

보안과제(), 일반과제(○)

과제번호 : 8100073

발효미생물을 이용한 기능성 식품 산업화연구사업단

(Project for Functional Foods Development using
Fermentation Microorganism)

명지대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “발효미생물을 이용한 기능성 식품 산업화 연구사업단” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 02월 06일

주관연구기관명 : 명지대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 서주원

핵심연구기관명 : 명지대학교 산학협력단

핵심연구책임자 : 서주원

세부연구책임자 : 서주원

세부연구기관명 : 경기과학기술진흥원

세부연구책임자 : 안은경

핵심연구기관명 : (주) 비엔씨바이오팜

핵심연구책임자 : 김종우

세부연구책임자 : 김종우

세부연구기관명 : 연세대학교 산학협력단

세부연구책임자 : 김택중

핵심연구기관명 : 인제대학교 산학협력단

핵심연구책임자 : 강재현

요 약 문

I. 제 목

발효미생물을 이용한 기능성 식품 산업화 연구사업단

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 경제와 사회가 발전하면서 신체 활동량의 감소와 식생활이 서구화되면서 나타나는 비만 및 각종 성인병에 대한 사회적 비용이 늘어나고 있는 현실이다. 인간이 건강하게 장수하는데 도움이 되는 발효식품산업 개발은 세계적으로 매년 6 ~ 7%의 성장세를 보이고 있는 미래 유망산업이다. 기능성물질에 대한 관심고조로 발효식품에 기능성물질을 첨가해 기능성을 증대시킨 건강 기능 제품들이 출시되고 있으나, 아직도 국내 발효식품 시장은 생산 방식에 있어서 자연발효에 대한 의존도가 높고, 원천기술특허가 부족하여 세계 시장에 진출하기에는 많은 문제점을 내포하고 있다. 따라서, 본 사업단에서는 최근 시장 요구도가 높은 비만 및 간기능 개선제 시장 공략을 위해 이미 선행 연구에서 비만, 간염, 알레르기, 아토피, 간기능 개선 등에 탁월한 효능이 검증된 소재에 본 연구사업단의 발효기술들을 접목시켜 비만 및 간기능 개선 효과가 우수한 건강 기능 식품을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. Monascus속 발효산물을 이용한 비만 및 간기능 개선 기능성 식품개발

- 가. 비만 및 간기능 개선효과가 있는 Monascus속 발효 산물의 발효기술 개발 및 제품화
- 나. Monascus속 발효산물의 비만 및 간기능 개선 세포내 효능평가
- 다. Monascus속 발효산물의 비만 및 간기능 개선 효능의 동물실험
- 라. Monascus속 발효 검정콩소재의 안전성 시험

2. 도라지 발효산물의 기능성 식품개발

- 가. 도라지 사포닌 추출물 및 단일 사포닌의 장내 세균발효조건 확립
- 나. 도라지 발효산물의 간보호 (간염억제 및 간기능 개선) 활성 연구
- 다. 도라지 발효산물의 알레르기 및 아토피 개선효과 연구
- 라. 도라지 발효산물의 제품개발 및 건강기능식품 개별인정 획득

3. Monascus속 발효산물과 도라지 사포닌 추출물의 비만 및 간기능 개선 임상시험 및 개별

인정형 획득

가. 도라지 발효산물의 간기능 개선 임상시험 연구

나. Monascus속 발효산물의 비만 및 간기능 개선 임상시험 연구

IV. 연구개발결과

1. Monascus속 발효산물을 이용한 비만 및 간기능 개선 기능성 식품개발

가. Monascus속 미생물을 이용한 발효 검정콩, 발효 녹차 및 발효뽕잎차의 표준발효공정을 개발 및 확립함

나. 확립된 Monascus속 미생물을 이용한 발효 검정콩, 발효 녹차 및 발효뽕잎차의 표준발효법을 이용하여 다양한 건강지향성 식품의 시제품제작을 완료함

다. Monascus속 발효 검정콩의 in vitro 작용기전 및 유효성분의 항비만 효능 및 세포/분자수준에서의 작용기전을 규명함

라. 식이유도 비만 동물모델에서 Monascus속 발효 검정콩의 항비만 및 간기능 개선 효능을 검증함

다. Monascus속 발효 검정콩의 비임상 시험(단회투여독성, 유전독성 및 반복투여 독성)을 통해 안전성을 규명함

마. Monascus속 발효 검정콩의 체지방 및 지질개선 기능성의 규명 및 적정 복용용량 설정을 위한 임상시험을 수행함

2. 도라지 발효산물의 기능성 식품개발

가. 도라지 발효산물 및 대사체의 최적발효조건을 확립함

나. 도라지 발효산물 및 대사체의 간염억제효능 및 세포독성을 평가함

다. 도라지 발효산물의 간보호 및 간기능 개선효능을 동물모델을 이용하여 입증하였음

라. 도라지 발효산물의 아토피 억제작용기전을 규명하고, 아토피성 피부염 유발 동물모델에서 효능을 입증하였음

마. 도라지 발효산물의 임상시험을 통해 간기능 개선 기능성 및 인체적용 안전성확인함

바. 도라지 발효산물의 건강기능식품 개별인정등록을 완료함

사. 도라지 발효산물의 제품화를 위한 다양한 제형 (정제, 음료 등)의 제형을 평가하였으며, 유통기한 설정을 위한 안정성 평가 실시함

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구의 성과로 “간기능 개선” 개별 인정형 원료 1건 (도라지추출물)을 획득했을 뿐만 아니라 다양한 건강기능성 제품의 상품 개발 관련 생명과학 기술분야의 융합/복합적 발전을 유

도하였다.

현재 국내 개별인정형 원료시장 중 가장 큰 간기능 개선관련 건강기능성 식품의 약 750억 규모이며, 전년대비 42%의 높은 성장세를 나타내고 있다. 국내건강기능식품의 시장규모는 건강관심 고조, 인구 노령화 등에 힘입어 매년 큰 폭으로 성장하고 있다. 본 사업단은 이러한 시장을 더 육성·발전시키기 위해서는 수출 know-how제고를 위한 인프라 구축, 전통발효식품 및 재래종을 이용한 국내 소재 기반 대표 브랜드 발굴 및 육성 지원하는 연구개발을 수행하였다.

본 과제 수행으로 건강기능식품 개별인정형 원료 인허가 획득시 소요되는 비용의 일부를 국책과제로 지원됨으로서 농산물 유래 식의약소재 (도라지 및 검정콩 등)의 건강기능성 식품으로 개발될 수 있었다. 도라지 추출물의 간기능 개선 기능식품 개별인정획득으로, 비만 및 간기능개선 효능 발효산물 임상시험 및 개별인정획득으로 세계적인 스타 건강기능식품 창출 가능할 것으로 예상되며, 제품화 기술 및 개발 노하우 제고를 위한 산학연 협동 인프라 구축할 수 있는 계기가 마련되었다. 본 연구 연구성과에 대한 참여기업의 자체기술실시 및 기술이전을 통해 고수익 창출 및 잉여 농작물의 활용으로 농작물 가격 안정화 및 지속적인 농가소득 보장될 수 있을 것이다. 그리고, 국가 기관이 지원하는 본 연구개발을 통하여 비만 및 간기능 개선 효과를 나타내는 국내재래종 농산물의 발효산물에 기원을 둔 건강기능식품의 개발로 직접적으로는 국민들의 삶의 질 향상을 도모하며, 간접적으로는 대정부 신뢰도 제고, 융복합 창조경제의 성공사례 등의 사회, 문화적 효과도 유발할 수 있을 것으로 판단된다.

SUMMARY

I. Title

Project for Functional Foods Development using Fermentation Microorganism

II. Contents and Ranges of Research and Development

- Development of Monascus fermented anti-obesity functional foods and liver function improving functional foods.
 - Development of an anti-obesity effect and improve liver function products.
 - Bioactive In vitro/vivo tests for anti-obesity effects of Monascus and liver function improvement.

- Development of fermented Doraji functional foods
 - Evaluation gastro of protective activity by Doraji saponin extracts and single saponin
 - Effectiveness on hepatitis control and liver function
 - Improvement studies on allergy and atopic dermatitis therapeutics by fermented Doraji products
 - Development of Doraji fermented products and acquisition of Health Functional Food

- Studies on Monascus fermented anti-obesity and liver function improvement functional foods
 - Clinical test for recovering hepatitis control and liver function using fermented Doraji products
 - Pre-clinical test for anti-obesity effects of Monascus and liver function improvement

III. Results of Research and Development

1. Development of Monascus fermented anti-obesity functional foods and liver function improvement functional foods
 - Development of Monascus fermented products using black beans, green tea, and

mulberry tea

- Development of *Monascus* fermented functional foods using black beans, green tea, and mulberry tea
- In vitro/vivo bioactivity tests for anti-obesity effects of *Monascus* fermented products
- Dietary Effects of Post-fermented Green Tea by *Monascus* on the Body Weight, Serum Lipid Profiles and the Activities of Hepatic Antioxidative Enzymes in Mouse Fed a High Fat Diet
- Quality Characteristics and Antioxidant Activity of Fermented Mulberry Leaves Tea by *Monascus*

2. Development of fermented Doraji functional foods

- Preparation of doraji extract and quality properties by extract and aging condition for hepatitis control and liver function
- Evaluation gastro protective activity by Doraji saponin extracts and single saponin
- Effectiveness of recovering hepatitis control and liver function
- Preventative effects of Doraji saponin extracts treatment on hepatic steatosis in high fat diet-fed C57BL/6 mice
- Improvement studies of allergy and atopic dermatitis therapeutics by fermented Doraji products
- Clinical test for recovering hepatitis control and liver function using Doraji fermented products
- Product development of Doraji fermented products for Health Functional Food

IV. Research outcomes and its application plan

Research was conducted to find the "liver function improvement" individual authorization type materials from Doraji extract. The results of this research, development of the product related life-science technology field of various healthy functionality products.

1. Commercialization : health functional food, individual recognition application
2. The spread of technology : promotional presentations
3. Intellectual property : paper submission
4. Further research : efficiency test on diseased-animal model, clinical trial etc.

CONTENTS

I. Summary of research project	9
II. Internal and external status of development	14
III. Contents and results of research development	21
IV. Goal achievement and contribution on related field	311
V. Research outcome and its application plan	314
VI. Collecting information on scientific technology during research development	319
VII. Research facilities and instruments	328
VIII. References	329

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	9
제1절 연구개발의 필요성	9
제2절 연구개발의 목적	14
제 2 장 국내외 기술개발 현황	15
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	21
제1절 Monascus속 발효산물을 이용한 비만 및 간기능 개선기능성 식품 개발 . .	21
제2절 Monascus속 발효산물에 대한 비만 및 간기능 개선 유효/지표물질 규명 . .	40
제3절 Monascus속 균을 이용한 간기능 개선 및 체중조절 효과를 가진 홍국 발효 검정콩의 비임상독성시험	87
제4절 Monascus속 균을 이용한 간기능 개선 및 체중조절 효과를 가진 발효검정콩 의 인체적용시험	166
제5절 Monascus속 균을 이용한 간기능 개선 및 체중조절 효과를 가진 후 발효차 개발과 제품화	202
제6절 도라지 추출물 및 발효대사 산물에 대한 연구	227
제7절 도라지 사포닌 발효추출물의 비만 및 간기능 개선 임상시험	246
제8절 건강기능식품 인허가 및 시제품 제작	277
제9절 도라지 발효 추출물에서 알레르기 천식 및 아토피 개선 유효물질 규명 . .	293
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	311
제1절 연구 목표 달성도	311
제2절 관련분야의 기술발정에 기여도	312
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	314
제1절 연구개발 결과의 목표대비 성과현황	314
제2절 세부항목별 연구성과 및 활용계획	315
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	319
제1절 C형 간염 관련자료	319
제2절 아토피시장현황	325
제 7 장 연구시설·장비 현황	328
제 8 장 참고문헌	329

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 필요성

발효식품에서 발달된 미생물 이용기술은 화학물질을 생산하는 분야에 주로 사용되어 왔는데, 각종 오믹스 기술의 발전 및 단백질 설계 기술 등의 생명공학기술의 발달과 함께 과거 항암제, 항생제 등의 의약품으로 대표된 대규모 대사공학제품들은 최근 생산성과 생산규모가 증대되면서 점차 식품소재 생산에 까지 도입되고 있다. 급격한 사회 노령화와 건강을 추구하는 사회의 변화에 의해 “건강기능성 식품소재 (functional food substances or nutraceuticals)”의 생산으로 발효를 이용한 식품소재 시장규모는 지속적으로 증가할 것으로 예상된다. 인간이 건강하게 장수하는데 도움이 되는 발효식품산업 개발은 세계적으로 매년 6 ~ 7%의 성장세를 보이고 있는 미래 유망산업이다. 발효식품 내에 존재하는 특정 기능성 물질을 고부가가치 신기능성 식품으로 개발하고, 상품화하는 Nutraceutical 산업은 한걸음 더 성장성이 기대되는 분야로 부각되고 있다. 따라서 체계적인 관리 및 산업적 차원의 관리를 통한 고부가가치 선진산업으로의 전환이 절실히 요구된다.

붉은 누룩이라는 뜻의 홍국(紅麴)은 2200년 전 중국 한나라 황제 유방이 처음 황실 음식으로 채택하여 혈행을 개선시키는 한약재로 사용하다가 조선중기 중국 사신에 의해 우리나라에 전래되어 한방에서 산후 어혈 해소제로 사용되고 있으며 문헌상으로는 중국 명나라 이시진의 본초강목과 허준의 동의보감에 기록되어 있다. 일본에서는 홍국이 건강기능성 식품 외에도 홍국 청주·식초·장류·두부·어묵·햄·소시지 빵 등 다양한 가공식품 제조에 널리 응용되어 왔으나 국내에서는 홍국의 식품에의 활용은 아직은 초기 단계라고 볼 수 있다. 다수의 업체들이 관심을 보이고 있지만 일반 소비자들의 홍국에 대한 인지도 부족과 식품소재로서의 홍국의 가격 부담 때문에 본격적인 제품에의 적용은 아직은 미미한 실정이다.

건강기능성 식품으로서의 홍국의 매출 타겟은 고지혈증(고콜레스테롤증) 저하제 시장이다. 세계 최대 규모의 건강기능성 식품 시장을 형성하고 있는 미국에서는 1990년대 말 파마넥스社에서 콜레스테롤 저하제 시장을 목표로 홍국추출물(모나콜린-K함량 0.4%)을 이용한 「콜레스틴」이라는 홍국 제품을 시판하였다. 그러나 이 제품은 2001년도에 이미 의약품으로 허가 받은 로바스타틴과 동일한 물질을 포함하고 있는 것으로 드러나, 美 FDA는 『건강기능식품은 이미 의약품으로 허가된 성분을 포함할 수 없다는 DSHEA(Dietary Supplement Health and Education Act)에 위반 된다』는 미연방 법원의 결정에 따라 이 제품의 판매를 금지하였다. 그러나 미국을 제외한 세계 30여개 국가에서 모나콜린-K 함유 홍국제품을 자유롭게 판매되고 있다.

Monascus속의 주성분으로 알려진 monacolin K는 일본의 엔도아끼라(1979)가 발견하였으며 Aspergillus sp에서 분리한 mevicolin 또는 lovastatin과 동일한 구조를 가지며, 항 콜레스테롤 효과는 있으나 항비만 효과가 있는지에 대하여는 확실한 연구가 없다. Monascus속균의 항비만 효과에 대한 연구도 보이지 않으나, Monascus속 추출물이 비만세포의 생육을 저해한다는 연구가 있으며 비만과 관련이 있는 지방합성관련 효소류의 활성을 억제시킨다는 연구가 있어 홍국 또는 Monascus속 미생물이 항비만과 관련된 미지의 물질을 생성함을 시사하고 있다.

현대인은 경제와 사회가 발전하면서 신체활동량의 감소와 식생활이 서구화되어 식이섬유가 적고 지방과 콜레스테롤 함량이 높은 음식물의 섭취가 증가하고 있으며 이로 인하여 비만인구의 비율이 점차 증가되고 순환기계 질환과 당뇨, 암 등이 증가하고 있으며 비만은 2차적으로 여러 퇴행성 질환의 유발과 깊은 관련이 있어 최근 커다란 건강문제로 대두되었다.

비만은 1980년 이후 전 세계적으로 약 75%가 증가하였으며 국제비만대책위원회(IOTF)는 최근 전 세계인구의 1/4인 17억이 체중감량이 필요하다고 보고하였고 미국국립보건통계센터(NCHS)는 미국성인의 61%를 과체중으로, 26%를 비만으로 분류하고 있다. 우리나라도 국민건강조사 자료에 의하면 14.8%로 20세 이상의 성인 비만은 1998년, 2001년, 2005년에 26.3%, 29.6%, 31.7%로 점점 증가하고 있다.

신체의 체중조절은 일반적으로 다음 4개의 일련과정으로 이루어지고 있는데 먼저, 길항작용계(feedback system)로서 렙틴(leptin)과 같은 구심성(afferent)의 신호가 지방세포에서 나와서 뇌로 전달이 되고 시상하부에서 이 신호에 반응하며 이로부터 나오는 원심성(efferent)신호가 식욕과 에너지 소비 및 대사를 조절하고 조절된 체계에 의해 음식에너지를 섭취, 흡수, 저장하게 된다. 비만은 이러한 조절체계가 여러 형태의 생물화학적인 과정의 변화에 의해 에너지 섭취가 에너지 소비를 능가하여 잉여 에너지가 지방조직에 축적될 때 발생하게 된다.

현재 가장 활발히 사용되고 있는 비만치료제로는 sibutramine (ReductilR)과 Orlistat를 들 수 있는데 이 두 약은 안정성에 있어서 FDA의 승인을 받고 보편적으로 처방이 되고 있지만 약간의 부작용을 보이는데 sibutramine은 혈압을 높이므로 심혈관계 질환을 앓고 있는 환자들은 주의해야 하며 orlistat는 소화기장애, 지방변, 배변실금, 지용성비타민 흡수방해 등을 유도한다고 보고되고 있다. 현재 판매되고 있는 비만 치료제들은 크고 작은 부작용을 보이고 있어 소비자들은 적은 노력으로 큰 효과를 내면서 부작용이 적은 자연소재의 비만 치료제에 더 많은 관심을 가지게 되었다.

천연물이란 자연계에서 얻어지는 식물, 동물, 광물 및 미생물과 이들의 대사산물을 말하며, 생약 (crude drug), 생약제제 (herbal medicinal preparation), 식물의약품 (botanical drug) 또는 식물제제(herbal medicinal product (HMP))를 포함함. 또한, 생약은 천연물을 의약품으로 사용하기 위하여 이들을 절단, 분쇄, 추출 등의 간단한 가공을 통해 그 본질을 변화시키지 않은 상

태의 천연물, 또는 이들로부터 약효성분을 추출하여 사용하거나 정제하여 사용하는 것들을 통칭함. 우리 나라에서 생육하고 있는 식물의 종류는 약 40만종으로 추정하고 그 중 약 1/3이 약용이 가능한 식물이라고 알려져 있음. 세계적으로 알려진 약물의 종류는 약 3,000여 종에 이르고 있으나 우리나라 한의계에서 주로 사용하고 있는 약재는 식물성 290종, 동물성 130종, 광물질 39종 등 400여종에 이르고 있다. 최근에는 약물의 독성과 부작용으로 인한 불편함과 치료 중단 등의 문제가 심각한 수준에 이르고 있어 천연재료를 이용한 치료제와 각종 기능성 식품에 대한 관심과 연구가 활발하게 진행되고 있다.

대부분의 천연물 제품의 경우 섭취하는 사람의 체질에 따라 그 효능이 차이가 있으며 환경에 따라 다양한 반응을 보이는 공통적인 문제점이 있다. 그 원인으로서는 섭취하는 개체별 차이가 있을 수 있으나 대부분의 경우 천연물 약효성분의 공통적인 문제인 낮은 생체 흡수율과 체내에 존재하는 다양한 효소에 의한 대사작용 때문임. 따라서, 천연물 유래 약효성분의 체내에서의 기능을 증대하고 일정한 수준의 효능을 기대하기 위해서는 생체 흡수율을 높이는 연구와 일정한 수준의 효능을 보이는 대사체만을 선별하고 규격화 하여 생산할 수 있는 연구가 반드시 필요하다고 판단된다.

도라지 (*Platycodon Radix*)는 동아시아지역에 자생 혹은 재배되고 있는 초롱꽃과 (*Campanulaceae*) 도라지속(*Platylcodon*)에 속하는 유일한 다년생 식물 도라지 (*Platycodon grandiflorum* A. DC.)의 뿌리를 일컫고 생약명으로는 길경(桔梗)이라고 한다. 도라지의 함유 성분으로는 탄수화물(당)이 90% 이상을 차지하고 단백질이 2.4%, 지질 0.1% 그리고 회분이 1.5% 정도를 존재한다고 보고되어 있다. 그 외에 triterpenoid saponin (platycodin A, C, D, D2, polygalacin D, D2 등 18여 종류가 보고되고 있음)이 약 2% 정도 존재하고 있으며 이들 사포닌 성분들은 도라지의 다양한 약리효능의 유효성분으로 주목받고 있다. 그 밖에도 도라지에는 α -spinasterol, Δ^7 -stigmastenol, α -spinasteryl- β -D-glucoside 등 steroid 화합물이 약 0.03% 정도 함유되어 있다. 탄수화물은 포도당, 과당, 설탕, 케스토스 등 이당류 혹은 삼당류가 대부분을 차지하고 inulin, platycodin (과당 10분자 정도의 다당류) 등의 다당류가 보고되고 있다.

한방에서 길경의 효능은 동의보감(東醫寶鑑), 향약집성방(鄉藥集成方), 신농본초경 (神農本草經), 본초 강목(本草綱目), 천금익방(天金翼方) 등 다수의 본초서 또는 한의학서에 나타나 있음. [향약집성방]에서는 인후통에 효과가 있음을, [동의보감]에는 허파, 목, 코, 가슴의 병을 다스리고 별레의 독을 완화시키는 것으로, [본초서] 약용편에서는 천식과 인후통, 코막힘병, 치통, 폐농양, 설사, 복통 등을 다스리며, 충독을 없애고 피를 맑게 하는 것으로 나타나 있다. 또한 현대의학적인 관점에서 연구된 도라지의 약리효능으로는 뇌신경세포 보호효과, 항 비만효과, 간 기능 보호 효과, 면역기능 조절 활성화 및 세포독성 등이 보고되고 있다.

생리활성 배당체는 동물의 장 내에 존재하는 수많은 미생물들이 지니고 있는 효소에 의해 비

배당체로 전환되어 흡수된다. 이때, 기질에 포함된 당의 종류 및 결합된 형태 및 섭취자의 장내 미생물 환경에 따라 이들 배당체의 전환효율은 변화하기 때문에, 그 생리활성 역시 달라진다 (Hein et al., 2008). 특히 인삼사포닌과 같은 배당체 화합물에서 결합된 당의 종류와 수, 결합의 형태 및 다른 배당체와 상호작용 등은 이들 물질을 섭취했을 때의 생체이용능 및 생리활성에 영향을 미치는 주요 인자이다.

도라지를 이용하여 발효 대사체를 만드는 가장 일반적인 방법은 장내세균 (프로바이오틱스 미생물과 GRAS식용 미생물 등)을 동정하여 이것을 생약 추출물에 넣고 발효시키는 방법이 있는데, 장내세균은 대장과는 다른 환경인 발효조에서는 잘 자라지 않아 혐기발효를 해야 하는 단점이 있다. 다른 방법은 장내세균이 분비하는 효소인 β -glucosidase, α -glucosidase, β -galactosidase, α -arabinofuranosidase, β -fructofuranosidase, α -mannosidase α -rhamnosidase 등과 신규 배당체를 만들 수 있는 glucosyl transferase와 galatosyl transferase 등을 엔약제와 함께 넣고 반응을 시켜 당과 어글루콘과의 글리코시딕 결합 (glycosidic bond)으로 연결되어 있는 결합을 끊거나 전환하는 것인데, 이 경우에는 세균 내에 여러 종류의 glycosidase가 있으므로 원하는 전환물로 바꿀 수 있는 것을 선택적으로 사용해야 하며 효소는 자신이 최적으로 반응 시킬 수 있는 조건을 확립해야 하는 문제가 있다. 이러한 과정을 복합적으로 이용하거나 물리 화학적 방법을 추가하여 당을 제거하고 원하는 대사체를 얻어내는 공정을 이용하는 연구가 많이 진행되고 있다.

이와 같은 목적의 연구로는 물리, 화학적 방법을 통해 배당체의 이용성을 향상시키고 독성을 경감시킨 홍삼관련 제품을 들 수 있는데, 이러한 처리를 통해 만들어진 비배당체 산물은 그 비특이적인 반응 특성으로 인해, 원하는 활성 물질의 생산을 분석하고 조절하는 데 어려움이 있으며, 부가적으로 발생될 수 있는 독성물질의 제어에 제약이 있다. 그러나, 이들 배당체를 특이적으로 전환할 수 있는 효소적인 방법을 통해 전환한 경우, 목적으로 하는 비배당체를 선택적으로 생산하는 것이 용이하며, 비차별적인 화학결합의 파괴로 인한 독성물질의 생산으로 식품의 안전성이 위협받는 것을 막을 수 있다.

앞으로는 개인의 연령과 성별, 건강상태를 고려한 맞춤형 제품을 통해 필요한 기능성 성분을 공급하는 형태로 발전해 나갈 것으로 예측되며, 소비자들이 더욱 편리하게 건강기능식품을 복용할 수 있도록 복합기능성 제품이 등장할 것으로 예상된다. 최근 1인 가구 증가 등 독립된 생활을 하는 기간이 증가함으로 인해 건강 관리에 대한 관심 증가하고 있고, 과거 표준화된 제품과 단순한 건강관리 차원의 건강기능식품을 넘어 피부 미용 및 개선, 노화방지에 이르기까지 각 연령별 특성에 맞는 다양화된 제품 생산 형태로 변화할 전망이다. 소비자의 요구에 따른 새로운 기능성 원료를 이용한 개별인정형 제품의 시장이 새롭게 부각되고 있다.

개별인정형 건강기능식품의 성장 요인은 우리 사회의 음주문화 등으로 간건강 제품에 대한 소비 수요 증대, 일본 방사능 유출, 환경오염, 자외선 등으로 인한 면역기능이나 피부건강에 대

한 소비자 관심 증가에 의한 것이다. 천연물 건강기능식품은 합성 기능식품에 비해 부작용 및 독성이 없어 수요가 점차 증가하는 추세이며, 건강기능식품 시장의 증대를 통해 국내 우수 건강기능식품 개발을 촉진하는 효과와, 이를 통한 국내 우수 건강기능식품 소재 산업을 활성화시키는 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단된다. 또한 최근 경제와 사회가 발전하면서 신체 활동량의 감소와 식생활이 서구화되어 식이섬유가 적고 지방과 콜레스테롤 함량이 높은 음식물의 섭취가 증가하고 있으며, 그 결과 국민 3명 중 1명이 비만이며 이로 인해 각종 질병이 발생하고 이에 따른 사회적 비용이 천문학적으로 늘어나고 있는 현실이며, 이에 대한 연구가 시급히 필요하다.

제2절 연구개발의 목적

최근 기능성물질에 대한 관심고조로 발효식품에 기능성물질을 첨가해 기능성을 증대시킨 건강 기능 제품들이 출시되고 있으나, 아직도 국내 발효식품 시장은 생산 방식에 있어서 자연 발효에 대한 의존도가 높고, 원천기술특허가 부족하여 세계 시장에 진출하기에는 많은 문제점을 내포하고 있다. 그러므로, 이미 충분한 선행연구를 통해 확보하고 있는 세계적 top수준의 미생물 발효산물을 이용한 새로운 개념의 기능성 식품 생산기술 개발 및 상품화하는 연구가 필요하다. 그리고, 이러한 연구개발은 정부-대학-연구소-기업 간의 긴밀과 기술개발 시너지 효과를 극대화하여 특화된 신개념 건강 기능성식품을 생산 할 수 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 우리의 전통식품인 발효식품을 세계적인 건강기능성 식품으로 알리는 산업화하는 차원을 넘어서, 생명공학 기술을 접목하여 무한한 가능성 산업인 신바이오 산업으로 도약할 수 있는 계기를 마련할 수 있을 것이다. 특히 오랜 역사와 함께한 우리의 전통식품으로부터 유래한 녹색 기능성식품 신소재는 우리 고유자원이라는 점에서 시장 독점성을 갖게 된다. 또한 전통발효식품의 건강식품으로서의 잠재적 브랜드 가치를 고려할 때, 고부가가치성, 건강 기능, 안전성 등을 두루 갖추어, 발효식품으로부터 녹색 기능성식품 신소재산업 육성은 지역기반 산업이 세계적 다국적 산업으로 발전가능성이 큰 신성장 동력 산업이다.

현재 선진국의 개발 방향을 고려할 때 현재까지 보고된 여러 기능성 식품의 유효성분 특성을 바탕으로 건강 기능 발효식품을 개발하고, 그에 대한 임상학적 추가실험이 진행된다면 고부가가치 창출이 가능한 제품화에 성공 가능성이 높을 것으로 판단된다. 또한 고도 가공 기술이 건강 기능 발효식품 분야에 접목되면, 바이오산업 활용에 있어 대표적인 기반 산업이라고 할 수 있는 발효산업 등은 규모 및 기술 측면에서 세계 우위를 선점할 수 있을 것이다. 이러한 기반 지식만이 세계 경쟁력을 지닌 우리만의 자원이라는 측면에서 단순한 전통식품의 첨단화, 세계화라는 차원에서 더 나아가 경쟁력 있는 국가 기반지식 확충에도 그 의의가 있다. 결론적으로 본 연구 사업단에서는 콜레스테롤, 중성지방, 혈압, 혈당 개선 및 다이어트(비만억제)에 탁월한 효과를 갖고 있는 *Monascus* 속의 대량발효 및 천연배지의 개발에 의한 비만 억제물질 및 간 기능개선 물질의 대량 생산 및 분리, 추출, 정제방법 개발, 세포와 동물실험에 의한 효능평가와 메카니즘 규명과 임상시험 연구에 의한 개별인정을 받아 비만과 간 기능개선에 탁월한 효과가 있는 건강 기능 식품 개발 및 제품화를 목표로 설정하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

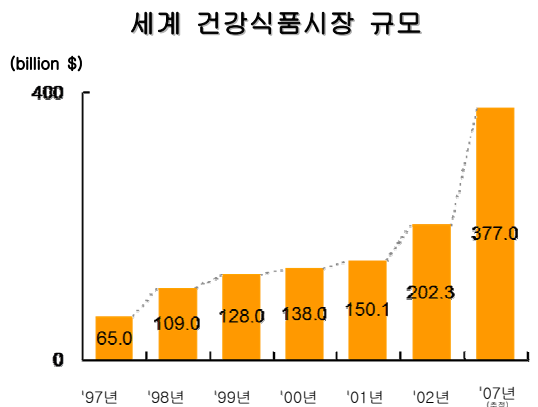
식생활 및 경제여건의 발달로 식품의 일차적 기능인 영양과 이차적 기능인 맛과 조직 감에 대해 21세기는 식품을 1, 2차적인 단순한 기능을 넘어서 생체조절기능에 대한 관심이 집중되고 있다. 특히 과거와 달리 만성질환으로 인한 사망자가 늘면서 치료보다는 예방이 중요하다라는 인식이 널리 퍼지고 있으며, 로하스 및 웰빙 추구 등을 통한 삶의 질을 높이려는 욕구가 건강기능식품의 구매로 이어지면서 시장이 지속적으로 성장하고 있다.

미국과 일본을 중심으로 지난 10년간 막대한 국가예산을 투입하여 연구개발을 독려해왔으며, 이에 따른 정책에 힘입어 건강기능식품의 세계시장은 놀라운 성장을 지속하였다. 세계시장규모는 통계기관별로 다소 차이는 있지만 1997년 650억 달러, 2002년 2,023억 달러로 높은 성장률을 나타내었으며 2007년에도 3,771억 달러(2002년 대비 86% 증가)에 달할 것으로 예상된다. 또한 의료비 증가에 따른 국가 부담가중, 노령화 사회 진입, 소비자의 건강관심 고조, 식품산업계의 신제품 개발 방향 등을 고려할 때 건강기능식품의 수요는 지속적으로 증가될 것으로 전망되고 있다. 세계 건강식품 시장은 10%이상의 고성장 추세이며, 미국(35%) > 유럽(32%) > 일본(18%) > 기타 아시아(6.9%) > 한국(0.5%) 순이다. 현재 가장 급성장 신흥시장은 중국이며, 개발도상권 국가의 소득증대, 건강식품투자 증가, 소비량 증가로 인한 고성장 예상되고 있다.

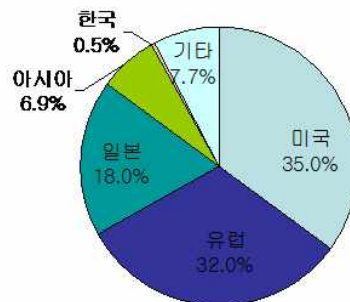
< 연도별 기능성식품 시장현황 >

년도	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2007
시장 규모 (억 달러)	650	1,090	1,280	1,380	1,501	2,023	3,771

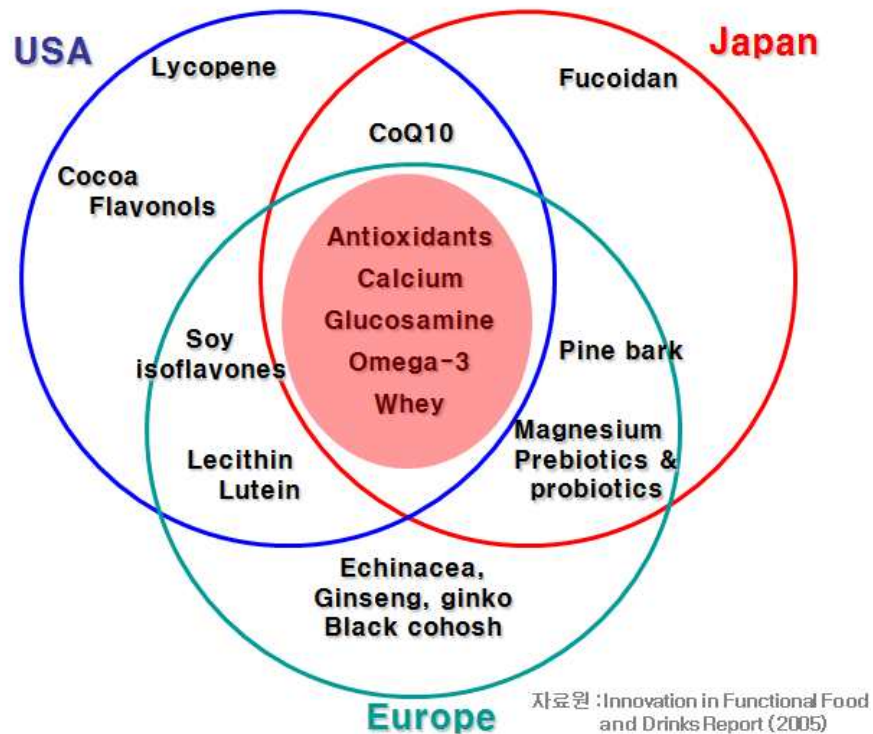
(출처 : Nutrition Business Journal 2003 Food Technology USA, 2003)



각국의 건강식품시장의 국가별 비중



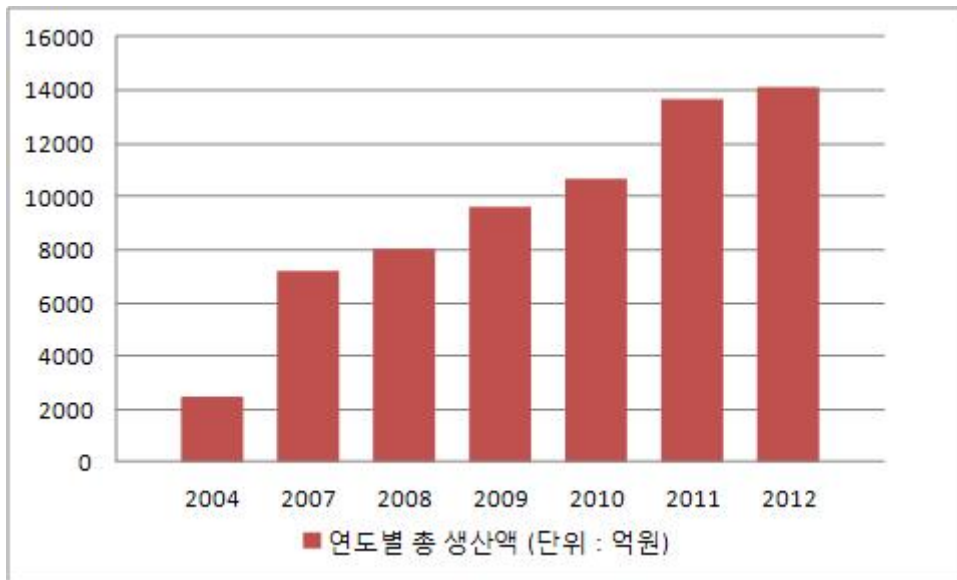
◆ 세계 건강식품시장 주요 소재 (미국, 유럽, 일본)



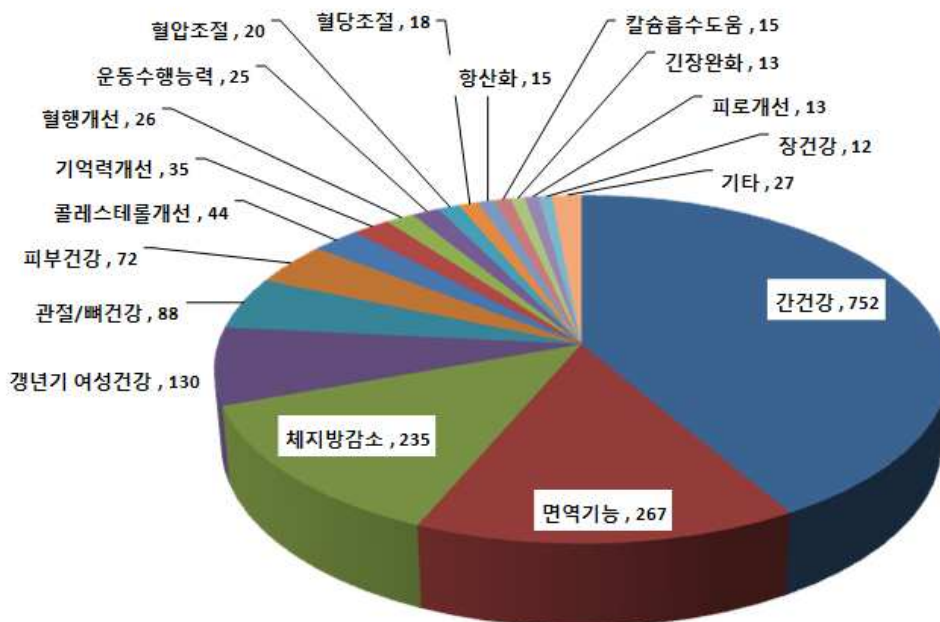
고령사회 진입에 따른 건강기능식품산업 성장전망에 따르면, 베이비부머 은퇴에 따른 고령인구의 급속한 확대, 노인인구의 증가로 건강기능식품 및 고령친화 제품 등 새로운 식품의 영역으로 부각되고 있으며, 만성질환 예방 등 건강한 고령 생활을 위한 식품개발 촉진되고 있다. 식품의약품안전청은 ‘2011년 건강기능식품 기능성원료의 개별 인정 현황을 분석한 결과, 국내 개발 비중은 점점 증가세를 나타내고 있다고 보고하고 있으며, 이는 건강기능식품 개발에 대한 노하우가 축적되고 국내 연구개발 인프라가 지속 발전하고 있는 데 따른 것으로 분석된다. ‘2011년 인정된 기능성 원료 총 42건 중 국내 개발 원료는 12건으로 국내 개발 비중이 ‘2008년 이후 증가하는 추세이며, 2012년도 인정된 기능성원료를 사용하여 제품화된 건강기능식품은 혈행개선/기억력개선(62품목), 간건강(57품목)이 가장 많았으며, 체지방감소(51품목)·피로개선(26품목)·관절/뼈건강(18품목)·갱년기여성건강(15품목)·혈중중성지방 개선(5품목)·긴장완화(4품목) 등 다양한 제품이 개발되었다. 최근 개별인정형 건강기능식품은 꾸준한 상승세를 나타내고 있으며, 새로운 기능성 원료를 사용한 ‘개별인정형’ 건강기능식품의 2012년 생산실적은 1,807억원으로 ‘11년 1,435억원에 비해 26% 증가한 것으로 나타났다. 특히 제품별로는 헛개나무과병 추출분말 (간 건강)이 전체 27.8% (502억원)을 차지하여 가장 많았으며, 그 뒤를 이어 당귀혼합 추출물 (면역기능)이 13.6%(245억원), 그린마떼 추출물 (체지방감소)이 8.1% (147억원), 밀크씨슬 추출물 (간건강)이 7.5% (135억원) 등이다. 개별인정형 건강기능 식품

중에 2012년도에 가장 높은 성장세를 보인 제품은 체지방 감소 제품으로 201.2% (78→235억원)이었으며, 갱년기 여성 건강 103.1% (64→130억원), 간 건강 41.6% (531→752억원) 등의 순이었다. 이들의 급성장 요인은 젊음을 유지하고 싶은 욕구 증대와 몸매관리를 중시하는 사회적 환경 때문인 것으로 풀이된다.

◆ 연도별 건강기능식품 생산실적



◆ 개별인정형 건강기능식품 기능성 별 생산실적('12년/억원)



세계인구 중 약 25%에 해당하는 17억명이 현재 과체중이고(BMI >25)이고, 주요시장인 미국, 유럽, 일본의 1억2천명을 포함한 서구지역의 3억명 이상이 비만환자(BMI >30)로 분류되고 있다. OECD국가 중에서 비만율이 가장 높은 나라는 미국으로, 전 국민의 31%가 비만환자이고, 그 다음이 멕시코(24%), 영국(23%), 그리스와 호주(22%), 뉴질랜드(21%), 헝가리(19%), 캐나다(14%), 스페인, 아이랜드, 독일, 포르투갈, 핀란드(13%), 터키와 벨기에(12%)의 순으로 전체 인구 중 비만환자 비율이 높게 나타나고 있으며, 중국은 7천만 명이 비만인구이고, 급속도로 체중조절 관련시장이 확대되고 있으며, 총 시장규모는 100억 위안 정도로 예측하고 있다. 비만은 식욕요법, 운동요법과 행동수정요법을 병행해야 최상의 치료효과를 거둘 수 있으나, 많은 시간과 노력이 많이 소요되기 때문에, 비만치료제 또는 다이어트제품이 많이 이용되고 있다. 현재 국내외에서 판매되는 비만치료제로는 미 FDA에서 승인을 받은 올리스타트(Orlistat)를 주원료로 하는 제니칼(한국로슈), 시부트라민(sibutramine)을 원료로 하는 리덕틸(일성신약), 그리고 녹차 카테콜 성분을 원료로 하는 '엑소리제(구주제약) 등이 있다. 리파아제 작용을 억제하는 제니칼의 경우 지방변, 장내가스 발생, 복부팽만감 등의 부작용이 있고, 리덕틸은 교감신경계의 세로토닌과 노르아드레날린 농도를 증가시킴으로서 두통, 구갈, 식욕부진, 불면, 변비 등의 부작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 이외에도 올리스타트는 비타민 E 와 D의 흡수를 억제하고 펜터민(phentermine)과 시부트라민은 심박수 증가, 심계항진 또는 현기증을 초래하는 부작용이 있으며, 합성의약품의 부작용과 만성질환의 극복에 서양의 학이 한계를 보임에 따라 천연물 신약이나 건강기능성 식품의 체중조절 기능성 가치가 새롭게 부각되고 있다.

홍국균은 예로부터 중국, 대만, 한국 및 일본의 동아시아 국가에서 홍국제조에 사용되어 왔으며, 본초강목에서 홍국을 약성을 완화하고 독성이 없으며 소화불량 설사를 다스리는데 유용하며 혈액순환을 촉진하고 소화기능을 튼튼히 한다고 기재되어 있었으며, 산업적으로 제조되기 시작한 것은 1970년대부터 식품첨가물 중 일부 타르계 합성착색료의 안전성이 제기되면서 홍국의 천연색소로서의 소비량이 매년 증대되었다. 최근 과학적 연구로 입증된 홍국의 약리효능은 콜레스테롤 생합성 억제작용, 항균효과, 암예방효과, 혈압강하효과 등이 있으며, 홍국에는 monacolin (statin)이 함유되어 이것들은 콜레스테롤합성경로의 HMG-CoA reductase를 저해시켜 혈중콜레스테롤을 저하시키는 작용외에 그 과정에 있어서 mevalonic 산 cascade의 중간대물의 생성을 저해시켜 혈중 NO생산 증대, 항산화성 활성화, 혈구응집억제를 통한 혈행개선 등 다면적 작용을 갖는 것으로 알려져 왔다.

고지혈증은 지방대사가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중에 중성지방과 콜레스테롤이 증가한 상태로 비만에 동반하여 쉽게 나타나는 증상이며, 고혈압, 동맥경화, 심근 경색 등 심혈관계질환의 유병인자로 알려져 있어서 서 고지혈증을 조절은 동맥경화, 심근경색, 협심증 등 관상동맥질환의 발생 예방에 큰 도움이 될 것이다. 특히 한국의 고콜레스테롤증(만 30세

이상)은 1998년 10.0%, 2009년 11.8%으로 증가하였고 50대 이후에는 성별에 따른 차이가 뚜렷하여 여자의 유병률이 더 높음. 고중성지방혈증 유병률은 1998년 10.2%에서 2009년 16.9%으로 증가하였으며, 남자가 여자보다 더 높으며, 50대가 가장 높은 것으로 조사되고 있다.

최근 식품소재로 유망한 홍국의 보급을 도모하기 위한 목적으로 여러 가지 연구가 수행되어 왔으며, 특히 홍국균에서 기능성 물질을 효율적으로 생산할 수 있는 배양법이나 기능성 물질인 색소, 항균물질, GABA, monacolin K 등의 기능성 물질을 이용한 식품소재개발에 관한 연구가 이뤄졌으나, 주로 고지혈증 개선 및 혈압조절 등의 기능성에 관한 연구가 대부분이었으며, 비만개선 및 간기능 개선 등의 기능성에 대한 연구는 전무한 실정이다.

국내에서 홍국을 생산 및 판매하고 있는 업체는 에프엔비, 마이코 및 (주)한스바이오 등 대학 연구자 중심으로 타 식품가공업체에 비하여 특이한 구조로 형성되어 있다. 홍국에 대한 홍보 및 인식 부족 등으로 인하여 시장이 크게 형성되지 못한 실정이다. 100% 홍국을 원료로 한 “콜파워”를 보령제약에서 출시하였는데, 홍국균으로 발효시키는 과정에서 생성되는 유효성분인 Monacolin K(lovastatin)가 콜레스테롤의 합성을 효과적으로 조절하는데 연구들을 통하여 그 유용함이 입증됨에 따라, 건강기능식품 시장에서 치료보조용 홍국 제제가 시장을 형성하면서 파나넥스의 “콜레스틴”, 서울 제약의 “하이포콜”, 태평양 제약의 “콜레스탑” 및 종근당의 “홍국플러스” 등이 경쟁을 하고 있다. *Monascus*관련과제는 한국식품개발연구원에서 “*Monascus*속 산물의 생리활성을 이용한 기능성 식품 제조기술 개발” 수행으로 “(주)제네티카”로 산업체 기술이전 하였다. *Monascus*관련 산업재산권 출원 및 등록현황은 한국식품개발연구원 (류미라) “*Monascus*속 산물의 생리활성을 이용한 기능성식품 제조기술 개발(산업이전)”, “*Monascus*속 산물의 생리활성을 이용한 기능성식품 제조 기술 개발 - 홍국을 이용한 일산화질소 생성체 조성물 및 이를 이용한 약품 조성물”(특허출원)이 있다.

국내성인 10명 중 3명은 지방간 증상을 갖고 있는 것으로 나타났으며, 2010년 삼성서울병원 소화기 내과에서 지방간 내원 환자 비율을 조사한 결과 전체 연령대 중 30대가 35.8%, 40대 34.3%, 50대 30.6%, 60대 24.6%, 20대 24.1% 순으로 나타나 30대 연령의 지방간 비율이 가장 높게 나타났으며, 대한간학회가 1988년부터 2007년까지 건강검진을 받은 성인 75만 명의 정보를 분석한 결과, 당뇨병 환자의 65%, 고혈압 환자의 48%, 대사증후군 환자의 36%가 지방간을 앓고 있는 것으로 나타나, 대사증후군 및 고혈압, 당뇨병, 지방간 등을 해결해야 할 건강기능식품에 대한 사회적 필요가 높은 것으로 보인다. 현재 식품의약품안전청에서 간기능 개선에 도움을 주는 건강기능식품으로 인정되는 기능성 원료로는 밀크시슬추출물, 브로콜리 스프라우트 분말, 표고버섯 균사체, 표고버섯균사체추출물, 복분자 추출 분말, 헛개나무 과병 추출물, 유산균발효다시마추출물 등이 있다.

	기능성 식품	의약품
특징	<ul style="list-style-type: none"> 식약청 인정 원료 헛개나무 열매꼭지 추출물, 표고버섯 균사체 추출물, 밀크시슬 추출물(3종) 	<ul style="list-style-type: none"> 의약품시장 : ETC제품과 OTC제품 OTC제품 : 담석치료제와 간보호제품
제품	<ul style="list-style-type: none"> 주요 건강기능식품 <ul style="list-style-type: none"> - 쿠퍼스(야쿠르트) - 헬프칸(CJ뉴트라) - 헤파칸(일진제약) - 헤파글루칸(대웅제약) - 헤파밸런스(보령제약) 헛개나무 추출물 제품과 표고버섯균사체 추출물 제품 각 3품목씩 	<ul style="list-style-type: none"> 주요 간기능 개선제 <ul style="list-style-type: none"> - 우루사 - 레가론 - 실리만 - 헤파텔즈 - 헬민
매출	헛개나무 추출분말 : 2010 생산실적 44억원	'07년 1,679억원 규모, 연평균 20%성장

도라지는 한국, 중국, 일본, 대만 및 러시아 등의 동아시아에서 분포한다. 초롱꽃과인 다년생 식물이며, 뿌리를 길경이라하여, 한국과 중국에서는 주로 한약재로 이용되고 있으며, 민간에서는 산채 및 나물등의 식재료로 이용되고 있다. 한방에서는 도라지 뿌리를 분말로 가공하여 기관지염, 거담제로 이용되어져 왔으며, 진정, 해열, 진통에 대한 주요 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 도라지의 주요성분으로는 테르펜계 사포닌인 polygalacin, prosapogenin, platycogenic acid A, B, C, polygalacic acid, platycodin A, C, D 등이 있으며, 그 중 주요 약효성분은 platycodin D로 알려져 있다. 이외 inulin, betulin, stigmasterol 등의 성분이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다. 도라지는 식용, 약용, 산업용 등 다양한 산업분야에서 가치가 인정되고 약용작물로 평가 받음에 따라 재배면적 및 생산량이 점차 증가하고 있으며, 이를 이용한 다양한 활성평가에 대한 연구도 진행되고 있다.

인삼, 영지, 도라지, 유향 등과 같이 사포닌 (특히 triterpenoid)들의 함량이 높은 식품들의 생물학적 효과는 오래전부터 알려져 왔다. 지금까지 약 30,000개의 천연 테르펜계 화합물이 확인되었으며, 생물학적 활성을 가진 천연물의 관점에서 triterpenoid들과 이들의 유도체들에 대한 약리학적인 연구는 항암, 항염증, 간장보호기능, 진통, 항균, 항진균, 항바이러스, 면역조절, 강장 등의 광범위한 분야에 걸쳐 있다. 이 화합물들은 현재에도 간염, 기생충과 원충감염의 예방과 치료에 사용되고 있다. 그러나 실제로 triterpenoid계 화합물들의 용혈 및 세포 증식 억제성과 관련된 독성 때문에 현재 진행 중인 천연물의 추출, 분리, 정제와 약리작용에 대한 연구에 더하여, 독성이 낮고 치료효과가 증강된 유도체들의 합성도 새로운 연구개발 분야로 등장하고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 *Monascus*속 발효산물을 이용한 비만 및 간 기능 개선 기능성 식품개발

1. *Monascus*속 발효에 의한 검정콩 발효산물의 비만 및 간기능개선 원료 대량생산 공정개발

가. *Monascus*속 발효에 의한 검정콩 발효산물의 비만 및 간기능 개선 원료의 생산

(1) 균주 및 재료

실험에 사용한 균주는 한국종균협회에서 분양받은 *Monascus pilosus* KCCM 60084, *M. pilosus* IFO4480, *M. ruber* ATCC22080, *M. kaoliang* KCCM 60154를 사용하였으며 검정콩과 통밀, 식용밀기울, 쌀가루 등을 실험재료로 사용하였다. 그 중 *Monascus pilosus* KCCM 60084를 사용하여 검정콩 대량 배양을 실시하였다.

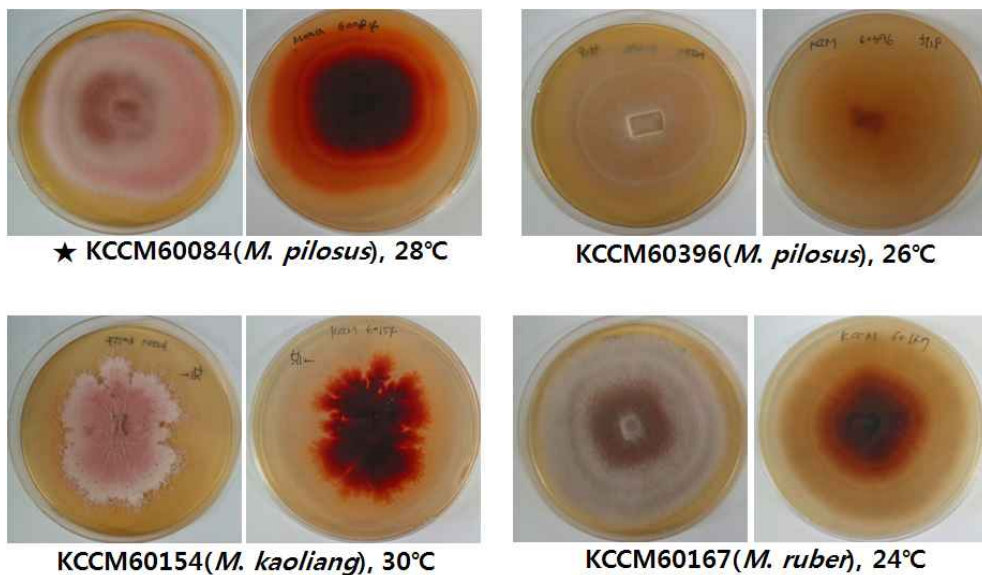


Fig 1. *Monascus* spp.의 PDA 배지에서의 배양형태

(2) 종균 배양

먼저 모든 균주들을 PDA배지(potato dextrose agar, Difco, MI, USA)를 이용하여 28°C에서 4일 배양한 다음, Modified Mizutani 배지(쌀가루2.0g, glucose 3.0 g, peptone 2.0 g, KH₂PO₄

0.8 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, sodium nitrate 0.2 g, NaCl 0.1 g, d-water 100 mL, pH 6.0)(Youn *et al* 2003)를 넣은 캡시험관에 활성화시킨 균주(*Monascus pilosus*)를 이식하여 28°C의 shaking incubator(150 rpm)에서 10일간 통기 배양하여 스타터로 사용하였다.

(3) 검정콩 홍국발효산물 생산

검정콩을 이용한 시료의 제조방법은 세척한 후 1내지 3배수의 물에 10~18시간 동안 침지시킨 다음 여분의 물기를 제거한 후 그대로 증자하는 방법, 침지시킨 콩을 분쇄하여 증자하는 방법, 콩을 분쇄하여 가루로 만든 다음 수분을 30~60% 첨가하여 증자하는 방법, 콩을 침지한 후 싹을 낸 후 분쇄하여 증자하는 방법을 모두 포함하여 제조된 시료에 modified 미주타니 배지에 배양한 홍국 종균을 5~10% 첨가하여 24~30°C에서 10~50일 발효시킨 다음 40~60°C로 열풍 건조한 후 분쇄하여 홍국검정콩 발효물을 얻었다.



Fig 2. 홍국균 (*Monascus pilosus* KCCM 60084)을 이용한 발효 검정콩

(4) 총 폴리페놀 함량

Dewanto 등(32)의 방법에 따라 시액 100 μ L에 2% sodium carbonate 2 mL과 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 μ L을 가한 후 720 nm에서 흡광도를 측정하였으며 gallic acid(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 검량선에 의하여 함량을 산출하였다.

(5) 전자공여활성 (electron donating ability)

Blois(1958)의 방법에 따라 시료 추출액 0.2 mL에 0.4 mM DPPH (1,1diphenyl-2-picryl-hydrazyl)용액 0.8 mL를 가하여 vortex로 혼합하고 10분간 방치 한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, 전자공여능(%) = 100 - [(OD of sample/OD of control) x 100]에 의하여 활성도를 산출하였다.

(6) 수퍼옥사이드디스뮤타제(superoxide dismutase: SOD) 유사활성

Martin 등 (1987)의 방법에 따라 0.1mM EDTA 함유 50mM 인산완충액(pH 7.4) 2.94 mL에 시료 일정량을 가해 25°C에서 5분간 가온한 다음 5mM hematoxylin 용액을 가해 10분간 반응시켜 560nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성도는 hematoxylin의 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 계산하였다.

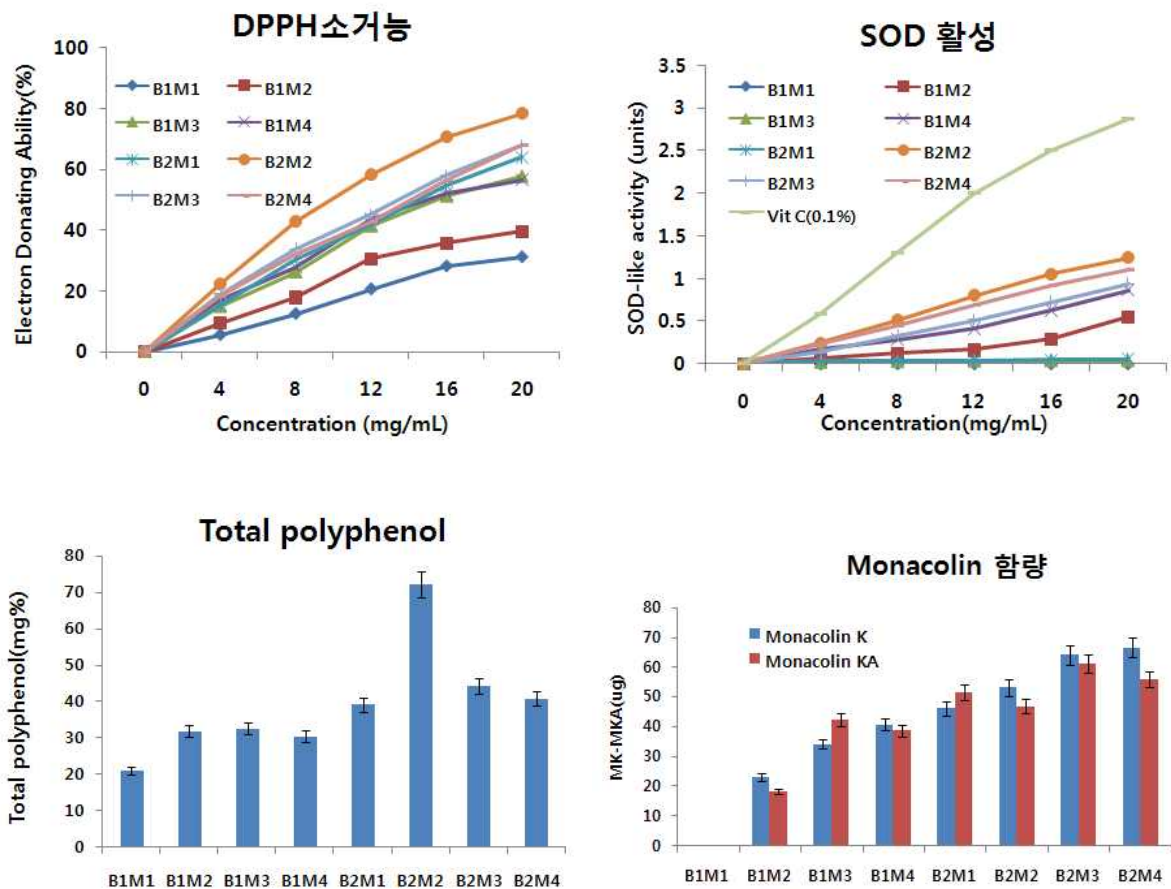


Fig 3. 발효공정 (수분 60%, 10일배양)에 따른 DPPH소거능, SOD활성, total polyphenol, monacolin 함량변화

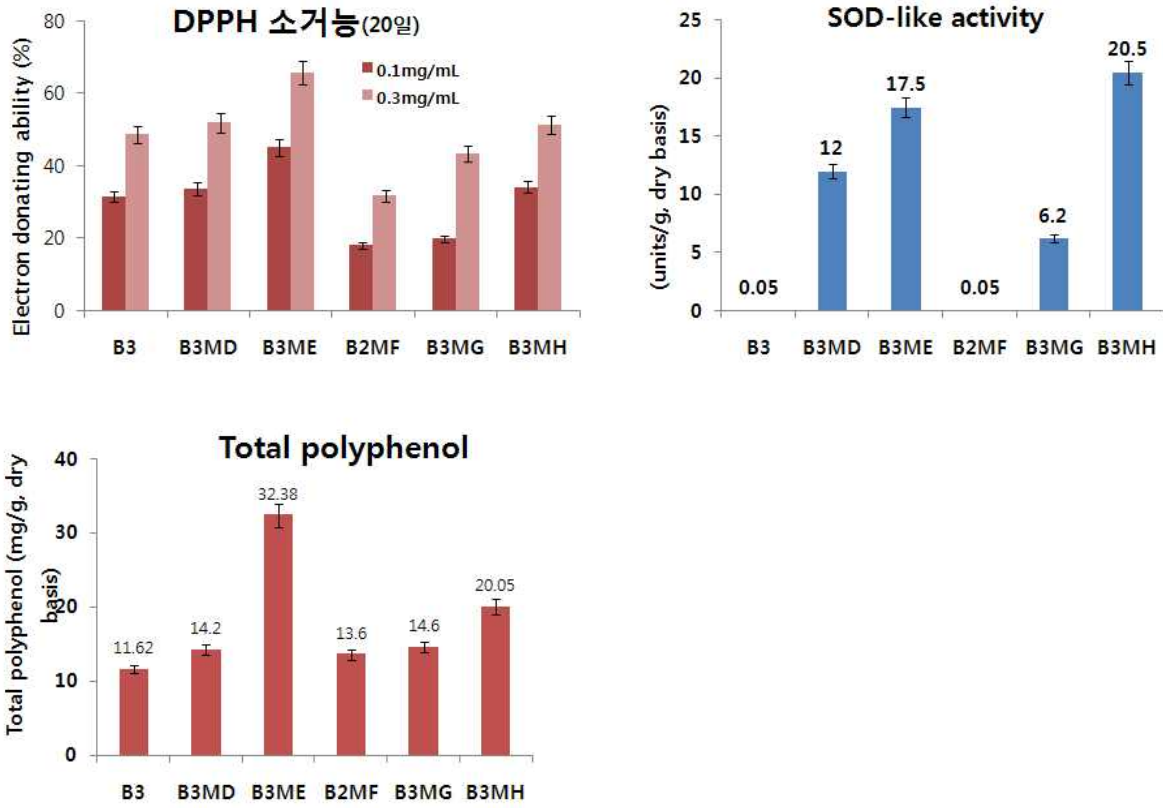


Fig 4. 발효공정 (수분 40 or 60%, 20~30일 배양)에 따른 DPPH소거능, SOD활성, total polyphenol, monacolin 함량변화

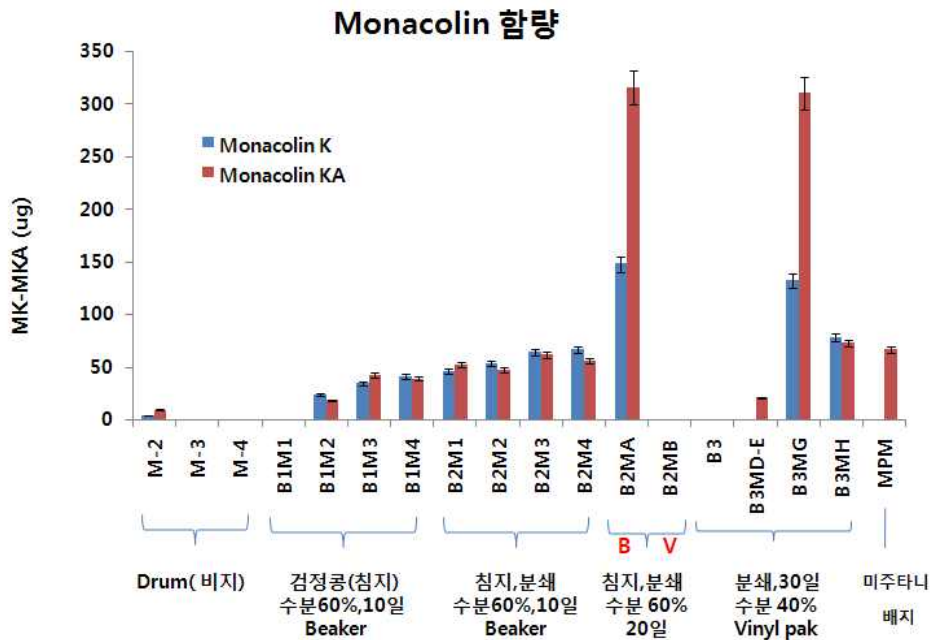
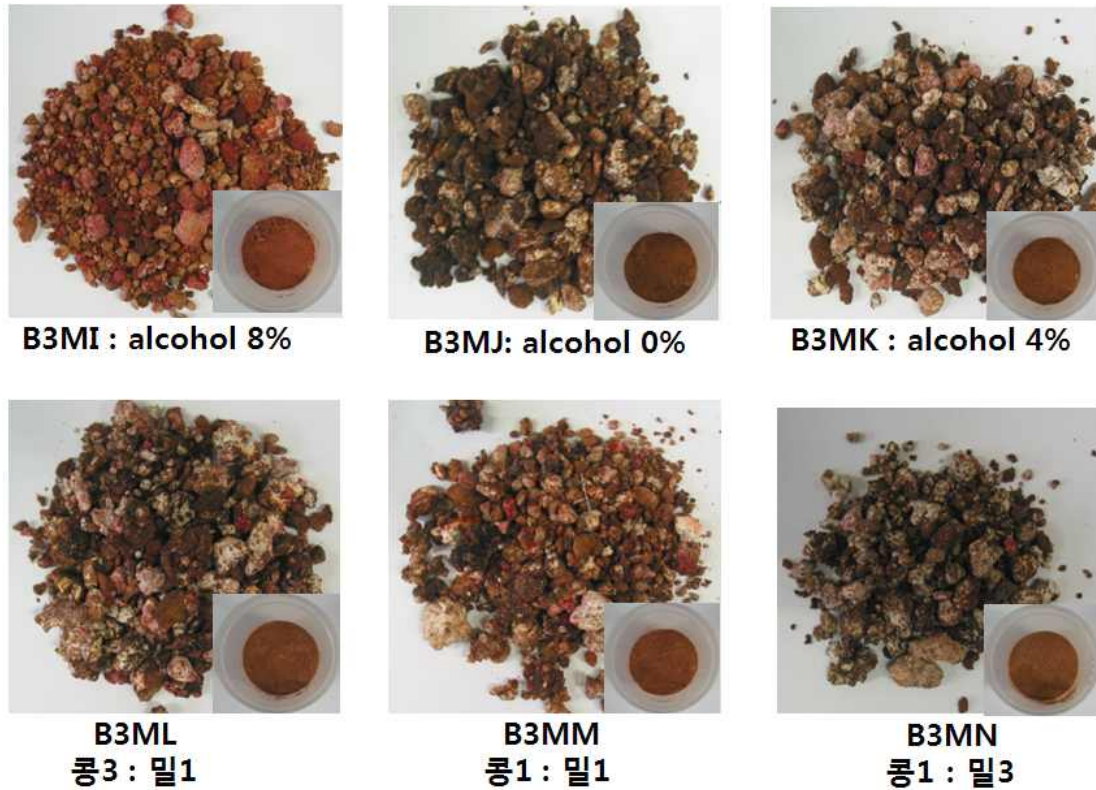


Fig 5. 발효공정에 따른 monacolin 함량변화



Vinyl pak : 28°C, 수분 40%, 종균 30%, 20일 배양

Fig 6. 발효공정에 따른 홍국균 발효검정콩의 최종배양산물

나. 홍국발효 검정콩 추출물 중 Monacolin K (MK)과 Monacolin K Acid form (MKA) 함량시험 및 실험동물에서의 비만 억제효과

(1) 시험용액의 조제 (MK)

시험용액 조제는 Monacolin K(Monacolin K lactone form, ChromaDex Inc. USA) 5 mg 을 정확히 취하여 MeOH로 정확히 50 ml로 정용, 시험용액으로 하였다. 표준 용액 (각 100 μg /ml)을 MeOH로 희석하여 6 농도의 시험용액을 조제하였다. 시험용액에서의 농도는 24.54, 9.82, 4.91, 2.45, 1.23, 0.49 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 하였다. 시험용액을 각각 0.45 μm membrane filter 로 여과한 후 20 μl 를 취하여 HPLC에 주입하여 분석하였다.

(2) 실험동물에서의 비만억제효과

검정콩 홍국 발효물을 항비만 효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 4주령이 된 평균체중 21~24g, CrljOrli;CD1 (ICR) 계통의 SPF/VAF outbred mice를 (주)오리엔트바이오(성남시, 경기도, 한국)으로부터 구입하여 일주일간 기본식이 만을 공급하여 환경에 적응하게 하였다.

기본식은 5L79 Rat/Mouse Formula 18%(PMI Nutrition LLC, Po Box 19798 Brentwood

Mo63144, USA)로 crude porotein(minimum) 18%, crude fat(minimum 5%, fiber(maximum) 5%, ash(maximum) 8%, carbohydrate 64%인 것을 사용하였다.

7일간 환경에 적응시킨 실험동물은 무작위로 6마리씩으로 구분하여 정상군(기본사료 급여군 : NC), 고지방식이 대조군(기본사료에 라이드 37.54% 함유, 기본사료에 함유된 지방 포함 : HC), HC+Biji급여 군(라이드 37.54% 및 비지 2%함유: Biji), HC+M2급여군(라이드 37.54% 및 M2 2% 함유: MA), HC+B3MG 급여군(라이드 37.54% 및 B3MG 2%함유: B3MG)의 5개군으로 구분하였다.

Table 1. 실험군별 식이 성분

Ingredients	Experimental groups ¹⁾				
	NC	HC	BIJI	MA	B3MG
Pellet stew (5L79 diets)	1,000	625	605	605	605
Lard	-	375	375	375	375
Biji	-	-	20	-	-
MA	-	-	-	20	-
B3MG	-	-	-	-	20

- NC, normal control group; HC, high fat control diet; BIJI, high fat +Biji.; MA, high fat +M2; B3MG, high fat +B3MG.

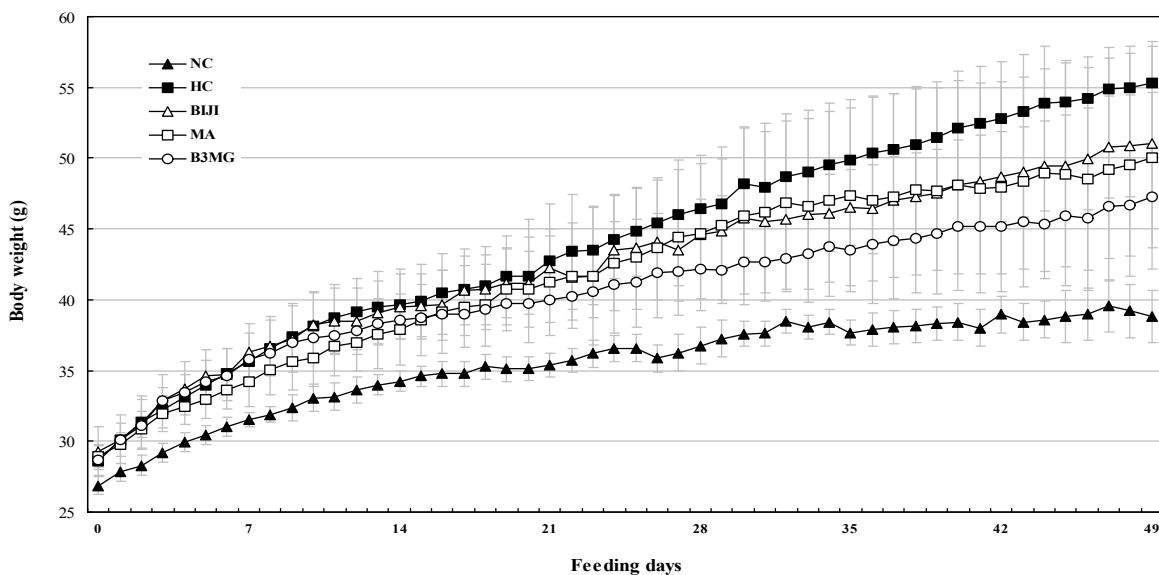


Fig. 7. Effects of bean products fermented by *M. pilosus* on the changes in body weight of mouse fed a high fat supplemented diet for 7 weeks. NC, normal control group; HC, high fat control diet; BIJI, high fat +Biji.; MA, high fat +M2; B3MG, high fat +B3MG

(3) 고지방 식이에 의한 간 조직의 GSH, LPO 함량 변화와 부고환 주변 지방함량

고지방 고콜레스테롤 식이로 유도한 비만 쥐에 대하여 7주간 실험 식이를 급여한 흰쥐 간 조직의 GSH (glutathione)의 함량은 Ellman (1959)의 방법에 따라 일정량의 간 조직 마쇄균질액에 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)를 가하여 생성되는 thiophenol의 흡광도를 측정하였으며 간 조직 g당 환원형 GSH μmole 로 나타내었다. LPO (lipid peroxide)의 함량은 Ohkawa 등 (1979)의 방법에 따라 일정량의 간 조직 마쇄균질액에 thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가하여 반응시킨 후 n-butanol을 가하여 이행되는 TBA-reactive substance를 흡광도 532 nm에서 측정한 다음 분자흡광계수 ($\epsilon=1.5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)를 이용하여 함량을 산출하였으며 간 조직 g 당 malondialdehyde nmole로 나타내었다.

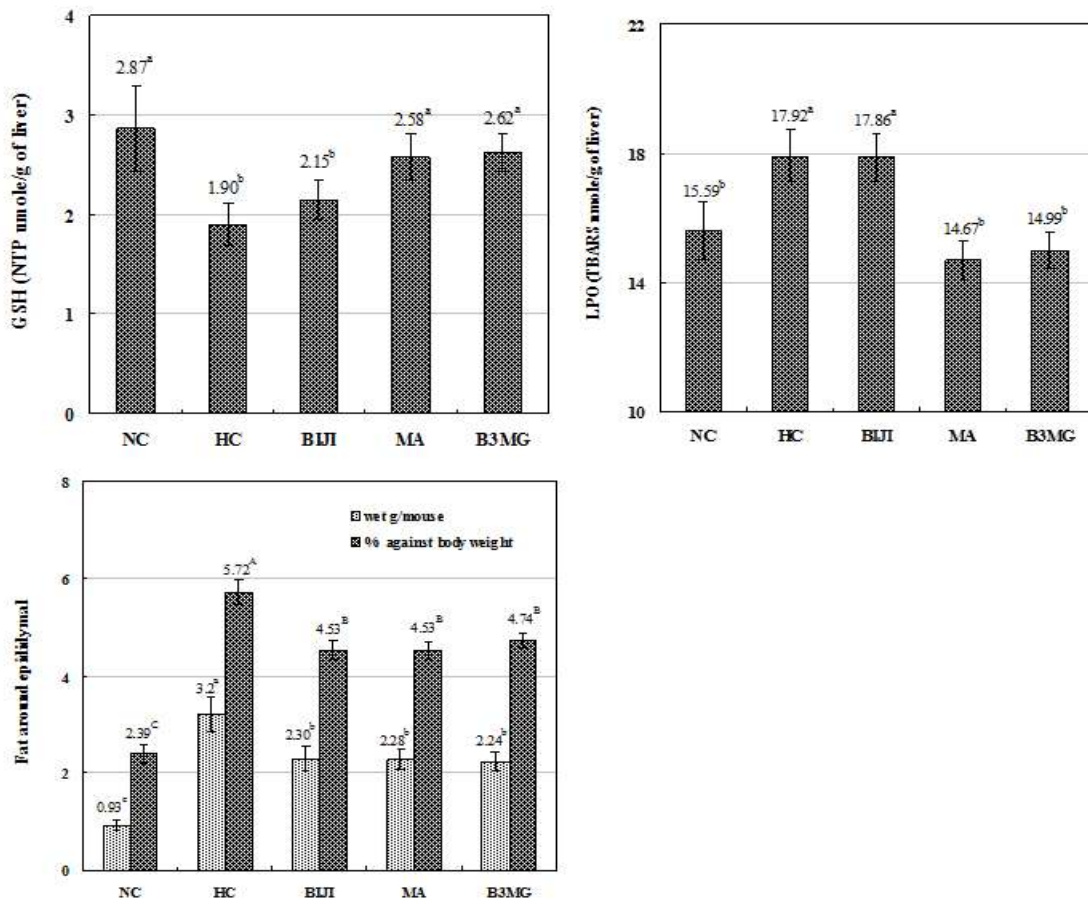


Fig. 8. 7주간 고지방 식이 후 간 조직내의 항산화물질, 산화물질량의 변화 및 부고환 주변 지방함량. NC, normal control group; HC, high fat control diet; BIJI, high fat +Biji.; MA, high fat +M2; B3MG, high fat +B3MG

(4) 고지방 식이에 의한 쥐의 간 조직에서의 항산화 효소 활성과 혈청지질 변화

(가) xanthine oxidoreductase

XOR (xanthine oxidoreductase)활성은 Stirpe & Della Corte³⁴⁾의 방법에 따라 효소원으로 PMF를 이용하여 total type 활성은 NAD⁺의 존재 하에서, O type 활성은 NAD⁺를 첨가하지 않은 상태에서 측정하였고, D type의 활성은 total type 활성도에서 O type 활성을 제한 값으로 하였으며, 활성도는 분당 단백 1 mg이 기질인 xanthine으로부터 생성시킨 uric acid의 량을 nmole (U)로 나타내었다.

(나) SOD, GST, GPX 활성

SOD활성은 Martin 등³⁵⁾의 방법에 따라 superoxide anion radical에 의해 hematoxylin으로부터 생성되는 hematin을 560 nm에서 측정하였으며 효소원을 가하지 않은 대조구의 흡광도를 50% 억제하는 효소량을 1 unit (U)로 하여 1 mg의 단백질이 hematoxylin의 자동산화를 억제하는 정도를 U로 나타내었다. GST 활성은 Habig 등³⁶⁾의 방법에 따라 효소에 의해 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 reduced glutathione이 반응하여 생성되는 thioether의 흡광도를 340 nm 에서 측정한 다음 흡광계수 ($\epsilon=9.5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 활성도를 계산하였으며 분당 단백질 1 mg이 생성시킨 thioether의 nmole로 나타내었다. GPX 활성은 Paglia 등³⁷⁾의 방법에 따라 1 mM EDTA 함유하는 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 용액 일정량에 1 mM sodium azide, 0.2 mM NADPH, 1 mM reduced glutathione, 1 unit glutathione reductase 및 일정량의 효소원과 기질인 0.25 mM hydrogen peroxide를 가해 25°C에서 반응시키는 동안에 생성된 oxidized glutathione을 환원시키는데 소모된 NADPH를 340 nm에서 측정하고 분자흡광계수 ($\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 효소활성을 계산하였다. 효소의 활성도는 1 mg의 단백질이 1분간 산화 시킨 NADPH의 함량을 nmole로 나타내었다.

(5) 혈청 지질함량

혈청중성지질, 총콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량은 kit 시약 (AM 157S-K, AM 202-K, AM 203-K, Asanpharm Co., Korea)으로 측정하였으며, LDL-콜레스테롤함량은 Friedewald 등³⁰⁾의 방법에 따라 계산하였다. Atherogenic index는 계산식 (total cholesterol - HDL- cholesterol) /HDL-cholesterol에 의하여 산출하였다.

(6) 혈청 ALT의 활성도 측정

혈청 ALT (alanine aminotransferase) 활성도는 Reitman & Frankel³¹⁾의 방법에 따라 조제된 kit시약 (Asan Pham., Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였으며 효소의 활성은 혈청 1 mL당 분당 NADH의 흡광도를 0.001 감소시키는 Karmen unit로 나타내었다.

인체의 세포질 미립체(microsome)에 존재하는 cytochrome P450 및 미토콘드리아(mitochondria)의 호흡계(respiratory generating system)에서는 여러 종류의 질병과 노화를 측

진하는 ROS가 끊임없이 생성되며(Nohl & Jordan 1980) 비만, 고지혈, 당뇨에서는 ROS 생성계가 활성화되는 반면 ROS 소거활성은 감소한다. SOD는 ROS generating system에 의해 생성된 superoxide를 반응성이 적은 hydrogen peroxide로 전환시키는데 관여하며, GST는 ROS에 의하여 생성된 LPO등의 organic hydroperoxide를 GSH의 작용과 함께 독성이 낮은 lipid alcohol로 전환하는데 관여한다.

이러한 결과로 보아, 홍국 첨가군이 고지방 대조군에 비하여 유해산소 해독계 효소활성이 높게 나타났으며, 따라서 홍국 균사체 추출물 식이는 간 조직 내의 SOD 및 GST를 활성화시켜 비만상태에서 생성되는 ROS를 소거시킴으로서 간 조직 손상을 경감시킬 뿐만 아니라 기능을 활성화시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

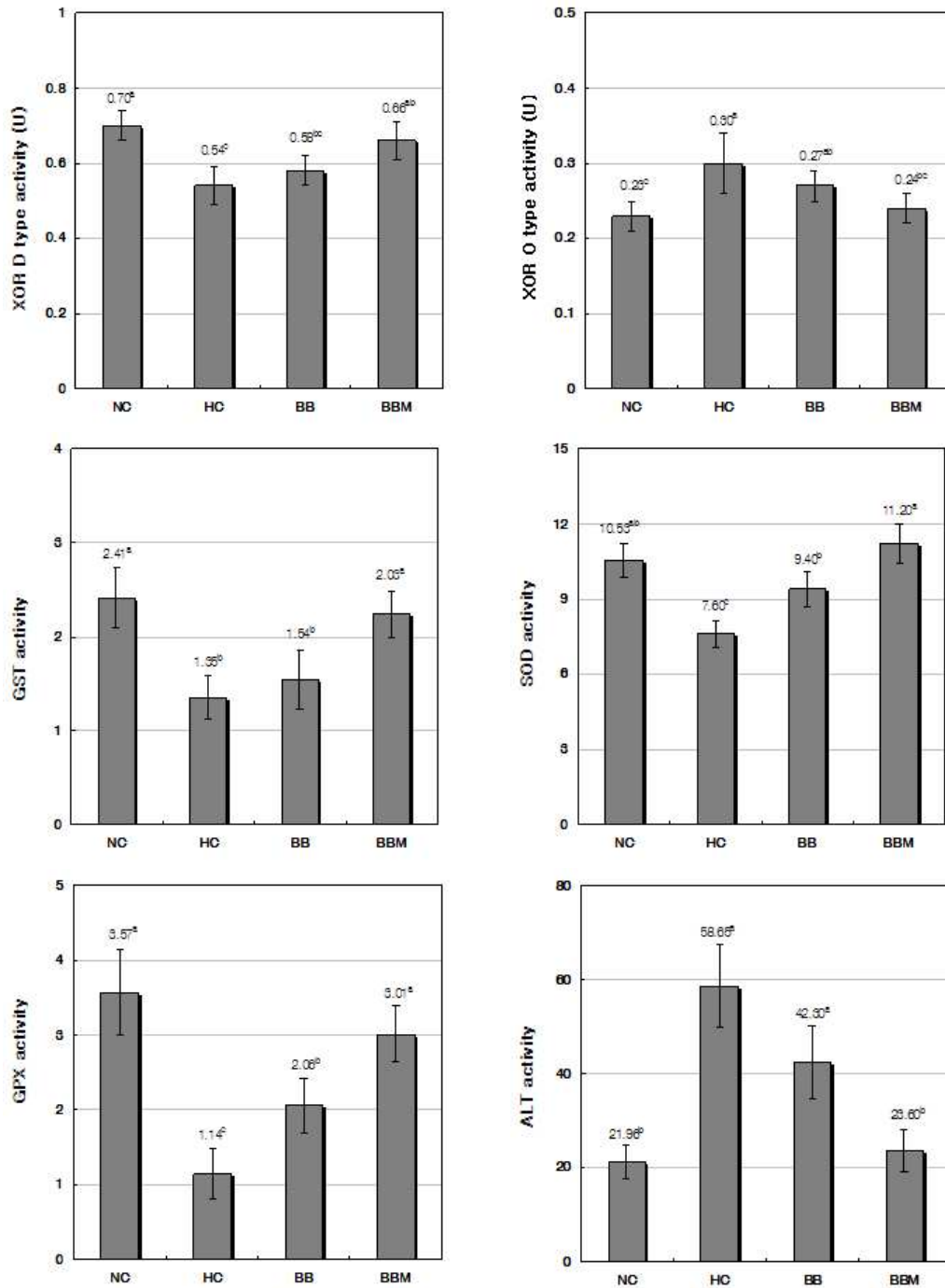


Fig. 9. 7주간 고지방 식이 후 간 조직내의 간 조직에서의 항산화 효소 활성과 혈청지질 변화. NC, normal control group; HC, high fat control diet; BIJI, high fat +Biji.; MA, high fat +M2; B3MG, high fat +B3MG

다. 항온항습기와 일반배양기에서의 대량 배양 실험

콩과 식용밀기울, 팥의 여러 농도에 따른 최적 발효 조건을 찾기 위하여 항온항습기와 일반 배양기를 이용하여 대량 배양하였다. 검정콩은 깨끗한 물로 세척한 다음 건풍하여 Hood Mixer (HMF-1710, Hanil, Korea)을 사용하여 콩알 크기의 1/4~1/8정도로 분쇄한 후 수분함량을 50%로 조정하여 2 L들이 polypropylene bag에 450 g씩 넣고 식용 밀기울과 팥을 비율별로 혼합한 다음 air filter를 부착한 후 121℃에서 90분간 가압 살균하고 무균상으로 옮겨 상온으로 냉각하여 고체배지를 준비하였다. 2% 쌀가루, 3% glucose, 2% peptone, 0.8% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2% CH_3COOK , 0.1% NaCl 를 함유하는 배지를 사용하여 28℃에서 7일간 배양한 *Monascus pilous* 배양액을 10% (v/w)되게 접종하여 28℃에서 10일~15일간 배양하여 Monacolin K와 KA함량을 측정하고 성상을 비교하였다.

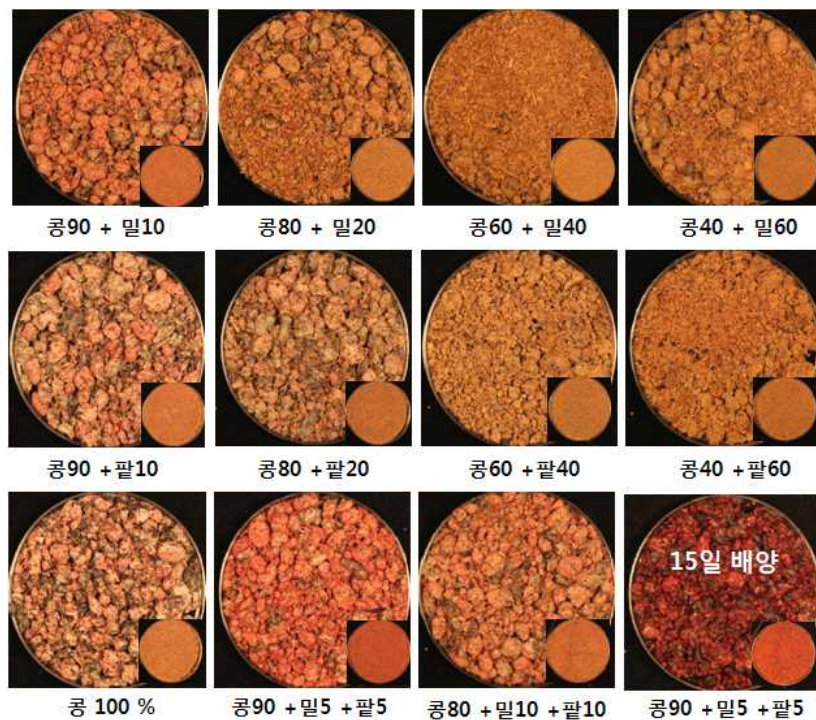


Fig. 10. 콩과 식용밀기울, 팥의 여러 농도에 따른 최적 발효 조건 (항온항습기)

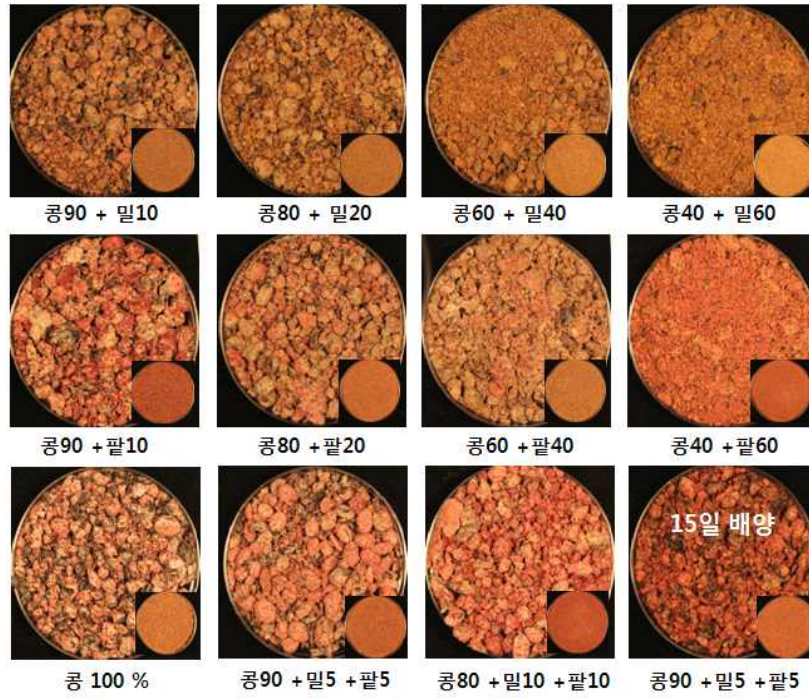


Fig. 11. 콩과 식용밀기울, 팥의 여러 농도에 따른 최적 발효 조건 (일반배양기)

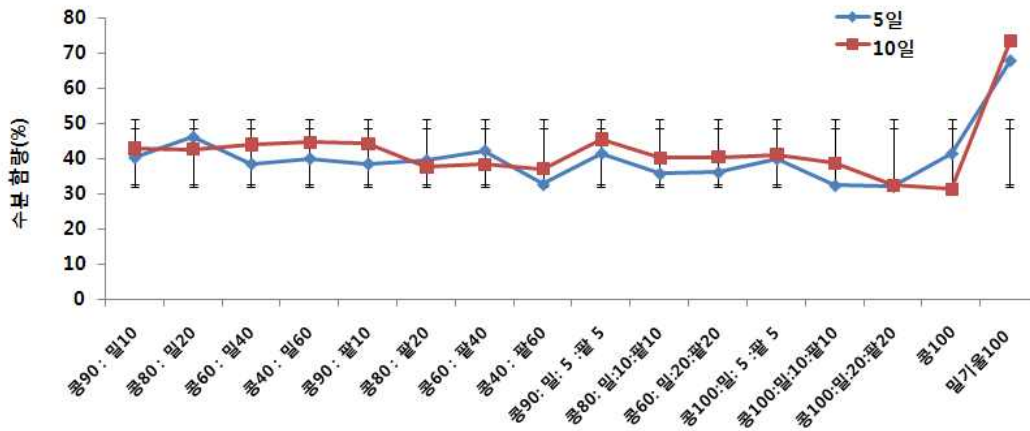


Fig. 12. 콩과 식용밀기울, 팥의 함량에 따른 수분함량의 변화

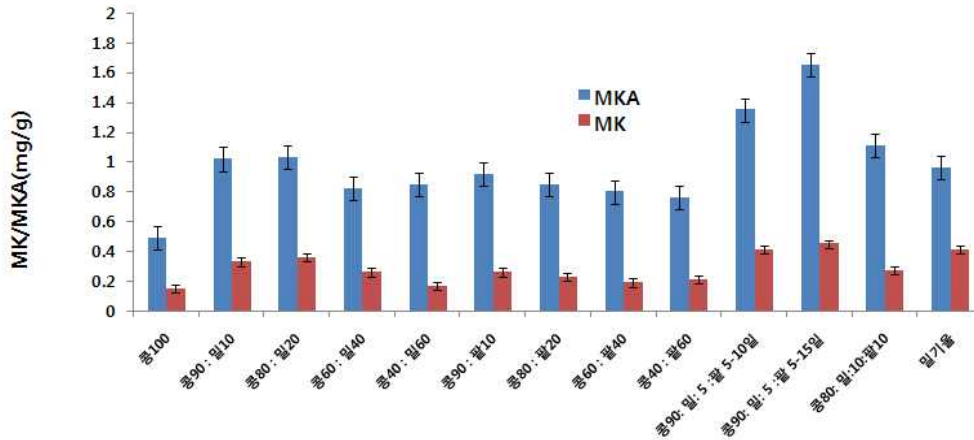


Fig. 12. 콩과 식용밀기울, 팥의 함량에 따른 모나콜린의 함량변화

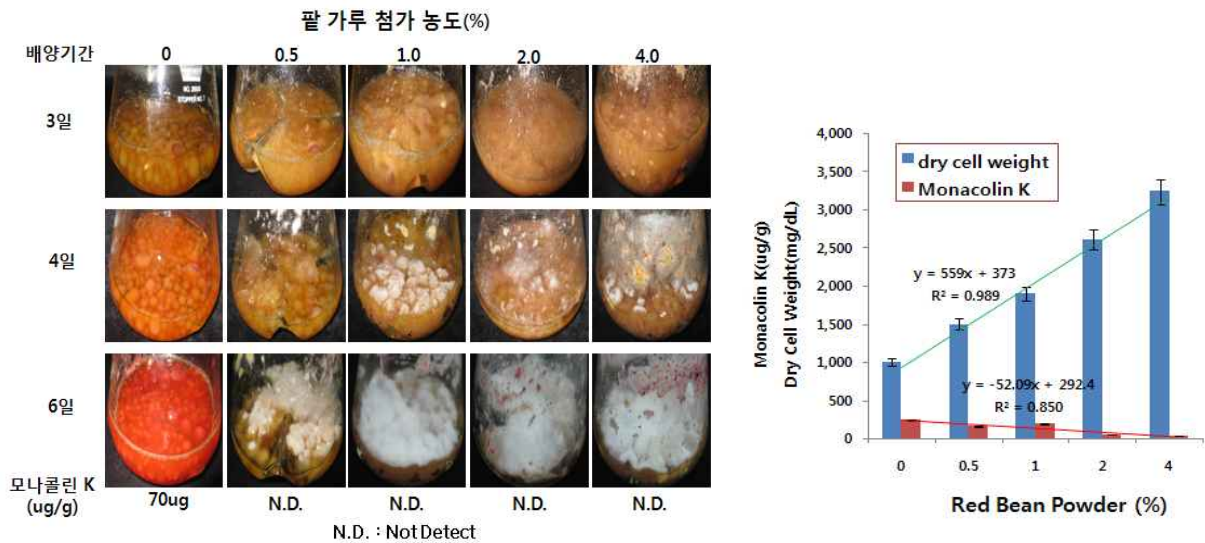


Fig. 12. 콩과 팥가루 함량에 따른 배양산물 및 모나콜린의 함량변화

라. *Monascus* 발효 검정콩소재의 한국산 및 중국산 비교

향후 상업적인 원료 생산을 위하여 항비만 소재의 원재료 원산지별 발효 효율 및 지표, 유효성분의 함량을 측정하였다. 아래에 그림에 나타낸 것과 같이 동일한 조건 (중균량, 배양시간, 온도 등)에서 모나콜린 K 함량은 5일 및 10일 배양에서 각각 약 3배이상 차이가 났으며, 이것은 중국산 검정콩의 경우 수입시 변질을 막기 위해 사용된 변질방지제의 영향으로 보인다.

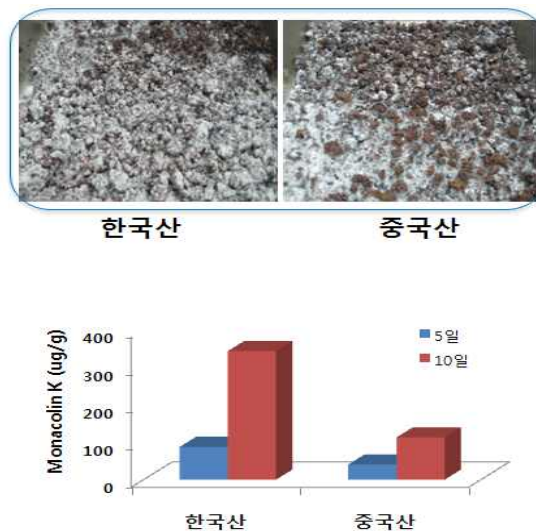
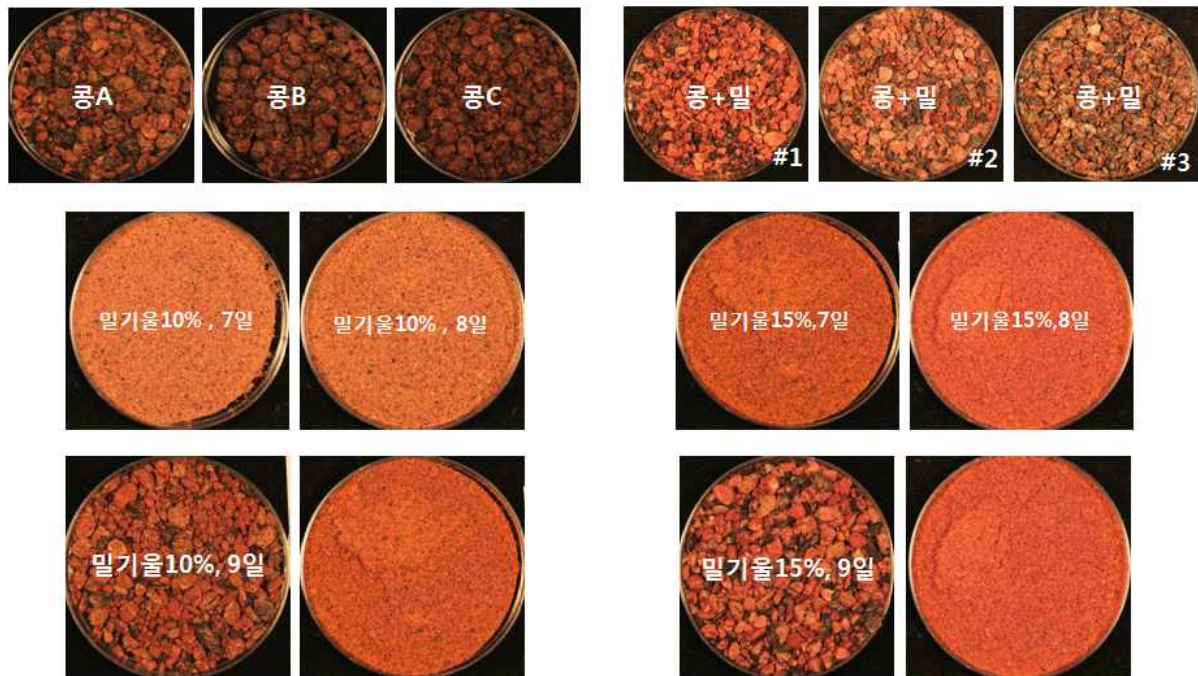


Fig. 13. 한국산 및 중국산 검정콩을 이용한 홍국균발효 검정콩내의 모나콜린 생성량

마. *Monascus* 발효 검정콩 표준임상제품 제작완성

항온항습기와 일반배양기를 이용하여 콩과 식용밀기울, 팥의 여러 농도에 따른 최적 발효 조건을 찾는 실험을 통한 결과를 바탕으로 하여 대량 생산을 위한 제조 공정을 표준화하기 위

하여 위의 실험과 동일한 방법으로 재확인 실험을 실시하였다. 제조 공정 표준화를 위한 실험으로는 검정콩은 깨끗한 물로 세척한 다음 건풍하여 Hood Mixer (HMF-1710, Hanil, Korea)을 사용하여 콩알 크기의 1/4~1/8정도로 분쇄한 후 4시간 정도 가수하여 수분함량을 50%로 조정하고 2 L들이 polypropylene bag에 450g씩 넣고 식용 밀기울 첨가비율(5~20%)을 달리하여 모나콜린 K함량이 높게 형성되었던 조건으로 혼합한 다음 air filter를 부착한 후 121℃에서 30~90분간 각기 달리 가압 살균하고 무균상으로 옮겨 상온으로 냉각하여 고체배지를 준비하였다. 2% 쌀가루, 3% glucose, 2% peptone, 0.8% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.2% CH₃COOK, 0.1% NaCl를 함유하는 배지를 사용하여 28℃에서 7일간 배양한 *Monascus pilous* 배양액을 5%~10% (v/w)되도록 달리 접종하여 28℃에서 10~15일간 배양하여 Monacolin K와 KA함량을 측정하고 성상을 비교 실험하여 그 결과에 따른 가장 발효가 잘되는 조건을 선택하여 제조공정 표준화를 하고 이 표준화된 조건으로 한스바이오(주)에 위탁하여 대량 배양하였다.



