package

7. Human study of *Ecklonia stolonifera* on the liver protection

- Human study of ethanol extract of *Ecklonia stolonifera* on the efficacy of enhancing liver function was designed and performed by appropriate institution and protocol
- The protocol was designed as double-blinded with placebo and parallel study and evaluated by IRB and approved

8. The establishment of expiry date for the functional ingredient and functional food product

- The stability test for ethanol extract of *Ecklonia stolonifera* was performed to establish the expiry date
- Marker component content, color change were monitored during long term storage at different temperature of 25 ± 5 °C, 35 ± 5 °C, 45 ± 5 °C
- The content of dieckol did not show significant change during all the storage condition up to 6 months

V. Conclusion and Prospect

- All the scientific evidences and technical documents for Health Functional Food application of oyster hydrolysate and *Ecklonia stolonifera* ethanol extract were established
- Two surplus marine natural products, oyster and *Ecklonia stolonifera* get to have a new value as a functional ingredient and potential monetary values will be produced and transferred to fisherman
- Future industry of high-valued functional food will be developed with domestic natural resources

CONTENTS
(영 문 목 차)

SUMMARY

Chap. 1 Overview of the study	19
Section 1. Objectives of the Research	19
Section 2. Needs of the Research	22
Section 3. Research Scope	23
Chap. 2 Current status of technology in domestic and foreign	24
Section 1. Current status of Blood Pressure Regulating Health Functional Food	24
Section 2. Current status of Liver Function Supporting Health Functional Food	26
Chap. 3 Study contents and results	29
Section 1. Development and Industrialization of Blood Pressure Regulating Health Functional Food from Enzyme-hydrolyzed Oyster	29
1. Standardization of Oyster hydrolysate and elucidation of functional component	29
2. Standard protocol for mass production of functional ingredient	52
3. Efficacy evaluation and determination of daily dose for human study	57
4. Action mechanism study of functional component of oyster hydrolysate	63
5. Toxicology study	75
6. Formulation study for sample product for human study	85
7. Human study of oyster hydrolysate on the regulation of blood pressure	113
8. The establishment of expiry date for the functional ingredient and functional food product	119
Section 2. Development and Industrialization of Liver Function Supporting Health Functional Food from Brown Algae, <i>Ecklonia stolonifera</i>	134
1. Standardization of <i>Ecklonia stolonifera</i> and elucidation of functional component	134
2. Standard protocol for mass production of functional ingredient	150
3. Efficacy evaluation and determination of daily dose for human study	155
4. Action mechanism study of functional component of <i>Ecklonia stolonifera</i>	167
5. Toxicology study	174
6. Formulation study for sample product for human study	175
7. Human study of <i>Ecklonia stolonifera</i> on the liver protection	180
8. The establishment of expiry date for the functional ingredient and functional food product	190
Chap. 4 Goal Achievement and contribution to related industries	214
Chap. 5 Result of the Study and Application plan	238
Chap. 6 Technical information and knowledge acquired for process of the study	239
Chap. 7 Current state of Research Facilities and Equipment	240
Chap. 8 References	241

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	19
제1절. 연구개발의 목적	19
제2절. 연구개발의 필요성	22
제3절. 기대효과	23
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	24
제1절. 혈압조절 건강기능식품 시장 동향	24
제2절. 간기능 개선 건강기능식품 시장의 동향	26
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	29
제1절. <1핵심> 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품의 개발 및 제품화	29
1. 굴 가수분해물 표준화 및 유효성분 탐색	29
2. 굴 가수분해물의 대량생산공정	52
3. 인체적용시험을 위한 효능 및 용량확인시험	57
4. 굴 가수분해물 및 유효물질의 혈압조절 작용기전 규명	63
5. 독성시험	75
6. 인체적용 시험용 시제품 생산을 위한 제형연구	85
7. 인체적용시험	113
8. 굴 가수분해물 원료의 유통기한 설정	119
9. 고혈압 예방 건강기능식품 출시를 위한 시장조사 및 전략 컨설팅	127
10. 제품허가를 위한 공인인증 시험	129
11. 식약처 허가서류	132
제2절. 곰피를 이용한 간기능 개선 건강기능 식품의 개발 및 제품화	134
1. 곰피추출물의 표준화 및 유효성분 탐색	134
2. 곰피 주정추출물의 대량 생산 공정	150
3. 인체적용시험을 위한 효능 및 용량확인시험	155
4. 곰피추출물의 간 보호 효능 작용기전	167
5. 독성시험	174
6. 인체적용 시험용 시제품 생산을 위한 제형연구	175
7. 곰피추출물의 간기능개선 인체적용시험	180
8. 곰피추출물 원료 및 제품의 유통기한 설정	190
9. 간 기능성 건강기능식품 출시를 위한 시장조사 및 마케팅 전략 수립	200
10. 제품허가를 위한 공인인증 시험서	206
11. 식약처 허가 서류 제출	210
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	214
제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획	238
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	239
제 7 장. 연구시설·장비 현황	240
제 8 장. 참고문헌	241

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제1절. 연구개발의 목적

- 소비되지 않고 저장 방치 되는 잉여수산자원을 이용한 글로벌 건강기능 식품 개발
- 잉여수산물의 새로운 가치 부여를 통한 수산어민 소득 증대
- 냉동 굴로부터 혈압조절 기능성 식품소재 및 제품개발
- 곰피로부터 간기능 개선 기능성 식품소재 및 제품개발
- 국내 수산생물소재 제품개발을 통해 관련 산업에서의 국가이미지 제고 및 창출에 기여하며 미래의 성장 동력으로서의 바이오산업의 부흥에 이바지



그림 1. 본 사업단의 최종목표 및 단계별 전략

가) 제1핵심과제 연차별 목표

제1핵심과제명 : 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품의 개발 및 제품화

	목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 굴 가수분해물 표준화 및 유효성분 탐색(<i>in vitro</i>) ○ 인체적용시험을 위한 용량 확인시험 (동물시험) ○ 작용기전 규명 ○ 대량 생산 공정 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - LC/MS를 이용한 펩타이드 지표물질 선정 - ACE 저해활성 검색을 통한 유효성분 탐색(가수분해물, 분자량에 따른 분획물, 생성 펩타이드) - 3개 이상의 용량군 투여에 따른 SHR 고혈압쥐의 혈압강하 효능시험을 통한 인체적용 시험용량 설정(가수분해물, 분자량에 따른 분획물, 양성대조군: 정어리펩타이드, Captopril) - 혈청 중 ACE활성 저하 및 angiotensin II의 농도 측정 - 연속식 원심분리기와 ultrafiltration을 이용한 pilot scale(100~500kg, 냉동굴 1.5톤)의 생산 공정 개발
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활성 펩타이드 규명을 위한 동물효능 시험 ○ 일반 독성 시험 ○ 인체적용 시험용 시료 생산 ○ 인체적용시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 3개 이상의 용량군 투여에 따른 SHR 고혈압 쥐의 혈압강하 효능시험을 통한 분리된 펩타이드들인 활성 펩타이드 규명 - 굴 가수분해물의 단회투여 독성 등 일반독성시험(GLP기관 : 켄온 또는 바이오톡스텍) - 신라대학교 GMP 생산시설을 이용한 인체적용 시험용 제품 생산 - GCP규정에 따른 30 cases의 예비 인체적용시험을 통해 혈압조절 기능성 및 안전성 검증
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형화 ○ 유통기한 설정을 위한 가혹 시험 ○ 제품 표준화 ○ 인체적용시험 ○ 식품의약품안전청에의 허가 서류 제출 	<ul style="list-style-type: none"> - 초미세분말 제조기술을 활용한 음료 또는 정제, 캡슐 시제품 제작 - 원료의 안정성 실험, 유화 안정성 실험, 미생물 검사, 관능검사 - 지표물질의 정량을 통한 최종제품의 품질 표준화 - GCP규정에 따른 60 cases 이상의 인체적용시험을 통해 혈압조절 기능성 및 안전성 검증 - 식품의약품안전청 개별 인정형 건강기능식품 허가에 필요한 서류작성 및 신청서 제출

나) 제2핵심과제 연차별 목표

제2핵심과제명 : 곰피를 이용한 간기능 개선 건강기능식품의 개발 및 제품화

	목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 곰피 주정추출물의 표준화 ○ 인체적용시험을 위한 용량 확인시험 (동물시험) ○ 대량 생산 공정 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - HPLC를 이용한 지표물질 선정 및 소재 표준화 - 3개 이상의 용량군 투여에 따른 만성 알코올성 지방간을 유도한 쥐에서의 간기능 개선시험을 통한 인체적용 시험용량 설정(곰피 주정추출물, 양성대조군: Silymarin) - Ultrafiltration과 동결건조를 이용한 pilot scale(1,500kg, 반응물 3톤)의 생산공정 개발
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 작용기전 규명 ○ 인체적용 시험용 시료 생산 ○ 인체적용시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 동물 조직을 이용한 지방간 개선에 작용하는 기전 검증 - 독성을 유도한 세포에서의 간보호 작용기전 검증 - 신라대학교 GMP 생산시설을 이용한 인체적용 시험용 제품 생산 - GCP규정에 따른 30 cases의 예비 인체적용시험을 통해 간기능 개선 기능성 및 안전성 검증
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형화 ○ 유통기한 설정을 위한 가혹 시험 ○ 제품 표준화 ○ 인체적용시험 ○ 식품의약품안전청에의 허가 서류 제출 	<ul style="list-style-type: none"> - 초미세분말 제조기술을 활용한 음료 또는 정제, 캡슐 시제품 제작 - 원료의 안정성 실험, 유통 안정성 실험, 미생물 검사, 관능검사 - 지표물질의 정량을 통한 최종제품의 품질 표준화 - GCP규정에 따른 60 cases 이상의 인체적용시험을 통해 간기능 개선 기능성 및 안전성 검증 - 식품의약품안전청 개별 인정형 건강기능식품 허가에 필요한 서류작성 및 신청서 제출

제2절. 연구개발의 필요성

1. 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품 개발의 필요성

- 최근에 발표한 국민건강영양조사에 따르면, 30세 이상의 남성 3명중 1명, 여자 5명중 1명이 고혈압으로 매년 일정비율을 유지하고 있으며 다빈도 상병 순위에서 본태성 고혈압은 외래진료 질환에서 8위를 차지하는 질병임. 고혈압에 대한 인지율과 치료율이 증가함에 따라 시장규모가 커지고 있으며 이에 따른 건강기능식품 시장의 필요성이 증대되고 있음.
- 국내 36,000톤/년 굴 생산량 중 18,000톤 가량이 생굴로 소비되고 나머지는 가공품 형태나 냉동 굴로 저장되어 상품성이 떨어지므로 고부가가치 상품화 기술 개발이 절실함.
- 생물전환기술을 적용해 상품가치가 저감된 굴로부터 건강기능식품 소재를 제조함으로써 단가가 낮은 냉동굴 활용을 통해 생산비 절감 및 굴 생산에 의한 소득 증대에 기여.
- 국내 자생 혹은 양식 해양생명자원으로부터의 건강기능식품의 개발을 통해 건강한 먹거리에 대한 인식확산과 건강에 대한 사회적 관심 환기.
- 혈압조절용 건강기능식품은 현재 정어리 펩타이드, 가쓰오부시 올리고펩타이드, 카제인 가수분해물, 올리브잎 추출물, 코엔자임Q10 만이 식품의약품안전청에 등재 되어 시판되고 있으나, 굴 유래 혈압조절용 물질은 등록되어 있지 않음.
- 생물소재의 표준화 기술은 관련 산업인 천연물신약 등의 제약 산업의 발전에도 활용될 수 있으며 세계적 수준의 표준화가 이뤄진 생물소재 제품개발을 통해 관련 산업에서의 국가이미지 제고 및 창출에 기여하며 미래의 성장 동력으로서의 바이오산업의 부흥에 이바지 함.

2. 곰피를 이용한 간기능 개선 건강기능식품 개발의 필요성

- 우리나라는 만성 간질환의 만연지역으로 중추 경제 인구인 30-50대의 사망원인 중 만성 간질환이 2-4위의 높은 비율임. 특히 노령화 사회로 빠르게 진행함으로써 에너지 대사 및 독성 물질 대사 기관인 간의 노화로 신체 기능이 급격히 저하되어 치명적인 결과를 초래함.
- 만성적인 간기능의 상실은 무자각성으로 인체의 방어 작용과 해독작용을 상실하므로, 안전하고 부작용이 없는 간 보호 효과가 있는 건강기능식품 개발이 필요함.
- 해조류 추출물을 대상으로 간 보호활성을 측정한 결과 양성대조군으로 사용된 Syllimarin 보다 높은 활성을 나타내었음. 따라서 우리나라 연안에 다량으로 자생하고 있는 다년생의 해조류인 곰피를 소재로 한 간기능 개선 건강기능식품의 개발이 필요함.
- 식품소재로서 낮은 부가가치를 갖는 곰피로부터 고부가가치의 바이오제품을 개발하는 것은 미래의 신성장 동력으로서의 해양생명자원 활용기술의 확립이라는 중요성을 가짐.

제3절. 기대효과

- 잉여수산자원을 이용한 건강기능식품 개발은 잉여수산물 소비 촉진을 통해 경제적으로 수산어민의 소득을 증대시킬 뿐 아니라 건강기능식품으로의 개발을 통한 수출 증대 및 수입 대체 효과를 지닐 것으로 보여짐.
- 해양 천연소재의 대량 확보를 위한 수급이나 양식 등의 기술에 진보를 이룰 것이며, 육지소재와는 다른 해양천연소재의 독특한 구성에 대한 유효·지표성분의 추출·분석 표준화에 대한 기술을 구축.
- 해양천연소재로서 개발되지 못할 경우 소재 자체가 바다의 오염원이 될 수도 있는 것을 유효자원으로 개발하여 경제가치 창출 및 환경 보호 기능의 효과를 기대.
- 동일 효능의 육지 천연자원 대비 원료의 생산이 훨씬 용이하여 원료 수급을 위한 비용 및 에너지가 절감됨.
- 혈압조절 및 간 대사질환에 대한 의학적 측면에서의 사회·국가적 대응 기술의 진보를 이룰 수 있음.

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제1절. 혈압조절 건강기능식품 시장 동향

1. 국내·외 혈압조절 건강기능식품 제품 현황

가. 정어리 펩타이드

- 한국시장 잠식(원료로서 12.6억원/년) - 제품가로 210억 시장
- 일본의 경우 단일 시장(일본 아지노모토)만으로도 100억엔/년 매출
- 국내 유일한 혈압조절 펩타이드형 건강기능식품소재로서 일본에서 전량 수입 중
- 국내 경쟁사 (일본원료 구매 후 제품만 출시하고 있음)

표 1. 경쟁사의 혈압조절 건강기능식품명과 판매가격 및 연 판매액

경쟁사명	제품명	판매가격 (천원)	연 판매액 (천원)
① 농심	안심정어리펩타이드	160	1,500,000
② 보령	보령혈통, 보령 120	230	1,200,000
③ YBC	선지 정어리펩타이드	258	2,000,000

나. 국내·외 지식재산권 현황

표 2. 혈압조절 건강기능식품 관련 지식재산권 현황

지식 재산권명	지식 재산권출원인	출원국/출원번호
① 락토바실러스 카제이 에치와이418의 배양액으로부터 분리된 혈압강하 펩타이드 혼합물 및 그 분리	한국야쿠르트	한국/10-1999-000770 3
② 참치 자숙액으로 부터 분리한 안지오펜신 전환 효소의 활성저해 펩타이드 및 그의 정제방법	조흥연	한국/특1996-0028659
③ 안지오펜신-I-전환효소 억제활성을 갖는 신규한 생리활성펩타이드	한국과학기술원	한국/10-1998-004460 1
④ 어육을 이용한 기능성 펩타이드 제조방법	한국식품개발연구원	한국/10-1999-002283 8
⑤ 혈압 저하 효과가 있는 난백 단백질 분해물 및 그 제조방법	농촌진흥청	한국/10-2001-003928 3

다. 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품 개발 기술 현황

- 굴 가수분해물에 의한 간기능 개선으로 현재 굴 펩타이드를 이용한 혈압조절 관련 특허가 1건이 있으나, 효능 펩타이드의 서열이 다르고 활성이 현저하게 차이가 나기 때문에 본 연

구개발 과제와는 무관하며 본 연구단의 결과가 더 우수함.

라. 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품 개발 시 비교우위성

- 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품 관련 특허 국내 없음. 본 과제와 관련하여 본 연구단에서만 보유한 유일한 관련 특허로 본 과제 개발 핵심 기술임.
- 트랜스글루타민나제를 이용한 기능성 굴 효소 가수분해물 및 그의 제조방법 (등록번호 10-09004631); 국내 유일의 굴이용 혈압조절 관련 특허로 트랜스 글루타민나제를 이용한 단백질구조 수식 후 단백질 가수분해효소에 의한 기능성 펩타이드 제조기술임.
- 굴의 이미지가 정어리보다 소비자 호응도가 뛰어남
 - 일본 아지노모토에서 굴 펩타이드가 정어리 펩타이드보다 효과와 경제성이 좋다면 자사 제품을 굴 펩타이드로 교체 생산이 가능하다는 사전 상의가 있었음.
 - 본 연구 참여기업인 (주)파마킹은 혈압관련 유통망을 확보하고 있는 제약회사임
 - CJ제일제당과 한국야쿠르트에서도 상품개발에 긍정적인 평가
 - 100억에서 150억 정도의 판매 가능 예측
 - 중국시장(내륙지역) 개척에 전략적 준비 완료
- 본 연구단의 연구 결과 정어리 펩타이드보다 뛰어난 혈압조절 효과(3배 정도 뛰어남)
- 본 연구단의 연구 결과 정어리 펩타이드보다 우수한 경제성(1/3 정도의 생산원가)
- 굴 펩타이드를 이용한 혈압조절 건강기능식품의 뛰어난 효능과 우수한 가격 경쟁력을 바탕으로 기존 수입제품 정어리 펩타이드 시장 공략.
- 부작용이 없고 이미지(강정)도 좋은 천연물 소재의 장점을 부각시켜 반건강인을 위한 새로운 혈압 조절 식품 개발.
- 냉동굴의 경우 기능성 제품생산에 품질문제가 전혀 없고 가격이 저렴하여 해양식품 가공원료로 활용 가능.

제2절. 간기능 개선 건강기능식품 시장의 동향

1. 국내외 간기능 개선 건강기능식품 제품 현황 및 사례분석

표 3. 국내외 간기능 개선 건강기능식품 제품 현황 및 사례분석표

	국내	일본
특징	<ul style="list-style-type: none"> ● 식약청 인정원료: 헛개나무 열매꼭지 추출물, 표고버섯 균사체 추출물, 밀크시슬 추출물 (3종) 	<ul style="list-style-type: none"> ● 다양한 소재 활용 ● 동물 및 임상 실험 데이터 효능, 기능성 검증 ● 제형의 다양화 ● 식품 용도의 다양화 ● 기능성 제품, 식품 첨가물 등 ● 지속적 소재 발굴
제품	<ul style="list-style-type: none"> ● 건강기능식품 6개 회사의 6개 제품 1. 쿠퍼스(야쿠르트) 2. 헬프칸(CJ뉴트라) 3. hepatan(일진제약) 4. hepatan(대웅제약) 5. hepatan(보령제약) 6. hepatan(한국마그나스) ● 헛개나무 추출물 제품과 표고버섯 균사체 추출물 제품 각 3 품목씩 	<ul style="list-style-type: none"> ● 울금의 힘(하우스식품) ● 글 엑기스(마르하니치로) ● 쿠르쿠민 C3복합체(사빈사자판코포레이션) ● 쿠르쿠민 수분산액(요코하마 유지공업회사) ● 헥산(마르하니치로) ● 간 펩타이드(ILS사) ● 폴리코사놀(일유) ● 스코알렌(마르하니치로) ● 알라닌 ● 체카피에드라 ● 가막조개
매출	건강기능식품 시장이 아직 미미함.	2005년 간기능 개선 기능성 식품 시장 규모 265억 엔으로 2004년 대비 15% 성장 함. 매년 성장 추세임.

2. 간기능 개선 제품 성공 사례 분석

- 제품명: 헛개나무 프로젝트 쿠퍼스
- 제조사: 한국야쿠르트
- 매출: 60만개/1일 판매-800억 이상 예상매출

표 4. 간기능 개선 제품 상품화 및 판매 전략

상품화 전략	커뮤니케이션 전략	유통 전략
<ul style="list-style-type: none"> ● 최초의 간 기능 발효유로 소비자 인식 first entry ● 헛개나무 컨셉 만이 아닌 기능성 임상 시험과 식약청 허가가 취득 ● 장기 복용을 통한 효능 지각 유도 	<ul style="list-style-type: none"> ● 집중적인 광고 투자로 인지도 확보 ● 간건강=활력 이미지 연상 유도→침묵의 장기로 타겟의 필요성 부각 ● 방판 사원에 의한 홍보 적극 활용 	<ul style="list-style-type: none"> ● 방판 전용 제품으로 타겟 공략 ● 남성 직장인을 타겟과 동시에 여성들을 마이너 타겟으로 활용 ● 매일 배달하는 유통으로 인해 제품으로 지속적인 음용 가능 ● 장기 복용에 의한 소비자 효과 자각

가. OTC 의약품 성공사례

- 제품명: (복합) 우루사
- 제조사: 대웅제약
- 매출: 125억 (2007년)/UDCA(244억원)/우루사(113억원)

표 5. 간기능 개선 제품 상품화 및 판매 전략 분석

상품화 전략	커뮤니케이션 전략	유통 전략
<ul style="list-style-type: none"> ● 3가지 product line 운영-복합우루사/UDCA/우루사 ● 국내 최초의 간장 약으로 소비자 인식 ● 웅담성분 소재를 내세워 소재 차별화 유도 ● 담석 치료 기능을 확대하여 간기능 개선 영역까지 시장 확대 	<ul style="list-style-type: none"> ● 지속적인 소비자 커뮤니케이션(1978년 이후 TV CM) ● 일관된 주제에 대한 커뮤니케이션: 피로회복 ● 장기 복용 유도 	<ul style="list-style-type: none"> ● 전국 약국의 99% 취급 ● 장수 브랜드로서의 유통 파워 보유 ● 소비자가 브랜드를 지정하여 구매하는 약국 필수 취급 품목 임.

나. 곰피 이용 간기능 개선 건강기능식품의 개발 방안

- 건강기능식품법 발효 이후 간기능 개선 건강기능식품으로 인정된 소재는 3종, 6제품임.
- 건강기능식품법 발효 이전이 오히려 제형이 다양했음. 현재 한국야쿠르트 헛개나무 쿠퍼스 제품(발효유) 이외의 건강기능식품 6개 제형(캡셀)으로 국한되어 있음. 휴대 및 음용의 간편성을 위한 제형의 다양화를 시도해야 함.
- 소재의 다양화를 위해 우리나라만의 소재를 개발해야 함.
- 건강기능식품법 발효 이전에는 생약제의 전통적 효능에 근거하여 제품을 실험, 판매하여 실험적 접근을 통한 기능성 규명에 관심이 약했기 때문에 동물실험을 실시한 제품이 전체의 약 50% 정도였고, 인체적용시험 또한 개별 제품 보다 원료 물질에 대해 실시하였음. 효능

의 과학적 입증을 위해 과학적 임상 데이터를 확보해야 함.

- 곱피는 성게나 전복의 먹이로 주로 사용되며 식용으로 이용되고 있지만 그 용도가 제한적이며 부가가치가 높지 않음.
- 본 연구사업단의 선행연구결과 해조류 추출물의 간보호 활성이, 양성대조군으로 사용된 Silymarin보다 높은 활성을 나타내는 것을 발견하였음. 따라서 우리나라 연안에서 다량으로 자생하고 양식도 용이하여 물량확보가 가능한 다년생의 해조류인 곱피를 소재로 한 간기능 개선 건강기능식품의 개발이 필요함.

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

제1절. <1핵심> 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품의 개발 및 제품화

1. 굴 가수분해물 표준화 및 유효성분 탐색

1.1 Pilot 규모로 제조한 혈압조절 기능성 굴 가수분해 분말의 특성과 열 안정성

가. 굴 가수분해 분말 제조

(1) 재료

냉동 굴(*Crassostrea gigas*)은 2012년 10월 통영 지역에 소재하는 대원식품에서 구입하여 효소가수분해물 제조용 시료로 사용하였다. ACE (5 units from rabbit lung), hippuryl-histidyl-leucine (HHL)과 YA는 Sigma에서 구입하였다. Protamex 1.5 MG (1.5 AU/g, Bacillus protease, complex), Neutrase 0.8 L (0.8 AU/g, endoprotease, Bacillus amyloliquefaciens)는 Biosis사에서 구입하였으며, Microbial transglutaminase(MTGase, 103 U/g)은 아지모노토사에서 구입하였다. 다른 시약들은 분석급을 사용하였으며, 실험에 사용한 물은 nanopure급 탈이온수를 사용하였다.

(2) Pilot 규모의 굴 가수분해물 생산과 캡슐의 제조

냉동 굴 1,000 kg을 2배량의 수도수에서 해동하고 어취와 해수에 기인하는 염을 제거하기 위해 100℃의 끓는 물에서 30분 동안 블렌칭하였다. 블렌칭한 굴을 5mm의 plate를 장착한 meat grinder에서 마쇄하였다. 마쇄한 굴을 2배량의 수도수에 현탁시키고 1%(w/v)가 되도록 MTGase(103 U/g)을 첨가하여 단백질 가교결합 반응을 위해 30℃의 발효조(5,000 L)에서 1시간 동안 교반하면서 향온시켰다. MTGase로 처리하여 수식한 굴 현탁물에 1%(w/v)가 되도록 Protamex를 첨가하여 40℃에서 1시간 동안 가수분해 한 후, 1%(w/v)가 되도록 Neutrase를 첨가하여 50℃에서 1시간 가수분해하였다. 첨가한 효소를 불활성화 시키기 위해 100℃에서 30분 동안 가열하고, 냉각하여 200 mesh의 체를 장착한 cake filter (600P-25-40)에서 여과하였다. 여액은 약 30 Brix가 될 때까지 100℃의 농축기 (HS-1000 L)에서 농축하였다. 농축한 가수분해물을 향류 흐름 모드로 분무건조기(20K)로 탈수하였다. 분무건조기의 입구와 출구 온도는 각각 120℃와 90℃로 설정하였다. 150 Kg의 건조분말을 회수하였으며 -20℃의 동결고에 저장하면서 분석에 사용하였다.

가수분해물의 캡슐화를 위해 125 mg의 가수분해물을 미세결정의 셀룰로오즈 (35 mg), 확장제 (carboxymethylcellulose calcium, 2.5 mg), anticracking 제 (magnesium stearate, 2.5 mg)과 혼합하여 경질캡슐에 충전하였다.

(3) ACE 저해활성의 측정

ACE 저해활성은 Wu et al.(2002)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 용액 20 uL를 225

uL의 ACE 용액 (0.025 units/mL)와 잘 혼합하여 37°C에서 10분 동안 먼저 항온하고, 50 uL의 HHL 기질 용액(2.5 mg/ mL, 0.3 M NaCl-0.1 M borate 완충액, pH 8.3)을 첨가한다. 반응액을 흔들며 주면서 37°C에서 30분 동안 반응시킨다. 75 μL의 1 M HCl 용액을 첨가하여 효소반응을 중지시키고, 반응물을 10,000 rpm에서 원심분리하였다. 상층액의 반응생성물인 hippuric acid (HA)의 함량은 Watchers C18 칼럼(5 μm, 4.6x250 mm)을 장착한 HPLC 시스템으로 정량하였다. 효소 활성의 저해는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{저해활성 (\%)} = [(\text{HAcontrol} - \text{HASample}) / \text{HAcontrol}] \times 100$$

(4) YA 함량의 측정

YA 함량은 C18 역상 칼럼(4.5 x 250 mm, Atlantis T3) 을 장착한 HPLC 시스템 (Waters)으로 측정하였다. Microfilter(0.45 μm)로 여과한 시료용액 10 μL를 주입하고 용매 A(0.1% TFA/water)와 용매 B(0.1% TFA/acetonitrile)로 균배 용출하였다. 분광광도계로 측정된 YA의 최대 흡수파장 220 nm에서 검출하였다. YA함량은 같은 조건에서 용출한 표준물질 YA로 작성한 검량곡선에 따라 정량하였다.

- HPLC: HPLC 시스템(Waters)
- Column: Atlantis T3 C18 (4.5 x 250 mm, 5 μm)
- UV detector: 220 nm (200-500 nm, DAD)
- Solvent 조성 및 gradient조건 (표 6)

표 6. 굴 가수분해물의 HPLC Gradient 조건

Time	Flow(mL/min)	ACN(0.1% TFA)	Water(0.1% TFA)
0		4	96
30		4	96
31	1.0	100	0
50		100	0
51		4	96

(5) E. coli의 검출

0.88% NaCl 멸균수에 녹인 굴 가수분해물 용액(10 mg/mL) 3 M Petrifilm E.coli Coliform Count Plates (EC-plate)상에 도포하여 37°C에서 48 시간 동안 항온하였다. EC-plate상에 갇힌 가스방울을 가진 콜로니를 E-coli로 취급하여 수를 확인하였다. 결과는 CFU/g으로 표시하였다.

(6) 일반성분, 아미노산, 유리아미노산 및 무기질 조성

AOAC(2006)의 방법에 따라 수분함량은 105°C에서 가열건조법, 조단백질 함량은 Kjeldahl 법, 회분함량은 550°C에서 건식회화법으로 측정하였다. 무기질 조성은 Chen et al.(2009)의 방법에 따라 전처리한 후 유도결합 플라즈마 분광기로 측정하였다. 수은 함량은 ASTM No. D-6722에 따라 수은분석기를 사용하여 측정하였다.

굴 가수분해물(50 mg)을 포함하는 시험관에 과량의 6 M HCl 용액(5 mL)을 첨가하고 감압

하면서 밀봉하여 110°C의 heating block에서 24시간 산가수분해 하였다. Cysteine과 methionine은 산 가수분해 전에 굴 가수분해물을 performic acid에서 하룻밤 산화시킨 후, 산 가수분해하였다. 가수분해한 시료는 3G-glass filter로 여과하여 40°C 이하의 온도에서 회전 진공증발기로 염산을 완전히 증발시킨 후 0.01M HCl 용액으로 5mL되게 정용하였다. 정용한 시료의 일부를 취하여 0.20 μm filter로 여과한 후 아미노산 자동분석용 시료로 사용하였다. 산 용액에서 파괴되는 tryptophan은 Spies and Chamber (1949)의 방법으로 측정하였다. 유리 아미노산은 과량의 75% ethanol로 추출한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 회전진공증발기로 유기용매를 완전히 휘발시키고 0.01M HCl로 일정량 정용하여 분석용 시료로 사용하였다.

(7) 용해도, 지질친화성 및 zeta 포텐셜의 측정

용해도는 Wang et al.(2010)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 굴 가수분해물(0.5g)을 pH 2-9조절한 증류수와 NaCl 농도 0-0.5M 범위인 염용액 10 mL에 녹였다. 혼합물을 충분히 저어준 후 3000xg에서 15분 동안 원심분리하였다. 상층액 중의 단백질 함량은 Lowry et al.(1951)의 방법으로 측정하였다. 용해도는 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{용해도}(\%) = \text{상층액 중 단백질함량} / \text{시료 중 전체 단백질 함량} \times 100$$

지질 친화성은 shake-flask법으로 옥탄올과 물 사이에 굴 가수분해물 단백질의 분배계수 (LogPow)로 측정하였다. 옥탄올과 물에 용해한 단백질 함량은 Lowry et al.(1951)의 방법으로 측정하였다.

$$\text{LogPow} = \text{Log}(\text{옥탄올 중 단백질 함량} / \text{물 중 단백질 함량})$$

가수분해물 분말을 증류수에 녹인 후, 0.1 N NaOH 혹은 0.1 M HCl로 pH 4, 7과 8로 조정하였다. 이들 용액의 Zeta potential은 Zetasizer로 측정하였으며, 12시료 측정값의 평균으로 표시하였다.

(8) 수분흡수능과 hygroscopicity

굴 가수분해물의 수분 흡수능(WAC)는 Choi et al. (2009)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 굴 가수분해물 (1.0g)을 20 mL의 증류수에 녹이고 10분 동안 vortex한 후 3000xg에서 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 완전히 버리고, 원심관을 거꾸로하여 여과지 위에서 1시간 동안 방치하면서 남은 물을 완전히 뺀다. 수분흡수능은 건조 중량과 습중량의 차이로 측정하여 흡수한 물(g)/시료의 g 으로 표시하였다. 시료 1g을 포화 NaCl용액으로 평행시킨 상대습도 62±6%에서 상대습도 probe 기록계를 장착한 데시케이터에 넣어 실온에 보관하면서 hygroscopicity를 측정하였다. Hygroscopicity는 시료 중량에 대하여 주변 환경에서 흡수한 수분 중량의 %로 표현하였다.

(9) 입자 크기 분포, 색과 형태의 측정

입자 크기 분포는 건조 분산모델로 레이저 회절입자크기 분석기(Model 1190)로 측정하였다.

측정값은 D90, D50, D10 및 평균 지름으로 표시하였다. D90은 분포의 90%가 더욱 작은 입자 크기를 가지고 10%가 더 큰 입자 크기를 가진 지름을 서술하며, D50은 규정한 지름의 절반 이상과 이하의 분포를 가진 크기 분할이다. 색은 색차계(ZE-2000)을 사용하여 측정하였고 L*, a*, b* 및 $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$ 로 표현하였다. 색차계는 표준백판으로 조정하였다(L*=96.83, a*=-0.36, b*=0.62). 입자의 형태는 주사전자현미경(SEM, JSM-6380L)으로 평가하였다. 이중면 테이프를 사용하여 SEM stub에 시료를 부착하고 진공 하에서 3-5 mA gold/palladium으로 코팅하여 x500, x1000, x2000 및 x5000 배율로 15 kV에서 실험하였다.

(10) Thermal stability

열 안정성을 측정하기 위해 굴 가수분해물 캡슐을 사용하였다. 캡슐을 플라스틱 병에 넣어 뚜껑을 단단히 닫아 봉하였다. 이들 병을 무작위로 3 그룹으로 나누어 저온(4±2°C/46±5%), 실온(25±2°C/50±5%) 및 가온(40±2°C/75±5%)에서 보관하면서 상기의 실험 방법에 따라 ACE 활성과 YA 함량의 변화를 측정하였다.

나. 실험결과

(1) 미생물, 물리화학 및 미세구조 특성

굴 가수분해물에서 E.coli는 검출되지 않았으며(표 7), 굴 가수분해물 분말은 59.5±1.0%의 조단백질, 7.1±0.1%의 회분과 2.8±0.2%의 수분을 포함하였다. 분무 건조 후 잔여 수분함량은 3% 미만으로서 굴 가수분해물의 안정성과 저장 수명의 연장에 기여할 수 있다. 단백질의 수분흡수능은 제품의 경제성과 관능 속성에 영향을 미치기 때문에 식품산업에서 아주 중요하다. 굴 가수분해물의 수분흡수능은 0.63±0.01 g-water/g-시료였다.

표 7. Microorganism and physicochemical properties of the oyster hydrolysate

Parameter	Content	Parameter	Content
<i>E. coli</i>	Negative	WAC (g water/g sample)	0.63±0.01
Moisture (%)	2.8±0.2	Zeta Potential (mV)	
Crude protein (%)	59.5±1.0	pH 4	-6.74±4.17
Ash (%)	7.1±0.1	pH 7	-43.40±7.89
LogP _{ow}	-0.439±0.058	pH 8	-39.00±5.08
Color		Particle size distributions (µm)	
L*	38.42±0.31	D10	26.24±2.72
a*	8.61±0.07	D50	55.34±2.07
b*	16.67±0.13	D90	93.98±3.60
ΔE	61.21±0.31	Mean	57.95±2.63

굴 가수분해물의 LogPow 값은 -0.439±0.058이었다. Lipinski et al.(2001)은 LogPow 값이 5 이하의 약물이 위장관 내에서 좋은 흡수능과 투과성을 보인다고 보고하였다. 높은 ΔE 값과 b값을 가진 가수분해물의 색은 짙은 갈색이었다. 가수분해물의 입자 크기는 26.24±2.72 µm(D10) - 93.98±3.60 µm(D90)로서 평균 크기는 57.95±2.63 µm였

다. 작은 입자 크기는 큰 표면적을 가져서 저장하는 동안 수분에 대한 친화성이 높고 덩어리 질 수 있다. 굴 가수분해물의 미세구조에서 입자들은 잔물결과 붕괴 구조를 보였다 (그림 2). 느슨하고 다공성 구조는 물의 흡수에 기여하여 높은 hygroscopicity를 초래한다.

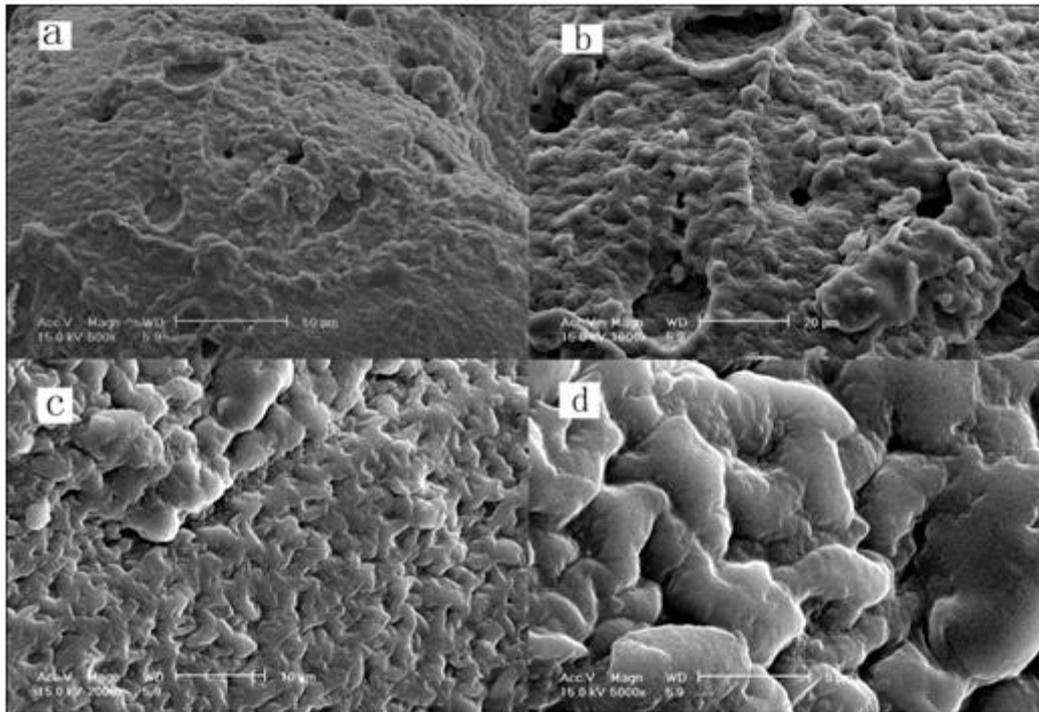


그림 2. SEM of the oyster hydrolysate. a, magnification $\times 500$; b, $\times 1,000$; c, $\times 2,000$; d, $\times 5,000$.

(2) 결합 아미노산, 유리 아미노산 및 무기질 조성

결합 아미노산은 함량은 시료 100g중 39.08%에 해당하였으며, 주요 아미노산인 Glu, Asp, Leu, Lys, Pro 및 Arg이 전체의 52.1%를 차지하였다(표 8). 비 필수아미노산에 대한 필수 아미노산의 비는 0.88로서 높은 비를 가진다. Pommie et al.(2004)의 아미노산 분류에 따라 소수성 아미노산에 대한 극성 아미노산의 비를 계산한 결과, 극성 아미노산과 비극성 아미노산은 각각 53.15%와 35.3%였다. 높은 극성 아미노산의 비가 굴 가수분해물의 용해도에 기여하는 반면, Lys과 Arg 같은 염기성 아미노산과 함께 높은 소수성 아미노산의 비는 ACE 저해활성에 기여한 것으로 추정된다.

대부분의 유리아미노산은 Tau, Leu 및 Ser으로서 전체 유리 아미노산의 약 35%를 차지하였다(표 9). Tau이 유리 아미노산 중 가장 많았으며 항산화, 무독성화, 삼투압 조절, 세포막 안정화와 신경조절을 포함하는 생리적 작용이 잘 알려져 있다. 다른 유리아미노산들은 굴 가수분해물의 향미와 맛에 중요한 기여 인자로 보인다.

Table 8. Free amino acid compositions of the oyster hydrolysate (mg/100 g-sample)

Amino acid	Content	Amino acid	Content
Phosphoserine	402.7	Isoleucine	157.2
Taurine	2286.7	Leucine	1302.9
Aspartate	810	Tyrosine	365.1
Hydroxyproline	127.3	Beta-alanine	605.3
Threonine	801.2	Phenylalanine	668.7
Serine	1078.5	Alpha-aminoisobutyric acid	28.9
Asparagine	304.8	Homocystine	68.4
Glutamate	660.9	Ethanolamine	168.8
Alpha amino adipic acid	22.1	5-hydroxylysine	151.7
Proline	885.3	Ornithine	16
Glycine	809.6	Lysine	380.7
Alanine	1351.3	1-methylhistidine	200.1
Alpha aminobutyric acid	64.7	Histidine	93.2
Valine	412.7	3-methylhistidine	24.1
Cysteine	195.4	Carnosine	158
Methionine	404.4	Arginine	432
Cystathionine	166.4	Total	15605.1

Table 9. Amino acid compositions of the oyster hydrolysate

AA ¹⁾	Content (g/100g sample)	Content (g/100g protein)	Reference standard ^a	AA	Content (g/100g sample)	Content (g/100g protein)
EAA				NEAA		
Ile	1.7±0.1	4.3±0.15	2.8	His	0.9±0.1	2.3±0.1
Leu	3.1±0.1	7.9±0.2	6.6	Ala	2.2±0.1	5.7±0.1
Lys	3.1±0.1	7.8±0.1	5.8	Arg	2.8±0.1	7.2±0.1
Met +Cys	2.7±0.1	6.8±0.1	2.5	Asp	3.3±0.1	8.5±0.1
Phe +Tyr	3.6±0.1	9.1±0.1	6.3	Glu	5.0±0.4	12.9±1.1
Thr	2.0±0.4	5.1±0.9	3.4	Gly	1.5±0.1	3.8±0.1
Val	2.1±0.1	5.4±0.1	3.5	Pro	3.0±0.2	7.8±0.4
Trp	0.2±0.1	0.5±0.1	1.1	Ser	1.9±0.2	4.8±0.4
Total	39.1±1.5	100.0±3.8				
Hydrophobic AA	13.8±0.3	35.3±0.7				
Polar AA	20.7±1.0	53.2±2.6				

1) FAO/WHO/UNU (1985); AA, amino acid; EAA, essential amino acid; NEAA, non-essential amino acid; Hydrophobic amino acids, Ile, Val, Leu, Phe, Cys, Met, Ala, Trp; Polar amino acids, Tyr, Thr, Ser, His, Asp, Glu, Lys, Arg.

굴 가수분해물은 다량 원소로서 Na, P, K, Ca이 고동도로 발견되며 미량원소로서 Zn, Fe, Cu, Mn이 풍부하였다 (표 10). 식품 중 Pb, Hg 와Cd 의 함량은 2 ppm, 0.5 ppm과 습중량으로 2 ppm 이하로 각각 제한하고 있다 (KFDA, 2014). 수분함량 2.8%인 굴 가수분해물 중 Ca의 함량은 3.0 ppm으로서 습중량으로 환산하면 0.08 ppm에 해당하기 때문에 KFDA의 규제 한계 이하 값에 해당한다. 비소와 Cr의 함량은 각각 0.4 ppm과 2.0 ppm이었다. KFDA는 As와 Cr에 대한 규제를 제시하지 않았으나 USFDA에서는 규제를 하고 있으며 규제 값은 각각 1.4 ppm과 12-13 ppm으로서 굴 가수분해물에서 검출된 As와 Cr의 함량인 0.4 ppm과 2.0 ppm은 문제되지 않는 것으로 확인하였다. 따라서 모든 중금속은 식품규격에 적합하였으며 따라서 굴 가수분해물은 식품과 의약품 첨가물로서 안전한 급원임을 확인하였다.

표 10. Mineral content of the oyster hydrolysate

Major	Content (mg/kg)	Minor	Content (mg/kg)
Na	17,131±3801	Fe	187.1±3.9
K	1,154±102	Cu	72.7±1.2
Ca	1,739±17	Zn	495.4±26.3
P	7,411±313	Mn	25.6±0.9
Mg	1,244±21	As	0.4±0.1
		Cd	3.0±0.1
		Pb	1.1±0.1
		Cr	2.0±0.1
		Hg	0.054

(3) 용해도와 Zeta potential

가수분해물의 용해도는 불용성 침전물의 외관이 불필요한 액상 단백질 공급원에서 특히 중요하다. 굴 가수분해물의 용해도는 유의적으로 용액의 pH에 의존하며 ($p < 0.05$), 시료 중 단백질 함량에 대한 최대값과 최소값은 pH 7.0에서 77%, pH 3에서 54.9%였다(그림 3a).

0.05-0.5M NaCl 농도 범위에서 용해도는 거의 변하지 않았으며, 이런 결과는 이온강도가 용해도에 영향을 미치지 않음을 뜻한다(그림 3b).

Zeta potential은 인접한 입자들 사이의 척력 정도를 지적하며 콜로이드 분산물의 안정성과 관련이 있다. pH 4, pH 7 및 pH 8에서 굴 가수분해물 용액(0.1mg/mL)의 zeta potential은 pH가 증가함에 따라 증가하였다. 높은 pH에서 유효하전의 증가는 단백질 응집물을 해리하고 단백질 용해도를 증가시킨다. 굴 가수분해물의 용해도는 pH 7에서 최대였고 분산물은 zeta potential의 결과에 따라 안정함을 확인하였다.

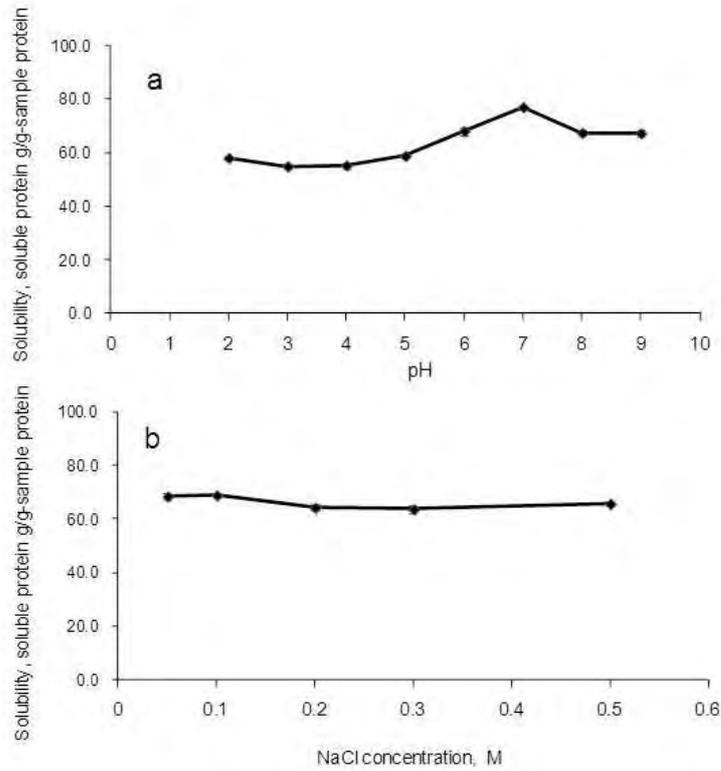


그림 3. Effect of pH (a) and ionic strength (b) on the solubility of the oyster hydrolysate.

(4) Hygroscopicity

Hygroscopicity는 주변 환경으로부터 물을 끌어들이고 유지하는 물질의 능력이다. 제품의 유효 수분 때문에 생화학적이며 미생물학 활성에 영향을 미친다. Hygroscopicity는 2일째에 급격히 증가하여 4주까지 유의적인 변화를 보이지 않았다($p < 0.05$) (그림 5). 상대습도 75%에서 분말에 대한 hygroscopicity의 표준 분류에 기초할 때 굴 가수분해물은 20.1-25.0%의 표준값에 비하여 대단히 높다.

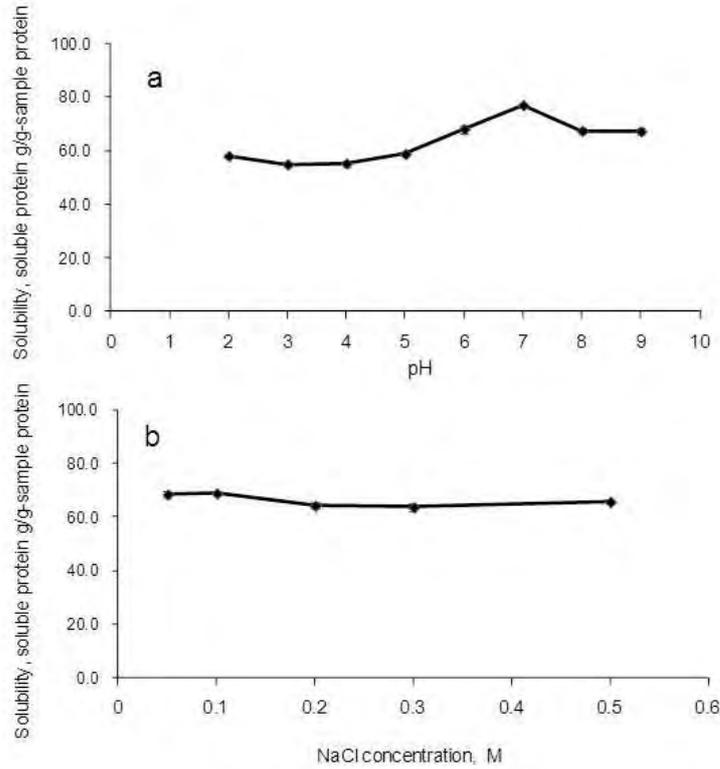


그림 4. Effect of pH (a) and ionic strength (b) on the solubility of the oyster hydrolysate

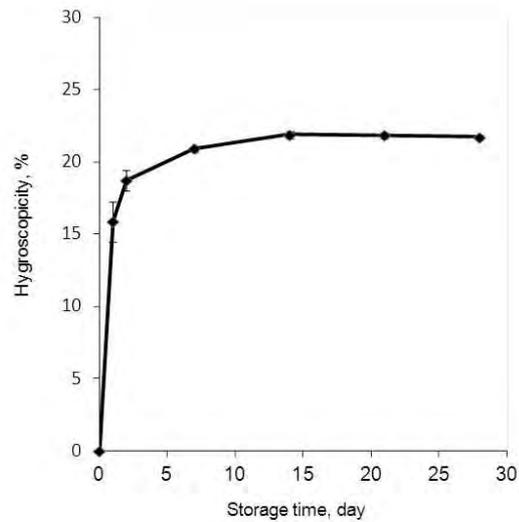


그림 5. Hygroscopicity change of the oyster hydrolysate stored in the desiccator with $62 \pm 6\%$ of relative humidity at room temperature for 4 weeks

(5) 열안정성

저장 중 물리화학적 변화는 기능성 식품의 생물활성 화합물의 손실을 유도할 수 있다. 적절한 저장 조건을 수립하기 위해 굴 가수분해물의 생물활성과 화합물의 변화를 저장조건과 기간에 따라 평가할 필요가 있다. 본 연구에서는 ACE 저해활성과 YA 함량을 열안정성의 평가 지표로 사용하였다. 전체 저장 기간 동안, 냉장 그룹에서 ACE 저해활성은 감소하지 않았으나, 가

속 그룹에서 15.1% 감소하였다(그림 6a). 냉장에서 YA 함량은 유의적으로 변하지 않은 반면, 가속 그룹에서는 3번째 달에 다소 증가한 경우를 제외하고 5개월째까지 감소하였다 ($p < 0.05$). 가속그룹은 40°C에서 저장하는 동안 YA 함량은 초기에 비하여 27.2% 감소하였다(그림. 6b). 단백질과 펩타이드의 경우, 저장 중 응집, 산화 및 갈변반응 같은 물리화학적 변화가 일어날 수 있다. 고온과 높은 습도의 부적절한 저장 조건은 이런 변화를 가속시켜 기능성 식품의 변패를 유도할 수 있다.

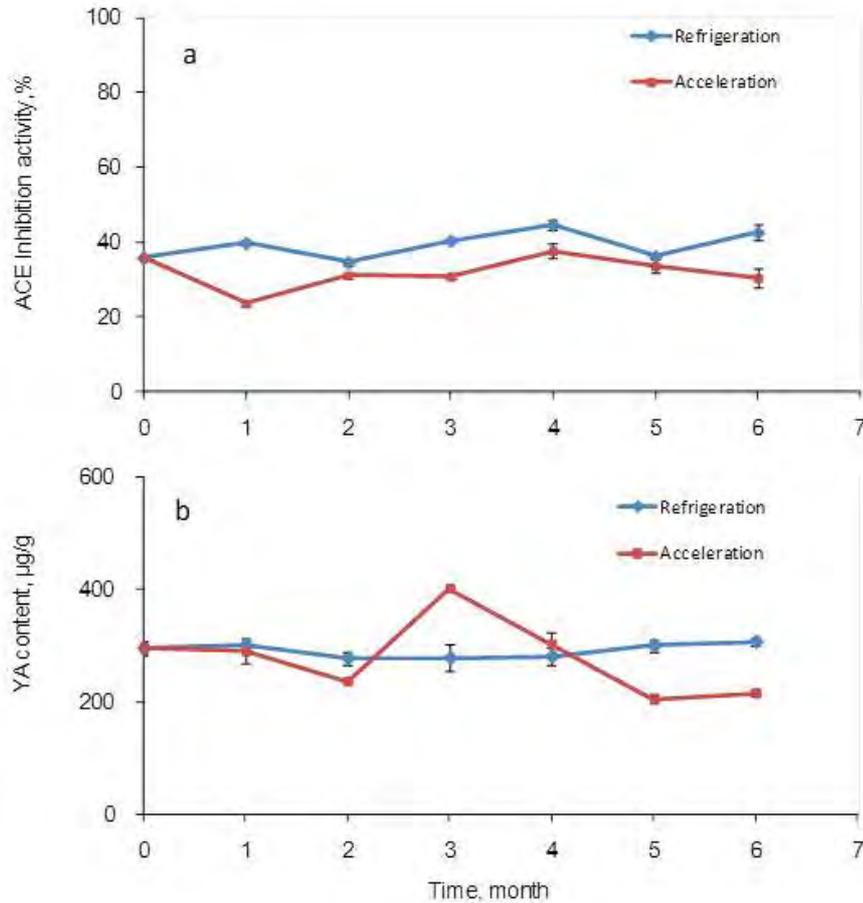


그림 6. The changes of ACE inhibition activity (a) and YA content (b) during the 6-month storage. ACE inhibition activity was determined at the concentration of 3mg/mL. Refrigeration, $4 \pm 3^\circ\text{C}$, RH $46 \pm 5\%$; Acceleration, $40 \pm 2^\circ\text{C}$, RH $60 \pm 5\%$.

다. 결론

- 굴 가수분해물은 MTGase로 가교결합하고 Protamex와 Neutralse로 2단 가수분해하여 여과, 농축 및 분무건조의 표준제조공정을 통해 제조하였다.
- 표준공정에 의해 생산된 굴 가수분해물은 어두운 갈색을 지닌 무정형 미세구조로서 낮은 수분함량, 높은 단백질 함량과 작은 크기의 입자 분포를 보였으며, 고품질의 아미노산 프로파일과 pH 7에서 50% 이상의 용해도를 가졌다.
- 위생지표와 중금속 함량은 식품의약품안전처 규정을 충족하였다.

1.2 굴 가수분해물로부터 안지오텐신 I-전환 효소 저해활성물질 규명

가. 실험방법

(1) ACE 저해활성 측정

시료 용액(20 μ L)를 225 μ L의 ACE 용액(0.025 units/mL)과 잘 혼합하여 37°C에서 10 분 동안 항온한 후 50 μ L의 HHL 용액(2.5 mg/mL, 0.3 M NaCl-0.1 M borate buffer, pH 8.3)을 첨가하였다. 반응은 37°C에서 30분 동안 실시한 후 75 μ L의 1 M HCl을 첨가하여 반응을 중지시키고 8,160 x g에서 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액 중의 hippuric acid(HA)의 양은 C18칼럼(5 μ m, 4.6 x 250 mm)을 장착한 역상 HPLC 시스템으로 측정하였다. IC₅₀ 값은 ACE 활성 50%를 저해하는 데 필요한 저해제 농도로 계산하였다. 효소 활성의 저해 %는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{저해활성 (\%)} = [(\text{HAcontrol} - \text{HASample}) / \text{HAcontrol}] \times 100$$

(2) ACE 저해 펩타이드의 정제

제조한 굴 가수분해물을 20 mM Tris-Cl, pH 8.0 완충액에 녹이고 HiLoad Q-Sepharose 칼럼(16x100 mm)을 이용하여 ACE 저해 분획을 용출하였다. 용출은 용매 A(20 mM Tris-Cl, pH 8.0)과 용매 B(0.75 M NaCl-20 mM Tris-Cl, pH 8.0)의 선형 균배를 사용하여 유속 1 mL/min에서 100분 동안 수행하였으며, 254 nm에서 검출하였다. 2 mL씩 분획하여 ACE 저해활성을 측정하였다. ACE 저해활성이 높은 분획들을 모아서 1 kDa의 막을 장착한 Amicon stirred cell에서 농축하였다. 농축 희분을 Superdex peptide 칼럼(10 x 300 mm)에 주입하고 20 mM Tris-Cl, pH 7.5 용액으로 유속 0.5 mL/min에서 용출하면서 216 nm에서 검출하였다. 분획물 1 mL씩을 모아서 ACE 저해활성을 측정하였다. 저해활성이 높은 분획을 원심형 진공농축기(ScanSpeed 40, LaboGene Aps, Denmark)에서 완전히 건조시켜 역상 칼럼에 적용하였다.

완전히 건조한 저해활성 분획을 0.1% TFA/water에 녹이고 Source 5RPC ST 칼럼(4.6 x 150 mm)를 장착한 AKTA purifier 시스템(GE Healthcare)를 사용하여 분획하였다. 용출은 용매 A(0.1% TFA/water)와 용매 B(0.1% TFA/60% ACN)으로 90분에 걸쳐 유속 1 mL/min으로 선형균배하면서 용출하여 216 nm에서 검출하였다. 칼럼을 용매 A로 평행시킨 후 50 μ L의 시료를 주입하고 다음의 조건, 즉 2배량 칼럼 부피의 용매 A, 14배량 부피의 용매 A-B 균배, 4배 칼럼 부피의 용매 B, 4배량칼럼 부피의 용매 A로 용출하였다. 정제한 ACE 저해 펩타이드를 원심형 진공농축기에서 건조시켜 아미노산 서열을 확인하였다.

(3) 아미노산 서열 확인과 펩타이드 합성

분자질량은 질량분석기로 측정하였고 펩타이드의 아미노산 서열은 단백질 서열기(Model-491)를 사용하여 Edman법으로 분석하였다. 펩타이드는 GL Biochem사에서 고상법으로 합성하였다. 합성한 펩티드들의 순도는 95.8% 이상이었으며, 역상 HPLC분석을 통해 확인하였다.

(4) 합성 펩타이드의 ACE 저해활성과 세포독성

합성 펩타이드의 ACE 저해활성을 측정하고 간 세포주 HepG2상에서 세포생존으로 합성 펩타이드의 세포독성을 평가하였다. HepG2 세포는 10% fetal bovine serum을 포함하는 MEM 배지에서 배양하였다. well 당 1x10⁴의 세포를 포함하는 96 well 플레이트를 5%의 CO₂를 포함하는 공기의 35℃에서 24시간 항온시켰다. 항온 후 최종 농도 200 μg/mL의 합성 펩타이드를 첨가하고 같은 조건으로 24시간 더 항온하였다. 세포성장은 CellTiter 96 Aqueous One solution cell proliferation 시험 키트로 시험하였으며 흡광도는 490 nm에서 마이크로플레이트 리더로 측정하였다. 세포 생존은 무처리 그룹의 흡광도와 비교한 합성 펩타이드 처리구의 흡광도의 %로 계산하였다.

나. 실험결과

(1) 굴 가수분해물의 ACE 저해 활성

굴 가수분해물 ACE 저해의 IC₅₀ 값은 단백분해효소의 종류와 가수분해 시간에 따라 큰 차이를 보였다. Protamex로 40℃에서 1시간 처리한 가수분해물이 가장 높은 ACE 저해활성을 보였으며, 가장 낮은 IC₅₀ 값은 1.49 mg/mL 였다.

ACE 저해활성은 Protamex와 Neutrase의 2단 가수분해에 의해 현저히 개선되어 1단 가수분해 및 다른 효소군의 조합에 의한 2단 가수분해에 비하여 높은 저해활성을 보였다(그림 7, 8). 결과에 근거할 때 굴 가수분해물 제조를 위한 최적 효소로서 Protamex와 Neutrase의 2단 가수분해를 선택하였다.

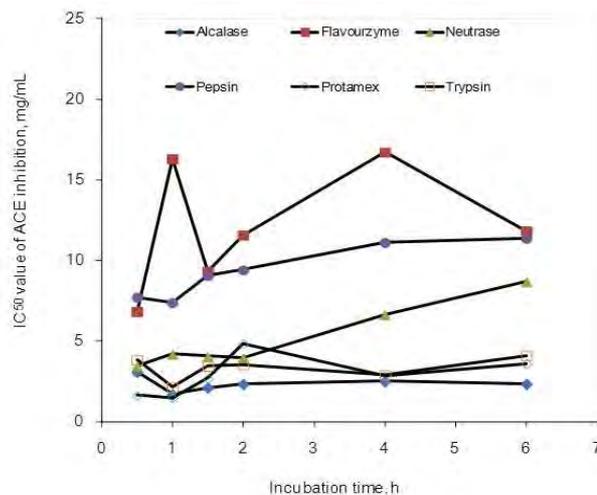


그림 7. The IC₅₀ values of ACE inhibition of the oyster hydrolysates according to protease used and hydrolysis time

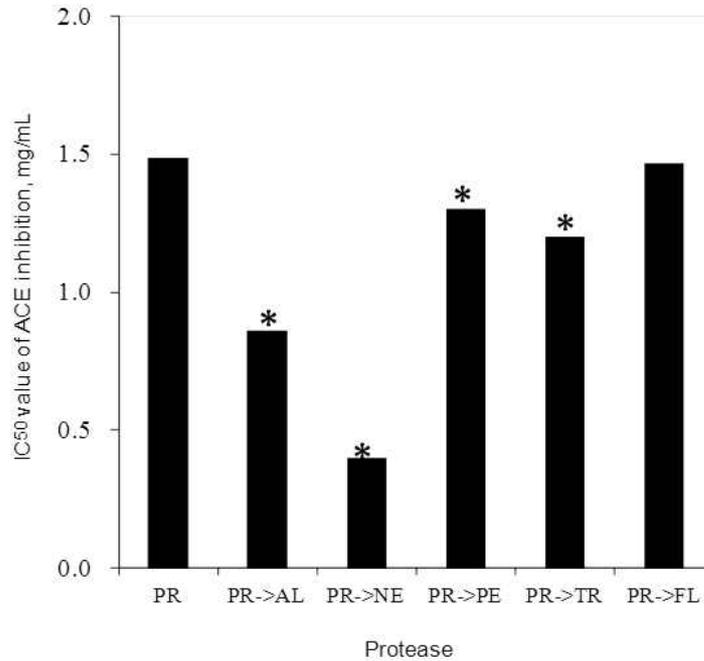


그림 8. The IC₅₀ values of the ACE inhibition of the oyster hydrolysate after two-step hydrolysis, with two proteases. PR, Protamex; AL, Alcalase; NE, Neutrase; PE, pepsin; TR, trypsin; FL, Flavourzyme. The asterisks above bars denote statistical significance compared to PR (p<0.05)

(2) ACE 활성 저해 펩타이드의 정제

최적 조건에서 제조한 굴 가수분해물은 Q-Sepharose 이온교환칼럼에서 8개의 분획으로 나누었으며, 비교적 높은 ACE 저해활성은 분획 2, 3 및 4에서 관측되었다(그림 9). 정제 조작의 대표적인 크로마토그램을 그림 10에 나타내었다. 이들 3 분획의 ACE 저해활성은 각각 4.0%, 4.9% 및 6.7%였다. 이들 분획은 크기배제 크로마토그래피에 의해 각각 2-1, 2-2, 2-3; 3-1, 3-2; 4-1, 4-2, 4-3으로 분획되었다. 이들 중 5개의 분획, 즉 2-1, 2-2, 2-3, 3-2 및 4-2가 15.0-19.0% 범위의 높은 ACE 저해활성을 가졌다. 활성 분획은 Source 5 RPC ST 역상 칼럼을 통해 더욱 정제하여 ACE 저해활성이 높은 5개의 성분, 즉 저해활성이 26.5-44.3% 범위인 펩타이드 2-1-3, 2-2-2, 2-3-2, 3-2-2와 4-2-1을 얻었다.

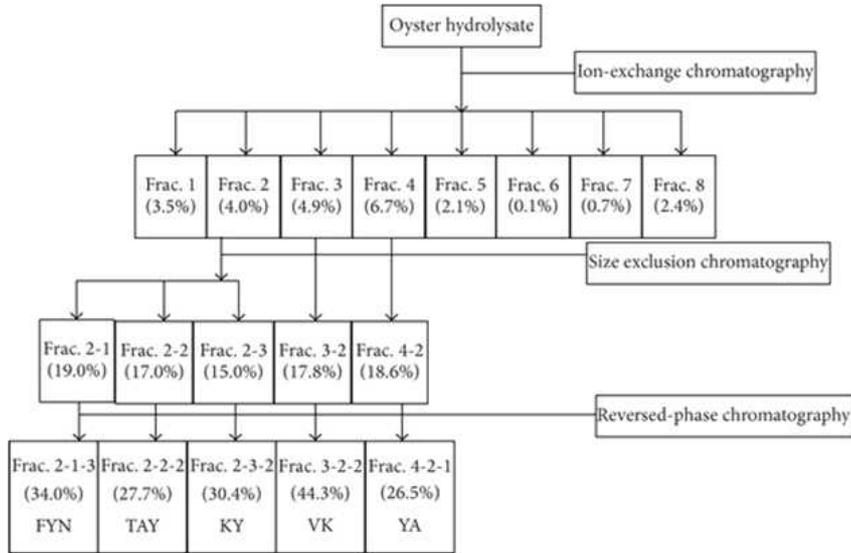


그림 9. Purification scheme of the oyster hydrolysate and ACE inhibition activity of fractions of ion-exchange, size exclusion and reversed-phase chromatography.

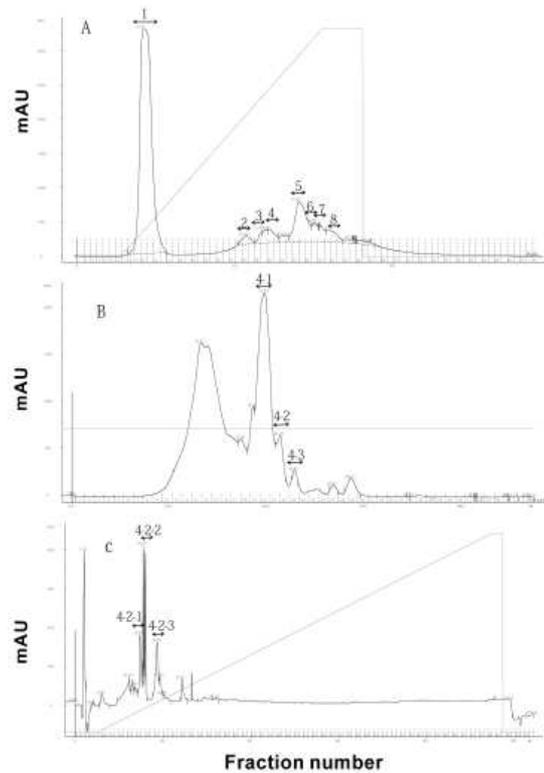


그림 10. Separation procedures of ACE inhibitory peptides by ion-exchange (A), size exclusion (B), and reversed-phase chromatography (C).

(3) ACE 활성 저해 펩타이드의 아미노산 서열 확인과 세포독성

정제한 펩타이드의 아미노산 서열을 확인하기 위해, 활성 분획 2-1-3, 2-2-2, 2-3-2, 3-2-2과 4-2-1를 Edman 분해와 질량분석을 실시하였다. 펩타이드 FYN(442.5 Da),

TAY(353.4 Da), KY(309.4 Da), VK (245.3 Da) 및 YA (252.3 Da)을 각각 확인하였다. 예로서 분획 4-2-1의 YA의 질량 스펙트럼을 그림 11에 나타내었다.

마지막 단계로서 확인한 펩타이드를 고상법으로 합성하였다. 합성 펩타이드 TAY, VK, KY, FYN, YA의 IC₅₀ 값은 각각 16.7, 29.0, 51.5, 68.2 및 93.9 μM이었다. HepG2 세포주에서 세포 생존율은 합성 펩타이드로 처리한 후 103.8±7.7%– 117±15.1% 범위였다(표 11). 이는 합성 펩타이드들이 HepG2 세포주에 대하여 200 μg/mL의 농도까지 독성이 없음을 제시한다.

펩타이드의 분자량은 200–500 Da의 범위였으며, 2–3개의 아미노산 잔기로 구성되어 있었으며 확인한 5종의 펩타이드들은 모두 소수성 아미노산 잔기를 포함하였다. 기존 연구에 의하면 생물 운반체들은 거대 분자들의 섭취에 대하여 높은 확산 저항을 보이며, 적절한 운반체는 거의 존재하지 않고 C-말단 위치에 있는 소수성 아미노산과 펩타이드의 ACE 저해 사이에 양의 관계가 알려져 있는데 이와 일치하는 결과를 보였다.

표 11. IC₅₀ values of ACE inhibition of the synthetic peptides and cell viability of HepG2 cell line treated with the synthetic peptides

Peptide	IC ₅₀ (μM)	Cell viability(%) ^a
TAY	16.7	105.1±1.9
VK	29.0	117.5±15.1
KY	51.5	118.2±7.0
FYN	68.2	109.5±3.0
YA	93.9	103.8±7.7

^aDeionized water was used as control; the final concentration of the synthetic peptides was 200 μg/mL

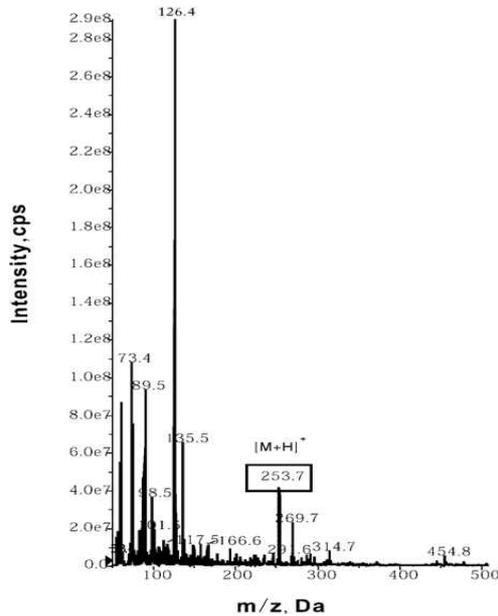


그림 11. Mass spectrum (MS) of the pool name Frac. 4-2-1 (YA) from reversed-phase chromatography. The full MS range data were recorded for YA at m/z 253.7. cps: counts per seconds.

다. 결론

- 혈압조절에 직접적으로 작용하는 안지오텐신 I-전환효소를 사용하여 그 활성을 억제하는 활성 펩타이드를 크로마토그래피 기법에 의해 추적 분리하여 TAY, VK, KY, FYN, YA의 5종의 활성 펩타이드를 분리 정제 하였다.
- 분리된 5종의 활성 펩타이드는 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 세포독성을 나타내지 않았다.
- 정제 분리된 5개의 펩타이드 중 기능성과 분석의 용이함 등을 종합적으로 고려하여 YA를 지표성분으로 설정하였다.

1.3 굴 효소가수분해물의 지표성분으로서의 Tyrosylalanine(YA)의 정량과 검증

가. 실험방법

(1) 자외선 스펙트럼과 역상 HPLC 분석

굴 가수분해물에서 YA를 지표성분으로 선정하여 지표성분의 검출 및 확인을 하였으며 HPLC 분석법을 사용하여 원료에 포함되어 있는 지표성분의 함량을 측정하였다. HPLC 분석을 통해 검량선을 작성한 후 함량을 계산하는 방법을 이용하였다. 자세한 방법은 다음과 같다.

(가) 시료 제조

실험에 사용된 굴 가수분해물의 제조는 1절2항에 제시된 방법으로 제조한 시료를 사용하였으며 지표성분인 YA는 Sigma Aldrich로부터 구매하였다. 지표성분인 YA 표준품 1 mg을 정밀하게 달아 이를 1 ml용량 플라스크에 넣고 Methanol로 녹인 후 이를 표준 원액으로 하였다. (1000 $\mu\text{g/mL}$) 상개 표준원액을 각 단계별(10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$)로

희석하여 검량선 작성용 표준용액으로 하였다.

굴 가수분해물 400 mg에 0.1% trifluoroacetic acid가 들어있는 증류수 10 ml을 넣어 한 시간 동안 sonication을 진행한 후 0.45 μ m PTFE syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

(나) 시약 및 재료

HPLC용 용매는 HPLC grade용매 (Fisher, South Korea)를 0.45 μ m PTFE filter (ADVANTEC, USA)로 여과한 후 사용하였으며 그 외에 trifluoroacetic acid (sigma aldrich, USA)는 분석용 1급 시약을 사용하였다. 초순수는 ABBOTA NEO 1으로 제조하여 18 M Ω 이상을 사용하였다.

(다) 기기분석 조건

YA 함량은 Atlantis T3 C18 역상 칼럼(4.5 x 250 mm) 을 장착한 HPLC 시스템 (Waters)으로 측정하였다. Microfilter(0.45 μ m)로 여과한 시료용액 10 μ L를 주입하고 용매 A(0.1% TFA/water)와 용매 B(0.1% TFA/acetonitrile)로 균배 용출하였다. 분광광도계로 측정된 YA의 최대 흡수파장 220 nm에서 검출하였다. YA함량은 같은 조건에서 용출한 표준물질 YA로 작성한 검량곡선에 따라 정량하였다.

- HPLC: HPLC 시스템(Waters)
- Column: Atlantis T3 C18 (4.5 x 250 mm, 5 μ m)
- UV detector: 220 nm (200–500 nm, DAD)
- Solvent 조성 및 gradient조건 (표 12)

표 12. 굴 가수분해물의 HPLC Gradient 조건

Time	Flow (mL/min)	ACN(0.1% TFA)	Water(0.1% TFA)
0		4	96
30		4	96
31	1.0	100	0
50		100	0
51		4	96

(2) 질량분석기에 의한 분자량의 측정

굴 가수분해물에서 얻은 YA의 질량을 측정하기 위해 역상 HPLC분석과 동일한 조건으로 AKTA purifier LC 시스템(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 사용하여 1 mL씩 분획하였다. YA 표준물을 사용하여 머무름 시간으로 확인한 YA를 확인하고, 분획물 중의 YA 질량을 ESI-MS(AB SCIEX)로 측정하였다. YA 분획은 회전진공증발기로 농축하고, 정제 YA는 그대로 0.1% formic acid/50% ACN에 녹여, 시료를 Habard 실린저로 펌프에 주입하고, 10 μ L/min의 유속으로 흘리면서 질량분석기(API 3200)로 Q1M1 스캔하여 positive 이온에서 질량을 검출하였다.

(3) 분석법 검증(Method validation)

건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정 중 기능성분 또는 지표성분 시험방법의 검증(새로 설정된 시험방법은 식품의약품안전청 고시 제2010-76호 표 13(시험방법 타당성 검토 항목의 정의 및 적용)을 참고하여 시험방법의 타당성(Method Validation)을 정량시험법의 검토항목에 따라서 시험법을 5개의 항목(특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 범위)으로 검증하였다.

표 13. 시험방법 타당성 (벨리데이션) 검토 항목의 정의 및 적용 (제13조 제6호 나목 및 제7호 나목 관련)

항목	정의	적용		
		기능성분		유해물질 (정량)
		정량시험	확인시험	
특이성 (Specificity)	불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력	예	예	예
정확성 (Accuracy)	측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도	예	아니오	예
정밀성 (Precision)	균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)	예	아니오	예
정량한계 (Quantitation Limit)	적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량	예	아니오	예
직선성 (Linearity)	시험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력	예	아니오	예
범위 (Range)	적절한 정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)의 하한값 및 상한값 사이의 영역	예	아니오	아니오

나. 실험결과

(1) 굴 가수분해물에서 YA의 함량

단백질 가수분해물은 일반적으로 광범위한 길이와 극성을 가진 복합 펩타이드 조성을 가진다. 굴 가수분해물에 있는 YA를 정량하기 위한 성공적인 역상 HPLC/UV법을 개발하기 위해 검출 파장, 칼럼 및 이동상의 종류와 조성이 중요하다. Tyrosine 잔기를 포함하는 YA는 220 nm에서 최대 흡광도를 가졌다. HPLC 분석결과 굴 가수분해물에서 지표성분인 YA의 함량은 1.04mg/g으로 분석 되었으며 낮은 상대표준편차를 나타내었다(표 14).

표 14. 굴 가수분해물에서 YA의 함량

Replicate	Peak area ratio	Measure conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Sample WT.	Content(mg/g)
1	968980	42.34	40mg	1.06
2	980989	42.86	40mg	1.07
3	920439	40.20	40mg	1.01
4	937436	40.95	40mg	1.02
5	905452	39.54	40mg	0.99
6	913491	39.90	40mg	1.00
			Mean	1.04
			SD	0.03
			RSD	2.95

(2) Method validation

(가) 특이성

표준원액, 시험용액 및 부형제 시험용액의 지표 물질의 크로마토그램을 확인한 결과 peak는 모양 및 대칭성이 양호하였고 분석 방해인자가 없음이 확인되었다. 표준원액과 시험용액의 Mass spectrum 분석결과 지표성분 YA의 동등함이 입증되었다. 따라서 특이성이 확보되었다(그림 12, 13).

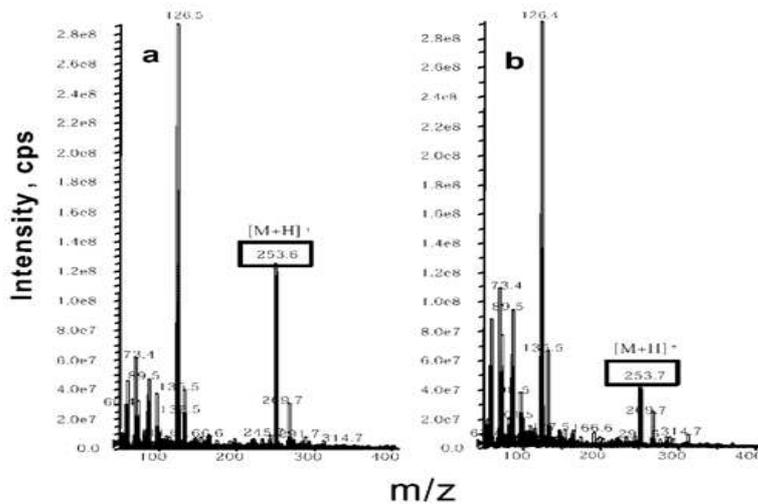


그림 12. The mass spectra of the synthetic YA (a) and the YA separated from the oyster hydrolysate by AKTA purifier LC system (b). cps, counts per seconds.

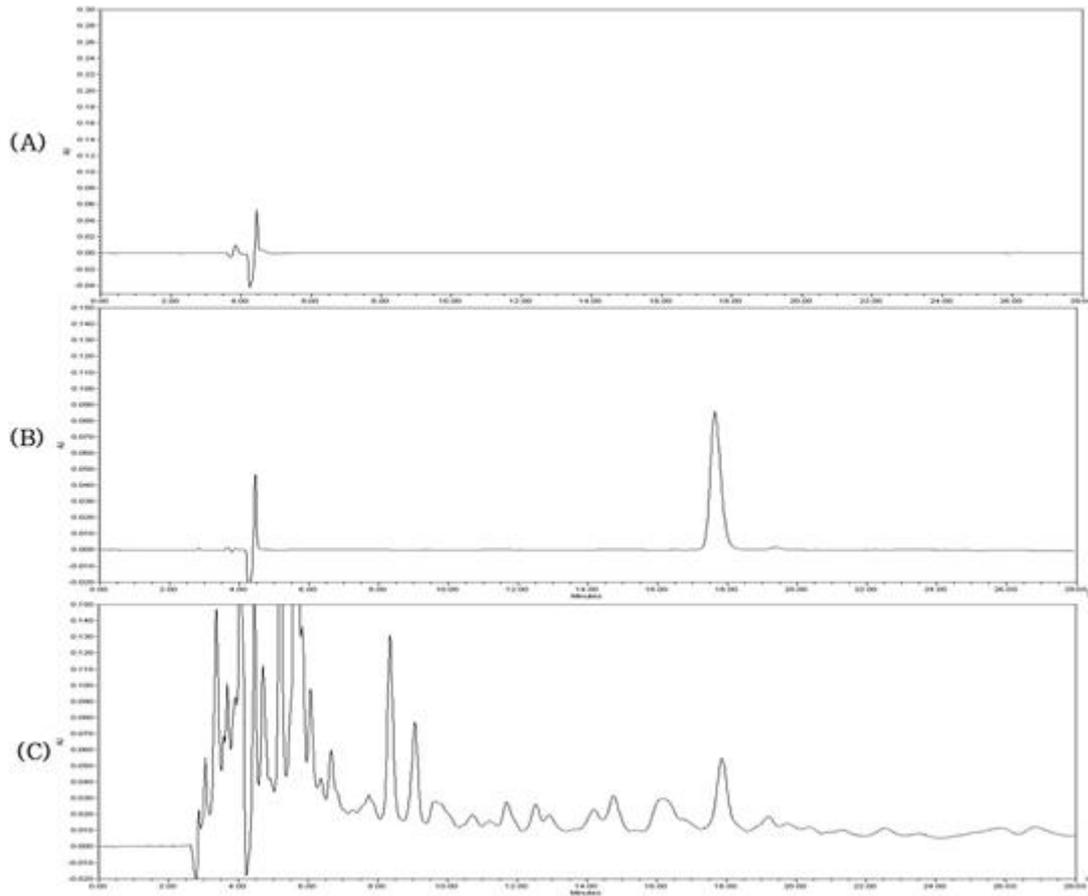


그림 13. Chromatogram of vehicle (a), standard (b, 0.1 mg/mL), QC (c, 40 mg/mL)

(나) 직선성

일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 표준원액을 희석하여 각 농도에 대해서 직접적으로 직선성을 증명하였다. 지표성분인 YA를 10~200 $\mu\text{g/ml}$ 범위의 5개의 농도를 사용($n=6$)하여 분석한 결과 상관계수(R^2)는 0.999로 양호한 직선성을 나타내었다. y-절편, 기울기와 그래프는 아래 표 15에 나타내었다

표 15. YA의 농도 면적 그래프 및 직선성

농도	면적	그래프
10	177502	
25	352730	
50	900660	
100	1825581	
200	3629089	
기울기	18198	
y절편	5936.2	
상관계수(R ²)	0.999	Conc.(ppm)

(다) 정확성(accuracy)

측정값을 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도로, 균질한 검체를 추출, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물 첨가법으로 회수율을 구하여 정확성을 검증하였다.

최종 검액 중 YA를 각각 25 ng, 50 ng, 100 ng을 추가한 3 batch의 검액을 분석하여 회수율을 구하였고, 결과를 표 16에 나타내었다. 회수율은 검량선을 이용하여 다음 식1에 의해 계산하였다. 전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물질을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과값으로부터 계산하였으며, 그 결과를 표16에 나타내었다.

표 16. 반복 정확성 결과

Compounds	Fortified amount (ng)	Observed amount (ng)	Recovery mean	Recovery SD	Recovery RSD (%)
tyrosinylalanine	25	32.31±3.49	124.88	14.40	11.53
	50	51.26±0.68	102.53	1.37	1.33
	100	95.59±1.34	95.60	2.56	2.67

- 실험실 내 정확성: 다른 실험일을 이용하여 분석 실험하여 얻은 측정값들 사이의 근접성 평가를 3일간 반복하여 평가하였다. 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성은 지표성분의 표준물질을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과 값으로부터 계산하였으며, 그 결과를 아래의 표 17에 나타내었다.

굴 가수분해물에서 각각의 지표성분을 이용한 회수율을 구한 결과, 전반적으로 95~120% 이상의 높은 회수율이 나타남에 따라 시험방법이 높은 정확성을 가짐을 검

증할 수 있었다. 가장 낮은 농도인 25 $\mu\text{g/mL}$ 을 추가한 경우 회수율 범위를 약간 상회하는 결과를 보였다.

표 17. 정확성 결과

Day	Fortified content ($\mu\text{g/mL}$)	Observed content (ng)	Recovery mean	Recovery SD	Recovery RSD (%)
Day 1	25	32.31 \pm 3.49	124.88	14.40	11.53
	50	51.26 \pm 0.68	102.53	1.37	1.33
	100	95.59 \pm 1.34	95.60	2.56	2.67
Day 2	25	34.78 \pm 0.44	139.13	1.77	1.27
	50	60.00 \pm 2.73	120.00	5.47	4.56
	100	99.22 \pm 5.98	99.22	5.98	6.03
Day 3	25	37.97 \pm 1.45	151.92	5.81	3.83
	50	62.14 \pm 1.66	124.28	3.33	2.68
	100	105.59 \pm 1.50	105.60	1.50	1.42

(라) 정밀성 (precision)

① 반복성 (repeatability)

피크면적의 반복성은 각각의 standard로 분석기기가 시간의 변화에 따라 변화하는 정도를 보기 위하여 연속 6회 injection하여 retention time과 area의 변화를 확인하였으며, 그 결과를 표 18에 나타내었다. 표 18에서 볼 수 있는 바와 같이 반복성은 RSD값이 모두 5% 이하로 적합하게 나타내었다.

표 18. Tyrosylalanine의 반복 정밀성 결과 (6회 반복)

YA conc.	Peak area			Retention time		
	average	SD	RSD (%)	average	SD	RSD (%)
10ppm	205328	310	0.15	17.70	0.22	1.27
25ppm	421854	179	0.04	17.70	0.14	0.79
50ppm	1065528	12727	1.19	17.79	0.11	0.61
100ppm	2119400	6845	0.32	17.67	0.17	0.98
200ppm	4258688	819	0.02	17.98	0.13	0.72

② 정밀성 (precision)

전 분석과정을 통한 분석결과, 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물질을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과 값으로부터 계산하였으며, 그 결과를 표 19에 나타내었다. 표 19에서 볼 수 있는 바와 같이 precision은 intra-day 및 inter-day 실험에서 모두 6% 이하로 나타났다.

표 19. Tyrosylalanine 반복 정밀성 결과 (3일간 반복)

Replicate	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					Curve parameters		
	10	25	50	100	250	Slope	intercept	R ²
Day 1	10.13	19.76	49.77	100.54	199.81	18205	-6924.6	0.9999
Day 2	9.75	19.90	49.90	100.79	199.65	18264	-6990.5	0.9999
Day 3	9.98	19.98	49.33	101.07	199.63	18198	-6378.2	0.9999
Mean	9.97	19.91	49.75	100.60	199.70	18222	-6764.4	0.9999
SD	0.16	0.11	0.29	0.26	0.10	36.25	336.11	0.00
RSD	1.58	0.56	0.59	0.26	0.05			

(마) 검출한계 (LOD)와 정량한계 (LOQ)

검량선의 y절편의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 표준용액을 단계별로 3회 반복 측정된 평균값으로 검량선을 작성하여 다음의 식에 따라 계산하여 검출한계와 정량한계를 확인하였다.

$$\text{LOD} = 3.3 * \sigma / S$$

$$\text{LOQ} = 10 * \sigma / S$$

(σ : y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

기울기 s는 분석대상물질의 검량선으로부터 구하였으며 표준편차(σ)는 정량한계 내에 있는 분석대상물질을 포함한 검체를 사용하여 특이적인 검량선을 작성한 후 y절편의 표준편차를 표준편차 σ 로서 이용하였다. 그 결과 검출한계(LOD)는 $0.6 \mu\text{g/mL}$ 정량한계(LOQ)는 $1.8 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

(바) 범위 (range)

정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 시험용액 중 지표성분의 농도 범위는 $10 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

다. 결론

- 굴 가수분해물에 있는 혈압조절 기능성 펩타이드인 tyrosinylalanine(YA) 정량을 위한 분석방법을 개발하여 YA함량은 $0.072 \sim 0.108 \%$ 로 정하였으며 개발한 표준시험법에 의해 Validation 자료를 확보하였다.
- 확립된 표준 YA 분석 방법은 굴 가수분해물의 효능 및 지표물질로서 소재 및 제품의 품질 관리에 적용할 수 있을 것으로 보여진다.

2. 굴 가수분해물의 대량생산공정

가. 대량생산 공정 최적화

GMP시설을 갖추고 있는 신라바이오텍에서 대량생산 공정 최적화를 시도하였다.

(1) 효소 최적 전환 조건 확립

- (가) TGase와 가수분해 효소(Protamex, Neutrased)를 이용한 굴 가수분해물(이하 TGPN)을 제조함.
- (나) 냉동굴에 대하여 1%의 농도가 되도록 각 효소를 첨가하여 반응시킴.
- (다) TGase를 첨가하여 30℃, 1h 처리한 후 Protamex(Novozyme-Korea, Pusan)로 40℃, 1h 가수분해함.
- (라) 1차 효소 가수분해물을 Neutrased(Novozyme-Korea, Pusan)로 1h 다시 가수분해한 뒤 100℃, 1h 불활성화 시킴.
- (마) 모든 효소 가수분해는 5 ton 반응기에서 150 rpm으로 교반하면서 실행함.
- (바) 효소가수분해물을 막필터를 통해 1차 여과 하여 2차적으로 필터링 (80 mesh) 하여 불용성 물질을 제거함.
- (사) 불순물이 제거된 굴 효소가수분해물을 농축기를 이용해 100, 4 h 농축하여 동결건조기의 사용율을 20%로 낮춰 생산성을 높임.

(2) 가수분해 효소별 최적 반응시간 및 온도 설정

- TGase 최적온도 30℃, 반응시간 1h
- Protamex(Novozyme-Korea, Busan) 최적온도 40℃, 반응시간 1h.
- Neutrased 최적온도 50℃, 반응시간 1h 100℃, 30 min 가열 처리하여 불활성화 시킴.

나. 대량생산 공정 표준화

(1) 효소를 이용한 굴 가수분해물 제조

- (가) 냉동굴 1,000kg을 수도수를 동량 첨가하여 상온으로 incubation하여 해동하였다.



그림 15. 냉동굴 1,000 kg 운반모습과 사용 냉동굴 사진

- (나) 해동된 냉동굴 1,000 kg을 분쇄기로 분쇄 후 5 ton 반응기에 넣고 수도수를 2배로 가하여 30분간 blanching 하였다.



그림 16. 냉동굴 분쇄과정



그림 17. 마쇄된 냉동굴을 5 ton 반응기에 투입하는 과정 및 교반 과정

- (다) 냉동굴에 대하여 1%의 농도로 각 효소를 첨가하여 반응시켰다.
- (라) TGase를 첨가하여 30℃에서 1시간 동안 처리한 후 Protamex(Novozyme-Korea, Busan)로 40℃, 1hr 동안 가수분해하였다.



그림 18. TGase와 TGase의 투입 과정 및 효소반응 과정



그림 19. Protamex와 Protamex의 투입 과정

(마) 1차 효소 가수분해물을 Neutrased(Novozyme-Korea, Busan)로 50℃에서 1시간동안 다시 2차 가수분해 한 뒤 100℃, 30 min 불활성화 시킴. 효소 가수분해는 5 ton 반응기에서 150 rpm으로 교반하면서 실행하였다.



그림 20. Neutrased와 Neutrased의 투입 과정

(바) 꿀 효소가수분해물은 필터링 (80 mesh)하여 불용성 물질을 제거하고, 회수하여 농축기로 이송하였다.

(사) 농축기로 이송된 꿀 효소가수분해물은 100℃, 4시간 농축하여 20%로 농축하였다.



그림 21. 농축기에서 꿀효소가수분해물을 농축하는 과정

(아) 농축된 꿀 효소가수분해물을 분무건조하여 최종 산물을 제조 하였다.



그림 22. 분무건조기와 굴효소가수분해물의 분무건조 과정

(자) 최종적으로 150 kg의 굴 가수분해물을 생산하여 yield는 15%로 나타났다.

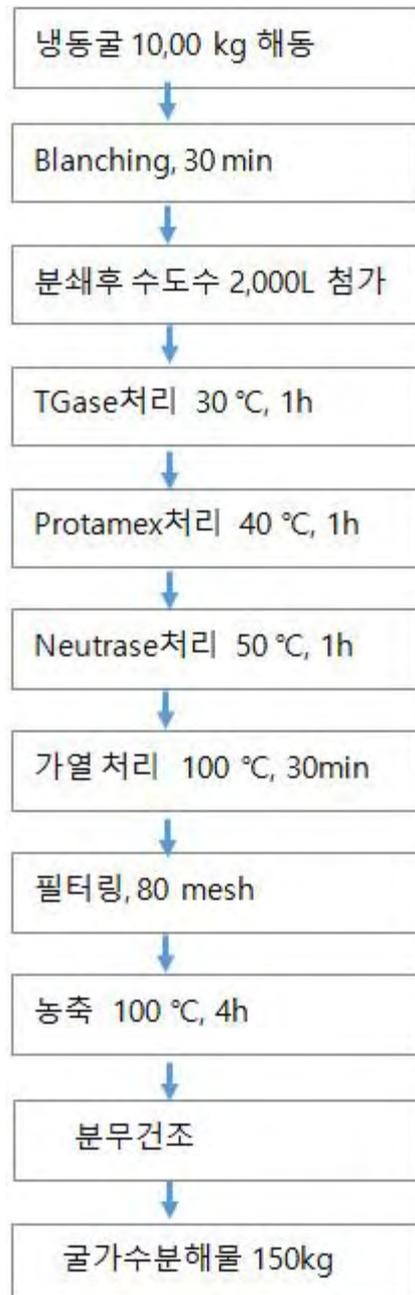


그림 23. 굴 가수분해물 제조 공정 흐름도

다. 공정 단계별 기능성 평가

공정 단계별로 ACE 저해 활성을 측정한 결과는 다음 표 20과 같았다.

표 20. ACE inhibitory activity at the different processing stage

Sample name	ACE inhibitory activity (%)
Frozen oyster	
Blanching and mincing	
Solubilization with water	
Cross-linking by MTGase	
Hydrolysis with Protamex	55.6±0.2
Hydrolysis with Neutrase	60.0±0.2
Inactivating enzymes	60.5±0.1
Filter and concentration	61.8±0.3
Spray-drying	60.1±0.1

라. 결론

- 굴 가수분해물 대량생산공정은 신라바이오텍의 GMP 시설장비를 이용하여 수행하였다.
- 냉동굴의 해동, blanching, 효소처리 (TGase - Protamex - Neutrase), 가열, 여과, 농축, 분무건조의 공정으로 표준공정을 설정하였다.
- 냉동굴 1,000kg의 해동공정에서부터 spray dry까지 완료하여 최종 굴 가수분해물 150kg을 생산하는 표준공정을 완성하였으며 생산 yield는 15%로 나타났다.

3. 인체적용시험을 위한 효능 및 용량확인시험

가. 실험재료 및 방법

(1) 실험동물

중앙실험동물로부터 구입한 11 주령의 수컷 선천성 고혈압 쥐 (Spontaneously Hypertensive Rat; SHR)를 사용하였다. 동물 입수 후 온도 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도 $60\pm 5\%$ 및 12 시간 명/암 cycle을 유지하며, 사료와 식수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 충분히 공급해주며 1주간 안정화 시킨 다음 12 주령 짝에 실험하였다.

본 동물실험은 경희대학교 약학대학 실험동물윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 통한 동물실험 가이드라인에 따랐다 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Care International).

(2) 단회투여에 따른 혈압강하 효과 검증

혈압조절 효과 측정: 실험동물을 42°C 로 유지되는 rat temperature control unit에 20분간 고정하여 충분히 꼬리혈관을 확장시킨 후 추출물의 경구나 복강투여 전 (0 시간)과 투여 3, 6, 9, 12, 24 시간 후 총 6 회에 걸쳐 수축기혈압을 측정하였다(그림 24).



그림 24. 본태성 고혈압 쥐(SHR)를 이용한 항고혈압 활성 측정 방법

(3) 반복투여에 따른 혈압강하 효과 검증

11주령의 수컷 양성 선천성 고혈압 쥐 (Spontaneously Hypertensive Rat; SHR)를 사용하여 각각의 실험 시료를 4주 동안 경구 투여하였다.

시험 종료 후 실험동물을 희생시킨 다음 채혈한 혈중에서 분리한 혈청을 이용하여 ACE 활성 저해, angiotensin-II 및 CRP 농도를 측정하였다.

나. 실험결과

(1) 단회투여에 따른 굴 가수분해물과 활성 펩타이드의 기능성 평가

(가) 실험군

투여 후 시간에 따른 혈압강하 효과를 확인하기 위해 0 (투여 전), 투여 후 3, 6, 9, 12 및 24 시간 후 수축기 혈압을 측정하였으며, 실험군은 아래 표 21과 같다.

표 21. 굴 가수분해물의 혈압조절 기능성 시험 실험군

동물종	실험군		투여용량	
Wistar Rat	정상군		Saline 2 ml	
선천성 고혈압 쥐 (Spontaneously Hypertensive Rat; SHR)	고혈압군		Saline 2 ml	
	양성대조군	정어리 펩타이드	100 mg/kg/saline 2 ml	
		바릴-티로신 (Val-Tyr)	50 µg/kg/saline 2 ml	
	총 가수분해물군			100 mg/kg/saline 2 ml
	분자량에 따른 분획물	10 kD 이상		
		10 kD 이하		
	활성물질 (Sequences)	VK	50 µg/kg/saline 2 ml	
		FYN		
		TAY		
		YA		
AFY				
MC				
LQP				
KY				

(나) 총가수분해물, 가수분해 펩타이드 10 kD 이상 및 10 kD 이하 투여 후 24 시간까지의 수축기 혈압 변화

최대 혈압강하 효과를 나타내는 시간은 시료 투여 후 각각 9 시간, 9 시간 및 6 시간 후 이었으며, 혈압군에 비해 각각 38.8%, 38.7% 및 35.4% 감소함을 확인할 수 있었다. 특히 10 kD 이하의 경우 투여 후 12 시간 후 까지 정상군과 동일한 혈압을 유지하였다. 양성대조군인 정어리 펩타이드 또한 12 시간까지 혈압을 유지하였지만 총 가수분해물이나 분획별 가수분해 펩타이드 보다 효과가 적었으며 6시간 또는 9시간대에 총 가수분해물과 비슷한 경향을 나타내었다(그림 25).

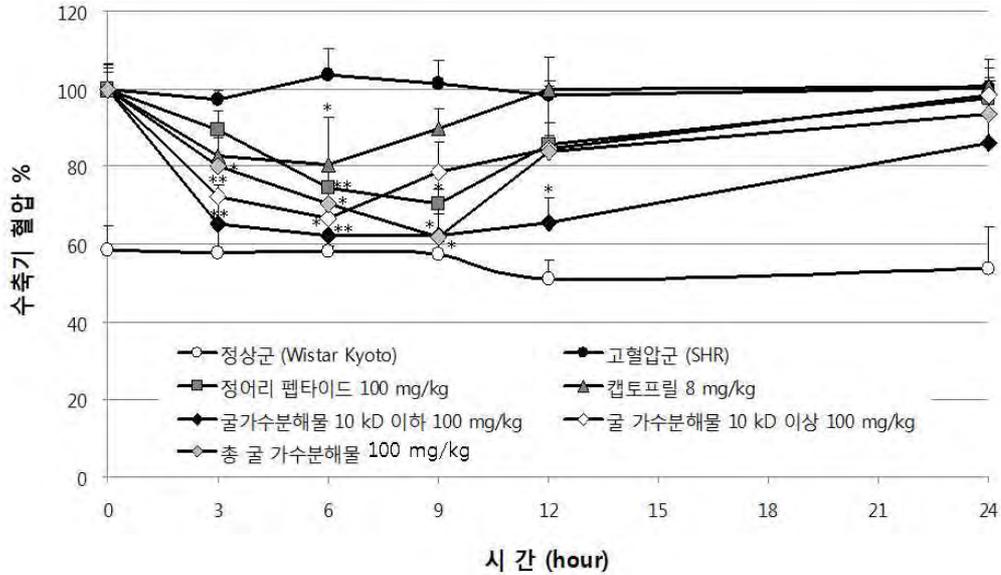


그림 25. 총 가수분해물, 분획별 가수분해물 펩타이드 (10 kD 이하 또는 이상)의 시간대별 혈압변화. * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$ vs. 고혈압군 대비 유의성

(다) 활성 펩타이드 투여 후 24 시간까지의 수축기 혈압 변화

정어리 펩타이드 가수분해물은 100 mg/kg이며 현재 식품의약품 안전처의 개별인정현황을 보면 지표성분으로 다이펩타이드인 바릴-티로신 함량을 0.05%로 표준화하고 있다. 이를 근거로 본 실험에서 사용한 정어리 펩타이드 100 mg/kg의 0.05%에 해당하는 바릴-티로신 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 본 실험에 사용하였으며 굴 가수분해물의 활성성분으로 예상되는 8 종에 대해서도 동일한 용량으로 진행하였다. 굴 가수분해물의 혈압강하 효과를 나타내는 활성물질을 알아보기 위해 아래의 그림 26과 같이 8 종의 sequence에 대한 투여 후 시간에 따른 수축기 혈압 변화를 측정하였다. KY, MC 및 YA를 제외한 두 종에서는 투여에 따른 혈압 저하의 변화를 확인할 수 없었다. YA의 경우 투여 3~12 시간 후 각각 17%, 34%, 24%, 12%의 혈압강하 효과를 나타내었으며, 바릴-티로신과 동일 투여 용량 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)과 비교하면 바릴-티로신 투여 9시간 후와 YA의 투여 6시간 후의 혈압강하 효과가 비슷함을 확인할 수 있었다.

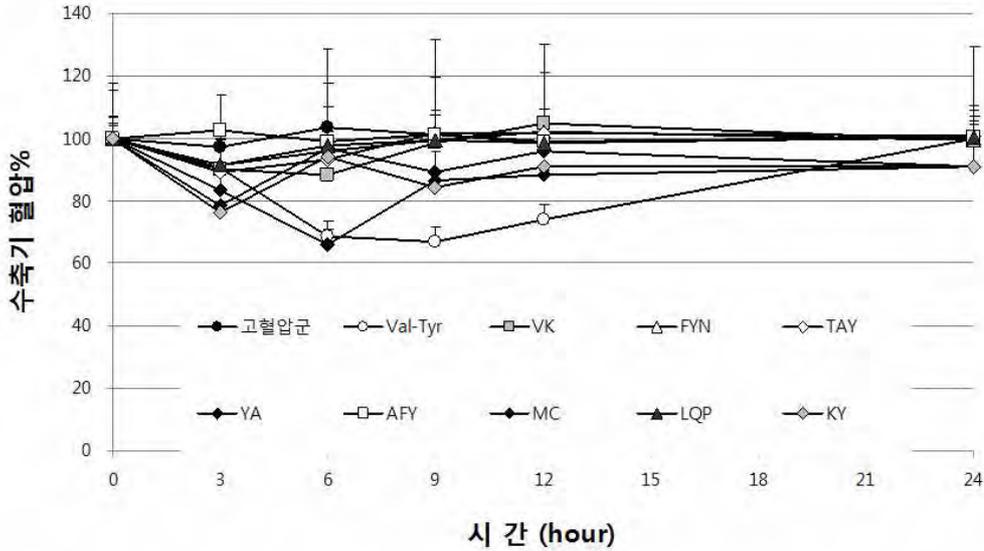


그림 26. 활성 펩타이드의 시간대별 혈압변화.

* $p < 0.05$ 및 * $p < 0.01$ vs. 고혈압군 대비 유의성

④ 인체적용시험 용량설정을 위한 시료선정

위의 24 시간 동안의 혈압변화 결과를 토대로, 인체적용시험을 위한 용량 설정 시험에는 글 가수분해물과 활성 펩타이드 YA를 선정하였다.

(2) 반복투여에 의한 혈압강하 효과

(가) 실험군

4주간의 반복 투여를 통한 혈압강하 효과를 확인하기 위해 매주 1회 수축기 혈압을 측정하였으며, 실험군은 아래 표 22와 같다.

표 22. 혈압조절 기능성 시험 실험군

동물종	실험군		투여용량
선천성 고혈압 쥐 (Spontaneously Hypertensive Rat; SHR)	고혈압군		Saline 2 ml
	양성대조군	정어리 펩타이드	100 mg/kg
	총 가수분해물	동결건조	100 mg/kg/
		분무건조	
활성 펩타이드	YA	50 μ g/kg/	

(나) 반복투여에 따른 수축기 혈압 변화

4주간의 반복투여에 따른 수축기혈압 변화는 아래의 그림 27과 같다. 고혈압군은 4주 후 25.3%의 혈압이 상승한 반면, 정어리펩타이드 11.4%, 동결건조 총 가수분해 펩타이드 13.0%, 분무건조 총 가수분해 펩타이드 2.4%, YA는 6.4%의 혈압상승률을 보였다.

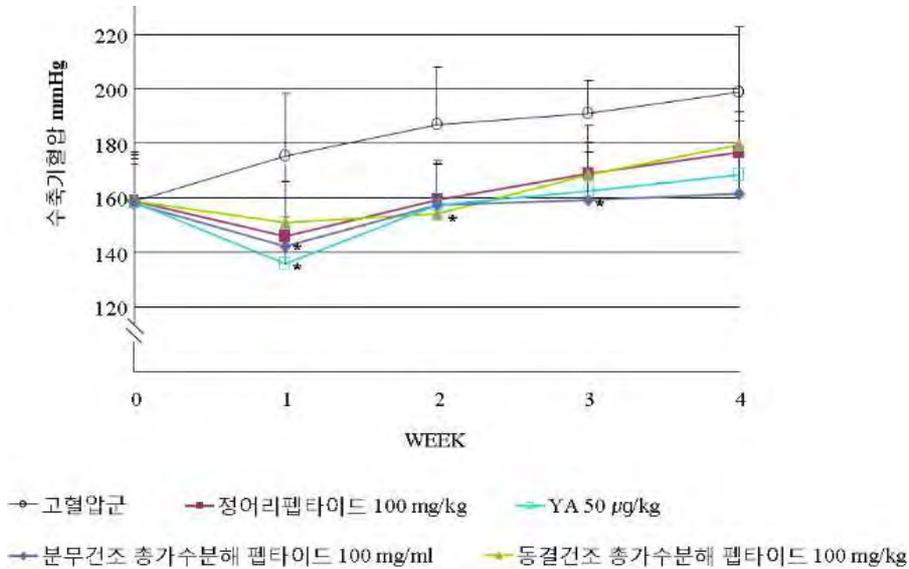


그림 27. 반복투여에 따른 수축기 혈압 변화.
* $p < 0.05$ 는 고혈압군 대비 유의적인 차이를 나타낸 것임.

(3) 혈중 ACE, angiotensin-II 및 CRP 농도

고혈압질환의 생체지표인 ACE, Ang-II 및 hs CRP 농도를 측정하였다. 레닌-안지오텐신계의 활성화증가는 말초혈관저항성을 증가시켜 혈압을 상승시킨다. 아래의 그림 28에서 ACE와 Ang-II의 농도를 보면 고혈압군에 비해 모든 실험군에서 그 수치가 낮아졌다. High-sensitivity C-Reaction protein (hs-CRP)는 심혈관계 질환의 환자에서 유의성 있는 연관성을 나타내는 혈압조절관련 기능성 평가 시험 항목 중의 하나인 중요한 인자이다²⁾. 아래의 hs-CRP 결과를 보면 모든 실험군에서 감소하였으며, 특히 총 가수분해물과 그 활성 펩타이드인 YA에서 유의성 있는 효과를 나타내었다 ($p < 0.001$).

2) 미국 심장학회와 미국 질병관리센터에서 '동물실험 및 인체시험의 혈압조절관련 기능성 평가' 주시험 항목으로 분류하고 있음.

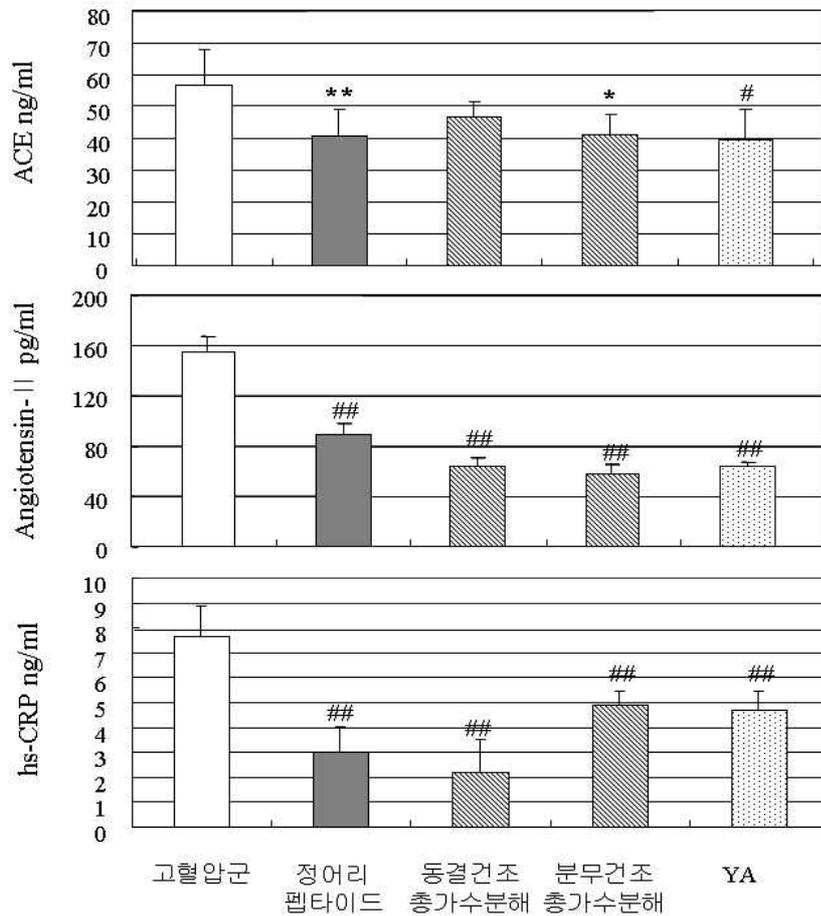


그림 28. 혈청 중의 ACE 저해 활성, Ang-II 및 high sensitivity-CRP 농도

다. 결론

- 양성대조군인 정어리 펩타이드와 동일한 용량(100 mg/kg)으로 굴 가수분해물을 경구투여 하여 *in vivo* 동물실험을 실시하여, 시간에 따른 혈압강하효과, 반복투여에 의한 혈압강하 효과, 혈중 ACE, angiotensin-II, hs-CRP농도를 측정하였다.
- 선천성 고혈압쥐 (SHR)를 사용한 *in vivo* 동물실험을 통해 동량의 정어리 펩타이드 (100 mg/kg) 보다 굴 가수분해물에서의 혈압강하 효능이 더 우수하였으며 혈청중의 ACE, angiotensin-II, hs-CRP의 양도 유의적으로 감소시켰다.
- 식약처의 바릴-타이로신 1일 허용 섭취량은 250~400 μ g으로 정어리 펩타이드 1일 섭취량은 500~800 mg 이다. 이를 바탕으로 굴 가수분해물의 인체적용시험 최저용량을 500 mg으로 설정하였으며, 실제 인체적용시험은 500~800 mg 범위 내에서 예비 실험을 실시하기로 하였다.

4. 굴 가수분해물 및 유효물질의 혈압조절 작용기전 규명

4.1 굴 가수분해물 및 분리된 굴 펩타이드의 *in vitro* 작용기전

굴 가수분해물 및 유효성분인 YA를 포함하는 펩타이드 성분들은 ACE 효소를 직접 억제하여 혈압을 조절하는 것을 1절1.2의 나항의 (가)에서 제시한 바 있으며 이를 토대로 유도체를 합성하여 활성을 비교하여 보았다.

가. 실험방법

(1) 실험 재료

ACE (5 units from rabbit lung), hippuryl-histidyl-leucine (HHL)과 captopril은 Sigama에서 구입하였다. 아세토니트릴과 메탄올은 HPLC급을 사용하였으며, 다른 시약들은 시약급을 사용하였다. Watchers 120 ODS-AP (5 μ m, 4.6x250 mm) C18칼럼은 Daiso Co.에서 구입하였다. 8종의 펩타이드, VK, VKW, TAY, TAW, YA, YAW, KY 및 KYW는 GL Biochem Ltd.에서 Fmoc 고상합성법으로 합성하였다. 합성 펩타이드의 순도는 C18 역상 칼럼을 장착한 HPLC를 통해 95% 이상으로 확인되었으며, QTRAP 질량 분석기(API-3200)로 각 펩타이드의 질량을 확인하였다.

(2) ACE 저해활성의 측정

시료 용액(20 μ L)를 225 μ L의 ACE 용액(0.025 units/mL)과 잘 혼합하여 37°C에서 10분 동안 항온한 후 50 μ L의 HHL 용액(2.5 mg/mL, 0.3 M NaCl-0.1 M borate buffer, pH 8.3)을 첨가하였다. 반응은 37°C에서 30분 동안 실시한 후 75 μ L의 1 M HCl을 첨가하여 반응을 중지시키고 8,160 x g에서 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액 중의 hippuric acid(HA)의 양은 C18칼럼(5 μ m, 4.6 x 250 mm)을 장착한 역상 HPLC 시스템(Shimadzu)으로 측정하였다. IC₅₀ 값은 ACE 활성 50%를 저해하는 데 필요한 저해제 농도로 계산하였다. 효소 활성의 저해 %는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{저해활성 (\%)} = [(\text{HAcontrol} - \text{HASample}) / \text{HAcontrol}] \times 100$$

(3) 합성 펩타이드의 세포독성

Chang 세포(인간정상세포)는 10% fetal bovine serum을 포함하는 MEM 배지에서 배양하였다. Well 당 1x10⁴의 세포를 포함하는 96 well 플레이트를 5%의 CO₂를 포함하는 상대습도 95%의 35°C의 항온기에서 24시간 항온 시켰다. 항온 후 최종 농도 1, 5, 10, 20 μ g/mL의 합성 펩타이드를 첨가하고 같은 조건으로 24시간 더 항온 하였다. 세포성장은 CellTiter 96 Aqueous One solution cell proliferation 시험 키트로 시험하였으며 흡광도는 490 nm에서 마이크로플레이트 리더로 측정하였다. 세포 생존은 무처리 그룹의 흡광도와 비교한 합성 펩타이드 처리구의 흡광도의 %로 계산하였다.

(4) 분자 도킹

연구 표적으로서 선택한 인간 ACE-lisinopril 복합체의 결정구조는 단백질 데이터 은행(PDB Id, 1O86)에서 얻었으며, Sybyl 프로그램을 사용하여 모든 기질과 Cl⁻ 이온들을 제거

하였다. 단백질 구조는 전분석하여 Sybyl 프로그램에서 지시한 것처럼 default setting으로 생물중합체 구조준비를 사용하여 도킹을 준비하였다. ACE-저해제 펩타이드의 3차원 구조를 준비하고 0.05 kcal/mol의 convergence 기준을 가진 Powell conjugate 근배 최적 알고리즘을 사용하여 Tripos force field로 각 분자에 대하여 에너지 최저화를 수행하였다. 도킹을 위해 Surflex-dock 프로그램을 선택하였다. 도킹 과정 중 참고 분자로서 ACE-lisinopril에서 얻은 리간드(lisinopril)를 사용하였고 사위 20개 구조를 발생시켜 surflex-dock의 전체 점수에 기초하여 각 펩타이드에 대한 구조의 순위를 정하고 다른 3종류의 도킹 점수, 즉 D score, G score 및 Chem score를 함께 계산하였다. 각 펩타이드에 대하여 1위인 구조를 선택하여 Discovery Studio로 ACE 잔기들과 펩타이드 잔기들 사이의 상호작용을 분석하였다.

(5) 분자동력(MD) 시뮬레이션

ACE와 저해제 펩타이드 사이의 상호작용을 개선하고 상보성을 증강하기 위해, 10 ns MD 모사로 surflex 도킹에서 얻은 ACE-펩타이드 복합체를 다듬었다. MD 시뮬레이션은 고속 리눅스 클러스터 컴퓨터 상에서 AMBER 3.0 force field를 사용하여 Gromacs 4.5.3 프로그램 패키지로 수행하였다. 저해제를 위한 위상 파일들은 ACPYPE (AnteChamber Python Parser interface)를 사용하여 발생시켰다(Silva and Vranken, 2012). 구조를 길이 1 nm의 12면체에 용매화하고 수용성 환경에서 모사를 수행하기 위해 TIP3P 물모델을 만들었다(Berendsen et al., 1981; Jorgenson et al., 1983). 모사한 시스템의 하전을 중성으로 하기 위해 Na⁺ 대이온들을 첨가하여 물 분자를 치환하였다. 시스템은 높은 에너지 상호작용과 입체적 충돌을 피하도록 1000 kJ/mol의 허용치까지 단계적으로 에너지 최소화 과정을 강하하였다. 평형에서 100 ps 동안 에너지 최소화 시스템을 처리하였다. V-rescale thermostat와 Parrinello-Rahman barostat로 300 K의 온도와 1 bar의 압력을 달성하였다(Parrinello and Rahman, 1981; Bussi et al., 2007). 6의 삽입 차수와 0.12 nm의 그리드 공간과 함께 긴-영역의 정전기적 상호작용을 정확하게 결정하기 위해 particle mesh Ewald(PME) 법을 적용하였다(Essmann et al., 1995). 발테르발스 상호작용에 대한 한계는 1.2 nm로 하였으며, 수소결합 상호작용은 공여체-수용체 거리와 각의 한계를 0.35 nm와 60° 로 설정하였다(Zhou et al., 2012). 중금속과 해당하는 수소원자 사이의 결합은 LINCS21 알고리즘을 사용하여 이들의 평행 결합길이를 속박하였다(Hess et al., 1997). 모사를 위한 시간 조각은 2 fs로 설정하였다.

나. 실험 결과

(1) ACE 저해활성과 *in vitro* 세포독성

4종의 새로운 펩타이드 유도체의 ACE 저해활성은 원래의 펩타이드에 비하여 크게 증가하였다. 특히 VKW의 저해활성은 VK에 비하여 1459배로서 captopril(IC₅₀=0.11 nM)의 약 1/180이었다(표 23).

합성 펩타이드로 처리한 Chang 세포의 생존율은 대조군에 비하여 82.3±14.0% ~ 128.9±6.0%의 범위로서 유의적인 세포독성을 보이지 않았다(p<0.05). 그러나 KYW-처리군은 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 감소하는 경향을 보였다(표 24).

표 23. Molecular mass and ACE inhibitory activity of peptides

Peptides	Molecular mass (Da)		IC ₅₀ (μM)	Relative activity
	Calculated	Measured		
VK	245.32	245.30	29	1
VKW	431.53	431.15	0.02	1450
YA	252.27	252.20	93.9	1
YAW	438.48	437.96	0.49	192
KY	309.37	309.08	51.5	1
KYW	495.57	495.15	0.43	120
TAY	353.38	353.25	16.7	1
TAW	376.41	375.72	0.63	27

표 24. Cell toxicity of peptides on Chang cell (%)

Peptide	Concentration (μg/mL)			
	1	5	10	20
VK	111.5±5.6	118.9±10.2	117.4±11.4	115.4±8.7
VKW	117.3±9.2	96.5±24.2	100.6±17.6	102.1±15.2
YA	103.8±10.7	112.2±12.8	121.9±18.5	117.9±25.6
YAW	104.8±8.3	104.3±9.3	97.4±11.8	99.3±13.0
KY	122.9±3.6	128.9±6.0	128.0±8.5	123.0±15.6
KYW	113.0±6.7	109.7±11.6	91.7±14.2	82.2±14.0
TAY	112.1±17.5	121.7±23.6	110.8±7.3	118.7±8.9
TAW	110.7±14.2	107.4±11.5	105.3±8.4	110.9±4.2

(2) 분자도킹

8개의 ACE 저해펩타이드를 Suflex dock에 도킹하고 도킹의 정확성을 평가하기 위해 같은 방법으로 ACE-lisinopril 복합체에서 얻은 리간드 lisinopril을 재도킹 하였다. 각 펩타이드와 lisinopril에 대하여 4개의 다른 도킹 점수를 아래의 표 25에 나타내었다. 수식한 펩타이드의 상대적 활성은 도킹 점수의 비교로 원래 펩타이드들과 완전히 구별될 수 있었다. VKW와 YAW의 4가지 다른 scoring 함수의 도킹 점수의 절대값은 VK와 YA에 비하여 증가한 반면, KYW와 TAW의 경우 total을 제외하고 다른 3가지 scoring 함수에서 얻은 도킹 점수의 절대값은 증가하였다.

표 25. Four kinds of docking scores of peptides and lisinopril from different scoring functions

Docking scores	Lisonopril	VK	VKW	YA	YAW	KY	KYW	TAY	TAW
Total score	11.9	11.0	11.5	7.5	12.2	10.8	10.7	10.3	9.6

* Δ Total score		0.5		4.7		-0.1		-0.7	
D_Score	-158.4	-98.4	-158.8	-79.9	-130.6	-106.5	-178.0	-121.0	-129.4
* Δ D_score		60.4		50.7		71.5		8.4	
G_Score	-241.6	-155.0	-248.6	-175.1	-240.0	-203.0	-306.5	-202.2	-245.3
* Δ G_Score		93.6		64.9		103.5		43.1	
CHEM_Score	-37.8	-16.9	-27.9	-9.4	-24.2	-22.3	-26.9	-25.4	-29.1
* Δ CHEM_Score		11.0		14.8		4.6		3.7	

* Δ : the difference between absolute value of docking score of derived peptides with that of original peptides for each scoring functions

(3) 분자 동력(MD) 시뮬레이션

분자 도킹은 단백질의 유연성이 부족하며 리간드 결합에 대하여 구조를 정확히 조정하지 못하는 반면, MD 시뮬레이션은 새로 도입된 리간드 주변의 수용체-결합 위치의 유도적합을 위해 유연한 방법으로 리간드와 단백질을 처리하여 도킹 후 수용체-리간드 구조가 MD 시뮬레이션에 의해 개선 될 수 있다(Alonso et al., 2006). MD 시뮬레이션 중 ACE-펩타이드 복합체 혹은 펩타이드의 구조변화는 골격 root mean square deviations(RMSD)를 분석하여 점검할 수 있다. 대표적으로 VK, VKW, VK-ACE와 VKW-ACE의 골격 RMSD 변화를 분석하였다. VK-ACE와 VKW-ACE는 모사 5ns 이후에 잘 평평화되었으며, VKW-ACE의 골격 RMSD 변화는 VK-ACE 보다 적었다(그림 29). 이것은 VKW-ACE가 VK-ACE보다 안정함을 제시한다. 그러나 모사하는 동안 VKW의 구조는 VK보다 크게 변하였다(그림 29b).

비공유적 상호작용은 생물 거대분자에서 중요한 역할을 행사하여 분자의 3차원 구조를 유지할 뿐 아니라 분자 인식 과정에 책임이 있다(Cerny and Hobza, 2007). Gromacs에서 쿨롱 유효 에너지와 Lennard-Jones(LJ) 유효 에너지로 비공유상호작용의 유효 에너지를 평가하였다. ACE와 펩타이드 사이의 전체 비공유결합 상호작용 유효 에너지(E_{total})은 3 부분, 즉 정전기적 상호작용으로서 ACE (Zn 배제)와 저해제 사이의 쿨롱 유효 에너지(E_{coul}), 반데르발스력으로서 ACE(Zn 배제)와 저해제 사이의 LJ 유효에너지(E_{LJ}), 금속 상호작용으로서 Zn과 저해제 사이의 쿨롱 유효 에너지(E_{Zn})로 나누어진다. ACE와 펩타이드 사이의 상호작용 유효 에너지는 마지막 5 ns 모사에 걸친 평균값으로 표현하였다(표 26, 27). ACE와 수식한 4개 펩타이드의 복합체들에 대한 모든 E_{total} 은 ACE와 원래 펩타이드의 값들에 비하여 감소하였다. 결과는 수식한 펩타이드가 원래의 펩타이드에 비하여 ACE와 더욱 안정한 복합체를 형성함을 제시한다. 결과들은 도킹 점수의 결과들과 일치한다. 그러나 전체 에너지의 각 부분의 유효 에너지 변화는 원래 펩타이드의 따라 달랐다. VK의 경우, 모든 정전기 및 반데르발스 상호작용이 감소하였으나, Trp로 수식한 후 금속 상호작용이 감소하였다. TAY의 경우 정전기적 상호작용은 증가하였으나, 반데르발스력과 금속 상호작용은 감소하였다(표 27). 이들 결과들은 ACE와 펩타이드 사이의 복합체의 구조 안정성은 C-말단을 Trp로 수식하여 강화될 수 있으나, 기작은 원래 펩타이드의 이차 서열에 따라 다름을 지적한다.

Discovery Studio 3.5로 발생시킨 상호작용도로 펩타이드와 ACE 사이의 상호작용 방법을 분석하였다. 수소결합과 pi-pi 상호작용을 포함하는 정전기, 반데르발스 및 금속 상호작용 같은 3 종류의 상호작용을 제공하였다. 펩타이드-ACE의 구조에 미치는 MD 모사의 효과를 확

인하기 위해, MD 전후의 VK와 VKW의 상호작용 이미지를 생성하였다(그림 30). MD 후에 VK와 상호작용에 포함된 ACE의 아미노산 잔기는 Glu162를 제외하고 거의 변하지 않았으나, 상호작용은 크게 변하였다. 아미노산 잔기 Ala356과 His383은 정전기 상호작용 대신 반데르발스 상호작용에 의해 VK와 상호작용한 반면, MD 모사 후 His353, His387, Glu411, Arg522은 반데르발스 상호작용 대신 정전기상호작용에 의해 VK와 상호작용하였다.(그림. 30A, C). VKW의 경우 반데르발스 상호작용을 포함하는 아미노산 잔기의 수는 MD 모사 후 분명히 감소되었다(그림. 30B, D). 더구나 MD 모사 후 Zn과 VKW의 상대적 위치가 크게 변하였다. 이는 VKW와 ACE 사이의 금속 상호작용의 감소를 유도할 수 있다(표 27). MD 모사 중 VKW 구조는 VK에 비하여 크게 변하였으며, 이 결과는 VK와 VKW의 골격 RMSD에서 얻은 결과들과 일치한다. 유연한 방법으로 리간드와 단백질의 처리 때문에 MD 모사로 ACE와 펩타이드 사이의 좀 더 정확한 상호작용을 얻을 수 있다.

ACE의 활성부위를 확인하기 위해 펩타이드-ACE의 상호작용 이미지로 8종 펩타이드와 상호작용에 포함되는 ACE의 아미노산 잔기의 빈도를 계산하였다. His353과 Glu384는 모든 8종의 ACE 저해 펩타이드와 상호결합하였다(그림 31). 그리고 8종 펩타이드 중 적어도 4종이 아미노산 잔기 Gln281, Ala354, Ser355, Glu376, Val380, His383, Glu411, Lys511, His513, Arg522, Tyr520 및 Tyr523와 상호작용을 포함하였다. Glu376, Val380, His383, Glu411과 Arg522,을 제외한 다른 아미노산 잔기들은 lisinopril-복합체의 결정 구조에 기초한 활성 부위와 관련한 것들과 동일하다(Natesh et al., 2003, 2004). 수식하거나 원래의 펩타이드와 상호작용에 포함된 아미노산 잔기들의 빈도를 비교했을 때, 수식한 펩타이드와 상호작용하는 아미노산 잔기 Gln281, Ala354, Glu411, Phe457과 Lys511의 빈도는 원래의 펩타이드 보다 높았으며, 이들 아미노산 잔기들과 펩타이드들 사이의 상호작용이 활성을 개선하는데 중요한 역할을 했음을 지적한다.

결과를 더욱 상세하게 설명하기 위해 ACE-lisinopril 복합체(PDB code: 1O86)처럼 MD 모사 후 ACE-VK와 ACE-VKW의 상호작용 이미지를 발생하고 상호작용 방법을 분석하였다. 상호작용에 포함된 아미노산 잔기들을 비교할 때, 아미노산 잔기, Glu162, Gln281, His383, Lys511, His513, Tyr520과 Arg522은 VKW와 정전기적 상호작용이 증가하였다. VKW와 정전기적 상호작용에 포함된 아미노산 잔기들은 lisinopril의 아미노산 잔기들과 거의 같았다. 반데르발스 상호작용인 경우 Trp279, His357와 Phe457 수소결합인 경우 Lys511과 His513이 역시 증가하였다. 증가한 아미노산 중에서 ACE의 활성 부위로 Glu162, Gln281, Lys511, His513과 Tyr520이 확인되었다(Natesh et al., 2003, 2004).

MD 모사의 결과에 기초할 때, C-말단을 Trp로 수식한 펩타이드는 상호작용 위치를 개선하고 유효 에너지를 감소시키는 ACE와 펩타이드 사이의 상호작용을 강화하고 복합체의 안정성을 증가시킨다.

Table 26. The amino acid residues involved in interaction with lisinopril, VK and VKW

Peptide	Electrostatic	van der Waals	Hydrogen bonds	pi-pi	Zn
lisinopril	GLU 162, GLN 281, HIS 353, ALA 354, GLU 384, LYS 511, HIS 513, TYR 520, TYR 523	SER 355, VAL 380, HIS 383, HIS 387, PHE 457, PHE 512, VAL 518	HIS 353, LYS 511, HIS 513, TYR 523	HIS 383, TYR 523	Yes
VK	HIS 353, ALA 354, GLU 376, GLU 384, HIS 387, GLU 411, ARG 522, TYR 523	SER 355, ALA 356, VAL 380, HIS 383, HIS 513, VAL 518	ALA 354, GLU 376, GLU 384, GLU 411, TYR 523	HIS 387	Yes
VKW	GLU 162, GLN 281, ALA 354, HIS 383, GLU 384, GLU 411, LYS 511, HIS 513, TYR 520, ARG 522, TYR 523,	TRP 279, HIS 353, SER 355, ALA 356, VAL 380, PHE 457	GLU 411, LYS 511, HIS 513		Yes

Table 27. Average interaction potential energies between ACE and peptides over last 5 ns simulation

Complex	E_{coul} (kJ/mol) ^a	E_{LJ} (kJ/mol) ^b	E_{Zn} (kJ/mol) ^c	E_{total} (kJ/mol) ^d
ACE/VK	5.15	-69.29	-387.45	-451.58
ACE/VKW	-165.74	-162.82	-184.52	-513.08
ACE/YA	-38.83	-77.65	-129.84	-246.31
ACE/YAW	-35.61	-183.78	-196.70	-416.08
ACE/KY	-113.05	-83.95	-255.25	-452.25
ACE/KYW	-73.58	-178.53	-218.62	-470.73
ACE/TAY	-104.90	-138.35	-6.04	-249.28
ACE/TAW	39.54	-154.27	-372.59	-487.32

a: Coulomb potential energy between ACE (exclude Zn) and inhibitors;

b: Lennard-Jones potential energy between ACE (exclude Zn) and inhibitors;

c: Coulomb potential energy between Zn and inhibitors;

d: The total non-covalent interaction energy $E = E_{\text{coul}} + E_{\text{LJ}} + E_{\text{zn}}$

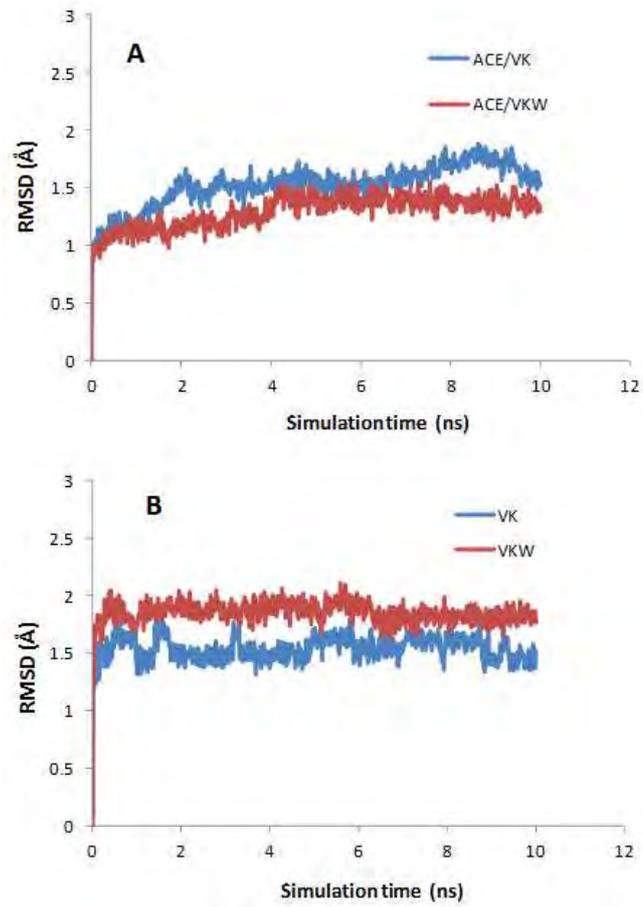


그림 29. Backbone RMSD as a function of simulation time for the complexes of ACE-VK and ACE-VKW (A) and VK and VKW(B)

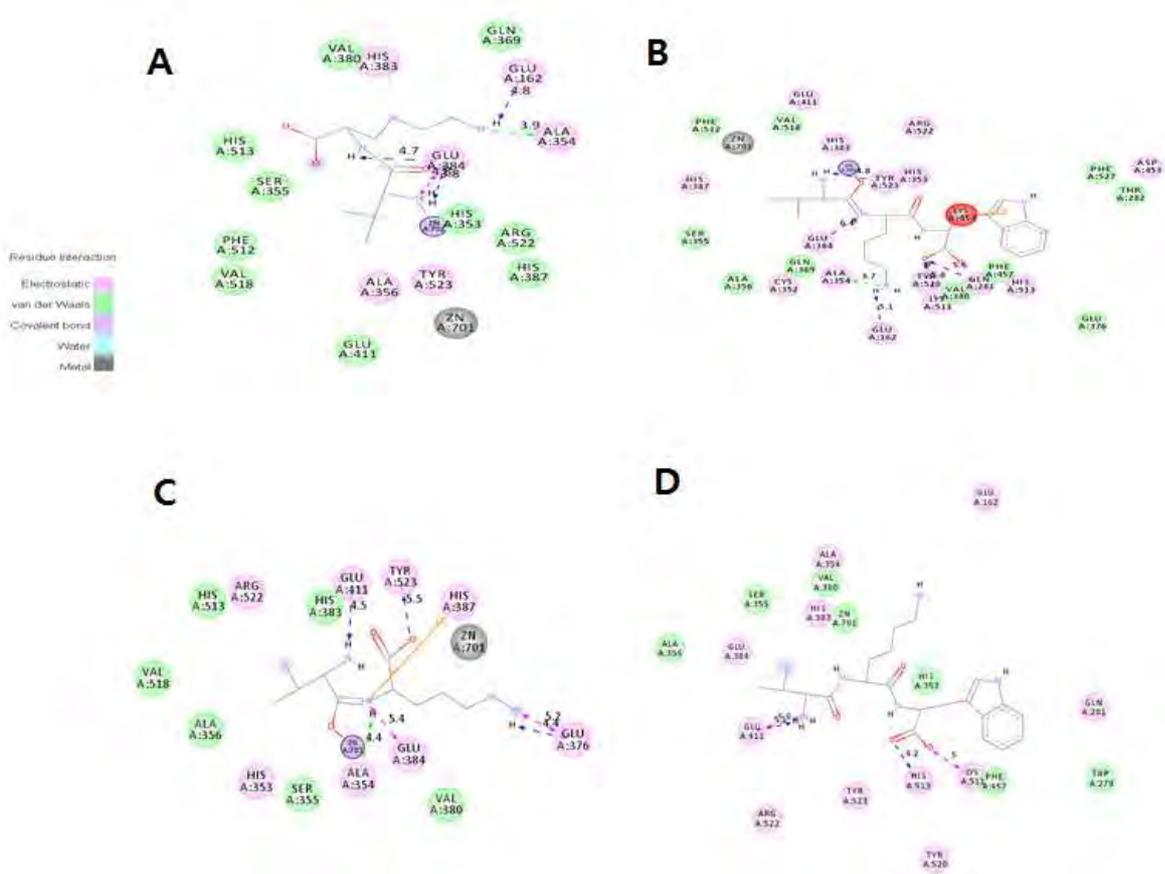


그림 30. The interaction images between ACE and peptides. ACE-VK before MD (A) ACE-VKW before MD (B) ACE-VK after MD (C) ACE-VKW after MD (D)

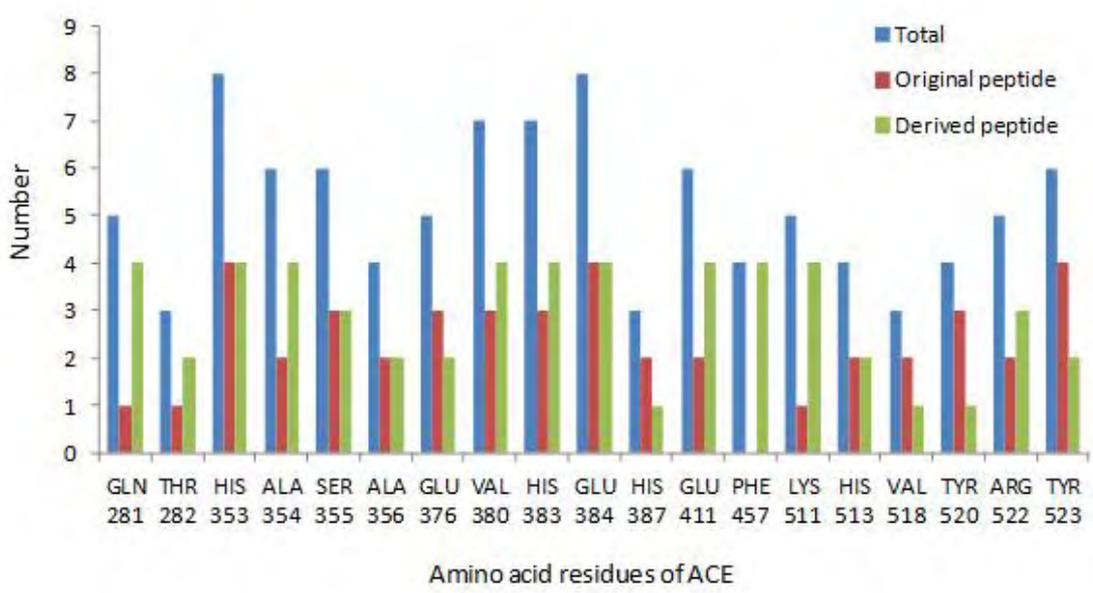


그림 31. The frequency of the amino acid residues involved in interacted with peptides

다. 결론

- 굴 가수분해물인 유효성분인 YA를 포함하는 펩타이드 성분들은 ACE 효소를 직접 억제하여 혈압을 조절하였다.
- 분자도킹 및 분자동역학 시뮬레이션연구를 통해 ACE의 작용부위에 활성펩타이드들이 비공유결합을 통해 그 작용을 억제하는 것으로 나타났으며 이러한 억제활성은 펩타이드의 C-말단을 트립토판으로 치환할 시 크게 증가하였다.

4.2 *In vivo*에서 혈압강하 작용기전

가. 실험방법

(1) 동물실험

수축기 혈압이 170–190 mmHg인 고혈압 쥐(SHR)와 수축기 혈압이 100–125 mmHg인 정상 중 Wistar Kyoto rats(WKR)는 Harlan에서 구입하였다. 동물을 스테인레스 스틸 케이지에 보관하면서 12시간 조명 사이클로 23±1℃, 상대습도 55±5%에 적응시켰다. 도착 후 1주일 동안 시판 펠렛 사료를 먹이고, 5개군, 즉 무처리 SHR 대조군 (n=3), 정상 WKR 대조군(n=3), 굴 가수분해물 처리 SHR 군 (100 mg/kg 체중, n=3), 정어리 가수분해물 처리 SHR 군(positive control, 100 mg/kg 체중, n=3); Captopril-처리 SHR 군 (positive control, ACE 저해제, 8 mg/kg 체중, n=3)으로 나누었다. Sonde를 사용하여 시료를 투여한 후 0, 3, 6, 9, 12 및 24 시간에 32℃의 환경 챔버에서 39분 동안 따뜻하게 한 후 tail-cuff 법을 사용하여 Coda non-invasive 혈압측정시스템으로 수축기 혈압을 측정하였다. 혈압은 초기 혈압에 대한 %로 표시하였다.

(2) 혈중 ACE 및 angiotensin-II 농도 측정

11주령의 수컷 웅성 선천성 고혈압 쥐(SHR)를 사용하여 각각의 실험 시료를 4주 동안 경구 투여하였다. 시험 종료 후 실험동물을 희생시킨 다음 채혈한 혈중에서 분리한 혈청을 이용하여 ACE 활성 저해, angiotensin-II 및 CRP 농도를 kit를 사용하여 측정하였다.

나. 실험결과

(1) 반복투여에 따른 혈압 변화

(가) 실험군

4주간의 반복투여를 통한 혈압강하 효과를 확인하기 위해 매주 1회 수축기 혈압을 측정하였으며, 실험군은 아래의 표 28과 같다.

표 28. 혈압조절 기능성 시험 실험군

동물종	실험군		투여용량
Wistar Rat	정상군		Saline 2 ml
선천성 고혈압 쥐 (Spontaneously Hypertensive Rat; SHR)	고혈압군		Saline 2 ml
	양성대조군	정어리 펩타이드	100 mg/kg
		바릴-티로신	50 µg/kg
	총 가수분해물	동결건조	100 mg/kg
	분자량에 따른 분획물	10 kD 이하	100 mg/kg
활성물질	YA	50 µg/kg	

(나) 혈압강하 효과

아래의 그림 32를 보면, 4주 반복 투여 후 정상군의 혈압이 거의 변화가 없는 반면 혈압 대조군의 혈압은 23.6% 상승하였다. 총 가수분해물은 12.1% 상승하여 10.7% 상승한 양성대조군 바릴-티로신(Val-Tyr)과 비슷한 혈압강하 효과를 나타내었으며, 10 kD이하 가수분해물은 혈압의 상승이 나타나지 않았으며, 활성 펩타이드인 YA는 8.4% 상승하였다. 수축기 혈압의 수치는 표 29에 나타낸 바와 같다.

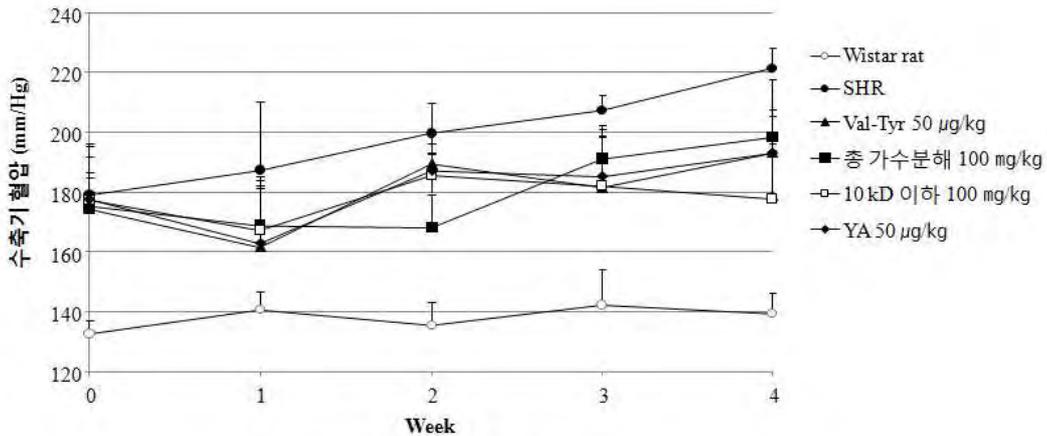


그림 32. 4주 반복투여에 따른 혈압강하 효과

Wistar rat, 정상군; SHR, 고혈압군; Val-Tyr, 바릴-티로신

표 29. 4주 반복투여에 따른 혈압강하 효과

	0주차	1 주차	2 주차	3 주차	4 주차
정상군	133±4.1	141±6.1	135.3±7.8	142.3±11.9	139.3±6.8
혈압군	179±17.0	187±22.9 ^{##}	199.8±9.7 ^{##}	207.1±5.3 ^{##}	221.3±7.0 ^{##}
Val-Tyr	174.3±12.2	162±20.4	189.7±10.1	181.8±19.1	193.0±24.5 [*]
총 가수분해	177±5.6	168±11.0	168.3±10.6 ^{**}	191.3±11.0	198.4±6.8
10 kD 이하	177±17.7	167±17.8	185.5±7.0	181.9±20.2	177.6±18.6 ^{**}
YA	178±14.3	163±20.1	187.2±9.0	185.3±13.3	193.0±14.5 [*]

^{###} $p < 0.01$ 및 ^{###} $p < 0.001$ 은 정상군 대비 고혈압군에서의 유의적 차이를 나타낸 것이고,

^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ 및 ^{****} $p < 0.001$ 은 고혈압군 대비 시료 경구 투여군의 유의적 차이를 나타낸 것임.

(다) 혈중 ACE 및 angiotensin-II 농도

① ACE 활성 저해 효과

4주 투여 후 고혈압 대조군의 혈중 angiotensin converting enzyme (ACE)의 농도는 정상군의 약 2배가량 높아진 반면 시료 투여군에서는 혈중 ACE 농도가 감소하였다. 특히 10 kD 이하 가수분해물과 YA는 의존적으로 ($p < 0.001$)으로 감소하는 효과를 나타내었다(그림 33).

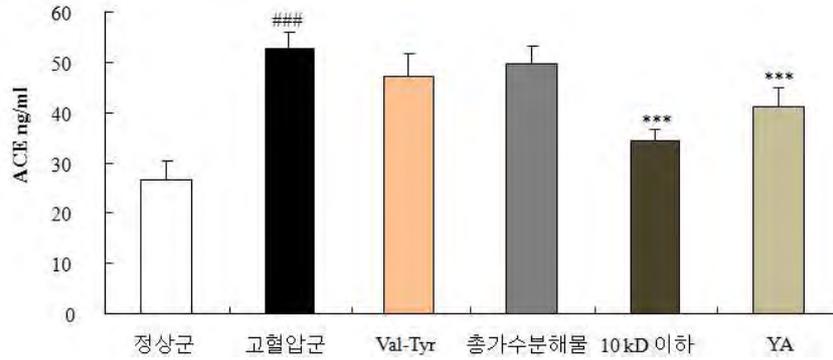


그림 33. 혈중 ACE 저해 활성 효과

$p < 0.001$ 은 정상군 대비 혈압군에서의 유의적 차이를 나타낸 것이고, *** $p < 0.001$ 은 고혈압군 대비 시료 경구투여군의 유의적 차이를 나타낸 것임.

② Angiotensin-II 농도

4주 투여 후 고혈압 대조군의 혈중 angiotensin-II의 농도는 정상군의 약 7배가량 높아진 반면 시료 투여군에서는 혈중 angiotensin-II의 농도가 유의적으로 감소하였다(그림 34).

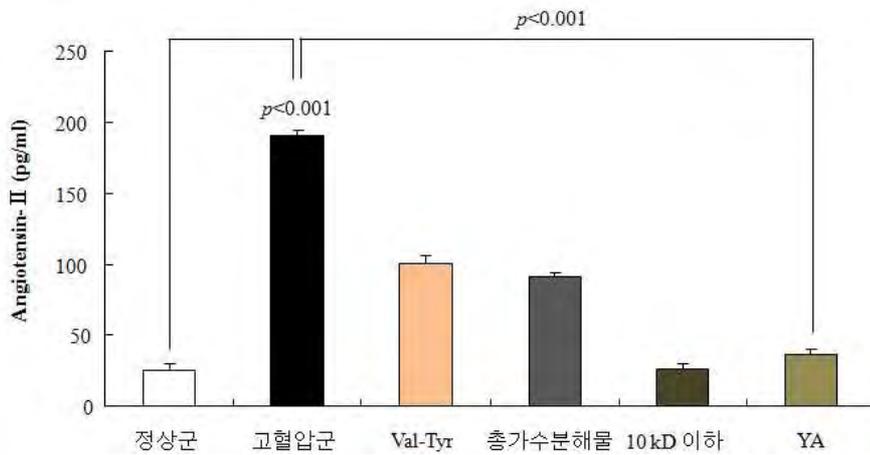


그림 34. 혈중 Angiotensin-II 활성 저해 효과

다. 결론

- 100 mg/kg의 굴 가수분해물과 양성대조군인 정어리 펩타이드 동량을 4주간 경구투여 한 후의 혈압 변화를 측정하였음. 그 결과 굴 가수분해물이 정어리 펩타이드보다 효능이 우수하다는 것을 확인하였다.
- 이 때의 혈청 중 ACE 활성을 측정한 결과, 고혈압 대조군의 혈중 angiotensin converting enzyme (ACE)의 활성이 정상군의 약 2배가량 높아진 반면 굴 가수분해물 투여군에서는 유의성있게 감소함을 확인하였다.
- 같은 시료에서의 안지오텐신-II의 농도를 측정한 결과, 고혈압 대조군의 혈중 angiotensin-II의 농도는 정상군의 약 7배가량 높아진 반면 굴 가수분해물 투여군에서는 혈중 angiotensin-II의 농도가 유의적으로 감소함을 확인하였다.
- *In vivo*에서도 ACE 효소 활성 억제제가 혈압강하 기전임을 확인할 수 있었다.

5. 독성시험

독성시험은 GLP기관인 (주)켄온에서 실시하였다.

가. 단회 경구투여 독성시험 (별첨 1)

Chemon Study No. 13-RA-225

시험개요

시 험 제 목	Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험		
시 험 목 적	본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.		
시 험 지 침	의약품등의독성시험기준(제2013-121호, MFDS, 2013 년 04 월 05 일)		
시 험 의뢰 자	경희대학교 서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호, 130-701 02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX) 의뢰책임자: 정 세 영		
시 험 기 관	(주)켄온 비임상연구소 경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826 경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX) 운영책임자: 김 갑 호		
시 험 일 정	2013 년 05 월 20 일	시험계획서 승인(시험개시일)	
	2013 년 05 월 22 일	동물입수(실험개시일)	
	2013 년 05 월 29 일	투여	
	2013 년 06 월 12 일	부검(실험종료일)	
	2013 년 07 월 02 일	최종보고서(안) 제출	
	2013 년 07 월 12 일	최종보고서 제출(시험종료일)	
주요시험관계자	시험물질 조제/보관:	김 지 훈 동물실험:	손 보 송
		김 현 지	정 지 란
		이 지 혜	
	병 리:	김 학 수 통계분석:	이 민 행
	자료보관:	이 유 나 보고서작성:	김 종 민
기록과 재료의 보관	시험계획서, 시험계획서 변경기록지, 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본 및 각종 증거자료는 시험종료 후 5 년간 (주)켄온 비임상연구소의 자료보관실에 보관한다. 이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.		

요 약

본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.

Oyster enzyme hydrolysate를 0 (부형제대조군), 1250, 2500 및 5000 mg/kg의 용량으로 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 단회 경구투여한 후 2 주간 사망률, 일반증상, 체중 및 부검소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
3. 체중변화 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
4. 부검시, 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 암수 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단한다.

나. 4주 반복투여 독성시험 (별첨 2)

시험개요

시 형 제 목	Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4 주간 반복 경구투여 독성시험	
시 형 목 적	본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 무독성량 및 표적장기를 확인하기 위하여 수행하였다.	
시 형 지 칭	의약품등의독성시험기준(제2013-121호, MFDS, 2013 년 04 월 05 일)	
시 형 의 리 자	경희대학교 서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호, 130-701 02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX) 의뢰책임자: 정 세 영	
시 형 기 관	㈜켄온 비임상연구소 경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826 경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터내, 443-270 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX) 운영책임자: 김 감 호	
시 형 일 정	2013 년 07 월 08 일	시험계획서 승인(시험개시일)
	2013 년 07 월 09 일	동물입수(실험개시일)
	2013 년 07 월 16 일	투여개시
	2013 년 08 월 13 일	투여종료
	2013 년 08 월 13 일	부검(수컷)
	2013 년 08 월 14 일	부검(암컷)
	2013 년 08 월 14 일	임상병리검사 완료
	2013 년 09 월 24 일	조직병리학적 검사 완료(실험종료일)
	2013 년 10 월 11 일	최종보고서(안) 제출
	2013 년 11 월 21 일	최종보고서 제출(시험종료일)
기록과 재료의 보 관	시험계획서, 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본, 검체 및 각종 증거 자료는 품목허가일로부터 3 년간 ㈜켄온 비임상연구소에 보관한다. 임상병리 검체(혈청, 혈장)는 측정 종료일로부터 1 년간 보관한다. 이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.	

요 약

본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 무독성량 및 표적장기를 확인하기 위하여 수행하였다.

시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 800, 2000 및 5000 mg/kg/day로 투여하는 시험물질 투여군 및 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하여 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 4 주간 반복 경구투여하였다.

일반증상관찰, 체중측정, 사료 및 물 섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량측정, 부검소견관찰 및 조직병리학적 검사를 실시하였고, 시험물질 투여군의 결과를 부형제대조군과 비교하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다.
3. 체중측정 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
4. 사료섭취량 측정 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
5. 물섭취량 측정 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
6. 안과학적 검사 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
7. 요검사 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
8. 혈액학적 검사 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
9. 혈액생화학적 검사 결과, 모든 시험물질 투여군 수컷에서 혈액요소질소의 증가가 관찰되었다. 하지만 이는 독성학적인 의미는 없었다.
10. 장기중량 측정 결과, 5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 수컷에서 우측 신장의 절대 및 상대 중량의 증가가 관찰되었다. 하지만 이는 독성학적인 의미는 없었다.
11. 부검소견 관찰 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
12. 조직병리학적 검사 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여하였을 때, 시험물질에 의한 독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서, 본 시험조건에서 Oyster enzyme hydrolysate의 무독성량(NOAEL, No Observed Adverse Effects Level)은 암수 모두 5000 mg/kg/day로 판단하고, 표적장기는 확인되지 않았다.

시험개요

- 시 험 제 목** Oyster enzyme hydrolysate의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험
- 시 험 목 적** 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate의 히스티딘 요구성 *Salmonella typhimurium*의 4 개 TA 균주와 트립토판 요구성 균주 *E. coli* WP2 *uvrA*에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위하여 실시하였다.
- 시 험 지 침** 의약품등의독성시험기준 (제2014-6호, MFDS, 2014 년 01 월 29 일)
OECD Guideline for Testing of Chemicals, TG 471 (1997) 'Bacterial Reverse Mutation Test'
- 시 험 의뢰 자** 경희대학교
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호,
130-701
02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX)
의뢰책임자: 정 세 영
- 시 험 기 관** (주)캠온 비임상연구소
경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826
경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270
031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)
운영책임자: 김 갑 호
- 시 험 일 정** 2014 년 05 월 14 일 시험계획서 승인(시험개시일)
2014 년 05 월 27 일 균주점종(실험개시일)
2014 년 05 월 28 일 시험물질 처리
2014 년 05 월 30 일 집락계수(실험종료일)
2014 년 06 월 17 일 최종보고서(안) 제출
2014 년 10 월 23 일 최종보고서 제출(시험종료일)
- 주요시험관계자** 시험물질 조제/보관: 김 지 훈 자료보관: 정 해 정
시험담당자: 이 준 형

요 약

본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate가 대사활성계 적용 및 비적용 하에 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 4 균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주(WP2 *uvrA*)에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위하여 실시하였다.

대사활성계로는 Aroclor-1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보효소(cofactor)를 첨가한 것을 사용하였다. 시험은 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다.

처리용 시험물질은 멸균주사용수로 조제하였다. 아래 표와 같이 설정한 농도군과 부형제(음성)대조군 및 양성대조군으로 시험군을 구성하였으며, 농도군당 3 개의 평판을 사용하였다.

균주명	S9 mix	농도군(µg/plate)					
TA strains	+/-	15	50	150	500	1500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	15	50	150	500	1500	5000

시험결과, 모든 균주의 시험물질 처리농도에서 음성대조군에 비해 집락 수의 증가는 관찰되지 않았으며, 세포독성도 관찰되지 않았다.

한편 모든 양성대조군에서는 해당 음성대조군에 비해 집락수의 확실한 증가가 관찰되었다.

이상의 결과로, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate는 본 시험조건 하에서 사용한 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

시험개요

시 험 제 목 Oyster enzyme hydrolysate의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험

시 험 목 적 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate가 배양한 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포의 염색체에 구조적 혹은 수적 이상을 유발하는가를 알아보기 위하여 실시하였다.

시 험 지 침 의약품등의독성시험기준 (제2014-6호, MFDS, 2014 년 01 월 29 일)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG 473 (1997) 'In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test'

시 험 의뢰자 경희대학교
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호, 130-701
02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX)
의뢰책임자: 정 세 영

시 험 기 관 ㈜켄온 비임상연구소
경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826
경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270
031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)
운영책임자: 김 갑 호

시 험 일 정	2014 년 05 월 26 일	시험계획서승인(시험개시일)
	2014 년 05 월 30 일	세포파종(실험개시일)
	2014 년 06 월 02 일	시험물질 처리
	2014 년 06 월 03 일	염색체 검체 제작
	2014 년 06 월 20 일	판독완료일(실험종료일)
	2014 년 07 월 01 일	최종보고서(안) 제출
	2014 년 10 월 23 일	최종보고서 제출(시험종료일)

주요시험관계자	시험물질 조제/보관:	김 지 훈	자료보관:	정 혜 정
	통계분석:	이 민 행	시험담당자:	신 건 국

요 약

시험물질 Oyster enzyme hydrolysate의 유전독성 평가를 위하여 배양 Chinese hamster lung (CHL) 세포를 이용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에 염색체이상시험을 수행하였다. 대사활성계로는 Aroclor-1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보효소(cofactor)를 첨가한 것을 사용하였다.

시험물질은 배양액에 현탁하여 처리하였다. 최고농도는 상대세포수(Relative Cell Count, RCC)를 세포독성의 지표로 하여 결정하였다.

음성(부형제)대조군 및 양성대조군을 포함하여 다음 표와 같이 농도군을 설정하였으며, 농도군당 2 개의 플라스크를 사용하였다.

Treatment series	Metabolic activation	Treatment time - recovery time (hrs)	Dose of test article (µg/mL)	Positive control and dose (µg/mL)
1	+	6-18	0, 1250, 2500, 5000	B[a]P 20
2	-	6-18	0, 1250, 2500, 5000	EMS 800
3	-	24-0	0, 1250, 2500, 5000	EMS 600

활발히 증식 중인 세포를 분리하여, 배양면적 25 cm²의 플라스크에 6 x 10⁴ 세포를 5 mL의 배양액에 파종하여 약 3 일간 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 처리개시로부터 24 시간 후에 염색체 검체를 제작하여, 플라스크당 100 개 (농도군당 200 개)의 중기상으로부터 염색체이상을 계수하였다. 결과는 100 중기상당 관찰되는 구조적(혹은 수적) 이상을 가진 중기상의 평균으로 나타내었다.

염색체 이상을 계수한 결과, 시험물질 처리군에서 구조적인 염색체이상을 가진 중기상의 출현빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았으며, 수적이상을 가진 중기상의 빈도에서도 통계학적으로 유의한 증가는 없었다.

한편, Benzo[a]pyrene 혹은 Ethylmethanesulfonate를 처리한 모든 양성대조군에서는 확실한 양성 결과를 얻었다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate는 본 시험에 사용한 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

시험개요

시 험 제 목 Oyster enzyme hydrolysate의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험

시 험 목 적 Oyster enzyme hydrolysate의 생체내 염색체이상의 유발 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 ICR 마우스의 골수세포에서의 소핵 유발성을 지표로 하여 평가하기 위하여 실시하였다.

시 험 지 침 의약품등의독성시험기준 (제2014-6호, MFDS, 2014 년 01 월 29 일)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG 474 (1997) 'Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test'

시 험 의 령 자 경희대학교
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호, 130-701
02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX)
의뢰책임자: 정 세 영

시 험 기 관 ㈜켄온 비임상연구소
경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826
경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270
031-329-9927 (TEL), 031-329-9901 (FAX)
운영책임자: 김 감 호

시 험 일 정	2014 년 05 월 28 일	시험계획서 승인(시험개시일)
	2014 년 06 월 03 일	동물입수(실험개시일)
	2014 년 06 월 10 일	투여개시
	2014 년 06 월 11 일	투여종료
	2014 년 06 월 12 일	검체제작
	2014 년 06 월 23 일	판독완료(실험종료일)
	2014 년 07 월 10 일	최종보고서(안) 제출
	2014 년 10 월 23 일	최종보고서 제출(시험종료일)

요약

본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate의 생체내 염색체이상의 유발 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 ICR 마우스의 골수세포에서 소핵 유발성을 지표로 하여 평가하기 위하여 실시하였다.

시험물질은 멸균주사용수에 현탁하여 투여하였다. 약 8 주령의 수컷 ICR 마우스(군당 6 마리)에 부형제(0), 시험물질 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day의 용량을 1 일 1 회 연속 2 일간 경구투여하였다.

부형제투여군을 음성대조군으로 하였으며, 양성대조군에는 70 mg/kg의 Cyclophosphamide monohydrate 를 1 회 복강투여 하였다. 최종 투여로부터 약 24 시간 후에 모든 동물을 부검, 대퇴골에서 골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였다.

소핵의 평가를 위하여 개체 당 2000 개의 다염성적혈구 중 소핵을 가진 다염성적혈구의 수를 계수한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 없었다.

세포독성은 PCE:RBC 비율을 산출하여 평가하였다. 개체당 500 개의 총적혈구로부터 세포독성을 평가한 결과, 이 비율은 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 없었다.

양성대조군에서는 분명한 양성의 결과를 얻었다.

이상의 결과, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate는 본 시험조건 하에서 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

바. 결론

- 굴 가수분해물은 굴소재를 식용 효소를 통해 가수분해한 산물이기 때문에 식용소재로 분류되어 원칙적으로 독성시험자료는 면제이나, 글로벌로 진출할 시 독성시험자료가 요구되어 질수도 있으므로 공인기관에 의뢰하여 독성자료를 확보하였다.
- GLP기관인 (주)캠온에 의뢰하여 단회투여독성 및 반복투여독성시험, 유전독성시험을 완료함
- 굴 가수분해물은 단회투여독성 및 반복투여독성시험 결과 최대 5000 mg/kg의 용량까지 독성이 나타나지 않아 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ADL)은 암수 모두 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되었다.
- 복귀돌연변이시험 결과 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 4 균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주(WP2 uvrA)를 사용하여 최대 5000 μ g/plate로 첨가하였을 때 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 확인되었다.
- 염색체이상시험 결과 최대 5000 μ g/ml의 농도까지 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 확인되었다.
- 소핵시험 결과 최대용량 5000mg/kg의 용량까지 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 확인되었다.

6. 인체적용 시험용 시제품 생산을 위한 제형연구

6.1 건강기능식품으로서 굴 가수분해물의 용해도와 유효활성

가. 실험방법

(1) 용해도의 측정

가수분해물의 용해도는 Wang et al (2010)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 굴 효소가 가수분해물(0.5 g)을 pH 범위 2-9, 이온강도 0-0.5 범위로 조절한 10 mL의 증류수에 분산시켰다. 혼합물을 잘 저어준 후 원심분리(3000xg)하여 얻은 상층액의 단백질 농도는 Lowry et al.(1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin으로 작성한 표준곡선에 따라 측정하였다. 한편 효소 가수분해물의 총 단백질 함량은 Kjeldahl법(AOAC, 2006)에 따라 측정하였으며, 가수분해물의 용해도는 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{용해도}(\%) = \text{상층액 단백질 농도} / \text{시료 중 총단백질 농도} \times 100$$

가수분해물 중 친유성 물질의 가용화 혹은 분산을 위해 가수분해물에 대하여 0.3-4.0% (w/w)의 lecithin을 가하여 용해도를 측정하였으며, co-solvent가 용해도 미치는 영향을 조사하기 위해 가수분해물에 대하여 0.0001-1% (w/w)의 polyethylene glycol 8000과 polyvinylpyrrolidone 10000을 첨가하여 용해도를 측정하였다.

(2) 친유성(Lipophilicity)의 측정

친유성은 n-octanol과 물 사이에 효소가수분해물 단백질 함량의 분배 계수를 shake-flask 법(Chambi et al., 2013)으로 측정하였다. 단백질 함량은 Lowry et al. 법 (1951)으로 측정하였으며, 친유성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{LogPow} = \log (\text{n-octanol에서 단백질 함량} / \text{물에서 단백질 함량})$$

(3) 가수분해물 염의 형성

효소 가수분해물(0.5 g)을 80 mL의 증류수에 현탁시킨 후, 호모게나이저로 8000 rpm에서 1분 동안 균질하였다. 균질물에 0.1 M의 Ca(OH)₂, NaOH 혹은 NaHCO₃을 첨가하여 pH 8.0으로 조정한 후 증류수로 100 mL되게 정용하였다. pH 8.0으로 조정한 용액의 일부를 취하여 100°C의 끓는 물에서 1 시간 동안 가열한 후 냉각한 용액을 원심분리(10,000 rpm, 10 분)하여 응집물을 제거한 용액을 용해도 측정에 사용하였다

(4) 유효특성의 측정

유효특성으로서 유효활성 지표(EAI)와 유효안정성 지표(ESI)는 Choi et al.의 방법 (2009)

에 따라 측정하였다. 효소 가수분해물 분말(125 mg)을 0.6 M NaCl을 포함하는 20 M sodium phosphat (pH 7.0)용액에 녹여 25 mL로 정용하였다. 25 mL의 가수분해물 용액에 6.7 mL의 정제 옥수수 기름을 첨가하여 호모게나이저(M 133/1281-0, Biospec Products Inc.)fh 8000 rpm에서 15초 동안 균질화하였다. 균질화된 유화물 17 uL를 0.1%(w/v) SDS 용액으로 희석하여 500 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. EAI는 다음의 식으로 계산하였다.

$$EAI(m^2/g) = 2 \times 2.303 \times A_{500} / \Phi \times c \times L$$

여기서 A500은 500 nm에서 흡광도이며, Φ 는 기름상의 부피 분획, c는 유화가 일어나기 전 수용성 용액에서 가수분해물의 농도, L은 측정 큐벳의 빛의 통과 길이이다. ESI는 유화물을 매스실린더에 넣어 저온고(4-7°C)에서 저장하는 동안 기름상과 물상으로 분리되는 부피를 측정하였으며 전체 유화물에 비교한 크림 상의 % 변화로 표시하였다.

나. 실험 결과

(1) 용해도에 미치는 pH와 이온강도의 영향

굴 효소 가수분해물 분말은 pH 3-4의 범위에서 가장 낮은 용해도 값인 32%이었다. 용해도는 pH 2에서 다소 증가하였고 pH 7.0까지 pH 증가와 더불어 용해도는 증가하는 경향을 보였다. 굴 가수분해물의 용해도는 NaCl의 농도가 증가함에 따라 0.3 M NaCl 농도까지 다소 감소하였으나, 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(그림 45).

화합물이 완전히 흡수되기 위해서는 최소 52 $\mu\text{g/mL}$ 의 용해도를 가질 필요가 있으며, 의약 화학의 용해도에 따른 화합물의 분류에서 >60 $\mu\text{g/mL}$ 를 고용해도로 분류하였다(Lipinski, 2000). Lipinski의 보고와 비교하면, 굴 가수분해물의 용해도는 pH 2.0-9.0의 범위에서 32.7-45.0 mg/mL의 범위였고, 이온강도 0.05-0.5의 범위에서 용해도가 37.9-40.8 mg/mL의 범위인 것에 미루어 높은 용해도 화합물로 분류될 수 있다.

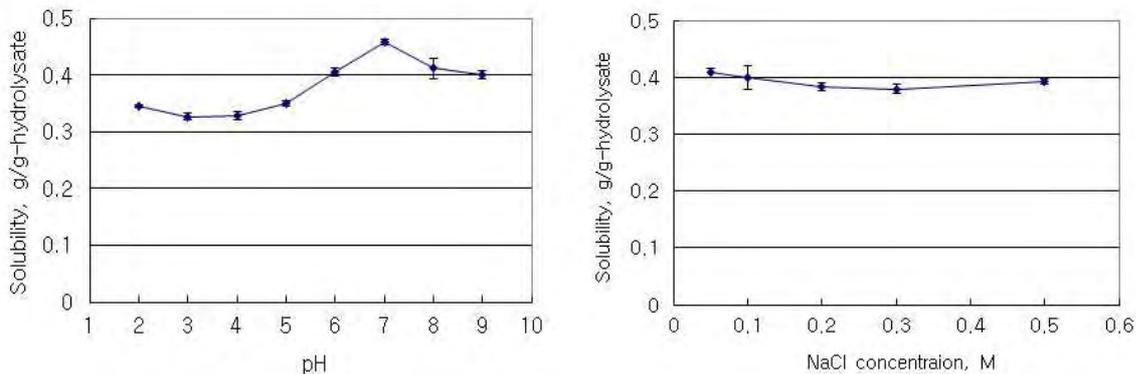


그림 45. Effect of pH (a) and ionic strength (b) on the solubility of the oyster hydrolysate.

(2) 용해도에 미치는 co-solvent의 영향

Co-solvent는 물과 효과적으로 섞을 수 있는 유기화합물로서 수용성 매질에서 용해도를 증가시키거나 감소시키고 비극성 용질을 가용화할 수 있는 가장 강력한 수단이다(Yalkowsky, 1999). 10^{-4} –1.0%의 PEG8000과 PVP10000을 포함하고 있는 증류수에서 굴 가수분해물의 용해도는 각각 25.0–26.1%와 25.3–26.6%로서 농도에 따른 유의적 차이를 보이지 않았다 ($p < 0.05$). 이 같은 용해도 값은 물에서의 pH 7.0의 수용성 매질에서의 용해도 값 45.8%에 비하여 54.6% 수준임을 확인하였다(그림 46). 이 같은 결과는 co-solvent가 굴 가수분해분말의 용해도 증가에 기여하기 보다는 감소에 기여한 것으로 확인되었다. Co-solvent는 OH, SH, NH 혹은 NH_2 같은 수소결합 공여체 기들과 =N-, =O, =S, -NH-, -O-, -S- 혹은 -N< 수용체 기들을 가지고 있어서 이들 기들이 물과 강력하게 상호작용하고 상호간의 썩힘 혹은 적어도 높은 수용성 용해도를 제공한다. 따라서 굴 가수분해물 분말에 있는 비가용성 물질의 수용화에는 기여하지 않는 것으로 추정하였다.

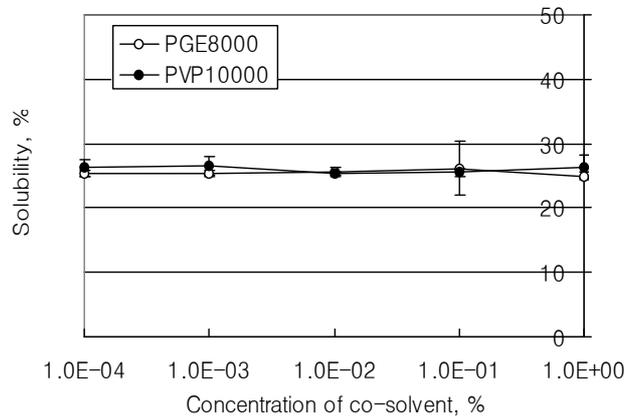


그림 46. Effect of co-solvent on the solubility of oyster hydrolysate powder

(3) 용해도에 미치는 표면활성제의 영향

양이온 표면활성제로 레시틴과 pluronic polysorbate로서 Tween 80을 사용하여 굴 가수분해물에 대한 첨가비율에 따라 용해도 변화를 측정된 결과, 레시틴은 0.15% 이상, Tween 80은 0.32%의 이상의 농도에서 용해도가 증가하는 경향을 보였으며, 각각 0.92%의 농도에서 용해도는 각각 약 24.6%와 11.7%가 증가하였다(그림 47). 이 같은 결과는 표면활성제가 가수분해물의 극성 및 비극성 아미노산과 반응하여 재배열함으로써 물에서 비극성 분자의 용매화에 기여하기 때문인 것으로 추정된다. 활성제 분자는 양쪽성물질로서 극성과 비극성의 두 가지 구분되는 영역으로 특징지을 수 있다. 분자의 극성과 비극성 부분의 분리는 다른 극성을 상사 사이의 계면에서 표면활성제가 축적하고 배향하는 경향의 원인이다. 계면에서의 이런 능력은 macroscopic 계면에 제한되지 않고 유기분자와 물 사이에 microscopical 계면으로 끌어당기고 배향된다. 이런 능력이 수용성 매질에서 유기 화합물들의 표면활성적 용매화의 원인이다 (Yalkowsky, 1999).

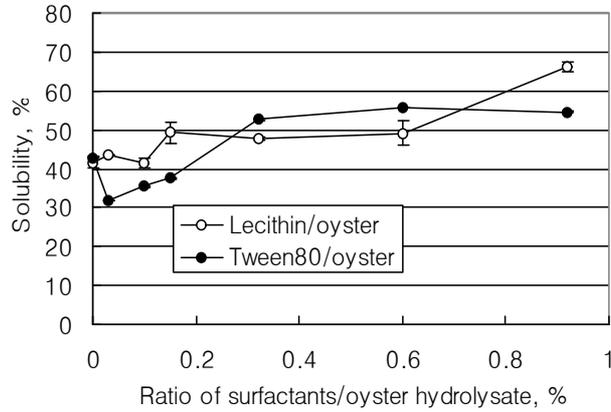


그림 47. Effect of lecithin and Tween80 on the solubility of oyster hydrolysate powder.

(4) 용해도에 미치는 금속 이온의 영향

염에 대한 counter이온은 약물과 다른 pKa를 가져야 하고, 인간에 사용할 경우 FDA가 승인한 counter이온을 사용해야 한다. 시판 약물들에 사용하는 counter 이온들의 약 70%가 음이온이고 30%가 양이온이다. 가장 흔히 사용하는 음이온은 Cl이며, 양이온은 Na⁺와 Ca²⁺이다(Kerns and Di, 2008). 용해도에 미치는 금속이온의 영향을 조사하기 위해 casein에 Ca 혹은 Na 염을 결합시키는 방법에 따라 굴 가수분해물에 Ca(OH)₂, NaOH 혹은 NaHCO₃를 반응시켜 각각 Ca와 Na염 형태가 용해도에 미치는 영향을 측정한 결과, Ca와 Na 염의 형태는 용해도 증가에 기여하지 못하였으며, Ca염을 오히려 감소하는 것으로 나타났다(그림 48). 이 같은 결과는 분자량이 작은 펩타이드 단위의 물질에는 염의 형태가 용해도에 영향을 미치지 않음을 제시한다. 세 가지의 평행이 유리 염기 혹은 산과 이들의 해당 염 사이의 상관을 지배한다. 첫째는 고체 상태인 염과 용액에서의 평행(K_{sp}, 용해도 제품 정수), 둘째는 고체 상태에서 유리 염기 혹은 산과 용액에서 유리 염기 혹은 산 사이의 평행(C_s, 염 혹은 산의 고유 용해도), 셋째는 용액 중 유리 염기 혹은 산과 용액 중 해당하는 염 사이의 평행이다(K_a, 이온화 정수)(Kerns and Di, 2008).

