11-1543
000-002
462-01

면역
식품
(소재)의
면역능
검증을
위한
표준설정
연구 및
민간
보급
프로세스
구축

최
종
보
고
서

2018

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

발 간 등 록 번 호
11-1543000-002462-01

면역 식품(소재)의 면역능 검증을 위한 표준설정 연구및 민간 보급 프로세스 구축

최종보고서

2018. 11. 24.

주관연구기관 / 충남대학교 산학협력단
협동연구기관 / 상지대학교 산학협력단
㈜비케이바이오

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "**고부가가치식품기술개발사업**"(개발기간 : 2015. 10. 12 - 2018. 10. 11)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 11. 24.

주관연구기관명 : 충남대학교 산학협력단 (대표자) 이 영 석 (인)

협동연구기관명 : 상지대학교 산학협력단 (대표자) 이 우 천 (인)

협동연구기관명 : ㈜ BK bio (대표자) 최 혁 규 (인)

주관연구책임자 : 권 재 열
협동연구책임자 : 권 보 인
협동연구책임자 : 임 근 형

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>315064-3</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td colspan="2">2015. 10. 12
- 2018. 10.
11 (36개월)</td><td>단 계 구
분</td><td>(최종단계)/
(총 3단 계)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="5">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="5">고부가가치식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="5">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="5">면역 식품(소재)의 면역능 검증을 위한 표준설정 연구 및 민간 보급 프로세스 구축</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">권재열</td><td>해당단계
참여연구원
수</td><td>총: 27명
내부: 27명
외부: 명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td colspan="2">정부: 300,000천원
민간: 100,000천원
계: 400,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원
수</td><td>총: 88명
내부: 88명
외부: 명</td><td>총 연구개
발비</td><td colspan="2">정부: 900,000천원
민간: 300,000천원
계: 1,200,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">충남대학교 산학협력단
상지대학교 산학협력단</td><td colspan="3">참여기업명

㈜ BK bio</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="3">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:</td><td colspan="3">연구책임자:</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

요약

- 수지상세포 기반 시험관내 면역능 검사법 개발
- 새롭게 정의한 면역지수들의 값에 기초하여 대상소재의 면역특성(면역증강, 면역관용)에 따른 분류와
  검사치 수량화 및 최상/상/중/하 등급화를 통해 객관적으로 평가
- 동물실험을 통한 시험관내 면역능 평가법의 유효성 평가
- 면역능 평가시스템 개발 및 앱 개발로 통한 민간보급 프로세스 구축
- 수지상 세포를 이용한 면역 식품소재의 면역능 평가기술 확립
- 시험관내 검사법 결과의 수량화 및 등급화 기준 확립(Immunogenic, Tolerogenic 소재로 분류)
- 동물시험 면역지표들 결과와 시험관내 검사법에 의한 등급화 결과를 비교 분석하여 시험관내 검사법의 타당성 확인
- 우수 면역식품(소재) 선정 가이드라인 설계(기존 개별인정형 원료와 비교) 특허등록 2건, 제품화 1건
- 식약처 가이드 비교를 통한 개발 평가법 타당성 분석을 통한 타당성 및 우수성 규명
- 민간보급 프로세스 구축을 위한 면역능 평가시스탬 앱 개발

보고서 면수

485

<요약문>

<table>
<tr><td>연구의
목적 및 내용</td><td colspan="5">• 면역식품(소재) 면역능 검사를 위한 시험관내 검사법 개발
• 면역기능 검사법 및 검사과정 표준화, 면역기능 검사치의 수량화 및 등급화
• 면역능 검사 동물모델 구축 및 시험관내 검사법의 유효성 검증
• 면역능 평가 시스템 개발 및 민간보급 프로세스 구축</td></tr>
<tr><td>연구개발성과</td><td colspan="5">• 수지상세포 기반 시험관내 면역능 검사법 개발
• 새롭게 정의한 면역지수들의 값에 기초하여 대상소재의 면역특성(면역증강, 면역관용)에 따른 분류와
검사치 수량화 및 최상/상/중/하 등급화를 통해 객관적으로 평가
• 동물실험을 통한 시험관내 면역능 평가법의 유효성 평가
• 면역능 평가시스템 개발 및 앱 개발로 통한 민간보급 프로세스 구축
• 수지상 세포를 이용한 면역 식품소재의 면역능 평가기술 확립
• 시험관내 검사법 결과의 수량화 및 등급화 기준 확립(Immunogenic, Tolerogenic 소재로 분류)
• 동물시험 면역지표들 결과와 시험관내 검사법에 의한 등급화 결과를 비교 분석하여 시험관내 검사법의 타당성 확인
• 우수 면역식품(소재) 선정 가이드라인 설계(기존 개별인정형 원료와 비교) 특허등록 2건, 제품화 1건
• 식약처 가이드 비교를 통한 개발 평가법 타당성 분석을 통한 타당성 및 우수성 규명
• 민간보급 프로세스 구축을 위한 면역능 평가시스탬 앱 개발</td></tr>
<tr><td>연구개발성과의
활용계획
(기대효과)</td><td colspan="5">• 면역능 평가시스템을 활용하여 면역능우수식품소재 수집 기업의 면역식품 개발 영역 연구효율 증대 및 소비자의 제품 선택과정 신뢰성향상에 기여할 계획임.
• 더 나아가 국제 경쟁력 있는 식품소재들의 신속한 탐색이 가능해지며, 국내자원의 면역능에 대한 표준화 탐색 기술이 제공됨으로써 효능 검증을 위한 투자비용 절감 및 신소재 발굴 시간 단축이 가능하다.
• 본 과제를 통해 면역증진 효과를 확인한 당근박다당 소재에 대한 생산공정 확립을 완료 하였으며, 이를 활용하여 제품화를 계획하고 있으며, 이외 우수면역소재에 대한 제품화를 계획임.
• 시중 판매 면역식품소재 품질 평가에 활용</td></tr>
<tr><td>국문핵심어
(5개 이내)</td><td>면역능</td><td>면역식품</td><td>검사법</td><td>표준화</td><td>수지상세포</td></tr>
<tr><td>영문핵심어
(5개 이내)</td><td>Immunity</td><td>Immunity-boosting food</td><td>Evaluation system</td><td>Standardization</td><td>Dendritic cells</td></tr>
</table>

<Abstract>

Research Aims	• Develop an *in-vitro* assay to evaluate the ability of certain functional foods to boost immune system function • Standardize the procedures and the quantification and grading methods for immune system function tests • Establish animal models to test immune system function and validate *in vitro* methods • Devise a system to distribute evaluation methods to the public
Research Results	• Developed a dendritic cell-based *in-vitro* assay • Classified immune function of funtional foods based on primary effect (immunogenic vs. tolerogenic) and degree of effect (Excellent, Good, Average, Poor) • Validated the *in-vitro* assay in animal models • Created a public distribution method via mobile application development • Successfully used dendritic cells to assess the ability of foodstuffs to boost the immune system • Establishment of quantification and grading criteria for *in-vitro* test results (classified as immunogenic or tolerogenic) • Conducted comparative analysis of results from *in-vitro* and animal tests to demonstrate the effectiveness of *in-vitro* testing • Designed selection guidelines for highly effective immunity-boosting foodstuffs (compared to individual existing assessment methods for raw material), currently pending two patents and one product • Confirmation of feasibility and reliability of aforementioned guidelines • Created a mobile/PC application for evaluation of immune system function as a method of public distribution
Future Steps and Implications	• We plan to continue to improve the research and development of immunity-boosting functional foods as well as the reliability of the product selection process for consumers • By standardizing tests that evaluate the immunity-boosting ability of foodstuffs, it is possible to quickly search for competitive and highly effective immunity-boosting foodstuffs from around the globe, thereby reducing the time and costs invested into discovering new raw material • Through this project, we have successfully validated the immunity-enhanced properties of carrot polysaccharide fraction; having established an efficient production process, we plan to commercialize it and other highly effective immunity-boosting foodstuffs in the future. • Immunity-boosting functional foods currently on the market can be assessed for validity

Keywords	Immunity	Immunity-boosting food	Evaluation system	Standardization	Dendritic cells
Keywords in Korean	면역능	면역식품	검사법	표준화	수지상세포

〈 Table of Contents 〉

Chapter 1. Research Goals and Objectives ····· 1

Chapter 2. Project Findings ····· 2

Section 1: Development of immunity evaluation *in vitro* methods of functional foods and their public distribution processes ····· 3

Section 2: Development of animal models to validate the in vitro immunity assays of functional foods ····· 155

Section 3: Standardized guidelines for identifying and testing efficacy and quality of immunity-boosting foods ····· 288

Section 4: Strategy and schedule for the research and development of immunity-boosting foods ····· 412

Section 5: Overall achievement and results ····· 418

Chapter 3. Significance and Conclusions ····· 463

Chapter 4. Future Steps and Applications ····· 473

References ····· 485

〈 목 차 〉

제1장. 연구개발과제의 개요 ····· 1
제2장. 연구수행 내용 및 결과 ····· 2
제1절. 표준화된 시험관내 면역능 검사법 제시 및 민간보급 프로세스 개발 ····· 3
제2절. 선정된 우수 효능 소재에 대한 동물시험법 구축 및 검증 ·· 155
제3절. 소재 발굴, 품질 표준화 및 효능시험법 가이드라인 제시 제품 개발 및 홍보 ····· 288
제4절. 연구개발 추진전략 및 방법, 추진체계, 추진 일정 ····· 412
제5절. 연구개발 성과 및 결과 ····· 418
제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 463
제4장. 연구결과의 활용 계획 등 ····· 473
붙임. 참고 문헌 ····· 485

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 면역식품(소재) 면역능 검사를 위한 시험관내 검사법 개발
- 면역기능 검사법 및 검사과정 표준화, 면역기능 검사치의 수량화 및 등급화
- 면역능 검사 동물모델 구축 및 시험관내 검사법의 유효성 검증
- 면역능 평가 시스템 개발 및 민간보급 프로세스 구축

1-2. 연구개발의 필요성

- 사회가 고령화되면서 많은 면역기능 문제가 대두되고 면역력 저하로 인한 감염성 질환에 노출되는 상황에서 면역능 조절 의약품 개발에 많은 시간과 비용이 투자되고 있는 실정임.
- 다양한 면역세포들의 특이적 기능들과 소통인자인 싸이토카인, 염증성 매개물질등의 매개인자들에 의한 소통들로 이루어진 인체의 면역체계는 면역식품(소재)로부터 영향을 받아 그 면역기능이 변화될 수 있어 면역기능 증진 및 과민반응 완화에 면역식품(소재)를 발굴해야 할 필요성이 있음
- 현재 학계에서 면역기능 향상에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있고 국내 식품시장에서 면역력 향상에 대한 기능성 식품의 수요가 증가함에 따라 객관적으로 면역기능 식품의 기준을 설정해야 할 필요성이 대두됨.
- MERS와 같은 감염성 질병이 증가한다고 보고되는 실정에서 면역력 증강에 대한 관심이 고조되고 있어 근거가 부족한 제품이 무분별하게 개발될 가능성이 농후하여 표준화된 검사법의 필요성이 절실함

1-3. 연구개발 범위

- 면역식품(소재)선정 및 면역능 검사를 위한 일차 시험관내 검사법 개발
- 면역능 우수 여부가 검증된 식품소재를 대상으로 동물시험에 대한 면역지표 선정 및 설계법 도출
- 면역식품 소재의 품질표준화 및 산업화를 위한 신뢰성 있는 평가 가이드라인 설계
- 선정된 표준에 대한 민간보급 프로세스 개발 및 보급체계 구축

2. 연구수행 내용 및 결과

목차 :

◦세부별 연구내용 및 결과

제1절

◆ 1세부 : 표준화된 시험관내 면역능 검사법 제시 및 민간보급 프로세스 개발

- 시험관내에서 측정가능한 면역기능 선택
- 면역체계를 이루는 다양한 세포들 가운데 면역능 검사 대상 세포 선정
- 각 세포군들에 적용 가능한 시험관내 검사법 개발 및 표준화
- 개발한 시험법을 적용하여 면역식품(소재) 스크리닝 및 우수 소재 선정
- 구축한 시험법의 타당성 조사 및 민간보급 프로세스 개발

제2절

◆ 1협동: 선정된 우수효능 소재에 대한 동물시험법 구축 및 검증

- 동물시험 모델에 대한 표준 시험법 제시
- 시험관내 검사법과 동물시험 검사법의 비교를 통한 신뢰성 검증

제3절

◆ 2협동 :소재 발굴, 품질표준화 및 효능시험법 가이드라인 제시, 제품개발 및 홍보

- 면역능 우수 식품소재 수집 및 추출, 분석법 개발 원료의 표준화
- 주요 기능별 분석법 가이드를 제시하여 기능 소재의 개발 가이드라인 제시
- 면역능 수치(등급)별 가이드라인 설계 및 소재 5종 이상 선정 가이드 제안
- 제품화 사례 적용을 통한 BC (Benefit-Cost analysis) 도출방안 제시 및 홍보

제4절 연구개발 추진전략 및 방법, 추진체계, 추진 일정

제5절 연구개발 성과 및 결과

제1절

1세부 : 충남대학교 산학협력단

표준화된 시험관내 면역능 검사법 제시 및 민간보급 프로세스 개발

1.1 표준화된 시험관내 면역능 검사법 설명
1.2. 수지상세포기반 시험관내 검사법 개발의 과학적 배경
1.3. 시험관내 검사법 과정의 표준화
1.4. 시험관내 면역능 검사 결과의 수량화 및 등급화
가. 시험관내 면역능 검사
나. 면역능 수치화
다. 면역능 등급화
1.5. 시험관내 면역능 평가 시스템 확립
1.6. 시험관내 면역능 검사법 유효성 평가
1.7. 시험관내 면역능 평가 시스템의 민간보급 프로세스 구축

1.1 표준화된 시험관내 면역능 검사법 설명 [Figure 1.1]

[요약] **수지상세포를 이용한 면역(식품)소재의 면역능 시험관내 평가기술**

◦ **표준화된 평가단계**

◆ **수지상세포 활성화표지 단백질들 발현량 측정**

수지상세포에 대상 소재 추출물을 처리한 처리구와, 블랭크를 처리한 대조구에서 Live/Dead staining을 통해 수지상세포의 생존률을 확인하고, 수지상세포의 positive marker인 MHCII와 CD11c, 수지상세포 표면에 발현하는 공동활성인자 CD40, CD80 및 억제인자 PD-L1, PD-L2 안티바디를 사용하여 세포를 염색한 후 유세포분석장치 를 이용하여 각 소재가 수지상세포의 활성화에 미치는 영향을 특징짓는 표지단백질들의 발현양을 측정하고 분석하여 이들 간의 특징적인 관계들을 지수화하여 각 소재들의 면역증진효과와 면역관용효과를 수치화하였다.

[Figure 1.2]

◆ **면역지수들 정의 및 각 지수별 수치화**

면역증강지수I, 면역증강지수II, 면역관용지수I, 면역관용지수II

◆ **면역효과의 등급화**

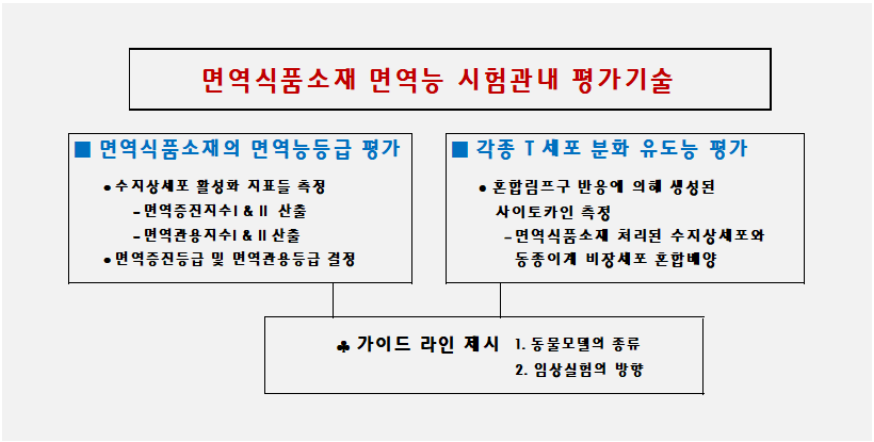
면역증강지수I 등급, 면역증강지수II 등급, 면역관용지수I, 면역관용지수II 등급을 얻고 이를 모두 종합하여 각 소재의 면역능 등급을 얻게 된다.

◆ **개발 면역식품소재의 면역능 결정**

개발소재의 면역증진 및 면역관용지수값과 등급을 산출하여 이를 바탕으로 얻은 각 면역지수 등급 및 면역능 등급이 표준 면역식품소재들과 비교해 면역증진소재 혹 면역관용소재 최상, 상, 중, 하 어느 등급에 속하는지를 결정한다.

◆ **평가소재가 처리된 수지상세포에 의한 T helper 세포 분화방향 및 정도 평가**

각 면역소재들로 처리된 골수유래 수지상세포를 동종이계 마우스의 비장세포들과 혼합배양하여 수지상세포에 의한 T Helper 세포 분화방향 및 정도를 평가한다. 동종이계 수지상세포와 비장세포 간의 반응에 의해 유도되는 일정한 방향성의 싸이토카인 생성 패턴과 정도를 측정하여 면역식품소재가 수지상세포에 미친 영향을 T Helper 세포 분화방향 및 정도에 미친 영향까지 평가한다. [Figure 1.3]



[요약] **수지상세포를 이용한 면역(식품)소재의 면역능 시험관내 평가기술**

◦ 핵심 요소기술 주요내용 및 특징

◇ 본 시험관내 검사법의 주요내용

- 각 면역식품소재의 면역능 특성을 면역증진지수I, 면역증진지수II, 면역관용지수I 값으로 수치화하고 등급화하여 각 소재들간의 면역능 객관적 비교 가능함
- 본 기술은 면역관련 식품 소재의 면역능의 특성(면역증강 or 면역관용)과 강도를 시험관 내에서 신속하고 객관적으로 평가함
- 면역식품소재 처리에 의한 수지상 세포 성숙화 방향 및 정도를 수지상세포 활성화의 바이오마커들 발현량 측정을 통해 평가함
- 면역식품소재가 처리된 수지상세포에 의해 유도되는 T Helper 세포 분화방향 및 정도를 동종이계 비장세포와 혼합림프구 반응 (MLR)을 통해 다양한 싸이토카인들을 측정함.
- 새로운 면역 소재의 발굴과 탐색이 객관적이면서 용이하고, 후속 동물실험 모델 설정 및 임상시험의 방향을 가이드할 수 있어 종래에 비해 기능성 면역식품소재 개발에 필요한 시간이 적게 들고 비용이 절감되면서도 객관적이고 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있음

◇ 면역식품소재 면역능 측정을 통한 면역기능 분류 및 평가 알고리즘

■ 면역증강 혹 과민면역개선 혹 알레르기개선 식품 분류 알고리즘
■ T helper 세포 분화의 종류에 기초하여 식품소재 후천면역 유도 정도 및 방향성 예측 알고리즘
■ 측정된 면역지수 값에 기초하여 식품소재의 Immunity 혹 Tolerance 유도 능력 예측
■ 식품소재 처리 수지상세포에 의해 유도되는 T helper 세포 분화 방향성 및 정도 측정
■ 기 개발소재를 통해 확립한 면역지수들 데이터베이스에 비추어 현 개발식품소재의 상대적 경향성 예측
■ 시장에서 유통되는 기능성면역식품소재 품질 평가

◇ 기존 기술과의 차별성

■ 면역식품소재의 면역효과를 수치화 혹 등급화하고 데이터베이스화할 수 있는 기초 기술 없음
■ 본 신기술에 기초하여 면역식품소재의 면역능을 데이터베이스화하여 면역식품소재 평가 및 개발 플랫폼 제작

◇ 관련 산업 파급효과

■ 소재의 면역증진 혹 면역개선효과 평가기술로 개발소재와 기존소재들과의 비교평가 활성화
■ 새로운 면역식품소재 효과적 개발을 위한 소재의 스크리닝 기술로 활용가능성
■ 면역식품소재의 면역능의 특성과 강도를 객관화, 수치화하여 각 소재들에 대한 면역능을 데이터베이스화하여 식품개발자와 소비자, 정책실행자가 활용하는 면역식품소재 플랫폼 개발
■ 본 신기술에 의한 면역능 수치에 기초하여 면역식품 후보소재의 면역능 평가에 필요한 동물모델 선정 및 임상시험에 대해서 객관적인 가이드라인을 제공하여 면역식품소재 개발 과정에 필요한 시간이 단축되고, 각 단계별 결정이 과학적으로 이루어 짐
■ 면역기능 관련 활성물질들의 복합체의 성격을 갖는 시중판매 면역식품소재들에 대한 세포기반 품질 평가 시스템 구축의 핵심요소

【시험관내 면역능 검사법 명칭】

수지상 세포를 이용한 면역식품소재의 면역능 평가기술

【기술분야】

본 기술은 식품 소재의 면역효과의 특성과 강도에 대한 합리적인 평가방법 및 면역기능 소재의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 수지상세포를 이용하여 면역소재의 면역증진 혹 면역개선 효과 평가기술 및 면역기능 소재의 스크리닝 기술에 관한 것이다.

【평가기술개발의 배경】

■ 면역기능식품의 소비 급증에 따른 객관적인 평가 가이드라인 필요성

최근 건강에 대한 관심이 고조되면서 각종 질환자나 기타 면역과 관련한 각종 질환으로 고생하는 환자뿐만 아니라 건강에 큰 이상이 없는 사람들도 면역에 관련된 여러 가지 대체요법에 따른 식품이나 건강보조식품을 섭취하는 사례가 늘고 있다.

정부에서는 이러한 면역관련 식약류에 대한 최소한의 관리를 위해 또한 사용지침을 주기 위해 '면역기능인정제품'을 지정하여 관리하고 있다. 2017년 현재 면역기능인정제품으로 인삼, 홍삼, 알콕시글리세롤함유 상어간유, 알로에 겔, 클로렐라와 같은 '고시형원료' 함유제품과, 게르마늄효모, 금사 상황버섯, 당귀혼합추출물, 클로렐라, 표고버섯균사체, Enterococcus faecalis 가열처리건조분말, L-글루타민, 다래추출물, 소엽추출물, 피카오프레토분말 등 복합물, 구아바잎추출물 등복합물, 스피루리나, 청국장균배양정제물(폴리감마글루탐산칼륨) 등 '개별인정원료'를 함유하는 제품이 있다. 물론 이외에도 수많은 식품 또는 건강보조식품, 기능성 소재 등이 소비되고 있다.

■ 면역기능식품의 면역증진 혹 면역관용 효과를 구별하는 면역기능평가법 필요성

사람을 대상으로 하는 한국 건강기능식품의 면역기능평가 가이드라인에 비추어보면 식품 섭취에 의해 기대되는 면역기능은 크게 ① 저하된 면역의 증강을 목적으로 하는 것과 ② 민감해진 면역반응(알레르기)을 조절해주는 것 등 두 가지로 분류된다. 즉, 면역관련 각종 식약품들은 면역증진(Immunity; 면역능, 면역항원, 항감염, 면역증강)용과 면역관용(Tolerance; 알레르기개선, 항염증, 과대면역개선, 과민면역개선)용으로 구분된다. 면역증진과 면역관용은 상호 상반된 기능이다. 정상적인 면역기능 수행을 통해 건강함을 유지하기 위해서는 면역증진과 면역관용의 잘 조정된 균형이 필요하다. 위험한 병원체들과 암화된 세포(transformed cell)들을 특이적으로 공격하여 잘 제거하지만, 해 없는 자가조직, commensal microorganisms, food antigens, 그리고 environmental antigens에는 관용성을 나타내야한다. 그러한 면에서 이러한 두 가지 면역기능에 대해 식약품 소재가 미치는 효과를 효과적으로 조사할 수 있는 평가방법이 필요하다.

■ 면역기능식품의 면역능 평가 및 개발을 객관적이며 신속한 기술의 필요성

다양한 면역관련 식약품 소재가 개발되어 시판되고 있음에도 이러한 식약품 소재의 면역효과의 특성과 강도에 대한 합리적인 평가 시스템이나, 면역증진 소재의 개발을 위한 표준화된 시험법이 없는 것이 현실이다. 그렇기 때문에 어떤 소재가 어떤 소재에 비해 면역증강 효과가 몇 % 더 강하다는 식의 상대적이고 비합리적인 비교만 있을 뿐 각종 면역관련 소재의 면역기능의 특성 및 강도에 따라 분류하고 수치화하는 것도 이루어지지 않고 있다.

식약품 소재의 면역효과의 특성과 강도에 대한 합리적인 평가 시스템이나 실험방법론이

없는 이러한 현실은 면역관련 식약품의 활용과 개발 양 측면에서 문제를 야기하고 있다.

사람마다 개인적인 기질이나 환경적인 차이에 의해 면역증강이 필요한 (즉, 면역관용이 있으면 안되는) 사람이나 상황일 수도, 그 반대일 수도 있다. 또한 면역증강 또는 면역관용이 요구되더라도 그 정도가 과하게 되면 오히려 부작용이 발생할 여지가 있다. 무분별한 면역관련 식약품의 남용은 오히려 건강을 악화시킬 우려가 있어 이는 개인적인 문제뿐만 아니라 사회적으로도 큰 문제를 야기할 수 있다.

또한 면역관련 식약품으로 가능성이 있는 소재의 발굴과 개발 역시 개별적, 단편적으로 이루어지고 있다. 예컨대, 어떤 소재가 면역관련 특성이 있는 것 같다는 정보를 얻게 되면 동물시험으로 직행할 수밖에 없어 시간과 비용이 많이 소요되는 단점이 있다.

그럼에도 아직까지 면역관련 식약품 소재의 세포독성 여부 및 정도, 면역특성(indexing), 면역증진 강도 등을 체계적으로 평가하는 방법에 대해 알려진 바 없다.

【평가기술의 해결과제】

본 기술은 이상과 같은 문제를 해결하기 위해 제안된 것으로, 식품 소재의 면역능의 특성과 강도를 객관화, 수치화할 수 있는 평가방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 기술은 상기 평가방법을 활용하여 면역증진 혹 면역개선 소재를 스크리닝하는 방법의 기반 기술이다. 이 기술을 기반으로 하여 면역식품 후보소재의 면역능 평가에 필요한 동물모델 선정 및 임상시험에 대해서 객관적인 가이드라인을 제공하여 준다.

【평가기술 실시개략도】

그림 A. 수지상세포의 준비 및 면역식품소재 처리

6~10주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골로부터 통상의 방법에 따라 골수세포를 획득하였다. 획득된 골수세포를 논문에 상술된 조성의 배지에 혼합하고, 37℃, 5% CO_2 조건에서 6일 배양하여 수지상세포로 분화를 유도하였다. 배양 3일째 배지를 보충해 주고, 6일째 부착되지 않은 분화된 수지상세포를 회수하고 원심분리하였다(1500rpm, 5분). 분리된 세포를 동일 배지에 현탁하고 48-well plate에 5×10^5개가 되도록 분주하였다.

이때 상기 대상 소재 추출물의 보관액을 상기 배지로 최종농도가 100~1000 ㎍/㎖가 되도록 희석하여 농도별로 처리하고 동일한 조건에서 24시간 배양한 후 부착되지 않은 세포를 수거하여 유세포분석을 수행하였다. 세포독성이 심한 소재의 경우에는 최종농도를 낮추어가며 실험을 진행하였다.

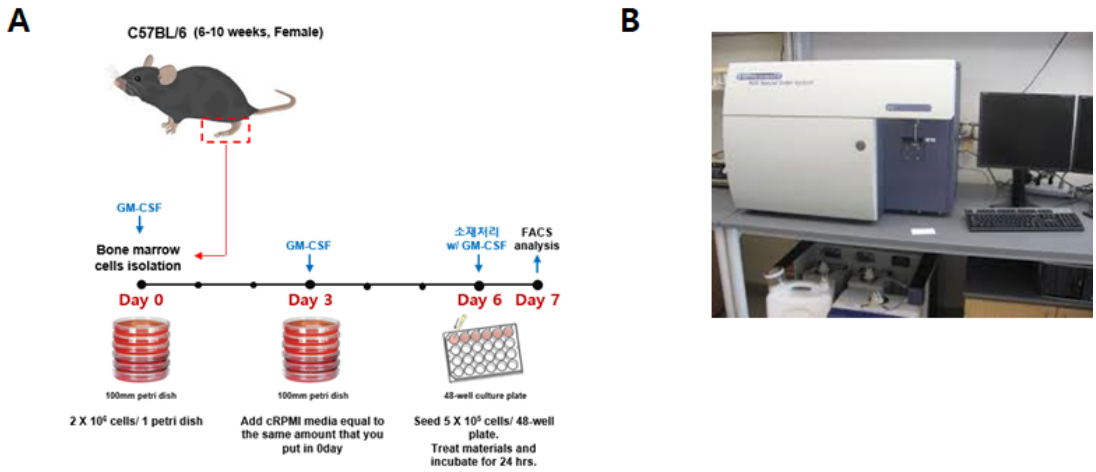


그림 B. 유세포분석

Live/Dead staining을 통해 수지상세포의 생존률을 확인하고, 수지상세포의 positive marker인 MHCII와 CD11c, 수지상세포 표면에 발현하는 공동활성인자 CD40, CD80 및 억제인자 PD-L1, PD-L2 안티바디를 사용하여 세포를 염색한 후 유세포분석장치 (FACS Canto Ⅱ, BD bioscience, 미국)를 이용하여 분석하였다.

그림 C. 면역증진지수 I 의 정의 및 수치화

살아있는 $MHCII^+$ $CD11c^+$ 수지상 세포에서 MHCII 대비 CD11b의 발현을 확인하여 구획(A0, A1, A2)나누기를 실시한 후 소재와 vehicle 처리에 의한 각 A0와 A1의 비율(A1/A0)을 얻고, vehicle에 의한 A1/A0에 대한 소재처리에 의한 A1/A0를 면역증진지수 I (The Immunogenic Index I)로 정의하고 각 소재처리농도에 따른 면역증진지수I를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

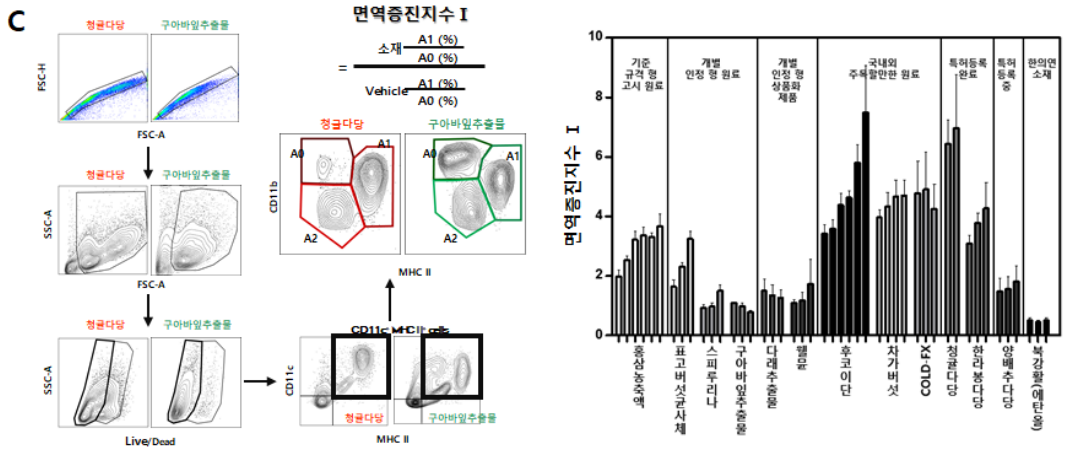


그림 D. 면역증진지수II의 정의 및 수치화

항원특이적인 수지상세포의 기능을 수행하기 위해서는 MHC II의 발현이 있어야하는데, 미성숙수지상세포의 경우에는 이 발현이 낮고 성숙세포의 경우에는 그 발현이 증가한다는 사실에 근거하여 살아있는 CD11c+ 수지상세포를 CD40와 MHC II의 발현양태에 기초하여 여러 그룹으로 나누었다. MHC II발현은 있으나 T cell activation 촉진 신호로 작용하는 CD40분자의 발현이 없는 그룹 (그림12, 2+3 그룹)과 MHC II가 강하게 발현되어 있으면서 CD40의 발현도 강한 그룹 (그림12, 6+9 그룹)을 나누어 가각 미성숙수지상세포와 성숙수지상 세포군으로 잠정 나누고 그들 간의 비율을 면역증진지수II (The Immunogenic Index II)로 정의하고, 각 소재처리농도에 따른 면역증진지수II을 수치화하여 그래프로 나타내었다.

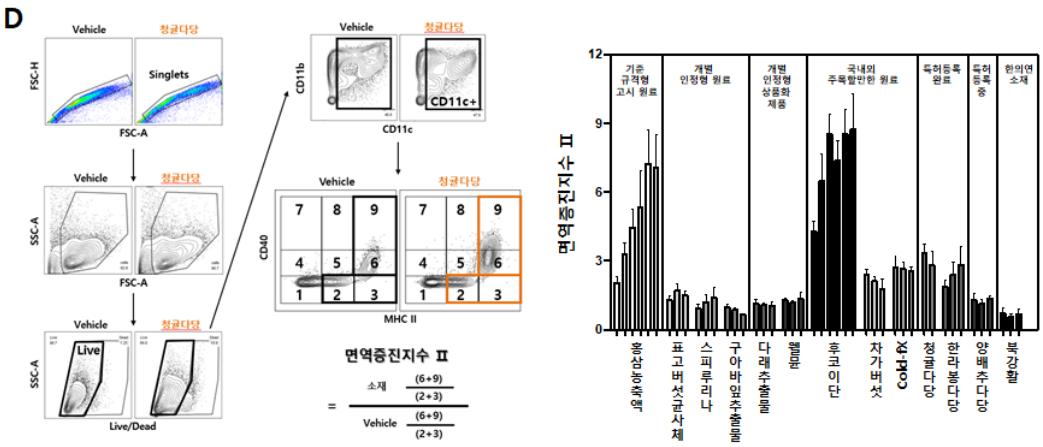


그림 E. 면역관용지수I의 정의 및 수치화

항원특이적 항원제시기능에 의존한 수지상세포의 면역기능을 검사하기 위해 면역증진분자 CD40과 면역억제분자 PD-L1발현과 MHCII발현에 기초하여 각각 CD11c+ 수지상세포를 분획하였다. 면역증강기능의 MHCIIhiCD40+세포군(6, 9 그룹)에 대한 면역억제기능의 MHCII+PD-L1세포군(5, 6 그룹)의 비율을 vehicle에 의한 비율로 나누어 면역관용지수I (The Tolerogenic Index I)로 정의하고, 각 소재처리농도에 따른 면역증진지수II을 수치화하여 그래프

로 나타내었다.

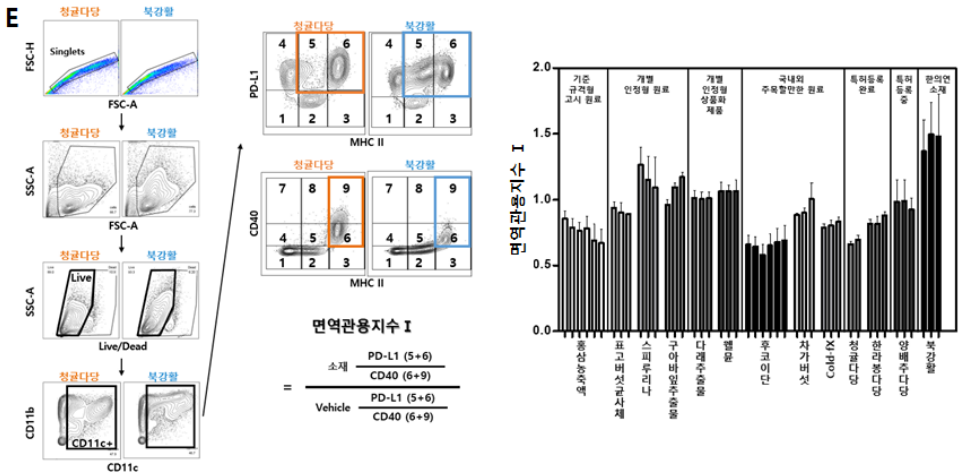


그림 F. 면역관용지수I의 정의 및 수치화

항원특이적 항원제시기능에 의존한 수지상세포의 면역기능을 검사하기 위해 면역억제분자 PD-L1발현과 MHCII발현에 기초하여 각각 CD11c+ 수지상세포를 분획하였다. MHCIIhiPD-L1+세포군(6 그룹)에 대한 MHCIIloPD-L1+세포군(5 그룹)의 비율을 vehicle에 의한 비율로 나누어 면역관용지수II (The Tolerogenic Index II)로 정의하고, 각 소재처리농도에 따른 면역관용지수II을 수치화하여 그래프로 나타내었다.

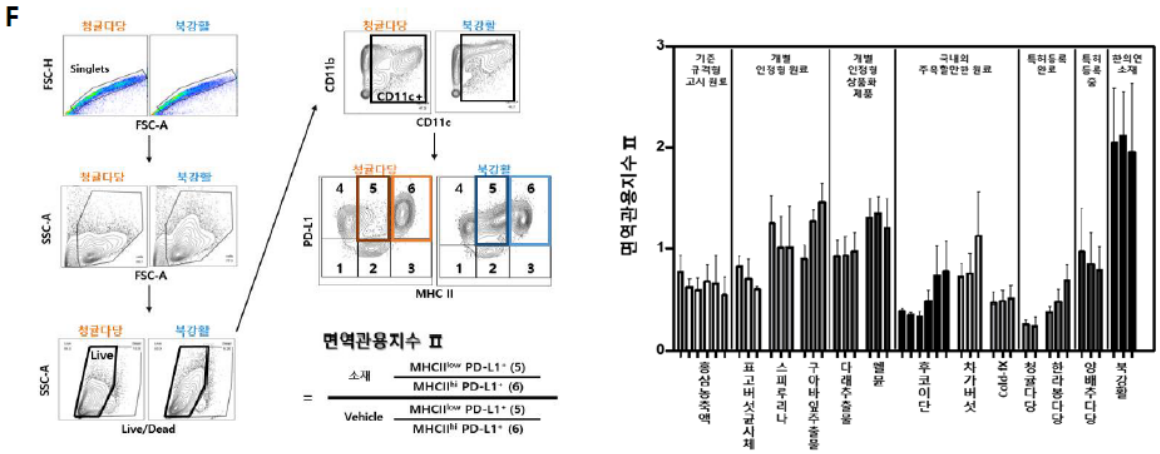
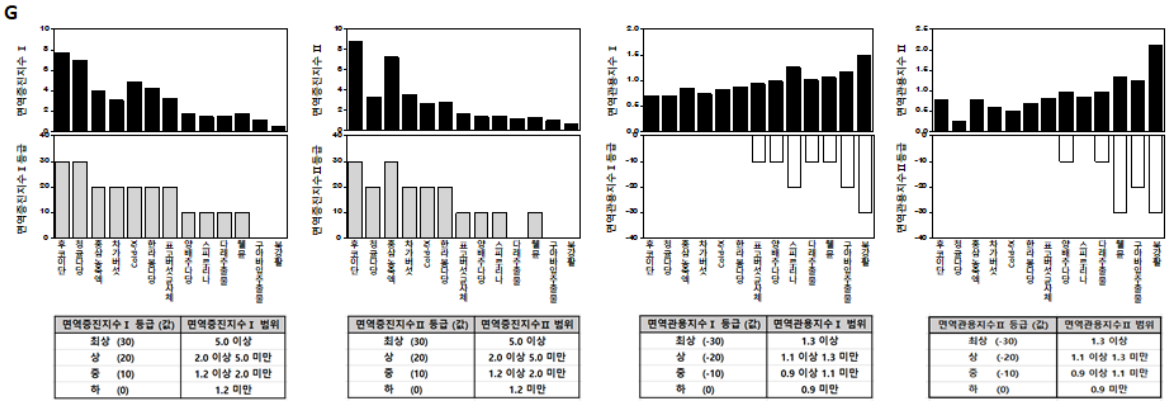


그림 G. 표준 면역식품소재들의 면역증진지수 및 면역관용지수 등급화

표준 면역식품소재들 면역증진지수와 면역관용지수값을 얻어 표에 표기된 것처럼 각각 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 나누고, 최상, 상, 중, 하 각 등급에 대해 면역증진지수에는 30, 20, 10, 0 각각 그래프값을 부여하고, 면역관용지수에는 −30, −20, −10, 0 각각 부여하여 그래프로 나타내었다. (위 : 각 소재의 면역증진지수 또는 면역관용지수를 나타낸 그래프, 아래 : 면역증진지수 및 면역관용지수의 등급 그래프).

G



면역증진지수 I 등급 (값)	면역증진지수 I 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만

면역증진지수 II 등급 (값)	면역증진지수 II 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만

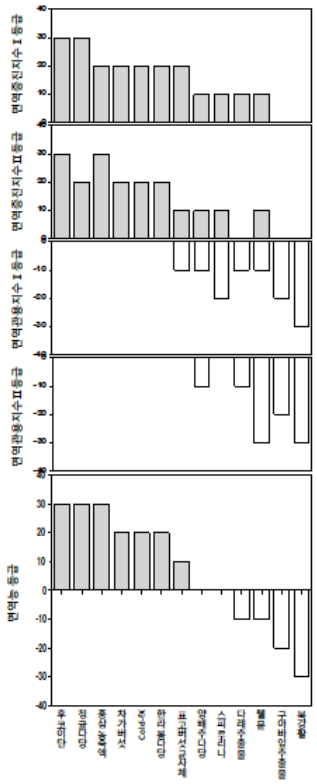
면역관용지수 I 등급 (값)	면역관용지수 I 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

면역관용지수 II 등급 (값)	면역관용지수 II 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

그림 H. 표준 면역식품소재들의 면역능 등급 산출

각 표준 면역식품소재들의 면역증진지수값과 (모두 더하여 2로 나누고 반올림하여 10단위로 만들어) 면역관용지수값을 합하여 각 소재들의 면역능 등급을 얻었다.

H



(I) 표준 면역식품소재들의 면역지수별 등급 heatmap

면역증진지수값(빨간색) 과 면역관용지수값(파란색)의 각 등급에 따라 다른 세기를 나누어 크게 각각 4등급을 표시하였다. 각 등급은 그림1H의 등급값을 사용하였다.

I

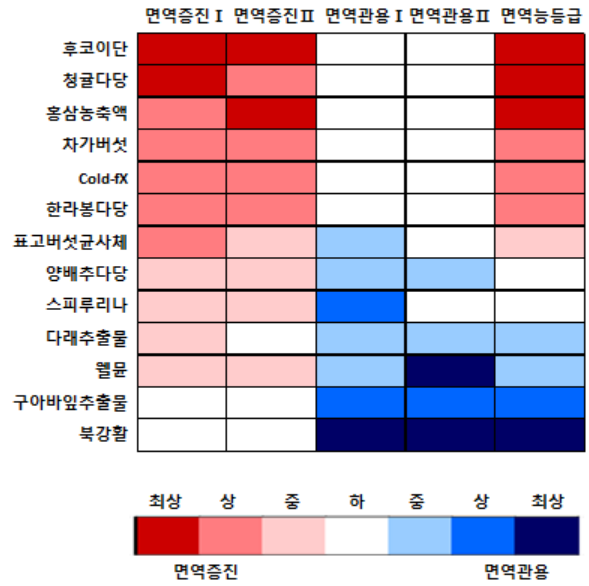


그림 J. 개발 면역식품소재들을 포함한 면역증진지수I 및 면역증진지수I 등급 그래프

J

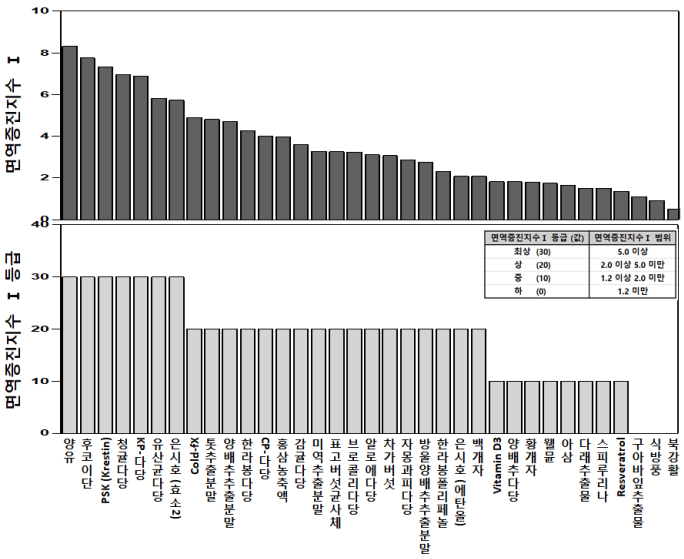


그림 K. 개발 면역식품소재들을 포함한 면역증진지수II 및 면역증진지수II 등급 그래프

K

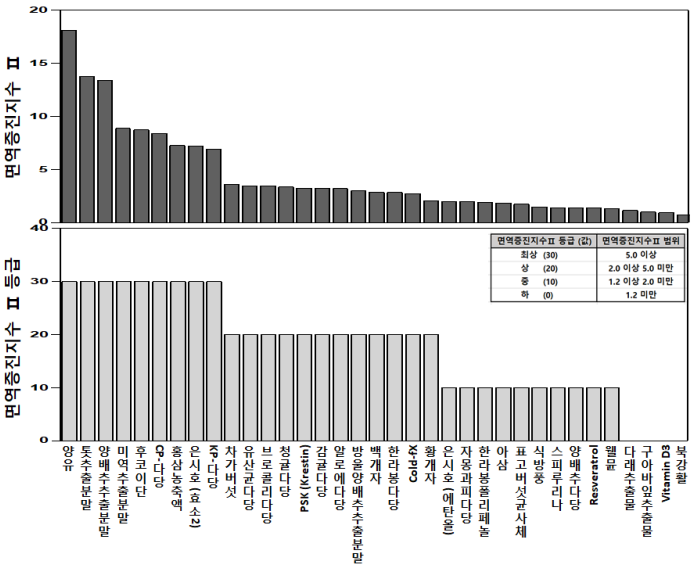


그림 L. 개발 면역식품소재들을 포함한 면역관용지수I 및 면역관용지수I 등급 그래프

L

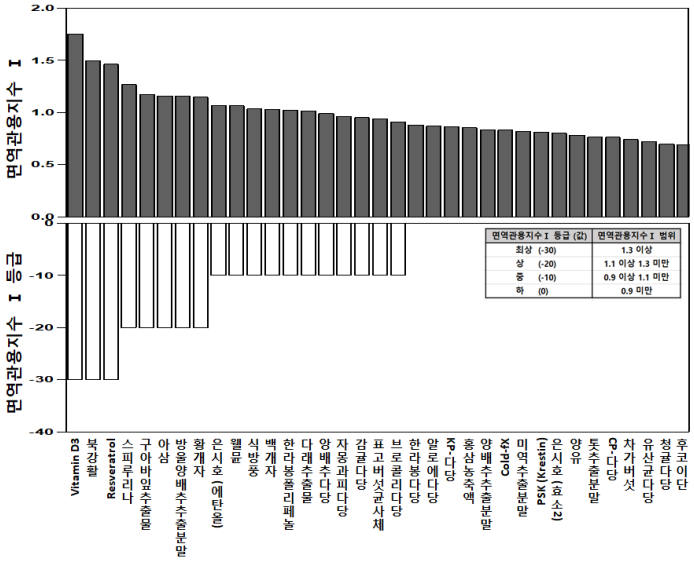


그림 M. 개발 면역식품소재들을 포함한 면역관용지수II 및 면역관용지수II 등급 그래프

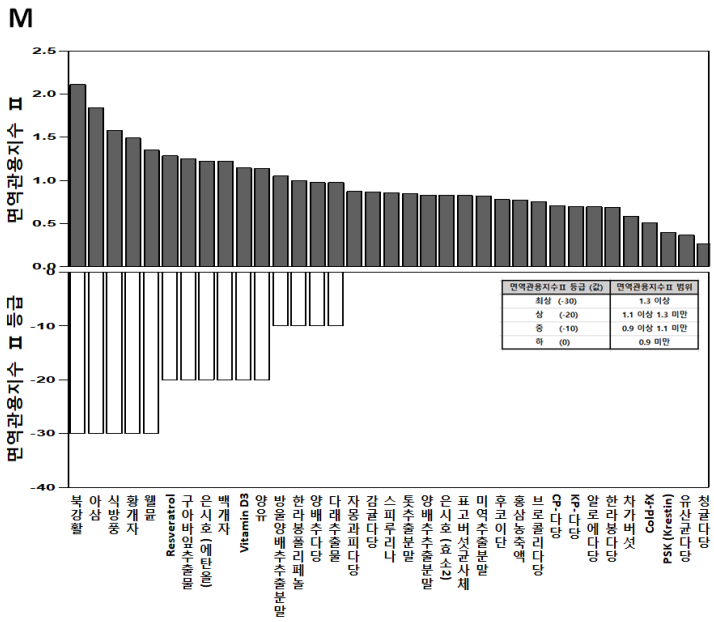
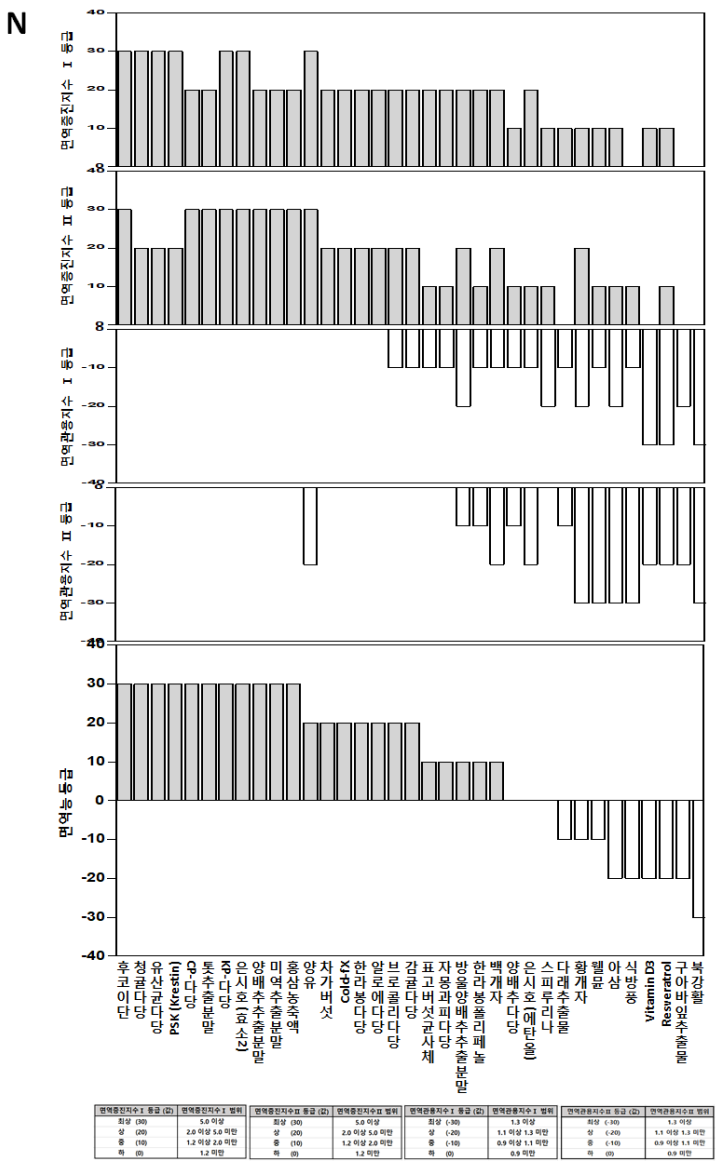


그림 N. 면역식품소재들의 면역능 등급 그래프



면역증진지수 I 등급 (2)	면역증진지수 I 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만

면역증진지수 II 등급 (2)	면역증진지수 II 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만

면역관용지수 I 등급 (2)	면역관용지수 I 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

면역관용지수 II 등급 (2)	면역관용지수 II 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

그림 O. 면역식품소재들의 면역증진지수 및 면역관용지수 등급 heatmap

o

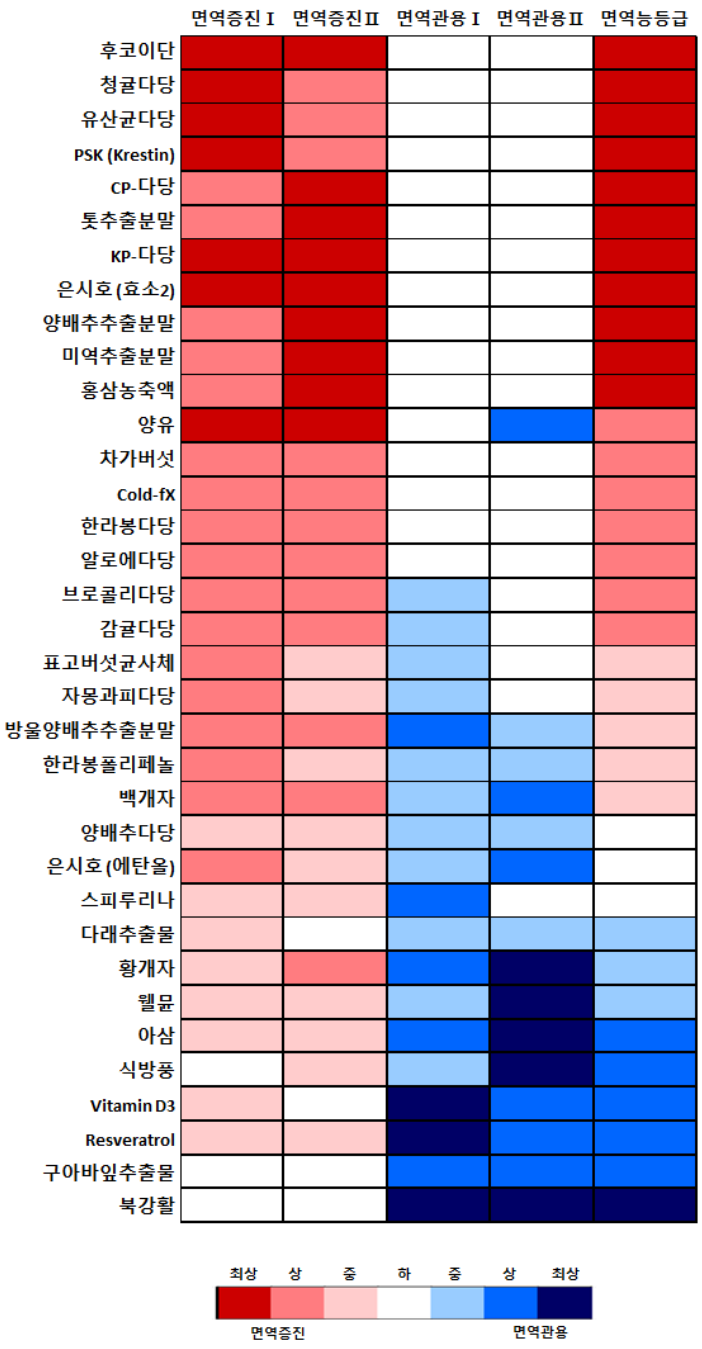


그림 P. 표준 면역식품소재를 처리한 수지상세포와 비장세포의 혼합림프구 반응 혹 소재처리한 RAW 264.7 세포에 의한 싸이토카인 생성

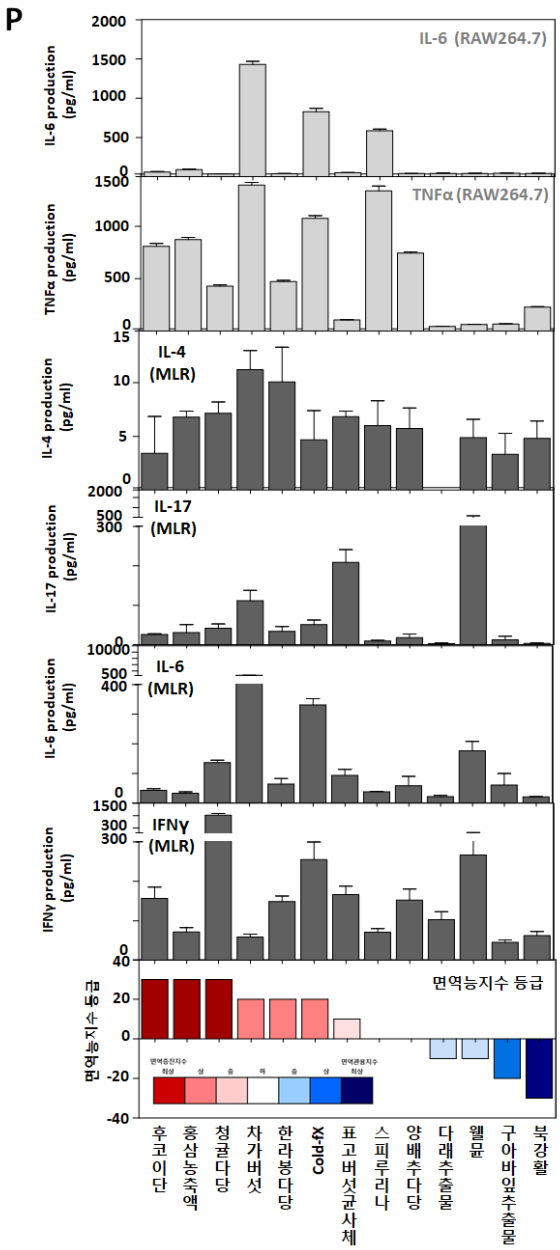
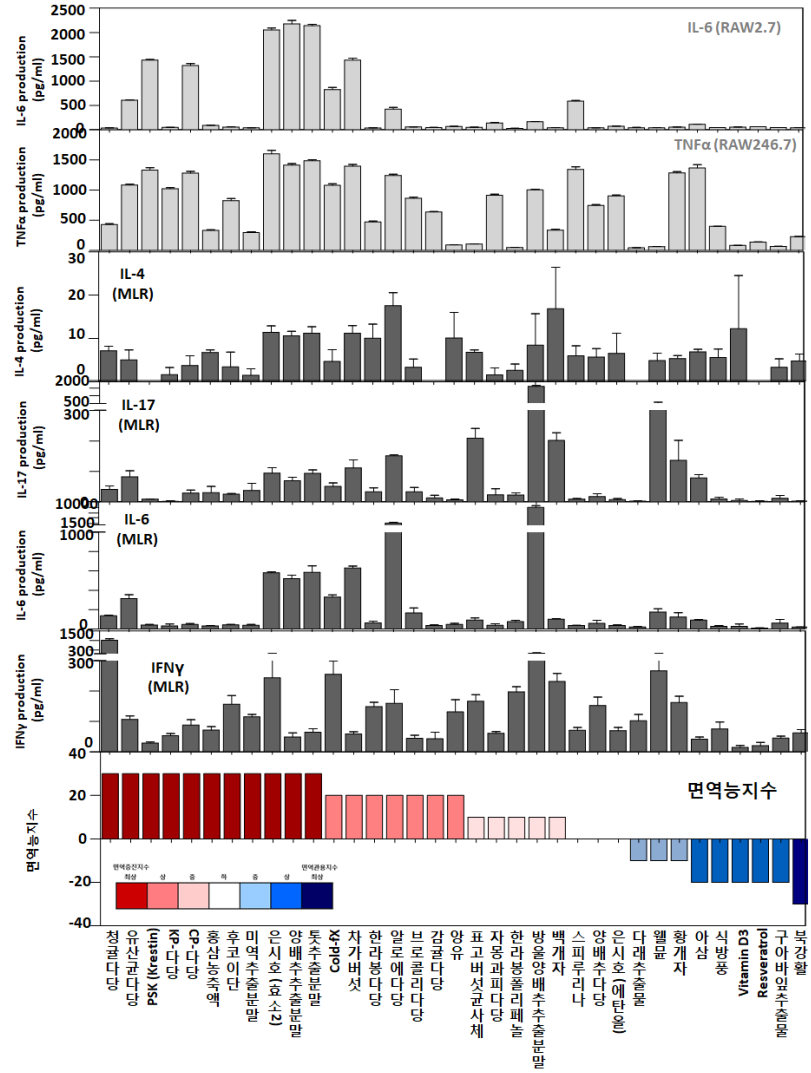


그림 Q. 면역식품소재를 처리한 수지상세포와 비장세포의 혼합림프구 반응 혹 소재처리한 RAW 264.7 세포에 의한 싸이토카인 생성

Q


IL-6 (RAW2.7)
IL-6 production (pg/ml)
TNFα (RAW246.7)
TNFα production (pg/ml)
IL-4 (MLR)
IL-4 production (pg/ml)
IL-17 (MLR)
IL-17 production (pg/ml)
IL-6 (MLR)
IL-6 production (pg/ml)
IFNγ (MLR)
IFNγ production (pg/ml)
면역능지수
청귤다당
유산균다당
PSK (Krestin)
KP-다당
CP-다당
홍삼농축액
후코이단
미역추출분말
은시호(효소)
양배추추출분말
톳추출분말
Cold-X
차가버섯
한라봉다당
알로에다당
브로콜리다당
감귤다당
앙유
표고버섯균사체
자몽과피다당
한라봉폴리페놀
방울양배추추출분말
백개자
스피루리나
양배추다당
은시호(에탄올)
다래추출물
웰뮨
황개자
아삼
식방풍
Vitamin D3
Resveratrol
구아바잎추출물
북강활

1.2. 수지상세포기반 시험관내 검사법 개발의 과학적 배경

■ 왜 수지상세포를 이용한 시험관내 검사법 개발이 중요한가?

○ 면역증진식품과 알레르기개선 식품 혹 과민면역개선 식품

• 면역기능평가의 범위

사람을 대상으로 하는 한국 건강기능식품의 면역기능평가 가이드라인에 비추어보면 식품 섭취에 의해 기대되는 면역기능은 크게 두 가지로 분류한다.

1. 저하된 면역의 증강을 목적으로 하는 것
2. 민감해진 면역반응(알레르기)을 조절해주는 것

그렇기 때문에 면역능 관련 기능성 식품으로 개발하는 과정에서 크게 면역증진식품과 알레르기개선 식품 혹 과대면역개선 식품으로 나눌 수 있다어야한다.

정상적인 면역기능 수행을 통해 건강함을 유지하기 위해서는 Immunity Tolerance간의 잘 조정된 균형이 필요하다. 위험한 병원체들과 암화된 세포transformed cell들을 특이적으로 공격하여 잘 제거하지만, 해 없는 자가조직, commensal microorganisms, food antigens, 그리고 environmental antigens에는 Tolerance를 나타내야한다. 그러한 면에서 이러한 두 가지 면역기능에 대해 식품소재가 미치는 효과를 잘 조사할 수 있는 검사법이 필요하다. 이러한 두 가지 면역기능을 동시에 측정할 수 있는 중요한 세포가 수지상세포이다.

○ 수지상세포기반 시험관내 검사법이 면역기능평가로서 갖는 중요성

주위 환경으로부터 항원들을 포획하고 위험신호들을 항상적으로 수집하고 통합하여 후천면역과 선천면역을 연결시키면서 강력하게 Immunity와 Tolerance 유도하는 그 핵심적인 역할에 비해 면역기능평가에서는 아직 본격적인 기능평가대상으로는 자리잡지 못하고 있다.

본 검사법 개발은 면역식품소재가 미치는 효과를 크게 두 과정으로 검사한다. 첫째는, 그 효과가 Immunogenic인지 Tolerogenic인지 조사한다. 두 번째는 수지상세포를 통한 T helper 발달의 방향이 어떤 방향성을 갖는지, 구체적으로는 Th1, Th2, Th17, Treg 인지 살피고 그 정도가 얼마인지 조사한다.

이렇게 함으로써 크게 두 갈래인 면역증진식품과 알레르기개선 식품 혹 과대면역개선 식품가운데 어느 그룹에 속하는지를 판별하게 되고, 수지상세포를 통한 T helper 발달의 방향성을 조사함으로써 구체적인 후천면역 방향성을 판별하여 동물모델이나 임상시험 디자인에 가이드라인을 제공한다.

- 위험신호를 비롯한 다양한 주변 정보들의 통합자
- 수지상세포의 성숙화 혹 활성화 양상이 Immunity와 Tolerance를 결정
- 공동자극세포들의 발현 양상이 수지상세포 기능을 잘 표현
- 수지상세포를 통한 T helper 발달의 방향성 조절

○ 기 검사법들에 대해 본 면역능 검사법이 갖는 차별성

수지상세포는 전문적인 항원제시세포로 naive 림프구의 증식과 분화를 유도할 수 있는 유일한 전문적인 항원제시세포로 작용하여, 바이러스, 세균, 기생충등의 외계 항원에 대한 후천면역반응을 유도할 뿐만 아니라, 선천면역반응의 주요세포들인 NK, NKT 세포의 활성유도에도 중요한 역할을 담당하고 있어 전체 면역반응 조절의 "장군" 이라는 별명을 얻고 있다.

미성숙 수지상세포는 모든 조직에 위치하고 있으면서 다양한 항원 섭취를 위한 endocytosis를 효과적으로 유도할 수 있도록 특화되어 있고, 다양한 감염체를 만나게 되면 미성숙 수지상세포는 성숙화 과정을 통해 세포 구조상의 변화와 함께 보조자극분자, MHC class I, II의 세포 표면상의 발현 증가, 림프절로의 이동등의 급격한 변화를 겪게 된다. 성숙 수지상세포의 경우는 항원의 제시 및 T helper 세포 분화를 유도할 수 있도록 세포의 기능이 변화되어 다양한 종류의 T helper 세포들로 분화를 유도하여 다양한 면역 조절 기능을 수행하게 된다.

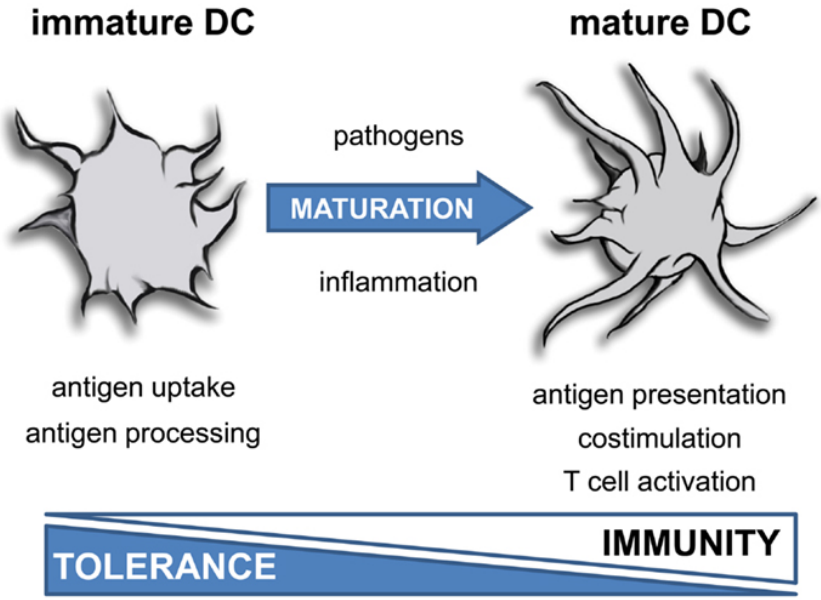
다양한 T, B 림프구들에 의해 수행되는 후천면역반응들과 주요 선천면역들을 함께 조절하는 중심 면역세포로 각광받고 있는 수지상세포의 분화 및 기능 활성화를 본 연구에서 면역능 측정의 주요 대상으로 설정한다. 본 사업 면역능 검사법은 크게 두 요소로 구성되어 있다. 첫째는 시험관내에서 유도한 미성숙 수지상세포의 성숙화의 정도를 측정하고, 두 번째 단계로 mixed lymphocyte reaction을 통해 수지상세포에 의한 다양한 T helper 세포 분화를 모니터링한다.

본 연구개발사업이 집중하고 있는 면역능검사법은 다양하게 추천된 기존의 면역능 측정법들에는 포함되지 않은 방법이다. 기존의 추천된 방법으로는 시험관내 검사법과 ex vivo에서 선천면역에서는 대식세포의 포식능, NK 세포의 살해능, 그리고 후천면역에서는 림프구 증식능이 주로 추천되어 있고 싸이토카인 생산 및 분비 기능이 추가되어 있다. 많은 경우 시험관내 검사법에서는 세포주를 주로 이용하고 있다. 본 사업에서 개발중인 검사법은 선천면역과 후천면역을 포괄하는 면역반응의 주요 조절자로 작용하는 primary 수지상세포에 가장 큰 주요성을 두고 있다. 후천 및 선천 면역반응에서 수지상 세포가 갖는 중요성은 최근에 알려졌고, 다양한 면역반응 정도 및 결과가 수지상세포의 성숙화 정도 및 분화 방향에 의해 결정되고 있는 점에 본 사업 검사법은 주목하고 있어 기존의 면역능 검사법으로 추천되어 널리 사용되는 검사법들과는 확연히 구별되어 있다.

○ 수지상세포 성숙과정의 중요성

수지상세포의 기능은 성숙화과정에 의존한다. Immature DC 미성숙 수지상세포는 거의 모든 peripheral tissue에 거주하면서 Phagocytosis, macorpinocytosis, receptor-mediated endocytosis등을 통해 강력하게 항원들을 포획하여 Peptide로 분해하고 이를 MHC과 결합하여 세포표면에 제시한다. 끊임없이 주변 LN 림프절 T cell 지역으로 이동하여 포획한항원들을 T cell에 제시하게 된다. Inflammation이 없으면-적절한 신호의 배합이 없으면- tolerance를

유도하고 충분한 신호배합이 충족되면 immunity를 유도한다.

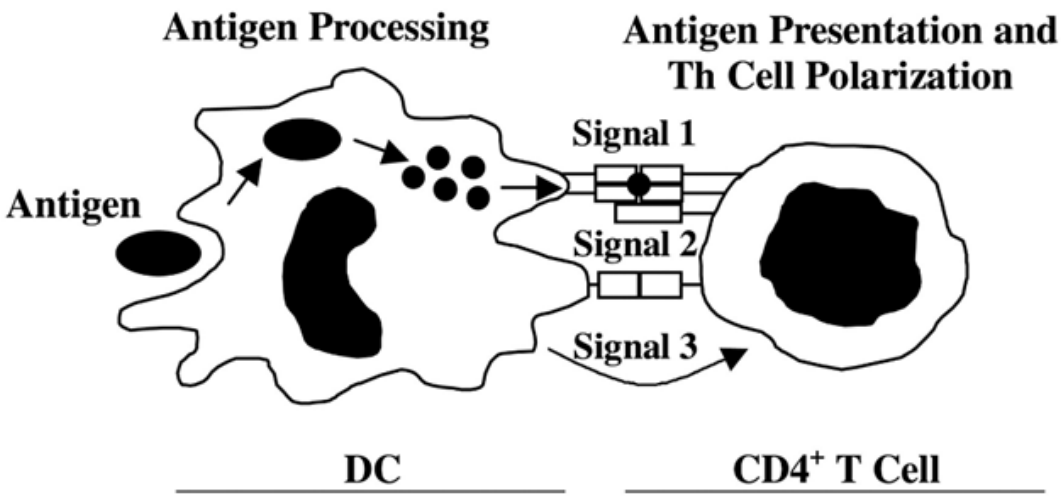


Peripheral tolerance에는 Immature DC가 강력하게 항원들을 포획하고 끊임없이 LN로 이동하여 자가항원을 T cell에 제시하는 과정이 핵심이다. 병원체의 PAMP와 DAMP등의 다양한 위험신호들danger signal들이 DC의 TLR등과 같은 PRR에 의해 인지되면서 Immature DC가 활성화 및 분화된다. 이처럼 Local inflammation이 DC differentiation에 직접적으로 영향을 주게된다. 이렇게 성숙한 수지상세포로 활성화되면 세포모양이 변형하게 되는데, 특히 더 많은 수지상을 가지면서 효과적인 T cell와의 상호작용이 용이하게 된다. IL-10R 발현정도 저하되면서 면역억제 싸이토카인 IL-10의 효과에 반응하지 않게 되고, 특히 가장 중요한 변화로 MHC, 공동자극인자들의 세포표면 발현 증가하고 LN로의 이동능이 증가한다.

○ Naive T cell 활성화에 미치는 수지상세포 유래 신호들

수지상세포는 유일하게 Naive T cell을 활성화시키면서 분화를 유도하기 때문에 전문적 항원제세포라 불리우고, 이처럼 선천면역과 후천면역을 연결하면서 후천면역의 정도와 방향성을 조절하는 최고 지휘자의 역할을 수행한다. 주변 정보를 통합하여 선천면역 세포들과 후천면역세포들을 적절하게 조절하며 활성화시키므로 수지상세포에 대한 조절 기제를 파악하고 이를 의도적으로 조정할 수 있다면 병을 직접적으로 예방하고 치료하는 보건의료적 차원과 식품조정에 의한 건강관리에 상당한 혜택을 누릴 수 있다.

항원특이적 후천면역의 활성화에 수지상세포가 일차적으로 관여하는 가장 주요한 부분은 naive T cell의 활성화와 분화이다. 이러한 Naive T cell의 활성화를 위해서는 수지상세포로부터 유래된 다양한 신호들이 필요하다.



◆ 신호1

수지상세포의 peptide와 MHC 결합체와 T 세포의 항원특이적 T cell receptor (TCR) 와 결하여 발생하는 신호이다. 포획된 항원들이 잘려서 생성된 peptide는 MHC와 결합체를 이루어 항원으로 제시되는데, 다양한 레파토리의 TCR중에서 항원특이적인 TCR와 반응하여 T cell activation에 필요한 신호 1을 발생하게 된다.

◆ 신호2

효과적인 T cell activation을 위해서는 공동자극신호가 필수적인데 공동자극신호없는 TCR 반응은 이 T cell을 anergic한 상태로 빠드린다. T cell actiovation 촉진형 신호2를 발생하는 공동자극분자들로는 CD28, CD40L과 각각 결합하는 CD40, CD80/86가 포함되어 있다.

◆ 신호3

수지상세포에서 생성되는 IL-12, IL-15, IL-6, 혹 TNF-alpha등과 같은 soluble facotr에 의한 신호들이다. Immunogenic DC는 IL-2는 T cell activation을 촉진하고 Il-12은 Th1 분화를, Il-4는 Th2 분화를, IL-10,TGFb, IL-35,or TNF등은 Treg 분화를 촉진한다.

Signal 1 : Ag-MHC binding to Ag-specific T cell receptors

Signal 2 : Co-stimulatory / co-inhibitory molecule – Ligands
(Expansion of the Ag-specific T cells)

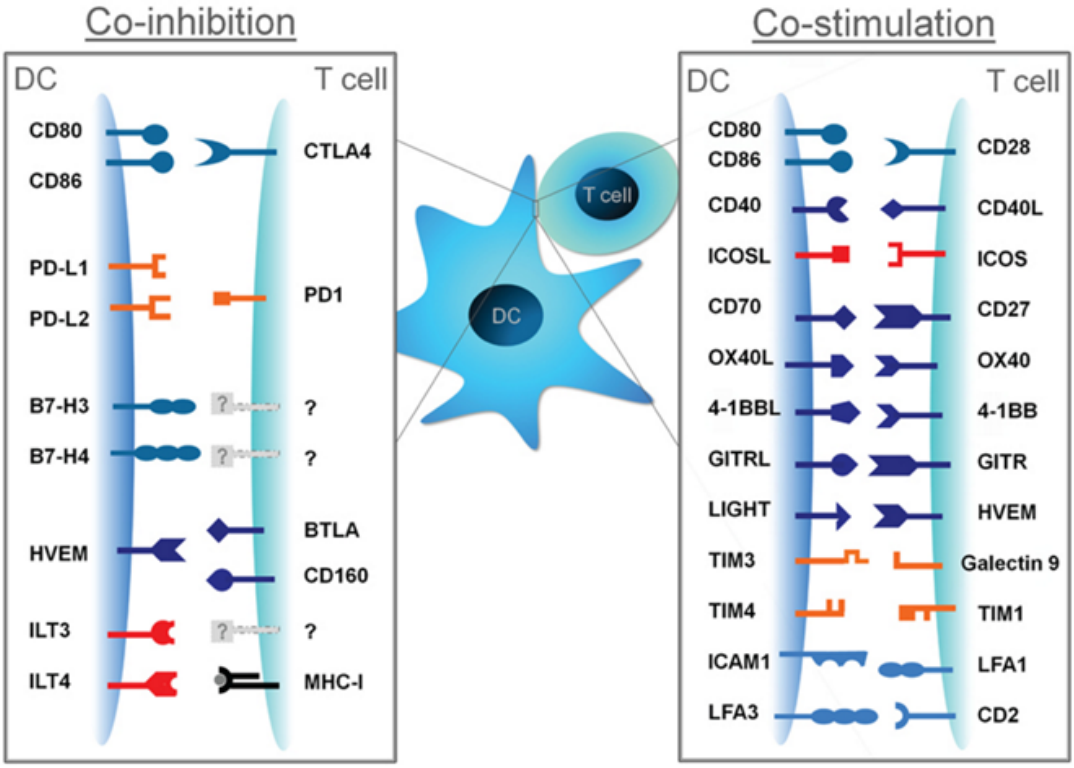
Signal 3 : DC-derived cytokine (T cell polarization)

이러한 신호들의 통합에 의해, 크게는 immunogenic 혹 tolerogenic DC의 성격을 갖게 되고 T cell differentiation 과정이 결정된다.

○ 수지상세포 기능에 미치는 신호2의 영향

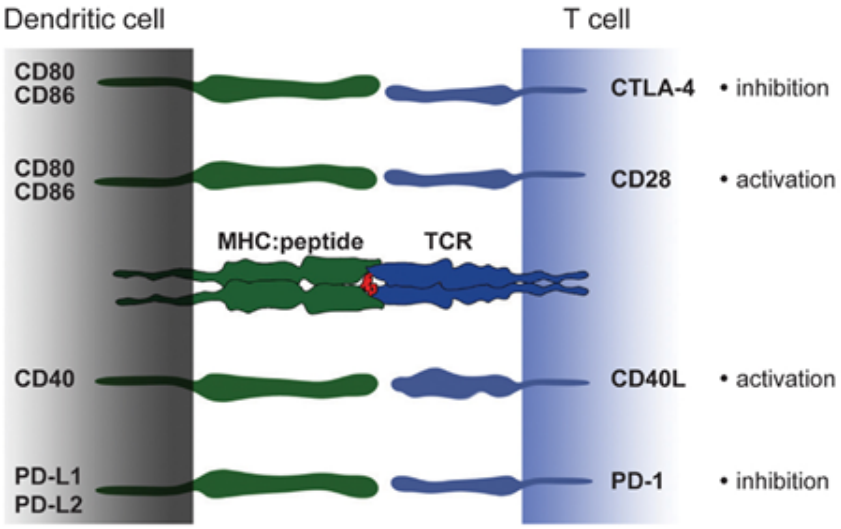
◆ 공동자극분자들 발현패턴 측정의 근거

아래 그림처럼 다양한 공동자극분자들이 신호전달체계의 일원으로 참여한다. 이중에는 T cell activation 활성화 촉진 신호 발생 분자들, 억제분자들 아주 다양하게 있다. 이러한 공동자극분자들의 다양한 조합에 기초한 패턴이 수지상세포 기능을 결정하게 된다.



DC에 공동자극분자들의 발현패턴이 T cell differentiation을 결정적으로 조절하여 면역 혹 면역관용과 같은 면역반응을 조절하게 된다. 하나의 공동자극분자가 면역항원적 혹 면역관용적인 성격을 갖는 다니보다는 여러 공동자극분자들 신호들의 통합, 싸이토카인과 같은 soluble cofactor와 의 상호작용, 상호작용하는 T cell의 분화상태등이 함께 면역반응을 결정하게 된다. 공동자극신호의 패턴이 immunogenic 혹 tolerogenic DC의 성격을 구별하는 중심되는 특성이다. 세포막 수용체/리간드 결합쌍의 복잡한 네트워크이 TCR 과 soluble facor들과 함께 작용하여 T cell activation 과정을 촉진하게된다.

- **현 시험관내 검사법에서 측정하는 공동자극분자들과 그 핵심적인 역할**



1) CD80/CD86

T cell activation에 가장 중요한 공동자극신호 체계를 이루면서 IL-2 production을 유도하고 T cell 성장촉진과 생존에 결정적인 역할을 수행한다. 강한 CD28신호는 IL-10R 안정화 방해하고 Treg 유도를 억제한다.

병원체 유래물들이나 염증 매개체들에 의해 빠르게 발현이 촉진되어 공동자극분자로서 매우 이른 시기부터 작용하는 공동자극분자의 기능을 수행하면서 Immature DC의 면역관용적 성격을 강하게 막는 역할을 한다. 이들의 표현은 완전히 성숙한 DC 표현형으로 간주된다. T cell activation이 일어나게 되면 negative feedback 조절분자로 발현된 T cell의 CTLA-4가 CD80/CD86와 강하게 결합하여 CD28 신호전달을 강하게 억제한다.

2) PD-1 ligands

T cell의 Programmed cell death-1 (PD-1)은 DC의 두 종류의 리간드 PD-L1, PD-L2와 결합한다. PD-L1는 다양한 면역세포 비면역세포와 resting DC에 항상적으로 일정정도 발현되어 있고 LPS과 같은 병원체 유래물에 자극 혹 CD-40 신호자극에 의해 PD-L1 발현이 더욱 촉진된다. PD-L2는 B cell, macrophage, DC와 같은 APC에 발현되고, anti-CD40, GM-CSF, IL-4, IFN-g, IL-12 자극에 의해 증가한다.

PD-L/PD-1-axis 는 T cell에 억제신호를 주어 T cell 의 PI3K pathway를 억제하면서 IFNg생성이 억제되고 세포생존이 억제되면서 세포사멸이 유도된다. PD-1신호는 Treg induction하여 Tolerogenic DC에 의한 self-reactive T cell 억제의 한 기작으로 PD-1신호는 peripheral tolerance에 중요하게 참여한다. 문제가 생긴 PD-L/PD-1-axis의 부적절한 신호는 암, 자가면역질환들에서 중요한 것으로 보고되고 있고 PD-1L은 많은 solid tumor들에 강하게 발현되어 있으며, Type I diabetes, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, and RA 는 비정상적인 PD-1의 발현이나 기능과 깊은 관계가 있다.

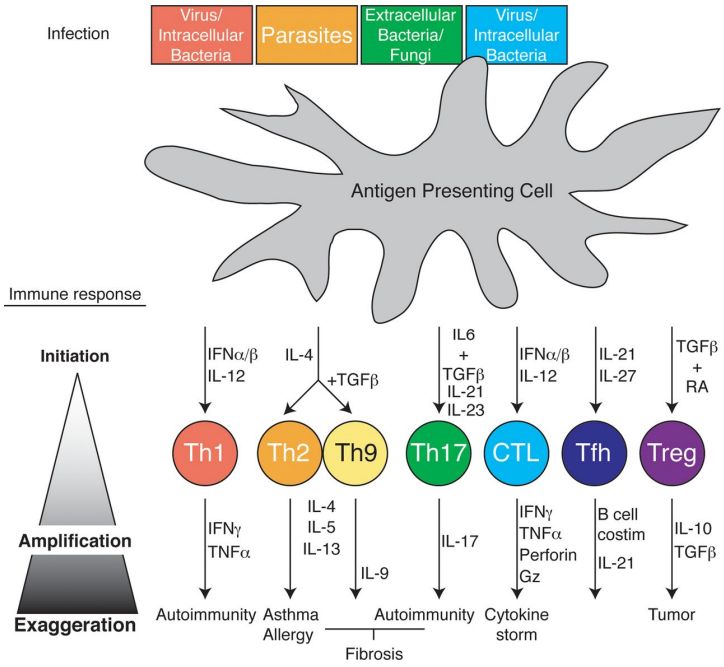
3) CD40

T cell activation과 분화에 중요한 역할을 하며 세포면역와 항체면역 모두에 관여하여 그 기능은 면역반응과 긴밀한 관계를 가지고 있다. 수지상세포의 CD40가 결합되면 MHC, 공동자극

분자들, 접착분자들의 발현이 증가되고 T cell stimulatory cytokine IL-12 생성을 촉진한다. 실제로 Recombinant CD40L 처리는 수지상세포의 성숙화를 유도한다. 수지상세포에 의한 effector molecule IL-12의 생성에는 CD40/CD40L interaction만으론 불충분하여 IFNg 같은 부가적인 싸이토카인의 도움이 필요하다. 결국 IFNg 등의 사이토카인에 의한 신호3의 존재나 그 정도가 T cell에 의존한 Immunity나 Tolerance를 결정하는데 결정적으로 작용한다.

○ T cell differentiation

T cell은 크게 Helper T cells와 cytotoxic T cells들로 분화하여 면역과정에 참여하게 된다. naive T cell의 TCR이 peptide-MHC와 적절히 반응하여 (신호1) 여러 신호들의 도움으로 (신호2) T cell activation과정을 거치게 되는데, 이 때 주변에 있는 다양한 종류의 사이토카인들이 T cell의 cytokine receptor들과 결합하여 생성되는 신호들에 (신호3) 의해 그림과 같이 여러 종류의 T cell들로 분화하게 된다. 크게는 Th1, Th2, Th17, Th9, Tfh로, 그리고 Treg로 나눌 수 있다.



다양한 병원체들에 맞서서 적절한 면역반응을 일으키기 위해 이러한 helper T cell들은 chemokine들을 분비하여 적절한 면역세포들을 그곳에 불러들이고, cyokine들을 생성하여 그들의 기능을 활성화시켜 면역반응들 수행토록 도와준다.

○ 수지상세포 기반 시험관내 면역기능 검사법

◆ 측정치

MHC, 공동자극분자들, 접착분자들 Adhesion molecules의 발현 정도 및 패턴

◆ 수지상세포의 활성화 표지 분자들과 특성

MHC: 항원제시기능
CD40: T cell activation 활성화 촉진 신호
PD-L1, PD-L2: T cell activation 활성화 억제 신호
CD80: T cell activation 활성화 촉진 혹 억제 신호
CD11b: 억제신호

• MHC
항원특이적 면역기능 수행은 MHC에 의한 peptide 제시기능에 의존하기 때문에 Immunity 혹 tolerance 기능 촉진을 위해서는 MHC 발현 양상이 중요한 효과를 낳는다.

• CD40, CD80, PD-L1, PD-L2
Immunogenic DC 면역항원성 수지상세포는 CD40, CD80등의 T cell activation 활성화 촉진 신호로 작용하는 공동자극분자들의 발현이 강화되어 있고 상대적으로 T cell activation 활성화 억제 신호인자인 PD-L1, PD-L2의 발현을 증어들어 있다. 반대로 Tolerogenic DC 면역관용적 수지상세포의 경우에는 CD40, CD80의 발현은 줄어들고 PD-L1, PD-L2의 발현은 증가한다.

• CD11c, CD11b
이들은 접착분자들의 일반적인 기능과 함께, 특히 CD11b의 경우에는 항염증기능이 있고, IL-6 발현조절을 통해 Treg/Th17 균형을 조절하는 기능이 있는 것으로 보고 되고 있다.

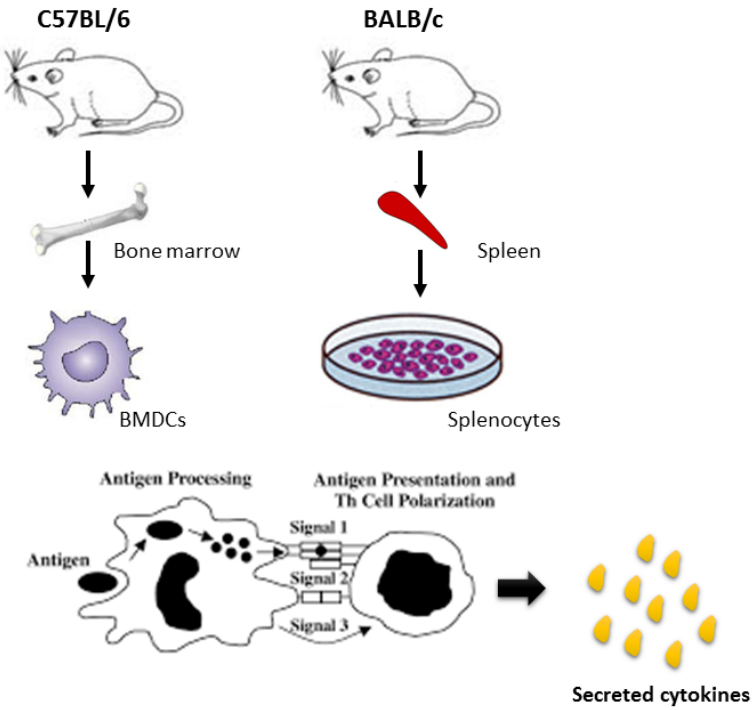
◇ 혼합림프구 반응을 통한 T helper 세포 분화 조절 능력 측정

■ 혼합림프구 반응

각 면역소재들로 처리된 골수유래 수지상세포를 동종이계 마우스의 비장세포들과 혼합배양하여 수지상세포에 의해 유도되는 일정한 방향성의 싸이토카인 생성 패턴과 정도를 측정하여 면역식품소재가 가질 수 있는 면역기능을 조사한다. Th1, Th2, Th17, Treg등 각 helper T cell 그룹들은 특이적 싸이토카인들을 생상하므로 생성된 싸이토카인 농도 변화를 측정하면 각 면역시료가 T helper 세포 분화에 미치는 영향을 검사할 수 있다.

◆ 혼합림프구 반응과정 모식도.

두 마우스 개체로부터 얻은 각 기 다른 림프구를 섞어 반응을 시켰을 때 골수유래 수지상세포로부터 자극을 받은 CD4+ T 세포가 분화하며 싸이토카인을 생산한다.



각 시료들에 따라 Th1, Th2, Th17, Treg 각 helper T cell 그룹 특이적 싸이토카인들을 강하게 생산하는 조합이 있음을 볼 수 있다. 식품소재 처리 수지상세포에 의해 유도되는 T helper 세포 분화에 특정한 방향성을 가질 수 있음을 잘 보여주고 있다. 이렇게 생성된 싸이토카인들의 양을 싸이토카인 비즈 분석법(Cytokine Bead Array, CBA)을 통해 측정하게 된다.

1.3. 시험관내 검사법 과정의 표준화

○ 연구결과

•BMDC 유도 및 배양과정 표준화

•면역식품소재 처리과정 표준화

•Flow cytometer 방법론에 기초한 수지상세포 성숙화 정도 및 방향 측정 및 분석과정

표준화
•혼합림프구 반응과정 표준화
•Cytokine Beads Array 방법에 의한 여러 싸이토카인 측정 및 분석과정 표준화

○ BMDC 유도 및 배양과정 표준화

• 마우스 골수세포 유래 수지상세포(BMDC) 유도 및 배양과정 표준화

본 연구에서는 시험관 내 방법으로 분화를 유도한 수지상세포(BMDC, bone-marrow derived dendritic cell)를 기반으로 하여 수행한다.

1) 실험동물
동물 실험은 다물사이언스(Korea)에서 구매하여 일반적 조건인 (CS : Conventional system) 충남대학교 의과대학 실험동물 관리 사육실 에서 멸균된 사료와 물을 자유롭게 섭취시키며 사육한 6~10 주령의 female C57BL/6 마우스를 사용하였다.

2) BMDC (Bone Marrow derived-Dendritic cell) 분화 media 제작
마우스 골수세포 유래 수지상세포 분화를 위한 세포 배양 배지는 다음과 같은 조성으로 제작하였다. 배지는 murine Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)는 첨가하지 않은 상태로 제작하여 냉장(4℃)보관 하였고, 배지를 사용할 때마다

RPMI 1640	444.5 ml	LM 011-01, WELGENE
Fetal Bovine Serum (FBS)	50 ml	16000-044, gibco
Penicillin/streptomycin	5 ml	LS 202-02, WELGENE
β-mercaptoethanol	0.5 ml	1810705, gibco
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	20 ng/ml	315-02, PEPRO TECH
Total	500 ml	

GM-CSF를 적정 농도로 첨가하여 완전배지를 제작하였다.
* RPMI 1640 cell culture medium with L-glutamine, sodium bicarbonate

* FBS : 56℃에서 1시간 동안 inactivation한 후, 50 ml-tube에 분주하여 -20℃에 보관. 배지 제작 시 37℃에 완전히 녹여서 사용.

* Penicillin/Streptomynic 100X (contains 10,000 units/ml of penicillen, 10,000 μg/ml of streptomycin) : 배지 제작 시 1X로 사용.

* β-mercaptoethanol 1000X : 배지 제작 시 1X로 사용.

* GM-CSF : 동결건조 상태의 GM-CSF를 PBS로 녹여 (100 μg/ml) 30 μl씩 분주하여 -20℃에 보관. 배지 제작 시 20 ng/ml로 사용.

3) 마우스 골수세포의 분리

마우스의 골수세포는 6~10 주령의 female 마우스(C57BL/6)의 양쪽 다리 (대퇴골과 경골)를 분리하여 사용한다.

4) 마우스 골수세포의 분리 및 골수세포로부터 수지상세포로의 분화 유도

1. 마우스 대퇴골과 경골을 분리 하고 마우스 골수 채취용 주사기에 멸균된 1X 농도의 PBS(Nacl, KCl, Na2HPO4, KH2PO4)를 담아 골수 내강을 세척하여 세포를 얻는다. 이 때, 1X 농도 PBS의 양은 마우스 한 마리 당 20 mL을 사용 하여 내강을 세척해 주었다.
2. 채취한 골수세포는 1500 rpm에 5분 간 원심분리(Centrifuge UNION 55R, Hanil, Korea)하여 골수세포를 모은다.
3. 상층액을 석션하여 제거 한 후, 수지상세포 분화 배지 10 mL을 첨가한다. 이때 회수한 골수세포는 80% 이상의 세포 생존율을 보이며 세포의 양은 마우스 한 마리 당 (다리 2개) 8 x 10^7 cells 정도이다.
4. 골수세포는 보통 10개의 100 mm culture dish에 나눠 37℃ · 5% CO_2 incubator에서 6일 동안 배양하여 수지상세포로의 분화를 유도한다. 각각 하나의 dish에는 수지상세포 분화 배지 7 mL에 8 x 10^6개의 세포를 배양시킨다.
5. 배양 3일 째 GM-CSF가 포함된 완전배지를 새로 7 mL씩 추가한다 (하나의 dish 당 최종 볼륨 14 mL).
6. 배양 6일 째 dish를 가볍게 파이펫팅 해주어 바닥에 침전 되어있는 세포들을 포함, 부착되지 않은 분화된 수지상 세포를 회수한다. 회수한 수지상세포를 1500 rpm에 5분간 원심분리 하여 분리된 수지상세포는 RPMI1640 배지에 GM-CSF를 첨가하여 48-well plate에 3 X 10^5개가 되도록 분주한다.
7. 이때 시료를 농도별로 처리한 다음 24시간 동안 37℃ · 5% CO_2 incubator에 배양한 후 부착되지 않은 세포들을 수거하여 실험을 진행하였다.

○ 면역식품소재 처리 과정 표준화

• 마우스 골수세포 유래 수지상세포(BMDC)에 면역식품소재 처리 과정 표준화

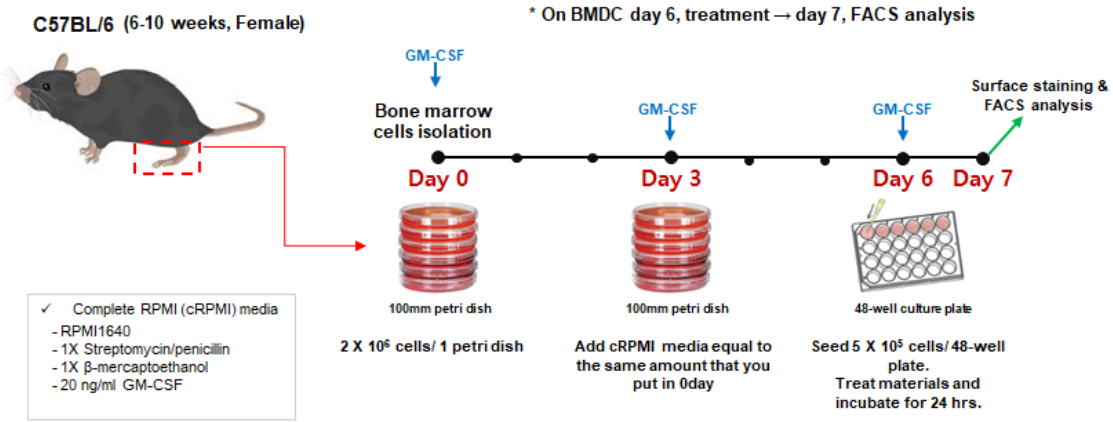
면역식품소재의 시험관내 면역능 검사를 위해 마우스 골수세포로부터 분화 된 배양 6일째의 수지상세포를 연구에 사용하였다. 시험관내 수지상세포의 분화는 6~10일 정도 배양을 하는데, 보통 LPS 처리를 통해 완전히 성숙한 수지상세포로 분화가 유도된다. 본 연구에서는 배양 6일째의 수지상세포에 면역식품소재를 처리하여 수지상세포의 성숙화 혹 활성화 양상을 확인하였다.

1) 실험재료 및 면역식품소재 제조

본 실험에서 사용한 면역능 후보물질 건조소재는 한국한의학연구원(Deajeon, Korea)과 ㈜비케이바이오(Jeju, Korea)에서 공급받아 사용하였다. 건조 상태로 분양받은 면역식품소재

(농축액 또는 추출분말)들을 10% DMSO in PBS 용액을 사용하여 40 또는 200 mg/ml의 농도가 되도록 stock solution을 제조하였고 -20℃에 보관하였다. 세포에 면역소재를 처리할 때 소재의 최종농도는 100~1000 μg/mL로 고정하였고, 세포독성이 심한 시료의 경우에는 최종 농도를 낮추어가며 실험을 진행하였다.

2) 면역식품소재 처리 방법 및 기간



배양 6일째의 수지상세포(100mm petri dish 10개 기준 2~3 x 10^7 cells/ml)를 모아 원심분리(1500 rpm, 5 min) 후, GM-CSF가 포함된 완전배지로 48-well culture plate에 5 x 10^5 cells/well개씩 분주한다. Cell(5 x 10^5 cells/48-well)에 3~6개의 다양한 농도의 면역소재를 처리하여 24시간 배양하여 유세포 분석에 이용하였다. Cell에 면역식품소재를 처리할 때에는 stock solution을 GM-CSF가 포함된 완전배지로 희석하여 최종 농도에 맞게 처리하였다.

○ Flow cytometer 방법론에 기초한 수지상세포 성숙화 정도 및 방향 측정 및 분석과정 표준화

• Flow cytometer 분석에 기반한 방법론

수지상세포의 생존률과 세포표면 활성인자 및 억제인자 의 발현 정도를 측정하기 위하여 실시하였으며, 세포염색법은 확립된 방법에 따라 수행하였다. Live/Dead staining을 통해 수지상세포의 생존률을 확인하였다. 수지상세포의 positive marker인 MHCII와 CD11c, 수지상세포 표면에 발현하는 공동활성인자 CD40, CD80 및 억제인자 PD-L1, PD-L2 안티바디를 사용하여 세포를 염색한 후 flow cytometer 분석을 하였다.

1) 실험재료

1. 안티바디 : FITC-conjugated anti-CD273(PD-L2) (11-9972-85, eBiosciences), PE-anti-CD274(PD-L1) (558091, BD Pharmingen), PerCP-Cy5.5-MHC Ⅱ (562363, BD Pharmingen), PE-Cy7-anti-CD80 (25-0801-82, eBioscience), APC-anti-CD11c (20-0114-U100, Tonbo bioscience), APC-Cy7-CD11b (BD Pharmingen, USA),
2. FACS buffer : 1X PBS (phosphate buffered saline), 1% BSA (Bovine serum

albumin), 0.05% NaN_3 (Sodium azide)

3. LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (L34966, Invitrogen) : 동봉된 DMSO 50 ㎕로 stock을 만들어 -20℃에 보관. 세포 염색 시 PBS에 1:1000으로 희석하여 사용. Light protection, Desiccate.

2) 안티바디 패널

Immuno/Tolerogenic DC(mouse)	Blue laser (488nm)				Red laser (640 nm)		Violet Laser(405nm)	
	530/30	588/42	670LP	780/60	660 / 668	785 / 785	450/50	510/50
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	BV421/V450	BV510/V500
Surface(Total volume : 200ul)	PD-L2	PD-L1	MHCII	CD80	CD11c	CD11b	CD40	L/D
vendor	eBio	BD	BD	eBio	TONBO	Biolegend	BD	Life technologies
Clone	122	MIH5	M5/114.15.2	16-10A1	N418	M1/70	3/23	
cat#	11-9972-85	558091	562363	25-0801-82	20-0114-U100	101226	562846	L34966
Vol. per test(μl)	0.3	0.3	0.02	0.3	0.25	0.35	0.3	1:1000

BD CantoII Flow cytometry를 이용하여 분석을 하였다.

3) 수지상세포의 생존률 평가

면역식품소재의 처리가 수지상세포에 대한 세포독성에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit를 사용하여 세포를 염색하였다. 회수한 수지상세포(1 x 10^6 cells/well)를 live cell과 dead cell을 구별하기 위해 Live/Dead dye stock을 PBS에 1:1000으로 희석하여 실온에서 30분 동안 염색하였다. Live cell은 dye에 의해 염색되지 않으므로 negative population을 나타내고, dead cell은 세포벽의 이상으로 dye가 세포 안으로 들어가 염색되므로 positive population을 나타낸다. 수지상세포의 생존률은 live cell과 dead cell population의 percentage로 확인하였다. Live celll population이 70% 이상인 농도까지 세포독성을 일으키지 않는 것으로 설정하였다.