	1차	2차	3차	4차		1차	2차	3차	4차
중균 배양일(고체)	12	12	10	10	쌀가루(%)	5	10	x	x
중균 배양일(액체)	12	10	7	7	밀기울(%)	5	10	10	15
검정콩 침지(시간)	O/N	16	6	4	쌀+ 밀(%)	5+5	10+10	x	x
분쇄(크기)	콩알	1/2	1/4	1/8	중균량(%)	5	20	15	10
증자(분)	30	60	90	90	총 수분함량(%)	60	60	60	60
발효 기간(일)	20	15	9-10	8-9	모나콜린K(ug/g)	200	400	600	1,200↑

Fig. 14. 콩과 식용밀기울, 쌀의 여러 농도에 따른 최적 발효 조건 탐색

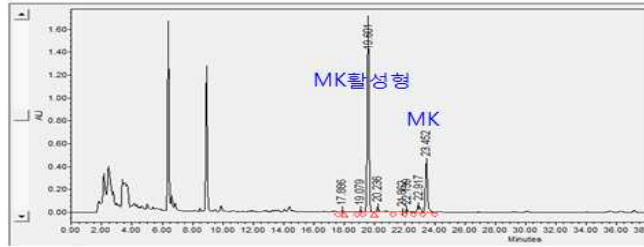


Fig. 15. 홍국균 발효 검정콩의 대량생산

바. *Monascus* 발효 검정콩소재 표준 임상제품을 위한 원료 규격기준안 및 안정성 시험

본 과제에서 연구 중인 홍국 발효 검정콩에 대한 기능성 식품 원료로의 식의약청에서 개별 인정을 받기 위한 준비로서 *Monascus* 발효 검정콩소재 표준 임상제품을 완성하기 위하여 원료 규격 기준안 (기능 및 지표성분)을 결정하여 실시하였으며, 추출조건에 따른 모나콜린 함량의 변화를 관찰하였으며 그 결과는 아래와 같았다.

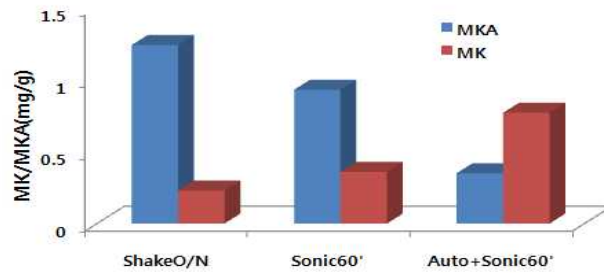
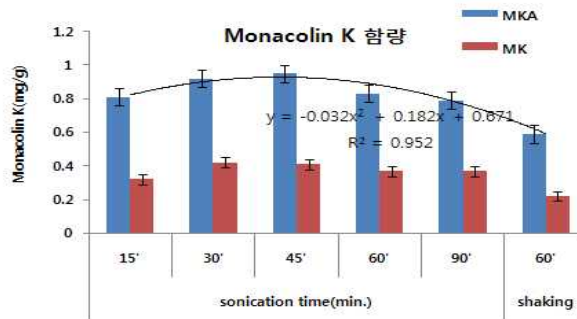
총 모나콜린 K 함량 분석법



고속 액체 크로마토그래피 (HPLC) 조건

- 컬럼 : SP 칼럼 C18 , MG(5 um, 4.6x250mm)
- 검출기 파장 : 자외선 검출기(UV) 237 nm
- 컬럼 온도 : 40 °C
- 주입량 : 5 μl
- 이동상 : A액: 0.2% Phosphoric acid B액: ACN

추출조건에 따른 모나콜린 K 함량 변화



또한 본 과제에서 연구 중인 홍국 발효 검정콩에 대한 기능성 식품 원료로의 식의약청에서 개별 인정을 받기 위한 준비로서 아래와 같이 원료 규격 기준안 (기능 및 지표성분)을 결정하였을 뿐만 아니라, 한국 기능식품 연구소에서의 안정성 시험을 수행하였다.

기능성 원료 규격 (안)

- 홍국 쌀 기준 변형
- 제조기준: 콩, 밀기울 및 홍국균을 이용하여 고체 발효함.
- 규격
 - 성상: 연(적)갈색 또는 적갈색의 분말
 - 모나콜린 K 함량 (%) : 0.08% 이상 (참고 홍국 0.05)
 - 활성형 모나콜린 K (베타-히드록시산 형태) 확인되어야 함
 - 검정콩 이소플라본: 확인되어야 함. (배당체 or 비배당체: Daidzin or diadzein, genistin or genistein, glycitin or glycitein)
 - 수분(%): 10.0 이하이어야 함
 - 시트리닌 (citrinin) ($\mu\text{g}/\text{kg}$): 500이하
 - 대장균군: 음성이어야 함.
 - 중금속, 농약 (규정농도 이하이거나 불검출)

홍국발효 검정콩을 임상시험을 위한 표준 시료로 제공하기 위하여 10kg 기준으로 3가지 Lot로 대량 배양하여 생산하였으며, 이 시료들의 안전성시험을 한국 기능식품 연구소에서 Lot별로 실시한 결과 모나콜린 함량은 Lot 별로 각각 1.22, 1.26, 1.27 mg/g 농도였으며, 시트리닌의 함량도 각각 0.005, 0.024, 0.028 mg/g으로 기준치 이하로 측정되었다. 또한 수분 함량은 10% 이하(5.21~5.34%)로서 대장균군의 경우 음성으로 판정 났으며, 잔류농약의 경우 51종 모두 불검출되는 결과를 얻었다. 이들 결과로 볼 때 홍국발효 검정콩은 기능성 개별 인정형 식품으로서의 안전성 기준치에 적합하다는 시험 성적서를 받았다.

Table 2. 홍국발효검정콩의 규격설정시험결과

	홍국발효검정콩			식약처규격 (홍국기준)
	MJLH2012005	MJLH2012006	MJLH2012007	
성상	적갈색의 분말, 특이취	적갈색의 분말, 특이취	적갈색의 분말, 특이취	연갈색~적갈색 분말, 특이취
총모나콜린 K (mg/g)	1.27	1.26	1.22	-
시트리닌 (mg/kg)	0.028	0.024	0.005	0.05이하
수분 (%)	5.21	5.42	5.34	10%이하
활성형 모나콜린 K	확인됨	확인됨	확인됨	확인됨
대두이소플라본 (비배당체, mg/g)	2.79	-	-	확인됨
대장균군	음성	-	-	음성
잔류농약	불검출	-	-	불검출
납 (mg/kg)	0.0197			
총비소 (mg/kg)	0.0172			
카드뮴 (mg/kg)	0.0501			
총수은 (mg/kg)	0.001			

사. *Monascus* 발효 검정콩소재의 임상시제품 제작

홍국발효 검정콩을 임상시험을 위한 홍국발효 검정콩 소재의 시제품 (시험식품)의 제조를 위해 우수건강 기능식품제조업체인증 (GMP)인 충남 보령소재의 에프엔바이오에서 시험제품의 생산을 위탁하였다. 시험 식품의 형태는 캡셀형태로 홍국발효 검정콩분말을 충전하여 조제하였으며, 위약과 시험약의 조성은 다음 표와 같다. 시험약의 캡셀당 홍국발효 검정콩분말은 412.9mg이며, 부형제를 포함한 캡셀당 함량은 416.7 mg으로 제작하였으며, 위약은 유당을 주성분으로 하고, 홍국발효 검정콩분말 특유의 색상을 나타내기 위 해 식용색소를 적량 첨가하였다.

Table 3. 위약 및 시험약의 처방

구분	성분	비율	실제함량 (mg)
시험약	홍국발효 검정콩 분말	99.10	412.9
	하이드록시프로필메틸셀룰로오스	0.90	3.8
위약	유당	96.59	402.5
	하이드록시프로필메틸셀룰로오스	1.90	7.9
	식용색소 청색 1호	0.01	0.04
	식용색소 황색 1호	0.04	0.2
	식용색소 적색 40호	0.06	0.3
	카카오색소	1.40	5.8

MJLH2013005 라벨(8.5*12cm)⁴⁾

본 제품은 "인체적용시험용"임⁴⁾

피험자번호 :⁴⁾
 제 품 명 : MJLH2012007 또는 대조식품⁴⁾
 원재료 및 함량 (416.7 mg 중): 홍국균 발효검정콩분말 또는 유당⁴⁾
 내 용 량 : 416.7 mg/캡셀, 300 캡셀/병⁴⁾
 복 용 법 : 1일 2회, ⁴⁾
 아침 저녁 식사 후 30분에 6캡셀씩(하루 12캡셀) 드십시오.⁴⁾
 저장방법 : 직사광선을 피해서 실온 보관 ⁴⁾
 제조번호 및 사용기한 : 13001 or 13002, 2014년 4월 30일까지⁴⁾
 원료공급처 : 발효미생물을 이용한 기능성 식품 산업화 연구 사업단⁴⁾
 경기도 용인시 처인구 남동 산 38-2 명지대학교⁴⁾
 제 조 원 : 에프엔바이오⁴⁾
⁴⁾

본 제품은 "인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없음"⁴⁾



모나 소이 다이어트 (시제품)



본 임상시험용 시험식품

Fig. 16. 임상시험용 시제품 및 임상시험용 시험식품

제 2 절 *Monascus*속 발효산물에 대한 비만 및 간기능 개선 유효/지표물질 규명

1. *Monascus*속 대량배양 균사체로부터 신규물질 및 생리활성 성분분리

가. 대량 배양된 *Monascus* 발효산물로부터 분리 방법 모색

- 주관연구기관으로부터 인계 받은 홍국균 대량 발효 산물 (26 종)에 대하여 HPLC 분석으로 홍국균의 주성분으로 알려진 monacolin K의 함량을 분석함.
- 함량 분석으로 monacolin K가 상대적으로 많이 검출된 샘플에 대하여 약효활성을 체크한 후 활성 성분 분리 샘플로 정함.
- 추출에 일반적으로 사용되는 알콜을 이용하여 반복 추출하여 얻은 엑스를 얻은 후 계통적 추출법에 따라 용매 분획 진행.
- 활성이 인정된 분획에 대하여 silica gel, Sephadex LH-20, Diaion-HP-20, XAD-7, prep. HPLC 등 다양한 분리 기법을 사용하여 활성추적법 (activity guided fractionation)에 따라 활성 성분 분리.
- 순수 분리 정제된 활성화합물을 UV, IR, 1D-, 2D-NMR, MS 등의 기기분석을 통하여 구조 결정을 시도하고 이미 분리 보고된 성분이나 간단한 유도체의 경우 문헌에 보고된 data와 비교분석 함으로서 구조를 동정할 수 있음. 그러나 필요에 따라서는 다양한 NMR기법 예를 들면, DEPT를 이용하여 methyl, methylene, methine, quaternary carbon을 결정하고, ^1H - ^1H COSY와 ^1H - ^{13}C COSY를 측정하여 one bond connectivity를 결정함. 또한 long range ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C COSY, HMBC, HMQC 등의 기법을 이용하여 two bond, three bond 사이의 proton, carbon의 connectivity를 결정해 줌으로서 구조를 동정하는데 결정적인 역할을 할 수 있음.
- 또한 물질에 따라 산, 알카리, 효소에 의한 가수분해, methylation, acetylation 등에 의한 유도체 합성 등을 이용하여 구조를 결정하고, 구조활성 상관관계를 규명함.

(1). 검정콩을 배지로하여 *Monascus*속 배양 균사체의 monacolin K lactone form (lovastatin / mevinolin) 및 monacolin K acid form (mevinolinic acid)의 함량분석

(가). 재료 : *Monascus*속 배양 균사체 (26 종), monacolin K (mevinolin과 mevinolinic acid)

	성분명	회사	순도 (%)
주성분 표준품	monacolin K lactone form (lovastatin/mevinolin MK)	Chromadex	98%
	monacolin K acid form (mevinolinic acid, MKA)		97%

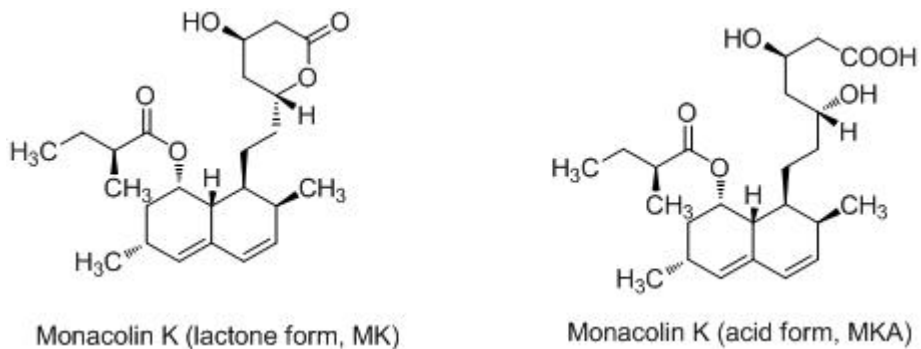


그림 1. Structure of monacolin K lactone form and acid form

(나) 함량분석 시험방법 및 시험결과

① 함량분석 시험항목 대상물질

*Monascus*속 배양균사체 (26종)의 성분인 MK 및 MKA 함량.

명지대로부터 받은 26종의 *Monascus*속 배양 균사체

M-2, M-3, M-4, B1M1, B1M2, B1M3, B1M4, B2M1, B2M2, B2M3, B2M4, B2MB, SF-K1, B2MA, B3, B3MD, B3MG, B3MH, MPM, B3MF, B3MI, B3MJ, B3MK, B4ML, B3MM, B3MN (26 종).

② 시험방법

㉠ 시험방법 및 분석기기조건 :

분석장비 : HPLC Agilent 1200 series

분석컬럼 : SunFire C18 (4.6 × 250 mm, 5um)

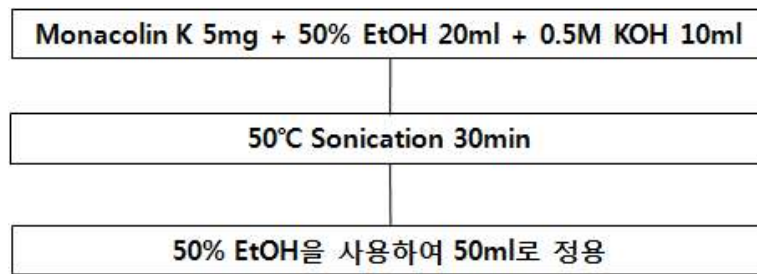
Flow rate : 1 mL/min

Inj. vol. : 20 uL

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 238 nm)

시간	H ₂ O (0.05% TFA)	Acetonitrile
0 min	60	40
10 min	60	40
15 min	35	65
30 min	35	65

㉞ Monacolin K 표준품의 alkaline hydrolysis에 의한 acid form의 제조



㉟ 표준용액

표준용액 조제는 반응시켜서 얻은 용액을 100 μ g/ml로 하고 표준용액으로 하였다. 표준용액 (각 100 μ g/ml)을 50% EtOH로 희석하여 7 농도의 표준용액을 조제하였다. 표준용액에서의 농도는 48.54, 24.27, 9.71, 4.85, 2.43, 1.21, 0.49 μ g/ml이 되도록 하였다. 표준용액을 각각 0.45 μ m membrane filter 로 여과한 후 20 μ l를 취하여 HPLC에 주입하여 분석.

㊱ 시료전처리

홍국균 시료에 대하여 1g씩 정확히 측정하여 70% EtOH 10mL을 가하여 ultrasonicator에서 2 시간 동안 추출하여 0.45 μ m membrane filter로 여과 후 분석.

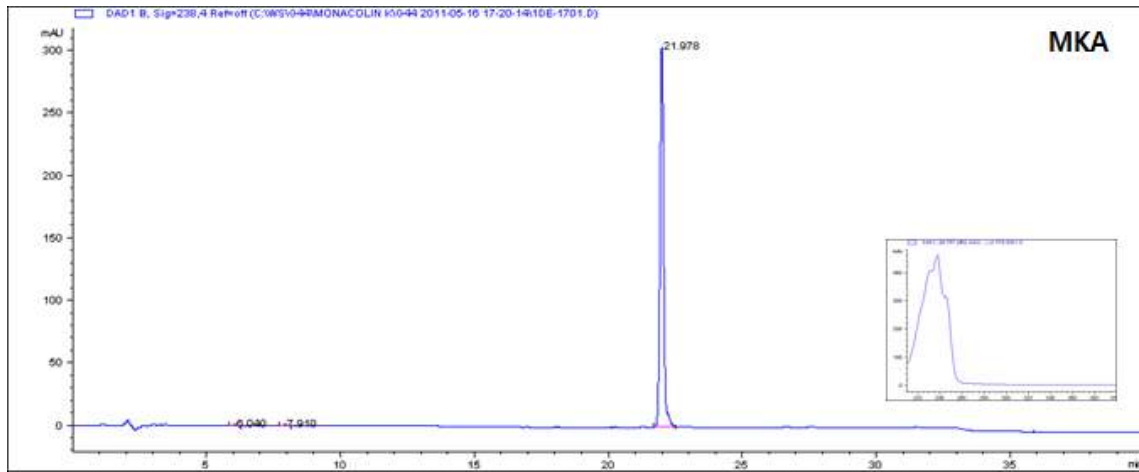


그림 2. 표준품 monacolin K acid form (MKA)의 HPLC chromatogram

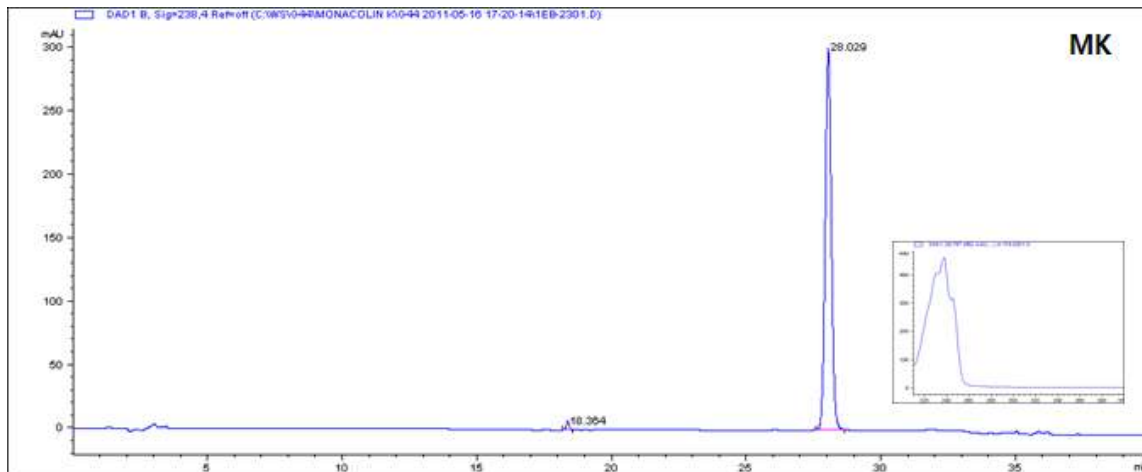
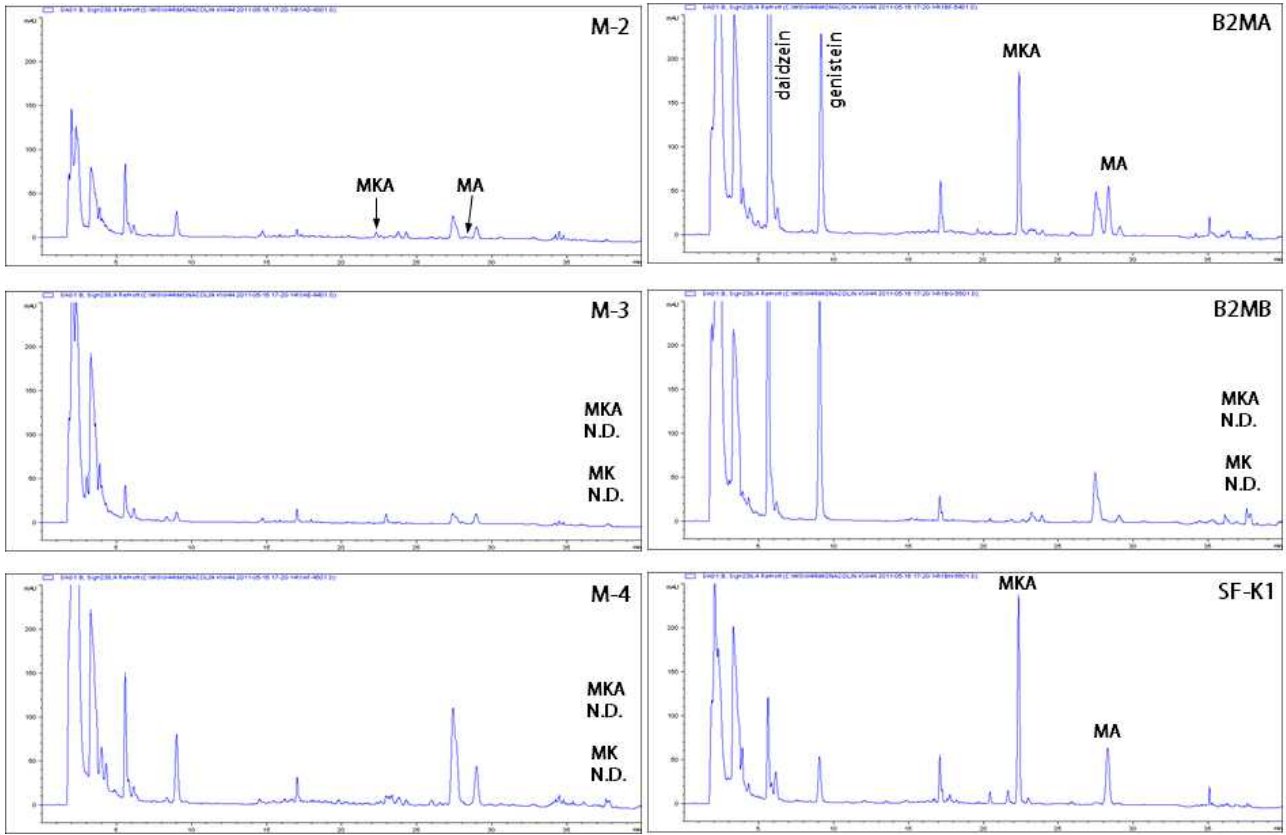


그림 3. 표준품 monacolin K (MK)의 HPLC chromatogram



(N.D. = not detector)

그림 4. 홍국 배양 균사체의 HPLC chromatogram

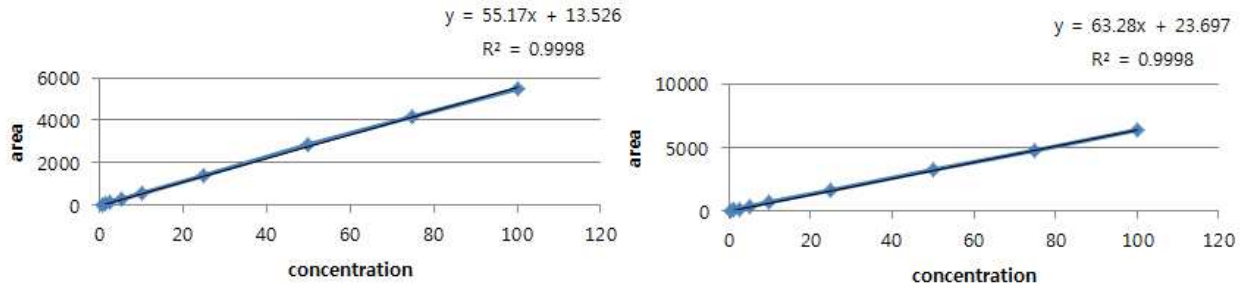


그림 5. MKA(左)와 MK(右)의 Calibration curve

표 1. 홍콩 배양균사체 26종의 MKA와 MK의 함량

	MKA				MK				MKA+MK	
	area	µg/ml	µg/g	%	area	µg/ml	µg/g	%	µg/g	%
M-2	72.3	0.90	9.0	0.00090	38.5	0.35	3.5	0.00035	12.5	0.00125
M-3	N.D.	-	-	-	N.D.	-	-	-	N.D.	-
M-4	N.D.	-	-	-	N.D.	-	-	-	N.D.	-
B1M1	N.D.	-	-	-	N.D.	-	-	-	N.D.	-
B1M2	126.5	1.83	18.3	0.00183	167.6	2.32	23.2	0.00232	41.5	0.00415
B1M3	267.9	4.24	42.4	0.00424	240.9	3.43	34.3	0.00343	76.7	0.00767
B1M4	146.5	3.87	38.7	0.00387	283.4	4.08	40.8	0.00408	79.5	0.00795
B2M1	322.6	5.17	51.7	0.00517	318.8	4.62	46.2	0.00462	97.9	0.00979
B2M2	235.9	3.69	36.9	0.00369	299.3	4.32	43.2	0.00432	80.1	0.00801
B2M3	379.1	6.13	61.3	0.00613	436.9	6.42	64.2	0.00642	125.5	0.01255
B2M4	348	5.60	56.0	0.00560	452.4	6.66	66.6	0.00666	122.6	0.01226
B2MA	1870.7	31.55	315.5	0.03155	986.0	14.79	147.9	0.01479	463.4	0.04634
B2MB	N.D.	-	-	-	N.D.	-	-	-	N.D.	-
SK-K1	2346.0	39.66	396.6	0.03966	1030.0	15.46	154.6	0.01546	551.2	0.05512
B3	N.D.	-	-	-	N.D.	-	-	-	N.D.	-
B3MD	140.9	2.07	20.7	0.00207	N.D.	-	-	-	20.7	0.00207
B3MG	1838.6	31.01	310.1	0.03101	882.1	13.21	132.1	0.01321	442.2	0.04422
B3MH	444.0	7.24	72.4	0.00724	529.0	7.82	78.2	0.00782	150.6	0.01506
MPM	322.5	6.64	66.4	0.00664	N.D.	-	-	-	66.4	0.00664
B3MF	N.D.	-	-	-	N.D.	-	-	-	N.D.	-
B3MI	1522.2	25.17	251.7	0.0252	2172.3	32.01	320.1	0.0320	571.8	0.05718
B3MJ	135.2	2.21	22.1	0.0022	87.1	1.24	12.4	0.0012	34.5	0.00345
B3MK	272.5	4.49	44.9	0.0045	190.5	2.77	27.7	0.0028	72.6	0.00726
B3ML	709.5	11.72	117.2	0.0117	472.4	6.93	69.3	0.0069	186.5	0.01865
B3MM	357.4	5.89	58.9	0.0059	292.9	4.28	42.8	0.0043	101.7	0.01017
B3MN	331.1	5.46	54.6	0.0055	229.2	3.34	33.4	0.0033	88.0	0.00880

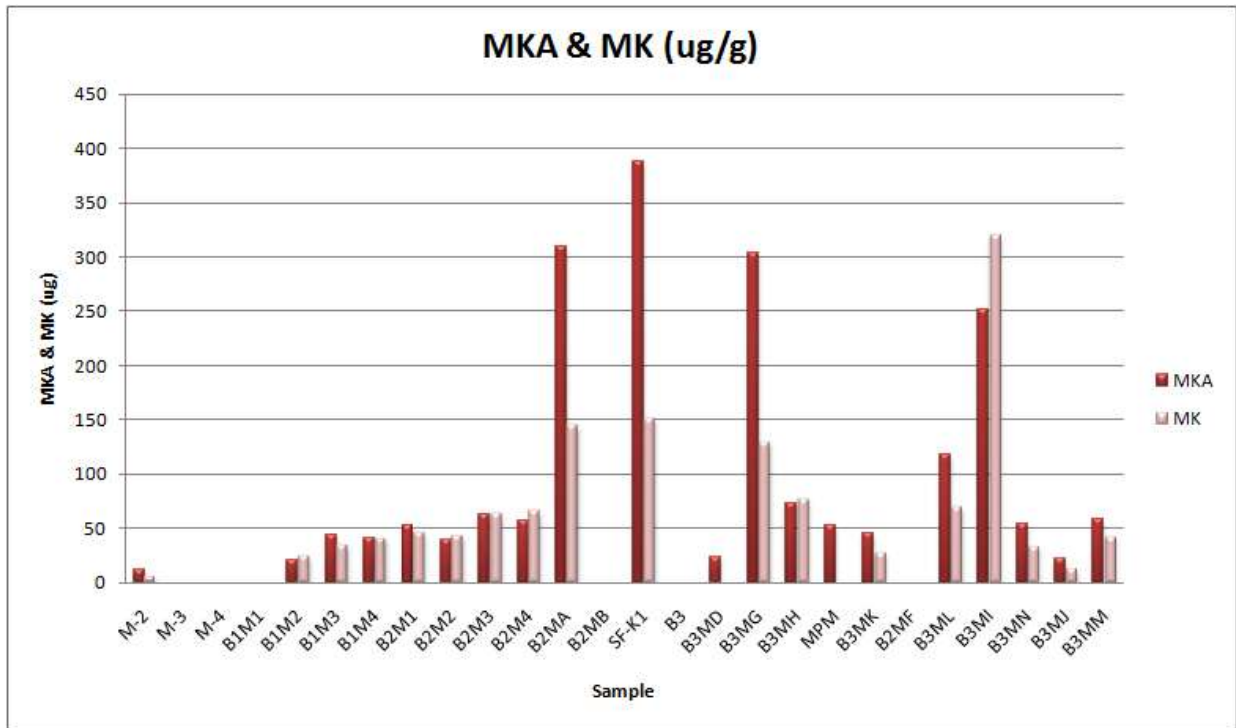


그림 6. 홍국 배양균사체 26종의 MKA와 MK의 함량 그래프

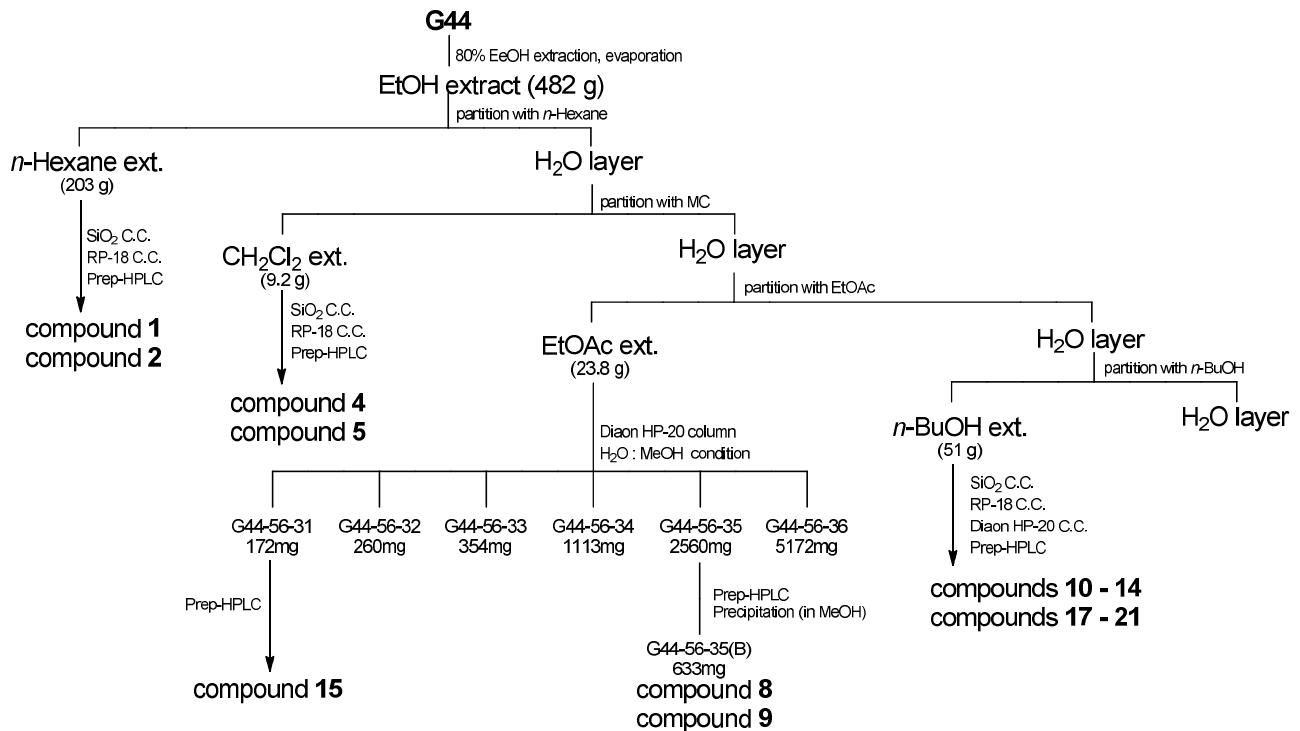
(다) Monacolin K 함량분석 결과

M-3, M-4, B1M1, B2MB, B3, B2MF 등 6종의 샘플에서는 MKA와 MK가 미검출
 B2MA, SF-K1, B3MG, B3MI 4종의 샘플이 상대적으로 많은 함량을 보임 (0.04~0.05%)
 26종 샘플의 Monacolin K의 함량 범위는 0.001~0.06%를 나타냄 (그림).

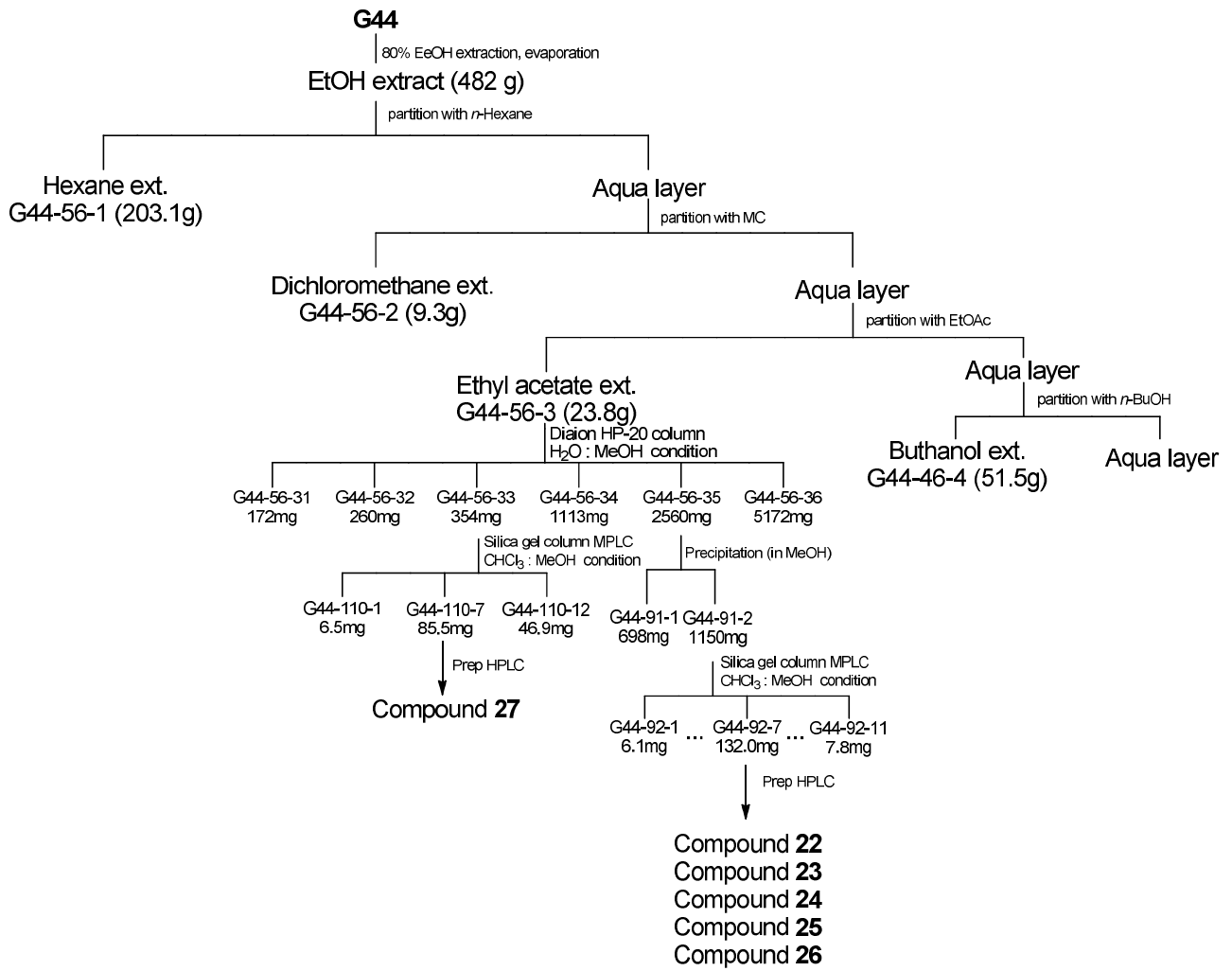
나. *Monascus*속 대량배양 균사체의 에탄올 추출물, 용매 분획물 제조 및 유효성분의 분리

• 정제 1

- *Monascus*속 대량배양 균사체 약 2.5 kg에 80% 에탄올을 가하고 24시간 2회 실온에서 추출하였다. 추출액을 감압상태에서 농축시켜 482 g의 에탄올 추출물을 얻었음. 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올로 용매 분획하였음.
- 각각의 분획층을 감압상태에서 증발시켜 용매별 추출물을 얻었고, 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 추출물을 실리카겔 및 Diaion HP-20 칼럼 크로마토그래프를 실시하였음.
- 각각의 소분획물에 대하여 실리카겔, RP-18 칼럼 크로마토그래프, prep. HPLC를 실행하여 21 종의 순수 화합물을 얻었음 (도식).



도식 1. G44의 에탄올 추출, 용매 분획 및 분리 정제



도식 2. G44의 에탄올 추출, 용매 분획 및 분리정제

(1) Identification of compound 1 (linoleic acid)

- Colorless oil; ESI-MS m/z 279 [M - H]⁻; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.37 (4H, m, H-9, 10, 12, 13), 2.79 (2H, t, J = 6.8 Hz, H-11), 2.37 (2H, t, J = 7.6 Hz, C-2), 2.07 (4H, dd, J = 6.8, 13.4 Hz), 1.65 (2H, m, H-3), 1.34 (14H, brs, [CH₂]₇), 0.91 (3H, t, J = 6.8 Hz, CH₃). The ¹H-NMR and MS spectral data were in consistent with those reported.

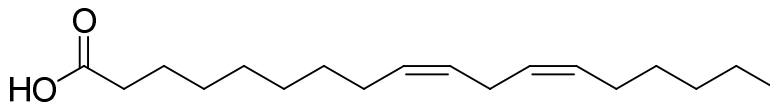
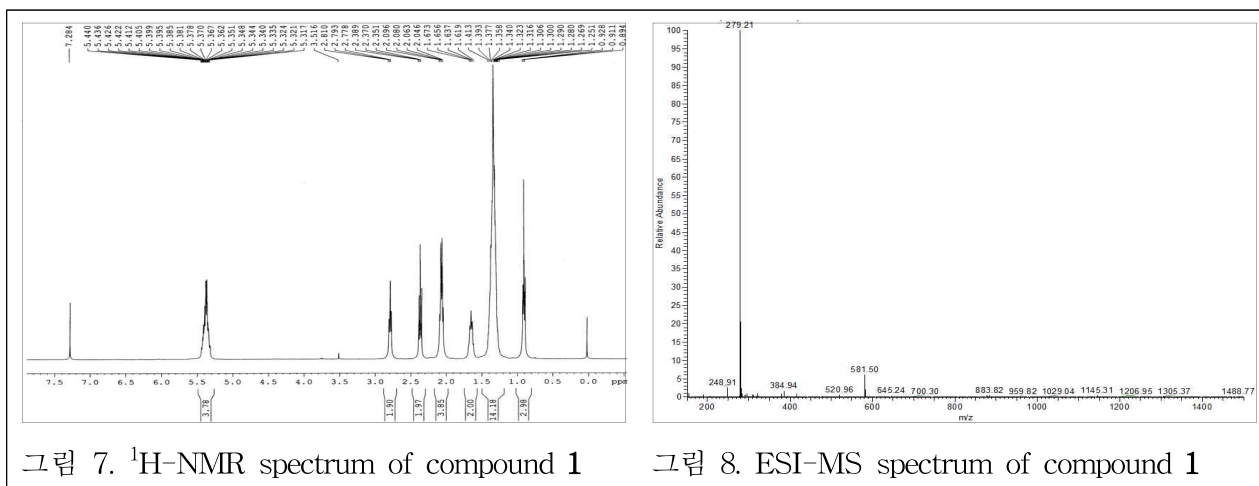


그림 9. Compound 1의 구조

(2) Identification of compound 2 (α-linolenic acid)

- Colorless oil; ESI-MS m/z 277 [M - H]⁻; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.39 (4H, m, H-9, 10, 12, 13, 15, 16), 2.83 (4H, t, J = 6.4 Hz, H-11, 13), 2.37 (2H, t, J = 7.2 Hz, C-2), 2.07 (4H, dd, J = 6.8, 13.4 Hz), 1.65 (2H, m, H-3), 1.34 (10H, brs, [CH₂]₅), 1.00 (3H, t, J = 5.2 Hz, CH₃). The ¹H-NMR and MS spectral data were in consistent with those reported.

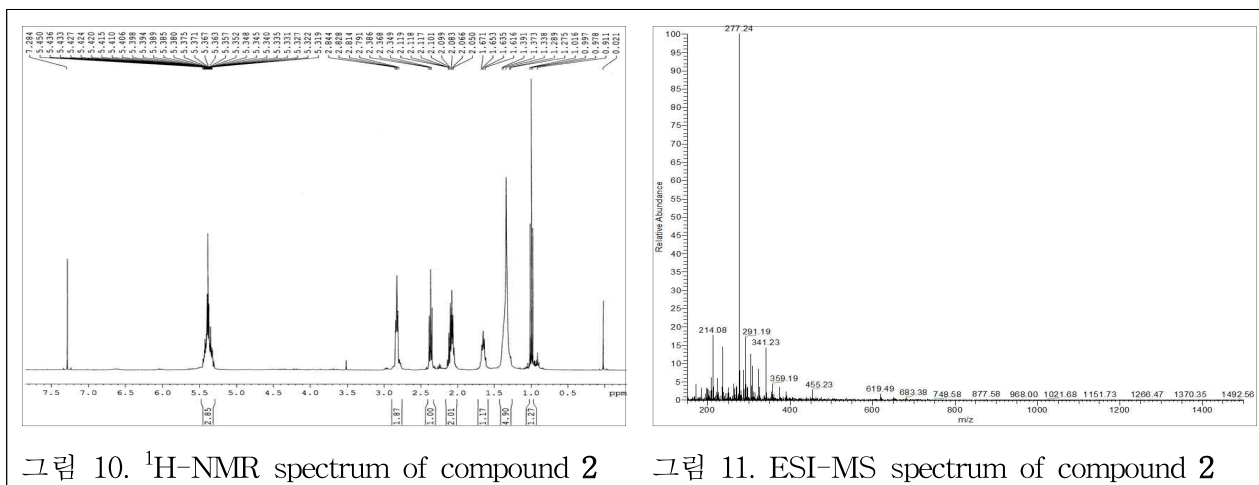


그림 10. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 2 그림 11. ESI-MS spectrum of compound 2

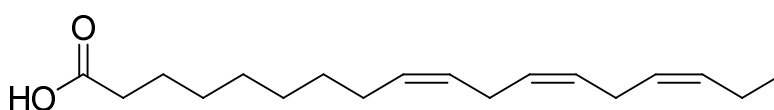


그림 12. Compound 2의 구조

(3) Identification of compound 4 (monacolin k)

- White powder; ESI-MS m/z 405 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.00 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-5), 5.79 (1H, dd, $J = 6.0, 9.5$ Hz, H-6), 5.53 (1H, brs, H-4), 5.39 (1H, dd, $J = 3.0, 6.3$ Hz H-1), 4.62 (1H, m, H-5'), 4.37 (1H, m, H-3'), 2.74 (1H, dd, $J = 5.0, 17.5$ Hz, H-2'), 2.63 (1H, ddd, $J = 1.5, 3.5, 17.6$ Hz, H-2'), 2.45 (1H, m, H-3), 2.36 (1H, m, H-7), 2.34 (1H, m, H-2''), 2.26 (2H, brs), 1.99 (2H, m, H-2), 1.92 (1H, m, H-4'), 1.87 (1H, m, H-8a), 1.68 (1H, m, H-8), 1.68 (2H, m, H-3''), 1.65 (1H, m, H-4'), 1.51 (1H, m, H-7'), 1.43 (1H, m, H-6'), 1.37 (1H, m, H-7'), 1.29 (1H, m, H-6'), 1.11 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, OCH_3), 1.08 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, OCH_3), 0.89 (6H, m, OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.9 (C-1''), 170.7 (C-6'), 133.1 (C-6), 131.6 (C-4a), 129.6 (C-4), 128.4 (C-5), 75.7 (C-2'), 68.0 (C-1), 62.6 (C-4'), 41.6 (C-2''), 38.7 (C-5'), 37.4 (C-8a), 36.7 (C-8), 36.2 (C-3'), 33.0 (C-10), 32.8 (C-2), 30.7 (C-7), 27.5 (C-3), 26.8 (C-3''), 24.3 (C-9), 22.9 (C-12), 16.3 (C-13), 13.9 (C-11), 11.7 (C-4'). The $^1\text{H-}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data were in consistent with those reported.

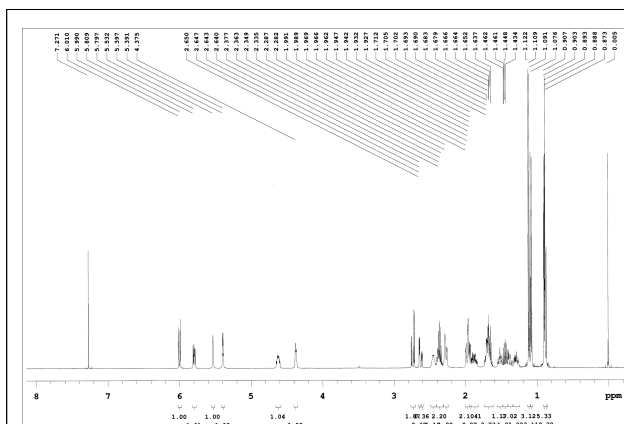


그림 13. ^1H -NMR spectrum of compound 4

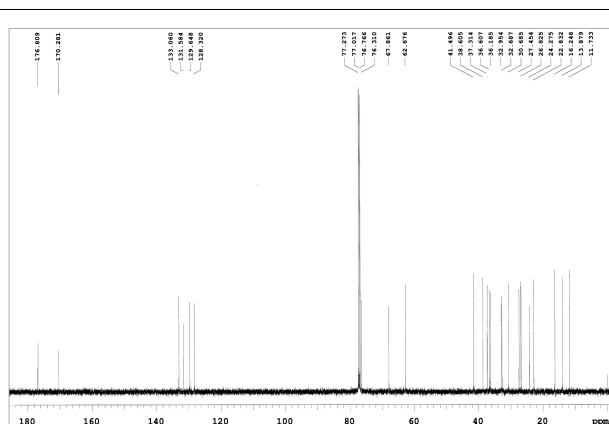


그림 14. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4

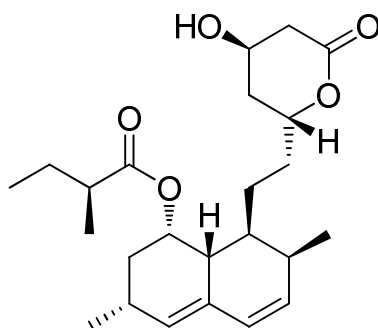


그림 15. Compound 4의 구조

(4) Identification of compound 5 (mevinolinic acid methyl ester)

- White powder; ESI-MS m/z 437 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H -NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 700 MHz) δ 5.99 (1H, dd, $J = 9.8$ Hz, 9.8 Hz, H-5), 5.79 (1H, dd, $J = 6.3$, 9.8 Hz, H-6), 5.52 (1H, d, $J = 9.1$ Hz H-4), 5.41 (1H, dd, $J = 2.8$, 6.0 Hz H-1), 4.26 (1H, m, H-4'), 3.80 (1H, m, H-2'), 3.72 (3H, s, OCH_3), 2.49 (2H, d, $J = 6.3$ Hz, H-5'), 2.45 (1H, m, H-3), 2.37 (1H, m, H-7), 2.35 (1H, m, H-2''), 2.25 (1H, dd, $J = 2.8$, 12.2 Hz, H-8a), 1.96 (2H, dd, $J = 2.8$, 7.7 Hz, H-2), 1.67 (1H, m, H-8), 1.67 (2H, m, H-3''), 1.56 (2H, m, H-3'), 1.53 (2H, m, H-9), 1.18 (2H, m, H-10), 1.11 (3H, dd, $J = 2.1$, 7.0 Hz, OCH_3), 1.07 (3H, d, $J = 7.7$ Hz, OCH_3), 0.89 (6H, m, $2 \times \text{OCH}_3$); ^{13}C -NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 175 MHz) δ 176.9 (C-1''), 172.9 (C-6'), 133.3 (C-6), 131.7 (C-4a), 129.5 (C-4), 128.3 (C-5), 72.3 (C-2'), 69.1 (C-4'), 67.9 (C-1), 51.8 (C- OCH_3), 42.3 (C-3'), 41.5 (C-5'), 41.5 (C-2''), 37.5 (C-8a), 36.3 (C-8), 34.8 (C-10), 32.8 (C-2), 30.6 (C-7), 27.5 (C-3), 26.8 (C-3''), 24.2 (C-9), 22.9 (C-12), 16.2 (C-13), 13.9 (C-11), 11.7 (C-4''). The ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data were

in consistent with those reported.

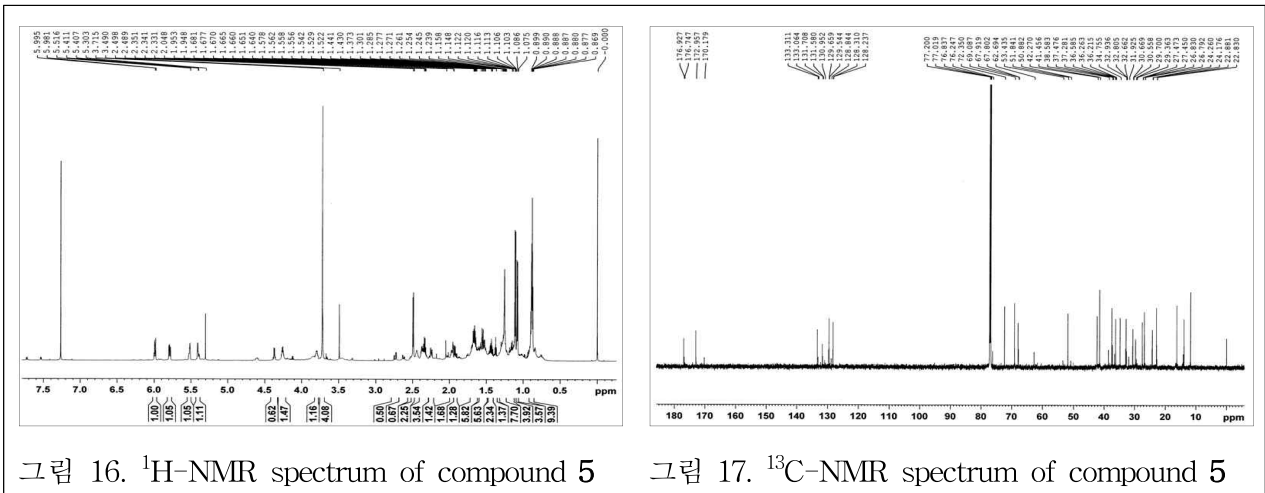


그림 16. ^1H -NMR spectrum of compound 5

그림 17. ^{13}C -NMR spectrum of compound 5

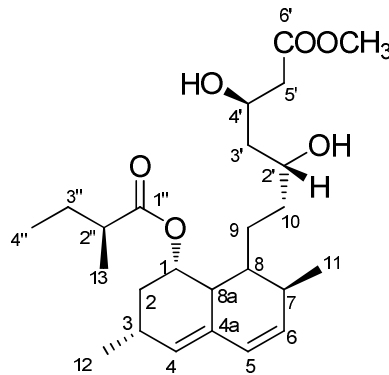


그림 18. Compound 5의 구조

(5) Identification of compound 8 (daidzein)

- Colorless needles; ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.81 (1H, br s, OH-7), 9.58 (1H, br s, OH-4'), 8.28 (1H, s, H-2), 7.96 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5), 7.38 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (1H, dd, $J = 2.1, 8.9$ Hz, H-6), 6.86 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.81 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'); For ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) data see 表 2. The ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data were in consistent with those reported.

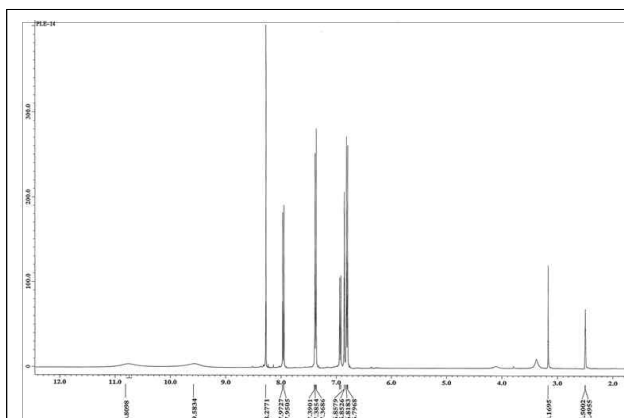


그림 19. ^1H -NMR spectrum of compound 8

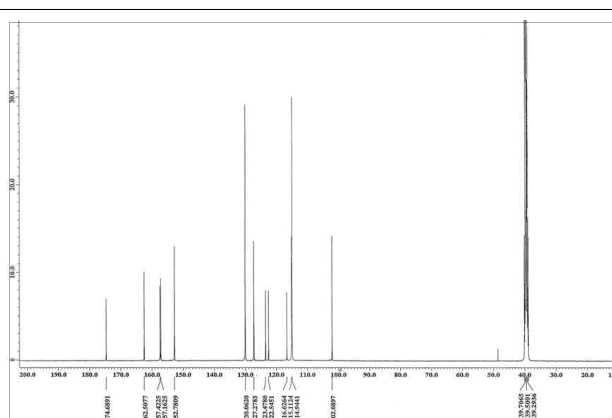


그림 20. ^{13}C -NMR spectrum of compound 8

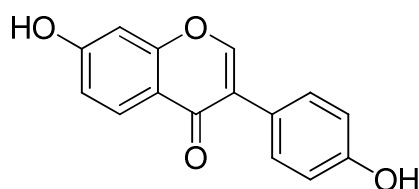


그림 21. Compound 8의 구조

(6) Identification of compound 9 (genistein)

- White powder; ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.95(1H, br s, 5-OH), 10.87 (1H, br s, 7-OH), 9.58 (1H, br s, 4'-OH), 8.31 (1H, s, H-2), 7.37 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6); For ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) data see ㄷ 2. The ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data were in consistent with those reported.

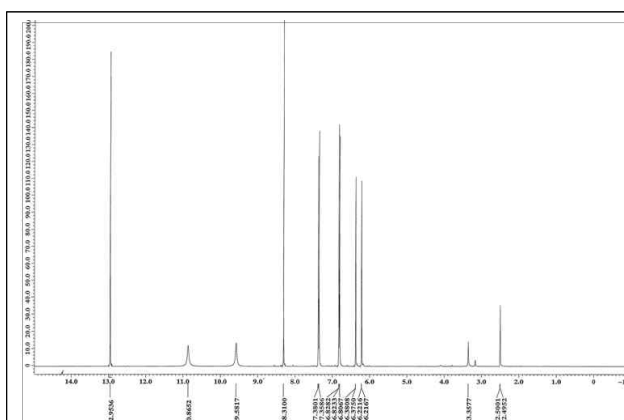


그림 22. ^1H -NMR spectrum of compound 9

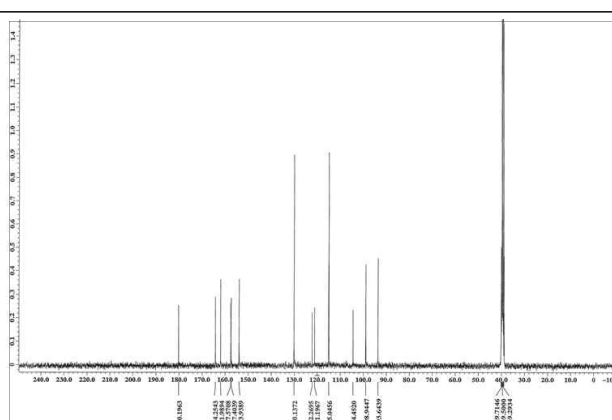


그림 23. ^{13}C -NMR spectrum of compound 9

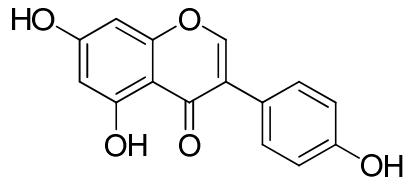


그림 24. Compound 9의 구조

(7) Identification of compound 10 (daidzin)

- Colorless needles; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 9.56 (1H, s, OH-4'), 8.39 (1H, s, H-2), 8.05 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5), 7.41 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 7.23 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 7.14 (1H, dd, $J = 2.3, 8.6$ Hz, H-6), 6.82 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 5.45 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, OH-2''), 5.17 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, OH-3''), 5.11 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 4.62 (1H, t-like, $J = 5.5$ Hz, OH-6''), 3.72 (1H, m, H-6''), 3.47 (2H, m, H-5'', 6''), 3.31 (2H, m, H-2'', 3''), 3.17 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-4''); For $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) data see 表 2. The $^1\text{H-}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data were in consistent with those reported.

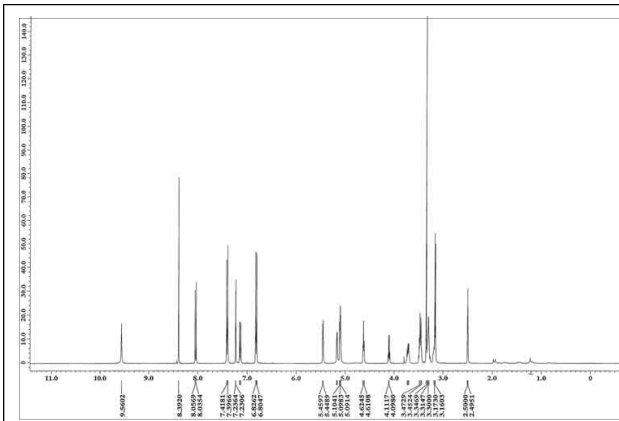


그림 25. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 10

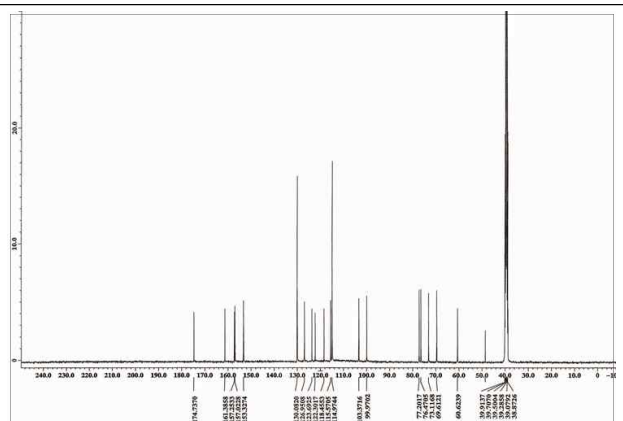


그림 26. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 10

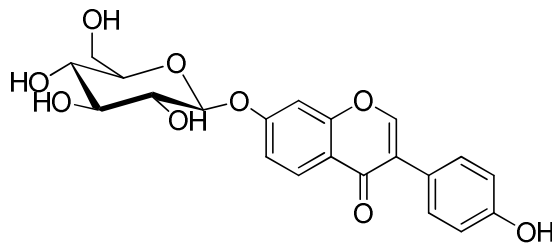


그림 27. Compound 10의 구조

(8) Identification of compound 11 (genistin)

- Colorless needles; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.94 (1H, s, OH-5), 9.61 (1H, s, OH-4'), 8.43 (1H, s, H-2), 7.40 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 6.72 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.47 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.41 (1H, br s, OH-2''), 5.14 (1H, br s, OH-3''), 5.06 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 4.61 (1H, br s, OH-6''), 3.71 (1H, m, H-6''), 3.46 (2H, m, H-5'', 6''), 3.27 (2H, m, H-2'', 3''), 3.17 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-4''); For $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) data see ㉠ 2. The $^1\text{H-}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data were in consistent with those reported.

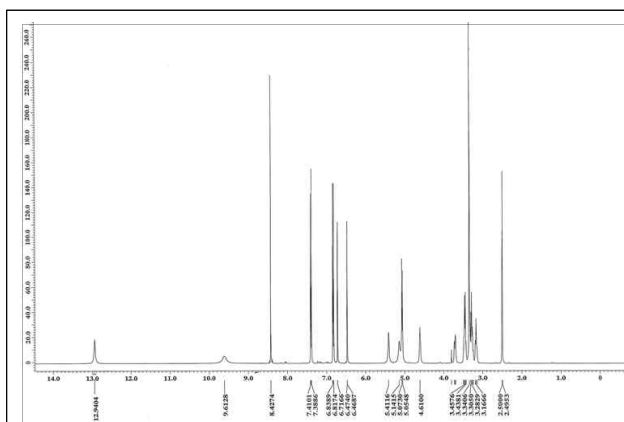


그림 28. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 11

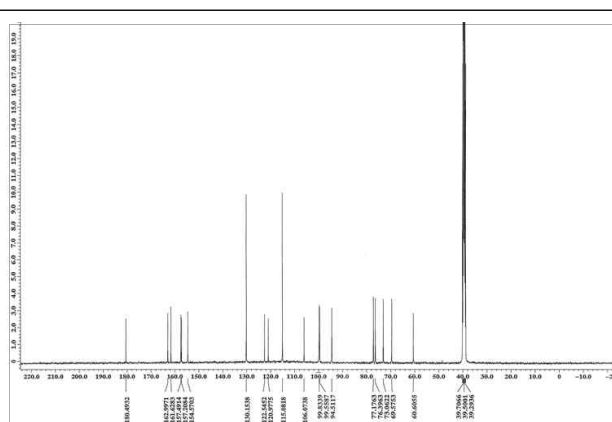


그림 29. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 11

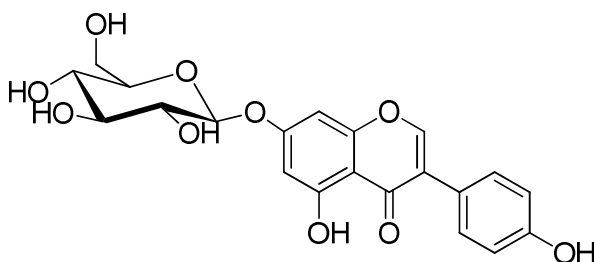


그림 30. Compound 11의 구조

표 2. ^{13}C -NMR data of compounds 8 - 11

position	8	9	10	11
2	152.8	157.4	153.3	154.5
3	122.6	122.3	123.7	122.6
4	174.7	180.2	174.7	180.5
5	127.3	162.0	127.0	161.6
6	115.1	98.7	115.6	99.6
7	162.5	164.3	161.4	163.0
8	102.1	93.6	103.4	94.5
9	157.4	153.9	157.0	157.5
10	116.6	104.5	118.5	106.1
1'	123.5	121.2	122.3	121.0
2'	130.1	130.1	130.1	130.2
3'	114.9	115.1	115.0	115.1
4'	157.2	157.6	157.3	157.2
5'	114.5	115.1	115.0	115.1
6'	130.1	130.1	130.1	130.2
1''			100.0	99.8
2''			73.1	73.1
3''			76.5	76.4
4''			69.6	69.6
5''			77.2	77.2
6''			60.6	60.6

(9) Identification of compound 12 (soyasaponin V)

- White powder; ESI-MS (positive mode) m/z 981 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (negative mode) m/z 957 $[\text{M} - \text{H}]^-$. The ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data were in consistent with those reported.

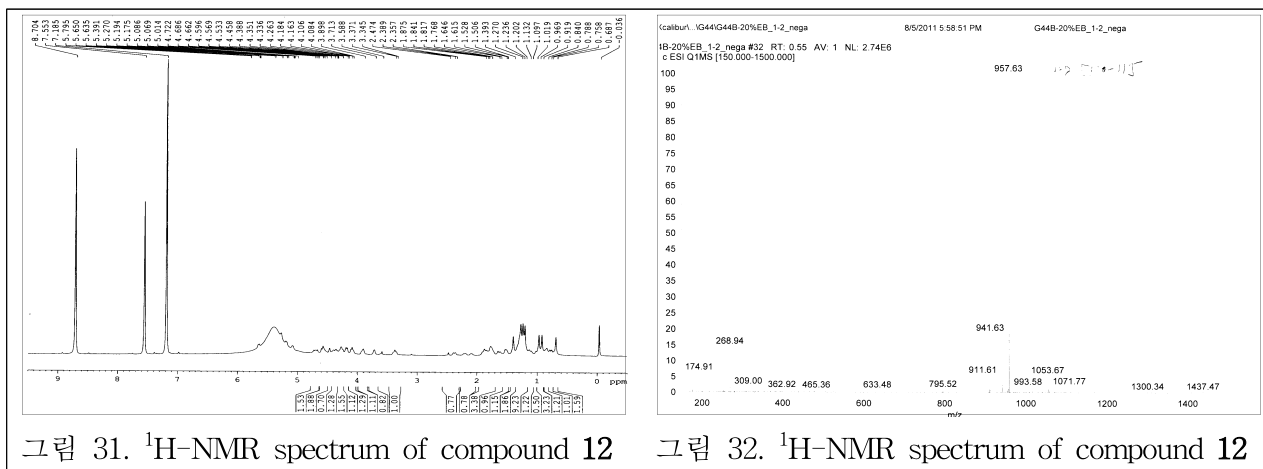


그림 31. ^1H -NMR spectrum of compound 12

그림 32. ^{13}C -NMR spectrum of compound 12

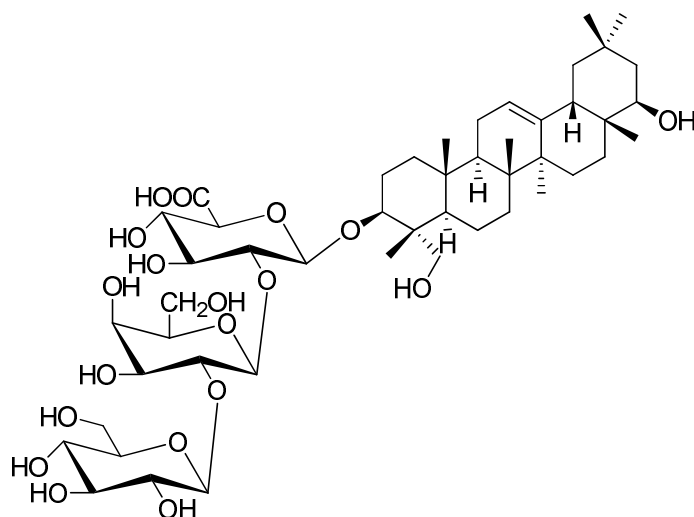


그림 33. Compound 12의 구조

(10) Identification of compound 13 (soyasaponin I)

- White powder; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) δ 6.29 (1H, brs, Rha-1), 5.80 (1H, d, J = 7.6 Hz, Gal-1), 5.27 (1H, brs, H-12), 1.39, 1.27, 1.27, 1.20, 0.97, 0.92, 0.67 (each 3H, s, *tert*-Me \times 7); ESI-MS (positive mode) m/z 965 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, (negative mode) m/z 941 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$ 795 [$\text{M} - \text{H} - \text{Rha}$] $^-$. The ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data were in consistent with those reported.

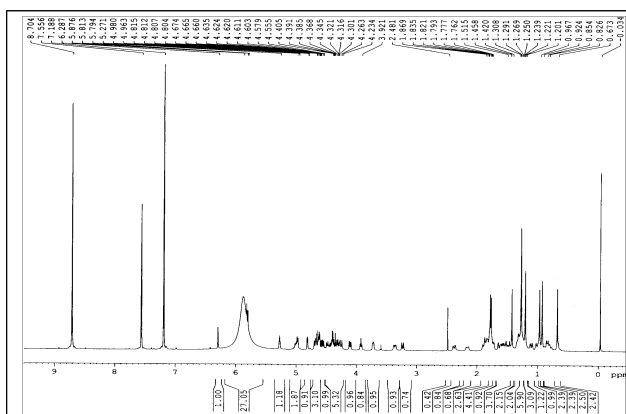


그림 34. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 13

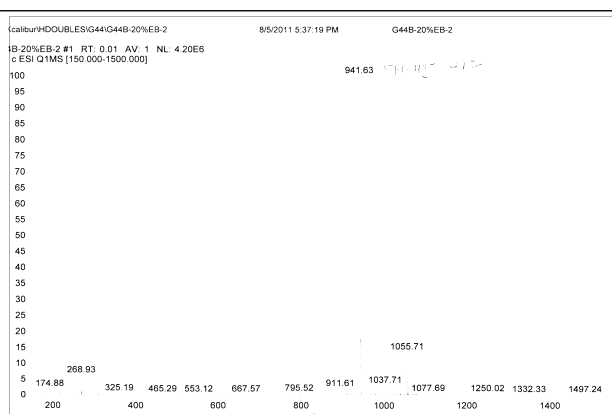


그림 35. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 13

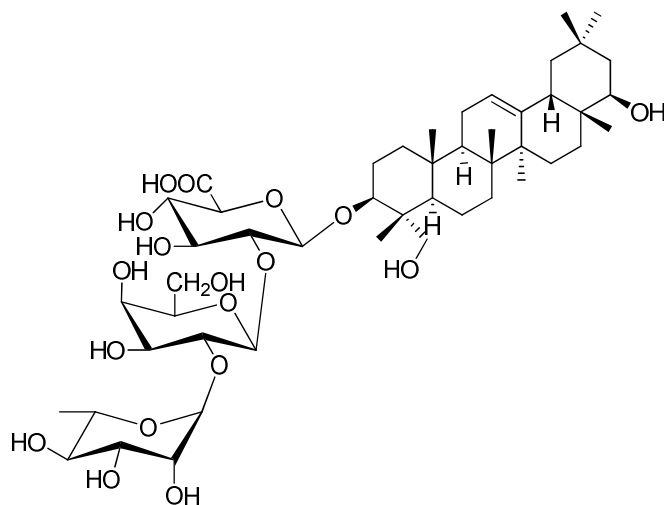


그림 36. Compound 13의 구조

(11) Identification of compound 14 (soyasaponin II)

- White powder; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) δ 6.23 (1H, brs, Rha-1), 5.59 (1H, d, J = 7.2 Hz, Gal-1), 5.27 (1H, brs, H-12), 1.41, 1.27, 1.27, 1.20, 0.97, 0.93, 0.69 (each 3H, s, *tert*-Me \times 7); ESI-MS (positive mode) m/z 935 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (negative mode) m/z 911 $[\text{M} - \text{H}]^-$. The ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data were in consistent with those reported.

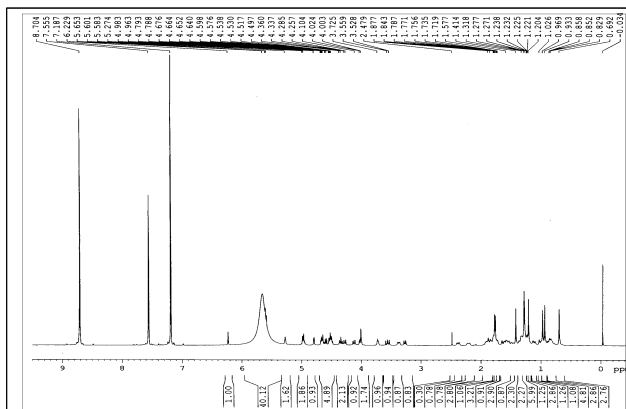


그림 37. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 14

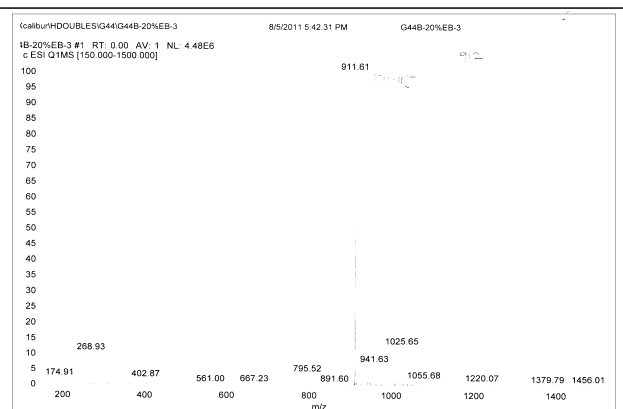


그림 38. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 14

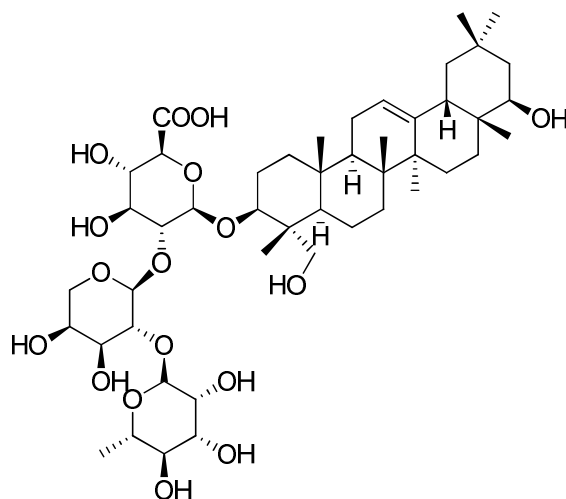


그림 39. Compound 14의 구조

(12) Identification of compound 15 (4-hydroxyphenylacetic acid)

- White powder; ESI-MS m/z 153 $[M + H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 7.71 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 6.75 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3, 5), 3.50 (2H, s, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ 174.8 (C-8), 156.0 (C-4), 129.9 (C-2, 6), 125.4 (C-1), 114.8 (C-3, 5), 39.7 (C-7). The $^1\text{H-}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data were in consistent with those reported.

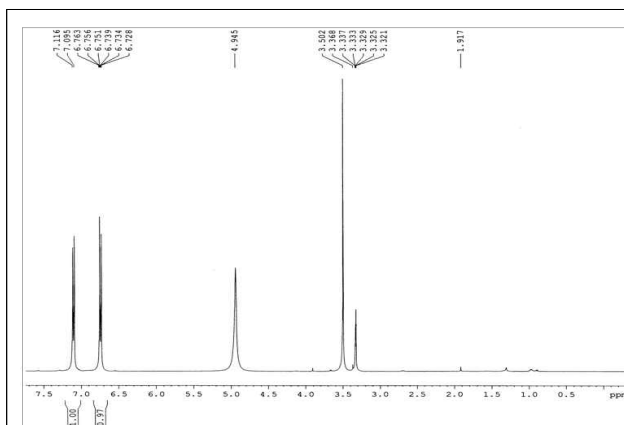


그림 40. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 15

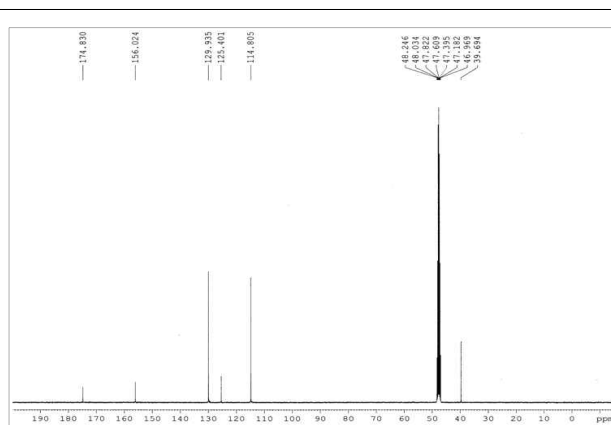


그림 41. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 15

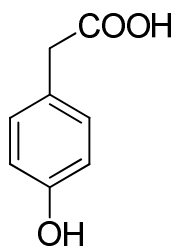


그림 42. Compound 15의 구조

(13) Identification of compound 17 (phenylalanine)

- White powder; ESI-MS m/z 167 $[M + H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.25 (5H, m, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.61 (1H, dd, $J = 8.4, 4.4$ Hz, H-8), 3.13 (1H, dd, $J = 14.4, 4.4$ Hz, H-7), 2.89(1H, dd, $J = 14.4, 8.0$ Hz, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 171.7 (C-9), 136.2 (C-1), 129.7, 129.1, 127.5 (C-4), 55.8 (C-8), 36.0 (C-7).

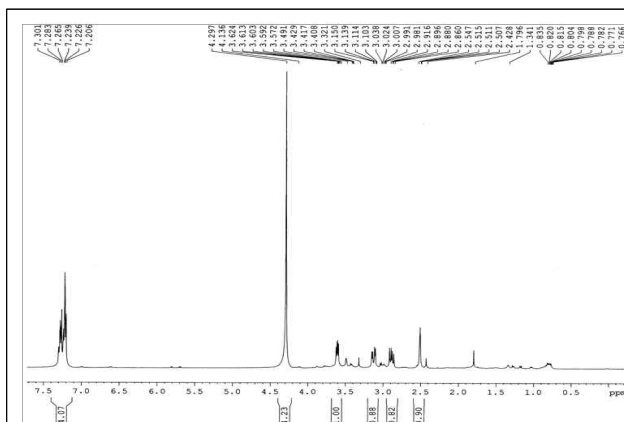


그림 43. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 17

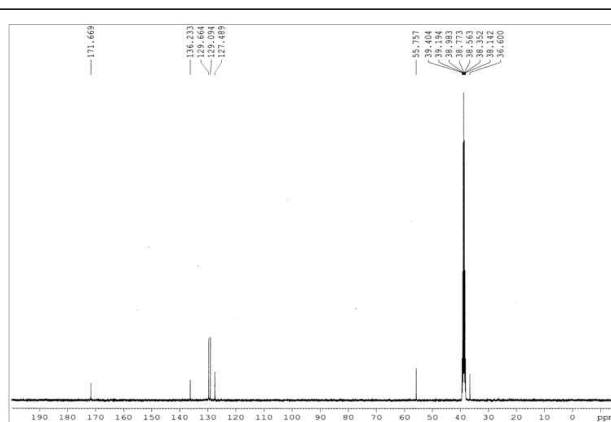


그림 44. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 17

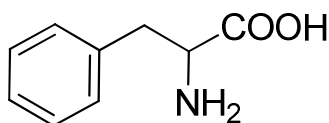


그림 45. Compound 17의 구조

(14) Identification of compound 18 (adenosine)

- White powder; ESI-MS m/z 268 $[M + H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8.36 (1H, s, H-8), 8.14 (1H, s, H-2), 7.37 (2H, s, $-\text{NH}_2$), 5.89 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 4.62 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, H-2'), 4.15 (1H, dd, $J = 2.8, 4.8$ Hz, H-3'), 3.97 (1H, d, $J = 3.2, 6.6$ Hz,

H-4'), 3.68 (1H, dd, $J = 3.6, 12.0$ Hz, H-5'), 3.56 (1H, d, $J = 3.6, 12.0$ Hz, H-5'); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ 156.6 (C-6), 152.8 (C-2), 149.5 (C-4), 140.4 (C-8), 119.8 (C-5), 88.4 (C-1'), 86.3 (C-4'), 73.9 (C-2'), 71.1 (C-3'), 62.1 (C-5'). The ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data were in consistent with those reported.

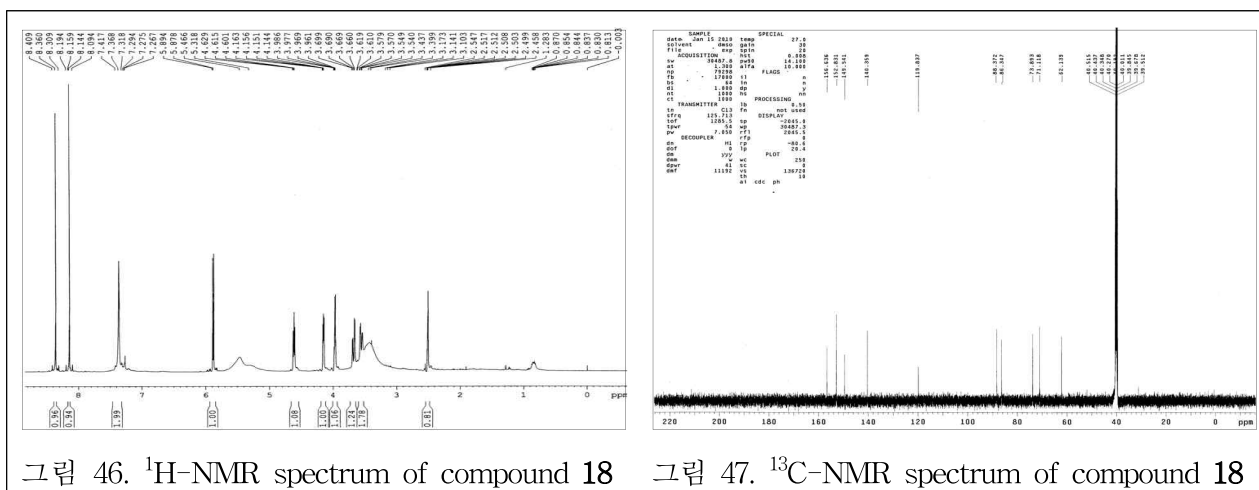


그림 46. ^1H -NMR spectrum of compound 18 그림 47. ^{13}C -NMR spectrum of compound 18

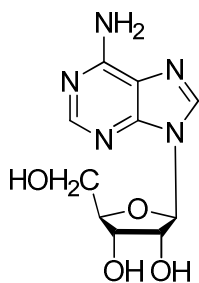


그림 48. Compound 18의 구조

(15) Identification of compound 19 (tyrptophan)

- White powder; ESI-MS m/z 167 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H -NMR (CD_3OD , 700 MHz) δ 7.73 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 7.49 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7), 7.29 (1H, s, H-2), 7.24 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 7.16 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-5), 4.00 (1H, dd, $J = 8.4, 4.9$ Hz, H-9), 3.49 (1H, dd, $J = 15.4, 4.9$ Hz, H-8), 3.27 (1H, dd, $J = 15.4, 8.4$ Hz, H-8); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 175 MHz) δ 174.0 (C-10), 136.5 (C-7a), 126.8 (C-3a), 124.7 (C-2), 122.0 (C-6), 119.3 (C-5), 118.3 (C-4), 111.7 (C-7), 107.6 (C-3), 55.2 (C-9), 26.6 (C-8). The ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data were in consistent with those reported.

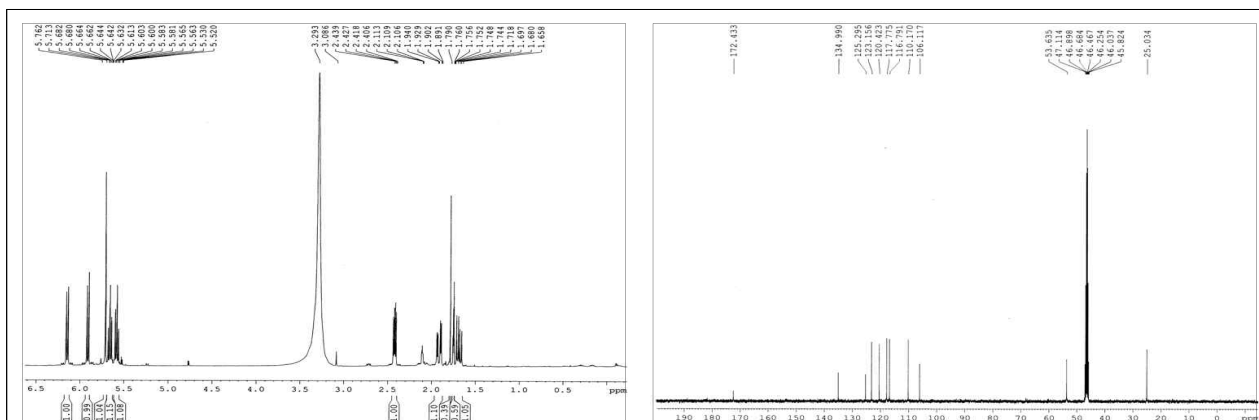


그림 49. ^1H -NMR spectrum of compound **19** 그림 50. ^{13}C -NMR spectrum of compound **19**

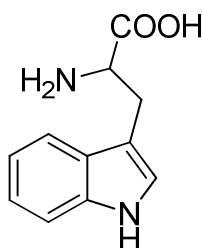


그림 51. Compound **19**의 구조

(16) Identification of compound **22** (6''-O-acetyldaidzin)

- White amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{28} - 85.4^\circ$ (c 0.28, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 255 (4.25); ^1H -NMR (700 MHz, CD_3OD) δ 8.21 (1H, s, H-2), 8.15 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.39 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2' and H-6'), 7.23 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 7.20 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-6), 6.85 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3' and H-5'), 5.11 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 4.46 (1H, dd, $J = 11.9, 1.4$ Hz, H-6''), 4.23 (1H, dd, $J = 11.9, 7.7$ Hz, H-6''), 3.78 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-5''), 3.52 (2H, m, H-2'', 3''), 3.39 (1H, m, H-4''), 2.08 (3H, s, OAc); For ^{13}C -NMR (175 MHz, CD_3OD) data see 表 3; ESI-MS (positive mode) m/z 459 $[\text{M}+\text{H}]^+$; ESI-MS (negative mode) m/z 503 $[\text{M}+\text{COOH}]^-$, 961 $[2\text{M}+\text{COOH}]^-$. The ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data were in consistent with those reported.

ESI-MS (negative mode) m/z 269 [M-ribose]⁻, 401 [M-H]⁻, 447 [M+COOH]⁻; HRESIMS (negative mode) m/z 401.0868 (calcd for C₂₀H₁₇O₉, 401.0867).

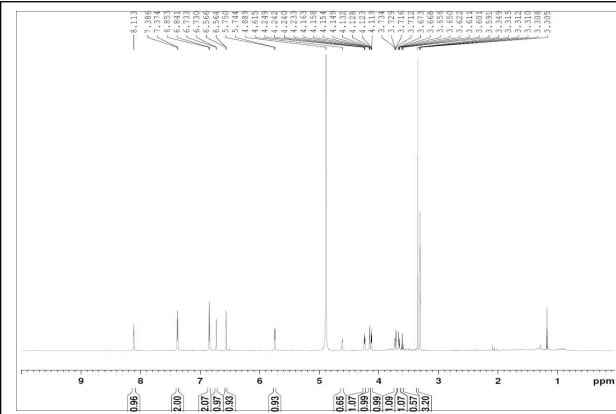


그림 55. ¹H-NMR spectrum of compound 23

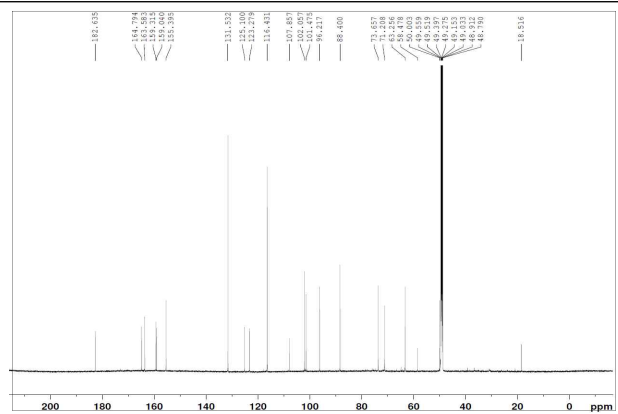


그림 56. ¹³C-NMR spectrum of compound 23

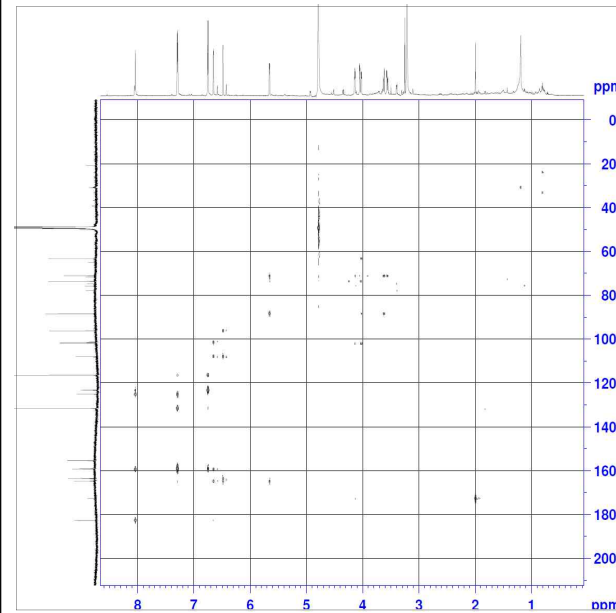


그림 57. HMBC spectrum of compound 23

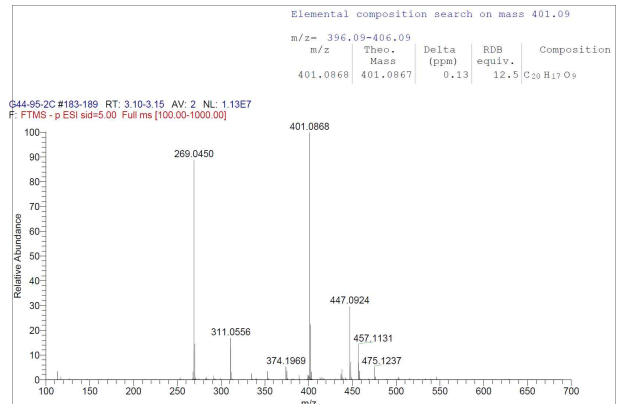


그림 58. HRESI-MS spectrum of compound 23

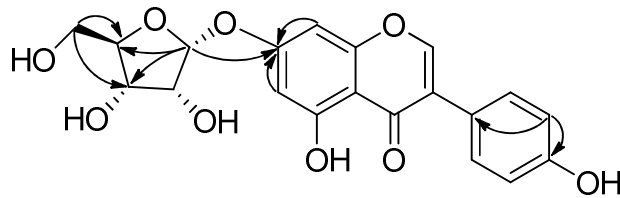


그림 59. Key HMBC correlations of Compound 23

(18) Identification of compound 24 (6''-O-acetylgenistin)

- White amorphous powder; $[\alpha]_D^{28} - 90.2^\circ$ (c 0.36, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 260 (4.15), 327 (3.56); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) δ 8.10 (1H, s, H-2), 7.39 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2' and H-6'), 6.86 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3' and H-5'), 6.63 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.48 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.00 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 4.46 (1H, dd, $J = 11.9, 1.4$ Hz, H-6''), 4.25 (1H, dd, $J = 11.9, 7.7$ Hz, H-6''), 3.73 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-5''), 3.51 (2H, m, H-2'', 3''), 3.39 (1H, m, H-4''), 2.11 (3H, s, OAc); $^{13}\text{C-NMR}$ (175 MHz, CD_3OD) spectroscopic data, see \S 3; ESI-MS (negative mode) m/z 473 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 947 $[2\text{M} - \text{H}]^-$, 993 $[2\text{M} + \text{COOH}]^-$. The ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data were in consistent with those reported.

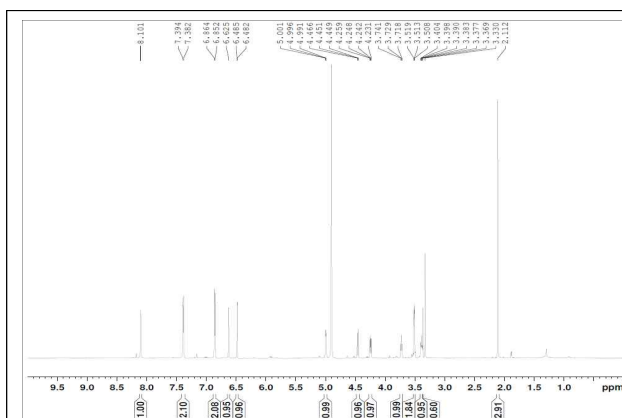


그림 60. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 24

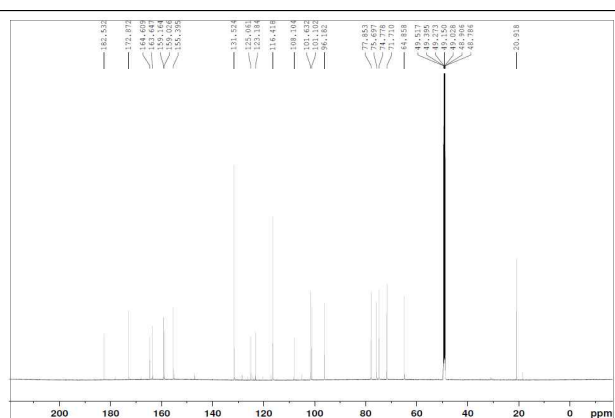


그림 61. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 24

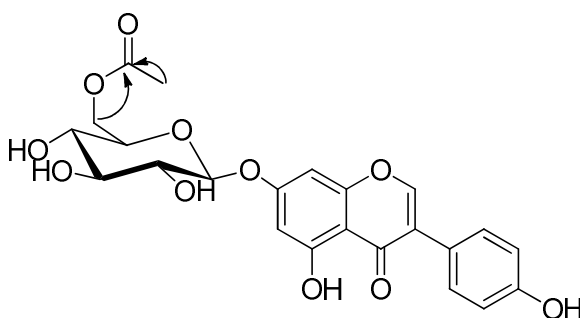


그림 62. Compound 24의 구조

(19) Identification of compound 25 (6''-O-crotonylgenistin)

- White amorphous powder; $[\alpha]_D^{28} - 76.9^\circ$ (c 0.1, MeOH); IR λ_{\max} 3516, 3455, 2918, 2853, 1709, 1656, 1511, 1442, 1370, 1239, 1182, 1073 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 260

(4.05), 329 (3.25); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) δ 8.16 (1H, s, H-2), 7.41 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2' and H-6'), 7.05 (1H, dd, $J = 15.4, 7.0$ Hz, H-3'''), 6.87 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3' and H-5'), 6.67 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-8), 6.54 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-6), 5.94 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-2'''), 5.05 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 4.53 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-6''b), 4.27 (1H, dd, $J = 11.9, 7.7$ Hz, H-6''a), 3.79 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-5''), 3.52 (2H, m, H-2'', 3''), 3.40 (1H, m, H-4''), 1.90 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, Me-4'''); and $^{13}\text{C-NMR}$ (175 MHz, CD_3OD) spectroscopic data, see 3; ESI-MS (negative mode) m/z 499 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 545 $[\text{M} + \text{COOH}]^-$, 999 $[2\text{M} - \text{H}]^-$, 1045 $[2\text{M} + \text{COOH}]^-$; HRESIMS (negative mode) m/z 499.1233 (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_{11}$, 499.1235).

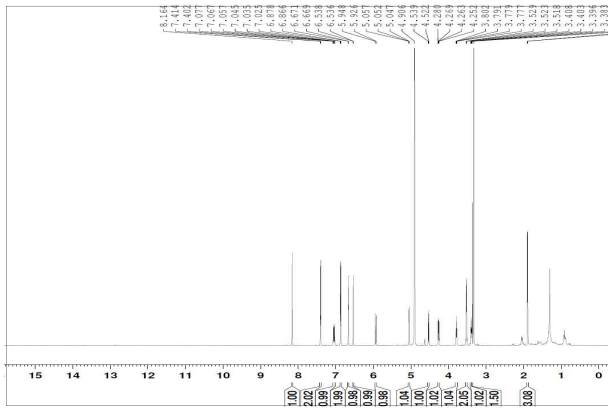


그림 63. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 25

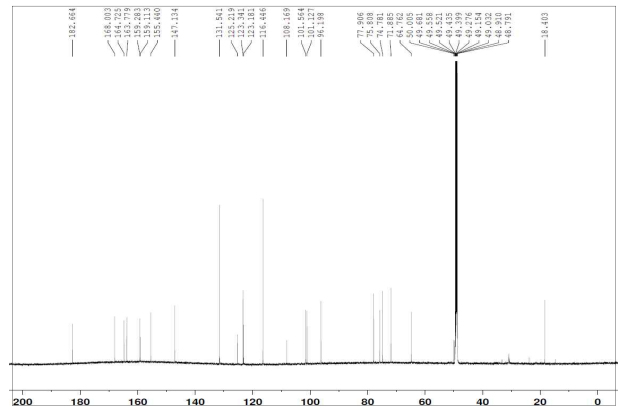


그림 64. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 25

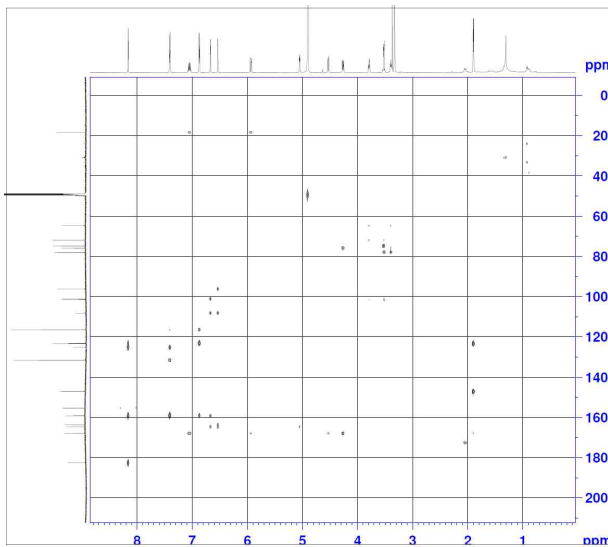


그림 65. HMBC spectrum of compound 25

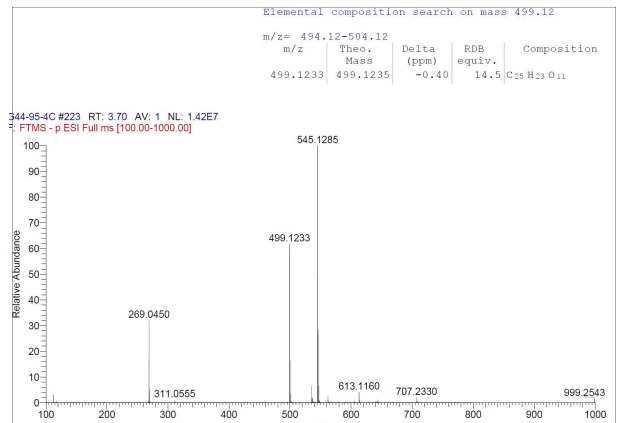


그림 66. HRESI-MS spectrum of compound 25

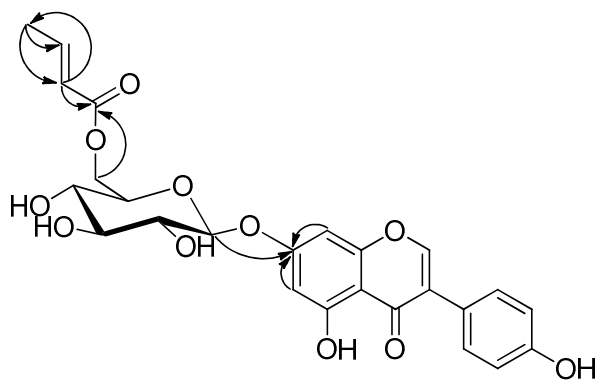


그림 67. Key HMBC correlations of Compound 25

Table 3. ^{13}C -NMR data of compounds **22** – **25** in CD_3OD^a

position	22	23	24	25
2	155.2	154.6	155.4	155.4
3	126.4	122.5	125.1	125.2
4	178.2	180.5	182.5	182.6
5	128.5	161.5	163.6	163.8
6	117.2	99.4	101.1	101.1
7	163.5	163.0	164.6	164.7
8	105.1	94.7	96.2	96.2
9	159.3	157.2	159.2	159.3
10	120.4	105.8	108.1	108.1
1'	124.2	121.0	123.2	123.2
2'	131.6	130.2	131.5	131.5
3'	116.4	115.1	116.4	116.4
4'	159.0	157.5	159.0	159.1
5'	116.4	115.1	116.4	116.4
6'	131.6	130.2	131.5	131.5
1''	101.8	100.3	101.6	101.6
2''	74.8	71.6	74.8	74.8
3''	77.9	69.2	77.9	77.9
4''	71.7	86.8	71.7	71.9
5''	75.7	61.4	75.7	75.8
6''	64.9		64.9	64.8
1'''				168.0
2'''				123.3
3'''				147.1
4'''				18.4
OAc	172.8		172.9	
	20.9		20.9	

^aSpectra were recorded at 700 MHz for ^1H -NMR and 175 MHz for ^{13}C -NMR using TMS as internal standard. The assignments were based on ^1H - ^1H COSY, HSQC, and HMBC experiments.

(20) Identification of compound 26 (9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid)

- Gummy, white solid; $[\alpha]_D^{25}$ -18.3° (c 0.1, CH₃OH); IR (KBr) ν_{\max} 3541, 3352, 2930, 2847, 1691, 1456, 1311, 1069 cm⁻¹; ¹H-NMR (700 MHz, CD₃OD) δ 5.73 (1H, dd, J = 15.4, 6.3 Hz, H-10), 5.69 (1H, dd, J = 15.4, 6.3 Hz, H-11), 4.07 (1H, dd, J = 12.6, 6.3 Hz, H-9), 3.93 (1H, t, J = 6.3 Hz, H-12), 3.43 (1H, m, H-13), 2.30 (2H, t, J = 7.7 Hz, H-2), 1.62 (2H, m, H-3), 1.55 (1H, m, H-8b), 1.36 (16H, brs, H-4, 5, 6, 7, 8b, 14a, 15, 16, 17), 0.93 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-18); ¹³C-NMR (175 MHz, CD₃OD) δ 177.9 (C-1), 136.7 (C-11), 131.2 (C-10), 76.7 (C-12), 75.9 (C-13), 73.2 (C-9), 38.5 (C-8), 35.1 (C-2), 33.7 (C-14), 33.3 (C-16), 30.7 (C-5 or C-6), 30.6 (C-5 or C-6), 30.3 (C-4), 26.8 (C-7), 26.6 (C-3 or C-15), 26.2 (C-3 or C-15), 23.9 (C-17), 14.6 (C-18); ESIMS (positive) m/z 353.85 [M + Na]⁺, 683.42 [2M + H]⁺; ESIMS (negative) m/z 329.72 [M - H]⁻, 659.83 [2M - H]⁻. The ¹H- and ¹³C-NMR spectral data were in consistent with those reported.