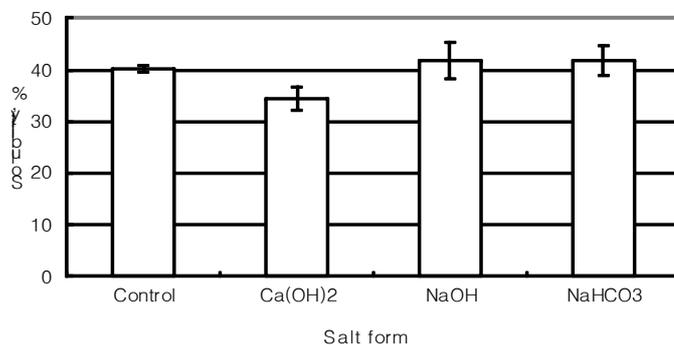


그림 48. Effect of salt form on the solubility of oyster hydrolysate powder.

(5) 유화능 및 유화안정성에 미치는 pH의 영향

위장, 십이지장과 공장 및 회장의 평균 pH값은 각각 1.4-2.1, 4.4-6.6, 6.8-8.0으로서 저분자성 펩타이드 물질은 공장에서 거의 흡수되기 때문에(Kerns and Di, 2008), 유화능과 유화안정성은 pH 2, 6 및 7에서 실시하였다. 유화활성 지표는 pH가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으나, shinla2 배치는 pH 7에서의 값이 pH 6.0에 비하여 다소 낮았다(그림 49). 한편 유화안정성은 유화 활성 지표와 반대로 pH 2에서 가장 높은 안정성을 보인 반면, pH 6과 7에서 현저히 감소하였다(그림 50). 가수분해물의 유화활성 지표는 용해도와 상관을 갖지 않으며, 가수분해에 사용한 단백질 분해효소의 형태와 가수분해도에 의존한다(Choi et al., 2009). 낮은 유화안정성 지표는 가수분해에 의해 생성된 펩타이드가 유화물에 높은 안정성을 부여하기에 충분할 정도의 양쪽성 하전을 갖지 않기 때문이다(Chobert et al., 1988). Endo형 단백질 분해소에 의한 가수분해물은 가수분해도 10-15%에서 가장 안정한 유화물을 형성하며 유화활성 지표와 안정성은 가수분해도가 증가함에 따라 감소한다(Kristinsson and Rasco, 2000). 가수분해물은 가수분해도 증가와 더불어 표면 소수성이 감소하기 때문으로 추정된다.

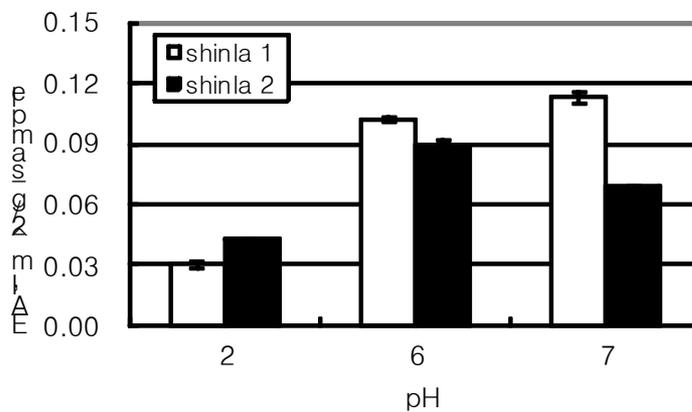


그림 49. Emulsion activity index of oyster hydrolysate at pH 2, 6, and 7

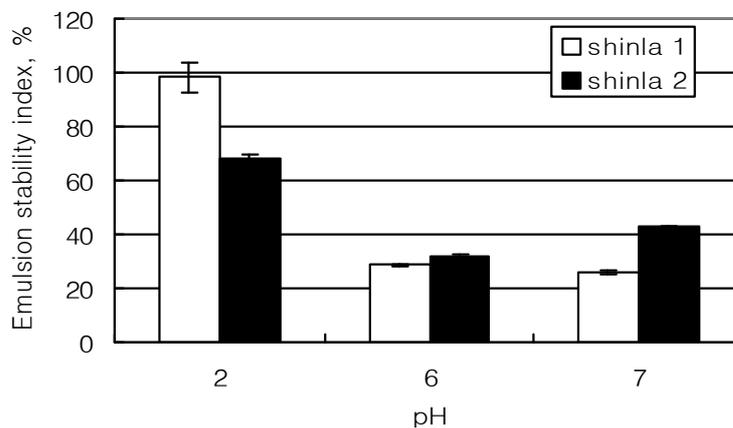


그림 50. Emulsion stability index of oyster hydrolysate at pH 2, 6, and 7.

6.2 제품화 연구

가. 제형 선정 및 마스킹 연구

(1) 제형 선정

(가) 정제

① 기존 캡슐과 같은 처방으로 진행하였다.

성분	1T(mg)	200T(g)	분율
굴 가수분해물 분말	125	25	80.65
미결정셀룰로오스	25	5	16.13
카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	2.5	0.5	1.61
스테아르산 마그네슘	2.5	0.5	1.61
총 량	155	31	100

㉞ 흐름성이 좋지 않아서 타정 시 질량편차가 발생할 것으로 생각되어 주성분 함습도 측정 후 수분함량이 많으면 건조 후 사용하거나 직타 부형체의 분량을 증가(전체 총량 증가)시키는 방법, 또는 주성분의 양을 줄여서 1회 2정 섭취하는 방법 등을 고려하였다.

② 1차 타정안

성분	1T(mg)	200T(g)	분율
굴 가수분해물 분말	125	25	69.44
미결정셀룰로오스	48	9.6	26.67
카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	3.5	0.7	1.94
스테아르산 마그네슘	3.5	0.7	1.94
총 량	180	36	100

㉞ 주성분 수분측정 결과 건조 전 4.16%, 60℃로 120분 건조 후 2.59%, 70℃로 90분 건조 후 1.56%, 70℃로 30분을 추가 건조 시 1.56%로 30분간 더 건조시켰지만 0.03%밖에 줄지 않았다.

㉞ 미결정셀룰로오스 양을 증가시켜 180mg으로 총량을 증가하였다.

→ 안식각 측정 결과 흐름성이 낮았다.



③ 2차 타정안

성분	1T(mg)	200T(g)	분율
굴 가수분해물 분말	125	25	60.98
미결정셀룰로오스	73	14.6	35.61
카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	3.5	0.7	1.71
스테아르산 마그네슘	3.5	0.7	1.71
총 량	205	41	100

- ㉠ 미결정셀룰로오스 양을 증가시켜 205mg으로 총량을 증가하였다.
 → 안식각 측정 결과 흐름성이 낮았다. 단, 1차타정안 보다는 완만하였다.



④ 3차 타정안

성분	1T(mg)	200T(g)	분율
굴 가수분해물 분말	125	25	52.08
미결정셀룰로오스	73	21.6	45.0
카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	3.5	0.7	1.46
스테아르산 마그네슘	3.5	0.7	1.46
총 량	240	48	100

- ㉔ 미결정셀룰로오스 양을 증가시켜 240mg로 총량을 증가하였다.
→ 안식각 측정 결과 2차안과 크게 차이가 없었다.



㉕ 4차 타정안

성분	1T(mg)	200T(g)	분율
굴 가수분해물 분말	125	25	29.76
유당수화물	80	16	19.05
미결정셀룰로오스	180	36	42.86
카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	27	5.4	6.43
스테아르산 마그네슘	8	1.6	1.90
총 량	420	84	100

- ㉔ 유당수화물을 추가하고 미결정셀룰로오스의 양을 증가시켜 총량 420mg
→ 주성분의 분율을 30%아래로 만들.



- ☞ 안식각 측정 결과 흐름성은 2, 3차안과 비슷하였다.

㉕ 4차 타정안 타정 (2014.03.19)



㉓ 타정조건 및 결과

타정조건	기 준	결 과
filling depth	-	12.40
main thickness	-	3.70
turret speed	-	12
cam	-	14
punch	-	무지편치 중
타정시간	-	15:30 ~ 16:30

㉔ 공정관리 및 결과

공정관리	기준	결과
기준질량	420 mg	-
개별질량	399 ~ 441	401.1~411.8
평균질량	408 ~ 432	405.9
경도	-	5.9 kp
두께	-	5.61 mm
마손도	-	0.234
붕해시험	-	1'15''~2'20''

㉕ 정제 formulation 연구 결과

200T의 소량 타정이라 hopper를 사용하지 않고 feeder에 바로 주입하여 타정하였고 타정성 확인에 비중을 두었고 질량 편차는 고려하지 않았다.

타정 조건에 있어 기준은 없으나 타정 속도와 시간, 정제의 두께 등의 항목에서 실제 생산에 적합하며 자사 공정관리 기준에도 적합하여 실제 판매를 위한 생산 시 가능한 formulation을 확립하였다.

(나) 캡슐

① 성분 및 원료량

㉠ 임상시험용 시험약 제조

성분	기준량(mg) 1 cap	사용량(g) 20,000cap	분량 (%)
글 가수분해물	250	5,000	78.13
미결정셀룰로오스	60	1,200	18.75
카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	5	100	1.56
스테아르산 마그네슘	5	100	1.56
총량	320	6,400	100.00

㉡ 임상시험용 위약 제조

성분	기준량(mg) 1 cap	사용량(g) 20,000cap	분량 (%)
옥수수전분	250	5,000	78.13
미결정셀룰로오스	60	1,200	18.75
카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	5	100	1.56
스테아르산 마그네슘	5	100	1.56
총량	320	6,400	100.00

㉢ 임상시험용 시험약 및 위약 기준 질량(캡슐 평균질량 79mg)

기준	320mg
평균질량	310.5 ~ 329.5 mg
개개질량	304 ~ 336 mg



(시험약)



(위 약)



(포장 내부 모습)



(포장 외부 모습)

② 캡슐 생산 결과

캡슐제의 경우 함께 추가한 부형제와의 흡착을 통해 굴 특유의 향이 대폭 감소하여 매스킹되는 효과가 있었으며 1차 시험에서 컬러가 하늘색 계열의 캡슐을 사용하여 시각적으로 부정적인 이미지라는 의견을 수렴하여 추가 인체적용시험용 캡슐은 갈색의 컬러를 적용하여 복용 대상자들에게 거부감을 줄일 수 있도록 시제품의 문제점을 보완하였다.

(다) 액제

① 굴 펙타이드 분말이 물에 잘 녹는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다.

확인 방법으로 굴 펙타이드 분말 1g을 100ml 비커에 넣고 물 100g(100ml)을 함께 넣어 녹을 때까지 충분히 교반(500rpm, 60분) 시킨 후 네슬러 관에 넣고 관찰하였다.



㉠ 11:35분 네슬러 관에 넣은 후

㉡ 11:55분 20분 경과

㉢ 11:55분 20분 경과

㉣ 13:35분 120분 경과

㉤ 13:35분 120분 경과

※ 처음 네슬러 관에 넣고 약 5분 후 침적물이 눈에 보이기 시작했으며, 120분 후 물의 색깔은 맑아졌고 침적물의 양이 증가됨을 확인되었다.

② 새로 동결건조 된 굴 펩타이드 분말로 용해도 시험을 진행하였다.



(24일 15시)

----->
24시간 경과 후



(25일 15시)

③ 결과

24시간과 48시간 관찰 결과 침전물은 생기지 않았다. 따라서 동결건조한 굴 펩타이드는 1g 이 100ml의 물에 모두 녹았고 액제로 만들기에 적합한 것으로 확인하였다.

(라) 현탁액

연구 1안(참고 자료, 1, 2, 3)

① 원료선정

원료	목적	in 100ml(단위 : g)	비고
굴 펩타이드 분말	주성분	0.25	
HPC-L	점증제	2	
설탕	감미제	7	
오렌지 향	착향제	0.1	

-	방부제		
-	소포제		

원료는 35mesh 체과 후 작업진행

② 제조공정

- ㉠ 물 50ml + HPC-L 2g → 교반기 800rpm, 50분 → homogenizer 15min
- ㉡ 글 펩타이드 분말 250mg + 물 50ml → 교반기 800rpm, 50분 → homogenizer 3min
- ㉢ ㉠+㉡ → 교반기 600rpm, 60분 → homogenizer 3min
- ㉣ ㉢ + 설탕 7g(7%) → 교반기 600rpm, 30분
- ㉤ ㉣ + 오렌지 향 0.1g(0.1%) → 교반기 600rpm, 60분 → homogenizer 3min
- ㉥ 1시간 방치 후 거품이 사라지면 공정완료(소포제 넣지 않음)



(14:48 기포가 많음)



(14:53 5분 경과)



(15:27 40분 경과)

☞ 기포는 40분 후 확인했을 때 사라지고 없었다. 목격시점이 40분 후라 그 이전에 사라졌을 수도 있으며 극소량의 진갈색 가루가 바닥에 깔렸다.(체과 시 덩어리부분)



(140327 16:40)

(140331 17:20)

☞ 4일이 지난 후 침강되었다. 100ml에 굴 펩타이드 250mg을 첨가하였는데 다음 시험에선 100ml에 굴 펩타이드 1g을 첨가하는 시험 계획을 작성하였다.

연구 2안

① 원료선정

원료	목적	in 100ml(단위 : g)	비고
굴 펩타이드 분말	주성분	1	
HPC-L	집중제	2	
설탕	감미제	7	
라임 향	착향제	0.1	
-	방부제	-	
-	소포제	-	
원료는 50mesh 체과 후 작업진행			

② 제조공정

- ㉠ 물 50ml + HPC-L 2g → 교반기 800rpm, 60분 → homogenizer 10min
- ㉡ 굴 펩타이드 분말 1.0g + 물 50ml → 교반기 800rpm, 60분 → homogenizer 10min
- ㉢ ㉠ + ㉡ → 교반기 800rpm, 60분 → homogenizer 10min
- ㉣ ㉢ + 설탕 7g(7%) → 교반기 800rpm, 60분
- ㉤ ㉣ + 라임 향 0.1g(0.1%) → 교반기 800rpm, 60분 → homogenizer 10min
- ㉥ 1시간 방치 후 거품이 사라지면 공정완료(소포제 넣지 않음)

③ 현탁액 연구 1안과의 차이점

㉑ 굴 펩타이드 분말의 분쇄

→ 볼 밀을 이용하여 3시간 동안 분쇄하였다.

㉒ 교반시간 및 호모제나이저 시간 동일화

→ 교반시간 및 속도 : 800RPM, 60분

→ homogenizer: 8000RPM, 10분

㉓ 용액의 온도

→ 초기 1안은 찬물(정수기), 2안은 미지근한 물(찬물 4 : 뜨거운 물 1)

㉔ 향료의 변경

→ 오렌지 향에서 라임향으로 변경하였다.



(15시 25분)

(15시 45분)

(16시 05분)

(18시 00분)

(21시 00분)

☞ 시간이 지날수록 침강이 일어남을 알 수 있었다.



(22시 00분)

----->
흔들어서 섞음



(09시 15분)

(15시 55분)

☞ 침강이 확연히 들어남을 확인

일정시간이 지난 후 다시 침강됨을 확인

④ 현탁액 1차 연구 결과

주성분인 굴 펩타이드 분말을 분쇄한 후에 연구1안과 동일 처방으로 실험을 진행 하였으나 굴펩타이드의 침강이 일어나는 현상은 동일하게 나타났다. 다음 연구 3안에서는 점증제의 점도(양증가) 변경 혹은 점증제를 변경하는 방향으로 연구방향 설정하여 추진하였다.

연구 3안

① 원료선정

원료	목적	in 100ml(단위 : g)	비고
굴가수분해물 분말	주성분	1	새로 입고 됨
HPC-L	점증제	2	

설탕	감미제	7	
	착향제	-	
-	방부제	-	
-	소포제	-	
원료는 50mesh 체과 후 작업진행			

② 제조공정

- ㉠ 물 50ml + HPC-L 2g → 교반기 800rpm, 60분
- ㉡ 굴 펄타이드 분말 1.0g + 물 50ml → 교반기 800rpm, 60분
- ㉢ ㉠ + ㉡ → 교반기 800rpm, 60분
- ㉣ ㉢ + 설탕 7g(7%) → 교반기 800rpm, 60분
- ㉤ 1시간 방치 후 거품이 사라지면 공정완료(소포제 넣지 않음)

③ 현탁액 연구 2안과의 차이점

50%의 용해도를 갖는 새로운 굴 펄타이드 분말을 가지고 기존 연구안에서 호모게나이저로 분산시키는 과정을 제외하고 동일하게 시험 진행하였다.



④ 현탁액 연구 결과

새로 들어온 원료를 가지고 진행을 하였으나 2차안과 별 차이점이 없었다. 이번 연구에서는 호모게나이저로 분산을 시키지 않아서 그럴 수도 있지만, 침강된 굴 펄타이드의 두께가 용해도에 크게 영향이 없는 것으로 확인하였다.

본 연구 결과 굴펄타이드를 활용하여 현탁액으로 개발 시 다양한 조건과 여러 첨가물을 적용하여 확인하였으나 음료제조를 위한 용해도는 크게 향상 되지 않음을 확인하였다.

(2) 마스킹 연구

귤펩타이드의 제품개발에 있어 가장 문제가 되는 것이 귤 특유의 비린향이다. 캡슐제제의 경우 귤 특유의 향이 있으나 거부감을 느낄 정도는 아니지만 정제와 액상제의 제품을 개발할 경우 귤 특유의 비린향이 제품개발에 있어 큰 문제점이 될 것으로 예상되어 마스킹 연구를 진행하였다.

(가) 향료의 종류



- ① 라임향
- ② 오렌지향
- ③ 페퍼민트향
- ④ 딸기향
- ⑤ 체리향
- ⑥ 레몬향

☞ 대표적으로 많이 쓰는 향 6가지를 선정하여 마스킹 연구를 진행하였다.

(나) 연구 방향 설계 및 진행

- ① 물과 향료와 귤 펩타이드를 일정한 비율로 섞어 선호도를 조사하였다.
- ② 물 10g에 귤 펩타이드 100mg을 넣고 향료는 귤 펩타이드의 10%인 10mg을 첨가하여 30분간 교반 하였다.
- ③ 만들어진 6개의 샘플은 블라인드로 하였다.
- ④ 선호도는 다음과 같다.

체리향, 페퍼민트향, 레몬향, 딸기향, 라임향, 오렌지향 순으로 결과가 나왔지만 체리향과 페퍼민트향의 마스킹 효과는 생각보다 적었다. 그리고 그 외의 향들은 오히려 귤 펩타이드 향과 섞여 더 역한 향을 풍겼다.

(다) 마스킹 연구 결과

대표적으로 사용하는 6가지 향은 귤의 비린 향을 충분히 마스킹하지 못했고 향에 따라서는 오히려 더 역한 향을 풍겨 대표적으로 사용하는 6개 향료는 액상타입의 제품개발에 적합하지 않은 것을 확인하였다. 따라서 귤소재의 기능성식품의 제형으로는 상대적으로 귤의 이취를 마스킹할 수 있는 캡슐제가 가장 적당할 것으로 판단된다.

나. 결론

- 굴 가수분해물의 시제품생산을 위한 제형으로서 정제, 캡슐제, 액제 등이 고려되어 다양한 formulation에 따라 제조하였다.
- 정제의 경우 미결정셀룰로오스를 부형제의 주성분으로 포함하는 조성으로 결정하고 소량의 타정이라 hopper대신 feeder에 바로 주입하여 타정하였다.
- 캡슐제의 경우도 미결정셀룰로오스, 스테아르산 마그네슘 등을 포함하는 부형제와 원료를 배합하여 충전하는 공정으로 제조하였다.
- 액제의 경우 1 g의 원료가 100 ml의 물에 완전히 용해되어 제형개발에 문제가 없었다.
- 굴 특유의 비린향이 제품에 나타나는 것을 감소시키기 위해 다양한 향료를 사용하여 냄새를 마스킹하는 연구를 진행하였으나 향을 통한 마스킹은 적절하지 않은 것으로 나타나 정제나 액상제보다는 캡슐제의 제형이 가장 적절한 것으로 나타났다.
- 다양한 제형에 대한 소비자 기호도 조사 결과 시각, 미각, 후각적으로 가장 우수한 캡슐타입 최종제형으로 선정하였고 시제품인 하늘색계열의 캡슐이 시각적으로 부정적인 이미지라는 의견을 수렴하여 갈색의 컬러를 적용하였다.

6.3 굴 가수분해물의 캡슐화를 위한 liposome-in-alginate 시스템

가. 실험방법

(1) 점도 측정

Alginate 농도에 따른 점도는 spinder No H2를 장착한 선형 점도계(Brookfield DV-II+)로 25℃에서 측정하였다.

(2) 에탄올 용해 레시틴(EDL)과 liposome의 제조

대두 레시틴 15 g과 30 mL의 에탄올을 혼합하고, 50℃에서 10분 동안 가열한 후 3000xg에서 15분 동안 원심분리(Mistral 2000)하였다. 상층액은 40℃ 이하에서 회전진공증발기(R-3000, EYELA)로 건조시켜 EDL을 얻었다. Perrett et al. (1991)의 proliposome 제조법에 따라 캡슐한 YA를 포함하는 liposome을 제조하였다. 즉 에탄올 용액(99.99%, v/v) 100 L에 95 mg의 EDL과 100 μL(4 mg/mL)의 YA 용액을 첨가하여 저어주면서 혼합하였다. 혼합용액을 60℃에서 10분 동안 가열한 후, 실온까지 냉각하였다.

(3) Liposome-in-alginate의 제조

중류수에 3% (w/v) 농도가 되도록 sodium alginate를 녹이고, 4 mL의 sodium alginate 용액에 proliposome을 첨가하여 혼합하였다. 혼합물은 5.5 게이지의 스테인레스 스틸 주사바늘을 장착한 10 mL의 주사기로 10 mL의 0.5 M CaCl₂ 용액에 한 방울씩 적하하여 구형의 불용성 alginate calcium bead를 성형하였다. 성형된 alginate calcium beads는 30분동안 실온에서 가교결합 용액에 방치한 후 원심분리하여 회수하였다. 회수한 alginate calcium bead는 진공동결건조기로 진공동결건조하여 분석에 사용하였다. 종속변수인 캡슐 효율에 미치는 독립변수로서 3인자 즉, EDL(X1), CaCl₂ 용액의 농도(X2) 및 sodium alginate (X3)의 영향을 조사하기 위해 중심합성 설계로 표면반응분석을 실시하였다(표 43). 최적 조건을 얻은 후 캡슐 효율에 미치는 굴 가수분해물 농도의 영향을 측정하였다.

표 43. Uncoded and coded independent variables used in RSM design

Independent variable	Symbol	Coded levels				
		a	-1	0	1	A
Ethanol-dissolved lecithin (mg)	x1	0	0	50	100	100
CaCl ₂ (M)	x2	0.1	0.1	0.3	0.5	0.5
Sodium alginate (%)	x3	1	1	2	3	3

a=-1, A=1 for three factor central composite design. The number of runs is 20 when the center point number is 6.

(4) 색, 크기 및 형태의 측정

색은 표준백판(L*=96.83, a*=-0.36, b*=0.62)로 조정된 색차계로 측정하여 L, a, b 단위로 표시하였으며 시료 사이에 전체적인 차이를 나타내는 델타 E는 (델타L²+델타a²+델타b²)^{1/2}의 식에 따라 계산하였다. 크기는 각 시료에 대하여 무작위로 선별한 10개의 시료에 대하여 40배

울의 광학현미경 상에서 eyepiece micrometer로 측정하였다. 외부의 형태는 주사전자현미경 (SEM)으로 관측하였다. 즉 이중면 테이프를 사용하여 SEM stub에 시료를 부착하여 진공 하에서 3-5 mA gold/palladium 으로 코팅하고 15 kV에서 x 50 배율, x500 배율, x5000 배율로 관측하였다.

(5) YA 함량의 측정

YA 함량은 C18 역상 칼럼(4.5 x 150 mm, Watchers, Tokyo, Japan) 을 장착한 HPLC 시스템(Shimadzu, Kyoto, Japan)으로 측정하였다. Microfilter(0.20 μ m)로 여과한 시료용액 5 μ L를 주입하고 용매 A(0.1% TFA/water)와 용매 B(0.1% TFA/acetonitrile)로 균배 용출하였다. YA의 용출은 다음과 같은 균배조건을 사용하였다: 40분 동안 0.8-5% B용액, 1분 동안 5-95% B용액, 9분 동안 95% B용액, 15분동안 0.8% B 용액으로 조건을 구성하여 총 65분 동안 용출하였다. 이때 유속은 1.0 mL/min으로 조정하였고, 분광광도계로 측정된 YA의 최대 흡수파장 273 nm에서 검출하였다. YA함량은 같은 조건에서 용출한 표준물질 YA 로 작성한 검량곡선에 따라 정량하였다. 굴 가수분해물의 단백질 농도는 Lowry et al. (1951)법에 따라 측정하였다.

(6) 캡슐 효율

Liposome-in-alginate에 갇힌 굴 가수분해물과 YA의 함량은 수집 용액에 유리된 단백질량과 전체 단백질 량의 차이를 %로 표시하였다.

(7) *in vitro* 팽윤과 유리

YA 혹은 굴 가수분해물을 포함하는 liposome-in-alginate의 *in vitro* 팽윤과 유리를 유사 위액(SGF, pH 1.2)와 장관액(SIF, pH 6.8)에서 실시하였다. SGF는 nanopure급 탈이온수에 7 mL의 진한 염산과 2 g의 NaCl을 용해하여 제조하였으며, SIF는 26th United State Pharmacopeia (USP 26)의 방법에 따라 제조하였다. 위장의 공복 시간은 평균 2시간이기 때문에 위장의 조건을 모방하여 SGF 용액에서 2시간동안 시험하였고, 용해 매질을 SIF로 교체하여 소장의 평균 전이 시간인 약 3 시간 동안 시험하였다. 이후에는 19 시간 동안 인산완충액 (pH 7.4)에서 19시간 동안 유리시켰다. 유리 속도를 계산하기 위해 YA 및 가수분해물의 함량을 측정하였다. 여과지로 표면에 부착한 수분을 제거하고 즉시 팽윤한 alginate 갈슘 bead의 습중량을 측정하였다:

$$\text{팽윤속도 (\%)} = (W_s - W_d) / W_d \times 100$$

W_s , 팽윤한 입자들의 중량; W_d , 건조 입자들의 중량

나. 결과

(1) Alginate의 점도

Alginates의 가장 중요한 특성은 물에서 점성 용액을 형성하는 능력이다. Alginate 용액의 점도는 1.5% 이상의 농도에서 지속적으로 증가한다(그림 88).

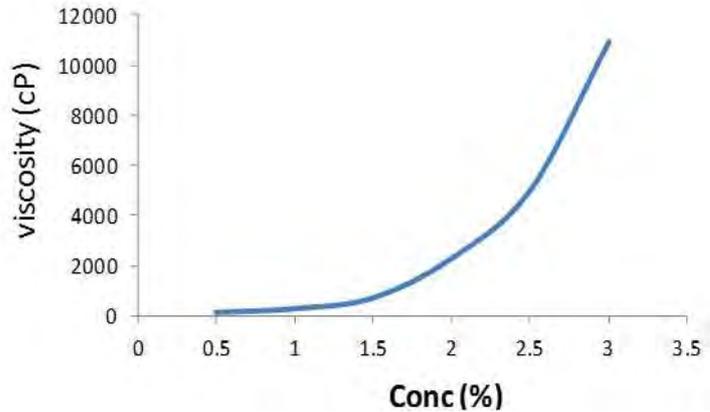


그림 88. The viscosity of sodium alginate solution with different concentration

(2) 캡슐 효율

YA의 캡슐화 효율은 33.6–74.1%의 범위였다. 모델의 독립변수 중에서 EDL과 sodium alginate는 종속변수인 효율에 대하여 99% 이상의 유의성을 나타낸 반면, CaCl₂의 농도는 유의성이 없는 것으로 나타났다(표 44). 일정한 농도의 CaCl₂와 sodium alginate 농도에서 EDK의 증가는 유의적으로 캡슐 효율을 개선하나 80% 이상의 수준에서는 최대값에 수렴하는 것으로 나타났다(표 44). 일정한 EDL과 CaCl₂의 농도에서 캡슐화는 sodium alginate의 농도 증가와 더불어 증가하였다(그림 89). EDL과 sodium alginate의 농도가 증가할수록 더 많은 YA가 갇히고 alginate bead의 구조가 더욱 견고해져 alginate bead의 다공성으로부터 누출을 방지할 수 있고 캡슐 효율을 증가시킨다. 약 75% 이상의 캡슐 효율을 달성하기 위한 최적 조건은 95.4 mg EDL, 0.5 M CaCl₂, 3% sodium alginate 이었다. 캡슐화 효율은 5–30 mg/mL의 가수분해물 농도 범위에서 유의적으로 변하지 않았으나(p<0.5), 40 mg/mL의 농도에서는 유의적으로 감소하였다(p<0.05)(표 45, 그림 90).

표 44. Experimental values of encapsulation efficiency obtained from the central composite experimental design

NO.	Pattern	EDL (mg)	CaCl ₂ (M)	SA (%)	EE (%)
1	---	0	0.10	1	33.6
2	---+	0	0.10	3	43.3
3	a00	0	0.30	2	39.8
4	--+	0	0.50	1	36.3
5	+++	0	0.50	3	51.6
6	0a0	50	0.10	2	61.2
7	00a	50	0.30	1	51.9
8	0	50	0.30	2	53.2

9	0	50	0.30	2	55.5
10	0	50	0.30	2	59.9
11	0	50	0.30	2	49.7
12	0	50	0.30	2	59.2
13	0	50	0.30	2	62.7
14	00A	50	0.30	3	67.0
15	0A0	50	0.50	2	62.2
16	+--	100	0.10	1	63.1
17	+++	100	0.10	3	69.3
18	A00	100	0.30	2	64.7
19	++-	100	0.50	1	66.5
20	+++	100	0.50	3	74.1

45. Analysis of variance of the response surface model

Term	Estimate	std Error	P value
Intercept	57.5	1.3	<.0001
lecithin(0,100)	13.3	1.2	<.0001
CaCl ₂ (0.1,0.5)	2.0	1.2	0.1287
SA(1,3)	5.4	1.2	0.0013
lecithin*CaCl ₂	-0.4	1.4	0.8027
lecithin*SA	-1.4	1.4	0.3289
CaCl ₂ *SA	0.9	1.4	0.5356
lecithin*lecithin	-6.4	2.3	0.0209
CaCl ₂ *CaCl ₂	3.1	2.3	0.2147
SA*SA	0.8	2.3	0.7281

Statistically significant at p<0.05

(3) Alginate 칼슘 비드의 특성

YA 혹은 가수분해물을 포함하는 alginate 칼슘 비드의 황색이었다. 이들 비드들의 습중량은 각각 6.3 ± 0.7 mg과 5.3 ± 0.2 mg이었고, 건조중량은 각각 0.7 ± 0.1 mg과 1.3 ± 0.2 mg 이었다. 한편 YA와 가수분해물을 포함하는 비드의 크기는 각각 1.9 ± 0.1 mm와 2.1 ± 0.1 mm 이었다. 건조 비드인 경우의 크기는 각각 1.1 ± 0.1 과 1.3 ± 0.1 mm로서 젖은 비드 크기에 58%와 62%에 해당하여 YA의 비드 크기가 가수분해물의 비드 크기에 비하여 더욱 줄어든 것은 작은 분자량의 동질성 물질과 다양한 분자량의 물질을 포함하는 다형성의 물질 차이에 기인하는 것으로 추정된다(표 46).

동결건조 후 비드의 표면은 수축하였다(그림 91a, d, g). 동결건조는 구멍의 벽을 붕괴시켜 인공의 구멍을 만든다. 형태적 구조에서 명백한 차이는 EDL의 유무에 따른 alginate 칼슘 비드에서도 관측된다. EDL을 포함하는 alginate 칼슘 비드가 EDL을 포함하지 않는 비드보다 더 스폰지 유사 구조를 가진다. EDL을 포함하지 않는 alginate 칼슘 비드에서 더 많은 표면의 갈라짐과 많은 양의 칼슘의 누출이 관측된다.(그림 91c). 이 같은 결과는 저분자 펩타이드의 캡슐화를 위해서는 EDL이 필요함을 의미한다.

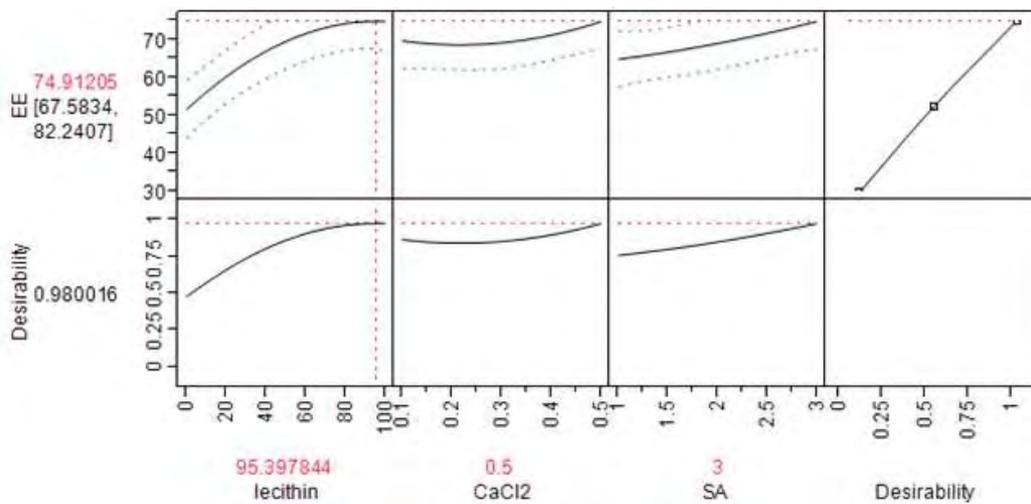


그림 89. The optimization condition by response surface method analysis

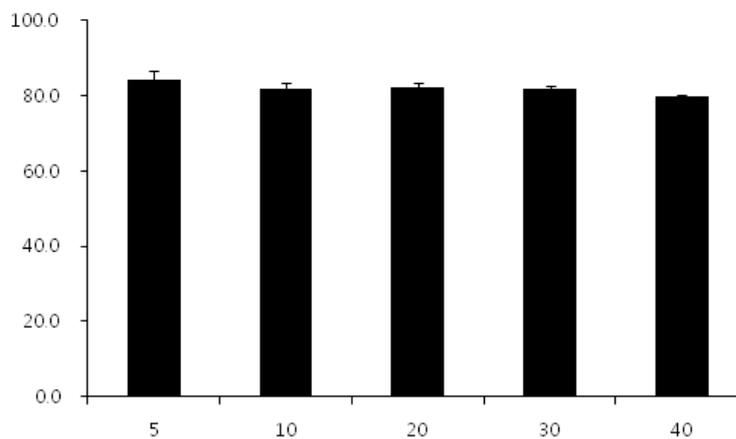


그림 90. The encapsulation efficiency with the different amount of oyster hydrolysate added

표 46. Properties of the with sodium alginate beads of YA and oyster hydrolysate

Parameters	YA	OH
weight (Wet, mg/particle)	6.3±0.7	5.3±0.2
weight (Dried, mg/particle)	0.7±0.1	1.3±0.2
Size (Wet, mm)	1.9±0.1	2.1±0.1
Size (Dried, mm)	1.1±0.1	1.3±0.1
Color		
L	49.13±0.48	54.87±0.38
a	8.33±0.25	6.05±0.17
b	26.02±0.25	29.53±0.04
ΔE	54.73±0.57	51.33±0.29

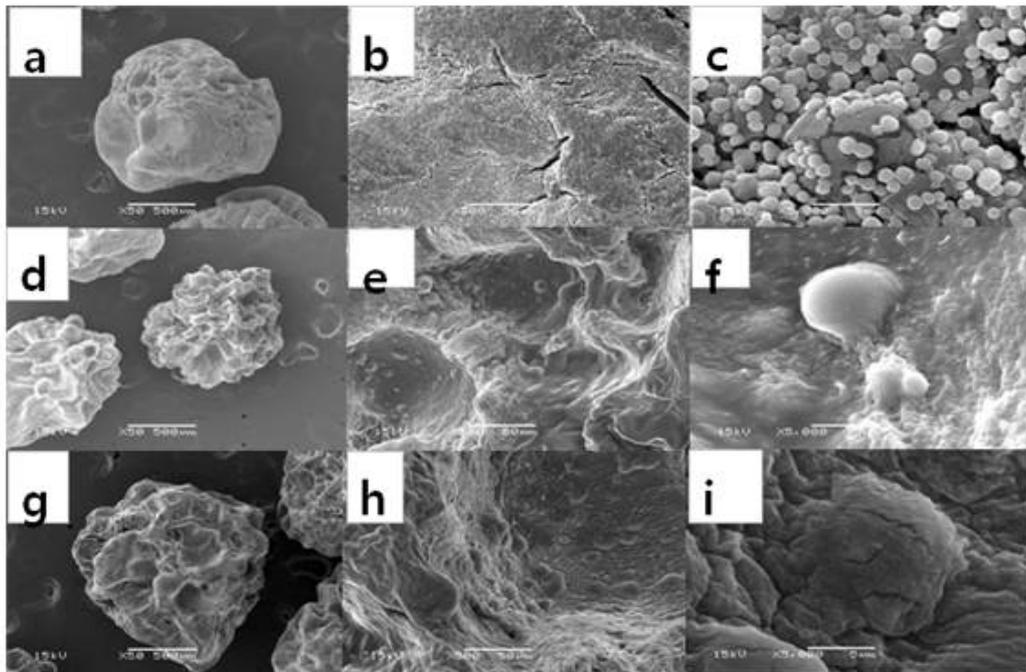


그림 91. SEM of alginate-Ca beads. 1) normal alginate-Ca beads. a, magnification ×50; b, ×500; c, ×5,000; 2) YA in the liposome-in-alginate system. d, magnification ×50; e, ×500; f, ×5,000; 3) oyster hydrolysate in the liposome-in-alginate system. g, magnification ×50; h, ×500; i, ×5,000.

(4) *in vitro* 팽윤과 유리

건조 비드의 팽윤은 주로 alginate의 친수성기들의 수화에 기인한다. 이 경우 물이 비드의 내부에 침투하여 중합체 사슬 중의 원래 구멍을 채워 팽윤 정도에 기여한다. SGF에서는 비드의 팽윤이 적어서 2시간 동안에 분해의 징후는 보이지 않았다. 비드는 SIF 조건에서 YA는 4시간, 굴 가수분해물은 5시간 후에 최대 팽윤하였으며, 5시간 항온한 후 비드는 완전히 분해되었다 (그림 92). 비드의 분해는 pH 의존적이었다. 낮은 pH에서 비드의 이온성 결합은 지속되어 비드의 매트릭스 물질은 원형으로 남는다. 중성 pH로 전이한 후 칼슘 alginate 복합체에

있는 음이온성 alginate는 OH 이온들로 치환될 수 있다. 더구나 장액에 노출되는 동안 비드는 장액의 인산 이온 때문에 쉽게 해리되어 Ca^{2+} 이온에 대하여 높은 친화성을 가진다. 높은 pH 에서 이 같은 칼슘 이온에 대한 인산의 친화성과 칼슘-인산 복합체의 용해도는 alginate의 친화성과 용해도에 비하여 높다.

2시간 위액에서 항온한 후 축적된 유리량은 YA와 가수분해물에 대하여 각각 84.6%와 48.8%였다(그림 93). 6 시간 항온 후 YA는 완전히 유리되었으나 가수분해물은 16 시간 후에 완전히 유리되었다. 이 같은 결과는 동결건조에 기인할 수 있다. YA는 분자량이 작기 때문에 동결건조하는 동안 물 분자와 더불어 alginate 비드의 표면까지 이동할 수 있다. 또한 동결건조에 의한 완전한 탈수는 비드의 틈을 유도하여 YA를 급속히 유리할 수 있다.

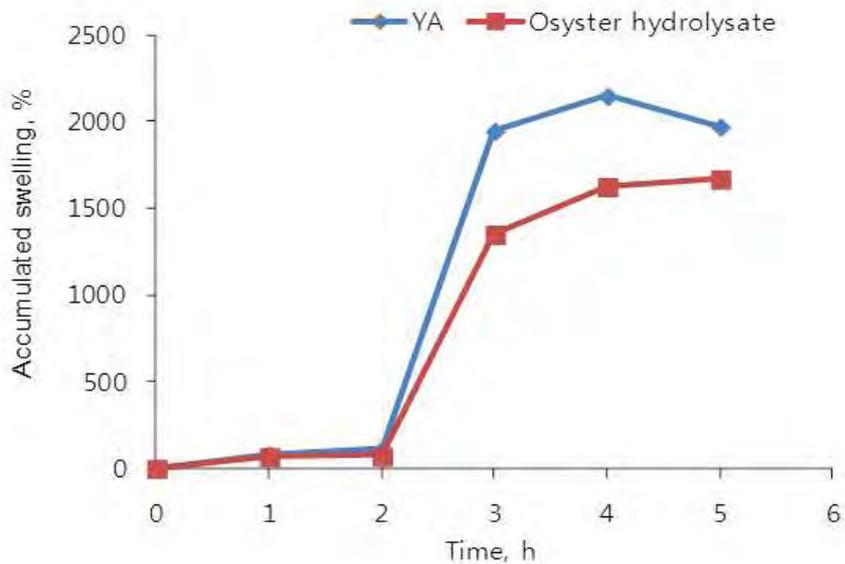


그림 92. The swelling of the alginate beads of the YA and oyster hydrolysate under different condition

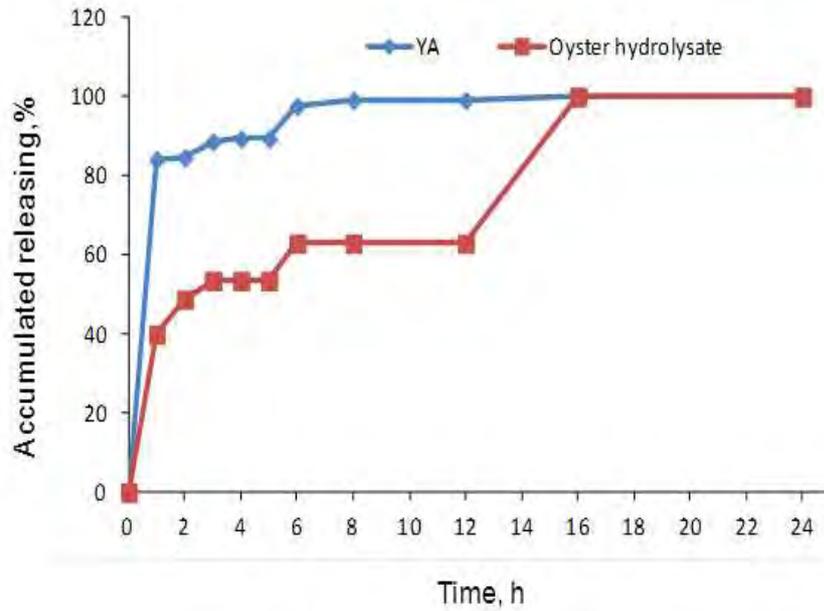


그림 93. The accumulated release of the oyster hydrolysate from the alginate beads of the YA and oyster hydrolysate under different condition.

다. 결론

- Liposome-in-alginate 시스템 제조를 위한 최적 조건을 조사한 결과, 75%의 캡슐 효율을 위한 최적조건은 95.4 mg EDL, 0.5 M CaCl₂, 3% sodium alginate인 것으로 나타났다.
- Liposome-in-alginate 시스템이 경구 투여를 위한 캡슐화에 효과적이며, 지속적으로 YA 혹은 글 가수분해물을 유리하여 기능성을 향상시킬 것으로 판단되었다.

7. 인체적용시험

7.1 굴 가수분해물의 예비 인체적용시험 (별첨 6)

가. 인체적용시험의 개요

인체적용시험의 명칭	굴 가수분해물의 혈압강하 효과 평가를 위한 유효섭취용량 설정 인체적용 시험
인체적용시험 책임자	경희대학교병원 임상약리학과 임성빈교수
인체적용시험 실시 기관	경희대학교병원, 서울시 동대문구 경희대로 23
인체적용시험의 목적	고혈압 전단계 증상을 가진 건강인을 대상으로 굴 가수분해물의 혈압강하 효과와 안전성을 확인하며, 향후 시험의 용량 설정을 목적으로 함.
시험 설계	단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험
대상자 수	최종 평가가능 예수 : 30 예 (시험식품군: 20명 (용량별 2군) 및 대조군: 10명)
연구 대상	문맹자를 제외한 만 20세 이상 70세 미만의 남성 및 여성으로 안정 시 좌위에서 측정한 혈압이 수축기 혈압이 120-139 mmHg이고 이완기 혈압이 80-89 mmHg인 정상인
시험 식품	굴 가수분해물 (1캡슐 125 mg) / 대조식품 (위약)
투여방법 및 투여기간	시험식품은 하루에 굴 가수분해물 (PMK-HF01)을 군당 500mg 및 750 mg (125 mg 4캡슐, 아침, 저녁 식후 30분에 2캡슐씩(위약 1캡슐씩 포함) 또는 125 mg 6캡슐, 아침, 저녁 식후 30분에 3캡슐씩)을 6주간 경구 투여하였음.
시험 기간	2013년 11월 20일 첫 시험대상자를 스크리닝 한 후, 각 시험대상자별로 총 8 (스크리닝 2주, 약제투여기간 6주)가 소요 되었으며 전체 30명의 대상 지원자에 대한 시험은 2013년 11월 20일부터 2014년 3월 18일에 종료되어 전체 시험이 종료되기까지 4개월이 소요되었음.
평가 방법	<p>1. 유효성 (Functionality)</p> <p>1차 기능성 평가 (Primary endpoint): Baseline 대비 수축기 및 이완기 혈압 강하 정도</p> <p>② 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint): Baseline 대비 혈중 angiotensin I, II의 변화율</p> <p>2. 안전성 (safety)</p> <p>시험식품 투여 전과 투여 6주 후에 심전도 검사, 혈액 및 뇨의 실험실적 검사, 활력징후 측정, 이학적 검사 진행을 실시하였고, 시험식품 투여 2주 후에는 전화 문진을 통하여 이상반응을 평가하고 연구기간 내내 이상반응을 평가하였음.</p>

나. 인체적용시험 결과 요약

<p>시험대상자의 기초 정보</p>	<p>선정된 30명의 시험대상자 중 중도탈락 2명을 제외한 28명이 완료하였음.</p> <p>인체적용시험에 선정된 시험대상자를 대상으로 기초정보에 대한 통계 분석 결과 성별, 연령별, 몸무게, 키, 수축기 및 이완기 혈압, 맥박, 체온, 흡연력, 음주력, 병용약물, 병력 및 동반질환, 기타 활력징후 및 운동 습관 등의 항목에서 위약군 및 시험군의 3군 모두에서 통계적 유의성이 관찰되지 않았음. 이는 군 간 시험대상자의 분포가 잘 되었다는 것을 의미함.</p>
<p>유효성 분석결과</p>	<p>수축기 및 이완기 혈압 측정 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 대조군, 굴 가수분해물 500 mg 투여군 및 750 mg 투여군에서 수축기 혈압, 이완기혈압 및 심박수의 변화를 관찰한 결과 세군에서 모두 수축기 및 이완기 혈압이 의미있는 저하를 나타내었음. - 굴가수분해물 500 mg과 750 mg을 투여한 군의 변화를 대조군과 비교한 결과 각 군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 혈압이 감소된다고 볼 수 없었음. <p>Angiotensin I & II 검사 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2차 유효성 평가 변수인 Angiotensin I & II 의 분설 결과 또한 대조군, 굴 가수분해물 500 mg 및 750 mg 투여군에서 통계적 유의성이 나타나지 않았음.
<p>안전성 분석결과</p>	<p>이상반응 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시험식품을 투여한 후 1회 이상 안전성에 대한 조사가 된 시험대상자를 대상으로 평가하였음 - 전체 30명의 시험대상자 중에서 이상반응이 있다고 응답한 시험대상자는 3명 (2명 중도 탈락)이었으나 시험식품과의 명백한 연관성을 찾을 수 없었고 임상적 의미도 적어 안전하니 식품으로 확인하였음. <p>혈액 및 뇨의 실험실 검사 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 대조군, 굴 가수분해물 500 mg 및 750 mg 투여군의 섭취 전후 혈액 및 뇨의 혈액학적 검사 및 생화학적 검사 등 실험실 검사 결과, 투여 6주후에 굴 500 mg 투여군과 굴 750 mg 투여군에서 대조군과 비교한 결과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았음.
<p>용량결정을 위한 유효성 추가분석</p>	<p>대조군에서 혈압이 전후에 감소하는 경우는 긴장 또는 여러 신체적인 상황에 의한 것으로 예측, 예비시험임을 감안하여 대조군에서 혈압이 감소한 R23, R26 시험대상자가 있어 두 명의 시험 대상자를 제외하고 분석을 시행하였음.</p> <p>대조군과 750 mg 군의 섭취 전후 유효성 평가 분석 결과 통계적 유의성이 나오지는 않았으나, 수축기 혈압에서 p value이 0.07을 보여 향후 본 시험에서 시험대상자 수를 충분히 확보하면 의미있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단하였음.</p>

결 론	<p>굴가수분해물의 혈압 강하 효과를 연구하기 위하여 단일기관, 위약 대조, 무작위배정, 평행 인체적용시험을 수행하였음.</p> <p>결과적으로 굴가수분해물은 혈압의 강하에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으나, 향후 본시험에서 적절한 시험대상자수의 산정과 750mg 이상의 투여량으로 시험 진행을 해야 한다는 정보를 얻을 수 있었음.</p>
--------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

7.2 굴 가수분해물의 본 인체적용시험 (별첨 7)

가. 인체적용시험 개요

인체적용시험의 명칭	굴 가수분해물의 혈압강하 효과 평가를 위한 임상시험
인체적용시험 책임자	단국대학교병원 가정의학과 정유석 교수
인체적용시험 실시 기관	단국대학교병원, 충남 천안시 동남구 망향로 201
인체적용시험의 목적	고혈압 전단계에 해당하는 건강인을 대상으로 굴 가수분해물의 혈압개선효과와 안전성을 확인
시험 설계	단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험
대상자 수	최종 평가가능 예수 : 66 예 (시험식품군: 33명 및 대조군: 33명)
연구 대상	문맹자를 제외한 만 20세 이상 70세 미만의 남성 및 여성으로 안정 시 좌위에서 측정된 혈압이 수축기 혈압이 120-139 mmHg이고 이완기 혈압이 80-89 mmHg인 정상인
시험 식품	굴 가수분해물 (1캡슐 250 mg) / 대조식품 (위약)
투여방법 및 투여기간	시험식품군 : 하루에 굴 가수분해물 1,000 mg (250 mg 4캡슐) 대조군 : 위약 4캡슐 (1일 2회, 1회 2캡슐)을 각각 4주간 경구 섭취함.
시험기간	2014년 12월 12일 첫 시험대상자를 스크리닝 한 후, 각 시험대상자별로 총 5주 (스크리닝 1주, 약제투여기간 4주)가 소요 되었으며, 전체 66명의 대상 지원자에 대한 시험은 2014년 12월 12일부터 2015년 3월 30일에 종료되어 전체 시험이 종료되기까지 4개월이 소요되었음.
평가방법	1. 유효성 (Functionality) 1차 기능성 평가 (Primary endpoint): Baseline 대비 수축기 및 이완기 혈압 강하 정도 ② 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint): Baseline 대비 혈중 angiotensin I, II의 변화율 2. 안전성 (safety) 시험식품 투여 전과 투여 6주 후에 심전도 검사, 혈액 및 뇨의 실험실적 검사, 활력징후 측정, 이학적 검사 진행을 실시하였고, 시험식품 투여 2주 후에는 전화 문진을 통하여 이상반응을 평가하고 연구기간 내내 이상반응을 평가하였음.

나. 인체적용시험 결과 요약

시험대상자의 기초 정보	선정된 66명의 시험대상자 중 중도탈락 2명을 제외한 64명이 완료하였음. 인체적용시험에 선정된 시험대상자를 대상으로 기초정보에 대한 통
--------------	---------------------------------------------------------------------------------

	<p>계 분석 결과 연령, 키, 수축기 및 이완기 혈압, 맥박, 체온, 흡연력, 음주력, 병용약물, 병력 및 동반질환, 기타 활력징후 및 운동 습관 등의 항목에서 위약군 및 시험군의 3군 모두에서 통계적 유의성이 관찰되지 않았음. 이는 군 간 시험대상자의 분포가 잘 되었다는 것을 의미함.</p> <p>대조군과 실험군의 성별 및 몸무게에서 통계적 유의성이 있어 유효성 평가 분석에 통제변수로 지정하여 검정을 수행하였음.</p>
유효성 분석결과	<p>수축기 및 이완기 혈압 측정 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 대조군, 시험군에서 수축기 및 이완기혈압의 변화를 관찰한 결과 두군에서 모두 수축기 및 이완기 혈압이 의미있는 저하를 나타내었음. - 섭취 전 후, 양 군간의 수축기 및 이완기 혈압의 측정 결과 통계적으로 의미있는 차이는 없었음. <p>Angiotensin I & II 검사 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2차 유효성 평가 변수인 Angiotensin I & II 의 분설 결과 또한 대조군과 실험군 간의 통계적 유의성이 확인되지 않았음.
안전성 분석결과	<p>이상반응 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시험식품을 투여한 후 1회 이상 안전성에 대한 조사가 된 시험대상자를 대상으로 평가하였음. - 전체 66명의 시험대상자 중에서 이상반응이 관찰된 예는 실험군의 위장장애 1건과 대조군의 간기능 효소 상승 1건이 발생하였으며, 이상반응조치 사항에 따라 관찰 및 조치 하였음. 이외의 시험식품 섭취로 인한 특이적인 인과관계가 확인된 사례는 없었음. <p>혈액 및 뇨의 실험실 검사 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 실험실 검사 결과의 변화는 시험식품을 투여하기 전과 투여한 4주 후의 변화를 통계분석 한 결과, 모든 실험실 검사 결과의 변화가 각 군에서 의미 있는 차이를 나타내지 않았음.
용량결정을 위한 유효성 추가분석	<p>추가적으로 수축기 혈압 120 ~ 129 mmHg 그룹과 130 ~ 139mmHg 그룹으로 나누어 각 그룹과 대조군과의 소그룹을 대상으로 유효성 평가를 수행한 결과 두 그룹 모두 대조군과 통계적으로 의미있는 차이를 보이지 않았음.</p> <p>소그룹 별 대조군 대비 Angiotensin I & II 의 수치도 통계적으로 의미있는 결과가 나타나지 않았음.</p>
결론	<p>실험군과 위약 대조군의 수축기혈압, 이완기혈압 및 심박수의 변화를 관찰한 결과 4주 복용 후 두 군 모두에서 수축기 및 이완기 혈압이 의미 있는 저하를 나타내었음.</p> <p>실험군의 변화를 위약대조군과 비교한 결과 수축기 및 이완기 혈압의 감소정도는 양군간에 차이가 없었음.</p> <p>실험군과 대조군 모두에서 4주 복용 후 Angiotensin I, II는 통계적으로 의미 있는 증가나 감소를 보이지 않았고, 군간의 차이도 없었</p>

	<p>음.</p> <p>실험군에서 위장장애와 간기능이상 이 각각 한 명씩 발생하였으나 식품과의 연관가능성은 있으나 인과관계는 명확하지 않았음.</p> <p>예비 및 본 인체적용시험의 결과를 토대로 확인된 결과, 시험식품 섭취 군의 혈압강하 효과는 있는 것으로 보이나, 대조군 또한 혈압강하 효과가 나타나는 placebo 효과로 인해 통계적으로 의미있는 결과가 도출되지 않았음.</p> <p>또한 순간혈압 측정의 불안정성은 고혈압 관련 연구에서 언제나 논쟁거리임. 잘 알려진 것처럼 혈압은 운동정도, 흥분상태, 긴장정도, 수면의 양 등에 의해 쉽게 영향을 받으며 평상시 혈압은 정상인데 병원에서만 혈압이 올라가는 Whitecoat Hypertension이라는 진단명은 순간혈압의 불안정성을 보여주는 사례임.</p> <p>향후 추가적인 용량 및 섭취기간의 재검토와 안정적인 혈압을 측정할 수 있는 시스템의 연구계획을 통한 인체적용시험의 수행이 필요할 것으로 판단됨.</p>
--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

나. 인체적용시험결과 해석 및 향후 방안

- 굴 인체적용시험의 경우 시험군에서 혈압조절효능이 확인되었으나 대조군과의 비교결과에서 통계적으로 유의성있는 결과가 나오지 않아 새로운 임상 프로토콜을 마련하여 추가 인체적용시험이 필요함
- 추가 인체적용시험에 소요되는 비용문제를 해결하기 위해 통영시(굴조합)의 냉동 굴 무료제공, (주)선마린바이오테크의 분무건조물제조 무료제공, (주)과마킹의 캡슐제 제조 무료제공 등의 협조를 득하여 산업통상자원부의 "바이오의료기기산업핵심기술개발사업"에서 지원을 받아 실시할 예정임.

8. 굴 가수분해물 원료의 유통기한 설정

가. 재료 및 방법

(1) 수분함량, 색깔, pH의 측정

AOAC(2006)의 방법에 따라 수분함량은 105℃에서 가열건조법으로 측정하였다. 색은 색차계(ZE-2000, Nippon Denshoku, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였고 L^* , a^* , b^* 및 $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$ 로 표현하였다. 색차계는 표준백판으로 조정하였다 ($L^*=96.83$, $a^*=-0.36$, $b^*=0.62$). pH는 pH meter로 측정하였다.

(2) ACE 저해활성의 측정

ACE 저해활성은 Wu et al.(2002)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 시료 용액 20 uL를 225 uL의 ACE 용액 (0.025 units/mL)와 잘 혼합하여 37℃에서 10분 동안 먼저 항온하고, 50 uL의 HHL 기질 용액(2.5 mg/ mL, 0.3 M NaCl-0.1 M borate 완충액, pH 8.3)을 첨가하였다. 반응액을 흔들며 주면서 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 75 μ L의 1 M HCl 용액을 첨가하여 효소반응을 중지시키고, 반응물을 10,000 rpm에서 원심분리(Micro 17TR, Hanil Sci. Inc. Co., Incheon, Korea)하였다. 상층액의 반응생성물인 hippuric acid (HA)의 함량은 Watchers C18 칼럼(5 μ m, 4.6x250 mm)을 장착한 HPLC 시스템(Shimadzu, Kyoto, Japan)으로 정량하였다. 효소 활성의 저해는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{저해활성 (\%)} = [(HA_{\text{control}} - HA_{\text{sample}})/HA_{\text{control}}] \times 100$$

(3) YA 함량의 측정

YA 함량은 C18 역상 칼럼(4.5 x 150 mm, Watchers, Tokyo, Japan)을 장착한 HPLC 시스템(Shimadzu)으로 측정하였다. Microfilter(0.20 μ m)로 여과한 시료용액 5 μ L를 주입하고 용매 A(0.1% TFA/water)와 용매 B(0.1% TFA/acetonitrile)로 균배 용출하였다. YA의 용출은 다음과 같은 균배조건을 사용하였다: 40분 동안 0.8-5% B용액, 1분 동안 5-95% B용액, 9분 동안 95% B용액, 15분 동안 0.8% B 용액으로 조건을 구성하여 총 65분 동안 용출하였다. 이때 유속은 1.0 mL/min으로 조정하였고, 분광광도계로 측정된 YA의 최대 흡수 파장 273 nm에서 검출하였다. YA함량은 같은 조건에서 용출한 표준물질 YA로 작성한 검량 곡선에 따라 정량하였다.

(4) *E. coli* 와 종균수의 검출

0.88% NaCl 멸균수에 녹인 굴 가수분해물 용액(10 mg/mL) 3 M Petrifilm *E.coli* Coliform Count Plates 또는 3M Aerobic Count Plate (3M Company, St. Paul, USA) 상에 도포하여 37℃에서 48 시간 동안 항온하였다. 결과는 CFU/g으로 표시하였다.

나. 실험결과

(1) 저장온도에 따른 물리화학적 특성 및 지표성분의 변화

(가) 굴 가수분해물 원료 및 캡슐의 40℃ 보관조건에서의 변화(표 51, 52)

굴 가수분해물 원료 및 캡슐은 $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $75 \pm 5\%$ 의 조건에서 보관 시 맛과

향에서는 6개월까지 큰 변화가 없었으나 수분은 점차적으로 증가하며, pH와 YA의 함량은 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

표 51. The physicochemical properties of oyster capsule stored at $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, RH $75\pm 5\%$

Storage time (Month)	0	1	2	3	4	5	6
Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour
Flavour	Squid taste burnt, a little bitter						
Moisture(%)	2.8 ± 0.2	4.2 ± 0.4	3.7 ± 0.2	5.8 ± 0.2	6.3 ± 0.1	7.2 ± 0.3	7.8 ± 0.1
pH	4.97 ± 0.04	4.97 ± 0.04	4.85 ± 0.04	4.58 ± 0.02	4.86 ± 0.07	4.52 ± 0.02	4.54 ± 0.02
Color							
L*	38.42 ± 0.31	43.29 ± 0.67	41.38 ± 0.06	38.68 ± 0.07	37.65 ± 0.23	39.25 ± 0.88	36.62 ± 0.26
a*	8.61 ± 0.07	8.64 ± 0.03	9.99 ± 0.03	12.25 ± 0.03	10.56 ± 0.09	12.17 ± 0.23	12.07 ± 0.13
b*	16.67 ± 0.13	16.76 ± 0.23	17.02 ± 0.06	16.95 ± 0.02	16.03 ± 0.16	17.14 ± 0.15	16.35 ± 0.10
ΔE	61.21 ± 0.31	56.70 ± 0.57	58.75 ± 0.08	61.69 ± 0.07	62.12 ± 0.25	61.19 ± 0.89	63.45 ± 0.24
ACE inhibition(%)	35.8 ± 0.3	23.6 ± 0.7	31.1 ± 0.8	30.8 ± 0.4	37.7 ± 2.0	33.5 ± 1.8	30.4 ± 2.6
YA(ug/g)	295.7 ± 12.8	289.8 ± 22.7	235.8 ± 0.7	400.8 ± 4.1	301.7 ± 21.4	204.8 ± 7.9	215.4 ± 4.9

표 52. The physicochemical properties of oyster hydrolysate powder stored at $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, RH $75\pm 5\%$

Storage time (Month)	0	2	4	6
Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour
Flavour	Squid taste burnt, a little bitter			
Moisture(%)	2.8 ± 0.2	2.3 ± 0.2	3.6 ± 0.3	5.5 ± 0.1
pH	4.97 ± 0.04	4.58 ± 0.02	4.59 ± 0.01	4.43 ± 0.03
Color				
L*	38.42 ± 0.31	39.62 ± 0.05	39.11 ± 0.14	37.60 ± 0.44
a*	8.61 ± 0.07	9.49 ± 0.02	10.03 ± 0.07	11.91 ± 0.02
b*	16.67 ± 0.13	17.82 ± 0.03	18.32 ± 0.07	18.69 ± 0.16
ΔE	61.21 ± 0.31	60.57 ± 0.04	61.26 ± 0.12	63.12 ± 0.37
ACE inhibition(%)	35.8 ± 0.3	42.7 ± 0.3	44.5 ± 1.1	40.4 ± 1.0
YA(ug/g)	412.8 ± 26.2	379.3 ± 2.9	381.2 ± 9.3	360.5 ± 11.1

(나) 굴 가수분해물 원료 및 캡슐의 25°C 보관조건에서의 변화

굴 가수분해물 원료 및 캡슐은 25±2°C, 상대습도 60±5%의 조건에서 보관 시 맛과 향, pH, 수분, YA의 함량에서 18개월까지 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다(표 53, 54).

표 53. The physicochemical properties of oyster capsule stored at 25±2°C, RH 60±5%

Storage time (Month)	0	3	6	9	12	18
Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour
Flavour	Squid taste burnt, a little bitter					
Moisture(%)	2.8±0.2	3.3±0.1	5.4±0.1	3.4±0.3	4.3±0.0	6.1±0.1
pH	4.97±0.04	4.91±0.01	5.02±0.03	4.93±0.02	4.77±0.03	4.67±0.02
Color						
L*	38.42±0.31	46.32±0.22	46.69±0.14	47.74±0.41	46.19±0.64	46.33±0.49
a*	8.61±0.07	7.78±0.06	7.53±0.07	7.15±0.12	8.70±0.09	9.32±0.14
b*	16.67±0.13	17.54±0.02	17.94±0.10	17.23±0.08	18.59±0.18	19.33±0.03
ΔE	61.21±0.31	53.88±0.21	53.62±0.17	52.37±0.39	54.49±0.66	54.71±0.48
ACE inhibition(%)	35.8±0.3	40.7±1.9	38.8±1.5	35.7±5.4	32.1±0.8	31.4±3.3
YA(ug/g)	295.7±12.8	277.9±7.2	274.6±6.3	289.0±2.3	256.5±10.8	311.1±6.2

표 54. The physicochemical properties of oyster hydrolysate powder stored at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, RH $60 \pm 5\%$

Storage time (Month)	0	3	6	9	12	18
Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour
Flavour	Squid taste burnt, a little bitter					
Moisture(%)	2.8 ± 0.2	1.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.6 ± 0.1
pH	4.97 ± 0.04	4.61 ± 0.02	4.68 ± 0.02	4.69 ± 0.04	4.49 ± 0.04	4.48 ± 0.03
Color						
L*	38.42 ± 0.31	40.22 ± 0.08	40.90 ± 0.22	41.25 ± 0.15	40.85 ± 0.30	40.45 ± 0.23
a*	8.61 ± 0.07	8.71 ± 0.07	8.50 ± 0.03	8.74 ± 0.05	9.63 ± 0.08	9.88 ± 0.05
b*	16.67 ± 0.13	17.87 ± 0.01	18.39 ± 0.05	18.48 ± 0.01	19.04 ± 0.06	19.14 ± 0.12
ΔE	61.21 ± 0.31	59.86 ± 0.07	59.34 ± 0.20	59.08 ± 0.15	59.76 ± 0.28	60.21 ± 0.19
ACE inhibition(%)	35.8 ± 0.3	48.4 ± 2.9	45.1 ± 1.5	40.9 ± 0.6	39.9 ± 0.4	44.1 ± 0.6
YA(ug/g)	412.8 ± 26.2	422.7 ± 6.6	433.1 ± 4.7	382.7 ± 23.5	459.6 ± 9.5	467.5 ± 6.0

(다) 굴 가수분해물 캡슐의 4°C 보관조건에서의 변화

굴 가수분해물 캡슐은 $4 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $46 \pm 5\%$ 의 조건에서 보관 시 맛과 향, pH, 수분, YA의 함량에서 18개월까지 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다(표 55, 56).

표 55. The physicochemical properties of oyster capsule stored at $4 \pm 3^\circ\text{C}$, RH $46 \pm 5\%$

Storage time (Month)	0	1	2	3	4	5	6	8
Odour	Oyster Odour		Oyster Odour					
Flavour	Squid taste burnt, a little bitter		Squid taste burnt, a little bitter					
Moisture(%)	2.8 ± 0.2		2.6 ± 0.3	4.9 ± 0.1	6.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1	5.0 ± 0.1	3.8 ± 0.1
pH	4.97 ± 0.04		4.92 ± 0.01	4.95 ± 0.04	4.86 ± 0.07	5.01 ± 0.04	4.89 ± 0.02	4.98 ± 0.05
Color								
L*	38.42 ± 0.31		46.19 ± 0.04	45.74 ± 0.09	37.65 ± 0.23	47.17 ± 0.17	46.84 ± 0.24	46.93 ± 0.27
a*	8.61 ± 0.07		7.44 ± 0.07	7.62 ± 0.08	10.56 ± 0.09	6.81 ± 0.04	7.00 ± 0.04	7.45 ± 0.44
b*	16.67 ± 0.13		17.15 ± 0.07	17.29 ± 0.15	16.03 ± 0.16	16.86 ± 0.08	17.23 ± 0.05	16.97 ± 0.39
ΔE	61.21 ± 0.31		53.84 ± 0.03	54.36 ± 0.16	62.12 ± 0.25	52.72 ± 0.18	53.18 ± 0.24	53.09 ± 0.18
ACE inhibition(%)	35.8 ± 0.3	39.8 ± 0.6	34.6 ± 0.8	40.4 ± 0.5	44.7 ± 1.3	36.2 ± 0.7	42.6 ± 2.2	32.8 ± 0.5
YA(ug/g)	295.7 ± 12.8	301.5 ± 2.8	277.8 ± 12.5	278.3 ± 24.3	280.7 ± 16.1	299.8 ± 10.4	306.6 ± 6.2	305.9 ± 5.7

표 56. The physicochemical properties of oyster capsule stored at $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$, RH $46 \pm 5\%$ (continue)

Storage time (Month)	9	10	11	12	15	17	18
Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour	Oyster Odour
Flavour	Squid taste burnt, a little bitter						
Moisture(%)	4.3 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.8 ± 0.0	4.7 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.6 ± 0.1
pH	4.89 ± 0.02	4.89 ± 0.02	4.81 ± 0.01	4.76 ± 0.04	4.89 ± 0.02	4.88 ± 0.04	4.86 ± 0.01
Color							
L*	46.90 ± 0.31	46.92 ± 0.65	47.07 ± 0.24	46.16 ± 0.18	47.15 ± 0.11	47.12 ± 0.18	46.96 ± 0.10
a*	7.18 ± 0.06	7.44 ± 0.08	7.34 ± 0.08	7.53 ± 0.03	7.08 ± 0.10	7.05 ± 0.05	7.19 ± 0.10
b*	17.03 ± 0.06	17.32 ± 0.23	17.11 ± 0.04	17.63 ± 0.02	17.34 ± 0.09	17.36 ± 0.22	17.38 ± 0.06
ΔE	53.10 ± 0.30	53.18 ± 0.55	52.96 ± 0.23	54.02 ± 0.17	52.94 ± 0.18	52.96 ± 0.24	53.15 ± 0.10
ACE inhibition(%)	40.9 ± 0.6	37.8 ± 0.5	36.8 ± 0.9	33.3 ± 1.5	36.8 ± 0.5	41.4 ± 2.0	39.4 ± 3.3
YA(ug/g)	303.1 ± 3.7	293.6 ± 10.9	291.1 ± 7.2	296.9 ± 10.8	333.5 ± 18.9	318.6 ± 14.1	339.0 ± 8.7

(2) 미생물 실험결과

굴 가수분해물은 10, 25, 40°C 에서 장기보존 하였을 때 18개월까지 대장균이 검출되지 않았다(표 57~59).

표 57. 장기보존 18개월 동안 굴가수분해물의 미생물 실험결과

10 $^{\circ}\text{C}$					
구분	기준	2개월	6개월	9개월	18개월
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
25 $^{\circ}\text{C}$					
구분	기준	2개월	6개월	9개월	18개월
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
40 $^{\circ}\text{C}$					
구분	기준	2개월	6개월		
대장균군	음성	음성	음성		

표 58. 미생물 실험결과

월수	0	2	6	9	18
월일	20130624	20130824	20131224	20140324	20141224

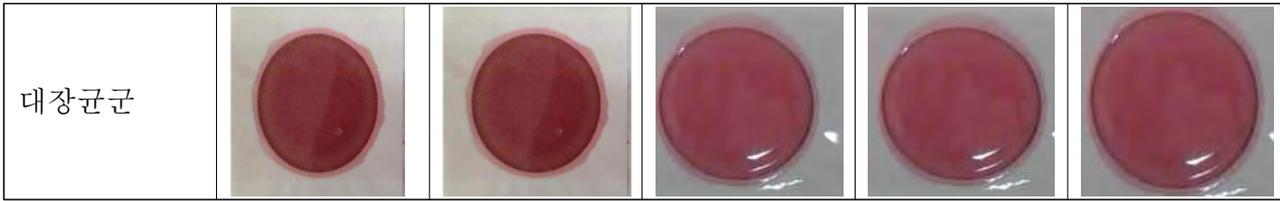


표 59. The bacteria number of oyster hydrolysate and capsule for 9 months

Sample	Bacteria(cfu/g)
분말	150
캡슐	200

(3) YA 성분의 유통기간 산출

지표성분인 YA의 함량을 저장온도 및 기간별로 분석하여 80%가 될 때까지의 기간을 아래의 방정식으로부터 구하였다(그림 99~102). 저장 온도별 반응속도 상수 산출은 0차 반응식을 이용하여 연간 변화치를 계산하였다(표 60, 61).

- 유통기간 (개월) $t = (C_0 - C) / K_{20}$ (K_{25} : 20℃에서 소실상수; C: 허용농도; C_0 : 초기농도)

$C_0 - C = 20\% C_0 = 0.2 \times 301.5 = 60.3 \text{ ppm}$

$\ln K_{25} = -12093 \times (1 / (273 + 20)) + 41.51 = 0.237$

$K_{25} = 1.27$

- 유통기간 (개월) $t = (C_0 - C) / K_{20} = 60.3 / 1.27 = 47.5$

YA 함량 변화에 따른 유통기한 산출 실험결과 20℃ 보관조건에서 47.5개월이 계산되었다.

이 결과로부터 20도에 보관할 경우 굴 가수분해물 유통기한을 24개월(2년)로 설정하였다.

표 60. 0 차 반응식을 이용한 연간변화 반응속도상수(K') 산출

저장온도 온도(℃)	국내 연간온도별 예상 유통일수 (A)	반응속도상수 (B)	연간변화 반응속도상수 (K') (AxB)
10	152일(5개월)	0.7	3.5
15	30일(1개월)	1.2	1.2
20	61일(2개월)	1.9	3.8
25	61일(2개월)	3.1	6.2
30	61일(2개월)	5.0	10
누계	365일(12개월)		24.7

표 61. 0 차 반응식을 이용한 유통기간 산출

최초함량 (A)	품질규격(B)	A-B	연간변화 반응속도상수 (K')	$((A-B)/K') \times 12$
301.5	241	60.5	24.7	29.4개월

10 °C (0차)

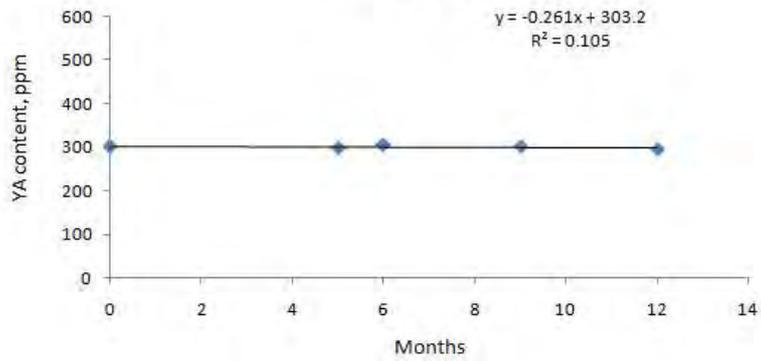


그림 99. 10°C에서의 YA 함량 변화

25 °C (0차)

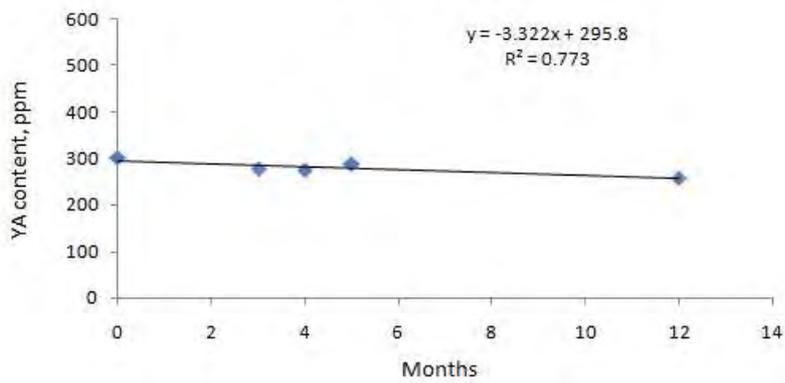


그림 100. 25°C에서의 YA 함량 변화

40 °C (0차)

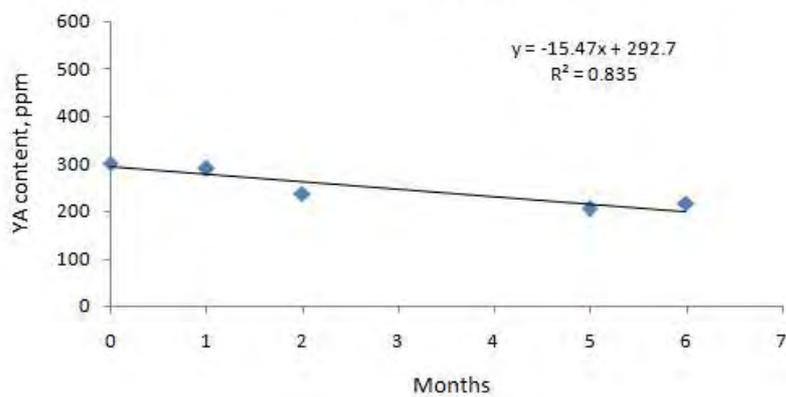


그림 101. 40°C에서의 YA 함량 변화

LnK 직선방정식

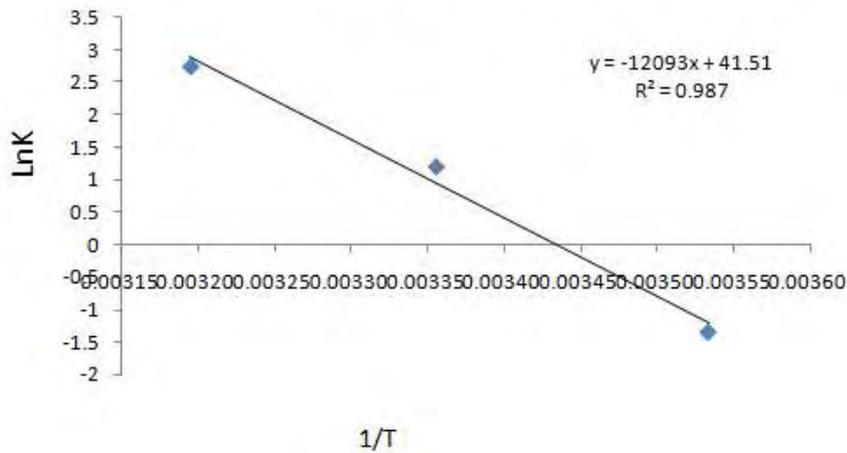
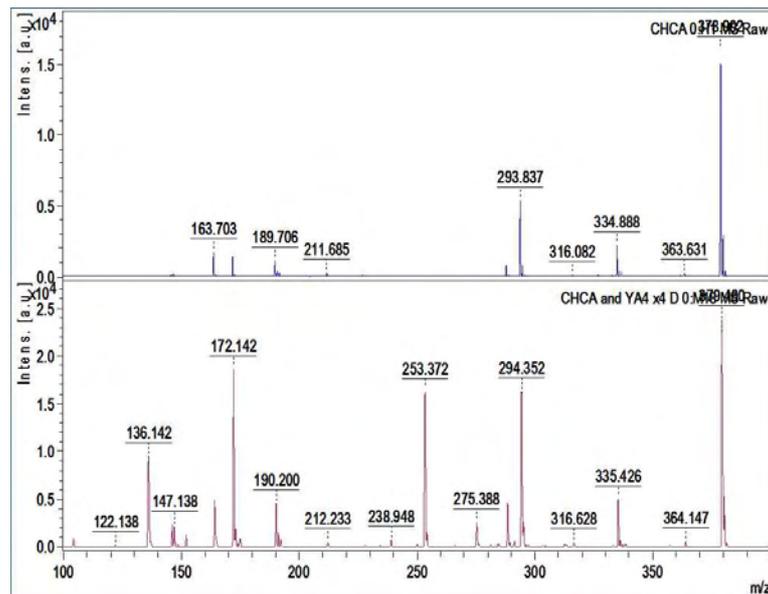


그림 102. LnK에 의해 도출된 직선방정식 그래프

(4) YA의 단백질분해효소작용에 대한 안정성

굴 가수분해물의 유효성분인 YA의 소화기관내 단백질 분해효소인 펩신의 분해작용에 대한 안정성을 확인하고자 MALDI-MS를 통한 실험을 진행하였음. YA의 질량 스펙트럼에서 펩신의 작용 전후에 따라 서로 상이한 질량스펙트럼을 보이는 경향을 보여 YA가 펩신의 영향에 의해 일정정도 분해된다는 사실을 확인할 수 있었음



<YA의 펩신처리 전후의 질량스펙트럼>

다. 결론

- 굴 가수분해물 원료의 저장 중 수분, pH, 색의 변화, ACE 저해활성, 지표물질로서 YA의 함량과 대장균 및 일반세균의 변화를 측정함으로써 원료와 유통기한을 설정하였다.
- 다양한 온도(4~40℃)에서 18개월까지 보관하며 각종 지표에 관한 변화를 측정하였다.
- 식약처에서 제시한 유통기한 설정 식에 따라, 각종 지표의 연간변화 반응속도상수(K')로부터 산출한 원료의 유통기한은 24개월로 결정하였다.
- 최종제품의 유통기한은 제품출시에 맞춰 결정할 것이다.
- 유효성분인 YA는 단백질 분해효소인 펩신에 의해 가수분해될 가능성이 높은 바 장용제 등의 코팅제형이 보다 효과적인 것으로 나타났다.

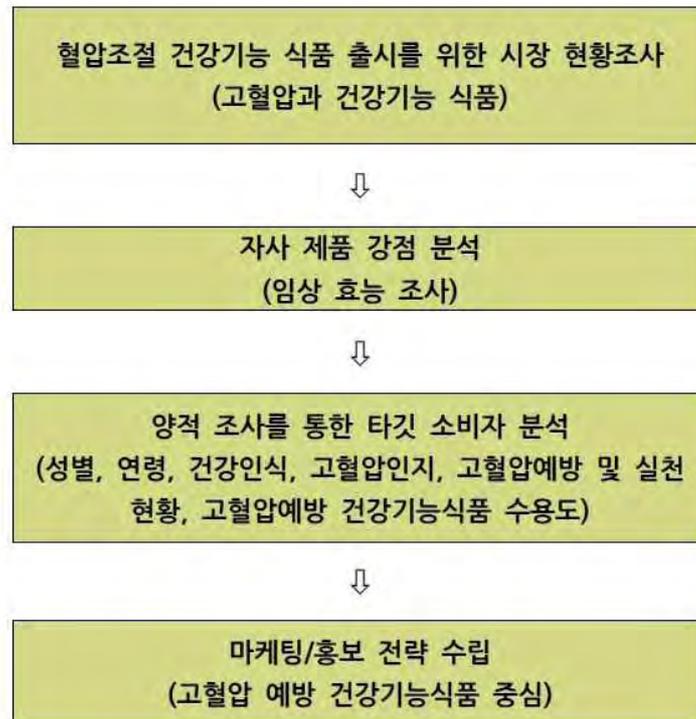
9. 고혈압 예방 건강기능식품 출시를 위한 시장조사 및 전략 컨설팅

가. 목적

고혈압과 건강기능식품의 주요 타겟 소비자들의 인식, 고혈압예방 및 실천 현황, 새로운 고혈압예방 건강기능식품 수용도 등을 분석하여 국내 고혈압 예방 건강기능식품 시장으로서의 성공적인 진입 전략(타겟, 메시지, 채널 등)을 수립하고자 하였다.

나. 조사과정

- 국내외 건강기능식품 및 고혈압 관련 2차 자료를 통한 시장 분석
- 만 35세~64세 성인 남녀를 대상으로 한 소비자 조사 및 분석



<조사수행과정 scheme>

다. 주요 전략 포인트

- 타겟: (1차) 40-59세, (2차) 35-39세
- 전략: 고혈압 예방에 대한 needs & trend 형성
“글루타민 성분=고혈압 예방” 으로 포지셔닝
- 핵심메세지: 천연성분(통영 굴 펩타이드)을 활용한 혈압 조절 건강기능 식품
간편하게 고혈압 예방이 가능한 건강기능 식품
중년을 위협하는 고혈압 예방에 효과적인 건강기능 식품
- 매체: (오프라인) PPL, (온라인) 온라인 뉴스, 검색 광고
- 유통: 백화점 → 유통점 → 홈쇼핑 → 약국
- 가격: 50,000원 이하

라. 결론

- 혈압조절 건강기능식품 출시를 위한 시장현황조사 및 전략 컨설팅을 통해 제품의 마케팅전략을 수립하였다.
- 고혈압 예방에 대한 needs와 trend를 형성시키고 중년을 위협하는 고혈압예방에 효과적인 천연성분의 기능성 소재(통영의 청정이미지 부각)라는 핵심메세지를 강조할 것이다.
- 국내에서는 (주)파마킹이 심혈관계 질환 치료제를 주로 판매하고 있으므로 현재 거래하고 있는 약국, 병원 중심으로 판매할 것이며, 한국야쿠르트와 기능성 야쿠르트에 꿀 가수분해물을 첨가한 신제품출시를 위해 검토중이다. 향후 파마킹의 유통채널인 약국이나 병원 이외로 백화점, 유통점, 홈쇼핑 등의 다각적인 유통망을 활용하여 판매통로를 확장할 것이다.
- 국외에서는 중국의 호텔 체인인 순화국제호텔그룹과 고급음식점 체인인 (주)진화 등과 VIP고객 중심의 고가 마케팅 제품 출시를 위한 협의를 진행중이다.
- 적정가격은 50,000이하/한 달로 결정하였다.

10. 제품허가를 위한 공인인증 시험 (별첨 8)

가. 시험기관: 한국식품연구소

나. 시험물질: 굴 가수분해물 원료 3 lot

다. 시험 항목: 외관, YA함량, 수분, 열량, 탄수화물, 회분, 조단백질, 조지방, 나트륨, 비소, 납, 카드뮴, 수은, 대장균 이상 총 14개 항목

라. 시험 결과:

Lot 1



KAFRI 한국식품연구소
KOREA ADVANCED FOOD RESEARCH INSTITUTE



일반 제 21673 호					
시 험 성 적 서					
검 체 명	굴겔타이드 LOT 1				
시 험 항 목	YA함량 외 12항목				
의뢰인주소및성명	충청북도 음성군 감곡면 행군이길 87-17 (주)파마킹 김완배				
시 험 의뢰 목 적	참고용	제조일자	유통기한	접수일자	2014.12.04
귀하가 우리 연구소에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.					
성 적 :					
외관.....갈색 분말 YA함량(%).....0.09 수분(%).....6.2 열량(kcal).....413.3(100g당) 탄수화물(%).....19.3 회분(%).....7.1 조단백질(%).....54.1(질소계수 6.25) 조지방(%).....13.3 나트륨(mg/100g).....1,913.20 비소(mg/kg).....4.28 납(mg/kg).....1.00 카드뮴(mg/kg).....3.41 수은(mg/kg).....불검출 대장균.....음성 끝.					
2015년 01월 02일					
한국식품연구소장 					
이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.					



일반 제 21674 호 <h2 style="text-align: center; text-decoration: underline;">시 험 성 적 서</h2>						
검 체 명	굴렙타이드 LOT 2					
시 험 항 목	YA함량 외 12항목					
의뢰인주소및성명	충청북도 음성군 감곡면 행군이길 87-17 (주)파마킹 김완배					
시 험 의뢰 목 적	참고용	제조일자		유통기한		접수일자 2014.12.04
귀하가 우리 연구소에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 성 적 : 외관.....갈색 분말 YA함량(%).....0.10 수분(%).....6.0 열량(kcal).....408.6(100g당) 탄수화물(%).....20.8 회분(%).....7.1 조단백질(%).....53.9(질소계수 6.25) 조지방(%).....12.2 나트륨(mg/100g).....1,908.02 비소(mg/kg).....4.60 납(mg/kg).....1.02 카드뮴(mg/kg).....3.12 수은(mg/kg).....불검출 대장균군.....음성 끝.						
2015년 01월 02일 <h3 style="text-align: center;">한 국 식 품 연 구 소 장</h3>						
이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.						





일반 제 21675 호						
<u>시 험 성 적 서</u>						
검 체 명	글렙타이드 LOT 3					
시 험 항 목	YA함량 외 12항목					
의뢰인주소및성명	충청북도 음성군 감곡면 행군이길 87-17 (주)파마킹 김완배					
시 험 의뢰 목 적	참고용	제조일자	유통기한	접수일자	2014.12.04	
귀하가 우리 연구소에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.						
성 적 :						
외관	갈색 분말					
YA함량(%)	0.09					
수분(%)	5.9					
열량(kcal)	407.1(100g당)					
탄수화물(%)	21.0					
지방(%)	7.2					
조단백질(%)	54.0(질소계수 6.25)					
조지방(%)	11.9					
나트륨(mg/100g)	1,923.26					
비소(mg/kg)	4.51					
납(mg/kg)	1.06					
카드뮴(mg/kg)	3.44					
수은(mg/kg)	불검출					
대장균군	음성 끝.					
2015년 01월 02일						
한국식품연구소장						
이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.						

- 공인인증기관인 한국식품연구소에서 14개 항목에 대한 일반시험 결과 특이사항은 없었으며 YA(%)함량은 0.09-0.1 %로서 사업단 연구결과와 동일한 시험성적을 나타내었다.
- 카드뮴의 함량은 1kg당 3mg을 초과하는 결과를 보여 일일허용량 준수를 위한 일일투여용량을 결정하는 것이 필요하다.

11. 식약처 허가서류(별첨 9)

-식약처에 개별인정을 위하여 제출할 허가서류를 작성하였으며 그 요약내용은 다음과 같다.

항 목	주요 내용	
1. 원료명	굴가수분해물	
2. 원재료	굴 (학명: <i>Crassostrea gigas</i> , 사용부위 : 굴껍질을 제외한 육질)	
3.기능(지표) 성분	지표 성분 : Tyrosinylalanine(YA)	
4. 제조과정	분쇄 → 배합 → 가열 → 냉각 → 효소반응 → 여과 → 농축 → 건조 → 굴가수분해물	
5. 규격 및 시험방법	1) 정상 : 갈색분말 2) YA (지표성분) : 0.072~0.108 % 3) 납(mg/kg) : 3 이하 4) 총비소(mg/kg) : 5 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 3 이하 6) 총수은(mg/kg) : 1 이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능(지표) 성분 시험법	1) 자사 기준시험법 2) Octadesyl silicagel column (250mmX10mm, 5µm) 또는 동등규격을 이용한 시험법
	규격외 (잔류농약)	「식품의 기준 및 규격」에 신청원료에 대한 농약의 잔류허용기준은 없으며, 이에 따라 5가지 잔류농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)에 대하여 국내 식품위생검사기관 시험결과 '불검출' 임을 확인함
6. 안전성	의사결정도	섭취경험이 있는 굴(<i>Crassostrea gigas</i> , 식품원료)의 육질을 효소가수분해 한 것으로 의사결정도 '다' 에 해당
	섭취 근거	<인정현황> ◦국내 : 식품공전에 생식용 참굴 등재 ◦프랑스 : 굴을 요리에 사용 <사용현황> ◦국내 : 사용 현황 없음, 굴을 요리에 사용 ◦미국 : 스완슨제품 유통 판매 ◦중국 : 굴소스를 요리에 사용
	안전성 정보	(예) ◦안전성 정보 DB : OO, OO 등 위장불편, 두통 등 보고 2건 ◦섭취시주의사항으로 'OO 복용시 병용사용을 피할 것' (PDR)
	섭취량 평가	◦ 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 750mg/일: - 최대안전섭취량 3600mg/일 (식품수급표 , '13) - 일일허용섭취량 :3600mg/일 ● 굴 원물로 환산시, 식품수급표 7~10 g/일에 해당 ● 문헌에 의한 통상섭취량:36g/일(식품섭취량)

		⇒ 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고 (또는 3배이내이고), 최대안전섭취량, 일일허용섭취량 이내임
	인체적용시험	심각한 이상반응은 확인되지 않음 (750mg/일 섭취 기준)
	독성 시험	◦ 단회 및 13주 반복투여시험에서 이상반응 및 독성 나타나지 않음 -최소치사량 5000 mg/kg·bw이상, 무독성량 5000 mg/kg·bw ◦ 유전독성시험 결과, 독성이 관찰되지 않았음
	기타 사항	-
	섭취 시 주의사항	◦해산물 등 알러지가 있는 분은 섭취를 피하십시오. ◦영유아는 섭취를 피하십시오.
7. 기능성	신청 기능성	혈압조절에 도움
	신청 일일섭취량	굴가수분해물로서 1 g/일
	시험관시험	6개의 활성 분획을 얻었고 ACE저해 범위는 29.56~85.85%였다.
	동물시험	[신청원료] ◦굴가수분해물은 SHR쥐에게 혈압을 유의하게 감소시켰다. ◦굴가수분해물의 고혈압 억제 효과는 정어리 가수분해물 보다 빠르고 지속적이었다. ※시험물질 : 굴가수분해물
	인체적용시험	[신청원료] ◦건강한 성인(n=66), 1g/일, 4주(RCT, DB) ※인체적용시험기관 : 단국대 병원(가정의학과 정유석)
	기타 사항	

- 굴소재의 혈압조절기능 개별인정 허가를 위한 최종 신청서는 인체적용시험이 완료되는 2016년 후반기에 제출할 예정임

제2절. 곰피를 이용한 간기능 개선 건강기능 식품의 개발 및 제품화

1. 곰피추출물의 표준화 및 유효성분 탐색

1.1 곰피추출물의 지표성분의 설정 및 표준화

가. 실험 재료 및 방법

(1) 곰피 주정추출물의 제조

경남 통영 연안에서 양식한 곰피를 수세 후 이물질 혼입 여부를 검사하고 통풍상태에서 약 일주일간 건조하여 시료로 사용하였다. 건조한 시료는 추출기를 이용하여 70% 에탄올 추출을 하였고 농축기를 사용하여 증발 농축시킨 다음 동결건조를 하여 곰피 주정 추출물을 제조하였다. 분석에 사용된 곰피의 주정추출물과 phlorotannin 성분들(eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol-A)은 부경대 최재수 교수로부터 제공받아 사용하였다.

(2) 지표성분의 분석

(가) 분석시료의 제조

지표성분 eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol-A 표준품 1mg을 정밀하게 달아 이를 4ml 용량 플라스크에 넣고 Methanol로 녹인 후 이를 표준 원액으로 하였다. (250 μ g/mL) 표준원액을 각 단계별(10, 25, 50, 100, 250 μ g/ml)로 희석하여 검량선 작성용 표준용액으로 하였다. 곰피 주정 추출물은 100mg에 Methanol 10ml을 넣어 30 분간 진행한 후 0.45 μ m PTFE syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

(나) 시약 및 재료

HPLC용 용매는 HPLC grade용매 (Fisher, South Korea)를 0.45 mm PTFE filter (ADVANTEC, USA)로 여과한 후 사용하였으며 그 외에 formic acid (Wako, Japan)는 분석용 1급 시약을 사용하였다. 초순수는 ABBOTA NEO 1으로 제조하여 18 M Ω 이상을 사용하였다.

(다) 분석기기

지표성분의 시험법 설정 시 고려사항으로 추출효율, 컬럼선정, 분석기기선정, 크로마토그램, 표준품 순도, 방해인자 차단 등이 있다. 여러 가지 사항을 고려한 결과 가장 일반적으로 사용되는 HPLC 분석이 phlorotannin계열 성분을 분석하는데 적합하다 판단하였고 분석기기는 HPLC는 Perkin Elmer series 200를 사용하였고 컬럼은 Shiseido capcellpak C18(4.6 X 250 mm, 5 μ m)를 사용하였다.

(3) 지표성분 시험법의 타당성 검증(Validation)

건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정 중 기능성분 또는 지표성분 시험방법의 검증(새로 설정된 시험방법은 식품의약품안전청 고시 제2010-76호 표 63(시험방법 타당성 검토 항목의 정의 및 적용)을 참고하여 시험방법의 타당성(Method Validation)을 정량시험법의 검토 항목에 따라서 시험법을 5개의 항목(특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 범위)으로 검증하였다.

표 63. 시험방법 타당성 (벨리데이션) 검토 항목의 정의 및 적용 (제13조 제6호 나목 및 제7호 나목 관련)

항목	정의	적용		
		기능성분		유해물질 (정량)
		정량시험	확인시험	
특이성 (Specificity)	불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력	예	예	예
정확성 (Accuracy)	측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도	예	아니오	예
정밀성 (Precision)	균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)	예	아니오	예
정량한계 (Quantitation Limit)	적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량	예	아니오	예
직선성 (Linearity)	시험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력	예	아니오	예
범위 (Range)	적절한 정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)의 하한값 및 상한값 사이의 영역	예	아니오	아니오

나. 실험결과

(1) 지표성분의 설정

곰피(*Ecklonia stolonifera*)로부터 70% 주정으로 추출한 곰피추출물에서 phlorotannin 화합물인 eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol-A, phlorofucofuroeckol-B이 간보호활성이 높은 활성 물질임을 본 연구과제에서 *in vitro* 실험을 통해 확인하였다(그림 107). 따라서 phlorotannin 성분을 HPLC 분석을 통하여 이들 성분이 곰피추출물에서 특이성, 대표성을 띄면서 일정수준 이상의 함량을 지니는지 확인하고자 하였다.

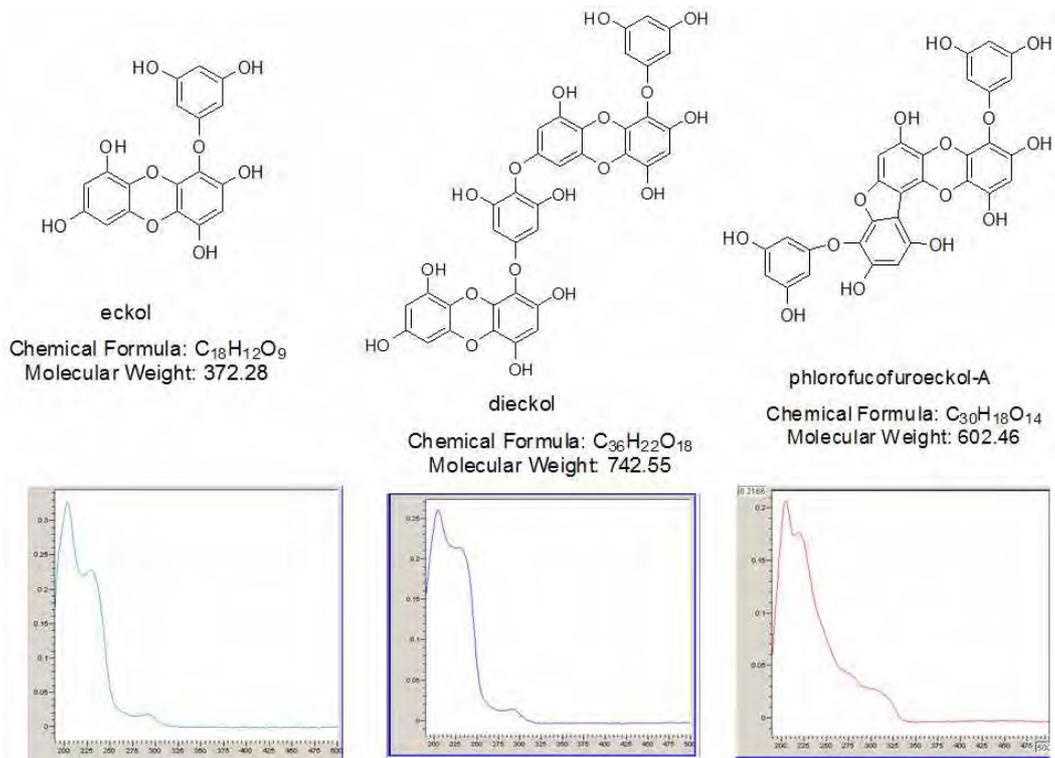


그림 108. 곰피추출물의 지표물질의 분자구조, 분자식, 그리고 UV 스펙트럼

(2) 지표성분의 기준 규격 설정

지표성분의 시험법 설정 시 고려사항으로 추출효율, 컬럼선정, 분석기기선정, 크로마토그램, 표준품 순도, 방해인자 차단 등이 있다. 여러 가지 사항을 고려한 결과 가장 일반적으로 사용되는 HPLC 분석이 phlorotannin계열 성분을 분석하는데 적합하다 판단하였고 다음과 같이 분석법을 설정하였다. UV파장은 phlorotannin계열 성분의 최대 흡수 파장인 254nm를 선정하였다.

- HPLC: Perkin Elmer series 200
- Column: Shiseido capcellpak C18, 4.6 X 250 mm, 5 μm
- UV detector: 254 nm (200-500 nm, DAD)
- Solvent 조성 및 gradient조건 (표 64)

표 64. 곰피 추출물의 HPLC Gradient 조건

Time	Flow(mL/min)	ACN(0.1% formic acid)	Water(0.1% formic acid)
0		15	85
7		15	85
9		18	82
35		20	80
45	0.8	25	75
60		26	74
74		28	72
79		28	72
80		15	85

(3) 곰피추출물의 표준 크로마토그램 확립

곰피 주정추출물에 대한 역상 HPLC-DAD를 사용하여 최적화된 표준크로마토그램은 그림 108에 나타내었다. 확립된 표준크로마토그램에서 dieckol 성분이 가장 높은 함량과 분리도를 나타내어 지표성분으로 가장 적합할 것으로 예상 되었다.

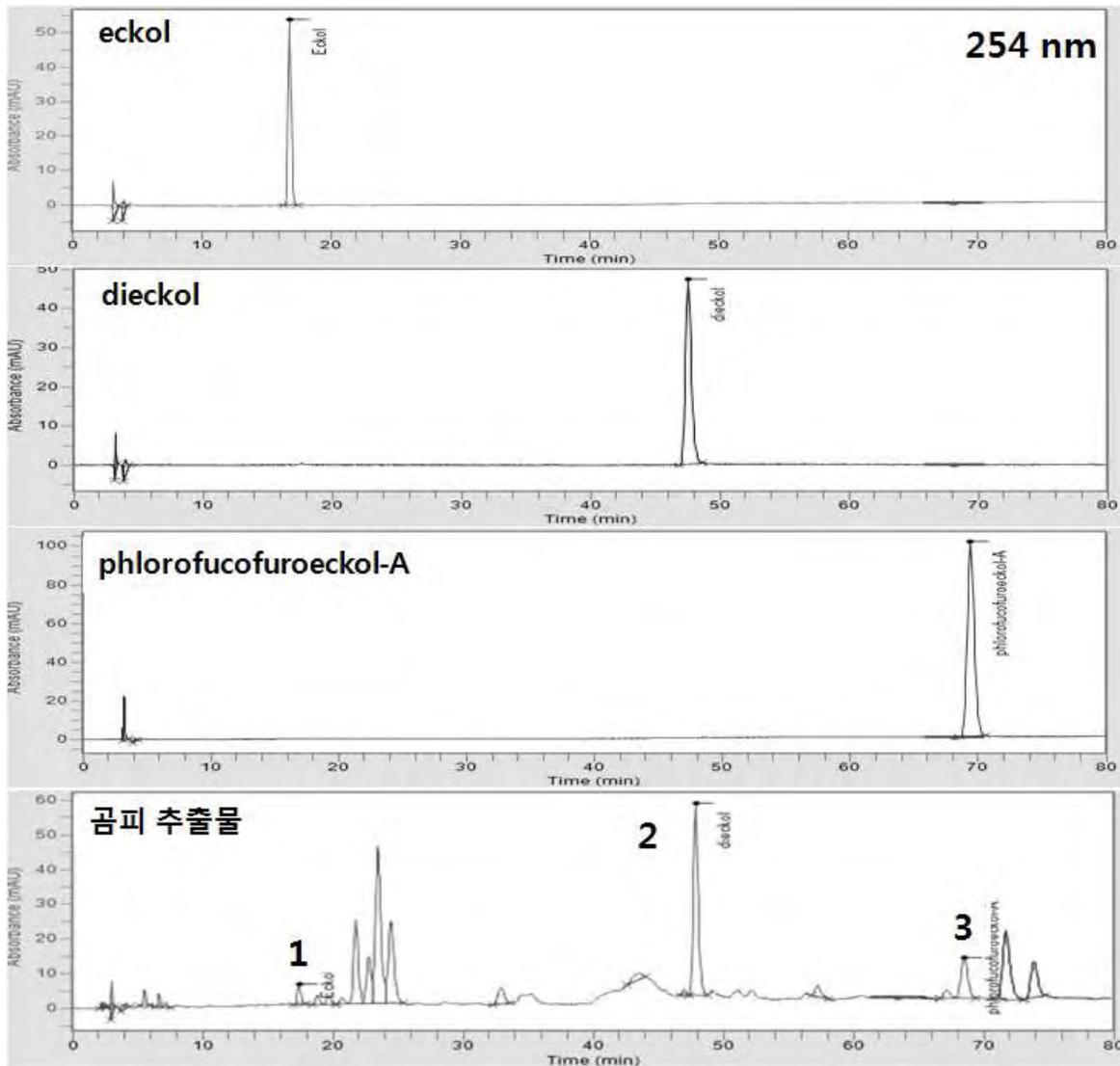


그림 109. 곰피 추출물의 표준 HPLC 크로마토그램. peak 1: eckol, 2: dieckol, 3: phlorofucofuroeckol-A

(4) 지표성분 시험법의 타당성 검증(Validation)

(가) 특이성 (specificity): 불순물, 분해생성물, 첨가물 등이 혼합된 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 평가하는 검증법으로 크로마토그램 제시(표준품/시료) 및 스펙트럼(표준품/시료의 spectrum 비교)을 통해 특이성을 검증하였다. Phlorotanin계열의 지표성분과 곰피추출물의 HPLC 크로마토그램의 Retention time(이하 Rt로 표시, 머무름 시간) 비교와 UV흡수

스펙트럼 패턴의 비교를 통해 시험법의 특이성을 검증하였다. 그 결과 3가지 성분 모두 분석시험 조건에서 선택적인 특이성이 확인되었다(그림 109).

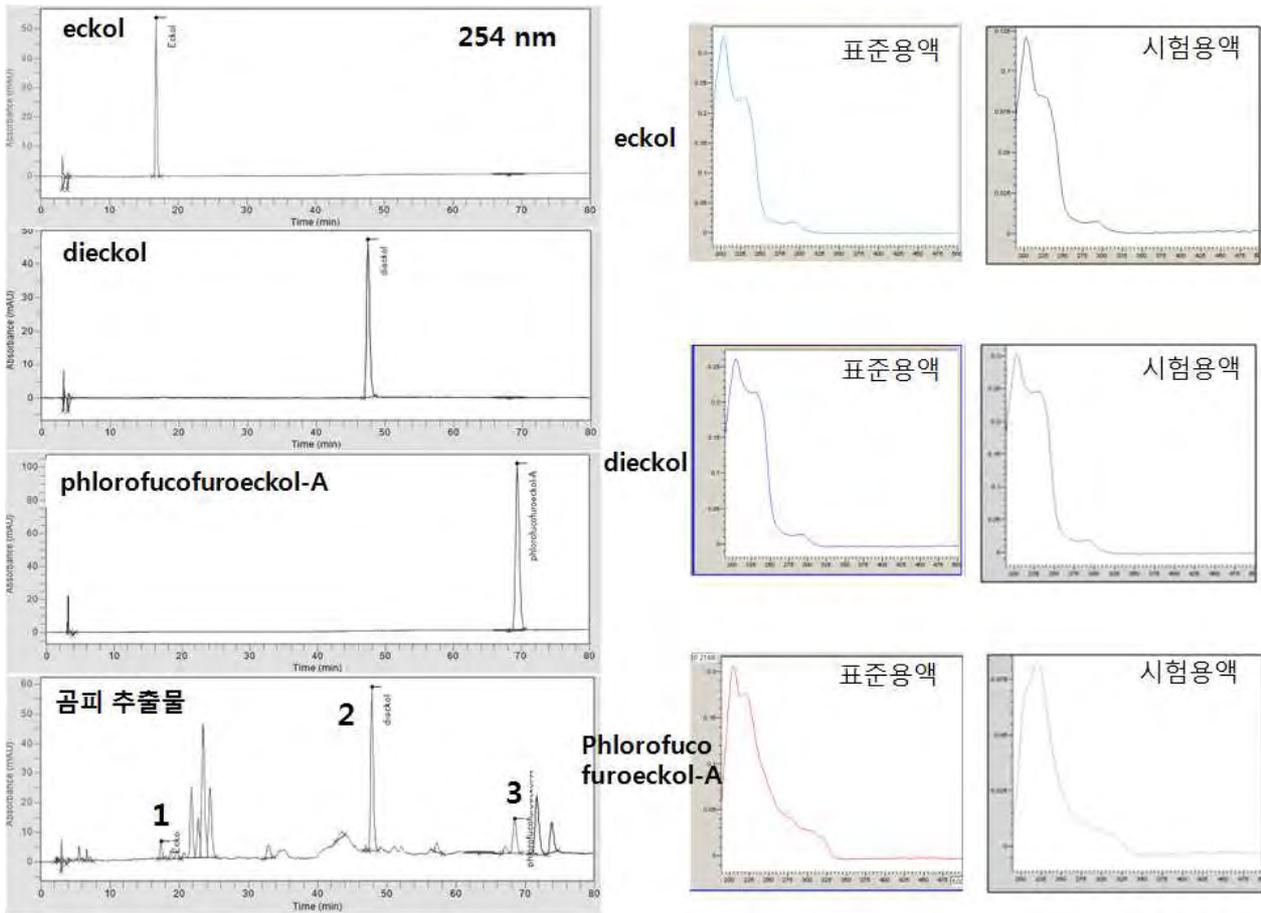


그림 110. 표준품과 시료의 HPLC 크로마토그램(좌), 표준품(표준용액)과 시료(시험용액)의 UV흡수 스펙트럼(우)

(나) 직선성(Linearity): 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 phlorotannin계열 표준품을 희석하여 각 농도에 대해서 직접적으로 직선성을 증명하였다. 이를 위해서 eckol과 phlorofuofuoeckol의 경우 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 5개의 농도를 설정하고 dieckol의 경우 25, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 HPLC 분석하여 직선성을 확인하였다. 그 결과 상관계수(R^2)는 0.99 이상을 나타내었으며 확립된 시험법을 3가지 지표성분 eckol, dieckol, phlorofuofuroeckol-A에 적용하여 시험한 결과 높은 직선성을 가짐을 확인하였다.(표 65, 66, 67)

표 65. eckol의 직선성 검증 결과

농도	면적	그래프
5	50014	
10	94661	
25	243518	
50	477599	
100	962298	
기울기	9606	
y절편	572.4	
상관계수 (R^2)	0.999	

표 66. dieckol의 직선성 검증결과

농도	면적	그래프
25	389707	
50	800469	
100	1636249	
200	3200096	
500	8205024	
기울기	16436	
y절편	-29993	
상관계수 (R^2)	0.99	

표 67. phlorofucofuroeckol-A의 직선성 검증결과

농도	면적	그래프
5	158340	
10	354036	
25	738902	
50	1885391	
100	3832324	
기울기	38609	
y절편	-33773	
상관계수 (R^2)	0.99	

(다) 정밀성(Precision)

균일한 시료로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 시험결과가 각각의 측정값들 간의 근접성(분산정도)을 나타낸다. 정밀성은 반복성, 실험실내 정밀성 등이 있으며 일반적으로 분산, 표준편차 또는 상대표준편차로 나타내어진다.

① 반복 정밀성(병행 정밀성, Repeatability, Intra-assay precision) : 균일한 검체로부터 얻은 다수의 시료를 짧은 시간차로 반복 분석하여 얻은 측정값들 사이의 근접성 평가, 3회 반복하여 평가하였다. 그 결과 3가지 성분 모두 통계적으로 우수한 정밀성을 나타내었다(표 68, 69).

표 68. eckol, phlorofucofuroeckol-A의 반복 정밀성(3회 반복)

RSD/농도	5	10	25	50	100	sample
eckol	0.60	1.14	0.43	0.18	0.45	4.60
phlorofucofuroeckol-A	1.56	0.43	0.33	1.74	1.54	1.58

표 69. dieckol의 반복 정밀성(3회 반복)

RSD/농도	25	50	100	200	500	sample
dieckol	0.23	0.08	2.77	0.11	1.20	0.54

② 실험실 내 정밀성(Inter-mediated Precision) : 다른 실험일을 이용하여 분석 실험하여 얻은 측정값들 사이의 근접성 평가를 3일간 반복하여 평가하였다. 그 결과 phlorofucofuroeckol-A와 dieckol에서는 통계적으로 우수한 실험실 내 정밀성을 보였으나 eckol의 경우 다소 높은 RSD값을 나타내었다(표 70, 71).

표 70. eckol, phlorofucofuroeckol-A의 반복 정밀성 결과 (3일간 반복)

RSD/농도	5	10	25	50	100	sample
eckol	4.81	7.71	6.47	7.37	6.77	4.60
phlorofucofuroeckol-A	3.06	3.06	6.49	4.64	3.22	1.58

표 71. dieckol의 반복 정밀성 결과 (3일간 반복)

RSD/농도	25	50	100	200	500	sample
dieckol	3.75	4.98	4.69	3.74	3.10	0.54

(라) 정확성 (Accuracy)

측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도, 회수율을 구하여 정확성을 검증하였다. 곰피 추출물에서 각각의 지표성분을 이용한 회수율을 구한 결과는 아래의 표 72과 같다. 그 결과 phlorofucofuroeckol-A와 dieckol에서는 95%이상의 높은 회수율을 보였으나 eckol의 경우 94%의 회수율을 나타내었다(그림 113).

표 72. 곰피 추출물에서 3가지 지표성분의 회수율

지표성분	회수율
eckol	94.2 ± 7.4
dieckol	96.2 ± 5.4
phlorofucofuroeckol-A	100.2 ± 5.0

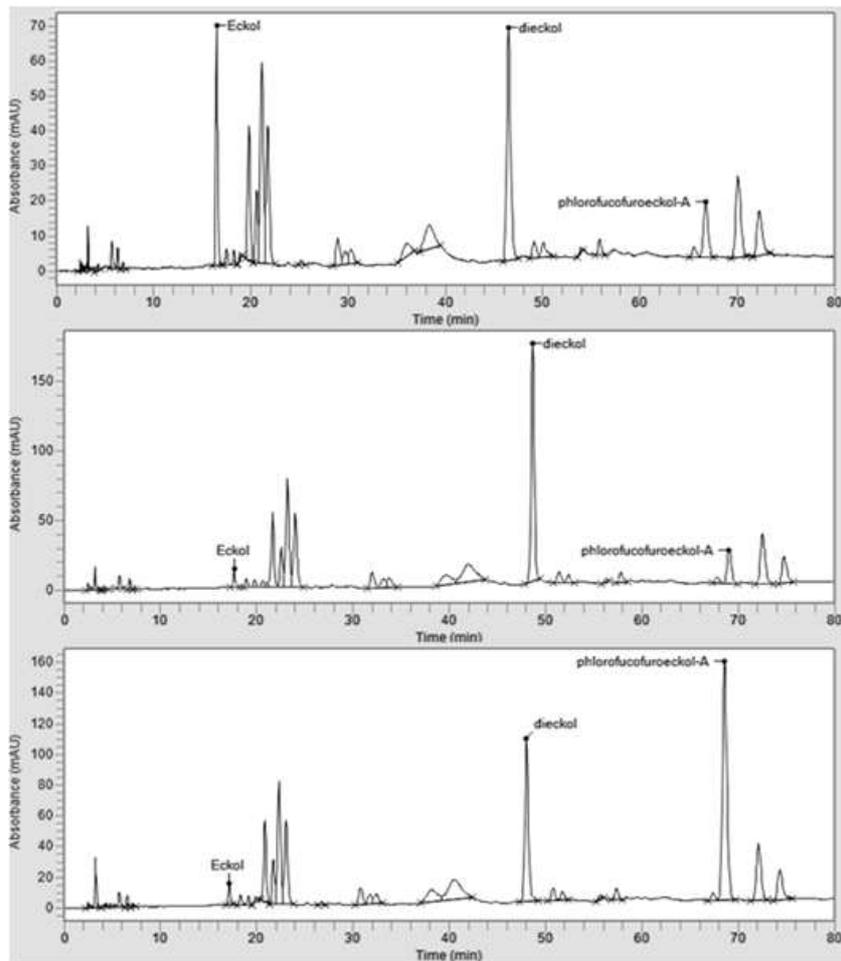


그림 114. 곰피 주정추출물의 지표성분 회수율 시험 표준 크로마토그램. (상) eckol 첨가, (중) dieckol 첨가, (하) phlorofucofuroeckol 첨가한 크로마토그램

(마) 범위(Range)

적절한 정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상 물질 양(또는 농도)의 하한 및 상한 값 사이의 영역으로 최소 규정하는 범위는 80~120% (AOAC, ICH)로 곱피 주정추출물에서 각각의 지표성분인 eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol-A의 평균 함량은 각각 3.80 ± 0.60 , 37.77 ± 3.29 , 3.98 ± 0.88 (mg/g)임을 확립된 시험법을 통해 확인할 수 있었다. 향후 곱피 추출물을 룯트별로 다양하게 분석하여 지표성분으로서 dieckol의 평균 함량을 구하고 이의 80~120%의 범위를 제시하고자 한다.

다. 결론

- 곱피에 함유된 유효성분들 중 특이성, 대표성, 용이성, 안정성 등의 기준시험법 개발지표에 가장 적합한 dieckol을 지표성분으로 설정하였다.
- 곱피추출물의 기능성 및 지표성분인 dieckol의 정량을 위한 분석방법을 개발하여 표준시험법에 의해 Validation 자료를 확보하였다.
- 확립된 dieckol의 표준분석 방법은 곱피추출물의 효능 및 지표물질로서 원료 및 제품의 품질관리에 적용할 수 있을 것이다.

1.2 곰피추출물의 batch별 fingerprint분석을 통한 표준화

가. 실험방법

(1) 표준 크로마토그램 확립

곰피추출물의 batch별 fingerprint 분석을 위해 HPLC 표준 크로마토그램을 확립하였다. 표준 크로마토그램 확립을 위해 2013년에 제조한 주정추출물과 2014년에 서로 다른 경로를 통해 채취하여 70% 주정으로 추출한 뒤 동결건조하여 얻은 시료 2종에 대하여 HPLC 분석을 진행하였다. HPLC 분석방법은 1.1의 실험방법과 같은 조건으로 시행하였다.

(2) 성분 프로파일 검증

비교대상 시료의 크로마토그램을 확보하여 표준 크로마토그램에 나타난 피크들과 동일한 피크들을 선택하여 시료의 성분프로파일을 확보하였다. 확보된 성분프로파일의 각 피크면적과 표준 성분프로파일 상에서의 피크 면적간의 동등상관계수값을 통하여 화학적 유사도를 Pearson correlation방법으로 평가하였다(그림 114).

$$r = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{N}}{\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} \right) \left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{N} \right)}$$

그림 115. Pearson correlation coefficient (r)

나. 실험 결과

(1) 표준 크로마토그램 확립

2013년에 제조한 주정추출물과 2014년에 서로 다른 경로를 통해 채취하여 70% 주정으로 추출한 뒤 동결건조하여 얻은 시료 2종에 대하여 각각의 곰피 주정추출물로부터 성분프로파일을 확보하고 그 피크면적 및 유지시간의 평균값 (mean) 또는 중간값 (median)을 구함으로써 표준 성분프로파일에 대한 수치값을 확보하였다. 표준 성분프로파일을 포함한 크로마토그램을 확보하는 것은 현실적으로 어려우므로 표준시료들의 크로마토그램을 중첩하여 표시하였다(그림 115).

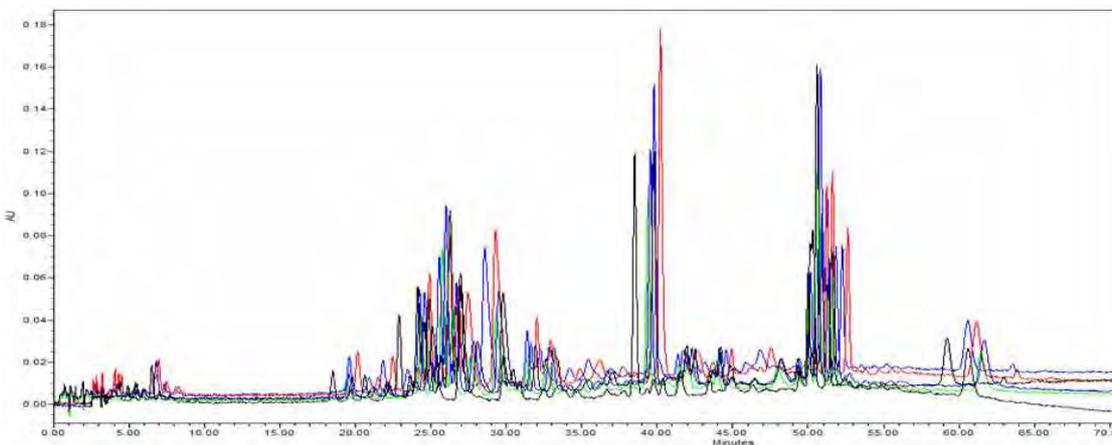


그림 116. 3가지 batch의 곰피 주정추출물의 중첩 크로마토그램

(2) 성분프로파일 검증: 성분프로파일에 의한 화학적 동등성 평가

동등상관계수는 표준 성분프로파일 중의 각 피크의 피크면적 (중간값 또는 평균값이 사용될 수 있으며 이에 대한 우선순위를 정하여야 한다)과 분석시료의 성분프로파일 중에 대응하는 각각의 피크의 피크면적의 상관관계를 나타내는 것으로 계산식은 다음과 같이 구했다.

피어슨상관계수를 이용하여 3 LOT의 곰피 주정추출물간의 동등상관계수를 계산한 결과 표와 같은 값을 나타내었고 평균값을 사용하여 동등상관계수를 비교하였을 때는 0.90이상을 나타내면서 3batch간의 큰 차이가 없었으나 중간값을 사용하면 batch1 번에서 유독 낮은 값을 보이는 경향을 나타내었다. 이는 LOT 2, 3의 peak에 대한 값이 더 유사함을 나타내는 것이고 LOT 1은 2013년도에 채집하고 LOT 2, 3의 경우 2014년도 같은 시기에 채집하여 이러한 경향을 보인다고 유추할 수 있었다(표 73).

표 73. 곰피주정추출물 표준 성분프로파일과 확보된 성분프로파일의 피크를 이용한 동등상관계수

동등상관계수	채집시기	mean	median
LOT1	2013.06	0.91	0.90
LOT2	2014.08	0.92	0.99
LOT3	2014.08	0.94	0.99

다. 결론

- 다양한 곰피 추출물 batch로부터 HPLC fingerprint 비교분석 결과 각 피크들의 상관계수는 0.9 이상으로 나타나 우수한 품질 동등성을 나타내었다.

1.3 원료의 표준화

가. 실험방법

곰피 추출물에서 phlorotannin화합물인 dieckol을 지표성분으로 선정하여 지표성분의 검출 및 확인을 위해 HPLC 분석법을 사용하여 원료에 포함되어 있는 지표성분의 함량을 측정하였다. 총 6회 반복하여 분석을 진행 하였으며 dieckol 표준용액을 이용하여 검량선을 작성 후 함량을 계산하는 방법을 이용하였다. 자세한 방법은 다음과 같다.

(1) 시료 제조

실험에 사용된 곰피 추출물 원료와 dieckol은 부경대 최재수 교수로부터 제공받아 사용하였다. 건조한 곰피를 10분간 물에 담가 불린 후 70% 주정을 이용하여 환류추출 및 정제 농축하여 건조한 분말을 네추럴웨이에서 과립형태로 만들었고 이를 곰피추출물 기능성원료로 하였다.

(2) 분석방법

(가) 표준원액의 제조

지표성분인 dieckol 표준품 1mg을 정밀하게 달아 이를 4ml용량 플라스크에 넣고 Methanol로 녹인 후 이를 표준 원액으로 하였다. (250 $\mu\text{g/mL}$)

상기 표준원액을 각 단계별(10, 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g/ml}$)로 희석하여 검량선 작성용 표준용액으로 하였다.

(나) 시험용액의 제조

곰피 주정 추출물 10mg에 Methanol 1ml을 넣어 30 분간 진행한 후 0.45 μm PTFE syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

(다) 시약 및 재료

HPLC용 용매는 HPLC grade용매 (Fisher, South Korea)를 0.45 μm PTFE filter (ADVANTEC, USA)로 여과한 후 사용하였으며 그 외에 formic acid (Wako, Japan)는 분석용 1급 시약을 사용하였다. 초순수는 ABBOTA NEO 1으로 제조하여 18 M Ω 이상을 사용하였다.

(라) 기기분석 조건

지표성분의 시험법 설정 시 고려사항으로 추출효율, 컬럼선정, 분석기기선정, 크로마토그램, 표준품 순도, 방해인자 차단 등이 있다. 여러 가지 사항을 고려한 결과 가장 일반적으로 사용되는 HPLC 분석이 phlorotannin계열 성분을 분석하는데 적합하다 판단하였고 분석기기는 HPLC는 Waters system을 사용하였고 컬럼은 Atlantis T3 C18 column C18(4.6 X 250 mm, 5 μm)를 사용하였다(표 74).

표 74. 사용기기 및 HPLC 조건

Device	Waters 717 autosampler, 600controller, 2487detector
Column	Atlantis T3 C18 column (4.6 x 250 mm i.d. 5 μm, waters , USA)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	254 nm
Column temp.	25 °C
Mobile phase	solvent A: CH ₃ CN solvent B: H ₂ O (0.1% formic acid)
Gradient condition	A : B = 24 : 76

나. 실험결과

(1) 원료에서의 dieckol의 함량

HPLC 분석결과 곰피 주정추출물에서 지표성분인 dieckol의 함량은 19.16mg/g으로 분석 되었으며 0.45의 낮은 상대표준편차를 나타내었다(표 75).

표 75. 곰피추출물에서의 dieckol의 함량

Replicate	Peak area ratio	Measure conc. (μg/ml)	Sample WT.	Content(mg/g)
1	1196183	192.94	10mg	19.29
2	1185348	191.21	10mg	19.12
3	1183624	190.94	10mg	19.09
4	1193037	192.44	10mg	19.24
5	1183974	190.99	10mg	19.09
6	1184618	191.10	10mg	19.11
			Mean	19.16
			SD	0.86
			RSD	0.45

(2) 분석법 검증(Method validation)

① 특이성

표준원액, 시험용액 및 부형제 시험용액의 지표 물질의 크로마토그램을 확인한 결과 peak 는 모양 및 대칭성이 양호하였고 분석 방해인자가 없음이 확인되었다. 표준원액과 시험용액 의 Mass spectrum 분석결과 지표성분 dieckol이 동등함이 입증되었다. 따라서 특이성이 확보되었다.

② 직선성

일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 표준원액을 희석하여 각 농도에 대해서 직접적으로 직선성을 증명하였다. 지표성분인 dieckol을 10~250 g/ml 범위의 5개의 농도를 사용(n=6)하여 분석한 결과 상관계수(R²)는 0.999로 양호한 직선성을 나타내었다. y-절편, 기울기와 그래프는 아래 표 76에 나타내었다.

표 76. Dieckol의 농도 면적 그래프 및 직선성

농도	면적	그래프
10	55796	
25	145078	
50	288914	
100	582026	
250	1382651	
기울기	5516.3	
y절편	10975	
상관계수(R ²)	0.999	

③ 정확성 (accuracy)

측정값을 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도로, 균질한 검체를 추출, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물 첨가법으로 회수율을 구하여 정확성을 검증하였다.

최종 검액 중 dieckol을 각각 10 ng, 25 ng, 50 ng을 추가한 3 batch의 검액을 분석하여 회수율을 구하였고, 결과를 표 77에 나타내었다. 회수율은 검량선을 이용하여 다음 식1에 의해 계산하였다. 전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물질을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과값으로부터 계산하였으며, 그 결과를 표로 나타내었다. 표 77 에서 볼 수 있는 바와 같이 정확성 실험에서 RSD값이 모두 6% 이하로 나타났다.

표 77. 반복 정확성 결과

Compounds	Fortified amount (ng)	Observed amount (ng)	Recovery mean	Recovery SD	Recovery RSD (%)
dieckol	10	12.84±0.60	128.46	0.64	5.02
	25	25.95±0.79	105.88	0.78	2.94
	50	52.83±1.07	101.58	0.85	1.68

- 실험실 내 정확성: 다른 실험일을 이용하여 분석 실험하여 얻은 측정값들 사이의 근접

성 평가를 3일간 반복하여 평가하였다. 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성은 지표성분의 표준물질을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과 값으로부터 계산하였으며, 그 결과를 아래의 표 78에 나타내었다.

표 78. 정확성 결과

Day	Fortified content (µg/mL)	Observed content (ng)	Recovery mean	Recovery SD	Recovery RSD (%)
Day 1	10	12.84±0.64	128.46	6.45	5.02
	25	25.95±0.77	105.88	3.11	2.94
	50	52.83±0.85	101.58	1.70	1.68
Day 2	10	10.03±0.80	103.55	8.12	7.84
	25	27.44±1.02	111.41	3.08	4.15
	50	52.80±1.04	105.80	2.62	2.47
Day 3	10	9.21±0.58	91.70	5.90	6.44
	25	21.21±0.82	89.11	3.59	4.12
	50	54.89±2.61	85.32	4.99	4.57

곰피 추출물에서 각각의 지표성분을 이용한 회수율을 구한 결과, 전반적으로 85~110 % 사이의 높은 회수율이 나타남에 따라 시험방법이 높은 정확성을 가짐을 검증할 수 있었다. 가장 낮은 농도인 10 µg/mL을 추가한 경우 회수율 범위를 약간 상회하는 결과를 보였다.

④ 정밀성 (precision)

㉞ 반복성 (repeatability)

피크면적의 반복성은 각각의 standard로 분석기기가 시간의 변화에 따라 변화하는 정도를 보기 위하여 연속 6회 injection하여 retention time과 area의 변화를 확인하였으며, 그 결과를 표 79에 나타내었다. 표 79에서 볼 수 있는 바와 같이 반복성은 RSD값이 모두 5%이하로 적합하게 나타내었다.

표 79. dieckol의 반복 정밀성 결과 (6회 반복)

dieckol conc.	Peak area			Retention time		
	average	SD	RSD (%)	average	SD	RSD (%)
10ppm	55796	967	1.73	16.05	0.14	0.87
25ppm	145078	2015	1.39	16.34	0.10	0.64
50ppm	288914	5532	0.91	16.41	0.27	1.63
100ppm	582026	4794	0.82	16.49	0.02	0.12
250ppm	1382651	67003	4.85	16.22	0.39	2.37

㉞ 정밀성 (precision)

전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물질을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과 값으로부터 계산하였으며, 그 결과를 표 80에 나타내었다. 표 80에서 볼 수 있는 바와 같이 precision은 intra-day 및 inter-day 실험에서 모두 6% 이하로 나타났다.

표 80. dieckol의 반복 정밀성 결과 (3일간 반복)

Replicate	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					Curve parameters		
	10	25	50	100	250	Slope	intercept	R ²
Day 1	11.17	25.83	49.46	97.61	250.94	6087.5	-12172	0.9998
Day 2	10.80	25.33	49.72	98.60	250.55	6489.5	-18822	0.9999
Day 3	9.94	24.99	50.45	99.51	250.11	6259.3	-11530	0.9999
Mean	10.64	25.38	49.88	98.57	250.53	6278.7 7	-14175	1.00
SD	0.63	0.42	0.51	0.95	0.41	201.71	4037	0.00
RSD	5.89	1.67	1.03	0.96	0.17	3.21		

⑤ 검출한계 (LOD)와 정량한계 (LOQ)

검량선의 y절편의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 표준용액을 단계별로 3회 반복 측정된 평균값으로 검량선을 작성하여 다음의 식에 따라 계산하여 검출한계와 정량한계를 확인하였다.

$$\text{LOD} = 3.3 * \sigma / S$$

$$\text{LOQ} = 10 * \sigma / S$$

(σ : y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

기울기 s는 분석대상물질의 검량선으로부터 구하였으며 표준편차(σ)는 정량한계 내에 있는 분석대상물질을 포함한 검체를 사용하여 특이적인 검량선을 작성한 후 y절편의 표준편차를 표준편차 σ 로서 이용하였다. 그 결과 검출한계 (LOD)는 $2.12 \mu\text{g/mL}$ 정량한계 (LOQ)는 $6.42 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

⑥ 범위 (range)

정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 시험용액 중 지표성분의 농도 범위는 $10 \sim 250 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

다. 결론

- 곱피추출물에서 dieckol의 평균 함량은 19.16mg/g 이었고 시험농도의 $80 \sim 120\%$ 범위를 일반적으로 함량기준으로 설정하므로 $15.32 \sim 22.99\text{mg/g}$ 으로 원료규격을 설정하였다.
- 지표성분인 dieckol에 대한 분석법 validation 결과 식약처에서 규정한 모든 항목에 적합한 결과를 나타내었다.

2. 곰피 주정추출물의 대량 생산 공정

가. 곰피 주정추출물 제조 표준화

GMP시설을 갖추고 있는 신라바이오텍에서 대량생산 공정 최적화를 진행하였다.

(1) 곰피의 추출 및 건조

추출에 앞서서 Lab scale로 추출 용매 조건을 검토한 후 대량 생산 공정을 개발하였다.

추출에 앞서 해조류 등은 많은 양의 염을 함유하고 있기 때문에 곰피의 수분 보유율과 염의 농도 변화를 조사하였다. 염의 농도는 염분계를 이용하여 측정하였으며 10-15분 정도 수도수에 침지하면 최초 염도계 0.8에서 0.0으로 나타났다 (그림 117). 이때 약 15%의 수분을 보유하고 24시간이 지나면 수분을 약 30% 보유하게 된다. 따라서 주정 100%를 첨가하여 추출하면 70% 주정 추출물을 얻게 되었다.

MeOH, EtOH, 70% MeOH과 70% EtOH 등, 여러 가지 용매 조건에 따른 수율의 변화를 살펴 보면 건조중량 100 gram당 각각 14.6 ± 1.1 , 13.2 ± 0.5 , 25.7 ± 2.2 와 23.5 ± 1.8 gram의 수율을 나타내었다. 추출 조건은 95°C에서 3시간 2회 추출하였다.

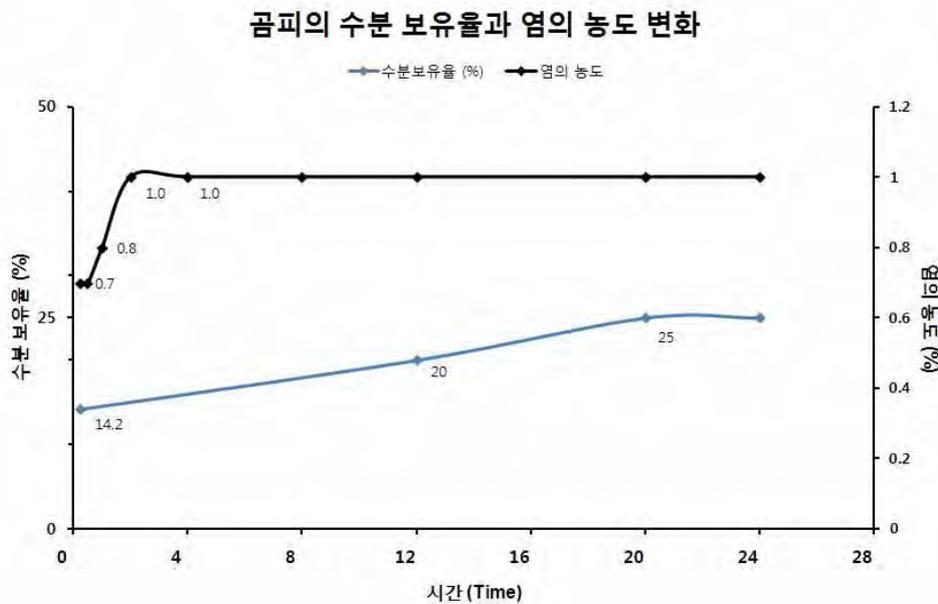


그림 118. 곰피의 수분 보유율과 염의 농도 변화

표 81. Lab scale에서 건조 곰피 1 kg의 용매 조건에 따른 수득률 비교

	용매			
	MeOH	70% MeOH	EtOH	70% EtOH
수율 (건조중량) (g/100 g)	14.6 ± 1.1	25.7 ± 2.2	13.2 ± 0.5	23.5 ± 1.8

경남 통영 연안에서 양식한 곰피 2톤을 확보하여 수세 후 이물질 혼입 여부를 검사하고 통풍 상태에서 약 일주일간 건조하여 시료로 사용하였다. 건조한 시료는 추출기를 이용하여 추출하고 농축기를 사용하여 증발 농축시켰다(그림 118). 추출 규모에 따른 수율은 대량생산과 Lab scale에서 유의적인 변화가 없었다(표 82).

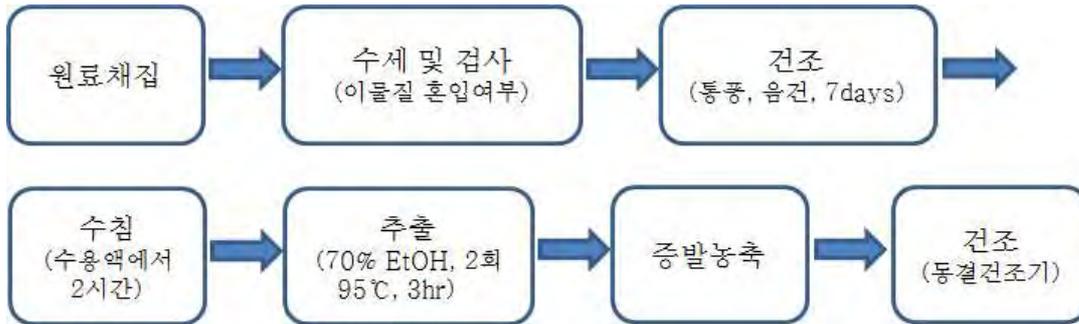


그림 119. 대량생산 공정

표 82. 대량 추출 (70% EtOH) 에 따른 수율

시료 (건조중량 100 kg)	
수율 (g/ 100 g)	18.5±0.5



그림 120. Lab scale 추출기 및 농축기



그림 121. 대량 추출기 및 농축기



그림 122. 건곰피의 선별 작업 및 추출용 부직포 소분 작업



그림 123. 3 ton 반응기를 이용한 곰피의 대량추출 작업



그림 124 . 곰피 추출에 사용된 주정



그림 125. 추출 후 곰피 잔여물

(2) 공정단계별 지표성분의 변화

부산시 기장군에서 채취한 곰피를 70 % 에탄올 추출하여 얻은 추출물을 동결건조하여 실험에 사용하였다.

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(ug/mg extract)	수율 (%)
원재료(곰피)			Eckol: 1.4 Dieckol: 4.3 Phlorofucofuroeckol-A : 2.3	
↓				
세척				
↓				
추출	70% 에탄올/열수	70 °C/9시간		
↓				
여과		filterpaper		
↓				
농축	진공농축기	40°C/in vacuo		
↓				
동결건조	동결건조기	-47°C/2 days		
↓				
곰피 powder			Dieckol: 19.1	18~19

수율 (%): 건조한 원재료에 대한 최종 건조된 70 % 에탄올 추출물의 수율

나. 결론

- 곱피 주정추출물의 대량생산공정은 신라바이오텍의 GMP 시설장비를 이용하여 수행하였다.
- 곱피의 수세 및 검사(이물질 혼입여부), 건조(통풍, 음건), 수침, 70% 주정추출, 증발농축, 동결건조의 공정으로 표준공정을 설정하였다.
- 건조한 곱피 1,500kg을 수침하는 과정부터 시작하여 동결건조하여 최종 곱피추출물 327.5kg을 생산하는 표준공정으로 최종 yield는 18.5%로 나타났다.

3. 인체적용시험을 위한 효능 및 용량확인시험

가. 실험방법

(1) 세포배양

American type culture collection (ATCC)으로부터 분양받은 Human hepatoma 세포주인 HepG2를 10% FBS, 100 U/ml penicilline 과 100 $\mu\text{g/ml}$ sterptomycin이 포함된 high glucose-DMEM media를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 배양하였다.

(2) 세포 보호능 측정

곰피 에탄올 추출물과 곰피로부터 분리한 phlorotanin (eckol, dieckol 및 phlorofucofuroeckol-A)의 에탄올 처리에 의한 간보호능을 확인하기 위함이다. 양성대조군으로는 실리마린을 이용하였다.

독성이 나타나지 않는 다양한 농도범위내의 시료를 HepG2 세포에 1시간 전 처리했다.

1시간 후 100 mM의 에탄올을 처리한 다음 24시간 동안 배양했으며, 24시간 후 세포 생존률을 확인하는 방법인 MTT 용액을 이용하여 세포 보호능을 측정하였다.

(3) 배양액 내에서의 ALT/AST 농도 측정

위의 세포 보호능을 확인하는 방법과 동일하게 시료와 에탄올을 처리하였으며, 24시간 후 세포배양액을 수거하여, 배양액 내의 ALT/AST 농도를 측정하였다.

(4) 과산화지질 분석

시료 처리 방법은 동일하며, 24시간 배양 후 PBS를 이용하여 세포를 2회 세척해줬다.

0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 200 μl 를 넣고 세포를 균질화 시켰다.

sonication 후 3000 g, 10 분간 원심분리를 실시했으며, 상등액을 이용하여 단백질 정량과 과산화지질을 측정하였다.

상등액에 20% TCA와 46 mM TBA를 혼합해준 다음 85°C에서 30 분간 boiling 해 주었다. 상온에 1 시간 방치 후 3,500 rpm에서 10 분간 원심분리 한 다음 상등액을 이용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

(5) 간독성 유도 방법(*in vivo*)

(가) 마우스에서의 간독성유도

- ICR mice 수컷 흰쥐 (8주령, 30 \pm 2 g)를 22°C, 약 60%의 습도 하에 사육하였다.

- 실험군은 6마리씩 6군으로 나누어 정상사료를 공급하여 사육하였다.

- 제 1군은 정상군으로 saline을 공급하고, 제 2군은 5 g/kg bw/day으로 ethanol을 공급하였다.

- 제 3, 4, 5군은 각각 1 g/kg bw/day, 5 g/kg bw/day, 10 g/kg bw/day의 시료를 경구 투여하고 30분 후 5 g/kg bw/day으로 ethanol을 투여하였다.

- 제 6군은 silymarin을 25 mg/kg bw/day을 경구투여하고 30분 후 5 g/kg bw/day으로

ethanol을 투여하였다.

- 각각의 시료를 8일간 공급한 후 12 시간 동안 절식시킨 뒤 diethyl ether로 마취시켜 cardiac puncture로 채혈하였다.
- 채혈된 혈액은 원심분리관에 넣어 실온에서 30분간 방치시킨 후 원심분리 (600 x g, 15 min)하여 혈청을 분리한 즉시 분석에 사용하였다.
- 혈액채취 후 바로 간을 적출하여 탈혈한 다음, 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하여 초저온 냉동고에 보관하였다 (-70°C).

(나) 랫트에서의 간독성유도

- 6주간의 식이 후에 rat은 총 7군(n=12/군)으로 구성함. 정상 식이군(ND), 정상식이 + 글 peptide 경구 투여군 (ND+00), 에탄올 식이군(ED), 에탄올 식이 +글 peptide 경구 투여군 (ED+저), 에탄올 식이 + 글 peptide 경구 투여군 (ED+중), 에탄올 식이 +글 peptide 경구 투여군 (ED+고), 에탄올 식이 + Sylimarin 100mg/kg 투여군(ED+S)으로 구성하였다.
- 각각의 시료는 6주 식이 후에 매일 오전 10시경에 2ml로 경구투여 하며, ND군과 ED군은 saline을 2ml 경구투여 하였고 경구 투여 기간은 4주간 진행하였다.
- 0, 6, 8, 10 주에 sacrifice 하기 전 12시간을 절식시키고 에테르를 사용하여 마취하여 혈액을 채취하고 간을 채취하였다.
- 혈액은 3,000 rpm, 4°C 에서 15분 동안 원심 분리(Vision scientific Co, Ltd., Korea)하여 혈청을 분리한 뒤 실험 전까지 -70°C에 보관하였다.
- 간은 생리식염수를 간문맥을 통해 주입하여 혈관 속의 혈액을 제거하고 간은 적당한 크기로 절단하여 알루미늄 호일에 싼 후 -70°C에 보관하였다.

(6) 혈중 간손상 지표(GOT/GPT)

GOT/GPT는 간세포성 손상을 나타내는 지표이다. 실험동물 희생 후 채혈한 혈액에서 분리한 혈청을 이용하여 상업용 kit로 GOT/GPT 값을 분석하였다.

(7) 혈청에서의 지질 농도 측정

에탄올은 간에서 중성지방 (Triglyceride, TG)의 생성을 증가시키고 이로 인해 콜레스테롤의 생성도 증가하였다. 유리지방산 (Free fatty acid, FFA), 중성지방, 총 콜레스테롤 및 고밀도 지단백 콜레스테롤 (High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)은 실험동물 희생 후 채혈한 혈액에서 분리한 혈청을 이용하여 상업용 kit로 분석하였다.

(8) 간 조직 내 지질 농도 측정

FFA, TG, TC 및 HDL-C은 실험동물 희생 후 분리한 간에서 지질을 추출한 후 상업용 kit로 분석하였다.

(9) 간조직 Oil-Red O 염색

실험동물 희생 후 saline을 이용하여 혈액을 제거한 간조직을 10% formaline에 고정하였

다. 고정된 간조직에서 증류수를 이용하여 formaline을 제거한 다음 냉동 절편을 만들어 Oil-Red O로 간조직의 지방구 염색을 실시하였다.

나. 실험결과

(1) 간세포 보호효능

농도별 시료를 처리한 후 세포 보호능을 확인하였다. 처리한 모든 시료에서 농도 의존적으로 유의성 있는 결과를 확인할 수 있었으며, 곰피추출물은 실리마린과 비슷한 정도의 효능을 나타냈다. 분리한 성분 중 dieckol, phlorofucofuroeckol-A의 효능이 양성대조군인 실리마린 보다 월등히 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(그림 126).

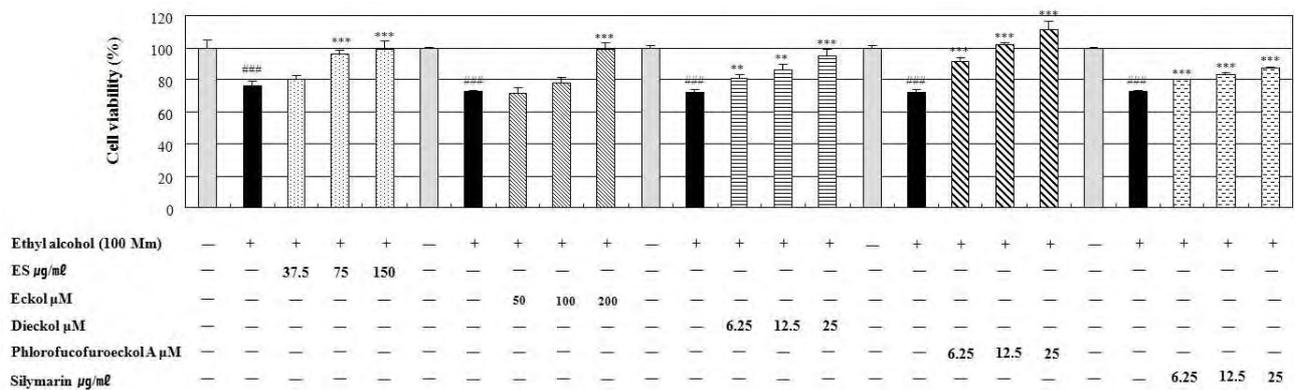


그림 127. Human hepatoma 세포주인 HepG2 세포를 이용한 곰피 또는 phlorotannin의 세포 보호능. ### $p < 0.001$ 은 정상대조군 대비 유의성을 나타낸 것이며, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 은 알코올 처리 대조군 대비 유의성을 나타낸 것임.

(2) 간세포 손상지표인 AST/ALT 활성 및 과산화지질 생성량의 변화

세포 배양액 내로 분비된 AST(A)/ALT(B) 농도와 세포내 생성된 MDA량(C)을 측정하였다. AST/ALT의 경우 처리한 모든 시료에서 농도의존적으로 유의성 있게 농도가 감소하였으며, 위의 세포 보호능 결과와 마찬가지로 dieckol, phlorofucofuroeckol-A의 효능이 양성대조군인 실리마린 보다 월등히 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(그림 127).

이 때의 MDA 생성억제능을 보면, 처리한 모든 농도에서 농도의존적으로 유의성 있게 감소하였으며, 위의 세포 보호능 결과와 마찬가지로 dieckol, phlorofucofuroeckol-A의 효능이 양성대조군인 실리마린 보다 월등히 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

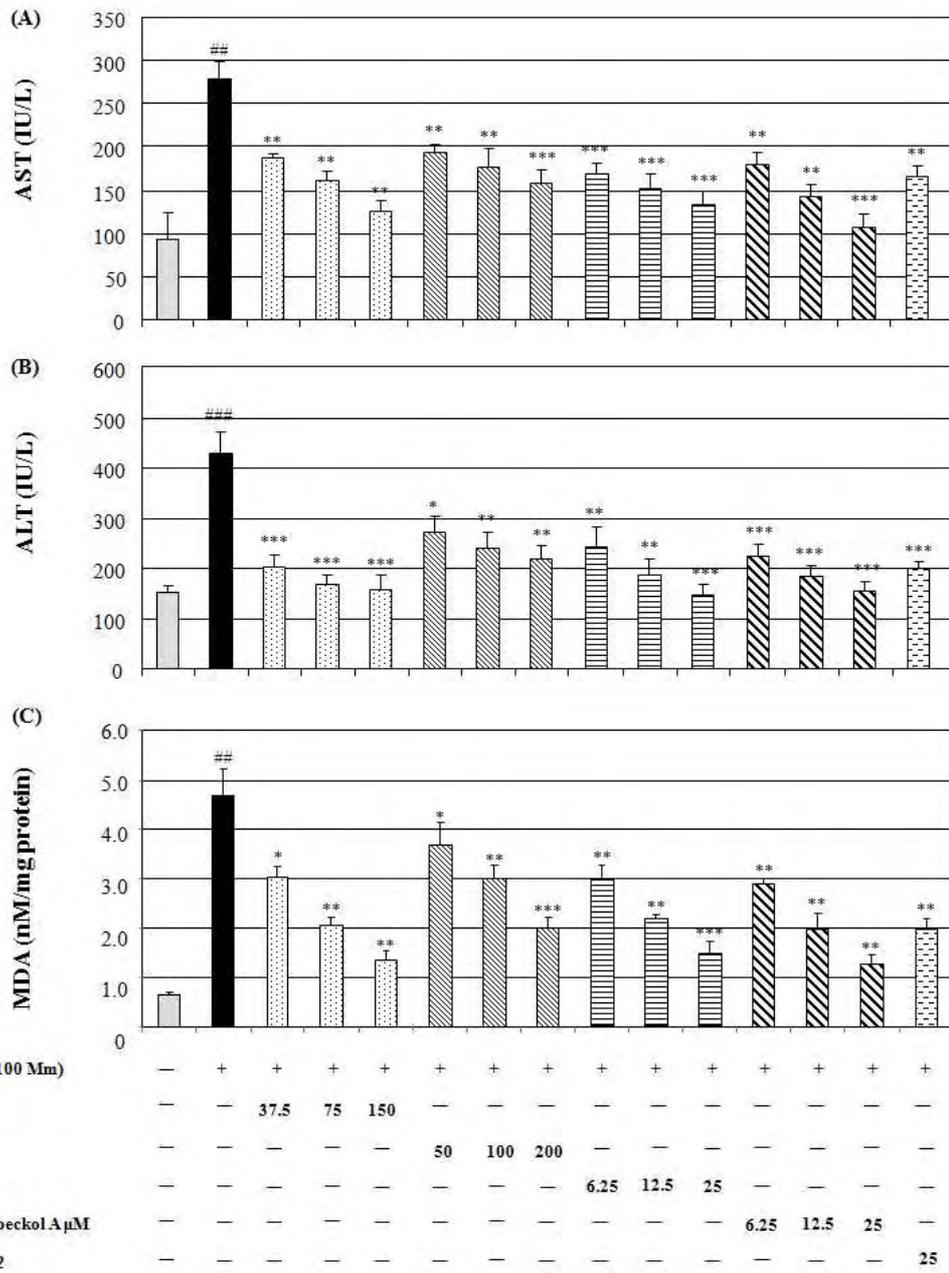


그림 128. 곰피 추출물 또는 곰피로 부터 분리한 phlorotannin이 HepG2 세포의 AST/ALT 활성 및 과산화지질 생성에 미치는 영향. ^{##} $p < 0.01$ 및 ^{###} $p < 0.001$ 은 정상대조군 대비 유의성을 나타낸 것이며, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ 및 ^{***} $p < 0.001$ 은 알코올 처리 대조군 대비 유의성을 나타낸 것임.

(3) 마우스에서의 곰피추출물의 간보호 효과

(가) 혈중 간손상 지표(GOT/GPT)의 변화

정상군에 비해 에탄올을 투여하여 독성을 유발한 군에서 GOT와 GPT가 각각 33%, 34% 증가하였다. GOT를 보면 양성대조군인 실리마린과 농도별 곰피 추출물에 의해 수치가 각각 31.1%, 26.4%, 26.0%, 및 34.4% 감소하였으며, GPT의 경우 각각 36.7%, 28.3%, 33.2% 및 39.4% 감소하였다(그림 128).

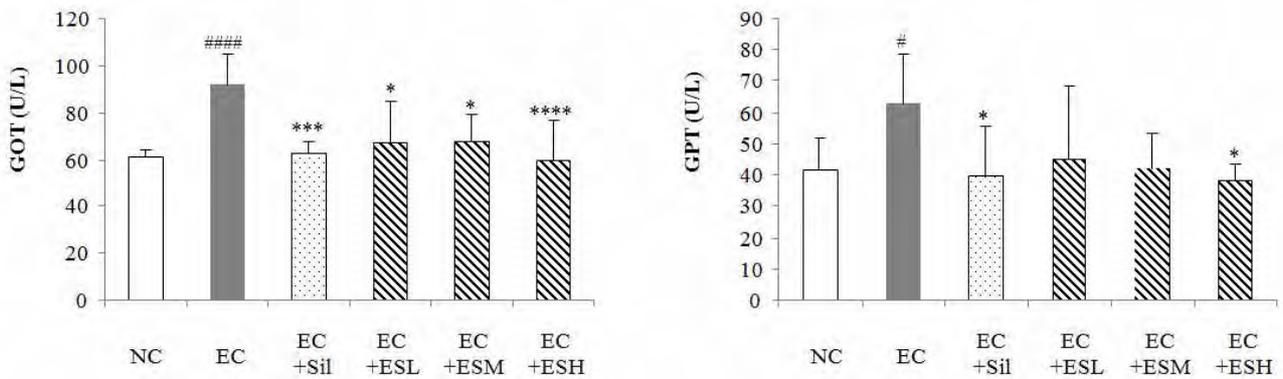


그림 129. 곰피 주정추출물과 에탄올을 투여한 마우스에서의 혈중 GOT 및 GPT 농도. (NC, 8일 동안 0.5% CMC 경구 투여 30 분 후 12시간 이내 총 3회 saline 경구 투여; EC, 8일 동안 0.5% CMC 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여; EC+Sil, 8일 동안 100 mg/kg 실리마린 (0.5% CMC에 용해) 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여; EC+ESL/EC+ESM /EC+ESH. 8일 동안 곰피 주정추출물 각각 50(저용량)/100(중용량)/200(고용량) mg/kg 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여. 실험동물 수는 군당 5~7 마리였으며 이들 실험동물의 결과 수치를 이용하여 SPSS 통계프로그램을 통해 유의성을 나타내었음. # $p<0.05$ 및 ### $p<0.001$ 은 정상군 대비 에탄올 투여군에서의 유의적 차이를 나타낸 것이고, * $p<0.05$, *** $p<0.005$ 및 **** $p<0.001$ 은 에탄올 투여군 대비 실리마린 또는 농도별 곰피 주정 추출물 군에서의 유의적 차이를 나타낸 것임.

(나) 혈청에서의 지질 농도 변화

정상군에 비해 에탄올을 투여하여 독성을 유발한 군에서 FFA, TG 및 TC의 농도가 증가한 반면, HDL-C 및 HDL-C/TC 비율은 감소하였다. 하지만 실리마린 또는 농도별 곰피 주정추출물 투여에 의해 지질생성이 억제되면서 FFA, TG 및 TC의 수치는 농도 의존적으로 유의성 있게 감소한 반면, HDL-C 및 HDL-C/TC 비율은 증가하는 효과를 나타내었다(그림 129). 특히, 양성대조군인 실리마린과 곰피 주정추출물 중용량에서 비슷한 결과를 확인할 수 있었다. 이는 곰피 주정추출물의 인체적용시험 용량을 실리마린과 비슷한 용량에서 실시할 수 있음을 시사한다 할 수 있다.

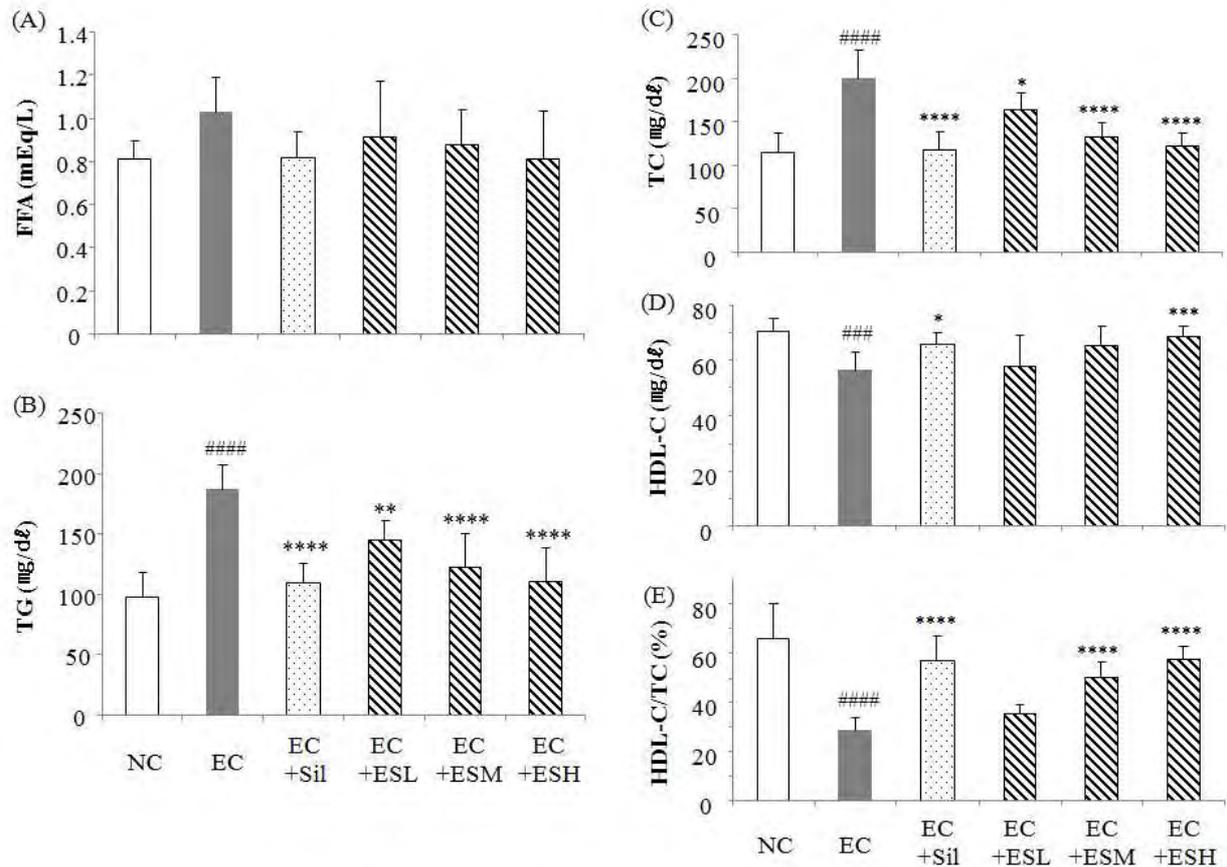


그림 130. 곰피 주정추출물과 에탄올을 투여한 마우스에서의 혈청 내 (A) 유리지방산, (B) 중성지질, (C) 총 콜레스테롤 (D) 고밀도 지단백 콜레스테롤 및 (E) HDL-C/TC 비율 측정. (NC, 8일 동안 0.5% CMC 경구 투여 30 분 후 12시간 이내 총 3회 saline 경구 투여; EC, 8일 동안 0.5% CMC 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여; EC+Sil, 8일 동안 100 mg/kg 실리마린 (0.5% CMC에 용해) 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여; EC+ESL/EC+ESM/EC+ESH. 8일 동안 곰피 주정추출물 각각 50(저용량) /100(중용량)/200(고용량) mg/kg 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여. 실험동물 수는 군당 5 마리였으며 이들 실험동물의 결과 수치를 이용하여 SPSS 통계프로그램을 통해 유의성을 나타내었음. ### $p < 0.05$ 및 #### $p < 0.001$ 은 정상군 대비 에탄올 투여군에서의 유의적 차이를 나타낸 것이고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ 및 **** $p < 0.001$ 은 에탄올 투여군 대비 실리마린 또는 농도별 곰피 주정 추출물 군에서의 유의적 차이를 나타낸 것임.)

(다) 간 조직 내 지질 농도 변화

간 조직 내의 TG, TC, FFA는 곰피 추출물과 실리마린 투여군에서 모두 유의적으로 감소하였으며, 반면에 HDL-C 및 HDL-C/TC 비율은 유의적으로 증가하였다. 양성대조군인 실리마린과 곰피 주정추출물 중용량에서 비슷한 결과를 확인할 수 있었다(그림 130).

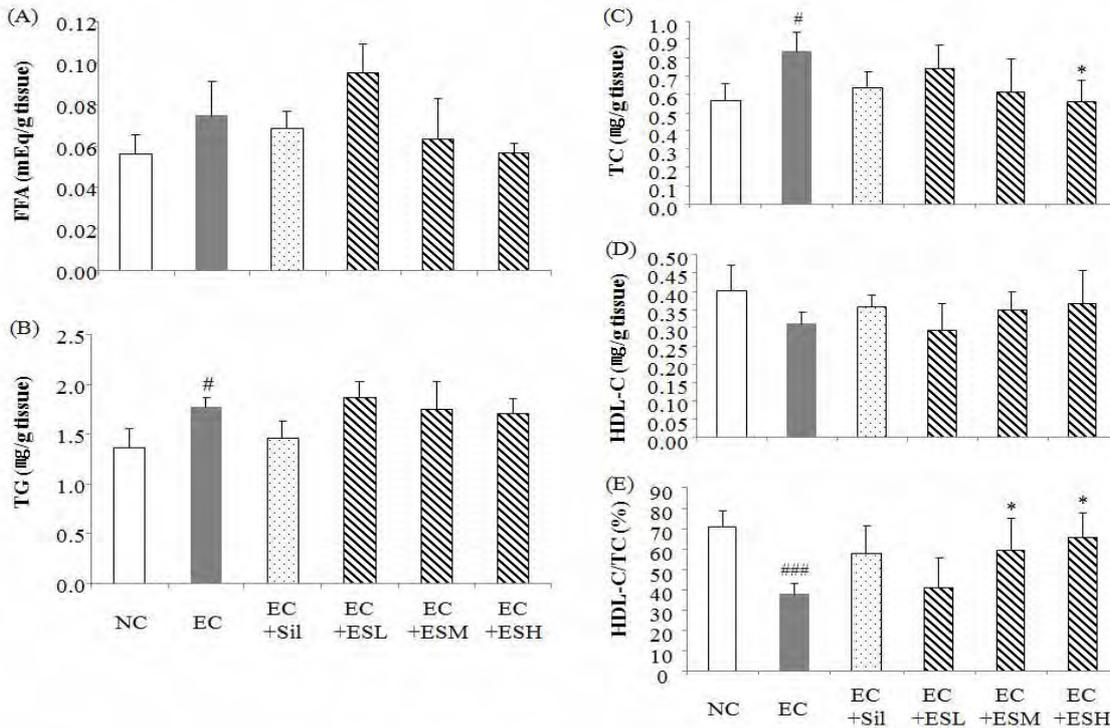


표 131. 곰피 주정추출물과 에탄올을 투여한 마우스에서의 간 조직 내 (A) 유리 지방산, (B) 중성지질, (C) 총 콜레스테롤 (D) 고밀도 지단백 콜레스테롤 및 (E) HDL-C/TC 비율 측정. (NC, 8일 동안 0.5% CMC 경구 투여 30 분 후 12시간 이내 총 3회 saline 경구 투여; EC, 8일 동안 0.5% CMC 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여; EC+Sil, 8일 동안 100 mg/kg 실리마린 (0.5% CMC에 용해) 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여; EC+ESL/EC+ESM/EC+ESH, 8일 동안 곰피 주정추출물 각각 50(저용량) /100(중용량)/200(고용량) mg/kg 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여. 실험동물 수는 군당 5 마리였으며 이들 실험동물의 결과 수치를 이용하여 SPSS 통계프로그램을 통해 유의성을 나타내었음. ### $p < 0.05$ 및 #### $p < 0.001$ 은 정상군 대비 에탄올 투여군에서의 유의적 차이를 나타낸 것이고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ 및 **** $p < 0.001$ 은 에탄올 투여군 대비 실리마린 또는 농도별 곰피 주정 추출물 군에서의 유의적 차이를 나타낸 것임.)

(4) 랫드에서의 곰피추출물의 간보호 효과

(가) 혈중 간손상 지표(GOT/GPT)의 변화

정상군에 비해 에탄올 유도군에서 GOT 및 GPT의 활성이 각각 약 50, 84% 증가하였으며, 양성대조군인 실리마린에서 각각 31.5, 23.5% 감소하였다. 곰피 투여군에서는 농도의존적으로 감소하였으며, 특히 고용량으로 갈수록 실리마린 보다 간보호활성이 우수하다는 것을 확인할 수 있었다(그림 131).

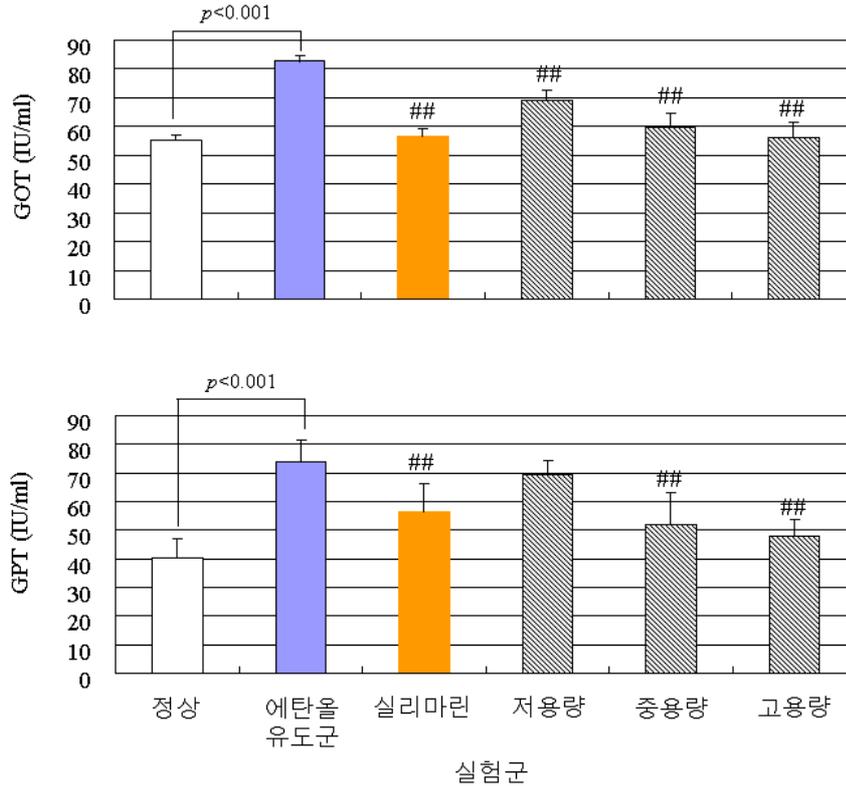


그림 132. 에탄올 식이를 이용한 만성알코올성 지방간을 유도한 실험 동물에서 곰피 추출물 투여에 의한 혈중 GOT 및 GPT 농도 개선 효과.

실리마린; 실리마린 100 mg/kg, 저용량/중용량/고용량; 곰피 50/100/200 mg/kg 4주간 경구투여. ## $p < 0.001$ 은 에탄올 투여군 대비 실리마린 또는 농도별 곰피 주정 추출물군에서의 유의적 차이를 나타낸 것임.

(나) 혈청에서의 지질 농도 변화

혈중 FFA 및 TG의 농도를 측정하였다. 정상군에 비해 에탄올 대비군의 혈중 FFA 및 TG의 농도가 유의성 있게 증가한 반면 실리마린 또는 곰피 추출물 투여에 의해 그 수치가 감소하였다. 실리마린군과 곰피 중용량의 경우 그 수치가 비슷하였으며, 곰피 고용량은 실리마린 보다 혈중 지질농도 개선에 더 좋은 효과를 보였다(그림 132).

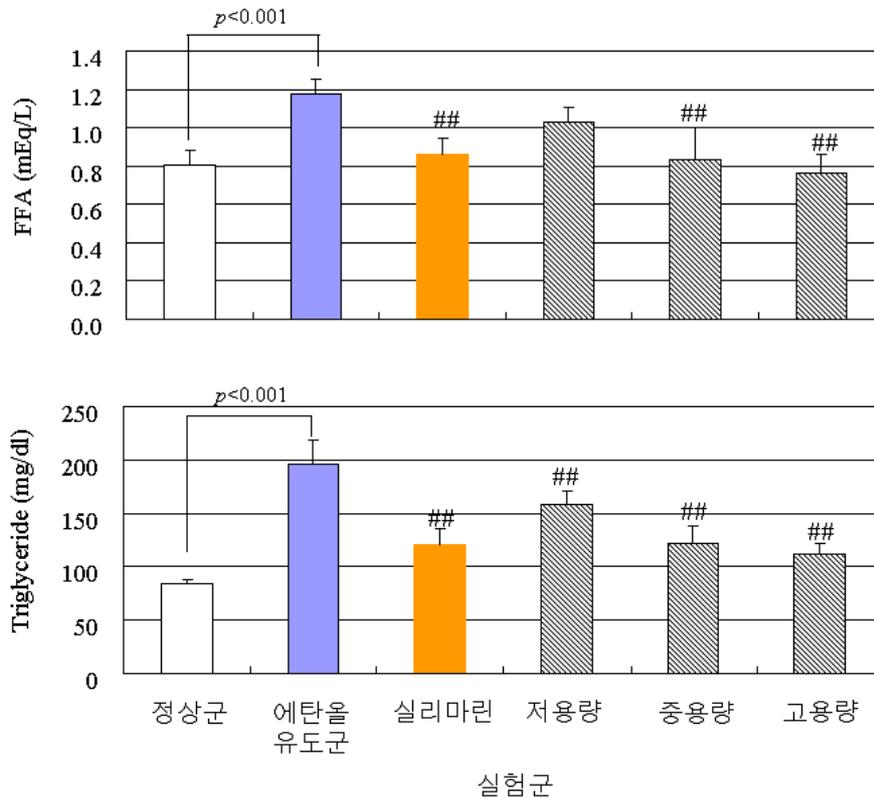


그림 133. 에탄올 식이를 이용한 만성알코올성 지방간을 유도한 실험 동물에서 곰피 추출물 투여에 의한 혈중 지질 개선 효과. ## $p < 0.001$ 은 에탄올 투여군 대비 실리마린 또는 농도별 곰피 주정 추출물군에서의 유의적 차이를 나타낸 것임.

혈중 TC, HDL-C 및 그 비율을 측정하였다. TC를 보면 정상군에 비해 에탄올 지방간을 유도한 대조군에서의 농도는 유의적으로 증가하였다. 하지만 실리마린 또는 용량별 곰피 주정추출물 투여에 의해 지질생성이 억제되면서 그 수치가 감소하였으며, 특히 실리마린과 곰피 추출물 중용량의 수치가 비슷하였고 고용량에서는 더 좋은 감소 효과를 나타내었다. HDL-C 및 HDL-C/TC 비율을 보면 에탄올 대조군의 수치가 정상군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 실리마린 또는 곰피 추출물 투여에 의해 증가함을 확인하였다. 마찬가지로 곰피 중용량에서 실리마린과 비슷한 경향을 보였으며, 고용량에서 더 좋은 개선 효과를 나타내었다(그림 133).

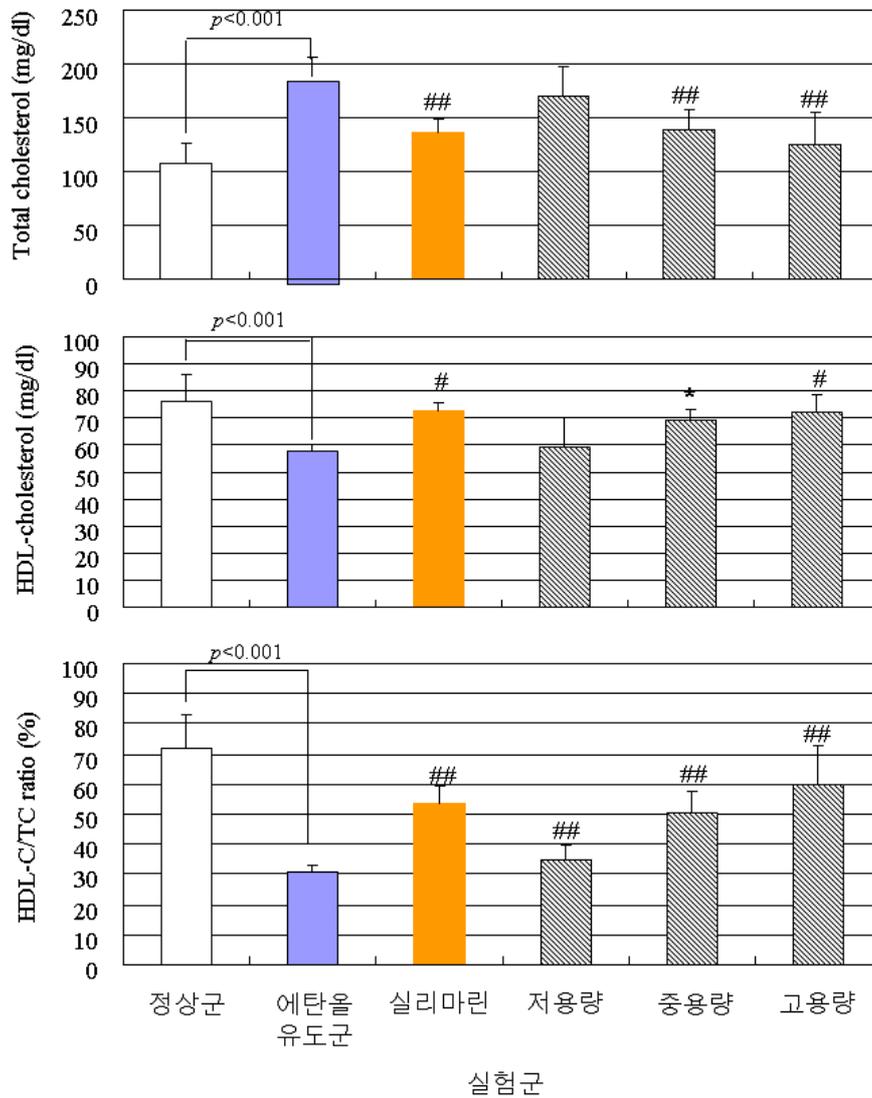


그림 134. 에탄올 식이를 이용한 만성알코올성 지방간을 유도한 실험 동물에서 곰피 추출물 투여에 의한 혈중 지질 개선 효과.

* $p < 0.05$, # $p < 0.005$ 및 ## $p < 0.001$ 은 에탄올 투여군 대비 실리마린 또는 농도별 곰피 주정 추출물군에서의 유의적 차이를 나타낸 것임.

(다) 간 조직 내 지질 농도 변화

간 조직 내의 TG, TC, FFA는 곰피 추출물과 실리마린 투여군에서 모두 유의적으로 감소하였으며, 반면에 HDL-C 및 HDL-C/TC 비율은 유의적으로 증가하였다. 양성대조군인 실리마린과 곰피 주정추출물 중용량에서 비슷한 결과를 확인할 수 있었다(그림 134).