4) 세포표면 염색 (Surface staining)

1. 면역식품 소재 처리 24시간 후 회수한 수지상세포(1 x 10^6 cells/well)를 FACS tube에 옮긴다.
2. 세척을 위해 PBS 2 ml을 넣고 300 *g* 에 5분 간 원심분리(Allegra X-12R Centrifuge, BECKMAN, USA)한다.
3. 원심분리 후 상층액은 부어 버리고, 남은 물기를 paper towel에 찍어 제거한다. Vortexing하여 세포가 뭉치지 않게 해준다.
4. Live cell과 dead cell을 구별하기 위해 LIVE/DEAD™ dye stock을 PBS에 1:1000으로 희석하여 준비한다. 희석한 Live/Dead를 cell에 100 ㎕씩 넣어주고 잘 섞이도록 vortexing 한다. 차광하여 실온에서 30분 동안 반응시킨다.

*** (주의사항) LIVE/DEAD™ dye는 stainig하기 10~15분 전 미리 실온에 꺼내어 평형상태가 되게 한다(equilibration). 습기가 들어가면 dye에 영향을 줄 수 있기 때문.

5. Washing 용액(FACS buffer) 2 ml으로 세척한 후, 300 *g* 에 5분 동안 원심분리한다.
6. 원심분리 후 상층액은 부어 버리고, 남은 물기를 paper towel에 찍어 제거한다. Pellt이 잘 풀리도록 vortexing 해준다.
7. 수지상세포의 세포표면인자 분석을 위하여 FITC-conjugated anti-CD40,

PE-anti-CD86, PerCP-Cy5.5-MHCⅡ, APC-Cy7-CD11b (BD Pharmingen, USA), PE-Cy7-anti-CD80 (eBioscience, USA), APC-anti-CD11c (Tonbo bioscience, USA) mAb로 4℃에서 30분 동안 반응시킨다. 충분히 vortexing하여 세포에 고루 염색이 되도록 해준다.

*** 안티바디는 염색할 샘플 수 보다 5~10개 더 추가한 양으로 계산하여 미리 mixture를 만든다. Mixture에서 필요한 용량만큼 따서 세포를 염색시킨다.

8. 염색된 세포는 다시 FACS buffer 2 ml로 세척하여 300 *g* 에 5분간 원심분리한 후, pellet을 얻는다.
9. 마지막으로 세포를 cell strainer에 걸러 준 후 유세포분석기(FACS Canto Ⅱ, BD bioscience)를 이용하여 결과를 얻는다.
10. 데이터 분석은 FlowJo software (FlowJo, USA)를 이용하였다.

5) 통계처리

각 실험은 2~3회 반복하여 시행하였다. 유세포 분석 실험에서 얻어진 결과는 Prism Graph-Pad를 이용하여 평균 ± 표준오차로 분석하였다.

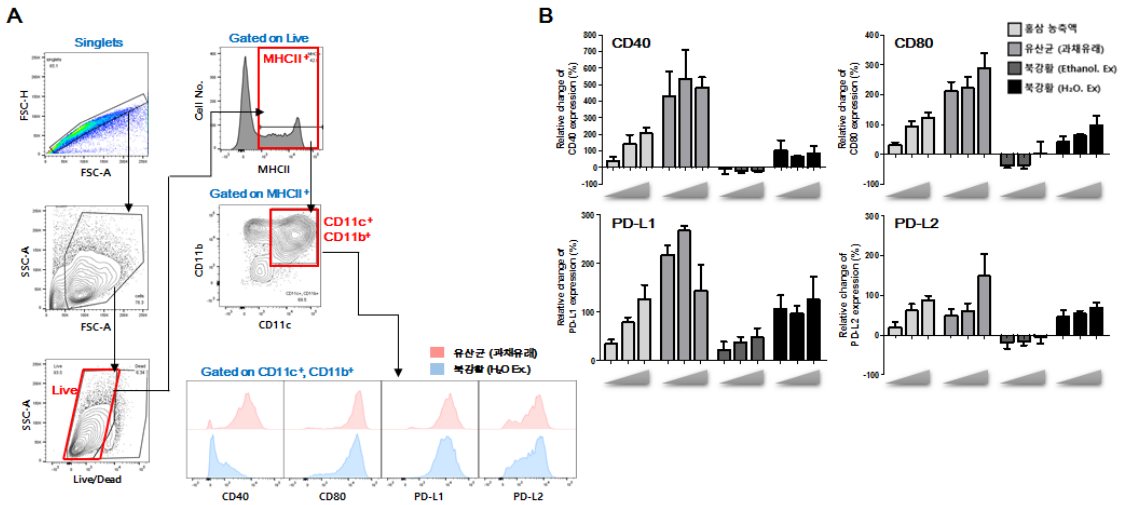
• 실험시간 계산 (총 4시간)

- Staining : 2시간
- Flow cytomer 분석 : 2시간

• 예상되는 결과

1) 보조자극인자(CD40, CD80) 및 억제인자(PD-L1, PD-L2) 발현정도 측정

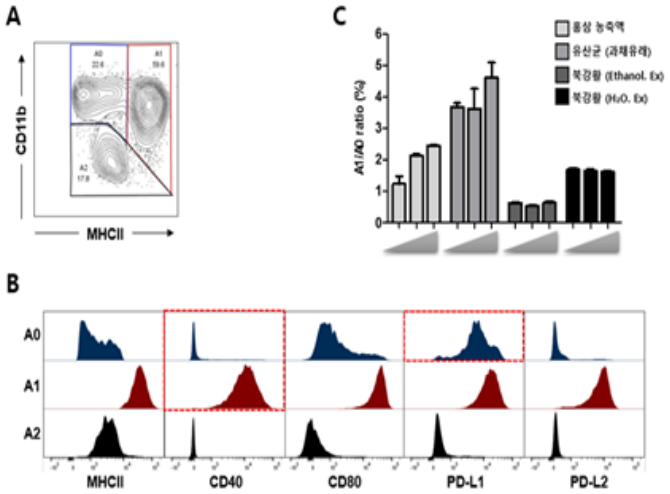
소재의 면역증진(항감염) 또는 면역관용(항염증) 가능성을 평가하기 위하여, 소재 처리 후 수지상세포의 보조자극인자 및 억제인자의 발현 정도를 유세포분석법을 이용하여 측정한다. 보조자극인자(CD40, CD80)들이 높게 발현하면 immunogenic DC, 억제인자(PD-L1, PD-L2)가 높게 발현하면 tolerogenic DC 분화를 유도하는 것으로 판단할 수 있다.



(선행실험결과) 수지상세포(MHCII+, CD11c+, CD11b+)에서 보조자극인자 및 억제인자 발현 확인. 면역증진 및 면역개선의 효능을 보이는 홍삼농축액과 유산균에 비해 복강활은 자극인

자(CD40, CD80)의 발현은 낮은 반면, PD-L1만 상대적으로 높게 발현되는 것으로 보아 항염증 효능을 나타내는 물질에 속할 것으로 판단된다.

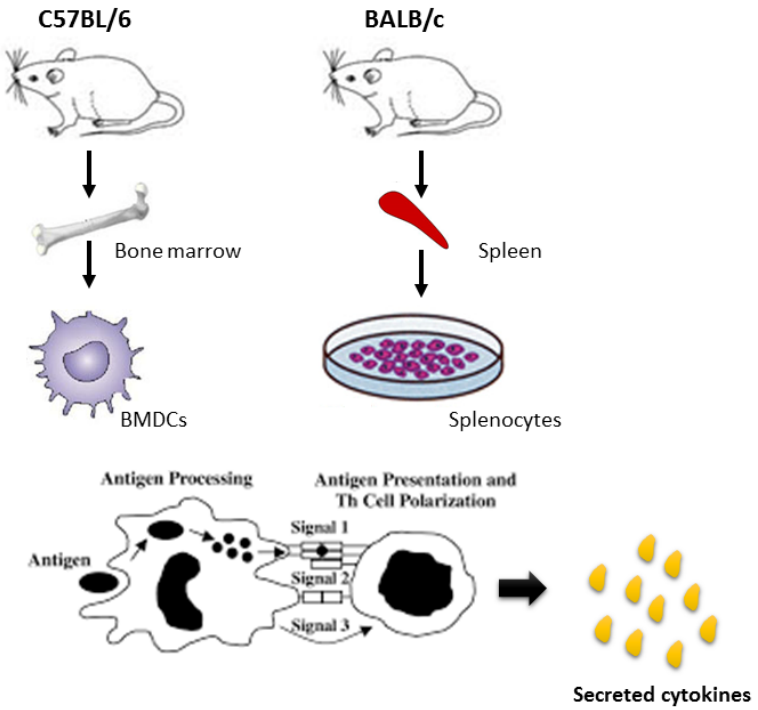
2) CD11c+MHCII+수지상세포에서 CD11b, MHCII 발현 차이에 기반한 세포분포 분석
소재의 면역증진(항감염) 또는 면역관용(항염증) 가능성을 평가하기 위하여, 소재 처리 후 수지상세포의 활성정도를 유세포분석기를 이용하여 측정한다. CD11c, MHICII 그리고 CD11b의 발현정도에 기초하여 수지상세포를 특정 구획으로 나누고 각 구획 마다 보조자극인자(CD40, CD80)와 억제인자(PD-L1, PD-L2)의 발현양상을 확인해 보았을 때, A1/A0의 비율이 낮을수록 tolerogenic DC로 분화가 유도되는 것으로 판단할 수 있다.



(선행실험결과) 홍삼농축액과 유산균에 비해 북강활(에탄올, 물 추출)이 A1/A0의 비율이 낮았고, 특히 북강활 에탄올 분획제조 방법에서 A1/A0의 비율이 현저하게 낮음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 두 종류의 북강활 모두 항 염증 효능을 나타내는 물질에 속하는 것으로 사료된다.

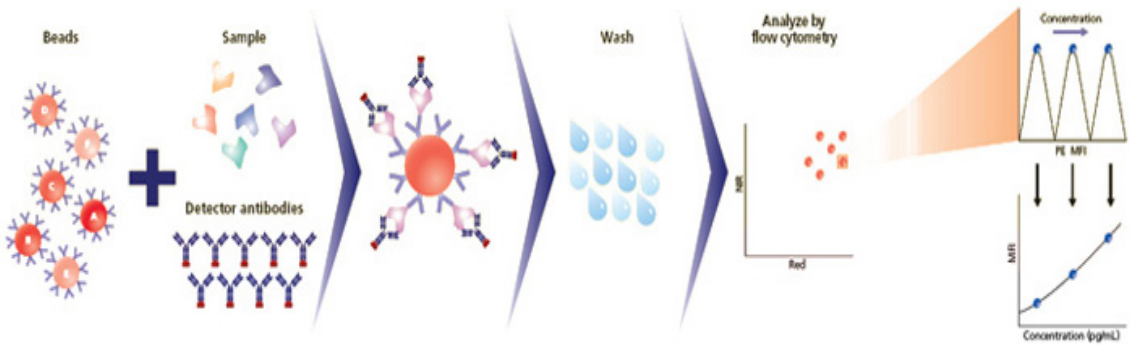
○ 골수유래 수지상세포와 비장세포의 혼합 배양에 따른 싸이토카인 분석 표준화

• Introduction
1) 혼합림프구 반응(Mixed Lymphocyte Reaction, MLR)
세포 면역기능을 시험관(*In vitro*)에서 측정하는 방법의 하나로, 동종이지만 서로 다른 면역계를 가진 개체들 간의 림프구를 섞어서 혼합세포배양 했을 때 MHC클래스II 대립유전자가 서로 다르면 림프구는 분열을 시작한다. 이 때 얼마나 분열했는지의 여부를 분석함으로써 장기이식 거부반응 등을 예측하는 등의 용도로 개발 되었다. 또 비자기의 MHC클래스Ⅱ 분자가 항원제시세포에 의해 처리되어 온 펩티드가 자기의 MHC클래스Ⅱ 분자에 의해 제시된 T세포를 활성화하는 반응도 MLR 내에 포함시키고 있다.

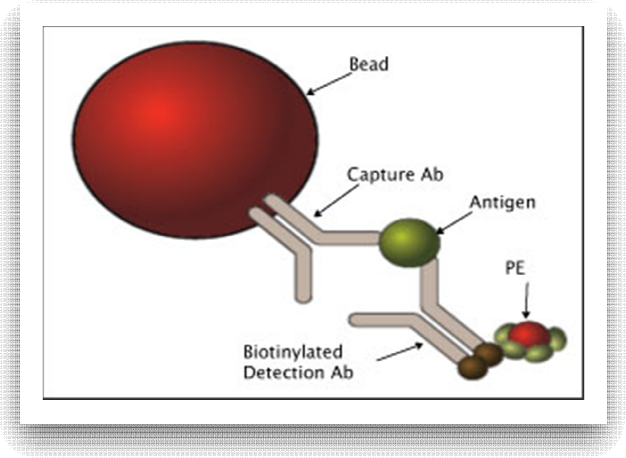


혼합림프구 반응과정 모식도. 두 마우스 개체로부터 얻은 각 기 다른 림프구를 섞어 반응을 시켰을 때 골수유래 수지상세포로부터 자극을 받은 CD4+ T 세포가 분화하며 싸이토카인을 생산한다.

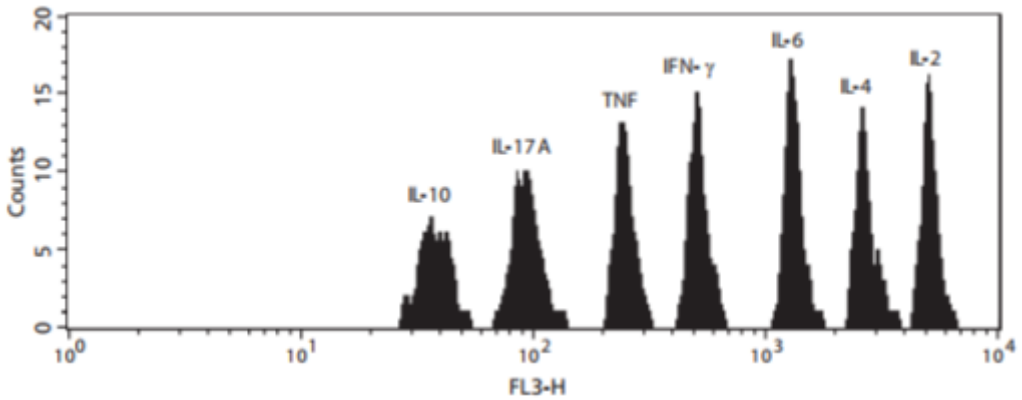
2) 싸이토카인 비즈 분석법(Cytokine Bead Array, CBA) 원리



Cytokine Beads Array(CBA)란 ELISA와 같은 면역분석법(Immunoassay)의 한 방법으로, 기본 원리는 sandwich-ELISA와 유사하다. Bead에 Capture antibody가 결합되어 있으며 이 Bead의 위치를 적절하게 배치하여 Flow cytometer를 통해 분석하면 각각의 cytokine의 생성량을 확인 할 수 있다. 키트 내에 재조합 단백질 스탠다드가 들어 있어 스탠다드 커브를 잡아 정량 분석이 가능하다. CBA의 장점은 한 샘플로부터 Cytokine 뿐만 아니라 여러 종류의 Chemokine, Growth factor, immunoglobulin, 신호전달 단백질 등의 생성을 한번에 비교할 수 있다. 또한 CBA 분석법은 ELISA를 사용할 때보다 훨씬 적은 양의 샘플을 사용하며 시간이 적게 걸리고 재현성이 높다.



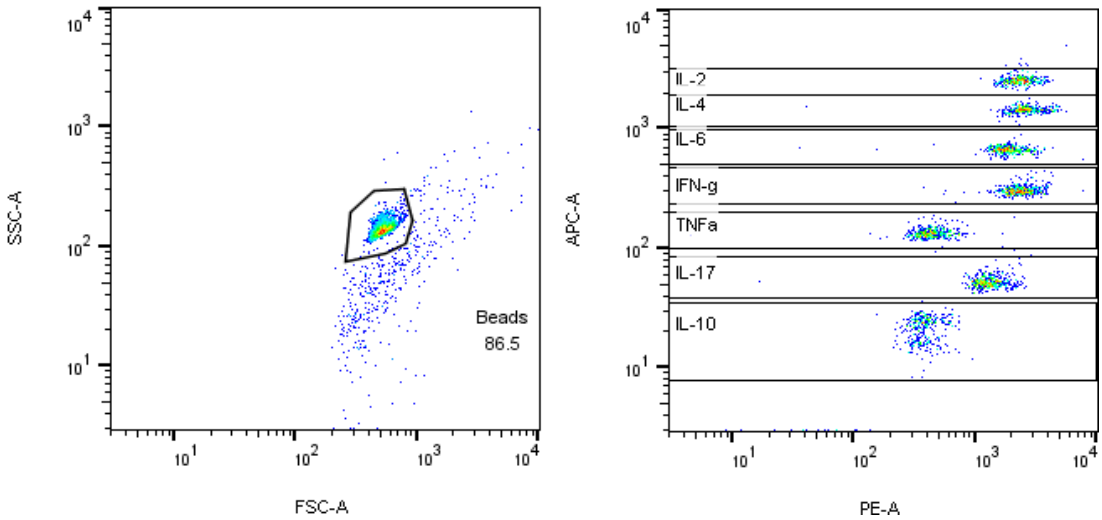
Capture antibody와 Detection antibody의 결합 모식도 Bead에 Capture antibody가 붙어 있는 형태로, 여기에 sample을 넣어주면 antibody와 antigen이 결합하고 그 후에 PE가 conjugation 되어 있는 Detection antibody가 붙는 형태이다.



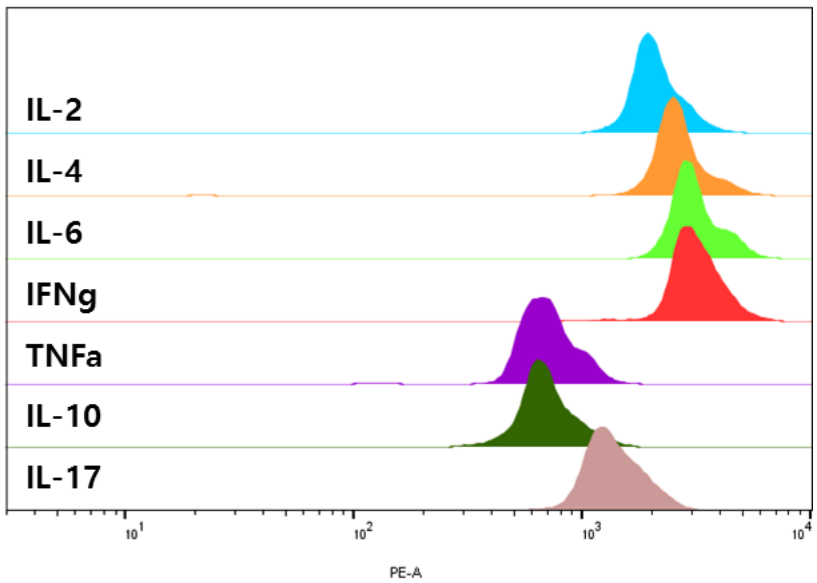
형광 세기를 통해 분류된 7개의 싸이토카인 Bead는 평균 지름이 7.5um로 매우 작은 Microsphere로써 각기 다른 형광 세기를 갖는 7개의 싸이토카인 비즈들은 캡쳐 안티바디가 IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF, IL-17A, IL-10 각각 특이적인 단백질로 코팅 되어 있으며 PE의 형광 값을 기준으로 나타낼 수 있다. 실험 과정에서 재조합 스탠다드와 샘플을 싸이토카인 캡쳐비즈와 섞고 PE 컬러가 달려 있는 디텍션 안티바디와 반응시켜서 PE의 세기를 유세포분석기를 이용하여 분석한다. 이 때 PE의 세기는 샘플 속에 존재하는 싸이토카인 농도를 의미한다.

Flow cytometry 종류에 따라 직접적으로 Target의 파장을 측정하는 reporter parameter와 Bead의 위치를 잡기 위한 clustering parameter로 사용할 수 있는 형광이 다르게 쓰이는데, 이번 실험에서는 BD FACS Canto II flow cytometer를 사용하였기 때문에 PE 형광을 reporter로 사용하였다.

• **결과**



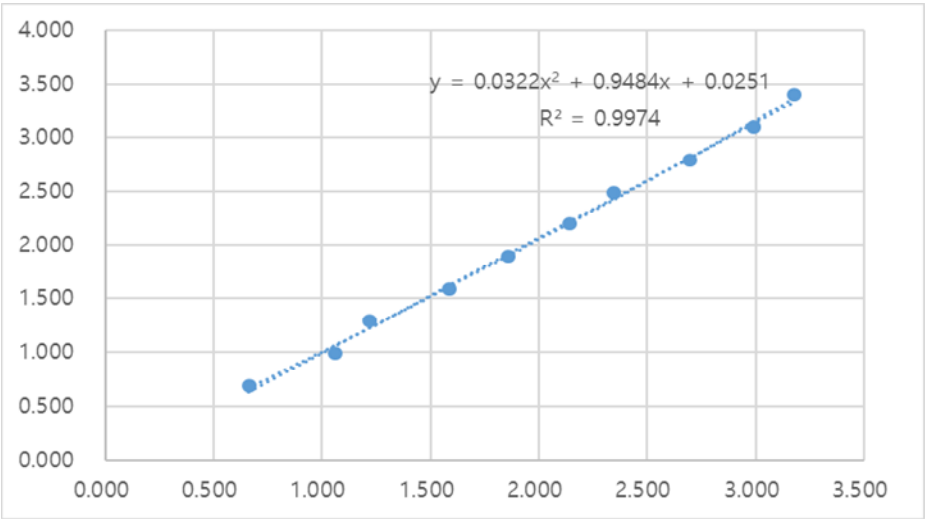
FSC/SSC를 기준으로 비즈를 구획화한 모습과 APC를 통해 분류된 싸이토카인들의 형광 세기를 PE를 기준으로 나타낸 모습.



각 싸이토카인을 reporter인 PE 형광 값의 세기를 바탕으로 나타낸 히스토그램

Standard	std (pg/ml)	Mean	Mean (0값 보정)	Log std (pg)	Log Mean
0-1	0.000	6.78	7.160		0.855
0-2	0.000	7.54	0.000		
1/1024	2.441	12.89	5.730	0.388	0.758
1/512	4.883	11.74	4.580	0.689	0.661
1/256	9.766	18.61	11.450	0.990	1.059
1/128	19.531	23.78	16.620	1.291	1.221
1/64	39.063	45.88	38.720	1.592	1.588
1/32	78.125	79.49	72.330	1.893	1.859
1/16	156.250	146.22	139.060	2.194	2.143
1/8	312.500	228.31	221.150	2.495	2.345
1/4	625.000	500.73	493.570	2.796	2.693
1/2	1250.000	984.26	977.100	3.097	2.990
top	2500.000	1519.85	1512.690	3.398	3.180
top2	2500.000	1402.87	1395.710	3.398	3.145

Standard curve를 그리기 위한 Standard mean 값 변환(IL-10) Standard의 zero point 2개의 평균을 낸 값이 7.160이며, 이 기본값을 각 mean 값에서 빼주었다. 이 값에 Log를 취한 값이 제일 오른쪽 값이며, 그 왼쪽의 Log std값은 standard 값에 Log를 취한 값이다.



위의 Standard mean값에 따른 Standard Curve(IL-10) 위의 표에서 변환한 값인 Log mean값과 Log standard 값을 이용하여 그린 그래프이다.

Sample	std (pg/ml)	Mean	Mean (0값 보정)		Log std (pg)	Log Mean
CPA-030	2.457	9.56	2.400		0.390	0.380
CPA-031	14.394	21.28	14.120		1.158	1.150
CPA-032	4.313	11.42	4.260		0.635	0.629
CPA-033	31.657	37.44	30.280		1.500	1.481
CPA-034	5.296	12.4	5.240		0.724	0.719
CPA-035	4.784	11.89	4.730		0.680	0.675
CPA-036	8.292	15.36	8.200		0.919	0.914
CPA-037	3.943	11.05	3.890		0.596	0.590
CPA-038	12.451	19.41	12.250		1.095	1.088
CPA-039	6.921	14.01	6.850		0.840	0.836
CPA-040	6.779	13.87	6.710		0.831	0.827
H35	4.483	11.59	4.430		0.652	0.646
H36	2.277	9.38	2.220		0.357	0.346
H37	3.234	10.34	3.180		0.510	0.502
H38	2.009	9.11	1.950		0.303	0.290
H39	1.829	8.93	1.770		0.262	0.248
H40	3.873	10.98	3.820		0.588	0.582
H41	2.546	9.65	2.490		0.406	0.396
H42	2.407	9.51	2.350		0.381	0.371
H43	10.563	17.58	10.420		1.024	1.018
H44	7.326	14.41	7.250		0.865	0.860

Standard curve의 계산식에 PE mean값을 대입하여 얻은 IL-10의 생성량(pg/ml)

• 실험시간 계산 (총 2시간 45분)

– 스탠다드 준비: 15분

– 싸이토미터 셋업 과정: 30분

– 샘플 스테이닝 및 반응시간: 2시간

• Materials

1) Reagents

BD Cytometric Bead Array(CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit (Catalog No. 560485)

2) Equipments

BD Falcon™ 12 × 75−mm sample acquisition tubes (Catalog No. 352008)

15−mL conical, polypropylene tubes (BD Falcon, Catalog No. 352097)

BD CantoII Flow cytometry

• Protocol

1) 골수세포의 분리 및 골수세포로부터 수지상세로포의 분화 유도 (위의 방법과 동일)

1. 마우스 대퇴골과 경골을 분리 하고 마우스 골수 채취용 주사기에 멸균된 1X 농도의 PBS(Nacl, KCl, Na2HPO4, KH2PO4)를 담아 골수 내강을 세척하여 세포를 얻는다. 이 때, 1X 농도 PBS의 양은 마우스 한 마리 당 20 mL을 사용 하여 내강을 세척해 주었다.
2. 채취한 골수세포는 1500 rpm에 5분 간 원심분리(Centrifuge UNION 55R, Hanil, Korea)하여 골수세포를 모은다.
3. 상층액을 석션하여 제거 한 후, 수지상세포 분화 배지 10 mL을 첨가한다. 이때 회수한 골수세포는 80% 이상의 세포 생존율을 보이며 세포의 양은 마우스 한 마리 당 (다리 2개) 8 x 10^7 cells 정도이다.
4. 골수세포는 보통 10개의 100 mm culture dish에 나눠 37℃ · 5% CO_2 incubator에서 6일 동안 배양하여 수지상세포로의 분화를 유도한다. 각각 하나의 dish에는 수지상세포 분화 배지 7 mL에 8 x 10^6개의 세포를 배양시킨다.
5. 배양 3일 째 GM-CSF가 포함된 완전배지를 새로 7 mL씩 추가한다 (하나의 dish 당 최종 볼륨 14 mL).
6. 배양 6일 째 dish를 가볍게 파이펫팅 해주어 바닥에 침전 되어있는 세포들을 포함, 부착되지 않은 분화된 수지상 세포를 회수한다. 회수한 수지상세포를 1500 rpm에 5분간 원심분리 하여 분리된 수지상세포는 RPMI1640 배지에 GM-CSF를 첨가하여 48-well plate에 3 X 10^5개가 되도록 분주한다.
7. 이때 시료를 농도별로 처리한 다음 24시간 동안 37℃ · 5% CO_2 incubator에 배양한 후 부착되지 않은 세포들을 수거하여 실험을 진행하였다.

2) 마우스의 비장세포 분리

1. 6주령의 Female 마우스(BALB/c)의 비장을 분리한다.
2. cell culture dish에 3ml RPMI 완전 배지를 넣고 100ul cell strainer를 얹은 뒤 비장을 옮긴다
3. 1ml Syringe 뒷 부분으로 비장을 으깬 후 strainer 얹은 50ml cornical tube에 걸러진 용액을 옮긴다.
4. Cell culture dish에 완전배지 3~5ml 더하여 50ml tube로 한번 더 옮겨준다.
5. PBS로 25ml까지 채운 후 350g로 8분 동안 원심분리 후에 상층액을 제거한다.
6. RBC 제거
   a. 10X RBC lysis buffer(Biolegend, USA)를 멸균된 증류수로 10배 희석해 1X로 만든다.
   b. Pellet을 5ml의 버퍼를 이용하여 풀어준다.
   c. 4℃에서 4분간 반응시킨다.
   d. 25ml의 PBS를 넣어 350g에서 5분 동안 원심분리 후에 상층액을 제거한다.
7. 세포수를 측정한 뒤 CM에 푼 뒤, 1 x 10^5개의 비장세포 100ul를 BMDC를 깔아 놓은 플레이트 위에 얹는다.
8. 72시간동안 37℃ · 5% CO_2 incubator에서 혼합 배양 시킨다.

3) 배양액 Harvest

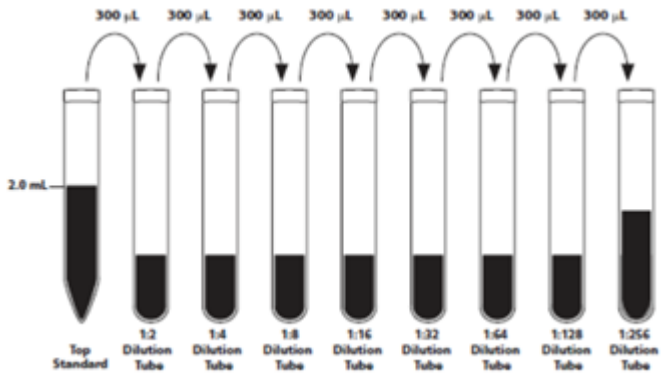
1. 96 well round bottom plate의 모든 배양액과 세포를 1.5ml EP tube에 옮겨 담고 300g

에서 5분 동안 원심분리 시킨 뒤 상층액만 120ul를 얻어 다른 tube로 옮긴다.

4) 싸이토카인 농도 스탠다드 준비

Mouse Th1/Th2/Th17 CBA kit(BD, USA)

1. 구 형태의 싸이토카인 스탠다드(Vial label C)를 15ml tube에 담는다.
 a. Sphere들은 깨지기 쉬우므로 조심히 다룬다.
2. 2ml의 assay diluent(Vial label G) 파이펫팅으로 조심스럽게 섞어준다.
 a. 사용전 15분 동안 상온에서 equilibration 시킨다.
 b. 섞어줄 때는 볼텍싱을 이용하거나 너무 무리하게 하지 않도록 한다.
3. 12 x 75mm FACS tube에 1:1, 1:2, 1:4 … 1:256, 0 까지 라벨링 한 뒤 각 tube에 300ul의 Assay diluent를 넣는다.
4. 높은 농도부터 1/2씩 연속으로 희석한다.
 a. 고농도 용액으로부터 저농도의 용액에 대한 영향을 최소화하기 위해 Tip을 계속 바꾼다.
 b. 각 tube는 볼텍싱을 5초 이상 진행한다.
 c. 0 tube에는 assay diluent만 넣어 준다.



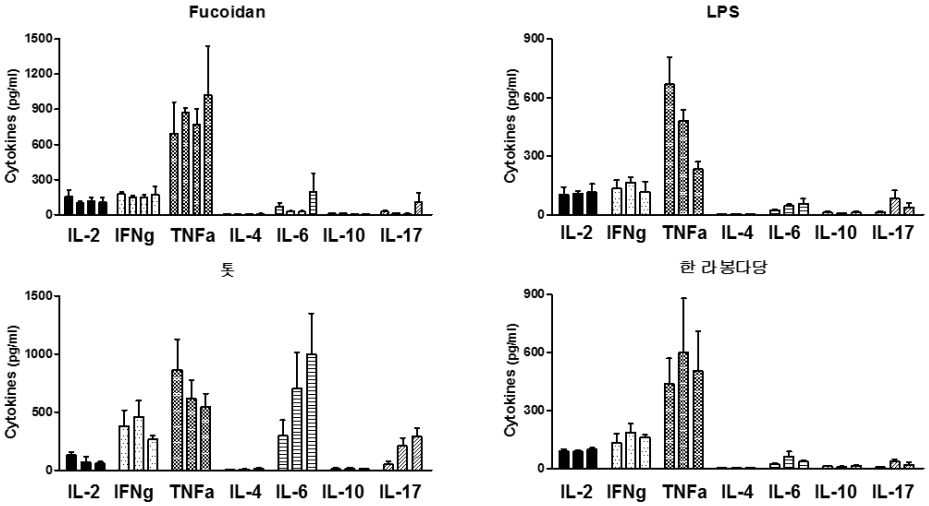
5) 캡쳐 비즈 혼합

1. Assay tube 수를 계산한다.
 a. 샘플 수 + 농도 스탠다드 수 + 음성 대조군 = 전체 Tube 수
2. Capture beads tube를 최소 5초 이상 볼텍싱해서 Tube 수 x 10ul의 볼륨으로 새로운 15ml tube에 넣는다.
3. 혼합용액을 볼텍싱한다.

6) Assay

1. 혼합용액을 모든 tube에 50ul씩 넣는다.
2. 희석해 놓은 스탠다드 용액과 샘플을 각 labeling에 맞게 50ul씩 넣는다.
3. PE detection reagents(Vial label B)를 모든 tube에 50ul씩 넣는다.
4. 2시간 동안 차광한 상태로 상온에서 반응시킨다.
5. 1ml wash buffer(Vial label F)를 넣고 200g로 5분 동안 centrifuge
6. 200ul의 wash buffer로 pellet을 resuspension 시킨다.
7. FACS reading

• 예상되는 결과



소재 농도에 따른 싸이토카인 생성량.
Vehicle, 톳, 한라봉다당: 100, 200, 400 μg/ml,
Fucoidan: 1, 2, 5, 10 μg/ml
LPS: 1, 10, 100 ng/ml

1.4. 시험관내 면역능 검사 결과의 수량화 및 등급화

가. 시험관내 면역능 검사

【기술 명칭】 수지상 세포를 이용한 면역 소재의 면역능 평가기술
【실시예】

1. 대상 소재 추출물의 준비

대상 소재 추출물은 농축액 또는 분말형태로 한국한의학연구원(대전, 한국)과 (주)비케이바이오(제주, 한국)에서 공급받았다. 소재 추출용액(에탄올 또는 물)에 대한 정보를 표시하였다. 추출물을 10% DMSO in PBS 용액으로 40 또는 200 ㎎/㎖의 보관액을 제조하여 −20℃에 보관하였다.

2. 수지상세포의 준비 및 시료 처리

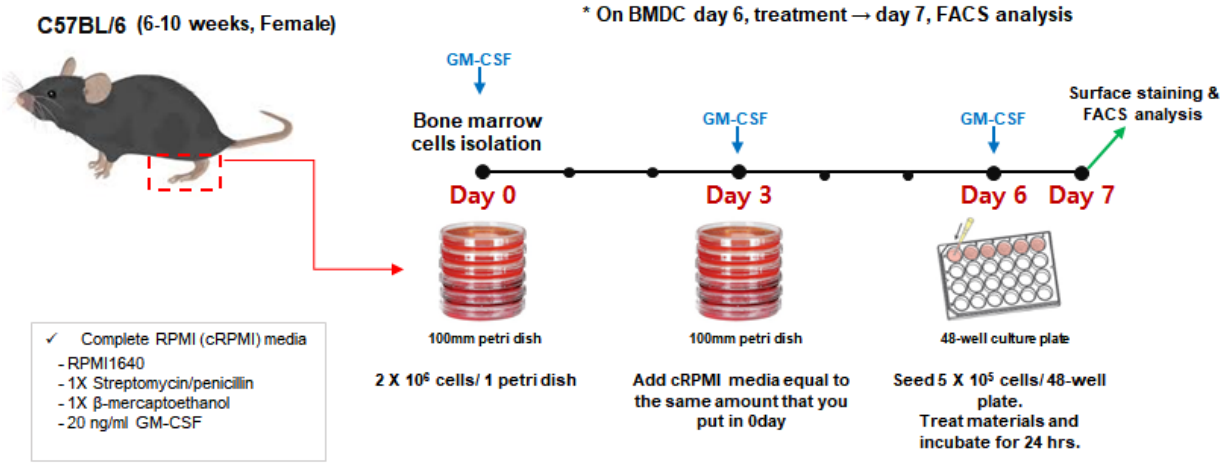
다물사이언스(한국)에서 구매하여 일반적 조건의 충남대학과 의과대학 실험동물 관리 사육실에서 멸균된 사료와 물을 자유롭게 섭취시키며 사육한 6~10주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골로부터 통상의 방법에 따라 골수세포를 획득하였다.

획득된 골수세포를 하기 표와 같은 조성의 배지에 혼합하고, 37℃, 5% CO_2 조건에서 6일 배양하여 수지상세포로 분화를 유도하였다.

성분	함량
RPMI 1640	444.5 ml
Fetal Bovine Serum (FBS)	50 ml
Penicillin/streptomycin	5 ml
β-mercaptoethanol	0.5 ml
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	20 ng/ml
Total	**500 ml**

배양 3일째 배지를 보충해 주고, 6일째 부착되지 않은 분화된 수지상세포를 회수하고 원심분리하였다(1500rpm, 5분). 분리된 세포를 동일 배지에 현탁하고 48−well plate에 5×10^5개가 되도록 분주하였다.

이때 상기 대상 소재 추출물의 보관액을 상기 배지로 최종농도가 100~1000 ㎍/㎖가 되도록 희석하여 농도별로 처리하고 동일한 조건에서 24시간 배양한 후 부착되지 않은 세포를 수거하여 유세포분석을 수행하였다. 세포독성이 심한 소재의 경우에는 최종농도를 낮추어가며 실험을 진행하였다.



3. 유세포분석

수지상세포의 생존률과 세포표면 활성인자 및 억제인자의 발현 정도를 측정하기 위하여 유세포분석을 실시하였다.

세포염색법은 확립된 방법에 따라 수행하였고, Live/Dead staining을 통해 수지상세포의 생존률을 확인하였다. 수지상세포의 positive marker인 MHCII와 CD11c, 수지상세포 표면에 발현하는 공동활성인자 CD40, CD80 및 억제인자 PD-L1, PD-L2 안티바디를 사용하여 세포를 염색한 후 유세포분석장치 (FACS Canto Ⅱ, BD bioscience, 미국)를 이용하여 분석하였다.

(1) 실험재료

① 안티바디

FITC-conjugated anti-CD273(PD-L2) (11-9972-85, eBiosciences),

PE-anti-CD274(PD-L1) (558091, BD Pharmingen),

PerCP-Cy5.5-MHCⅡ (562363, BD Pharmingen),

PE-Cy7-anti-CD80 (25-0801-82, eBioscience),

APC-anti-CD11c (20-0114-U100, Tonbo bioscience),

APC-Cy7-CD11b (BD Pharmingen, USA),

② FACS buffer

1X PBS (phosphate buffered saline), 1% BSA (Bovine serum albumin), 0.05% NaN_3 (Sodium azide)

③ LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (L34966, Invitrogen)

동봉된 DMSO 50 ㎕로 stock을 만들어 -20℃에 보관. 세포 염색 시 PBS에 1:1000으로 희석하여 사용. Light protection, Desiccate.

(2) 안티바디 패널

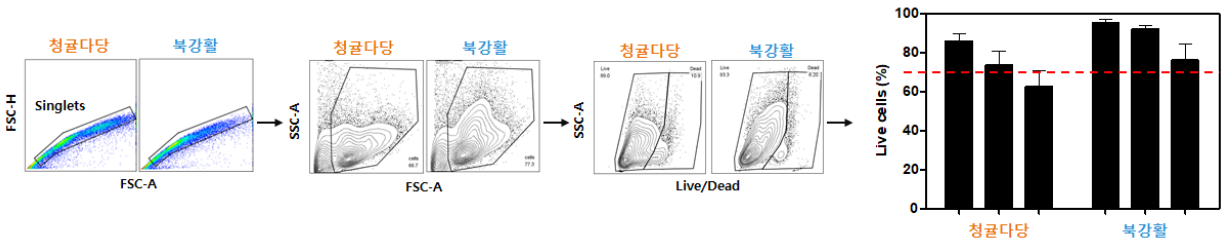
Immuno/Tolerogenic DC(mouse)	Blue laser (488nm)				Red laser (640 nm)		Violet Laser(405nm)		stimulation	surface
	530/30	588/42	670LP	780/60	660 / 668	785 / 785	450/50	510/50	Fix/Perm	ICS
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	BV421/V450	BV510/V500		
Surface(Total volume : 200ul)	PD-L2	PD-L1	MHCII	CD80	CD11c	CD11b	CD40	L/D		
vendor	eBio	BD	BD	eBio	TONBO	Biolegend	BD	Life technologies		
Clone	122	MIH5	M5/114.15.2	16-10A1	N418	M1/70	3/23			
cat#	11-9972-85	558091	562363	25-0801-82	20-0114-U100	101226	562846	L34966		
Vol. per test(μl)	0.3	0.3	0.02	0.3	0.25	0.32	0.3	1/25 dilution -> 5ul		

(3) 수지상세포의 염색 및 유세포분석

종래 확립된 방법에 따라 수지상세포를 염색하고 유세포분석을 수행하였다. 통상의 방법에 따라 유세포분석 과정에서 소재의 독성 즉, 세포의 생존률 평가도 이루어졌다. 각 실험은 2~3회 반복하여 시행하였다. 유세포분석 실험에서 얻어진 결과는 Prism Graph-Pad를 이용하여 평균 ± 표준오차로 분석하였고, 데이터는 FlowJo software (FlowJo, USA)를 이용하여 분석하였다.

(4) 세포독성 평가

종래 확립된 방법에 따라 LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (L34966, Invitrogen)를 유세포분석을 적용하여 Live/Dead 세포 비율 정보를 통해 면역개발소재가 세포에 미치는 독성을 평가하여 효과적인 소재 처리 농도(생존율 70% 이상)를 결정한다.

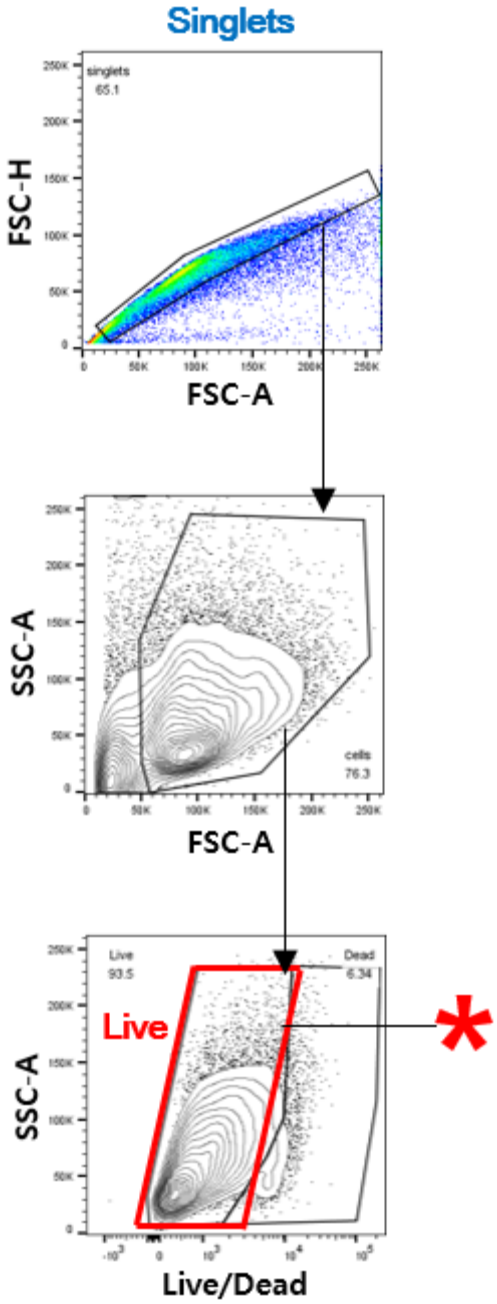


(5) 게이팅 및 데이터 분석

다음과 같은 전략에 따라 게이팅이 이루어졌다. 하기 설명에서 게이팅과정을 통해 " X를 제외, 분리 또는 선택" 한다는 것은 '유세포분석 데이터에서 X에 대한 전자정보를 제외, 분리 또는 선택하여 정보처리' 한다는 의미이다.

먼저, FSC-H vs. FSC-A 플롯에서 단리되지 않은 세포(doublets와 clumps)를 제외하고, 이어서 FSC-A vs. SSC-A 플롯에서 세포 잔해(debris)를 제외하여 단일세포(singlet cell)를 분리하였다. 이어서 SSC-A vs. Live/Dead 플롯에서 사멸 세포를 제거하고 생존 세포만 게이팅하

였다.



이어서 상기 생존 세포를 대상으로 아래와 같이 다양한 전략에 따라 게이팅 하여 대상 소재가 수지상세포에 대한 보조자극인자 및 억제인자 발현에 미치는 영향을 분석하였다.

(6) 면역소재가 수지상세포 생존률에 미치는 효과

표준면역식품소재 및 단일물질 소재가 수지상세포 생존률에 미치는 효과를 각각 [Figure 1.4] [Figure1.5]로 정리하였다.

4. 수지상세포 활성화 표지분자들 세포면 발현에 기초한 면역능 평가기술

(1) 수지상세포 활성화 표지분자들의 세포면 발현 측정

모든 조직에 위치하는 수지상세포는 감염이나 세포사멸등 다양한 주변상황의 정보들을 위험인자들로 인식하여 활성화과정을 거치게 되는데, 활성화 정도나 방향에 따라 각 항원에 대해 Immunogenic 하거나 (면역증진) Tolerogenic 한 (면역관용) 면역반응 유도한다. 선천면역과 후천면역을 연결시키면서 항원특이적 면역반응을 지휘하는 "장군"이라는 별명을 가진 이 수지상세포에 대한 면역식품소재의 면역능 평가기술은 식품소재에 의한 면역반응의 방향성과 정도를 예측하기 위해 확립되어야 할 기술이라고 할 수 있다.

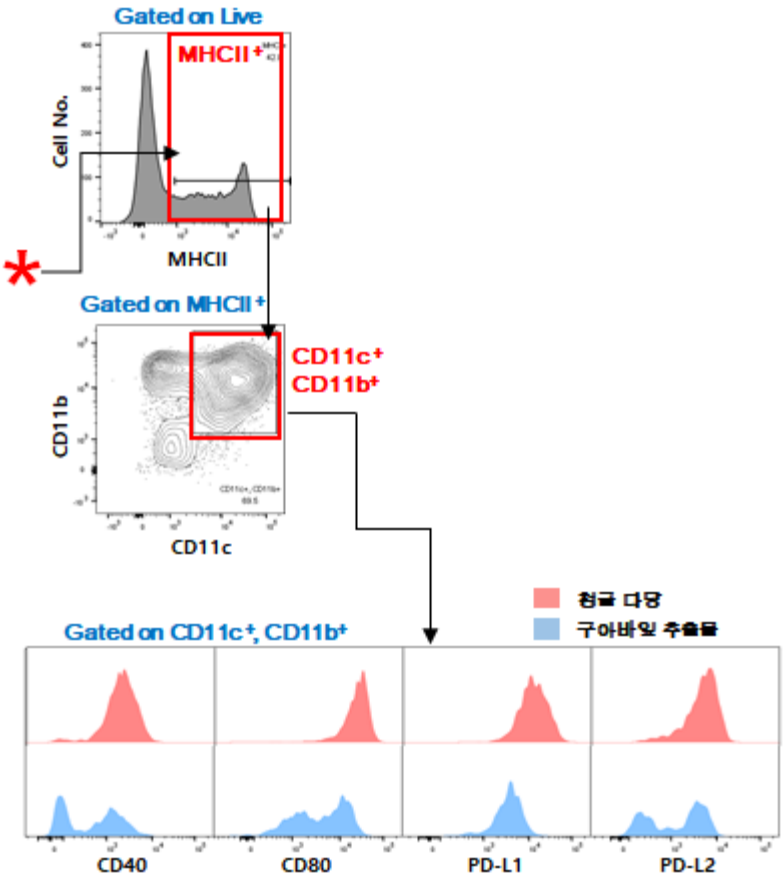
면역식품소재에 의한 수지상세포의 활성화 정도와 방향을 예측하기 위해 활성화 표지분자들로 잘 알려진 분자들인 수지상세포 표면에 발현되는 MHC, 공동자극분자들 CD40, CD80, PD-L1, PD-L2, 접착분자들 CD11c, CD11b들의 세포면 발현량을 측정하였다. [첨부자료1: 수지상세포 기반 면역능 측정기술의 이론적 배경]

◆ 수지상세포의 활성화 표지 분자들과 특성

MHC:	항원제시기능
CD40:	T cell activation 활성화 촉진 신호
PD-L1, PD-L2:	T cell activation 활성화 억제 신호
CD80:	T cell activation 활성화 촉진 혹 억제 신호
CD11b:	억제신호

면역증진 효과가 있는 것으로 알려진 청귤다당, 항염증(면역관용) 효과가 있는 것으로 알려진 구아바잎추출물을 전술한 방법에 따라 수지상세포에 처리하고, 보조자극인자 및 억제인자의 발현 특성을 확인하였다.

전술한 방법에 따라 분리한 생존세포에서 MHCII가 강하게 발현되는 세포를 게이팅하고, 이어서 CD11b와 CD11c를 강하게 발현하는 세포를 게이팅하였다.



이렇게 얻어진 MHCII+, CD11c+, CD11b+ 수지상세포에서 보조자극인자 및 억제인자의 발현량을 측정하였다. 면역증진 효과를 가진다고 알려진 청귤다당은 면역개선 효과를 가지는 것으로 보고된 구아바잎추출물에 비해 상대적으로 많은 양의 CD40, CD80, PD-L1, PD-L2을 발현하고 있음을 알 수 있다.

(2) 표준면역식품소재 혹 단일물질 소재에 의한 수지상세포 활성화 변화 측정

표준면역식품소재 혹 단일물질 소재처리에 의해 유도된 CD11+수지상세포 혹 CD11+MHCII+수지상세포군 구성비 변화를 측정하였다. [Figure 1.4-1.9]

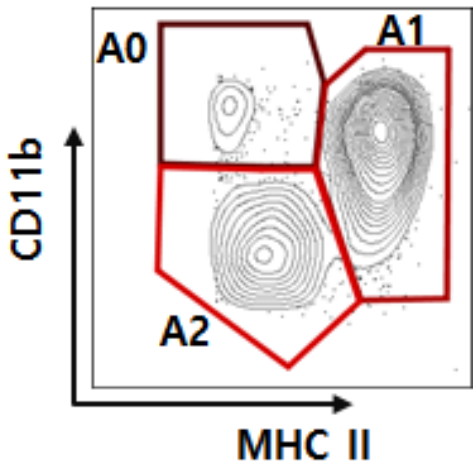
나. 면역능 수치화

1. 면역증진지수I 에 기반한 면역식품소재 면역능 평가기술

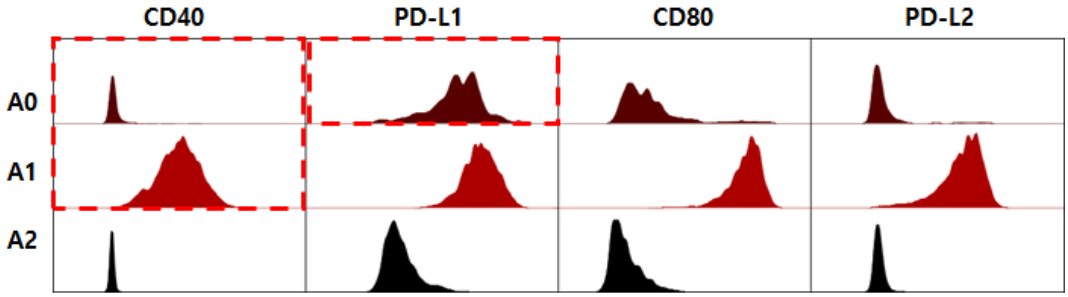
(1) 항원특이적 수지상세포 subgroup 나누기

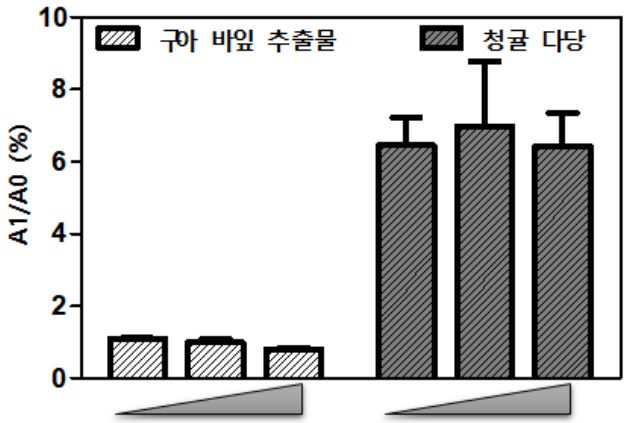
전술한 소재를 수지상세포에 처리하고, CD11c, MHICII 그리고 CD11b의 발현정도에 기초하여 수지상세포를 세포들을 CD11b vs. MHCII 발현 평면상에 펼쳐서 검토한 바, 세포들이 3개

구획으로 명확하게 구분되었다. 즉, CD11b가 평균 이상으로 강하게 발현되고, MHCII가 평균 이하로 미미하게 발현된 그룹(A0), MHCII가 평균 이상으로 강하게 발현된 그룹(A1) 및 CD11b와 MHCII 모두 평균 이하로 미미하게 발현된 그룹(A2)으로 명확히 구분되었다.



이렇게 구분된 각 구획 마다 보조자극인자(CD40, CD80)와 억제인자(PD-L1, PD-L2)의 발현양상과, A1/A0의 비율을 분석하였다.





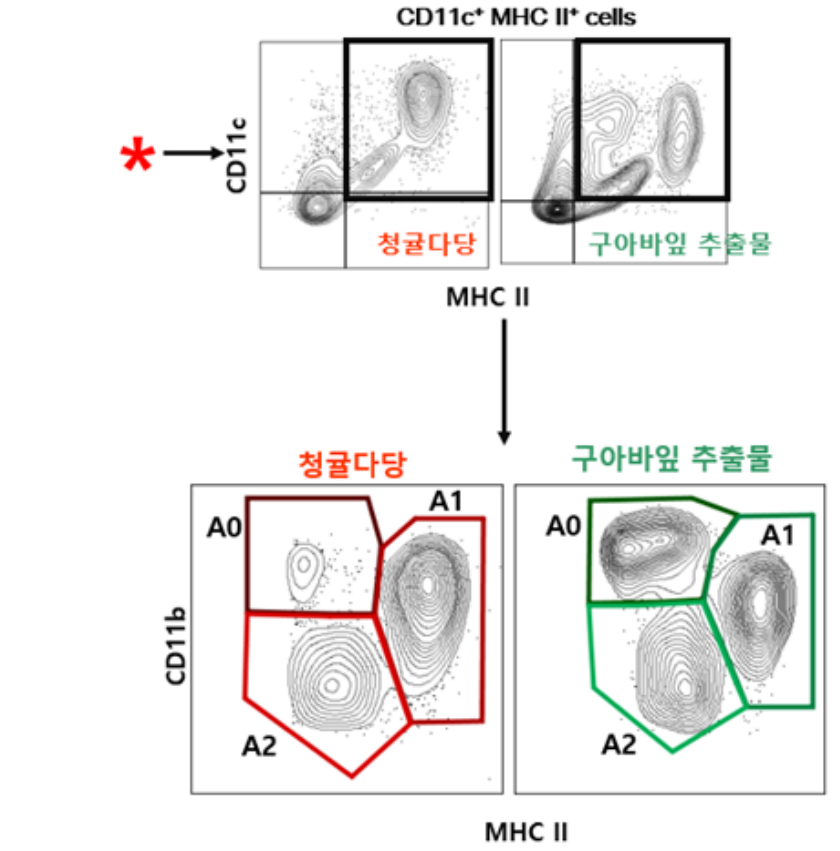
그 결과, 면역증진 효과가 높은 것으로 알려진 청귤다당에서 A1/A0의 비율이 높았고, 면역

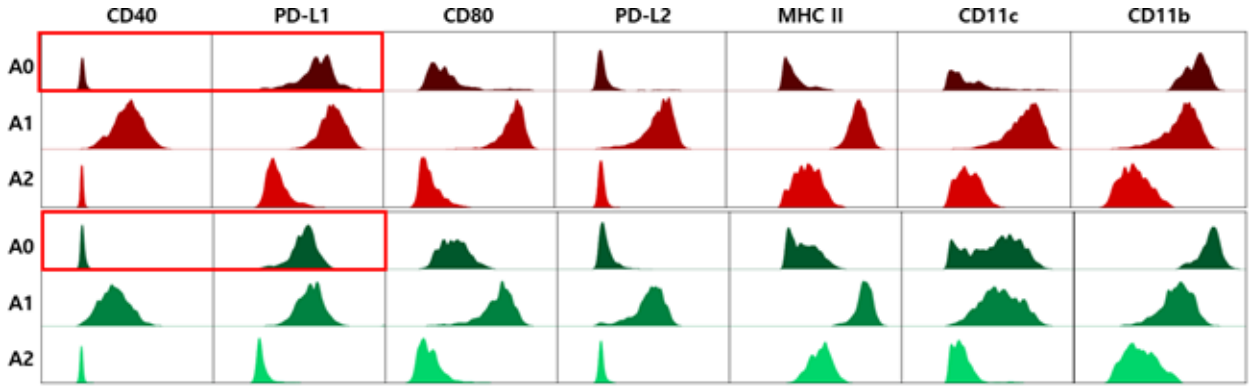
관용 효과가 있는 구아바잎추출물에서 비율이 낮았다. 즉, 소재 처리에 따른 A1/A0의 비율과 상기 소재의 기존에 알려진 면역특성(면역증진 또는 면역관용)에 상관관계가 나타남을 확인하였다.

(2) 수지상세포 Subgroups의 특성 확인

[Figure 1.10]

면역증진 작용을 하는 것으로 특허완료 확인된 청귤다당과, 면역개선 효과로 특허완료된 구아바잎추출물을 면역증진 혹 면역개선의 표본시료로 수지상세포에 처리하여, 전술한 방법에 따라 분리한 생존세포에서 CD11c+MHCII+ 세포들을 게이팅하하고, 이어서 CD11c+MHCII+ 세포들을 CD11b vs. MHCII 발현 평면상에 펼쳤다. 여기서 CD11b가 평균 이상으로 강하게 발현되고, MHCII가 평균 이하로 미미하게 발현된 그룹(A0)과, MHCII가 평균 이상으로 강하게 발현된 그룹(A1)을 구획하여 각각 게이팅하고 이들 그룹에서 각 세포표면분자들의 발현정도와, 각 그룹의 세포 비율(또는 세포수)를 측정하였다.



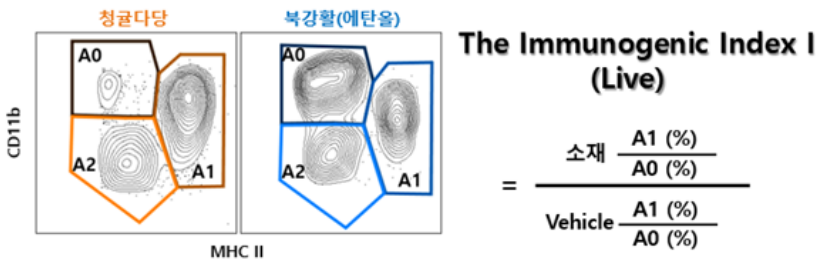


도표에서 볼 수 있듯이, A0 그룹 세포에는 CD40, CD80, PD-L2, MHCII 등의 발현이 미미하고 면역억제 효과가 큰 PD-L1과 CD11b가 강하게 발현되어 있어 면역억제 반응효과가 있는 분자들만 발현되어 있음을 볼 수 있다. A1 그룹 세포는 강한 CD40, CD80, PD-L1, MHCII의 발현양상을 보이고 있어 면역증강 기능을 하는 성숙수지상세포에 포함시킬 수 있다. A2에는 모든 측정 분자들의 발현양이 낮았다.

(3) 면역증진지수I의 정의

[Figure 1.11]

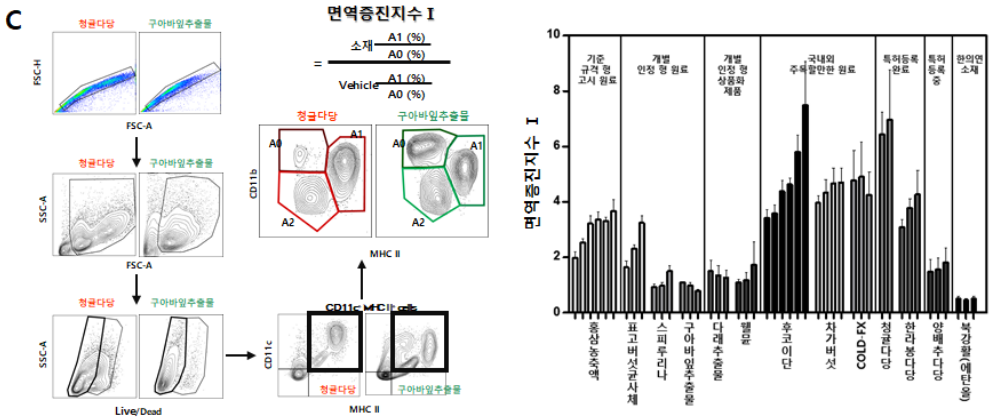
이상과 같이, 면역관련 기능적 특성이 알려진 소재로부터 면역기능과 A0, A1 그룹의 비율 사이에 일정한 패턴이 있음을 발견하였다. 이에 소재들의 면역기능 강도를 평가하고 하고 타 소재들과의 객관적 비교가 가능하도록 면역항원성의 척도로 하기 식과 같은 면역능지수I (The Immunogenic Index I)을 정의하였다.



이때 대조구는 대상 소재 추출물이 포함되지 않은 vehicle, 즉 블랭크로 처리된 것이다. 본 기술에서는 위에 기술한 바와 같이, 처리구와 동일한 양의 10% DMSO in PBS 용액에 동일한 양의 (수지상세포 배양) 배지가 혼합된 것을 vehicle로 하였지만, 추출물이 포함되지 않는 점 이외에 처리구에 첨가되는 처리액과 동일한 것이라면 vehicle로 특별한 제한은 없다. 종래 면역기능이 실험검증과정을 통해 특허등록이나 축허출원으로 인증된 13종의 면역식품소재를 표준소재로 설정하거나 면역기능 관련 연구 단일물질 소재 처리를 통해 얻은 결과를 분석하여 위 그림과 같은 구획나누기를 통해 면역증진지수I 평가를 가능하도록 하였다. [Figure 1.12] [Figure 1.13]

(4) 면역증진지수I을 통한 표준면역소재 및 단일물질 소재 면역증진효과 수치화

종래 면역기능이 실험검증과정을 통해 특허등록이나 축허출원으로 인증된 13종의 면역식품소재를 표준소재로 설정하여, 처리 농도를 달리하면서 세포 생존율 70% 이상인 조건에서 면역증진지수1 값을 [C]와 같이 얻고 치를 그래프로 비교분석하였다. [Figure 1.13] [Figure 1.14]



처리된 수지상세포에서 CD11c+MHCII+ 세포들을 CD11b vs. MHCII 발현 평면상에 펼쳤을 때, 모든 소재에 대하여 CD11b가 평균 이상으로 강하게 발현되고, MHCII가 평균 이하로 미미하게 발현된 그룹(A0), MHCII가 평균 이상으로 강하게 발현된 그룹(A1) 및 CD11b와 MHCII 모두 평균 이하로 미미하게 발현된 그룹(A2)으로 명확히 구분되었다. 시험관내 처리조건에서 세포생존율 70% 이상인 조건에서 면연관련측정치에 효과를 보이는 가장 높은 시료처리농도에서의 면역증진지수I 값을 그래프로 표시하면 이미 면역증진소재로 인증받은 소재들은 면역증진지수I이 높은 값을 나타내고 과민면역개선으로 인증받은 소재들은 낮은 값을 가짐을 알 수 있다.

단일물질 소재에 의한 면역증진지수1 값 산출을 위한 구획나누기 결과는 supplementary Figure 1.1에 정리하였고, 단일물질 소재에 의한 면역증진지수1 값 은 [Figure 1.16-1.17]에 잘 나타나 있다.

(5) 면역능 평가에서의 면역증진지수I의 특이성

종래에는 수지상세포에 대한 소재의 효과를 시험관 수준에서 평가할 때 소재처리에 의한 각 자극인자와 억제인자들의 발현량을 비교하는 방법을 사용하였다. [Figure 1.15]에 위 검증테스트에 사용된 소재들에 의한 각 인자들의 발현량과 면역능지수I 관계를 도시하였다.

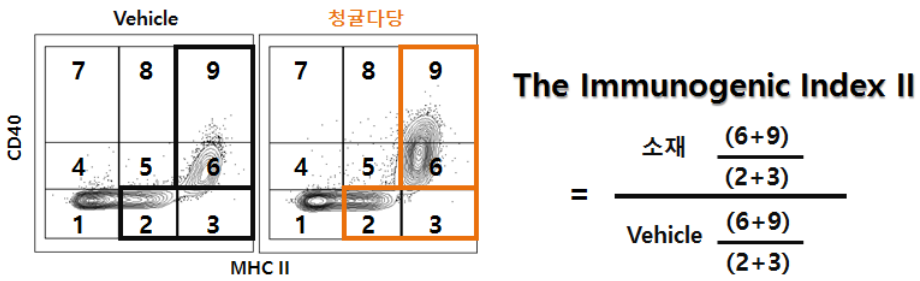
도시된 바와 같이, 예를 들면 자극인자 CD80의 발현량이 많은 스피루리나나 다래추출물 등이 실제는 면역관용 효과를 나타내며, 발현량이 더 적은 홍삼농축액, 유산균다당 등이 면역증진 작용을 하고, 억제인자 PD-L1의 발현량이 많은 후코이단, 홍삼농축액 등이 실제 면역증진 작용을 하며 발현량이 적은 스피루리나나 다래추출물 등이 면역관용 작용을 함을 알 수 있다. 즉, 자극인자와 억제인자들의 발현량과 소재의 면역특성(면역능지수 I)은 상관관계를 보이지 않는다.

따라서 종래와 같이 소재처리에 의한 자극인자와 억제인자들의 발현량을 비교하는 방법으로는 소재들의 상대적인 면역능을 예측하고 동물실험모델을 설계하는 데 적합하지 않음을 확인할 수 있다.

2. 면역증진지수II 에 기반한 면역식품소재 면역능 평가기술

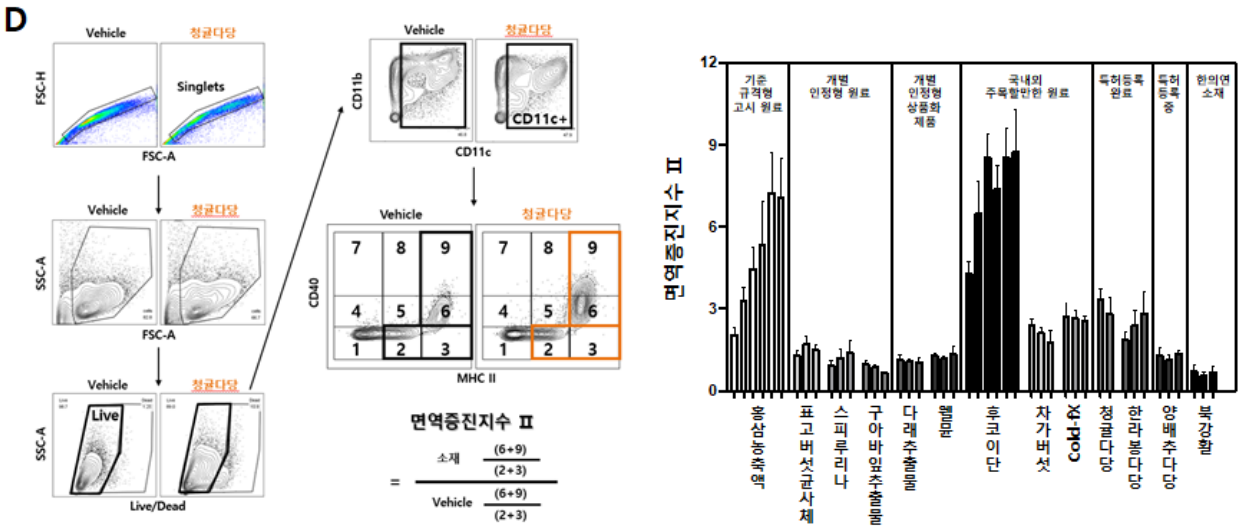
(1) 면역증진지수II의 정의

Figure 1.18에서처럼 Live CD11c+ 수지상세포를 잡고 이들의 CD40와 MHC II의 발현양태에 기초하여 수지상세포를 여러 그룹으로 나누었다. 항원특이적인 수지상세포의 기능을 수행하기 위해서는 MHC II의 발현이 있어야하는데, 미성숙수지상세포의 경우에는 이 발현이 낮고 성숙세포의 경우에는 그 발현이 증가한다. MHC II발현은 있으나 T cell activation 촉진 신호로 작용하는 CD40분자의 발현이 없는 그룹 (2+3 그룹)과 MHC II가 강하게 발현되어 있으면서 CD40의 발현도 강한 그룹 (6+9 그룹)을 나누어 가각 미성숙수지상세포와 성숙수지상 세포군으로 잠정 나누고 그들 간의 비율을 면역증진지수II (The Immunogenic Index II)로 정의하였다. 면역증진지수II 값을 얻기 위한 구획나누기와 구획의 특성은 [Figure 1.18] [Figure 1.19]에 잘 나타나있다. 종래 면역기능이 실험검증과정을 통해 특허등록이나 특허출원으로 인증된 13종의 면역식품소재를 표준소재로 설정하여 각 구획을 설정하였다 [Figure 1.20]



(2) 면역증진지수II을 통한 표준소재들 및 단일물질 소재들 면역증진효과 수치화

종래 면역기능이 실험검증과정을 통해 특허등록이나 특허출원으로 인증된 13종의 면역식품소재를 표준소재로 설정하여, 처리 농도를 달리하면서 세포 생존율 70% 이상인 조건에서 D와 같이 면역증진지수II 값을 얻었다. [Figure 1.21]



시험관내 처리조건에서 세포 생존율 70% 이상인 조건에서 면연관련측정치에 효과를 보이는 가장 높은 시료처리농도에서의 면역증진지수I 값을 그래프로 표시하면 이미 면역증진소재로 인증받은 소재들은 면역증진지수II이 높은 값을 나타내고 과민면역개선으로 인증받은 소재들은 낮은 값을 가짐을 알 수 있다. [Figure 1.21-1.22]

단일물질 소재 처리에 의한 CD11+수지상세포군의 MHCII와 CD40발현은 Supplementary Figure 1.2에 정리하였고, 단일물질 소재에 의해 면역증진지수II 에 미치는 영향은 [Figure 1.24-1.25]에 잘 나타나 있다.

(2) 면역증진지수II 값 측정의 특이성

[Figure 1.23]

종래에는 수지상세포에 대한 소재의 효과를 시험관 수준에서 평가할 때 소재처리에 의한 각 자극인자와 억제인자들의 발현량을 비교하는 방법을 사용하였다. 도 6에 위 검증테스트에 사용된 소재들에 의한 각 인자들의 발현량과 면역능지수II 관계를 도시하였다.

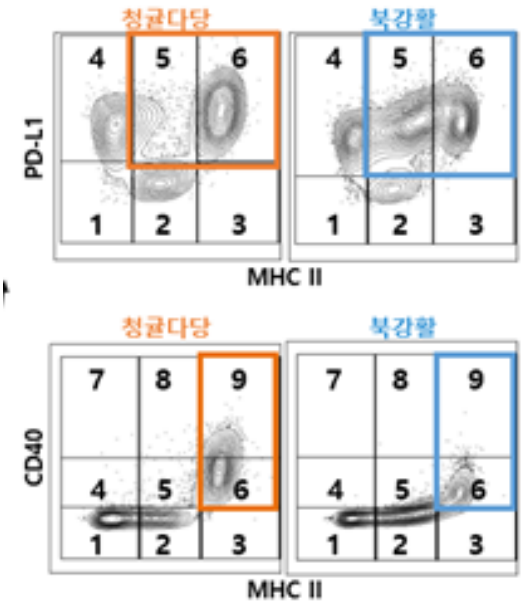
도시된 바와 같이, 예를 들면 자극인자 CD40의 발현량이 상대적으로 적은 청귤다당, 차가버섯 등이 발현량이 많은 후코이단, 홍삼농축액보다 더 면역증진 작용을 하며, 억제인자 PD-L1의 발현량이 상대적으로 아주 많은 후코이단, 홍삼농축액 등이 실제 가장 큰 면역증진 작용을 하며, 오히려 상대적으로 발현량이 적은 스피루리나나 다래추출물 등이 면역관용 작용을 함을 알 수 있다. 즉, 기존의 각 자극인자와 억제인자들의 발현량 측정값과 소재의 면역특성(면역능지수 II)은 상관관계를 보이지 않는다.

따라서 종래와 같이 소재처리에 의한 각 자극인자와 억제인자들의 발현량을 단순 비교하는 방법으로는 소재들의 상대적인 면역능을 예측하고 동물실험모델을 설계하는데 적합하지 않음을 확인할 수 있다.

3. 면역관용지수I 에 기반한 면역식품소재 면역능 평가기술

(1) 면역관용지수I 의 정의

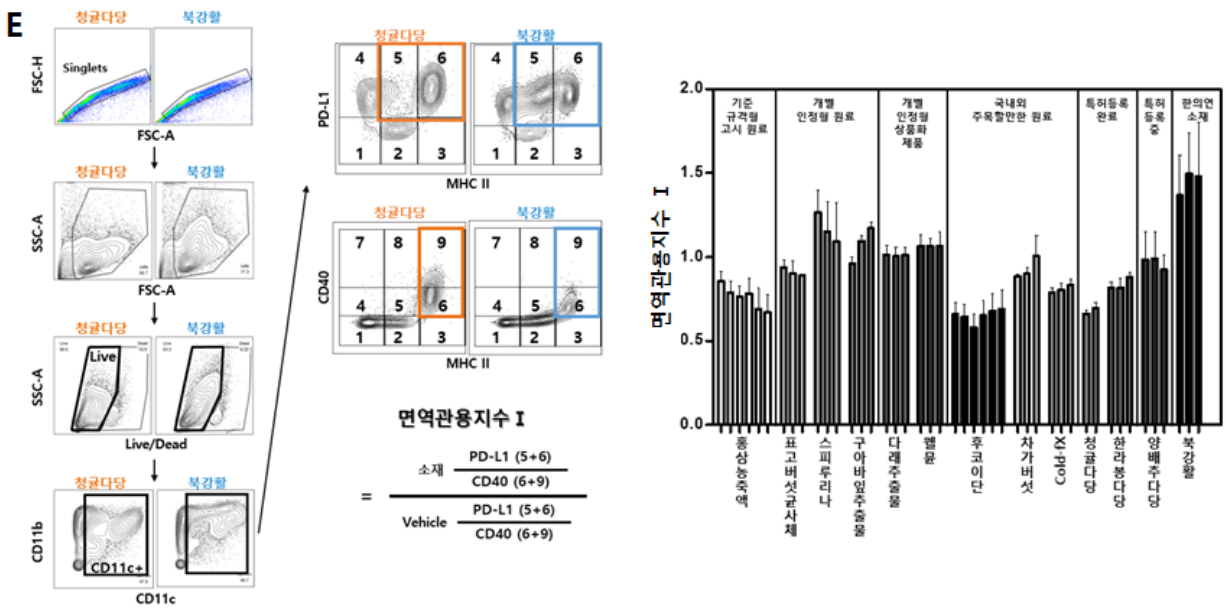
아래 그림E와 [Figure 1.26]에서처럼 살아있는 CD11c+ 수지상세포를 잡고 이들의 PD-L1, CD40와 MHC II의 발현양태에 기초하여 수지상세포를 여러 그룹으로 나누었다. 항원특이적인 수지상세포의 기능을 수행하기 위해서는 MHC II의 발현이 있어야하는데, 미성숙수지상세포의 경우에는 이 발현이 낮고 성숙세포의 경우에는 그 발현이 증가한다. MHC II발현은 있으면서 T cell activation 억제 신호로 작용하는 PD-L1분자의 발현이 있는 그룹 (5+6 그룹)과 MHC II가 강하게 발현되어 있으면서 T cell activation 촉진 신호로 작용하는 CD40발현이 있는 그룹 (6+9 그룹)의 비율을 Vehicle에서의 그 비율에 대한 비로 면역관용지수I (The Tolerogenic Index I)로 정의하였다. [Figure 1.27] 면역관용지수I값이 높을수록 억제 신호로 작용하는 PD-L1분자의 영향이 상대적으로 커지는 면역관용효과를 나타내게 된다. 종래 면역기능이 실험검증과정을 통해 특허등록이나 축허출원으로 인증된 13종의 면역식품소재를 표준소재로 설정하여 [Figure 1.28]와 같이 구획나누기를 실시하였다.



$$\text{면역관용지수 I} = \frac{\text{소재 } \frac{\text{PD-L1 (5+6)}}{\text{CD40 (6+9)}}}{\text{Vehicle } \frac{\text{PD-L1 (5+6)}}{\text{CD40 (6+9)}}}$$

(2) 면역관용지수I을 통한 표준소재들 및 단일물질 소재 면역관용효과 수치화 및 등급화

종래 면역기능이 실험검증과정을 통해 특허등록이나 축허출원으로 인증된 13종의 면역식품소재를 표준소재로 설정하여, 처리 농도를 달리하면서 세포 생존율 70% 이상인 조건에서 아래 그림처럼 면역관용지수I 값을 얻었다 [그림1E].



시험관내 처리조건에서 세포 생존율 70% 이상인 조건에서 면연관련측정치에 효과를 보이는 가장 높은 시료처리농도에서의 면역관용지수I 값을 그래프로 표시하면 이미 과민면역개선로 인증받은 소재들은 면역관용지수I이 높은 값을 나타내고 면역증강소재로 인증받은 소재들은 낮은 값을 가짐을 알 수 있다. [Figure 1.29-1.30]

단일물질 소재에 의한 CD11+수지상세포군에서의 MHCII, CD40, PDL1 발현분석은 supplementary Figure 1.3-1.4에 정리하였고, 단일물질소재 면역관용지수I에 대한 결과들은 [Figure 1.32-33]에 정리하였다.

(3) 면역관용지수I 값 측정의 특이성

[Figure 1.31]

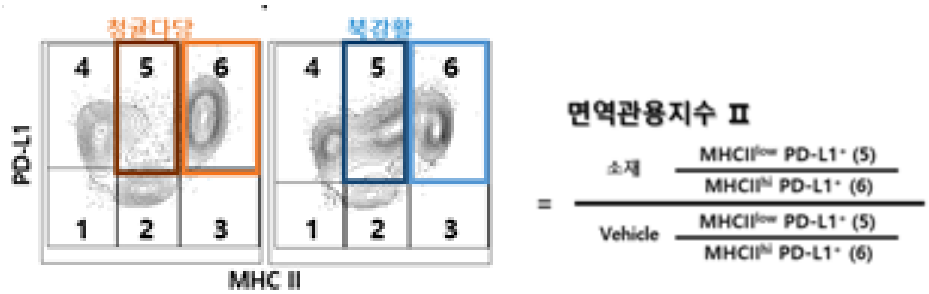
종래처럼 한 분자의 발현량 변화 측정에 기초해서는 각 면역소재가 갖는 특징적인 면역효과를 평가하기에는 미흡함을 알 수 있다.

4. 면역관용지수II 에 기반한 면역식품소재 면역능 평가기술

(1) 면역관용지수II의 정의

아래 그림F와 Figure 1.34에서처럼 살아있는 CD11c+ 수지상세포를 잡고 이들의 PD-L1와 MHC II의 발현양태에 기초하여 수지상세포를 여러 그룹으로 나누었다. 항원특이적인 수지상세포의 기능을 수행하기 위해서는 MHC II의 발현이 있어야하는데, 미성숙수지상세포의 경우에는 이 발현이 낮고 성숙세포의 경우에는 그 발현이 증가한다. T cell activation 억제 신호로 작용하는

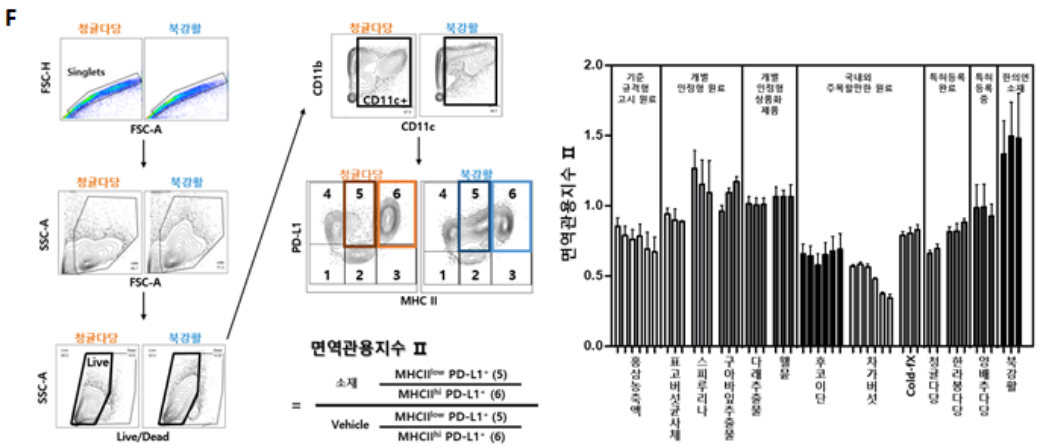
PD-L1분자의 발현이 있으면서 MHC II발현은 약한 그룹 (5 그룹)과 MHC II가 강하게 발현되어 있으면서 T cell activation 억제 신호로 작용하는 PD-L1분자의 발현이 있는 그룹 (6 그룹)의 비율을 Vehicle에서의 그 비율에 대한 비로 면역관용지수II (The Tolerogenic Index II)로 정의하였다. 면역관용지수II값이 높을수록 면역관용효과를 나타내게 될 것으로 기대된다. [Figure 1.35]



종래 면역기능이 실험검증과정을 통해 특허등록이나 축허출원으로 인증된 13종의 면역식품소재를 표준소재로 설정하여 면역관용지수II 값 산출을 위한 구획나누기를 실시하였다. [Figure 1.36]

(2) 면역관용지수II을 통한 표준소재들 및 단일물질 소재 면역관용효과 수치화

종래 면역기능이 실험검증과정을 통해 특허등록이나 축허출원으로 인증된 13종의 면역식품소재를 표준소재로 설정하여, 처리 농도를 달리하면서 세포 생존율 70% 이상인 조건에서 면역관용지수II 값을 얻었다 [Figure 1.37].



시험관내 처리조건에서 세포 생존율 70% 이상인 조건에서 면연관련측정치에 효과를 보이는 가장 높은 시료처리농도에서의 면역관용지수II을 그래프로 표시하면 이미 과민면역개선로 인증받은 소재들은 면역관용지수II 높은 값을 나타내고 면역증강소재로 인증받은 소재들은 낮은 값을 가짐을 알 수 있다. [Figure 1.38]

단일물질 소재에 의한 CD11+수지상세포군에서의 MHCII, PDL1 발현분석은 supplementary Figure 1.4에 정리하였고, 단일물질 소재에 대한 면역관용지수II 값에 대한 분석은 [Figure 1.40-41]에 나타내었다.

(3) 면역관용지수II 값 측정의 특이성

[Figure 1.39]

종래에는 수지상세포에 대한 소재의 효과를 시험관 수준에서 평가할 때 소재처리에 의한 각 자극인자와 억제인자들의 발현량을 비교하는 방법을 사용하였다. 도 5에 위 검증테스트에 사용된 소재들에 의한 각 인자들의 발현량과 면역관용지수II 관계를 도시하였다.

도시된 바와 같이, 예를 들면 자극인자 CD40의 발현량이 상대적으로 많은 차가버섯과 후코이단이 CD40의 발현량이 상대적으로 아주 적은 스피루리나, 다래추출물과 비슷한 면역관용지수 II 값을 보이면서 면역관용 효과를 보이고 있다. 면역증진 효과가 잘 입증되어 인증된 소재인 후코이단, 청귤다당, cold-fX 등이 오히려 면역관용 효과가 높은 북강활, 구아바잎추출물, 다래추출물, 스피루리나보다 면역억제인자 PD-L1의 발현량이 훨씬 많음을 관찰할 수 있다. 즉, 기존의 각 자극인자와 억제인자들의 개별적 발현량 측정값과 소재의 면역특성(면역관용지수 II)은 상관관계를 보이지 않는다.

따라서 종래와 같이 소재처리에 의한 각 자극인자와 억제인자들의 발현량을 개별적으로 단순 비교하는 방법으로는 소재들의 상대적인 면역능을 예측하고 동물실험모델을 설계하는데 적합하지 않음을 확인할 수 있다.

다. 면역능 등급화

1. 표준면역식품소재 면역능 등급 산출 및 heatmap 완성

표준 면역식품소재들 면역증진지수와 면역관용지수값을 얻어 표에 표기된 것처럼 Figure 1.42] 각각 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 나누고, 최상, 상, 중, 하 각 등급에 대해 면역증진지수에는 30, 20, 10, 0 각각 그래프값을 부여하고, 면역관용지수에는 -30, -20, -10, 0 각각 부여하여 그래프로 나타내었다. 각 표준 면역식품소재들의 두 종류의 면역증진지수값을 모두 더하여 2로 나누고 반올림하여 10단위로 만들어 면역증지수 값이 30, 20, 10, 0중에 한 값을 가질 수 있도록 하고, 이들 면역증진지수값을 면역관용지수값과 합하여 각 소재들의 면역능 등급을 얻었다.[Figure 1.43]

표준 면역식품소재들의 면역지수별 등급 heatmap을 만들기 위해 면역증진지수값 (빨간색) 과 면역관용지수값 (파란색)의 각 등급에 따라 다른 세기를 나누어 크게 각각

4등급을 표시하였다. 그리고 각 등급은 Figure 1.43의 등급값을 사용하였다 [Figure 1.44]

면역증진효과를 보이는 것으로 상품화, 특허 등의 인정과정을 거친 면역증진소재들가운데 후코이단, 청귤다당, 홍삼농축액은 본 신기술에 의하면 최상의 면역능등급을 보이고 있고, Cold-fX, 차가버섯, 한라봉다당은 상 등급, 표고버섯균사체는 중 등급의 면역증진등급을 보여주고 있다. 면역개선효과로 인증받은 소재들가운데 북강활이 최상, 구아바잎추출물, 식방풍, 아삼이 상, 웰뮨과 다래추출물이 중 등급의 면역관용효과, 스피루리나는 하 등급을 보여주고 있다. 면역증진소재로 인증받은 웰뮨과 스피루리나는 면역관용과 면역증진 효과 모두를 가질 가능성이 있음을 현 신기술 평가결과에서 볼 수 있다.

2. 단일물질 소재 면역능 등급 산출 및 heatmap 완성

Figure 1.45-47

1.5. 시험관내 면역능 평가 시스템 확립

가. 수지상세포기반 시험관내 면역능 평가법

1. 대상 소재 추출물의 준비
2. 수지상세포의 준비 및 면역소재 처리
3. 유세포분석
    (1) 세포독성 평가
    (2) 수지상세포 활성화 표지분자들의 세포면 발현 측정
4. 면역능 지수 (면역증진지수I,II & 면역관용지수I, II) 수치화 및 등급화
5. 면역식품소재 면역능 등급 산출

나. 우수 면역식품소재의 개발

개발 면역식품소재들에 대해 각각 면역증진지수I (그림J), 면역증진지수II (그림K), 면역관용지수I (그림L), 면역관용지수II (그림M) 값을 구하고 각 지수값을 기준으로 등급을 설정하고, 각 면역식품소재들의 면역능 등급을 그래프(그림N), 와 heatmap(그림O)으로 나타내어 표준 면역식품소재들과 비교하여 각 개발 소재들의 면역능을 측정하였다.

1) 각 면역지수의 수치화 과정

면역지수 산출을 위한 개발 면역소대들에 대한 구획나누기 결과
-Supplementary Figure 1.5-1.8
각 면역지수 값 수치화
-Figure 1.48-51

2) 각 면역지수 통합을 통한 면역능 지수 등급 산출

Figure 1.52

3) 각 면역지수와 면역능 지수 등급의 HEATMAP

Figure 1.53

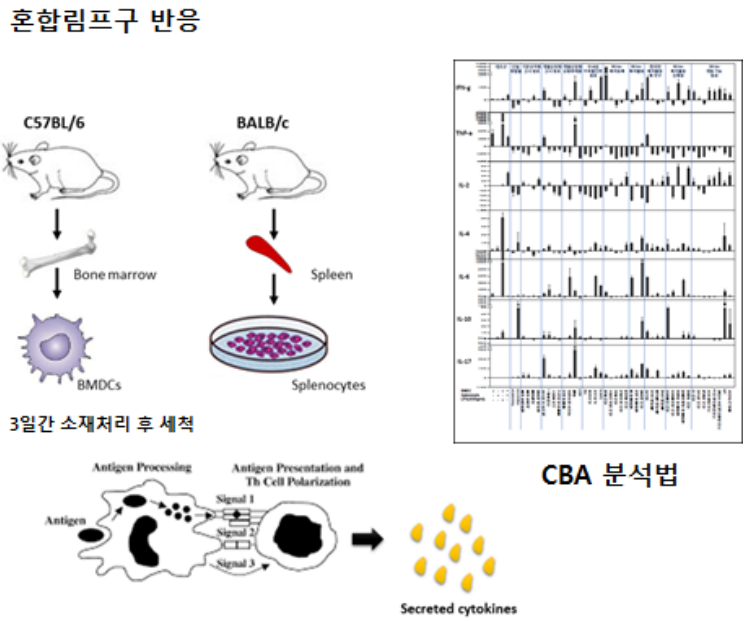
다. 면역식품소재의 T 세포 분화 유도능 평가

1) 혼합림프구 반응을 통한 T helper 세포 분화 조절 능력 측정

[Figure 1.54-55]

각 면역소재들로 처리된 골수유래 수지상세포를 동종이계 마우스의 비장세포들과 혼합 배양하여 수지상세포에 의해 유도되는 일정한 방향성의 싸이토카인 생성 패턴과 정도를 측정하여 면역식품소재가 가질 수 있는 면역기능을 조사한다. Th1, Th2, Th17, Treg등 각 helper T cell 그룹들은 특이적 싸이토카인들을 생상하므로 생성된 싸이토카인 농도 변화를 측정하면 각 면역시료가 T helper 세포 분화에 미치는 영향을 검사할 수 있다.

각 시료들에 따라 Th1, Th2, Th17, Treg 각 helper T cell 그룹 특이적 싸이토카인들을 강하게 생산하는 조합이 있음을 볼 수 있다. 식품소재 처리 수지상세포에 의해 유도되는 T helper 세포 분화에 특정한 방향성을 가질 수 있음을 잘 보여주고 있다. 이렇게 생성된 싸이토카인들의 양을 싸이토카인 비즈 분석법(Cytokine Bead Array, CBA)을 통해 측정하게 된다. [그림 P & Q]. 면역식품소재에 의한 T helper 세포 분화 방향과 정도를 측정함으로써 각 소재의 효과를 가장 잘 증명할 수 있는 동물실험 및 인체실험을 가이딩할 수 있는 객관적인 자료로 사용될 수 있다.



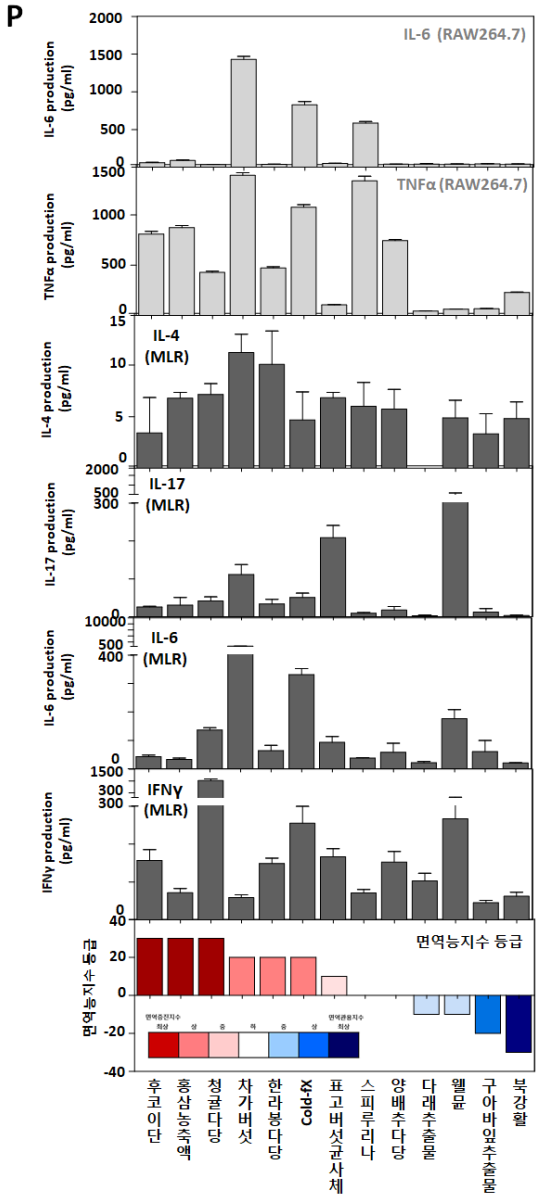
2) 대식세포 싸이토카인 생성능과 비교 분석

[Figure 1.56-57]

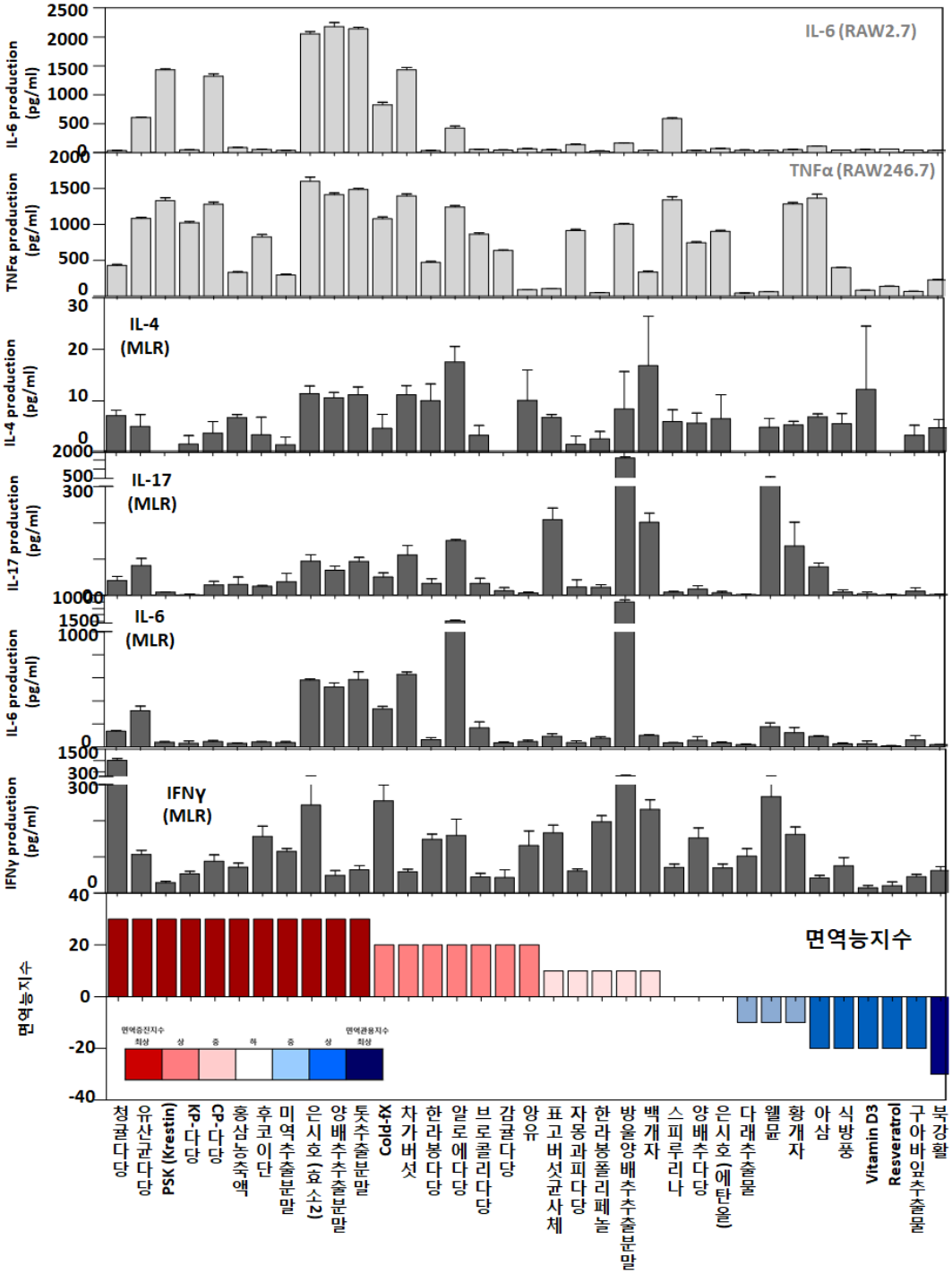
면역세포중 하나인 대식세포 (macrophage)는 외부에서 침입된 세균이나 박테리아등에 반응하여 다량의 염증성사이토카인을 분비하고, 잡아서 소화시킴으로써 제거하는 기작이 잘 알려져 있다. 대식세포에서 외부물질에 의한 반응이 빠른 시간 내에 유도되면, 과한 면역 반응이나 염증을 억제하고 보다 빨리 항상성을 유도할 수 있으므로, 좋은 항염증 물질로 여길 수 있다. 대식세포에서 주로 분비되는 염증성 사이토카인으로는 Interleukin-6 (IL-6)와 Tumor

Necrosis Factor alpha (TNF-α), IL-10, IL-1β등이 알려져 있으며, 이들은 대식세포의 면역증진마커로 여겨진다. 따라서 본 실험에서는 마우스 대식세포 세포주인 RAW264.7을 이용하여 다양한 소재의 처리에 따른 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF-α의 세포 밖 분비량을 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 기법으로 측정하였다.

◆[그림 P & Q] 설명 가) 대식세포주와 혼합림프구 반응에서의 표준 면역식품소재에 의한 싸이토카인 생성, 나) 대식세포주와 혼합림프구 반응에서의 개발 면역식품소재에 의한 싸이토카인 생성. 회색 그래프: 대식세포주, 검정색 그래프: 혼합림프구



Q


IL-6 (RAW2.7)
IL-6 production (pg/ml)
TNFα (RAW246.7)
TNFα production (pg/ml)
IL-4 (MLR)
IL-4 production (pg/ml)
IL-17 (MLR)
IL-17 production (pg/ml)
IL-6 (MLR)
IL-6 production (pg/ml)
IFNγ (MLR)
IFNγ production (pg/ml)
면역능지수
면역능지수
청귤다당
유산균다당
PSK (Krestin)
Xp·다당
Cp·다당
홍삼농축액
후코이단
미역추출분말
은시호 (효 소2)
양배추추출분말
토츠추출분말
Xp-pro
차가버섯
한라봉다당
알로에다당
브로콜리다당
감귤다당
양유
표고버섯균사체
자몽과피다당
한라봉폴리페놀
방울양배추추출분말
백개자
스피루리나
양배추다당
은시호 (에탄올)
다래추출물
웰뮤
황개자
아삼
식방풍
Vitamin D3
Resveratrol
구아바잎추출물
북강활

3) 면역식품소재에 대한 시험관내 검사법의 발전 방향

대식세포에 대한 싸이토카인 생성능은 기존의 면역식품소재에 의한 면역학적 특성을 판별하는데 주로 사용되어 왔다. 결과에 보면 면역증진소재들은 많은 경우 염증성 싸이토카인을 생성하는 것을 볼 수 있고, 면역관용소재들은 염증성 싸이토카인 생성이 아주 약함을 볼 수 있어 수지상세포와 T 세포 혼합배양에 의한 혼합림프구 반응 결과와 많은 경우 같은 면역학적 방향성을 가질 수 있음을 보여준다. 하지만 대식세포주와 수지상세포에 대해 한 종류의 세포에 치우친 특이적인 영향을 주는 소재들도 많이 있음을 보여주어 대식세포와 수지상세포가 함께 시험관내 면역능평가법에 이용될 경우 개발식품소재에 대한 훨씬 온전한 면역학적 특성을 가질 수 있음을 볼 수 있다.

다. 시중 유통되는 홍삼류 및 후코이단 식품소재들 (제조사별) 비교분석 – 적용사례

[Figure 1.58-67]

개별인증 등의 형태로 인증된 면역식품소재의 경우에도 시중 유통되는 면역식품소재들의 경우 같은 혹 비슷한 원료로 제작되었다 할지라도 면역능 검사결과는 아주 다양한 양상을 디고 있음을 볼 수 있다.

현 개발 시험관내 검사법은 면역식품소재 품질평가법으로 다양하게 응용될 수 있음을 볼 수 있다.

1.6. 시험관내 면역능 검사법 유효성 평가

1. 동물모델을 통한 유효성 검증

면역관용지수 “최상”등급의 북강할은 두 가지 동물모델, 즉 Th1&17형 만성염증 동물모델과 Th2형 알레르기 동물모델에서 모두 항염증효과 및 과민면역개선 효과를 보였다. 면역관용지수 “상”등급의 아삼도 두 모델 모두에서 개선효과를 보였고, 구아바는 Th1&17형 만성염증 개선효과를, 식방풍은 Th2형 과민면역 개선효과를 보였다. 면역관용지수 “중” 등급의 황개자와 다래는 Th2형 과민면역 개선효과 보이지 않았다. 면역관용지수 “하” 등급의 경우에는 면역증진지수 등급이 무엇인지, 그리고 사이토카인 생성 및 T helper 분화 방향성이 무엇인지에 결정되는 양상을 보였다. 이처럼 면역증진지수와 면역관용지수를 통한 면역식품소재 등급 평가는 동물모델을 통한 유효성 평가에서 놀라운 적합성을 보였다.