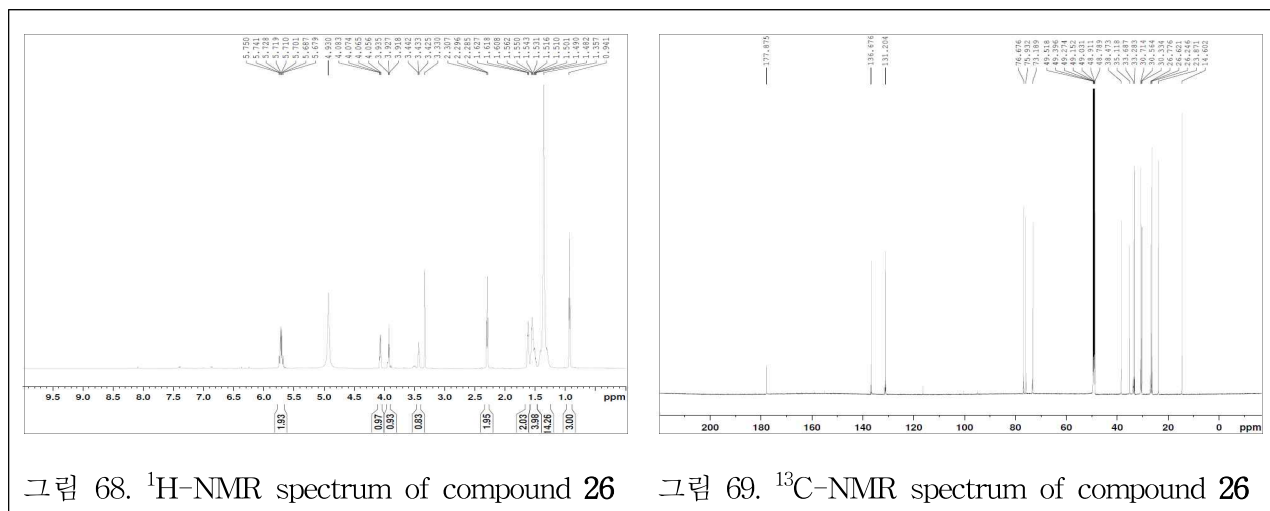


그림 68. ¹H-NMR spectrum of compound 26

그림 69. ¹³C-NMR spectrum of compound 26

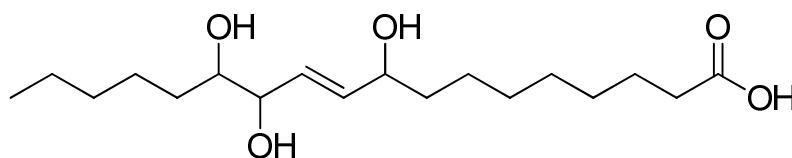


그림 70. Compound 26의 구조

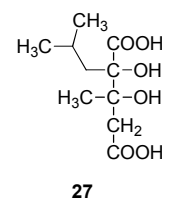
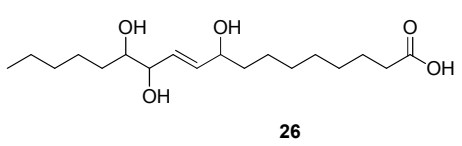
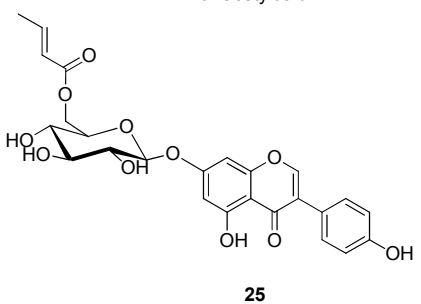
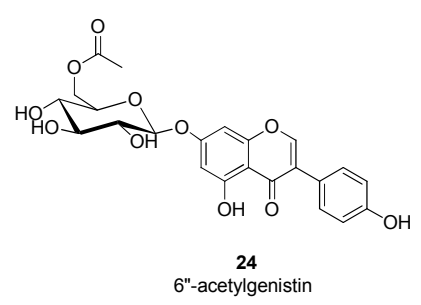
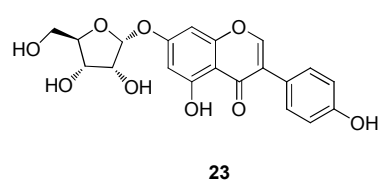
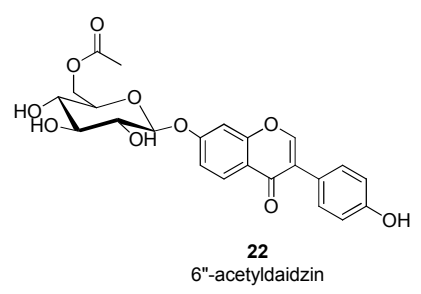
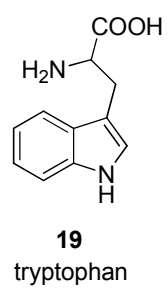
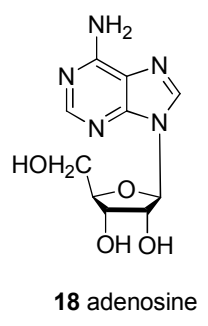
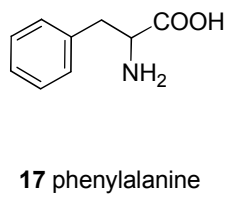
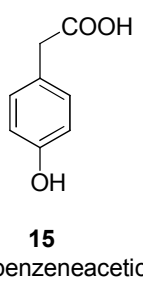
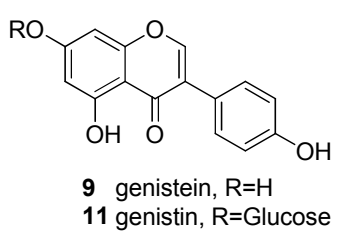
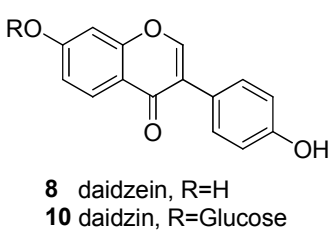
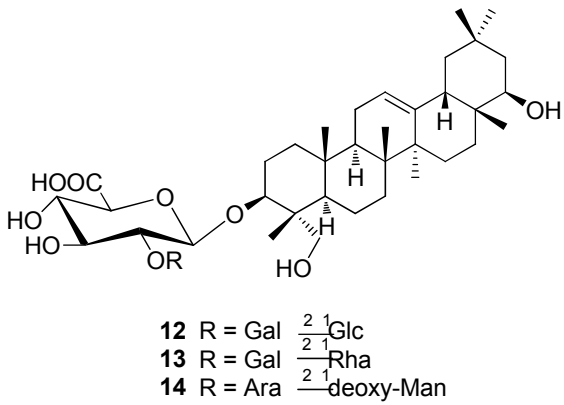
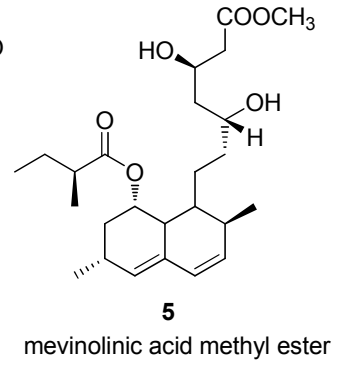
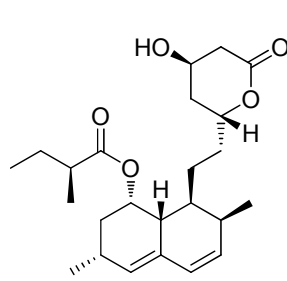
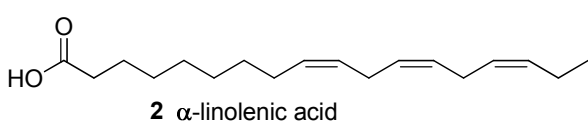
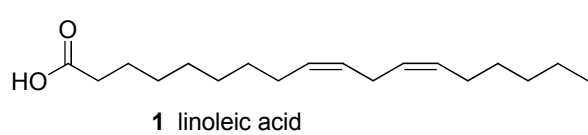


그림 74. *Monascus*속 발효산물로부터 분리한 화합물의 구조

2. *Manascus*속 대량배양 균사체로부터 항비만 활성 억제 및 작용메커니즘 규명

가. 전구지방세포를 이용한 지방세포로의 분화유도 작용기전 연구 실험 방법

(1) 3T3-L1 지방전구세포의 준비

- 3T3-L1 지방전구세포는 미국세포주은행(ATCC)으로부터 구매하여 실험에 사용하였음. 3T3-L1은 지방세포의 대사과정을 연구하는 데에 널리 이용되는 세포주으로써, 상기 세포의 분화가 활발할수록 지방세포 내의 지방 축적이 활발하여 비만을 유도하게 됨. 따라서 항비만 효과를 가질 것으로 생각되는 물질을 상기 세포에 처리하였을 때, 세포의 분화가 적을수록 항비만 효과가 큰 물질인 것으로 볼 수 있음.

(2) 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화 유도

- 마우스 전구지방세포인 3T3-L1을 10 % BCS DMEM 배지를 넣고 37 °C, 5 % CO₂의 조건에서 배양하였음. 3T3-L1 전구지방세포를 24 well plate에 5×10⁴/well의 세포 수로 분주한 후, 100 % confluency 시점이 되면 2일 동안 더 유지시켰음. 전구지방세포는 MDI (0.5 mM 3-isobutyl -1-methylxanthine (IBMX), 1 uM dexamethasone, 1 ug/ml 인슐린)를 포함하는 10% FBS DMEM 배지로 지방세포 분화를 2일 동안 유도하였고, 배양 48 시간 후, 1 ug/ml 인슐린이 함유된 10% FBS DMEM으로 이틀 동안 배양하였음. 그 후 2일 마다 4일 동안 10 % FBS DMEM 배양액으로 교체하고 지방세포 분화를 유도하는 동안 홍국균 시료를 25, 50, 100 ug/ml 농도까지 처리하고, 분화가 완성되는 시점인 8일째에 지방세포 분화 정도를 관찰하였음.

(3) 오일 레드 O (Oil Red O) 염색 및 분석

- 지방의 축적 정도를 확인하기 위해 오일레드 O 염색을 실시하였음. 상기 전구지방세포 분화 유도 방법과 마찬가지로 지방세포의 분화 정도를 오일 레드 O 염색을 통해 1차적으로 현미경을 통해 확인하였고, 지방세포 염색 정도는 510 nm 흡광도에서 세포의 분화 된 지방의 양을 측정하였음.

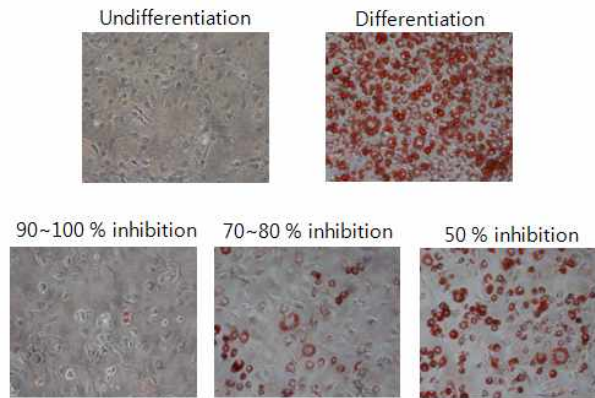


그림 75. 3T3-L1 세포주를 이용하여 전구지방세포에서 지방세포의 분화억제에 따른 지방량 감소를 측정하여 항비만 활성능을 육안과 지방 염색량의 발색정도에 따라 흡광도로 측정

(4) Real-Time PCR

- 지방세포로 분화 단계에서 C/EBP α 와 PPAR γ 는 분화 된 지방세포에서 발현 양이 증가하고 대부분의 아디포카인(adipokine) 들의 발현도 증가하게 됨. 지방세포 분화 유도 방법과 마찬가지로 홍국균 시료를 처리 한 후 8일 동안 분화를 시켜 C/EBP α 와 PPAR γ , 지방세포 분화에 관여하는 유전자들의 발현 정도를 Real-time PCR로 확인하였고, 분화가 완벽히 된 3T3-L1 세포를 PBS로 두 번 세척한 후 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 넣어서 세포를 용해시킨 후 chloroform (Sigma, ST. Louis, MO, U.S.A)를 넣고 13000rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 얻었음. 상층액과 isopropanol을 섞은 후 반응시켜 RNA를 침전시킨 후 에탄올로 1회 세척하여 RNA를 분리하여 추출된 RNA를 1 ug 사용하여 cDNA를 합성한 후 SYBR green과 primer를 이용하여 Real-time PCR을 수행하였으며, 대조군 유전 자로는 GAPDH를 사용하였음.

표 4. The primer sequence used for real-time PCR

Target	Primer sequences	Accession No.
GAPDH	5'-GTATGACTCCACTCACGGCAA-3' (sense)	BC083080
PPAR γ	5'-GGTCTCGCTCCTGGAAGATG-3' (antisense)	NM_011146
	5'-CGCTGATGCACTGCCTATGA-3' (sense)	
C/EBP α	5'-AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC-3' (antisense)	BC058161
	5'-AGGTGCTGGAGTTGACCAGT-3' (sense)	
Adiponectin	5'-CAGCCTAGAGATCCAGCGAC-3' (antisense)	NM_009605
	5'-AGCCTGGAGAAGCCGCTTAT-3' (sense)	
aP2	5'-TTGCAGTAGAACTTGCCAGTGC-3' (antisense)	NM_024406
	5'-CATGGCCAAGCCCAACAT-3' (sense)	
Resistin	5'-CGCCCAGTTTGAAGGAAATC-3' (antisense)	NM_022984
	5'-TCAACTCCCTGTTTCCAAATGC-3' (sense)	
Fas	5'-TCTTACGAATGTCCCACGA-3' (antisense)	NM_007988
	5'-CTGAGATCCCAGCACTTCTTGA-3' (sense)	
	5'-GCCTCCGAAGCCAAATGAG-3' (antisense)	

(5) Western blotting

- PPAR γ , C/EBP α , Fas 등의 단백질 발현 정도는 지방세포 분화 유도 방법과 같이 3T3-L1 세포에 시료를 이틀 간격으로 처리하고, AMPK 인산화 정도는 MDI 배지에 시료를 30분, 1시간, 2시간, 3시간 시간별로 처리하여 세포를 PBS로 두 번 wash하고 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM sodium chloride, 1 % NP-40, 0.5 % sodium dexycholate, 0.1 % sodium dodecyl sulfate, protease inhibitor)를 이용하여 세포를 용해시켰음. 13000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 단백질을 추출 정량하여 8 % SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동하고 전기 영동된 protein 들을 membrane에 이동시킨 후 5% skim milk를 포함하는 TBST로 blocking 하였음. 1차 항체 (PPAR γ , C/EBP α) SantaCruz, (AMPK, ACC, Fas) Cell signaling과 2차 항체 Cell signaling으로 반응시킨 후 ECL을 통해 각 단백질의 발현 정도를 β -actin의 발현 정도와 비교하여 평가하였음.

나. 발효 조건에 따른 홍국균 추출 시료에 대한 세포내 항비만 효과

- 세포내 항비만 효능이 우수한 최적 발효 조건에 따른 홍국균 배양균 시료를 찾기 위해 총 26종의 발효조건이 다른 시료를 통해 지방세포 분화 억제 활성을 검색함.
- M-2, M-3, M-4, B1M1, B1M2, B1M3, B1M4, B2M1, B2M2, B2M3, B2M4, B2MB, SF-K1, B2MA, B3, B3MD, B3MG, B3MH, MPM, B3MF, B3MI, B3MJ, B3MK, B4ML, B3MM, B3MN (26 종)
- 지방세포 분화억제 효능과 MK, MKA 함량 분석을 통해 함량이 우수한 B2MA, SF-K1, B3MG, B3MI 4종의 샘플을 최적 시료로 선정하였음.

(1) 발효조건에 따른 홍국 배양시료 26종의 지방세포 분화억제 효과

표 5. 에탄올의 % 별로 추출한 시료

Name	에탄올 추출 %	Name	에탄올 추출 %	Name	에탄올 추출 %
M2		M3		M4	
3-1	25% 에탄올추출물	3-5	25% 에탄올추출물	3-9	25% 에탄올추출물
3-2	50% 에탄올추출물	3-6	50% 에탄올추출물	3-10	50% 에탄올추출물
3-3	75% 에탄올추출물	3-7	75% 에탄올추출물	3-11	75% 에탄올추출물
3-4	100% 에탄올추출물	3-8	100% 에탄올추출물	3-12	100% 에탄올추출물

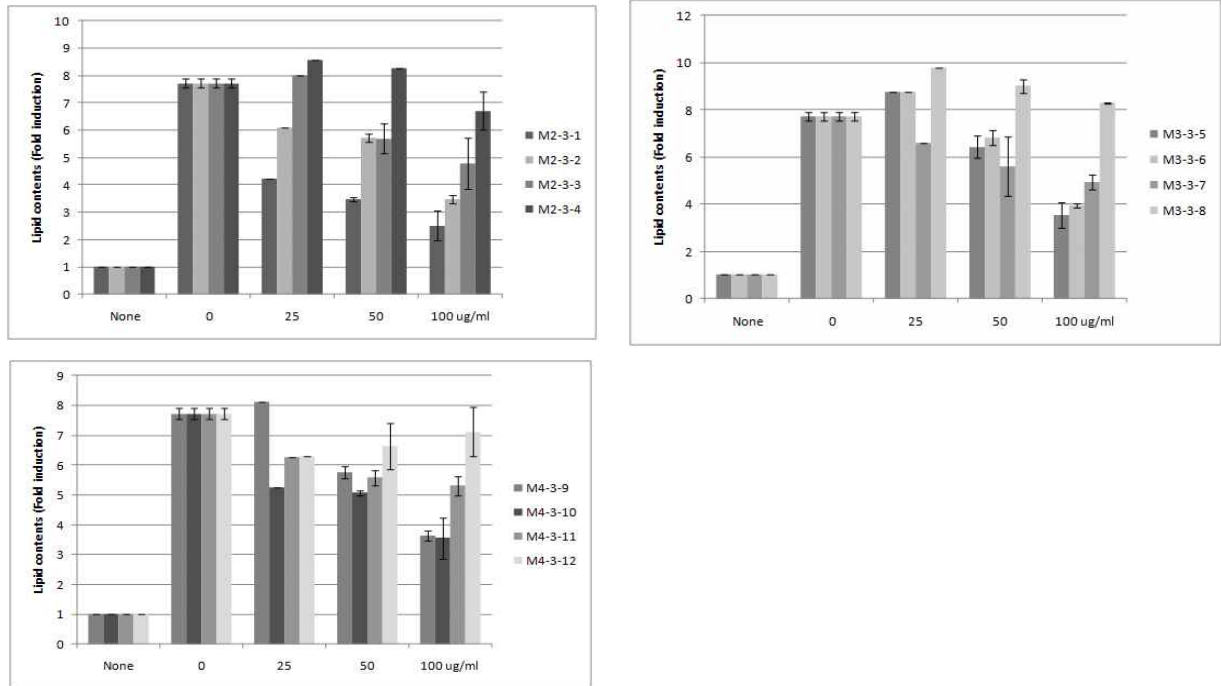


그림 76. M2~M4 홍국균 추출물의 지방세포 분화억제 효과

- 마우스의 전구지방세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 지방 세포로의 분화억제 실험을 수행한 결과, 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 비지발효를 이용한 홍국균 추출물 (M2~M4) 25% 에탄올 추출물에서 대체적으로 억제 효과가 나타남.

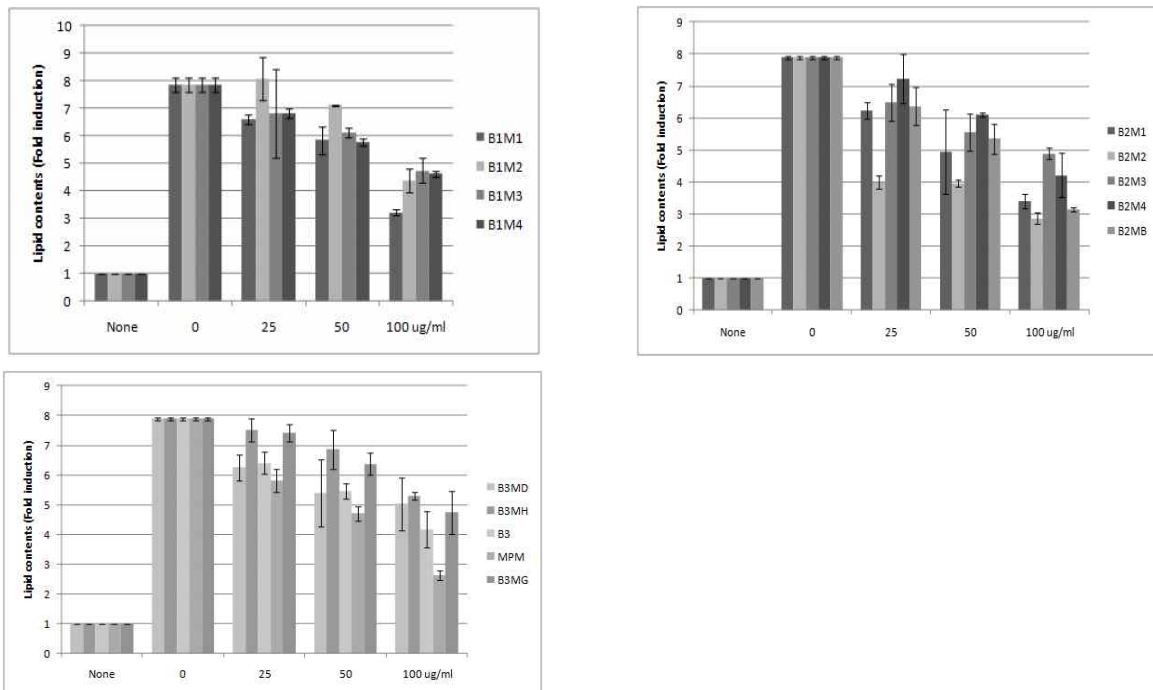


그림 77. 14종의 홍국배양시료 추출물의 지방세포 분화억제 효과

- 14종 메탄올 추출물 중 시료 B1M1, B2M1, B2M2, MPM에서 100 ug/ml에서 50% 이상의 분화 억제 효과가 관찰되었음.

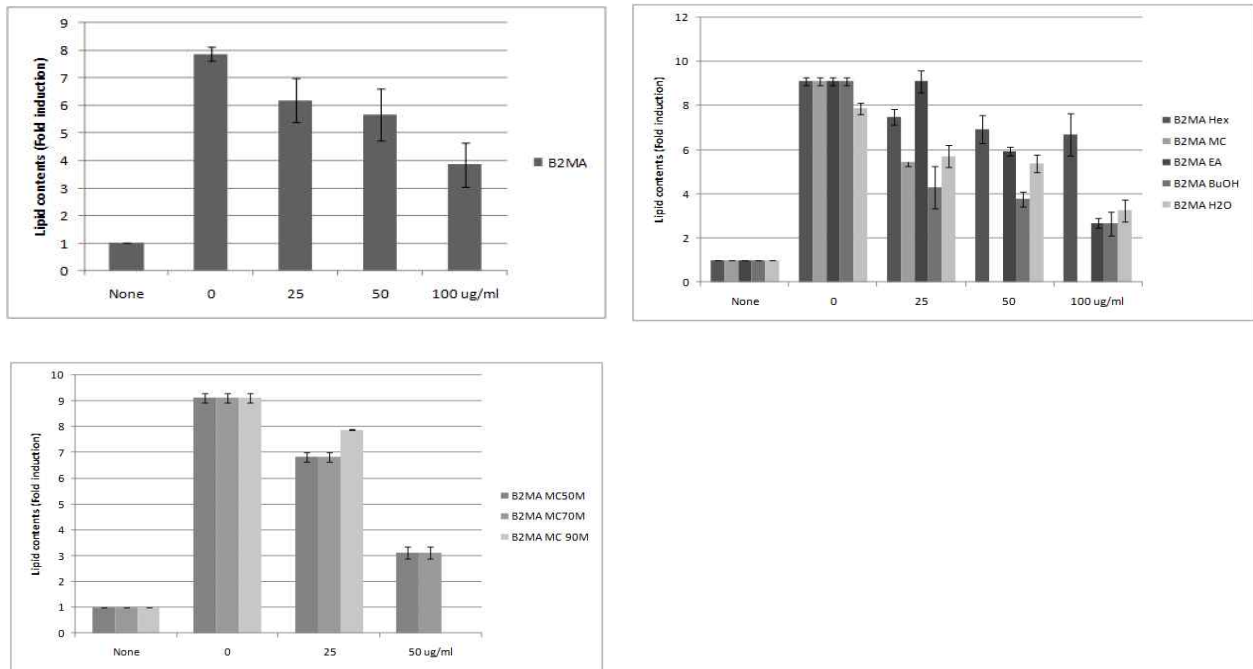


그림 78. B2MA 추출물 및 그 분획물의 지방세포 분화억제 효과

- B2MA 추출물 활성은 농도 의존적으로 25, 50, 100 ug/ml에서 지방 분화억제 효과가 나타났음. B2MA 분획 중 MC층에서는 독성이 나타났고, EA, BuOH, H₂O층의 100ug/ml 농도에서 60% 이상의 지방 분화억제 효과가 나타났음. B2MA MC 분획 중 50M, 70M, 90M의 100ug/ml 농도에서는 독성이 나타났고 50M, 70M의 50ug/ml에서 지방 분화억제 효과가 나타났음

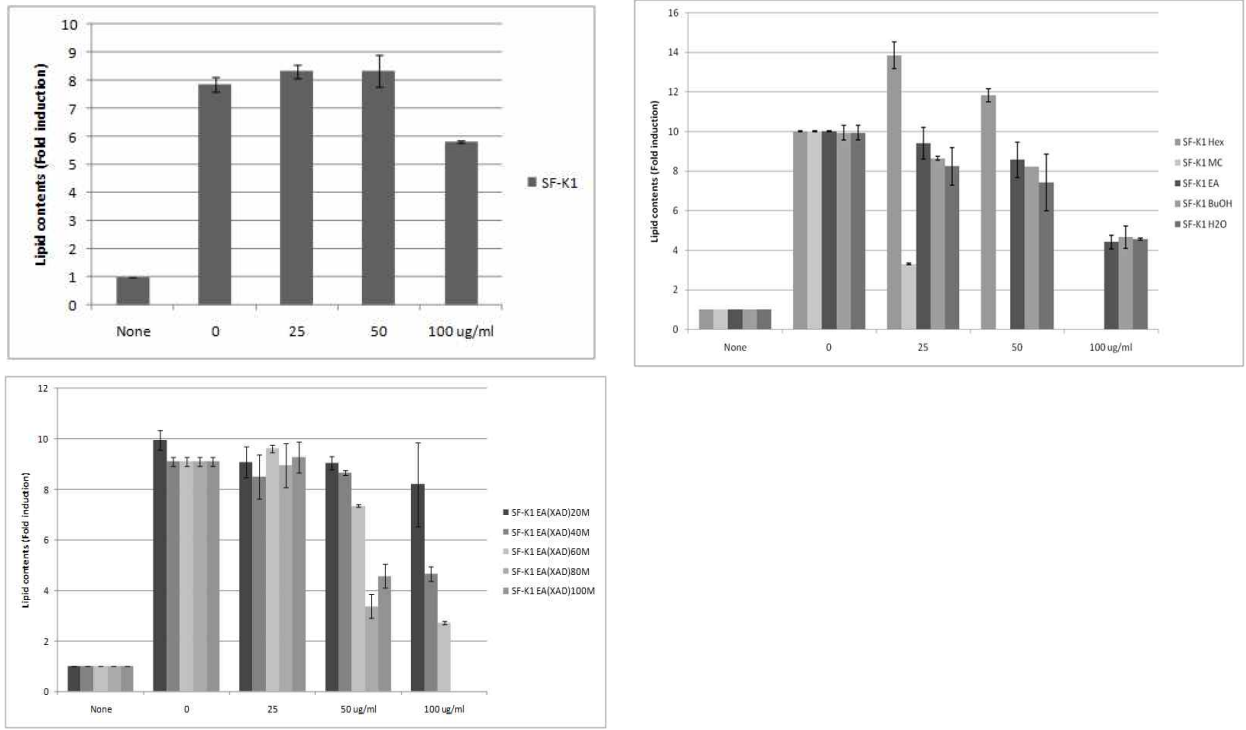


그림 79. SF-K1 추출물 및 분획물의 지방세포 분화억제 효과

- SF-K1 추출물의 활성은 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 100ug/ml에서 20% 정도 지방 분화억제 효과가 나타났음. SF-K1 분획 중 Hex, MC층에서는 독성이 나타났고, EA, BuOH, H₂O 층의 100ug/ml 농도에서 50% 이상의 분화억제 효과가 나타났음. SF-K1 EA 분획 중 XAD 80M, 100M의 경우 50ug/ml에서는 분화억제효과가 있고 100ug/ml 농도에서는 세포독성이 나타남. XAD 40M, 60M에서는 100ug/ml에서 지방 분화억제 효과를 확인하였음.

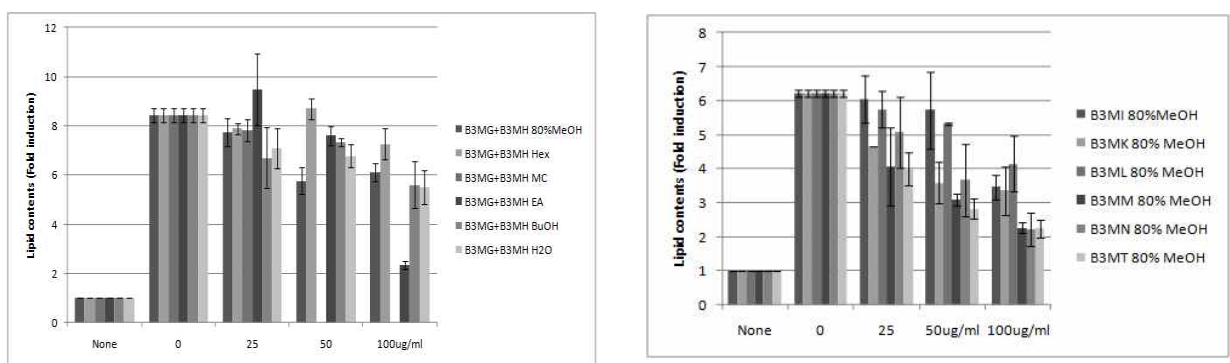


그림 80. 6종의 한국배양시료 추출물의 지방세포 분화억제 효과

- 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 B2MG&B3MH EA층 100 ug/ml에서 70%이상의 우수한 지방 분화억제 효과가 나타났음. 6종 추출물 중 B3MM, B3MN, B3MT에서 100 ug/ml의 농도처리시 50% 이상의 지방분화 억제 효과가 관찰되었음.

다. 홍국균 최적 발효 조건에 따른 추출 시료에 대한 세포내 항비만 효과 및 작용기전 연구

- 홍국균 최적 발효 조건에 따라 생산된 홍국 배양균 시료를 통해 추출된 홍국균 추출물의 세포내 항비만 효과 및 작용기전을 확인하기 위해 마우스의 전구지방세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 지방 세포로의 분화억제 실험을 수행한 결과, 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 홍국균 80% 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 지방세포 분화를 억제하는 효과를 나타냈으며, 100ug/ml 농도에서 50% 정도 억제 활성을 보였음.
- 홍국균 80% 에탄올 추출물에 의한 지방축적 억제 작용의 분자생물학적 메커니즘을 유전자와 단백질 수준에서 확인하기 위해 지방전구세포의 분화를 유도하면서 추출물을 8일 동안 처리 한 후 PPAR γ , C/EBP α 의 유전자 및 adipokine들의 mRNA 유전자 발현을 확인하였음. 그 결과 지방세포 분화에서 특이적으로 발현되는 유전자 marker인 PPAR γ , C/EBP α , ap2, Resistin, adiponectin, Fas의 발현이 홍국균 에탄올 추출물에 의해 억제됨을 확인하였음.
- 또한 홍국균 80% 에탄올 추출물에 의한 단백질 수준에서의 작용기전 확인하기 위해 지방세포 분화의 주요 지표인 PPAR γ , C/EBP α 발현 정도를 확인한 결과 유전자 레벨에서 확인한 결과와 마찬가지로 홍국균 에탄올 추출물에 의해 단백질 발현이 억제됨을 확인하였음.
- 홍국균 추출물이 지방합성에 있어서 중심적인 조절단백질의 역할을 하는 AMPK의 인산화에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해 MDI로 지방세포분화를 유도함과 동시에 홍국균 80% 에탄올 추출물 100 ug/ml을 지방전구세포의 분화를 유도하면서 추출물을 30분, 1시간, 2시간, 3시간 시간별로 처리 한 후 AMPK 신호전달 관련 단백질 발현 정도 확인하였음. 그 결과 홍국균을 처리한 30분과 1시간에서 AMPK의 인산화가 가장 증가하는 것을 확인할 수 있었음.
- 홍국균 에탄올 추출물은 지방세포 분화억제 효능을 가지면 에너지 대사 조절 지표가 되는 아디포넥틴 및 AMPK의 인산화에 영향을 주고 PPAR γ , SREBP, C/EBP α , FABPs 전사인자들을 억제 기전을 통해 체지방 감소에 효능을 줄 것으로 예상함.

(1) 홍국균 80% 에탄올 추출물의 지방세포 분화억제 효과

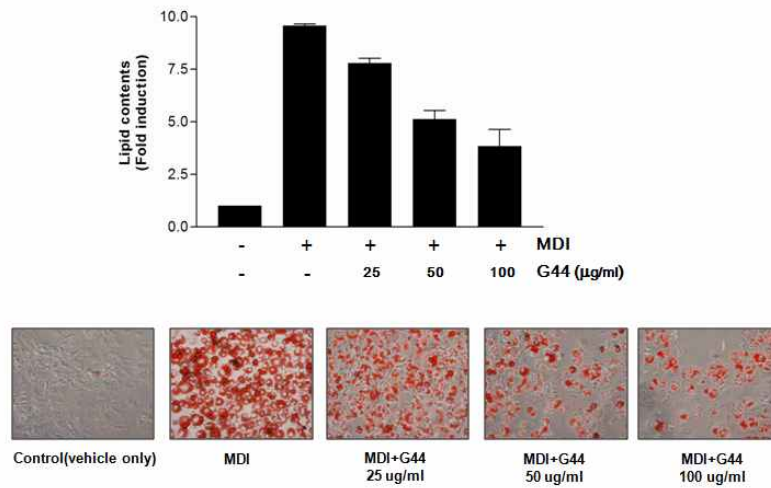


그림 81. The effects of 80% ethanol extracts of *Monascus* on differentiation in 3T3-L1 cells.

(2) 홍국균 80% 에탄올 추출물의 유전자 수준에서의 작용기전 연구

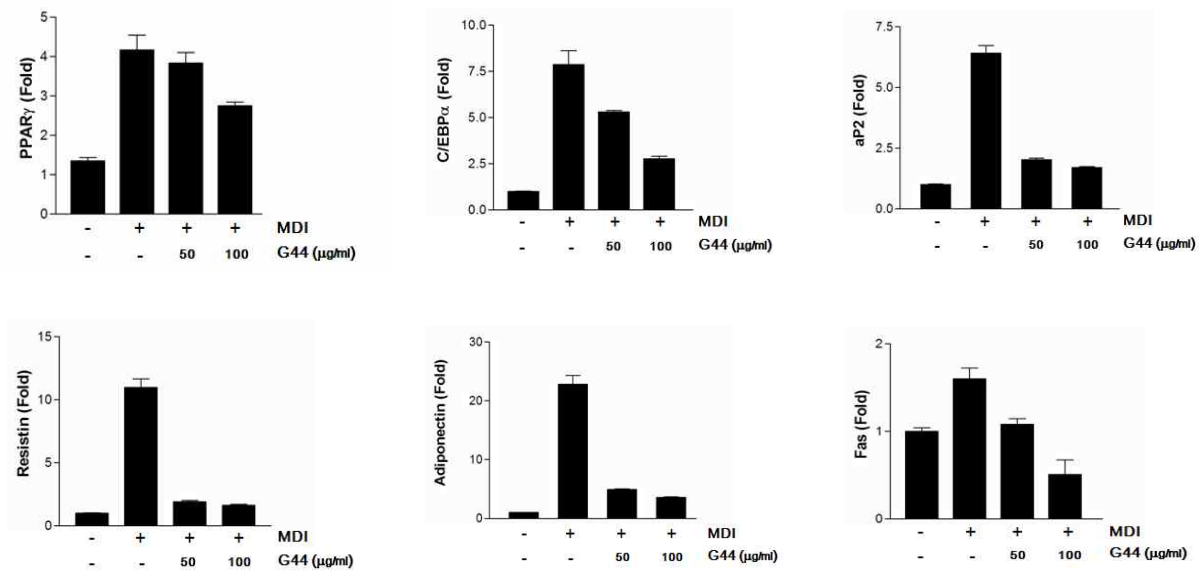


그림 82. The effects of extracts of *Monascus* on PPAR γ , C/EBP α , adipokine mRNA expression in differentiated 3T3-L1 cells.

(3) 홍국균 80% 에탄올 추출물의 단백질 수준에서의 작용기전 연구

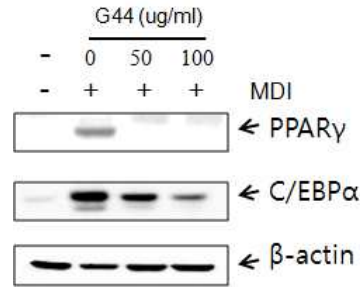


그림 83. The effects of extracts of *Monascus* on PPAR γ , C/EBP α expression in differentiated 3T3-L1 cells.

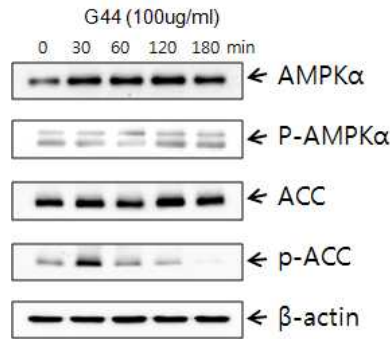


그림 84. The effects of AMPK phosphorylation by *Monascus*

라. 홍국균 80% 에탄올에서 분리된 21종의 유효성분들의 지방세포 분화억제 효과

- 최적 발효 조건에 따른 홍국균 배양균 시료를 통한 최적 추출물에서 총 21종의 유효성분을 분리했고, 이 분리된 21종의 유효성분을 통해 세포내 지방세포 분화 억제 활성을 검색했음.
- 이 중 linoleic acid (1)와 α -linolenic acid (2)는 세포 독성이 많아 실험 진행이 어려웠고, 나머지 19종을 통해 지방세포 분화억제 활성을 확인해 보았음.
- Monacolin K (4), mevinolinic acid methyl ester (5), daidzein (8), genistein (9), daidzin (10), genistin (11), soyasaponin V (12), soyasaponin I (13), soyasaponin II (14), 4-hydroxyphenylacetic acid (15), phenylalanine (17), adenosine (18), tryptophan (19), 6''-O-acetyldaidzin (22), genistein-7-O- α -D-ribofuranoside (23), 6''-O-acetylgenistin (24), 6''-O-crotonylgenistin (25), 9,12,13-trihydroxy-10(E)-octadecenoic acid (26), 2,3-dihydroxy-2-(methylpropyl)pentanedioic acid (27) 로 총 19종의 세포내 유효성 평가를 진행함.

(1) Monacolin K와 Monacolin K 유도체의 지방세포 분화 억제 효과

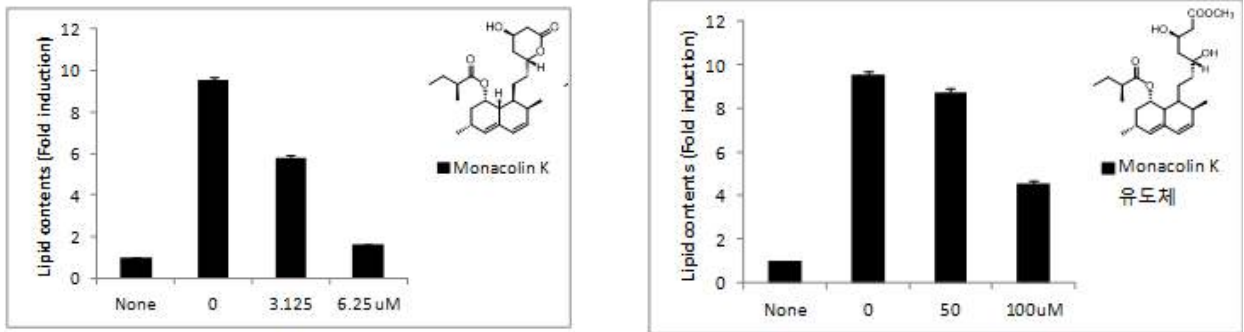


그림 85. Anti-obesity effects of monacolin K and mevinolic acid methyl ester in 3T3L1 cells

- 지표물질인 monacolin K는 세포독성이 많이 나타났으나 6.25와 3.125uM인 낮은 농도에서도 지방분화 억제 효과가 나타났음. Monacolin K 유도체인 mevinolic acid methyl ester는 100 ug/ml에서 50% 이상의 분화 억제 효과가 관찰되었으나 monacolin K 만큼 효과가 우수하지 않음.

(2) 홍국균 80% 에탄올에서 분리된 1차 유효성분들의 지방세포 분화억제 효과

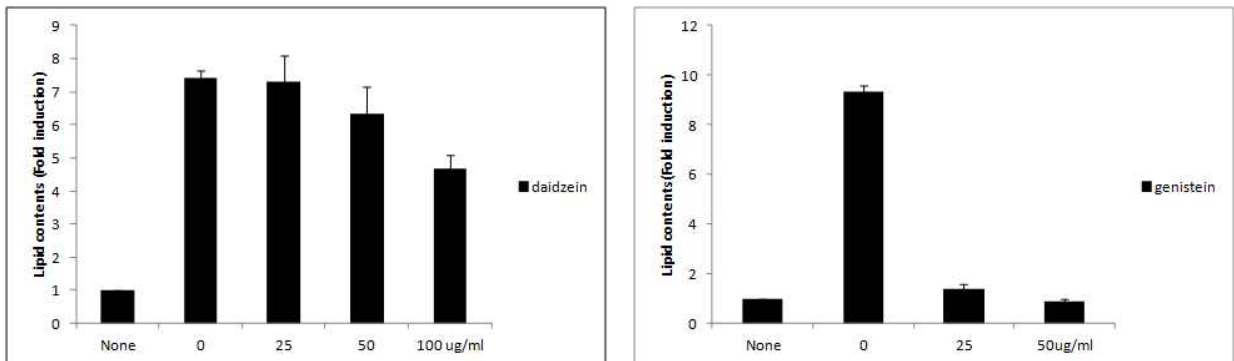


그림 86. Anti-obesity effects of daidzein and genestein in 3T3L1 cells

- 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 daidzein이 100ug/ml에서 20% 정도 분화억제 효과가 나타났음. 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 genestein은 25, 50ug/ml에서 분화 유도하진 대조군 수준까지 분화억제 효과가 나타났음.

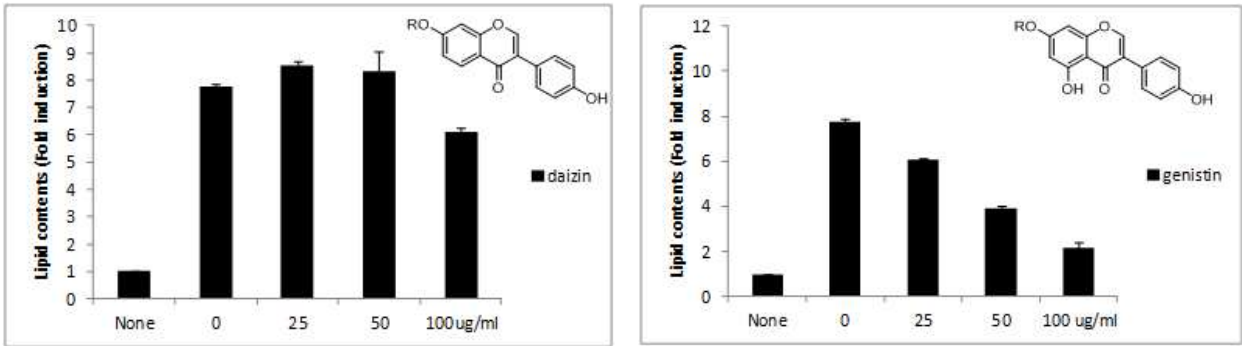


그림 87. Anti-obesity effects of daizin and genistin in 3T3L1 cells

- 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 daizin이 100ug/ml에서 20% 정도 분화억제 효과가 나타났다. 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 genistin이 농도 의존적으로 분화억제 효과가 나타났다.

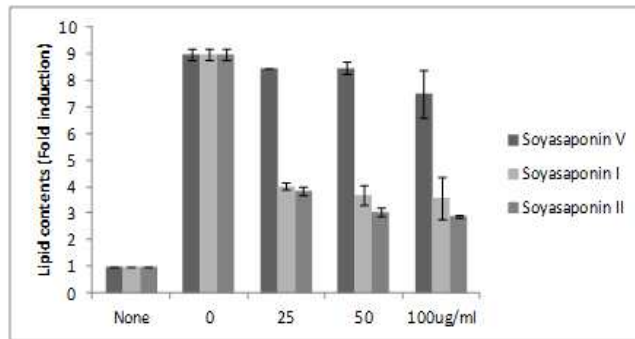


그림 88. Anti-obesity effects of soyasaponins in 3T3L1 cells

- Soyasapoin 유도체인 V는 지방 분화 억제 효과가 나타나지 않은 반면, I, II 중 25ug/ml 에서부터 100ug/ml까지 모든 농도에서 지방 분화 억제 활성을 나타냄.

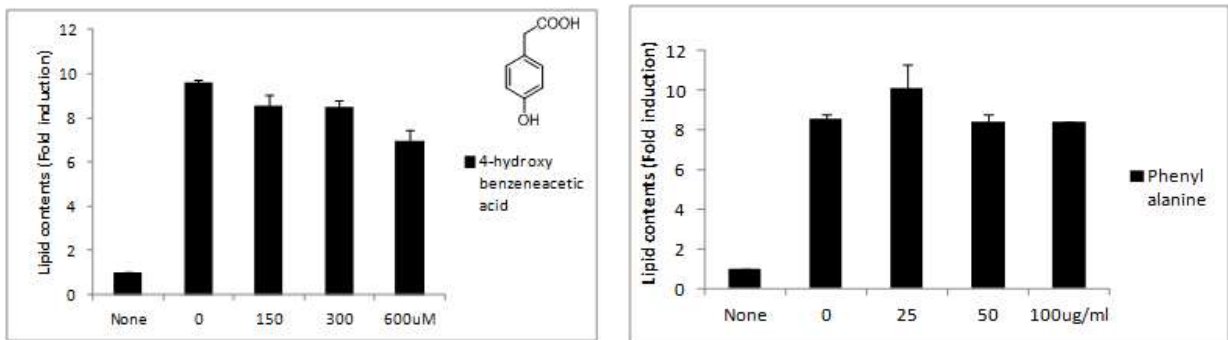


그림 89. Anti-obesity effects of 4-hydroxy benzeneacetic acid and phenyl alanine in 3T3L1 cells

- 분화가 유도된 대조군 세포에 비해 4-hydroxyphenylacetic acid는 지방 분화 억제 효과가 거의 없는 것으로 나타남. 분화가 유도된 대조군 세포에 비해 phenylalanine은 지방 분화 억제 효과가 거의 없는 것으로 나타남.

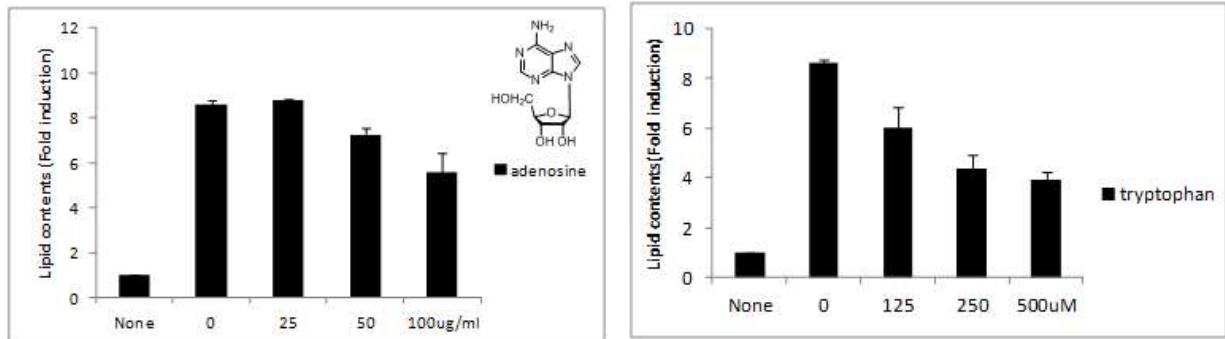


그림 90. Anti-obesity effects of adenosine and tryptophan in 3T3L1 cells

- 분화가 유도된 대조군 세포에 비해 adenosine은 100ug/ml 농도에서 10% 정도 지방 분화 억제 효과가 나타남. 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 tryptophan이 농도 의존적으로 분화억제 효과가 나타났음.

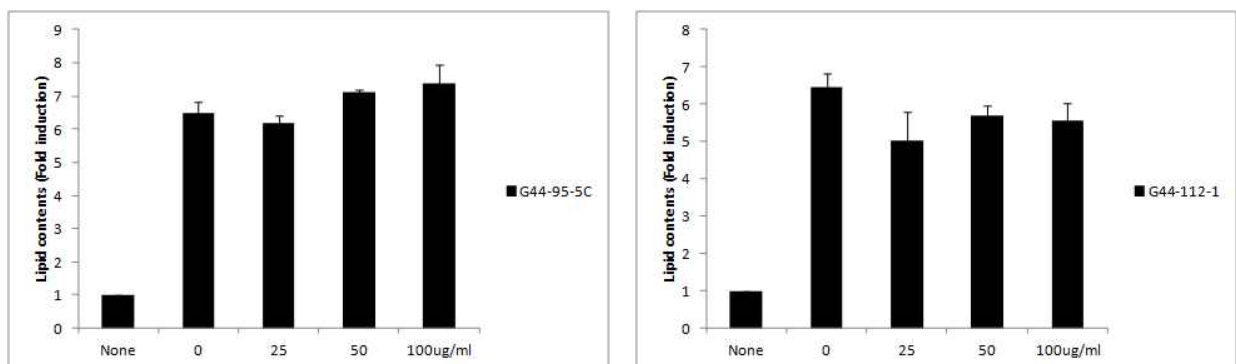


그림 91. Anti-obesity effects of 9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid and 2,3-dihydroxy-2-(methylpropyl) pentanedioic acid in 3T3L1 cells

- 분화가 유도된 대조군 세포에 비해 (9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid)은 지방 분화 억제 효과가 거의 나타나지 않았으며, (2,3-dihydroxy-2-(methylpropyl) pentanedioic acid) 또한 분화가 유도된 대조군 세포에 비해 지방 분화 억제 효과가 미비한 것으로 관찰됨.

(3) 홍국균 80% 에탄올에서 분리된 2차 유효성분들의 지방세포 분화억제 효과

- 홍국균 80% 에탄올 추출물에서 분리된 주요 유효물질 4종을 통한 지방세포 분화 억제 활성을 확인해 본 결과 compound 22가 가장 효능이 우수한 지방분화 억제 활성을 나타내었음.

표 6. Anti-obesity effect of isolated compounds 22-25 adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells

Relative fat accumulation (% of control)			
Differentiated control	100		
Compounds	50 μ M	100 μ M	200 μ M
22 (6"-O-crotonylgenistin)	69.3 \pm 9.0 ^a	22.8 \pm 8.7	21.2 \pm 6.8
23 (genistein-7-O- α -D-ribofuranoside)	91.7 \pm 15.5	54.7 \pm 11.5	15.0 \pm 6.6
24 (6"-O-acetyldaidzin)	81.3 \pm 7.2	83.9 \pm 20.6	80.5 \pm 18.3
25 (6"-O-acetylgenistin)	89.1 \pm 6.0	80.1 \pm 4.5	62.9 \pm 6.3

마. 홍국균 에탄올 추출 시료에서 분리된 유효물질에 대한 세포내 항비만 효과 및 작용기전 연구

- 홍국균 에탄올 추출물에서 효능이 우수한 genistein 유도체 중 주요 유효물질 4종에서 가장 지방세포 분화 억제 활성이 우수한 compound 22를 통해 홍국균 추출 시료와 마찬가지로 지방세포 분화 억제 활성에 관한 작용기전을 연구하였음.
- 마우스의 전구지방세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 지방 세포로의 분화억제 실험을 수행한 결과, 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 compound 22는 농도 의존적으로 지방세포 분화를 억제하는 효과를 나타냈으며, 100, 200 uM에서는 분화하지 않은 대조군 정도의 억제 활성을 보였음.
- 홍국균 유효물질 또한 홍국균 추출물과 같은 기전을 연구할 결과 지방전구세포의 분화를 유도하면서 8일 동안 유효물질을 처리 한 후 PPAR γ , C/EBP α 의 유전자 및 adipokine들의 mRNA 유전자 발현을 확인한 결과 지방세포 분화에서 특이적으로 발현되는 유전자 marker인 PPAR γ , ap2, Resistin, adiponectin, Fas의 발현이 억제됨을 확인하였고 C/EBP α 의 경우 100uM에서 약간 증가하는 경향을 보였으나 200 uM에서는 분화 유도군에 비해 현저히 감소하였고 단백질 수준에서도 감소함을 확인하였음. PPAR γ 도 단백질 수준에서도 발현이 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였음.

(1) 홍국균 유효물질의 지방세포 분화억제 효과

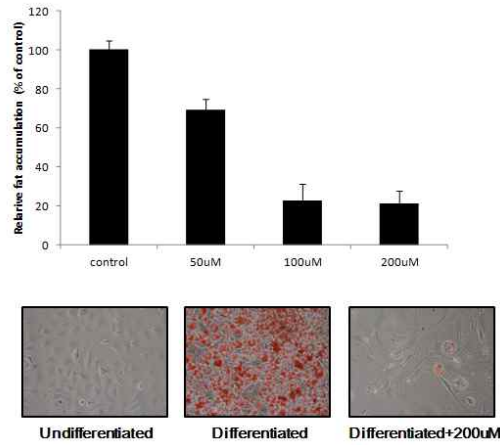


그림 92. The effect of compound 22 on differentiation in 3T3-L1 cells.

(2) 홍국균 유효물질의 유전자 수준에서의 작용기전 연구

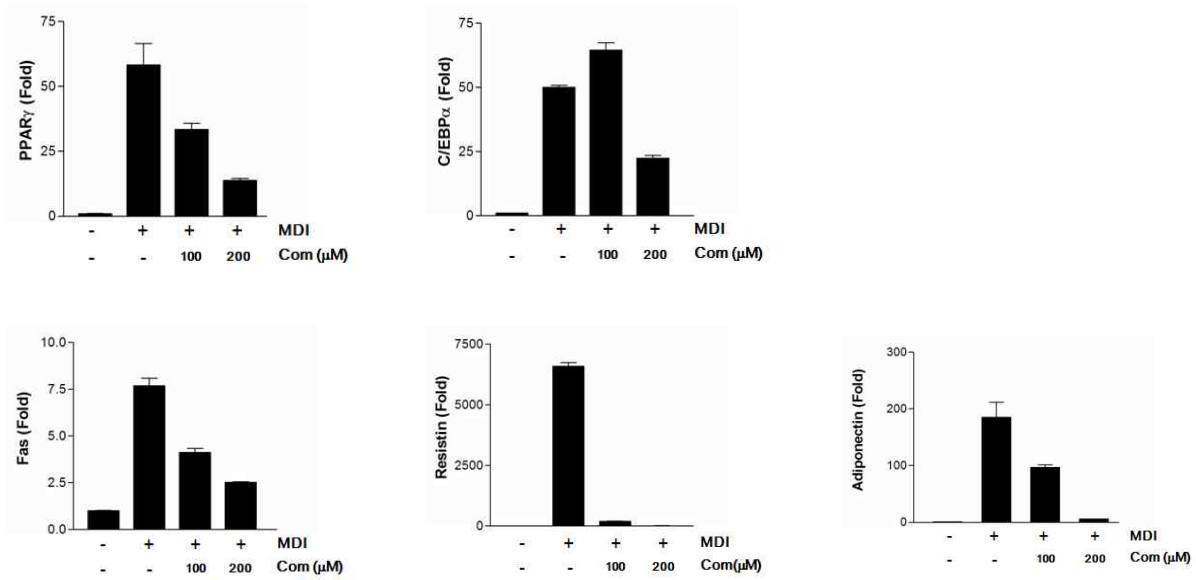


그림 93. The effect of extracts of compound 22 on PPAR γ , C/EBP α , adipokine mRNA expression in differentiated 3T3-L1 cells.

(3) 홍국균 유효물질의 단백질 수준에서의 작용기전 연구

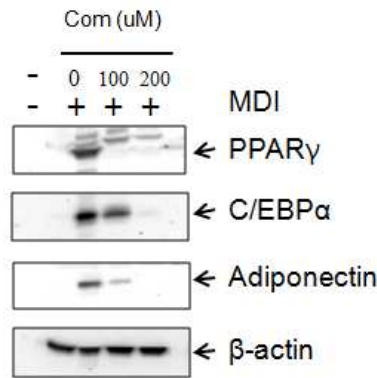


그림 94. The effects of extracts of compound 22 on PPAR γ , C/EBP α expression in differentiated 3T3-L1 cells.

- 결론적으로 화합물 22의 세포내 항비만 활성 및 작용기전을 살펴본 결과 이 물질은 전구지방세포 분화를 조절하는 transcription factor인 PPAR γ , C/EBP α 의 발현을 억제하면서 다양한 adipokine들의 발현 또한 억제하는 작용으로 전구지방세포가 지방세포로 분화되는 활성을 억제시키는 것이 세포실험을 통해 확인되었으며, 이 결과는 향후 동물과 인체 내의 체중감소를 유도할 수 있는 작용기전에 대한 근거 실험 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

제3절. *Monascus*속 균을 이용한 간기능 개선 및 체중조절 효과를 가진 홍국 발효검정콩의 비임상독성시험

1. 홍국균 발효 검정콩의 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

가. 시험목적

암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 홍국균 발효 검정콩을 단회 경구투여시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다. 본 시험은 Good Laboratory Practices(“비임상시험관리기준”, 식품의약품안전청 고시 제2009-183호, 2009년12월 22일)를 준수하였다. 또한 본 시험은 의약품등의 독성시험기준 (식품의약품안전청 고시 제 2009-116호, 2009년8월24일)에 근거하여 실시하였으며, 동물보호법 (제정 1991년5월31일 법률 제4379호, 전부개정 2011년 8월4일 법률 제10995호)에 근거한 (주)바이오독스텍의 동물실험윤리 위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 120373). 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

나. 시험물질

시험물질은 이미 및 이취가 없고 고유의 향미를 가진 적갈색의 분말의 홍국균발효검정콩 (Lot No. MJLH2012005)을 사용하였으며, 지표성분은 monacolin K(총monacolin K 함량 1.27 mg/g)로 설정하였다. 시험물질은 냉장 (3.5 ~ 5.2°C)보관하였다.

다. 시험물질의 조제

시험물질을 전자저울 (CP323S, CP423S, Sartorius, Germany)로 칭량하여 유발에 넣고, 부형제를 일부 넣어 현탁시켰다. 조제병에 조제물을 옮긴 후, 부형제를 가하여 규정농도 (125 mg/mL)로 조제하였다. 조제물은 투여당일 조제하였다. 2시간 간격으로 2회 조제하였다. 조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

라. 시험동물

시험동물은 SPF Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)) 랫트를 오리엔트바이오 (성남, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 시험종 및 계통의 선택이유는 Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다. 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위는 수컷, 12마리, 5주령, 117.4 ~ 124.2 g / 암컷, 12마리, 5주령, 116.6 ~ 125.9 g이었으며, 투여시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위는 수컷, 10마리, 6주령, 156.3 ~ 168.6 g /

암컷, 10마리, 6주령, 134.7 ~ 153.6 g이었다. 검역 및 순화는 반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울 (CP3202S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물입수 시 검역실에서 3일간 일반증상을 관찰 후 동물실로 이동하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화 (Table 5)를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

개체 및 사육상자 식별은 순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역시순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다. 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다. 군분리는 모든 동물에 대하여 순화종료일 (군분리일)에 실시하였다. 군분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 10마리를 선발하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2군, 군당 5마리로 군분리하였다. 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시켰다.

사육상자는 스테인레스 철망사육상자 (260W×350D×210H mm)를 사용하였으며, 사육상자당 수용동물 수는 3마리 (검역시순화기간) / 1마리 (관찰기간)로 하였다. 온도는 21.0 ~ 23.0°C, 상대습도는 42.7 ~ 69.1%, 환기횟수는 10 ~ 15회/시간, 명암주기 (조명시간)는 12시간/일 (오전 7시부터 오후 7시) 조도는 150 ~ 300 Lux로 조절하였다. 사육상자 및 급이기는 1회/2주 빈도로 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다. 실험동물용 고형사료는 Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C (Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.). 급이방법은 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취 시켰다. 사료의 분석은 Harlan Laboratories, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인하였다. 음수는 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취 시켰다. 검역실에서는 폴리카보네이트제 음수병 (500 mL)으로, 동물실에서는 자동급수 장치로 자유섭취 시켰다.

마. 투여경로 및 투여 방법

투여경로는 경구투여로 실시하였으며, 시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다. 총 투여액량은 40 mL/kg으로 하였고, 1회 투여액량은 20 mL/kg 으로 하였다. 투여는 2시간 간격으로 2회 분할하여 투여하였다. 개체별 투여액량은 절식 후 (투여당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (5 mL)를 이용하여 위내에 단회 강제투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 최종 투여 후 약 4시간에 사료를 급여하였다.

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	40	5 (1101 ~ 1105)	5 (2101 ~ 2105)
G2 시험물질 투여군	5,000	40	5 (1201 ~ 1205)	5 (2201 ~ 2205)

시험물질의 임상적용예정용량은 약 6 g/human/day (성인 70 kg 기준시 0.086 g/kg)이다. 시험물질의 용해도를 고려하여 시험의뢰자와 협의하여 임상적용예정 용량의 58배로 설정하였다. 본시험의 예비시험 (Biotoxtech Study No.: B12353P)으로 투여가능한 최대용량인 5,000 mg/40 mL/kg을 암수 각 1 마리에 단회 경구투여한 결과 사망례가 관찰되지 않아, 5,000 mg/kg의 단일 시험물질 투여군을 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

바. 일반중독 증상관찰 및 부검

투여당일 (0일)에 1차 투여 후 30분까지는 적어도 1회 이상, 1, 2시간째, 2차 투여 후 30분까지는 적어도 1회 이상, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태 (독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 투여 후 1일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 체중은 투여당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7일 및 14일 (부검일)에 측정하였다. 관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대해서 CO₂가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다. 부검 시 육안소견이 관찰되지 않아, 조직병리학적 검사를 실시하지 않았다.

사. 통계처리

실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS (version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정하였다. Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정한 결과 (유의수준: 0.05), 등분산이 인정되어 Student t-test를 실시하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

아. 시험결과 및 고찰

관찰기간 동안, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 없었다. 5,000 mg/kg 투여군의 암수 전례에서 투여 후 1일에 약물혼입변 (compound-colored stool)이 관찰되었으나, 투여 후 2일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 이러한 증상은 시험물질 투여에 기인한 일시적인 변화로 판단된다. 관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다. 부검시, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다. 본 시험의 조건 하에서 홍국균 발효 검정콩을 랫드에 단회

경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

Table 1. Summary of mortality

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after dosing														Mortality (dead/total)		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
	G2 5,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
	G2 5,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)

Table 2. Summary of clinical signs

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Hours (Day 0) after dosing				
				0.5	1	2	4	6
Male	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA	5	5	5	5	5
Female	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA	5	5	5	5	5

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			Compound-colored stool	5													
Female	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			Compound-colored stool	5													

NOA: No Observable Abnormality

Table 3. Mean body weights

Sex	Group / Dose (mg/kg)		Days after dosing					(g)
			0	1	3	7	14	Gain 0 ~ 14
Male	G1 0	Mean	162.3	186.4	211.0	254.0	326.7	164.4
		S.D.	4.8	5.1	6.8	6.9	8.3	6.3
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	Mean	161.5	185.4	209.0	249.6	316.7	155.2
		S.D.	3.5	3.3	3.9	7.6	10.6	9.5
		N	5	5	5	5	5	5
Female	G1 0	Mean	145.5	163.8	177.0	198.1	233.0	87.5
		S.D.	5.8	6.1	13.8	17.7	22.4	17.2
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	Mean	144.1	161.3	176.3	196.9	224.4	80.3
		S.D.	7.9	6.5	7.9	11.9	12.6	7.9
		N	5	5	5	5	5	5

2. 홍국균 발효 검정콩의 비글견을 이용한 단회 경구투여 용량증가 독성시험

가. 시험목적

암수 비글견을 이용하여 시험물질인 홍국균 발효 검정콩을 일정한 간격으로 용량을 증가하여 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시하였다. 본 시험은 Good Laboratory Practices(“비임상시험관리기준”, 식품의약품안전청 고시 제2009-183호, 2009년12월 22일)를 준수하였다. 또한 본 시험은 의약품등의 독성시험기준 (식품의약품안전청 고시 제 2009-116호, 2009년8월24일)에 근거하여 실시하였으며, 동물보호법 (제정 1991년5월31일 법률 제4379호, 전부개정 2011년 8월4일 법률 제10995호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리 위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 120373). 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

나. 시험물질

시험물질은 이미 및 이취가 없고 고유의 향미를 가진 적갈색의 분말의 홍국균발효검정콩 (Lot No. MJLH2012005)을 사용하였으며, 지표성분은 monacolin K(총monacolin K 함량 1.27 mg/g)로 설정하였다. 시험물질은 냉장 (3.5 ~ 5.2°C)보관하였다.

다. 시험물질의 조제

시험물질은 별도의 조제 없이, 투여당일의 체중으로 투여량을 산출하고, 개체별로 시험물질을 전자저울(CP423S, Sartorius, Germany)로 칭량하였으며, 젤라틴캡슐에 충전하여 투여하였다.

라. 시험동물

시험동물은 Beagle Dog (Beijing Marshall Biotechnology Co., Ltd, 베이징, 중국)을 우정 BSC (수원, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 본 비글견은 동물실험용으로 생산되었고, 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 시험기초자료가 풍부하여 선택하였다. 입수 시 성별, 동물 수, 월령 및 체중범위는 암수 각 3마리, 5개월령, 수컷: 4.93~5.33 kg, 암컷: 4.78~4.97 kg였으며, 투여개시 시 성별, 동물 수 및 월령은 암수 각 3마리, 6개월령, 수컷: 5.35~5.94 kg, 암컷: 5.24~5.77 kg였다. 검역 및 순화는 입수 시 모든 동물은 문신번호를 확인하고, 일반증상, 체중 (HW-100KGV, A&D Co., Ltd., Korea) 및 체온을 측정하였다. 입수 후 15 일간의 검역&순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 주 1회 체중을 측정하였으며, 검역 & 순화 종료 시에 동물의 건강상태를 확인하였다. 사육상자에는 개체식별카드를 부착하고, 동물은 문신번호로 식별하였다. 검역&순화기간 종료 후, 체중을 기초로 하여 암수 각각 대조군은 1마리, 시험물질투여군은 2마리로 군분리하였다. 동물사육상자는 스테인레스 개사육상자 (

800W×900L×830H mm)를 사용하였으며, 사육상자당 수용동물 수는 1마리로 하였다. 사육실내 온도는 19.5~23.0°C, 상대습도는 44.4~ 65.8%, 환기회수는 10~15회/시간, 명암주기 (조명시간)는 12시간/일 (오전 7시부터 오후 7시), 조도는 150~300 Lux로 조절하였다. 사육상자 및 사료통은 1~2회/2주의 빈도로 세척하였으며, 이 기간에 사료통이 분변 및 뇨 등으로 오염되었을 경우, 그때마다 세척 또는 교환하였다. 시험사료는 퓨리나 실험동물용 개사료 (Agribands Purina Korea Inc., 한국)를 사용하였으며, 사료통에 고형사료를 마리당 약 250 g씩 1일 1회 (11:00~13:00)에 공급하였다. 단, 투여일에는 그 전날의 16:00~17:00 시부터 절식시켰다. 사료의 분석은 Agribands Purina Korea Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 입수하여 확인한 결과, 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다. 음수는 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사한 정제수를 자동급수장치를 이용하여 자유섭취 시켰다.

마. 투여경로 및 투여방법

투여경로는 경구투여로 실시하였으며, 시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다. 투여방법 및 횟수는 개체별 투여량은 투여당일의 체중으로 산출하여 젤라틴캡슐에 충전하였으며, 설근부에 넣어 강제 투여하고, 4일 간격으로 용량을 증가하여 총 3회 투여하였다.

군	투여용량 (mg/kg)	동물 수 (개체번호)	
		수컷	암컷
G1 대조군	0→0→0	1 (1101)	1 (2101)
G2 시험물질투여군	1,250→2,500→5,000	2 (1201, 1202)	2 (2201, 2202)

시험물질의 임상적용예상용량은 최대 6 g/human/day (성인 70 kg 기준시 약 0.086 g/kg)이다. 본 시험에서는 시험의뢰자와 협의하여 임상예상용량의 약 14.5 배인 1,250 mg/kg을 1차 투여용량으로 설정하였으며, 약 29 및 58배인 2,500 및 5,000 mg/kg을 2 및 3차 투여용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질투여군과 동일한 수량의 공캡슐을 투여하였다.

바. 일반중등 증상관찰 및 부검

관찰 및 검사일은 투여개시일을 투여 0일로 하고, 투여개시일로부터 7일간을 1주로 계산하여 실시하였다. 투여당일에는 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태, 운동성, 자율신경계의 기능 및 배설물 등에 대한 일반증상을 관찰하였다. 그 다음날부터는 1일 2회 관찰하고, 빈사나 사망동물의 유무를 확인하였으며, 최종투여 후 2주간 관찰하였다. 체중은 매번 투여당일 (투여

전), 투여 후 1 및 3 일, 최종투여 후 1, 3, 7 및 13일에 측정하며, 동일한 시간대에 실시하였다. 관찰기간 종료 후, 모든 동물에 대하여 펜토탈소듐 (thiopental sodium, (주)중외제약)으로 마취하여 방혈치사 시킨 후, 부검을 실시하였다. 부검 시 육안소견 및 병리변화가 의심되는 장기나 조직이 관찰되지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

사. 통계처리

체중에 대한 통계처리는 실시하지 않았다.

아. 시험결과 및 고찰

실험기간 중 암수 모두에서 사망동물은 발생하지 않았다. 1 차 1,250 mg/kg 투여 후, 암수 모두에서 어떠한 증상도 관찰되지 않았다. 2 차 2,500 mg/kg 투여 후에는 약 1 시간째에 암컷 1 레(2202)에서 구토(vomiting)증상이 관찰되었으며, 3 차 5,000 mg/kg 투여 후에도 약 2 시간째에 암컷 1 레(2202)에서 구토증상이 관찰되었다. 그 외, 암컷 대조군에서 구토증상이 1 회 관찰되었으며, 투여군 모두에서 투여 후 1 일째에 시험물질혼입변(compound-colored stool)이 관찰되었다. 상기의 구토증상은 1 레에서만 관찰되고, 구토증상 외 다른 증상이 관찰되지 않아, 이는 물리적인 자극 및 개체차이에 의한 것으로서 시험물질의 영향은 아닌 것으로 사료된다. 체중에서는 암수 모두 시험물질의 투여에 의한 변화가 관찰되지 않았다. 부검에서도 대조군을 포함한 암수 모든 시험군에서 육안소견이 관찰되지 않았다. 본 시험에서는 암수 각 2마리의 비글견에 시험물질인 홍국균 발효 검정콩의 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg을 4일 간격으로 용량을 증가하여 단회 경구투여한 결과, 암수 모두에서 사망례는 발생하지 않았으며, 일반증상, 체중 및 부검에서도 시험물질에 의한 영향이 관찰되지 않았다. 따라서, 본 시험조건 하에 암수 비글견에 대한 최대내성용량 (MTD)은 5,000 mg/kg으로 판단된다.

Table 4. Clinical signs in beagle dogs

Sex: male																																			
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Day																																	
		0*					1	2	3	4*					5	6	7	8*					9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
		0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr				0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr				0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr													
G1 0→0→0	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
G2 1,250→2,500 →5,000	1201	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1202	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sex: female																																			
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Day																																	
		0*					1	2	3	4*					5	6	7	8*					9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
		0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr				0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr				0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr													
G1 0→0→0	2101	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250→2,500 →5,000	2201	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2202	-	-	-	-	-	C	-	-	-	V	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: dosing day, -: no abnormal findings, C: compound colored stool, V: vomiting

Table 5. Mean bodyweight in beagle dogs

Sex : male												
Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day (kg)										
		0*	1	3	4*	5	7	8*	9	11	15	21
G1 0→0→0	1101	5.35	5.46	5.50	5.53	5.69	5.53	5.63	5.75	5.69	5.73	5.92
	N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G2 1,250→2,500 →5,000	1201	5.73	5.83	5.94	5.80	5.93	5.97	6.01	6.07	6.04	6.14	6.27
	1202	5.94	6.04	6.20	6.04	6.21	6.26	6.23	6.35	6.39	6.49	6.68
	Mean	5.84	5.94	6.07	5.92	6.07	6.12	6.12	6.21	6.22	6.32	6.48
	S.D.	0.15	0.15	0.18	0.17	0.20	0.21	0.16	0.20	0.25	0.25	0.29
	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sex : female												
Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day (kg)										
		0*	1	3	4*	5	7	8*	9	11	15	21
G1 0→0→0	2101	5.24	5.42	5.47	5.29	5.55	5.54	5.52	5.70	5.77	5.87	6.09
	N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G2 1,250→2,500 →5,000	2201	5.77	5.91	5.99	5.79	5.97	6.00	5.89	6.03	6.11	6.14	6.16
	2202	5.46	5.60	5.69	5.58	5.78	5.78	5.72	5.92	5.94	6.04	6.25
	Mean	5.62	5.76	5.84	5.69	5.88	5.89	5.81	5.98	6.03	6.09	6.21
	S.D.	0.22	0.22	0.21	0.15	0.13	0.16	0.12	0.08	0.12	0.07	0.06
N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	

* : dosing day.

Table 6. Necropsy findings in beagle dogs

Sex	Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Findings	Day of sacrifice
Male	G1 0→0→0	1101	All	Unremarkable findings	14
	G2	1201	All	Unremarkable findings	14
	1,250→2,500→5,000	1202	All	Unremarkable findings	14
Female	G1 0→0→0	2101	All	Unremarkable findings	14
	G2	2201	All	Unremarkable findings	14
	1,250→2,500→5,000	2202	All	Unremarkable findings	14

3. 홍국균 발효 검정콩의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

가. 시험목적

시험물질 홍국균 발효 검정콩의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (Salmonellatyphimurium)과 트립토판 요구성인 대장균 (Escherichiacoli)을 이용하여 검토하였다. 본 시험은 Good Laboratory Practices(“비임상시험관리기준”, 식품의약품안전청 고시 제 2009-183호, 2009년12월22일)를 준수하였다. 또한 본 시험은 의약품등의 독성시험기준 (식품의약품안전청 고시 제2009-116호, 2009년8월24일)에 근거하여 실시하였다.

나. 시험물질

시험물질은 이미 및 이취가 없고 고유의 향미를 가진 적갈색의 분말의 홍국균발효검정콩 (Lot No. MJLH2012005)을 사용하였으며, 지표성분은 monacolin K(총monacolin K 함량 1.27 mg/g)로 설정하였다. 시험물질은 냉장 (3.5 ~ 5.2°C)보관하였다.

다. 시험물질의 조제

용량설정시험의 최고용량인 50 mg/mL을 조제하기 위해, 시험의뢰자가 제공한 정보에 따라 부형제 검토를 실시한 결과, dimethyl sulfoxide (DMSO), aetone 및 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt 수용액에는 용해 또는 현탁되지 않았고, 주사용수에는 현탁되었기 때문에 주사용수를 선택하였다. 시험물질의 조제는 시험물질 처리일에 실시하였다. 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (CP423S, Sartorius, Germany), 유발에 넣고 소량의 부형제를 가하여 유봉으로 균일하게 현탁시켰다. 현탁된 시험물질액을 조제용기에 넣고 부형제로 규정용

량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계희석하여 조제하였다. 각 균주에 대한 양성대조물질의 용량은 본 기관의 배경데이터에 기초하여 설정하였다. Sodium azide (SA)는 주사용수 (Lot No.: GBA1009, Choongwae Pharma Corp., Korea)에, 2-Nitrofluorene (2-NF), 9-Aminoacridine (9-AA), 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF2) 및 2-Aminoanthracene (2-AA)는 DMSO (Lot No.: K42088831, Merck, Germany)에 조제하고, 조제된 양성대조물질은 초저온냉동고 (OPR-DFU-657CEV, Operon, -80 ~ -60°C)에 동결보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다. 시험물질액의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다. 각 균주에 대한 양성대조물질의 종류와 용량은 다음과 같이 사용하였다.

S9 mix	균주명	명칭	용량 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
-	TA98	2-NF	5.0
	TA100	SA	1.5
	TA1535	SA	1.5
	TA1537	9-AA	80.0
	WP2uvrA(pKM101)	AF2	0.005
+	TA98	2-AA	1.0
	TA100	2-AA	2.0
	TA1535	2-AA	3.0
	TA1537	2-AA	3.0
	WP2uvrA(pKM101)	2-AA	2.0

라. 시험종 및 균주명

시험균주는 Salmonella typhimurium TA98, Salmonella typhimurium TA100, Salmonella typhimurium TA1535, Salmonella typhimurium TA1537, Escherichia coli WP2uvrA(pKM101)를 사용하였으며, 변이원성물질에 대한 감수성이 높고, 변이원성시험에 가장 일반적으로 사용되고 있으며, 가이드라인에서 추천되고 있는 균주를 사용하였다. 균주는 2011년 10월 28일에 Molecular Toxicology, Inc. (MOLTOXTM, Inc., U.S.A.)에서 구입하였다. 입수된 각 균주를 nutrient broth 배지에 접종하여 8시간 동안 진탕배양 (37°C, 130 rpm)한 후, 각 균주의 유전자형 (genotype), 자발복귀변이콜로니수 및 양성대조물질에 대한 감수성을 확인하였다. 균주의 특성을 확인한 후, 균주 현탁액과 DMSO를 1:0.09의 비율로 혼합하여 동결보존용 튜브에 분주하고 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하였다. 각 균주의 유전자형은 다음과 같았다.

종	균주명	유전자형	
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfaΔuvrB</i> (pKM101)
	TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfaΔuvrB</i> (pKM101)
	TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfaΔuvrB</i>
	TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>rfaΔuvrB</i>
<i>Escherichia coli</i>	WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i> (pKM101)

동결보관된 각 균주를 해동하여 nutrient broth 배지에 접종하고 진탕배양 (37°C, 130 rpm) 하였다. 전배양 종료 후, 각 균주의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer (측정파장 660 nm, V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 측정하고, 균수가 1×10⁹cells/mL 이상 되는 것을 확인한 후 시험에 사용하였다. Nutrient 배지는 Nutrient broth No.2 (Oxoid, UK)를 칭량한 후, 소량의 초순수를 첨가하여 stirrer로 교반하여 용해시켰다. 최종농도가 2.5%가 되도록 초순수를 첨가하였다. 조제후 고압증기 멸균하였다. 최소 glucose 한천평판배지는 Bacto agar (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 첨가하여 조제하여 고압증기 멸균하였다. 멸균후 VB (Vogel-Bonner) salts 10배 농축액과 20% glucose (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)를 각각 첨가하고 플레이트에 분주하여 상온 방치하였다. Top agar는 염화나트륨 및 bacto agar (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 첨가하여 각각 0.5 및 0.6%가 되게 조제한 후, 고압증기멸균하였다. 멸균후, 살모넬라 균주용 top agar는 0.5 mM L-Histidine/D-Biotin 혼합액 (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하고, 대장균용 top agar는 0.5 mM L-Tryptophan (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하여 조제하였다.

S9과 Cofactor A를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하고, 유효기간 내에 사용하였다. S9 mix는 필요량을 사용시에 조제하였다. 동결보관된 S9 (Lot No.: 12012711)과 Cofactor A (Lot No.: A12012411)를 해동하여 1 : 9의 비율로 혼합하여 조제하였다.

마. 용량설정시험

본시험의 용량을 결정하기 위하여 용량설정시험을 실시하였다. 가이드라인에서 추천하는 5,000 µg/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 4로 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 µg/plate의 5 용량을 설정하였다. 또한 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 용량설정시험은 본시험과 동일한 방법 및 조건으로 실시하였다. 단 용량설정시험에서는 각 용량당 2매의 플레이트를 사용하였다. 용량설정시험의 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하의 TA100, TA1535 및 TA1537 균주는 313 µg/plate 이상, 대사활성화존재하의 TA100, TA1535 및

TA1537 균주는 5,000 µg/plate에서 관찰되었다. 대사활성화비존재하 및 존재하의 TA98 및 WP2uvrA(pKM101)균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전은 대사활성화비존재하에서는 78.1 µg/plate 이상, 대사활성화존재하에서는 313 µg/plate 이상의 용량에서 관찰되었지만, 복귀변이콜로니수의 계측에는 영향이 없었다.

바. 본시험

본시험의 최고용량은 대사활성화비존재하의 TA100, TA1535 및 TA1537 균주는 생육저해가 관찰된 최저용량인 313 µg/plate, 대사활성화존재하의 TA100, TA1535 및 TA1537 균주는 5,000 µg/plate으로 하고, 이하 공비 2로 5용량의 시험물질균을 설정하였다. 대사활성화비존재하 및 존재하의 TA98 및 WP2uvrA (pKM101)균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았기 때문에, 5,000 µg/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 4용량의 시험물질균을 설정하였다. 또한, 음성대조균 및 양성대조균을 설정하였다. 본시험은 프리인큐베이션법으로 실시하였다. 또한, 대사활성화비존재하 및 존재하의 2계열로 하였다. 본시험에서는 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하였다. 각각의 플레이트에 균주명, 용량, 음성대조물질, 양성대조물질 및 S9 mix 존재 유무를 식별한 번호를 기입하였다.

대사활성화 비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질을 각각 100 µL씩 건열멸균한 유리시험관에 넣고, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 및 각 균주현탁액 100 µL를 첨가한 후, 37°C에서 20분간 진탕하였다. 진탕종료 후, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP2uvrA(pKM101)에는 대장균용 top agar를 각각 2 mL씩 첨가하여 vortexing 하였다. 그 후, 현탁액을 최소 glucose 한천평판배지에 중층하여 실온에서 방치하였다. 대사활성화존재하에서는 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 대신에 S9 mix 500 µL를 첨가하였다. 그 외의 처리는 동일하게 실시하였다. 배양시간은 Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기 (DK-LI020-P, Daiki scientific Co., LT, Korea)에서 48시간 배양하였다.

잡균에 의한 오염유무를 확인하기 위해 최고용량의 시험물질액, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 및 S9 mix를 건열멸균한 유리시험관에 각각 넣고, 37°C 배양기에서 20분간 진탕하였다. 진탕 종료 후, top agar를 가해서 vortexing 한 후, nutrient broth 한천평판배지에 중층하여 실온에 방치하였다. Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기에서 48시간 배양한 후, 미생물의 오염으로 인한 콜로니 형성 유무를 확인하였다.

시험물질의 처리시 및 콜로니 수 계측시에 시험물질의 침전에 대해 육안으로 관찰하고 기록하였다. 배양 종료 후, 복귀변이콜로니수를 콜로니카운터 (ProtoCOL, SYNBIOISIS, UK)로 자동계측하였다. 자동계측이 정확하지 않을 경우에는 육안계수를 실시하였다. 생육저해 유무를 확인하기 위해, 복귀변이콜로니수 계측시, background lawn의 형성유무를 확인하였다. 생육저

해의 판정기준은 background lawn이 음성대조군과 비교시 옅어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다. 시험의 성립조건은 음성 및 양성대조군에서의 평균복귀변이콜로니수가 Historical control data의 범위내 또는 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배 이상, 4용량 이상에서 생육저해가 관찰되지 않은 경우 및 오염이 없을 시로 설정하였다. 그리고, 적어도 1개 균주에서 복귀변이콜로니수가 1용량 이상에서 음성대조군에 비해 2배 이상 증가하고, 증가에 따른 용량의존성이 있거나, 재현성이 있을 경우 양성으로 판정하였다.

사. 통계처리

복귀변이콜로니수의 측정치에 관해서는 실측치를 표기하고, 평균치 및 표준편차를 구하며 통계학적 방법은 사용하지 않았다.

아. 시험결과 및 고찰

시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다. 각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다. 시험물질에 의한 생육저해는 대사활성화비존재하의 TA100 및 TA1537 균주는 156 μ g/plate 이상, TA1535 균주는 313 μ g/plate, 대사활성화존재하의 TA100, TA1535 및 TA1537균주는 5,000 μ g/plate에서 관찰되었다. 대사활성화비존재하 및 존재하의 TA98 및 WP2uvrA(pKM101)균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전은 대사활성화비존재하의 78.1 μ g/plate 이상, 대사활성화존재하의 에서 156 μ g/plate 이상에서 관찰되었다. 이상의 결과로, 용량설정시험 및 본시험에서 재현성이 확보되었기 때문에, 본시험은 음성으로 판정하였다. 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치는 historical control data의 범위내에 속하였다.

해당시험은 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치가 historical control data 범위내에 속하였고, 각 균주에 있어서의 양성대조군의 복귀변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실한 증가가 확인되었다. 또한, 생육저해가 인정되지 않는 용량이 4용량 이상이었으며, 잡균에 의한 오염도 확인되지 않았기 때문에 해당시험은 적절하게 실시되었다고 판단하였다. 이상의 결과로부터, 본 시험조건에서 시험물질 홍국균 발효 검정콩의 유전자들연변이 유발성은 음성으로 판정되었다.

Table 7. The number of revertant colonies per plate in absence metabolic activation (dose range finding study)

Strain	Test item	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean
TA98	Water for injection	0	15 , 22	19
		4.88	20 , 18	19
	Test Substance	19.5	14 , 14	14
		78.1†	26 , 20	23
		313†	19 , 16	18
		1,250†	20 , 12	16
		5,000†	24 , 20	22
	2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	508 , 444	476
TA100	Water for injection	0	75 , 69	72
		4.88	72 , 82	77
	Test Substance	19.5	70 , 79	75
		78.1†	71 , 74	73
		313†	45* , 53*	49
		1,250†	49* , 53*	51
		5,000†	43* , 58*	51
	Sodium azide (SA)	1.5	429 , 516	473
TA1535	Water for injection	0	8 , 14	11
		4.88	8 , 11	10
	Test Substance	19.5	11 , 8	10
		78.1†	11 , 8	10
		313†	6* , 9*	8
		1,250†	7* , 9*	8
		5,000†	9* , 10*	10
	Sodium azide (SA)	1.5	387 , 396	392
TA1537	Water for injection	0	5 , 5	5
		4.88	7 , 4	6
	Test Substance	19.5	6 , 7	7
		78.1†	6 , 6	6
		313†	2* , 2*	2
		1,250†	2* , 2*	2
		5,000†	1* , 1*	1
	9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	265 , 400	333
WP2uvrA (pKM101)	Water for injection	0	84 , 104	94
		4.88	95 , 103	99
	Test Substance	19.5	85 , 101	93
		78.1†	105 , 116	111
		313†	120 , 102	111
		1,250†	117 , 114	116
		5,000†	124 , 118	121
	2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2)	0.005	545 , 560	553

*: Indicated growth inhibition

†: Precipitation

Table 8. The number of revertant colonies per plate in presence metabolic activation (dose range finding study)

Strain	Test item	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean
TA98	Water for injection	0	20 , 33	27
	Test Substance	4.88	20 , 32	26
		19.5	18 , 26	22
		78.1	24 , 19	22
		313†	35 , 25	30
		1,250†	26 , 25	26
		5,000†	30 , 30	30
	2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	222 , 214	218
TA100	Water for injection	0	75 , 85	80
	Test Substance	4.88	91 , 103	97
		19.5	90 , 80	85
		78.1	81 , 68	75
		313†	103 , 92	98
		1,250†	102 , 93	98
		5,000†	45* , 54*	50
	2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	289 , 246	268
TA1535	Water for injection	0	8 , 12	10
	Test Substance	4.88	7 , 7	7
		19.5	10 , 10	10
		78.1	6 , 11	9
		313†	10 , 10	10
		1,250†	13 , 12	13
		5,000†	12* , 3*	8
	2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	73 , 80	77
TA1537	Water for injection	0	12 , 16	14
	Test Substance	4.88	12 , 15	14
		19.5	7 , 11	9
		78.1	12 , 18	15
		313†	12 , 9	11
		1,250†	15 , 16	16
		5,000†	9* , 3*	6
	2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	152 , 110	131
WP2uvrA (pKM101)	Water for injection	0	113 , 109	111
	Test Substance	4.88	109 , 116	113
		19.5	103 , 105	104
		78.1	103 , 133	118
		313†	114 , 121	118
		1,250†	105 , 127	116
		5,000†	137 , 129	133
	2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	289 , 270	280

*: Indicated growth inhibition

†: Precipitation

Table 9. The number of revertant colonies per plate in absence metabolic activation (main study)

Strain	Test item	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	10 , 19 , 15	15	5
	Test Substance	313†	23 , 25 , 15	21	5
		625†	15 , 21 , 16	17	3
		1,250†	21 , 13 , 14	16	4
		2,500†	22 , 15 , 18	18	4
		5,000†	21 , 23 , 22	22	1
	2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	463 , 481 , 472	472	9
TA100	Water for injection	0	63 , 75 , 65	68	6
	Test Substance	9.77	65 , 70 , 64	66	3
		19.5	56 , 63 , 59	59	4
		39.1	64 , 63 , 64	64	1
		78.1†	76 , 69 , 61	69	8
		156†	70* , 71* , 55*	65	9
		313†	52* , 46* , 59*	52	7
Sodium azide (SA)	1.5	553 , 542 , 482	526	38	
TA1535	Water for injection	0	13 , 9 , 12	11	2
	Test Substance	9.77	10 , 11 , 9	10	1
		19.5	12 , 10 , 9	10	2
		39.1	10 , 8 , 12	10	2
		78.1†	13 , 9 , 13	12	2
		156†	14 , 13 , 5	11	5
		313†	6* , 5* , 10*	7	3
Sodium azide (SA)	1.5	453 , 453 , 435	447	10	
TA1537	Water for injection	0	7 , 8 , 8	8	1
	Test Substance	9.77	8 , 9 , 9	9	1
		19.5	10 , 8 , 8	9	1
		39.1	6 , 7 , 6	6	1
		78.1†	8 , 10 , 8	9	1
		156†	5* , 5* , 3*	4	1
		313†	7* , 2* , 5*	5	3
9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	388 , 542 , 514	481	82	
WP2uvrA (pKM101)	Water for injection	0	131 , 139 , 147	139	8
	Test Substance	313†	132 , 138 , 158	143	14
		625†	136 , 136 , 151	141	9
		1,250†	134 , 158 , 148	147	12
		2,500†	128 , 132 , 136	132	4
		5,000†	143 , 133 , 153	143	10
2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2)	0.005	706 , 821 , 829	785	69	

S.D.: Standard Deviation

*: Indicated growth inhibition

†: Precipitation

Table 10. The number of revertant colonies per plate in presence metabolic activation (main study)

Strain	Test item	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	19 , 25 , 30	25	6
		313†	25 , 21 , 26	24	3
	Test Substance	625†	28 , 27 , 28	28	1
		1,250†	30 , 27 , 30	29	2
		2,500†	20 , 21 , 35	25	8
		5,000†	23 , 32 , 29	28	5
		2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	240 , 251 , 277	256
TA100	Water for injection	0	69 , 79 , 80	76	6
		156†	77 , 72 , 86	78	7
	Test Substance	313†	80 , 71 , 61	71	10
		625†	78 , 76 , 81	78	3
		1,250†	89 , 94 , 99	94	5
		2,500†	73 , 80 , 92	82	10
		5,000†	52* , 52* , 63*	56	6
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	521 , 492 , 497	503	16	
TA1535	Water for injection	0	6 , 6 , 6	6	0
		156†	5 , 7 , 8	7	2
	Test Substance	313†	9 , 7 , 9	8	1
		625†	8 , 10 , 6	8	2
		1,250†	10 , 9 , 7	9	2
		2,500†	11 , 8 , 9	9	2
		5,000†	2* , 8* , 6*	5	3
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	94 , 107 , 100	100	7	
TA1537	Water for injection	0	17 , 20 , 15	17	3
		156†	12 , 16 , 13	14	2
	Test Substance	313†	17 , 20 , 15	17	3
		625†	11 , 16 , 20	16	5
		1,250†	14 , 21 , 22	19	4
		2,500†	15 , 13 , 16	15	2
		5,000†	14* , 10* , 11*	12	2
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	122 , 127 , 154	134	17	
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	Water for injection	0	123 , 129 , 159	137	19
		313†	151 , 134 , 118	134	17
	Test Substance	625†	132 , 129 , 126	129	3
		1,250†	115 , 132 , 120	122	9
		2,500†	127 , 125 , 130	127	3
		5,000†	132 , 144 , 129	135	8
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	322 , 468 , 383	391	73	

S.D.: Standard Deviation

*: Indicated growth inhibition

†: Precipitation

Table 11. Historical control data

Historical negative control values of revertant colonies									
Strain	S9 mix	N	Mean	±	S.D.	Range			
						Lower	Upper		
TA100	-	112	81.4	±	12.5	52.9	110.0		
	+	112	92.8	±	12.7	57.1	128.4		
TA1535	-	112	10.3	±	2.4	4.2	16.5		
	+	112	9.8	±	2.5	2.1	17.6		
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	-	112	125.0	±	19.5	72.0	177.9		
	+	112	149.4	±	18.9	97.0	201.8		
TA98	-	112	15.5	±	4.0	6.5	24.5		
	+	112	22.0	±	5.3	9.0	35.0		
TA1537	-	112	6.0	±	1.9	1.0	11.0		
	+	112	10.8	±	3.0	2.6	19.0		
Historical positive control values of revertant colonies									
Strain	S9 mix	Positive control	Dose (µg/plate)	N	Mean	±	S.D.	Range	
								Lower	Upper
TA100	-	SA	1.5	112	436.8	±	74.7	253.6	619.9
	+	2-AA	2.0	110	396.7	±	133.2	73.7	719.8
TA1535	-	SA	1.5	112	440.9	±	83.2	277.4	604.5
	+	2-AA	3.0	112	144.7	±	38.6	54.4	235.0
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	-	AF2	0.005	110	977.6	±	220.4	487.8	1467.3
	+	2-AA	2.0	112	416.6	±	85.9	187.1	646.1
TA98	-	2-NF	5.0	112	485.7	±	103.6	236.1	735.3
	+	2-AA	1.0	110	229.9	±	71.9	69.8	390.1
TA1537	-	9-AA	80.0	112	316.6	±	111.9	81.9	551.3
	+	2-AA	3.0	110	162.1	±	48.4	54.9	269.2

Negative control : Water for injection, Dimethyl sulfoxide, Acetone, 0.5% methyl cellulose 1,500cP, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution

SA : Sodium azide.

2-AA : 2-Aminoanthracene

AF2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2-NF : 2-Nitrofluorene

9-AA : 9-Aminoacridine

The above historical control values were obtained from the data pooled from Oct. 8, 2010 to Sep. 24, 2011.

The range was calculated by the control limit of X derived from $\bar{X}-R-R_s$ value.

4. 홍국균 발효 검정콩의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

가. 시험목적

시험물질 홍국균 발효 검정콩에 대해 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 사용하여 염색체이상 유발성의 유무를 검토하였다. 본 시험은 Good Laboratory Practices(“비임상시험관리기준”, 식품의약품안전청 고시 제2009-183호, 2009년12월22일)를 준수하였다. 또한 본 시험은 의약품등의 독성시험기준 (식품의약품안전청 고시 제2009-116호, 2009년8월24일)에 근거하여 실시하였다.

나. 시험물질

시험물질은 이미 및 이취가 없고 고유의 향미를 가진 적갈색의 분말의 홍국균발효검정콩 (Lot No. MJLH2012005)을 사용하였으며, 지표성분은 monacolin K(총monacolin K 함량 1.27 mg/g)로 설정하였다. 시험물질은 냉장 (3.5 ~ 5.2°C)보관하였다.

다. 시험물질의 조제

시험물질의 조제를 위한 부형제는 증류수를 사용하였으며, 세포증식억제시험의 최고용량인 5,000 µg/mL의 10배 stock (수용액) 또는 100배 stock (유기용매)를 조제하기 위해, 시험의뢰자가 제공한 정보에 따라 부형제 검토를 실시한 결과, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt 수용액, dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone 및 tetrahydrofuran (THF)에는 용해 또는 현탁되지 않았고, 주사용수에 현탁되었기 때문에 주사용수를 선택하였다.

시험물질의 조제는 시험물질 처리일에 실시하였다. 최고용량의 10배 stock을 조제하기 위하여, 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (LA230S, CP423S, Sartorius, Germany), 유발에 넣고 소량의 부형제를 가하여 유봉으로 균일하게 현탁시켰다. 현탁된 시험물질액을 조제용기에 넣고 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계희석하여 조제하였다.

양성물질의 조제는 2 mg/vial의 MMC에 주사용수 (Choongwae Pharma Corp., Korea) 4 mL를 가하여 vortex mixer로 용해시킨 후 생리식염수 (Choongwae Pharma Corp., Korea)로 희석하여 5 µg/mL의 stock solution을 조제하였다. B[a]P는 필요량을 칭량한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, Lot No. : K42088831, Merck, Germany)를 가하여 vortex mixer로 용해시켜 2,000 µg/mL의 stock solution을 조제하였다. 조제된 각각의 양성대조물질은 튜브에 분주하여 초저온냉동고 (OPR-DFU-657CEV, Operon, -80 ~ -60°C)에 동결보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다. 시험물질액의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

라. 시험세포주

시험에는 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포를 사용하였으며, 검출감도가 높아 염

색채이상시험에 많이 사용되고 있으며 가이드라인에서도 추천하는 Chinese Hamster Lung (CHL/ IU) 세포주를 선택하였다.

CHL/IU 세포주 (Lot No.: 3375917, U.S.A.)는 2006년 10월 25일에 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여, 10% Fetal bovine serum (FBS)를 포함한 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)이 들어있는 75 cm²플라스크 (Nunc, Denmark)에 넣고, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. Hoechst Stain Kit (MPBIOMEDICALS, Japan)를 사용하여 세포의 마이코플라즈마의 오염유무에 대해 확인하고, 배양된 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 가하여 플라스크 바닥으로부터 세포가 분리된 것을 확인하였다. 세포 현탁액을 tube에 옮겨 담고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 1×10⁶cells/mL이 되도록 FBS를 첨가한 후, DMSO (Merck, Germany)의 최종농도가 10%가 되도록 하여 동결보존용 튜브에 분주하고, 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에서 하루동안 방치한 후, 액체질소탱크에 사용시까지 보관하였다. 동결된 세포를 37°C로 설정된 항온수조에서 녹인 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지가 들어있는 50 mL 플라스틱 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm²플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

세포가 배양플라스크 바닥면적에 70 ~ 80%이상 생육할 때 세포형태를 관찰하고, 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리하였다. 세포현탁액을 50 mL 플라스틱 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm²플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

마. 전배양

염색체이상시험에는 세포 계대수가 25 이내인 세포를 사용하였다. 대수증식기의 세포에 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리한 후, 50 mL 플라스틱 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시킨 후, 혈구계수판을 이용하여 세포수를 계수하여 5×10⁴cells/mL 세포현탁액을 만든 후, 세포증식억제시험용은 96 well plate (200 µL/well; Nunc, Denmark), 본시험용은 60 mm dish (5 mL/dish, BD, U.S.A.)에 분주하여 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 1일간 배양하였다. 시험에 사용할 배지를 조제하기 위하여, EMEM에 비활성화된 FBS를 최종농도 10%가 되도록 첨가한 후, 10,000 units/mL의 Penicillin G sodium과 10,000 µg/mL의 streptomycin sulfate를 포함한 혼합액 (Invitrogen, U.S.A.)을 100 : 1의 비율로 첨가하였다. 조제 후 사용시까지 냉장 (2 ~ 8°C) 보관하였다. S9과 Cofactor C를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하고, 유효기간 내에 사용하였다.

S9 mix는 아래의 표와 같은 조성으로 필요량을 사용시에 조제하였다. 동결보관된 S9과 Cofactor C를 해동하여 2 : 4.7의 비율로 혼합하였다.

바. 예비시험

본시험의 용량을 설정하기 위한 예비시험에서는 가이드라인에서 추천한 5,000 µg/mL을 최고 용량으로 하고, 이하 2,500, 1,000, 500, 250, 100, 50, 10 및 5 µg/mL의 8용량을 설정하였다. 또한, 음성대조군을 설정하였다. 계대배양한 세포현탁액의 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수한 후 5×10⁴cells/mL이 되도록 10% FBS를 포함한 EMEM으로 희석하여 96 well plate (Nunc, Denmark)에 200 µL씩 분주하고, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 1일간 배양하였다. 배양종료 후, 각 plate는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 합 3계열로 분리하였다. 한 용량당 4 well을 사용하고, 시험번호 및 각 계열을 기입해서 well plate를 구별하였다. 처리후, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하에는 6시간 배양한 후 well내를 Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (D-PBS)로 세정하고, 신선한 배양액 200 µL를 가해 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 경우에는 24시간 연속 배양하였다. 시험물질의 침전은 시험물질액 처리시와 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다. 배양종료 후 모든 well에 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL D-PBS)를 50 µL씩 첨가하여 4시간 더 배양한 후에 배양액을 버리고 건조시켰다. 여기에 DMSO를 150 µL씩 첨가하여 침전물을 용해시켰다. ELISA reader (ELx808IU, BioTek, U.S.A.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사. 본시험

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포독성이 관찰되어 50% 세포증식억제용량 (Inhibition concentration 50%: IC₅₀)을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하에서는 1,198.5 µg/mL, 존재하에서는 652.4 µg/mL, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서는 1,110 µg/mL이었다. 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하에서는 250 µg/mL이상, 단시간처리법의 대사활성화존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하에서는 500 µg/mL 이상에서 관찰되었다. 본시험의 최고용량은 단시간처리법의 대사활성화비존재하는 1,200 µg/mL, 존재하는 650 µg/mL, 연속처리법의 대사활성화비존재하는 1,100 µg/mL으로 하고, 이하 공비 2로 3용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계대배양한 세포현탁액의 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수한 후 5×10⁴cells/mL이 되도록 10% FBS를 포함한 EMEM로 희석하여 60 mm dish (BD, U.S.A.)에 5 mL씩 분주하여 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 1일간 배양하였다. 배양종료 후, 각 plate는 단시간처리법

의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 합 3계열로 분리하였다. 한 용량당 2개의 plate를 사용하고, 각각의 plate에 유성펜으로 코드화한 용량, 음성대조물질, 양성대조물질 및 대사활성화 존재유무를 기입하여 식별하였다. 처리 후, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 6시간 배양한 후 plate내를 D-PBS로 세정하고, 신선한 배양액 5 mL로 교환하고 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 경우에는 24시간 연속 배양하였다. 시험물질의 침전은 시험물질액의 처리시와 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다.