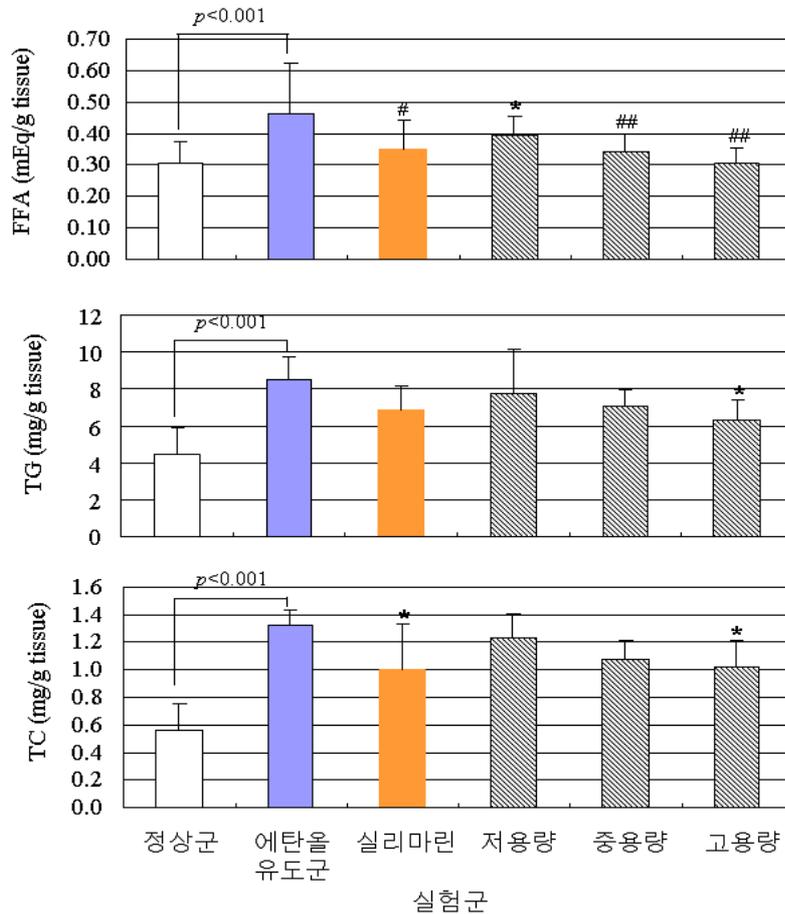


그림 135. 에탄올 식이를 이용한 만성알코올성 지방간을 유도한 실험 동물에서 곰피 추출물 투여에 의한 간조직에서의 지질 개선 효과.

* $p < 0.05$, # $p < 0.005$ 및 ## $p < 0.001$ 은 에탄올 투여군 대비 실리마린 또는 농도별 곰피 주정 추출물군에서의 유의적 차이를 나타낸 것임.

(라) 간조직 Oil-Red O 염색을 통한 지방간 개선효과

실험동물 희생 후 saline을 이용하여 혈액을 제거한 간조직을 10% formaline에 고정하였다. 고정된 간조직에서 증류수를 이용하여 formaline을 제거한 다음 냉동 절편을 실시하여 간조직의 지방구 염색을 실시하였다.

에탄올 식이에 의해 지방구가 많이 생성되었으며, 실리마린과 곰피 추출물 경구투여에 의해 지방구가 감소됨을 확인 할 수 있었다. 실리마린과 곰피 추출물 중용량에서 비슷한 결과를 얻을 수 있었다(그림 135).

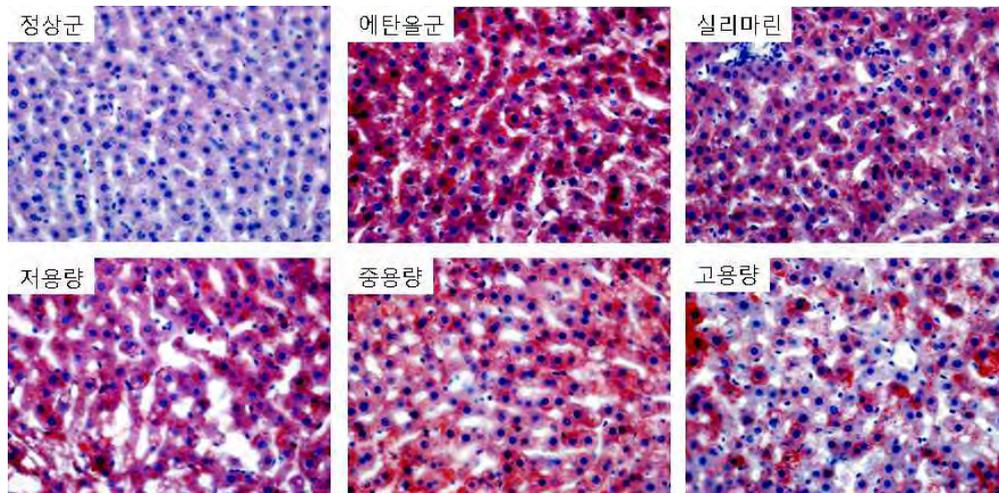


그림 136. 간조직 Oil-Red O 염색

실리마린; 실리마린 100 mg/kg, 저용량/중용량/고용량; 곰피 50/100/200 mg/kg 4주간 경구투여

다. 결론

- Human hepatoma (HepG2) 세포를 이용하여 간세포 보호능, 간세포 손상지표 (AST/ALT), 과산화지질 생성량을 측정한 결과 곰피추출물 및 phlorotannin성분들 (dieckol 및 phlorofuofuroeckol-A)에서 실리마린보다 우수한 효능을 보였다.
- 에탄올을 투여하여 간독성을 유발한 실험동물에 곰피 추출물을 투여하였을 때 혈중 GOT/GPT의 활성이 중용량(100mg/kg)에서 양성대조군인 실리마린(100mg/kg)과 동등하게 감소시키는 결과를 나타냄. 혈청에서의 지질 농도를 측정한 결과 FFA, TG 및 TC의 수치는 용량 의존적으로 유의성 있게 감소하였으며 HDL-C 및 HDL-C/TC 비율은 증가하는 효과를 나타냄. 양성대조군인 실리마린(100mg/kg)과 곰피 주정추출물 중용량(100mg/kg)에서 동등한 보호효능을 확인하였다.
- 간에서 지질을 추출한 후 분석한 결과, 혈액 중에서 분석한 지질의 농도변화와 같은 경향을 나타내었다.
- 간조직 Oil-Red O 염색을 통하여 곰피 추출물 경구투여에 의해 지방구의 크기와 수가 감소되었다.
- 양성대조군인 실리마린 100mg/kg과 곰피 추출물 100mg/kg(중용량)에서 동등한 효능을 보이므로 곰피 추출물의 인체적용시험 용량을 실리마린과 비슷한 용량에서 실시하도록 결정하였음. 식약처의 실리마린 1일 허용 기준량은 130mg으로 dieckol을 같은 농도로 섭취하였을 때 곰피 추출물의 1일 섭취량은 130~180mg임. 인체적용시험 최저용량을 130mg으로 설정하였다.

4. 곰피추출물의 간 보호 효능 작용기전

4.1 *in vitro*에서의 작용기전

가. 실험방법

(1) 세포배양

American type culture collection (ATCC)으로부터 분양받은 Human hepatoma 세포주인 HepG2를 10% FBS, 100 U/ml penicilline 과 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 high glucose-DMEM media를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 배양하였다.

(2) Nitric Oxide (NO) 및 활성산소종 (ROS) 생성량 측정

독성이 나타나지 않는 다양한 농도범위내의 시료를 HepG2 세포에 1시간 전 처리했다.

1시간 후 100 mM의 에탄올을 처리한 다음 24시간 동안 배양했으며, 배양액내의 NO 생성량 및 활성산소종 생성량을 측정하였다.

(3) 에탄올 유발 산화스트레스인자의 분석

시료 처리 방법은 동일하며, 24 시간 배양 후 세포를 lysate 하여 단백질을 추출한 후 western blot 기법을 이용하여 항산화 인자인 heme oxygenase-1 (HO-1) 와 Nrf-2, 염증인자인 TNF- α 의 단백질 변화를 분석하였다.

나. 실험 결과

(1) Nitric oxide (NO) 및 활성산소종 (ROS) 생성량 변화

배양 후 배양액에서는 NO 생성량 (A)을 측정, 세포에서는 ROS (B)생성량을 측정하였다.

곰피 추출물에 비해 실리마린의 NO, ROS 생성 감소가 우수하였으며, 곰피 추출물로부터 분리한 dieckol, phlorofurofucoeckol-A의 활성은 실리마린에 비해 우수하였다(그림 136).

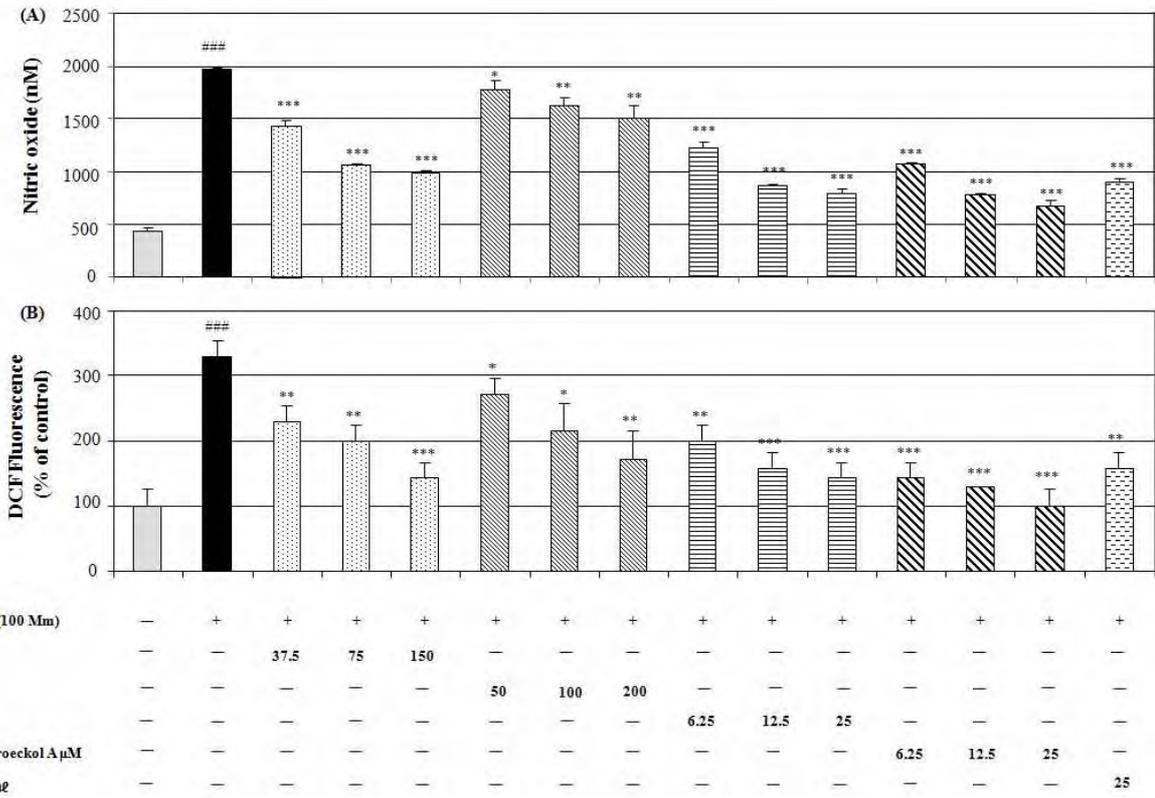


그림 137. 곰피 추출물 또는 곰피로부터 분리한 phlorotannin이 HepG2 세포의 NO (A) 및 ROS (B) 생성에 미치는 영향. ## $p < 0.01$ 및 ### $p < 0.001$ 은 정상대조군 대비 유의성을 나타낸 것이며, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 은 알코올 처리 대조군 대비 유의성을 나타낸 것임.

(2) 에탄올 유발 산화스트레스인자의 변화

(가) 곰피 추출물과 phlorotannin이 HO-1의 발현에 미치는 영향

곰피 또는 phlorotannin은 HO-1의 발현을 증가시킴으로써 TNF- α 의 발현을 감소시켰다. 특히 dieckol 및 phlorofucofuroeckol-A는 실리마리에 비해 HO-1의 발현을 현저히 증가시킴과 동시에 TNF- α 의 발현을 현저히 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(그림 137).

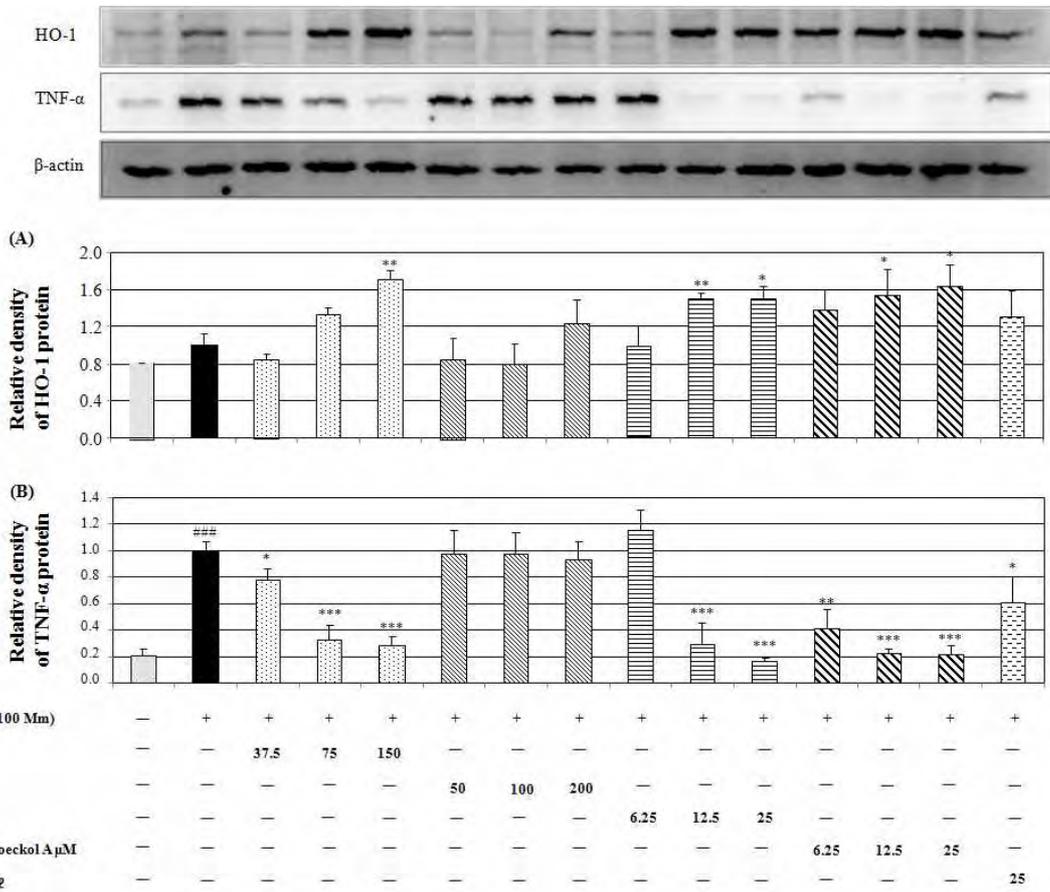


그림 138. 곰피 또는 phlorotannin이 HO-1 및 TNF- α 의 발현에 미치는 영향. ### $p < 0.001$ 은 정상대조군 대비 유의성을 나타낸 것이며, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 은 알코올 처리 대조군 대비 유의성을 나타낸 것임.

(나) 곰피 추출물과 phlorotannin이 Nrf-2 발현에 미치는 영향

HO-1의 발현증가는 항산화 인자인 Nrf-2에 의해 조절된다. 곰피 추출물 및 유효성분인 phlorotannin을 처리한 결과, cytoplasmic fraction에서는 Nrf-2의 변화가 뚜렷하지 않지만 nuclear fraction에서의 Nrf-2의 단백질 변화가 농도의존적으로 유의성 있게 나타났으며, 특히 phlorofucofuroeckol-A를 처리하였을 때 발현이 가장 많이 증가하였음을 확인할 수 있었다. 곰피는 3가지 phlorotannin 중에 특히 dieckol 및 phlorofucofuroeckol-A에 의해 HO-1 및 Nrf-2의 발현을 증가시켜 에탄올 유발 산화 스트레스에 의한 간손상에서 간보호 효과가 있는 것으로 판단되어 진다(그림 138).

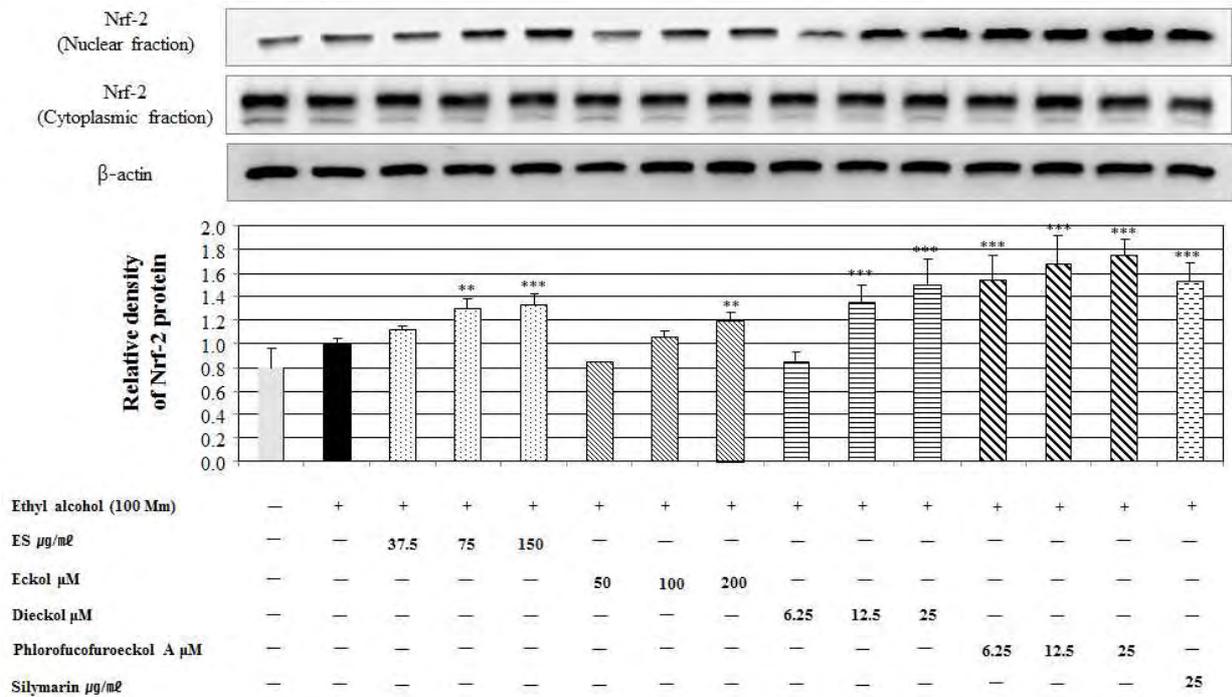


그림 139 . 곰피 또는 phlorotannin이 Nrf-2의 발현에 미치는 영향. ### $p < 0.001$ 은 정상대조군 대비 유의성을 나타낸 것이며, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 은 알코올 처리 대조군 대비 유의성을 나타낸 것임.

4.2 *In vivo*에서의 작용기전 연구

가. 실험재료 및 방법

(1) 간독성 유도(실험동물)

(가) 동물 실험

ICR mice 수컷 흰쥐 (8주령, 30 ± 2 g)를 22°C , 약 60%의 습도 하에 사육하였다.

실험 기간 종료 후 12 시간 동안 절식시킨 뒤 diethyl ether로 마취시켜 cardiac puncture 로 채혈하였다.

- 채혈된 혈액은 원심분리관에 넣어 실온에서 30분간 방치시킨 후 원심분리 ($600 \times g$, 15 min)하여 혈청을 분리한 즉시 분석에 사용하였다.

- 혈액채취 후 바로 간을 적출하여 탈혈한 다음, 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하여 초저온 냉동고에 보관하였다 (-70°C).

(나) 실험군과 식이의 구성

실험군은 6마리씩 6군으로 나누어 정상사료를 공급하여 사육하였다.

제 1군은 정상군으로 saline을 공급하고, 제 2군은 5 g/kg bw/day 으로 ethanol을 공급하였다. 제 3, 4, 5군은 각각 1 g/kg bw/day , 5 g/kg bw/day , 10 g/kg bw/day 의 시료를 경구투여하고 30분 후 5 g/kg bw/day 으로 ethanol을 투여하였다. 제 6군은 silymarin을 25 mg/kg bw/day 을 경구투여하고 30분 후 5 g/kg bw/day 으로 ethanol을 투여하였다.

각각의 시료를 8일간 공급한 후 시료의 기능성을 다양한 혈액 지표 및 생화학적 시험을 통해 분석하였다.

(2) 간 조직 내 산화스트레스 관련 인자 측정

알코올은 alcohol dehydrogenase (ADH)와 aldehyde dehydrogenase (ALDH)에 의해 대사되는 동안 활성산소를 생성하여 산화스트레스를 일으켜 세포독성을 유발한다. 곰피 주정추출물이 항산화 효소 활성화에 미친 영향을 알아보기 위해 실험동물에서 분리한 간에서 상업용 kit를 이용하여 분석하였다.

(가) Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

간 조직을 50 mM의 phosphate buffer로 균질화한 후 4°C에서 13,000 x g로 15 분간 원심분리하여 상층액으로부터 조직 내 SOD의 활성을 분석하였다.

간 조직 균질체 0.1 ml에 1.2 ml의 sodium pyro-phosphate buffer (pH 8.3, 0.052 M), 0.1 ml의 phenazine methosulphate (186 μ M), 0.3 ml의 nitroblue tetrazolium (300 μ M), 0.2 ml의 NADH (750 μ M)을 넣고 혼합하였다.

NADH를 첨가하여 30°C에서 90 초간 반응 시킨 후 0.1 ml의 glacial acetic acid를 첨가 하였다.

혼합물에 4 ml의 n-butanol을 넣고 잘 섞어준 후 10분간 방치하여 butanol 층을 분리하여 butanol 층의 흡광도를 560 nm에서 측정하여 분석하였다.

(나) Catalase 활성 측정

조직 균질체 0.1 ml을 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 1.9 ml과 혼합하였다.

혼합물에 1.0 ml의 H₂O₂ (30 mM)을 첨가하여 반응시켰다.

H₂O₂가 변화하는 양을 240 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

(다) Glutathione 측정

조직 균질체에 1 mM의 EDTA가 들어있는 20% TBA시약을 동일한 양으로 넣고 혼합하였다.

혼합물을 5 분간 방치한 후 200 rpm으로 10 분간 원심분리 하였다.

상층액 200 ul를 새로운 시험관으로 옮긴 후 1.8 ml의 Ellman시약을 넣고 반응시킨 후 412 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

(라) Malondialdehyde (MDA) 측정

조직 균질체 0.2 ml에 8.1% SDS 시약 0.2 ml와 20% 초산 1.5 ml, 8% TBA시약 1.5 ml을 넣고 증류수로 최종 부피를 4 ml로 맞추어 95°C에서 60 분간 가열하였다.

시험관을 실온에서 냉각 후 증류수로 최종 부피를 5 ml로 조절하였다.

여기에 5 ml의 butanol:pyridine (15:1) 혼합물을 넣어 2 분간 혼합하였다.

3,000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정하여 분석 하였다.

(3) 간보호 관련 유전자 발현

Real-time PCR 기법을 통한 간조직에서의 지방산 생성에 관여하는 유전자 발현을 확인하

였다.

나. 실험결과

(1) 간 조직 내 산화스트레스 관련 인자의 변화

간독성 유발군에서 SOD, catalase 및 glutathione의 수치는 정상군에 비해 각각 15.9%, 29.0% 및 27.2% 감소한 반면 실리마린 또는 농도별 곰피 추출물에 의해 활성이 증가하였다. SOD와 glutathione의 경우 곰피 중용량 및 고용량에서 실리마린 투여군 또는 정상군보다 그 효과가 더 우수하였다. 항산화 효소 활성 증가에 따라 산화스트레스 지표 중 하나인 MDA의 수치가 개선됨을 확인할 수 있었다(그림 139).

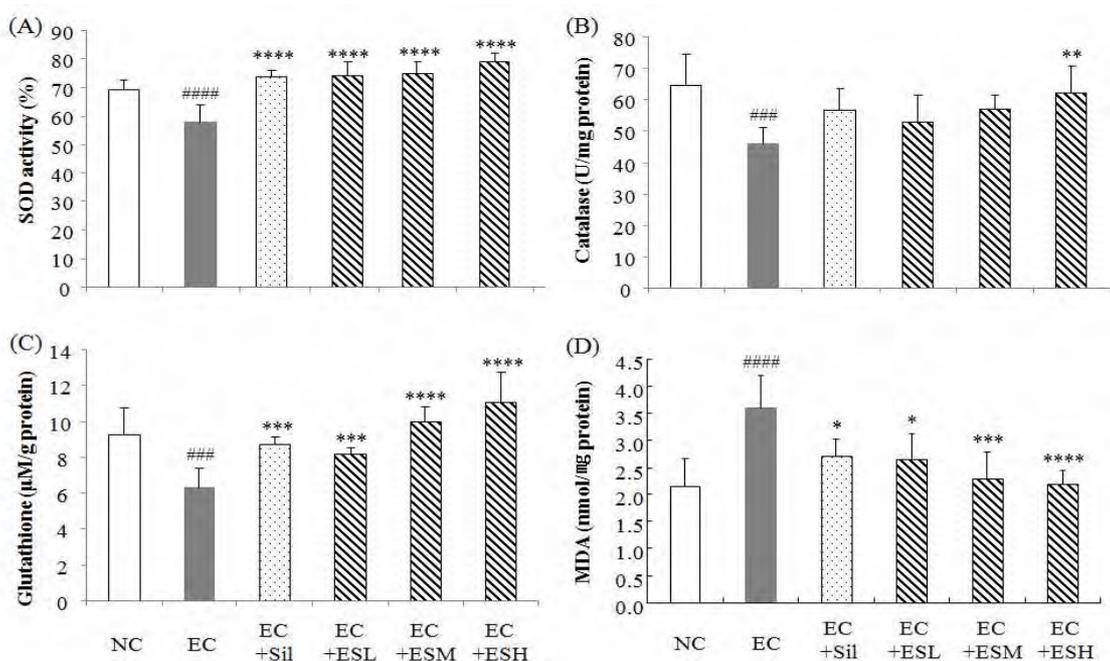


그림 140. 곰피 주정추출물과 에탄올을 투여한 마우스에서의 간 조직내 항산화 효소인 (A) SOD, (B) catalase, (C) glutathine 활성 및 (D) MDA 농도 측정. (NC, 8일 동안 0.5% CMC 경구 투여 30 분 후 12시간 이내 총 3회 saline 경구 투여; EC, 8일 동안 0.5% CMC 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여; EC+Sil, 8일 동안 100 mg/kg 실리마린 (0.5% CMC에 용해) 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여; EC+ESL/EC+ESM /EC+ESH. 8일 동안 곰피 주정추출물 각각 50(저용량)/100(중용량)/200(고용량) mg/kg 경구 투여 30 분 후 에탄올 5 g/kg을 12시간 이내 총 3회 나눠 경구 투여. 실험동물 수는 군당 5 마리였으며 이들 실험동물의 결과 수치를 이용하여 SPSS 통계프로그램을 통해 유의성을 나타내었음. ### $p < 0.05$ 및 #### $p < 0.001$ 은 정상군 대비 에탄올 투여군에서의 유의적 차이를 나타낸 것이고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ 및 **** $p < 0.001$ 은 에탄올 투여군 대비 실리마린 또는 농도별 곰피 주정 추출물 군에서의 유의적 차이를 나타낸 것임.)

(2) 곰피 에탄올 추출물의 만성알코올성 지방간 개선 기전연구

곰피 추출물은 간에서 유리지방산의 중성지방으로의 전환을 억제하고 미토콘드리아 내부로의 지방산 유입을 용이하게 한다 (CPT-1). 또한 미토콘드리아 내부로 유입된 지방산 사슬의 산화를 촉진하는 효소 (LCAD, MCAD)의 발현을 증가시켜 beta-oxidation을 증가시키고 간조직에서 혈중으로 초고밀도 콜레스테롤 (VLDL)을 운반하는 MTP (microsomal triglyceride transfer protein)의 민감도를 감소시킴으로서 간 및 혈중 지질 농도를 개선하였다. 곰피 추출물 중용량에서 실리마린과 비슷한 정도의 유전자 발현 조절을 하고 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 140).

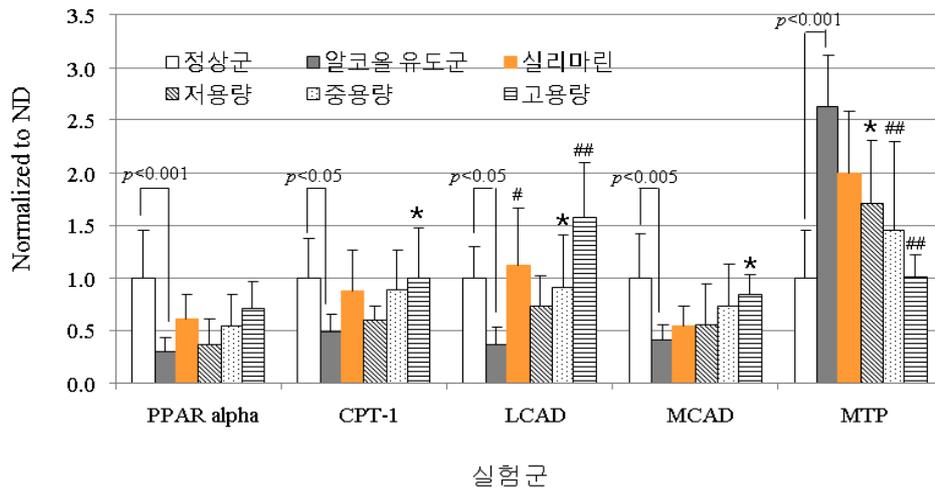


그림 141. 곰피 추출물이 지방산 생성 및 산화에 관여하는 유전자 발현에 미치는 영향. * $p < 0.05$, # $p < 0.005$ 및 ## $p < 0.001$ 은 알코올 유도군 대비 유의성을 나타낸 것임.

다. 결론

- 곰피 추출물의 간보호 효능기전을 확인한 결과 간 조직 내 산화스트레스 관련인자(SOD, catalase 및 glutathione)의 활성이 증가하였으며 효소활성 증가에 따라 MDA의 수치가 개선됨을 확인하였다.
- 곰피 추출물의 만성알코올성 지방간 개선 기전연구를 위하여 Real-time PCR 기법을 통한 간조직에서의 지방산 생성에 관여하는 유전자 발현을 확인하였다.
- 곰피 추출물은 간에서 유리지방산의 중성지방으로의 전환을 억제하고 미토콘드리아 내부로의 지방산 유입을 용이하게 함(CPT-1). 또한 미토콘드리아 내부로 유입된 지방산 사슬의 산화를 촉진하는 효소 (LCAD, MCAD)의 발현을 증가시켜 beta-oxidation을 증가시키고 간조직에서 혈중으로 초고밀도 콜레스테롤 (VLDL)을 운반하는 MTP (microsomal triglyceride transfer protein)의 민감도를 감소시킴으로써 간 및 혈중 지질 농도를 개선하였다.
- 곰피 추출물은 간 조직 내 산화스트레스 관련인자의 활성을 증가시키고, lipogenesis에 관련한 유전자의 발현을 조절함으로써 알코올성 간손상 억제 및 지방간을 개선시키는 것으로 판단되어 진다.

5. 독성시험

- 곱피는 식약처 식품공전에 식품원료로 등재되어 있으므로 식품에 사용되는 용매로 추출시 독성시험은 면제이다.
- 본 원료의 생산공정에 사용되는 70% 주정은 식품의 원료 추출에 사용할 수 있는 용매이므로 독성시험항목은 해당사항이 없다.

6. 인체적용 시험용 시제품 생산을 위한 제형연구

가. 곰피주정추출물의 제형연구

(1) 다양한 제형 제조

(가) 과립

① 소비자의 선호도를 고려하여 기존 생산품과 유사한 부원료 및 배율을 적용하였다(표 83).

표 83. 곰피과립 배합비 및 1일 기준양(mg)

원재료명	배합비(%)	1일 기준량(mg)	투입량(mg)/T
곰피추출분말	9.000	180.000	180.000
유당	34.300	686.000	686.000
식품성크림	21.000	420.000	420.000
말티톨	16.300	326.000	326.000
자일리톨분말	10.000	200.000	200.000
딸기분말분말	5.200	104.000	104.000
딸리향분말	2.000	40.000	40.000
프락토올리고당 분말	1.800	36.000	36.000
효소처리스테비아	0.400	8.000	8.000

② 섭취시 입안에서 쉽게 녹게 하기 위해 과립을 하였고 곰피 특유의 향과 맛을 제어하기 위해 자일리톨분말, 딸기분말, 딸기향 분말을 첨가하였다 (그림 141)



그림 142. 곰피과립 모습

(나) 정제

① 기존 생산품과 유사한 부원료 및 배율을 적용하였다(표 84).

표 84. 곰피정제 배합비 및 1일 기준양(mg)

원재료명	배합비(%)	1일 기준양(mg)	투입량(mg)/T
곰피추출분말	22.50	180.000	180.000
유당	21.00	168.000	168.000
옥수수전분	23.00	184.000	184.000
결정셀룰로오스	29.26	234.080	234.080
스테아린산 마그네슘	1.00	8.000	8.000
opadry 1050180000	3.00	24.000	24.000

② 기존 생산품의 배합비율을 기본으로 기능성 성분인 dieckol을 180mg 섭취 할 수 있도록 400mg, 2정을 섭취 방법으로 설정하여 배합비를 조절하여 정제를 제조하였다(그림 142).



그림 143. 곰피정제 모습

(다) 연질캡슐

① 기존 생산품과 유사한 배합비율을 적용하였다(표 85).

표 85. 곰피캡슐의 배합비 및 1일 기준양(mg)

원재료명	배합비(%)	1일 기준양(mg)	투입량(mg)/T
곰피추출분말	9.000	180.000	90.000
정제어유(55%)	80.000	1,600.000	800.000
밀납	9.240	184.800	92.400
레시틴	1.760	35.200	17.600

② 곰피의 기능성 성분 뿐만 아니라 정제어유를 첨가하여 EPA와 DHA의 기능성을 합한 제품을 제조하고자 하였으며 내부의 내용물이 변질되지 아니하고 외관을 보기 좋기 하기 위해 갈색의 연질캡슐에 충전하였다(그림 143).



그림 144. 곰피캡슐 모습

(2) 제형결정

- ① 곰피의 고유 기능성을 유지하고자 연질캡슐 제형을 제외하였다.
- ② 정제 제조중 타정시 dieckol의 성분이 저하될 수 있음이 보고되어 정제 제형을 제외하였다.
- ③ 최종적으로 섭취하기 좋고 소비자 선호도가 좋은 과립, 스틱형을 선택하였다.

(3) 곰피 과립제형 특허출원

- ① 곰피 과립 특허출원사실증명원



출원사실증명원 CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	(주) 네추럴웨이 NATURAL WAY	주민번호 Residence No	115411-0*****
	주소	경기도 포천시 해룡로 83-135 (설운동)	전화번호	031-535-7674
발명자 Inventor	성명 Name	정세영 CHOUNG, Se Young	주민번호 Residence No	561231-1*****
	주소	서울특별시 동대문구 천장산로11길 17, 204동 1503호 (이문동, 이문상천래미안아파트)	전화번호	
	성명 Name	이경호 LEE, Kyoung-Ho	주민번호 Residence No	710131-1*****
	주소	경기도 수원시 장안구 권천로 74번길 92, 822동 1502호 (정자동, 대월마을대림진흥아파트)	전화번호	
	성명 Name	최중헌 CHOI, Jong-Hun	주민번호 Residence No	561012-1*****
	주소	서울특별시 강남구 압구정로 151, 102동 306호 (압구정동, 현대아파트)	전화번호	
	성명 Name	이기천 LEE, Ki-Cheon	주민번호 Residence No	790326-1*****
	주소	경기도 포천시 신북면 간자동길 80	전화번호	
	성명 Name	최재훈 CHOI, Jae-Hoon	주민번호 Residence No	830910-5*****
	주소	서울특별시 강남구 압구정로 151, 102동 306호 (압구정동, 현대아파트)	전화번호	
대리인 Agent	성명	특허법인필앤온지	대리인 코드	9-2007-100001-1
	주소	서울특별시 서초구 반포대로 63, 진석빌딩 본관8층 (서초동)		
출원번호 Application Number		특허-2014-0153647 PATENT-2014-0153647	출원일자 Filing Date	2014년 11월 06일 NOV 06, 2014
발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 물품, 상품(서비스업)류 구분 Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark		곰피 추출물, 가바, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 맛이 차폐된 과립 Taste-masked granules containing Ecklonia stolonifera extract, GABA, or their mixtures		
용도	확인용		IPC 분류	A23L 1/015
최종처분상태		최종처분일		

② 공피과립 특허출원번호 통지서

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2014.11.06
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2014-0153647 (접수번호 1-1-2014-1070142-59)
출원인명칭 (주)네추럴웨이(1-2002-006128-7)
대리인성명 특허법인필앤은지(9-2007-100001-1)
발명자성명 이경호 최종현 이기천 최재훈 이천수
발명의명칭 공피 추출물, 가바, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 맛이 차폐된 과립

특 허 청 장

<< 안내 >>

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

7. 곰피추출물의 간기능개선 인체적용시험

7.1 곰피추출물의 예비 인체적용시험 (별첨 10)

(1) 예비임상실험 : 2014년 10월 완료

경희대학교병원
KyungHee University Hospital e-IRB
e-IRB

! 심사결과를 확인하시려면, 아래 항목중 "심사결과" 버튼을 클릭하시면 됩니다.

심사결과
심사승인
첨보서 보기
(2013.09.17)

임상연구 결과 보고서

IRB No	KMC-IRB 1331-04	승인일자	2013년 10월 15일	
과제명	국 문 곰피 추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한 유효성허용량 설정 인체적용 시험			
	영 문 A clinical study for alcohol extract of Ecklonia stolonifera, Dose finding study			
	Protocol No.	GPL-01		
	Version No.	3.0		
연구자	소속	직위	성명	연락처(H.P)
	시험책임자	임상약리학과	교수	김성민
	시험담당자	소화기내과	조교수	김재준
	시험담당자	경희의료원	조교수	김보형
	시험담당자	경희대학교	교수	정세원
	시험담당자	경희의료원	연구원	김영일
	시험담당자	경희의료원	연구원	김미숙
	시험담당자	임상약리학과	연구원	오수희
	시험담당자	소화기내과	CRC	홍학경
	시험담당자	비뇨기과	CRC	이해경
연구담당자				
연구내용	<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 생물약품 <input type="checkbox"/> 의료기기 <input type="checkbox"/> 시약 <input type="checkbox"/> 진단 및 치료법 <input type="checkbox"/> 기타 (기타의약품)			
연구대상자 수	Phase: <input type="checkbox"/> 1상 <input type="checkbox"/> 2상 <input type="checkbox"/> 3상 <input type="checkbox"/> 4상 <input type="checkbox"/> PMS <input type="checkbox"/> 임상연구 <input type="checkbox"/> 선행연구 <input type="checkbox"/> 기타 <input type="checkbox"/> 단독임상 <input checked="" type="checkbox"/> 다기관 <input type="checkbox"/> 계 기관 <input type="checkbox"/> 다국가 다기관 <input type="checkbox"/> 외국 <input type="checkbox"/> 계 기관			
본원 시험대상자 수	목표 시험대상자수	동의서 취득 시험대상자수	완료된 시험대상자수	
	30 명	107 명	24 명	
전체 시험대상자 수	목표 시험대상자수	동의서 취득 시험대상자수	완료된 시험대상자수	
	30 명	107 명	24 명	
연구기간	2014 년 01 월 21 일 ~ 2014 년 10 월 28 일 까지			
총 연구비	40,000,000 원 (간접비포함)			
연구의뢰자	회사명 : (주)네스칼웨이		대표(직위) : 홍준현 (대표이사)	
여속하지	간속	0 건		
복합 중대환	타기관 국제	0 건		
이상반응보고	타기관 국제	0 건		

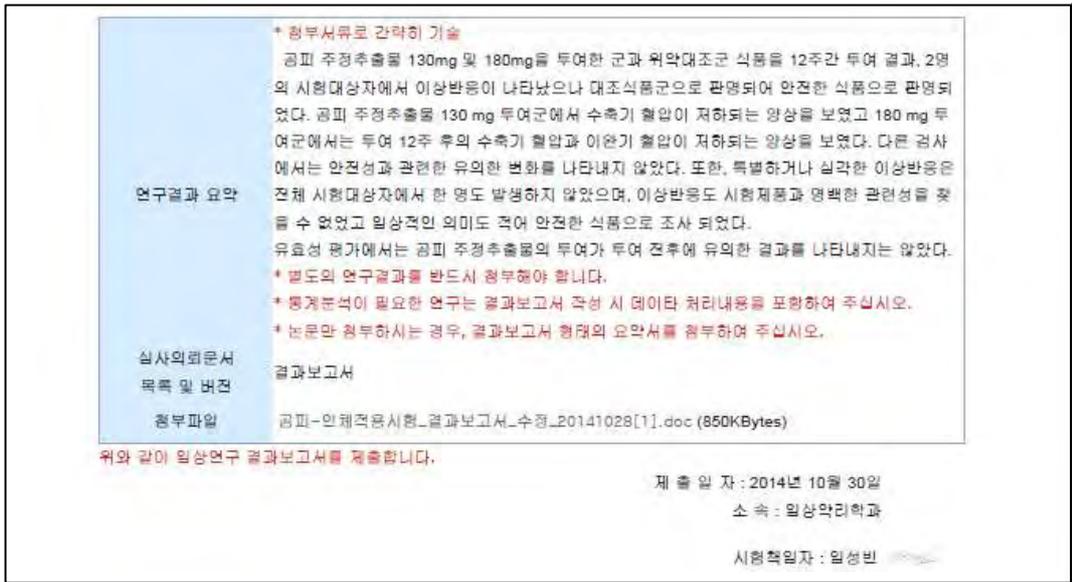


그림 148 . 예비인체적용시험 결과 보고서 요약문

7.2 곶피추출물의 본 인체적용시험

가. 인체적용시험 개요 (별첨 12)

인체적용시험의 명칭	곶피 주정추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한 인체적용 시험
인체적용시험 책임자	순천향대학교 서울병원 소화기내과 교수 장재영
인체적용시험 실시기관	순천향대학교 서울병원, 서울시 용산구 대사관로 59
인체적용시험의 목적	경증 또는 중등도의 간기능 이상 소견자에서 곶피 주정추출물의 간기능 개선 효과와 안전성을 확인하는 것을 목적으로 함.
시험설계	단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험
대상자수	최종 평가가능 예수 : 65 예 (시험식품군: 33명 및 대조군: 32명)
연구대상	문맹자를 제외한 만 20세 이상의 남성 및 여성으로 경증 또는 중등도의 간기능 이상 소견을 보이는 자
시험식품	곶피 주정추출물 (1포 210 mg) / 대조식품 (위약)
투여방법 및 투여기간	시험식품군 : 하루에 곶피 주정추출물 420 mg (250 mg 2포) 대조군 : 위약 2포 (1일 2회, 1회 1포)를 각각 12주간 경구 섭취함.
시험기간	각 시험대상자 별로 총 14주(스크리닝 2주, 약제투여기간 12주)가 소요되고 전체 65명의 대상 지원자를 모집하는데 필요한 기간은 약 29주가 예상되며, 총 인체적용시험 기간은 IRB 승인일로부터 1년이 소요될 것으로 예상됨.

평 가 방 법	<p><u>1. 유효성 (Functionality)</u></p> <p>1차 기능성 평가 (Primary endpoint): Baseline 대비 혈중 AST, ALT 수치의 변화 Baseline 대비 GGT 수치의 변화</p> <p>2차 기능성 평가 (Secondary endpoint): 혈중 지질대사 지표의 변화 - TC, TG, HDL, LDL</p> <p><u>2. 안전성 (safety)</u></p> <p>시험식품 투여 전과 투여 12주 후에 심전도 검사, 혈액 및 뇨 실험실적 검사, 활력징후 측정, 이학적 검사 진행을 실시하여 이상반응을 평가함.</p>
----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

나. 인체적용시험 진행 상황 요약

연구 용역 계약 체결	<ul style="list-style-type: none"> ○ 간기능 개선 인체적용시험 총괄 용역 계약 체결 (2014.08.18) ○ 인체적용시험 수행 기관 선정 -> 순천향대학교 서울병원 소화기내과 (2014.09)
I R B 심 의 / 승 인 / 변 경	<ul style="list-style-type: none"> ○ IRB 심의 (2014.09.25) ○ IRB 시정승인 : 연구계획서, CRF, 피험자설명문 및 동의서 등 (2014.11.10) ○ IRB 시정계획 제출 (2014.11.11) ○ IRB 승인 (2014.11.12) ○ IRB 변경 신청 : 시험식품 섭취량 변경 (180 mg -> 420 mg) (2014.11.25) ○ IRB 변경 승인 (2014.12.04) -> 연구 개시 (2014.12.05.) ○ IRB 변경 신청 : 취약대상자 참여를 위한 보호대책 제출 (2015.03.30) ○ IRB 변경 승인 (2015.04.02) -> 시험대상자 확대 모집 ○ IRB 변경 신청 : 시험대상자 사례비 증액 (120,000원 -> 240,000원) (2015.04.13) ○ IRB 변경 승인 (2015.04.16) -> 인체적용시험 연구비 변경 ○ IRB 변경 신청 : 원외 시험대상자 모집 광고 (2015.04.20) ○ IRB 변경 승인 (2015.04.22) -> 시험대상자 확대 모집을 위한 온라인 원외 공고
시 험 대 상 자 모 집 공 고	<ul style="list-style-type: none"> ○ 순천향대학교 서울병원 원내 시험대상자 모집 공고 ○ 소화기내과 내원 환자 및 보호자 대상 시험대상자 홍보 및 모집 ○ 시험대상자 온라인 모집 대행 의뢰 및 모집 중
시 험 대 상 자 모 집 현 황	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시험의뢰자 스크리닝 시행 : 102명 지원자 대상 스크리닝 완료 ○ 시험대상자 선정 : 35명 시험대상자 선정 (2015.07.10. 까지)

향후 인체적용 시험 완료 계획	<ul style="list-style-type: none"> ○ 추가 시험대상자 모집 완료 : 12 주 (2015.08) ○ 시험식품 섭취 : 12주 (2015.11) ○ 간기능 개선 유효성 평가 biomarker 및 안전성 검사 : 2주 (2015.12) ○ 통계분석 및 결과보고서 작성 4주 (2016. 01) ○ IRB 결과보고 승인 (2016.02)
---------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

나. 인체적용시험 진행지연 사유 및 예상종료시기

- 건강기능식품의 인체시험은 환자를 대상으로 진행하는 것이 아니라 건강인을 대상으로 진행하는 시험이니 만큼 환자와 건강인의 경계에 있는 시험대상자를 모집하는데 오랜 시간이 소요됨
- 곰피 인체적용시험의 경우 현재로서는 환자모집 등에 예상하지 못한 지연이 있어 임상시험이 늦어지고 있으나, 2016년 2월까지는 완료될 것이므로 완료 후 인체적용시험에서의 효능여부에 대한 판단을 내릴 수 있을 것임.

시험대상자 모집공고문

1. 인체적용시험 제목

- 곰피 주정추출물의 간기능 개선 효과를평가하기위한 **인체적용시험**

2. 연구의 목적 및 방법

- 목적 : 경증 또는 중등도의 간기능 이상 소견자를 대상으로 곰피 주정추출물의 **간기능 개선 효과와 안전성을 확인**하고자 함.
- 방법 : 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, **평행 인체적용시험**

3. 시험식품의 설명

- 곰피 (학명:*Ecklonia stolonifera*)는 갈조식을 다시마목 미역과의 다년생 해조로 우리나라 동해안 특산물로, 식품원재료 데이터베이스에 식용 가능한 원료로 등재되어 있는 안전한 식품임.
- 본 연구에서는주정을 사용한 **곰피주정추출물을 시험식품으로 사용함.**

4. 자격요건

- 만 20 세 이상 성인으로 간기능 검사에서 **ALT, AST, GGT 항목이 높은 자**

5. 시험일정 및 시험식품 복용

- 시험기간 : 약 12 주 진행, 총 4 회 내원
- 연구예정기간 : IRB 승인일로부터 1 년
- 참가 예상 인원 : 총 65 명
- 복용일정 : 1 일 2 회, 총 12 주간 복용
- 검사항목 : **혈액검사, 소변검사, 이화학적 검사, 심전도 및 혈압 검사**

6. 참여 시 혜택

- 인체적용시험 기간 동안 **순천향대학교서울병원 소화기내과 교수님의 진찰 및 상담**
 - 12 주간의 시험식품과 검사비를 연구비에서 지급
 - 매 방문 일정을 마치시면 소정의 교통비 지급
- 더 많은 정보를 원하시거나 본 연구에 지원하고자 하시는 분은 아래로 연락 주십시오.**

순천향대학교 서울병원소화기내과 (CRC 김영옥 ☎ 02-709-9685)

원내공고_version 1.2_SCH_20150203

그림 149. 임상시험대상자 모집공고문

다. 관련자료
(1) 계약서

위탁연구용역 계약서
(인체적용시험용)

본 연구를 수행함에 있어 연구 의뢰기관인 (주)네추럴웨이 (이하 “갑”이라 함)와 연구 추진기관인 (주)SFC 기능성식의약 임상시험지원센터 (이하“을”이라 함)는 다음과 같이 합의하고 연구실시에 따른 연구용역 계약을 체결하기로 한다.

- 다 음 -

제 1조 (연구과제명)

본 계약의 대상인 연구의 과제명은 “곰피주정추출물의 간기능 개선 기능성 인체적용시험 연구”라 한다.

제 2조 (용역계약의 기간)

본 용역계약의 기간은 2014 년 8 월 18 일부터 2015 년 9 월 17 일까지로 한다. 단, 기간의 연장이 필요 시, 상호협의 하에 연장할 수 있고 변경 계약서를 작성한다.

제 3조 (연구의 기간)

연구의 기간은 “을”의 임상심의윤리위원회(IRB)의 연구계획서 승인 일로부터 12개월로 한다. 단, 기간의 연장이 필요 시, 상호협의 하에 연장할 수 있고 변경 계약서를 작성한다.

제 4조 (용역연구 추진 방법)

“을”은 “갑”으로부터 인체적용시험의 기획, 추진, 관리 등 용역연구의 일체에 대한 총괄 계약을 체결하며, 인체적용시험 기관은 순천향대병원 소화기내과에서 수행한다.

제 5조 (연구계획서의 실사와 승인 및 준수)

- 1) “을”은 인체적용시험 추진 전, 반드시 연구계획서를 임상심의윤리위원회(IRB)의 승인을 득해야 하며 그 실시 방법은 승인된 연구 계획서를 준수하여 수행, 관리하여야 한다.

- 2) 연구계획서의 변경 시에는 전 항의 절차를 동일하게 준수하여 사전 승인을 받아야 한다.

제 6조 (연구용역비의 지급)

“갑”은 “을”에게 다음과 같이 연구 용역비를 지급한다.

- 1) 총 연구 용역비 : ₩ 120,000,000 (부가세 별도)
- 2) 지불 방법 : 일시 납, 2회 분납
- 3) 지불 시기
 - 1차 (계약일로부터 7일 이내) : ₩ 60,000,000 (부가세 별도)
 - 2차 (IRB 승인일로부터 7일 이내) : ₩ 60,000,000 (부가세 별도)
- 4) 입 금 계 좌 : 935-007919-04-018 기업은행

제 7조 (연구결과의 귀속 및 권리양도의 제한)

본 연구의 결과는 “갑”의 소유로 한다. 쌍방의 합의 없이는 본 연구에 의해 취득 되는 저작권리를 제3자에게 제공하거나 양도할 수 없다.

제 8조 (비밀의 보장)

“갑”과 “을”은 쌍방의 사전 합의 없이는 본 연구와 관련된 모든 사항을 제 3자에게 공개 또는 제공하지 아니한다. 본 조항은 계약이 해제 또는 해지되었을 경우에는 단독유효하다.

제 9조 (명칭 및 상호사용)

“갑”과 “을”은 쌍방의 사전 동의 없이는 상대방의 명칭이나 상호를 사용할 수 없다.

제10조 (피험자 보상)

인체적용시험 중 피험자의 이상 징후가 발생한 경우, 역학적 원인조사 실시하고 “갑”으로부터 제공받은 시험물질로부터 기인한다고 판정 시 피험자 보상에 대한 사항은 “피험자 관리기준”에 따라 “갑”이 진다.

제11조 (계약의 효력)

본 계약은 “갑”과 “을”이 날인한 날로부터 유효하다.

제12조 (해석)

본 계약에 명시되지 아니한 사항 및 본 계약에 이의가 있는 사항에 관해서는 쌍방합의에 의해 결정한다.

제13조 (기타)

본 계약서는 총 2부를 작성하여 계약 당사자가 각 1부씩 보관한다.

2014 년 8 월 18 일

“갑”

기관명 (주)네추럴웨이

사업자등록번호 127-81-35614

주소 경기도 포천시 설운동 584-13

대표자 최 종 현 (인)

“을”

기관명 (주)SFC 기능성식약의약품 임상지원센터

사업자등록번호 312-86-67801

주소 충북 원주시 동남구 단대로 119, 412
(안서동, 단국대학교천안캠퍼스산학협력관)

대표자 임 현 우 (인)

그림 152. 인체실험용역 위탁서

(2) 임상실험 version

Version 1.0	<p><선정 기준> (대상시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.)</p> <p>1) 문맹자를 제외한 만 20세 이상의 남성 및 여성</p> <p>2) ALT (GOT) 정상 상한치(M = 50 U/L, F = 30 U/L)를 초과하고 3배 이내의 범위에 있는 자 (남성 50~149 IU/L, 여성 30 ~ 89 IU/L)</p>
Version 1.2	<p><선정 기준> (대상시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.)</p> <p>1) 문맹자를 제외한 만 20세 이상의 남성 및 여성</p> <p>2) ALT (GPT) 정상 상한치(M = 50 U/L, F = 30 U/L)를 초과하고 3배 이내의 범위에 있는 자 (남성 50~149 IU/L, 여성 30 ~ 89 IU/L)</p>
Version 1.5	<p><선정 기준> (대상시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.)</p> <p>1) 문맹자를 제외한 만 20세 이상의 남성 및 여성</p> <p>2) ALT (GPT)가 남성은 33 U/L, 여성은 25 U/L를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 33~149 IU/L, 여성 25~89 IU/L)</p>
Version 2.0	<p><선정 기준> (대상시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.)</p> <p>1) 문맹자를 제외한 만 20세 이상의 남성 및 여성</p> <p>2) ALT (GPT)가 남성은 33 U/L, 여성은 25 U/L를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 33~149 IU/L, 여성 25~89 IU/L)</p>
Version 2.5 / 3.0	<p>2) ALT (GPT)가 남성은 33 U/L, 여성은 25 U/L 를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 33~149 IU/L, 여성 25~89 IU/L), 또는 AST (GOT)가 남성은 40 U/L, 여성은 30 U/L 를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 40~149 IU/L, 여성 30~89 IU/L), 또는 GGT 가 남성은 50 U/L, 여성은 30 U/L 를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 50~149 IU/L, 여성 30~89 IU/L)</p>

그림 153. version별 임상실험 방법

(3) 임상실험 곰피과립포장 표시사항

[인체적용시험용] 인체적용시험 외의 목적으로 사용 할 수 없음.	[인체적용시험 고유번호] GPL-01 [시험식품의 코드명] NW-GPL02 또는 NW-GPL02_P [제조번호] 14001(T)/14001(P) [유효기한] 2016.12.30 까지
[시험대상자 고유번호] GPL-001	[저장방법] 스틱포/박스포장, 실온보관(1~30°C) [제조업자] <u>쥬네추럴웨이</u> , 경기도 포천시 설운동 584-13

[시험대상자 고유번호] GPL-001 ~ GPL-065 까지 제작

[시험식품의 코드명] [제조번호] [유효기한] 은 임의로 작성한 것으로 제조사에 맞게 수정 가능
위 라벨은 내용만 참고하시고 크기는 박스 사이즈에 맞게 향후 조정하여 제작 요청

그림 154. 임상실험용 곰피과립포장 표시사항

8. 곰피추출물 원료 및 제품의 유통기한 설정

가. 곰피원료의 유통기한 설정을 위한 가속시험

곰피 주정 추출물의 사용기간 설정을 위하여 「의약품 등의 안정성시험 기준」을 참고하여 가속시험을 진행하였다.

곰피 주정 추출물을 25±5℃, 35±5℃, 45±5℃의 각각 온도가 다른 챔버에 보관을 한 후 1개월이 경과할 때마다 네추럴웨이로부터 제공을 받아 6개월간의 시료를 HPLC 분석을 통해 함량을 측정하였다.

곰피 주정 추출물의 dieckol함량은 1.9%를 함유한 시료를 가속 챔버에 보관하여 매 개월마다 지표성분의 함량변화를 HPLC 분석을 통하여 측정하였으나 35℃와 45℃에서 약간의 함량이 감소하는 듯한 경향을 보이기는 하지만 눈에 띄게 함량이 줄어드는 현상은 관찰할 수 없었다(그림 154). 곰피 주정추출물의 6개월간의 함량변화를 표 88과 같이 나타내었다. 곰피 주정추출물의 원료에 대해서는 가속시험 6개월간 안정성이 확인되었으므로 최소 12개월의 유통기한 설정이 가능하다.

표 88. 가속시험 개월 수와 온도에 따른 곰피의 지표성분 함량변화

안정성	Mean (%)	25℃		35℃			45℃		
		STD	RSD	Mean (%)	STD	RSD	Mean (%)	STD	RSD
0개월	1.96	0.03	1.67						
1개월	1.91	0.03	1.59	1.95	0.03	1.65	1.99	0.04	1.88
2개월	1.98	0.04	1.86	1.97	0.01	0.65	1.97	0.01	0.55
3개월	2.08	0.02	1.09	1.85	0.03	1.72	1.68	0.01	0.34
4개월	1.81	0.03	1.74	1.83	0.03	1.87	1.7	0.02	0.89
5개월	1.76	0.01	0.61	1.76	0.05	2.99	1.95	0.02	0.77
6개월	1.86	0.04	2.37	1.93	0.02	0.79	1.75	0.06	3.25

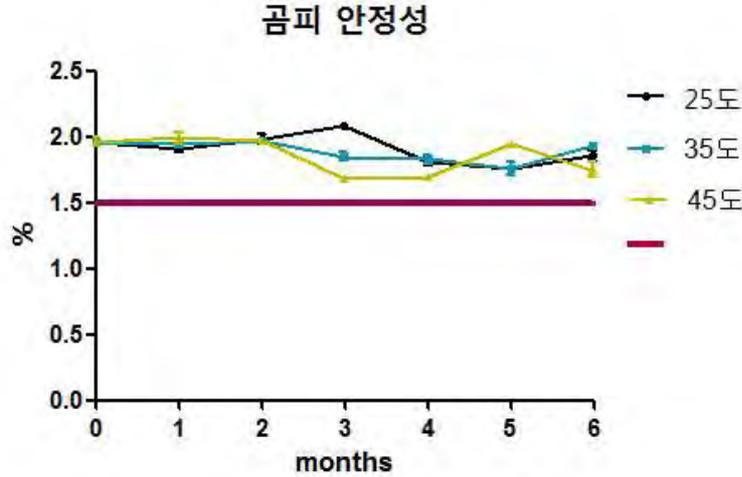


그림 155. 가속시험 개월 수와 온도에 따른 곰피의 지표성분 함량변화 그래프

나. 곰피 시제품의 유통기한 설정

(1) 실험설계

(가) 실험기간 : 2014.07.01.~2014.12.16.(24주간)

(나) 저장온도 : 25℃, 35℃, 45℃

(다) 실험항목

① 관능실험

- 실험방법 :보관 온도별 제품의 시각, 미각, 후각 항목을 평가한다.
- 기준 및 규격 : 식품 고유의 시각(성상,색,외관), 미각(맛), 후각(향,냄새)을 다음의 성상 채점기준에 따라 채점한 결과 평균 3점 이상 이고 1점 항목이 없어야 한다.

항목	채점기준
시각(성상,색,외관)	5:아주양호, 4:양호, 3:보통, 2:양호하지못함, 1:불량
미각(맛)	5:아주양호, 4:양호, 3:보통, 2:양호하지못함, 1:불량
후각(향,냄새)	5:아주양호, 4:양호, 3:보통, 2:양호하지못함, 1:불량

② 미생물 실험

	기준(cfugl)	배 양 온 도 (℃)	배 양 시 간 (hr)	사용배지
일반세균	100	35	48	건조필름
대장균군	음성	35	48	건조필름
황색포도상구균	음성	35	48	BP
진균	음성	25	120	PDA

③ 지표성분 함량

- dieckol 함량 : 3.45mg/180mg
- 실험방법 : HPLC를 이용한 자체적인 dieckol 함량 측정법에 따른다.

(2) 실험결과

(가) 관능실험결과

25℃																	
구분	기준	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주	11주	12주	16주	20주	24주
시각	3점 이상	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4
미각	3점 이상	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
후각	3점 이상	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

35℃																	
구분	기준	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주	11주	12주	16주	20주	24주
시각	3점 이상	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4
미각	3점 이상	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4
후각	3점 이상	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4

45℃																	
구분	기준	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주	11주	12주	16주	20주	24주
시각	3점 이상	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	4	4	3
미각	3점 이상	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4
후각	3점 이상	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4

- 실험시작 24주 경과시 까지 맛의 변화는 크게 없는 것으로 확인되었다,

(나) 미생물실험결과

25℃																	
구분	기준	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주	11주	12주	16주	20주	24주
일반세균	100 cfu/g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
황색	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
진균	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성

35℃																	
구분	기준	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주	11주	12주	16주	20주	24주
일반세	100 cfu/g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

균																	
대장균	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성
황색	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성
진균	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성
45℃																	
구분	기준	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주	11주	12주	16주	20주	24주
일반세균	100 cfu/g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
대장균	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성
황색	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성
진균	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성	00성

- 24주 경과시 까지 미생물의 증식은 확인되지 않았다(그림 155~157).

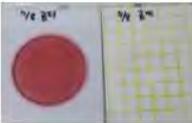
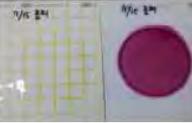
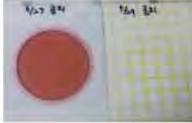
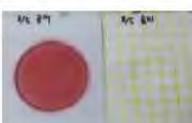
주간	월일	일반세균 / 대장균군	황색포도상구균	진균
0	07월 01일			
1	07월 08일			
2	07월 15일			
3	07월 22일			
4	07월 29일			
5	08월 05일			
6	08월 12일			

그림 156. 미생물 실험 결과

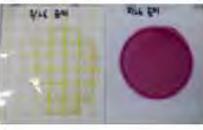
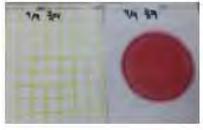
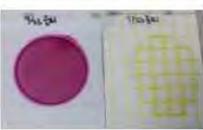
주간	월일	일반세균 / 대장균군	황색포도상구균	진균
7	08월 19일			
8	08월 26일			
9	09월 02일			
10	09월 09일			
11	09월 16일			
12	09월 23일			
16	10월 21일			

그림 157. 미생물 실험 결과

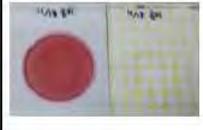
주간	월일	일반세균 / 대장균군	황색포도상구균	진균
20	11월 18일			
24	12월 16일			

그림 158. 미생물 실험 결과

(다) 지표성분(dieckol) 함량실험 결과

임상시험을 위한 곰피 시제품에 대해서 균일하게 지표성분의 함량이 나오는지 확인하기 위하여 HPLC 분석을 통해 측정하였다.

2g 단위의 스틱형태로 포장된 임상시험용 시제품을 100ml 메탄올을 넣어 초음파추출을 1시간 진행하였다. 그런 다음 여과하여 잘 섞어준 뒤 메탄올로 두배 희석하여 최종농도는 10mg/ml로 제조하여 HPLC 분석에 사용하였다.

placebo 시료와 130mg, 180mg 으로 제조된 곰피 시제품을 분석한 결과 내인성 방해인자는 검출 되지 않았으며 130mg과 180mg의 시제품에서 dieckol의 머무름 시간이 잘 일치함을 확인할 수 있었으며 1.3 : 1.8의 비율로 함량이 균일하게 검출되었다(그림 158).

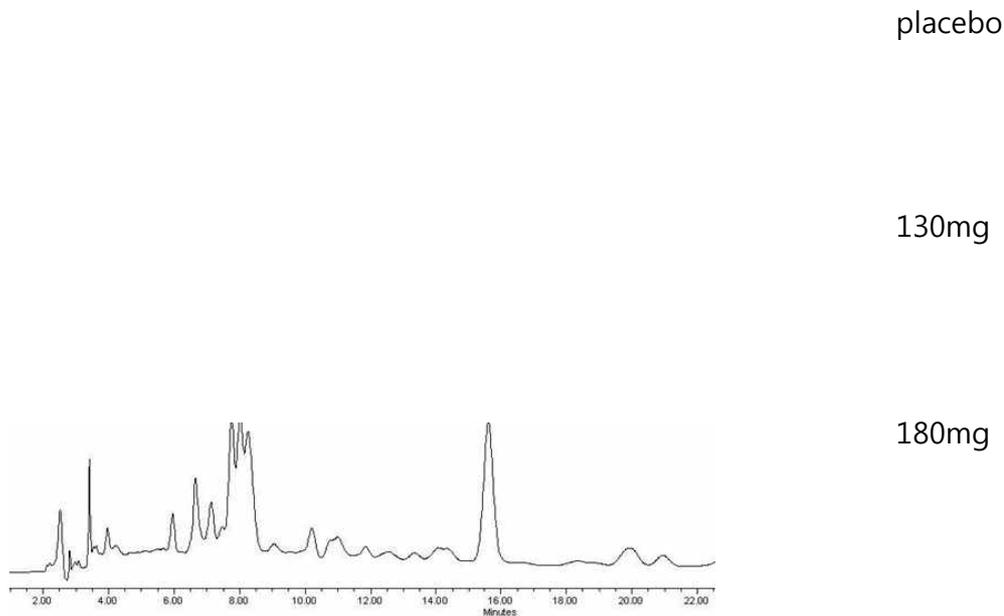


그림 159. 곰피 임상용 시제품의 HPLC chromatogram

(라) 지표성분(dieckol)에 의한 유통기한 설정

- ① 지표성분인 dieckol의 25℃, 35℃, 45℃에서 24주간의 함량변화를 측정한 결과 공통적으로 12주부터 dieckol의 함량이 서서히 줄어드는 것이 확인 되었으나 최저점의 dieckol 함량이 기준인 3.45mg보다 1.5% 줄어든 3.40mg으로 나타나 품질적으로 이상이 없음을 확인하였다(표 94).

표 94. 온도별 보존기간에 따른 dieckol의 함량변화

주차	기준	온도		
		25℃	35℃	45℃
0	3.45mg/ 180mg	3.45mg	3.45mg	3.45mg
1		3.45mg	3.45mg	3.45mg
2		3.45mg	3.45mg	3.45mg

3	3.45mg	3.45mg	3.45mg
4	3.45mg	3.45mg	3.45mg
5	3.45mg	3.45mg	3.45mg
6	3.45mg	3.45mg	3.45mg
7	3.45mg	3.45mg	3.45mg
8	3.45mg	3.45mg	3.45mg
9	3.45mg	3.45mg	3.45mg
10	3.45mg	3.45mg	3.45mg
11	3.45mg	3.45mg	3.45mg
12	3.44mg	3.44mg	3.43mg
16	3.43mg	3.43mg	3.42mg
20	3.43mg	3.42mg	3.41mg
24	3.43mg	3.41mg	3.40mg

② 저장온도별 품질지표의 반응속도상수 산출

0차 반응식의 반응속도상수인 $K_{25^{\circ}\text{C}} = -0.001$, $K_{35^{\circ}\text{C}} = -0.0016$, $K_{45^{\circ}\text{C}} = -0.0022$ 을 이용하여 품질지표별 활성화에너지를 산출한다.

반응차수	온도	회귀방정식	결정계수
0차	25℃	$y = -0.001x + 3.4546$	0.001
	35℃	$y = -0.0016x + 3.4579$	0.0016
	45℃	$y = -0.0022x + 3.4601$	0.0022

③ 0차 반응식 그래프

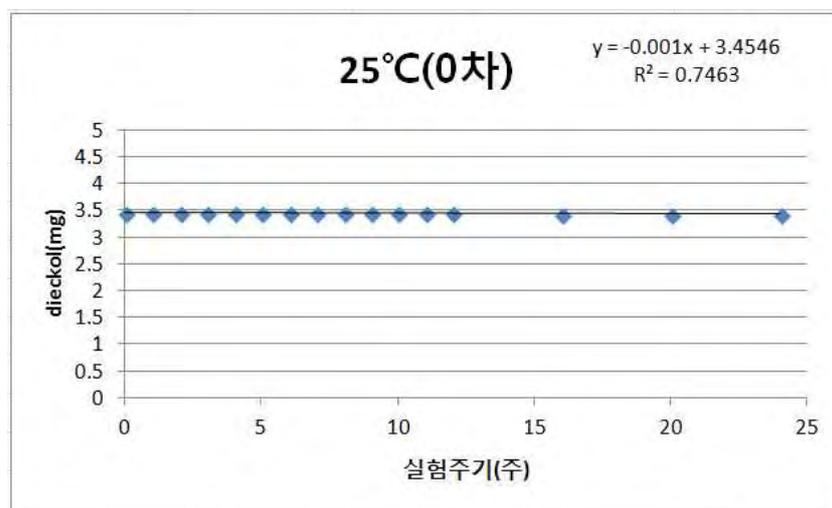


그림 161. 25℃에서의 dieckol 함량(mg) 변화

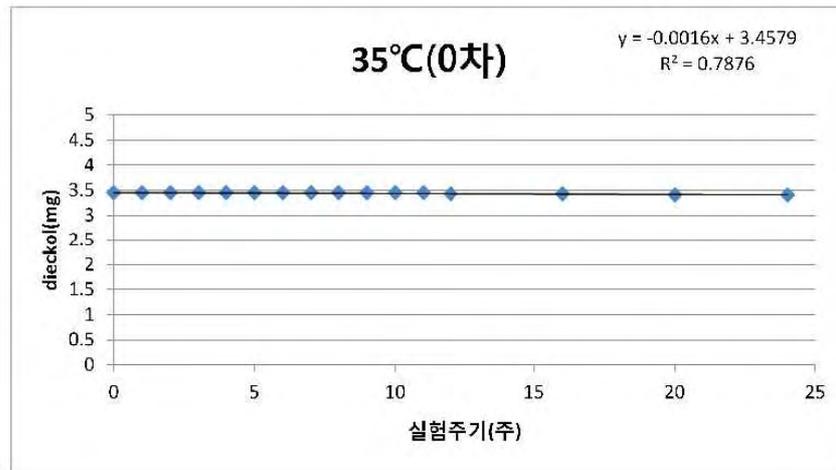


그림 162. 30°C에서의 dieckol 함량(mg) 변화

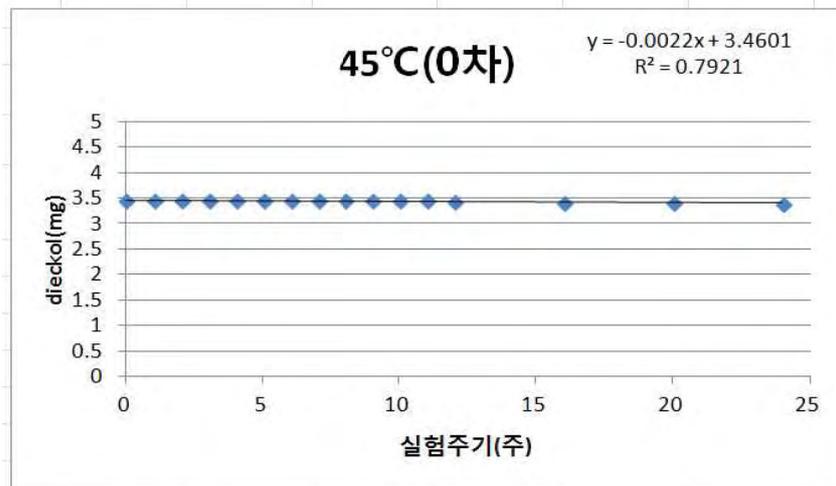


그림 163. 45°C에서의 dieckol 함량(mg) 변화

③ 유통기한의 산출

지표성분인 dieckol의 함량이 80%가 될 때까지의 기간(t_{80})은 아래의 방정식으로 부터 구한다.

반응차수	T(273+보관온도)	1/T	K	LnK	$\text{LnK} = (E_a/R)(1/T) + \text{LnA}$
0차	25°C	298	0.0033557	0.001	-6.907755279
	35°C	308	0.0032467	0.0016	-6.43775165
	45°C	318	0.0031446	0.0022	-6.119297919

$y = -3741.5x + 5.6678$

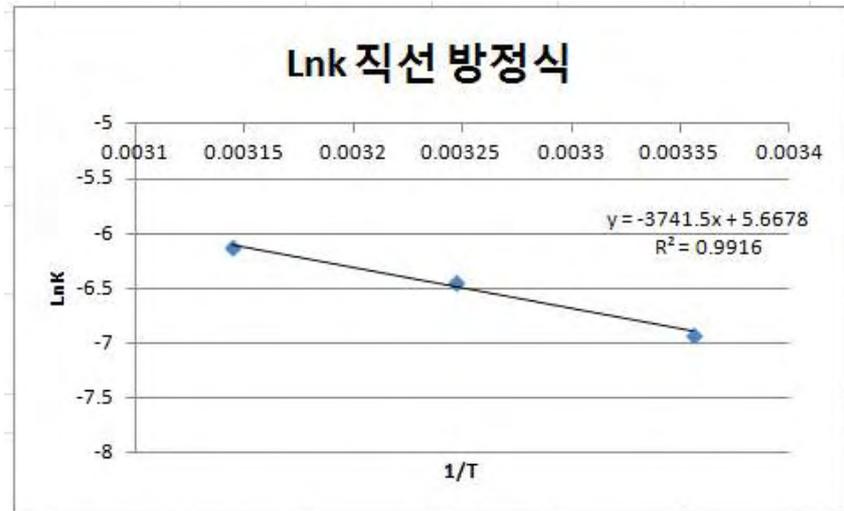


그림 164. lnk에 의해 도출된 직선방정식 그래프

$$t_{80} = \frac{1}{k_{35}} \times \ln\left(\frac{C}{C_0}\right)$$

(k_{35} : 35°C에서의 소실상수, C : 허용농도, C_0 : 초기농도)

$$\begin{aligned} \ln k_{35} &= -3741.5 \times \left(\frac{1}{273+35}\right) + 5.6678 \\ \ln k_{35} &= -6.47992 \\ k_{35} &= 0.001534 \end{aligned}$$

$$t_{80} = \frac{1}{k_{35}} \times \ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = \frac{1}{0.001534} \times \ln\left(\frac{100}{80}\right) = 145.46$$

아레니우스 방정식에 의해 35°C에서 보관하였을 때 dieckol이 기준(3.45mg)에서 80%(2.76mg)까지 저하되는 기간은 145개월이 소요된다는 것을 확인하였다.

다. 결론

- 곰피추출물 원료 및 제품의 유통기한은 25±5°C, 35±5°C, 45±5°C의 세 가지 조건으로 6개월 동안 30일 간격으로 7회 품질 지표를 분석하였다. 품질지표는 dieckol의 함량변화로 확인하였다.
- 지표성분인 dieckol은 1.9%의 함량이 전 기간에 걸쳐 일정하게 유지됨을 확인하였다.
- 시험 결과, 미생물 검사에서 모든 기간, 보관온도 조건에서 대장균이 검출되지 않았고 성상 또한 모든 기간, 보관온도 조건에서 변화가 없었다.
- 식약처에서 제시한 유통기한 설정 식에 따라, 품질 지표의 연간변화 반응속도상수(K')로부터 산출한 원료의 유통가능기한은 145개월이었으므로 최종 유통기한을 24개월로 설정하였다.

9. 간 기능성 건강기능식품 출시를 위한 시장조사 및 마케팅 전략 수립

가. 건강기능성 식품의 시장조사

개별인정형 원료의 총생산액은 타 원료에 비해 가파른 상승세를 보이고 있으며(표 97) 현재 건강기능식품 개별인정형 원료들만이 가지고 있는 기술과 차별화된 마케팅 방법들을 통해 간 건강에 도움을 줄 수 있는 개별인정형 원료로 시장에 무사히 안착시킬 예정이다.

(단위:억원)

순위	구분	총생산액				
		2008	2009	2010	2011	2012
1	홍삼	4,184	4,995	5,817	7,191	6,484
2	개별인정형	416	799	1,129	1,435	1,807
3	비타민·무기질	531	761	991	1,561	1,646
4	알로에	639	648	584	692	687
5	프로바이오틱스 ¹⁾	190	254	317	405	518
6	오메가-3지방산함유유지	266	334	348	509	497
7	인삼	413	364	341	381	450
8	가르시니아감보지아 추출물 ²⁾	-	-	208	207	440
9	식이섬유	1	99	117	116	168
10	감마리놀렌산	145	108	93	224	152
누계 (10품목)		6,785 (84.5%) ³⁾	8,363 (87.1%)	9,945 (93.2%)	12,719 (93.0%)	12,849 (91.2%)
11	기타품목	1,246 (15.5%)	1,235 (12.9%)	726 (6.8%)	963 (7.0%)	1,232 (8.7%)
총생산액		8,031	9,598	10,671	13,682	14,091

※ 2012년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표, 식품의약품안전처, 2013

1) 유산균 증식 및 유해균 억제, 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음

2) 탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하여 체지방 감소에 도움을 줌

3) ()의 값은 총생산액에서 차지하는 비중

표 97. 품목별 생산실적 현황

(단위:억원)

순위	구분	총 생산액					기능성 내용
		2008	2009	2010	2011	2012	
1	헛개나무과병추출분말	-	145	441	349	502	간건강
2	당귀혼합추출물	22	62	87	140	245	면역기능
3	그린마데추출물	-	-	6	4	147	체지방감소
4	밀크씨슬추출물	-	-	50	138	135	간건강
5	복분자추출분말	-	-	-	31	104	간건강
6	백수오 등 복합추출물	-	-	14	40	100	갱년기여성건강
7	대두배아열수추출물등 복합물	-	-	-	-	61	체지방감소
8	히알루론산나트륨	-	3	11	71	41	피부건강
9	AP 콜라겐 호소분해타이드	-	-	5	20	29	피부건강
10	초록입홍합추출오일 복합물	-	36	32	29	28	관절건강
누계 (10품목)		22 (5.3%) ¹⁾	210 (26.3%)	614 (54.4%)	793 (55.3%)	1,364 (75.5%)	
기타 원료 식품		394 (94.7%)	590 (73.8%)	515 (45.6%)	642 (44.7%)	443 (24.5%)	
총생산액(억원)		416	800	1,129	1,435	1,807	

※ '12년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표, 식품의약품안전처, 2013

1) ()의 값은 총생산액에서 차지하는 비중

표 98. 개별인정형 원료별 건강기능식품 생산실적

12년도까지 건강기능식품 상위 원료별 생산실적을 살펴보면 10가지의 주요 개별인정형 원료 중 간건강에 대한 생산 원료가 3가지이며 생산액도 꾸준한 성장세로 생산실적이 증가하고 있는 추세이다(표 98).

나. 마케팅 전략

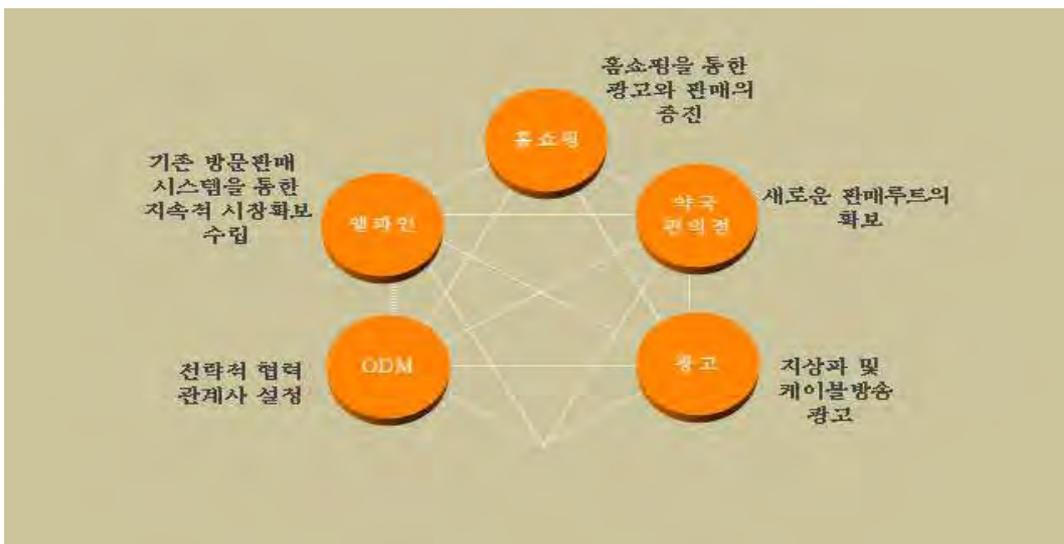


그림 168. 마케팅 전략 개요도

(1) 마케팅전략 개요

(가) OEM/ODM

당사는 현재 CJ제일제당, KGC인삼공사, 롯데헬스원 한국야쿠르트와 같은 대기업 식품업체들의 제품개발 및 생산을 주로하고 있음. 이에 따라 곰피의 원료에 대한 꾸준한 개발을 통해 당사의 대기업 인프라를 통한 OEM/ODM 전략을 수립하여 간 건강에 도움을 줄 수 있는 새로운 원료로 시장을 개척해 나갈 예정임.

(나) 소재판매

장래에 곰피에 대한 특허 및 개별인정을 획득하여 이를 통해 식품제조업체 및 식품유통업체들에게 소재판매를 하여 독자적 원료에 대한 시장의 크기를 확장해나갈 예정임.

(다) 직접유통

당사는 현재 별도의 방문판매법인인 엘파인을 필두로 자사의 제품을 시장에 유통하고 있음. 이를 통해 시제품 및 테스트마켓용으로 제품을 출시하여 제품의 효과 및 개선점을 도출할 예정에 있으며 15년 3사분기 3여년간의 연구 끝에 개발한 제품을 홈쇼핑을 통해 런칭할 예정이며 이를 성공요소로 차후에 곰피에 관한 제품을 홈쇼핑을 통한 성공요소의 하나로써 밝아 나갈 것이다. 뿐만 아니라 당사는 홈플러스 PB상품으로 새로운 제품이 입점이 확정됨에 따라 차후 본격적인 일반 소비재시장으로의 진출이 더욱 수월해질 것임. 이런 강점요소를 통해 본사업의 성공적인 롤모델을 이룩할 것이다.

(2) 판로확대 등 시장개척 계획

(가) 인터넷 쇼핑물 구축

- 네추럴웨이 홈페이지 카테고리 및 구성 요소 변경
- 컨셉에 맞는 쇼핑물 디자인 및 Tone&Manner 변경
- 별도의 온라인 홈페이지 구축 및 현재 홈페이지에 카테고리 개설
- 온라인 상의 이벤트를 위한 마이크로 사이트 제작

(나) TV 홈쇼핑 광고

- 벤더사와의 전략적 제휴를 통한 홈쇼핑 채널을 탐색
- 제품을 효과적으로 알리기 위한 최적의 컨셉을 설정
- 제품을 효과적으로 전달할 수 있는 출연진 섭외
- 홈쇼핑 채널을 통한 런칭 및 광고

(다) 소셜미디어 및 검색엔진 최적화

- 파워블로거 및 온라인 상의 영향력 있는 유저 섭외
- 제품에 대한 특성이나 소개글들을 블로그에 포스팅하여 포털사이트에 노출
- 제품과 연관되는 연관검색어를 별도로 설정하여 이슈화
- 제품에 대한 블로그 및 페이스북 운영하여 소통의 극대화

(라) 오프라인 프로모션

- 내부인력과 외주업체가 아이디어 협의하여 프로모션 방향 설정
- 도출된 아이디어를 통한 구체적인 세트 제작 및 프로모션 진행

(3) 마케팅 계획

(가) 내용물 개발

- 인허가 (임상)
- 제형 및 음용방법 결정 및 처방확정

(나) 시장 분석 및 기회도출

- 내부 전략가설 공유 및 Key Man Interview
- 국내외 관련시장 트렌드 분석, 2차 자료 분석
- U&A 조사 (On Line Survey)
- 국내시장 주요 경쟁자 분석/자사분석
- 해외시장 주요 브랜드 벤치마킹
- 네추럴웨이 시장 기회

(다) 혁신 아이디어 및 컨셉 도출

Product Hit Idea

- Key Hit Point 도출
- 상품화 아이디어 개발
- 아이디어 스크리닝

Hit Concept

- Hit Concept 개발
- Main Benefit 도출
- USP 도출

검증 및 정교화

- 가설 컨셉 검증 (FGD : Focus Group Discussion)
- 컨셉 수정 및 정교화 : Winning Concept 설정

(라) 브랜드 개발

- 브랜드 Identity 설계
- Brand Textbook
- 신규 브랜드 네임 & 디자인 개발

(마) STP 전략

- Sales Communication Target 규정
- Positioning 목표 설정

(바) 용기개발

- 용기& 그래픽 디자인 개발
- 용기 업체 선정 / 생산 Feedback
- 초도 생산 및 입고
- Concept& Product Test(HUT 조사 : Home Using Test)

(사) 런칭

- 가격 전략
- 유통 전략
- 런칭/ IMC 전략 수립
- MD / In-store Promotion / 판촉물 기획 및 준비
- 런칭 프로그램 실행

(아) 출시 후 관리

- 런칭 후 Brand Tracking
- 2차 상품화 준비

(4) 기타 판매전략(광고 등)

추후 성공적인 런칭 후 대중의 인지도를 쌓은 후 방송용 광고 제작하여 대중에게 제품을 어필

(5) 사업화 전략을 위한 MKT 일정 Process

(가) 시장 분석 및 기회도출

- 내부 전략가설 공유 및 Key Man Interview
- 국내외 관련시장 트렌드 분석, 2차 자료 분석
- U&A 조사 (On Line Survey)
- 국내시장 주요 경쟁자 분석/자사분석
- 해외시장 주요 브랜드 벤치마킹
- 네추럴웨이 시장 기회 도출

(나) 혁신 아이디어 및 컨셉 도출

㉠ Product Hit Idea

- Key Hit Point 도출
- 상품화 아이디어 개발
- 아이디어 스크리닝

㉡ Hit Concept

- Hit Concept 개발
- Main Benefit 도출
- USP 도출

㉢ 검증 및 정교화

- 가설 컨셉 검증 (FGD : Focus Group Discussion)
- 컨셉 수정 및 정교화 : Winning Concept 설정

(다) 브랜드 개발

- 브랜드 Identity 설계
- Brand Textbook
- 신규 브랜드 네임 & 디자인 개발

(라) STP 전략

- Sales Communication Target 규정
- Positioning 목표 설정

(마) 상품화

① 내용물 개발

- 인허가
- 제형 및 음용방법 결정 및 처방확정

② 용기개발

- 용기& 그래픽 디자인 개발
- 용기 업체 선정 / 생산 Feedback
- 초도 생산 및 입고
- Concept& Product Test(HUT 조사 : Home Using Test)

(바) 런칭

- 가격 전략
- 유통 전략
- 런칭/ IMC 전략 수립
- MD / In-store Promotion / 판촉물 기획 및 준비
- 런칭 프로그램 실행

(사) 출시 후 관리

- 런칭 후 Brand Tracking
- 2차 상품화 준비

(6) Sales & Public Relations 전략

- 국내외 원료전시회를 통한 제품의 홍보
- 개별인정형 추진 후 곰피 원료의 보도자료 작성 및 배포하여 홍보
- 파워블로거 및 SNS 수단을 활용하여 제품 및 원재료의 직간접적 마케팅 및 홍보전략
- 국내외 곰피의 수요기업과 제휴하여 원재료 제공
- 국내 SSM 및 CVS 업체와 협약하여 PB상품 제작
- 원재료를 통한 네추럴웨이만의 신규 브랜드 런칭하여 판매
- 자체 브랜드 출시하여 홈쇼핑 채널을 런칭 1차 전략으로 삼으며 온라인쇼핑몰 사이트 구축을 통한 판매 증진
- 영업 인력을 통한 방문판매로 제품의 홍보 및 판매 증진
- 해외 협력기업인 중국의 군지학을 통한 해외진출전략을 수립함

10. 제품허가를 위한 공인인증 시험서 (별첨 11)

제 D2015040772 호				검 사 성 적 서																			
검체명	곰피추출물	제조일자 (유통기한)	2013-10-20																				
의뢰인	업체명	(주)네추럴웨이																					
	주소	경기 포천시 해룡로 83-135 (설운동 158-13)																					
	성명	최종현																					
제조번호	131020	접수년월일	2015-04-13																				
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2015040772																				
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> 귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 천 희 </div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 45%;">시험항목</th> <th style="width: 30%;">결과</th> <th style="width: 25%;">검사담당자</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BHC(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>이선미</td> </tr> <tr> <td>DDT(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>이선미</td> </tr> <tr> <td>Aldrin(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>이선미</td> </tr> <tr> <td>Dieldrin(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>이선미</td> </tr> <tr> <td>Endrin(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>이선미</td> </tr> </tbody> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 40px;"> <p>2015 년 4 월 20 일</p> <p>한국기능식품연구원 </p> <p><small>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 031-628-2100 FAX(031)628-0400-1</small></p> </div>						시험항목	결과	검사담당자	BHC(mg/kg)	불검출	이선미	DDT(mg/kg)	불검출	이선미	Aldrin(mg/kg)	불검출	이선미	Dieldrin(mg/kg)	불검출	이선미	Endrin(mg/kg)	불검출	이선미
시험항목	결과	검사담당자																					
BHC(mg/kg)	불검출	이선미																					
DDT(mg/kg)	불검출	이선미																					
Aldrin(mg/kg)	불검출	이선미																					
Dieldrin(mg/kg)	불검출	이선미																					
Endrin(mg/kg)	불검출	이선미																					

제 D2015040770 호

검 사 성 적 서

검체명	곰피추출물	제조일자 (유통기한)	2013-10-20
의뢰인	업체명	(주)네추럴웨이	
	주 소	경기 포천시 해룡로 83-135 (설운동 158-13)	
	성 명	최종현	
제조번호	131020	접수년월일	2015-04-13
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2015040770

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 권 회

시험항목	결과	검사담당자
열량(Kcal/100g)	356.11Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	65.84%	한아름
조단백질(%)	9.80%	이경민
조지방(%)	5.95%	이선정
수분(%)	3.82%	김혜운
회분(%)	14.59%	김혜운
나트륨(mg/100g)	2426.09mg/100g	김세미

2015 년 4 월 23 일

한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031)628-2400 FAX(031)628-0400-1

제 D2015040771 호

검 사 성 적 서

검체명	곰피추출물	제조일자 (유통기한)	2013-10-20
의뢰인	업체명	(주)네추럴웨이	
	주소	경기 포천시 해룡로 83-135 (설운동 158-13)	
	성명	최종현	
제조번호	131020	접수년월일	2015-04-13
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2015040771

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
납(mg/kg)	0.0920mg/kg	류미진
총비소(mg/kg)	65.3865mg/kg	류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0186mg/kg	류미진
총수은(mg/kg)	0.002mg/kg	박새롬이
대장균군	음성	허태영
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말	김수희

2015 년 4 월 23 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsl.re.kr> 전화번호 (031) 628-2400 FAX(031)628-0400-1

제 D2015040769 호

검 사 성 적 서

검체명	곰피추출물	제조일자 (유통기한)	2013-10-20
의뢰인	업체명	(주)네추럴웨이	
	주소	경기 포천시 해룡로 83-135 (설운동 158-13)	
	성명	최중헌	
제조번호	131020	접수년월일	2015-04-13
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2015040769

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자 김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
Dieckol(mg/g)	20.23mg/g	강동희

분석법-업체제공(주)네추럴웨이, HPLC(DAD))

2015 년 5 월 19 일

한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.kfsi.re.kr> 전화번호 031-628-2000 FAX(031)628-0400-1

11. 식약처 허가 서류 제출(별첨13)

-식약처에 개별인정을 위하여 제출할 허가서류를 작성하였으며 그 요약내용은 다음과 같다.

항 목	주요 내용	
1. 원료명	곰피추출물	
2. 원재료	곰피(<i>Ecklonia stolonifera</i> Okamura)	
3.기능 (지표)성분	지표성분 : 디에콜(Dieckol)	
4. 제조 공정	원재료(곰피) → 세척 → 주정 추출(주정 70%, 70℃/9시간) → 여과 → 진공농축(40℃) → 동결건조(-47℃/2일) → 분쇄 → 곰피추출물	
5. 규격 및 시험방법	1) 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말 2) Dieckol(지표성분) : 16-24mg/g 3) 납(mg/kg) : 1이하 4) 총비소(mg/kg) : - 5) 카드뮴(mg/kg) : 1이하 6) 총수은(mg/kg) : 1이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능(지표)성 분 시험법	1) 자사 시험법 2) 기기분석 조건(Alantis T3 C18 column(250mm×4.6mm, 5μm) 또는 이와 동등한 것)
	규격외 (잔류농약)	건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정 중 「식품의 기준 및 규격」에 농약의 잔류허용기준이 없으며, 이에 따라 5가지 잔류농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)에 대하여 국내 식품위생검사기관 시험결과 '불검출' 임을 확인함.
6. 안전성	의사결정도	섭취 경향이 있는 곰피(<i>Ecklonia stolonifera</i> Okamura)를 주정을 이용하여 단순 추출, 건조한 것으로 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하였다 판단하여 의사결정도의 '다'에 해당됨.
	섭취 근거	<국내 인정/허가 현황> <ul style="list-style-type: none"> 곰피는 식품의 원료로 사용이 가능함[식규 65421(2000. 6)]. 지표성분인 'Dieckol'은 기능성원료(감태추출물 : 수면의 질 개선)의 지표성분(또는 기능성분)으로 인정된 사례 있음. <국외 인정/허가 현황> <ul style="list-style-type: none"> 미국 : 감태에서 추출되는 저분자량의 폴리페놀 화합물 복합체인 '씨놀(seanol, 라이브렘(주))'은 2008년 미국 FDA로부터 NDI(New Dietary Ingredient)로 인증 받은 사례가 있음(주성분 : eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol, fucosterol 등).

	안전성 정보	<ul style="list-style-type: none"> 안전성 정보 DB(DrugDigest) <ul style="list-style-type: none"> 갈조류의 요오드는 여드름을 유발할 수 있음. 개인에 따라 갈조류의 섭취 시 설사, 메스꺼움이 나타날 수 있으나, 일반적으로 몇 일 후면 사라짐. 섭취 시 주의사항으로 '임산부, 수유부 섭취에 대한 자료가 충분치 않으므로 섭취에 주의'(Natural Medicines Comprehensive DB)
	섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 420mg/일 공피추출물은 원재료(공피)로서 약 2.1g (수율 약 20%)을 섭취하는 것에 해당되며, 우리나라에서는 과거에 비해 식용하는 지역이 거의 없는 실정이어서 섭취량 평가 자료의 확보가 어려움. 따라서 기능성원료의 섭취량이 국민 일상 섭취량보다 증가하였다고 판단함.
	인체적용 시험	임상시험 진행 중(1일 섭취량 : 공피추출물 420mg, 안전성 평가 항목 : 이상반응, 심전도, 활력징후, 심혈심적 검사)
	독성 시험	해당 사항 없음
	기타 사항	없음.
	섭취 시 주의 사항	임산부와 수유부는 사용을 피할 것.
7. 기능성	신청 기능성	간 건강에 도움을 줄 수 있음.
	신청 일일섭취량	공피추출물로서 1일 420mg
	시험관시험	<p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> doxorubicin으로 간 독성이 유발된 rat hepatocytes 간 독성에 대한 공피추출물과 6개의 phlorotannin의 EC 50은 2.0µg/ml과 3.4-11.5µg/ml으로서 강력한 간 기능 보호 작용이 나타남(양성대조군 silymarin EC50 =13.5µg/ml, 8.2µg/ml). * 시험원료 : 공피추출물(95% 주정추출물), 공피에서 분리된 6종의 phlorotannin <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> tacrine으로 간 독성이 유발된 간암세포(HepG2 cells) ROS 생성능은 2-phloroeckol, eckol과 6,6'-bieckol 처리군에서 용량의존적으로 유의적 감소를 보임. Eckol 및 6,6'-bieckolDPPH Radical 소거능은 양성 대조군인 L-ascorbic acid EC50과 유사함. 2-phloroeckol과 eckol 처리는 용량의존적으로 세포 생존율을 유의적으로 증가시킴. 2-Phloroeckol과 eckol의 처리는 GST 및 catalase 활성을 용량의존적으로 유의적으로 증가시킴. 2-Phloroeckol과 eckol의 처리는 용량의존적으로 cell death protein의 발현 및 세포질의 미토콘드

	<p>리아로부터의 cychrome c의 방출을 용량의존적으로 저해함. * 시험원료 : 곰피 유래 Phlorotannins</p> <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ tacrine으로 간 독성이 유발된 간암세포(HepG2 cells) - ROS 생성능은 2-phloroeckol, eckol과 6,6'-bieckol 처리군에서 용량의존적으로 유의적 감소를 보임. Eckol 및 6,6'-bieckolDPPH Radical 소거능은 양성 대조군인 L-ascorbic acid EC₅₀과 유사함. 2-phloroeckol과 eckol 처리는 용량의존적으로 세포 생존율을 유의적으로 증가시킴. 2-Phloroeckol과 eckol의 처리는 GST 및 catalase 활성을 용량의존적으로 유의적으로 증가시킴. 2-Phloroeckol과 eckol의 처리는 용량의존적으로 cell death protein의 발현 및 세포질의 미토콘드리아로부터의 cychrome c의 방출을 용량의존적으로 저해함. <p>* 시험원료 : 곰피 유래 Phlorotannins</p> <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)- and tacrine으로 산화적 스트레스가 유발된 간암세포(HepG2 cells) - ROS 및 glutathione 농도는 Fucosterol 에 의해 저해됨. tacrine를 투여한 mice의 AST, ALT 농도는 Fucosterol 투여 후 유의적으로 감소함. <p>* 시험원료 : Fucosterol(갈조류 함유 sterol)</p> <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ tacrine으로 간 독성이 유발된 간암세포(HepG2 cells) - tacrine으로 으로 유발된 세포독성에 대한 EC50은 eckstolonol 및 phlorofucofuroeckol 각각 62.0, 79.2 microg/mL으로 나타남(양성대조군Silybin EC50 50.0 microg/ml). <p>* 시험원료 : 곰피 유래 Phlorotannins</p>
동물시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 만성 알코올 지방간 유도한 male Sprague Dawley rats, 곰피추출물 50,100,200mg/kg, 10주, 식이투여 - 간의 무게 증가를 저해함. 혈중 TC, TG 농도는 유의적으로 감소함(에탄올 식이 대조군 대비, p<0.01). 혈중 AST, 및 ALT 농도는 유의적으로 감소함(에탄올 식이 대조군 대비, p<0.01). 간의 MDA 농도는 유의적으로 감소함(에탄올 식이 대조군 대비, p<0.01). <p>* 시험물질 : 곰피추출물</p> <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ CCl4 간 손상 유발 ICR mice, dieckol 5, 25mg/kg - 체중과 생존율은 유의적으로 증가함(CCl4 투여군 대비). 혈중 GOT, GPT, MDA 농도는 CCl4 처리군 대비 dieckol 투여군이 용량의존적으로 유의적으로 감소함

		<p>였음(CCl4 투여군 대비). CAT 및 GSH-px 농도는 dieckol 투여군이 CCl4 처리군 대비 유의적으로 증가하였음(CCl4 투여군 대비).</p> <p>* 시험물질 : 곰피유래 Dieckol</p>
	인체적용시험	<p>[신청원료]</p> <p>◦ 경증 및 중증의 간 기능 손상자(n=65), 1일 곰피추출물로서 420mg/12주</p> <p>- 시험 진행 중</p> <p>- 유효성 평가항목 : 혈중 AST, ALT, GGT, 혈중 지질(TC, TG, HDL, LDL)</p> <p>* 인체적용시험기관 : 순천향대학교 서울병원, 소화기내과</p>
	기타 사항	없음.

- 곰피소재의 간기능 개별인정 허가를 위한 최종 신청서는 인체적용시험이 완료되는 2016년 후반기에 제출할 예정임

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 목표

<1핵심> 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품의 개발 및 제품화

개발 기술	목표(수준, 성능, 품질)		
	1차년도	2차년도	3차년도
1. 굴 가수분해물 표준화 및 유효성분 탐색(<i>in vitro</i>)	- 냉동굴 1,500kg 가수분해물 제조 표준화 - 식약청 건강기능식품규격 등재를 위한 유효물질 및 지표물질 선정	- 지표물질(YA) validation	
2. 인체적용시험을 위한 용량확인시험 (동물시험)	- 3개 이상 용량군(굴 가수분해물) 투여하여 2개이상 효과를 입증	- 3개이상 용량군(굴 가수분해물) 투여하여 2개이상 효과를 입증	
3. 굴 유래 유효물질의 혈압조절 작용기전 규명	- ACE활성저해측정과 Angiotensin-II 측정을 통해 혈압조절 작용기전 규명	- ACE활성저해측정과 Angiotensin-II 측정을 통해 혈압조절 작용기전 규명	
4. 굴 유래 기능성소재 대량 생산 공정 개발	- GMP 시설에서 대량생산 공정 최적화		
5. 굴 유래 활성 펩타이드 규명을 위한 동물효능 시험	- SHR를 이용하여 3개 이상 용량군(펩타이드) 투여하여 2개이상 효과를 입증	- SHR를 이용하여 3개 이상 용량군(펩타이드) 투여하여 2개이상 효과를 입증	
6. 일반 독성 시험		- GLP 기관에 의뢰하여 독성 데이터 완성	
7. 인체적용 시험용 시제품 생산		- GMP 기관에서 인체적용시험용 시제품 5,000개 생산	
8. 인체적용시험		- GCP 기관에서 30 case 검증	
9. 제형화			- 캡슐시제품 제작 - 유효성 개선을 위한 encapsulation 제작 - 유효성 향상을 위한 수식제품설계
10. 유통기한 설정을 위한 가속시험			- 유통기한 설정:28.7개월
11. 제품 표준화			- Fingerprint 분석
12. 인체적용시험			- GCP규정에 따라 60 case 이상 검증
13. 식품의약품안전청에의 허가 서류 제출			- GCP규정에 따라 60 case 이상 검증

<2핵심> 곰피를 이용한 간기능 개선 건강기능 식품의 개발 및 제품화

개발 기술	목표(수준, 성능, 품질)		
	1차년도	2차년도	3차년도
1. 곰피 주정추출물의 표준화	- HPLC를 이용한 지표물질 선정 및 소재 표준화 - 식약청 건강기능식품규격 등재를 위한 유효물질 및 지표물질 선정	- 지표물질 dieckol validation	
2. 인체적용시험을 위한 용량확인시험 (동물시험)	- 3개 이상의 용량군 투여에 따른 만성 알코올성 지방간을 유도한 쥐에서의 간기능 개선시험을 통한 인체적용 시험용량 설정(곰피 주정추출물, 양성대조군: Silymarin)		
3. 대량 생산 공정 개발	- Ultrafiltration과 동결건조를 이용한 pilot scale (1,500kg, 반응물 3톤)의 생산공정 개발		
4. 작용기전 규명		- 동물 조직을 이용한 지방간 개선에 작용하는 기전 검증 - 독성을 유도한 세포에서의 간보호 작용기전 검증	
5. 인체적용 시험용 시료 생산		- 신라대학교 GMP 생산시설을 이용한 인체적용 시험용 제품 생산	
6. 인체적용시험		- GCP규정에 따른 30 cases의 예비 인체적용시험을 통해 간기능 개선 기능성 및 안전성 검증	
7. 제형화			- 음료 또는 정제, 캡슐 시제품 제작 - 선호도가 좋은 과립, 스틱형으로 선정
8. 유통기한 설정을 위한 가속시험			- 유통기한 설정: 24개월 이상
9. 제품 표준화			- Fingerprint 분석
10. 인체적용시험			- GCP규정에 따라 60 case 이상 검증
11. 식품의약품안전처에 허가 서류 제출			- GCP규정에 따라 60 case 이상 검증

2. 연도별 목표 (정량적 제시)

<1핵심> 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품의 개발 및 제품화

개발 기술	목표(수준, 성능, 품질)		
	1차년도 (2012)	2차년도 (2013)	3차년도 (2014)
굴 효소가수분해물 생산성 향상 기술 개발 (기술선진국 대비)	70%	90%	100%
ACE 활성 저해 peptide의 제조(누적 건 수)	2	3	5
기능성 해양소재의 표준화기술 (기술선진국 대비)	75%	85%	100%
해양유래 기능성소재 제품개발 건수	0	0	1

<2핵심> 곰피를 이용한 간기능 개선 건강기능 식품의 개발 및 제품화

개발 기술	목표(수준, 성능, 품질)		
	1차년도 (2012)	2차년도 (2013)	3차년도 (2014)
곰피추출물 대량생산 기술 개발 (기술선진국 대비)	60%	85%	100%
간기능개선 기능성분의 개발 (누적 건 수)	1	2	3
기능성 해양소재의 표준화기술 (기술선진국 대비)	75%	85%	100%
해양유래 기능성소재 제품개발 건수	0	0	1

3. 연차별 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		신제품				논문투고		학술회 의 발표
		출원	등록	품종 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호		SCI (투고심사 중)	비SCI	
						출원	등록			
1차 년도	목표	1	0	0	0	0	0	1	1	4
	달성	2	0	0	0	0	0	1	1	6
2차 년도	목표	1	0	0	0	0	0	5	1	4
	달성	1(PCT)						2	1	4
3차 년도	목표	1	1	0	0	0	0	3	1	4
	달성	1	1					1(8)	1	3
계	목표	3	1	0	0	0	0	9	3	12
	달성	4	1					4(8)	3	13

4. 연구종료 후 연구결과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	2	0	0	0
	달성	0	0	0	0	10

5. 논문투고 및 게재 성과

게재연 도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내 외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Enzymatic Hydrolysates of <i>Crassostrea gigas</i> (Oyster).	도형주	하종명	박혜진, 김옥주, 김안드레, 최영준, 정세영	J. Life Science	22(2)	국내	비SCI
2012	Inhibitory activity of <i>Ecklonia stolonifera</i> and its isolated phlorotannins against Cu ²⁺ -induced low density lipoprotein oxidation	문혜은	최재수	안보라, 정현아	Fisheries Science	78, 927-934	국외	SCI
2013	SD-Rat의 혈청과 간균질물에 대한 굴 가수분해물의 항산화 효과	최영준	최영준	허성익, 박시향, 이수선, 정세영	한국식품영양과 학회지 (투고)	42(12), 1940-1948	국내	비SCI
2014	Protective effect of the edible brown alga <i>Ecklonia stolonifera</i> on doxorubicin-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes	Hyun Ah Jung	Jae Sue Choi	Hyun Ah Jung, Jae-I Kim, Se-Young Chung, Jae Sue Choi	Journal of Pharmacy and Pharmacology	66(8) 1180-1188,	국외	SCI
2014	Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from cross-linked oyster protein.	Xie C-L	Choi Y-J	Kim J-S, Ha J-M, Choung S-Y	BioMed Research International,	article ID379234	국외	SCI
2014	아세트아미노펜 유도 HepG-2 세포주 손상에 대한 굴 효소 가수분해물의 보호효과.	박시향	최영준	문성실, Cheng-Liang Xie, 정세영	한국식품영양과 학회지,	43, 1166-1173.	국내	비SCI
2015	In silico investigation of action mechanism of four novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides modified with Trp	Xie C-L	Choi Y-J.	Choung S-Y	Journal of Functional Food	under revision	국외	SCI
2015	Protective effect of fucosterol isolated from the edible brown algae, <i>Ecklonia stolonifera</i> and <i>Eisenia bicyclis</i> , on tert-butyl hydroperoxide- and tacrine-induced HepG2 cell injury	Jae Sue Choi	Hyun Ah Jung	Yu Ran Han, Jeong Su Byeon, Se-Young Chung, Hee Sook Sohn	Journal of Pharmacy and Pharmacology	doi: 10.1111/jph p.12404	국외	SCI

2015	Protective Effects of <i>Ecklonia stolonifera</i> Extract on Ethanol-Induced Fatty Liver in Rats	Chae Young Bang	Se Young Choung	Jae-Sue Choi	<i>Journal of Pharmacy and Pharmacology</i>	under review	국외	SCI
2015	Inhibitory effect of Oyster Hydrolysate and its active on Angiotensin- I Converting Enzyme (ACE)	Chae Young Bang	Se Young Choung	Yeung-Joon Choi	<i>Journal of medicinal food</i>	under review	국외	SCI
2015	Rational design and action mechanism of four novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from oyster hydrolysate	Cheng-liang Xie	Se-young Choung, Guang-ping Cao, Keun Woo Lee	Yeung Joon Choi	Journal of Functional Foods	under revision	국외	SCI
2015	Quantification of tyrosylalanine in oyster, <i>Crassostrea gigas</i> , hydrolysate as antihypertensive index	Cheng-liang Xie	Young-pyo Jang, Se-young Choung, Sang Soo Kang	Yeung Joon Choi	Food Analytical Methods	under submission	국내	SCI
2015	Properties and stability of oyster(<i>Crassostrea gigas</i>) hydrolysate with antihypertensive effect	Su-Seon Lee	Cheng-liang Xie, Se-young Choung, Sang Soo Kang	Yeung Joon Choi	Journal of Functional Foods	under submission	국외	SCI
2015	Sustained release of oyster(<i>Crassostrea gigas</i>) hydrolysate with antihypertensive effect by Liposome-in-alginate beads	Cheng-liang Xie	Se-young Choung, Sang Soo Kang, Su-Seon Lee	Yeung Joon Choi	Journal of Functional Foods	under submission	국외	SCI
2015	Hepato-protective effect of phlorotannins isolated from edible brown alga <i>Ecklonia stolonifera</i> on ethanol-induced oxidative stress through Nrf-2 activation	Chae Young Bang	Se Young Choung	Jae-Sue Choi	<i>Toxicology in vitro</i>	submitted 2015.05.24	국외	SCI

1. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Enzymatic Hydrolysates of *Crassostrea gigas* (Oyster).

Journal of Life Science 2012 Vol. 22, No. 2, 220-225 ISSN : 1225-9918
DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.2.220

Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Enzymatic Hydrolysates of *Crassostrea gigas* (Oyster)

Hyung Joo Do¹, Hye Jin Park¹, Ok Ju Kim¹, Andre Kim¹, Yeung Joon Choi³, Se Young Choung⁴ and Jong-Myung Ha^{1,2*}

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate school, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

³Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Jinju 650-160, Korea

⁴Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Received December 6, 2011 / Revised December 8, 2011 / Accepted December 9, 2011

The peptides of enzymatic hydrolysates from oyster were determined by inhibitory activity against angiotensin-converting enzyme. The ACE inhibitory activity of enzymatic oyster hydrolysates increases with hydrolysis time. Among enzymatic oyster hydrolysates, oyster hydrolysates incubated with Protamex showed the best ACE inhibitory activity after 10 h. Hydrolysates were filtered through a HiSep ultrafiltration membrane (M.W. cut-off 30 kDa, 10 kDa) to obtain the peptide fractions with ACE inhibition activity. These fractions were applied to an HPLC column (waters 120 ODS-AP 250 X 4.6 (5 μm)). Six active fractions were collected and the range of ACE inhibition was from 29.56 to 85.85%. Peptide was purified from fraction B, showing the highest ACE inhibitory activity, and its sequence was Leu-Gln-Pro. These results suggest that PEH may be beneficial for developing anti-hypertensive food and drug.

Key words : Angiotensin converting enzyme, *Crassostrea gigas* (oyster), hydrolysate, hypertension, Leu-Gln-Pro

2. Inhibitory activity of *Ecklonia stolonifera* and its isolated phlorotannins against Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation

Fish Sci (2012) 78:927-934
DOI 10.1007/s12562-012-0511-7

ORIGINAL ARTICLE

Food Science and Technology

Inhibitory activity of *Ecklonia stolonifera* and its isolated phlorotannins against Cu²⁺-induced low-density lipoprotein oxidation

Hye Eun Moon · Bo Ra Ahn · Hyun Ah Jung · Jae Sue Choi

Received: 23 March 2012 / Accepted: 13 May 2012 / Published online: 4 June 2012
© The Japanese Society of Fisheries Science 2012

Abstract Since the oxidation of low-density lipoprotein (LDL) is one of the main causes of atherosclerosis, Cu²⁺-induced LDL oxidation and conjugated diene formation is currently being explored for the development of pharmaceutical drugs or functional foods for the treatment of atherosclerosis. The present work investigated the inhibitory effects on in vitro Cu²⁺-induced human LDL oxidation and conjugated diene formation of the methanol (MeOH) extract of the edible brown alga (*Ecklonia stolonifera*) and its different solvent-soluble fractions, as well as the phlorotannins isolated from them. The most active ethyl acetate fraction was selected for chromatographic separation to isolate six phlorotannins: phloroglucinol (1), dioxinodehydroeckol (2), eckol (3), phlorofucofuroeckol A (4), dieckol (5), and 7-phloroecol (6). Compounds 3-6 showed potent inhibitory activity against Cu²⁺-induced LDL oxidation as compared with probucol, a well-known clinical therapeutic agent for hypercholesterolemia. Moreover, when compound 5 (at levels of 9 and 4.5 μM) was used in combination with probucol (4.5 μM), they additively inhibited Cu²⁺-induced LDL oxidation. In addition, 3-5 significantly prolonged the lag time of conjugated diene formation at 10 μM. These results suggest that the potent antiatherosclerotic effects of *E. stolonifera* and its isolated phlorotannins may be partly attributed to the

inhibition of Cu²⁺-induced LDL oxidation and conjugated diene formation.

Keywords *Ecklonia stolonifera* · Low-density lipoprotein · Antiatherosclerosis · Phlorotannins · Combination effect · Marine algae

Introduction

Atherosclerosis is a complicated and chronic inflammatory disease, and remains the most common cause of morbidity and mortality [1-3]. Over the past decade, a number of studies have provided evidence of the oxidation hypothesis of atherosclerosis, where oxidized low-density lipoproteins play a pivotal role in the initial and progressive stages of atherosclerosis [4]. LDL is oxidized by reactive oxygen species (ROS), which cause chemical and physical modifications to the LDL [5, 6]. Native LDL do not cause atherosclerotic plaques, whereas oxidized LDLs get into the artery wall and promote the progression of atherosclerosis by converting foam cells into fatty acids, leading to atheromatous plaque build-up in coronary arteries, and accordingly coronary artery disease (CAD) [5]. Thus, antioxidants that can slow or inhibit the oxidation of LDL may be an important strategy in preventing and possibly treating atherosclerosis [3, 7]. Although there have been

3. SD-Rat의 혈청과 간균질물에 대한 굴 가수분해물의 항산화 효과

J Korean Soc Food Sci Nutr
42(12), 1940-1948(2013)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.12.1940

굴 가수분해물이 SD-Rat의 혈청과 간 균질물에 미치는 항산화 효과

허성익¹ · 박시향² · 이수선² · 정세영³ · 최영준^{1*}

¹경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소

²선마린바이오테크

³경희대학교 약학대학

Anti-oxidative Effect of Oyster Hydrolysate on the Serum and Hepatic Homogenate in SD-rats

Sung-Ik Hur¹, Si-Hyang Park², Su-Seon Lee², Se Young Choung³, and Yeung Joon Choi^{1*}

¹Dept. of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry,

Gyeongsang National University, Gyeongnam 650-160, Korea

²Sun Marine Biotech Co., Gyeongnam 650-160, Korea

³Dept. of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT This study is conducted to investigate the antioxidative effect of oyster hydrolysates in the serum and liver of SD-rats through the determination of lipid content, production of free radicals and antioxidant enzyme activities. Two different hydrolysates, Protamex-treated and Neutrased-treated hydrolysate with the cross-linking of protein by transglutaminase (TGPN group) and without (PN group), were fed for 6 weeks. TGPN hydrolysate in serum and liver significantly decreased the total cholesterol in the range of 26.1% to 28.9%, and triglyceride in the liver of up to 6.3%. Superoxide radical in the serum and lipid peroxide radical in the liver were significantly decreased in SD-rats fed 200 mg TGPN hydrolysate. Superoxide dismutase activity was significantly decreased in the liver of SD-rats. These results indicate that TGPN hydrolysate could scavenge the superoxide and hydroxyl radicals, and reduce the superoxide dismutase and catalase activities. The TGPN is also protected the oxidation of protein by the free radicals.

Key words: oyster hydrolysate, antioxidation, serum, liver, SD-rat

4. Protective effect of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on doxorubicin-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes

JPP JOURNAL OF Pharmacy and Pharmacology
JPP Journal of Pharmacy And Pharmacology
Research Paper

Protective effect of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on doxorubicin-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes

Hyun Ah Jung^a, Jae-I Kim^b, Se Young Choung^c and Jae Sue Choi^d

^aDepartment of Food Science and Human Nutrition, Chonbuk National University, Jeonju, ^bNational of Food & Drug Safety Evaluation Scientific Food Investigation Team, Korea Food & Drug Administration, Chungcheongbuk-do, ^cDepartment of Preventive Pharmacy and Toxicology, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul, ^dDepartment of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, Busan, Korea

Keywords

doxorubicin, *Ecklonia stolonifera*, hepatotoxicity, phlorotannin, seaweed

Correspondence

Jae Sue Choi, Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, 808-737, Korea.
E-mail: choijs@pknu.ac.kr

Received September 16, 2013
Accepted February 2, 2014

doi: 10.1111/jpp.12241

Abstract

Objectives As part of our efforts to isolate anti-hepatotoxic agents from marine natural products, we screened the ability of 14 edible varieties of Korean seaweed to protect against doxorubicin-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes.

Methods Among the crude extracts of two Chlorophyta (*Codium fragile* and *Capsosiphon fulvescens*), seven Phaeophyta (*Undaria pinnatifida*, *Sargassum thunbergii*, *Pelvetia siliculosus*, *Ishige okamurae*, *Ecklonia cava*, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*), five Rhodophyta (*Chondrus ocellatus*, *Gelidium amansii*, *Gracilaria verrucosa*, *Symphylodidia latiuscula* and *Porphyra tenera*), and the extracts of *Ecklonia stolonifera*, *Ecklonia cava*, *Eisenia bicyclis* and *Pelvetia siliculosus* exhibited significant protective effects on doxorubicin-induced hepatotoxicity, with half maximal effective concentration (EC50) values of 2.0, 2.5, 3.0 and 15.0 µg/ml, respectively.

Key findings Since *Ecklonia stolonifera* exhibits a significant protective potential and is frequently used as foodstuff, we isolated six phlorotannins, including phloroglucinol (1), dioxinodihydroeckol (2), eckol (3), phlorofucofuroeckol A (4), dieckol (5) and triphloroethol-A (6). Phlorotannins 2-6 exhibited potential protective effects on doxorubicin-induced hepatotoxicity, with corresponding EC50 values of 3.4, 8.3, 4.4, 5.5 and 11.5 µg/ml, respectively.

Conclusion The results clearly demonstrated that the anti-hepatotoxic effects of *Ecklonia stolonifera* and its isolated phlorotannins are useful for further exploration and development of therapeutic modalities for treatment of hepatotoxicity.

5. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from cross-linked oyster protein.

Research Article

Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor Derived from Cross-Linked Oyster Protein

Cheng-Liang Xie,¹ Jin-Soo Kim,¹ Jong-Myung Ha,²
Se-Young Choung,³ and Yeung-Joon Choi¹

¹Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University,
Gyeongnam-do 650-160, Republic of Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Republic of Korea

³Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Republic of Korea

Correspondence should be addressed to Yeung-Joon Choi; yjchoi@gnu.ac.kr

Received 11 April 2014; Revised 7 June 2014; Accepted 24 June 2014; Published 23 July 2014

Academic Editor: Stelvio M. Bandiera

Copyright © 2014 Cheng-Liang Xie et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Following cross-linking by microbial transglutaminase, modified oyster proteins were hydrolyzed to improve inhibitory activity against angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity with the use of a single protease, or a combination of six proteases. The oyster hydrolysate with the lowest 50% ACE inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.40 mg/mL was obtained by two-step hydrolysis of the cross-linked oyster protein using Protamex and Neutrase. Five ACE inhibitory peptides were purified from the oyster hydrolysate using a multistep chromatographic procedure comprised of ion-exchange, size exclusion, and reversed-phase liquid chromatography. Their sequences were identified as TAY, VK, KY, FYN, and YA, using automated Edman degradation and mass spectrometry. These peptides were synthesized, and their IC_{50} values were measured to be 16.7, 29.0, 51.5, 68.2, and 93.9 μ M, respectively. Toxicity of the peptides on the HepG2 cell line was not detected. The oyster hydrolysate also significantly decreased the systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR). The antihypertensive effect of the oyster hydrolysate on SHR was rapid and long-lasting, compared to commercially obtained sardine hydrolysate. These results suggest that the oyster hydrolysate could be a source of effective nutraceuticals against hypertension.

6. 아세트아미노펜 유도 HepG-2 세포주 손상에 대한 굴 효소 가수분해물의 보호효과

J Korean Soc Food Sci Nutr
43(8), 1166–1173(2014)

한국식품영양과학회지
<http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.8.1166>

아세트아미노펜 유도 HepG-2 세포주 손상에 대한 굴 효소 가수분해물의 보호 효과

박시향¹ · 문성실² · Cheng-Liang Xie³ · 정세영⁴ · 최영준³

¹선마린바이오테크, ²선진육가공연구소

³경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소, ⁴경희대학교 약학대학

Protective Effects of Enzymatic Oyster Hydrolysate on Acetaminophen-induced HepG-2 Cell Damage

Si-Hyang Park¹, Sung-Sil Moon², Cheng-Liang Xie³, Se-Young Choung⁴, and Yeung-Joon Choi³

¹Sun Marine Biotech

²Sunjin Meat Research Center

³Department of Seafood Science and Technology, Gyeongsang National University/Institute of Marine Industry

⁴Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University

ABSTRACT This study investigated the detoxification effects of enzymatic hydrolysate from oyster on acetaminophen-induced toxicity using HepG-2 cells. Oyster hydrolysate was made with 1% Protamex and 1% Neutrase after treatment with transglutaminase (TGN) or without (PN). Two types of oyster hydrolysate were added to human-derived HepG-2 hepatocytes damaged by acetaminophen, after which the survival rate of HepG-2 cell was measured. In addition, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) activities in the culture media were evaluated. The survival rates of HepG-2 cells were 136.2±1.4% at 100 μ g/mL of TGN and 179.6±3.8% at 200 μ g/mL of TGN. These cell survival rates were higher compared to that of the negative control group (60.7±3.2%) treated only with acetaminophen. GOT activity was 38.3±0.2 Karmen/mL in the negative control group, whereas it was 19.9±0.5 for TGN (200 μ g/mL) and 22.0±2.4 Karmen/mL for PN (200 μ g/mL). GOT and GPT activities were shown to be dependent on TGN concentration, and significant reduction in activities could be confirmed. The detoxification efficacy of TGN was higher compared to that of PN. These results suggest that oyster hydrolysate has potential as a healthy food or pro-drug for liver protection.

Key words: oyster, hydrolysate, acetaminophen, detoxification of drug, peptide

7. In silico investigation of action mechanism of four novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides modified with Trp

Journal of Functional Foods

Contact us Help ?  'My EES Hub' available for consolidated users ... [more](#)

Home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: yjchoi@gnu.ac.kr

Revisions Being Processed for Author Yeung-Joon Choi, Dr.

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status
Action Links	JFF-D-15-00184R2	In silico Investigation of Action Mechanism of Four Novel Angiotensin-1 Converting Enzyme Inhibitory Peptides Modified with Trp	May 25, 2015	May 26, 2015	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

8. Protective effect of fucosterol isolated from the edible brown algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*, on tert-butyl hydroperoxide- and tacrine-induced HepG2 cell injury

JPP JOURNAL OF Pharmacy and Pharmacology

JPP Journal of Pharmacy And Pharmacology

ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY

Research Paper

Protective effect of fucosterol isolated from the edible brown algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*, on tert-butyl hydroperoxide- and tacrine-induced HepG2 cell injury

Jae Sue Choi^{a,*}, Yu Ran Han^{a,*}, Jeong Su Byeon^a, Se-Young Choung^b, Hee Sook Sohn^c and Hyun Ah Jung^{a,*}

^aDepartment of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, Busan, ^bCollege of Pharmacy, Kyong Hee University, Seoul and ^cDepartment of Food Science and Human Nutrition, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

Keywords
fucosterol; hepatoprotection; oxidative stress; tacrine; tert-butyl hydroperoxide

Correspondence
Hyun Ah Jung, Department of Food Science and Human Nutrition, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju 561-756, Korea.
E-mail: jungah@cbnu.ac.kr
Jae Sue Choi, Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, 45 Yongso-ro, Nam-gu, Busan 608-737, Korea.
E-mail: choi@pknu.ac.kr

Received August 19, 2014
Accepted February 1, 2015
doi: 10.1111/jjpp.12404
*These authors contributed equally to this work.

Abstract
Objectives Fucosterol is the primary sterol found in brown algae. Recently, considerable interest has been generated regarding fucosterol due to its potential anti-oxidant, anti-inflammatory and antidiabetic effects. The aim of this study was to investigate the protective effects of fucosterol on tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)- and tacrine-induced oxidative stress in HepG2 cells.
Methods Fucosterol by itself exhibited no cytotoxicity at concentrations below 100 μM by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay. The increased intracellular reactive oxygen species (ROS) and decreased glutathione levels observed in t-BHP- and tacrine-treated HepG2 cells were ameliorated by fucosterol pretreatment, indicating that the protective effects of fucosterol are mediated by the induction of cellular defence mechanisms against oxidative stress. Moreover, elevated alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels in tacrine-treated mice were significantly reduced after oral administration of fucosterol.
Key findings The hepatoprotective effects of fucosterol may occur via an increase in the hepatic level of glutathione and a decrease in ROS production, thereby preventing hepatic damage and the resultant increases in ALT and AST activity.
Conclusion These results suggest that fucosterol may be an effective hepatoprotective agent that could be useful for preventive therapies against oxidative stress-related hepatotoxicity.

9. Protective Effects of *Ecklonia stolonifera* Extract on Ethanol-Induced Fatty Liver in Rats

ScholarOne Manuscripts™ Chae Young Bang Instructions & Forms Help Log Out

JPP JOURNAL OF Pharmacy and Pharmacology ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY

Main Menu / Author Dashboard / Submission Confirmation

Submission Confirmation **DO NOT USE YOUR BROWSER BACK BUTTON.** TO EXIT THIS PAGE, PLEASE CLOSE YOUR BROWSER WINDOW OR CLICK ON THE RETURN TO DASHBOARD BUTTON, IF AVAILABLE.

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

Manuscript ID: JPP-15-0321
 Title: Protective Effects of *Ecklonia stolonifera* Extract on Ethanol-Induced Fatty Liver in Rats
 Authors: Bang, Chae-Young
 Choi, Jae-Sue
 Choung, Se-Young
 Date Submitted: 17-May-2015

Print Return to Dashboard

10. Inhibitory effect of Oyster Hydrolysate and its active on Angiotensin- I Converting Enzyme (ACE)

ScholarOne Manuscripts™ Chae-Young Bang Instructions & F

Journal of MEDICINAL FOOD

Main Menu / Author Dashboard / Submission Confirmation

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Medicinal Food*.

Manuscript ID: JMF-2015-3523
 Title: Inhibitory Effect of Oyster Hydrolysate and its Active Peptide on Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)
 Authors: Bang, Chae-Young
 Choi, Yeungjoon
 Choung, Se-Young
 Date Submitted: 21-May-2015

Print Return to Dashboard

11. Rational design and action mechanism of four novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from oyster hydrolysate

Journal of Functional Foods Contact us Help ? My EES Hub' available for consolidated users ... more

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out Username: yjchoi@gnu.ac.kr

Revisions Being Processed for Author Yeung-Joon Choi, Dr.

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status
Action Links	JFF-D-15-00184R2	In silico Investigation of Action Mechanism of Four Novel Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Modified with Trp	May 25, 2015	May 26, 2015	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

12. Quantification of tyrosylalanine in oyster, *Crassostrea gigas*, hydrolysate as antihypertensive index

Sender : Food Analytical Methods <em@editorialmanager.com >

To : Yeung Joon Choi <yjchoi@gnu.ac.kr >

Date : 2015-01-17 02:42:40

Subject : [FWD]Acknowledgement of Receipt

Dear Dr. Yeung Joon Choi:

Thank you for submitting your manuscript, "Quantification of Peptide, Tyrosylalanine, in Oyster (*Crassostrea gigas*) Hydrolysate as Antihypertensive Index", to Food Analytical Methods.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://fanm.edmgr.com/>

Your username is: yjchoi

Your password is: choi84735

With kind regards,

The Editorial Office
Food Analytical Methods

13. Properties and stability of oyster(*Crassostrea gigas*) hydrolysate with antihypertensive effect

받는사람 yjchoi@gnu.ac.kr

보낸날짜 2015-01-26 12:14:49

Full Length Article

Dear Dr. Yeung-Joon Choi,

We have received your article "Properties and Stability of Oyster (*Crassostrea gigas*) Hydrolysate with Antihypertensive Effect" for consideration for publication in Journal of Functional Foods.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/jff/>

2. Enter these login details:

Your username is: yjchoi@gnu.ac.kr

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/jff/automail_query.asp

14. Sustained release of oyster(*Crassostrea gigas*) hydrolysate with antihypertensive effect by Liposome-in-alginatebeads



15. Hepato-protective effect of phlorotannins isolated from edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on ethanol- induced oxidative stress through Nrf-2 activation



현재 5편의 SCI저널게재 성과가 완료되었으나 추가 7편의 SCI 저널에 투고되거나 투고중 이므로 이들 논문들은 최대 1년 이내에는 게재가 예상되므로 과제종료 후 추적조사를 통해 초과달성(9편 목표대비 12편 달성)을 확인할 수 있을것으로 판단됨.

6. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013	콜라게나제의 활성저해효과를 갖는 글 가수분해물 유래 신규 펩타이드 및 그의 용도	경상대산학협력단	한국	10-2013-0098938	2015	안지오텐신-I 전환 효소 저해능을 나타내는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물	경희대학교 산학협력단, 경상대학교 산학협력단	한국	10-1533308
2013	안지오텐신-I 전환 효소 저해능을 나타내는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물	경희대학교 산학협력단, 경상대학교 산학협력단	PCT	PCT/KR2013/007598	2015	콜라게나제의 활성저해효과를 갖는 글 가수분해물 유래 신규 펩타이드 및 그의 용도	경상대산학협력단	한국	10-1530125
2014	곰피 추출물, 가바, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 맛이 차폐된 과립	(주)네추럴웨이	한국	10-2014-0153647					

<특허 증빙서류>

발급번호 : 5-5-2015-07423917

출원사실증명원
CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	경상대학교산학협력단 INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY	주민번호 Residence No	191171-0*****
	주소	경상남도 진주시 권후대로 501 (23동) 501	전화번호	055-772-0233
발명자 Inventor	성명 Name	최영준 CHOI, Yeung-Joon	주민번호 Residence No	541219-1*****
	주소	경상남도 통영시 마수해안로 36, 115동 405호 (마수동, 통영대학교)	전화번호	
대리인 Agent	성명 Name	위영갑	대리인 코드	9-2004-000165-3
	주소	서울특별시 강남구 테헤란로33길 7 7층 (대영빌딩)(위혁희법률사무소)		
출원번호 Application Number	특허-2013-0098938 PATENT-2013-0098938	출원일자 Filing Date	2013년 08월 21일 AUG 21, 2013	
발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 물품, 상표(서비스표)류 구분	콜라게나제의 활성 저해 효과를 갖는 글 가수분해물 유래 신규 펩타이드 및 그의 용도 Novel peptide derived from oyster hydrolysate with collagenase inhibitory activity and their application			
Title of Invention, Product(s) Embodied In Design, or Classification of Mark				
용도	확인용	IPC 분류	C07K 5/08	
최종저분상대	등록결정	최종저분일	2015년 05월 21일	

위 사실을 증명함.
This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office

2015년 07월 30일

특허청장
COMMISSIONER

◆ 본 증명서 발급은 발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 물품, 상표(서비스표)류 구분, IPC 분류, 최종저분일 등의 기재사항이 정확히 기재되어 있는 것을 전제로 하며, 위 기재사항이 정확하지 않거나 누락된 경우에는 본 증명서 발급을 취소할 수 있습니다. ◆

발급일자 : 20150730

<특허출원>

발급번호 : 5-5-2015-07423513

출원사실증명원
CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	경희대학교 산학협력단 UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY	주민번호 Residence No	
	주소	경기도 용인시 기흥구 영월로 120 (유학동) 446-701 (대우인)	전화번호	82-2-3453-0507
발명자 Inventor	성명 Name	경상대학교 산학협력단 INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY	주민번호 Residence No	
	주소	경상남도 진주시 권후대로501 66 (23동) 501동 606호	전화번호	
	성명 Name	정세영 CHUNG, Sa-Young	주민번호 Residence No	
	주소	서울시 중대문구 통상대로 11길 17 204호, 1503호, 191-730 (대원빌딩)	전화번호	
	성명 Name	최영준 CHOI, Yeung Joon	주민번호 Residence No	
	주소	경상남도 통영시 마수해안로 36, 115동 405호 (마수동, 통영대학교)	전화번호	
대리인 Agent	성명 Name	이연희	대리인 코드	9-1999-000395-9
	주소	서울시 강남구 역삼동642-16 8층 지라이츠 2차 8동 135-080 (대한민국)		
출원번호 Application Number	PCT/KR2013/007598	출원일자 Filing Date	2013년 08월 23일 AUG 23, 2013	
발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 물품, 상표(서비스표)류 구분	안지오텐신-I 전환 효소 저해능을 나타내는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물			
Title of Invention, Product(s) Embodied In Design, or Classification of Mark				
용도	확인용	IPC 분류		
최종저분상대		최종저분일		

위 사실을 증명함.
This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office

2015년 07월 30일

특허청장
COMMISSIONER

◆ 본 증명서 발급은 발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 물품, 상표(서비스표)류 구분, IPC 분류, 최종저분일 등의 기재사항이 정확히 기재되어 있는 것을 전제로 하며, 위 기재사항이 정확하지 않거나 누락된 경우에는 본 증명서 발급을 취소할 수 있습니다. ◆

<특허출원>



출원사실증명원
CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	(주) 네츨웨이 NATUREL WAY	주민번호 Residence No	115411-0*****
	주소	충청남도 천안시 태안군 화서면 1리 20번지	전화번호	031-535-7674
발명자 Inventor	성명 Name	정세영 CHOUNG, Se Young	주민번호 Residence No	561231-1*****
	주소	충청북도 충주군 원천면(원천1리) 20번지 (55300 충청북도 충주군원천면(원천1리))	전화번호	
	성명 Name	이강호 LEE, Kyoung-Ho	주민번호 Residence No	710131-1*****
	주소	경기도 수원시 화성구 송호동 74-1번지 (44270 경기도 수원시화성구송호동74-1번지(송호초등학교))	전화번호	
	성명 Name	정준현 CHUN, Jung-Hyun	주민번호 Residence No	561612-1*****
	주소	충청북도 괴산군 괴산읍 1리 302번지 (33800 충청북도 괴산군괴산읍1리302번지)	전화번호	
	성명 Name	이기진 LEE, Ki-Chun	주민번호 Residence No	750326-1*****
	주소	경기도 고양시 과목면 안곡동 1리 10번지 (47000 경기도고양시과목면안곡동1리10번지)	전화번호	
대리인 Agent	성명 Name	최동규 CHOI, Dong-Gyu	주민번호 Residence No	830310-5*****
	주소	서울특별시 강남구 삼성동 151-1번지 (06350 서울특별시강남구삼성동151-1번지)	전화번호	
출원번호 Application Number	출원번호 Application No	특허-2014-0153317 PATENT-2014-0153317	출원일자 Filing Date	2014년 11월 06일 NOV 06 2014
	발명(고안)의 명칭, 디자인을 포함할 때, 상품(서비스)의 구분 Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark	균화 추출물, 과채, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것이 식품과 관련 Taste-masked granules containing Ecklonia stolonifera extract, GABA, or their mixtures		
영도 Class	화학공학	IPC 분류 IPC Class	A23L 1/015	
최초출원일 Priority Date	최초출원일			

<특허출원>

특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허
Patent Number

제 10-1533308 호

출원번호
Application Number

제 10-2013-0100232 호

출원일
Filing Date

2013년 08월 23일

등록일
Registration Date

2015년 06월 26일

발명의 명칭
Title of the Invention

인지오템신-1 전환 효소 저해능을 나타내는 펙티다이드 유추성분으로 포함하는 식염관계 질한 여방 또는 지도용 약학적 조성물

특허권자
Patentee

등록사항권에 기재

발명자
Inventor

등록사항권에 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.



2015년 06월 26일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

최동규

<특허증>

특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허
Patent Number

제 10-1530125 호

출원번호
Application Number

제 10-2013-0098938 호

출원일
Filing Date

2013년 08월 21일

등록일
Registration Date

2015년 06월 12일

발명의 명칭
Title of the Invention

콜라게나제의 활성 저해 효과를 갖는 글 가수분해물 유래 신규 펩타이드 및 그의 용도

특허권자
Patentee

경상대학교산학협력단(191171-0*****)
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

발명자
Inventor

최영준(S41219-1*****)
경상남도 통영시 미수해안로 36, 103동 805호(미수동, 현대아파트)

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.



2015년 06월 12일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

최동규

<특허증>

7. 지자체 홍보 및 관련 산업 발전 기여

통영수산물 중국시장 개척사업 추진결과 보고 배포 자료(2014년 01월 07일, 어업진흥과-283)

□ 수산물 위생·안전성 및 건강기능성 홍보



- 통영수산물의 위생·안전성 및 건강기능성 홍보
 - 강 연 자: 시장님, 경희대 정세영 교수
 - 강연일시: 2013.12.22~24.(3회)
 - 강연장소: 청향각, 허방원, 산동순화국제호텔
 - 강연내용
 - 지정해역의 개념과 관리기준
 - 굴 위생관리를 위한 통영시의 노력(추진상황)
 - 일반적인 굴의 영양성분 및 효능 등

□ 중국 제남시 언론사 기자회견



- 산동성 제남시 언론사 기자회견
 - 일 시: 2013년 12월 24일, 16:00~17:00, - 장소: 순화국제호텔 회견장
 - 참석자: 통영시장, 통영시 의회의장, 순화그룹 런썬번 회장, 경희대 정세영 교수, (주)진화 정상철 사장
 - 참여언론사: 지난일보, 지난시보, 산동상보, 생활일보, 지난 CCTV, 여행세계잡지
- ⇒ 현지 언론 대상으로 통영수산물의 우수성 및 위생성, 안전성, 건강 기능성 홍보

□ “굴” 수출계약 체결

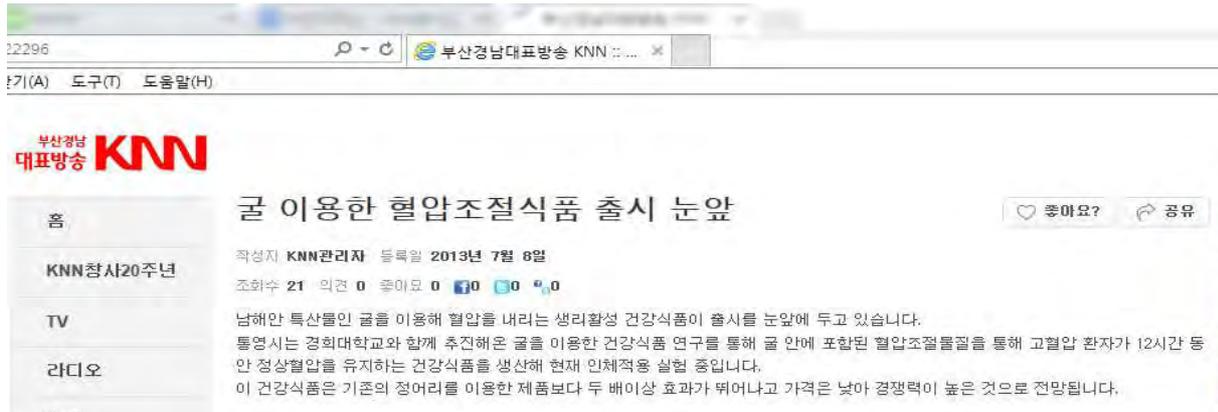


- 2013년 12월 22일, 북경시 『청향각』에서 수출계약체결
 - 진화 / 청향각: 400톤, 40억원
- 2013년 12월 24일, 산동성 제남시 순화국제호텔에서 수출계약체결
 - 주)진화 / 순화국제호텔그룹: 350톤, 35억원
- ⇒ 통영 “굴” 중국시장 수출 본격 추진

8. 언론보도자료

-인터넷 뉴스

1. 부산경남 대표방송 KNN : <http://t.knn.co.kr/n.asp?p=H2H>



2. 공감언론 NEWSis통신사 :

<http://news.naver.com/main/read.nhn?mode=LSD&mid=sec&sid1=102&oid=003&aid=0005248822>



3. 뉴스 1 코리아 : <http://news1.kr/articles/1225173>

통영군, '꿀' 건강식품 개발 추진

1면날 통영=뉴스1 취재기 기자 | 2013.07.05 07:25:25 송고



통영군 꿀을 이용한 혈압조절 건강기능식품 개발사업 중간보고회가 열렸다(News1)

경남 통영시(시장 김동진)는 4일 시청 회의실에서 '꿀을 이용한 혈압조절 건강기능식품 개발사업' 중간보고회를 개최했다고 5일 밝혔다.
 발표자로 나선 경희대학교 정세영 교수는 그 동안 진행한 연구 결과를 설명하면서 꿀 펙타이드(혈압조절물질)를 고혈압 환자들에게 1회 투여한 결과 12시간 동안 정상혈압을 유지했다고 밝혔다.
 정 교수는 이날 "이는 현재 일본과 국내에서 유통되고 있는 정어리 펙타이드에 비해 효과는 두 배 이상 뛰어나며, 생신원가는 훨씬 낮아 충분한 경쟁력을 갖추고 있다"고 강조했다.
 정 교수는 특히 "이러한 꿀 펙타이드의 경쟁력을 무기로 국내외 시장을 개척한다면 연간 1,500억원 이상의 건강기능성 식품시장을 확보할 수 있을 것"으로 전망했다.

4. 아시아뉴스통신 : <http://www.anewsa.com/detail.php?number=514292&thread=10r02>

The First Smart
 이는 고혈압
 소아용 프로스타
 CO 1902WU Series

자세히 보기

"통영꿀", 혈압조절·간기능 개선 효능 확인!

경희대 정세영 교수, 건강기능식품 개발 보고회서

기사입력 : 2013년 07월 05일 14시 00분

(아시아뉴스통신=오종근 기자)

4일 통영시에 기진 '꿀을 이용한 혈압조절 건강기능식품 개발사업' 중간보고회 모습 (사진제공=통영시청)

경남 통영의 '꿀'이 혈압조절과 간 기능 개선에 탁월한 효과가 있다는 연구결과가 나와 주목된다.

경희대 경희대학교 교수는 지난 4일 통영시에서 기진 '꿀을 이용한 혈압조절 건강기능식품 개발사업' 중간보고회에서 이 같은 내용을 밝혔다.

발표자로 나선 정세영 경희대학교 교수는 사업추진 경과와 추진계획을 보고하는 과정에서 그 동안 통영꿀로써 동물과 인체에 적용하는 실험결과 꿀 펙타이드(혈압조절물질)의 탁월한 유효성이 있다고 강조했다.

정 교수는 "고혈압군에 1회 투여 후 실험결과 12시간동안 정상혈압을 유지했다"며 "현재 일본과 국내에서 유통되고 있는 정어리 펙타이드에 비해 효과는 두 배 이상 뛰어나며, 생신원가는 훨씬 낮아 충분한 경쟁력을 갖추고 있다"고 밝혀 주목을 받았다.

이어서 정 교수는 "이러한 꿀 펙타이드의 경쟁력을 무기로 국내는 물론 일본과 중국시장으로 진출한다면 연간 1500억원 이상의 건강기능성 식품시장을 확보할 수 있다"고 말했다.

5. 한산신문 : <http://www.hansannews.com/news/articleView.html?idxno=38426>

"찾았다. 굴의 또 다른 효과"...1,500억원 건강식품 시장 확보

통영시, 4일 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품 개발사업 중간보고회 가졌다

2013년 07월 05일 | 목 | 09:37:09

김민석 기자 | news174@hanan.com



경희대학교 황세원 교수가 그라진 연구결과를 발표하고 있다.

'굴'의 '유아'로 불리며 영양학적 가치가 입증된 '굴'의 또 다른 의학적 효능이 발견됐다.

굴에 다량 함유된 펩타이드 성분이 혈압조절과 간기능 개선에 탁월하다는 연구결과가 나왔다.

통영시는 지난 4일 해양바이오 산업 육성용 위해 추진하고 있는 '굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품 개발사업' 중간보고회를 가졌다.

발표자로 나선 경희대학교 경제영 교수는 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품 시제품과 그동안 동물 및 인체적용 실험을 통해 확인된 굴 펩타이드의 탁월한 효능을 소개했다.

보고에 따르면 굴에서 추출한 펩타이드를 고열순균에 1회 투여 후 관찰한 결과, 12시간동안 항생물 작용을 유지했다.

6. 통영인터넷뉴스 :

<http://www.tyinews.com/ArticleView.asp?intNum=27014&ASection=001001>

통영인터넷뉴스 **tyinews.com** 최종편집 2013-06-01 오전 7:05:00 **통영인터넷뉴스** 기사 검색

[로그인] [회원가입] 회사소개 | 후원하기 | 윤리(편집규약)강령 | 사업영역 | 시민정보 | 취재요청 | 명예기자신청 | 광고문의 | 콘텐츠

2013-07-05 오전 9:54:35 업력 **뉴스 > 통영뉴스**

통영굴, 혈압조절 간기능 개선에 효능

이 기사를 후원하고자 하시면 클릭하시면 얻을됩니다.

통영시는 4일 시청 회의실에서 해양바이오 산업 육성을 위해 통영시가 추진하고 있는 굴을 이용한 혈압조절 건강기능식품 개발사업 중간보고회를 개최했다.

Hot Click

- ▶ 민선6기 공약실현 평가 중단... 통영시 최하위 1등급
- ▶ 수출입은행, 성동조선에 300억원 단독 지회 발전관리 위기 불타... 재검단 돌...
- ▶ 통영시의회 개원 이래 사상 처음 계란과 밀가루로 뒤덮...
- ▶ 통영PCE 세자트라 자연 생태공원 개관
- ▶ 불기 255년 부처님 오신날 통속 대법회 중생물에 대한 준비와 평양이 비쳐지...

문화행사안내

도서관으로 무료영화 보러 오세요.

통영시립도서관에서는 5월 마지막 주 수요일(27일),

절초보르크 만차르데움, 5년 만에 통영 공연

절초보르크 만차르데움 오케스트라는 22일 저녁 7시 30.

7. 통영인(in)뉴스 : http://tyinnews.com/bbs/board.php?bo_table=sub03&wr_id=186#



-방송

1. 모닝와이드 [2013년 07월 08일] 뉴스 19분부터~

<http://news.knn.co.kr/news/vodprogram.asp?progid=3000001&vodid=MDAyOTQ3Ng==&page=1>



9. 학술대회 발표성과



**2012년도
한국식품과학회 영남지부/한국수산과학회
수산이용가공분과 연합 심포지움**

식품 산업의 정책과 산업화 방향

- 일시 : 2012년 8월 24일(금)
- 장소 : 국립경상대학교 해양생물교육연구센터 1917홀(통영)
- 주최 : 한국식품과학회 영남지부/
한국수산과학회 수산이용가공분과
- 주관 : 경상대학교 해양산업연구소
- 후원 : (사)한국식품과학회/(사)한국수산과학회
(주)마린바이오프로세스/(주)엠에스바이오

한국식품과학회
한국수산과학회

p-1

Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a oyster protein hydrolysate

Hyung Joo Do, Hye Jin Park, Ok Ju Kim, Andre Kim and Jong-Myung Ha
Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science, Silla University, Busan, Korea

The oyster is known that it has many functional properties. Especially, its hydrolysate produced by enzymes can be produced a good functional substance. The peptides from protamex enzymatic hydrolysates of oyster were isolated and for inhibitory activity against angiotensin converting enzyme (ACE). The ACE inhibitory activity of enzymatic oyster hydrolysates did increase with hydrolysis time. The enzymatic hydrolysate were filtered through Hisep ultrafiltration membrane (M.W. cut-off 30,000, 10,000) to obtain the peptides fractions with ACE inhibition activity. These fractions were applied to a HPLC column (watchers 120 ODS-AP 250X4.6 (5 μm)). Six active fractions [A (No. 4), B (No. 6), C (No. 7), D (No. 10), E (No. 12), F (No. 15)] were collected. ACE inhibition of HPLC fraction (A, B, C, D, E, F) were 85.78%, 85.85%, 29.56%, 81.72%, 77.37%, 52.53% respectively. Among the active fractions, B (tube No. 6) had the highest ACE inhibitory activity. Its amino acid sequence was determined to be Leu-Gln-Pro. IC50 value of Leu-Gln-Pro was 1.18 μM. These results suggest that PEH may be of benefit for developing antihypertensive food and drug.

○ **조청 특강 발표 일정**

일시	식순	내용	비고
10:00~10:30	등록	- 등록	
10:30~11:00	개회식	-개회식 (김진수 지부장/한국식품과학회 영남지부) -축사 (김인수 위원장/한국수산과학회 수산이용가공분과) -환영사 (남택정 회장/한국수산과학회) -환영사 (정용갑 회장/경상대학교 해양과학대학)	경상대학교 해양생물 연구센터 1917홀
11:00~11:40	조청 특강(I)	-기후변화에 따른 식품안전관리 (안상배 과장 / 식품의약품안전청)	조청 차용준 (장원대)
11:40~12:20	조청 특강(II)	-수산식품산업 육성 정책 (정영훈 과장 / 농림수산식품부 수산정책국)	조청 구재민 (교신대)
12:20~13:20	점심식사		경상대학교내식당
13:20~14:00	지부/분과 총회		
14:00~14:40	조청 특강(III)	-Functional Properties of Peptides from Oyster Hydrolysate (최영준 교수 / 경상대)	조청 정영준 (조선대)
14:40~15:20	조청 특강(IV)	-다시마 발효물용 이용한 건강 기능성 식품의 개발 (이백진 대표이사 / (주)마린바이오프로세스)	조청 김용우 (한국수산물)
15:20~15:40	Coffee break		
15:40~16:20	조청 특강(V)	-식품 분야 특허 전략 (위명갑 변호사/ 위 특허법률사무소)	조청 윤영환 (동원수산업)
16:20~17:00	조청 특강(VI)	- Application of electromagnetic field at 27 MHz in food and bioprocessing industries (Prof. Oon-Doo Baik/ University of Saskatchewan, Canada)	조청 권혁희 (부경대)
17:30~20:00	간담회		애송회실

cytotoxicity and apoptosis in SH-SY5Y cells may be, at least in part, attribute to the its potent inhibition ability of induced activity by DA

P1-102 Protective effects of ES extract on alcoholic fatty liver induced ethanol diet fed rats

YOON Sun-Myang, BANG Chae-Young¹, CHUNG Se-Young^{2*}
Department of Life and Nanopharmaceutical Science of Pharmacy, Kyung Hee University, Korea, ¹Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, 130-701, Seoul, Republic of Korea
*Corresponding author: sychung@khu.ac.kr
Presenting author: leth9221@gmail.com

Chronic alcohol consumption is a major health issue worldwide, and causes alcoholic liver disease, which is associated, or initiated, with dysregulated lipid metabolism. Very recent evidence suggested that dysregulated cholesterol metabolism plays an important role in the pathogenesis of alcoholic fatty liver diseases. ES is a perennial brown marine algae that belongs to the family Laminariaceae. This species is usually found in sub-tidal zones at depths of between 2 and 10 m, and is widely distributed throughout the eastern and southern coasts of Korea. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into six groups (n=10/group): the ND group, which was fed a normal diet for 10. The ED group, which was fed an Lieber DeCarli liquid diet containing 5% ethanol for 10 weeks and given daily oral doses ES extract (50, 100 and 200 mg/kg/day) and silymarin(100 mg/kg/day) over the last four weeks. Long-term excessive alcohol feeding to rats caused fatty liver and liver injury, which was associated with disrupted cholesterol homeostasis, characterized by increased hepatic cholesterol levels and hypercholesterolemia. Compared with the normal group, liver/body weight, serum ALT and AST levels increased in the ED group. Moreover, liver TG and TC, and FFA significantly increased in the ED group. On the other hand, rats were administered with ES extract, their liver/body weight, serum ALT and AST, also liver TG and TC and FFA were significantly decreased compared with those in the ED group. Liver histological changes were also analyzed by Oil Red O staining showed ES extract suppressed adipogenic process. These results indicate that ES extract may be useful in preventing and improving fatty liver induced by ethanol diet.

P1-103 Induction of apoptosis by *Isidra zinicola* extracts is associated with activation of a caspase cascade in human hela cells

JEONG¹ Il-Yun¹, CHO Byoung-Ok², CHOI Dae-Seong³, JIN Chang-Hyun⁴, KIM Wang-Geun^{1*}
Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Korea, ¹Rare Isotope Science Project Team, Institute for basic science, Korea
*Corresponding author :
Presenting author : enzyme21@hanmail.net

The purpose of this study was to elucidate the anti-proliferative effect and the mechanisms underlying apoptosis induced by methanol extracts from *Isidra zinicola* (ISE) in HeLa cells. ISE treatment for 24 h significantly inhibited cell viability in a dose-dependent manner. Apoptosis was detected by a Hoechst 33258 staining and an annexin V/PI assay after 24 h treatment. Moreover, ISE treatment triggered the cleavage of caspase-8, -9, -3, and Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in a dose-dependent and time-dependent manner. In addition, z-VAD-fmk, a general caspase inhibitor, blocked ISE-induced cell death. Taken together, these results suggest that ISE-induced apoptosis is mediated by the activation of a caspase cascade in HeLa cells.

P1-104 *Myagrostis myagrostoides* extracts induces apoptosis via a caspase dependent pathway and reactive oxygen species generation in U937 and PC-3 cancer cells

CHO Byoung-Ok¹, RYU Hyung-Won², SO Yang-Kang³, JIN Chang-Hyun⁴, JEONG Il-Yun^{1*}
Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Korea
*Corresponding author : byjeong@kaeri.re.kr
Presenting author : enzyme21@hanmail.net

The purpose of this study was to elucidate the mechanisms underlying apoptosis induced by ethanol extracts from *Myagrostis myagrostoides* (ME) in U937 and PC-3 cells. ME treatment for 24 h significantly inhibited cell viability in

Paper Title: Inhibitory Effect of Oyster Hydrolysate on Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)

Author: Prof Se Young Chung
Job title: Professor
Company: Kyung Hee University
Country: SOUTH KOREA

Additional Authors: Hyung Joo Do, Chae Young Bang, Andre Kim, Jong Myung Ha, and Se Young Chung

Abstract:

Heart disease is the leading causes of death in many countries and high blood pressure has been one of the main risk factors for it. Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) has an important physiological role in the regulation of blood pressure. The objective of this research was to study the ACE inhibition effect of oyster hydrolysates (OH) and isolate active peptide from the most active fractions. The ACE inhibitory activity of enzymatic oyster hydrolysates (OH) was potentiated with hydrolysis time. The enzymatic hydrolysate was filtered through Hiseo ultrafiltration membrane (M.W. cut-off 30,000, 10,000) to obtain the peptide fractions with ACE inhibition activity. These fractions were applied to a reverse phase HPLC column. Six active sub-fractions (A, B, C, D, E, F) were collected. ACE inhibitions of HPLC fractions (A, B, C, D, E, F) were 85.78 %, 85.85 %, 29.56 %, 81.72 %, 77.37 %, 52.53 % respectively. Among the active fractions, fraction B had the highest ACE inhibitory activity. Also, we investigated the effects of OH on the blood pressure levels in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). Thirteen-week-old SHRSPs were assigned to four groups: the control group, positive control group (sardine peptide), OH, and isolated active peptide groups. Administration of sardine peptide (100 mg/kg), OH (100 mg/kg) and isolated active peptide (50 mg/kg) decreased the maximum blood pressure at 9 (28.4%), 6 (26.9%) and 3 hr (23.9%), respectively. The blood pressure levels in sardine peptide group and isolated active peptide group were maintained until 24 hr after administration. These results suggest that oyster hydrolysates and the isolated active peptide can be considered as a potential source for antihypertensive functional foods or drugs.

Biography: Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
Department of Preventive Pharmacy and Toxicology, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

<2012 춘계약학회 초록, 제주도>

Effect of Oyster Hydrolysate on blood pressure in stroke-prone spontaneously hypertensive rats(SHRSPs).

Chae Young Bang¹, Eun-Hyeong Shim², Andre Kim³, Jong-Myung Ha³, Young Jun Choi⁴ and Se Young Chung^{1,2*}

¹Department of Preventive Pharmacy and Toxicology, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea
²Department of Life and Nanopharmaceutical Science of Pharmacy, Kyung Hee University, Korea, Seoul 130-701, Korea
³Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
⁴Department of Seafood Science and Technology, Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

Introduction

We examined blood pressure regulation of oyster hydrolysate(OH) which is widely used for food. It is easy to create bioactive substances which can be transferred through hydrolysis using enzyme. Also it reduces the safety problem. In this study, we would like to know the impact of blood pressure control through animal testing using oyster hydrolysate and its fractionated products.

Method

The enzymatic hydrolysate was filtered through Hisep ultrafiltration membrane (M.W. cut-off 30,000, 10,000) to obtain the peptide fractions with ACE inhibition activity. These fractions were applied to a reverse phase HPLC column. Thirteen-week-old SHRSPs were assigned to four groups; the control group, positive control group (sardine peptide), OH, and isolated active peptide groups. The animals received treatment with sardine peptide (100 mg/kg), OH (100 mg/kg) and isolated active peptide (50 mg/kg) for four weeks. To elucidate effect of Oyster Hydrolysate on blood pressure, we measured level of angiotensin-II and ACE in blood.

Result and Discussion

Six active sub-fractions (A, B, C, D, E, F) were collected. ACE levels of HPLC fractions (A, B, C, D, E, F) were decreased 85.78 %, 85.85 %, 29.56 %, 81.72 %, 77.37 %, 52.53 % respectively. Among the active fractions, fraction B had the highest ACE inhibitory activity. Also, we investigated the effects of OH on the blood pressure levels in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). Administration of sardine peptide (100 mg/kg), OH (100 mg/kg) and isolated active peptide (50 mg/kg) decreased the maximum blood pressure. The blood pressure levels in sardine peptide group, OH group, and isolated active peptide group were maintained until 24 hr after administration. Also, angiotensin-II and ACE levels were decreased after treatment for 4 weeks. These results suggest that oyster hydrolysates and the isolated active peptide can be considered as a potential source for antihypertensive functional foods or drugs.

<2012 Vitafoods 국제학회 초록, 스위스>

Effects of *Ecklonia stolonifera* on Acute Alcohol-induced Hepatotoxicity in Mice

Chae Young Bang¹, Jung Hwan Kang², Jae Su Choi³ and Se Young Chung^{1,2*}

¹Department of Preventive Pharmacy and Toxicology, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea
²Department of Life and Nanopharmaceutical Science of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea
³Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Introduction

Ecklonia stolonifera (ES) is a perennial brown marine algae that belongs to the family Laminariaceae. This species is usually found in sub-tidal zones and is widely distributed throughout the eastern and southern coasts of Korea. Alcoholic beverages have been a part of the human diet since antiquity. However, excessive drinking of alcohol will cause serious health problems, such as alcoholic liver disease. This study is focused on the protective effect of 70% ethanol extract from ES on liver damage induced by ethanol.

Method

Eight-week-old male ICR mice were assigned to six groups (n=8/group). NC, normal group, mice treated with normal saline; EC, ethanol group, mice treated with 5 g/kg ethanol; EC+Sil, positive control group, mice treated with 5 g/kg ethanol 30 min after 100 mg/kg silymarin; EC+ESL/EC+ESM/EC+ESH, various dose of ES treated groups, mice treated with ethanol 30 min after ES (50, 100 and 200 mg/kg).

Each group received the appropriate vehicle or ethanol by oral administration for 8 days. At the end of the experimental period, animals were sacrificed to collect serum and liver. AST/ALT activities in serum, lipid levels (FFA, TG, TC, HDL-C, and HDL-C/TC) in serum and in liver were measured. SOD, catalase, glutathione(GSH), and MDA in liver homogenates were also determined.

Result and Discussion

Ethanol administration caused hepatotoxicity in mice, as indicated by the significant increase in serum AST, ALT as compared to the normal group. Administration of ES along with alcohol decreased the level of these functional markers relative to the ethanol group. FFA, TG, TC, and MDA levels in the ethanol-treated group were significantly higher than those in the normal group. Those in the ES-treated groups were significantly lower than that of the ethanol-treated group. There was a significant increase of antioxidant enzymes activities in ES and silymarin treated groups compared to the ethanol group.

These results indicate that ES supplementation could restrain the hepatic damage caused by acute alcohol exposure.

<일본약학회 초록, 2012 10월, 교토>

<일본약학회 초록, 2012 10월, 교토>

P03

Preparation of enzymatic hydrolysate from oyster (*Crassostrea gigas*) and purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides

Eon Joo Jin, Jin-Soo Kim, Jong-Myung Ha¹, Andre Kim¹, Se Young Choung², and Yeung Joon Choi

(Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National Univ., Korea, ¹Department of Pharmaceutical Engineering, Silla Univ., Korea, ²Department of Hygienic Chemistry, Kyung Hee Univ., Korea)

The objectives of this study were to prepare oyster hydrolysate using commercial proteases and to purify the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. Oyster protein was cross-linked using transglutaminase and then hydrolyzed with Protamex and Neutrase. Degree of hydrolysis and potential ACE inhibitory activities improved with the combination of Protamex and Neutrase. ACE inhibitory activity was the highest in the range of 200-500 Da. Twelve peptides were purified from the oyster hydrolysate through multi-step chromatographic purification comprised of anion exchange, size exclusion, and reverse-phase liquid chromatography, and their sequences were identified using an amino acid sequencer and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. The IC₅₀ values of the synthetic peptides TAY, VK, KY, YA, AFY and MC were 2.18, 2.63, 5.90, 8.76, 11.18, and 14.36 µg, respectively, and no toxicities to the Hep-G2 cell line were detected for any of the synthetic peptides.

제 10회 한일증양식품포지움. 2012.12.08-09, 나가사키, 일본

P7-22 Protective Effect of the Edible Brown Alga *Ecklonia stolonifera* on Dexamethasone-induced Hepatotoxicity in Primary Rat Hepatocytes

JUNG Hyun Ah, CHUNG Se Young¹, KIM Jae-Il¹, CHOI Jae-Sun^{2*}

¹Department of Food Science and Human Nutrition, Chonbuk National University, Korea, ²Department of Preventive Pharmacy and Toxicology, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Korea, ³National of Food & Drug Safety Evaluation Research, Food Investigation Team, Korea Food & Drug Administration, Korea, ⁴Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, Korea.

*Corresponding author: chaajp@pknu.ac.kr
Presenting author: jungaha@jnu.ac.kr

As part of our efforts to isolate anti-hepatotoxic agents from marine natural products, we screened the ability of 14 edible varieties of Korean seaweeds to protect against dexamethasone-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes. Among the crude extracts of selected seaweeds, including two Chlorophyta (*Codium fragile* and *Capsosiphon dolosum*), seven Rhodophyta (*Gracilaria tikvahiae*, *Sargassum thunbergii*, *Filiporia salicina*, *Jagoria nhanturum*, *Ecklonia cava*, *Ecklonia stolonifera*, and *Ectocarpus agardhii*) and five Rhodophyta (*Chondrus aculeatus*, *Gelidium acuminatum*, *Gracilaria verticillata*, *Sporophyllaria latiuscula*, and *Porphyra tenella*), the ethanolic extracts of *Ecklonia stolonifera*, *Ecklonia cava*, *Ectocarpus agardhii*, and *Porphyra tenella* exhibited significant protective effects on dexamethasone-induced hepatotoxicity with half maximal effective concentration (EC₅₀) values of 2.0, 2.5, 3.0, and 15.0 µg/mL, respectively. Since *Ecklonia stolonifera* exhibits a significant protective potential and is frequently used as foodstuff, we performed a detailed investigation, including Western blotting analysis. We isolated and identified six polyphenols from the most active ethyl acetate fractions of *E. stolonifera*, namely, phloroglucinol (1), flavanone-3-O-glucoside (2), catechol (3), phloroglucinol A (4), diethyl (5), and alpha-tocopherol (6). With the exception of phloroglucinol (1), polyphenols 2-6 exhibited potential protective effects on dexamethasone-induced hepatotoxicity with corresponding EC₅₀ values of 3.4 ± 0.7, 8.3 ± 0.5, 4.4 ± 0.3, 5.5 ± 0.3, and 11.5 ± 1.1 µg/mL, respectively. The results of the present study clearly demonstrated that the anti-hepatotoxic effects of *Ecklonia stolonifera* and its isolated polyphenols are useful for further exploration and development of therapeutic modalities for treatment of hepatotoxicity.

PA16

Inhibitory effect of active peptide from oyster hydrolysate on Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)

Kim S¹, Bang C¹, Kim A², Ha J², Choi Y³, Choung S¹

¹Department of Preventive Pharmacy and Toxicology, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130 - 701, Korea; ²Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science, Silla University, Busan, Korea; ³Department of Marine Processing, Kyungsang National University, Tongyeong, Korea

Heart disease is the leading causes of death in many countries and high blood pressure has been one of the main risk factors for it. [1] Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) has an important physiological role in the regulation of blood pressure. [2] The objective of this research was to study the ACE inhibition effect of oyster hydrolysates fraction (OH) and isolate active peptide. We investigated the effects of oyster hydrolysates fraction and active peptide on the blood pressure levels in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). Thirteen-week-old SHRSPs were assigned to four groups; the control group, positive control group (Val-Tyr), OH group, and isolated active peptide groups. Administration of Val-Tyr (50 µg/kg), OH (100 mg/kg) and isolated active peptide (50 µg/kg) decreased the maximum blood pressure at 9 (29.7%), 9 (37.9%) and 6 hr (12%), respectively. The blood pressure levels in treated group were maintained until 24 hr after administration. Furthermore, we measured ACE activity in the serum, aorta and kidney. In the serum and aorta, the SHRSPs showed higher ACE activity than the treated groups. These results suggest that OH and the isolated active peptide can be considered as a potential source for antihypertensive functional foods or drugs. References: [1] James R.S. et al. (2001) Hypertension 37: 1053 - 1059. [2] Tetsuya S. et al. (2004) Hypertension 43: 1003 - 1010.

대한약학회 추계 학술대회 2013.10.17~10.18
오송첨단의료산업진흥재단 CV센터

유럽 약용식물학회 2013.09.01~09.05 독일 뮌스터

Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Oyster (*Crassostrea gigas*) Hydrolysate and the Antihypertensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats

Yeung Joon Choi^{1*}, Cheng-Liang Xie¹, Jin-Soo Kim², Jong-Myung Ha³ and Se-Young Choung⁴

¹Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Gyeongnam 650-160, Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

³Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

*yjchoi@gnu.ac.kr (Yeung Joon Choi)

[Objective]

Hypertension is the most common serious chronic health problem all over the world. Synthetic ACE (angiotensin I-converting enzyme) inhibitors have been used as drugs to treat hypertension in spite of side effects. However, the ACE inhibitory peptides derived from food proteins do not show these side effects. The oyster is an abundant marine resource in Tongyeong, Korea. In order to promote oyster consumption and utilization as nutraceutical and functional foods, the oyster hydrolysate was prepared by commercial proteases and the ACE inhibitory peptides from oyster hydrolysate were purified and identified.

[Methods]

Oyster hydrolysate was prepared by firstly cross-linked using transglutaminase and then hydrolyzed by two-steps hydrolysis with six commercial proteases including Protamex, Alcalase, Neutrase, pepsin, trypsin and Flavourzyme. ACE inhibitory peptides from the oyster hydrolysate were purified through multi-step chromatographic purification comprised of anion exchange, size exclusion and reverse-phase liquid chromatography. The peptide sequence was identified by automated Edman degradation and mass spectrometry. After the peptides were synthesized, ACE inhibitory activity of synthetic peptides was determined in vitro. The cell toxicity was evaluated by the Hep-G2 cell line. The ACE inhibitory activities of oyster hydrolysate and peptide YA in vivo were evaluated by the hypertensive rat.

EAFTA 2013 , Hakodate, Hokkaido, JAPAN,
November 25.

PI-1. Structure Modification of Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Oyster Hydrolysate for Improvement of Bioavailability

Chengliang Xie¹, Susoon Lee¹, Se-Young Choung², and Yeung Joon Choi^{1*}

¹Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry Gyeongsang National University, Gyeongnam 650-160, Korea

²Department of Hygienic Chemistry, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Angiotensin-I converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) is an exopeptidase that cleaves His-Leu dipeptides from angiotensin I to produce a potent vasopressor octapeptide angiotensin II, by which plays a pivotal role in blood pressure regulation. ACE is a key therapeutic target for combating hypertension and related cardiovascular diseases. In our previous studies, four ACE inhibitory peptides, TAY, VK, KY and YA, have been purified and identified from the cross-linked oyster protein hydrolysate with antihypertensive effect. To potentiate bioactivity of four ACE inhibitory peptides, VK, YA, KY and TAY from oyster hydrolysate, four novel ACE inhibitory peptides VKX, YAX, KYX and TAX were designed by modified with X at the C-terminus. The modified four novel peptides were synthesized, and the ACE inhibitory activity and cell toxicity for Chang cell were determined experimentally. The ACE inhibitory activities of derived peptide were higher 27-1450 times than those of the original peptides, while cell toxicity was not detected. Structure modification with X at the C-terminus of tripeptide and addition of X at C-terminus of dipeptide could improve the interaction sites and strengthen the interaction of peptides with ACE in silica. It was an effective way for peptide to improve their activities by modified with X at the C-terminus. The four novel ACE inhibitory peptides, especially VKX, has a potential application for drug lead or a functional ingredient.

*Corresponding author email: yjchoi@gnu.ac.kr

2015 PFT conference, Astoria, OR, USA, March
1-4

Validation of the Assay Method for Tyrosylalanine as Quality Index of Anti-hypertensive Products and Its Stability in Simulated Gastrointestinal Fluids

Cheng-Liang Xie¹, Yeung-Pyo Jang², Andre Kim³, Se-Young Choung⁴ and Yeung Joon Choi^{1*}

¹Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Gyeongnam 650-160, Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

³Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

*yjchoi@gnu.ac.kr (Yeung Joon Choi)

[Objective]

The ACE (angiotensin I-converting enzyme) inhibitory peptides derived from food proteins are paid more attention because of the potency of anti-hypertension treatment without side effects. In our previous study, the oyster hydrolysate showed high ACE inhibitory activity in vitro, and decreases greatly a cytosolic blood pressure of the spontaneously hypertensive rat in vivo, compared with that of commercial sardine peptide with anti-hypertensive activity. The oyster hydrolysate is more likely to be utilized as nutraceutical food or supplement in the future. The ACE inhibitory dipeptide, tyrosylalanine (YA) from oyster hydrolysate, was chosen as the index components. For the quality and process control of the oyster hydrolysate during commercial manufacture, we develop a rapid assay method for YA, and validate.

[Methods]

The assay method for YA was built, which was composed of the sample preparation by off-line C18 solid phase extraction and separation, and determination by RP-HPLC with UV detector. Validation of the method was performed using synthetic YA, according to the international conference on harmonization guidance for the validation of analytic method. The proteolysis stability of YA in the oyster hydrolysate was evaluated in the simulated

EAFTA 2013 , Hakodate, Hokkaido, JAPAN,
November 25.

PI-3. Inhibitory Effect of Oyster Hydrolysate and its Activity on Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)

Chae-Young Bang¹, Yeung-Joon Choi² and Se-Young Choung^{1*}

¹Department of Preventive Pharmacy and Toxicology, Kyung Hee U., Seoul, 130-701, Korea

²Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry Gyeongsang National University, Tongyeong, 650-160, Korea

Heart disease is the leading causes of death in many countries and high blood pressure has been one of the main risk factors for it. In hypertension patients, glucose tolerance weakens with an increase in blood pressure. Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) has an important physiological role in the regulation of blood pressure. The objective of this research was to study the ACE inhibition effect of oyster hydrolysates fraction (OH) and isolate active peptide. In this study, we investigated the effects of oyster hydrolysates fraction and active peptide (tyrosylalanine; Y-A) on the blood pressure levels in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). We examined the effects on blood pressure for 24 hrs after administrated and/or 4 weeks. Twelve-week-old male SHRSPs were assigned to four groups; a hypertension control group, OH group, Y-A groups and positive control group (sardine peptide; SP). The blood glucose levels of SHRSPs were no differences among the four groups, however OH, Y-A and SP in fasting blood glucose levels were lower than in the control group. Administration of OH (100 mg/kg), Y-A (50 µg/kg) and SP (100 mg/kg) decreased the maximum blood pressure at 6 hr (37.5%), 6 hr (33.9%), and 9 hr (26.5%) compared to the control group, respectively. The blood pressure levels in treated groups were maintained until 24 hr after administration. Administration for 4 wk with OH, Y-A and SP significantly decreased ACE activity, Angiotensin II and hs-CRP concentrations in serum and aorta. These results suggest that OH and Y-A, the isolated active peptide, can be considered as a potential source for antihypertensive functional foods or drugs.

*Corresponding author email: sychoung@khu.ac.kr

2015 PFT conference, Astoria, OR, USA, March
1-4

✓ P2-2. Liposome-in-Alginate System for Encapsulation of Oyster, *Crassostrea gigas*, Hydrolysate with Antihypertensive Effect

Chengliang Xie¹, Suseon Lee¹, Se-Young Choung², and Yeung Joon Choi^{1*}

¹Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry
Gyeongsang National University, Gyeongnam 650-160, Korea

²Department of Hygienic Chemistry, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

In our previously study, oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysate is prepared by two-step hydrolysis with Protamex and Neutrase after cross-linking with microbial transglutaminase (MTGase), which shows antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats significantly. Due to low bioavailability in vivo, which is caused by unstable from the acidic and/or enzymatic degradation and short half-life cycle in bloods after absorption, a delivery system is necessary to protect oyster hydrolysate from degradation and prolong the release in vivo. The aim of this study was to prepare a liposome-in-alginate system for encapsulation of the oyster hydrolysate to enhance oral bioavailability in vivo. Antihypertensive dipeptide Tyr-Ala (YA) from the oyster hydrolysate was used as a model peptide to optimize preparation conditions by response surface method with variables of the concentration of calcium chloride, sodium alginate and ethanol dissolved lecithin (EDL). The properties of the system were characterized by investigating the swelling and in vitro release behavior of the oyster hydrolysate and YA in the simulated gastric and intestinal fluid. The concentration elevation of sodium alginate and EDL improved significantly the encapsulation efficiency of YA. The maximum encapsulation efficiencies of YA and the oyster hydrolysate were 74.1% and 81.7%, respectively. The liposome-in-alginate system prolonged the release of the oyster hydrolysate up to 16 h, which was helpful to maintain the level of the bioactive components of oyster hydrolysate in the blood and enhance the bioavailability in vivo.