■ 항감염 동물모델

1) CTX 처리 면역저하 동물모델

□ 면역증진지수 “최상” 등급

◦ 한라봉 다당 면역증진효과

◦ 청귤다당 면역증진효과

2) 인플루엔자 항감염 동물모델

□ 면역증진지수 “최상” 등급

◦ 당근박 다당 항감염 효과

◦ 청귤다당 항감염효과

■ Th1&17형 만성염증 동물모델을 통한 시험관내 면역능평가기술 유효성 평가

□ 면역관용지수 “상” 등급

◦ 아삼 Th1&17형 만성염증 개선효과

◦ 구아바 Th1&17형 만성염증 개선효과

□ 면역관용지수 “하” 등급

◦ 스피루리나 Th1&17형 만성염증 개선효과 보이지 않음

◦ 표고버섯균사체 Th1&17형 만성염증 개선효과 보이지 않음

■ Th2형 알레르기 동물모델을 통한 시험관내 면역능평가기술 유효성 평가

□ 면역관용지수 “최상” 등급

◦ 북강할 Th2형 과민면역 개선효과

□ 면역관용지수 “상” 등급

◦ 아삼 Th2형 과민면역 개선효과

◦ 식방풍 Th2형 과민면역 개선효과

□ 면역관용지수 “중” 등급

◦ 황개자 Th2형 과민면역 개선효과 보이지 않음
◦ 다래 Th2형 과민면역 개선효과 보이지 않음

□ 면역관용지수 “하” 등급

◆ 면역증진지수 “최상” 등급
◦ 은시호(효소) Th2형 과민면역 개선효과 (Th1형 면역반응)
◦ 청귤다당 Th2형 과민면역 개선효과 (Th1형 면역반응, 강한 IFNg 생성)
◦ 후코이단 Th2형 과민면역 개선효과 보이지 않음 (대식세포 TNFα 생성 유도)

◆ 면역증진지수 “상” 등급
◦ 양유 Th2형 과민면역 개선효과 (Th1형 면역반응)

◆ 면역증진지수 “중” 등급
◦ 표고버섯균사체 Th2형 과민면역 개선효과 보이지 않음

◆ 면역증진지수 “하” 등급
◦ 은시호 Th2형 과민면역 개선효과
◦ 스피루리나 Th2형 과민면역 개선효과
◦ 양배추다당 Th2형 과민면역 개선효과

Table 1.
Chronic autoimmune model of Collagen induced arthritis(CIA)
(Th1&17형 만성염증모델)
[첨부자료6] 페이지 159-160

Strain/Gender: DBA/1, Female
Sensitisation/Allergen: Collagen+CFA, Bovine Type2 collagen
Exposure/challenge: Collagen (s.c.) on day 0-21
Responses to challenge:
관절염 1.관절변형 증가 2.발등 부종 증가
혈장내 1.IgG 증가 2.colallagen specific IgG 증가

면역식품소재	**반응**	**Th1&17형 만성염증 개선능**
		in vitro 평가 타당성 분석
스피루리나 (Spirulina)	효과없음	효과 없음
		면역증진지수-하 면역관용지수-하
표고버섯 균사체	효과없음	효과 없음

(Lentinula edodes)		면역증진지수-중 면역관용지수-하
아삼 (Anthriscus sylvestris Hoffm)	관절염 1.관절변형 감소 혈장내 1.IgG 감소 2.collagen specific IgG 감소	만성염증 완화
		면역증진지수-하 **면역관용지수-상**
구아바 (Psidium guajava)	관절염 1.관절변형 감소 혈장내 1.IgG 감소	만성염증 완화
		면역증진지수-하 **면역관용지수-상**

Table 2.

Acute model of allergic lung inflammation

(Th2형 알레르기 동물모델)

A. Strain/Gender: Balb/c, Female

Sensitisation/Allergen: OVA+Alum, OVA

Exposure/challenge: OVA (i.n.) on day 14-17

Responses to challenge:

폐기도세척액내

1.염증세포(호산구) 증가 2. IL-4, 5, 13 증가, 3.IgE 증가

폐조직내 1.활성화된 도움 T 세포 증가

면역식품소재	**반응**	**Th2형 과민면역 개선능** **in vitro 평가 타당성 분석**
백개자 (White mustard seeds)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소	효과 없음
		면역증진지수-중 면역관용지수-하
황개자 (Yellow mustard seeds)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소	효과 없음
		면역증진지수-하 면역관용지수-중

B. Strain/Gender: Balb/c, Female

Sensitisation/Allergen: OVA+Alum, OVA

Exposure/challenge: OVA (i.n.) on day 15-18

Responses to challenge:

폐기도세척액내

1.염증세포(호산구) 증가 2. IL-4, 5, 13 증가, 3.IgE 증가

폐조직내 1.활성화된 도움 T 세포 증가

면역식품소재	반응	Th2형 과민면역 개선능
		in vitro 평가 타당성 분석
양유(더덕) (Codonopsis lanceolata)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소 2. IL-4, 5, 13 감소 3.IgE의 감소 폐조직내 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	과민면역 완화
		면역증진지수-상 면역관용지수-하
은시호 (Stellaria dichotoma var. lanceolata Bge)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소 2. IL-4, 5, 13 감소	과민면역 완화
		면역증진지수-하 **면역관용지수-하**

C. Strain/Gender: C57bl/6, Female

Sensitisation/Allergen: OVA+Alum, OVA

Exposure/challenge: OVA (i.n.) on day 14-17

Responses to challenge:

폐기도세척액내

1.염증세포(호산구) 증가 2. IL-4, 5, 13 증가, 3.IgE 증가

폐조직내 1.활성화된 도움 T 세포 증가

면역식품소재	반응	Th2형 과민면역 개선능
		in vitro 평가 타당성 분석
다래 (Actinidia argute)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소	효과 없음
		면역증진지수-하 면역관용지수-중
후코이단 (Fucoidan)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소	효과 없음
		면역증진지수-최상 면역관용지수-하
은시호	vehicel군 대비 폐기도세척액내	과민면역 완화

효소처리 (Stellaria dichotoma var. lanceolata Bge)-treated with enzyme	1.염증세포(호산구) 감소 폐조직내 1.억제T세포 증가	**면역증진지수-최상** 면역관용지수-하
양배추 다당 (polysaccharides from Brassica oleracea var. capitate)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소 폐조직내 1.억제T세포 증가	과민면역 완화 **면역증진지수-하** **면역관용지수-하**

D. Strain/Gender: Balb/c, Female
Sensitisation/Allergen: OVA+Alum, OVA
Exposure/challenge: OVA (i.n.) on day 13-16
Responses to challenge:

폐기도세척액내

1.염증세포(호산구) 증가 2. IL-4, 5, 13 증가, 3.IgE 증가

폐조직내 1.활성화된 도움 T 세포 증가

면역식품소재	반응	Th2형 과민면역 개선능 in vitro 평가 타당성 분석
표고버섯 균사체 (Lentinula edodes)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.IL-13 감소	효과 없음 면역증진지수-중 면역관용지수-하
스피루리나 (Spirulina)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소 1.IL-5, 13 감소	과민면역 완화 **면역증진지수-하** **면역관용지수-하**
청귤다당 (polysaccharides from immature fruit of Citrus unshiu S. Marcov.)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소 2.IL-13 감소	과민면역 완화 **면역증진지수-최상** 면역관용지수-하
양배추 다당 (polysaccharides from Brassica oleracea var. capitate)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.IL-13 감소 2.IgE의 감소	과민면역 완화 **면역증진지수-하** **면역관용지수-하**
식방풍 (Peucedanum japonicum)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소 2.IL-4, 5, 13 감소 3.Mucus 분비 감소	과민면역 완화 면역증진지수-하 **면역관용지수-상**

	폐조직내 1.활성화된 도움 T 세포의 감소	
아삼 (Anthriscus sylvestris Hoffm)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소 2.IL-4, 5, 13 감소 3.Mucus 분비 감소 폐조직내 1.활성화된 도움 T 세포의 감소	과민면역 완화 면역증진지수-하 **면역관용지수-상**
강활(북강할) (Ostericum koreanum (OK)Maximowicz)	vehicel군 대비 폐기도세척액내 1.염증세포(호산구) 감소 2.IL-4, 5, 13 감소 3.Mucus 분비 감소 폐조직내 1.활성화된 도움 T 세포의 감소	과민면역 완화 면역증진지수-하 **면역관용지수-최상**

TABLE 3. In vitro - in vivo 소재별 결과 비교 분석 및 타당성 평가

소재	선정 이유	In vitro (충남대)					In vivo (한의연)		타당성 분석
		Th cell (CBA)	Immuno genic Index I	Immuno genic Index II	Tolero genic Index I	Tolero genic Index II	평가모델	결과	
클로렐라	기준규격형	특징X	low	low	high	high	만성염증 (Th1, Th17형)	진행중 (특징없음)	진행중
표고버섯 균사체	개별인정형	IL2, IL6, IFNg, IL17, TNF	med	med	med	med	과민면역 (Th2형)	효과없음	적합
							만성염증 (Th1, Th17형)	진행중 (특징없음)	진행중
스피루리나	개별인정형	특징X	low	low	high	high	과민면역 (Th2형)	과민면역완화	적합
							만성염증 (Th1, Th17형)	진행중 (특징없음)	진행중
구아바	개별인정형	특징X	low	low	high	high	만성염증 (Th1, Th17형)	염증완화	적합
다래	개별인정형 + 상품화	IL-2, TNF	low	low	high	med	과민면역 (Th2형)	효과없음	부적합

후코이단	국내외 주목원료	큰 특징없음	med	med	med	med	과민면역 (Th2형)	효과없음	적합
청귤다당	BK bio 특허소재	IFN-g 유도 (Th1)	high	high	low	med	과민면역 (Th2형)	과민면역완화	적합
양배추 (효소)	BK bio 특허진행	IFN-g 유도 (Th1)	high	high	low	low	과민면역 (Th2형)	과민면역완화	적합
양배추 (다당)	BK bio 특허진행	IFN-g, IL-2 (Th1)	low	low	high	med	과민면역 (Th2형)	과민면역완화	적합
은시호 (EtOH)	한의연 우수소재	IFN-g, IL-4, IL-17a 유도 (Th1, 2, 17)	low	low	med	med	과민면역 (Th2형)	과민면역완화	적합
은시호 (효소2 추출)	한의연 우수소재 + BK bio 가공	결과없음	high	high	low	low	과민면역 (Th2형)	과민면역완화	적합
아삼 (EtOH)	한의연 우수소재	IL-2 유도	low	low	high	high	과민면역 (Th2형)	과민면역완화	적합
							만성염증 (Th1, Th17형)	진행중 (특징없음)	진행중
북강활 (EtOH)	한의연 우수소재	IL-4, IL-17a (Th2, Th17)	low	low	high	high	과민면역 (Th2형)	과민면역완화	적합
식방풍 (EtOH)	한의연 우수소재	결과없음	low	low	high	high	과민면역 (Th2형)	과민면역완화	적합
양유(더덕) (EtOH)	한의연 우수소재	IL-2, IL-4 (Th2)	high	med	med	high	과민면역 (Th2형)	효과없음 (고농도 일부효과)	적합
백개자 (EtOH)	한의연 우수소재	결과없음	low	med	med	med	과민면역 (Th2형)	효과없음	적합

황개자 (EtOH)	한의연 우수소재	결과없음	med	high	med	med	과민면역 (Th2형)	효과없음	적합

* NOTE

- Immunogenic한 경향성을 보이는 소재의 경우 감염저항성을 높여 감염모델에서 유효한 작용을 나타낼 것으로 예상됨. 반면에 Tolerogenic한 경향성을 보이는 소재의 경우 과민면역 모델 혹은 만성염증 모델에서 염증반응을 완화하는 작용을 나타낼 것으로 예상됨.
- 과민면역 질환 모델의 경우 Th2 cell (IL-4)의 활성과 밀접한 영향이 있음이 보고되어있음. 기존의 보고를 근거로 판단해 보았을 때 Tolerogenic한 경향성을 보이는 소재이외에도 Immunogenic한 경향성을 보이더라도 Th1(IFN-g) 혹은 Th17(IL-17a) cell로 편중된 소재의 경우 Th2세포를 억제함으로서 과민면역반응을 완화 할 것으로 예상됨.
- 만성염증 질환 모델의 경우 Th1(IFN-g), Th 17(IL-17a) cell의 활성과 밀접한 영향이 있음이 보고되어있음. 기존의 보고를 근거로 판단해 보았을 때 Tolerogenic한 경향성을 보이는 소재이외에도 Immunogenic한 경향성을 보이더라도 Th2 cell(IL-4) 활성으로 편중된 소재의 경우 Th1 및 Th17 세포를 억제함으로서 만성적인 염증반응을 완화 할 것으로 예상됨.
- 상기한 기준으로 판단하였을 때, 세포실험에서 Tolerogenic DC로 유도하는 면역능이 확인된 소재를 과민면역완화 동물실험을 통해 그 타당성을 평가한 결과 평가했던 대부분의 소재에서 (스피룰리나, 양배추 다당, 은시호(EtOH), 아삼, 북강활, 식방풍) 과민면역 조절능을 확인 할 수 있었음.
- 또한 Immunogenic한 DC로 유도하는 면역소재중 DC의 활성능이 Th1 또는 17 cell으로 유도하여 Th2 매개 과민면역을 완화 할 것으로 예상된 소재 3종(청귤 다당, 양배추 효소 처리, 은시호 효소2 추출)이 실제 동물실험에서 과민면역 완화하는 것으로 나타남.
- 뚜렷하게 Immunogenic 또는 Tolerogenic DC로 유도하는 효과가 없었던 소재(표고버섯 균사체, 양유, 백개자, 황개자)의 경우 예상대로 과민면역 동물실험에서 효과를 나타내지 않았음.
- 따라서 세포실험결과와 동물실험결과 15종중에서 14종이 일치된 결과를 확인할 수 있었으므로 개발된 In vitro 면역능 시험법이 타당한 것으로 판단됨.
- 만성염증 모델에 대한 소재의 검증은 진행중에 있으며 세포실험결과 Tolerogenic DC 유도능을 보이는 구아바의 경우 만성염증의 phenotype이 상대적으로 감소하여 결과의 일관성이 있는 것으로 판단되며, 이외의 소재들에서는 별다른 특이점이 아직 나타나지 않음. (실험 진행중)
- 상기의 결과를 종합적으로 분석 하였을때 in vitro상의 면역능 평가법은 소재의 Imunogenic 또는 Tolerogenic DC의 유도 방향성 및 그 DC의 T cell의 differentiation (Th1, Th2, Th17) 유도능 평가를 통해 소재의 면역능을 예측하는데 적절한 것으로 판단됨.

2. 면역능평가기술에 표준소재로 사용된 기존 인정된 소재별 클레임과 면역능지수와의 상관관계

면역증진효과를 보이는 것으로 상품화, 특허 등의 인정과정을 거친 면역증진소재들가운데 후코이단, 청귤다당, 홍삼농축액은 본 신기술에 의하면 최상의 면역능등급을 보이고 있고, Cold-fX, 차가버섯, 한라봉다당은 상 등급, 표고버섯균사체는 중 등급의 면역증진등급을

보여주고 있다. 면역개선효과로 인증받은 소재들가운데 북강활이 최상, 구아바잎추출물, 식방풍, 아삼이 상, 웰뮨과 다래추출물이 중 등급의 면역관용효과, 스피루리나는 하 등급을 보여주고 있다. 면역증진소재로 인증받은 웰뮨과 스피루리나는 면역관용과 면역증진 효과 모두를 가질 가능성이 있음을 현 신기술 평가결과에서 볼 수 있다.
이러한 기존 인정된 소재별 클레임 내용과 면역지수 평가치는 상당한 상관관계를 보이면서 본 시험관내 평가기술은 면역식품소재에 대한 면역능 평가에

Table 1. 국내 기능성 인정 소재들의 정보 수집

구분	원료명	기능성 내용	면역지수	기능(지표)성분/ 규격	제조법
기준규격형	홍삼농축액	면역력 증진에 도움	면역증진 최상	진세노사이드/ Rg1, Rb1 및 Rg3를 합하여 2.5~34 mg/g	(1) 원재료 분말화 (2) 원재료를 물이나 주정으로 추출하여 여과하거나 여과한 후 농축 또는 발효
	알로에 겔	면역력 증진에 도움	면역증진 상	총 다당체/ 총 다당체 30mg/g이상	(1) 원재료의 외피 제거 후 젤 부분을 분리하여 건조, 분말화하여 제조 (2) 원재료의 겔 부분만 분리하도록 분쇄, 여과하거나 착즙한 것 또는 분쇄, 착즙한 후 농축하거나 농축한 것을 건조, 분말화하여 제조
개별인정형	표고버섯균사체	면역력 증진에 도움 (생리활성기능 2등급)	면역증진 중	a-glucan/ 글루칸 3.5~10%	표고버섯균사체 배양액을 알파-아밀라아제, 펙티나아제, 프로테아제를 처리한 후 건조
	스피루리나	면역력 증진에 도움 (생리활성기능 3등급)	면역관용 하	총 엽록소/ 총 엽록소 5mg/g이상	원재료를 열수 추출하고 여과, 농축하여 제조
	다래추출물	과민면역반응 개선에 도움 (생리활성기능 2등급)	면역관용 중	Quinic acid, Citric acid/ -	원재료를 열수 추출하고 여과, 농축하여 제조
	구아바잎추출물 등 복합물	과민면역반응 개선에 도움 (생리활성기능 2등급)	면역관용 상	Ellagic acid, EGCG, Gallic acid/ 총 폴리페놀 250~450 mg/g	녹차잎, 구아바잎, 장미꽃잎 추출물로 이루어진 식물 복합물

*자료 : 면역조절 기능성 식품의 구조 및 작용 (2016)

Table 2. 국외 면역관련 판매 소재들의 정보 수집

구분	원료명	기능성 내용	면역지수	기능(지표)성분/	제조법

		(클레임)		규격	
해 외 주 목 할 원 료	알로에다당	면역력 증진	면역증진 상	총 다당체/ -	원재료를 분리하여 건조
	후코이단	면역력 증진	면역증진 최상		
	Cold-fX	면역력 증진	면역증진 상		
	PSK/PSP	면역력 증진	면역증진 최상	PSP/ -	열수추출

* 자료 : 식품의 면역조절 및 면역력 강화관련 특허 동향 (2001)

Table 3. 개발 면역소재 특허출원

클레임	원료명	기능성분	면역능 등급	비고
면역증진	청귤다당	다당체	면역증진 최상	**특허출원**
	알로에다당	다당체	면역증진 상	**특허출원**
	KP-다당	다당체	면역증진 최상	**특허출원**
	CP-다당	다당체	면역증진 최상	**특허출원**
	한라봉 다당	다당체	면역증진 상	**특허출원**
	감귤 다당	다당체	면역증진 상	**특허출원**
	브로콜리 다당	다당체	면역증진 상	**특허출원**
	양배추출분말	펩타이드	면역증진 최상	**특허출원**
면역개선	북강할		면역관용 최상	**특허출원**

3. 결론

이상과 같은 본 신기술에 의하면 시험관내에서 수지상세포에 소재를 처리하고 면역 자극인자와 억제인자 각각의 발현여부, 발현정도를 확인함으로써 소재의 세포독성 여부 및 정도, 면역특성(indexing), 면역증진 강도 등에 대한 기초정보를 용이하게 획득할 수 있게 된다. 또한 처리된 수지상세포가 생성하는 면역관련 물질들의 발현 비율을 인덱싱하여 소재의 면역성의 특성 및 강도에 따라 소재를 분류하고 서열하는 것이 가능해지므로, 대상소재의 면역특성(면역증강 or 면역관용)과 그 강도를 체계적으로 정립할 수 있게 된다.

또한 본 신기술은 면역식품(소재)의 면역증진을 시험관 수준에서 평가할 수 있도록 면역기능 검사치의수량화 및 등급화를 가능하게 하는 것이다. 이에 의해 종래 알려진 면역식품(소재)의 면역학적 특성을 정확하게 파악할 수 있어 면역식품의 품질 표준화가 가능하게 된다. 또한 본 발명에 의하면 새로운 소재가 면역기능을 가지는 지, 그렇다면 면역증진인지 면역관용인지 그 효과의 정도가 어떤지를 빠르고 정확하게 평가할 수 있으므로 신소재 탐색이 용이해지고, 동물모델에 대한 가이드라인을 제시할 수 있어 새로운 면역기능 소재의 탐색과 검증을 효율적으로 할 수 있게 된다.

1.7. 시험관내 면역능 평가 시스템의 민간보급 프로세스 구축

1. 개발한 면역능 평가 시스템을 웹페이지 및 앱 개발을 통한 민간보급 구축

본 연구결과인 면역능 평가 시스템은 면역효능 건강기능식품 개발 초기단계의 면역 기능성 소재 발굴을 면역증진 및 과민면역 완화 측면의 평가로 통하여 과학적이고 체계적인 제품 개발을 지원할 수 있는 콘텐츠를 담고 있다.

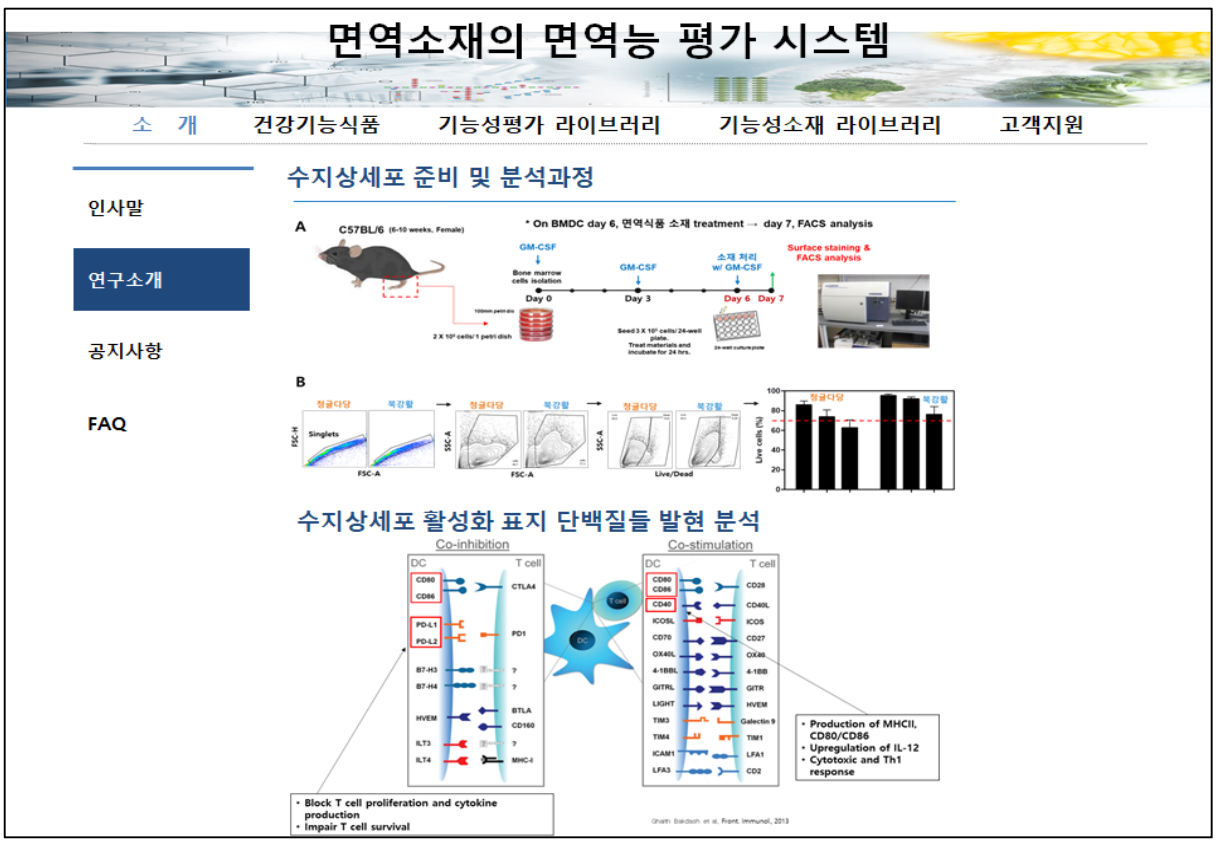
이 연구결과를 활용하여 면역능 우수 식품소재 수집 기업의 면역식품 개발영역 연구효율 증대 및 소비자의 제품 선택과정 신뢰성 향상에 기여할 수 있다.

면역식품(소재)의 면역능을 검사하기 위해서 동물모델 시험을 통해 타당성이 검증된 표준화되고 등급화된 일차 시험관내 검사법들의 평가방법을 지원하고, 민간영역 면역식품(소재) 개발연구의 효율성을 돕기 위해서 확립된 검사법을 웹기반 프로그램과 스마트폰 앱으로 면역능 평가시스템을 구축하여 보급 체계를 마련할 계획이다.

가. 웹페이지 주요 내용

(1) 면역능 평가 시스템 소개

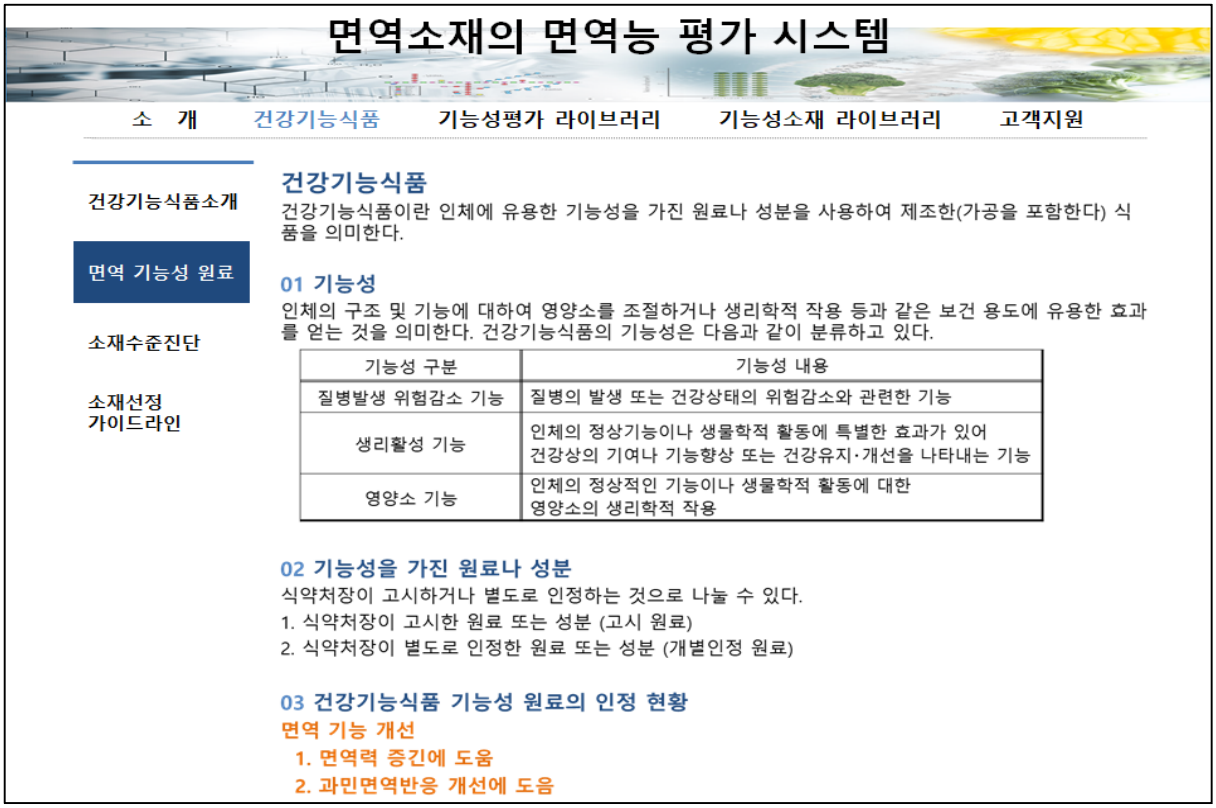
- 시험관내 검사법 및 동물모델 소개
- 시험관내 검사 및 동물모델 절차 안내



(2) 건강기능식품 현황 소개

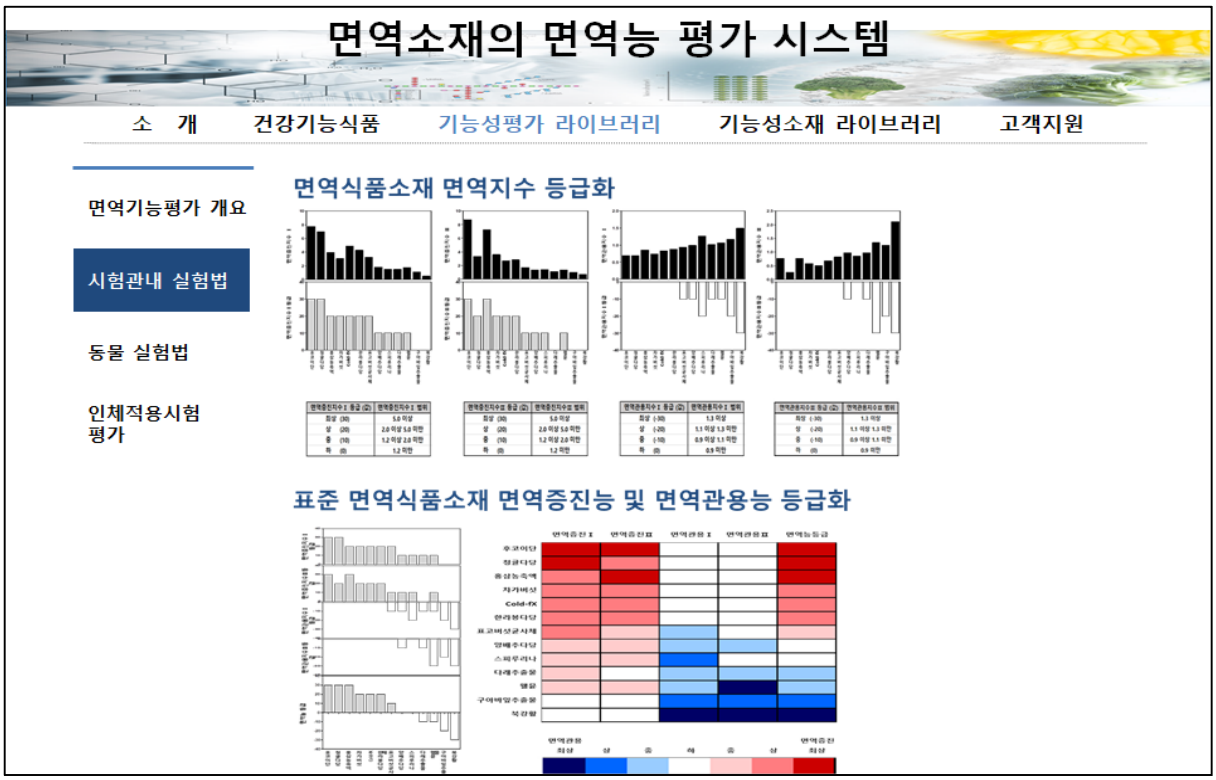
– 식품의약품안전처 '건강기능식품 기능성 원료 인정 현황' 등 건강기능식품 개요 및

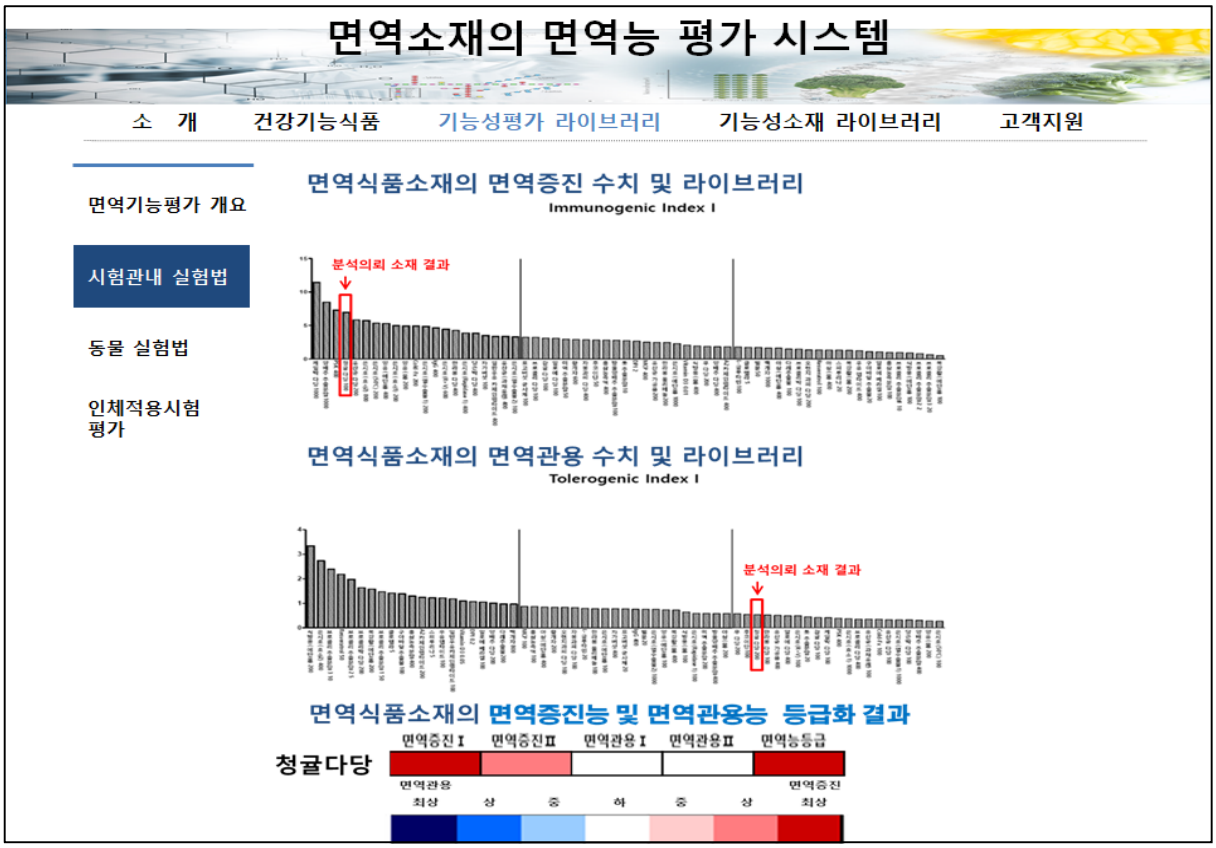
건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 인정 방법을 통한 소재수준 진단 및 소재선정 가이드라인 제시



(3) 면역능 평가시스템을 위한 DB 구축

자료관리 기능 지원을 통한 개발된 면역능 평가 시스템을 통한 면역능 측정 결과를 분석, 마련되는 면역능 평가시스템에서 사용되는 여러 입력 자료와 라이브러리, 지표, 결과 자료 등의 DB를 관리를 통한 소재에 대한 면역 기능성 방향성 및 등급화를 통한 면역능 평가, 건강기능식품 가능성 확인할 수 있다.

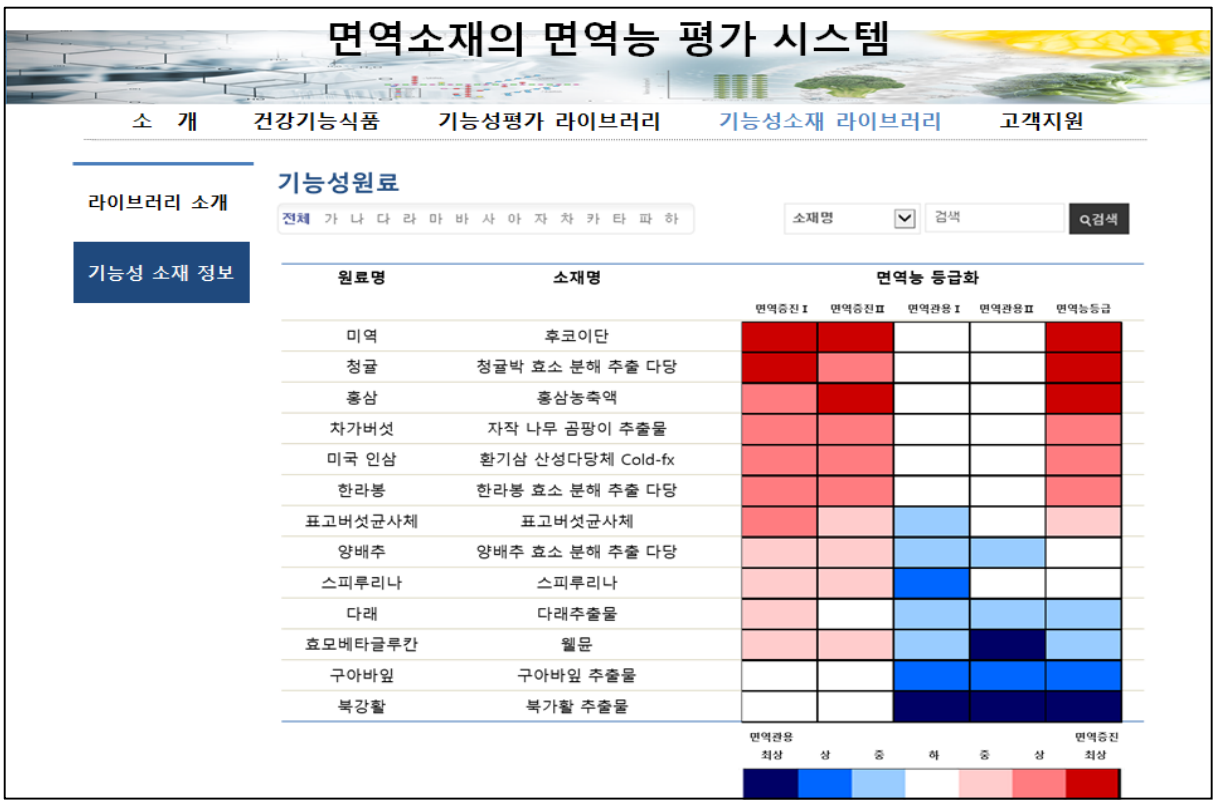




(4) 기능성소재 라이브러리

식품소재의 면역능 평가 연구 자료를 소재별로 구분하고 현재까지 진행된 연구 현황을 진단하여 결과를 소개하는 라이브러리로서 면역 건강기능 식품 제품 개발 전략의 수립에 도움

을 주고자 구축된 데이터베이스이다. 개발 평가법에 의해 면역증진, 면역관용에 따른 등급화를 통한 데이터베이스화 및 연구 자료들을 수집하였다.



(5) 면역능 평가시스템 구축과 배포

- 웹기반 평가 프로그램 개발을 위하여 JSP를 이용한 웹에서 실행가능한 평가 프로그램을 개

발하여 일차 시험관내 검사법의 결과를 도출하고, 동물모델 결과와 비교하여 검증하고 통계 분석할 수 있는 기능 및 프로세스를 지원함

- 기업의 면역식품(소재)의 효율적인 개발을 지원하기 위해 웹기반 평가 프로그램과 동일한 기능의 스마트폰 앱을 개발하여 배포하여 민간 영역의 면역식품(소재) 개발에 활용하도록 함. 스마트폰은 안드로이드 폰과 애플 아이폰 모두 지원 가능하도록 개발함

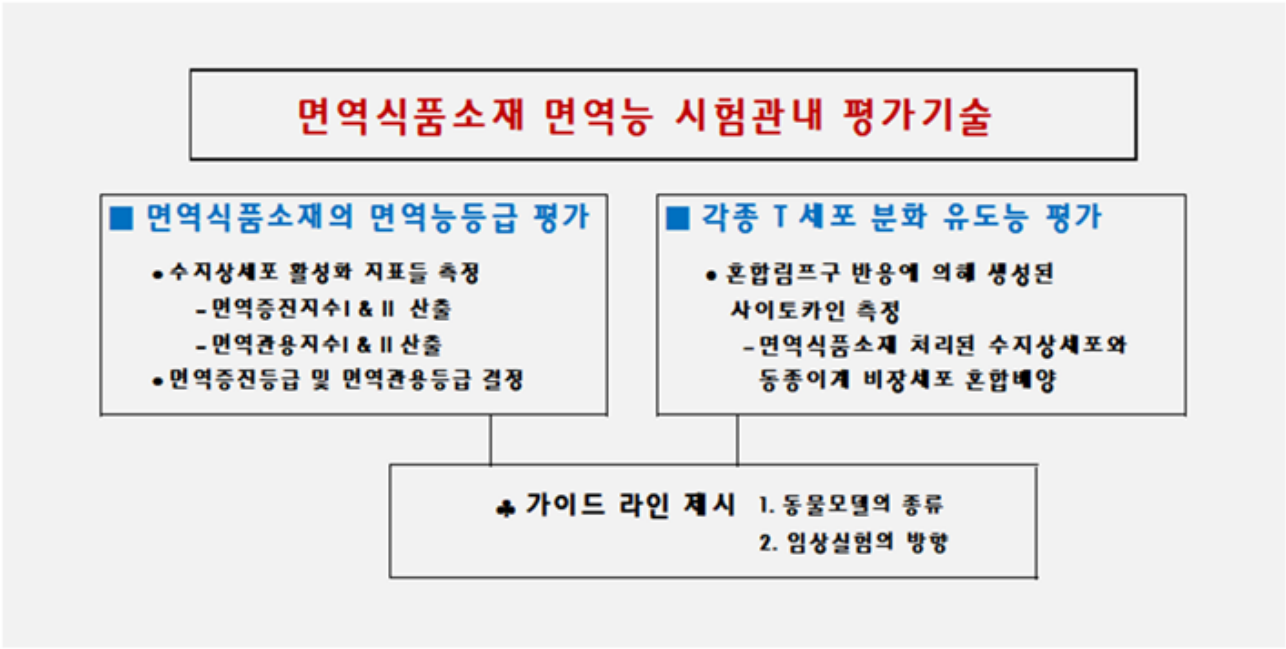
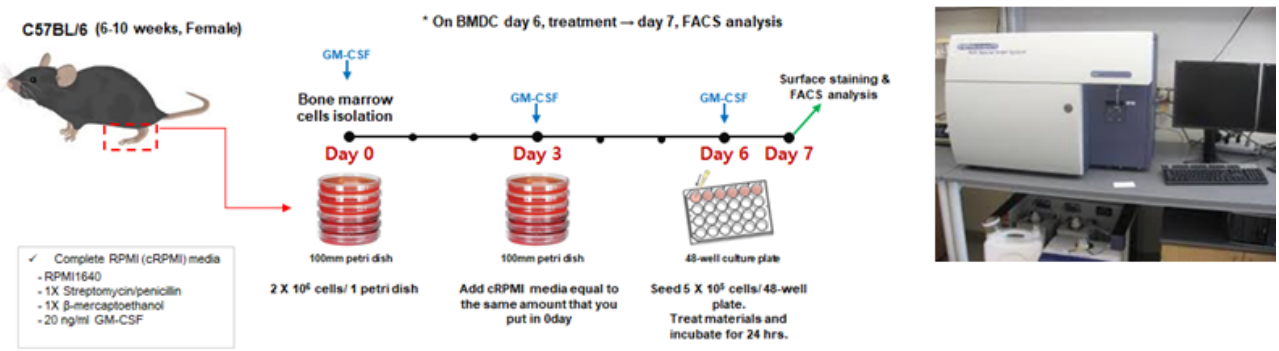


Figure 1.1. 면역식품 소재 면역능 시험관내 평가기술 도해

A



B

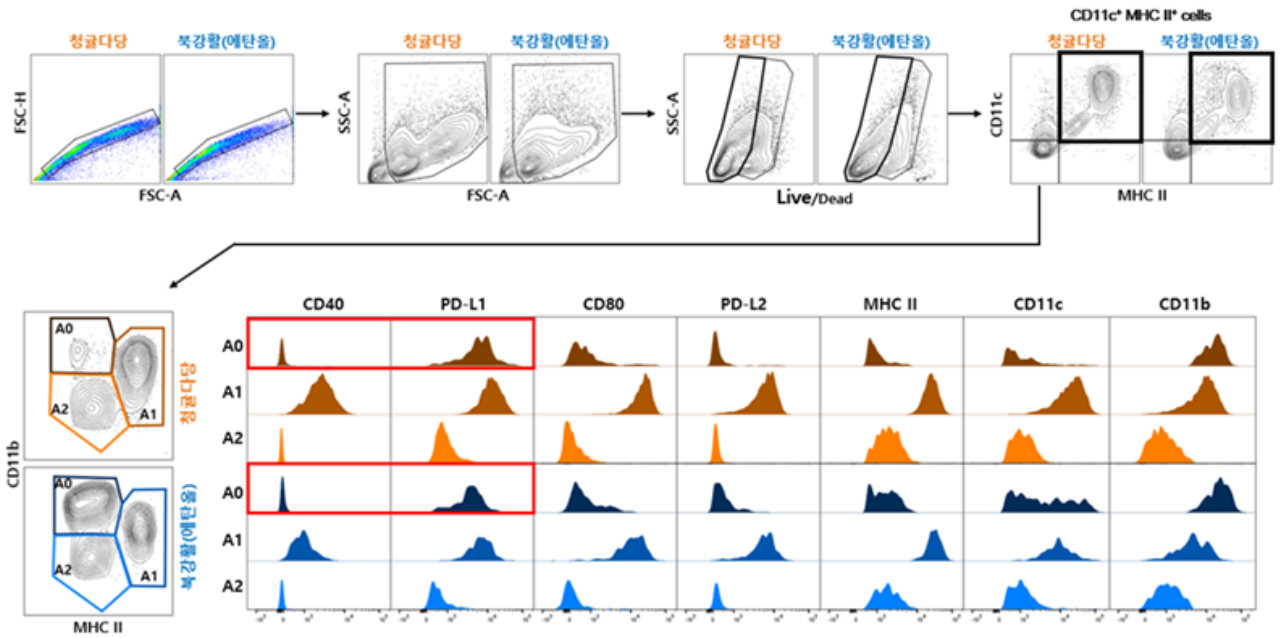


Figure 1.2. 면역식품 소재 면역능 시험관내 평가를 위한 실험과정들

(A) 수지상세포의 준비, 면역식품소재 처리, 및 유세포분석. (B) 세포독성 평가 및 수지상세포 활성화 표지분자들의 발현량 측정.

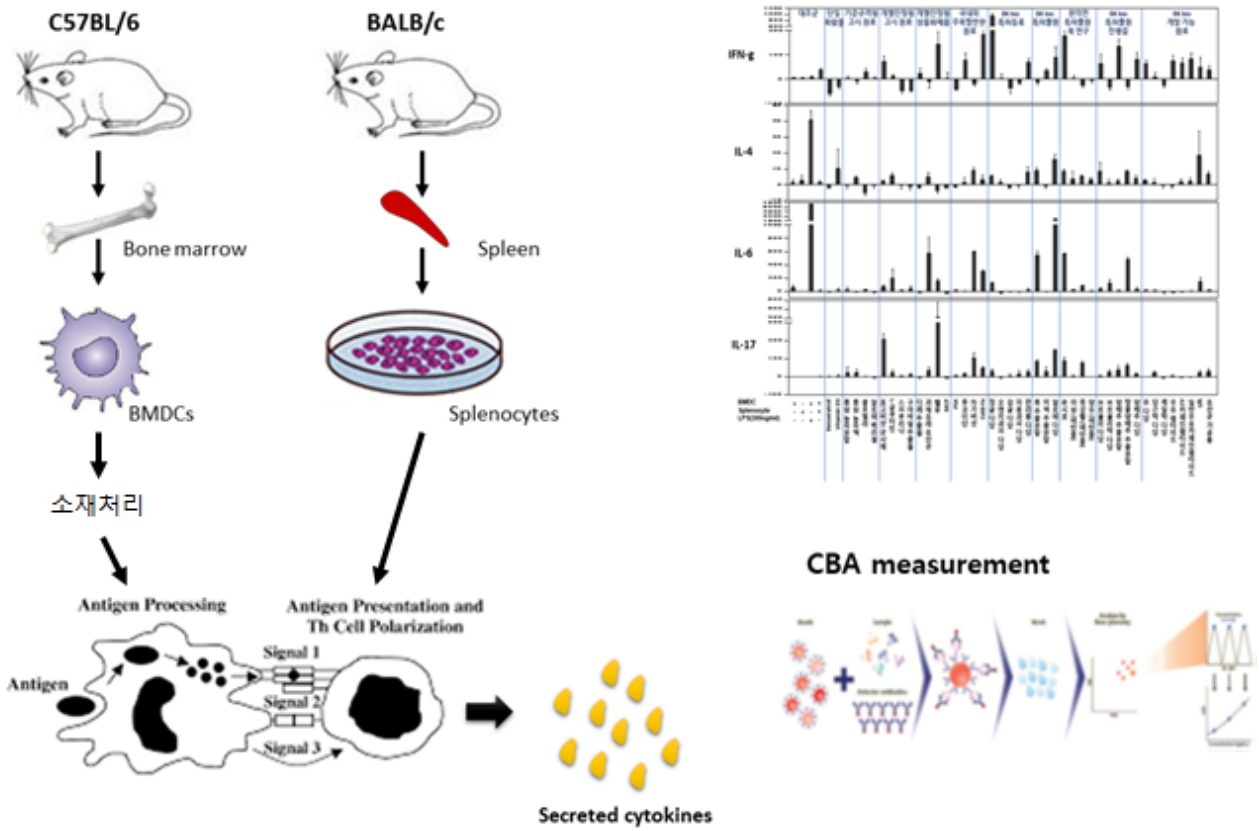


Figure 1.3. 혼합림프구 반응과정 모식도

골수유래 수지상세포에 조건에 맞추어 각 면역소대들을 일정시간 처리하고 처리된 소재는 세척하여 수지상세포들만 따로 동종이계 마우스의 비장세포들과 혼합배양하여 수지상세포에 의해 유도되는 싸이토카인 생성 패턴과 정도를 CBA 분석법으로 측정하였다.

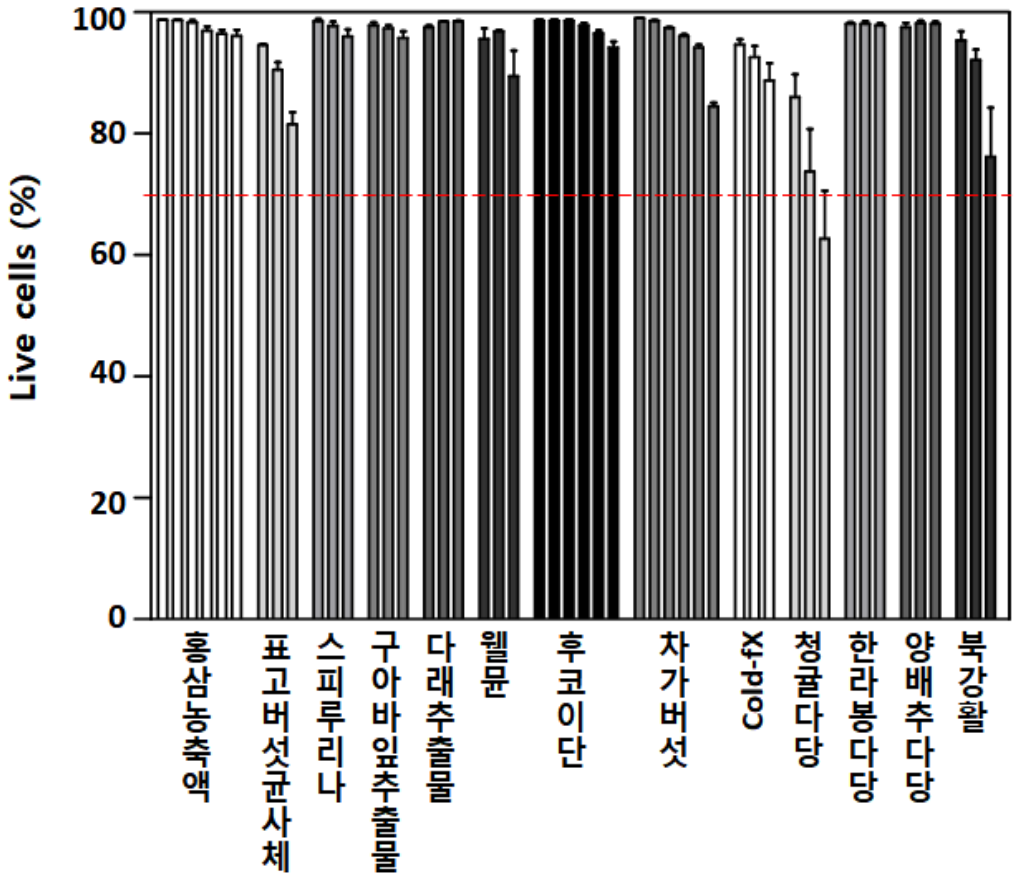


Figure 1.4. 표준 면역식품소재의 처리가 수지상세포의 생존률에 미치는 영향

표준소재의 처리가 수지상세포에 대한 세포독성에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 6일째의 분화된 수지상세포를 48-well culture plate에 3 x 10^5개씩 분주한 후, 각 well에 소재를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 유세포 분석에 이용하였다. Live cells(%)이 70% 이상인 경우를 이 후 분석과정에 포함시켰다.

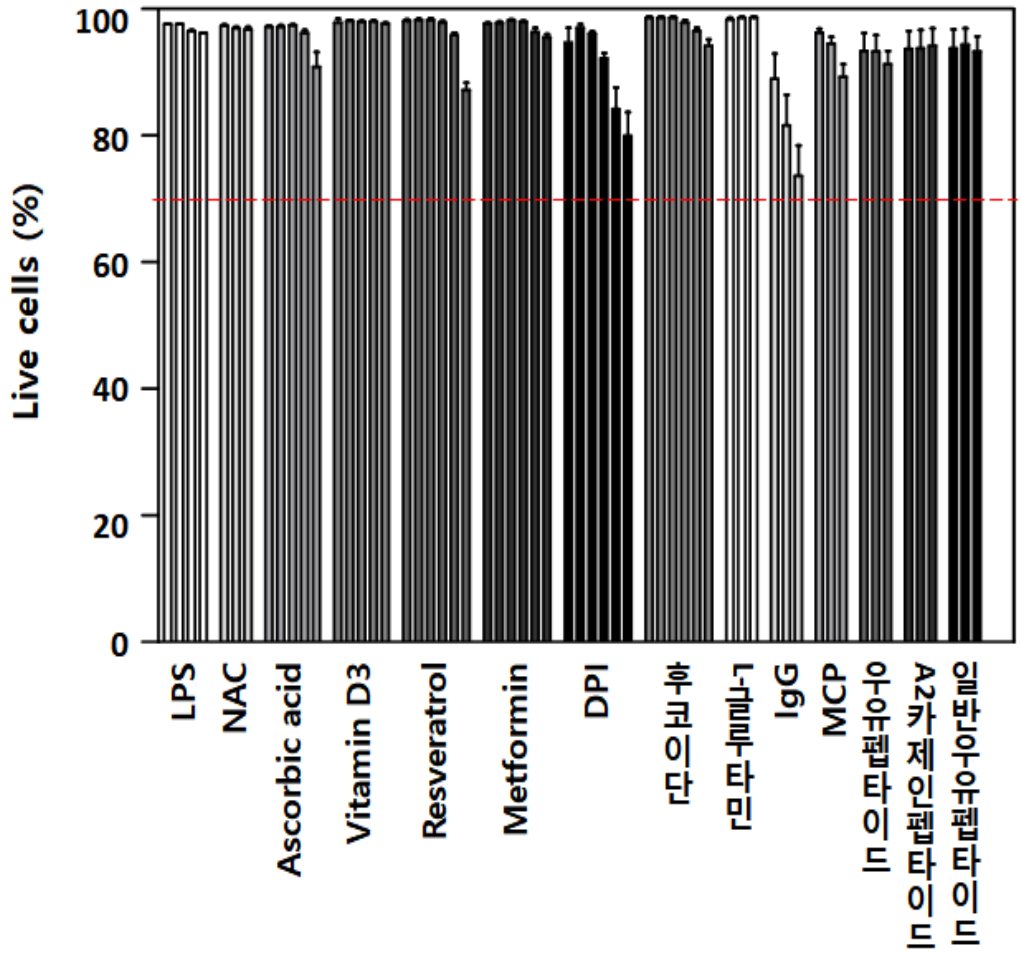


Figure 1.5. 단일물질의 처리가 수지상세포의 생존률에 미치는 영향

단일물질의 처리가 수지상세포에 대한 세포독성에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 6일째의 분화된 수지상세포를 48-well culture plate에 3 x 10^5개씩 분주한 후, 각 well에 소재를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 유세포 분석에 이용하였다. Live cells(%)이 70% 이상인 경우를 이 후 분석과정에 포함시켰다.

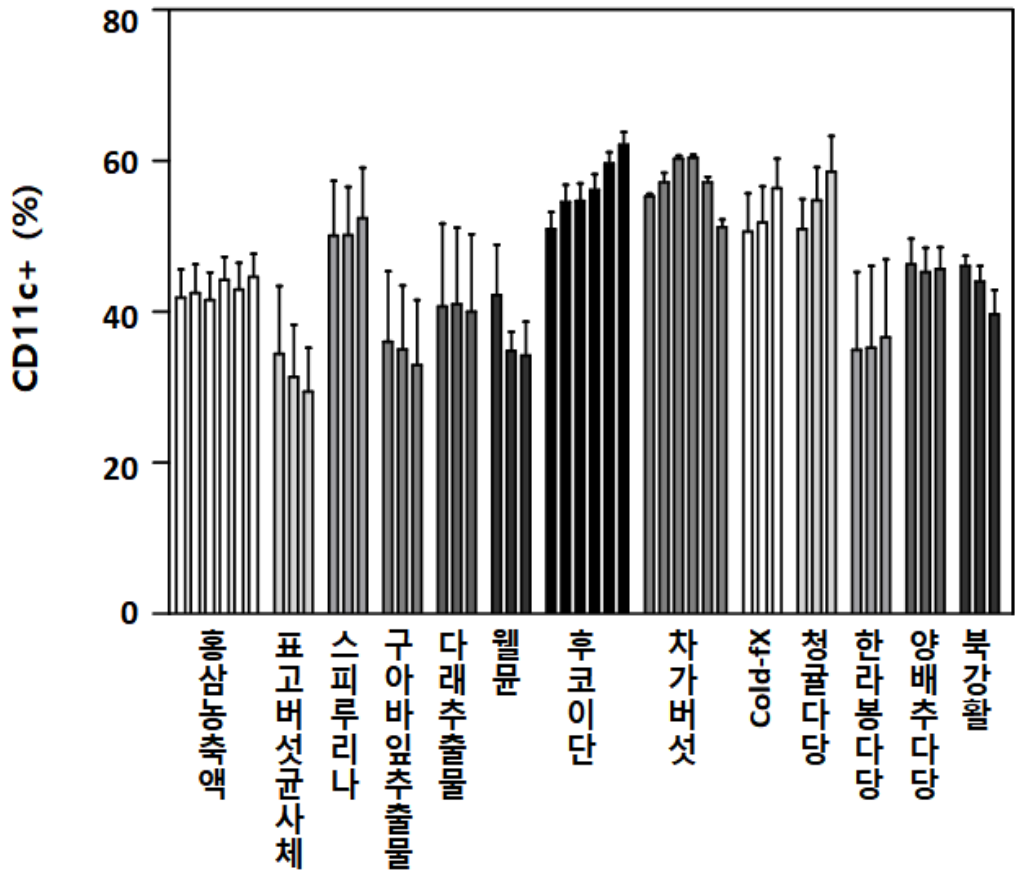


Figure 1.6. 표준 면역식품소재의 처리에 의한 CD11c의 발현 변화

6일째의 분화된 수지상세포에 소재를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 유세포 분석에 이용하였다. Live cells(%)이 70% 이상인 세포에서 수지상세포의 positive marker인 CD11c 발현 정도를 분석하였다.

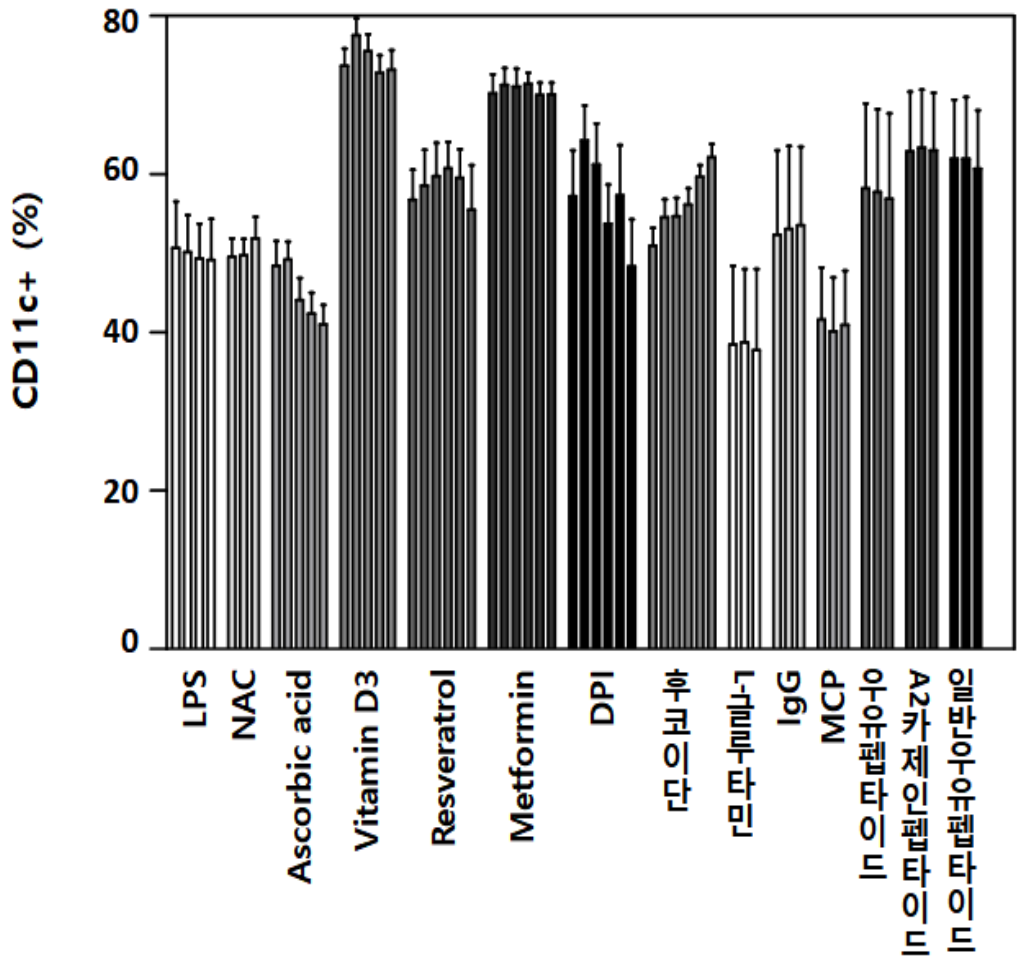


Figure 1.7. 단일물질 처리에 의한 CD11c의 발현 변화

6일째의 분화된 수지상세포에 물질을 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 유세포 분석에 이용하였다. Live cells(%)이 70% 이상인 세포에서 수지상세포의 positive marker인 CD11c를 발현 정도를 분석하였다.

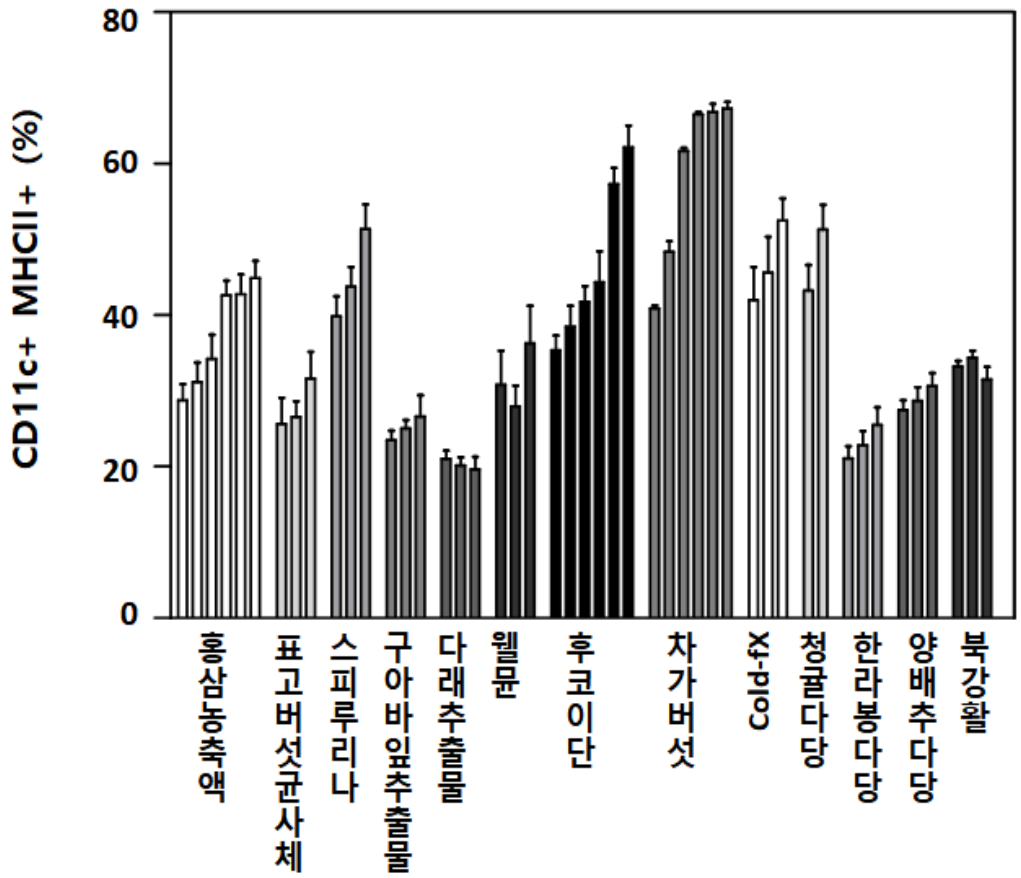


Figure 1.8. 표준 면역식품소재에 의한 CD11c⁺ MHCII⁺ 세포군 구성비 변화

소재 처리에 의한 수지상세포의 성숙 지표 인 MHC II 및 CD11c의 발현 정도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 6일 동안 분화시킨 수지상세포에 각각의 소재들을 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 세포생존율(Live cells)이 70% 이상인 세포에서 MHC II 및 CD11c 둘 다 발현하는 세포들의 구성비를 전체 세포들에 대한 백분율로 분석하였다.

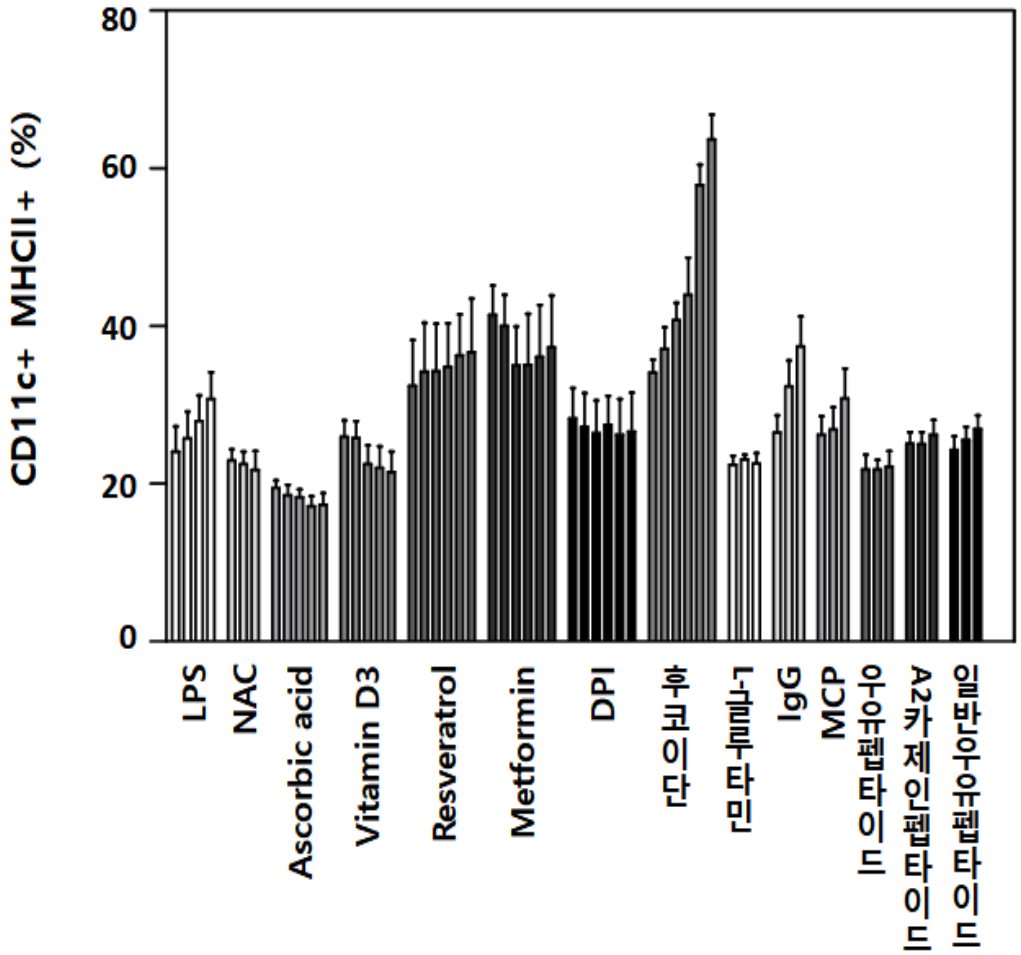


Figure 1.9. 단일물질에 의한 CD11c⁺ MHCII⁺ 세포군 구성비 변화

단일물질이 수지상세포의 성숙 지표 인 MHC Ⅱ 및 CD11c의 발현 정도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 6일 동안 분화시킨 수지상세포에 각각의 소재들을 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 세포생존율(Live cells)이 70% 이상인 세포에서 MHC Ⅱ 및 CD11c 둘 다 발현하는 세포들의 구성비를 전체 세포들에 대한 백분율로 분석하였다.

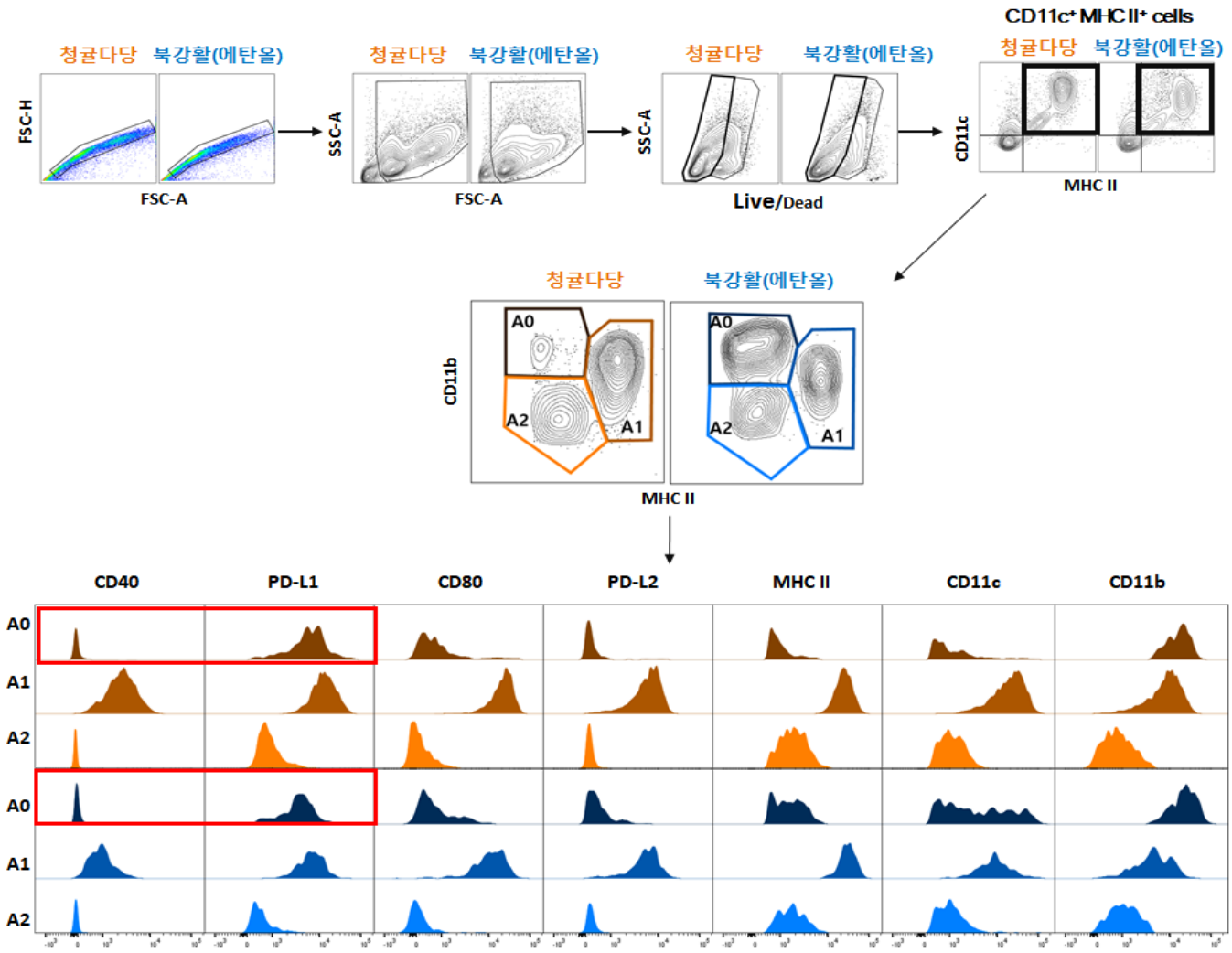


Figure 1.10. 면역증진지수 I 의 정의를 위한 구획나누기

MHC II⁺ CD11c⁺ 수지상 세포에서 MHCII 대비 CD11b의 발현을 확인하여 구획(A0, A1, A2)한 뒤 각 구획 별 CD40, PDL1, CD80, PDL2, MHCII, CD11c, CD11b의 발현 정도를 확인하였다.

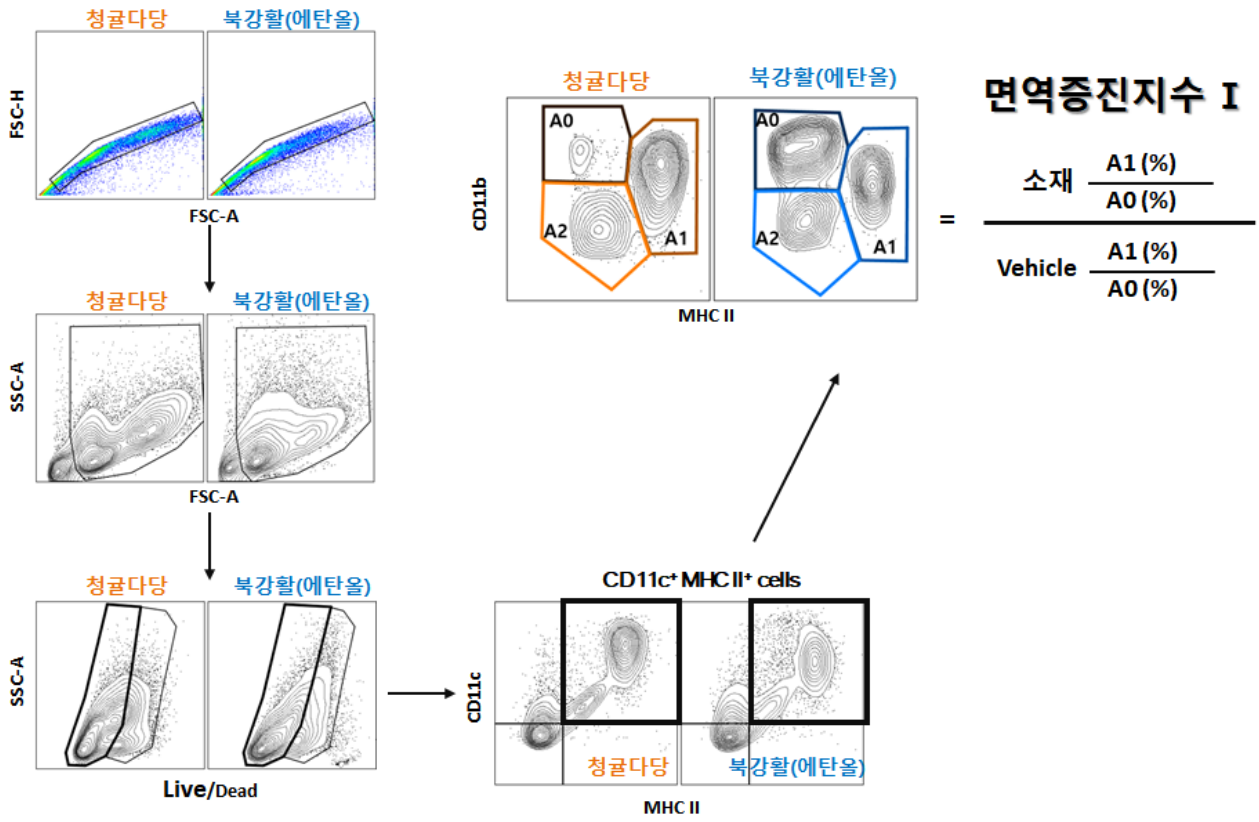


Figure 1.11. 면역증진지수 I 의 정의 및 수치화

단일 세포 게이트 (FSC-A versus FSC-H) 에서 주요 세포들을 게이트 (FSC-A versus SSC-A) 한 다음 살아있는 세포에서 (Live dead versus SSC-A) MHCII 및 CD11c를 동시에 발현하는 세포를 게이트 하였다. MHCII⁺ CD11c⁺ 수지상 세포에서 MHCII 대비 CD11b의 발현을 확인하여 구획(A0, A1, A2) 한 뒤 그에 따른 비율(A1/A0)을 정의하고 Vehicle에서 얻은 값에 대해 소재 처리 후 갖는 값의 상대적 비율을 면역증진지수 I 로 설정하였다.

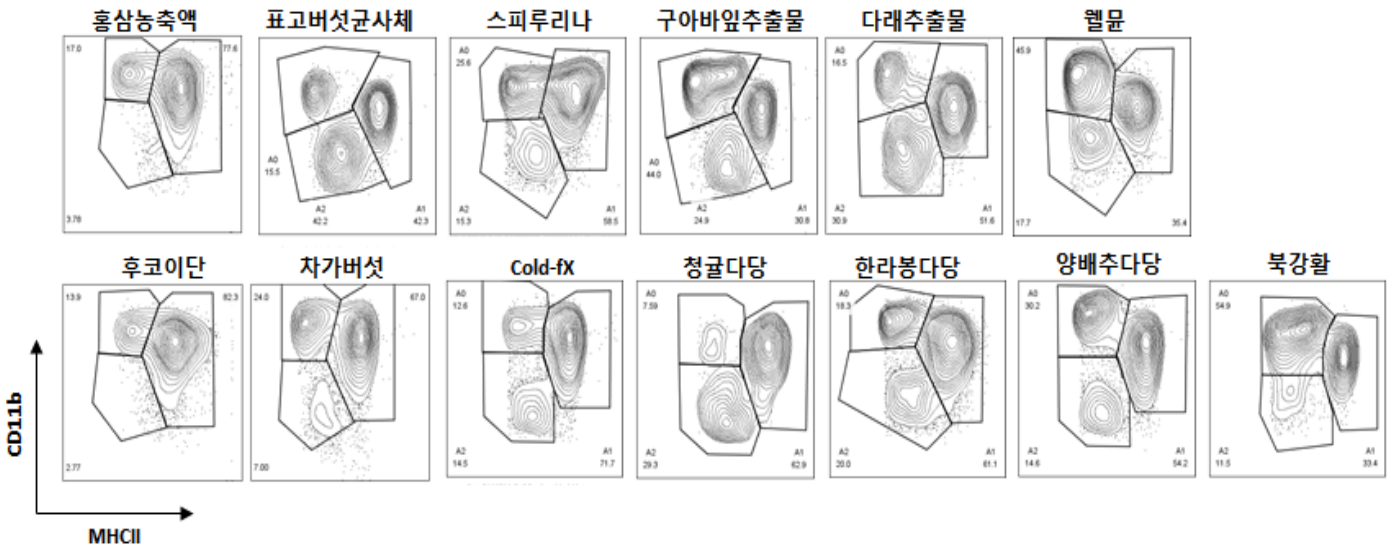


Figure 1.12. 표준 면역식품소재를 처리한 마우스 골수 유래 수지상세포 표면 표지분자들의 발현

배양 6일 째, 수지상 세포에 각각의 소재들을 농도 별로 24시간 처리 한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 세포 생존율(Live cells %)이 70% 이상인 세포에서 수지상세포의 세포 유착 분자(cell adhesion molecule)인 CD11b 와 MHC class II의 발현 정도를 확인하였다.

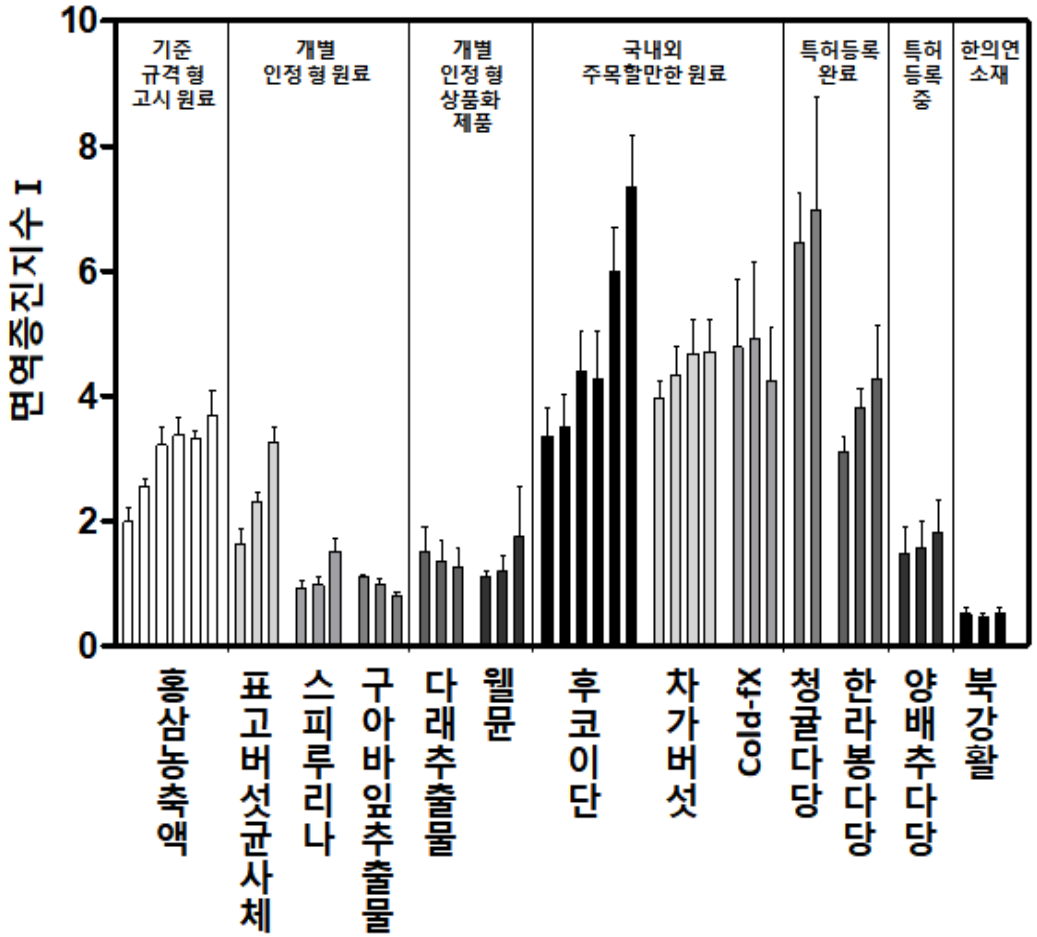


Figure 1.13. 농도별로 처리된 표준 면역식품소재의 면역증진지수 I

CD11c+MHCII+세포군에서 얻은 면역증진지수 I 를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

면역증진지수 I		
평가소재	면역능지수값	처리농도 (μg/ml)
후코이단	7.336	400
청귤다당	6.971	100
Cold-fX	4.911	200
한라봉다당	4.275	400
홍삼농축액	3.960	1000
표고버섯균사체	3.255	100
차가버섯	3.066	400
양배추다당	1.822	400
웰뮨	1.743	50
다래추출물	1.507	100
스피루리나	1.506	20
구아바잎추출물	1.100	20
북강활	0.517	100

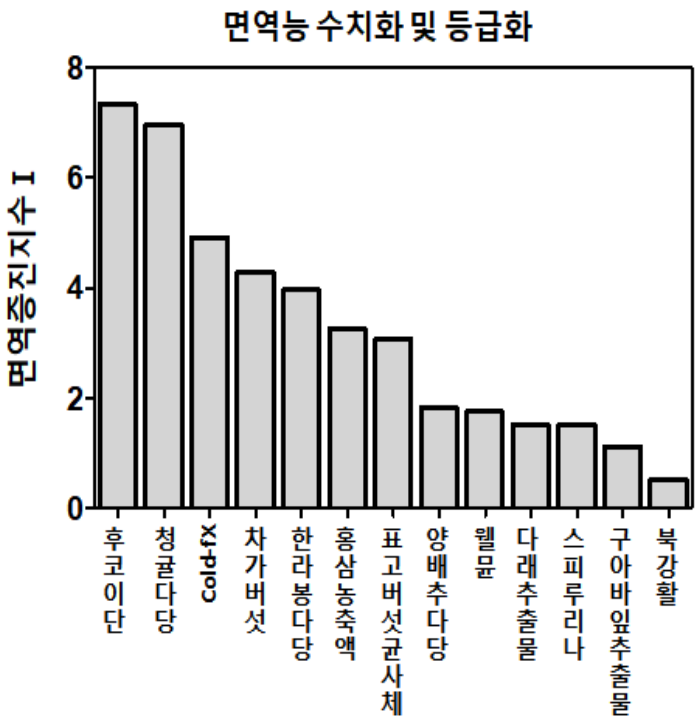


Figure 1.14. 표준 면역식품소재 면역증진지수 Ⅰ의 최대값 비교 분석

농도별 소재 처리를 통해 CD11c+MHCII+세포군에서 얻은 면역증진지수Ⅰ의 값들가운데 소재 별 특정 처리농도에서 얻은 면역증진지수Ⅰ의 최대값을 얻어 높은 순서대로 그래프로 나타내었다.

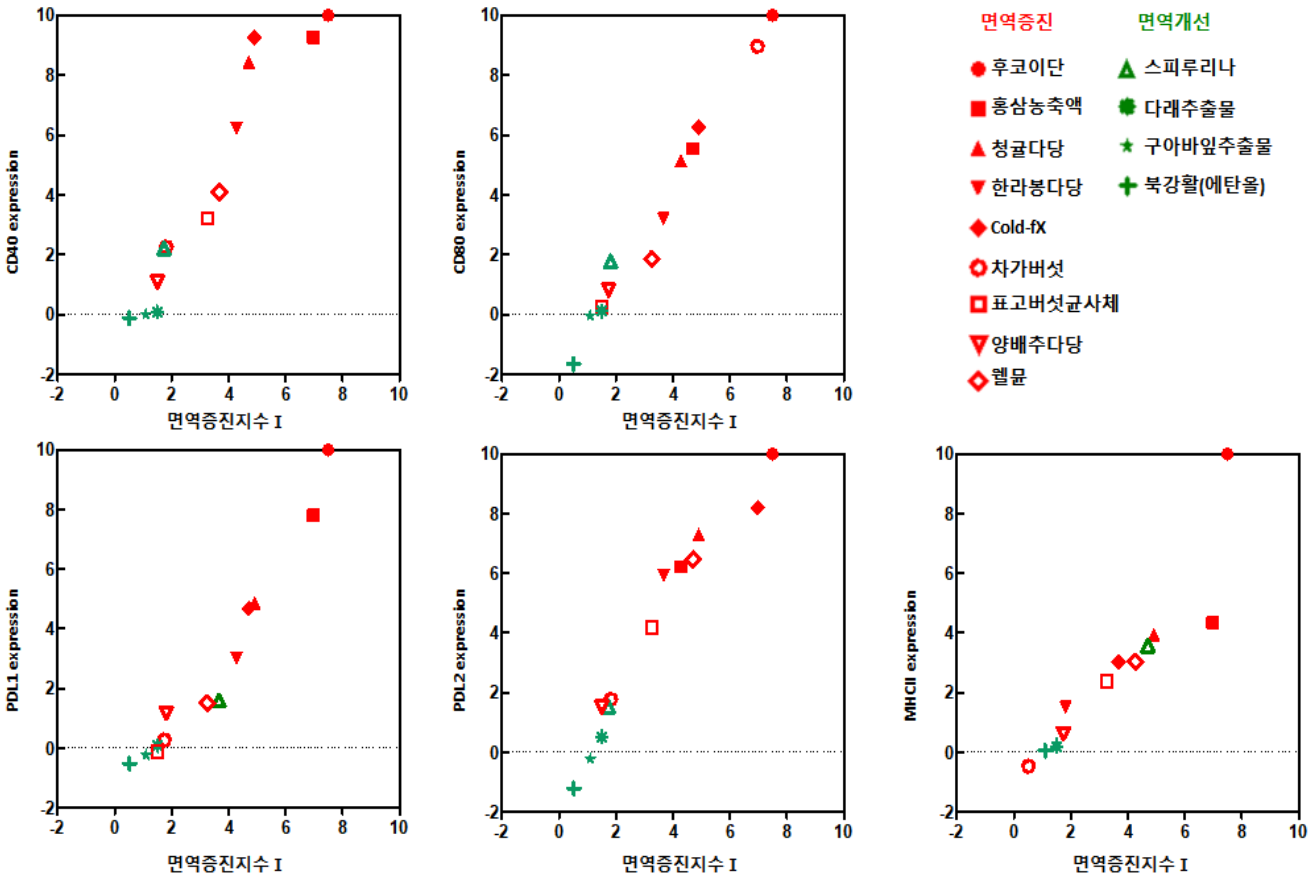


Figure 1.15. 수지상세포 표면 자극 및 억제인자들의 발현량과 면역증진지수 I 의 값과의 관계 비교 분석

면역증진지수 I 의 최대값이 제일 높은 소재가 갖는 촉진단백질 및 억제단백질의 발현량 측정값과 표준 식품면역 소재의 면역증진지수 I 의 값들을 10으로 놓고 나머지 소재들이 갖는 각 단백질 발현량 값 및 면역증진지수 I 값을 상대값으로 얻어 그래프로 각 단백직질 발현량과 면역증진지수 I 간의 상관관계를 나타내었다.

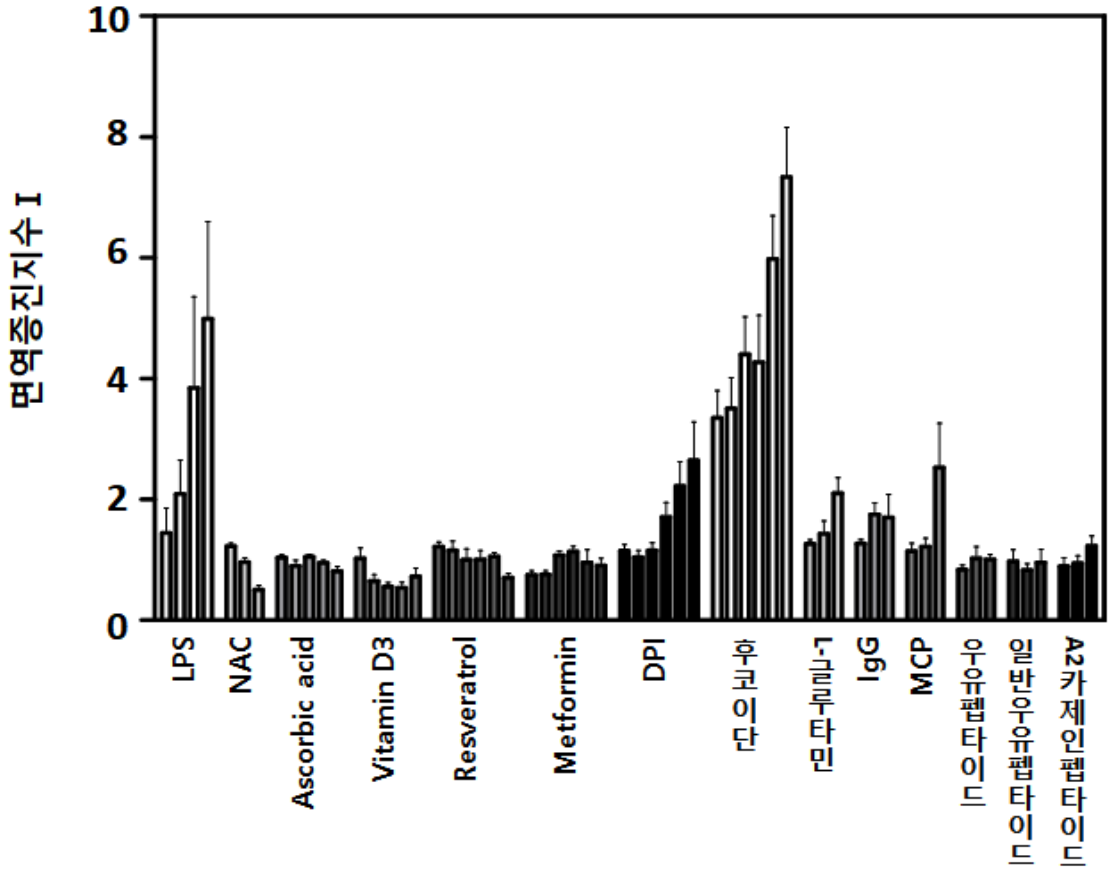


Figure 1.16. 농도별로 처리된 단일물질에 대한 면역증진지수 I

CD11c+MHCII+세포군에서 얻은 면역증진지수 I 를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

면역증진지수 Ⅰ			
평가소재	면역능지수값	처리농도	단위
후코이단	7.336	400	μg/ml
LPS	4.992	0.1	ng/ml
IgG	4.640	400	μg/ml
DPI	4.321	5	μM
일반우유펩타이드	3.359	400	μg/ml
MCP	2.952	400	μg/ml
Vitamin D3	1.816	100	nM
A2카제인 펩타이드	1.799	400	μg/ml
L-글루타민	1.796	400	μg/ml
Metformin	1.767	5	mM
NAC	1.353	5	mM
Ascorbic acid	1.261	0.01	mM
우유펩타이드	1.250	400	μg/ml
Resveratrol	1.114	1	mM

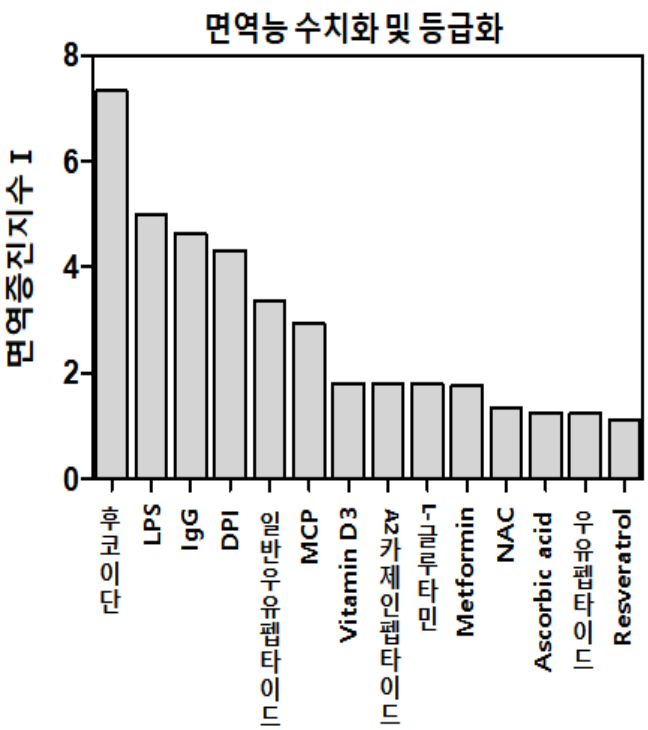


Figure 1.17. 단일물질 면역증진지수Ⅰ 의 최대값 비교 분석

농도별 소재 처리를 통해 CD11c+MHCII+세포군에서 얻은 면역증진지수Ⅰ의 값들가운데 소재 별 특정 처리농도에서 얻은 면역증진지수Ⅰ의 최대값을 얻어 높은 순서대로 그래프로 나타내었다.

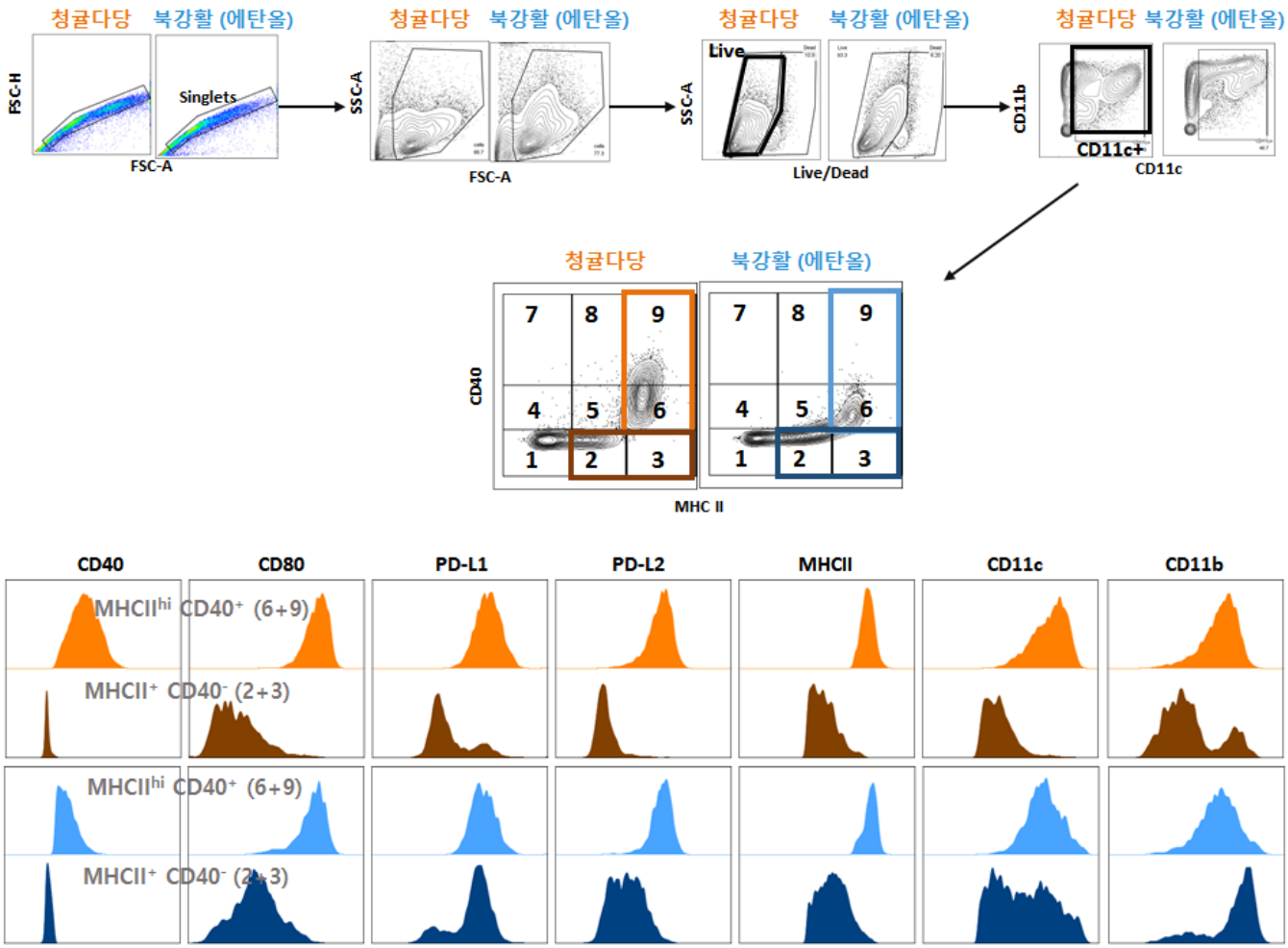


Figure 1.18. 면역증진지수 Ⅱ 의 정의를 위한 구획나누기

CD11c+ 세포에서 MHCII/CD40 발현을 확인했을 때, MHCII와 CD40을 각각 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포 군에 따라 9가지의 구획으로 구분 하고 (6+9)구획과 (2+3)구획 별 CD40, PDL1, CD80, PDL2, MHCII, CD11c, CD11b의 발현 정도를 확인하였다.