배양종료 2시간 전에 Colcemid 용액 (Invitrogen, U.S.A.)을 최종농도가 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되게 첨가하였다. 배양종료 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 plate 바닥으로부터 세포를 떼어내었다. 떨어진 세포를 1,000 rpm 에서 5분간 원심분리 (FLETA 5, 한일과학) 한 후 상등액을 버리고 37°C에서 보온한 0.075 mol/L KCl 수용액을 5 mL 첨가하여 vortex mixer로 교반한 후 37°C에서 20분간 방치하였다. 20분 후, 1 mL의 냉각한 고정액 (methanol : acetic acid = 3 : 1)을 넣고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 세포를 반고정하였다. 이후, 5 mL의 냉각한 고정액을 첨가한 후 vortex mixer로 교반하여 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 1회 반복하여 세포를 고정하였다. 얻어진 세포부유액을 슬라이드글라스 2군데에 1 ~ 2방울 떨어뜨려 슬라이드 표본을 제작하고 코드화하였다. 건조 후, 3% Giemsa 염색액으로 20분간 염색하였다.

슬라이드 표본관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시하였다. 염색체 관찰의 대상용량은 각 처리법 모두 용량당 200개의 분열중기세포가 관찰 가능한 3용량을 설정하였다. 각 슬라이드당 100개, 1개 용량 당 최소 200개의 분열중기세포를 현미경 (BX51, Olympus, Japan, 400 ~ 600배 배율)으로 관찰하였다. 구조이상으로서 염색분체절단 (chromatid break; ctb), 염색분체교환 (chromatid exchange; cte), 염색체절단 (chromosome break; csb), 염색체교환 (chromosome exchange; cse), 갭 (gap: 염색분체의 폭 보다도 좁은 비염색성 부위) 및 기타 (other; o)로 분류하였다. 기타로서 1개의 분열중기세포에 다수의 gap 및 절단 등이 있는 경우에는 단편화 (fragmentation; frg)로 기록하였다. Gap에 대해서는 결과 기록시 구조이상에 포함하지 않고, 종합판정에서도 gap을 포함하지 않는 결과로 평가하였다. 또한, 수적 이상으로서 배수체 (polyploid; pol) 및 핵내배화 (endoreduplication; end)를 기록하였다. 이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 퍼센트 값을 구하고, 퍼센트 값을 염색체이상빈도로 하였다. 또한, 염색체이상의 종류를 각각 기록하였다. 시험의 성립조건은 염색체이상출현빈도가 음성대조군에서는 5% 미만, 양성대조군은 10% 이상일 때, 시험물질군에서 분열중기상세포를 200개 관찰한 용량이 3용량 이상일 때와 세포의 오염이 없을 때 성립하는 것으로 하였다. 염색체이상을 가진 세포 (gap은 제외)의 출현빈도에 대해 Toshio Sofuni등의 판정기준에 따라 아래와 같이 판정하였다.

이상세포의 평균 출현율	판정
5% 미만	음성 (-)
5% 이상 ~ 10% 미만	의양성 (±)
10% 이상	양성 (+)

양성으로 판정되지 않았기 때문에 D20 및 TR값은 구하지 않았다.

- D20: 20%의 세포에 구조이상이 출현할 수 있는 농도 (mg/mL)
- TR값: 단위용량 (mg/mL)당의 염색분체형교환 (cte) 출현빈도의 비교치

아. 통계처리

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도는 SAS version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.을 사용하여 통계해석을 실시하였다. 음성으로 판정되어 염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도에 대해서 Fisher's exact test에 의해 음성대조군과 시험물질처리군간 및 음성대조군과 양성대조군간의 유의차 (유의수준: 0.05) 검증을 실시하였다.

자. 시험결과 및 고찰

검체제작과정에서, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 최고용량에서 분열중기상 세포 200개를 확보할 수 있었기 때문에 최고용량을 포함한 3용량을 염색체 관찰의 대상용량으로 하였다. 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성도 관찰되지 않았다 (Fisher's exact test, $p \geq 0.05$). 각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 10% 이상으로 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가되었다 (Fisher's exact test, $p < 0.05$). 단시간처리법의 대사활성화비존재하에서는 150 $\mu\text{g/mL}$ 이상, 대사활성화존재하에서는 325 $\mu\text{g/mL}$ 이상, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서는 275 $\mu\text{g/mL}$ 이상에서 관찰되었다. 음성대조군 및 양성대조군의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 historical control data의 범위 내에 있었다.

염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만이었으며, 양성대조군에서 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 10% 이상으로 음성대조군과 비교해서 유의한 증가가 확인되었다. 시험물질군의 3용량에서 200개의 분열중기상세포가 관찰 가능하였으며, 세포의 오염도 없었기 때문에 해당시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것이 확인되었다. 이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질 홍국균 발효 검정공의 염색체이상 유발성은 음성으로 판정되었다.

Table 12. Summary of Growth inhibition study

Test substance	Dose (µg/mL)	S9 mix	Trit-Rec Time (hr)	Growth of cells (OD) (Mean±S.D.)			Growth rate (%)
Water for injection	0	-	6-18	1.015	±	0.088	100
test substance	5	-	6-18	0.958	±	0.208	94.4
	10	-	6-18	0.890	±	0.077	87.7
	50	-	6-18	0.891	±	0.069	87.8
	100	-	6-18	0.750	±	0.055	73.9
	250†	-	6-18	0.802	±	0.046	79.0
	500†	-	6-18	0.673	±	0.058	66.3
	1,000†	-	6-18	0.642	±	0.108	63.3
	2,500†	-	6-18	0.066	±	0.002	6.50
	5,000†	-	6-18	0.065	±	0.002	6.40
Water for injection	0	+	6-18	0.880	±	0.014	100
test substance	5	+	6-18	0.896	±	0.007	102
	10	+	6-18	0.922	±	0.008	105
	50	+	6-18	0.882	±	0.045	100
	100	+	6-18	0.864	±	0.055	98.2
	250	+	6-18	0.838	±	0.067	95.2
	500†	+	6-18	0.715	±	0.079	81.3
	1,000†	+	6-18	0.073	±	0.005	8.29
	2,500†	+	6-18	0.064	±	0.002	7.27
	5,000†	+	6-18	0.062	±	0.002	7.04
Water for injection	0	-	24-0	1.002	±	0.087	100
test substance	5	-	24-0	0.984	±	0.040	98.2
	10	-	24-0	0.915	±	0.025	91.3
	50	-	24-0	0.819	±	0.087	81.7
	100	-	24-0	0.756	±	0.135	75.4
	250	-	24-0	0.670	±	0.030	66.9
	500†	-	24-0	0.611	±	0.156	61.0
	1,000†	-	24-0	0.531	±	0.102	53.0
	2,500†	-	24-0	0.074	±	0.002	7.39
	5,000†	-	24-0	0.070	±	0.002	6.99

Trit-Rec time : Treatment-Recovery times

S.D.:Standard deviation

† : Precipitation

Table 13. Summary of main study

Test substance	Dose (µg/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations						gap (%)	Number of cells with numerical aberrations		
					ctb	csb	cte	cse	fig	total (%)		end	pol	total (%)
Water for injection	0	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)
				100	0	0	0	0	0			0		
test substance	150†	-	6-18	not observed										
				100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)
	100	0	0	0	0	0	0	0						
	300†	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	600†	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	1,200†	-	6-18	100	0	0	0	0	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0	2	6 (3.0)
100				0	0	2	0	0	2			2		
MMC	0.05	-	6-18	100	2	0	13	0	0	27* (13.5)	0 (0.0)	0	3	3 (1.5)
				100	1	0	11	0	0			0	0	
Water for injection	0	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
test substance	81.3	+	6-18	not observed										
				100	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
	100	0	0	0	0	0	0	0						
	325†	+	6-18	100	0	0	1	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	0	1 (0.5)
				100	0	0	0	0	0			0	1	
	650†	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	2 (1.0)
				100	0	0	0	0	0			0	1	
	B[a]P	20	+	6-18	100	4	0	10	0	0	27* (13.5)	0 (0.0)	0	2
100					2	0	12	0	0	0			0	
Water for injection	0	-	24-0	100	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
test substance	138	-	24-0	not observed										
				100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	2	4 (2.0)
	100	0	0	0	0	0	0	0						
	275†	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	2 (1.0)
				100	0	0	0	0	0			0	1	
	550†	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	1,100†	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
100				0	0	0	0	0	0			0		
MMC	0.05	-	24-0	100	6	0	10	0	0	31* (15.5)	0 (0.0)	0	3	5 (2.5)
				100	1	0	14	0	0			0	2	

Aberration: gap: chromatid and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, fig: fragmentation, end: endoreduplication, pol: polyploidy

MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene

Trt-Rec time : Treatment-Recovery times

Significant difference from negative control by fisher's exact test : * p<0.05

† : Precipitation

Table 14. Historical control data

Historical control values of structural aberrations								
Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Structural aberration cells without gap (%) (Mean±S.D.)			Range (%)	
							MIN	MAX
Negative	-	6-18	113	0.1	±	0.3	0	<5
	+	6-18	113	0.2	±	0.4	0	<5
	-	24-0	102	0.2	±	0.3	0	<5
Positive	-	6-18 ^{a)}	113	19.3	±	5.0	<10	34*
	+	6-18 ^{b)}	113	20.8	±	5.8	<10	38*
	-	24-0 ^{a)}	102	19.4	±	5.8	<10	37*

Historical control values of numerical aberrations								
Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Numerical aberration cells (%) (Mean±S.D.)			Range(%)	
							MIN	MAX
Negative	-	6-18	113	0.1	±	0.3	0	<5
	+	6-18	113	0.1	±	0.3	0	<5
	-	24-0	103	0.1	±	0.3	0	<5

Negative control : Water for injection, Dimethyl sulfoxide, Acetone, 0.5% methyl cellulose 1500cP solution, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution, Tetrahydrofuran etc.

a : Mitomycin C (0.05 µg/mL)

b : Benzo[a]pyrene (20 µg/mL)

N : The total number of chromosome aberration test

The above historical control values are obtained from the data pooled from Jan. 1, 2011 to May 31, 2012

*: The range was calculated by the control limit from Mean ± 3S.D.

5. 홍국균 발효 검정콩의 마우스를 이용한 소핵시험

가. 시험목적

마우스 골수세포를 이용하여 시험물질 홍국균 발효 검정콩의 소핵유발 유무를 평가하였다. 본 시험은 Good Laboratory Practices(“비임상시험관리기준”, 식품의약품안전청 고시 제 2009-183호, 2009년12월22일)를 준수하였다. 또한 본 시험은 의약품등의 독성시험기준 (식품의약품안전청 고시 제2009-116호, 2009년8월24일)에 근거하여 실시하였으며, 동물보호법 (제정 1991년5월31일 법률제4379호, 전부개정 2011년 8월4일 법률 제10995호)에 근거한 (주)바이오텍스의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 120373). 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

나. 시험물질

시험물질은 이미 및 이취가 없고 고유의 향미를 가진 적갈색의 분말의 홍국균발효검정콩 (Lot No. MJLH2012005)을 사용하였으며, 지표성분은 monacolin K(총monacolin K 함량 1.27 mg/g)로 설정하였다. 시험물질은 냉장 (3.5 ~ 5.2°C)보관하였다.

다. 시험물질의 제조

시험물질의 조제는 투여일에 실시하였다 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (LA230S, CP423S, Sartorius, Germany), 유발에 넣고 소량의 부형제를 가하여 유봉으로 균일하게 현탁시켰다. 현탁된 시험물질액을 조제용기에 넣고 부형제를 가하여 규정용량으로 조제하였다. 음성대조물질은 본시험의 부형제인 주사용수를 선택하였으며, 양성대조물질은 mitomycin C를 사용하였다. 시험물질의 조제를 위한 부형제는 주사용수를 선택하였으며, 시험의뢰자의 정보에 따라 부형제 검토를 실시한 결과, 주사용수에 현탁되었기 때문에 선택하였다. 양성대조물질인 mitomycin C (MMC)는 2 mg에 주사용수 (Lot No.: DBA1003, Choongwae Pharma Corp., Korea) 4 mL를 첨가하여 용해한 후 생리식염주사액 (Lot No.: GAA1013, Choongwae Pharma Corp., Korea) 을 더하여 0.2 mg/mL으로 조제하여 초저온 냉동고 (-80 ~ -60°C) 내에 보관하고, 사용시 해당하여 시험에 사용하였다. 시험물질액의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

라. 시험동물

시험동물은 SPF CrIjOri:CD1(ICR)마우스를 오리엔트바이오 (성남, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 시험종 및 계통의 선택이유는 ICR 마우스가 설치류로서 소핵시험을 비롯한 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있으며 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있어 선택하였다. 입수 시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위는 용량설정시험에 수컷, 각 17마리, 7주령, 25.9 ~ 27.6 g, 검체 제작시간 설정시험에 수컷, 10마리, 7주령, 26.9 ~ 28.8 g, 본시험에 수컷, 27마리, 7주령, 28.8 ~

31.9 g이었다. 투여시의 동물수 및 주령 및 체중은 용량설정시험에 수컷, 각 15마리, 8주령, 32.3 ~ 36.2 g, 검체제작시간 설정시험에 수컷, 9마리, 8주령, 31.9 ~ 35.1 g, 본시험에 수컷, 25마리, 8주령, 34.0 ~ 37.7 g이었다. 검역 및 순화는 반입시 동물의 외관 검사를 실시한 후, 체중을 측정하였다 (BP410S, Sartorius, Germany). 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물 입수시 검역실에서 3일간 일반증상을 관찰한 후 동물실로 이동하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강상태에 이상이 없는 것을 확인하였다. 순화기간 중에는 입수시에 체중 측정한 동물의 꼬리에 적색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역순화 기간 중 개체식별카드를 부착하였다. 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 하였다. 사육상자에는 색깔별로 라벨을 부착하여 식별하였다. 군분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동물을 이용하여 순화종료일 (군분리일)에 실시하였다. 군분리일에 평균체중에 가까운 동물에 대해 용량설정시험용 수컷 15마리, 검체제작시간 설정시험용 수컷 9마리 및 본시험용 수컷 25마리를 선별하였다. 선별한 동물은 각 군 평균체중이 균등하도록 군분리하였다. 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시켰다.

사육상자는 순화기간 중에는 폴리카보네이트 케이지 (260W×420D×180H mm), 시험기간중에는 폴리카보네이트 케이지 (200W×260D×130H mm)를 사용하였다. 사육실의 온도는 21.0 ~ 23.0°C, 상대습도는 42.7 ~ 69.1%, 환기횟수는 10 ~ 15회/시간, 명암주기 (조명시간)는 12시간/일 (오전 7시부터 오후 7시) 조도는 150 ~ 300 Lux로 조절하였다. 사육상자 및 급이기는 1회/2주 빈도로 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다. 실험동물용 고형사료는 Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C (Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.). 급이방법은 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취 시켰다. 사료의 분석은 Harlan Laboratories, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인하였다. 음수는 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취 시켰다. 검역실에서는 폴리카보네이트제 음수병 (500 mL)으로, 동물실에서는 자동급수 장치로 자유섭취 시켰다.

마. 용량설정시험

본시험의 용량을 설정하기 위해 용량설정시험을 실시하였으며, 시험물질의 임상적용예상용량은 최대 6 g/human/day (성인 70 kg 기준시 약 0.086 g/kg)이므로, 임상예상용량의 약 23배인 2,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 1,000, 500, 250 및 125 mg/kg의 4용량을 설정하였다.

투여방법은 1용량당 3마리로 하였으며, 테프론제 존대를 장착한 주사기를 사용하여 강제경구 투여하였다. 투여액량은 15 mL/kg로 하고, 군분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다. 투여직후

(투여 0일), 투여 후 2시간, 투여 후 1, 2 및 3일에 일반증상 및 각 용량별 사망동물을 관찰하였다.

바. 본시험

용량설정시험의 결과, 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서, 본시험의 최고용량은 2,000 mg/kg으로 하고, 이하 공비 2로 2용량 (1,000 및 500 mg/kg)의 시험물질군을 설정하였다. 또한 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 용량설정 시험에서 설정한 최고용량 (2,000 mg/kg)을 1회 경구투여하고, 투여 후 24, 48 및 72시간째에 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰하였다. 각 시간당 동물은 3마리로 하였다. 투여액량은 15 mL/kg로 하고, 균분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다. 일반증상 및 사망동물 관찰은 시험물질 투여직후 (투여 0일), 투여 후 2시간, 투여 후 1, 2 및 3일에 일반증상 및 사망동물을 관찰하였다.

투여 후, 24, 48 및 72시간에 소핵유발을 확인한 결과, 모든 관찰 시간대에서 소핵유발은 증가되지 않았기 때문에 일반적으로 사용되는 투여 후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 하였다. 각 군에 5마리의 동물을 사용하여 5군으로 설정하였다. 투여경로는 경구투여로 설정하였으며, 시험물질의 임상적용예정경로를 고려하여 경구투여를 선택하였다. 시험물질은 테프론제 존데를 장착한 주사기 (1 mL) 를 사용하여 1회 강제경구 투여하였다. 음성대조군은 시험물질과 동일한 방법으로 부형제를 1회 강제경구 투여하였다. 양성대조물질 MMC는 일반적으로 많이 사용되고 있는 복강에 1 mL (26 G) 주사기를 이용하여 1회 투여하였다. 투여액량은 음성대조군 및 시험물질군은 15 mL/kg, 양성대조군은 10 mL/kg로 하고, 균분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

일반증상 관찰은 투여직후 (투여 0일), 투여 후 2 시간 및 검체제작일까지 24시간 간격으로 실시하며, 각 용량의 사망동물을 관찰하였다. 체중은 투여일 (투여 0일) 및 골수채취직전에 측정하였다 (BP410S, Sartorius, Germany). 시험물질 투여 후 각 군의 검체제작시간에 동물을 경추탈골하였다. 대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 200 μ L의 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, Invitrogen, U.S.A.)을 관류시켜 골수세포를 채취하였다. 골수세포부유액은 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 (MICRO17TR, Hanil Science Industrial, Korea) 하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 소량을 슬라이드글라스에 떨어뜨려 도말하였다. 개체당 3매의 골수도말검체를 제작하였다. 슬라이드글라스에 개별번호를 기입하고 충분히 건조시킨 후, 메탄올로 고정하였다. 3% Giemsa 염색액 (0.01 mol/L Sörenson 인산완충액 (pH 6.8)의 조제)으로 30분간 염색하였다. 0.01 mol/L Sörenson 인산완충액 (pH 6.8)을 사용하여 세척하고 0.004% citric acid 수용액에 세정하여 건조시켰다.

코드화된 골수도말표본을 1,000배 배율의 현미경 (BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

검체 1장당 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte)를 1,000개씩 관찰하고, 1개체당 2,000개의 다염성적혈구를 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 대한 소핵다염성적혈구 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현율을 구하였다. 골수세포의 증식 억제 지표로서, 검체 1장당 총적혈구 250개를 관찰하여, 1개체 당 500개의 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비를 구하였다.

시험의 성립조건은 음성대조군 및 양성대조군에 있어 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 범위내에 있을 때 성립으로 하였다. 결과의 판정은 와 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum and Bowman의 추정학적 통계 방법을 사용하여 검증하고, 통계학적으로 유의하게 증가할 때 양성으로 판정하였다.

사. 자료의 통계처리

소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum & Bowman의 추정학적 통계방법을 이용하여 검증하였다. 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중의 변화는 통계처리 프로그램 version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.을 사용하여 통계해석을 실시하였다. Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였다 (유의수준: 0.05).

아. 시험결과 및 고찰

시험물질군의 모든 용량에서 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 각군 모든 동물에서 음성대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$). 시험물질군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 비율이 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, Kastenbaum & Bowman). 또한, 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$). 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$, Kastenbaum & Bowman). 또한, 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$). 음성대조군 및 양성대조군의 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 historical control data의 범위내에 있었기 때문에 해당시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것으로 판단하였다. 이상의 결과로부터, 본시험 조건하에서 시험물질 홍국균 발효 검정용의 마우스 골수세포의 소핵유발성은 음성으로 판정하였다.

Table 15. Clinical signs (dose range finding test)

Test substance	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Hours after treatment				
					0	2	24	48	72
	125	P.O.	3	NAD	3	3	3	3	3
	250	P.O.	3	NAD	3	3	3	3	3
Test substance	500	P.O.	3	NAD	3	3	3	3	3
	1,000	P.O.	3	NAD	3	3	3	3	3
	2,000	P.O.	3	NAD	3	3	3	3	3

NAD : No Abnormalities Detected

P.O. : Per Os

Table 16. Clinical signs (sampling time determining study)

Test substance	Dose (mg/kg)	Administration route	No. of animals	Clinical signs	Hours after treatment				
					0	2	24	48	72
	2,000	P.O.	3	NAD	3	3	3	-	-
Test substance	2,000	P.O.	3	NAD	3	3	3	3	-
	2,000	P.O.	3	NAD	3	3	3	3	3

NAD : No Abnormalities Detected

P.O.: Per Os

- : No data

Table 17. Results (Sampling time determining study)

Test substance	Dose (mg/kg)	Administration route	Time after administration	Animal ID	Counted PCE : NCE	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE
Test substance	2,000	P.O.	24 hrs	B1101	243 : 257	0.486	2 / 2000
				B1102	196 : 304	0.392	2 / 2000
				B1103	240 : 260	0.480	1 / 2000
				Total	- : -	-	5 / 6000
				Mean±S.D.	- : -	0.453 ± 0.053	1.7 ± 0.6
		P.O.	48 hrs	B1201	245 : 255	0.490	0 / 2000
				B1202	251 : 249	0.502	0 / 2000
				B1203	183 : 317	0.366	0 / 2000
				Total	- : -	-	0 / 6000
				Mean±S.D.	- : -	0.453 ± 0.075	0.0 ± 0.0
P.O.	72 hrs	B1301	162 : 338	0.324	0 / 2000		
		B1302	166 : 334	0.332	1 / 2000		
		B1303	161 : 339	0.322	0 / 2000		
		Total	- : -	-	1 / 6000		
		Mean±S.D.	- : -	0.326 ± 0.005	0.3 ± 0.6		

P.O.: Per Os

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

S.D. : Standard deviation

- : No data

Table 18. Clinical sings (Main study)

Group	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Hours after treatment			
					0	2	24	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	5	NAD	5	5	5
						5	5	5
Test substance	Test substance	1,000	P.O.	5	NAD	5	5	5
		2,000	P.O.	5	NAD	5	5	5
Positive control	MMC	2	I.P.	5	NAD	5	5	5

P.O. : Per Os

I.P. : Intraperitoneal

MMC : Mitomycin C

NAD : No Abnormalities Detected

Table 19. Mean bodyweight (Main study)

Group	Dose (mg/kg)	Administration route	Animal I.D.	Body weight (g) at the time of		
				Administration	Sacrifice	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	1101	37.7	37.1
				1102	35.7	35.0
				1103	35.6	35.0
				1104	34.3	34.8
				1105	34.2	34.4
				Mean±S.D.	35.5 ± 1.4	35.3 ± 1.1
Test substance	500	P.O.	1201	37.2	36.8	
			1202	35.7	35.3	
			1203	35.5	35.2	
			1204	34.3	34.1	
			1205	34.2	33.7	
			Mean±S.D.	35.4 ± 1.2	35.0 ± 1.2	
	1,000	P.O.	1301	37.0	36.8	
			1302	36.3	34.8	
			1303	35.5	34.0	
			1304	34.3	34.0	
			1305	34.2	34.0	
			Mean±S.D.	35.5 ± 1.2	34.7 ± 1.2	
	2,000	P.O.	1401	36.8	35.2	
			1402	36.3	35.6	
			1403	35.0	33.6	
1404			34.5	34.6		
1405			34.0	33.4		
Mean±S.D.			35.3 ± 1.2	34.5 ± 1.0		
Positive control	Mitomycin C	2	I.P.	1501	36.5	35.7
				1502	36.5	36.2
				1503	34.9	33.7
				1504	34.7	34.4
				1505	34.0	35.2
				Mean±S.D.	35.3 ± 1.1	35.0 ± 1.0

P.O.: Per Os

I.P. : Intraperitoneal

S.D. : Standard deviation

Table 20. Results (Main study)

Groups	Dose (mg/kg)	Administration route	Time after administration	Animal I.D.	Counted PCE : NCE	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24 hrs	1101	162 : 338	0.324	0 / 2000
					1102	144 : 356	0.288	0 / 2000
					1103	163 : 337	0.326	0 / 2000
					1104	142 : 358	0.284	0 / 2000
					1105	141 : 359	0.282	0 / 2000
					Total	- : -	-	0 / 10000
				Mean±S.D.	- : -	0.301 ± 0.022	0.0 ± 0.0	
Test substance	500	P.O.	24 hrs	1201	179 : 321	0.358	2 / 2000	
				1202	186 : 314	0.372	0 / 2000	
				1203	181 : 319	0.362	2 / 2000	
				1204	152 : 348	0.304	1 / 2000	
				1205	142 : 358	0.284	0 / 2000	
				Total	- : -	-	5 / 10000	
					Mean±S.D.	- : -	0.336 ± 0.039	1.0 ± 1.0
	1,000	P.O.	24 hrs	1301	167 : 333	0.334	0 / 2000	
				1302	135 : 365	0.270	0 / 2000	
				1303	164 : 336	0.328	2 / 2000	
				1304	179 : 321	0.358	0 / 2000	
1305				193 : 307	0.386	1 / 2000		
Total				- : -	-	3 / 10000		
				Mean±S.D.	- : -	0.335 ± 0.043	0.6 ± 0.9	
2,000	P.O.	24 hrs	1401	252 : 248	0.504	2 / 2000		
			1402	160 : 340	0.320	1 / 2000		
			1403	241 : 259	0.482	0 / 2000		
			1404	149 : 351	0.298	0 / 2000		
			1405	174 : 326	0.348	1 / 2000		
			Total	- : -	-	4 / 10000		
				Mean±S.D.	- : -	0.390 ± 0.096	0.8 ± 0.8	
Positive control	Mitomycin C	2	I.P.	24 hrs	1501	169 : 331	0.338	94 / 2000
					1502	208 : 292	0.416	109 / 2000
					1503	199 : 301	0.398	107 / 2000
					1504	209 : 291	0.418	106 / 2000
					1505	151 : 349	0.302	85 / 2000
					Total	- : -	-	501† / 10000
				Mean±S.D.	- : -	0.374 ± 0.052	100.2 ± 10.3	

P.O.: Per Os

I.P.: Intraperitoneal

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

Significant difference from negative control by Kastenbaum & Bowman : † p<0.05

S.D. : Standard deviation

Table 21. Historical control data

Historical control values of micronucleated polychromatic erythrocytes(MNPCE)							
Group	Dose (mg/kg)	n	MNPCE/2000PCE			Range(MNPCE/2000PCE)	
			Mean±S.D.			MIN	MAX
Negative control	0	103	0.6	±	0.50	0	1.8
Positive control	2	103	126.2	±	31.44	47.6	204.8

Historical control values of ratio of polychromatic erythrocytes(PCE) to total erythrocytes							
Group	Dose (mg/kg)	n	PCE/NCE+PCE			Range(PCE/NCE+PCE)	
			Mean±S.D.			MIN	MAX
Negative control	0	103	0.372	±	0.041	0.270	0.473
Positive control	2	103	0.343	±	0.045	0.231	0.455

Negative control : Including water for injection, normal saline injection, olive oil, corn oil, 0.5% methyl cellulose 1,500cP solution,

Positive control : Mitomycin C (2 mg/kg, I.P., single administration)

The above historical control values were obtained from the data pooled from Jan. 15, 2009 to May 30, 2012.

The range was calculated by the control limit from Mean \pm 2.5S.D.

6. 홍국균 발효 검정콩의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험

가. 시험목적

암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 홍국균 발효 검정콩을 13주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하기 위하여 실시한다. 본 시험은 Good Laboratory Practices(“비임상시험관리기준”, 식품의약품안전청 고시 제2009-183호, 2009년12월 22일)를 준수하였다. 또한 본 시험은 의약품등의 독성시험기준 (식품의약품안전청 고시 제2009-116호, 2009년8월24일)에 근거하여 실시하였으며, 동물보호법 (제정 1991년5월31일 법률 제4379호, 전부개정 2011년 8월4일 법률 제10995호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리 위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 120373). 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

나. 시험물질

시험물질은 이미 및 이취가 없고 고유의 향미를 가진 적갈색의 분말의 홍국균발효검정콩 (Lot No. MJLH2012005)을 사용하였으며, 지표성분은 monacolin K(총monacolin K 함량 1.27 mg/g)로 설정하였다. 시험물질은 냉장 (3.5 ~ 5.2°C)보관하였다.

다. 시험물질의 조제

시험물질을 전자저울 (CP323S, CP423S, Sartorius, Germany)로 칭량하여 유발에 넣고, 부형제를 일부 넣어 현탁시켰다. 조제병에 조제물을 옮긴 후, 부형제를 가하여 규정농도 (125 mg/mL)로 조제하였다. 조제물은 투여당일 조제하였다. 2시간 간격으로 2회 조제하였다. 조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

라. 시험동물

시험동물은 SPF Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)) 랫트를 오리엔트바이오 (성남, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 시험종 및 계통의 선택이유는 Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다. 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위는 수컷, 46 마리, 5주령, 90.0 ~ 150.0 g / 암컷, 46 마리, 5주령, 80.0 ~ 140.0 g이었으며, 투여개시시 주령 및 동물수는 6주령, 암수 각 40 마리였다. 검역 및 순화는 반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울 (CP3202S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물입수 시 검역실에서 3일간 일반증상을 관찰 후 동물실로 이동하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화 (Table 5)를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

개체 및 사육상자 식별은 순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여

개체표시를 하고, 사육상자에는 검역순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다. 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다. 개체 및 사육상자 식별은 순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다. 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다.

군분리는 모든 동물에 대하여 순화종료일 (군분리일)에 실시하였다. 군분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 10마리를 선발하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2군, 군당 5마리로 군분리하였다. 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시켰다.

사육상자는 스테인레스 철망사육상자 (260W×350D×210H mm)를 사용하였으며, 사육상자당 수용동물 수는 3마리 (검역순화기간) / 1마리 (관찰기간)로 하였다. 온도는 21.0 ~ 23.0°C, 상대습도는 42.7 ~ 69.1%, 환기횟수는 10 ~ 15회/시간, 명암주기 (조명시간)는 12시간/일 (오전 7시부터 오후 7시) 조도는 150 ~ 300 Lux로 조절하였다. 사육상자 및 급이기는 1회/2주 빈도로 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다. 실험동물용 고형사료는 Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C (Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.). 급이방법은 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취 시켰다. 사료의 분석은 Harlan Laboratories, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인하였다. 음수는 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취 시켰다. 검역실에서는 폴리카보네이트제 음수병 (500 mL)으로, 동물실에서는 자동급수 장치로 자유섭취 시켰다.

마. 투여경로 및 투여방법

투여경로는 경구투여로 실시하였으며, 시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다. 시험물질의 투여는 1일 총 투여액량은 20 mL/kg으로 하고, 1회 투여액량은 10 mL/kg으로 2회 분할하여 투여하였다. 개체별 투여액량은 최근에 측정한 체중을 기준으로 산출하였으며, 매일 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (3 ~ 10 mL)를 이용하여 13주간 1일 4시간 간격으로 2회 위내에 강제투여하였다.

시험물질의 임상적용예정용량은 약 6 g/human/day (성인 70 kg 기준시 0.086 g/kg)이며, 단회투여 독성시험 (Biototech Study No.: B12353)의 결과, 5,000 mg/kg 용량에서 사망례 및 시험물질에 의한 영향이 관찰되지 않았다. 반복투여의 투여가능한 최대액량을 고려하고 시험의뢰자와 협의하여 임상적용예정 용량의 약 29배로 설정하여, 본 시험에서는 2,500 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 공비 2를 적용한 1,250 및 625 mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정

하였다. 대조군에는 부형제인 주사용수를 투여하였다.

군	투여용량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)		
			수컷	암컷	
G1	대조군	0	20	10 (1101 ~ 1110)	10 (2101 ~ 2110)
G2	저용량군	625	20	10 (1201 ~ 1210)	10 (2201 ~ 2210)
G3	중용량군	1,250	20	10 (1301 ~ 1310)	10 (2301 ~ 2310)
G4	고용량군	2,500	20	10 (1401 ~ 1410)	10 (2401 ~ 2410)

바. 일반중독증상 관찰 및 검사

모든 동물에 대하여 1일 2회 일반증상을 관찰하고, 2차 투여 후 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다. 관찰은 투여 1일부터 13주간 실시하였으며, 관찰기간 중 사망동물은 발견시 신속히 부검하고, 즉시 부검을 실시하지 못하는 경우, 냉장 보관한 후 부검을 실시하였다. 빈사로 판단된 경우는 isoflurane으로 마취하여 배대동맥에서 채혈한 후 부검하였다. 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사는 가능한 범위내에서 생존동물과 동일한 항목에 대해서 실시하였다. 부검 후 장기중량 측정 및 조직병리학적 검사를 실시한다. 단, 각 측정결과는 평가에서 제외하였다.

모든 동물에 대하여 투여개시일 (투여전), 투여 개시 후 주 1회, 부검일에 체중을 측정하였다. 단, 부검일의 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하였다. 빈사동물 및 사망동물은 부검전에 체중을 측정하였다. 모든 동물에 대하여 투여개시 전의 사료섭취량은 군분리일부터 투여개시일까지 1일간의 섭취량을 측정하였다. 투여 12주까지는 7일간의 섭취량을, 투여 13주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

각 군당 5마리에 대하여 투여 13주에 실시하였으며, 안과학적 검사는 산동제 (이속토 아트로핀1% 점안제, 한국알콘)를 점안하기 전에 육안으로 동공대광반사 및 전안부 관찰을 실시하고, 산동제 점안 후에 검안경 (ALL PUPIL II, Keeler, U.K.)으로 전안부, 중간투광체, 안저에 대해서 실시하였다. 안저에서 시험물질에 의한 영향으로 사료되는 이상이 발견될 경우, 안저를 촬영하고 조직병리학적 검사를 실시하였다.

각 군당 5마리에 대하여 투여 13주에 뇨검사를 실시하였다. 신선뇨 (배설 후 약 3시간 이내의 뇨) 및 축뇨 (배설 후 약 24시간 뇨)를 수거하여, 아래 항목들의 검사를 실시하였다. 신선뇨 채취 중에는 사료급여를 실시하지 않고, 음수는 자유섭취시켰다.

종류	항목	단위	측정방법 / 측정기기
신선뇨	pH	-	Combur ¹⁰ Test [®] Mstick
	단백 (protein)	mg/dL	(Roche,Germany),
	당 (glucose)	mg/dL	노화학 분석기
	케톤체 (ketone body)	mg/dL	(cobas u 411, Roche,Germany)
	빌리루빈 (bilirubin)	mg/dL	
	잠혈 (occult blood)	Ery/ μ L	
	색상 및 투명도	-	육안관찰
축뇨	침사	-	현미경 검사
	노량	mL	메스실린더 측정
	노비중	-	비중계 (Vet360, Reichert, U.S.A.)

모든 생존 동물에 대하여 부검 전 약 18시간 이상 절식시킨 후, 부검일에 isoflurane으로 마취하여 배대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액 약 1 mL을 EDTA 함유 tube에 넣은 후, 혈구 분석기 (ADVIA 2120i, SIEMENS, Germany)로 다음 항목들을 측정하였다. 응고검사는 채취한 혈액 약 2 mL을 3.2% sodium citrate 함유 tube에 넣고, 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리한 후 혈장을 채취하였다. 응고시간 분석기 (Coapresta 2000, SEKISUI, Japan)로 다음 항목들을 측정하였다.

혈액생화학적 검사는 배대동맥에서 채취한 혈액 중 혈액학적 검사용 혈액을 제외한 나머지 혈액을 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리 후 혈청을 취하여 이용하였다. 혈액생화학 분석기 (7180, HITACHI, Japan) 및 전해질 분석기 (AVL9181, Roche, Germany)로 다음 항목들을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
적혈구수 (erythrocyte count, RBC)	$\times 10^6$ cells/ μ L	Flow cytometry
혈색소량 (hemoglobin, HGB)	g/dL	Flow cytometry, Cyanmethemoglobin
헤마토크리트치 (hematocrit, HCT)	%	Calculated
평균적혈구용적 (mean corpuscular volume, MCV)	fL	Flow cytometry
평균적혈구헤모글로빈량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)	pg	Calculated
평균적혈구헤모글로빈농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	g/dL	
혈소판수 (platelet, PLT)	$\times 10^3$ cells/ μ L	Flow cytometry
백혈구수 (leucocyte count, WBC)	$\times 10^3$ cells/ μ L	Flow cytometry,
백혈구백분율 (WBC differential counting) - 중성호성백혈구 (neutrophils, NEU) - 림프구 (lymphocytes, LYM) - 단핵구 (monocytes, MONO) - 산호성 백혈구 (eosinophils, EOS) - 염기호성 백혈구 (basophils, BASO)	%	Peroxidase stain
망상적혈구 (reticulocytes, Reti)	%	Flow cytometry, RNA stain
항목	단위	측정방법
프로트롬빈시간 (prothrombin time, PT)	sec	Coagulation time method
부분활성트롬보플라스틴시간 (activated thromboplastin time, APTT)	sec	
항목	단위	측정방법
알라닌 아미노기전이효소 (alanine aminotransferase, ALT)	U/L	JSCC (UV Kinetic)

항목	단위	측정방법
아스파테이트 아미노기전이효소 (aspartate aminotransferase, AST)	U/L	JSCC (UV Kinetic)
알칼라인 포스파타제 (alkaline phosphatase, ALP)	U/L	4-Nitrophenyl-phosphate 2Na (JSCC Transferable)
감마 글루타밀트란스펩티다제 (gamma glutamyl transpeptidase, GGT)	U/L	IFCC
혈액요소질소 (blood urea nitrogen, BUN)	mg/dL	Urease-GLDH
크레아티닌 (creatinine, Crea)	mg/dL	Jaffe
총빌리루빈 (total bilirubin, T-Bili)	mg/dL	Vanadate oxidation
총단백 (total protein, TP)	g/dL	Biuret
알부민 (albumin, Alb)	g/dL	BCG
A/G ratio	-	Calculated
총콜레스테롤 (total cholesterol, T-Chol)	mg/dL	Cholesterol oxidase-HMMPS
트리글리세라이드 (triglycerides, TG)	mg/dL	GPO-HMMPS Glycerol blanking
인 (phosphorus, P)	mg/dL	Fiske Subbarow
혈당 (glucose, Glu)	mg/dL	Hexokinase-G6PDH
칼슘 (calcium, Ca)	mg/dL	OCPC
염소* (chloride, Cl)	mmol/L	Ion-selective electrode
나트륨* (sodium, Na)	mmol/L	
칼륨* (potassium, K)	mmol/L	

모든 생존 동물에 대해서 투여 92일에 isoflurane 마취 하에 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다. 부검을 실시한 모든 동물에 대해서 전신의 장기·조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다. 모든 동물에 대하여 다음의 장기에 대한 습중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기중량비를 산출하였다. 좌우가 있는 장기 (#)는 좌우를 합하여 무게를 측정하였다.

- 뇌 (brain)
- 심장 (heart)
- 간 (liver)
- 신장# (kidney)
- 고환# (testis)
- 난소# (ovary)
- 뇌하수체 (pituitary)
- 폐 (lung)
- 비장 (spleen)
- 부신# (adrenal)
- 전립선 (prostate)
- 자궁 (uterus)

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기·조직을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액 (neutral buffered formalin)에 고정하고, 그 중 고환 및 안구는 Davidson 고정액에 고정하

였다. 조직병리학적 검사를 실시하는 장기·조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하여 박절한 후, Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 골조직은 Calci-Clear-Rapid™액 (National diagnostics, U.S.A.)을 사용하여 탈회한다. 잔여 장기·조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존한다. 조직병리학적 검사는 아래의 장기·조직에 대하여 검정하였다.

- 대조군과 고용량군의 모든 개체
- 중용량군과 저용량군의 빈사 및 사망개체와 육안소견이 관찰된 장기·조직
- 고용량군에서 시험물질에 의한 영향으로 사료되는 변화가 관찰된 경우, 중용량 및 저용량군의 해당 장기·조직

- | | |
|--|--------------------------------------|
| · 뇌 (brain) | · 뇌하수체 (pituitary) |
| · 갑상선 및 부갑상선 ^{a)} (thyroid and parathyroid) | |
| · 흉선 (thymus) | · 폐 (기관지포함) (lung including bronchi) |
| · 기관 (trachea) | · 심장 (heart) |
| · 간 (liver) | · 비장 (spleen) |
| · 신장 (kidney) | · 부신 (adrenal) |
| · 타액선 (악하선, 설하선, 이하선)
(salivary gland: submandibular, sublingual and parotid gland) | |
| · 식도 (esophagus) | · 위 (stomach) |
| · 십이지장 (duodenum) | · 공장 (jejunum) |
| · 회장 (ileum) | · 맹장 (cecum) |
| · 결장 (colon) | · 직장 (rectum) |
| · 췌장 (pancreas) | · 고환 (testis) |
| · 부고환 (epididymis) | · 전립선 (prostate) |
| · 정낭 (seminal vesicle) | · 난소 (ovary) |
| · 자궁 (uterus) | · 질 (vagina) |
| · 방광 (urinary bladder) | · 악하 림프절 (submandibular lymph node) |
| · 장간막 림프절 (mesenteric lymph node) | |
| · 안구 (시신경 ^{a)} 포함) 및 하더리안선 (eye including optic nerve and harderian gland) | |
| · 유선 (서혜부) (mammary gland: inguinal) | |
| · 피부 (서혜부) (skin: inguinal) | |
| · 흉골 (골수 포함) (sternum including bone marrow) | |
| · 대퇴골 (골수 포함) (femur including bone marrow) | |
| · 혀 (tongue) | · 척수 (흉부) (spinal cord: thoracic) |
| · 그 외 육안소견이 관찰된 장기·조직 | |

a) 해당 장기·조직이 슬라이드에 존재할 때만 조직병리학적 검사를 실시

사. 통계처리

실험에서 얻어진 체중, 사료섭취량, 뇨량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 결과는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정하였다. Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성 (유의수준: 0.05)이 관찰되면 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 등분산이 기각되면 Kruskal-Wallis test를 실시하여 유의성 (유의수준: 0.05)이 관찰되면 Steel test의 다중검정을 실시하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

아. 시험결과 및 고찰

투여기간 동안, 암수 대조군 및 625, 1,250, 2,500 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 투여기간 동안, 시험물질색변 (compound-colored stool)이 625 mg/kg 투여군에서 산발적으로 관찰되었고, 1,250 및 2,500 mg/kg 투여군에서 지속적으로 모든 동물에서 관찰되었다. 시험물질색변은 시험물질에 의한 착색변으로 사료되어 시험물질에 의한 독성변화는 아닌 것으로 판단된다. 암컷 2,500 mg/kg 투여군의 1마리에서 투여 87일에 투여 이후 동물이 순간적으로 튀어올라 사육상자에 목이 끼는 사고가 발생하여 투여 87 ~ 91일에 불규칙호흡 (irregular respiration), 우측 안구돌출 (exophthalmos), 체온저하 (hypothermia), 구개의 손상 (wound of palate), 호흡곤란 (dyspnea), 변량의 감소 (decrease of fecal volume), 흑색변 (blackish stool), 비출혈 (nasal hemorrhage), 거식 (refusal to feed), 무변 (no stool), 하복부오염 (soiled perineal region)이 관찰되었으나, 우발적인 사고에 의한 것으로 독성학적 의미는 없다. 투여기간 동안, 암수 625, 1,250, 2,500 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

투여기간 동안, 암수 625, 1,250, 2,500 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 사료섭취량 변화는 관찰되지 않았다. 암수 대조군과 625, 1,250, 2,500 mg/kg/day 투여군에서 이상 소견은 관찰되지 않았다.

안검사결과, 암수 625, 1,250, 2,500 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 모두 관찰되지 않았다. 관찰된 모든 변화는 경미한 변동이거나, 우발적 분포를 나타내었으므로 독성학적 의미는 없었다.

뇨검사 결과, 암수 625, 1,250, 2,500 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 모두 관찰되지 않았다. 통계학적 유의성이 관찰된 모든 항목은 배경데이터 범위 (Biototech background data, 2012년)내의 경미한 변동으로서, 용량의존성이 없거나 조직병리학적 검사에서 관련된 변화를 동반하지 않았으므로 독성학적 의미는 없었다. 혈액학적 및 혈액생화학적 검사결과, 암수 625, 1,250, 2,500 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 모두 관찰되지

않았다. 통계학적 유의성이 관찰된 모든 항목은 배경데이터 범위 (Biotoxtech background data, 2012년)내의 경미한 변동으로서, 용량상관성이 명확하지 않거나 조직병리학적 검사에서 관련된 변화를 동반하지 않았으므로 독성학적 의미는 없었다. 장기무게는 암수 625, 1,250, 2,500 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 모든 측정장기에서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다. 부검결과, 암수 625, 1,250, 2,500 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 관찰된 모든 육안적인 변화는 우발적인 소견으로 판단된다. 조직병리학적 검사결과, 암수 2,500 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 모두 관찰되지 않았다. 조직병리학적 검사에서 관찰된 다른 모든 변화는 모두 자연발생적이거나, 우발적인 것으로 판단된다.

본 시험 조건하에서, 홍국균 발효 검정콩을 13주 경구 반복투여 독성시험을 실시한 결과, 암수 2,500 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 독성이 관찰되지 않아, 무독성량 (NOAEL)은 암수 모두 2,500 mg/kg/day를 상회하는 것으로 판단된다.

Table 22. Summary of clinical signs

Sex: Male			
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected
G2 625	10	Compound-colored stool	10
G3 1,250	10	Compound-colored stool	10
G4 2,500	10	Compound-colored stool	10
Sex: Female			
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected
G2 625	10	Compound-colored stool	10
G3 1,250	10	Compound-colored stool	10
G4 2,500	10	Compound-colored stool	10
		Irregular respiration	1
		Exophthalmos (right eye)	1
		Hypothermia	1
		Wound of palate	1
		Dyspnea	1
		Decrease of fecal volume	1
		Blackish stool	1
		Nasal hemorrhage	1
		Refusal to feed	1
		No stool	1
		Soiled perineal region	1

Sex Male

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1 0	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	10	NOA Compound-colored stool	10	6	10	10	8	6	8	10	8	6	6	6	6	7	
				4			2	4	2		2	4	4	4	4	3	
G3 1,250	10	NOA Compound-colored stool	10	2	3	3	2	2	1		1						
				8	7	7	8	8	9	10	9	10	10	10	10	10	
G4 2,500	10	NOA Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day															
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
G1 0	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
G2 625	10	NOA Compound-colored stool	10	8	9	9	7	9	7	8	8	6	7	5	6	5		
				2	1	1	3	1	3	2	2	4	3	5	4	5		
G3 1,250	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
G4 2,500	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
G1 0	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	10	NOA Compound-colored stool	6	5	5	6	6	6	6	7	6	7	6	6	5	6
			4	5	5	4	4	4	4	3	4	3	4	4	5	4
G3 1,250	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

NOA: No Observable Abnormality

Sex Male

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
G1 0	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
G2 625	10	NOA Compound-colored stool	6 4	7 3	6 4	7 3	5 5	7 3	6 4	4 6	6 4	5 5	6 4	3 7	2 8	5 5
G3 1,250	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
G4 2,500	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
G1 0	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
G2 625	10	NOA Compound-colored stool	4 6	10	1 9	1 9	3 7	3 7	3 7	3 7	4 6	4 6	5 5	4 6	4 6	5 5
G3 1,250	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
G4 2,500	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
G1 0	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
G2 625	10	NOA Compound-colored stool	2 8	4 6	5 5	5 5	2 8	1 9	4 6	4 6	4 6	5 5	5 5	4 6	4 6	5 5
G3 1,250	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
G4 2,500	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	

NOA: No Observable Abnormality

Sex Male

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day						
			85	86	87	88	89	90	91
G1 0	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	10	NOA	4	4	4	3	4	4	3
		Compound-colored stool	6	6	6	7	6	6	7
G3 1,250	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10

NOA: No Observable Abnormality

Sex Female

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
G1 0	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	10	NOA Compound-colored stool	5	5	6	8	8	7	6	7	7	6	5	5	6	4
G3 1,250	10	Compound-colored stool	5	5	4	2	2	3	4	3	3	4	5	5	4	6
G4 2,500	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
G1 0	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	10	NOA Compound-colored stool	4	4	3	4	5	4	3	5	3	4	4	6	5	3
G3 1,250	10	Compound-colored stool	6	6	7	6	5	6	7	5	7	6	6	4	5	7
G4 2,500	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
G1 0	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	10	NOA Compound-colored stool	4	3	5	2	4	5	6	5	3	6	6	5	6	7
G3 1,250	10	Compound-colored stool	6	7	5	8	6	5	4	5	7	4	4	5	4	3
G4 2,500	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

NOA: No Observable Abnormality

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day						
			85	86	87	88	89	90	91
G1 0	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	10	NOA Compound-colored stool	6 4	6 4	6 4	4 6	5 5	6 4	6 4
G3 1,250	10	Compound-colored stool	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	10	Compound-colored stool Irregular respiration Exophthalmos (right eye) Hypothermia Wound of palate Dyspnea Decrease of fecal volume Nasal hemorrhage Refusal to feed Blackish stool No stool Soiled perineal region	10	10	10	10	9	9	9
					1				
					1				
					1	1	1	1	1
						1	1	1	1
						1	1		1
							1		1
								1	
								1	1

NOA: No Observable Abnormality

Table 23. Mean bodyweights

Sex Male		(g)						
Group /		Week						
Dose (mg/kg/day)		0	1	2	3	4	5	6
G1 0	Mean	197.4	257.2	308.2	347.2	381.6	412.6	438.3
	S.D.	7.9	10.5	12.1	15.3	20.0	24.1	27.2
	N	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	197.6	255.6	315.0	363.2	402.5	435.5	463.9
	S.D.	6.9	12.1	18.3	24.5	31.1	36.7	43.4
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	197.9	255.8	311.0	355.9	394.4	426.6	453.1
	S.D.	7.6	14.3	26.1	36.7	43.4	49.7	53.0
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	197.4	257.1	316.2	361.9	400.9	431.7	460.8
	S.D.	6.3	12.5	17.7	25.0	31.1	36.5	39.6
	N	10	10	10	10	10	10	10

Group /		Week						
Dose (mg/kg/day)		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	462.1	482.7	494.0	512.4	522.2	530.1	538.1
	S.D.	30.0	34.1	35.8	37.5	38.8	42.4	44.4
	N	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	486.3	507.3	521.9	536.9	550.1	560.5	568.1
	S.D.	49.3	53.1	56.2	56.6	59.6	63.0	63.5
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	476.8	496.0	513.0	528.2	539.7	553.5	560.8
	S.D.	62.3	68.3	70.5	70.2	73.1	79.9	85.4
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	482.6	501.5	519.1	534.5	547.7	557.5	564.4
	S.D.	46.9	49.2	52.0	55.4	55.1	57.3	58.8
	N	10	10	10	10	10	10	10

Sex: Female

(g)

Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		0	1	2	3	4	5	6
G1 0	Mean	159.5	183.0	204.8	221.3	242.3	255.6	265.9
	S.D.	8.7	10.4	14.3	17.5	18.7	19.3	19.1
	N	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	159.5	182.3	205.3	222.6	239.5	253.5	266.2
	S.D.	8.9	8.2	10.2	14.2	17.0	18.7	20.4
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	159.3	184.5	206.6	229.9	248.7	263.4	274.4
	S.D.	9.1	8.2	8.3	9.8	14.3	13.5	15.0
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	159.7	187.3	210.4	230.4	246.8	257.5	271.8
	S.D.	7.2	12.5	15.6	18.1	22.7	27.7	27.0
	N	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	279.4	283.7	292.3	297.9	303.6	302.0	310.9
	S.D.	18.9	19.3	21.1	19.4	19.2	18.8	16.3
	N	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	277.6	284.4	291.7	299.0	303.5	302.8	306.8
	S.D.	23.7	25.1	27.2	26.5	29.0	27.2	28.3
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	290.5	296.5	303.9	309.7	317.0	314.8	321.4
	S.D.	16.9	19.9	20.2	20.8	24.3	22.8	25.5
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	284.1	292.9	306.0	314.5	317.9	314.2	316.9
	S.D.	26.6	27.2	26.5	27.8	31.5	31.7	34.2
	N	10	10	10	10	10	10	10

Table 24. Mean food consumption

Sex Male		(g/day)						
Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		0	1	2	3	4	5	6
G1 0	Mean	27.6	29.6	31.3	31.7	32.0	33.1	33.3
	S.D.	2.5	2.4	2.2	2.4	2.9	3.2	3.1
	N	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	27.3	28.4	31.8	33.6	33.8	34.1	33.8
	S.D.	3.2	2.5	3.1	3.9	4.3	4.5	4.6
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	27.2	28.3	30.7	32.3	32.9	33.5	32.7
	S.D.	2.7	2.4	4.0	4.8	5.1	5.2	4.6
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	26.1	27.0	30.6	31.7	32.3	32.1	31.6
	S.D.	2.2	1.4	1.9	1.9	2.1	2.5	3.1
	N	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	33.3	32.9	32.1	32.2	31.9	30.4	28.3
	S.D.	2.9	3.4	3.6	3.5	3.4	3.3	3.1
	N	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	33.3	32.6	32.6	31.8	31.3	30.8	29.2
	S.D.	4.9	4.5	4.0	3.6	3.9	4.1	3.9
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	31.9	31.3	30.9	30.8	30.2	29.3	28.2
	S.D.	4.3	4.7	3.6	4.1	3.6	4.9	5.0
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	30.8	30.5	29.8	29.8	29.1	28.4	26.4
	S.D.	3.7	3.8	3.9	3.8	3.2	3.0	3.6
	N	10	10	10	10	10	10	10

Sex: Female

(g/day)

Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		0	1	2	3	4	5	6
G1 0	Mean	19.7	20.9	22.4	23.2	23.8	24.5	23.7
	S.D.	2.9	1.4	2.0	2.2	2.0	2.0	1.6
	N	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	19.2	20.8	22.3	23.1	24.1	24.5	23.8
	S.D.	2.7	1.6	1.6	2.0	1.8	2.0	1.9
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	18.7	20.7	21.9	23.4	24.1	24.2	23.9
	S.D.	2.7	1.5	1.4	1.5	1.6	1.1	1.6
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	19.1	20.6	21.8	23.0	23.4	23.3	23.0
	S.D.	1.3	1.6	2.1	2.2	2.7	2.9	2.4
	N	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	23.6	22.9	22.5	22.3	22.0	19.8	20.2
	S.D.	1.6	1.9	1.5	1.8	1.3	1.6	1.7
	N	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	23.5	23.2	22.9	22.2	21.8	20.1	19.2
	S.D.	2.5	2.6	2.8	2.4	1.9	1.7	2.5
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	23.9	22.9	21.8	22.0	21.6	19.1	19.7
	S.D.	1.8	1.7	1.9	2.2	2.2	0.9	1.8
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	23.2	23.0	23.5	22.9	20.9	18.7	17.6
	S.D.	2.3	1.8	2.3	2.5	3.2	2.9	4.7
	N	10	10	10	10	10	10	10

Table. 25. Summary of ophthalmological examination

Sex Male										
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 625	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 1,250	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,500	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex Female										
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 625	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 1,250	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,500	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 26. Summary of urinalysis results

Sex		Male				Female			
Group / Dose (mg/kg/day)		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
No. of animals		0	625	1,250	2,500	0	625	1,250	2,500
		5	5	5	5	5	5	5	5
Volume (mL)	Mean	9.0	15.5	14.5	12.6	4.7	5.3	6.6	5.9
	S.D.	3.2	3.3	7.7	4.8	1.4	2.0	4.1	2.1
Color	Pale yellow		3	3		1	3	3	
	Yellow	5	2	2	5	4	2	2	5
Transparency	Clear	4	4	5	5	2	5	4	4
	Mild turbidity	1	1			2		1	1
	Turbidity					1			
pH	5								
	6								
	6.5								1
	7					3	1	1	
	8	3	5	4	5	2	4	4	4
	9	2		1					
Protein (mg/dL)	-	3	5	4	4	2	5	4	2
	25	2		1	1	2		1	3
	75					1			
	150								
	500								
Glucose (mg/dL)	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
	50								
	100								
	300								
	1,000								
Ketone body (mg/dL)	-	1	5	5	1	2	3	3	1
	5	4			4	3	2	2	3
	15								1
	50								
	150								
Bilirubin (mg/dL)	-	5	5	5	5	5	5	5	5
	1								
	3								
	6								
Occult blood (Ery/ μ L)	-	5	5	5	5	5	5	5	4
	10								1
	25								
	50								
	150								
	250								

Sex		Male				Female			
Group /		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Dose (mg/kg/day)		0	625	1,250	2,500	0	625	1,250	2,500
No. of animals		5	5	5	5	5	5	5	5
Cast [^]	0	5	5	5	5	5	5	5	5
	1 ~ 5								
	6 ~ 10								
	>10								
Epithelial cell [^]	0	5	5	5	5	5	5	5	5
	1 ~ 5								
	6 ~ 10								
	>10								
Leukocyte [^]	0	5	5	5	5	5	5	5	5
	1 ~ 10								
	11 ~ 50								
	51 ~ 100								
	>100								
Erythrocyte [^]	0	5	5	5	5	5	5	5	5
	1 ~ 10								
	11 ~ 50								
	51 ~ 100								
	>100								
Specific gravity	1.000~1.010			1					
	1.011~1.020								
	1.021~1.030				1		1		
	1.031~1.040		2		1		1		
	1.041~1.050	1	3	2		2	1		4
	1.051~1.060	2		2	2	2	1	2	
	>1.060	2			1	1	2	1	1

[^]: Sediment

Table 27. Mean hematological parameters

Sex Female									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	7.93	15.1	41.5	52.4	19.0	36.3	903	1.94
	S.D.	0.29	0.6	1.8	1.0	0.4	0.5	50	0.41
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	8.03	15.3	42.5	52.9	19.1	36.1	940	1.73
	S.D.	0.23	0.5	1.4	1.2	0.5	0.5	78	0.26
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	8.04	15.1	41.9	52.1	18.8	36.2	959	1.79
	S.D.	0.40	0.6	1.6	1.3	0.5	0.4	124	0.51
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	7.92	15.0	41.6	52.5	18.9	36.0	907	1.86
	S.D.	0.43	0.7	2.0	1.0	0.4	0.4	40	0.44
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	5.96	14.0	81.7	2.1	1.2	0.2	16.3	13.2
	S.D.	2.23	5.9	6.1	0.8	0.6	0.1	0.7	1.7
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	4.66	17.8	77.9	1.9	1.3	0.1	17.0	14.2
	S.D.	1.02	5.3	4.7	0.5	0.5	0.0	0.4	1.2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	5.10	16.1	79.0	2.4	1.3	0.1	16.6	13.7
	S.D.	1.71	5.9	5.4	0.4	0.7	0.1	0.5	1.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	5.22	21.9	73.5	2.3	1.5	0.1	16.9	12.8
	S.D.	2.15	9.5	9.9	0.8	0.7	0.1	0.7	2.6
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Sex Male

Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	8.72	15.8	44.4	50.9	18.1	35.6	923	1.89
	S.D.	0.52	0.9	2.3	1.1	0.4	0.4	66	0.45
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	8.77	15.3	43.4	49.5	17.4 *	35.2	1005	2.28
	S.D.	0.39	0.7	1.9	1.0	0.4	0.5	103	0.41
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	8.69	15.4	43.6	50.1	17.7	35.4	952	2.01
	S.D.	0.50	0.8	2.5	1.4	0.5	0.3	73	0.43
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	8.74	15.6	43.9	50.2	17.9	35.6	884	2.08
	S.D.	0.41	0.8	2.3	1.5	0.7	0.5	107	0.43
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	8.11	22.4	73.9	1.9	1.1	0.2	18.2	15.9
	S.D.	1.60	4.6	4.6	0.4	0.3	0.1	0.8	1.7
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	8.17	23.6	72.1	2.3	1.3	0.1	18.3	15.4
	S.D.	2.84	7.8	8.1	0.6	0.6	0.0	0.9	2.2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	9.09	21.8	74.6	1.9	1.0	0.2	18.5	16.1
	S.D.	3.53	7.4	7.9	0.5	0.3	0.1	0.7	1.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	11.23 *	26.5	69.5	2.1	1.0	0.2	18.3	15.4
	S.D.	2.39	11.6	12.0	0.7	0.3	0.1	0.8	1.8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * p<0.05.

Table 28. Mean clinical chemistry

Sex Male										
Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)
G1 0	Mean	34.2	89.2	318.6	0.44	124	12.6	0.46	0.04	80
	S.D.	6.5	16.6	73.6	0.15	16	1.5	0.05	0.01	12
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	30.0	93.9	326.0	0.58	126	11.8	0.46	0.03	89
	S.D.	3.0	18.6	39.0	0.15	11	1.5	0.03	0.01	13
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	31.3	90.8	300.5	0.46	129	11.8	0.45	0.03	80
	S.D.	5.0	16.4	59.7	0.11	9	1.6	0.03	0.02	17
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	32.7	96.1	316.1	0.48	134	12.3	0.47	0.04	89
	S.D.	6.2	19.8	81.0	0.07	11	1.0	0.04	0.01	20
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		TG (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	Mean	58	6.0	2.4	0.65	6.18	10.2	141	4.4	105
	S.D.	16	0.2	0.1	0.03	0.69	0.2	1	0.2	1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	66	6.0	2.4	0.68	6.36	10.2	142	4.7 *	106
	S.D.	27	0.3	0.1	0.03	0.55	0.4	1	0.4	1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	71	6.0	2.4	0.67	6.01	10.2	141	4.6	106
	S.D.	47	0.3	0.1	0.03	0.47	0.4	1	0.3	1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	87	6.2	2.5	0.66	6.05	10.2	141	4.3	105
	S.D.	53	0.3	0.1	0.04	0.54	0.2	2	0.3	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * p<0.05.

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)
G1 0	Mean	37.9	103.7	103.9	0.41	118	14.1	0.49	0.10	110
	S.D.	14.7	30.3	17.2	0.15	8	1.9	0.04	0.04	13
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	39.8	101.2	135.6 #	0.72 ##	123	15.3	0.49	0.09	98
	S.D.	20.5	29.3	31.0	0.15	6	2.0	0.02	0.01	12
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	35.7	88.6	138.8	0.69	124	14.8	0.51	0.09	106
	S.D.	11.1	25.0	56.6	0.30	11	2.2	0.04	0.03	17
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	37.5	98.1	141.1 #	0.67	123	13.6	0.49	0.08	94
	S.D.	11.7	26.6	28.0	0.34	9	2.7	0.05	0.02	20
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		TG (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	Mean	40	7.4	3.5	0.89	4.80	10.8	142	4.4	104
	S.D.	17	0.4	0.2	0.06	0.49	0.4	1	0.5	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	32	7.0 *	3.3	0.88	4.95	10.5	141	4.5	105
	S.D.	20	0.3	0.2	0.04	0.70	0.4	1	0.2	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	49	7.2	3.4	0.91	4.51	10.6	141	4.3	105
	S.D.	24	0.3	0.2	0.06	0.51	0.3	1	0.3	1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	30	6.7 **	3.1 **	0.86	5.11	10.4	141	4.4	105
	S.D.	12	0.5	0.3	0.06	0.55	0.4	2	0.2	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * p<0.05, ** p<0.01.

Significantly different from control by Steel test: # p<0.05, ## p<0.01.

Table 29. Mean absolute organ weight

Sex Male		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Bram	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	509.6	2.11	0.0127	1.40	1.57	13.55
	S.D.	43.0	0.09	0.0026	0.18	0.16	1.54
	N	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	543.6	2.09	0.0113	1.46	1.60	14.73
	S.D.	61.1	0.12	0.0015	0.15	0.18	2.19
	N	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	535.7	2.11	0.0115	1.39	1.57	14.11
	S.D.	85.0	0.08	0.0017	0.12	0.14	2.17
	N	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	539.7	2.08	0.0122	1.49	1.63	14.85
	S.D.	56.3	0.09	0.0015	0.13	0.18	2.48
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	0.85	3.10	0.0577	3.40	0.58
	S.D.	0.09	0.37	0.0097	0.21	0.16
	N	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	0.85	2.98	0.0563	3.45	0.58
	S.D.	0.12	0.37	0.0112	0.35	0.13
	N	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	0.87	3.04	0.0571	3.47	0.53
	S.D.	0.16	0.30	0.0092	0.24	0.18
	N	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	0.93	3.08	0.0561	3.34	0.53
	S.D.	0.12	0.40	0.0094	0.13	0.13
	N	10	10	10	10	10

Sex: Female

(g)

Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	293.5	1.93	0.0195	0.98	1.23	8.23
	S.D.	15.8	0.07	0.0019	0.10	0.07	0.77
	N	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	291.6	1.91	0.0188	0.96	1.24	7.52
	S.D.	26.3	0.08	0.0020	0.08	0.09	0.68
	N	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	303.3	1.96	0.0186	0.99	1.20	8.12
	S.D.	23.0	0.07	0.0033	0.11	0.11	0.76
	N	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	300.6	1.93	0.0189	0.99	1.20	8.24
	S.D.	32.2	0.07	0.0037	0.16	0.10	1.44
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	0.53	1.94	0.0714	0.0707	0.70
	S.D.	0.06	0.16	0.0109	0.0145	0.30
	N	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	0.51	1.82	0.0661	0.0713	0.57
	S.D.	0.08	0.16	0.0106	0.0160	0.10
	N	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	0.53	1.90	0.0661	0.0688	0.62
	S.D.	0.07	0.20	0.0094	0.0124	0.13
	N	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	0.54	1.98	0.0794	0.0708	0.53
	S.D.	0.10	0.19	0.0105	0.0146	0.09
	N	10	10	10	10	10

Table 30. Mean relative organ weights

Sex: Male		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	509.6	0.42	0.0025	0.27	0.31	2.66
	S.D.	43.0	0.03	0.0005	0.02	0.02	0.12
	N	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	543.6	0.39	0.0021	0.27	0.30	2.70
	S.D.	61.1	0.04	0.0002	0.02	0.02	0.21
	N	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	535.7	0.40	0.0022	0.26	0.30	2.64
	S.D.	85.0	0.05	0.0004	0.03	0.04	0.12
	N	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	539.7	0.39	0.0023	0.28	0.30	2.74
	S.D.	56.3	0.04	0.0003	0.01	0.03	0.23
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	0.17	0.61	0.0113	0.67	0.11
	S.D.	0.01	0.05	0.0015	0.06	0.03
	N	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	0.16	0.55	0.0104	0.64	0.11
	S.D.	0.01	0.05	0.0018	0.11	0.02
	N	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	0.16	0.57	0.0108	0.66	0.10
	S.D.	0.01	0.06	0.0019	0.08	0.04
	N	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	0.17	0.57	0.0105	0.63	0.10
	S.D.	0.02	0.05	0.0024	0.07	0.03
	N	10	10	10	10	10

Sex: Female

(g/100 g body weight)

Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	293.5	0.66	0.0067	0.33	0.42	2.80
	S.D.	15.8	0.04	0.0006	0.03	0.03	0.23
	N	10	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	291.6	0.66	0.0065	0.33	0.43	2.58
	S.D.	26.3	0.06	0.0007	0.02	0.03	0.17
	N	10	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	303.3	0.65	0.0061	0.33	0.40	2.68
	S.D.	23.0	0.05	0.0011	0.03	0.04	0.20
	N	10	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	300.6	0.65	0.0063	0.33	0.40	2.74
	S.D.	32.2	0.09	0.0010	0.04	0.04	0.32
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	0.18	0.66	0.0243	0.0241	0.24
	S.D.	0.02	0.04	0.0035	0.0048	0.10
	N	10	10	10	10	10
G2 625	Mean	0.18	0.63	0.0227	0.0244	0.20
	S.D.	0.03	0.05	0.0035	0.0045	0.04
	N	10	10	10	10	10
G3 1,250	Mean	0.18	0.63	0.0218	0.0229	0.20
	S.D.	0.03	0.05	0.0025	0.0051	0.05
	N	10	10	10	10	10
G4 2,500	Mean	0.18	0.66	0.0267	0.0235	0.18
	S.D.	0.03	0.06	0.0048	0.0043	0.03
	N	10	10	10	10	10

Table 31. Summary of necropsy findings

Organ / Findings	Sex	Male				Female			
	Group /	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
	Dose (mg/kg/day)	0	625	1,250	2,500	0	625	1,250	2,500
	No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10
	Unremarkable findings	10	9	10	0	10	9	10	10
	No. of examined	10	10	10	10	10	10	10	10
Stomach	-Focus, black, glandular stomach	0	1	0	0	0	0	0	0
	-Nodule, white, forestomach	0	0	0	0	0	0	0	1
Vagina	-Nodule, yellow					0	1	0	0

External surface and other organs in body cavity were unremarkable.

Table 32. Summary of histopathological findings

Organ / Findings	Sex	Male			Female			
		Group /	G1	G2	G4	G1	G2	G4
		Dose (mg/kg/day)	0	625	2,500	0	625	2,500
No. of animals		10	1	10	10	1	10	
Adrenal	-Vacuolation, zona fasciculata	±	1	4	0	0	0	
	No. of examined		10	10	10	10	10	
Harderian gland	-Cell infiltration, focal	±	0	1	1	1	1	
		+	0	0	0	0	1	
	No. of examined		10	10	10	10	10	
Heart	-Cell infiltration, focal, myocardium	±	1	0	0	0	0	
	No. of examined		10	10	10	10	10	
Kidney	-Basophilic tubules, cortical	±	0	1	0	0	0	
	-Cast, hyaline, focal	±	0	0	2	0	0	
	-Cell infiltration, cortical, focal	±	0	2	0	0	0	
	-Cyst, outer medulla	<+>	1	0	0	0	0	
	-Hyperplasia, tubule, atypical, focal	±	0	1	0	0	0	
	-Mineralization, tubular, outer medulla	±	0	0	1	0	0	
	No. of examined		10	10	10	10	10	
Liver	-Microgranuloma	±	0	2	0	0	1	
	-Periportal vacuolation	±	0	2	0	0	0	
	No. of examined		10	10	10	10	10	
Lung including bronchi	-Cell infiltration, eosinophils and monocytes, mainly in perivascular zone	+	0	0	0	0	1	
	-Mineralization, arterial wall, focal	±	0	1	0	0	0	
	No. of examined		10	10	10	10	10	
Ovary	-Atrophy, luteal	+			1	0	0	
		++			1	0	0	
	-Cyst, luteal	<+>			3	2	2	
	No. of examined				10	10	10	
Pancreas	-Atrophy, acinar, focal	±	2	0	0	0	1	
	-Cell infiltration, focal	±	0	1	1	1	0	
	No. of examined		10	10	10	10	10	
Pituitary	-Cyst, pars distalis	<+>	1	0	0	0	0	
	No. of examined		10	10	10	10	10	
Prostate	-Cell infiltration, interstitial	±	1	3				
		+	1	0				
	No. of examined		10	10				

Grade- ±: minimal, +: mild, ++: moderate

<+>: Presence in "presence or not" basis.

Organ / Findings	Sex Group / Dose (mg/kg/day) No. of animals	Male			Female		
		G1	G2	G4	G1	G2	G4
		0	625	2,500	0	625	2,500
		10	1	10	10	1	10
Salivary gland, parotid	-Atrophy, acinar, focal	±	0	1	0	0	0
		+	0	0	0	0	1
	-Basophilic hypertrophic foci	±	2	3	2	2	0
	-Cell infiltration, focal	±	2	0	1	1	0
	No. of examined		10	10	10	10	10
Skin: inguinal	-Cell infiltration, subcutis, focal	±	0	0	0	0	1
	No. of examined		10	10	10	10	10
Spleen	-Deposit, pigment	±	4	6	8	8	6
		+	4	4	2	2	2
	-Extramedullary hematopoiesis	±	3	2	3	3	3
	No. of examined		10	10	10	10	10
Stomach	-Erosion, focal	+	0	1	0	0	0
	-Squamous cyst, submucosa	<+>	0	0	0	0	1
	No. of examined		10	1	10	10	10
Thymus	-Atrophy	+	0	0	0	0	1
	-Cyst, thymic	<+>	0	0	0	0	1
	No. of examined		10	10	10	10	10
Thyroid	-Cell infiltration, focal	±	0	0	1	1	0
	-Ectopic thymus	<+>	0	1	0	0	0
	-Ultimobranchial cyst	<+>	3	2	3	3	5
	No. of examined		10	10	10	10	10
Trachea	-Dilatation, submucosal glands	±	2	0	0	0	2
	No. of examined		10	10	10	10	10
Urinary bladder	-Cell infiltration, submucosa, focal	±	0	0	0	0	1
	No. of examined		10	10	10	10	10
Vagina	-Squamous cyst	<+>			0	1	0
	No. of examined				10	1	10

There were unremarkable changes in the brain, cecum, colon, duodenum, epididymis (male), esophagus, eye including optic nerve, femur including bone marrow, ileum, jejunum, mammary gland: inguinal, mesenteric lymph node, parathyroid, rectum, salivary gland(sublingual, submandibular), seminal vesicle (male), spinal cord : thoracic, sternum including bone marrow, submandibular lymph node, testis (male), tongue and uterus (female) of Groups 1 and 4.

Grade- ±: minimal, +: mild

<+>: Presence in "presence or not" basis.

6. 홍국균 발효 검정콩의 식이유도비만모델에서의 효능평가

가. 시험목적

식이유도된 비만 C57BL/6J 마우스를 이용하여 시험물질인 홍국균 발효 검정콩을 12주간 반복 경구투여하여 비만개선에 대한 효능을 평가하였다. 본 시험은 동물보호법 (제정 1991년5월 31일 법률제4379호, 전부개정 2011년 8월4일 법률 제10995호)에 근거한 (주)휴벳의 동물실험윤리 위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: WKU12-25). 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

나. 시험물질

시험물질은 이미 및 이취가 없고 고유의 향미를 가진 적갈색의 분말의 홍국균발효검정콩 (Lot No. MJLH2012005)을 사용하였으며, 지표성분은 monacolin K(총monacolin K 함량 1.27 mg/g)로 설정하였다. 시험물질은 냉장 (3.5 ~ 5.2°C)보관하였다.

다. 시험물질의 조제

Vehicle로서 D.W.를 사용하였으며, 각각 0.5g/kg, 1g/kg, 2g/kg의 농도로 하루 투여량의 시료를 분주하고 투여 직전에 vortex하여 매일 정해진 시간에 강제경구투여 하였다. 체중은 주 1회 측정하였다. 의뢰기관과의 협의 하에 제공된 시료에 대한 안전성 균일성 등에 대한 검사는 따로 실시하지 않았다.

라. 사용동물 및 환경조건

시험동물은 수컷 C57BL/6J 마우스를 중앙실험동물 (서울, 한국)에서 구입하여 사용하였으며, C57BL/6J mice는 효능평가 및 독성시험에 적당한 동물로서 항비만 효능평가에 널리 사용되고 있다. 본 계통의 마우스는 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어서 시험결과의 해석 및 평가시에 이러한 자료를 이용하는 것이 가능하여 선택하였다. 입수시 주령 및 체중은 5주령, 18-23g이었으며, 순화후 비만유도기간 (6주) 후 12주령부터 시험물질을 투약하였다. 동물입수시 모든 동물의 일반 건강상태에 대한 수의학적 검역을 실시하였다 시험을 실시하는데 적합하도록 약 1주일간의 순화기간을 거쳤다. 비만유도기간을 거친 후 정산군과 비만유도군과의 체중이 20%이상 차이를 보여, 각각 체중을 측정하고 Z배열법에 따라 군간 체중을 고르게 분리하였다. ear punch를 이용하여 개체식별 표시를 하였다.

사육상자는 스테인레스 폴리실폰사육상자를 사용하였으며, 사육상자당 수용동물 수는 2~3마리로 하였다. 온도는 20.0 ~ 24.0°C, 상대습도는 45 ~ 55%, 환기횟수는 10/시간, 명암주기 (조명시간)는 12시간/일 (오전 7시부터 오후 7시) 조도는 150 ~ 300 Lux로 조절하였다. 일반식이 사료는 실험동물 공급업체(샘타코주), 경기도 오산시 서량동 77-1)에서 고지방식이 사료는 60%

calorie fat diet (중앙실험동물 한국)를 공급받은 사료를 공급하였으며, 필터링 되어진 음용수를 매일 갈아주며 자유롭게 섭취하도록 하였다. 음수는 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취 시켰다.

마. 시험군의 구성 및 투여

비만유도를 위해 5주령 C57BL/6J mice 수컷을 구입후 1주일간 순화과정을 거친 후 실험에 사용하였다. 비만유도는 60% calorie fat diet (중앙실험동물, 한국)를 급여하여 비만을 유도하였으며, 정상군과 비만유도군의 몸무게 차이가 20%이상 차이가 있는 개체를 선발하여 시험에 사용하였다.

투여경로는 경구투여로 실시하였으며, 시험물질의 임상예정경로가 경구투여이므로, 경구를 투여경로로 선택하였다. 개체별 투여액량은 절식 후 (투여당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (5 mL)를 이용하여 위내에 단회 강제투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 최종 투여 후 약 4시간에 사료를 급여하였다.

시험군	투여용량 (g/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여물질
대조군 (Control)	0	20	증류수
실험군 I	0.5	20	홍국발효검정콩분말
실험군 II	1	20	홍국발효검정콩분말
실험군 III	2	20	홍국발효검정콩분말

바. 일반증상관찰 및 검사

각 성분별로 조합된 사료를 자율급식 하였으며 주 1회 일정량의 사료, 음수를 급여 후 익일 잔량을 측정하여 케이지당 5두씩 분리 사육 하였으며 주간 사료, 음수 섭취량을 측정하였다. 투여종료 후에는 모든 생존동물에 대해서 CO2가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사 시키고 부검하였다. 부검시에는 주요 지방조직 및 주요 장기의 무게를 측정하였으며, 비만관련 혈액생화학적 표지자에 대한 검사를 실시하였다.

사. 통계학적 분석

실험결과의 그룹간 유의성 검정은 One-way ANOVA((SPSS V12. USA)Duncan 사후검정) 비교를 실시하여 $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판정하였다.

아. 시험결과

홍국균발효검정콩 분말의 경구투여에 의한 12주간 사료 섭취량은 대조군에 비하여 발효콩 중농도군에서 가장 적은 량의 사료섭취 경향이 관찰되었으며, 음수섭취량의 변화는 관찰되지 않았다. 실험동물의 주간별 체중은 3주차부터 12주까지 발효콩 중농도군의 체중이 통계학적으로 유의하게 감소하였으며, 7주와 11주에 저농도군에서도 체중 감소효과가 관찰되었다.

12주간 발효콩 투여 후 혈당의 변화는 대조군에 비하여 중농도에서 혈당강하효과가 나타났으며, 저농도 및 고농도에서 감소하는 경향이 나타났다. 12주간 발효콩 투여 후 간, 신장, 고환 및 부고환의 중량 변화는 없었다. 12주간 발효콩 투여 후 지방 조직의 중량은 부고환 주변 지방의 무게는 대조군에 비하여 발효콩 중농도에서 가장 적은 지방 중량이 관찰되었으며, 발효콩 저농도에서는 감소 경향이 관찰되었으나, 후복막 주변 지방은 대조군과 실험군간의 차이는 관찰되지 않았다. 신장 주변 지방의 중량은 대조군에 비하여 발효콩 중농도에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. Total cholesterol의 혈중 함량은 대조군에 비하여 발효콩 중농도에서 통계학적 유의하게 감소하였으며, 발효콩 저농도와 고농도에서는 감소하는 경향이 관찰되었으나, 혈중 TG, LDL, HDL의 함량 변화는 없었다. 발효콩을 12주간 강제 경구 투여 후 지방 세포의 크기를 관찰하였다. 지방세포의 크기는 대조군이 정상군에 비하여 유의하게 증가하였으며, 발효콩 중농도 투여군에서 대조군에 비하여 통계학적 유의하게 감소되었으나, 저농도와 고농도의 지방 크기는 변화가 없었다. 발효콩을 12주간 강제 경구 투여 후 간의 지방 침착을 관찰하였다. 지방침착은 대조군이 정상군에 비하여 유의하게 증가하였으며, 발효콩 중농도 투여군에서 가장 적은 지방 침착이 관찰되었으며, 고농도, 저농도 순으로 지방 침착의 정도가 높았다.

본 연구결과에서는 사료 섭취량, 체중지방조직의 중량, 렙틴 함량, 지방세포의 크기 및 간 조직의 지방 침착의 결과에서 12주간 발효콩 중농도 투여군에서 효과가 가장 좋았으며, 실험동물 kg당 1 g/의 농도로 발효콩을 투여 시 비만 개선에 도움을 줄 것으로 생각된다.

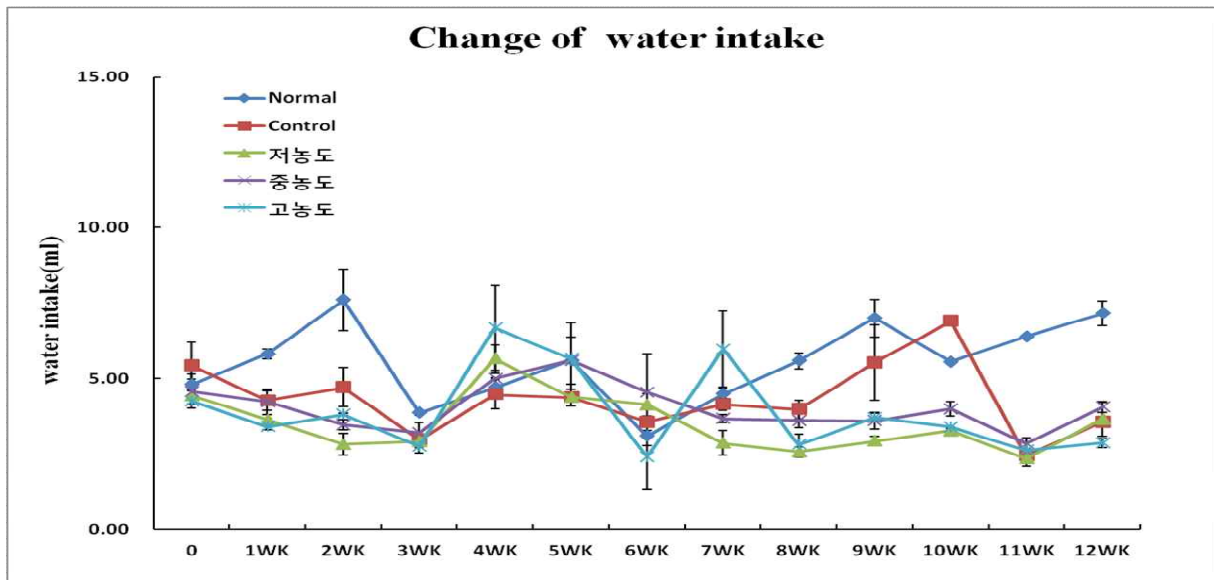


Fig 1. Effects of black bean fermented by *M. pilosus* on change of feed and water intakes in obesity model mouse induced by high fat diet. Data was means \pm SE (n = 8).

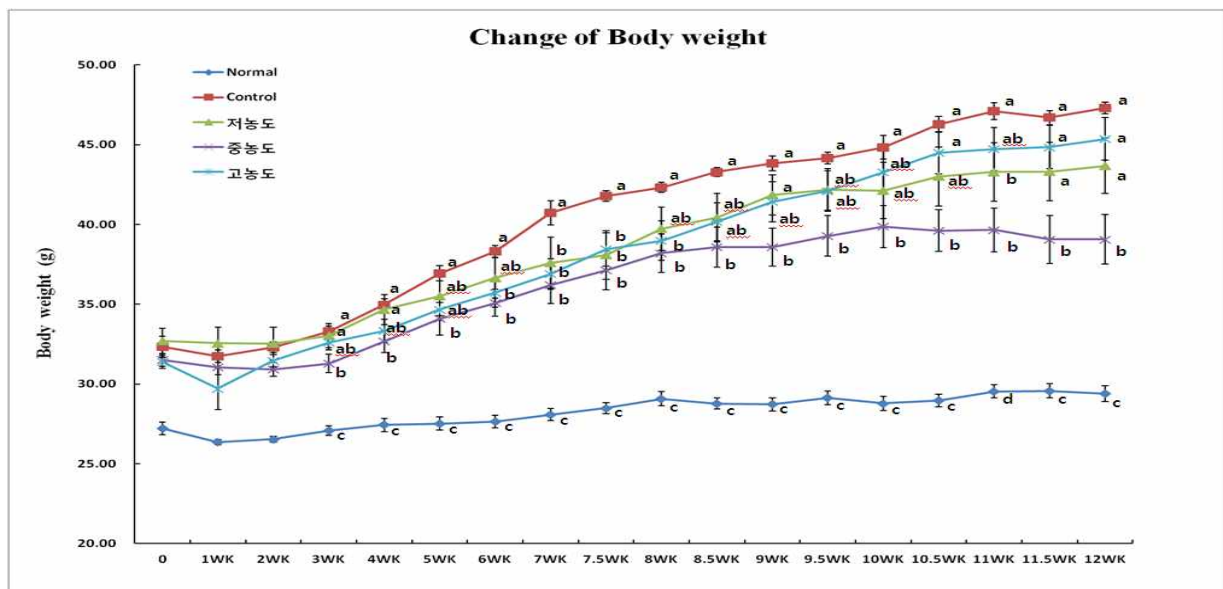


Fig. 2. Effects of black bean fermented by *M. pilosus* on change of body weight in obesity model mouse induced by high fat diet. Results with different letters from the control are significantly different ($p < 0.05$). Data was means \pm SE (n = 8).

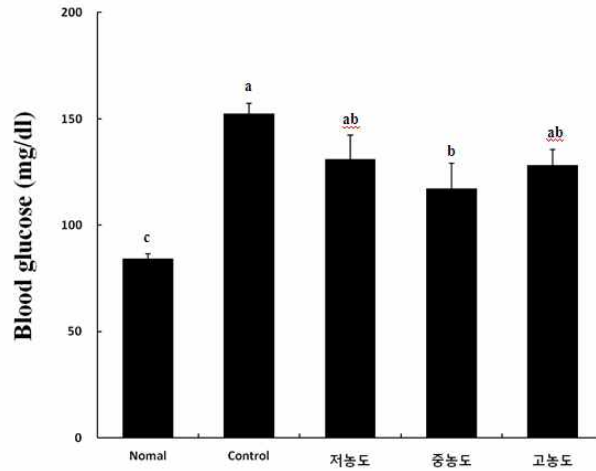


Fig 3. Effects of black bean fermented by *M. pilosus* on change of blood glucose in obesity model induced by high fat diet. Results with different letters from the control are significantly different ($p < 0.05$). Data was means \pm SE (n = 8).

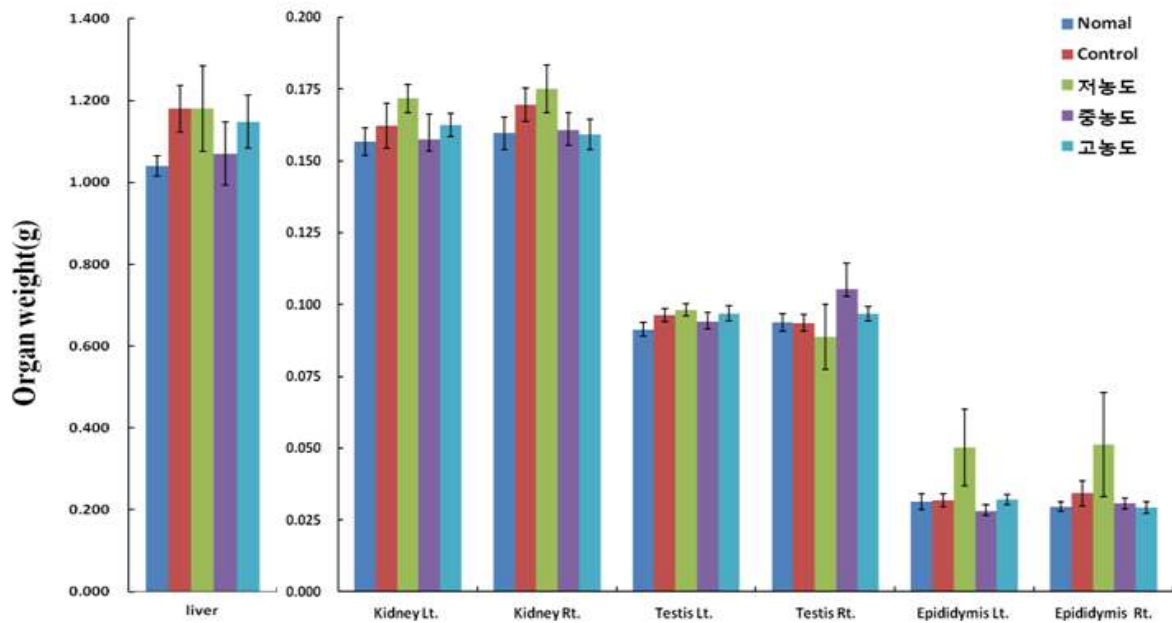


Fig.4. Effects of black bean fermented by *M. pilosus* on change of organ weight in obesity model mouse induced by high fat diet. Results with different letters from the control are significantly different ($p < 0.05$). Data was means \pm SE (n = 8).

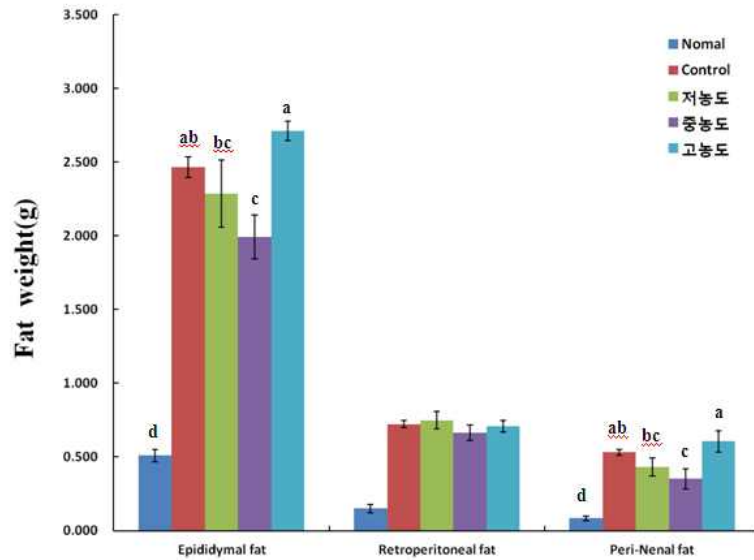


Fig. 5. Effects of black bean fermented by *M. pilosus* on change of fat absolute weight in obesity model mouse induced by high fat diet. EPI Lt: epididymal fat left, EPI Rt: epididymal fat right, RP Lt: retroperitoneal fat left, RP Rt: retroperitoneal fat right, RN Lt: peri-nenal fat left, RN Rt: peri-nenal fat right. Results with different letters from the control are significantly different ($p < 0.05$). Data was means \pm SE ($n = 8$).

Table 33. Effects of black bean fermented by *M. pilosus* on change of serum TG, LDL and HDL content in obesity model mouse induced by high fat diet

	Total cholesterol (mg/dL)	TG (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)
Normal	107.13 \pm 2.94 ^c	115.75 \pm 3.01	8.63 \pm 0.63	96.00 \pm 2.75
Control	204.50 \pm 3.14 ^a	92.25 \pm 2.99	38.00 \pm 1.07	187.75 \pm 2.96
저농도	197.63 \pm 11.00 ^{ab}	111.88 \pm 7.05	34.13 \pm 4.40	194.13 \pm 7.55
중농도	178.75 \pm 13.14 ^b	103.38 \pm 8.10	34.13 \pm 3.82	178.63 \pm 9.90
고농도	197.25 \pm 4.51 ^{ab}	107.88 \pm 6.52	36.38 \pm 2.58	183.75 \pm 4.91

- Results with different letters from the control are significantly different ($p < 0.05$). Data was means \pm SE ($n = 8$).

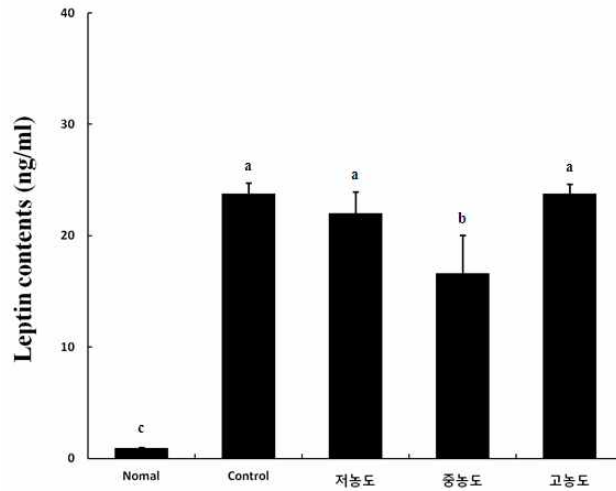


Fig. 6. Effects of black bean fermented by *M. pilosus* on change of leptin content in obesity model induced by high fat diet. Results with different letters from the control are significantly different ($p < 0.05$). Data was means \pm SE (n = 8).

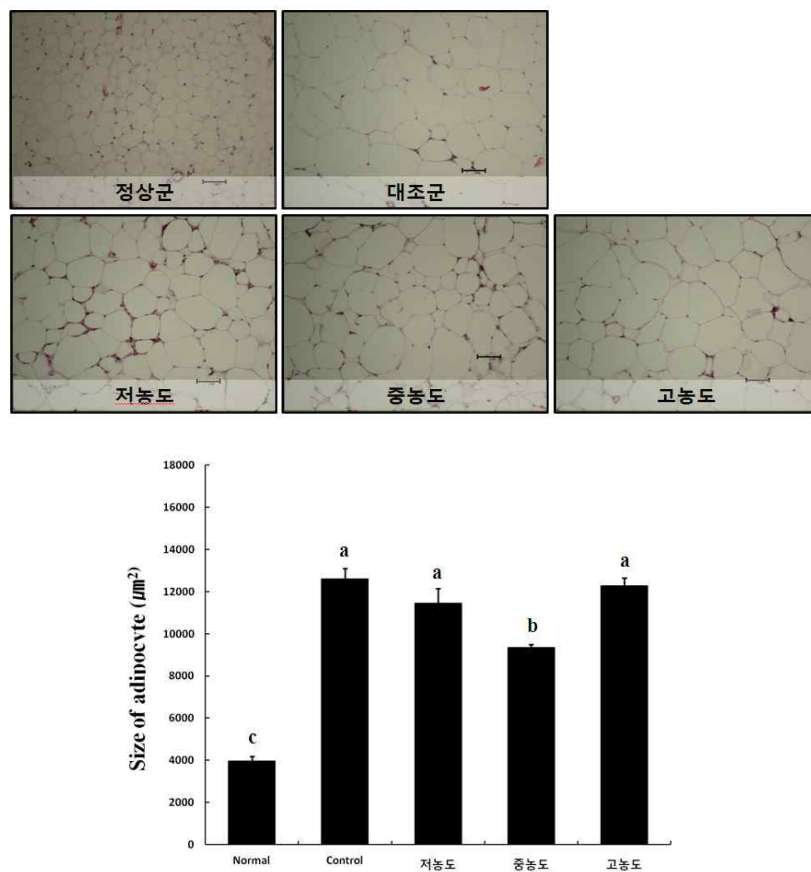


Fig. 7. Effects of black bean fermented by *M. pilosus* on histological adipocyte size in obesity model mouse induced by high fat diet. quantitative analysis (X 100 magnification). Data was means \pm SE (n = 8). Bars with different letters from the control are significantly different ($p < 0.05$). Data was means \pm SE (n = 8).

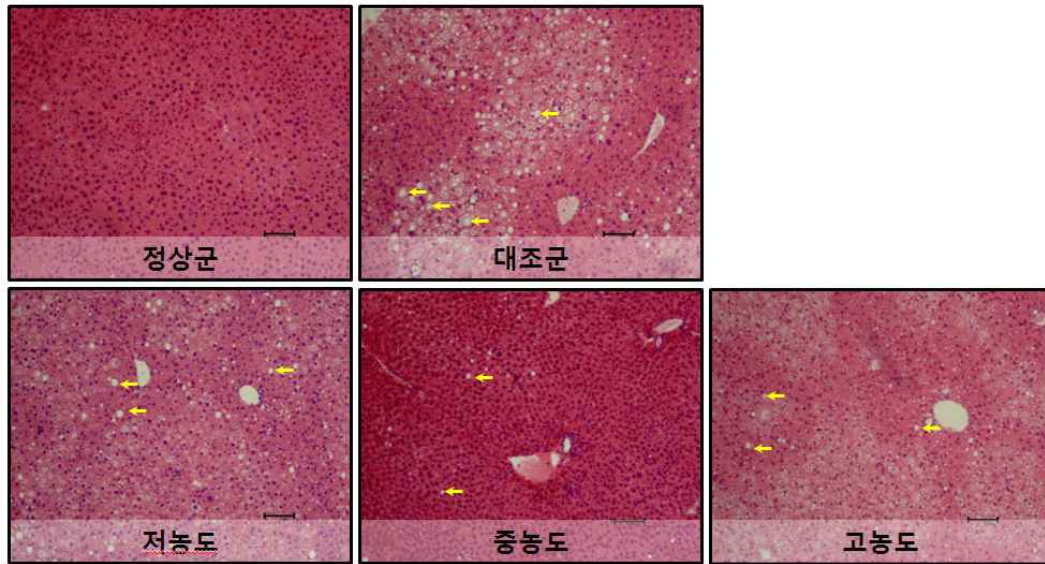


Fig. 8. Effects of of black bean fermented by *M. pilosus* on histological steatosis in obesity model mouse induced by high fat diet. Quantitative analysis (x 100 magnification). Data was means \pm SE (n = 8).

제4절. *Monascus*속 균을 이용한 간기능 개선 및 체중조절 효과를 가진 발효검정콩의 인체적용시험

1. 피험자의 선정기준, 제외기준, 목표 대상자 수

가. 피험자 선정기준

- (1) 만 20세 이상 65세 이하인 성인 남녀
- (2) 체질량지수 (BMI)가 25.0~29.9 kg/m² 인 남녀
- (3) 혈중 콜레스테롤 수치가 240mg/dl 이상인 남녀
- (4) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 들은 후 동의서에 서명한 환자

나. 피험자 제외기준

- (1) 혈압이 SBP 160 mmHg 이상 또는 DBP100 mmHg 이상이거나 고혈압 치료제 중 베타차단제나 이노제를 복용하고 있는 고혈압 환자
- (2) 공복 혈당이 126 mg/dL 이상이거나 무작위 혈당이 200 mg/dL 이상인 경우, 또는 경구 혈당강하제 또는 인슐린을 복용하고 있는 당뇨병 환자
- (3) 고지혈증 약물을 복용중인 고지혈증 환자
- (4) 내분비질환이 있거나 스크리닝 검사에서 TSH(Thyroid-Stimulating Hormone)가 정상범위 0.1 uU/ml 이하이거나, 10.0 uU/ml 이상인 갑상선 기능 장애환자
- (5) 혈청 내 간수치(ALT, AST)가 정상의 상한선보다 3배 이상인 경우
- (6) 혈청 creatinine 수치가 정상의 상한선보다 2배 이상인 경우
- (7) 비만치료제(흡수저해제 및 식욕억제제) 및 항우울제, 피임약, 스테로이드제제, 여성호르몬제 등의 체중에 영향을 줄 수 있는 약제를 복용한 경우
- (8) 스크리닝 이전 6개월 이내에 심질환(심부전, 협심증, 심근경색, 관상동맥 우회로술, 혈관확장술)이 있는 환자
- (9) 최근 5년 이내 악성 종양 진단 및 치료를 받은 적이 있는 환자
- (10) 우울증, 식사장애, 정신분열증, 알코올중독증, 약물중독 등의 신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 질환을 앓고 있는 환자
- (11) 시험기간 중 효과적인 피임방법을 사용할 것을 동의하지 않은 가임기 여성(단, 경구용 피임제의 복용은 불가)

- (12) 임부 또는 수유부
- (13) 최근 3개월 이내에 다른 임상시험에 참여한 경험이 있는 환자
- (14) 최근 3개월 동안 체중변화가 3kg 이상 있었던 경우
- (15) 심한 근골격계 질환으로 운동을 할 수 없을 것으로 판단되는 경우
- (16) 임상시험 담당자의 소견으로 볼 때, 임상시험 참여에 부적합하다고 판단한 자

다. 피험자 수 및 산출근거

피험자 선정, 제외 기준에 적합한 30명 이상을 확보하여 섭취하도록 한다.

유효한 피험자 수의 산정근거는 홍국균은 이미 콜레스테롤 개선으로 개별인정을 받은 기능성 식품으로 국내외에서 시판 중에 있으나, 체중감량과 관련해서 선행된 연구가 없었고, 본 연구가 pilot study인 점을 고려하고 과거 진행했던 다른 pilot study를 참고하여 피험자 수를 산정하였다.

구분	대조군	시험군 1	시험군 2
성분	placebo	<i>Monascus</i> 속 발효산물 (홍국균 발효 검정콩)2.5g	<i>Monascus</i> 속 발효산물 (홍국균 발효 검정콩) 5g
대상자수	10	10	10

2. 임상시험의 방법(설계, 투여량, 투여방법, 투여기간 및 병용요법 등)

가. 임상시험의 설계

본 인체적용시험은 이중맹검, 무작위배정, 위약대조 비교 인체적용시험으로 설계되었다. 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 대상자가 본 인체적용시험에 참가하면서 신체계측, 체질량지수, 활력징후, 임상병리검사, 임신반응검사(가임이 여성만 해당), 심전도 검사 등의 방문평가를 실시한다. 대상자 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 대상자에 한하여 본 인체적용시험에 등록되며 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위로 배정된다. 배정된 대상자는 12주간 시험식품 또는 대조식품을 투여하게 된다.

나. 시험식품의 섭취방법

(1) 제형 : 캡셀

(2) 원료 및 제품의 라벨

- 원료와 동일한 형태의 위약의 사용 및 코드 라벨을 통한 맹검 유지. 인체시험용 건강 기능식품의 라벨 기재는 약사법 시행규칙 제 71조 제 5항을 준수한다.
- 시험 종료 시까지 이중맹검을 유지(맹검을 해지할만한 사유발생시 예외)한다.