*Corresponding author email: yjchoi@gnu.ac.kr

2015 PFT conference, Astoria, OR, USA, March 1-4

✓ P2-3. Properties and Stability of Oyster, *Crassostrea gigas*, Hydrolysate with Antihypertensive Effect

Chengliang Xie¹, Suseon Lee¹, Se-Young Choung², and Yeung Joon Choi^{1*}

¹Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry
Gyeongsang National University, Gyeongnam 650-160, Korea

²Department of Hygienic Chemistry, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Hypertension is one of the major risk factors for the development of cardiovascular diseases, stroke and end-stage renal disease and one of the most common serious chronic health problems all over the world. Synthetic ACE inhibitors such as Captopril, Lisinopril, Enalapril, Fosinopril, have been used as drug to treat hypertension, but cause strong side effects, including coughing, skin rashes and angioedema. Protein hydrolysates with antihypertensive effect do not show these side effects. Oyster hydrolysate (100 mg/kg) showed high antihypertensive activity in vivo test, compared to those of sardine hydrolysate (100 mg/kg) and captopril (8 mg/kg). To extend the application of the oyster hydrolysate as functional ingredients for antihypertension, the properties and stability of the oyster hydrolysate were investigated. Oyster hydrolysate powder showed dark-brown with high hygroscopicity. The average particle size, Zeta potential at pH 7, and Log Pow are $57.95 \pm 2.63 \mu\text{m}$, $-43.40 \pm 7.89 \text{ mV}$, and -0.439 ± 0.058 , respectively. Protein solubility was significantly affected by pH with the maximum value of 77% at pH 7 and the minimum value of 54.9% at pH 3. Amino acid was composed of 71.5% bound and 28.5% free amino acid. The content of heavy metals such as Cd, Pb, As and Hg was conformed under the level of the related regulations. ACE inhibitory activity and tyrosylalanine content were stable in the range of 80-120% for six months at refrigerated storage. The oyster hydrolysate has a potential application as functional ingredients against hypertension.

*Corresponding author email: yjchoi@gnu.ac.kr

2015 PFT conference, Astoria, OR, USA, March 1-4

제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

* 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

- 굴 가수분해물 : 참여기업인 과마킹에서 특허에 관한 전용실시권을 확보하여 허가취득 후 즉시 제품출시를 계획하고 있음. 기존의 약국 유통망을 포함한 다양한 유통경로를 통해 새로운 혈압조절 건강기능식품 시장을 창출하고 굴관련 지자체 및 수산어민들의 수익창출에 이바지할 것임
- 곰피 주정추출물 : 참여기업인 (주)네추럴웨이에서 확보한 특허와 기존의 특허에 대한 전용실시를 통하여 개별인정 취득 후 즉시 건강기능식품 제품을 출시할 계획임. 본 기업이 갖고 있는 기존의 유통망과 특히 홈쇼핑을 통해 제고된 이미지를 활용하여 기존의 간기능 개선 건강식품시장에 새로운 소재로 시장을 개척하고 관련 산업의 성장과 수산어민 수익창출에 기여할 것임
- 굴가수분해물과 곰피 주정추출물의 경우 독성에 대한 문제가 전혀 없는 식품소재로서 건강기능식품 이외에도 청정이미지와 건강에 도움을 주는 이미지를 활용한 일반식품으로의 제품개발도 가능하여 내수 및 해외 시장을 대상으로한 제품개발에 본 사업단의 연구개발결과들이 활용될 수 있음

* 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

회의명	주제	일시	장소	주최
경남항노화산업 실천전략 포럼	경남항노화의약품전략	2014.08.29	(재)바이오 21센터	한국과학기술단체총연합회, 경상남도
경남 항노화바이오산업 육성 업무역량 강화를 위한 세미나	해양생물소재를 이용한 건강기능식품개발	2014.11.27	경남 서부권개발본부	경상남도

* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- 굴 가수분해물의 경우 혈압조절 기능의 평가에서 오는 변동성으로 인해 통계적으로 유의한 인체시험결과를 얻지 못하였으므로 보다 많은 수의 시험자를 대상으로 추가 인체적용시험을 계획하고 있음
- 추가 인체적용시험에 대한 비용은 본 연구과제의 지원을 통해 대외 수출실적이 대폭 증가한 통영시와 주관 기업인 과마킹에서 지원하기로 함
- 인체적용시험 완료후 식약처 개별인정신청 후 참여기업인 (주)과마킹에 굴 유래 혈압조절에 관한 건강기능식품 제조에 관한 기술 실시권 제공 1건, 참여기업인 (주)네추럴웨이에 곰피 유래 간기능 개선 건강기능식품 제조에 관한 기술 실시권 제공 1건을 계약할 것임
- 사업화 성과물로서 굴 가수분해물, 곰피추출물의 건강기능식품 개별인정 허가신청서를 제출하고 신청책자와 증명서를 제출할 것임

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
해당사항 없음.

제 7 장. 연구시설·장비 현황

해당사항 없음.

제 8 장. 참고문헌

1. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Delivery Rev* 46:3-26.
2. Pinterits A, Arnfield S. 2008. Improvement of canola protein gelation properties through enzymatic modification with transglutaminase. *LWT* 41:128-138.
3. Pripp AH, Isaksson T, Stepaniak L, Sørhaug T. 2004. Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *Eur Food Res Technol* 219:579-583.
4. Statistics Korea (KOSTAT). 2012. 2012 statistics on the age. Available from <http://kostat.go.kr/portal/english/news/1/8/index.board?bmode=read&aSeq=268470>. Accessed 2013 September 15.
5. Wu J, Aluko R, Muir A. 2002. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *J Chromatogra A* 950:125-130.
6. Floch J, Lee M, Solane-Stanley CH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226: 497-509.
7. MSDF. 2011. Standard method for food. p1-1-61. Korea.
8. Lee SS, Park SH, Park JD, Konno K, Choi YJ. 2012. Functionalities of squid liver hydrolysates. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1677-1685.
9. ICH (1996) Validation of analytical procedures: text and methodology. International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland
10. AOAC. 2006. Official Methods of Analysis. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists.
11. Chen, Y. C., Tou, J., and Jaczynski, J. 2009. Amino acid and mineral composition of protein and other components and their recovery yields from whole Antarctic krill (*Euphausia superba*) using isoelectric solubilization/precipitation. *J. Food Sci.* 74(2): H31-H39.
12. Choi, Y. J., Hur, S., Choi, B. D., Konno, K., and Park, J. W. 2009. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *J. Food Sci.* 74(1):C17-C24.
13. FAO/WHO/UNU. 1985. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report. No. 724. Geneva: WHO.
14. Lipiński, C., Lombardo, F., Dominy, B. W., and Feeney, P. 2001. Experimental and

computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46: 1-3.

15. Pommié, C., Levadoux, S., Sabatier, R., Lefranc, G., and Lefranc, M. P. 2004. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V REGION amino acid properties. *J. Mol. Recognit.* 17(1): 17-32.
16. Wang, Y., Li, S., Ahmed, Z., and Song, Q. 2010. Extraction of broad bean protein and effects of NaCl concentration and pH value on its solubility and emulsibility. *Nongye Gongchen Xuebao.* 26(1): 380-384.
17. Chobert JM, Bertrand-Harp C, Nicolas MG. 1988. Solubility and emulsifying properties of casein and whey proteins by Alcalase: comparison with the plastein reaction and characterization on interactions. *J Agric Food Chem* 51: 6036-42.
18. Kerns EH, Di L. 2008. Solubility, In *Drug-like properties: concepts, structure design and methods*, Elsevier Inc, MA, p.56-85.
19. Kristinson HG, Rasco BA. 2000. Fish protein hydrolysate: production, biochemical, and functional properties. *Criti Rev Food Sci Nutri* 40: 43-81.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275.
21. Yalkowsky SH. 1999. Solubility and solubilization in aqueous media. American Chemical Society, Washington, D.C, p. 180-320.
22. Alonso H, Bliznyuk AA, Gready JE. 2006. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal research reviews* 26(5):531-68.
23. Černý J, Hobza P. 2007. Non-covalent interactions in biomacromolecules. *Physical Chemistry Chemical Physics* 9(39):5291-303.
24. Natesh R, Schwager SL, Evans HR, Sturrock ED, Acharya KR. 2004. Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* 43(27):8718-24.
25. Natesh R, Schwager SL, Sturrock ED, Acharya KR. 2003. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme - lisinopril complex. *Nature* 421(6922):551-4.
26. Jung HA et al. Angiotensin-converting enzyme I inhibitory activity of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fish Sci* 2006; 72: 1292 - 1299.
27. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 1999; 13: 1169 - 1183.
28. Ku KL et al. Hepatoprotective effect of *Cirsium arisanense* Kitamura in tacrine-treated hepatoma Hep3B cells and C57BL mice. *Am J Chin Med* 2008; 36: 355 - 368.
29. 통계청, 2013

30. 식품의 유통기한설정기준(식품의약품안전청 고시 제2008-53호, 2008.8.14.)

31. 의약품등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 개정판(식품의약품안전청, 2012.09)

별첨자료 목록

- 별첨 1: 굴가수분해물의 단회투여 독성시험 최종보고서
- 별첨 2: 굴가수분해물의 4주간 반복투여 독성시험 최종보고서
- 별첨 3: 굴가수분해물의 소핵시험 최종보고서
- 별첨 4: 굴가수분해물의 복귀돌연변이시험 최종보고서
- 별첨 5: 굴가수분해물의 염색체이상시험 최종보고서
- 별첨 6: 굴가수분해물의 공인인증기관 시험 성적서
- 별첨 7: 굴가수분해물의 인체적용 예비 시험 결과보고서
- 별첨 8: 굴가수분해물의 인체적용 본 시험 결과보고서
- 별첨 9: 식약처 제출자료(굴 가수분해물)
- 별첨 10: 곰피추출물의 인체적용시험 예비 결과보고서
- 별첨 11: 곰피추출물의 공인인증기관 시험 성적서
- 별첨 12: 곰피추출물의 IRB 승인서
- 별첨 13: 식약처 제출자료(곰피 추출물)

최종보고서

Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를
이용한 단회 경구투여 독성시험

시험번호: 13-RA-225

시험의뢰기관: 경희대학교

(주)켄온 비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
240, Nampyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do,
449-826, Republic of Korea

진 술 서

Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2013-40호, MFDS, 2013년 04월 05일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

상기 시험은 승인된 시험계획서의 일정과 ㈜켄온 비임상연구소의 SOP에 따라 수행되었고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험자료의 신뢰성을 저해할 상황은 발생하지 않았다.

차 미 진 

2013.07.12

차 미 진, D.V.M., M.S.

날 짜

시험책임자

주 소 : ㈜켄온 비임상연구소

경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826

연 락 처 : 031-329-9969 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

E-mail : chacha3@chemon.co.kr

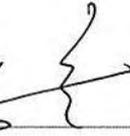
서명

차 미 진 

차 미 진, D.V.M., M.S.
시험책임자
㈜켄온 비임상연구소

2013. 07. 12

날 짜

김 감 호 

김 감 호, M.S.
운영책임자
㈜켄온 비임상연구소

2013. 07. 12

날 짜

정 세 영 

정 세 영
의뢰책임자
경희대학교

2013. 07. 10

날 짜

신뢰성보증확인서

시 험 번 호: 13-RA-225

시 험 제 목: Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

시 험 기 간: 2013.05.20 - 2013.07.12

시험의뢰기관: 경희대학교

점검내용	점검실시일	시험책임자 확인일	운영책임자 보고일
시험계획서	2013.05.20	2013.05.20	2013.05.21
동물입수 및 검역	2013.05.22	2013.05.23	2013.05.23
시험물질/대조물질 보관	2013.05.29	2013.05.29	2013.05.29
시험물질/대조물질 조제	2013.05.29	2013.05.29	2013.05.29
투여 및 동물사육	2013.05.29	2013.05.29	2013.05.29
동물사육실 내 관찰 및 검사	2013.06.05	2013.06.05	2013.06.07
부검	2013.06.12	2013.06.12	2013.06.13
시험기초자료	2013.06.27	2013.07.02	2013.07.03
최종보고서(안)	2013.06.27	2013.07.02	2013.07.03
최종보고서	2013.07.12	-	-

상기의 점검으로써, 본 보고서의 시험방법이 식품의약품안전처고시 제2013-121호(2013년 04월 05일) '의약품등의독성시험기준'에 따라 행하여졌음과, 해당시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 보고서에 정확하게 반영되었으며, 본 시험이 식품의약품안전처고시 제2013-40호(2013년 04월 05일) '비임상시험관리기준' 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 실시되었음을 증명함.

2013년 07월 12일

㈜켄온 비임상연구소

신뢰성보증업무책임자

김문준(인)

시험개요

시험제목	Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험		
시험목적	본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.		
시험지침	의약품등의독성시험기준(제2013-121호, MFDS, 2013년 04월 05일)		
시험의뢰자	경희대학교 서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1층 113호, 130-701 02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX) 의뢰책임자: 정세영		
시험기관	(주)캠온 비임상연구소 경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826 경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX) 운영책임자: 김갑호		
시험일정	2013년 05월 20일	시험계획서 승인(시험개시일)	
	2013년 05월 22일	동물입수(실험개시일)	
	2013년 05월 29일	투여	
	2013년 06월 12일	부검(실험종료일)	
	2013년 07월 02일	최종보고서(안) 제출	
	2013년 07월 12일	최종보고서 제출(시험종료일)	
주요시험관계자	시험물질 조제/보관:	김지훈 김현지 이지혜	동물실험: 손보송 정지란
	병리:	김학수	통계분석: 이민행
	자료보관:	이유나	보고서작성: 김종민
기록과 자료의 보관	시험계획서, 시험계획서 변경기록지, 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본 및 각종 증거자료는 시험종료 후 5년간 (주)캠온 비임상연구소의 자료보관실에 보관한다. 이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.		

목 차

진 술 서	i
서 명	ii
신뢰성보증확인서	iii
시험개요	iv
요 약	1
재료 및 방법	2
결 과	6
고찰 및 결론	7
단위 및 약호	8
TABLES	9
Table 1. Mortalities	10
Table 2. Clinical signs	11
Table 3. Body weights	12
Table 4. Necropsy findings	13
APPENDIX 1. INDIVIDUAL DATA	14
Appendix 1-1. Clinical signs	15
Appendix 1-2. Body weights	17
Appendix 1-3. Necropsy findings	19
APPENDIX 2. PROTOCOL AND AMENDMENT	21
APPENDIX 3. CERTIFICATE OF ANALYSIS	32

요 약

본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.

Oyster enzyme hydrolysate를 0 (부형제대조군), 1250, 2500 및 5000 mg/kg의 용량으로 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 단회 경구투여한 후 2 주간 사망률, 일반증상, 체중 및 부검소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
3. 체중변화 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
4. 부검시, 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 암수 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단한다.

재료 및 방법

1. 시험물질 및 부형제

1) 시험물질 (Appendix 3)

명 칭:	Oyster enzyme hydrolysate
코드번호:	C-1390
제조번호:	OP130213
입 수 일:	2013 년 04 월 19 일
입 수 량:	1 kg/pack x 1 pack
외 관:	Brown powder
함 량:	Tyrosine-alanine 0.0146~0.0166 %
유효일자:	2015 년 02 월 12 일
보관조건:	실온, 차광, 방습
공 급 원:	경희대학교

2) 부형제

명 칭:	멸균주사용수
제조번호:	63M2F21
보관조건:	실온(개봉 후 냉장)
공 급 원:	대한약품공업주
선택이유:	본 부형제는 실험동물에 독성을 나타내지 않으며, 시험물질이 부형제에 잘 현탁되어 선택하였다.

2. 투여시험물질의 조제 및 분석

1) 투여시험물질 조제

본 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였다. 각 용량별로 정량의 시험물질을 칭량한 후 부형제에 현탁시켜 조제하였다. 조제는 투여 당일에 실시하였다.

2) 투여시험물질 분석

투여시험물질의 분석은 실시하지 않았다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Hsd:Sprague Dawley®™SD®™		
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)		
선정사유	본 시험에 사용한 랫드는 각종 독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과와 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.		
성별		수컷	암컷
동물 수	입수시	24	24
	투여시	20	20
주령	입수시	7	
	투여시	8	
입수시 체중범위		212.66-236.96 g	156.43-169.67 g
투여시 체중범위		229.53-246.29 g	158.60-171.56 g
잔여동물의 처리	안락사 처리하였다.		

(2) 검역 및 순화

입수시 외관을 관찰하고 체중을 측정한 후 7일간 본 시험을 실시하는 동물실내에서 사육하면서 매일 일반증상을 관찰하였다. 동물 공급처에서 제공한 '시험계의 병원체 검사 성적서'를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

(3) 식별

동물은 순화기간에는 적색 유성 매직, 투여 및 관찰기간에는 흑색 유성 매직으로 미부표 식별을 사용하여 식별하였다. 사육상자에는 색으로 용량을 구별하는 개체식별카드를 부착하였고, 사육상자대는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착하였다.

(4) 실험동물윤리

(주)켄온 비임상연구소의 실험동물운영위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 13-R175).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정

동물은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 (주)켄온 비임상연구소 제2동물사육구역 6 호실에서 사육하였다.

온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하였고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정하였다.

사육기간 동안 동물실의 온도 및 상대습도는 일평균 22.2-23.8 °C 및 58.9-65.6 %이었고, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

(2) 사료, 물 및 오염물질 검사

사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET, 2918C, Harlan Laboratories Inc., USA)를 (주)두얼 바이오텍(서울특별시 서초구 양재동 153 번지 성보프라자 107 호)으로부터 공급받아 자유섭취 하도록 하였다. 사료의 '성분분석 성적서'를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

물은 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 지하수를 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취 하도록 하였다. 수질검사는 경기도보건환경연구원(경기도 수원시 장안구 파장동 324-1)에서 수행하였고, 먹는물수질기준에 적합하였다.

(3) 사육상자 및 사육밀도

스테인레스제 망 사육상자(W 215 x L 355 x H 200 mm)에서 실험기간 동안 모두 3 마리 이하/사육상자로 수용하였다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

1) 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량(mL/kg)	투여량(mg/kg)
G1	M / F	5 / 5	1-5 / 21-25	20	0
G2	M / F	5 / 5	6-10 / 26-30	20	1250
G3	M / F	5 / 5	11-15 / 31-35	20	2500
G4	M / F	5 / 5	16-20 / 36-40	20	5000

G1: 부형제대조군(멸균주사용수)

2) 투여량 설정

본 시험물질을 2500 및 5000 mg/kg으로 Sprague-Dawley 랫드 암수 각 1 마리에 단회 경구예비투여한 후 7 일간 관찰한 결과, 사망동물 및 일반증상관찰에서 특이 이상증상이 관찰되지 않았다.

상기 예비투여 결과를 토대로 시험의뢰자와 협의하여 5000 mg/kg을 고용량군으로 두고 그 아래로 공비 2로 두 개 군을 두었으며, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

3) 군분리

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 평균에 가까운 동물들을 선택하여 '시험군 구성'표와 같이 무작위 분배하였다.

4) 투여

투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용하였다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 단회 투여, 10:06 이전에 투여하였다.
투여액량 산출	투여당일에 측정된 절식시의 체중을 기준으로 20 mL/kg으로 산출하였다.
투여방법	투여 전에 하룻밤 절식(약 16-20 시간)시켜 위 내용물을 비운 후 경배부 피부를 고정하고 경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여하였다. 또한 시험물질 투여 후 약 4 시간 후에 사료를 재급여하였다.

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상

모든 동물에 대하여 매일 1 회 이상 실시하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 1 시간까지는 지속적으로, 6 시간까지는 매시간 관찰하였다. 투여일을 Day 1으로 설정하였고, Day 15까지 실시하였다.

2) 체중

모든 동물에 대하여 Day 1(투여전), 2, 4, 8 및 15에 체중을 측정하였다.

3) 부검

Day 15에 모든 동물을 CO₂를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 후대정맥 및 복대동맥을 절단하여 방혈/치사 시킨 다음, 체표 및 장기에 대한 육안적인 부검소견을 관찰하였다.

6. 통계 분석

통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용하였으며 유의수준은 $P < 0.05$ 로 설정하였다.

체중변화에 대하여는 자료의 정규성을 가정하고 모수적인 일원분산분석(One-way ANOVA)을 적용하였다. 분산의 동질성은 Levene test로 검정하였다. 그 결과 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

사망동물이 발생하지 않았기에 반수치사량은 산출하지 않았다.

결 과

사망동물 (Table 1; Appendix 1-1)

사망동물은 관찰되지 않았다.

일반증상 (Table 2; Appendix 1-1)

시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

체중 (Table 3; Appendix 1-2)

시험물질의 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

부검소견 (Table 4; Appendix 1-3)

육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

고찰 및 결론

본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.

본 시험에서 시험물질에 의한 사망동물이나 일반증상의 이상은 관찰되지 않았고, 체중 및 부검소견에서도 시험물질의 투여와 관련되는 특이한 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단한다.

단위 및 약호

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by Chemon Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this report.

%	Percent	hr	Hour
°	Degree	min	Minute
C	Celsius	sec	Second
L	Liter	rpm	Revolution per Minute
dL	Deciliter	RCF	Relative Centrifugal Force
mL	Milliliter	SD	Standard Deviation
µL	Microliter	CV	Coefficient of Variation
g	Gram	RE	Relative Error
kg	Kilogram	RH	Relative Humidity
mg	Milligram	M	Male
µg	Microgram	F	Female
ng	Nanogram	NA	Not Applicable
m	Meter	N	Number of measurements in a group
cm	Centimeter	SPF	Specific Pathogen Free
mm	Millimeter	TK	Toxicokinetic
µm	Micrometer	PK	Pharmacokinetic
ppm	Parts per million	AUC	Area Under the Curve
ppb	Parts per billion	C_{max}	Maximum Concentration
wk	Week	T_{max}	Time at Maximum Concentration
d	Day	t_{1/2}	Half-life
GLP	Good Laboratory Practice Regulation	SOP	Standard Operating Procedures
QAU	Quality Assurance Unit	ICH	International Conference on Harmonization
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	MFDS	Ministry of Food and Drug Safety
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee	SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

TABLES

Table 1. Mortalities

		MORTALITIES										
GROUPS (mg/kg)	No. DEAD/ No. DOSED	DAYS AFTER DOSE										ALD Value
		1	2	3	4	5	6	7	8	9-15		
												MALE
G1 (0)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2 (1250)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G3 (2500)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G4 (5000)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>5000 mg/kg
												FEMALE
G1 (0)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2 (1250)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G3 (2500)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G4 (5000)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>5000 mg/kg

ALD: Approximate Lethal Dose

Table 2. Clinical signs

CLINICAL SIGNS					
DAYS	SIGNS	GROUPS (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)
MALE					
1-14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
FEMALE					
1-14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

The day of administration was designated as day 1.

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

Table 3. Body weights

BODY WEIGHTS (g)				
DAYS	GROUPS (mg/kg)			
	G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)
MALE				
1	237.77±6.54	237.22±5.46	236.10±4.69	235.39±5.87
2	265.66±9.73	265.90±5.91	263.65±3.55	265.65±4.98
4	283.22±10.40	279.27±9.14	278.25±4.25	276.97±6.59
8	309.40±15.33	305.23±11.32	307.58±3.09	305.60±6.76
15	346.71±19.71	339.78±12.20	343.65±5.21	342.46±9.58
GAINS	108.94±14.67	102.56±7.91	107.55±9.03	107.08±7.86
N	5	5	5	5
FEMALE				
1	165.58±3.64	166.16±5.41	165.17±5.45	163.01±3.90
2	184.22±3.60	187.99±7.66	186.86±7.53	183.47±3.25
4	191.17±0.78	192.17±6.28	191.85±5.39	189.68±4.67
8	201.06±2.59	201.41±8.91	199.51±6.51	198.65±6.68
15	212.48±3.68	214.29±11.23	216.20±7.82	213.61±7.31
GAINS	46.89±4.75	48.14±7.00	51.03±3.99	50.60±5.29
N	5	5	5	5

The day of administration was designated as day 1.

Data are expressed as mean ± S.D.

Gain is body weight on day 15 – body weight on day 1.

Table 4. Necropsy findings

NECROPSY FINDINGS			
GROUPS (mg/kg)	LOCATION	FINDINGS	FREQUENCY
MALE			
G1 (0)		No gross findings	5 / 5
G2 (1250)		No gross findings	5 / 5
G3 (2500)		No gross findings	5 / 5
G4 (5000)		No gross findings	5 / 5
FEMALE			
G1 (0)		No gross findings	5 / 5
G2 (1250)		No gross findings	5 / 5
G3 (2500)		No gross findings	5 / 5
G4 (5000)		No gross findings	5 / 5

Number of animals with the finding/Number of animals examined.

APPENDIX 1. INDIVIDUAL DATA

Appendix 1-1. Clinical signs

GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	CLINICAL SIGNS	
		SIGNS	OBSERVED ON
G1 (0)	1	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	2	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	3	Normal	DAY 1-15
Terminal sacrifice		DAY 15	
G2 (1250)	4	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	5	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	6	Normal	DAY 1-15
Terminal sacrifice		DAY 15	
G3 (2500)	7	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	8	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	9	Normal	DAY 1-15
Terminal sacrifice		DAY 15	
G4 (5000)	10	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	11	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	12	Normal	DAY 1-15
Terminal sacrifice		DAY 15	
G4 (5000)	13	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	14	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	15	Normal	DAY 1-15
Terminal sacrifice		DAY 15	
G4 (5000)	16	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	17	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	18	Normal	DAY 1-15
Terminal sacrifice		DAY 15	
G4 (5000)	19	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15
	20	Normal	DAY 1-15
		Terminal sacrifice	DAY 15

The day of administration was designated as day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Clinical signs

GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	CLINICAL SIGNS	FEMALE
		SIGNS	OBSERVED ON
G1 (0)	21	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	22	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	23	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	24	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	25	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
G2 (1250)	26	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	27	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	28	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	29	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	30	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
G3 (2500)	31	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	32	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	33	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	34	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	35	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
G4 (5000)	36	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	37	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	38	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	39	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15
	40	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-15 DAY 15

The day of administration was designated as day 1.

<END>

Appendix 1-2. Body weights

GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	BODY WEIGHTS (g)					MALE
		Day 1	Day 2	Day 4	Day 8	Day 15	GAINS
G1 (0)	1	242.05	273.23	285.01	310.83	340.44	98.39
	2	229.53	254.16	272.78	294.56	329.91	100.38
	3	234.56	261.34	278.46	300.17	338.23	103.67
	4	246.29	278.05	300.12	334.44	380.68	134.39
	5	236.43	261.51	279.74	306.98	344.29	107.86
	MEAN	237.77	265.66	283.22	309.40	346.71	108.94
	S.D.	6.54	9.73	10.40	15.33	19.71	14.67
	N	5	5	5	5	5	5
G2 (1250)	6	232.54	257.68	268.68	297.33	326.97	94.43
	7	233.03	264.21	273.83	294.26	334.90	101.87
	8	238.39	265.19	282.09	305.25	333.89	95.50
	9	236.15	268.73	278.89	305.94	344.70	108.55
	10	246.01	273.71	292.85	323.37	358.46	112.45
	MEAN	237.22	265.90	279.27	305.23	339.78	102.56
	S.D.	5.46	5.91	9.14	11.32	12.20	7.91
	N	5	5	5	5	5	5
G3 (2500)	11	233.30	264.66	274.92	307.66	348.85	115.55
	12	234.91	260.99	278.52	308.77	341.08	106.17
	13	235.07	266.57	279.14	310.81	349.18	114.11
	14	232.9	258.95	273.94	302.48	341.91	109.01
	15	244.32	267.07	284.71	308.17	337.21	92.89
	MEAN	236.10	263.65	278.25	307.58	343.65	107.55
	S.D.	4.69	3.55	4.25	3.09	5.21	9.03
	N	5	5	5	5	5	5
G4 (5000)	16	230.11	258.92	270.54	299.59	330.95	100.84
	17	231.58	262.58	270.78	299.02	334.10	102.52
	18	235.58	267.76	280.03	304.55	346.43	110.85
	19	234.55	267.21	277.35	310.25	353.76	119.21
	20	245.11	271.77	286.16	314.59	347.08	101.97
	MEAN	235.39	265.65	276.97	305.60	342.46	107.08
	S.D.	5.87	4.98	6.59	6.76	9.58	7.86
	N	5	5	5	5	5	5

The day of administration was designated as day 1.

Gain is body weight on day 15 – body weight on day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-2. Body weights

GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	BODY WEIGHTS (g)					FEMALE
		Day 1	Day 2	Day 4	Day 8	Day 15	GAINS
G1 (0)	21	162.53	183.81	190.84	201.11	207.15	44.62
	22	166.48	182.75	191.98	200.88	217.17	50.69
	23	170.70	190.09	191.77	202.94	211.41	40.71
	24	161.63	180.35	190.02	203.47	214.14	52.51
	25	166.58	184.10	191.26	196.88	212.51	45.93
	MEAN	165.58	184.22	191.17	201.06	212.48	46.89
	S.D.	3.64	3.60	0.78	2.59	3.68	4.75
	N	5	5	5	5	5	5
G2 (1250)	26	158.60	176.74	183.57	191.68	200.32	41.72
	27	167.62	190.92	196.85	197.66	208.05	40.43
	28	162.74	184.68	188.19	195.94	211.69	48.95
	29	171.55	190.59	193.42	210.72	224.56	53.01
	30	170.28	197.04	198.83	211.03	226.85	56.57
	MEAN	166.16	187.99	192.17	201.41	214.29	48.14
	S.D.	5.41	7.66	6.28	8.91	11.23	7.00
	N	5	5	5	5	5	5
G3 (2500)	31	159.57	183.07	185.94	191.00	212.32	52.75
	32	159.84	177.12	188.38	195.56	209.23	49.39
	33	165.46	187.73	190.04	199.22	210.27	44.81
	34	169.43	188.87	196.16	206.31	223.06	53.63
	35	171.56	197.49	198.74	205.45	226.13	54.57
	MEAN	165.17	186.86	191.85	199.51	216.20	51.03
	S.D.	5.45	7.53	5.39	6.51	7.82	3.99
	N	5	5	5	5	5	5
G4 (5000)	36	158.71	179.82	183.94	188.00	207.24	48.53
	37	160.68	180.93	187.52	199.73	217.70	57.02
	38	167.98	187.70	196.04	205.32	220.97	52.99
	39	161.51	183.29	188.44	197.36	204.38	42.87
	40	166.17	185.59	192.47	202.84	217.74	51.57
	MEAN	163.01	183.47	189.68	198.65	213.61	50.60
	S.D.	3.90	3.25	4.67	6.68	7.31	5.29
	N	5	5	5	5	5	5

The day of administration was designated as day 1.

Gain is body weight on day 15 – body weight on day 1.

<END>

Appendix 1–3. Necropsy findings

GROUPS (mg/kg)	NECROPSY FINDINGS			MALE
	ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
G1 (0)	1	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	2	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	3	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	4	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	5	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
G2 (1250)	6	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	7	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	8	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	9	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	10	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
G3 (2500)	11	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	12	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	13	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	14	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	15	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
G4 (5000)	16	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	17	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	18	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	19	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	20	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings

<CONTINUED>

Appendix 1–3. Necropsy findings

GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	NECROPSY FINDINGS		FEMALE
		FATE	LOCATION	FINDINGS
G1 (0)	21	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	22	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	23	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	24	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	25	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
G2 (1250)	26	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	27	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	28	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	29	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	30	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
G3 (2500)	31	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	32	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	33	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	34	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	35	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
G4 (5000)	36	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	37	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	38	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	39	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
	40	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings

<END>

APPENDIX 2. PROTOCOL AND AMENDMENT

Chem ● n

시험계획서

Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를
이용한 단회 경구투여 독성시험

시험번호: 13-RA-225



승인:

차미진 2013. 05. 20
차미진, D.V.M., M.S. 날짜
시험책임자
주점온 비임상연구소

김갑호 2013. 05. 21
김갑호, M.S. 날짜
운영책임자
주점온 비임상연구소

정세영 2013. 05. 21
정세영 날짜
시험의뢰자
경희대학교

ORIGINAL

시 험 제 목	Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험			
시 험 목 적	본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 평가하기 위해 수행한다.			
시 험 지 점	의약품등의독성시험기준(제2013-121호, MFDS, 2013 년 04 월 05 일)			
시 험 의 리 자	경희대학교 서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호, 130-701 02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX)			
시 험 기 관	썬켄온 비임상연구소 경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826 경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터내, 443-270 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)			
시 험 일 정	2013 년 05 월 22 일	동물임수(실험개시일)		
	2013 년 05 월 29 일	투여		
	2013 년 06 월 12 일	부검(실험종료일)		
	2013 년 06 월 28 일	최종보고서(안) 제출 예정		
주요시험관계자	시험물질 조제/보관:	김 지 훈 김 현 지 이 지 혜	동 물:	손 보 송 정 지 란
	병 리:	김 학 수	통 계 분석:	이 민 행
	자료보관:	이 유 나	주 시험자:	김 종 민

기록과 재료의 관	<p>[SOP-AC-001~007]</p> <p>본 시험의 시험계획서(수정 및 이탈기록), 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본, 검체 및 각종 증거자료는 시험종료 후 5 년간 ㈜켄은 비임상연구소에 보관한다.</p> <p>그 이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.</p>
G L P 대 응	<p>비임상시험관리기준(제2013-40호, MFDS, 2013 년 04 월 05 일) OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17</p> <p>시험계획서의 수정 혹은 이탈은 문서로 작성하고, 신뢰성보증부서(QAU)에서 검토 후 시험책임자, 운영책임자 및 시험의뢰자가 승인한다.</p> <p>㈜켄은 비임상연구소의 신뢰성보증부서는 시험과정 전반에 걸친 점검을 단독으로 행한다.</p>
최 종 보 고 서	<p>[SOP-TO-007]</p> <p>최종보고서는 시험계획서의 내용을 반영하여 표지, 시험책임자진술서, 신뢰성보증확인서, 목적, 요약, 재료 및 방법, 관찰 및 측정 결과, 고찰 및 결론, 참고문헌 등으로 구성하며, 필요에 따라 사진이나 표, 부표 및 첨부자료 등을 포함하여 작성한다.</p>

1. 시험물질 및 부형제

1) 시험물질 [SOP-TA-001]

명 칭: Oyster enzyme hydrolysate
 코드번호: C-1390
 제조번호: OP130213
 입 수 일: 2013 년 04 월 19 일
 입 수 량: 1 kg/pack x 1 pack
 외 관: Brown powder
 함 량: 의뢰자 미제공
 유효일자: 2015 년 02 월 12 일
 보관조건: 실온, 차광, 방습
 공 급 원: 경희대학교

2) 부형제

명 칭: 멸균주사용수
 제조번호: 63M2F21
 보관조건: 실온(개봉 후 냉장)
 공 급 원: 대한약품공업주
 선택이유: 본 부형제는 실험동물에 독성을 나타내지 않으며, 시험물질이 부형제에 잘 현탁되어 선택하였다.

2. 투여시험물질 조제 및 분석

1) 투여시험물질 조제[SOP-TA-002]

본 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용한다. 각 용량별로 정량의 시험물질을 칭량한 후 부형제에 현탁시켜 조제한다. 조제는 투여 당일에 실시한다.

2) 투여시험물질 분석[SOP-AS-011]

투여시험물질에 대한 함량분석은 실시하지 않는다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보[SOP-AM-007/017/020]

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Hsd:Sprague Dawley [®] TMSD [®] TM		
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)		
선정사유	본 시험에 사용하는 랫드는 각종 독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.		
성별		수컷	암컷
동물 수	임수시	24	24
	투여시	20	20
주령	임수시	7	
	투여시	8	
투여시 체중범위	평균체중(g)의 $\pm 20\%$ 이내		
잔여동물의 처리	㈜켄온의 SOP에 따른다.		

(2) 검역 및 순화[SOP-QT-001]

모든 동물에 대하여 임수 시 체중을 측정하고, 7 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시키고, 매일 1 회 이상 일반증상을 관찰한다.

(3) 식별[SOP-AM-030/031]

동물은 검역 및 순화기간에는 적색 유성 매직, 투여 및 관찰기간에는 흑색 유성 매직으로 미부표식법을 사용하여 식별한다. 사육상자에는 색으로 용량을 구별하는 개체식별카드를 부착하고, 사육상자대는 고유번호를 부여한다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착한다.

(4) 동물실험 윤리규정[SOP-AM-008]

㈜켄온 비임상연구소의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 13-R175).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정[SOP-FA-005]

동물은 온도 $23\pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $55\pm 15\%$, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 ㈜켄온 비임상연구소 제2동물사육구역 6 호실에서 사육한다.

온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정한다.

- (2) 사료, 물 및 오염물질검사 [SOP-AM-014, SOP-AT-008/009]
 사료는 TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET (2918C, Harlan Laboratories Inc., USA)를 급이기에 넣고 자유섭취 하도록 한다.
 물은 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 지하수를 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취 하도록 한다. 물과 사료의 오염물질에 대한 검사는 ㈜켄온의 관련 SOP에 따라 실시한다.
- (3) 사육상자 및 사육밀도[SOP-AM-023]
 동물은 스테인레스제 망 사육상자(W 215 x L 355 x H 200 mm)에서 검역, 순화, 투여 및 관찰 기간 동안 모두 3 마리 이하/사육상자로 사육한다.
- (4) 군분리[SOP-AM-029]
 순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 시험군 구성과 같이 무작위 분배한다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정 및 투여

1) 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량(mL/kg)	투여량(mg/kg)
G1	M / F	5 / 5	1-5 / 21-25	20	0
G2	M / F	5 / 5	6-10 / 26-30	20	1250
G3	M / F	5 / 5	11-15 / 31-35	20	2500
G4	M / F	5 / 5	16-20 / 36-40	20	5000

G1: 부형제대조군(멸균주사용수)

2) 투여량의 설정[SOP-GT-006]

본 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드에 2500 및 5000 mg/kg으로 암수 각 1 마리에 단회 경구 예비투여한 후 7 일간 관찰한 결과, 사망동물 및 일반증상관찰에서 이상증상이 관찰되지 않았다. 상기 예비투여 결과를 토대로 시험의뢰자와 협의하여 5000 mg/kg을 고용량군으로 두고 그 아래로 공비 2로 두 개 군을 두었으며, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

3) 투여[SOP-AT-001]

투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용한다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 단회 투여, 13:00 이전에 투여를 완료한다.
투여역량 산출	투여일에 측정된 절식시의 체중을 기준으로 20 mL/kg으로 산출한다.
투여방법	투여 전에 하룻밤 절식(약 16-20 시간)시켜 위 내용물을 비운 후 경배부 피부를 고정하고 경구투여용 증대를 장착한 주사관을 이용하여, 위내에 직접 투여한다. 또한, 시험물질 투여 후 약 4 시간 후에 사료를 재급여한다.

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상[SOP-AT-004]

모든 동물에 대하여 매일 1 회 이상 증상관찰을 실시한다. 단, 투여 당일에는 투여 후 1 시간까지는 지속적으로, 6 시간까지는 매 시간 관찰한다. 투여일을 Day 1으로 설정하고, 일반증상관찰은 Day 15까지 실시한다.

일반증상이 악화된 개체는 동중섭식을 피하기 위하여 격리하며, 사망동물은 발견 즉시 해당 동물의 체중을 측정 후, 계획부경 동물에 준하여 처리한다.

2) 체중[SOP-AT-006]

모든 동물에 대하여 Day 1(투여 전), 2, 4, 8 및 15에 측정한다.

3) 부검[SOP-PA-003]

Day 15에 모든 생존동물을 CO₂를 이용하여 흡입 마취시킨 후 개복하여 후대정맥 및 복대동맥을 절단하는 방법으로 방혈치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사한다. 도중 사망동물에 대하여는 개복하여 육안적으로 모든 장기를 검사한다. 육안적 이상장기의 조직(투여 당일 사망한 동물의 이상장기는 고정하지 않음)은 ㈜캠온의 SOP에 따라 적합한 고정액에 고정하고 필요한 경우에 조직병리학적 검사를 실시한다.

6. 통계 분석[SOP-CO-001]

통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용하며 유의수준은 $P < 0.05$ 로 설정한다. 다음과 같이 통계분석을 실시하며, 기타 통계학적 방법을 사용할 경우 최종보고서에 명시한다.

체중 및 증체량에 대하여는 자료의 정규성을 가정하고 모수적인 일원분산분석(One-way ANOVA)을 적용한다. 분산의 동질성은 Levene test로 검증한다.

ANOVA 결과가 유의하며 등분산인 경우 Duncan multiple range test (표본수 같음) 또는

Scheffe multiple range test (표본수 다름)로, 이분산인 경우는 Dunnett T3 test로 사후검정을 실시하여 부정제대조군과 유의한 차이를 나타내는 군을 확인한다.

사망 동물이 관찰된 경우 반수치사량의 산출은 probit법에 따른다.

단위 및 약호

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by Chemon Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this protocol.

%	Percent	hr	Hour
°	Degree	min	Minute
C	Celsius	sec	Second
L	Liter	rpm	Revolution per Minute
dL	Deciliter	RCF	Relative Centrifugal Force
mL	Milliliter	SD	Standard Deviation
µL	Microliter	CV	Coefficient of Variation
g	Gram	RE	Relative Error
kg	Kilogram	RH	Relative Humidity
mg	Milligram	M	Male
µg	Microgram	F	Female
ng	Nanogram	NA	Not Applicable
m	Meter	N	Number
cm	Centimeter	SPF	Specific Pathogen Free
mm	Millimeter	TK	Toxicokinetic
µm	Micrometer	PK	Pharmacokinetic
ppm	Parts per million	AUC	Area Under the Curve
ppb	Parts per billion	C _{max}	Maximum Concentration
wk	Week	T _{max}	Time at Maximum Concentration
d	Day	t _{1/2}	Half-life
GLP	Good Laboratory Practice Regulation	SOP	Standard Operating Procedures
QAU	Quality Assurance Unit	ICH	International Conference on Harmonization
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	MFDS	Ministry of Food and Drug Safety
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee	SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Protocol Amendment Form
(시험계획서 변경 기록지)

Study Title: Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험
 Study No.: 13-RA-225 Amendment No.: 1

Amendment to the Protocol:
(변경 내용)

1. 4 p. 1. 1) 시험물질: 시험물질의 함량을 아래와 같이 변경한다.

변경 전	변경 후
의뢰자 미제공	Tyrosine-alanine 0.0146~0.0166 %

Reason for the Amendment:
(변경 사유)

1. 시험의뢰자가 제공한 시험성적의 내용을 반영함.



Impact on Study:
(시험에 미치는 영향)

1. 없음.

Approved by:

Study Director <u>차미진</u>	Date <u>2013. 07. 02</u>
Management <u>김갑로</u>	Date <u>2013. 07. 03</u>
Authorized by Sponsor <u>정세영</u>	Date <u>2013. 07. 03</u>

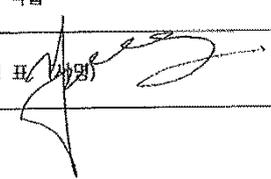
ORIGINAL

APPENDIX 3. CERTIFICATE OF ANALYSIS

시험성적서
경희대학교 약학대학

품 명	Oyster enzyme hydrolysate	제조번호	OP130213
제조일자	2013. 6. 5	시험일자	2013. 6. 27

시험항목	시험기준	결과
성 상	Brown powder	적합
확인시험	HPLC	적합
함량시험	tyrosine-alanine 함량	0.0146~0.0166%
무균시험	음성	음성
불용성이물 검사	육안으로 보이는 이물질이 없어야 함	적합
엔도톡신	20EU/ml 이하	적합

판정	적합
시험 담당자	장 영 표 (서명) 

최종보고서

Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를
이용한 4 주간 반복 경구투여 독성시험

시험번호: 13-RR-336

시험의뢰기관: 경희대학교

(주)켄온 비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
240, Nampyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do,
449-826, Republic of Korea

진 술 서

Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4 주간 반복 경구투여 독성시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2013-40호, MFDS, 2013 년 04 월 05 일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

상기 시험은 승인된 시험계획서와 ㈜켄온 비임상연구소의 SOP에 따라 수행하였고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험자료의 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았다.

차 리 진 

차 미 진, D.V.M., M.S.

시험책임자

주 소 : ㈜켄온 비임상연구소

경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826

연 락 처 : 031-329-9969 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

E - m a i l : chacha3@chemon.co.kr

2013. 11. 21

날 짜

서 명

차 미 진

차 미 진, D.V.M., M.S.

시험책임자

㈜캠온 비임상연구소

2013. 11. 21

날 짜

김 갑 호

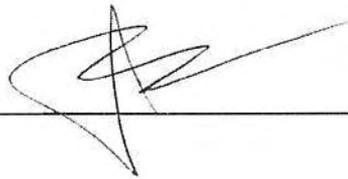
김 갑 호, M.S.

운영책임자

㈜캠온 비임상연구소

2013. 11. 21

날 짜



정 세 영

의뢰책임자

경희대학교

2013. 11. 20

날 짜

신뢰성보증확인서

시험번호: 13-RR-336

시험제목: Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4주간 반복 경구투여 독성시험

시험기간: 2013.07.08 - 2013.11.21

시험의뢰기관: 경희대학교

점검내용	점검일	시험책임자 확인일	운영책임자 보고일
시험계획서	2013.07.08	2013.07.08	2013.07.08
동물입수 및 검역	2013.07.09	2013.07.09	2013.07.11
시험물질/대조물질 보관	2013.07.16	2013.07.16	2013.07.17
	2013.08.12	2013.08.12	2013.08.13
시험물질/대조물질 조제	2013.07.16	2013.07.16	2013.07.17
	2013.08.12	2013.08.12	2013.08.13
투여 및 동물사육	2013.07.16	2013.07.16	2013.07.17
	2013.08.12	2013.08.12	2013.08.13
동물사육실 내 관찰 및 검사	2013.07.16	2013.07.16	2013.07.17
	2013.08.12	2013.08.12	2013.08.13
채뇨 및 요검사	2013.08.08	2013.08.12	2013.08.12
안과학적 검사	2013.08.09	2013.08.12	2013.08.12
부검	2013.08.13	2013.08.13	2013.08.14
	2013.08.14	2013.08.19	2013.08.21
채혈 및 혈액학적검사	2013.08.13	2013.08.13	2013.08.14
	2013.08.14	2013.08.19	2013.08.21
혈액생화학적검사	2013.08.13	2013.08.13	2013.08.14
	2013.08.14	2013.08.19	2013.08.21
조직병리검체제작	2013.08.28	2013.08.28	2013.09.02
조직병리학적검사	2013.09.09	2013.09.11	2013.09.12
시험기초자료	2013.10.04 - 07	2013.10.11	2013.10.11
최종보고서(안)	2013.10.04 - 07	2013.10.11	2013.10.11
최종보고서	2013.11.21	-	-

상기의 점검으로써, 본 보고서의 시험방법이 식품의약품안전처고시 제2013-121호(2013년 04월 05일) '의약품등의독성시험기준'에 따라 행하여졌음과, 해당시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 보고서에 정확하게 반영되었으며, 본 시험이 식품의약품안전처고시 제2013-40호(2013년 04월 05일) '비임상 시험관리기준' 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 실시되었음을 증명함.

2013년 11월 21일

㈜켄온 비임상연구소

신뢰성보증업무책임자

김문순 (인)

시험개요

시 형 제 목	Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4 주간 반복 경구투여 독성시험	
시 형 목 적	본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 무독성량 및 표적장기를 확인하기 위하여 수행하였다.	
시 형 지 침	의약품등의독성시험기준(제2013-121호, MFDS, 2013 년 04 월 05 일)	
시 형 의 회 자	경희대학교 서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호, 130-701 02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX) 의뢰책임자: 정 세 영	
시 형 기 관	(주)캠온 비임상연구소 경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826 경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터내, 443-270 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX) 운영책임자: 김 감 호	
시 형 일 정	2013 년 07 월 08 일	시험계획서 승인(시험개시일)
	2013 년 07 월 09 일	동물입수(실험개시일)
	2013 년 07 월 16 일	투여개시
	2013 년 08 월 13 일	투여종료
	2013 년 08 월 13 일	부검(수컷)
	2013 년 08 월 14 일	부검(암컷)
	2013 년 08 월 14 일	임상병리검사 완료
	2013 년 09 월 24 일	조직병리학적 검사 완료(실험종료일)
	2013 년 10 월 11 일	최종보고서(안) 제출
	2013 년 11 월 21 일	최종보고서 제출(시험종료일)
기록과 재료의 보 관	시험계획서, 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본, 검체 및 각종 증거 자료는 품목허가일로부터 3 년간 (주)캠온 비임상연구소에 보관한다. 임상병리 검체(혈청, 혈장)는 측정 종료일로부터 1 년간 보관한다. 이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.	

주요시험관계자

동물실험:	정 지 란, B.S. 손 보 송 (주)캠온 비임상연구소
시험물질 조제/보관:	김 지 훈 김 현 지, B.S. 이 지 혜 (주)캠온 비임상연구소
병 리:	김 학 수, M.S., 임상병리사 (주)캠온 비임상연구소
판 독:	강 부 현, D.V.M., Ph.D., Toxicological pathologist, Toxicologist (주)캠온 비임상연구소
통계분석:	이 민 행, M.S. (주)캠온 비임상연구소
자료보관:	이 유 나 (주)캠온 비임상연구소

목 차

진 술 서	i
서 명	ii
신뢰성보증확인서	iii
시험개요	iv
주요시험관계자	v
요 약	1
재료 및 방법	2
결 과	10
고찰 및 결론	13
참고문헌	14
TABLES	15
Table 1. Clinical signs	16
Table 2. Body weights	17
Table 3. Food consumptions	18
Table 4. Water consumptions	19
Table 5. Ophthalmological examination	20
Table 6. Urinalysis	21
Table 7. Urine sediments	23
Table 8. Hematological test	24
Table 9. Clinical biochemistry test	26
Table 10. Absolute and relative organ weights	28
Table 11. Necropsy findings	30
APPENDIX 1. INDIVIDUAL DATA	31
Appendix 1-1. Clinical signs	32
Appendix 1-2. Body weights	36
Appendix 1-3. Food consumptions	38
Appendix 1-4. Water consumptions	40
Appendix 1-5. Ophthalmological examination	42
Appendix 1-6. Urinalysis	43
Appendix 1-7. Urine sediments	45
Appendix 1-8. Hematological test	46
Appendix 1-9. Clinical biochemistry test	50
Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights	54

Appendix 1-11. Necropsy findings..... 70
APPENDIX 2. PATHOLOGY REPORT..... 74
APPENDIX 3. ANALYSIS REPORT(Non-GLP) 145
APPENDIX 4. PROTOCOL..... 154
APPENDIX 5. CERTIFICATE OF ANALYSIS..... 167

요 약

본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 무독성량 및 표적장기를 확인하기 위하여 수행하였다.

시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 800, 2000 및 5000 mg/kg/day로 투여하는 시험물질 투여 군 및 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하여 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 4 주간 반복 경구투여하였다.

일반증상관찰, 체중측정, 사료 및 물 섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량측정, 부검소견관찰 및 조직병리학적 검사를 실시하였고, 시험물질 투여군의 결과를 부형제대조군과 비교하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다.
3. 체중측정 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
4. 사료섭취량 측정 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
5. 물섭취량 측정 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
6. 안과학적 검사 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
7. 요검사 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
8. 혈액학적 검사 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
9. 혈액생화학적 검사 결과, 모든 시험물질 투여군 수컷에서 혈액요소질소의 증가가 관찰되었다. 하지만 이는 독성학적인 의미는 없었다.
10. 장기중량 측정 결과, 5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 수컷에서 우측 신장의 절대 및 상대 중량의 증가가 관찰되었다. 하지만 이는 독성학적인 의미는 없었다.
11. 부검소견 관찰 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
12. 조직병리학적 검사 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여하였을 때, 시험물질에 의한 독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서, 본 시험조건에서 Oyster enzyme hydrolysate의 무독성량(NOAEL, No Observed Adverse Effects Level)은 암수 모두 5000 mg/kg/day로 판단하고, 표적장기는 확인되지 않았다.

재료 및 방법

1. 시험물질 및 부형제

1) 시험물질 (Appendix 5)

명 칭:	Oyster enzyme hydrolysate
코드번호:	C-1390
제조번호:	OP130213
입 수 일:	2013 년 04 월 19 일; 2013 년 06 월 19 일
입 수 량:	1 kg/pack x 1 pack; 500 g/pack x 1 pack
외 관:	Brown powder
함 량:	Tyrosine- alanine 0.0146 ~ 0.0166 %
유효일자:	2015 년 02 월 12 일
보관조건:	실온, 차광, 방습
공 급 원:	경희대학교

2) 부형제

명 칭:	멸균주사용수
제조번호:	63M2F21
보관조건:	실온(개봉 후 냉장)
공 급 원:	대한약품공업주
선택이유:	본 부형제는 실험동물에 독성을 나타내지 않으며, 시험물질이 부형제에 잘 현탁되어 선택하였다.

2. 투여시험물질의 조제 및 분석

1) 투여시험물질의 조제

(1) 조제방법

본 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였다. 각 용량별로 정량의 시험물질을 칭량한 후 부형제에 현탁시켜 조제하였다. 투여개시일에 농도별로 100 mL의 시험물질을 별도 조제하여 시험의뢰자에게 전달하였다.

(2) 조제빈도

투여시험물질은 매일 조제하였다.

2) 투여시험물질의 분석 (Appendix 3)

투여시험물질의 분석은 시험의뢰자측에서 Non-GLP로 실시하였으며, 그 결과는 최종보고서에 반영하지 않고 부록으로 첨부하였다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Hsd:Sprague Dawley [®] TMSD [®] TM	
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)	
선정사유	본 시험에 사용한 랫드는 독성시험에 적당한 실험동물로서 일반독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.	
성별	수컷	암컷
동물 수	입수시	48
	투여개시시	40
주령	입수시	5
	투여개시시	6
입수시 체중범위	114.05-137.93 g	99.23-119.73 g
투여개시시 체중범위	174.39-197.51 g	135.17-156.87 g
잔여동물의 처리	안락사처리 하였다.	

(2) 검역 및 순화

입수시 외관을 관찰하고 체중을 측정한 후 7일간 본 시험을 실시하는 동물실내에서 사육하면서 매일 일반증상을 관찰하였다. 동물 공급처에서 제공한 '시험계의 병원체 검사 성적서'를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

(3) 식별

순화기간에는 적색 유성 매직을 이용한 미부표식법을 사용하였고, 투여 및 관찰기간에는 흑색 유성매직을 이용한 미부표식법 및 ear-punch법을 사용하여 식별하였다. 사육상자에는 색으로 용량을 구별하는 개체식별카드를 부착하였고, 사육상자대는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착하였다.

(4) 실험동물윤리규정

본 시험은 ㈜켘온 비임상연구소의 실험동물운영위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 13-R237).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정

동물은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 (주)켄온 비임상연구소 제2동물사육구역 1 호실에서 사육하였다.

온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하였고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정하였다. 실험기간 동안 동물실의 온도 및 상대습도는 일평균 22.3-24.4 °C, 57.1-64.0 %이었고, 시험 결과에 영향을 줄만한 이상은 없었다.

(2) 사료, 물, 깔개 및 오염물질 검사

사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET, 2918C, Harlan Laboratories Inc., USA)를 (주)두얼 바이오텍(서울특별시 서초구 양재동 153, 정보프라자 107 호)으로부터 공급받아 자유섭취 하도록 하였다. 사료의 성분분석성적서를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

물은 지하수를 자외선 살균기와 미세여과장치를 거친 후, 물병을 이용하여 자유섭취 하도록 하였다. 수질검사는 경기도보건환경연구원(경기도 수원시 장안구 파장동 324-1)에서 수행하였고, 먹는물수질기준에 적합하였다.

깔개는 종이깔개를 (주)BUZO(경기도 광주시 오포읍 신현리 134-1번지)로부터 공급받아 고압증기멸균 후 사용하였다. 깔개의 오염물질 분석성적서를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

(3) 사육상자 및 사육밀도

폴리카보네이트 사육상자(W 235 x L 380 x H 175 mm)에서 검역 및 순화기간에는 3 마리 이하/사육상자로 수용하였고, 투여 및 관찰기간에는 2 마리 이하/사육상자로 수용하였다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

1) 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량(mL/kg/day)	투여량(mg/kg/day)
G1	M / F	10 / 10	1-10 / 41-50	20	0
G2	M / F	10 / 10	11-20 / 51-60	20	800
G3	M / F	10 / 10	21-30 / 61-70	20	2000
G4	M / F	10 / 10	31-40 / 71-80	20	5000

G1: 부형제대조군(멸균주사용수)

2) 투여량의 설정

본 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드에 1250, 2500 및 5000 mg/kg으로 단회 경구투여 독성 시험 [㈜켘온 시험번호: 13-RA-225] 결과, 사망동물 및 이상증상이 관찰되지 않았다.

상기 결과를 바탕으로, 시험의뢰자와 협의하에 본 시험에서는 체중을 기준으로 5000 mg/kg/day를 고용량군으로 두고, 그 아래로 공비 2.5로 두 개 군을 두었으며, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

3) 군분리

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 평균에 가까운 동물들을 선택하여 '시험군 구성' 표와 같이 무작위 분배하였다.

4) 투여

투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용하였다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 7 일/주, 4 주간 투여, 09:25-14:42에 투여하였다.
투여액량 산출	최근에 측정한 체중을 기준으로 20 mL/kg/day으로 산출하였다.
투여방법	경구투여용 존대를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여하였다.

5. 관찰 및 검사**1) 일반증상**

투여 및 관찰기간 동안 사망여부, 일반증상의 종류, 발현 일 및 증상의 정도를 1 일 1 회 관찰하였고, 개체 별로 기록하였다. 투여개시일을 Day 1로 설정하였다.

2) 체중

모든 동물에 대하여 투여개시일(투여 전), 그 이후에는 주 1 회 및 부검일에 체중을 측정하였다. 부검일은 절식시킨 체중을 측정하였다.

3) 사료 및 물섭취량

사료 및 물 섭취량은 투여개시일, 그 이후에는 주 1 회 측정하였다. 측정방법은 사료 및 물을 정량급여한 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하였고, 마리당 평균섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

4) 안과학적 검사

관찰 최종 주에 군당 암수 각 5 마리에 대하여 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후 양쪽 안구에 산동제(미드리아실 1 % 점안액, 한국알콘, Lot 11J20F)를 점적하여 동공확장을 유도한 다음, 안저사진기(Genesis, Gowa Co. Ltd., Japan)로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰하였다. 특이증상이 발견되지 않아 사진 촬영은 실시하지 않았다.

6. 임상병리

1) 채뇨 및 채혈

(1) 채뇨

관찰 최종 주에 각 군당 암수 각 5 마리를 대사 케이지에 수용하였다. 수집한 신선뇨 중, 약 1 mL을 취하여 요검사를 실시하였고, 24 시간 동안 수집한 요량을 측정하였다.

(2) 채혈

부검 전날 하룻밤(16-20 시간) 절식한 계획부검동물에 대하여 Isoflurane (테렐 액, 경보제약㈜)으로 흡입마취하여, 마취가 확인되면 회복하여 후대정맥에서 혈액학적 검사 및 혈액 생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다.

2) 요검사

(1) 요 일반검사

약 0.3 mL의 요를 요검사용 시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, USA)에 묻힌 후, 요자동분석기(Clinitek Advantus, Siemens, USA)를 이용하여 아래의 항목을 검사하였다. 단, 요색조는 동물실에서 관찰한 결과를 요자동분석기에 입력하였다.

요색조(urine color)	빌리루빈(BIL)	pH	아질산염(NIT)
투명도(clarity)	케톤체(KET)	요단백(PRO)	잠혈(BLO)
당(GLU)	요비중(SG)	유로빌리노겐(URO)	

(2) 요침사 검사

요 일반검사에 사용한 후 남은 요를 5 분간 원심분리(Hanil MF300, 1500 rpm, 425 RCF)한 후, 그 침전물을 SM법으로 염색한 후, 현미경으로 아래의 항목을 관찰하였다.

백혈구(WBC)	상피세포(epithelial cells)	적혈구(RBC)	원주(cast)
----------	------------------------	----------	----------

3) 혈액학적 검사

(1) 전혈구 검사

혈액 약 1 mL를 항응고제(EDTA-2K)가 들어있는 CBC bottle (Vacutainer 3 mL, BD, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 이용하여 아래 항목을 검사하였다.

적혈구(RBC)	적혈구분포폭(RDW)	림프구(LYM)
헤마토크리트치(HCT)	헤모글로빈분포폭(HDW)	단핵구(MONO)
혈색소량(HGB)	평균혈소판용적(MPV)	호산구(EOS)
평균적혈구용적(MCV)	혈소판수(PLT)	호염기구(BASO)
평균적혈구헤모글로빈량(MCH)	백혈구(WBC)	대형비염색성세포(LUC)
평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)	호중구(NEU)	

(2) 혈액응고시간 검사

혈액 1.8 mL를 항응고제(3.2 % sodium citrate 액 0.2 mL)가 들어있는 microtube에 주입한 후 원심분리하여 얻은 혈장으로 아래 항목을 혈액응고시간검사기(ACL 100, Instrumentation Laboratory, USA)를 이용하여 측정하였다.

부분활성트롬보플라스틴시간(APTT) 프로트롬빈시간(PT)

4) 혈액생화학적 검사

부검시 채혈한 혈액의 일부를 clot activator가 들어 있는 5 mL vacutainer tube (INSEPACK, SEKISUI, JAPAN)에 주입하고 15-20 분간 실온에 방치하여 응고시킨 후 10 분간 원심분리(3000 rpm, 1902 RCF, Combi-514R, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 아래 항목을 AU680 혈액생화학분석기(Beckman coulter, Japan)를 이용하여 검사하였다.

아스파테이트 아미노기전이효소(AST)	총콜레스테롤(TCHO)	크레아티닌(CRE)
알라닌 아미노기전이효소(ALT)	중성지방(TG)	무기인(IP)
알칼라인 포스파타제(ALP)	총단백(TP)	칼슘(Ca ²⁺)
크레아티닌산활성효소(CPK)	알부민(ALB)	칼륨(K ⁺)
총빌리루빈(TBIL)	알부민/글로불린 비(A/G)	나트륨(Na ⁺)
당(GLU)	혈액요소질소(BUN)	염소(Cl ⁻)

7. 조직병리

1) 부검

임상병리 검사를 위한 채혈 후, 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사 시킨 다음, 체표, 피하, 두부, 흉강 및 복강의 모든 장기를 관찰하였고, 부검소견을 기록하였다.

2) 장기중량 측정

모든 동물의 아래 장기에 대하여 전자저울(BP221S, Sartorius AG, Germany)로 중량을 측정(양측성 장기는 각각 측정)하고, 각 장기에 대하여 부검시 체중에 대한 상대중량을 산출하였다.

뇌(brain) 뇌하수체(pituitary gland) 간장(liver)

폐(lung)	비장(spleen)	고환(testis)
심장(heart)	부신(adrenal gland)	부고환(epididymis)
가슴샘(thymus)	신장(kidney)	전립샘(prostate gland)
자궁(uterus)	난소(ovary)	

3) 조직 및 장기의 보존

모든 동물의 아래 장기를 적출하였고, 모든 장기 및 투여부위를 10 % 중성완충포르말린용액에 고정하되, 안구는 Davidson's 용액에, 고환 및 부고환은 Bouin's 용액에 고정하였다.

뇌(brain)	공장(jejunum)	말초신경(peripheral nerve)
뇌하수체(pituitary gland)	회장(ileum)	대퇴경골관절(femorotibial joint)
폐(lung)	맹장(cecum)	방광(urinary bladder)
심장(heart)	결장(colon)	고환(testis) [#]
가슴샘(thymus)	직장(rectum)	부고환(epididymis) [#]
비장(spleen)	안구(시신경 포함) [#] (eye with optic nerve)	전립샘(prostate gland)
부신(adrenal gland) [#]	갑상샘(부갑상샘 포함) [#] (thyroid gland with parathyroid gland)	정낭(응고샘 포함) (seminal vesicle with coagulation gland)
신장(kidney) [#]	하더샘(hardierian gland) [#]	난소(ovary) [#]
간장(liver)	침샘(salivary gland) [#]	자궁(경부포함) (uterus with cervix)
혀(tongue)	대동맥(aorta)	질(vagina)
기관(trachea)	흉골(골수포함) (sternum with bone marrow)	피부(skin)
식도(esophagus)	턱밑림프절 (mandibular lymph node) [#]	젖샘 (mammary gland of females)
위(stomach)	장간막림프절 (mesenteric lymph node)	골격근(skeletal muscle)
췌장(pancreas)	흉척수(thoracic spinal cord)	육안적 병변(gross lesion)
십이지장(duodenum)		

양측 장기 모두 적출 한 후 고정하였다.

부갑상샘이 조직슬라이드 상에 관찰되지 않을 경우 SOP에 따라 조치하고, 해당 장기가 관찰된 조직슬라이드만을 검경하였다.

젖샘은 수컷의 경우 조직슬라이드 상에 관찰될 시 검경을 실시하였다.

4) 조직병리학적 검사

부형제대조군 및 고용량군의 모든 동물의 고정장기와 중간용량군에서 부검소견이 관찰된 장기에 대하여 일반적인 과정을 거쳐 조직슬라이드를 제작하여 조직병리학적 검사를 수행하였

다. 조직병리학적 소견은 Pristima[®] (xybion, USA) 프로그램에 입력하여 처리하였으며, 진단용어는 Pristima[®]의 Lexicon에 제시된 것을 우선적으로 사용하였다. 필요시 미국독성병리학회의 Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria: Guides for Toxicologic Pathology 및 Covance 사의 Covance Glossary 등을 참고하였다²⁻¹¹⁾.

병변 정도의 등급 매기기는 Pristima[®] program에 따라서 5 등급으로 실시되었다. 일반적으로 등급매기기는 미약한(minimal) 병변을 +1로, 현저한(massive) 병변을 +5로 하여 두 변화 사이를 정비례로 균등하게 5 등분하여 반정량적으로 실시되었다.

특히, 신장의 만성진행성신병증은 초기 변화로서 기저막이 비후된 호염성세뇨관(tubule basophilia with thickened dasement membrane)이 관찰되면 만성진행성신병증으로 진단하였다¹¹⁾. 이 때 같은 쪽 신장에 병발한 유리질원주(hyaline cast)는 별도로 진단하지 않았다. 그러나 호염성 세뇨관에서 기저막의 비후가 관찰되지 않았으면 별도로 진단하였고, 만성진행성신병증이 관찰되지 않은 경우, 유리질원주(hyaline cast)는 별도로 진단하였다.

8. 통계 분석

통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용하였으며 유의수준은 $P < 0.05$ 로 설정하였다.

체중, 사료 및 물섭취량, 혈액학 및 혈액생화학적 자료, 장기중량에 대하여는 자료의 정규성을 가정하고 모수적인 일원분산분석(One-way ANOVA)을 적용하였다. 분산의 동질성은 Levene test로 검정하였다.

ANOVA 결과가 유의하며 등분산인 경우 Duncan multiple range test 로, 이분산인 경우는 Dunnett T3 test로 사후검정을 실시하여 부형제대조군과 유의한 차이를 나타내는 군을 확인하였다.

요검사 결과는 순위화한 데이터를 이용하여 비모수적 Kruskal-Wallis'H-test를 실시하였으며, 그 결과가 유의할 경우 Mann-Whitney U-test로 부형제대조군과 유의한 차이를 나타내는 군을 확인하였다.

본 보고서에서 특별히 언급하지 않는 한, '유의한'은 부형제대조군과 비교하였을 때 통계학적인 유의성을 나타낸다는 의미이다.

결 과

사망동물 및 일반증상 (Table 1; Appendix 1-1)

사망동물은 관찰되지 않았고, 시험물질 투여와 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다.

체중변화 (Table 2; Appendix 1-2)

5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷에서 Day 21에 유의하게 높았다($P < 0.05$). 이는 (쥐)캠온의 reference data¹⁾의 정상범위 이내의 변화였으며, 용량-반응 상관성 없이 관찰되었기에 시험물질과 무관한 우발적인 변화로 판단한다.

사료섭취량 (Table 3; Appendix 1-3)

시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

물섭취량 (Table 4; Appendix 1-4)

2000 및 5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷에서 Day 27에 유의하게 높았다($P < 0.05$).

이는 (쥐)캠온의 reference data¹⁾의 정상범위 이내의 변화였으며, 이는 용량-반응 상관성 없이 관찰되었기에 우발적인 변화로 판단한다.

안과학적 검사 (Table 5; Appendix 1-5)

시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

요검사 (Tables 6 & 7; Appendices 1-6 & 1-7)

2000 및 5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 수컷에서 요단백(PRO)이 유의하게 높았다($P < 0.05$).

5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷에서 요비중(SG) 및 PRO가 유의하게 높았다($P < 0.05$).

이는, 경미한 변화로서 (쥐)캠온의 reference data¹⁾의 정상범위 이내의 변화였으므로 시험물질 투여와 무관한 변화로 판단한다.

혈액학적 검사 (Table 8; Appendix 1-8)

2000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷과 5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암수에서 헤마토크리트치(HCT)의 증가가, 5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷에서 백혈구(WBC)의 증가가 유의하게 관찰되었다($P < 0.05$). 이는 관련항목에서 유의한 변화가 동반 관찰되지 않았고, (쥐)캠온의 reference data의 정상범위 이내의 변화였으므로¹⁾ 시험물질 투여와 무관한 변화로 판단한다.

혈액생화학적 검사 (Table 9; Appendix 1-9)

모든 시험물질 투여군 수컷에서 혈액요소질소(BUN)의 증가가 유의하게 관찰되었다($P < 0.05$ or $P < 0.01$)

800 및 2000 mg/kg/day 시험물질 투여군 수컷에서 칼슘(Ca^{2+})의 감소가 유의하게 관찰되었다 ($P < 0.05$). 이는 용량-반응 상관성있게 관찰되지 않아 시험물질 투여와 무관한 변화로 판단한다.

5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 수컷에서 나트륨(Na^+) 및 염소(Cl^-)의 감소가 유의하게 관찰되었다($P < 0.05$ or $P < 0.01$). 이는 통계학적 유의성은 관찰되지 않았지만, 5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 수컷에서 Day 27 물섭취량의 증가와 관련된 변화로 시험물질과 무관한 변화로 추정한다.

장기중량 (Table 10; Appendix 1-10)

5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 수컷에서 우측 신장의 절대 및 상대중량의 증가가 유의하게 관찰되었다($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷에서 우측 신장 및 비장의 절대중량 증가가 유의하게 관찰되었다($P < 0.05$). 이는, 혈액학적 검사에서 관련된 항목의 변화가 관찰되지 않았고, (쥐켄온의 reference data¹⁾의 정상범위 이내의 변화였으므로 시험물질 투여와 무관한 변화로 판단한다.

2000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷에서 심장의 절대중량 증가가 유의하게 관찰되었다 ($P < 0.05$). 이는 용량-반응 상관성 없이 관찰되어 우발적인 변화로 판단한다.

부검소견 (Table 11; Appendix 1-11)

2000 mg/kg/day 시험물질 투여군 수컷에서 간장의 미상엽 일부가 흰색조로 변색된 소견(white discoloration on the part of caudate lobe)이 1례 관찰되었다. 5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷 1례에서 자궁각 부위에 직경 0.2 cm 크기의 낭포 1개소(one globular cyst on the uterus cornu sized 0.2 cm)가 관찰되었고, 2000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷 1례에서 양측 부신에 흰색반점이 산재된 소견(diffused white spots)이 관찰되었다.

이는 그 발생 레가 적고, 용량-반응 상관성 없이 관찰되어 우발적인 변화로 판단한다.

또한 자궁 내 맑은 액체 저류(retention of clear fluid)가 부형제대조군, 2000 및 5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 순으로 각 3, 2 및 1례 관찰되었는데, 이는 암컷의 성주기와 관련된 변화로 판단한다.

조직병리학적 검사(Appendix 2)

조직병리학적 검사 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았고, Sprague-Dawley 랫드에서 흔히 관찰되는 자연발생학적인 병변²⁻¹²⁾이 관찰되었다.

2000 mg/kg/day 시험물질 투여군 수컷 간장에서 미상엽 괴사(caudate lobe necrosis)가 1 레 관찰되었는데, 이는 어린 연령의 랫드에서도 흔히 관찰되는 병변¹¹⁾으로, 이는 자연발생학적인 병변으로 판단한다.

2000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷 부신에서 피질비대(cortical hypertrophy)가 1 레 관찰되었는데, 이는 만성적 스트레스 또는 뇌하수체종양에 의해 기능적으로 발생할 수 있으며⁴⁾, 부검소견 및 조직병리학적 검사에서 부형제대조군과 비교하여 부신에서 변화를 관찰할 수 없었으므로, 우발적인 원인에 의한 변화로 판단한다.

5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷 자궁에서 낭성샘(cystic gland) 및 자궁내강 확장(luminal dilation)이 1 레 관찰되었다. 이는 부검결과 관찰된 소견에 부합되고, Sprague-Dawley 랫드에서 발생하는 자연발생학적인 병변²⁻¹²⁾으로 시험물질과는 무관한 것으로 판단한다.

5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 암컷 1 레(# 79)의 방광에서 염증세포침윤(inflammation cell infiltration) 및 이행상피과다형성(transitional cell hyperplasia)이 관찰되었다. 이는 동일개체의 신장에서 관찰된 신우부위에서의 염증세포침윤(pelvis inflammation cell infiltration)과 연관된 변화로 자연발생학적인 병변으로 판단한다.

고찰 및 결론

본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 무독성량 및 표적장기를 확인하기 위하여 수행하였다

투여기간 동안, 사망동물 및 이상증상은 관찰되지 않았고, 체중, 사료 및 물섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 검사, 부검소견 관찰 및 조직병리학적 검사 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

혈액생화학적 검사에서 관찰된 시험물질 투여군 수컷에서 BUN의 증가는 용량-반응 상관성있게 관찰되었고, 장기중량 측정에서 5000 mg/kg/day 수컷 우측 신장의 절대 및 상대중량의 증가가 관찰되어 이는 시험물질에 의한 영향으로 판단한다. 하지만, BUN과 관련된 항목의 변화가 관찰되지 않았고, 신장의 조직병리학적 검사에서 연관된 변화가 관찰되지 않았다. 또한, (쥐캠온의 reference data¹⁾)의 정상범위 이내의 변화였으므로 독성학적 의미는 없는 것으로 판단한다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여하였을 때, 시험물질에 의한 독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서, 본 시험조건에서 Oyster enzyme hydrolysate의 무독성량(NOAEL, No Observed Adverse Effects Level)은 암수 모두 5000 mg/kg/day로 판단하고, 표적장기는 확인되지 않았다.

참고문헌

1. 1.ZZ Han, HD Xu, KH Kim, TH Ahn, JS Bae, JY Lee, KH Gil, JY Lee, SJ Woo, HJ Yoo, HK Lee, KH Kim, CK Park, HS Zhang and SW Song (2010). Reference Data of the Main Physiological Parameters in Control Sprague–Dawley Rats from Pre–clinical Toxicity Studies, Lab. Anim. Res. 26(2):153–164.
2. Xybion (2010). Lexicon, Pristima™ (Path/Tox system), Version 6.1.0 Build 31. Xybion Medical Systems. USA
3. Streett, C. Spencer et al (2003). Standardized System for Nomenclature and Diagnostic Criteria – Guides for Toxicologic Pathology. STP/ARP/AFIP, Washington, D.C.
4. Covance (2001). Covance Glossary, Version 5
5. Greaves, P. (2012). Histopathology of preclinical toxicity studies: Interpretation and relevance in drug safety evaluation. Elsevier.
6. Renne, R. et al. (2009). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Respiratory Tract. Toxicologic Pathology 37:5S–73S.
7. Thoolen, B. et al. (2010). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Hepatobiliary System. Toxicologic Pathology 38:5S–81S.
8. Frazier, K.S. et al. (2012). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Urinary System. Toxicologic Pathology 40:14S–86S.
9. Kaufman, W. et al. (2012). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Central and Peripheral Systems. Toxicologic Pathology 40: 87S–157S.
10. Haschek, W.M., Rousseaux, C.G., Wallig, M.A.(2010). Fundamentals of Toxicologic Pathology. 2nd edition, Academic Press.
11. Peter Mann.(2012). Background lesions in laboratory animals: A color atlas.Elsevier
12. Hard, G.C., Khan, K.N.: A Contemporary Overview of Chronic Progressive Nephropathy in the Laboratory Rat, and Its Significance for Human Risk Assessment. Toxicologic Pathology, 32:171–180, 2004.

TABLES

Table 1. Clinical signs

CLINICAL SIGNS					
Days	SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)
MALE					
1-28	Normal	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
29	Normal	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Terminal sacrifice	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
FEMALE					
1-29	Normal	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
30	Normal	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Terminal sacrifice	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10

The day of first treatment was designated as day 1.

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

Table 2. Body weights

BODY WEIGHTS (g)				
DAYS	GROUPS (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)
MALE				
1	186.46±5.91	186.59±6.32	185.51±6.37	187.64±5.18
7	233.43±8.88	233.18±5.91	235.75±7.77	238.95±6.96
14	281.54±12.21	281.47±5.33	284.36±12.34	289.74±11.81
21	320.40±18.27	320.95±7.98	325.86±17.90	331.89±16.16
28	341.48±19.38	344.49±11.57	348.36±21.72	356.90±20.83
GAINS	155.02±16.28	157.90±12.78	162.85±18.85	169.26±18.94
N	10	10	10	10
FEMALE				
1	146.76±4.82	147.21±6.05	147.25±5.41	148.21±5.30
7	163.96±6.48	161.14±10.20	167.69±4.56	168.32±7.85
14	182.22±8.65	183.30±12.98	188.23±5.95	186.95±10.77
21	199.61±10.65	196.69±13.49	204.46±9.01	211.90±12.87*
28	209.63±10.14	209.27±18.02	215.11±7.52	219.96±15.09
GAINS	62.87±9.22	61.06±12.50	67.86±6.57	71.75±10.97
N	10	10	10	10

The day of first treatment was designated day 1.

Gain is body weight on day 28 – body weight on day 1.

Data are expressed as Mean ± S.D..

* Significant difference at $P < 0.05$ levels compared with the vehicle control.

Table 3. Food consumptions

FOOD CONSUMPTIONS (g/rat/day)				
DAYS	GROUPS (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)
MALE				
1	18.25±2.11	18.20±1.89	18.52±1.56	17.64±1.12
7	20.59±0.68	20.26±0.83	19.70±1.11	19.57±1.04
14	20.90±1.57	20.84±1.61	21.33±1.69	21.10±1.17
21	19.97±0.96	19.94±0.67	19.94±1.14	19.79±0.85
27	21.08±0.68	22.34±1.41	21.32±2.25	22.15±1.23
N	10	10	10	10
FEMALE				
1	12.28±0.66	11.43±0.78	12.71±0.68	11.63±0.97
7	12.60±0.83	13.46±1.00	12.43±1.12	12.58±1.06
14	12.52±1.81	12.11±1.93	12.79±1.22	14.20±0.31
21	12.36±1.13	12.27±1.97	12.67±0.87	12.25±1.20
27	14.65±1.25	14.76±1.32	14.88±1.17	14.55±1.26
N	10	10	10	10

The day of first treatment was designated day 1.

Data are expressed as Mean ± S.D..

Table 4. Water consumptions

WATER CONSUMPTIONS (g/rat/day)				
DAYS	GROUPS (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)
MALE				
1	25.53±1.59	24.76±2.42	23.80±1.90	26.89±2.39
7	25.92±1.98	23.77±1.07	24.04±2.15	26.79±3.19
14	24.80±3.02	24.48±2.73	23.57±1.19	26.27±2.15
21	26.25±3.70	23.06±1.82	24.29±2.25	26.30±2.79
27	27.68±3.40	25.90±1.34	27.13±2.03	30.48±3.91
N	10	10	10	10
FEMALE				
1	16.85±1.56	17.21±2.71	18.23±1.64	17.42±2.99
7	16.31±1.77	19.14±1.56	18.01±2.54	19.70±2.08
14	15.55±3.74	15.61±2.23	17.26±0.72	18.87±2.36
21	16.21±2.20	17.67±2.09	19.27±2.79	17.91±4.57
27	20.79±1.52	24.06±2.33	26.20±2.54*	26.08±4.09*
N	10	10	10	10

The day of first treatment was designated day 1.

Data are expressed as Mean ± S.D..

* Significant difference at $P < 0.05$ levels compared with the vehicle control.

Table 5. Ophthalmological examination

OPHTHALMOLOGICAL EXAMINATIONS					
SITES	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)
MALE					
Left eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
FEMALE					
Left eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the finding / Number of animals examined.

Table 6. Urinalysis

			URINALYSIS				MALE
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)				
			G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)	
GLU	-	0	5	5	5	5	
BIL	-	0	5	5	5	4	
	1+	2	0	0	0	1	
KET	-	0	5	5	4	2	
	+/-	1	0	0	1	2	
	1+	2	0	0	0	1	
SG	≤1.005	0	3	3	1	1	
	1.010	1	2	2	3	1	
	1.015	2	0	0	1	2	
	1.020	3	0	0	0	0	
	1.025	4	0	0	0	1	
	≥1.030	5	0	0	0	0	
pH	6.0	0	0	0	0	0	
	6.5	1	0	0	0	0	
	7.0	2	0	0	0	1	
	7.5	3	2	1	1	1	
	8.0	4	3	4	4	0	
	8.5	5	0	0	0	3	
	≥9.0	6	0	0	0	0	
PRO	-	0	3	0	0	0	
	+/-	1	1	2	1	0	
	1+	2	1	3	2	2	
	2+	3	0	0	2*	2	
	3+	4	0	0	0	1*	
URO	0.2	0	5	5	5	4	
	1.0	1	0	0	0	1	
NIT	-	0	5	4	5	4	
	+	1	0	1	0	1	
BLO	-	0	3	4	2	2	
	+/-	1	1	1	2	2	
	1+	2	0	0	1	0	
	2+	3	1	0	0	1	
CLARITY	-	0	5	5	5	5	
VOLUME (mL)			19.8±3.3	19.8±4.8	19.8±5.2	25.0±7.1	
COLOR-Yellow			5	5	5	5	
N			5	5	5	5	

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, BLO: Occult blood. * Significant difference at $P < 0.05$ level compared with the vehicle control.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	BLO (EA/μL)	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.2	Negative	Negative	Clear
+/-	1	Trace	Trace	Trace	Trace	1.0	NA	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Turbid
3+	4	≥1,000	Large	≥80	≥300	≥8.0	NA	Large	Other

<CONTINUED>

Table 6. Urinalysis

			URINALYSIS				FEMALE	
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)					
			G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)		
GLU	-	0	5	5	5	5		
BIL	-	0	5	5	5	5		
	1+	2	0	0	0	0		
KET	-	0	5	5	5	5		
	+/-	1	0	0	0	0		
	1+	2	0	0	0	0		
SG	≤1.005	0	5	4	3	1		
	1.010	1	0	1	2	1		
	1.015	2	0	0	0	0		
	1.020	3	0	0	0	2		
	1.025	4	0	0	0	0		
	≥1.030	5	0	0	0	1*		
pH	6.0	0	0	0	0	1		
	6.5	1	0	0	0	2		
	7.0	2	0	0	0	1		
	7.5	3	0	1	0	0		
	8.0	4	5	2	1	0		
	8.5	5	0	2	3	1		
	≥9.0	6	0	0	1	0		
PRO	-	0	5	5	5	1		
	+/-	1	0	0	0	2		
	1+	2	0	0	0	2*		
	2+	3	0	0	0	0		
	3+	4	0	0	0	0		
URO	0.2	0	5	5	5	2		
	1.0	1	0	0	0	3		
NIT	-	0	5	5	3	4		
	+	1	0	0	2	1		
BLO	-	0	5	5	5	5		
	+/-	1	0	0	0	0		
	1+	2	0	0	0	0		
	2+	3	0	0	0	0		
CLARITY	-	0	5	5	5	5		
VOLUME (mL)			19.4±6.5	15.4±0.9	14.4±3.0	14.4±4.7		
COLOR-Yellow			5	5	5	5		
N			5	5	5	5		

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, BLO: Occult blood. * Significant difference at $P < 0.05$ level compared with the vehicle control.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	BLO (EA/μL)	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.2	Negative	Negative	Clear
+/-	1	Trace	Trace	Trace	Trace	1.0	NA	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Turbid
3+	4	≥1,000	Large	≥80	≥300	≥8.0	NA	Large	Other

<END>

Table 7. Urine sediments

URINE SEDIMENTS						
MALE						
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)			
			G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)
RBC	-	0	5	5	4	5
	+/-	1	0	0	1	0
WBC	-	3	5	5	5	5
EPITHELIAL CELL	-	0	5	5	5	5
CASTS	-	0	5	5	2	5
	+/-	1	0	0	3	0
N			5	5	5	5
FEMALE						
RBC	-	0	5	5	5	4
	+/-	1	0	0	0	1
WBC	-	0	5	5	5	5
EPITHELIAL CELL	-	1	5	4	5	5
	+/-	2	0	1	0	0
CASTS	-	0	5	5	5	5
N			5	5	5	5

Grade	Result	RBC (mean/field)	WBC (mean/field)	Epithelial Cell	Casts (mean/field)
0	-	0	0	0/20 field	0
1	+/-	≤4	≤5	Few/20 field	1
2	1+	5-8	6-20	Around 1/few field	2-5
3	2+	9-30	21-50	Few/field	6-10
4	3+	31≤(local)	51≤(local)	10-20/field	11-30
5	4+	All over the field	All over the field	30≤/field	31≤

Table 8. Hematological test

		HEMATOLOGICAL TEST				MALE
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)	
RBC	10 ⁶ /μL	8.03±0.10	7.97±0.19	7.98±0.36	8.13±0.21	
HGB	g/dL	15.0±0.3	15.1±0.4	15.1±0.5	15.3±0.3	
HCT	%	45.7±1.1	45.7±1.0	45.4±1.2	46.8±0.9*	
MCV	fL	56.9±1.5	57.4±0.7	57.0±2.1	57.5±1.4	
MCH	pg	18.7±0.5	18.9±0.3	18.9±0.6	18.9±0.4	
MCHC	g/dL	32.9±0.3	32.9±0.2	33.1±0.3	32.8±0.3	
RDW	%	11.0±0.2	10.9±0.2	10.8±0.2	11.0±0.2	
HDW	g/dL	2.34±0.11	2.31±0.09	2.32±0.12	2.30±0.08	
RET	%	2.71±0.33	2.78±0.21	2.61±0.41	2.51±0.30	
PLT	10 ³ /μL	1002.0±63.3	1035.5±72.0	1053.8±114.1	1010.9±63.4	
MPV	fL	5.4±0.3	5.6±0.3	5.7±0.2	5.6±0.2	
WBC	10 ³ /μL	9.37±1.29	9.44±1.69	9.71±1.73	10.05±1.32	
NEU	%	13.1±5.0	10.9±2.3	14.3±5.7	9.4±3.4	
LYM	%	80.6±4.6	82.6±3.0	79.1±6.7	84.8±3.8	
MONO	%	4.3±1.1	4.5±1.3	4.4±1.4	3.8±0.9	
EOS	%	0.9±0.4	0.9±0.4	1.1±0.5	0.9±0.3	
BASO	%	0.2±0.0	0.3±0.3	0.2±0.1	0.3±0.1	
LUC	%	1.0±0.4	0.8±0.3	1.0±0.3	0.9±0.2	
PT	sec	8.93±0.26	9.30±0.41	9.29±0.38	9.12±0.33	
APTT	sec	18.1±0.7	17.3±1.6	18.0±1.4	18.3±0.8	
N		10	10	10	10	

Data are expressed as Mean ± S.D..

<CONTINUED>

Table 8. Hematological test

		HEMATOLOGICAL TEST				FEMALE
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)	
RBC	10 ⁶ /μL	7.62±0.19	7.61±0.28	7.73±0.26	7.79±0.30	
HGB	g/dL	14.1±0.3	14.1±0.3	14.5±0.5	14.5±0.3	
HCT	%	42.0±1.2	41.9±1.0	43.2±1.5*	43.1±0.9*	
MCV	fL	55.1±1.2	55.1±1.3	55.9±0.8	55.3±1.5	
MCH	pg	18.5±0.4	18.6±0.5	18.7±0.3	18.6±0.6	
MCHC	g/dL	33.6±0.3	33.8±0.5	33.5±0.4	33.5±0.4	
RDW	%	10.4±0.3	10.3±0.2	10.5±0.3	10.4±0.2	
HDW	g/dL	2.36±0.11	2.35±0.10	2.42±0.15	2.30±0.11	
RET	%	2.67±0.45	2.55±0.51	2.99±0.56	2.54±0.57	
PLT	10 ³ /μL	1051.4±71.5	1053.0±120.8	1109.4±122.1	1099.7±95.5	
MPV	fL	5.2±0.3	5.1±0.3	5.3±0.2	5.2±0.2	
WBC	10 ³ /μL	5.59±1.33	5.73±1.48	6.27±1.07	7.15±1.16*	
NEU	%	12.8±5.3	11.0±2.9	10.6±3.7	11.2±3.7	
LYM	%	81.4±5.4	83.2±3.5	83.7±3.8	82.8±3.9	
MONO	%	3.6±0.7	3.5±1.1	3.5±0.7	3.7±1.0	
EOS	%	1.3±0.3	1.4±0.5	1.2±0.5	1.4±0.7	
BASO	%	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	
LUC	%	0.8±0.1	0.8±0.3	0.8±0.2	0.8±0.2	
PT	sec	8.91±0.20	8.94±0.34	8.90±0.22	9.11±0.28	
APTT	sec	17.7±0.9	17.4±1.0	17.6±0.7	17.6±0.9	
N		10	10	10	10	

Data are expressed as Mean ± S.D..

* Significant difference at $P < 0.05$ levels compared with the vehicle control.

<END>

Table 9. Clinical biochemistry test

		CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST				MALE
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)	
AST	U/L	85.1±14.8	85.7±10.7	83.0±20.7	81.3±15.5	
ALT	U/L	34.5±5.9	34.8±3.6	37.6±18.0	37.1±3.5	
ALP	U/L	137.9±26.5	128.1±14.8	134.6±21.0	138.3±28.9	
CPK	U/L	217.5±47.4	236.9±89.8	201.6±82.6	199.0±82.2	
TBIL	mg/dL	0.14±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	
GLU	mg/dL	109.1±7.0	112.5±13.7	114.8±10.6	128.2±18.1	
TCHO	mg/dL	90.0±7.6	82.0±14.4	79.7±10.9	77.3±9.0	
TG	mg/dL	44.0±7.3	44.4±10.4	43.2±7.8	43.3±9.9	
TP	g/dL	5.78±0.22	5.65±0.18	5.66±0.15	5.77±0.15	
ALB	g/dL	3.07±0.13	3.01±0.10	2.97±0.09	3.07±0.10	
A/G	ratio	1.14±0.04	1.14±0.02	1.11±0.04	1.14±0.03	
BUN	mg/dL	15.3±1.6	17.5±1.5*	17.2±1.5*	18.4±2.9**	
CRE	mg/dL	0.42±0.03	0.43±0.04	0.43±0.03	0.43±0.04	
IP	mg/dL	7.84±0.24	7.99±0.26	7.94±0.34	7.81±0.41	
Ca ²⁺	mg/dL	10.08±0.21	9.89±0.16*	9.88±0.23*	10.03±0.12	
Na ⁺	mmol/L	141.05±0.85	141.14±0.76	140.95±0.44	140.32±0.61*	
K ⁺	mmol/L	4.93±0.25	4.87±0.16	4.88±0.24	4.98±0.22	
Cl ⁻	mmol/L	102.57±1.12	102.49±0.51	102.00±0.58	101.33±1.20**	
N		10	10	10	10	

Data are expressed as Mean ± S.D..

*/** Significant difference at $P<0.05/P<0.01$ levels compared with the vehicle control.

<CONTINUED>

Table 9. Clinical biochemistry test

		CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST				FEMALE
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)	
AST	U/L	93.5±10.3	92.2±17.7	92.2±12.4	89.0±8.1	
ALT	U/L	30.9±3.6	30.2±5.2	28.6±2.9	31.3±3.4	
ALP	U/L	90.7±13.2	97.8±23.7	80.5±14.9	85.9±15.9	
CPK	U/L	231.7±38.3	222.7±64.9	235.9±98.9	195.2±72.7	
TBIL	mg/dL	0.16±0.01	0.16±0.02	0.15±0.02	0.16±0.02	
GLU	mg/dL	108.1±10.9	104.3±8.7	110.2±14.4	102.8±9.0	
TCHO	mg/dL	104.5±6.9	99.5±10.8	100.5±13.7	93.4±12.8	
TG	mg/dL	36.2±12.1	38.7±9.9	35.7±6.1	34.9±6.7	
TP	g/dL	5.60±0.20	5.54±0.19	5.58±0.18	5.58±0.28	
ALB	g/dL	3.03±0.11	3.05±0.10	3.07±0.11	3.06±0.17	
A/G	ratio	1.18±0.04	1.23±0.03	1.23±0.04	1.22±0.07	
BUN	mg/dL	18.2±1.8	18.7±2.0	17.5±1.6	19.7±1.5	
CRE	mg/dL	0.47±0.05	0.50±0.07	0.44±0.02	0.46±0.03	
IP	mg/dL	6.87±0.63	6.88±0.82	6.80±0.44	6.91±0.56	
Ca ²⁺	mg/dL	9.50±0.18	9.50±0.39	9.42±0.23	9.53±0.35	
Na ⁺	mmol/L	138.33±1.34	138.40±1.06	139.08±0.84	138.02±1.06	
K ⁺	mmol/L	4.69±0.34	4.64±0.28	4.61±0.35	4.61±0.25	
Cl ⁻	mmol/L	101.99±1.31	102.30±1.38	102.32±1.14	101.84±0.96	
N		10	10	10	10	

Data are expressed as Mean ± S.D..

<END>

Table 10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					MALE
PARAMETERS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)	
BODY WEIGHTS (g)	318.74±18.18	321.91±11.78	326.83±19.62	333.30±18.14	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0240±0.0030	0.0245±0.0020	0.0252±0.0032	0.0242±0.0025	
% to BODY WEIGHT	0.0076±0.0009	0.0076±0.0007	0.0077±0.0006	0.0073±0.0007	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0235±0.0021	0.0233±0.0019	0.0237±0.0030	0.0235±0.0023	
% to BODY WEIGHT	0.0074±0.0006	0.0072±0.0006	0.0072±0.0006	0.0071±0.0006	
PITUITARY GLAND	0.0107±0.0008	0.0108±0.0006	0.0107±0.0009	0.0138±0.0076	
% to BODY WEIGHT	0.0033±0.0002	0.0034±0.0002	0.0033±0.0002	0.0041±0.0021	
THYMUS	0.5085±0.1048	0.4897±0.0732	0.4836±0.0924	0.4988±0.0725	
% to BODY WEIGHT	0.1593±0.0301	0.1520±0.0214	0.1480±0.0278	0.1493±0.0178	
PROSTATE GLAND	0.4035±0.0800	0.4008±0.0812	0.4206±0.0626	0.4427±0.0993	
% to BODY WEIGHT	0.1272±0.0268	0.1241±0.0232	0.1293±0.0220	0.1337±0.0332	
TESTIS-LEFT	1.9079±0.1455	1.9413±0.0619	1.9299±0.1123	1.9577±0.1141	
% to BODY WEIGHT	0.5993±0.0437	0.6038±0.0292	0.5915±0.0355	0.5882±0.0359	
TESTIS-RIGHT	1.9133±0.1606	1.9477±0.0815	1.8876±0.0969	1.9849±0.1033	
% to BODY WEIGHT	0.6013±0.0528	0.6059±0.0365	0.5785±0.0320	0.5967±0.0383	
EPIDIDYMIS-LEFT	0.4789±0.0355	0.4840±0.0365	0.4799±0.0365	0.4956±0.0422	
% to BODY WEIGHT	0.1505±0.0113	0.1505±0.0122	0.1471±0.0118	0.1491±0.0149	
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.4846±0.0396	0.4931±0.0342	0.4766±0.0207	0.4942±0.0394	
% to BODY WEIGHT	0.1523±0.0129	0.1534±0.0120	0.1464±0.0122	0.1484±0.0109	
SPLEEN	0.7390±0.1370	0.7562±0.0579	0.7783±0.1075	0.7891±0.0966	
% to BODY WEIGHT	0.2307±0.0329	0.2351±0.0179	0.2377±0.0247	0.2365±0.0238	
KIDNEY-LEFT	1.0909±0.1143	1.0637±0.0355	1.1180±0.1000	1.1710±0.0674	
% to BODY WEIGHT	0.3418±0.0243	0.3308±0.0167	0.3417±0.0159	0.3516±0.0167	
KIDNEY-RIGHT	1.1043±0.0875	1.0953±0.0595	1.1173±0.0878	1.2132±0.0821**	
% to BODY WEIGHT	0.3464±0.0186	0.3403±0.0150	0.3418±0.0184	0.3641±0.0163*	
HEART	1.2164±0.1060	1.2196±0.0606	1.2404±0.1127	1.2566±0.0805	
% to BODY WEIGHT	0.3815±0.0241	0.3791±0.0197	0.3800±0.0322	0.3774±0.0224	
LUNG	1.4811±0.1246	1.4652±0.0690	1.5205±0.1100	1.5156±0.0931	
% to BODY WEIGHT	0.4647±0.0299	0.4554±0.0204	0.4658±0.0300	0.4553±0.0275	
BRAIN	1.8752±0.0813	1.8478±0.0530	1.8745±0.1158	1.8931±0.0476	
% to BODY WEIGHT	0.5899±0.0399	0.5743±0.0163	0.5738±0.0200	0.5694±0.0313	
LIVER	9.5308±1.1778	9.4977±0.6873	9.8095±0.7996	10.5111±0.8650	
% to BODY WEIGHT	3.0001±0.4451	2.9509±0.1937	3.0018±0.1770	3.1519±0.1619	
N	10	10	10	10	

The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

Data are expressed as Mean ± S.D..

*/** Significant difference at $P<0.05/P<0.01$ levels compared with the vehicle control.

<CONTINUED>

Table 10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					FEMALE
PARAMETERS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)	
BODY WEIGHTS (g)	198.78±7.76	197.14±14.58	204.00±8.33	209.16±13.30	
OVARY-LEFT	0.0487±0.0061	0.0491±0.0063	0.0489±0.0076	0.0495±0.0047	
% to BODY WEIGHT	0.0246±0.0035	0.0249±0.0029	0.0241±0.0042	0.0237±0.0023	
OVARY-RIGHT	0.0477±0.0069	0.0416±0.0061	0.0476±0.0065	0.0468±0.0064	
% to BODY WEIGHT	0.0240±0.0034	0.0211±0.0028	0.0234±0.0032	0.0225±0.0035	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0332±0.0029	0.0308±0.0025	0.0309±0.0033	0.0304±0.0028	
% to BODY WEIGHT	0.0167±0.0018	0.0157±0.0012	0.0152±0.0021	0.0146±0.0017	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0298±0.0026	0.0300±0.0016	0.0302±0.0024	0.0304±0.0030	
% to BODY WEIGHT	0.0151±0.0017	0.0153±0.0010	0.0148±0.0016	0.0146±0.0016	
PITUITARY GLAND	0.0118±0.0012	0.0110±0.0011	0.0117±0.0014	0.0117±0.0013	
% to BODY WEIGHT	0.0059±0.0008	0.0056±0.0007	0.0057±0.0007	0.0056±0.0005	
THYMUS	0.3031±0.0426	0.3620±0.0906	0.3669±0.0498	0.3740±0.0803	
% to BODY WEIGHT	0.1526±0.0209	0.1826±0.0384	0.1802±0.0264	0.1801±0.0426	
UTERUS	0.6417±0.3142	0.4413±0.1321	0.5825±0.2334	0.5843±0.2082	
% to BODY WEIGHT	0.3241±0.1608	0.2249±0.0690	0.2864±0.1180	0.2800±0.1029	
SPLEEN	0.5459±0.0420	0.5438±0.0505	0.5875±0.0547	0.6012±0.0635*	
% to BODY WEIGHT	0.2751±0.0242	0.2759±0.0158	0.2879±0.0222	0.2887±0.0372	
KIDNEY-LEFT	0.6860±0.0405	0.6886±0.0505	0.7268±0.0486	0.7323±0.0576	
% to BODY WEIGHT	0.3455±0.0221	0.3499±0.0215	0.3564±0.0211	0.3517±0.0387	
KIDNEY-RIGHT	0.7102±0.0384	0.6880±0.0547	0.7461±0.0602	0.7606±0.0536*	
% to BODY WEIGHT	0.3575±0.0195	0.3494±0.0204	0.3658±0.0262	0.3654±0.0399	
HEART	0.7850±0.0659	0.7650±0.0825	0.8682±0.1009*	0.8422±0.0917	
% to BODY WEIGHT	0.3954±0.0360	0.3881±0.0296	0.4259±0.0502	0.4044±0.0536	
LUNG	1.1521±0.0823	1.1890±0.1169	1.1923±0.1586	1.2210±0.1419	
% to BODY WEIGHT	0.5799±0.0392	0.6040±0.0531	0.5848±0.0789	0.5864±0.0811	
BRAIN	1.7270±0.0395	1.7296±0.0369	1.7210±0.0446	1.8063±0.1182	
% to BODY WEIGHT	0.8698±0.0353	0.8807±0.0522	0.8447±0.0359	0.8680±0.0945	
LIVER	5.6694±0.3398	5.6478±0.6791	5.9636±0.3293	6.0531±0.6060	
% to BODY WEIGHT	2.8558±0.2025	2.8640±0.2565	2.9246±0.1406	2.9008±0.3041	
N	10	10	10	10	

The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

Data are expressed as Mean ± S.D..

* Significant difference at $P < 0.05$ levels compared with the vehicle control.

<END>

Table 11. Necropsy findings

NECROPSY FINDINGS					
ORGANS	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2000)	G4 (5000)
MALE					
	No gross findings	10	10	9	10
LIVER	White discoloration on the part of caudate lobe	0	0	1	0
	N	10	10	10	10
FEMALE					
	No gross findings	7	10	7	8
UTERUS	Retention of clear fluid	3	0	2	1
UTERUS	A 0.2 cm sized globular cyst on the uterus cornu	0	0	0	1
ADRENAL GLAND	Diffused white spots on both sides	0	0	1	0
	N	10	10	10	10

APPENDIX 1. INDIVIDUAL DATA

Appendix 1-1. Clinical signs

CLINICAL SIGNS		MALE
G1 (0 mg/kg/day)		
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON
1	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
2	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
3	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
4	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
5	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
6	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
7	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
8	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
9	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
10	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
G2 (800 mg/kg/day)		
11	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
12	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
13	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
14	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
15	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
16	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
17	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
18	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
19	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
20	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29

The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Clinical signs

CLINICAL SIGNS		MALE
G3 (2000 mg/kg/day)		
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON
21	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
22	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
23	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
24	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
25	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
26	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
27	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
28	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
29	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
30	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
G4 (5000 mg/kg/day)		
31	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
32	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
33	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
34	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
35	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
36	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
37	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
38	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
39	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29
40	Normal	DAY 1-29
	Terminal sacrifice	DAY 29

The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Clinical signs

CLINICAL SIGNS		FEMALE
G1 (0 mg/kg/day)		
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON
41	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
42	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
43	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
44	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
45	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
46	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
47	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
48	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
49	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
50	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
G2 (800 mg/kg/day)		
51	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
52	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
53	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
54	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
55	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
56	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
57	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
58	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
59	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30
60	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-30 DAY 30

The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Clinical signs

CLINICAL SIGNS		FEMALE
G3 (2000 mg/kg/day)		
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON
61	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
62	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
63	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
64	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
65	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
66	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
67	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
68	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
69	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
70	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
G4 (5000 mg/kg/day)		
71	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
72	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
73	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
74	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
75	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
76	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
77	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
78	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
79	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30
80	Normal	DAY 1-30
	Terminal sacrifice	DAY 30

The day of first treatment was designated day 1.

<END>

Appendix 1-2. Body weights

BODY WEIGHTS (g)											MALE
ANIMAL ID	G1 (0 mg/kg/day)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
DAY 1	183.38	192.70	195.52	183.63	189.55	176.44	188.95	181.98	181.79	190.66	
DAY 7	225.59	242.39	245.02	235.82	237.00	216.32	233.78	230.18	226.64	241.51	
DAY 14	267.94	300.67	292.25	281.45	286.53	264.57	283.31	284.81	264.51	289.31	
DAY 21	292.82	350.33	329.36	316.89	328.76	301.83	323.35	324.77	297.92	337.96	
DAY 28	304.06	365.08	349.49	335.13	343.31	323.09	345.48	355.48	328.05	365.66	
GAINS	120.68	172.38	153.97	151.50	153.76	146.65	156.53	173.50	146.26	175.00	
ANIMAL ID	G2 (800 mg/kg/day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
DAY 1	186.81	187.65	179.27	187.59	187.49	192.50	197.51	190.05	180.16	176.85	
DAY 7	232.89	236.31	224.65	232.85	228.09	240.96	240.91	238.91	228.80	227.42	
DAY 14	288.05	281.55	279.05	276.31	280.38	290.05	280.59	285.35	281.39	272.02	
DAY 21	337.24	318.07	321.14	313.09	324.88	328.48	314.28	324.68	315.52	312.13	
DAY 28	352.83	338.44	338.44	319.72	347.22	361.22	339.76	350.91	354.09	342.28	
GAINS	166.02	150.79	159.17	132.13	159.73	168.72	142.25	160.86	173.93	165.43	
ANIMAL ID	G3 (2000 mg/kg/day)										
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
DAY 1	177.51	185.54	186.38	189.35	195.82	174.39	184.06	192.72	184.51	184.77	
DAY 7	228.02	238.83	231.72	236.74	253.61	229.08	229.93	239.89	230.32	239.40	
DAY 14	272.55	277.14	276.97	284.52	315.43	278.85	279.92	289.00	277.97	291.21	
DAY 21	309.65	318.22	317.78	324.67	370.08	324.13	311.75	326.27	315.21	340.86	
DAY 28	322.14	327.70	338.92	345.67	396.30	351.90	334.63	355.35	341.58	369.36	
GAINS	144.63	142.16	152.54	156.32	200.48	177.51	150.57	162.63	157.07	184.59	
ANIMAL ID	G4 (5000 mg/kg/day)										
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
DAY 1	187.70	191.59	187.90	183.78	181.23	194.28	195.20	180.72	183.87	190.13	
DAY 7	239.00	238.66	239.32	233.90	227.61	247.39	251.58	234.51	234.83	242.66	
DAY 14	292.56	281.22	284.11	272.92	275.26	304.84	302.37	285.98	292.93	305.21	
DAY 21	335.21	318.55	328.18	302.82	316.60	351.58	347.00	329.16	337.59	352.20	
DAY 28	361.37	332.35	349.67	327.76	332.43	382.37	370.52	359.31	367.51	385.68	
GAINS	173.67	140.76	161.77	143.98	151.20	188.09	175.32	178.59	183.64	195.55	

The day of first treatment was designated day 1.

Gain is body weight on day 28 – body weight on day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-2. Body weights

		BODY WEIGHTS (g)									FEMALE
ANIMAL ID	G1 (0 mg/kg/day)										
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
DAY 1	144.26	147.43	144.45	151.26	151.36	137.80	154.26	146.47	147.79	142.54	
DAY 7	157.11	164.48	166.84	168.56	175.55	153.01	165.18	168.11	159.17	161.54	
DAY 14	174.73	180.28	189.21	192.82	191.32	173.31	185.09	186.96	166.12	182.36	
DAY 21	184.88	193.49	208.52	207.56	217.33	184.66	205.10	203.50	197.35	193.69	
DAY 28	194.21	196.22	212.93	218.71	221.58	197.38	208.66	214.35	213.53	218.72	
GAINS	49.95	48.79	68.48	67.45	70.22	59.58	54.40	67.88	65.74	76.18	
ANIMAL ID	G2 (800 mg/kg/day)										
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
DAY 1	151.09	148.86	148.21	135.17	149.44	151.71	147.38	156.39	141.47	142.34	
DAY 7	170.23	169.40	166.28	139.87	157.95	167.49	161.65	170.97	158.82	148.72	
DAY 14	196.31	194.44	179.33	161.29	183.00	196.09	180.95	198.69	175.77	167.15	
DAY 21	209.11	209.92	200.81	172.31	191.00	207.07	192.95	211.29	193.64	178.78	
DAY 28	237.52	223.45	206.17	184.87	201.55	217.44	202.76	222.34	199.75	186.82	
GAINS	86.43	74.59	57.96	49.70	52.11	65.73	55.38	65.95	58.28	44.48	
ANIMAL ID	G3 (2000 mg/kg/day)										
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	
DAY 1	147.76	142.93	153.98	154.15	140.84	148.48	145.63	147.01	153.00	138.72	
DAY 7	168.43	164.07	174.30	174.33	165.74	166.96	167.17	169.65	167.31	158.89	
DAY 14	197.27	185.96	189.29	198.61	183.83	183.36	186.15	190.91	186.80	180.07	
DAY 21	210.97	204.90	215.88	217.56	201.96	195.57	198.51	211.13	195.38	192.72	
DAY 28	225.28	212.14	220.88	225.04	211.05	203.60	215.01	220.19	211.66	206.27	
GAINS	77.52	69.21	66.90	70.89	70.21	55.12	69.38	73.18	58.66	67.55	
ANIMAL ID	G4 (5000 mg/kg/day)										
	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
DAY 1	146.74	141.99	140.84	149.69	151.72	144.64	156.87	147.98	146.28	155.37	
DAY 7	169.25	161.61	161.10	174.79	180.06	155.79	174.12	166.13	164.06	176.32	
DAY 14	179.79	184.42	174.73	188.00	202.98	176.74	195.16	192.46	173.91	201.32	
DAY 21	210.17	202.83	197.51	215.86	232.40	193.21	220.55	212.48	205.04	228.98	
DAY 28	223.26	213.39	202.77	220.93	242.13	196.33	237.25	215.93	211.51	236.13	
GAINS	76.52	71.40	61.93	71.24	90.41	51.69	80.38	67.95	65.23	80.76	

The day of first treatment was designated day 1.

Gain is body weight on day 28 – body weight on day 1.

<END>

Appendix 1-3. Food consumptions

FOOD CONSUMPTIONS												MALE
GROUPS		G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)					
DAYS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
1	Sum	31.36	42.41	36.28	38.40	34.03	37.78	40.90	32.63	38.34	32.31	
	g / N	15.68	21.21	18.14	19.20	17.02	18.89	20.45	16.32	19.17	16.16	
7	Sum	42.43	39.45	40.04	42.34	41.59	41.09	39.47	39.71	43.19	39.15	
	g / N	21.22	19.73	20.02	21.17	20.80	20.55	19.74	19.85	21.60	19.58	
14	Sum	41.95	46.56	42.57	39.24	38.71	45.18	36.82	40.60	43.68	42.16	
	g / N	20.97	23.28	21.29	19.62	19.35	22.59	18.41	20.30	21.84	21.08	
21	Sum	38.13	43.11	39.41	40.19	38.88	41.43	38.47	40.93	39.99	38.62	
	g / N	19.07	21.56	19.71	20.10	19.44	20.72	19.24	20.47	19.99	19.31	
27	Sum	43.06	42.99	39.82	42.12	42.76	47.07	43.69	40.54	44.58	47.50	
	g / N	21.53	21.50	19.91	21.06	21.38	23.54	21.84	20.27	22.29	23.75	
GROUPS		G3 (2000 mg/kg/day)					G4 (5000 mg/kg/day)					
DAYS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
1	Sum	37.88	34.10	41.60	34.09	37.54	34.30	33.46	38.94	35.87	33.79	
	g / N	18.94	17.05	20.80	17.05	18.77	17.15	16.73	19.47	17.94	16.90	
7	Sum	37.38	37.22	40.63	39.31	42.47	39.28	39.41	41.78	39.29	35.95	
	g / N	18.69	18.61	20.32	19.66	21.24	19.64	19.71	20.89	19.65	17.98	
14	Sum	37.02	45.75	44.36	43.74	42.43	40.35	39.37	43.63	45.10	42.53	
	g / N	18.51	22.88	22.18	21.87	21.22	20.18	19.68	21.82	22.55	21.27	
21	Sum	37.39	41.82	42.41	37.79	39.96	37.98	38.87	40.49	38.44	42.11	
	g / N	18.70	20.91	21.21	18.90	19.98	18.99	19.44	20.25	19.22	21.05	
27	Sum	40.13	44.35	48.06	36.33	44.35	45.37	47.71	43.73	43.69	41.01	
	g / N	20.07	22.18	24.03	18.17	22.18	22.69	23.86	21.87	21.85	20.51	

The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-3. Food consumptions

FOOD CONSUMPTIONS												FEMALE
GROUPS		G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)					
DAYS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
1	Sum	23.79	23.44	25.08	26.64	23.83	24.48	22.19	20.56	23.07	23.99	
	g / N	11.90	11.72	12.54	13.32	11.92	12.24	11.10	10.28	11.54	12.00	
7	Sum	24.97	23.45	26.54	27.24	23.82	28.98	26.98	24.77	28.83	25.06	
	g / N	12.48	11.73	13.27	13.62	11.91	14.49	13.49	12.39	14.42	12.53	
14	Sum	25.03	27.59	20.10	29.27	23.21	27.52	25.75	27.55	19.21	21.03	
	g / N	12.52	13.80	10.05	14.64	11.61	13.76	12.88	13.78	9.61	10.52	
21	Sum	21.79	24.06	24.20	25.56	27.94	29.48	20.36	20.86	27.06	24.93	
	g / N	10.90	12.03	12.10	12.78	13.97	14.74	10.18	10.43	13.53	12.47	
27	Sum	26.13	31.47	30.11	27.19	31.58	28.18	29.77	29.03	33.79	26.79	
	g / N	13.07	15.74	15.05	13.60	15.79	14.09	14.89	14.52	16.90	13.40	
GROUPS		G3 (2000 mg/kg/day)					G4 (5000 mg/kg/day)					
DAYS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
1	Sum	23.98	25.50	24.14	26.42	27.07	23.20	22.58	20.46	25.37	24.73	
	g / N	11.99	12.75	12.07	13.21	13.54	11.60	11.29	10.23	12.69	12.37	
7	Sum	23.81	25.60	23.65	28.42	22.80	26.52	22.15	26.24	23.77	27.12	
	g / N	11.91	12.80	11.83	14.21	11.40	13.26	11.08	13.12	11.89	13.56	
14	Sum	26.40	27.73	21.35	26.07	26.34	27.90	27.82	28.35	29.38	28.57	
	g / N	13.20	13.87	10.68	13.04	13.17	13.95	13.91	14.18	14.69	14.29	
21	Sum	25.86	24.56	27.90	23.19	25.22	22.87	21.66	24.76	27.90	25.33	
	g / N	12.93	12.28	13.95	11.60	12.61	11.44	10.83	12.38	13.95	12.67	
27	Sum	28.13	33.71	27.91	29.87	29.19	33.03	28.12	30.03	26.70	27.58	
	g / N	14.07	16.85	13.96	14.93	14.60	16.52	14.06	15.02	13.35	13.79	

The day of first treatment was designated day 1.

<END>

Appendix 1-4. Water consumptions

WATER CONSUMPTIONS												MALE
GROUPS		G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)					
DAYS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
1	Sum	53.40	54.40	49.18	51.69	46.60	49.73	47.01	43.88	56.94	49.99	
	g / N	26.70	27.20	24.59	25.85	23.30	24.87	23.51	21.94	28.47	25.00	
7	Sum	54.43	55.49	48.62	46.63	54.05	44.83	49.47	47.29	49.90	46.25	
	g / N	27.22	27.75	24.31	23.32	27.03	22.42	24.74	23.65	24.95	23.13	
14	Sum	46.72	58.74	47.00	52.28	43.27	47.18	41.09	48.60	52.53	55.39	
	g / N	23.36	29.37	23.50	26.14	21.64	23.59	20.55	24.30	26.27	27.70	
21	Sum	51.79	65.16	51.00	48.11	46.44	45.32	42.81	42.81	48.53	51.10	
	g / N	25.90	32.58	25.50	24.06	23.22	22.66	21.41	21.41	24.27	25.55	
27	Sum	49.87	64.45	50.65	50.94	60.89	50.55	49.19	50.15	53.35	55.72	
	g / N	24.94	32.23	25.33	25.47	30.45	25.28	24.60	25.08	26.68	27.86	
GROUPS		G3 (2000 mg/kg/day)					G4 (5000 mg/kg/day)					
DAYS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
1	Sum	48.77	47.02	51.00	41.34	49.90	54.62	61.41	53.31	49.45	50.08	
	g / N	24.39	23.51	25.50	20.67	24.95	27.31	30.71	26.66	24.73	25.04	
7	Sum	44.21	51.75	51.16	42.64	50.61	56.14	62.86	53.59	47.64	47.65	
	g / N	22.11	25.88	25.58	21.32	25.31	28.07	31.43	26.80	23.82	23.83	
14	Sum	44.23	47.19	49.18	45.38	49.76	49.79	58.51	51.60	55.12	47.69	
	g / N	22.12	23.60	24.59	22.69	24.88	24.90	29.26	25.80	27.56	23.85	
21	Sum	44.84	55.63	47.23	44.98	50.21	52.75	62.14	49.68	48.09	50.38	
	g / N	22.42	27.82	23.62	22.49	25.11	26.38	31.07	24.84	24.05	25.19	
27	Sum	49.57	57.50	57.59	50.11	56.57	61.33	73.89	57.88	53.04	58.61	
	g / N	24.79	28.75	28.80	25.06	28.29	30.67	36.95	28.94	26.52	29.31	

The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-4. Water consumptions

WATER CONSUMPTIONS												FEMALE
GROUPS		G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)					
DAYS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
1	Sum	31.33	29.75	35.21	34.76	37.48	42.63	34.84	27.69	34.67	32.25	
	g / N	15.67	14.88	17.61	17.38	18.74	21.32	17.42	13.85	17.34	16.13	
7	Sum	33.48	27.32	34.31	36.71	31.26	42.47	34.03	36.88	39.39	38.63	
	g / N	16.74	13.66	17.16	18.36	15.63	21.24	17.02	18.44	19.70	19.32	
14	Sum	27.93	35.78	20.87	40.44	30.51	36.39	32.61	31.08	24.13	31.92	
	g / N	13.97	17.89	10.44	20.22	15.26	18.20	16.31	15.54	12.07	15.96	
21	Sum	29.22	31.15	30.08	31.50	40.11	35.16	33.33	30.73	41.99	35.52	
	g / N	14.61	15.58	15.04	15.75	20.06	17.58	16.67	15.37	21.00	17.76	
27	Sum	38.64	40.64	45.56	39.10	43.91	45.70	52.08	46.96	53.61	42.29	
	g / N	19.32	20.32	22.78	19.55	21.96	22.85	26.04	23.48	26.81	21.15	
GROUPS		G3 (2000 mg/kg/day)					G4 (5000 mg/kg/day)					
DAYS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
1	Sum	33.79	32.88	41.14	36.98	37.49	30.51	38.40	26.83	37.07	41.35	
	g / N	16.90	16.44	20.57	18.49	18.75	15.26	19.20	13.42	18.54	20.68	
7	Sum	33.62	33.94	39.93	42.51	30.07	38.62	40.25	32.73	41.84	43.56	
	g / N	16.81	16.97	19.97	21.26	15.04	19.31	20.13	16.37	20.92	21.78	
14	Sum	34.39	35.80	32.73	36.11	33.58	31.60	41.52	33.94	39.44	42.15	
	g / N	17.20	17.90	16.37	18.06	16.79	15.80	20.76	16.97	19.72	21.08	
21	Sum	37.04	32.44	47.66	37.01	38.50	25.92	35.65	27.96	47.35	42.20	
	g / N	18.52	16.22	23.83	18.51	19.25	12.96	17.83	13.98	23.68	21.10	
27	Sum	53.23	55.35	52.72	56.89	43.81	47.53	55.36	40.87	62.21	54.84	
	g / N	26.62	27.68	26.36	28.45	21.91	23.77	27.68	20.44	31.11	27.42	

The day of first treatment was designated day 1.

<END>

Appendix 1–5. Ophthalmological examination

OPHTHALMOLOGICAL EXAMINATION						MALE
G1 (0 mg/kg/day)			G2 (800 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
1	Normal	Normal	11	Normal	Normal	
2	Normal	Normal	12	Normal	Normal	
3	Normal	Normal	13	Normal	Normal	
4	Normal	Normal	14	Normal	Normal	
5	Normal	Normal	15	Normal	Normal	
G3 (2000 mg/kg/day)			G4 (5000 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
21	Normal	Normal	31	Normal	Normal	
22	Normal	Normal	32	Normal	Normal	
23	Normal	Normal	33	Normal	Normal	
24	Normal	Normal	34	Normal	Normal	
25	Normal	Normal	35	Normal	Normal	
						FEMALE
G1 (0 mg/kg/day)			G2 (800 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
41	Normal	Normal	51	Normal	Normal	
42	Normal	Normal	52	Normal	Normal	
43	Normal	Normal	53	Normal	Normal	
44	Normal	Normal	54	Normal	Normal	
45	Normal	Normal	55	Normal	Normal	
G3 (2000 mg/kg/day)			G4 (5000 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
61	Normal	Normal	71	Normal	Normal	
62	Normal	Normal	72	Normal	Normal	
63	Normal	Normal	73	Normal	Normal	
64	Normal	Normal	74	Normal	Normal	
65	Normal	Normal	75	Normal	Normal	

Appendix 1–6. Urinalysis

ANIMAL ID	URINALYSIS											MALE
	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO	NIT	BLO	CLARITY	COLOR	VOLUME (mL)
G1 (0 mg/kg/day)												
1	-	-	-	≤1.005	8.0	+/-	0.2	-	+/-	-	Y	17
2	-	-	-	1.010	7.5	-	0.2	-	-	-	Y	21
3	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.2	-	-	-	Y	25
4	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.2	-	-	-	Y	17
5	-	-	-	1.010	7.5	1+	0.2	-	2+	-	Y	19
G2 (800 mg/kg/day)												
11	-	-	-	≤1.005	7.5	+/-	0.2	-	-	-	Y	25
12	-	-	-	1.010	8.0	1+	0.2	-	+/-	-	Y	23
13	-	-	-	≤1.005	8.0	1+	0.2	+	-	-	Y	13
14	-	-	-	1.010	8.0	+/-	0.2	-	-	-	Y	21
15	-	-	-	≤1.005	8.0	1+	0.2	-	-	-	Y	17
G3 (2000 mg/kg/day)												
21	-	-	-	1.010	7.5	1+	0.2	-	+/-	-	Y	11
22	-	-	-	1.010	8.0	1+	0.2	-	1+	-	Y	21
23	-	-	-	≤1.005	8.0	+/-	0.2	-	-	-	Y	21
24	-	-	+/-	1.010	8.0	2+	0.2	-	-	-	Y	21
25	-	-	-	1.015	8.0	2+	0.2	-	+/-	-	Y	25
G4 (5000 mg/kg/day)												
31	-	-	1+	1.025	7.0	2+	2.0	-	-	-	Y	23
32	-	-	+/-	1.015	7.5	2+	1.0	-	-	-	Y	21
33	-	-	-	≤1.005	8.5	1+	0.2	-	+/-	-	Y	35
34	-	-	-	1.010	8.5	1+	0.2	-	+/-	-	Y	29
35	-	1+	+/-	1.015	8.5	3+	0.2	+	2+	-	Y	17

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, BLO: Occult blood, C: Clear, Y: Yellow.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	BLO (EA/μL)	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.2	Negative	Negative	Clear
+/-	1	Trace	Trace	Trace	Trace	1.0	NA	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Turbid
3+	4	≥1,000	Large	≥80	≥300	≥8.0	NA	Large	Other

NA: not applicable.

<CONTINUED>

Appendix 1–6. Urinalysis

ANIMAL ID	URINALYSIS											FEMALE
	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO	NIT	BLO	CLARITY	COLOR	VOLUME (mL)
G1 (0 mg/kg/day)												
41	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.2	-	-	-	Y	29
42	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.2	-	-	-	Y	11
43	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.2	-	-	-	Y	21
44	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.2	-	-	-	Y	17
45	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.2	-	-	-	Y	19
G2 (800 mg/kg/day)												
51	-	-	-	≤1.005	8.5	-	0.2	-	-	-	Y	15
52	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.2	-	-	-	Y	15
53	-	-	-	≤1.005	7.5	-	0.2	-	-	-	Y	15
54	-	-	-	1.010	8.5	-	0.2	-	-	-	Y	15
55	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.2	-	-	-	Y	17
G3 (2000 mg/kg/day)												
61	-	-	-	1.010	8.5	-	0.2	-	-	-	Y	13
62	-	-	-	≤1.005	8.5	-	0.2	-	-	-	Y	18
63	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.2	+	-	-	Y	13
64	-	-	-	≤1.005	≥9.0	-	0.2	+	-	-	Y	11
65	-	-	-	1.010	8.5	-	0.2	-	-	-	Y	17
G4 (5000 mg/kg/day)												
71	-	-	-	1.020	6.5	+/-	1.0	+	-	-	Y	12
72	-	-	-	1.010	7.0	1+	0.2	-	-	-	Y	17
73	-	-	-	≤1.005	8.5	-	0.2	-	-	-	Y	21
74	-	-	-	1.020	6.5	+/-	1.0	-	-	-	Y	13
75	-	-	-	≥1.030	6.0	1+	1.0	-	-	-	Y	9

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, BLO: Occult blood, C: Clear, Y: Yellow.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	BLO (EA/μL)	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.2	Negative	Negative	Clear
+/-	1	Trace	Trace	Trace	Trace	1.0	NA	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Turbid
3+	4	≥1,000	Large	≥80	≥300	≥8.0	NA	Large	Other

NA: not applicable.

<END>

Appendix 1-7. Urine sediments

URINE SEDIMENTS										
MALE										
GROUPS	G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	1	2	3	4	5	11	12	13	14	15
RBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPITHELIAL CELL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASTS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GROUPS	G3 (2000 mg/kg/day)					G4 (5000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	21	22	23	24	25	31	32	33	34	35
RBC	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
WBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPITHELIAL CELL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASTS	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-
FEMALE										
GROUPS	G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	41	42	43	44	45	51	52	53	54	55
RBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPITHELIAL CELL	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
CASTS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GROUPS	G3 (2000 mg/kg/day)					G4 (5000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	61	62	63	64	65	71	72	73	74	75
RBC	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
WBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPITHELIAL CELL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASTS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Grade	Result	RBC (mean/field)	WBC (mean/field)	Epithelial Cell	Casts (mean/field)
0	-	0	0	0/20 field	0
1	+/-	≤4	≤5	Few/20 field	1
2	1+	5-8	6-20	Around 1/few field	2-5
3	2+	9-30	21-50	Few/field	6-10
4	3+	31≤(local)	51≤(local)	10-20/field	11-30
5	4+	All over the field	All over the field	30≤/field	31≤

Appendix 1–8. Hematological test

GROUP		HEMATOLOGICAL TEST										MALE
GROUP		G1 (0 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
RBC	10 ⁶ /μL	7.98	7.80	8.17	8.00	8.02	7.96	8.11	8.06	8.09	8.10	
HGB	g/dL	15.2	15.3	14.9	15.0	15.0	14.4	15.1	15.3	14.6	15.2	
HCT	%	46.0	46.2	45.3	45.5	45.6	43.5	45.8	47.3	44.6	47.0	
MCV	fL	57.7	59.1	55.4	56.8	56.9	54.6	56.5	58.7	55.1	58.0	
MCH	pg	19.1	19.6	18.3	18.8	18.7	18.1	18.6	18.9	18.1	18.8	
MCHC	g/dL	33.1	33.1	33.0	33.1	32.8	33.1	32.9	32.3	32.8	32.3	
RDW	%	10.8	11.0	11.2	10.9	10.8	11.0	10.7	11.4	11.1	10.8	
HDW	g/dL	2.25	2.45	2.54	2.36	2.31	2.38	2.17	2.37	2.37	2.20	
RET	%	2.32	2.81	3.00	2.55	2.25	2.56	2.54	3.33	2.77	2.95	
PLT	10 ³ /μL	1007	915	964	1120	995	1043	1043	1048	958	927	
MPV	fL	5.0	5.7	5.4	5.5	5.2	5.5	5.8	5.2	5.4	5.1	
WBC	10 ³ /μL	7.78	11.53	8.45	8.25	9.82	8.82	8.24	10.87	9.26	10.65	
NEU	%	7.4	6.4	12.5	12.3	8.9	13.7	19.2	13.3	22.4	15.3	
LYM	%	86.2	88.5	82.7	80.4	81.9	78.2	75.7	81.3	73.0	78.1	
MONO	%	4.0	3.3	3.5	4.6	6.0	5.9	3.7	3.8	2.9	4.8	
EOS	%	0.7	0.7	0.6	1.3	1.6	0.8	0.6	0.6	1.2	0.4	
BASO	%	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	
LUC	%	1.6	0.9	0.5	1.1	1.5	1.3	0.7	0.7	0.2	1.2	
PT	sec	9.15	8.85	8.70	9.00	8.55	9.00	8.70	9.00	9.45	8.85	
APTT	sec	18.3	18.8	17.3	19.1	18.0	17.1	18.9	17.9	17.3	17.9	
GROUP		G2 (800 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
RBC	10 ⁶ /μL	7.91	7.99	7.85	7.68	8.36	8.12	7.97	7.81	8.13	7.89	
HGB	g/dL	15.1	15.0	15.2	14.5	15.3	15.5	14.9	14.6	15.6	15.0	
HCT	%	45.4	45.8	45.8	44.1	46.7	47.3	45.3	44.4	46.8	45.5	
MCV	fL	57.4	57.4	58.3	57.4	55.8	58.2	56.9	56.9	57.6	57.6	
MCH	pg	19.0	18.7	19.3	18.9	18.3	19.1	18.7	18.7	19.2	19.0	
MCHC	g/dL	33.2	32.6	33.2	32.9	32.7	32.8	32.9	32.9	33.2	32.9	
RDW	%	11.0	10.8	10.8	10.5	11.0	10.8	10.7	11.0	11.0	11.0	
HDW	g/dL	2.33	2.28	2.35	2.28	2.12	2.30	2.33	2.48	2.30	2.36	
RET	%	2.61	2.34	2.71	2.69	2.70	3.00	3.02	2.85	2.98	2.93	
PLT	10 ³ /μL	1043	1038	1042	1111	1194	972	1032	984	982	957	
MPV	fL	5.1	5.4	5.7	5.4	5.9	6.0	5.9	5.4	5.2	5.5	
WBC	10 ³ /μL	11.87	10.38	8.81	8.57	10.64	10.87	5.92	8.91	10.13	8.32	
NEU	%	10.1	10.2	8.4	11.0	7.6	12.4	15.1	13.4	9.1	11.2	
LYM	%	85.2	85.2	83.6	80.5	85.8	82.6	76.7	80.6	85.4	80.7	
MONO	%	3.0	2.4	5.6	5.7	4.7	3.7	6.0	4.3	3.9	6.0	
EOS	%	0.6	1.5	1.0	1.3	1.0	0.4	1.3	0.6	0.7	0.9	
BASO	%	0.3	0.2	1.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	
LUC	%	0.9	0.5	0.2	1.2	0.7	0.7	0.8	1.0	0.6	1.1	
PT	sec	9.90	9.15	9.60	9.45	9.45	9.75	9.00	9.15	8.55	9.00	
APTT	sec	18.8	19.5	18.0	16.5	17.4	18.3	14.7	18.3	15.3	15.8	

<CONTINUED>

Appendix 1–8. Hematological test

GROUP		HEMATOLOGICAL TEST										MALE
GROUP		G3 (2000 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
RBC	10 ⁶ /μL	8.26	8.17	8.08	7.06	8.03	8.22	8.02	7.87	7.80	8.26	
HGB	g/dL	15.4	15.2	15.4	14.4	15.2	15.6	14.4	14.7	14.8	15.5	
HCT	%	46.7	45.6	45.9	44.2	45.7	46.6	43.9	44.0	44.4	47.2	
MCV	fL	56.6	55.8	56.8	62.6	56.9	56.7	54.7	56.0	56.9	57.1	
MCH	pg	18.6	18.6	19.0	20.4	18.9	19.0	18.0	18.6	18.9	18.8	
MCHC	g/dL	32.9	33.4	33.5	32.5	33.3	33.5	32.8	33.3	33.3	32.9	
RDW	%	10.7	10.7	10.6	11.3	10.8	10.6	10.7	10.8	10.9	10.9	
HDW	g/dL	2.21	2.19	2.34	2.39	2.39	2.29	2.25	2.49	2.48	2.17	
RET	%	1.97	1.96	2.49	3.06	2.88	2.69	2.29	2.99	2.82	2.90	
PLT	10 ³ /μL	1133	1026	1079	1265	1058	959	965	910	956	1187	
MPV	fL	5.7	5.7	5.4	6.0	6.0	5.7	5.6	5.8	5.7	5.3	
WBC	10 ³ /μL	12.53	8.03	10.31	6.75	10.74	10.53	9.54	8.67	8.56	11.42	
NEU	%	10.0	7.1	12.2	10.5	13.3	15.0	25.6	17.3	21.1	10.4	
LYM	%	82.9	89.1	83.0	83.1	78.5	79.6	66.9	72.7	71.9	82.8	
MONO	%	4.1	2.1	2.4	4.4	5.5	3.6	4.8	7.0	5.0	4.9	
EOS	%	1.6	0.9	1.4	0.5	1.3	0.8	1.5	1.7	0.9	0.4	
BASO	%	0.3	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1	0.3	
LUC	%	1.1	0.6	0.7	1.4	1.3	0.8	1.0	1.0	1.0	1.2	
PT	sec	9.90	9.90	9.15	9.00	9.30	9.45	9.00	8.70	9.30	9.15	
APTT	sec	20.0	20.0	17.9	15.5	18.8	16.8	17.6	16.7	17.7	18.5	
GROUP		G4 (5000 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
RBC	10 ⁶ /μL	8.01	8.34	8.10	8.44	8.18	8.21	8.17	8.17	7.64	8.08	
HGB	g/dL	15.0	15.8	15.2	15.8	15.1	15.1	15.3	15.6	15.0	15.5	
HCT	%	45.6	47.5	46.2	47.9	46.4	45.9	46.2	47.9	46.0	48.0	
MCV	fL	56.9	56.9	57.0	56.8	56.7	55.9	56.6	58.6	60.3	59.4	
MCH	pg	18.8	18.9	18.7	18.7	18.5	18.3	18.7	19.1	19.6	19.2	
MCHC	g/dL	33.0	33.3	32.8	32.9	32.6	32.8	33.0	32.6	32.6	32.4	
RDW	%	10.9	10.8	11.2	10.8	10.9	10.9	10.7	11.3	11.2	10.9	
HDW	g/dL	2.17	2.37	2.35	2.33	2.25	2.28	2.36	2.33	2.36	2.17	
RET	%	2.69	2.30	2.26	2.11	2.25	2.39	2.46	3.07	2.74	2.78	
PLT	10 ³ /μL	954	913	985	1077	990	1045	993	992	1137	1023	
MPV	fL	5.2	5.5	5.5	5.6	5.6	5.7	5.6	5.4	6.0	5.6	
WBC	10 ³ /μL	10.61	10.05	9.68	8.98	8.06	13.00	10.33	9.43	10.84	9.56	
NEU	%	4.6	8.7	11.7	7.5	8.9	17.5	9.2	9.6	9.4	7.3	
LYM	%	92.1	86.4	83.2	86.4	84.3	77.0	83.7	84.1	83.4	87.0	
MONO	%	1.9	3.0	3.4	3.8	4.2	4.0	4.8	4.2	4.9	4.1	
EOS	%	0.5	1.0	0.6	1.1	1.4	0.7	1.1	0.7	1.2	0.5	
BASO	%	0.2	0.2	0.2	0.4	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	
LUC	%	0.7	0.7	0.9	1.0	0.9	0.6	1.0	1.2	0.9	0.8	
PT	sec	8.85	9.00	9.15	9.45	9.15	8.70	9.30	9.15	9.75	8.70	
APTT	sec	19.4	18.2	18.5	18.9	18.9	17.7	18.6	17.6	16.8	18.3	

<CONTINUED>

Appendix 1–8. Hematological test

GROUP		HEMATOLOGICAL TEST										FEMALE
GROUP		G1 (0 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
RBC	10 ⁶ /μL	7.55	7.32	7.79	7.53	7.48	7.74	7.91	7.75	7.42	7.69	
HGB	g/dL	14.0	13.7	14.2	14.1	13.7	13.6	14.6	14.2	14.1	14.6	
HCT	%	41.9	40.6	42.0	41.8	40.5	41.2	43.9	42.0	42.0	43.9	
MCV	fL	55.4	55.5	53.9	55.5	54.1	53.2	55.5	54.2	56.5	57.1	
MCH	pg	18.5	18.7	18.2	18.7	18.4	17.6	18.5	18.3	19.1	19.0	
MCHC	g/dL	33.4	33.6	33.7	33.7	33.9	33.1	33.3	33.8	33.7	33.3	
RDW	%	10.6	10.3	10.2	10.7	10.4	10.2	10.2	9.9	10.5	10.7	
HDW	g/dL	2.48	2.41	2.31	2.45	2.40	2.22	2.23	2.27	2.52	2.34	
RET	%	3.08	2.60	2.42	3.13	2.44	2.58	2.31	1.96	2.72	3.47	
PLT	10 ³ /μL	1071	1033	1090	1114	1178	982	931	1087	1030	998	
MPV	fL	4.8	5.0	4.8	5.7	5.4	5.4	5.4	5.0	5.3	5.0	
WBC	10 ³ /μL	5.48	4.83	6.76	8.38	4.49	3.49	5.26	5.29	6.02	5.89	
NEU	%	10.0	14.1	9.3	24.1	10.2	12.0	9.3	5.7	17.7	15.5	
LYM	%	83.5	80.5	85.6	69.5	84.6	81.3	83.8	89.0	77.7	78.5	
MONO	%	4.4	3.2	2.7	4.6	3.2	3.8	4.7	2.9	2.9	3.6	
EOS	%	1.2	1.5	1.3	0.8	1.2	1.9	0.9	1.6	1.1	1.4	
BASO	%	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	
LUC	%	0.7	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	0.6	0.5	0.8	
PT	sec	8.85	9.30	8.70	9.15	9.00	9.00	8.85	8.70	8.85	8.70	
APTT	sec	18.3	18.0	17.6	18.5	17.9	18.5	17.3	15.3	18.3	17.6	
GROUP		G2 (800 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
RBC	10 ⁶ /μL	7.58	7.21	7.61	7.47	7.67	7.44	7.34	7.69	8.20	7.88	
HGB	g/dL	14.5	13.8	14.4	13.6	14.1	13.7	14.1	14.5	14.2	14.5	
HCT	%	43.0	40.7	42.8	40.8	42.1	41.0	40.5	42.7	43.0	42.2	
MCV	fL	56.8	56.5	56.2	54.6	54.9	55.1	55.1	55.5	52.4	53.5	
MCH	pg	19.1	19.1	18.9	18.2	18.4	18.4	19.1	18.8	17.4	18.4	
MCHC	g/dL	33.6	33.9	33.7	33.4	33.6	33.4	34.7	33.9	33.1	34.4	
RDW	%	10.1	10.5	10.4	10.5	10.2	10.3	10.1	10.4	10.2	10.0	
HDW	g/dL	2.29	2.54	2.39	2.20	2.24	2.46	2.39	2.36	2.29	2.35	
RET	%	2.55	2.71	2.57	3.62	2.49	2.54	2.49	2.77	2.18	1.55	
PLT	10 ³ /μL	1038	1077	1192	985	1049	956	801	1120	1219	1093	
MPV	fL	5.0	4.9	5.3	5.4	4.9	5.1	5.2	5.5	5.3	4.7	
WBC	10 ³ /μL	5.19	7.14	8.33	4.63	7.45	4.97	3.43	5.31	5.07	5.79	
NEU	%	9.3	8.4	7.8	12.6	12.6	12.3	16.7	12.8	7.6	9.5	
LYM	%	85.4	86.6	87.7	83.8	82.4	80.0	75.7	81.4	84.0	84.9	
MONO	%	2.8	2.2	2.9	2.0	3.4	5.4	4.9	3.0	4.4	3.8	
EOS	%	2.0	1.9	0.8	1.1	1.0	1.3	1.3	1.8	2.1	1.1	
BASO	%	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.4	0.1	
LUC	%	0.4	0.6	0.7	0.5	0.6	0.9	1.1	0.8	1.5	0.6	
PT	sec	8.55	9.30	8.40	9.00	9.00	9.45	9.15	9.00	9.00	8.55	
APTT	sec	17.9	17.9	19.2	17.3	15.6	17.0	18.0	17.0	16.7	17.6	

<CONTINUED>

Appendix 1–8. Hematological test

GROUP		HEMATOLOGICAL TEST										FEMALE
GROUP		G3 (2000 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	
RBC	10 ⁶ /μL	7.40	7.51	7.86	7.48	7.37	8.07	7.99	7.92	7.76	7.90	
HGB	g/dL	13.7	14.3	14.3	14.0	13.9	15.2	15.1	15.1	14.6	14.4	
HCT	%	41.5	41.9	42.5	42.0	41.6	45.1	45.7	44.3	43.3	43.8	
MCV	fL	56.1	55.7	54.0	56.2	56.5	56.0	57.2	55.9	55.8	55.4	
MCH	pg	18.6	19.0	18.2	18.7	18.9	18.8	18.9	19.0	18.8	18.3	
MCHC	g/dL	33.1	34.0	33.7	33.3	33.5	33.6	33.0	34.0	33.7	33.0	
RDW	%	10.8	10.5	10.1	10.7	10.1	10.3	10.3	10.7	10.6	10.4	
HDW	g/dL	2.25	2.35	2.28	2.36	2.36	2.45	2.35	2.64	2.70	2.41	
RET	%	3.90	2.47	2.09	3.80	2.66	3.03	3.17	3.13	2.79	2.84	
PLT	10 ³ /μL	1131	1141	1125	1250	929	1020	1024	1040	1081	1353	
MPV	fL	5.2	5.0	5.2	5.0	5.4	5.6	5.4	5.1	5.7	5.2	
WBC	10 ³ /μL	7.28	7.52	6.38	7.06	5.45	7.60	4.62	6.16	5.18	5.41	
NEU	%	5.0	9.9	9.0	10.8	13.9	8.8	10.8	18.9	10.3	8.8	
LYM	%	88.7	84.9	84.3	83.9	80.3	85.7	82.8	75.3	83.2	87.4	
MONO	%	4.6	2.9	3.8	3.2	3.5	3.3	3.4	4.0	3.8	2.2	
EOS	%	0.6	1.5	2.0	1.0	1.3	0.9	2.2	1.0	1.2	0.7	
BASO	%	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3	0.2	
LUC	%	0.9	0.6	0.6	0.9	0.8	1.1	0.7	0.7	1.2	0.8	
PT	sec	9.00	9.15	9.15	8.85	8.85	8.40	8.70	9.00	8.85	9.00	
APTT	sec	18.5	18.9	17.3	17.3	18.2	17.6	16.7	17.1	16.7	17.4	
GROUP		G4 (5000 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
RBC	10 ⁶ /μL	7.62	7.27	7.66	7.91	7.78	8.01	7.63	8.43	7.79	7.83	
HGB	g/dL	14.6	14.1	14.2	14.7	14.2	14.6	14.5	14.7	14.0	14.9	
HCT	%	43.1	41.6	42.3	43.2	43.0	43.1	43.4	44.4	42.2	44.5	
MCV	fL	56.5	57.3	55.2	54.6	55.2	53.9	56.9	52.7	54.2	56.9	
MCH	pg	19.1	19.4	18.5	18.6	18.2	18.2	19.0	17.5	18.0	19.0	
MCHC	g/dL	33.8	33.9	33.5	34.1	33.0	33.7	33.4	33.1	33.3	33.4	
RDW	%	10.5	10.6	10.2	10.1	10.2	10.1	10.5	10.6	10.6	10.4	
HDW	g/dL	2.34	2.54	2.31	2.22	2.23	2.24	2.39	2.12	2.34	2.30	
RET	%	2.98	3.12	1.99	1.86	2.10	1.98	3.47	2.32	3.02	2.54	
PLT	10 ³ /μL	1212	1010	1107	1094	1076	1143	968	1033	1289	1065	
MPV	fL	4.8	4.9	4.9	5.3	5.6	5.3	5.3	5.3	5.1	5.1	
WBC	10 ³ /μL	5.99	7.62	6.48	6.98	6.18	6.37	8.11	8.02	9.58	6.17	
NEU	%	9.5	7.6	9.7	9.7	13.2	9.5	13.2	19.1	13.8	6.6	
LYM	%	82.8	88.2	83.4	86.0	82.0	84.5	81.3	74.3	79.8	85.8	
MONO	%	5.4	2.5	2.8	2.5	2.6	3.7	3.7	4.7	4.0	4.6	
EOS	%	1.2	1.1	3.1	1.2	1.0	1.4	0.9	0.8	1.1	1.7	
BASO	%	0.1	0.1	0.3	0.1	0.2	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2	
LUC	%	1.1	0.5	0.7	0.6	0.9	0.7	0.7	0.8	1.0	1.2	
PT	sec	9.30	9.30	9.45	9.15	9.00	8.55	9.15	9.30	8.70	9.15	
APTT	sec	16.8	18.6	17.9	18.5	16.2	17.1	17.7	17.4	18.8	16.7	

<END>

Appendix 1–9. Clinical biochemistry test

		CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST										MALE
GROUP		G1 (0 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
AST	U/L	78.4	73.2	64.4	100.0	116.3	76.9	88.6	89.9	85.1	77.9	
ALT	U/L	30.6	28.9	28.9	39.8	44.7	28.4	32.0	39.6	39.6	32.9	
ALP	U/L	126.9	115.2	115.5	196.1	165.4	141.0	112.9	145.6	120.0	140.5	
CPK	U/L	250	249	189	211	250	143	263	278	153	189	
TBIL	mg/dL	0.14	0.16	0.13	0.14	0.13	0.14	0.13	0.15	0.13	0.15	
GLU	mg/dL	114.3	109.9	107.2	115.5	115.3	115.7	102.8	105.6	94.0	111.0	
TCHO	mg/dL	87	93	104	97	95	86	88	82	78	90	
TG	mg/dL	42	58	42	42	41	41	40	44	34	56	
TP	g/dL	5.60	5.81	5.58	6.03	5.65	5.73	5.68	6.04	5.49	6.14	
ALB	g/dL	2.97	3.07	2.98	3.14	3.01	2.95	3.07	3.27	2.97	3.30	
A/G	ratio	1.13	1.12	1.15	1.09	1.14	1.06	1.18	1.18	1.18	1.16	
BUN	mg/dL	15.3	14.1	15.1	17.5	15.1	15.1	16.5	16.2	11.6	16.2	
CRE	mg/dL	0.41	0.42	0.38	0.45	0.42	0.42	0.42	0.42	0.37	0.48	
IP	mg/dL	7.83	8.20	8.20	7.99	7.60	7.87	7.71	7.84	7.50	7.65	
Ca ²⁺	mg/dL	9.69	10.40	10.01	10.16	10.10	10.17	9.85	10.29	9.97	10.16	
Na ⁺	mmol/L	142.42	140.69	140.82	140.78	139.96	141.12	141.34	140.60	142.51	140.22	
K ⁺	mmol/L	4.84	5.17	5.04	5.16	4.88	5.03	4.96	5.15	4.33	4.78	
Cl ⁻	mmol/L	103.18	102.43	102.43	102.74	102.30	102.33	101.48	101.52	105.40	101.89	
GROUP		G2 (800 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
AST	U/L	78.7	96.8	74.1	74.5	76.9	78.8	95.8	104.1	86.6	90.9	
ALT	U/L	29.4	34.4	31.7	33.7	36.7	34.8	36.4	33.8	43.1	33.7	
ALP	U/L	112.6	147.3	125.3	112.6	111.1	135.1	135.3	148.1	139.3	114.1	
CPK	U/L	207	256	194	202	157	198	434	316	122	283	
TBIL	mg/dL	0.15	0.13	0.13	0.14	0.12	0.14	0.12	0.13	0.13	0.14	
GLU	mg/dL	120.9	137.3	106.9	92.6	125.1	107.9	104.3	101.4	104.1	124.3	
TCHO	mg/dL	79	77	88	79	49	87	95	83	104	79	
TG	mg/dL	57	33	29	35	58	37	53	43	49	50	
TP	g/dL	5.57	5.93	5.66	5.38	5.56	5.55	5.81	5.70	5.87	5.46	
ALB	g/dL	2.99	3.16	3.04	2.82	2.99	2.98	3.08	3.07	3.11	2.90	
A/G	ratio	1.16	1.14	1.16	1.10	1.16	1.16	1.13	1.17	1.13	1.13	
BUN	mg/dL	16.9	16.1	18.4	19.7	16.9	20.2	15.9	16.1	17.3	17.7	
CRE	mg/dL	0.46	0.46	0.44	0.42	0.42	0.52	0.41	0.39	0.39	0.40	
IP	mg/dL	7.73	8.02	8.20	7.99	7.68	8.08	7.87	7.65	8.39	8.33	
Ca ²⁺	mg/dL	9.88	9.97	9.69	9.61	10.09	9.75	10.04	9.97	10.04	9.82	
Na ⁺	mmol/L	141.90	141.03	141.34	140.30	139.79	142.03	141.90	140.52	140.99	141.64	
K ⁺	mmol/L	4.81	4.88	4.71	5.00	4.84	4.56	4.81	5.11	4.96	4.97	
Cl ⁻	mmol/L	103.18	102.13	102.74	102.47	102.47	102.36	102.30	102.88	101.38	103.01	

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Clinical biochemistry test

GROUP		CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST										MALE
GROUP		G3 (2000 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
AST	U/L	69.8	71.3	70.0	60.6	90.5	80.8	92.1	134.9	82.3	77.5	
ALT	U/L	30.8	29.6	35.9	24.9	36.8	35.5	30.8	87.7	33.3	30.8	
ALP	U/L	157.6	125.3	138.7	154.4	138.3	160.6	129.3	89.1	126.5	125.9	
CPK	U/L	160	132	138	110	281	259	357	220	119	240	
TBIL	mg/dL	0.13	0.14	0.13	0.14	0.14	0.12	0.12	0.13	0.14	0.14	
GLU	mg/dL	133.3	112.5	123.9	112.3	94.5	120.5	111.3	106.4	120.9	112.0	
TCHO	mg/dL	81	83	75	82	106	66	81	80	70	73	
TG	mg/dL	48	35	40	45	50	33	41	44	37	59	
TP	g/dL	5.58	5.62	5.83	5.42	5.85	5.53	5.58	5.63	5.65	5.88	
ALB	g/dL	2.90	2.96	3.12	2.88	3.03	2.97	2.93	2.83	2.99	3.11	
A/G	ratio	1.08	1.11	1.15	1.13	1.07	1.16	1.11	1.01	1.12	1.12	
BUN	mg/dL	17.9	18.0	16.3	16.0	18.9	20.2	16.6	16.8	16.1	15.5	
CRE	mg/dL	0.43	0.43	0.44	0.39	0.45	0.48	0.43	0.44	0.40	0.38	
IP	mg/dL	8.30	7.66	7.66	7.85	7.90	7.72	7.44	8.36	8.00	8.46	
Ca ²⁺	mg/dL	10.05	9.65	9.92	9.78	10.02	9.65	9.62	9.79	10.02	10.34	
Na ⁺	mmol/L	141.47	140.60	141.16	140.78	141.72	140.99	140.26	140.52	141.03	140.99	
K ⁺	mmol/L	5.11	4.82	4.68	4.58	4.83	4.94	5.18	4.68	4.70	5.29	
Cl ⁻	mmol/L	102.67	102.53	101.89	102.26	102.13	101.82	101.86	101.79	102.43	100.61	
GROUP		G4 (5000 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
AST	U/L	63.8	67.0	59.7	75.8	100.9	92.1	95.1	89.6	98.0	71.1	
ALT	U/L	33.9	32.8	40.4	39.4	43.6	34.0	33.9	37.7	38.9	36.3	
ALP	U/L	142.0	121.5	161.5	105.0	187.8	168.8	109.1	156.1	117.5	113.5	
CPK	U/L	160	151	116	159	220	245	373	288	156	122	
TBIL	mg/dL	0.12	0.14	0.14	0.13	0.14	0.13	0.13	0.13	0.12	0.13	
GLU	mg/dL	153.8	146.5	151.2	126.8	108.8	127.6	115.1	117.6	101.0	133.1	
TCHO	mg/dL	71	79	72	69	83	85	73	66	79	96	
TG	mg/dL	47	53	24	32	40	51	48	36	48	54	
TP	g/dL	5.60	5.58	5.71	5.93	5.82	5.84	5.91	5.89	5.54	5.86	
ALB	g/dL	2.95	2.96	3.05	3.15	3.13	3.16	3.10	3.22	2.92	3.09	
A/G	ratio	1.11	1.13	1.15	1.13	1.16	1.18	1.10	1.21	1.11	1.12	
BUN	mg/dL	17.1	17.6	24.1	15.1	18.3	22.2	15.2	17.8	16.4	19.8	
CRE	mg/dL	0.39	0.45	0.42	0.41	0.42	0.54	0.40	0.44	0.39	0.42	
IP	mg/dL	7.42	7.51	7.90	7.50	7.26	8.16	8.40	7.59	8.27	8.13	
Ca ²⁺	mg/dL	10.02	9.93	10.13	9.88	9.89	10.03	10.07	10.24	9.97	10.13	
Na ⁺	mmol/L	140.56	140.56	140.82	139.83	139.75	139.28	140.82	141.34	140.18	140.09	
K ⁺	mmol/L	4.92	4.89	4.94	4.90	5.28	4.83	5.40	5.00	5.06	4.62	
Cl ⁻	mmol/L	101.58	101.15	103.12	101.72	101.08	99.31	100.51	102.33	102.60	99.91	

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Clinical biochemistry test

		CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST										FEMALE
GROUP		G1 (0 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
AST	U/L	81.3	106.0	113.4	90.7	92.7	84.2	97.1	84.7	97.8	86.8	
ALT	U/L	29.3	37.5	32.5	29.8	29.3	29.5	36.7	30.8	26.5	27.5	
ALP	U/L	103.1	85.6	97.4	70.3	97.1	111.9	83.9	100.1	81.5	75.9	
CPK	U/L	196	282	264	251	178	193	288	230	220	215	
TBIL	mg/dL	0.17	0.16	0.14	0.17	0.14	0.14	0.15	0.16	0.17	0.17	
GLU	mg/dL	115.4	113.7	110.2	106.6	111.0	107.6	102.1	91.0	94.4	129.2	
TCHO	mg/dL	117	102	100	113	105	101	93	109	101	104	
TG	mg/dL	31	58	36	52	20	25	36	45	27	32	
TP	g/dL	5.41	5.52	5.45	6.12	5.59	5.56	5.56	5.54	5.60	5.64	
ALB	g/dL	2.95	2.92	2.95	3.29	3.07	2.98	3.05	3.04	3.08	2.99	
A/G	ratio	1.20	1.12	1.18	1.16	1.22	1.16	1.22	1.22	1.22	1.13	
BUN	mg/dL	16.1	18.4	18.6	17.3	17.1	16.0	19.4	21.0	17.0	20.7	
CRE	mg/dL	0.42	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.48	0.51	0.48	0.60	
IP	mg/dL	7.73	6.11	6.69	6.05	7.02	6.24	6.77	7.11	7.10	7.89	
Ca ²⁺	mg/dL	9.44	9.45	9.44	9.67	9.74	9.56	9.27	9.41	9.24	9.75	
Na ⁺	mmol/L	139.45	138.58	137.89	137.46	138.45	139.84	138.53	136.64	136.13	140.28	
K ⁺	mmol/L	4.73	4.81	5.17	4.77	4.59	4.57	4.29	4.36	4.33	5.27	
Cl ⁻	mmol/L	102.83	102.32	102.22	101.07	101.91	104.03	102.49	98.98	101.61	102.45	
GROUP		G2 (800 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
AST	U/L	78.9	92.8	82.7	100.7	83.3	108.5	78.1	70.1	129.9	96.8	
ALT	U/L	21.5	30.9	30.4	30.8	36.0	38.0	27.8	22.3	31.6	32.2	
ALP	U/L	61.2	69.6	134.9	127.4	99.6	101.0	80.8	99.5	114.4	89.2	
CPK	U/L	202	226	214	285	159	286	197	91	290	277	
TBIL	mg/dL	0.17	0.17	0.18	0.18	0.15	0.14	0.13	0.15	0.14	0.14	
GLU	mg/dL	120.3	110.6	112.9	109.1	102.7	93.7	96.3	103.7	99.0	94.9	
TCHO	mg/dL	113	88	109	81	100	96	90	103	113	102	
TG	mg/dL	33	48	60	34	46	34	28	34	30	40	
TP	g/dL	5.75	5.37	5.91	5.50	5.47	5.37	5.43	5.43	5.74	5.44	
ALB	g/dL	3.11	2.99	3.27	3.06	2.97	3.02	2.99	2.98	3.15	2.97	
A/G	ratio	1.18	1.26	1.24	1.25	1.19	1.29	1.23	1.22	1.22	1.20	
BUN	mg/dL	18.1	17.4	18.7	17.7	18.3	19.0	22.1	14.7	19.4	21.1	
CRE	mg/dL	0.56	0.48	0.44	0.48	0.47	0.49	0.64	0.42	0.47	0.58	
IP	mg/dL	7.74	7.00	6.86	6.26	5.92	5.88	8.53	6.50	7.06	7.08	
Ca ²⁺	mg/dL	10.02	9.54	10.12	9.51	9.41	8.93	9.25	9.68	9.51	9.00	
Na ⁺	mmol/L	138.58	138.41	137.16	138.84	138.84	139.97	139.32	136.56	137.33	138.97	
K ⁺	mmol/L	4.79	4.65	4.74	4.50	4.07	4.50	5.09	4.45	4.86	4.79	
Cl ⁻	mmol/L	100.74	100.54	100.57	102.69	103.82	104.27	102.96	103.00	101.44	103.00	

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Clinical biochemistry test

GROUP		CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST										FEMALE
GROUP		G3 (2000 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	
AST	U/L	73.2	90.2	94.5	96.9	91.3	84.7	85.9	82.3	105.6	117.1	
ALT	U/L	27.7	25.0	26.0	27.3	31.2	34.3	27.4	29.2	31.4	26.2	
ALP	U/L	70.1	87.7	101.6	102.6	80.3	74.6	73.8	54.1	88.0	72.0	
CPK	U/L	169	238	327	291	152	159	178	128	274	443	
TBIL	mg/dL	0.18	0.15	0.15	0.16	0.16	0.15	0.10	0.14	0.18	0.17	
GLU	mg/dL	135.2	111.6	99.8	97.7	101.9	137.0	104.5	109.9	99.2	105.0	
TCHO	mg/dL	95	84	91	113	78	120	106	104	115	99	
TG	mg/dL	38	41	47	40	34	30	25	33	34	35	
TP	g/dL	5.60	5.33	5.25	5.62	5.71	5.46	5.61	5.70	5.71	5.79	
ALB	g/dL	3.08	2.99	2.85	3.09	3.23	3.02	3.03	3.12	3.13	3.17	
A/G	ratio	1.22	1.28	1.19	1.22	1.30	1.24	1.17	1.21	1.21	1.21	
BUN	mg/dL	18.6	18.8	18.0	13.7	18.9	18.6	17.1	16.2	16.6	18.3	
CRE	mg/dL	0.46	0.43	0.44	0.42	0.49	0.45	0.42	0.44	0.43	0.46	
IP	mg/dL	7.06	7.26	7.64	6.23	6.27	6.81	6.50	6.67	6.88	6.72	
Ca ²⁺	mg/dL	9.85	9.33	9.27	9.46	9.34	9.46	9.01	9.31	9.62	9.54	
Na ⁺	mmol/L	138.53	139.67	137.54	139.27	140.50	139.49	139.62	139.14	138.88	138.19	
K ⁺	mmol/L	5.20	4.36	4.77	4.63	4.08	4.42	4.75	4.71	4.17	5.00	
Cl ⁻	mmol/L	100.97	101.71	101.61	101.71	103.96	102.96	103.79	103.41	100.87	102.22	
GROUP		G4 (5000 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
AST	U/L	83.8	105.3	86.4	93.4	94.4	76.3	89.4	88.9	91.8	80.5	
ALT	U/L	32.6	38.4	31.6	29.1	33.0	25.2	29.3	31.2	29.7	32.8	
ALP	U/L	75.2	71.2	87.4	114.6	99.2	87.8	61.5	74.2	99.8	88.1	
CPK	U/L	113	318	174	266	201	114	255	244	140	127	
TBIL	mg/dL	0.19	0.18	0.12	0.15	0.16	0.14	0.16	0.14	0.17	0.14	
GLU	mg/dL	111.6	115.8	95.3	99.7	101.9	101.5	110.1	111.0	91.1	90.0	
TCHO	mg/dL	80	103	73	93	90	106	116	99	86	88	
TG	mg/dL	40	32	44	40	30	32	45	31	27	28	
TP	g/dL	5.45	5.11	5.22	5.92	5.79	5.87	5.76	5.43	5.56	5.70	
ALB	g/dL	2.99	2.83	2.95	3.25	3.22	3.26	3.17	2.78	3.09	3.08	
A/G	ratio	1.22	1.24	1.30	1.22	1.25	1.25	1.22	1.05	1.25	1.18	
BUN	mg/dL	18.2	20.1	19.4	18.4	19.8	20.4	17.6	21.5	22.3	19.3	
CRE	mg/dL	0.45	0.45	0.44	0.46	0.54	0.46	0.42	0.49	0.49	0.44	
IP	mg/dL	6.77	6.89	6.74	6.51	6.22	6.35	7.39	7.96	7.58	6.65	
Ca ²⁺	mg/dL	9.48	9.15	8.91	9.57	9.27	9.77	9.93	10.01	9.75	9.45	
Na ⁺	mmol/L	137.37	138.62	138.06	136.86	139.27	137.41	138.97	139.06	136.09	138.53	
K ⁺	mmol/L	4.54	4.80	4.60	4.76	4.45	4.36	4.64	5.15	4.38	4.37	
Cl ⁻	mmol/L	101.41	102.18	102.11	100.70	103.68	100.27	102.11	102.49	101.37	102.11	

<END>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						MALE
GROUPS	G1 (0 mg/kg/day)					
ANIMAL ID	1	2	3	4	5	
BODY WEIGHTS (g)	282.65	338.80	325.94	312.49	326.24	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0238	0.0229	0.0227	0.0253	0.0250	
% to BODY WEIGHT	0.0084	0.0068	0.0070	0.0081	0.0077	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0213	0.0213	0.0232	0.0244	0.0228	
% to BODY WEIGHT	0.0075	0.0063	0.0071	0.0078	0.0070	
PITUITARY GLAND	0.0100	0.0117	0.0109	0.0098	0.0120	
% to BODY WEIGHT	0.0035	0.0035	0.0033	0.0031	0.0037	
THYMUS	0.3967	0.4759	0.4242	0.4406	0.4108	
% to BODY WEIGHT	0.1404	0.1405	0.1301	0.1410	0.1259	
PROSTATE GLAND	0.4424	0.3638	0.5714	0.3924	0.4780	
% to BODY WEIGHT	0.1565	0.1074	0.1753	0.1256	0.1465	
TESTIS-LEFT	1.7889	2.0693	2.0261	1.7203	2.0127	
% to BODY WEIGHT	0.6329	0.6108	0.6216	0.5505	0.6169	
TESTIS-RIGHT	1.8118	2.0567	2.0009	1.7572	2.0529	
% to BODY WEIGHT	0.6410	0.6071	0.6139	0.5623	0.6293	
EPIDIDYMIS-LEFT	0.4714	0.4928	0.5228	0.4807	0.5271	
% to BODY WEIGHT	0.1668	0.1455	0.1604	0.1538	0.1616	
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.4765	0.5335	0.5307	0.4914	0.5155	
% to BODY WEIGHT	0.1686	0.1575	0.1628	0.1573	0.1580	
SPLEEN	0.5232	0.8456	0.6800	0.7144	0.7668	
% to BODY WEIGHT	0.1851	0.2496	0.2086	0.2286	0.2350	
KIDNEY-LEFT	0.9085	1.1961	1.2957	1.0695	1.1776	
% to BODY WEIGHT	0.3214	0.3530	0.3975	0.3423	0.3610	
KIDNEY-RIGHT	1.0160	1.2132	1.2596	1.0344	1.1663	
% to BODY WEIGHT	0.3595	0.3581	0.3865	0.3310	0.3575	
HEART	0.9895	1.2291	1.3237	1.3326	1.2749	
% to BODY WEIGHT	0.3501	0.3628	0.4061	0.4264	0.3908	
LUNG	1.2821	1.5932	1.2892	1.5115	1.6397	
% to BODY WEIGHT	0.4536	0.4702	0.3955	0.4837	0.5026	
BRAIN	1.8806	1.9331	1.8458	1.7613	1.9400	
% to BODY WEIGHT	0.6653	0.5706	0.5663	0.5636	0.5947	
LIVER	11.7760	10.0387	8.5672	8.8215	9.5273	
% to BODY WEIGHT	4.1663	2.9630	2.6285	2.8230	2.9203	

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					MALE
GROUPS	G1 (0 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	6	7	8	9	10
BODY WEIGHTS (g)	302.69	319.45	335.64	305.01	338.50
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0219	0.0185	0.0249	0.0254	0.0300
% to BODY WEIGHT	0.0072	0.0058	0.0074	0.0083	0.0089
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0228	0.0225	0.0244	0.0241	0.0286
% to BODY WEIGHT	0.0075	0.0070	0.0073	0.0079	0.0084
PITUITARY GLAND	0.0100	0.0103	0.0111	0.0102	0.0107
% to BODY WEIGHT	0.0033	0.0032	0.0033	0.0033	0.0032
THYMUS	0.5910	0.6378	0.6532	0.4301	0.6246
% to BODY WEIGHT	0.1952	0.1997	0.1946	0.1410	0.1845
PROSTATE GLAND	0.3374	0.3665	0.2843	0.4173	0.3817
% to BODY WEIGHT	0.1115	0.1147	0.0847	0.1368	0.1128
TESTIS-LEFT	1.6962	1.9967	1.9618	2.0349	1.7717
% to BODY WEIGHT	0.5604	0.6250	0.5845	0.6672	0.5234
TESTIS-RIGHT	1.6662	1.9839	1.9572	2.1250	1.7209
% to BODY WEIGHT	0.5505	0.6210	0.5831	0.6967	0.5084
EPIDIDYMIS-LEFT	0.4064	0.4952	0.4849	0.4575	0.4498
% to BODY WEIGHT	0.1343	0.1550	0.1445	0.1500	0.1329
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.4020	0.4887	0.4670	0.4924	0.4482
% to BODY WEIGHT	0.1328	0.1530	0.1391	0.1614	0.1324
SPLEEN	0.6614	0.6487	1.0296	0.7021	0.8180
% to BODY WEIGHT	0.2185	0.2031	0.3068	0.2302	0.2417
KIDNEY-LEFT	0.9509	1.0537	1.1111	1.0466	1.0993
% to BODY WEIGHT	0.3141	0.3298	0.3310	0.3431	0.3248
KIDNEY-RIGHT	0.9978	1.0883	1.1036	1.0381	1.1253
% to BODY WEIGHT	0.3296	0.3407	0.3288	0.3403	0.3324
HEART	1.2110	1.1615	1.2355	1.1100	1.2958
% to BODY WEIGHT	0.4001	0.3636	0.3681	0.3639	0.3828
LUNG	1.4500	1.5686	1.4952	1.4022	1.5788
% to BODY WEIGHT	0.4790	0.4910	0.4455	0.4597	0.4664
BRAIN	1.7300	1.9066	1.8876	2.0008	1.8663
% to BODY WEIGHT	0.5715	0.5968	0.5624	0.6560	0.5513
LIVER	8.3576	9.3451	10.4189	7.9293	10.5263
% to BODY WEIGHT	2.7611	2.9254	3.1042	2.5997	3.1097

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						MALE
GROUPS	G2 (800 mg/kg/day)					
ANIMAL ID	11	12	13	14	15	
BODY WEIGHTS (g)	333.44	314.91	317.32	299.11	324.76	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0254	0.0251	0.0244	0.0252	0.0274	
% to BODY WEIGHT	0.0076	0.0080	0.0077	0.0084	0.0084	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0231	0.0220	0.0234	0.0208	0.0255	
% to BODY WEIGHT	0.0069	0.0070	0.0074	0.0070	0.0079	
PITUITARY GLAND	0.0108	0.0102	0.0105	0.0103	0.0119	
% to BODY WEIGHT	0.0032	0.0032	0.0033	0.0034	0.0037	
THYMUS	0.5498	0.5172	0.4637	0.3767	0.6293	
% to BODY WEIGHT	0.1649	0.1642	0.1461	0.1259	0.1938	
PROSTATE GLAND	0.4338	0.3868	0.5332	0.2743	0.3770	
% to BODY WEIGHT	0.1301	0.1228	0.1680	0.0917	0.1161	
TESTIS-LEFT	1.8414	1.9216	1.9562	1.9142	1.9419	
% to BODY WEIGHT	0.5522	0.6102	0.6165	0.6400	0.5979	
TESTIS-RIGHT	1.7711	1.9879	1.9427	1.9293	1.8756	
% to BODY WEIGHT	0.5312	0.6313	0.6122	0.6450	0.5775	
EPIDIDYMIS-LEFT	0.4573	0.5077	0.4624	0.4723	0.5371	
% to BODY WEIGHT	0.1371	0.1612	0.1457	0.1579	0.1654	
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.4558	0.5109	0.4661	0.4918	0.5357	
% to BODY WEIGHT	0.1367	0.1622	0.1469	0.1644	0.1650	
SPLEEN	0.7075	0.7201	0.7010	0.7250	0.9029	
% to BODY WEIGHT	0.2122	0.2287	0.2209	0.2424	0.2780	
KIDNEY-LEFT	1.0273	1.0748	1.0467	1.0807	1.0053	
% to BODY WEIGHT	0.3081	0.3413	0.3299	0.3613	0.3096	
KIDNEY-RIGHT	1.0946	1.0442	1.1095	1.0567	1.1095	
% to BODY WEIGHT	0.3283	0.3316	0.3496	0.3533	0.3416	
HEART	1.2073	1.3044	1.1903	1.1119	1.2293	
% to BODY WEIGHT	0.3621	0.4142	0.3751	0.3717	0.3785	
LUNG	1.4926	1.4659	1.5610	1.3476	1.3995	
% to BODY WEIGHT	0.4476	0.4655	0.4919	0.4505	0.4309	
BRAIN	1.8375	1.8350	1.8677	1.8008	1.8496	
% to BODY WEIGHT	0.5511	0.5827	0.5886	0.6021	0.5695	
LIVER	9.0239	9.7999	9.1369	8.4387	10.6450	
% to BODY WEIGHT	2.7063	3.1120	2.8794	2.8213	3.2778	

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					MALE
GROUPS	G2 (800 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	16	17	18	19	20
BODY WEIGHTS (g)	342.15	316.27	327.91	326.14	317.10
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0245	0.0245	0.0204	0.0220	0.0257
% to BODY WEIGHT	0.0072	0.0077	0.0062	0.0067	0.0081
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0234	0.0251	0.0202	0.0234	0.0259
% to BODY WEIGHT	0.0068	0.0079	0.0062	0.0072	0.0082
PITUITARY GLAND	0.0111	0.0113	0.0112	0.0110	0.0098
% to BODY WEIGHT	0.0032	0.0036	0.0034	0.0034	0.0031
THYMUS	0.4592	0.5408	0.5010	0.4304	0.4286
% to BODY WEIGHT	0.1342	0.1710	0.1528	0.1320	0.1352
PROSTATE GLAND	0.4576	0.3003	0.4784	0.4276	0.3386
% to BODY WEIGHT	0.1337	0.0950	0.1459	0.1311	0.1068
TESTIS-LEFT	1.9461	1.9892	1.9104	2.0796	1.9128
% to BODY WEIGHT	0.5688	0.6290	0.5826	0.6376	0.6032
TESTIS-RIGHT	1.9585	2.0544	1.9932	2.0346	1.9298
% to BODY WEIGHT	0.5724	0.6496	0.6078	0.6238	0.6086
EPIDIDYMIS-LEFT	0.4878	0.5169	0.4693	0.5157	0.4136
% to BODY WEIGHT	0.1426	0.1634	0.1431	0.1581	0.1304
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.5080	0.5294	0.4623	0.5286	0.4427
% to BODY WEIGHT	0.1485	0.1674	0.1410	0.1621	0.1396
SPLEEN	0.7664	0.7734	0.7713	0.7568	0.7376
% to BODY WEIGHT	0.2240	0.2445	0.2352	0.2320	0.2326
KIDNEY-LEFT	1.0876	1.0885	1.0917	1.1113	1.0231
% to BODY WEIGHT	0.3179	0.3442	0.3329	0.3407	0.3226
KIDNEY-RIGHT	1.1419	0.9934	1.1664	1.1842	1.0529
% to BODY WEIGHT	0.3337	0.3141	0.3557	0.3631	0.3320
HEART	1.1902	1.2071	1.2107	1.3292	1.2158
% to BODY WEIGHT	0.3479	0.3817	0.3692	0.4076	0.3834
LUNG	1.5069	1.4110	1.4152	1.5352	1.5170
% to BODY WEIGHT	0.4404	0.4461	0.4316	0.4707	0.4784
BRAIN	1.9361	1.8384	1.8907	1.8816	1.7403
% to BODY WEIGHT	0.5659	0.5813	0.5766	0.5769	0.5488
LIVER	9.3930	9.4310	10.0870	10.2198	8.8020
% to BODY WEIGHT	2.7453	2.9819	3.0761	3.1336	2.7758

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						MALE
GROUPS	G3 (2000 mg/kg/day)					
ANIMAL ID	21	22	23	24	25	
BODY WEIGHTS (g)	303.97	313.57	316.87	320.81	374.04	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0245	0.0246	0.0248	0.0223	0.0328	
% to BODY WEIGHT	0.0081	0.0078	0.0078	0.0070	0.0088	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0210	0.0221	0.0227	0.0219	0.0310	
% to BODY WEIGHT	0.0069	0.0070	0.0072	0.0068	0.0083	
PITUITARY GLAND	0.0093	0.0099	0.0114	0.0106	0.0119	
% to BODY WEIGHT	0.0031	0.0032	0.0036	0.0033	0.0032	
THYMUS	0.4848	0.4267	0.6738	0.3859	0.5705	
% to BODY WEIGHT	0.1595	0.1361	0.2126	0.1203	0.1525	
PROSTATE GLAND	0.4183	0.5514	0.4229	0.4838	0.4324	
% to BODY WEIGHT	0.1376	0.1758	0.1335	0.1508	0.1156	
TESTIS-LEFT	2.0331	1.9131	1.8940	1.8863	2.1486	
% to BODY WEIGHT	0.6688	0.6101	0.5977	0.5880	0.5744	
TESTIS-RIGHT	1.9708	1.8567	1.8565	1.8219	2.0888	
% to BODY WEIGHT	0.6484	0.5921	0.5859	0.5679	0.5584	
EPIDIDYMIS-LEFT	0.5119	0.4449	0.4836	0.4058	0.5230	
% to BODY WEIGHT	0.1684	0.1419	0.1526	0.1265	0.1398	
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.4953	0.4864	0.4957	0.4487	0.4563	
% to BODY WEIGHT	0.1629	0.1551	0.1564	0.1399	0.1220	
SPLEEN	0.7129	0.6769	0.7812	0.6583	0.9955	
% to BODY WEIGHT	0.2345	0.2159	0.2465	0.2052	0.2661	
KIDNEY-LEFT	0.9625	1.1085	1.1295	1.1572	1.3294	
% to BODY WEIGHT	0.3166	0.3535	0.3565	0.3607	0.3554	
KIDNEY-RIGHT	0.9274	1.0902	1.1588	1.1870	1.2512	
% to BODY WEIGHT	0.3051	0.3477	0.3657	0.3700	0.3345	
HEART	1.1856	1.3716	1.2844	1.2171	1.4760	
% to BODY WEIGHT	0.3900	0.4374	0.4053	0.3794	0.3946	
LUNG	1.5346	1.5789	1.4729	1.5847	1.7412	
% to BODY WEIGHT	0.5049	0.5035	0.4648	0.4940	0.4655	
BRAIN	1.8468	1.8118	1.8034	1.7236	2.1654	
% to BODY WEIGHT	0.6076	0.5778	0.5691	0.5373	0.5789	
LIVER	8.8576	8.8973	10.3135	9.9064	10.9509	
% to BODY WEIGHT	2.9140	2.8374	3.2548	3.0879	2.9277	