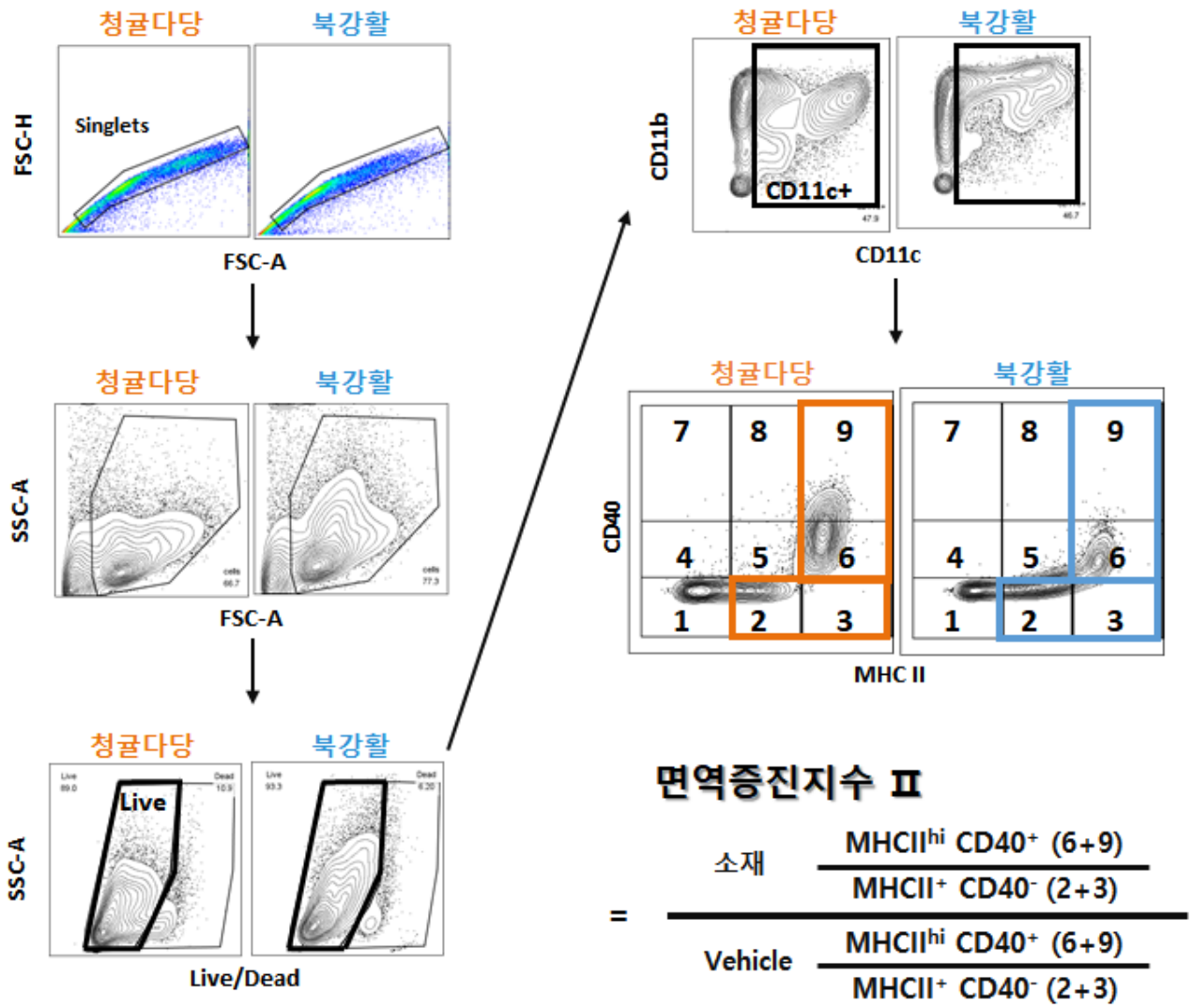


Figure 1.19. 면역증진지수II의 정의 및 수치화

단일 세포 게이트 (FSC-A versus FSC-H) 에서 주요 세포들을 게이트 (FSC-A versus SSC-A) 한 다음 살아있는 세포에서 (Live dead versus SSC-A) CD11c를 발현하는 세포를 게이트 하였다. MHCII 와 CD40의 발현 정도에 따라 9가지로 구획 하고 MHCII+ CD40- 세포군(2+3)에 대한 MHCII hi CD40 hi 세포군(6+9)의 비율을 각 소재처리 값으로 구하여 Vehicle에서 얻은 값에 대해 소재처리 후 갖는 값의 상대적 비율을 면역증진지수II 로 설정하였다.

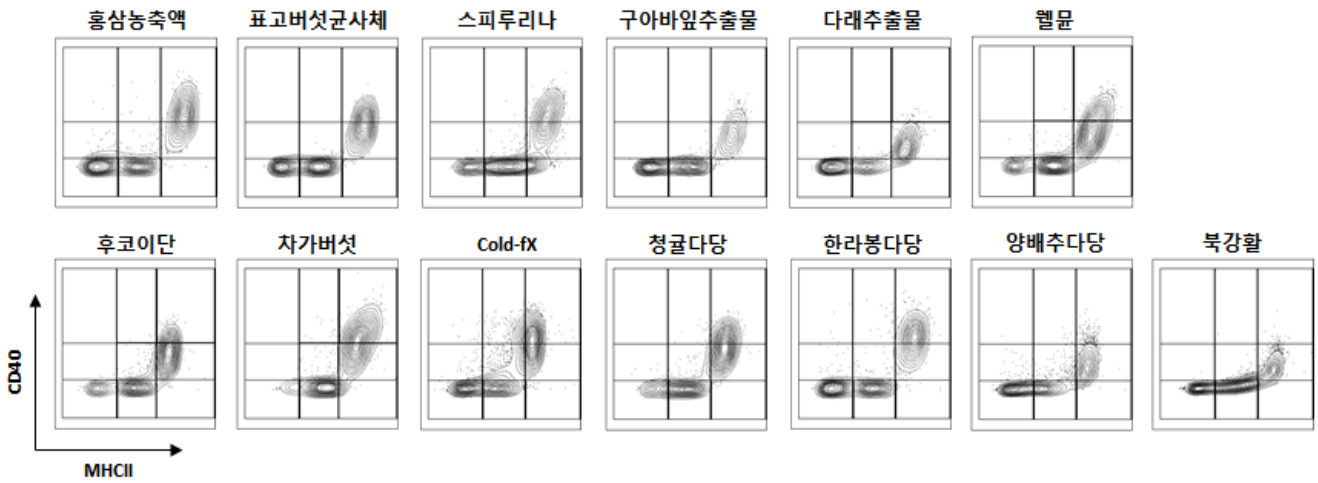


Figure 1.20. 표준 면역식품소재를 처리한 CD11c+수지상 세포군에서의 MHCII와 CD40의 발현

6일째의 분화된 수지상세포에 소재를 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후, 살아있는 CD11c+수지상 세포군에서 MHCII와 CD40의 발현 정도를 유세포 분석을 통해 확인하였다. MHCII와 CD40을 각각 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군에 따라 9가지의 구획으로 나누어 설정하였다.

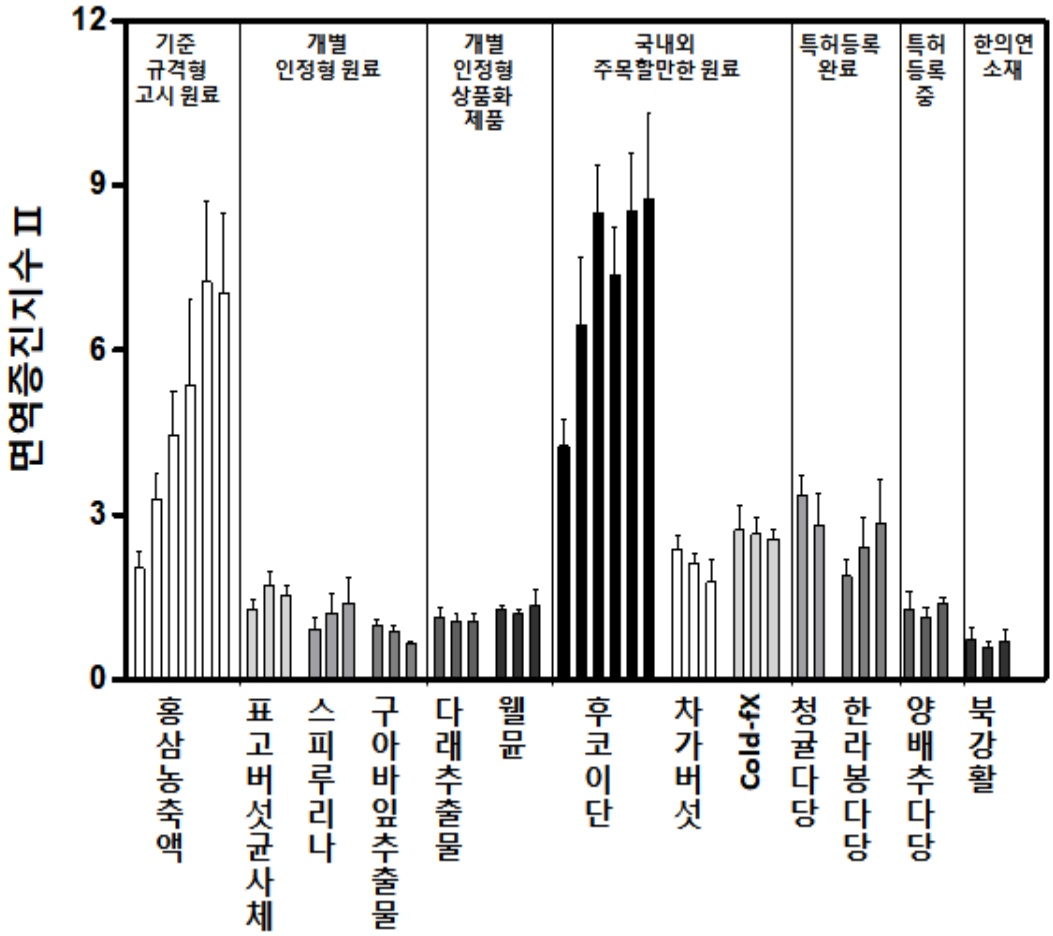


Figure 1.21. 농도별로 처리된 표준 면역식품소재에 대한 면역증진지수Ⅱ의 수치화

CD11c+세포군에서 얻은 농도별 면역증진지수Ⅱ를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

면역능지수 Ⅱ		
평가소재	면역능지수값	처리농도 (μg/ml)
후코이단	8.74	400
홍삼농축액	7.24	800
청귤다당	3.35	50
한라봉다당	2.84	400
Cold-fX	2.72	100
차가버섯	2.38	100
표고버섯균사체	1.72	50
스피루리나	1.39	20
양배추다당	1.36	400
웰뮨	1.33	50
다래추출물	1.14	100
구아바잎추출물	0.99	20
북강활 (에탄올)	0.71	100

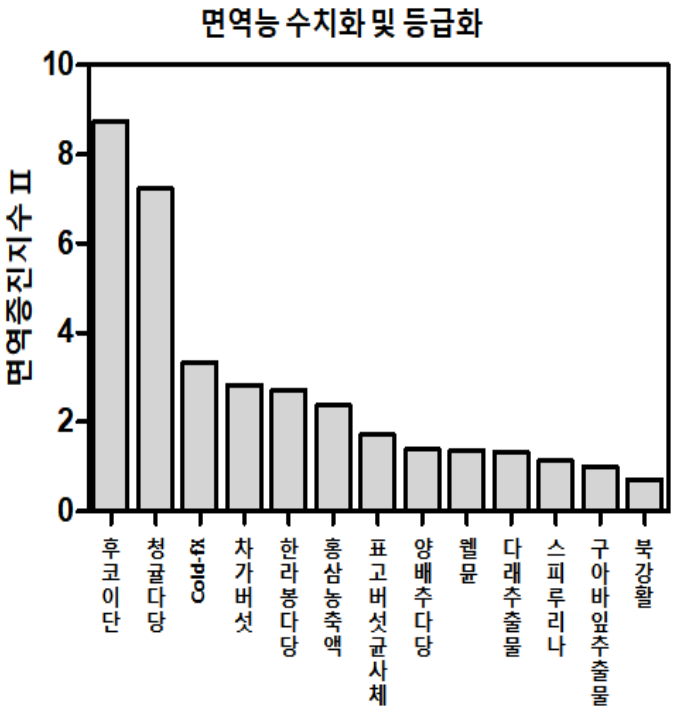


Figure 1.22. 표준 면역식품소재 면역증진지수 Ⅱ 의 최대값 비교 분석

농도별 소재 처리를 통해 CD11c+세포군에서 얻은 면역증진지수 Ⅱ 의 값들가운데 소재 별 특정 처리농도에서 얻은 면역증진지수 Ⅱ 의 최대값을 얻어 높은 순서대로 그래프로 나타내었다.

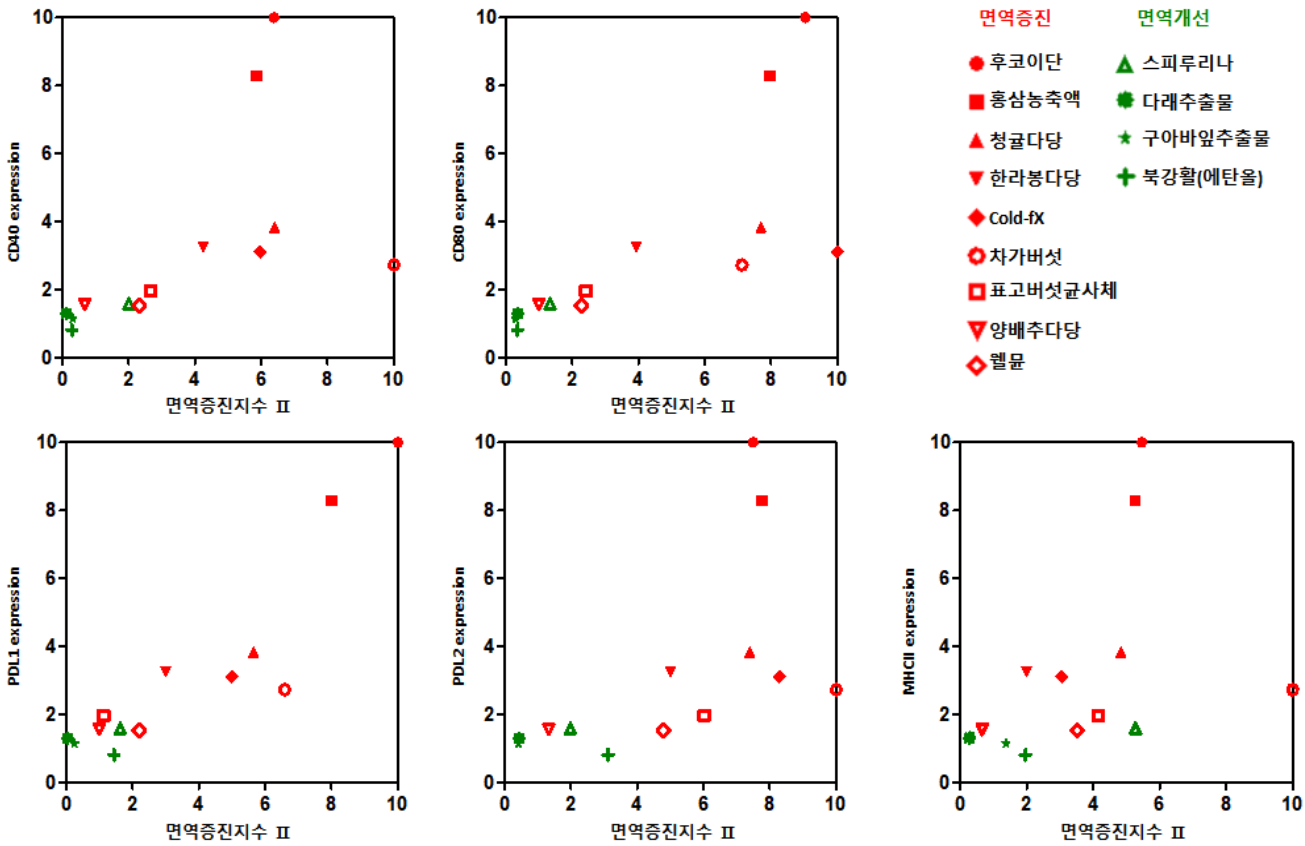


Figure 1.23. 수지상세포 표면 자극 및 억제인자들의 발현량과 면역증진지수 II 의 값과의 관계 비교 분석

면역증진지수 II 의 최대값이 제일 높은 소재가 갖는 촉진단백질 및 억제단백질의 발현량 측정값과 표준 식품면역 소재의 면역증진지수 II 의 값들을 10으로 놓고 나머지 소재들이 갖는 각 단백질 발현량 값 및 면역증진지수 II 값을 상대값으로 얻어 그래프로 각 단백직질 발현량과 면역증진지수 II 간의 상관관계를 나타내었다.

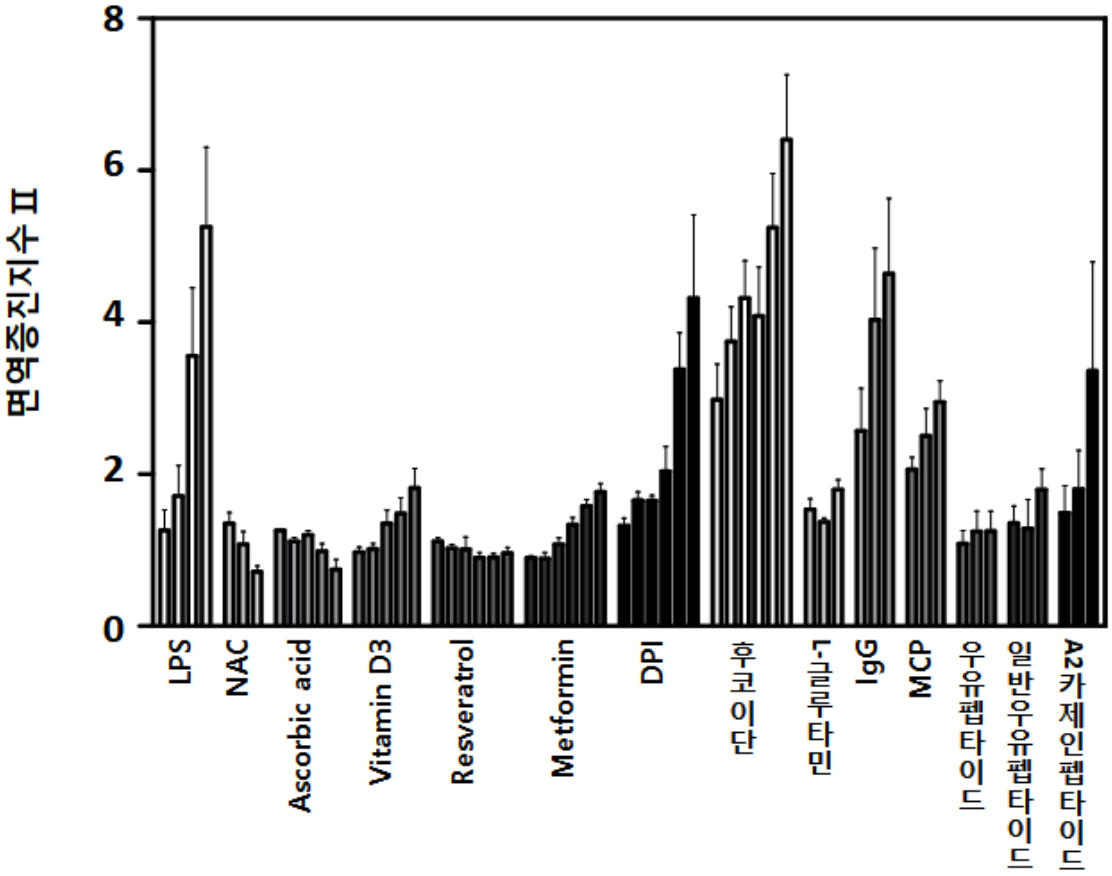


Figure 1.24. 농도별로 처리된 단일물질에 대한 면역증진지수Ⅱ

CD11c+세포군에서 얻은 면역증진지수Ⅱ를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

면역증진지수 Ⅱ			
평가소재	면역능지수값	처리농도	단위
후코이단	8.122	50	μg/ml
LPS	5.255	0.1	ng/ml
DPI	2.649	5	μM
MCP	2.528	400	μg/ml
L-글루타민	2.100	400	μg/ml
IgG	1.750	200	μg/ml
일반우유펩타이드	1.230	400	μg/ml
NAC	1.228	5	mM
Resveratrol	1.222	1	mM
Metformin	1.135	1	mM
Ascorbic acid	1.049	0.1	mM
우유펩타이드	1.024	200	μg/ml
Vitamin D3	1.021	0.1	nM
A2카제인펩타이드	0.976	100	μg/ml

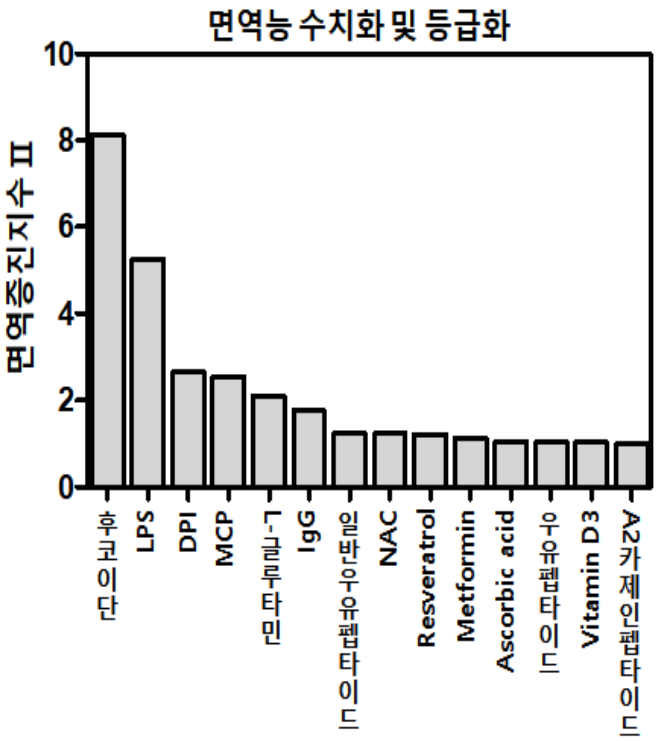


Figure 1.25. 단일물질 면역증진지수 Ⅱ 의 최대값 비교 분석

농도별 소재 처리를 통해 CD11c+세포군에서 얻은 면역증진지수 Ⅱ 의 값들가운데 소재 별 특정 처리농도에서 얻은 면역증진지수 Ⅱ 의 최대값을 얻어 높은 순서대로 그래프로 나타내었다.

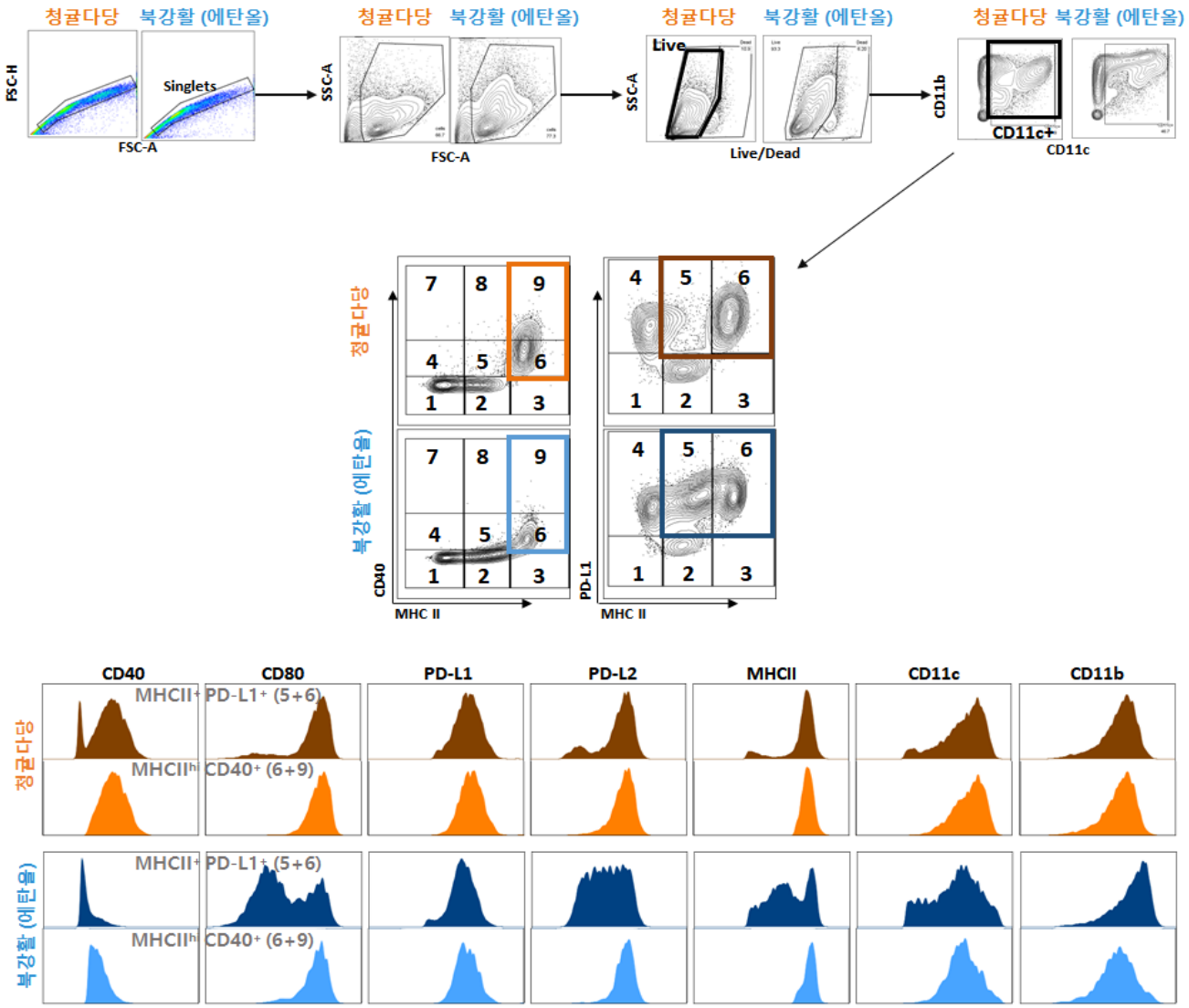


Figure 1.26. 면역관용지수 I 의 정의를 위한 구획나누기

CD11c+ 세포에서 MHCII/CD40의 발현 정도에 따라 9구획, MHCII/PD-L1의 발현 정도에 따라 여섯 부분으로 구획으로 구분 하고 (5+6)구획과 (6+9)구획 별 CD40, PDL1, CD80, PDL2, MHCII, CD11c, CD11b의 발현 정도를 확인하였다.

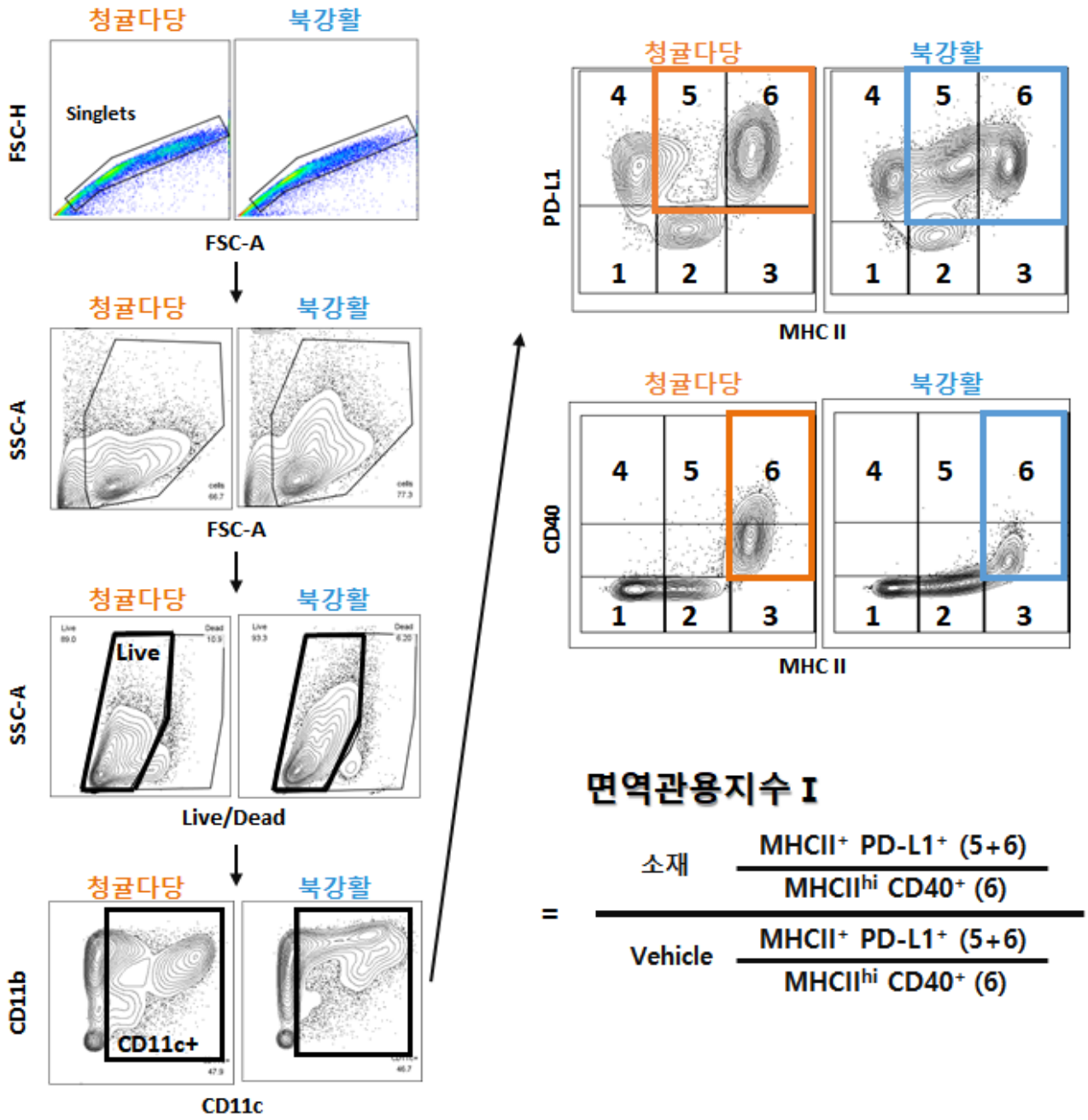


Figure 1.27. 면역관용지수 I 의 정의 및 수치화

CD11c+ 세포에서 MHCII/CD40의 발현 정도에 따라 아홉 구획으로, MHCII/PD-L1의 발현 정도에 따라 여섯 구획으로 구분하였다. MHCII hi CD40 hi 세포군(CD40 6+9)에 대한 MHCII+ PD-L1+ 세포군(PD-L1 5+6)의 비율을 구하여 Vehicle에서 얻은 값에 대해 소재처리 후 갖는 값의 상대적 비율을 면역관용지수 I 로 설정하였다.

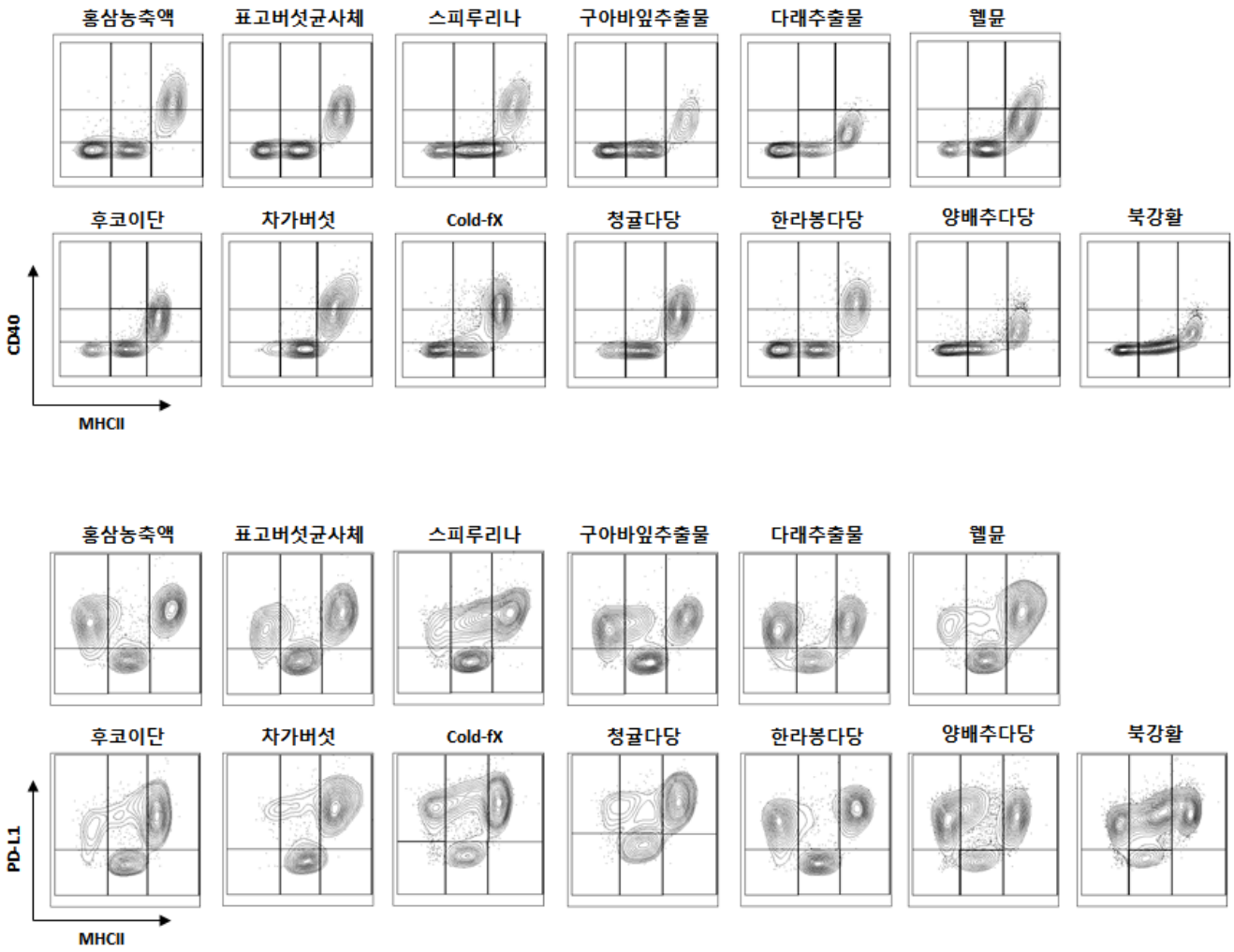


Figure 1.28. 표준 면역식품소재를 처리한 수지상 세포에서의 MHCII, CD40, 및 PDL1의 발현 분석

6일째의 분화된 수지상세포에 소재를 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후, 살아있는 CD11c+수지상 세포군에서 MHCII와 CD40의 발현 정도를 유세포 분석을 통해 확인하였다. 위 ; MHCII와 CD40을 각각 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군에 따라 9가지의 구획으로 나누어 설정하였다. 아래 ; MHCII를 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군으로 나누고, PD-L1을 발현하지 않는 세포군과 발현하는 세포군으로 나누어 6가지의 구획을 설정하였다.

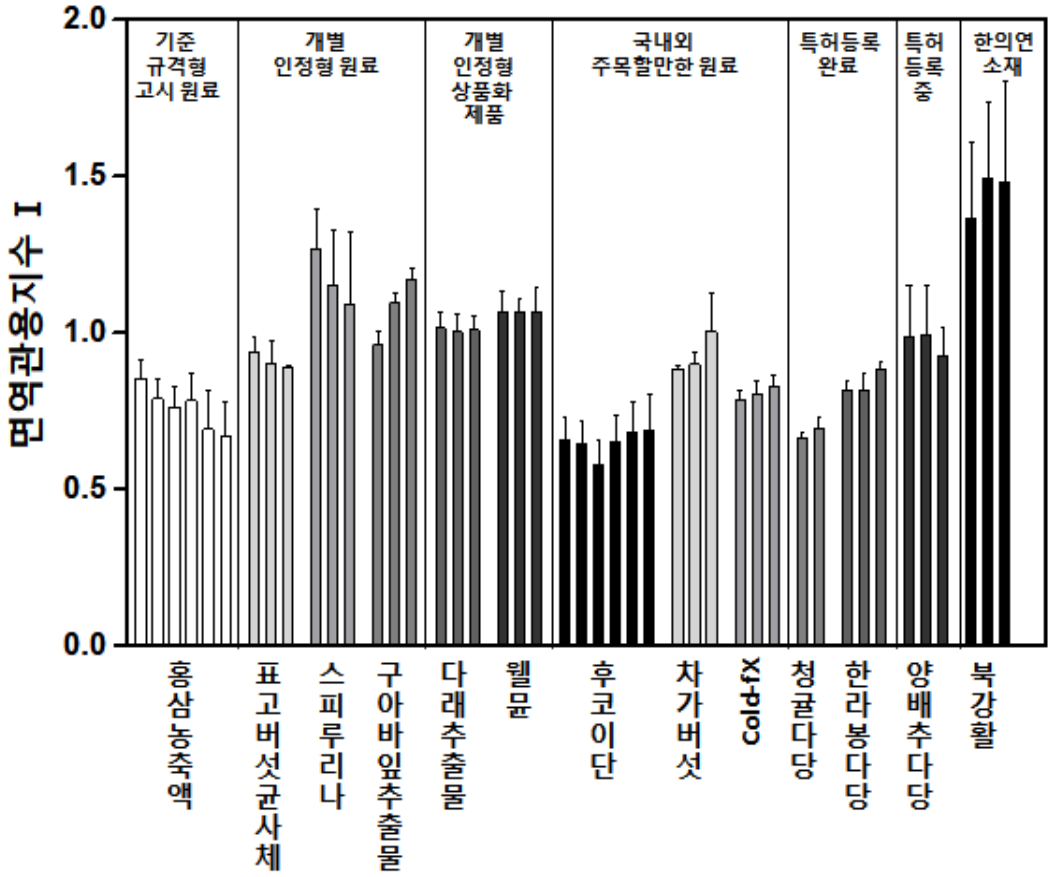


Figure 1.29. 농도별로 처리된 표준 면역식품소재에 대한 면역관용지수 I의 수치화
CD11c+세포군에서 얻은 면역관용지수 I 수치화하여 그래프로 나타내었다.

면역관용지수 Ⅰ		
평가소재	면역능지수값	처리농도 (μg/ml)
북강활	1.50	200
스피루리나	1.27	5
구아바잎추출물	1.17	100
웰뮨	1.07	50
다래추출물	1.02	100
차가버섯	1.01	400
양배추다당	0.99	200
표고버섯균사체	0.94	20
한라봉다당	0.88	400
홍삼농축액	0.86	100
Cold-fX	0.83	400
청귤다당	0.70	100
후코이단	0.69	400

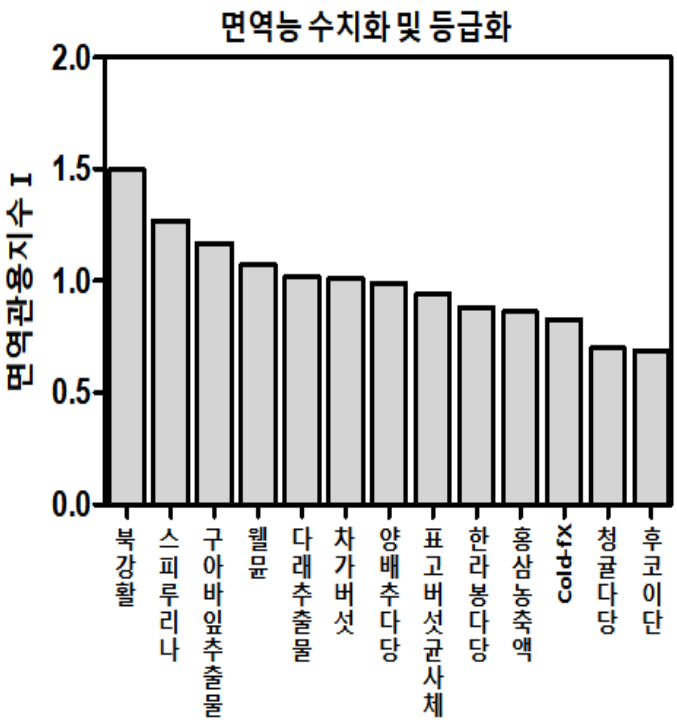


Figure 1.30. 표준 면역식품소재 면역관용지수 Ⅰ 의 최대값 비교 분석

농도별 소재 처리를 통해 CD11c+세포군에서 얻은 면역관용지수 Ⅰ 의 값들가운데 소재 별 특정 처리농도에서 얻은 면역관용지수 Ⅰ 의 최대값을 얻어 높은 순서대로 그래프로 나타내었다.

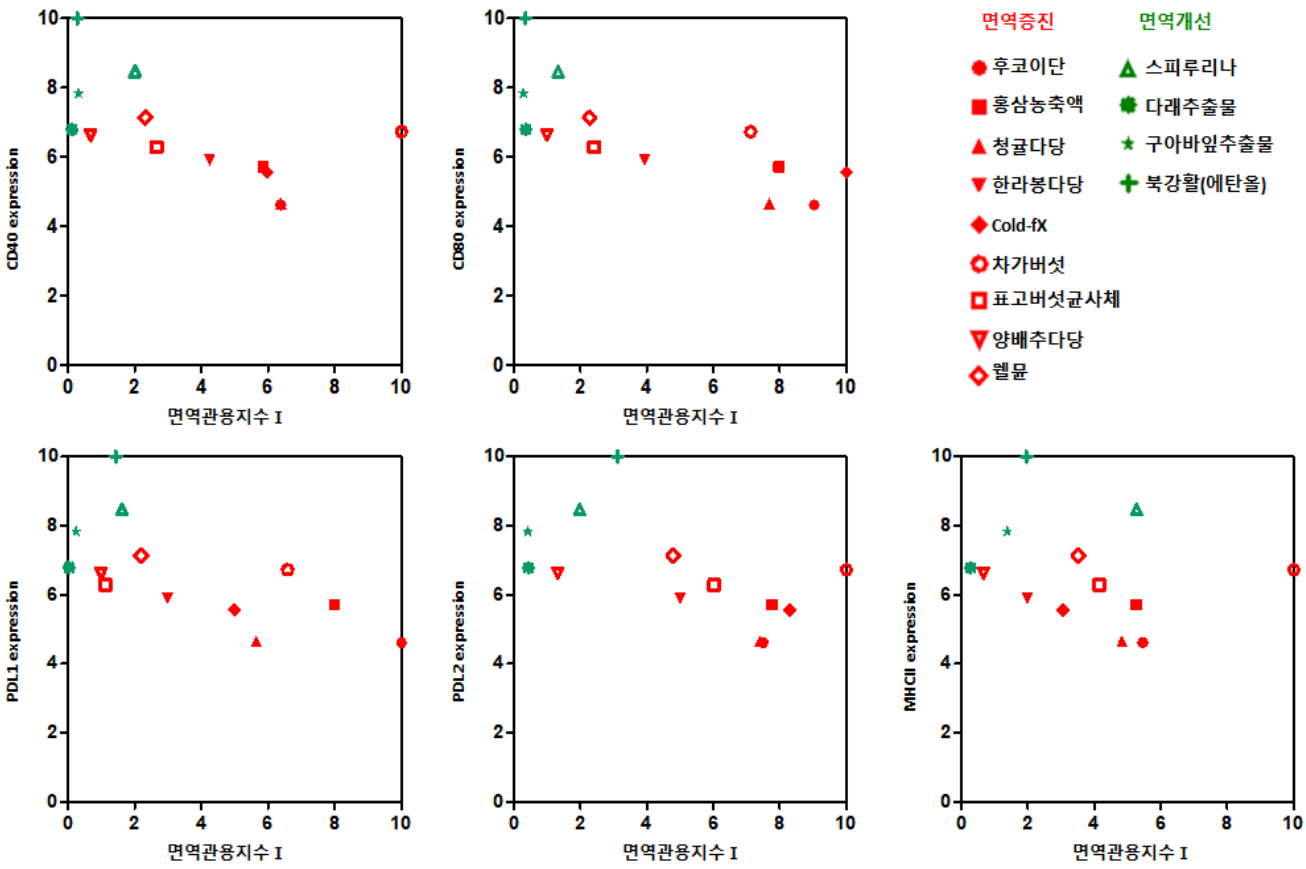


Figure 1.31. 수지상세포 표면 자극 및 억제인자들의 발현량과 면역관용지수 I 의 값과의 관계 비교 분석

면역관용지수 I 의 최대값이 제일 높은 소재가 갖는 촉진단백질 및 억제단백질의 발현량 측정값과 표준 식품면역 소재의 면역관용지수 I 의 값들을 10으로 놓고 나머지 소재들이 갖는 각 단백질 발현량 값 및 면역관용지수 I 값을 상대값으로 얻어 그래프로 각 단백직질 발현량과 면역관용지수 I 간의 상관관계를 나타내었다.

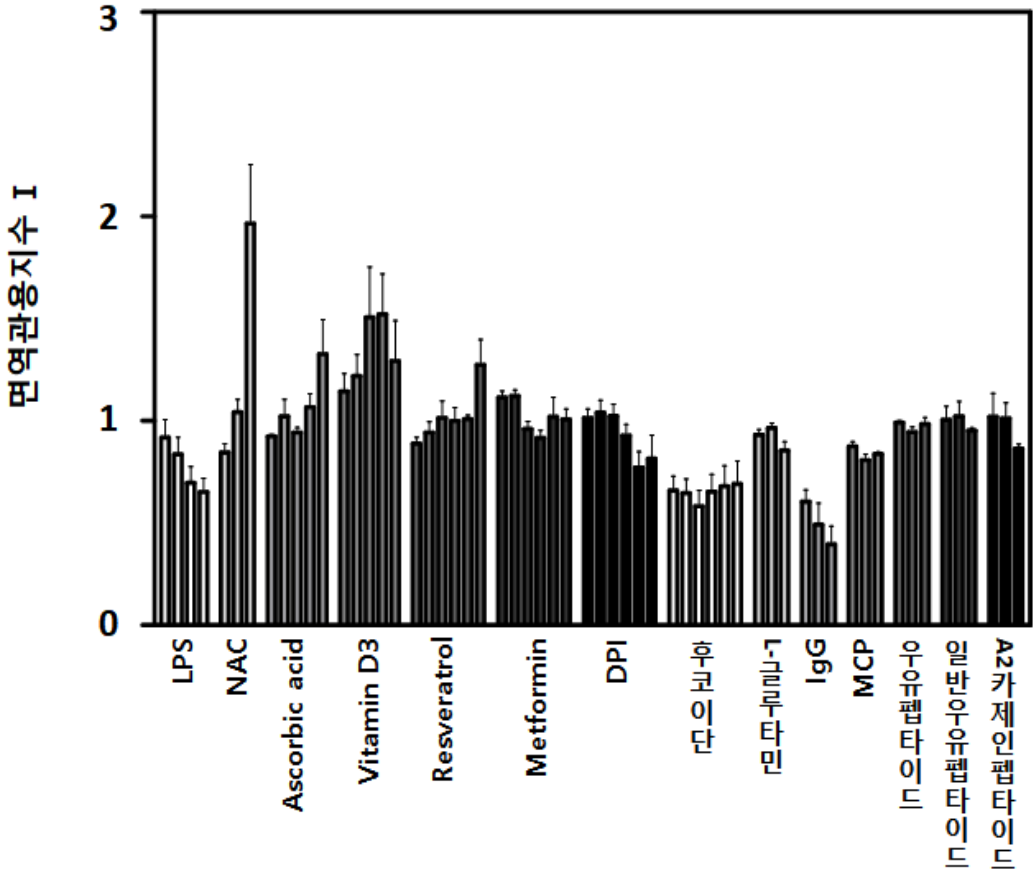


Figure 1.32. 농도별로 처리된 단일물질에 대한 면역관용지수 I 의 수치화

CD11c+세포군에서 얻은 농도별 면역관용지수 I 를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

면역관용지수 I			
평가소재	면역능지수값	처리농도	단위
NAC	1.966	20	mM
Vitamin D3	1.523	50	nM
Ascorbic acid	1.326	1	mM
Resveratrol	1.273	50	mM
Metformin	1.121	0.2	mM
DPI	1.041	0.2	μM
A2카제인펩타이드	1.021	200	μg/ml
일반우유펩타이드	1.020	100	μg/ml
우유펩타이드	0.991	100	μg/ml
L-글루타민	0.966	200	μg/ml
LPS	0.918	0.0001	ng/ml
MCP	0.874	100	μg/ml
후코이단	0.691	400	μg/ml
IgG	0.604	100	μg/ml

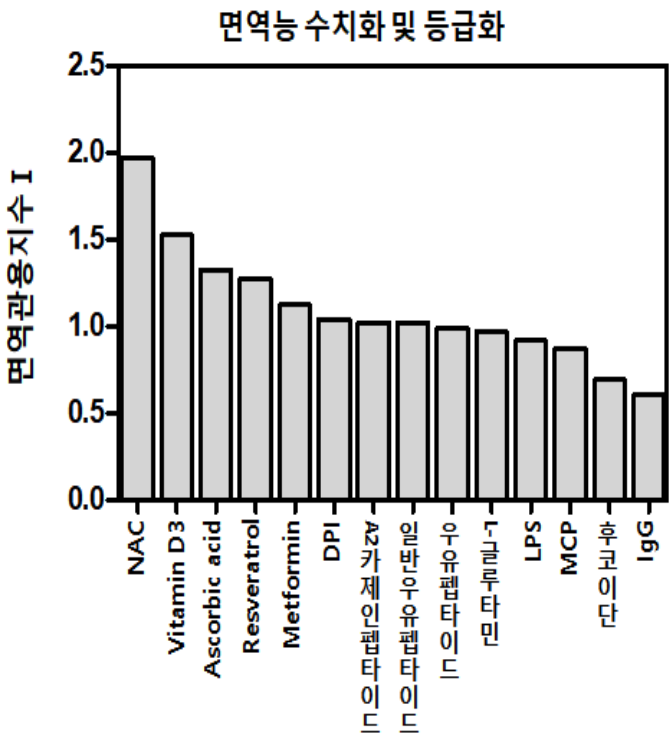


Figure 1.33. 단일물질 면역관용지수 I 의 최대값 비교 분석

농도별 소재 처리를 통해 CD11c+세포군에서 얻은 면역관용지수 I 의 값들가운데 소재 별 특정 처리농도에서 얻은 면역관용지수 I 의 최대값을 얻어 높은 순서대로 그래프로 나타내었다.

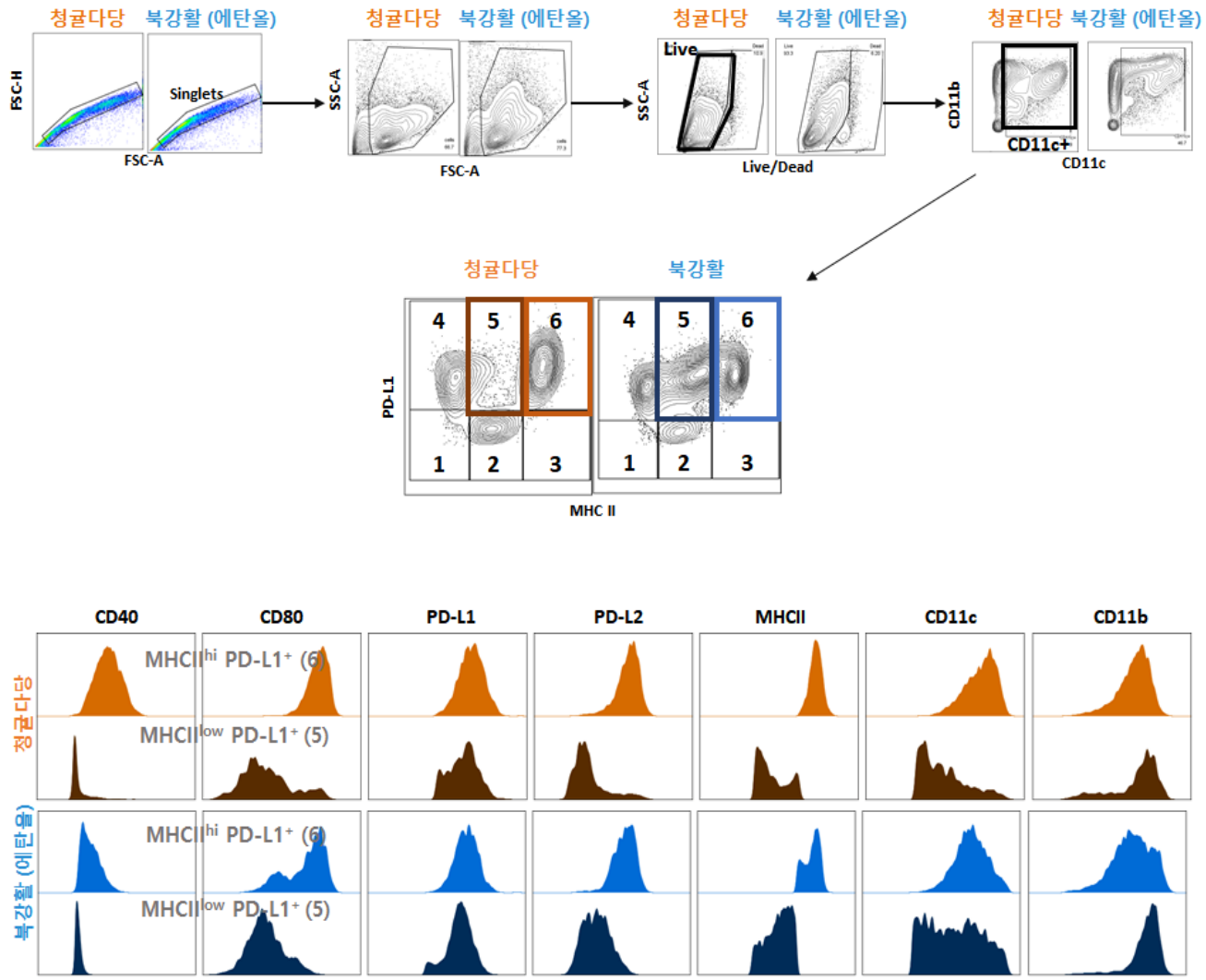


Figure 1.34. 면역관용지수 II 의 정의를 위한 구획나누기

CD11c+ 세포에서 MHCII/PD-L1의 발현 정도에 따라 여섯 부분으로 구획으로 구분 하고 (5) 구획과 (6)구획 별 CD40, PDL1, CD80, PDL2, MHCII, CD11c, CD11b의 발현 정도를 확인하였다.

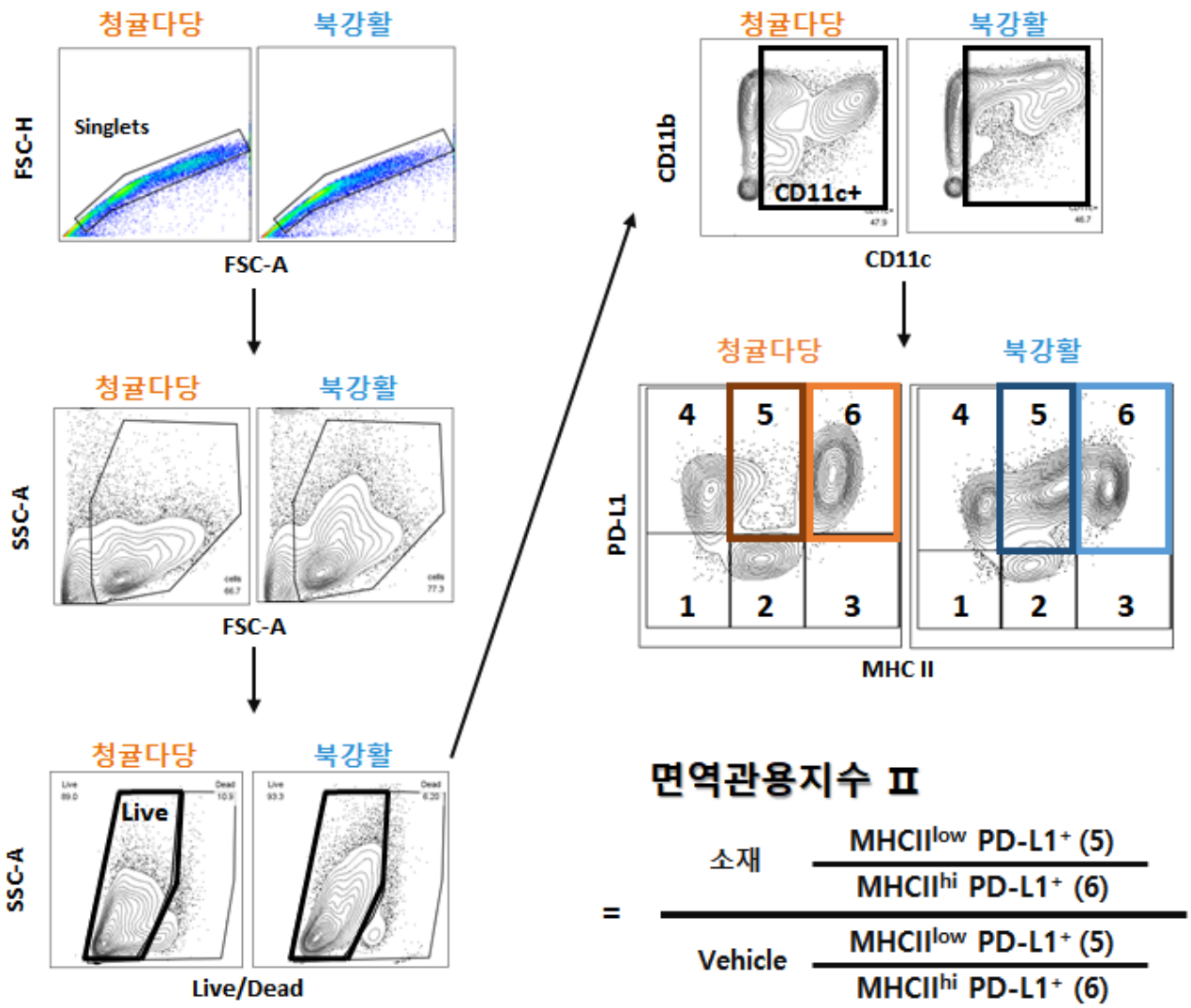


Figure 1.35. 면역관용지수 II 의 정의 및 수치화

CD11c+ 세포에서 MHCII/PD-L1의 발현 정도에 따라 여섯 구획으로 구분하였다. MHCII low PD-L1+세포군(6)에 대한 MHCII hi PD-L1 세포군(5) 의 비율을 구하여 Vehicle에서 얻은 값에 대해 소재처리 후 갖는 값의 상대적 비율을 면역관용지수 II 로 설정하였다.

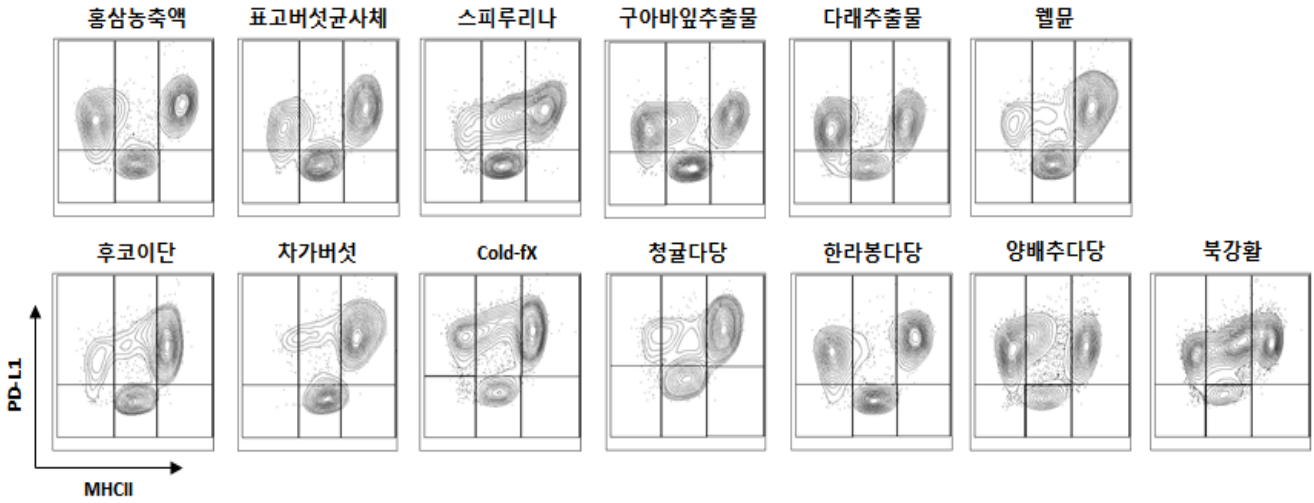


Figure 1.36. 표준 면역식품소재를 처리한 CD11c+수지상 세포군에서의 MHCII와 PD-L1 의 발현

6일째의 분화된 수지상세포에 소재를 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후, 살아있는 CD11c+수지상 세포군에서 MHCII와 PD-L1 의 발현 정도를 유세포 분석을 통해 확인하였다. MHCII를 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군으로 나누고, PD-L1을 발현하지 않는 세포군과 발현하는 세포군으로 나누어 6가지의 구획을 설정하였다.

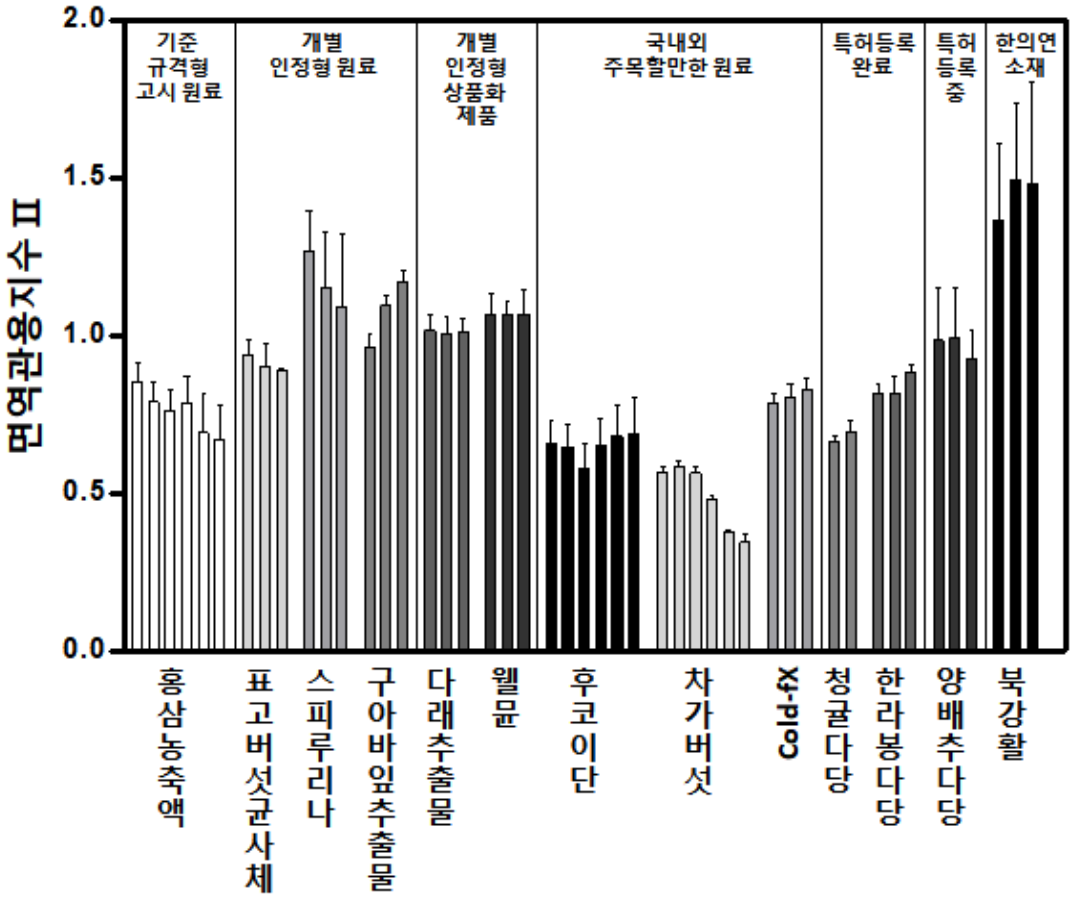


Figure 1.37. 농도별로 처리된 표준 면역식품소재에 대한 면역관용지수 II 의 수치화

CD11c+세포군에서 얻은 농도별 면역관용지수 II 를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

면역관용지수 Ⅱ		
평가소재	면역능지수값	처리농도 (μg/ml)
북강활	2.11	200
구아바잎 추출물	1.46	100
웰뮨	1.35	50
스피루리나	1.25	5
차가버섯	1.13	400
양배추 다당	0.98	200
다래추출물	0.97	100
표고버섯 균사체	0.82	20
후코이단	0.78	400
홍삼농축액	0.77	100
한라봉 다당	0.69	400
Cold-fX	0.51	400
청귤 다당	0.26	100

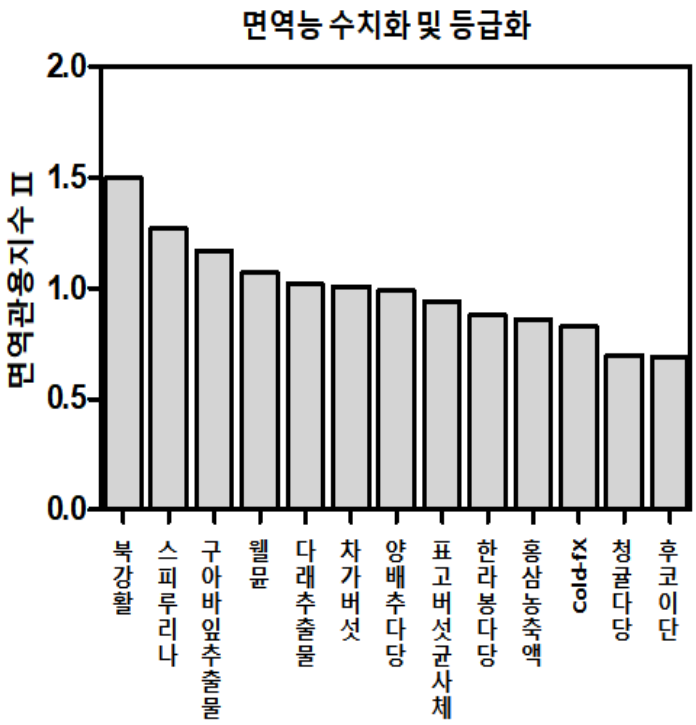


Figure 1.38. 표준 면역식품소재 면역관용지수 Ⅱ 의 최대값 비교 분석

농도별 소재 처리를 통해 CD11c+세포군에서 얻은 면역관용지수 Ⅱ 의 값들가운데 소재 별 특정 처리농도에서 얻은 면역관용지수 Ⅱ 의 최대값을 얻어 높은 순서대로 그래프로 나타내었다.

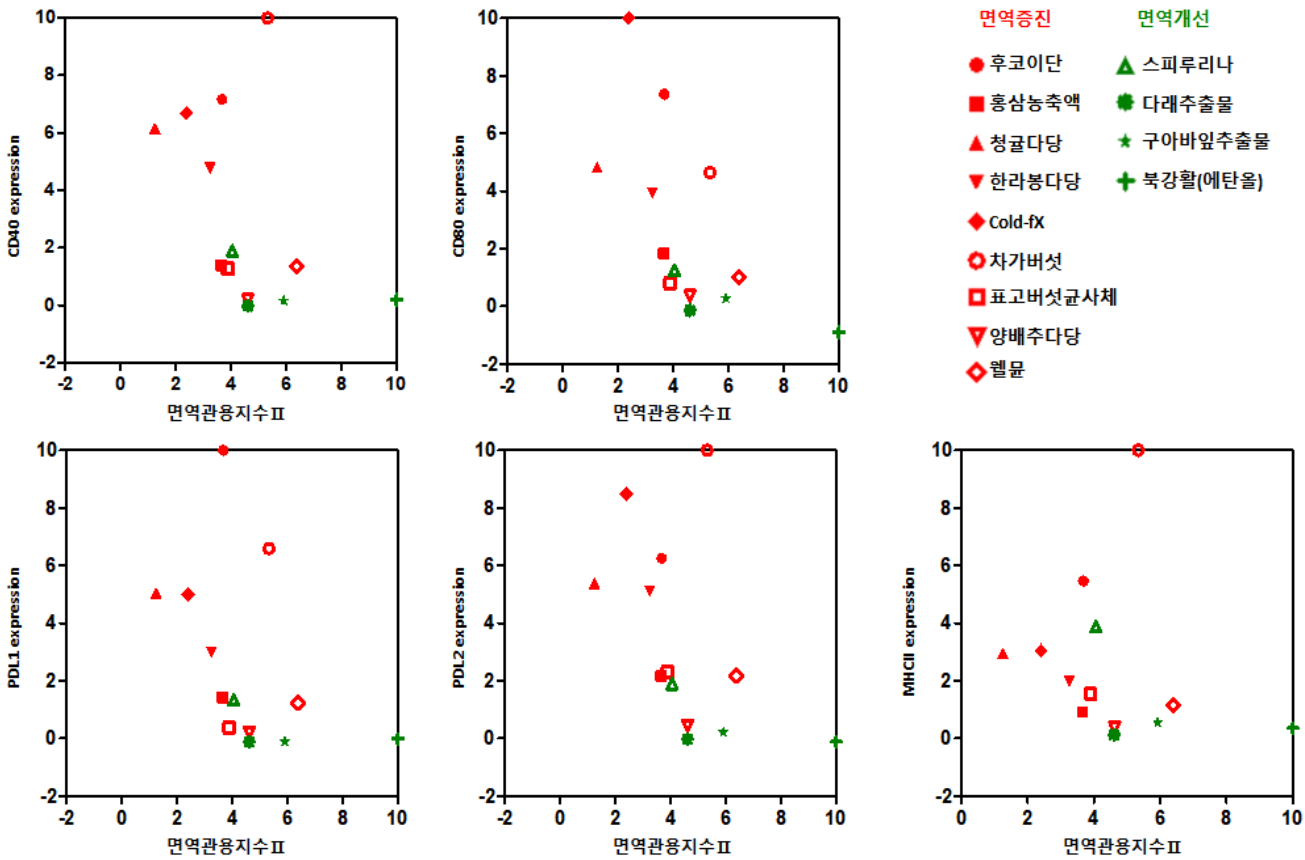


Figure 1.39. 수지상세포 표면 자극 및 억제인자들의 발현량과 면역관용지수 Ⅱ 의 값과의 관계 비교 분석

면역관용지수 Ⅱ 의 최대값이 제일 높은 소재가 갖는 촉진단백질 및 억제단백질의 발현량 측정값과 표준 식품면역 소재의 면역관용지수 Ⅱ 의 값들을 10으로 놓고 나머지 소재들이 갖는 각 단백질 발현량 값 및 면역관용지수 Ⅱ 값을 상대값으로 얻어 그래프로 각 단백직질 발현량과 면역관용지수 Ⅱ 간의 상관관계를 나타내었다.

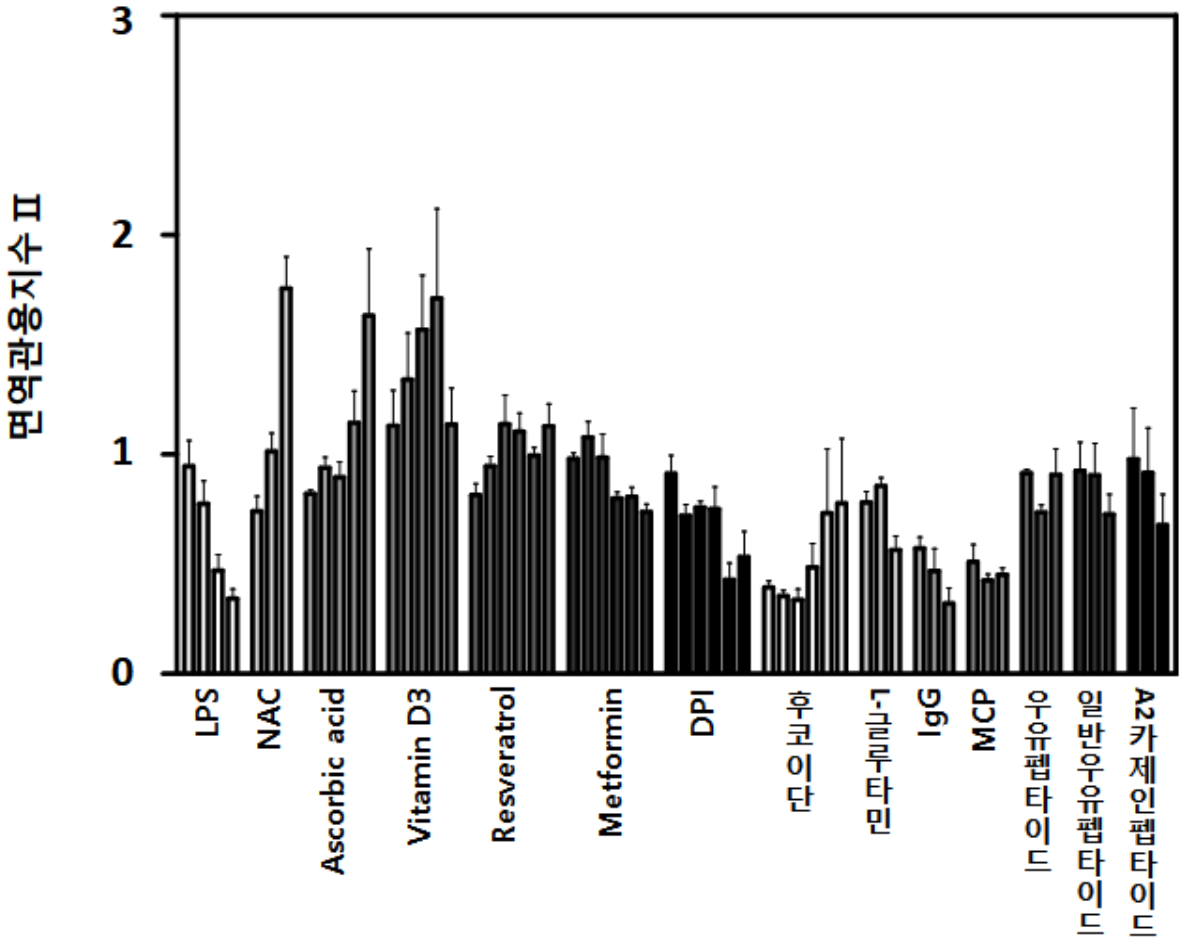


Figure 1.40. 농도별로 처리된 단일물질에 대한 면역관용지수Ⅱ

CD11c+세포군에서 얻은 면역관용지수 Ⅱ 를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

면역관용지수 Ⅱ			
평가소재	면역능지수값	처리농도	단위
NAC	1.757	20	mM
Vitamin D3	1.712	50	nM
Ascorbic acid	1.633	1	mM
Resveratrol	1.139	5	mM
Metformin	1.077	0.2	mM
일반우유펩타이드	0.978	100	μg/ml
LPS	0.947	0.0001	ng/ml
A2카제인펩타이드	0.925	100	μg/ml
우유펩타이드	0.915	100	μg/ml
DPI	0.913	0.1	μM
L-글루타민	0.856	200	μg/ml
후코이단	0.777	400	μg/ml
IgG	0.572	100	μg/ml
MCP	0.510	100	μg/ml

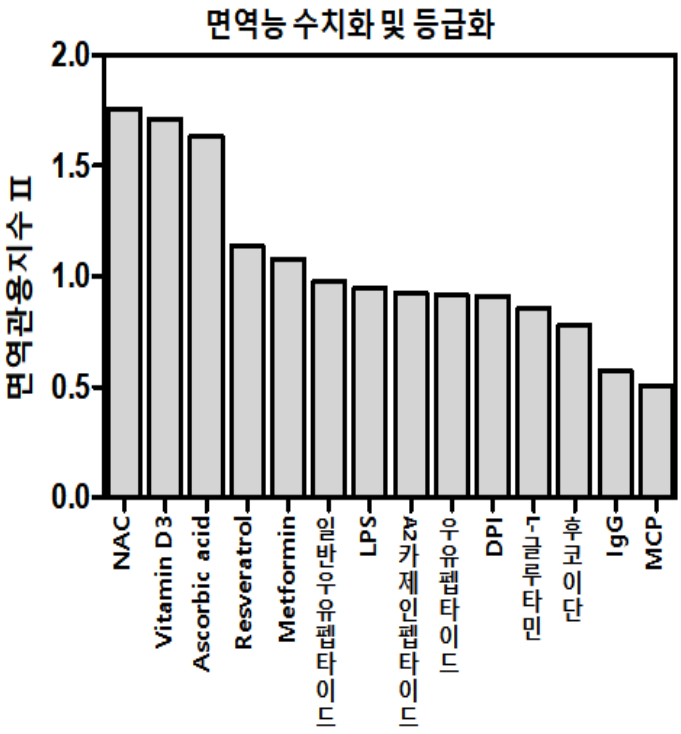
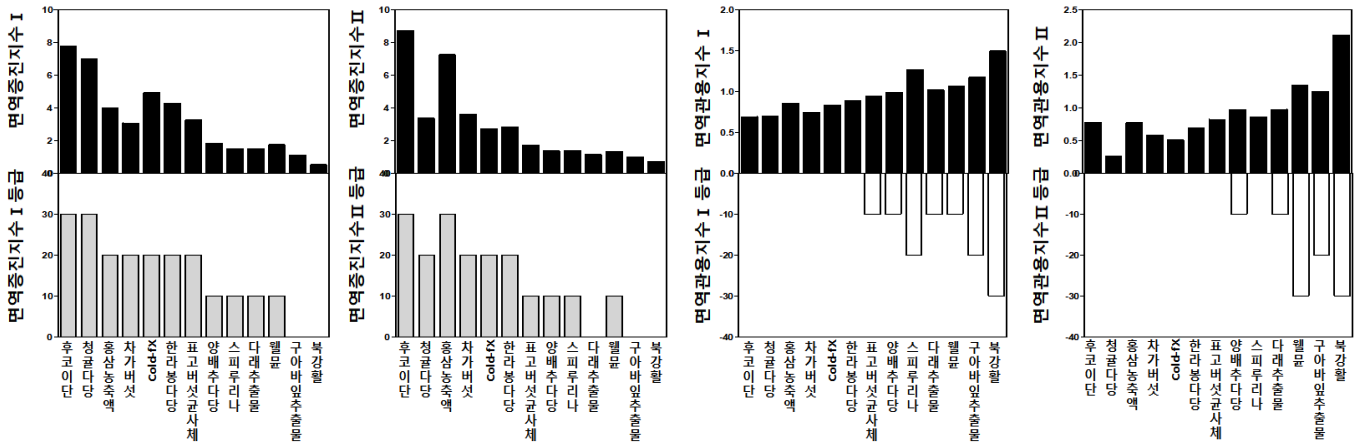


Figure 1.41. 단일물질 면역관용지수 Ⅱ 의 최대값 비교 분석

농도별 소재 처리를 통해 CD11c+세포군에서 얻은 면역관용지수 Ⅱ 의 값들가운데 소재 별 특정 처리농도에서 얻은 면역관용지수 Ⅱ 의 최대값을 얻어 높은 순서대로 그래프로 나타내었다.



면역증진지수 I 등급 (값)	면역증진지수 I 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만

면역증진지수II 등급 (값)	면역증진지수II 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만

면역관용지수 I 등급 (값)	면역관용지수 I 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

면역관용지수II 등급 (값)	면역관용지수II 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

Figure 1.42. 표준 면역식품소재 면역지수의 등급화

표준 소재들의 면역증진지수 Ⅰ,Ⅱ 및 면역관용지수 Ⅰ,Ⅱ들을 수치화하고 범위에 따라 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 구분하였다. 수치화된 각 면역지수 값에 대해 표에 나타난 기준으로 각 지수들의 등급을 나누었다. 비교분석을 용이하게 하기 위해 면역증진지수 등급은 위로, 면역관용지수 등급은 아래로 향하도록 그래프를 그렸다.

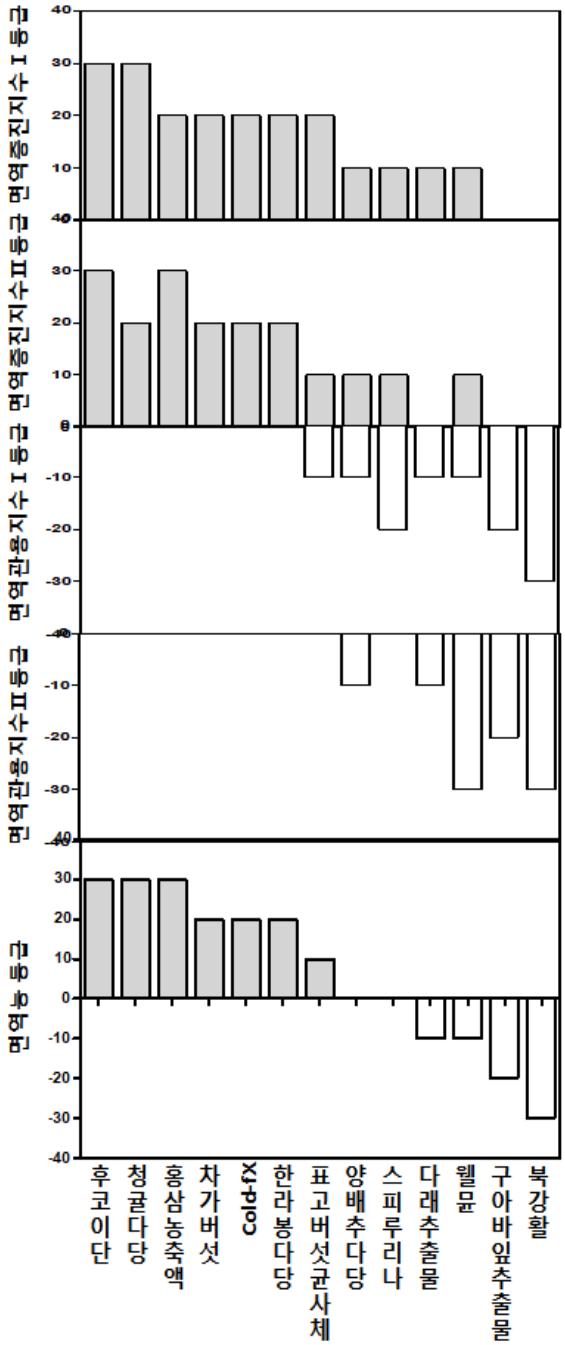


Figure 1.43. 표준 면역식품소재의 각 면역능지수 등급

면역증진지수 등급은 위로 향하고, 면역관용지수 등급은 아래로 향하도록 그래프를 그리고 최종 면역능 등급은 면역증진수 등급 (+) 값과 면여관용지수 (-)값의 최종결과 등급을 면역능 등급으로 표시하였다.

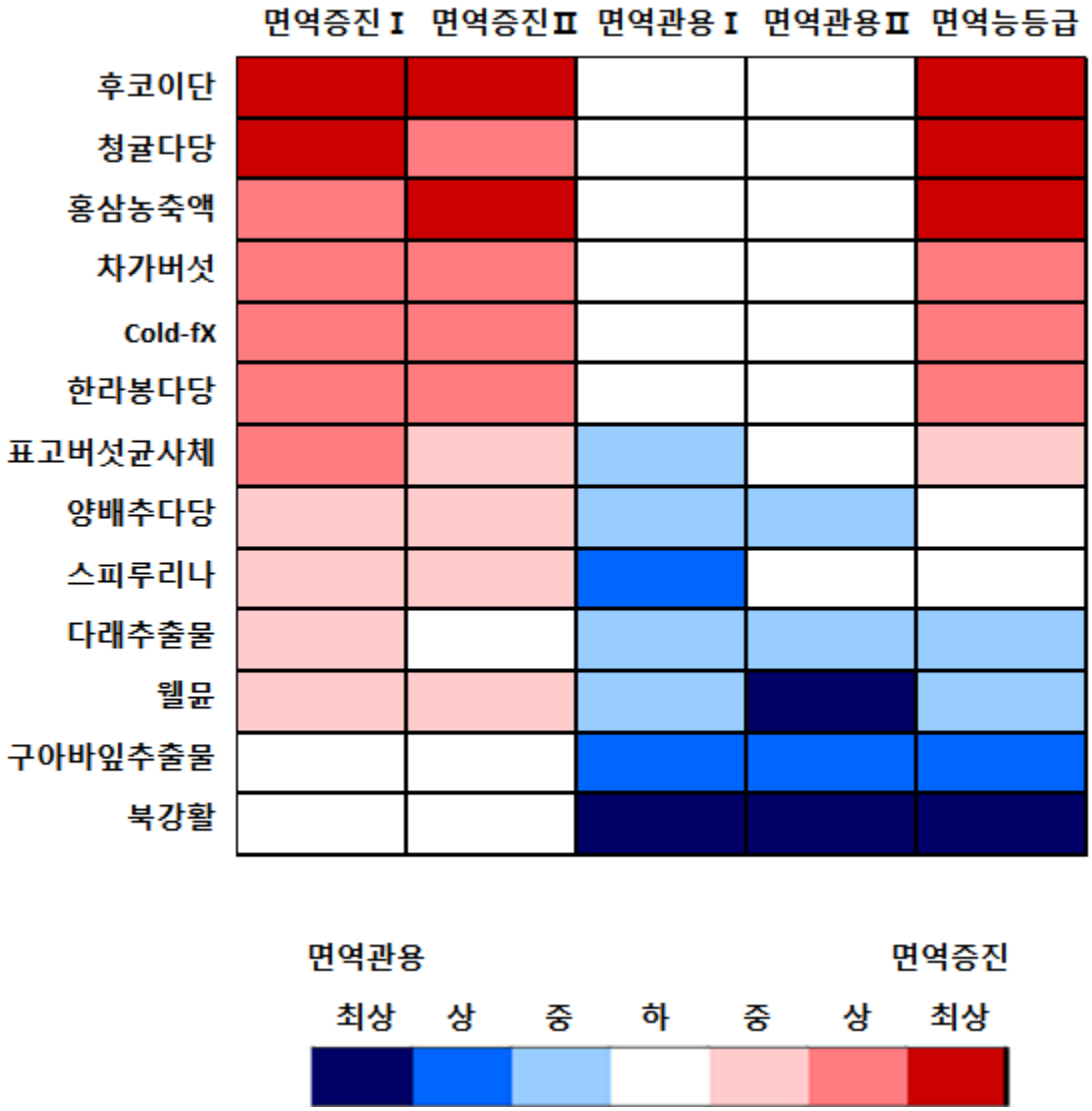
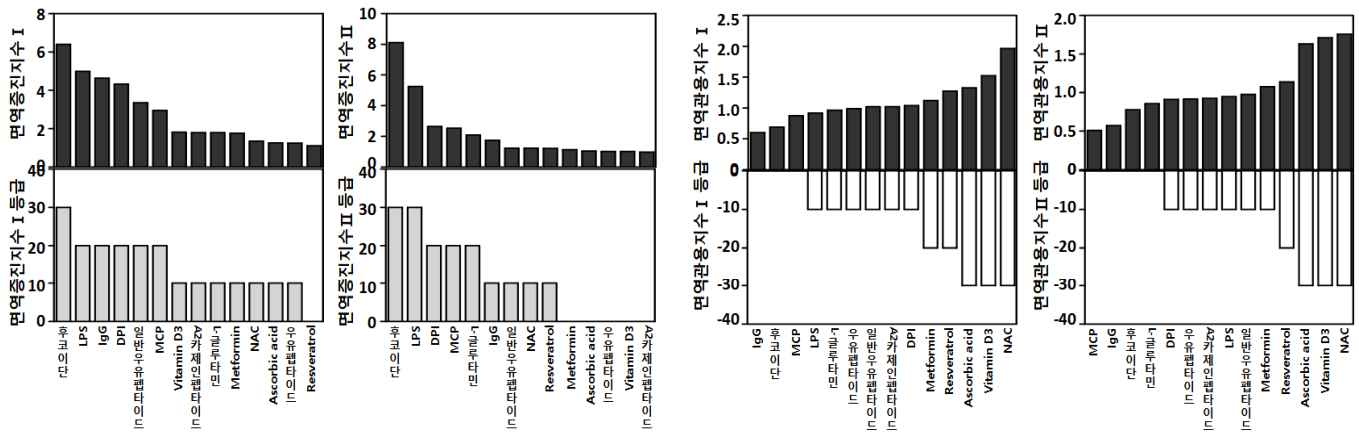


Figure 1.44. 표준 면역식품소재가 갖는 면역지수 등급의 Heat map

(+) 값으로 표현되는 면역증진지수 등급은 빨간색으로 표시하고, (-) 값으로 표시되는 면역관용지수 등급은 파란색으로 표시하여 각 면역에 미치는 방향성을 구별하기 용이하게 하였다. 면역증진 효과와 면역관용효과가 결합되어 나나타는 결과론적 면역효과는 면역능 등급으로 표시되어 각 소재가 갖는 결과적으로 예상되는 면역효과 경향성을 표시하였다.



면역증진지수 I 등급 (값)	면역증진지수 I 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만

면역증진지수II 등급 (값)	면역증진지수II 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만

면역관용지수 I 등급 (값)	면역관용지수 I 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

면역관용지수II 등급 (값)	면역관용지수II 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

Figure 1.45. 단일물질 면역지수의 등급화

단일 물질들의 면역증진지수 Ⅰ,Ⅱ 및 면역관용지수 Ⅰ,Ⅱ들을 수치화하고 범위에 따라 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 구분하였다. 수치화된 각 면역지수 값에 대해 표에 나타난 기준으로 각 지수들의 등급을 나누었다. 비교분석을 용이하게 하기 위해 면역증진지수 등급은 위로, 면역관용지수 등급은 아래로 향하도록 그래프를 그렸다.

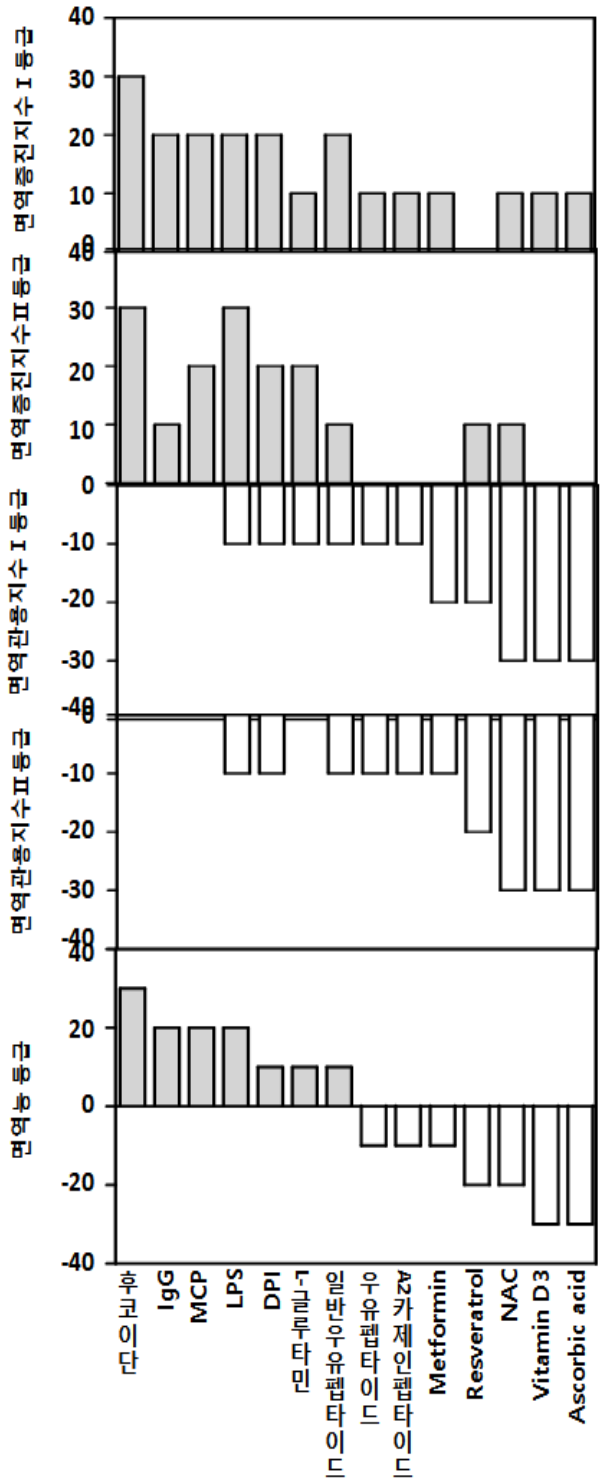


Figure 1.46. 단일물질의 각 면역능지수 등급

면역증진지수 등급은 위로 향하고, 면역관용지수 등급은 아래로 향하도록 그래프를 그리고 최종 면역능 등급은 면역증진수 등급 (+) 값과 면여관용지수 (-)값의 최종결과 등급을 면역능 등급으로 표시하였다.

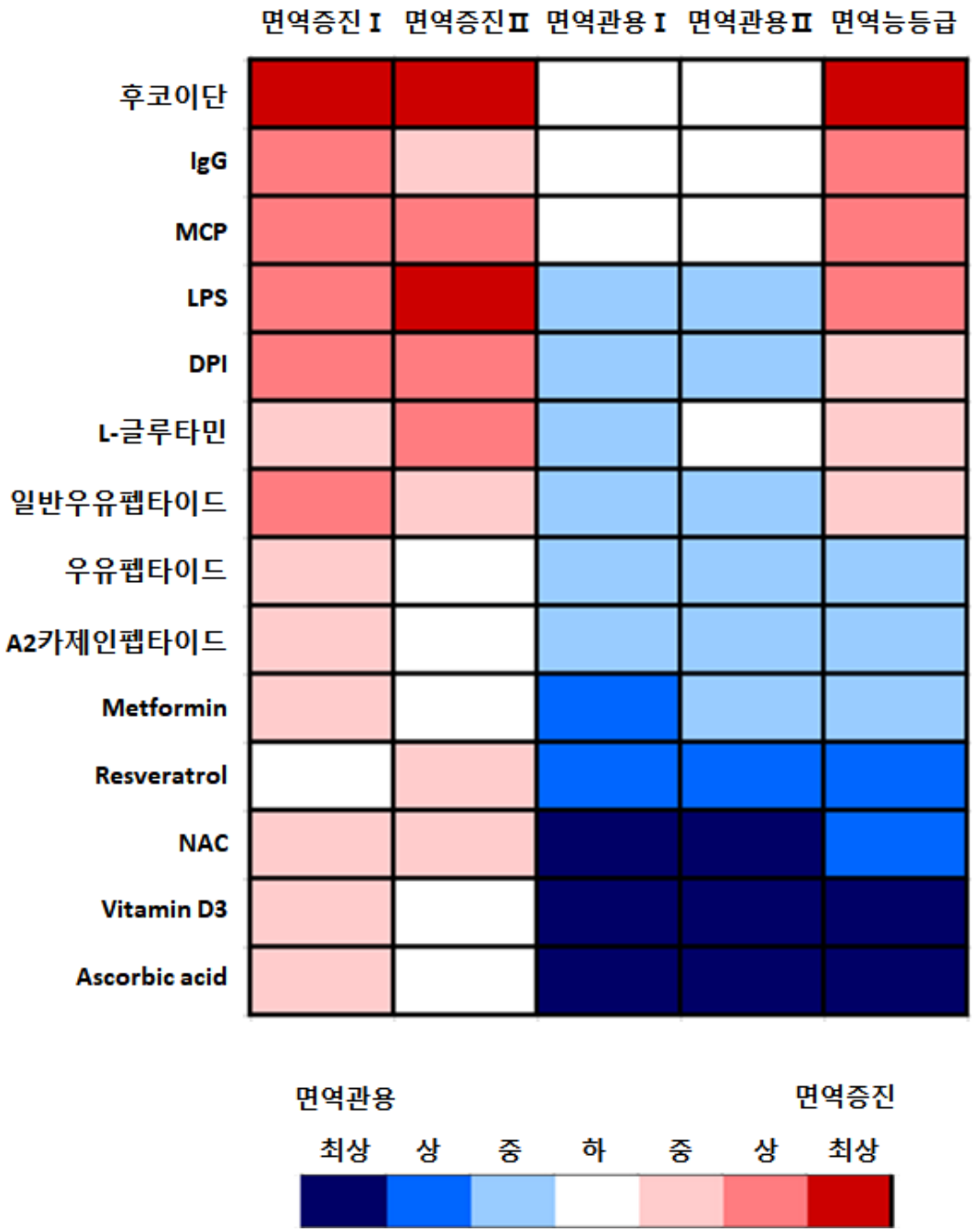


Figure 1.47. 단일물질이 갖는 면역지수 등급의 Heat map

(+) 값으로 표현되는 면역증진지수 등급은 빨간색으로 표시하고, (-) 값으로 표시되는 면역관용지수 등급은 파란색으로 표시하여 각 면역에 미치는 방향성을 구별하기 용이하게 하였다. 면역증진 효과와 면역관용효과가 결합되어 나나타는 결과론적 면역효과는 면역능 등급으로 표시되어 각 소재가 갖는 결과적으로 예상되는 면역효과 경향성을 표시하였다.

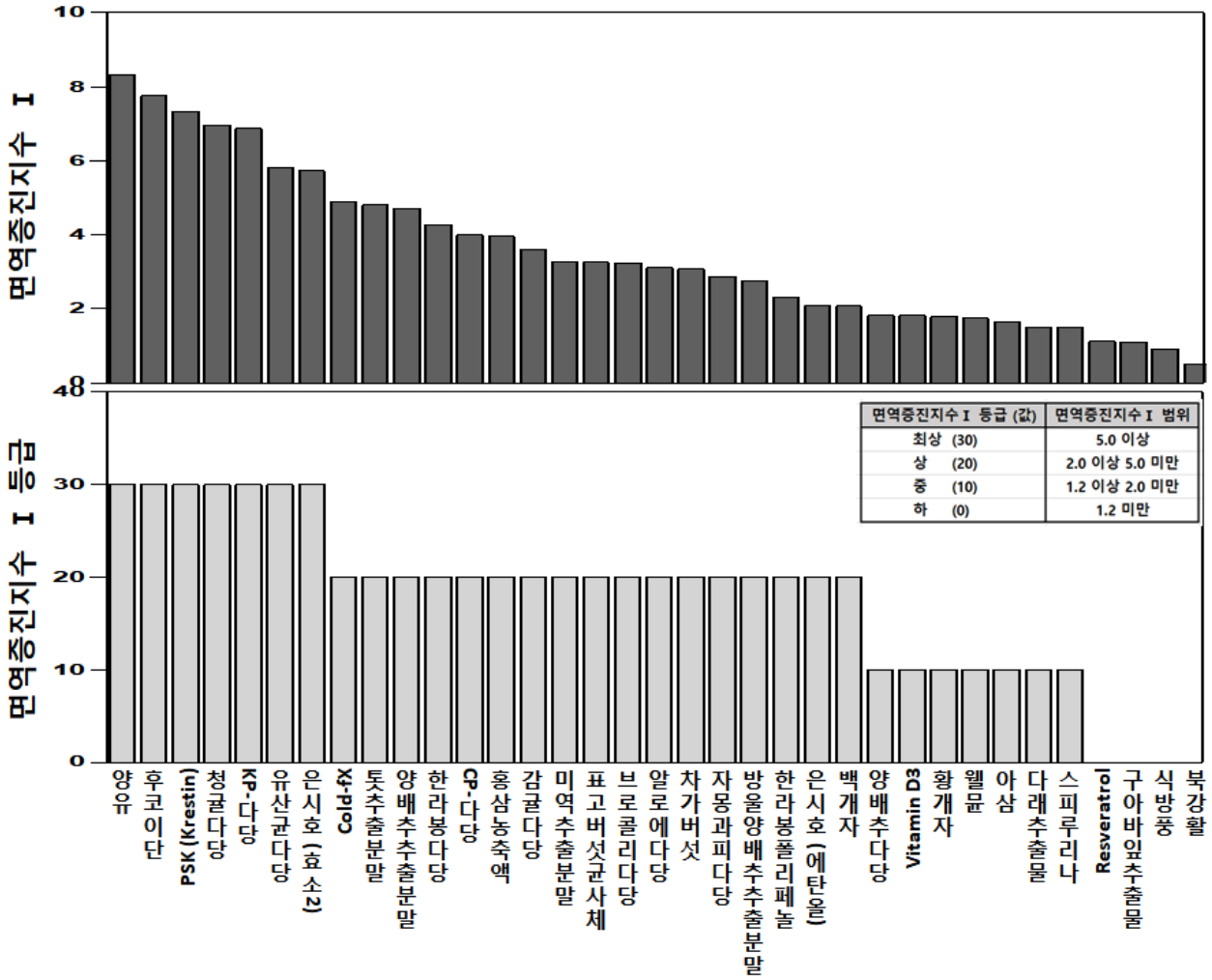


Figure 1.48. 개발소재의 면역증진지수 I 의 등급화

개발 소재들의 면역증진지수 I를 수치화하고 범위에 따라 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 구분하였다. 수치화된 각 면역지수 값에 대해 표에 나타난 기준으로 각 지수들의 등급을 나누었다. 비교분석을 용이하게 하기 위해 면역증진지수 I 등급은 위로 향하도록 그래프화 하였다.