(3) 원료 및 제품의 저장

원료 및 제품의 유통기한은 약 2년으로 비교적 저장성이 보장된다. 또한, 햇빛에 직접적으로 노출되거나 열을 가하는 위치의 보관 및 저장은 피하도록 한다.

(4) 섭취량 및 섭취방법

1일 2회, 1회 6캡셀씩 아침 식사 및 저녁 식사 후 30분에 물과 함께 섭취하도록 한다.

(5) 섭취기간

피험자는 대조군과 시험군으로 나뉘어 총 12주간 대조식품 또는 시험식품을 섭취한다.

(6) 무작위배정

본 임상시험은 시험군 및 대조군을 무작위 배정하여 병행시험으로 진행되며, 각 필요한 피험자 수는 각 군당 10명씩 총 30명이다. 연구에 참여한 피험자는 부여받은 무작위 배정번호에 따라 미리 생성된 무작위 배정표대로 각 시험식품 또는 대조식품을 배정받는다.

- 피험자는 복용 전 방문에서 임상시험 피험자번호(Screening Number)를 부여 받게 되며 번호는 일련 순서(예:XX01번부터 XX99번)에 의해 결정된다.
- 무작위배정번호는 선정, 제외기준에 적합한 경우 부여되고 임상시험 제품이 처방된다. 새로운 피험자는 반드시 새로운 피험자 번호를 할당 받아야 하며, 각 군으로의 배정에 대해서는 이중맹검법이 적용된다.

다. 병용요법

다음 약물의 사용은 안전성, 내약성 또는 유효성의 평가를 방해할 수 있다. 따라서 이러한 약물은 임상시험 종료 시까지 금지되며, 다음 약물을 투여하는 피험자는 임상시험에서 제외되어야 한다.

- (1) 베타차단제, 이노제
- (2) 경구 혈당강하제, 인슐린
- (3) 흡수저해제 및 식욕억제제 등의 비만치료제
- (4) 항우울제, 피임약, 스테로이드제제, 여성호르몬제 등의 체중에 영향을 줄 수 있는 약제
- (5) 비만개선 관련 건강기능식품 및 보충제
- (6) 고지혈증 약물 및 혈중 콜레스테롤 관련 건강기능식품

3. 관찰항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법

가. 임상시험 진행 일정표

Period	Screening ¹⁾	Active Treatment		
Visit	1	2	3	4
Week	-2	0	6	12
Window period ²⁾			± 7	± 5
서면동의서	✓			
인구학적 조사	✓			
병력/약물력 조사	✓			
혈압/맥박 측정	✓	✓	✓	✓
이학적 검사	✓	✓	✓	✓
임상병리검사 ³⁾	✓		✓	✓
임신반응검사 ⁴⁾	✓		✓	✓
심전도검사	✓			✓
식이 및 신체활동 교육	✓	✓	✓	✓
식사일지 조사		✓	✓	✓
신장	✓			
체중	✓	✓	✓	✓
허리/엉덩이둘레		✓	✓	✓
DEXA		✓		✓
선정/제외기준 확인	✓	✓		
무작위배정		✓		
시험식품 및 대조식품 처방		✓	✓	
병용약물 확인		✓	✓	✓
이상반응 확인			✓	✓
순응도 확인			✓	✓

1) 방문1의 방문일로부터 2주 이내가 방문2가 시행될 수 있도록 한다. 단, 임상병리 검사 및 임신반응 검사 결과를 당일 확인할 수 있는 경우, 방문1에 방문2의 검사를 실시 할 수도 있다.

2) 방문3의 방문일은 지정된 날짜 전후 7일 허용하며, 방문4의 방문일은 지정된 날짜 전후 5일을 허용한다.

3) 피험자는 채혈하기 전날 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다. 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대해 임상병리검사 등을 재검할 수 있다.

- 혈액학적 검사: RBC, Hb, Hct, Platelet, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, MCV
- 혈액화학적 검사: AST(GOT), ALT(GPT), Protein, Albumin, Glucose, Total bilirubin, ALP, Na, K, Cl, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, Calcium, CK, Creatinine, BUN, Uric acid, γ -GTP, 단, TSH는 스크리닝에만 시행
- 소변검사: Protein, Glucose, Ketone, Erythrocyte

4) 가임기 여성에 한하여 Urine HCG 검사를 실시한다.

나. 관찰항목

(1) 대상자 동의 및 인구학적 조사

임상시험 들어가기 전, 본 임상시험 목적과 내용에 대하여 피험자에게 상세히 설명하고, 서면으로 동의를 받고, 서면 동의를 받는 순서에 따라 스크리닝 번호를 부여한 뒤 인구학적 정보를 조사한다.

(2) 병력 및 약물 투여력 조사

문진과 과거진료 기록 점검 및 면담 등을 통하여 피험자의 병력 및 약물 투여력을 조사한다.

(3) 이학적 검사

매 방문시 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 대사/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관에 대한 피험자의 임상적 상태를 근거로 이학적 검사를 실시한다.

(4) 혈압, 맥박측정

혈압, 맥박은 피험자에게 10분 이상 안정 상태를 유지시킨 후 실시하며 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 동일한 시간대에 동일한 임상시험 담당자가 측정할 수 있도록 최선을 다한다.

(5) 임상병리 검사 및 임신반응 검사

임상병리 검사 및 임신반응 검사는 방문1, 방문3, 방문4에 이루어지며 검사항목은 아래와 같다.

- 혈액학적 검사: RBC, Hb, Hct, Platelet, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, MCV
- 혈액화학적 검사: AST(GOT), ALT(GPT), Protein, Albumin, Glucose, Total bilirubin, ALP, Na, K, Cl, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, Calcium, CK, Creatinine, BUN, Uric acid, γ -GTP, 단, TSH는 스크리닝에만 시행
- 소변검사: Proten, Glucose, Keton, Erythrocyte
- 가임기 여성에 한하여 Urine HCG 검사를 실시한다.

(6) 심전도 검사

심전도검사는 스크리닝 방문인 방문1과 종료방문인 방문4에 이루어진다. 단 방문1에서 심전도

검사가 미 실시 되거나 연구자 판단에 의해 재검이 필요한 경우 방문2에 심전도 검사를 실시할 수 있다.

(7) 신장, 체중 측정

신장은 방문1에만 측정하고 체중은 방문 시 측정하며 측정값은 신장은 0.1cm 단위까지 반올림하여 기록하고, 체중은 가벼운 옷차림 상태에서 공복상태를 기준으로 0.1kg 단위까지 반올림하여 기록한다.

(8) 허리/엉덩이둘레

허리/엉덩이둘레는 방문2, 방문3, 방문4에 측정하며 대상자를 평평한 바닥에 세운 채 측정하며 측정값은 0.1cm에 가장 근사치로 기록한다.

- 허리둘레: 직립자세로 몸의 측면에서 늑골의 최하위와 골반 장골능 상단 사이의 중간부위를 측정해야 하며, 측정 시에는 줄자의 압력이 일정하게 가해야 한다.
- 엉덩이둘레: 엉덩이에서 가장 돌출된 부위를 지나 둘레를 측정한다.

(9) 식이 및 신체활동 교육

시험기간 동안 대상자에게 식이 및 신체활동에 대한 교육을 실시한다. 시험 기간동안 에너지 섭취량을 평소보다 500kcal/day 감량하여 섭취할 것과 신체활동은 시험기간 동안 평소의 신체활동량을 유지할 것을 권장한다.

(10) 식사일지 교육

방문1, 방문2, 방문3에 대상자에게 식사일지를 배부한다. 다음 방문일 전 최근 일주일 중 3일 동안(가능한 주말 1일 포함) 평소의 식사와 유사한 날의 음식물 섭취 및 신체활동량을 일지에 기록하여 방문할 수 있도록 한다.

(11) DEXA(Dual Energy X-ray Absorptiometry)

방문2, 방문4에 DEXA를 이용하여 체지방률, 체지방량, 제지방량을 측정한다. DEXA는 두 종류의 X선을 사용하여 뼈와 근육 그리고 지방 등의 연부조직을 나누어 측정하는 방법으로 최근 미국을 비롯한 유럽 등지에서 크게 대두되고 관심을 받고 있는 체성분 측정방법이다.

(12) 선정기준/제외기준 (대상자 적합성 평가)

병력 및 기초 조사 자료에 근거하여 선정기준에 적합한 대상자를 선별하여 동의서를 받은 후 스크리닝 검사를 실시한다. 스크리닝 검사 평가들을 종합하여 방문2(인체적용시험용 식품 섭취 전)에 선정기준/제외기준에 적합한 대상자 선정이 이루어졌는지 최종 평가 한다.

(13) 무작위 배정 및 섭취

방문2에서 선정기준 및 제외기준에 적합하다고 평가가 이루어진 대상자를 대상으로 시험군 또는 대조군으로 무작위배정하고, 무작위배정번호에 따라 섭취한다. 무작위배정은 선정기준/ 제외기준 최종평가가 이루어지는 방문2에 이루어진다.

(14) 이상반응/순응도 평가

인체적용시험을 진행하는 동안 연구 대상자들에게 나타나는 이상반응을 매 방문 시 확인하고, 복용량을 확인하여 순응도를 계산한다.

다. 대상자의 방문별 진행사항

(1) 대상자 참여 : 1차 방문 (screening visit, week -2)

본 임상시험에 참가하도록 선택된 피험자는 임상시험에 대한 서명을 듣고 다음 순서에 따라 평가를 받는다.

- 피험자를 시험에 참여시키기 전에 시험 과정을 설명하고, 피험자에서 서면동의서를 받는다.
- 피험자는 순서대로 스크리닝 번호를 지정 받는다.
- 피험자의 인구학적 조사, 병력 및 약물투여력 조사를 기록한다.
- 이학적 검사를 시행한다.
- 신장, 체중 및 혈압/맥박 측정을 시행한다.
- 생화학검사를 실시한다.
- 심전도 검사를 실시한다.
- 선정/제외 기준에 대해 1차적으로 적합성을 판정한다
- 다음 방문 시 제출할 식사일지를 배부한다.
- 식이 및 신체활동 권고사항, 식사일지 기록에 대한 교육을 실시한다.
- 피험자에게 다음 방문 일을 지정해 준다.

(2) 2차 방문 (Baseline visit, week 0)

이 방문은 최초 방문일 이후 14일 이내에 이루어지고, 다음 순서에 따라 평가를 받는다.

- 1차 방문 평가결과를 종합하여 선정기준/제외기준의 적합성을 평가한다.
- 무작위 배정한다.
- 약물투여력 변화를 조사한다.
- 이학적검사를 시행한다.
- 체중, 허리/엉덩이둘레 및 혈압/맥박 측정을 시행한다.
- DEXA를 시행한다.
- 기록된 피험자의 식사일지를 확인하고 수거한다.
- 식사지도 및 기초식이조사를 시행한다.
- 다음 방문시 제출할 식사일지를 배부한다.
- 임상시험용 식품의 섭취방법에 대해 교육하고 임상시험용 식품을 배부한다.
- 다음 방문일을 지정한다.
- 시험식품/대조식품을 처방하고, 섭취 방법에 대하여 교육한다.

(3) 3차 방문 (Interim visit, week 6)

이 방문은 2차 방문일 이후 42일(± 7) 이후에 이루어지고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같다.

- 이상반응 유무를 확인한다.
- 약물투여력 변화를 확인한다.
- 이학적 검사를 시행한다.
- 체중, 허리/엉덩이둘레 및 혈압/맥박 측정을 시행한다.
- 식사지도 및 기초식이조사를 시행한다.
- 다음 방문시 제출할 식사일지를 배부한다.
- 생화학검사를 시행한다.
- 섭취 및 순응도 확인 : 피험자가 무작위로 배정된 제품을 전술한 섭취량, 섭취기간 및 섭취 방법에 따라 섭취토록 하고 순응도를 기록한다.
- 시험식품/대조식품을 처방하고, 섭취 방법에 대하여 교육한다.
- 피험자의 다음 방문일을 지정한다.

(4) 4차 방문 (Closing visit, week 12)

이 방문은 2차 방문일 이후 84일(± 5) 이후에 이루어지고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같다.

- 이상반응 유무를 확인한다.
- 약물투여력 변화를 확인한다.
- 이학적 검사를 시행한다.
- 체중, 허리/엉덩이둘레 및 혈압/맥박을 시행한다.
- DEXA를 시행한다.
- 식사지도 및 기초식이조사를 시행한다.
- 생화학검사를 시행한다.
- 심전도 검사를 시행한다.
- 순응도 확인 : 순응도를 기록한다.

4. 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법

가. 평가기준

(1) 1차 유효성 평가변수

- 체중
- DEXA를 통한 체지방률
- DEXA를 통한 체지방량
- 혈중 콜레스테롤

(2) 2차 유효성 평가변수

- 허리둘레 변화치

나. 평가방법

임상시험 결과를 평가하기 위한 1차 및 2차 유효성 평가변수에 대하여 시험군 I, 시험군 II와 대조군으로 구분되어 분석될 것이다.

(2) 통계분석 방법

본 연구의 자료는 SAS 또는 SPSS통계 프로그램을 이용하여 처리되며, 대조군과 시험군 간의 평균값의 차이에 대한 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 판정한다. 시험군 I, 시험군 II와 대조군간의 비교는 ANOVA검정을 이용하여 유의성을 검증하고, 군내비교는 paired t-test를 이용하여 유의성을 검증한다.

제 3 절 연구결과

1. 대상자의 일반적 사항

임상시험 대상자 총 30명 중 임상시험을 모두 완료한 모든 대상자는 총 16명, 진행중인 대상자 4명, 중도탈락한 대상자가 10명이었다. 중도탈락 사유는 모두 피험자 자의에 의한 동의철회였다.

따라서 이번 분석에서는 임상시험을 모두 완료한 대조군 6명, 홍국균 발효 검정콩 2.5g군(이하 시험군 I) 7명, 홍국균 발효 검정콩 5.0g군(이하 시험군 II) 3명, 즉 총 16명만이 분석대상에 포함되었다.

분석대상에 포함된 대상자의 평균 연령은 49.9세, 평균신장은 159.30cm이었으며 군별 평균연령, 평균신장은 표 1과 같다.

<표 1> 대상자의 일반적 사항

	대조군 (n = 6)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 2)	p-value
연령 (세)	44.17 ± 14.22	55.00 ± 3.42	49.67 ± 6.03	0.157
신장(cm)	163.25 ± 11.51	158.67 ± 10.17	156.30 ± 5.22	0.580

2. 임상시험을 종료한 모든 대상자 결과 분석

임상시험을 모두 완료한 대조군 6명, 홍국균 발효 검정콩 2.5g군(이하 시험군 I) 7명, 홍국균 발효 검정콩 5.0g군(이하 시험군 II) 3명을 대상으로 분석하였다.

가. 1차 유효성 평가분석 (체중, 체지방률, 체지방량, 총 콜레스테롤)

(1) 체중, 체지방률, 체지방량(종료된 모든 대상자)

대조군과 시험군 I, 시험군 II의 1차 유효성 평가항목인 체중, 체지방률, 체지방량을 비교분석한 결과는 표 2와 같다. 체중은 매방문(0주, 6주, 12주)마다 측정하였고, 체지방률과 체지방량은 DEXA를 이용해 측정되었으며 임상시험약 복용 전후(0주, 12주) 2회만 측정하였다.

- 12주 후의 세 군의 체중을 비교한 결과 시험군 I 은 1.69kg 감소, 시험군 II는 2.83kg 감소, 대조군은 2.33kg 감소하여 시험군 II가 가장 많이 감소하고, 대조군, 시험군 I 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세군의 BMI를 비교한 결과 시험군 I 은 0.64kg/m² 감소, 시험군 II는 1.18kg/m² 감소, 대조군은 0.86kg/m² 감소하여 시험군 II가 가장 많이 감소하고, 대조군, 시험군 I 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세군의 체지방률을 비교한 결과 시험군 I 은 0.30% 감소, 시험군 II는 0.20% 감소, 대조군은 1.53% 감소하여 대조군, 시험군 I, 시험군 II 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세군의 체지방량을 비교한 결과 시험군 I 은 697.86g 감소, 시험군 II는 963.00g 감소, 대조군은 1942.67g 감소하여 대조군, 시험군 II, 시험군 I 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세군의 체지방량을 비교한 결과 시험군 I 은 956.00g 감소, 시험군 II는 1542.00g 감소, 대조군은 166.83g 감소하여 시험군 II, 시험군 I, 대조군 순으로 감소하였으나, 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

<표 2> 대조군과 시험군 I, 시험군 II의 체중, 체지방률, 체지방량
-종료된 모든 대상자

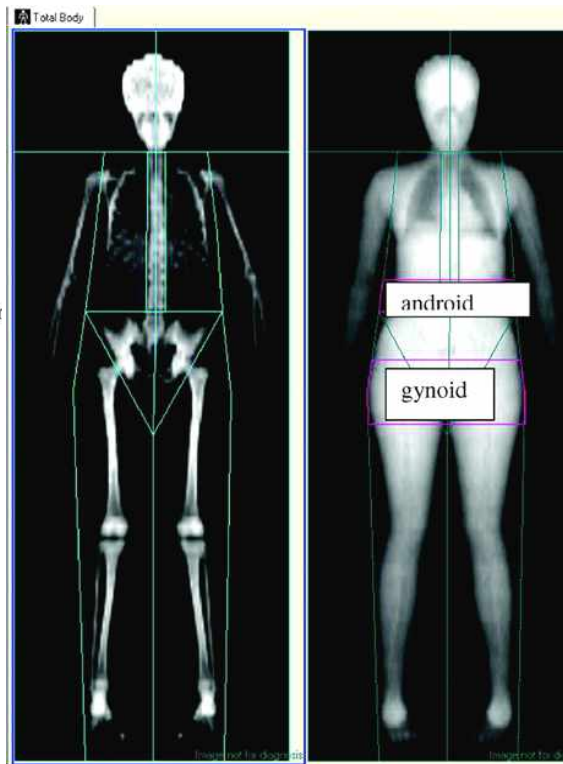
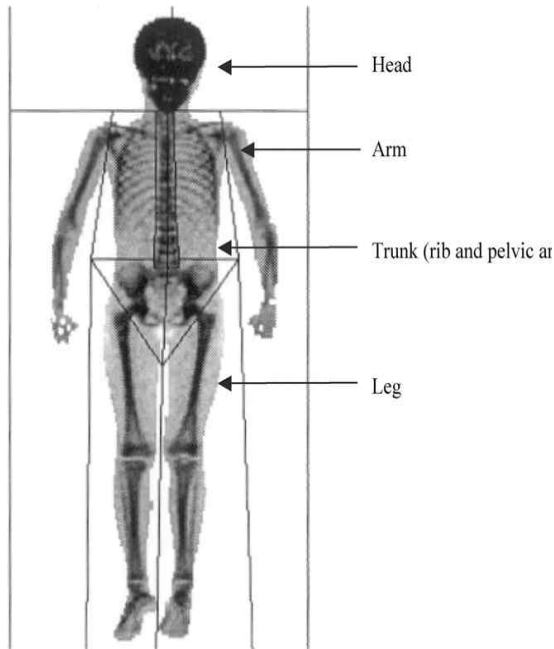
항목		대조군 (n = 6)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾
체중 (kg)	0 wk	74.58 ± 13.07	68.64 ± 8.94	67.27 ± 6.88	0.511
	6 wk	74.50 ± 13.05	67.49 ± 8.64	65.13 ± 4.60	0.371
	12 wk	72.25 ± 11.93	66.96 ± 8.10	64.44 ± 8.06	0.473
	12wk-0wk	-2.33 ± 2.32	-1.69 ± 1.65	-2.83 ± 2.41	0.698
	p-value ²⁾	0.057	0.035	0.179	
BMI (kg/m ²)	0 wk	27.80 ± 1.80	27.19 ± 1.51	27.48 ± 1.10	0.791
	6 wk	27.77 ± 1.72	26.74 ± 1.64	26.58 ± 1.45	0.466
	12 wk	26.94 ± 1.03	26.55 ± 1.50	26.29 ± 1.48	0.766
	12wk-0wk	-0.86 ± 0.91	-0.64 ± 0.62	-1.18 ± 1.06	0.632
	p-value ²⁾	0.070	0.033	0.193	
Total Fat(%) /DEXA	0 wk	28.28 ± 6.38	30.46 ± 5.85	32.37 ± 6.95	0.640
	12 wk	26.75 ± 8.75	30.16 ± 6.36	32.17 ± 5.23	0.535
	12wk-0wk	-1.53 ± 3.04	-0.30 ± 1.14	-0.20 ± 1.15	0.549
	p-value ²⁾	0.272	0.511	0.878	
Total Fat(g) /DEXA	0 wk	19812.17 ± 4428.15	19771.43 ± 3683.91	20399.33 ± 2972.00	0.971
	12 wk	17869.50 ± 4772.93	19073.57 ± 3869.77	19436.33 ± 818.90	0.810
	12wk-0wk	-1942.67 ± 2437.88	-697.86 ± 981.13	-963.00 ± 2236.73	0.492
	p-value ²⁾	0.108	0.109	0.534	
Total Lean(g) /DEXA	0 wk	51200.50 ± 11584.90	45847.57 ± 8795.99	43439.33 ± 8868.18	0.489
	12 wk	51033.67 ± 13467.67	44891.57 ± 8381.44	41897.33 ± 8774.11	0.431
	12wk-0wk	-166.83 ± 2463.84	-956.00 ± 1259.92	-1542.00 ± 311.02	0.525
	p-value ²⁾	0.875	0.091	0.038	

1)Compared between groups; p-value by one way ANOVA

2)Compared within groups; p-value by paired t-test

● 부위별 DEXA 결과

DEXA 검사시 각 부위는 그림 1, 2와 같다.



<그림 1> DEXA Arms, Legs, Trunk부위

Qing He, Xiaojing Zhang, Suyuan He, Luxia Gong, Yungao Sun§, Stanley Heshka, Richard J. Deckelbaum and Dymna Gallagher. Higher Insulin, Triglycerides, and Blood Pressure With Greater Trunk Fat in Tanner 1 Chinese. *Obesity* (2007) 15, 1004-1011.

<그림 2> DEXA의 Android, Gynoid 부위

Rachel Novotny, Scott Going, Dorothy Teegarden, Marta Van Loan, George McCabe, Linda McCabe, Yihe G. Daida and Carol J. Boushey and the ACT Research Team. Hispanic and Asian Pubertal Girls Have Higher Android/Gynoid Fat Ratio Than Whites. *Obesity* (2007) 15, 1565-1570.

DEXA 검사결과를 부위별로 나누어 분석한 결과는 표 3과 같다.

- DEXA를 통해 부위별(Arms, Legs, Trunk, Android, Gynoid)로 나누어 12주 후의 체지방률과 체지방량을 분석한 결과 Arms 부위는 시험군Ⅱ가 가장 많이 감소하였고(2.22%, 282.00g 감소), 대조군, 시험군 I 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. Legs 부위에서는 대조군이 가장 많이 감소하였고(0.98%, 445.33g감소), 시험군 I, 시험군Ⅱ순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 복부에 해당하는 Trunk, Android, Gynoid 부위의 12주 후의 체지방률과 체지방을 분석한 결과, Trunk 부위는 대조군이 가장 많이 감소하였고, 시험군Ⅱ, 시험군 I 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. Android, Gynoid부위에서도 대조군이 가장 많이 감소하였고, 시험군 I, 시험군Ⅱ순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

<표 3> 대조군, 시험군 I, 시험군 II 세 군의 부위별 DEXA 결과

-종료된 모든 대상자

항목		대조군 (n = 6)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾		
Arms		0 wk	23.52 ± 12.44	25.86 ± 10.76	25.80 ± 11.08	0.926	
	Fat	12 wk	21.83 ± 13.15	24.44 ± 10.39	23.63 ± 8.70	0.917	
	(%)	12wk-0wk	-1.68 ± 2.41	-1.41 ± 1.72	-2.22 ± 3.23	0.892	
		p-value ²⁾	0.147	0.073	0.366		
		0 wk	1786.33 ± 859.81	1801.00 ± 806.11	1744.00 ± 733.17	0.995	
Arms (g)	Fat	12 wk	1634.50 ± 913.78	1676.43 ± 800.12	1462.00 ± 510.11	0.928	
	(g)	12wk-0wk	-151.83 ± 256.33	-124.57 ± 217.42	-282.00 ± 334.75	0.668	
		p-value ²⁾	0.207	0.180	0.282		
	Legs		0 wk	23.68 ± 9.01	25.99 ± 6.56	30.20 ± 12.28	0.578
		Fat	12 wk	22.70 ± 10.51	25.14 ± 6.82	30.50 ± 11.58	0.505
(%)		12wk-0wk	-0.98 ± 1.71	-0.84 ± 1.13	0.30 ± 0.89	0.399	
		p-value ²⁾	0.218	0.095	0.618		
		0 wk	5946.50 ± 2542.06	5785.00 ± 1251.18	7132.33 ± 3050.10	0.657	
Legs (g)	Fat	12 wk	5501.17 ± 2650.745	5399.14 ± 1301.39	6963.33 ± 2553.45	0.549	
	(g)	12wk-0wk	-445.33 ± 369.52	-385.86 ± 232.37	-169.00 ± 502.36	0.526	
		p-value ²⁾	0.032	0.005	0.619		
	Trunk		0 wk	34.58 ± 4.17	36.63 ± 5.13	37.27 ± 2.55	0.621
		Fat	12 wk	32.60 ± 8.01	36.93 ± 5.64	37.03 ± 1.86	0.433
(%)		12wk-0wk	-1.98 ± 4.62	0.30 ± 1.89	-0.23 ± 3.14	0.483	
		p-value ²⁾	0.341	0.688	0.909		
		0 wk	11406.83 ± 1800.16	11503.57 ± 1941.41	10841.33 ± 925.07	0.859	
Trunk (g)	Fat	12 wk	10104.00 ± 1693.45	11321.00 ± 1865.14	10335.33 ± 1933.68	0.472	
	(g)	12wk-0wk	-1302.83 ± 2024.36	-182.57 ± 848.24	-506.00 ± 1421.72	0.418	
		p-value ²⁾	0.176	0.590	0.600		
	Android		0 wk	38.83 ± 5.03	41.80 ± 5.24	42.83 ± 2.46	0.426
		Fat	12 wk	37.12 ± 8.72	42.29 ± 5.99	42.00 ± 2.18	0.380
(%)		12wk-0wk	-1.72 ± 3.86	0.49 ± 1.52	-0.83 ± 2.22	0.376	
		p-value ²⁾	0.325	0.428	0.583		
		0 wk	2101.33 ± 167.76	2232.14 ± 425.10	2160.00 ± 202.68	0.763	
Android (g)	Fat	12 wk	1889.17 ± 308.56	2174.86 ± 430.33	1926.67 ± 332.83	0.373	
	(g)	12wk-0wk	-212.17 ± 307.45	-57.29 ± 174.53	-233.33 ± 294.92	0.464	
		p-value ²⁾	0.152	0.419	0.304		
	Gynoid		0 wk	29.28 ± 8.25	32.54 ± 6.98	36.93 ± 11.55	0.446
		Fat	12 wk	28.22 ± 10.09	31.77 ± 7.10	37.27 ± 9.53	0.368
(%)		12wk-0wk	-1.07 ± 2.48	-0.77 ± 1.49	0.33 ± 2.29	0.630	
		p-value ²⁾	0.341	0.221	0.825		
		0 wk	3159.33 ± 940.59	3230.86 ± 636.37	3859.67 ± 1226.42	0.508	
Gynoid (g)	Fat	12 wk	2941.17 ± 922.07	3082.14 ± 670.75	3718.67 ± 842.45	0.401	
	(g)	12wk-0wk	-218.17 ± 259.13	-148.71 ± 142.15	-141.00 ± 387.40	0.848	
		p-value ²⁾	0.094	0.033	0.593		

1)p-value by one way ANOVA

2)p-value by paired t-test

(2) 총 콜레스테롤 분석(종료된 모든 대상자)

대조군과 시험군 I, 시험군 II의 총 콜레스테롤은 비롯하여 그 외 지질검사를 분석한 결과는 표 4와 같다.

- 12주 후의 세 군의 총 콜레스테롤을 비교한 결과 시험군 II는 53.67mg/dl 감소, 시험군 I은 26.71mg/dl 감소, 대조군은 17.67mg/dl 감소하여 시험군 II가 가장 많이 감소하고, 시험군 I, 대조군 순으로 감소하였다. 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 용량이 높을수록 총 콜레스테롤이 감소하는 경향을 보였다.
- 12주 후의 세 군의 LDL-Cholesterol을 비교한 결과 시험군 II는 65.33mg/dl 감소, 시험군 I은 24.29mg/dl 감소, 대조군은 24.17mg/dl 감소하여 시험군 II가 가장 많이 감소하고, 시험군 I, 대조군 순으로 감소하였다. 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 용량이 높을수록 LDL-Cholesterol이 감소하는 경향을 보였다.
- 12주 후의 세 군의 중성지방(Triglyceride)을 비교한 결과, 시험군 I은 17.43mg/dl 감소하고, 대조군은 0.50mg/dl 감소한 반면 시험군 II는 8.00mg/dl 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다.
- 12주 후의 세 군의 HDL-Cholesterol 비교한 결과, 시험군 II은 10.33mg/dl 감소하고, 대조군은 2.83mg/dl 감소한 반면 시험군 I은 0.57mg/dl 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

<표 4> 대조군, 시험군 I, 시험군 II 세 군의 총 콜레스테롤 및 지질검사 결과 - 종료된 모든 대상자

항목		대조군 (n = 6)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾
총 콜레스테롤 (mg/dl)	0 wk	265.83 ± 14.50	262.86 ± 11.07	307.33 ± 102.26	0.304
	6 wk	235.17 ± 35.27	216.43 ± 17.66	255.33 ± 64.83	0.299
	12 wk	248.17 ± 30.47	236.14 ± 28.71	253.67 ± 39.07	0.666
	12wk-0wk	-17.67 ± 28.32	-26.71 ± 26.72	-53.67 ± 67.58	0.402
	p-value²⁾	0.187	0.038	0.303	
Triglyceride (mg/dl)	0 wk	128.17 ± 30.95	132.00 ± 54.71	174.33 ± 64.53	0.394
	6 wk	173.83 ± 85.34	155.43 ± 95.45	83.00 ± 12.17	0.329
	12 wk	127.67 ± 60.88	114.57 ± 33.12	182.33 ± 63.96	0.186
	12wk-0wk	-0.50 ± 50.09	-17.43 ± 49.82	8.00 ± 26.91	0.692
	p-value²⁾	0.981	0.390	0.658	
HDL- Cholesterol (mg/dl)	0 wk	61.50 ± 13.87	57.14 ± 7.88	65.67 ± 17.21	0.587
	6 wk	56.83 ± 20.49	55.14 ± 12.97	63.00 ± 13.75	0.786
	12 wk	58.67 ± 17.94	57.71 ± 10.42	55.33 ± 10.97	0.944
	12wk-0wk	-2.83 ± 8.23	0.57 ± 3.51	-10.33 ± 7.02	0.075
	p-value²⁾	0.438	0.681	0.126	
LDL- Cholesterol (mg/dl)	0 wk	177.17 ± 15.12	170.00 ± 17.07	219.67 ± 68.07	0.092
	6 wk	151.33 ± 31.07	128.00 ± 8.19	172.67 ± 65.39	0.156
	12 wk	153.00 ± 18.89	145.71 ± 24.55	154.33 ± 19.86	0.782
	12wk-0wk	-24.17 ± 23.23	-24.29 ± 13.68	-65.33 ± 55.01	0.104
	p-value²⁾	0.051	0.003	0.176	

1)p-value by one way ANOVA

2)p-value by paired t-test

나. 2차 유효성 평가분석 (종료한 모든 대상자)

(1) 허리/ 엉덩이둘레 (종료한 모든 대상자)

대조군과 시험군 I, 시험군 II의 허리둘레/엉덩이둘레를 분석한 결과는 표 5와 같다.

- 12주 후의 세 군의 허리둘레를 비교한 결과 시험군 I 은 2.86cm 감소, 시험군 II는 3.00cm 감소, 대조군은 3.03cm 감소하여 대조군에서 가장 많이 감소한 것으로 나타났고, 시험군 II, 시험군 I 순으로 감소하였으나 세 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세 군의 엉덩이둘레를 비교한 결과 시험군 I 은 1.71cm 감소, 시험군 II는 2.83cm 감소, 대조군은 2.38cm 감소하여 시험군 II에서 가장 많이 감소한 것으로 나타났고, 대조군, 시험군 I 순으로 감소하였으나 세 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

<표 5> 대조군, 시험군 I, 시험군 II 세 군의 허리둘레, 엉덩이둘레
-종료된 모든 대상자

항목	대조군 (n = 6)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾	
허리둘레 (cm)	0 wk	91.23 ± 3.40	90.86 ± 4.96	89.67 ± 5.58	0.887
	6 wk	90.83 ± 3.24	89.50 ± 4.65	87.67 ± 6.03	0.607
	12 wk	88.20 ± 3.35	88.00 ± 4.52	86.67 ± 6.66	0.885
	12wk-0wk	-3.03 ± 0.45	-2.86 ± 1.49	-3.00 ± 1.32	0.961
	p-value²⁾	0.000	0.002	0.059	
엉덩이 둘레 (cm)	0 wk	101.97 ± 5.05	100.14 ± 3.38	102.50 ± 2.78	0.617
	6 wk	101.75 ± 5.30	98.96 ± 3.52	101.33 ± 1.15	0.454
	12 wk	99.58 ± 5.44	98.43 ± 3.36	99.67 ± 2.52	0.856
	12wk-0wk	-2.38 ± 0.58	-1.71 ± 0.70	-2.83 ± 2.75	0.395
	p-value²⁾	0.000	0.001	0.217	

1)p-value by one way ANOVA

2)p-value by paired t-test

3. 추가분석 (6kg 이상 체중 감량된 대상자 제외)

임상시험을 종료한 대상자 중 6kg 이상 체중이 감소된 대상자들을 제외하고 추가분석을 실시하였다. 분석대상은 대조군 5명, 시험군 I (홍국균 발효 검정콩 2.5g) 7명, 시험군 II (홍국균 발효 검정콩 5.0g) 3명으로 총 15명이다.

가. 1차 유효성 평가분석 (체중, 체지방률, 체지방량, 총 콜레스테롤 추가분석)

(1) 체중, 체지방률, 체지방량(추가분석)

6kg 이상 체중이 감소된 대상자들을 제외하고 대조군과 시험군 I (홍국균 발효 검정콩 2.5g), 시험군 II (홍국균 발효 검정콩 5.0g)의 1차 유효성 평가항목인 체중, 체지방률, 체지방량을 추가 분석한 결과는 표 6과 같다.

- 12주 후의 세 군의 체중을 비교한 결과 시험군 II는 2.83kg 감소하고, 시험군 I은 1.69kg 감소, 대조군은 1.56kg 감소하여 시험군 II가 가장 많이 감소하고, 시험군 I, 대조군 순으로 감소하였다. 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나 용량이 높을수록 체중이 더 많이 감소한 경향을 보였다.
- 12주 후의 세 군의 BMI를 비교한 결과 시험군 II는 1.18kg/m² 감소, 시험군 I은 0.64kg/m² 감소, 대조군은 0.53kg/m² 감소하여 시험군 II가 가장 많이 감소하고, 시험군 I, 대조군 순으로 감소하였다. 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나 용량이 높을수록 BMI가 더 많이 감소한 경향을 보였다.
- 12주 후의 세 군의 체지방률을 비교한 결과 시험군 I은 0.30% 감소, 시험군 II는 0.20% 감소, 대조군은 1.86% 감소하여 대조군, 시험군 I, 시험군 II 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세 군의 체지방량을 비교한 결과 시험군 I은 697.86g 감소, 시험군 II는 963.00g 감소, 대조군은 1912.60g 감소하여 대조군, 시험군 II, 시험군 I 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세 군의 체지방량을 비교한 결과 시험군 I은 956.00g 감소, 시험군 II는 1542.00g 감소한 반면 대조군은 498.40g 증가하여 시험군 II, 시험군 I, 대조군 순으로 감소하였으나, 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

<표 6> 대조군과 시험군 I, 시험군 II의 1차 유효성 평가 (체중, 체지방률, 체지방량)
-6kg이상 체중이 감소된 대상자 제외 추가분석

항목	대조군 (n = 5)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾	
체중 (kg)	0 wk	74.50 ± 14.61	68.64 ± 8.94	67.27 ± 6.88	0.582
	6 wk	74.52 ± 14.60	67.49 ± 8.64	65.13 ± 4.60	0.437
	12 wk	72.94 ± 13.21	66.96 ± 8.10	64.44 ± 8.06	0.468
	12wk-0wk	-1.56 ± 1.49	-1.69 ± 1.65	-2.83 ± 2.41	0.580
	p-value²⁾	0.080	0.035	0.179	
BMI (kg/m ²)	0 wk	27.29 ± 1.46	27.19 ± 1.51	27.48 ± 1.10	0.959
	6 wk	27.30 ± 1.45	26.74 ± 1.64	26.58 ± 1.45	0.767
	12 wk	26.77 ± 1.05	26.55 ± 1.50	26.29 ± 1.48	0.890
	12wk-0wk	-0.53 ± 0.47	-0.64 ± 0.62	-1.18 ± 1.06	0.404
	p-value²⁾	0.068	0.033	0.193	
Total Fat(%) /DEXA	0 wk	26.34 ± 4.74	30.46 ± 5.85	32.37 ± 6.95	0.324
	12 wk	24.48 ± 7.56	30.16 ± 6.36	32.17 ± 5.23	0.243
	12wk-0wk	-1.86 ± 3.28	-0.30 ± 1.14	-0.20 ± 1.15	0.447
	p-value²⁾	0.274	0.511	0.878	
Total Fat(g) /DEXA	0 wk	18351.20 ± 2915.90	19771.43 ± 3683.91	20399.33 ± 2972.00	0.663
	12 wk	16438.60 ± 3622.16	19073.57 ± 3869.77	19436.33 ± 818.90	0.377
	12wk-0wk	-1912.60 ± 2724.39	-697.86 ± 981.13	-963.00 ± 2236.73	0.572
	p-value²⁾	0.192	0.109	0.534	
Total Lean(g) /DEXA	0 wk	52595.40 ± ^{12376.1} ₆	45847.57 ± 8795.99	43439.33 ± 8868.18	0.409
	12 wk	53093.80 ± ^{13960.3} ₆	44891.57 ± 8381.44	41897.33 ± 8774.11	0.307
	12wk-0wk	498.40 ± 2066.18	-956.00 ± 1259.92	-1542.00 ± 311.02	0.163
	p-value²⁾	0.618	0.091	0.038	

1)Compared between groups; p-value by one way ANOVA

2)Compared within groups; p-value by paired t-test

6kg이상 체중이 감소된 대상자를 제외하고, DEXA 검사결과를 부위별로 나누어 추가분석한 결과는 표 7과 같다.

- DEXA를 통해 부위별(Arms, Legs, Trunk, Android, Gynoid)로 나누어 12주 후의 체지방률과 체지방량을 분석한 결과 Arms 부위는 시험군Ⅱ가 가장 많이 감소하였고(2.22%, 282.00g 감소), 대조군, 시험군 I 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. Legs 부위에서는 대조군이 가장 많이 감소하였고(1.52%, 502.40g감소), 시험군 I, 시험군Ⅱ 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

- 복부에 해당하는 Trunk, Android, Gynoid 부위의 12주 후의 체지방률과 체지방을 분석한 결과, Trunk, Android 부위는 대조군이 가장 많이 감소하였고, 시험군Ⅱ, 시험군 I 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Gynoid부위에서도 대조군이 가장 많이 감소하였고, 시험군 I, 시험군Ⅱ 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

<표 7> 대조군과 시험군 I, 시험군 II 세 군의 부위별 DEXA 결과

항목		대조군 (n = 5)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾
Arms	0 wk	20.30 ± 10.77	25.86 ± 10.76	25.80 ± 11.08	0.655
	Fat (%)	18.54 ± 11.60	24.44 ± 10.39	23.63 ± 8.70	0.627
	12wk-0wk	-1.76 ± 2.68	-1.41 ± 1.72	-2.22 ± 3.23	0.897
	p-value ²⁾	0.216	0.073	0.366	
	0 wk	1512.60 ± 601.75	1801.00 ± 806.11	1744.00 ± 733.17	0.794
Arms (g)	Fat (%)	1360.00 ± 691.81	1676.43 ± 800.12	1462.00 ± 510.11	0.750
	12wk-0wk	-152.60 ± 286.58	-124.57 ± 217.42	-282.00 ± 334.75	0.690
	p-value ²⁾	0.300	0.180	0.282	
	0 wk	20.72 ± 5.96	25.99 ± 6.56	30.20 ± 12.28	0.255
	Legs	Fat (%)	19.20 ± 6.79	25.14 ± 6.82	30.50 ± 11.58
12wk-0wk		-1.52 ± 1.22	-0.84 ± 1.13	0.30 ± 0.89	0.128
p-value ²⁾		0.049	0.095	0.618	
0 wk		5095.80 ± 1627.85	5785.00 ± 1251.18	7132.33 ± 3050.10	0.332
Legs (g)		Fat (%)	4593.40 ± 1613.31	5399.14 ± 1301.39	6963.33 ± 2553.45
	12wk-0wk	-502.40 ± 382.44	-385.86 ± 232.37	-169.00 ± 502.36	0.438
	p-value ²⁾	0.042	0.005	0.619	
	0 wk	33.54 ± 3.68	36.63 ± 5.13	37.27 ± 2.55	0.404
	Trunk	Fat (%)	31.34 ± 8.26	36.93 ± 5.64	37.03 ± 1.86
12wk-0wk		-2.20 ± 5.13	0.30 ± 1.89	-0.23 ± 3.14	0.483
p-value ²⁾		0.392	0.688	0.909	
0 wk		11129.80 ± 1864.16	11503.57 ± 1941.41	10841.33 ± 925.07	0.853
Trunk (g)		Fat (%)	9907.20 ± 1815.01	11321.00 ± 1865.14	10335.33 ± 1933.68
	12wk-0wk	-1222.60 ± 2252.61	-182.57 ± 848.24	-506.00 ± 1421.72	0.531
	p-value ²⁾	0.292	0.590	0.600	
	0 wk	38.12 ± 5.27	41.80 ± 5.24	42.83 ± 2.46	0.348
	Android	Fat (%)	36.04 ± 9.30	42.29 ± 5.99	42.00 ± 2.18
12wk-0wk		-2.08 ± 4.19	0.49 ± 1.52	-0.83 ± 2.22	0.325
p-value ²⁾		0.330	0.428	0.583	
0 wk		2108.00 ± 186.68	2232.14 ± 425.10	2160.00 ± 202.68	0.813
Android (g)		Fat (%)	1898.80 ± 343.97	2174.86 ± 430.33	1926.67 ± 332.83
	12wk-0wk	-209.20 ± 343.65	-57.29 ± 174.53	-233.33 ± 294.92	0.512
	p-value ²⁾	0.245	0.419	0.304	
	0 wk	26.86 ± 6.41	32.54 ± 6.98	36.93 ± 11.55	0.226
	Gynoid	Fat (%)	25.04 ± 7.18	31.77 ± 7.10	37.27 ± 9.53
12wk-0wk		-1.82 ± 1.86	-0.77 ± 1.49	0.33 ± 2.29	0.280
p-value ²⁾		0.094	0.221	0.825	
0 wk		2936.00 ± 855.46	3230.86 ± 636.37	3859.67 ± 1226.42	0.348
Gynoid (g)		Fat (%)	2681.80 ± 747.15	3082.14 ± 670.75	3718.67 ± 842.45
	12wk-0wk	-254.20 ± 272.39	-148.71 ± 142.15	-141.00 ± 387.40	0.729
	p-value ²⁾	0.105	0.033	0.593	

- 6kg이상 체중이 감소된 대상자 제외 추가분석

1)p-value by one way ANOVA

2)p-value by paired t-test

(2) 총 콜레스테롤 분석(추가분석)

6kg이상 체중이 감소된 대상자를 제외하고 대조군과 시험군 I, 시험군 II의 총 콜레스테롤은 비롯하여 그 외 지질검사를 추가분석한 결과는 표 8과 같다.

- 12주 후의 세 군의 총 콜레스테롤을 비교한 결과 시험군 II는 53.67mg/dl 이 감소, 시험군 I 은 26.71mg/dl 감소, 대조군은 17.80mg/dl 감소하여 시험군 II가 가장 많이 감소하고, 시험군 I, 대조군 순으로 감소하였다. 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 용량이 높을수록 총 콜레스테롤이 감소하는 경향을 보였다.
- 12주 후의 세 군의 LDL-Cholesterol을 비교한 결과 시험군 II는 65.33mg/dl 감소, 시험군 I 은 24.29mg/dl 감소, 대조군은 29.80mg/dl 감소하여 시험군 II가 가장 많이 감소하고, 대조군, 시험군 I 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의하지 않았다.
- 12주 후의 세 군의 중성지방(Triglyceride)을 비교한 결과, 시험군 I 은 17.43mg/dl 감소한 반면, 대조군은 1.20mg/dl 증가하고, 시험군 II는 8.00mg/dl 증가하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세 군의 HDL-Cholesterol비교한 결과, 시험군 II는 10.33mg/dl 감소하고, 대조군은 0.60mg/dl 감소한 반면 시험군 I 는 0.57mg/dl 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

<표 8> 대조군, 시험군 I, 시험군 II 세 군의 총 콜레스테롤 및 지질검사 결과 - 6kg이상
체중이 감소된 대상자 제외 추가분석

항목		대조군 (n = 5)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾
총 콜레스테롤 (mg/dl)	0 wk	267.00 ± 15.89	262.86 ± 11.07	307.33 ± 102.26	0.342
	6 wk	246.20 ± 25.34	216.43 ± 17.66	255.33 ± 62.83	0.179
	12 wk	249.20 ± 33.95	236.14 ± 28.71	253.67 ± 39.07	0.677
	12wk-0wk	-17.80 ± 31.67	-26.71 ± 26.72	-53.67 ± 67.58	0.449
	p-value ²⁾	0.277	0.038	0.303	
Triglyceride (mg/dl)	0 wk	132.80 ± 32.20	132.00 ± 54.71	174.33 ± 64.53	0.394
	6 wk	152.80 ± 76.06	155.43 ± 95.45	83.00 ± 12.17	0.329
	12 wk	134.00 ± 65.81	114.57 ± 33.12	182.33 ± 63.96	0.186
	12wk-0wk	1.20 ± 55.81	-17.43 ± 49.82	8.00 ± 26.91	0.692
	p-value ²⁾	0.964	0.390	0.658	
HDL- Cholesterol (mg/dl)	0 wk	63.00 ± 14.95	57.14 ± 7.88	65.67 ± 17.21	0.587
	6 wk	61.80 ± 18.43	55.14 ± 12.97	63.00 ± 13.75	0.786
	12 wk	62.40 ± 17.26	57.71 ± 10.42	55.33 ± 10.97	0.944
	12wk-0wk	-0.60 ± 6.88	0.57 ± 3.51	-10.33 ± 7.02	0.075
	p-value ²⁾	0.855	0.681	0.126	
LDL- Cholesterol (mg/dl)	0 wk	179.20 ± 15.96	170.00 ± 17.07	219.67 ± 68.07	0.092
	6 wk	160.80 ± 23.12	128.00 ± 8.19	172.67 ± 65.39	0.156
	12 wk	149.40 ± 18.68	145.71 ± 24.55	154.33 ± 19.86	0.782
	12wk-0wk	-29.80 ± 20.90	-24.29 ± 13.68	-65.33 ± 55.01	0.104
	p-value ²⁾	0.033	0.003	0.176	

1)p-value by one way ANOVA

2)p-value by paired t-test

나. 2차 유효성 평가분석 (추가분석)

(1) 허리/ 엉덩이둘레 (추가분석)

6kg이상 체중이 감소된 대상자를 제외하고 대조군과 시험군 I, 시험군 II의 허리둘레/엉덩이둘레를 추가분석한 결과는 표 9와 같다.

- 12주 후의 세 군의 허리둘레를 비교한 결과 시험군 I은 2.86cm 감소, 시험군 II는 3.00cm 감소, 대조군은 3.04cm 감소하여 대조군에서 가장 많이 감소한 것으로 나타났고, 시험군 II, 시험군 I 순으로 감소하였으나 세 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세 군의 엉덩이둘레를 비교한 결과 시험군 I은 1.71cm 감소, 시험군 II는 2.83cm 감소, 대조군은 2.26cm 감소하여 시험군 II에서 가장 많이 감소한 것으로 나타났고, 대조군, 시험군 I 순으로 감소하였으나 세 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

<표 9> 대조군, 시험군 I, 시험군 II 세 군의 허리둘레, 엉덩이둘레
-6kg이상 체중이 감소된 대상자 제외 추가분석

항목	대조군 (n = 5)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾	
허리둘레 (cm)	0 wk	91.28 ± 3.80	90.86 ± 4.96	89.67 ± 5.58	0.895
	6 wk	90.80 ± 3.62	89.50 ± 4.65	87.67 ± 6.03	0.657
	12 wk	88.24 ± 3.74	88.00 ± 4.52	86.67 ± 6.66	0.893
	12wk-0wk	-3.04 ± 0.50	-2.86 ± 1.49	-3.00 ± 1.32	0.964
	p-value²⁾	0.000	0.002	0.059	
엉덩이 둘레 (cm)	0 wk	101.66 ± 5.59	100.14 ± 3.38	102.50 ± 2.78	0.680
	6 wk	101.40 ± 5.85	98.96 ± 3.52	101.33 ± 1.15	0.558
	12 wk	99.40 ± 6.07	98.43 ± 3.36	99.67 ± 2.52	0.891
	12wk-0wk	-2.26 ± 0.56	-1.71 ± 0.70	-2.83 ± 2.75	0.447
	p-value²⁾	0.001	0.001	0.217	

1) p-value by one way ANOVA

2) p-value by paired t-test

4. 안전성 검사

가. 혈액학적 검사

대조군과 시험군 I (홍국균 발효 검정콩 2.5g), 시험군 II (홍국균 발효 검정콩 5.0g)의 혈액학적 검사를 분석한 결과는 표 10과 같다.

세 군간 비교에서 12주후 RBC, WBC, Hematocrit, Hemoglobin, Platelet 모두 두 군간에 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 정상범위에 있었다.

군내 비교에서도 임상시험약 복용 전후에 유의한 변화가 있었던 항목은 없는 것으로 나타났다.

<표 10> 혈액학적 검사

항목		대조군 (n = 6)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾
RBC (10 ⁶ /μℓ)	0 wk	4.78 ± 0.36	4.56 ± 0.38	4.64 ± 0.35	0.547
	6 wk	4.67 ± 0.42	4.46 ± 0.35	4.69 ± 0.55	0.595
	12 wk	4.79 ± 0.39	4.52 ± 0.33	4.76 ± 0.52	0.445
	12wk-0wk	0.01 ± 0.31	-0.03 ± 0.15	0.11 ± 0.29	0.694
	p-value²⁾	0.950	0.580	0.565	
WBC (10 ³ /μℓ)	0 wk	6.82 ± 1.84	7.04 ± 1.73	5.36 ± 0.78	0.357
	6 wk	6.48 ± 0.90	6.22 ± 1.85	6.34 ± 1.31	0.953
	12 wk	6.85 ± 2.06	6.59 ± 1.68	6.12 ± 1.12	0.845
	12wk-0wk	0.03 ± 0.40	-0.45 ± 1.46	0.76 ± 0.34	0.268
	p-value²⁾	0.860	0.448	0.061	
Hematocrit (%)	0 wk	42.92 ± 2.83	41.63 ± 4.25	41.10 ± 1.15	0.703
	6 wk	41.77 ± 3.29	40.70 ± 3.77	41.03 ± 3.20	0.861
	12 wk	42.98 ± 2.35	41.30 ± 4.14	41.90 ± 2.60	0.667
	12wk-0wk	0.07 ± 2.46	-0.33 ± 1.33	0.80 ± 1.61	0.691
	p-value²⁾	0.950	0.537	0.480	
Hemoglobin (g/dl)	0 wk	14.68 ± 0.98	14.06 ± 1.43	14.13 ± 0.97	0.634
	6 wk	14.27 ± 1.11	13.81 ± 1.25	14.00 ± 1.31	0.800
	12 wk	14.62 ± 0.87	13.87 ± 1.36	14.27 ± 1.16	0.529
	12wk-0wk	-0.07 ± 0.75	-0.19 ± 0.56	0.13 ± 0.31	0.754
	p-value²⁾	0.837	0.410	0.529	
Platelet (10 ³ /μℓ)	0 wk	265.67 ± 50.56	231.14 ± 17.06	235.33 ± 48.00	0.276
	6 wk	238.83 ± 47.29	243.43 ± 23.12	233.33 ± 74.65	0.945
	12 wk	255.17 ± 45.43	239.71 ± 32.88	241.00 ± 90.21	0.847
	12wk-0wk	-10.50 ± 18.55	8.57 ± 35.12	5.67 ± 57.01	0.604
	p-value²⁾	0.224	0.542	0.879	

1)p-value by one way ANOVA

2)p-value by paired t-test

나. 혈액화학적 검사

대조군과 시험군 I (홍국균 발효 검정콩 2.5g), 시험군 II (홍국균 발효 검정콩 5.0g)의 혈액화학적 검사를 분석한 결과는 표 11과 같다.

세 군간 비교에서 12주후 K, Cl, Creatinine, BUN, Uric acid, Ca Glucose, Protein, Albumin, ALP, CK, NA 등 모든 혈액화학적 검사에서 세 군간 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 정상 범위에 있었다.

군내 비교결과 12주후 시험군 I 에서 Creatinine, Protein에서 유의한 차이가 나타났으나 임상 시험약 복용전후 모두 정상범위 안에 있었다.

<표 11 > 혈액화학적 검사

항목	대조군 (n = 6)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾	
K (mmol/L)	0 wk	4.30 ± 0.28	4.11 ± 0.24	4.43 ± 0.55	0.341
	6 wk	4.28 ± 0.29	4.16 ± 0.22	3.93 ± 0.15	0.166
	12 wk	4.17 ± 0.18	1.19 ± 0.26	3.93 ± 0.06	0.227
	12wk-0wk	-0.13 ± 0.37	0.07 ± 0.36	-0.50 ± 0.50	0.139
	p-value ²⁾	0.414	0.618	0.225	
Cl (mmol/L)	0 wk	102.3 3 ± 2.25	103.0 ± 2.83	101.67 ± 1.53	0.722
	6 wk	103.8 3 ± 1.72	103.71 ± 2.06	104.67 ± 1.16	0.743
	12 wk	101.8 3 ± 2.04	102.57 ± 2.00	103.67 ± 0.58	0.403
	12wk-0wk	-0.50 ± 2.43	-0.43 ± 2.76	2.00 ± 2.00	0.345
	p-value ²⁾	0.636	0.695	0.225	
Creatinine (mg/dl)	0 wk	0.82 ± 0.12	0.83 ± 0.15	0.81 ± 0.15	0.979
	6 wk	0.79 ± 0.12	0.79 ± 0.17	0.86 ± 0.20	0.799
	12 wk	0.84 ± 0.15	0.78 ± 0.14	0.87 ± 0.21	0.642
	12wk-0wk	0.02 ± 0.56	-0.04 ± 0.05	0.07 ± 0.06	0.020
	p-value ²⁾	0.421	0.043	0.195	
BUN (mg/dl)	0 wk	13.83 ± 3.00	14.57 ± 2.23	11.00 ± 3.00	0.187
	6 wk	13.00 ± 4.15	13.29 ± 3.40	11.33 ± 1.53	0.719
	12 wk	13.33 ± 3.67	13.14 ± 1.95	12.00 ± 2.65	0.792
	12wk-0wk	-0.50 ± 3.39	-1.43 ± 1.90	1.00 ± 2.00	0.418
	p-value ²⁾	0.733	0.094	0.478	

<표 11> 혈액화학적 검사(계속)

항목		대조군 (n = 6)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾
Uric acid (mg/dl)	0 wk	6.00 ± 0.83	5.31 ± 0.99	5.13 ± 1.12	0.342
	6 wk	6.13 ± 1.03	4.86 ± 1.01	5.73 ± 1.45	0.142
	12 wk	5.95 ± 1.08	5.24 ± 0.92	5.57 ± 1.66	0.543
	12wk-0wk	-0.05 ± 0.72	-0.07 ± 0.36	0.43 ± 0.64	0.422
	p-value ²⁾	0.872	0.622	0.363	
Ca (mg/dl)	0 wk	9.87 ± 0.69	9.27 ± 0.24	9.13 ± 0.25	0.059
	6 wk	9.70 ± 0.49	9.03 ± 0.44	9.13 ± 0.23	0.040
	12 wk	9.67 ± 0.56	9.06 ± 0.40	9.03 ± 0.06	0.055
	12wk-0wk	-0.20 ± 0.50	-0.21 ± 0.37	-0.10 ± 0.26	0.920
	p-value ²⁾	0.374	0.178	0.580	
Glucose (mg/dl)	0 wk	93.67 ± 9.71	95.29 ± 7.52	89.33 ± 1.53	0.566
	6 wk	89.67 ± 10.01	95.71 ± 11.37	83.67 ± 2.08	0.229
	12 wk	91.17 ± 10.17	91.89 ± 8.24	81.67 ± 4.73	0.238
	12wk-0wk	-2.50 ± 9.85	-3.43 ± 9.43	-7.67 ± 6.11	0.723
	p-value ²⁾	0.562	0.373	0.162	
Protein (g/dl)	0 wk	7.65 ± 0.33	7.60 ± 0.42	7.40 ± 0.46	0.670
	6 wk	7.40 ± 0.30	7.43 ± 0.63	7.40 ± 0.30	0.993
	12 wk	7.62 ± 0.44	7.33 ± 0.54	7.27 ± 0.58	0.446
	12wk-0wk	-0.03 ± 0.58	-0.27 ± 0.22	-0.13 ± 0.40	0.601
	p-value ²⁾	0.893	0.018	0.625	
Albumin (g/dl)	0 wk	4.82 ± 0.26	4.43 ± 0.19	4.30 ± 0.35	0.015
	6 wk	4.68 ± 0.15	4.30 ± 0.24	4.37 ± 0.35	0.031
	12 wk	4.78 ± 0.31	4.30 ± 0.23	4.30 ± 0.30	0.015
	12wk-0wk	-0.33 ± 0.38	-0.13 ± 0.15	0.00 ± 0.17	0.721
	p-value ²⁾	0.837	0.063	1.000	
ALP (IU/L)	0 wk	65.67 ± 16.94	66.71 ± 20.21	66.00 ± 19.47	0.995
	6 wk	65.83 ± 20.31	65.00 ± 19.53	68.67 ± 19.86	0.965
	12 wk	66.00 ± 22.54	64.86 ± 19.90	60.67 ± 21.08	0.937
	12wk-0wk	0.33 ± 10.44	-1.86 ± 5.67	-5.33 ± 2.31	0.584
	p-value ²⁾	0.941	0.419	0.057	

<표 11> 혈액화학적 검사(계속)

항목		대조군 (n = 6)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾
CK (IU/L)	0 wk	108.00 ± 42.63	156.14 ± 139.53	126.67 ± 44.50	0.690
	6 wk	220.67 ± 140.15	198.86 ± 293.04	174.00 ± 81.56	0.954
	12 wk	153.50 ± 91.18	141.14 ± 144.33	128.33 ± 30.53	0.950
	12wk-0wk	45.50 ± 76.80	-15.00 ± 39.98	1.67 ± 23.71	0.180
	p-value²⁾	0.206	0.359	0.914	
Na (mmol/L)	0 wk	139.83 ± 2.48	139.29 ± 1.89	138.67 ± 2.52	0.758
	6 wk	140.00 ± 1.41	139.71 ± 1.25	142.33 ± 2.08	0.059
	12 wk	139.33 ± 2.16	139.00 ± 1.73	140.33 ± 0.58	0.574
	12wk-0wk	-0.50 ± 2.59	-0.29 ± 1.50	1.67 ± 2.52	0.351
	p-value²⁾	0.656	0.631	0.370	

1)p-value by one way ANOVA

2)p-value by paired t-test

다. 간기능검사

대조군과 시험군 I(홍국균 발효 검정콩 2.5g), 시험군 II(홍국균 발효 검정콩 5.0g)의 간기능 검사를 분석한 결과는 표 12와 같다.

세 군간 비교에서 12주후 AST에서 유의한 차이가 나타났으나, 세 군 모두 정상범위 안에 있었고, ALT, γ -GTP,는 세 군간에 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 정상범위에 있었다.

군내 비교에서도 임상시험약 복용 전후에 유의한 변화가 있었던 간기능검사 항목은 없는 것으로 나타났다.

<표 12> 간기능검사

항목		대조군 (n = 6)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾
AST (GOT, IU/L)	0 wk	22.00 ± 5.18	27.86 ± 8.07	25.67 ± 1.53	0.289
	6 wk	25.17 ± 4.07	28.57 ± 14.51	34.33 ± 17.21	0.582
	12 wk	28.83 ± 7.41	25.43 ± 9.43	22.67 ± 1.53	0.531
	12wk-0wk	6.83 ± 7.91	-2.43 ± 3.31	-3.00 ± 3.00	0.019
	p-value²⁾	0.088	0.100	0.225	
ALT (GPT, IU/L)	0 wk	27.17 ± 9.15	28.00 ± 10.99	27.00 ± 3.00	0.982
	6 wk	27.67 ± 11.84	28.71 ± 14.60	40.33 ± 30.83	0.561
	12 wk	27.50 ± 6.16	24.57 ± 11.03	20.67 ± 6.03	0.552
	12wk-0wk	0.33 ± 6.25	-3.43 ± 4.86	-6.33 ± 4.93	0.229
	p-value²⁾	0.901	0.111	0.156	
γ -GTP (mg/dl)	0 wk	45.17 ± 39.94	30.43 ± 10.26	41.33 ± 28.54	0.634
	6 wk	35.50 ± 28.19	29.00 ± 8.56	43.33 ± 29.02	0.630
	12 wk	28.33 ± 15.46	27.86 ± 10.51	27.67 ± 19.01	0.997
	12wk-0wk	-16.83 ± 32.00	-2.57 ± 4.83	-13.67 ± 9.71	0.452
	p-value²⁾	0.254	0.208	0.135	

1)p-value by one way ANOVA

2)p-value by paired t-test

라. 혈압, 맥박

대조군과 시험군 I(홍국균 발효 검정콩 2.5g), 시험군 II(홍국균 발효 검정콩 5.0g)의 혈압 및 맥박검사를 분석한 결과는 표 13과 같다.

세 군간 비교에서 12주후 최고혈압, 최저혈압, 맥박 모두 두 군간에 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 정상범위에 있었다.

군내 비교에서는 세 군 모두 임상시험 전후에 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 임상시험 전후 모두 정상범위 내에 있었다.

<표 13> 최고혈압, 최저혈압, 맥박

항목	대조군 (n = 6)	시험군 I (n = 7)	시험군 II (n = 3)	p-value ¹⁾	
최고혈압 (mmHg)	0 wk	134.00 ± 16.83	130.00 ± 8.00	139.33 ± 17.04	0.411
	6 wk	123.83 ± 13.83	127.57 ± 13.29	120.33 ± 24.58	0.296
	12 wk	123.67 ± 13.66	118.71 ± 12.47	123.67 ± 13.58	0.989
	12wk-0wk	-10.33 ± 18.18	-11.29 ± 16.52	-15.67 ± 13.32	0.745
	p-value ²⁾	0.223	0.121	0.178	
최저혈압 (mmHg)	0 wk	83.83 ± 11.69	83.43 ± 9.03	87.33 ± 17.24	0.472
	6 wk	76.50 ± 8.46	79.57 ± 8.08	79.33 ± 19.43	0.118
	12 wk	78.00 ± 12.30	79.86 ± 9.72	83.33 ± 7.51	0.798
	12wk-0wk	-5.83 ± 13.82	-3.57 ± 12.27	-4.00 ± 9.85	0.777
	p-value ²⁾	0.434	0.471	0.555	
맥박 (회)	0 wk	70.17 ± 11.62	72.00 ± 4.55	75.67 ± 1.53	0.022
	6 wk	69.50 ± 12.88	68.00 ± 4.97	67.33 ± 8.96	0.019
	12 wk	74.33 ± 13.31	68.00 ± 4.28	73.67 ± 12.34	0.033
	12wk-0wk	4.17 ± 6.88	-4.00 ± 4.04	-2.00 ± 13.11	0.052
	p-value ²⁾	0.198	0.480	0.816	

1)p-value by one way ANOVA

2)p-value by paired t-test

마. 갑상선 기능 기능검사, 소변검사, 임신반응검사, 심전도

갑상선 기능검사인 TSH는 스크리닝 방문시 1회만 검사하였는데 임상시험에 등록된 모든 피험자가 정상범위에 있었다.

가임기 여성에게만 실시한 임신반응검사에서 양성반응이 나타난 피험자는 없었고, 소변검사에서도 모든 피험자가 정상범위에 있었다.

심전도 검사는 스크리닝 방문과 종료방문시 실시하였는데 모든 피험자가 정상범위에 있었다.

5. 이상반응

임상시험 기간동안 대조군과 시험군 I (홍국균 발효 검정콩 2.5g), 시험군 II (홍국균 발효 검정콩 5.0g)에 나타난 이상반응은 표 14와 같다. 감기, 두드러기, 복통, 설사, 장염 등의 이상반응이 발생하였으며, 대조군 4건, 시험군 I 6건, 시험군 II 3건이 발생하였다.

<표 14> 이상반응

	대조군	시험군 I	시험군 II
감기	1	2	
두드러기		1	
복통	1		1
비염		1	
설사	1		1
우울감			1
입안건조	1		
장염		1	
팔저림		1	
총 건수	4	6	3

6. 결론

임상시험 대상자 총 30명 중 임상시험을 모두 완료한 모든 대상자는 총 16명, 진행중인 대상자 4명, 중도탈락한 대상자가 10명이었다. 중도탈락 사유는 모두 동의철회였다.

따라서, 이번 분석에서는 임상시험을 모두 완료한 대조군 6명, 홍국균 발효 검정콩 2.5g군(이하 시험군 I) 7명, 홍국균 발효 검정콩 5.0g군(이하 시험군 II) 3명, 즉 총 16명만이 분석대상에 포함되었다.

가. 임상시험을 모두 완료한 대상자를 분석한 결과

(1) 1차 유효성 평가분석 (체중, 체지방률, 체지방량, 총 콜레스테롤)

- 12주 후의 세 군의 체중을 비교한 결과 시험군 I 은 1.69kg 감소, 시험군 II는 2.83kg 감소, 대조군은 2.33kg 감소하여 시험군 II가 가장 많이 감소하고, 대조군, 시험군 I 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세군의 체지방률과 체지방량을 비교한 결과 시험군 I 은 0.30%(679.86g) 감소, 시험군 II는 0.20%(963.00g)감소, 대조군은 1.53%(1942.67g) 감소하여 대조군, 시험군 I, 시험군 II 순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세 군의 총 콜레스테롤을 비교한 결과 시험군 II는 53.67mg/dl 감소, 시험군 I 은 26.71mg/dl 감소, 대조군은 17.67mg/dl 감소하여 시험군 II가 가장 많이 감소하고, 시험군 I, 대조군 순으로 감소하였다. 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 용량이 높을수록 총 콜레스테롤이 감소하는 경향을 보였다.

(2) 2차 유효성 평가분석 (허리둘레)

12주 후의 세 군의 허리둘레를 비교한 결과 시험군 I 은 2.86cm 감소, 시험군 II는 3.00cm 감소, 대조군은 3.03cm 감소하여 대조군에서 가장 많이 감소한 것으로 나타났고, 시험군 II, 시험군 I 순으로 감소하였으나 세 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

나. 임상시험을 종료한 대상자 중 6kg이상 체중이 감소된 자를 제외하고 추가분석한 결과

(1) 1차 유효성 평가분석 (체중, 체지방률, 체지방량, 총 콜레스테롤)

- 12주 후의 세 군의 체중을 비교한 결과 시험군Ⅱ는 2.83kg 감소하고, 시험군 I은 1.69kg 감소, 대조군은 1.56kg 감소하여 시험군Ⅱ가 가장 많이 감소하고, 시험군 I, 대조군 순으로 감소하였다. 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나 용량이 높을수록 체중이 더 많이 감소한 경향을 보였다.
- 12주 후의 세 군의 체지방률과 체지방량을 비교한 결과 시험군 I은 0.30%(679.86g) 감소, 시험군Ⅱ는 0.20%(963.00g) 감소, 대조군은 1.86%(1912.60g) 감소하여 대조군, 시험군 I, 시험군Ⅱ순으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- 12주 후의 세 군의 총 콜레스테롤을 비교한 결과 시험군Ⅱ는 53.67mg/dl 감소, 시험군 I은 26.71mg/dl 감소, 대조군은 17.80mg/dl 감소하여 시험군Ⅱ가 가장 많이 감소하고, 시험군 I, 대조군 순으로 감소하였다. 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 용량이 높을수록 총 콜레스테롤이 감소하는 경향을 보였다.

(2) 2차 유효성 평가분석 (허리둘레)

12주 후의 세 군의 허리둘레를 비교한 결과 시험군 I은 2.86cm 감소, 시험군Ⅱ는 3.00cm 감소, 대조군은 3.04cm 감소하여 대조군에서 가장 많이 감소한 것으로 나타났고, 시험군Ⅱ, 시험군 I 순으로 감소하였으나 세 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

최소한의 피험자를 대상으로 하는 Pilot study의 특성상 평가변수에 대한 통계적 유의성을 도출 하는 데에는 한계가 있었다. 그러나 다른 군에 비해 홍국균 발효 검정콩 5.0g군에서 체중이 더 많이 감소하는 경향을 보였다. 또한 총 콜레스테롤에서는 홍국균 발효 검정콩의 용량이 높을수록 콜레스테롤 감소효과가 높아지는 경향이 나타났다.

이번 Pilot study의 결과로 보았을 때, 홍국균 발효 검정콩 5.0g이 홍국균 발효 검정콩 2.5g에 비해 체중감량에 더 우수한 기능성을 있을 것으로 판단되므로, 피험자수를 확대하여 홍국균 발효 검정콩 5.0g의 체중감량 기능성을 입증하는 것이 의미가 있을 것으로 사료된다.

이에 따라 현재 60명의 피험자를 대상으로 홍국균 발효 검정콩 5.0g의 체중감량 기능성을 입증하기 위한 위약대조 임상시험을 진행 중에 있다.

제5절. *Monascus*속 균을 이용한 간기능 개선 및 체중조절 효과를 가진 후 발효차 개발과 제품화

1. *Monascus*속 미생물을 이용한 후 발효차의 제조

가. 재료 및 균주

실험에 사용한 녹차(*Aspalathus linearis*)는 2012년 4월에 경상남도 하동군에서 첫물(1지2엽)을 채취하여 사용하였으며, 균주는 한국종균협회에서 분양받은 *M. pilosus* KCCM 60084를 사용하였다.

나. 차의 최적 발효 조건

차의 발효는 채취한 녹차 잎을 하루 동안 위조시킨 다음 250℃의 덩음 솥에서 넣어 덩음과 유념을 5회 반복하여 덩음차(CHA)를 조제하였다. 이 덩음차에 증류수를 가하여 수분함량이 37.5%가되게 조정된 후 2 L들이 polypropylene bag에 500 g씩 넣고 air filter를 부착한 후 12 1℃에서 90분간 가압살균하였다. 살균한 후는 무균상으로 옮겨 실온이 되도록 식히고 미리 준비한 *M. pilosus* 배양액 50 mL씩을 혼합하여 30℃의 incubator에서 15일간 배양하여 발효차(mCHA)를 제조하였다. 발효가 끝난 차는 40℃에서 최종 수분함량이 2% 내외가 되도록 충분히 건조시켜 실험에 사용하였다. *M. pilosus* 배양액은 5% glucose, 2% peptone, 0.8% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.2% CH₃COOK, 0.1% NaCl를 함유하는 액에 균주를 접종하여 150 rpm의 진탕 배양기에서 10일간 배양하여 사용하였다.

다. *Monascus*속 미생물을 이용한 후 발효차의 제조 후 항산화활성의 변화

(1) 열수추출

상기에서 조제한 건조차잎, 덩음차잎 및 발효차잎의 1~5 g에 증류수를 가하여 100 mL로 채워 1~5% 용액을 만든 후 100℃에서 10분간 추출하였으며, Whatman No 2 여과지로 여과하여 열수추출액을 조제하였으며 total polyphenol 및 total flavonoid 함량과 항산화능 분석용 시액으로 사용하였다.

(2) 총 폴리페놀 함량

Dewanto 등(32)의 방법에 따라 시액 100 μL에 2% sodium carbonate 2 mL과 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 μL을 가한 후 720 nm에서 흡광도를 측정하였으며 gallic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 검량선에 의하여 함량을 산출하였다.

(3) 총 플라보노이드 함량

시료 중의 총플라보노이드 함량은 Meda 등(2005)의 방법에 따라 시료 일정량에 2% AlCl₃ 1.6 mL를 가해 실온에서 10분간 방치한 다음 파장 415nm에서 측정하였다. 시료중 총플라보노이드의 함량은 naringin 표준검량선에 준해 계산하였다.

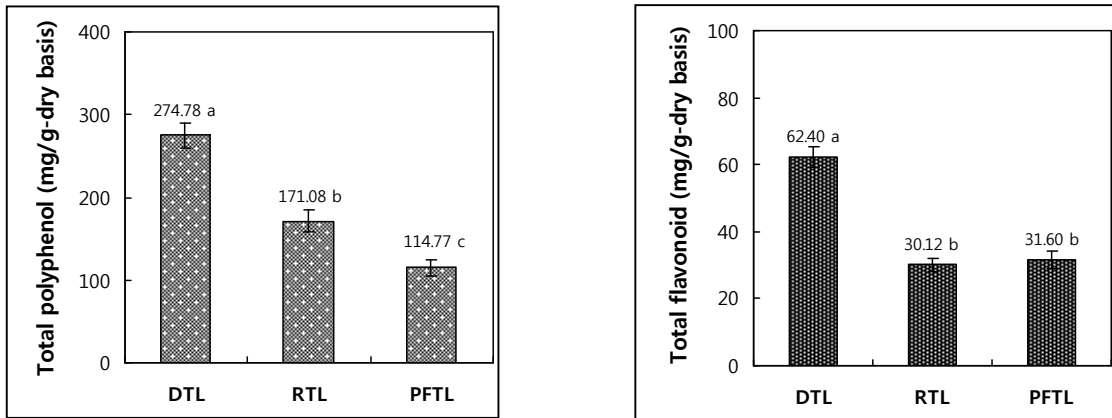


Fig. 1. 홍국발효에 의한 후 발효차에서의 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량 변화

(4) 전자공여활성 (electron donating ability: EDA)

Blois(1958)의 방법에 따라 시료 추출액 0.2 mL에 0.4 mM DPPH(1,1diphenyl-2-picryl-hydrazyl)용액 0.8 mL를 가하여 vortex로 혼합하고 10분간 방치 한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, $EDA(\%) = 100 - [(OD \text{ of sample}/OD \text{ of control}) \times 100]$ 에 의하여 활성도를 산출하였다.

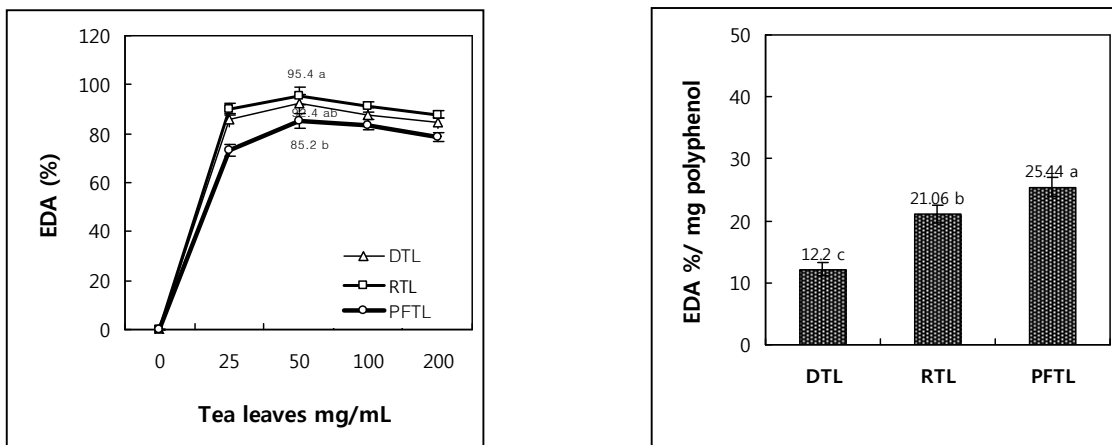


Fig. 2. 홍국발효에 의한 후 발효차에서의 EDA(electron donating ability)함량의 변화

(5) Superoxide dismutase (SOD) 유사활성

Martin 등 (1987)의 방법에 따라 0.1mM EDTA 함유 50mM phosphate buffer(pH 7.4) 2.94 mL에 시료 일정량을 가해 25°C에서 5분간 가온한 다음 5mM hematoxylin 용액을 가해 10분간 반응시켜 560nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성도는 hematoxylin의 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 계산하였다.

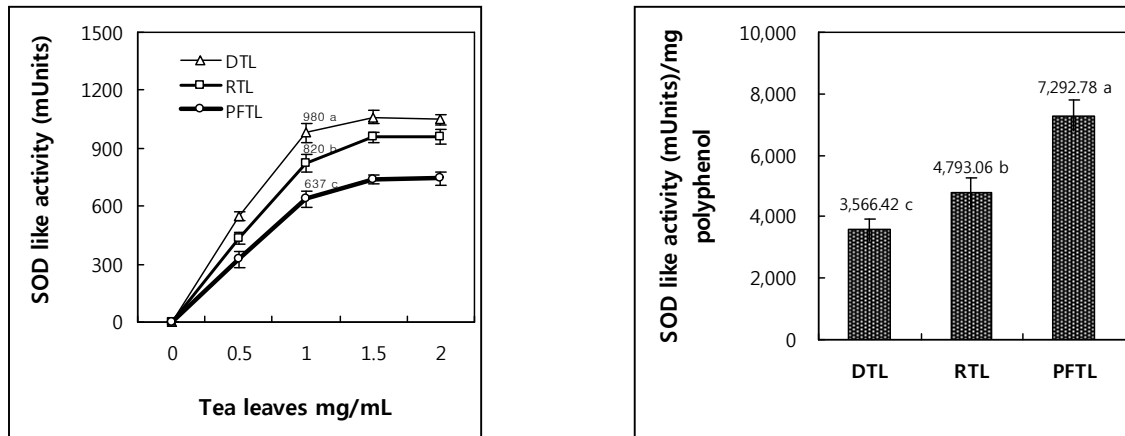


Fig. 3. 홍국발효에 의한 후 발효차에서의 SOD like activity의 변화

(6) Xanthine oxidase (XO) 저해활성

Özer 등(1999)의 방법에 따라 신선한 우유로부터 부분 정제한 XO를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 신선한 우유 1 L를 하루 동안 4°C로 냉각한 후 EDTA와 toluene을 최종 농도가 각각 2mM 및 3%(v/v)되게 첨가하여 Hot & Stirrer(MS300HS, Misung Scientific Co Ltd, Korea)로 30분간 교반, 냉각하는 조작을 3회 반복하였다. 다음에 6겹의 cheese cloth로 여과한 여액에 38% ammonium sulfate를 포화시킨 후 8,000×g에서 15분간 원심분리하여 상정액을 얻었다. 상정액에 다시 50% ammonium sulfate를 포화시킨 후 침전물을 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻었으며, 0.1mM EDTA를 함유하는 10 mM tris·-HCl(pH 7.6)-5mM 2-mercaptoethanol (buffer A) 용액에 현탁시켰다. 이 현탁액은 dialysis tube(cut off MW 20,000)에 넣어 0.1M EDTA를 함유하는 완충용액(A용액) 으로 12시간동안 투석하였다. 투석용액은 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 효소용액을 얻었다. XO 효소반응액은 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) 일정량에 차잎 추출액 50~100 μL, 효소액 100 μL을 가하여 30°C에서 5분간 preincubation시킨 후 최종 60 μM xanthine 이 되게 용액을 가하여 5분간 반응시킨 후 292nm에서의 흡광도를 측정하였다. 대조구는 물추출물의 경우는 차잎추출물 대신에 증류수를 사용하였다. XO 저해활성은 차잎 열수 추출물로 인한 흡광도 저해율(%)로 나타내었다.

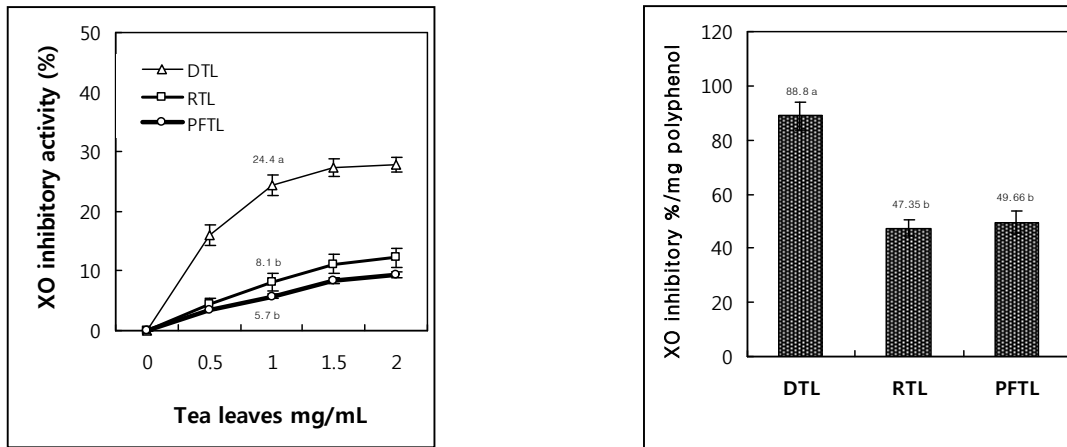


Fig. 4. 홍국발효에 의한 후 발효차에서의 XO(xanthine oxidase) 저해활성 비교

(7) Nitrite scavenging activity

Kato *et al*(1987)의 방법에 따라 1 mM NaNO 용액 1 mL에 시액 1 mL를 가하고 0.1 N HCl과 0.2 M citrate buffer(pH 2.5)를 이용하여 pH 1.2, 2.5 및 6.0으로 조절한 다음 증류수를 가하여 총 부피를 10 mL로 조정하였다. 다음에 37°C에서 1시간 반응시킨 후 1 mL를 취하여 2% 초산용액 3 mL와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 mL을 순차적으로 가한 후 실온에서 15분간 방치, 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 Griess reagent 대신에 증류수를 사용하였으며 계산식, nitrite scavenging activity(%) = 100 - [(OD of sample/OD of control) x 100]에 의하여 산출하였다.

(8) Hydrogen peroxide 함량

시료 중의 hydrogen peroxide 함량은 Jiang 등(1990)의 방법에 따라 50mM phosphate buffer(pH 7.4)에 일정량의 시료를 첨가한 다음 FOX-1 reagent를 가해 25°C에서 30분간 반응시킨 다음 560nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료중의 hydrogen peroxide 함량은 표준검량선에 준해 계산하였다.

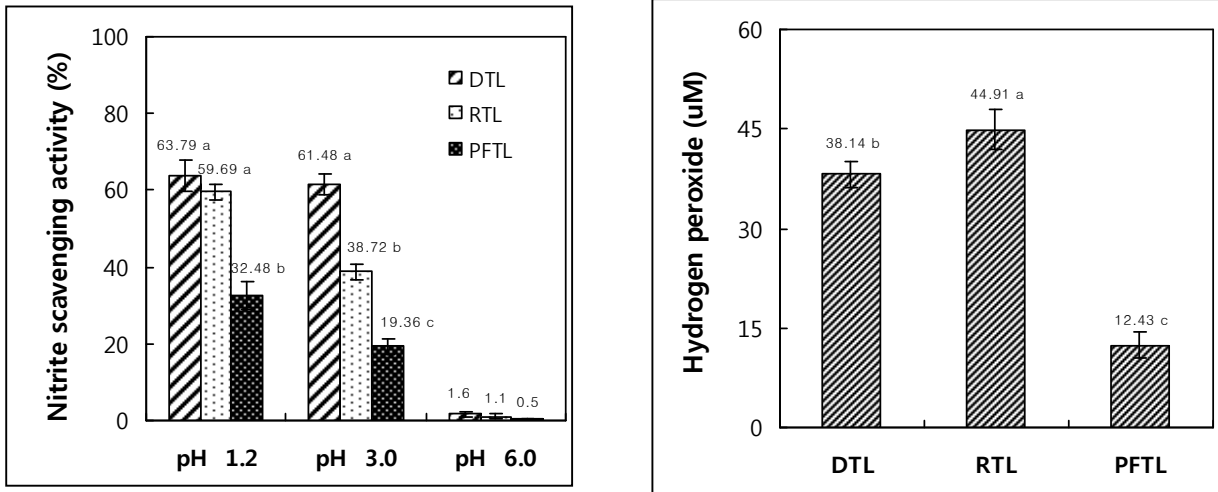


Fig. 5. 홍국발효에 의한 후-발효차에서의 nitrite 소거능과 hydrogen peroxide 농도의 변화

(9) 관능검사

관능검사는 식품학을 전공하는 25명의 관능요원에 의하여 5점 척도법(Herbet & Jeol 1993)으로 단맛, 신맛, 쓴맛, 구수한맛은 강도로 아주 낮다(1점), 낮다(2점), 보통이다(3점), 강하다(4점), 아주강하다(5점)로 나타내었으며. 냄새기호도, 색상기호도 및 종합적 기호도는 아주 싫다(1점), 싫다(2점), 보통이다(3점), 좋다(4점), 아주 좋다(5점)로 평가하였다.

Table 1. 홍국 발효차의 관능평가결과

Sensory quality of 1% hot water extracts of post-fermented tea leaves by *Monascus pilosus*

Sensory attributes	DTL	RTL (Green Tea)	PFTL (Post-fermented Tea)
Sweet taste ¹⁾	1.52±0.23 ^{c,9)}	2.66±0.19 ^b	3.10±0.23 ^a
Sour taste ²⁾	1.33±0.18 ^a	1.40±0.12 ^a	1.67±0.19 ^a
Bitter taste ³⁾	2.49±0.18 ^a	2.35±0.17 ^a	1.50±0.20 ^b
Astringent taste ⁴⁾	4.13±0.25 ^a	2.85±0.15 ^b	1.66±0.23 ^c
Savory taste ⁵⁾	2.15±0.27 ^b	3.80±0.32 ^a	3.73±0.22 ^a
Flavor acceptability ⁶⁾	1.68±0.34 ^b	3.75±0.30 ^a	3.68±0.27 ^a
Color acceptability ⁷⁾	2.25±0.29 ^c	3.02±0.22 ^b	4.45±0.25 ^a
Overall acceptability ⁸⁾	2.16±0.14 ^c	3.50±0.21 ^b	4.12±0.28 ^a

¹⁻⁵⁾Very strong(5 points), strong(4 points), moderate(3 points), low(2 points), ver low(1 point).

⁶⁻⁷⁾Very good(5 points), good(4 points), modrate(3 poinnts), poor(2 points), very poor (1 points). ⁹⁾Values are mean±standard deviations of 25 panels. Different superscripts within a row indicate significant differences($p<0.05$).

Sensory characteristics of teas

Attributes	Teas ¹⁾						
	FT	TM15	TM30	PU	FM	MM15	MM30
Sweet taste ²⁾	2.67	3.56	3.15	3.49	2.88	3.02	2.54
Sour taste ³⁾	1.41	1.85	2.06	1.54	1.65	1.85	1.89
Astringent taste ⁴⁾	2.84	1.35	1.20	1.40	1.66	1.28	1.24
Savory taste ⁵⁾	3.76	3.25	2.84	2.95	4.05	3.55	3.01
Flavor acceptability ⁶⁾	3.70	3.50	3.15	2.45	3.65	3.17	2.98
Color acceptability ⁷⁾	2.85	3.78	3.80	4.15	3.05	3.44	3.65
Overall acceptability ⁸⁾	3.22	4.05	3.84	4.11	3.03	3.55	3.00

¹⁾See Fig. 1 and 2. ²⁻⁵⁾Values are mean \pm standard deviation of 25 panels evaluated from very low(1 point) to very strong(5 points). Different superscripts at the same row(a-c) indicate significant differences ($p<0.05$). ⁶⁻⁸⁾Values are mean \pm standard deviation of 10 panels evaluated from very poor(1 point) to very good(5 points). ⁹⁾Different superscripts at the same row(a-c) indicate significant differences($p<0.05$).

건조차잎과 덩음차잎 및 발효차잎의 1% 열수추출액에 대하여 관능검사를 실시한 결과는 Table 1과 같다. 발효차잎에서는 건조차잎이나 덩음차잎에 비하여 단맛이 유의적으로 높았으며, 구수한 맛은 덩음차잎과 비슷하였다. 그러나 쓴맛과 떫은맛은 유의적으로 감소되었으며 신맛은 모두 2점 이하로 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 냄새에 대한 기호도는 건조차잎 1.68점, 덩음차잎과 발효차잎은 각각 3.80점 및 3.75점으로 발효차의 경우도 덩음차잎과 대등한 기호도를 나타내었다. 이러한 현상은 중국산 보이차에서 냄새에 대한 기호도가 다소 낮게 평가되는 점과는 차이가 있는 것으로 이는 *M. pilosus*에 의한 차의 발효가 실용적 면에서 가치가 있음을 시사한다. 색상 기호도는 발효차잎이 4.45점으로 덩음차잎의 3.02점에 비하여 기호성이 현저하게 높은 것으로 평가되었으며, 밝은 적갈색을 띠어 시중의 수입산 보이차와 유사한 색깔을 나타내었으며 5~10회 추출시에도 색소성분과 맛이 우러나오는 특성이 있었다(without data). 종합적인 기호도 역시 발효차잎은 4.12점으로 높게 평가되었으나 덩음차는 3.50점, 건조차잎은 2.16점으로 평가되었다

라. 홍국 최적 발효에 의한 후-발효차에서의 항산화 활성의 변화

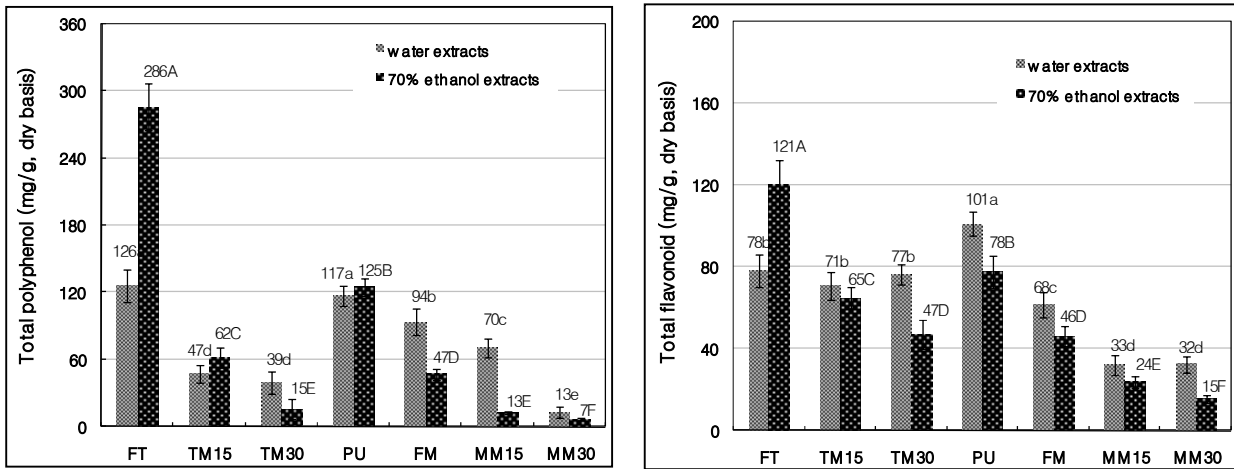


Fig. 6. 홍국 최적 발효에 의한 후-발효차에서의 총 폴리페놀과 플라보노이드의 변화

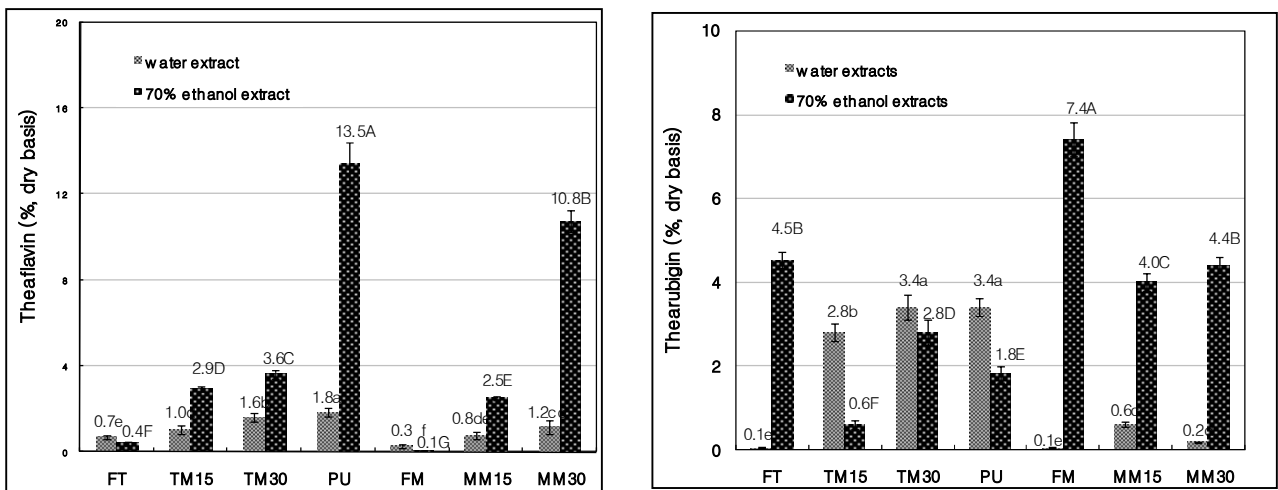


Fig. 홍국 최적 발효에 의한 후-발효차에서의 theaflavin and thearubigin농도의 변화

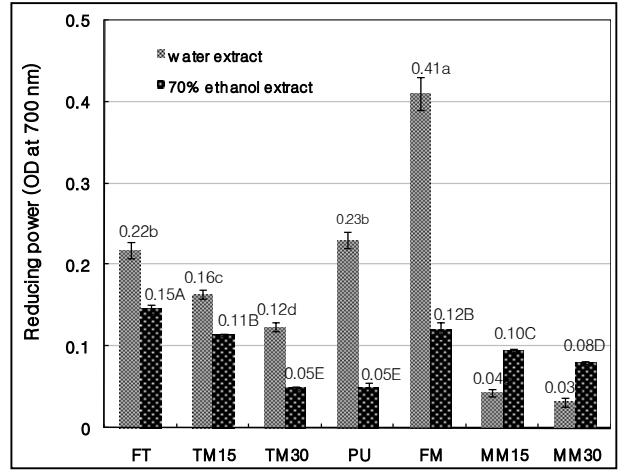
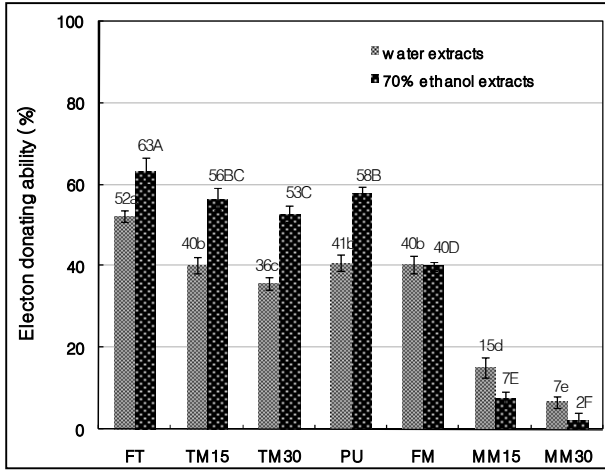


Fig. 7. 홍국 최적 발효에 의한 후-발효차에서의 전자 공여능과 환원력의 변화

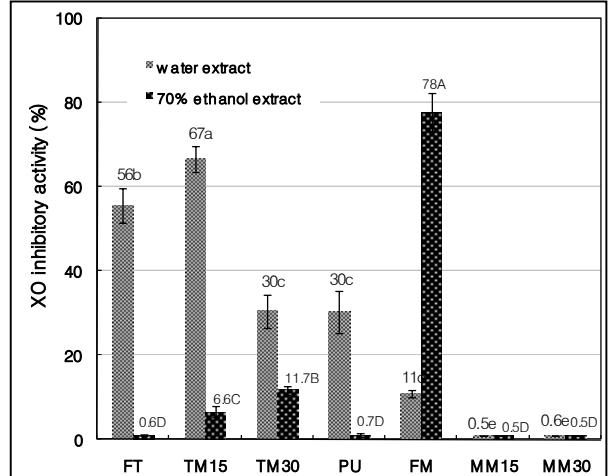
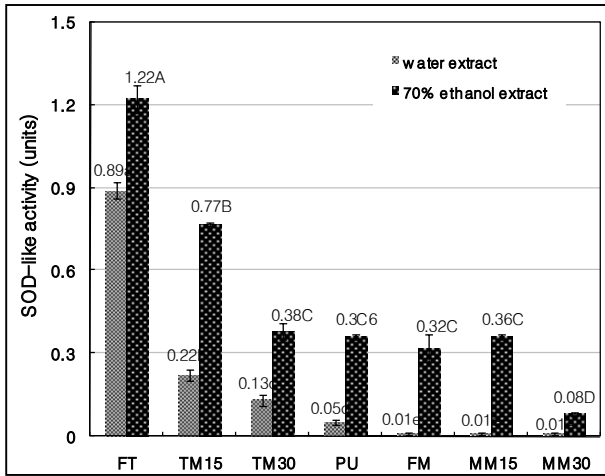


Fig. 8. 홍국 최적 발효에 의한 후-발효차에서의 SOD-like 활성과 xanthine oxidase 활성의 변화

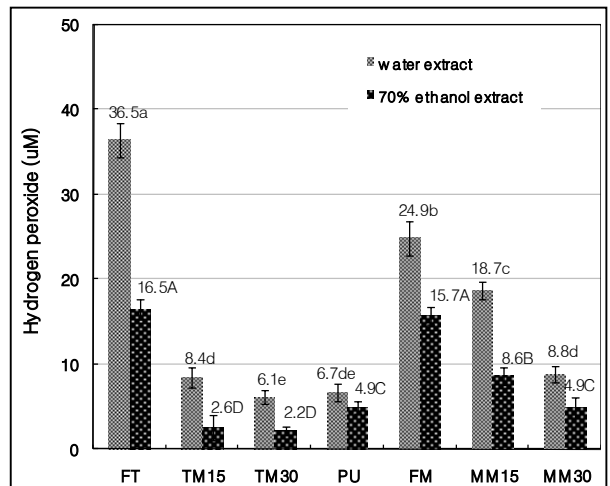
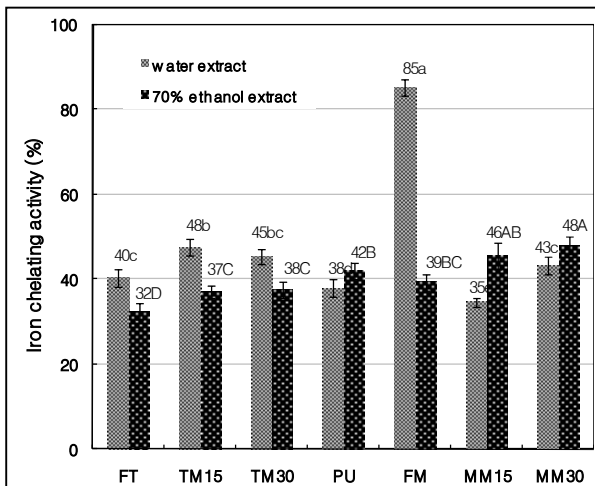


Fig. 9. 홍국 최적 발효에 의한 후-발효차에서의 Iron chelating 활성과 hydrogen peroxide량의 변화

2. 동물에서의 후-발효차에 의한 체중조절 효과 및 항산화활성

가. 실험동물

실험동물은 4주령의 평균체중 21-24 g의 ICR(Crljori: CD-1), SPF/VAF outbred mice (Orient Ltd., Sungnamsi, Korea)를 기본사료인 5L79 diets (PMI Nutrition, Brentwood, LA)로 1주일간 사육하여 환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 실험군은 기본사료만을 급여한 정상군(NC), 기본사료에 lard를 37.5%(w/w) 혼합한 고지방식이 대조군 (HC), 기본사료에 lard 37.5%(w/w)와 비발효 녹차를 2% 혼합한 식이군(CHA) 및 기본사료에 lard 37.5%(w/w)와 *M. pilosus*로 후발효시킨 발효차를 2% 혼합한 식이군(mCHA)의 4개군(6마리/군)으로 구분하여 7주간 사육하였다 (Table 1).

실험식은 1주일에 한 번씩 제조하여 4°C에서 보관하면서 매일 신선한 식이를 공급하였다. 사육장은 stainless steel cage를 사용하였고, 온도 및 습도는 23±2°C, 60±5%로 조정하였으며, 명암주기는 12시간 간격으로 설정하고, 물과 사료는 자유 섭취시켰다.

나. 식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이효율 측정

체중과 식이섭취량은 전 실험기간 동안 매일 일정시간에 측정하였으며, 식이효율(feed efficiency ratio, FER)은 1주간의 체중증가량을 1주간의 식이섭취량으로 나눈 값으로 하였다.