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					MALE
GROUPS	G3 (2000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	26	27	28	29	30
BODY WEIGHTS (g)	330.32	316.28	330.68	320.13	341.65
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0219	0.0238	0.0272	0.0233	0.0268
% to BODY WEIGHT	0.0066	0.0075	0.0082	0.0073	0.0078
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0206	0.0244	0.0236	0.0242	0.0256
% to BODY WEIGHT	0.0062	0.0077	0.0071	0.0076	0.0075
PITUITARY GLAND	0.0098	0.0116	0.0103	0.0106	0.0120
% to BODY WEIGHT	0.0030	0.0037	0.0031	0.0033	0.0035
THYMUS	0.3606	0.4415	0.4686	0.4834	0.5397
% to BODY WEIGHT	0.1092	0.1396	0.1417	0.1510	0.1580
PROSTATE GLAND	0.4376	0.3858	0.3790	0.3430	0.3518
% to BODY WEIGHT	0.1325	0.1220	0.1146	0.1071	0.1030
TESTIS-LEFT	1.7588	1.9166	1.9589	1.7980	1.9917
% to BODY WEIGHT	0.5325	0.6060	0.5924	0.5616	0.5830
TESTIS-RIGHT	1.7713	1.9039	1.9386	1.7677	1.8998
% to BODY WEIGHT	0.5362	0.6020	0.5862	0.5522	0.5561
EPIDIDYMIS-LEFT	0.4623	0.4996	0.5149	0.4622	0.4910
% to BODY WEIGHT	0.1400	0.1580	0.1557	0.1444	0.1437
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.4507	0.4907	0.5031	0.4601	0.4790
% to BODY WEIGHT	0.1364	0.1551	0.1521	0.1437	0.1402
SPLEEN	0.7213	0.8216	0.9218	0.7583	0.7354
% to BODY WEIGHT	0.2184	0.2598	0.2788	0.2369	0.2152
KIDNEY-LEFT	1.1538	1.0257	1.0856	1.0489	1.1785
% to BODY WEIGHT	0.3493	0.3243	0.3283	0.3276	0.3449
KIDNEY-RIGHT	1.1076	1.0974	1.1181	1.0558	1.1794
% to BODY WEIGHT	0.3353	0.3470	0.3381	0.3298	0.3452
HEART	1.1314	1.2093	1.2343	1.2006	1.0935
% to BODY WEIGHT	0.3425	0.3824	0.3733	0.3750	0.3201
LUNG	1.4167	1.4378	1.3639	1.4759	1.5984
% to BODY WEIGHT	0.4289	0.4546	0.4125	0.4610	0.4678
BRAIN	1.8506	1.8862	1.8590	1.8724	1.9255
% to BODY WEIGHT	0.5602	0.5964	0.5622	0.5849	0.5636
LIVER	8.9678	9.7738	10.6991	9.1778	10.5508
% to BODY WEIGHT	2.7149	3.0902	3.2355	2.8669	3.0882

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						MALE
GROUPS	G4 (5000 mg/kg/day)					
ANIMAL ID	31	32	33	34	35	
BODY WEIGHTS (g)	327.85	316.68	325.31	304.84	315.40	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0233	0.0235	0.0279	0.0190	0.0241	
% to BODY WEIGHT	0.0071	0.0074	0.0086	0.0062	0.0076	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0227	0.0218	0.0280	0.0203	0.0225	
% to BODY WEIGHT	0.0069	0.0069	0.0086	0.0067	0.0071	
PITUITARY GLAND	0.0121	0.0104	0.0106	0.0093	0.0119	
% to BODY WEIGHT	0.0037	0.0033	0.0033	0.0031	0.0038	
THYMUS	0.5710	0.4679	0.4405	0.4380	0.3535	
% to BODY WEIGHT	0.1742	0.1478	0.1354	0.1437	0.1121	
PROSTATE GLAND	0.5060	0.4546	0.6795	0.4216	0.4371	
% to BODY WEIGHT	0.1543	0.1436	0.2089	0.1383	0.1386	
TESTIS-LEFT	2.1247	1.7963	1.8781	1.9416	1.8556	
% to BODY WEIGHT	0.6481	0.5672	0.5773	0.6369	0.5883	
TESTIS-RIGHT	2.0738	1.8326	1.9137	1.9891	1.9816	
% to BODY WEIGHT	0.6325	0.5787	0.5883	0.6525	0.6283	
EPIDIDYMIS-LEFT	0.5927	0.4456	0.4786	0.5224	0.4467	
% to BODY WEIGHT	0.1808	0.1407	0.1471	0.1714	0.1416	
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.5780	0.4390	0.4908	0.4603	0.4646	
% to BODY WEIGHT	0.1763	0.1386	0.1509	0.1510	0.1473	
SPLEEN	0.8610	0.7131	0.6562	0.7275	0.6671	
% to BODY WEIGHT	0.2626	0.2252	0.2017	0.2386	0.2115	
KIDNEY-LEFT	1.2141	1.0640	1.2261	1.1121	1.1260	
% to BODY WEIGHT	0.3703	0.3360	0.3769	0.3648	0.3570	
KIDNEY-RIGHT	1.1586	1.0944	1.2641	1.1453	1.1615	
% to BODY WEIGHT	0.3534	0.3456	0.3886	0.3757	0.3683	
HEART	1.3179	1.1422	1.2830	1.1221	1.3139	
% to BODY WEIGHT	0.4020	0.3607	0.3944	0.3681	0.4166	
LUNG	1.6246	1.3386	1.5610	1.4520	1.4976	
% to BODY WEIGHT	0.4955	0.4227	0.4798	0.4763	0.4748	
BRAIN	1.9888	1.8143	1.8312	1.8890	1.8977	
% to BODY WEIGHT	0.6066	0.5729	0.5629	0.6197	0.6017	
LIVER	11.4201	9.4292	10.6386	9.2173	9.8822	
% to BODY WEIGHT	3.4833	2.9775	3.2703	3.0237	3.1332	

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					MALE
GROUPS	G4 (5000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	36	37	38	39	40
BODY WEIGHTS (g)	351.65	348.87	336.43	345.91	360.03
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0271	0.0262	0.0230	0.0231	0.0247
% to BODY WEIGHT	0.0077	0.0075	0.0068	0.0067	0.0069
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0229	0.0264	0.0226	0.0230	0.0251
% to BODY WEIGHT	0.0065	0.0076	0.0067	0.0066	0.0070
PITUITARY GLAND	0.0109	0.0116	0.0109	0.0349	0.0149
% to BODY WEIGHT	0.0031	0.0033	0.0032	0.0101	0.0041
THYMUS	0.5054	0.5252	0.5616	0.5706	0.5540
% to BODY WEIGHT	0.1437	0.1505	0.1669	0.1650	0.1539
PROSTATE GLAND	0.2957	0.4179	0.3980	0.4346	0.3815
% to BODY WEIGHT	0.0841	0.1198	0.1183	0.1256	0.1060
TESTIS-LEFT	1.8817	2.1237	1.9336	2.0669	1.9744
% to BODY WEIGHT	0.5351	0.6087	0.5747	0.5975	0.5484
TESTIS-RIGHT	1.8902	2.1244	1.9247	2.1509	1.9683
% to BODY WEIGHT	0.5375	0.6089	0.5721	0.6218	0.5467
EPIDIDYMIS-LEFT	0.5061	0.5107	0.4878	0.4830	0.4823
% to BODY WEIGHT	0.1439	0.1464	0.1450	0.1396	0.1340
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.4986	0.5247	0.4905	0.4768	0.5185
% to BODY WEIGHT	0.1418	0.1504	0.1458	0.1378	0.1440
SPLEEN	0.8800	0.8943	0.9162	0.8114	0.7640
% to BODY WEIGHT	0.2502	0.2563	0.2723	0.2346	0.2122
KIDNEY-LEFT	1.2179	1.2257	1.0795	1.2129	1.2320
% to BODY WEIGHT	0.3463	0.3513	0.3209	0.3506	0.3422
KIDNEY-RIGHT	1.1969	1.2970	1.1680	1.3102	1.3355
% to BODY WEIGHT	0.3404	0.3718	0.3472	0.3788	0.3709
HEART	1.1961	1.3385	1.2187	1.3030	1.3302
% to BODY WEIGHT	0.3401	0.3837	0.3622	0.3767	0.3695
LUNG	1.5340	1.5794	1.4067	1.6233	1.5392
% to BODY WEIGHT	0.4362	0.4527	0.4181	0.4693	0.4275
BRAIN	1.8809	1.9002	1.9186	1.9082	1.9021
% to BODY WEIGHT	0.5349	0.5447	0.5703	0.5516	0.5283
LIVER	10.7863	11.0151	10.0512	10.7228	11.9484
% to BODY WEIGHT	3.0673	3.1574	2.9876	3.0999	3.3187

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					FEMALE
GROUPS	G1 (0 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	41	42	43	44	45
BODY WEIGHTS (g)	187.49	191.21	203.43	206.55	209.09
OVARY-LEFT	0.0482	0.0523	0.0402	0.0510	0.0464
% to BODY WEIGHT	0.0257	0.0274	0.0198	0.0247	0.0222
OVARY-RIGHT	0.0482	0.0430	0.0538	0.0351	0.0570
% to BODY WEIGHT	0.0257	0.0225	0.0264	0.0170	0.0273
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0323	0.0368	0.0309	0.0308	0.0345
% to BODY WEIGHT	0.0172	0.0192	0.0152	0.0149	0.0165
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0338	0.0289	0.0310	0.0280	0.0296
% to BODY WEIGHT	0.0180	0.0151	0.0152	0.0136	0.0142
PITUITARY GLAND	0.0126	0.0110	0.0103	0.0124	0.0110
% to BODY WEIGHT	0.0067	0.0058	0.0051	0.0060	0.0053
THYMUS	0.3429	0.2713	0.3633	0.2472	0.3750
% to BODY WEIGHT	0.1829	0.1419	0.1786	0.1197	0.1793
UTERUS	0.6448	0.4063	0.4546	0.8413	0.5665
% to BODY WEIGHT	0.3439	0.2125	0.2235	0.4073	0.2709
SPLEEN	0.5637	0.5120	0.4828	0.6337	0.5289
% to BODY WEIGHT	0.3007	0.2678	0.2373	0.3068	0.2530
KIDNEY-LEFT	0.6855	0.6432	0.7186	0.7510	0.7206
% to BODY WEIGHT	0.3656	0.3364	0.3532	0.3636	0.3446
KIDNEY-RIGHT	0.6804	0.6928	0.7819	0.7567	0.7255
% to BODY WEIGHT	0.3629	0.3623	0.3844	0.3664	0.3470
HEART	0.7192	0.7723	0.8273	0.8798	0.6747
% to BODY WEIGHT	0.3836	0.4039	0.4067	0.4260	0.3227
LUNG	1.1268	1.1049	1.1511	1.3371	1.0267
% to BODY WEIGHT	0.6010	0.5778	0.5658	0.6473	0.4910
BRAIN	1.7058	1.7582	1.7631	1.7536	1.6736
% to BODY WEIGHT	0.9098	0.9195	0.8667	0.8490	0.8004
LIVER	5.4958	5.4944	5.7576	6.0235	5.2861
% to BODY WEIGHT	2.9312	2.8735	2.8303	2.9162	2.5281

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					FEMALE
GROUPS	G1 (0 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	46	47	48	49	50
BODY WEIGHTS (g)	187.30	202.84	201.80	196.69	201.42
OVARY-LEFT	0.0573	0.0505	0.0470	0.0384	0.0561
% to BODY WEIGHT	0.0306	0.0249	0.0233	0.0195	0.0279
OVARY-RIGHT	0.0476	0.0525	0.0447	0.0543	0.0410
% to BODY WEIGHT	0.0254	0.0259	0.0222	0.0276	0.0204
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0355	0.0363	0.0337	0.0337	0.0274
% to BODY WEIGHT	0.0190	0.0179	0.0167	0.0171	0.0136
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0314	0.0304	0.0313	0.0301	0.0239
% to BODY WEIGHT	0.0168	0.0150	0.0155	0.0153	0.0119
PITUITARY GLAND	0.0141	0.0104	0.0110	0.0124	0.0125
% to BODY WEIGHT	0.0075	0.0051	0.0055	0.0063	0.0062
THYMUS	0.2812	0.3033	0.2784	0.2830	0.2854
% to BODY WEIGHT	0.1501	0.1495	0.1380	0.1439	0.1417
UTERUS	1.0399	0.3201	0.3891	0.4800	1.2745
% to BODY WEIGHT	0.5552	0.1578	0.1928	0.2440	0.6328
SPLEEN	0.5807	0.5424	0.5196	0.5323	0.5633
% to BODY WEIGHT	0.3100	0.2674	0.2575	0.2706	0.2797
KIDNEY-LEFT	0.7173	0.6200	0.6721	0.6737	0.6584
% to BODY WEIGHT	0.3830	0.3057	0.3331	0.3425	0.3269
KIDNEY-RIGHT	0.7318	0.7053	0.6663	0.6663	0.6951
% to BODY WEIGHT	0.3907	0.3477	0.3302	0.3388	0.3451
HEART	0.8433	0.7753	0.7368	0.7629	0.8583
% to BODY WEIGHT	0.4502	0.3822	0.3651	0.3879	0.4261
LUNG	1.1027	1.2164	1.1836	1.1289	1.1427
% to BODY WEIGHT	0.5887	0.5997	0.5865	0.5739	0.5673
BRAIN	1.6883	1.7709	1.7704	1.6851	1.7005
% to BODY WEIGHT	0.9014	0.8731	0.8773	0.8567	0.8443
LIVER	6.0624	5.7535	5.7490	5.0386	6.0331
% to BODY WEIGHT	3.2367	2.8365	2.8489	2.5617	2.9953

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					FEMALE
GROUPS	G2 (800 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	51	52	53	54	55
BODY WEIGHTS (g)	217.58	211.45	195.40	174.51	194.20
OVARY-LEFT	0.0527	0.0454	0.0508	0.0473	0.0595
% to BODY WEIGHT	0.0242	0.0215	0.0260	0.0271	0.0306
OVARY-RIGHT	0.0492	0.0383	0.0331	0.0370	0.0493
% to BODY WEIGHT	0.0226	0.0181	0.0169	0.0212	0.0254
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0344	0.0310	0.0307	0.0282	0.0311
% to BODY WEIGHT	0.0158	0.0147	0.0157	0.0162	0.0160
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0307	0.0305	0.0285	0.0273	0.0319
% to BODY WEIGHT	0.0141	0.0144	0.0146	0.0156	0.0164
PITUITARY GLAND	0.0126	0.0093	0.0100	0.0114	0.0119
% to BODY WEIGHT	0.0058	0.0044	0.0051	0.0065	0.0061
THYMUS	0.3975	0.5444	0.3509	0.3215	0.2834
% to BODY WEIGHT	0.1827	0.2575	0.1796	0.1842	0.1459
UTERUS	0.3799	0.3509	0.3275	0.5353	0.6615
% to BODY WEIGHT	0.1746	0.1659	0.1676	0.3067	0.3406
SPLEEN	0.6123	0.6334	0.5638	0.4917	0.5672
% to BODY WEIGHT	0.2814	0.2996	0.2885	0.2818	0.2921
KIDNEY-LEFT	0.7466	0.7178	0.7161	0.6219	0.7270
% to BODY WEIGHT	0.3431	0.3395	0.3665	0.3564	0.3744
KIDNEY-RIGHT	0.7477	0.7459	0.6814	0.5856	0.7214
% to BODY WEIGHT	0.3436	0.3528	0.3487	0.3356	0.3715
HEART	0.9398	0.8362	0.7673	0.6632	0.7055
% to BODY WEIGHT	0.4319	0.3955	0.3927	0.3800	0.3633
LUNG	1.3143	1.2835	1.1450	1.0804	1.3001
% to BODY WEIGHT	0.6041	0.6070	0.5860	0.6191	0.6695
BRAIN	1.7299	1.7780	1.7119	1.6877	1.7485
% to BODY WEIGHT	0.7951	0.8409	0.8761	0.9671	0.9004
LIVER	6.5986	5.9903	6.2142	4.8872	5.9625
% to BODY WEIGHT	3.0327	2.8330	3.1802	2.8005	3.0703

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					FEMALE
GROUPS	G2 (800 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	56	57	58	59	60
BODY WEIGHTS (g)	211.02	190.64	208.75	188.87	179.02
OVARY-LEFT	0.0536	0.0417	0.0556	0.0414	0.0426
% to BODY WEIGHT	0.0254	0.0219	0.0266	0.0219	0.0238
OVARY-RIGHT	0.0460	0.0342	0.0436	0.0466	0.0387
% to BODY WEIGHT	0.0218	0.0179	0.0209	0.0247	0.0216
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0295	0.0322	0.0338	0.0260	0.0311
% to BODY WEIGHT	0.0140	0.0169	0.0162	0.0138	0.0174
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0302	0.0304	0.0322	0.0279	0.0305
% to BODY WEIGHT	0.0143	0.0159	0.0154	0.0148	0.0170
PITUITARY GLAND	0.0105	0.0126	0.0114	0.0108	0.0098
% to BODY WEIGHT	0.0050	0.0066	0.0055	0.0057	0.0055
THYMUS	0.4425	0.4247	0.3117	0.3046	0.2386
% to BODY WEIGHT	0.2097	0.2228	0.1493	0.1613	0.1333
UTERUS	0.6481	0.4529	0.4204	0.2932	0.3436
% to BODY WEIGHT	0.3071	0.2376	0.2014	0.1552	0.1919
SPLEEN	0.5273	0.5226	0.5355	0.5063	0.4778
% to BODY WEIGHT	0.2499	0.2741	0.2565	0.2681	0.2669
KIDNEY-LEFT	0.6381	0.7189	0.7285	0.6610	0.6099
% to BODY WEIGHT	0.3024	0.3771	0.3490	0.3500	0.3407
KIDNEY-RIGHT	0.6389	0.6983	0.7303	0.7042	0.6262
% to BODY WEIGHT	0.3028	0.3663	0.3498	0.3728	0.3498
HEART	0.7048	0.7300	0.7813	0.8178	0.7037
% to BODY WEIGHT	0.3340	0.3829	0.3743	0.4330	0.3931
LUNG	1.1548	1.3625	1.1519	1.0645	1.0333
% to BODY WEIGHT	0.5472	0.7147	0.5518	0.5636	0.5772
BRAIN	1.7538	1.7481	1.7707	1.7013	1.6659
% to BODY WEIGHT	0.8311	0.9170	0.8482	0.9008	0.9306
LIVER	4.8381	5.3691	6.3868	5.4926	4.7381
% to BODY WEIGHT	2.2927	2.8164	3.0595	2.9081	2.6467

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					FEMALE
GROUPS	G3 (2000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	61	62	63	64	65
BODY WEIGHTS (g)	215.62	204.09	210.68	217.81	199.22
OVARY-LEFT	0.0425	0.0489	0.0425	0.0508	0.0387
% to BODY WEIGHT	0.0197	0.0240	0.0202	0.0233	0.0194
OVARY-RIGHT	0.0404	0.0455	0.0472	0.0587	0.0375
% to BODY WEIGHT	0.0187	0.0223	0.0224	0.0270	0.0188
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0276	0.0260	0.0328	0.0285	0.0330
% to BODY WEIGHT	0.0128	0.0127	0.0156	0.0131	0.0166
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0279	0.0266	0.0321	0.0286	0.0302
% to BODY WEIGHT	0.0129	0.0130	0.0152	0.0131	0.0152
PITUITARY GLAND	0.0141	0.0105	0.0110	0.0118	0.0114
% to BODY WEIGHT	0.0065	0.0051	0.0052	0.0054	0.0057
THYMUS	0.3441	0.4024	0.3355	0.3937	0.2565
% to BODY WEIGHT	0.1596	0.1972	0.1592	0.1808	0.1288
UTERUS	0.6351	0.4356	0.4372	0.5851	0.4594
% to BODY WEIGHT	0.2945	0.2134	0.2075	0.2686	0.2306
SPLEEN	0.6901	0.5432	0.5579	0.6685	0.5602
% to BODY WEIGHT	0.3201	0.2662	0.2648	0.3069	0.2812
KIDNEY-LEFT	0.6984	0.7997	0.7882	0.7804	0.6525
% to BODY WEIGHT	0.3239	0.3918	0.3741	0.3583	0.3275
KIDNEY-RIGHT	0.7296	0.8097	0.7663	0.8480	0.6598
% to BODY WEIGHT	0.3384	0.3967	0.3637	0.3893	0.3312
HEART	0.8313	0.9122	0.9179	0.9456	1.0784
% to BODY WEIGHT	0.3855	0.4470	0.4357	0.4341	0.5413
LUNG	1.2606	1.2923	1.1673	1.2757	0.7856
% to BODY WEIGHT	0.5846	0.6332	0.5541	0.5857	0.3943
BRAIN	1.7166	1.7263	1.7406	1.7083	1.6486
% to BODY WEIGHT	0.7961	0.8459	0.8262	0.7843	0.8275
LIVER	6.5202	6.0717	5.7699	6.3840	5.5646
% to BODY WEIGHT	3.0239	2.9750	2.7387	2.9310	2.7932

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					FEMALE
GROUPS	G3 (2000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	66	67	68	69	70
BODY WEIGHTS (g)	193.03	201.34	197.75	204.43	195.99
OVARY-LEFT	0.0546	0.0627	0.0434	0.0472	0.0578
% to BODY WEIGHT	0.0283	0.0311	0.0219	0.0231	0.0295
OVARY-RIGHT	0.0504	0.0560	0.0448	0.0458	0.0499
% to BODY WEIGHT	0.0261	0.0278	0.0227	0.0224	0.0255
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0330	0.0306	0.0320	0.0286	0.0372
% to BODY WEIGHT	0.0171	0.0152	0.0162	0.0140	0.0190
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0308	0.0294	0.0339	0.0284	0.0336
% to BODY WEIGHT	0.0160	0.0146	0.0171	0.0139	0.0171
PITUITARY GLAND	0.0130	0.0117	0.0089	0.0118	0.0125
% to BODY WEIGHT	0.0067	0.0058	0.0045	0.0058	0.0064
THYMUS	0.3744	0.4102	0.3542	0.3634	0.4346
% to BODY WEIGHT	0.1940	0.2037	0.1791	0.1778	0.2217
UTERUS	0.7883	1.1524	0.5018	0.4181	0.4119
% to BODY WEIGHT	0.4084	0.5724	0.2538	0.2045	0.2102
SPLEEN	0.6079	0.5549	0.5275	0.5589	0.6059
% to BODY WEIGHT	0.3149	0.2756	0.2668	0.2734	0.3091
KIDNEY-LEFT	0.7123	0.6911	0.6893	0.7324	0.7233
% to BODY WEIGHT	0.3690	0.3433	0.3486	0.3583	0.3690
KIDNEY-RIGHT	0.7587	0.6710	0.6875	0.7714	0.7592
% to BODY WEIGHT	0.3930	0.3333	0.3477	0.3773	0.3874
HEART	0.8724	0.7580	0.8389	0.7814	0.7454
% to BODY WEIGHT	0.4520	0.3765	0.4242	0.3822	0.3803
LUNG	1.1735	1.1616	1.3576	1.1610	1.2879
% to BODY WEIGHT	0.6079	0.5769	0.6865	0.5679	0.6571
BRAIN	1.6435	1.7544	1.7461	1.7827	1.7430
% to BODY WEIGHT	0.8514	0.8714	0.8830	0.8720	0.8893
LIVER	6.2371	5.9279	5.5855	5.7909	5.7845
% to BODY WEIGHT	3.2312	2.9442	2.8245	2.8327	2.9514

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					FEMALE
GROUPS	G4 (5000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	71	72	73	74	75
BODY WEIGHTS (g)	211.26	203.96	189.76	208.33	230.40
OVARY-LEFT	0.0512	0.0465	0.0449	0.0555	0.0433
% to BODY WEIGHT	0.0242	0.0228	0.0237	0.0266	0.0188
OVARY-RIGHT	0.0491	0.0466	0.0407	0.0547	0.0476
% to BODY WEIGHT	0.0232	0.0228	0.0214	0.0263	0.0207
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0318	0.0268	0.0314	0.0298	0.0280
% to BODY WEIGHT	0.0151	0.0131	0.0165	0.0143	0.0122
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0266	0.0288	0.0298	0.0303	0.0308
% to BODY WEIGHT	0.0126	0.0141	0.0157	0.0145	0.0134
PITUITARY GLAND	0.0141	0.0110	0.0100	0.0125	0.0116
% to BODY WEIGHT	0.0067	0.0054	0.0053	0.0060	0.0050
THYMUS	0.3916	0.5055	0.3193	0.2939	0.2497
% to BODY WEIGHT	0.1854	0.2478	0.1683	0.1411	0.1084
UTERUS	0.7560	0.5652	0.3593	0.4341	0.6710
% to BODY WEIGHT	0.3579	0.2771	0.1893	0.2084	0.2912
SPLEEN	0.6005	0.5429	0.5409	0.5887	0.5645
% to BODY WEIGHT	0.2842	0.2662	0.2850	0.2826	0.2450
KIDNEY-LEFT	0.7390	0.7150	0.6719	0.6782	0.6356
% to BODY WEIGHT	0.3498	0.3506	0.3541	0.3255	0.2759
KIDNEY-RIGHT	0.7204	0.7348	0.7022	0.7465	0.6916
% to BODY WEIGHT	0.3410	0.3603	0.3700	0.3583	0.3002
HEART	0.8470	0.9369	0.7200	0.7161	0.7346
% to BODY WEIGHT	0.4009	0.4594	0.3794	0.3437	0.3188
LUNG	1.2195	1.1113	1.0953	1.1527	1.0688
% to BODY WEIGHT	0.5773	0.5449	0.5772	0.5533	0.4639
BRAIN	1.8098	1.6789	1.7304	1.7639	1.6834
% to BODY WEIGHT	0.8567	0.8232	0.9119	0.8467	0.7306
LIVER	6.0790	5.3542	5.2543	6.1507	5.5258
% to BODY WEIGHT	2.8775	2.6251	2.7689	2.9524	2.3984

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					FEMALE
GROUPS	G4 (5000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	76	77	78	79	80
BODY WEIGHTS (g)	193.15	222.94	207.09	200.91	223.82
OVARY-LEFT	0.0502	0.0513	0.0524	0.0434	0.0559
% to BODY WEIGHT	0.0260	0.0230	0.0253	0.0216	0.0250
OVARY-RIGHT	0.0546	0.0364	0.0517	0.0385	0.0483
% to BODY WEIGHT	0.0283	0.0163	0.0250	0.0192	0.0216
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0298	0.0274	0.0295	0.0340	0.0353
% to BODY WEIGHT	0.0154	0.0123	0.0142	0.0169	0.0158
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0305	0.0286	0.0275	0.0348	0.0363
% to BODY WEIGHT	0.0158	0.0128	0.0133	0.0173	0.0162
PITUITARY GLAND	0.0105	0.0124	0.0127	0.0099	0.0119
% to BODY WEIGHT	0.0054	0.0056	0.0061	0.0049	0.0053
THYMUS	0.4271	0.4028	0.4712	0.3402	0.3384
% to BODY WEIGHT	0.2211	0.1807	0.2275	0.1693	0.1512
UTERUS	0.5017	0.5529	0.5259	1.0707	0.4059
% to BODY WEIGHT	0.2597	0.2480	0.2539	0.5329	0.1814
SPLEEN	0.7016	0.7052	0.6087	0.6336	0.5251
% to BODY WEIGHT	0.3632	0.3163	0.2939	0.3154	0.2346
KIDNEY-LEFT	0.7982	0.7901	0.7802	0.7917	0.7231
% to BODY WEIGHT	0.4133	0.3544	0.3767	0.3941	0.3231
KIDNEY-RIGHT	0.8647	0.7710	0.8177	0.7917	0.7652
% to BODY WEIGHT	0.4477	0.3458	0.3949	0.3941	0.3419
HEART	0.9688	0.9231	0.8402	0.8802	0.8554
% to BODY WEIGHT	0.5016	0.4141	0.4057	0.4381	0.3822
LUNG	1.4233	1.4335	1.3852	1.2107	1.1094
% to BODY WEIGHT	0.7369	0.6430	0.6689	0.6026	0.4957
BRAIN	2.0664	1.8035	1.7693	1.9395	1.8178
% to BODY WEIGHT	1.0698	0.8090	0.8544	0.9654	0.8122
LIVER	6.4777	7.1312	6.7569	5.8485	5.9527
% to BODY WEIGHT	3.3537	3.1987	3.2628	2.9110	2.6596

The body weights were measured right before necropsy after an overnight fasting.

<END>

Appendix 1-11. Necropsy findings

NECROPSY findings			MALE
G1 (0 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
1	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
2	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
3	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
4	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
5	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
6	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
7	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
8	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
9	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
10	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
G2 (800 mg/kg/day)			
11	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
12	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
13	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
14	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
15	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
16	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
17	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
18	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
19	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
20	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings

<CONTINUED>

Appendix 1-11. Necropsy findings

NECROPSY findings			MALE
G3 (2000 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
21	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
22	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
23	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
24	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
25	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
26	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
27	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
28	TERMINAL SACRIFICE	LIVER	White discoloration on the part of caudate lobe
29	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
30	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
G4 (5000 mg/kg/day)			
31	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
32	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
33	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
34	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
35	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
36	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
37	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
38	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
39	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings
40	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings

<CONTINUED>

Appendix 1-11. Necropsy findings

NECROPSY findings				FEMALE
G1 (0 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS	
41	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
42	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
43	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
44	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid	
45	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
46	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid	
47	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
48	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
49	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
50	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid	
G2 (800 mg/kg/day)				
51	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
52	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
53	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
54	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
55	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
56	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
57	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
58	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
59	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
60	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	

<CONTINUED>

Appendix 1-11. Necropsy findings

NECROPSY findings				FEMALE
G3 (2000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS	
61	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
62	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
63	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
64	TERMINAL SACRIFICE	ADRENAL GLAND	Diffused white spots on both sides	
65	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
66	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid	
67	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid	
68	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
69	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
70	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
G4 (5000 mg/kg/day)				
71	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
72	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
73	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	One globular cyst on the uterus cornu sized 0.2 cm	
74	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
75	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
76	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
77	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
78	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
79	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid	
80	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	

<END>

APPENDIX 2. PATHOLOGY REPORT

병리 보고서

Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를
이용한 4 주간 반복 경구투여 독성시험

시험번호: 13-RR-336

시험의뢰기관: 경희대학교

(주)켄온비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
240, Nampyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do,
449-826, Republic of Korea

서 명

Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4 주간 반복 경구투여 독성시험
(병리 부문)

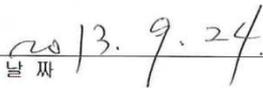


강 부 현

조직병리책임자

DVM, PhD, DKSTP, Fellow IATP

㈜캠온 비임상연구소



날 짜

시험개요

시 험 제 목 Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4 주간 반복
경구투여 독성시험

시 험 부 문 병리

시 험 일 정	2013 년 08 월 16 일 - 09 월 09 일	검체제작 기간
	2013 년 09 월 05 일 - 09 월 20 일	조직병리 검사
	2013 년 09 월 24 일	병리 보고서 제출

재료 및 방법

1. 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량(mL/kg/day)	투여량(mg/kg/day)
G1	M / F	10 / 10	1-10 / 41-50	20	0
G2	M / F	10 / 10	11-20 / 51-60	20	800
G3	M / F	10 / 10	21-30 / 61-70	20	2000
G4	M / F	10 / 10	31-40 / 71-80	20	5000

G1: 부형제대조군(염균주사용수)

2. 임상병리

다음과 같은 항목에 대하여 검사하였다.

1) 요검사

요색조(urine color)	빌리루빈(BIL)	pH	아질산염(NIT)
투명도(clarity)	케톤체(KET)	요단백(PRO)	잠혈(BLO)
당(GLU)	요비중(SG)	유로빌리노겐(URO)	백혈구(WBC)
적혈구(RBC)	원주(cast)	상피세포(epithelial cells)	

2) 혈액학적 검사

(1) 전혈구 검사

적혈구(RBC)	적혈구분포폭(RDW)	림프구(LYM)
헤마토크리치(HCT)	헤모글로빈분포폭(HDW)	단핵구(MONO)
혈색소량(HGB)	평균혈소판용적(MPV)	호산구(EOS)
평균적혈구용적(MCV)	혈소판수(PLT)	호염기구(BASO)
평균적혈구헤모글로빈량(MCH)	백혈구(WBC)	대형비염색성세포(LUC)
평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)	호중구(NEU)	

(2) 혈액응고시간 검사

부분활성트롬보πλα스틴시간(APTT)	프로트롬빈시간(PT)
----------------------	-------------

3) 혈액생화학적 검사

아스파테이트 아미노기전이효소(AST)	총콜레스테롤(TCHO)	크레아티닌(CRE)
알라닌 아미노기전이효소(ALT)	중성지방(TG)	무기인(IP)
알칼라인포스파타제(ALP)	총단백(TP)	칼슘 이온(Ca ²⁺)
크레아틴인산활성효소(CPK)	알부민(ALB)	칼륨(K ⁺)
총빌리루빈(TBIL)	알부민/글로불린 비(A/G)	나트륨(Na ⁺)
당(GLU)	혈액요소질소(BUN)	염소(Cl ⁻)

3. 조직병리

1) 부검

임상병리 검사를 위한 채혈 후, 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사 시킨 다음, 체표, 피하, 두부, 흉강 및 복강의 모든 장기를 관찰하였고, 부검소견을 기록하였다.

2) 장기중량

모든 동물의 아래 장기에 대한 중량을 측정(양측성 장기는 각각 측정)하였고, 각 장기의 중량으로 체중에 대한 상대중량을 산출하였다.

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

3) 조직 및 장기의 보존

모든 동물의 아래 장기를 적출하고, 안구(Davidson's 용액), 고환 및 부고환(Bouin's 용액)을 제외한 모든 장기를 10 % 중성완충포름알린용액에 고정하였다.

뇌(brain)	공장(jejunum)	말초신경(peripheral nerve)
뇌하수체(pituitary gland)	회장(ileum)	대퇴경골관절(femorotibial joint)
폐(lung)	맹장(cecum)	방광(urinary bladder)
심장(heart)	결장(colon)	고환(testis) [#]
가슴샘(thymus)	직장(rectum)	부고환(epididymis) [#]
비장(spleen)	안구(시신경 포함) [#] (eye with optic nerve)	전립샘(prostate gland)
부신(adrenal gland) [#]	갑상샘(부갑상샘 포함) [#] (thyroid gland with parathyroid gland)	정낭(응고샘 포함) (seminal vesicle with coagulation gland)

PATHOLOGY REPORT

Chemon Study No. 13-RR-336

신장(kidney) [#]	하더샘(hardierian gland) [#]	난소(ovary) [#]
간장(liver)	침샘(salivary gland) [#]	자궁(경부포함) (uterus with cervix)
혀(tongue)	대동맥(aorta)	질(vagina)
기관(trachea)	흉골(골수포함) (sternum with bone marrow)	피부(skin)
식도(esophagus)	턱밑림프절 (mandibular lymph node) [#]	젖샘 (mammary gland of females)
위(stomach)	장간막림프절 (mesenteric lymph node)	골격근(skeletal muscle)
췌장(pancreas)	흉척수(thoracic spinal cord)	육안적 병변(gross lesion)
십이지장(duodenum)	투여부위(injection site)	

양측 장기 모두 적출 한 후 고정한다.

부갑상샘이 조직슬라이드 상에 관찰되지 않을 경우 SOP에 따라 조치하고, 해당 장기가 관찰된 조직슬라이드만을 검경한다.

젖샘은 수컷의 경우 조직슬라이드 상에 관찰될 시 검경을 실시한다

4) 조직병리학적 검사

부형제대조군 및 시험물질 5000 mg/kg/day 투여군의 모든 동물의 고정장기와 시험물질 2000 mg/kg/day 투여군에서 부검소견이 관찰된 장기에 대하여 일반적인 과정을 거쳐 조직슬라이드를 제작하여 조직병리학적 검사를 수행하였다. 조직병리학적 소견은 Pristima[®] (xybion, USA) 프로그램에 입력하여 처리하였으며, 진단용어는 Pristima[®]의 Lexicon에 제시된 것을 우선적으로 사용하였다. 필요시 미국독성병리학회(Society of Toxicology)의 Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria: Guides for Toxicologic Pathology 및 Covance 사의 Covance Glossary 등을 참고하였다¹⁻¹⁰⁾.

병변 정도의 등급매기기는 Pristima[®] program에 따라서 5 등급으로 실시되었다. 일반적으로 등급매기기는 미약한(minimal) 병변을 +1로, 현저한(massive) 병변을 +5로 하여 두 변화 사이를 정비례로 균등하게 5 등분하여 반정량적으로 실시되었다. 특히, 신장의 만성진행성신병증은 초기 변화로서 기저막이 비후된 호염성세뇨관(tubule basophilia with thickened dasement membrane)이 관찰되면 만성진행성신병증으로 진단하였다¹⁰⁾. 이 때 같은 쪽 신장에 병발한 유리질원주(hyaline cast)는 별도로 진단하지 않았다. 그러나 호염성세뇨관에서 기저막의 비후가 관찰되지 않았으면 별도로 진단하였고, 만성진행성신병증이 관찰되지 않은 경우, 유리질원주(hyaline cast)는 별도로 진단하였다.

4. 통계분석

통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용하였으며 유의수준은 $P < 0.05$ 로 설정하였다.

체중, 사료 및 물섭취량, 혈액학 및 혈액생화학적 자료, 장기중량에 대하여는 자료의 정규성을 가정하고 모수적인 일원분산분석(One-way ANOVA)을 적용하였다. 분산의 동질성은 Levene test로 검정하였다.

ANOVA 결과가 유의하며 등분산인 경우 Duncan multiple range test 로, 이분산인 경우는 Dunnett T3 test로 사후검정을 실시하여 부형제대조군과 유의한 차이를 나타내는 군을 확인하였다.

요검사 결과는 순위화한 데이터를 이용하여 비모수적 Kruskal-Wallis'H-test를 실시하였으며, 그 결과가 유의할 경우 Mann-Whitney U-test로 부형제대조군과 유의한 차이를 나타내는 군을 확인하였다.

본 보고서에서 특별히 언급하지 않는 한, '유의한'은 부형제대조군과 비교하였을 때 통계학적인 유의성을 나타낸다는 의미이다.

결과

요검사

요단백(PRO)이 시험물질 2000 및 5000 mg/kg/day 투여군 수컷 및 시험물질 5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 유의하게 높았다($P<0.05$).

요비중(SG)이 시험물질 5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 유의하게 높았다($P<0.05$).

혈액학적 검사

헤마토크리치(HCT)가 시험물질 2000 및 5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 유의하게 증가하였고($P<0.05$), 백혈구(WBC)가 시험물질 5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 유의하게 증가하였다($P<0.05$).

혈액생화학적 검사

혈액요소질소(BUN)가 모든 시험물질 투여군 수컷에서 유의하게 증가하였고, 칼슘(Ca^{2+})이 시험물질 800 및 2000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 유의하게 감소하였다. 나트륨(Na^+) 및 염소(Cl^-)는 시험물질 5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 유의하게 감소하였다 ($P<0.05$ or $P<0.01$).

장기중량

우측 신장 중량이 시험물질 5000 mg/kg/day 투여군 수컷에서는 절대 및 상대중량이 유의하게 증가하였고($P<0.05$ or $P<0.01$), 암컷에서는 절대중량이 유의하게 증가하였다($P<0.05$).

한편, 비장의 절대중량이 시험물질 5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 유의하게 증가하였다($P<0.05$). 심장의 절대중량은 시험물질 2000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 유의하게 증가하였다($P<0.05$).

부검소견

간장의 미상엽 일부가 흰색조로 변색된 소견(locally extensive white discoloration caudate lobe)이 시험물질 2000 mg/kg/day 투여군 수컷 1 레에서 관찰되었다.

자궁각 부위에 직경 0.2 cm크기의 낭포 1개소(cyst, 0.2 cm diameter, uterine horn)가 시험물질 5000 mg/kg/day 투여군 암컷 1 레에서 관찰되었고, 양측 부신에 흰색반점이 산재된 소견(diffused white spots)이 시험물질 2000 mg/kg/day 투여군 암컷 1 레에서 관찰되었다.

또한 자궁내 맑은액체저류(retention of clear fluid)가 부형제대조군, 2000 및 5000 mg/kg/day 시험물질 투여군 순으로 각 3, 2 및 1 레 관찰되었다.

조직병리학적 검사

조직병리학적 검사 결과, 주목할 만한 병변은 관찰되지 않았다.

부검에서 관찰되었던 소견은 간장과 부신에서 미상엽 괴사(caudate lobe necrosis) 및 피질비대(cortical hypertrophy)로 확인되었고, 자궁에서 낭성샘(cystic gland) 및 자궁내강 확장(luminal dilation)으로 확인되었다. 한편, 염증세포침윤(inflammation cell infiltration) 및 이행상피과다형성(transitional cell hyperplasia)이 시험물질 5000 mg/kg/day 투여군 암컷 1 개체(79번 동물)의 방광에서 관찰되었는데 이 병변은 동일개체의 신장에서 관찰된 신우부위 염증세포침윤(pelvis inflammation cell infiltration)과 연관된 결과였다.

그 밖에 Sprague-Dawley 랫드에서 흔히 관찰되는 자연발생병변²⁻¹¹⁾이 관찰되었다.

고찰 및 결론

본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여를 실시하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 무독성량 및 표적장기를 확인하기 위하여 수행하였다.

요검사 결과, 통계학적으로 유의한 변화를 보인 PRO 및 SG의 변화는 군간 용량상관성은 인정되었으나, 신장의 조직병리학적 검사결과 부형제대조군과 비교하여 차이를 나타내지 않았으므로 시험물질과 무관한 변화로 판단한다.

혈액학적 검사결과, 통계학적으로 유의한 변화를 보인 암컷 HCT 및 WBC의 변화는 군간 용량상관성 및 성간연관성이 없었고, 변화의 폭이 작았다. 또한, 연관된 RBC, RDW, RET 등의 변화가 관찰되지 않았고, 동일 주령의 Sprague-Dawley 랫드의 배경자료¹²⁾내의 결과로 시험물질과 무관한 변화로 판단한다.

혈액생화학적 검사결과, 통계학적으로 유의한 변화를 보인 수컷 BUN은 비록, 암컷에서 용량상관성이 인정되지 않았지만, 시험물질 5000 mg/kg/day 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 약간 증가하였으므로, 시험물질에 의한 영향으로 판단한다. 하지만, 연관된 크레아티닌(CRE)의 변화 및 신장의 조직병리학적 검사결과 연관된 변화가 관찰되지 않았고, 동일 주령의 Sprague-Dawley 랫드의 배경자료¹²⁾내의 결과이었으므로, 독성학적 의미는 미약한 것으로 판단한다.

그 밖에 변화를 보인 Ca^{2+} 은 용량상관성이 인정되지 않았으므로 시험물질과 무관한 변화로 판단하고, Na^+ 및 Cl^- 의 변화는 군간 용량상관성이 인정되지 않았고, 수컷 동물의 음수량(day 27)의 증가와 연관된 일시적 변화로서, 시험물질과 무관한 변화로 판단한다.

장기중량 측정결과, 통계학적으로 유의한 변화를 보인 암수 우측 신장의 절대중량 증가는 비록 시험물질 800 mg/kg/day 투여군에서 부형제대조군보다 감소하였지만 시험물질 2000 mg/kg/day 이상 투여군에서는 암수모두 증가하는 경향이 인정되었다. 이 변화는 혈액생화학적 검사결과에서 변화를 보인 BUN과 부합하는 변화로 시험물질에 의한 영향으로 판단한다. 하지만, 본 변화는 동일 주령의 Sprague-Dawley 랫드의 배경자료¹²⁾내의 결과였고, 조직병리학적 검사결과 부형제대조군과 비교하여 연관된 변화를 관찰할 수 없었으므로 독성학적 의미는 미약한 것으로 판단한다.

그 밖에 통계학적으로 유의한 변화를 보인 심장의 절대중량은 용량상관성이 없는 변화로 시험물질과 무관한 변화로 판단한다.

PATHOLOGY REPORT

Chemon Study No. 13-RR-336

부검결과 관찰된 소견은 모두 부합된 소견이 관찰되었고, 이 들 소견은 동일 주령의 Sprague-Dawley 랫드에서 발생하는 자연발생병변²⁻¹¹⁾으로 시험물질과는 무관한 것으로 판단한다.

조직병리학적 검사결과, 변화의 발생빈도와 정도에 있어서 부형제대조군과 비교하여 군간 용량상 관성이 인정되는 변화가 관찰되지 않았고, 5000 mg/kg/day 투여군에서 현저한 변화가 관찰되지 않았으므로, 시험물질에 의해 유발된 변화는 없었다고 판단한다.

또한, 본시험에서 관찰된 모든 소견들은 Sprague-Dawley 랫드에서 흔히 관찰되는 자연발생병변²⁻¹¹⁾으로 판단한다.

요검사, 혈액검사, 혈액생화학검사, 장기중량, 부검 및 조직병리검사 결과를 바탕으로 종합해 볼 때, Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여를 실시하였을 때, 본 시험에서 표적장기는 관찰하지 못했고, 무독성량(NOEL)은 암수 모두 5000 mg/kg/day 이상 이라고 판단한다.

참고문헌

1. Xybion (2010). Lexicon, Pristima™ (Path/Tox system), Version 6.1.0 Build 31. Xybion Medical Systems. USA
2. Streett, C. Spencer et al (2003). Standardized System for Nomenclature and Diagnostic Criteria – Guides for Toxicologic Pathology. STP/ARP/AFIP, Washington, D.C.
3. Covance (2001). Covance Glossary, Version 5
4. Greaves, P. (2012). Histopathology of preclinical toxicity studies: Interpretation and relevance in drug safety evaluation. Elsevier.
5. Renne, R. et al. (2009). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Respiratory Tract. Toxicologic Pathology 37:5S–73S.
6. Thoolen, B. et al. (2010). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Hepatobiliary System. Toxicologic Pathology 38:5S–81S.
7. Frazier, K.S. et al. (2012). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Urinary System. Toxicologic Pathology 40:14S–86S.
8. Kaufman, W. et al. (2012). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Central and Peripheral Systems. Toxicologic Pathology 40: 87S–157S.
9. Haschek, W.M., Rousseaux, C.G., Wallig, M.A.(2010). Fundamentals of Toxicologic Pathology. 2nd edition, Academic Press.
10. Peter Mann.(2012). Background lesions in laboratory animals: A color atlas.Elsevier
11. Hard, G.C., Khan, K.N.: A Contemporary Overview of Chronic Progressive Nephropathy in the Laboratory Rat, and Its Significance for Human Risk Assessment. Toxicologic Pathology, 32:171–180, 2004.
12. ZZ Han, HD Xu, KH Kim, TH Ahn, JS Bae, JY Lee, KH Gil, JY Lee, SJ Woo, HJ Yoo, HK Lee, KH Kim, CK Park, HS Zhang and SW Song (2010).Reference Data of the Main Physiological Parameters in Control Sprague–Dawley Rats from Pre–clinical Toxicity Studies, Lab. Anim. Res. 26(2):153–164.

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 1 of 7

Printed: 10 Oct 2013 11:06:13 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley		Subchronic/4-week repeated oral dose					
		M			F		
Dosage Group: Control		3	4	Control	3	4	
Number of Animals:	10	10	10	10	10	10	
Number Examined:	10	1	10	10	3	10	
<hr/>							
Adrenal gland	Number Examined:	10	-	10	10	1	10
Hypertrophy, zona glomerulosa		0	0	0	0	1	0
Pituitary gland	Number Examined:	10	-	10	10	-	10
Cyst(s), pars distalis		0	0	0	0	0	2
Cystic cleft		2	0	1	4	0	3
Prostate gland	Number Examined:	10	-	10			
Infiltration, mononuclear cell		4	0	2			

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 2 of 7

Printed: 10 Oct 2013 11:06:13 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley		Subchronic/4-week repeated oral dose					
		M			F		
Dosage Group: Control		3	4	Control	3	4	
Number of Animals:		10	10	10	10	10	
Number Examined:		10	1	10	10	3	
Uterus		Number Examined:		10	2	10	
Cyst, gland				0	0	1	
Dilation, lumen				3	2	4	
Vagina		Number Examined:		10	-	10	
Mucification				4	0	5	
Kidney		Number Examined:		10	-	10	
Basophilia, tubules		5	0	7	1	0	
Casts, hyaline		5	0	8	0	0	
Infiltration, inflammation cell, pelvis		0	0	0	0	0	
Mineralization, intraluminal, corticomedullary junction		1	0	0	0	0	
Mineralization, intraluminal,papilla		1	0	1	1	0	
Nephropathy, chronic progressive		0	0	0	1	0	

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 3 of 7

Printed: 10 Oct 2013 11:06:13 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley		Subchronic/4-week repeated oral dose					
		M			F		
Dosage Group: Control		3	4	Control	3	4	
Number of Animals:		10	10	10	10	10	
Number Examined:		10	1	10	10	3	
Urinary bladder		Number Examined:					
		10	-	10	10	-	10
Hyperplasia, transitional cell		0	0	0	0	0	1
Infiltration, inflammation cell, transitional cell		0	0	0	0	0	1
Liver		Number Examined:					
		10	1	10	10	-	10
Infiltration, mixed cell		2	0	0	2	0	2
Infiltration, mononuclear cell		9	0	6	4	0	6
Necrosis, caudate lobe		0	1	0	0	0	0
Spleen		Number Examined:					
		10	-	10	10	-	10
Hematopoiesis, extramedullary		8	0	8	4	0	2

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 4 of 7

Printed: 10 Oct 2013 11:06:13 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley		Subchronic/4-week repeated oral dose					
		M			F		
Dosage Group: Control		3	4	Control	3	4	
	Number of Animals:	10	10	10	10	10	
	Number Examined:	10	1	10	10	3	
<hr/>							
Lung	Number Examined:	10	-	10	10	-	10
	Inflammation, mixed	1	0	1	2	0	2
Heart	Number Examined:	10	-	10	10	-	10
	Infiltration, mononuclear cell, myocardium	1	0	0	0	0	0
	Inflammation, mixed, epicardium	1	0	0	0	0	0
Thyroid gland	Number Examined:	10	-	10	10	-	10
	Cyst, ultimobranchial duct	2	0	0	0	0	2
	Ectopia, thymus	3	0	0	0	0	0

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 5 of 7

Printed: 10 Oct 2013 11:06:13 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley		Subchronic/4-week repeated oral dose					
		M			F		
Dosage Group: Control		3	4	Control	3	4	
Number of Animals:		10	10	10	10	10	
Number Examined:		10	1	10	10	3	
Salivary gland, parotid		Number Examined: 10					
Infiltration, mononuclear cell		0	0	0	1	0	
Vacuolation, acinar cell		8	0	9	0	0	
Lymph node, mandibular		Number Examined: 10					
Hyperplasia, lymphoid		8	0	6	2	0	
Cecum		Number Examined: 10					
Dilation, lumen		5	0	3	1	0	

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 6 of 7

Printed: 10 Oct 2013 11:06:13 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley		Subchronic/4-week repeated oral dose					
		M			F		
Dosage Group: Control		3	4	Control	3	4	
Number of Animals:		10	10	10	10	10	
Number Examined:		10	1	10	10	3	
Colon		Number Examined:					
		10	-	10	10	-	10
Dilation, lumen		0	0	3	0	0	1
Rectum		Number Examined:					
		10	-	10	10	-	10
Dilation, lumen		2	0	2	2	0	4

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 7 of 7

Printed: 10 Oct 2013 11:06:13 AM +09:00

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Subchronic/4-week repeated oral dose

Rat/Sprague-Dawley

Report Selections

Report_phases_together

True

Include_Finding

False

Exclude_Finding

True

Report generated by

Mi-Jin Cha

Control group(s)

1

Comparison group(s)

2,3,4

Sex

Male,Female

Individual Data Listing of Histopathology

Page 1 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
001	M	1
<p>Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29 Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)</p>		
<p>Kidney (Required) Basophilia, tubules - minimal</p>		
<p>Liver (Required) Infiltration, mononuclear cell - minimal</p>		
<p>Heart (Required) Infiltration, mononuclear cell - minimal</p>		
<p>Cecum (Required) Dilatation, lumen - Present</p>		
<p>The following Tissues are No Abnormalities Detected:</p>		
Skin	Adrenal gland	Mammary gland
Epididymis	Seminal vesicle	Pituitary gland
Testis	Prostate gland	Spleen
Thymus	Thyroid gland	Parathyroid gland
Salivary gland, sublingual	Jejunum	Skeletal muscle
Eye	Harderian gland	Lung
Trachea	Esophagus	Salivary gland, mandibular
Stomach	Tongue	Urinary bladder
Lymph node, mandibular	Femorotibial joint	Aorta
Lymph node, mesenteric	Rectum	Brain
Duodenum	Ileum	Colon
Pancreas	Spinal cord, thoracic	Nerve, peripheral

Individual Data Listing of Histopathology

Page 2 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
001	M	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Salivary gland, parotid	Sternum
	Eye-Optic Nerve	Coagulating gland
002	M	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Pituitary gland (Required)		
Cystic cleft - Present		
Prostate gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Kidney (Required)		
Casts, hyaline - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Thyroid gland (Required)		
Ectopia, thymus - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Skin	Adrenal gland
	Epididymis	Seminal vesicle
	Heart	Thymus
	Salivary gland, sublingual	Jejunum
		Mammary gland
		Testis
		Parathyroid gland
		Skeletal muscle

Individual Data Listing of Histopathology

Page 3 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
002	M	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Eye	Harderian gland	Lung
Trachea	Esophagus	Salivary gland, mandibular
Stomach	Tongue	Lymph node, mandibular
Urinary bladder	Femorotibial joint	Aorta
Lymph node, mesenteric	Rectum	Brain
Duodenum	Ileum	Colon
Pancreas	Cecum	Spinal cord, thoracic
Nerve, peripheral	Salivary gland, parotid	Sternum
Coagulating gland	Eye-Optic Nerve	
003	M	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Mineralization, corticomedullary junction - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mixed cell - minimal		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Thyroid gland (Required)		
Cyst(s), ultimobranchial duct - Present		
Salivary gland, parotid (Required)		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 4 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
003	M	1
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - mild		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Skin	Adrenal gland	Mammary gland
Epididymis	Seminal vesicle	Pituitary gland
Testis	Prostate gland	Heart
Thymus	Parathyroid gland	Salivary gland, sublingual
Jejunum	Skeletal muscle	Eye
Harderian gland	Lung	Trachea
Esophagus	Salivary gland, mandibular	Stomach
Tongue	Urinary bladder	Femrotibial joint
Aorta	Lymph node, mesenteric	Rectum
Brain	Duodenum	Ileum
Colon	Pancreas	Cecum
Spinal cord, thoracic	Nerve, peripheral	Sternum
Coagulating gland	Eye-Optic Nerve	
004	M	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Prostate gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 5 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
004	M	1
Kidney (Required)		
Basophilia, tubules - minimal		
Casts, hyaline - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - mild		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Mammary gland	Skin
Epididymis	Seminal vesicle	Pituitary gland
Testis	Heart	Thymus
Thyroid gland	Parathyroid gland	Salivary gland, sublingual
Jejunum	Skeletal muscle	Eye
Harderian gland	Lung	Trachea
Esophagus	Salivary gland, mandibular	Stomach
Tongue	Urinary bladder	Femorotibial joint
Aorta	Lymph node, mesenteric	Rectum
Brain	Duodenum	Ileum
Colon	Pancreas	Cecum

Individual Data Listing of Histopathology

Page 6 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group			
004	M	1	The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
			Spinal cord, thoracic	Nerve, peripheral	Sternum
			Coagulating gland	Eye-Optic Nerve	
005	M	1	<p>Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice</p> <p>Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29</p> <p>Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)</p> <p>Kidney (Required)</p> <p>Basophilia, tubules - minimal</p> <p>Casts, hyaline - minimal</p> <p>Liver (Required)</p> <p>Infiltration, mononuclear cell - minimal</p> <p>Thyroid gland (Required)</p> <p>Cyst(s), ultimobranchial duct - Present</p> <p>Parathyroid gland (Required) Both Missing</p> <p>Salivary gland, parotid (Required)</p> <p>Vacuolation, acinar cell - minimal</p> <p>Lymph node, mandibular (Required)</p> <p>Hyperplasia - minimal</p> <p>Cecum (Required)</p> <p>Dilation, lumen - Present</p> <p>Rectum (Required)</p> <p>Dilation, lumen - Present</p>		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 7 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
005	M	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Prostate gland	Adrenal gland	Mammary gland
Skin	Epididymis	Seminal vesicle
Pituitary gland	Testis	Spleen
Heart	Thymus	Salivary gland, sublingual
Jejunum	Skeletal muscle	Eye
Harderian gland	Lung	Trachea
Esophagus	Salivary gland, mandibular	Stomach
Tongue	Urinary bladder	Femorotibial joint
Aorta	Lymph node, mesenteric	Brain
Duodenum	Ileum	Colon
Pancreas	Spinal cord, thoracic	Nerve, peripheral
Sternum	Coagulating gland	Eye-Optic Nerve
006	M	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Basophilia, tubules - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - mild		
Lung (Required)		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 8 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
006	M	1
Lung (Required)		
Inflammation, mixed - mild		
Thyroid gland (Required)		
Ectopia, thymus - Present		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - minimal		
Cecum (Required)		
Dilation, lumen - Present		
Rectum (Required)		
Dilation, lumen - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Skin	Prostate gland
Mammary gland	Epididymis	Seminal vesicle
Pituitary gland	Testis	Heart
Thymus	Salivary gland, sublingual	Jejunum
Skeletal muscle	Eye	Harderian gland
Trachea	Esophagus	Salivary gland, mandibular
Stomach	Tongue	Urinary bladder
Femorotibial joint	Aorta	Lymph node, mesenteric
Brain	Duodenum	Ileum
Colon	Pancreas	Spinal cord, thoracic

Individual Data Listing of Histopathology

Page 9 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
006	M	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Nerve, peripheral	Sternum
	Eye-Optic Nerve	Parathyroid gland
		Coagulating gland
007	M	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
	Basophilia, tubules - minimal	
	Casts, hyaline - minimal	
Liver (Required)		
	Infiltration, mononuclear cell - minimal	
Spleen (Required)		
	Hematopoiesis - minimal	
Salivary gland, parotid (Required)		
	Vacuolation, acinar cell - minimal	
Lymph node, mandibular (Required)		
	Hyperplasia - mild	
Cecum (Required)		
	Dilation, lumen - Present	
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Adrenal gland	Skin
	Prostate gland	Epididymis
	Pituitary gland	Testis
		Mammary gland
		Seminal vesicle
		Heart

Individual Data Listing of Histopathology

Page 10 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
007	M	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Thymus	Thyroid gland	Parathyroid gland
Salivary gland, sublingual	Jejunum	Skeletal muscle
Eye	Harderian gland	Lung
Trachea	Esophagus	Salivary gland, mandibular
Stomach	Tongue	Urinary bladder
Femorotibial joint	Aorta	Lymph node, mesenteric
Rectum	Duodenum	Ileum
Colon	Pancreas	Spinal cord, thoracic
Nerve, peripheral	Brain	Sternum
Coagulating gland	Eye-Optic Nerve	
008	M	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Pituitary gland (Required)		
Cystic cleft - Present		
Liver (Required)		
Infiltration, mixed cell - minimal		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - mild		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 11 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
008	M	1
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - minimal		
Cecum (Required)		
Dilation, lumen - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Mammary gland	Skin
Prostate gland	Epididymis	Seminal vesicle
Testis	Kidney	Heart
Thymus	Thyroid gland	Parathyroid gland
Salivary gland, sublingual	Jejunum	Skeletal muscle
Eye	Harderian gland	Lung
Trachea	Esophagus	Salivary gland, mandibular
Stomach	Tongue	Urinary bladder
Femorotibial joint	Aorta	Lymph node, mesenteric
Rectum	Duodenum	Ileum
Colon	Pancreas	Spinal cord, thoracic
Nerve, peripheral	Brain	Sternum
Coagulating gland	Eye-Optic Nerve	
009	M	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Prostate gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 12 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
009	M	1
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Heart (Required)		
Inflammation - minimal		
Thyroid gland (Required)		
Ectopia, thymus - Present		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - moderate		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Skin	Mammary gland
Epididymis	Seminal vesicle	Pituitary gland
Testis	Kidney	Liver
Thymus	Parathyroid gland	Salivary gland, sublingual
Jejunum	Skeletal muscle	Eye
Harderian gland	Lung	Trachea
Esophagus	Salivary gland, mandibular	Stomach
Tongue	Urinary bladder	Femrotibial joint
Aorta	Lymph node, mesenteric	Rectum
Duodenum	Ileum	Colon
Pancreas	Cecum	Spinal cord, thoracic
Nerve, peripheral	Brain	Sternum

Individual Data Listing of Histopathology

Page 13 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
009	M	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Coagulating gland	Eye-Optic Nerve
010	M	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Prostate gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Kidney (Required)		
Casts, hyaline - minimal		
Mineralization, papilla - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - mild		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - mild		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Skin	Mammary gland
Epididymis	Seminal vesicle	Pituitary gland
Testis	Heart	Thymus
Thyroid gland	Parathyroid gland	Salivary gland, sublingual

Individual Data Listing of Histopathology

Page 14 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
010	M	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Jejunum	Skeletal muscle
	Harderian gland	Lung
	Esophagus	Salivary gland, mandibular
	Tongue	Urinary bladder
	Aorta	Lymph node, mesenteric
	Duodenum	Ileum
	Pancreas	Cecum
	Nerve, peripheral	Brain
	Coagulating gland	Eye-Optic Nerve
028	M	3
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Liver (Non required)		
Necrosis, caudate lobe - Present		
031	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Basophilia, tubules - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 15 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
031	M	4
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		
Cecum (Required)		
Dilation, lumen - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Mammary gland	Epididymis
Pituitary gland	Testis	Skin
Prostate gland	Seminal vesicle	Tongue
Thymus	Trachea	Esophagus
Parathyroid gland	Duodenum	Spinal cord, thoracic
Eye	Nerve, peripheral	Lung
Urinary bladder	Jejunum	Rectum
Heart	Aorta	Lymph node, mandibular
Salivary gland, mandibular	Lymph node, mesenteric	Ileum
Skeletal muscle	Pancreas	Thyroid gland
Salivary gland, sublingual	Harderian gland	Stomach
Colon	Brain	Femorotibial joint
Coagulating gland	Eye-Optic Nerve	Sternum
032	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 16 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
032	M	4
Kidney (Required)		
Casts, hyaline - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Mammary gland	Adrenal gland	Epididymis
Pituitary gland	Testis	Skin
Prostate gland	Seminal vesicle	Tongue
Spleen	Thymus	Trachea
Esophagus	Parathyroid gland	Duodenum
Spinal cord, thoracic	Eye	Nerve, peripheral
Lung	Urinary bladder	Jejunum
Heart	Aorta	Lymph node, mandibular
Salivary gland, mandibular	Lymph node, mesenteric	Ileum
Rectum	Skeletal muscle	Pancreas
Thyroid gland	Salivary gland, sublingual	Harderian gland
Stomach	Cecum	Colon
Brain	Femorotibial joint	Coagulating gland
Eye-Optic Nerve	Sternum	
033	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 17 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
033	M	4
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - mild		
Cecum (Required)		
Dilation, lumen - Present		
Colon (Required)		
Dilation, lumen - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Mammary gland	Epididymis
Pituitary gland	Testis	Skin
Prostate gland	Seminal vesicle	Tongue
Spleen	Thymus	Trachea
Esophagus	Parathyroid gland	Duodenum
Spinal cord, thoracic	Eye	Nerve, peripheral
Kidney	Lung	Urinary bladder
Jejunum	Heart	Aorta
Salivary gland, mandibular	Lymph node, mesenteric	Ileum
Rectum	Skeletal muscle	Pancreas
Thyroid gland	Salivary gland, sublingual	Harderian gland

Individual Data Listing of Histopathology

Page 18 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
033	M	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Stomach	Brain	Femorotibial joint
Coagulating gland	Eye-Optic Nerve	Sternum
034	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Casts, hyaline - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - minimal		
Colon (Required)		
Dilation, lumen - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Mammary gland	Epididymis
Pituitary gland	Testis	Skin
Prostate gland	Seminal vesicle	Tongue
Thymus	Trachea	Esophagus

Individual Data Listing of Histopathology

Page 19 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
034	M	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Parathyroid gland	Duodenum	Spinal cord, thoracic
Eye	Nerve, peripheral	Lung
Urinary bladder	Jejunum	Heart
Aorta	Salivary gland, mandibular	Lymph node, mesenteric
Ileum	Rectum	Skeletal muscle
Pancreas	Thyroid gland	Salivary gland, sublingual
Harderian gland	Stomach	Cecum
Brain	Femorotibial joint	Coagulating gland
Eye-Optic Nerve	Sternum	
035	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Pituitary gland (Required)		
Cystic cleft - Present		
Prostate gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - mild		
Kidney (Required)		
Basophilia, tubules - minimal		
Casts, hyaline - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Lung (Required)		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 20 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group	
035	M	4	
			Lung (Required)
			Inflammation, mixed - minimal
			Parathyroid gland (Required)
			One of the pair is Missing
			Salivary gland, parotid (Required)
			Vacuolation, acinar cell - minimal
			Cecum (Required)
			Dilation, lumen - Present
			Rectum (Required)
			Dilation, lumen - Present
			The following Tissues are No Abnormalities Detected:
			Adrenal gland
			Epididymis
			Testis
			Skin
			Mammary gland
			Seminal vesicle
			Tongue
			Liver
			Thymus
			Trachea
			Esophagus
			Duodenum
			Spinal cord, thoracic
			Eye
			Nerve, peripheral
			Urinary bladder
			Jejunum
			Heart
			Aorta
			Parathyroid gland
			Lymph node, mandibular
			Salivary gland, mandibular
			Lymph node, mesenteric
			Ileum
			Skeletal muscle
			Pancreas
			Thyroid gland
			Salivary gland, sublingual
			Harderian gland
			Stomach
			Colon
			Brain
			Femorotibial joint
			Coagulating gland
			Eye-Optic Nerve
			Sternum
036	M	4	
			Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice

Individual Data Listing of Histopathology

Page 21 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
036	M	4
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Basophilia, tubules - minimal		
Casts, hyaline - minimal		
Mineralization, papilla - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - minimal		
Rectum (Required)		
Dilation, lumen - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Mammary gland	Adrenal gland	Epididymis
Pituitary gland	Testis	Skin
Prostate gland	Seminal vesicle	Tongue
Thymus	Trachea	Esophagus
Parathyroid gland	Duodenum	Spinal cord, thoracic
Eye	Nerve, peripheral	Lung

Individual Data Listing of Histopathology

Page 22 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336
StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats
Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
036	M	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Urinary bladder	Jejunum	Heart
Aorta	Salivary gland, mandibular	Lymph node, mesenteric
Ileum	Skeletal muscle	Pancreas
Thyroid gland	Salivary gland, sublingual	Harderian gland
Stomach	Cecum	Colon
Brain	Femorotibial joint	Coagulating gland
Eye-Optic Nerve	Sternum	
037	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Basophilia, tubules - minimal		
Casts, hyaline - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - mild		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - moderate		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Epididymis	Pituitary gland
Testis	Skin	Mammary gland

Individual Data Listing of Histopathology

Page 23 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
037	M	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Prostate gland	Seminal vesicle	Tongue
Liver	Thymus	Trachea
Esophagus	Parathyroid gland	Duodenum
Spinal cord, thoracic	Eye	Nerve, peripheral
Lung	Urinary bladder	Jejunum
Heart	Aorta	Salivary gland, mandibular
Lymph node, mesenteric	Ileum	Rectum
Skeletal muscle	Pancreas	Thyroid gland
Salivary gland, sublingual	Harderian gland	Stomach
Cecum	Colon	Brain
Femorotibial joint	Coagulating gland	Eye-Optic Nerve
Sternum		
038	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Basophilia, tubules - minimal		
Casts, hyaline - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - mild		
Salivary gland, parotid (Required)		
Vacuolation, acinar cell - minimal		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 24 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
038	M	4
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Epididymis	Pituitary gland
Testis	Skin	Mammary gland
Prostate gland	Seminal vesicle	Tongue
Liver	Thymus	Trachea
Esophagus	Parathyroid gland	Duodenum
Spinal cord, thoracic	Eye	Nerve, peripheral
Lung	Urinary bladder	Jejunum
Heart	Aorta	Salivary gland, mandibular
Lymph node, mesenteric	Ileum	Rectum
Skeletal muscle	Pancreas	Thyroid gland
Salivary gland, sublingual	Harderian gland	Stomach
Cecum	Colon	Brain
Femorotibial joint	Coagulating gland	Eye-Optic Nerve
Sternum		
039	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29		
Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)		
Prostate gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - mild		
Kidney (Required)		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 25 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
039	M	4
Kidney (Required)		
Basophilia, tubules - minimal		
Casts, hyaline - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - mild		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Mammary gland	Adrenal gland	Epididymis
Pituitary gland	Testis	Skin
Seminal vesicle	Tongue	Thymus
Trachea	Esophagus	Parathyroid gland
Salivary gland, parotid	Duodenum	Spinal cord, thoracic
Eye	Nerve, peripheral	Lung
Urinary bladder	Jejunum	Heart
Aorta	Salivary gland, mandibular	Lymph node, mesenteric
Ileum	Rectum	Skeletal muscle
Pancreas	Thyroid gland	Salivary gland, sublingual
Harderian gland	Stomach	Cecum
Colon	Brain	Femorotibial joint
Coagulating gland	Eye-Optic Nerve	Sternum

Individual Data Listing of Histopathology

Page 26 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group																														
039	M	4																														
040	M	4																														
<p>Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 29 Death Date and Time: 13 Aug 2013 03:12:47 PM +09:00(approximate)</p> <p>Kidney (Required) Basophilia, tubules - minimal Casts, hyaline - minimal</p> <p>Spleen (Required) Hematopoiesis - mild</p> <p>Salivary gland, parotid (Required) Vacuolation, acinar cell - minimal</p> <p>Colon (Required) Dilation, lumen - Present</p> <p>The following Tissues are No Abnormalities Detected:</p> <table border="0"> <tr> <td>Mammary gland</td> <td>Adrenal gland</td> <td>Epididymis</td> </tr> <tr> <td>Pituitary gland</td> <td>Testis</td> <td>Skin</td> </tr> <tr> <td>Prostate gland</td> <td>Seminal vesicle</td> <td>Tongue</td> </tr> <tr> <td>Liver</td> <td>Thymus</td> <td>Trachea</td> </tr> <tr> <td>Esophagus</td> <td>Parathyroid gland</td> <td>Duodenum</td> </tr> <tr> <td>Spinal cord, thoracic</td> <td>Eye</td> <td>Nerve, peripheral</td> </tr> <tr> <td>Lung</td> <td>Urinary bladder</td> <td>Jejunum</td> </tr> <tr> <td>Heart</td> <td>Aorta</td> <td>Lymph node, mandibular</td> </tr> <tr> <td>Salivary gland, mandibular</td> <td>Lymph node, mesenteric</td> <td>Ileum</td> </tr> <tr> <td>Rectum</td> <td>Skeletal muscle</td> <td>Pancreas</td> </tr> </table>			Mammary gland	Adrenal gland	Epididymis	Pituitary gland	Testis	Skin	Prostate gland	Seminal vesicle	Tongue	Liver	Thymus	Trachea	Esophagus	Parathyroid gland	Duodenum	Spinal cord, thoracic	Eye	Nerve, peripheral	Lung	Urinary bladder	Jejunum	Heart	Aorta	Lymph node, mandibular	Salivary gland, mandibular	Lymph node, mesenteric	Ileum	Rectum	Skeletal muscle	Pancreas
Mammary gland	Adrenal gland	Epididymis																														
Pituitary gland	Testis	Skin																														
Prostate gland	Seminal vesicle	Tongue																														
Liver	Thymus	Trachea																														
Esophagus	Parathyroid gland	Duodenum																														
Spinal cord, thoracic	Eye	Nerve, peripheral																														
Lung	Urinary bladder	Jejunum																														
Heart	Aorta	Lymph node, mandibular																														
Salivary gland, mandibular	Lymph node, mesenteric	Ileum																														
Rectum	Skeletal muscle	Pancreas																														

Individual Data Listing of Histopathology

Page 27 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
040	M	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Thyroid gland	Salivary gland, sublingual	Harderian gland
Stomach	Cecum	Brain
Femorotibial joint	Coagulating gland	Eye-Optic Nerve
Sternum		
041	F	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Vagina (Required)		
Mucification - Present		
Liver (Required)		
Infiltration, mixed cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Parathyroid gland (Required) Both Missing		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Thymus	Salivary gland, mandibular	Jejunum
Adrenal gland	Tongue	Urinary bladder
Kidney	Heart	Salivary gland, parotid
Colon	Rectum	Lung
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Duodenum
Uterus	Spinal cord, thoracic	Pancreas
Aorta	Trachea	Esophagus

Individual Data Listing of Histopathology

Page 28 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
041	F	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Thyroid gland	Lymph node, mesenteric	Skeletal muscle
Eye	Sternum	Cervix
Brain	Stomach	Ileum
Pituitary gland	Femorotibial joint	Mammary gland
Cecum	Ovary	Harderian gland
Nerve, peripheral	Eye-Optic Nerve	Skin
042	F	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Rectum (Required)		
Dilation, lumen - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Thymus	Salivary gland, mandibular	Jejunum
Adrenal gland	Tongue	Urinary bladder
Kidney	Heart	Salivary gland, parotid
Colon	Lung	Salivary gland, sublingual
Lymph node, mandibular	Duodenum	Uterus
Vagina	Spinal cord, thoracic	Spleen
Pancreas	Aorta	Parathyroid gland
Trachea	Esophagus	Thyroid gland

Individual Data Listing of Histopathology

Page 29 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
042	F	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Skeletal muscle	Eye	Sternum
Cervix	Brain	Stomach
Lymph node, mesenteric	Ileum	Pituitary gland
Femorotibial joint	Mammary gland	Cecum
Ovary	Harderian gland	Nerve, peripheral
Eye-Optic Nerve	Skin	
043	F	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Pituitary gland (Required)		
Cystic cleft - Present		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Thymus	Salivary gland, mandibular	Jejunum
Adrenal gland	Tongue	Urinary bladder
Kidney	Heart	Salivary gland, parotid
Colon	Rectum	Lung
Salivary gland, sublingual	Duodenum	Uterus
Vagina	Spinal cord, thoracic	Spleen

Individual Data Listing of Histopathology

Page 30 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
043	F	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Pancreas	Aorta	Parathyroid gland
Trachea	Esophagus	Thyroid gland
Skeletal muscle	Eye	Sternum
Cervix	Brain	Stomach
Lymph node, mesenteric	Ileum	Femorotibial joint
Mammary gland	Cecum	Ovary
Harderian gland	Nerve, peripheral	Eye-Optic Nerve
Skin		
044	F	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Pituitary gland (Required)		
Cystic cleft - Present		
Uterus (Required)		
Dilation - Present		
Vagina (Required)		
Mucification - Present		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - mild		
Lung (Required)		
Inflammation, mixed - mild		
Parathyroid gland (Required)	One of the pair is Missing	

Individual Data Listing of Histopathology

Page 31 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
044	F	1
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - mild		
Rectum (Required)		
Dilation, lumen - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Thymus	Salivary gland, mandibular	Jejunum
Adrenal gland	Tongue	Liver
Urinary bladder	Kidney	Heart
Salivary gland, parotid	Colon	Salivary gland, sublingual
Duodenum	Spinal cord, thoracic	Pancreas
Aorta	Parathyroid gland	Trachea
Esophagus	Thyroid gland	Skeletal muscle
Eye	Sternum	Cervix
Brain	Stomach	Lymph node, mesenteric
Ileum	Femorotibial joint	Mammary gland
Cecum	Ovary	Harderian gland
Nerve, peripheral	Eye-Optic Nerve	Skin
045	F	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Pituitary gland (Required)		
Cystic cleft - Present		
Vagina (Required)		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 32 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group																																							
045	F	1																																							
Vagina (Required) Mucification - Present Kidney (Required) Basophilia, tubules - minimal Liver (Required) Infiltration, mononuclear cell - minimal Cecum (Required) Dilatation, lumen - Present The following Tissues are No Abnormalities Detected:																																									
<table border="0"> <tr> <td>Thymus</td> <td>Salivary gland, mandibular</td> <td>Jejunum</td> </tr> <tr> <td>Adrenal gland</td> <td>Tongue</td> <td>Urinary bladder</td> </tr> <tr> <td>Heart</td> <td>Salivary gland, parotid</td> <td>Colon</td> </tr> <tr> <td>Rectum</td> <td>Lung</td> <td>Salivary gland, sublingual</td> </tr> <tr> <td>Lymph node, mandibular</td> <td>Duodenum</td> <td>Uterus</td> </tr> <tr> <td>Spinal cord, thoracic</td> <td>Spleen</td> <td>Pancreas</td> </tr> <tr> <td>Aorta</td> <td>Parathyroid gland</td> <td>Trachea</td> </tr> <tr> <td>Esophagus</td> <td>Thyroid gland</td> <td>Skeletal muscle</td> </tr> <tr> <td>Eye</td> <td>Sternum</td> <td>Cervix</td> </tr> <tr> <td>Brain</td> <td>Stomach</td> <td>Lymph node, mesenteric</td> </tr> <tr> <td>Ileum</td> <td>Femorotibial joint</td> <td>Mammary gland</td> </tr> <tr> <td>Ovary</td> <td>Harderian gland</td> <td>Nerve, peripheral</td> </tr> <tr> <td>Eye-Optic Nerve</td> <td>Skin</td> <td></td> </tr> </table>			Thymus	Salivary gland, mandibular	Jejunum	Adrenal gland	Tongue	Urinary bladder	Heart	Salivary gland, parotid	Colon	Rectum	Lung	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Duodenum	Uterus	Spinal cord, thoracic	Spleen	Pancreas	Aorta	Parathyroid gland	Trachea	Esophagus	Thyroid gland	Skeletal muscle	Eye	Sternum	Cervix	Brain	Stomach	Lymph node, mesenteric	Ileum	Femorotibial joint	Mammary gland	Ovary	Harderian gland	Nerve, peripheral	Eye-Optic Nerve	Skin	
Thymus	Salivary gland, mandibular	Jejunum																																							
Adrenal gland	Tongue	Urinary bladder																																							
Heart	Salivary gland, parotid	Colon																																							
Rectum	Lung	Salivary gland, sublingual																																							
Lymph node, mandibular	Duodenum	Uterus																																							
Spinal cord, thoracic	Spleen	Pancreas																																							
Aorta	Parathyroid gland	Trachea																																							
Esophagus	Thyroid gland	Skeletal muscle																																							
Eye	Sternum	Cervix																																							
Brain	Stomach	Lymph node, mesenteric																																							
Ileum	Femorotibial joint	Mammary gland																																							
Ovary	Harderian gland	Nerve, peripheral																																							
Eye-Optic Nerve	Skin																																								
046	F	1																																							
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice																																									

Individual Data Listing of Histopathology

Page 33 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
046	F	1
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Pituitary gland (Required)		
Cystic cleft - Present		
Uterus (Required)		
Dilation - Present		
Vagina (Required)		
Mucification - Present		
Kidney (Required)		
Mineralization, papilla - minimal		
Lung (Required)		
Inflammation, mixed - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Thymus	Salivary gland, mandibular	Jejunum
Adrenal gland	Tongue	Urinary bladder
Heart	Salivary gland, parotid	Colon
Rectum	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular
Duodenum	Liver	Spleen
Pancreas	Aorta	Parathyroid gland
Trachea	Esophagus	Thyroid gland
Skeletal muscle	Eye	Sternum
Cervix	Brain	Stomach
Lymph node, mesenteric	Ileum	Spinal cord, thoracic

Individual Data Listing of Histopathology

Page 34 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group			
046	F	1	The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
			Femorotibial joint	Mammary gland	Cecum
			Ovary	Harderian gland	Nerve, peripheral
			Eye-Optic Nerve	Skin	
047	F	1	<p>Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice</p> <p>Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30</p> <p>Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)</p> <p>Spleen (Required)</p> <p>Hematopoiesis - mild</p> <p>Parathyroid gland (Required) One of the pair is Missing</p> <p>The following Tissues are No Abnormalities Detected:</p>		
			Thymus	Salivary gland, mandibular	Jejunum
			Adrenal gland	Tongue	Urinary bladder
			Kidney	Heart	Salivary gland, parotid
			Colon	Rectum	Lung
			Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Duodenum
			Uterus	Vagina	Liver
			Pancreas	Aorta	Parathyroid gland
			Trachea	Esophagus	Thyroid gland
			Skeletal muscle	Eye	Sternum
			Cervix	Brain	Stomach
			Lymph node, mesenteric	Ileum	Pituitary gland
			Spinal cord, thoracic	Femorotibial joint	Mammary gland

Individual Data Listing of Histopathology

Page 35 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
047	F	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Cecum	Ovary
	Nerve, peripheral	Eye-Optic Nerve
		Harderian gland
		Skin
048	F	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
	Parathyroid gland (Required)	One of the pair is Missing
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Thymus	Salivary gland, mandibular
	Adrenal gland	Tongue
	Kidney	Heart
	Colon	Lung
	Lymph node, mandibular	Duodenum
	Vagina	Liver
	Pancreas	Aorta
	Trachea	Esophagus
	Rectum	Skeletal muscle
	Sternum	Cervix
	Stomach	Lymph node, mesenteric
	Pituitary gland	Spinal cord, thoracic
	Mammary gland	Cecum
	Harderian gland	Nerve, peripheral
	Skin	
		Jejunum
		Urinary bladder
		Salivary gland, parotid
		Salivary gland, sublingual
		Uterus
		Spleen
		Parathyroid gland
		Thyroid gland
		Eye
		Brain
		Ileum
		Femorotibial joint
		Ovary
		Eye-Optic Nerve

Individual Data Listing of Histopathology

Page 36 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group																																										
048	F	1																																										
049	F	1																																										
<p>Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30 Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)</p> <p>Liver (Required) Infiltration, mixed cell - minimal</p> <p>The following Tissues are No Abnormalities Detected:</p> <table border="0"> <tr> <td>Thymus</td> <td>Salivary gland, mandibular</td> <td>Jejunum</td> </tr> <tr> <td>Adrenal gland</td> <td>Tongue</td> <td>Urinary bladder</td> </tr> <tr> <td>Kidney</td> <td>Heart</td> <td>Salivary gland, parotid</td> </tr> <tr> <td>Colon</td> <td>Lung</td> <td>Salivary gland, sublingual</td> </tr> <tr> <td>Lymph node, mandibular</td> <td>Duodenum</td> <td>Uterus</td> </tr> <tr> <td>Vagina</td> <td>Spleen</td> <td>Pancreas</td> </tr> <tr> <td>Aorta</td> <td>Parathyroid gland</td> <td>Trachea</td> </tr> <tr> <td>Esophagus</td> <td>Thyroid gland</td> <td>Rectum</td> </tr> <tr> <td>Skeletal muscle</td> <td>Eye</td> <td>Sternum</td> </tr> <tr> <td>Cervix</td> <td>Brain</td> <td>Stomach</td> </tr> <tr> <td>Lymph node, mesenteric</td> <td>Pituitary gland</td> <td>Spinal cord, thoracic</td> </tr> <tr> <td>Femorotibial joint</td> <td>Mammary gland</td> <td>Ileum</td> </tr> <tr> <td>Cecum</td> <td>Ovary</td> <td>Harderian gland</td> </tr> <tr> <td>Nerve, peripheral</td> <td>Eye-Optic Nerve</td> <td>Skin</td> </tr> </table>			Thymus	Salivary gland, mandibular	Jejunum	Adrenal gland	Tongue	Urinary bladder	Kidney	Heart	Salivary gland, parotid	Colon	Lung	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Duodenum	Uterus	Vagina	Spleen	Pancreas	Aorta	Parathyroid gland	Trachea	Esophagus	Thyroid gland	Rectum	Skeletal muscle	Eye	Sternum	Cervix	Brain	Stomach	Lymph node, mesenteric	Pituitary gland	Spinal cord, thoracic	Femorotibial joint	Mammary gland	Ileum	Cecum	Ovary	Harderian gland	Nerve, peripheral	Eye-Optic Nerve	Skin
Thymus	Salivary gland, mandibular	Jejunum																																										
Adrenal gland	Tongue	Urinary bladder																																										
Kidney	Heart	Salivary gland, parotid																																										
Colon	Lung	Salivary gland, sublingual																																										
Lymph node, mandibular	Duodenum	Uterus																																										
Vagina	Spleen	Pancreas																																										
Aorta	Parathyroid gland	Trachea																																										
Esophagus	Thyroid gland	Rectum																																										
Skeletal muscle	Eye	Sternum																																										
Cervix	Brain	Stomach																																										
Lymph node, mesenteric	Pituitary gland	Spinal cord, thoracic																																										
Femorotibial joint	Mammary gland	Ileum																																										
Cecum	Ovary	Harderian gland																																										
Nerve, peripheral	Eye-Optic Nerve	Skin																																										
050	F	1																																										
<p>Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30</p>																																												

Individual Data Listing of Histopathology

Page 37 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
050	F	1
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Uterus (Required)		
Dilation - Present		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Salivary gland, parotid (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Thymus	Salivary gland, mandibular	Jejunum
Adrenal gland	Tongue	Urinary bladder
Heart	Colon	Lung
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Duodenum
Vagina	Pancreas	Aorta
Parathyroid gland	Trachea	Esophagus
Thyroid gland	Rectum	Skeletal muscle
Eye	Sternum	Cervix
Brain	Stomach	Lymph node, mesenteric
Pituitary gland	Spinal cord, thoracic	Femorotibial joint
Mammary gland	Ileum	Cecum

Individual Data Listing of Histopathology

Page 38 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group	
050	F	1	
			The following Tissues are No Abnormalities Detected:
			Ovary Harderian gland Nerve, peripheral
			Eye-Optic Nerve Skin
064	F	3	
			Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
			Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30
			Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)
			Adrenal gland (Non required)
			Hypertrophy, zona glomerulosa - minimal
066	F	3	
			Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
			Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30
			Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)
			Uterus (Non required)
			Dilation - Present
067	F	3	
			Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
			Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30
			Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)
			Uterus (Non required)
			Dilation - Present
071	F	4	
			Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
			Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30

Individual Data Listing of Histopathology

Page 39 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
071	F	4
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Pituitary gland (Required)		
Cyst(s), pars distalis - Present		
Uterus (Required)		
Dilation - Present		
Vagina (Required)		
Mucification - Present		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Parathyroid gland (Required)		Both Missing
Rectum (Required)		
Dilation, lumen - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Kidney	Tongue
Urinary bladder	Pancreas	Trachea
Esophagus	Lymph node, mesenteric	Jejunum
Heart	Thyroid gland	Salivary gland, sublingual
Lymph node, mandibular	Ovary	Lung
Aorta	Thymus	Salivary gland, parotid
Duodenum	Eye	Salivary gland, mandibular
Spinal cord, thoracic	Nerve, peripheral	Cervix

Individual Data Listing of Histopathology

Page 40 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
071	F	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Stomach	Ileum
	Colon	Skeletal muscle
	Sternum	Femorotibial joint
	Brain	Skin
		Cecum
		Harderian gland
		Eye-Optic Nerve
		Mammary gland
072	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Uterus (Required)		
Dilation - Present		
Vagina (Required)		
Mucification - Present		
Kidney (Required)		
Casts, hyaline - minimal		
Mineralization, corticomedullary junction - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Thyroid gland (Required)		
Cyst(s), ultimobranchial duct - Present		
Colon (Required)		
Dilation, lumen - Present		
Rectum (Required)		
Dilation, lumen - Present		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 41 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group			
072	F	4	The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
			Adrenal gland	Tongue	Urinary bladder
			Spleen	Pancreas	Trachea
			Esophagus	Lymph node, mesenteric	Jejunum
			Pituitary gland	Heart	Salivary gland, sublingual
			Lymph node, mandibular	Parathyroid gland	Ovary
			Lung	Aorta	Thymus
			Salivary gland, parotid	Duodenum	Eye
			Salivary gland, mandibular	Spinal cord, thoracic	Nerve, peripheral
			Cervix	Stomach	Ileum
			Cecum	Skeletal muscle	Harderian gland
			Sternum	Femorotibial joint	Eye-Optic Nerve
			Brain	Skin	Mammary gland
073	F	4	Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30 Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate) Uterus (Required) Cyst(s) - Present The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
			Adrenal gland	Kidney	Tongue
			Urinary bladder	Liver	Spleen
			Pancreas	Trachea	Esophagus
			Lymph node, mesenteric	Jejunum	Pituitary gland

Individual Data Listing of Histopathology

Page 42 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
073	F	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Heart	Thyroid gland	Salivary gland, sublingual
Lymph node, mandibular	Parathyroid gland	Ovary
Vagina	Lung	Aorta
Thymus	Salivary gland, parotid	Duodenum
Eye	Salivary gland, mandibular	Spinal cord, thoracic
Nerve, peripheral	Cervix	Stomach
Ileum	Cecum	Colon
Rectum	Skeletal muscle	Harderian gland
Sternum	Femorotibial joint	Eye-Optic Nerve
Brain	Skin	Mammary gland
074	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Thyroid gland (Required)		
Cyst(s), ultimobranchial duct - Present		
Parathyroid gland (Required)	One of the pair is Missing	
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Kidney	Tongue
Urinary bladder	Spleen	Pancreas
Trachea	Esophagus	Lymph node, mesenteric

Individual Data Listing of Histopathology

Page 43 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
074	F	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Jejunum	Pituitary gland	Heart
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Parathyroid gland
Ovary	Vagina	Lung
Aorta	Thymus	Salivary gland, parotid
Duodenum	Eye	Salivary gland, mandibular
Spinal cord, thoracic	Nerve, peripheral	Cervix
Stomach	Ileum	Cecum
Colon	Rectum	Uterus
Skeletal muscle	Harderian gland	Sternum
Femortibial joint	Eye-Optic Nerve	Brain
Skin	Mammary gland	
075	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Pituitary gland (Required)		
Cyst(s), pars distalis - Present		
Cystic cleft - Present		
Uterus (Required)		
Dilation - Present		
Vagina (Required)		
Mucification - Present		
Liver (Required)		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 44 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
075	F	4
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Kidney	Tongue
Urinary bladder	Spleen	Pancreas
Trachea	Esophagus	Lymph node, mesenteric
Heart	Thyroid gland	Salivary gland, sublingual
Parathyroid gland	Jejunum	Ovary
Lung	Aorta	Thymus
Salivary gland, parotid	Duodenum	Eye
Salivary gland, mandibular	Spinal cord, thoracic	Nerve, peripheral
Cervix	Stomach	Ileum
Cecum	Colon	Rectum
Skeletal muscle	Harderian gland	Sternum
Femorotibial joint	Eye-Optic Nerve	Brain
Skin	Mammary gland	
076	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Pituitary gland (Required)		
Cystic cleft - Present		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 45 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
076	F	4
Kidney (Required)		
Casts, hyaline - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Lymph node, mandibular (Required)		
Hyperplasia - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Urinary bladder	Spleen
Pancreas	Trachea	Esophagus
Lymph node, mesenteric	Tongue	Heart
Thyroid gland	Salivary gland, sublingual	Parathyroid gland
Jejunum	Ovary	Vagina
Lung	Aorta	Thymus
Salivary gland, parotid	Duodenum	Eye
Salivary gland, mandibular	Spinal cord, thoracic	Nerve, peripheral
Cervix	Stomach	Ileum
Cecum	Colon	Rectum
Uterus	Skeletal muscle	Harderian gland
Sternum	Femorotibial joint	Eye-Optic Nerve
Brain	Skin	Mammary gland
077	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 46 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
077	F	4
		Liver (Required)
		Infiltration, mixed cell - minimal
		Lung (Required)
		Inflammation, mixed - mild
		Parathyroid gland (Required)
		One of the pair is Missing
		The following Tissues are No Abnormalities Detected:
		Adrenal gland
		Spleen
		Esophagus
		Tongue
		Salivary gland, sublingual
		Jejunum
		Aorta
		Duodenum
		Spinal cord, thoracic
		Stomach
		Colon
		Skeletal muscle
		Femorotibial joint
		Skin
		Kidney
		Pancreas
		Lymph node, mesenteric
		Heart
		Lymph node, mandibular
		Ovary
		Thymus
		Eye
		Nerve, peripheral
		Ileum
		Rectum
		Harderian gland
		Eye-Optic Nerve
		Mammary gland
		Urinary bladder
		Trachea
		Pituitary gland
		Thyroid gland
		Parathyroid gland
		Vagina
		Salivary gland, parotid
		Salivary gland, mandibular
		Cervix
		Cecum
		Uterus
		Sternum
		Brain
078	F	4
		Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
		Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30
		Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)

Individual Data Listing of Histopathology

Page 47 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
078	F	4
Pituitary gland (Required) Cystic cleft - Present Vagina (Required) Mucification - Present Kidney (Required) Basophilia, tubules - minimal Casts, hyaline - minimal Lung (Required) Inflammation, mixed - mild Rectum (Required) Dilatation, lumen - Present The following Tissues are No Abnormalities Detected: Adrenal gland Urinary bladder Liver Spleen Pancreas Trachea Esophagus Lymph node, mesenteric Tongue Heart Thyroid gland Salivary gland, sublingual Lymph node, mandibular Parathyroid gland Jejunum Ovary Aorta Thymus Salivary gland, parotid Duodenum Eye Salivary gland, mandibular Spinal cord, thoracic Nerve, peripheral Cervix Stomach Ileum Cecum Colon Uterus Skeletal muscle Harderian gland Sternum		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 48 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group			
078	F	4	The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
			Femorotibial joint	Eye-Optic Nerve	Brain
			Skin	Mammary gland	
079	F	4	Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30 Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
			Uterus (Required)		
			Dilation - Present		
			Vagina (Required)		
			Mucification - Present		
			Kidney (Required)		
			Infiltration, inflammation cell - mild		
			Urinary bladder (Required)		
			Infiltration, inflammation cell - mild		
			Hyperplasia, transitional cell - minimal		
			Liver (Required)		
			Infiltration, mixed cell - minimal		
			Rectum (Required)		
			Dilation, lumen - Present		
			The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
			Adrenal gland	Spleen	Pancreas
			Trachea	Esophagus	Lymph node, mesenteric
			Pituitary gland	Tongue	Heart

Individual Data Listing of Histopathology

Page 49 of 51
 Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
 Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
079	F	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Thyroid gland	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular
Parathyroid gland	Jejunum	Ovary
Lung	Aorta	Thymus
Salivary gland, parotid	Duodenum	Eye
Salivary gland, mandibular	Spinal cord, thoracic	Nerve, peripheral
Cervix	Stomach	Ileum
Cecum	Colon	Skeletal muscle
Harderian gland	Sternum	Femorotibial joint
Eye-Optic Nerve	Brain	Skin
Mammary gland		
080	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 30		
Death Date and Time: 14 Aug 2013 03:13:20 PM +09:00(approximate)		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - mild		
Parathyroid gland (Required)	One of the pair is Missing	
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Adrenal gland	Kidney	Urinary bladder
Pancreas	Trachea	Esophagus
Lymph node, mesenteric	Pituitary gland	Tongue

Individual Data Listing of Histopathology

Page 50 of 51

Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00

Chemon Corp.

Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
080	F	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Heart	Thyroid gland	Salivary gland, sublingual
Lymph node, mandibular	Parathyroid gland	Jejunum
Ovary	Vagina	Lung
Aorta	Thymus	Salivary gland, parotid
Duodenum	Eye	Salivary gland, mandibular
Spinal cord, thoracic	Nerve, peripheral	Cervix
Stomach	Ileum	Cecum
Colon	Rectum	Uterus
Skeletal muscle	Harderian gland	Sternum
Femorotibial joint	Eye-Optic Nerve	Brain
Skin	Mammary gland	

Individual Data Listing of Histopathology

Page 51 of 51
Printed: 10 Oct 2013 11:01:18 AM +09:00
Pristima® Version 6.4.0 Build 65

Chemon Corp.

Study: 13-RR-336

StudyTitle: A 4-week repeated oral toxicity of Oyster enzyme hydrolysate in SD rats

Test Article: Oyster enzyme hydrolysate

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/4-week repeated oral dose

Report Selections

All records

True

Report generated by

Mi-Jin Cha

APPENDIX 3. ANALYSIS REPORT(Non-GLP)

문서번호 Document No.

PV-0006



시험 성적서

Analysis Certificate

시험분석 의뢰기관:
Requested by

(주) 케온

시험분석 대 상:
Sample

굴 가수분해 조제물 (13-RR-336)

시험분석 책임자:
Principal Investigator

정 세 희

경희대학교 약학대학 생약학실
Division of Pharmacognosy
College of Pharmacy, Kyung Hee University
Seoul, Korea 130-701

날짜 Date : 2013년 08월 09일

Lab. Manager : 장 영 표
Young Pyo Jang



글 가수분해물 조제시험물질의 검증시험

시험물질, 표준물질 및 부형제

(가) 시험물질

- ① 명칭: 0mg, 800mg, 2000mg, 5000mg
- ② 제조(로트)번호: 13-RR-366
- ③ 입수일: 2013.07.16
- ④ 입수량: 100ml
- ⑤ 외관 및 색상: 황토색의 현탁액
- ⑥ 제조자: 이지혜
- ⑦ 유효기간: 2013.07.16
- ⑧ 보관조건: 냉장보관
- ⑨ 공급원: 캡온

(나) 표준물질

- ① 명칭: tyrosine-alanine
- ② 제조(로트)번호: T5129
- ③ 입수일: 2013.06.10
- ④ 입수량: 50mg
- ⑤ 외관 및 색상: white powder
- ⑥ 순도: 99.9%
- ⑦ 보관조건: 냉동
- ⑧ 공급원: Aldrich

1. 실험재료

1.1 시료

실험에 사용된 굴 가수분해물은 주식회사 캡온으로부터 제공받아 사용하였고, 실험에 사용된 표준품의 순도는 tyrosine alanine 99.9%를 사용하였다.

1.2 사용기기

사용한 UPLC는 Waters ACQUITY UHPLC로 Empower software를 통해 크로마토그램 데이터를 처리하였다. 분석에는 Halo peptide ES-C18 column (4.6 x 100 mm i.d. 2.7 μ m, Advancedmaterialtechnology, USA)를 사용하였다.

1.3 시약 및 재료

UHPLC용 용매는 HPLC grade용매 (Fisher, South Korea)를 0.2 μ m PTFE filter (ADVANTEC, USA)로 여과한 후 사용하였으며 그 외에 trifluoroacetic acid (sigmaaldrich, USA)는 분석용 1급 시약을 사용하였다. 초순수는 ABBOTA NEO 1으로 제조하여 18 M Ω 이상을 사용하였다.

1.4 HPLC 조건

Device	Waters ACQUITY UHPLC H-class
Column	Halo peptide C18 column (2.1 x 75 mm i.d. 2.7 μ m, Perkinelmer, USA)
Flow rate	0.7 mL/min
Detector	220 nm
Column temp.	25 $^{\circ}$ C
Mobile phase	solvent A: CH ₃ CN (0.1% trifluoroacetic acid) solvent B: H ₂ O (0.1% trifluoroacetic acid)
Gradient condition	

1.5 이동상 및 표준용액

① CH₃CN (0.1% trifluoroacetic acid)

trifluoroacetic acid 1ml 을 1000ml 의 Acetonitrile 에 넣은후, 0.45 μ m 필터로 여과 하였다.

② H₂O (0.1% trifluoroacetic acid)

trifluoroacetic acid 1ml 을 1000ml 의 Water 에 넣은후, 0.45 μ m 필터로 여과 하였다.

③ 표준용액

㉞ 보관용 표준용액

표준물질 2mg 을 1ml 의 water 에 녹이고, 냉장고에 보관하였다.

㉟ 상용 표준용액

보관용 표준용액을 water 로 희석하여 200, 100, 50, 20, 5 μ g/ml 로 조제하였다.

2. 분석법 검증

2.1 특이성

특이성은 부형제(0.1%) 중 내인성 방해물질의 존재를 chromatogram 으로 평가하였다.

2.2 직선성

분석법 검증 기간 동안 상용표준용액을 분석하고, 피크 면적으로 검량선을 작성하였다. 직선성은 결정계수(0.99 이상)와 회귀방정식으로 역산출한 농도에 대한 각 표준물질의 이론 농도에 대한 상대오차로 평가하였다. (90~110%이내)

2.3 정확성과 정밀성

정확성과 정밀성은 일내, 일간 상대오차와 변동계수를 평가하였다. 일내 정확성과 정밀성 평가를 위해 시료(5,20,50,100,200 μ g/ml)를 6 회(n=6) 분석하였고, 일간 정확성과 정밀성은 3 배치를 분석하여 평가하였다. 허용기준은 상대오차는 90~110%이내, 변동계수 10%미만으로 하였다.

2.4 안정성

2.4.1 실온안정성

표준용액을 실온에서 약 4 시간 방치 후 분석하였다. 실온안정성은 상대오차로 평가하였다. (95~105%이내)

2.4.2 자동주입기 안정성

상용 표준용액을 자동주입기에서 하룻밤 동안 방치 후 분석하였다. 자동주입기 안정성은 상대오차로 평가하였다. (95~105%)

2.5 조제시험물질 분석

2.5.1 조제시험물질의 운송 및 보관

(주)캠은경기바이오연구센터에서경희대학교로 운송하고 이후 실험이 종료되는 기간까지냉장 보관 하였다.

2.5.2 시료의 채취

조제시험물질 튜브 외부에 유성매직으로 표선을 만들고, 조제당일에는 상, 중, 하층에서 채취하고, 4 및 7 일째에는 중층에서만 채취하였다. 조제시험물질은 시험물질 조제당일과 조제 후 4 및 7 일째로 총 3 회 채취하였다.

3. 결과

(1) 분석법 검증

1.1 특이성

부형제 중 내인성 방해인자는 관찰되지 않았다.

Figure 1. Chromatogram of vehicle (a), standard (b, 0.1 mg/mL), QC (c, 2 mg/mL)

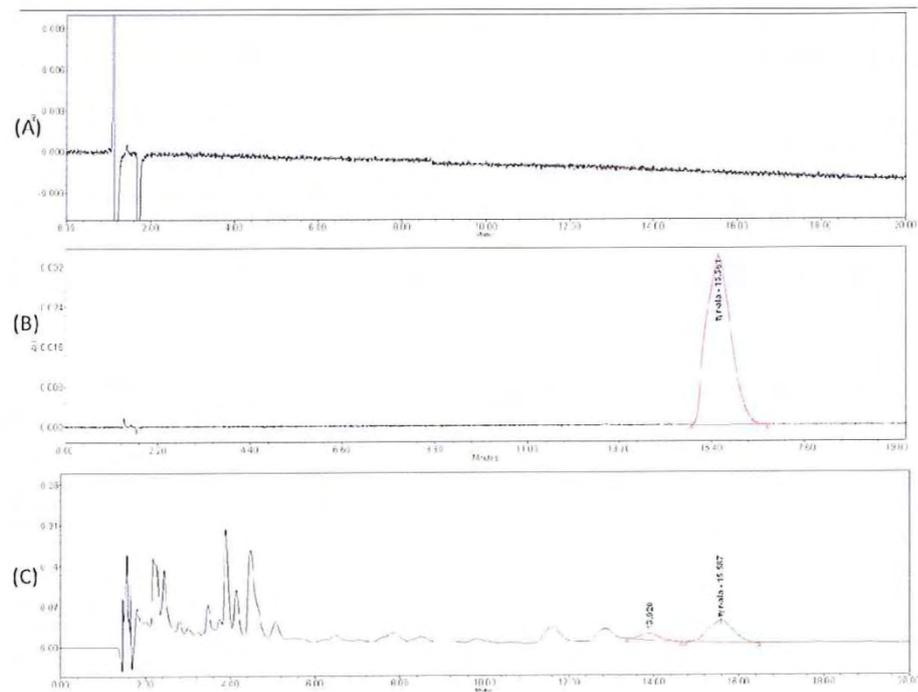
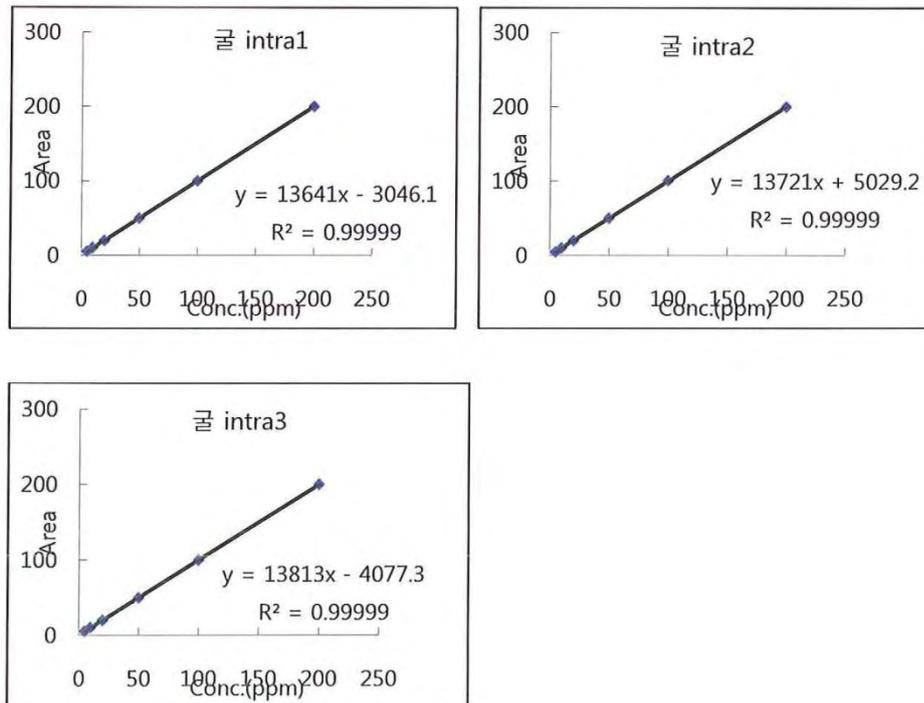


Table 1. Content of tyrosine-alanine in oyster peptide

Replicate	Peak area ratio	Measure conc.(g/ml)	Sample WT.	Content (mg/g)
1	347889	12.86	2000mg	0.643
2	364070	13.46	2000mg	0.673
3	348926	12.90	2000mg	0.645
4	369884	13.67	2000mg	0.683
5	311924	11.54	2000mg	0.577
6	337758	12.49	2000mg	0.625
			Mean	0.641
			SD	0.038
			RSD	5.91

1.2 직선성

Tyrosine-alanine의 농도와 기기적 감응의 상관계수(r)는 0.999, 상대오차는 95~105%사이였으며, 5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$)의 농도범위에서 직선성을 나타내었다.

Figure 2. Calibration of tyrosine-alanine in the range of 5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by HPLC

1.3 정확성과 정밀성

일내, 일간 상대오차는 분석법의 정확성 및 정밀성을 측정한 결과, 모두 검증기준을 충족시키는 결과를 나타내었다. 투여시험물질은 0(부형제 대조군), 800, 2000, 5000 mg의 용량으로 조제하였다. 꿀 가수분해물 1g중 tyrosine-alanine의 표시량은 0.641 $\mu\text{g}/\text{g}$ 로 결정되었다.(Table 1) 조제된 투여시험물질은 시료의 채취부위에 상관없이 균질성을 나타내었으며 부형제로 조제된 꿀 가수분해물은 냉장보관조건에서 7일간 안정성이 확보되었다.

검량선은 최소자승법을 이용하여 회귀식의 기울기, 절편 및 상관계수를 구하였으며, 각 농도에서 역-환산된 측정값의 상대오차는 전체 정량범위에서 -0.94~0.91%로서 직선성의 기준을 충족하였다.(Table 2)

정밀성은 QC시료의 분석을 통하여 측정된 tyrosine-alanine의 농도값에 대한 변동계수(CV)값으로 평가하여 정밀성은 2~23% ($n=18$)이었다. 정확성은 QC시료의 분석을 통하여 측정된 tyrosine-alanine의 농도값의 상대오차 값으로 평가하여 정확성은

4.48~11.10%(n=18)로서 $\pm 15\%$ 이내의 RE값을 허용하는 정확성의 기준을 충족하였다.(Table 3,4)

Table 2. Linearity of calibration curves of tyrosine-alanine in the range of 5~200g/mL

Replicate	Concentration(g/mL)					Curve parameters		
	5	10	50	100	200	Slope	intercept	R ²
1	5.17	10.12	49.86	99.77	200.15	13641	-3064.1	0.9999
2	4.73	10.09	50.00	100.56	199.74	13721	5029.2	0.9999
3	4.97	10.07	49.96	100.11	199.96	13813	-4077.3	0.9999
Mean	4.95	10.09	49.94	100.14	199.95	13725.00	-704.07	1.00
SD	0.22	0.02	0.07	0.40	0.20	86.07	4990.93	0.00
CV(%)	4.47	0.25	0.14	0.40	0.10			
RE(%)	0.91	-0.94	0.12	-0.14	0.02			

Table 3. Precision and accuracy of the method in the range of 5~200g/mL

Replicate	Concentration(g/mL)			
	20	50	100	
Day 1-1	1-1		58.69	102.24
	1-2	28.24	59.31	101.82
	1-3	28.90	57.65	103.23
	1-4	29.63	55.82	101.24
	1-5	29.47	50.13	104.08
	1-6	29.95	52.80	104.67
	Mean	29.24	55.73	102.88
SD	0.68	3.61	1.34	
RSD	2.31	6.48	1.30	
Day 2-1	2-1		55.08	106.95
	2-2	16.26	55.45	108.36
	2-3	17.17	54.86	107.43
	2-4	16.60	55.67	108.89
	2-5	17.63	56.43	108.42
	2-6	19.80	56.42	108.56
	Mean	17.49	55.65	108.10
SD	1.39	0.66	0.75	
RSD	7.96	1.19	0.69	
Day 3-1	3-1		52.40	101.34
	3-2	19.51	52.42	101.64
	3-3	19.04	52.42	102.48
	3-4	19.57	50.91	102.29
	3-5	20.99	52.06	101.57
	3-6	20.53	51.71	101.40
	Mean	19.93	51.99	101.78
SD	0.80	0.60	0.48	
RSD	4.04	1.15	0.47	
Inter day Mean	22.220	54.327	104.485	
SD	5.321	2.685	2.774	
RSD	23.946	4.943	2.655	

Table 4. Recovery of marker compounds through standard addition ($n=5$)

Day	Fortified content (mg/ml)	Observed content (ng)	Recovery mean	Recovery SD	Recovery RSD (%)
Day 1	20	29.24±0.68	146.19	3.38	2.31
	50	55.73±3.61	111.47	7.22	6.48
	100	102.88±1.34	102.88	1.34	1.30
Day 2	20	17.49±1.39	92.83	14.54	7.96
	50	55.65±0.66	111.30	1.32	1.19
	100	108.10±0.75	108.10	0.75	0.69
Day 3	20	19.93±0.80	92.90	16.90	4.04
	50	51.99±0.60	103.97	1.19	1.15
	100	102.47±0.35	102.47	0.35	0.34

(2) 함량 균질성 및 안전성

시험물질에 대하여 6회의 분석을 수행하여 굴 가수분해물 중 tyrosine-alanine의 함량을 측정된 결과, 굴 가수분해물 1g중 tyrosine-alanine의 표시량은 0.641µg/g을 함유하는 것으로 나타났다.

위에서 설정된 표시량에 따라 계산된 각 투여시험물질 중 굴 가수분해물의 함량은 800mg, 2000mg 및 5000mg 군에서 각각 110.95%, 106.21% 및 159.81%를 나타내었다. 이는 15%이내를 허용하는 투여시험물질의 함량기준을 다소 상회하는 것으로 나타났다.

투여시험물질의 함량 균질성은 튜브의 세부분(상, 중, 하)에서 시료를 채취하고 분석하여 얻은 함량에 대한 변동계수로서 평가하였다. 그결과 세가지 농도의 CV값은 각각 1.52, 0.66 및 3.24%였으며, 이 값은 15% 미만의 허용기준을 충족하였다.

함량시험은 투여시험물질을 조제 후 7일간 냉장보관 후 측정된 결과로서, 굴 가수분해물은 약 4℃의 냉장보관조건에서 7일간 안정성을 확보할 수 있었다.

Table 5. Content uniformity of oyster peptide

Dose	Sampling position	Peak area ratio	Measured Content (µg/mL)		Assay (%)	CV (%)
			each	mean		
800mg	Low	152598	5.71	5.69	110.95	1.66
	Middle	152598	5.67	0.02		
	High	152415	5.70			
2000mg	Low	371399	13.72	13.61	106.21	1.07
	Middle	364070	13.46	0.14		
	High	369884	13.67			
5000mg	Low	1437980	52.22	51.22	159.81	5.31
	Middle	1420159	51.57	1.21		
	High	1373601	49.87			

APPENDIX 4. PROTOCOL



시험계획서

Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를
이용한 4 주간 반복 경구투여 독성시험

시험번호: 13-RR-336



승인:

차 미 진 주

2013. 07. 08

차 미 진, D.V.M., M.S.
시험책임자
㈜정온 비임상연구소

날 짜

김 갑 호

2013. 07. 08

김 갑 호, M.S.
운영책임자
㈜정온 비임상연구소

날 짜

정 세 영

2013. 07. 08

정 세 영
의뢰책임자
경희대학교

날 짜

ORIGINAL

시 험 제 목 Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4 주간 반복 경구투여 독성시험

시 험 목 적 본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate를 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 무독성량 및 표적장기를 확인하기 위하여 수행한다.

시 험 지 칭 의약품등의독성시험기준 (제2013-121호, MFDS, 2013 년 04 월 05 일)

시 험 의 외 자 경희대학교
 서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호,
 130-701
 02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX)

시 험 기 관 ㈜캠온 비임상연구소
 경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826
 경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터내, 443-270
 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

시 험 일 정	2013 년 07 월 09 일	동물입수(실험개시일)
	2013 년 07 월 16 일	투여개시
	2013 년 08 월 13 일	투여종료
	2013 년 08 월 13 일	부검(수컷)
	2013 년 08 월 14 일	부검(암컷)
	2013 년 09 월 23 일	조직병리학적 검사 완료 예정(실험종료일)
	2013 년 10 월 14 일	최종보고서(안) 제출 예정

주요시험관계자	시험물질 조제/보관:	김 지 훈 김 현 지 이 지 혜	동물실험:	정 지 란 손 보 송
	병 리:	김 학 수	판 독:	강 부 현 강 민 수 이 영 화
	자료보관:	이 유 나	통계분석:	이 민 행

기록과 재료의 보 관 [SOP-AC-001~007]
 본 시험의 시험계획서(변경 및 일탈기록), 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본, 검체 및 각종 증거자료는 품목허가일로부터 3 년간 ㈜켄온 비임상 연구소에 보관한다.
 임상병리 검체(혈청, 혈장)는 측정 종료일로부터 1 년간 보관한다.
 그 이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

G L P 대 응 비임상시험관리기준(제2013-40호, MFDS, 2013 년 04 월 05 일)
 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17
 시험계획서의 변경 혹은 일탈은 문서로 작성하고, 신뢰성보증부서(QAU)에서 검토 후 시험책임자, 운영책임자 및 시험의뢰자가 승인한다.
 ㈜켄온 비임상연구소의 신뢰성보증부서는 시험과정 전반에 걸친 점검을 단독으로 행한다.

최 종 보 고 서 [SOP-TO-007]
 최종보고서는 시험계획서의 내용을 반영하여 표지, 시험책임자진술서, 신뢰성 보증확인서, 목차, 요약, 재료 및 방법, 관찰 및 측정 결과, 고찰 및 결론, 참고문헌 등으로 구성하며, 필요에 따라 사진이나 표, 부표 및 첨부자료 등을 포함하여 작성한다.

1. 시험물질 및 부형제

1) 시험물질 [SOP-TA-001]

명 칭: Oyster enzyme hydrolysate
 코드번호: C-1390
 제조번호: OP130213
 입 수 일: 2013 년 04 월 19 일; 2013 년 06 월 19 일
 입 수 량: 1 kg/pack x 1 pack; 500 g/pack x 1 pack
 외 관: Brown powder
 함 량: Tyrosine- alanine 0.0146 ~ 0.0166 %
 유효일자: 2015 년 02 월 12 일
 보관조건: 실온, 차광, 방습
 공 급 원: 경희대학교

2) 부형제

명 칭: 멸균주사용수
 제조번호: 63M2F21
 보관조건: 실온(개봉 후 냉장)
 공 급 원: 대한약품공업(주)
 선택이유: 본 부형제는 실험동물에 독성을 나타내지 않으며, 시험물질이 부형제에 잘 현탁되어 선택하였다.

2. 투여시험물질 조제 및 분석

1) 투여시험물질 조제[SOP-TA-002]

(1) 조제 방법

본 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용한다. 각 용량별로 정량의 시험물질을 칭량한 후 부형제에 현탁시켜 조제한다. 투여개시일에 농도별로 100 mL의 시험물질을 별도 조제하여 시험의뢰자에게 전달한다.

(2) 조제 빈도

투여시험물질은 매일 조제한다.

2) 투여시험물질 분석

투여시험물질의 분석은 시험의뢰자측에서 Non-GLP로 실시하며, 그 결과는 최종보고서에 반영하지 않고 부록으로 첨부한다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보[SOP-AM-007/017/020]

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Hsd:Sprague Dawley®™SD®™	
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)	
선정사유	본 시험에 사용하는 랫드는 각종 독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과와 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.	
성별	수컷	암컷
동물 수	입수시	48
	투여개시시	40
주령	입수시	5
	투여개시시	6
투여개시시 체중범위	평균체중(g)의 ± 20 % 이내	
잔여동물의 처리	㈜켄온의 SOP에 따른다.	

(2) 검역 및 순화[SOP-QT-001]

입수 시 체중을 측정하고, 7 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시키며, 매일 1 회 이상 일반증상을 관찰한다.

(3) 식별[SOP-AM-017/030/031]

순화기간에는 적색 유성매직을 이용한 미부표식법을, 투여 및 관찰기간에는 흑색 유성매직을 이용한 미부표식법 및 ear-punch법을 사용하여 식별한다. 사육상자에는 색으로 용량을 구별하는 개체식별카드를 부착하고, 사육상자대는 고유번호를 부여한다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착한다.

(4) 실험동물윤리규정[SOP-AM-008]

본 시험은 ㈜켄온 비임상연구소의 실험동물운영위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 13-R237).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정[SOP-FA-005]

동물은 온도 23±3 °C, 상대습도 55±15 %, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 ㈜켄온 비임상연구소 제2동물사육구역 1 호실에서 사육한다.

온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정한다.

(2) 사료, 물, 깔개 및 오염물질검사[SOP-AM-014/015]

사료는 TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET (2918C, Harlan Laboratories Inc., USA)를 급이기에 넣고 자유섭취 하도록 한다.

물은 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 지하수를 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취 하도록 한다. 오염물질에 대한 검사는 ㈜켄온의 관련 SOP에 따라 실시한다. 깔개는 종이깔개를 고압증기멸균 한 후 건조하여 사용한다.

(3) 사육상자 및 사육밀도[SOP-AM-023]

폴리카보네이트 사육상자(W 235 x L 380 x H 175 mm)에서 검역 및 순화기간에는 3 마리 이하/사육상자로 수용하고, 투여 및 관찰기간에는 2 마리 이하/사육상자로 수용한다.

(4) 사육관리[SOP-AM-002]

사육상자 및 깔개는 주 1 회, 물은 매일 점검하고, 물병은 주 1 회 이상 교환한다.

(5) 군분리[SOP-AM-029]

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 평균에 가까운 동물들을 선택하여 '시험군 구성' 표와 같이 무작위 분배한다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정 및 투여

1) 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량(mL/kg/day)	투여량(mg/kg/day)
G1	M / F	10 / 10	1-10 / 41-50	20	0
G2	M / F	10 / 10	11-20 / 51-60	20	800
G3	M / F	10 / 10	21-30 / 61-70	20	2000
G4	M / F	10 / 10	31-40 / 71-80	20	5000

G1: 부형제대조군(평균주사용수)

2) 투여량의 설정[SOP-GT-006]

본 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드에 1250, 2500 및 5000 mg/kg으로 단회 경구투여 독성 시험[㈜켄온 시험번호: 13-RA-225] 결과, 사망동물 및 이상증상이 관찰되지 않았다.

상기 결과를 바탕으로, 시험의뢰자와 협의하에 본 시험에서는 체중을 기준으로 5000 mg/kg/day를 고용량군으로 두고 그 아래로 공비 2.5로 두 개 군을 두었으며, 평균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

3) 투여[SOP-AT-001]

투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용한다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 7 일/주, 4 주간 투여, 15:00 이전에 투여한다.
투여액량 산출	계획된 일자에 측정된 체중을 기준으로 20 mL/kg/day로 산출한다.
투여방법	경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여한다.

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상[SOP-AT-004]

투여 및 관찰기간 동안 사망여부, 일반증상의 종류, 발현 일 및 증상의 정도를 1 일 1 회 관찰하고, 개체 별로 기록한다. 일반증상이 악화된 개체는 격리하고, 빈사동물 및 사망동물은 계획부검 동물에 준하여 처리한다. 투여개시일을 Day 1로 설정한다.

2) 체중[SOP-AT-006]

투여개시일(투여전), 그 이후에는 주 1 회 및 부검일에 체중을 측정한다. 부검일은 절식시킨 체중을 측정한다.

3) 사료 및 물섭취량[SOP-AT-008/009]

투여개시일, 그 이후에는 주 1 회 측정한다. 사료 및 물을 정량급여한 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하고, 마리당 평균섭취량으로 산출한다.

4) 안과학적 검사[SOP-AT-012]

관찰 최종 주에 군당 암수 각 5 마리에 대하여 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후 양쪽 안구에 산동제를 점적하여 동공확장을 유도한 다음, 안저사진기로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰한다. 특이증상이 발견되면 사진을 촬영하며, 시험책임자의 판단 하에 전체 동물에 대한 검사 확대 실시 및 사진촬영 여부를 결정한다.

6. 임상병리

1) 채뇨 및 채혈

(1) 채뇨[SOP-AT-010]

관찰 최종 주에 각 군당 암수 각 5 마리를 대사 케이지에 수용한다. 수집한 신선뇨 중, 약 1 mL을 취하여 요검사를 실시하고, 하룻밤 동안 수집한 요로 요량을 측정한다.

(2) 채혈[SOP-AT-020, SOP-PA-001, SOP-BL-001]

동물은 채혈 전에 하룻밤 동안 절식(물은 제공)한다.

부검일에 동물을 Isoflurane으로 흡입마취하고, 마취가 확인되면 회복하여 후대정맥에서 주사기를 이용하여 채혈한다.

검사항목	혈액량	튜브
전혈구 검사	약 1 mL	EDTA-2K CBC bottle
혈액응고시간 검사	1.8 mL	0.2 mL 3.2 % sodium citrate tube
혈액생화학적 검사	약 2 mL 이상	Clot activator vacutainer tube

2) 요검사 [SOP-BL-008/009]

(1) 요 일반검사

요색조(urine color)	빌리루빈(BIL)	pH
아질산염(NIT)	투명도(clarity)	케톤체(KET)
요단백(PRO)	잠혈(BLO)	당(GLU)
요비중(SG)	유로빌리노겐(URO)	

(2) 요침사 검사

백혈구(WBC)	상피세포(epithelial cells)	적혈구(RBC)	원주(cast)
----------	------------------------	----------	----------

3) 혈액학적 검사

(1) 전혈구 검사[SOP-BL-016]

적혈구(RBC)	적혈구분포폭(RDW)	호중구(NEU)
헤마토크리치(HCT)	헤모글로빈분포폭(HDW)	림프구(LYM)
혈색소량(HGB)	평균혈소판용적(MPV)	단핵구(MONO)
평균적혈구용적(MCV)	혈소판수(PLT)	호산구(EOS)
평균적혈구헤모글로빈량(MCH)	망상적혈구(RET)	호염기구(BASO)
평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)	백혈구(WBC)	대형비염색성세포(LUC)

(2) 혈액응고시간 검사 [SOP-BL-006]

부분활성트롬보플라스틴시간(APTT)	프로트롬빈시간(PT)
---------------------	-------------

4) 혈액생화학적 검사 [SOP-BL-002]

아스파테이트 아미노기전이효소(AST)	총콜레스테롤(TCHO)	크레아티닌(CRE)
알라닌 아미노기전이효소(ALT)	중성지방(TG)	무기인(IP)
알칼라인 포스파타제(ALP)	총단백(TP)	칼슘(Ca ²⁺)
크레아틴인산활성효소(CPK)	알부민(ALB)	나트륨(Na ⁺)
총빌리루빈(TBIL)	알부민/글로불린 비(A/G)	칼륨(K ⁺)
당(GLU)	혈액요소질소(BUN)	염소(Cl ⁻)

7. 조직병리

1) 부검[SOP-PA-001]

임상병리 검사를 위한 채혈 후, 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사 시킨 다음, 체표, 피하, 두부, 흉강 및 복강의 모든 장기를 관찰하고, 부검소견을 기록한다.

2) 장기중량 측정[SOP-PA-001]

모든 동물의 아래 장기에 대한 중량을 측정(양측성 장기는 각각 측정)하고, 각 장기의 중량으로 부검 시 체중에 대한 상대중량을 산출한다.

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

3) 조직 및 장기의 보존[SOP-PA-002]

모든 동물의 아래 장기를 적출하고, 모든 장기 및 투여부위를 10 % 중성원충포르말린용액에 고정하되, 안구는 Davidson's 용액에, 고환 및 부고환은 Bouin's 용액에 고정한다.

뇌(brain)	공장(jejunum)	말초신경(peripheral nerve)
뇌하수체(pituitary gland)	회장(ileum)	대퇴골관절(femorotibial joint)
폐(lung)	맹장(cecum)	방광(urinary bladder)
심장(heart)	결장(colon)	고환(testis) [#]
가슴샘(thymus)	직장(rectum)	부고환(epididymis) [#]
비장(spleen)	안구(시신경 포함) [#] (eye with optic nerve)	전립샘(prostate gland)
부신(adrenal gland) [#]	갑상샘(부갑상샘 포함) [#] (thyroid gland with parathyroid gland)	정낭(음고샘 포함) (seminal vesicle with coagulation gland)

신장(kidney) [#]	하더샘(hardierian gland) [#]	난소(ovary) [#]
간장(liver)	침샘(salivary gland) [#]	자궁(경부포함) (uterus with cervix)
혀(tongue)	대동맥(aorta)	질(vagina)
기관(trachea)	흉골(골수포함) (sternum with bone marrow)	피부(skin)
식도(esophagus)	턱밑림프절 (mandibular lymph node) [#]	젖샘 (mammary gland of females)
위(stomach)	장간막림프절 (mesenteric lymph node)	골격근(skeletal muscle)
췌장(pancreas)	흉척수(thoracic spinal cord)	육안적 병변(gross lesion)

십이지장(duodenum)

양측 장기 모두 적출 한 후 고정한다.
부갑상샘이 조직슬라이드 상에 관찰되지 않을 경우 SOP에 따라 조치하고, 해당 장기가 관찰된 조직슬라이드만을 검경한다.
젖샘은 수컷의 경우 조직슬라이드 상에 관찰될 시 검경을 실시한다.

4) 조직병리학적 검사[SOP-PA-006~013]

부형제대조군 및 고용량군의 모든 동물, 빈사 및 사망동물의 고정장기와 저용량 및 중간용량군에서 육안적 부검소견이 인정되는 장기에 대하여 조직슬라이드를 제작한다. 부형제대조군과 고용량군의 장기를 검사하여 시험물질에 의한 변화가 인정되는 장기는 모든 투여군의 해당 장기에 대하여 조직병리학적 검사를 실시한다. 필요 시 Peer review는 시험책임자 및 조직병리책임자가 협의하여 결정한다.

조직병리학적 검사의 판독결과 data 처리는 Pristima[®]를 사용하고, Pristima[®]의 Lexicon 용어를 사용한다.

8. 통계 분석[SOP-CO-001]

측정결과는 SPSS (ver. 10.1K)를 사용하여, 모수적인 다중비교 또는 비모수적인 다중비교를 통하여 군간 비교하고, $P < 0.05$ 인 경우 통계학적으로 유의하다고 판정한다. 기타 통계학적 방법을 사용한 경우에는 최종보고서에 상세히 기술한다.

단위 및 약호

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by Chemon Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this protocol.

%	Percent	hr	Hour
°	Degree	min	Minute
C	Celsius	sec	Second
L	Liter	rpm	Revolution per Minute
dL	Deciliter	RCF	Relative Centrifugal Force
mL	Milliliter	SD	Standard Deviation
µL	Microliter	CV	Coefficient of Variation
g	Gram	RE	Relative Error
kg	Kilogram	RH	Relative Humidity
mg	Milligram	M	Male
µg	Microgram	F	Female
ng	Nanogram	NA	Not Applicable
m	Meter	N	Number
cm	Centimeter	SPF	Specific Pathogen Free
mm	Millimeter	TK	Toxicokinetic
µm	Micrometer	PK	Pharmacokinetic
ppm	Parts per million	AUC	Area Under the Curve
ppb	Parts per billion	C _{max}	Maximum Concentration
wk	Week	T _{max}	Time at Maximum Concentration
d	Day	t _{1/2}	Half-life
GLP	Good Laboratory Practice Regulation	SOP	Standard Operating Procedures
QAU	Quality Assurance Unit	ICH	International Conference on Harmonization
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	MFDS	Ministry of Food and Drug Safety
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee	SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

<CONTINUED>

단위 및 약호

(임상병리 약호)

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by Chemon Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this protocol.

A/G	Albumin/Globulin ratio	Li	Lithium
ALB	Albumin	LUC	Large unstained cell
ALP	Alkaline phosphatase	LYM	Lymphocytes
ALT	Alanine aminotransferase	MCH	Mean corpuscular hemoglobin
APTT	Activated partial thromboplastin time	MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
AST	Aspartate aminotransferase	MCV	Mean corpuscular volume
BASO	Basophils	MONO	Monocytes
BIL	Bilirubin	MPV	Mean platelet volume
BUN	Blood urea nitrogen	Na ⁺	Sodium ion
Ca ²⁺	Calcium ion	NEU	Neutrophils
Cl ⁻	Chloride ion	NIT	Nitrite
CPK	Creatine phosphokinase	BLO	Occult blood
CRE	Creatinine	pH	Potential of hydrogen
EOS	Eosinophils	PLT	platelet count
Fe	Iron	PRO	Protein
GGT	Gamma glutamyl transpeptidase	PT	Prothrombin time
GLU	Glucose	RBC	Red blood cell
HCT	Hematocrit	RDW	Red cell distribution width
HDL	High density lipoprotein cholesterol	RET	Reticulocytes
HDW	Hemoglobin distribution width	SG	Specific gravity
HGB	Hemoglobin	TBIL	Total bilirubin
IP	Inorganic phosphorus	TCHO	Total cholesterol
K ⁺	Potassium ion	TG	Triglyceride
KET	Ketone body	TP	Total protein
LDL	Low density lipoprotein cholesterol	URO	Urobilinogen
LDH	Lactate dehydrogenase	WBC	White blood cell

<END>

APPENDIX 5. CERTIFICATE OF ANALYSIS

시험성적서
경희대학교 약학대학

품 명	Oyster enzyme hydrolysate	제조번호	OP130213
제조일자	2013. 6. 5	시험일자	2013. 6. 27

시험항목	시험기준	결과
성 상	Brown powder	적합
확인시험	HPLC	적합
함량시험	tyrosine-alanine 함량	0.0146~0.0166%
무균시험	음성	음성
불용성이물 검사	육안으로 보이는 이물질이 없어야 함	적합
엔도독신	20EU/ml 이하	적합

판정	적합
시험 담당자	장영표 (서명)

최종보고서

Oyster enzyme hydrolysate의 수컷 ICR 마우스
골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험

시험번호: 14-MG-182

시험의뢰기관: 경희대학교

(주)켄온 비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
240, Nampyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do,
449-826, Republic of Korea

진술서

Oyster enzyme hydrolysate의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2014-67호, MFDS, 2014년 02월 12일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

상기 시험은 승인된 시험계획서의 일정과 ㈜켄온 비임상연구소의 SOP에 따라 수행하였고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험자료의 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았다.

김 성 숙 

2014. 10. 23

김 성 숙, M.S.

날 짜

시험책임자

주 소 : ㈜켄온 비임상연구소

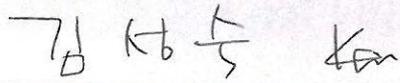
경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826

경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270

연 락 처 : 031-888-6660 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

E - m a i l : kss1526@chemon.co.kr

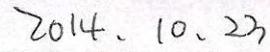
서 명



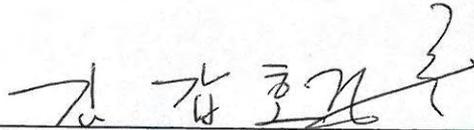
김 성 속, M.S.

시험책임자

㈜켄온 비임상연구소



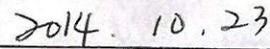
날 짜



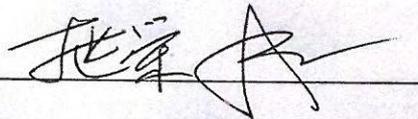
김 갑 호, M.S., Toxicologist

운영책임자

㈜켄온 비임상연구소



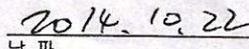
날 짜



정 세 영

의뢰책임자

경희대학교



날 짜

신뢰성보증확인서

시험번호: 14-MG-182

시험제목: Oyster enzyme hydrolysate의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험

시험기간: 2014.05.28 - 2014.10.23

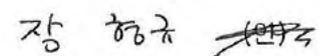
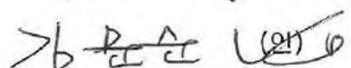
시험의뢰기관: 경희대학교

점검내용	점검실시일	시험책임자 확인일	운영책임자 보고일
시험계획서	2014.05.29	2014.05.29	2014.05.30
동물입수 및 검역	2014.06.03	2014.06.05	2014.06.09
시험물질/대조물질 보관	2014.06.10	2014.06.11	2014.06.13
	2014.06.11	2014.06.13	2014.06.16
시험물질/대조물질 조제	2014.06.10	2014.06.11	2014.06.13
	2014.06.11	2014.06.13	2014.06.16
투여 및 동물사육	2014.06.10	2014.06.11	2014.06.13
	2014.06.11	2014.06.13	2014.06.16
동물사육실 내 관찰 및 검사	2014.06.11	2014.06.13	2014.06.16
골수검체제작	2014.06.12	2014.06.12	2014.06.16
소핵검사	2014.06.24	2014.06.24	2014.06.25
시험기초자료	2014.07.08	2014.07.09	2014.07.11
최종보고서(안)	2014.07.08	2014.07.09	2014.07.11
최종보고서	2014.10.23	-	-

상기의 점검으로써, 본 보고서의 시험방법이 식품의약품안전처고시 제2014-6호(2014년 01월 29일) '의약품등의독성시험기준' 및 OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG 474 (1997) 'Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test'에 따라 행하여졌음과, 해당시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 보고서에 정확하게 반영되었으며, 본 시험이 식품의약품안전처고시 제2014-67호(2014년 02월 12일) '비임상시험관리기준' 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 실시되었음을 증명함.

2014년 10월 23일

㈜켄온 비임상연구소

신뢰성보증업무담당자 
 신뢰성보증업무책임자 

시험개요

- 시험제목** Oyster enzyme hydrolysate의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험
- 시험목적** Oyster enzyme hydrolysate의 생체내 염색체이상의 유발 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 ICR 마우스의 골수세포에서의 소핵 유발성을 지표로 하여 평가하기 위하여 실시하였다.
- 시험지침** 의약품등의독성시험기준 (제2014-6호, MFDS, 2014년 01월 29일)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG 474 (1997) 'Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test'
- 시험의뢰자** 경희대학교
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1층 113호, 130-701
02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX)
의뢰책임자: 정 세 영
- 시험기관** ㈜켄온 비임상연구소
경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826
경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270
031-329-9927 (TEL), 031-329-9901 (FAX)
운영책임자: 김 갑 호
- 시험일정**
- | | |
|---------------|-----------------|
| 2014년 05월 28일 | 시험계획서 승인(시험개시일) |
| 2014년 06월 03일 | 동물입수(실험개시일) |
| 2014년 06월 10일 | 투여개시 |
| 2014년 06월 11일 | 투여종료 |
| 2014년 06월 12일 | 검체제작 |
| 2014년 06월 23일 | 판독완료(실험종료일) |
| 2014년 07월 10일 | 최종보고서(안) 제출 |
| 2014년 10월 23일 | 최종보고서 제출(시험종료일) |

주요시험관계자	동물실험:	장 동 진
	시험물질 조제/보관:	김 지 훈, 김 현 지, 이 지 혜
	통계분석:	이 민 행
	자료보관:	정 혜 정

기록과 재료의 보 관 시험계획서, 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본, 검체 및 각종 증거자료는 품목허가일부터 3 년간 (주)켄온 비임상연구소의 자료보관실에 보관한다.
이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

목 차

진술서	i
서명	ii
신뢰성보증확인서.....	iii
시험개요.....	iv
요 약.....	1
재료 및 방법.....	2
결 과.....	9
고찰 및 결론.....	9
참고문헌.....	10
단위 및 약호.....	11
 TABLES	
Table 1. Observations of micronucleus and PCE:RBC ratio – summary	13
Table 2. Body weights of mice – summary	14
Table 3. Observations of mice	15
 APPENDICES	
Appendix 1. Observations of micronucleus and PCE:RBC ratio – individual animal data..	17
Appendix 2. Body weights of mice – individual animal data	18
Appendix 3. Historical control data	19
Appendix 4. Protocol and protocol amendment	20
Appendix 5. Certificate of analysis	30
Appendix 6. Result of dose formulation analysis	31

요 약

본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate의 생체내 염색체이상의 유발 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 ICR 마우스의 골수세포에서 소핵 유발성을 지표로 하여 평가하기 위하여 실시하였다.

시험물질은 멸균주사용수에 현탁하여 투여하였다. 약 8 주령의 수컷 ICR 마우스(군당 6 마리)에 부형제(0), 시험물질 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day의 용량을 1 일 1 회 연속 2 일간 경구투여 하였다.

부형제투여군을 음성대조군으로 하였으며, 양성대조군에는 70 mg/kg의 Cyclophosphamide monohydrate 를 1 회 복강투여 하였다. 최종 투여로부터 약 24 시간 후에 모든 동물을 부검, 대퇴골에서 골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였다.

소핵의 평가를 위하여 개체 당 2000 개의 다염성적혈구 중 소핵을 가진 다염성적혈구의 수를 계수한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 없었다.

세포독성은 PCE:RBC 비율을 산출하여 평가하였다. 개체당 500 개의 총적혈구로부터 세포독성을 평가한 결과, 이 비율은 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 없었다.

양성대조군에서는 분명한 양성의 결과를 얻었다.

이상의 결과, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate는 본 시험조건 하에서 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

재료 및 방법

1. 시험물질, 부형제 및 대조물질

1) 시험물질(Appendix 5)

명 칭: Oyster enzyme hydrolysate
 코드번호: C-1390
 제조번호: OP140415
 입 수 일: 2014 년 05 월 27 일
 입 수 량: 60 g/pack X 1 pack
 외 관: Powder
 함 량: tyrosine-alanine 평균 0.13 %
 유효일자: 2015 년 04 월 15 일
 보관조건: 실온, 차광, 방습
 공 급 원: 경희대학교

2) 부형제(음성대조물질)

명 칭: 멸균주사용수
 제조번호: 31N1F21
 보관조건: 실온(개봉 후 냉장)
 공 급 원: 대한약품공업(주)
 선택이유: 본 부형제는 실험동물에 독성을 나타내지 않으며, 일반적으로 사용되는 부형제이다.

3) 양성대조물질

(1) 다음과 같이 Cyclophosphamide monohydrate [CAS No. 6055-19-2, 약칭 CPA]를 사용하였다.

물질명	공급원	제품번호	로트번호	입수일	보관
CPA	Sigma-Aldrich Co.	C0768	SLBG4216V	2014 년 03 월 12 일	-1~10°C

(2) 선택이유: OECD 가이드라인 TG 474에 제시된 것 중에서 선택하였다.

2. 투여시험물질 조제 및 분석

1) 투여시험물질 조제

시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였다. 각 용량별로 정량의 시험물질을 칭량한 후 부형제를 가하여 조제하였다. 투여를 위한 시험물질 조제는 투여 당일에 조제하였다.

2) 양성대조물질 조제

적량의 CPA를 투여 직전 생리식염 주사액(대한약품공업(주), 78N2K08)에 용해하여 조제하였다.

3) 투여시험물질의 분석

조제시험물질에 대한 함량분석은 시험의뢰자가 실시하였고, 분석결과는 첨부자료로 첨부하였다 (Appendix 6).

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 마우스, Hsd:ICR(CD-1 [®])	
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 진위로 181-21)	
선정사유	본 시험에 사용한 마우스는 독성시험에 적당한 실험동물로서 유전독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초 자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다. 또한 예비시험 결과 성별에 따른 독성차이가 현저하지 않았으므로 수컷을 선택하였다.	
성별	수컷	
동물 수	입수 시	33
	투여개시 시	30
주령	입수 시	7
	투여개시 시	8
입수 시 체중범위	29.06 - 32.83 g	
투여개시 시 체중범위	32.12 - 35.95 g	
잔여동물의 처리	안락사 처리하였다.	

(2) 검역 및 순화

입수 시 체중을 측정하고 7 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시켰고, 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다. 동물 공급처에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를 검토한 결과, 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

(3) 식별

동물은 순화기간에는 개체식별카드로, 투여 및 관찰기간에는 Ear punch 법을 사용하여 식별하였다. 사육상자에는 용량별로 개체식별카드를 부착하여 식별하고, 사육상자대에는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착하였다.

(4) 실험동물윤리규정

(주)캠온 비임상연구소는 AAALAC(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 2010) 인증을 획득하였으며, 본 시험은 실험동물운영 위원회에 의해 승인되었다(심의번호: 14-M240).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정

동물은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10 - 20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등 - 오후 8 시 소등) 및 조도 150 - 300 Lux로 유지되는 (주)캠온 비임상연구소 제2동물사육구역 13 호실에서 사육하였다.

온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정하였다. 사육기간 동안 동물실의 온도 및 상대습도는 일평균 $21.0 - 22.0$ °C 및 $53.9 - 58.6$ % 였고, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

(2) 사료, 물, 깔개 및 오염물질 검사

사료는 TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET (2918C, Harlan Laboratories Inc., USA)를 (주)두얼바이오텍(서울특별시 서초구 바우포로 91)으로부터 공급받아 급이기에 넣고 자유섭취 하도록 하였다. 사료의 '성분분석 성적서'를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

물은 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 지하수를 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취 하도록 하였다. 수질검사는 경기도보건환경연구원(경기도 수원시 장안구 파장천로 95)에서 수행하였고, 먹는물수질기준에 적합하였다.

종이깔개를 부조(경기도 광주시 오포읍 문형산길 165)로부터 공급받아 고압증기멸균 후 사용하였다. 깔개의 '오염물질 분석성적서'를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

(3) 사육상자 및 사육밀도

폴리카보네이트 사육상자(W 170 x L 235 x H 125 mm)에서 검역 및 순화기간, 투여 및 관찰기간동안 1 마리/사육상자로 수용하였다.

(4) 사육관리

사육상자 및 깔개와 물병은 주 1 회 교환하였다.

(5) 군분리[SOP-BM-009]

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하였고, 평균 체중에 가까운 동물들을 선택하여, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 ‘시험군 구성’ 표와 같이 무작위 분배하였다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

1) 시험군 구성

시험군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)	투여일수	투여경로
G1	M	6	1-6	20	0	2	경구
G2	M	6	7-12	20	1250	2	경구
G3	M	6	13-18	20	2500	2	경구
G4	M	6	19-24	20	5000	2	경구
G5	M	6	25-30	10 (mL/kg)	70 (mg/kg)	1	복강

G1: 음성대조군(별균주사용수)

G2-G4: 시험물질 투여군

G5: 양성대조군(Cyclophosphamide monohydrate)

2) 투여량의 설정

투여량을 결정하기 위하여 동일종 동일주령의 동물을 사용하여 예비시험(쥬켄은 시험번호: 14-MG-181P)을 실시하였다. 예비시험에서 시험물질 용량을 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day로 설정하여 용량당 암수 각 3 마리에 2 일간 투여하고, 투여일 포함 4 일간 관찰하였다. 그 결과 모든 동물에서 특별한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았으며 성별에 따른 현저한 독성의 차이도 없었다.

따라서 본 시험에서는 수컷 동물을 사용하며, 예비시험 결과에 따라 체중을 기준으로 5000 mg/kg/day를 본 시험의 고용량으로 설정하고, 공비를 2로 하여 ‘시험군 구성’표와 같이 시험군을 구성하였다.

3) 투여

시험물질	
투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용하였다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 약 24 시간 간격으로 2 일간, 15:07 이전에 투여하였다.
투여액량 산출	투여일에 측정된 체중을 기준으로 산출하였다(20 mL/kg/day).
투여방법	경구 투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위 내에 직접 투여 하였다.

양성대조물질	
투여경로 및 선택이유	일반적으로 채택되는 복강투여로 하였다.
투여횟수 및 기간	시험물질의 2 회차 투여일에 1 회 투여하였다. 14:30 이전에 투여하였다.
투여액량 산출	투여일에 측정된 체중을 기준으로 산출하였다(10 mL/kg).
투여방법	소독용 알코올을 이용하여 투여할 부위를 소독한 후 26 G 주사침을 이용하여 복강에 투여하였다.

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상

다음 표와 같이 일반증상을 관찰하여 개체별로 기록하였다.

기간	증상관찰
순화기간	매일 1 회 증상 관찰
Day 1: 투여 1 회차	투여 전, 투여 직후 및 투여 1 시간 후에 증상관찰
Day 2: 투여 2 회차	투여 전, 투여 직후 및 투여 1 시간 후에 증상관찰
Day 3: 부검일	부검 전 1 회 증상관찰

2) 체중

모든 동물에 대하여 투여 전, 투여일 및 검체 제작일에 측정하였다.

3) 골수검체 제작

골수검체는 Schmid (1975)의 방법에 따라 다음과 같이 제작하였다. 검체 제작시기는 일반적으로 적용하는 기간인 최종 투여로부터 약 24 시간 후로 하였다.

- (1) 각 마우스를 CO₂로 흡입 마취시켜 사망을 확인한 후 한 쪽 대퇴골을 적출해 23 G 주사침을 사용, 2 mL의 Fetal Bovine Serum 으로 골수를 씻어내려 현탁하였다.
- (2) 세포현탁액을 1000 rpm으로 5 분간 원심분리하였다.
- (3) 상등액을 제거한 후 침전된 골수 세포를 slide glass에 도말하여 실온에서 충분히 건조한 후 메탄올에 5 분간 고정하였다. 검체는 각 동물당 2 매씩 제작하였다.
- (4) 고정과 건조가 끝난 검체는 염색/계수 전까지 보관장에 보관하였다.

4) 형광관찰법

- (1) 각 동물당 도말상태가 양호한 1 매의 검체를 선정하여, 계수자가 내용을 알 수 없도록 미리 코드화하였다.
- (2) 형광염색액(Acridine orange 액, 이하 AO액)의 조제는 Hayashi (1983)의 방법을 응용하여, acridine orange base (CAS No. 494-38-2) 0.05 % 수용액을 Sorensen buffer (pH 6.8)로

1:4 (v/v) 희석하여 조제하였다.

- (3) 각 검체는 코드순으로 염색하되, 해당 검체의 계수 직전에 실시하였다.
- (4) 검체에 AO액 적량을 떨어뜨리고 cover glass를 덮은 다음 2 분 후에 염색상태를 확인하고, 적절한 염색상태가 되었을 때 계수를 시작하였다. 계수는 400 배의 배율로 실시하였다.
- (5) 형광계수에는 형광현미경(Nikon model Ni-U, B-2A fluorescence filter set)을 이용하였다. 소핵의 형태적인 판별은 Hayashi (1983)에 따랐다.
- (6) 다염성적혈구(PCE)는 적색형광으로, 정염성적혈구(NCE)는 형광이 거의 없으며 어두운 회색으로 보였다. 소핵이 있을 경우 적색 바탕에 녹색 점으로 나타났다.

5) 소핵의 계수 및 결과의 표시

동물당 2000 개의 PCE를 계수하면서 그 중 소핵을 가진 PCE (MNPCE)의 수를 계수하였다. 소핵 출현 빈도는 개체당 2000 개의 PCE에서 관찰되는 MNPCE 수의 평균±표준편차로 나타내었다.

소핵 유무에 상관없이 합계 500 개 이상의 적혈구(PCE+NCE)를 계수하여 PCE:RBC 비율을 산출해 세포독성의 지표로 하였다. 이 비율은 $PCE/(PCE+NCE)$ 로 산출하였다.

6) 타당성 기준

다음의 조건을 만족하였을 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정하였다.

- (1) 부검시 모든 군에서 5 마리 이상의 동물이 생존할 것.
- (2) 시험물질 투여군 및 양성대조군에서 PCE:RBC 비율의 평균값이 음성대조군의 20 % 이상일 것.
- (3) 2000 개의 PCE 중 MNPCE의 빈도가 음성대조군은 평균 10.0 (0.5 %) 이하, 양성대조군은 평균 50 (2.5 %) 이상일 것.

6. 통계 분석 및 판정

1) 통계 분석 프로그램

시험 결과의 통계분석에는 SPSS (ver. 10.1K) 프로그램을 사용하였다.

2) 결과의 평가 및 해석

- (1) 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용하며 유의수준은 $P<0.05$ 로 설정하였다.

소핵 유발 빈도에 대하여는 순위화한 데이터를 이용하여 비모수적 Kruskal-Wallis'H-test를 실시하였다. 그 결과 음성대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 음성대조군과 양성대조군의 자료는 Mann-Whitney U-test로 유의성을 검정하였다.

PCE:RBC 비율 및 체중에 대하여는 자료의 정규성을 가정하고 모수적인 일원분산분석

(One-way ANOVA)을 적용하였다. 분산의 동질성은 Levene test로 검정하였다. 그 결과 시험물질 투여군의 PCE:RBC 비율에서 음성대조군과 유의한 차이가 나타나지 않았다. 음성대조군과 양성대조군의 평균의 차이는 독립표본 T-test로 분석하였다. .

(2) 판정기준

투여군의 PCE:RBC 비율의 평균값이 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소를 나타낼 때 세포독성이 있는 것으로 판정하였다.

시험물질 투여군에서 MNPCE의 빈도가 통계학적으로 유의하며 용량의존적으로 증가하거나, 한 용량 이상에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 그러나 통계학적인 유의성을 양성판정의 유일한 근거로 삼지는 않으며, 생물학적 연관성 또한 고려하였다.

결 과

소핵 유발빈도 및 세포독성(Table 1 and Appendix 1)

개체당 2000 개의 PCE에서 관찰된 소핵을 가진 PCE (MNPCE) 빈도는 음성대조군 (0), 시험물질 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day 투여군 순으로 평균 0.33, 1.00, 0.33 및 0.50 이었다. 시험물질 투여군의 소핵 빈도에 대하여 음성대조군과의 차이를 조사한 결과, 모든 군에서 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았다.

한편, 양성대조군에서는 소핵 빈도가 72.50 으로, 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다($P < 0.01$).

세포독성의 지표인 PCE:RBC 비율은 음성대조군 (0), 시험물질 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day 투여군 순으로 평균 0.58, 0.57, 0.55 및 0.56 으로, 모든 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화는 없었다. 한편 양성대조군에서는 PCE:RBC 비율이 0.45 로, 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다($P < 0.01$).

체중(Table 2 and Appendix 2)

각 군간의 체중을 비교한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

일반증상(Table 3)

모든 생존동물에서 시험물질 투여로 인한 특별한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

고찰 및 결론

본 시험에 적용한 용량범위 내에서, 개체 당 2000 개의 PCE를 대상으로 소핵을 가진 PCE를 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 없었으며, 양성판정 기준을 만족시키지 못하였다.

따라서 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate는 본 시험조건 하에서 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983): An Application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 120:241-247.
- 2) Heddle, J.A., E. Stuart and M.F. Salamone (1984): The bone marrow micronucleus test, In: Handbook of mutagenicity test procedures, 2nd edition (edited by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel), Elsevier Science Publishers BV, pp. 441-457.
- 3) Schmid, W. (1975): The micronucleus test, *Mutat. Res.*, 31:9-15.

단위 및 약호

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by Chemon Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this report.

%	Percent
°	Degree
C	Celsius
L	Liter
mL	Milliliter
µL	Microliter
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Milligram
µg	Microgram
ng	Nanogram
m	Meter
cm	Centimeter
mm	Millimeter
µm	Micrometer
hr	Hour
min	Minute
sec	Second
rpm	Revolution per Minute
M	Male
F	Female
GLP	Good Laboratory Practice Regulation
ICH	International Conference on Harmonization
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee
MFDS	Ministry of Food and Drug Safety
MNPCE	Micronucleated PCE
NCE	Normochromatic erythrocyte
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PCE	Polychromatic erythrocyte
RBC	Red blood cell
QAU	Quality Assurance Unit
RH	Relative Humidity
SD	Standard Deviation
SOP	Standard Operating Procedures
SPF	Specific Pathogen Free
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

TABLES

Table 1. Observations of micronucleus and PCE:RBC ratio – summary

Dose (mg/kg/day)	Animals per Dose	MNPCE/2000 PCE (Mean±SD)	PCE:RBC Ratio (Mean±SD)	(% Control)
0	6	0.33 ± 0.52	0.58 ± 0.04	100
1250	6	1.00 ± 0.63	0.57 ± 0.04	97
2500	6	0.33 ± 0.52	0.55 ± 0.02	95
5000	6	0.50 ± 0.84	0.56 ± 0.03	96
CPA 70 (mg/kg)	6	72.50 ± 11.81**	0.45 ± 0.02**	77

Test article: Oyster enzyme hydrolysate

Vehicle: Sterile distilled water for injection

Vehicle and Test article were orally administered to mice for two consecutive days.

CPA was intraperitoneally administered to mice once on the day of the 2nd admin.

Bone marrow smears were prepared about 24 hours after the final administration.

** Significantly different from the negative control group at $P < 0.01$.

Abbreviations

PCE: Polychromatic erythrocyte

RBC: Red blood cells (polychromatic erythrocyte+normochromatic erythrocyte)

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

CPA: Cyclophosphamide monohydrate (positive control article)

Table 2. Body weights of mice – summary

Dose (mg/kg/day)	Animals per Dose	Body weights (g) at the time of		
		1 st Admin.	2 nd Admin.	Sacrifice
0	6	34.14 ± 1.32	34.74 ± 1.37	34.38 ± 1.82
1250	6	34.16 ± 1.17	34.73 ± 1.06	34.10 ± 1.32
2500	6	34.23 ± 0.71	34.79 ± 1.06	34.44 ± 0.79
5000	6	34.35 ± 0.93	35.11 ± 0.73	34.55 ± 0.68
CPA 70 (mg/kg)	6	34.08 ± 0.38	34.47 ± 0.54	34.33 ± 0.42

Test article: Oyster enzyme hydrolysate

Vehicle: Sterile distilled water for injection

Vehicle and Test article were orally administered to mice for two consecutive days.

CPA was intraperitoneally administered to mice once on the day of the 2nd admin.

Mice were euthanized about 24 hours after the final administration.

Abbreviation

CPA: Cyclophosphamide monohydrate (positive control article)

Table 3. Observations of mice

Dose (mg/kg/day)	Animal No.	1 st Admin.			2 nd Admin.			Before Sacrifice
		BD	IPD	1-hr PD	BD	IPD	1-hr PD	
0	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0
1250	7	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0
2500	13	0	0	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	0	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0
5000	19	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0
	21	0	0	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	0	0	0	0
	23	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0
CPA 70 (mg/kg)	25	0	-	-	0	0	0	0
	26	0	-	-	0	0	0	0
	27	0	-	-	0	0	0	0
	28	0	-	-	0	0	0	0
	29	0	-	-	0	0	0	0
	30	0	-	-	0	0	0	0

Test article: Oyster enzyme hydrolysate

Vehicle: Sterile distilled water for injection

Vehicle and Test article were orally administered to mice for two consecutive days.

CPA was intraperitoneally administered to mice once on the day of the 2nd admin.

Mice were euthanized about 24 hours after the final administration.

Abbreviation

CPA: Cyclophosphamide monohydrate (positive control article)

BD: before dosing

IPD: Immediately post dosing last animal

PD: post dosing last animal

0=Normal, -: Not done.

APPENDICES

Appendix 1. Observations of micronucleus and PCE:RBC ratio – individual animal data

Dose (mg/kg/day)	Animal ID	MNPCEs/ 2000 PCEs	Number of PCE / NCE	PCE:RBC Ratio
0	1	0	305 / 195	0.61
	2	0	294 / 206	0.59
	3	1	292 / 208	0.58
	4	0	320 / 180	0.64
	5	0	260 / 240	0.52
	6	1	269 / 231	0.54
1250	7	1	279 / 221	0.56
	8	1	252 / 248	0.50
	9	1	312 / 188	0.62
	10	0	286 / 214	0.57
	11	2	284 / 216	0.57
	12	1	283 / 217	0.57
2500	13	0	280 / 220	0.56
	14	0	285 / 215	0.57
	15	1	276 / 224	0.55
	16	0	285 / 215	0.57
	17	0	255 / 245	0.51
	18	1	271 / 229	0.54
5000	19	2	271 / 229	0.54
	20	0	282 / 218	0.56
	21	1	301 / 199	0.60
	22	0	269 / 231	0.54
	23	0	256 / 244	0.51
	24	0	288 / 212	0.58
CPA 70 (mg/kg)	25	85	229 / 271	0.46
	26	65	221 / 279	0.44
	27	74	206 / 294	0.41
	28	76	218 / 282	0.44
	29	82	237 / 263	0.47
	30	53	231 / 269	0.46

Test article: Oyster enzyme hydrolysate

Vehicle: Sterile distilled water for injection

Vehicle and Test article were orally administered to mice for two consecutive days.

CPA was intraperitoneally administered to mice once on the day of the 2nd admin.

Bone marrow smears were prepared about 24 hours after the final administration.

Abbreviations

PCE: Polychromatic erythrocyte

RBC: Red blood cells (polychromatic erythrocyte+normochromatic erythrocyte)

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

CPA: Cyclophosphamide monohydrate (positive control article)

Appendix 2. Body weights of mice – individual animal data

BODY WEIGHTS (g)				
Dose (mg/kg/day)	Animal ID	1 st dosing	2 nd dosing	Sacrifice
0	1	35.95	36.59	36.69
	2	34.58	35.15	35.07
	3	34.99	35.44	35.23
	4	33.67	34.82	34.39
	5	33.41	33.40	33.57
	6	32.21	32.67	31.33
1250	7	34.92	36.05	35.08
	8	34.48	35.10	34.11
	9	34.69	34.52	33.48
	10	35.28	34.97	35.65
	11	33.45	34.92	34.40
	12	32.12	32.83	31.88
2500	13	35.14	34.90	34.91
	14	34.85	35.83	35.16
	15	34.58	36.19	35.22
	16	33.53	33.51	33.31
	17	33.59	34.38	34.28
	18	33.69	33.92	33.75
5000	19	35.75	36.16	35.40
	20	34.85	35.54	34.34
	21	34.43	35.02	35.07
	22	34.24	35.34	34.92
	23	33.78	34.17	33.75
	24	33.02	34.43	33.83
CPA 70 (mg/kg)	25	34.07	34.53	33.78
	26	34.80	35.37	34.94
	27	34.16	34.69	34.44
	28	33.83	34.32	34.08
	29	33.88	33.87	34.62
	30	33.75	34.03	34.09

Test article: Oyster enzyme hydrolysate

Vehicle: Sterile distilled water for injection

Vehicle and Test article were orally administered to mice for two consecutive days.

CPA was intraperitoneally administered to mice once on the day of the 2nd admin.

Mice were euthanized about 24 hours after the final administration.

Abbreviation

CPA: Cyclophosphamide monohydrate (positive control article)

Appendix 3. Historical control data

(Dec 2012 – Mar 2014, SPF male ICR Mice, 8 weeks old at administration, AO staining)

All vehicle controls

	MNPCE/2000 PCE	PCE/RBC Ratio
Minimum	0	0.34
Maximum	8	0.69
Mean	1.23	0.52
S.D.	1.28	0.07
No. of Values	125	

Methylcellulose (0.5 and 1 %)

	MNPCE/2000 PCE	PCE/RBC Ratio
Minimum	0	0.47
Maximum	4	0.69
Mean	1.22	0.57
S.D.	1.04	0.05
No. of Values	23	

Positive controls (intraperitoneal administration)

	MNPCE/2000 PCE	PCE/RBC Ratio
Minimum	51	0.25
Maximum	109	0.50
Mean	66.23	0.38
S.D.	13.45	0.05
No. of Values	124	

Positive control article: Cyclophosphamide monohydrate [CAS No. 6055-19-2]

Appendix 4. Protocol and protocol amendment



시험계획서

Oyster enzyme hydrolysate의 수컷 ICR 마우스
골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험

시험번호: 14-MG-182



승인:

김성숙

2014. 05. 28

김성숙, M.S.
시험책임자
㈜켘온 비임상연구소

날짜

김갑호

2014. 05. 30

김갑호, M.S., Toxicologist
운영책임자
㈜켘온 비임상연구소

날짜

정세영

2014. 05. 30

정세영
의뢰책임자
경희대학교

날짜

ORIGINAL	
2014년 05월 10일	
시험책임자	김성숙 (PI)

- 시 험 제 목** Oyster enzyme hydrolysate의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험
- 시 험 목 적** 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate의 생체내 염색체이상의 유발 또는 유사 분열기구에 대한 이상 유발 여부를 ICR 마우스의 골수세포에서의 소핵 유발성을 지표로 하여 평가하기 위함이다.
- 시 험 지 침** 의약품등의독성시험기준 (제2014-6호, MFDS, 2014 년 01 월 29 일)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG 474 (1997) 'Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test'
- 시 험 의뢰 자** 경희대학교
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호,
130-701
02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX)
- 시 험 기 관** ㈜켄온 비임상연구소
경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826
경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270
031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)
- 시 험 일 정**
- | | |
|------------------|----------------|
| 2014 년 06 월 03 일 | 동물입수(실험개시일) |
| 2014 년 06 월 10 일 | 투여개시 |
| 2014 년 06 월 11 일 | 투여종료 |
| 2014 년 06 월 12 일 | 검체제작 |
| 2014 년 06 월 26 일 | 판독완료 예정(실험종료일) |
| 2014 년 07 월 10 일 | 최종보고서(안) 제출 예정 |
- 주요시험관계자**
- | | |
|-------------|---------------------|
| 동물시험: | 장 동 진 |
| 시험물질 조제/보관: | 김 지 훈, 김 현 지, 이 지 혜 |
| 통계분석: | 이 민 행 |
| 자료보관: | 정 혜 정 |

기록과 재료의 [SOP-AC-001~007]

보 관 시험계획서(변경 및 일탈기록), 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본, 검체 및 각종 증거자료는 품목허가일부터 3 년간 ㈜켄온 비임상연구소의 자료보관실에 보관한다. 이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

G L P 대 응 비임상시험관리기준(제2014-67호, MFDS, 2014 년 02 월 12 일)

OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17

시험계획서의 변경 혹은 일탈은 문서로 작성하고, 신뢰성보증부서(QAU)에서 검토 후 시험책임자, 운영책임자 및 시험의뢰자가 승인한다.

㈜켄온 비임상연구소의 신뢰성보증부서는 시험과정 전반에 걸친 점검을 단독으로 행한다.

최 종 보 고 서 [SOP-TO-007]

최종보고서는 시험계획서의 내용을 반영하여 표지, 시험책임자진술서, 신뢰성보증확인서, 목차, 요약, 재료 및 방법, 관찰 및 측정 결과, 고찰 및 결론, 참고 문헌 등으로 구성하며, 필요에 따라 사진이나 표, 부표 및 첨부자료 등을 포함하여 작성한다.

1. 시험물질, 부형제 및 대조물질

1) 시험물질[SOP-TA-001]

명 칭: Oyster enzyme hydrolysate
 코드번호: C-1390
 제조번호: 시험의뢰자 미제공
 입 수 일: 2014 년 05 월 27 일
 입 수 량: 60 g/pack X 1 pack
 외 관: Powder
 함 량: Tyrosine-alanine 10.7 - 13.6 µg/g
 유효일자: 시험의뢰자 미제공
 보관조건: 실온, 차광, 방습
 공 급 원: 경희대학교

2) 부형제(음성대조물질)

명 칭: 멸균주사용수
 제조번호: 31N1F21
 보관조건: 실온(개봉 후 냉장보관)
 공 급 원: 대한약품공업(주)
 선택이유: 본 부형제는 실험동물에 독성을 나타내지 않으며, 일반적으로 사용되는 부형제이다.

3) 양성대조물질

다음과 같이 Cyclophosphamide monohydrate [CAS No. 6055-19-2, 약칭 CPA]를 사용한다.
 이 양성대조물질은 OECD 가이드라인 TG 474에 제시된 것 중에서 선택하였다.

물질명	공급원	제품번호	로트번호	입수일	보관
CPA	Sigma-Aldrich Co.	C0768	SLBG4216V	2014 년 03 월 12 일	-1~10°C

2. 투여시험물질 조제 및 분석

1) 투여시험물질 조제 [SOP-TA-002]

시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용한다. 각 용량별로 정량의 시험 물질을 칭량한 후 부형제를 가하여 조제한다. 조제는 투여 당일 실시한다.

2) 양성대조물질 조제

적량의 CPA를 투여 직전 생리식염 주사액에 용해하여 조제한다.

3) 투여시험물질의 분석[SOP-AS-011]

조제시험물질에 대한 함량분석은 시험의뢰자가 실시하고, 분석결과는 최종보고서에 첨부한다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보[SOP-BE-001/004/007]

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 마우스, Hsd:ICR(CD-1 [®])	
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 진위로 181-21)	
선정사유	본 시험에 사용하는 마우스는 독성시험에 적당한 실험동물로서 유전독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초 자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.	
성별	수컷	
동물 수	입수 시	33
	투여개시 시	30
주령	입수 시	7
	투여개시 시	8
투여개시 시 체중범위	평균체중(g)의 ± 20 % 이내	
잔여동물의 처리	㈜켄온의 SOP에 따른다.	

(2) 검역 및 순화[SOP-QT-001]

입수 시 체중을 측정하고, 7 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시킨다. 매일 1 회 이상 일반 증상을 관찰한다.

(3) 식별[SOP-BE-010/011]

동물은 순화기간에는 개체식별카드로, 투여 및 관찰기간에는 Ear punch 를 사용하는 표식법을 사용하여 개체 식별한다.

사육상자에는 색으로 구별하는 용량별 개체식별카드를 부착하고, 사육상자대에는 고유번호를 부여한다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착한다.

(4) 실험동물윤리규정[SOP-VC-001]

㈜켄온 비임상연구소는 AAALAC(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 2010) 인증을 획득하였으며, 본 시험은 실험동물윤리위원회에 의해 승인되었다(심의번호:14-M240).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정[SOP-FA-005]

동물은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10 - 20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등 - 오후 8 시 소등) 및 조도 150 - 300 Lux로 유지되는 ㈜켄온 비임상연

구소 제2동물사육구역 13 호실에서 사육한다.

온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정한다.

(2) 사료, 물, 깔개 및 오염물질 검사[SOP-BE-002/003]

사료는 TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET (2918C, Harlan Laboratories Inc., USA)를 급이기에 넣고 자유섭취 하도록 한다.

물은 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 지하수를 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취 하도록 한다.

깔개는 종이깔개를 고압증기멸균 후 사용한다. 오염물질 검사는 ㈜켐온의 SOP에 따른다.

(3) 사육상자 및 사육밀도[SOP-BE-008]

폴리카보네이트 사육상자(W 170 x L 235 x H 125 mm)에서 검역 및 순화기간, 투여 및 관찰 기간에는 1 마리/사육상자로 수용한다.

(4) 사육관리[SOP-BM-002]

사육상자 및 깔개와 물병은 주 1 회 교환한다.

(5) 군분리[SOP-BM-009]

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 평균에 가까운 동물들을 선택하여, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 '시험군 구성' 표와 같이 무작위 분배한다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정 및 투여

1) 시험군 구성

시험군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)	투여일수	투여경로
G1	M	6	1-6	20	0	2	경구
G2	M	6	7-12	20	1250	2	경구
G3	M	6	13-18	20	2500	2	경구
G4	M	6	19-24	20	5000	2	경구
G5	M	6	25-30	10 (mL/kg)	70 (mg/kg)	1	복강

G1: 음성대조군(별군주사용수)

G2-G4: 시험물질 투여군

G5: 양성대조군(Cyclophosphamide monohydrate)

2) 투여량의 설정

투여량을 결정하기 위하여 동일종 동일주령의 동물을 사용하여 예비시험(㈜켐온 시험번호: 14-MG-181P)을 실시하였다. 예비시험에서 시험물질 용량을 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day로 설정하여 용량당 암수 각 3 마리에 2 일간 투여하고, 투여일 포함 4 일간 관찰하였다. 그 결과 모든 동물에서 특별한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았으며 성별에 따른

현저한 독성의 차이도 없었다.

따라서 본 시험에서는 수컷 동물을 사용하며, 예비시험 결과에 따라 체중을 기준으로 5000 mg/kg/day를 본 시험의 고용량으로 설정하고, 공비를 2로 하여 '시험군 구성'표와 같이 시험군을 구성하였다.

3) 투여[SOP-AT-001]

시험물질	
투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용한다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 약 24 시간 간격으로 2 일간, 16:00 이전에 투여한다.
투여액량 산출	투여일에 측정된 체중을 기준으로 산출한다(20 mL/kg/day).
투여방법	경구 투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위 내에 직접 투여한다.
양성대조물질	
투여경로 및 선택이유	일반적으로 채택되는 복강투여로 한다.
투여횟수 및 기간	시험물질의 2 회차 투여일에 1 회 투여한다. 16:00 이전에 투여한다.
투여액량 산출	투여일에 측정된 체중을 기준으로 산출한다(10 mL/kg).
투여방법	시험물질은 70 % 소독용 알코올을 이용하여 투여할 부위를 소독한 후 26 G 주사침을 이용하여 복강 투여한다. 투여시험물질은 매회 취할 때마다 잘 흔들어준다.

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상[SOP-AT-004]

다음 표와 같이 일반증상을 관찰하여 개체별로 기록한다. 계획부검 이전에 발견된 빈사동물 및 사망동물은 증상 및 외관 관찰 결과를 기록한 후 안락사 처리 또는 폐기한다. 이들 동물은 부검을 실시하지 않는다.

기간	증상관찰
순환기간	매일 1 회 증상 관찰
Day 1: 투여 1 회차	투여 전, 투여 직후 및 투여 1 시간 후에 증상관찰
Day 2: 투여 2 회차	투여 전, 투여 직후 및 투여 1 시간 후에 증상관찰
Day 3: 부검일	부검 전 1 회 증상관찰

2) 체중[SOP-AT-006]

모든 동물에 대하여 투여 전, 투여일 및 검체 제작일에 측정한다.

3) 골수검체 제작[SOP-MT-404]

골수검체는 Schmid (1975)의 방법에 따라 다음과 같이 제작한다. 검체 제작시기는 일반적으로

적용하는 기간인 최종 투여로부터 약 24 시간 후로 한다.

- (1) 각 마우스를 CO₂로 흡입 마취시켜 사망을 확인한 후 한 쪽 대퇴골을 적출해 23 G 주사침을 사용, 2 mL의 Fetal Bovine Serum 으로 골수를 씻어내려 현탁한다.
- (2) 세포현탁액을 1000 rpm으로 5 분간 원심분리한다.
- (3) 상등액을 제거한 후 침전된 골수 세포를 slide glass에 도말하여 실온에서 충분히 건조한 후 메탄올에 5 분간 고정한다. 검체는 각 동물당 2 매 이상 제작한다.
- (4) 고정과 건조가 끝난 검체는 염색/계수 전까지 보관장에 보관한다.

4) 형광관찰법[SOP-MT-404]

- (1) 각 동물당 도말 상태가 양호한 1 매의 검체를 선정하여, 계수자가 내용을 알 수 없도록 미리 코드화한다.
- (2) 형광염색액(Acridine orange 액, 이하 AO액)의 조제는 Hayashi (1983)의 방법을 응용하여, acridine orange base (CAS No. 494-38-2) 0.05 % 수용액을 Sorensen buffer (pH 6.8)로 1:4 (v/v) 희석하여 조제한다.
- (3) 각 검체는 코드순으로 염색하되, 해당 검체의 계수 직전에 실시한다.
- (4) 검체에 AO액 적량을 떨어뜨리고 cover glass를 덮은 다음 2 분 후에 염색상태를 확인하고, 적절한 염색상태가 되었을 때 계수를 시작한다. 계수는 400 배의 배율로 실시한다.
- (5) 형광계수에는 형광현미경(Nikon model Ni-U, B-2A fluorescence filter set)을 이용한다. 소핵의 형태적인 판별은 Hayashi (1983)에 따른다.
- (6) 다염성적혈구(PCE)는 적색형광으로, 정염성적혈구(NCE)는 형광이 거의 없으며 어두운 회색으로 보인다. 소핵이 있을 경우 적색 바탕에 녹색 점으로 나타난다.

5) 소핵의 계수 및 결과의 표시[SOP-MT-402]

동물당 2000 개의 PCE를 계수하면서 그 중 소핵을 가진 PCE (MNPCE)의 수를 계수한다. 소핵 출현 빈도는 개체당 2000 개의 PCE에서 관찰되는 MNPCE 수의 평균±표준편차로 나타낸다.

소핵 유무에 상관없이 합계 500 개 이상의 적혈구(PCE+NCE)를 계수하여 PCE:RBC 비율을 산출해 세포독성의 지표로 한다. 이 비율은 PCE/(PCE+NCE)로 산출한다.

6) 타당성 기준

다음의 조건을 만족하였을 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정한다.

- (1) 부검시 모든 군에서 5 마리 이상의 동물이 생존할 것.
- (2) 시험물질 투여군 및 양성대조군에서 PCE/RBC 비율이 음성대조군의 20 % 이상일 것.
- (3) 2000 개의 PCE 중 MNPCE의 빈도가 음성대조군은 평균 10.0 (0.5 %) 이하, 양성대조군은 평균 50 (2.5 %) 이상일 것.

6. 통계 분석 및 판정[SOP-CO-001]

1) 통계 분석 프로그램

시험 결과의 통계분석에는 SPSS (ver. 10.1K) 프로그램을 사용한다.

2) 결과의 평가 및 해석

(1) 통계처리

통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지를 이용하며 유의수준은 $P < 0.05$ 로 설정한다. 다음과 같이 통계분석을 실시하며, 기타 통계학적 방법을 사용할 경우 최종보고서에 명시한다.

소핵 유발 빈도에 대하여는 순위화한 데이터를 이용하여 비모수적 Kruskal-Wallis'H-test를 실시하며, 그 결과가 유의할 경우 Mann-Whitney U-test로 음성대조군과 유의한 차이를 나타내는 군을 확인한다. 음성대조군과 양성대조군의 자료는 Mann-Whitney U-test로 유의성을 검정한다.

PCE:RBC 비율 및 체중에 대하여는 자료의 정규성을 가정하고 모수적인 일원분산분석(One-way ANOVA)을 적용한다. 분산의 동질성은 Levene test로 검정한다. ANOVA 결과가 유의하며 등분산인 경우 Duncan multiple range test (표본수 같음) 또는 Scheffe multiple range test (표본수 다름)로, 이분산인 경우는 Dunnett T3 test로 사후검정을 실시하여 음성대조군과 유의한 차이를 나타내는 군을 확인한다. 음성대조군과 양성대조군의 평균의 차이는 독립표본 T-test로 분석한다.

(2) 판정기준

투여군의 PCE:RBC 비율의 평균값이 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소를 나타낼 때 세포독성이 있는 것으로 판정한다.

시험물질 투여군에서 MNPCE의 수가 용량의존적으로 증가하거나 또는 1 개 이상의 용량단계에서 확실하게 증가할 경우 양성으로 판정한다. 그러나 통계학적인 유의성을 양성판정의 유일한 근거로 삼지는 않으며, 생물학적 연관성 또한 고려한다.

7. 참고문헌

- 1) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983): An Application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 120:241-247.
- 2) Heddle, J.A., E. Stuart and M.F. Salamone (1984): The bone marrow micronucleus test, In: Handbook of mutagenicity test procedures, 2nd edition (edited by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel), Elsevier Science Publishers BV, pp. 441-457.
- 3) Schmid, W. (1975): The micronucleus test, *Mutat. Res.*, 31:9-15.