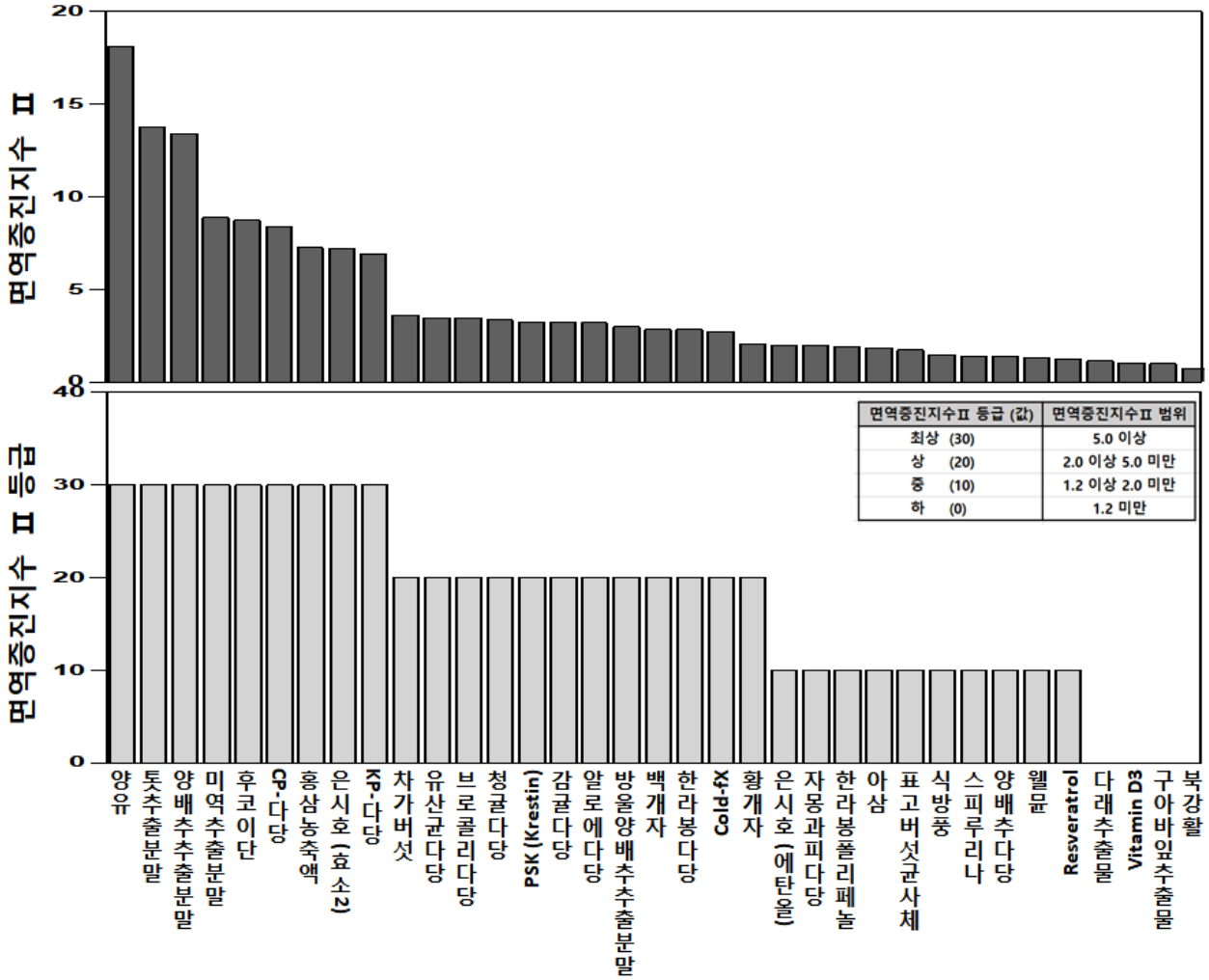


Figure 1.49. 개발소재의 면역증진지수 II 의 등급화

개발 소재들의 면역증진지수 II 를 수치화하고 범위에 따라 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 구분하였다. 수치화된 각 면역지수 값에 대해 표에 나타난 기준으로 각 지수들의 등급을 나누었다. 비교분석을 용이하게 하기 위해 면역증진지수 II 등급은 위로 향하도록 그래프화 하였다.

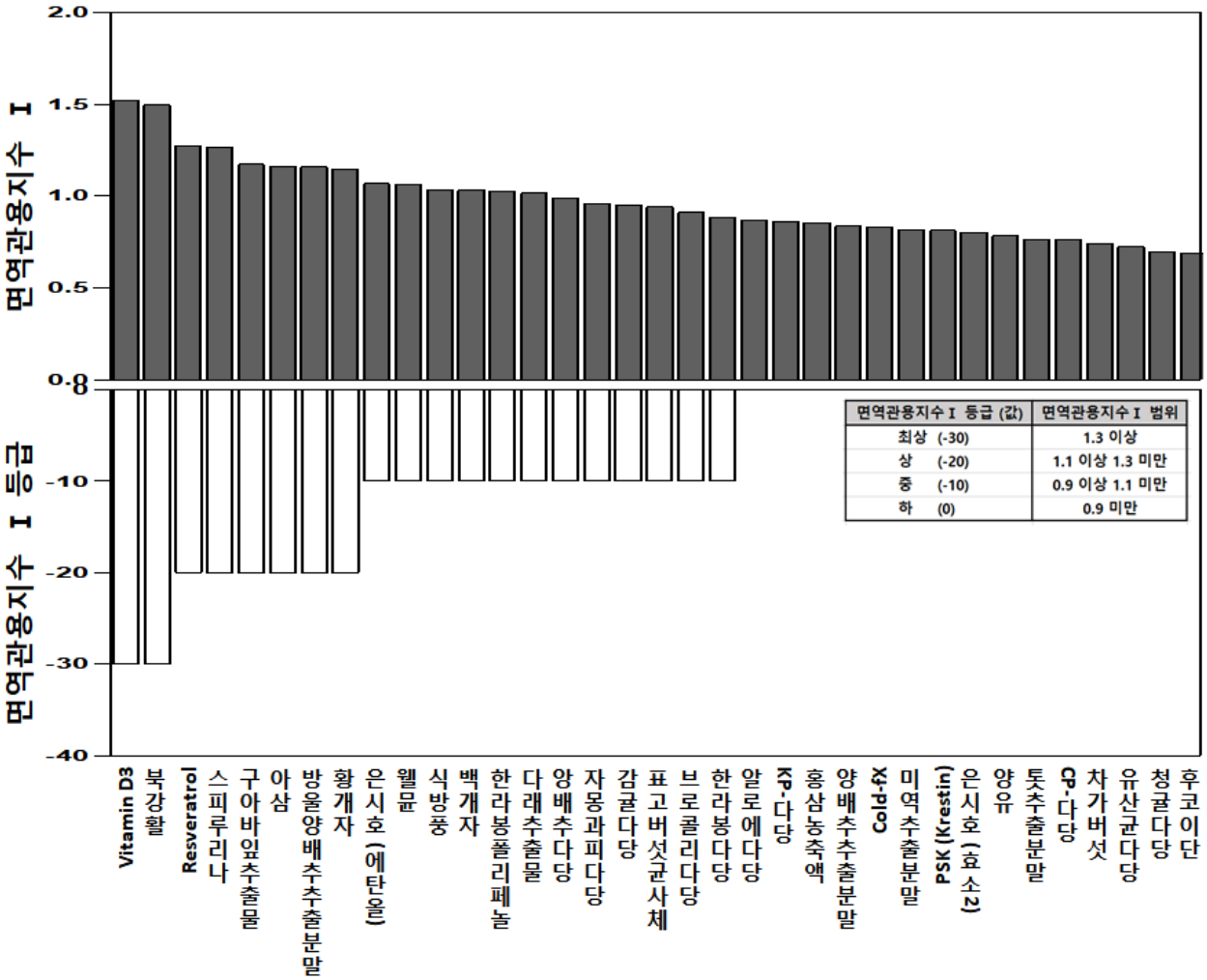


Figure 1.50. 개발소재의 면역관용지수 I 의 등급화

개발 소재들의 면역관용지수 I를 수치화하고 범위에 따라 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 구분하였다. 수치화된 각 면역지수 값에 대해 표에 나타난 기준으로 각 지수들의 등급을 나누었다. 비교분석을 용이하게 하기 위해 면역관용지수 I 등급은 아래로 향하도록 그래프화 하였다.

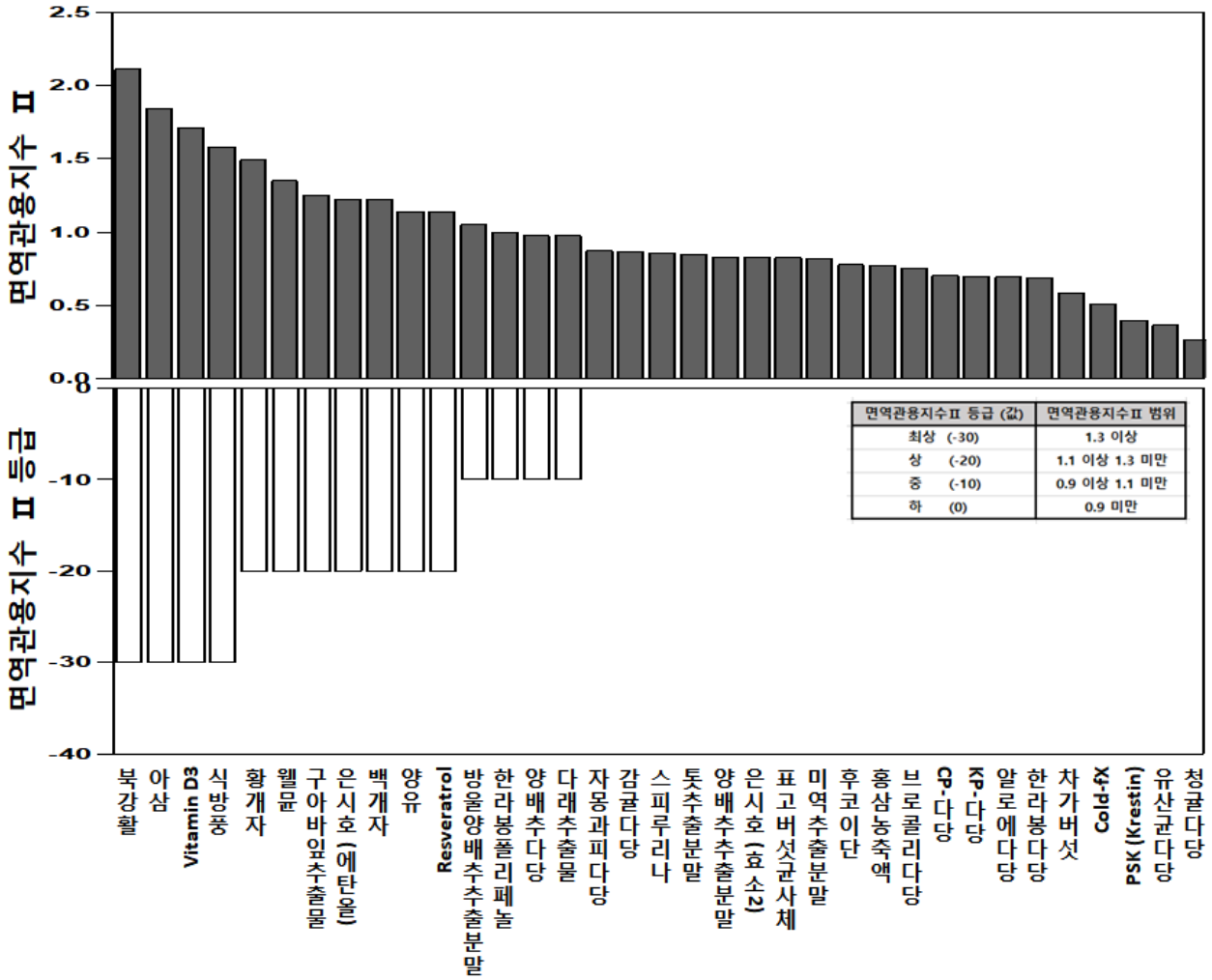


Figure 1.51. 개발소재의 면역관용지수 II 의 등급화

개발 소재들의 면역관용지수 II 를 수치화하고 범위에 따라 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 구분하였다. 수치화된 각 면역지수 값에 대해 표에 나타난 기준으로 각 지수들의 등급을 나누었다. 비교분석을 용이하게 하기 위해 면역관용지수 II 등급은 아래로 향하도록 그래프화 하였다.

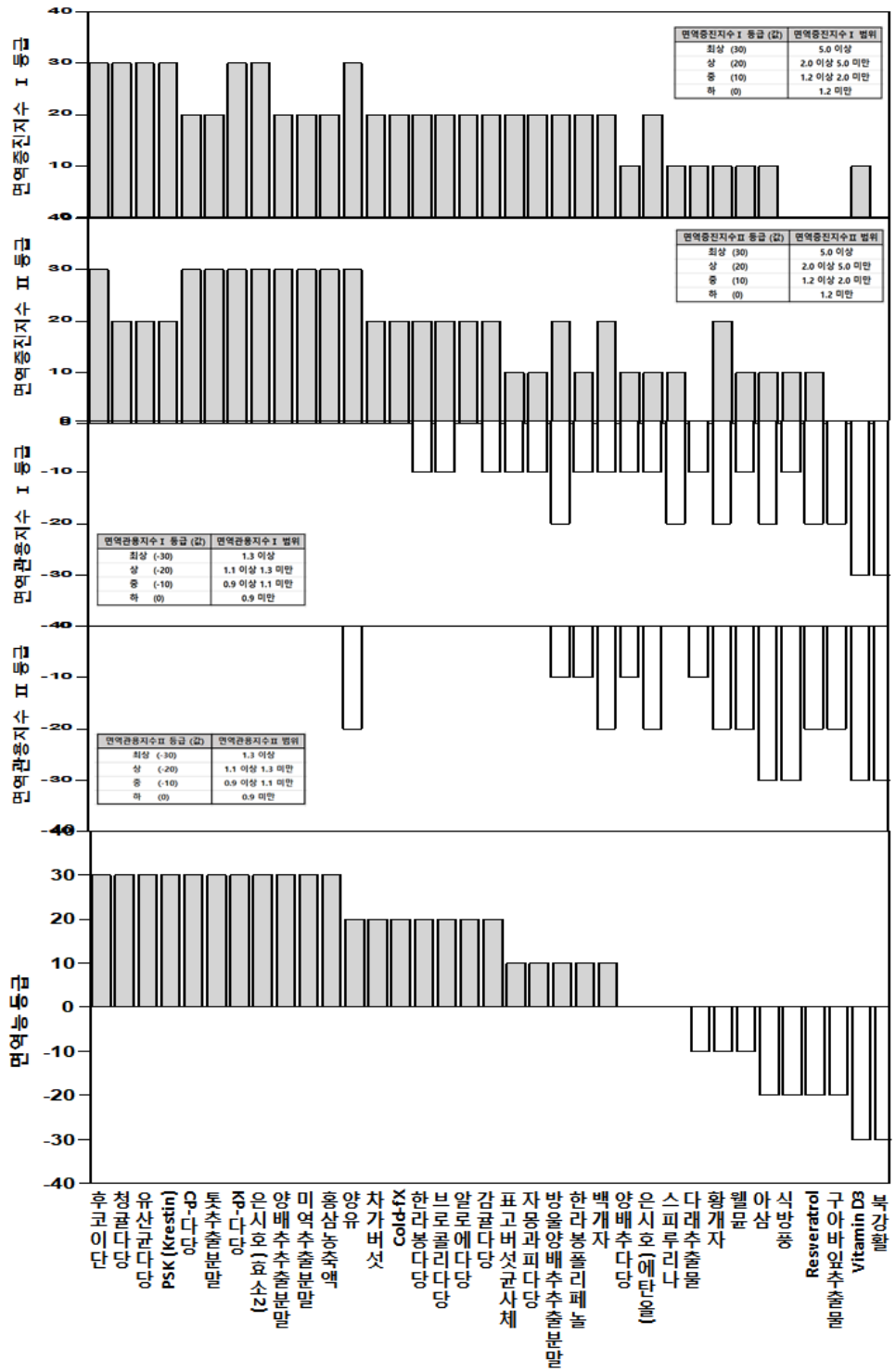


Figure 1.52. 개발소재의 각 면역능지수 등급

면역증진지수 등급은 위로 향하고, 면역관용지수 등급은 아래로 향하도록 그래프를 그리고 최종 면역능 등급은 면역증진수 등급 (+) 값과 면여관용지수 (-)값의 최종결과 등급을 면역능 등급으로 표시하였다.

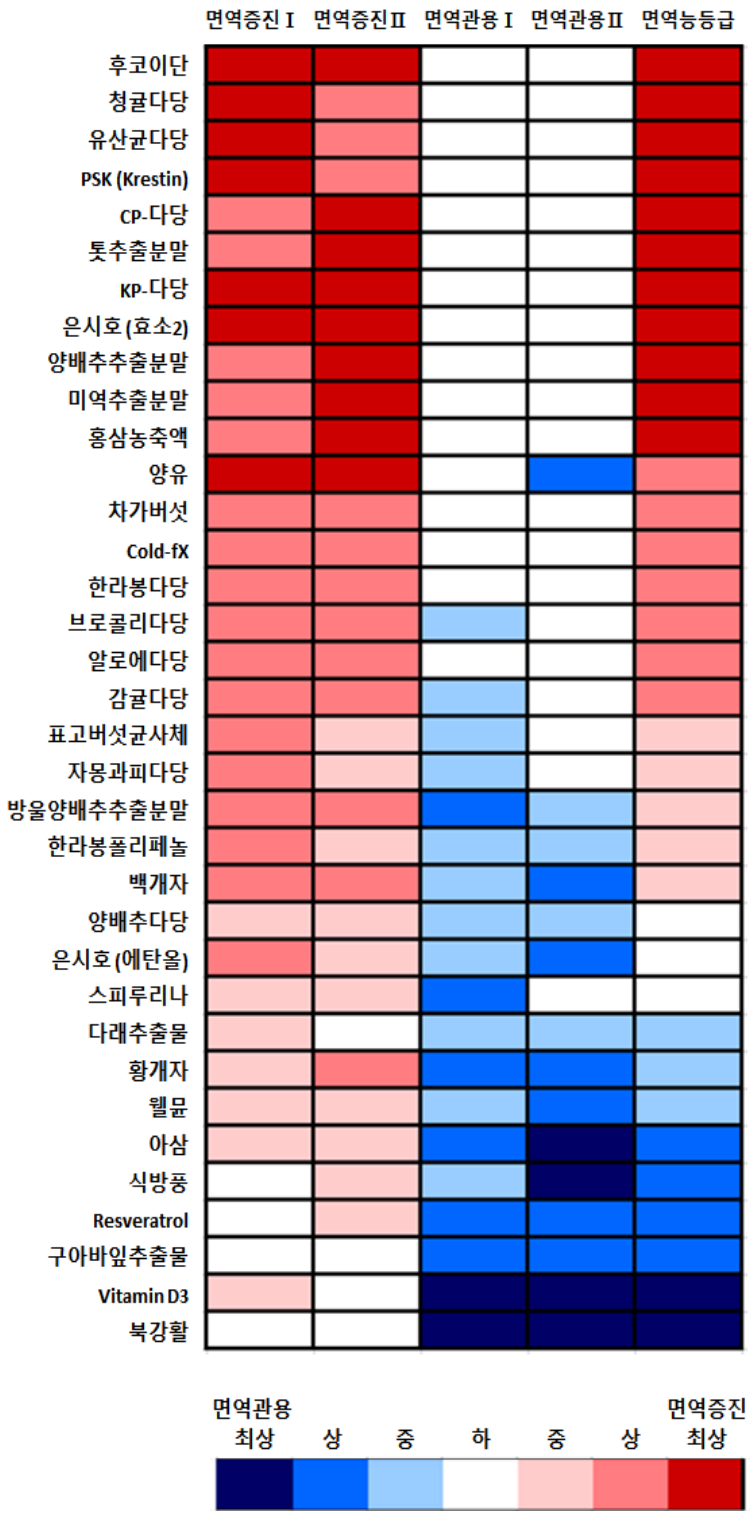


Figure 1.53. 개발소재가 갖는 면역지수 등급의 Heat map

(+) 값으로 표현되는 면역증진지수 등급은 빨간색으로 표시하고, (-) 값으로 표시되는 면역관용지수 등급은 파란색으로 표시하여 각 면역에 미치는 방향성을 구별하기 용이하게 하였다. 면역증진 효과와 면역관용효과가 결합되어 나나타는 결과론적 면역효과는 면역능 등급으로 표시되어 각 소재가 갖는 결과적으로 예상되는 면역효과 경향성을 표시하였다.

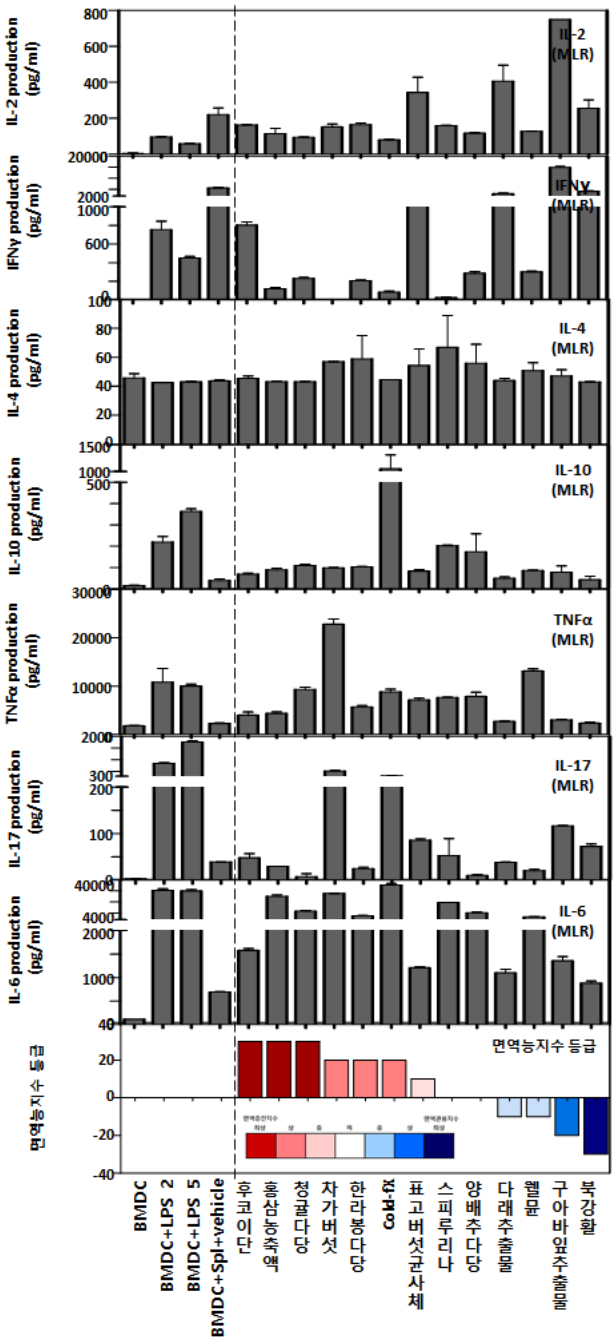


Figure 1.54. 혼합림프구 반응에서의 표준 식품면역소재에 의한 싸이토카인 생성

골수유래 수지상세포와 동종이계 마우스의 비장세포를 혼합배양 했을 때 표준소재 처리에 의해 배양액에 생성된 싸이토카인 농도를 측정하였다.

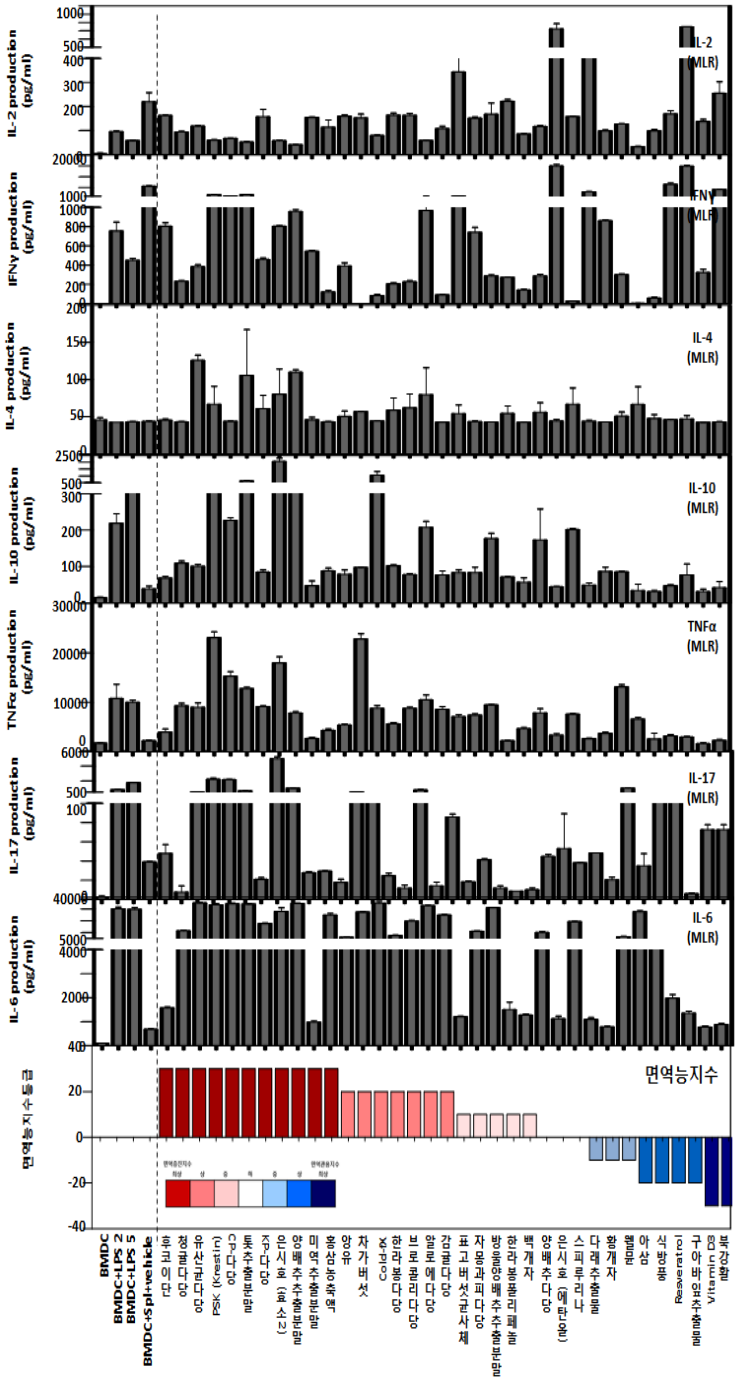
BMDC: BMDC alone

BMDC+LPS2 ; BMDC+LPS 2 μg/ml,

BMDC+LPS5 ; BMDC+LPS 5 μg/ml,

BMDC+spl+vehicle: BMDC+spl+vehicle

표준소재 ; BMDC+spl+표준소재



Fiugre 1.55. 혼합림프구 반응에서의 개발소재에 의한 싸이토카인 생성

골수유래 수지상세포와 동종이계 마우스의 비장세포를 혼합배양 했을 때 개발소재 처리에 의해 배양액에 생성된 싸이토카인 농도를 측정하였다.

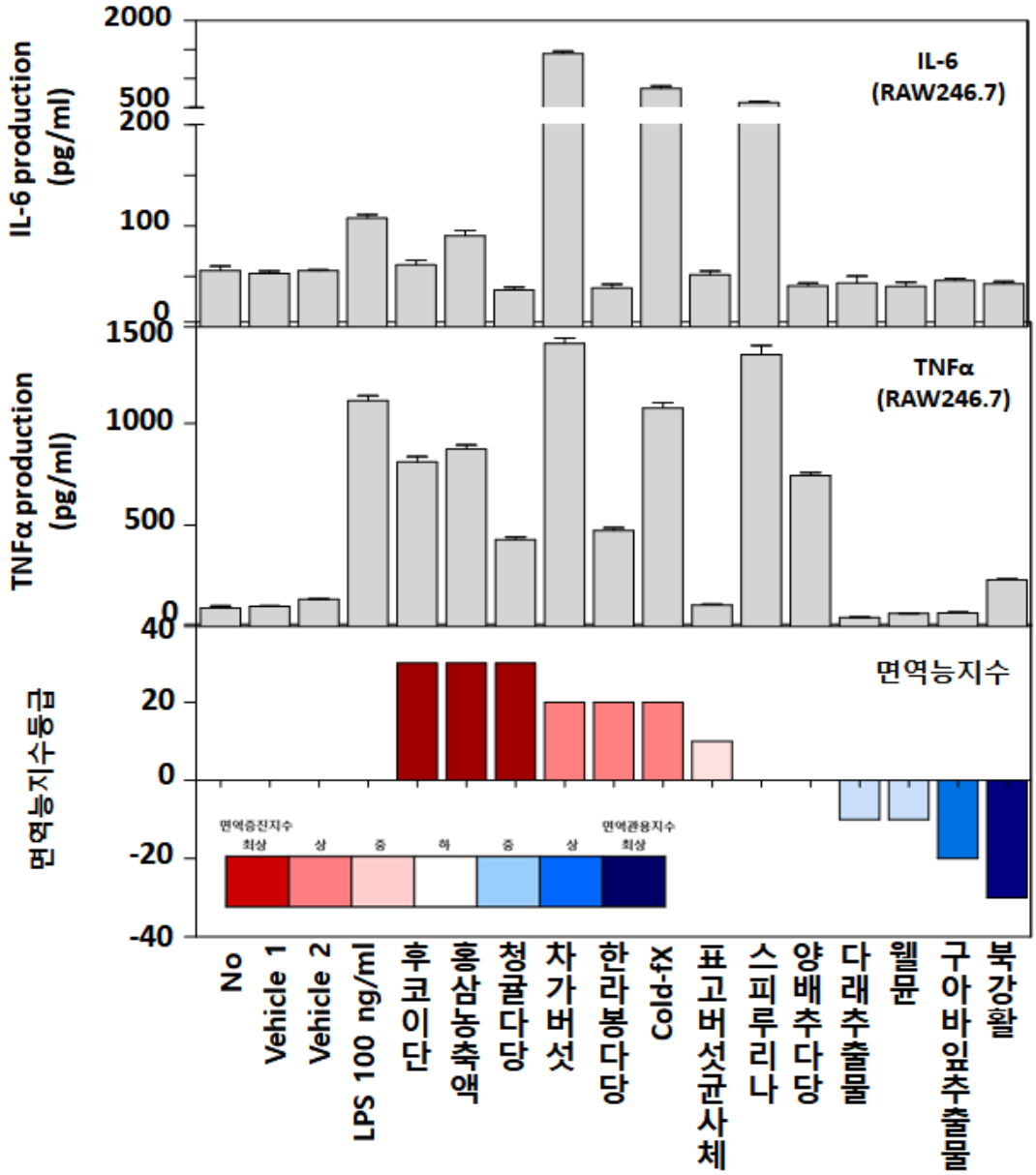
BMDC: BMDC alone

BMDC+LPS2 ; BMDC+LPS 2 μg/ml,

BMDC+LPS5 ; BMDC+LPS 5 μg/ml,

BMDC+spl+vehicle ; BMDC+spl+vehicle

표준소재 ; BMDC+spl+표준소재

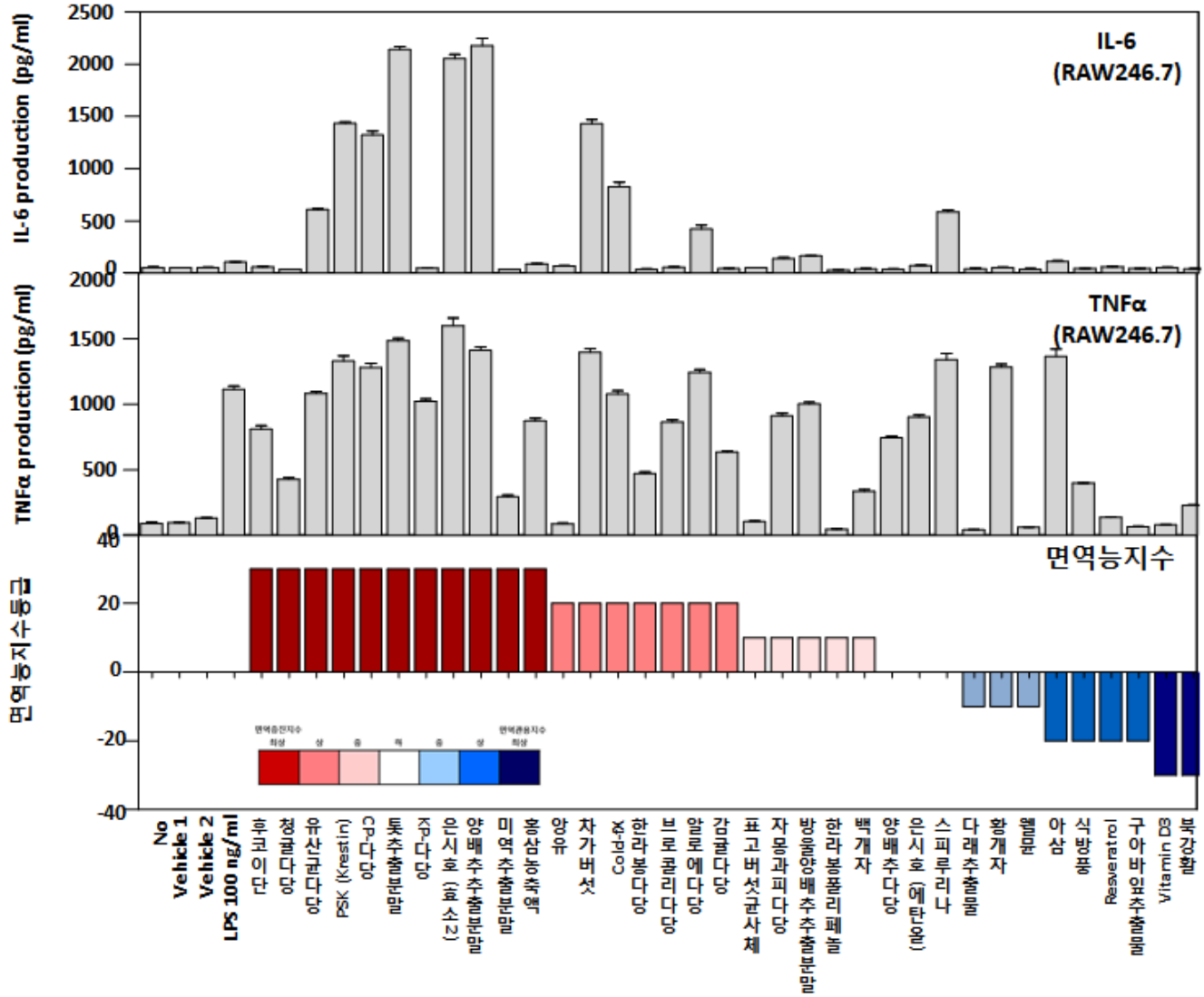


Fiugre 1.56. 표준 면역식품소재처리에 의한 대식세포주 싸이토카인 생성

마우스 대식세포 인 RAW246.7에 표준소재를 24시간 처리 한 뒤, 표준소재 처리에 의해 배양액에 생성된 싸이토카인 농도를 측정하였다.

No ; no treated

LPS ; 100 ng/ml



Fiugre 1.57. 개발 소재처리에 의한 대식세포주 싸이토카인 생성

마우스 대식세포 인 RAW246.7에 개발소재를 24시간 처리 한 뒤, 개발소재 처리에 의해 배양액에 생성된 싸이토카인 농도를 측정하였다.

No ; no treated

LPS ; 100 ng/ml

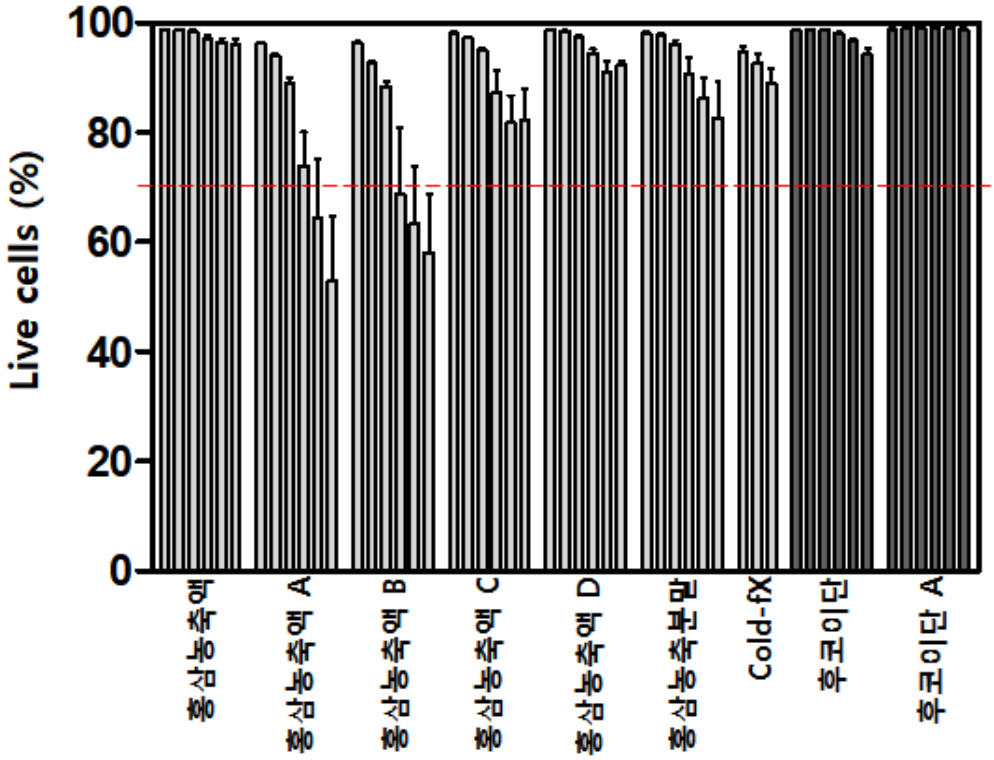


Figure 1.58. 시중 판매 제조사별 홍삼류 및 후코이단 식품소재의 처리가 수지상세포의 생존률에 미치는 영향

기존소재 및 시중에 판매되고 있는 여러 제조사들의 식품소재의 처리가 수지상세포에 대한 세포독성에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 6일째의 분화된 수지상세포를 48-well culture plate에 3 x 10^5개씩 분주한 후, 각 well에 소재를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 유세포 분석에 이용하였다. Live cells(%)이 70% 이상인 경우를 이 후 분석과정에 포함시켰다.

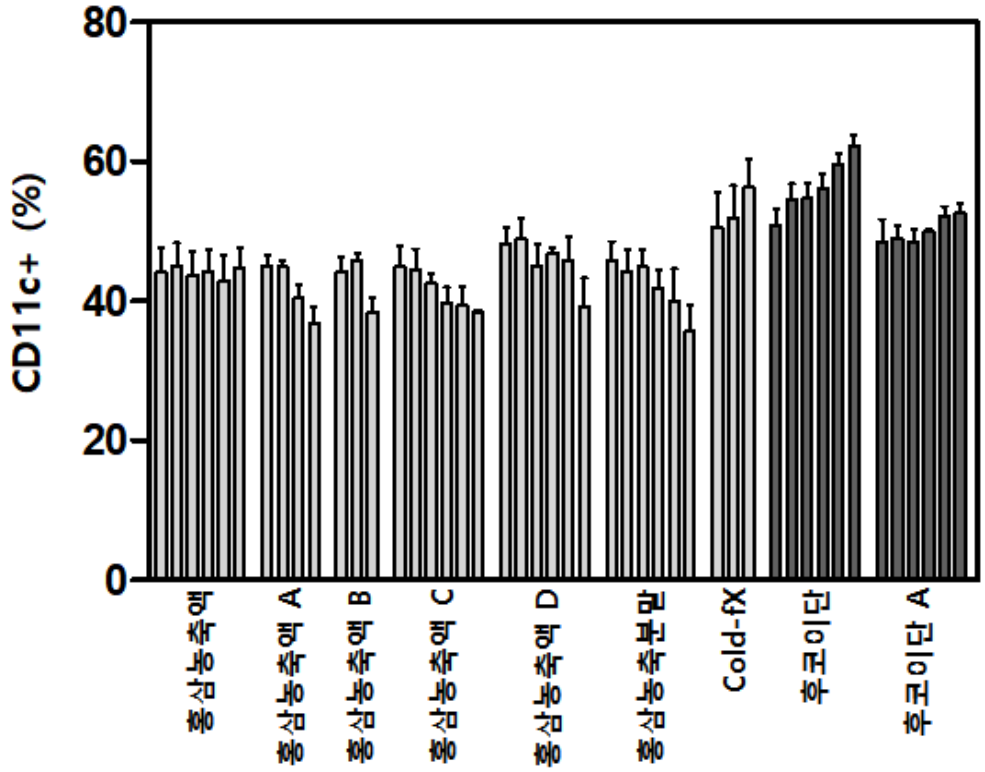


Figure 1.59. 시중 판매 제조사별 홍삼류 및 후코이단 식품소재의 처리에 의한 CD11c의 발현 변화

6일째의 분화된 수지상세포에 식품소재를 농도별로 처리하여 24시간 배양 한 후 유세포 분석에 이용하였다. Live cells(%)이 70% 이상인 세포에서 수지상세포의 positive marker인 CD11c 발현 정도를 분석하였다.

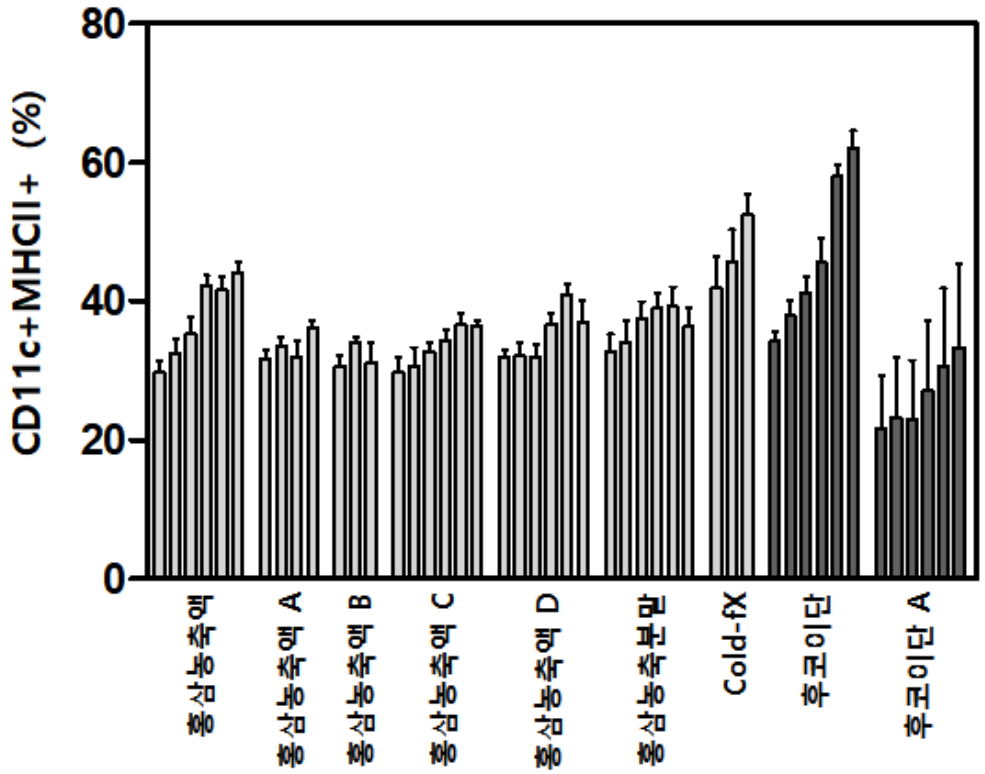


Figure 1.60. 시중 판매 제조사별 홍삼류 및 후코이단 식품소재의 처리에 의한 $CD11c^{+}$ $MHCII^{+}$ 세포군 구성비 변화

소재 처리에 의한 수지상세포의 성숙 지표 인 MHC II 및 CD11c의 발현 정도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 6일 동안 분화시킨 수지상세포에 각각의 소재들을 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 세포생존율(Live cells)이 70% 이상인 세포에서 MHC II 및 CD11c 둘 다 발현하는 세포들의 구성비를 전체 세포들에 대한 백분율로 분석하였다.

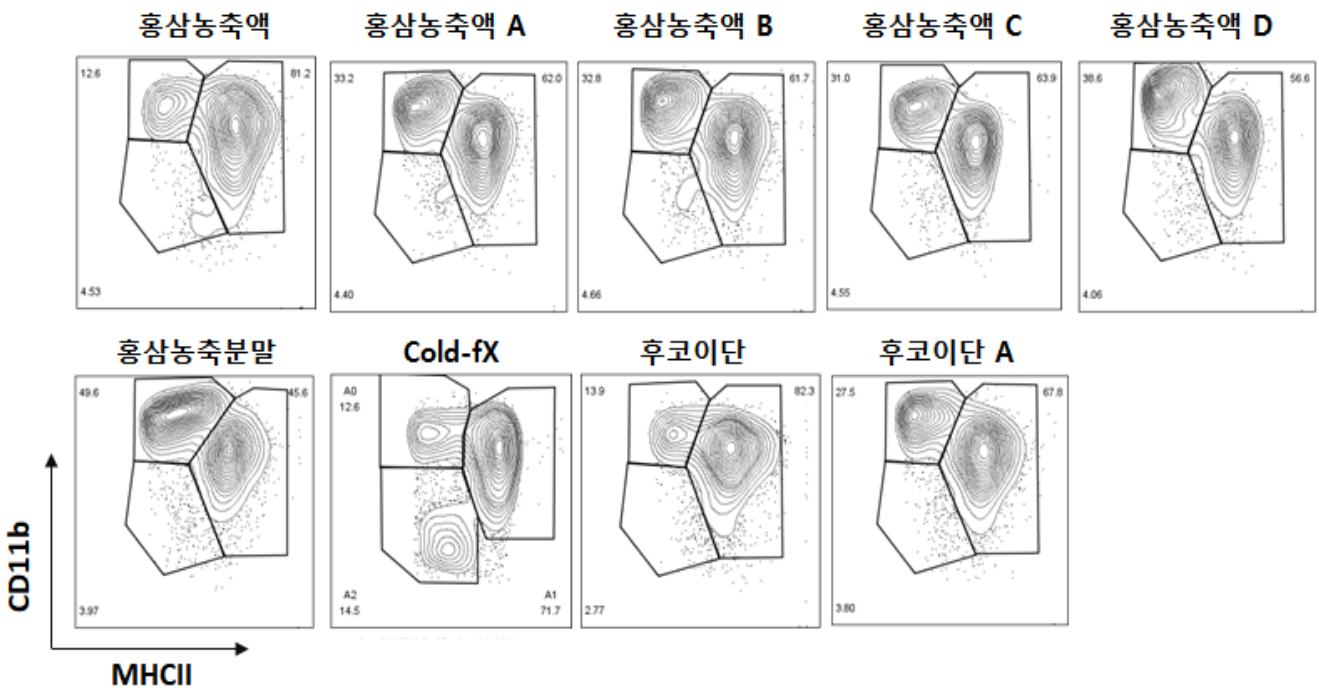


Figure 1.61. 시중 판매 제조사별 홍삼류 및 후코이단 식품소재를 처리한 마우스 골수 유래 수지상세포 표면 표지분자들의 발현

배양 6일 째, 수지상 세포에 각각의 소재들을 농도 별로 24시간 처리 한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 세포 생존율(Live cells %)이 70% 이상인 세포에서 수지상세포의 세포 유착 분자(cell adhesion molecule)인 CD11b 와 MHC class II의 발현 정도를 확인하였다.

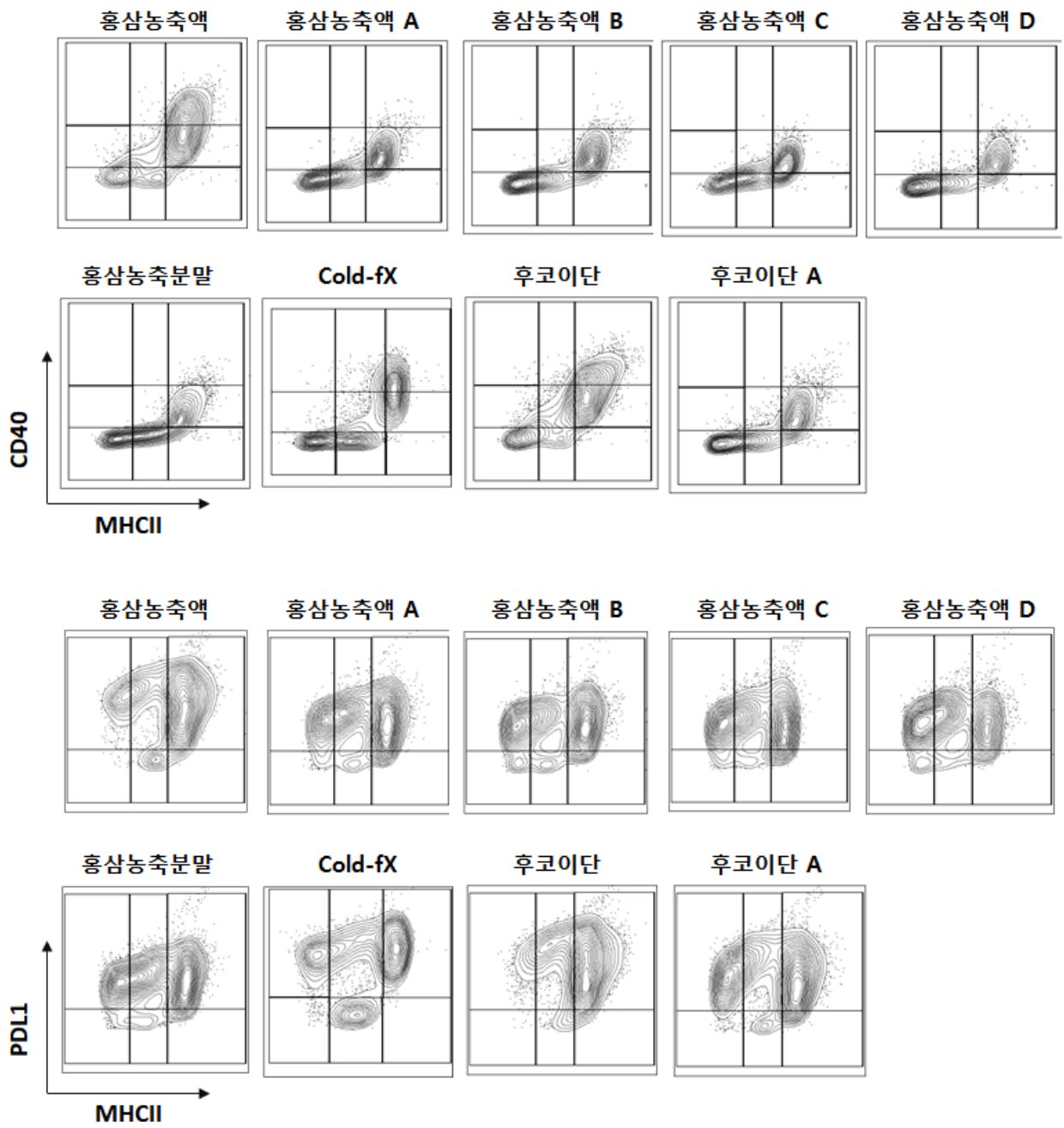


Figure 1.62. 시중 판매 제조별 홍삼류 및 후코이단 식품소재를 처리한 수지상 세포에서의 MHCII, CD40, 및 PDL1의 발현 분석

6일째의 분화된 수지상세포에 소재를 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후, 살아있는 CD11c+수지상 세포군에서 MHCII와 CD40의 발현 정도를 유세포 분석을 통해 확인하였다. 위 ; MHCII와 CD40을 각각 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군에 따라 9가지의 구획으로 나누어 설정하였다. 아래 ; MHCII를 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군으로 나누고, PD-L1을 발현하지 않는 세포군과 발현하는 세포군으로 나누어 6가지의 구획을 설정하였다.

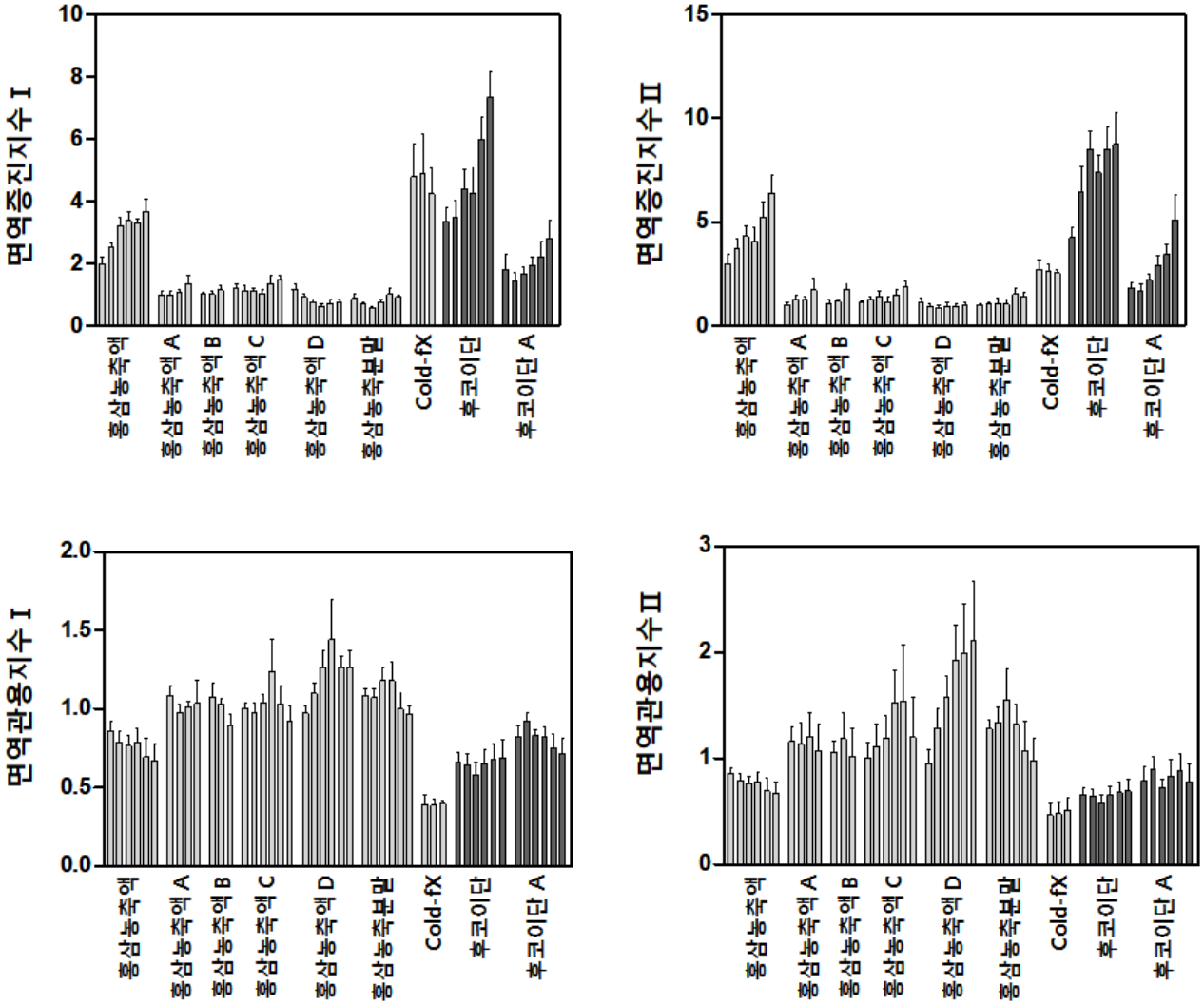
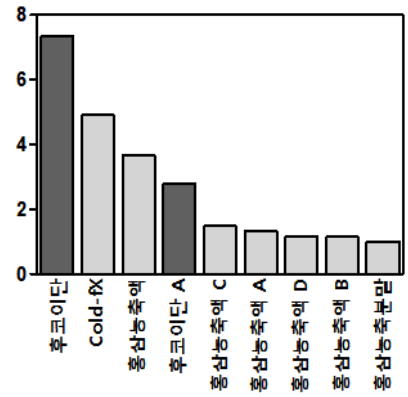
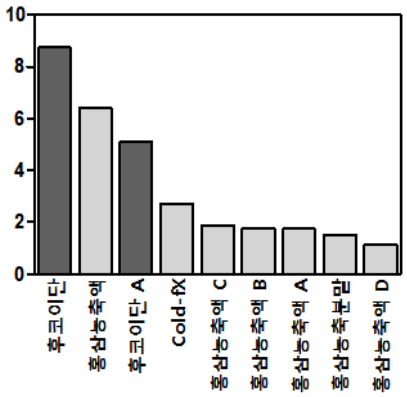


Figure 1.63. 농도별로 처리된 시중 판매 제조사별 홍삼류 및 후코이단 식품소재의 면역지수

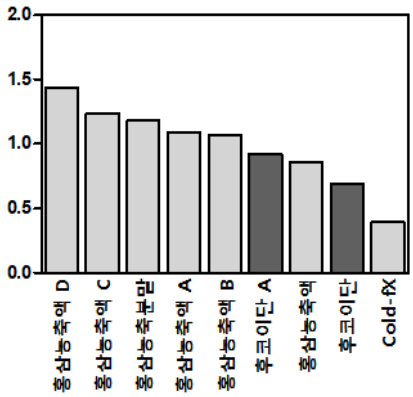
CD11c+MHCII+세포군에서 얻은 면역증진지수Ⅰ, CD11c+ 세포군에서 얻은 면역증진지수Ⅱ, 면역관용지수Ⅰ,Ⅱ를 수치화하여 그래프로 나타내었다.



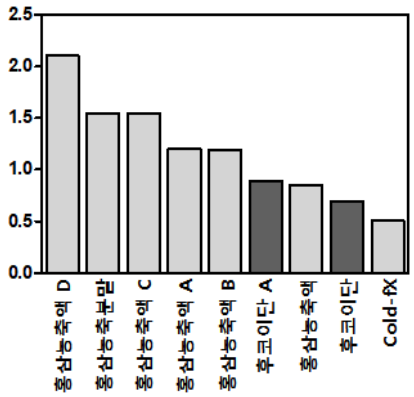
면역증진지수 I		
평가소재	면역능지수값	처리농도 (μg/ml)
후코이단	7.336	400
Cold-fX	4.911	200
홍삼농축액	3.673	1000
후코이단 A	2.794	400
홍삼농축액 C	1.490	1000
홍삼농축액 A	1.338	600
홍삼농축액 D	1.162	100
홍삼농축액 B	1.144	400
홍삼농축분말	1.008	800



면역증진지수II		
평가소재	면역능지수값	처리농도 (μg/ml)
후코이단	8.745	400
홍삼농축액	6.404	1000
후코이단 A	5.092	400
Cold-fX	2.721	100
홍삼농축액 C	1.891	1000
홍삼농축액 B	1.738	400
홍삼농축액 A	1.735	600
홍삼농축분말	1.512	800
홍삼농축액 D	1.136	100



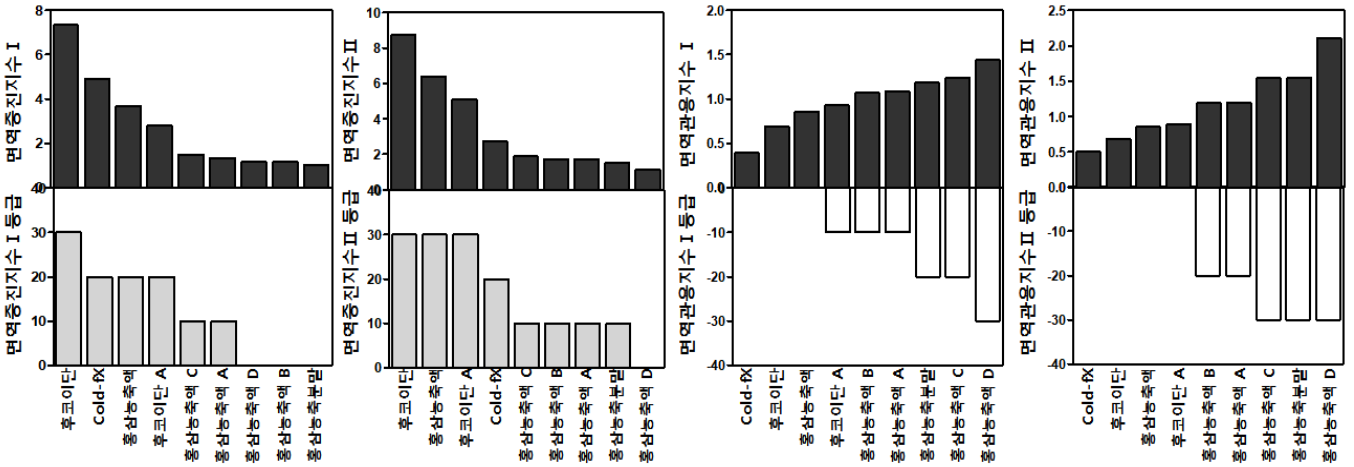
면역관용지수 I		
평가소재	면역능지수값	처리농도 (μg/ml)
홍삼농축액 D	1.440	600
홍삼농축액 C	1.240	600
홍삼농축분말	1.181	400
홍삼농축액 A	1.087	100
홍삼농축액 B	1.073	100
후코이단 A	0.925	20
홍삼농축액	0.856	100
후코이단	0.691	400
Cold-fX	0.395	400



면역관용지수II		
평가소재	면역능지수값	처리농도 (μg/ml)
홍삼농축액 D	2.109	1000
홍삼농축분말	1.552	400
홍삼농축액 C	1.541	800
홍삼농축액 A	1.203	400
홍삼농축액 B	1.192	200
후코이단 A	0.893	20
홍삼농축액	0.856	100
후코이단	0.691	400
Cold-fX	0.508	400

Figure 1.64. 시중 판매 제조사별 홍삼류 및 후코이단 식품소재의 면역지수들의 의 최대값 비교 분석

농도별 소재 처리를 통해 CD11c+MHCII+세포군에서 얻은 면역지수들의 값들가운데 소재별 특정 처리농도에서 얻은 각각의 면역지수들의 최대값을 얻어 높은 순서대로 그래프로 나타내었다.



면역증진지수 I 등급 (값)	면역증진지수 I 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만

면역증진지수II 등급 (값)	면역증진지수II 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만

면역관용지수 I 등급 (값)	면역관용지수 I 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

면역관용지수II 등급 (값)	면역관용지수II 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

Figure 1.65. 시중 판매 제조사별 홍삼류 및 후코이단 식품소재의 면역지수 등급화

홍삼류 및 후코이단 식품소재들의 면역증진지수 Ⅰ,Ⅱ 및 면역관용지수 Ⅰ,Ⅱ들을 수치화하고 범위에 따라 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 구분하였다. 수치화된 각 면역지수 값에 대해 표에 나타난 기준으로 각 지수들의 등급을 나누었다. 비교분석을 용이하게 하기 위해 면역증진지수 등급은 위로, 면역관용지수 등급은 아래로 향하도록 그래프를 그렸다.

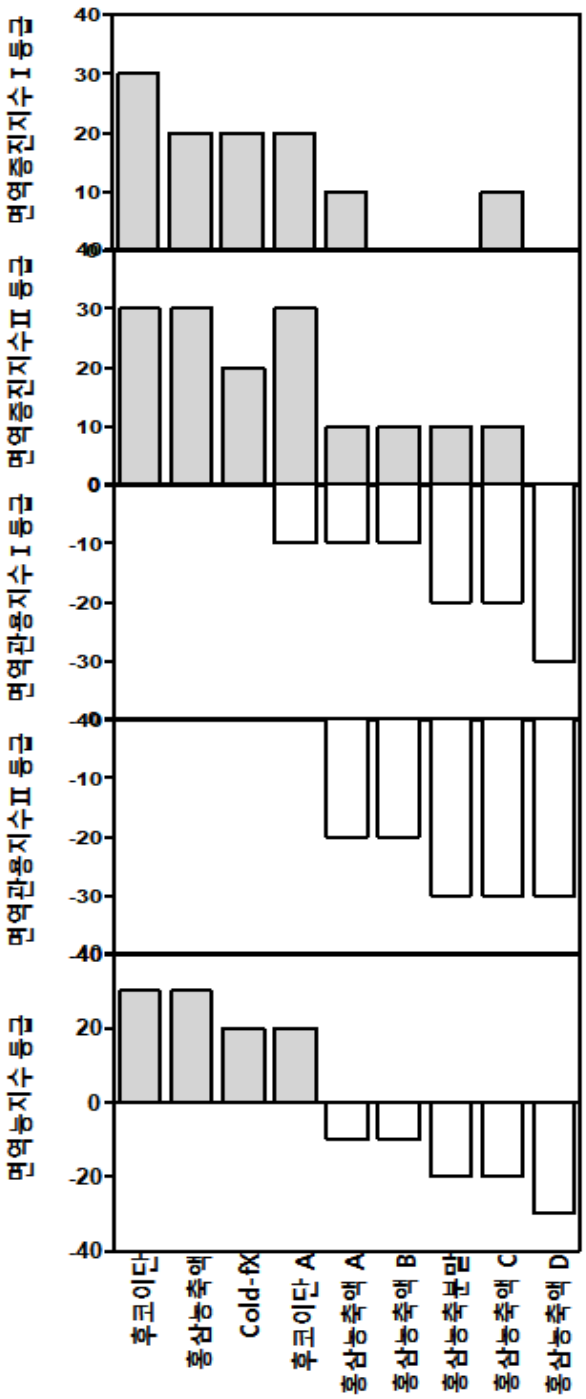


Figure 1.66. 시중 판매 제조사별 홍삼류 및 후코이단 식품소재의 각 면역능지수 등급

면역증진지수 등급은 위로 향하고, 면역관용지수 등급은 아래로 향하도록 그래프를 그리고 최종 면역능 등급은 면역증진수 등급 (+) 값과 면여관용지수 (-)값의 최종결과 등급을 면역능 등급으로 표시하였다.

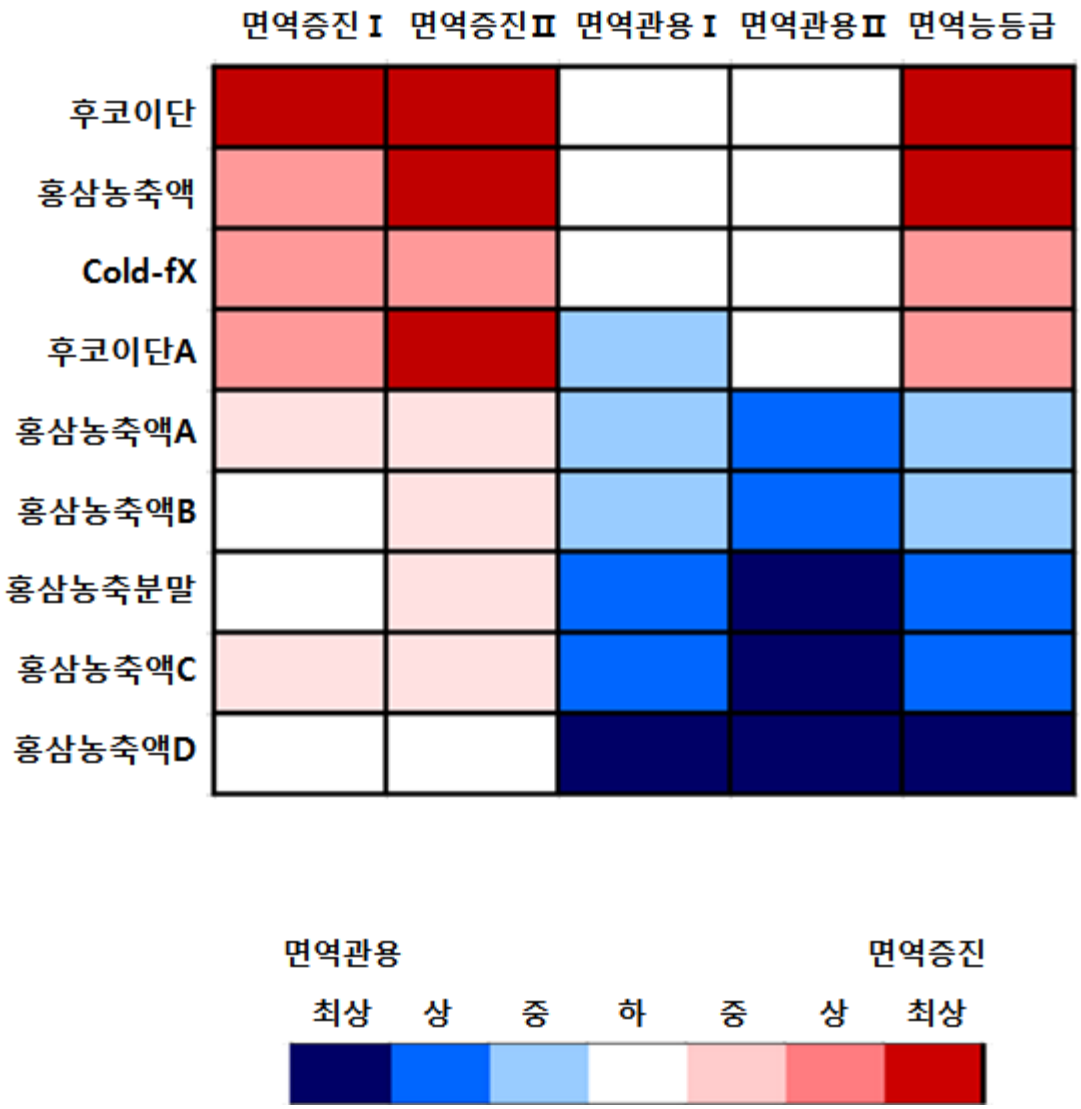
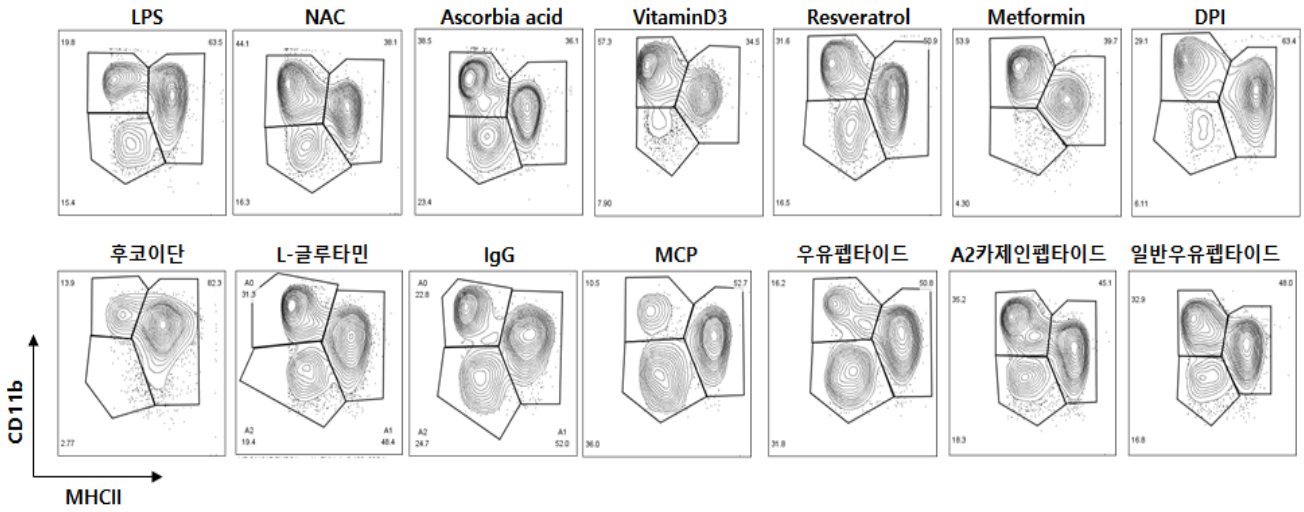


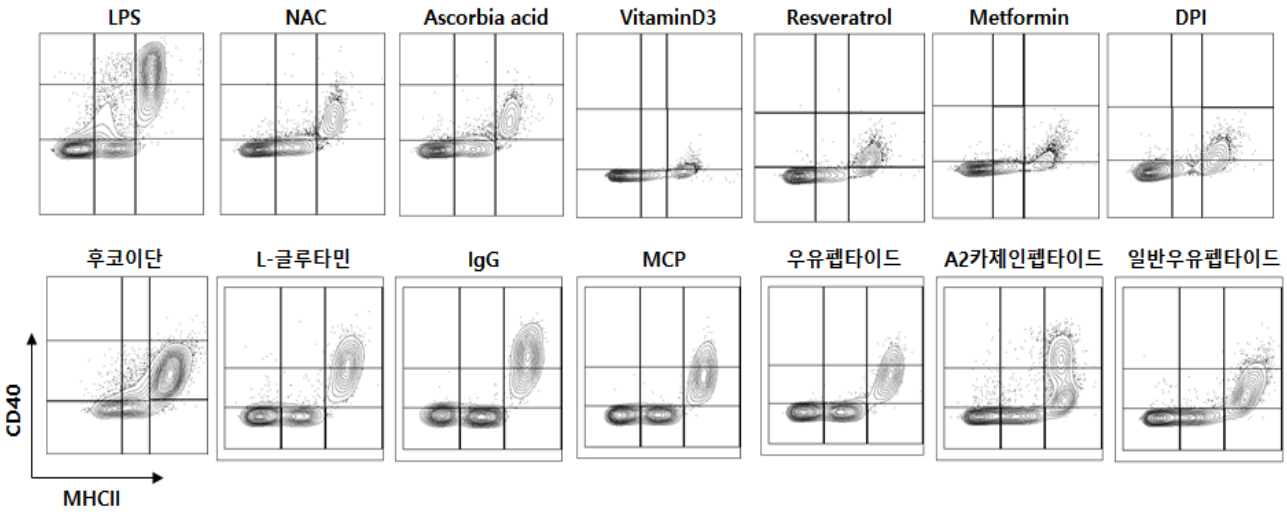
Figure 1.67. 시중 판매 제조사별 홍삼류 및 후코이단 식품소재가 갖는 면역지수 등급의 Heat map

(+) 값으로 표현되는 면역증진지수 등급은 빨간색으로 표시하고, (-) 값으로 표시되는 면역관용지수 등급은 파란색으로 표시하여 각 면역에 미치는 방향성을 구별하기 용이하게 하였다. 면역증진 효과와 면역관용효과가 결합되어 나나타는 결과론적 면역효과는 면역능 등급으로 표시되어 각 소재가 갖는 결과적으로 예상되는 면역효과 경향성을 표시하였다.



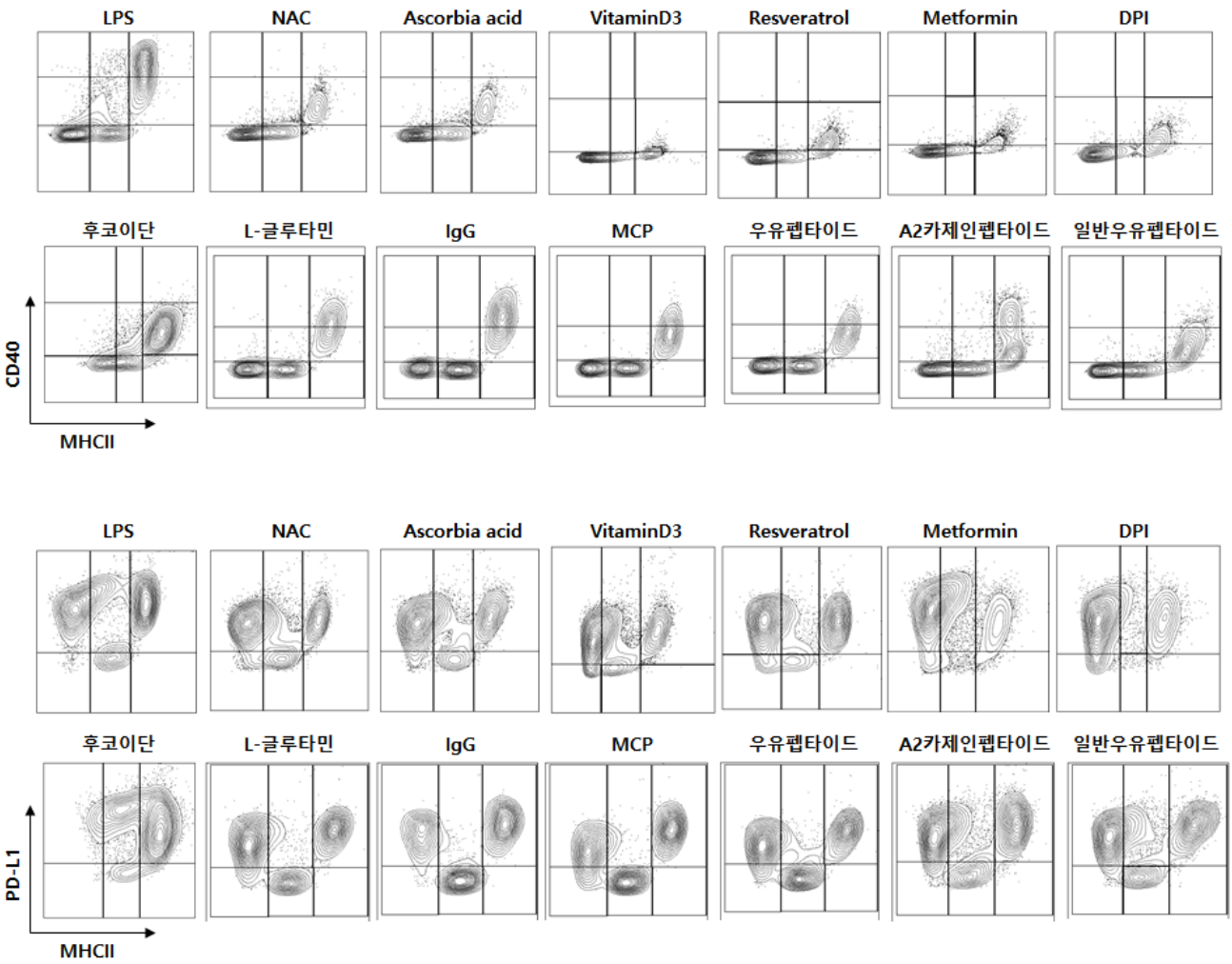
Supplementary Figure 1.1. 단일물질를 처리한 마우스 골수 유래 수지상세포 표면 표지분자들의 발현

배양 6일 째, 수지상 세포에 각각의 소재들을 농도 별로 24시간 처리 한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 세포 생존율(Live cells %)이 70% 이상인 세포에서 수지상세포의 세포 유착 분자(cell adhesion molecule)인 CD11b 와 MHC class II의 발현 정도를 확인하였다.



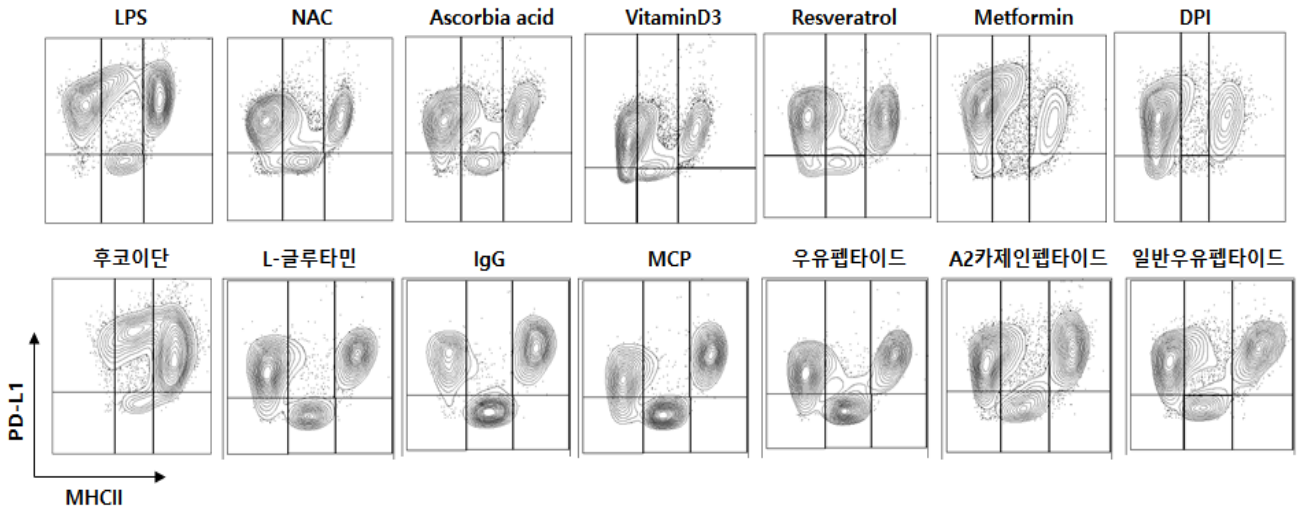
Supplementary Figure 1.2. 단일물질을 처리한 CD11c+수지상 세포군에서의 MHCII와 CD40의 발현

6일째의 분화된 수지상세포에 소재를 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후, 살아있는 CD11c+수지상 세포군에서 MHCII와 CD40의 발현 정도를 유세포 분석을 통해 확인하였다. MHCII와 CD40을 각각 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군에 따라 9가지의 구획으로 나누어 설정하였다.



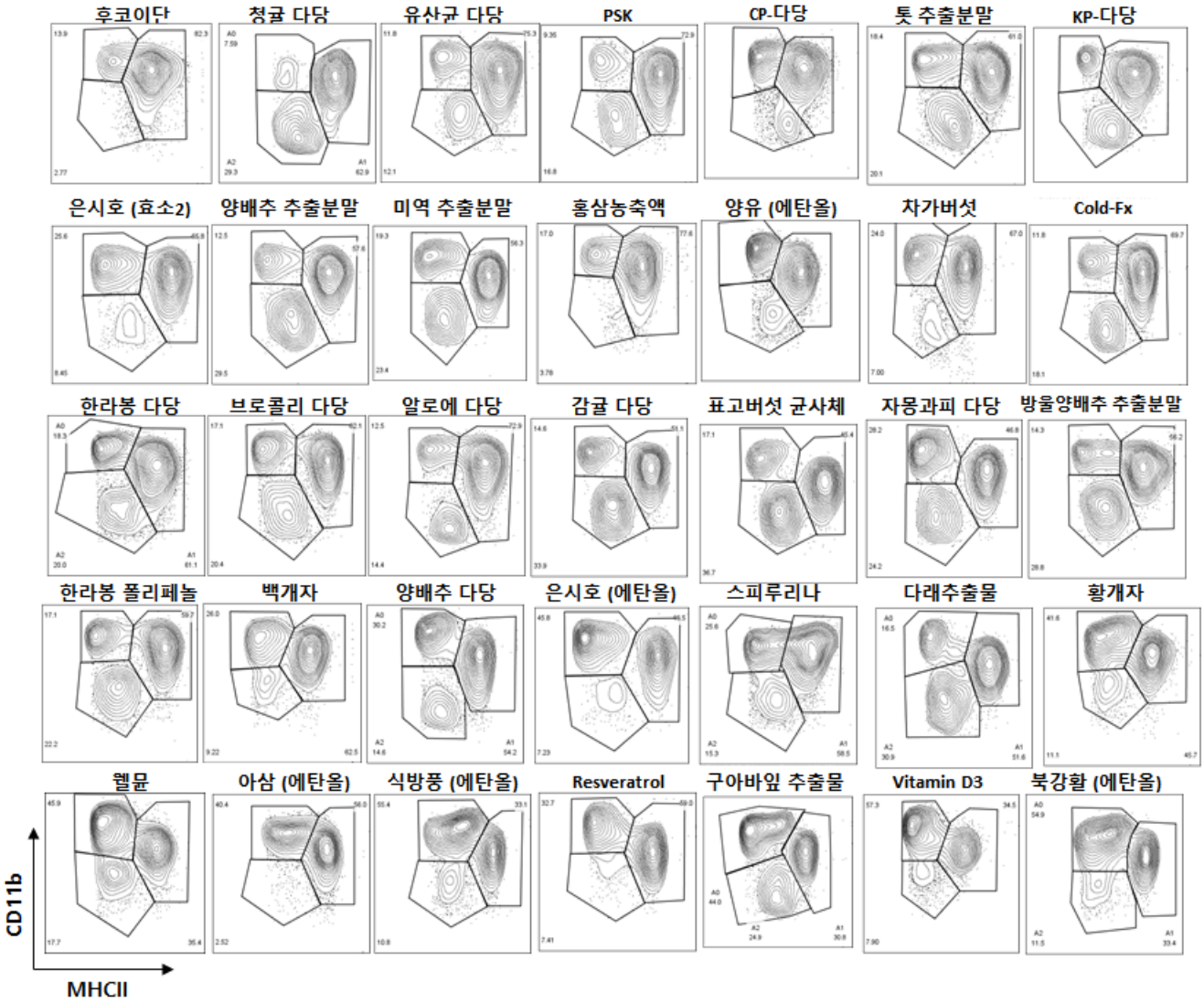
Supplementary Figure 1.3. 단일물질를 처리한 수지상 세포에서의 MHCII, CD40, 및 PDL1의 발현 분석

6일째의 분화된 수지상세포에 소재를 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후, 살아있는 CD11c+ 수지상 세포군에서 MHCII와 CD40의 발현 정도를 유세포 분석을 통해 확인하였다. MHCII와 CD40을 각각 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군에 따라 9가지의 구획으로 나누어 설정하였다. MHCII를 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군으로 나누고, PD-L1을 발현하지 않는 세포군과 발현하는 세포군으로 나누어 6가지의 구획을 설정하였다.



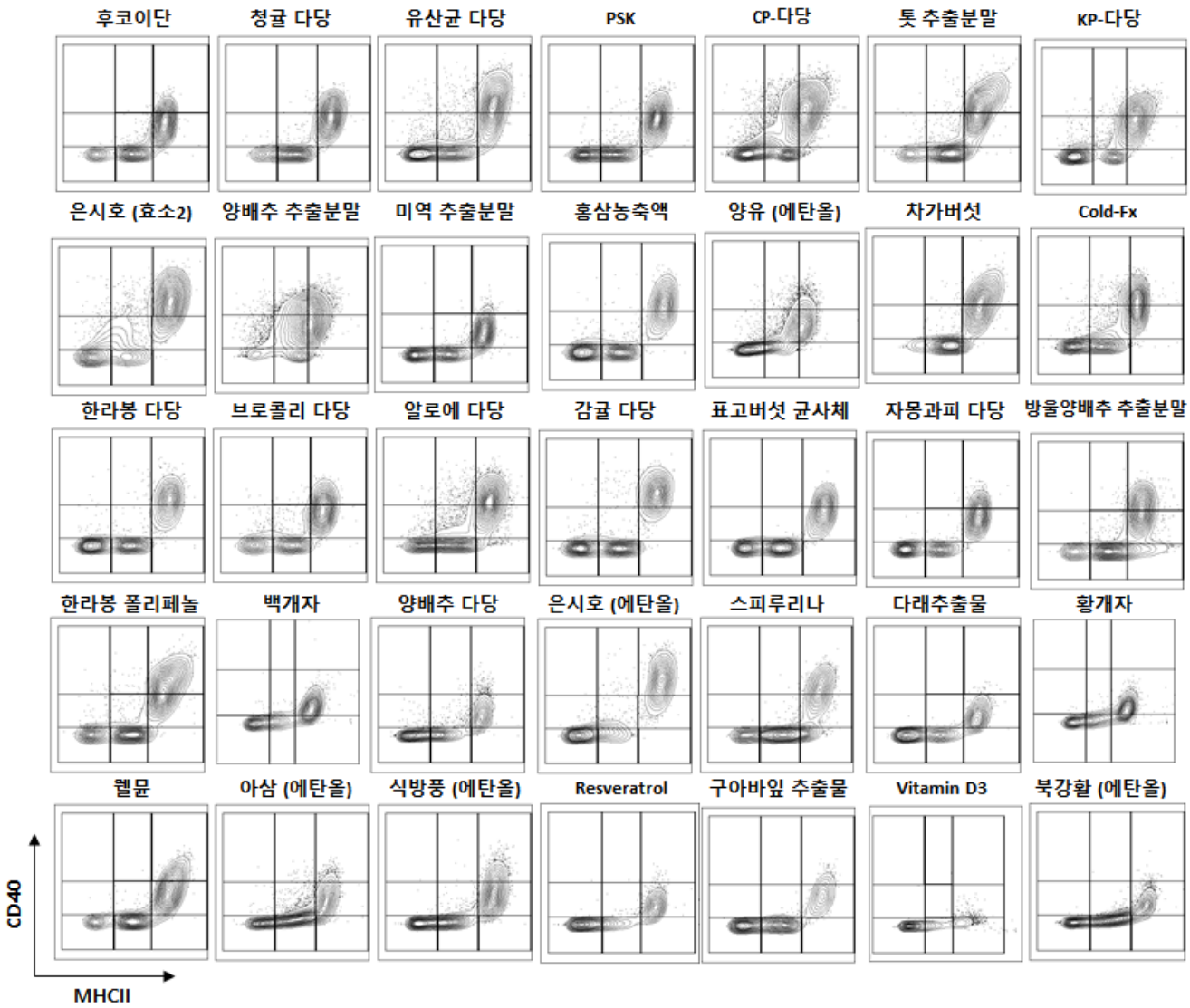
Supplementary Figure 1.4. 단일물질을 처리한 CD11c+수지상 세포군에서의 MHCII와 PD-L1 의 발현

6일째의 분화된 수지상세포에 소재를 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후, 살아있는 CD11c+수지상 세포군에서 MHCII와 PD-L1 의 발현 정도를 유세포 분석을 통해 확인하였다. MHCII를 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군으로 나누고, PD-L1을 발현하지 않는 세포군과 발현하는 세포군으로 나누어 6가지의 구획을 설정하였다.



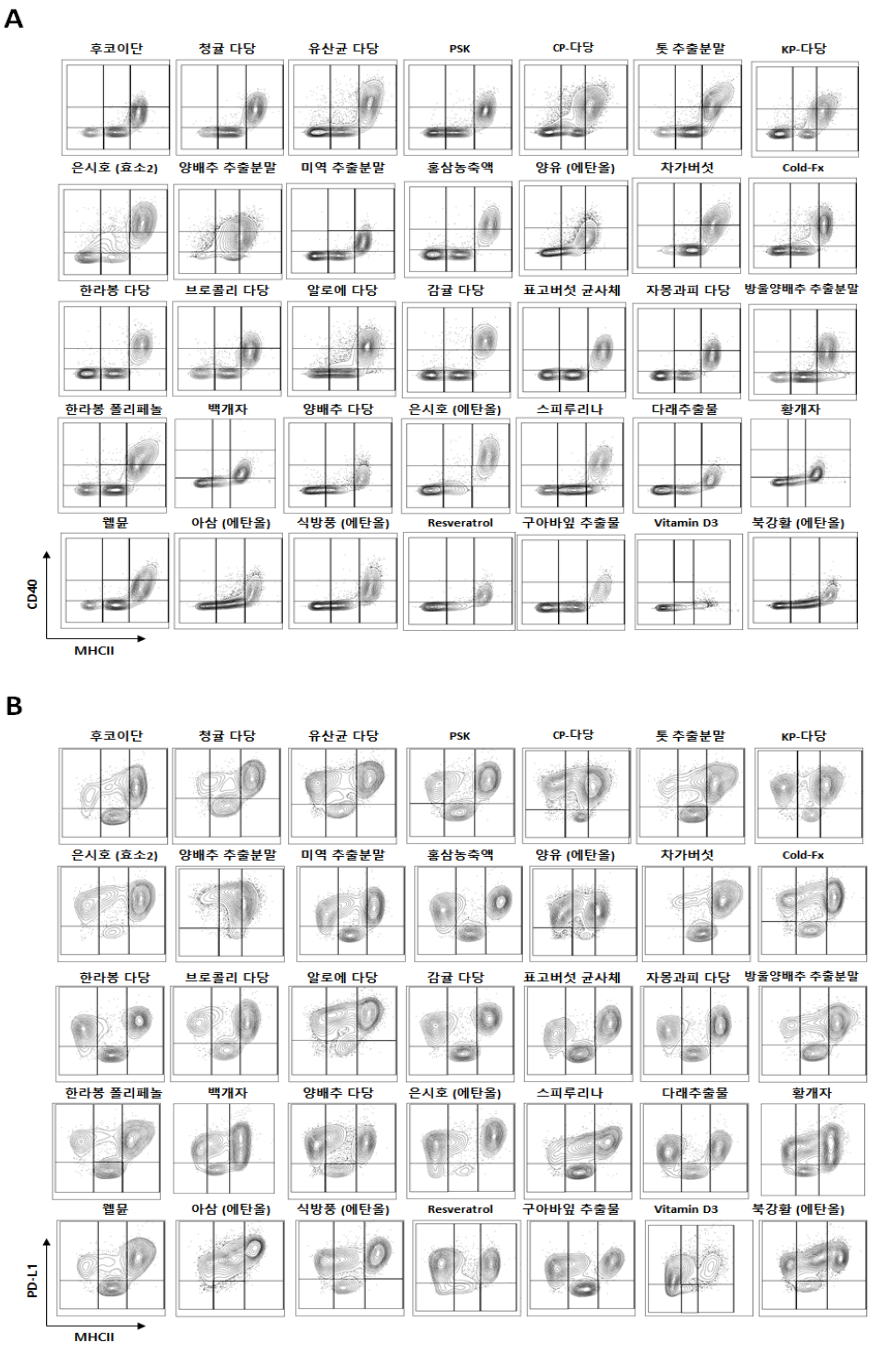
Supplementary Figure 1.5. 개발소재를 처리한 마우스 골수 유래 수지상세포 표면 표지분자들의 발현

배양 6일 째, 수지상 세포에 각각의 소재들을 농도 별로 24시간 처리 한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 세포 생존율(Live cells %)이 70% 이상인 세포에서 수지상세포의 세포 유착 분자(cell adhesion molecule)인 CD11b 와 MHC class II의 발현 정도를 확인하였다.



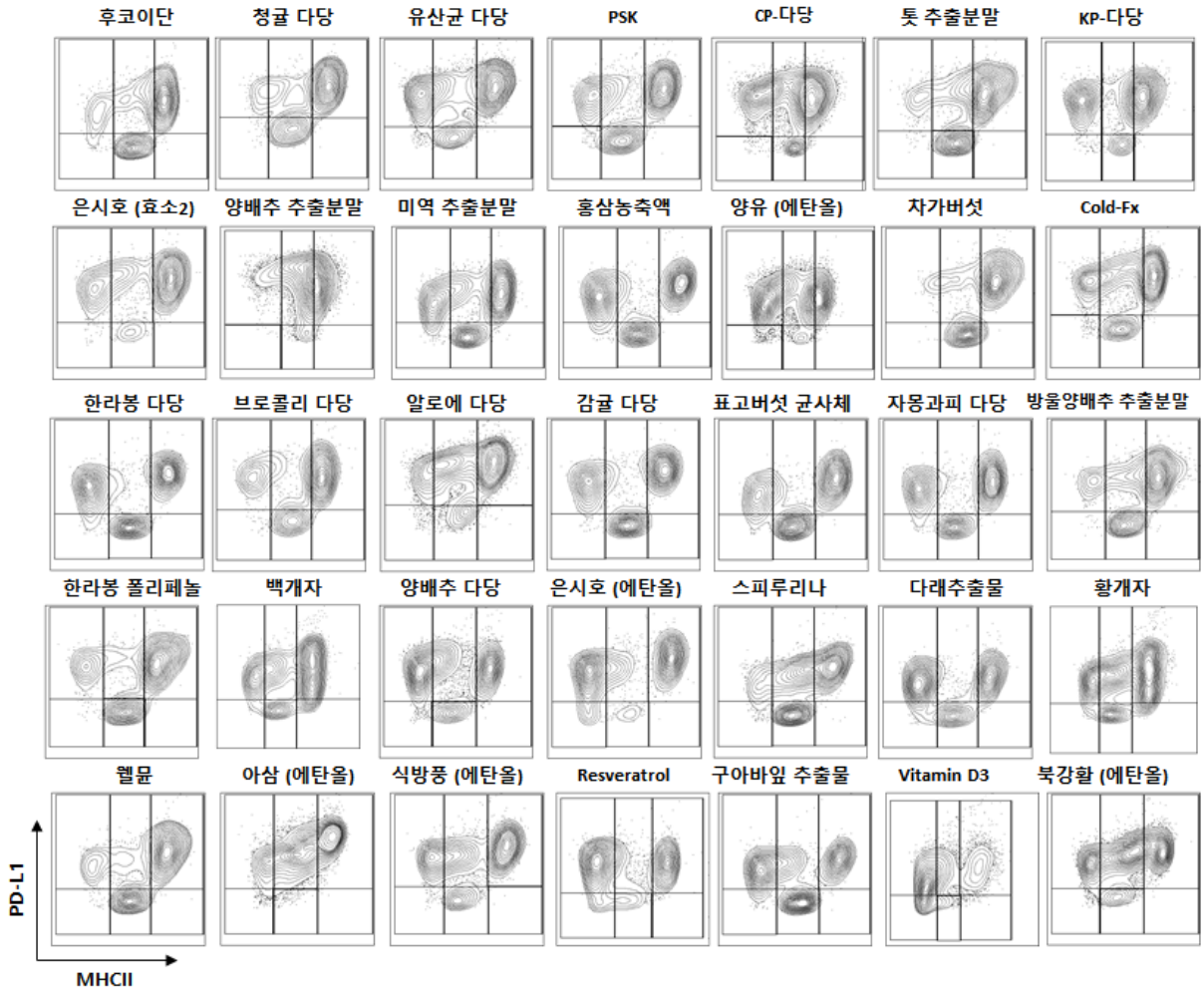
Supplementary Figure 1.6. 개발소재를 처리한 CD11c+수지상 세포군에서의 MHCII와 CD40의 발현

6일째의 분화된 수지상세포에 소재를 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후, 살아있는 CD11c+수지상 세포군에서 MHCII와 CD40의 발현 정도를 유세포 분석을 통해 확인하였다. MHCII와 CD40을 각각 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군에 따라 9가지의 구획으로 나누어 설정하였다.



Supplementary Figure 1.7. 개발소재를 처리한 수지상 세포에서의 MHCII, CD40, 및 PDL1의 발현 분석

6일째의 분화된 수지상세포에 소재를 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후, 살아있는 CD11c+ 수지상 세포군에서 MHCII와 CD40의 발현 정도를 유세포 분석을 통해 확인하였다. (A) MHCII와 CD40을 각각 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군에 따라 9가지의 구획으로 나누어 설정하였다. (B) MHCII를 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군으로 나누고, PD-L1을 발현하지 않는 세포군과 발현하는 세포군으로 나누어 6가지의 구획을 설정하였다.



Supplementary Figure 1.8. 개발소재를 처리한 CD11c+수지상 세포군에서의 MHCII와 PD-L1 의 발현

6일째의 분화된 수지상세포에 소재를 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후, 살아있는 CD11c+수지상 세포군에서 MHCII와 PD-L1 의 발현 정도를 유세포 분석을 통해 확인하였다. MHCII를 발현하지 않는 세포군, 낮게 발현하는 세포군, 높게 발현하는 세포군으로 나누고, PD-L1을 발현하지 않는 세포군과 발현하는 세포군으로 나누어 6가지의 구획을 설정하였다.

제2절
제1협동 상지대학교

목차

1. 우수면역능 소재 선정기준 마련
가. 식약처 건강기능식품에 대한 면역능 문헌조사
나. 식약공용한약재의 면역능 문헌조사

2. 동물시험기반 면역능 검증평가법 비교 연구를 통한 신뢰도 검증
 가. 항감염능 기능성 동물모델 신뢰도 검증
  (1) 항감염능 기능성 동물모델 개요
  (2) 면역능 소재 4종 (양배추 추출 분말, 청귤 다당, 한라봉 다당, 당근박 다당) 항감염능 신뢰도 검증
  (3)면역능 소재 2종 (청귤 다당, 한라봉 다당)의 농도별 항감염능 신뢰도 검증
  (4) 인플루엔자 항감염 동물모델
 나. 과민면역 조절 질환 동물모델 신뢰도 검증
  (1) 과민면역조절 질환모델 (OVA-induced allergic asthma model)
  (2) 면역능 기존 우수 식품소재(홍삼, 개자류, 식방풍, 아삼, 더덕, 은시호)의 신뢰도 검증
   (가) 홍삼의 과민면역반응조절 동물실험
    ① 홍삼의 기간별 투여조건에 따른 과민면역조절능 평가
    ②질환유도조건별 홍삼의 과민면역조절능 평가
    ③ 질환유도조건별 홍삼의 과민면역조절능 평가
   (나) 개자류의 과민면역반응조절 동물시험
    ① 1차 개자류의 과민면역반응조절 동물실험
    ② 2차 백개자의 과민면역반응조절 동물실험
    ③ 2차 황개자의 과민면역반응조절 동물실험
   (다) 식방풍의 과민면역반응조절 동물시험
   (라) 아삼의 과민면역반응조절 동물시험
   (마) 더덕(양유) 저농도(100, 200 mg/kg)의 과민면역반응조절 동물실험
   (바) 더덕(양유)고농도(200, 400 mg/kg)의과민면역반응조절동물실험
   (사) 은시호저농도(100, 200 mg/kg)의 과민면역반응조절 동물실험
   (아) 은시호고농도(200, 400 mg/kg)의과민면역반응조절동물실험
   (자) 기존 소재 4종(북강활, 식방풍, 아삼, 더덕)의 과민면역반응 조절능 비교
  (3) 면역능 소재 5종(다래, 후코이단, 은시호 효소2 처리, 양배추 효소 처리, 양배추 다당)의 과민면역 반응 조절 동물실험
  (4) 면역능 소재 5종(표고버섯균사체, 스피룰리나, 청귤다당, 양배추다당, 양배추효소처리)의 과민면역 반응조절 동물실험
 다. 만성염증 질환 동물모델 신뢰도 검증
  (1) 만성염증조절 질환모델 1차 실험

(2) 만성염증조절 질환모델 2차 양성 대조군 설정실험
(3) 면역능 기존 소재 4종(홍삼, 백개자, 황개자, 흑개자)의 만성염증 반응 조절 동물실험
(4) 면역능 소재 5종(스피룰리나, 표고버섯균사체, 아삼, 구아바, 클로렐라)의 만성염증반응조절 동물실험

3. In vitro – in vivo 소재별 결과 비교 분석 및 타당성 평가

제2절
제1협동 상지대학교

1. 우수면역능 소재 선정기준 마련

- 기존 면역능 소재 (식약처 기능성식품 및 BK bio에서 추천한 소재)를 이용하여 개발중인 면역능
  평가법에 적용을 통한 평가법의 적정성 검증
- 전통적으로 실제 사용되었던 식약공용소재를 이용하여 면역능평가법의 적정성 평가 및 기능성식
  품으로 발전가능성 조사
- 선행연구를 통해 확보한 소재를 면역능평가법에 적용하여 그 유효성을 검증
- 종합적인 면역기능 정보를 확인하기 위해서 다양한 검색조합을 이용

가. 식약처 건강기능식품에 대한 면역능 문헌조사

- 식약처고시 건강기능식품 6종 (기준규격 및 개별인정형)과 BK bio 추천소재 12종에 대한 문헌조사를 시
  행함.
- 다양한 검색어 조합을 통해서 평가용 시료의 다면적인 면역관련 정보를 확보함
  e.g.) Immunoboosting, Immunomodulation, Inflamamtion, Antiinflammatory, Asthma, Lung inflammation, Airway inflammation, Rheumatoid arthritis, Rheumatism, Arthritis, Infection 등.
- 각 검색조건별 주요논문의 내용 파악을 통해 주요소재의 보고된 면역능정보를 확보함.