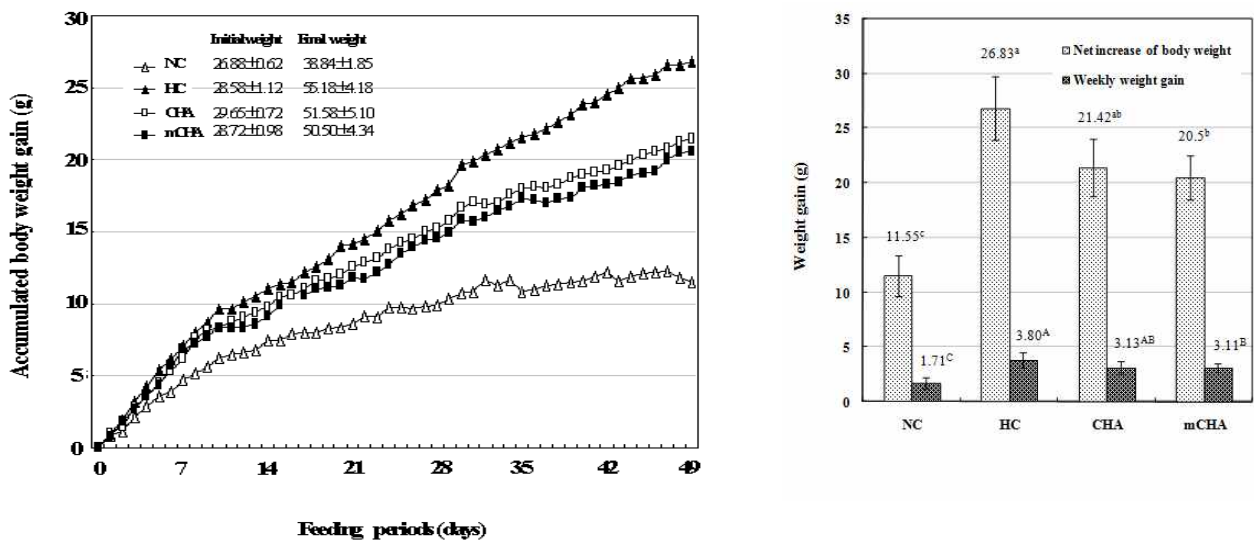


Fig. 10. 7주간 고지방 식이에서 홍국발효 후-발효차와 녹차간의 체중변화 비교

다. 혈청 지질함량

혈청중성지질, 총콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량은 kit 시약(AM 157S-K, AM 202-K, AM 203-K, Asanpharm Co., Korea)으로 측정하였으며, LDL-콜레스테롤함량은 Friedewald et al (1972)의 방법에 따라 계산하였다. Atherogenic index(AI)는 계산식 (total

cholesterol - HDL-cholesterol) / HDL-cholesterol에 의하여 산출하였다.

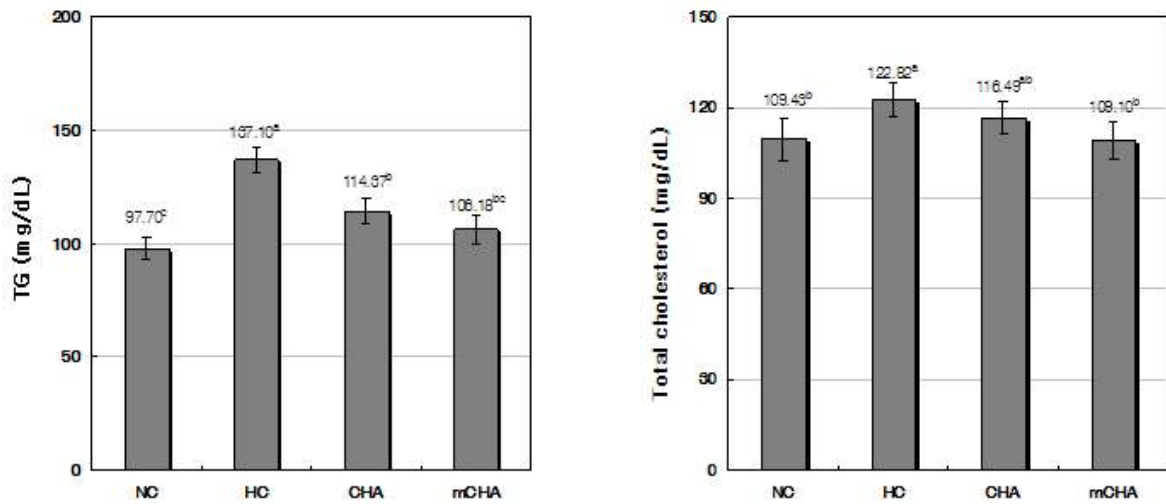


Fig. 11. 고지방 식이에서 후-발효차와 녹차에 의한 혈청내의 중성지질(TG)과 총콜레스테롤 함량 비교

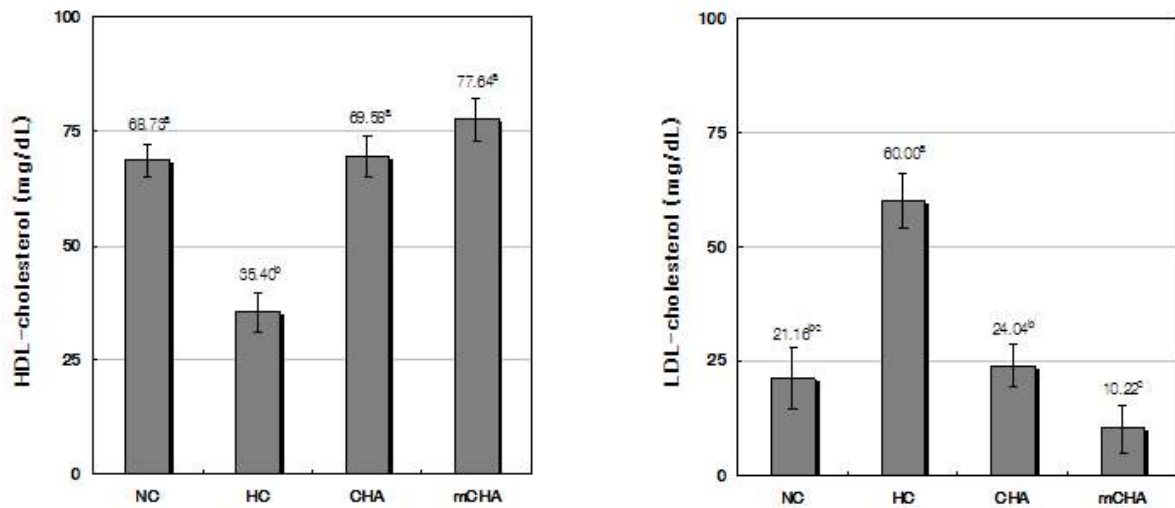


Fig. 12. 고지방 식이에서 후-발효차와 녹차에 의한 혈청내의 HDL-cholesterol 과 LDL-cholesterol 함량비교

라. 효소활성 측정 시료 준비

7주간 사육한 mouse는 물만 주고 12시간동안 금식시킨 후 ether 마취 하에서 복부 대동맥 으로부터 채혈한 다음, 병냉의 생리식염수로 간을 관류하고 장기를 적출 한 후 습기를 제거하고 무게를 측정하였다. 적출한 간 조직 일정량에 4배량의 병냉의 0.25 M sucrose 용액을 가하여 마쇄한 균질액을 10,000×g에서 30분간 원심분리한 다음 postmitochondrial fraction을 취해 효소 활성도 측정에 이용하였다. 채취한 혈액은 실온에서 응고시킨 다음 4℃, 2,500×g에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 분리한 후 -70℃에 두면서 분석용 시료로 사용하였다.

마. 혈청 ALT 활성의 측정

혈청 ALT (alanine aminotransferase) 활성은 Reitman과 Frankel (1957)의 방법에 따라 조제된 kit시약 (Asan Pham., Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였으며 효소의 활성은 혈청 1 mL 당 분당 NADH의 흡광도를 0.001 감소시키는 Karmen unit로 나타내었다.

바. 간 조직 GSH 및 LPO의 함량 측정

간 조직 GSH (glutathione)의 함량은 Ellman (1959)의 방법에 따라 일정량의 간 조직 마쇄균질액에 5,5'-dithibis (2-nitrobenzoic acid)를 가하여 생성되는 thiophenol의 흡광도를 측정하였으며 간 조직 g당 환원형 GSH μ mole로 나타내었다. LPO (lipid peroxide)의 함량은 Ohkawa 등 (1979)의 방법에 따라 일정량의 간 조직 마쇄균질액에 thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가하여 반응시킨 후 n-butanol을 가하여 이행되는 TBA-reactive substance를 흡광도 532 nm에서 측정한 다음 분자흡광계수 ($\epsilon=1.5 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$)를 이용하여 함량을 산출하였으며 간 조직 g 당 malondialdehyde nmole로 나타내었다.

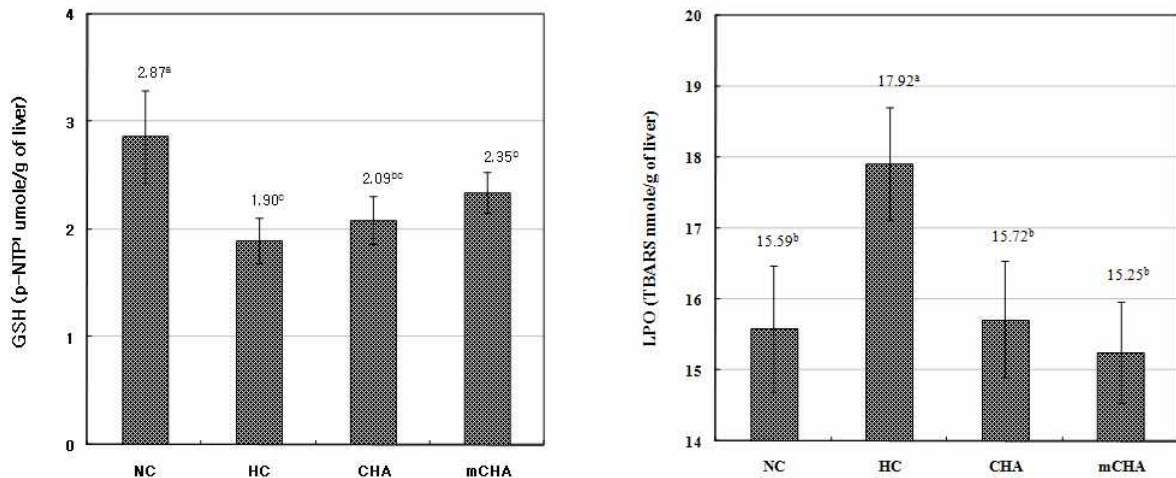


Fig. 13. 흥국발효 후-발효차와 녹차간의 간조직 glutathione (GSH)과 lipid peroxide 함량 비교

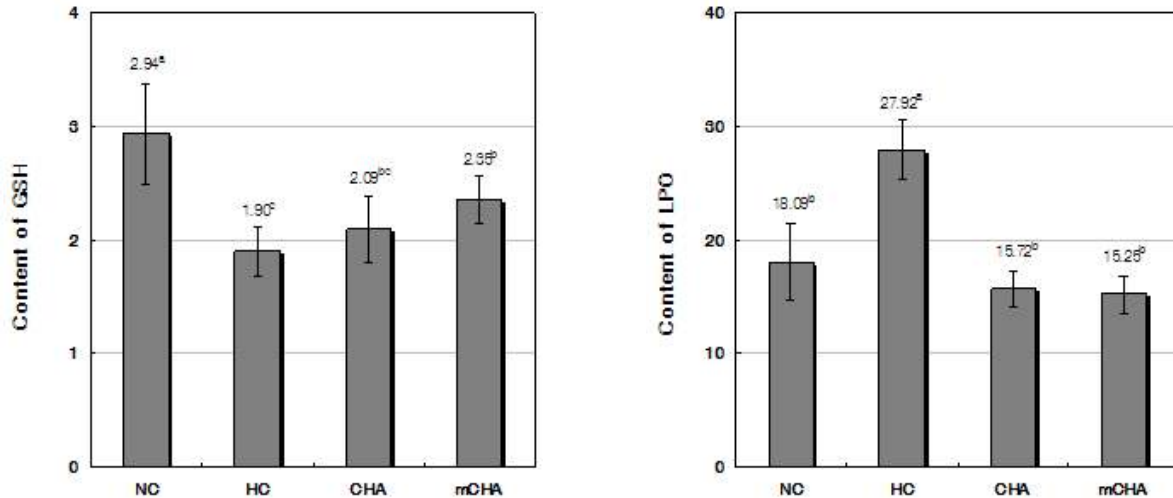


Fig. 14. 고지방 식이에서 후-발효차와 녹차에 의한 간 조직내glutathione(GSH)과 lipid peroxide(LPO) 비교

사. 간 조직 XOR, SOD, GST 및 GPX 활성 측정

XOR (xanthine oxidoreductase) 활성은 Stirpe & Della Corte (1969)의 방법에 따라 total type 활성은 NAD⁺의 존재 하에서, O type 활성은 NAD⁺를 첨가하지 않은 상태에서 측정하였으며 D type 활성은 total type 활성에서 O type 활성을 제한값으로 산출하였다. 활성도는 분당 단백 1 mg이 기질인 xanthine으로부터 생성되는 uric acid의 양을 nmole로 나타내었다. SOD (superoxide dismutase) 활성은 Martin 등 (1987)의 방법에 따라 superoxide anion radical에 의해 hematoxylin으로부터 생성되는 hematin을 560 nm에서 측정하였으며 효소원을 가하지 않은 대조구의 흡광도를 50% 억제하는 효소량을 1 unit (U)로 하여 1 mg의 단백질이 hematoxylin의 자동산화를 억제하는 정도를 U로 나타내었다. GST(glutathione S-transferase) 활성은 Habig 등 (1974)의 방법에 따라 효소에 의해 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 reduced glutathione이 반응하여 생성되는 thioether의 흡광도를 340 nm에서 측정한 다음 흡광계수($\epsilon=9.5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 활성도를 계산하였으며 분당 단백질 1 mg이 생성시킨 thioether의 nmole로 나타내었다. GPX (glutathione peroxidase) 활성은 Paglia 등 (1967)의 방법에 따라 1 mM EDTA 함유하는 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 용액 일정량에 1 mM sodium azide, 0.2 mM NADPH, 1 mM reduced glutathione, 1 unit glutathione reductase 및 일정량의 효소원과 기질인 0.25 mM hydrogen peroxide를 가해 25°C에서 반응시키는 동안에 생성된 oxidized glutathione을 환원시키는데 소모된 NADPH를 340 nm에서 측정하고 분자흡광계수 ($\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 효소활성을 계산하였다. 효소의 활성도는 1 mg의 단백질이 1분간 산화시킨 NADPH의 함량을 nmole로 나타내었다.

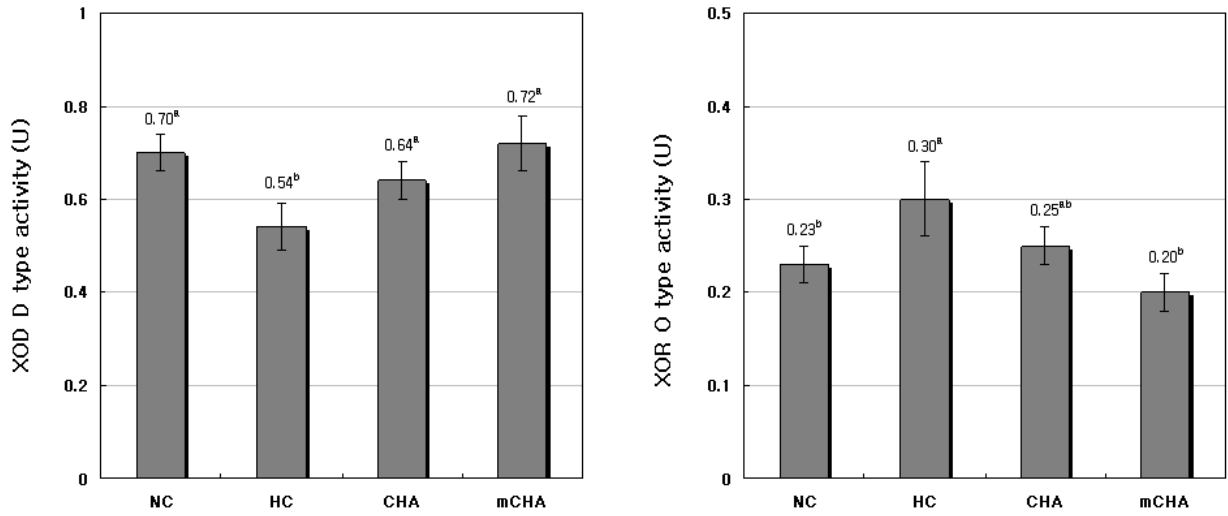


Fig. 15. 고지방 식이에서 후-발효차와 녹차에 의한 간 조직내 XOR(xanthine oxidase) D와 O형 함량 비교

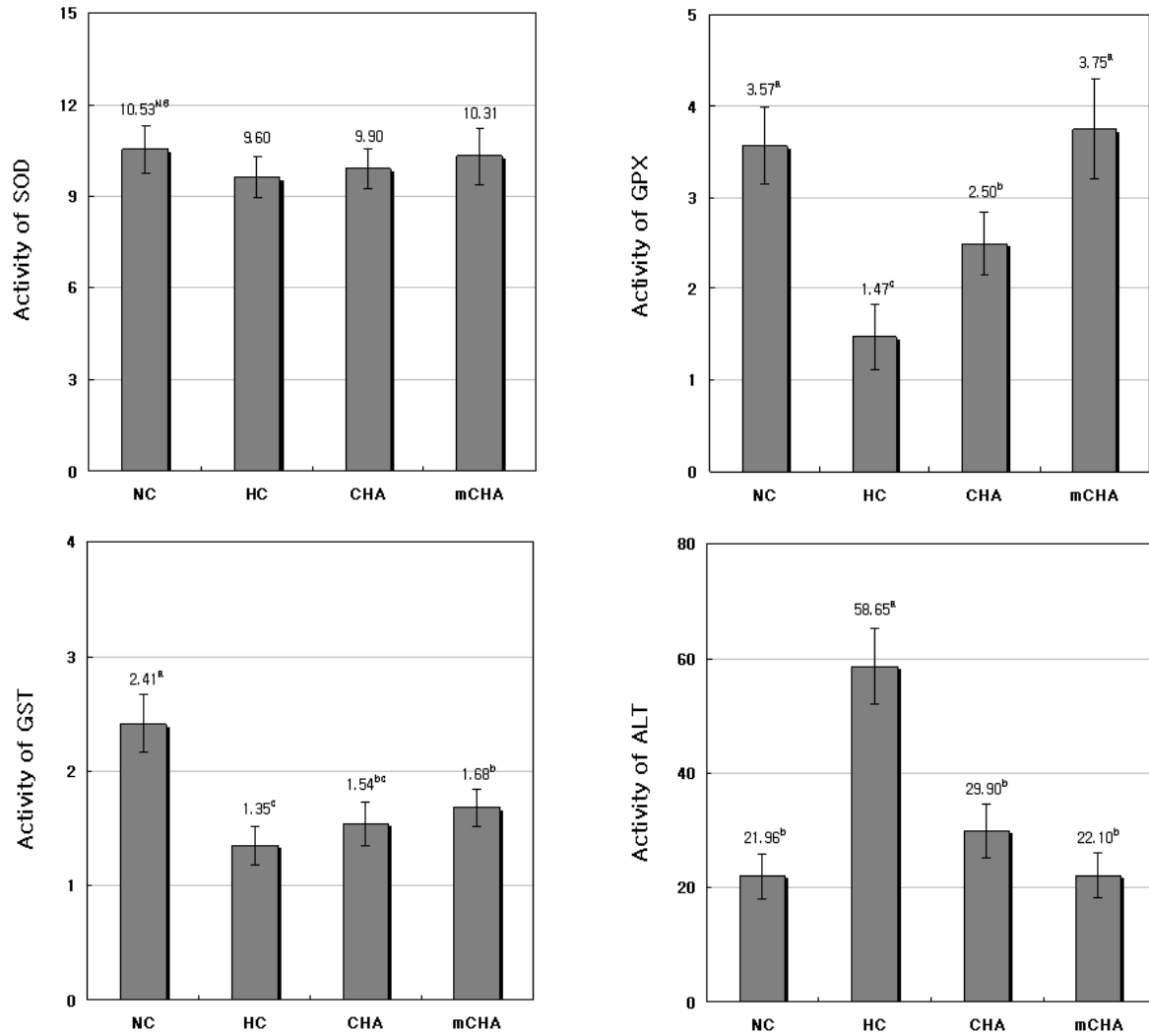


Fig. 16. 고지방 식이에서 후-발효차와 녹차에 의한 간 조직내 SOD, GPX, GST와 ALT 비교

아. 단백질 측정

간 조직의 단백질 함량은 Lowry 등 (1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin (BSA)을 표준용액으로 하여 측정하였다.

자. 간 조직 검사

7주간 사육한 흰쥐 간 조직을 절취하여 10% neutral formalin에 고정시킨 다음, 알코올 탈수, 파라핀 포매하여 microtome으로 4 μm 두께로 잘라 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

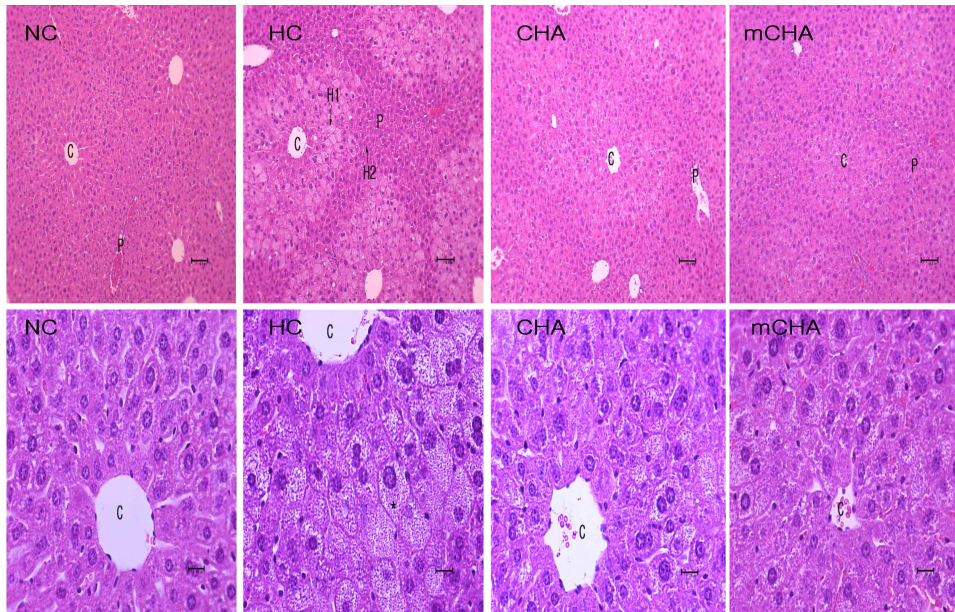


Fig. 17. 7주간 고지방 식이에서 홍국 발효 후-발효차와 녹차식이 섭취에 의한 흰쥐의 간 조직사진

3. *Monascus*속 미생물을 이용한 후 발효차 시제품 생산

홍국 후 발효차의 비만개선효과를 확인하고, 신속한 제품화와 판매가 가능한 시제품을 생산하였다. 녹차(*Aspalathus linearis*)는 경상남도 하동군에서 첫물(1지2엽)을 채취하여 사용하였다. 차의 발효는 채취한 녹차 잎을 하루 동안 위조시킨 다음 250℃의 덥음 솥에서 넣어 덥음과 유념을 5회 반복하여 덥음차(CHC)를 조제하였다. 이 덥음차에 증류수를 가하여 수분함량이 37.5%가되게 조정한 후 2 L들이 polypropylene bag에 500 g씩 넣고 air filter를 부착한 후 121℃에서 90분간 가압살균하였다. 살균한 후는 무균상으로 옮겨 실온이 되도록 식히고 미리 준비한 홍국 배양액 50 mL씩을 혼합하여 30℃의 incubator에서 15일간 배양하여 발효차를 제조하였다. 발효가 끝난 차는 40℃에서 최종 수분함량이 2% 내외가 되도록 충분히 건조시켜 실험에 사용하였다.



Fig. 18. *Monascus*속 미생물을 이용한 후 발효차 시제품

3. *Monascus*속 균을 이용한 지방간 예방기능성 발효 뽕잎차 개발과 제품화

가. *Monascus*속 미생물을 이용한 뽕잎차의 발효공정 확립

(1) 재료 및 균주

실험용 뽕잎(*M. alba* leaves)은 2011년 6월에 경북경산시 남산면 안심리에서 채취한 것을 사용하였으며, 균주는 한국중균협회에서 분양받은 *M. pilosus* IFO 4480을 사용하였다.

(2) 뽕잎의 발효

뽕잎의 발효는 생 뽕잎을 1 × 2 cm 크기로 자른 후 40 °C에서 2일간 건조시켰으며 (unfermented mulberry leaves: UF), 발효는 건조시킨 뽕잎에 물을 가하여 총 수분 함량이 30%가 되게 조절한 후 2 L들이 polypropylene bag에 300 g씩 넣고 air filter를 부착하여 121 °C에서 90분간 살균하였다. 살균시킨 뽕잎에 미리 준비한 *M. pilosus* 배양액 50 mL를 접종하여 30 °C에서 15일간 배양한 다음, 40 °C에서 수분함량이 2% 내외가 되도록 건조시킨 후 1.5mm 체로 쳐서 발효뽕잎차를 제조하였다. *M. pilosus* 종 배양액은 glucose(5%), peptone (2%), KH₂PO₄(0.8%), MgSO₄·7H₂O(0.05%), CH₃COOK(0.2%), NaCl(0.1%)을 함유하는 배지에 균주를 접종하여 150 rpm의 진탕 배양기에서 10일간 배양하여 사용하였다.

(3) 동물실험을 통한 비만 및 간 기능개선효과 검증

실험동물은 4주령의 평균체중 21-24 g의 ICR(Crljori: CD-1), SPF/VAF outbred mice (Orient Ltd., Sungnamsi, Korea)를 basic pellet chew인 5L79 diets (PMI Nutrition, LLC, Brentwood, MO, USA)로 1주일간 사육하여 환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 동물실험은 정상식이와 고지방식이에 따른 영향을 각각 검토하기 위하여 Table 1에서와 같은 실험군으로 나누어 실험하였다. 정상식이 실험군에서는 basic pellet chew(5L79 diets, PMI Nutrition, LLC, Brentwood, MO, USA)를 급여하고 음용수로 증류수를 급여한 군(NC), basic pellet chew를 급여하고 음용수대신 비발효 뽕잎차(UM) 1% 용액(1 tea bag 기준, 100 °C의 열수로 3분간 추출한 추출액을 20 °C로 냉각)을 급여한 군(UMI) 및 basic pellet chew를 급여하고 음용수 대신 *Monascus pilosus*로 발효한 뽕잎차(FM) 1% 용액을 급여한 군(FMI) 등 3개 군으로 구분하여 8주간 실험하였다. 한편, 고지방식이 실험군은 basic pellet chew만을 급여한 정상식이군(NC), basic pellet chew에 lard를 35% 혼합한 고지방식이 대조군(HC), basic pellet chew에 lard 35%와 UM분말을 2% 혼합한 식이군(UM) 및 basic pellet chew에 lard 35%와 FM분말을 2% 혼합한 식이군(FM) 등 4개 군으로 나누어 실험하였다.

실험식은 실험식이 전문제조회사인 Feeds Lab(Guri-si, Gyeonggi-do, Korea)에 의뢰하여 제조한 후 4 °C에서 보관하면서 매일 신선한 식이를 공급하였다. 실험동물은 stainless steel cage에 넣어 사육하였고, 온도 및 습도는 23±2 °C, 60±5%로 조정하였으며, 명암주기는 12시간

간격으로 설정하였고, 차추출물 또는 음용수 및 사료는 자유 섭취시켰다.

(4) 시험결과

정상식을 하면서 음용수 대신에 차 추출액을 공급한 UMI군과 FMI군 사이의 체중 증가량은 유의차가 없었으나, NC군 보다는 모두 감소되는 경향을 보였다. 이러한 결과는식이섭취량이 NC군에 비하여 높음에도 불구하고 뽕잎과 발효뽕잎 모두가 체중을 감소시키는 효과가 있는 것으로 생각된다. 2차 실험에서 HC군의 주당 체중증가량은 NC군에 비해 2.13배로 높았으나 UM군과 FM군은 NC군의 1.80 및 1.67배로 체중 증가량이 크게 완화되었다. 정상 식이군에서의 혈청 ALT 활성은 유의차를 보이지 않았다. 고지방식이군에서의 ALT활성은 HC군이 NC군에 비하여 2.56배나 높은 수치를 나타내었으며 UM군과 HC간의 유의차는 보이지 않으나 FM군은 HC군에 비하여 유의적으로 낮았다.

간 조직 TG 함량은 정상식을 행한 경우에는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 고지방식을 행한 경우에는 UM 및 FM군이 HC군에 비하여 25.18~25.72%가 감소되었으며 총콜레스테롤의 함량에서도 TG와 유사한 경향을 보였다. UMI군에서 GSH(glutathione)의 함량은 다소 감소하는 경향을 보였으나 고지방식이군에서는 FM군이 UM군에 비하여 유의적으로 증가하였다. LPO(lipid peroxide)의 함량은 FMI군과 UMI군 사이에 유의차가 없었으나 UM군과 FM군은 HC군에 비하여 각각 49.82% 및 44.52% 감소하였다. XO(xanthine oxidase) 활성은 FMI군에서 다소 감소하는 경향을 보였으며 UM군과 FM군에서는 HC군에 비하여 각각 38.41% 및 53.62%가 감소하였다. SOD 활성은 NC, UMI 및 FMI군에서는 12.81~15.16 U/mg protein으로 유의적인 차이를 보이지 않았으나 2차실험군(NC, HC, UM, FM)에서는 UM과 FM군 모두 NC군과 유사한 활성을 나타내었다. GST(glutathione S-transferase)활성은 FMI군이 NC군과 UMI군에 비하여 유의적으로 높았으며 UM군과 FM군은 고지방식이에 의해 감소된 HC군의 활성을 14.81~23.46% 증가시켰다. GPX(glutathione peroxidase) 활성(NADPH nmole/min/mg protein)은 FMI군과 NC군은 유사한 활성을 나타내었으나 UMI군에서는 이 두 군에 비하여 유의적으로 낮았다. 그리고 고지방식이 대조군인 HC군에서의 활성은 NC군의 65.59%에 불과하였으나 UM군과 FM군은 HC군에 비하여 각각 22.95% 및 38.52% 증가하였다.

간 조직을 검경한 결과, UMI 및 FMI군에서는 중심정맥과 간 조직 세포, 세포막 및 sinusoid가 정상 구조를 유지하고 있으며, NC군과의 조직학적인 뚜렷한 차이는 보이지 않았다. 그러나 고지방식이 대조군인 HF군에서는 거의 모든 간 조직 세포가 소지방구의 축적에 의해 확장되어 동양혈관이 폐쇄된 상태이며, 염증성 세포들이 부분적으로 침윤되어 있는 간 조직 손상이 나타났다. UM군과 FM군에서는 중심정맥 주위의 세포들이 정상적으로 잘 보존되어 있으며 간 소엽의 간세포삭과 간 조직 세포 내에 소지방구가 축적이 보이긴 하나 구분이 가능하며 UM군에 비하여 FM군쪽의 간 손상이 보다 경미한 것으로 나타났다.

이상의 실험결과, *M. pilosus*로 발효시킨 빵잎차는 정상식이군에서는 간 조직 손상과 관련된 LPO의 함량을 경감시키는 효과와 함께 경미한 체중감소 효과가 있는 것으로 사료되며 고지방식이에 의한 비정상 생리상태에서는 비만해소와 ROS생성계효소의 저해와 소거계 항산화효소의 활성화를 통한 간 기능증진과 조직손상을 예방 또는 경감시키는 효과가 있는 것으로 생각된다.

Table2. 비발효 빵잎차와 발효 빵잎차 1% 물 추출물(정상식이)과 2% 분말(고지방식이)에 의한 8주 후 식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이효율 변화

Measurements	Normal diet groups ²⁾			High fat diet groups ³⁾			
	NC	UMI	FMI	NC	HC	UM	FM
Initial body weight (g)	29.8± 1.4 ^{NS,4)}	29.5± 1.2 ⁵⁾	30.3± 1.3	29.81± 1.42 ^{NS}	31.38± 1.85	32.74± 1.28	32.86± 12.39
Final body weight (g)	36.7± 2.2 ^{NS}	35.4± 1.6	35.8± 1.2	36.70± 2.20 ^b	46.00± 2.10 ^a	45.10± 2.07 ^a	44.40± 1.94 ^a
Feed intakes (g/week)	43.5± 2.4 ^b	52.6± 3.1 ^a	50.2± 3.7 ^a	43.5± 2.4 ^a	38.6± 2.1 ^b	43.0± 2.3 ^a	35.4± 2.5 ^b
Calorie intakes(kcal/week)	162.3± 8.8 ^b	195.9± 11.5 ^a	187.4± 13.6 ^a	162.28± 8.76 ^c	214.93± 11.43 ^{ab}	236.73± 12.54 ^a	198.62± 13.95 ^b
Weight gain (g/week)	0.9± 0.1 ^a	0.7± 0.0 ^b	0.7± 0.0 ^b	0.9± 0.1	1.8± 0.2 ^a	1.6± 0.1 ^{ab}	1.4± 0.1 ^{bc}
Water intakes(mL/week)	54.2± 4.3 ^b	84.6± 6.3 ^a	83.1± 6.5 ^a	54.2± 4.3 ^b	33.4± 3.0 ^b	34.6± 3.8 ^b	27.4± 4.6 ^b
FER ¹⁾	0.02± 0.0 ^a	0.01± 0.0 ^b	0.01± 0.0 ^b	0.02± 0.0 ^a	0.05± 0.02 ^c	0.04± 0.01 ^c	0.04± 0.01 ^c

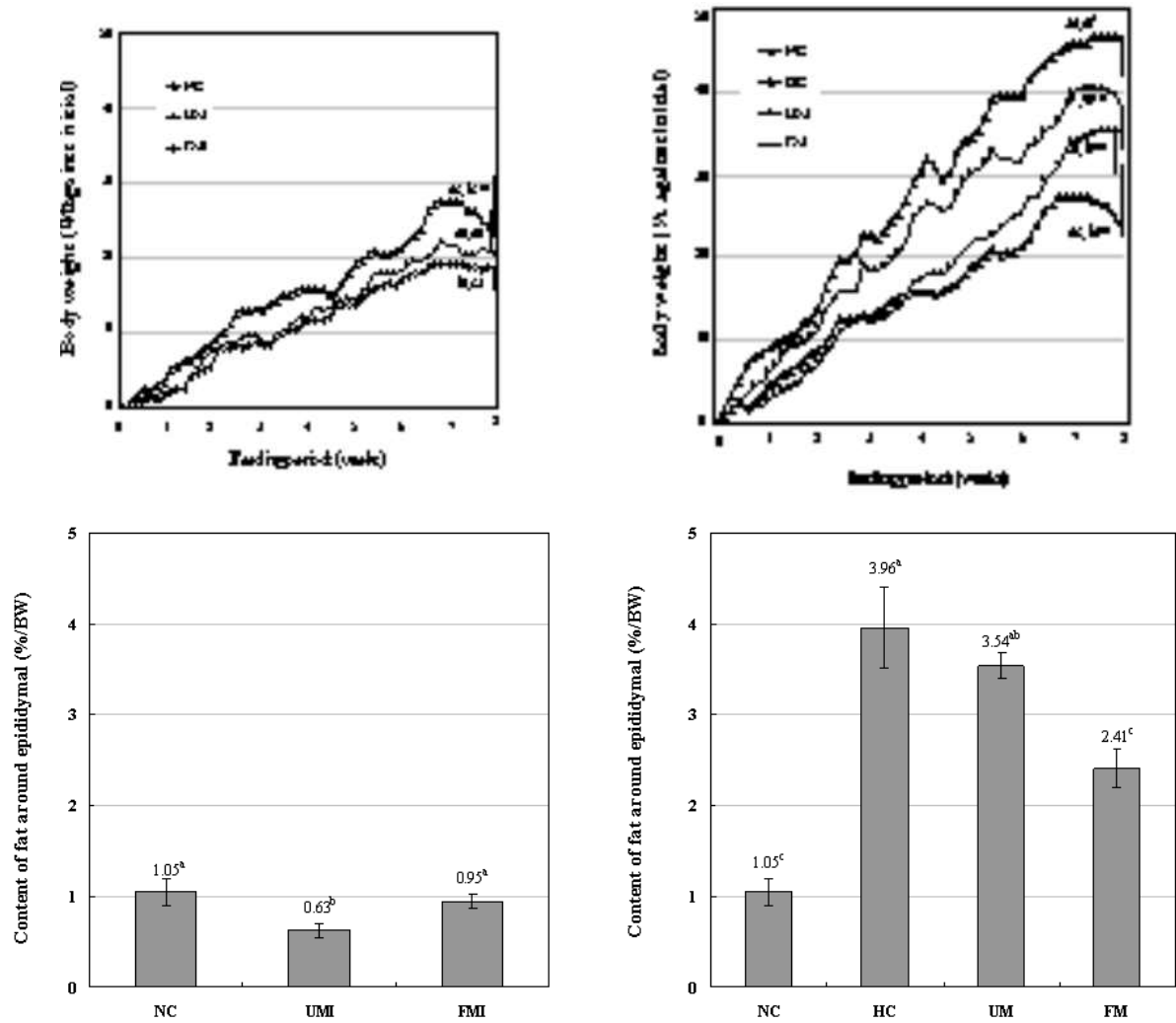


Fig. 19. 비발효 빵잎차와 발효 빵잎차 1% 물 추출물과 2% 분말 식이(8주)에 의한 흰쥐의 체중과 부고환주변 지방무게 변화

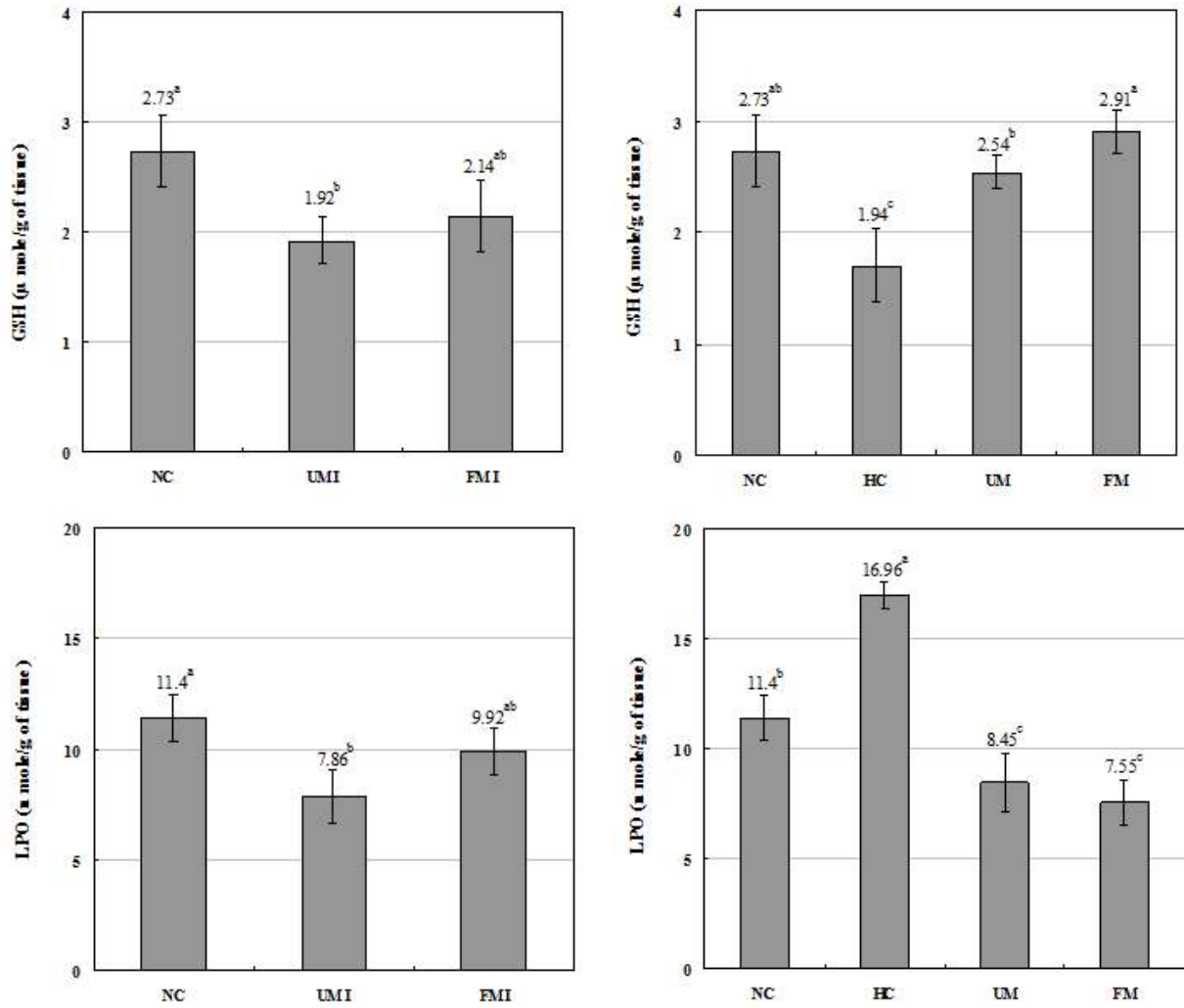


Fig. 20. 비발효 빵잎과 발효 빵잎차의 1% 물 추출물, 2% 분말 8주간 식이에 의한 간조직 내의 항산화물질 GSH(glutathione)과 과산화물질 LPO (lipid peroxide)의 변화

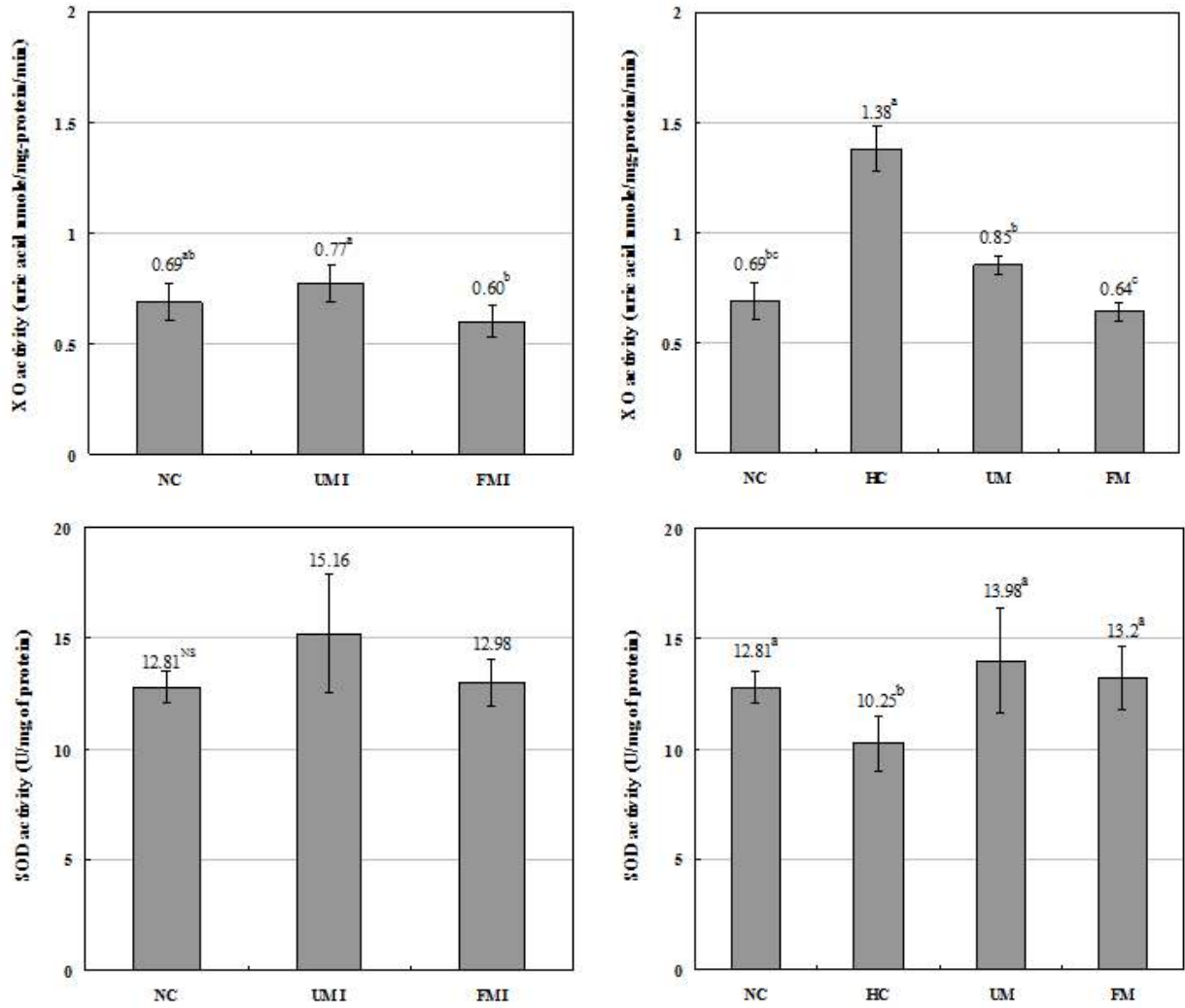


Fig. 21. 비발효 콩잎과 발효 콩잎차의 1% 물 추출물, 2% 분말 8주간 식이에 의한 간조직 내의 XO (xanthine oxidase), SOD (superoxide dismutase)의 변화

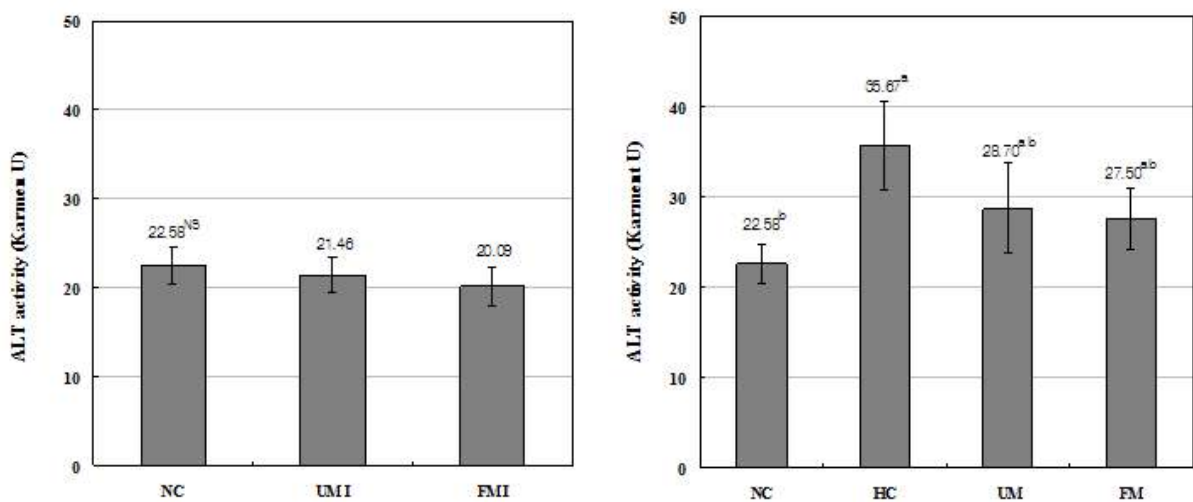


Fig. 22. 비발효 콩잎과 발효 콩잎차의 1% 물 추출물, 2% 분말 8주간 식이에 의한 혈청

내의 ALT(alanineamino-transferase)의 변화

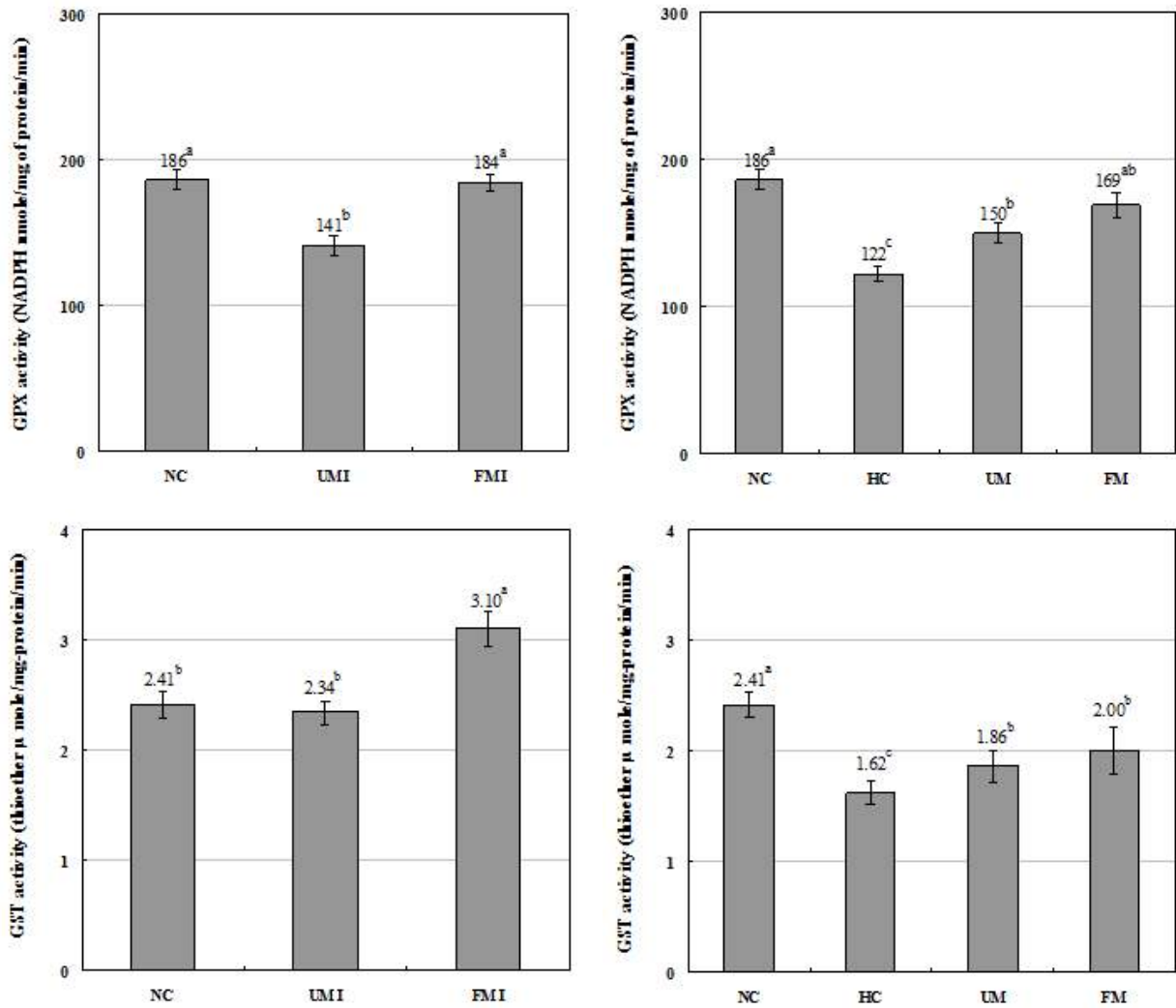


Fig. 23. 비발효 빵잎과 발효 빵잎차의 1% 물 추출물, 2% 분말 8주간 식이에 의한 간조직 내의 GPX (glutathione peroxidase), GST (glutathione S-transferase)의 변화

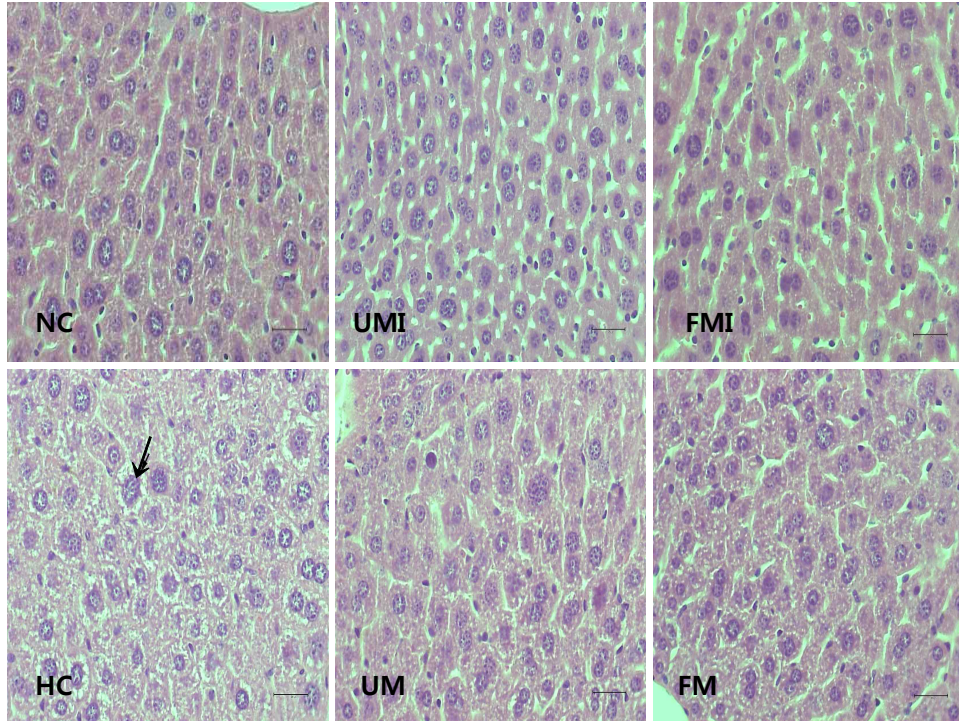


Fig. 24. 비발효 뽕잎과 발효 뽕잎차의 1% 물 추출물, 2% 분말 8주간 식이에 의한 간조직 사진

나. *Monascus*속 미생물을 이용한 후 발효뽕잎차 시제품 생산

시제품 생산용 뽕잎(*M. alba* leaves)은 경북 경산에서 생산한 것을 사용하였다. 뽕잎의 발효는 생 뽕잎을 1 × 2 cm 크기로 자른 후 40 °C에서 2일간 건조시켰으며(unfermented mulberry leaves: UF), 발효는 건조시킨 뽕잎에 물을 가하여 총 수분 함량이 30%가 되게 조절한 후 2 L 들이 polypropylene bag에 300 g씩 넣고 air filter를 부착하여 121 °C에서 90분간 살균하였다. 살균시킨 뽕잎에 미리 준비한 홍국 배양액 50 mL를 접종하여 30 °C에서 15일간 배양한 다음, 40 °C에서 수분함량이 2% 내외가 되도록 건조시킨 후 1.5mm 체로 쳐서 발효뽕잎차를 제조하였다. 사용자의 편이를 고려하여 홍국발효뽕잎차는 티백형태로 제작하여 상품화하였다.



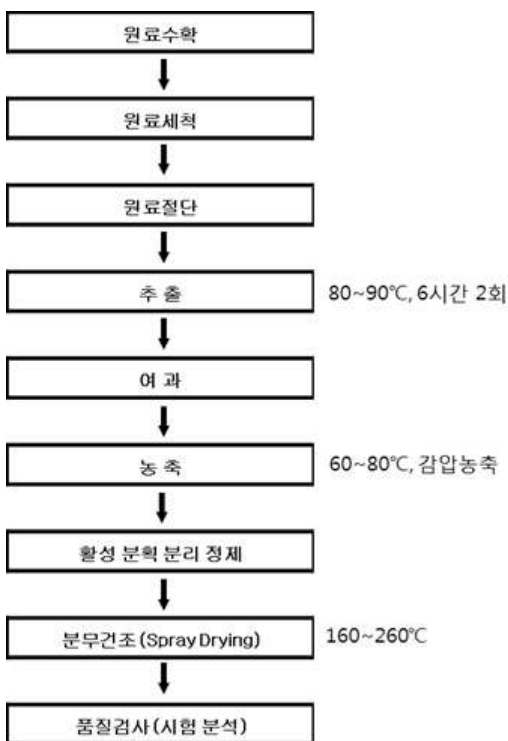
Fig. 25. *Monascus*속 미생물을 이용한 후 발효뽕잎차 시제품

제6절 도라지 추출물 및 발효대사 산물에 대한 연구

1. 도라지 추출물(Prep of PG Root extract)의 추출 및 표준화

도라지 원료를 물 (정제수), 에탄올, 메탄올 등을 이용하여 2회 이상 추출하고 여기서 얻어진 추출물을 원심분리하여 고형분을 제거한 다음 농축하고 동결건조 하여 용매가 제거된 각각의 추출물을 확보하였다. 추출물로부터 단일 활성성분을 분리정제하기 위하여 위에서 얻어진 추출물을 물로 완전히 녹인 다음 RP-18, Diaion HP-20, 그리고 Ion exchange gel column을 이용하여 각 분획 별 활성을 확인한 후 활성을 보이는 분획만을 얻어내었고, 추가 HPLC 과정을 통해 각 단일 활성성분 (BC-7031, BC-7032, BC-7033, BC-7034, BC-7035, BC-7036)을 분리정제 하였다.

분리 정제된 각 활성성분에 대한 HCV 저해 활성을 평가한 결과, HCV replicon cell에서 매우 우수한 바이러스 RNA 증식 억제활성을 나타내었음. 천연물 제품으로의 개발을 위해 각각의 단일 활성성분이 모두 포함된 활성분획 (active fraction, BC703)의 조성을 확립하여 향후 개발 과정에 이용하도록 하였다. 천연물 제품으로의 개발을 위해 각각의 단일 활성성분이 모두 포함된 활성 분획 (active fraction)의 조성을 확립하여 향후 연구 과정에 이용하도록 하였다. 또한, 열수 추출한 후 아래 그림과 같은 대량생산 공정을 확립하여 표준화 된 임상 시험물질 (BC703)을 생산하여 건강기능식품 임상 시험에 이용하도록 하였다.



가. 지표물질의 선정

원재료의 표준화를 위해 지역별, 시기별로 원재료를 채취하여 유효성분의 함량 및 분포를 조사하였고, 각각의 활성을 비교 분석하여 9월 ~ 이듬해 3월 사이에 채취한 도라지를 이용하도록 하였다. 기능성 지표 물질의 선정을 위해 도라지 유효성분 30여 종에 대한 분리정제 및 구조분석을 완료하였다. 각각에 대한 C형 간염 바이러스 증식 억제 활성 및 세포독성 실험을 완료하였고, 이들의 생산수율과 함량 (% , w/w) 분석연구를 진행하였다. 제품화를 위한 기능성 지표 물질 선정연구를 통하여 활성과 함량면에서 우수한 BC-7036(platycodin D, PD)를 선정하였다. 지표물질을 순도 98% 이상의 표준품으로 구입, 혹은 분리 정제하여 제품 표준화 연구에 사용하도록 하였다.

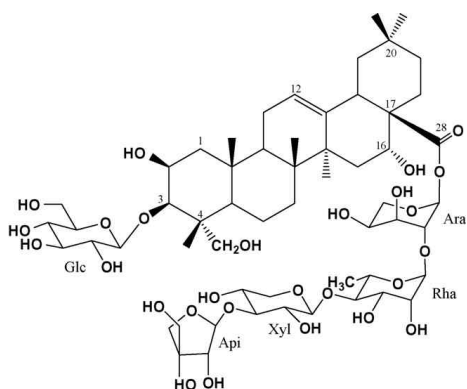


Fig. 1. Chemical structure of platycodin D (PD, C₅₇H₉₂O₂₈, MW: 1224.5854) from the roots of *Platycodon grandiflorum*.

나. 지표물질 PD의 시험분석조건 확립

시료의 분리는 HPLC system (Agilent 1260 series, USA)을 사용하였으며, 검출기는 ELSD (Alltech ELSD 2000, USA)를 사용하였다. 컬럼은 C18column (2.6 μ m, 4.6mm x 100mm, Phenomenex, Germany)을 사용하였으며, 이동상은 0.15% formic acid (A), Acetonitrile(B), Methanol(C)를 사용하였으며 다음과 같은 조건으로 기울기용매흐림(gradient flow) 방법으로 대상물질인 platycodin D (PD)를 분석하였다. 기울기용매흐림 완료 후 컬럼의 안정화를 위해 10분간 0.15%formic acid (A) : Acetonitrile(B) : Methanol(C) = 75 : 20 : 5 (v/v)로 post-run 을 실시하였다 이때 시료의 주입량 및 유속은 20 μ l 와 0.6ml/min 로 조정하였다. PD 시료의 검출은 ELSD 검출기를 이용하였으며, 이때 건조가스는 질소를 사용하였으며 유속 및 온도는 1.5L/min 및 80 $^{\circ}$ C 로 설정하여 PD를 정량하였다.

Time (min)	%A	%B	%C
0.00	75	20	5
10.00	75	20	5
17.00	72.5	22.5	5
25.00	72.5	22.5	5
34.00	71	24	5
42.00	71	24	5
52.00	70	25	5
52.50	0	0	100
67.50	0	0	100

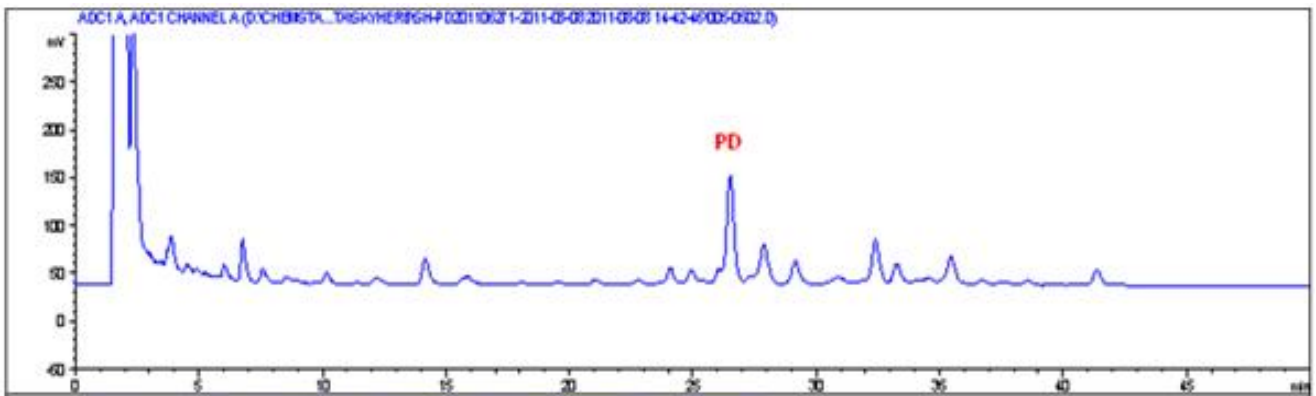


Fig. 1. HPLC/ELSD chromatogram of BC703

PD는 상용 표준품 (Futuro lab.사)을 정확히 계량하여 50% methanol에 용해시킨 다음 HPLC/ELSD를 이용, 표준정량곡선을 그려 PD 함량을 확인하였다. PD 상용표준품 으로부터 구한 표준정량곡선의 검량선 계산식은 $y=17.757x-643.76$ ($R^2=0.999$)로 양호한 직선성을 나타내었다. 시험물질의 표준화를 위하여 각 시료를 50% methanol에 20mg/ml 이 되도록 용해한 다음 불순물을 제거하고 (0.45 μ m filter) HPLC/ELSD 검출을 실시하였다. 얻어진 크로마토그램으로부터 내부 표준물질의 peak 면적에 대한 PD의 peak 면적비를 구하여 미리 작성한 표준곡선 으로부터 추출물 내의 PD 농도를 구하여 제품을 표준화하였다. 개발된 표준시험법의 타당성 (method validation)을 검토하기 위해 정확성, 정밀성, 특이성에 대한 표준시험법 타당성 검토 를 수행하였다. 평균회수율은 101.35%였으며, 변이계수는 1.60으로 우수한 시험법으로 판단되 며, 특이성도 높게 나타나서 PD의 머무름시간에 다른 방해물질은 나타나지 않는 것으로 나타 났다.

Table 1. 도라지 추출물 표준시험법의 타당성검토 (method validation)

구분	회수율(%) ^{주8)}				평균회수율(%)
	1회	2회	3회	평균	
정확성 시험용액 ①	103.90	103.19	103.98	103.69	101.35
정확성 시험용액 ②	101.11	99.62	101.88	100.87	
정확성 시험용액 ③	100.11	98.53	99.78	99.47	

구분	PD 농도 (mg/mL)	PD 평균농도 (mg/mL)	PD 평균함량(%)	SD	RSD(%)
Platycodin D	0.19950	-	-	-	-
시험용액	1회	0.18179	0.92%	0.0029	1.60
	2회				
	3회				
	4회				
	5회				
	6회				

구분	회수율(%)				평균회수율(%)
	1회	2회	3회	평균	
특이성 시험용액 ①	100.73	100.43	102.06	101.07	100.96
특이성 시험용액 ②	102.28	99.10	99.48	100.29	
특이성 시험용액 ③	101.13	100.55	102.90	101.53	

2. BC703의 간손상 마우스 모델에서 간보호 및 간기능개선 효과 실험

가. Thioacetamide (TA)로 유발된 마우스 간독성 모델에서의 간보호 효과 연구

Anti-HCV 활성을 나타내는 도라지 활성분획 BC703의 간독성 예방효과를 평가하고 건강기능식품 및 천연물의약품 개발의 근거로 활용하기 위하여 간 독성 유발물질인 thioacetamide (TA)에 의해 유도된 간독성 모델 연구를 진행하였다. 시험동물로는 약 30g의 ICR계 웅성 생쥐 (IRC mice)를 1주일간의 순회기간을 거친 후 사용하였다. 시험물질은 농도별로 조제하여 TA 처리 전 3일간 경구 투여하였다. 시험동물에 3일째 BC703을 투여한 후 3시간째에 200mg/kg의 TA 혹은 생리식염수를 복강 내로 투여하였다. TA 투여 후 24시간째에 CO2로 경마취한 다음 심장천자를 통해 혈액시료를 채취한 뒤 살처분 하였다. 시험군으로 1mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg의 BC703을 경구투여 하였고, 대조군으로는 생리식염수만 투여하여 비교하였다. 혈청ALT (alanine aminotransferase)과 AST (aspartate aminotransferase) 활성도를 비교하여 활성분획의 간보호 효과를 확인하였음. TA에 의해 간손상 지표인 ALT/AST 값이 급격히 상승하는데, 활성분획을 경구 투여한 시험군에서는 농도 의존적으로 ALT/AST 값이 감소하는 것을 확인하였다. 그리고, ALP, BUN, CRE 등 다양한 간손상 지표에서도 BC703에 의한 개선 효과를 확인할 수 있었다. 또한, TA에 의한 간손상이 일어나는 경우 TBARS와 NO의 level은 상승하는 반면에 GSH와 SOD의 경우 감소하는 양상을 보였다. BC703을 투여한 군의 경우 반대로 TBARS와 NO의 level을 감소시키고 GSH와 SOD를 증가시킴으로써 간독성을 완화하고 간기능을 개선하는 효과를 확인할 수 있었다. 조직병리학적 분석 결과 간독성 물질인 TA에 의해 간조직에 지방변성과 괴사, 그리고 vacoulation 등이 나타나는데 BC703를 섭취한 경우 간보호작용에 의해 간조직의 이상현상이 현저히 감소하는 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

Table 2. Effect of BC703 on serum biochemical parameters in TA-induced fulminant hepatic failure in mice

Groups	AST (Unit/L)	ALT (Unit/L)	ALP (Unit/L)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)
Negative control	97.33±21.55	71.50±8.63	106.8±9.02	15.40±1.54	0.32±0.09
TA alone	4308.33±246.24	8351.67±890.48	167.50±42.50	72.50±12.50	0.81±0.17
TA+ 1mg of BC703/kg	3425.83±722.42	7465.00±700.58	166.25±9.44	57.50±17.50	0.60±0.11
TA+ 5mg of BC703/kg	2912.50±435.66	7275.00±1130.29	150.00±10.80	46.25±10.28	0.55±0.06
TA+ 10mg of BC703/kg	2301.17±510.10	6312.50±1351.87	156.25±11.43	32.50±12.50	0.45±0.05

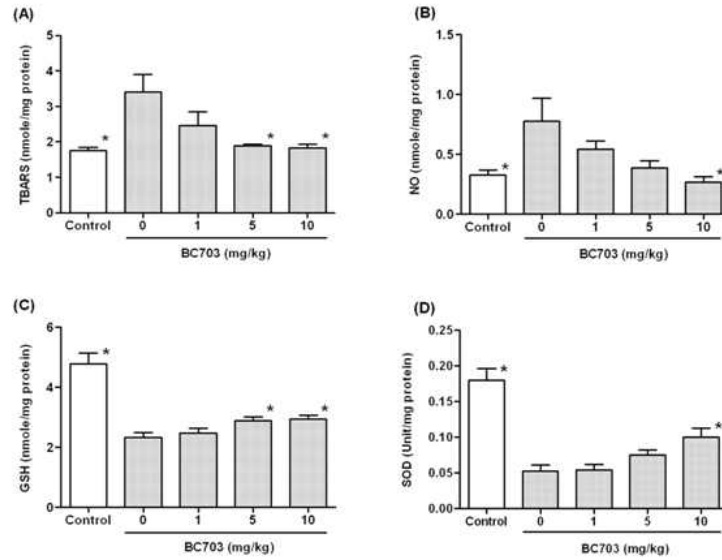


Fig. 3. Effect of BC703 on TBARS (A), NO (B), GSH (C) and SOD (D) content in the TA-induced fulminant hepatic failure. Mice were given orally BC703 (0, 1, 5 and 10 mg/kg) once daily for 3 consecutive days prior to intraperitoneal injection of TA (200 mg/kg) or saline. Values are expressed as means \pm SEM (in survival animals). * $p < 0.05$, a significant difference in compared with the TA alone treated group.

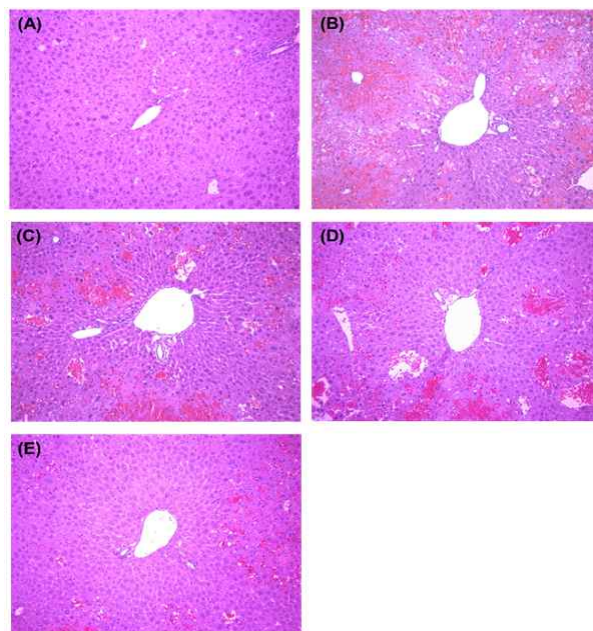


Fig. 4. The histopathological changes of liver stained with Hematoxyline & Eosin on the TA-induced hepatotoxicity ($\times 200$). Mice were given orally BC703 (0, 1, 5 and 10 mg/kg) once daily for 3 consecutive days prior to intraperitoneal injection of TA (200mg/kg) or PBS. A, non-treated negative control; B, TA alone treated group; C, TA+1 mg/kg of BC703 treated group; D, TA+5 mg/kg of BC703 treated group; E, TA+10 mg/kg of BC703 treated group.

나. 사염화탄소 (CCl4)로 유발된 마우스 간독성 모델에서의 간보호 효과 연구

Anti-HCV 활성을 나타내는 도라지 추출물의 활성분획 BC703의 간독성 예방효과를 평가하고 건강기능식품 및 천연물의약품 개발의 근거로 활용하기 위하여 간 독성 유발물질인 사염화탄소 (CCl4)에 의해 유도된 간독성 모델 연구를 진행하였다. 시험동물로는 약 32-36g의 ICR계 웅성 생쥐 (IRC mice)를 1주일간의 순회기간을 거친 후 사용하였다. 시험물질은 농도별로 조제하여 CCl4 처리 전 3일간 경구 투여하였다. 시험동물에 3일간 BC703을 투여한 후 3시간째에 CCl4 (1ml/kg in olive oil) 혹은 생리식염수를 복강 내로 투여하였다. CCl4투여 후 24시간째에 각 마우스를 CO2로 경마취한 다음 심장천자를 통해 혈액시료를 채취한 뒤 살처분 하였다. 시험군으로 1mg/kg, 5mg/kg의 BC703을 경구투여 하였고, 대조군으로는 olive oil 만 투여하여 비교하였다. 혈청 ALT (alanine aminotransferase)과 AST (aspartate aminotransferase) 활성도를 비교하여 활성분획의 간보호 효과를 확인하였다. CCl4에 의해 간손상 지표인 ALT/AST 값이 급격히 상승하는데, 활성분획을 경구 투여한 시험군에서는 농도 의존적으로 ALT/AST 값이 감소하는 것을 확인하였다. 그러나, 시험물질을 인공 위액에서 인위적으로 영향을 준 그룹 (BC703+GJ (gastric juice)) 에서는 상대적으로 약한 개선 효과를 나타내었다. 또한, CCl4에 의한 간손상이 일어나는 경우 TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) 와 NO (Nitric Oxide)의 level은 상승하는 반면에 GSH (glutathione)와 SOD (Superoxide Dismutase)의 경우 감소하는 양상을 보였다. BC703을 투여한 군의 경우 반대로 TBARS와 NO의 level을 감소시키고 GSH와 SOD를 증가시킴으로써 간독성을 완화하고 간기능을 개선하는 효과를 확인할 수 있었다.

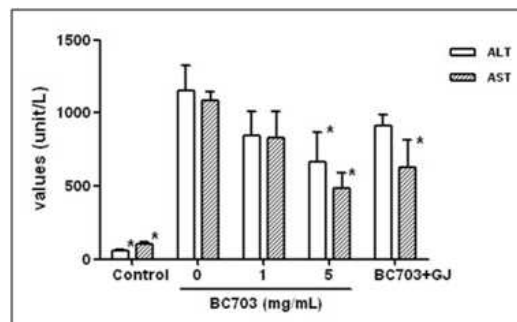


Fig 5. BC703의 사염화탄소 (CCl4)로 유발된 마우스 간독성 모델에서의 ALT/AST 개선 효과] A, non-treated negative control; B, CCl4 alone treated group; C, CCl4+1 mg/kg of (BC703) treated group; D, CCl4+5 mg/kg of (BC703) treated group; E, CCl4+10 mg/kg of digested (BC703) treated group.

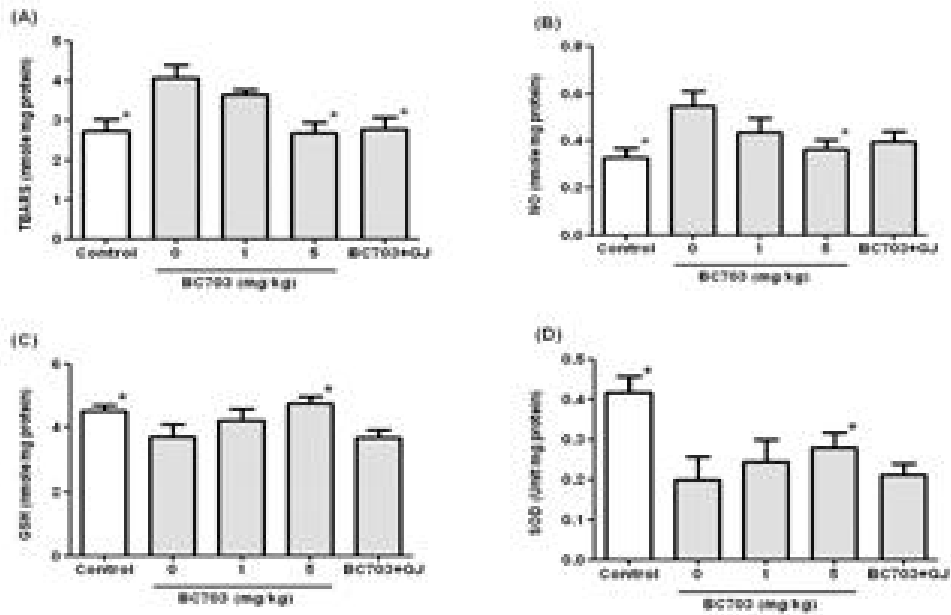


Fig. 6. BC703의 사염화탄소 (CCl₄)로 유발된 마우스 간독성 모델에서의 간손상 개선 효과] A, non-treated negative control; B, CCl₄ alone treated group; C, CCl₄+1 mg/kg of (BC703) treated group; D, CCl₄+5 mg/kg of (BC703) treated group; E, CCl₄+10 mg/kg of digested (BC703) treated group.

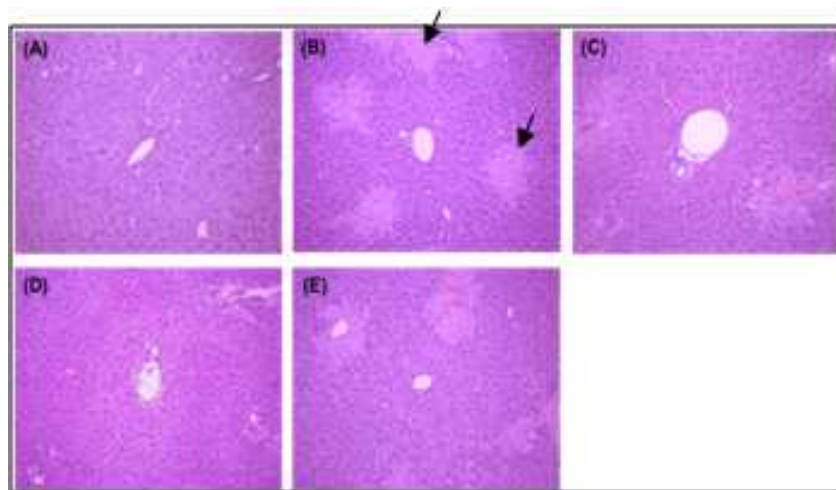


Fig. 7. 사염화탄소 (CCl₄)로 유발된 마우스 간독성 모델에서의 조직병리학적 분석 결과] A, non-treated negative control; B, CCl₄ alone treated group; C, CCl₄+1 mg/kg of (BC703) treated group; D, CCl₄+5 mg/kg of (BC703) treated group; E, CCl₄+10 mg/kg of digested (BC703) treated group.

다. 담즙정체 (cholestasis)로 유발된 마우스 간독성 모델에서의 간보호 효과 연구

도라지 추출물 활성분획 BC703의 간염 및 간기능 개선 효과를 평가하기 위하여 담즙 정체로 유도된 간독성 모델 연구를 진행하였다. 시험동물로는 약 32-36g의 ICR계 웅성 생쥐 (IRC mice)를 1주일간의 순회기간을 거친 후 사용하였다. 시험물질은 농도별로 조제하여 독성 유발 물질 처리 전 3일간 경구 투여하였다. 시험동물에 3일간 BC703을 투여한 후 3시간째에 zolazepam 와 tiletamine (Zoletil 50®, Virbac, Carros, France)를 병용투여한 다음 개복하고 담관을 봉합하여 담관결찰 (bile duct ligation)을 일으켜 담즙정체 (cholestasis)를 유도하였다. Cholestasis 유도 후 24 시간째에 각 마우스를 CO2로 경마취한 다음 심장천자를 통해 혈액시료를 채취한 뒤 살처분 하였다. 시험군으로 1mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg의 BC703을 경구투여 하였고, 대조군으로는 동일하게 개복한 sham (negative control) 군에 정제수만 투여하여 비교하였다. 혈청 ALT (alanine aminotransferase)과 AST (aspartate aminotransferase) 활성도를 비교하여 활성분획의 간보호 효과를 확인하였다. Bile duct ligation에 의해 간손상 지표인 ALT/AST 값이 급격히 상승하는데, 활성분획을 경구 투여한 시험군에서는 농도 의존적으로 ALT/AST 값이 정상범위에 가깝도록 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

또한, Bile duct ligation으로 유도된 cholestasis에 의해 간손상이 일어나는 경우 TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) 와 NO (Nitric Oxide)의 level은 상승하는 반면에 GSH (glutathione)와 SOD (Superoxide Dismutase)의 경우 감소하는 양상을 보였다. BC703을 투여한 군의 경우 반대로 TBARS와 NO의 level을 정상 범위에 가깝게 감소시키고 GSH와 SOD를 증가시킴으로써 간독성을 완화하고 간기능을 개선하는 효과를 확인할 수 있었다.

또한, 조직병리학적 분석 결과 cholestasis에 의해 담관 증식 (bile duct proliferation), 간조직에 지방변성과 괴사 (hepatocyte necrosis), 염증세포의 침윤 등이 나타나는데 BC703를 미리 섭취한 경우 간보호작용에 의해 간조직의 이상현상이 현저히 감소하는 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

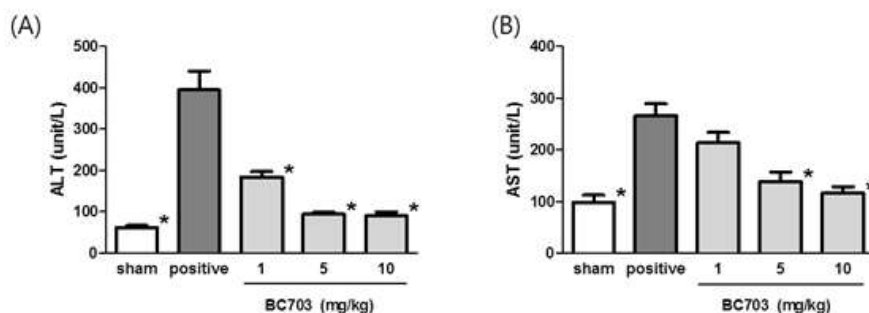


Fig. 8. BC703의 Bile duct ligation으로 유발된 마우스 간독성 모델에서의 ALT/AST 개선 효과] A, non-treated negative control; B, positive control group; C, 1 mg/kg of (BC703) treated group; D, 5 mg/kg of (BC703) treated group; E, 10 mg/kg of (BC703) treated group.

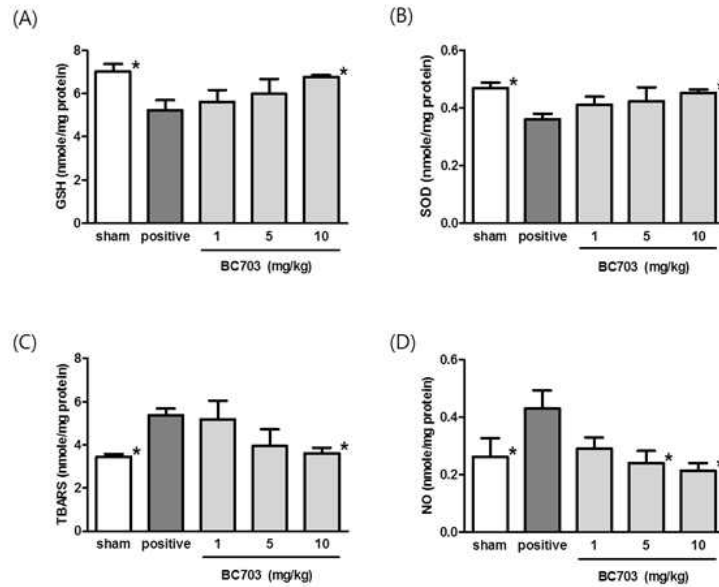


Fig. 9. BC703의 Bile duct ligation으로 유발된 마우스 간독성 모델에서의 간손상 개선 효과] A, non-treated negative control; B, positive control group; C, 1 mg/kg of (BC703) treated group; D, 5 mg/kg of (BC703) treated group; E, 10 mg/kg of (BC703) treated group.

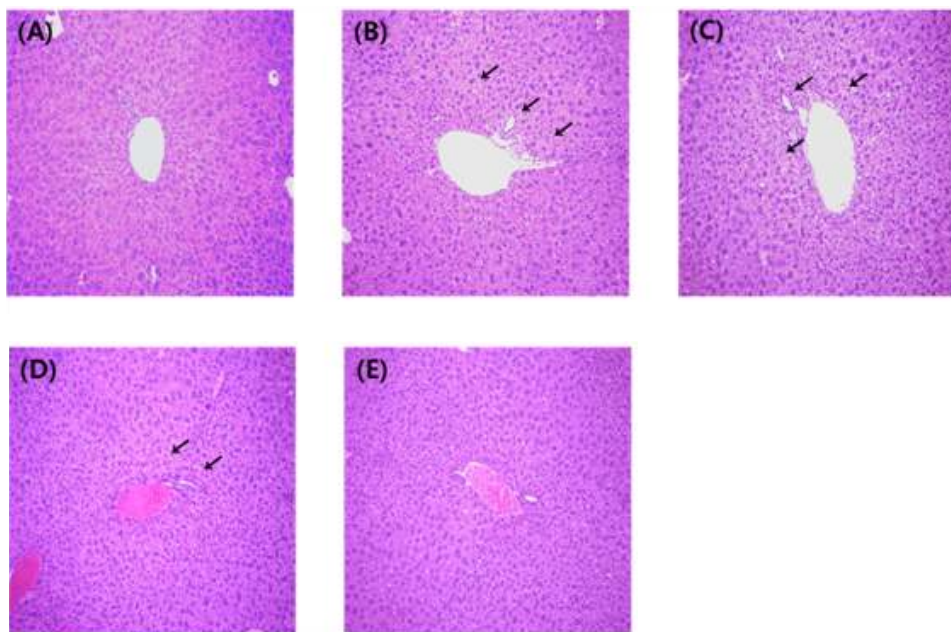


Fig. 10. Bile duct ligation으로 유발된 마우스 간독성 모델에서의 조직병리학적 분석 결과. A, non-treated negative control; B, positive control group; C, 1 mg/kg of (BC703) treated group; D, 5 mg/kg of (BC703) treated group; E, 10 mg/kg of (BC703) treated group.

3. 도라지추출물의 HCV 억제활성

가. 단일 활성성분과 활성분획 BC703의 유전자형에 따른 HCV RNA Replicon에서의 복제 (Replication) 저해활성 비교

선행 연구를 통해 HCV RNA replicon에서의 HCV 복제 저해활성 측정을 위한 탐색방법을 확립하였다. HCV replicon은 HCV-1b 형 C형 간염바이러스 유전자를 이용하였고, HCV IRES, neomycin 저항 유전자 (resistant gene, neomycin transferase gene), HCV nonstructural protein NS3에서 NS5B, 그리고 HCV 3'의 UTR (untranslational region)을 포함하는 서열로 구성되어 있다. HCV replicon cell에 각각의 화합물을 처리한 다음 72시간 동안 배양하고 cell 내에서 증식하는 HCV RNA를 RT-PCR과 real-time PCR 등의 방법으로 정량화 하여 HCV 증식에 대한 억제 활성을 평가하였다. 도라지 조사포닌과 PD의 경우 각각 EC50값이 0.6ug/ml 과 0.2ug/ml로 나타났다.

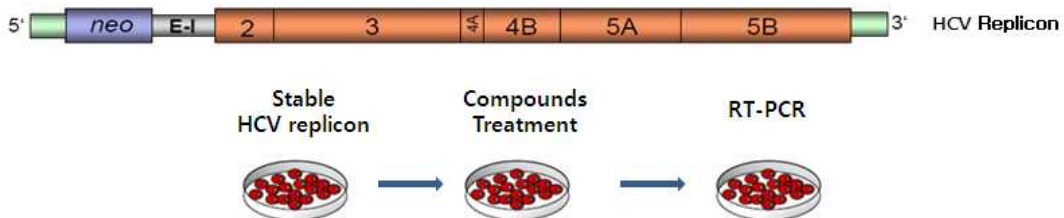


Fig. 11. HCV RNA Replicon에서 HCV 복제억제 저해활성 평가 방법

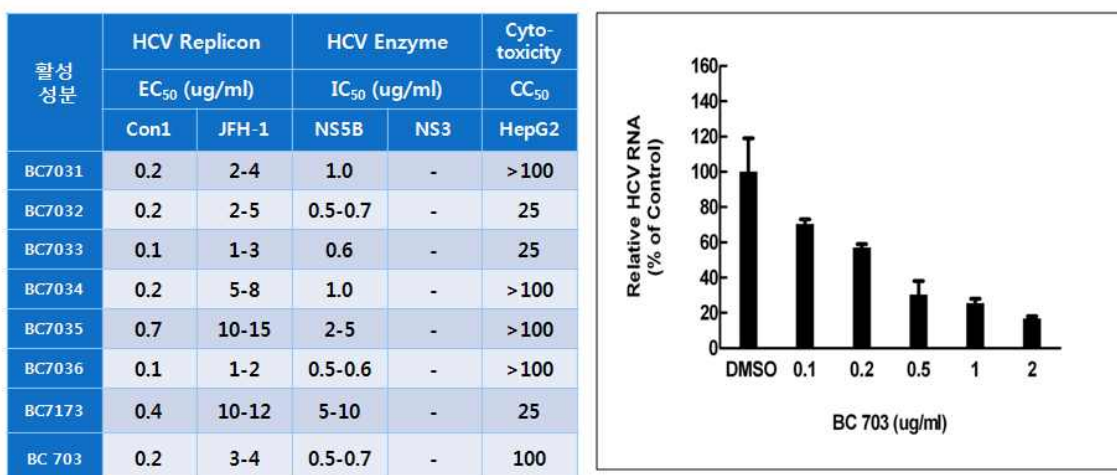


Fig. 12. 활성성분의 in vitro HCV 억제 활성 평가

또한, HCV 유전자형 2a에 대한 항바이러스 활성을 유전자형 2a (HCV-2a, JFH-1)에 바이러스에 감염된 세포 중에서 시험하였다. HCV 유전자형 2a (JFH1) 바이러스가 감염된 Huh-7 세포를 2% 우태 혈청 하에 도라지 추출물 중 조사포닌과 PD로 3일간 배양 시켰다. 배양 후, 세포 안의 HCV-2a 바이러스 RNA양을 실시간 중합효소 연쇄반응 분석법을 사용하여 측정하였다. 도라지 조사포닌 (EC50 = 5-7ug/ml)과 PD (EC50 = 1-2ug/ml) 의 항바이러스 활성은 HCV-1b에 비해 HCV-2a 감염된 세포 배양 모델에서 다소 감소하였다.

Table 3. 조사포닌과 PD의 HCV 유전자형에 따른 HCV RNA 레플리콘에서의 복제 저해활성 비교

샘플 종류	HCV Replicon 억제활성 (EC ₅₀ , µg/ml)	
	HCV-1b (Con1)	HCV-2a (JFH-1)
조사포닌	0.6	5-7
PD	0.2	1-2

분리 정제된 각 활성성분에 대한 HCV 저해 활성을 평가한 결과, HCV replicon cell에서 매우 우수한 바이러스 RNA 증식 억제활성을 나타내었다. Western blot 분석 결과 바이러스 복제의 필수 단백질인 NS5A의 발현을 매우 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다. 또한, HCV replicon cell에서 RT-PCR을 이용하여 억제 활성을 평가한 결과 western blot 결과와 매우 유사한 활성을 나타내었으며 세포독성은 나타나지 않았다.

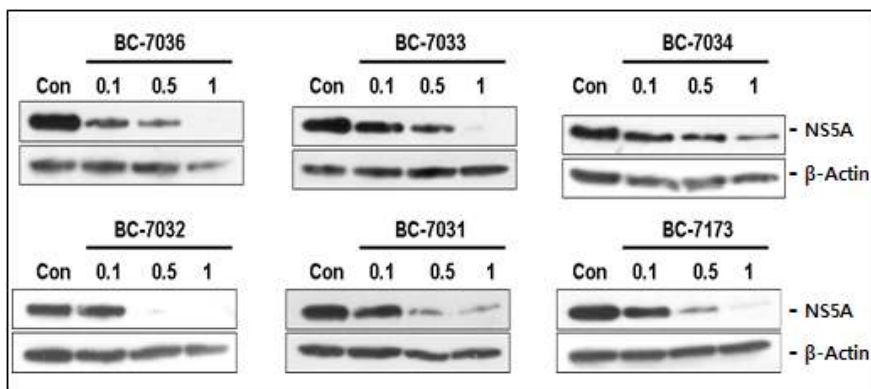


Fig. 13. 단일 활성 성분의 HCV replicon에서의 NS5A 발현 억제 활성 평가

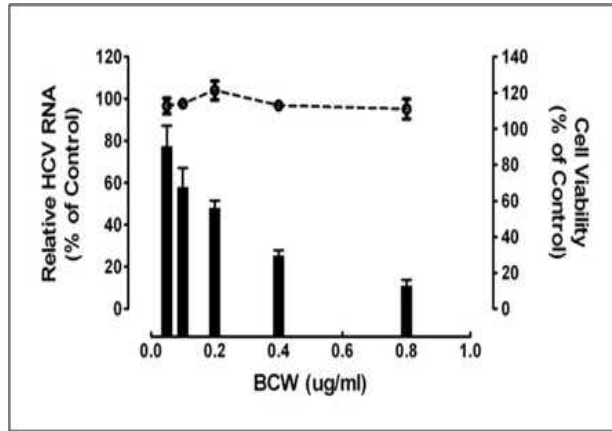


Fig. 14. 최적 활성분획의 HCV replicon에서의 NS5B억제 활성 평가

나. 활성 분획과 인터페론의 장기 반복 병용처리 시 in vitro HCV 억제 시너지 평가 (HCV replicon cell)

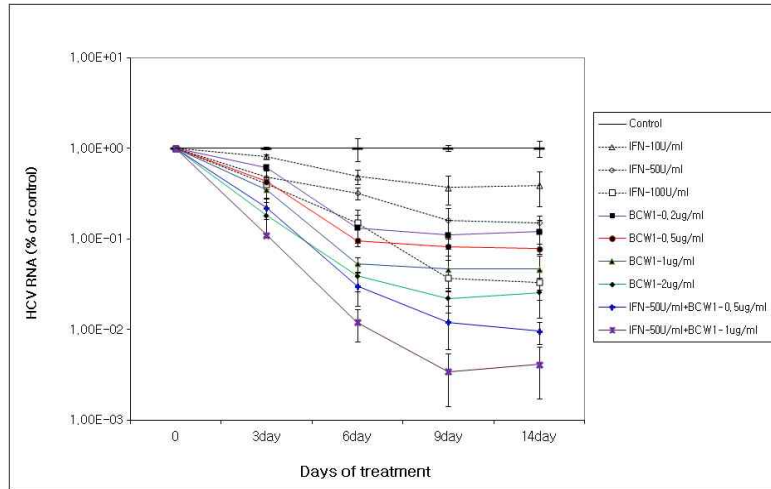
환자를 대상으로 한 임상시험에서의 최대 C형 간염바이러스 감소효과 (HCV RNA reduction)와 인터페론과의 병용투여 시 시너지효과를 예측하기 위하여 9-14일 반복 처리 시 HCV replicon 세포에서의 HCV RNA 복제 저해 활성 연구를 실시하였다. 매 3-4일 마다 replicon 세포를 계대 배양하면서 각 화합물을 반복 처리하였고, 이때 replicon 세포를 harvest 하여 화합물을 처리하지 않은 control과의 HCV RNA 차이를 Real time-PCR을 이용하여 정량 분석 하였다.

Long-term 저해활성 측정 결과 활성분획의 경우 0.5ug/ml에서 1log 이상의 HCV RNA 감소 효과를, 1ug/ml 농도에서 1.3log의 HCV RNA 감소 효과를 나타냈으며, 2ug/ml에서 최대 1.6~1.7log의 HCV RNA 감소 효과를 나타내는 것으로 판단되었다. 또한, Interferon- α 와 병용 처리한 경우 비교 물질로 사용된 Interferon- α 보다 높은 최대 2.6~2.8log의 HCV RNA감소효과를 나타내어 long-term 처리에서 확실한 시너지효과를 확인하였다.

Fig. 15. 도라지 추출물 활성분획의 long-term HCV RNA 복제 저해활성

다. 인터페론 및 다른 작용기전을 갖는 도라지추출물의 병용처리시 시너지 효과 및 innate immune 촉진 효과 연구

도라지유래 활성성분의 인터페론과 다른 작용기전을 갖는 C형 간염 치료제 후보 물질에 대한 시너지 효과를 알아보았다. NS3 protease inhibitor로는 Pharmasset/Roche 사의 R7227을, NS5A inhibitor로는 BMS사의 BMS-790052를 사용하여 HCV replicon cell 을 이용, 3일간 다양한 농도비에 따른 저해 효과를 조사하였다. 각각에 대한 시너지 효과를 비교하기 위하여



CalcuSyn 프로그램 (Biosoft 사)을 사용하여 EC50, EC75, EC90 농도에서의 Combination Index (CI) 값을 구하여 수치화 하였다. 실험 결과 대부분의 농도에서 CI 값이 1 이하로 강력한 시너지 효과를 나타 내는 것을 확인하였다. 또한, 시너지 효과의 메카니즘 연구를 위하여 활성분획의 인터페론에 의하여 유도되는 innate immune system에 대한 조절 효과 연구를 진행하였다. Target 유전자로 OAS1 (2'-5' Oligoadenylate Synthetase 1)를 이용하였고, 단일활성분과 활성분획을 단독 혹은 인터페론과 병용처리 하였을 경우 유전자의 발현 촉진 정도를 PCR 반응을 이용하여 비교하였다. 실험 결과, 단일활성성분 혹은 활성분획을 인터페론과 병용 처리한 경우 인터페론 단독처리에 비해 3배 이상의 발현 촉진 효과를 나타내었다.

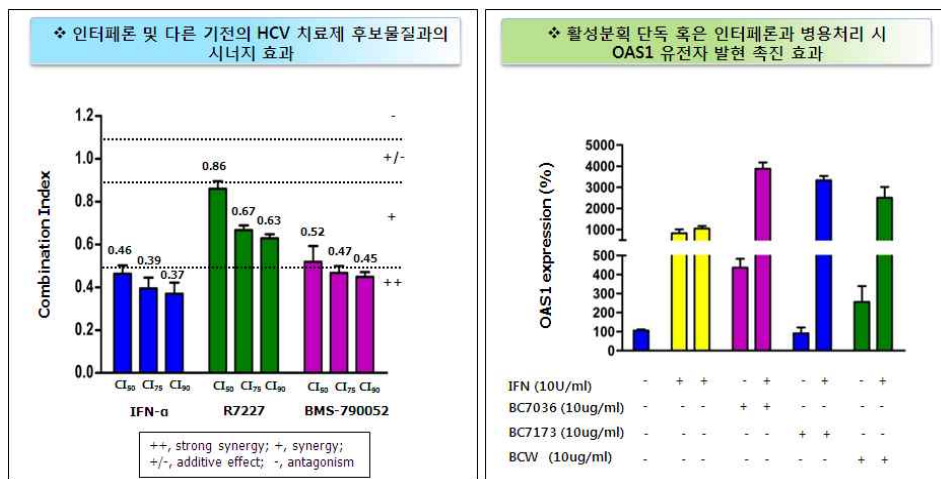
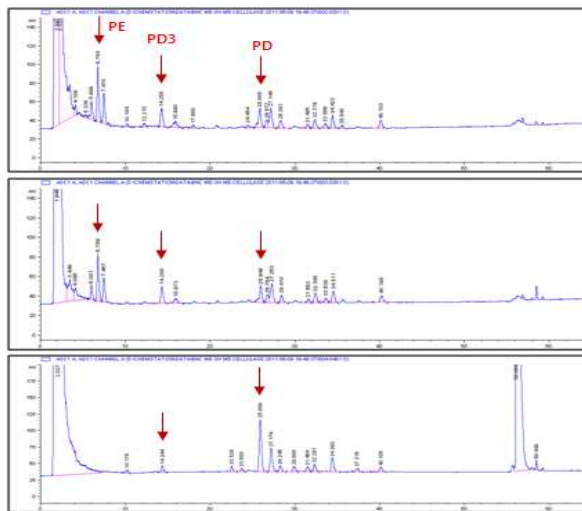


Fig. 16. 인터페론 및 다른 작용기전을 갖는 도라지추출물의 병용효과

4. 도라지 추출물의 효소 전환 연구

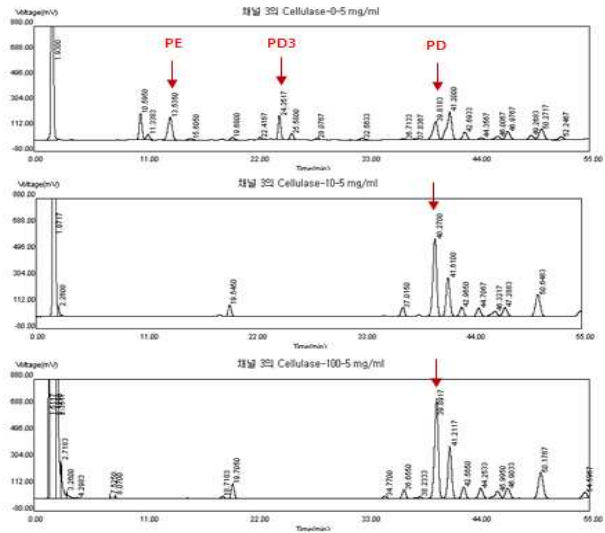
도라지 추출물의 발효 조건을 최적화 하고 C형 간염 억제 효과와 간기능 개선 효과에 특이적으로 작용하는 주요 Platycosides의 biotransformation 효율을 알아보기 위하여 미생물 유래

효소 (cellulase)를 이용한 효소 전환 연구를 진행하였다. 사용효소는 cellulase (100 unit)를 사용하였으며, 기질로는 도라지 추출물 및 도라지 조사포닌을 사용하였다. 반응은 0.1M Na-acetate (pH 5.2) 완충용액내에서 40~50°C로 시켰다. 분석은 기확립된 도라지추출물 표준분석법 (HPLC/ELSD법)을 사용하였다.