Protocol Amendment Form
(시험계획서 변경 기록지)

Study Title: Oyster enzyme hydrolysate의 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험
 Study No.: 14-MG-182 Amendment No.: 1

Amendment to the Protocol:
(변경 내용)

1. Page 4, 1.1) 시험물질 부분을 다음과 같이 변경한다.

	변경 전	변경 후
제조번호	시험의뢰자 미제공	OP140415
함 량	Tyrosine-alanine 10.7 - 13.6 µg/g	tyrosine-alanine 평균 0.13 %
유효일자	시험의뢰자 미제공	2015 년 04 월 15 일

Reason for the Amendment:
(변경 사유)

1. 시험의뢰자가 제공한 정보의 내용을 반영한다.



Impact on Study:
(시험에 미치는 영향)

1. 시험에 미치는 영향 없음

Approved by:

Study Director: 김 서 승 Date: 2014. 10. 21

Management: 김 장 호 Date: 2014. 10. 21

Authorized by Sponsor: 丁世海 Date: 2014. 10. 22

Chemon Inc. TO-006-S03



Appendix 5. Certificate of analysis

시험성적서
경희대학교 약학대학

품 명	Oyster enzyme hydrolysate	제조번호	OP140415
제조일자	2014.04.15	시험일자	2014.04.20
		유효일자	2015.04.15

시험항목	시험기준	결과
성 상	powder	적합
확인시험	HPLC	적합
함량시험	tyrosine-alanine 함량	0.10~0.15% (평균 함량: 0.13%)
불용성이물검사	육안으로 보이는 이물질이 없어야 함	적합

판정	적합
시험 담당자	장영표 (서명)

Appendix 6. Result of dose formulation analysis

문서번호 Document No.	
PV-0009	
<h1>시험 성적서</h1> <h2>Analysis Certificate</h2>	
시험분석 의뢰기관: Requested by	
(주) 켈온	
시험분석 대 상: Sample	
굴 가수분해 조제물 (14-VG-182)	
시험분석 책임자: Principal Investigator	
정 세 희	
경희대학교 약학대학 생약학실 Division of Pharmacognosy College of Pharmacy, Kyung Hee University Seoul, Korea 130-701	날짜 Date : 2014. 07. 30 Lab. Manager : 장 영 표 Young Pyo Jang 

굴 가수분해물 조제시험물질의 검증시험

시험물질, 표준물질 및 부형제

(가) 시험물질

- ① 조제농도: 62.5mg/mL, 125mg/mL, 250mg/mL
- ② 시험(로트)번호: 14-VG-182
- ③ 조제일: 2014.06.10
- ④ 입수량: 40ml
- ⑤ 외관 및 성상: 황토색의 현탁액
- ⑥ 시험물질명: Oyster enzyme hydrolysate
- ⑦ 시험물질로트: OP140415
- ⑧ 보관조건: 냉장보관
- ⑨ 공급원: 켄온
- ⑩ 부형제: 멸균주사용수

(나) 표준물질

- ① 명칭: tyrosine-alanine
- ② 제조(로트)번호: T5129
- ③ 입수일: 2013.06.10
- ④ 입수량: 50mg
- ⑤ 외관 및 성상: white powder
- ⑥ 순도: 99.9%
- ⑦ 보관조건: 냉동
- ⑧ 공급원: Aldrich

1. 실험재료

1.1 시료

실험에 사용된 굴 가수분해물은 주식회사 켐온으로부터 제공받아 사용하였고, 실험에 사용된 표준품의 순도는 tyrosine alanine 99.9%를 사용하였다.

1.2 사용기기

사용한 UPLC는 Waters HPLC로 Empower software를 통해 크로마토그램 데이터를 처리하였다. 분석에는 Atlantis T3 C18 column (4.6 x 250 mm i.d. 5 µm, waters, Massachusetts, USA)를 사용하였다.

1.3 시약 및 재료

HPLC용 용매는 HPLC grade용매 (Fisher, South Korea)를 0.45 µm PTFE filter (ADVANTEC, USA)로 여과한 후 사용하였으며 그 외에 trifluoroacetic acid (sigma aldrich, USA)는 분석용 1급 시약을 사용하였다. 초순수는 ABBOTA NEO 1으로 제조하여 18 MΩ 이상을 사용하였다.

1.4 HPLC 조건

Device	Waters 717autosampler, 600controller, 2487detector
Column	Atlantis T3 C18 column (4.6 x 250 mm i.d. 5 µm, waters, USA)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	220 nm
Column temp.	25 °C
Mobile phase	solvent A: CH ₃ CN (0.1% trifluoroacetic acid) solvent B: H ₂ O (0.1% trifluoroacetic acid)
Gradient condition	A:B=4:96

1.5 이동상 및 표준용액

① CH₃CN (0.1% trifluoroacetic acid)

trifluoroacetic acid 1ml 을 1000ml 의 Acetonitrile 에 넣은후, 0.45µm 필터로 여과 하였다.

② H₂O (0.1% trifluoroacetic acid)

trifluoroacetic acid 1ml 을 1000ml 의 Water 에 넣은후, 0.45µm 필터로 여과 하였다.

③ 표준용액

㉞ 보관용 표준용액

표준물질 20mg 을 1ml 의 water 에 녹이고, 냉장고에 보관하였다.

㉟ 상용 표준용액

보관용 표준용액을 water 로 희석하여 200, 100, 50, 20, 10µg/ml 로 조제하였다.

2. 분석법 검증

2.1 특이성

특이성은 부형제(0.1%) 중 내인성 방해물질의 존재를 chromatogram 으로 평가하였다.

2.2 직선성

분석법 검증 기간 동안 상용표준용액을 분석하고, 피크 면적으로 검량선을 작성하였다.

직선성은 결정계수(0.99 이상)와 회귀방정식으로 역산출한 농도에 대한 각 표준물질의 이론 농도에 대한 상대오차로 평가하였다. (90~110%이내)

2.3 정확성과 정밀성

정확성과 정밀성은 일내, 일간 상대오차와 변동계수를 평가하였다. 일내 정확성과 정밀성 평가를 위해 시료(10, 20, 50, 100, 200µg/ml)를 3 회(n=3)분석하였고, 일간 정확성과 정밀성은 3 배치를 분석하여 평가하였다. 허용기준은 상대오차는 90~110%이내, 변동계수 10%미만으로 하였다.

2.4 안정성

2.4.1 실온안정성

표준용액을 실온에서 약 4 시간 방치 후 분석하였다. 실온안정성은 상대오차로 평가하였다. (95~105%이내)

2.4.2 자동주입기 안정성

상용 표준용액을 자동주입기에서 하룻밤 동안 방치 후 분석하였다. 자동주입기 안정성은 상대오차로 평가하였다. (95~105%)

2.5 조제시험물질 분석

2.5.1 조제시험물질의 운송 및 보관

㈜캠온 경기바이오연구센터에서 경희대학교로 운송하고 이후 실험이 종료되는 기간까지 냉장 보관 하였다.

2.5.2 시료의 채취

조제시험물질 튜브 외부에 유성매직으로 표선을 만들고, 조제당일에는 상, 중, 하층에서 채취하고, 4 및 7 일째에는 중층에서만 채취하였다. 조제시험물질은 시험물질 조제당일과 조제 후 4 및 7 일째로 총 3 회 채취하였다.

3. 결과

(1) 분석법 검증

1.1 특이성

부형제 중 내인성 방해인자는 관찰되지 않았다.

Figure 1. Chromatogram of vehicle (a), standard (b, 0.1 mg/mL), QC (c, 40 mg/mL)

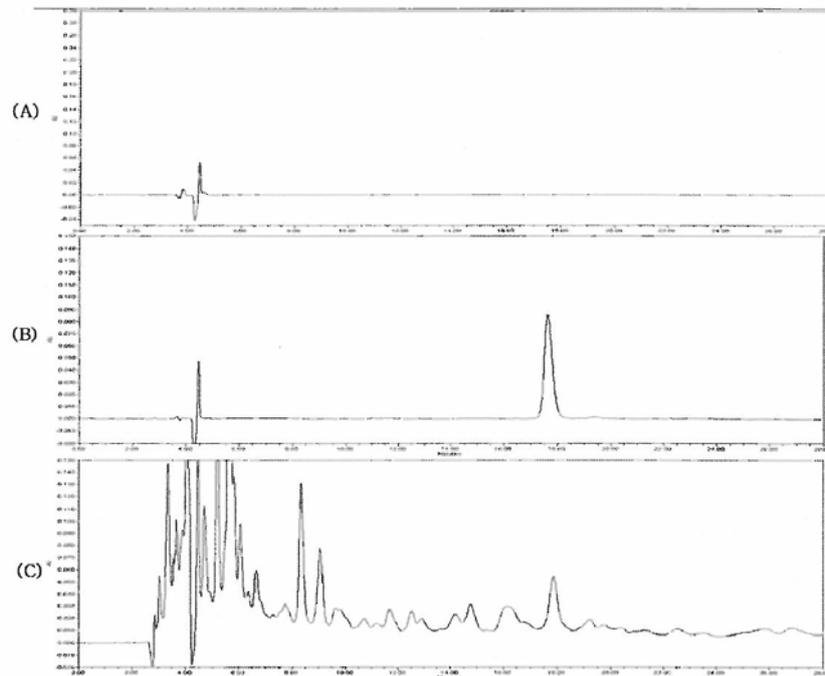


Table 1. Content of tyrosine-alanine in oyster peptide

Replicate	Peak area ratio	Measure conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Sample WT.	Content(mg/g)
1	968980	52.92	40mg	1.32
2	980989	53.58	40mg	1.34
3	920439	50.25	40mg	1.26
4	937436	51.19	40mg	1.28
5	905452	49.43	40mg	1.24
6	913491	49.87	40mg	1.25
			Mean	1.30
			SD	0.04
			RSD	2.95

1.2 직선성

Tyrosine-alanine의 농도와 기기적 감응의 상관계수(r)는 0.999, 상대오차는 95~105%사이였으며, 10~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$)의 농도범위에서 직선성을 나타내었다.

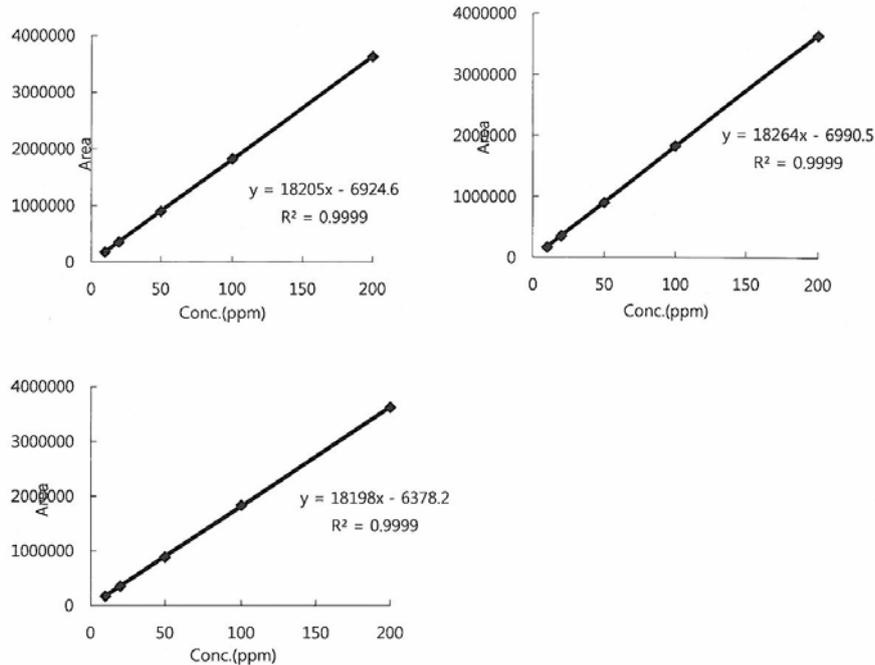


Figure 2. Calibration of tyrosine-alanine in the range of 5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by HPLC

1.3 정확성과 정밀성

일내, 일간 상대오차는 분석법의 정확성 및 정밀성을 측정한 결과, 모두 검증기준을 충족시키는 결과를 나타내었다. 투여시험물질은 0(부형제 대조군), 50, 150, 500, 1500, 5000mg의 용량으로 조제하였다. 글 가수분해물 1g중 tyrosine-alanine의 표시량은 1.30 mg/g으로 결정되었다. (Table 1) 조제된 투여시험물질은 시료의 채취부위에 상관없이 균질성을 나타내었으며 부형제로 조제된 글 가수분해물은 냉장보관조건에서 7일간 안정성이 확보되었다.

검량선은 최소자승법을 이용하여 회귀식의 기울기, 절편 및 상관계수를 구하였으며, 각 농도에서 역-환산된 측정값의 상대오차는 전체 정량범위에서 -0.94~0.91%로서 직선성의 기준을 충족하였다. (Table 2)

정밀성은 QC시료의 분석을 통하여 측정된 tyrosine-alanine의 농도값에 대한 변동계수(CV)값으로 평가하여 정밀성은 0.05~1.58% ($n=9$)이었다. 정확성은 QC시료의 분석을 통하여 측정된 tyrosine-alanine의 농도값의 상대오차 값으로 평가하여 정확성은 -1.27~11.53% ($n=9$)로서 $\pm 15\%$ 이내의 RE값을 허용하는 정확성의 기준을 충족하였다. (Table

3,4)

Table 2. Linearity of calibration curves of tyrosine-alanine in the range of 5~200 $\mu\text{g/mL}$

Replicate	Concentration($\mu\text{g/mL}$)					Curve parameters		
	10	20	50	100	200	Slope	intercept	R ²
1	10.13	19.76	49.77	100.54	199.81	18205	-6924.6	0.9999
2	9.75	19.90	49.90	100.79	199.65	18264	-6990.5	0.9999
3	9.98	19.98	49.33	101.07	199.63	18198	-6378.2	0.9999
Mean	9.97	19.91	49.75	100.60	199.70	18222	-6764.43	1.00
SD	0.16	0.11	0.29	0.26	0.10	36.25	336.11	0.00
CV(%)	1.58	0.56	0.59	0.26	0.05			
RE(%)	-0.34	-0.45	-0.50	0.60	-0.15			

Table 3. Precision and accuracy of the method in the range of 5~200 $\mu\text{g/mL}$

Replicate	Concentration($\mu\text{g/mL}$)			
		25	50	100
Day 1	1-1	35.17	51.39	96.16
	1-2	28.43	51.88	92.80
	1-3	33.35	50.53	97.82
	Mean	32.32	51.27	95.60
	SD	3.49	0.68	2.56
	RSD	10.80	1.33	2.67
Day 2	2-1	34.27	61.50	104.61
	2-2	35.05	56.84	95.45
	2-3	35.02	61.66	104.01
	Mean	34.78	60.00	99.22
	SD	0.44	2.74	5.98
	RSD	1.27	4.56	6.03
Day 3	3-1	37.41	60.48	103.87
	3-2	39.63	63.81	106.34
	3-3	36.90	62.13	106.58
	Mean	37.98	62.14	105.60
	SD	1.45	1.67	1.50
	RSD	3.83	2.68	1.42
Inter day Mean		35.03	57.80	100.14
	SD	2.84	5.76	5.06
	RSD	8.10	9.97	5.06

Table 4. Recovery of marker compounds through standard addition ($n=3$)

Day	Fortified content($\mu\text{g/ml}$)	Observed content (ng)	Recovery mean	Recovery SD	Recovery RSD (%)
Day 1	25	32.31 \pm 3.49	124.88	14.40	11.53
	50	51.26 \pm 0.68	102.53	1.37	1.33
	100	95.59 \pm 1.34	95.60	2.56	2.67
Day2	25	34.78 \pm 0.44	139.13	1.77	1.27
	50	60.00 \pm 2.73	120.00	5.47	4.56

	100	99.22±5.98	99.22	5.98	6.03
Day 3	25	37.97±1.45	151.92	5.81	3.83
	50	62.14±1.66	124.28	3.33	2.68
	100	105.59±1.50	105.60	1.50	1.42

(2) 함량 균질성

시험물질에 대하여 3회의 분석을 수행하여 굴 가수분해물 중 tyrosine-alanine의 함량을 측정된 결과, 굴 가수분해물 1g중 tyrosine-alanine의 표시량은 1.30 mg/g을 함유하는 것으로 나타났다.

위에서 설정된 표시량에 따라 계산된 각 투여시험물질 중 굴 가수분해물의 함량은 1.5mg, 5mg, 15mg 및 50mg 군에서 각각 105.93%, 130.11% 및 125.56% 를 나타내었다. 이는 15%이내를 허용하는 투여시험물질의 함량기준을 다소 상회하였다.

투여시험물질의 함량 균질성은 튜브의 세부분(상, 중, 하)에서 시료를 채취하고 분석하여 얻은 함량에 대한 변동계수로서 평가하였다. 그 결과 세가지 농도의 CV값은 각각 4.27, 0.89 및 3.06, 였으며, 이 값은 15% 미만의 허용기준을 충족하였다.

함량시험은 투여시험물질을 조제 후 7일간 냉장보관 후 측정된 결과로서, 굴 가수분해물은 약 4℃의 냉장보관조건에서 7일간 안정성을 확보할 수 있었다.

Table 5. Content uniformity of oyster peptide

Dose	Sampling position	Peak area ratio	Measured Content (µg/mL)		Assay (%)	CV (%)
			each	mean		
62.5mg/ml	Top	1467002	83.63	86.07	105.93	4.27
	Middle	1583719	90.31	3.69		
	Bottom	1478058	84.27			
125mg/ml	Top	3663348	209.33	211.43	130.11	0.89
	Middle	3205426	183.12	1.89		
	Bottom	3708790	211.93			
250mg/ml	Top	6898781	394.50	408.07	125.56	3.06
	Middle	7987448	456.81	12.52		
	Bottom	7329722	419.16			

최종보고서

Oyster enzyme hydrolysate의 세균을 이용한
복귀돌연변이시험

시험번호: 14-VG-178

시험의뢰기관: 경희대학교

(주)켄온 비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
240, Nampyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do
449-826, Republic of Korea

진술서

Oyster enzyme hydrolysate의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2014-67호, MFDS, 2014년 02월 12일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

상기 시험은 승인된 시험계획서와 ㈜켄온 비임상연구소의 SOP에 따라 수행하였고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험자료의 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았다.

오 정 자 Jeonjin

2014. 10. 23

오 정 자, M.S.

날 짜

시험책임자

주 소 : ㈜켄온 비임상연구소

경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270

연 락 처 : 031-888-6658 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

E-mail : dune0516@chemon.co.kr

서명

오정자 Jeongja

오정자, M.S.

시험책임자

㈜켄온 비임상연구소

2014. 10. 23

날짜

김갑호 Kimgap

김갑호, M.S., Toxicologist

운영책임자

㈜켄온 비임상연구소

2014. 10. 23

날짜

정세영 Jeongseyoung

정세영

의뢰책임자

경희대학교

2014. 10. 22

날짜

신뢰성보증확인서

시험번호: 14-VG-178

시험제목: Oyster enzyme hydrolysate의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험기간: 2014.05.14 - 2014.10.23

시험의뢰기관: 경희대학교

점검내용	점검실시일	시험책임자 확인일	운영책임자 보고일
시험계획서	2014.05.13	2014.05.13	2014.05.15
배지조제 및 균주접종	2014.05.28	2014.05.28	2014.05.29
시험물질/대조물질 보관	2014.05.28	2014.05.28	2014.05.29
시험물질/대조물질 조제	2014.05.28	2014.05.28	2014.05.29
미생물상태	2014.05.28	2014.05.28	2014.05.29
식별	2014.05.28	2014.05.28	2014.05.29
시험물질처리	2014.05.28	2014.05.28	2014.05.29
콜로니검사	2014.05.30	2014.05.30	2014.06.02
시험기초자료	2014.06.13	2014.06.17	2014.06.18
최종보고서(안)	2014.06.13	2014.06.17	2014.06.18
최종보고서	2014.10.23	-	-

상기의 점검으로써, 본 보고서의 시험방법이 식품의약품안전처고시 제2014-6호(2014년 01월 29일) '의약품등의독성시험기준' 및 OECD Guideline for Testing of Chemicals, TG 471 (1997) 'Bacterial Reverse Mutation Test'에 따라 행하여졌음과, 해당시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 보고서에 정확하게 반영되었으며, 본 시험이 식품의약품안전처고시 제2014-67호(2014년 02월 12일) '비임상시험관리기준' 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 실시되었음을 증명함.

2014년 10월 23일

㈜켄온 비임상연구소

신뢰성보증업무담당자

김대성 (인)

신뢰성보증업무책임자

김효순 (인)

시험개요

- 시 험 제 목** Oyster enzyme hydrolysate의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험
- 시 험 목 적** 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate의 히스티딘 요구성 *Salmonella typhimurium*의 4 개 TA 균주와 트립토판 요구성 균주 *E. coli* WP2 *uvrA*에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위하여 실시하였다.
- 시 험 지 침** 의약품등의독성시험기준 (제2014-6호, MFDS, 2014 년 01 월 29 일)
OECD Guideline for Testing of Chemicals, TG 471 (1997) 'Bacterial Reverse Mutation Test'
- 시 험 의 료 자** 경희대학교
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호,
130-701
02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX)
의뢰책임자: 정 세 영
- 시 험 기 관** (주)캠온 비임상연구소
경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826
경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270
031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)
운영책임자: 김 감 호
- 시 험 일 정**
- | | |
|------------------|-----------------|
| 2014 년 05 월 14 일 | 시험계획서 승인(시험개시일) |
| 2014 년 05 월 27 일 | 균주접종(실험개시일) |
| 2014 년 05 월 28 일 | 시험물질 처리 |
| 2014 년 05 월 30 일 | 집락계수(실험종료일) |
| 2014 년 06 월 17 일 | 최종보고서(안) 제출 |
| 2014 년 10 월 23 일 | 최종보고서 제출(시험종료일) |
- 주요시험관계자** 시험물질 조제/보관: 김 지 훈 자료보관: 정 해 정
시험담당자: 이 준 형

기록과 자료의 보관 시험계획서, 시험계획서 변경기록지, 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본 및 각종 증거자료는 품목허가일로부터 3 년간 (주)켄온 비임상연구소의 자료보관실에 보관한다.

이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

목 차

진술서	i
서 명	ii
신뢰성보증확인서	iii
시험개요	iv
요 약	1
재료 및 방법	2
결 과	9
고찰 및 결론	10
참고문헌	10
단위 및 약호	11
TABLE	
Table 1. Reverse mutagenicity assay results – summary	13
APPENDICES	
Appendix 1. Reverse mutagenicity assay results – individual plate counts.....	15
Appendix 2. Viable cell count of tester strains and results of sterility test	16
Appendix 3. Historical control data.....	17
Appendix 4. Protocol and protocol amendment	18
Appendix 5. Certificate of analysis.....	31
Appendix 6. Results of dose formulation analysis.....	32

요 약

본 시험은 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate가 대사활성계 적용 및 비적용 하에 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 4 균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주(WP2 *uvrA*)에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위하여 실시하였다.

대사활성계로는 Aroclor-1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보조소(cofactor)를 첨가한 것을 사용하였다. 시험은 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다.

처리용 시험물질은 멸균주사용수로 조제하였다. 아래 표와 같이 설정한 농도군과 부형제(음성)대조군 및 양성대조군으로 시험균을 구성하였으며, 농도군당 3 개의 평판을 사용하였다.

균주명	S9 mix	농도군($\mu\text{g}/\text{plate}$)					
		15	50	150	500	1500	5000
TA strains	+/-	15	50	150	500	1500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	15	50	150	500	1500	5000

시험결과, 모든 균주의 시험물질 처리농도에서 음성대조군에 비해 집락 수의 증가는 관찰되지 않았으며, 세포독성도 관찰되지 않았다.

한편 모든 양성대조군에서는 해당 음성대조군에 비해 집락수의 확실한 증가가 관찰되었다.

이상의 결과로, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate는 본 시험조건 하에서 사용한 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. 시험물질 및 대조물질

1) 시험물질(Appendix 5)

명 칭: Oyster enzyme hydrolysate
 코드번호: C-1390
 제조번호: OP140415
 입 수 일: 2014 년 05 월 27 일
 입 수 량: 60 g/pack X 1 pack
 외 관: Powder
 함 량: tyrosine-alanine 평균 0.13 %
 유효일자: 2015 년 04 월 15 일
 보관조건: 실온, 차광, 방습
 공 급 원: 경희대학교

2) 부형제(음성대조물질)

명 칭: 멸균주사용수
 제조번호: 31N1F21
 보관조건: 실온(개봉 후 냉장)
 공 급 원: 대한약품공업(주)
 선택이유: 시험물질이 잘 현탁되어 본 부형제를 선택하였다.

3) 양성대조물질

다음과 같이 양성대조물질을 사용하였다. 이들 양성대조물질은 OECD 가이드라인 TG 471에 제시된 것 중에서 선택하였다.

대사활성계	양성대조물질(약칭)	CAS No.	적용균주	농도 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
+	2-Aminoanthracene (2-AA)	613-13-8	TA100	1
			TA1535	2
			TA1537	1
			WP2 <i>uvrA</i>	6
	Benzo[a]pyrene (B[a]P)	50-32-8	TA98	1
-	Sodium azide (SA)	26628-22-8	TA100	0.5
			TA1535	0.5
	2-Nitrofluorene (2-NF)	607-57-8	TA98	2

	4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO)	56-57-5	WP2 <i>uvrA</i>	0.5
	Acridine Mutagen ICR 191 (ICR-191)	17070-45-0	TA1537	0.5

물질명	공급원	제품번호	로트번호	입수일	보관
2-AA	Sigma-Aldrich Co.	A38800	STBB1901V	2013 년 01 월 02 일	11~30 °C
B[a]P	Sigma-Aldrich Co. (Supelco)	48564	LB98566V	2013 년 05 월 31 일	11~30 °C
SA	Sigma-Aldrich Co.	S8032	BCBJ1210V	2013 년 01 월 02 일	11~30 °C
2-NF	Sigma-Aldrich Co.	N16754	S43858V	2013 년 01 월 02 일	11~30 °C
4NQO	Sigma-Aldrich Co.	N8141	SLBB5231V	2013 년 01 월 02 일	-15 °C 이하
ICR-191	Sigma-Aldrich Co.	I3636	110M1173V	2013 년 01 월 02 일	-1~10 °C

2. 조제시험물질 및 분석

1) 시험물질 조제

본 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였다. 적량의 시험물질을 칭량하여 부형제를 넣은 것을 최고농도로 하고, 이것을 동일한 부형제로 희석하여 각 농도군을 조제하였다. 처리용 시험물질은 처리 직전에 조제하였다.

2) 양성대조물질 조제

SA는 멸균주사용수(대한약품공업㈜, 제조번호 A6M7F21)로 조제하여 냉동한 것을 해동하여 사용하였다. 2-AA, B[a]P, 2-NF, 4NQO 및 ICR-191은 DMSO (Sigma-Aldrich Co., # 472301-500ML, 제조번호 SZBD0030V, ≥99.9 %)로 조제하여 냉동 보관한 것을 해동하여 사용하였다.

3) 조제시험물질의 분석

조제 시험물질의 분석은 시험의뢰자가 실시하였고, 분석결과는 첨부자료로 첨부하였다 (Appendix 6).

3. 시험계

1) 시험계 및 선택 이유

히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 (Maron and Ames, 1983) 및 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (Green and Muriel, 1976) 를 사용하였다. 이 균주들은 전술한 MFDS 및 OECD guideline에 복귀돌연변이 시험용 균주로 예시되어 있다. 이들 균주는 다양한 화학물질의 변이원성을 민감하게 검출할 수 있음이 입증되었으며, 각 균주의 유전적 특징과 검출 가능한 돌연변이 유형은 다음 표와 같다.

균주명	<i>his/trp</i> 돌연변이	부가적인 돌연변이	플라스미드	검출 돌연변이
TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Base pair substitution
TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Base pair substitution
TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Frameshift
TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Frameshift
WP2 <i>uvrA</i>	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i>	-	Base pair substitution

살모넬라 TA균주의 *rfa* 돌연변이는 세포벽의 lipopolysaccharide 장벽의 합성에 관련된 유전자에 일어난 돌연변이로써, 이 돌연변이로 인한 장벽의 손상은 일부 큰 분자량의 화학물질에 대한 세포벽의 투과성을 높여준다. DNA 손상의 절제회복에 관련된 유전자에 일어난 *uvrA* 혹은 *uvrB* 돌연변이는 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 현저히 높여준다. 플라스미드 pKM101은 이를 가진 균주에서 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 더욱 높여준다.

2) 균주 공급원 및 배지

균주 공급원

Molecular toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)에서 구입 후 (주)켄온 비임 상연구소에서 형질확인 후 계대배양한 것을 시험에 사용하였다.

액체배지

복귀돌연변이 시험을 위한 균주의 전배양에는 2.5 % Oxoid Nutrient broth No. 2를 사용하였다.

최소배지(Minimal glucose agar plate)

1.5 % Bacto agar (Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2 % glucose를 함유한 것을 페트리디쉬(90 x 15 mm, 감마선 멸균)에 25 mL씩 분주한 것을 사용하였다. 대장균(*E. coli*)의 경우 위와 동일한 최소배지에 0.1 % tryptophan액을 0.25 mL/L로 첨가한 것을 사용하였다.

Top agar

Top agar는 0.6 % Bacto agar와 0.5 % NaCl로 조제하였으며, 살모넬라 균주용 top agar에만 100 mL당 10 mL의 0.5 mM histidine-biotin 액을 첨가하였다.

3) 균주의 보존 및 형질확인

균주의 냉동보존

균주의 장기 보존을 위하여, 균배양액 1 mL 당 90 µL의 DMSO를 가하여 냉동 vial에 채워 -70°C 이하에서 냉동보관하였다.

마스터 플레이트(Master plate)

마스터 플레이트는 냉동 균주를 해동하여 10 시간 배양한 균배양액을 적절한 최소배지에 도말하여 제작하고 냉장보관하였다. 균배양액의 일부는 형질확인에 사용하고, 각 균주의 형질확인을 완료한 마스터 플레이트의 균주를 복귀돌연변이시험에 사용하였다.

형질확인

각 균주에 대하여 Maron and Ames (1983)의 방법에 준하여 다음 표와 같이 유전형질을 확인하였다.

형질	확인 대상 균주
histidine 요구성	살모넬라 TA 균주
<i>uvrB</i> mutation 유지	살모넬라 TA 균주
R-factor 유지	살모넬라 TA 균주
<i>rfa</i> 돌연변이의 유지	살모넬라 TA 균주
spontaneous revertant의 수	살모넬라 TA 균주 및 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
tryptophan 요구성	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
<i>uvrA</i> mutation 유지	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>

4. 대사활성계(S9 mix)**1) S9 및 Cofactor****S9**

기원: Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간

공급원: Molecular Toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)

제품번호: 11-01L

로트번호: 3219

단백질 함량: 35.0 mg/mL

보관조건: 냉동보관(-15°C 이하)

Cofactor

명칭: Cofactor-I

공급원: Wako Pure Chem. Ind., Ltd. (Japan)

제품번호: 309-50611

로트번호: 999303

보관조건: 냉장보관(-1~10°C)

2) S9 mix 1 mL 중의 조성(5 % S9, v/v)

S9 mix는 S9과 보호소 용액으로 조제하였다. S9 mix의 조성은 8 μmol $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 33 μmol KCl, 5 μmol G-6-P, 4 μmol NADPH, 4 μmol NADH, 100 μmol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 50 μL S9으로 하였으며, 조제한 S9 mix는 얼음에 채워 사용하였다.

5. 시험 방법

1) 농도군 설정

본 시험의 처리 농도는 예비시험(시험번호 14-VG-177P)에서 본시험과 같은 방법으로 전술한 5 종의 균주에 대하여 농도군당 1 개의 플레이트(평판)를 사용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였다.

예비시험에서는 5-5000 µg/plate의 8 단계 농도를 처리하였으며, 시험물질 처리시 top agar와 혼합할 때 및 집락 계수시 플레이트에 침전 생성 여부를 관찰하였다.

그 결과 1500 µg/plate 이상의 농도군에서 top agar 와 혼합 시 혼탁이 관찰되었으나, 집락 계수 시 침전은 관찰되지 않았으며, 플레이트에서도 집락수의 증가 및 세포독성은 관찰되지 않았다.

따라서, 본시험에서는 다음과 같이 시험균을 구성하고, 음성 및 양성대조군을 포함하며, 농도군당 3 개의 플레이트를 사용하여 시험하였다.

균주명	S9 mix	농도군(µg/plate)					
TA strains	+/-	15	50	150	500	1500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	15	50	150	500	1500	5000

2) 시험물질 처리 및 평판(plate) 제작

시험물질의 처리는 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다.

시험균주는 master plate로부터 20 mL의 액체배지(2.5 % Oxoid Nutrient Broth No. 2)에 접종해 shaking incubator (37 ± 2°C, 120 rpm)에서 10 시간 전배양 하였으며, 전배양을 마친 균주는 파장 600 nm에서 흡광도 측정으로 생균수를 산출한 후 시험에 사용할 때까지 냉장 보관하였다.

온도 45 ± 2°C를 유지하는 dry bath에 꽂은 멸균 tube (12 x 75 mm)에 고압증기멸균한 top agar를 2 mL씩 분주한 다음, S9 mix 0.5 mL (대사활성계 비적용시에는 S9 mix 대신 0.5 mL의 sodium-phosphate buffer, pH 7.4), 균배양액 0.1 mL, 시험물질 용액 0.1 mL을 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼뜨려 굳게 하였다.

음성대조군은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL을, 양성대조군은 양성대조물질 용액을 동일한 방법으로 가하여 실시하였다.

시험물질 및 S9 mix의 무균성 확인을 위해 시험물질 최고농도액 0.1 mL 및 S9 mix 0.5 mL을 각각 2 mL의 top agar에 혼합하여 평판을 제작하였다.

처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 평판을 뒤집어 37 ± 2°C에서 50 ± 2 시간 배양한 후 복귀 돌연변이집락(이하 집락)을 육안으로 계수하였다.

3) 평판의 구별

평판에 유성펜으로 시험번호, 균주명, 농도, S9 mix 처리여부 등의 내용을 구별할 수 있도록 기입하였다.

4) 관찰 항목

시험물질 처리 시 시험물질액을 top agar에 혼합할 때 침전 생성 여부를 관찰하였다. 육안으로 확인 가능한 입자가 관찰되면 침전으로 판단하였다.

집락은 육안으로 계수하였다. 집락 계수 시 각 평판의 기본성장균층(background lawn)의 형성 여부를 음성대조군과 비교하여 검사하였으며, 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검하였다.

다음 중 최소 한 항목이 관찰되는 경우 해당 농도에서 세포독성이 있는 것으로 판단하였다.

- (1) 기본성장균층이 얇아지거나 없어지면서 집락수의 감소가 나타날 때.
- (2) 미세집락(microcolony)이 나타날 때.

집락수의 '감소'에 대해서는 공통된 기준이 없으므로, 본 시험에서는 편의상 집락수가 음성대조군에서 나타난 집락수 평균치의 50 % 이하로 감소한 경우 혹은 증가 경향이 역전되는 경우를 세포독성으로 판단하였다.

5) 결과의 표시

시험 결과는 각 농도군 당 3 개의 평판으로부터 얻은 집락 수의 평균 ± 표준편차 및 음성대조군에 대한 증가 배수로 나타내었으며, 집락 수의 실측치도 아울러 제시하였다.

6) 시험 타당성 기준

다음 기준을 모두 만족할 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정하였다.

- (1) 플레이트 당 처리한 생균의 수가 0.5×10^8 CFU 이상일 것.
- (2) 시험물질 처리군 중 세포독성을 나타내지 않는 농도가 최소한 3 단계 이상일 것.
- (3) 음성대조군의 집락 수가 아래 범위일 것.

균주명	집락수
TA100	75-200
TA1535	3-37
TA98	15-60
TA1537	4-31
WP2 uvrA	5-40

- (4) 모든 양성대조군의 평균 집락 수가 음성대조군의 2 배 이상일 것. 이 때 2-AA 및 B[a]P 처리군에서 나타난 집락수의 분명한 증가는 S9 mix의 활성화에 대한 증거가 됨.
- (5) 시험물질과 S9 mix의 무균성 확인을 위한 플레이트에서 미생물 집락이 없을 것.

6. 통계학적 방법 및 결과의 평가

1) 통계학적 분석

통계분석은 실시하지 않았다.

2) 결과의 평가

대사활성계 적용 여부에 상관 없이 최소 1 개 균주에서 시험물질 처리군의 평균 집락 수가 농도 의존적으로 증가하거나 1 개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

양성판정 기준을 만족하지 못할 경우 음성으로 판정하였으며, 시험물질은 본 시험에 사용한 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단하였다. 생물학적 연관성 또한 판정에 참고하였다.

결 과

조제 시험물질

시험물질은 부형제에 현탁되었으며, 모든 농도군의 조제물에서 침전은 관찰되지 않았다.

복귀돌연변이시험(Table 1, Appendix 1 and Appendix 2)

조제 시험물질을 top agar와 혼합할 때 및 집락 계수 시 모든 농도군에서 혼탁이나 침전은 관찰되지 않았다.

*Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537 의 4 개의 균주에서 대사활성계 적용 및 비적용 시 시험물질 농도의 증가에 따른 집락수의 증가는 나타나지 않았으며, 세포독성 또한 나타나지 않았다.

E. coli WP2 *uvrA*에서도 대사활성계 적용 및 비적용 시 모두 시험물질 농도의 증가에 따른 집락수의 증가는 나타나지 않았으며, 세포독성 또한 나타나지 않았다.

한편 모든 양성대조군에서는 분명한 양성의 결과를 얻었다.

시험물질 최고농도 및 S9 mix의 무균성을 확인하기 위한 플레이트에서 미생물 오염으로 인한 집락은 나타나지 않았다.

시험에 사용한 5 개 균주는 파장 600 nm에서의 흡광도 기준으로 생균수 측정 결과 $2.20 - 3.20 \times 10^9$ (TA균주) 및 4.11×10^9 (*E. coli*) CFU/mL 이었으며, 모든 플레이트 당 처리된 생균수는 0.5×10^8 CFU 이상이었다.

고찰 및 결론

시험타당성 기준은 모두 만족하였다. 모든 시험균주에서 대사활성계 적용 여부에 상관 없이 시험물질 처리군의 평균 집락 수는 증가를 나타내지 않았으며, 이 결과는 양성판정 기준을 만족시키지 못하였다.

따라서, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate는 본 시험조건 하에 사용한 시험 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures, Edited by David J. Kirkland, Cambridge University Press, 1990. ISBN 0-521-39347-7.
- 2) Green, MHL and Muriel, WJ (1976): Mutagen testing using *trp+* reversion in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 38:3-32.
- 3) GREEN, MHL (1984) Mutagen testing using *trp+* reversion in *Escherichia coli* in KILBEY, BJ, LEGATOR, M, NICHOLS, W and RAMEL, C (Eds.). *Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Second edition*, p.161-187. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.
- 4) Maron, DM and Ames, BN (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113:173-215.
- 5) Vogel, HJ and Bonner, DM (1956): Acetylornithinase of *E. coli*: Partial purification and some properties, *J. Biol. Chem.*, 218:97-106 (1956).

단위 및 약호

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by Chemon Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this report.

%	Percent
°	Degree
C	Celsius
L	Liter
mL	Milliliter
µL	Microliter
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Milligram
µg	Microgram
ng	Nanogram
m	Meter
cm	Centimeter
mm	Millimeter
µm	Micrometer
nm	Nanometer
hr	Hour
min	Minute
sec	Second
rpm	Revolution per Minute
G-6-P	Glucose-6-phosphate
KCl	Potassium chloride
MgCl ₂	Magnesium chloride
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
GLP	Good Laboratory Practice Regulation
ICH	International Conference on Harmonization
MFDS	Ministry of Food and Drug Safety
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
QAU	Quality Assurance Unit
SD	Standard Deviation
SOP	Standard Operating Procedures
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

TABLES

Table 1. Reverse mutagenicity assay results – summary

Test Strain	Chemical Treated	Dose (µL/plate)	Colonies/plate [factor] ^{a)}			
			With S9 mix		Without S9 mix	
TA100	Test article	0	115 ± 3		113 ± 10	
		15	122 ± 11 [1.1]		119 ± 10 [1.1]	
		50	120 ± 14 [1.0]		119 ± 18 [1.1]	
		150	119 ± 12 [1.0]		117 ± 2 [1.0]	
		500	126 ± 11 [1.1]		120 ± 11 [1.1]	
		1500	145 ± 15 [1.3]		126 ± 15 [1.1]	
		5000	152 ± 15 [1.3]		146 ± 6 [1.3]	
TA1535	Test article	0	9 ± 1		11 ± 2	
		15	10 ± 2 [1.1]		9 ± 2 [0.8]	
		50	12 ± 3 [1.3]		11 ± 2 [0.9]	
		150	11 ± 4 [1.2]		8 ± 3 [0.7]	
		500	11 ± 2 [1.2]		9 ± 2 [0.8]	
		1500	11 ± 2 [1.2]		11 ± 3 [0.9]	
		5000	11 ± 2 [1.1]		13 ± 3 [1.2]	
TA98	Test article	0	37 ± 3		35 ± 6	
		15	41 ± 2 [1.1]		38 ± 1 [1.1]	
		50	44 ± 1 [1.2]		37 ± 3 [1.1]	
		150	43 ± 7 [1.2]		33 ± 7 [1.0]	
		500	39 ± 7 [1.0]		26 ± 4 [0.8]	
		1500	36 ± 7 [1.0]		39 ± 3 [1.1]	
		5000	41 ± 4 [1.1]		36 ± 3 [1.0]	
TA1537	Test article	0	10 ± 1		8 ± 1	
		15	8 ± 1 [0.8]		11 ± 1 [1.3]	
		50	9 ± 2 [0.9]		6 ± 3 [0.8]	
		150	14 ± 3 [1.4]		8 ± 2 [1.0]	
		500	12 ± 4 [1.2]		10 ± 2 [1.3]	
		1500	12 ± 3 [1.2]		7 ± 2 [0.9]	
		5000	10 ± 5 [1.0]		8 ± 2 [1.0]	
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	Test article	0	20 ± 3		16 ± 1	
		15	25 ± 1 [1.3]		12 ± 3 [0.7]	
		50	22 ± 3 [1.1]		16 ± 7 [1.0]	
		150	21 ± 3 [1.1]		14 ± 5 [0.9]	
		500	25 ± 6 [1.3]		16 ± 4 [1.0]	
		1500	22 ± 3 [1.1]		18 ± 1 [1.1]	
		5000	24 ± 5 [1.2]		21 ± 3 [1.3]	
Positive controls			3			
TA100	2-AA	1.0	941 ± 36 [8.2]			
TA1535	2-AA	2.0	248 ± 14 [26.6]			
TA98	B[a]P	1.0	217 ± 15 [5.8]			
TA1537	2-AA	1.0	96 ± 9 [9.6]			
WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	6.0	138 ± 13 [6.9]			
TA100	SA	0.5		678 ± 16 [6.0]		
TA1535	SA	0.5		449 ± 25 [39.6]		
TA98	2-NF	2.0		363 ± 66 [10.5]		
TA1537	ICR-191	0.5		112 ± 10 [14.0]		
WP2 <i>uvrA</i>	4NQO	0.5		109 ± 26 [6.8]		

Test article: Oyster enzyme hydrolysate

a) Three plates/dose were used. No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate

Abbreviations

2-AA, 2-aminoanthracene; SA, sodium azide; B[a]P, benzo[a]pyrene; ICR-191, acridine mutagen ICR 191; 4NQO, 4-nitroquinoline N-oxide; 2-NF, 2-Nitrofluorene.

APPENDICES

Appendix 1. Reverse mutagenicity assay results – individual plate counts

Test Strain	Chemical Treated	Dose (µL/plate)	Colonies/plate (Status of background lawn ^{a)})							
			With S9 mix				Without S9 mix			
TA100	Test article	0	112 (N)	118 (N)	115 (N)	102 (N)	120 (N)	117 (N)		
		15	116 (N)	115 (N)	134 (N)	129 (N)	110 (N)	119 (N)		
		50	111 (N)	113 (N)	136 (N)	119 (N)	101 (N)	137 (N)		
		150	118 (N)	108 (N)	131 (N)	117 (N)	119 (N)	116 (N)		
		500	132 (N)	113 (N)	132 (N)	108 (N)	123 (N)	130 (N)		
		1500	155 (N)	151 (N)	128 (N)	128 (N)	140 (N)	110 (N)		
		5000	134 (N)	162 (N)	159 (N)	139 (N)	150 (N)	148 (N)		
TA1535	Test article	0	9 (N)	9 (N)	10 (N)	10 (N)	10 (N)	14 (N)		
		15	10 (N)	8 (N)	12 (N)	6 (N)	10 (N)	10 (N)		
		50	9 (N)	12 (N)	14 (N)	9 (N)	13 (N)	10 (N)		
		150	13 (N)	6 (N)	14 (N)	5 (N)	9 (N)	10 (N)		
		500	13 (N)	11 (N)	9 (N)	7 (N)	9 (N)	10 (N)		
		1500	13 (N)	10 (N)	11 (N)	11 (N)	8 (N)	13 (N)		
		5000	9 (N)	13 (N)	10 (N)	15 (N)	15 (N)	10 (N)		
TA98	Test article	0	36 (N)	41 (N)	35 (N)	28 (N)	39 (N)	37 (N)		
		15	43 (N)	40 (N)	39 (N)	37 (N)	39 (N)	37 (N)		
		50	43 (N)	44 (N)	44 (N)	35 (N)	35 (N)	40 (N)		
		150	36 (N)	44 (N)	50 (N)	40 (N)	26 (N)	34 (N)		
		500	37 (N)	46 (N)	33 (N)	27 (N)	22 (N)	30 (N)		
		1500	30 (N)	44 (N)	34 (N)	42 (N)	40 (N)	36 (N)		
		5000	40 (N)	38 (N)	45 (N)	38 (N)	38 (N)	32 (N)		
TA1537	Test article	0	10 (N)	9 (N)	11 (N)	8 (N)	9 (N)	7 (N)		
		15	8 (N)	9 (N)	8 (N)	10 (N)	11 (N)	11 (N)		
		50	9 (N)	10 (N)	7 (N)	4 (N)	9 (N)	6 (N)		
		150	12 (N)	14 (N)	17 (N)	8 (N)	6 (N)	10 (N)		
		500	16 (N)	10 (N)	9 (N)	8 (N)	10 (N)	12 (N)		
		1500	15 (N)	9 (N)	11 (N)	9 (N)	8 (N)	5 (N)		
		5000	14 (N)	12 (N)	5 (N)	10 (N)	7 (N)	7 (N)		
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	Test article	0	18 (N)	23 (N)	19 (N)	16 (N)	15 (N)	17 (N)		
		15	26 (N)	25 (N)	24 (N)	14 (N)	13 (N)	8 (N)		
		50	19 (N)	21 (N)	25 (N)	16 (N)	23 (N)	10 (N)		
		150	20 (N)	25 (N)	19 (N)	18 (N)	9 (N)	15 (N)		
		500	28 (N)	18 (N)	29 (N)	18 (N)	19 (N)	12 (N)		
		1500	22 (N)	20 (N)	25 (N)	19 (N)	18 (N)	17 (N)		
		5000	25 (N)	28 (N)	18 (N)	24 (N)	19 (N)	21 (N)		
Positive controls										
TA100	2-AA	1.0	900 (N)	964 (N)	960 (N)					
TA1535	2-AA	2.0	232 (N)	260 (N)	252 (N)					
TA98	B[a]P	1.0	230 (N)	200 (N)	220 (N)					
TA1537	2-AA	1.0	88 (N)	105 (N)	95 (N)					
WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	6.0	125 (N)	150 (N)	138 (N)					
TA100	SA	0.5				680 (N)	693 (N)	662 (N)		
TA1535	SA	0.5				425 (N)	448 (N)	475 (N)		
TA98	2-NF	2.0				335 (N)	316 (N)	438 (N)		
TA1537	ICR-191	0.5				113 (N)	121 (N)	101 (N)		
WP2 <i>uvrA</i>	4NQO	0.5				138 (N)	100 (N)	89 (N)		

Test article: Oyster enzyme hydrolysate

a) Status of background lawn (BL) and plate

N, normal BL; R, reduced BL; A, absent or almost absent BL; E, enhanced BL; O, obscured BL by precipitation;

P, precipitation of test article in plate; M, presence of microcolonies; C, contaminated plate.

Abbreviations

2-AA, 2-aminoanthracene; SA, sodium azide; B[a]P, benzo[a]pyrene; ICR-191, acridine mutagen ICR 191; 4NQO, 4-nitroquinoline N-oxide; 2-NF, 2-Nitrofluorene.

Appendix 2. Viable cell count of tester strains and results of sterility tests

Test strain	Viable cell counts (10 ⁹ CFU/mL)	Sterility of test article Solution (highest dose)	Sterility of S9 mix
TA100	2.60		
TA1535	3.20		
TA98	2.97	No colony due to contamination	No colony due to contamination
TA1537	2.20		
WP2 <i>uvrA</i>	4.11		

Appendix 3. Historical control data

(Jan 2006 – Mar 2014, Reverse mutation assays in the histidine auxotroph strains of *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and a tryptophan auxotroph strain of *Escherichia coli* WP2 *uvrA*)

All solvent controls

Strain	TA100		TA1535		TA98		TA1537		WP2 <i>uvrA</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
S9 mix	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Min	95	86	6	7	15	13	4	4	13	10
Max	210	213	29	33	52	51	35	25	44	42
Mean	147	144	14	14	31	24	13	11	25	22
SD	25	23	4	4	6	6	4	4	6	6
No. of plates	429	429	411	411	423	426	420	417	423	417

Dimethylsulfoxide controls

Strain	TA100		TA1535		TA98		TA1537		WP2 <i>uvrA</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
S9 mix	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Min	95	88	6	8	15	13	4	4	13	10
Max	198	207	29	33	46	40	28	25	39	39
Mean	147	143	14	15	30	23	14	11	25	21
SD	26	24	4	4	6	6	4	4	6	6
No. of plates	162	162	153	153	159	159	156	156	159	156

Positive controls ^{a)}

Strain	TA100		TA1535		TA98		TA1537		WP2 <i>uvrA</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
S9 mix	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Min	360	180	53	62	95	192	49	41	69	68
Max	988	820	484	648	521	468	711	724	298	424
Mean	680	464	154	293	228	328	164	233	130	186
SD	117	93	66	90	87	58	75	107	39	68
No. of plates	228	429	411	411	273	165	420	318	219	417

a) See Table 1 for names of positive control articles and doses/plate

Appendix 4. Protocol and protocol amendment



시험계획서

Oyster enzyme hydrolysate의 세균을 이용한
복귀돌연변이시험

시험번호: 14-VG-178



승인:

오정자 Jeongja 2014. 05. 14
 오정자, M.S. 날짜
 시험책임자
 ㈜켘온 비임상연구소

김갑호 김갑호 2014. 05. 15
 김갑호, M.S., Toxicologist 날짜
 운영책임자
 ㈜켘온 비임상연구소

정세영 정세영 2014. 05. 16
 정세영 날짜
 의뢰책임자
 경희대학교

1

ORIGINAL
2014년 05월 02일
시험책임자 <u>오정자 Jeongja</u>

시 험 제 목 Oyster enzyme hydrolysate의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시 험 목 적 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate이 히스티딘 요구성 *Salmonella typhimurium*의 4 개 TA 균주와 트립토판 요구성 균주 *E. coli* WP2 *uvrA*에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위함이다.

시 험 지 침 의약품등의독성시험기준 (제2014-6호, MFDS, 2014 년 01 월 29 일)
OECD Guideline for Testing of Chemicals, TG 471 (1997) 'Bacterial Reverse Mutation Test'

시 험 의 리 자 경희대학교
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호,
130-701
02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX)

시 험 기 관 ㈜켄은 비임상연구소
경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826
경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270
031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

시 험 일 정 2014 년 05 월 27 일 균주접종(실험개시일)
2014 년 05 월 28 일 시험물질 처리
2014 년 05 월 30 일 집락계수(실험종료일)
2014 년 06 월 18 일 최종보고서(안) 제출 예정

주요시험관계자 시험물질 조제/보관: 김 지 훈 자료보관: 정 혜 정
시험담당자: 이 준 형

- 기록과 재료의 보관** [SOP-AC-001~007]
- 시험계획서(변경 및 일탈기록), 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본 및 각종 증거자료는 품목허가일로부터 3 년간 ㈜켄은 비임상연구소의 자료보관실에 보관한다.
- 이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.
- G L P 대응** 비임상시험관리기준(제2013-40호, MFDS, 2013 년 04 월 05 일)
OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17
- 시험계획서의 변경 혹은 일탈은 문서로 작성하고, 신뢰성보증부서(QAU)에서 검토 후 시험책임자, 운영책임자 및 시험의뢰자가 승인한다.
- ㈜켄은 비임상연구소의 신뢰성보증부서는 시험과정 전반에 걸친 점검을 단독으로 행한다.
- 최종보고서** [SOP-TO-007]
- 최종보고서는 시험계획서의 내용을 반영하여 표지, 시험책임자진술서, 신뢰성보증확인서, 목차, 요약, 재료 및 방법, 관찰 및 측정 결과, 고찰 및 결론, 참고문헌 등으로 구성하며, 필요에 따라 사진이나 표, 부표 및 첨부자료 등을 포함하여 작성한다.

1. 시험물질, 부형제 및 대조물질

1) 시험물질 [SOP-TA-001]

명 칭: Oyster enzyme hydrolysate
 코드번호: C-1390
 제조번호: OP140415
 입 수 일: 2014 년 04 월 22 일
 입 수 량: 20.60 g/tube x 1 tube
 외 관: Powder
 함 량: Tyrosine-Alanine 함량 10.7 - 13.6 µg/g
 유효일자: 2015 년 04 월 15 일
 보관조건: 실온, 차광, 방습
 공 급 원: 경희대학교

2) 부형제(음성대조물질)

명 칭: 멸균주사용수
 제조번호: 31N1F21
 보관조건: 실온(개봉 후 냉장)
 공 급 원: 대한약품공업㈜
 선택이유: 시험물질이 잘 현탁되어 본 부형제를 선택하였다.

3) 양성대조물질

다음과 같이 양성대조물질을 사용한다. 이들 양성대조물질은 OECD 가이드라인 TG 471에 제시된 것 중에서 선택하였다.

대사활성계	양성대조물질(약칭)	CAS No.	적용균주	농도 (µg/plate)
+	2-Aminoanthracene (2-AA)	613-13-8	TA100	1
			TA1535	2
			TA1537	1
	Benzo[a]pyrene (B[a]P)	50-32-8	TA98	1
-	Sodium azide (SA)	26628-22-8	TA100	0.5
			TA1535	0.5
	2-Nitrofluorene (2-NF)	607-57-8	TA98	2
	4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO)	56-57-5	WP2 <i>uvrA</i>	0.5
	Acridine Mutagen ICR 191 (ICR-191)	17070-45-0	TA1537	0.5

Chemon Study No. 14-VG-178

물질명	공급원	제품번호	로트번호	입수일	보관
2-AA	Sigma-Aldrich Co.	A38800	STBB1901V	2013년 01월 02일	11-30 °C
B[a]P	Sigma-Aldrich Co. (Supelco)	48564	LB98566V	2013년 05월 31일	11-30 °C
SA	Sigma-Aldrich Co.	S8032	BCBJ1210V	2013년 01월 02일	11-30 °C
2-NF	Sigma-Aldrich Co.	N16754	S43858V	2013년 01월 02일	11-30 °C
4NQO	Sigma-Aldrich Co.	N8141	SLBB5231V	2013년 01월 02일	-15 °C 이하
ICR-191	Sigma-Aldrich Co.	I3636	110M1173V	2013년 01월 02일	-1-10 °C

2. 조제시험물질 및 분석

1) 시험물질 조제[SOP-TA-002]

본 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용한다. 적량의 시험물질을 칭량하여 부형제를 넣은 것을 최고농도로 하고, 이것을 동일한 부형제로 희석하여 각 농도군을 조제한다. 처리용 시험물질은 처리 직전에 조제한다.

2) 양성대조물질 조제

SA는 멸균주사용수(대한약품공업(주), 제조번호 A6M7F21)로 조제하여 냉동한 것을 해동하여 사용한다. 2-AA, B[a]P, 2-NF, 4NQO 및 ICR-191은 DMSO (Sigma-Aldrich Co., # 472301-500ML, 제조번호 SZBD0030V, ≥99.9 %)로 조제하여 냉동 보관한 것을 해동하여 사용한다.

3) 조제시험물질의 분석[SOP-AS-010/011]

조제 시험물질의 분석은 시험의뢰자가 실시하고, 분석결과는 최종보고서에 첨부한다.

3. 시험계

1) 시험계 및 선택 이유

히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 (Maron and Ames, 1983) 및 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (Green and Muriel, 1976) 를 사용한다. 이 균주들은 전술한 MFDS 고시 및 OECD guideline에 복귀돌연변이 시험용 균주로 제시되어 있다. 이들 균주는 다양한 화학물질의 변이원성을 민감하게 검출할 수 있음이 입증되었으며, 각 균주의 유전적 특징과 검출 가능한 돌연변이 유형은 다음 표와 같다.

균주명	<i>his/trp</i> 돌연변이	부가적인 돌연변이	플라스미드	검출 돌연변이
TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Base pair substitution
TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Base pair substitution

Chemon Study No. 14-VG-178

TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Frameshift
TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Frameshift
WP2 <i>uvrA</i>	<i>trp</i>	<i>uvrA</i>	-	Base pair substitution

살모넬라 TA균주의 *rfa* 돌연변이는 세포벽의 lipopolysaccharide 장벽의 합성에 관련된 유전자에 일어난 돌연변이로써, 이 돌연변이로 인한 장벽의 손상은 일부 큰 분자량의 화학물질에 대한 세포벽의 투과성을 높여준다. DNA 손상의 절제회복에 관련된 유전자에 일어난 *uvrA* 혹은 *uvrB* 돌연변이는 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 현저히 높여준다. 플라스미드 pKM101은 이를 가진 균주에서 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 더욱 높여준다.

2) 균주 공급원 및 배지

균주 공급원

Molecular toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)에서 구입 후 ㈜켄온 비임 상연구소에서 형질확인 후 계대배양한 것을 시험에 사용한다.

액체배지 [SOP-MT-101]

복귀돌연변이 시험을 위한 균주의 전배양에는 2.5 % Oxoid Nutrient broth No. 2를 사용한다.

최소배지(Minimal glucose agar plate) [SOP-MT-101]

1.5 % Bacto agar (Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2 % glucose를 함유한 것을 페트리디쉬(90 x 15 mm, 감마선 멸균)에 25 mL씩 분주한 것을 사용한다. 대장균(*E. coli*)의 경우 위와 동일한 최소배지에 0.1 % tryptophan액을 0.25 mL/L로 첨가한 것을 사용한다.

Top agar [SOP-MT-101]

Top agar는 0.6 % Bacto agar와 0.5 % NaCl로 조제하며, 살모넬라 균주용 top agar에만 100 mL당 10 mL의 0.5 mM histidine-biotin 액을 첨가한다.

3) 균주의 보존 및 형질확인

균주의 냉동보존 [SOP-MT-107]

균주의 장기 보존을 위하여, 균배양액 1 mL 당 90 µL의 DMSO를 가하여 냉동 vial에 채워 -70°C 이하에서 냉동보관한다.

마스터 플레이트(Master plate) [SOP-MT-101/102]

마스터 플레이트는 냉동 균주를 해동하여 10 시간 배양한 균배양액을 적절한 최소배지에 도말하여 제작하고 냉장보관한다. 균배양액의 일부는 형질확인에 사용하고, 각 균주의 형질확인을 완료한 마스터 플레이트의 균주를 복귀돌연변이시험에 사용한다.

형질확인 [SOP-MT-106]

각 균주에 대하여 Maron and Ames (1983)의 방법에 준하여 다음 표와 같이 유전형질을 확인한다.

형질	확인 대상 균주
histidine 요구성	살모넬라 TA 균주
<i>uvrB</i> mutation 유지	살모넬라 TA 균주
R-factor 유지	살모넬라 TA 균주
<i>rfa</i> 돌연변이의 유지	살모넬라 TA 균주
spontaneous revertant의 수	살모넬라 TA 균주 및 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
tryptophan 요구성	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
<i>uvrA</i> mutation 유지	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>

4. 대사활성계(S9 mix)

1) S9 및 Cofactor

S9

기원: Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간

공급원: Molecular Toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)

제품번호: 11-01L

로트번호: 최종보고서에 기재

단백질 함량: 최종보고서에 기재

보관조건: 냉동보관(-15°C 이하)

Cofactor

명칭: Cofactor-I

공급원: Wako Pure Chem. Ind., Ltd. (Japan)

제품번호: 309-50611

로트번호: 최종보고서에 기재

보관조건: 냉장보관(-1~10°C)

2) S9 mix 1 mL 중의 조성(5 % S9, v/v) [SOP-MT-108]

S9 mix는 S9과 보호소 용액으로 조제한다. S9 mix의 조성은 8 μmol $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 33 μmol KCl, 5 μmol G-6-P, 4 μmol NADPH, 4 μmol NADH, 100 μmol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 50 μL S9으로 하며, 조제한 S9 mix는 얼음에 채워 사용한다.

5. 시험 방법

1) 농도군 설정

본 시험의 처리 농도는 예비시험(시험번호 14-VG-177P)에서 본시험과 같은 방법으로 전술한 5 종의 균주에 대하여 농도군당 1 개의 플레이트(평판)를 사용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였다.

예비시험에서는 5-5000 µg/plate의 8 단계 농도를 처리하였으며, 시험물질 처리시 top agar와 혼합할 때 및 집락 계수시 플레이트에 침전 생성 여부를 관찰하였다.

그 결과 1500 µg/plate 이상의 농도군에서 top agar 와 혼합 시 혼탁이 관찰되었으나, 집락 계수 시 침전은 관찰되지 않았으며, 플레이트에서도 집락수의 증가 및 세포독성은 관찰되지 않았다.

따라서, 본시험에서는 다음과 같이 시험군을 구성하고, 음성 및 양성대조군을 포함하며, 농도군당 3 개의 플레이트를 사용하여 시험한다.

균주명	S9 mix	농도군(µg/plate)					
TA strains	+/-	15	50	150	500	1500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	15	50	150	500	1500	5000

2) 시험물질 처리 및 평판(plate) 제작[SOP-MT-102/103/104/105]

시험물질의 처리는 direct plate incorporation 방법으로 실시한다.

시험균주는 master plate로부터 20 mL의 액체배지(2.5 % Oxoid Nutrient Broth No. 2)에 접종해 shaking incubator (37 ± 2°C, 120 rpm)에서 10 시간 전배양 하며, 전배양을 마친 균주는 파장 600 nm에서 흡광도 측정으로 생균수를 산출한 후 시험에 사용할 때까지 냉장 보관한다.

온도 45 ± 2°C를 유지하는 dry bath에 꽂은 멸균 tube (12 x 75 mm)에 고압증기멸균한 top agar를 2 mL씩 분주한 다음, S9 mix 0.5 mL (대사활성계 비적용시에는 S9 mix 대신 0.5 mL의 sodium-phosphate buffer, pH 7.4), 균배양액 0.1 mL, 시험물질 용액 0.1 mL을 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2 - 3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼뜨려 굳게 한다.

음성대조군은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL을, 양성대조군은 양성대조물질 용액을 동일한 방법으로 가하여 실시한다.

시험물질 및 S9 mix의 무균성 확인을 위해 시험물질 최고농도액 0.1 mL 및 S9 mix 0.5 mL을 각각 2 mL의 top agar에 혼합하여 평판을 제작한다.

처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 평판을 뒤집어 37 ± 2°C에서 50 ± 2 시간 배양한 후 복귀 돌연변이집락(이하 집락)을 육안으로 계수한다.

3) 평판의 구별

평판에 유성펜으로 시험번호, 균주명, 농도, S9 mix 처리여부 등의 내용을 구별할 수 있도록 기입한다.

4) 관찰 항목

시험물질 처리시 시험물질액을 top agar에 혼합할 때 침전 생성 여부를 관찰하였다. 육안으로 확인 가능한 입자가 관찰되면 침전으로 판단한다.

집락은 육안으로 계수한다. 집락 계수 시 각 평판의 기본성장균층(background lawn)의 형성 여부를 음성대조군과 비교하여 검사하며, 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검한다.

다음 중 최소 한 항목이 관찰되는 경우 해당 농도에서 세포독성이 있는 것으로 판단한다.

- (1) 기본성장균층이 얇아지거나 없어지면서 집락수의 감소가 나타날 때.
- (2) 미세집락(microcolony)이 나타날 때.

집락수의 '감소'에 대해서는 공통된 기준이 없으므로, 본 시험에서는 집락수가 음성대조군 평균치의 50 % 미만인 경우 혹은 증가 경향이 역전되는 경우로 판단한다.

5) 결과의 표시

시험 결과는 각 농도군 당 3 개의 평판으로부터 얻은 집락 수의 평균±표준편차 및 음성대조군에 대한 증가 배수로 나타내며, 집락 수의 실측치도 아울러 제시한다.

6) 시험 타당성 기준

다음 기준을 모두 만족할 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정한다.

- (1) 플레이트 당 처리한 생균의 수가 0.5×10^8 CFU 이상일 것.
- (2) 시험물질 처리군 중 세포독성을 나타내지 않는 농도가 최소한 3 단계 이상일 것.
- (3) 음성대조군의 집락 수가 아래 범위일 것.

균주명	집락수
TA100	75-200
TA1535	3-37
TA98	15-60
TA1537	4-31
WP2 uvrA	5-40

- (4) 모든 양성대조군의 평균 집락 수가 음성대조군의 2 배 이상일 것. 이 때 2-AA 및 B[a]P 처리군에서 나타난 집락수의 분명한 증가는 S9 mix의 활성화에 대한 증거가 됨.
- (5) 시험물질과 S9 mix의 무균성 확인을 위한 플레이트에서 미생물 집락이 없을 것.

6. 통계학적 방법 및 결과의 평가

1) 통계학적 분석

통계분석은 실시하지 않는다.

2) 결과의 평가

대사활성계 적용 여부에 상관 없이 최소 1 개 균주에서 평균 집락 수가 1 개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정한다.

양성판정 기준을 만족하지 못할 경우 음성으로 판정하며, 시험물질은 본 시험에 사용한 균주에

복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단한다. 생물학적 연관성 또한 판정에 참고한다.

7. 참고문헌

- 1) Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures, Edited by David J. Kirkland, Cambridge University Press, 1990. ISBN 0-521-39347-7.
- 2) Green, MHL and Muriel, WJ (1976): Mutagen testing using *trp+* reversion in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 38:3-32.
- 3) GREEN, MHL (1984) Mutagen testing using *trp+* reversion in *Escherichia coli* in KILBEY, BJ, LEGATOR, M, NICHOLS, W and RAMEL, C (Eds.). *Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Second edition*, p.161-187. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.
- 4) Maron, DM and Ames, BN (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113:173-215.
- 5) Vogel, HJ and Bonner, DM (1956): Acetylornithinase of *E. coli*: Partial purification and some properties, *J. Biol. Chem.*, 218:97-106 (1956).

Protocol Amendment Form
(시험계획서 변경 기록지)

Study Title: Oyster enzyme hydrolysate의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

Study No.: 14-VG-178

Amendment No.: 1

Amendment to the Protocol:
(변경 내용)

1. 3 페이지, GLP 대응에 관한 내용을 다음과 같이 변경한다.

변경 전	변경 후
비임상시험관리기준 (제2013-40호, MFDS, 2013년 04월 05일)	비임상시험관리기준 (제2014-67호, MFDS, 2014년 02월 12일)

Reason for the Amendment:
(변경 사유)

1. 개정된 비임상시험관리기준을 반영함.

Impact on Study:
(시험에 미치는 영향)

1. 없음.

Approved by:

Study Director	오정자 Jeongja	Date	2014. 05. 27
Management	김갑록 김문	Date	2014. 05. 28
Authorized by Sponsor	정세영	Date	2014. 05. 30

Chemon Inc.

ORIGINAL	
2014년 07월 11일	
시험책임자	오정자 (인)

TO-006-S03

Protocol Amendment Form
(시험계획서 변경 기록지)

Study Title: Oyster enzyme hydrolysate의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

Study No.: 14-VG-178

Amendment No.: 2

Amendment to the Protocol:
(변경 내용)

1. 4 페이지 1. 1) 시험물질 부분을 다음과 같이 변경한다.

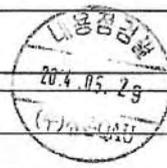
	변경 전	변경 후
입 수 일	2014 년 04 월 22 일	2014 년 05 월 27 일
입 수 량	20.60 g/tube X 1 tube	60 g/pack X 1 pack

Reason for the Amendment:
(변경 사유)

1. 시험에 사용한 시험물질의 정보를 기재함.

Impact on Study:
(시험에 미치는 영향)

1. 없음.



Approved by:

Study Director 오정자 Jeongja Date 2014.05.28

Management 김갑홍 김갑홍 Date 2014. 05. 29

Authorized by Sponsor 김세영 김세영 Date 2014. 05. 30

Chemon Inc.

TO-006-S03

ORIGINAL
2014년 5월 11일
시험책임자 오정자

Protocol Amendment Form
(시험계획서 변경 기록지)

Study Title: Oyster enzyme hydrolysate의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험
 Study No.: 14-VG-178 Amendment No.: 3

Amendment to the Protocol:
(변경 내용)

1. Page 4, 1.1) 시험물질 부분을 다음과 같이 변경한다.

	변경 전	변경 후
함 량	Tyrosine-alanine 10.7 - 13.6 µg/g	tyrosine-alanine 평균 0.13 %

Reason for the Amendment:
(변경 사유)

1. 시험의뢰자가 제공한 정보의 내용을 반영한다.



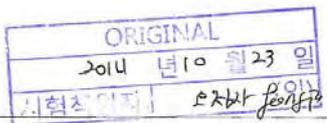
Impact on Study:
(시험에 미치는 영향)

1. 시험에 미치는 영향 없음

Approved by:

오정자 <i>Jeongja</i> Study Director	2014. 10. 21 Date
김성호 <i>Kim Seung-ho</i> Management	2014. 10. 21 Date
池澤 <i>Ikisawa</i> Authorized by Sponsor	2014. 10. 22 Date

Chemon Inc. TO-006-S03



Appendix 5. Certificate of analysis

시험성적서
경희대학교 약학대학

품 명	Oyster enzyme hydrolysate	제조번호	OP140415
제조일자	2014.04.15	시험일자	2014.04.20
		유효일자	2015.04.15

시험항목	시험기준	결과
성 상	powder	적합
확인시험	HPLC	적합
함량시험	tyrosine-alanine 함량	0.10~0.15% (평균 함량: 0.13%)
불용성이물검사	육안으로 보이는 이물질이 없어야 함	적합

판정	적합
시험 담당자	장영표 (서명)

Appendix 6. Results of dose formulation analysis

문서번호 Document No. PV-0007	
<h1>시험 성적서</h1> <h2>Analysis Certificate</h2>	
시험분석 의뢰기관: Requested by	
(주) 켐온	
시험분석 대 Sample	상: 글 가수분해 조제물 (14-VG-178)
시험분석 책임자: Principal Investigator	
정 세 희	
경희대학교 약학대학 생약학실 Division of Pharmacognosy College of Pharmacy, Kyung Hee University Seoul, Korea 130-701	날짜 Date : 2014. 07. 30 Lab. Manager : 장 영 표 Young Pyo Jang 

굴 가수분해물 조제시험물질의 검증시험

시험물질, 표준물질 및 부형제

(가) 시험물질

- ① 조제농도: 0mg, 0.5mg, 1.5mg, 5mg, 15mg, 50mg/mL
- ② 시험(로트)번호: 14-VG-178
- ③ 조제일: 2014.05.28
- ④ 입수량: 40ml
- ⑤ 외관 및 성상: 황토색의 현탁액
- ⑥ 시험물질명: Oyster enzyme hydrolysate
- ⑦ 시험물질로트: OP140415
- ⑧ 보관조건: 냉장보관
- ⑨ 공급원: 썬온
- ⑩ 부형제: 멸균주사용수

(나) 표준물질

- ① 명칭: tyrosine-alanine
- ② 제조(로트)번호: T5129
- ③ 입수일: 2013.06.10
- ④ 입수량: 50mg
- ⑤ 외관 및 성상: white powder
- ⑥ 순도: 99.9%
- ⑦ 보관조건: 냉동
- ⑧ 공급원: Aldrich

1. 실험재료

1.1 시료

실험에 사용된 굴 가수분해물은 주식회사 캠온으로부터 제공받아 사용하였고, 실험에 사용된 표준품의 순도는 tyrosine alanine 99.9%를 사용하였다.

1.2 사용기기

사용한 HPLC는 Waters HPLC로 Empower software를 통해 크로마토그램 데이터를 처리하였다. 분석에는 Atlantis T3 C18 column (4.6 x 250 mm i.d. 5 µm, waters, Massachusetts, USA)를 사용하였다.

1.3 시약 및 재료

HPLC용 용매는 HPLC grade용매 (Fisher, South Korea)를 0.45 µm PTFE filter (ADVANTEC, USA)로 여과한 후 사용하였으며 그 외에 trifluoroacetic acid (sigma aldrich, USA)는 분석용 1급 시약을 사용하였다. 초순수는 ABBOTA NEO 1으로 제조하여 18 MΩ 이상을 사용하였다.

1.4 HPLC 조건

Device	Waters 717autosampler, 600controller, 2487detector
Column	Atlantis T3 C18 column (4.6 x 250 mm i.d. 5 µm, waters , USA)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	220 nm
Column temp.	25 °C
Mobile phase	solvent A: CH ₃ CN (0.1% trifluoroacetic acid) solvent B: H ₂ O (0.1% trifluoroacetic acid)
Gradient condition	A:B=4:96

1.5 이동상 및 표준용액

① CH₃CN (0.1% trifluoroacetic acid)

trifluoroacetic acid 1ml 을 1000ml 의 Acetonitrile 에 넣은후, 0.45µm 필터로 여과 하였다.

② H₂O (0.1% trifluoroacetic acid)

trifluoroacetic acid 1ml 을 1000ml 의 Water 에 넣은후, 0.45µm 필터로 여과 하였다.

③ 표준용액

㉞ 보관용 표준용액

표준물질 20mg 을 1ml 의 water 에 녹이고, 냉장고에 보관하였다.

㉟ 상용 표준용액

보관용 표준용액을 water 로 희석하여 200, 100, 50, 20, 10µg/ml 로 조제하였다.

2. 분석법 검증

2.1 특이성

특이성은 부형제 중 내인성 방해물질의 존재를 chromatogram 으로 평가하였다.

2.2 직선성

분석법 검증 기간 동안 상용표준용액을 분석하고, 피크 면적으로 검량선을 작성하였다. 직선성은 결정계수(0.99 이상)와 회귀방정식으로 역산출한 농도에 대한 각 표준물질의 이론 농도에 대한 상대오차로 평가하였다. (90~110%이내)

2.3 정확성과 정밀성

정확성과 정밀성은 일내, 일간 상대오차와 변동계수를 평가하였다. 일내 정확성과 정밀성 평가를 위해 시료(10, 20, 50, 100, 200 μ g/ml)를 3 회(n=3)분석하였고, 일간 정확성과 정밀성은 3 배치를 분석하여 평가하였다. 허용기준은 상대오차는 90~110%이내, 변동계수 10%미만으로 하였다.

2.4 안정성

2.4.1 실온안정성

표준용액을 실온에서 약 4 시간 방치 후 분석하였다. 실온안정성은 상대오차로 평가하였다. (95~105%이내)

2.4.2 자동주입기 안정성

상용 표준용액을 자동주입기에서 하룻밤 동안 방치 후 분석하였다. 자동주입기 안정성은 상대오차로 평가하였다. (95~105%)

2.5 조제시험물질 분석

2.5.1 조제시험물질의 운송 및 보관

(주)캠은 경기바이오연구센터에서 경희대학교로 운송하고 이후 실험이 종료되는 기간까지 냉장 보관 하였다.

2.5.2 시료의 채취

조제시험물질 튜브 외부에 유성매직으로 표선을 만들고, 조제당일에는 상, 중, 하층에서 채취하고, 4 및 7 일째에는 중층에서만 채취하였다. 조제시험물질은 시험물질 조제당일과 조제 후 4 및 7 일째로 총 3 회 채취하였다.

3. 결과

(1) 분석법 검증

1.1 특이성

부형제 중 내인성 방해인자는 관찰되지 않았다.

Figure 1. Chromatogram of vehicle (a), standard (b, 0.1 mg/mL), QC (c, 40 mg/mL)

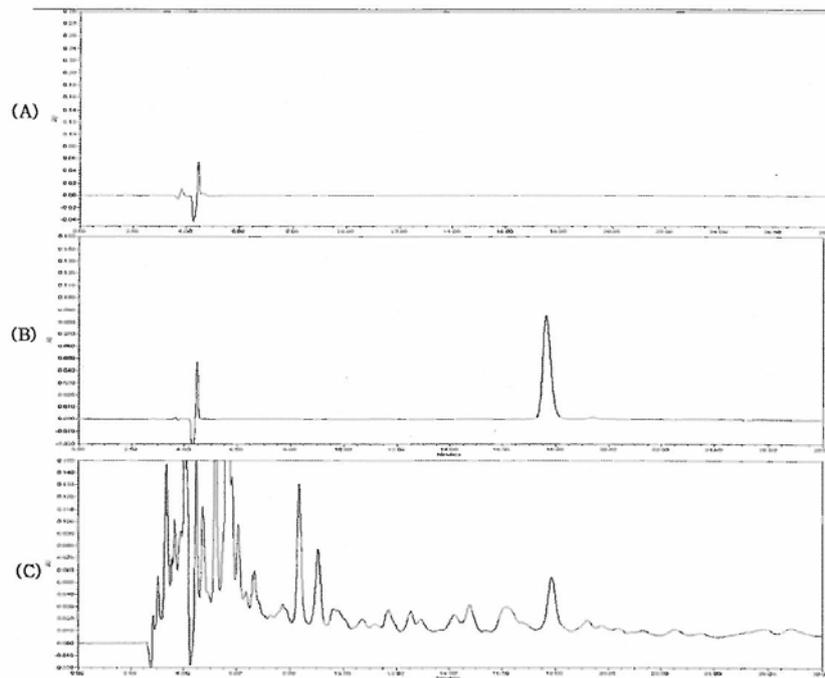


Table 1. Content of tyrosine-alanine in oyster peptide

Replicate	Peak area ratio	Measure conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Sample WT.	Content (mg/g)
1	968980	52.92	40mg	1.32
2	980989	53.58	40mg	1.34
3	920439	50.25	40mg	1.26
4	937436	51.19	40mg	1.28
5	905452	49.43	40mg	1.24
6	913491	49.87	40mg	1.25
			Mean	1.30
			SD	0.04
			RSD	2.95

1.2 직선성

Tyrosine-alanine의 농도와 기기적 감응의 상관계수(r)는 0.999, 상대오차는 95~105%사이였으며, 10~200 $\mu\text{g/mL}$ (n=3)의 농도범위에서 직선성을 나타내었다.

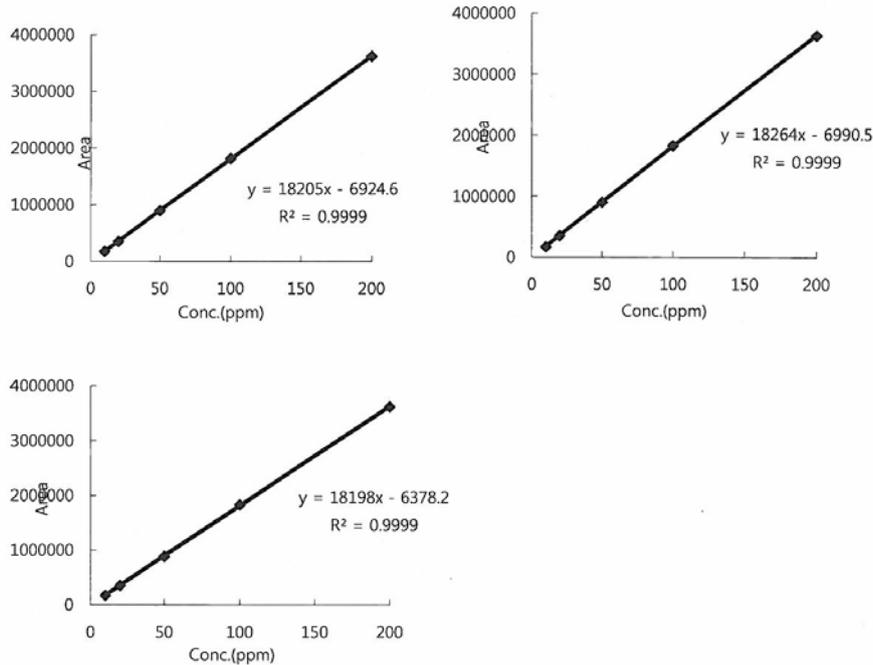


Figure 2. Calibration of tyrosine-alanine in the range of 10~200 $\mu\text{g/mL}$ by HPLC

1.3 정확성과 정밀성

일내, 일간 상대오차는 분석법의 정확성 및 정밀성을 측정한 결과, 모두 검증기준을 충족시키는 결과를 나타내었다. 투여시험물질은 0(부형제 대조군), 50, 150, 500, 1500, 5000mg의 용량으로 조제하였다. 굴 가수분해물 1g중 tyrosine-alanine의 표시량은 1.30 mg/g으로 결정되었다. (Table 1) 조제된 투여시험물질은 시료의 채취부위에 상관없이 균질성을 나타내었으며 부형제로 조제된 굴 가수분해물은 냉장보관조건에서 7일간 안정성이 확보되었다.

검량선은 최소자승법을 이용하여 회귀식의 기울기, 절편 및 상관계수를 구하였으며, 각 농도에서 역-환산된 측정값의 상대오차는 전체 정량범위에서 -0.94~0.91%로서 직선성의 기준을 충족하였다. (Table 2)

정밀성은 QC시료의 분석을 통하여 측정된 tyrosine-alanine의 농도값에 대한 변동계수(CV)값으로 평가하여 정밀성은 0.05~1.58% (n=9)이었다. 정확성은 QC시료의 분석을 통하여 측정된 tyrosine-alanine의 농도값의 상대오차 값으로 평가하여 정확성은 -1.27~11.53%(n=9)로서 $\pm 15\%$ 이내의 RE값을 허용하는 정확성의 기준을 충족하였다. (Table

3,4)

Table 2. Linearity of calibration curves of tyrosine-alanine in the range of 10~200µg/mL

Replicate	Concentration(µg/mL)					Curve parameters		
	10	20	50	100	200	Slope	intercept	R ²
1	10.13	19.76	49.77	100.54	199.81	18205	-6924.6	0.9999
2	9.75	19.90	49.90	100.79	199.65	18264	-6990.5	0.9999
3	9.98	19.98	49.33	101.07	199.63	18198	-6378.2	0.9999
Mean	9.97	19.91	49.75	100.60	199.70	18222	-6764.43	1.00
SD	0.16	0.11	0.29	0.26	0.10	36.25	336.11	0.00
CV(%)	1.58	0.56	0.59	0.26	0.05			
RE(%)	-0.34	-0.45	-0.50	0.60	-0.15			

Table 3. Precision and accuracy of the method in the range of 10~200µg/mL

Replicate	Concentration(µg/mL)			
		25	50	100
Day 1	1-1	35.17	51.39	96.16
	1-2	28.43	51.88	92.80
	1-3	33.35	50.53	97.82
	Mean	32.32	51.27	95.60
	SD	3.49	0.68	2.56
	RSD	10.80	1.33	2.67
Day 2	2-1	34.27	61.50	104.61
	2-2	35.05	56.84	95.45
	2-3	35.02	61.66	104.01
	Mean	34.78	60.00	99.22
	SD	0.44	2.74	5.98
	RSD	1.27	4.56	6.03
Day 3	3-1	37.41	60.48	103.87
	3-2	39.63	63.81	106.34
	3-3	36.90	62.13	106.58
	Mean	37.98	62.14	105.60
	SD	1.45	1.67	1.50
	RSD	3.83	2.68	1.42
Inter day Mean		35.03	57.80	100.14
SD		2.84	5.76	5.06
RSD		8.10	9.97	5.06

Table 4. Recovery of marker compounds through standard addition (n=3)

Day	Fortified content (µg/ml)	Observed content (ng)	Recovery mean	Recovery SD	Recovery RSD (%)
Day 1	25	32.31±3.49	124.88	14.40	11.53
	50	51.26±0.68	102.53	1.37	1.33
	100	95.59±1.34	95.60	2.56	2.67
Day 2	25	34.78±0.44	139.13	1.77	1.27
	50	60.00±2.73	120.00	5.47	4.56

	100	99.22±5.98	99.22	5.98	6.03
Day 3	25	37.97±1.45	151.92	5.81	3.83
	50	62.14±1.66	124.28	3.33	2.68
	100	105.59±1.50	105.60	1.50	1.42

(2) 함량 균질성

시험물질에 대하여 3회의 분석을 수행하여 글 가수분해물 중 tyrosine-alanine의 함량을 측정 한 결과, 글 가수분해물 1g중 tyrosine-alanine의 표시량은 1.30 mg/g을 함유하는 것으로 나타났다.

위에서 설정된 표시량에 따라 계산된 각 투여시험물질 중 글 가수분해물의 함량은 1.5mg, 5mg, 15mg 및 50mg 군에서 각각 90.94%, 86.96%, 101.35% 및 107.57%를 나타내었다. 이는 15%이내를 허용하는 투여시험물질의 함량기준을 충족하였다.

투여시험물질의 함량 균질성은 튜브의 세부분(상, 중, 하)에서 시료를 채취하고 분석하여 얻은 함량에 대한 변동계수로서 평가하였다. 그 결과 세가지 농도의 CV값은 각각 2.81, 1.89, 1.69, 및 3.04%였으며, 이 값은 15% 미만의 허용기준을 충족하였다.

함량시험은 투여시험물질을 조제 후 7일간 냉장보관 후 측정 한 결과로서, 글 가수분해물은 약 4℃의 냉장보관조건에서 7일간 안정성을 확보할 수 있었다.

Table 5. Content uniformity of oyster peptide

Dose	Sampling position	Peak area ratio	Measured Content (µg/mL)		Assay (%)	CV (%)
			each	mean		
0.5mg/ml	Top					
	Middle					
	Bottom					
1.5mg/ml	Top	24198	1.71	1.75	90.94	2.81
	Middle	25375	1.77	0.42		
	Bottom	25458	1.78			
5mg/ml	Top	95979	5.65	5.59	86.96	1.89
	Middle	92788	5.48	0.48		
	Bottom	95834	5.64			
15mg/ml	Top	345787	19.37	19.55	101.35	1.69
	Middle	355809	19.92	0.70		
	Bottom	345387	19.35			
50mg/ml	Top	1267318	69.99	69.17	107.57	3.04
	Middle	1280642	70.73	2.48		
	Bottom	1208937	66.79			

최종보고서

Oyster enzyme hydrolysate의 배양 Chinese Hamster
Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험

시험번호: 14-VG-180

시험의뢰기관: 경희대학교

(주)켄온 비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
240, Nampyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do
449-826, Republic of Korea

진술서

Oyster enzyme hydrolysate의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2014-67호, MFDS, 2014년 02월 12일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

상기 시험은 승인된 시험계획서와 ㈜켄온 비임상연구소의 SOP에 따라 수행하였고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험자료의 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았다.

이 우주 

2014. 10. 23

이 우주, M.S.

날 짜

시험책임자

주 소 : ㈜켄온 비임상연구소

경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270

연 락 처 : 031-888-6659 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

E-mail : wjoo923@chemon.co.kr

서명

이우주

이우주, M.S.

시험책임자

㈜켄온 비임상연구소

2014. 10. 23

날짜

김갑호

김갑호, M.S., Toxicologist

운영책임자

㈜켄온 비임상연구소

2014. 10. 23

날짜

정세영

정세영

시험의뢰자

경희대학교

2014. 10. 22

날짜

신뢰성보증확인서

시험번호: 14-VG-180

시험제목: Oyster enzyme hydrolysate의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체 이상시험

시험기간: 2014.05.26 - 2014.10.23

시험의뢰기관: 경희대학교

점검내용	점검일시	시험책임자 확인일	운영책임자 보고일
시험계획서	2014.05.26	2014.05.26	2014.05.28
세포보관 및 재생	2014.06.02	2014.06.03	2014.06.09
계대배양	2014.06.02	2014.06.03	2014.06.09
시험물질/대조물질 보관	2014.06.02	2014.06.03	2014.06.09
시험물질/대조물질 조제	2014.06.02	2014.06.03	2014.06.09
세포상태	2014.06.02	2014.06.03	2014.06.09
식별	2014.06.02	2014.06.03	2014.06.09
시험물질처리	2014.06.02	2014.06.03	2014.06.09
염색체검체제작	2014.06.03	2014.06.03	2014.06.09
염색체검사	2014.06.13	2014.06.13	2014.06.16
시험기초자료	2014.06.30	2014.07.01	2014.07.03
최종보고서(안)	2014.06.30	2014.07.01	2014.07.03
최종보고서	2014.10.23	-	-

상기의 점검으로써, 본 보고서의 시험방법이 식품의약품안전처고시 제2014-6호(2014년 01월 29일) '의약품등의독성시험기준' 및 OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG 473 (1997) 'In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test'에 따라하여 행하여졌음과, 해당시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 보고서에 정확하게 반영되었으며, 본 시험이 식품의약품안전처고시 제2014-67호(2014년 02월 12일) '비임상시험관리기준' 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 실시되었음을 증명함.

2014년 10월 23일

(주)켄온 비임상연구소

신뢰성보증업무담당자

김대성 (인)

신뢰성보증업무책임자

김효진 (인)

시험개요

시 험 제 목 Oyster enzyme hydrolysate의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험

시 험 목 적 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate가 배양한 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포의 염색체에 구조적 혹은 수적 이상을 유발하는가를 알아보기 위하여 실시하였다.

시 험 지 침 의약품등의독성시험기준 (제2014-6호, MFDS, 2014 년 01 월 29 일)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG 473 (1997) 'In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test'

시 험 의뢰 자 경희대학교
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호, 130-701
02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX)
의뢰책임자: 정 세 영

시 험 기 관 (주)캠온 비임상연구소
경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826
경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270
031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)
운영책임자: 김 갑 호

시 험 일 정	2014 년 05 월 26 일	시험계획서승인(시험개시일)
	2014 년 05 월 30 일	세포파종(실험개시일)
	2014 년 06 월 02 일	시험물질 처리
	2014 년 06 월 03 일	염색체 검체 제작
	2014 년 06 월 20 일	판독완료일(실험종료일)
	2014 년 07 월 01 일	최종보고서(안) 제출
	2014 년 10 월 23 일	최종보고서 제출(시험종료일)

주요시험관계자	시험물질 조제/보관:	김 지 훈	자료보관:	정 혜 정
	통계분석:	이 민 행	시험담당자:	신 건 국

기록과 재료의 보관 시험계획서, 시험계획서 변경기록지, 시험계획서 일탈기록지, 최종보고서, 시험 기초자료, 시험물질 표본, 검체 및 각종 증거자료는 품목허가일로부터 3 년간 (주)캠온 비임상연구소에 보관한다.
이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

목 차

진술서	i
서 명.....	ii
신뢰성보증확인서.....	iii
시험개요.....	iv
요 약.....	1
재료 및 방법.....	2
결 과.....	9
고찰 및 결론.....	10
참고문헌.....	11
단위 및 약호.....	12
 TABLES	
Table 1. Chromosome aberration test in the presence of S9 mix – summary (6-hour treatment)	14
Table 2. Chromosome aberration test in the absence of S9 mix – summary (6-hour treatment)	15
Table 3. Chromosome aberration test in the absence of S9 mix – summary (24-hour treatment)	16
 APPENDICES	
Appendix 1. Cell counts – individual data	18
Appendix 2. Historical control data	19
Appendix 3. Protocol, protocol deviation and protocol amendment	20
Appendix 4. Certificate of analysis	32
Appendix 5. Result of dose formulation analysis	33

요 약

시험물질 Oyster enzyme hydrolysate의 유전독성 평가를 위하여 배양 Chinese hamster lung (CHL) 세포를 이용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에 염색체이상시험을 수행하였다. 대사활성계로는 Aroclor-1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보효소(cofactor)를 첨가한 것을 사용하였다.

시험물질은 배양액에 현탁하여 처리하였다. 최고농도는 상대세포수(Relative Cell Count, RCC)를 세포독성의 지표로 하여 결정하였다.

음성(부형제)대조군 및 양성대조군을 포함하여 다음 표와 같이 농도군을 설정하였으며, 농도군당 2 개의 플라스크를 사용하였다.

Treatment series	Metabolic activation	Treatment time - recovery time (hrs)	Dose of test article ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Positive control and dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	+	6-18	0, 1250, 2500, 5000	B[a]P 20
2	-	6-18	0, 1250, 2500, 5000	EMS 800
3	-	24-0	0, 1250, 2500, 5000	EMS 600

활발히 증식 중인 세포를 분리하여, 배양면적 25 cm^2 의 플라스크에 6×10^4 세포를 5 mL의 배양액에 파종하여 약 3 일간 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 처리개시로부터 24 시간 후에 염색체 검체를 제작하여, 플라스크당 100 개 (농도군당 200 개)의 중기상으로부터 염색체이상을 계수하였다. 결과는 100 중기상당 관찰되는 구조적(혹은 수적) 이상을 가진 중기상의 평균으로 나타내었다.

염색체 이상을 계수한 결과, 시험물질 처리군에서 구조적인 염색체이상을 가진 중기상의 출현빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았으며, 수적이상을 가진 중기상의 빈도에서도 통계학적으로 유의한 증가는 없었다.

한편, Benzo[a]pyrene 혹은 Ethylmethanesulfonate를 처리한 모든 양성대조군에서는 확실한 양성 결과를 얻었다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate는 본 시험에 사용한 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

재료 및 방법

1. 시험물질 및 대조물질

1) 시험물질(Appendix 4)

명 칭: Oyster enzyme hydrolysate
 코드번호: C-1390
 제조번호: OP140415
 입 수 일: 2014 년 05 월 27 일
 입 수 량: 60 g/pack x 1 pack
 외 관: Powder
 함 량: Tyrosine-alanine 평균 0.13 %
 유효일자: 2015 년 04 월 15 일
 보관조건: 실온, 차광, 방습
 공 급 원: 경희대학교

2) 부형제(음성대조물질)

명 칭: 배양액(Minimum Essential Medium, MEM)
 제조번호: 1384833
 보관조건: 냉장(-1~10°C)
 공 급 원: Gibco (Invitrogen Corp.) (제품번호: 41500-034)
 선택이유: 시험물질이 잘 현탁되어 본 부형제를 선택하였다.

3) 양성대조물질

다음과 같이 대사활성계 적용시는 Benzo[a]pyrene (CAS No. 50-32-8, 약칭 B[a]P)를, 대사활성계 비적용시는 Ethylmethanesulfonate (CAS No. 62-50-0, 약칭 EMS)를 사용하였다. 이들 양성대조물질은 OECD 가이드라인 TG 473에 제시된 것 중에서 선택하였다.

물질명	공급원	제품번호	로트번호	입수일	보관
B[a]P	Sigma-Aldrich Co. (Supelco)	48564	LB98566V	2013 년 05 월 31 일	11-30°C
EMS	Sigma-Aldrich Co.	M0880	BCBG1395V	2012 년 06 월 12 일	11-30°C

2. 조제시험물질 및 분석

1) 시험물질 조제

시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였다. 적량의 시험물질을 칭량하여 부형제를 넣고 최고농도군을 조제하고, 이것을 동일한 부형제로 희석하여 각 농도군을 조제하였다. 처리용 시험물질은 처리 직전에 조제하였다.

2) 조제시험물질의 분석

조제시험물질에 대한 함량분석은 분석은 시험의뢰자가 실시하였고, 분석결과는 첨부자료로 첨부하였다. (Appendix 5)

3) 양성대조물질 조제

B[a]P는 Dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해하여 조제한 원액을 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이하에 냉동 보관하고, 처리 직전에 해동하여 시험에 사용하였다. EMS는 처리 직전 배양액에 용해하여 조제하였다.

3. 시험계

1) 시험계 및 선택 이유

본 시험에는 암컷 Chinese hamster의 폐섬유아세포에서 유래한 CHL/IU 세포주를 사용하였다. 이 세포주는 다양한 화학물질을 대상으로 한 유전독성시험에 널리 사용되고 있으며, 염색체이상의 검출에 적합함이 입증되었다. 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 입수하였다(Cat. No. CRL-1935). ATCC에서 제공한 정보에 의하면 이 세포주의 염색체 modal number는 25 이며, 분열주기는 약 15 시간이다.

본 시험에서 사용한 세포주의 세포 증식률 및 핵형 검사 결과, 염색체 modal number는 25 이며, 분열주기는 약 12.2 시간이었다.

2) 배양 조건

배양액은 1 리터용 Minimum Essential Medium (Gibco-BRL #41500-034) 분말배지에 sodium bicarbonate (2200 mg), L-glutamine (292 mg), penicillin-streptomycin 액 (Gibco-BRL #15140-122)을 첨가하여 멸균주사용수로 총 액량을 1000 mL로 조정된 것을 공경 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 의 membrane filter로 여과한 것에 Fetal Bovine Serum (Gibco-BRL #16000-044) 100 mL를 첨가한 것을 사용하였다.

세포는 5 %의 이산화탄소와 포화 수증기를 함유한 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 항온배양기(Forma 311 및 3111)에서 세포 배양용 플라스크(배양면적 75 cm^2 , Falcon)를 사용하여 배양하며 매 2-3 일마다 0.1 % 트립신액으로 세포를 분리, 계대배양하였다.

3) 세포의 장기 보존

장기 보존을 위한 세포는 15 % fetal bovine serum (FBS)을 함유한 배양액에 현탁한 것에 10 % (v/v) dimethylsulfoxide를 첨가하여 액체질소 내에 냉동보관하였다. 해동하여 배양한 세포에 대하여는 증식을 측정, 핵형검사 및 mycoplasma에 의한 오염 여부를 검색하였다.

4) 시험물질 처리를 위한 세포 배양

냉동세포를 해동하여 최소한 7 일간 배양 후 시험에 사용하였다. 활발히 증식 중인 세포를 트립신으로 분리한 다음 Coulter counter model Z2 (Beckman Coulter)로 mL 당 세포 수를 산출하고, 이를 근거로 배양면적 25 cm² 플라스크당 6 x 10⁴ 개의 세포를 5 mL의 배양액에 파종, 약 3 일간 배양한 후 시험물질을 처리하였다.

4. 대사활성계(S9 mix)**1) S9 및 Cofactor****S9**

기원: Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간

공급원: Molecular Toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)

제품번호: 11-01L

로트번호: 3219

단백질함량: 35.0 mg/mL

보관조건: 냉동보관(-15°C 이하)

Cofactor

명칭: Cofactor-1

공급원: Wako Pure Chem. Ind., Ltd. (Japan)

제품번호: 309-50611

로트번호: 999303

보관조건: 냉장보관(-1~10°C)

2) S9 mix의 조성(1 mL 기준, 30 % S9, v/v)

S9 mix는 S9과 cofactor 용액으로 조제하였다. S9 mix의 조성은 8 µmol MgCl₂ · 6H₂O, 33 µmol KCl, 5 µmol G-6-P, 4 µmol NADPH, 4 µmol NADH, 100 µmol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 0.3 mL S9으로 하며, 조제한 S9 mix는 얼음에 채워 사용하였다.

5. 시험 방법

1) 처리농도 결정

본 시험의 처리 농도는 예비시험(시험번호 14-VG-179P)에서 본시험과 같은 방법으로 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였다. 처리 방법에 따라 다음과 같이 구분하였다.

처리계열-1: 대사활성계 적용 6 시간 처리 - 18 시간 회복(약칭 6+S)

처리계열-2: 대사활성계 미적용 6 시간 처리 - 18 시간 회복(약칭 6-S)

처리계열-3: 대사활성계 미적용 24 시간 처리 - 0 시간 회복(약칭 24-S)

예비시험에서는 5000 µg/mL 을 최고농도로 설정하고 5~5000 µg/mL 범위의 8 단계 시험물질을 처리하였다. 시험물질 처리 개시 및 종료시각에 침전생성 여부, 배양액의 색변화 등을 관찰하였다. 관찰은 육안으로 하였으며, 처리종료시까지 처리액 중에 시험물질 입자가 관찰될 때를 침전으로 판단하였다.

시험물질 처리개시로부터 약 24 시간 후 플라스크로부터 세포를 분리, 계수하여 얻은 세포 수로 다음 수식에 의해 상대세포수(Relative Cell Count, RCC)를 산출하여 세포독성의 지표로 하였다.

$$RCC = (\text{처리군의 세포수} / \text{음성대조군의 세포수}) \times 100 (\%)$$

예비시험 결과 모든 처리계열의 모든 농도군에서 침전은 생성되지 않았으며 최고농도에서도 RCC 값은 91 % 이상이었으므로, 본 시험에서는 5000 µg/mL 을 고농도로 설정하고 음성(부형제)대조군 및 양성대조군을 포함하여 아래 표와 같이 시험군을 구성하였다.

[처리계획]

Treatment series	Metabolic activation	Treatment time - recovery time (hrs)	Dose of test article (µg/mL)	Positive control and dose (µg/mL)
1	+	6-18	0, 1250, 2500, 5000	B[a]P 20
2	-	6-18	0, 1250, 2500, 5000	EMS 800
3	-	24-0	0, 1250, 2500, 5000	EMS 600

2) 시험의 실시

세포배양

배양 면적 25 cm²인 플라스크(Falcon)당 6 × 10⁴ 세포를 5 mL의 배양액으로 파종하여 약 3 일간 배양하였다. 농도군당 2 개의 플라스크를 사용하였다.

시험계의 구별

플라스크의 측면에 유성펜으로 시험번호, 농도군(코드), S9 mix 처리여부 및 처리시간 등을 기입하였다.

시험물질 처리

세포를 처리계열(Series) 1, 2, 3으로 나누어 준비하고, 시험물질 처리 전에 미리 각 플라스크의

배양액을 모두 제거한 후 대사활성계 적용군(계열-1)은 2.2 mL, 비적용군(계열-2 및 3)은 4.5 mL의 배양액을 분주, 1 시간 이상 경과한 후 시험물질을 처리하였다. 음성대조군에는 부형제만을 같은 양 처리하였다. 처리액 조성은 시험물질 처리액 조성표와 같다.

[시험물질 처리액 조성]

Series	Medium + Test article	S9 mix	Final volume
1	2.2 mL + 300 μ L	0.5 mL	3.0 mL
2	4.5 mL + 500 μ L	-	5.0 mL
3	4.5 mL + 500 μ L	-	5.0 mL

양성대조군에는 30 μ L B[a]P (series-1), 400 μ L EMS (series-2) 및 300 μ L EMS (series-3)를 처리하여 합계액량을 동일하게 조정함.

계열-1 및 계열-2는 처리개시로부터 약 6 시간 경과 후 플라스크로부터 시험물질을 함유한 처리액을 제거하고 5 mL의 Ca^{2+} & Mg^{2+} free Dulbecco's phosphate buffered saline (CMF D-PBS)로 세포층을 1 회 세척한 후 신선한 배양액 5 mL를 가하여 중기세포 수거시까지 계속 배양하였다. 계열-3은 세척 없이 중기세포 수거시까지 계속 처리하였다. 모든 계열의 처리개시 및 종료시에 침전의 생성 혹은 pH에 따른 배양액의 색변화 등을 관찰하였다.

검체 제작

시험물질 처리 개시로부터 약 22 시간 후 모든 플라스크에 50 μ L의 콜히친 액을 처리하여(최종농도 1 μ M) 2 시간 경과 후 진탕법으로 중기세포를 수거하였다. 중기세포를 포함한 배양액을 원심분리, 75 mM KCl 액에 의한 저장액처리 및 고정(메틸알콜:빙초산=3:1 v/v)을 거쳐 공기건조법으로 염색체검체를 제작하고 5 % Giemsa액으로 염색하였다. 검체는 각 플라스크 당 2 매씩 제작하였다.

검체 제작 방법의 선택이유

일반적으로 실시되는 방법이며, 이 방법은 중기세포를 고밀도로 얻을 수 있는 장점이 있다.

세포독성의 측정

중기세포 수거 후 플라스크에 남아있는 세포를 트립신 액으로 분리 및 계수하여 RCC 값을 산출하였다.

3) 염색체이상의 계수

계수의 기준

염색체이상의 형태 판별 및 계수는 일본환경변이원학회(JEMS) 포유동물시험분과회(MMS)판 '염색체이상 아틀라스(1988)'에 의하였다.

각 플라스크로부터 제작한 2 매의 검체 중 1 매씩을 선택하여 코드화 한 후, 100 개의 분열 중기상(이하 '중기상'이라 함)을 대상으로 1000 배의 배율로 염색체이상을 계수하였다.

구조적 이상

동원체 수가 23-27인 중기상에 대하여 동원체 수 및 염색체이상의 유무를 관찰하고, 염색체 이상이 관찰되면 이상의 종류와 수 및 슬라이드 상의 위치를 기록하였다.

이상은 크게 염색체형 절단 및 교환과 염색분체형 절단 및 교환으로 대별해 계수하였으며, gap 을 포함한 경우와 제외한 경우를 병기하였다.

염색체이상이 10 개 이상(gap 포함, multiple aberration) 혹은 단편화(fragmentation)는 '기타' 로 분류하여 1 개의 이상으로 계수하였다.

수적 이상

이상의 유무에 관계 없이 100 개의 중기상을 계수하면서 동원체의 수에 따라 diploid (23-36 동원체), polyploid (37≤동원체) 및 핵내배화(endoreduplication)로 분류, 그 수를 기록하였다.

4) 결과의 표시

농도군당 이상중기상 및 염색체이상의 수는 2 반복의 검체로부터 구한 평균으로 나타내었다.

5) 시험 타당성 기준

다음의 조건을 모두 만족하였을 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정하였다.

- (1) 시험물질 처리군의 최소한 3 농도군의 모든 플라스크에서 100 개의 중기상으로부터 염색체이상의 계수가 가능할 것.
- (2) 음성대조군에서 염색체의 구조적 이상(gap 제외)을 가진 중기세포의 빈도가 5 % 미만이며, 양성대조군에서는 이 빈도가 10 % 이상일 것. 이 때 B[a]P 처리군에서 나타난 이상중기상의 분명한 증가는 S9 mix의 활성화에 대한 증거가 됨.

6. 통계학적 방법 및 결과의 평가**1) 통계 분석 프로그램**

시험 결과의 통계분석에는 SPSS (ver. 10.1K) 프로그램을 사용하였다.

2) 구조적 이상

적어도 1 개 이상의 구조적 이상을 가진 중기상을 이상중기상으로 분류하여 통계처리를 적용하였으며, gap 만을 가진 중기상은 통계처리 대상에서 제외하였다.

음성대조군과 처리군의 자료를 Fisher's exact test로 비교하였으며, $P < 0.05$ 일 때 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다. 시험물질 처리군에서 이상중기상의 빈도가 유의한 증가를 나타낼 경우는 Chi-square test의 linear-by-linear association으로 용량상관성을 검사하였다.

3) 수적 이상

동원체수 37 이상인 중기상 및 핵내배화를 가진 중기상의 합계에 대하여 구조적 이상의 경우와 같은 방법으로 평가하였다.

4) 결과의 평가

시험물질 처리군에서 염색체이상을 가진 중기상의 빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 판정하였다. 그러나 통계학적인 유의성을 양성판정의 유일한 근거로 삼지는 않으며, 생물학적 연관성, 이상중기상의 빈도 및 세포증식 억제(세포독성)의 정도 또한 판정에 참조하였다.

결 과

조제 시험물질

시험물질은 모든 농도군에서 부형체에 쉽게 혼탁되었다.

대사활성계 적용 6 시간 처리(Table 1 and Appendix 1)

시험물질을 처리한 모든 군에서 침전 및 세포독성은 관찰되지 않았다. 구조적 이상중기상의 빈도 (이하 gap 제외)는 음성대조군 및 모든 시험물질 처리군에서 0.5 이하이었으며, 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다.

수적이상을 가진 중기상의 빈도는 음성대조군 및 모든 시험물질 처리군에서 모두 0.0 이었다.

양성대조군에서는 구조적 이상을 가진 중기상의 빈도(21.0)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다($P < 0.01$).

대사활성계 비적용(Table 2, 3 and Appendix 1)

[6 시간 처리]

시험물질을 처리한 모든 군에서 침전 및 세포독성은 관찰되지 않았다. 구조적 이상중기상의 빈도는 음성대조군 및 모든 시험물질 처리군에서 0.5 이하이었으며, 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다.

수적이상을 가진 중기상의 빈도는 음성대조군 및 모든 시험물질 처리군에서 모두 0.0 이었다.

양성대조군에서는 구조적 이상을 가진 중기상의 빈도(28.0)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다($P < 0.01$).

[24 시간 처리]

시험물질을 처리한 모든 군에서 침전 및 세포독성은 관찰되지 않았다. 구조적 이상중기상의 빈도는 음성대조군 및 모든 시험물질 처리군에서 모두 0.0 이었다.

수적이상을 가진 중기상의 빈도는 음성대조군 및 모든 시험물질 처리군에서 모두 0.0 이었다.

양성대조군에서는 구조적 이상을 가진 중기상의 빈도(33.0)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다($P < 0.01$).

고찰 및 결론

시험타당성 기준은 모두 만족하였다. 염색체이상을 계수한 결과, 처리 방법에 상관없이 모든 시험물질 처리군에서 염색체의 구조적 및 수적 이상을 가진 중기상의 출현빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하지 않았으며, 이 결과는 양성판정 기준을 만족시키지 못하였다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate는 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Dean and Danford (1984): Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells, in: Mutagenicity testing a practical approach, IRL press Ltd., pp.187-232.
- 2) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni, and K.Yoshikawa (1981): Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens, GANN Monograph on Cancer Res., 27:95-107.
- 3) Japanese environmental mutagen society-mammalian mutagenicity study group (1988): Atlas of chromosome aberration by chemicals
- 4) Koyama, H., T. Utakoji, and T. Ono (1970): A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue, GANN, 61:161-167.

단위 및 약호

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by Chemon Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this report.

%	Percent
°	Degree
C	Celsius
L	Liter
mL	Milliliter
µL	Microliter
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Milligram
µg	Microgram
ng	Nanogram
m	Meter
cm	Centimeter
mm	Millimeter
µm	Micrometer
hr	Hour
min	Minute
sec	Second
rpm	Revolution per Minute
G-6-P	Glucose-6-phosphate
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
GLP	Good Laboratory Practice Regulation
MFDS	Ministry of Food and Drug Safety
ICH	International Conference on Harmonization
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
QAU	Quality Assurance Unit
SD	Standard Deviation
SOP	Standard Operating Procedures
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

TABLES

Table 1. Chromosome aberration test in the presence of S9 mix – summary (6-hour treatment)^{a)}

Dose (µg/mL)	No. cells examined (mean)	Aberrations						PP+ER		No. aberrant metaphase ^{b)}			RCC
		Chromosome type		Chromatid type		Others (mean)	Gaps (mean)	No. (mean)	Decision	+Gaps		-Gaps	
		csb (mean)	cse (mean)	ctb (mean)	cte (mean)					No. (mean)	No. (mean)	Decision	
0	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	100
	100	0	0	0	0	0	0	0		0	0		
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.0)	(0.0)		
1250	100	0	0	0	0	0	1	0	Negative	0	0	Negative	91
	100	0	0	0	0	0	0	0		0	0		
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)		(0.5)	(0.0)		
2500	100	0	0	0	1	0	0	0	Negative	1	1	Negative	98
	100	0	0	0	0	0	1	0		1	0		
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.5)	(0.0)		(1.0)	(0.5)		
5000	100	0	0	0	0	0	2	0	Negative	2	0	Negative	94
	100	0	0	0	0	0	0	0		0	0		
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(1.0)	(0.0)		(1.0)	(0.0)		
20 B[a]P	100	1	1	9	37	0	2	1	Negative	26	25	Positive	71
	100	0	2	6	19	0	0	0		17	17		
	(100)	(0.5)	(1.5)	(7.5)	(28.0)	(0.0)	(1.0)	(0.5)		(21.5)	(21.0)**		

** Significantly different from the negative control at $P < 0.01$ (Fisher's exact test).

Test article: Oyster enzyme hydrolysate

a) 6-hour treatment – 18-hour recovery.

b) Inclusive/exclusive gaps. 100 metaphases were examined per culture.

PP: Polyploid

ER: Endoreduplication

B[a]P: Benzo[a]pyrene (positive control article).

RCC: Relative Cell Counts = (Cell count of treated flask / Cell count of control flask) x 100 (%)

Gaps: Chromosome type + Chromatid type gaps

csb: Chromosome type deletions

cse: Chromosome type exchanges

ctb: Chromatid type deletions

cte: Chromatid type exchanges

Other: Metaphases with more than 10 aberrations (including gaps) or with chromosome fragmentation

Table 2. Chromosome aberration test in the absence of S9 mix – summary (6-hour treatment)^{a)}

Dose (µg/mL)	No. cells examined (mean)	Aberrations						PP+ER		No. aberrant metaphase ^{b)}			RCC
		Chromosome type		Chromatid type		Others (mean)	Gaps (mean)	No. (mean)	Decision	+Gaps No. (mean)	-Gaps		
		csb (mean)	cse (mean)	ctb (mean)	cte (mean)						No. (mean)	Decision	
0	100	0	0	0	0	0	1	0	Negative	1	0	Negative	100
	100	0	0	0	0	0	0	0		0	0		
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)		(0.5)	(0.0)		
1250	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	102
	100	0	0	0	0	0	1	0		1	0		
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)		(0.5)	(0.0)		
2500	100	0	0	0	1	0	0	0	Negative	1	1	Negative	104
	100	0	0	0	0	0	0	0		0	0		
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.5)	(0.5)		
5000	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	100
	100	0	0	0	0	0	1	0		1	0		
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)		(0.5)	(0.0)		
800 EMS	100	0	0	7	33	0	2	0	Negative	28	26	Positive	78
	100	0	1	9	32	0	1	0		30	30		
	(100)	(0.0)	(0.5)	(8.0)	(32.5)	(0.0)	(1.5)	(0.0)		(29.0)	(28.0)**		

** Significantly different from the negative control at $P < 0.01$ (Fisher's exact test).

Test article: Oyster enzyme hydrolysate

a) 6-hour treatment – 18-hour recovery.

b) Inclusive/exclusive gaps. 100 metaphases were examined per culture.

PP: Polyploid

ER: Endoreduplication

EMS: Ethylmethanesulfonate (positive control article)

RCC: Relative Cell Counts = (Cell count of treated flask / Cell count of control flask) x 100 (%)

Gaps: Chromosome type + Chromatid type gaps

csb: Chromosome type deletions

cse: Chromosome type exchanges

ctb: Chromatid type deletions

cte: Chromatid type exchanges

Other: Metaphases with more than 10 aberrations (including gaps) or with chromosome fragmentation

Table 3. Chromosome aberration test in the absence of S9 mix – summary (24-hour treatment)^{a)}

Dose (µg/mL)	No. cells examined (mean)	Aberrations						PP+ER		No. aberrant metaphase ^{b)}			RCC	
		Chromosome type		Chromatid type		Others (mean)	Gaps (mean)	No. (mean)	Decision	+Gaps No. (mean)	-Gaps			
		csb (mean)	cse (mean)	ctb (mean)	cte (mean)						No. (mean)	Decision		
0	100	0	0	0	0	0	1	0	Negative	1	0	Negative	100	
	100	0	0	0	0	0	0	0		0	0			0
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)		(0.5)	(0.0)			(0.0)
1250	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	105	
	100	0	0	0	0	0	0	0		0	0			0
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.0)	(0.0)			(0.0)
2500	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	104	
	100	0	0	0	0	0	0	0		0	0			0
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.0)	(0.0)			(0.0)
5000	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	102	
	100	0	0	0	0	0	0	0		0	0			0
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.0)	(0.0)			(0.0)
600 EMS	100	0	1	8	40	0	6	0	Negative	35	33	Positive	71	
	100	0	1	6	43	0	1	0		33	33			Positive
	(100)	(0.0)	(1.0)	(7.0)	(41.5)	(0.0)	(3.5)	(0.0)		(34.0)	(33.0)**			

** Significantly different from the negative control at $P < 0.01$ (Fisher's exact test).

Test article: Oyster enzyme hydrolysate

a) 24-hour treatment – 0-hour recovery.

b) Inclusive/exclusive gaps. 100 metaphases were examined per culture.

PP: Polyploid

ER: Endoreduplication

EMS: Ethylmethanesulfonate (positive control article)

RCC: Relative Cell Counts = (Cell count of treated flask / Cell count of control flask) x 100 (%)

Gaps: Chromosome type + Chromatid type gaps

csb: Chromosome type deletions

cse: Chromosome type exchanges

ctb: Chromatid type deletions

cte: Chromatid type exchanges

Other: Metaphases with more than 10 aberrations (including gaps) or with chromosome fragmentation

APPENDICES

Appendix 1. Cell counts – individual data

Treatment Schedule ^{a)}	S9 mix	Dose (µg/mL)	Cell Counts				Mean	RCC ^{b)} (%)
			Flask A		Flask B			
6 – 18	+	0	8832	8878	8140	8183	8508	100
		1250	7976	7406	7887	7776	7761	91
		2500	8178	8031	8661	8545	8354	98
		5000	8657	8251	7741	7450	8025	94
		B[a]P 20	6181	5910	6057	5943	6023	71
6 – 18	–	0	9775	9457	9700	9806	9685	100
		1250	9746	9498	10274	9841	9840	102
		2500	10993	10944	9376	9129	10111	104
		5000	9779	9662	9681	9516	9660	100
		EMS 800	7805	7683	7502	7409	7600	78
24 – 0	–	0	10444	10054	10058	10413	10242	100
		1250	10341	10115	11279	11391	10782	105
		2500	11406	10744	10303	10238	10673	104
		5000	10862	10777	10254	10011	10476	102
		EMS 600	7368	7290	7206	7110	7244	71
Initial cell count			3787	3653	3995	3795	3808	

Test article: Oyster enzyme hydrolysate

a) Treatment time – recovery time, hours.

b) RCC: Relative Cell Counts = (Cell count of treated flask / Cell count of control flask) × 100 (%)

Initial cell count: cell count of untreated flasks at the start of chemical treatment

Two flasks/dose were used. After harvesting mitotic cells, each culture was trypsinized and suspended with 0.5 mL of 0.1% trypsin and 5 mL of culture medium. The cell suspensions of 0.4 mL/culture was diluted 50 times with 19.6 mL of Isoton[®] sol. The cells in 0.5 mL of Isoton[®] sol. were counted twice/culture using Coulter Counter model Z2.

Actual number of cells per flask = Mean Cell Count × 550.

B[a]P: Benzo[a]pyrene (positive control article)

EMS: Ethylmethanesulfonate (positive control article)

Appendix 2. Historical control data

Chinese Hamster Lung cells, Jan 2006 – Mar 2014.

Negative controls

Treatment schedule ^{a)}	S9 mix	Vehicle	% Aberrant metaphase with structural aberration (range)	N
6 – 18	+	All solvents	0.19 ± 0.47 (0 – 2)	230
		DMSO	0.30 ± 0.58 (0 – 2)	66
	–	All solvents	0.16 ± 0.42 (0 – 2)	226
		DMSO	0.20 ± 0.47 (0 – 2)	66
24 – 0	–	All solvents	0.13 ± 0.39 (0 – 2)	222
		DMSO	0.19 ± 0.54 (0 – 2)	62

a) Treatment time–recovery time, hours.

DMSO: dimethylsulfoxide [67–68–5]

Positive controls

Treatment schedule ^{a)} (articles and concentration)	S9 mix	% Aberrant metaphase with structural aberration (range)	N
6 – 18 (B[a]P, 20 µg/mL)	+	22.68 ± 8.07 (10 – 46)	148
6 – 18 (EMS, 800 µg/mL)	–	20.77 ± 6.81 (9 – 51)	224
24 – 0 (EMS, 600 µg/mL)	–	25.28 ± 10.22 (9 – 67)	220

a) Treatment time–recovery time, hours.

B[a]P: Benzo[a]pyrene [50–32–8]

EMS: Ethylmethanesulfonate [62–50–0]

Appendix 3. Protocol, protocol deviation and protocol amendment



시험계획서

Oyster enzyme hydrolysate의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험

시험번호: 14-VG-180



승인:

이우주 (Signature)
이우주, M.S.
시험책임자
㈜렘온 비임상연구소

2014. 05. 26
날짜

김갑호 (Signature)
김갑호, M.S., Toxicologist
운영책임자
㈜렘온 비임상연구소

2014. 05. 28
날짜

정세영 (Signature)
정세영
의뢰책임자
경희대학교

2014. 05. 30
날짜

1

ORIGINAL
2014년 5월 10일
시험책임자 이우주 (인)

시 험 제 목 Oyster enzyme hydrolysate의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험

시 험 목 적 시험물질 Oyster enzyme hydrolysate가 배양한 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포의 염색체에 구조적 혹은 수적 이상을 유발하는가를 알아보기 위함이다.

시 험 지 침 의약품등의독성시험기준 (제2014-6호, MFDS, 2014 년 01 월 29 일)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG 473 (1997) 'In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test'

시 험 의뢰자 경희대학교
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 약학대학 1 층 113 호,
130-701
02-961-0372 (TEL), 02-961-0372 (FAX)

시 험 기 관 ㈜켄은 비임상연구소
경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 449-826
경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 내, 443-270
031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

시 험 일 정	2014 년 05 월 30 일	세포파종일(실험개시일)
	2014 년 06 월 02 일	시험물질 처리
	2014 년 06 월 03 일	염색체 검체 제작
	2014 년 06 월 19 일	판독완료 예정(실험종료일)
	2014 년 06 월 27 일	최종보고서(안) 제출 예정

주요시험관계자	시험물질 조제/보관:	김 지 훈	자료보관:	정 해 정
	통계분석:	이 민 행	시험담당자:	신 건 국

기록과 자료의 [SOP-AC-001~007]

보 관 시험계획서(변경 및 이탈기록), 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본 및 각종 증거자료는 품목허가일로부터 3 년간 ㈜켘온 비임상연구소에 보관한다. 이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

G L P 대 응 비임상시험관리기준(제2014-67호, MFDS, 2014 년 02 월 12 일)
OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17

시험계획서의 변경 혹은 이탈은 문서로 작성하고, 신뢰성보증부서(QAU)에서 검토 후 시험책임자, 운영책임자 및 시험의뢰자가 승인한다.

㈜켘온 비임상연구소의 신뢰성보증부서는 시험과정 전반에 걸친 정검을 단독으로 행한다.

최 종 보 고 서 [SOP-TO-007]

최종보고서는 시험계획서의 내용을 반영하여 표지, 시험책임자진술서, 신뢰성보증확인서, 목차, 요약, 재료 및 방법, 관찰 및 측정 결과, 고찰 및 결론, 참고문헌 등으로 구성하며, 필요에 따라 사진이나 표, 부표 및 첨부자료 등을 포함하여 작성한다.

1. 시험물질, 부형제 및 양성대조물질

1) 시험물질[SOP-TA-001]

명 칭: Oyster enzyme hydrolysate
 코드번호: C-1390
 제조번호: OP140415
 입 수 일: 2014 년 04 월 22 일
 입 수 량: 20.60 g/tube x 1 tube
 외 관: Powder
 함 량: Tyrosine-alanine 함량 10.7 ~ 13.6 ug/g
 유효일자: 2015 년 04 월 15 일
 보관조건: 실온, 차광, 방습
 공 급 원: 경희대학교

2) 부형제(음성대조물질)

명 칭: 배양액(Minimum Essential Medium, MEM)
 제조번호: 1384833
 보관조건: 냉장(-1~10°C)
 공 급 원: Gibco (Invitrogen Corp.) (제품번호: 41500-034)
 선택이유: 시험물질이 잘 현탁되어 본 부형제를 선택하였다.

3) 양성대조물질

다음과 같이 대사활성계 적용시는 Benzo[a]pyrene (CAS No. 50-32-8, 약칭 B[a]P)를, 대사활성계 비적용시는 Ethylmethanesulfonate (CAS No. 62-50-0, 약칭 EMS)를 사용한다. 이들 양성대조물질은 OECD 가이드라인 TG 473에 제시된 것 중에서 선택하였다.

물질명	공급원	제품번호	로트번호	입수일	보관
B[a]P	Sigma-Aldrich Co. (Supelco)	48564	LB98566V	2013 년 05 월 31 일	11-30°C
EMS	Sigma-Aldrich Co.	M0880	BCBG1395V	2012 년 06 월 12 일	11-30°C

2. 조제시험물질 및 분석

1) 시험물질 조제[SOP-TA-002]

시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용한다. 적량의 시험물질을 칭량하여 부형제를 넣고 최고농도군을 조제하고, 이것을 동일한 부형제로 희석하여 각 농도군을 조제한다. 처리용 시험물질은 처리 직전에 조제한다.

2) 조제시험물질의 분석

조제시험물질의 분석은 시험의뢰자가 실시하고, 분석결과는 최종보고서에 첨부한다.

3) 양성대조물질 조제

B[a]P는 Dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해하여 조제한 원액을 -50°C 이하에 냉동 보관하고, 처리 직전에 해동하여 시험에 사용한다. EMS는 처리 직전 배양액에 용해하여 조제한다.

3. 시험계**1) 시험계 및 선택 이유**

본 시험에는 암컷 Chinese hamster의 폐섬유아세포에서 유래한 CHL/IU 세포주를 사용한다. 이 세포주는 다양한 화학물질을 대상으로 한 유전독성시험에 널리 사용되고 있으며, 염색체 이상의 검출에 적합함이 입증되었다. 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 입수한 것을 사용한다(Cat. No. CRL-1935). ATCC에서 제공한 정보에 의하면 이 세포주의 염색체 modal number는 25 이며, 분열주기는 약 15 시간이다.

2) 배양 조건[SOP-MT-201/204]

배양액은 1 리터용 Minimum Essential Medium (Gibco-BRL #41500-034) 분말배지에 sodium bicarbonate (2200 mg), L-glutamine (292 mg), penicillin-streptomycin 액 (Gibco-BRL #15140-122)을 첨가하여 멸균주사용수로 총 액량을 1000 mL로 조정된 것을 공경 $0.2\ \mu\text{m}$ 의 membrane filter로 여과한 것에 Fetal Bovine Serum (Gibco-BRL #16000-044) 100 mL를 첨가한 것을 사용한다.

세포는 5%의 이산화탄소와 포화 수증기를 함유한 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 항온배양기(Forma 311 및 3111)에서 세포 배양용 플라스크(배양면적 $75\ \text{cm}^2$, Falcon)를 사용하여 배양하며 매 2-3 일 마다 0.1% 트립신액으로 세포를 분리, 계대배양한다.

3) 세포의 장기 보존[SOP-MT-205/211]

장기 보존을 위한 세포는 15% fetal bovine serum (FBS)을 함유한 배양액에 현탁한 것에 10% (v/v) dimethylsulfoxide를 첨가하여 액체질소 내에 냉동보관한다. 해동하여 배양한 세포에 대하여는 증식률 측정, 핵형검사 및 mycoplasma에 의한 오염 여부를 검색한다.

4) 시험물질 처리를 위한 세포 배양

냉동세포를 해동하여 최소한 7 일간 배양 후 시험에 사용한다. 활발히 증식 중인 세포를 트립신으로 분리한 다음 Coulter counter model Z2 (Beckman Coulter)로 mL 당 세포 수를 산출하고, 이를 근거로 배양면적 $25\ \text{cm}^2$ 플라스크당 6×10^4 개의 세포를 5 mL의 배양액에 파종, 약 3 일간 배양한 후 시험물질을 처리한다.

4. 대사활성계

1) S9 및 Cofactor

S9

기원: Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간

공급원: Molecular Toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)

제품번호: 11-01L

로트번호: 최종보고서에 기재

단백질함량: 최종보고서에 기재

보관조건: 냉동보관(-15°C 이하)

Cofactor

명칭: Cofactor-1

공급원: Wako Pure Chem. Ind., Ltd. (Japan)

제품번호: 309-50611

로트번호: 최종보고서에 기재

보관조건: 냉장보관(-1~10°C)

2) S9 mix의 조성(1 mL 기준, 30 % S9, v/v) [SOP-MT-108]

S9 mix는 S9과 cofactor 용액으로 조제하였다. S9 mix의 조성은 8 µmol MgCl₂ · 6H₂O, 33 µmol KCl, 5 µmol G-6-P, 4 µmol NADPH, 4 µmol NADH, 100 µmol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 0.3 mL S9으로 하며, 조제한 S9 mix는 얼음에 채워 사용한다.

5. 시험 방법

1) 처리농도 결정[SOP-MT-206]

본 시험의 처리 농도는 예비시험(시험번호 14-VG-179P)에서 본 시험과 같은 방법으로 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였다. 처리 방법에 따라 다음과 같이 구분하였다.

처리계열-1: 대사활성계 적용 6 시간 처리 - 18 시간 회복(약칭 6+S)

처리계열-2: 대사활성계 미적용 6 시간 처리 - 18 시간 회복(약칭 6-S)

처리계열-3: 대사활성계 미적용 24 시간 처리 - 0 시간 회복(약칭 24-S)

예비시험에서는 5000 µg/mL 을 최고농도로 설정하고 5~5000 µg/mL 범위의 8 단계 시험물질을 처리하였다. 시험물질 처리 개시 및 종료시각에 침전생성 여부, 배양액의 색변화 등을 관찰하였다. 관찰은 육안으로 하였으며, 처리종료시까지 처리액 중에 시험물질 입자가 관찰될 때를 침전으로 판단하였다.

Chemon Study No. 14-VG-180

시험물질 처리개시로부터 약 24 시간 후 플라스크로부터 세포를 분리, 계수하여 얻은 세포 수로 다음 수식에 의해 상대세포수(Relative Cell Count, RCC)를 산출하여 세포독성의 지표로 하였다.

$$RCC = (\text{처리군의 세포수} / \text{음성대조군의 세포수}) \times 100 (\%)$$

예비시험 결과 모든 처리계열의 모든 농도군에서 침전은 생성되지 않았으며 최고농도에서도 RCC 값은 91 % 이상이었으므로, 본 시험에서는 5000 µg/mL 을 고농도로 설정하고 음성(부형제)대조군 및 양성대조군을 포함하여 아래 표와 같이 시험군을 구성하였다.

[처리계획]

Treatment series	Metabolic activation	Treatment time - recovery time (hrs)	Dose of test article (µg/mL)	Positive control and dose (µg/mL)
1	+	6-18	0, 1250, 2500, 5000	B[a]P 20
2	-	6-18	0, 1250, 2500, 5000	EMS 800
3	-	24-0	0, 1250, 2500, 5000	EMS 600

2) 시험의 실시[SOP-MT-207/208/209]

세포배양

배양 면적 25 cm²인 플라스크(Falcon)당 6 × 10⁴ 세포를 5 mL의 배양액으로 파종하여 약 3 일간 배양한다. 농도군당 2 개의 플라스크를 사용한다.

시험계의 구별

플라스크의 측면에 유성펜으로 시험번호, 농도군(코드), S9 mix 처리여부 및 처리시간 등을 기입한다.

시험물질 처리

세포를 처리계열(Series) 1, 2, 3으로 나누어 준비하고, 시험물질 처리 전에 미리 각 플라스크의 배양액을 모두 제거한 후 대사활성계 적응군(계열-1)은 2.2 mL, 비적용군(계열-2 및 3)은 4.5 mL의 배양액을 분주, 1 시간 이상 경과한 후 시험물질을 처리한다. 음성대조군에는 부형제만을 같은 양 처리한다. 처리액 조성은 시험물질 처리액 조성표와 같다.

[시험물질 처리액 조성]

Treatment series	Medium + Test article	S9 mix	Final volume
1	2.2 mL + 300 µL	0.5 mL	3.0 mL
2	4.5 mL + 500 µL	-	5.0 mL
3	4.5 mL + 500 µL	-	5.0 mL

양성대조군에는 30 µL B[a]P (series-1), 400 µL EMS (series-2) 및 300 µL EMS (series-3)를 처리하여 합계액량을 동일하게 조정함.

계열-1 및 계열-2는 처리개시로부터 약 6 시간 경과 후 플라스크로부터 시험물질을 함유한 처리액을 제거하고 5 mL의 Ca²⁺ & Mg²⁺ free Dulbecco's phosphate buffered saline (CMF D-PBS)로 세포층을 1 회 세척한 후 신선한 배양액 5 mL를 가하여 증기세포 수거시까지 계속

배양한다. 계열-3은 세척 없이 중기세포 수거시까지 계속 처리한다. 모든 계열의 처리개시 및 종료시에 침전의 생성 혹은 pH에 따른 배양액의 색변화 등을 관찰한다.

검체 제작

시험물질 처리 개시로부터 약 22 시간 후 모든 플라스크에 50 μ L의 콜히친 액을 처리하여(최종농도 1 μ M) 2 시간 경과 후 진탕법으로 중기세포를 수거한다. 중기세포를 포함한 배양액을 원심분리, 75 mM KCl 액에 의한 저장액처리 및 고정(메틸알콜:빙초산=3:1 v/v)을 거쳐 공기건조법으로 염색체검체를 제작하고 5% Giemsa액으로 염색한다. 검체는 각 플라스크 당 2 매씩 제작한다.

검체 제작 방법의 선택이유

일반적으로 실시되는 방법이며, 이 방법은 중기세포를 고밀도로 얻을 수 있는 장점이 있다.

세포독성의 측정

중기세포 수거 후 플라스크에 남아있는 세포를 트립신 액으로 분리 및 계수하여 FCC 값을 산출한다.

3) 염색체이상의 계수[SOP-MT-210]

계수의 기준

염색체이상의 형태 판별 및 계수는 일본환경변이원학회(JEMS) 포유동물시험분과회(MMS)판 '염색체이상 아틀라스(1988)'에 의한다.

각 플라스크로부터 제작한 2 매의 검체 중 1 매씩을 선택하여 코드화 한 후, 100 개의 분열 중기상(이하 '중기상'이라 함)을 대상으로 1000 배의 배율로 염색체이상을 계수한다.

구조적 이상

동원체 수가 23-27인 중기상에 대하여 동원체 수 및 염색체이상의 유무를 관찰하고, 염색체이상이 관찰되면 이상의 종류와 수 및 슬라이드 상의 위치를 기록한다.

이상은 크게 염색체형 절단 및 교환과 염색분체형 절단 및 교환으로 대별해 계수하며, gap을 포함한 경우와 제외한 경우를 병기한다.

염색체이상이 10 개 이상(gap 포함, multiple aberration) 혹은 단편화(fragmentation)는 '기타'로 분류하여 1 개의 이상으로 계수한다.

수적 이상

이상의 유무에 관계 없이 100 개의 중기상을 계수하면서 동원체의 수에 따라 diploid (23-36 동원체), polyploid (37 \leq 동원체) 및 핵내배화(endoreduplication)로 분류, 그 수를 기록한다.

4) 결과의 표시

농도군당 이상중기상 및 염색체이상의 수는 2 반복의 검체로부터 구한 평균으로 나타낸다.

5) 시험 타당성 기준

다음의 조건을 모두 만족하였을 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정한다.

- (1) 시험물질 처리군의 최소한 3 농도군의 모든 플라스크에서 100 개의 증기상으로부터 염색체이상의 계수가 가능할 것.
- (2) 음성대조군에서 염색체의 구조적 이상(gap 제외)을 가진 증기세포의 빈도가 5 % 미만이며, 양성대조군에서는 이 빈도가 10 % 이상일 것. 이 때 B[a]P 처리군에서 나타난 이상증기상의 분명한 증가는 S9 mix의 활성화에 대한 증거가 됨.

6. 통계학적 방법 및 결과의 평가**1) 통계 분석 프로그램[SOP-CO-001]**

시험 결과의 통계분석에는 SPSS (ver. 10.1K) 프로그램을 사용한다.

2) 구조적 이상[SOP-CO-001]

적어도 1 개 이상의 구조적 이상을 가진 증기상을 이상증기상으로 분류하여 통계처리를 적용하며, gap 만을 가진 증기상은 통계처리 대상에서 제외한다.

음성대조군과 처리군의 자료를 Fisher's exact test로 비교하며, $P < 0.05$ 일 때 통계학적으로 유의한 것으로 판정한다. 기타 통계학적 방법을 사용할 경우 최종보고서에 서술한다.

3) 수적 이상

동원체수 37 이상인 증기상 및 핵내배화를 가진 증기상의 합계에 대하여 구조적 이상의 경우와 같은 방법으로 평가한다.

4) 결과의 평가

시험물질 처리군에서 염색체이상을 가진 증기상의 빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 판정한다. 그러나 통계학적인 유의성을 양성판정의 유일한 근거로 삼지는 않으며, 생물학적 연관성, 이상증기상의 빈도 및 세포증식 억제(세포독성)의 정도 또한 판정에 참조한다.

7. 참고문헌

- 1) Dean and Danford (1984): Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells, in: Mutagenicity testing a practical approach, IRL press Ltd., pp.187-232.
- 2) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni, and K.Yoshikawa (1981): Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens, GANN Monograph on Cancer Res., 27:95-107.
- 3) Japanese environmental mutagen society-mammalian mutagenicity study group (1988): Atlas of chromosome aberration by chemicals
- 4) Koyama, H., T. Utakoji, and T. Ono (1970): A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue, GANN, 61:161-167.

Protocol Deviation Form
(시험계획서 일탈 기록지)

Study Title: Oyster enzyme hydrolysate의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험

Study No.: 14-VG-180

Deviation No.: 1

Date of Deviation: 2014 년 06 월 03 일
(일탈 발생일)

Description of Deviation:
(일탈 내용)

1. 4 페이지 1. 시험물질, 부형제 및 양성대조물질 1) 시험물질 부분의 정보의 변경이 누락되어 일탈되었다.

	변경 전	변경 후
입 수 일	2014 년 04 월 22 일	2014 년 05 월 27 일
입 수 량	20.60 g/tube x 1 tube	60 g/pack x 1 pack

Corrective Action(s):
(조치 사항)

1. 2014 년 05 월 27 일에 입고된 시험물질을 본 시험에 사용하였으나, 시험물질 처리 당일까지 변경기록지가 제출되지 않고 누락되어 일탈기록지를 제출함.

Impact on Study:
(시험에 미치는 영향)

1. 없음.



Confirmed by:

Study Director	이우주	Date	2014. 07. 01
Management	김갑호	Date	2014. 07. 01
Authorized by Sponsor	양세영	Date	2014. 07. 03

Chemon Inc.

ORIGINAL
2014년 7월 1일
시험책임자 이우주

TO-006-S04

Protocol Amendment Form
(시험계획서 변경 기록지)

Study Title: Oyster enzyme hydrolysate의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험

Study No.: 14-VG-180

Amendment No.: 1

Amendment to the Protocol:
(변경 내용)

1. Page 4, 1.1) 시험물질 함량을 다음과 같이 변경한다.

	변경 전	변경 후
함 량	Tyrosine-alanine 함량 10.7 ~ 13.6 ug/g	tyrosine-alanine 평균 0.13 %

Reason for the Amendment:
(변경 사유)

1. 시험의뢰자가 제공한 정보의 내용을 반영한다.



Impact on Study:
(시험에 미치는 영향)

1. 시험에 미치는 영향 없음

Approved by:

Study Director	<u>이 우 조</u>	Date	<u>2014. 10. 21</u>
Management	<u>김 갑 호</u>	Date	<u>2014. 10. 21</u>
Authorized by Sponsor	<u>정 세 영</u>	Date	<u>2014. 10. 22</u>

Chemon Inc.

TO-006-S03

ORIGINAL
2014년 10월 23일
시안측단장 이우조

Appendix 4. Certificate of analysis

시험성적서
경희대학교 약학대학

품 명	Oyster enzyme hydrolysate	제조번호	OP140415
제조일자	2014.04.15	시험일자	2014.04.20
		유효일자	2015.04.15

시험항목	시험기준	결과
성 상	powder	적합
확인시험	HPLC	적합
함량시험	tyrosine-alanine 함량	0.10~0.15% (평균 함량: 0.13%)
불용성이물검사	육안으로 보이는 이물질이 없어야 함	적합

판정	적합
시험 담당자	장영표 (서명)

Appendix 5. Result of dose formulation analysis

문서번호 Document No.	
PV-0008	
<h1>시험 성적서</h1> <h2>Analysis Certificate</h2>	
시험분석 의뢰기관: Requested by	
(주) 케온	
시험분석 대 상: Sample	
굴 가수분해 조제물 (14-VG-180)	
시험분석 책임자: Principal Investigator	
정 세 희	
경희대학교 약학대학 생약학실 Division of Pharmacognosy College of Pharmacy, Kyung Hee University Seoul, Korea 130-701	날짜 Date : 2014. 07. 30 Lab. Manager : 장 영 표 Young Pyo Jang 

굴 가수분해물 조제시험물질의 검증시험

시험물질, 표준물질 및 부형제

(가) 시험물질

- ① 조제농도: 12.5mg/mL, 25mg/mL, 50mg/mL
- ② 시험(로트)번호: 14-VG-180
- ③ 조제일: 2014.06.02
- ④ 입수량: 40ml
- ⑤ 외관 및 성상: 황토색의 현탁액
- ⑥ 시험물질명: Oyster enzyme hydrolysate
- ⑦ 시험물질로트: OP140415
- ⑧ 보관조건: 냉장보관
- ⑨ 공급원: 캡은
- ⑩ 부형제: 배양액 (Minimum Essential Medium, MEM)

(나) 표준물질

- ① 명칭: tyrosine-alanine
- ② 제조(로트)번호: T5129
- ③ 입수일: 2013.06.10
- ④ 입수량: 50mg
- ⑤ 외관 및 성상: white powder
- ⑥ 순도: 99.9%
- ⑦ 보관조건: 냉동
- ⑧ 공급원: Aldrich

1. 실험재료

1.1 시료

실험에 사용된 글 가수분해물은 주식회사 켐온으로부터 제공받아 사용하였고, 실험에 사용된 표준품의 순도는 tyrosine alanine 99.9%를 사용하였다.

1.2 사용기기

사용한 HPLC는 Waters HPLC로 Empower software를 통해 크로마토그램 데이터를 처리하였다. 분석에는 Atlantis T3 C18 column (4.6 x 250 mm i.d. 5 µm, waters, Massachusetts, USA)를 사용하였다.

1.3 시약 및 재료

HPLC용 용매는 HPLC grade용매 (Fisher, South Korea)를 0.45 µm PTFE filter (ADVANTEC, USA)로 여과한 후 사용하였으며 그 외에 trifluoroacetic acid (sigma aldrich, USA)는 분석용 1급 시약을 사용하였다. 초순수는 ABBOTA NEO 1으로 제조하여 18 MΩ 이상을 사용하였다.

1.4 HPLC 조건

Device	Waters 717autosampler, 600controller, 2487detector
Column	Atlantis T3 C18 column (4.6 x 250 mm i.d. 5 µm, waters, USA)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	220 nm
Column temp.	25 °C
Mobile phase	solvent A: CH ₃ CN (0.1% trifluoroacetic acid) solvent B: H ₂ O (0.1% trifluoroacetic acid)
Gradient condition	A:B=4:96

1.5 이동상 및 표준용액

① CH₃CN (0.1% trifluoroacetic acid)

trifluoroacetic acid 1ml 을 1000ml 의 Acetonitrile 에 넣은후, 0.45µm 필터로 여과 하였다.

② H₂O (0.1% trifluoroacetic acid)

trifluoroacetic acid 1ml 을 1000ml 의 Water 에 넣은후, 0.45µm 필터로 여과 하였다.

③ 표준용액

㉞ 보관용 표준용액

표준물질 20mg 을 1ml 의 water 에 녹이고, 냉장고에 보관하였다.

㉟ 상용 표준용액

보관용 표준용액을 water 로 희석하여 200, 100, 50, 20, 10µg/ml 로 조제하였다.

2. 분석법 검증

2.1 특이성

특이성은 부형제(0.1%) 중 내인성 방해물질의 존재를 chromatogram 으로 평가하였다.

2.2 직선성

분석법 검증 기간 동안 상용표준용액을 분석하고, 피크 면적으로 검량선을 작성하였다.

직선성은 결정계수(0.99 이상)와 회귀방정식으로 역산출한 농도에 대한 각 표준물질의 이론 농도에 대한 상대오차로 평가하였다. (90~110%이내)

2.3 정확성과 정밀성

정확성과 정밀성은 일내, 일간 상대오차와 변동계수를 평가하였다. 일내 정확성과 정밀성 평가를 위해 시료(10, 20, 50, 100, 200 μ g/ml)를 3 회(n=3)분석하였고, 일간 정확성과 정밀성은 3 배치를 분석하여 평가하였다. 허용기준은 상대오차는 90~110%이내, 변동계수 10%미만으로 하였다.

2.4 안정성

2.4.1 실온안정성

표준용액을 실온에서 약 4 시간 방치 후 분석하였다. 실온안정성은 상대오차로 평가하였다. (95~105%이내)

2.4.2 자동주입기 안정성

상용 표준용액을 자동주입기에서 하룻밤 동안 방치 후 분석하였다. 자동주입기 안정성은 상대오차로 평가하였다. (95~105%)

2.5 조제시험물질 분석

2.5.1 조제시험물질의 운송 및 보관

(주)캠온 경기바이오연구소에서 경희대학교로 운송하고 이후 실험이 종료되는 기간까지 냉장 보관 하였다.

2.5.2 시료의 채취

조제시험물질 튜브 외부에 유성매직으로 표선을 만들고, 조제당일에는 상, 중, 하층에서 채취하고, 4 및 7 일째에는 중층에서만 채취하였다. 조제시험물질은 시험물질 조제당일과 조제 후 4 및 7 일째로 총 3 회 채취하였다.

3. 결과

(1) 분석법 검증

1.1 특이성

부형제가 포함된 조제시험물질에서 내인성인자가 관찰되어 함량균질성 시험을 진행하는데 내인성인자를 고려하여 측정하였다.

Figure 1. Chromatogram of vehicle (a), standard (b, 0.1 mg/mL), QC (c, 12.5 mg/mL)

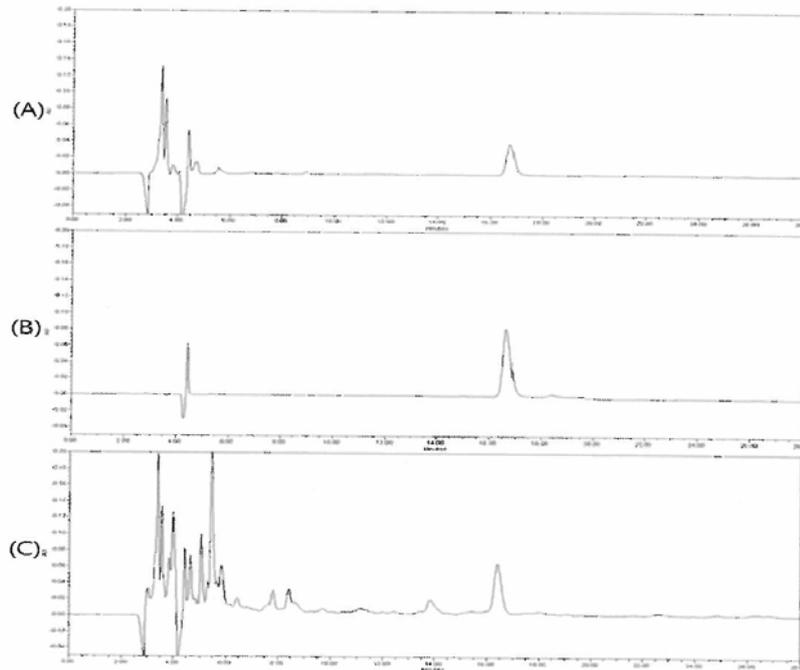


Table 1. Content of tyrosine-alanine in oyster peptide

Replicate	Peak area ratio	Measure conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Sample WT.	Content(mg/g)
1	968980	52.92	40mg	1.32
2	980989	53.58	40mg	1.34
3	920439	50.25	40mg	1.26
4	937436	51.19	40mg	1.28
5	905452	49.43	40mg	1.24
6	913491	49.87	40mg	1.25
			Mean	1.30
			SD	0.04
			RSD	2.95

1.2 직선성

Tyrosine-alanine의 농도와 기기적 감응의 상관계수(r)는 0.999, 상대오차는 95~105%사이였으며, 10~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$)의 농도범위에서 직선성을 나타내었다.

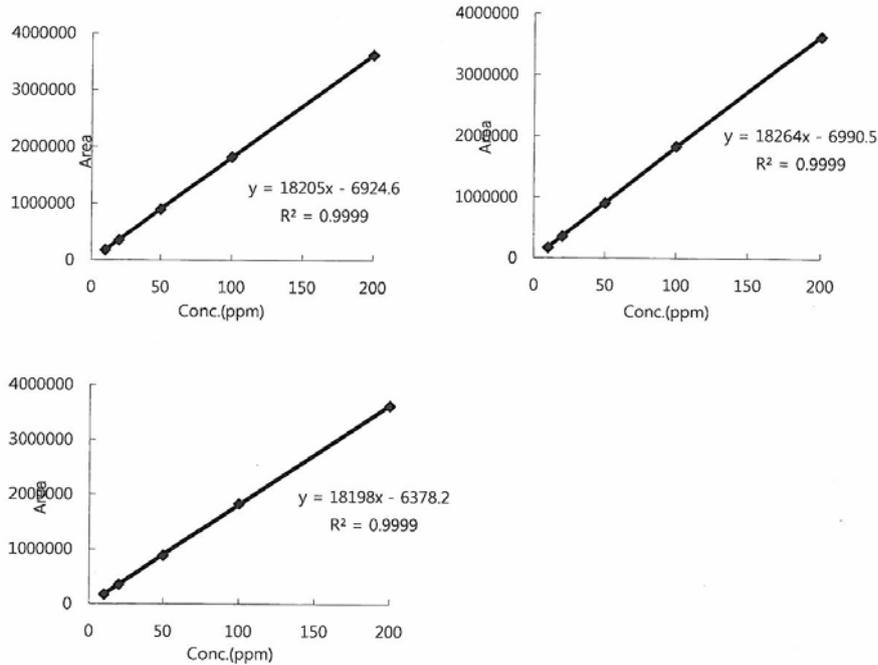


Figure 2. Calibration of tyrosine-alanine in the range of 10~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by HPLC

1.3 정확성과 정밀성

일내, 일간 상대오차는 분석법의 정확성 및 정밀성을 측정한 결과, 모두 검증기준을 충족시키는 결과를 나타내었다. 투여시험물질은 0(부형제 대조군), 12.5, 25, 50mg의 용량으로 조제하였다. 글 가수분해물 1g중 tyrosine-alanine의 표시량은 1.30 mg/g으로 결정되었다. (Table 1) 조제된 투여시험물질은 시료의 채취부위에 상관없이 균질성을 나타내었으며 부형제로 조제된 글 가수분해물은 냉장보관조건에서 7일간 안정성이 확보되었다.

검량선은 최소자승법을 이용하여 회귀식의 기울기, 절편 및 상관계수를 구하였으며, 각 농도에서 역-환산된 측정값의 상대오차는 전체 정량범위에서 -0.94~0.91%로서 직선성의 기준을 충족하였다. (Table 2)

정밀성은 QC시료의 분석을 통하여 측정된 tyrosine-alanine의 농도 값에 대한 변동계수(CV)값으로 평가하여 정밀성은 0.05~1.58% ($n=9$)이었다. 정확성은 QC시료의 분석을 통하여 측정된 tyrosine-alanine의 농도 값의 상대오차 값으로 평가하여 정확성은 -1.27~11.53% ($n=9$)로서 $\pm 15\%$ 이내의 RE값을 허용하는 정확성의 기준을 충족하였다. (Table

3,4)

Table 2. Linearity of calibration curves of tyrosine-alanine in the range of 10~200 $\mu\text{g/mL}$

Replicate	Concentration($\mu\text{g/mL}$)					Curve parameters		
	10	20	50	100	200	Slope	intercept	R ²
1	10.13	19.76	49.77	100.54	199.81	18205	-6924.6	0.9999
2	9.75	19.90	49.90	100.79	199.65	18264	-6990.5	0.9999
3	9.98	19.98	49.33	101.07	199.63	18198	-6378.2	0.9999
Mean	9.97	19.91	49.75	100.60	199.70	18222	-6764.43	1.00
SD	0.16	0.11	0.29	0.26	0.10	36.25	336.11	0.00
CV(%)	1.58	0.56	0.59	0.26	0.05			
RE(%)	-0.34	-0.45	-0.50	0.60	-0.15			

Table 3. Precision and accuracy of the method in the range of 10~200 $\mu\text{g/mL}$

Replicate	Concentration($\mu\text{g/mL}$)			
		25	50	100
Day 1	1-1	35.17	51.39	96.16
	1-2	28.43	51.88	92.80
	1-3	33.35	50.53	97.82
	Mean	32.32	51.27	95.60
	SD	3.49	0.68	2.56
	RSD	10.80	1.33	2.67
Day 2	2-1	34.27	61.50	104.61
	2-2	35.05	56.84	95.45
	2-3	35.02	61.66	104.01
	Mean	34.78	60.00	99.22
	SD	0.44	2.74	5.98
	RSD	1.27	4.56	6.03
Day 3	3-1	37.41	60.48	103.87
	3-2	39.63	63.81	106.34
	3-3	36.90	62.13	106.58
	Mean	37.98	62.14	105.60
	SD	1.45	1.67	1.50
	RSD	3.83	2.68	1.42
Inter day Mean		35.03	57.80	100.14
	SD	2.84	5.76	5.06
	RSD	8.10	9.97	5.06

Table 4. Recovery of marker compounds through standard addition ($n=3$)

Day	Fortified content($\mu\text{g/ml}$)	Observed content (ng)	Recovery mean	Recovery SD	Recovery RSD (%)
Day 1	25	32.31 \pm 3.49	124.88	14.40	11.53
	50	51.26 \pm 0.68	102.53	1.37	1.33
	100	95.59 \pm 1.34	95.60	2.56	2.67
Day 2	25	34.78 \pm 0.44	139.13	1.77	1.27
	50	60.00 \pm 2.73	120.00	5.47	4.56

	100	99.22±5.98	99.22	5.98	6.03
Day 3	25	37.97±1.45	151.92	5.81	3.83
	50	62.14±1.66	124.28	3.33	2.68
	100	105.59±1.50	105.60	1.50	1.42

(2) 함량 균질성

시험물질에 대하여 3회의 분석을 수행하여 굴 가수분해물 중 tyrosine-alanine의 함량을 측정된 결과, 굴 가수분해물 1g중 tyrosine-alanine의 표시량은 1.30 mg/g을 함유하는 것으로 나타났다.

위에서 설정된 표시량에 따라 계산된 각 투여시험물질 중 굴 가수분해물의 함량은 12.5mg, 25mg 및 50mg 군에서 각각 194.64%, 160.48% 및 134.73% 를 나타내었다. 이는 15%이내를 허용하는 투여시험물질의 함량기준을 다소 상회하였다.

투여시험물질의 함량 균질성은 튜브의 세 부분(상, 중, 하)에서 시료를 채취하고 분석하여 얻은 함량에 대한 변동계수로서 평가하였다. 그 결과 세가지 농도의 CV값은 각각 0.81, 2.79 및 1.87 %였으며, 이 값은 15% 미만의 허용기준을 충족하였다.

함량시험은 투여시험물질을 조제 후 7일간 냉장보관 후 측정된 결과로서, 굴 가수분해물은 약 4℃의 냉장보관조건에서 7일간 안정성을 확보할 수 있었다.

Table 5. Content uniformity of oyster peptide

Dose	Sampling position	Peak area ratio	Measured Content (µg/mL)		Assay (%)	CV (%)
			each	mean		
12.5mg/ml	Top	1344997	31.47	31.63	194.64	0.81
	Middle	1359962	32.32	0.63		
	Bottom	1338586	31.10			
25mg/ml	Top	1757498	55.07	52.16	160.48	2.79
	Middle	1663006	49.67	2.73		
	Bottom	1699043	51.73			
50mg/ml	Top	2407895	92.30	87.57	134.73	1.87
	Middle	2421383	93.07	8.86		
	Bottom	2338247	88.31			



일반 계 21673 호

시 험 성 적 서

검 체 명	글렙타이드 LOT 1						
시 험 항 목	YA함량 외 12항목						
의뢰인주소및성명	충청북도 음성군 갑곡면 행군이길 87-17 (주)파마킹 김완택						
시 험 의뢰 목 적	참고용	제조일자		유통기한		접수일자	2014.12.04

귀하가 우리 연구소에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

성 적 :

외관	갈색 분말
YA함량(%)	0.09
수분(%)	6.2
열량(kcal)	413.3(100g당)
탄수화물(%)	19.3
회분(%)	7.1
조단백질(%)	54.1(질소계수 6.25)
조지방(%)	13.3
나트륨(mg/100g)	1,913.20
비소(mg/kg)	4.28
납(mg/kg)	1.00
카드뮴(mg/kg)	3.41
수은(mg/kg)	불검출
대장균군	음성 끝.

2015년 01월 02일

한국식품연구소장



이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.

일반 계 21674 호

시 험 성 적 서

검 체 명	글렙타이드 LOT 2				
시 험 항 목	YA함양 외 12항목				
의뢰인주소및성명	충청북도 음성군 갑곡면 행군이길 87-17 (주)과마킹 김원배				
시 험 의 의 목 적	참고용	제조일자	유통기한	접수일자	2014. 12. 04

귀하가 우리 연구소에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

성 적 :

외관.....	갈색 분말
YA함양(%).....	0.10
수분(%).....	6.0
열량(kcal).....	408.6(100g당)
탄수화물(%).....	20.8
지방(%).....	7.1
조단백질(%).....	53.9(질소계수 6.25)
조지방(%).....	12.2
나트륨(mg/100g).....	1,908.02
비소(mg/kg).....	4.60
납(mg/kg).....	1.02
카드뮴(mg/kg).....	3.12
수은(mg/kg).....	불검출
대장균군.....	음성 결과

2015년 01월 02일

한 국 식 품 연 구 소 장



이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의외목적 이외의 상품선전용·상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.



일반 제 21675 호

시 험 성 적 서

검 세 명	글루타이드 LOT 3				
시 험 항 목	YA함량 외 12항목				
의뢰인주소및성명	충청북도 음성군 감곡면 행군이길 87-17 (주)파마킹 김완재				
시 험 의뢰 목 적	참고용	제조일자	유통기한	접수일자	2014. 12. 04

귀하가 우리 연구소에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

성 격 :

외관.....	감색 분말
YA함량(%).....	0.09
수분(%).....	5.9
열량(kcal).....	407.1(100g당)
탄수화물(%).....	21.0
지방(%).....	7.2
조단백질(%).....	54.0(질소계수 6.25)
조지방(%).....	11.9
나트륨(mg/100g).....	1,923.26
비소(mg/kg).....	4.51
납(mg/kg).....	1.08
카드뮴(mg/kg).....	3.44
수은(mg/kg).....	불검출
대장균군.....	음성 검.

2015년 01월 02일

한 국 식 품 연 구 소  장

이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.

인체적용시험 결과 보고서

굴 가수분해물의 혈압강하 효과 평가를 위한 유효섭취용량
설정 인체적용 시험

2014년 7월

(주)파마킹

본 시험결과 보고서는 (주)파마킹과 경희대학교병원 임상약리학과와 공동으로 기밀 서류입니다. 수용한다는 것은 공개적으로는 가용하지 않으나 여기에 포함되어 있는 정보를 본 시험을 보고하기 위한 심사위원회(IRB) 또는 윤리위원회에서의 사용을 제외하고는 누설하지 않겠다는 데 대한 동의를 의미합니다. IRB에게는 비밀의 유지가 요구되며 또 기대됩니다. (주)파마킹의 동의 없이는 본 자료를 전체 또는 부분적으로 사용하거나 발표할 수 없습니다.

인체적용시험 확인서

인체적용시험 제목: 굴 가수분해물의 혈압강하 효과 평가를 위한 유효섭취용량 설정 인체적용 시험 (A clinical study for hydrolysates of oyster: Dose-finding Study)

프로토콜 번호: OYH-01

시험 식품: 굴 가수분해물

인체적용시험 의뢰자: (주)파마킹

본 인체적용시험은 “의약품임상시험관리기준” (KGCP, 식약처 고시 제 2009-211호, 2009.12.22)을 준수하여 시행되었으며 그 결과 최종 인체시험보고서를 (주)파마킹과 경희대학교 산학협력단에 제출하는 바입니다. 경희대학교병원에서 수행된 본 시험의 보고서 내용에 대하여 인체적용시험 책임자로서 확인 합니다.

2014년 7월

연구책임자: 임성빈 교수
경희대학교병원 임상약리학과

일시: 2014년 7월 28 일

서명 : 임 성 빈 _____(인)

❖ 인체적용시험 요약

인체적용시험 의 명 칭	굴 가수분해물의 혈압강하 효과 평가를 위한 유효섭취용량 설정 인체적용 시험
인체적용시험 책 임 자	경희대학교병원 임상약리학과 임성빈 교수
공 동 연 구 자	경희대학교 약학대학 정세영 교수
시 험 담 당 자	경희대학교병원 가정의학과 원장원 교수
인체적용시험 실 시 기 관	경희대학교병원, 서울시 동대문구 경희대로 23
인체적용시험 의 목 적	고혈압 전단계 증상을 가진 건강인을 대상으로 굴 가수분해물의 혈압강하 효과와 안전성을 확인하는 것을 목적으로 하며 향후 시험의 용량 설정을 목적으로 함.
시 험 설 계	단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험
대 상 자 수	최종 평가가능 예수 30 예 (시험식품군: 20명 (용량별 2군) 및 대조식품군: 10명)
연 구 대 상	문맹자를 제외한 만 20세 이상 70세 미만의 남성 및 여성으로 안정 시 좌위에서 측정된 혈압이 수축기 혈압이 120-139 mmHg이고 이완기 혈압이 80-89 mmHg 인 정상인
시험대상자의 선 정 기 준	<p><선정 기준> (대상시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 문맹자를 제외한 만 20세 이상 70세 미만의 남성 및 여성 2) 고혈압 전단계인 정상인(안정시 좌위에서 측정된 수축기 혈압이 120-139 mmHg이고 이완기 혈압이 80-89 mmHg인 자) 3) 인체적용시험동의서에 서면 동의한 자
시험대상자의 제 외 기 준	<p><제외 기준> (다음 조건의 어느 하나라도 해당되는 시험대상자는 본 연구에 참여할 수 없다.)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 굴 및 기타 해산물에 과민증 또는 그 병력이 있는 시험대상자 2) 3개월 이내 또는 현재 알코올중독으로 치료 중이거나 갑상선 기능 이상으로 치료중인 자 3) 뇌종양, 수두증이 있거나 있었던 자 혹은 3개월 이내에 호르몬 대체요법을 시행했거나 시행중인 자 4) 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 또는 폐질환이 있는 시험대상자

	<p>5) 심한 신기능 장애 나 간 기능장애가 있는 시험대상자 (serum creatinine > 2.0 mg/dl, ALT, AST, alkaline phosphatase > 정상 상한치 × 2.5)</p> <p>6) 혈당강하제로 혈당조절이 어려운 경우 (혈당강하제를 복용하고 있음에도 불구하고 공복혈당 160이상)와 혈소판(15만/mm³ 이하), 백혈구(3000/mm³ 이하), 혈색소 수치(남자 9.5g/dL, 여자 9.0g/dL)이하 인 시험대상자</p> <p>7) 최근 3개월 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제 등을 복용하였거나 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 기능성식품 등을 복용한 경험이 있거나 3개월 내 기타 인체적용시험에 참여한 경험이 있는 시험대상자</p> <p>8) 6개월 내 외과적 수술을 받았거나 1개월 내 금지된 치료(침술이나 혈압 강하 목적의 치료 또는 건강식품, 한약 또는 남용우려 있는 약물 투여)를 받고 있는 자</p> <p>9) 위 절제술 등 약물의 흡수에 영향을 줄 수 있는 수술을 한 시험대상자</p> <p>10) 임산부, 수유부 및 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임여성</p> <p>11) 최근 1개월 이내에 혈압강하제 복용자, 다른 시험식품이나 시험약품을 복용한 경험이 있는 시험대상자</p> <p>12) 최근 2개월 이내에 헌혈을 한 시험대상자 또는 1개월 이내에 성분 헌혈을 한 시험대상자</p> <p>인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 시험대상자</p>
시험식품명	굴 가수분해물 (1캡슐 125 mg)
대조식품명	대조식품
투여방법 및 투여기간	시험식품은 하루에 굴 가수분해물 (PMK-HF01)을 군당 500mg 및 750 mg (125 mg 4캡슐, 아침, 저녁 식후 30분에 2캡슐씩(위약 1캡슐씩 포함) 또는 125 mg 6 캡슐, 아침, 저녁 식후 30분에 3캡슐씩)을 6주간 경구 투여하였다.
시험기간	2013년 11월 20일 첫 시험대상자를 스크리닝 한 후, 각 시험대상자별로 총 8 (스크리닝 2주, 약제투여기간 6주)가 소요 되었으며 전체 30명의 대상 지원자에 대한 시험은 2013년 11월 20일부터 2014년 3월 18일에 종료되어 전체 시험이 종료되기까지 4개월이 소요되었다.
평가방법	<p><u>유효성 (Functionality)</u></p> <p>① 1차 기능성 평가 (Primary endpoint):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Baseline 대비 수축기 및 이완기 혈압 강하 정도 <p>② 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Baseline 대비 혈중 angiotensin I, II의 변화율

안전성 (safety)

- 시험식품 투여 전과 투여 6주 후에 심전도 검사, 실험실적 검사, 활력징후 측정, 이학적 검사 진행을 실시하였고 시험식품 투여 2주 후에는 전화 문진을 통하여 이상반응을 평가하고 연구기간 내내 이상반응을 평가하였다.

목 차

1. 인체적용시험의 명칭7

2. 서론7

3. 시험 방법7

3.1 인체시험의 윤리적 수행7

3.2 시험 제품8

3.3 시험 흐름도8

3.4 시험 절차9

3.5 통계분석 방법 10

4. 시험대상자의 기초정보 12

4.1 시험대상자의 기초정보..... 12

5. 유효성분석 결과 14

5.1 시험 전후 유효성 평가변수 14

5.2 시험 후 유효성 평가변수..... 14

6. 유효성분석의 결론 16

7. 안전성분석 결과 16

7.1 이상반응 발생현황 16

7.2 실험실 검사결과 17

7.3 안전성 분석의 결론 24

8. 향후 시험의 용량 결정을 위한 추가적인 분석..... 24

9. 결론 26

10. 고찰 27

11. 참고문헌..... 27

1. 인체적용시험의 명칭

굴 가수분해물의 혈압강하 효과 평가를 위한 유효섭취용량 설정 인체적용 시험

2. 서론

굴은 우리나라에서 널리 섭취하는 해산물로 콜레스테롤 개선 (타우린 성분), 빈혈예방 (철분 함유), 피부미용 등에 효능을 가지고 있는 것으로 알려지고 있다.

본 연구팀은 굴의 가수분해물에서 혈압강하 효과를 갖는 펩타이드 성분을 추출하고 이를 건강기능성 식품으로 개발하고자 아래와 같은 실험을 수행하였다.

굴을 Protamex와 Neutrase라는 가수분해효소로 처리한 분해산물의 분획을 추출하여 angiotensin converting enzyme (ACE)에 대한 저해활성을 갖는 10 kDa 이하의 분획을 평가하여 ACE 저해 IC50 값이 우수한 K-Y, Y-A, A-F-Y, M-C 등의 펩타이드를 확인하였다. 굴 가수분해물의 최종 지표성분으로 K-Y, M-C 및 Y-A 펩타이드를 확립하고 SEP-Pak 및 MS를 이용한 검출 방법을 수립하였다.

굴의 혈압강하 효과를 증명하기 위하여 선천성 고혈압 쥐 (SHR, spontaneous hypertensive rat)에서 굴의 총가수분해물과 10 kDa 이하의 분획물을 100mg/kg의 농도로 단회 투여한 결과 9시간 이후부터 33~38%의 혈압저하능을 보였다. K-Y, M-C 및 Y-A의 경우 50µg/kg의 농도에서 각각 17, 34, 24%의 혈압강하 효능 보였다.

캠온에서 수행한 “Oyster enzyme hydrolysate의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험”에서 독성을 나타내지 않아 굴의 가수분해물이 안전함을 확인하였다.

이에 본 연구팀은 굴 가수분해물의 혈압강하 효과를 평가하기 위한 인체적용시험의 예비시험으로 굴 가수분해물의 투여 용량을 500mg/day, 750mg/day로 하여 대조식품군과 비교하여 인체적용시험을 진행하였다.

3. 시험 방법

3.1 인체적용시험의 윤리적 수행

본 인체시험은 가장 최근에 개정된 헬싱키 선언과 ICH guideline 및 식품의약품안전처의 의약품임상시험관리기준에 따라 수행되었다. 본 인체시험의 시험계획서, 시험대상자 동의서 및 기타 인체시험과 관련된 모든 사항은 2013년 9월 25일 경희대학교병원 임상시험심사위원회(IRB)의 승인을 취득한 이후에 실시 되었다(KMC IRB 1330-03).

시험대상자는 시험에 참여하기 전 준비된 시험대상자 설명문에 따라 임상시험 전반에 관한 설명을 들은 후 서면 동의서를 작성하였다. 설명문에는 임상시험의 목적 및 방법, 예측 효능 및 효과, 이상반응, 위험성, 피해 발생시 보상 및 치료대책, 자료의 비밀보장 등의 내

용이 포함되었다. 또한 본인의 자발적인 의지에 의해 시험에 참여하며, 참여에 동의한 후 언제든지 동의를 철회할 수 있다는 점과 이에 관련된 불이익을 받지 않는다는 점을 명시하였다. 서면 동의서를 작성한 시험대상자에 한하여 시험이 진행되었다.

3.2 시험제품

인체적용시험에 사용된 굴 가수분해물은 우수건강기능식품 제조기준 (GMP) 적용 업소인 ㈜파마킹에서 제조하였으며 250 mg 캡슐로 제작되어 인체적용시험에 사용하였다.

3.3 시험 흐름도 <표 1>

시험은 다음과 같은 절차에 의하여 수행되었다.

	스크리닝	치료기간			F/U ⁹⁾ 필요시
	Visit 1	Visit 2	전화문진 ⁸⁾	Visit 3	
	(평가일: 방문예정일 ± 5일) -14일 ~ -1일	0일 (0주)	2주 (14일)	6주 (42일)	
시험대상자 동의	○				
인구학적 조사 ¹⁾	○				
활력징후 ²⁾	○	○		○	○
신체검사 ³⁾	○				
생활습관 조사 ⁴⁾		○		○	
병력 및 동반질환	○				
이학적 검사	○	○		○	○
심전도 검사	○			○	○
실험실적 검사 ⁵⁾	○	○		○	○
임신여부 검사(가임기 여성) ⁶⁾	○	○		○	○
선행/병용 약물	○	○		○	○
이상반응			○	○	○
시험대상자 선정 ⁷⁾	○				
무작위 배정		○			
인체적용시험용 식품 처방		○			
복약 순응도 평가				○	

1. 인구학적 조사: 생년월일, 성별 등을 조사한다.
2. 활력징후: 체온, 혈압, 맥박수를 측정하며, 혈압과 맥박수는 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 동일한 혈압계를 사용하여 측정한다.
3. 신체검사: 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용하며, 신장은 신을 벗고 cm 단위로 측정하며 방문1에서만 측정한다.
4. 생활습관조사: 방문 2와 방문 4에서만 시행하며, 시험대상자의 흡연, 음주, 식사, 운동 습관에 대하여 조사한다.
5. 실험실적 검사: 시험대상자는 채혈하기 전 최소 8시간 이상 금식한 상태로 내원해야 한다. 단 방문 1 이전 2주 이내에 본원에서 실시한 실험실적 검사결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 방문 1에서 시행해야 할 검사 항목 중 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있다. 방문 2에서는 angiotensin I, II를 검사한다.

 <방문 1 검사 항목>

 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelet

 혈액생화학적 검사: BUN, Albumin, Total bilirubin, AST, ALT, r-GT, Triglyceride, Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol,

 Creatinine, Alkaline phosphatase, glucose

 소변검사: pH, Protein, Glucose, RBC, WBC, Specific gravity, HCG (가임 여성인 경우)

 <방문 2 검사 항목>

 angiotensin I, angiotensin II

 <방문 3 검사 항목>

 방문 1과 2의 검사를 모두 실시한다.
6. 임신여부검사: 실험실적 검사의 일환으로 시험대상자 중 임신가능성이 있는 경우에 한하여 매 방문 시 임신여부를 확인한다.
7. 시험대상자 선정: 활력징후, 신체검사, 생활습관 조사, 이학적 검사, 심전도 검사, 실험실적 검사 등에서 선정기준에 적합한 시험대상자를 시험대상자로 선정한다.
8. 전화문진: 복용 시작 2주 후 전화 문진을 통하여 인체적용시험용 식품 복용 후의 이상반응을 조사한다.
9. F/U: 인체적용시험용 식품 투여종료 후 혹은 중도탈락 후 비정상적인 실험실 결과나 비정상적인 심전도 검사 결과, 계속되는 이상반응 등 시험자 판단에 따라 추적관찰이 필요하다고 여겨지는 경우에 따라 실시하며 심전도 검사의 경우 종료방문 후 심전도 검사 결과 이상이 있는 경우에 한하여 시행하도록 한다.

3.4 시험절차

본 인체적용시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 평행 인체시험으로 주 목적은 굴 가수분해물을 하루에 500 mg 및 750 mg (아침저녁 식사 30분 후 2 캡셀 (위약 1캡셀 포함) 또는 아침저녁 식사 30분 후 3 캡셀)을 6주 동안 경구 투여하였을 때의 혈압강하와 관련된 가능성을 평가하려는 것이다.

연구대상은 문맹자를 제외한 만 20세 이상 70세 미만의 남성 및 여성으로 고혈압 전단계인 정상인(안정시 좌위에서 측정한 수축기 혈압이 120-139 mmHg이고 이완기 혈압이 80-

89 mmHg인 자)을 대상으로 하여 각 군당 10명을 목표로 진행하였다.

2013년 11월 20일에 첫 시험대상자 스크리닝을 시작하여 2014년 3월 18일에 종료되어 전체 시험이 종료되기까지 GCP 기관인 경희대학교병원 가정의학과를 방문한 33여명의 시험대상자 중 선정제외기준에 적합한 시험대상자 30명을 선정하여 6주간의 투여 기간을 갖는 무작위, 전향적 연구를 수행하였다.

스크리닝 검사를 통하여 (안정시 좌위에서 측정한 수축기 혈압이 120-139 mmHg이고 이완기 혈압이 80-89 mmHg) 시험대상자가 시험요건에 적합한지를 판단하였다. 선정 제외기준에 따라 시험대상자로 적합하다고 판단된 경우 randomization 기법에 의하여 대조식품군, 굴 가수분해물 500 mg 투여군과 굴 가수분해물 750 mg 군으로 무작위 배정하여 시험을 수행하였다. 중도에 탈락하는 경우를 감안하여 인체적용시험용 제품을 공급하였고 목표 시험대상자수인 30명에 도달하면 나머지는 고려하지 않았다. 인체적용시험연구자가 시험 전 스크리닝 평가를 통해 본 인체시험의 시험대상자를 선정한 후 무작위로 2개의 시험식품군 또는 대조식품에 배정한 다음 선정된 대상시험대상자는 컴퓨터에서 추출된 난수표를 근거로 하여 세 군의 시험대상자수가 동일하도록 만든 무작위코드에 따라 세 군 중의 한 군에 방문일(Day 0) 순서대로 낮은 번호부터 할당되었다.