면역능 평가용 시료							Immune		Inflammation		Asthma			RA			Infection
구분	No.	품명	생약명	이명	기원(학명)	pubmed	immune boosting	immunomodulation	inflammation	antiinflammatory	Asthma	Lung inflammation	Airway inflammation	Rheumatoid arthritis	Rheumatism	Arthritis	Infection
기준규격	1	홍삼	Ginseng Radix Rubra	**red ginseng**	인삼 *Panax ginseng* C. A.	625	1	4			3	0	0	1	1	1	31
기준규격	2	클로렐라		Chlorella	*Chlorella spp.*	5,044	0	3			2	0	1	0	1	1	134
기준규격	3	알로에 겔		Aloe gel	Aloe+K24 ferox Miller	55	0	0	6	5	0	0	0	0	0	0	3
개별인정형	4	구아바잎추출물		Guava	Psidium guajava L.	466	0	0			0	0	0	0	1	1	16
개별인정형	5	표고버섯균사체		Oak Mushroom, Shiitake Fungus	Lentinus edodes (Berk.) Sing. Cortinellus edodes (Berk.) S. Ito & S. Imai	50 492	0 0	0 4			0 3	0 0	0 0	0 0	0 0	0 1	0 10
개별인정형	6	L-글루타민		L-Glutamine		2,248	0	2	60	66	5	0	1	0	0	4	68
BK 바이오제안	7	유산균		Lactobacillus, lactic acid bacteria (LAB)		28907 6836	0 1	202 72			110 12	8 0	28 7	35 4	2 0	80 5	1898 264
BK 바이오제안	8	한라봉다당		Hallabong, kabosu	*Citrus sphaerocarpa* Tanaka nom. nud.	5 7	0 0	0 0			0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
BK 바이오제안	9	감귤다당		mandarin orange	*Citrus unshiu* S.Marcov.	41	0	0			2	0	0	0	0	0	0
BK 바이오제안	10	해조다당		seaweeds	*Sargassum fusiforme*	1,068	0	8	82	92	11	0	0	2	7	13	24
BK 바이오제안	11	arabinoxylan				822	0	3			0	0	0	0	0	0	11
BK 바이오제안	12	β-glucan				3,165	0	29			31	17	7	13	0	20	326
BK 바이오제안	13	PSP (단백다당체)		polysaccharide peptide		102	0	0			0	0	0	1	1	2	3
BK 바이오제안	14	우유 펩타이드		milk derived peptide milk peptide		8 20	0 0	0 0	1 2	1 3	0	0	0	0	0	0	0
BK 바이오제안	15	IgG		Immunoglobulin G		123,057	4	254			2009	110	280	4953	185	7032	18909
BK 바이오제안	16	스피루리나		Spirulina	*Spirulina platensis* (Gomo	1356	0	3			0	2	0	2	0	5	19
BK 바이오제안	17	브로콜리		Broccoli, Asparagus broccoli, Italian broccoli, Sprouting broccoli	*Brassica oleracea* L. var. italica Plenck	1871 31 70 3	0 0 0 0	1 5 0 0			11 0 1 0	0 0 0 0	0 0 0 0	3 0 0 0	0 0 0 0	9 1 1 0	33 0 0 0
BK 바이오제안	18	MCP (modified citrus pectin)				41	1	1	8	1	0	0	0	1	1	1	1

그림 2.1 식약처고시 건강기능식품 6종 및 BK bio 추천소재 12종의 Keyword 검색

〈출처: 식품의약품안전처 식품안전정보포탈 www.foodsafetykorea.go.k, 미국 국립보건원 미국국립 의학도서관 정보검색 www.pubmed.com〉

No.	품명	이명	기원(학명)	pubmed	immune boosting	immunomodulation	efficacy material	효능	논문명	저널	PMID
1	홍삼	red ginseng	인삼 *Panax ginseng* C. A. Meyer	625	0	4	Red ginseng extract	1. cancer chemoprevention (decrease the incidence of papilloma,prolong the latent period of tumor occurrence, reduce tumor number) 2. antioxidative effect	Cancer chemopreventive and therapeutic activities of red ginseng.	J Ethnopharmacol. 1998 Feb;60(1):71-8.	9533434
							red ginseng acidic polysaccharide(RGAP) *Combined treatment with pidotimod and RGAP	1. increased the number of plaque-forming cells in immunesupressive mice	Synergistic immunostimulatory effect of pidotimod and red ginseng acidic polysaccharide on humoral immunity of immunosuppressed mice.	Pharmazie. 2008 Dec;63(12):904-8.	19177908
							Red ginseng extract	Anti-tumor activity on MDSCs 1. induces T cell proliferation and the secretion of IL-2 and IFN-γ 2. inhibits iNOS and IL-10 expression	T Cell Stimulatory Effects of Korean Red Ginseng through Modulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells.	J Ginseng Res. 2011 Nov; 35(4): 462–470.	23717093
							Red ginseng extract	1. stimulate antiviral cytokine (IFN-γ) 2. reduced the expression of pro-inflammatory genes (IL-6, IL-8) 3. inhibits the infiltration of inflammatory cells	Immunomodulatory activity of red ginseng against influenza A virus infection.	Nutrients. 2014 Jan 27;6(2):517-29.	24473234
2	클로렐라	Chlorella	*Chlorella spp.*	5044	0	11	Chlorella supplementation	immunostimulatory effect 1. enhances the NK cell activity 2. Produces interferon-γ, interleukin-12, interleukin-1β (Th-1 cell-induced cytokines)	Chlorella supplementation: enhancement of Natural Killer cell activity and early inflammatory response (Randomized, double-blinded, placebo-controlled trial)	Nutr J. 2012 Jul 31;11:53.	22849818
							Chlorella vulgaris extract	immunosuppressive effect	Protective effects of Chlorella vulgaris in lead-exposed mice infected with Listeria monocytogenes	Int Immunopharmacol. 2003 Jun;3(6):889-900.	12781705
							Chlorella vulgaris, or its acetone-extract (Ac-Ex)	antitumor immunity	Oral administration of Chlorella vulgaris augments concomitant antitumor immunity.	Immunopharmacol Immunotoxicol. 1990;12(2):277-91.	2229925
							autoclaved Chlorella cells or heat-extracted substance	antitumor effects	Immunomodulation by a unicellular green algae (Chlorella pyrenoidosa) in tumor-bearing mice.	J Ethnopharmacol. 1988 Dec;24(2-3):135-46.	3253484
							hot water extract of Chlorella vulgaris	Antitumor effect	Antitumor effect induced by a hot water extract of Chlorella vulgaris (CE): resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes	Cancer Immunol Immunother. 1985;19(2):73-8.	3845850
3	알로에 겔	Aloe gel	Aloe+K24 ferox Miller	55	0	0					
4	구아바잎추출물	Guava	idium guajava	466	0	0					

5	표고버섯균사체	Oak Mushroom, Shiitake Fungus	Lentinus edodes (Berk.) Sing. Cortinellus edodes (Berk.) S. Ito & S. Imai	50 492	0 0	0 10	Polysaccharides from Tricholoma matsutake and Lentinus edodes	efficacy of 5-fluorouracil(FU)-mediated H22 cell growth inhibition 1. (a) reduces tumor weight and volume 2. increases serum levels of TNF-alpha, IL-2, and IFN-gamma 3. increases CD4+ and CD8+ T cell frequencies in the spleen 4. increases splenic NK cell and CTL activities	Polysaccharides from Tricholoma matsutake and Lentinus edodes enhance 5-fluorouracil-mediated H22 cell growth inhibition	J Tradit Chin Med. 2014 Jun;34(3):309-16.	24992758
							Polysaccharides in Lentinus edodes	antitumor and immunomodulating effect	Polysaccharides in Lentinus edodes: isolation, structure, immunomodulating activity and future prospective	Crit Rev Food Sci Nutr. 2014;54(4):474-87.	24236998
							lentinula edodes mycelia extract	immune function 1. increase Interferon (IFN)-γ secretion	Evaluation of quality of life and immune function in cancer patients receiving combined immunotherapy and oral administration of lentinula edodes mycelia extract	Gan To Kagaku Ryoho. 2012 Nov;39(12):1779-81.	23267884
							Lentinula edodes mycelia extract	immunosuppression 1. Mitigation of regulatory T cell-mediated immunosuppression	Oral ingestion of Lentinula edodes mycelia extract inhibits B16 melanoma growth via mitigation of regulatory T cell-mediated immunosuppression.	Cancer Sci. 2011 Mar;102(3):516-21.	21261790
							hot-water extraction and ethanol precipitation	immunostimulating 1. activation of macrophages including NO production cytokine expression and phagocytosis	Study on immunostimulating activity of macrophage treated with purified polysaccharides from liquid culture and fruiting body of Lentinus edodes.	J Microbiol Biotechnol. 2009 Jun;19(6):566-72.	19597314
							polysaccharide L-II (isolated and purified from the fruiting body of Lentinus edodes)	immunomodulating and antitumor activity 1. immunomodulation in inducing T-cells and macrophage-dependent immune system responses	Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from Lentinus edodes.	Int Immunopharmacol. 2005 May;5(5):811-20.	15778117
6	L-글루타민	L-Glutamine		2,248	0	2	L-Glutamine	immunosuppressive activity by supporting MDSC maturation	L-glutamine is a key parameter in the immunosuppression phenomenon	chem Biophys Res Commun. 2012 Sep 7;425(4):72-	22885179
							L-alanyl-L-glutamine	immunostimulatory activities 1. increase T-lymphocyte proliferation 2. enhances cytokine production	The role of L-alanyl-L-glutamine in the immune response in vitro.	ien Klin Wochenschr. 2002 Aug 30;114(15-16):702-	12602115
7	유산균	Lactobacillus, lactic acid bacteria (LAB)		28907 6836	0 1	202 72					
8	한라봉다당	Hallabong, kabosu	*Citrus sphaerocarpa* Tanaka nom. nud.	5 7	0 0	0 0					

9	감귤다당	handarin orang	*Citrus unshiu* S.Marcov.	41	0	0					
10	해조다당	seaweeds	*Sargassum fusiforme*	1,068	0	8	fucoidan	prevention of IgE-mediated allergy 1. inhibits the increase of plasma IgE 2. suppression of IgE-producing B cell population	Peritoneal injection of fucoidan suppresses the increase of plasma IgE induced by OVA-sensitization.	hem Biophys Res Commun. 2009 Sep 25;387(3):43	19607810
							sulfated polysaccharides	immunomodulatory activity 1. proliferation of macrophages (Raw 264.7) 2. increase production of nitric oxide (NO) and cytokines (IL-6 and TNF-α)	In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from red seaweed Nemalion helminthoides.	Int J Biol Macromol. 2014 Feb;63:38-42	24444887
							β-1,3/1,6-glucan	immunomodulatory effect 1. increase in activated CD19+ B lymphocytes	Soluble β-1,3/1,6-glucan in seaweed from the southern hemisphere and its immunomodulatory effect.	Carbohydr Polym. 2013 Jan 30;92(1):241-8.	23218290
							Fucoidan	suppresses IgE induction	Fucoidan suppresses IgE production in peripheral blood mononuclear cells from patients with atopic dermatitis.	Arch Dermatol Res. 2011 Aug;303(6):425-31.	21191796
11	**arabinoxylan**			822	0	3					
12	**β-glucan**			3165	0	29					
13	**SP (단백다당체**	saccharide peptide		102	0	0					
14	**우유 펩타이드**	k derived peptide		8	0	0					
15	**IgG**	mmunoglobulin G		123057	4	254					
16	**스피루리나**	Spirulina	*Spirulina platensis* (Gomont) Geitler	1356	0	3					
17	**브로콜리**	Broccoli, Asparagus broccoli, Italian broccoli, Sprouting broccoli	*Brassica oleracea* L. var. italica Plenck	1871 31 70 3	0 0 0 0	1 0 0 0	10-day broccoli	inflammatory effects 1. increased plasma levels of folate and lutein 2. decreased plasma C-reactive protein level	Effect of 10-day broccoli consumption on inflammatory status of young healthy smokers.	Int J Food Sci Nutr. 2014 Feb;65(1):106-11	23992556
18	**MCP (modified citrus pectin)**			41	0	0					

그림 2.2 소재별 Immune 관련논문 세부검색

〈출처: 식품의약품안전처 식품안전정보포탈 www.foodsafetykorea.go.kr,
미국 국립보건원 미국국립 의학도서관 정보검색 www.pubmed.com〉

구분	No.	품명	생약명	이명	기원(학명)	pub med	inflam mation	antiinflam matory	efficacy material	효능	논문명	저널	PMID
기준규격	1	홍삼	Ginseng Radix Rubra	red ginseng	인삼 *Panax ginseng* C. A. Meyer	625	48	19	soluble hot-water extract of those ultra-fine granules of red ginseng (URG)	anti-inflammatory effects on THP-1 cells	Enhanced inhibitory effect of ultra-fine granules of red ginseng on LPS-induced cytokine expression in the monocyte-derived macrophage THP-1 cells.	Int J Mol Sci. 2008 Aug;9(8):1379-92.	19325809
									red ginseng saponin extract	anti-arthritic effects	Red ginseng saponin extract attenuates murine collagen-induced arthritis by reducing pro-inflammatory responses and matrix metalloproteinase-3 expression.	Biol Pharm Bull. 2010;33(4):604-10.	20410593
									red ginseng (RG) and fermented red ginseng (FRG)	anti-allergic activities	Oral administration of fermented red ginseng suppressed ovalbumin-induced allergic responses in female BALB/c mice.	Phytomedicine. 2012 Jul 15;19(10):896-903.	22608480
									red ginseng marc oil (RMO)	anti-inflammatory effects on Raw264.7 cells	Red ginseng marc oil inhibits iNOS and COX-2 via NFκB and p38 pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.	Molecules. 2012 Nov 22;17(12):13769-86.	23174895
									red ginseng extract	1. improves lipid profiles 2. stimulates NK cell activity	Anti-oxidant and natural killer cell activity of Korean red ginseng (Panax ginseng) and urushiol (Rhus vernicifera Stokes) on non-alcoholic fatty liver disease of rat.	Food Chem Toxicol. 2013 May;55:586-91.	23369934
									red ginseng extract	1. protective effect in CsA-induced renal injury via reducing oxidative stress	Ginseng treatment attenuates chronic cyclosporine nephropathy via reducing oxidative stress in an experimental mouse model.	Am J Nephrol. 2013;37(5):421-33.	23594788
									red ginseng extracts	1. mitigate H2S-induced angiogenesis (gastritis and gastric cancer are closely associated with increased levels ofH2S)	Inhibition of Hydrogen Sulfide-induced Angiogenesis and Inflammation in Vascular Endothelial Cells: Potential Mechanisms of Gastric Cancer Prevention by Korean Red Ginseng.	J Ginseng Res. 2012 Apr;36(2):135-45.	23717113
									red ginseng saponin fraction	1. anti-inflammatory effect on LPS induced endotoxic shock	Korean Red Ginseng Saponin Fraction Downregulates Proinflammatory Mediators in LPS Stimulated RAW264.7 Cells and Protects Mice against Endotoxic Shock.	J Ginseng Res. 2012 Jul;36(3):263-9.	23717127
									red ginseng	1. Reduces the nasal allergic inflammatory reaction in an allergic murine model by reducing Th2 cytokines	The effect of Korean red ginseng on allergic inflammation in a murine model of allergic rhinitis.	J Ginseng Res. 2013 Apr;37(2):167-75.	23717169
									ginsenoside Rh1	1. eliminate HIV-1 infected macrophages by inhibiting the PDK1/Akt pathway	Ginsenoside Rh1 eliminates the cytoprotective phenotype of human immunodeficiency virus type 1-transduced human macrophages by inhibiting the phosphorylation of pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1.	Biol Pharm Bull. 2013;36(7):1088-94.	23811558
									red ginseng extract	1. protective effect against cyclosporine-induced pancreatic β cell injury via reducing oxidative stress	Oral administration of ginseng ameliorates cyclosporine-induced pancreatic injury in an experimental mouse model.	PLoS One. 2013 Aug 29;8(8):e72685.	24009697
									Ginsenoside Rg1	1. inhibitory effect of TSLP production and caspase-1 activity in AR experimental model	Ginsenoside Rg1 inhibits the TSLP production in allergic rhinitis mice.	Immunopharmacol Immunotoxicol. 2013 Dec;3	24053327
									red ginseng extracts	1. inhibits the expression of MCP-1 and iNOS by suppressing the activation of NADPH oxidase and Jak2/Stat3 in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells	Red ginseng extract inhibits the expression of MCP-1 and iNOS in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells by suppressing the activation of NADPH oxidase and Jak2/Stat3.	J Ethnopharmacol. 2013 Nov 25;150(2):761-4.	24055641
									red ginseng extracts	1. preventing production of ROS and subsequently protecting brain cells from apoptosis	Antistress effect of red ginseng in brain cells is mediated by TACE repression via PADI4.	J Ginseng Res. 2013 Jul;37(3):315-23.	24198657
									red ginseng extract	1. antiviral activity against respiratory syncytial virus (RSV) infection	Antiviral activity of ginseng extract against respiratory syncytial virus infection.	Int J Mol Med. 2014 Jul;34(1):183-90.	24756136
									red ginseng extract	1. inflammatory effect on aging model rats with diet-induced atherosclerosis	Anti-inflammation effect of Exercise and Korean red ginseng in aging model rats with diet-induced atherosclerosis.	Nutr Res Pract. 2014 Jun;8(3):284-91.	24944773
									red ginseng extract	1. targeting pathogenic Th17 and osteoclast differentiation	Red ginseng extract ameliorates autoimmune arthritis via regulation of STAT3 pathway, Th17/Treg balance, and osteoclastogenesis in mice and human.	Mediators Inflamm. 2014;2014:351856.	25147435
									red ginseng extracts	1 improving cell survival 2. partial inhibition of viral replication 3. modulation of cytokine production and types of immune cells migrating into the lung	Ginseng protects against respiratory syncytial virus by modulating multiple immune cells and inhibiting viral replication.	Nutrients. 2015 Feb 4;7(2):1021-36.	25658239
									red ginseng extracts	1. inhibits the hypoxic induction of COX-2 expression and cell invasion through Sirt1 activation	Red ginseng represses hypoxia-induced cyclooxygenase-2 through sirtuin1 activation.	Phytomedicine. 2015 Jun 1;22(6):597-604.	26055124
									red ginseng extracts	1. age-related decline of learning and memory is ameliorated through anti-inflammatory activity	Administration of red ginseng ameliorates memory decline in aged mice.	J Ginseng Res. 2015 Jul;39(3):250-6.	26199557
									red ginseng extracts	1. protect host cells from lethal pneumococcal sepsis by inhibiting inflammation 2. Eenhances bacterial clearance thereby reinforcing cell survival against pneumococcal infection	Panax ginseng aqueous extract prevents pneumococcal sepsis in vivo by potentiating cell survival and diminishing inflammation.	Phytomedicine. 2015 Oct 15;22(11):1055-61.	26407948
									red ginseng extracts	1. inhibited ovariectomy-induced obesity, adiposity, and adipocyte hypertrophy by modulating angiogenesis and MMP activity	Effects of Korean red ginseng (Panax ginseng) on obesity and adipose inflammation in ovariectomized mice.	J Ethnopharmacol. 2016 Feb 3;178:229-37.	26707750
									nonpolar and protopanaxadiol (PPD) class ginsenosides	1. antiproliferative activity in human breast cancer cells	Cellular uptake of ginsenosides in Korean white ginseng and red ginseng and their apoptotic activities in human breast cancer cells.	Planta Med. 2011 Jan;77(2):133-40.	20669086
									red ginseng extracts	1. inhibition of the p38/JNK/TBK1 activation pathway	ATF-2/CREB/IRF-3-targeted anti-inflammatory activity of Korean red ginseng water extract.	J Ethnopharmacol. 2014 May 28;154(1):218-28.	24735861

기준규격	2	클로렐라		Chlorella	*Chlorella spp.*	5044	17	23	ROQUETTE Chlorella sp.	skin inflammation 1. efficient effect on healing process and duration of wound healing	Benefits of oral and topical administration of ROQUETTE Chlorella sp. on skin inflammation and wound healing in mice.	Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem. 2014;13(2):93-102.	24965517
									Chlorella 11-peptide	protective effects on chronic inflammatory-related vascular diseases 1. inhibits the production of macrophage-induced adhesion molecules 2. reduces endothelin-1 expression and endothelial permeability	Chlorella 11-peptide inhibits the production of macrophage-induced adhesion molecules and reduces endothelin-1 expression and endothelial permeability.	Mar Drugs. 2013 Oct 14;11(10):3861-74.	24129228
									lycopene	antioxidant and anti-inflammatory effect in high-cholesterol fed rats	Effect of lycopene from Chlorella marina on high cholesterol-induced oxidative damage and inflammation in rats.	Inflammopharmacology. 2014 Feb;22(1):45-54.	23887896
									dried Chlorella (97% purity) extracted from 100% of Chlorella vulgaris	immunostimulatory effect 1. enhances the NK cell activity 2. produces interferon-γ, interleukin-12, interleukin-1β (Th-1 cell-induced cytokines) in healthy people	Beneficial immunostimulatory effect of short-term Chlorella supplementation: enhancement of natural killer cell activity and early inflammatory response (randomized, double-blinded, placebo-controlled trial).	Nutr J. 2012 Jul 31;11:53.	22849818
									aqueous Chlorella extract	anti-allergic effects	An aqueous Chlorella extract inhibits IL-5 production by mast cells in vitro and reduces ovalbumin-induced eosinophil infiltration in the airway in mice in vivo.	Int Immunopharmacol. 2005 Apr;5(4):689-98.	15710338
									methanol extract of Chlorella vulgaris	anti-inflammation and anti-tumor promotion in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced mice	Inhibitory effects of sterols isolated from Chlorella vulgaris on 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin.	Biol Pharm Bull. 1996 Apr;19(4):573-6.	8860961
기준규격	3	알로에 겔		Aloe gel	Aloe+K24 ferox Miller	55	6	5	aloin, aloesin and aloe-gel	anti-inflammatory activity 1. ameliorates intestinal inflammatory responses in a DSS-induced ulcerative colitis	Dietary aloin, aloesin, or aloe-gel exerts anti-inflammatory activity in a rat colitis model.	Life Sci. 2011 Mar 14;88(11-12):486-92.	21277867
									mannose-6-phosphate	anti-inflammatory activity	Anti-inflammatory and wound healing activity of a growth substance in Aloe vera.	J Am Podiatr Med Assoc. 1994 Feb;84(2):77-81	8169808
개별인정형	4	구아바잎 추출물		Guava	idium guajava	466	6	1	guava leaf extract	anti-proliferative activity 2. inhibition of the catalytic activity of Prostaglandin endoperoxide H synthase (PGHS) isoforms	Antiproliferative activity of guava leaf extract via inhibition of prostaglandin endoperoxide H synthase isoforms.	Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009	19457650
									guava leaf extract	reduce the metastasis of lung cancer cells	The butanol fraction of guava (Psidium cattleianum Sabine) leaf extract suppresses MMP-2 and MMP-9 expression and activity through the suppression of the ERK1/2 MAPK signaling pathway.	Nutr Cancer. 2012;64(2):255-66.	22211962
									guava leaf extract	anti-inflammatory activity (using 2 difference animal model : Freund's complete adjuvant-induced hyperalgesia in the rat and LPS-induced endotoxic shock in mice)	Anti-inflammatory effects of an ethanolic extract of guava (Psidium guajava L.) leaves in vitro and in vivo.	J Med Food. 2014 Jun;17(6):678-85.	24738717
									red guava extract	anti-inflammatory and anti-oxidative effects in diabetes	Protective Effects of Red Guava on Inflammation and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice.	Molecules. 2015 Dec 12;20(12):22341-50.	26703532
									guava leaf extract	inhibition of iNOS and COX-2 via the down-regulation of NF-kappaB pathway	Fermented guava leaf extract inhibits LPS-induced COX-2 and iNOS expression in Mouse macrophage cells by inhibition of transcription factor NF-kappaB.	Phytother Res. 2008 Aug;22(8):1030-4.	18618521
개별인정형개별	5	표고버섯 균사체		Oak Mushroom, Shiitake Fungus	Lentinus edodes (Berk.) Sing. Cortinellus edodes (Berk.) S. Ito & S. Imai	50 492	0 14	0 13	shiitake (Lentinus edodes) extract	antioxidant and anti- inflammatory effects 1. regulation of nitric oxide concentration and thiol redox status	Effect of shiitake (Lentinus edodes) extract on antioxidant and inflammatory response to prolonged eccentric exercise.	J Physiol Pharmacol. 2013 Apr;64(2):249-54.	23756400
									shiitake mushroom (Lentinula edodes) extract	antigingivitis activity	In vitro assessment of shiitake mushroom (Lentinula edodes) extract for its antigingivitis activity.	J Biomed Biotechnol. 2011;2011:507908.	21966183
									shiitake extracts	induce or suppress immune function	The effects of whole mushrooms during inflammation.	BMC Immunol. 2009 Feb 20;10:12.	19232107
									Lentinan	1. induce protective Th1 immune responses 2. stimulate the maturation of DCs to inhibit negative regulation of the Th1 immune response by Tregs	The shiitake mushroom-derived immuno-stimulant lentinan protects against murine malaria blood-stage infection by evoking adaptive immune-responses.	Int Immunopharmacol. 2009 Apr;9(4):455-62.	19189863
									raw shiitake mushroom.	induces dermatitis	Systemic allergic contact dermatitis due to consumption of raw shiitake mushroom	Clin Exp Dermatol. 2009 Dec;34(8):e910-3.	20055865
개별인정형	6	L-글루타민		L-Glutamine		2248							
BK 바이오제안	7	유산균		Lactobacillus, lactic acid bacteria (LAB)		28907 6836							
BK 바이오제안	8	한라봉다당		Hallabong, kabosu	*Citrus sphaerocarpa* Tanaka nom. nud.	5 7							
BK 바이오제안	9	감귤다당		mandarin orang	*Citrus unshiu* S.Marcov.	41	0	0					
BK 바이오제안	10	해조다당		seaweeds	*Sargassum fusiforme*	1,068	82	92					
BK 바이오제안	11	rabinoxyla				822	7	1	Arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran)	1. activates natural killer (NK) cells, T cells and monocytes in infections and cancer	Activation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro by the biological response modifier arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran).	Int J Immunopathol Pharmacol. 2011 Oct-Dec;	22230400
									arabinoxylan	1. improved irritable bowel syndrome (IBS) symptoms	Therapeutic effects of biobran, modified arabinoxylan rice bran, in improving symptoms of diarrhea predominant or mixed type irritable bowel syndrome: a pilot, randomized controlled study.	Evid Based Complement Alternat Med. 2014;20	25161692
BK 바이오제안	12	β-glucan				3165							

BK 바이오제안	13	PSP (단백다당체)		polysaccharide peptide		102	2	3	Polysaccharide peptide (PSP), isolated from Coriolus versicolor	anti-nociceptive effects 1. induced hyperalgesia was related to activation of peritoneal resident cells 2. increase in the release of inflammatory mediators	Polysaccharide peptides from COV-1 strain of Coriolus versicolor induce hyperalgesia via inflammatory mediator release in the mouse.	Life Sci. 2006 Apr 18;78(21):2463-70.	16310221
BK 바이오제안	14	우유 펩타이드		milk derived peptide		8							
BK 바이오제안	15	IgG		Immunoglobulin G		123057							
BK 바이오제안	16	스피루리나		Spirulina	*Spirulina platensis* (Gomont) Geitler	1356	39	0	Immolina	1. recruitment of diverse populations of leukocytes in response to inflammatory and infectious signals	Immolina, a high-molecular-weight polysaccharide fraction of Spirulina, enhances chemokine expression in human monocytic THP-1 cells.	J Altern Complement Med. 2006 Jun;12(5):429	16813506
									phycocyanin	1. inhibition of PGE2 production 2. moderate inhibition of phospholipase A2(PLA2) activity	Effects of phycocyanin extract on prostaglandin E2 levels in mouse ear inflammation test.	Arzneimittelforschung. 2000 Dec;50(12):1106-9	11190776
									phycocyanin	1. inhibition of histamine release from mast cells	Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response.	Mediators Inflamm. 2002 Apr;11(2):81-5.	12061428
									C-Phycocyanin	1. COX-2 inhibition	C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages.	Biochem Biophys Res Commun. 2003 May 2;3(	12711327
									C-phycocyanin	1. suppressing iNOS and COX-2 induction 2. Attenuation of TNF-alpha formation and neutrophil infiltration into inflammatory sites	Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycocyanin.	Anesth Analg. 2009 Apr;108(4):1303-10.	19299804
									C-phycocyanin	1. beneficial effects of spirulina on TNBS-induced inflammatory bowel disease	The study of biochemical and histopathological effects of spirulina in rats with TNBS-induced colitis	Bratisl Lek Listy. 2011;112(5):235-43.	21682075
									C-phycocyanin and Spirulina p	1. reduce the cytotoxicity 2. inhibit expression of inflammation-related genes	Spirulina and C-phycocyanin reduce cytotoxicity and inflammation-related genes expression of microglial cells.	Nutr Neurosci. 2012 Nov;15(6):252-6	22687570
									spirulina and phycocyanin	anti-oxidative and anti-inflammatory mechanisms 1. breaking the crosstalk between oxidative stress and inflammation 2. inhibit nonalcoholic steatohepatitis(NASH) progression.	Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of spirulina on rat model of non-alcoholic steatohepatitis.	J Clin Biochem Nutr. 2012 Nov;51(3):227-	23170052
									spirulina	ameliorate the experimental colitis	Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Spirulina platensis in comparison to Dunaliella salina in acetic acid-induced rat experimental colitis.	Immunopharmacol Immunotoxicol. 2015 Apr;3	25567297
									spirulina (Arthrospira) maxima	antioxidant activity	Antioxidant Effect of Spirulina (Arthrospira) maxima on Chronic Inflammation Induced by Freund's Complete Adjuvant in Rats.	J Med Food. 2015 Aug;18(8):865-71.	25599112
BK 바이오제안	17	브로콜리		Broccoli, Asparagus broccoli, Italian broccoli, Sprouting broccoli	*Brassica oleracea* L. var. italica Plenck	1871 31 70 3	52 0 0 0	48 0 0 0	Sulforaphane-Rich Broccoli Sprout Extracts	attenuated cognitive deficits 1. improvement of phencyclidine-Induced Cognitive Deficits	Dietary Intake of Sulforaphane-Rich Broccoli Sprout Extracts during Juvenile and Adolescence Can Prevent Phencyclidine-Induced Cognitive Deficits at Adulthood.	PLoS One. 2015 Jun 24;10(6):e0127244.	26107664
									glucoraphanin and sulforaphane	decreases inflammation, Helicobacter pylori colonization, and protection against cancer	Clinical and molecular evidence of the consumption of broccoli, glucoraphanin and sulforaphane in humans.	Nutr Hosp. 2014 Nov 30;31(2):559-69.	25617536
									broccoli sprout	modulated the excretion of biomarkers linked to inflammation and vascular reactions	The intake of broccoli sprouts modulates the inflammatory and vascular prostanoids but not the oxidative stress-related isoprostanes in healthy humans.	Food Chem. 2015 Apr 15;173:1187-94.	25466142
									Indole-3-carbinol	potential benefit in preventing obesity and metabolic disorders	Indole-3-carbinol prevents diet-induced obesity through modulation of multiple genes related to adipogenesis, thermogenesis or inflammation in the visceral adipose tissue of mice.	J Nutr Biochem. 2012 Dec;23(12):1732-9.	22569347
									10% blueberry or broccoli	prevents inflammatory bowel disease 1. increased colon crypt size and the number of goblet cells per crypt	Influence of dietary blueberry and broccoli on cecal microbiota activity and colon morphology in mdr1a(-/-) mice, a model of inflammatory bowel diseases.	Nutrition. 2012 Mar;28(3):324-30.	22113065
									Sulforaphane	prevent the CIS-induced renal injury 1. inhibiting the cell death and inflammation involved pathway	Sulforaphane, a natural constituent of broccoli, prevents cell death and inflammation in nephropathy.	J Nutr Biochem. 2012 May;23(5):494-500.	21684138
									Broccoli Extract	Anti-Inflammatory and Antioxidant in DSS induced colitis model	Examination of the Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Xenobiotic-Inducing Potential of Broccoli Extract and Various Essential Oils during a Mild DSS-Induced Colitis in Rats.	ISRN Gastroenterol. 2013;2013:710856.	23533793
									Sulforaphane	inhibit human colon cancer progression and cancer cell angiogenesis 1. inhibits HIF-1α and VEGF expression	Sulforaphane inhibits hypoxia-induced HIF-1α and VEGF expression and migration of human colon cancer cells.	Int J Oncol. 2015 Dec;47(6):2226-32.	26498863
									sulforaphane	1. provides a modest reduction in age-related oxidative stress and glial reactivity 2. insufficient to inhibit LPS-induced inflammation.	Dietary broccoli mildly improves neuroinflammation in aged mice but does not reduce lipopolysaccharide-induced sickness behavior.	Nutr Res. 2014 Nov;34(11):990-9.	25439028
									Indole-3-carbinol and 3',3'-diindolylmethane	inhibits CCL2 and inflammatory microenvironment in androgen involved prostate tun	Indole-3-carbinol and 3',3'-diindolylmethane modulate androgen's effect on C-C chemokine ligand 2 and monocyte attraction to prostate cancer cells.	Cancer Prev Res (Phila). 2013 Jun;6(6):519-29.	23585426
									Sulforaphane	inhibits neointima formation 1. targeting of adhesion molecules through the suppression of NF-κB/GATA6 2. regulates migration and proliferation in vascular smooth muscle cells (VSMCs)	Sulforaphane inhibits restenosis by suppressing inflammation and the proliferation of vascular smooth muscle cells.	Atherosclerosis. 2012 Nov;225(1):41-9.	22898620

그림 2.3 소재별 Inflammation 관련논문 세부검색

〈출처: 식품의약품안전처 식품안전정보포탈 www.foodsafetykorea.go.kr, 미국 국립보건원 미국국립 의학도서관 정보검색 www.pubmed.com〉

구분	No.	품명	생약명	이명	기원(학명)	pubmed	Asthma	Lung inflammation	Airway inflammation	efficacy material	효능	논문명	저널	PMID
기준규격	1	홍삼	Ginseng Radix Rubra	red ginseng	인삼 Panax ginseng C. A. Meyer	625	3	0	0	red ginseng	reduces the nasal allergic inflammatory reaction in an allergic murine model 1. by reducing Th2 cytokines	The effect of Korean red ginseng on allergic inflammation in a murine model of allergic rhinitis	J Ginseng Res. 2013 Apr;37(2):167-75.	23717169
										red ginseng	anti-asthmatic effects	Comparative study of Korean White Ginseng and Korean Red Ginseng on efficacies of OVA-induced asthma model in mice.	J Ginseng Res. 2015 Jan;39(1):38-45.	25535475
기준규격	2	클로렐라		Chlorella	Chlorella spp.	5044	1	0	1	Chlorella pyrenoidosa extract	anti-allergic inflammation	An aqueous Chlorella extract inhibits IL-5 production by mast cells in vitro and reduces ovalbumin-induced eosinophil infiltration in the airway in mice in vivo.	Int Immunopharmacol. 2005 Apr;5(4):689-98.	15710338
기준규격	3	알로에 겔		Aloe gel	Aloe+K24 ferox Miller	55	0	0	0					
개별인정형	4	구아바잎추출물		Guava	Psidium guajava L.	466	0	0	0					
개별인정형	5	표고버섯균사체		Oak Mushroom, Shiitake Fungus	Lentinus edodes (Berk.) Sing. Cortinellus edodes (Berk.) S. Ito & S. Imai	50 492	0 3	0 0	0 0					
개별인정형	6	L-글루타민		L-Glutamine		2248	5	0	1	l-glutamine	anti-asthmatic effects 1. suppresses airway neutrophilia via inhibiting p38 MAPK and its downstream pathways in an MKP-1-dependent way	Glutamine suppresses airway neutrophilia by blocking cytosolic phospholipase A(2) via an induction of MAPK phosphatase-1.	J Immunol. 2012 Dec 1;189(11):5139-46.	23109722
										l-glutamine	anti-asthmatic effects 1. suppression of Th2-dependent phenotypes and late airway hyperresponsiveness (ARH) 2. inhibition of cytosolic phospholipase A(2) (cPLA(2)) activity	Glutamine preferentially inhibits T-helper type 2 cell-mediated airway inflammation and late airway hyperresponsiveness through the inhibition of cytosolic phospholipase A(2) activity in a murine asthma model.	Clin Exp Allergy. 2008 Feb;38(2):357-64.	18070157
BK 바이오제안	7	유산균		Lactobacillus, lactic acid bacteria (LAB)		28907 6836	110 12	8 0	28 7					
BK 바이오제안	8	한라봉다당		Hallabong, kabosu	Citrus sphaerocarpa Tanaka nom. nud.	5 7	0 0	0 0	0 0					
BK 바이오제안	9	감귤다당		mandarin orange	Citrus unshiu S.Marcov.	41	2	0	0					
BK 바이오제안	10	해조다당		seaweeds	Sargassum fusiforme	1068	8	0	0	marine macro- and microalgae	anti-asthmatic activity	Marine macro- and microalgae as potential agents for the prevention of asthma: hyperresponsiveness and inflammatory subjects.	Adv Food Nutr Res. 2011;64:277-86. Review	22054955
										marine algae	Antiallergic effects	Antiallergic benefit of marine algae in medicinal foods.	Adv Food Nutr Res. 2011;64:267-75. Review	22054954
										alginate oligosaccharide	anti-asthmatic effects 1. modulation of Th1/Th2 cytokines	Bacillus subtilis KCTC 11782BP-produced alginate oligosaccharide effectively suppresses asthma via T-helper cell type 2-related cytokines.	PLoS One. 2015 Feb 6;10(2):e0117524.	25658604
BK 바이오제안	11	arabinoxylan				822	0	0	0					
BK 바이오제안	12	β-glucan				3165	31	17	7					
BK 바이오제안	13	PSP (단백다당체)		polysaccharide peptide		102	0	0	0					
BK 바이오제안	14	우유 펩타이드		milk derived peptide		8	0	0	0					
BK 바이오제안	15	IgG		Immunoglobulin G		123057	2009	110	280					
BK 바이오제안	16	스피루리나		Spirulina	irulina platensis (Gomont) Geit	1356	0	2	0	phycocyanobilin	inhibitor ofNADPH oxidase activity	Carvedilol and spirulina may provide important health protection to smokers and other nicotine addicts: a call for pertinent research.	Mo Med. 2015 Jan-Feb;112(1):72-5.	19573997
BK 바이오제안	17	브로콜리		Broccoli, Asparagus broccoli, Italian broccoli, Sprouting	Brassica oleracea L. var. italica Plenck	1871 31 70 3	11 0 1 0	0 0 0 0	0 0 0 0	Sulforaphane	anti-asthmatic effects 1. suppressed the increase in the levels of SOCS-3 and GATA-3 and IL-4 expression in the OVA-challenged mice	Sulforaphane inhibits the Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma.	BMB Rep. 2012 May;45(5):311-6.	22617456
										Sulforaphane	prevents allergic disease and asthma	Sulforaphane-rich broccoli sprout extract attenuates nasal allergic response to diesel exhaust particles.	Food Funct. 2014 Jan;5(1):35-41.	24287881
BK 바이오제안	18	MCP (modified citrus pectin)				41	0	0	0					

그림 2.4 소재별 Allergic asthma 관련논문 세부검색

〈출처: 식품의약품안전처 식품안전정보포탈 www.foodsafetykorea.go.kr, 미국 국립보건원 미국국립 의학도서관 정보검색 www.pubmed.com〉

구분	No.	품명	생약명	이명	기원(학명)	pubmed	Rheumatoid arthritis	Rheumatism	Arthritis	efficacy material	효능	논문명	저널	PMID
기준규격	1	홍삼	Ginseng Radix Rubra	red ginseng	인삼 *Panax ginseng* C. A. Meyer	625	1	1	3	red ginseng extracts	ameliorate arthritis in mice with CIA 1. by targeting pathogenic Th17 2. by targeting osteoclast differentiation	Red ginseng extract ameliorates autoimmune arthritis via regulation of STAT3 pathway, Th17/Treg balance, and osteoclastogenesis in mice and human.	Mediators Inflamm. 2014;2014:351856.	25147435
										red ginseng saponin extract	anti-arthritic effects	Red ginseng saponin extract attenuates murine collagen-induced arthritis by reducing pro-inflammatory responses and matrix metalloproteinase-3 expression.	Biol Pharm Bull. 2010;33(4):604-10.	20410593
										red ginseng extracts	1. by targeting pathogenic Th17 2. by targeting osteoclast differentiation	Red ginseng extract ameliorates autoimmune arthritis via regulation of STAT3 pathway, Th17/Treg balance, and osteoclastogenesis in mice and human.	Mediators Inflamm. 2014;2014:351856.	25147435
										red ginseng saponin fraction-A (RGSF-A)	attenuated arthritis severity	Korean red ginseng saponin fraction rich in ginsenoside-Rb1, Rc and Rb2 attenuates the severity of mouse collagen-induced arthritis.	Mediators Inflamm. 2014;2014:748964.	24833816
기준규격	2	클로렐라		Chlorella	*Chlorella spp.*	5044	0	1	1	lycopene	anti-arthritis	Anti-inflammatory activity of lycopene isolated from Chlorella marina on type II collagen induced arthritis in Sprague Dawley rats.	Immunopharmacol Immunotoxicol. 2013 Apr;35(2):282-91.	23237458
기준규격	3	알로에 겔		Aloe gel	Aloe+K24 ferox Miller	55	0	0	0					
개별인정형	4	구아바잎추출물		Guava	Psidium guajava L.	466	0	1	1					
개별인정형	5	표고버섯균사체		Oak Mushroom, Shiitake Fungus	Lentinus edodes (Berk.) Sing. Cortinellus edodes (Berk.) S. Ito & S. Imai	50 492	0 0	0 0	0 1	White button and shiitake mushrooms	anti-arthritis	White button and shiitake mushrooms reduce the incidence and severity of collagen-induced arthritis in dilute brown non-agouti mice.	J Nutr. 2011 Jan;141(1):131-6.	21106932
개별인정형	6	L-글루타민		L-Glutamine		2248	0	0	4					
BK 바이오제안	7	유산균		Lactobacillus, lactic acid bacteria (LAB)		28907 6836	35 4	2 0	80 5					
BK 바이오제안	8	한라봉다당		Hallabong, kabosu	*Citrus sphaerocarpa* Tanaka nom. nud.	5 7	0 0	0 0	0 0					
BK 바이오제안	9	감귤다당		mandarin orange	*Citrus unshiu* S.Marcov.	41	0	0	0					
BK 바이오제안	10	해조다당		seaweeds	*Sargassum fusiforme*	1068	0	0	2	lectin	anti-nociceptive and anti-inflammatory efficacy 1. partially dependent on TNF-α and IL-1β inhibition	A lectin from the green seaweed Caulerpa cupressoides reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis.	Int Immunopharmacol. 2014 Jul;21(1):34-43.	24768528
										Fucoidan	treatment of rheumatoid arthritis 1. reduces the viability, survival, and invasiveness of IL-1β-treated RAFLS 2. inhibition of NF-κB and p38 activation	Low-Molecular-Weight Fucoidan Inhibits the Viability and Invasiveness and Triggers Apoptosis in IL-1β-Treated Human Rheumatoid Arthritis Fibroblast Synoviocytes.	Inflammation. 2015 Oct;38(5):1777-86.	25787883
BK 바이오제안	11	arabinoxylan				822	0	0	0					
BK 바이오제안	12	β-glucan				3165	13	0	20					
BK 바이오제안	13	PSP (단백다당체)		polysaccharide peptide		102	1	1	2	Ganoderma lucidum polysaccharide peptide	treatment of rheumatoid synovial fibroblast 1. inhibits nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) transcription pathway	Ganoderma lucidum polysaccharide peptide reduced the production of proinflammatory cytokines in activated rheumatoid synovial fibroblast.	Mol Cell Biochem. 2007 Jul;301(1-2):173-9.	17219061
BK 바이오제안	14	우유 펩타이드		milk derived peptide		8	0	0	0					
BK 바이오제안	15	IgG		Immunoglobulin G		123057	4953	185	7032					
BK 바이오제안	16	스피루리나		Spirulina	*Spirulina platensis* (Gomont) Geitler	1356	2	0	5	Spirulina	anti-inflammatory effect in arthritis model	Inhibitory effects of Spirulina in zymosan-induced arthritis in mice.	Mediators Inflamm. 2002 Apr;11(2):75-9.	12061427
										Spirulina fusiformis	anti-inflammatory activity against adjuvant-induced arthritic animals	Anti-inflammatory effect of Spirulina fusiformis on adjuvant-induced arthritis in mice.	Biol Pharm Bull. 2006 Dec;29(12):2483-7.	17142986
										S. platensis	protective efficacy against collagen-induced arthritis (CIA) rats	Evaluation of protective efficacy of Spirulina platensis against collagen-induced arthritis in rats.	Inflammopharmacology. 2009 Jun;17(3):181-	19390977
BK 바이오제안	17	브로콜리		Broccoli, Asparagus broccoli, Italian broccoli, Sprouting broccoli	*Brassica oleracea* L. var. italica Plenck	1871 31 70 3	3 0 0 0	0 0 0 0	3 1 1 0	sulforaphane (SFN), derived broccoli	inhibits Rheumatoid T Cell Activation	Inhibition of Synovial Hyperplasia, Rheumatoid T Cell Activation, and Experimental Arthritis in Mice by Sulforaphane, a Naturally Occurring Isothiocyanate.	Arthritis Rheum. 2010 Jan;62(1):159-70.	20039434
BK 바이오제안	18	(modified citrus pectin)				41	1	1	1	Galectin-3	treatment of inflammatory arthritisalectin-3	Galectin-3 is a sensor-regulator of toll-like receptor pathways in synovial fibroblasts.	Cytokine. 2015 May;73(1):30-5.	25689620

그림 2.5 소재별 만성염증모델 관련논문 세부검색

〈출처: 식품의약품안전처 식품안전정보포탈 www.foodsafetykorea.go.kr, 미국 국립보건원 미국국립 의학도서관 정보검색 www.pubmed.com〉

나. 식약공용한약재의 면역능 문헌조사

- 식약공용소재 약 67종에 대한 면역능관련 문헌조사를 통해 면역능평가법의 적정성 검증 소재로 이용 및 건강기능식품의 개발소재로서 정보획득.
- 논문내용 및 한방의료에서 사용되는 예를 참고하여 기준품목 및 개발가능 후보품목으로 구분함.
- 다양한 검색어 조합으로 정보를 획득하여 다면적인 면역능정보를 취득함.
- 대한민국약전 한약표준성분에 기초해서 지표성분 분석이 가능한 품목과 그 외 품목을 구분함.

										Allergic lung inflammation			Rheumatoid arthritis			감염모델
No.	품명	생약명	이명	기원(학명)	부위	식용가능여부	pubmed	immune boosting	immunomodulation	Asthma	Lung inflammation	Airway inflammation	Rheumatoid arthritis	Rheumatism	Arthritis	Infection
1	고추	Capsici Fructus	hot pepper, Cayenne, Capsicum, Chili Pepper, Red Pepper, Tabasco	고추 *Capsicum annuum* Linné 또는 그 변종	열매	가능	1114	0	2	15	6	2	4	8	10	278
2	길경	Platycodonis Radix	Balloonflower	도라지 *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle	뿌리	가능	201	0	3	0	0	0	0	0	0	0
3	미삼	Ginseng Radix Palva		인삼 *Panax ginseng* C.A.Meyer	가는 뿌리	가능	2084	2	17	9	8	3	2	3	4	40
4	상심자	Mori Fructus		뽕나무 Morus alba Linné 또는 기타 동속 근연식물	열매	가능	401	0	1	13	6	2	3	3	9	24
5	상지	Mori Ramulus	Bombycis mulberry	뽕나무 Morus alba Linné또는 기타 동속 근연식물	어린 가지	가능	401	0	1	13	6	2	3	3	9	24
6	생강	Zingiberis Rhizoma Recens	ginger	생강 *Zingiber officinale* Roscoe	뿌리줄기	가능	797	2	2	9	7	5	13	28	37	26
7	아교	Asini Corii Colla		당나귀 *Equus asinus* Linne 소 *Bos taurus* Linné var. *domesticus* Gmelin	교질	가능	243 2929	0 0	2 0	0 6	3 12	0 1	0 4	0 6	1 18	33 191
8	울금	Curcumae Radix	Turmeric	은울금 (溫鬱金) *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 강황 (薑黃) Curcuma longa Linné 광서아출 (廣西莪朮) Curcuma kwangsiensis S. G. Lee et C. F. Liang 봉아출 (蓬莪朮) Curcuma phaeocaulis Val.	덩이뿌리	제한적가능	98 1431 18 30	0 1 0 0	0 13 0 0	0 11 0 0	0 0 0 0	0 3 0 0	1 8 0 0	0 7 0 0	2 29 1 1	0 46 0 0
9	인삼	Ginseng Radix	Ginseng	인삼 *Panax ginseng* C. A. Meyer	뿌리	가능	267	0	4	9	0	2	2	2	4	32
10	홍삼	Ginseng Radix Rubra	red ginseng	인삼 *Panax ginseng* C. A. Meyer	뿌리	가능	11	0	0	9	8	3	2	3	4	40
11	황기	Astragali Radix		황기 *Astragalus membranaceus* Bunge 몽골황기 (蒙古黃芪) *Astragalus membranaceus* Bunge var. *mongholicus* Hsiao	뿌리	뿌리/잎/어린싹-가능	171	0	0	13 0	12 0	6 0	1 0	3 0	3 0	27 0
12	작약	Paeoniae Radix.	Paeny Root	작약 *Paeonia lactiflora* Pallas 또는 기타동속근연식물	뿌리	제한적 가능	173	0	1	9	1	3	23	1	40	12

1) 생약명 : 한약학명목록 참조
2) 이명 : 식품안전정보포털 참조

그림 2.6 식약공용소재 중 면역능검증 기준품목 및 Keyword 검색

〈출처: 식품의약품안전처 생약종합정보시스템 http://www.mfds.go.kr/herbmed/index.do,
한국한의학연구원 한약표준표본관 http://boncho.kiom.re.kr/herbarium/index.php,
한국한의학연구원 전통의학정보포털 OASIS http://boncho.kiom.re.kr/herbarium/index.php
미국 국립보건원 미국국립 의학도서관 정보검색 www.pubmed.com〉

								Immune		Allergic lung inflammation			Rheumatoid arthritis			감염모델
No.	품명	생약명[1]	이명[2]	기원 (학명)	부위	식용가능여부	Pubmed	immune boosting	immuno modulation	Asthma	Lung inflammation	Airway inflammation	Rheumatoid arthritis	Rheumatism	Arthritis	Infection
1	갈근	Puerariae Radix	Kudzu, Kudzu vine, Kuzu vine, Pueraria	칡 *Pueraria lobata* Ohwi	뿌리	가능	288	0	0	1	3	1	0	0	0	5
2	감국	Chrysanthemi Indici Flos	-	감국 *Chrysanthemum indicum* Linné	꽃	가능	102	0	0	0	2	0	1	1	4	4
3	강황	Curcumae Longae Rhizoma	Turmeric, Curcuma, haldi	강황(薑黃) *Curcuma longa* Linné	뿌리줄기	제한적 가능	1447	1	13	11	11	4	8	20	38	50
4	건율	Castaneae Semen	chestnut	밤나무 *Castanea crenata* Sieboldet Zuccarini	씨	가능	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	계심	Cassiae Cortex Interior	cinnamon	육계(肉桂) *Cinnamomum cassia* Blume	줄기껍질	가능	199	0	2	0	0	0	0	0	0	1
6	계지	Cinnamomi Ramulus	cinnamon	육계(肉桂) *Cinnamomum cassia* Presl	어린 가지	가능	199	0	2	1	0	0	0	0	0	0
7	구기자	Lycii Fructus	Chinese matrimony vine	구기자나무 *Lycium chinense* Miller 영하구기(寧夏枸杞) *Lycium barbarum* Linné	열매	가능	94 295	0 0	0 7	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
8	국화	Chrysanthemi Flos	-	국화 *Chrysanthemum morifolium* Ramatuelle	꽃	가능	211	0	1	0	0	0	0	0	0	0
9	녹두	Vignae Radiatae Semen	Green gram, Mung bean	녹두 *Vigna radiatus Wilczek*	씨	가능	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	목과	Chaenomelis Fructus	Chinese quince, chaenomeles fruit, mu gua	모과나무 *Chaenomeles sinensis* Koehne 명자나무 *Chaenomeles speciosa* Nakai	열매	가능	18 27	0 0	0 2	0 0	0 0	0 0	0 1	0 1	0 3	1 1
11	산수유	Corni Fructus	Cornus Fruit, royal jelly	산수유나무 *Cornus officinalis* Sieboldet Zuccarini	열매	가능	132	0	2	1	1	1	0	0	0	1
12	산초	Zanthoxyli Pericarpium	Chinese pepper	초피나무 *Zanthoxylum piperitum* De Candolle 산초나무 *Zanthoxylum schinifolium* Sieboldet Zuccarini 화초 (花椒) *Zanthoxylum bungeanum* Maximowicz	열매껍질	가능	47 35 38	0 0 0	1 0 0	1 0 1	0 0 0	0 0 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
13	상백피	Mori Radicis Cortex	White Mulberry, Mulberry twig	뽕나무 *Morus alba* Linné	뿌리껍질	가능	401	0	1	1	4	2	1	2	4	12
14	상엽	Mori Folium		뽕나무 *Morus alba* Linné 산뽕나무 *Morus bombycis* Koidz	잎	가능	401 36	0 0	1 0	1 2	4 1	2 0	1 0	2 0	4 1	12 1
15	애엽	Artemisiae Argyi Folium	Artemisia Herb	황해쑥 *Artemisia argyi* Lev. et Vant. 쑥 *Artemisia princeps* Pampanini 산쑥 *Artemisia montana* Pampani	잎 및 어린줄기	가능	40 83 10	0 0 0	1 0 0	1 1 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
16	영지	-	varnished Polypore	영지 *Ganoderma lucidum* Karsten 또는 기타 근연종	자실체	가능	1094	2	34	20	1	2	4	0	9	35
17	오미자	Schisandrae Fructus	Chinese magnolia vine	오미자 *Schisandra chinensis* Baillon	열매	가능	394	0	1	2	3	1	0	1	0	4
18	옥죽	Polygonati Odorati Rhizoma	Korean solomon's seal	둥굴레 *Polygonatum odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi 또는 기타 동속 근연식물	뿌리줄기	어린잎/줄기/뿌리줄기	41	0	0	1	0	0	0	0	0	2
19	육계	Cinnamomi Cortex	cinnamon	육계 (肉桂) *Cinnamomum cassia* Presl	줄기껍질	어린가지/줄기껍질/	199	0	2	1	0	0	1	1	2	9
20	은행엽	Ginkgo Folium	Ginkgonis Germen	은행나무 Ginkgo biloba Linné	잎	제한적 가능	3455	0	10	29	0	5	1	1	9	15
21	정향	Syzygii Flos	Cloves, Flores Caryophylli, Choji, Ding xiang	정향 (丁香) *Syzygium aromaticum* Merrill et Perry	꽃봉오리	가능	205	0	1	1	0	0	1	0	2	16
22	천문동	Asparagi Tuber	-	천문동 *Asparagus cochinchinensis* Merrill	덩이뿌리	제한적 가능	19	0	0	1	2	2	0	0	0	0
23	청피	Citri Unshius Pericarpium Immaturus		귤나무 *Citrus unshiu* Markovich *Citrus reticulata* Blanco	열매껍질	가능	174	1	0	0 1	1 1	0 2	0	0	0	6 10
24	총백	Allii Fistulosi Bulbus	Allii fistulosi	파 *Allium fistulosum* Linné	신선한 비늘줄기	가능	100	0	0	0	0	0	0	0	0	2
25	치자	Gardeniae Fructus	Cape jasmine	치자나무 *Gardenia jasminoides* Ellis	열매	제한적 가능	233	0	0	1	4	1	3	2	5	4
26	팔각회향	Illici Veri Fructus	Chinese Star Anise	팔각회향 (八角茴香) *Illicium verum* Hook. fil	열매	가능	80	0	0	2	0	0	0	3	0	4
27	하고초	Prunellae Spica	all heal	꿀풀 *Prunella vulgaris* Linné var. *lilacina* Nakai 하고초 (夏枯草) *Prunella vulgaris* Linné	꽃대	어린순/어린잎/꽃자루	165	0 0	2 2	0	0	0	1	5	6	12
28	하수오	Polygoni Multiflori Radix		하수오 *Polygonum multiflorum* Thunberg	덩이뿌리	가능, 씨-불	218	0	1	0	0	0	0	0	0	6
29	한속단	Phlomidis Radix		한속단 *Phlomis umbrosa* Turczaninow	뿌리	가능	17	0	0	0	0	0	0	1	0	0
30	행인	Armeniacae Semen		살구나무 *Prunus armeniaca* Linné var. *ansu* Maximowicz 개살구나무 *Prunus mandshurica* Koehne var. *glabra* Nakai 시베리아살구 *Prunus sibirica* Linné 아르메니아살구 *Prunus armeniaca* Linné	씨	열매/꽃-가능, 씨-불 가능 씨-불가능 열매-가능, 씨-불가능 열매-가능, 씨-불가능	171 3 9 171	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 2	1 0 0 1	1 0 0 1	0 0 0 0	0 0 0 0	6 0 0 6
31	홍화자	Carthami Fructus	Safflower	잇꽃 *Carthamus tinctorius* Linné	열매	가능	483	0	0	1	5	0	1	1	1	8
32	회향	Foeniculi Fructus	Adas Landi	회향 *Foeniculum vulgare* Miller		뿌리줄기	252	0	2	0	1	0	0	0	0	8
33	화귤홍	Citri Grandis Exocarpium	Citron	화주유(化州柚. Citrus grandis 'Tomentosa') 당유자나무[유柚. Citrus grandis (L.) Osbeck]	열매의 과피		2 18/ 101	0 0	0 0							
34	대추	Zizyphi Fructus	Chinese jujube	대추나무 *Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* Rehder 보은대추나무 *Zizyphus jujuba* Miller var. *hoonensis* T. B. Lee	열매	가능	0 0/7	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
35	로얄젤리			일벌 *Apis indica* Rodosz Kowski	분비물	가능	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	복분자	Rubi Fructus	Korean bramble	복분자딸기 *Rubus coreanus* Miquel	열매	가능	68	0	1	3	0	0	2	0	2	1
37	사삼	Adenophorae Radix		잔대 *Adenophora triphylla* var. *japonica* Hara 사삼(沙參) *Adenophora stricta* Miq.	뿌리	가능	2 7	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
38	석류	Granati Fructus	Dwarf Pomegranate	석류나무 *Punica granatum* Linné	열매	가능	533	0	2	3	5	0	1	2	4	26
39	어성초	Houttuyniae Herba	Houttuynia	약모밀 *Houttuynia cordata* Thunberg	지상부	제한적 가능	165	0	1	2	3	0	1	0	1	16
40	우방근	Arctii Radix	Burdock	우엉 Arctium lappa Linné	뿌리	가능	167	0	0	0	1	0	0	0	3	3
41	우슬	Achyranthis Radix	Japanese Achyranthes	쇠무릎 *Achyranthes japonica* Nakai우슬 (牛膝) Achyranthes bidentata Blume	뿌리	잎-가능, 뿌리-제한적	12 106	0 0	0 1	02	00	02	01	00	24	04
42	지실	Ponciri Fructus Immaturus		탱자나무 *Poncirus trifoliata* Rafinesque	열매	꽃-가능, 열매-제한적	219	0	0	1	0	0	0	0	1	13
43	천마	Gastrodiae Rhizoma	Tall Gastrodia Tuber	천마 *Gastrodia elata* Blume	덩이줄기	가능	222	0	1	2	0	0	0	1	0	3
44	청호	Artemisiae Annuae Herba		개똥쑥 *Artemisia annua* Linné 개사철쑥 Artemisia apiacea Hance	지상부	어린잎-가능	5	0	0	6 0	2 0	2 0	3 0	1 0	4 0	26 0
45	포공영	Taraxaci Herba	Mongolian dandelion	민들레 *Taraxacum platycarpum* H. Dahlstedt 서양민들레 *Taraxacum officinale* Weber 털민들레 *Taraxacum mongolicum* Handel-Mazzetti 흰민들레 *Taraxacum coreanum* Nakai	전초	가능	1	0	0	0 2 0 0	0 3 1 0	0 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 1 0 0	1 6 1 1

46	황정	Polygonati Rhizoma	Siberian Solomon's Seal	층층갈고리둥굴레 *Polygonatum sibiricum* Redoute 진황정 *Polygonatum falcatum* A. Gray 전황정 (滇黃精) *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsley 다화황정 (多花黃精) *Polygonatum cyrtonema* Hua	열매	가능	10	0	0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0
47	곡기생	Visci Ramulus & Folium	Mistletoe	겨우살이 *Viscum album* L. var. *coloratum* Ohwi	잎, 줄기, 가지	제한적 가능	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	곽향	Agastachis Herba		배초향 *Agastache rugosa* (Fischer et Meyer) O. Kuntze	지상부	어린잎_가능, 전초-제	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	독활	Araliae Continentalis Radix	Aralia cordata	독활 *Aralia continentalis* Kitagawa	뿌리	어린잎-가능, 제한적	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	백수오	Cynanchi Wilfordii Radix		은조롱 *Cynanchum wilfordii* Hemsley	덩이뿌리	가능	2	0	0	1	0	0	0	0	0	1
51	사삼	Adenophorae Radix	Japanese Lady Bell	잔대 *Adenophora triphylla* var. *japonica* Hara 사삼(沙參) *Adenophora stricta* Miq.	뿌리	가능	2	0	0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
52	사상자	Cnidi Fructus		벌사상자 *Cnidium monieri* (L). Cussion 사상자 *Torilis japonica* Decandolle	열매	제한적 가능	0	0	0	4 0	1 0	2 0	0 0	0 0	0 0	0 1
53	식방풍	Peucedani Japonici Radix		갯기름나물 *Peucedanum japonicum* Thunberg	뿌리	어린순/어린잎/어린줄	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
54	욱리인	Pruni Japonicae Semen		이스라지 *Prunus japonica* Thunb 양이스라지나무 Prunus humillis Bunge	씨	열매-가능, 씨-불가능	0	0	0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
55	의이인	Coicis Semen	Coicis Semen	율무 *Coix lacryma-jobi* Linné var. *ma-yuen* Stapf	씨	가능	6	0	0	0	0	0	0	0	0	3
56	전호	Peucedani Radix		백화전호(白花前胡) *Peucedanum praeruptorum* Dunn 바디나물 Angelica decursiva Franchet et Savatier (=Peucedanum decursivum Maximowicz)	뿌리	어린순-가능, 뿌리-모	14	0	0	3 1 1	1 1 0	3 1 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
57	정력자	Lepidii seu Descurainiae Semen		다닥냉이 *Lepidium apetalum* Willdenow 재쑥 Descurainia sophia Webb ex Prantl	씨	어린순-가능, 씨-모름	1	0	0	0 2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
58	진피	Fraxini Cortex		귤나무 *Citrus unshiu* Markovich *Citrus reticulata* Blanco	열매껍질	가능	4	0	0	0 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	6 10
59	토사자	Cuscutae Semen	Dodder Seed	갯실새삼 *Cuscuta chinensis* Lamark	씨	제한적 가능	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	회향	Foeniculi Fructus	Adas Landi; Adas Pedas, Anis Vert, Wild Fennel	회향 *Foeniculum vulgare* Miller		뿌리줄기	5	0	0	0	1	0	0	0	0	8
61	후박	Magnoliae Cortex		일본목련 *Magnolia obovata* Thunberg 후박 (厚朴) *Magnolia officinalis* Rehder et Wilson 요엽후박 (凹葉厚朴) *Magnolia officinalis* Rehder et Wilson var. *biloba* Rehder et Wilson		열매	25	0	0	1 5	0 4	0 0	0 0	0 1	0 2	1 6
62	흑지마	Sesami Semen Nigra	Sesame	참깨 *Sesamum indicum* Linné	씨	씨-가능, 잎-불가능	0	0	0	2	2	0	0	1	1	7
63	자소엽	Perillae Folium	Perilla mint, Befsteak plant	차조기 Perilla frutescens		가능	5	0	0	8	3	2	1	0	1	5
64	백개자	Sinapis Albae Semen	mustard	Brassica juncea		가능	7	0	0	0	0	0	0	0	0	18
65	오가피	Acanthopanacis Cortex	Five-leaved aralia	오갈피나무 *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman 또는 기타 동속식물	뿌리껍질 및 줄기껍질	줄기/잎/열매/뿌리-가	5	0	0	0	2	0	4	3	7	1
66	세주오가	Acanthopanax gracilistylus		*Acanthopanax gracilistylus* W.W.Smith			35	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	자오가 (가시오가피)	Acanthopanacis Senticosi Radix & Rhizoma	Siberian ginseng	*Acanthopanax senticosus* Harms			6	1	0	0	2	0	3	3	6	2

품목	약전 정량품목
	분석불가
	분석검색안됨

그림 2.7 식약공용소재 중 면역능개발후보품목 및 Keyword 검색

〈출처: 식품의약품안전처 생약종합정보시스템 http://www.mfds.go.kr/herbmed/index.do,
한국한의학연구원 한약표준표본관 http://boncho.kiom.re.kr/herbarium/index.php,
한국한의학연구원 전통의학정보포털 OASIS http://boncho.kiom.re.kr/herbarium/index.php
미국 국립보건원 미국국립 의학도서관 정보검색 www.pubmed.com〉

2. 동물시험기반 면역능 검증평가법 비교 연구를 통한 신뢰도 검증

- 면역능평가 동물시험법을 통해 전통적으로 실제 사용되었던 기존 우수 면역식품 (소재)의 신뢰도를 검증함.
- 선행연구를 통해 확보한 면역능 기존 우수 식품소재(홍삼, 개자류, 식방풍, 아삼, 더덕, 은시호)를 과민 면역반응조절 동물실험을 통해 신뢰도를 검증함.

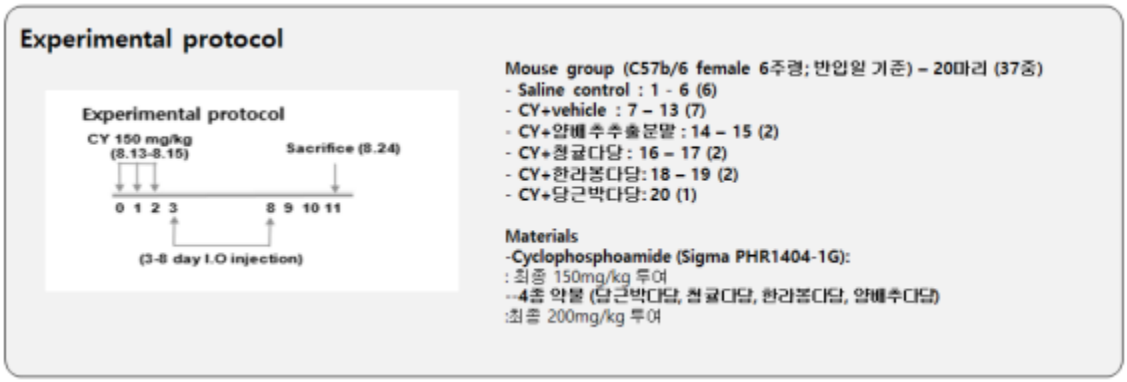
가. 항감염능 기능성 동물모델 신뢰도 검증

- 기능성 식품의 면역력 증대에 대한 많은 기대부분이 감염저항성을 높이는 것에 있음.
- 식품 소재와 약용으로 쓰이는 식물을 포함한 여러 천연 재료로부터 추출한 다당체들이 합성 의약품에 비하여 상대적으로 낮은 독성과 부작용을 보이며 면역체계를 강화할 수 있다는 사실이 보고되고 있다.
- 의약품이 아닌 식품으로서 기능을 고려할 때 특정 고병원성 병원체에 대한 치료효과를 평가하는 모델은 적합 하지 않음.
- 천연물에서 추철된 다당체들은 대식세포, 림프구, natural killer(NK) 세포 등 면역 세포의 활성화를 촉진시키며 면역 관련 cytokine들의 분비를 유도하여 면역력을 향상시킨다고 알려져 있음.
- 면역체계중 감염균에 대응하는 림프구의 활성을 측정함으로서 감염저항성 모델로 이용함.
- T 세포의 한 종류의 Th1 세포는 바이러스나 또는 세균감염 등의 항원에 대한 선천면역반응 (Innate immune response)에 핵심적인 역할을 함.
- 위와 같이 림프구의 활성정도를 측정하여 감염저항성의 척도로 측정하는 것이 넓은 범위의 항감염능을 측정할 수 있고 식품으로서 면역력 향상의 취지를 고려할 때 타당함.

(1) 항감염능 기능성 동물모델 개요

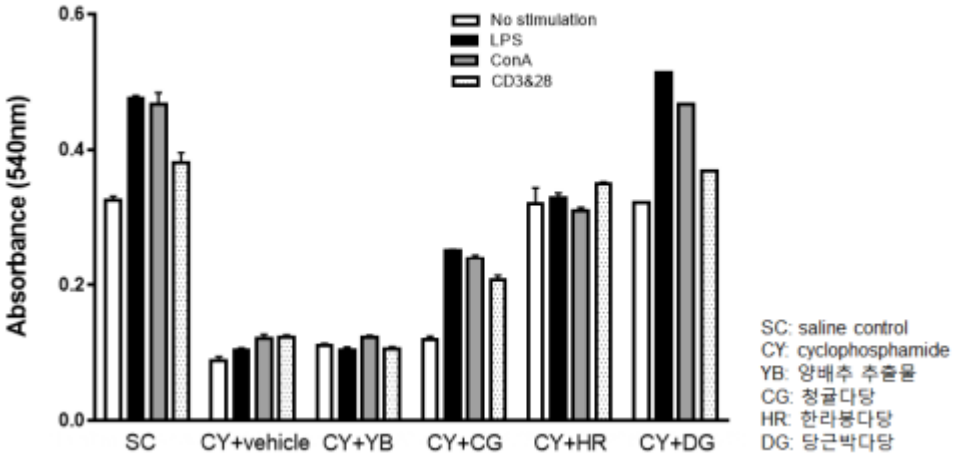
- **동물:** C57BL/6 mouse (8주령)을 이용함.
- **면역 억제:** cyclophosphamide의 농도를 (100~200mg/kg/day)정도로 복강(intra-peritoneal)의 경로로 3회 투여한다.
- **식품투여:** Bk bio에서 제공받은 양배추 추출분말, 청귤 다당, 한라봉 다당, 당근박 다당을 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 (200~400mg/kg/day)정도의 양을 100ul로 경구투여 하였음. 투여 기간(4일, 6일 투여)을 달리하여 면역력 증대 비교한다.
- **비장세포 획득:** Mouse를 희생한 후 비장을 얻는다. 그 후 10%FBS와 항생제 penicillin과 streptomycin(100 unit/mL, 100 μg/mL)가 포함되어 있는 RPMI-1640에 세척한 후 RBC를 lysis 한다. 그 후 grinder를 이용하여 비장세포를 균질화 한다.
- **림프구 활성 측정:** 균질화 된 비장세포를 72시간 동안 Lipopolysaccharide (10 μg/mL), Concanavalin A (20 μg/mL), CD3 & CD28 (0.5 μg/mL)를 처리하여 배양 한다.
  그 후 well 당 10 μL의 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (0.5mg/mL) 용액을 첨가하여 4시간 동안 반응 시킨 후 formazan을 용해 한 후 흡광도를 측정한다.
- **림프구 생산 싸이토카인 분비량 정량:** 비장세포를 72시간 동안 Lipopolysaccharide (10 μg/mL), Concanavalin A (20 μg/mL), CD3 & CD28 (0.5 μg/mL)를 처리하여 배양 후 배양액에서 L-1 β, IL-6, IFN-γ의 양을 ELISA을 통해서 정량한다.

(2) 면역능 소재 4종 (양배추 추출 분말, 청귤 다당, 한라봉 다당, 당근박 다당) 항감염능 신뢰도 검증

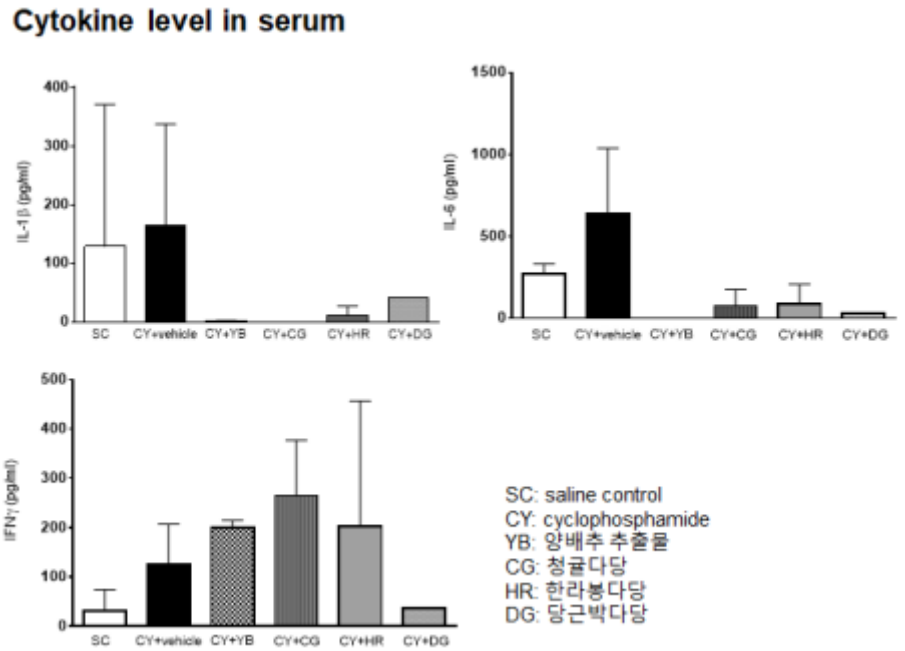


〈그림 2.8 면역결핍유도 및 면역증진 예상 물질 기간별 투여 일정〉

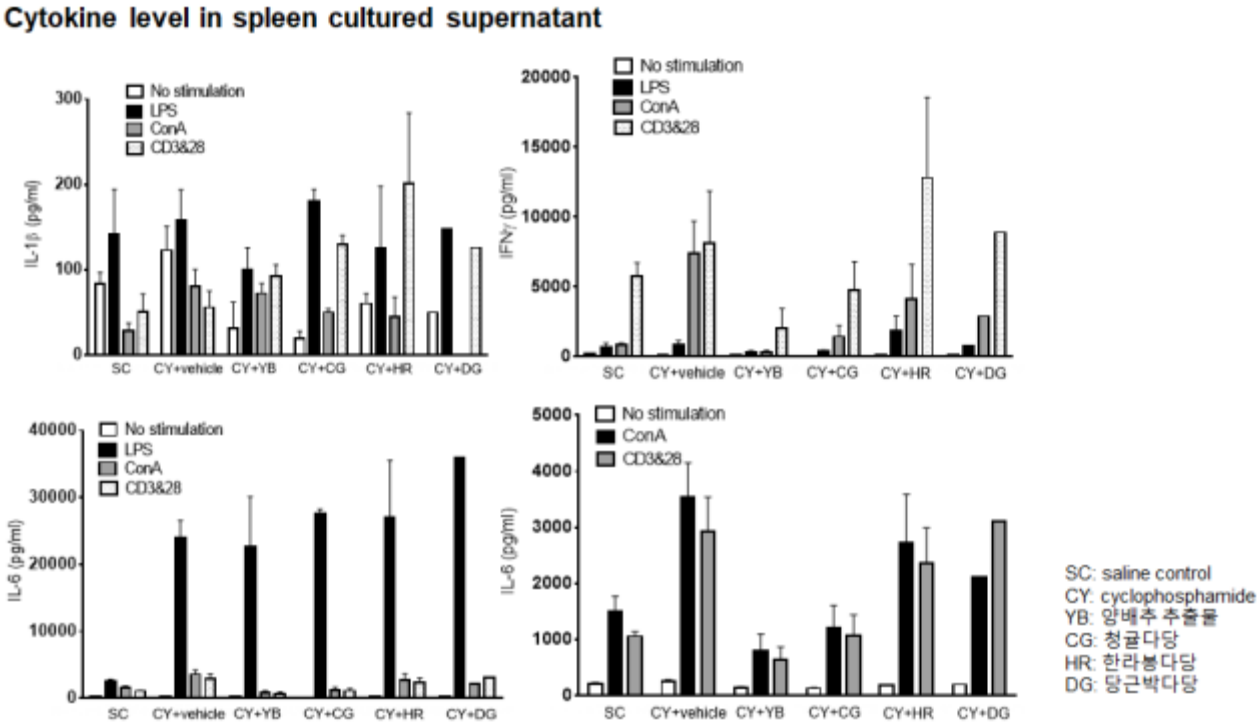
림프구 증식 활성 측정



〈그림 2.9 비장세포의 림프구 증식활성 측정〉



〈그림 2.10 혈청 내 염증 사이토카인의 수준 측정 〉

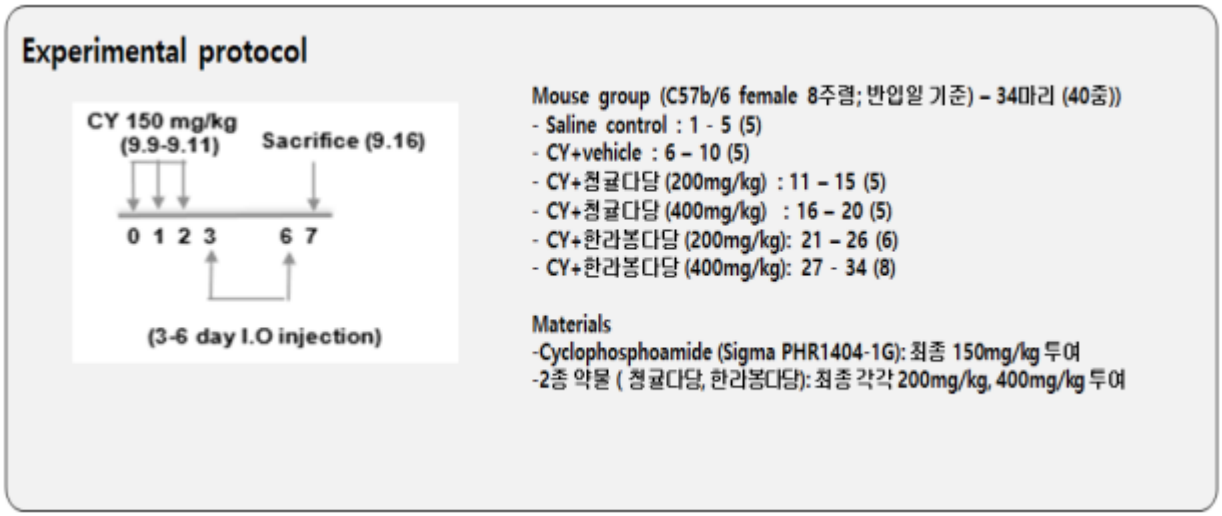


〈그림 2.11 비장세포 배양액내 염증 사이토카인의 수준 측정〉

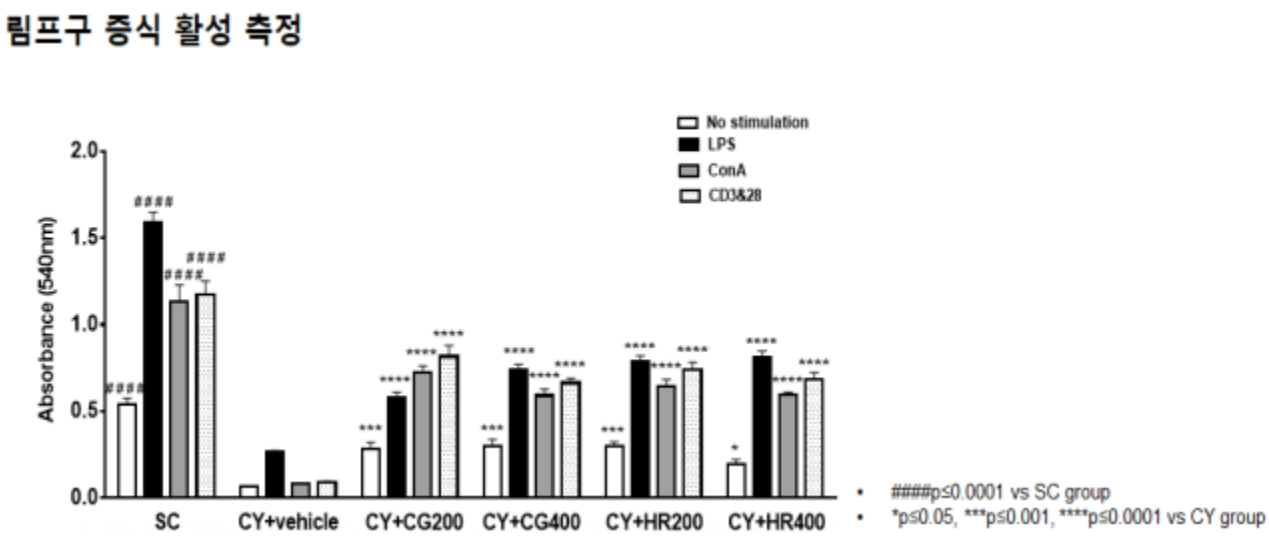
* Conclusion

- Cyclophosphamide를 이용한 면억억제는 잘 된 것으로 판단됨. Cyclophosphamide를 3일간 복강투여 하였을 시 T세포, B세포와 같은 림프구는 효과적으로 억제되어 세포활성도가 낮아짐을 확인함. 그러나 면역억제 후의 6일간의 투여동안 점차적으로 림프구 외의 대식세포, 수지상세포들과 같은 포식세포들이 억제된 림프구의 역할을 보완하는 것으로 보여짐. 낮아진 면역력을 강화시켜 줄 것이라고 예상 되는 양배추 추출분말, 청귤 다당, 한라봉 다당, 당근박 다당 투여 후 림프구 활성도 및 기타 염증 사이토카인의 양을 고려하여 청귤 다당과 한라봉 다당을 선정함.

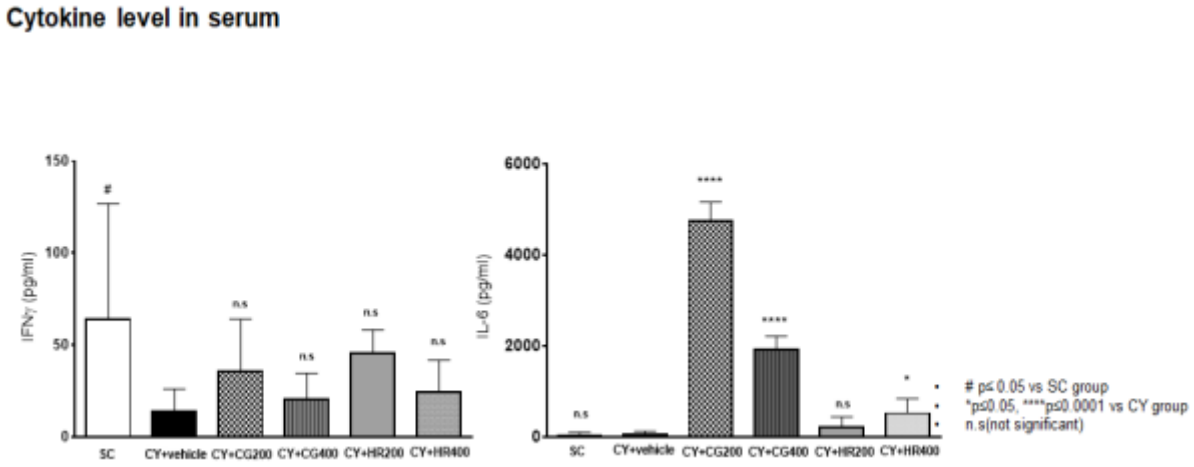
(3)면역능 소재 2종 (청귤 다당, 한라봉 다당)의 농도별 항감염능 신뢰도 검증



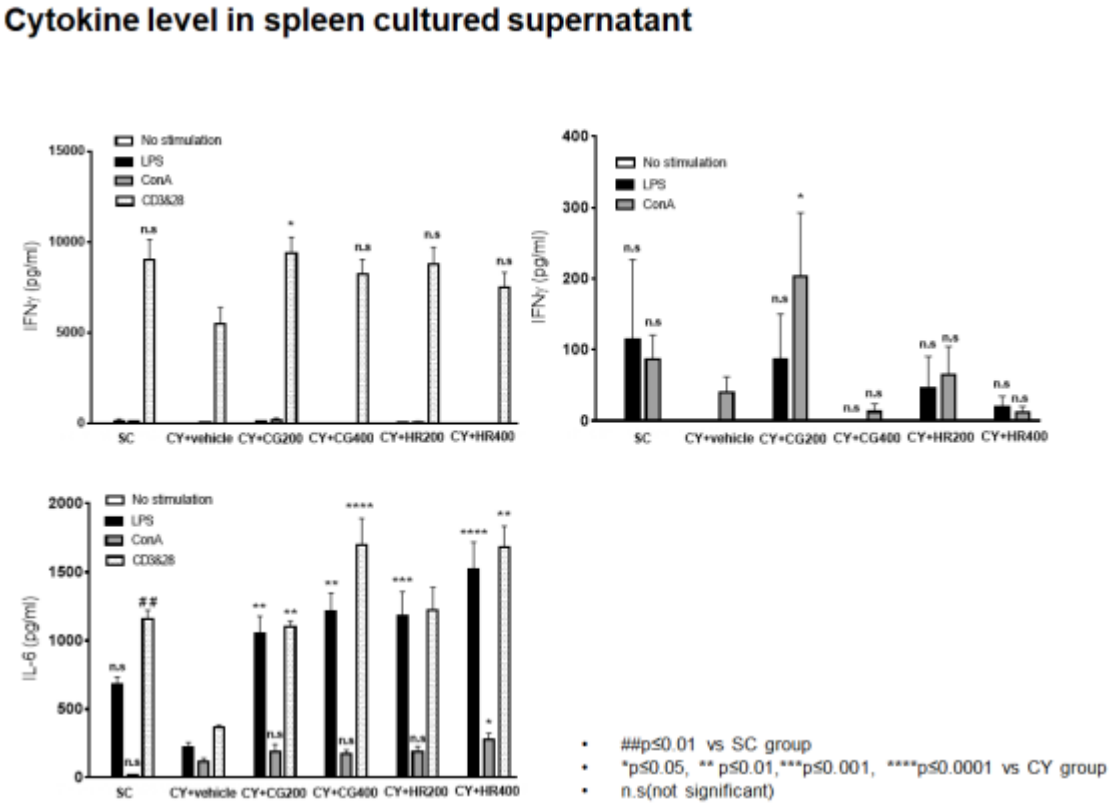
〈그림 2. 12 면역결핍유도 및 면역증진 예상 물질 기간별 투여 일정〉



〈그림 2.13 비장세포의 림프구 증식활성 측정〉



〈그림 2.14 혈청 내 염증 사이토카인의 수준 측정〉



〈그림 2.15 비장세포 배양액내 염증 사이토카인의 수준 측정〉

* Conclusion

- Cyclophosphamide를 이용한 면억억제는 잘 된 것으로 판단됨. Cyclophosphamide를 3일간 복강투여 하였을 시 T세포, B세포와 같은 림프구는 효과적으로 억제되어 세포활성도가 낮아짐을 확인함. 면역억제 후 4일이 지난 후 면역력을 억제한 그룹에서는 LPS와 같은 염증유도 물질을 처리하였을 시 증가함이 보이지 않았으나 청귤다당과 한라봉 다당을 하였을 때는 유의한 수준으로 림프구의 활성이 증가함을 보였음. 또한 사이토카인의 증가 폭 역시 유의미한 수준으로 증가함을 보였음. 따라서 청귤 다당과 한라봉 다당의 경우 단기간의 면역억제 시 효과적으로 면역력을 증강시키는 것으로 생각됨.

---

2. 인플루엔자바이러스 항감염 동물모델

(한국한의약연구원 유수성 박사님 연구실과 공동연구)

1) 동물실험방법

- Balb/c 8주령 female을 이용, cyclophosphamide 150mg/kg로 2일 간격 총 3회 IP 투여
- 마지막 항암제 투여 후 3일째부터 10일 동안 후보 물질 경구투여, control 군은 0.25% CMC solution 경구투여
- 경구투여 10일 종료 후 1일째 백신 접종(IM), 1ug of each influenza antigen/ mouse
- 백신 접종 후 4주째에 부검

Materials

1, 8주령 female balb/c (오리엔트 바이오)

2, cyclophosphamide (sigma)

3, 백신 (2017-2018 seasonal vaccine) : A/Michigan/45/2015, A/Hong Kong/4801/2014, B/Phuket/3073/2013, B/Brisbane/60/2008

2) ELISA 분석 방법

백신 용액을 이용, 각각의 influenza 항원을 1ug/ml로 plate 코팅(4가 백신이므로 총 4ug/ml), blocking 후, 10000배 희석한 serum과 incubation하고 HRP가 붙어있는 anti-IgG antibody, anti-IgG1 antibody, anti-IgG2a antibody(각각은 1000배 희석)를 이용해서 influenza antigen-specific Ab titer 측정 (구체적인 방법은 일반적인 ELISA 방법과 동일)

3) Splenocytes 구성 면역세포 분석

- Zombie Aqua (BV510) 염색 후 washing
- Anti-mouse CD16/32 Ab 추가 후 10분 incubation, washing 없이 surface antibody 추가: CD3(FITC), CD4(BV605), CD8a(PERCPCY5.5), CD19(APC), CD11C(PECY7), CD11B(PB), NK1.1(ALEXAFLUOR700), LY-6G(PE), LY-6C(APC-CY7)

Anti CD19-APC만 BD 제품이며 나머지는 biolegend 제품 사용

4) In vitro influenza antigen stimulation 및 CBA를 이용한 cytokine 분석

- Splenocyte 분리 후 2M/200ul 10% FBS RPMI media/well로 분주
- 각각의 개체에 anti-mouse CD28 Ab(1ug/ml, biolegend) 자극 군과 anti-mouse CD28 Ab +influenza antigen(0.5ug/ml) 자극 군으로 나누어 자극을 주고 2일 후에 culture sup.을 모음. 5배 희석해서 CBA를 이용 antigen-specific cytokine을 분석함

6) 동물실험군 및 면역식품소재 처리

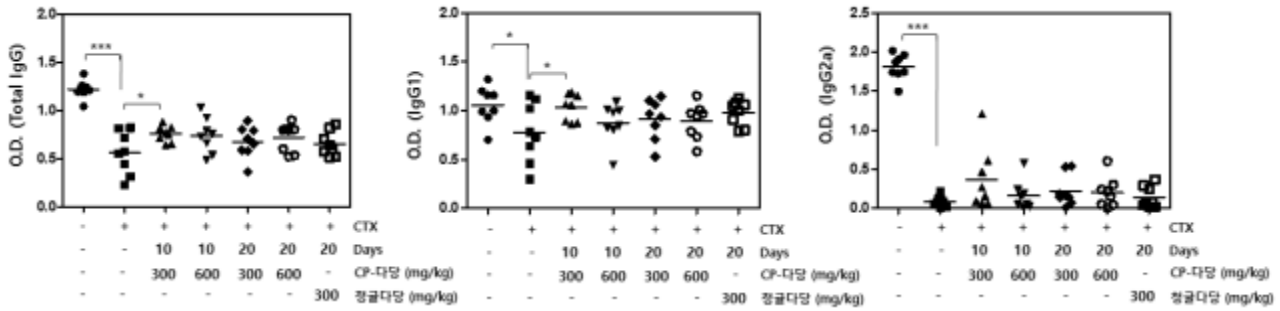
- 각군 당 8마리
- 동물실험군 종류: no treat, CTX, CTX+dg(당근박다당 300mg/kg), CTX+ki(케일박다당 300mg/kg), CTX+hsbm(홍삼분말 300mg/kg), CTX+hscc(홍삼추출액 300mg/kg)
- 면역식품소재 처리: no treat, CTX, CTX+dg 300-10(당근박다당 300mg/kg 접종 전 10일), CTX+dg 600-10(당근박다당 600mg/kg 접종 전 10일), CTX+dg 300-20(당근박다당 300mg/kg 접종 전후 10일씩 총 20일), CTX+dg 600-20, CTX+cg 300-20(청귤박다당 300mg/kg 접종 전후 10일씩 총 20일)

7) Intracellular Cytokine staining 방법을 통한 splenocytes 사이토카인 생성능 측정

결과

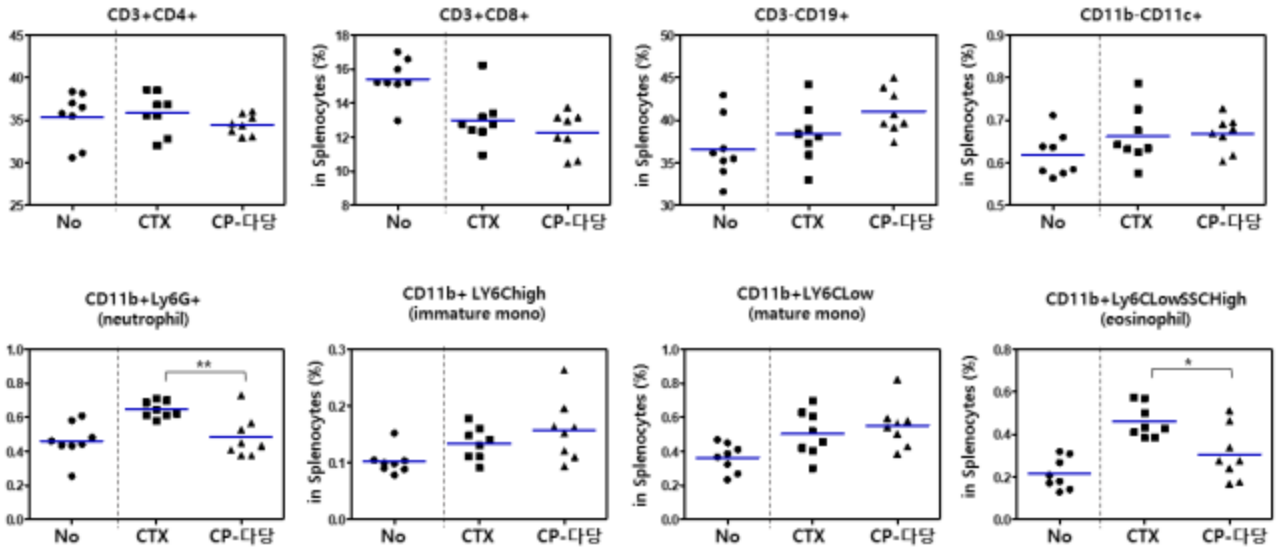
항체검사

인플루엔자항원 특지적 항체 형성에 미치는 면역식품소재의 영향 평가를 하엿다. CTX에 의하면 일반적으로 항원 특이적 항체가 감소하는데 당근박다당의 경우 항체 형성이 증가되는 통계적으로 유의미한 결과를 보여주고 있다



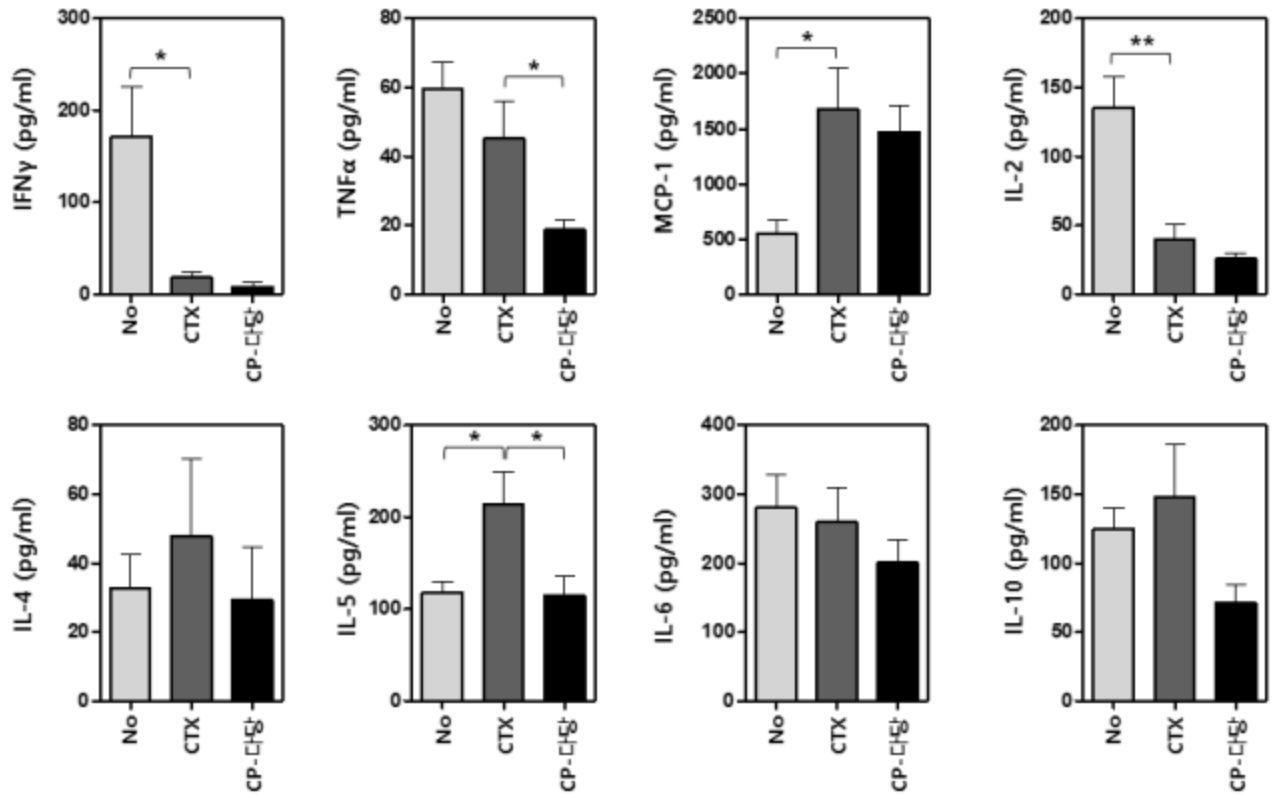
Splenocyte내 면역세포 구성분포

CTX 처리에 의해 변화된 구성분포변화를 보인 세포들가운데 특이적으로 Neutrophil과 eosinophil 의 경우 당근박다당 처리에 의해 CTX전의 구성비율로 회복되는 결과를 보여주고 있다



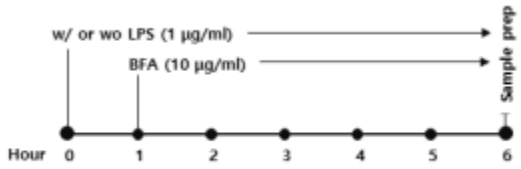
항원 특이적 사이토카인 형성 패턴을 CBA로 측정

Splenocyte에 대한 항원특적 자극에 의한 사이토카인 생성 패턴 분석에 의하면 CTX처리에 의해 증가한 IL-5의 양이 당근닥바당 처리에 의해 회복된 결과를 보여주었다. 이는 Neutrophil과 eosinophil 의 구성비 변화양상과 잘 일치되는 결과라고 할 수 있다.