	PE (%)	PD3 (%)	PD (%)
BNC Water Extract (no reaction)	0.43	0.33	0.31
BNC WE-cellulase-48h-0unit	0.39	0.32	0.29
BNC WE-cellulase-48h-100unit	0	0.13	0.76

Cellulase Reaction condition : 0.1M Na-acetate pH 5.2, 40~50°C



	PE (%)	PD3 (%)	PD (%)
BNC RP-18 column fraction	7.17	4.70	6.23
BNC RP-cellulase-48h-10unit	ND	ND	14.65
BNC RP-cellulase-48h-100unit	ND	ND	17.86

Cellulase Reaction condition : 0.1M Na-acetate pH 5.2, 40~50°C

(A) 도라지 추출물

(B) 도라지 조사포닌

Fig. 17. 도라지 추출물 및 도라지 조사포닌의 cellulase 효소 전환

10~100Unit이상의 cellulase를 사용하는 경우 48시간 반응에서 PE와 PD3가 대부분 PD로 전환되는 것을 확인하였다. PD는 시험물질의 지표물질로서 간염 억제와 간기능 개선 등의 약리활성을 대표할 수 있는 물질이므로 특이적인 cellulase 등을 이용한 biotransformation 과정을 통하여 발효추출물과 활성분획의 약효를 최적화할 수 있을 것으로 판단된다. 각 시험 물질의 anti-HCV 활성 및 세포독성을 측정 한 결과 cellulase로 효소 전환하는 경우 활성이 약 2~3배 증가하였으나 세포 독성은 큰 차이가 없는 것으로 나타나므로 도라지추출물의 발효과정이나 효소전환을 거치는 경우 간염치료제와 간기능개선 식품으로의 활용이 더 유리할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 4. cellulase로 효소 전환 시 각 시험물질의 HCV 증식 억제 활성 비교]

시험물질 명		HCV 억제 활성 (Con1, uM)		세포독성
		EC ₉₀ (ug/ml)	EC ₅₀ (ug/ml)	CC ₅₀ (ug/ml)
도라지 추출물	효소전환 전	50	20	200
	효소전환 후	20-30	10	100
도라지 조사포닌	효소전환 전	7-8	0.6-0.8	50
	효소전환 후	2-3	0.3-0.4	50

5. 발효미생물을 이용한 도라지 사포닌 생물전환과 전환체 구조 분석

가. Platycodin D 전환에 이용되는 미생물 유래의 효소 생산의 최대화

Platycodin D를 여러 가지 전환체로 전환하기 위해서 이용 가능한 식용균주 중 전환가능한 효소를 가지고 있는 균주를 선발하였다. 전환 가능한 균주는 *Aspergillus niger*와 *Aspergillus usamii* 두 종류로 선별되었으며 나머지 균주는 선별된 두 균주에 비해 현저하게 전환능이 떨어지거나 전환능이 보이지 않았다. 따라서 위 두 가지 균주를 가지고 전환을 하였으며 두 균주를 가지고 전환을 하였을 때 나타나는 platycodin D의 패턴을 보고 *A. niger*는 apiosidase와 xylosidase를 가지고 있다고 추측하였으며 *A. usamii*는 platycodin D의 backbone에 달려있는 glucose를 제거할 수 있는 glucosidase를 가지고 있다고 추측하고 이를 가상기질인 pNP-glucoside로 효소의 유무와 효소의 강도를 측정하였다. 또한 앞서 *A. niger*와 *A. usamii*의 경우 minimal media에 배양할 경우 C-source를 변경할 경우 특정 효소의 생산량이 달라지는 실험을 한 바탕으로 두 가지 균주의 원하는 효소의 induction을 위하여 C-source를 변경하여 효소활성을 측정하였다.

*A. niger*와 *A. usamii*의 배양 시 배지의 C source를 glucose, rhamnose, xylose, cellobiose 등으로 다양하게 배양하였다. 7일-9일 간 배양 후 glass filter와 0.22um pore size의 bottle top filter를 이용한 균사와 포자 제거하였다. 암모늄 설페이트를 이용한 단백질의 침전과 조 단백질을 수득하였다. Dialysis를 통한 암모늄설페이트의 제거로 조효소액을 수득하였다. Enzyme activity의 변화를 가상기질인 pNP-xyloside, pNP-glucoside 5mM in 0.01mM phosphate buffer pH6.0 와 효소액을 섞어서 final pNP의 농도가 1mM이 되도록 하여 37도에서 반응하였다. 반응의 종결은 1M Na₂CO₃ 를 1:1로 섞어서 종결하였고 biorad ELISA detector를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 조효소액을 가지고 실제 기질 전환을 통한 효소활성 측정과 실제 생산율을 측정하였다. 4번 효소액은 *A. usamii*를 minimal media에 cellobiose를 첨가한 배지에 키운 것으로 다른 당을 첨가한 배지에서보다 β-glucosidase의 활성이 높게 나타났다. 또한 10번 효소액을 test한 결과 *A. niger*의 경우 xylose를 첨가한 경우 β-xylosidase 활성이 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

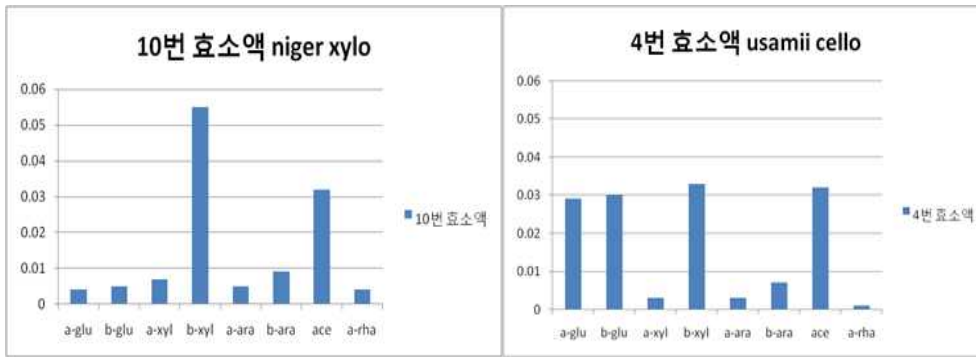


Fig. 18. Platycodin D 전환에 이용되는 미생물 유래의 효소 생산의 최대화. 4번 배지조성 (A. usamii : minimal media + cellobiose 4g/L), 10번 배지조성 (A. niger :minimal media + casamino acid 5g +xylose 5g/L)

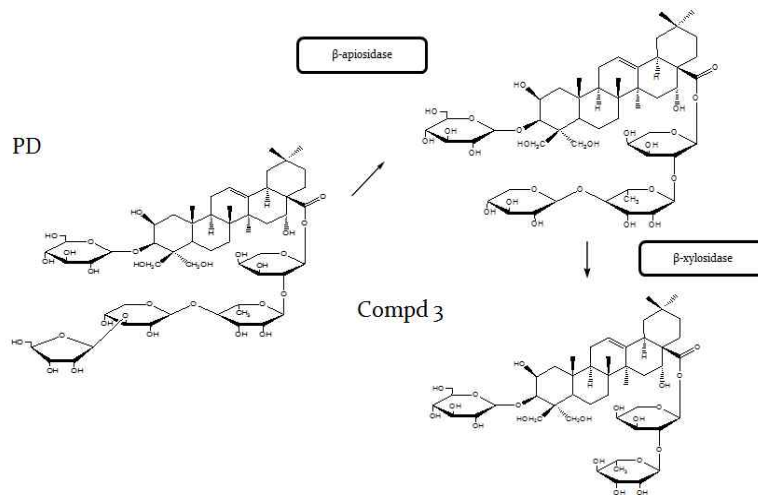


Fig. 19. Platycodin D를 10번 효소액(A. niger minimal media에 xylose첨가)을 이용하여 전환한 pathway

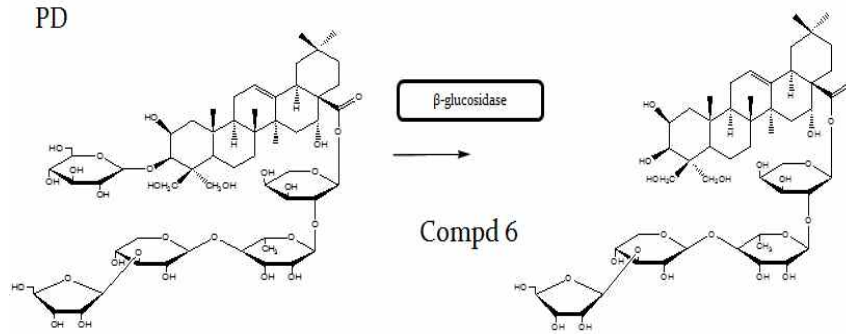


Fig. 20. Platycodin D를 4번 효소액(*A. usarii* minimal media에 glucose첨가)을 이용하여 전환한 pathway

Table 5. 생물 전환을 통해 얻어질 수 있는 다양한 PD 유도체의 구조

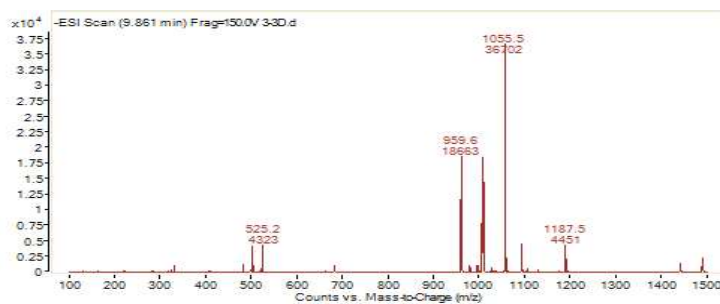
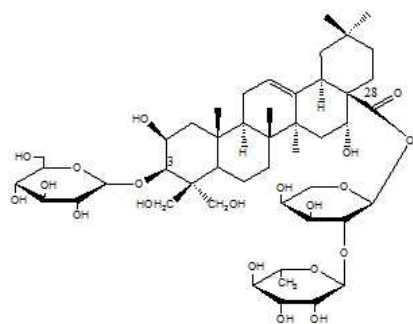
NO.	Molecular formula	Molecular weight	Substituted group (A)	Substituted group (B)	Transformed form
1	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₈	1224.58	-Glc	-Api-Xyl-Rham-Ara	Platycodin D
2	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₄	1092.54	-Glc	-Xyl-Rham-Ara	Deapio-platycodin D
3	C ₄₇ H ₇₆ O ₂₀	960.49	-Glc	-Rham-Ara	
4	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₆	814.44	-Glc	-Ara	
5	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₂	682.39	-Glc		
6	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₃	1062.52		-Api-Xyl-Rham-Ara	
7	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₉	930.48		-Xyl-Rham-Ara	
8	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₅	798.44		-Rham-Ara	
9	C ₃₅ H ₅₆ O ₁₁	652.38		-Ara	
10	C ₃₀ H ₄₈ O ₇	520.34			Platycodigenin

Glc : β-D-glucopyranoside Api : β-D-apiofuranoside Xyl : β-D-xylopyranoside
 Rha : α-L-rhamnopyranoside Ara : α-L-arabinopyranoside
 A : 3-O-side chain B : 28-O-side chain

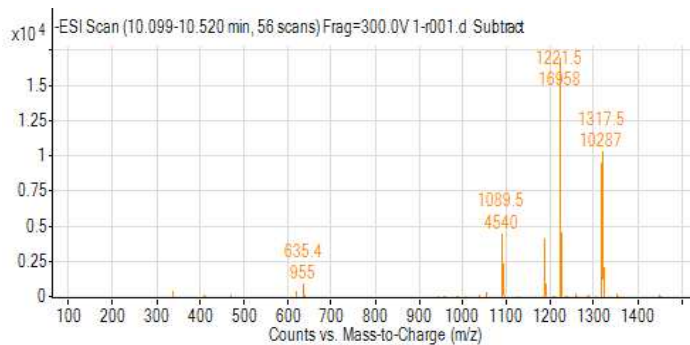
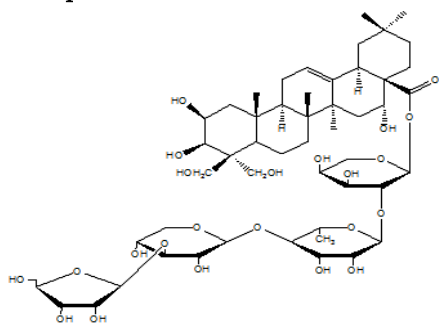
나. 전환체의 구조의 규명과 확인

HPLC-MS/MS를 이용한 분리된 물질의 분자량의 확인과 H-NMR, 13C-NMR, DEPT, HSQC, HMBC을 이용한 물질의 구조확인하였다.

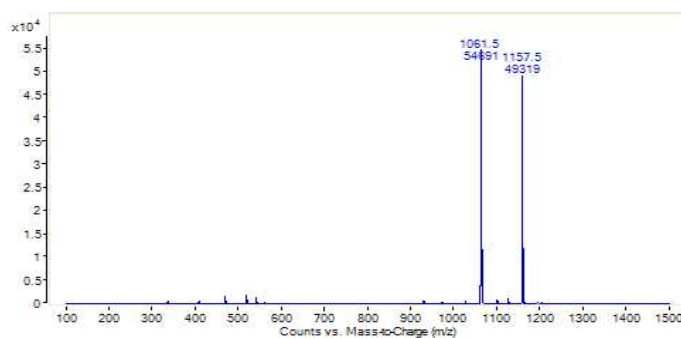
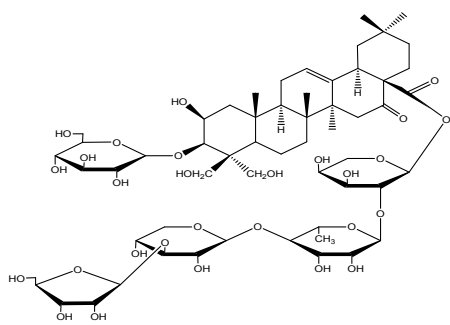
compound 3



compound 6



compound 11



제 7절 도라지 사포닌 발효추출물의 비만 및 간기능개선 파일럿 임상시험

1. 피험자의 선정기준, 제외기준, 목표 대상자 수

가. 피험자 선정기준

- (1) 만 20세 이상 만 70세 이하의 남·녀
- (2) 혈액검사에서 AST(GOT) 40~120 IU/L 또는 ALT(GPT) 45~135 IU/L 또는 γ -GTP 60~180 IU/L의 범위에 있는 사람(피험자 스크리닝 당시 기준)
- (3) 시험이 시작되기 전에 본 임상시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서를 작성하여야 한다.

나. 피험자 제외기준

- (1) 병력 조사 등을 통해 알코올 사용·유발 장애, 심장질환, 중추 신경 장애 등으로 입원 및 약물 치료, 재활치료 중인 사람
- (2) 복부초음파 검사상 간경변증 또는 간암 환자
- (3) ALP 정상 상한치의 1.5배 이상 또는 LDH 정상 상한치의 1.5배 이상 또는 Platelet 105/ml 이하 또는 AFP 20 ng/mL 이상인 사람
- (4) HBs Ag 또는 HCV Ab 검사상 양성인 사람
- (5) Albumin 3.5 g/dl 이하 또는 Total Bilirubin 3 mg/dl 이상인 사람
- (6) PT 15 sec 이상 또는 aPTT 45 sec 이상인 사람
- (7) Creatinine 정상 상한치의 2배 이상인 사람
- (8) TSH 0.1 uU/ml 이하이거나, 10 uU/ml 이상인 사람(피험자 스크리닝 당시 기준)
- (9) 연구 시작 4주 이내에 간 기능에 영향을 미치는 약물(INH, valproic acid, tetracycline, allopurinol, ibuprofen, phenytoin, phenelzine, sertraline, naproxen, diclofenac, 기타 간독성을 유발할 가능성이 있는 약물)을 복용한 사람
- (10) 연구 시작 4주 이내에 부신피질 호르몬 또는 성 호르몬을 복용한 사람
- (11) 조절되지 않는 고혈압 환자(170/100mmHg 이상, 피험자 스크리닝 당시 기준)
- (12) 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 시 혈당 180mg/dl 이상, 피험자 스크리닝 당시 기준)
- (13) 임신 중이거나 본 임상시험 기간 동안 임신 계획이 있는 사람

- (14) 본 임상시험 기간 중에 다른 임상시험에 참가할 계획이 있는 사람
- (15) 본 임상시험 시작 3개월 이내에 다른 임상시험에 참여했던 사람
- (16) 시험자가 본 임상시험에 부적절하다고 판단하는 사람

다. 피험자 수 및 산출근거

피험자 선정, 제외기준에 적합한 100명 이상을 확보하여 섭취하도록 하고, Protocol에 명시된 PP기준에 적합한 최종 유효성 평가 예수로 70명 이상(군당 35명 이상)을 분석하기로 하였다.

	시험군 (도라지 추출물)	대조군 (placebo)	합 계
최종 평가 레수(PP)	35	35	70
Drop-out(30%) 고려예수	50	50	100

2. 임상시험의 방법

가. 임상시험의 설계

본 임상시험은 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험으로 디자인되었다. 자의에 의해 임상 시험 동의서에 서명한 사람이 본 임상시험에 참가하면 병력조사, 이학적 검사, 활력징후, 체중 검사, 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당), 심전도 검사, Clinical lab(AST(GOT), ALT(GPT), γ -GTP), 복부초음파 검사를 실시하여 선정, 제외기준에 적합하면 무작위배정을 통한 피험자 등록이 이루어졌다. 시험군 또는 대조군으로 배정된 피험자는 총 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취하였다. 각 군의 배정비율은 시험군 : 대조군 = 1 : 1로 하였다.

나. 시험기간

본 임상시험은 방문 2를 시작으로 임상시험에 참여하는 기간은 총 12주(84일)이었다.

다. 임상시험용 건강기능식품의 개요

- (1) 시험식품 (도라지 추출물)

- 주성분명 : 도라지 추출물(BC703)
- 성장 및 제형 : 정제
- 함량 : 1정(800mg) 중 도라지 추출물(BC703) 500mg 함유
- 섭취량 : 1일 3회, 1회 2정씩 식후 섭취(1일 6정, 도라지추출물 3,000mg/day)
- 원재료명 및 배합비율

원료명	함량(mg)	배합비(%)
도라지추출물	500	56.800
결정셀룰로오스	172.8	19.627
이산화규소	13.6	1.540
스테아린산마그네슘	13.6	1.540
옥수수전분	84	9.500
HPMC	8	0.909
정제포도당	8	0.909
합 계	800	100.000

- 지표성분 함량 : 플라티코딘 D (PD, Platycodin D) 0.8% 이상

(2) 대조식품 (Placebo)

- 주성분명 : 결정셀룰로오스
- 성상 및 제형 : 정제
- 함량 : 시험식품과 동일한 중량, 동일한 부피를 가짐
- 섭취량 : 1일 3회, 1회 2정씩 식후 섭취
- 원재료명 및 배합비율

원료명	함량(mg)	배합비(%)
결정셀룰로오스	672.8	76.427
이산화규소	13.6	1.540
스테아린산마그네슘	13.6	1.540
옥수수전분	84	9.500
HPMC	8	0.909
정제포도당	8	0.909
합 계	800	100.000

라. 배정 방법

본 임상시험은 시험군 또는 대조군을 무작위배정하여 병행시험으로 진행하였으며, 필요한 피험자 수는 탈락율(30%)을 고려하여 각 군당 50명씩 총 100명이었다.

마. 맹검

이중맹검 유지를 위하여 본 임상시험에 사용되는 제품의 생산/포장 및 라벨링에서 언급된 내용 이외에, 각 군별로 고유코드의 할당 내역은 임상시험 담당자가 봉인된 상태로 관리하였으며, 중대한 약물유해반응 발생으로 부득이하게 해당 코드 열람이 필요한 경우를 제외하고는 임상시험 종료 시까지 공개하지 않았다. 임상시험 연구자는 선정된 피험자의 섭취 배정번호와 일치하는 고유코드 식품을 피험자에게 공급하였으며, 임상시험용 건강기능식품의 결손 및 파손 시에는 여분(고유코드별)을 사용함으로써 맹검을 유지하였다.

3. 관찰항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법

가. 임상시험 진행 일정표

Period		Screening ¹⁾	Active Treatment		
Visit		1	2	3	4
Week ²⁾		-1	0	6	12
Window period				+/- 7	+/- 5
서면동의서		√			
인구학적 조사		√			
병력조사		√			
이학적 검사		√	√	√	√
활력징후, 체중		√	√	√	√
식사지도 및 식품섭취빈도조사 ⁵⁾			√	√	√
임상병리검사 ³⁾		√			√
임신반응검사(가임기 여성만 해당) ³⁾		√			√
심전도 검사			√		√
Clinical lab ³⁾	AST(GOT)	√		√	√
	ALT(GPT)	√		√	√
	γ-GTP	√		√	√
복부초음파 검사 ⁴⁾			√		
다차원 피로 척도(MFS)			√	√	√
피험자 적합성 평가			√		
무작위배정			√		
시험식품 및 대조식품 처방			√	√	
이상반응 확인				√	√
순응도 확인				√	√
약물투여력 및 병용요법 변화 확인		√	√	√	√

1) 스크리닝 방문 후 1주일 이내 방문2가 시행되어야 한다.

2) 방문3의 방문일은 지정된 날짜 전·후 7일을 허용하며, 방문4의 방문일은 지정된 날짜 전·후 5일을 허용한다.

3) 피험자는 채혈하기 전날 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다. 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당) 등을 시행할 수 있다.

- 혈액학적 검사: RBC, Hb, Hct, WBC, Platelet, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, MCV

- 생화학적 검사: Na, K, Cl, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-cholesterol, Calcium, CK, AST(GOT), ALT(GPT), Protein, Albumin, Glucose, Total bilirubin, ALP, Creatinine, BUN, Uric acid, γ -GTP, LDH, PT, aPTT

- 소변검사: SG, pH, Leukocyte, Nitrite, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Erythrocyte

- 임신반응검사: HCG (※가임기 여성만 해당)

- 갑상선호르몬검사: TSH (방문1에서만 실시)

- 종양표지자검사: AFP (방문1에서만 실시)

- 간염 바이러스검사: HBs Ag, HCV-Ab (방문1에서만 실시)

4) 복부초음파 검사: 혈액검사에서 AST(GOT) 40~120 IU/L 또는 ALT(GPT) 45~135 IU/L 또는 γ -GTP 60~180 IU/L의 범위에 있는 사람(피험자 스크리닝 당시 기준)에 만족하는 사람을 대상으로 시행한다.

5) 시험기간 중 시험식품(도라지추출물)의 원재료인 도라지 관련식품(도라지무침류, 액상, 분말, 차) 및 건강기능식품을 가급적 섭취하지 않도록 하고, 시험기간 동안 피험자가 작성할 식품섭취빈도조사지 작성방법에 대해 설명한다.

나. 관찰항목

(1) 피험자 동의 및 인구학적 조사

임상시험에 들어가기 전, 본 임상시험의 목적과 내용에 대하여 피험자에게 상세히 설명하고, 문서 동의를 받고 인구학적 정보를 조사하였다. 기록사항은 서면 동의 여부 및 동의 일자와 피험자 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 연락처, 결혼상태, 교육수준, 직업, 운동여부, 흡연여부, 음주여부, 고지방식 섭취여부(한 끼 식사로 고지방식을 섭취하는 횟수), 스트레스 자각 정도였다.

(2) 병력 및 약물 투여력 조사

문진과 과거 진료 기록 점검 및 면담 등을 통하여 조사한다. 외과적 수술력을 포함한 병력은 스크리닝 시점을 기준으로 6개월 이내 병력을 상세히 조사하여 기록하였다. 과거력 및 현 병력에 대하여 발생시기(발생년도 또는 발생년월), 치료기간, 지속여부, 연구자의 의견 등을 기재하였다. 약물투여력은 스크리닝 시점을 기준으로 4주 이내에 선행약물을 모두 확인하였다.

(3) 이학적 검사

각 방문 시 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 대사/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관에 대한 피험자의 임상적 상태를 근거로 이학적 검사를 실시하였다.

(4) 활력징후, 체중

각 방문에서 활력징후(맥박, 혈압), 체중을 측정하여 기록하였다. 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 동일한 시간대에 동일한 피험자의 혈압을 동일한 시험기관 담당자가 측정할 수 있도록 최선을 다하였다.

체중은 가벼운 옷차림 상태에서 공복상태를 기준으로 0.1kg 단위까지 반올림하여 측정하였다.

(5) 식사지도 및 식품섭취빈도 조사

임상시험 대상자로 적합하다고 판정될 경우 방문2에서 지난 일주일간의 도라지 관련식품의 섭취빈도수를 조사하고, 식사지도를 실시하였다. 식사지도 내용은 시험기간 중 시험식품(도라지추출물)의 원재료인 도라지 관련식품 및 건강기능식품을 가급적 섭취하지 않도록 하고, 시험기간 동안 피험자가 작성할 식품섭취빈도조사지 작성방법에 대해 설명하였다. 피험자는 임상시험기간 동안 지난 일주일간 섭취한 도라지 관련 식품의 빈도수를 조사지에 작성해야 하며, 시험담당자는 방문3(Interim visit, week 6), 방문4(Closing visit, week 12)에 작성여부를 확인하였다.

피험자는 시험기간 동안 평소의 신체활동량과 식이섭취량(음주 포함)을 유지하도록 하였다.

(6) 임상병리검사

임상병리검사를 실시하여 피험자의 전신적인 건강상태를 평가하였다. 시험자는 피험자로 하여금 검사당일 공복상태로 내원하도록 지시하였다. 검사 항목에는 다음이 포함되었다.

- 혈액학적 검사: RBC, Hb, Hct, WBC, Platelet, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, MCV
- 혈액화학적 검사: Na, K, Cl, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-cholesterol, Calcium, CK, AST(GOT), ALT(GPT), Protein, Albumin, Glucose, Total bilirubin, ALP, Creatinine, BUN, Uric acid, γ -GTP, LDH, PT, aPTT
- 소변검사: SG, pH, Leukocyte, Nitrite, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Erythrocyte
- 임신반응검사: HCG (※가임기 여성만 해당)
- 갑상선호르몬검사: TSH (방문1에서만 실시)
- 종양표지자검사: AFP (방문1에서만 실시)

- 간염 바이러스검사: HBs Ag, HCV-Ab (방문1에서만 실시)

생화학적 비정상치 기준을 벗어나는 주목할만한 임상병리검사 결과는 피험자가 피험자의 증례 기록서(CRF) 연구자 의견(Comments)란에 평가를 기재하고, 시험자가 적절하다고 판단하는 경우 추가 평가를 실시하였다. 생화학적 비정상치로 인하여 임상적 징후/증상이 야기되거나 치료 중재술이 필요한 경우 피험자의 증례기록서(CRF)의 '이상반응' 페이지에 진단 또는 의학적 상태를 입력하였다. 생화학적 비정상치가 예기치 않은 입원의 주요 원인이거나 이상반응의 중대성 범주에 해당되는 경우 중대한 이상반응의 신속보고 절차를 따르도록 하였다. 또한 피험자가 생화학적 비정상치로 인하여 중도탈락 되는 경우 비정상치가 해소되거나 영구적인 것으로 판단될 때까지 피험자를 추적관찰 하였다.

(7) 심전도 검사

모든 심전도 검사결과는 각 시험기관 별로 판독하고 해석하였다. 결과의 해석은 자격을 갖춘 의사가 실시해야 하며 증례기록서(CRF)에 기록하였다. 임상적으로 유의한 비정상치는 피험자의 증례기록서의 '이상반응' 페이지에 기록하였다. 피험자를 등록하기 전에 임상적으로 유의한 결과를 (주)네오뉴트라 모니터요원과 상의하였다.

(8) Clinical lab

Clinical lab 검사 항목에는 AST(GOT), ALT(GPT), γ -GTP 검사가 포함이 되며 혈액 채취를 통해 방문1, 방문3, 방문4에 시행하였다.

(9) 복부초음파 검사

인체에 거의 무해한 초음파(음파의 일종)를 몸 안에 투사시켜 반사되는 음파를 영상으로 변환, 모니터에 나타내는 검사이다. 인체에 무해하다는 장점으로 상복부 장기 즉, 간, 담낭, 담관, 췌장, 비장 등 검사에 많이 사용하고 있고, 내과영역의 질병의 유무, 병소의 크기와 양상을 진단 하는데 사용한다.

본 임상시험에서는 복부초음파 검사는 선정기준 ②혈액검사에서 AST(GOT) 40~120 IU/L 또는 ALT(GPT) 45~135 IU/L 또는 γ -GTP 60~180 IU/L의 범위에 있는 사람(피험자 스크리닝 당시 기준)에 만족하는 사람을 대상으로 방문2에서 시행하며 검사를 통해 간경변증, 간암 등 이상소견이 발견되는 사람은 본 임상시험에서 제외하였다.

(10) 다차원 피로 척도(Multidimensional Fatigue Scale : MFS) 설문지

다차원 피로 척도는 피로의 다차원 특성을 내포하고 있고, 신뢰도와 타당도 그리고 민감도에

있어 만족할 만한 측정도구로 평가 되어진 Schwartz의 FAI(Fatigue Assessment Inventory)를 토대로 재구성한 다차원 피로 척도 설문으로서, 피로로 인한 육체적, 심리적, 사회적 증상 등을 객관적으로 측정할 수 있도록 표준화된 측정도구이다. 다차원 피로 척도는 표준화된 피로측정 도구로서 갖추어야 할 피로의 다차원적 특성을 포함할 수 있도록 구성되어야 한다는 점, 모든 측정도구에서 동일하게 적용되듯이 응답자가 질문의 내용을 이해할 수 있게끔 어구(wording)가 모호하지 않게 짜여야 한다는 점, 설문지 구성에서 가장 중요한 부분으로 응답자가 응답하는데 지루함이나 짜증을 내지 않도록 가급적 문항수를 적게 만들어야 한다는 점을 전제조건으로 고려하였다.

다차원 피로 척도를 19문항의 3개의 요인(전반적 피로도, 일상생활 기능장애, 상황적 피로)으로 점수 산정방식은 1-2-3-4-5-6-7의 방식을 사용하였다.

12번, 13번, 14번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번이 ‘전반적 피로도’ 8문항이고, 1번, 2번, 3번, 4번, 10번, 11번이 ‘일상생활기능장애’ 6문항이고, 5번, 6번, 7번, 8번, 9번이 ‘상황적 피로’ 5문항이다.

(11) 선정기준/제외기준 확인 (피험자 적합성 평가)

방문1에 이루어진 피험자 동의여부와 인구학적 조사, 병력조사, 이학적 검사, 활력징후 및 체중, 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당), Clinical lab 결과와 방문2에 이루어진 심전도 검사, 복부초음파 검사 결과를 종합하여 선정기준/제외기준에 적합한 피험자인지를 평가하여 기록하였다.

(12) 이상반응 점검

이상반응에 대한 정보는 임상시험 기간 동안의 각 방문에서 피험자에게 우회적으로 질문(Non-directive questioning)하여 탐색하였다. 또한 방문 시 또는 방문 기간 사이에 피험자가 자발적으로 보고하거나 이학적 검사, 임상병리검사 또는 기타 평가를 통하여 확인하도록 하였다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 임상시험용 건강기능식품과 관련하여 취해진 조치 및 임상시험용 건강기능식품과의 인과관계, 임상시험용 건강기능식품 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함되었다.

(13) 무작위배정 및 섭취

방문2에서 선정기준 및 제외기준에 적합하다고 평가가 이루어진 피험자를 대상으로 시험군 또는 대조군으로 무작위 배정하고, 무작위배정번호에 따라 섭취하도록 하였다.

(14) 순응도 확인

시험식품 및 대조식품의 섭취상황에 대하여 방문2, 3에 시험식품/대조식품 처방 후 임상시험

담당자 또는 관리약사가 기록하고, 방문3, 4에 피험자가 지참하고 온 시험식품/대조식품의 잔량을 비교하여 임상시험 담당자 또는 관리약사가 점검하였다. 순응도 확인시 섭취율(%)은 반올림하여 소수점 1자리까지 표기하였다.

다. 대상자의 방문별 진행사항

(1) 1차 방문 (Screening visit, week -1)

본 임상시험에 참가를 원하는 피험자는 임상시험에 대한 설명을 듣고 다음 순서에 따라 평가를 실시하였다.

- 피험자를 시험에 참여시키기 전에 시험 과정을 설명하고, 피험자에게 서면 동의서를 받았다.
- 피험자는 순서대로 연구 ID번호를 지정 받았다.
- 피험자의 인구학적 조사, 병력 조사를 기록하였다.
- 약물투여력 및 병용요법을 조사하여 기록하였다.
- 이학적검사를 시행하고, 결과를 기록하였다.
- 활력징후, 체중검사를 시행하였다.
- 임상병리검사를 실시하였다.
- 임신반응검사(가임기 여성만 해당)를 실시하였다.
- Clinical lab(AST(GOT), ALT(GPT), γ -GTP) 검사를 실시하였다.
- 피험자에게 다음 방문 일을 지정해 주었다.

(2) 2차 방문 (Baseline visit, week 0)

이 방문은 최초 방문일 이후 7일 이내에 이루어지고, 다음 순서에 따라 평가를 실시하였다.

- 약물투여력 및 병용요법 변화를 조사하여 기록하였다.
- 이학적검사를 시행하고, 결과를 기록하였다.
- 활력징후, 체중검사를 시행하였다.
- 심전도 검사를 실시하였다.
- 복부초음파검사를 실시하였다.
- 다차원 피로 척도(MFS)를 조사하였다.
- 1차 방문 평가결과를 종합하여 선정기준/제외기준의 적합성을 평가하였다.
- 무작위배정하였다.
- 시험식품/대조식품을 처방하고, 섭취 방법에 대하여 교육하였다.
- 식사지도 및 식품섭취빈도조사를 시행하였다.
- 다음 방문일을 지정하였다.

(3) 3차 방문 (Interim visit, week 6)

이 방문은 2차 방문일 이후 42일(±7일) 이후에 이루어지고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가를 실시하였다.

- 이상반응 유무를 확인하였다.
- 약물투여력 및 병용요법 변화를 확인하였다.
- 이학적검사를 시행하고, 결과를 기록하였다.
- 활력징후, 체중검사를 시행하였다.
- 식사지도 및 식품섭취빈도조사를 시행하였다.
- 섭취 및 순응도 확인: 피험자가 무작위로 배정된 제품을 전술한 "7.2 섭취량, 섭취방법 및 섭취기간" 따라 섭취토록 하고 순응도를 기록하였다.
- Clinical lab(AST(GOT), ALT(GPT), γ -GTP) 검사를 실시하였다.
- 다차원 피로 척도(MFS)를 조사하였다.
- 시험식품 또는 대조식품을 처방하고, 섭취방법을 다시 한 번 설명하였다.
- 피험자의 다음 방문일을 지정하였다.

(4) 4차 방문 (Closing visit, week 12)

4차 방문은 시험종료일로서 2차 방문일 이후 84일(±5일) 이후에 이루어지고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가를 실시하였다.

- 이상반응 유무를 확인하였다.

- 약물투여력 및 병용요법 변화를 확인하였다.
- 이학적검사를 시행하였다.
- 활력징후, 체중검사를 시행하였다.
- 식사지도 및 식품섭취빈도조사를 시행하였다.
- 섭취 및 순응도를 확인하였다.
- 임상병리검사를 시행하였다.
- 임신반응 검사(가임기여성만 해당)를 시행하였다.
- Clinical lab(AST(GOT), ALT(GPT), γ -GTP) 검사를 실시하였다.
- 심전도 검사를 실시하였다.
- 다차원 피로 척도(MFS)를 조사하였다.

4. 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법

가. 평가기준

(1) 1차 유효성 평가변수

- AST(GOT)
- ALT(GPT)
- γ -GTP

(2) 2차 유효성 평가변수

- 다차원 피로 척도(MFS)

(3) 안전성 평가변수

- 이상반응
- 임상병리검사(혈액학적/생화학적 검사, 요검사)
- 활력징후(맥박, 혈압), 체중
- 심전도 검사

나. 평가방법

(1) 1차 유효성 평가 변수 분석

간기능 손상자를 대상으로 매일 시험식품(도라지추출물)과 대조식품(placebo)을 투여하며, 투여 6주째, 12주째에 시험식품 투여에 의한 AST(GOT), ALT(GPT), γ -GTP 검사치의 평균을 비교하고 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석, 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

(2) 2차 유효성 평가 변수 분석

간기능 손상자를 대상으로 매일 시험식품(도라지추출물)과 대조식품(placebo)을 투여하며, 투여 6주째, 12주째에 시험식품 투여에 의한 다차원 피로 척도(MFS)를 비교하고 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석, 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

(3) 안전성 평가방법

피험자 개인별 이상반응기록표에 기재된 이상반응 빈도, 정도 등과 혈액학적검사, 생화학적검사, 요검사 등의 임상병리검사, 체중과 맥박 및 혈압의 활력징후, 심전도 검사결과에서의 이상소견을 고려하여 평가하였다.

임상병리검사의 이상치, 활력징후 및 심전도 검사결과의 이상소견 중 임상적인 유의성이 있는 경우에는 증례기록서(CRF)의 피험자 개인별 이상반응기록표에 기재하도록 했으며, 통계분석으로 평가하였다.

다. 통계분석

(1) 결과분석의 일반적 원칙

본 임상시험의 피험자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety 분석법, ITT(Intent-to-treat)분석법과 PP(Per protocol)분석법의 세 가지 형태로 분석하였다.

Safety 분석법은 최소한 한 번이라도 임상시험용 건강기능식품을 투여 받았던 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다.

ITT분석법은 최소한 한 번이라도 임상시험용 건강기능식품을 섭취하였던 피험자 중 유효성 평가변수의 베이스라인 및 베이스라인 이후 평가가 있는 무작위 배정된 모든 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. ITT 분석에서 유효성 결과 변수가 결측(Missing)된 경

우에는 LOCF(Last Observation Carried Forward)에 의하여 분석하였다.

PP분석법은 ITT분석에 포함되는 피험자 중 연구계획서대로 완료한 피험자로부터 얻어진 자료를 분석에 포함하였다.

유효성에 대한 자료는 PP분석법을 주 분석법으로 하고, ITT분석을 추가적으로 실시하였다. 안전성에 대한 자료는 Safety분석법을 주 분석법으로 실시하였다.

본 임상시험에서 얻은 자료는 적당한 기술통계량으로 평균(Mean)과 표준편차(Standard deviation)를 산출하여 제시하며, 차이(Difference)에 대한 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

(2) 통계분석 방법

통계분석은 SAS®(Version 9.2, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 분석하였다.

인구학적 평가 분석, 유효성 평가 분석, 안전성 평가 분석은 유의수준 0.05로 설정하여 양측검정을 실시하였다. 모든 분석의 p-value 값에 대해서는 소수점 4자리까지 제시하였으며, 모든 분석의 p-value 값이 < 0.05 면 유의한 것으로 간주하였다. 평균, 표준편차, 백분율 등 소수점 이하의 값을 가지는 수치에 대해서는 소수점 2자리까지 제시하였다.

제 3 절 연구결과

1. 피험자

가. 피험자의 임상시험 참여상태

본 임상시험은 2011년 5월 4일 첫 피험자가 스크리닝 되었고 2012년 4월 25일 피험자의 마지막 방문이 진행되었다.

본 임상시험에서는 적합한 피험자를 선정하기 위해 총 176명의 피험자에 대해서 Screening 평가를 실시하였다. 이 중에서 선정/제외기준 부적합 72명, 동의철회 4명의 사유로 총 76명이 탈락하여 총 100명이 연구에 등록되었다. 시험군 50명, 대조군 50명이 무작위배정되었으나, 이 중 시험군에서 동의철회 4명, 이상반응 2명, 병용금지약물복용 1명의 사유로 총 7명이 중도탈락하였고, 대조군에서 동의철회 4명, 선정/제외기준 위반 1명의 사유로 총 5명의 피험자가 중도탈락하여, 임상시험을 완료한 피험자는 총 88명이었다. 그리고 시험군에서 선정/제외기준위반 1명, 방문기간 위반 7명, 대조군에서 선정/제외기준위반 1명, 방문기간 위반 7명, 병용금지약물복용 1명으로 총 17명이 시험 완료 후 탈락되어 총 71명의 피험자(시험군 35명, 대조군 36명)가 계획서대로 임상시험을 종료하였다.

본 임상시험의 유효성 분석은 PP set을 주 분석 대상자로 하고, ITT set을 추가적으로 분석하였다.

무작위배정된 피험자 100명(시험군 50명, 대조군 50명) 중, ITT set은 계획서에 기술하였던대로 임상시험용 건강기능식품을 적어도 한번 이상 섭취하고 유효성 평가변수의 베이스라인 및 베이스라인 이후 평가가 있는 피험자를 포함하였다. 따라서 ITT set에 포함되는 피험자수는 시험군 50명, 대조군 50명이었다. PP set도 사전에 'ITT분석에 포함된 피험자 중에서 중대한 임상시험계획서 위반 없이 시험을 종료한 피험자'로 계획서에 정의함에 따라 시험군 35명, 대조군 36명이 분석에 포함되었다.

나. 피험자의 인구학적 정보 및 기타 섭취 전 특성에 대한 비교

본 임상시험에 참여한 피험자의 인구학적 정보를 포함한 섭취 전의 모든 특성을 섭취군별로 비교하여 차이가 있는 요인을 확인하고자 하였다.(표1)

섭취 전 피험자들의 인구학적 정보와 특성에 대하여 조사한 결과, 성별에서는 시험군의 경우 남성이 45명(90.00%), 여성이 5명(10.00%)이 포함되었고, 대조군의 경우 남성이 44명(88.00%), 여성이 6명(12.00%) 포함되어 군간 차이가 없었다($p=0.7493$). 연령에서도 시험군의 경우 평균 49.48 ± 10.58 , 대조군의 경우 평균 49.62 ± 10.30 으로 군간 차이가 없었다($p=0.9467$).

표 1. 피험자의 인구학적 정보 및 섭취 전 특성

		시험군	대조군	p-value
		N=50	N=50	
성별	남, n(%)	45 (90.00)	44 (88.00)	0.7493 [§]
	여, n(%)	5 (10.00)	6 (12.00)	
연령(세)	Mean \pm SD	49.48 \pm 10.58	49.62 \pm 10.30	0.9467*
	Min, Max	26.00, 68.00	28.00, 68.00	

*: p-value by t-test

§: p-value by Chi-square test

2. AST(GOT), ALT(GPT), r-GTP 분석

가. AST(GOT), ALT(GPT), r-GTP 변화(PP set)

0주, 6주, 12주에서 측정된 AST(GOT), ALT(GPT), r-GTP 변화를 PP set을 대상으로 분석한 결과이다.(표2)

PP set의 AST(GOT) 변화량 분석에서 시험군에서는 섭취 6주 후 3.60 ± 14.74 감소하였고, 12주 후에는 3.49 ± 23.13 감소하였으나 섭취 군내 및 군간의 통계적으로 유의한 차이가 없었고, ALT(GPT) 변화량 분석에서는 시험군에서 섭취 후 6주, 12주에 각각 7.71 ± 18.60 , 8.91 ± 21.01 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.0194$, $p=0.0170$). 군간에서도 6주, 12주 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.0349$, $p=0.0349$). r-GTP 변화량 분석에서는 시험군에서 섭취 후 6주, 12주에 각각 8.17 ± 25.35 , 15.66 ± 30.23 감소하였고, 12주에서 유의한 차이를 보였다($p=0.0043$). 군간에서도 12주 에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.0047$).

표 2. 방문별 AST(GOT), ALT(GPT), r-GTP 변화량 (PP set)

		시험군	대조군	p-value*
		N=35	N=36	
		Mean ± SD	Mean ± SD	
AST (GOT) (IU/L)	Baseline(방문 1)	40.14 ± 15.77	35.53 ± 14.82	0.2080
	6주(방문3)	36.54 ± 16.03	35.56 ± 14.78	
	Change from baseline	-3.60 ± 14.74	0.03 ± 14.93	0.3066
	p-value**	0.1576	0.9912	
	12주(방문4)	36.65 ± 21.10	36.53 ± 13.40	
	Change from baseline	-3.49 ± 23.13	1.00 ± 14.49	0.3331
	p-value**	0.3789	0.6813	
ALT (GPT) (IU/L)	Baseline(방문 1)	54.63 ± 23.77	45.22 ± 18.22	0.0650
	6주(방문3)	46.91 ± 22.34	47.06 ± 25.11	
	Change from baseline	-7.71 ± 18.60	1.83 ± 18.78	0.0349
	p-value**	0.0194	0.5618	
	12주(방문4)	45.71 ± 25.66	46.42 ± 24.76	
	Change from baseline	-8.91 ± 21.01	1.19 ± 18.53	0.0349
	p-value**	0.0170	0.7013	
r-GTP (IU/L)	Baseline(방문 1)	90.34 ± 47.20	79.58 ± 38.82	0.2972
	6주(방문3)	82.17 ± 49.20	85.31 ± 51.12	
	Change from baseline	-8.17 ± 25.35	5.72 ± 36.59	0.0670
	p-value**	0.0650	0.3545	
	12주(방문4)	74.69 ± 46.19	89.81 ± 58.51	
	Change from baseline	-15.66 ± 30.23	10.22 ± 43.25	0.0047
	p-value**	0.0043	0.1650	

*: Compared between groups; p-value by t - test

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

나. AST(GOT), ALT(GPT), r-GTP 변화(ITT set)

0주, 6주, 12주에서 측정된 AST(GOT), ALT(GPT), r-GTP 변화를 ITT set을 대상으로 분석한 결과이다.(표3)

ITT set 분석의 AST(GOT) 변화량 분석에서 시험군에서는 섭취 6주 후 2.16 ± 12.76 감소하였고, 12주 후에는 2.64 ± 19.64 감소하였으나 섭취 군내 및 군간의 통계적으로 유의한 차이가 없었다. ALT(GPT) 변화량 분석에서 시험군에서는 섭취 후 6주, 12주에 각각 5.22 ± 16.79 , 6.10 ± 19.22 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.0327$, $p=0.0294$). 군간에서도 6주, 12주 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.0254$, $p=0.0296$). r-GTP 변화량 분석에서 시험군에서는 섭취 후 6주, 12주에 각각 1.08 ± 31.90 , 5.76 ± 42.38 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

표 3. 방문별 AST(GOT), ALT(GPT), r-GTP 변화량 (ITT set)

		시험군	대조군	
		N=50	N=50	p-value*
		Mean ± SD	Mean ± SD	
AST (GOT) (IU/L)	Baseline(방문 1)	38.82 ± 14.99	34.94 ± 12.94	0.1690
	6주(방문3)	36.66 ± 15.18	35.32 ± 13.10	
	Change from baseline	-2.16 ± 12.76	0.38 ± 13.44	0.3348
	p-value**	0.2369	0.8424	
	12주(방문4)	36.18 ± 18.81	36.56 ± 13.64	
	Change from baseline	-2.64 ± 19.64	1.62 ± 15.15	0.2274
	p-value**	0.3465	0.4531	
ALT (GPT) (IU/L)	Baseline(방문 1)	51.34 ± 24.84	44.74 ± 18.38	0.1344
	6주(방문3)	46.12 ± 24.31	47.32 ± 24.88	
	Change from baseline	-5.22 ± 16.79	2.58 ± 17.56	0.0254
	p-value**	0.0327	0.3040	
	12주(방문4)	45.24 ± 25.87	47.14 ± 24.58	
	Change from baseline	-6.10 ± 19.22	2.40 ± 19.28	0.0296
	p-value**	0.0294	0.3831	
r-GTP (IU/L)	Baseline(방문 1)	92.84 ± 43.87	79.92 ± 39.61	0.1254
	6주(방문3)	91.76 ± 53.76	85.18 ± 47.97	
	Change from baseline	-1.08 ± 31.90	5.26 ± 32.10	0.3243
	p-value**	0.8118	0.2522	
	12주(방문4)	87.08 ± 57.88	86.18 ± 54.17	
	Change from baseline	-5.76 ± 42.38	6.26 ± 44.10	0.1678
	p-value**	0.3413	0.3204	

*: Compared between groups; p-value by t - test

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

3. 다차원 피로 척도 분석

가. 다차원 피로 척도 분석 결과(PP set)

0주, 6주, 12주에서 방문별 다차원 피로 척도(MFS) 변화를 PP set을 대상으로 분석한 결과이다.(표4)

PP set의 Total의 경우 시험군에서는 섭취 6주 후 1.77 ± 16.18 , 섭취 12주 후에는 0.20 ± 14.54 감소하였으나 섭취 군내 및 군간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

PP set의 일상생활 기능장애 변화량을 분석해본 결과 시험군에서는 섭취 6주 후 1.86 ± 5.52 감소하였으나 시험군내 통계적으로 유의한 차이는 없었고($P=0.0544$), 섭취 12주 후 0.69 ± 5.35 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

또한, 상황적 피로의 변화량을 PP set을 통해 분석해본 결과 섭취 6주 후 0.74 ± 5.40 감소하였으나 시험군내, 섭취군간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

표 4. 방문별 다차원 피로 척도(MFS) 변화량 (PP set)

평가변수	시험군 N=35		대조군 N=36		p-value*
	Mean ± SD		Mean ± SD		
TOTAL	Baseline(방문2)	81.03 ± 20.74	71.50 ± 17.52		
	6주(방문3)	79.26 ± 21.40	72.25 ± 19.32		
	Change from baseline	-1.77 ± 16.18	0.75 ± 14.65		0.4933
	p-value**	0.5215	0.7606		
	12주(방문4)	81.23 ± 19.54	69.08 ± 16.10		
	Change from baseline	-0.20 ± 14.54	-2.42 ± 17.16		0.4910
	p-value**	0.9356	0.4037		
전반적 피로도	Baseline(방문2)	32.54 ± 10.24	27.69 ± 9.25		
	6주(방문3)	33.37 ± 10.96	28.61 ± 8.92		
	Change from baseline	0.83 ± 7.54	0.92 ± 7.41		0.9605
	p-value**	0.5198	0.4630		
	12주(방문4)	33.20 ± 9.29	27.50 ± 7.80		
	Change from baseline	0.66 ± 6.79	-0.19 ± 8.50		0.6429
	p-value**	0.5707	0.8916		
일상생활 기능장애	Baseline(방문2)	26.63 ± 6.77	24.08 ± 5.92		
	6주(방문3)	24.77 ± 7.03	24.03 ± 6.41		
	Change from baseline	-1.86 ± 5.52	-0.06 ± 5.17		0.1600
	p-value**	0.0544	0.9490		
	12주(방문4)	25.94 ± 6.69	22.25 ± 5.49		
	Change from baseline	-0.69 ± 5.35	-1.83 ± 5.91		0.3945
	p-value**	0.4536	0.0712		
상황적 피로	Baseline(방문2)	21.86 ± 6.15	19.72 ± 4.71		
	6주(방문3)	21.11 ± 5.10	19.61 ± 5.66		
	Change from baseline	-0.74 ± 5.40	-0.11 ± 5.16		0.6161
	p-value**	0.4217	0.8980		
	12주(방문4)	22.09 ± 4.85	19.33 ± 4.47		
	Change from baseline	0.23 ± 4.95	-0.39 ± 4.97		0.6018
	p-value**	0.7865	0.6416		

*: Compared between groups; p-value by t - test

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

나. 다차원 피로 척도 분석 결과(ITT set)

0주, 6주, 12주에서 방문별 다차원 피로 척도(MFS) 변화를 ITT set으로 분석한 결과이다.(표5)
Total의 경우 ITT set을 통해 분석해본 결과 시험군에서는 섭취 6주 0.38 ± 14.99 감소하였으나
섭취 군내 및 군간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

일상생활 기능장애의 변화량을 ITT set을 통해 분석해본 결과 시험군에서는 섭취 6주 후
 1.02 ± 5.37 감소하였고 섭취 12주 후에는 0.26 ± 5.39 감소하였으나 섭취 군내 및 군간 통계적으로
유의한 차이는 보이지 않았다.

상황적 피로의 변화량을 ITT set을 통해 분석해본 결과 시험군에서는 섭취 6주 후 0.14 ± 4.97
감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다.

표 5. 방문별 다차원 피로 척도(MFS) 변화량 (ITT set)

평가변수	시험군	대조군	p-value*	
	N=50	N=50		
	Mean ± SD	Mean ± SD		
TOTAL	Baseline(방문2)	75.48 ± 22.92	72.76 ± 18.51	
	6주(방문3)	75.10 ± 21.68	72.68 ± 19.13	
	Change from baseline	-0.38 ± 14.99	-0.08 ± 14.19	0.9183
	p-value**	0.8585	0.9684	
	12주(방문4)	76.28 ± 20.57	70.72 ± 16.82	
	Change from baseline	0.80 ± 13.59	-2.04 ± 15.39	0.3303
p-value**	0.6789	0.3531		
전반적 피로도	Baseline(방문2)	30.34 ± 10.73	28.84 ± 9.43	
	6주(방문3)	31.12 ± 11.04	28.96 ± 8.66	
	Change from baseline	0.78 ± 6.85	0.12 ± 7.02	0.6354
	p-value**	0.4247	0.9043	
	12주(방문4)	31.12 ± 10.03	28.28 ± 7.82	
	Change from baseline	0.78 ± 6.23	-0.56 ± 7.57	0.3362
p-value**	0.3804	0.6033		
일상생활 기능장애	Baseline(방문2)	24.86 ± 7.99	24.40 ± 6.40	
	6주(방문3)	23.84 ± 7.21	24.32 ± 6.89	
	Change from baseline	-1.02 ± 5.37	-0.08 ± 5.60	0.3935
	p-value**	0.1851	0.9199	
	12주(방문4)	24.60 ± 6.98	23.02 ± 6.02	
	Change from baseline	-0.26 ± 5.39	-1.38 ± 5.42	0.3028
p-value**	0.7343	0.0782		
상황적 피로	Baseline(방문2)	20.28 ± 6.49	19.52 ± 4.70	
	6주(방문3)	20.14 ± 5.34	19.40 ± 5.40	
	Change from baseline	-0.14 ± 4.97	-0.12 ± 4.82	0.9837
	p-value**	0.8428	0.8609	
	12주(방문4)	20.56 ± 5.31	19.42 ± 4.45	
	Change from baseline	0.28 ± 4.44	-0.10 ± 4.64	0.6765
p-value**	0.6576	0.8795		

*: Compared between groups; p-value by t-test

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

4. 안전성 평가 결과

안전성 평가는 Safety 분석을 주분석법으로 시행하였으며, 임상시험에 무작위배정 후 임상시험용 식품이 섭취된 시험군 50명, 대조군 50명이 분석에 포함되었다. 분석 대상자는 무작위 배정되어 임상시험용 식품을 적어도 한번 이상 섭취한 피험자 중 안전성 관련 정보가 수집된 피험자이다. 이상반응 종류 및 발생율을 평가하였으며, 임상병리검사(혈액학적검사, 생화학적검사, 요검사), 활력징후(맥박, 혈압), 심전도 검사를 분석하였다.

안전성 평가변수에 대한 군간 검정은 양측검정을 실시하였고, 양측검정에 대한 유의확률값(p-value)을 제시하였다.

가. 혈액학적 검사

방문별 혈액학적 검사결과를 분석한 것이다. 분석 결과 모든 항목의 섭취 군내 및 군간에서 통계적으로 유의한 결과가 나타나지 않았다.(표 6)

표 6. 방문별 혈액학적 검사 (Safety set)

		시험군	대조군	p-value*
		N=50	N=50	
		Mean±SD	Mean±SD	
RBC (106/ml)	Baseline(방문 1)	4.87±0.43	4.94±0.40	0.6578
	12주(방문4)	4.85±0.43	4.94±0.42	
	Change from baseline	-0.01±0.18	0.00±0.19	
	p-value**	0.6020	0.9080	
Hb (g/dl)	Baseline(방문 1)	15.14±1.13	15.23±1.16	0.5736
	12주(방문4)	15.22±1.13	15.37±1.23	
	Change from baseline	0.08±0.58	0.14±0.62	
	p-value**	0.3600	0.1081	
Hct (%)	Baseline(방문 1)	44.84±2.93	45.17±3.23	0.6763
	12주(방문4)	44.60±3.11	45.07±3.53	
	Change from baseline	-0.25±1.90	-0.10±1.67	
	p-value**	0.3604	0.6809	
WBC (103/ml)	Baseline(방문 1)	6.31±1.76	6.33±1.72	0.4129
	12주(방문4)	6.62±1.86	6.40±1.64	
	Change from baseline	0.31±1.66	0.06±1.27	
	p-value**	0.1964	0.7214	
Platelet (103/ml)	Baseline(방문 1)	235.50±47.55	243.12±66.44	0.2315
	12주(방문4)	241.24±52.36	243.52±78.22	
	Change from baseline	5.74±17.39	0.40±26.07	
	p-value**	0.0237	0.9140	

*: Compared between groups; p-value by t - test

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

나. 생화학적 검사

방문별 생화학적 검사 결과를 분석한 것이다.(표7)

생화학적 검사의 섭취 군내 분석에서는 Calcium, Protein 에서 시험군내 유의한 차이(p=0.0018, p=0.0267)를 보였으나, 모두 정상범위 이내의 변화 이거나 임상적 의미가 없는 비정상으로 판단되었다. 대조군에서는 유의한 차이를 보이는 검사항목이 없었다. 섭취 군간에서는 Protein과 Albumin에서 통계적으로 유의한 결과를 보였다(p=0.0082, p=0.0296). 그러나 정상범위 내에서의 변화였고, 임상적 의미가 없는 것으로 연구자가 판단하였다.

표 7. 방문별 생화학적 검사 (Safety set)

		시험군 N=50 Mean±SD	대조군 N=50 Mean±SD	p-value*
Na (mmol/L)	Baseline(방문 1)	140.32±2.01	140.70±1.80	
	12주(방문4)	140.28±2.03	140.50±2.48	
	Change from baseline	-0.04±2.32	-0.20±1.70	0.6952
	p-value**	0.9035	0.4101	
K (mmol/L)	Baseline(방문 1)	4.26±0.33	4.28±0.33	
	12주(방문4)	4.25±0.33	4.25±0.25	
	Change from baseline	-0.01±0.36	-0.03±0.29	0.7858
	p-value**	0.8772	0.5328	
Cl (mmol/L)	Baseline(방문 1)	103.16±2.25	103.42±2.16	
	12주(방문4)	103.24±1.92	103.38±2.40	
	Change from baseline	0.08±2.35	-0.04±2.03	0.7855
	p-value**	0.8111	0.8898	
Calcium (mg/dl)	Baseline(방문 1)	9.41±0.36	9.34±0.29	
	12주(방문4)	9.27±0.34	9.30±0.27	
	Change from baseline	-0.14±0.30	-0.04±0.29	0.1101
	p-value**	0.0018	0.2967	
CK (IU/L)	Baseline(방문 1)	141.46±118.44	138.14±74.90	
	12주(방문4)	242.46±580.95	138.96±81.27	
	Change from baseline	101.00±581.77	0.82±98.60	0.2354
	p-value**	0.2255	0.9533	
Protein (g/dl)	Baseline(방문 1)	7.56±0.39	7.44±0.38	
	12주(방문4)	7.46±0.37	7.50±0.34	
	Change from baseline	-0.10±0.30	0.06±0.28	0.0082
	p-value**	0.0267	0.1390	

표 7. 방문별 생화학적 검사 (Safety set) 계속

		시험군 N=50 Mean ± SD	대조군 N=50 Mean ± SD	p-value*
Albumin (g/dl)	Baseline(방문 1)	4.68 ± 0.21	4.63 ± 0.23	
	12주(방문4)	4.65 ± 0.23	4.68 ± 0.24	
	Change from baseline	-0.04 ± 0.16	0.04 ± 0.19	0.0296
	p-value**	0.1267	0.1216	
Glucose (mg/dl)	Baseline(방문 1)	109.14 ± 24.89	101.92 ± 19.99	
	12주(방문4)	105.68 ± 21.03	104.86 ± 22.92	
	Change from baseline	-3.46 ± 18.08	2.94 ± 14.77	0.0554
	p-value**	0.1822	0.1655	
T. Bilirubin (g/dl)	Baseline(방문 1)	0.88 ± 0.41	0.80 ± 0.32	
	12주(방문4)	0.88 ± 0.42	0.84 ± 0.32	
	Change from baseline	-0.00 ± 0.26	0.04 ± 0.24	0.3823
	p-value**	0.9129	0.2522	
ALP	Baseline(방문 1)	104.48 ± 63.44	98.96 ± 59.89	
	12주(방문4)	105.18 ± 67.23	102.76 ± 61.44	
	Change from baseline	0.70 ± 13.44	3.80 ± 17.49	0.3228
	p-value**	0.7143	0.1309	
Creatinine (mg/dl)	Baseline(방문 1)	0.88 ± 0.15	0.87 ± 0.14	
	12주(방문4)	0.88 ± 0.15	0.87 ± 0.13	
	Change from baseline	-0.00 ± 0.06	0.01 ± 0.07	0.5115
	p-value**	0.8341	0.4982	
BUN (mg/dl)	Baseline(방문 1)	14.06 ± 3.69	14.33 ± 3.36	
	12주(방문4)	14.24 ± 3.70	14.62 ± 3.37	
	Change from baseline	0.18 ± 2.95	0.29 ± 3.05	0.8653
	p-value**	0.6606	0.5104	
Uric acid (mg/dl)	Baseline(방문 1)	6.29 ± 1.63	6.09 ± 1.27	
	12주(방문4)	6.26 ± 1.70	6.00 ± 1.20	
	Change from baseline	-0.03 ± 0.79	-0.08 ± 0.76	0.7285
	p-value**	0.7894	0.4389	
LDH	Baseline(방문 1)	282.96 ± 102.49	290.74 ± 109.08	
	12주(방문4)	282.20 ± 99.39	282.42 ± 93.93	
	Change from baseline	-0.76 ± 34.08	-8.32 ± 38.89	0.3037
	p-value**	0.8753	0.1367	

표7. 방문별 생화학적 검사 (Safety set) 계속

		시험군 N=50 Mean ± SD	대조군 N=50 Mean ± SD	p-value*
Total Chole. (mg/dl)	Baseline(방문 1)	186.68±40.97	194.02±31.63	
	12주(방문4)	182.18±31.59	198.18±38.41	
	Change from baseline	-4.50±27.06	4.16±29.60	0.1300
	p-value**	0.2453	0.3252	
Triglyceride	Baseline(방문 1)	237.20±165.32	210.54±114.20	
	12주(방문4)	199.66±103.73	219.18±259.44	
	Change from baseline	-37.54±134.31	8.64±236.33	0.2333
	p-value**	0.0538	0.7971	
HDL-chole.	Baseline(방문 1)	49.98±13.93	51.72±12.88	
	12주(방문4)	50.40±13.32	53.88±13.19	
	Change from baseline	0.42±8.34	2.16±8.02	0.2904
	p-value**	0.7235	0.0628	
LDL-chole.	Baseline(방문 1)	114.32±40.08	123.58±30.87	
	12주(방문4)	116.86±32.35	127.40±32.18	
	Change from baseline	2.54±20.98	3.82±21.49	0.7638
	p-value**	0.3961	0.2148	
PT	Baseline(방문 1)	12.27±0.53	12.28±0.50	
	12주(방문4)	12.31±0.51	12.32±0.48	
	Change from baseline	0.03±0.49	0.04±0.35	0.9442
	p-value**	0.6292	0.4182	
aPTT	Baseline(방문 1)	31.16±5.97	30.36±7.45	
	12주(방문4)	31.30±6.07	30.90±5.77	
	Change from baseline	0.14±1.83	0.54±4.61	0.5732
	p-value**	0.5797	0.4107	

*: Compared between groups; p-value by t - test

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

다. 활력징후(맥박, 혈압 결과)의 평가

방문별 활력징후 검사결과를 나타낸 것이다(표8). 분석결과 통계적으로 섭취군내 및 군간에 유의미한 결과를 보이는 항목은 없었다.

표 8. 방문별 활력징후 검사 (Safety set)

		시험군 N=50 Mean ± SD	대조군 N=50 Mean ± SD	p-value*
체중(kg)	Baseline(방문2)	74.78 ± 9.39	72.74 ± 9.80	
	6주(방문3)	74.72 ± 9.55	72.78 ± 9.76	
	Change from baseline	-0.06 ± 1.34	0.04 ± 1.12	0.6864
	p-value**	0.7535	0.8009	
	12주(방문4)	74.88 ± 9.67	72.67 ± 9.67	
	Change from baseline	0.10 ± 1.61	-0.07 ± 1.09	0.5339
	p-value**	0.6629	0.6429	
맥박 (회/min)	Baseline(방문2)	77.92 ± 9.90	75.20 ± 9.09	
	6주(방문3)	77.32 ± 9.43	72.60 ± 9.12	
	Change from baseline	-0.60 ± 7.06	-2.60 ± 10.94	0.2806
	p-value**	0.5505	0.0993	
	12주(방문4)	77.76 ± 10.82	74.28 ± 8.43	
	Change from baseline	-0.16 ± 7.95	-0.92 ± 8.52	0.6457
	p-value**	0.8875	0.4487	
수축기압 (mmHg)	Baseline(방문2)	130.80 ± 13.78	128.50 ± 11.97	
	6주(방문3)	131.98 ± 13.68	129.64 ± 11.48	
	Change from baseline	1.18 ± 15.35	1.14 ± 11.73	0.9884
	p-value**	0.5893	0.4953	
	12주(방문4)	130.38 ± 13.54	128.68 ± 11.74	
	Change from baseline	-0.42 ± 13.99	0.18 ± 10.94	0.8117
	p-value**	0.8328	0.9078	
이완기압 (mmHg)	Baseline(방문2)	82.74 ± 9.77	79.76 ± 8.49	
	6주(방문3)	84.34 ± 9.52	81.04 ± 7.84	
	Change from baseline	1.60 ± 8.45	1.28 ± 7.81	0.8446
	p-value**	0.1870	0.2524	
	12주(방문4)	84.38 ± 8.54	81.58 ± 8.03	
	Change from baseline	1.64 ± 8.93	1.82 ± 6.76	0.9098
	p-value**	0.2004	0.0627	

*: p-value by t - test of change from baseline(방문2)

** : p-value by paired t-test in group(compare with Baseline)

5. 고찰 및 결론

1차 유효성 평가인 AST(GOT), ALT(GPT), r-GTP 분석결과는 다음과 같다.

PP set의 AST(GOT) 변화량 분석에서 시험군에서는 섭취 6주 후 3.60 ± 14.74 감소하였고, 12주 후에는 3.49 ± 23.13 감소하였으나 섭취 군내 및 군간의 통계적으로 유의한 차이가 없었고, ALT(GPT) 변화량 분석에서는 시험군에서 섭취 후 6주, 12주에 각각 7.71 ± 18.60 , 8.91 ± 21.01 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.0194$, $p=0.0170$). 군간에서도 6주, 12주 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.0349$, $p=0.0349$). r-GTP 변화량 분석에서는 시험군에서 섭취 후 6주, 12주에 각각 8.17 ± 25.35 , 15.66 ± 30.23 감소하였고, 12주에서 유의한 차이를 보였다($p=0.0043$). 군간에서도 12주에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.0047$).

ITT set 분석의 AST(GOT) 변화량 분석에서 시험군에서는 섭취 6주 후 2.16 ± 12.76 감소하였고, 12주 후에는 2.64 ± 19.64 감소하였으나 섭취 군내 및 군간의 통계적으로 유의한 차이가 없었다. ALT(GPT) 변화량 분석에서 시험군에서는 섭취 후 6주, 12주에 각각 5.22 ± 16.79 , 6.10 ± 19.22 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.0327$, $p=0.0294$). 군간에서도 6주, 12주 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.0254$, $p=0.0296$). r-GTP 변화량 분석에서 시험군에서는 섭취 후 6주, 12주에 각각 1.08 ± 31.90 , 5.76 ± 42.38 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

2차 유효성 평가인 다차원 피로척도(MFS)의 분석결과는 다음과 같다.

PP set의 Total의 경우 시험군에서는 섭취 6주 후 1.77 ± 16.18 , 섭취 12주 후에는 0.20 ± 14.54 감소하였으나 섭취 군내 및 군간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다. PP set의 일상생활 기능장애 변화량을 분석해본 결과 시험군에서는 섭취 6주 후 1.86 ± 5.52 감소하였고 시험군내 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으며 12주 후에는 0.69 ± 5.35 감소하였고 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 또한, 상황적 피로의 변화량을 PP set을 통해 분석해본 결과 섭취 6주 후 0.74 ± 5.40 감소하였으나 섭취 군내 및 군간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

ITT set 분석결과 Total의 경우 시험군에서는 섭취 6주 0.38 ± 14.99 감소하였으나 섭취 군내 및 군간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 일상생활 기능장애의 변화량을 ITT set을 통해 분석해본 결과 시험군에서는 섭취 6주 후 1.02 ± 5.37 감소하였고 섭취 12주 후에는 0.26 ± 5.39 감소하였으나 섭취 군내 및 군간 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 상황적 피로의 변화량을 ITT set을 통해 분석해본 결과 시험군에서는 섭취 6주 후 0.14 ± 4.97 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다.

결과적으로 간기능 손상자에 대한 도라지 추출물은 간기능 개선 효과가 있는 것으로 판단된다. 이는 간기능 손상자에게 도라지 추출물은 간기능 개선 효과가 있는 안전한 건강기능식품이라고 판단된다.


제 8절 건강기능식품 인허가 및 시제품 제작

1. 인허가 절차(경과) 및 서류

- 한국 식품의약품 안전처 건강기능식품 개별인정 등록 (2013년 9월 26일).
- 인정번호 : 기능성원료 인정 제2013-26호('13.08.28) ((주)비엔씨바이오팜)

[별지 제3호 서식]

(앞쪽)

건강기능식품 기능성 원료 인정서	국내	수입
	○	
<p>제 2013-26호</p> <p>대표자 : 김 종 우 업체명 : ㈜비엔씨바이오팜 소재지 : 경기도 수원시 영통구 아외동 906-5 차세대융합기술연구원 D-1동 2층 원료명 : 도라지추출물</p>		
<p>수출국 : 중국 수출국 제조회사명 : ZHEJIANG SKYHERB INGREDIENTS 수출국 제조회사 소재지 : Tangpu Industry Park, Economic Development Zone, Anji, Zhejiang</p>		
<p>「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제10조제1항에 따라 건강기능식품 기능성 원료로 인정합니다.</p> <p style="text-align: right;">2013년 8월 27일</p> <p style="text-align: center;">식품의약품안전처 </p>		

2. 시험방법 확립(Validation etc)

가. 장비와 재료

(1) 실험실 장비 및 소모품

부피플라스크, HPLC용 유리병, 일회용 실린지, 여과용 멤브레인필터(0.45 um syringe filter), HPLC용 유리병, 일회용 실린지,인필터(0.45 um syringe filter)

(2) 분석장비

- 고속액체크로마토그래프(HPLC)
- ELSD (Evaporative Light Scattering Detector)
- Column: ZORBAX Eclipse Plus C18(3.5um, 4.6×150mm, Agilent Technologies) 또는 이와 동등한 것

나. 표준물질 및 일반시약

(1) 표준물질 : Platycodin D (Futuro Laboratories, Inc, 순도 97.79%)

(2) 일반시약 : 메탄올(HPLC급), Acetonitrile(HPLC급), DW, Formic acid(Sigma, 695076)

다. 시험과정

(1) 표준용액 제조

(가) 표준품을 정밀히 칭량하여(약 5.0mg) 이를 10ml 부피 플라스크에 넣는다.

(나) 부피 플라스크에 50% 메탄올 약 5.0ml을 넣은 후 37°C shaking Incubator에서 30분간 교반하고 50% 메탄올로 표선을 맞추고 이를 표준원액(stock solution)으로 한다.

(다) 이 표준원액을 50% 메탄올을 이용하여 단계별 일정 농도로 희석한 후 검량선 작성용 표준용액으로 한다(0.0~500.0ug/mL 범위).

(2) 시험용액 제조

(가) 시료 약 200.0mg을 정확히 칭량하여 10ml 부피 플라스크에 넣는다.

(나) 부피 플라스크에 50% 메탄올 약 5.0ml을 넣은 후 37°C shaking incubator에서 6시간 교반하여 충분히 녹이고 50% 메탄올로 표선을 맞춘다.

(다) 상기 용액을 시험용액으로 하여 분석한다.

라. 분석 및 계산

(1) 기기분석

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

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건
주입량	20 ul
칼럼온도	25℃
이동상	A: 0.0015% Formic acid in DW B: Acetonitrile C: Methanol
유속	0,6 mL/분
Post-run	17.5 min

표 2. 이동상 조건

Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0.00	75	20	5
10.00	75	20	5
17.00	72,5	22,5	5
25.00	72,5	22,5	5
34.00	71	24	5
42.00	71	24	5
52.00	70	25	5
60.00	70	25	5
60.50	0	50	0
77.50	0	50	0

(2) 계산

<p>Platycodin D 함량 (mg/g)</p> $= C \times (V / W) \times P \times D$ <p>C: 시험 용액 중의 Platycodin D 농도 (mg/mL) V: 시험 용액의 전량(mL) W: 시료채취량 (g) P: 표준품 순도 D: 회석배수</p>
--

마. 시제품제작



< 제품구성 >

- 제품명 : DRJ 프로젝트
- 판매사 : ㈜비엔씨바이오팜
- 원산지 : 국내산
- 제품 구성 : DR.J 120정 2병 (192g)

< 제품특성 >

- 천연물 C형 간염치료제- Dr. J 프로젝트의 연구 성과를 기반으로 개발된 식품으로 C형 간염치료제 전문 연구개발 기업 ㈜비엔씨바이오팜에서 개발한 기존의 일반식품과는 차별화되는 고급 제품입니다.
- 오랜 기간 동안 식용, 약용으로 이용되어 온 천연물을 원료로 하여 매우 탁월한 안전성을 갖고 있으므로 누구나 안전하게 드실 수 있습니다.
- “현재 C형 간염의 유일한 치료제로 알려진 인터페론과 ‘Dr. J’를 병용할 경우 치료효과가 높다고 밝혔다”.
- ‘Dr. J’ 관련 제품을 ‘건강식품’ 형태로 우선 출시함 (출처: 머니투데이, 2011.06.13).

2. 도라지추출물의 정제 제형화 연구

가. 실험개요

국내외 건강기능식품 중의 대다수를 차지하고 있는 제형은 정제, 캡슐 등의 제형으로써, 이는 섭취와 휴대가 간편하고 일반 식품 등과의 차별성 부여하는 제형으로 제품화의 우선 접근 제형으로 선정하였다. 도라지추출물 원료는 수용성 추출물을 근간으로 하는 분말타입의 원료이므로, 이를 이용한 정제(Tablet)제형에 적합하다고 판단되어 이에 대한 제형화를 진행하였다. 또한, 일부 소비자들에게서 속쓰림, 더부룩함 등의 경미한 위장장애에 대한 섭취의견이 있었던 바, 위에서는 봉해되지 않고 소장에서 봉해될 수 있도록 장용성 코팅 제제로써 제형화를 진행하였다.

나. 실험 목적

(1) 제조 정제의 특징

- 용량이 정확하고, 사용 및 휴대가 간편하며, 대량생산을 통해 가격이 저렴함
- 제피에 의해 쓴맛이나 냄새를 방지하고 서방성 또는 장용성 제제를 제조가능

(2) 정제 제조 시 고려사항

- 제제의 안전성, 유효성, 목적, 제형의 형태, 용량
- 원료의 물리화학적 성질: 안정성, 용해도, 분말의 성질, 부형제와의 상호작용 등
- 사용성 및 편리성, 가격, 윤리성, 경제성
- 제조설비, 원료의 입하 및 유용성, 생산단가 및 견적

(3) 첨가제 선정

(가)목적

- 기능성분을 최종 섭취제형으로 성형하고 물리화학적 특성을 개선

(나) 역할

- 건강기능식품 제조 공정의 보조역할
- 건강기능식품의 기능성 내용 개선: 안정성, 생체이용률, 섭취순응도 향상
- 보관 및 사용 중 제품의 안전성 및 효능 향상

(다) 첨가제 조건

- 인체에 무해한 물질
- 첨가제 자체 또는 첨가제 내 불순물이 제제 성분, 포장재료 등과 상호반응 없음
- 건강기능식품 품질관리 시에 기준 시험법에 지장을 주지 않음
- 원료의 입하가 용이하고 경제적인 물질

(라) 첨가제의 종류

첨가제	용도	첨가제 예
결합제	정제용 과립의 분말 부착성 부여	HPMC
부형제	벌크, 유동성, 압축성의 부여	유당
붕해제	고형제제의 붕해에 도움	CMC-Na
유동화제	분말의 유동성 개선	옥수수전분
활택제	타정시 분말과 기기의 마찰 감소	이산화규소
가소제	코팅 시 피막물질의 특성 보조	글리세린

다. 시험결과

(1) 배합비

원료명	배합비(%)	비고
도라지추출물	89.286	건강기능식품 원료
카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	0.969	붕해제
히드록시프로필메틸셀룰로오스	4.013	결합제
스테아린산마그네슘	0.969	활택제
프탈산히드록시프로필메틸셀룰로오스	4.248	장용성 코팅제
이산화티타늄	0.021	색소
글리세린지방산에스테르	0.425	유화제
천연치자색소	0.067	색소
합계	100.000	

(2) 제품 규격

원료명	지표성분 표시량(1일 3,360mg)	비고
도라지 추출물	도라지추출물로써 3g (Platycodin D 27.9mg)	개별인정서 2013-26호

- 제품규격(내용물) : 840mg/정, 1일 4정 섭취(3,360mg/일)

(3) 제품 외관



- 담갈색의 장용성 정제

(4) 제조 공정

: 원료칭량 → 건조 → 혼합, 과립 → 2차 혼합 → 타정 → 코팅 → 선별 → 포장 → 자가 규격검사 → 출고

3. 도라지추출물 정제의 유통기한 설정 실험

가. 가속 시험 조건 및 시험기간

- 온도조건 : 4℃, 25℃, 40℃
- 시험기간 : 2013. 8. 10. ~ 2013. 10. 10 (3개월)

나. 저장온도별 저장기간에 따른 기능성분의 함량 변화

- 일반항목 시험결과

시험항목	제조사	상온(25℃)			가속(40℃)		
		1개월	2개월	3개월	1개월	2개월	3개월
성상	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
붕해도 (장용성)	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
납	불검출	-	-	불검출	-	-	불검출
총비소	불검출	-	-	불검출	-	-	불검출
카드뮴	불검출	-	-	불검출	-	-	불검출
총수은	불검출	-	-	불검출	-	-	불검출

- 가속 실험 결과

분류	수분함량(%)	플라티코딘D(%)
생산당일	1.90	110.00

온도(℃)	수분함량(%)	플라티코딘D(%)
1개월		
4	1.85	109.73
25	1.90	109.87
40	1.92	108.93
2개월		
4	1.92	109.87
25	1.85	109.73
40	1.85	108.00
3개월		
4	1.85	109.07
25	1.92	107.73
40	1.90	106.93

※ 표시량 대비 결과 자료

다. 품질지표별 반응속도상수(K) 산출

품질지표	반응차수	온도	회귀방정식 기울기	회귀방정식 절편	결정계수
수분함량	0	4	0.000	1.873	0.000
수분함량	0	25	0.000	1.870	0.077
수분함량	0	40	0.000	1.910	0.077
수분함량	1	4	0.000	0.628	0.000
수분함량	1	25	0.000	0.626	0.075
수분함량	1	40	0.000	0.647	0.075
플라티코딘D	0	4	-0.012	110.217	0.597
플라티코딘D	0	25	-0.038	111.250	0.799
플라티코딘D	0	40	-0.036	109.953	0.998
플라티코딘D	1	4	0.000	4.702	0.597
플라티코딘D	1	25	0.000	4.712	0.798
플라티코딘D	1	40	0.000	4.700	0.998

- 회귀 분석을 통하여, 가속 실험 중 지표성분인 플라티코딘D가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 아래의 조건에서 가장 최대 결정계수가 높음을 확인하였고, 감소되는 정도를 아레니우스방정식을 이용하여 유통기한을 예측하는 지표로써 활용함.

항목	최대결정계수	품질지표	차수	온도
	0.998	플라티코딘D	0	40

라. 온도에 대한 품질지표의 활성화에너지(Ea) 산출

품질지표의 회귀 방정식

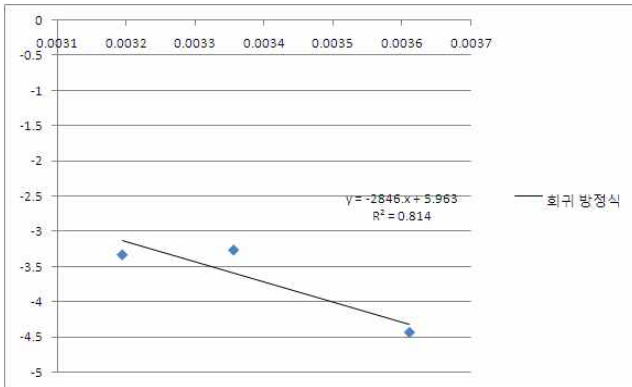
품질지표	반응차수	온도	기울기	절편	결정계수
플라티코딘D	0	4	-0.012	110.217	0.597
플라티코딘D	0	25	-0.038	111.250	0.799
플라티코딘D	0	40	-0.036	109.953	0.998

품질지표의 한계규격 및 품질한계

	초기값	한계규격	품질한계
플라티코딘D	110.000	80.000	80.000

□ 온도별 반응속도 상수 및 활성화에너지 산출

온도(°C)	온도(T)	1/T	K	LnK	Arrhenius Equation	
4	277	0.00361	0.012	-4.44087	항목	값
25	298	0.003356	0.038	-3.26455	기울기	-2846.94
40	313	0.003195	0.036	-3.3322	절편	5.963
					R	1.987
					Ea(cal/mole)	-5656.87



마. 유통기간 산출

□ 연간 반응 속도 상수 산출

온도(°C)	온도(T)	1/T	LnK	K	연간 예상 유통 일수 (일)	연간 예상 반응속도상수(K)
10	283	0.003534	-4.09676	0.016626	152	2.52722
15	288	0.003472	-3.92211	0.019799	30	0.59398
20	293	0.003413	-3.75342	0.023437	61	1.42968
25	298	0.003356	-3.59039	0.027587	60	1.65525
30	303	0.0033	-3.43275	0.032298	62	2.00249
합계 (연간변화반응속도 상수)						8.20861

□ 유통기간 산출

최초규격	품질규격	차이	연간변화 반응속도상수	예상 유통기한(일)	안전계수	예상 안전 유통기한(일)
110.000	80.000	35.000	8.20861	1333.97	0.7	933.8

바. 유통 기한

-도라지추출물을 이용한 정제를 제조 직후부터 가속조건 (4°C, 25°C, 40°C)에서 12주 간 안정성시험을 실시한 결과, 일반항목 (성상, 붕해도, 납, 총비소, 카드뮴, 총수은, 대장균군)에서 기

준규격에 적합하였으며, 또한 지표성분(플라티코딘 D)의 함량을 가속조건에서 확인하고, 아레니우스 방정식을 이용하여 유통기한을 예측한 결과, 국내 상온 유통으로 판매 할 경우, 약 1,334일간 표시량의 80% 이상으로 유지되는 것으로 확인되어, 이에 대한 안전계수(0.7)를 감안하여, 약 934(2.6년)일의 안전성을 확인하였다.

- 건강기능식품 기준·규격에 적합한 원료를 사용하여 각 공정별로 위생적이고, 엄중하게 품질관리를 실시한 당해 제품은 밀폐용기 또는 밀폐포장재질로 포장하여 실온에서 유통되므로 상기 가속시험 결과에 근거하여 24개월 이내에 품질 변화요인은 없다고 판단됨. 따라서, 적정 유통기간을 24개월로 설정하다.

4. 도라지추출물의 액상 제형화 연구

가. 개요

- 국내 간 건강 제품들의 트렌드는 30-40대 이상의 중장년층 남성을 타겟으로 한 액상타입의 음료 제형의 제품이 다수 개발되고 있으며, 이에 대한 매출 규모도 지속적으로 성장하고 있다.

- 이는 비단, 건강기능식품 원료를 사용한 제품 뿐만 아니라, “헛개나무”처럼 일반식품으로도 제품화하여 소비자들에게 건강지향식품으로써 원료소재가 포지셔닝 될 수 있는 가능성이 있는 바, 도라지의 경우에도 일반도라지 농축액을 이용하여, 이와 같은 접근이 필요하다고 판단된다.

나. 실험 목적

- 기존의 도라지 농축액을 식물성 유산균을 활용하여 발효공정을 추가함으로써, 도라지 특유의 이미/이취를 저감화하여 음용이 편리한 액상 형태의 일반식품을 만드는 것을 목표로 함.

다. 실험 내용

(1) 발효도라지 농축액의 제조

분류	내용	비고
원료	- 도라지농축액(진성에프엠) - 유산균혼합분말 (메디오젠, 1.0x10 ⁹ CFU/g)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
접종농도	1.0x10 ⁶ CFU/g	0.1%(w/w)
온도	25-30℃	
시간	12~24시간	시간별 sampling 확인
규격 확인	Brix, pH, 산도, 유산균, 관능	

(2) 발효도라지 농축액 제조 결과

규격	Sampling Time(Hour)					
	0	12	15	18	21	24
Brix	62.4	62.4	62.4	62.3	62.4	62.5
pH	4.23	4.11	4.14	4.10	4.08	4.05
산도	2.9	3.04	3.15	3.19	3.18	3.24
유산균 CFU/g	1.2 x 10 ⁶	9.3 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁷	1.3 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁷	1.5 x 10 ⁷
관능검사	-	상쾌한신맛	상쾌한신맛	강한신맛	강한신맛	강한신맛

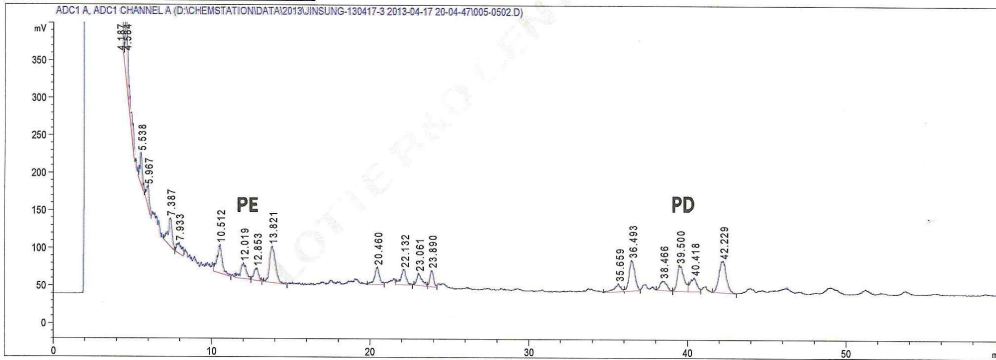
- 이화학 및 관능검사를 통해, 12시간이나 15시간에서의 발효도라지농축액이 선택되었으며, 발효 시간에 따른 경제성을 고려했을 때 12시간이 가장 적합하다고 판단됨.

(3) 발효도라지 농축액의 플라티코딘 D 함량 분석

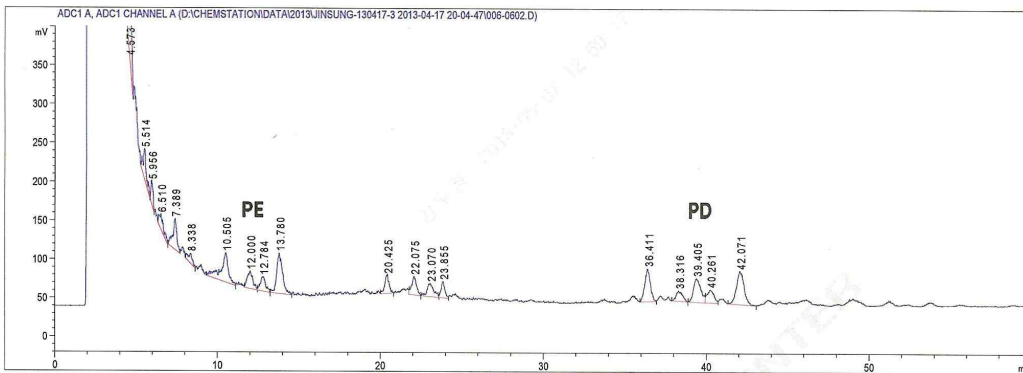
분류	플라티코딘 D (%)	플라티코딘 E (%)
발효 전-200mg	0.459	0.345
12시간 발효 후-200mg	0.461	0.342

- 발효 전/후로 플라티코딘D의 함량은 확인하였을 때, 발효가 지표성분의 함량에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되며, 일정부분 함량이 확인되는 것으로 미루어 판단컨대, 건강지향 제품으로써 충분한 가치가 있다고 판단됨.

□ 발효 전



□ 12시간 발효 후

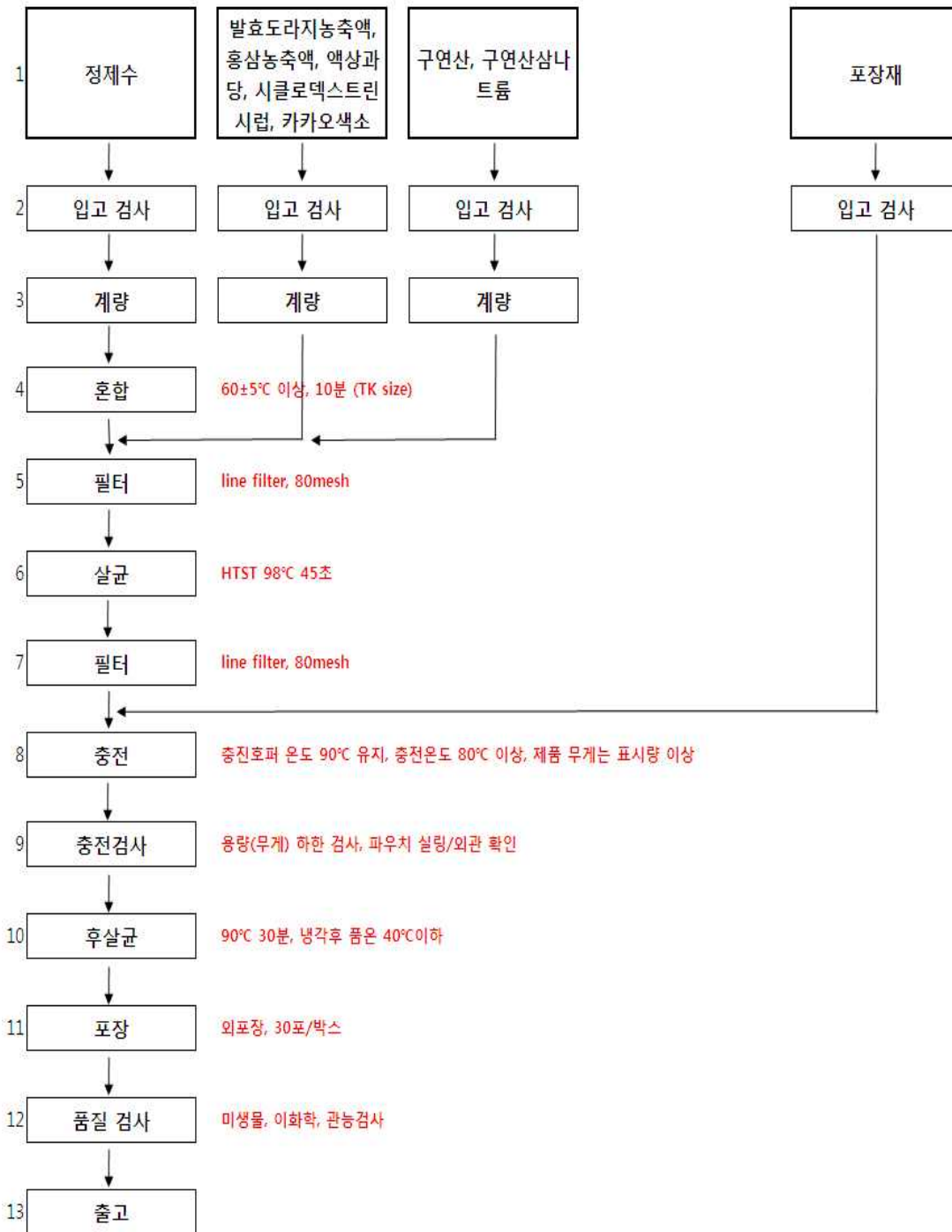


(4) 발효도라지 음료의 제조

□ 배합비

원재료명	배합비1 (%)	배합비2 (%)	비고
발효도라지농축액	3.00	3.00	주원료
홍삼농축액	0.35	0.35	주원료
액상과당	13.00	12.00	감미료
시클로덱스트린시럽	1.20	1.00	고미(苦味)제거
함수구연산	0.12	0.10	산미료
구연산삼나트륨	0.03	0.03	산미료
카카오색소	0.14	0.14	천연색소
정제수	82.16	83.38	
합계	100.00	100.00	

□ 제조 공정도



□ 이화학 규격 확인

규격 분류	배합비1	배합비2	비고
Brix	12.95	12.20	at 20℃
pH	3.80	3.95	
산도	0.198	0.177	구연산기준
비중	1.0496	1.0462	at 20℃

□ 관능 평가 결과

관능항목	평가 점수(5점 척도)		비고
	배합비1	배합비2	
전반 맛	3.85	3.60	
단맛 기호도	4.00	3.50	
쓴맛 기호도	3.80	3.30	
향 기호도	3.80	3.70	

- 15인의 패널을 대상으로 관능평가를 진행하여, 배합비1과 배합비2의 품질력을 측정한 결과, 배합비1에 대한 전반 맛이 더 좋은 것으로 판단되어, 이를 액상 제형의 배합비로써 확정함.

제9절 도라지 발효 추출물에서 알레르기 천식 및 아토피 개선 유효물질 규명

1. 연구범위 및 이론적, 실험적 접근방법

연구범위	이론적·실험적 접근방법
도라지 추출물과 도라지 사포닌의 약효성분 규명과 항알레르기 및 아토피 개선 활성 탐색	<ul style="list-style-type: none"> - 사포닌계 함유에 따른 도라지 추출물의 탈과립 억제 효과 탐색 - 사포닌계 함유에 따른 도라지 추출물의 아나필락시스 효능평가 - 도라지 추출물의 세포독성평가
도라지 추출물의 항 알레르기 및 아토피 개선 동물실험 및 분석, 인체 피부감작시험	<ul style="list-style-type: none"> - 동물시험 모델 제작 및 효능평가 - 도라지 추출물의 효능에 대한 조직학적분석 - 도라지 추출물의 행동학적, 관능적 평가 - 도라지 추출물의 인체 피부독성 평가를 위한 피부감작시험 평가
도라지 성분의 아토피 억제 작용기전 규명 및 아토피 유발 동물모델 시험, 시제품화	<ul style="list-style-type: none"> - 도라지 추출물의 항아토피 효과 및 작용기전 연구 - 시제품제작 - 타사제품과의 비교동물실험 - 케이스 임상시험

2. 연구내용 및 결과

가. 연구방법

(1) 실험재료

Mouse monoclonal anti-DNP IgE antibody와 dinitriphenol-conjugated human serum albumin (DNP-HSA), Evans blue는 WelGENE, Inc. (Daegu, Korea)에서 구입하였다. P-Nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide (p-NAG)는 MP Biomedicals, LLC (Solon, OH, USA)로 부터 구입하여 사용하였다. 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)와 Olive oil 및 Acetone 은 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 1%, 3% 그리고 5%의 Platycodin D 를 포함하는 도라지 추출물 (PG-Platycodin D)은 표준화되어 (주)비엔씨바이오팜으로 부터 제공 받았다.

(2) 실험동물

수컷 ICR mice (7주)는 Orient Bio (Gangneung, Korea)로 부터 구매하여 온도20-22°C와 습

도 40-50%의 환경에서 사육하였다. 모든 동물들은 표준화 된 사료와 물을 제공하였으며, 연세 대학교의 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) (Wonju, Korea) 가 본 연구의 동물실험을 승인하였다.

(3) 수동피부과민반응 측정

Anti-DNP-specific IgE (0.5 mg) 는 각각의 ICR mice의 귀에 피하주사로 주입하였으며, 24 시간 후에, Platycodin D 1%, 3% 그리고 5%를 포함하는 도라지 추출물 (PG-Platycodin D) 100 mg/kg의 농도로 경구투여 하여, 1시간 후에 3% Evans blue와 혼합된 DNP-HSA (200 mg)을 정맥주사 하였다. 항원 처리 2시간 후에 ICR mice를 안락사 시키고 귀의 항원-항체 반응에 의한 Evans blue 염색약의 양을 육안으로 관찰하였다. 또한, 500 ml formamide에 해당 귀를 절개 후, 63°C에서 하루 동안 반응시켜 microplate reader를 이용하여 620 nm의 흡광도로 염색약의 양을 측정하였다.

(4) 세포배양

쥐의 비만세포인 RBL-2H3세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로 부터 구매하였으며, 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 첨가된 Eagle's minimal essential medium (WelGENE, Inc., Daegu, Korea) 배지에서 2-3일마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양 환경은 37°C로 유지되는 5% CO₂배양기에서 배양하였다.

(5) β -hexosaminidase 방출량 측정

탈과립 현상의 표지 물질인 β -hexosaminidase의 방출량을 측정함으로써 알러지 반응 억제 정도를 세포 수준에서 알아보았다. RBL-2H3 세포는 24-well plates에 각 well당 200,000 세포가 되도록 분주한 후, 12시간을 배양하였다. Anti-DNP-specific IgE를 200 ng/ml 농도로 각 well에 감작시켜 12시간 배양하였다. IgE에 감작된 세포는 PIPES buffer (25 mM PIPES, pH 7.2, 110 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.4 mM MgCl, 40 mM HCl, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂, and 0.1% BSA)로 두 번 세척하였고, 37°C에서 30분 동안 PIPES buffer에 녹인 PG-Platycodin D를 처리하였다. 세포는 37°C 에서 15분간 DNP-HSA (25 ng/ml)와 반응시켰으며 안정화를 위해 5분간 얼음 위에 두었다. β -hexosaminidase 방출량을 측정하기 위해서, 항원-항체 반응이 일어난 세포가 존재하는 well의 PIPES buffer 상층액과 β -hexosaminidase의 기질인 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 녹인 p-NAG를 96-well plate에서 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰고, 0.1 M carbonate buffer (pH 10.5)를 처리하여 반응을 종결시킨 뒤, microplate reader를 이용하여 405 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

(6) RNA 추출과 역전사 중합효소 연쇄 반응 측정 (RT-PCR)

RBL-2H3 세포는 6-well plate에 분주한 뒤, 200 ng/ml anti-DNP-specific IgE를 감작시켜 하루 동안 배양하였다. PIPES buffer로 두 번 세척 한 후, PG-Platycodin D를 처리하고, 1시간 동안 DNP-HSA (25 ng/ml)를 처리하였다. 반응 후에, 세포를 PBS로 세척하고, TRI reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. Total RNA는 흡광도계를 이용하여 정량하여 1 mg의 RNA를 이용하였고, cDNA 합성 및 PCR은 Accupower RT/PCR premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR조건은 IL-3의 경우, 94°C 1분, 60°C 45초, 72°C 45초로 24 cycles을 수행하였다. PCR 산물은 2% agarose gel로 전기영동을 한 후, ethidium bromide을 첨가하여 밴드를 가시화 하였다. 사용된 primer는 다음과 같다. IL-3 sense 5'- GTATGCTGCTCCCGCTCCTGATG-3'; IL-3 antisense 5'- CATTCCACGGTCATAGGGCGAAAG-3'; b-actin sense 5'- atgccatcctgcgtctggacctggc-3'; and b-actin antisense 5'- agcatttgcggtgcacgatggaggg-3'.

(7) 실험동물의 사육

실험군은 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)를 도포하지 않은 정상 대조군 (Normal군), DNCB 단독 도포군 (DNCB군), DNCB와 10mg/ml의 5% PG-Platycodin D를 도포한 군 (PD 5%+DNCB군)으로 나누었다. 각 군에 6마리씩 분리하여 polycarbonate cage에 수용하고, 고형 사료와 물을 자유롭게 섭취시키면서 1주 동안 적응시킨 후 사용하였다.

(8) 접촉성 피부염의 유도 및 시료처리

접촉성 피부염을 유발하기 위해 acetone과 olive oil을 3:1로 섞어 만든 기체에 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)를 녹여서 만든 1% DNCB 용액과 0.5% DNCB 용액을 사용하였다. ICR mice의 등쪽 부위를 제모하고 하루 동안 피부를 진정시킨 뒤, 1% DNCB 용액을 등쪽 부위에 도포하여 sensitization한다. 4일 후부터 2주 동안 0.5% DNCB 용액을 반복적으로 도포하여 접촉성 피부염을 유발하였다 (Scheme 1). DNCB군과 PD 5%+DNCB군에서의 접촉피부염 유발 여부는 직접 육안으로 확인할 수 있었다.

(9) 혈액의 채취

2 ml syringe를 이용하여 mouse의 심장혈을 채혈한 다음, EDTA tube에 넣어 8,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상등액은 실험 전까지 -70°C에 보관하였다.

(10) Serum IgE 함량 측정

혈중 IgE 함량 수준은 Mouse IgE ELISA kit (Bio legend, USA)를 사용하여 microplate

reader에서 450 nm의 흡광도로 측정하였다.

(11) Scratching behavior 측정

각각의 Mice는 개별적으로 깨끗한 플라스틱 케이지에서 생활하게 하여, sensitization 이후 2주 동안 60분씩 격일 단위로 mice의 행동을 동영상 촬영 하였다. Scratching behavior는 등쪽 부위를 물어뜯거나 뒷발로 긁는 등의 행동양식을 횟수로서 측정하였다.

(12) Skin severity score 측정

Skin severity 측정 평가 방법은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법으로서 아토피 피부염의 심각성 정도를 홍반(Erythma), 가려움과 건조피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종(Edema & Excoriation), 짓무름 (Erosion), 태선화 (Lichenification)와 같은 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타낸다. 각각의 항목에 대하여 증상 없음 (0점), 증상 약함 (1점), 보통 (2점), 심함 (3점)으로 채점한 후, 5항목의 점수를 합산함으로써 최소 0점에서 최고 15점 사이의 평가점수를 부여하였다.

(13) 피부조직 병리검사

실험종료 후에, 등쪽 부위의 피부를 적출하여 4% paraformaldehyde에서 4시간 동안 고정하고, 30% sucrose 용액에서 안정화 시켜주기 위해 overnight하였다. 그 조직을 Tissue-Tek O.C.T Compound (SAKURA, USA)로 포매하였다. 그 조직은 부종 여부를 확인할 수 있도록 haematoxylin-eosin 염색법을 이용하여 조직 염색을 하였으며, 광학현미경상에서 100배의 배율로 피부의 전반적인 상태를 관찰하였다.

(14) 피부 보습효과 실험

PG-Platycodin D의 파우더를 0.008% 함유하는 크림 및 세럼을 만들어 피부 보습효과 실험을 수행하였다. 피부 보습효과에 사용된 기기는 MY-808S Moisture Checker (Scalar, Japan)를 사용하였으며 사람의 팔뚝 안쪽면을 이용하여 임상시험 하였다. 보습력 측정방법은 바르기 전의 피부 보습력을 대조군을 포함하여 체크하고, 각각의 시료 0.25g/cm²를 바른 다음 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 경과 후의 피부 보습력을 측정하였다. 피부 보습력은 온도, 습도에 따라 아주 민감하게 발생하므로, 온도 20℃, 습도 60%로 일정하게 조절되는 항온 항습실내에서 실시하였다. 피검자는 20대 남녀, 5명을 대상으로 시험하였다.