시험진행 중에는 연구자와 시험대상자 모두 각 시험대상자가 어느 군에 배정되어 있는지 알지 못하였고 배정된 군의 비밀을 유지 하였다. 인체적용시험 담당자는 대상시험대상자에게 부여한 코드대로 인체적용시험용 식품을 대상 시험대상자에게 정확히 지급하였고 각 시험대상자들은 굴 가수분해물을 6 주간 하루 6정씩 (아침저녁 식사 30분 후 4 캡셀과 대조식품 2 캡셀 또는 아침저녁 식후 30 분 후 6 캡셀) 경구 투여하였다. 또는 동량의 대조식품을 투여 받았다 (대조식품 아침저녁 식사 30분 후 3캡셀씩 6캡셀). 스크리닝 방문 시(시작일 2주전)에 인체시험책임자는 선정 제외 기준에 따라 시험대상자를 선별하고, 시험대상자로부터 서면동의서를 얻고 기초조사, 생명징후, 과거력, 약물 복용 및 치료경험, 혈압 등을 측정하고 이를 통계적으로 분석하였다. 중도에 탈락된 환자는 투여 종료 시 항목을 측정하였고 측정 결과는 인체시험담당자에 의하여 임상적 유의성 여부를 판단하였다.

본 인체시험은 단일기관 인체시험으로 진행되었으며, 경희대학교병원 가정의학과에서 의약품 인체시험 관리기준 (GCP)에 따라 이루어 졌으며 시험대상자 등록, 연구자와의 의견교환 등을 포함한 시험의 전반적인 진행상황에 대한 모니터링은 (주)파마킹이 관리하였다. 또한 본 임상시험의 신뢰성 보증을 위하여 점검 (On -site audit)을 실시하였다. 점검은 (주)파마킹의 모니터링 요원인 김재은에 의하여 수행되었으며, 경희대학교병원을 방문하여 임상시험의 전반적인 상태를 점검하였다. 점검에서 중대한 오류사항은 발견되지 않았고 지적된 오류는 모두 수정되었다.

3.5 통계 분석 방법

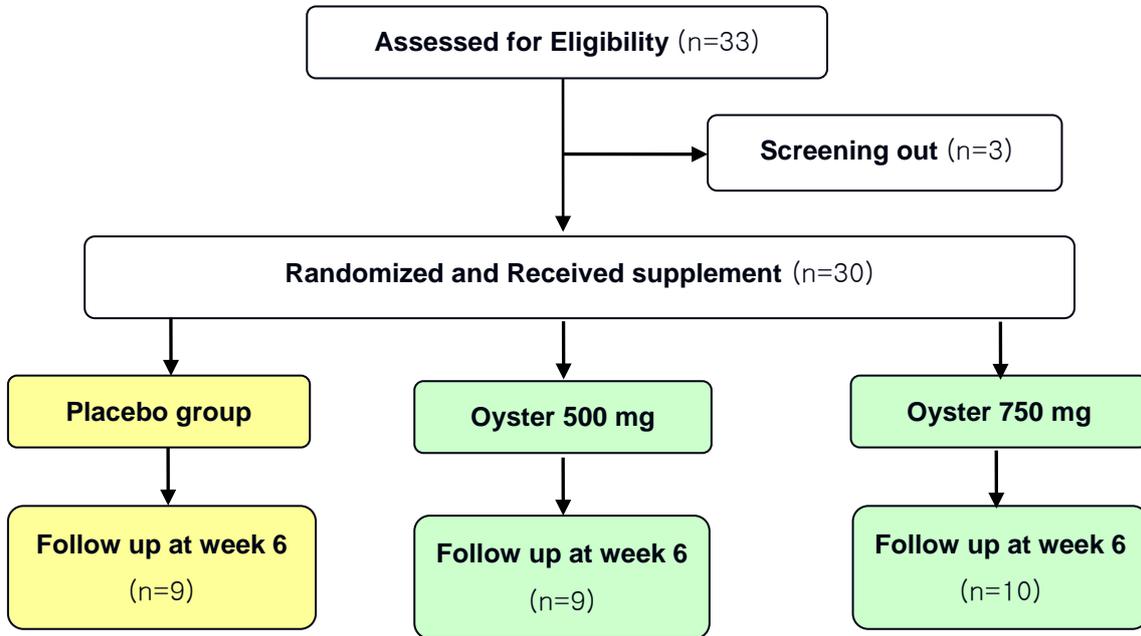
본 인체적용시험의 시험대상자로부터 얻어진 기능성 자료는 paired t-test를 실시하여 군간의 차이가 있는지 검토하였다.

안전성 자료는 본 인체적용시험에 참여하여 인체적용시험용 식품을 복용한 시험대상자를 대상으로 안전성 평가가 이루어진 모든 시험대상자로부터 얻어진 자료를 모두 분석하였다.

33명을 스크리닝하여 선정기준 미달이나 동의철회로 3명이 스크리닝에서 탈락되었고 30명을 등록하여 대조식품군과 굴 가수분해물 투여군(500 mg군 및 750 mg군)에 각각 10명, 10명과 10명이 할당되었으나 투여 중 이상반응에 의해 시험대상자가 더 이상 임상시험에 참여를 거부한 2명 (대조식품군 1명-소양증, 굴 가수분해물 500 mg 투여군 1명-안검부종)이 중도 탈락하였다.

발현된 모든 부작용은 각 치료군별로 자세한 설명과 함께 나열하였다. 각 치료군별로 시험식품과의 연관성이 있는 부작용과 연관성이 없는 부작용의 빈도를 기록하고 부작용 발현 건수와 한번 이상의 부작용을 경험한 환자의 비율에 대하여 투여군내에서 90%신뢰구간을 구하고 또한 투여군간 비교하였다.

<그림 1> 인체적용시험 진행과정 요약



4. 시험대상자의 기초 정보

4.1 시험대상자의 기초 정보

<표 2>에서는 인체적용시험에 등재된 시험대상자의 기초정보를 정리하였다. 시험대상자는 남자 13명, 여자 17명으로 총 30명이었다. 시험대상자의 연령대는 22세부터 64세까지 구성되었는데 평균은 45.17±11.29세였고 세 군에 고르게 분포하고 있어서 연령에 따른 차이를 배제할 수 있었다. 또한 시험대상자의 흡연, 음주, 운동 등 생활습관에서도 특별한 차이를 관찰할 수 없었고, 이학적검사, 심전도에서도 특별한 차이를 관찰할 수 없었다. 시험전 측정된 혈압에서도 군간의 차이는 발견되지 않았다.

시험대상자들의 과거 질병력도 세 군간에 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다. 또한, 임상시험 개시 전의 약물 복용력도 세 군간에 차이를 보인 약물은 없었다. 기능성 식품의 주기적인 복용에서도 두 군간에 차이가 없었다.

<표 2> 대상자 기초정보 및 과거병력

평가변수	위약군(n=10)	750mg(n=10)	500mg(n=10)	p value
연령 (세)	46.4±11.94	42.3±11.09	46.8±11.47	0.631 ^a
성별(n,%)				
남자	5(50.0)	3(30.0)	5(50.0)	0.722 ^b
여자	5(50.0)	7(70.0)	5(50.0)	
몸무게(kg)	68.73±8.86	67.01±12.03	65.47±12.16	0.808 ^a
키(cm)	165.57±7.69	164.28±9.89	162.08±11.33	0.724 ^a
수축기혈압(mmHg)	134.7±5.46	129.6±7.11	130.7±5.66	0.165 ^a
이완기혈압(mmHg)	84.8±3.55	82.5±2.99	83.1±2.47	0.232 ^a
맥박(beat/min.)	75.9±11.04	77.4±10.65	79.4±7.35	0.729 ^a
체온(°C)	36.5±0.09	36.45±0.07	36.41±0.09	0.077 ^a
흡연력(n,%)				
비흡연	6(60.0)	5(20.0)	9(90.0)	0.672 ^c
과거흡연	2(20.0)	3(30.0)	1(10.0)	
현재흡연	2(20.0)	2(20.0)	0(0.0)	
음주력(n,%)				
비음주	2(20.0)	3(30.0)	2(20.0)	0.473 ^c
소량음주(<소주 ½ 병/주)	6(60.0)	2(20.0)	5(50.0)	
다량음주(>소주 ½ 병/주)	2(20.0)	5(50.0)	3(30.0)	

병용약물(n,%)				
없음	8(80.0)	8(80.0)	10(100.0)	0.786 ^c
있음	2(20.0)	2(20.0)	0(0.0)	
병력 및 동반질환				
없음	6(6.0)	7(70.0)	10(100.0)	0.151 ^c
있음	4(40.0)	3(30.0)	0(0.0)	
이학적 검사				
no	10(100.0)	10(100.0)	10(100.0)	1.000 ^c
yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
심전도				
정상	8(80.0)	6(60.0)	6(60.0)	0.698 ^c
비정상(임상적 의미없음)	2(20.0)	4(40.0)	4(40.0)	
식사				
규칙적	9(90.0)	9(90.0)	8(80.0)	1.00 ^c
불규칙적	1(10.0)	1(10.0)	2(20.0)	
운동				
전혀하지 않음	5(50.0)	4(40.0)	8(80.0)	0.397 ^c
불규칙적(30분, 주3회이하)	3(30.0)	2(20.0)	1(10.0)	
규칙적(30분, 주3회이상)	2(20.0)	4(40.0)	1(10.0)	
기능성식품				
주기적 복용	2(20.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.310 ^c
복용하지 않음	8(80.0)	10(100.0)	10(100.0)	

a p value by ANOVA

b p value by Chi-square test

c p value by Fisser's exact test

5. 유효성분석결과

5.1 시험 전후 유효성평가 변수

<표 3> 시험 후 유효성평가 변수의 검정 (대조군과 750 mg 투여군)

평가변수		위약군	750mg 복용군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
Systolic B.P.	Baseline	133.3±4.6	127.8±5.1	0.022	
	after 6 weeks	125.4±8.6	119.0±8.5	0.113	
	Difference ^c	7.9±7.8	8.8±5.4	0.768	0.921
	p value ^d	0.011	0.001		
Diastolic B.P.	Baseline	83.8±3.8	82.3±3.4	0.366	
	after 6 weeks	77.1±6.1	74.6±7.1	0.410	
	Difference ^c	6.7±3.9	7.7±4.7	0.614	0.868
	p value ^d	<0.001	0.001		
Pulse	Baseline	78.9±10.0	76.1±11.8	0.573	
	after 6 weeks	75.2±9.4	76.2±10.7	0.826	
	Difference ^c	3.7±6.1	-.1±12.2	0.390	0.521
	p value ^d	0.089	0.980		
Temperature	Baseline	36.46±.07	36.43±.05	0.279	
	after 6 weeks	36.41±.07	36.42±.09	0.791	
	Difference ^c	.05±.11	.01±.11	0.423	0.911
	p value ^d	0.177	0.780		
Angiotensin I	Baseline	.9336±.3151	1.0476±.5177	0.559	
	after 6 weeks	.8448±.2613	.9384±.2699	0.441	
	Difference ^c	.0888±.1669	.1092±.2968	0.852	0.608
	p value ^d	0.127	0.274		
Angiotensin II	Baseline	.2798±.0636	.2832±.1092	0.933	
	after 6 weeks	.2392±.0746	.2550±.1231	0.733	
	Difference ^c	.0406±.0348	.0282±.1093	0.736	0.714
	p value ^d	0.005	0.436		

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 6 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

<표 4> 시험 전후 유효성평가 변수의 검정 (대조군과 500 mg 투여군)

평가변수	Mean±S.D.		p value ^a	p value ^b	
	위약군	500mg 복용군			
Systolic B.P.	Baseline	133.3±4.6	127.4±6.8	0.036	
	after 6 weeks	125.4±8.6	121.0±9.2	0.284	
	Difference ^c	7.9±7.8	6.4±7.4	0.664	0.912
	p value ^d	0.011	<0.001		
Diastolic B.P.	Baseline	83.8±3.8	82.0±3.1	0.262	
	after 6 weeks	77.1±6.1	73.0±4.3	0.099	
	Difference ^c	6.7±3.9	9.0±5.8	0.316	0.211
	p value ^d	<0.001	<0.001		
Pulse	Baseline	78.9±10.0	80.6±7.7	0.675	
	after 6 weeks	75.2±9.4	75.0±7.6	0.959	
	Difference ^c	3.7±6.1	5.6±10.8	0.635	0.774
	p value ^d	0.089	0.026		
Temperature	Baseline	36.46±.07	36.41±.07	0.137	
	after 6 weeks	36.41±.07	36.39±.03	0.441	
	Difference ^c	.05±.11	.02±.08	0.487	0.425
	p value ^d	0.177	0.110		
Angiotensin I	Baseline	.9336±.3151	.8484±.2887	0.536	
	after 6 weeks	.8448±.2613	.8816±.1656	0.711	
	Difference ^c	.0888±.1669	-.0332±.2880	0.262	0.349
	p value ^d	0.127	0.607		
Angiotensin II	Baseline	.2798±.0636	.2884±.1132	0.836	
	after 6 weeks	.2392±.0746	.2824±.0925	0.265	
	Difference ^c	.0406±.0348	.0060±.1473	0.479	0.286
	p value ^d	0.005	0.337		

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 6 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

6. 유효성분석의 결론

본 시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험으로 시험의 목적은 혈압이 높은 정상인에서 굴 가수분해물을 경구 복용하게 하여 수축기 및 이완기 혈압과 혈중 Angiotensin I & II 등의 검사를 수행하여 혈압 강하에 미치는 굴 가수분해물의 가능성을 예비적으로 확인하고 안전성 여부도 확인하고자 하였다. 또한, 굴 가수분해물 500 mg 군과 750 mg 군으로 나누어 시험을 진행함으로써 향후 시험에 대한 농도 설정을 위한 기초자료로 삼고자 하였다.

유효성에 대한 자료는 처음에 배정받은 대상자 (30명, 각 군 10명씩) 중 중도에 탈락한 2명을 제외한 28명 대상자에서 6주간 굴 가수분해물 500 mg 또는 750 mg 및 대조식품을 복용한 결과는 다음과 같다.

- ① 대조군, 굴 가수분해물 500 mg 투여군 및 750 mg 투여군에서 수축기혈압, 이완기혈압 및 심박수의 변화를 관찰한 결과 세군에서 모두 수축기 및 이완기 혈압이 의미있는 저하를 나타내었다.
- ② 굴 가수분해물 500 mg과 750 mg을 투여한 군의 변화를 대조군과 비교한 결과 각 군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 혈압이 감소된다고 볼 수 없었다.

7. 안전성분석결과

안전성 분석에서 이상반응은 시험에 참여한 모든 시험대상자를 대상으로 평가하였고, 실험실 검사 및 그 외의 항목에 대하여는 조사된 자료를 모두 이용하였다.

7.1 이상반응 발생 현황

이상반응은 시험식품을 투여한 후 1회 이상 안전성에 대한 조사가 된 시험대상자를 대상으로 평가하였다. 전체 30명의 시험대상자 중에서 이상반응이 있다고 응답한 시험대상자는 3명이였다. R013 시험대상자는 굴 가수분해물 500 mg 투여 군으로 투여 후에 안검부종이 발생하여 투여를 중단하였다. R014 시험대상자는 대조군으로 소양증을 호소하여 시험을 중단하였다. R025 시험대상자는 투여 종료 후 간수치 상승 (V3 종료 방문시에 ALP150, AST 106, ALT111)하였으나, follow-up visit에서 간수치의 정상화 소견 (ALP154, AST 31, ALT41)을 확인하고 시험을 종료하였다.

<표 5> 이상반응 현황

시험대상자/시험군	이상반응 (시작일-	이상반응정	처치	제품 연관성
-----------	------------	-------	----	--------

	소멸일, yy/dd/dd)	도		
R013 - 굴 500 mg 군 (중도탈락)	안검부종 (13/12/25 - 13/12/30)	경증	임상약 투여 중단 및 중단	연관 가능성 있음
R014 - 대조군	소양증 (13/12/27 - 14/01/15)	경증	없음	연관이 없음
R025 - 굴 500 mg 군 (시험종료)	간기능검사 이상 (14/02/07 - 14/03/06)	경증	관찰 후 재검	연관이 없음

7.2 실험실 검사 결과

실험실 검사 결과의 변화는 시험식품을 투여하기 직전과 투여한 후 6주째 후의 변화량을 two-sample t-test의 방법으로 평가하였다. 또한, 그룹별 차이는 student's t-test를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 모든 실험실 검사 결과의 변화가 각 군에서 의미 있는 차이를 나타내지 않았다.

<표 6> 시험 전후 혈액학적 검사 변화 - 대조군 vs 750 mg 투여군

평가변수	Mean±S.D.		p value ^a	p value ^b	
	대조군	750mg 복용군			
WBC	Baseline	5.94±1.15	6.41±1.56	0.457	
	after 6 weeks	5.97±1.50	6.00±1.59	0.957	
	Difference ^c	-.03±1.11	.40±1.30	0.438	0.574
	p value ^d	0.945	0.353		
RBC	Baseline	4.90±.49	4.84±.48	0.797	
	after 6 weeks	4.82±.37	4.89±.61	0.759	
	Difference ^c	.08±.21	-.05±.27	0.258	0.284
	p value ^d	0.259	0.603		
Hemoglobin	Baseline	14.80±±1.23	14.76±1.20	0.942	
	after 6 weeks	14.51±.99	14.87±1.45	0.526	
	Difference ^c	.29±.73	-.11±.62	0.205	0.211
	p value ^d	0.241	0.591		
Hematocrit	Baseline	43.70±3.88	43.94±4.14		
	after 6 weeks	42.97±2.15	44.44±4.91	0.895	
	Difference ^c	.73±2.70	-.50±2.45	0.397	0.250

	p value ^d	0.414	0.535	0.300	
Platelet	Baseline	256.90±70.61	261.00±±55.71	0.887	
	after 6 weeks	256.70±81.18	234.80±57.94	0.496	
	Difference ^c	.20±38.40	26.20±21.51	0.078	0.088
	p value ^d	0.987	0.004		

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 6 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

<표 7> 시험 전후 혈액학적 검사 변화 - 대조군 vs 500 mg 투여군

평가변수		대조군	500mg 복용군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
WBC	Baseline	5.94±1.15	6.69±1.69	0.260	
	after 6 weeks	5.97±1.50	5.65±1.27	0.622	
	Difference ^c	-.03±1.11	1.04±1.57	0.097	0.224
	p value ^d	0.945	0.066		
RBC	Baseline	4.90±.49	4.73±.30	0.361	
	after 6 weeks	4.82±.37	4.67±.37	0.380	
	Difference ^c	.08±.21	.06±.18	0.798	0.879
	p value ^d	0.259	0.341		
Hemoglobin	Baseline	14.80±±1.23	13.73±1.25	0.070	
	after 6 weeks	14.51±.99	13.49±1.15	0.048	
	Difference ^c	.29±.73	.24±.51	0.861	0.426
	p value ^d	0.241	0.168		
Hematocrit	Baseline	43.70±3.88	41.43±3.20	0.171	
	after 6 weeks	42.97±2.15	41.01±2.97	0.108	
	Difference ^c	.73±2.70	.42±1.95	0.772	0.399
	p value ^d	0.414	0.514		
Platelet	Baseline	256.90±70.61	268.50±43.14	0.663	
	after 6 weeks	256.70±81.18	256.30±35.32	0.989	

	Difference ^c	.20±38.40	12.20±21.78	0.401	0.445
	p value ^d	0.987	0.110		

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 6 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

<표 8> 시험 전후 생화학적 검사 변화 - 대조군 vs 750 mg 투여군

평가변수		대조군	750mg 복용군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
ALP	Baseline	68.40±22.75	64.60±19.43	0.693	
	after 6 weeks	67.00±20.48	66.70±16.66	0.972	
	Difference ^c	1.40±5.15	-2.10±9.40	0.315	0.367
	p value ^d	0.412	0.498		
Total Protein	Baseline	7.80±.52	7.59±.33	0.295	
	after 6 weeks	7.77±.56	7.41±.43	0.122	
	Difference ^c	.03±.43	.18±.36	0.412	0.269
	p value ^d	0.832	0.150		
AST	Baseline	28.90±8.74	24.90±5.38	0.234	
	after 6 weeks	29.90±14.56	24.70±9.09	0.606	
	Difference ^c	-1.00±8.16	.20±6.16	0.715	0.899
	p value ^d	0.708	0.920		
ALT	Baseline	29.20±25.67	21.00±10.46	0.362	
	after 6 weeks	27.90±30.26	21.80±20.89	0.606	
	Difference ^c	1.30±10.17	-.80±17.02	0.741	0.637
	p value ^d	0.695	0.885		
rGTP	Baseline	37.00±26.06	53.30±67.25	0.484	
	after 6 weeks	35.70±25.47	54.80±99.80	0.565	
	Difference ^c	1.30±18.12	-1.50±40.93	0.845	0.842
	p value ^d	0.826	0.910		
BUN	Baseline	13.10±2.23	11.80±4.13	0.393	

	after 6 weeks	14.30±3.37	13.20±3.85	0.505	
	Difference ^c	-1.20±1.75	-1.40±2.72	0.847	0.990
	p value ^d	0.058	0.138		
Creatinine	Baseline	.77±.17	.75±.12	0.764	
	after 6 weeks	.80±.16	.77±.17	0.692	
	Difference ^c	-.03±.05	-.02±.08	0.736	0.767
	p value ^d	0.081	0.443		
Glucose	Baseline	104.40±18.40	101.90±10.40	0.713	
	after 6 weeks	105.20±19.61	99.90±10.27	0.459	
	Difference ^c	-.80±8.52	2.00±8.46	0.470	0.434
	p value ^d	0.773	0.474		
Uric acid	Baseline	4.95±.89	5.16±1.17	0.656	
	after 6 weeks	5.32±1.00	5.35±1.71	0.962	
	Difference ^c	-.37±.47	-.19±1.11	0.644	0.628
	p value ^d	0.036	0.602		
Total Cholesterol	Baseline	194.30±23.98	192.40±43.81	0.906	
	after 6 weeks	195.70±18.46	200.00±32.11	0.719	
	Difference ^c	-1.40±27.91	-7.60±36.94	0.478	0.648
	p value ^d	0.877	0.532		
Triglyceride	Baseline	127.30±73.10	111.90±65.37	0.625	
	after 6 weeks	133.90±87.89	122.60±65.33	0.979	
	Difference ^c	-6.60±86.39	-10.70±32.75	0.890	0.977
	p value ^d	0.815	0.329		
LDL	Baseline	120.40±22.34	116.80±37.22	0.796	
	after 6 weeks	122.40±18.13	122.70±29.93	0.979	
	Difference ^c	-2.00±28.35	-5.90±38.76	0.800	0.924
	p value ^d	0.828	0.642		
HDL	Baseline	55.20±12.35	58.00±15.94	0.666	
	after 6 weeks	55.00±11.80	58.50±12.33	0.525	
	Difference ^c	.20±9.61	-.50±6.72	0.853	0.634
	p value ^d	0.949	0.819		

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 6 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

<표 9> 시험 전후 생화학적 검사 변화 - 대조군 vs 500 mg 투여군

평가변수		대조군	500mg 복용군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
ALP	Baseline	68.40±22.75	68.40±18.06	1.000	
	after 6 weeks	67.00±20.48	75.90±32.53	0.473	
	Difference ^c	1.40±5.15	-7.50±25.98	0.302	0.316
	p value ^d	0.412	0.385		
Total Protein	Baseline	7.80±.52	7.69±.33	0.579	
	after 6 weeks	7.77±.56	7.67±.43	0.659	
	Difference ^c	.03±.43	.02±.33	0.954	0.928
	p value ^d	0.832	0.852		
AST	Baseline	28.90±8.74	25.40±2.32	0.237	
	after 6 weeks	29.90±14.56	25.40±6.17	0.380	
	Difference ^c	-1.00±8.16	.00±6.36	0.763	0.927
	p value ^d	0.708	1.000		
ALT	Baseline	29.20±25.67	17.80±6.18	0.189	
	after 6 weeks	27.90±30.26	20.40±12.10	0.476	
	Difference ^c	1.30±10.17	-2.60±12.06	0.444	0.376
	p value ^d	0.695	0.512		
rGTP	Baseline	37.00±26.06	25.20±13.72	0.221	
	after 6 weeks	35.70±25.47	35.30±33.41	0.976	
	Difference ^c	1.30±18.12	-10.10±30.81	0.326	0.470
	p value ^d	0.826	0.327		
BUN	Baseline	13.10±2.23	12.90±2.42	0.850	
	after 6 weeks	14.30±3.37	14.40±2.72	0.943	

	Difference ^c	-1.20±1.75	-1.50±1.84	0.713	0.709
	p value ^d	0.058	0.030		
Creatinine	Baseline	.77±.17	.67±.21	0.252	
	after 6 weeks	.80±.16	.66±.18	0.089	
	Difference ^c	-.03±.05	.01±.06	0.017	0.038
	p value ^d	0.081	0.591		
Glucose	Baseline	104.40±18.40	99.00±7.02	0.397	
	after 6 weeks	105.20±19.61	98.80±6.61	0.341	
	Difference ^c	-.80±8.52	.20±4.05	0.741	0.672
	p value ^d	0.773	0.879		
Uric acid	Baseline	4.95±.89	4.81±1.17	0.766	
	after 6 weeks	5.32±1.00	5.01±1.50	0.594	
	Difference ^c	-.37±.47	-.20±.48	0.434	0.482
	p value ^d	0.036	0.217		
Total Cholesterol	Baseline	194.30±23.98	204.50±35.47	0.461	
	after 6 weeks	195.70±18.46	204.90±31.37	0.434	
	Difference ^c	-1.40±27.91	-.40±9.94	0.916	0.732
	p value ^d	0.877	0.901		
Triglyceride	Baseline	127.30±73.10	115.50±45.48	0.670	
	after 6 weeks	133.90±87.89	104.50±22.75	0.319	
	Difference ^c	-6.60±86.39	11.00±29.46	0.550	0.381
	p value ^d	0.815	0.268		
LDL	Baseline	120.40±22.34	133.80±33.79	0.309	
	after 6 weeks	122.40±18.13	137.20±30.87	0.208	
	Difference ^c	-2.00±28.35	-3.40±8.44	0.883	0.459
	p value ^d	0.828	0.234		
HDL	Baseline	55.20±12.35	51.50±11.29	0.493	
	after 6 weeks	55.00±11.80	53.80±9.90	0.808	
	Difference ^c	.20±9.61	-2.30±5.23	0.479	0.665
	p value ^d	0.949	0.198		

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

- b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)
- c: Difference between the values of Baseline and after 6 weeks.
- d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

혈액학적 검사 및 생화학적 검사 등 실험실 검사 결과, 투여 6주 후에 굴 500 mg 투여군과 굴 750 mg 투여군에서 대조군과 비교한 결과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

7.3 안전성 분석의 결론

이상반응은 시험식품을 투여한 후 1회 이상 안전성에 대한 조사가 된 시험대상자를 대상으로 시험대상자에서 발생한 이상반응은 안검부종, 소양증, 간기능검사 수치의 이상 등으로 경미한 이상반응이 나타났으며 이중 500mg 투여군에서 발생한 이상반응에서 ‘연관의 가능성이 있음’으로 나타났으나 시험제품과 명백한 관련성을 찾을 수 없었다.

결론적으로 6주간 굴 가수분해물 500 mg과 750 mg 및 대조식품을 투여한 결과 특별하거나 심각한 이상반응은 전체 시험대상자에서 한 명도 발생하지 않았으며, 이상반응도 시험제품과 명백한 관련성을 찾을 수 없었고 임상적인 의미도 적어 안전한 식품으로 조사 되었다.

8. 향후 시험의 용량 결정을 위한 추가적인 분석

본 시험은 굴 가수분해물의 용량 설정을 위한 예비시험이므로 향후 본 인체적용시험의 용량을 설정하기 위하여 추가적인 분석을 수행하였다. 추가적인 분석은 raw data를 분석한 결과 대조군에서 혈압이 감소한 R23, R26 시험대상자가 있어 두명의 시험 대상자를 제외하고 분석을 시행하였다 이는 대조군에서 혈압이 전후에 감소하는 경우는 긴장 또는 여러 신체적인 상황에 의한 것이므로 예비시험임을 감안하여 분석을 수행하여 혈압 강하 효과가 본 시험에서 증명될 수 있는지를 알아보고자 하였다.

8.1 대조군의 혈압 변동

<표 10> 대조군의 혈압, 맥박 추가분석

Enrollment No.	Random Code	sex	age(만)	V2			V3		
				SBP_0	DBP_0	pulse_0	SBP_6	DBP_6	pulse_6
001	3	1	31	131	81	85	125	75	88
003	3	2	48	128	80	88	126	71	80
004	3	1	52	138	82	68	138	80	72
016	3	2	45	139	89	88	138	85	80
019	3	1	54	139	89	76	126	85	71
022	3	1	62	135	85	88	129	82	90

027	3	2	43	126	81	70	127	77	62
p value							0.081	0.002	0.2265

* 추가 분석은 시험 결과에서 통계 분석의 계획에 포함되지는 않았으나 향후 본시험의 용량 결정을 위하여 분석됨.

추가분석을 위해 2명의 시험대상자 데이터를 삭제한 결과 대조군의 수축기혈압, 이완기혈압 및 심박수의 변화 중 이완기혈압에서만 통계적으로 의미있는 결과를 나타내었다.

8.2 대조군과 750 mg 군의 비교

<표 11> 대조군과 750mg군의 혈압, 맥박 비교 (추가분석)

	대조군			750mg 복용군			p value†
	시험 전	시험 후	차이	시험 전	시험 후	차이	
systolic B.P	133.3±4.6	125.4±8.6	7.9±7.8	127.8±5.1	119.0±8.5	8.8±5.4	0.074
diastolic B.P	83.8±3.8	77.1±6.1	6.7±3.9	82.3±3.4	74.6±7.1	7.7±4.7	0.129
Pulse	78.9±10.0	75.2±9.4	3.7±6.1	76.1±11.8	76.2±10.7	-.1±12.2	0.561

†p value were calculated by independet t-test

대조군에서 시험 전과 후의 변수는 정규성 검정을 하였다. 정규성 검정 값인 Shapro-Wilk 검정값이 0.05 이상이어서 정규분포하였다. 시험 전과 후의 차이를 구하여 그 차이는 서로 독립적인 집단이므로 independent t-test를 사용하여 검정하였다. 검정결과 차이는 없는 것으로 나타났다.

750mg 투여한 군의 전후의 차이는 paired t-test를 이용하여 검정한 결과는 복용전과 후는 차이가 있었으며 통계학적으로도 유의하였다. 그렇지만, 대조군도 전후의 차이가 통계적으로 의미가 있어 전체적으로 두 군간의 투약전 후의 혈압 및 맥박의 차이는 통계적으로 의미없는 결과를 보였다. 그러나, 대조군에서 혈압이 강하된 R23, R26 시험대상자의 데이터를 빼고 분석한 결과 통계적으로 의미있는 결과가 나오지는 않았으나 p value가 수축기 혈압에서 0.07을 보여 향후 시험에서 시험대상자 수를 충분히 확보하면 의미있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

8.3 대조군과 500 mg 군의 비교

<표 12> 대조군과 500mg군의 혈압, 맥박 비교 (추가분석)

	대조군	500mg 복용군	p value†
--	-----	-----------	----------

	시험 전	시험 후	차이	시험 전	시험 후	차이	
systolic B.P	133.3±4.6	125.4±8.6	7.9±7.8	127.4±6.8	121.0±9.2	6.4±7.4	0.843
diastolic B.P	83.8±3.8	77.1±6.1	6.7±3.9	82.0±3.1	73.0±4.3	9.0±5.8	0.239
Pulse	78.9±10.0	75.2±9.4	3.7±6.1	80.6±7.7	75.0±7.6	5.6±10.8	0.410

tp value were calculated by independet t-test

대조군에서 시험 전과 후의 변수는 정규성 검정을 하였다. 정규성 검정 값인 Shapro-Wilk 검정값이 0.05 이상이어서 정규분포하였다. 시험 전과 후의 차이를 구하여 그 차이는 서로 독립적인 집단이므로 independent t-test를 사용하여 검정하였다. 검정결과 차이는 없는 것으로 나타났다.

500mg 투여한 군도 대조군과 투약전후의 차이를 구하여 그 값의 차이를 independent t-test를 사용하여 검정한 결과 의미있는 차이를 보이지 않았다. 개별 군에서는 투약전과 후의 혈압 및 맥박의 차이는 통계적으로 의미있는 차이를 보였으나, 그 차이값을 두 군간으로 비교하였을 때에는 통계학적인 차이는 없었다.

9. 결론

본 인체적용시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 평행 인체적용시험으로 주 목적은 골가수분해물을 하루에 500 mg 및 750 mg (아침저녁 식사 30분 후 2 캡셀 (위약 1캡셀 포함) 또는 아침저녁 식사 30분 후 3 캡셀)을 6주 동안 경구 투여하였을 때의 혈압강하와 관련된 기능을 평가하고 안전성 여부도 확인하고자 하였다.

골가수분해물 500mg 및 750mg을 투여한 군과 대조식품을 6주간 투여 결과, 혈압, Angiotensin I, II의 수치는 복용 전후에 비슷한 정도를 나타내어 유의한 차이를 보이지 않았다.

안전성 분석결과 골가수분해물 500mg 및 750mg을 투여한 군과 대조식품을 투여한 군에서 실험실적 검사에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 또한, 특별하거나 심각한 이상반응은 전체 시험대상자에서 한 명도 발생하지 않았으며, 이상반응도 시험제품과 명백한 관련성을 찾을 수 없었고 임상적인 의미도 적어 안전한 식품으로 조사 되었다.

결론적으로 살펴보면, 통계분석 결과 골가수분해물의 투여는 대조군에 비하여 혈압과 관련된 여러 검사 항목에서 차이가 없었다.

인체적용시험 결과 골가수분해물의 투여가 혈압과 관련한 여러 생체 지표의 변화에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으나 향후 본 시험을 위하여 대조군에서 혈압이 V2에 비하여 V3에서 저하된 시험 대상자를 제외하고 분석한 결과 750mg을 투여한 경우 혈압 강하 정도가 p value 0.07 정도를 나타내어 향후 시험에 용량을 증강하고 시험대상자수를 적절하게 조정하여야 한다는 정보를 얻을 수 있었다.

10. 고찰

굴가수분해물의 혈압 강하 효과를 연구하기 위하여 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 평행 인체적용시험을 수행하였다. 결과 굴가수분해물은 혈압의 강하에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으나 향후 시험에서 적절한 시험대상자수의 산정과 750mg 이상의 투여량으로 시험 진행을 해야 한다는 정보를 얻을 수 있었다. 본 인체적용시험을 통하여 굴가수분해물은 상대적으로 안전한 식품임을 알 수 있었다.

11. 참고문헌

- 1) 건강기능식품 인체적용시험 설계 안내서. 식품의약품안전평가원 식품위해평가부. (2012)
- 2) 건강기능식품 기능성 평가 가이드, '높은 혈압 감소에 도움' 편. 식품의약품안전청(2012)
- 3) Je, J. Y., Park, J. Y., Jung, W. K., Park, P. J., & Kim, S. K. (2005). Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. *Food Chemistry*, 90, 809–814.
- 4) Inhibitory activity of *Ecklonia stolonifera* and its isolated phlorotannins against Cu^{2+} -induced low density lipoprotein oxidation. *Fisheries Science*, 2012;78:927–934
- 5) Kazuhiro Shiozaki, Momo Shiozaki, Junko Masuda, Akiko Yamauchi, Shuichi Ohwada, Toshiki Nakano, Toshiyasu Yamaguchi, Tadao Saito, Koji Muramoto, Minoru Sato. Identification of oyster-derived hypotensive peptide acting as angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. *Fish Sci* (2010) 76:865–872
- 6) Ruqiang Huang, Nianghai Li, Qingzhu Zeng, Qian Deng, Bin Chen. Extraction and separation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from enzymatic hydrolysate of oyster. *Advanced Materials Research* (2011) 236–238:2610–2614.

임상시험 결과 보고서

굴 가수분해물의 혈압강하 효과 평가를 위한 임상시험

2015년 4월

경희대학교 산학협력단

본 시험결과 보고서는 경희대학교 산학협력단과 단국대학교병원과의 재산으로 기밀 서류입니다. 보고서에 포함되어 있는 정보는 본 시험을 보고하기 위한 심사위원회(IRB) 또는 윤리위원회를 제외하고는 누설해서는 안됩니다. 또한 경희대학교 산학협력단의 동의 없이는 본 자료를 전체 또는 부분적으로 사용하거나 발표할 수 없습니다.

인체적용시험 확인서

인체적용시험 제목 : 굴 가수분해물의 혈압강하 효과 평가를 위한 임상시험 (A clinical study for hydrolysates of oyster: Dose-finding Study)

프로토콜 번호 : HO-001

시험 식품 : 굴 가수분해물

인체적용시험 의뢰자 : 경희대학교 산학협력단

본 인체적용시험은 “임상시험관리기준(KGCP)”을 준수하여 시행되었으며 그 결과 최종 인체 시험보고서를 경희대학교 산학협력단과 단국대학교병원 임상의학연구소에 제출하는 바입니다. 단국대학교병원에서 수행된 본 시험의 보고서 내용에 대하여 인체적용시험 책임자로서 확인합니다.

2015년 4월

연구책임자 : 정유석 교수
단국대학교병원 가정의학과

일시: 2015년 5월 15 일

서명 : 정 유 석



◎ 인체적용시험 요약

인체적용시험의 명칭	굴 가수분해물의 혈압강하 효과 평가를 위한 임상시험
인체적용시험책임자	단국대학교병원 가정의학과 정유석 교수
공동연구자	단국대학교병원 심장혈관내과 임성훈 교수
시험담당자	단국대학교병원 임상의학연구소 남섭주, 유경희
인체적용시험실시기관	단국대학교병원, 충남 천안시 동남구 망향로 201
인체적용시험의 목적	고혈압 전단계에 해당하는 건강인을 대상으로 굴 가수분해물의 혈압개선 효과와 안전성을 확인
시험설계	단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중눈가림, 평행 인체적용시험
대상자수	최종 평가가능 예수 66 예 (시험식품군 : 33명 및 대조군 : 33명)
연구대상	문맹자를 제외한 만 20세 이상 70세 미만의 남성 및 여성으로 안정시 좌위에서 측정된 혈압이 수축기 혈압이 120-139 mmHg이거나 이완기 혈압이 80-89 mmHg인 정상인
시험대상자의 선정 기준	<ol style="list-style-type: none"> 1) 문맹자를 제외한 만 20세 이상 70세 미만의 남성 및 여성 2) 고혈압 전단계인 성인 안정시 좌위에서 5분 간격으로 2회 측정된 평균 혈압이 120-139mmHg 이거나 이완기 혈압이 80-89mmHg 인자 <ul style="list-style-type: none"> ※ 측정방법 : 총 4회 측정(Pre-Screening과 방문 1에서 각각 2회씩 측정) -1차 측정 : Pre-Screening시 안정 시 좌위에서 5분 간격으로 2회 측정 -2차 측정 : 방문 1시 안정시 좌위에서 5분 간격으로 2회 측정 3) 인체적용시험동의서에 서면 동의한 자
시험대상자의 제외 기준	<p><제외 기준></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 굴 및 기타 해산물에 과민증 또는 그 병력이 있는 자 2) 최근 1개월 이내에 혈압강하제, 혈행개선제(은행잎 추출물, 아스피린 등), 항고지혈증 약물이나 이와 관련된 건강기능식품을 복용한 자 3) 최근 1개월 이내에 혈압강하제, 혈행개선제를 제외한 혈압에 영향을 미칠 수 있는 약물(베타차단제, 전립선비대증치료제중 알파차단제 등)을 복용한 자

	<p>4) 최근 1개월 이내에 펩타이드 성분을 포함한 기능성 식품을 복용한 자</p> <p>5) 최근 1개월 이내에 한약을 복용한 자</p> <p>6) 3개월 이내 또는 현재 알코올중독으로 치료 중이거나 갑상선 기능 이상으로 치료중인 자</p> <p>7) 최근 1개월 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제 등을 복용하였거나 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 기능성식품 등을 복용한 경험이 있는 자</p> <p>8) 심질환(관상동맥질환, 심부전, 협심증, 심근경색 등), 고콜레스테롤혈증, 뇌졸중, 악성종양 또는 폐질환이 있는 자</p> <p>9) 당뇨병인 자와 이와 관련된 약물을 복용하는 자</p> <p>10) 6개월 이내 외과적 수술을 받은 자</p> <p>11) 뇌종양, 수두증이 있거나 있었던 자</p> <p>12) 심한 신기능 장애 또는 간 기능장애가 있는 자(serum creatinine > 2.0 mg/dl, ALT, AST, alkaline phosphatase > 정상 상한치× 2.5)</p> <p>13) 혈소판(15만/mm³이하), 백혈구(3000/mm³이하), 혈색소 수치(남자 9.5g/dL, 여자 9.0g/dL)이하 인 자</p> <p>14) 위 절제술 등 약물의 흡수에 영향을 줄 수 있는 수술을 한 자</p> <p>15) 임신부, 수유부 및 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임 여성</p> <p>16) 최근 3개월 이내 타 임상시험식품이나 타 시험약품을 복용한 경험이 있는 자</p> <p>17) 최근 2개월 이내에 헌혈을 하였거나 1개월 이내에 성분 헌혈을 한 자</p> <p>18) 그 외 시험책임자의 소견으로 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 본 임상시험에 부적합하다고 판단되는 자</p>
시험식품명	굴 가수분해물 (1캡슐 250mg)
대조식품명	위약 캡슐
투여 방법 및 투여 기간	<p>-실험군 : 하루에 굴 가수분해물을 1000mg(250mg 4캡슐, 아침, 저녁 식 후 30분에 2캡슐씩</p> <p>-대조군 : 위약 4캡슐(1일 2회 1회 2캡슐)을 각각 4주간 경구 투여.</p>
시험 기간	2014년 12월 12일 첫 시험대상자를 스크리닝 한 후, 각 시험대상자별로 총 5주(스크리닝 1주, 약제투여기간 4주)가 소요 되었으며 전체 66명의 대상 지원자에 대한 시험은 2014년 12월 12일부터 2015년 3월 30일에 종료되어 전체 시험이 종료되기까지 약 4개월이 소요되었다.

<p>평 가 방 법</p>	<p><u>유효성 (Functionality)</u></p> <p>① 1차 기능성 평가 (Primary endpoint) : Baseline 대비 수축기 및 이완기 혈압 개선 정도</p> <p>② 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint) : Baseline 대비 혈중 angiotensin I, II의 변화</p> <p><u>안전성 (safety)</u></p> <p>시험식품 투여 전과 투여 4주 후에 실험실적 검사, 활력징후 측정, 이학적 검사 진행을 실시하였고 시험식품 투여 2주 후에는 전화 문진을 통하여 이상반응을 평가하고 연구기간 내내 이상반응을 평가하였다.</p>
<p>통 계 방 법</p>	<p>최초 참여자 (66명, 각 군 33명씩) 전체에 대한 ITT분석과 중도 탈락한 2명을 제외한 PP분석을 모두 시행하였다.</p> <p>실험군과 대조군의 일반적특성에 대한 검정은 Chi-square test와 Mann whitney U test로 실시하였다. 대조군과 실험군의 평균차이를 검정하기 위해 Mann-Whitney U test를 실시하였으며 시험 전과 시험 후 사후검정은 Wilcoxon Signed Ranks Test를 사용하였다.</p>
<p>결 과</p>	<p>1) 실험군과 위약 대조군의 수축기혈압, 이완기혈압 및 심박수의 변화를 관찰한 결과 4주 복용 후 두 군 모두에서 수축기 및 이완기 혈압이 의미 있는 저하를 나타내었다.</p> <p>2) 실험군의 변화를 위약대조군과 비교한 결과 수축기 및 이완기 혈압의 감소정도는 양군간에 차이가 없었다.</p> <p>3) 실험군과 대조군 모두에서 4주 복용 후 Angiotensin I, II는 통계적으로 의미 있는 증가나 감소를 보이지 않았고, 군간의 차이도 없었다.</p> <p>4) 실험군에서 위장장애와 간기능이상 이 각각 한 명씩 발생하였으나 식품과의 연관가능성은 있으나 인과관계는 명확하지 않았다.</p>

목 차

1. 인체적용시험의 명칭	1
2. 서론	1
3. 시험방법	1
3.1. 인체적용시험의 윤리적 수행	1
3.2. 시험 제품	2
3.3. 시험 흐름도	3
3.4. 시험절차	4
3.5. 데이터 관리 및 통계	5
3.6. 인체적용시험용 식품의 생산, 포장, 라벨 및 저장	5
3.7. 인체적용시험 식품의 관리	5
3.8. 시험대상자의 선정기준, 제외기준	6
3.8.1. 선정기준	6
3.8.2. 제외기준	6
3.9. 목표한 시험대상자의 수 및 설정근거	7
3.9.1. 시험대상자의 수	7
3.9.2. 목표 시험대상자의 수 설정근거	7
4. 임상시험 기간	8
4.1 인체적용시험 방법	8
4.1.1 인체적용시험의 설계	8
4.1.2. 섭취량, 섭취방법 및 섭취기간	8
4.1.2.1. 1일 섭취량 및 섭취방법	9
4.1.2.2. 섭취기간	9
4.1.2.3. 섭취기간 설정사유	9
4.1.2.4. 복약순응도	9
4.1.2.5. 복약지도	9
4.1.2.6. 미사용 시험식품/대조식품 회수	9
4.1.3. 무작위배정 및 이중 눈가림	9
4.1.4. 병용요법	10
4.1.5. 관찰 항목, 임상검사 항목 및 관찰 검사 방법	10
4.1.5.1. 인체적용시험 진행일정표	10
4.1.5.2. 시험대상자 동의 및 인구학적 조사	11
4.1.5.3. 활력징후	11
4.1.5.4. 신체검사	11
4.1.5.5. 생활습관 조사	11

4.1.5.6.	식이섭취 조사	11
4.1.5.7.	병력 및 동반질환	11
4.1.5.8.	이학적검사	11
4.1.5.9.	실험실적 검사	11
4.1.5.10.	Angiotensine I , Angiotensine II 검사	12
4.1.5.11.	선행/병용약물 조사	12
4.1.6.	방문별 관찰 검사 방법	12
4.1.6.1.	Pre-Screening (-2~-7일)	12
4.1.6.2.	방문 1: Screening + Baseline (+5일)	12
4.1.6.3.	방문 2: 전화방문 (시험식품 투여기간 D 14일±5일)	13
4.1.6.4.	방문 3: 시험식품 투여종료 (D 28일±5일)	13
4.1.6.5.	Follow-up방문 (추가 방문)	13
4.2.	기능성 평가기준, 평가방법 및 해석방법	14
4.2.1.	기능성 평가기준	14
4.2.2.	통계적 분석	14
4.3.	결과 분석의 참고사항	15
4.3.1.	통계처리의 기준	15
4.3.2.	자료관리 (Data Management)	15
4.4.	시험대상자 동의서 및 설명문	16
5.	시험대상자의 기초정보	16
5.1.	시험대상자의 기초정보	16
6.	유효성분석 결과(FAS analysis)	18
6.1.	시험 전후 유효성 평가변수의 변화	18
6.2.	체중통제후 시험 전후 유효성평가 변수의 변화	20
6.3.	성별 통제후 시험 전후 유효성평가 변수의 변화	21
6.4.	소그룹 분석 : 혈압이 높은 군과 낮은 군별 유효성 평가 변수의 검정	22
7.	유효성분석 결과(PP analysis)	25
7.1.	시험 전후 유효성 평가변수의 변화	25
7.2.	체중 통제후 시험 전후 유효성평가 변수의 변화	27
7.3.	성별 통제후 시험 전후 유효성평가 변수의 변화	28
7.4.	소그룹 분석 : 혈압이 높은 군과 낮은 군별 유효성 평가 변수의 검정	29
8.	안전성분석 결과	32
8.1.	이상반응 발생현황	32
8.2.	실험실 검사결과	33
9.	유효성 분석의 결론	35
10.	안전성 분석결과	35
11.	토의	35

12. 결론	37
참고문헌	38

1. 인체적용시험의 명칭

굴 가수분해물의 혈압강하 효과 평가를 위한 임상시험

2. 서 론

굴은 우리나라에서 널리 섭취하는 해산물로 콜레스테롤 개선 (타우린 성분), 빈혈예방 (철분 함유), 피부미용 등에 효능을 가지고있는 것으로 알려지고 있다.

본 연구팀은 굴의 가수분해물에서 혈압강하 효과를 갖는 펩타이드 성분을 추출하고 이를 건강기능성 식품으로 개발하고자 아래와 같은 시험을 수행하였다.

굴을 Protamex 와 Neutrase 라는 가수분해효소로 처리한 분해산물의 분획을 추출하여 angiotensin converting enzyme (ACE)에 대한 저해활성을 갖는 10kDa 이하의 분획을 평가하여 ACE 저해 IC50 값이 우수한 K-Y, Y-A, A-F-Y, M-C 등의 펩타이드를 확인하였다. 굴 가수분해물의 최종 지표성분으로 K-Y, M-C 및 Y-A 펩타이드를 확립하고 SEP-Pak 및 MS 를 이용한 검출 방법을 수립하였다.

굴의 혈압강하 효과를 증명하기 위하여 선천성 고혈압 쥐 (SHR, spontaneous hypertensive rat)에서 굴의 총가수분해물과 10kDa 이하의 분획물을 100mg/kg 의 농도로 단회 투여한 결과 9 시간 이후부터 33~38%의 혈압저하능을 보였다. K-Y, M-C 및 Y-A 의 경우 50µg/kg 의 농도에서 각각 17, 34, 24%의 혈압강하 효능 보였다. 캄온에서 수행한 "Oyster enzyme hydrolysate 의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험"에서 독성을 나타내지 않아 굴의 가수분해물이 안전함을 확인하였다.

이에 본 연구팀은 굴 가수분해물의 혈압강하 효과를 평가하기 위한 인체적용시험의 예비시험으로 굴 가수분해물의 투여 용량을 500mg/day, 750mg/day 로 하여 시험을 진행하였고, 통계적인 의미를 찾을 수는 없었으나 용량 의존적인 혈압강하 효과를 확인하였다.

시험 결과 750mg 을 투여한 경우 혈압 강하 정도가 P Value 0.07 정도를 나타내어 본 임상시험에서 용량을 증가시키고 시험대상자수를 적절하게 조정하여야 한다는 정보를 얻을 수 있었다.

용량 증강에 따른 가장 문제가 될 수 있는 부작용은 다음과 같았다. 예비시험에서 500mg 투여군에서 안검 부종과 간기능 검사 이상, 대조군에서 소양증 등 3 건이 발생하여 용량과 실험군과 대조군 모두에서 이상반응이 발생하여 동물실험 결과를 기준으로 용량 설정 근거를 삼아 1g 으로 투여 용량을 설정하였다.

3. 시험 방법

3.1 인체적용시험의 윤리적 수행

본 인체시험은 가장 최근에 개정된 헬싱키 선언과 ICH guideline 및 식품의약품안전처의 의약품임상시험관리기준에 따라 수행되었다. 본 인체시험의 시험계획서, 시험대상자 동의서 및

기타 인체시험과 관련된 모든 사항은 2014년 12월 4일 단국대학교병원 기관생명윤리심의위원회(IRB)의 승인을 취득한 이후에 실시되었다(DKUH 2014-11-005-001).

시험대상자는 시험에 참여하기 전 준비된 시험대상자 설명문에 따라 임상시험 전반에 관한 설명을 들은 후 서면 동의서를 작성하였다. 설명문에는 임상시험의 목적 및 방법, 예측 효능 및 효과, 이상반응, 위험성, 피해 발생 시 보상 및 치료대책, 자료의 비밀보장 등의 내용이 포함되었다. 또한 본인의 자발적인 의지에 의해 시험에 참여하며, 참여에 동의한 후 언제라도 동의를 철회할 수 있다는 점과 이에 관련된 불이익을 받지 않는다는 점을 명시하였다. 서면 동의서를 작성한 시험대상자에 한하여 시험이 진행되었다.

3.2 시험제품

인체적용시험에 사용된 굴 가수분해물은 우수건강기능식품 제조기준(GMP) 적용 업소인 (주)파마킹에서 제조하였으며 250mg 캡슐로 제작되어 인체적용시험에 사용하였다.

1) 시험식품

굴 가수분해물 (PMK-HF02, 1 캡슐)

이 식품 1 캡슐(중)

(단위: mg)

구 분	원 료 명	배합비율(%)	합량(mg)
주원료	굴 가수분해물	80.65	250
부원료	미결정셀룰로오스	16.13	60
	카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	1.61	5
	스테아르산 마그네슘	1.61	5
합 계		100	320

2) 대조군식품

옥수수전분이 식품 1 캡슐(중)

(단위 : mg)

구 분	원 료 명	배합비율(%)	합량(mg)
주원료	옥수수전분	78.13	250
부원료	미결정셀룰로오스	18.75	60
	카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	1.56	5
	스테아르산 마그네슘	1.56	5
합 계		100	320

3.3 시험 흐름도

Visit	Pre-Screening	Visit 1 (Screening +Baseline)	Visit 2 (전화방문)	Visit 3	F/U ⁹⁾
Week (Visit window)	-2~-7 일	0 주 (+5 일)	2 주 (14 일±5)	4 주 (28 일±5)	필요시
시험대상자 동의		○			
인구학적 조사 ¹⁾		○			
활력징후 ²⁾	○	○		○	○
신체검사 ³⁾		○			
생활습관 조사 ⁴⁾		○		○	
식이섭취 조사			○	○	
병력 및 동반질환 ⁵⁾		○			
이학적 검사		○		○	○
실험실적 검사 ⁶⁾		○		○	○
Angiotensine I , Angiotensine II		○		○	
임신여부 검사 (가임기 여성) ⁷⁾		○		○	○
선행/병용 약물		○	○	○	○
이상반응			○	○	○
시험대상자 선정 ⁸⁾		○			
무작위 배정		○			
인체적용시험용 식품 처방		○			
복약 순응도 평가				○	
인체적용시험용 식품 회수				○	

3.4 시험절차

본 인체적용시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 평행 인체시험으로 주 목적은 굴 가수분해물을 하루에 1000mg(아침저녁 식사 30분 후 2캡셀)을 4주 동안 경구 투여하였을 때의 혈압강하와 관련된 기능성을 위약대조군과 비교 평가하려는 것이다.

연구대상은 문맹자를 제외한 만 20세 이상 70세 미만의 남성 및 여성으로 고혈압 전단계인 정상인(안정 시 좌위에서 측정한 수축기 혈압이 120~139mmHg이고 이완기 혈압이 80~89 mmHg인자)을 대상으로 하여 각 군당 33명을 목표로 진행하였다.

2014년 12월 12일에 첫 시험대상자 스크리닝을 시작하여 2015년 3월 30일에 종료되어 전체 시험이 종료되기까지 GCP 기관인 단국대학교병원 임상시험센터의 모집공고문을 보고 지원한 71명의 시험대상자 중 선정제외기준에 적합한 시험대상자 66명을 선정하여 4주간의 투여기간을 갖는 무작위, 전향적 연구를 수행하였다.

스크리닝 검사를 통하여 (안정 시 좌위에서 측정한 수축기 혈압이 120~139mmHg이고 이완기 혈압이 80~89mmHg) 시험대상자가 시험요건에 적합한지를 판단하였다. 선정 제외기준에 따라 시험대상자로 적합하다고 판단된 경우 randomization 기법에 의하여 대조식품군, 굴 가수분해물 1000mg 투여군과 위약군으로 무작위 배정하여 시험을 수행하였다. 인체적용시험 연구자가 시험 전 스크리닝 평가를 통해 본 인체시험의 시험대상자를 선정한 후 무작위로 2개의 시험식품군 또는 대조식품에 배정한 다음 선정된 대상시험대상자는 컴퓨터에서 추출된 난수표를 근거로 하여 두 군의 시험대상자수가 동일하도록 만든 무작위코드에 따라 세 군 중의 한 군에 방문일(Day 0) 순서대로 낮은 번호부터 할당되었다.

시험 진행 중에는 연구자와 시험대상자 모두 각 시험대상자가 어느 군에 배정되어 있는지 알지 못하였고 배정된 군의 비밀을 유지 하였다. 인체적용시험 담당자는 대상시험대상자에게 부여한 코드대로 인체적용시험용 식품을 대상 시험대상자에게 정확히 지급하였고 각 시험대상자들은 굴 가수분해물을 4주간 하루 4정씩(아침저녁 식사 30분 후 2캡셀) 경구 투여하였다. 또는 동량의 대조식품을 투여 받았다(대조식품 아침저녁 식사 30분 후 2캡셀씩 4캡셀). 스크리닝 방문 시(시작일 2주전)에 인체시험책임자는 선정 제외 기준에 따라 시험대상자를 선별하고, 시험대상자로부터 서면동의서를 얻고 기초조사, 생명징후, 과거력, 약물 복용 및 치료경험, 혈압 등을 측정하고 이를 통계적으로 분석하였다. 중도에 탈락된 환자는 투여 종료 시 항목을 측정하였고 측정 결과는 인체시험담당자에 의하여 임상적 유의성 여부를 판단하였다.

본 인체시험은 단일기관 인체시험으로 진행되었으며, 단국대학교병원 임상의학연구소에서 의약품 인체시험 관리기준 (GCP)에 따라 이루어 졌으며 시험대상자 등록, 연구자와의 의견 교환 등을 포함한 시험의 전반적인 진행상황에 대한 모니터링은 (주)SFC 기능성식의약임상지원센터가 관리하였다. 또한 본 임상시험의 신뢰성 보증을 위하여 점검(On-site audit)을 실시하였다. 점검은 (주)SFC 기능성식의약임상지원센터의 모니터링 요원인 임현우에 의하여 수행되었으며, 단국대학교병원을 방문하여 임상시험의 전반적인 상태를 점검하였다. 점검에서 중대한 오류사항은 발견되지 않았고 지적된 오류는 모두 수정되었다.

3.5 데이터 관리 및 통계

본 인체적용시험의 시험대상자로부터 얻어진 자료는 Microsoft사의 Excel(ver. 2013) 프로그램에 데이터 입력 후 통계프로그램인 SPSS(Version 22.0)로 양 군간의 차이를 통계적으로 검토하였다.

안전성 자료는 본 인체적용시험용 식품을 복용한 시험대상자와 위약군 복용자 간에 부작용 발생 건수 및 내용을 분석하였다.

3.6 인체적용시험용 식품의 생산, 포장, 라벨 및 저장

- 1) 인체적용시험용 식품은 의약품임상시험관리기준(KGCP, 의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표 4, 2013.03.23) 제 8호 거목의 규정에 따라 인체적용시험의뢰자가 제조(또는 구입) 후, 인체적용시험기관의 관리약사에게 공급하였다.
- 2) 인체적용시험용 식품은 동일한 라벨을 부착함으로써 시험대상자 및 연구자에 대하여 눈가림(Blinding)이 유지되도록 하였다.
- 3) 인체적용시험용 식품은 4주+ 10 일 분이 병(Bottle)에 들어간 형태로 제공되며 총 152캡슐 (4주 28일 112캡슐 + 10일 여유분 40캡슐)의 굴 가수분해물 (PMK-HF02)을 포장한 후 Labeling하였다. 각 병에는 위약대조군은 위약 152 캡슐이 들어있었다.
- 4) 인체적용시험용 식품 라벨의 기재는 의약품 등의 안전에 관한 규칙 제 69조 6항에 준하며, 시험대상자 번호를 추가하여 아래와 같이 기입하였다.

시험식품에 대한 라벨은 다음과 같은 내용을 포함하였다.

- ① 인체적용시험용이라는 표시
- ② 시험식품의 코드명 또는 주성분의 일반명
- ③ 제조번호 및 사용(유효)기한 또는 재검사 일자
- ④ 저장방법: 실온 보관
- ⑤ 임상시험계획 승인을 받은자의 상호와 주소
- ⑥ 제조업자 또는 수입자의 상호
- ⑦ "인체적용시험외의 목적으로는 사용할 수 없음"이라는 표시

3.7 인체적용시험 식품의 관리

- 1) 본 인체적용시험용 식품은 실온 보관하였다.
- 2) 인체적용시험에 사용되는 식품의 관리에 대한 책임은 시험책임자가 담당하였다.
- 3) 인체적용시험에 사용되는 식품을 관리하는 시험책임자 또는 시험담당자는 인체적용시험에 사용되는 식품에 대해 인수, 재고 관리, 시험대상자별 투약, 반납 등의 의무를 수행하고 관련 기록을 유지하였고 해당 사항을 주기적으로 시험책임자에게 알렸다.
- 4) 규정에 의한 기록에는 각 시험대상자별로 인체적용시험에 사용되는 식품의 투여일자, 수량, 제조번호 또는 일련번호, 사용(유효)기간(필요한 경우에 한함), 시험식품의 코드명 또는 주성분의 일반명 및 시험대상자식별코드가 포함되었다.
- 5) 인체적용시험 담당자는 각 시험대상자가 계획서에 명시된 적정 용량을 투여 받았는지 확

인할 수 있는 투약기록을 유지하고, 인체적용시험에 사용되는 식품의 재고가 사용기록과 일치하는지의 여부를 확인하였다.

- 6) 인체적용시험에 사용되는 식품은 의뢰자가 지정한 조건과 관련규정이 정하는 바에 따라 보관되었다.
- 7) 시험책임자는 인체적용시험에 사용되는 식품이 계획서에 따라 투여되고 관리되는지의 여부를 확인하였다.
- 8) 시험책임자, 시험담당자는 각각의 시험대상자에게 인체적용시험에 사용되는 식품의 정확한 투여방법을 설명하였고, 시험대상자가 해당 지시 사항을 적절히 이행하고 있는지를 일정한 간격으로 확인하였다.

3.8 시험대상자의 선정기준, 제외기준

3.8.1 선정기준

시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합한 자로 선별하였다.

- 1) 문맹자를 제외한 만 20세 이상 70세 미만의 남성 및 여성
- 2) 고혈압 전단계인 성인

안정 시 좌위에서 5분 간격으로 2회 측정된 평균 혈압이 120~139mmHg 이거나 이완기 혈압이 80~89mmHg 인 자

※ 혈압 측정 방법 : 총 4회 측정 (Pre-Screening 과 방문 1 에서 각각 2회씩 측정)

1차 측정 : Pre-Screening 시 안정 시 좌위에서 5분 간격으로 2회 측정

2차 측정 : 방문 1 시 안정 시 좌위에서 5분 간격으로 2회 측정

- 3) 인체적용시험동의서에 서면 동의한 자

3.8.2 제외기준

다음 조건의 어느 하나라도 해당되는 시험대상자는 본 연구의 대상에서 제외하였다.

- 1) 굴 및 기타 해산물에 과민증 또는 그 병력이 있는 자
- 2) 최근 1개월 이내에 혈압강하제, 혈행개선제(은행잎 추출물, 아스피린 등), 항고지혈증 약물이나 이와 관련된 건강기능식품을 복용한 자
- 3) 최근 1개월 이내에 혈압강하제, 혈행개선제를 제외한 혈압에 영향을 미칠 수 있는 약물(베타차단제, 전립선비대증치료제중 알파차단제 등)을 복용한 자
- 4) 최근 1개월 이내에 펩타이드 성분을 포함한 기능성 식품을 복용한 자
- 5) 최근 1개월 이내에 한약을 복용한 자
- 6) 3개월 이내 또는 현재 알코올중독으로 치료 중이거나 갑상선 기능 이상으로 치료중인 자
- 7) 최근 1개월 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제 등을 복용하였거나 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 기능성식품 등을 복용한 경험이 있는 자

- 8) 심질환(관상동맥질환, 심부전, 협심증, 심근경색 등), 고콜레스테롤혈증, 뇌졸중, 악성 종양 또는 폐질환이 있는 자
- 9) 당뇨병자와 이와 관련된 약물을 복용하는 자
- 10) 6개월 이내 외과적 수술을 받은 자
- 11) 뇌종양, 수두증이 있거나 있었던 자
- 12) 심한 신기능 장애나 간 기능장애가 있는 자(serum creatinine > 2.0 mg/dl, ALT, AST, alkaline phosphatase > 정상 상한치 2.5)
- 13) 혈소판(15만/mm³ 이하), 백혈구(3000/mm³ 이하), 혈색소 수치(남자 9.5g/dL, 여자 9.0g/dL)이하 인 자
- 14) 위 절제술 등약물의 흡수에 영향을 줄 수 있는 수술을 한 자
- 15) 임신부, 수유부 및 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임 여성
- 16) 최근 3개월 이내 타 임상시험식품이나 타 시험약품을 복용한 경험이 있는 자
- 17) 최근 2개월 이내에 헌혈을 하였거나 1개월 이내에 성분 헌혈을 한자
- 18) 그 외 시험책임자의 소견으로 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 본 임상 시험에 부적합하다고 판단되는 자

3.9 목표한 시험대상자의 수 및 설정근거

3.9.1 시험대상자의 수

유효 표본수 최소 대상자 24명에 탈락률15% 및 순응도 15%를 고려하여 각 군당 등록할 대상자 수는 33명이며, 총 대상자수는 66명이었다.

3.9.2 목표 시험대상자의 수 설정근거

본 연구는 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험으로 문맹자를 제외한 만 20세 이상에서 70세 미만의 남성 및 여성에서 굴 가수분해물을 1일 2회 (1g/day)을 식사 후에 투여했을 때 Baseline(0주) 대비 4주 후의 수축기 및 이완기 혈압 강하 정도 등의 효과 및 안전성을 평가하고자 하는 연구이며, 연구 대상자들은 무작위로 대조군과 실험군에 1:1로 할당되며 4주간의 복용기간을 거친 후에 효과를 평가하였다.

본 인체적용시험의 목적은 실험군에서 투여기간 4주 후 Baseline(0주) 을 비교하여 수축기 및 이완기 혈압 강하 정도, Angiotensin I, Angiotensine II의 변화율이 대조군보다 우월하다는 것을 증명하고자 하였다.

유효한 대상자 수를 산정하기 위하여 다음을 가정하였다.

- (1) 평가변수의 통계적 가설검정은 양측검정으로 한다.
- (2) 유의수준(Level of significance)은 5%로 한다.
- (3) 제 2종 오류(β)는 0.2로 하여 검정력(Power of the test)은 80%를 유지한다.
- (4) 실험군과 대조군의 시험예수의 비율, 1 즉, (실험군의 예수)=(대조군의 예수), 1:1로 함
- (5) 시험식품 섭취 후 실험군과 대조군의 기능성 평가변수를 비교

굴 가수분해물을 이용한 선행연구 결과를 찾을 수 없어 대상자수 산정을 위하여 수행한 인체적용시험에서 굴 가수분해물 750mg을 투여한 결과는 아래와 같았다.

해당 연구에서는 대조군 10명, 750mg 투여군 10명의 시험대상자를 대상으로 초기 대비 6주 후의 수축기 혈압 강하 효과를 분석한 결과 수축기 혈압의 차이가 대조군의 경우 $7.9 \pm 7.8 \text{mmHg}$, 실험군의 경우 $8.8 \pm 5.4 \text{mmHg}$ 의 결과를 보였다.

이를 검정하기 위한 가설은 다음과 같다.

$H_0: \mu_t = \mu_c$ (시험 후 실험군의 평가변수 측정값이 대조군의 값과 같다)

$H_1: \mu_t \neq \mu_c$ (시험 후 실험군의 평가변수 측정값이 대조군과 같지 않다)

위의 (1) - (5)를 가정하였을 때 본 연구에 필요한 시험예수는 다음과 같다. (양측 검정)

대상자수 산정공식

$$n = \frac{2(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\mu_c - \mu_t)^2}$$

상기 식으로 아래와 같이 대상자 수를 계산하면, 최소 대상자 수는 군당 약 24명이다.

$$\frac{(1.965 + 0.840)^2 \times 5.4^2 \times 2}{(4.4)^2} = 23.6$$

유효 표본수는 최소 대상자 24명에 탈락률 15% 및 순응도 15%를 고려하여 계산하면

$$24 \times (100/85) \times (100/85) = 33$$

각 군당 등록할 피험자 수는 33명이며, 총 피험자 수는 66명이다.

4. 임상시험 기간

본 임상시험의 기관생명윤리심의위원회(IRB)의 승인일인 2014년 12월 04일로부터 2015년 04월 30일까지였다.

4.1 인체적용시험 방법

4.1.1 인체적용시험의 설계

단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중눈가림, 평행 인체적용시험

4.1.2 섭취량, 섭취방법 및 섭취기간

4.1.2.1 1일 섭취량 및 섭취방법

시험식품 및 대조군식품을 아침, 저녁 식후 30분에 2캡슐씩(총1일 4캡슐, 1000mg) 복용하도록 하며 1일 총 1000mg을 섭취하도록 하였다.

4.1.2.2 섭취기간

방문 1 (Baseline 0주) 부터 4주간 복용하도록 하였다.

4.1.2.3 섭취기간 설정 사유

동물시험으로 단회, 반복 경구투여 독성시험과 글 가수분해물의 혈압강하 효과 평가를 위한 유효섭취용량 설정 인체적용 시험 결과 투여기간을 4주로 설정하였다.

4.1.2.4 복약순응도

방문 3(마지막 방문)에 복약순응도를 계산하였다.

$$\text{순응도} = \frac{\text{복용한 시험식품 수}}{\text{복용해야 할 시험식품 수}} \times 100$$

- 복용해야 할 시험식품의 수 : 복용일수 × 1일 복용량
- 복용한 시험식품의 수 : 처방된 시험식품의 수 - 반납한 시험식품의 수

4.1.2.5 복약지도

복약일지 작성 : 시험대상자가 시험식품/대조식품을 복용하고 제공된 복약일지에 복용 캡슐량을 기록하였다.

방문 3(마지막 방문) 시 복용하고 남은 시험식품/대조식품 전량과 포장용기를 반납하였다.

4.1.2.6 미사용 시험식품/대조식품 회수

미사용 시험식품/대조식품은 인체적용식품의 관리에 따라 모두 회수하였다.

4.1.3 무작위배정 및 이중 눈가림

Microsoft Excel 프로그램(Ver.2013)을 이용하여 Randomization number 1번~66번까지 난수로 자동 생성하여 부여받았다. 시험대상자는 임상시험에 참여하는 순서대로 Randomization number를 부여받았다. 무작위 배정 이후에는 시험대상자와 시험자 모두 무작위 배정된 임상약 정보를 알 수 없도록 이중 눈가림법으로 진행하였다.

4.1.3.1 이중눈가림의 유지

무작위 배정표는 시험종료 후 결과 분석을 위한 경우나 응급상황을 제외하고는 봉합된 상태로 유지되었다.

4.1.4 병용요법

혈압 및 인체적용시험에 영향을 미칠 수 있는 혈압강하제, 혈행개선제, 항고지혈증, 베타차단제, 전립선비대증치료제 중 알파차단제, 당뇨약물이나 이와 관련된 건강기능식품을 제외하였으나 시험책임자 판단 하에 병용 복용이 가능하도록 하였다.

4.1.5 관찰 항목, 임상검사 항목 및 관찰 검사 방법

4.1.5.1 인체적용시험 진행일정표

Visit	Pre-Screening	Visit 1 (Screening + Baseline)	Visit 2 (전화방문)	Visit 3	F/U ⁹⁾
Week (Visit window)	-2~-7일	0주 (+5일)	2주 (14일±5)	4주 (28일±5)	필요시
시험대상자 동의		○			
인구학적 조사 ¹⁾		○			
활력징후 ²⁾	○	○		○	○
신체검사 ³⁾		○			
생활습관 조사 ⁴⁾		○		○	
식이섭취 조사			○	○	
병력 및 동반질환 ⁵⁾		○			
이학적 검사		○		○	○
실험실적 검사 ⁶⁾		○		○	○
Angiotensine I , Angiotensine II		○		○	
임신여부 검사 (가임기 여성) ⁷⁾		○		○	○
선행/병용 약물		○	○	○	○
이상반응			○	○	○
시험대상자 선정 ⁸⁾		○			
무작위 배정		○			
인체적용시험용 식품 처방		○			
복약 순응도 평가				○	
인체적용시험용 식품 회수				○	

4.1.5.2 시험대상자 동의 및 인구학적 조사

시험책임자 또는 위임을 받은 자는 시험대상자에게 본 임상시험의 목적과 내용 등에 대하여 상세히 설명하고 동의서에 자필로 서명을 받았으며 피험자에게 설명문을 제공하였다. 시험자는 시험대상자가 본 임상시험 참여에 동의하면 피험자의 성별, 생년월일 등의 인구학적 정보를 조사하였다.

4.1.5.3 활력징후

활력징후는 병원 도착 후 30분이 경과한 후 혈압, 맥박수, 체온을 측정하며 혈압은 좌위에서 5분 간격으로 2회 측정하고, 측정값의 평균을 최종 값으로 사용하였다.

4.1.5.4 신체검사

신체검사는 체중, 신장을 측정하였다.

4.1.5.5 생활습관 조사

흡연, 음주, 식사, 운동 습관을 조사하였다.

4.1.5.6 식이섭취 조사

본 인체적용시험용 식품은 굴 가수분해 효소가 주원료로 본 인체적용시험에 영향을 미치는 굴, 정어리의 섭취와 이를 포함한 건강기능식품(예: 정어리 성분 함유 오메가 3) 등을 시험기간 동안 제한하였다.

4.1.5.7 병력 및 동반질환

굴 및 기타 해산물에 과민증 또는 병력이 있는 자, 3개월 이내 또는 현재 알코올중독으로 치료 중이거나 갑상선 기능 이상으로 치료중인 자, 심질환(관상동맥질환, 심부전, 협심증, 심근경색 등), 고콜레스테롤혈증, 뇌졸중, 악성종양 또는 폐질환인 자, 당뇨, 뇌종양, 수두증이 있거나 있는 자, 심한 신기능 또는 간 기능장애가 있는 자, 혈소판($15\text{만}/\text{mm}^3$ 이하), 백혈구($3000/\text{mm}^3$ 이하), 혈색소 수치(남자 $9.5\text{g}/\text{dL}$, 여자 $9.0\text{g}/\text{dL}$)이하 인자는 제외하였다.

4.1.5.8 이학적검사

이학적검사는 시진, 촉진, 문진에 의해 확인할 수 있는 외관, 피부, 두/경부, 흉부/폐, 복부, 비뇨/생식계, 사지, 근골격계, 신경계, 림프절 등의 신체기관 검진을 포함하였다.

4.1.5.9 실험실적 검사

시험대상자는 방문1과 방문 3에 실험실적 검사를 실시하였다. 방문 1 이전 2주 이내에 본원에서 실시한 실험실적 검사결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않았으며, 방문 1에서 시행해야 할 검사 항목 중 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 진행하였다.

실험실적 검사 항목

<방문 1>

혈액학적 검사	WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
혈액생화학적 검사	BUN, Albumin, Total Protein, Uric acid, Total bilirubin, AST, ALT, r-GT, Creatinine, Alkaline phosphatase, HbA1c
소변 검사	pH, Protein, Glucose, WBC, RBC, Specific gravity, HCG (가임 여성만 시행)

<방문3>

혈액학적 검사	WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
혈액생화학적 검사	BUN, Albumin, Total Protein, Uric acid, Total bilirubin, AST, ALT, r-GT, Creatinine, Alkaline phosphatase, HbA1c
소변 검사	pH, Protein, Glucose, WBC, RBC, Specific gravity, HCG (가임 여성만 시행)

4.1.5.10 Angiotensine I , Angiotensine II 검사

방문 1과 방문 3에 2차 기능성 평가변수로 Angiotensin I , Angiotensine II를 검사하였다. (일본 LSI Medience corporation사에 의뢰하여 방사면역측정법(Radioimmunoassay)으로 분석)

4.1.5.11 선행/병용약물 조사

인체적용시험 참가 4주 이내 약물 복용력과 인체적용시험 진행 중에 병용한 약물 투여(용법, 용량, 투여기간 등)에 대해 조사하였다.

4.1.6 방문별 관찰 검사 방법

4.1.6.1 Pre-Screening (-2~-7일)

- 1) 활력징후

4.1.6.2 방문 1: Screening + Baseline (+5일)

- 1) 시험대상자 동의서 취득
- 2) 인구학적 조사
- 3) 활력징후 (Vital sign)

- 4) 신체검사
- 5) 생활습관 조사
- 6) 병력 및 동반 질환
- 7) 이학적 검사
- 8) 실험실적 검사
- 9) Angiotensin I, Angiotensine II 검사
- 10) 임신여부 검사 (가임기 여성에 해당)
- 11) 심전도 검사 (EKG)
- 12) 선행/병용 약물 조사
- 13) 시험대상자 선정
- 14) 무작위 배정
- 15) 인체적용시험용 식품 처방

4.1.6.3 방문 2: 전화방문 (시험식품 투여기간 D 14일±5일)

시험식품 투약기간으로 투약기간 중 식이섭취를 확인, 투약 후 14일 동안의 이상반응에 대하여 확인하였다. 만약 시험대상자에게서 유의한 변화 혹은 이상반응이 있을 경우 수집하며, 필요 시 방문하여 시험대상자의 검사 및 진료를 진행하였다.

- 1) 식이섭취 조사
- 2) 병용약물 조사
- 3) 이상반응 확인

4.1.6.4 방문3: 시험식품 투여종료 (D 28일±5일)

- 1) 활력징후
- 2) 생활습관 조사
- 3) 식이섭취 조사
- 4) 이학적 검사
- 5) 실험실적 검사
- 6) Angiotensin I, Angiotensine II 검사
- 7) 임신여부 검사 (가임기 여성에 해당)
- 8) 병용약물 조사
- 9) 이상반응조사
- 10) 복약 순응도 평가
- 11) 인체적용시험용 식품 회수

4.1.6.5 Follow-up 방문 (추가 방문)

시험자의 판단에 따라 인체적용시험용식품 최종 투여 후 혹은조기 투여 중지 후 비정상적인 실험실 결과, 계속되는 이상반응, 중도 탈락, 시험자 판단에 따라 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우 필요에 따라 추적 관찰을 위해 추가 방문하도록 하였다.

4.2 기능성 평가기준, 평가방법 및 해석방법

4.2.1 기능성 평가기준

1) 1차 기능성 평가변수

Visit 1(Baseline) 대비 Visit 3(시험식품 투여 종료)의 수축기 및 이완기 혈압 강하 정도
시험식품을 투여 받은 시험대상자의 투여 4주 후(Visit 3) 수축기 및 이완기의 혈압을 측
정하여 투여 전 Visit 1(Baseline)에 비해 감소한 혈압 수치를 평가하였다.

2) 2차 기능성 평가변수

Visit 1(Baseline) 대비 Visit 3(시험식품 투여 종료)의 혈중 Angiotensin I, Angiotensin
II의 변화

시험식품을 투여 받은 시험대상자의 투여 4주 후(Visit 3) 혈중 Angiotensin I, Angiotensin
II의 수치를 구하고, 투여 전 Visit 1 (Baseline) 대비 감소한 값을 구하여 비교하였다.

4.2.2 통계적 분석

본 자료의 통계적 분석은 호서대학교 통계학교실 통계상담실(김현철 교수팀)에 의뢰해서
진행하였다.

대상자의 일반적인 특성 및 연구변수에 대한 서술적 통계는 빈도와 백분율, 평균과 표준
편차를 구하였다. 인구통계학적 변수와 건강 상태 변수에 있어서 실험군과 대조군간 통계
학적 차이가 있는지 검정하기 위해 t-test를 이용하여 실험군과 대조군간의 비교를 실시하
였다. 범주형 자료의 경우 군간 비교를 위해 군간 빈도를 구하고 Chi-square test 또는
Fisher's Exact test 등을 이용하여 분석하였다.

실험군과 대조군의 일반적특성에 대한 검정은 Chi-square test와 Mann whitney U test
를 실시하였다. 대조군에서 시험 전과 후의 변수는 정규성 검정을 하였다. 정규성 검정
값인 Shapiro-Wilk 검정값이 0.05 이하로 나와서 정규분포를 만족하지 않았으므로 비모수
통계검정을 실시하였다. 대조군과 실험군의 평균차이를 검정하기 위해 Mann-Whitney U
test를 실시하였으며 시험 전과 시험 후 사후검정은 Wilcoxon Signed Ranks Test를 사용
하였다.

본 인체적용시험의 대상자로부터 얻어진 자료는 안전성(Safety)분석과 함께 FAS(full
analysis)군, PP(Per Protocol)의 두 가지 형태로 분석/제시하였다.

기능성 평가에 대한 자료는 FAS 분석을 주 분석으로 하고 PP분석을 별도로 실시하여
FAS 분석 결과와 차이가 있는지 평가하였다.

FAS군의 경우, 어떤 시점에서 결측치가 발생되거나 인체적용시험이 종료되기 전에 대상자
가 탈락하면 가장 최근에 얻은 자료를 마치 해당 시점에서 얻어진 것처럼 자료분석을 실
시(Last Observation Carried Forward Analysis)하는 방법으로 분석하였다.

안전성 평가에 대한 자료는 Safety군에 대해 실시하여 본 인체적용시험용 식품의 안전성
을 평가하였다.

1) 안전성 분석군

본 인체적용시험에 참여하여 최소한 1회 이상 인체적용시험용 식품을 복용한 대상자로부터 얻어진 자료를 모두 분석하였다.

2) FAS 군

FAS군은 ITT(Intention to treat) 원칙에 의해 제공되는 개념과 가능한 한 근접하는 이상적인 연구대상 집단으로 모든 무작위 배정된 대상자에서 최소한의 정당한 제외사유를 가진 연구대상자를 제거한 대상자를 대상으로 하는 것이다. 이 경우 무작위 배정된 대상자 중 다음에 한해서는 주 분석에서 제외할 수 있다.

- ① 주요한 선정, 제외기준을 위배하거나
- ② 인체적용시험용 식품을 단 한번이라도 투여 받지 못하거나
- ③ 무작위 배정 이후 자료가 전무한 경우

3) PP 군

PP군은 FAS군에 포함되는 대상자 중 인체적용시험계획서에 따라 본 연구를 성공적으로 완료한 대상자를 대상으로 하였다.

4.3 결과 분석의 참고사항

4.3.1 통계처리의 기준

기술 분석 시 연속형 자료인 경우 평균, 표준편차, 95% 신뢰구간을 산출하고, 범주형 자료인 경우 빈도, 퍼센트를 산출하였다.

결측치가 있는 경우, 결측치를 나타내는 자료는 분석에서 제외하였다.

본 자료 분석 시 이용되는 모든 검정 통계량은 양측검정의 결과이고, 통계적 유의수준은 0.05를 기준으로 하였다

4.3.2 자료관리 (Data Management)

인체적용시험에서 얻어진 자료의 질적 수준을 확보하기 위한 자료관리는 KGCP 규정 및 ICH 지침에 근거하여 실시하며, 인체적용시험 자료의 질적 보증(data quality assurance)을 위한 자료관리 과정은 인체적용시험 관련자(시험책임자, 시험담당자 등)에 대한 교육, 인체적용시험 의뢰자에 의한 모니터링 및 점검(monitoring and audit), 데이터 관리(data management) 등의 형태로 실시하였다.

증례기록서에 기록된 인체적용시험 자료의 입력 및 관리를 위해 데이터 관리계획(Data Management Plan, 이하 DMP)를 정의하여 데이터의 완전성, 정확성 및 일치성을 점검하였다. 임상시험 자료 입력의 정확성을 보장하고, 이상반응 및 병용약물은 코딩사전(Coding Dictionary)을 이용하여 코드화하였다. 임상자료의 입력이 완료되면, 데이터 점검 과정(Data validation) 및 Data Quality Control(QC) 과정을 실시하여 데이터의 완결성, 정

확성 및 신뢰성을 보장할 수 있도록 하고, 이 후 데이터베이스 잠금(Database Lock)을 실시하였다. 맹검 해제(Code Open)를 실시하기 전에 Blind Meeting을 실시하여 객관성을 유지하였다. 임상시험 데이터 관리를 위해 사용된 데이터베이스(database) 및 데이터 관리 과정에서 발생하는 모든 문서들은 시스템 오류 또는 재난(system error or environmental disasters) 등으로 인한 데이터 손실을 방지하기 위해 정기적인 백업을 실시하여 복구가 가능하도록 관리하였다.

4.4 시험대상자 동의서 및 설명문

본 시험의 실시에 있어서 시험대상자 또는 보호자에게 본 시험의 내용 및 시험식품의 효과, 이상반응에 대해 사전에 충분히 설명한 후 시험대상자의 동의를 얻어 동의서를 작성하고 증례기록서에 동의를 취득한 년도와 월일을 기재하였다.

5. 시험대상자의 기초 정보

5.1 시험대상자의 기초정보

71명을 스크리닝하여 선정기준 미달로 5명이 스크리닝에서 탈락되었고 66명을 등록하였다. 대조군과 굴 가수분해물 투여군(1000 mg군)에 각각 33명씩 총 66명이 할당되었으나 투여 종료 후 이상반응과 시험식품 복용순응도 80%미만에 의해 시험대상자 2명(대조식품군 1명 : 임신, 굴 가수분해물 1000mg 투여군 1명 : 시험식품 복용률 80% 미만)이 중도 탈락 하였다(표 1).

시험 대상자는 남자 48명, 여자 18명으로 총 66명이었다. 시험대상자의 연령대는 20세 부터 55세까지 구성되었다. 실험군의 체중평균(77.4±11.6kg)이 대조군의 평균체중(70.4±11.8kg)에 비해 의미 있게 높았으며 남성의 비율(84.8%)도 대조군(60.6%)에 비해 높았다. 연령, 키, 수축기 및 이완기 기저혈압, 흡연력, 음주력, 동반질환, 운동 등 다른 변수들에 있어서는 군간의 차이는 발견되지 않았다.

시험대상자들의 과거 질병력도 양 군간에 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다. 또한, 임상시험 개시 전의 약물 복용력도 양 군간에 차이를 보이지 않았다.

<표 1> 대상자 기초정보 및 과거병력

평가변수		대조군(n=33)	실험군(n=33)	p value
연령 (세)		33.8±10.6	37.2±9.8	.150
성별(n, %)	남자	20(60.6)	28(84.8)	.027
	여자	13(39.4)	5(15.2)	
몸무게(kg)		70.4±11.8	77.4±11.6	.018
키(cm)		171.4±7.8	172±7.8	.700
수축기혈압(mmHg)		131±4	131.6±3.7	.568
이완기혈압(mmHg)		83.3±3.9	83.3±3.6	.837
흡연력(n, %)	비흡연	17(51.5)	19(57.6)	.835
	과거흡연	7(21.2)	7(21.2)	
	현재흡연	9(27.3)	7(21.2)	
흡연력 4주후(n, %)	비흡연	18(54.5)	19(57.6)	.844
	과거흡연	5(15.2)	6(18.2)	
	현재흡연	10(30.3)	8(24.2)	
음주력(n, %)	비음주	10(30.3)	8(24.2)	.510
	보통음주(≤소주½병/주)	6(18.2)	10(30.3)	
	다량음주(≥소주½병/주)	17(51.5)	15(45.5)	
음주력 4주 후(n, %)	비음주	10(30.3)	7(21.2)	.372
	보통음주(≤소주½병/주)	7(21.2)	12(36.4)	
	다량음주(≥소주½병/주)	16(48.5)	14(42.4)	
선행/ 병용약물(n, %)	없음	28(84.8)	26(78.8)	.523
	있음	5(15.2)	7(21.2)	
동반질환	없음	23(69.7)	18(54.5)	.205
	있음	10(30.3)	15(45.5)	
이학적 검사	no	33(100.0)	33(100.0)	1.000
	yes	0(0.0)	0(0.0)	
운동	전혀하지 않음	15(45.5)	11(33.3)	.345
	불규칙적(30분, 주3회 이하)	12(36.4)	11(33.3)	
	규칙적(30분, 주3회 이상)	6(18.2)	11(33.3)	
운동_4주 후	전혀하지 않음	17(51.5)	9(27.3)	.130
	불규칙적(30분, 주3회이하)	9(27.3)	14(42.4)	
	규칙적(30분, 주3회이상)	7(21.2)	10(30.3)	

a p value by Mann whitney U test

b p value by Chi-square test

6. 유효성 분석결과(FAS analysis)

본 임상시험에 참여하여 최소한 1회 이상 시험용 식품을 복용한 대상자 전체를 포함하여 ITT(Intention to treat) 방식에 따른 FAS 분석을 실시하였다.

6.1 시험 전후 유효성 평가 변수의 변화

실험군의 수축기 혈압은 $130.4 \pm 4.3 \text{ mmHg}$ 에서 $123.9 \pm 5.9 \text{ mmHg}$ 로 $6.5 \pm 6.1 \text{ mmHg}$ 감소하였고 이는 통계적으로 의미가 있었다($p=0.000$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

대조군의 수축기 혈압은 $129.8 \pm 4.1 \text{ mmHg}$ 에서 $124.4 \pm 8.3 \text{ mmHg}$ 로 $5.4 \pm 8 \text{ mmHg}$ 감소하였고 이는 통계적으로 의미가 있었다($p=0.001$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

하지만 감소된 정도는 양군 간에 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다($p=0.63$, p-value by Mann whitney U test).

실험군의 이완기 혈압은 $83.5 \pm 5 \text{ mmHg}$ 에서 $80.3 \pm 6.4 \text{ mmHg}$ 로 $2.7 \pm 5.3 \text{ mmHg}$ 감소하였고 이는 통계적으로 의미가 있었다($p=0.012$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

대조군의 이완기 혈압은 $82.6 \pm 4.1 \text{ mmHg}$ 에서 $79.3 \pm 7.1 \text{ mmHg}$ 로 $3.3 \pm 6.5 \text{ mmHg}$ 감소하였고 이는 통계적으로 의미가 있었다($p=0.009$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

하지만 감소된 정도는 양군 간에 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다($p=0.488$, p-value by Mann whitney U test).

실험군의 Angiotensin I 수치는 시험 후에 $3.6 \pm 892.7 \text{ pg/mL}$ 감소하였고 대조군의 경우는 307.9 ± 1124.5 증가하였다. 양군 모두에서 시험 전후 변화에 통계적인 유의성은 없었고(실험군 $p=0.908$, 대조군 $p=0.396$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test), 각 군의 복용 전후 변화량 간에도 통계적으로 의미 있는 차이는 없는 것으로 나타났다($p=0.509$, p-value by Mann whitney U test).

실험군의 Angiotensin II 수치는 시험 후에 $8.8 \pm 30.2 \text{ pg/mL}$ 감소하였고 대조군의 경우는 5.8 ± 16.6 감소하였다. 양군 모두에서 시험 전후 변화에 통계적인 유의성은 없었고(실험군 $p=0.065$, 대조군 $p=0.185$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test), 각 군의 복용 전후 변화량 간에도 통계적으로 의미 있는 차이는 없는 것으로 나타났다($p=0.739$, p-value by Mann whitney U test).

실험군과 대조군간의 혈압과 체온 변화에 있어서도 양군 간에 의미 있는 차이는 없었다.

<표 2> 시험 전후 유효성평가 변수의 검정 (대조군과 실험군, ITT analysis)

평가변수		대조군	실험군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
수축기혈압	Baseline	129.8±4.1	130.4±4.3	.551	
	after 4 weeks	124.4±8.3	123.9±5.9	.949	
	Difference ^c	5.4±8	6.5±6.1	.630	
	p value ^d	.001	.000		
이완기혈압	Baseline	82.6±4.1	83±5	.352	
	after 4 weeks	79.3±7.1	80.3±6.4	.393	
	Difference ^c	3.3±6.5	2.7±5.3	.488	
	p value ^d	.009	.012		
맥박	Baseline	81.9±12.3	80.2±11.9	.710	
	after 4 weeks	81.9±12.8	76.1±10.3	.107	
	Difference ^c	0±12.1	4.1±10.8	.253	
	p value ^d	.976	.056		
체온	Baseline	36.6±0.3	36.5±0.3	.717	
	after 4 weeks	36.4±0.2	36.4±0.2	.262	
	Difference ^c	0.2±0.4	0.1±0.4	.315	
	p value ^d	.004	.107		
Angiotensin I	Baseline	1355.8±660.2	1487.9±981	.739	
	after 4 weeks	1663.6±1231.6	1484.2±846.3	.832	
	Difference ^c	-307.9±1124.5	3.6±892.7	.509	
	p value ^d	.396	.908		
Angiotensin II	Baseline	18.7±15.6	17.3±14.2	.337	
	after 4 weeks	24.5±22.9	26.1±31.7	.608	
	Difference ^c	-5.8±16.6	-8.8±30.2	.739	
	p value ^d	.185	.065		

a : Compared between groups : p-value by Mann whitney U test

b : Compared between groups : p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c : Difference between the values of Baseline and after 4 weeks.

d : Compared within groups : p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test

6.2 체중 통제후 시험 전후 유효성평가 변수의 변화

실험군과 대조군의 체중차이를 보정하기 위하여 체중을 통제변수로 지정하고 ANCOVA 검정을 실시하였다. 수축기혈압, 이완기혈압, Angiotensin I, Angiotensin II 네가지 유효성 평가 변수 모두에서 실험군과 대조군 간에 의미 있는 차이는 없었다(표 3).

<표 3> 체중 통제후 시험 전후 유효성평가변수의 변화(ITT analysis)

평가변수		내소군	실험군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
수축기혈압	Baseline	129.8±4.1	130.4±4.3	.551	
	after 4 weeks	124.4±8.3	123.9±5.9	.949	
	Difference ^c	5.4±8	6.5±6.1	.630	.366
	p value ^d	.001	.000		
이완기혈압	Baseline	82.6±4.1	83±5	.352	
	after 4 weeks	79.3±7.1	80.3±6.4	.393	
	Difference ^c	3.3±6.5	2.7±5.3	.488	.790
	p value ^d	.009	.012		
Angiotensin I	Baseline	1355.8±660.2	1487.9±981	.739	
	after 4 weeks	1663.6±1231.6	1484.2±846.3	.832	
	Difference ^c	-307.9±1124.5	3.6±892.7	.509	.491
	p value ^d	.396	.908		
Angiotensin II	Baseline	18.7±15.6	17.3±14.2	.337	
	after 4 weeks	24.5±22.9	26.1±31.7	.608	
	Difference ^c	-5.8±16.6	-8.8±30.2	.739	.693
	p value ^d	.185	.065		

a : Compared between groups : p-value by Mann whitney U test

b : Compared between groups : p-value by ANCOVA(adjustment with weight)

c : Difference between the values of Baseline and after 4 weeks.

d : Compared within groups : p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test

6.3 성별 통제후 시험 전후 유효성 평가변수의 변화

실험군과 대조군의 성별분포의 차이를 보정하기 위하여 성별을 통제변수로 지정하고 ANCOVA 검정을 실시하였다. 수축기혈압, 이완기혈압, Angiotensin I, Angiotensin II 네 가지 유효성평가 변수 모두에서 실험군과 대조군 간에 의미 있는 차이는 없었다(표 4).

<표 4> 성별 통제 후 시험전후 유효성 평가변수의 변화(ITT analysis)

평가변수		대조군	실험군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
수축기혈압	Baseline	129.8±4.1	130.4±4.3	.551	
	after 4 weeks	124.4±8.3	123.9±5.9	.949	
	Difference ^c	5.4±8	6.5±6.1	.630	.243
	p value ^d	.001	.000		
이완기혈압	Baseline	82.6±4.1	83±5	.352	
	after 4 weeks	79.3±7.1	80.3±6.4	.393	
	Difference ^c	3.3±6.5	2.7±5.3	.488	.682
	p value ^d	.009	.012		
Angiotensin I	Baseline	1355.8±660.2	1487.9±981	.739	
	after 4 weeks	1663.6±1231.6	1484.2±846.3	.832	
	Difference ^c	-307.9±1124.5	3.6±892.7	.509	.534
	p value ^d	.396	.908		
Angiotensin II	Baseline	18.7±15.6	17.3±14.2	.337	
	after 4 weeks	24.5±22.9	26.1±31.7	.608	
	Difference ^c	-5.8±16.6	-8.8±30.2	.739	.755
	p value ^d	.185	.065		

a : Compared between groups : p-value by Mann whitney U test

b : Compared between groups : p-value by ANCOVA(adjustment with Sex)

c : Difference between the values of Baseline and after 4 weeks.

d : Compared within groups : p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test

6.4 소그룹 분석 : 혈압이 높은 군과 낮은 군별 유효성 평가 변수의 검정

시험대상군의 수축기혈압을 130mmHg을 기준으로 이보다 낮은 군과 높은 군으로 나누어 소그룹 분석(subgroup analysis)을 수행하였다.

실험군의 수축기 혈압은 126.7 ± 2.6 mmHg에서 123.2 ± 6.8 mmHg로 3.5 ± 5.8 mmHg 감소하였으나 통계적으로 의미 있는 차이는 아니었다($p=0.319$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

대조군의 수축기 혈압은 126.4 ± 1.8 mmHg에서 123.3 ± 8.6 mmHg로 3.2 ± 8.4 mmHg 감소하였으나 통계적으로 의미 있는 차이는 아니었다($p=0.177$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

양 군간에 감소된 정도는 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다($p=0.984$, p-value by Mann whitney U test).

실험군의 이완기 혈압은 82.3 ± 5.6 mmHg에서 81.1 ± 7.1 mmHg로 1.2 ± 5.2 mmHg 감소하였으나 통계적인 의미는 없었다($p=0.319$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

대조군의 이완기 혈압은 83.6 ± 2.9 mmHg에서 80.3 ± 7.5 mmHg로 3.3 ± 7.2 mmHg 감소하였으나 통계적인 의미는 없었다($p=0.07$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

하지만 감소된 정도는 양군 간에 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다($p=0.355$, p-value by Mann whitney U test).

실험군의 Angiotensin I 수치는 시험 후에 218.0 ± 656.1 pg/ml 증가하였고 대조군의 경우는 372.9 ± 1207.3 증가하였다. 양군 모두에서 시험 전후 변화에 통계적인 유의성은 없었고(실험군 $p=0.256$, 대조군 $p=0.356$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test), 각 군의 복용 전후 변화량 간에도 통계적으로 의미 있는 차이는 없는 것으로 나타났다($p=1.000$, p-value by Mann whitney U test).

실험군의 Angiotensin II 수치는 시험 후에 6.3 ± 13.7 pg/ml 증가하였고 대조군의 경우는 7.5 ± 18.5 증가하였다. 양군 모두에서 시험 전후 변화에 통계적인 유의성은 없었고(실험군 $p=0.023$, 대조군 $p=0.186$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test), 각 군의 복용 전후 변화량 간에도 통계적으로 의미 있는 차이는 없는 것으로 나타났다($p=0.531$, p-value by Mann whitney U test).

<표 5> Baseline 수축기 혈압 120-129그룹의 시험전후 유효성평가 변수의 변화(ITT analysis)

평가변수		대조군	실험군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
S B P.	Baseline	126.4±1.8	126.7±2.6	.526	
	after 4 weeks	123.3±8.6	123.2±6.8	.970	
	Difference ^c	3.2±8.4	3.5±5.8	.948	
	p value ^d	.177	.041		
D B P.	Baseline	83.6±2.9	82.3±5.6	.940	
	after 4 weeks	80.3±7.5	81.1±7.1	.664	
	Difference ^c	3.3±7.2	1.2±5.2	.355	
	p value ^d	.070	.319		
Angiotensin I	Baseline	1414.1±774.8	1180.0±589.1	.290	
	after 4 weeks	1787.1±1188.5	1398.0±646.5	.584	
	Difference ^c	-372.9±1207.3	-218.0±656.1	1.000	
	p value ^d	.356	.256		
Angiotensin II	Baseline	20.5±19.7	16.4±14.1	.287	
	after 4 weeks	28.0±7.6	22.7±18.5	.850	
	Difference ^c	-7.5±18.5	-6.3±13.7	.531	
	p value ^d	.186	.023		

a : Compared between groups : p-value by Mann whitney U test

b : Compared between groups : p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c : Difference between the values of Baseline and after 4 weeks.

d : Compared within groups : p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test

<표 6> Baseline 수축기 혈압 130-139그룹의 시험전후 유효성평가 변수의 변화(ITT analysis)

평가변수		대조군	실험군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
S B P.	Baseline	133.5±2.4	133.5±2.8	.890	
	after 4 weeks	125.6±8.0	124.5±5.1	.691	
	Difference ^c	7.8±7.1	9.0±5.2	.579	
	p value ^d	.002	<.001		
D B P.	Baseline	81.6±5.0	83.5±4.5	.162	
	after 4 weeks	78.3±6.8	79.7±6.0	.479	
	Difference ^c	3.3±5.9	3.8±5.3	.993	
	p value ^d	.046	.006		
Angiotensin I	Baseline	1293.8±530.6	1744.4±1171.6	.523	
	after 4 weeks	1532.5±1301.4	1556.1±995.9	.932	
	Difference ^c	-238.8±1064.4	188.3±1032.5	.379	
	p value ^d	.856	.276		
Angiotensin II	Baseline	16.8±9.9	18.1±14.7	.742	
	after 4 weeks	20.8±16.7	28.9±39.8	.616	
	Difference ^c	-4.1±14.6	-10.8±39.4	.939	
	p value ^d	.629	.601		

a : Compared between groups : p-value by Mann whitney U test

b : Compared between groups : p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c : Difference between the values of Baseline and after 4 weeks.

d : Compared within groups : p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test

7. 유효성 분석결과(PP analysis)

7.1 시험 전후 유효성 평가 변수의 변화

총 66명의 참여자중 식품 투여 중 이상반응에 의해 중도 탈락한 2명(대조군과 실험군 각 1명)을 제외하고 프로토콜을 완성한 64명을 대상으로 PP(Per protocol analysis)분석을 시행하였다.

실험군의 수축기 혈압은 $130.5 \pm 4.4 \text{ mmHg}$ 에서 $123.9 \pm 6 \text{ mmHg}$ 로 $6.6 \pm 6.1 \text{ mmHg}$ 감소하였고 이는 통계적으로 의미가 있었다($p=0.000$, p -value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

대조군의 수축기 혈압은 $129.7 \pm 4.1 \text{ mmHg}$ 에서 $124.8 \pm 8.1 \text{ mmHg}$ 로 $4.9 \pm 7.5 \text{ mmHg}$ 감소하였고 이는 통계적으로 의미가 있었다($p=0.002$, p -value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

하지만 감소된 정도는 양군 간에 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다($p=0.416$, p -value by Mann whitney U test).

실험군의 이완기 혈압은 $83.2 \pm 4.9 \text{ mmHg}$ 에서 $80.6 \pm 6.3 \text{ mmHg}$ 로 $2.6 \pm 5.4 \text{ mmHg}$ 감소하였고 이는 통계적으로 의미가 있었다($p=0.16$, p -value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

대조군의 이완기 혈압은 $82.5 \pm 4.1 \text{ mmHg}$ 에서 $79.5 \pm 7.2 \text{ mmHg}$ 로 $3.0 \pm 6.4 \text{ mmHg}$ 감소하였고 이는 통계적으로 의미가 있었다($p=0.015$, p -value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

하지만 감소된 정도는 양군 간에 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다($p=0.596$, p -value by Mann whitney U test).

실험군의 Angiotensin I 수치는 시험 후에 $6.6 \pm 906.8 \text{ pg/ml}$ 감소하였고 대조군의 경우는 275.6 ± 1126.9 증가하였다. 양군 모두에서 시험 전후 변화에 통계적인 유의성은 없었고(실험군 $p=0.896$, 대조군 $p=0.550$, p -value by Wilcoxon Signed Ranks Test), 각 군의 복용 전후 변화량 간에도 통계적으로 의미 있는 차이는 없는 것으로 나타났다($p=0.610$, p -value by Mann whitney U test).

실험군의 Angiotensin II 수치는 시험 후에 $9.0 \pm 30.7 \text{ pg/ml}$ 감소하였고 대조군의 경우는 5.7 ± 16.8 감소하였다. 양군 모두에서 시험 전후 변화에 통계적인 유의성은 없었고(실험군 $p=0.075$, 대조군 $p=0.226$, p -value by Wilcoxon Signed Ranks Test), 각 군의 복용 전후 변화량 간에도 통계적으로 의미 있는 차이는 없는 것으로 나타났다($p=0.662$, p -value by Mann whitney U test).

<표 7> 시험 전후 유효성평가 변수의 검정 (대조군과 실험군. PP analysis)

평가변수		대조군	실험군	p value ^a
		Mean±S.D.		
수축기혈압	Baseline	129.7±4.1	130.5±4.4	.412
	after 4 weeks	124.8±8.1	123.9±6	.768
	Difference ^c	4.9±7.5	6.6±6.1	.416
	p value ^d	.002	.000	
이완기혈압	Baseline	82.5±4.1	83.2±4.9	.231
	after 4 weeks	79.5±7.2	80.6±6.3	.357
	Difference ^c	3±6.4	2.6±5.4	.596
	p value ^d	.015	.016	
맥박	Baseline	81.5±12.2	80.1±12.1	.809
	after 4 weeks	82±13	75.7±10.2	.074
	Difference ^c	-0.5±11.9	4.4±10.8	.136
	p value ^d	.821	.036	
체온	Baseline	36.6±0.3	36.5±0.3	.532
	after 4 weeks	36.4±0.2	36.4±0.2	.254
	Difference ^c	0.2±0.4	0.1±0.4	.227
	p value ^d	.002	.140	
Angiotensin I	Baseline	1361.9±669.8	1507.5±990.1	.840
	after 4 weeks	1637.5±1242	1500.9±854.3	.989
	Difference ^c	-275.6±1126.9	6.6±906.8	.610
	p value ^d	.550	.896	
Angiotensin II	Baseline	19±15.8	17.6±14.4	.370
	after 4 weeks	24.7±23.2	26.6±32.1	.737
	Difference ^c	-5.7±16.8	-9±30.7	.662
	p value ^d	.266	.075	

a : Compared between groups : p-value by Mann whitney U test

b : Compared between groups : p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c : Difference between the values of Baseline and after 4 weeks.

d : Compared within groups : p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test

7.2 체중 통제후 시험 전후 유효성평가 변수의 변화

실험군과 대조군의 체중차이를 보정하기 위하여 체중을 통제변수로 지정하고 ANCOVA 검정을 실시하였다. 수축기혈압, 이완기혈압, Angiotensin I, Angiotensin II 네가지 유효성평가 변수 모두에서 실험군과 대조군 간에 의미 있는 차이는 없었다(표 8).

<표 8> 체중 통제 후 시험 전후 유효성평가 변수의 변화(PP analysis)

평가변수		대조군	실험군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
수축기혈압	Baseline	129.7±4.1	130.5±4.4	.412	
	after 4 weeks	124.8±8.1	123.9±6	.768	
	Difference ^c	4.9±7.5	6.6±6.1	.416	.301
	p value ^d	.002	.000		
이완기혈압	Baseline	82.5±4.1	83.2±4.9	.231	
	after 4 weeks	79.5±7.2	80.6±6.3	.357	
	Difference ^c	3±6.4	2.6±5.4	.596	.700
	p value ^d	.015	.016		
Angiotensin I	Baseline	1361.9±669.8	1507.5±990.1	.840	
	after 4 weeks	1637.5±1242	1500.9±854.3	.989	
	Difference ^c	-275.6±1126.9	6.6±906.8	.610	.584
	p value ^d	.550	.896		
Angiotensin II	Baseline	19±15.8	17.6±14.4	.370	
	after 4 weeks	24.7±23.2	26.6±32.1	.737	
	Difference ^c	-5.7±16.8	-9±30.7	.662	.660
	p value ^d	.266	.075		

a : Compared between groups : p-value by Mann whitney U test

b : Compared between groups : p-value by ANCOVA(adjustment with weight)

c : Difference between the values of Baseline and after 4 weeks.

d : Compared within groups : p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test

7.3 성별 통제후 시험 전후 유효성평가 변수의 변화

실험군과 대조군의 성별분포의 차이를 보정하기 위하여 성별을 통제변수로 지정하고 ANCOVA 검정을 실시하였다. 수축기혈압, 이완기혈압, Angiotensin I, Angiotensin II 네 가지 유효성평가 변수 모두에서 실험군과 대조군 간에 의미 있는 차이는 없었다(표 9).

<표 9> 성별 통제 후 시험 전후 유효성평가 변수의 변화(PP analysis)

평가변수	Mean±S.D.		p value ^a	p value ^b	
	대조군	실험군			
수축기혈압	Baseline	129.7±4.1	130.5±4.4	.412	
	after 4 weeks	124.8±8.1	123.9±6	.768	
	Difference ^c	4.9±7.5	6.6±6.1	.416	.196
	p value ^d	.002	.000		
이완기혈압	Baseline	82.5±4.1	83.2±4.9	.231	
	after 4 weeks	79.5±7.2	80.6±6.3	.357	
	Difference ^c	3±6.4	2.6±5.4	.596	.830
	p value ^d	.015	.016		
Angiotensin I	Baseline	1361.9±669.8	1507.5±990.1	.840	
	after 4 weeks	1637.5±1242	1500.9±854.3	.989	
	Difference ^c	-275.6±1126.9	6.6±906.8	.610	.358
	p value ^d	.550	.896		
Angiotensin II	Baseline	19±15.8	17.6±14.4	.370	
	after 4 weeks	24.7±23.2	26.6±32.1	.737	
	Difference ^c	-5.7±16.8	-9±30.7	.662	.701
	p value ^d	.266	.075		

a : Compared between groups : p-value by Mann whitney U test

b : Compared between groups : p-value by ANCOVA(adjustment with Sex)

c : Difference between the values of Baseline and after 4 weeks.

d : Compared within groups : p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test

7.4 소그룹 분석 : 혈압이 높은 군과 낮은 군별 유효성 평가 변수의 검정

시험대상군의 수축기혈압을 130mmHg을 기준으로 이보다 낮은 군과 높은 군으로 나누어 소그룹 분석(subgroup analysis)을 수행하였다.

실험군의 수축기 혈압은 126.6 ± 2.7 mmHg에서 123.1 ± 7.0 mmHg로 3.5 ± 6.0 mmHg 감소하였으나 통계적으로 의미 있는 차이는 아니었다($p=0.152$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

대조군의 수축기 혈압은 126.4 ± 1.8 mmHg에서 123.3 ± 8.6 mmHg로 3.2 ± 8.4 mmHg 감소하였으나 통계적으로 의미 있는 차이는 아니었다($p=0.186$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

양군 간에 감소된 정도는 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다($p=0.883$, p-value by Mann whitney U test).

실험군의 이완기 혈압은 82.9 ± 5.5 mmHg에서 81.8 ± 6.7 mmHg로 1.1 ± 5.3 mmHg 감소하였으나 통계적인 의미는 없었다($p=0.987$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

대조군의 이완기 혈압은 83.6 ± 2.9 mmHg에서 80.3 ± 7.5 mmHg로 3.3 ± 7.2 mmHg 감소하였으나 통계적인 의미는 없었다($p=0.07$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test).

하지만 감소된 정도는 양군 간에 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다($p=0.321$, p-value by Mann whitney U test).

실험군의 Angiotensin I 수치는 시험 후에 227.1 ± 679.9 pg/ml 증가하였고 대조군의 경우는 372.9 ± 1207.3 증가하였다. 양군 모두에서 시험 전후변화에 통계적인 유의성은 없었고(실험군 $p=0.296$, 대조군 $p=0.378$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test), 각 군의 복용 전후 변화량 간에도 통계적으로 의미 있는 차이는 없는 것으로 나타났다($p=0.992$, p-value by Mann whitney U test).

실험군의 Angiotensin II 수치는 시험 후에 6.6 ± 14.4 pg/ml 증가하였고 대조군의 경우는 7.5 ± 18.5 증가하였다. 양군 모두에서 시험 전후 변화에 통계적인 유의성은 없었고(실험군 $p=0.024$, 대조군 $p=0.196$, p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test), 각 군의 복용 전후 변화량 간에도 통계적으로 의미 있는 차이는 없는 것으로 나타났다($p=0.523$, p-value by Mann whitney U test).

<표 10> Baseline 수축기혈압 120-129그룹의 시험전후 유효성평가 변수의 변화(PP analysis)

평가변수		대조군	실험군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
S B P.	Baseline	126.4±1.8	126.6±2.7	.603	
	after 4 weeks	123.3±8.6	123.1±7.0	.992	
	Difference ^c	3.2±8.4	3.5±6.0	.883	
	p value ^d	.186	.152		
D B P.	Baseline	83.6±2.9	82.9±5.5	.688	
	after 4 weeks	80.3±7.5	81.8±6.7	.468	
	Difference ^c	3.3±7.2	1.1±5.3	.321	
	p value ^d	.072	.987		
Angiotensin I	Baseline	1414.1±774.8	1202.9±604.3	.382	
	after 4 weeks	1787.1±1188.5	1430.0±658.5	.645	
	Difference ^c	-372.9±1207.3	-227.1±679.9	.992	
	p value ^d	.378	.296		
Angiotensin II	Baseline	20.5±19.7	16.9±14.4	.423	
	after 4 weeks	28.0±27.6	23.5±18.9	1.000	
	Difference ^c	-7.5±18.5	-6.6±14.2	.523	
	p value ^d	.196	.024		

a : Compared between groups : p-value by Mann whitney U test

b : Compared between groups : p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c : Difference between the values of Baseline and after 4 weeks.

d : Compared within groups : p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test

<표 11> Baseline 수축기혈압 130-139그룹의 시험전후 유효성평가 변수의 변화(PP analysis)

평가변수		대조군	실험군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
S B P.	Baseline	133.4±2.5	133.5±2.8	.993	
	after 4 weeks	126.5±7.4	124.5±5.1	.469	
	Difference ^c	6.8±6.0	9.0±5.2	.366	
	p value ^d	.001	<.001		
D B P.	Baseline	81.4±5.0	83.5±4.5	.127	
	after 4 weeks	78.6±6.9	79.7±6.0	.611	
	Difference ^c	2.8±5.7	3.8±5.3	.796	
	p value ^d	.086	.052		
Angiotensin I	Baseline	1302.7±547.9	1744.4±1171.6	.515	
	after 4 weeks	1468.0±1320.4	1556.1±995.9	.769	
	Difference ^c	-165.3±1059.0	188.3±1032.5	.526	
	p value ^d	.815	.304		
Angiotensin II	Baseline	17.2±10.1	18.1±14.7	.701	
	after 4 weeks	20.9±17.3	28.9±39.8	.714	
	Difference ^c	-3.7±15.0	-10.8±39.4	.908	
	p value ^d	.915	.300		

a : Compared between groups : p-value by Mann whitney U test

b : Compared between groups : p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c : Difference between the values of Baseline and after 4 weeks.

d : Compared within groups : p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test

8. 안전성 분석 결과

안전성 분석에서 이상반응은 시험에 참여한 모든 시험대상자를 대상으로 평가하였고, 실험실 검사 및 그 외의 항목에 대하여는 조사된 자료를 모두 이용하였다.

8.1 이상반응 발생 현황

실험군의 경우 한 명의 피험자(R038)에서 위장장애가 발생하였고 한 명에서 간기능이상 나타났으며 두 사례 모두 투여 식품과 연관 가능성이 있을 것으로 판단되었다(표 13).

위장장애는 식품 투여 후 일 시점인 15년 1월 28일 위장관통증이 발생하였으나 제산제 병용투여하며 지켜보기로 하였다. 동년 2월 4일 증세 호전 없어 위내시경 시행하였고 내시경상 hiatal hernia, reflux esophagitis, erythematous gastritis 소견이 나타나 각각 별도의 이상반응 건수로 포함시켰다. 문진상 기간 중 과음, 과로, 특이한 음식 등 섭취력 없어서 인과관계가 있을 가능성이 있다고 판단하였다.

간기능 이상은 한 명의 피험자(R060)에서 Visit 3 시점(15년 3월 24일)에 관찰되었다(AST 127, ALT 125). 4주간의 식품 섭취 직후인지라 인과관계의 가능성이 있다고 판단하였으나 당시 2-3일간 과로와 극도의 수면부족 상태임을 고려할 필요가 있다. 1주 후 추가 방문시 AST 44, ALT 59로 호전됨을 확인하였다.

대조군의 경우 감기 6건, 근골격계 질환 3건, 기타 3건이 발생하였으나 투여한 위약과의 인과관계가 있다고 생각할 만한 사례는 없었다.

<표 12> 실험군과 대조군의 이상반응 발생건수

이상반응 분류	건수 / 총수		비율(%)	
	실험군	대조군	실험군	대조군
위장장애	5/38	0/34	13%	0
피부발진	0/38	0/34	0	0
URI (감기등..)	3/38	6/34	7.9%	17.6%
근골격계질환	0/38	3/34	0	8.8%
간기능효소 상승	1/38	0/34	2.6%	0
기타	3/38	3/34	7.9%	8.8%

<표 13> 연관 가능성이 있는 이상반응 발생 현황

시험대상자	이상반응 (시작일-소멸일, yy/dd/dd)	이상반응정도	처치	제품 연관성
R038 - 실험군	Dyspepsia (15/01/28 - 15/02/06)	중등증	치료약물 병용투여	연관의 가능성이 있음
R038 - 실험군	hiatal hernia (15/02/04 - ongoing)	경증	없음	연관의 가능성이 있음
R038 - 실험군	reflux esophagitis (15/02/04 - ongoing)	경증	없음	연관의 가능성이 있음
R038 - 실험군	erythematous gastritis (15/02/04 - ongoing)	경증	없음	연관의 가능성이 있음
R060 - 실험군	elevated liver enzymes (15/03/24 - 15/03/30)	중등증	없음	연관의 가능성이 있음

8.2 실험실 검사 결과

실험실 검사 결과의 변화는 시험식품을 투여하기 직전과 투여한 후 4주 후의 변화량을 비모수검정법인 Wilcoxon signed ranks test로 평가하였다. 또한, 그룹별 차이는 Mann whitney U test를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 모든 실험실 검사 결과의 변화가 각 군에서 의미 있는 차이를 나타내지 않았다(표 14).

<표 14> 시험 전후 혈액학적 검사 변화 - 대조군 vs 실험군

평가변수		대조군	실험군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
WBC	Baseline	6.7±2.1	6.2±1.4	.534	
	after 4 weeks	6.5±1.2	6.2±1.6	.256	
	Difference ^c	0.1±1.7	-0.1±1.3	.857	
	p value ^d	.986	.748		
RBC	Baseline	4.7±0.5	4.9±0.4	.211	
	after 4 weeks	4.7±0.5	4.9±0.4	.144	
	Difference ^c	0±0.1	0±0.2	.812	
	p value ^d	.090	.661		
Hemoglobin	Baseline	14.6±1.5	15.1±1.3	.138	
	after 4 weeks	14.4±1.5	15.1±1.3	.069	
	Difference ^c	0.2±0.5	0±0.7	.385	
	p value ^d	.033	.636		
Hematocrit	Baseline	42.5±3.5	54.2±59.3	.058	
	after 4 weeks	42.1±3.5	43.7±3.5	.075	
	Difference ^c	0.3±1.4	10.5±60	.753	
	p value ^d	.110	.401		
Platelet	Baseline	245.1±51.3	237±47.9	.342	
	after 4 weeks	249±42.9	238.5±52.3	.086	
	Difference ^c	-3.9±34.5	-1.5±29.5	.465	
	p value ^d	.073	.645		

<표 15> 시험 전후 혈액화학적 검사 변화 - 대조군 vs 실험군

평가변수	Mean±S.D.		p value ^a	p value ^b
	대조군	실험군		
ALP	Baseline	63.6±14.9	61.8±13.8	.739
	after 4 weeks	61.6±14.2	62.1±14.7	.888
	Difference ^c	2±6.7	-0.3±8.2	.298
	p value ^d	.141	.918	
Total Protein	Baseline	7.1±0.3	7.1±0.3	.320
	after 4 weeks	7.1±0.3	7.1±0.4	.377
	Difference ^c	0±0.2	0±0.3	.679
	p value ^d	.357	.813	
Albumin	Baseline	4.5±0.2	4.6±0.2	.923
	after 4 weeks	4.5±0.2	4.5±0.2	.990
	Difference ^c	0±0.3	0.1±0.2	.547
	p value ^d	.435	.122	
AST	Baseline	20.4±5.4	22.2±9.9	.857
	after 4 weeks	19.3±5.8	21.1±7.9	.495
	Difference ^c	1.2±4.5	1.1±9.8	.923
	p value ^d	.232	.501	
ALT	Baseline	22.5±10.7	25.2±13.8	.534
	after 4 weeks	21.8±11.3	23.3±13.8	.893
	Difference ^c	0.7±6.3	1.9±9.4	.411
	p value ^d	.576	.130	
r-GT	Baseline	29±22.8	30.7±23.8	.621
	after 4 weeks	26.9±18.5	26.6±16.7	.817
	Difference ^c	2±10.3	4.1±11.2	.207
	p value ^d	.411	.030	
Total bilirubin	Baseline	0.6±0.3	0.6±0.2	.667
	after 4 weeks	0.6±0.2	0.6±0.3	.644
	Difference ^c	0±0.2	0±0.3	.748
	p value ^d	.466	.701	
BUN	Baseline	12.2±2.4	13.6±3.6	.182
	after 4 weeks	12±2.7	12.7±2.7	.333
	Difference ^c	0.3±2.1	0.9±3.1	.469
	p value ^d	.789	.147	
Creatinine	Baseline	0.7±0.1	0.8±0.1	.045
	after 4 weeks	0.7±0.2	0.8±0.1	.073
	Difference ^c	0±0.1	0±0.1	.949
	p value ^d	.959	.875	
HbA1c	Baseline	5.4±0.3	5.5±0.4	.307
	after 4 weeks	5.4±0.2	5.5±0.3	.370
	Difference ^c	0±0.2	0±0.3	.840
	p value ^d	.687	.990	
Uric acid	Baseline	5±1.2	6±1.4	.004
	after 4 weeks	5.1±1.2	6±1.2	.005
	Difference ^c	-0.1±0.6	0±0.9	.117
	p value ^d	.481	.273	

S.D.: standard deviation

a : Compared between groups : p-value by Mann whitney U test

b : Compared between groups : p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c : Difference between the values of Baseline and after 4 weeks.

d : Compared within groups : p-value by Wilcoxon Signed Ranks Test

9. 유효성 분석의 결론

본 시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험으로 시험의 목적은 혈압이 높은 정상인에서 굴 가수분해물을 경구 복용하게 하여 수축기 및 이완기 혈압과 혈중 Angiotensin I & II 등의 검사를 수행하여 혈압 강하에 미치는 굴 가수분해물의 기능성을 예비적으로 확인하고 안전성 여부도 확인하고자 하였다. 유효성에 대한 자료는 처음에 배정받은 대상자 (66명, 각 군 33명씩) 전체에 대한 ITT분석과 중도 탈락한 2명을 제외한 PP분석을 모두 시행하였다.

1) 실험군과 위약 대조군의 수축기혈압, 이완기혈압 및 심박수의 변화를 관찰한 결과 4주 복용 후 두 군 모두에서 수축기 및 이완기 혈압이 의미 있는 저하를 나타내었다.

2) 실험군의 변화를 위약대조군과 비교한 결과 수축기 및 이완기 혈압의 감소정도는 양군간에 차이가 없었다.

3) 실험군과 대조군 모두에서 4주 복용 후 Angiotensin I, II는 통계적으로 의미 있는 증가나 감소를 보이지 않았고, 군 간의 차이도 없었다.

10. 안전성 분석의 결론

이상반응은 시험식품을 투여한 후 1회 이상 안전성에 대한 조사가 된 시험대상자를 대상으로 평가하였다. 총 33명의 실험군중에서 이상반응이 있다고 응답한 시험대상자는 6건이었다. 이중 시험식품과 연관가능성이 있을 수 있다고 판단된 것은 간기능 효소 상승 1건과, 위장장애 4건(1인)이었으나 시험제품과의 명백한 인과관계를 찾을 수는 없었다. 대조군의 경우는 33명중 11건의 이상반응이 있었으나 감기, 근골격계질환 등 모두 명확히 연관이 없는 것들이었다.

11. 토의

본 인체적용시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 평행 인체적용시험으로 주 목적은 굴 가수분해물을 하루에 1000mg(아침저녁 식사 30분 후 250mg 2 캡셀을 4주 동안) 경구 투여하였을 때의 혈압강하와 관련된 생화학적 지표를 평가하고 안전성 여부도 확인하고자 하였다.

본 연구에서 수축기 및 이완기 혈압과 함께 생화학적 지표로 채택한 Angiotensin I, II는 혈압의 조절에 매우 중요한 역할을 하는 인체의 RAAS(Renin-angiotensin-aldosterone system)에서의 주요 효소이다. 탈수 등으로 인해 신장으로 가는 혈류가 감소하면 Renin이 분비되며 이 Renin은 간에서 분비되는 Angiotensinogen을 Angiotensin I으로 변화시킨다. Angiotensin I은 폐와 신장의 endothelium에서 분비되는 Angiotensin Converting Enzyme(ACE)에 의하여 Angiotensin II로 바뀌게 된다. 이 Angiotensin II가 교감신경을 활성화시키고 신장의 나트륨과 염소의 재흡수를 증가시키고 부신에서 Aldosterone분비를 증가시켜 수분저류를 촉진하게 된다. Angiotensin II는 직접 혈관을 수축시키고 뇌하수체의 ADH를 분비시켜 수분저류에 기여함으로써 혈압상승을 유발한다(그림 1).

현재 주요 혈압약으로 사용중인 ACEI제제는 Angiotensin I이 Angiotensin II로 변환되는 것

을 억제함으로써 혈압강하 작용을 나타내는 것이다. 본 임상시험에서 사용된 굴 가수분해물의 특정성분인 ACE 저해 IC50 값이 우수한 K-Y, Y-A, A-F-Y, M-C 등의 펩타이드의 유효성은 Angiotensin I의 상승과 Angiotensin II의 감소를 통해 혈압강하효과를 보일 것으로 기대하였다.

그러나 굴가수분해물 1000mg을 4주간 투여한 군에 있어서 수축기 및 이완기혈압은 위약에 비해 통계적으로 의미 있게 하강하지 않았다. 생화학적 지표인 Angiotensin I의 경우 실험군은 감소, 대조군은 증가하였으며, Angiotensin II는 양군에서 모두 상승하여 혈압강하 효과를 입증하지 못했다.

선천성 고혈압 쥐 (SHR, spontaneous hypertensive rat)를 대상으로 한 동물실험에서는 굴의 총가수분해물과 10kDa 이하의 분획물을 100mg/kg의 농도로 단회 투여한 결과 9시간 이후부터 33~38%의 혈압저하능을 보였으며, K-Y, M-C 및 Y-A의 경우 50µg/kg의 농도에서 각각 17, 34, 24%의 혈압강하 효능 보였다.

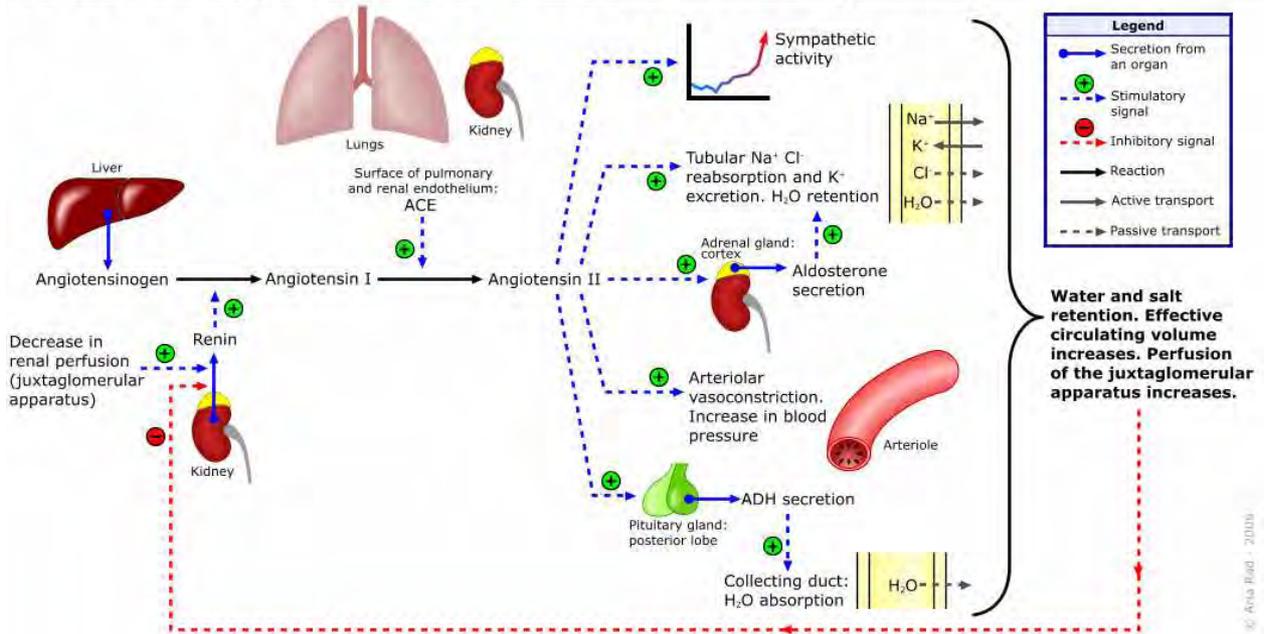
동물실험에서 입증된 효과가 인체 적용에서 검증되지 않은 이유에 대한 가설은 용량의 문제일 것으로 사료된다. 본 임상시험에서 사용한 하루 1000mg은 본 시험의 대상자 평균 체중인 70kg을 기준으로 할 때 14.2mg/kg에 불과하여 100mg/kg를 투여했던 고혈압 쥐 실험에 비하여 매우 적다고 볼 수 있다. 본 인체적용시험의 전단계인 예비임상에서도 하루 500mg과 750mg을 투여했을 때 의미 있는 결과를 보이지 못했으나 안검부종, 간기능검사 이상 등 이상 반응 때문에 더 이상의 용량 증가는 불가능하였다.

순간혈압 측정의 불안정성은 고혈압관련 연구에서 언제나 논쟁거리이다. 잘 알려진 것처럼 혈압은 운동정도, 흥분상태, 긴장정도, 수면의 양 등에 의해 쉽게 영향을 받으며 평상시 혈압은 정상인데 병원에서만 혈압이 올라가는 Whitecoat Hypertension이라는 진단명은 순간혈압의 불안정성을 보여주는 사례이다. 본 임상시험에서는 이러한 순간혈압의 불안정성을 보정하고자 pre-screening과 방문 1 시점에 충분한 휴식 후 5분 간격으로 2회씩 총 4회의 혈압을 측정하여 그 평균값을 사용하였다. 최근 혈압관련 연구의 경우 24시간 혈압(24 hour ambulatory monitoring)을 사용하는 경우가 증가하고 있으나 비용의 부담이나 시험대상자의 불편 정도가 심하여 현실적으로 적용에는 어려움이 있다.

향후 좀 더 용량을 높인 굴 가수분해물의 인체적용시험을 위해서는 추가적인 안전성 자료가 확보되어야 할 것으로 보인다.

<그림 1> 레닌-안지오텐신-알도스테론 시스템의 모식도

Renin-angiotensin-aldosterone system



12. 결론

굴가수분해물의 혈압 강하 효과를 연구하기 위하여 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 평행 인체적용시험을 수행하였다. 결과 굴가수분해물은 혈압의 강하에 영향을 주지 않았고 생화학적 지표인 Angiotensin I, II의 개선반응을 보이지 않는 것으로 나타났다. 본 인체적용시험을 통하여 굴가수분해물은 1건의 간독성과 위장장애의 연관성을 의심할 수 있었으나 상대적으로 안전한 식품으로 볼 수 있다.

참고문헌

- 1) 건강기능식품 인체적용시험 설계 안내서. 식품의약품안전평가원 식품위해평가부. (2012)
- 2) 건강기능식품 기능성 평가 가이드, '높은 혈압 감소에 도움' 편. 식품의약품안전청(2012)
- 3) Je, J. Y., Park, J. Y., Jung, W. K., Park, P. J., & Kim, S. K. Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. *Food Chemistry*, 2005;90, 809-814.
- 4) Inhibitory activity of *Ecklonia stolonifera* and its isolated phlorotannins against Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation. *Fisheries Science*, 2012;78:927-934
- 5) Kazuhiro Shiozaki, Momo Shiozaki, Junko Masuda, Akiko Yamauchi, Shuichi Ohwada, Toshiki Nakano, Toshiyasu Yamaguchi, Tadao Saito, Koji Muramoto, Minoru Sato. Identification of oyster-derived hypotensive peptide acting as angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. *Fish Sci* .2010;76:865-872
- 6) Ruqiang Huang, Nianghai Li, Qingzhu Zeng, Qian Deng, Bin Chen. Extraction and separation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from enzymatic hydrolysate of oyster. *Advanced Materials Research*. 2011;236-238:2610-2614.
- 7) Basso N, Terragno NA (Dec 2001). "History about the discovery of the renin-angiotensin system". *Hypertension* **38** (6): 1246-9. doi:10.1161/ hy1201.101214.PMID 11751697
- 8) Boulpaep EL, Boron WF (2005). *Medical Physiology: a Cellular and Molecular Approach*. St. Louis, Mo: Elsevier Saunders. p. 771. ISBN 1-4160-2328-3.
- 9) Je, J. Y., Park, J. Y., Byun, H. G., Jung, W. K., & Kim, S. K.. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. *Bioresource Technolgy*, 2005;96(14), 1624-1629.
- 10) Tanaka K, Nishizono S, Kungino K, Tamari M, Kurmiya M, Abe N, Ikeda I. Effects of dietary oyster extract on lipid metabolism, blood pressure, and blood glucose in SD Rats, Hypertensive Rats, and Diabetic Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2006;70(2):462-470.

[별지 제1호서식]

(앞쪽)

건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서				처리기간		
				120일	60일	
				○		
신청인	대표자		김 완 배			
	업체명		(주)파마킹	영업허가/ 신고번호	제조업 수입업	
	업체 소재지		충북 음성군 삼곡면 행군이길 87-17 (전화번호)			
	수입건강 기능식품	수리번호				
		수출국				
제조회사						
소재지						
원료명		굴가수분해물				
<p>「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제5조에 따라 건강기능식품 기능성 원료 인정을 신청합니다.</p> <p style="text-align: right;">2015년 5월 일</p> <p style="text-align: right;">신청인 김 완 배 (서명 또는 인)</p> <p>식품의약품안전처장 귀하</p>						
<p>※ 구비서류</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 제출자료 1부 2. 제출자료 수록 CD 1개 3. 제품 또는 시제품 4. 기능성분(또는 지표성분) 표준품 5. 국내·외 검사기관이 발행한 시험성적서 					<p>수수료</p> <p>1,900,000원</p>	
<p>※ 제출자료</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 제출자료 전체의 총괄 요약본 2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료 3. 제조방법에 관한 자료 4. 원료의 특성에 관한 자료 5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 7. 안전성에 관한 자료 8. 기능성 내용에 관한 자료 9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료 						

210mm×297mm[일반용지 60g/m²(재활용품)]

1. 제출자료의 총괄 요약본

□ 신청원료 개요

(최초, 변경¹⁾)

회 사 명		(주)파마킹 (대표이사 : 김 완 배)			
영업허가(신고번호)		제조업 <input type="checkbox"/>		수입업 <input checked="" type="checkbox"/>	제2015-0445101호
주소 및 연락처		* 충북 음성군 감곡면 행군이길 87-17 * (연락처) (팩스)			
		담당자	(이름) 유 상 우	(연락처)	
신청 원료명		글가수분해물			
심사 대상 분류	개별인정 원료	·새로운 원료 <input checked="" type="checkbox"/>	신청 기능성	혈압 조절에 도움	
			신청 섭취량	1일 750mg 섭취	
		·기능성 추가 <input type="checkbox"/>	(변경 전)		
	·섭취량 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)			
	·제조방법 변경 <input type="checkbox"/>				
	·기준규격 변경 <input type="checkbox"/>				
·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>					
고시된 원료	·기능성 추가 <input type="checkbox"/>	(변경 전)			
	·섭취량 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)			
	·제조방법 변경 <input type="checkbox"/>				
	·기준규격 변경 <input type="checkbox"/>				
	·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>				
국내제조 <input checked="" type="checkbox"/> 수입 <input type="checkbox"/>	수입인 경우	수리번호		수출국	
		제조회사			
		소재지			
모듬토의 <input type="checkbox"/>	실시 날짜 :				
품목설명회 <input type="checkbox"/>	희망 날짜 :				

1) (최초) 고시되지 않고 새롭게 개별인정 신청하는 원료 (변경) 고시된 원료 또는 개별인정원료의 기능성 추가 또는 변경(섭취량, 제조기준, 기준규격, 배합비율 또는 시험방법)

□ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부번호	비고
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본		■예 □ 아니오		
2. 기원 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료				
2.1	기원	■국내 □국외	2-#1	
2.2	개발경위	■국내 □국외		
2.3	국내·외 인정·허가 현황	■국내 □국외	2-#2~ #4	
2.4	국내·외 사용 현황	■국내 □국외	2-#5	
3. 제조방법 및 그에 관한 자료				
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	■예 □ 아니오	3-#1	
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	□예 □ 아니오		
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	■ 예 (모두, 일부) □ 아니오	3-#2~#4	
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	■예 □ 아니오	3-#5	
3.5	주요공정별 수율 변화	■예 □ 아니오	3-#5	
4. 원료의 특성에 관한 자료				
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	■예 □ 아니오		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	■예 □ 아니오 □기능성분 □지표성분		
4.3	영양성분정보자료	■예 □ 아니오	4-#1	
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	■예 □ 아니오		
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	■예 □ 아니오	5-#1	
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도,구조동정,유효기간 등 정보 추가)	■예 □ 아니오 ■시판 표준품 □ 자사 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	■예 □ 아니오 □ 공인 시험방법 ■자사 시험방법	5-#2	
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가		5-#3	

□ 전체 내용 요약

항 목	주요 내용	
1. 원료명	굴가수분해물	
2. 원재료	굴 (학명: <i>Crassostrea gigas</i> , 사용부위 : 굴껍질을 제외한 육질)	
3.기능 (지표)성분	지표 성분 : Tyrosinylalanine(YA)	
4. 제조 공정	분쇄 → 배합 → 가열 → 냉각 → 효소반응 → 여과 → 농축 → 건조 → 굴가수분해물	
5. 규격 및 시험방법	1) 정상 : 갈색분말 2) YA (지표성분) : 0.072~0.108 % 3) 납(mg/kg) : 3 이하 4) 총비소(mg/kg) : 5 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 3 이하 6) 총수은(mg/kg) : 1 이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능 (지 표) 성분 시험법	solvent A: CH ₃ CN(0.1%trifluoroaceticacid) solvent B: H ₂ O(0.1%trifluoroaceticacid)
	규격외 (잔류농약)	「식품의 기준 및 규격」에 신청원료에 대한 농약의 잔류허용기준은 없으며, 이에 따라 5가지 잔류농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)에 대하여 국내 식품위생검사기관 시험결과 '불검출' 임을 확인함
6. 안전성	의사결정도	섭취경험이 있는 굴(<i>Crassostrea gigas</i> , 식품원료)의 육질을 효소가수분해 한 것으로 의사결정도 '나'에 해당
	섭취 근거	<인정현황> ◦국내 : 식품공전에 생식용 참굴 등재 ◦프랑스 : 굴을 요리에 사용 <사용현황> ◦국내 : 사용 현황 없음, 굴을 요리에 사용 ◦미국 : 스완슨제품 유통 판매 ◦중국 : 굴소스를 요리에 사용
	안전성 정보	안전성 정보 검색결과 특이 사항 없음
	섭취량 평가	◦ 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 750mg/일: - 최대안전섭취량 3600mg/일 (식품수급표 , '13)

		<ul style="list-style-type: none"> - 일일허용섭취량 :3600mg/일 • 굴 원물로 환산시, 식품수급표 7~10 g/일에 해당 • 문헌에 의한 통상섭취량:36g/일(식품섭취량) ⇒ 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고(또는 3배이내 이고), 최대안전섭취량, 일일허용섭취량 이내임
	인 체 적 용 시 험	심각한 이상반응은 확인되지 않음 (750mg/일 섭취 기준)
	독성 시험	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 단회 및 13주 반복투여시험에서 이상반응 및 독성 나타나지 않음 - 최소치사량 5000 mg/kg·bw이상, 무독성량 5000 mg/kg·bw ◦ 유전독성시험 결과, 독성이 관찰되지 않았음
	기타 사항	-
	섭 취 시 주의 사항	<ul style="list-style-type: none"> ◦ <p><i>[근거] 설정 근거를 기재</i></p>
7. 기능성	신청 기능성	혈압조절에 도움
	신청 일일섭 취량	굴가수분해물로서 750mg/일
	시험관시험	6개의 활성 분획을 얻었고 ACE저해 범위는 29.56~85.85%였다.
	동물시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 굴가수분해물은 SHR쥐에게 혈압을 유의하게 감소시켰다. ◦ 굴가수분해물의 고혈압 억제 효과는 정어리 가수분해물 보다 빠르고 지속적이었다. <p>※시험물질 : 굴가수분해물</p>
	인 체 적 용 시 험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 건강한 성인(n=30), 500, 750mg/일, 6주(RCT, DB) <p>※인체적용시험기관 : 경희대병원 ('14) , 시험책임자 : 임성빈</p>
	기타 사항	- <i>특이사항, 참작사항 등을 기재</i>

2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

2.1. 기원

○ 원재료 : 굴가수분해물

굴은 예로부터 타우린, 글리코겐, 셀레늄 및 아연 등을 다량 함유한 건강기능 식품소재로 알려져 있다.

○ 중국연안, 발해, 홍콩, 한국, 일본(홋카이도), 캄차카반도에 분포하며 조간대 암반에 고착하며 다소 담수의 영향이 있는 곳에 잘 산다. 패각은 원추형 또는 가지모양으로 좌우각 모두 비늘모양의 패각이 중첩되어 성장선을 나타낸다. 환경에 따라 패각의 모양이 판이하게 달라지는데 조간대에 사는 것은 원추형을 보이나 물살이 센 곳 또는 내만의 진흙에 사는 것은 가지모양으로 길어진다. 패각은 백색이며, 방사륜이 굵고 굴곡지어 있으며, 중첩된 비늘모양의 끝은 자색을 띤다. 좌각은 우각보다 약간 짧아 우각의 각정이 돌출하며, 우각 각정부의 중앙에는 홈이 패어 있다. 자색의 방사상 돌기가 중첩되어 있다.

<원재료의 기원에 관한 정보>(첨부번호2-#1)

원재료명	굴 가수분해물	비고(참고)
학명	<i>Crassostrea gigas</i>	
원산지	대한민국	
사용부위	굴껍질을 제외한 육질	

원재료명	참굴 (Pacific oyster)	
이명	Magaki(일명), 굴	
학명	<i>Crassostrea gigas</i>	
생약명		
원재료 분류	동물 (수산물)	
식용가능 여부	가능	○
	제한적	
	불가능	
※ 해당부위를 클릭하시면 부위별 상세정보를 확인 할 수 있습니다.		



이미지 출처 : 식품의약품안전청

1 2 3

클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

2.2. 개발경위

- 굴은 심장 및 간장의 기능 강화와 콜레스테롤 감소에 의한 고혈압, 동맥경화 예방효과가 있다. 우리나라에서는 이와 같은 건강기능성 식품 소재인 굴을 다량 생산할 목적으로 청정해역인 남해안에서 수하식 양식을 실시하여 굴 단백질 가수분해물과 같은 우수한 물질을 혈압 조절 제제로 사용한다면 부작용이 없는 건강기능식품 소재로 자리 잡을 수 있을 것으로 기대한다.
- 현재 김 가수분해물, 김 다시마, 미역, 우뚝가사리, 청각, 가시파래, 툯 열수 추출물, 소미역, 파래, 김, 지누아리 효소 가수분해물, 굴 단백질 pepsin 가수분해물, 바지락단백질 Thermolysin 가수분해물, 어육 단백질로부터 분리된 항고혈압 펩타이드, 분리대두 단백질 가수분해 등의 해산물 및 곡물을 이용한 혈압조절 건강기능서에 관한 선행연구가 이루어지고 있다. 또한 정어리 단백질 유래 디펩타이드인 valyl-tyrosine은 경증 고혈압 환자에 대한 강압효과를 나타내어 우리나라 제 1호 개별인정형 건강기능식품으로 인정받았다.
- 본 신청서에서는 본태성 고혈압 쥐를 이용한 *in vivo* 실험에서 굴효소가수분해물이 항고혈압 활성이 나타난다는 선행연구 결과에 따라 혈압조절 개선에 도움을 주는 기능성 원료서 개별인정을 신청하는 바이다.

2.3. 국내·외 인정·허가 현황

2.3.1. 국내

- 국내 인정·허가 현황을 요약

- 원재료 ‘굴’은 식품의 원료로 사용 가능(식품공전 원재료 분류에 패류)
- 신청원료(첨부번호2-#2)
 - 「식품공전」 : 등재되어 있으며, 식품원재료 DB검색결과 ‘참굴’로 등재-
- 정어리펩타이드(제2004-1호 : 원니스바이오 ‘정어리펩타이드SP100N’)
 - “혈압을 건강한 수준으로 유지하는데 도움을 줄 수 있습니다”의 기능성을 인정하였습니다. 확보된 자료의 결과는 일관성 있으나 기반연구와 인체적용 연구의 수가 충분하지 않아 기능성등급은 “기타기능 II”에 해당합니다.
 - (첨부번호2-#3)

○ 식품공전에 수산물에 대한 규격에 생식용 굴 등재(첨부번호2-#4)

6) 생식용 굴

(1) 정의

생식용 굴이란 소비자가 날로 섭취할 수 있는 전각굴, 반각굴, 탈각굴로서 포장한 것을 말한다(냉동굴을 포함한다).

(2) 원료 등의 구비요건

(가) 생식용 굴은 「정착성 수산동식물 생산해역의 등급설정 기준」(농림축산식품부 고시)에 따라 청정해역의 수질기준에 적합한 해역에서 생산된 것이거나 자연정화 1) 또는 인공정화 2) 작업을 통해 청정해역의 기준에 적합하도록 처리되어야 한다.

(나) 굴은 채취 후 신속하게 위생적인 물로써 충분히 세척하여야 하며, 화학적합성품(차아염소산나트륨 제외)을 사용하여서는 안 된다.

(다) 생식용 굴은 덮개가 있는 용기(합성수지, 알루미늄 상자 또는 내수성의 가공용지) 등으로 포장해서 10℃이하로 보존·유통하여야 한다.

※ 용어 풀이

1) 자연정화 : 굴 내에 존재하는 미생물 수치를 줄이기 위해 굴을 수질기준에 적합한 지역으로 옮겨서 자연 정화 능력을 이용하여 처리하는 과정

2) 인공정화 : 굴 내부의 병원체를 줄이기 위하여 육상 시설 등의 제한된 수중 환경으로 처리하는 과정

(3) 규격

① 대장균 : 230 MPN/100g 이하

(4) 시험방법

① 대장균

제 9. 일반시험법 3. 미생물 시험법 3.8 대장균 가. 최확수법 2) 제2법에 따라 시험한다.

2.3.2. 국외

- 국외 정부기관의 인정근거를 기재 (예: GRAS, Novel food, FOSHU 등)
- 외국에서 신청원료와 동일한 것은 없음

◆ 작성

- 프랑스 : 전통적으로 요리에 사용
- 중국 : 굴소스를 전통적으로 사용

2.4. 국내·외 사용 현황

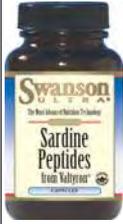
2.4.1. 국내

<유통 판매 현황 표>

제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도	유통량
	리턴큐 정어리 펩타이드	코스맥스 바이오	2.4g		위장장애 시 섭취 중단	혈관확장	
	오뚜기 팬터 굴소스	오뚜기	510g			요리에 사용	
	훈제굴	델리씨	85g			요리에 사용	
	통영굴 통조림	통영 수산	225g			요리에 사용	
	통영산 건굴	통영 한산도	400g			요리에 사용	

2.4.2. 국외

<유통 판매 현황 표>

유통국	제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도	유통량
미국		Sardine Peptides	SWANSON	500mg		Consult your healthcare provider before use if you are pregnant or nursing, taking prescription medication, or if you have a medical condition.	혈압조절	

요리에 사용(첨부번호2-#5)



3. 제조방법 및 그에 관한 자료

3.1. 원재료

3.1.1. 원재료 조성비

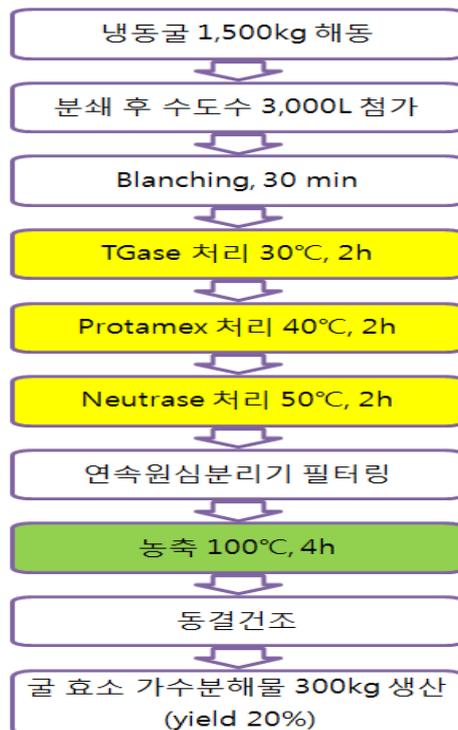
성분	분량(%)
굴 가수분해물	100

3.2. 개요

- 냉동굴을 해동하여 효소처리 한 후 연속 원심분리기로 필터링 하고 100도씨에서 4시간 농축 하고 동결건조 하여 적절한 용기에 포장한다.

3.3. 제조공정표

굴효소가수분해물 제조공정 흐름도(첨부번호3-#1)



수율 및 지표성분 함량 변화(첨부번호3-#5)

	수분함량, %	수율	ACE inhibitory activity(%)	YA (ug/g)
냉동굴 1,000 kg 해동	① 83.7±0.0	1,000 kg (100%)	Not detection	Not detection
Blanching, 30 min	②			
분쇄 후 수도수 2,000L 첨가	③ 94.8±0.4	156.0±28.2kg (15.6±0.3%)		
TGase 처리, 30℃, 1h	④ 96.1±1.3			
Protamex 처리, 40℃, 1h	⑤ 95.2±0.4		56.9±3.0	383.2±15.8
Neutrase 처리, 50℃, 1h	⑥ 94.3±0.4			268.9±19.3
불활성화, 100℃, 30 min	⑦ 93.6±0.7			309.4±11.8
여과, 80 mesh	⑧			
농축 100℃, 4h	⑨ 63.8±4.9		54.4±2.9	
분무건조	⑩ 2.1±0.1	150.0 kg (15.0 %)	48.6±0.3	333.5±18.9
굼가수분해물 150 kg	⑪			

4. 원료의 특성에 관한 자료

4.1. 원료를 특징 지을 수 있는 성상, 물성 등

- 성상 : 갈색 분말
- 물성

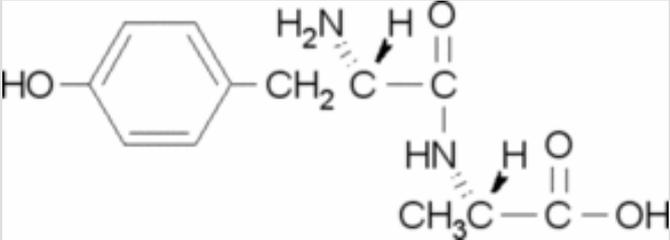
일반명	굴가수분해물
-----	--------

4.2. 기능성분(또는 지표성분) 및 근거

◆

○ 기능성분 : Tyrosinylalanine(YA) 0.072~0.108%

구조



일반명	Tyrosinylalanine(YA)
분자식	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₄
분자량	252.27

4.3. 영양성분정보자료(첨부번호4-#1)

[검사기관명 : 한국식품연구소]

성분	함량	성분	함량
열량(Kcal/100g)	413.3	수분(%)	6.2
탄수화물(%)	39.3	회분(%)	7.1
조지방(%)	13.3	나트륨(mg/100g)	1913.20
조단백질(%)	54.1		

5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료

5.1. 기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거

5.1.1. 기능성분(또는 지표성분)의 규격

5.1.2. 설정근거

1) 글가수분해물 : 한국식품연구소 시험기관 성적서 (첨부번호5-#1)

[검사기관명 : 한국식품연구원]

Lot No. 반복수	1 (Lot 1)	2 (Lot 2)	3 (Lot 3)	평균
1반복	0.09	0.10	0.09	
2반복				
3반복				
평균	0.09	0.10	0.09	

5.2. 기능성분(또는 지표성분) 표준품 정보

○ Tyrosinylalanine(YA)

■ 시판되는 표준품	표준품명	Tyrosin-Alanine
	제조·판매회사명	Sigma Aldrich
	구조식	$C_{12}H_{16}N_2O_4$
	CAS No.	730-08-5

5.3. 기능성분(또는 지표성분) 시험방법(첨부번호5-#2)

<input type="checkbox"/> 공인시험방법	출처:
<input checked="" type="checkbox"/> 자사시험방법	<input checked="" type="checkbox"/> 시험방법 타당성(밸리데이션) 자료 제출 여부
<시험방법>	
○ 굴 가수분해물의 지표성분 (tyrosine alanine) 분석방법	
1. HPLC 조건	
Device	Waters 717autosampler, 600controller, 2487detector
Column	Atlantis T3 C18 column (4.6 x 250 mm i.d. 5 µm, waters , USA)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	220 nm
Column temp.	25 °C
Mobile phase	solvent A: CH ₃ CN(0.1%trifluoroaceticacid) solvent B: H ₂ O(0.1%trifluoroaceticacid)
Gradient condition	0~25분 A:B=4:96, 30분 A:B=100:0
2. 이동상의 제조	
① CH ₃ CN(0.1%trifluoroaceticacid) trifluoroacetic acid 1ml 을 1000ml 의 Acetonitrile 에 넣은후, 0.45mm 필터로 여과 하였다.	
② H ₂ O(0.1%trifluoroaceticacid) trifluoroacetic acid 1ml 을 1000ml 의 Water 에 넣은후, 0.45mm 필터로 여과 하였다.	
3. 표준용액의 제조	
① 굴 가수분해물 굴 가수분해물 400mg 을 10ml 의 water(0.1% trifluoroacetic acid)에 녹여 sonication 을 한시간 진행한 후 0.45mm 필터로 여과 하여 HPLC 분석에 이용하였다.	
② 표준물질(tyrosine alanine) 표준물질 1.0mg 을 1ml 의 water(0.1% trifluoroacetic acid)로 용해한 후 희석하여 200, 100, 50, 20, 10mg/ml 로 조제하였다.	
○ 시험방법 밸리데이션 (첨부번호5-#3)	

6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

6.1. 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거

6.2. 유해물질 규격 미설정항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료

- 「식품의 기준 및 규격」에 농약의 잔류허용기준이 없는 경우 : 5가지 농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)에 대하여 시험결과와 분석자료

6.3. 유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법

6.3.1. 납

식품공전 제 10. 일반시험법 7. 식품중 유해물질시험법 7.1.2 금속별 시험 7.1.2.1 납 (Pb) 1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법 (2) 마이크로웨이브법에 준하여 시험용액 조제 후 2) 측정 ICP-MS로 측정한다.

6.3.2. 총비소

식품공전 제 10. 일반시험법 7. 식품중 유해물질시험법 7.1.2 금속별 시험 7.1.2.2 비소 (As) 1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법 (2) 마이크로웨이브법에 준하여 시험용액 조제 후 2) 측정 ICP-MS로 측정한다.

6.3.3. 카드뮴

식품공전 제 10. 일반시험법 7. 식품중 유해물질시험법 7.1.2 금속별 시험 7.1.2.3 카드뮴 (Cd) 1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법 (2) 마이크로웨이브법에 준하여 시험용액 조제 후 2) 측정 ICP-MS로 측정한다.

6.3.4. 총수은

식품공전 제 10. 일반시험법 7. 식품중 유해물질시험법 7.1.2 금속별 시험 7.1.2.4 수은 (Hg) 1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법 (2) 마이크로웨이브법에 준하여 시험용액 조제 후 2) 측정 ICP-MS로 측정한다.

6.3.5. 대장균군

식품공전 제 10. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군 3.7.1 정성시험 가. 유당배지 법에 준하여 시험한다.

6.3.6. 잔류농약

식품공전 제 10. 일반시험법 4. 식품중 잔류농약 분석법 4.1.2. 다중농약다성분분석법 4.1.2.2 다중농약다성분분석법에 따라 시험한다.

6.4. 필요시 추가항목의 규격 및 근거

■ 시험성적서 요약표

[시험기관명 : 한국식품연구소]

제안 기준 및 규격	시험항목	제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)			
규격항목	성상	갈색분말	특이한 냄새가 있는 백색의 결정성 분말			
	기능성분(지표성분)(mg/g)	Tyrosinylalinine	0.09	0.10	0.09	
	중금속 (mg/kg)	납	30이하	1.0	1.02	1.06
		총비소	50이하	4.28	4.60	4.51
		카드뮴	3.50이하	3.41	3.12	3.44
		총수은	1이하	불검출	불검출	불검출
	미생물	대장균군	음성	음성		
		세균수(cfu/g)	-			
	곰팡이 독소	독소명 기재	-			
잔류용매	용매명 :	-				
규격 미설정 항목	동물용의약품	검사수 :	-			
	잔류농약	49종	-			
		5종	불검출			

■ 중금속의 1일 노출량(첨부번호5-#1)

중금속명	실측치 ^{a)} (mg/kg)	최대 섭취량 ^{b)} (g)	제안규격 ^{c)} (μg/g)	제안규격에 의한 일일 노출량 ^{d)} (μg)			1일 최대 노출허용량 (μg)
납	1.06	0.75	3	2.25			10.8
총비소	4.60		5	3.75			150
카드뮴	3.4		3.5	2.625			3.0
총수은	0		1	0.75			2.1

^{a)}실측치 : 한국기능식품연구원 3LOT 실측치의 평균값

^{b)}최대섭취량 : 신청원료 1일 최대섭취량 2 g/일으로 설정 (신청사, 최대섭취량 5 g으로 신청함)

^{c)}제안규격 : 신청인이 제안한 규격

^{d)}제안규격에 의한 일일노출량 : b × c

7. 안전성에 관한 자료

<건강기능식품 기능성원료의 안전성평가를 위한 의사결정도[별표3]>

- 섭취경험이 있는 굴(*Crassostrea gigas*)
 , 식품원료의 육질을 효소가수분해 한 것으로 의사결정도 ‘나’에 해당

<안전성에 관한 제출자료>

섭취 근거 자료

해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료2)

섭취량평가자료

:

7.1. 섭취근거 정보

2.3. 국내·외 인정·허가 현황 및 2.4. 국내·외 사용 현황으로 같음

7.2. 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등) DB 검색 정보

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부	첨부번호
Toxline	Oyster hydrolysate	O	O	7-#1
Pubmed	Oyster hydrolysate	O	O	7-#2
PDRhealth	Oyster hydrolysate	X	X	7-#3
Natural Medicines	Oyster hydrolysate	X	X	7-#4

2) 데이터베이스에서 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 독성 또는 안전성 자료를 검색한 자료

7.3. 섭취량 평가 정보(첨부번호7-#5)

Annual food supply per capita per day

Unit: g

2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Year	Products
42.51	43.89	40.39	38.18	38.02	45.22	44.46	39.41		Shellfishes
0.06	0.06	0.06	0.04	0.03	0.03	0.05	0.05		Oriental Prawn, Metapenaeus Shrimp
9.24	10.17	9.90	9.01	10.41	10.89	11.74	11.40		Shrimp
0.57	0.99	0.73	0.95	0.89	0.86	0.76	0.83		Blue Crab
1.43	1.61	1.61	0.94	0.65	1.76	0.19	0.12		Crabs, other
0.07	0.11	0.12	0.13	0.13	0.13	0.16	0.18		Abalone
0.05	0.05	0.07	0.06	0.08	0.06	0.07	0.06		Topshell
1.75	2.36	1.46	1.59	1.56	5.04	6.94	3.66		Oyster

※ 신청원료의 제안 섭취량

- 일일 섭취량 : 750mg/일

- 굴 원물로 환산 시 : 7000mg ~ 8000mg/일 (수율 15%)

(계속 : 식품섭취빈도, 남자, 만12세이상)

식품 및 음식명	섭취빈도	N	1일		1주		1개월		1년		거의 안먹음	평균빈도 (회/주)		
			3회	2회	1회	4-6회	2-3회	1회	2-3회	1회			6-11회	
어패류	18. 고등어	분율 (표준오차)	2,840	0.01 (0.01)	0.00 (-)	0.07 (0.04)	1.05 (0.22)	11.80 (0.80)	24.72 (1.02)	24.14 (0.94)	21.94 (0.97)	7.09 (0.60)	9.18 (0.69)	0.80 (0.02)
	19. 참치	분율 (표준오차)	2,840	0.00 (-)	0.00 (-)	0.16 (0.10)	0.82 (0.26)	7.02 (0.57)	17.97 (0.92)	19.11 (0.99)	20.36 (0.95)	7.77 (0.60)	26.80 (1.23)	0.58 (0.02)
	20. 조기	분율 (표준오차)	2,839	0.00 (-)	0.00 (-)	0.10 (0.06)	1.00 (0.22)	5.69 (0.51)	15.08 (0.71)	19.48 (0.93)	24.66 (0.97)	13.03 (0.76)	20.95 (1.01)	0.54 (0.02)
	21. 명태	분율 (표준오차)	2,838	0.00 (-)	0.00 (-)	0.05 (0.03)	0.44 (0.14)	4.42 (0.45)	14.27 (0.89)	21.85 (0.97)	27.07 (1.01)	13.40 (0.80)	18.50 (0.95)	0.49 (0.01)
	22. 멸치	분율 (표준오차)	2,840	0.37 (0.13)	0.40 (0.13)	6.64 (0.60)	7.84 (0.66)	22.06 (0.96)	22.99 (0.98)	14.54 (0.87)	12.55 (0.72)	3.87 (0.44)	8.73 (0.71)	1.89 (0.06)
	23. 어묵류	분율 (표준오차)	2,840	0.00 (-)	0.02 (0.02)	0.35 (0.12)	1.20 (0.26)	11.81 (0.68)	22.21 (1.03)	19.01 (0.95)	18.98 (0.90)	7.29 (0.60)	19.14 (1.03)	0.77 (0.02)
	24. 오징어	분율 (표준오차)	2,839	0.00 (-)	0.00 (-)	0.44 (0.15)	1.05 (0.23)	8.88 (0.67)	18.55 (0.84)	20.52 (0.88)	22.96 (1.06)	9.44 (0.72)	18.16 (1.03)	0.68 (0.02)
	25. 조개류	분율 (표준오차)	2,840	0.00 (-)	0.00 (-)	0.23 (0.12)	0.94 (0.25)	6.08 (0.62)	15.09 (0.76)	19.66 (0.91)	24.79 (1.04)	11.22 (0.78)	21.99 (1.01)	0.56 (0.02)

• 연간소비량, 한국농촌경제연구원(식품수급표)(첨부번호7-#6)

어패류 1일 섭취량 : 51.2g

굴 1인 1일 섭취량 : 3.66g(2013년도)

7.4. 영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 정보

[안전성 평가를 위한 인체적용시험 요약]

디자인	대상자(탈락율)	시험물질 섭취량/섭취기간	안전성지표	결과	비고
DB RCT 등	30명, 각10명 위약군, 500mg, 750mg군	<ul style="list-style-type: none"> • 글가수분해물(신청원료) • 6주간 복용 	<p>시험식품 투여 전과 투여 6주 후에 심전도 검사, 실험실적 검사, 활력 징후 측정, 이학적 검사 진행을 실시하였고 시험식품 투여 2주 후에는 전화 문진을 통하여 이상반응을 평가하고 연구기간 내내 이상반응을 평가하였다.</p>	<p>6주간 글가수분해물 500 mg과 750 mg 및 대조식품을 투여한 결과 특별하거나 심각한 이상반응은 전체 시험대상자에서 한 명도 발생하지 않았으며, 이상반응도 시험제품과 명백한 관련성을 찾을 수 없었고 임상적인 의미도 적어 안전한 식품으로 조사 되었다.</p>	▶ 첨부번호 8-#4

7.5. 독성시험

[안전성 평가를 위한 독성시험자료 요약표]

시험종류		종 및 계통	투여 방법	투여 기간	시험물질, 용량	시험결과	비고
단회투여	설치류	SD Rat (M 5, F 5)	경구	1회	<ul style="list-style-type: none"> 시험물질 투여량(0, 1250, 2500, 5000 mg/kg/bw) 	<ul style="list-style-type: none"> 사망동물 발생하지 않음 (특이한 일반증상, 사망례, 유의한 체중변화 및 육안적 병변 소견 없음) LD₅₀ > 5,000 mg/kg 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ GLP 여부, 논문/보고서 여부 기재 ▶ 첨부번호 (예) ▶ 논문 ▶ 첨부번호 7-#7
30 반복투여	설치류	SD Rat (M 40, F 40)	경구	4주	<ul style="list-style-type: none"> 시험물질 투여량 (0, 800, 2000, 5000 mg/kg/bw) 	<ul style="list-style-type: none"> 독성학적으로 유해한 변화 관찰되지 않음 (시험물질과 관련된 임상증상, 행동이상, 체중변화, 폐사개체가 관찰되지 않음, NOAEL > 5000 mg/kg bw 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ GLP 여부, 논문/보고서 여부 기재 ▶ 첨부번호 7-#8
유전독성	복귀돌연변이 (Ames test)	<ul style="list-style-type: none"> <i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 <i>E.coli</i> WP2 uvrA 		1회	<ul style="list-style-type: none"> 시험물질 투여량 (0.5~50mg/plate) 	<ul style="list-style-type: none"> 음성 (복귀돌연변이를 유발하지 않음.) 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ GLP 여부, 논문/보고서 여부 기재 ▶ 첨부번호 7-#9
	염색체이상시험	CHL cells		1회	<ul style="list-style-type: none"> 시험물질 투여량 (0~5000 mg/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> 음성 (염색체 이상을 나타내지 않음.) 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ GLP 여부, 논문/보고서 여부 기재 ▶ 첨부번호 7-#10
	소핵시험	ICR 마우스 골수세포		1회	<ul style="list-style-type: none"> 시험물질 투여량 (0, 1250, 2500, 5000 mg/plate) 	<ul style="list-style-type: none"> 음성 (소핵을 유발하지 않음.) 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ GLP 여부, 논문/보고서 여부 기재 ▶ 첨부번호 7-#11

8. 기능성에 관한 자료

■ 제안된 기능성내용 및 섭취량

- 기능성 내용 : 혈압조절에 도움
- 일일 섭취량 : 1일 750mg 섭취

■ 기능성 제출자료

시험물질	총 제출자료(건)	시험관시험(건)	동물시험(건)	인체적용시험(건)
신청원료	4	2	1	1

<제출자료 요약>

No	시험물질 섭취량/섭취 기간	문헌명	자료 요건	연구유형	대상	섭취 경로	바이오마커
1	신청원료	보고서	○	human	고혈압전단계 정상인	경구	수축기, 이완기 혈압, 안전성
2	신청원료	Jr of Life Science	○	in vitro	ACE정제효소	경구	ACE저해능
3	신청원료	B i o M e d R e s e a r c h I n t e r n a t i o n a l	○	in vitro	ACE정제효소	경구	ACE저해능
4	신청원료	B i o M e d R e s e a r c h I n t e r n a t i o n a l	○	in vivo	쥐	경구	ACE저해능

※ IRB 승인보고서를 제출하는 경우에는 인체시험계획서, 윤리위원회 승인을 받은 최종보고서, 변경이 있는 경우 변경요청서와 IRB 변경승인서

■ 추측 가능한 작용기전

8.1. 시험관시험

[신청원료]

[시험관시험자료 요약]

시험물질	시험계	시험방법	결과	비고
(신청원료) 굴가수분해물	A C E Inhibitory Acitivity Assay	ACE의 저해능 측정	•6개의 활성 분획을 얻었고 ACE 저해 범위는 29.56~85.85%였다	▶ Jr of Life Science Vol 22. No2. 220-225 ▶ KCI 등재 ▶ 첨부번호8-#1
(신청원료) 굴가수분해물	A C E Inhibitory Acitivity Assay	ACE의 저해능 측정	TAY 16.7μM, VK 29.0μM, KY 51.5μM, FYN 68.2μM, YA 93.9μM	▶ B i o M e d R e s e a r c h International ▶ SCIE 등재 ▶ 첨부번호8-#2

8.2. 동물시험

[신청원료]

[동물시험자료 요약]

시험 물질	시험동물	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과	비고
(신청원료) 굴효소가 수분해물	SHR, 4주령 정어리가수분해물 처리 SHR군 등	자유섭취 4주	ACE 저해 활성	◦굴가수분해물은 SHR쥐에게 혈압을 유 의하게 감소시켰다. ◦굴가수분해물의 고혈압 억제 효과는 정어리 가수분해물 보다 빠르고 지속적 이었다.	▶ B i o M e d R e s e a r c h International ▶ SCIE 등재 ▶ 첨부번호 8-#3

8.3. 인체적용시험

[신청원료]

[인체적용시험자료 요약]

시험 물질	디자인	대상자	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과	비고
(신청원료) 글가수분 해물	RCT DB	특성 (포함기준) 나이(20-70 세), 30명	500mg, 750mg /6주간	혈압개선 /수축기, 이완기혈압	<ul style="list-style-type: none"> • 군간 통계적 유의하지 않음 • 안전한 식품 	▶ 첨부번호 8-#4

9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

9.1. 섭취량 및 근거

- 섭취량 : 굴가수분해물로서 1일 750mg
- 근거내용 : 본 인체적용시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 평행 인체적용 시험으로 주 목적은 굴 가수분해물을 하루에 500 mg 및 750 mg (아침저녁 식사 30분 후 2 캡셀 (위약 1캡슐 포함) 또는 아침저녁 식사 30분 후 3 캡셀) 을 6주 동안 경구 투여하였을 때의 혈압강하와 관련된 가능성을 평가하고 안전성 여부도 확인하고자 하였다.