Intracellular Cytokine staining 방법을 통한 splenocytes 사이토카인 생성능 측정

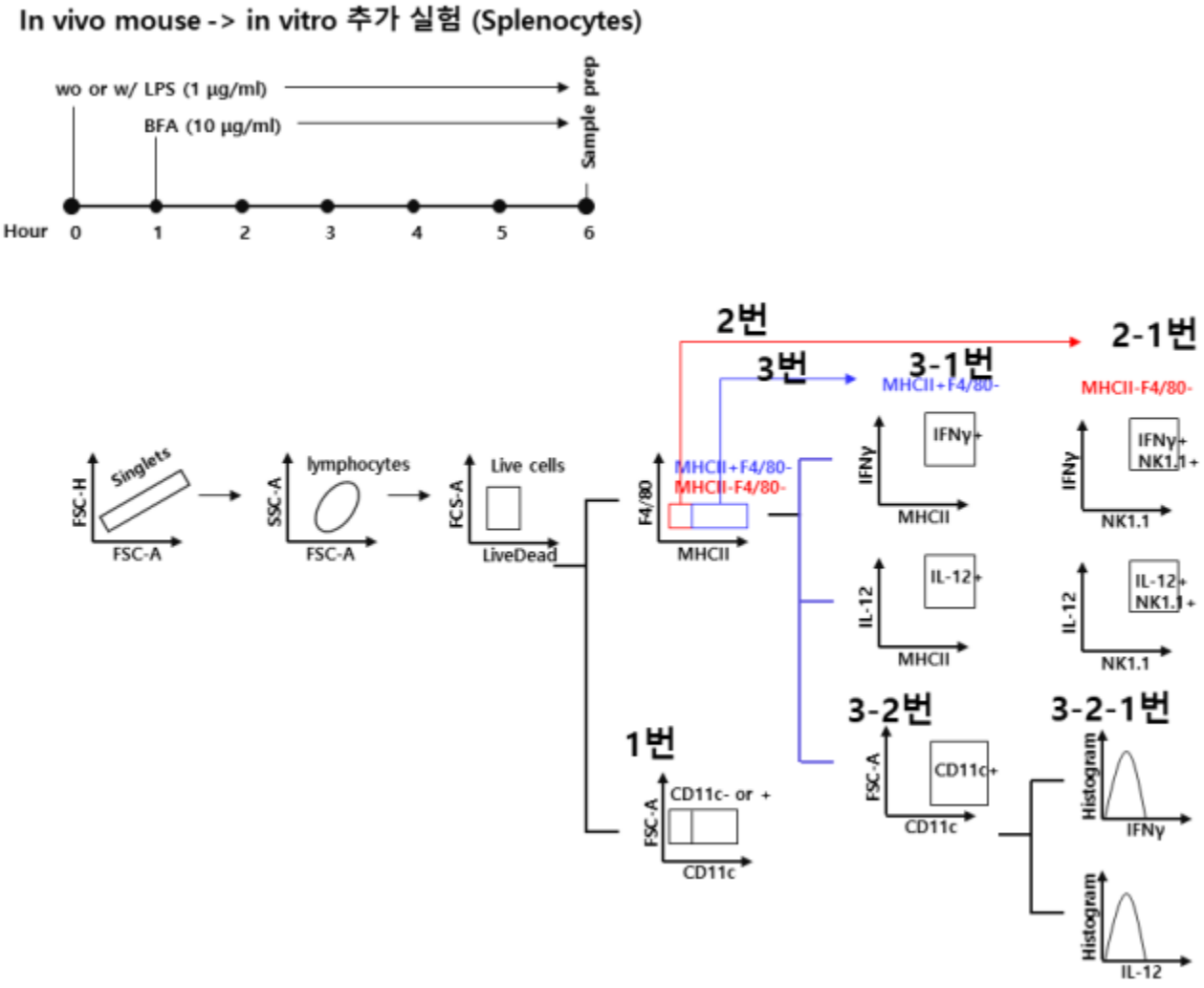
a. 사용 항체 패널



1. Live-dead 1:1000 (in PBS), 15min at RT.
2. Surface staining (in FACS Buffer), 25min at 4℃.
3. Fix/perm 200μl, 30min at 4℃.
4. 1xperm 200μl, 15min at RT.
5. Intracellular staining (in 1xperm), 30min at 4℃.

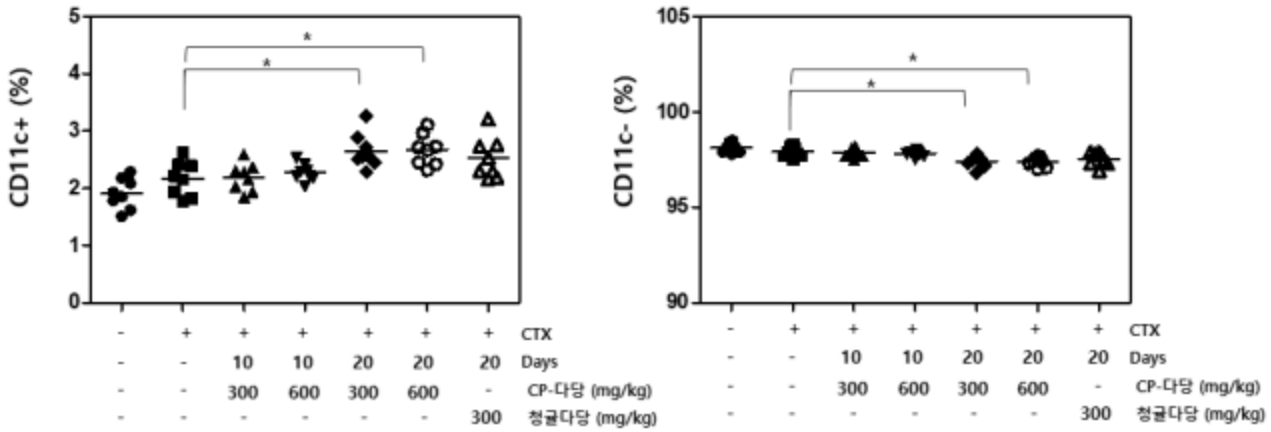
ICS(mouse)	Blue laser (488nm)				Red laser (640 nm)		Violet Laser(405nm)		stimulation	surface
	530/30	588/42	670LP	780/60	660 / 668	785 / 785	450/50	510/50	Fix/Perm	ICS
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	BV421/V450	BV510/V500		
immune cell	IL-12	NK1.1	MHCII	IFN-g	CD11c	CD11b	F4/80	L/D		
vendor	BD	BD	BD	BD	TONBO	BD	Biolegend	Life technologies		
Clone	C15.6	PK136	M5/114.15.2	XMG1.2	N418	M1/70	BM8			
cat#	560564	557391	562363	557649	20-0114-U100	557657	123137	L34966		
Vol. per test(μl)	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	1:1000	BD	

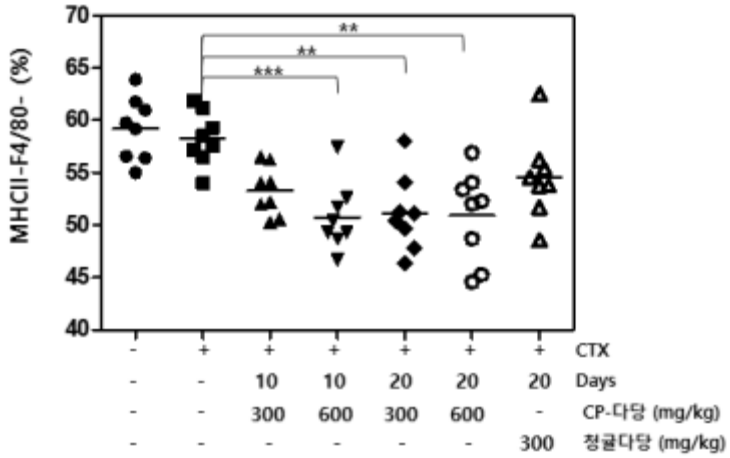
b. splenocyte에 대한 in vitro 자극과 Flow cytometry 게이팅 방법



c. splenocyte내의 수지상세포 구성비 측정

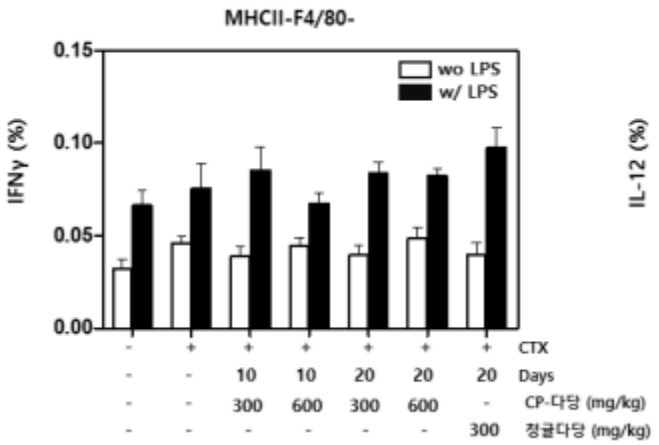
수지상세포가 많이 포함된 CD11+세포군의 구성비가 면역식품소재 처리에 의해 증가되는 것을 확인 할 수 있다

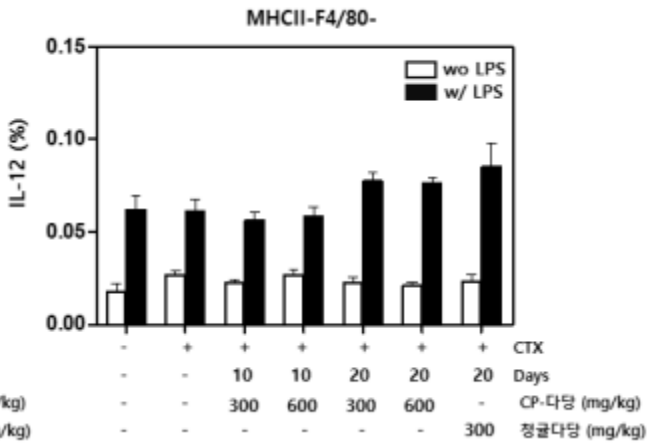


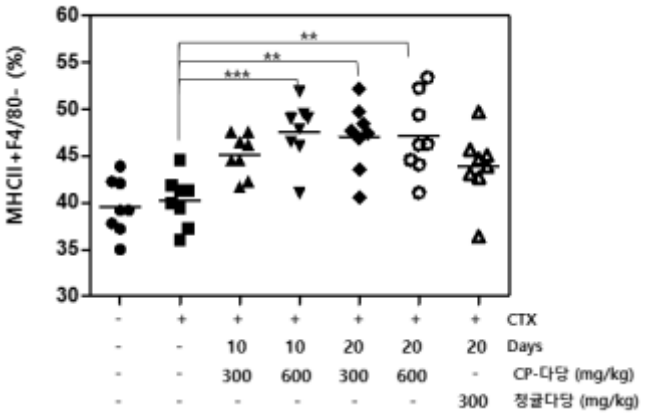


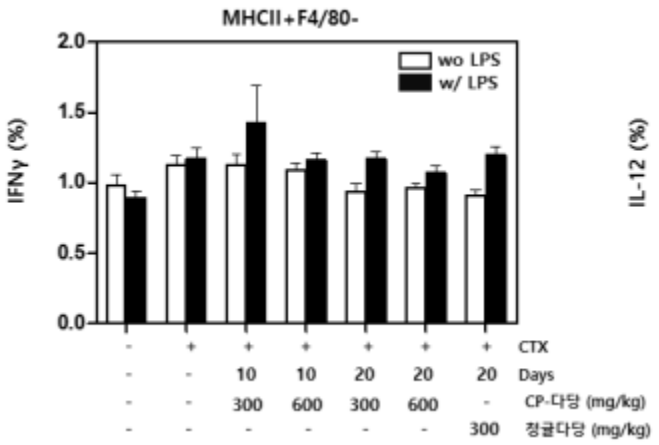
D. ICS방법을 통해 splenocyte내의 면역세포 사이토카인 생성능 측정

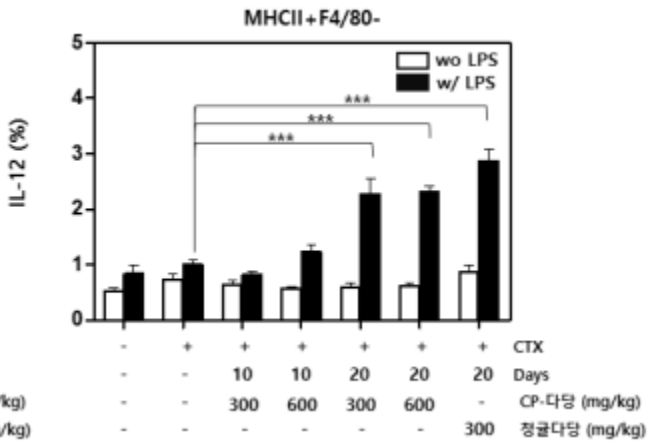
면역식품소재 처리에 의해 수지상세포가 많이 포함된 MHCII+F4/80-세포군의 비중이 증가한다. 그리고 항바이러스성 면역반응에 핵심적인 사이톤카인인 IL-12생성능이 우수 개발 면역식품소재에 의해 증가하는 것을 볼 수 있다

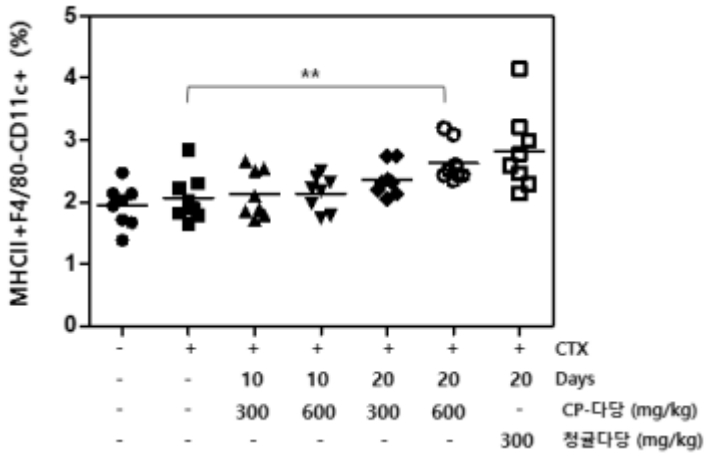

MHCII-F4/80-
IFNγ (%)
0.15
0.10
0.05
0.00
wo LPS
w/ LPS
- + + + + + + CTX
- - 10 10 20 20 20 Days
- - 300 600 300 600 - CP-다당 (mg/kg)
- - - - - - 300 정균다당 (mg/kg)

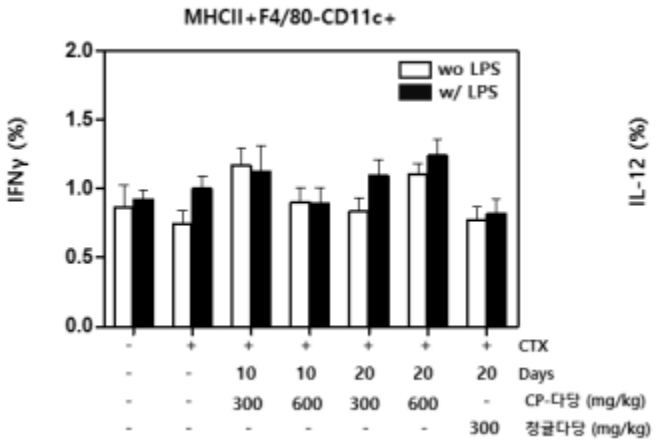

MHCII-F4/80-
IL-12 (%)
0.15
0.10
0.05
0.00
wo LPS
w/ LPS
- + + + + + + CTX
- - 10 10 20 20 20 Days
- - 300 600 300 600 - CP-다당 (mg/kg)
- - - - - - 300 정균다당 (mg/kg)

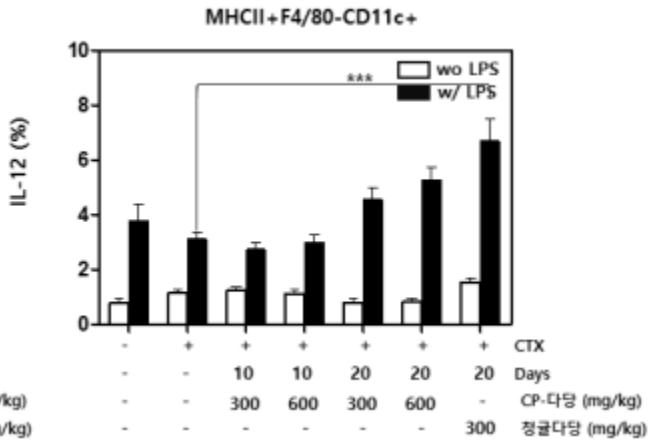

MHCII+F4/80- (%)
60
55
50
45
40
35
30
**
**
***
- + + + + + + CTX
- - 10 10 20 20 20 Days
- - 300 600 300 600 - CP-다당 (mg/kg)
- - - - - - 300 정균다당 (mg/kg)


MHCII+F4/80-
IFNγ (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
wo LPS
w/ LPS
- + + + + + + CTX
- - 10 10 20 20 20 Days
- - 300 600 300 600 - CP-다당 (mg/kg)
- - - - - - 300 정균다당 (mg/kg)


MHCII+F4/80-
IL-12 (%)
5
4
3
2
1
0
wo LPS
w/ LPS
***
***
***
- + + + + + + CTX
- - 10 10 20 20 20 Days
- - 300 600 300 600 - CP-다당 (mg/kg)
- - - - - - 300 정균다당 (mg/kg)







결론

인플루엔자 항감염 동물모델을 통해 우수 면역식품소재로 개발하는 당근박다당과 청귤다당이 우수한 항감염효과를 가질 수 있음을 볼 수 있었다. 또한 시험관내 면역능 평가법에 의해 우수 개발 소재로 선택된 당근박다당에 우수한 항감염효과를 보임으로써 시험관내 검사법의 유효성이 입증되었다고 볼 수 있다.

나. 과민면역 조절 질환 동물모델 신뢰도 검증

- 과민면역 질환모델중 상대적으로 정확한 결과를 도출할 수 있는 기도 및 폐의 과민면역 모델을 이용하였음.
- 기능성 식품의 과민면역 (Allergic response)을 조절하는 동물모델로서 Allergic asthma model (과민성 천식)이 광범위하게 사용되어 왔음.

- 실제로 기관지 및 폐의 염증을 완화하고 기침에 사용한다고 알려진 기존 우수 면역소재를 이용하여 검증한 결과 기 구축모델에서 면역지표의 변화를 보임.
- 호산구 (Eosinophil)는 천식을 비롯한 알러지질환에서 싸이토카인 (cytokine), 케모카인 (chemokine), MBP (major basic protein), 지질매개체 (lipid mediator) 등을 분비하여 기도의 수축과 다른 면역세포의 활성을 유발하는 핵심적인 역할을 함.
- 호산구의 분화, 활성, 이동에 중요한 매개체로서 인터루킨5 (IL-5)가 중요한 작용을 함.
- 인터루킨13 (IL-13)은 기도의 수축 및 기도점액 (Mucus)생성을 유발하고 인터루킨4 (IL-4)는 항원특이항체(antigen specific antibody)를 생산하는데 핵심적인 역할을 해서 급격한 과민면역반응을 유발함.
- 기도 또는 폐의 호산구와 관련 매개체를 분석함으로서 기능성식품의 과민면역반응 조절에 관한 면역능을 평가하는 방법이 타당함.

ㅇ과민면역반응 (Allergy)의 조절

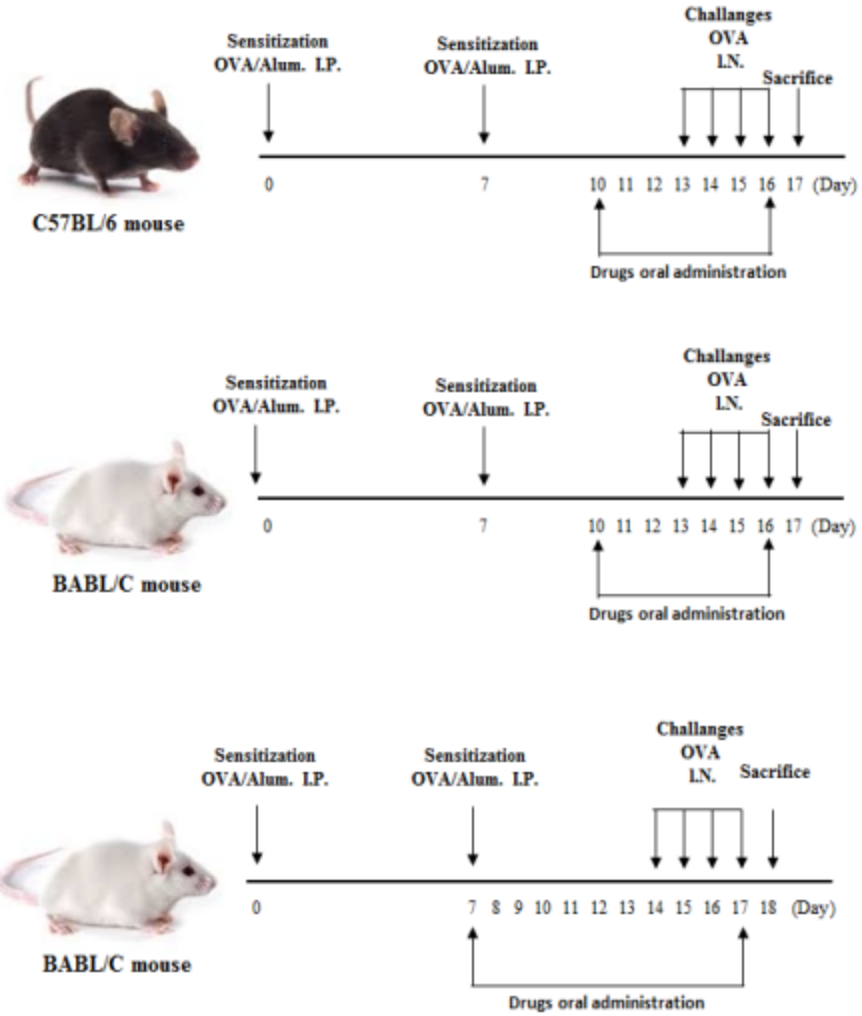
면역학적 의미	기능	Markers
과민면역반응의 조절	B세포의 기능	immunoglobulin E의 분비 immunoglobulin G의 분비
	T세포의 기능	제2형 도움 T 세포의 활성 (CD44, CD25) Cytokine 분비 (IL-4, IL-5, IL-13) 조절 T 세포의 활성
	호염기구 및 호산기구의 기능	호염기구 및 호산기구의 활성 및 이동 Cytokine 분비 (IL-4, IL-5)

(1) 과민면역조절 질환모델 (OVA-induced allergic asthma model)

- **동물:** Balb/c (6주령) 또는 C57BL/6 mouse (6주령)을 이용함.
- **식품투여:** 식품의 농도를 (50~400mg/kg/day)정도로 과민성 천식모델인 2차 면역유도 후 7일간 약물을 투여하는 모델(치료효과 평가)과 2차면역 유도와 약물을 동시에 투여하여 11일간

장기 투여하는 모델(예방 및 치료능 평가)을 구축함.

- **과민면역유도**: Chicken egg ovabumin을 alum adjuvant와 함께 일주일 간격으로 (D-0, 7) 50ug을 복강투여한다. D-13~16까지 OVA 25ug을 기관내 투여한다.
- **기도세척액 획득**: 식품투여 18시간 후 기도에 삽관하고 dPBS 1.0ml로 두 번 세척한다.
- **호산구의 비율 및 절대수 측정**: 기도세척액의 total inflammatory 세포수를 분석한다. 그리고 giemsa staining을 통해서 호산구의 비율 및 절대수를 측정한다.
- **싸이토카인 분석**: 기도세척액내 IL-4, 5, 13을 ELISA로 정량한다.



〈그림 2.24 다양한 Allergic asthma 질환 모델구축〉

(2) 면역능 기존 우수 식품소재(홍삼, 개자류, 식방풍, 아삼, 더덕, 은시호)의 신뢰도 검증

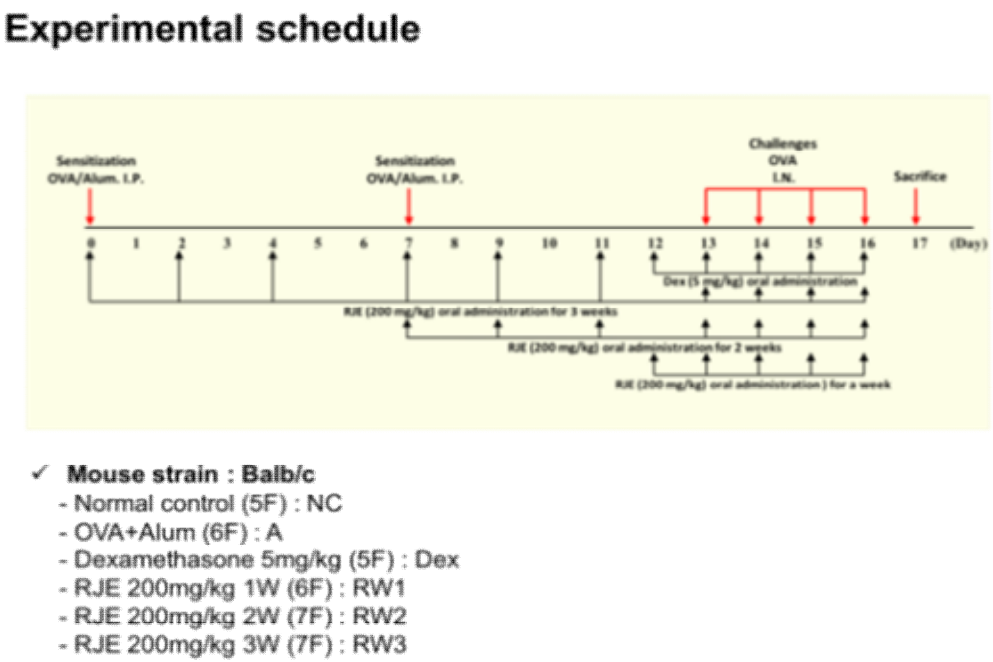
- 면역능평가 동물시험법을 통해 전통적으로 실제 사용되었던 기존 우수 면역식품 (소재)의 신뢰도를 검증함.
- 선행연구를 통해 확보한 면역능 기존 우수 식품소재(홍삼, 개자류, 식방풍, 아삼, 더덕, 은

시호)를 과민 면역반응조절 동물실험을 통해 신뢰도를 검증함.

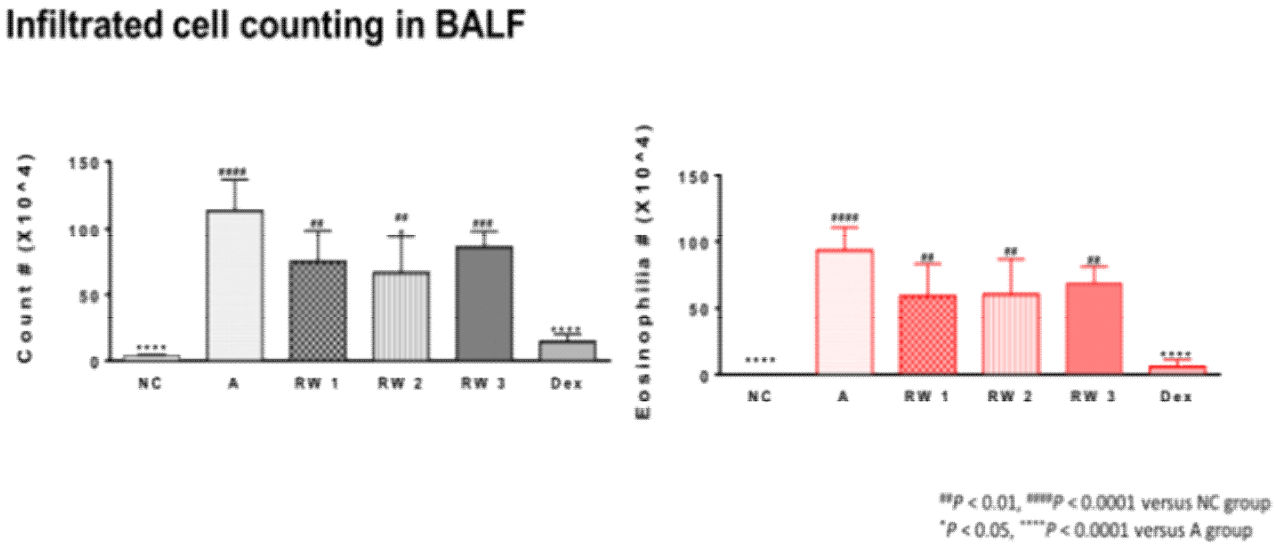
(가) 홍삼의 과민면역반응조절 동물실험

① 홍삼의 기간별 투여조건에 따른 과민면역조절능 평가

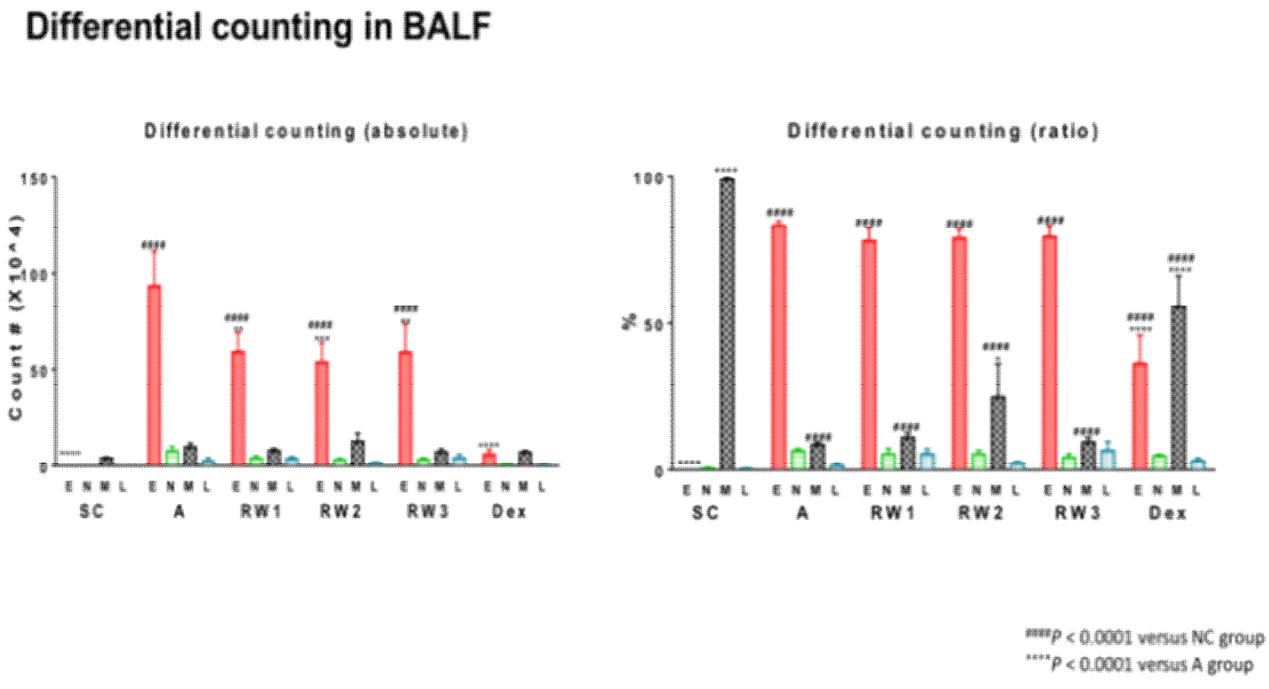
- Bk bio에서 제공받은 홍삼농축분말을 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 200mg/kg (4mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- Dexamethasone powder (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 5mg/kg (0.1mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- 홍삼의 과민면역조절능을 확인하기 위하여 Allergic asthma model을 이용하여 홍삼 (RJE)을 기간별 투여한 후 면역능을 평가함.
- 호산구의 기도세척액내 절대수가 감소한 경향을 보이지만 싸이토카인 (IL-4, 5, 13)에서는 뚜렷한 양상을 보이지 않음. 2주 동안 투여군에서 상대적으로 유의성을 보임.
- 폐의 activated CD4 T cell의 population을 flowcytometry로 분석하였음. 홍삼 투여군에서 유의성을 보이지 않음.



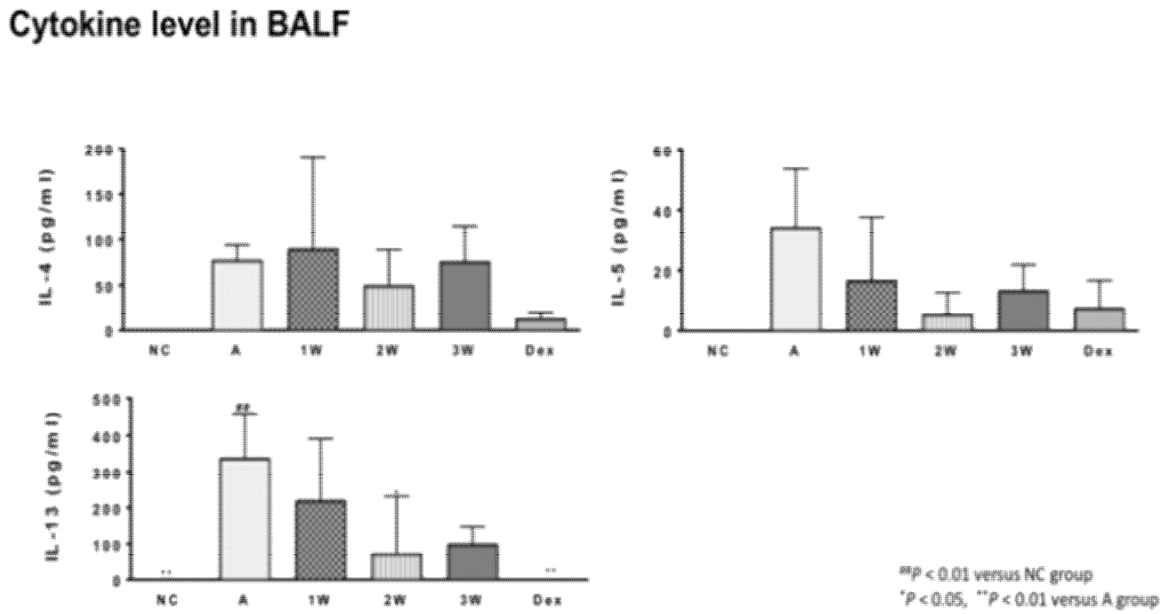
〈그림 2.25 과민면역유도 및 홍삼의 기간별 투여 일정〉



〈그림 2.26 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수〉



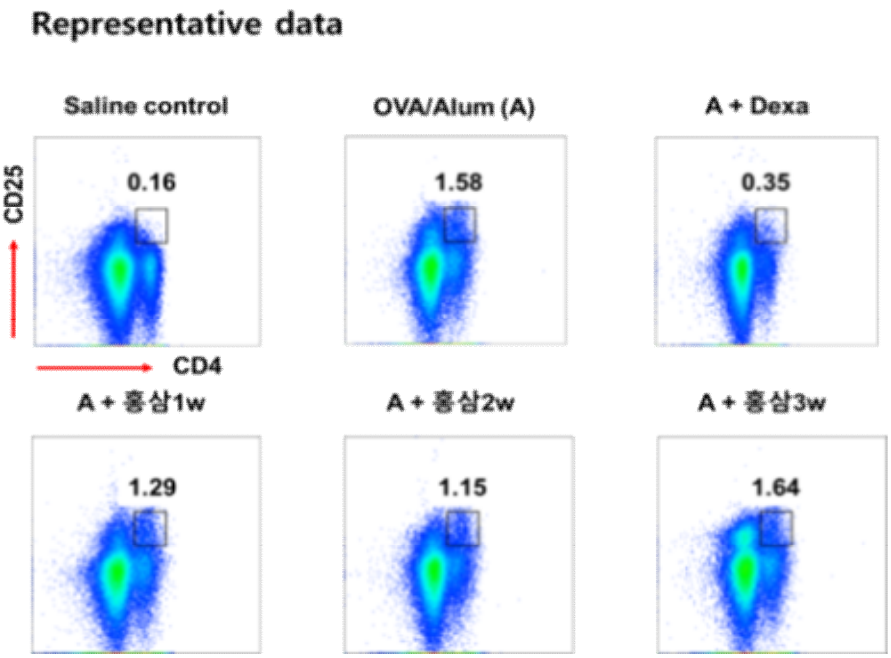
〈그림 2.27 기도세척액내 염증세포의 비율 및 절대수〉



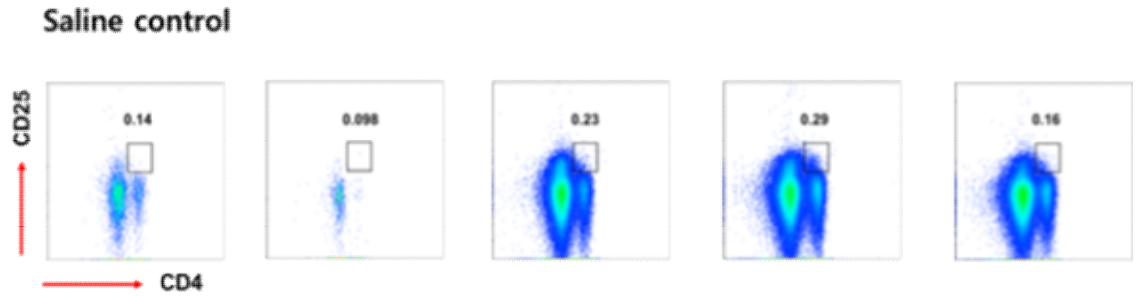
〈그림 2.28 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉

Activated CD4 T cell in Lung (CD4+CD25+cell)

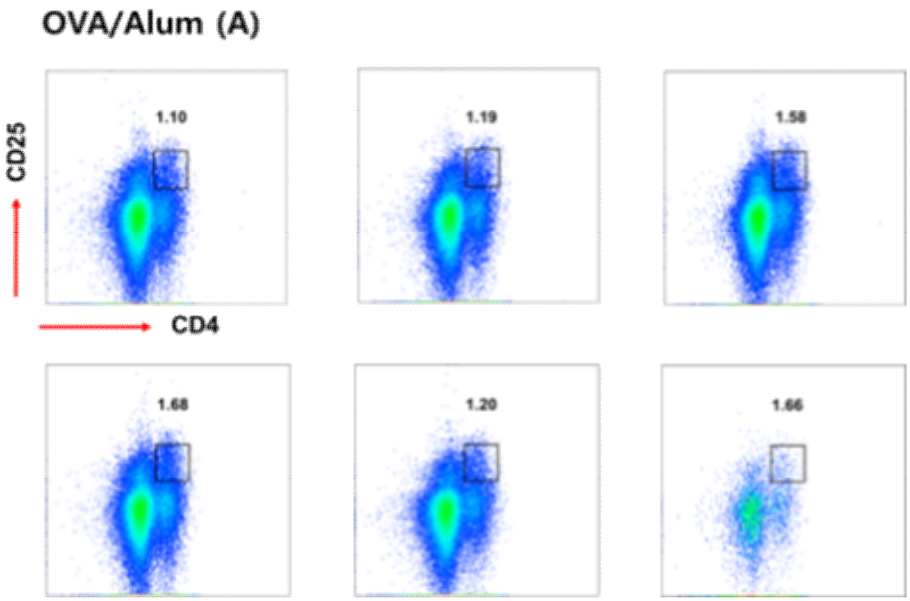
- Flowycytometry를 이용해서 분석함



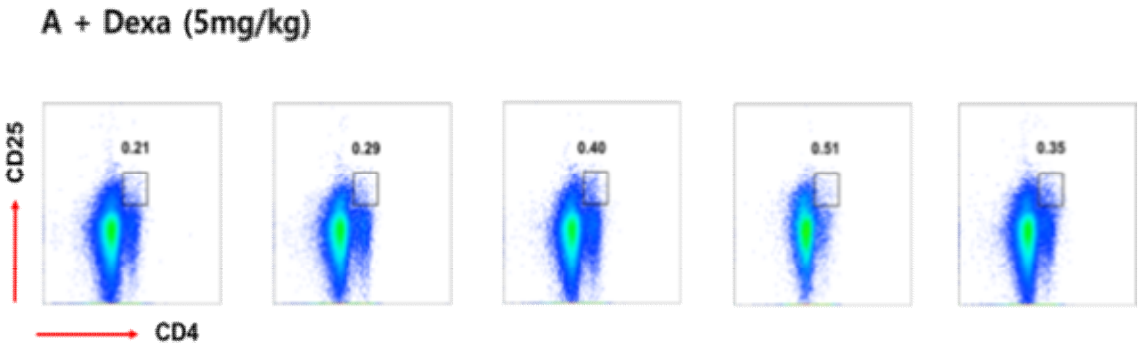
〈그림 2.29 폐의 activated CD4 T cell의 population측정 군별 대표값〉



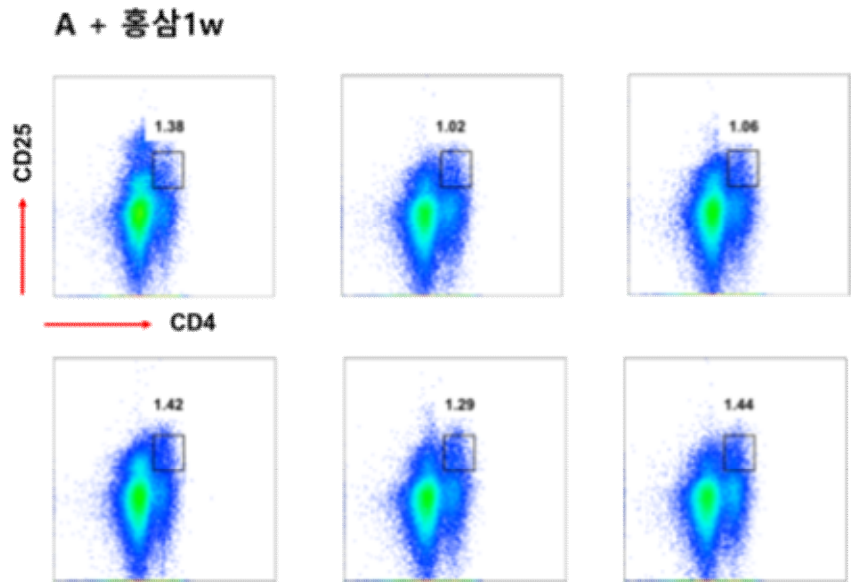
〈그림 2.30 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



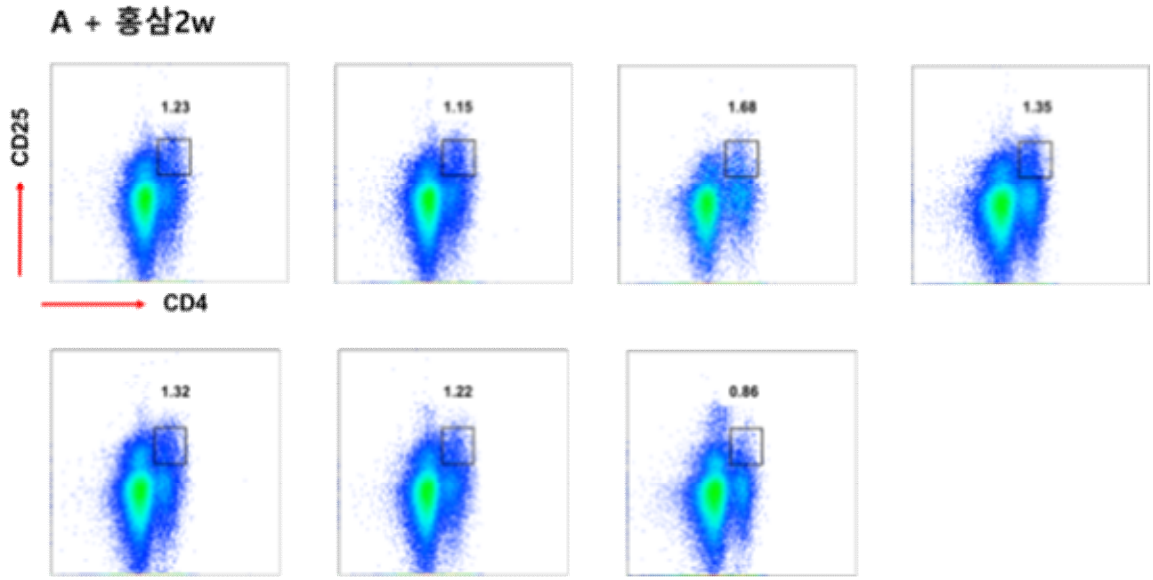
〈그림 2.31 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



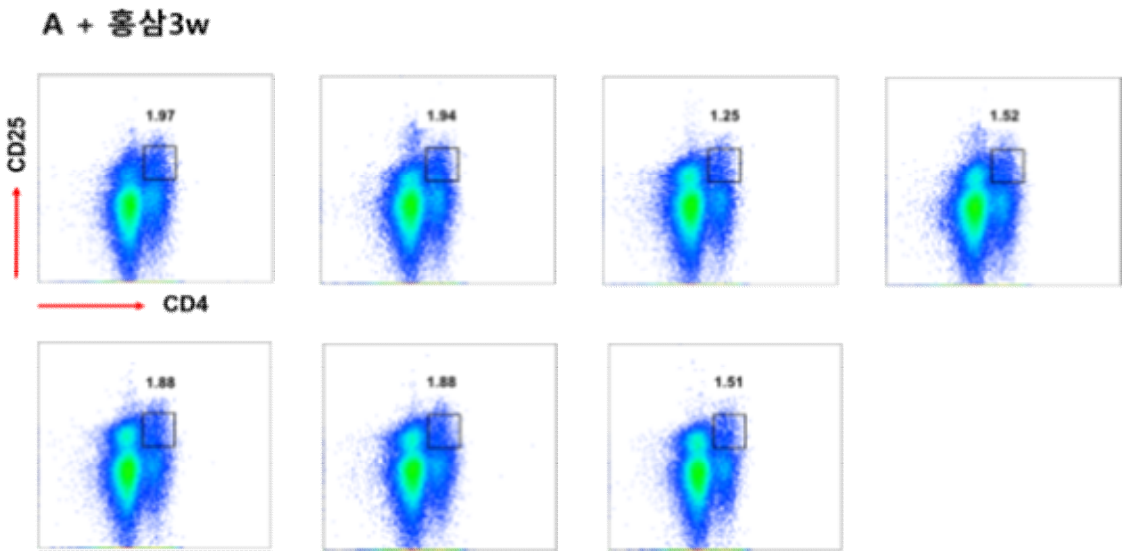
〈그림 2.32 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



〈그림 2.33 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



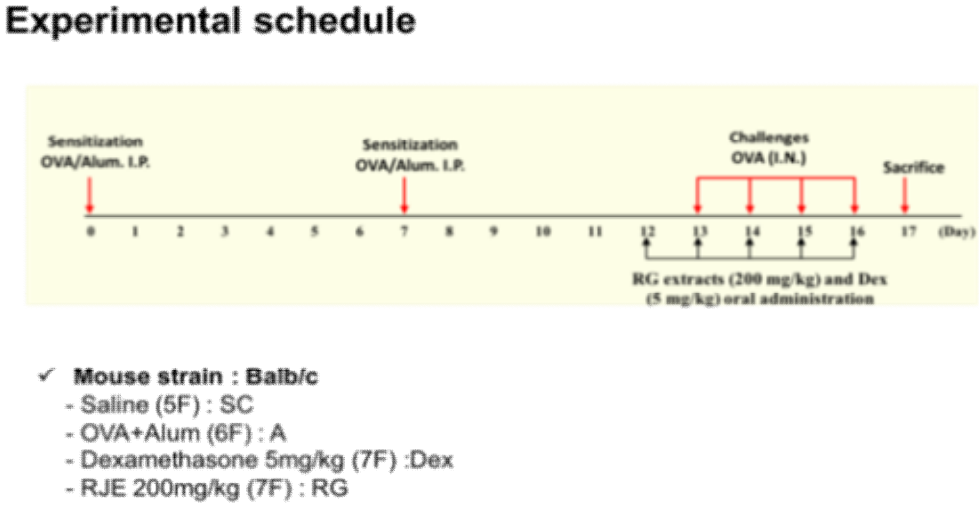
〈그림 2.34 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



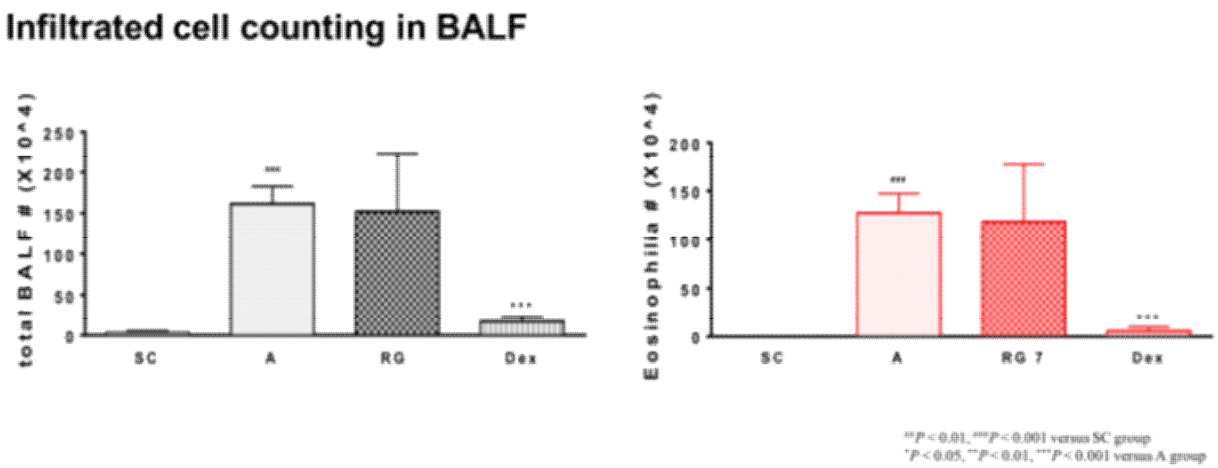
〈그림 2.35 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉

②질환유도조건별 홍삼의 과민면역조절능 평가

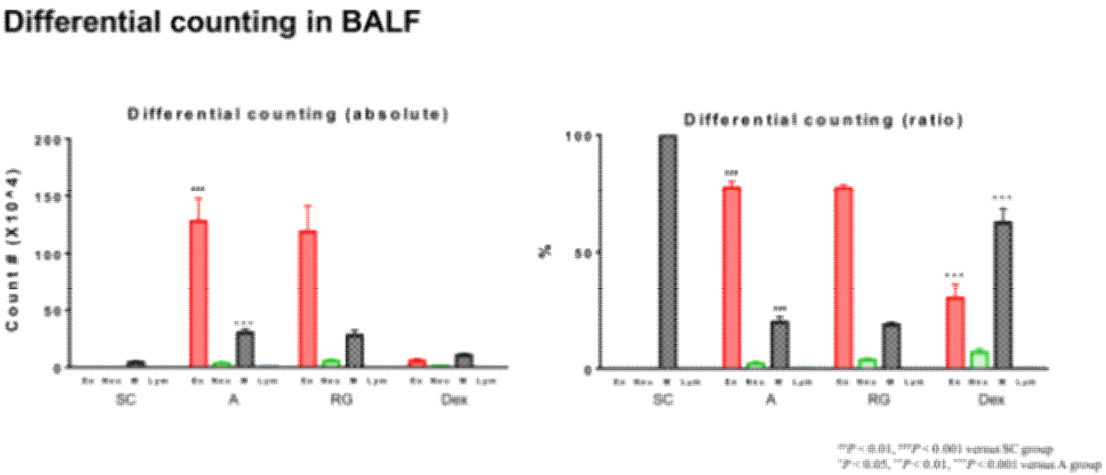
- Bk bio에서 제공받은 홍삼농축분말을 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 200mg/kg (4mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- Dexamethasone powder (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 5mg/kg (0.1mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- OVA의 sensitization기간을 두 조건으로 구분하여 실험을 진행함.
- short term 조건 (OVA injection D-0, 7)에서는 IL-13 level을 제외하고는 뚜렷한 유의성을 보이지 않음.



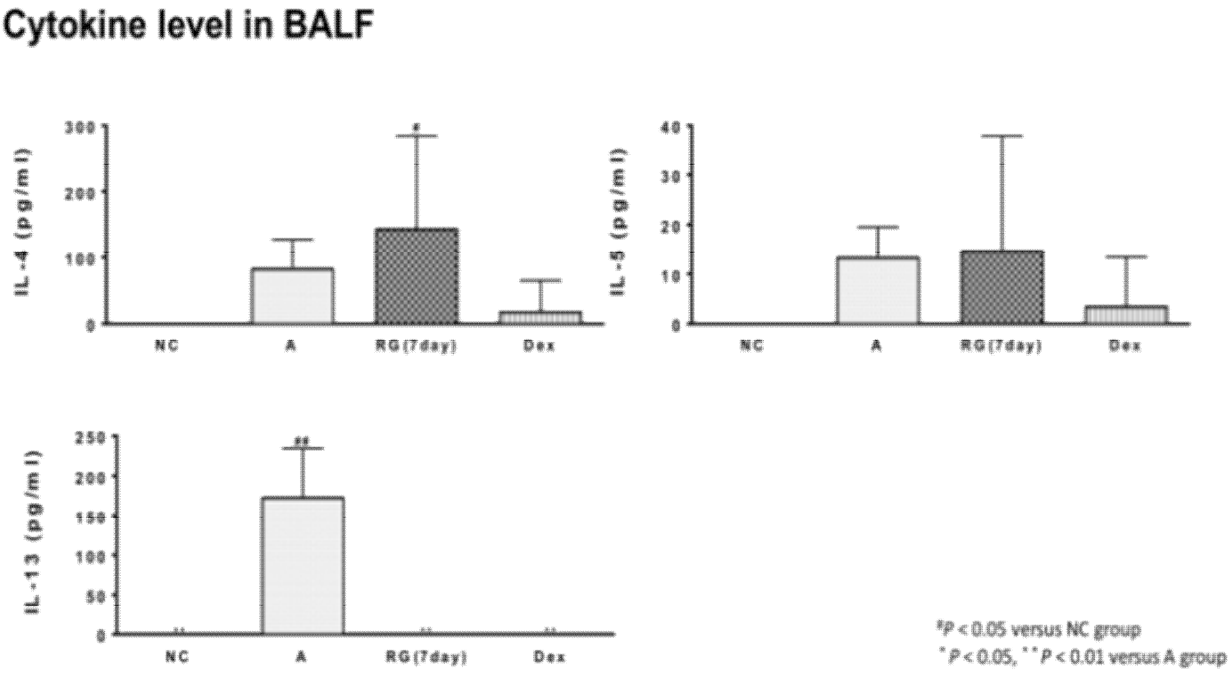
〈그림 2.36 과민면역유도 및 홍삼의 기간별 투여 일정〉



〈그림 2.37 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수〉



〈그림 2.38 기도세척액내 염증세포의 비율 및 절대수〉

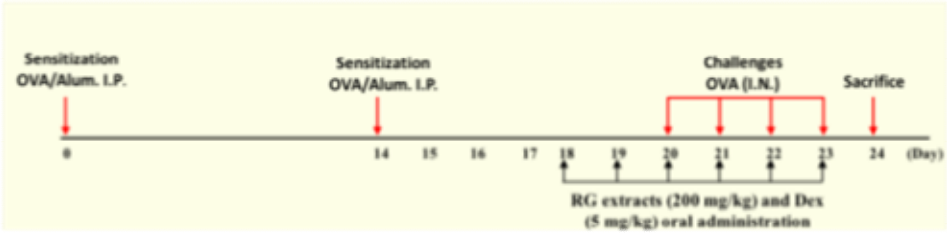


〈그림 2.39 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉

③ 질환유도조건별 홍삼의 과민면역조절능 평가

- Bk bio에서 제공받은 홍삼농축분말을 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 200mg/kg (4mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- Dexamethasone powder (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose) 에 희석하여 5mg/kg (0.1mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- OVA의 sensitization기간을 두 조건으로 구분하여 실험을 진행함.
- long term 조건 (OVA injection D-0, 14)에서는 홍삼군의 뚜렷한 유의성을 보이지 않음.

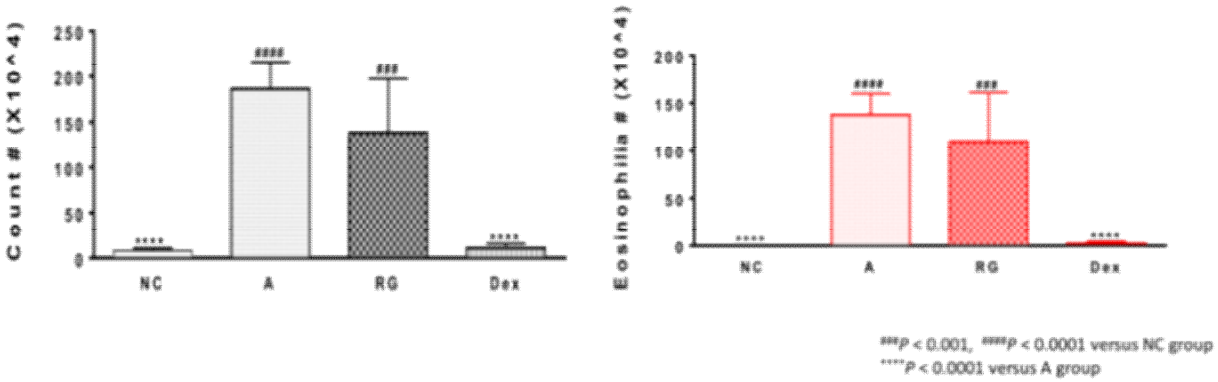
Experimental plan



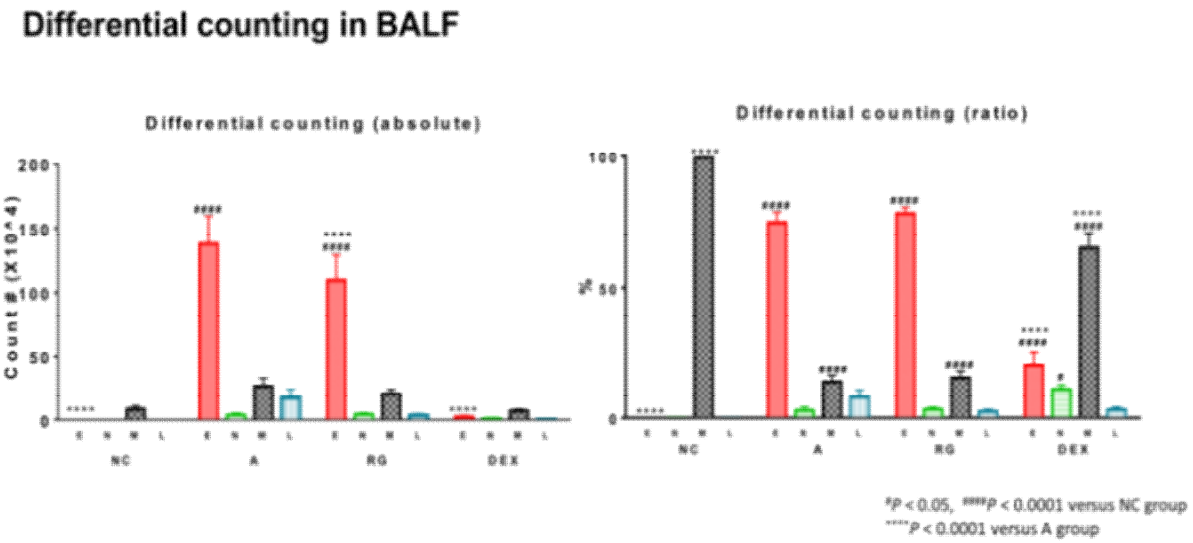
✓ **Mouse strain : balb/c**
- Normal control (5F) : NC
- OVA+Alum (7F) : A
- Dexamethasone 5mg/kg (6F) : Dex
- RJE 200mg/kg (7F) : RG

〈그림 2.40 과민면역유도 및 홍삼의 기간별 투여 일정〉

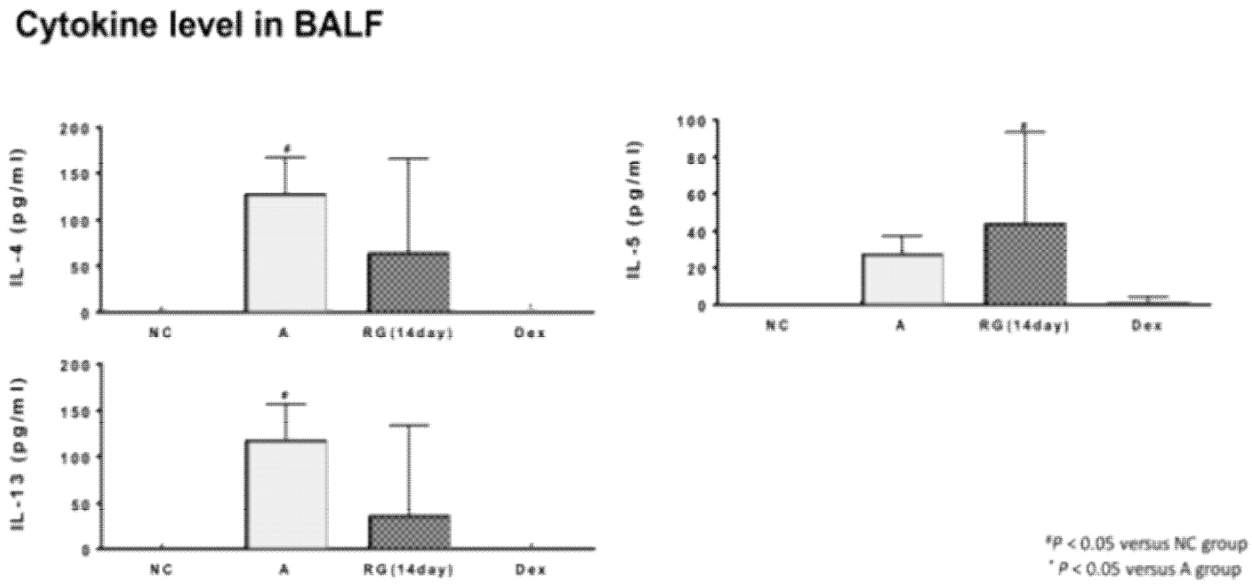
Infiltrated cell counting in BALF



〈그림 2.41 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수〉



〈그림 2.42 기도세척액내 염증세포의 비율 및 절대수〉



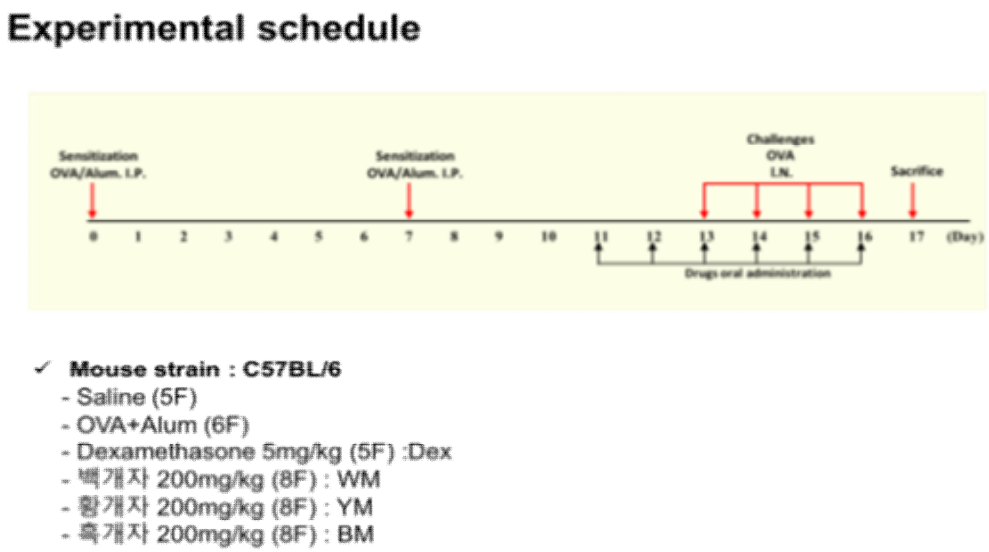
〈그림 2.43 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉

***** Conclusion: OVA/Alum을 이용한 과민면역모델은 잘 정립된 것으로 판단됨. 기도내 면역세포 및 특히 호산구의 양이 증가하였고 기도세척액 내 싸이토카인 (IL-4, 5, 13)의 양이 유도군에서 매우 증가되어 있음. 또한 양성대조군으로 이용한 Dexamethasone군에서 관련면역지표들이 모두 감소되어 있음. **홍삼의 경우 다양한 조건으로 실험을 진행하였으나 과민면역반응을 조절하는 면역능은 보이지 않는 것으로 생각됨.**

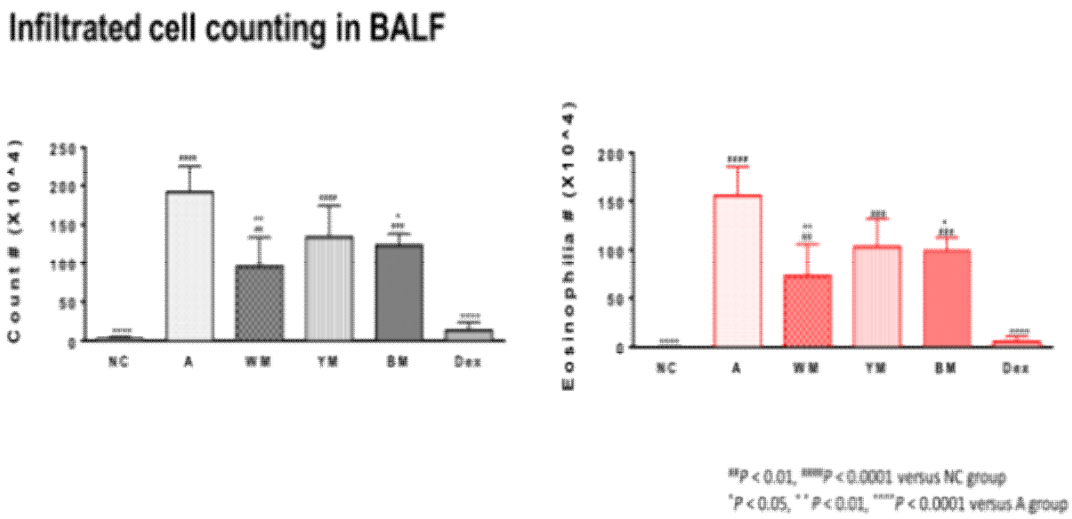
(나) 개자류의 과민면역반응조절 동물시험

- 백개자 (Sinapis alba), 황개자 (Brassica juncea), 흑개자 (Sinapis nigra)를 V-BEYBI Ltd를 통해서 구입하였음. 이를 분쇄 후 70% ethanol에서 3시간동안 80도씨에서 환류추출 (reflux extraction) 한 후 동결건조를 통해서 분말형태화 함. 이를 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 200mg/kg (4mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- Dexamethasone powder (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 5mg/kg (0.1mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- OVA를 이용한 과민면역반응조절 동물모델에 개자류의 조절효과를 확인함.
- 개자류는 머스타드로서 식품으로 널리 사용되고 있고 그 중 백개자의 경우 한약으로서도 사용되고 있으며 호흡기의 염증 및 기침을 완화하는 용도로 사용되고 있음.
- 따라서 개자류를 7일연속으로 먹인 후 호산구 및 염증매개체 (IL-4, 5, 13)등을 측정함.
- 백개자 투여군에서 기도내 염증세포의 수 및 특히 호산구의 절대수가 감소한 것을 확인할 수 있음.
- 염증매개 싸이토카인 (IL-4, 5, 13)을 다양한 실험방법으로 (ELISA 및 ELISpot) 확인하였으나 유의성을 확인하지 못하였음.
- 폐의 Activated CD4 T cell (CD4+CD25+)을 flowcytometry를 이용하여 분석한 결과 유의성을 확인할 수 없었음.

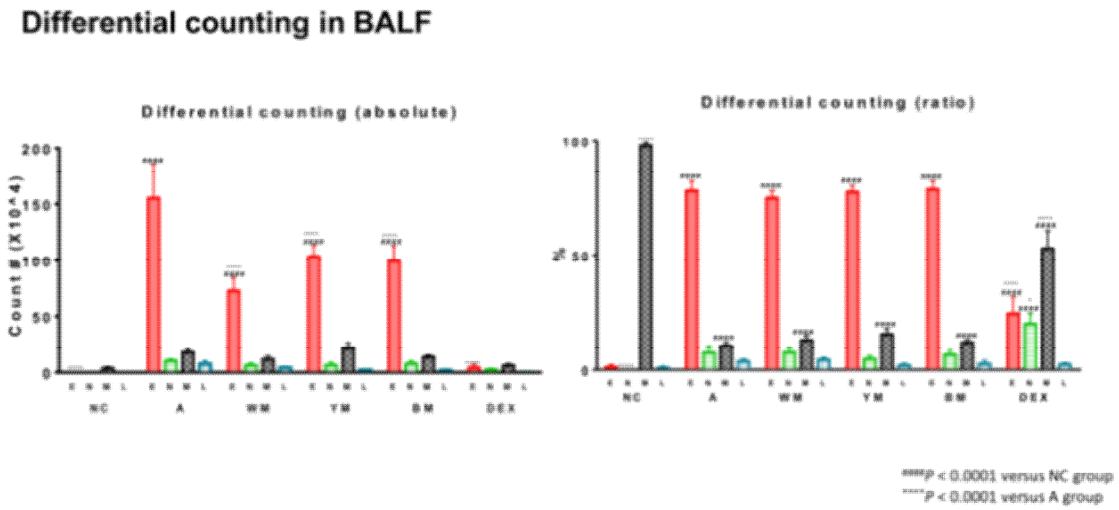
① 1차 개자류의 과민면역반응조절 동물실험



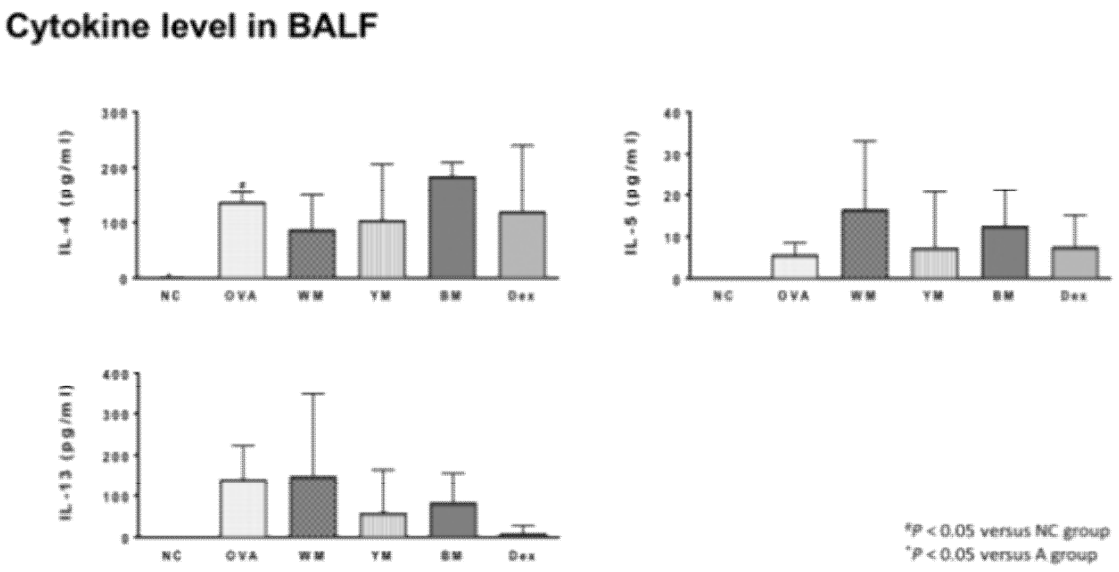
〈그림 2.44 과민면역유도 및 개자류의 기간별 투여 일정〉



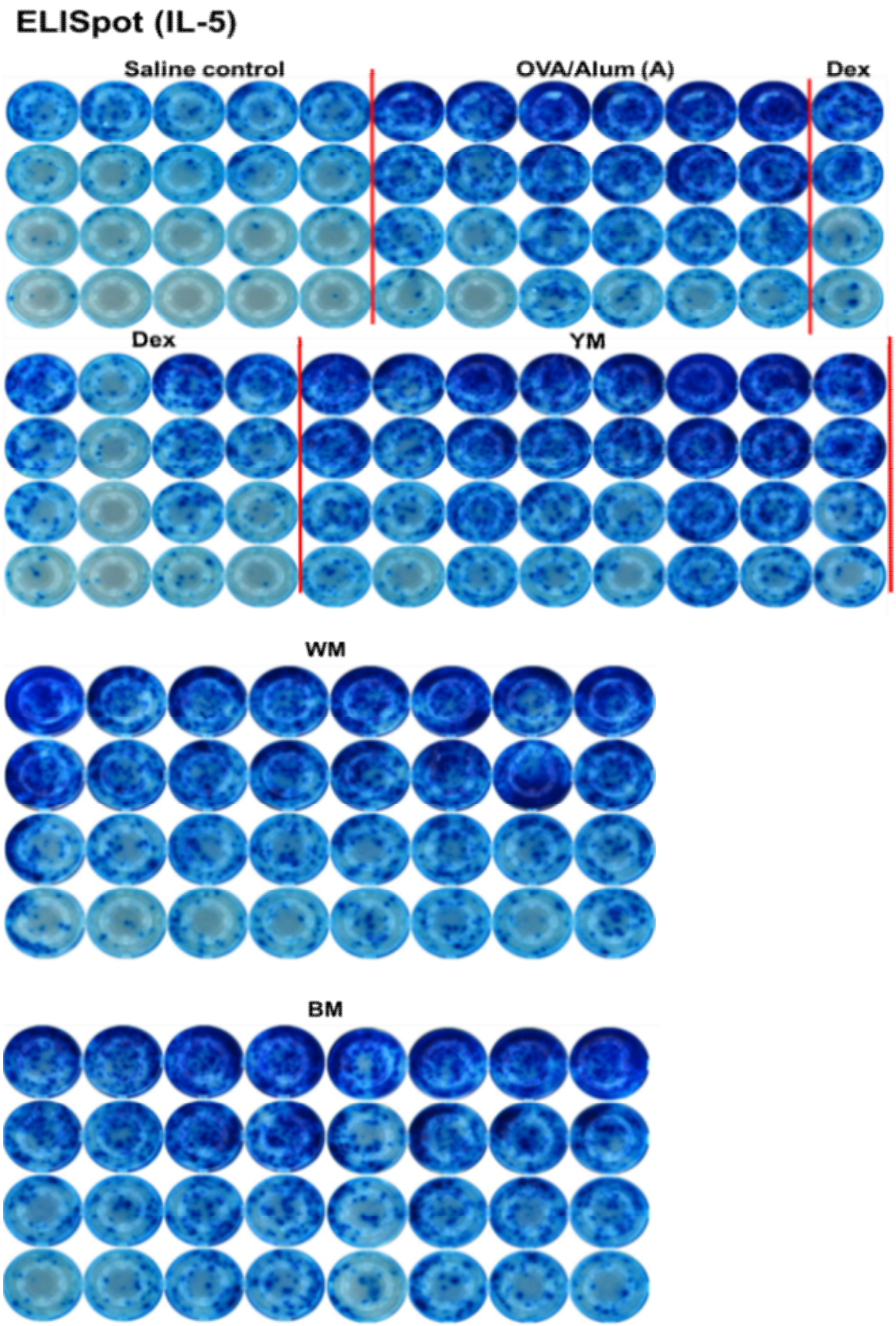
〈그림 2.45 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수〉



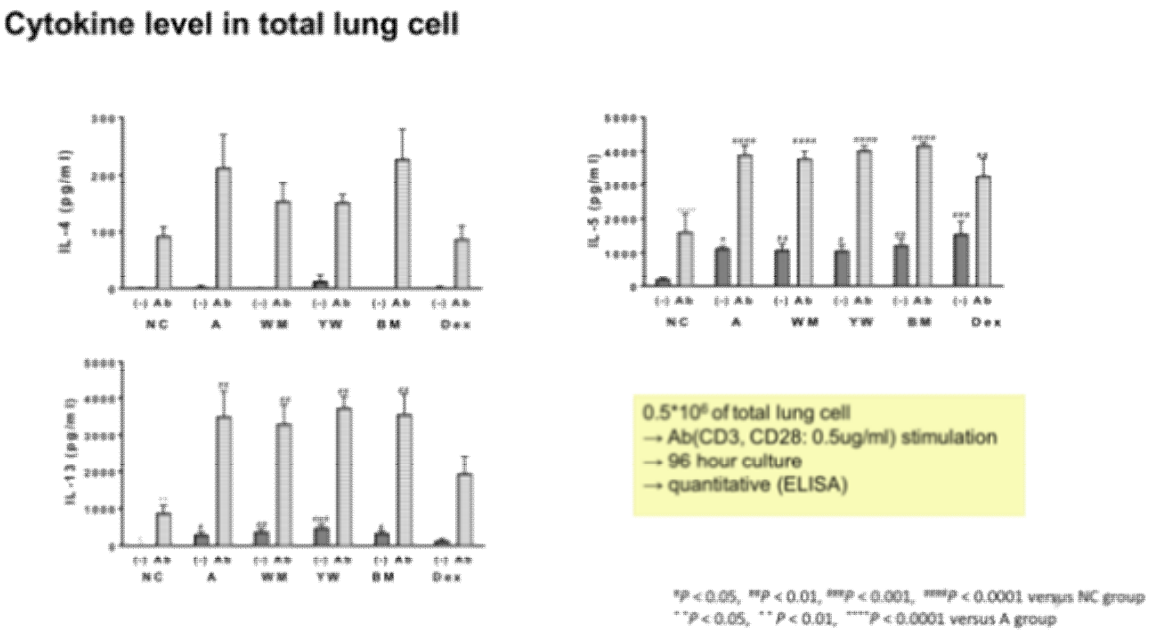
〈그림 2.46 기도세척액내 염증세포의 비율 및 절대수〉



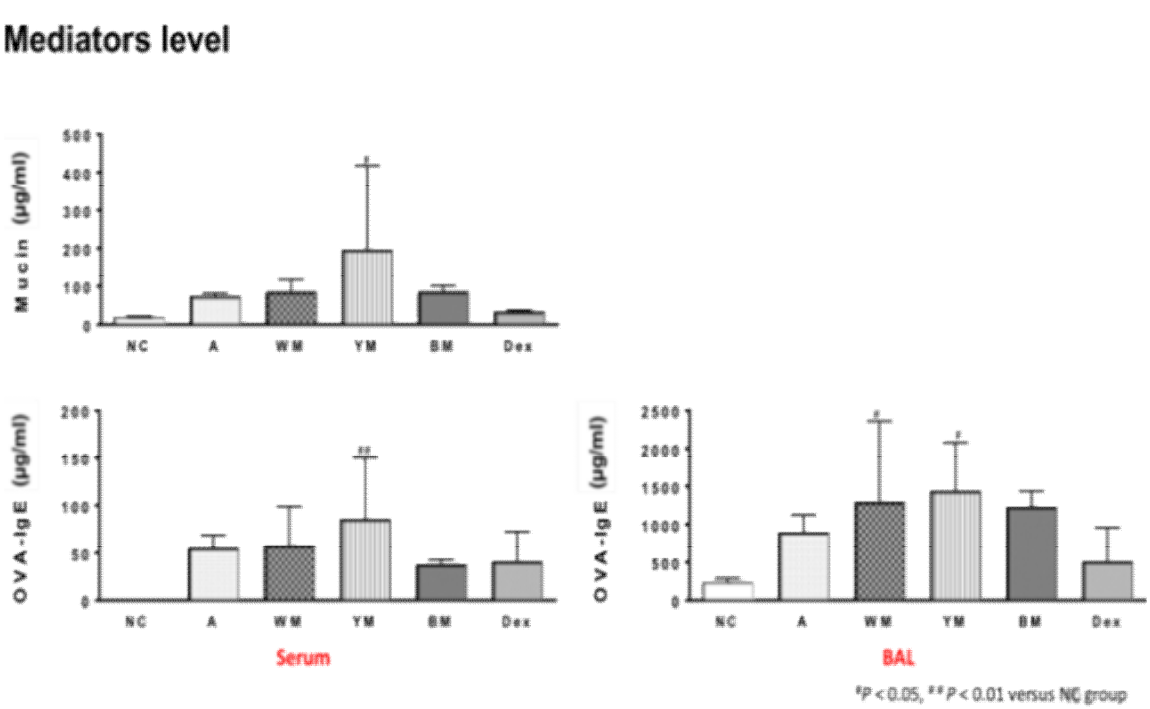
〈그림 2.47 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉



〈그림 2.48 폐의 염증매개체의 수준을 spot으로 측정〉



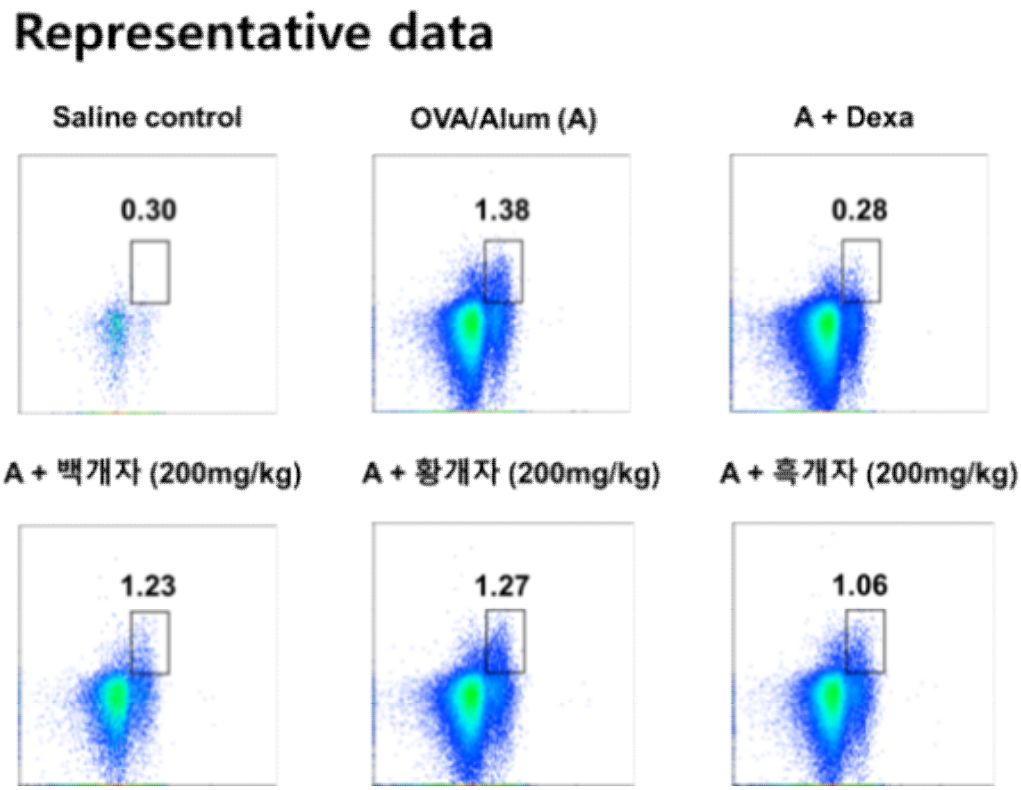
〈그림 2.49 폐의 염증매개체의 수준을 Ab로 re-stimulation후 측정〉



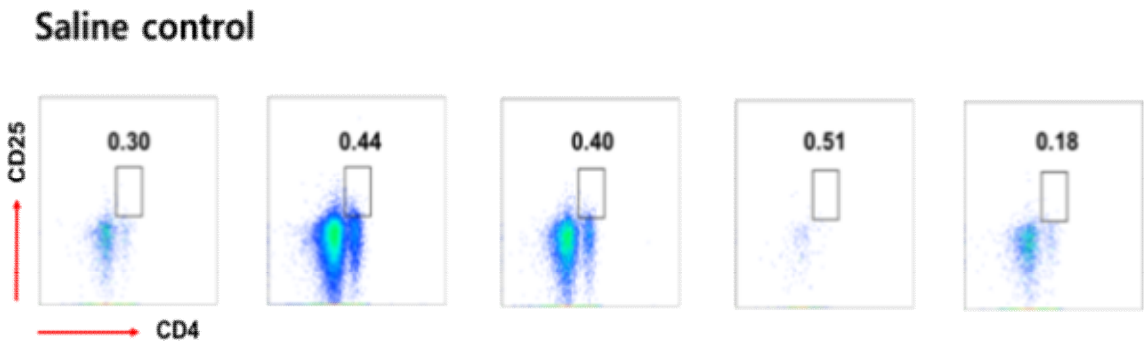
〈그림 2.50 기도세척액의 Mucin과 antibody의 수준 측정〉

Activated CD4 T cell in Lung (CD4+CD25+cell)

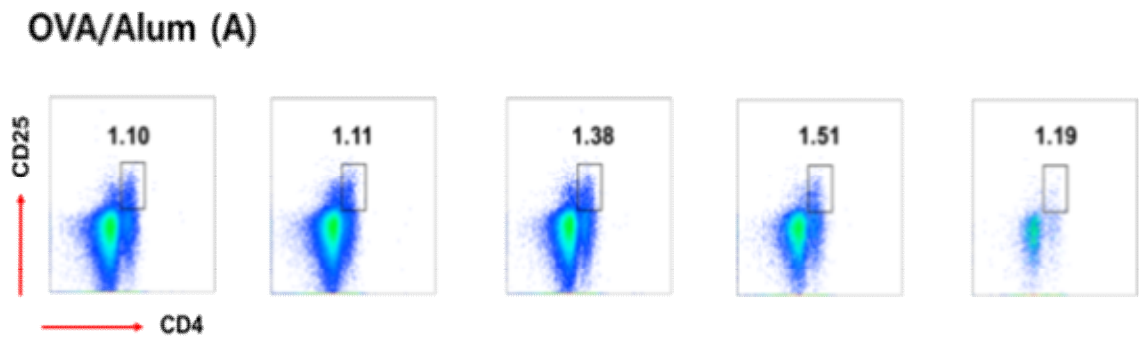
- Flowycytometry를 이용해서 분석함



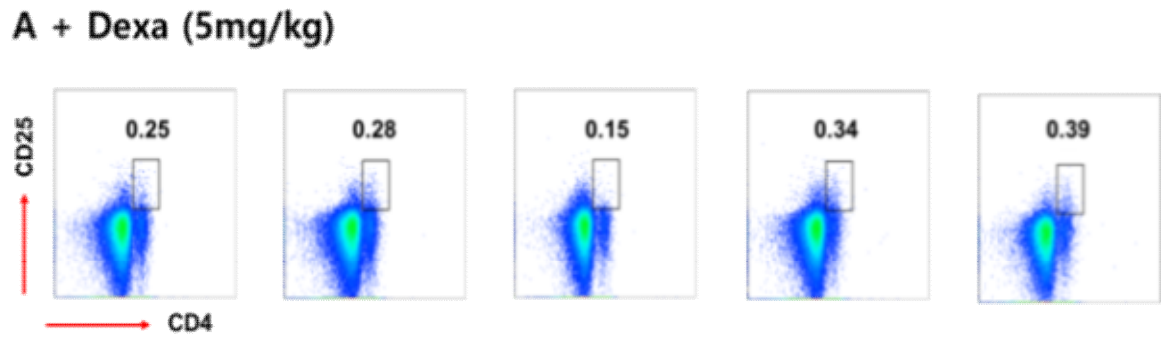
〈그림 2.51 폐의 activated CD4 T cell의 population측정 군별 대표값〉



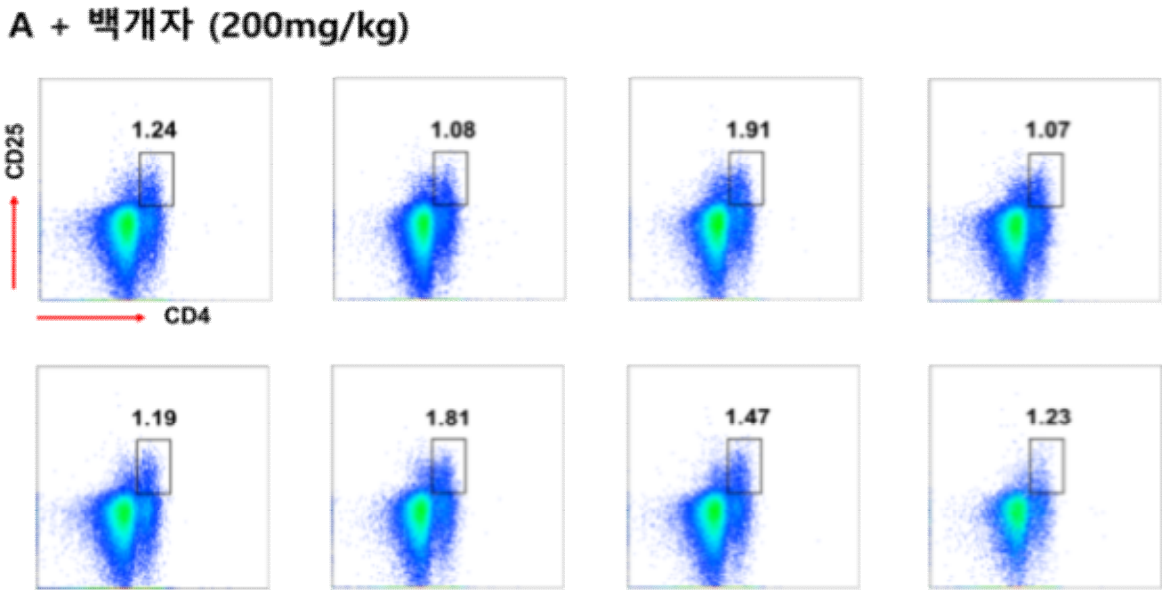
〈그림 2.52 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



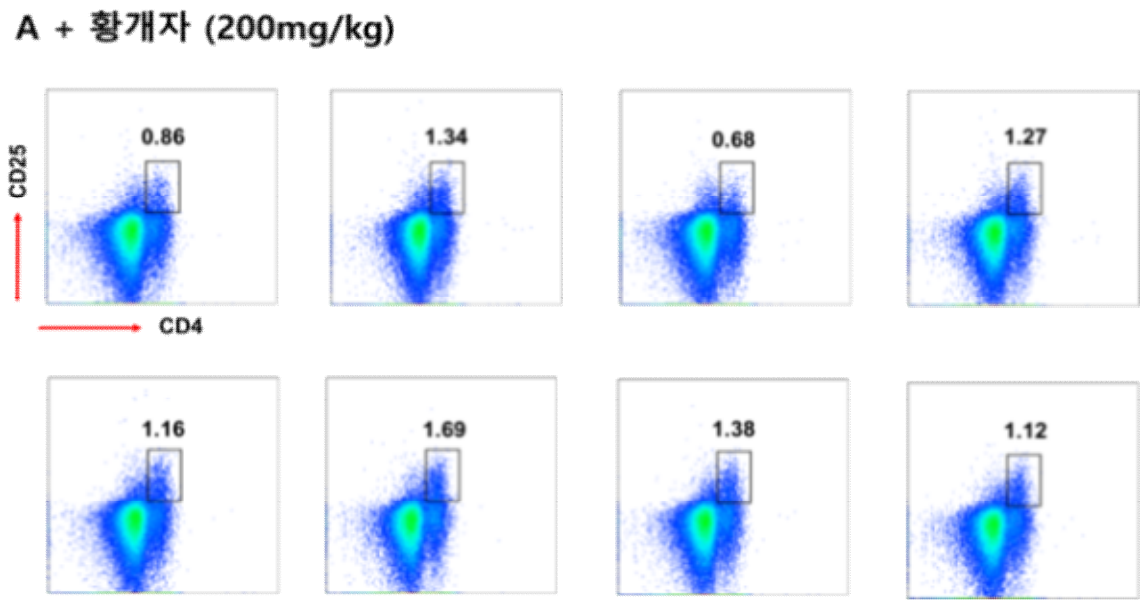
〈그림 2.54 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



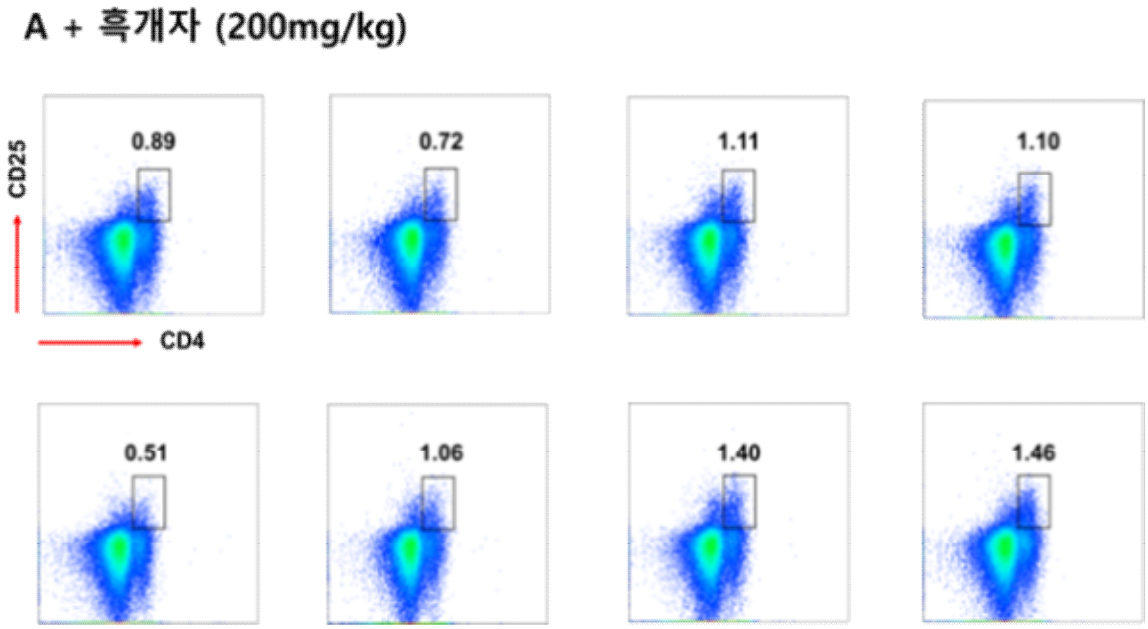
〈그림 2.55 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



〈그림 2.56 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



〈그림 2.57 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



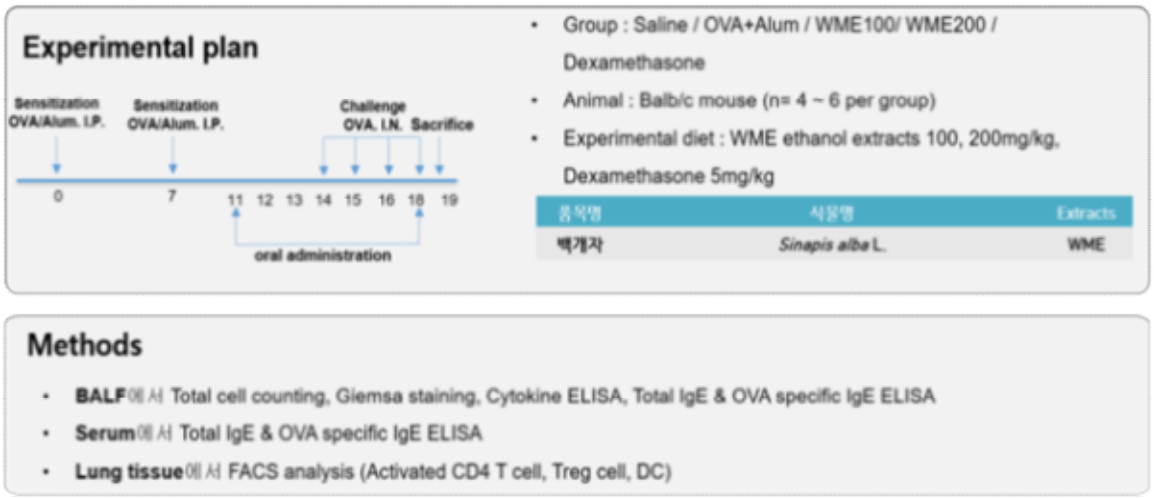
〈그림 2.58 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉

* Conclusion: 백개자의 호산구매개 과민반응을 억제하는 효과를 확인하였음. 다만 그 매개체인 싸이토카인 (IL-4, 5, 13)의 조절능은 확인하지 못함. 추가적인 실험을 통해서 개자류의 과민면역조절능을 확인할 필요가 있음. (mouse strain의 변경 또는 투여횟수, dose등)

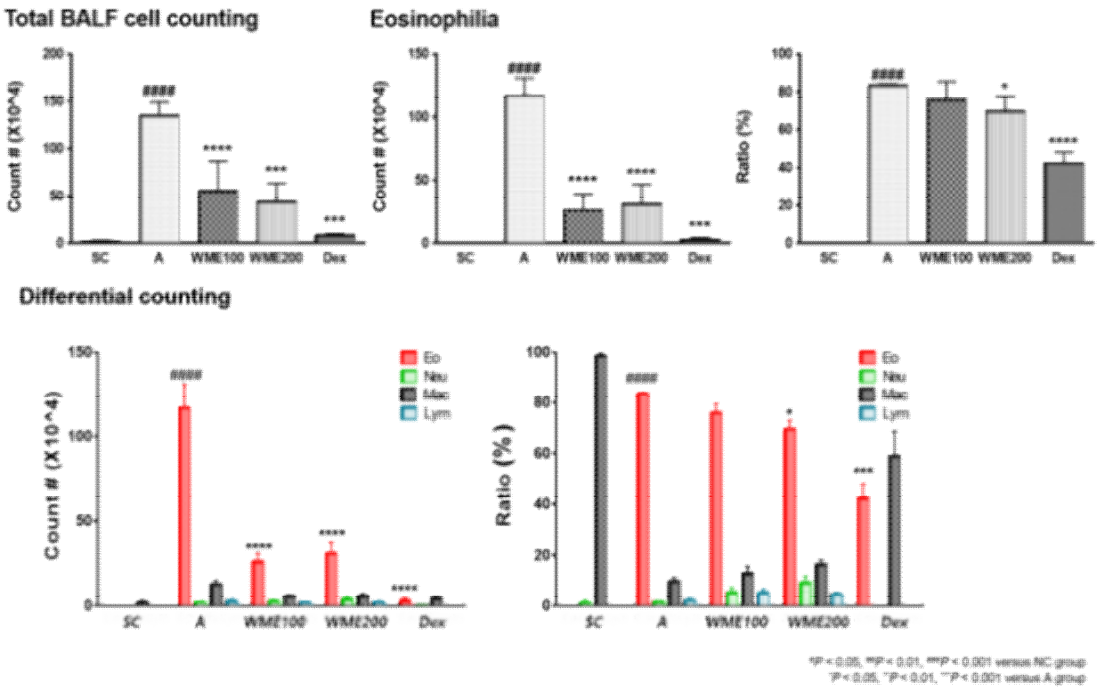
② 2차 백개자의 과민면역반응조절 동물실험

- 기존 우수 식품소재인 백개자(100, 200mg/kg)를 100ul로 경구투여 하였음.

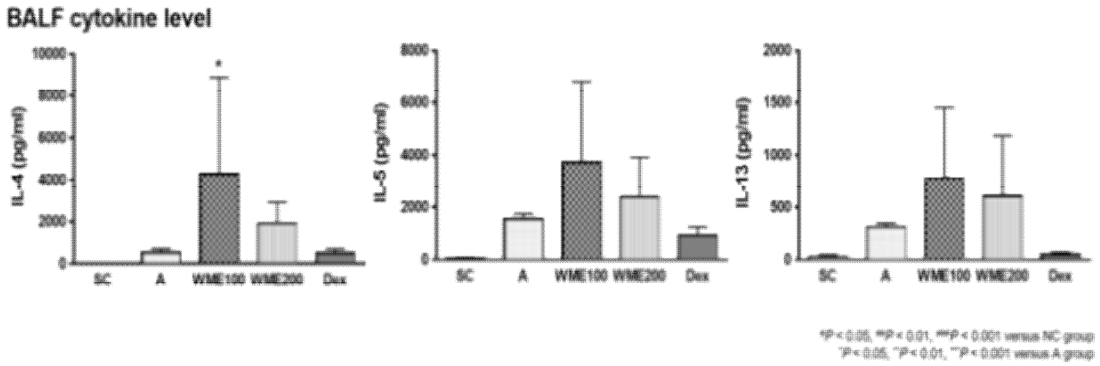
- Dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 5mg/kg으로 100ul씩 경구투여 하였음.
- 기도내 면역세포 및 특히 호산구의 양이 증가하였고 약물에 의해 감소하였음.
- 백개자의 경우 다른 과민면역반응을 조절하는 염증매개인자에 대한 조절능은 보이지 않는 것으로 판단됨.