(15) 통계처리

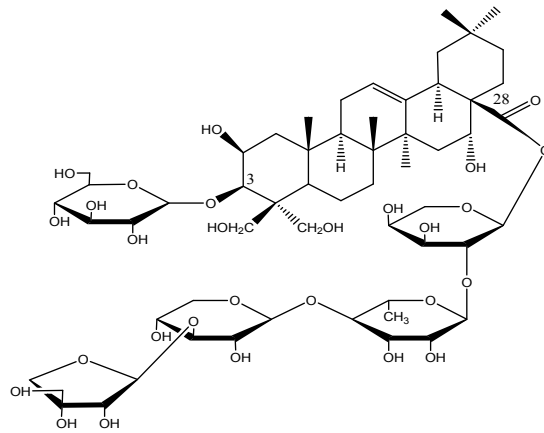
모든 실험 결과는 평균±표준편차(means±SD)로 나타내었다. 통계처리는 Dunnett's test로 검

정하였고 정상 대조군과 비교하여 <math><0.05</math> 이하의 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

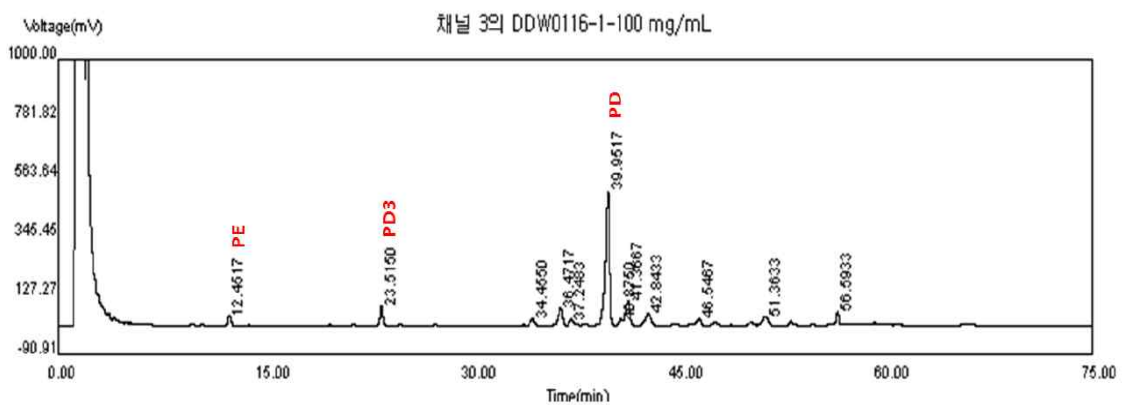
나. 연구결과

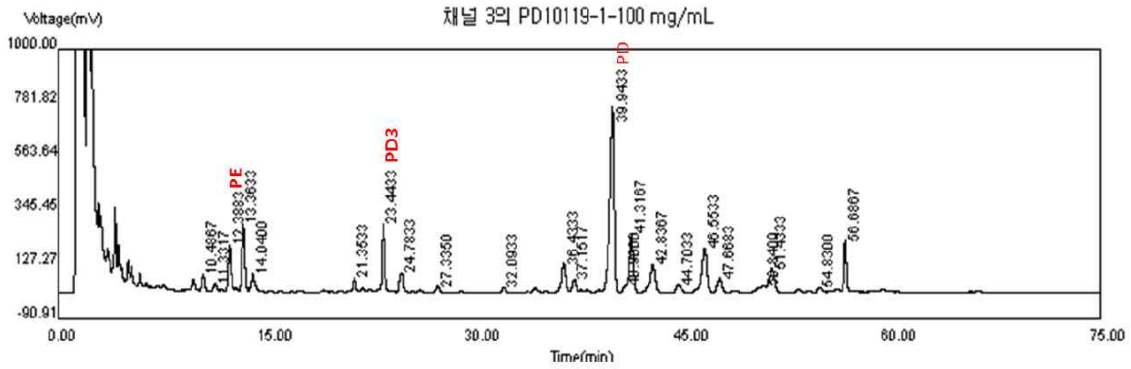
제 2-1 세부과제 팀인 ‘비엔씨바이오팜’과 함께 시험물질 (PD , Platycodin D, 그림 1)로 표준화된 도라지 추출물(그림 2)의 탈과립 억제 효과 실험과 알레르기성 과민반응 억제 효과 실험을 실시하였다.

PD는 Platycodin D (PD)의 함량에 따라서 1%, 3%, 5%로 구분되었으며, S sample의 경우 제조회사(원료)가 다르고 PD의 % 함량은 동일하였다. 표준화된 PD의 함량은 같으나 PD이외의 성분의 분포(함량)가 다르고 성상이 다르기 때문에 PD와 S sample의 비교실험을 진행하였다.



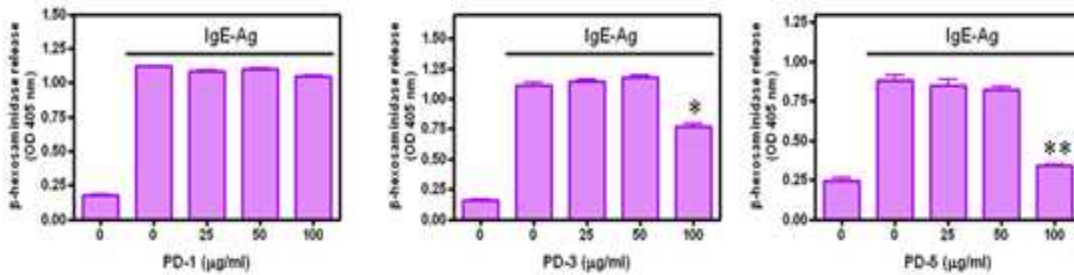
[그림 1] Platycodin D의 구조





[그림 2] HPLC/ELSD chromatogram 패턴 비교

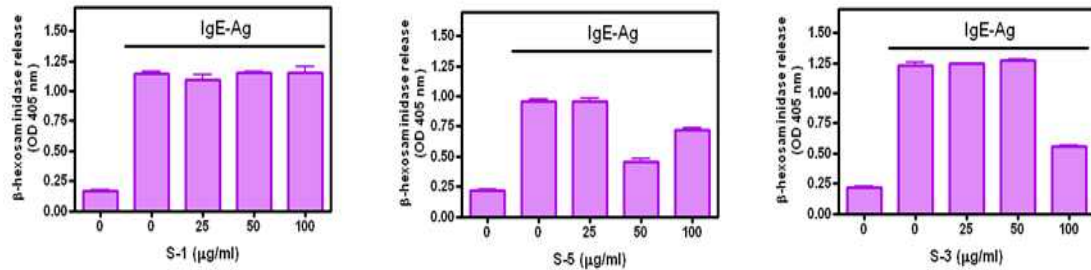
가. IgE/Ag에 의해 매개된 비만 세포의 탈 과립현상에 대한 PG-Platycodin D의 억제 효과
 알레르기성 천식이나 일부 아토피성 질환의 경우 항원-항체 반응에 의한 알레르기성 반응에 의해 발생하게 된다. 또한 이러한 반응에 의해서 세포 내 과립들의 탈과립 현상이 발생되고 Beta-hexosaminidase와 같은 관련 효소나 mediator들이 발생하게 된다. PD가 함량별로 이러한 탈과립현상을 얼마나 억제하는지를 확인해 본 결과, (A) PD-1은 농도와 상관없이 탈과립을 억제하는 양상을 보이지 않았으며. 한편, (B)에서 볼 수 있듯이, PD-3의 경우 50 $\mu\text{g/ml}$ 이후로 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적인 Beta-hexosaminidase 방출의 억제 양상을 확인할 수 있었다. (C) PD-5의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 감소되었다가 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 다시 증가하는 양상을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 Platycodin D의 함량에 의해 비만 세포의 탈 과립현상을 억제 함으로써 항 알러지 효과가 나타남을 알 수 있었다(그림 3).



[그림 3] 도라지 추출 물질의 PD함량 변화에 따른 탈과립 억제효과

또한, 성분분포가 다른 도라지 추출 물질의 PD함량 변화에 따른 탈과립 억제효과 확인한 결과 (A)에서 볼 수 있듯이, S-1의 경우 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 탈과립이 어느정도 감소되는 양상을 확인할 수 있었으나 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 농도 의존적인 감소 양상이나 큰 감소폭을 보이지는 않았다. 한편, (B) S-3의 경우 50 $\mu\text{g/ml}$ 이후로 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적인

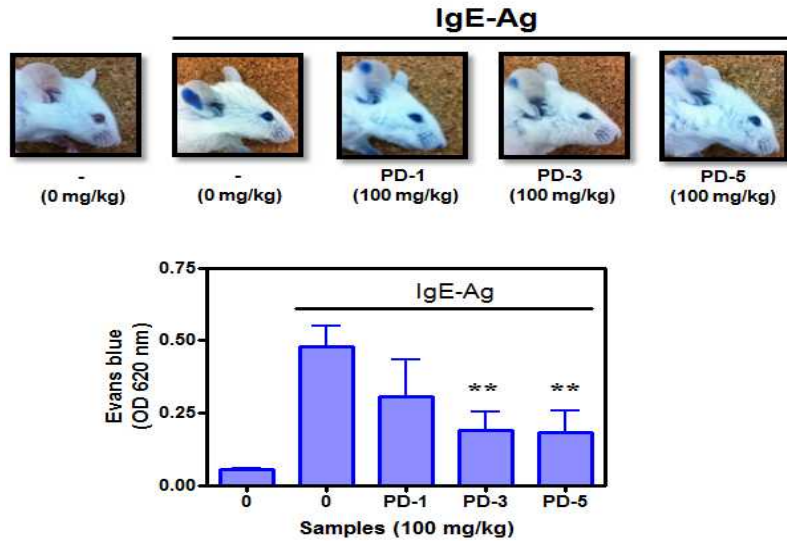
Beta-hexosaminidase 방출의 억제 양상을 확인할 수 있었다. (C) S-5의 경우 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 감소되었다가 이후 농도에서는 다시 증가하는 양상을 확인할 수 있었다(그림 4).



[그림 4] 성분분포가 다른 도라지 추출 물질의 PD함량 변화에 따른 탈과립 억제효과

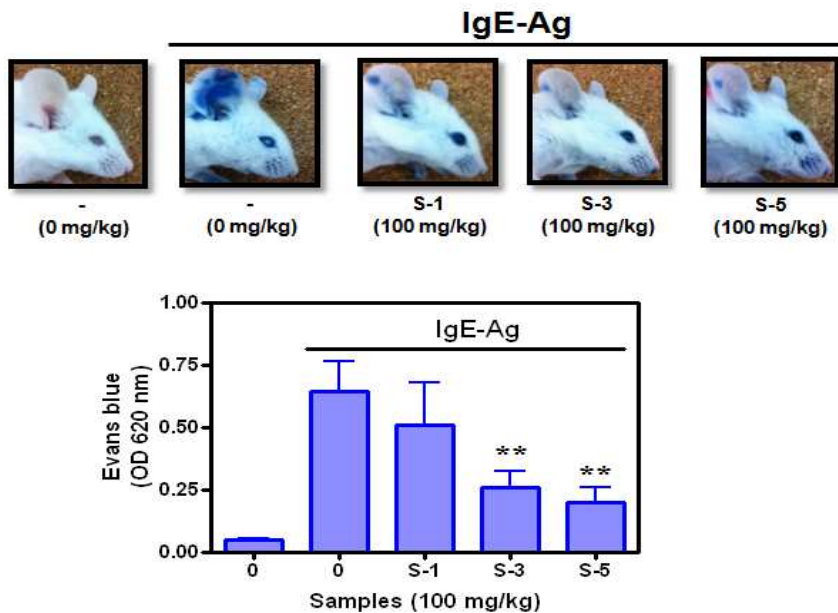
나. IgE/Ag에 의해 매개된 아나필락틱 쇼크에 대한 PG-Platycodin D의 억제 효과

아나필락틱 쇼크 평가를 위한 수동피부과민반응 동물 모델은 알러지 반응의 생체 수준 평가에 광범위하게 사용되기 때문에 수동피부과민반응의 억제 효과를 PG-Platycodin D를 이용하여 확인하였다. Anti-DNP-specific IgE를 ICR mice의 귀에 피하주사 하고, Platycodin D의 함량이 1%, 3%, 5%인 PG-Platycodin D 100 mg/kg으로 경구투여 한 후, Evans blue와 DNP-HSA를 정맥주사하여, 귀의 항원-항체 반응에 의한 Evans blue 염색약의 양을 육안으로 확인한 결과, IgE/Ag에 의해 매개된 수동피부과민반응이 대부분 억제됨을 알 수 있었다. 생화학적인 분석을 위하여, formamide에 해당 귀를 절개하여, 63°C에서 하루 동안 반응시켜 염색약의 양을 측정된 결과, Evans blue의 양이 Platycodin D의 함량에 따라 농도 의존적으로 저하되는 것을 확인하였다(Fig. 5). 따라서, PG-Platycodin D가 in vivo 알러지 반응을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었다.



[그림 5] PD 함량변화에 대한 알레르기성 과민반응 억제효과

S로 명명된 PD함유 도라지 추출물 역시 농도 의존적인 알레르기성 과민반응 억제 양상을 보였다. 3%의 PD를 함유한 도라지 추출물 100 mg/kg과 5%의 PD를 함유한 도라지 추출물 100 mg/kg은 약물을 처리하지 않은 개체군에 비해서 상당히 알레르기성 과민반응을 억제하는 양상을 확인할 수 있었다(그림 6).

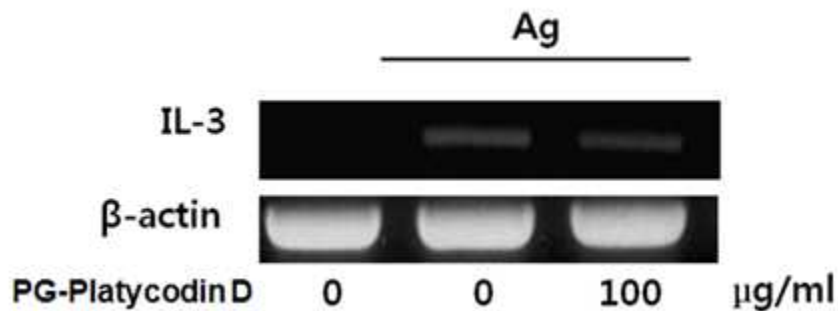


[그림 6] 성분분포가 다른 도라지 추출물질의 PD 함량변화에 대한 알레르기성 과민반응억제효과

다. PG-Platycodin D에 의한 비만 세포내 IL-3 사이토카인 유전자 발현 억제 효과

알러지 반응에 있어서 IL-3는 전 염증성 사이토카인으로서 작용한다. IL-3는 호염기구의 히

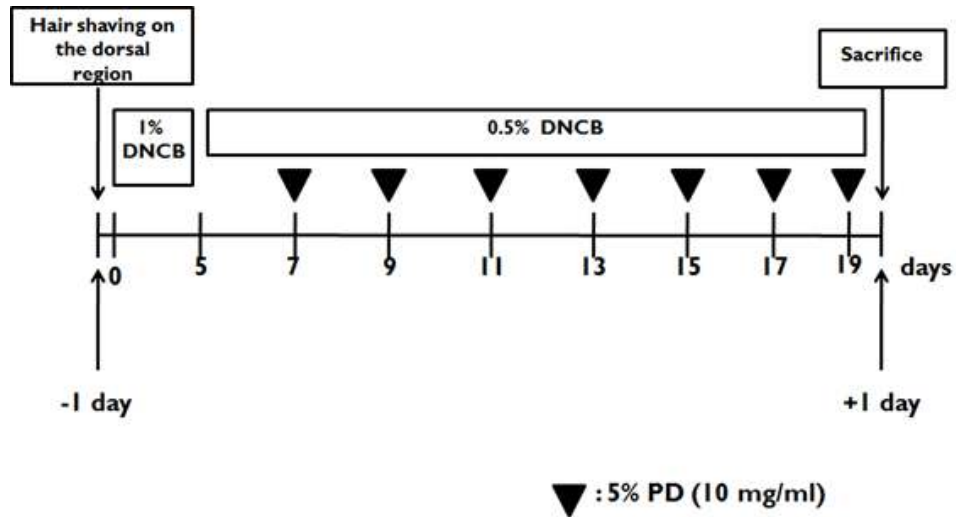
스타민 방출 자극이나 대식세포의 활성화 등의 기능을 하며, 항원에 의해 자극된 T세포에서 특이적으로 생각된다. 쥐의 경우 비만세포에서 생성되기도 하며 염증반응과 같은 과정에도 작용하는 것으로 알려져 있다[3]. 본 연구에서 항원-항체 반응에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포에서 PG-Platycodin D가 IL-3의 발현에 있어 어떤 효과를 나타내는지 확인하였다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이, 5%의 Platycodin D를 포함하는 PG-Platycodin D 100 mg/ml 처리했을 경우 항원-항체 반응에 의한 IL-3의 유전자 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(그림 7). 이로부터, PG-Platycodin D가 IL-3의 유전자 발현을 억제함으로써 항원-항체 반응에 의한 탈 과립 현상을 억제할 수 있을 것으로 생각 된다.



[그림 7] PG-Platycodin D에 의한 비만 세포내 IL-3 사이토카인 유전자 발현 억제 효과

라. 아토피 피부염 유발 동물 모델 제작 및 치료 처리

접촉성 피부염을 유발하기 위해 acetone과 olive oil을 3:1로 섞어 만든 기체에 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)를 녹여서 만든 1% DNCB 용액과 0.5% DNCB 용액을 사용하였다. ICR mice의 등쪽 부위를 제모하고 하루 동안 피부를 진정시킨 뒤, 1% DNCB 용액을 등쪽 부위에 도포하여 sensitization한다. 4일 후부터 2주 동안 0.5% DNCB 용액을 반복적으로 도포하여 접촉성 아토피 피부염을 유발하였다(그림 8). DNCB군에서의 접촉성 아토피 피부염 유발 여부는 직접 육안으로 확인할 수 있었다(그림 9).



[그림 8] DNCB 용액을 반복적으로 도포한 접촉성 아토피 피부염 유발 동물 모델 제작 디자인

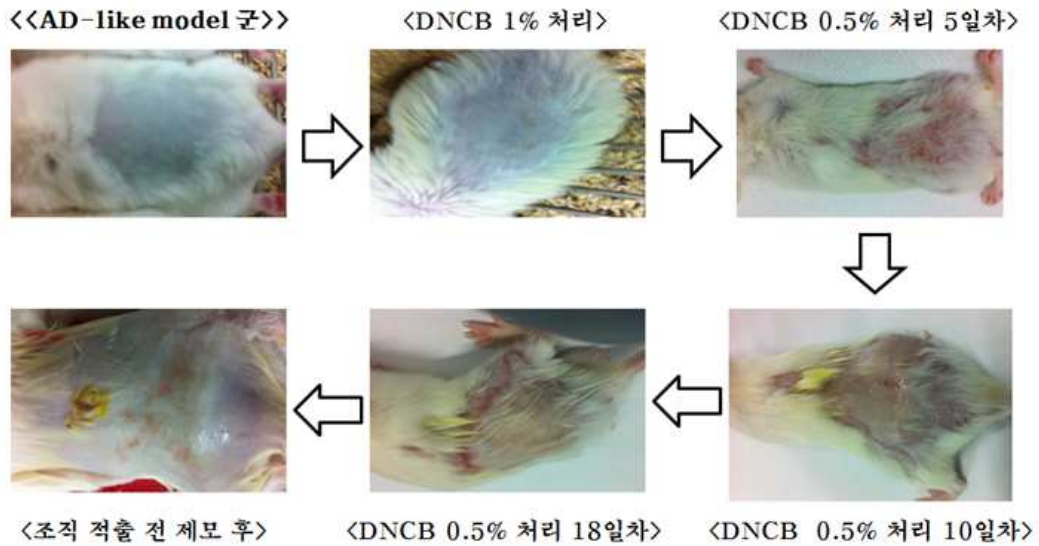


[그림 9] DNCB 용액을 반복적으로 도포한 접촉성 아토피 피부염 유발 동물 모델 제작

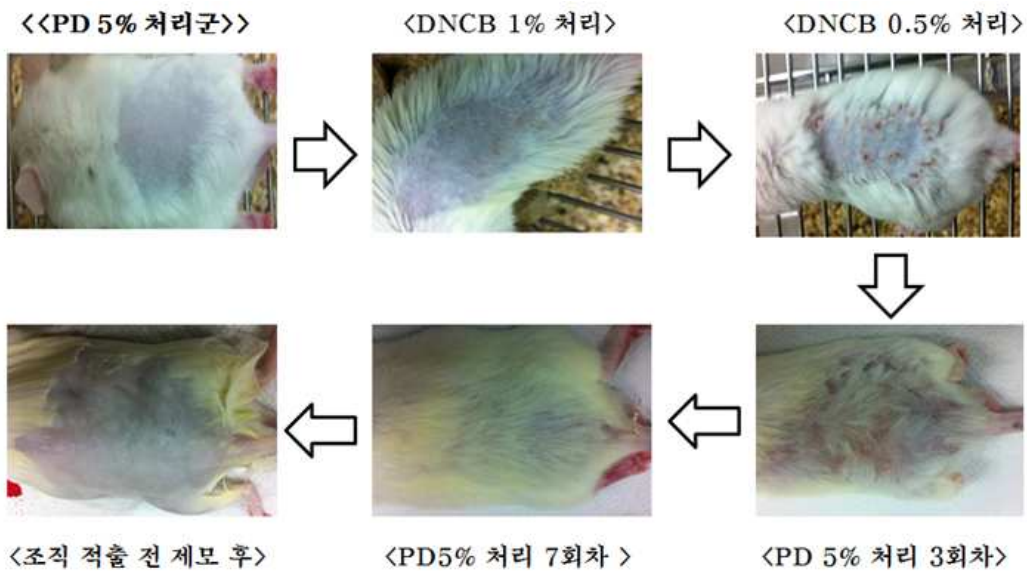
마. PG-Platycodin D가 DNCB에 의해 유도된 아토피 피부염에 미치는 조직학적 영향

본 연구에서는 PG-Platycodin D의 알레르기성 아토피 피부염에 대한 회복능을 조사하기 위하여 normal군과 DNCB로 알레르기 접촉피부염을 유발시킨 DNCB군 및 DNCB군에 PG-Platycodin D를 도포한 실험군으로 나누어 실험을 실시하였다. 육안적 관찰에서 DNCB군은 등 부위에 피부 반점, 홍반, 피부 건조, 부종 및 출혈 등이 심하게 나타났다(그림 10).

이러한 상태의 mice에 PG-Platycodin D를 3회 도포하면 환부의 피부염이 어느정도 회복되는 양상을 볼 수 있었다. 또한 7회 도포 시에는 거의 정상 피부 상태로 회복되었다(그림 11).



[그림 10] 접촉성 아토피 피부염 유발 동물 모델의 피부 반점, 홍반, 피부 건조, 부종 및 출혈 육안 관찰



[그림 11] PG-Platycodin D 도포에 의한 접촉성 아토피 피부염 유발 동물의 개선 효과

등쪽 부위의 피부를 적출하여 4% paraformaldehyde에서 4시간 동안 고정하고, 30% sucrose 용액에서 안정화 시켜주기 위해 overnight하였다. 그 조직을 Tissue-Tek O.C.T Compound로 포매하였다. 그 조직은 부종 여부를 확인할 수 있도록 haematoxylin-eosin 염색법을 이용하여 조직 염색을 하였으며, 광학현미경상에서 100배의 배율로 피부의 전반적인 상태를 관찰하였다. 조직학적으로 DNCB군의 피부 조직은 피부표면의 출형과 표피부의 비대화가 두드러져 normal 군의 표피부에 비해 2-3배 이상 두꺼워진 형태로 나타나고 있다. 그러나 PG-Platycodin D를 도포한 실험군에서는 표피층의 두께가 점차 normal군과 같은 두께로 회복되고 있는 것으로 관

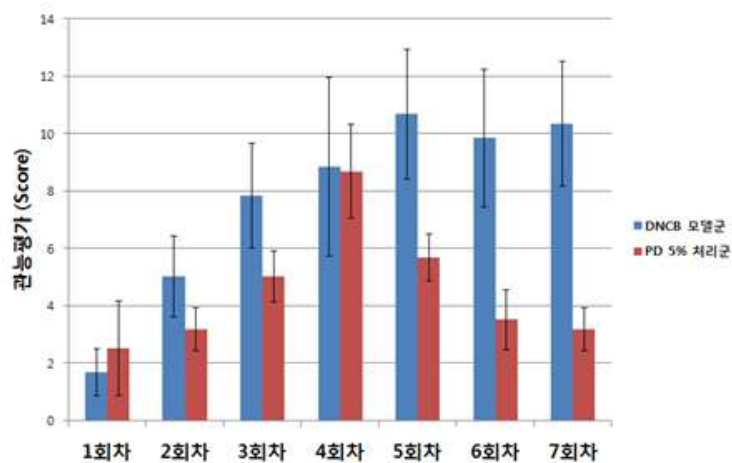
찰되었다(그림 12).



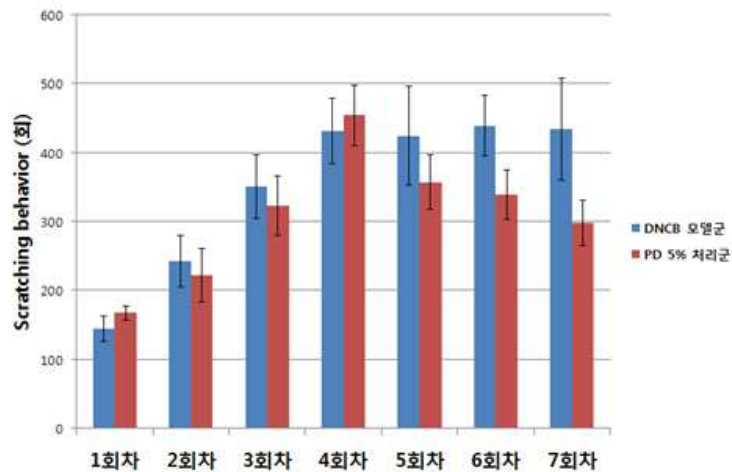
[그림 12] PG-Platycodin D에 의한 아토피 피부염유발 피부조직의 개선 효과

바. Skin severity와 scratching behavior에 있어서 PG-Platycodin D의 효과

알레르기성 아토피 피부염의 심각성 정도를 홍반(Erythma), 가려움과 건조피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종(Edema & Excoriation), 짓무름 (Erosion), 태선화 (Lichenification)와 같은 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었을 때, 2주 동안 PG-Platycodin D를 처리하였을 경우, 4회차 도포 이후부터 DNCB군에 비해서 점차 그 score가 감소되는 것을 확인할 수 있었다(그림 13). 또한 Scratching behavior 역시 PG-Platycodin D 도포 4회차 이후부터 등쪽 부위를 긁는 횟수가 점진적으로 감소하는 양상을 나타냈다(그림 14). 따라서 PG-Platycodin D가 DNCB로 인하여 발생된 알레르기성 아토피 피부염을 효과적으로 억제해주는 기능을 할 것으로 생각된다.



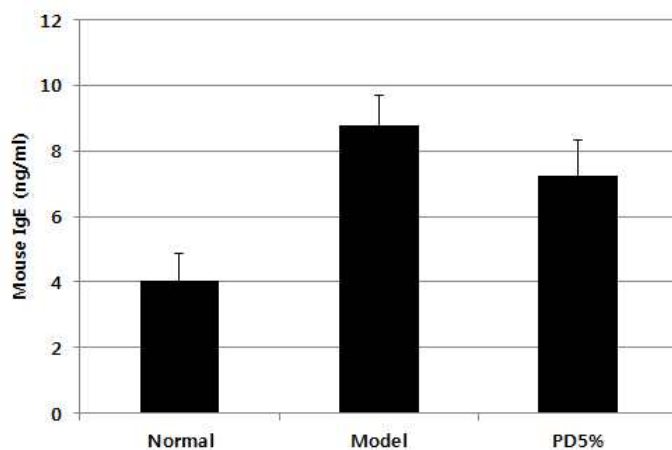
[그림 13] PG-Platycodin D에 의한 홍반(Erythma), 가려움과 건조피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종(Edema & Excoriation), 짓무름 (Erosion), 태선화 (Lichenification) 개선 효과



[그림 14] Scratching behavior에 있어 PG-Platycodin D에 의한 개선 효과

사. PG -Platycodin D가 알레르기성 아토피 피부염에 의한 혈액 내 IgE 농도에 미치는 영향

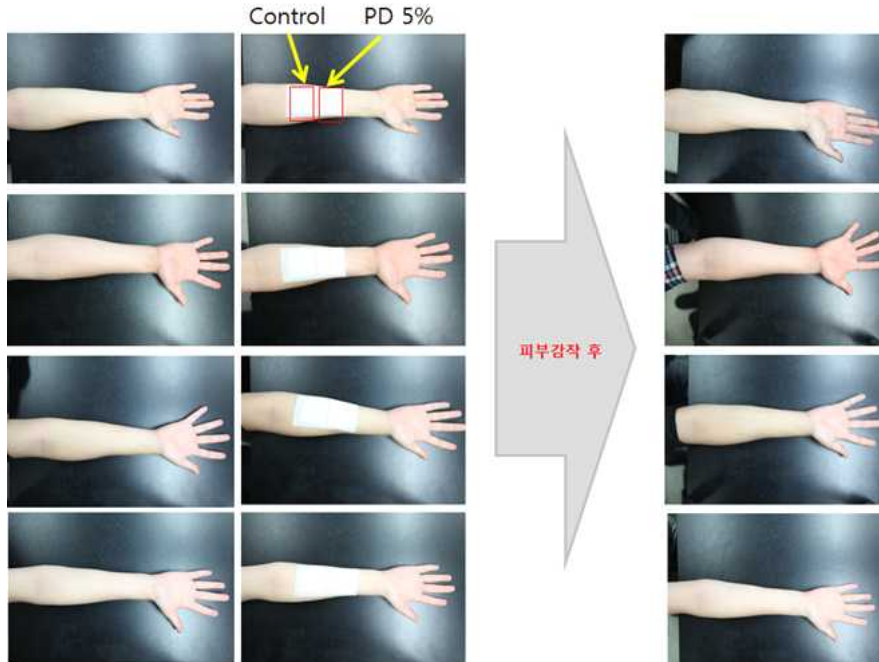
피부 알레르기 반응은 Immunoglobulin이 항원과 반응하여 방출하는 화학전달물질이나 T 림프구에 의한 각종 화합물에 의해 혈관의 확장, 모세혈관의 투과성 향진, 점액의 증가 및 점막의 부종과 염증 등을 유발시킨다[4]. 특히 알레르기성 아토피 피부염은 IgE의 증가와 연관되어 있다. 본 연구에서 혈액 내 IgE의 수준을 측정해 보면 알레르기성 아토피 피부염을 유발했을 때 normal군에 비해 IgE의 수준이 증가하였으며 PG-Platycodin D를 처리하였을 때 일정 수준 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 15). 따라서 PG-Platycodin D를 도포할 경우 혈액 내 IgE 수준이 알레르기성 아토피 피부염이 유발된 개체군에 비해 감소하고 있기 때문에 면역 염증반응을 감소시켜 피부의 과민반응을 완화해주는 데에 관여할 것으로 생각된다.



[그림 15] PG -Platycodin D가 알레르기성 아토피 피부염에 의한 혈액 내 IgE 농도에 미치는 영향

아. PG-Platycodin D가 피부감작에 미치는 영향

한편, PG-Platycodin D가 피부나 인체에 알려지나 트러블을 일으키는지 여부를 확인하기 위하여 피부감작시험을 실시하였다. 이를 통해 PG-Platycodin D 천연소재가 24시간 감작 후 피부에 전혀 알려지나 트러블을 유발하지 않는다는 점을 확인하였다(그림 16). 따라서 PG-Platycodin D가 피부독성 없이 알레르기성 아토피 피부염을 효과적으로 억제해줄 수 있는 천연소재로서 기대됨을 알 수 있었다.

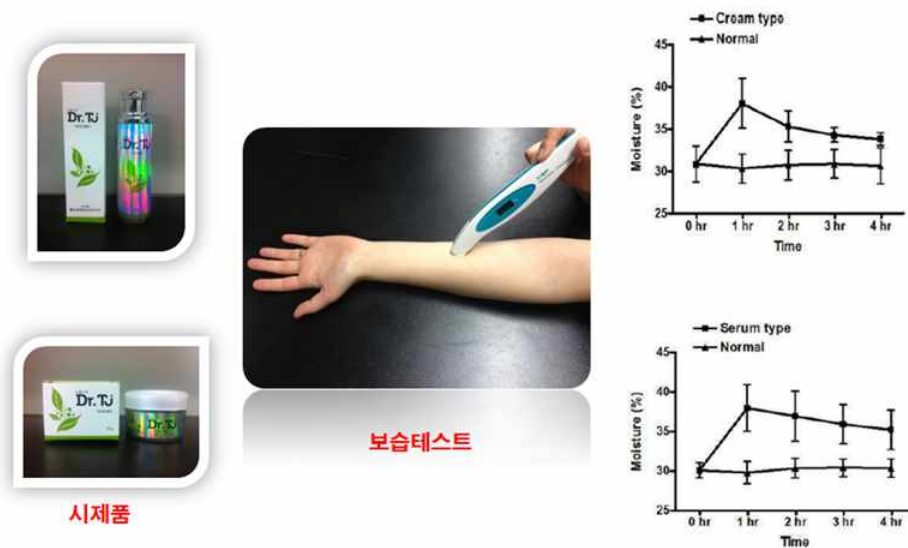


[그림 16] PG-Platycodin D가 피부트러블에 미치는 영향

자. PG-Platycodin D 시제품이 보습효과에 미치는 영향

PG-Platycodin D 파우더 0.008%가 함유된 크림에서 바르기 전의 피부 수분측정량인 30.88%에서, 바른 후 38.02%의 피부 수분 측정량으로 증가하는 피부보습효과가 있었으며, 시간 경과에 따른 피부 보습효과는 4시간 경과후의 피부 보습효과는 바른 후에 시간 단위별로 점차 감소되는 양상을 보였지만 일반 피부 상태의 수분측정량보다 높은 수치를 확인할 수 있었다. PG-Platycodin D 파우더 0.008%가 함유된 세럼에서 바르기 전의 피부 수분측정량인 30.08%에서, 바른 후 37.96%의 피부 수분 측정량으로 증가하는 피부보습효과가 있었으며, 시간 경과에 따른 피부 보습효과는 4시간 경과후의 피부 보습효과는 바른 후에 시간 단위별로 점차 감소되는 양상을 보였지만 일반 피부 상태의 수분측정량보다 높은 수치를 확인할 수 있었다. 그 이유는 플라티코딘 D 함유 도라지 추출물이 피부 각질층 표면을 덮어 피부의 수분 손실량을 막아 주며, 피부 수분의 홀딩효과가 있어 보습효과가 지속되는 것으로 해석되어 진다.

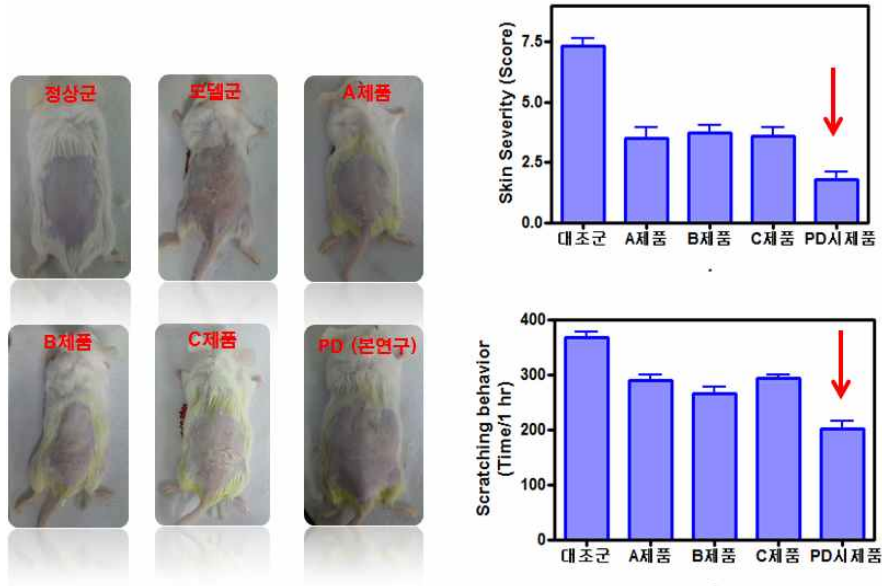
한편, 플라티코딘 D 함유 도라지 추출물 파우더 0.008%가 함유된 크림보다 플라티코딘 D 함유 도라지 추출물 파우더 0.008%가 함유된 세럼에서 더 높은 보습효과가 있었다(그림 17).



[그림 17] PG-Platycodin D 시제품이 보습효과에 미치는 영향

차. Skin severity와 scratching behavior에 있어서 PG-Platycodin D 시제품과 타시제품과의 비교 테스트

2주 동안 PG-Platycodin D시제품과 국내 A사, B사, 그리고 일본 C사를 처리하였을 경우, 7회차 도포 이후 DNCB군에 비해서 그 score가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 특히 타사 제품과 비교하여 우월히 효과가 뛰어남을 확인하였다. 또한 Scratching behavior 역시 PG-Platycodin D시제품과 국내 A사, B사, 그리고 일본 C사의 도포 7회차에서 등쪽 부위를 긁는 횟수가 타사제품에 비해 뛰어난 효과를 나타냈다(그림 18). 따라서 본 연구개발로 인해 제작된 PG-Platycodin D시제품이 DNCB로 인하여 발생된 알레르기성 아토피 피부염을 타사제품보다 효과적으로 억제해주는 기능을 할 것으로 생각된다.

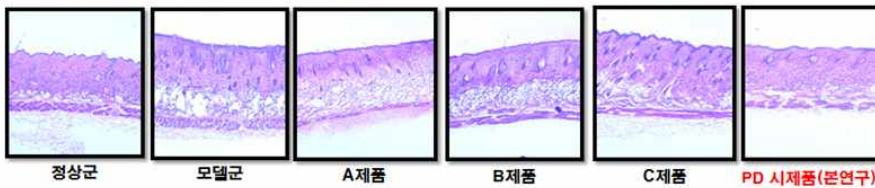


[그림 18] Skin severity와 scratching behavior에 있어서 PG-Platycodin D 시제품과 타시제품과의 비교 테스트

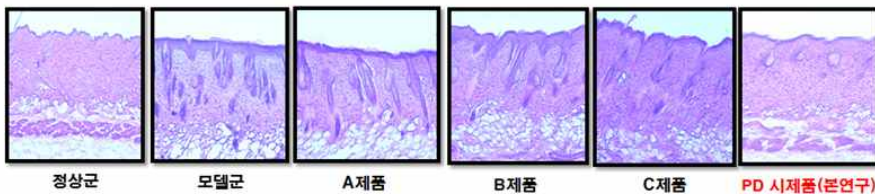
카. PG-Platycodin D 시제품과 타시제품과의 조직학적 비교

조직학적으로 DNCB군의 피부 조직은 피부표면의 출형과 표피부의 비대화가 두드러져 normal군의 표피부에 비해 2-3배 이상 두꺼워진 형태로 나타나고 있다. 그러나 PG-Platycodin D시제품을 타시제품과 비교하여 도포한 실험군에서는 표피층의 두께가 점차 normal군과 같은 두께로 회복되고 있는 것으로 관찰되었다(그림 19).

o Tissue Section (X40)



o Tissue Section (X100)



[그림 19] PG-Platycodin D 시제품과 타시제품과의 조직학적 비교

타. PG-Platycodin D 시제품 임상시험

8주 동안 PG-Platycodin D시제품을 14세 남성에 1일 3회 처리하였을 경우, 아토피 피부에서 우월히 효과가 뛰어난을 확인하였다(그림 20). 따라서 본 연구개발로 인해 제작된 PG-Platycodin D시제품이 알레르기성 아토피 피부염을 타사제품보다 효과적으로 억제해주는 기능을 할 것으로 생각된다.



[그림 20] PG-Platycodin D 시제품(Dr.Tj) 케이스 임상시험

알레르기성 아토피 피부염의 피부조직에서는 탈 과립화가 일어나는 비만세포와 호산구가 조직에 침윤하며 표피의 과각질화가 일어나게 된다. 알레르기성 아토피 피부염이 유발되면 피부 표면의 수분 증발이 증가되어서 항원의 침투가 용이해지므로 피부의 과민반응이 더욱 심화되어 세라마이드에 결합하는 매트릭스 구조 단백질에 의해 형성되는 피부장벽을 약화시키므로 감염과 염증에 대한 감수성이 높아지게 되는 것으로 알려져 있다[5-7]. 따라서 면역 반응에 의한 피부염의 치료를 위해서는 자극을 일으키는 항원을 제거하는 것이 중요하다. 하지만 특이적 항원을 알 수 없는 경우도 많기 때문에 일반적으로 항생제와 국소적으로 스테로이드 제제를 사용하여 치료하는 경우가 보통이다. 이러한 치료는 장기간 지속될 경우 안정성에 문제가 발생한다. 본 연구에서 PG-Platycodin D 시제품을 알레르기성 아토피 피부염이 유발된 피부에 8주도포할 경우 효과적인 피부 회복능을 나타내고 있기 때문에 알레르기성 아토피 피부염에 대한 제제로서 가능성을 제시해주고 있다.

본 연구개발의 결과로 연구에 사용된 소재인 도라지 추출물은 원자재수급 용이성, 농가소득증대 등 경제적 가치가 우수하며, 농생물을 향염, 항아토피 효과의 기능성 화장품 원료개발로 농

가소득 증대, 자원활용기술 증대, 스킨케어 원료시장 경쟁력 확보가 가능하다고 판단된다.

하. 실용화를 위한 아토피개선 시제품 Dr.Tj 제작

본 연구개발을 통해 도라지추출물이 함유된 시제품 Dr. Tj의 세럼타입과 크림타입 2종류를 제작하였다.



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구 목표 달성도

구분(연도)	세부연구개발목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도
1차년도 (2011)	○비만 및 간기능 개선효과가 있는 홍국 표준발효 산물 배양법 완성	15	○ 표준발효산물 배양법 완성여부	100%
	○ 비만 및 간기능 개선효과가 있는 홍국 균사체 대량생산용 천연배지 개발	10	○ 홍국 균사체 대량생산용 천연배지 개발여부	100%
	○홍국을 이용한 찻잎과 빙잎의 발효기술개발	5	○ 찻잎과 빙잎의 발효기술개발여부	100%
	○ 홍국발효산물에 대한 비만 및 간기능 개선효능 평가 및 세포내 반응실험	20	○ 홍국발효산물에 대한 세포내 효능평가 수행여부	100%
	○약용식물발효산물제조기술개발 및 활성탐색	10	○ 제조기술 개발 여부 및 활성탐색 수행여부	100%
	○ 도라지 사포닌 추출물 및 단일사포닌의 장내세균발효조건 확립	10	○ 장내세균발효조건 확립 여부	100%
	○ 도라지 추출물 및 단일 사포닌 효소 대사체 연구	5	○ 구조결정 및 분석 연구 수행여부	100%
	○도라지 발효산물 및 대사체의 간염 억제효과 연구	15	○ 도라지 발효산물의 간염억제효과 평가 여부	100%
	○도라지 추출물의 간기능 개선 pilot 임상시험 및 간기능 개선 임상시험	10	○ 간기능 개선 임상시험의 수행여부	100%
	2 차 년 도 (2012)	○ 홍국발효에 의한 검정콩 소재의 대량생산 방법 개발	15	○ 대량생산 방법 개발여부
○ 홍국 발효 검정콩 소재의 비만 및 간기능 개선원료의 동물실험		10	○ 동물효능평가 실험 수행여부	100%
○홍국발효 검정콩 소재의 임상시험 제품 생산		10	○임상시험 제품 생산완료 여부	100%
○ 홍국발효 검정콩 소재의 안전성 평가		10	○ 안전성 평가수행여부	100%
○홍국을 이용한 발효차 개발 연구 및 시제품 생산		10	○발효차시제품 생산여부	100%
○도라지 발효산물 및 대사체의 간보호 및 간기능 개선효과 연구		10	○ 동물효능평가 수행여부	100%

	○ 발효산물 및 대사체의 알레르기 및 아토피 개선효과 동물시험 ○ 약용식물 미생물 발효 scale-up 조건 확립	5	○ 동물효능평가 수행여부	100%
	○ 도라지 발효산물 및 대사체의 임상시험 제품생산	5	○ 약용식물 미생물 발효 scale-up 조건 확립여부	100%
	○ 도라지 추출물의 간기능 개선 pilot 임상시험 및 간기능 개선 유효성 평가	10	○ 임상시험 제품생산여부	100%
		15	○ 임상시험 완료여부	100%
3 차 년 도 (2013)	○ 홍국발효검정콩의 제품화 pilot 생산	10	○ pilot 생산수행 여부	100%
	○ 홍국발효에 의한 발효차 제품화 (보이차, 빵잎차 등)	20	○ 시제품 생산 여부	100%
	○ 도라지 발효산물의 간보호 및 간기능 개선 기능성 제품 개발 및 기술이전을 통한 상품화	15	○ 제품 개발 및 상품화 여부	100%
	○ 도라지 발효산물 및 대사체의 알레르기 및 아토피 개선효과 검증	15	○ 동물효능평가지험 수행 여부	100%
	○ 도라지 발효사포닌의 간기능 개선 건강기능 식품 개별인증 획득	20	○ 건강기능 식품 개별인증 획득 여부	100%
	○ 홍국 발효 검정콩에 대한 비만 및 간기능 개선 임상시험	20	○ 임상시험수행여부	100%

제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 본 연구사업단의 연구 개발 제품이 시장에 진출함으로써, 건강기능식품 관련 산업 및 제품 시장이 확장되고 특히 농산물 유래 식의약소재 (도라지 및 검정콩 등)가 정책과제의 지원으로 기술 집약형 상품으로 크게 성장하는 성공사례가 도출되었다. 현재 도라지관련 제품의 경우, 간건강 개선에 대한 식약처의 개별인정형 원료로 인정받아 참여기업을 통한 제품출시는 물론 건강기능식품 기업에 기능성 원료 공급을 앞두고 있다. 그리고, 홍국관련 발표제품의 경우 홍국 발효빵, 홍국 발효 보이차, 홍국 발효 빵잎차등의 건강지향성 일반 식품형태로 개발되어 출시되었다. 홍국발효검정콩도 비만개선에 대한 인체적용시험이 완료되는대로 식약처에 개별인정형 건강기능식품 원료 인증을 신청할 예정이다. 본 연구의 결과로 건강기능식품, 차 생산에 참여하는 기업의 성장 및 생산 농가의 수입도 크게 증가할 수 있을 것이다.

2. 본 연구의 결과, 효과가 뛰어나면서 부작용이 적은 건강기능식품 원료를 개발 및 등록할 수 있었으며, 이를 통하여 관련 생명과학 시루의 융합/복합적 발전을 유도할 수 있었다. 또한 그

동안 산학연에서 산발적으로 진행되어 온 연구 개발 결과 정보 교환 및 축적된 기술의 상호 교환 등 시너지 효과를 바탕으로 차세대 건강 기능식품 개발을 성공적으로 수행했다.

3. 본 연구에는 약 54명의 연구 인력이 참여하여, 산학연 공동연구를 수행하였으며, 이러한 연구 인력들은 본 연구사업단 과제 참여를 통하여 우리나라 발효 기능성 식품 산업의 미래를 열어가는 연구자 및 개발기술자들이 되어 우리나라가 이 분야에서 세계시장을 선도하도록 이끌어 나갈 수 있는 우수인력을 배출하는 계기가 되었다. 또한 자기 연구 분야에서 습득한 지식과 기술을 바로 생산현장에 적용할 수 있는 기회를 얻게 되었다.

4. 최근 기능성물질에 대한 관심고조로 발효식품에 기능성물질을 첨가해 기능성을 증대시킨 건강 기능 제품들이 출시되고 있으나, 아직도 국내 발효식품 시장은 생산 방식에 있어서 자연발효에 대한 의존도가 높고, 원천기술특허가 부족하여 세계 시장에 진출하기에는 많은 문제점을 내포하고 있다. 본 연구는 최근 시장 요구도가 높은 비만 및 간기능 개선제 시장 공략을 위해 이미 선행 연구에서 비만, 간염, 알레르기, 아토피, 간기능 개선 등에 그 탁월한 효능이 검증된 본 연구사업단의 발효기술들을 접목시켜 비만 및 간기능 개선 효과가 우수한 건강 기능 식품을 개발하였다. 또한 이러한 기능성 식품 제제 그 자체 개발 외에 이들로부터 유래된 새로운 구조(novel compound)의 유효-지표물질에도 초점을 맞추어 개발함으로써 기존의 단순 건강 기능 식품이 가진 한계점을 극복할 수 있는 차세대 건강 기능 식품을 개발하였다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 연구개발 결과의 목표대비 성과현황

1. 연구성과목표

구 분	특 허		신품종				유전자 등록	논 문		기 타
	출원	등록	품종명칭 등록	품종수 생산 입판 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도 (2011)	목표	0	0	0	0	0	0	0	0	
	달성	5		0	0	0	0	0	1	2
2차년도 (2012)	목표	4	0	0	0	0	0	0	4	5
	달성	4	1	0	0	0	0	0	5	7
3차년도 (2013)	목표	5	0	0	0	0	0	0	6	6
	달성	2	1	0	0	0	0	0	5	1
계	목표	9	0	0	0	0	0	0	10	11
	달성	11	2	0	0	0	0	0	11	10

2. 연구결과 활용 목표

구 분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타 ¹⁾
활용건수	목표	4	4		8	
	달성	-	-		6	1

1) 건강기능식품 기능성 원료 인정 : 도라지 추출물 (기능성원료 인정 제2013-26호('13.08.28) ((주)비엔 씨바이오팜)

제2절 세부항목별 연구성과 및 활용계획

1. 특허출원성과 (출원11건, 등록 2건)

번호	출원등록명	출원인	출원국	출원등록번호	상태
1	디에틸스틸베스트롤을 함유하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물	연세대학교 원주산학협력단	한국	10-2011-0070124	출원
2	아스퍼질러스 나이거 (Aspergillusniger) 유래의 조효소액으로 생물전환된 플라티코딘 D 유도체 (16-oxo platycodin D)의 제조 방법 및 이를 포함하는C형 간염의 예방 및 치료용 약학적 조성물	(주) 비엔씨바이오 팜	한국	10-2011-0087922	출원
3	홍국균을 이용한 검정콩 발효물을 이용한 비만 개선제	명지대학교 산학협력단	한국	2011-0091136	출원
4	항비만 활성을 가지는 홍국균을 이용한 검정콩 발효물 및 그 제조방법	명지대학교 산학협력단	한국	10-2011-0091137	출원
5	모나스쿠스 필로서스를 이용한 후발효차의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 후발효차	명지대학교 산학협력단	한국	10-2011-0091503	출원
6	홍국발효 빵잎차 및 이의 제조방법	명지대학교 산학협력단	한국	10-2012-0063217	출원
7	플라티코딘 D 함유 도라지 추출물을 포함하는 알레르기 치료용 조성물	연세대학교 원주산학협력단	한국	10-2012-0087125	출원
8	도라지사포닌 추출물 또는 막분리 도라지 사포닌 추출물을 함유하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 간기능 개선용 건강기능식품	(주) 비엔씨바이오 팜	한국	10-2012-0156797	출원
9	모나스쿠스균속을 이용한 검정콩 발효물을 이용한 비만개선제	명지대학교 산학협력단	한국	10-2012-0069088	출원
10	플라티코딘 D 함유하는 도라지 추출물을 유효성분으로 포함하는 접촉성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물	연세대학교 원주산학협력단	한국	10-2013-0009767	출원
11	플라티코딘 D 함유 도라지 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부보습용 화장품 조성물	연세대학교 원주산학협력단	한국	10-2013-0009734	출원
1	항비만 활성을 가지는 홍국균을 이용한 검정콩 발효물 및 그 제조방법	명지대학교 산학협력단	한국	1011451810000	등록
2	모나스쿠스 필로서스를 이용한 후발효차의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 후발효차	명지대학교 산학협력단	한국	1012815720000	등록

2. 논문게재 (SCI 11건, 비SCI 10건)

번호	논문명	학술지명	권호, 페이지	게재 연도	국내외 구분	SCI 구분
1	Protective Effect of <i>Monascus pilosus</i> Mycelial Extract on Hepatic Damage in High-Fat Diet Induced-obese Rats	Journal of applied biology and chemistry	54(3), 206~213	2011	국내	비SCI
2	Protective Effects of <i>Platycodon grandiflorum</i> Aqueous Extract on Thioacetamide-induced Fulminant Hepatic Failure in Mice	Journal of Toxicological Pathology	24(4), 223~228	2011	국외	SCI
3	Anti-obesity Effect of <i>Monascus pilosus</i> Mycelial Extract in High Fat Diet-induced Obese Rats	Journal of applied biology and chemistry	54(3), 197~205	2011	국내	비SCI
4	Diethylstilbestrol induces arrest of rat vascular smooth muscle cell cycle progression through downregulation of cyclin D1 and cyclin E	Molecular and Cellular Biochemistry	360, 103~109	2012	국내	SCI
5	Effects of <i>Platycodon Grandiflorum</i> Including Platycodin D in IgE/Ag-Induced Type I Hypersensitivity	Journal of Life Science	22(5), 595~599	2012	국내	비SCI
6	<i>Eupatorium chinensis</i> var. <i>simplicifolium</i> Root Extract Inhibits the Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in Raw 264.7 Macrophages by Inhibiting iNOS and COX-2 Expression	Journal of Life Science	22(9), 1137~1144	2012	국내	비SCI
7	1 β -Hydroxy-2-oxopomolic Acid Isolated from <i>Agrimonia pilosa</i> Extract Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Cells	Biol. Pharm. Bull.	35(5), 643~649	2012	국외	SCI
8	Hepatoprotective and anti-hepatitis C viral activity of <i>Platycodon grandiflorum</i> extract carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice.	Journal of Nutrition Science Vitaminology	58, 187~194	2012	국외	SCI
9	Protective effect of the aqueous extract from the root of <i>Platycodon grandiflorum</i> on cholestasis-induced hepatic injury in mice	Pharmaceutical Biology	50(12), 1473~1478	2012	국외	SCI
10	<i>Monascus pilosus</i> 로 발효시킨 뽕잎차의 품질특성과 항산화능	한국식품영양과학회지	41(5), 706~713	2012	국내	비SCI
11	Dietary Effects of Post-fermented Green Tea by <i>Monascus pilosus</i> on the Body Weight, Serum Lipid	Journal of applied biology and chemistry	55(2), 85~94	2012	국내	비SCI

	Profiles and the Activities of Hepatic Antioxidative Enzymes in Mouse Fed a High Fat Diet					
12	Antioxidant activity of Green Tea Fermented with <i>Monascus pilosus</i>	Journal of applied biology and chemistry	55(1), 19~25	2012	국내	비SCI
13	Inhibitory Effect of PG-Platycodin D on the Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in ICR mice	Journal of Life Science	22(10), 123~129	2012	국내	비SCI
14	<i>Monascus pilosus</i> 로 발효시킨 후발효 녹차가 고지방 식이 마우스의 체중과 혈청 지방함량 및 간 조직 항산화계 효소활성에 미치는 영향	Journal of applied biology and chemistry	55(2), 85~94	2012	국내	비SCI
15	Platycodin D, a triterpenoid saponin from <i>Platycodon grandiflorum</i> , ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice	Food and Chemical Toxicology	50, 4254~4259	2012	국외	SCI
16	<i>Monascus pilosus</i> 발효 빵잎차가 고지방 식이 마우스의 체중과 간 조직 항산화계 효소 활성에 미치는 영향	한국식품영양학회지	26(1), 66~77	2013	국내	비SCI
17	Platycodin D attenuates bile duct ligation-induced hepatic injury and fibrosis	Food and Chemical Toxicology	51, 364~369	2013	국외	SCI
18	Protective effect of the roots extract of <i>Platycodon grandiflorum</i> on bile duct ligation-induced hepatic fibrosis in rats	Human and Experimental Toxicology	32(11), 1197~1205	2013	국외	SCI
19	Effect of Eriodictyol on the Development of Atopic Dermatitis-Like Lesions in ICR Mice	Biological and Pharmaceutical Bulletin	36(8), 1375~1379	2013	국외	SCI
20	Two New Isoflavone Glycosides from the Extracts of the Fungus <i>Monascus pilosus</i> -Fermented Black Soybean	Bull. Korean Chem. Soc.	32(12), 3863~3866	2013	국내	SCI
21	Triterpenoid Saponins Isolated from <i>Platycodon grandiflorum</i> Inhibit Hepatitis C Virus Replication	Hindawi Publishing Corporation	2013, 1~11	2013	국외	SCI

3. 사업화 현황

4. 인력양성 및 활용 성과

	지원대상 (학위별 취득자)				성별		계열별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	공학	농림수산학	의약보건학
인력양성자수	3				1	2		3	

5. 추가연구에의 활용계획

- 기술평가 및 기술 이전 전문 업체인 델타텍 코리아의 “홍국균 발효 검정콩을 이용한 비만 기능성 건강기능식품”에 대한 기술성 및 상업적 분석 결과, 기술적인 면에서 타당성이 충분하며, 특히, 사업성 측면에서 우수한 점수를 부여 받아 유사기술 대비 사업적인 면의 경쟁력이 있음으로 평가를 받았다.

- 본 과제의 수행으로 도라지를 이용한 C형 간염억제 및 간기능 개선 효능뿐만 아니라 알레르기성 천식 및 아토피를 개선 하는 것에도 효능이 검증되어 원료의 상품가치가 상승했으며, 또한 이를 함유한 건강기능식품인 Dr. J의 부가기능을 통한 홍보가 가능하여 기존 시장의 제품과 차별화가 가능할 것으로 보인다. 따라서 복합기능성 건강기능식품으로 마케팅을 펼칠 수 있다.

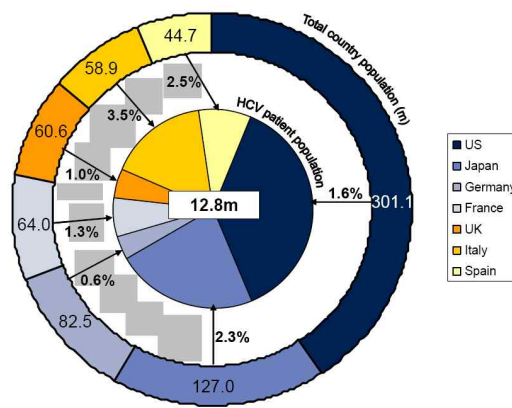
- 도라지 발효 사포닌의 간기능 개선 기능식품 개별인정획득으로, 비만 및 간 기능개선 효능 발효산물 임상시험 및 개별인정획득으로 세계적인 스타 건강기능식품 창출 가능할 것으로 예상된다.

- 자체기술실시 및 기술이전을 통해 고수의 창출 및 잉여 농작물의 활용으로 농작물 가격 안정화 및 지속적인 농가소득 보장될 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절 C형 간염 관련자료

세계보건기구 (WHO)의 2007년 조사에 따르면 현재 전 세계 C형 간염 환자 수는 약 1억 8천만 명으로 추정되고 있으며, 7대 시장에만 1,280만 명의 C형 간염 환자가 존재하는 것으로 알려져 있어 효과적인 항 HCV 치료제가 절실히 필요한 상황임. HCV에 감염되면 60-80%의 감염자가 만성 간염으로 진행되는 것이 특징인데 만성 C형 간염으로 진행한 경우 간경화 및 간암으로 전이되는 확률이 매우 높음. 또한, 현재까지 개발된 백신이 없어 환자의 수가 지속적으로 증가하는 추세에 있으므로 C형 간염으로 인한 사회적, 경제적 비용은 막대한 상황임.



Source: Datamonitor, CIA Factbook (2007), Esteban et al. (2007), Rustgi (2007)

[그림 1. 7대 의약품 시장 기준 HCV 환자 수 분포]

Market Research 사의 보고에 의하면, 전 세계 HCV 질환 치료제 시장은 2004년 기준으로 약 27억 달러(약 3조원)에 이르며, 매년 14.6%의 성장을 기록하여 2009년에는 약 40억 달러(약 4조원), 2013년 이후에는 약 80억달러 이상으로 시장 규모가 확대될 것으로 예측하고 있음 (표 1 참조).

[표 1. 전 세계 HCV 치료제 시장]

(단위: 10억 달러)

Global Market	2004	2005	2007	2008	2009
HCV Therapy	2.72	2.97	3.46	3.7	3.97

Source; Market Research Inc.

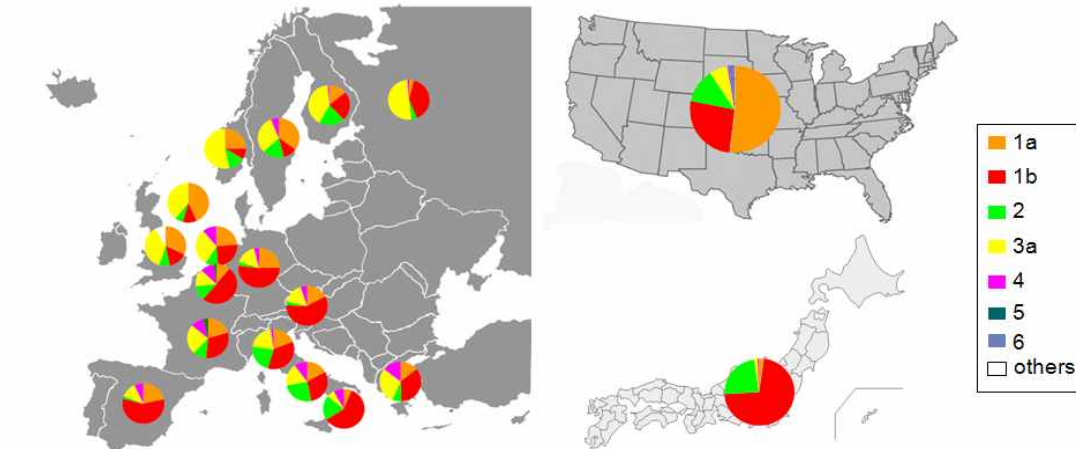
현재 유일한 C형 간염 치료제인 페길화된 인터페론-알파 (peglytated Interferon- α)와 리바비린 (Ribavirin)의 병용요법은 구토와 우울증 등의 부작용이 크고 치료 성공률도 환자의 절반 이하에 그치는데도 불구하고 2조원 이상의 시장을 형성하고 있음 (표 2 참조).

[표 2. Treatment Rates in the Seven Major Markets]

(Source: Datamonitor)

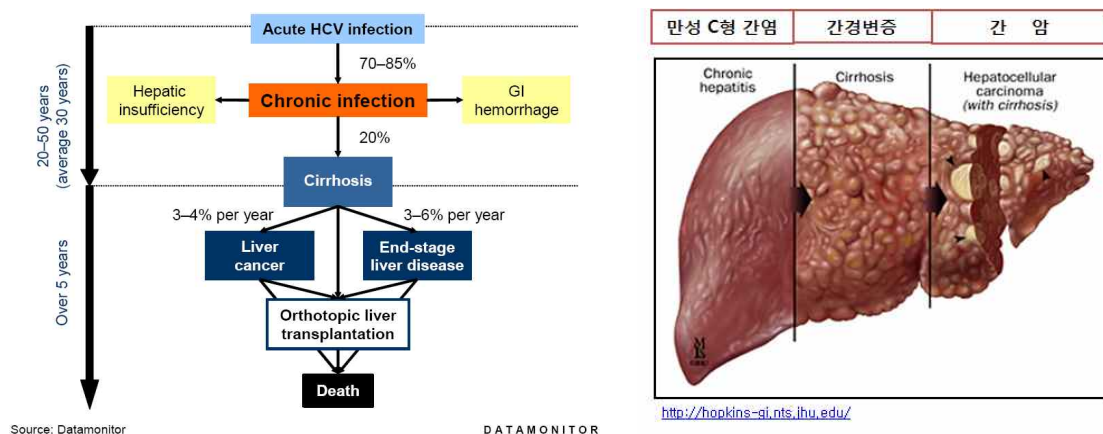
Treatment Rates in the Seven Major Markets, 2007			
Country	Number of chronic HCV patients	Number of patients treated per year	Treatment rates (%)
US	4,244,474	71,320	1.7
Japan	973,976	51,298	5.3
France	572,747	21,293	3.7
Germany	420,354	23,335	5.6
Italy	2,798,315	28,481	1.0
Spain	612,640	156,71	2.6
UK	465,600	5,282	1.1
Total Seven Major Markets	10,088,105	216,680	2.2

C형 간염바이러스 (HCV)는 만성 간염을 일으키는 RNA 바이러스로 국내에는 약 80만 명 이상, 미국의 경우에는 환자 및 보균자가 증가하여 약 4백만 명을 포함해서 전세계 약 1억 8천만 명이 감염된 것으로 추정됨. HCV genotype별로 분류를 할 경우 대략 6가지가 알려져 있으며, 그 중에서 genotype 1의 경우에 약 700만 명 이상이 감염되어 있는 것으로 보고되고 있음. (그림 2 참조)



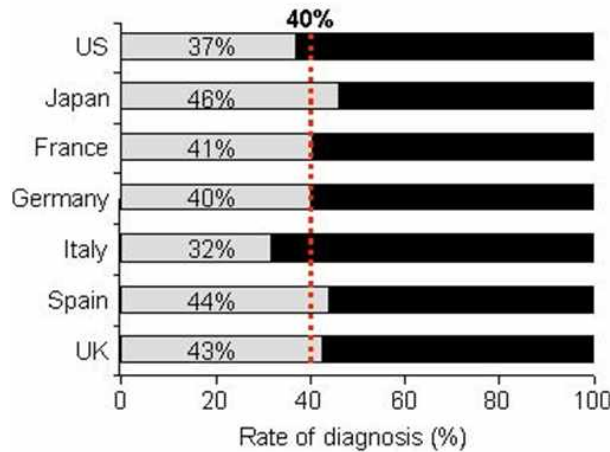
[그림 2. Genotype별 환자 분포 (미국, 유럽 및 일본의 경우), Source: Esteban et al. (2007), Hayashi et al.(2003), Nainan et al. (2006)]

HCV에 새로 감염된 환자의 80%는 특별한 증상이 없으므로, 감염을 인지하지 못하는 경우가 많음. 하지만, 일단 인체에 HCV가 기생하게 되면 빠르게 유전적인 변이를 일으키고, 이른바 'quasispecies'라고 하는 다른 유전적인 변이체로 존재하게 됨. 많은 연구자들에 의하면 HCV는 HIV와 비교할 때, 2~3배 이상의 유전적인 변이성(genetic variability)을 가지고 있는 것으로 보고하고 있음. 더불어 HIV 보다 100배 이상 빠른 속도로 증식 (Jonhs Hopkins Medicine, 6, 2005) 되므로 쉽게 만성간염 상태가 됨. C형 간염바이러스에 감염된 이후 6개월 이내에, 환자의 70 ~ 85%가 급성에서 만성상태로 이행이 되는 것으로 보고가 되고 있음. 또한 C형 간염에 감염된 환자들 대부분이 감염 후 20~50년 동안 증상이 나타나지 않다가, 간질환이 상당히 진척이 된 상태에서 진단이 되는 경우가 많음. 즉, 간경화 혹은 간암으로 이행된 상태에서 HCV 감염이 진단되어 치료시기를 놓치는 경우가 많고, 현재로서는 마땅한 치료제가 없는 상태임. 유일한 치료방법은 수술을 통한 간이식이 최선인 것으로 알려져 있음. 미국의 경우 HCV에 의한 간경화로 인하여 전체 장기 이식 수술 중에 40%가 간이식수술을 하는 것으로 보고가 되고 있음(www.hepatitis.va.gov) (그림 3 참조)



[그림 3. HCV 감염 질환의 진행과정]

한편, 지역별로 HCV 감염환자의 분포를 살펴보면, 아프리카 > 서태평양 > 동아시아 > 미국 > 유럽의 순으로 환자가 많이 분포하고 있으나, 아직까지 HCV에 대한 진단율은 매우 낮은 편임. 현재 선진국의 경우 진단율에 비해 치료제에 대한 처방비율이 상당히 높고 전 세계적으로 인터페론과, 리바비린 이외의 치료제가 거의 없는 실정이므로 본 사업을 통하여 C형 간염 치료제를 개발한다면 현재의 시장 규모 보다 월등한 시장을 확보할 수 있으며, 전 세계적으로 산업 경제적인 파급효과가 매우 클 것으로 예상함. (그림 4 참조)

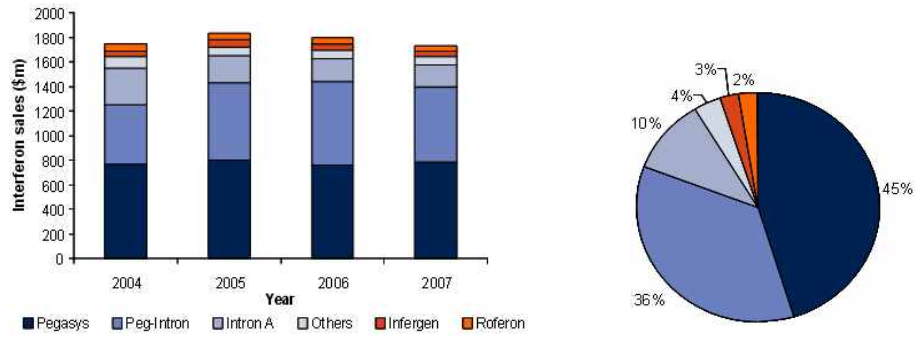


[그림 4. 주요 선진국에서의 HCV 진단율]

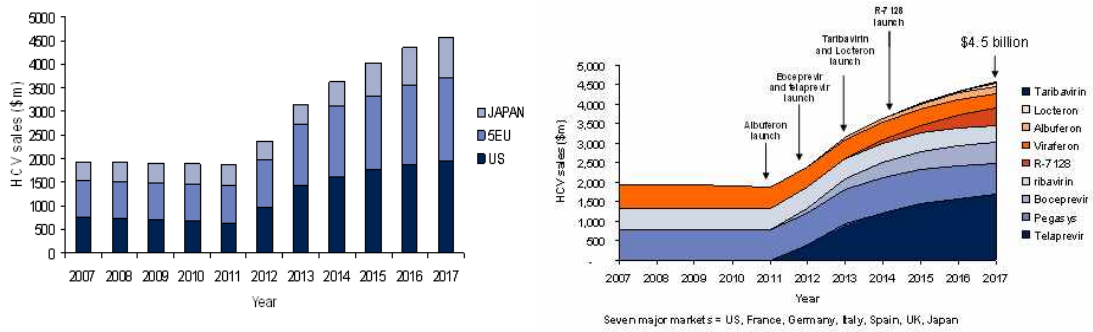
(Source; DMHC2042 : Stakeholder insight: Hepatitis B&C (2004))

역학적으로 볼 때 C형 간염 바이러스 (HCV)는 B형 간염바이러스(HBV)와 달리 전세계에 골고루 분포되어 있고 전 세계 인구의 1.5~2%가 감염된 것으로 보고되고있음. HCV에 감염되면 만성 간염으로 진행되는 것이 특징인데 간경화 및 간암으로 전이되는 확률이 매우 높으며, 현재 C형 바이러스에 대한 백신이 개발되지 않아 예방이 불가능하며 인터페론으로 치료를 시도하고 있으나 유전형에 따라 반응이 현저히 다르고 효과 또한 극히 미약한 실정임. 특히 많은 수가 감염되어 있는 유전형 1b (genotype 1b)의 경우 인터페론 치료 효과가 가장 미약하여 새로운 치료제 개발이 절실한 실정임.

현재의 치료 방법은 인터페론 (Interferon)과 리바비린 (Ribavirin) 병용투여 요법임. 페그인터페론의 치료율이 가장 좋으며, 로슈사의 페가시스와 쉐링-프라우사의 페그인트론이 주로 사용되고 있음. Dataminor의 보고서에 의하면, 2007년 세계 7대 시장에서 인터페론의 C형 간염 시장은 약 2조원에 이르고 있으며, 새로운 작용 기전의 치료제가 순차적으로 개발되는 경우 2017년에는 약 5.5조원의 시장을 형성할 수 있을 것으로 예측하고 있음 (그림 5, 6.)



[그림 5. 세계 7대 시장에서 C형 간염으로 처방된 인터페론 시장]



[그림 6. 세계 7대 시장에서의 향후 C형 간염 시장 예측]

(자료 출처 : Pipeline and Commercial Insight Hepatitis C, Datamonitor, 2008)

C형 간염에 대한 치료요법으로 사용되고 있는 인터페론으로는 로슈사의 페가시스와 쉐링-프라우사의 페그인트론이 주로 사용되며 종류에 따라 처방 방법이 차이가 있음 (표 3.)

[표 3. 현재의 C형 간염 치료 방법]

유전자형	치료 방법	페가시스 (로슈 사)	페그인트론 (쉐링-프라우 사)
HCV 유전자 1형	용량	180 ug 48주 간, 주 1회 주사	환자 체중 1Kg당 1.5 ug 48주 간, 주 1회 주사
	리바비린 병용요법	경구투여로, 1) 65kg 미만 : 하루 800mg (아침 400mg, 저녁 400mg) 2) 65-85kg : 하루 1000mg (아침 400mg, 저녁 600mg) 3) 85kg초과 : 하루 1200mg (아침 600mg, 저녁 600mg)	
HCV 유전자 2, 3형	용량	180 ug 4주 간, 주 1회 주사	환자 체중 1Kg당 1.5 ug 24주 간, 주 1회 주사
	리바비린 병용요법	경구 투여로, 체중에 상관 없이 하루 800mg (아침 400mg, 저녁 400mg)	

처방 12주 후 바이러스 RNA 수가 2log 이상 감소 (1/100 이상 감소)하는 초기바이러스 반응 (EVR)이 나타나는 경우, 24주 내지 48 주간 처방을 지속하고 2log 미만인 경우에는 투여 중단하게 됨 (이 때 의료보험 적용 안됨). 처방 24주 후 바이러스 RNA 수가 감소한 상태로 유지되는 지속적 바이러스 반응 (SVR)이 관찰되는 경우 의사의 처방에 따라 계속 투여 여부 결정하게 됨.

인터페론/리바비린 복합 제제를 24주~48주 동안 투여하여 C형 간염을 완전히 제거하는 것을 기대할 수 있지만, 약 50%의 환자에서 약에 대한 반응이 없거나 개발 (rebound) 되며 치료 비용이 매우 비싸고 처방 방법 또한 어려운 상황임. 약물로 인한 부작용 (빈혈, 우울증, 식욕감퇴, 불면증 등)이 심각하며, 반응률도 C형 간염의 유전형에 따라 다양하므로 치료 결과를 확신할 수 없고, 치료에 반응하지 않았거나 치료를 중단한 경우 다른 선택의 여지가 없다는 것이 큰 문제라고 할 수 있음.

따라서, 반응률과 치료율을 높일 수 있고 치료에 반응을 보이지 않은 감염자나 여러 부작용으로 인해 치료를 중단한 환자들을 위해 새로운 치료제의 개발이 시급한 상황이며, 인터페론/리바비린과는 달리 바이러스의 증식을 직접 억제함으로써 C형 간염을 치료할 수 있고 부작용이 없는 안전한 치료제의 개발이 필요하다고 할 수 있음.

제2절 아토피시장현황

최근 데이터모니터자료에 의하면 미국, 일본, 독일등 세계 7대 거대시장의 4,000만명 이상이 아토피 피부염으로 고통받고 있는 것으로 분석되었으며, 세계 7개국 아토피 피부염환자의 연령별 발병률을 분석한 결과 공통적으로 0세 4세 소아에게서 21%정도의 높은 발병률을 보인다.

[단위: 천명, 000s]

Population	US		Japan		France		Germany	
	AD인구	AD발병률	AD인구	AD발병률	AD인구	AD발병률	AD인구	AD발병률
Infant (0-4)	4,455	21.5%	1,180	20.3%	797	21.5%	734	21.5%
Child (5-14)	7,123	17.2%	2,160	18.0%	687	9.4%	539	6.8%
Adult (>15)	7,960	3.3%	3,646	3.3%	1,647	3.3%	2,351	3.3%
Population	UK		Spain		Italy			
	AD인구	AD발병률	AD인구	AD발병률	AD인구	AD발병률		
Infant (0-4)	713	21.5%	493	21.5%	569	21.5%		
Child (5-14)	1,047	14.6%	186	4.6%	310	5.7%		
Adult (>15)	1,634	3.3%	1,229	3.3%	1,652	3.3%		

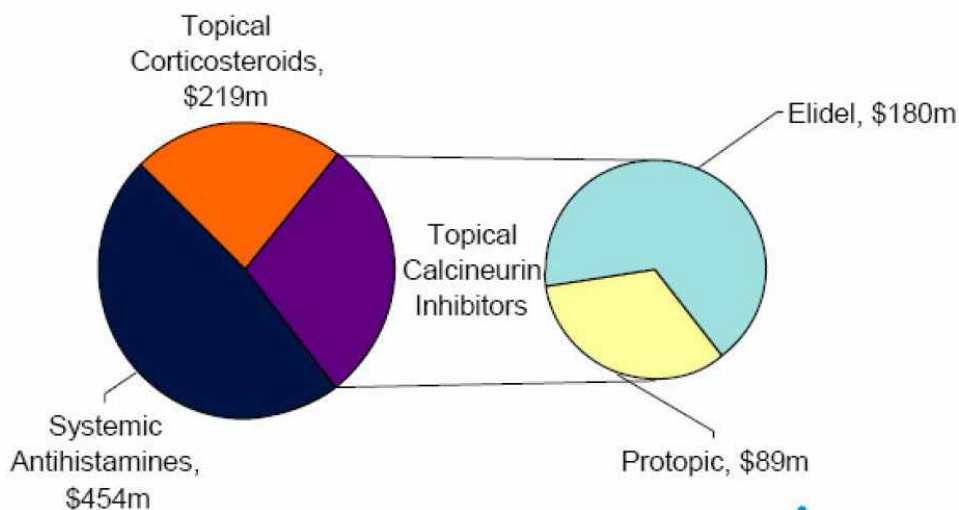
세계 7대 거대시장의 연령대별 아토피 피부염 환자수 및 발병률

데이터모니터 자료에 따르면 세계 아토피 피부염 시장은 2005년 9.4억달러의 시장을 형성한 것으로 분석되었다. 상위 10개 기업의 시장점유율은 40.3%로 전년대비 1.4%의 판매액의 증가가 있었으나, 그 외 기업들은 11.7%로 높은 성장세를 보인다.

	Sales (\$m)		Sales growth	CAGR	Market share
	2004	2005	2004~5	2001~5	2005
Novartis	646	593	-8.2%	32.2%	5.3%
GlaxoSmithKline	569	561	-1.4%	0.0%	5.0%
Schering-Plough	584	538	-7.9%	-6.8%	4.8%
Sanofi-Aventis	518	520	0.4%	-0.5%	4.6%
Johnson & Johnson	565	520	-8.0%	-2.9%	4.6%
Schering AG	400	412	3.1%	6.5%	3.7%
Stiefel Labs	293	390	33.1%	23.1%	3.5%
Roche	426	350	-17.8%	-18.2%	3.1%
L' Oreal	294	321	8.9%	12.4%	2.9%
Nestle	282	300	6.1%	10.5%	2.7%
Top 10 Total	4,579	4,505	-1.6%	1.4%	40.3%
Others	6,217	6,685	7.5%	11.7%	59.7%
Total	10,796	11,190	3.7%	7.0%	100.0%

세계 피부질환의 시장 규모 및 주요 기업 현황, 2004-2005

시장규모 산정시 포함된 약물분류체계 및 대표적 약품 D7A0: Plain topical corticosteroids; R6A0: Systemic antihistamines; Elidel(pimecrolimus); Protopic(tacrolimus) 약물 분류별로 볼 때 ‘전신 항히스타민제’가 4.5억 달러로 전체의 47%를 차지하고 있으며 ‘국부적 Calcineurin Inhibitors’가 2.7억원의 시장을, ‘국부 스테로이드제’가 2.2억 달러를 형성하고 있는 것으로 분석되었다.



약물분류체계 및 대표적 약품

국부 Calcineurin Inhibitors'의 대표적인 아토피 피부염 치료제인 Elidel과 Protopic은 각각 1.8억 달러, 0.89억 달러의 높은 판매액을 기록하였으나 '05년 미국 FDA 발암경고에 따라 관련 시장이 급속히 위축되고 있다. 아토피성 피부염 치료제로 칼시뉴린 억제제(Calcineurin inhibitors)인 타크로리무스(Tacrolimus)를 함유한 의약부외품개발(유럽특허공보 제184162호, 미국특허공보 제6,346,537호)과 크림형태의 피메크로리무스(Pimecrolimus, ascomycin derivative)가 개발되어 판매되고 있다.

Brand	Generic	Originator	Licensee	Formulation	Severity/ Age	Launch date
Elidel ^a	pimecrolimus	Novartis	Esteve (Spain) and 3M (Germany)	1% cream; twice daily application	Mild or moderate >2 years	Feb 2002 US; Oct 2002 EU ^b
Protopic	tacrolimus	Astellas (formerly Fujisawa)	GSK copromotes in US; Roche in South and Central America	0.1% ointment; 0.03% ointment	Moderate-to-severe >2 years	Nov 1999 Japan; Feb 2001 US; Aug 2002 EU

아토피피부염 치료제 대표적인 물질

현재 개발파이프라인에 있는 아토피 피부염치료제는 총 42건으로 임상 3상에있는 신약은 총 2건으로 혁신적인 신약개발이 부족한 실정이다. 임상 3단계(Phase III) 신약은 새로운 제형의 Protopic 연고와 면역억제제인 Neoral과 Sandimmune의 reformulation된 Neoral/Sandimmune으로 기존 아토피 피부염 치료제로 개발된 것의 제형(reformulation)등을 변경한 제품이다. 임상 2단계에는 17개의 신약이 임상 1상에는 6개의신약, 전임상에는 17개의 신약이 진행중에 있다. 개발단계에 있는 42건의 약물의 투여타입별로 구분해볼 때, 국부형(Topical) 23건으로 절반 이상을 차지하였으며, 경구형(Oral)6건, 주사형(Injectable) 6건, 기타 7건이 있다. 건선치료제로 개발된 생물약품 Raptiva는 아토피 치료제로 적응증을 확대하여 임상 2단계 진행 중이다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

제 8 장 참고문헌

- Aliciguzel Y, Ozen I, Aslan M, and Karayalcin U (2003) Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J Lab Clin Med* 142, 172-177.
- Birch AJ, Cassera A, Fitton P, Holker JSE, Smith H, Tompson GA, and Whalley WB (1962) Studies in relation to biosynthesis. Part XXX. Rotiorin, monascin and rubropunctatin. *J Chem Soc* 3583- 3587.
- Campos SC, Moreira DA, Nunes TD, Colepicolo P, and Brigagão MR (2005) Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis. *Arch Oral Biol* 50, 661-668.
- Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, and Nieto N (2005) A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J* 19, 136-138.
- Chen WP, Ho BY, Lee CL, Lee CH, and Pan TM (2008) Red mold rice prevents the development of obesity, dyslipidemia and hyperinsulinemia induced by high-fat diet. *Int J Obes (Lond)* 32, 1694-1704.
- Choi MJ and Yu TS (2004) Effects of red-yeast-rice supplementation on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 37, 423-430.
- Cornelli U (2009) Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol* 27, 175-194.
- DeLany JP, Blohm F, Truett AA, Scimeca JA, and West DB (1999) Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am J Physiol* 45, R1172-R1179.
- Duracková Z (2010) Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 59, 459-469.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.
- Endo A (1979) Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent produced by *Monascus* species. *J Antibiot (Tokyo)* 32, 852-854.
- Endo A (1980) Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Antibiot (Tokyo)* 33, 334-336.
- Eybl V, Kotyzová D, and Bludovská M (2004) The effect of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the liver of rats and mice. *Toxicol Lett* 151, 79-85.
- Frank L (1991) Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity. *Free Radic Biol Med* 11, 463-494.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, and Shimomura I (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114, 1752-1761.
- Grundy SM (1998) Multi-factorial causation of obesity. Implications for prevention. *Am J Clin Nutr* 67, 563S-572S.
- Gutteridge JM and Swain J (1993) Lipoprotein oxidation. The 'fruit and vegetable gradient' and heart disease. *Br J Biomed Sci* 50, 284-288.
- Gwinner W, Scheuer H, Haller H, Brandes RP, and Groene HJ (2006) Pivotal role of

- xanthine oxidase in the initiation of tubulointerstitial renal injury in rats with hyperlipidemia. *Kidney Int* 69, 481-487.
- Habig WH, Pabst MJ, and Jacoby WB (1974) Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249, 7130-7139.
- Halliwell B (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 46, 531-542.
- Hashim MS, Lincy S, Remya V, Teena M, and Anila L (2005) Effect of polyphenolic compounds from *Coriandrum sativum* on H₂O₂-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Food Chem* 92, 653-660.
- Haumann BF (1996) Conjugated linoleic acid offers research promise. *INFORM* 7, 152-159.
- Hill JO, Lin D, Yakubu F, and Peters JC (1992) Development of dietary obesity in rats. Influence of amount and composition of dietary fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16, 321-333.
- Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, and Hoopes JE (1985) Effects of superoxide dismutase and allopurinol in survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 201, 357-359.
- Ip C and Scimeca JA (1997) Conjugated linoleic acid and linoleic acid are distinctive modulators of mammary carcinogenesis. *Nutr Cancer* 27, 131-135.
- Jakoby JB (1978) The glutathione S-transferase. A group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 46, 383-414.
- Kang KJ, Kim KH, and Park HS (2002) Dietary conjugated linoleic acid did not affect on body fatness, fat cell size and leptin level in male Sprague Dawley rats. *Nutr Sci (Korea)* 5, 117-122.
- Kang MR, Kim JY, Hyun YJ, Kim HJ, Yeo HY, Song YD, and Lee JH (2008) The effect of red-yeast-rice supplement on serum lipid profile and glucose control in subjects with impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. *Korean J Nutr* 41, 31-40.
- Karmen A (1955) A note on the spectrophotometric assay of glutamicoxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest* 34, 131-133.
- Keisuke T, Tomio I, Nobukazu T, Hiroshi O, Shirou A, Shouichi T, and Yasue N (1992) Extraction of hypotensive substance from wheat benzi-koji. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 39, 913-918.
- Kim EY and Rhyu MR (2008) Antimicrobial activities of *Monascus Koji* extracts. *Korean J Food Sci Technol* 40, 76-81.
- Kim JW, Kim SD, and Youn KS (2010) Effects of chicken treated with Hwangki-BeniKoji sauces on body weight, serum and hepatic lipid profiles of rats fed high fat and high cholesterol diets. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39, 1270-1278.
- Kiyoshi I, Yoshio M, Keisuke T, Nobukazu T, Sjiocjo T, Sjiopji A, and Makoto T (1995) Effect of beni-koji extracts on blood pressure in primary hypertensive volunteers. *Jpn J Nutr* 53, 263-271.
- Kopelman PG (2000) Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-643.
- Lew EA (1985) Mortality and weight. Insured lives and the American Cancer Society studies. *Ann Intern Med* 103, 1024-1029.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RL (1951) Protein measurement Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Ma JY, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, and Chang M (2000) Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem* 48, 5220-5225.
- Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-Usmar VM, and Bailey SM (2009) High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *Biochem J* 417, 183-193.
- Martin JP Jr, Dailey JM, and Sugarman E (1987) Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys* 255, 329-336.
- Martinkova L, Patakova-Juzlova P, Krent V, Kucerova Z, Havlicek V, Olsovsky P, Hovorka O, Rihova B, Vesely D, Vesela D, Ulrichova J, and Prikrylova V (1999) Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit Contam* 16, 15-24.
- Miller CC, Park Y, Pariza MW, and Cook ME (1994) Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 1107-1112.
- Munday JS, Thompson KG, and James KA (1999) Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br J Nutr* 81, 251-255.
- Nohl H and Jordan W (1980) The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide. *Eur J Biochem* 111, 203-210.
- Oben JE, Enyegue DM, Fomekong GI, Soukontoua YB, and Agbor GA (2007) The effect of *Cissus quadrangularis* (CQR-300) and a *Cissus* formulation (CORE) on obesity and obesity-induced oxidative stress. *Lipids Health Dis* 6, 4.
- Oh JD, Yoon CG, and Yu TS (2004) Effect of dietary monascus koji on the liver damage induced by bromobenzene in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33, 965-972.
- Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-358.
- Park GY, Lee SJ, and Lim JG (1997) Effects of green tea catechin on cytochrome P450, xanthine oxidase activities in liver and liver damage in streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26, 901-907.
- Parks DA, Williams TK, and Beckman JS (1988) Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine. A reevaluation. *Am J Physiol* 254, G768-G774.
- Park Y, Albright KJ, Storkson JM, Liu W, Cook ME, and Pariza MW (1999) Changes in body composition in mice during feeding and withdrawal of conjugated linoleic acid. *Lipids* 34, 243-248.
- Reitman S and Frankel S (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 28, 56-63.
- Rhyu MR, Kim EY, and Chung KS (2003) Effect of *Monascus koji* on the quality

- characteristics of bologna-type sausage. *Korea J Food Sci Technol* 35, 229–234.
- Sisk MB, Hausman DB, Martin RJ, and Azain MJ (2001) Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats. *J Nutr* 131, 1668–1674.
- Stripe F and Della Corte E (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244, 3855–3863.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, and Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1–40.
- Wang RS, Nakajima T, and Honma T (1999) Different change patterns of the isozymes of cytochrome P450 and glutathione S-transferases in chemically induced liver damage in rat. *Ind Health* 37, 440–448.
- Yasukawa K, Takahashi M, Yamanouchi S, and Takido M (1996) Inhibitory effect of oral administration of *Monascus* pigment on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 53, 247–249.
- Yoon CG, Lee MK, and Lee SI (1998) Effect of growth on the enzyme activities of oxygen free radical generating and scavenging system in CCl₄-treated rats. *Korean J Gerontol* 8, 35–42.
- Youn UK, Kim YH, and Kim SD (2003) Pigment and monacolin K content of beni-koji fermented with soybean curd residue. *Korean J Food Preserv* 10, 360–364.
- Yu TS, Kim HH, and Yoon CG (2003) Hepatic oxygen free radical metabolizing enzyme activities and serum lipid profile in rats fed diet supplemented with *Monascus* pigment. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33, 244–249.
- Kim SY, Lee DY, Seo KH, Rho YD, Kim GW, Cheoi DS, Baek NI (2012) Isolation and identification of lipids from the fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*. *J. Appl Biol Chem* 55, 103–107.
- Ahn YS, Shin DH, Baek NI, Seong RS, Woo GJ (2001) Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Mallotus japonicus* Muell on *Listeria monocytogenes*. *Korean J Food Sci Technol* 33, 271–277.
- 3) Brus, J.; Jegorov, A. *J. Phys. Chem.* 2004, 108, 3955.
- Ahmad A, Panda BP, Khan S, Ali M, Javed S (2009) Downstreaming and purification of lovastatin from *Monascus purpureus* culture. *Thai J Pharm Sci*, 33, 39–46.
- Baek MR, Choi YH, Yoo DS, Kim MR, Choi SU, Hong KS, Kim YS, Lee KR, Ryu SY (2009) Anti-proliferative components in the roots extract from *Pueraria thunbergiana*. *Kor J Pharmacogn*, 40, 46–50.
- Yoon JS, Sung SH, Park JH, Kim YC (2004) Flavonoids from *Spatholobus suberectus*. *Arch Pharm Res*, 27, 589–592.
- Fedoreyev SA, Bulgakov VP, Grishchenko OV, Veselova MV, Krivoschekova OE, Kulesh NI, Denisenko VA, Tchernoded GK, Zhuravlev YN (2008) Isoflavonoid composition of a callus culture of the relict tree *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. *J Agric Food Chem*, 56, 7023–7031.

- Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Booren AM, Gray JI (1999) Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *J Agric Food Chem*, 47, 840-844.
- Tsunoda Y, Okawa M, Kinjo J, Ikeda T, Nohara T (2008) Studies on the constituents of *Gueldenstaedtia multiflora*. *Chem Pharm Bull*, 56, 1138-1142.
- Han SJ (2011) HPLC/MS/MS method for determination of soyasaponins in the soybean varieties. *Korean J Crop Sci*, 56, 244-249.
- Kubo T, Hamada S, Nohara T, Wang Z, Hirayama H, Ikegami K, Yasukawa K, Takido M (1989) Study on the constituents of *Desmodium styracifolium*. *Chem Pharm Bull*, 37, 2229-2231.
- Kitagawa I, Wang HK, Taniyama T, Yosikawa M (1988) Reinvestigation of the structures of soyasapogenols A, B, and E, oleanene-sapogenols from soybean, Structures of Soyasaponins I, II, and III. *Chem Pharm Bull*, 36, 153-161.
- Xifeng L, Kim SK, Kang JS, Choi HD, Son BW (2006) Radical scavenging hydroxyphenyl ethnoic acid derivatives from a marine-derived fungus. *J Microbial Biotechnol*, 16, 637-638.
- Choi JS, Kim JY, Lee JH, Young HS, Lee TW (1992) Isolation of adenosine and free amino acid composition from the leaves of *Allium tuberosum*. *J Korean Soc Food Nutr*, 21, 286-290.
- Gutsche B, Grun C, Scheutzw D, Herderich M (1999) Tryptophan glycoconjugates in food and human urine. *Biochem J*, 343, 11-19.
- Farmakalidis E, Murphy PA (1985) Isolation of 6'-O-acetylaidzein and 6'-O-acetylgenistein from toasted defatted soy flakes. *J Agric Food Chem*, 33, 385-389.
- Ohta N, Kuwata G, Akahori H, Watanabe T (1980) Isolation of a new isoflavone acetylglucoside, 6"-O-acetylgenistin, from soybeans. *Agric Biol Chem*, 44, 469-470.
- Oueslati MH, Jannet HB, Mighri Z, Chriaa J, Abreu PM (2006) Phytochemical constituents from *Salsola tetrandra*. *J Nat Prod*, 69, 1366-1369.
- Maron DM and Ames BN (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113, 173-215.
- Yahagi T, Nagao M, Seino Y, Matsushima T, Sugimura T and Okada M. (1977) Mutagenicities of N-nitrosamines of *Salmonella*. *Mutation Research*, 48, 121-129.
- Claxton LD, Allen J, Auletta A, Mortelmans K, Nestmann E and Zeiger E (1987) Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. *Mutation Research*, 189(2), 83-91.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Ishidate M Jr and Odashima S (1977) Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.
- Sofuni T, Matsuoka A, Sawada M, Ishidate M. Jr, Zeiger E and Shelby MD (1990) A comparison of chromosome aberration induction by 25 compounds tested by two Chinese

- hamster cell (CHL and CHO) systems in culture. *Mutation Research*, 241, 175-213.
- Toshio Sofuni (Ed.) (1998) Data book of chromosomal aberration test in vitro, Revised edition 1998.
- Makoto Hayashi (1999) 소핵시험, 실험법으로부터 데이터의 평가까지, 의약안전성 연구회 모노그래피시리즈 No. 2.
- Kastenbaum MA and Bowman KO (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutation Research*, 9, 527-549.
- Osami Kajimoto, Yasuyo Yamaguchi, Toyomi Takeuchi, Toshio Namba, Akane Shimada, Akane Shimada, Kazuo Matsumoto, Takahsi Shimizu, Masahiro Iwano, Rei Takahashi (2000) Effects of Lentinus Edodes Mycelia enriched Diet on borderline and mild liver dysfunction: A double blind, Controlled study. *일본임상영양학회지*. 22(1):22-31.
- 장세진. 스트레스. In: 건강통계자료 수집 및 측정의 표준화. 대한예방의학회, 계축문화사. 서울. 92-143, 2000a
- 장세진. 피로. In: 건강통계자료 수집 및 측정의 표준화. 대한예방의학회. 계축문화사. 서울. 144-81, 2000b
- 장세진 등. 우리나라 직장인들의 스트레스 수준의 파악. 스트레스 감소프로그램의 개발 및 인프라 구축에 관한 연구. 보건복지부. 2001
- Schwartz JE, Jandorf L, Krupp LB (1993) The measurement of fatigue: a new instrument. *J Psychosom Res*, 37(7), 753-62.
- Palo MA, Vidal-Adeva L and Maceda L (1961) A study on ang-kak and its production. *Philippines J Sci*, 89, 1-22
- Juzlova P, Martinkova L and Kren V (1996) Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *J Ind Microbiol*, 16, 163-170
- Endo A (1980) Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Antibiot*, 33, 334-336
- Par MZ, Yoon EK and Kim SD (2002) Stability of pigment produced by *Monascus pilosus*. *Korean J Food Sci Technol*, 34, 541-545
- Kim EY and Rhyu MR (2008) Antimicrobial activities of *Monascus koji* extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 40, 76-81
- Kang MR, Kim JY, Hyun YJ, Kim HJ, Yeo HY, Song YD and Lee JH (2008) The effect of red-yeast-rice supplement on serum lipid profile and glucose control in subjects with impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. *Korean J Nutr*, 41, 31-40
- Kiyoshi I, Yoshio M, Keisuke T, Nobukazu T, Sjiocjo T, Sjiopi A and Makoto T (1995) Effect of beni-koji extracts on blood pressure in primary hypertensive volunteers. *Jpn J Nutr*, 53, 263-271
- Yasukawa K, Takahashi M, Yamanouchi S and Takido M (1996) Inhibitory effect of oral administration of *Monascus* pigment on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncol*, 53, 247-249
- Izawa S, Harada N, Watanabe T, Yamamoto A, Hayatsu H and Arimoto-Kobayashi S (1997) Inhibitory effects of food-coloring agents derived from *Monascus* on the

- mutagenicity of heterocyclic amines. *J Agric Food Chem*, 45, 3980–3984
- Watanabe T, Mazumder TK, Yamamoto A, Nagai S, Arimoto-Kobayashi S, Hayatsu H and Terabe S (1999) A simple and rapid method for analyzing the *Monascus* pigment-mediated degradation of mutagenic 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b]indole by in-capillary micellar electrokinetic chromatography. *Mutat Res*, 444, 75–83
- Inoue K, Shirai T, Ochiai H, Kasao M, Hayakawa K and Kimura M (2003) Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid in mild hypertensives. *Eur J Clin Nutr*, 57, 490–495
- Kim CS, Rhee SH and Kim SH (1977) Studies on production and characteristics of edible red color pigment produced by *moli* (*Monascus* sp.). *Kor J Food Sci Technol*, 9, 277–283
- Lin CF and Hszuka H (1982) Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. *Apv Environ Microbiol*, 43, 671–676
- Wang SF, Holliwell B, Richmond R and Skoweroneck WR (1981) The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and ascorbic acid. *J Inorg Biochem*, 14, 127–134
- Eizyro N (1932) Pigment of *Monascus pulpurus* Went(Part 1). *J Agr Chem Soc Japan*, 8, 1007–1015
- Yoshimura MS, Yamanaka K, Mitsugi K and Hirose Y (1975) Production of *Monascus* pigment in a submerged culture. *Agr Biol Chem*, 39, 1789–1795
- Broder CU and Koehler PE (1980) Pigments produced by *M. purpureus* with regard to quality and quantity. *J Food Sci*, 45, 567–569
- Su YC (1983) Fermentative production of anka pigments. *Korea J Appl Microbial Bioeng*, 11, 325–337
- Ju JY, Nam HW, Yoon JC and Shin CS (1994) Extractive fermentation of red pigment using *Monascus* sp, J101. *Korea J Appl Microbial Biotechnol*, 22, 85–91
- Hiroi T, Shima T, Isobe A and Kimura S (1975) Studies on the structure of two pigment obtained from *Monascus* sp. *J Jpn Soc Food Nutr*, 28, 497–502
- Lin CF and Suen SJT. (1973) Isolation of hyperpigment productive mutants of *Monascus* sp. F-2. *J Ferment Technol*, 51, 757–759
- Tsukioka MT, Suzuki HT and Kono T (1986) Pigment production by mutants of *Monascus anka* (Studies on alcoholic beverage production using genus *Monascus*, Part I. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 60, 451–455
- Choi CS, Jeon CP, Lee JB, Lee OS, Rhee CH and Kwon GS (2006) Optimal culture conditions for production of yellow pigments from *Monascus purpureus* in liquid culture. *Kor J Food Preserv*, 13, 192–197
- Su YC, Wang JJ, Lin TT and Pan TM (2003) Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30, 41–46
- Blanc PJ, Loret MO and Goma G (1995) Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotech Lett*, 17, 291–294
- Wang J, Su M, Lu Z, et al. (1995) Clinical trial of extract of *Monascus purpureus*(red

- yeast) in the treatment of hyperlipidemia. *Chinese J Exp Ther Prep Chin Medicine*, 1(1), 1-5.
- Chi H, Lee BH, You HJ, Park MS and Ji GE (2006) Differential transformation of ginsenosides from *Panax ginseng* by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol*, 16(10), 1629-1633
- Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, and Veit M (2001) Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*, 41(5), 492-9
- Hein EM, Rose K, Slot VGT, Friedrich AW, and Humpf HU (2008) Deconjugation and Degradation of Flavonol Glycosides by Pig Cecal Microbiota Characterized by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH). *J Agric Food Chem*, 56, 2281 - 2290
- Lee BH, You HJ, Park MS, Kwon B and Ji GE (2006) Transformation of the glycosides from food materials by probiotics and food microorganisms. *J Microbiol Biotechnol*, 16(4), 497-504
- Wie HJ, Zhao HL, Chang JH, Kim YS, Hwang IK, Ji GE (2007) Enzymatic modification of saponins from *Platycodon grandiflorum* with *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*, 55(22),
- Huang, K. C. 2000. *The Pharmacology of Chinese Herbs*, CRC Press, Boca Raton.
- Son IH, Park YH, Lee SI, Yang HD. and Moon HI (2007). Neuroprotective activity of triterpenoid saponins from *platycodi radix* against glutamate-induced toxicity in primary cultured rat cortical cells. *Molecules*. 12, 1147-1152.
- Lorentz A, Klopp I, Gebhardt T, Manns M and Bischoff S (2003) Role of activator protein 1, nuclear factor- κ B, and nuclear factor of activated T cells in IgE receptor-mediated cytokine expression in mature human mast cells. *J Allergy Clin Immunol*, 111, 1062-1068.
- Ishizaka K (1984) Regulation of IgE synthesis. *Ann Rev Immunol*, 2, 159-182.
- Matsuda H, N Watanabe G P, Geba J Sperl, M Tsudzuki, J Hiroi, M Matsumoto, H Ushio, S Saito, PW Askenase, and C Ra (1997) Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol*, 9, 461-466.
- Vestergaard C, H Yoneyama, M Murai, K Nakamura, K Tamaki, Y Terashima, T Imai, O Yoshie, T Irimura, H Mizutani, and K Matsushima (1999) Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis like lesions. *J Clin Invest*, 104, 1097-1105.
- Sator PG, JB Schmidt, and H Honigsmann (2003) Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*, 48, 352-358.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 발효미생물을 이용한 기능성 식품 산업화 연구사업단의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 발효 미생물을 이용한 기능성 식품 산업화 연구사업단의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.