10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

10.1. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 곶효소가수분해물은 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약처 고시 제2013-207호, '13.08.16)」 제 2. 1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료'에 해당하지 않음

10.2. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 곶효소가수분해물은 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약처 고시 제2013-207호, '13.08.16)」 제 2. 1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료' 2)의약품의 용도로만 사용되는 원료 등 섭취방법 또는 섭취량에 대해 의·약학적 전문 지식을 필요로 하는 것에 해당하지 않음

단회투여독성 시험 자료 요약서(설치류)

민원번호:	<input type="checkbox"/> 필수 <input checked="" type="checkbox"/> 선택
-------	--------------------------------------------------------------------

1. 원료명	굴효소가수분해물										
2. 시험기관	캠온										
3. 자료의 요건	<input checked="" type="checkbox"/> GLP 기관보고서 <input type="checkbox"/> 논문 <input type="checkbox"/> 기타										
4. 시험물질 (배합비 포함)	굴효소가수분해물										
5. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 기타 ()									
	계통	Sprague-Dawley				주령					
	동물수	수컷	5		암컷	5					
6. 투여경로	<input checked="" type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 기타 ()										
7. 관찰 기간	<input checked="" type="checkbox"/> 14일 <input type="checkbox"/> 기타 ()일										
8. 실험내용	실험군	(1)		(2)		(3)		(4)			
	투여용량 (mg/kg)	0		1250		2500		5000			
	실험동물	암	수	암	수	암	수	암	수		
	군당 동물수	5	5	5	5	5	5	5	5		
	사망동물수	0	0	0	0	0	0	0	0		
9. 평가항목	<input checked="" type="checkbox"/> 사망 개체 수 <input checked="" type="checkbox"/> 임상증상 <input checked="" type="checkbox"/> 체중측정 <input checked="" type="checkbox"/> 육안적 소견 <input type="checkbox"/> 병리조직학적검사 <input type="checkbox"/> 기타 ()										
10. 시험결과 (치사량 포함)	사망동물이 발생하지 않았기에 반수치사량은 산출하지 않았다.										
11. 시험자결론	시험물질 굴효소가수분해물의 치사량은 암수 모두 5000 mg/kg을 상회										
12. 검토의견	작성하지 않음										

30일 반복투여독성시험자료요약서(설치류)

		인원번호:		<input type="checkbox"/> 필수 <input checked="" type="checkbox"/> 선택		
1. 원료명	굴 효소가수분해물					
2. 시험기관	캠온					
3. 자료의 요건	<input checked="" type="checkbox"/> GLP 기관보고서 <input type="checkbox"/> 논문 <input type="checkbox"/> 기타					
4. 투여기간/ 횟수	4주간/반복투여		<input checked="" type="checkbox"/> 7회/주 <input type="checkbox"/> 기타 (회/주)			
5. 시험물질 (배합비 포함)	굴 효소가수분해물					
6. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 기타 ()				
	계통	Sprague-Dawley		주령		
	동물수	수컷	40	암컷	40	
7. 투여경로	<input checked="" type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 기타 ()					
8. 실험내용	실험군	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
	투여용량 (mg/kg)	0	800	2000	5000	
	실험동물	암 수	암 수	암 수	암 수	암 수
	군당 동물수	10 10	10 10	10 10	10 10	
	사망동물수	0 0	0 0	0 0	0 0	
9. 평가항목	<input checked="" type="checkbox"/> 사망 개체 수	<input checked="" type="checkbox"/> 체중	<input checked="" type="checkbox"/> 시료섭취량	<input checked="" type="checkbox"/> 물 섭취량	<input checked="" type="checkbox"/> 혈액학적검사	
	<input checked="" type="checkbox"/> 혈액생화학검사	<input checked="" type="checkbox"/> 뇨검사	<input checked="" type="checkbox"/> 안구검사	<장기무게>		
	<input checked="" type="checkbox"/> 조직병리검사	<input type="checkbox"/> 회복성 및 지연성 독성 검토(회복군 여부)		<input checked="" type="checkbox"/> 심장, <input checked="" type="checkbox"/> 간장, <input checked="" type="checkbox"/> 폐, <input checked="" type="checkbox"/> 비장 <input checked="" type="checkbox"/> 신장, <input checked="" type="checkbox"/> 부신, <input checked="" type="checkbox"/> 전립선 <input checked="" type="checkbox"/> 고환, 부고환 <input checked="" type="checkbox"/> 난소, <input checked="" type="checkbox"/> 뇌 <input checked="" type="checkbox"/> 하수체, <input type="checkbox"/> 흉선		
10. 시험결과 (무독성량 포함)	굴효소가수분해물의 무독성량은 5000mg/kg/day 로 판단된다.					
11. 시험자결론	시험물질에 대한 독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않았다.					
12. 검토의견	작성하지 않음					

유전독성시험자료요약서
-복귀돌연변이시험

민원번호: 필수 선택

1. 원료명	굴효소가수분해물					
2. 시험기관	캠온					
3. 자료의 요건	<input checked="" type="checkbox"/> GLP 기관보고서 <input type="checkbox"/> 논문 <input type="checkbox"/> 기타					
4. 시험물질 (배합비 포함)	굴효소가수분해물					
5. 시험계	균 주			종 류		
	TA100, TA1535, TA98, TA1537					
6. 실험내용	처리 농도		15, 50, 150, 500 1500, 5000($\mu\text{g}/\text{plate}$)			
	시 험 법					
	처리 시간					
7. 대조군	S9mix	균주	양성대조군	용량 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	음성대조 군	용량 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
	(+)	TA100 및 TA98	2-AA	0.5		
		TA100 및 TA1535	SA	0.5		
		TA98 및 E. Coli	4NQO	0.5		
		TA1537	9-AA	50		
	(-)					
8. 시험결과	모든 시험균주에서 대사 활성계 적용 여부에 상관없이 양성판정 기준을 만족 못함					
9. 시험자결론	굴가수분해물은 본시험조건하에 사용한 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않음					
10. 검토의견	작성하지 않음					

유전 독성 시험 자료 요약서
- 소핵 시험

		민원번호:		<input type="checkbox"/> 필수 <input type="checkbox"/> 선택	
1. 원료명	굴효소가수분해물				
2. 시험기관	켄온				
3. 자료의 요건	<input checked="" type="checkbox"/> GLP 기관보고서 <input type="checkbox"/> 논문 <input type="checkbox"/> 기타				
4. 시험물질 (배합비 포함)	굴효소가수분해물				
5. 시험동물	종	<input checked="" type="checkbox"/> 마우스 <input type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기타()			
	계 통	ICR		주 령	8주
	동물수	수 컷	24	암 컷	
6. 처리농도	0, 1250, 2500, 5000 mg/kg/day				
7. 투여경로	<input checked="" type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 기타()				
8. 실험내용	대조군	음성대조군	부형제	용 량	0
		양성대조군	Cyclophosphamide	용 량	70 mg/kg
	처리시간	24시간			
	판정기준	MNPCE의 빈도 : 음성대조군 10.0이하, 양성대조군 50 이상			
9. 시험결과	통계학적으로 유의한 결과 나타나지 않음				
10. 시험자결론	굴효소가수분해물은 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않음				
11. 검토의견	작성하지 않음				

유전독성시험자료요약서
-염색체이상시험

		민원번호:		<input type="checkbox"/> 필수 <input type="checkbox"/> 선택		
1. 원료명	굴효소가수분해물					
2. 시험기관	켄온					
3. 자료의 요건	<input checked="" type="checkbox"/> GLP 기관보고서 <input type="checkbox"/> 논문 <input type="checkbox"/> 기타					
4. 시험물질 (배합비 포함)	굴효소가수분해물					
5. 시험계	세포주	<input type="checkbox"/> CHO <input checked="" type="checkbox"/> CHL <input type="checkbox"/> V79				
6. 실험내용	처리 농도	0, 1250, 2500, 5000 ($\mu\text{g/ml}$)				
	시 험 법					
	처리 시간	6, 6, 24시간				
	세포수거시간					
7. 대조군	S9mix	세포주	양성대조군	용량 ($\mu\text{g/ml}$)	음성대조군	용량 ($\mu\text{g/ml}$)
	(+)		CPA			
			EMS			
	(-)					
8. 시험결과	염색체의 구조적 및 수적 이상을 가진 출현빈도는 통계적으로 유의하지 않았음					
9. 시험자결론	굴가수분해물을 CHL 세포에 염색체 이상을 유발하지 않음					
10. 검토의견	작성하지 않음					

기능성 시놉시스

※ 기능성 시놉시스는 시스템 등록과 동시에 생성되므로 시스템으로 작성

a. 시험관시험 요약본

논문코드 :

연구유형 :
연구의 질 :

학술지정보	Journal of Life Science					
	Vol	22	게재연도	2012	시작페이지	220
논문제목	Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity Enzymatic Hydrolysates of Crassostrea gigas(Oyster)					
연구목적	굴효소 가수분해물의 안지오텐신 I-전환 효소 억제 활성 효과를 알아보기 위함					
연구유형	<i>in vitro</i>					
시험계	ACE Inhibitory Activity Assay					
시험물질	굴 효소 가수 분해물					
대조군	<input checked="" type="checkbox"/> control <input checked="" type="checkbox"/> positive control <input type="checkbox"/> negative control					
시험군	1. 1step 효소 가수분해물 제조 2. Angiotensin I converting enzyme(ACE)의 저해능 3. Ultrafiltration에 의한 분리 4. Peptide 서열 분석 및 합성					
바이오마커	ACE 저해 활성					
통계처리	해당 없음					
시험결과	- 6개의 활성 분획을 얻었고 ACE저해 범위는 29.56~85.85%였다. - 그 중 저해활성이 가장 높게 나타나는 B분획의 아미노산 서열을 확인한 결과 Leu-Gln-Pro 임을 확인 하였다.					
비고						

학술지정보	BioMed Research International					
	Vol	2014	게재연도	2014	시작페이지	1
논문제목	Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor Derived from Cross-Linked Oyster Protein					
연구목적	굴효소 가수분해물의 안지오텐신 I-전환 효소 억제 활성 효과를 알아보기 위함					
연구유형	in vitro					
시험계	ACE Inhibitory Activity Assay					
시험물질	굴 효소 가수 분해물					
대조군	<input checked="" type="checkbox"/> control <input checked="" type="checkbox"/> positive control <input type="checkbox"/> negative control					
시험군	<ol style="list-style-type: none"> 1. ACE 억제 활성분석 2. ACE 억제 활성 Peptide 정제 3. 아미노산 서열 확인 및 펩타이드 합성 4. ACE 억제활성 및 합성 펩타이드 HepG2 세포독성 					
바이오마커	ACE 저해 활성					
통계처리	the mean with standard deviation of triplicate determination Analysis of variance					
시험결과	TAY 16.7 μ M, VK 29.0 μ M, KY 51.5 μ M, FYN 68.2 μ M, YA 93.9 μ M					
비고						

b. 동물시험 요약본

논문코드 :

연구유형 :
연구의 질 :

ga

학술지정보	BioMed Research International					
	Vol	2014	게재연도	2014	시작페이지	1
논문제목	Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor Derived from Cross-Linked Oyster Protein					
연구목적	굴효소 가수 분해물의 혈압 강하 효과를 알아보기 위함					
연구유형	동물시험					
Species	Rat		Age	4주령		
Strain	SHR		Sex	<input type="checkbox"/> male <input type="checkbox"/> female		
시험물질	굴효소가수분해물					
투입형태	<input checked="" type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타					
시험디자인	대조군	placebo				
		positive	정어리 가수분해물 처리 SHR군, 칸토프릴 처리 SHR군			
		negative				
	시험군	SHR control, WKR control, 굴가수분해물 처리 SHR 군				
	디자인	SHR control, WKR control, 굴가수분해물 처리 SHR 군	섭취량	자유 섭취		
섭취기간			4주			
식이조절						
바이오마커	ACE 저해 활성					
통계처리	the mean with standard deviation of triplicate determination Analysis of variance					
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> ◦굴가수분해물은 SHR쥐에게 혈압을 유의하게 감소시켰다. ◦굴가수분해물의 고혈압 억제 효과는 정어리 가수분해물 보다 빠르고 지속적이었다. 					
비고						

c. 인체적용시험 요약본

연구유형 : T1
 연구의 질 : QL1 21

논문코드 : A0413531130(시스렘 등록과 동시에 생성됨)

학술지정보		보고서(경희대학교 병원 임상약리학과)			
임상제목		A clinical study for hydrolysates of oyster: Dose-finding Study			
연구목적		고혈압 전단계 증상을 가진 건강인을 대상으로 굴 가수분해물의 혈압강하 효과와 안전성을 확인하는 것을 목적으로 하며 향후 시험의 용량 설정을 목적으로 함.			
연구유형		인체시험	IRB 구성 및 승인		Y
실험설계		Double-blind	Randomized		
대상자 특징	대상자 선정 기준	고혈압 전단계의 정상인(수축기 120-139mmHg, 이완기 80-89mmHg)			
	특징	<제외기준> 1. 굴 및 기타 해산물에 과민증 또는 그 병력이 있는 시험대상자 2. 3개월 이내 또는 현재 알코올중독으로 치료 중이거나 갑상선 기능 이상으로 치료중인 자 3. 뇌졸중, 수두증이 있거나 있었던 자 혹은 3개월 이내에 호르몬 대체요법을 시행했거나 시행 중인 자 4. 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 또는 폐질환이 있는 시험대상자 등			
시험물질		- 굴가수분해물(1캡슐 125mg)			
시험디자인	대조군	placebo	대조식품		
		positive	없음		
		negative	없음		
	시험군	500mg군, 750mg군			
디자인	위약군, 500mg투여군, 750mg 투여군으로 나누어 6주간 각군당 10명씩 배정	섭취량	시험물질 참조		
		섭취기간	6주간		
식이조절					
바이오마커		1차기능성: 수축기 및 이완기 혈압 강하정도 2차기능성: angiotensin I, II의 변화율			
통계처리		paired t-test			
시험결과		1. 각 군에 의미 있는 차이는 나타나지 않음 2. 안전한 식품으로 조사 되었다.			
비고					

인체적용시험 결과 보고서

곰피 주정추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한

유효섭취용량 설정 인체적용 시험

2014년 10월

(주)네추럴웨이

본 시험결과 보고서는 (주)네추럴웨이와 경희대학교병원 임상약리학과와 의 재산으로 기밀 서류입니다. 수용한다는 것은 공개적으로는 가용하지 않으나 여기에 포함되어 있는 정보를 본 시험을 보고하기 위한 심사위원회(IRB) 또는 윤리위원회에서의 사용을 제외하고는 누설하지 않겠다는 데 대한 동의를 의미합니다. IRB에게는 비밀의 유지가 요구되며 또 기대됩니다. (주)네추럴웨이의 동의 없이는 본 자료를 전체 또는 부분적으로 사용하거나 발표할 수 없습니다.

인체적용시험 확인서

인체적용시험 제목: 공피 주정추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한 유효섭취용량 설정
인체적용 시험

프로토콜 번호: GPL-01

시험 식품: 공피 주정추출물

인체적용시험 의뢰자: (주)네추럴웨이

본 인체적용시험은 “의약품임상시험관리기준” (KGCP, 식약처 고시 제 2011-36호, 2011.7.20)을 준수하여 시행되었으며 그 결과 최종 인체시험보고서를 (주)네추럴웨이와 경희대학교 산학협력단에 제출하는 바입니다. 경희대학교병원에서 수행된 본 시험의 보고서 내용에 대하여 인체적용시험 책임자로서 확인 합니다.

2014년 10월

연구책임자: 임성빈 교수
경희대학교병원 임상약리학과

일시: 2014년 10월 29 일

서명 : 임 성 빈 _____(인)

❖ 인체적용시험 요약

인체적용시험 의 명 칭	곰피 주정추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한 유효섭취용량 설정 인체적용 시험
인체적용시험 책 임 자	경희대학교병원 임상약리학과 임성빈 교수
공 동 연 구 자	경희대학교 약학대학 정세영 교수
시 험 담 당 자	경희대학교병원 소화기내과 심재준 교수
인체적용시험 실 시 기 관	경희대학교병원, 서울시 동대문구 경희대로 23
인체적용시험 의 목 적	경증 또는 중등도의 간기능 이상 소견자에서 곰피 주정추출물의 간기능 개선 효과와 안전성을 확인하는 것을 목적으로 하며 향후 시험의 용량 설정을 목적으로 함..
시 험 설 계	단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험
대 상 자 수	최종 평가가능 예수 30 예 (시험식품군: 20명 (용량별 2군) 및 위약대조군: 10명)
연 구 대 상	문맹자를 제외한 만 20세 이상의 남성 및 여성으로 경증 또는 중등도의 간기능 이상 소견을 보이는 자
시험대상자의 선 정 기 준	<p><선정 기준> (대상시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 문맹자를 제외한 만 20세 이상의 남성 및 여성 2) ALT (GPT)가 남성은 33 U/L, 여성은 25 U/L를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 33~149 IU/L, 여성 25~89 IU/L), 또는 AST (GOT)가 남성은 40 U/L, 여성은 30 U/L를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 40~149 IU/L, 여성 30~89 IU/L), 또는 GGT가 남성은 50 U/L, 여성은 30 U/L를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 50~149 IU/L, 여성 30~89 IU/L) 3) 인체적용시험동의서에 서면 동의한 자
시험대상자의 제 외 기 준	<p><제외 기준> (다음 조건의 어느 하나라도 해당되는 시험대상자는 본 연구에 참여할 수 없다.)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 곰피 및 기타 해산물에 과민증 또는 그 병력이 있는 시험대상자 2) 바이러스성 간염 검사에서 B형 간염 표면 항원 또는 C형 간염 항체 양성인 자

	<p>3) 아래의 간 질환을 가진 자</p> <p>간부전 등 중증 간질환, 원발성 담즙성 간경변, 약물 유발성 간질환, 자가면역성 간질환, 억제유발성 또는 수술 등으로 유발된 간질환</p> <p>4) 과다 알코올 섭취자 (알코올 섭취량 남>30g/일, 여>20g/일)</p> <p>5) 3개월 이내 또는 현재 갑상선 기능 이상으로 치료중인 자</p> <p>6) 뇌종양, 수두증이 있거나 있었던 자 혹은 3개월 이내에 호르몬 대체요법을 시행했거나 시행중인 자</p> <p>7) 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 또는 폐질환이 있는 시험대상자</p> <p>8) 심한 신기능 장애가 있는 시험대상자 (serum creatinine > 2.0 mg/dl)</p> <p>9) 혈압강화제를 복용하고 있음에도 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100 mmHg 이상) 또는 혈당강화제로 혈당조절이 어려운 경우 (혈당강화제를 복용하고 있음에도 불구하고 공복혈당 160이상)와 당화혈색소 수치 8% 이상인 경우 및 혈소판(15만/mm³ 이하), 백혈구(3000/mm³ 이하), 혈색소 수치(남자 9.5g/dL, 여자 9.0g/dL)이하 인 시험대상자</p> <p>10) 최근 3개월 이내에 간기능에 영향을 주는 약물 (INH, valproic acid, tetracycline, allopurinol, ibuprofen, phenytoin, phenelzin, sertraline, naproxen, diclofenac, 기타 간독성을 유발할 가능성이 있는 약물)을 복용한 자</p> <p>11) 3개월 이내에 당뇨약제나 항지질 계열의 약물을 새로 투여받은 시험대상자</p> <p>12) 최근 3개월 내에 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 기능성식품 등을 복용한 경험이 있거나 3개월 내 기타 인체적용시험에 참여한 경험이 있는 시험대상자</p> <p>13) 6개월 내 외과적 수술을 받았거나 1개월 내 금지된 치료(침술이나 불안수준 개선 목적의 치료 또는 건강식품, 남용우려 있는 약물 투여)를 받고 있는 자 또는 간기능 개선제 복용자</p> <p>14) 위 절제술 등 약물의 흡수에 영향을 줄 수 있는 수술을 한 시험대상자</p> <p>15) 임신부, 수유부 및 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임여성 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 시험대상자</p>
<p>시험식품명</p>	<p>곰피 주정추출물 (1포 130 mg 또는 1포 180 mg)</p>
<p>대조식품명</p>	<p>위약대조군</p>

<p>투여방법 및 투여기간</p>	<p>시험식품은 공피 주정추출물 (GPL) 130mg 또는 180 mg (130mg 또는 180 mg/1포, 아침 또는 저녁 식전 30분에 1포)을 baseline (0주)부터 12주간 경구 투여하였다.</p>
<p>시험기간</p>	<p>2014년 1월 9일 첫 시험대상자를 스크리닝 한 후, 각 시험대상자 별로 총 14주 (스크리닝 2주, 약제투여기간 12주)가 소요되었고 2014년 10월 28일에 종료되어 전체 시험이 종료되기까지 10개월 이상이 소요되었다.</p>
<p>평가방법</p>	<p><u>유효성 (Functionality)</u></p> <p>① 1차 기능성 평가 (Primary endpoint):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Baseline 대비 혈중 AST, ALT 수치의 변화 <p>② 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Baseline 대비 GGT 수치의 변화 • 혈중 지질대사 지표의 변화 <ul style="list-style-type: none"> - TC, TG, HDL, LDL <p><u>안전성 (safety)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 시험식품 투여 전과 투여 12주 후에 심전도 검사, 실험실적 검사, 활력징후 측정, 이학적 검사 진행을 실시하고, 이상반응을 평가하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다.

목 차

1. 인체적용시험의 명칭7

2. 서론7

3. 시험 방법7

3.1 인체시험의 윤리적 수행7

3.2 시험 제품8

3.3 시험 흐름도 10

3.4 시험 절차 12

3.5 통계분석 방법 15

4. 시험대상자의 기초정보 17

4.1 시험대상자의 기초정보..... 17

5. 유효성분석 결과 19

5.1 시험 전후 유효성 평가변수 19

6. 유효성분석의 결론 21

7. 안전성분석 결과 22

7.1 이상반응 발생현황 22

7.2 실험실 검사결과 24

7.3 안전성 분석의 결론 33

8. 결론 33

9. 고찰 33

10. 참고문헌..... 35

1. 인체적용시험의 명칭

곰피 주정추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한 유효섭취용량 설정 인체적용 시험

2. 서론

곰피 (*Ecklonia stolonifera*)는 갈조식물 다시마목 미역과의 다년생 해조로 우리나라 동해안 특산물이다. 곰피는 무기질을 풍부하게 함유하고 있으며 약간 짙은 맛이 인기가 좋아 쌈이나 무침 등에 많이 사용된다

본 연구팀은 곰피의 주정추출물에서 간기능 개선 효과를 갖는 기능성 식품을 개발하기 위하여 HPLC를 이용하여 곰피 주정추출물에서 eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol-A를 지표 성분으로 확인하였고 곰피 주정추출물의 간기능 개선 효과를 알아보기 위하여 알코올로 유도된 흰쥐 간독성 모델에서 곰피 주정추출물 100 mg/kg와 200 mg/kg를 투여하여 실험한 결과 간세포 보호 효능과 혈중 지질지표 개선효과를 확인하였다. 또한, 곰피 주정추출물의 작용 기전을 검토한 결과 간조직 내 항산화 효소인 SOD, catalase, glutathione의 수치를 증가시키고 산화 스트레스 지표인 MDA의 수치를 낮추는 것을 확인하였다.

이에 본 연구팀은 곰피 주정추출물의 안전성 및 간기능 개선 효과를 평가하기 위한 인체적용시험의 예비시험으로 곰피 주정추출물의 투여 용량을 130 및 180 mg/day로 설정하고 하여 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험을 수행하였다.

3. 시험 방법

3.1 인체적용시험의 윤리적 수행

본 인체시험은 가장 최근에 개정된 헬싱키 선언과 ICH guideline 및 식품의약품안전처의 의약품임상시험관리기준에 따라 수행되었다. 본 인체시험의 시험계획서, 시험대상자 동의서 및 기타 인체시험과 관련된 모든 사항은 2013년 10월 15일 경희대학교병원 임상시험심사위원회(IRB)의 승인을 취득한 이후에 실시 되었다(KMC IRB 1331-04).

시험대상자는 시험에 참여하기 전 준비된 시험대상자 설명문에 따라 임상시험 전반에 관한 설명을 들은 후 서면 동의서를 작성하였다. 설명문에는 임상시험의 목적 및 방법, 예측 효능 및 효과, 이상반응, 위험성, 피해 발생시 보상 및 치료대책, 자료의 비밀보장 등의 내용이 포함되었다. 또한 본인의 자발적인 의지에 의해 시험에 참여하며, 참여에 동의한 후 언제든지 동의를 철회할 수 있다는 점과 이에 관련된 불이익을 받지 않는다는 점을 명시하였다. 서면 동의서를 작성한 시험대상자에 한하여 시험이 진행되었다.

3.2 시험제품

인체적용시험에 사용된 곰피 주정추출물은 우수건강기능식품 제조기준 (GMP) 적용 업소인 (주)네추럴웨이에서 제조하였으며 포의 형태로 제작되어 인체적용시험에 사용하였다.

1) 시험식품

곰피 주정추출물 (GPL 130 mg 1포)
이 식품 1포 중 (단위: mg)

원 재료 명	기능	배합비 (%)	기준량(mg)	투입량 (mg)	실제작업량(g)
곰피추출분말	주원료	6.500	130.000	130.000	71.500
유당		35.000	700.000	700.000	385.000
식물성크림		22.100	442.000	442.000	243.100
말티톨		17.000	340.000	340.000	187.000
자일리톨		10.000	200.000	200.000	110.000
딸기과즙분말		5.200	104.000	104.000	57.200
딸기향분말	후혼합	2.000	40.000	40.000	22.000
프락토올리고당 분말		1.800	36.000	36.000	19.800
효소처리스테비아	바인더	0.400	8.000	8.000	4.400
sub total		100.000	2,000.000	2,000.000	1,100.000

곰피 주정추출물 (GPL 180 mg 1포)
이 식품 1포 중 (단위: mg)

원 재료 명	기능	배합비 (%)	기준량(mg)	투입량 (mg)	실제작업량(g)
곰피추출분말	주원료	9.000	180.000	180.000	99.000
유당		34.300	686.000	686.000	377.300
식물성크림		21.000	420.000	420.000	231.000
말티톨		16.300	326.000	326.000	179.300
자일리톨		10.000	200.000	200.000	110.000
딸기과즙분말		5.200	104.000	104.000	57.200
딸기향분말	후혼합	2.000	40.000	40.000	22.000
프락토올리고당 분말		1.800	36.000	36.000	19.800
효소처리스테비아	바인더	0.400	8.000	8.000	4.400
sub total		100.000	2,000.000	2,000.000	1,100.000

2) 대조식품

원 재 료 명	기능	배합비 (%)	기준량(mg)	투입량 (mg)	실제작업량(g)
유당		36.700	734.000	734.000	403.700
식물성크림		23.700	474.000	474.000	260.700
말티톨		18.600	372.000	372.000	204.600
자일리톨		11.600	232.000	232.000	127.600
말기과즙분말		5.200	104.000	104.000	57.200
말기향분말	후혼합	2.000	40.000	40.000	22.000
프락토올리고당 분말		1.800	36.000	36.000	19.800
효소처리스테비아	바인더	0.400	8.000	8.000	4.400
sub total		100.000	2,000.000	2,000.000	1,100.000

3.3 시험 흐름도 <표 1>

시험은 다음과 같은 절차에 의하여 수행되었다.

	스크리닝	치료기간			F/U ⁹⁾ 필요시
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4	
	(평가일: 방문예정일 ± 5일)				
	-14일 ~ -1일	0일 (0주)	6주 (42일)	12주 (84일)	
시험대상자 동의	○				
인구학적 조사 ¹⁾	○				
활력징후 ²⁾	○	○		○	○
신체검사 ³⁾	○	○	○	○	○
생활습관 조사 ⁴⁾		○			
운동 및 식습관 조사		○		○	
병력 및 동반질환	○				
이학적 검사	○	○	○	○	○
심전도 검사	○			○	○
실험실적 검사 ⁵⁾	○		○	○	○
임신여부 검사(가임기 여성) ⁶⁾	○		○	○	○
선행/병용 약물	○	○	○	○	○
이상반응			○	○	○
시험대상자 선정 ⁷⁾		○			
무작위 배정		○			
인체적용시험용 식품 처방		○	○		
복약 순응도 평가			○	○	

1. 인구학적 조사: 생년월일, 성별 등을 조사한다.
2. 활력징후: 체온, 혈압, 맥박수를 측정하며, 혈압과 맥박수는 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 동일한 혈압계를 사용하여 측정한다.
3. 신체검사: 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용하며, 신장은 신을 벗고 cm 단위로 측정하며 매 방문 때마다 측정한다.
4. 생활습관조사: 방문 2에서만 시행하며, 시험대상자의 흡연, 음주, 식사, 운동 습관에 대하여 조사한다.
5. 실험실적 검사: 시험대상자는 채혈하기 전 최소 8시간 이상 금식한 상태로 내원해야 한다. 단 방문 1 이전 2주 이내에 본원에서 실시한 실험실적 검사결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 방문 1에서 시행해야 할 검사 항목 중 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있다.
 <방문 1 검사 항목>
 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelet
 혈액생화학적 검사: Total bilirubin, Direct bilirubin, protein, Albumin, ALT, AST, ALP, r-GT, LD, glucose, BUN, Creatinine, Uric acid, Triglyceride, Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, HbA1c, free T4, TSH
 혈청 검사: HBsAg, anti-HCV Ab, ANA
 소변검사: pH, Protein, Glucose, RBC, WBC, Specific gravity, HCG (가임 여성인 경우)
 <방문 3 검사 항목>
 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelet
 혈액생화학적 검사: Total bilirubin, Direct bilirubin, protein, Albumin, ALT, AST, ALP, r-GT, LD, glucose, BUN, Creatinine, Uric acid, Triglyceride, Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, HbA1c
 소변검사: pH, Protein, Glucose, RBC, WBC, Specific gravity, HCG (가임 여성인 경우)
 <방문 4 검사 항목>
 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelet
 혈액생화학적 검사: Total bilirubin, Direct bilirubin, protein, Albumin, ALT, AST, ALP, r-GT, LD, glucose, BUN, Creatinine, Uric acid, Triglyceride, Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, HbA1c
 소변검사: pH, Protein, Glucose, RBC, WBC, Specific gravity, HCG (가임 여성인 경우)
6. 임신여부검사: 실험실적 검사의 일환으로 시험대상자 중 임신가능성이 있는 경우에 한하여 매 방문 시 임신여부를 확인한다.
7. 시험대상자 선정: 활력징후, 신체검사, 생활습관 조사, 이학적 검사, 심전도 검사, 실험실적 검사 등에서 선정기준에 적합한 시험대상자를 시험대상자로 선정한다.
8. F/U: 인체적용시험용 식품 투여종료 후 혹은 중도탈락 후 비정상적인 실험실 결과나 비정상적인 심전도 검사 결과, 계속되는 이상반응 등 시험자 판단에 따라 추적관찰이 필요하다고 여겨지는 경우에 따라 실시하며 심전도 검사의 경우 종료방문 후 심전도 검사 결과 이상이 있는 경우에 한하여 시행하도록 한다.

3.4 시험절차

본 인체적용시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 평행 인체시험으로 주 목적은 곰피 주정추출물을 하루에 130 mg 및 180 mg (아침 또는 저녁 식전 30분에 1포)을 12주 동안 경구 투여하였을 때의 간기능 개선 효과와 안전성을 확인하는 것을 목적으로 하는 예비시험으로 향후 시험의 용량 설정을 평가하려 하였다.

임상시험심사위원회의 심사는 아래와 같다.

<표 2> 임상시험심사위원회 심사

	심사 내역	내용
2013.09.26	IRB 초기심의 접수	시정승인(2013.09.10)
2013.10.11	시정승인답변서 제출	승인(2013.10.15)
2013.12.18	1차 변경 (연구기간 변경 외)	승인(2013.12.20)
2014.01.16	2차 변경 (시험대상자 선정기준 확대)	승인(2014.01.22)
2014.03.03	3차 변경 (연구기간 변경)	승인(2014.03.05)
2014.03.25	4차변경 (원내 취약한 시험대상자군에 대한 시험대상자 포함 요청)	승인(2014.04.08)
2014.04.10	5차 변경 (계획서 변경)	승인(2014.05.13)
2014.05.15	변동 및 위반사례 보고(선정 제외 기준 위반)	진행-연구자 주의(2014.05.21)
2014.05.30	6차 변경 (연구기간 변경)	승인(2014.06.03)
2014.07.24	변동 및 위반 사례 보고(방문 기간 위반)	진행-아무런 조치없이 연구(2014.07.24)
2014.09.03	연차심의	승인(2014.09.16)

연구대상은 문맹자를 제외한 만 20세 이상의 남성 및 여성으로 경증 또는 중등도의 간기능 이상 소견을 보이는 자를 대상으로 하여 각 군당 10명을 목표로 진행하였다.

인체적용시험은 2014년 1월 9일 에 첫 시험대상자 스크리닝을 시작하여 2014년 10월 28일에 종료되어 전체 시험이 종료되기까지 GCP 기관인 경희대학교병원 소화기내과와 임상약리학과를 방문한 107여명의 시험대상자 중 선정제외기준에 적합한 시험대상자 30명을 선정하여 12주간의 투여 기간을 갖는 무작위, 전향적 연구를 수행하였다.

스크리닝 검사를 통하여 (ALT (GPT)가 남성은 33 U/L, 여성은 25 U/L를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 33~149 IU/L, 여성 25~89 IU/L), 또는 AST (GOT)가 남성은 40 U/L, 여성은 30 U/L를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 40~149 IU/L, 여성 30~89 IU/L), 또는 GGT가 남성은 50 U/L, 여성은 30 U/L를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 50~149 IU/L, 여성 30~89 IU/L)를 선정기준으로 하였고

시험대상자가 시험요건에 적합한지를 판단하였다. 선정 제외기준에 따라 시험대상자로 적합하다고 판단된 경우 randomization 기법에 의하여 위약대조군, 공치 주정추출물 130 mg 투여군과 공피 주정추출물 180 mg 군으로 무작위 배정하여 시험을 수행하였다. 중도에 탈락하는 경우를 감안하여 인체적용시험용 제품을 공급하였고 목표 시험대상자수인 30명에 도달하면 나머지는 고려하지 않았다. 인체적용시험연구자가 시험 전 스크리닝 평가를 통해 본 인체시험의 시험대상자를 선정한 후 무작위로 2개의 시험식품군 또는 위약대조군에 배정한 다음 선정된 시험대상자는 컴퓨터에서 추출된 난수표를 근거로 하여 세 군의 시험대상자수가 동일하도록 만든 무작위코드에 따라 세 군 중의 한 군에 방문일(Day 0) 순서대로 낮은 번호부터 할당되었다.

시험진행 중에는 연구자와 시험대상자 모두 각 시험대상자가 어느 군에 배정되어 있는지 알지 못하였고 배정된 군의 비밀을 유지 하였다. 인체적용시험 담당자는 시험대상자에게 부여한 코드대로 인체적용시험용 식품을 대상 시험대상자에게 정확히 지급하였고 각 시험대상자들은 공피 주정추출물을 12 주간 하루 1포씩 (아침 또는 저녁 식전 30분에 1포) 경구 투여하였다. 또는 동량의 대조식품을 투여 받았다 (대조식품 아침 또는 저녁 식전 30분에 1포). 스크리닝 방문 시(시작일 2주전)에 인체시험책임자는 선정 제외 기준에 따라 시험대상자를 선별하고, 시험대상자로부터 서면동의서를 얻고 기초조사, 생명징후, 과거력, 약물 복용 및 치료경험, 혈압 등을 측정하고 이를 통계적으로 분석하였다. 중도에 탈락된 환자는 투여 종료 시 항목을 측정하였고 측정 결과는 인체시험담당자에 의하여 임상적 유의성 여부를 판단하였다.

본 인체시험은 단일기관 인체시험으로 진행되었으며, 경희대학교병원 소화기내과와 임상약리학과에서 의약품 인체시험 관리기준 (GCP)에 따라 이루어 졌으며 시험대상자 등록, 연구자와의 의견 교환 등을 포함한 시험의 전반적인 진행상황에 대한 모니터링은 (주)네추럴웨이 가 관리하였다. 또한 본 임상시험의 신뢰성 보증을 위하여 점검 (On-site audit)을 실시하였다. 점검은 (주)네추럴웨이의 모니터링 요원인 김재은에 의하여 수행되었으며, 경희대학교병원을 방문하여 임상시험의 전반적인 상태를 점검하였다. 점검에서 중대한 오류 사항은 발견되지 않았고 지적된 오류는 모두 수정되었다.

<표 3> 스크리닝 탈락자 및 사유

스크리닝번호	이니셜	동의취득일	실패사유	스크리닝번호	이니셜	동의취득일	실패사유
S001	KJY	2014.1.9	선정기준제외	S051	KIH	2014.3.27	선정기준제외
S003	KYH	2014.1.14	선정기준제외	S052	HSY	2014.3.27	선정기준제외
S004	JON	2014.1.14	선정기준제외	S053	LMH	2014.3.27	선정기준제외
S005	LKH	2014.1.21	선정기준제외	S054	ASH	2014.04.01	선정기준제외
S007	SIH	2014.1.21	선정기준제외	S055	KHY	2014.04.01	선정기준제외
S008	PJS	2014.1.28	선정기준제외	S056	JJH	2014.04.01	선정기준제외
S009	LGM	2014.1.29	선정기준제외	S057	YYJ	2014.04.01	선정기준제외

S012	JYD	2014.2.5	선정기준제외
S013	KSJ	2014.2.6	선정기준제외
S014	PYM	2014.2.11	선정기준제외
S015	OSM	2014.2.11	선정기준제외
S016	CJH	2014.2.11	선정기준제외
S019	OSH	2014.2.18	취약한 피험자
S020	CNJ	2014.2.18	선정기준제외
S021	SKS	2014.2.18	선정기준제외
S022	AKJ	2014.2.19	선정기준제외
S023	LJN	2014.2.19	선정기준제외
S025	PHJ	2014.2.19	선정기준제외
S026	LSS	2014.2.25	연구자의 판단
S028	BSJ	2014.2.26	선정기준제외
S030	JMS	2014.3.4	선정기준제외
S031	LSY	2014.3.4	선정기준제외
S032	SYK	2014.3.4	선정기준제외
S033	LKM	2014.3.4	선정기준제외
S034	LJY	2014.3.4	선정기준제외
S035	JMK	2014.3.4	선정기준제외
S036	JSD	2014.3.4	선정기준제외
S037	LKJ	2014.3.5	선정기준제외
S038	OSG	2014.3.11	선정기준제외
S039	ANH	2014.3.11	선정기준제외
S040	KNY	2014.3.11	선정기준제외
S043	SJS	2014.3.18	선정기준제외
S044	KMJ	2014.3.18	선정기준제외
S045	KSY	2014.3.19	선정기준제외
S046	LHS	2014.3.25	선정기준제외
S048	KON	2014.3.25	선정기준제외
S049	KMS	2014.3.25	선정기준제외
S050	PSY	2014.3.26	선정기준제외

S059	LSR	2014.04.01	선정기준제외
S060	KYY	2014.4.2	선정기준제외
S061	CYJ	2014.4.3	선정기준제외
S062	JSH	2014.4.8	선정기준제외
S064	CCH	2014.5.20	선정기준제외
S065	KJS	2014.5.21	선정기준제외
S069	LJM	2014.5.26	선정기준제외
S071	SHG	2014.5.30	선정기준제외
S072	LHS	2014.5.30	선정기준제외
S073	JSH	2014.5.30	선정기준제외
S074	YYD	2014.06.03	선정기준제외
S075	KHK	2014.06.03	선정기준제외
S078	JSM	2014.6.5	선정기준제외
S081	LJH	2014.6.9	선정기준제외
S082	LSH	2014.6.10	선정기준제외
S085	CHJ	2014.6.11	선정기준제외
S086	LSH	2014.6.11	선정기준제외
S087	JSH	2014.6.11	선정기준제외
S088	KHJ	2014.6.11	선정기준제외
S089	KDW	2014.6.11	선정기준제외
S090	CLY	2014.6.11	선정기준제외
S091	LSS	2014.6.11	선정기준제외
S092	JJS	2014.6.11	선정기준제외
S093	JJS	2014.6.11	선정기준제외
S094	LHS	2014.6.17	선정기준제외
S095	GBS	2014.6.17	선정기준제외
S099	KSJ	2014.7.9	선정기준제외
S100	KYJ	2014.7.9	선정기준제외
S101	LSH	2014.7.16	선정기준제외
S102	JSK	2014.7.18	선정기준제외
S103	JYS	2014.7.18	선정기준제외
S104	PKS	2014.7.23	선정기준제외

<표 4> 중도 탈락자 및 사유

스크리닝번호	랜덤 번호	군	이니셜	동의취득일	중도탈락 사유
S041	R010	130 mg 군	KJM	2014.03.12	선정제외기준 위반
S096	R025	180mg 군	KJY	2014.06.20	방문일 초과
S097	R026	대조군	CSJ	2014.7.2	동의철회
S105	R028	대조군	LIH	2014.8.12	연구자 중단요청
S106	R029	130mg 군	KMS	2014.8.12	연구자 중단요청
S107	R030	대조군	KKD	2014.8.18	동의철회

3.5 통계 분석 방법

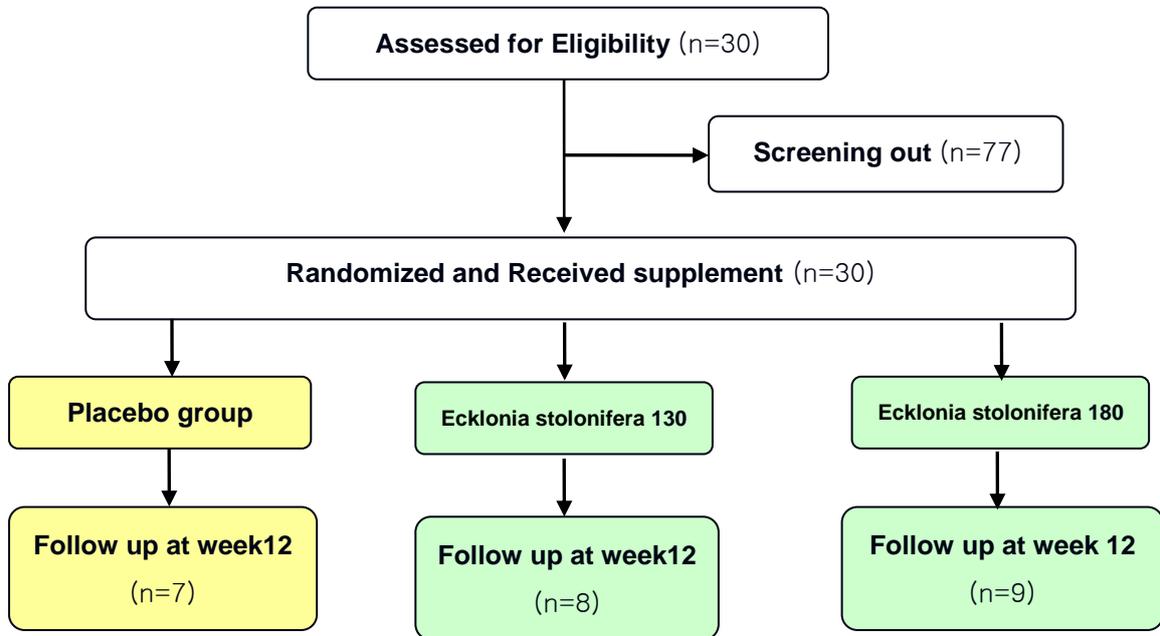
본 인체적용시험의 시험대상자로부터 얻어진 기능성 자료는 paired t-test를 실시하여 군 간의 차이가 있는지 검토하였다.

안전성 자료는 본 인체적용시험에 참여하여 인체적용시험용 식품을 복용한 시험대상자를 대상으로 안전성 평가가 이루어진 모든 시험대상자로부터 얻어진 자료를 모두 분석하였다.

107명을 스크리닝하여 선정기준 미달이나 동의철회로 77명이 스크리닝에서 탈락되었고 30명을 등록하여 위약대조군과 공피 주정추출물 투여군(130 mg군 및 180 mg군)에 각각 10명, 10명과 10명이 할당되었으나 투여 중 선정제외기준 위반, 방문일 초과, 동의 철회 및 연구자에 의한 중단 등에 의한 탈락자 6명 (대조식품군 3명, 130 mg군 2명, 180mg군 1명) 이 중도 탈락하였다.

발현된 모든 부작용은 각 치료군별로 자세한 설명과 함께 나열하였다. 각 치료군별로 시험식품과의 연관성이 있는 부작용과 연관성이 없는 부작용의 빈도를 기록하고 부작용 발현 건수와 한번 이상의 부작용을 경험한 환자의 비율에 대하여 투여군내에서 90%신뢰구간을 구하고 또한 투여군간 비교하였다.

<그림 1> 인체적용시험 진행과정 요약



4. 시험대상자의 기초 정보

4.1 시험대상자의 기초 정보

<표 5>에서는 인체적용시험에 등재된 시험대상자의 기초정보를 정리하였다. 시험대상자는 남자 18명, 여자 12명으로 총 30명이었다. 시험대상자의 연령대는 25세부터 71세까지 구성되었는데 평균은 47.7±10.78세였고 세 군에 고르게 분포하고 있어서 연령에 따른 차이를 배제할 수 있었다. 또한 시험대상자의 흡연, 음주, 운동 등 생활습관에서도 특별한 차이를 관찰할 수 없었고, 이학적검사, 심전도에서도 특별한 차이를 관찰할 수 없었다. 시험 전 측정된 혈압에서도 군간의 차이는 발견되지 않았다.

시험대상자들의 과거 질병력도 세 군간에 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다. 또한, 임상시험 개시 전의 약물 복용력도 세 군간에 차이를 보인 약물은 없었다. 기능성 식품의 주기적인 복용에서도 두 군간에 차이가 없었다.

<표 5> 대상자 기초정보 및 과거병력

평가변수	대조군(n=7)	130mg(n=8)	180mg(n=9)	p value
연령 (세)	41.4±11.2	49.5±9.9	49.2±10.8	0.272 ^a
성별(n,%)				
남자	5(71.4)	4(50.0)	6(66.7)	0.658 ^b
여자	2(28.6)	4(50.0)	3(33.3)	
몸무게(kg)	74.7±11.9	70.9±7.8	67.3±12.0	0.412 ^a
키(cm)	172.5±11.3	164.3±8.5	162.1±9.6	0.117 ^a
배둘레(abdominal girth, cm)	86.3±5.7	88.5±4.8	86.7±5.9	0.698 ^a
수축기혈압(mmHg)	129.3±10.8	129.8±11.5	121.9±9.0	0.240 ^a
이완기혈압(mmHg)	80.0±10.4	79.6±10.0	74.4±5.0	0.352 ^a
맥박(beat/min.)	71.9±10.2	79.3±11.6	74.5±9.8	0.243 ^a
체온(℃)	36.4±0.2	36.4±0.3	36.4±0.4	0.906 ^a
흡연력(n,%)				
비흡연	3(42.9)	5(62.5)	9(100.0)	0.074 ^b
과거흡연	1(14.3)	2(25.0)	0(0.0)	
현재흡연	3(42.9)	1(12.5)	0(0.0)	
음주력(n,%)				
비음주	2(28.6)	5(62.5)	5(55.5)	0.468 ^b
소량음주(<소주 ½ 병/주)	0(0.0)	1(12.5)	1(11.1)	

다량음주(>소주 ½ 병/주)	5(71.4)	2(25.0)	3(33.3)	
<hr/>				
병용약물(n,%)				
없음	5(71.4)	7(87.5)	6(66.7)	0.592 ^b
있음	2(28.6)	1(12.5)	3(33.3)	
<hr/>				
병력 및 동반질환				
없음	4(57.1)	7(87.5)	6(66.7)	0.409 ^b
있음	3(42.9)	1(12.5)	3(33.3)	
<hr/>				
이학적검사				
no	7(100.0)	8(100.0)	9(100.0)	not available
yes				
<hr/>				
심전도				
정상	3(42.9)	6(75.0)	8(88.9)	0.126 ^b
비정상(임상적 의미없음)	4(57.1)	2(25.0)	1(11.1)	
<hr/>				
식사				
규칙적	7(100.0)	8(100.0)	9(100.0)	not available
불규칙적				
<hr/>				
운동				
전혀하지 않음	7(100.0)	8(100.0)	9(100.0)	not available
불규칙적(30분, 주3회이하)				
규칙적(30분, 주3회이상)				
<hr/>				
기능성식품				
주기적 복용				not available
비정기적 복용	7(100.0)	8(100.0)	9(100.0)	

a: Compared between groups: p-value by ANOVA

b: Compared between groups: p-value by Fisher's exact test

5. 유효성분석결과

5.1 시험 전후 유효성평가 변수

<표 6> 시험 후 유효성평가 변수의 검정 (대조군과 130 mg 투여군)

평가변수		대조군	130mg 복용군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
AST	Baseline	34.71±10.83	35.13±13.97	0.951	
	after 12 weeks	31.57±8.08	31.00±13.74	0.925	
	Difference ^c	3.14±5.96	4.13±8.24	0.798	
	p value ^d	0.212	0.200		0.807
ALT	Baseline	46.86±27.00	42.00±23.14	0.713	
	after 12 weeks	33.29±12.42	40.75±26.50	0.508	
	Difference ^c	13.57±19.16	1.25±13.23	0.166	
	p value ^d	0.110	0.797		0.177
rGT	Baseline	57.43±54.30	79.88±89.63	0.575	
	after 12 weeks	58.29±42.02	85.25±95.34	0.503	
	Difference ^c	-0.86±46.19	-5.38±7.87	0.789	
	p value ^d	0.962	0.095		0.710
Total Cholesterol	Baseline	190.14±16.53	214.78±42.65	0.173	
	after 12 weeks	192.71±24.12	206.56±41.18	0.444	
	Difference ^c	-2.57±16.65	8.22±15.36	0.200	
	p value ^d	0.697	0.147		0.337
Triglyceride	Baseline	140.57±75.72	130.56±68.56	0.786	
	after 12 weeks	115.29±51.72	125.22±31.04	0.640	
	Difference ^c	25.29±47.24	5.33±70.15	0.529	
	p value ^d	0.207	0.825		0.496
HDL	Baseline	50.29±8.50	57.78±12.64	0.200	
	after 12 weeks	53.71±10.77	56.78±12.68	0.617	
	Difference ^c	-3.43±6.70	1.00±4.61		
	p value ^d	0.225	0.533	0.139	0.213
LDL	Baseline	118.71±16.59	136.78±38.59	0.269	
	after 12 weeks	118.14±16.84	130.67±35.46	0.406	
	Difference ^c	0.57±15.25	6.11±13.49	0.454	

p value ^d	0.924	0.211	0.741
----------------------	-------	-------	-------

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 12 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

유효성평가 변수인 AST, ALT, rGT 등에서는 시험전 각군별 비교에서 차이가 없었고, 시험 후에 각 군간의 비교에서 차이가 없었다. 또한 초기 측정된 값의 영향을 보정한 ANCOVA test 결과에서도 각 군별로 차이가 없었다.

<표 7> 시험 전후 유효성평가 변수의 검정 (대조군과 180 mg 투여군)

평가변수	Mean±S.D.		p value ^a	p value ^b
	대조군	180mg 복용군		
AST	Baseline	34.71±10.83	33.44±10.76	0.819
	after 12 weeks	31.57±8.08	32.33±11.87	0.887
	Difference ^c	3.14±5.96	1.11±6.37	0.526
	p value ^d	0.212	0.615	0.569
ALT	Baseline	46.86±27.00	39.44±34.49	0.648
	after 12 weeks	33.29±12.42	45.22±38.01	0.441
	Difference ^c	13.57±19.16	-5.78±7.17	0.014
	p value ^d	0.110	0.042	0.018
rGT	Baseline	57.43±54.30	44.11±21.02	0.508
	after 12 weeks	58.29±42.02	45.67±24.22	0.461
	Difference ^c	-0.86±46.19	-1.56±9.07	0.965
	p value ^d	0.962	0.621	0.696
Total Cholesterol	Baseline	190.14±16.53	214.78±42.65	0.173
	after 12 weeks	192.71±24.12	206.56±41.18	0.444
	Difference ^c	-2.57±16.65	8.22±15.36	0.200
	p value ^d	0.697	0.147	0.337
Triglyceride	Baseline	140.57±75.72	130.56±68.56	0.786
	after 12 weeks	115.29±51.72	125.22±31.04	0.640

	Difference ^c	25.29±47.24	5.33±70.15	0.529	
	p value ^d	0.207	0.825		0.496
HDL	Baseline	50.29±8.50	57.78±12.64	0.200	
	after 12 weeks	53.71±10.77	56.78±12.68	0.617	
	Difference ^c	-3.43±6.70	1.00±4.61		
	p value ^d	0.225	0.533	0.139	0.213
LDL	Baseline	118.71±16.59	136.78±38.59	0.269	
	after 12 weeks	118.14±16.84	130.67±35.46	0.406	
	Difference ^c	0.57±15.25	6.11±13.49	0.454	
	p value ^d	0.924	0.211		0.741

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 12 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

아미노전이효소인 ALT에서 시험전과 후의 변화량의 차이를 구하여 대조군과 대용량 투여군간 비교한 결과에서 차이가 있었다. 임상적으로는 의미를 부여할 만한 차이는 아니었다. 다른 유효성 평가지표인 AST, rGT 등에서는 시험전 각 군별 비교에서 차이가 없었고, 시험후에서도 각 군별 비교에서도 차이가 없었다.

또한 초기 측정된 값의 영향을 보정한 ANCOVA test 결과에서도 각 군별로 차이가 없었다.

6. 유효성분석의 결론

본 시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험으로 시험의 목적은 경증 또는 중등도의 간기능 이상 소견자에서 공피 주정추출물의 간기능 개선 효과와 안전성을 확인하는 것을 목적으로 하며 향후 시험의 용량 설정을 목적으로 하였다. 또한, 공피 주정추출물 130 mg 군과 180 mg 군으로 나누어 시험을 진행함으로써 향후 시험에 대한 농도 설정을 위한 기초자료로 삼고자 하였다.

유효성에 대한 자료는 처음에 배정받은 대상자 (30명, 각 군 10명씩) 중 중도에 탈락한 6명을 제외한 24명 대상자에서 12주간 공피 주정추출물 130 mg 또는 180 mg 및 대조식품을 복용한 결과는 다음과 같다.

- ① 대조군, 공피 주정추출물 130 mg 투여군 및 180 mg 투여군에서 AST, ALT, GGT, TC, TG, HDL, LDL의 변화를 관찰한 결과 대조군과 130mg 투여군에서 투여전과 투여후의 각 군간 비교에서 차이를 나타내지 않았다.
- ② 대조군과 180 mg 투여군에서 투여전과 투여후의 유효성 변수를 비교한

결과 ALT에서 대용량 투여군에서 ALT가 증가하는 양상을 보였으나 경계치 이내의 수치여서 임상적인 의미를 부여할 만한 차이는 아니었다.

③ 다른 유효성 평가지표에서는 대조군과 130mg 투여군, 대조군과 180mg 투여군에서 의미있는 결과를 나타내지 않았다.

7. 안전성분석결과

안전성 분석에서 이상반응은 시험에 참여한 모든 시험대상자를 대상으로 평가하였고, 실험실 검사 및 그 외의 항목에 대하여는 조사된 자료를 모두 이용하였다.

7.1 이상반응 발생 현황

이상반응은 시험식품을 투여한 후 1회 이상 안전성에 대한 조사가 된 시험대상자를 대상으로 평가하였다. 전체 30명의 시험대상자 중에서 이상반응이 있다고 응답한 시험대상자는 2명이었다. 모두 대조군에 속하는 시험대상자로 시험식품과는 관련이 없는 것으로 나타났다.

<표 8> 이상반응을 보인 시험대상자

시험대상자/시험군	이상반응 (시작일-소멸일, yy/dd/dd)	이상반응정도	처치	제품 연관성
R004 - 대조군	Hemoglobin 수치 감소 (14/3/27 - 14/6/2)	경증	없음	연관이 없음
R026 - 대조군	General weakness (14/7/16 - 14/7/19)	경증	없음	연관이 없음

7.2 활력징후 분석 결과

<표 9> 시험전후 대조군과 130mg 투여군의 활력징후

평가변수	Mean±S.D.		p value ^a	p value ^b
	대조군	130mg 복용군		
Systolic B.P.	Baseline	129.3±16.9	134.3±12.5	0.525
	after 12 weeks	135.7±10.1	126.5±11.3	0.122
	Difference ^c	-6.4±14.4	7.8±9.4	0.039
	p value ^d	0.282	0.053	0.033
Diastolic B.P.	Baseline	80.0±11.9	77.8±8.8	0.681
	after 12 weeks	83.4±10.2	76.3±7.2	0.134
	Difference ^c	-.34±10.5	1.5±5.1	0.258
	p value ^d	0.421	0.433	0.121
Pulse	Baseline	81.0±13.2	84.6±14.9	0.629

	after 12 weeks	73.7±10.8	76.0±9.1	0.663
	Difference ^c	7.3±17.7	8.6±10.1	0.857
	p value ^d	0.317	0.046	0.787
Temperature	Baseline	36.3±0.2	36.3±0.2	0.644
	after 12 weeks	36.4±0.2	36.4±0.3	0.857
	Difference ^c	-0.1±0.3	-0.1±0.4	0.818
	p value ^d	0.569	0.523	0.756

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 12 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

혈압과 12주 후 측정된 결과에서 130 mg 투여군에서 저하되는 양상을 나타내었고 12주 후 측정된 수축기 혈압이 초기 측정된 수축기 혈압을 보정한 ANCOVA test결과 그룹간에 차이가 있었다(p=0.033). 맥박은 130mg 투여군에서 투여 12주 후에 의미있는 감소를 보였으나 맥박을 포함한 이완기 혈압, 체온 등은 각 군별로 측정시점에 따라 비교한 independent t-test에서 차이가 없었고, 천후 차이를 비교한 paired t-test에서도 차이가 없었다. 측정 전후의 차이를 구하여 각 군별로 비교한 값에서도 차이가 없었다.

<표 10> 시험전후 대조군과 180mg 투여군의 활력징후

평가변수		대조군	180mg 복용군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
Systolic B.P.	Baseline	129.3±16.9	127.2±11.8	0.777	
	after 6 weeks	135.7±10.1	119.7±15.6	0.034	
	Difference ^c	-6.4±14.4	7.6±11.0	0.045	
	p value ^d	0.282	0.074		0.022
Diastolic B.P.	Baseline	80.0±11.9	78.2±4.1	0.679	
	after 6 weeks	83.4±10.2	73.3±8.3	0.046	
	Difference ^c	-.34±10.5	4.9±6.3	0.069	
	p value ^d	0.421	0.049		0.044
Pulse	Baseline	81.0±13.2	72.2±8.0	0.121	
	after 6 weeks	73.7±10.8	75.1±8.2	0.772	

	Difference ^c	7.3±17.7	-2.9±4.4	0.183
	p value ^d	0.317	0.084	0.502
Temperature	Baseline	36.3±0.2	36.3±0.3	0.990
	after 6 weeks	36.4±0.2	36.5±0.2	0.199
	Difference ^c	-0.1±0.3	-0.2±0.5	0.523
	p value ^d	0.569	0.272	0.150

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 12 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

혈압은 12주 후 측정된 수축기 혈압이 초기 측정된 수축기 혈압을 보정한 ANCOVA test결과 그룹간에 차이가 있었고(p=0.022) 이완기 혈압도 차이를 나타내었다 (p=0.044). 이외에 맥박, 체온 등은 각 군별로 측정시점에 따라 비교한 independent t-test에서 차이가 없었고, 전후 차이를 비교한 paired t-test에서도 차이가 없었다. 측정 전후의 차이를 구하여 각 군별로 비교한 값에서도 차이가 없었다.

7.3 실험실 검사 결과

실험실 검사 결과의 변화는 시험식품을 투여하기 직전과 투여한 후 12주째 후의 변화량을 two-sample t-test의 방법으로 평가하였다. 실험실적 검사는 유효성 평가지표에서 기술되어 있으나 일부가 간기능과 중복되지만 전체적인 안전성을 위하여 중복 기재하였고 일반생화학 검사와 간기능 관련 생화학 검사로 분류하여 기술하였다. 또한, 그룹별 차이는 student's t-test를 이용하여 분석하였다.

<표 11> 시험 전후 혈액학적 검사 변화 - 대조군 vs 130 mg 투여군

평가변수	Mean±S.D.		p value ^a	p value ^b
	대조군	130mg 복용군		
WBC	Baseline	6.14±0.69	7.00±1.77	0.237
	after 12 weeks	6.29±0.76	7.75±1.98	0.090
	Difference ^c	-0.14±1.07	-0.75±2.19	0.517
	p value ^d	0.736	0.365	0.180
RBC	Baseline	4.86±0.69	4.63±0.52	0.470

	after 12 weeks	5.00±0.82	4.50±0.53	0.179	
	Difference ^c	-0.14±0.38	0.13±0.35	0.180	
	p value ^d	0.356	0.351		0.188
Hemoglobin	Baseline	14.71±2.06	14.25±1.98	0.664	
	after 12 weeks	15.14±2.27	14.25±2.12	0.445	
	Difference ^c	-0.43±0.79	0.00±0.53	0.234	
	p value ^d	0.200	1.000		0.272
Hematocrit	Baseline	43.43±5.53	43.25±5.70	0.952	
	after 12 weeks	45.14±6.28	42.13±5.77	0.350	
	Difference ^c	-1.71±1.38	1.13±1.81	0.005	
	p value ^d	0.017	0.122		0.007
Platelet	Baseline	230.71±36.13	270.13±94.12	0.318	
	after 12 weeks	258.00±42.86	228.88±116.63	0.527	
	Difference ^c	-27.29±47.79	41.25±74.52	0.058	
	p value ^d	0.182	0.161		0.095

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 12 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

일반혈액검사는 Hematocrit 만이 시험 전 값을 보정한 ANCOVA test 결과 차이가 있었다 (p=0.007). 또한 시험 전과 후의 차이를 구하여 각 군별로 비교한 independent t-test에서 차이가 있었다(p=0.005).

다른 백혈구 수치, 적혈구 수치, 헤모글로빈 수치, 혈소판 수치 등은 시험 전과 후의 차이에 서로 통계적으로 차이를 보이지 않았다.

<표 12> 시험 전후 혈액학적 검사 변화 - 대조군 vs 180 mg 투여군

평가변수		위약군	180mg 복용군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
WBC	Baseline	6.14±0.69	6.11±1.17	0.947	
	after 12 weeks	6.29±0.76	6.56±1.24	0.620	

	Difference ^c	-0.14±1.07	-0.14±1.07	0.596	
	p value ^d	0.736	0.272		0.581
RBC	Baseline	4.86±0.69	4.78±0.67	0.820	
	after 12 weeks	5.00±0.82	4.78±0.67	0.570	
	Difference ^c	-0.14±0.38	0.00±0.00	0.271	
	p value ^d	0.356	1.000		0.295
Hemoglobin	Baseline	14.71±2.06	14.33±1.41	0.667	
	after 12 weeks	15.14±2.27	14.56±1.59	0.552	
	Difference ^c	-0.43±0.79	-0.22±0.67	0.579	
	p value ^d	0.200	0.347		0.614
Hematocrit	Baseline	43.43±5.53	42.89±4.34	0.830	
	after 12 weeks	45.14±6.28	42.78±4.24	0.383	
	Difference ^c	-1.71±1.38	0.11±1.76	0.041	
	p value ^d	0.017	0.855		0.050
Platelet	Baseline	230.71±36.13	257.00±65.04	0.355	
	after 12 weeks	258.00±42.86	267.22±62.49	0.744	
	Difference ^c	-27.29±47.79	-10.22±19.68	0.345	
	p value ^d	0.182	0.158		0.514

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 12 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

일반혈액검사는 Hematocrit 만이 시험 전 값을 보정한 ANCOVA test 결과 차이가 있었다(p=0.050). 또한 시험 전과 후의 차이를 구하여 각 군별로 비교한 independent t-test에서 차이가 있었다(p=0.041). 다른 백혈구 수치, 적혈구 수치, 헤모글로빈 수치, 혈소판 수치 등은 시험 전과 후의 차이에서도 통계적으로 차이를 보이지 않았다.

<표 13> 시험 전후 생화학적 검사 변화 - 대조군 vs 130 mg 투여군

평가변수	대조군	130mg 복용군	p value ^a	p value ^b
	Mean±S.D.			

Glucose	Baseline	101.00±9.85	113.50±14.39	0.075	
	after 12 weeks	104.86±9.69	112.50±15.77	0.287	
	Difference ^c	-3.86±5.27	1.00±7.78	0.187	
	p value ^d	0.101	0.727		0.361
BUN	Baseline	14.86±2.97	14.25±4.65	0.772	
	after 12 weeks	13.71±2.93	14.13±4.88	0.849	
	Difference ^c	1.14±3.13	0.13±2.85	0.521	
	p value ^d	0.372	0.905		0.580
Creatinine	Baseline	0.73±0.15	0.70±0.15	0.720	
	after 12 weeks	0.73±0.19	0.69±0.16	0.663	
	Difference ^c	0.00±0.06	0.01±0.06	0.700	
	p value ^d	1.000	0.598		0.770
Uric acid	Baseline	5.54±1.41	5.75±1.26	0.769	
	after 12 weeks	5.21±1.63	9.40±9.99	0.295	
	Difference ^c	0.33±0.99	-3.65±10.86	0.354	
	p value ^d	0.415	0.373		0.241
Total Cholesterol	Baseline	190.14±16.53	189.75±21.73	0.970	
	after 12 weeks	192.71±24.12	177.88±37.96	0.391	
	Difference ^c	-2.57±16.65	11.88±19.85	0.154	
	p value ^d	0.697	0.135		0.133
Triglyceride	Baseline	140.57±75.72	179.00±131.59	0.509	
	after 12 weeks	115.29±51.72	148.88±114.06	0.487	
	Difference ^c	25.29±47.24	30.13±46.15	0.844	
	p value ^d	0.207	0.107		0.828
LDL	Baseline	118.71±16.59	118.00±12.56	0.926	
	after 12 weeks	118.14±16.84	107.00±30.37	0.406	
	Difference ^c	0.57±15.25	11.00±23.64	0.337	
	p value ^d	0.924	0.230		0.358
HDL	Baseline	50.29±8.50	44.75±9.27	0.252	
	after 12 weeks	53.71±10.77	45.75±12.33	0.209	
	Difference ^c	-3.43±6.70	-1.00±7.31	0.517	

	p value ^d	0.225	0.710	0.589
HbA1c	Baseline	5.50±0.10	6.26±1.26	0.136
	after 12 weeks	5.43±0.19	6.06±0.92	0.095
	Difference ^c	0.07±0.21	0.20±0.49	0.533
	p value ^d	0.411	0.286	0.483

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 12 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

생화학 검사 시험 전과 후의 차이를 비교한 검정에서 차이가 없었다. 시험전 각 군별 비교에서도 차이가 없었고, 시험 전후의 변화량의 차이도 검정결과 차이가 없었다. 또한 시험 후 측정값에 영향을 주는 초기값을 보정한 ANCOVA test에서도 차이가 없었다.

<표 14> 시험 전후 생화학적 검사 변화 - 대조군 vs 180 mg 투여군

평가변수		대조군	180mg 복용군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
Glucose	Baseline	101.00±9.85	94.00±7.28	0.365	
	after 12 weeks	104.86±9.69	100.56±9.55	0.389	
	Difference ^c	-3.86±5.27	-3.56±6.98	0.926	
	p value ^d	0.101	0.165		0.806
BUN	Baseline	14.86±2.97	16.11±3.59	0.468	
	after 12 weeks	13.71±2.93	15.00±3.74	0.468	
	Difference ^c	1.14±3.13	1.11±3.55	0.985	
	p value ^d	0.372	0.375		0.690
Creatinine	Baseline	0.73±0.15	0.76±0.17	0.742	
	after 12 weeks	0.73±0.19	0.77±0.13	0.642	
	Difference ^c	0.00±0.06	-0.01±0.06	0.715	
	p value ^d	1.000	0.594		0.675
Uric acid	Baseline	5.54±1.41	5.63±1.16	0.890	

	after 12 weeks	5.21±1.63	5.66±1.29	0.555	
	Difference ^c	0.33±0.99	-0.02±0.74	0.431	
	p value ^d	0.415	0.931		0.436
Total Cholesterol	Baseline	190.14±16.53	214.78±42.65	0.173	
	after 12 weeks	192.71±24.12	206.56±41.18	0.444	
	Difference ^c	-2.57±16.65	8.22±15.36	0.200	
	p value ^d	0.697	0.147		0.337
Triglyceride	Baseline	140.57±75.72	130.56±68.56	0.786	
	after 12 weeks	115.29±51.72	125.22±31.04	0.640	
	Difference ^c	25.29±47.24	5.33±70.15	0.529	
	p value ^d	0.207	0.825		0.496
LDL	Baseline	118.71±16.59	136.78±38.59	0.269	
	after 12 weeks	118.14±16.84	130.67±35.46	0.406	
	Difference ^c	0.57±15.25	6.11±13.49	0.454	
	p value ^d	0.924	0.211		0.741
HDL	Baseline	50.29±8.50	57.78±12.64	0.200	
	after 12 weeks	53.71±10.77	56.78±12.68	0.617	
	Difference ^c	-3.43±6.70	1.00±4.61		
	p value ^d	0.225	0.533	0.139	0.213
HbA1c	Baseline	5.50±0.10	5.52±0.49	0.898	
	after 12 weeks	5.43±0.19	5.61±0.38	0.268	
	Difference ^c	0.07±0.21	-0.09±0.25	0.195	
	p value ^d	0.411	0.312		0.122

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 12 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

생화학 검사 시험 전과 후의 차이를 비교한 검정에서 차이가 없었다. 시험전 각 군별 비교에서도 차이가 없었고, 시험 전후의 변화량의 차이도 검정결과 차이가 없었다. 또한 시험 후 측정값에 영향을 주는 초기값을 보정한 ANCOVA test에서도 차이가 없었다.

<표 15> 시험 전후 간기능 관련 생화학적 검사 변화 - 대조군 vs 130mg 투여군

평가변수		대조군	130mg 복용군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
Total bilirubin	Baseline	0.85±0.24	0.68±0.20	0.161	
	after 12 weeks	0.86±0.33	0.67±0.16	0.185	
	Difference ^c	-0.01±0.42	0.00±0.13	0.931	
	p value ^d	0.952	0.938		0.327
Direct bilirubin	Baseline	0.21±0.06	0.19±0.06	0.418	
	after 12 weeks	0.24±0.07	0.20±0.06	0.269	
	Difference ^c	-0.02±0.09	-0.01±0.04	0.671	
	p value ^d	0.510	0.557		0.425
Total Protein	Baseline	7.34±0.34	7.60±0.19	0.087	
	after 12 weeks	7.81±0.37	7.35±0.31	0.020	
	Difference ^c	-0.47±0.41	0.25±0.33	0.002	
	p value ^d	0.023	0.069		0.016
Albumin	Baseline	4.37±0.11	4.40±0.16	0.699	
	after 12 weeks	4.56±0.19	4.34±0.21	0.053	
	Difference ^c	-0.19±0.23	0.06±0.16	0.028	
	p value ^d	0.073	0.305		0.035
ALT	Baseline	46.86±27.00	42.00±23.14	0.713	
	after 12 weeks	33.29±12.42	40.75±26.50	0.508	
	Difference ^c	13.57±19.16	1.25±13.23	0.166	
	p value ^d	0.110	0.797		0.177
AST	Baseline	34.71±10.83	35.13±13.97	0.951	
	after 12 weeks	31.57±8.08	31.00±13.74	0.925	
	Difference ^c	3.14±5.96	4.13±8.24	0.798	
	p value ^d	0.212	0.200		0.807
ALP	Baseline	71.57±13.56	73.50±17.78	0.819	
	after 12 weeks	74.29±18.25	71.38±18.21	0.763	
	Difference ^c	-2.71±5.25	2.13±7.51	0.178	

	p value ^d	0.220	0.450	0.181
rGT	Baseline	57.43±54.30	79.88±89.63	0.575
	after 12 weeks	58.29±42.02	85.25±95.34	0.503
	Difference ^c	-0.86±46.19	-5.38±7.87	0.789
	p value ^d	0.962	0.095	0.710
LD	Baseline	404.86±47.19	338.88±39.74	0.011
	after 12 weeks	404.71±65.94	333.50±36.80	0.021
	Difference ^c	0.14±46.57	5.38±37.69	0.814
	p value ^d	0.994	0.699	0.468

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 12 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

간기능 검사에서는 총단백질과 LD에서 시험전 대조군과 고용량 투여군 두 군간의 independent test 결과 차이가 있었다. 총단백질에서는 시험전후의 변화량의 차이가 각 군별로 차이를 보였다. 정상 범위내에서 보인 차이로서 통계적으로는 차이를 보였지만 임상적으로는 의미를 부여할 만한 차이는 아니었다. 다른 간기능 수치인 총빌리루빈, 직접빌리루빈, AST, ALT, rGT 등에서는 시험전 각군별 비교에서 차이가 없었고, 시험 후에 각 군간의 비교에서 차이가 없었다. 또한 초기 측정된 값의 영향을 보정한 ANCOVA test 결과에서도 각 군별로 차이가 없었다.

<표 16> 시험 전후 간기능 관련 생화학적 검사 변화 - 대조군 vs 180 mg 투여군

평가변수		대조군	180mg 복용군	p value ^a	p value ^b
		Mean±S.D.			
Total bilirubin	Baseline	0.85±0.24	0.91±0.40	0.715	
	after 12 weeks	0.86±0.33	0.91±0.55	0.832	
	Difference ^c	-0.01±0.42	0.00±0.37	0.947	
	p value ^d	0.952	0.979		0.996
Direct bilirubin	Baseline	0.21±0.06	0.22±0.09	0.911	
	after 12 weeks	0.24±0.07	0.22±0.12	0.757	
	Difference ^c	-0.02±0.09	0.00±0.11	0.694	
	p value ^d	0.510	0.931		0.714

Total Protein	Baseline	7.34±0.34	7.67±0.30	0.065	
	after 12 weeks	7.81±0.37	7.62±0.37	0.319	
	Difference ^c	-0.47±0.41	0.04±0.33	0.014	
	p value ^d	0.023	0.695		0.092
Albumin	Baseline	4.37±0.11	4.40±0.19	0.727	
	after 12 weeks	4.56±0.19	4.42±0.22	0.221	
	Difference ^c	-0.19±0.23	-0.02±0.19	0.141	
	p value ^d	0.073	0.738		0.163
ALT	Baseline	46.86±27.00	39.44±34.49	0.648	
	after 12 weeks	33.29±12.42	45.22±38.01	0.441	
	Difference ^c	13.57±19.16	-5.78±7.17	0.014	
	p value ^d	0.110	0.042		0.018
AST	Baseline	34.71±10.83	33.44±10.76	0.819	
	after 12 weeks	31.57±8.08	32.33±11.87	0.887	
	Difference ^c	3.14±5.96	1.11±6.37	0.526	
	p value ^d	0.212	0.615		0.569
ALP	Baseline	71.57±13.56	62.67±14.31	0.225	
	after 12 weeks	74.29±18.25	64.67±14.31	0.256	
	Difference ^c	-2.71±5.25	-2.00±6.18	0.811	
	p value ^d	0.220	0.360		0.994
rGT	Baseline	57.43±54.30	44.11±21.02	0.508	
	after 12 weeks	58.29±42.02	45.67±24.22	0.461	
	Difference ^c	-0.86±46.19	-1.56±9.07	0.965	
	p value ^d	0.962	0.621		0.696
LD	Baseline	404.86±47.19	392.89±62.80	0.601	
	after 12 weeks	404.71±65.94	372.78±61.54	0.335	
	Difference ^c	0.14±46.57	20.11±59.50	0.478	0.338
	p value ^d	0.994	0.340		

S.D.: standard deviation

a: Compared between groups: p-value by Independent T-test

b: Compared between groups: p-value by ANCOVA(adjustment with baseline)

c: Difference between the values of Baseline and after 6 weeks.

d: Compared within groups: p-value by Paired t-test

총단백질에서 시험전후의 변화량의 차이를 구하여 대조군과 대용량 투여군간의 independent test에서 차이를 보였다. 또 아미노전이효소인 ALT에서 시험전과 후의 변화량의 차이를 구하여 대조군과 대용량 투여군간 비교에서 차이가 있었다. 임상적으로는 의미를 부여할 만한 차이는 아니었다. 다른 간기능 수치인 총빌리루빈, 직접빌리루빈, 알부민, AST, rGT, LD 등에서는 시험전 각 군별 비교에서 차이가 없었고, 시험 후에서도 각 군별 비교에서도 차이가 없었다.

또한 초기 측정된 값의 영향을 보정한 ANCOVA test 결과에서도 각 군별로 차이가 없었다.

7.3 안전성 분석의 결론

이상반응은 시험식품을 투여한 후 1회 이상 안전성에 대한 조사가 된 시험대상자를 대상으로 시험대상자에서 발생한 없어서 시험식품은 안전한 것으로 나타났다. 2명의 시험대상자가 이상반응을 보였으나 모두 대조군으로 판명되었고 시험식품을 복용한 시험대상자 중에서 실험실적검사 및 활력징후 등에서 이상반응을 보인 시험대상자는 없었다.

결론적으로 12주간 곰피 주정추출물 130 mg과 180 mg 및 위약대조식품을 투여한 결과 특별하거나 심각한 이상반응은 전체 시험대상자에서 한 명도 발생하지 않았으며, 따라서 곰피 주정추출물은 안전한 식품으로 조사 되었다.

8. 결론

본 인체적용시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 평행 인체적용시험으로 주 목적은 곰피 주정추출물 하루에 130 mg 및 180 mg (아침 또는 저녁 식전 30분에 1포)을 12주 동안 경구 투여하였을 때의 간기능과 관련된 기능성을 평가하고 안전성 여부도 확인하고자 하였다.

곰피 주정추출물 130mg 및 180mg을 투여한 군과 위약대조군 식품을 12주간 투여 결과, 2명의 시험대상자에서 이상반응이 나타났으나 대조식품군으로 판명되어 안전한 식품으로 판명되었다. 곰피 주정추출물 130 mg 투여군에서 수축기 혈압이 저하되는 양상을 보였고 180 mg 투여군에서는 투여 12주 후의 수축기 혈압과 이완기 혈압이 저하되는 양상을 보였다. 다른 검사에서는 안전성과 관련한 유의한 변화를 나타내지 않았다. 또한, 특별하거나 심각한 이상반응은 전체 시험대상자에서 한 명도 발생하지 않았으며, 이상반응도 시험제품과 명백한 관련성을 찾을 수 없었고 임상적인 의미도 적어 안전한 식품으로 조사 되었다.

유효성 평가에서는 곰피 주정추출물의 투여가 투여 전후에 유의한 결과를 나타내지는 않았다.

9. 고찰

곰피 주정추출물의 연구하기 위하여 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 평행 인체적용시험을 수행하였다. 결과 곰피주정추출물은 간기능의 개선에 관한 영향을 주지 않는

것으로 나타났다. 본 인체적용시험을 통하여 공피 주정추출물은 상대적으로 안전한 식품임을 알 수 있었다.

10. 참고문헌

- 1) 건강기능식품 인체적용시험 설계 안내서. 식품의약품안전평가원 식품위해평가부. (2012)
- 2) Park SH, Heo NY, Kim CH, Suk KT, Kim DJ, Lee HY. Upper reference limits for aminotransferase activities and the prevalence of elevated aminotransferase activities in a Korean population. *J Clin Gastroenterol* 2013;47:76-82
- 3) Yoon JS, Kasin Yadunandam A, Kim SJ, Woo HC, Kim HR, Kim GD. Dieckol, isolated from *Ecklonia stolonifera*, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *J Nat Med.* 2013;67(3):519-27.
- 4) Lee MS, Kim JI, Utsuki T, Park NG, Kim HR. Cytoprotective effects of phlorofucofuroeckol A isolated from *Ecklonia stolonifera* against tacrine-treated HepG2 cells. *Fitoterapia.* 2012;83(6):1060-7.
- 5) Lee MS, Shin T, Utsuki T, Choi JS, Byun DS, Kim HR. Isolation and identification of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* with antioxidant and hepatoprotective properties in tacrine-treated HepG2 cells. *J Agric Food Chem.* 2012;60(21):5340-9.

제 D2015040769 호

검 사 성 적 서

검체명	곰피추출물	제조일자 (유통기한)	2013-10-20
의뢰인	업체명	(주)네추럴웨이	
	주 소	경기 포천시 해룡로 83-135 (설운동 158-13)	
	성 명	최종현	
제조번호	131020	접수년월일	2015-04-13
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2015040769

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
Dieckol(mg/g)	20.23mg/g	강동희

분석법-업체제공(주)네추럴웨이, HPLC(DAD))

2015 년 5 월 19 일

한국기능식품연구원



제 D2015040770 호

검 사 성 적 서

검체명	곰피추출물	제조일자 (유통기한)	2013-10-20
의뢰인	업체명	(주)네추럴웨이	
	주 소	경기 포천시 해룡로 83-135 (설운동 158-13)	
	성 명	최종현	
제조번호	131020	접수년월일	2015-04-13
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2015040770

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
열량(Kcal/100g)	356.11Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	65.84%	한아름
조단백질(%)	9.80%	이경민
조지방(%)	5.95%	이선정
수분(%)	3.82%	김혜윤
회분(%)	14.59%	김혜윤
나트륨(mg/100g)	2426.09mg/100g	김세미

2015 년 4 월 23 일

한국기능식품연구원



제 D2015040772 호

검 사 성 적 서

검체명	곰피추출물	제조일자 (유통기한)	2013-10-20
의뢰인	업체명	(주)네추럴웨이	
	주소	경기 포천시 해룡로 83-135 (설운동 158-13)	
	성명	최종헌	
제조번호	131020	접수년월일	2015-04-13
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2015040772

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
BHC(mg/kg)	불검출	이선미
DDT(mg/kg)	불검출	이선미
Aldrin(mg/kg)	불검출	이선미
Dieldrin(mg/kg)	불검출	이선미
Endrin(mg/kg)	불검출	이선미

2015 년 4 월 20 일

한국기능식품연구원



제 D2015040771 호

검사성적서

검체명	곰피추출물	제조일자 (유통기한)	2013-10-20
의뢰인	업체명	(주)네추럴웨이	
	주소	경기 포천시 해룡로 83-135 (설운동 158-13)	
	성명	최종현	
제조번호	131020	접수년월일	2015-04-13
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2015040771

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
납(mg/kg)	0.0920mg/kg	류미진
총비소(mg/kg)	65.3865mg/kg	류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0186mg/kg	류미진
총수은(mg/kg)	0.002mg/kg	박새롬이
대장균군	음성	허태영
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말	김수희

2015년 4월 23일

한국기능식품연구원



연구심의 신청서 I

접수처 기재(IRB에서 기재하는 항목입니다.)			
IRB File No.	SCHUH 2014-09-004	접수처 확인	김보배
		접수일	2014.09.25
e-IRB 사용권한 (아래의 내용은 e-IRB에서 조회, 신청이 가능한 권한을 부여합니다.)			
연구책임자	장재영	순천향대학교 서울병원 원	소화기내과
연구담당자	김영옥	순천향대학교 서울병원 원	소화기내과 간호사 의뢰일
담당모니터			의뢰일

연구과제명	국문	금피 주정추출물의 인기는 개선 효과 평가를 위한 인체적용 시험
영문	A Clinical Trial for determination of Ecklonia stolonifera for improvement of liver function	

◎ 연구관련자 정보

구분	성명	소속	부서	전화번호	교육완료일
연구책임자	장재영	순천향대학교 서울병원	소화기내과	02-709-9027	2015.10.01
공동연구자	정승원	순천향대학교 서울병원	소화기내과	02-709-9037	2016.08.27
공동연구자	이웅선	순천향대학교 서울병원	소화기병센터	02-710-3079	2016.07.12
공동연구자	박길호	순천향대학교 서울병원	소화기내과	02-709-9114	2016.08.22
연구담당자	김영옥	순천향대학교 서울병원	소화기내과 간호사	02-709-9685	2016.08.16

연구주체	<input type="radio"/> 연구자 주도 <input checked="" type="radio"/> 의뢰자 주도	
연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input type="checkbox"/> 세포치료제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품	<input type="checkbox"/> 의료시술 <input type="checkbox"/> 의문기기 (○1등급 ○2등급 ○3등급 ○4등급)
	<input type="checkbox"/> 해당사항 없음	
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물(경제)연구 <input type="checkbox"/> 의무기록연구	<input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 유전자 치료
	<input type="checkbox"/> 배아연구 <input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구 <input type="checkbox"/> 줄기세포주연구	<input type="checkbox"/> 기타 ()
	<input checked="" type="radio"/> 전형적 연구 <input type="radio"/> 후향적 연구 <input type="radio"/> 전형적 & 후향적 병행연구	
	연구분류3	

연구분류4	<input checked="" type="checkbox"/> 중재연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구 <input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 원치내조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트연구) <input type="checkbox"/> 기타 ()
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study) <input type="checkbox"/> 금피 주정추출물 <input type="checkbox"/> 상품명
질환분류	소화기계
기관 구분	<input checked="" type="radio"/> 단일기관 <input type="radio"/> 국내다기관(참여기관수: 0) <input type="radio"/> 다국다기관(참여국가수: 0)
전체피험자총계수	전체 65명 국내 65명 본원 65명
피험자동의	<input checked="" type="radio"/> 필요 <input type="radio"/> 불필요 M/FDS 승인(IND 등) <input type="radio"/> 필요 <input checked="" type="radio"/> 불필요 <input checked="" type="checkbox"/> 학술용 <input checked="" type="checkbox"/> 국내허가용(MFDS) <input type="checkbox"/> 해외허가용(국가명:)
목적	<input type="checkbox"/> I (<input type="checkbox"/> First-in-human <input type="checkbox"/> First-non-human) <input type="checkbox"/> II <input checked="" type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> PMS <input type="checkbox"/> 기타
Phase	<input type="checkbox"/> I <input checked="" type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> PMS <input type="checkbox"/> 기타
생물학적동등성시험	<input type="radio"/> 예 <input checked="" type="radio"/> 아니오
연구예정기간	IRB 승인일 ~ 2015.10.31
지원의뢰기관	기관명 내부과제 심영 CRO 대표(직위)
연구비	총 70000000 원 (연구간접비 포함) 원물유무 <input type="radio"/> 유 <input checked="" type="radio"/> 무
심사비계공자	<input checked="" type="radio"/> 의뢰(지원기관) <input type="radio"/> 연구 책임자 <input type="radio"/> 심사비 연체
원부파일	IRB최출_20140912.zip
연구책임자첨부	
관리자첨부	
제출서류목록	
연구자요청사항	1. 연구예정기간은 IRB 승인일로 부터 1년입니다. 임력이 안되어 임의로 2015년 10월 31일로 임력했습니다. 연구계획서에는 IRB 승인일로 부터 1년으로 기재했습니다. 2. 지원의뢰기관이 임력이 안되어 내부과제로 임력했습니다. 참고부탁드리는 바입니다.
비고	
관리자 Comment	

위와 같이 연구계획서 심의를 신청합니다.

신청일	2014.09.12	연구책임자	김재영
-----	------------	-------	-----

순천향대학교 서울병원 귀하

연구심의 신청서 II

접수처 기재(IRB에서 기재하는 항목입니다.)

IRB File No.	SCHUH 2014-09-004	접수처 확인	김보배
		접수일	2014.09.25

연구과제명	구분	공피 주정추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한 인체적용 시험
	영문	A Clinical Trial for determination of Ecklonia stolonifera for improvement of liver function
임상시험등록코드	Study Nick Name	
질문군분류	소화기계	
지원기관 지원사항	<input checked="" type="checkbox"/> 연구비 전액	<input type="checkbox"/> 연구비 일부
	<input type="checkbox"/> 연구비 일부 (의약품)	<input type="checkbox"/> 연구비 일부 (의료기기)
개발회사	<input type="checkbox"/> 연구비 일부 (기타) ()	생물학적동등성시험 여부 <input type="radio"/> 예 <input checked="" type="radio"/> 아니오

I. 연구자

교육실적(연구책임자)

연구책임자 및 연구관련자는 임상연구, 연구윤리 및 임상시험 가이드라인(GCP)에 대한 교육을 이수한 적이 있습니까? 예 아니오

교육이력

번호	이수년도	취수	교육명	이수일
1	2013		CITI프로그램	2013.08.15
2	2013		KGCP 온라인 교육 (순천향대학교 서울병원)	2013.08.15
3	2013		생명윤리 및 안전에 관한 법률 온라인교육(순천향대학교서울병원)	2013.10.02

본 계획서의 시험절차에 대해서 특별히 교육을 시행하거나 계획하고 계십니까? 예 아니오

연구자정보

No	구분	성명	소속	교육명	이수일자
1	연구책임자	김재영	순천향대학교 서울병원	CITI프로그램	2013.10.02
2	공동연구자	정승원	순천향대학교 서울병원	KGCP 온라인 교육 (순천향대학교 서울병원)	2014.08.28

3	공동연구자	이동선	순천향대학교 서울병원	생명윤리 및 안전에 관한 법률 온라인교육 (순천향대학교서울병원)	2014.07.13
4	공동연구자	박길호	순천향대학교 서울병원	생명윤리 및 안전에 관한 법률 온라인교육 (순천향대학교서울병원)	2014.08.23
5	연구책임자	김영욱	순천향대학교 서울병원	생명윤리 및 안전에 관한 법률 온라인교육 (순천향대학교서울병원)	2014.08.17

연구관련 자원 (Resource)

연구자께서는 연구 수행을 위하여 충분한 시간을 배려하여야 합니다.

본 과제에 대한 임무할애를 어느 정도 계획하고 계십니까? 80 %

본 연구를 위해서 특별히 요구되는 특정 시설이나 장비, 연구비, 연구인력 등이 확보되어 있습니까? 예 아니오

피험자 보상에 대한 지원이 마련되어 있습니까? 예 아니오

피험자 보상의 주체 지원(의뢰)기관 원대보상기준

기타 ()

피험자에게 개인인터뷰를 제공합니까? 예 (금액 : 30,000) 아니오

(교행비, 식비, 사례비 등) - 약물, 검사 제외

II. 연구계획

연구목적

1) 경증 또는 중증도의 간기능 이상 소견을 보이는 정상인을 대상으로 공피 주정추출물의 간기능 개선 효과를 확인하려는 것이다.

2) 두번째 목적은 혈액질후, 실험실적 수치들에 대한 영향, 이상반응의 측면에서 "공피 주정추출물"의 안전성을 평가하려는 것이다.

배경 및 이론적 근거 요약

공피 (Ecklonia stolonifera)는 갈조식물 다시마목 미역과의 다년생 해조로 우리나라 동해안 특산물이다. 공피는 무기질을 풍부하게 함유하고 있으며 약간 짠 맛이 인기기가 좋아 씹거나 무친 등에 많이 사용된다.

본 연구팀은 공피의 주정추출물에서 간기능 개선 효과를 갖는 기능성 성분을 개발하기 위하여 HPLC를 이용하여 공피 주정추출물에서 eckol, dieckol, phlorofucofuuroeckol-A를 지표 성분으로 확인하였고 공피 주정추출물의 간기능 개선 효과를 알아보기 위하여 일교율로 유도된 흰쥐 간독성 모델에서 공피 주정추출물 100 mg/kg와 200 mg/kg를 투여하여 실험한 결과 간세포 보호 효능과 혈중 지질지표 개선효과를 확인하였다. 또한, 공피 주정추출물의 작용 기전을 검토한 결과 간조직 내 활성산소인 SOD, catalase, glutathione의 수치를 증가시키고 산화 스트레스 지표인 MDA의 수치를 낮추는 것을 확인하였다.

또한 경희대학교 연구팀은 2014년 5월 임상시험자 30명을 대상으로 공피 주정추출물의 간기능 개선 효과를 평가하기 위한 인체적용시험의 예비시험으로 공피 주정추출물의 투여 용량을 130 및 180 mg/day로 하여 시험을 진행하였고 유체삼투압은 180mg/day로 설정하였다.

이에 본 임상연구는 180mg/day를 유체삼투압량으로 정하여 경증 또는 중증도의 간기능 이상 소견자에서 공피 주정추출물의 간기능 개선 효과와 안전성을 확인하고자 한다.

연구방법	<p>1. 시험대상자가 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의하면, 인체적용 시험계획서에 따라 필요한 검진 및 검사를 실시한 후, 시험대상자 적합성 평가결과 선정기준에 적합한 시험대상자에 한하여 1군과 2군에 무작위 배정된다. 무작위 배정된 시험대상자는 12주간 인체적용시험용 식용 섬유인 글피 주정추출물을 복용하게 된다.</p> <p>2. 각 시험대상자 별로 총 14주(스크리닝 2주, 약제투여기간 12주)가 소요되며 전체 65명의 대상 지원자를 모집하는데 필요한 기간은 약 29주가 예상되며, 총 인체적용시험 실시기간은 최초 모집시점으로부터 약 52주가 소요될 것으로 예상된다.</p> <p>해당 연구대상 질환/동상에 대하여 일반적인 진료 환경에서 기분이 사용되고 있는 표준치료방법을 기술하여 주십시오.</p>
III. 피험자	
선정기준	<p>1) 문맹자를 제외한 만 20세 이상의 남성 및 여성</p> <p>2) ALT (GPT)가 정상은 33 U/L, 여성은 25 U/L를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 33~149 IU/L, 여성 25~89 IU/L), 또는 AST (GOT)가 정상은 40 U/L, 여성은 30 U/L를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 40~149 IU/L, 여성 30~89 IU/L), 또는 GGt가 정상은 50 U/L, 여성은 30 U/L를 초과하고 다음 범위 이내의 범위에 있는 자 (남성 50~149 IU/L, 여성 30~89 IU/L)</p> <p>3) 인체적용시험동의서에 서면 동의한 자</p>
제외기준	<p>1) 글피 및 기타 해산물에 과민증 또는 그 병력이 있는 시험대상자</p> <p>2) 바이러스성 감염 검사에서 B형 간염 표면 항원 또는 C형 간염 항체 양성인 자</p> <p>3) 아래의 간 질환을 가진 자</p> <p>간부전 등 중증 간질환, 원발성 담즙성 간경변, 약물 유발성 간질환, 자기면역성 간질환, 약제유발성 또는 수술 등으로 유발된 간질환</p> <p>4) 과다 알코올 섭취자 (알코올 섭취량 남>80g/일, 여>20g/일)</p> <p>5) 3개월 이내 또는 현재 간상선 기능 이상으로 치료중인 자</p> <p>6) 뇌종양, 수두증이 있거나 있었던 자 혹은 3개월 이내에 호르몬 대체요법을 시행했거나 시행중인 자</p> <p>7) 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 또는 폐질환이 있는 시험대상자</p> <p>8) 심한 신기능 장애가 있는 시험대상자 (serum creatinine > 2.0 mg/dl)</p> <p>9) 혈압강화제를 복용하고 있음에도 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100 mmHg 이상) 또는 혈당강화제로 혈당조절이 어려운 경우 (혈당강화제를 복용하고 있음에도 불구하고 공복혈당 180이상)와 당화혈색소 수치 8% 이상인 경우 및 혈소판(15만/mm3 이하), 백혈구(3000/mm3 이하), 혈색소 수치(남자 9.5g/dL, 여자 9.0g/dL)이하 인 시험대상자</p> <p>10) 최근 3개월 이내에 간기능에 영향을 주는 약물 (INH, valproic acid, tetracycline, allopurinol, ibuprofen, phenytoin, phenelzin, setraline, naproxen, diclofenac, 기타 간독성을 유발할 가능성이 있는 약물)을 복용한 자</p> <p>11) 3개월 이내에 당뇨약이나 항지질 계열의 약물을 새로 투여받은 시험대상자</p> <p>12) 최근 3개월 내에 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 기능성식품 등을 복용한 경험이 있거나 3개월 내 기타 인체적용시험에 참여한 경험이 있는 시험대상자</p> <p>13) 6개월 내 외과적 수술을 받았거나 1개월 내 금치루 치료(원술이나 불안수준 개선 목적의 치료 또는 건강식품, 남용 우려 있는 약물 투여)를 받고 있는 자 또는 간기능 개선 목적의 치료 또는 건강식품, 남용 우려 있는 약물 투여를 받은 자</p> <p>14) 위 점막을 약물에 흡수에 영향을 줄 수 있는 수술을 한 시험대상자</p> <p>15) 임신부, 수유부 및 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임여성</p>

16 인체적용시험용담자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 시험대상자	
피험자수 및 산출근거	<p>1. 목표 시험대상자 수 총65례 (시험군 33례, 대조군 32례, 총 2군)</p> <p>2. 목표 시험대상자 수 설정근거 글피 주정추출물의 인체적용시험으로 pilot study의 실적을 갖는다. 또한, 향후 기능성 인정을 위한 인체적용시험에서 필요한 투여 용량을 평가하기 위한 목적으로 1군과2군으로 나누어 시험군 33례, 대조군 32례로 시험을 수행하여 이 시험에서는 시험식품 복용으로 인한 간기능 개선 효과를 평가한다.</p>
모집 방법 (중복 체크 가능)	
내원한지	<p><input type="checkbox"/> 차트리부 <input checked="" type="checkbox"/> 피험자모집광고 <input type="checkbox"/> 타기관에서 refer <input type="checkbox"/> 검색이용</p> <p><input type="checkbox"/> 기타 ()</p>
피험자 모집광고의 종류	<p><input checked="" type="checkbox"/> 원내광고 <input type="checkbox"/> 원외광고 <input type="checkbox"/> 원내/원외광고 <input type="checkbox"/> 해당없음</p> <p>광고장부를 연구계획서에 포함하고 있습니까? <input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니요</p>
취약한 환경의 피험자 (중복 체크 가능)	<p><input type="checkbox"/> 임신부 <input type="checkbox"/> 소아/미성년자 <input type="checkbox"/> 타어 <input type="checkbox"/> 신생아 <input type="checkbox"/> 가임여성 <input checked="" type="checkbox"/> 노인(70세이상)</p> <p><input type="checkbox"/> 알기환자 <input type="checkbox"/> 수감자 <input type="checkbox"/> 학생(의대, 약대, 간호대생 등) <input checked="" type="checkbox"/> 원내직원</p> <p><input type="checkbox"/> 경제적으로 취약한 자 <input type="checkbox"/> 정신지체자 <input type="checkbox"/> 의학적으로 동의 능력이 없는 자</p> <p><input type="checkbox"/> 기타 강압이나 부담한 영향을 받을 수 있는 자 ()</p>
취약한 피험자에 대한 별도의 보호조치나 내력이 수립되어 있을 경우 이에 대하여 추가 기술 바랍니다.	
* 구체적인 도움이 필요하시면 본원 IRB 연구윤리지침의 "취약한 환경의 피험자" 규정을 참고하십시오.	
IV. 피험자에 대한 위험/이익 평가(Risk/benefit assessment)	
위험	<p>본 연구로 인하여 피험자에게 예상되는 신체적 위험에 대하여 기술하여 주십시오. (발생 가능성, 강도, 지속기간 포함)</p> <p>기타 정보 노출 등으로 발생 가능한 정신적, 사회적/법적, 경제적 피해에 대하여 기술하여 주십시오.</p> <p>1. 본 인체적용시험에 사용되는 글피 주정추출물은 국내 해조류를 이용하여 추출한 식품으로 동물실험을 통하여 안전성을 인정받았습니다. 또한 글피는 식품공전에 주원료로 등재 되어있어 특별한 부작용이 보고된 바는 없습니다. 기능성 식품으로서 과량을 복용하는 경우 기능성 식품에서 일어날 수 있는 일반적인 이상반응이 나타날 수 있습니다. 본 인체적용시험에 의한 피해가 발생할 경우 시험식품 제공사인 (국내추출웨이에서 시험대상자 보상규약에 근거하여 보상을 할 것입니다. 의료진은 시험대상자의 안전에 만전을 기할 것이며, 이상반응이 발생했을 경우에는 신속하고 적절한 조치를 취하여 피해를 최소화할 것입니다.</p> <p>2. 본 시험에 참여하신 시험참여자의 정보는 연구 목적으로만 사용하며, 성명 등 개인정보는 확인할 수 없게 하여 사용</p>

될 것입니다. 본 연구 결과가 발표되더라도 시험참여자의 신분은 비밀로 유지될 것입니다. 따라서 정보 노출 등으로 발생할 수 있는 정신적, 사회적/법적, 경제적 피해는 없을 것으로 사료됩니다.

최소위험보다 높은 연구입니까?
 ※ 최소위험: 일상생활이나 일반 진료과정에서 겪게 되는 정도의 위험 또는 불편
 예 아니오

최소위험보다 높은 연구인 경우 Data monitoring 계획에 대하여
 의뢰자 자체점검
 기타 ()

개인정보(Privacy) 보호를 위한 계획
 피험자식별정보 코드화(피험자식별코드지 사용)
 피험자식별정보 완전 제거(unlinked)
 기타 ()

자료의 기밀 유지를 위한 계획
 시간장치 사용
 개인정보 data의 접근 제한
 기타 ()

이력

본 연구에서 피험자에게 예상되는 직접적 이익에 대하여 기술하여 주십시오.
 본 시험에 참여함으로써 전반적인 건강상태를 통해 건강상태를 체크하고, 간기능의 상태에 대한 진단 및 전문의의 상담을 받으실 수 있습니다.

예) 치료 및 진단, 예방 이익

본 연구에서 피험자에게 예상되는 간접적 이익에 대하여 기술하여 주십시오.
 본 인체적용시험의 참여로 인하여 발생하는 시험식품, 검사 및 진료비 등은 비용부담 없이 제공되며, 매 방문 시 마다 3만원의 교통비가 지급됩니다.

예) 약물/검사 제공, 교통비 제공 등

본 연구의 사회적 이익에 대하여 기술하여 주십시오.
 본 시험의 결과가 향후 다른 간기능 이상을 가지는 사람을 위한 새로운 예방 및 치료법 개발에 도움을 줄 수 있습니다.

예) 유용한 임상정보 제공 등

V. 동의 절차

위험

누구의 동의를 받을 예정입니까?
 피험자 법정대리인
 기타 ()

누가 동의 과정에서 설명할 예정입니까?
 연구책임자 연구관련자
 기타 (공동연구자)

동의를 위한 논의를 위하여 피험자당 얼마만큼의 시간을 할애 할 예정입니까?
 30 분
 ※ 통상적으로 30분이상을 할애할 것을 권장합니다.

강의의 가능성이나 부당한 영향을 최소화하기 위한 조치는 무엇이 있습니까?
 연구관련자에 대한 교육
 피험자에 대한 교육
 피험자 보호 연구윤리담당자에 대한 정보 제공
 기타 ()

VI. 추가 기술 사항

임상시험용 의약품(Investigational drug) 임상시험

③ 의약품

No	의약품명	①	②	③	④	⑤
		허가대 사용	MFDS/FDA 허가 예정	IND 허가용	IND 허가용 면제	

① 시험이 허가된 약물로 허가된 적응증 및 허가된 용량 범위 내에서 사용할 예정이다. 예 아니오

② 본 시험은 미국 식품의약품(FDA) 또는 식약청에 허가를 위하여 제출될 예정이다. 예 아니오

③ 식약청 허가 사항과 다르게 사용할 예정으로 식약청에 임상시험승인(IND)허가를 위하여 제출되었다. 예 아니오

④ 식약청 허가 사항과 다르게 사용할 예정이나 허가받지 않은 대체 치료 방법이 없는 질환 등과 같이 식약청 임상시험승인(IND) 면제에 해당한다. 예 아니오

⑤ 사용될 의약품은 해외허가를 위한 IND이다. 예 (국가 _____, IND No. _____) 아니오

IND 중립 여부 예 아니오

임상시험용 의로기기(Investigational device) 임상시험

③ 의로기기

No	의로기기명	①	②	③	④
		시판 허가	허가내 사용	MFDS/FDA 허가 예정	

① 시험이 허가된 의로기기이다. 예 아니오

② 승인된 사용 목적으로 허가된 적응증에 허가된 범위 내에서 사용할 예정이다. 예 아니오

③ 본 연구절과는 FDA 또는 KFDA에 허가를 위하여 제출될 예정이다. 예 아니오

④ 사용될 의로기기는 FDA외 IDE이다. 예 (IDE No. _____) 아니오

원내 관리약사
 원외약국 관리약사
 원내 관리약사
 원외약국 관리약사
 연구자 직접관리
 기타 ()

IDE 준비 항목		<input type="checkbox"/> 의료기기 관리자 <input type="checkbox"/> 연구자 직접관리 <input type="checkbox"/> 기타 ()	
계획서 승인 관련 사항			
국책과제	<input type="radio"/> 예	<input type="radio"/> 아니오	<input checked="" type="radio"/> 심사진행중
식약청	<input type="radio"/> 예	<input type="radio"/> 아니오	<input checked="" type="radio"/> 심사진행중
FDA	<input type="radio"/> 예	<input type="radio"/> 아니오	<input checked="" type="radio"/> 심사진행중
타기관 임상시험			
본 기관의 연구책임자가 본 임상시험의 총괄책임자이거나 또는 본 기관이 주관기관이 <input checked="" type="radio"/> 예 <input type="radio"/> 아니오 Yes에 체크하였다면, 피험자 보호에 영향을 줄 수 있는 정보(예: 예상치 못한 문제, 이상반응, 중간결과, 오타리팅 보고서 또는 연구계획의 변경)에 대한 전체연구기관의 권리계획을 기술하십시오.			
1. 중대한 이상반응의 보고 인체적용시험책임자는 인체적용시험 중 중대한 이상반응이 발생한 때는 즉시 인체적용시험의뢰자 및 인체적용시험상시위원회의에 보고해야 한다. 즉, 모든 중대한 이상반응을 "중대한 이상반응 신속보고양식"에 의거, 임상시험의뢰자 및 시험식품 제공자(국내후발웨이)에게 인체적용 24시간 이내, 혹은 늦어도 다음 근무일까지 전화(031-535-7674, 담당자 이기천 과장)로 보고해야 하며, 5일 이내에 문서로 상세한 내용이 포함된 후가 보고를 하여야 한다.			
2. 임상시험 오타리팅 임상시험이 KGCP에 따라 실시되고 시험자료가 국대외에서 동록 시 인정될 수 있도록 하기 위해 임상시험의뢰자 측에서 오타리팅 및 관리를 실시한다. 오타리팅 시에는 종래기록이 완전하고 명확한지 확인하고 임상시험담당자의 임의 하에 대조 검토가 필요하다. 이를 위해 시험자는 의뢰자가 그 시험의 결과 기록 및 시험계획서의 문헌여부 등을 확인하기 위해 방문할 수 있도록 수락해야 하며 이는 임상시험센터, 시험약 보관장소, 시험대상자 종래기록서, 시험대상자 기록, 그 외 임상시험과 관련된 모든 서류 등의 검토를 포함한다. 모든 미사용된 임상시험용약품은 임상시험이 종료된 후 회수한다. ☞ 임상시험오타리 : ㈜SFC 기능성식약임상지원센터 ☎ 070-4916-0987			
3. 임상시험 결과보고 계획서에 따라 수행된 결과는 시험대상자 진찰결과서나 연구진행노트 및 의뢰자로부터 제공된 시험대상자 종래기록서에 기록하여야 한다. 시험대상자 종래기록서는 반드시 경은 불펜이나 경은 펜을 사용하여 예 시험대상자의 진찰 및 경사결과에 따라 기록되어야 하며 시험자는 시험대상자 종래기록서를 보관하여 의뢰자나 보건당국의 요청에 따라 검토 가능하도록 하여야 한다. 만일 자료가 누락된 경우에는 시험자가 타당한 설명을 덧붙여야 하며 기록이 연결된 종래기록서는 계획서에 서명한 시험자가 서명해야 한다.			
4. 임상시험계획서의 수정 임상시험계획서의 수정에 관한 사항은 시험자와 의뢰자간의 협의 하에 이루어져야 하며 안전성 평가나 유효성 평가의 수정에 관계되는 모든 수정사항은 이행되기 이전에 임상시험상시위원회의 승인을 획득해야만 한다. 행정과 관련된 수정사항은 보통 임상시험상시위원회의 승인을 필요로 하지는 않으나 관련사항에 관한 정보를 상시위원회의에 알려야 한다.			

시험대상자의 안전과 관계되는 수정사항은 시험대상자의 급작스런 상태를 제거할 필요가 있는 경우 상시위원회의 승인이 진행시킬 수 있으며 이런 경우 시험자는 반드시 처치 후 10일 이내에 상시위원회의에 통보하여야 한다. 시험책임자 또는 시험담당자는 승인된 계획서와 다르게 실시된 모든 사항에 대하여 타당한 사유와 함께 이를 문서화하여야 한다.

시정계획서

정수치 기재(IRB에서 기재하는 항목입니다.)			
IRB File No.	SCHUH 2014-09-004-001	정수치 확인	경수빈
			정수일 2014.11.10
e-IRB 사용권한 (아래의 내용은 e-IRB에서 조회, 신청이 가능한 권한을 부여합니다.)			
연구책임자	장재영	순천향대학교 서울병원	소화기내과
		원	신창일 2014.11.04
연구담당자	김영옥	순천향대학교 서울병원	소화기내과 간클리닉
			의뢰일
담당모니터			의뢰일

연구과제명	금피 주정숙출혈의 인기능 개선 효과 평가를 위한 인체적용 시험		
영문	A Clinical Trial for determination of of Ecklonia stolonifera for improvement of liver function		
임상시험코드		Study Nick Name	

◎ 연구관련자 정보

구분	성명	소속	부서	전화번호	교육인용일
연구책임자	장재영	순천향대학교 서울병원	소화기내과	02-709-9027	2015.10.01
공동연구자	정승원	순천향대학교 서울병원	소화기내과	02-709-9037	2016.08.27
공동연구자	이동섭	순천향대학교 서울병원	소화기내과	02-710-3079	2016.07.12
공동연구자	박일호	순천향대학교 서울병원	소화기내과	02-709-9114	2016.08.22
연구실무담당자	김영옥	순천향대학교 서울병원	소화기내과 간클리닉	02-709-9885	2016.08.16

Phase	<input type="checkbox"/> I (<input type="radio"/> First-in-human <input type="radio"/> First-non-human)			
	<input type="checkbox"/> II <input checked="" type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> PMS <input type="checkbox"/> 기타			
연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물	<input type="checkbox"/> 생물학적 제제	<input type="checkbox"/> 세포치료제	<input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품
	<input type="checkbox"/> 의문시술	<input type="checkbox"/> 의문기기 (<input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급)		
	<input type="checkbox"/> 해당사항 없음			
	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구	<input type="checkbox"/> 인체유래물(경제)연구	<input type="checkbox"/> 의무기록연구	
연구분류2	<input type="checkbox"/> 유전자연구	<input type="checkbox"/> 유전자 치료		
	<input type="checkbox"/> 배아연구	<input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구	<input type="checkbox"/> 줄기세포주연구	
	<input type="checkbox"/> 기타 ()			
연구분류3	<input checked="" type="checkbox"/> 전향적 연구 <input type="checkbox"/> 후향적 연구 <input type="checkbox"/> 전향적 & 후향적 병행연구			

연구분류4	<input checked="" type="checkbox"/> 종래연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구 <input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 환자미조문연구 <input type="checkbox"/> 코호트연구) <input type="checkbox"/> 기타 ()			
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)			
일반명	금피 주정숙출혈	65 명	국내	65 명
전체			상동명	65 명
연구승인기간				
지원의뢰기관	기관명	대부과제	대표(직위)	성명
시정사항	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획	<input type="checkbox"/> 연구과제명	<input checked="" type="checkbox"/> 연구기간	<input type="checkbox"/> 연구책임자
	<input type="checkbox"/> 의뢰기관	<input checked="" type="checkbox"/> 동의서	<input type="checkbox"/> 심사항목	<input type="checkbox"/> 연구비
대응	1. 변경 대비표와 수정된 파일들을 첨부하였습니다.			
원부파일	시정승인당첨서_IRB제출_20141104.zip			
연구책임자첨부				
관리자첨부				
제출서류목록				
연구자유참사항	1. 연구예정기간은 IRB 승인일로 부터 1년입니다. 신청서대에 입력이 안됩니다. 연구계획서에는 IRB 승인일로 부터 1년으로 기재했습니다.			
비고				
관리자 Comment				

위와 같이 임상시험 시정계획서를 제출합니다.

연구책임자	장재영	순천향대학교 서울병원	소화기내과	신창일	2014.11.04
-------	-----	-------------	-------	-----	------------

순천향대학교 서울병원 귀하

통지서

* 본 과제의 문서보존기간은 3 년 입니다.

수신	의뢰(지원)기관	내부과제
연구책임자	소화기내과 장재영	
IRB File No.	SCHUH 2014-09-004-001	심사내용
연구과제명	금피 주정추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한 인체적용 시험	
영상시험코드	연구명	A Clinical Trial for determination of Ecklonia stolonifera for Improvement of liver function
	Study Nick Name	

연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물	<input type="checkbox"/> 생물학적 제제	<input type="checkbox"/> 세포치료제	<input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품
	<input type="checkbox"/> 의료시술	<input type="checkbox"/> 의료기기 (○1등급 ○2등급 ○3등급 ○4등급)	<input type="checkbox"/> 해당사항 없음	
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구	<input type="checkbox"/> 인체유래물(결체)연구	<input type="checkbox"/> 의무기록연구	
	<input type="checkbox"/> 유전자연구	<input type="checkbox"/> 유전자 치료	<input type="checkbox"/> 배아연구	<input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구
연구분류3	<input type="checkbox"/> 기타 ()	<input checked="" type="checkbox"/> 전향적 연구	<input type="checkbox"/> 후향적 연구	<input type="checkbox"/> 전향적 & 후향적 병행연구
	<input checked="" type="checkbox"/> 종래연구	<input type="checkbox"/> 설문조사	<input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구	
연구분류4	<input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 환자대조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구)	<input type="checkbox"/> 기타 ()		
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)			
	일반명	공피 주정추출물	상품명	
전체피험자총래수	전체	65 명	국내	65 명
			본원	65 명
연구승인기간				
지원의뢰기관	기관명	내부과제	대표(직위)	성명
제출서류목록	공피_주정추출물의 간기능개선_Protocol_Version_4.1_SCH_20141104			
	별첨 4_시험대상자 모집 공고문_SCH_20141104			
	별첨 5_피험자 설명문 및 동의서_V1.1_SCH_20141104			
	별첨 6_연구 안전성 별첨 7_공피 주정추출물의 동물실험 요약 시정승인당번서_20141104			

관련근거	심사평가록	2014.11.11	비고
중간보고시기			
심사결과	<p>○ 승인 ● 시정승인</p> <p>2014년 15차 정규심의(Apanel) - 시정승인 통.</p> <p>시정사항 및 답변 :</p> <p>심의결과 : 시정승인 (시정승인 5명, 보완 2명)</p> <p>시정사항 :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 간경변 환자의 등쪽에 대하여 피험자 선정 및 체외기준을 명확히 명시하시기 바랍니다. -> 임상적 소견 또는 간조직 검사에서 간경변증으로 진단된 환자를 제외한 아래의 간수치 이상이 측정되는 환자 2. 피험자 제외기준 내 알코올 섭취의 기준을 명확히 명시하시기 바랍니다. (일주일 전 하루 30g 이상 섭취 시 제외인지, 현달 전 섭취 등) -> 최근 한 달 이내 과다 알코올 섭취자 (알코올 섭취량 남>30g/일, 여>20g/일) 3. 피험자 모집공고 내 임상시험심사위원회의 연락처를 삭제하고, 연구예정기간을 명시하시기 바랍니다. -> IRB 연락처 삭제, 연구 예정 기간 IRB 승인일로부터 1년으로 수정함. 4. 허가받지 않은 건강기능식품의 인체적용에 대한 안전성을 보장하기 위해서 안전성평가자료, 제품생산자 등 안전성 및 유효성을 확인할 수 있는 자료를 첨부하여 제출하시기 바랍니다. -> [별첨 6] 섭취 안전성, [별첨 7] 공피 주정추출물의 동물실험 요약 첨부 5. 이 시험은 아직 검증되지 않은 인체적용시험이라는 사실을 시험대상자들이 인지할 수 있도록 시험대상자 설명서에 추가하시기 바랍니다. -> '본 시험은 동물실험을 통해 간기능 개선 효과가 확인되었으며, 인체적용시험을 통한 기능성 검증이 추가로 필요함' 내용 추가 6. 피험자 설명문 및 동의서 내 모더가 및 기지 있습니다. 확인 후 수정하시기 바랍니다. -> IRB 승인일로부터 1년을 명시하였습니다. (신청서 내에 변경은 IRB 승인 후 처리될 예정입니다.) 7. 신청서 및 계획서 내 연구예정기간이 서로 상이합니다. 통일하여 명시하시기 바랍니다. -> IRB 승인일로부터 1년을 명시하였습니다. (신청서 내에 변경은 IRB 승인 후 처리될 예정입니다.) 8. 그 외 변경사항 : 공동연구자 박길환 삭제, 시정사항에 대한 연구계획서, 피험자 설명문 및 동의서 버전 변경 <p>2014년도 제 11-02차 신속심의 심의결과 : 시정승인(시정승인 3명)</p> <p>시정사항 :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 연구대상자 모집공고 내 공피에 대한 간략한 설명과 무작위 배정 등 연구내용과 목적, 연구방법을 추가하시기 바랍니다. * 시정승인 당번서는 본 심의일로부터 6개월 이내에 제출하시기 바랍니다. 		

* 본 위원회는 ICH-GCP 및 K-GCP를 준수하여, 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련법규를 준수합니다.

* 임상연구심사위원회에서 제발가하여 변경이나 보완을 요청할 수 있습니다.

* 만약 본 위원회의 심의결과에 불복할 경우, 심의결과 통보 후 그 사유를 기록하여 이의를 신청할 수 있습니다.

* 본 위원회에서 통지한 대로 연구기간 1년마다 지속심의신청서를 연구 종료 시에는 종료 및 결과보고서를 작성하여 제출해 주시기 바랍니다.

* 연구 중에 중대한 이상반응(Adverse Event) 발생 시 책임연구자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.

* 본 임상연구 결과는 임상연구실시기관의 사전 서면동의 없이는 어떤 경우라도 학술목적 이외에 실시 기관명을 사용
할 수 없습니다.

순천향대학교 서울병원 임상연구심의위원회 위원



시정계획서

접수처 기재(IRB에서 기재하는 항목입니다.)			
IRB File No.	SCHUH-2014-09-004-002	접수처 확인	경수빈
			접수일 2014.11.24
e-IRB 사용권한 (아래의 내용은 e-IRB에서 조회, 신청이 가능한 권한을 부여합니다.)			
연구책임자	장재영	순천향대학교 서울병원	소화기내과
연구담당자	김명옥	순천향대학교 서울병원	소화기내과 간클리닉
담당모니터			의뢰일

연구과제명	공피 주정추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한 인체적용 시험		
영문	A Clinical Trial for determination of Ecklonia stolonifera for improvement of liver function		
임상시험코드	Study Nick Name		

◎ 연구관련자 정보

구분	성명	소속	부서	전화번호	교육인원일
연구책임자	장재영	순천향내학교 서울병원	소화기내과	02-709-9027	2015.10.01
공동연구자	정승원	순천향내학교 서울병원	소화기내과	02-709-9037	2016.08.27
공동연구자	이동섭	순천향대학교 서울병원	소화기병센터	02-710-3079	2016.07.12
공동연구자	박원효	순천향대학교 서울병원	소화기내과	02-709-9114	2016.08.22
연구실무담당자	김명옥	순천향대학교 서울병원	소화기내과 간클리닉	02-709-9685	2016.08.16

Phase	<input type="checkbox"/> I (<input type="checkbox"/> First-in-human)		<input type="checkbox"/> First-non-human)	
	<input type="checkbox"/> II	<input checked="" type="checkbox"/> III	<input type="checkbox"/> IV	<input type="checkbox"/> PWS
연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물	<input type="checkbox"/> 생물학적 제제	<input type="checkbox"/> 세포치료제	<input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품
	<input type="checkbox"/> 의문시술	<input type="checkbox"/> 의로기기 (<input type="checkbox"/> 1등급 <input type="checkbox"/> 2등급 <input type="checkbox"/> 3등급 <input type="checkbox"/> 4등급)		
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 해당사항 없음	<input type="checkbox"/> 인간대상연구	<input type="checkbox"/> 인체유래물(장체)연구	<input type="checkbox"/> 의우기력연구
	<input type="checkbox"/> 유전자연구	<input type="checkbox"/> 유전자 치료		
연구분류3	<input type="checkbox"/> 배아연구	<input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구	<input type="checkbox"/> 줄기세포유연구	
	<input type="checkbox"/> 기타 ()			
	<input checked="" type="checkbox"/> 전향적 연구	<input type="checkbox"/> 후향적 연구	<input type="checkbox"/> 전향적 & 후향적 병행연구	

연구분류4	<input checked="" type="checkbox"/> 중재연구	<input type="checkbox"/> 설문조사	<input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구
	<input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단연조사연구 <input type="checkbox"/> 환자대조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트연구)		
	<input type="checkbox"/> 기타 ()		
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)		
일반명	공피 주정추출물	상품명	
전체	65 명	국대	65 명
연구승인기간		분교	65 명
지원의뢰기관	기관명 대부국제	대표(직위)	성명
시정사항	<input type="checkbox"/> 연구계획 <input type="checkbox"/> 연구과제명 <input type="checkbox"/> 연구기간 <input type="checkbox"/> 연구책임자 <input type="checkbox"/> 시험담당자	<input type="checkbox"/> 의뢰기관 <input type="checkbox"/> 동의서 <input type="checkbox"/> 검사항목 <input type="checkbox"/> 연구배	<input checked="" type="checkbox"/> 기타
내용	1. 시험대상자 공고문을 시정내용에 맞게 수정하여 답변서를 제출합니다.(시정 답변서 첨부)		
첨부파일	시정답변서_20141117.docx	별첨 4 시험대상자 원대모집	
연구책임자첨부	관리자첨부	제출서류목록	연구자요청사항
비고	관리자 Comment		

위와 같이 임상시험 시정계획서를 제출합니다.

연구책임자	장재영	순천향대학교 서울병원	소화기내과	신청일	2014.11.17
-------	-----	-------------	-------	-----	------------

순천향대학교 서울병원 귀하

통지서

※ 본 과제의 문서보존기간은 3년입니다.

수신	의뢰(지원)기관	내부과제			
연구책임자	소화기대과 장재영				
IRB File No.	SCHUH 2014-09-004-002	심사대응	시정계획서	통지일치	2014.11.26
연구과제명	국문	금피 주정추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한 인체적용 시험			
	영문	A Clinical Trial for determination of Ecklonia stolonifera for improvement of liver function			
임상시험코드	Study Nick Name				

연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물	<input type="checkbox"/> 생물학적 제제	<input type="checkbox"/> 세포치료제	<input type="checkbox"/> 건강기능식품
	<input type="checkbox"/> 의료시술	<input type="checkbox"/> 의료기기	(<input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급)	
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 해당사항 없음			
	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구	<input type="checkbox"/> 인체유래물(정제)연구	<input type="checkbox"/> 의무기록연구	
연구분류3	<input type="checkbox"/> 유전자연구	<input type="checkbox"/> 유전자 치료		
	<input type="checkbox"/> 배아연구	<input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구	<input type="checkbox"/> 줄기세포주연구	
연구분류4	<input type="checkbox"/> 기타 ()			
	<input checked="" type="checkbox"/> 전향적 연구	<input type="radio"/> 후향적 연구	<input type="radio"/> 전향적 & 후향적 병행연구	
연구분류5	<input checked="" type="checkbox"/> 중재연구	<input type="checkbox"/> 설문조사	<input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구	
	<input type="checkbox"/> 관찰연구	(<input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 원치대조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구)		
일반명	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)			
	금피 주정추출물	상품명		
전체피험자총래수	전체 65명	국내 65명	본원 65명	
연구승인기간	2014.11.26 ~ 2015.10.31			
지원의뢰기관	기관명	대부과제	대표(직위)	성명
제출서류목록	시험당번서 [1] 시험대상자 원내모집 공고문 [1]			
관련근거	심사평가일	2014.11.26		
중간보고시기	2015년 08월 25일까지	비고		
심사결과	● 승인 ○ 시정승인			

2014년도 제 11-02차 신속심의 - 시정승인 명.
시정사항 및 답변 :
1. 연구대상자 모집광고 대 공피에 대한 간략한 설명과 무작위 배정 등 연구대응과 목적, 연구방법을 추가하시기 바랍니다. -> 연구의 목적과 방법, 공피에 대한 설명 추가
2014년도 제 11-04차 신속심의
심의결과 : 승인 (승인 3명)
연구유치기간 : 승인일로 부터 1년(연구예정기간 1년 미만 연구의 경우 연구종료일)
중간보고 제출시점 : 2015년 08월 25일

- * 본 위원회는 ICH-GCP 및GCP를 준수하며, 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련법규를 준수합니다.
- * 임상연구심사위원회에서 재평가하여 변경이나 보완을 요청할 수 있습니다.
- * 인약, 본 위원회의 심의결과에 불복할 경우, 심의결과 통보 후 그 사유를 기록하여 이의를 신청할 수 있습니다.
- * 본 위원회에서 통지한 대로 연구기간 1년이다. 지속심의신청서를 연구 종료 시에는 종료 및 결과보고서를 작성하여 제출 주시기 바랍니다.
- * 연구 중에 중대한 이상반응(Adverse Event) 발생 시 책임연구자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.
- * 본 임상연구 결과는 임상연구실시기관의 사전 서약동의 없이는 어떤 경우라도 학술목적 이외에 실시기관명을 사용할 수 없습니다.

순천향대학교 서울병원 임상연구심의위원회 위원



변경신청서

접수처 기재(IRB에서 기재하는 항목입니다.)			
IRB File No.	SCHUH	접수처 확인	접수일 2014.12.01
2014-09-004-003			
e-IRB 사용권한 (아래의 대응은 e-IRB에서 조회, 신청이 가능한 권한을 부여합니다.)			
연구책임자	장재영	순천향대학교 서울병 원	소환기내과
연구담당자	김영옥	순천향대학교 서울병 원	소환기내과 간음리닉
담당모니터			의뢰일
연구과제명	국문 공피 주정추출물의 간기능 개선 효과 평가를 위한 인체적용 시험		
영문	A Clinical Trial for determination of the Ecklonia stolonifera for improvement of liver function		
임상시험코드	Study Nick Name		

◎ 연구관련자 정보

구분	성명	소속	부서	전화번호	교목번호
연구책임자	장재영	순천향대학교 서울병원	소환기내과	02-709-9027	2015.10.01
공동연구자	정승원	순천향대학교 서울병원	소환기내과	02-709-9037	2016.08.27
공동연구자	이용선	순천향대학교 서울병원	소환기병센터	02-710-3079	2016.07.12
공동연구자	박길호	순천향대학교 서울병원	소환기내과	02-709-9114	2016.08.22
연구실무담당자	김영옥	순천향대학교 서울병원	소환기내과 간음리닉	02-709-9685	2016.08.16

Phase	<input type="checkbox"/> I (<input type="radio"/> First-in-human <input type="radio"/> First-non-human)	
	<input type="checkbox"/> II <input checked="" type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> PMS <input type="checkbox"/> 기타	
연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물	<input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input type="checkbox"/> 세포치료제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품
	<input type="checkbox"/> 의료기술	<input type="checkbox"/> 의료기기 (<input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급)
	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물(정제)연구 <input type="checkbox"/> 의무기록연구	
	<input type="checkbox"/> 해당사항 없음	
연구분류2	<input type="checkbox"/> 유전자연구	<input type="checkbox"/> 유전자 치료
	<input type="checkbox"/> 배아연구	<input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구 <input type="checkbox"/> 줄기세포주연구
	<input type="checkbox"/> 기타 ()	
연구분류3	<input checked="" type="radio"/> 전향적 연구 <input type="radio"/> 후향적 연구 <input type="radio"/> 전향적 & 후향적 병행연구	

연구분류4	<input checked="" type="checkbox"/> 중재연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구 <input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 환자내조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트연구) <input type="checkbox"/> 기타 ()			
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (In vitro, in vivo preclinical study)			
일반명	공피 주정추출물	상품명		
전체시험지점개수	전체	65 명	극대	65 명
연구승인기간	2014.11.26 ~ 2015.10.31			
지원의뢰기관	기관명	대부과제	대표(직위)	성명
변경사항	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획 <input type="checkbox"/> 연구과제명 <input type="checkbox"/> 연구기간 <input type="checkbox"/> 연구책임자 <input type="checkbox"/> 시험담당자 <input type="checkbox"/> 의뢰기관 <input checked="" type="checkbox"/> 동의서 <input type="checkbox"/> 검사항목 <input type="checkbox"/> 연구비 <input checked="" type="checkbox"/> 기타			
내용	1. 연구자 회의록 통해 공피의 간기능 개선에 대한 인체적용시험 섭취량의 증가가 결정되어 기존의 180mg을 420mg으로 변경하고 이에 대한 사유를 첨부함. 2. 연구계획서/ 동의기록지/ 시험식품복약지도/ 원내모임공고문/ 피험자설명문 및 동의서/ 섭취인 전회/ 실리마인 인체적용시험 섭취량조사(참고문헌) / 시험식품편입표 첨부 3. 변경내비표 첨부			
첨부파일	20141127_동양변경.zip			
연구책임자첨부				
관리자첨부				
제출서류목록				
연구자요청사항				
비고				
관리자 Comment				

위와 같이 임상시험 변경신청서를 제출합니다.

연구책임자	장재영	순천향대학교 서울	소환기내과	신청일	2014.11.28
		병원			

순천향대학교 서울병원 귀하

통지서

※ 본 과제의 문서보존기간은 3년 일입니다.

수신	의뢰(지원)기관	내부과제	연구책임자	소화기내과 장재명
IRB File No.	SCHUH	심사내용	변경신청서	불기일자
연구과제명	2014-09-004-003	연구목적	연구목적	2014.12.04
임상시험코드	A Clinical Trial for determination of Ecklonia stolonifera for improvement of liver function	Study Nick Name		

연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물	<input type="checkbox"/> 생물학적 제제	<input type="checkbox"/> 세포치료제	<input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품
	<input type="checkbox"/> 외과시술	<input type="checkbox"/> 의료기기	<input type="checkbox"/> 1등급	<input type="checkbox"/> 2등급
	<input type="checkbox"/> 해당사항 없음		<input type="checkbox"/> 3등급	<input type="checkbox"/> 4등급
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구	<input type="checkbox"/> 인체유래물(전체)연구	<input type="checkbox"/> 의무기록연구	
	<input type="checkbox"/> 유전자연구	<input type="checkbox"/> 유전자 치료		
	<input type="checkbox"/> 배아연구	<input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구	<input type="checkbox"/> 줄기세포포유연구	
	<input type="checkbox"/> 기타 ()			
연구분류3	<input checked="" type="checkbox"/> 전향적 연구	<input type="checkbox"/> 후향적 연구	<input type="checkbox"/> 전향적 & 후향적 병행연구	
	<input checked="" type="checkbox"/> 종래연구	<input type="checkbox"/> 설문조사	<input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구	
	<input type="checkbox"/> 관찰연구	<input type="checkbox"/> 단면조사연구	<input type="checkbox"/> 환자대조군연구	<input type="checkbox"/> 코호트 연구
	<input type="checkbox"/> 기타 ()			
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)			
일반영	금피 주정추출물	상품영		
전체포함치종계수	전체 65명	국내 65명	본원 65명	
연구승인기간	2014.11.26 ~ 2015.10.31			
지원의뢰기관	기관명 내부과제	내표(직위)	성명	
제출서류목록	1. 금피 주정추출물의 간기능개선_Protocol_Version_4.2_SCH_20141127.[1] 공표의 간기능개선 인체적용시험 연구임 증가사유_20141127.[1] 변경대비표_20141127.[1] 별첨 1. 중례기록지 CRF_SCH_V2.1_20141127.[1] 별첨 2. 시험식품 복약지도_SCH_20141127.[1] 별첨 3. 시험식품 복약지도_SCH_20141127.[1] 별첨 4. 시험대상자 원내오전 공고문_SCH_20141127.[1]			

제출서류목록	별첨 5. 피험자 설명문 및 동의서_V1.2_SCH_20141127.[1] 별첨 6. 섭취 안전성_20141127.[1] 별첨 8. 심리마틴 인체적용시험 섭취량조사_참고문헌_20141127.[1] 시험식품 원재료_SCH_20141127.[1]
관련근거	심사평가록 2014.12.04
중간보고서기	2015년 08월 25일까지 비고
심사결과	승인 <input type="radio"/> 시정승인 <input type="radio"/> 2014년도 제 12-01 차 신속심의 변경사항 : 1. 연구자 회의를 통해 금피의 간기능개선에 대한 인체적용시험 섭취량의 증가가 결정되어 기존의 180mg을 420mg으로 변경 (변경된 연구계획서/ 중례기록지/ 시험식품복약지도/ 원내오전공고문/ 피험자설명문 및 동의서/ 섭취안전성/ 심리마틴 인체적용시험 섭취량조사(참고문헌) / 시험식품 원표 첨부) 심의결과 : 승인(승인 3명) * 피험자 설명문 및 동의서는 IRB의 원공을 받은 후 시용하십시오. * 피험자 동의는 반드시 책임연구자가 피험자에게 설명 후 서명 받으십시오.

- * 본 위원회는 ICH-GCP 및 K-GCP를 준수하며, 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련법규를 준수합니다.
- * 임상연구심사위원회에서 재평가하여 변경이나 보완을 요청할 수 있습니다.
- * 만약 본 위원회의 심의결과에 불복할 경우, 심의결과 통보 후 그 사유를 기록하여 이의를 신청할 수 있습니다.
- * 본 위원회에서 통지한 대로 연구기간 1년이다. 지속심의신청서를 연구 종료 시에는 종료 및 결과보고서를 작성하여 제출 주시기 바랍니다.
- * 연구 중에 중대한 이상반응(Adverse Event) 발생 시 책임연구자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.
- * 본 임상연구 결과는 임상연구심사기관의 사전 서면동의 없이는 어떤 경우라도 학술목적 이외에 실시 기념을 사용할 수 없습니다.

승인항대학교 서울병원 임상연구심사위원회 위원장



1. 제출자료의 총괄 요약본

□ 신청원료 개요

(최초, 변경¹⁾)

회 사 명		(주)네츄럴웨이 (대표이사 : 최종현)			
영업허가(신고번호)		제조업 <input checked="" type="checkbox"/>	제 2004-서울청-0013호	수입업 <input type="checkbox"/>	
주소 및 연락처		* 경기 포천시 설운동 584-13 * (연락처) (팩스)			
		담당자	(이름) 최종현 (연락처) (대리인 : (주)네오뉴트라 유지숙)		
신청 원료명		공피추출물			
심사 대상 분류	개별인정 원료	·새로운 원료 <input checked="" type="checkbox"/>	신청 기능성	간 건강에 도움을 줄 수 있음.	
			신청 섭취량	공피추출물로서 1일 420mg	
	고시된 원료	·기능성 추가 <input type="checkbox"/>	(변경 전)		
		·섭취량 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)		
	·제조방법 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 전)			
	·기준규격 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)			
	·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>				
국내제조 수입	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	수입인	수리번호		수출국
		경우	제조회사		
			소재지		
모듬토의	<input type="checkbox"/>	실시 날짜 :			
품목설명회	<input type="checkbox"/>	희망 날짜 :			

1) (최초) 고시되지 않고 새롭게 개별인정 신청하는 원료 (변경) 고시된 원료 또는 개별인정원료의 기능성 추가 또는 변경(섭취량, 제조기준, 기준규격, 배합비율 또는 시험방법)

□ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부번호	비고
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본		■예 □ 아니오		
2. 기원 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료				
2.1	기원	■국내 □국외		
2.2	개발경위	■국내 □국외		
2.3	국내·외 인정·허가 현황	■국내 □국외		
2.4	국내·외 사용 현황	■국내 □국외		
3. 제조방법 및 그에 관한 자료				
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	■예 □ 아니오		
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	■예 □ 아니오		
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	■ 예 (모두, 일부) □ 아니오		
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	■예 □ 아니오		
3.5	주요공정별 수율 변화	■예 □ 아니오		
4. 원료의 특성에 관한 자료				
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	■예 □ 아니오		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	■예 □ 아니오 □기능성분 ■지표성분		
4.3	영양성분정보자료	■예 □ 아니오		
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	■예 □ 아니오		
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	■예 □ 아니오		
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)	■예 □ 아니오 □ 시판 표준품 ■ 자사 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	■예 □ 아니오 □ 공인 시험방법 ■ 자사 시험방법		
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)			

연번	제출자료		제출여부	첨부번호
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료				
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거		■예 □ 아니오	
	※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함		■예 □ 아니오	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료		■예 □ 아니오	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)		□예 ■ 아니오	
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함		□예 ■ 아니오	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법		■예 □ 아니오	
7. 안전성에 관한 자료 [의사결정도 : '다']				
7.1	섭취근거 정보		■예 □ 아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보		■예 □ 아니오	
7.3	섭취량 평가 정보		■예 □ 아니오	
7.4	영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보		■예 □ 아니오	
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	□예 ■ 아니오	
		3개월 반복투여독성시험	□예 ■ 아니오	
		유전독성시험	□예 ■ 아니오	
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)	□예 ■ 아니오	
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료				
8.1	시험관시험	□ 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :		
		■ 유사원료 (논문 4편)		
8.2	동물시험	■ 신청원료 (논문 1편) * 시험기관 :		
		■ 유사원료 (논문 1편)		
8.3	인체적용시험	■ 신청원료 (IRB 승인 보고서 1 편, 논문 편) * 인체적용시험기관 :		
		■ 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)		
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료				
9.1	섭취량 및 근거		■예 □ 아니오	
9.2	섭취방법 및 근거		■예 □ 아니오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거		□예 ■ 아니오	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료				
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부		■예 □ 아니오	
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부		■예 □ 아니오	

□ 전체 내용 요약

항 목	주요 내용	
1. 원료명	곰피추출물	
2. 원재료	곰피(<i>Ecklonia stolonifera</i> Okamura)	
3.기능 (지표)성분	지표성분 : 디에콜(Dieckol)	
4. 제조 공정	원재료(곰피) → 세척 → 주정 추출(주정 70%, 70℃/9시간) → 여과 → 진공농축(40℃) → 동결건조(-47℃/2일) → 분쇄 → 곰피추출물	
5. 규격 및 시험방법	1) 색상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말 2) Dieckol(지표성분) : 16-24mg/g 3) 납(mg/kg) : 1이하 4) 총비소(mg/kg) : - 5) 카드뮴(mg/kg) : 1이하 6) 총수은(mg/kg) : 1이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능(지표)성 분 시험법	1) 자사 시험법 2) 기기분석 조건(Alantis T3 C18 column(250mm×4.6mm, 5μm) 또는 이와 동등한 것)
	규격외 (잔류농약)	건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정 중 「식품의 기준 및 규격」에 농약의 잔류허용기준이 없으며, 이에 따라 5가지 잔류농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)에 대하여 국내 식품위생검사기관 시험결과 ‘불검출’ 임을 확인함.
6. 안전성	의사결정도	섭취 경험이 있는 곰피(<i>Ecklonia stolonifera</i> Okamura)를 주정을 이용하여 단순 추출, 건조한 것으로 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하였다 판단하여 의사결정도의 ‘다’에 해당됨.
	섭취 근거	<국내 인정/허가 현황> ◦ 곰피는 식품의 원료로 사용이 가능함[식규 65421(2000. 6)]. ◦ 지표성분인 ‘Dieckol’은 기능성원료(감태추출물 : 수면의 질 개선)의 지표성분(또는 기능성분)으로 인정된 사례 있음. <국외 인정/허가 현황> ◦ 미국 : 감태에서 추출되는 저분자량의 폴리페놀 화합물 복합체인 ‘씨놀(seanol, 라이브캠(주))’은 2008년 미국 FDA로부터 NDI(New Dietary Ingredient)로 인증 받은 사례가 있음(주성분 : eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol, fucosterol 등).

	안전성 정보	<ul style="list-style-type: none"> 안전성 정보 DB(DrugDigest) <ul style="list-style-type: none"> 갈조류의 요오드는 여드름을 유발할 수 있음. 개인에 따라 갈조류의 섭취 시 설사, 메스꺼움이 나타날 수 있으나, 일반적으로 몇 일 후면 사라짐. 섭취 시 주의사항으로 '임산부, 수유부 섭취에 대한 자료가 충분치 않으므로 섭취에 주의'(Natural Medicines Comprehensive DB)
	섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 420mg/일 공피추출물은 원재료(공피)로서 약 2.1g (수율 약 20%)을 섭취하는 것에 해당되며, 우리나라에서는 과거에 비해 식용하는 지역이 거의 없는 실정이어서 섭취량 평가 자료의 확보가 어려움. 따라서 기능성원료의 섭취량이 국민 일상 섭취량보다 증가하였다고 판단함.
	인체적용 시험	임상시험 진행 중(1일 섭취량 : 공피추출물 420mg, 안전성 평가 항목 : 이상반응, 심전도, 활력징후, 실험실적 검사)
	독성 시험	해당 사항 없음
	기타 사항	없음.
	섭취 시 주의 사항	임산부와 수유부는 사용을 피할 것.
7. 기능성	신청 기능성	간 건강에 도움을 줄 수 있음.
	신청 일일섭취량	공피추출물로서 1일 420mg
	시험관시험	<p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> doxorubicin으로 간 독성이 유발된 rat hepatocytes 간 독성에 대한 공피추출물과 6개의 phlorotannin의 EC 50은 2.0µg/ml과 3.4~11.5µg/ml로서 강력한 간 기능 보호 작용이 나타남(양성대조군 silymarin EC50 =13.5µg/ml, 8.2µg/ml). * 시험원료 : 공피추출물(95% 주정추출물), 공피에서 분리된 6종의 phlorotannin <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> tacrine으로 간 독성이 유발된 간암세포(HepG2 cells) ROS 생성능은 2-phloroeckol, eckol과 6,6'-bieckol 처리군에서 용량의존적으로 유의적 감소를 보임. Eckol 및 6,6'-bieckolDPPH Radical 소거능은 양성 대조군인 L-ascorbic acid EC50과 유사함. 2-phloroeckol과 eckol 처리는 용량의존적으로 세포 생존율을 유의적으로 증가시킴. 2-Phloroeckol과 eckol의 처리는 GST 및 catalase 활성을 용량의존적으로 유의적으로 증가시킴. 2-Phloroeckol과 eckol의 처리는 용량의존적으로 cell death protein의 발현 및 세포질의 미토콘드

	<p>리아로부터의 cychrome c의 방출을 용량의존적으로 저해함.</p> <p>* 시험원료 : 곰피 유래 Phlorotannins</p> <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ tacrine으로 간 독성이 유발된 간암세포(HepG2 cells) - ROS 생성능은 2-phloroecol, eckol과 6,6'-bieckol 처리군에서 용량의존적으로 유의적 감소를 보임. Eckol 및 6,6'-bieckolDPPH Radical 소거능은 양성 대조군인 L-ascorbic acid EC₅₀과 유사함. 2- phloroecol과 eckol 처리는 용량의존적으로 세포 생존율을 유의적으로 증가시킴. 2-Phloroecol과 eckol의 처리는 GST 및 catalase 활성을 용량의존적으로 유의적으로 증가시킴. 2-Phloroecol과 eckol의 처리는 용량의존적으로 cell death protein의 발현 및 세포질의 미토콘드리아로부터의 cychrome c의 방출을 용량의존적으로 저해함. <p>* 시험원료 : 곰피 유래 Phlorotannins</p> <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)- and tacrine으로 산화적 스트레스가 유발된 간암세포(HepG2 cells) - ROS 및 glutathione 농도는 Fucosterol 에 의해 저해됨. tacrine를 투여한 mice의 AST, ALT 농도는 Fucosterol 투여 후 유의적으로 감소함. <p>* 시험원료 : Fucosterol(갈조류 함유 sterol)</p> <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ tacrine으로 간 독성이 유발된 간암세포(HepG2 cells) - tacrine으로 으로 유발된 세포독성에 대한 EC₅₀은 eckstolonol 및 phlorofucofuroeckol 각각 62.0, 79.2 microg/mL으로 나타남(양성대조군Silybin EC₅₀ 50.0 microg/ml). <p>* 시험원료 : 곰피 유래 Phlorotannins</p>
동물시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 만성 알코올 지방간 유도한 malle Sprague Dawley rats, 곰피추출물 50,100,200mg/kg, 10주, 식이투여 - 간의 무게 증가를 저해함. 혈중 TC, TG 농도는 유의적으로 감소함(에탄올 식이 대조군 대비, p<0.01). 혈중 AST, 및 ALT 농도는 유의적으로 감소함(에탄올 식이 대조군 대비, p<0.01). 간의 MDA 농도는 유의적으로 감소함(에탄올 식이 대조군 대비, p<0.01). <p>* 시험물질 : 곰피추출물</p> <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ CCl₄ 간 손상 유발 ICR mice, dieckol 5, 25mg/kg - 체중과 생존율은 유의적으로 증가함(CCl₄ 투여군 대비). 혈중 GOT, GPT, MDA 농도는 CCl₄ 처리군 대비 dieckol 투여군이 용량의존적으로 유의적으로 감소하

		<p>였음(CCl4 투여군 대비). CAT 및 GSH-px 농도는 dieckol 투여군이 CCl4 처리군 대비 유의적으로 증가하였음(CCl4 투여군 대비).</p> <p>* 시험물질 : 곰피유래 Dieckol</p>
	인체적용시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 경증 및 중증의 간 기능 손상자(n=65), 1일 곰피추출물로서 420mg/12주 - 시험 진행 중 - 유효성 평가항목 : 혈중 AST, ALT, GGT, 혈중 지질(TC, TG, HDL, LDL) <p>* 인체적용시험기관 : 순천향대학교 서울병원, 소화기내과</p>
	기타 사항	없음.

2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

2.1. 기원

- 원재료 : 곰피

<원재료의 기원에 관한 정보>

[참고 : 식품의약품안전처 원재료검색 DB]

원재료명	곰피
학명	<i>Ecklonia stolonifera</i> Okamura
식용근거	식규 65421- 2000. 6. 곰피는 식품원료로 사용
특성/분포	미역과(Alariaceae)의 여러해살이 갈색 해조(<i>Ecklonia stolonifera</i>). 길이는 30~100센티미터, 너비는 5~30센티미터이다. 깊은 바다 밑의 바위 위에서 11월부터 다음 해 가을에 걸쳐 자란다. 약간 짙은 맛이 있으며 씹이나 무침 따위로 이용한다. 한국 동해안의 특산이다.

- 곰피는 동해안과 남해안을 따라 분포하며, 해안선을 따라 2-10 m 수심의 해안에서 자라는 다년생의 다시마과에 속하는 갈조류로서, 우리나라에서는 다시마, 미역 등과 함께 식용으로 이용되어 왔으며, 전통적으로는 이러한 해조류들이 항마취제, 항염증제 및 습진, 통풍, 담석 등의 치료에 민간요법으로 사용되어 오고 있다. 서양에서는 주로 식품이나 의약품에 사용할 polysaccharides(agar, alginates, carageenans)의 원료로 사용되고 있다 [출처 : Journal of Life Science 20(12):1851-1858, 2010, J Korean Soc Food Sci Nutr 39(12) : 1769-1775, 2010].

2.2. 개발경위

간은 인체에서 가장 큰 장기이며, 소화배설 기능, 영양소 저장, 새로운 물질합성, 해로운 화학 물질을 해독시키는 중요한 역할을 담당하고 있으나, 최근 식생활의 변화 등으로 인하여 간질환 환자가 늘고 있다. 이는 우리나라 경제성장과 생활수준의 향상으로 인하여 칼로리 섭취가 증가하였으나 활동적인 운동의 기회가 감소하여 여분의 칼로리가 지방의 형태로 피하지방층이나 간에 축적되어 비만과 steatosis(simple fatty liver), NASH(nonalcoholic steatohepatitis; hepatitis, fibrosis), cirrhosis(irreversible) 등과 같은 비알코올성 지방간이 증가하였기 때문이다. 이와 더불어 알코올 섭취 증가로 인한 알코올성 지방간 또한 가장 흔히 발생하는 간질환의 예이다.

지방간이란 지방의 과도한 섭취, 간 내 축적 및 합성 증가, 간장 내 저장지방 증가 및 간장으로부터 말

초조적으로 이동하는 지방의 감소, 배출 감소 등이 원인이 되어 정상적인 지방대사가 이루어지지 못하여 지방이 전체 간 무게의 5% 이상을 차지하게 되는 경우를 말한다. 만성적인 에탄올 섭취는 신체의 주요 기관에 치명적인 영향을 미칠 수 있으며, 지방산 합성과 분비 및 대사에 중요한 역할을 담당하는 간세포에 장애를 초래하고 간 비대화, 간 괴사, 알코올성 간염, 지방간 및 간경변 등으로 진전된다. 만성적인 알코올 섭취에 의해서 뿐만 아니라 고용량을 1회 섭취하는 것만으로도 알코올성 지방간이 유도될 수 있다.

비알코올성 지방간질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 알코올 섭취가 거의 없는 사람에서 나타나며, 특별한 임상적 의의가 없는 단순한 지방간부터 간경화를 일으키는 더 심한 형태의 비알코올성 지방간염(NASH)에 이르는 다양한 범위의 간질환을 포함한다. 근래에 들어 전 세계적으로 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증 등 대사성증후군의 유병률이 증가하면서 비알코올성 지방간의 유병률도 증가됨에 따라 임상적으로 많은 관심을 끌고 있다.

해조류는 식이성 섬유소인 복합다당류를 다량 함유하고 있을 뿐 아니라 여러 비타민과 무기질이 비교적 풍부하고 그 독특한 맛과 향기가 우수한 알칼리성 기호식품으로서 가치가 높다. 또한 소화율이 낮아서 열량원으로서의 가치는 적지만 섬유성 식품으로 위에 포만감과 통변을 조절하는 효과뿐만 아니라 항암, 항당뇨, 항고지혈증, 항산화 및 항노화 등 여러 생리적 효능을 지니고 있어 그 가치가 높은 것으로 알려져 있다.

최근 해조류의 다양한 생리·화학적 효과가 검증되면서 해조류로부터 분리한 생리활성물질에 관심이 고조되었고, 이에 관한 연구가 활발히 진행 중이다. 특히 주목받고 있는 곰피(*Ecklonia stolonifera*)는 다시마목(Laminariales) 다시마과(Laminariaceae)에 속하는 다년생 갈조류로 한국, 일본 등지에 분포하고 있으며, 우리나라에서는 동해안 특산종으로 부산, 통영, 금호, 월성, 추자도, 거제도, 울릉도, 영일만 등에 서식한다. 곰피에 대한 선행연구로는 곰피로부터 분리한 phloroglucinol이 흰쥐의 아세트아미노펜 대사효소활성에 미치는 영향 및 곰피 메탄올추출물의 xanthine oxidase 저해작용을 들 수 있다. 또한 곰피 메탄올 추출물의 아질산염 소거활성, 항산화 활성에 대한 연구뿐만 아니라, 곰피 에탄올 추출물의 항균활성, 항돌연변이 활성에 대한 연구결과도 보고되어 있다 [출처 : Journal of Life Science 20(12):1851-1858, 2010, J Korean Soc Food Sci Nutr 39(12) : 1769-1775, 2010].

특히 곰피에는 약리학적으로 효능이 높은 phlorotannin 화합물을 포함하고 있는데 최근 국내의 14 종류의 해조류를 스크리닝 한 결과 곰피추출물에서 강력한 간 독성 보호 작용을 확인하였으며, phlorotannin 화합물인 eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol-A, phlorofucofuroeckol-B이 간 보호 활성이 높은 활성 물질임을 확인하였다^{B4)}.

이러한 선행연구들을 토대로 곰피추출물의 간 기능 개선 효과를 확인하고자 하였으며, 알코올로 유도된 간독성 모델에서 곰피추출물 100 mg/kg와 200 mg/kg를 투여하여 실험한 결과 간세포 보호 효능과 혈중 지질지표 개선효과를 확인하였다. 또한, 곰피추출물의 작용 기전을 검토한 결과 간조직 내 항산화 효소인 SOD, catalase, glutathione의 수치를 증가시키고 산화 스트레스 지표인 MDA의 수치를 낮추는 것을 확인하였다^{B2)}.

이후 경증 및 중등도의 간 기능 손상자들을 대상으로 12주, 무작위, 이중맹검, 위약대조의 디자인의 인체적용시험을 실시한 결과, 12주간의 곰피추출물의 섭취는 유의성 있는 간 기능 개선 효과가 확인되어 건강기능식품 기능성원료로 신청하는 바이다.

2.3. 국내·외 인정·허가 현황

2.3.1. 국내

- 곰피는 식품의 원료로 사용이 가능함[식규 65421(2000. 6)].
- 지표성분인 ‘Dieckol’은 기능성원료(감태추출물 : 수면의 질 개선)의 지표성분(또는 기능성분)으로 인정된 사례 있음.

2.3.2. 국외

- 미국 : 감태에서 추출되는 저분자량의 폴리페놀 화합물 복합체인 ‘씨놀(seanol, 라이브캠(주))’은 2008년 미국 FDA로부터 NDI(New Dietary Ingredient)로 인증 받은 사례가 있음(주성분 : eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol, fucosterol 등).

3. 제조방법 및 그에 관한 자료

3.1. 원재료

- 곰피(*Ecklonia stolonifera*)

3.2. 개요

- 상기의 원재료를 주정 추출 후, 농축하고 동결건조하여 제조함.

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(%)	수율(kg)
곰피			Dieckkol 0.43% ¹⁾	
↓				
세척				
↓				
추출	70% 주정	70℃/9시간		
↓				
여과				
↓				
진공농축		진공농축기/40℃		
↓				
동결건조		동결건조기/-47℃ /2일		
↓				
분쇄(곰피추출물)			Dieckkol 2%	18-19%

¹⁾ Quantitative determination of major phlorotannins in *Ecklonia stolonifera*. *Archives of Pharmacal Research*, 33, 539-444, 2010.

- 주정은 국내 규격에 적합함을 확인하였음.

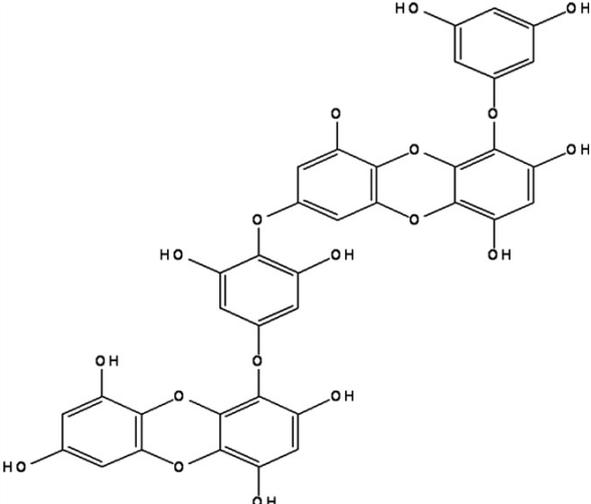
4. 원료의 특성에 관한 자료

4.1. 원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등

- 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말

4.2. 기능성분(또는 지표성분) 및 근거

4.2.1. 지표성분 : 디에콜(Dieckol)

구조	
일반명	디에콜()
분자식	C ₃₆ H ₂₂ O ₁₈
분자량	742.57

4.2.2. 지표성분 설정근거

- 곰피추출물에서 phlorotannin 화합물인 eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol-A, phlorofucofuroeckol-B이 간보호활성이 높은 활성 물질임을 확인하였다. 따라서 phlorotannin 화합물을 지표성분으로 선정하고자 하였으며 HPLC 분석을 통하여 phlorotannin 계열 성분 중 곰피추출물에서 특이성, 대표성을 띄면서 일정수준 이상의 함량을 지니고 분석이 용이한 Dieckol을 지표성분으로 최종 설정하였다.

4.3. 영양성분정보자료

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

성분	함량	성분	함량
열량(Kcal/100g)	356.11	회분(%)	14.59
탄수화물(%)	65.84	수분(%)	3.82
조지방(%)	5.95	나트륨(mg/100g)	2426.09
조단백질(%)	9.80		

5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료

5.1. 기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거

5.1.1. 기능성분(또는 지표성분)의 규격

○ 지표성분 : Dieckol 16-24mg/g

5.1.2. 설정근거

○ 국내 시험기관 성적서

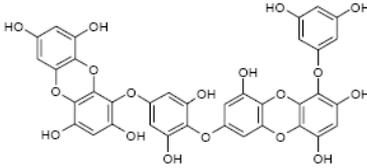
신청원료는 단일성분이 아닌 추출물에 해당되는 원료임을 고려하여 한국기능식품연구원의 1lot, 3반복 시험결과를 근거로 80-120%에 해당하는 16-24mg/g을 Dieckol의 규격으로 설정한다.

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

반복 수	1	2	3	평균
Lot No.				
Lot 131020	20.4988mg/g	19.9570mg/g	20.2345mg/g	20.2301mg/g

5.2. 기능성분(또는 지표성분) 표준품 정보

○ Dieckol

■ 자사 표준품	표준품명	Dieckol
	구조식	
	CAS No.	88095-77-6
	순도	95%

○ Dieckol의 구조 확인

표준품에 대한 구조확인인은 NMR 분석을 통하여 비교하였으며, Dieckol 은 이전에 보고된 참고논문의 1H NMR data 와 비교하여 구조확인을 하였음 [참고문헌 : Phlorotannins isolated from the edible brown alga Ecklonia stolonifera exert anti-adipogenic activity on 3T3-L1 adipocytes by downregulating C/EBP α and PPAR γ , Fitoterapia 92 (2014) 260-269].

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.15 (1H, s, H-3''), 6.13 (1H, s, H-3), 6.09 (2H, s, H-2'',6''), 6.06 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-8), 6.05 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-6''), 5.98(1H, d, J = 2.8 Hz, H-6), 5.95 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-6), 5.92 (3H, s, H-2',4',6'). ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 162.7 (C-1'), 161.0 (C-3',5'), 158.6 (C-1'''), 156.8 (C-7), 155.3 (C-7''), 153.2 (C-3''', 5'''), 148.1 (C-2''), 148.01 (C-2), 147.9 (C-9''), 147.7 (C-9), 145.1 (C-5a''), 145.0 (C-5a), 144.2 (C-4''), 144.1 (C-4'''), 139.4 (C-10a), 139.3 (C-10a''), 127.3 (C-4'''), 127.0 (C-9a), 126.5 (C-1), 126.4 (C-1''), 125.7 (C-9a'), 125.5 (C-4a''), 125.4 (C-4a), 100.7 (C-8''), 100.6 (C-8), 100.3 (C-3), 100.2 (C-3''), 98.5 (C-4'), 97.0 (C-2''',6'''), 96.7 (C-6''), 96.6 (C-6'), 96.2 (C-2',6').
Positive FABMS m/z 742 [M]⁺.

5.3. 기능성분(또는 지표성분) 시험방법

<input type="checkbox"/> 공인시험방법	출처 :
<input checked="" type="checkbox"/> 자사시험방법	<input checked="" type="checkbox"/> 시험방법 타당성(밸리데이션) 자료

<시험방법>

1. 장치 : HPLC

2. 시약 및 시액

- 1) 표준품 : Dieckol(순도 95%)
- 2) Methanol
- 3) Acetonitrile
- 4) Formic acid

3. 표준용액의 제조

표준품 1mg을 정밀하게 달아 이를 4ml용량 플라스크에 넣고 Methanol로 녹인 후 이를 표준원액으로 하였다 (250 µg/mL).

상기 표준원액을 적정농도로 희석하여 검량선 작성용 표준용액으로 한다.

4. 시험용액의 제조

시료 10mg에 Methanol 1ml을 넣어 30 분간 진행한 후 0.45µm PTFE syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용한다.

5. 기기분석 조건

- 1) 검출기 : Waters 717autosampler, 600controller, 2487detector

- 2) 컬럼 : Atlantis T3 C18 column (4.6 x 250 mm i.d. 5 μ m, waters, USA) 또는 이와 동등한 것
- 3) 컬럼온도 : 25 $^{\circ}$ C
- 4) 주입량 : 10 μ l
- 5) 유속 : 1.0 ml/min
- 6) 이동상 : (A)= ACN (Acetonitrile), (B) = Formic acid
A : B = 24: 76

6. 계산

$$Dieckol(mg/g) = A \times \frac{B}{S} \times P$$

A : 시험 용액 중 Dieckol의 농도(μ g/ml)

B : 시험 용액의 전량(ml)

S : 시료 채취량(mg)

P : 표준품의 순도

6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

6.1. 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 비소, 수은, 대장균군)의 규격 및 근거

6.1.1. 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 비소, 수은, 대장균군) 규격

- 1) 납 : 1ppm 이하
- 2) 총비소 : -
- 3) 카드뮴 : 1ppm 이하
- 4) 총수은 : 1ppm 이하
- 5) 대장균군 : 음성

6.1.2. 설정근거 : 국내 시험기관 성적서

- 1) 중금속 4종의 설정근거 : 신청원료 중 중금속의 1일 노출량(D)이 1일 최대 노출허용량(E)을 초과하지 않으므로 제안 규격은 적절하다고 판단된다.

■ 중금속의 1일 노출량

중금속명	실측치 (A)	제안 규격 (B)	신청원료의 최대 1일 섭취량(kg) (C)	신청원료 중 중금속 1일 노출량 (D)	중금속 1일 최대 노출허용량(μg) (E)
납	0.092μg/g	1000μg/kg	0.00042	0.42μg	10.8
총비소	65.3865μg/g	-		0.42μg	150
카드뮴	0.0186μg/g	1000μg/kg		0.42μg	3.0
총수은	0.002μg/g	1000μg/kg		0.42μg	2.1

※ 신청원료 중 중금속의 1일 노출량(D)이 1일 최대 노출허용량(E)보다 크지 않도록 규격을 설정하되 실측치를 고려하여 설정해야 함.

(A) 실측치 평균값 : 1lot 실측치의 평균값

(B) 제안규격 : 신청인이 제안한 규격

(C) 신청원료의 최대섭취량 : 제안 섭취량의 최대량, 제안 섭취량이 단일값인 경우 그 값을 적용

(D) 일일노출량 : 제안 규격 (B) x 최대섭취량 (C)

2) 대장균의 설정근거

대장균군은 식품 위생 관리에 가장 기본적인 지표로서 반드시 음성으로 관리되어야 하며, 해머 본 신청원료의 1lot, 1반복의 한국기능식품연구원 시험결과를 토대로 음성으로 규격 설정하였다.

6.2. 유해물질 규격 미설정항목 (잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료

6.2.1. 잔류농약

건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정 중 「식품의 기준 및 규격」에 농약의 잔류허용기준이 없는 경우에 해당되므로 5가지 농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)에 대하여 분석하였다. 국내 식품위생검사기관 시험결과 ‘불검출’임을 확인하였으며, 분석 자료를 제출한다.

6.3. 유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법

6.3.1. 납

식품공전 제 9. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1.2 금속별 시험 7.1.2.1 납(Pb) 1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법 (2) 마이크로웨이브법 에 준하여 시험용액 조제 후 2) 측정 ICP-MS로 측정한다.

6.3.2. 총비소

식품공전 제 10. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1.2 금속별 시험 7.1.2.1 납(Pb) 1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법 (2) 마이크로웨이브법 에 준하여 시험용액 조제 후 2) 측정 ICP-MS로 측정한다.

6.3.3. 카드뮴

식품공전 제 10. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1.2 금속별 시험 7.1.2.1 납(Pb) 1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법 (2) 마이크로웨이브법 에 준하여 시험용액 조제 후 2) 측정 ICP-MS로 측정한다.

6.3.4. 총수은

식품공전 제 9. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1 중금속 시험 7.1.2.4 수은(Hg)에 근거하여 시험한다.

6.3.5. 대장균군

식품공전 제 9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군 3.7.1 정성시험 가. 유당배지법에 준하여 시험한다.

6.3.6. 잔류농약

식품공전 제 9. 일반시험법 4. 식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다중농약다성분분석법 4.1.2.2 다중농약다성분분석법에 따라 시험한다.

■ 시험성적서 요약표

[시험기관명 : 한국기능식품연구원]

제안 기준 및 규격	시험항목		제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)		
규격항목	성상			이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말		
	기능성분(지표성분)(mg/g)		Diecjol 16-24mg/g	20.2301 mg/g		
	중금속 (mg/kg)	납	1ppm이하	0.092ppm		
		총비소	-	65.3865ppm		
		카드뮴	1ppm이하	0.0186ppm		
		총수은	1ppm이하	0.002ppm		
	미생물	대장균군	음성			
		세균수(cfu/g)	-			
	곰팡이 독소	독소명 기재	-			
	잔류용매	용매명 :	-			
규격 미설정 항목	동물용의약품	검사수 :	-			
	잔류농약	59종				
		5종	불검출			

7. 안전성에 관한 자료

○ 안전성에 관한 제출 자료의 범위

「건강기능식품 기능성원료 및 기준규격 인정에 관한 규정」 별표 3. 의사결정도 ‘다’에 해당됨.

따라서 안전성에 관한 자료 제출범위는 섭취근거자료, 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료, 섭취량 평가자료, 영양평가자료, 생물학적 유용성 자료, 인체적용시험자료 임.

7.1. 섭취근거 정보

2.3. 국내·외 인정·허가 현황 및 2.4. 국내·외 사용 현황으로 같음.

7.2. 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등) DB 검색 정보

7.1.1. DB 검색

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부	첨부번호
Pubmed	(Ecklonia stolonifera or Dieckol or phlorotannin) And (safety or adverse or toxic)	x	x	-
Natural Medicines	(Ecklonia stolonifera or Dieckol or phlorotannin)	○	○	C1
DrugDigest	'Brown Algae'	○	○	C2

7.1.1. DB 검색 결과

DrugDigest	<ul style="list-style-type: none"> - 갈조류의 요오드는 여드름을 유발할 수 있음. - 개인에 따라 갈조류의 섭취 시 설사, 메스꺼움이 나타날 수 있으나, 일반적으로 몇 일 후면 사라짐.
Natural Medicines Comprehensive DB	<ul style="list-style-type: none"> - 임산부, 수유부 섭취에 대한 자료가 충분치 않으므로 섭취에 주의

7.3. 섭취량 평가 정보

○ 곰피추출물의 1일 섭취량은 420mg 임.

○ 고평추출물은 원재료(곶피)로서 약 2.1g (수율 약 20%)을 섭취하는 것에 해당되며, 우리나라에서는 과거에 비해 식용하는 지역이 거의 없는 실정이어서 섭취량 평가 자료의 확보가 어려움. 따라서 기능성 원료의 섭취량이 국민 일상 섭취량보다 증가하였다고 판단함.

7.4. 영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 정보

7.4.1. 인체적용시험

[인체적용시험자료 요약]

시험물질	디자인	대상자	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과	비고
곶피추출물 (신청원료)	무작위 이중맹검 위약대조	경증 및 중증의 간 기능 손상자 65명	곶피추출물 1일 420mg/12주	[안전성 마커] ▪ 이상반응, 심전도, 활력징후, 실험실적 검사	▪ 시험 진행 중	▶ 보고서(순천향대학교 서울병원, 소화가내과) ▶ 첨부 B1

8. 기능성에 관한 자료

■ 제안된 기능성내용 및 섭취량

- 기능성 내용 : 간 건강에 도움을 줄 수 있음.
- 일일 섭취량 : 곰피추출물로서 420mg

■ 기능성 제출자료

시험물질	총 제출자료(건)	시험관시험(건)	동물시험(건)	인체적용시험(건)
신청원료	2		1	1
참고자료	5	4	1	

8.1.1. 추측 작용기전

곰피추출물은 간 손상으로 유발된 혈중 AST, ALT 농도를 유의적으로 감소시키고, 간 조직 내 항산화 효소 및 산화스트레스를 개선시키는 작용기전으로 간 기능 개선 및 보호효과를 나타낸다고 판단함.

8.1.2. 작용기전 설명자료

간은 인체에서 가장 큰 장기이며, 소화배설기능, 영양소 저장, 새로운 물질합성, 해로운 화학 물질을 해독시키는 중요한 역할을 담당하고 있다. 한편 간은 혈액의 흐름이 매우 풍부한 기관으로 혈류를 통한 독성 물질의 침투도 용이하게 일어날 수 있다. 만성적인 에탄올 섭취의 경우에도 간세포에 장애를 초래하여 알코올성 간염, 지방간 및 간경변을 초래할 수 있다.

Free radicals은 외부 물질 및 자외선과 같은 외부 인자에 의한 정상적 또는 병리학적 세포 대사를 통해 생성되며, 호흡과 산화가 진행되는 동안 산소분자는 free radicals과 쉽게 반응하여 reactive oxygen species (ROS) 형태가 된다. 이러한 반응종은 호기성 대사 및 핵산, 단백질 그리고 지질을 포함한 세포 내 성분의 손상에 의한 결과로서 생성된다. ROS는 또한 간 손상에도 관여하는데, 몇몇 간 독성 모델 시스템은 간 독성에 대한 천연물질의 보호 작용을 평가하는데 사용되고 있다. 앞선 연구에서는 carbon tetrachloride (CCl₄), acetaminophen, thioacetamide, rubratoxin B, tacrine, doxorubicin, H₂O₂ 와 lipopolysaccharide, D-galactosamine과 같은 세포 독소로 유발된 간 독성에 대한 연구가 활발히 진행되었으며, 이러한 간 독소는 cytochrome P450의 대사에 작용하여 반응성 독소 물질을 생성하게 된다. 일반적으로 간손상 치료 또는 보호 약물을 개발할 목적으로 사염화탄소 (CCl₄), D-galactosamine 등 화학물질을 처리하여 간손상을 유도한 실험동물 모델을 활용하고 있다.

특히 CCl₄는 mixed function oxidase(MFO) 효소계 활성화에 의해 trichloromethyl free radical(\cdot CCl₃)로 활성화된다. 생성된 free radical은 인근 지질막을 공격하여 지질의 과산화를 일으키거나, 세포내의 단백질이나 지질등의 macromolecules와 결합하여 간의 괴사, fatty infiltration, microsomal enzyme 활성화 저하 등의 간독성을 나타내고, endoplasmic reticulum의 Ca²⁺ pump를 억제하여 세포내 Ca²⁺ homeostasis를 저해하여 세포의 죽음을 초래하는 것으로 알려져 있다. 한편 이러한 유리기에 대하여 생체 조직은 superoxide dismutase, glutathione S-transferase, catalase 등과 같은 내인성 제거물질과 식품에 많은 vitamin A, C, E, flavonoid계 색소를 포함한 polyphenol류 등의 생리활성들을 활용하여 조직손상을 방어한다.

Tacrine (1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine hydrochloride)는 ROS 생성 및 glutathione(GSH)의 결핍을 유발하여 산화적 스트레스로 간 독성을 발생시키며, Tacrine으로 유발된 간 독성은 in vitro system에서 간 세포 보호 활성 소재를 탐색하기 위한 방법으로 잘 알려져 있다.

또한 Doxorubicin(adriamycin)은 다발성 골수종, 골육종, 림프성 백혈병 그리고 소화암과 같은 다양한 종양 상태에서 항암 소재로도 사용되나, 포유류에서 간과 일반적인 장기 독성을 유발하기도 한다. 간 세포에 대한 주요 독성은 세포주기 차단 및 산화적 스트레스, 전자전달계 분열을 포함한다.

다양한 Ecklonia 종들은 phlorotannin이 풍부한 소재로 사용되고 있으며, phlorotannins은 ether, phenyl 또는 1,4-dibenzodioxin linkage으로 중합된 phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene)의 2차 대사물질이다. 이러한 폴리페놀 화합물들은 당뇨 합병증 저해 및 간 보호 효과, 항플라스민 저해, 항염증, 항산화 그리고 안지오텐신변환효소 저해 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

특히 곰피에는 약리학적으로 효능이 높은 phlorotannin 화합물을 포함하고 있는데 최근 국내의 14종류의 해조류를 스크리닝 한 결과 곰피추출물에서 강력한 간 독성 보호 작용을 확인하였으며, phlorotannin 화합물인 eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol-A, phlorofucofuroeckol-B가 간 독성 유발물질에 의한 간 손상에 대한 보호 효과가 높은 활성 물질들임을 확인하였다^{B4, B5}.

이러한 선행연구들을 토대로 곰피추출물의 간 기능 개선 효과를 확인하고자 하였으며, 알코올로 유도된 간독성 모델에서 곰피추출물 100 mg/kg와 200 mg/kg를 투여하여 실험한 결과 간세포 보호 효과와 혈중 지질지표 개선효과를 확인하였다. 또한, 곰피추출물의 작용 기전을 검토한 결과 간조직 내 항산화 효소인 SOD, catalase, glutathione의 수치를 증가시키고 산화 스트레스 지표인 MDA의 수치를 낮추는 것을 확인하였다^{B2}.

이후 경증 및 중등도의 간 기능 손상자들을 대상으로 12주, 무작위, 이중맹검, 위약대조의 디자인의 인체적용시험을 실시한 결과, 12주간의 곰피추출물의 섭취는 유의성 있는 간 기능 개선 효과가 확인되어 건강기능식품 기능성원료로 신청하는 바이다.

8.2. 기능성 근거자료

○ 인체적용시험

[인체적용시험자료 요약]

시험물질	디자인	대상자	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과	비고
곰피추출물 (신청원료)	무작위 이중맹검 위약대조	경증 및 중증의 간 기능 손상자 65명	곰피추출물 1일 420mg/12주	[유효성 마커] ▪ 혈중 AST, ALT, GGT ▪ 혈중 지질(TC, TG, HDL, LDL) [안전성 마커] ▪ 이상반응, 심전도, 활력징후, 실험실적 검사	▪ 시험 진행 중	▶ 보고서(순 천향대학교 서울병원, 소화가내과) ▶ B1

○ 동물시험

[동물시험자료 요약]

시험물질	실험동물	섭취량/섭취기간	바이오마커	결과	비고
곰피추출물 (신청원료)	만성 알코올 지방간 유도 Male Sprague- Dawley rats (n=8)	곰피추출물 50,100, 200mg /kg/10주/경구 투여	▪ 혈중 GOT, GPT ▪ 혈중 및 간 조직 내 지질 농도 ▪ 지방간 개선효과 : Oil-Red O 염색 ▪ gene expression	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 에탄올 식이 대조군은 정상 식이군 대 비 체중이 유의적으로 감소하였으며, 곰 피추출물 투여 군은 에탄올 식이 대조군 보다 증가함. ▪ 곰피추출물은 에탄올로 유발된 간의 무게 증가를 저해함. 특히 200mg/kg 곰 피추출물 투여군의 간의 무게는 정상 식 이군 대비 감소되었음. ▪ 혈중 TG 및 TC 농도는 에탄올 식이 대 조군 대비 곰피추출물 투여군에서 용량 의존적으로 유의적으로 감소함(p<0.01). ▪ 혈중 AST 및 ALT 농도 또한 에탄올 식 이 대조군 대비 곰피추출물 투여군에서 유의적으로 감소함(p<0.01). ▪ 에탄올로 유도된 간의 lipid droplets 수는 곰피추출물 투여에 의해 정상화 되었으며, 특히 곰피추출물 100, 200mg/kg 처리군이 실리마린보다 효과 적인 것으로 나타남. ▪ 간의 MDA 농도는 곰피추출물 투여군이 	▶ Agricultural and Food Chemistry (투고 중) ▶ B2

				<p>에탄올 식이 대조군 대비 유의적으로 감소하였음($p<0.01$).</p> <ul style="list-style-type: none"> 에탄올 투여로 인한 PPAR-α, CPT-1, LCAD 그리고 MCAD mRNA 발현 감소는 곰피추출물 투여에 의해 용량의존적으로 유의적으로 증가함(에탄올 식이 대조군 대비, $p<0.01$). 에탄올 투여에 의해 감소된 MTP 농도는 곰피추출물 투여에 의해 용량의존적으로 유의적으로 감소함($p<0.05$, $p<0.01$). 	
<p>곰피 유래 Dieckol (유사원료)</p>	<p>CCI4 간 손상 유발 ICR mice</p>	<p>dieckol 5 or 25mg/kg</p>	<ul style="list-style-type: none"> - CCI4 처리군 - CCI4+dieckol (5mg/kg mouse) - CCI4+dieckol (25mg/kg mouse) ▪ 혈중 GOT, GPT, MDA 농도 ▪ 조직 내 항산화효소(CAT, GSH-px) ▪ 간 조직 병리학적 검사 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 체중과 생존율은 dieckol 투여군이 CCI4 처리군 대비 유의적으로 증가하였음. ▪ 혈중 GOT, GPT, MDA 농도는 CCI4 처리군 대비 dieckol 투여군이 용량의존적으로 유의적으로 감소하였음. ▪ CAT 및 GSH-px 농도는 dieckol 투여군이 CCI4 처리군 대비 유의적으로 증가하였음. 	<p>▶ Environmental Toxicology and Pharmacology 35(3): 517-523, 2013</p> <p>▶ B3</p>

○ 시험관시험

[시험관시험자료 요약]

시험물질	실험계	실험방법	결과	비고
<p>곰피추출물 (유사원료, 95% 주정추출물)</p> <p>곰피에서 분리된 6종의 phlorotannin (phloroglucinol, dioxinodehydroeckol, eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol, iphloroethol-A)</p>	<p>doxorubicin 으로 간 독성이 유발된 rat hepatocytes</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ doxorubicin으로 세포독성 유발 ▪ 세포독성(EC 50) : WST-1 assay 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 간 독성에 대한 곰피추출물과 6개의 phlorotannin의 EC 50은 2.0μg/ml과 3.4~11.5μg/ml으로서 강력한 간 기능 보호 작용이 나타남(양성대조군 silymarin EC50 =13.5μg/ml, 8.2μg/ml). 	<p>▶ Journal of Pharmacy and Pharmacology 66(8):1180-1188, 2014</p> <p>▶ B4</p>
<p>곰피 유래 Phlorotannins</p>	<p>tacrine으로 간 독성이 유발된 간암세포</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 세포독성(cell viability) : MTS assay ▪ DPPH Radical 소거능 : EC₅₀ 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 세포 괴사에 대한 tacrine의 IC₅₀은 0.30 \pm 0.05 mM 농도이며, 2-phloroecol, eckol 그리고 6,6' 	<p>▶ Agric. Food Chem. 60 :</p>

	(HepG2 cells)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ROS 생성능 : oxidantsensitive fluorescent probe DCF-DA ▪ 항산화 효소 활성 : GST 및 catalase 활성 ▪ FAS-Related cell death protein expression : western blot assay ▪ 세포질의 미토콘드리아로부터의 cytochrome c의 방출 	<p>-bieckol은 200 μM 농도까지 세포 독성이 나타나지 않았음. phlorofucofuroeckol B는 50 μM 농도에서 약 18%의 세포독성을 보임.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 곰피에서 분리된 Phlorotannins 중 2-phloroeckol, eckol, phlorofucofuroeckol B 그리고 6,6'-bieckol의 EC₅₀는 각각 35.2 \pm 0.4, 10.6 \pm 0.4, 4.9 \pm 0.2, and 9.5 \pm 0.2 μM으로 나타남. Eckol 및 6,6'-bieckol DPPH Radical 소거능은 양성 대조군인 L-ascorbic acid EC₅₀과 유사함. ▪ 세포 내 시스템에서의 Phlorotannins의 항산화 활성을 측정하기 위해 free radical mediated oxidation에 대한 작용을 조사하였으며, ROS 생성능은 2-phloroeckol, eckol 과 6,6'-bieckol 처리군에서 용량의존적으로 유의적 감소를 보임. ▪ 50-200 μM 6,6'-bieckol, 100, 200 μM eckol 그리고 200 μM 2-phloroeckol의 처리는 정상대조군 대비 ROS 농도가 유의적으로 낮았음. ▪ tacrine으로 독성이 유발된 간암세포에서 25 μM 농도 이상에서의 2-phloroeckol과 eckol 처리는 용량의존적으로 세포 생존율을 유의적으로 증가시킴. 100, 200 μM eckol과 200 μM 2-phloroeckol의 세포 생존율은 양성 대조군과 유사한 수준임. ▪ 2-Phloroeckol과 eckol의 처리는 GST 및 catalase 활성을 용량의존적으로 유의적으로 증가시킴. GST 및 catalase 활성에 대한 100, 200 μM eckol 그리고 200 μM 2-phloroeckol의 처리는 정상대조군과 유사한 수준이었으며, 50 μM eckol (18.6 μg/mL)과 2-phloroeckol (24.8 μg/mL)의 처리는 양성대조군인 silymarin treatment (25 μg/mL) 보다 높은 활성을 보임. ▪ 2-Phloroeckol과 eckol의 처리는 용량의존적으로 cell death protein의 발현을 용량의존적으로 저해하였으며, Bid와 tBid 농도는 정상 농도로 회복되었 	5340-5349, 2012 ▶ B5
--	---------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------

			<p>음. 또한 두 성분은 용량의존적으로 caspase-3 활성 및 PARP을 저해함.</p> <ul style="list-style-type: none"> 2-Phloroeckol과 eckol의 처리는 용량의존적으로 세포질의 미토콘드리아로부터의 cytochrome c의 방출을 저해함. 	
<p>Fucosterol (갈조류 함유 sterol)</p>	<p>tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)- and tacrine으로 산화적 스트레스가 유발된 간암세포 (HepG2 cells)</p>	<ul style="list-style-type: none"> cytotoxicity : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay ROS 및 glutathione 농도 mice의 혈중 AST, ALT 농도 	<ul style="list-style-type: none"> Fucosterol 자체로는 세포 독성이 없음. ROS 및 glutathione 농도는 Fucosterol에 의해 저해됨. tacrine를 투여한 mice의 AST, ALT 농도는 Fucosterol 투여 후 유의적으로 감소함. 	<p>▶ J Pharm Pharmacol. 2015 Mar 13. ▶ B6</p>
<p>곰피유래 phlorotannins [phloroglucinol, eckstolonol, eckol, phlorofucofuroeckol, dieckol]</p>	<p>tacrine으로 간 독성이 유발된 간암세포 (HepG2 cells)</p>	<ul style="list-style-type: none"> 세포독성(EC 50) 	<ul style="list-style-type: none"> tacrine으로 으로 유발된 세포독성에 대한 EC50은 eckstolonol 및 phlorofucofuroeckol 각각 62.0, 79.2 microg/mL으로 나타남(양성대조군 Silybin EC50 50.0 microg/ml). 	<p>▶ Arch Pharm Res. 28(12):1376-80, 2005 ▶ B7</p>

9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

9.1. 섭취량 및 근거

○ 섭취량 : 공피추출물로서 1일 420mg

○ 설정근거 : 가능성이 확인된 인체적용시험의 섭취량을 고려하여 설정함.

무작위, 이중맹검, 위약대조의 디자인으로 시험된 1건의 인체적용시험에서 경증 및 중등도의 간 기능 손상자들을 대상으로 공피추출물 1일 420mg을 12주간 섭취시켰다. 인체적용시험에서의 유효 용량인 420mg을 공피추출물의 1일 섭취량으로 설정하고자 한다.

10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

10.1. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 곰피 및 지표성분인 Dieckol은 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약처 고시 제2013-207호, '13.08.16)」 제 2. 1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료'에 해당하지 않음.

10.2. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 곰피 및 지표성분인 Dieckol은 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약처 고시 제2013-207호, '13.08.16)」 제 2. 1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료' 2)의약품의 용도로만 사용되는 원료 등 섭취방법 또는 섭취량에 대해 의·약학적 전문 지식을 필요로 하는 것에 해당하지 않음.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.