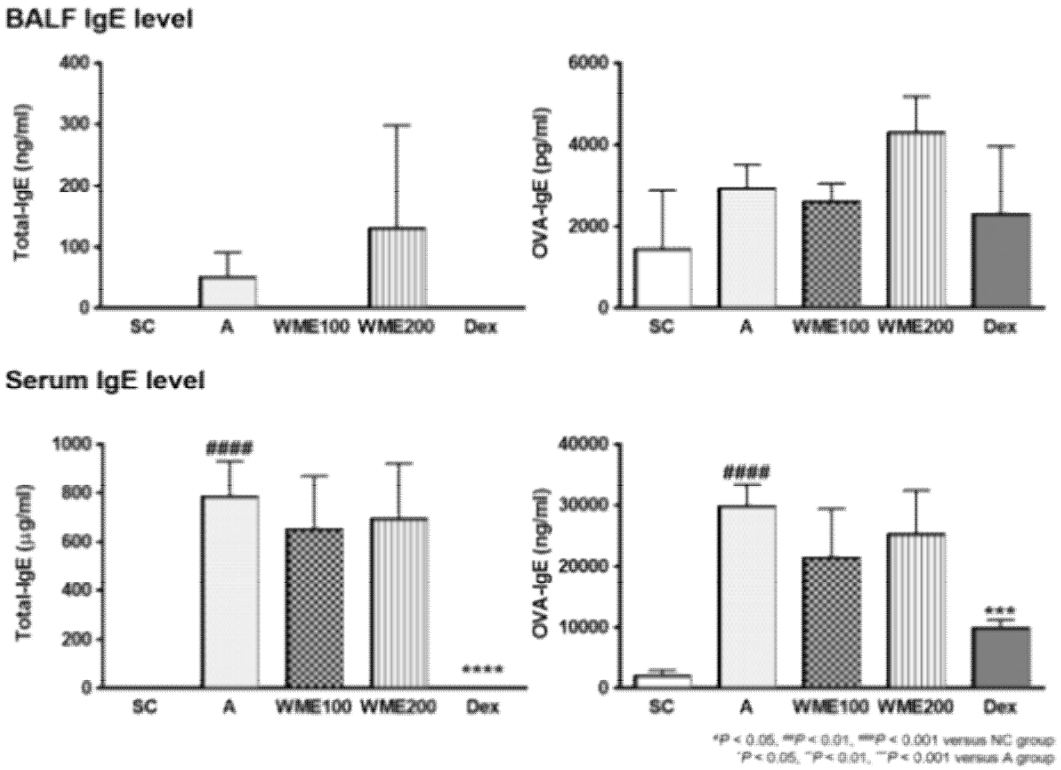
〈그림 2.59 과민면역유도 및 백개자의 투여 일정〉



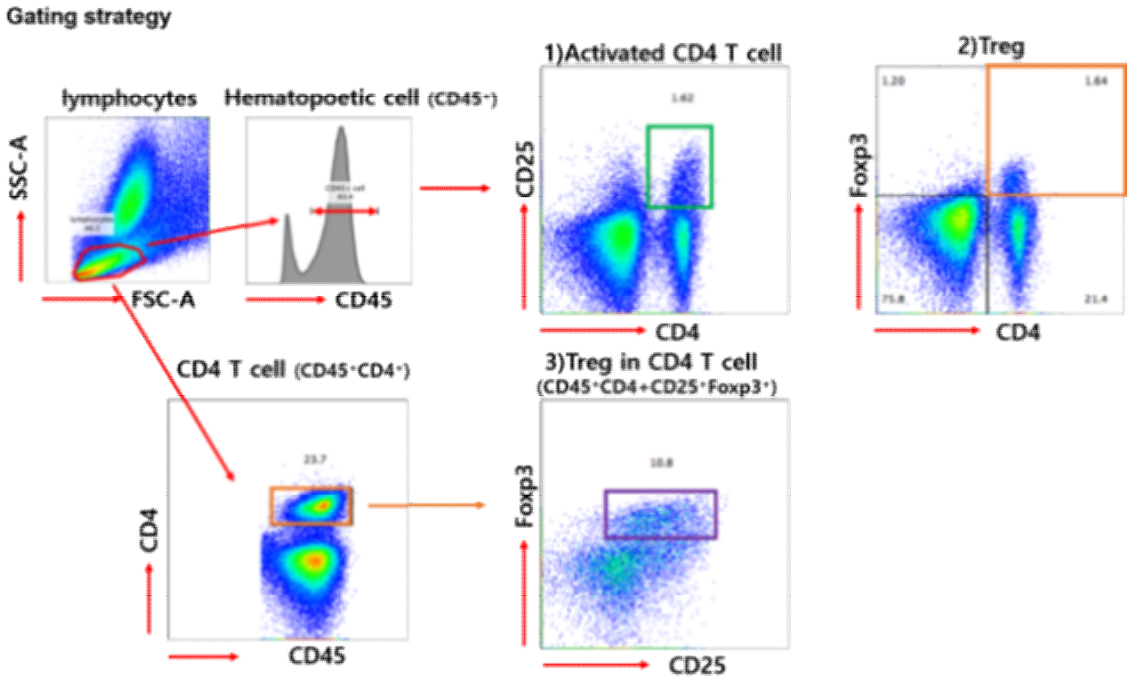
〈그림 2.60 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수와 비율〉



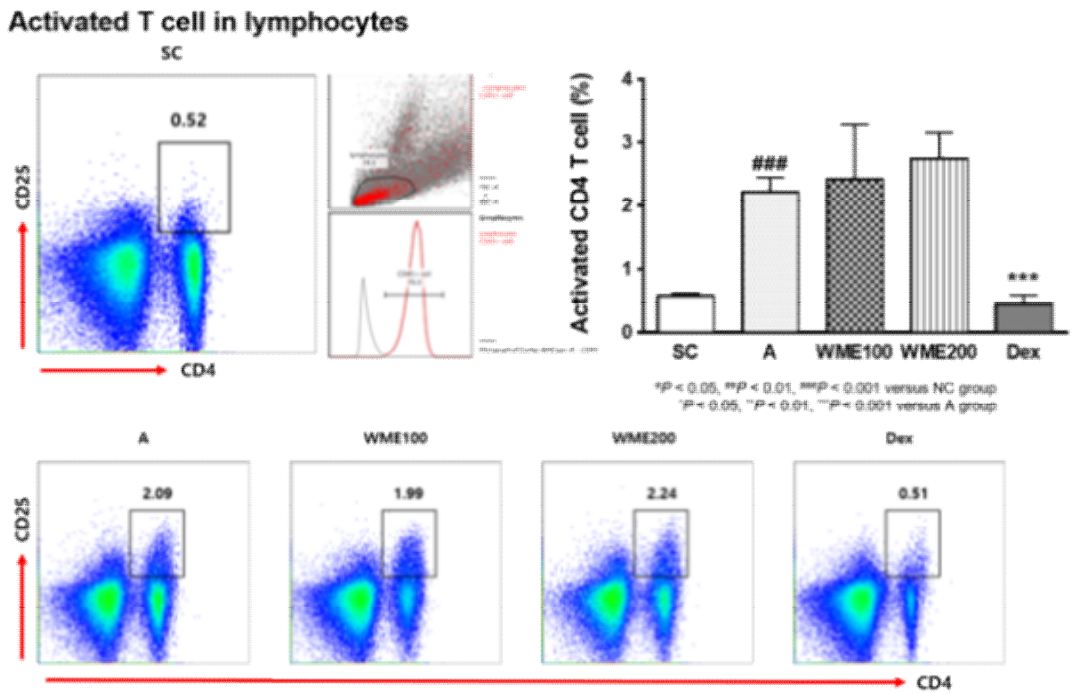
〈그림 2.61 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉



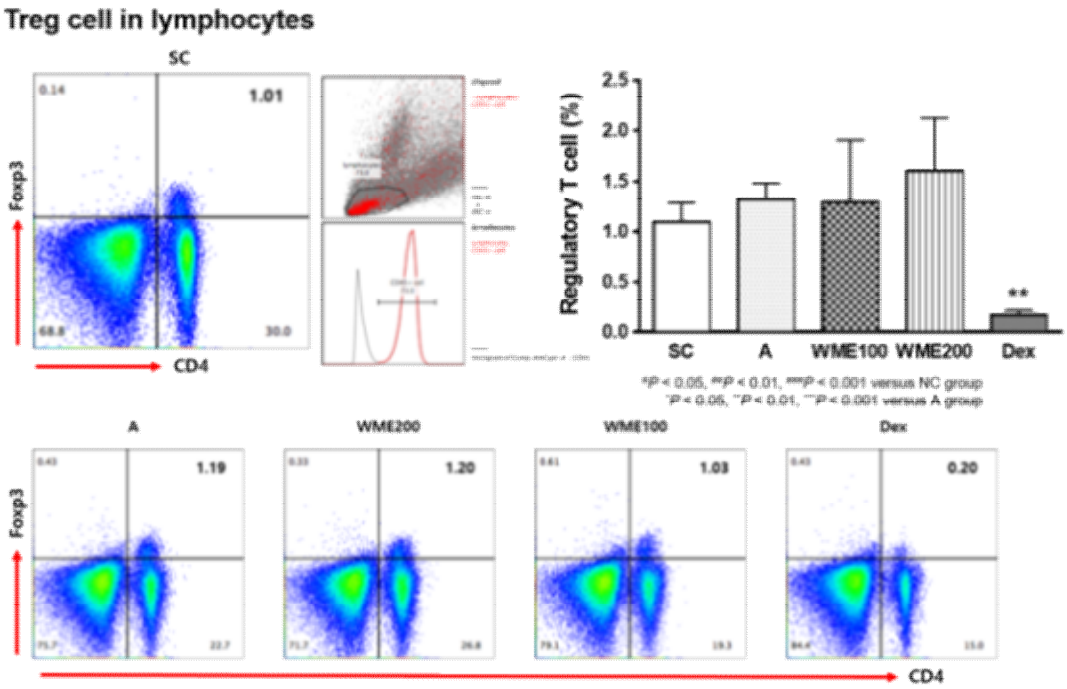
〈그림 2.62 기도세척액과 혈청 내의 Total IgE 와 OVA-IgE의 수준측정〉



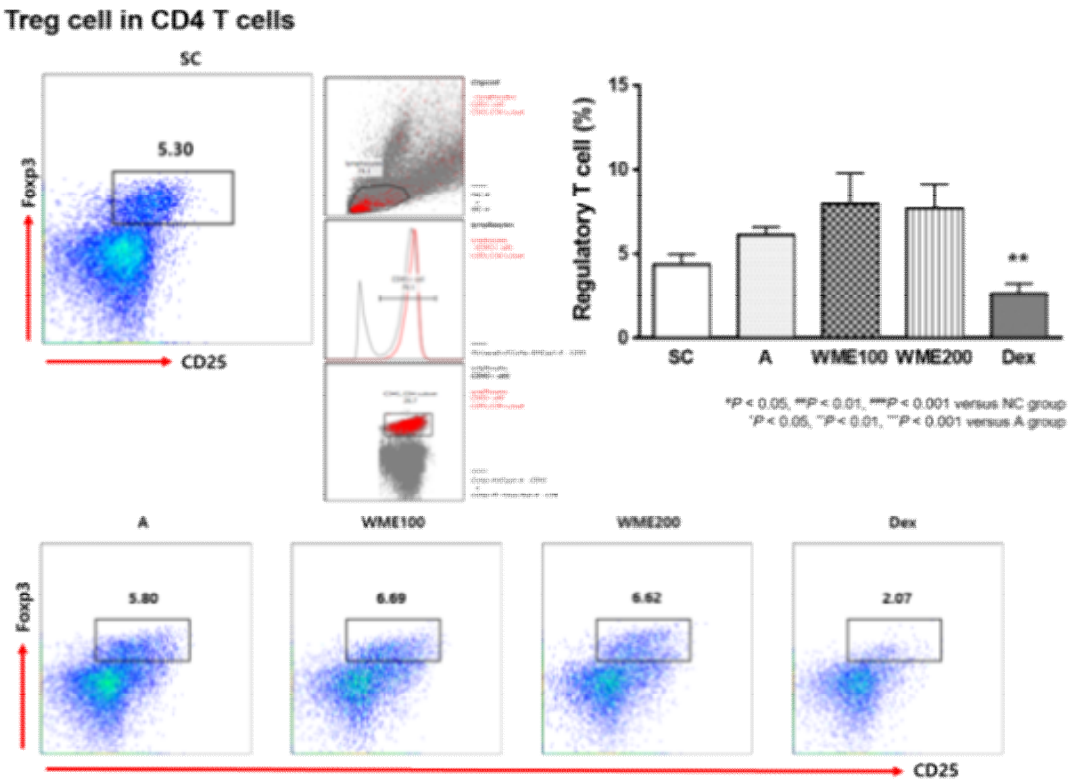
〈그림 2.63 Flowcytometry의 Gating strategy〉



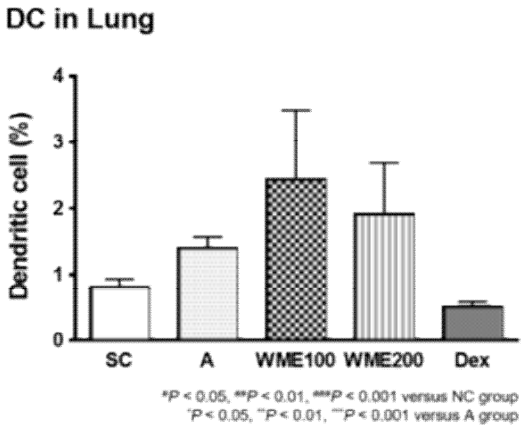
〈그림 2.64 Lymphocytes의 activated CD4 T cell population 측정〉



〈그림 2.65 Lymphocytes의 Treg cell population 측정〉



〈그림 2.66 CD4 T cell의 Treg cell population 측정〉



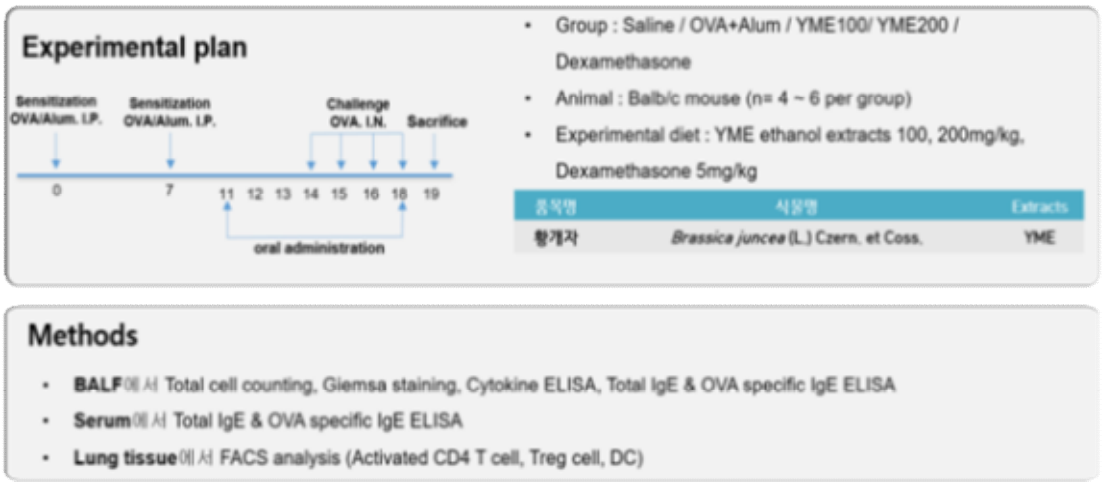
〈그림 2.67 폐의 Dendritic cell 비율 측정〉

* Conclusion

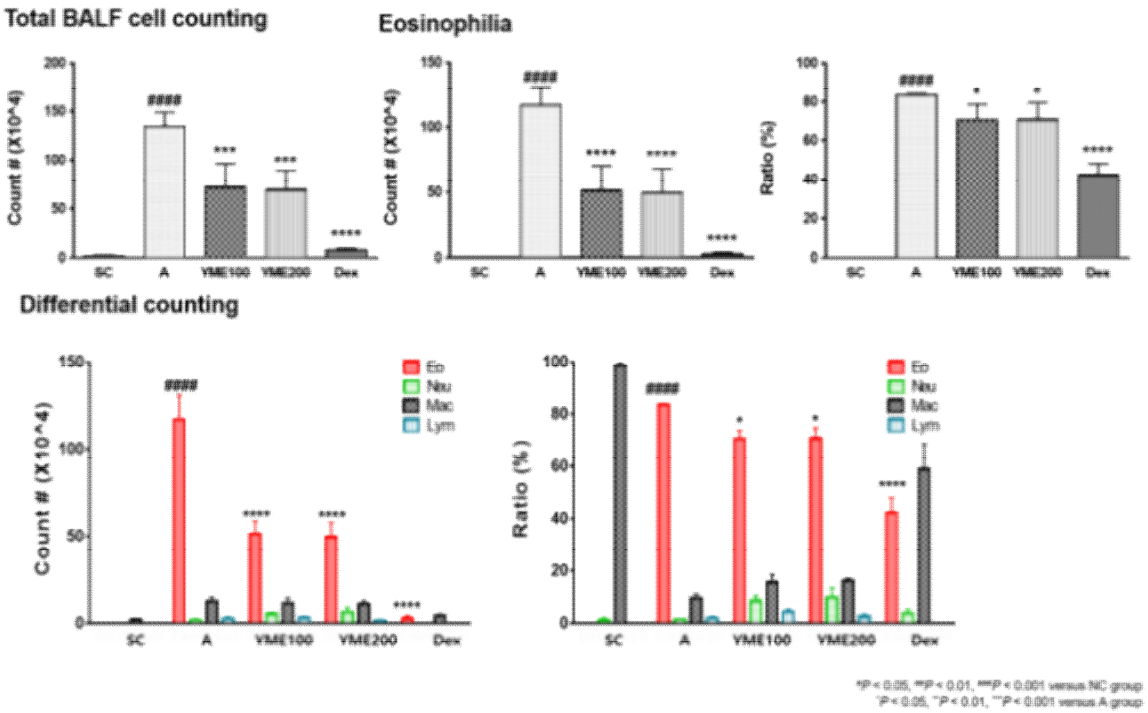
- 백개자는 4가지 index 모두에서 뚜렷한 방향성이 나타나지 않았음. 과민면역 조절 동물실험 결과 폐기도 세척액내 호산구의 수는 감소하였으나, 염증매개자에 대한 영향이 없는 것으로 확인되었음. 따라서 in vitro 와 in vivo 결과의 통일성이 있는 것으로 판단됨.

③ 2차 황개자의 과민면역반응조절 동물실험

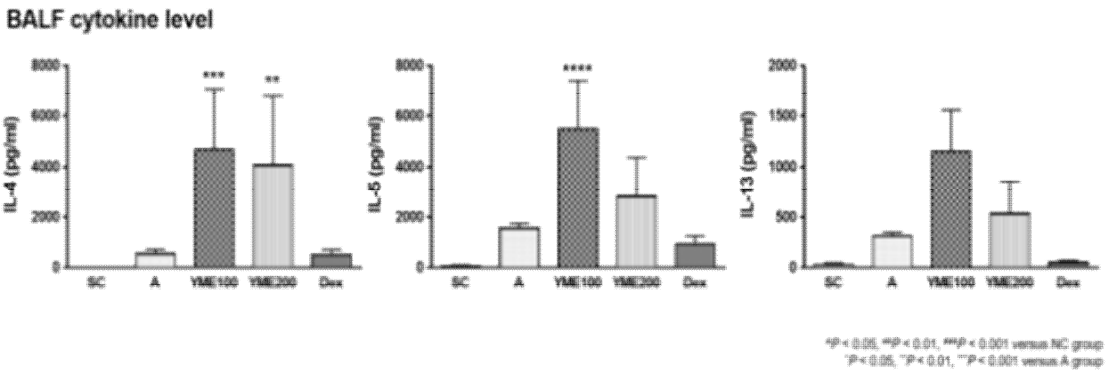
- 기존 우수 식품소재인 황개자(100, 200mg/kg)를 100ul로 경구투여 하였음.
- Dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 5mg/kg으로 100ul씩 경구투여 하였음.
- 기도내 면역세포 및 특히 호산구의 양이 증가하였고 약물에 의해 감소하였음.
- 황개자의 경우 다른 과민면역반응을 조절하는 염증매개인자에 대한 조절능은 보이지 않는 것으로 판단됨.



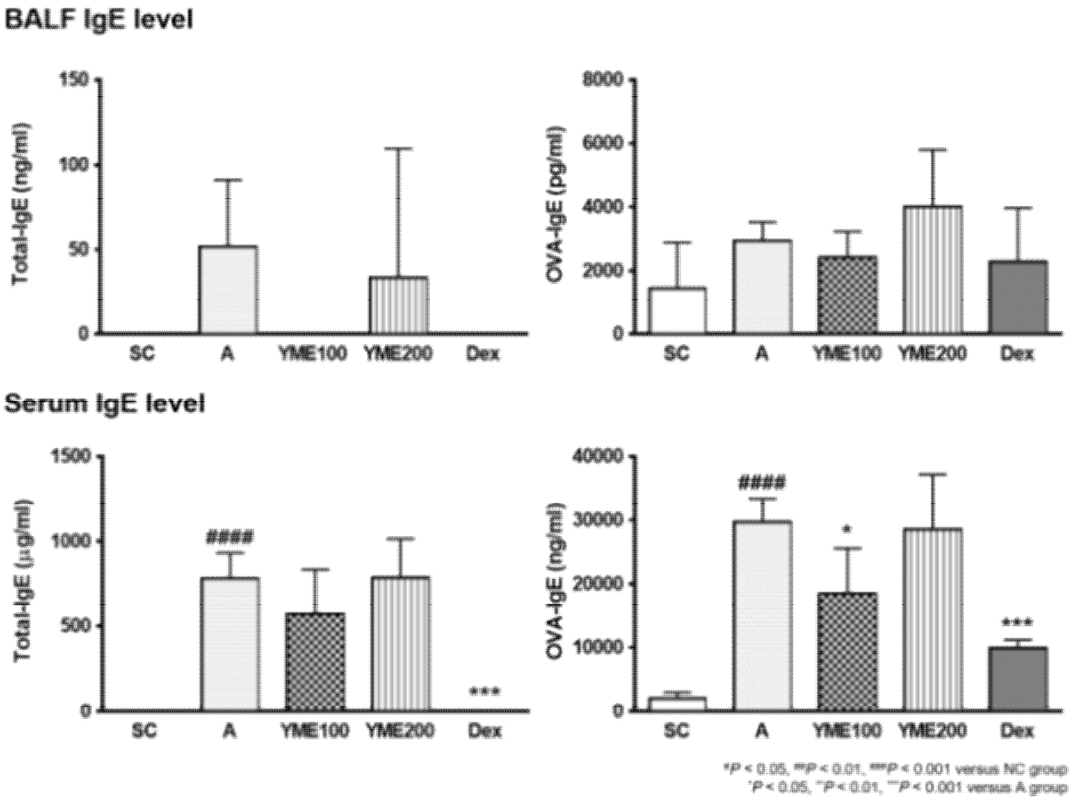
〈그림 2.68 과민면역유도 및 황개자의 투여 일정〉



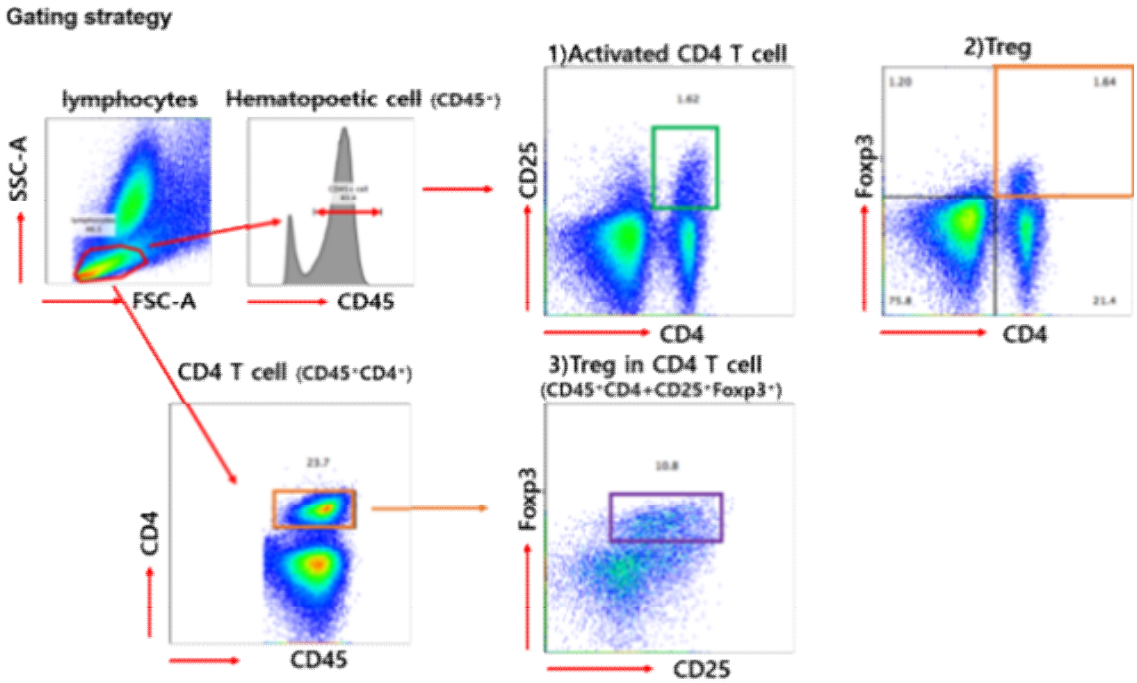
〈그림 2.69 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수와 비율〉



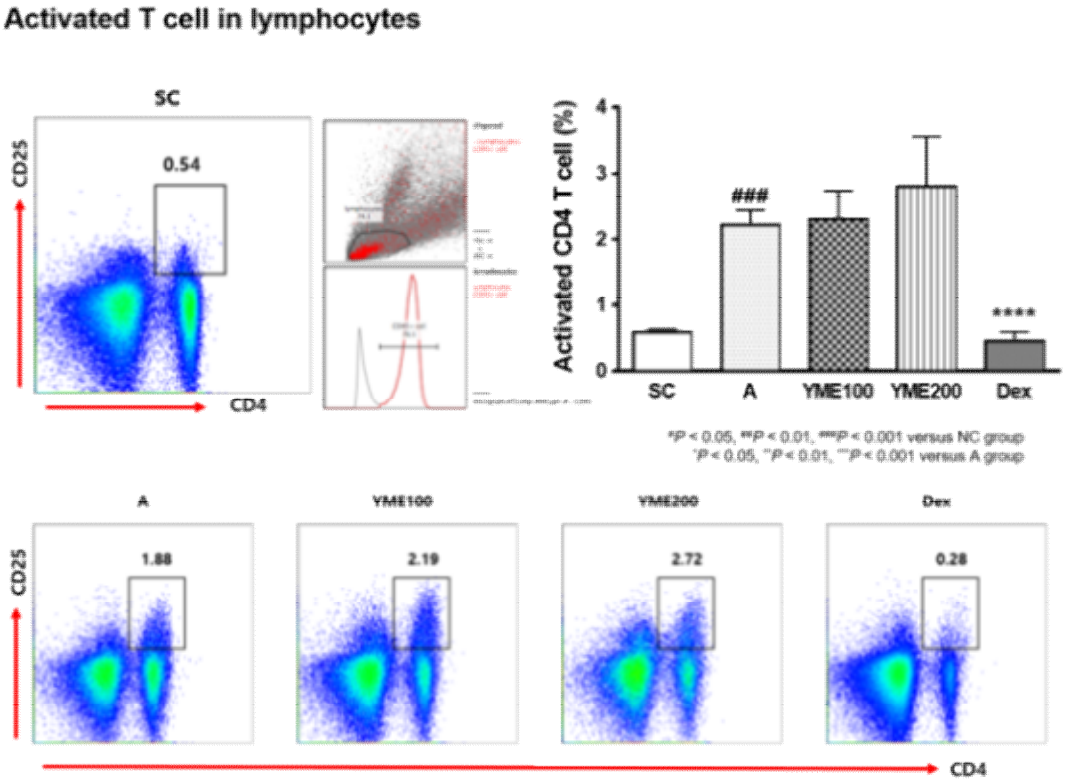
〈그림 2.70 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉



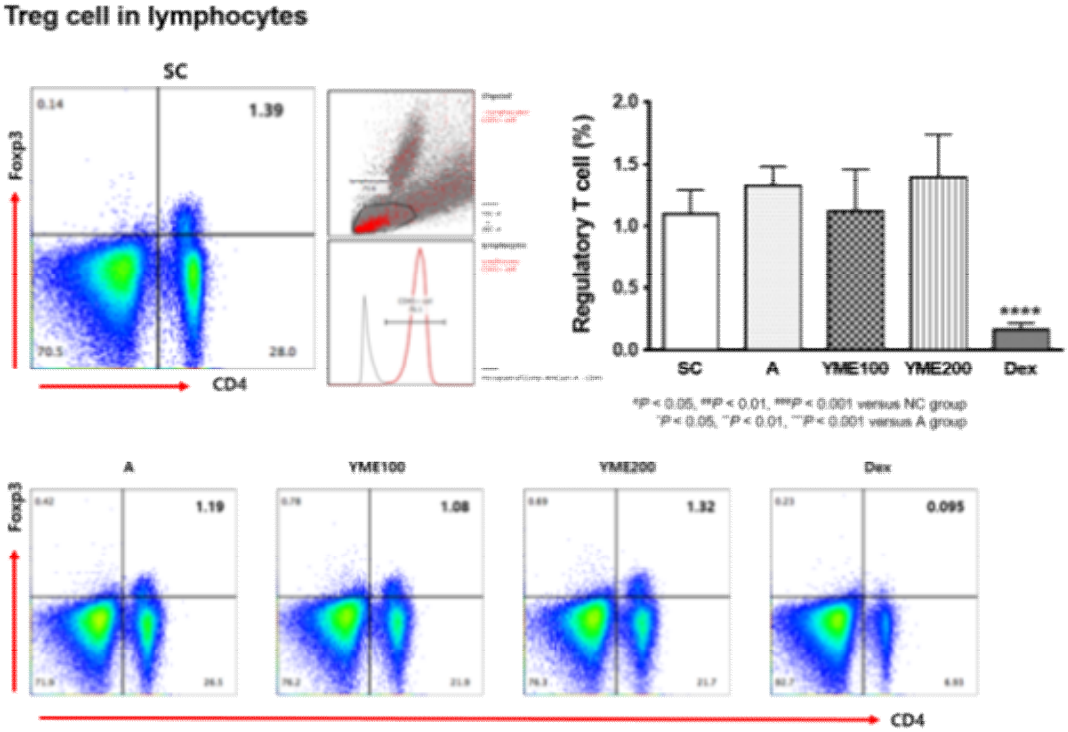
〈그림 2.71 기도세척액과 혈청 내의 Total IgE 와 OVA-IgE의 수준측정〉



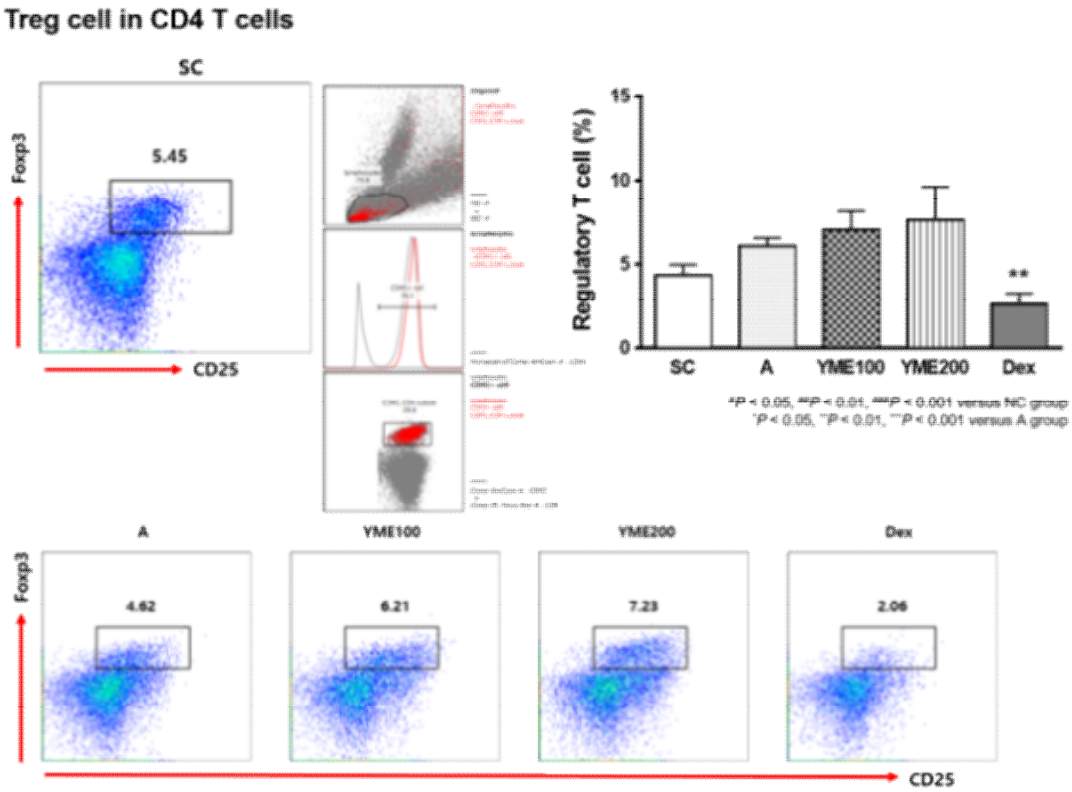
〈그림 2.72 Flowcytometry의 Gating strategy〉



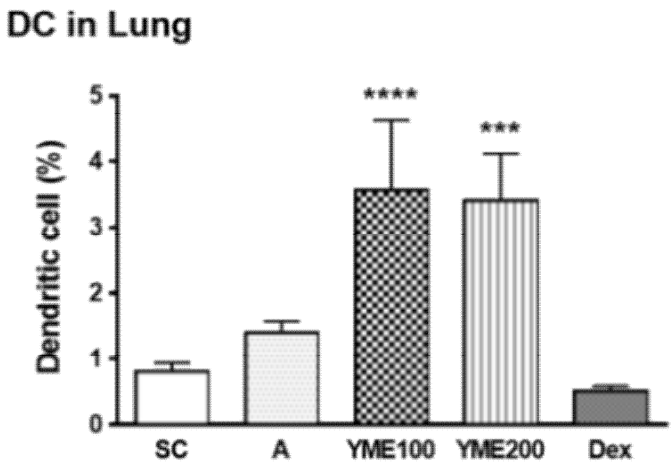
〈그림 2.73 Lymphocytes의 activated CD4 T cell population 측정〉



〈그림 2.74 Lymphocytes의 Treg cell population 측정〉



〈그림 2.75 CD4 T cell의 Treg cell population 측정〉



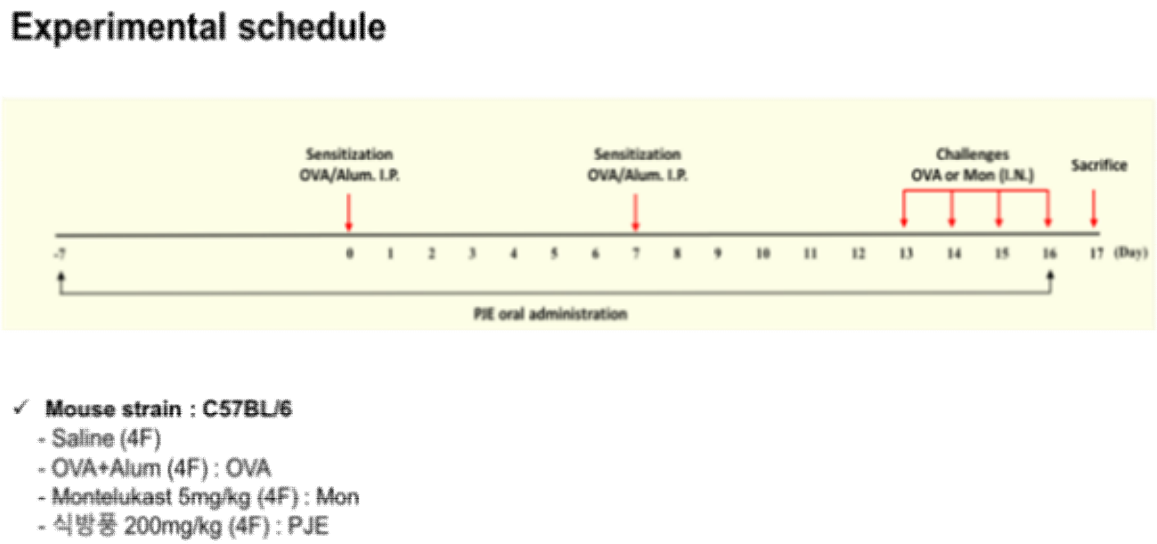
〈그림 2.76 폐의 Dendritic cell 비율 측정〉

* Conclusion

- 황개자는 Immunogenic index II에서 높은 수치를 기록하였음. 과민면역 조절 동물실험 결과 폐기도 세척액내 호산구의 수는 감소하였으나, 염증매개자에 대한 영향이 없는 것으로 확인되었음. 따라서 in vitro와 in vivo 결과의 통일성이 있는 것으로 판단됨.

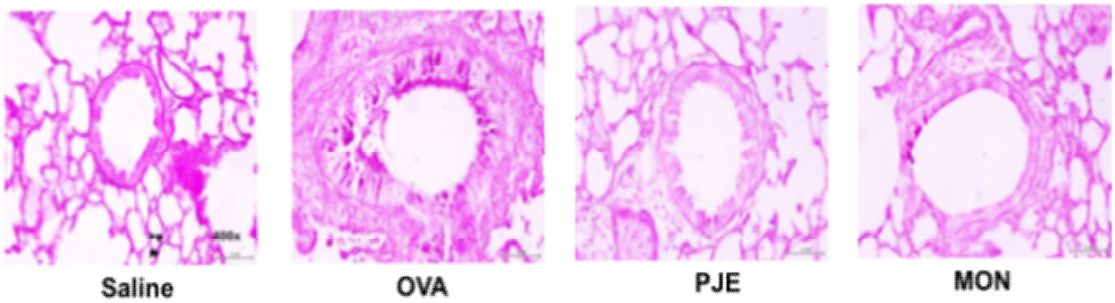
(다) 식방풍의 과민면역반응조절 동물시험

- 식방풍 (Peucedanum Japnicum)을 광명당제약을 통해서 구입하였음. 이를 70% ethanol에서 2시간동안 80도씨에서 환류추출 (reflux extraction) 한 후 동결건조를 통해서 분말형태화 함. 이를 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 200mg/kg (4mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- Dexamethasone powder (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 5mg/kg (0.1mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- 선행연구를 통해서 염증 억제능을 알고 있는 소재인 식방풍을 정립된 과민면역조절모델을 이용하여 모델의 적정성을 검증하고 식방풍의 유효성을 확인하고자 하였음.
- 식방풍을 투여한 군에서 기도의 염증완화를 조직염색을 통해서 확인하였음. (PAS staining)
- 과민반응의 가장 중요한 지표인 total 면역세포와 호산구의 감소를 기도세척액에서 확인하였음.
- 또한 기도내 싸이토카인 (IL-4, 5, 13)역시 식방풍 투여시 감소하는 경향을 보임.
- 매개체생산의 중요한 세포인 Activated CD4 T cell 또는 Th2 cell이 식방풍 투여군에서 유의한 감소를 확인함.
- 구체적인 세포 mechanism을 확인하기 위하여 in vitro실험까지 진행한 결과 Th2 cell activation을 감소시키는 면역능을 확인하였음.



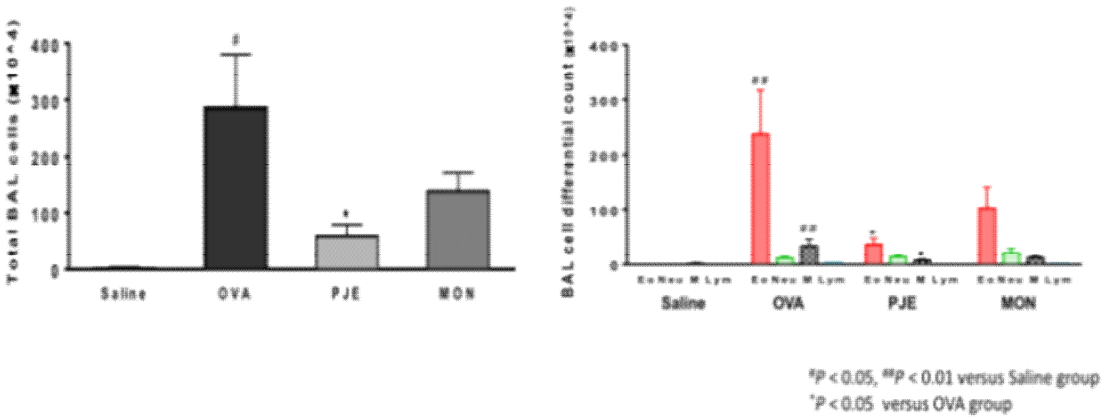
〈그림 2.77 과민면역유도 및 식방풍의 기간별 투여 일정〉

Histopathological data

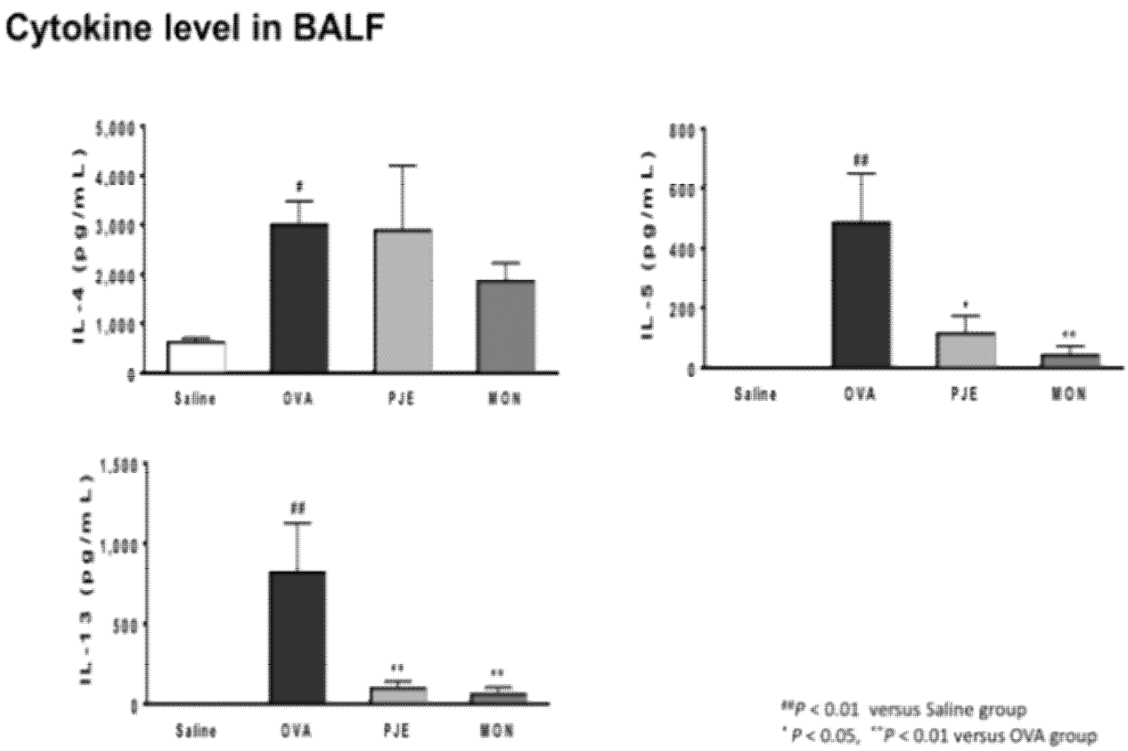


〈그림 2.78 그룹별 PAS 조직염색 군별 대표〉

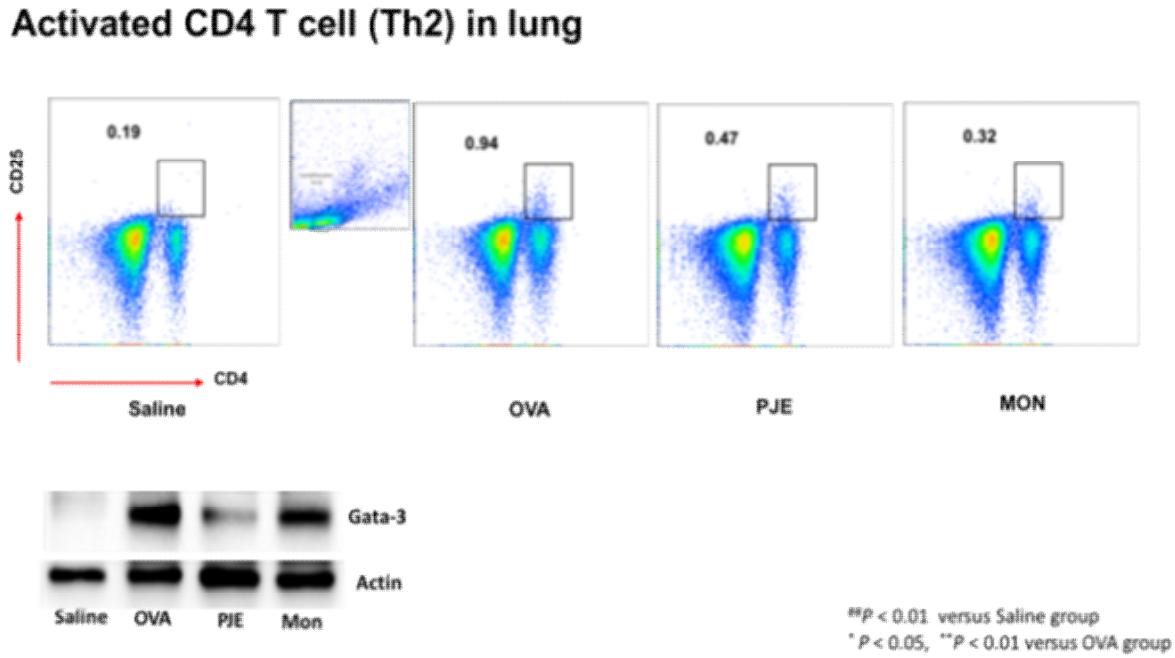
Infiltrated cell counting in BALF



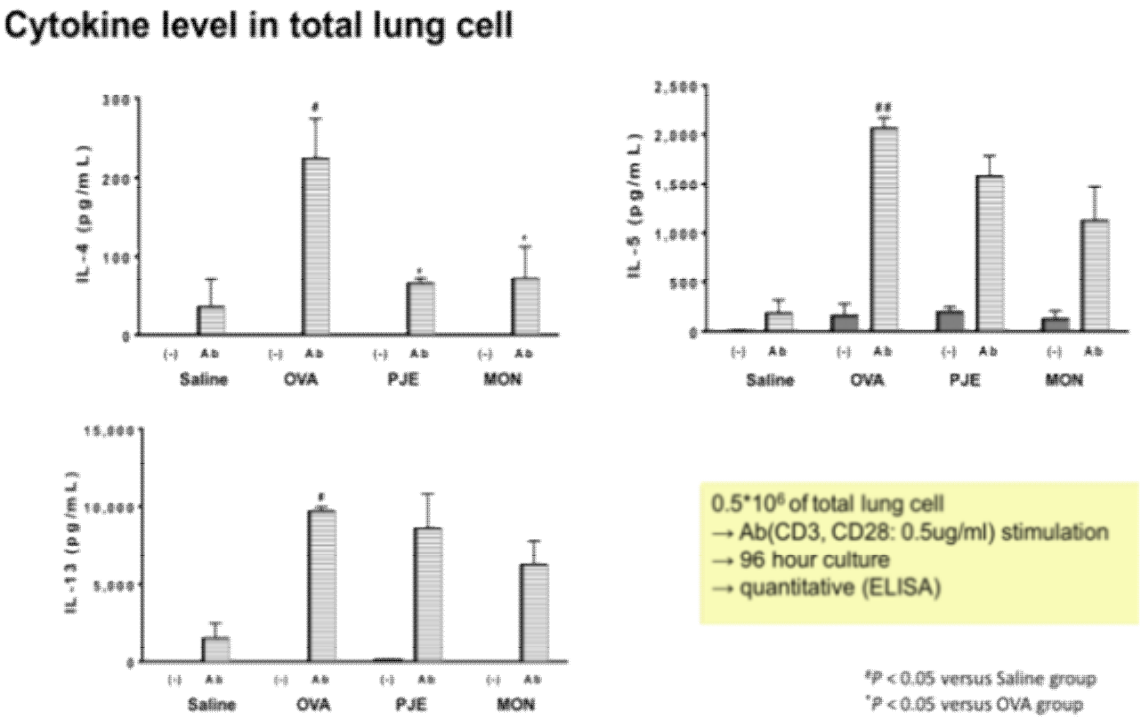
〈그림 2.79 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수〉



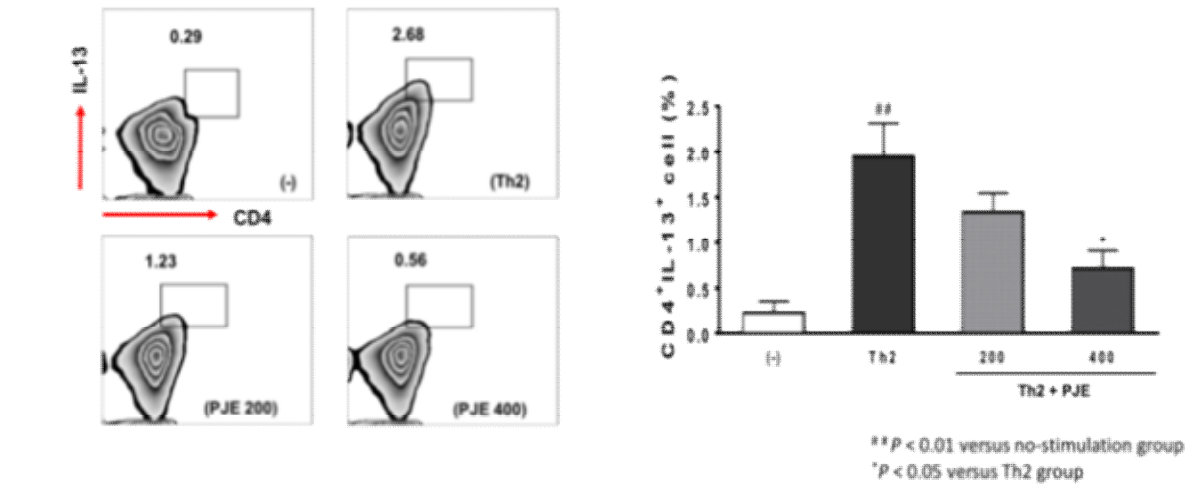
〈그림 2.80 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉



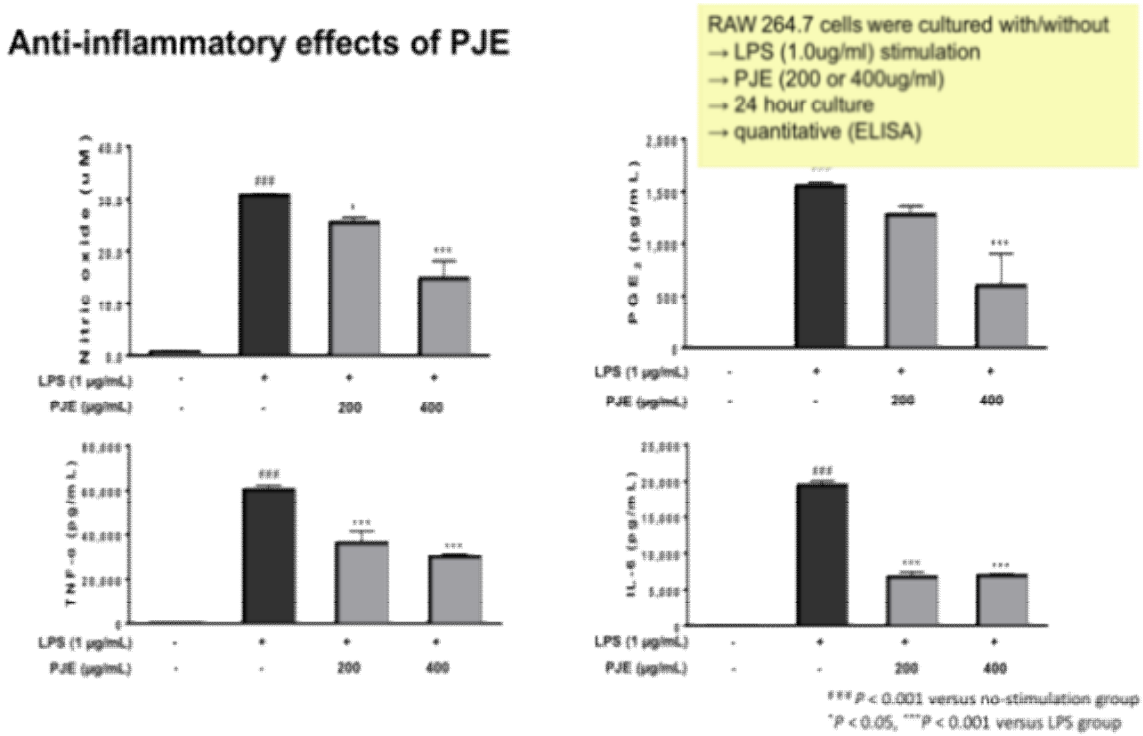
〈그림 2.81 폐의 activated CD4 T cell 및 Th2 cell의 population측정 군별 대표값〉



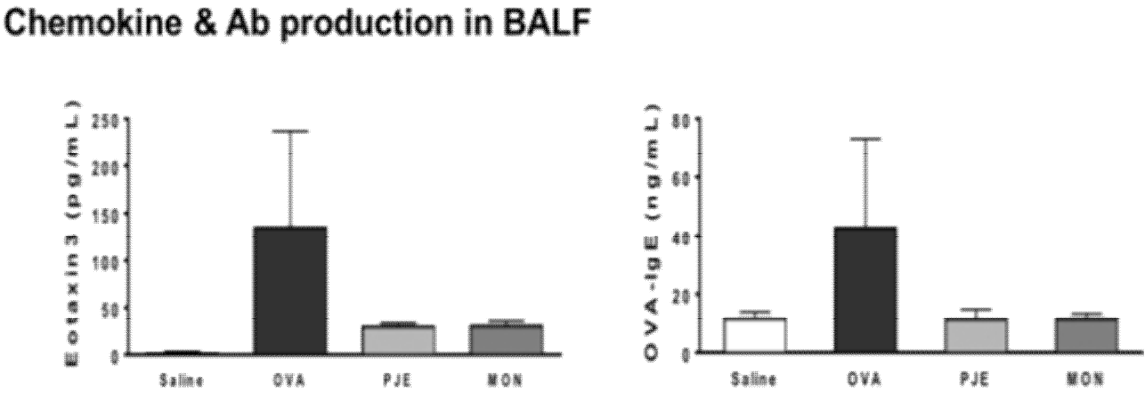
〈그림 2.82 폐의 염증매개체의 수준을 Ab로 re-stimulation후 측정〉



〈그림 2.83 식방풍의 Th2 re-activation 조절능 측정〉



〈그림 2.84 식방풍의 항염작용 측정〉

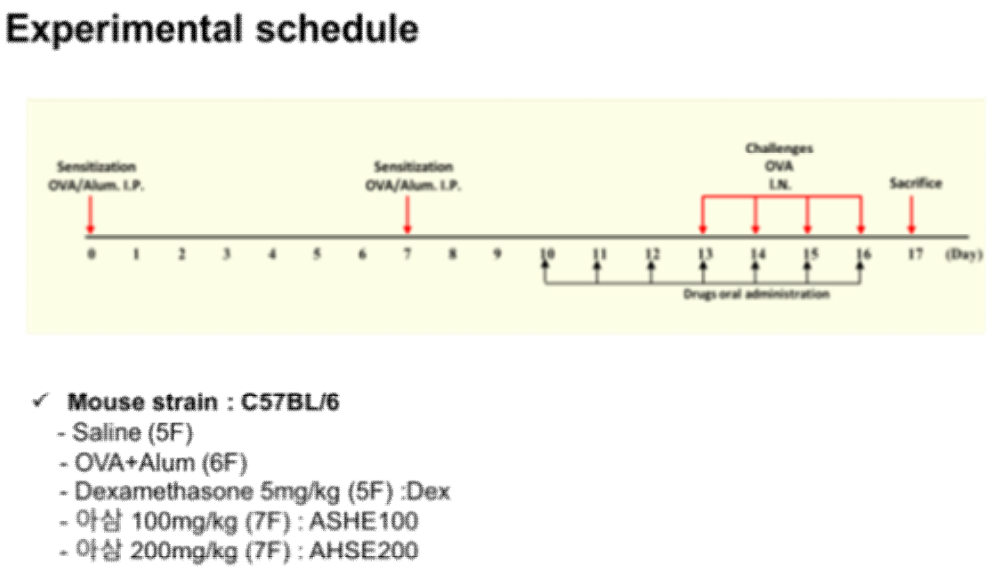


〈그림 2.85 폐기도세척액내 chemokine 및 antibody측정〉

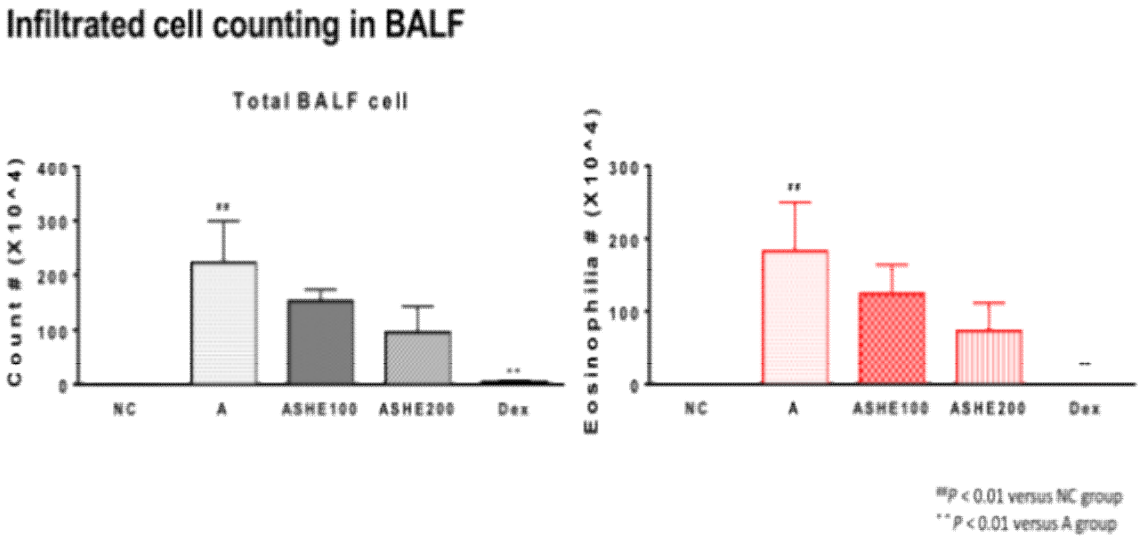
* Conclusion: 식방풍의 호산구매개 과민반응을 억제하는 효과를 확인하였음. 또한 매개체인 싸이토카인(IL-4, 5, 13)의 조절능까지 확인하였으며 추가적인 실험을 통해서 이것이 Th2 cell의 활성을 조절함으로서 이뤄진다는 결과를 확인하였음. 위 결과는 논문에 투고할 예정임.

(라) 아삼의 과민면역반응조절 동물시험

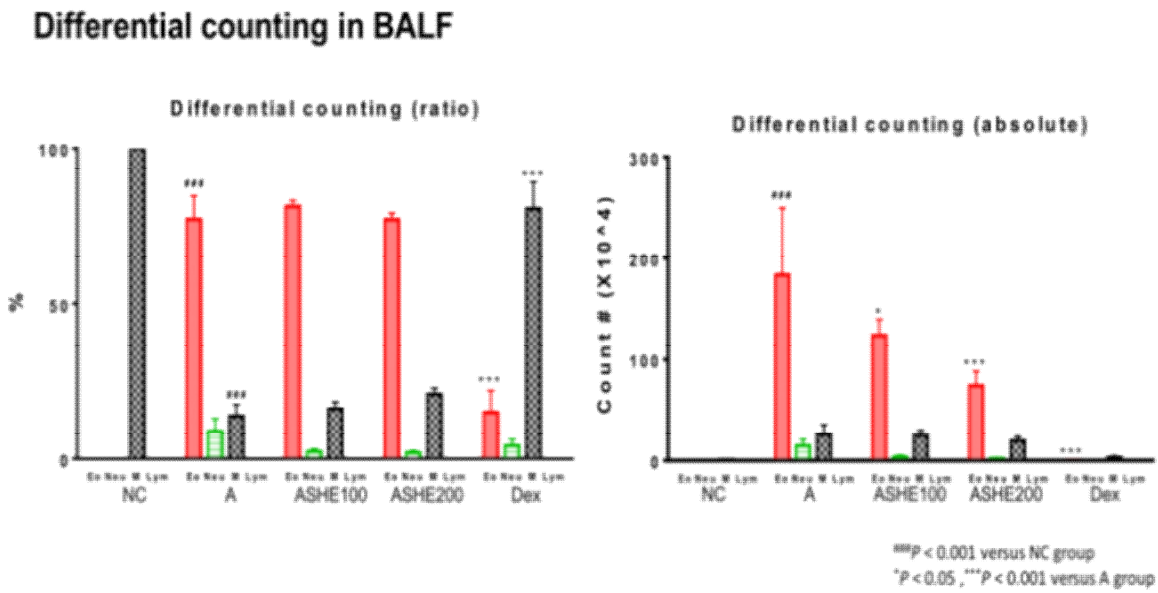
- 아삼 (Angelica decursiva (Miq.) Franch. & Sav.)을 광명당제약을 통해서 구입하였음. 이를 70% ethanol에서 2시간동안 80도씨에서 환류추출 (reflux extraction) 한 후 동결건조를 통해서 분말형태화 함. 이를 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 200mg/kg (4mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- Dexamethasone powder (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 0.25% CMC (sodium carboxymethyl cellulose)에 희석하여 5mg/kg (0.1mg/mouse)의 양을 100ul로 경구투여 하였음.
- 선행연구를 통해서 과민면역조절능을 알고 있는 소재인 아삼을 정립된 과민면역조절모델을 이용하여 모델의 적정성을 검증하고 그 유효성을 확인하고자 하였음.
- 과민반응의 가장 중요한 지표인 total 면역세포와 호산구의 감소를 기도세척액에서 확인하였음.
- 아삼투여군에서 기도내 싸이토카인 (IL-4, 5, 13)이 감소하는 경향을 보임.
- 매개체생산의 중요한 세포인 activated CD4 T cell이 아삼투여군에서 유의한 감소를 확인함.



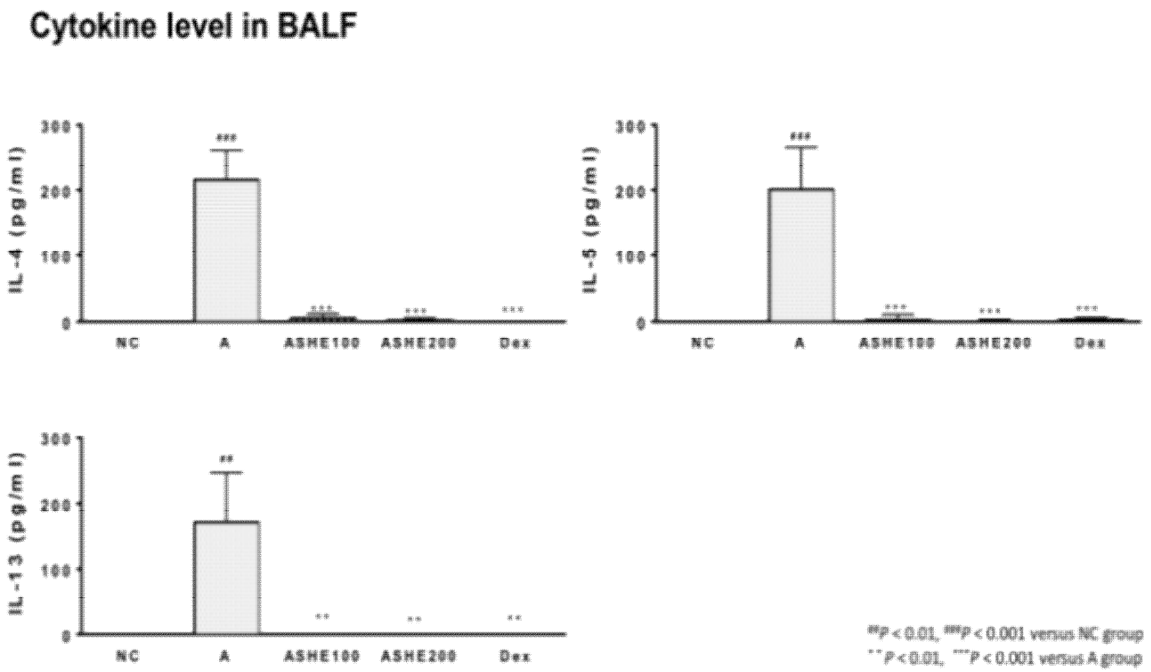
〈그림 2.86 과민면역유도 및 아삼의 기간별 투여 일정〉



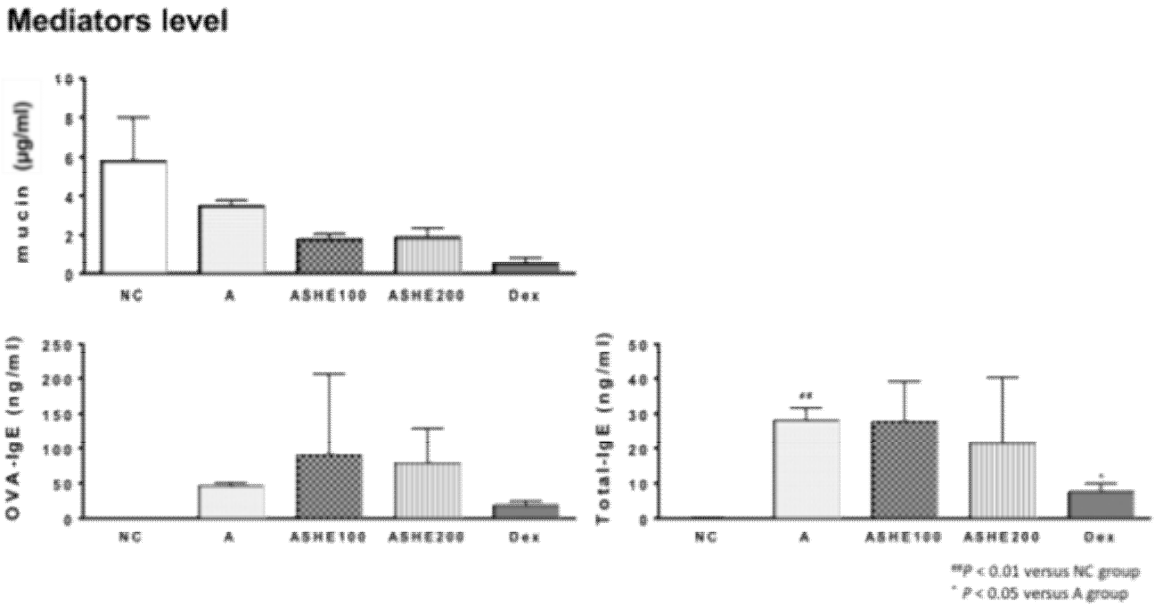
〈그림 2.87 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수〉



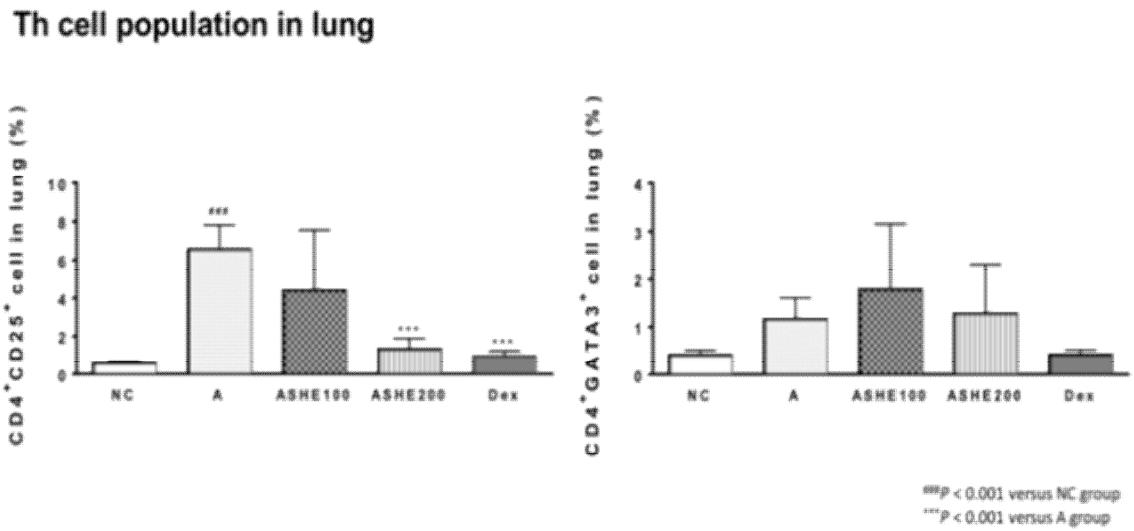
〈그림 2.88 기도세척액내 염증세포의 비율 및 절대수〉



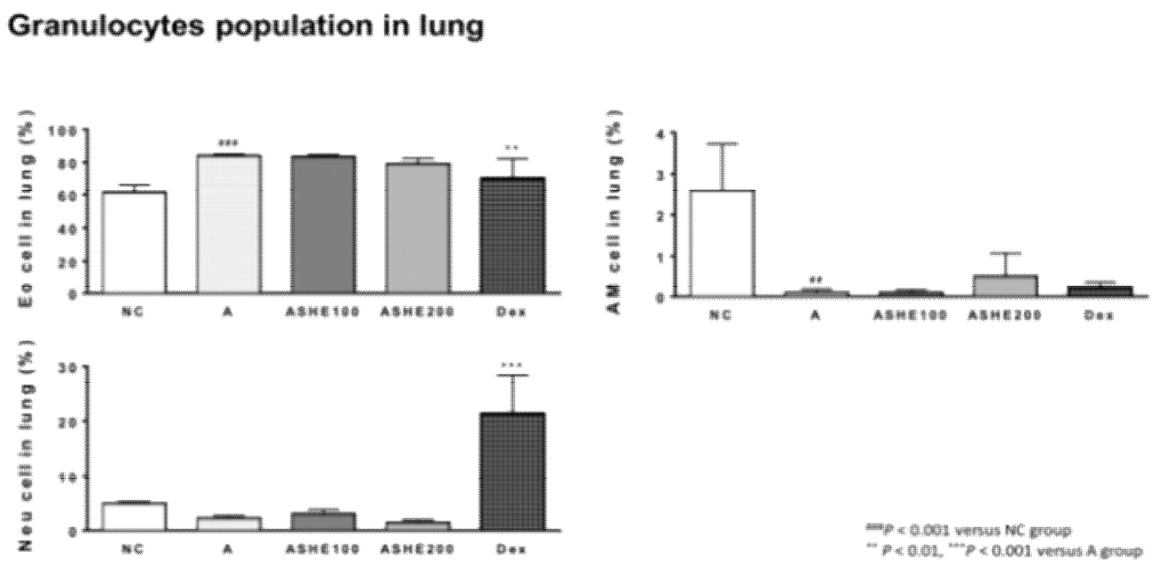
〈그림 2.89 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉



〈그림 2.90 기도세척액내 Mucin과 antibody의 수준측정〉



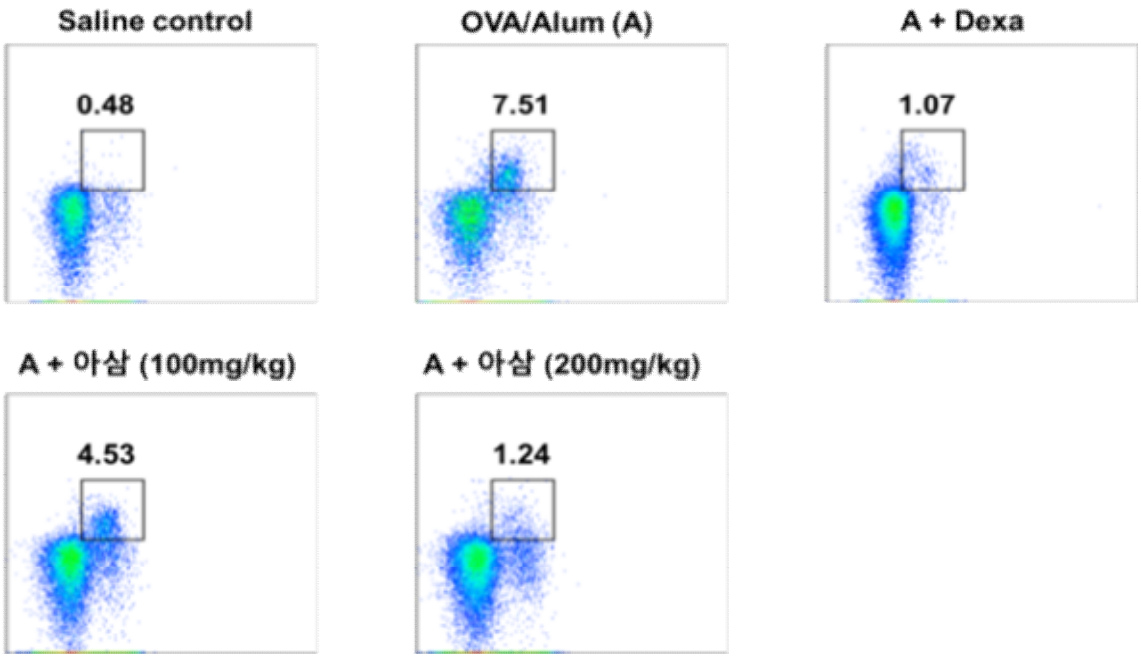
〈그림 2.91 폐의 activated CD4 T cell과 Th2 cell 수준측정〉



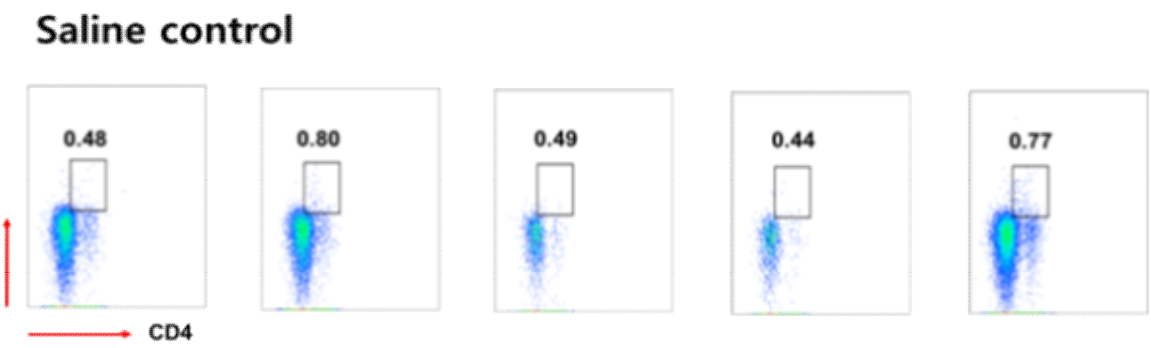
〈그림 2.92 폐의 호산구, 대식세포, 호중구 수준측정〉

Activated CD4 T cell in Lung (CD4+CD25+cell)

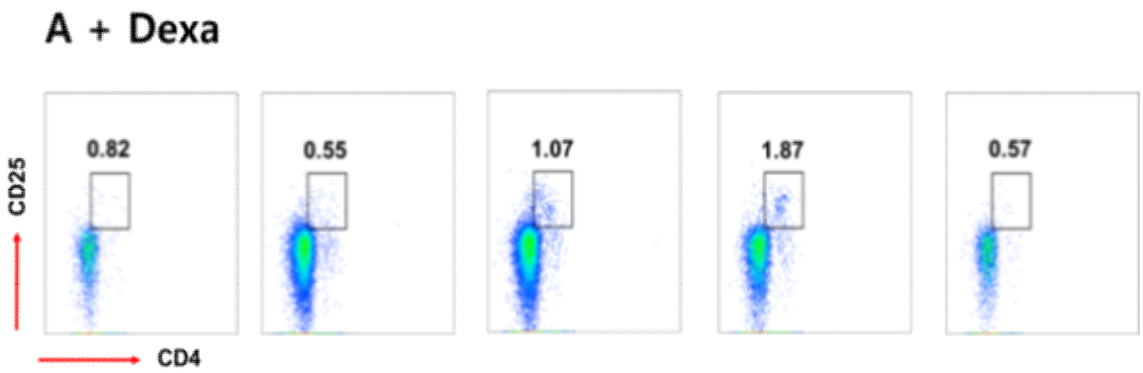
- Flowycytometry를 이용해서 분석함



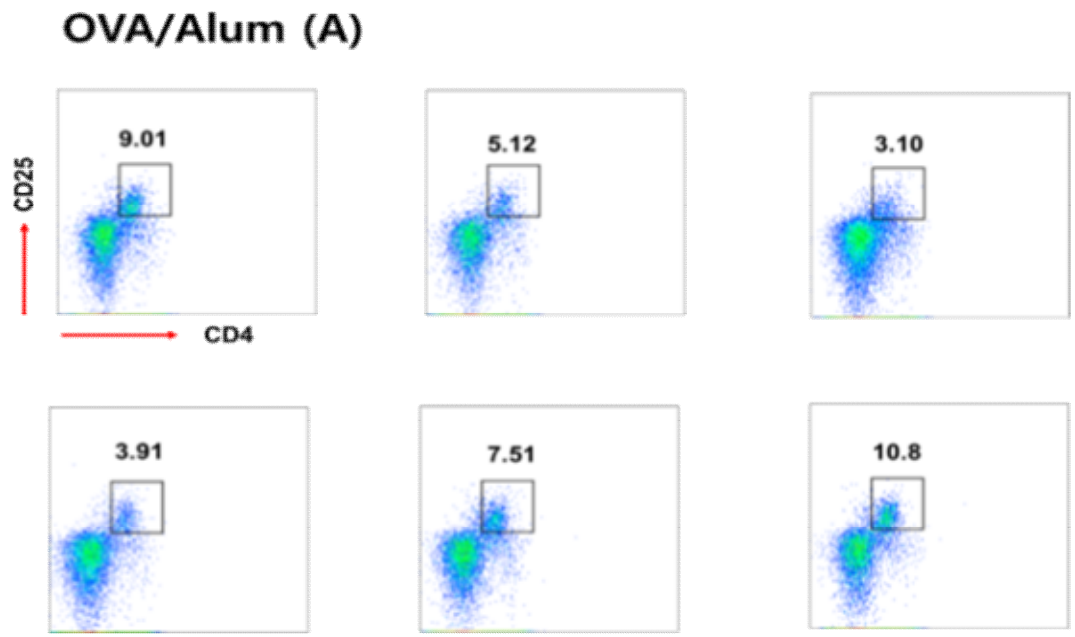
〈그림 2.93 폐의 activated CD4 T cell의 population측정 군별 대표값〉



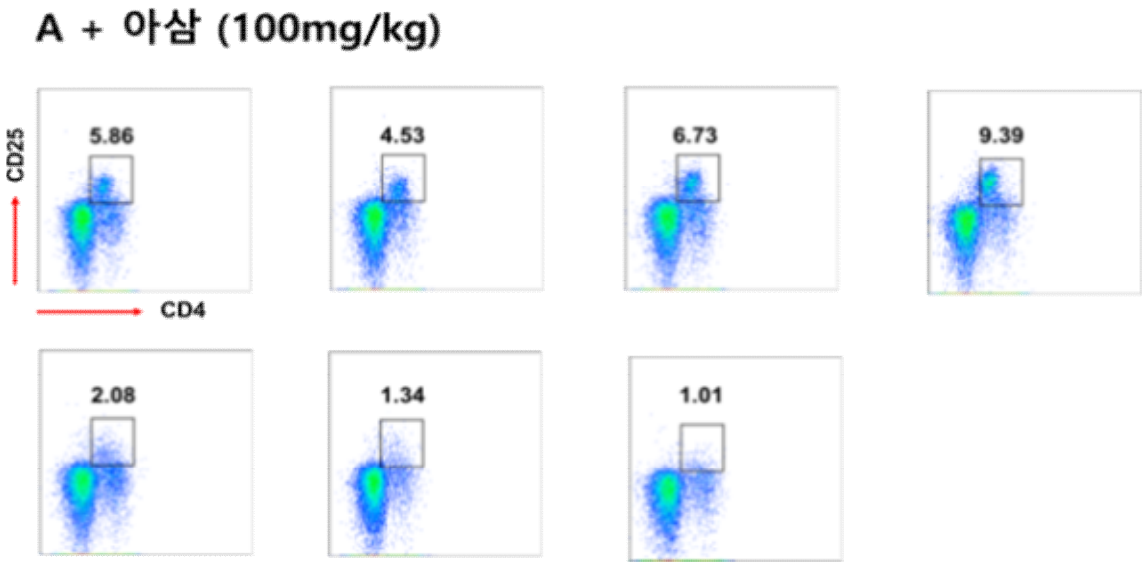
〈그림 2.94 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



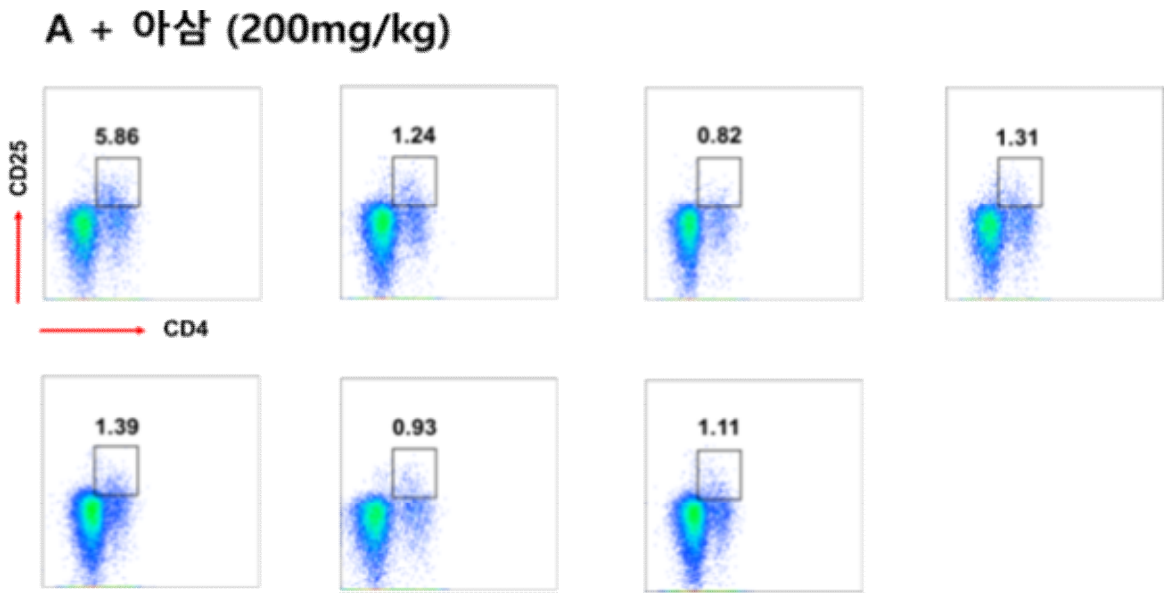
〈그림 2.95 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



〈그림 2.96 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



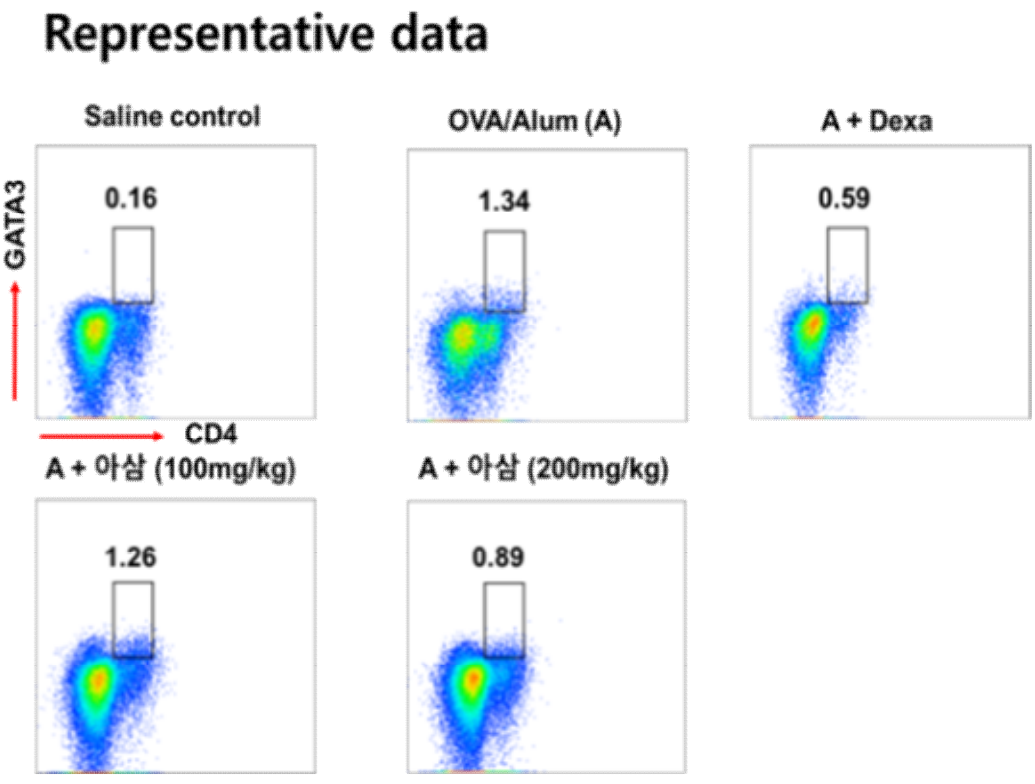
〈그림 2.97 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉



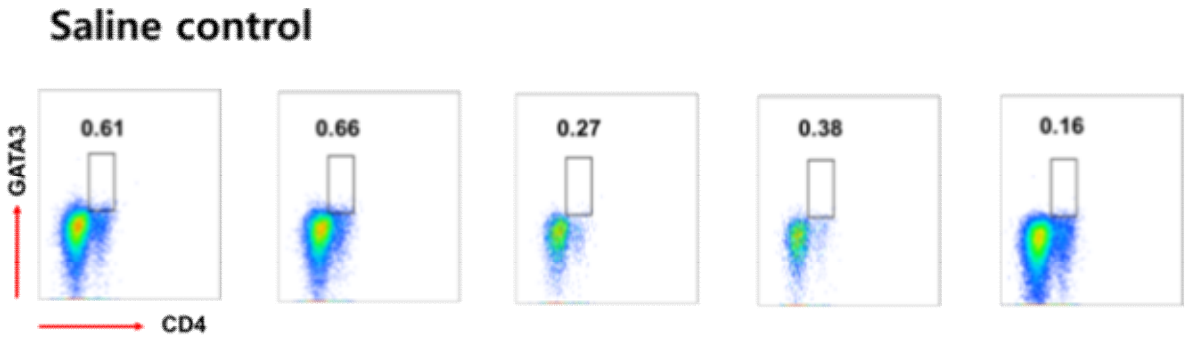
〈그림 2.98 폐의 activated CD4 T cell의 population측정〉

Th2 in Lung (CD4+GATA3+cell)

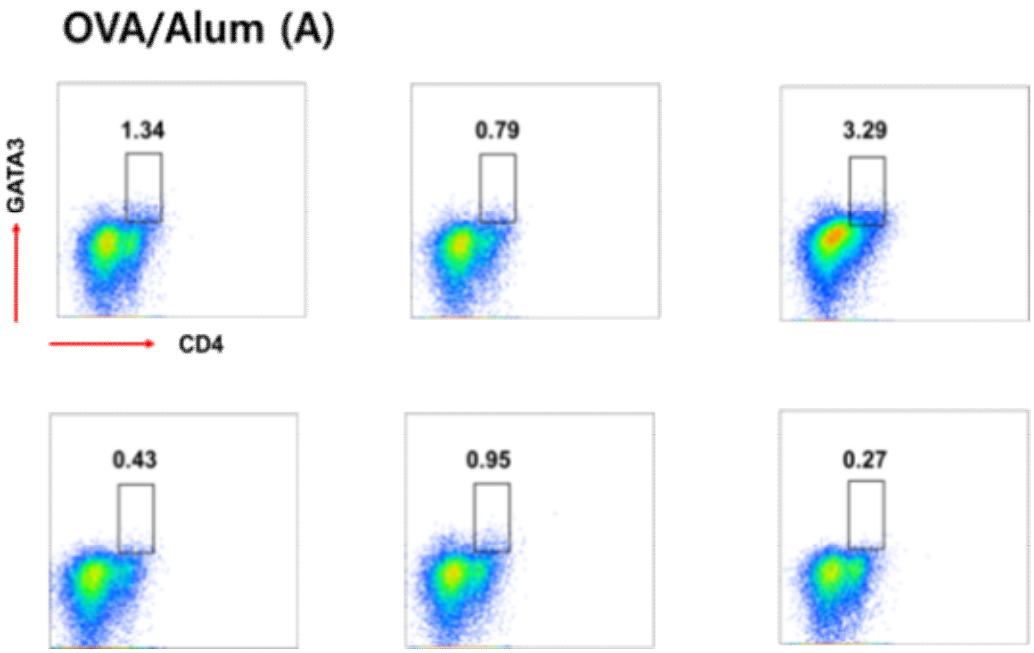
- Flowycytometry를 이용해서 분석함



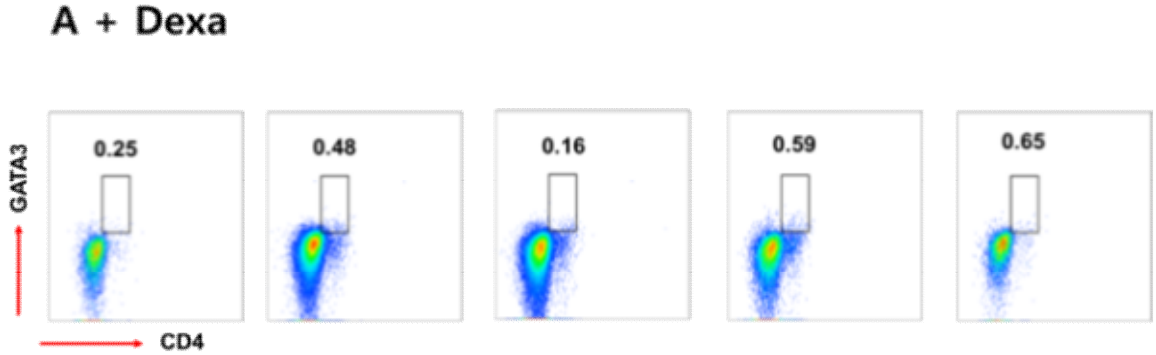
〈그림 2.99 폐의 Th2 cell의 population측정 군별 대표값〉



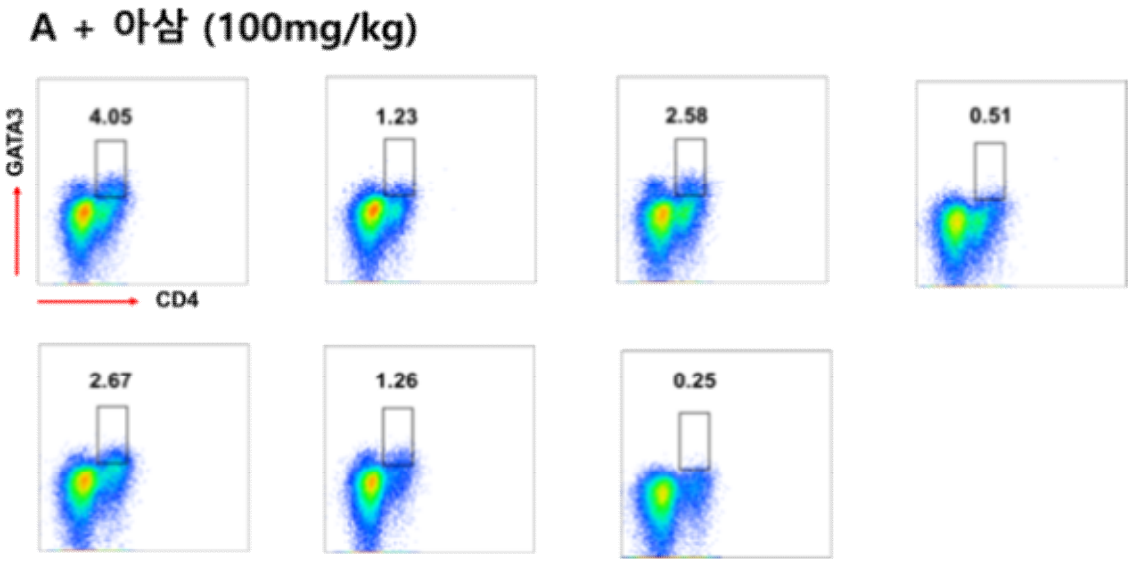
〈그림 2.100 폐의 Th2 cell의 population측정〉



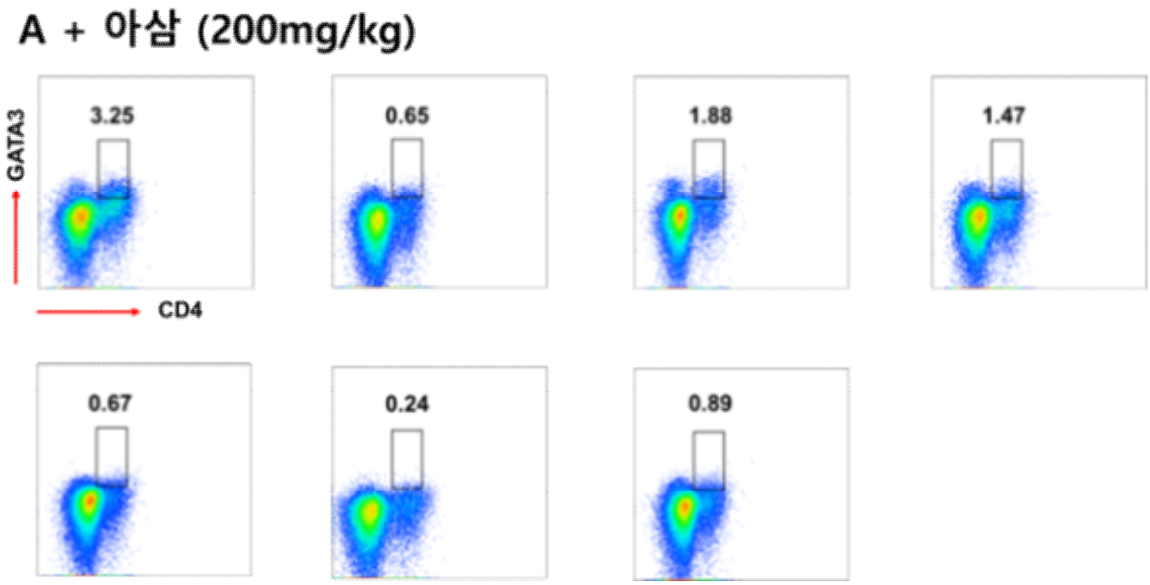
〈그림 2.101 폐의 Th2 cell의 population측정〉



〈그림 2.102 폐의 Th2 cell의 population측정〉



〈그림 2.103 폐의 Th2 cell의 population측정〉

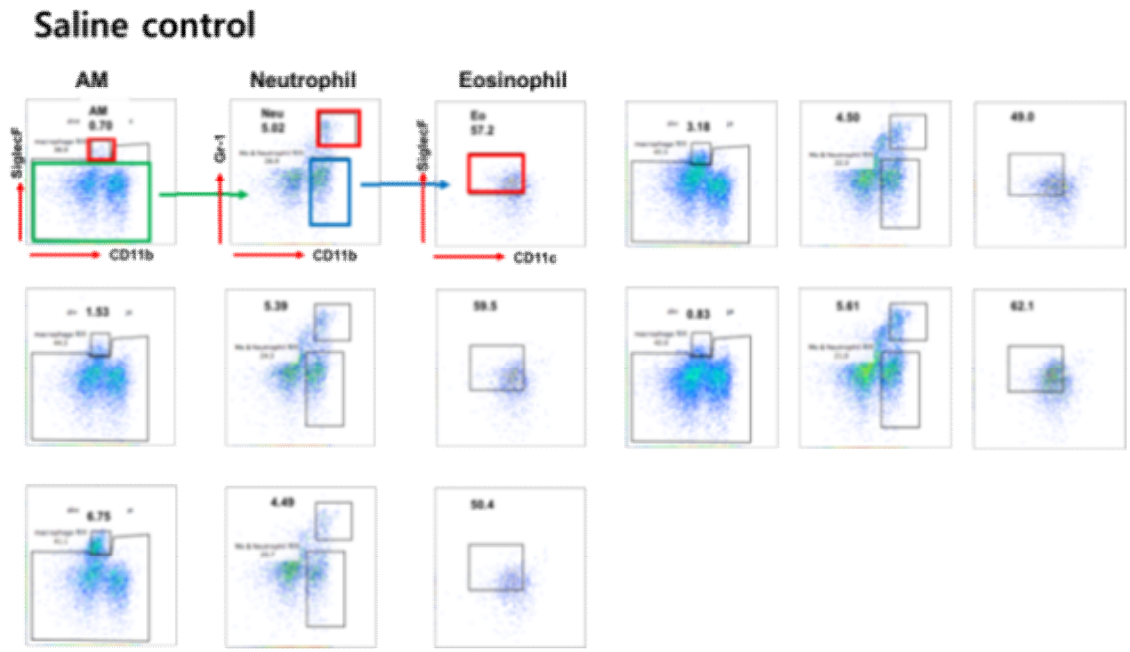


〈그림 2.104 폐의 Th2 cell의 population측정〉

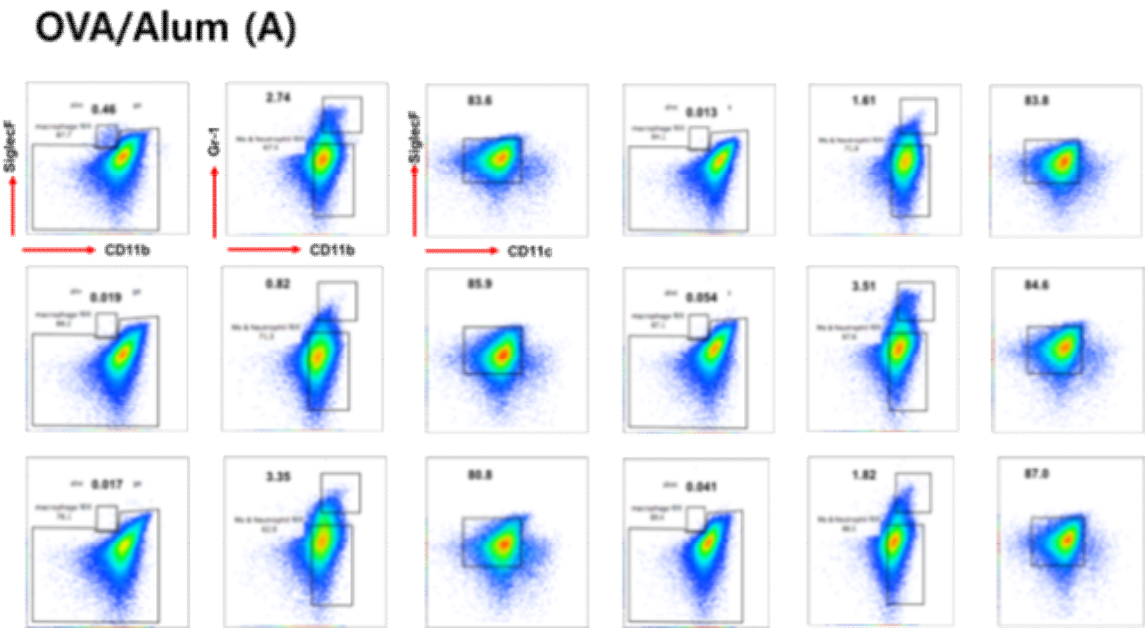
1. Alveolar macrophage
($CD45^+CD11b^{int}SiglecF^+CD64^+CD11c^+$)

2. Neutrophil ($CD45^+CD11b^+Gr\text{-}1^+$)

3. Eosinophil ($CD45^+CD11b^+Gr\text{-}1^-SiglecF^+$)

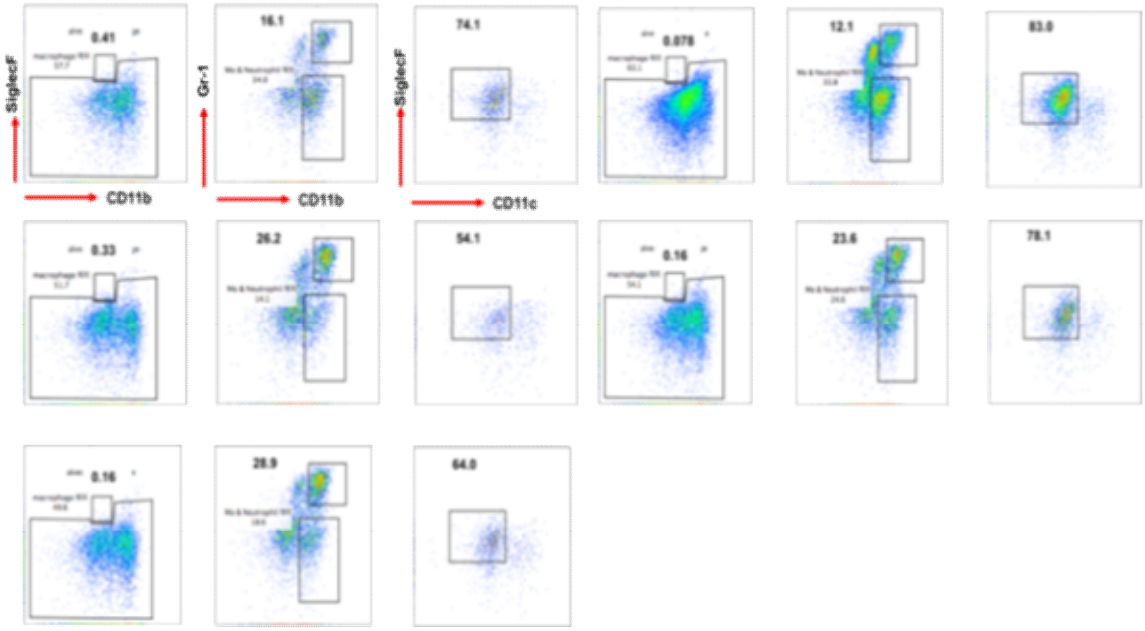


〈그림 2.105 폐의 granulocytes의 population측정〉



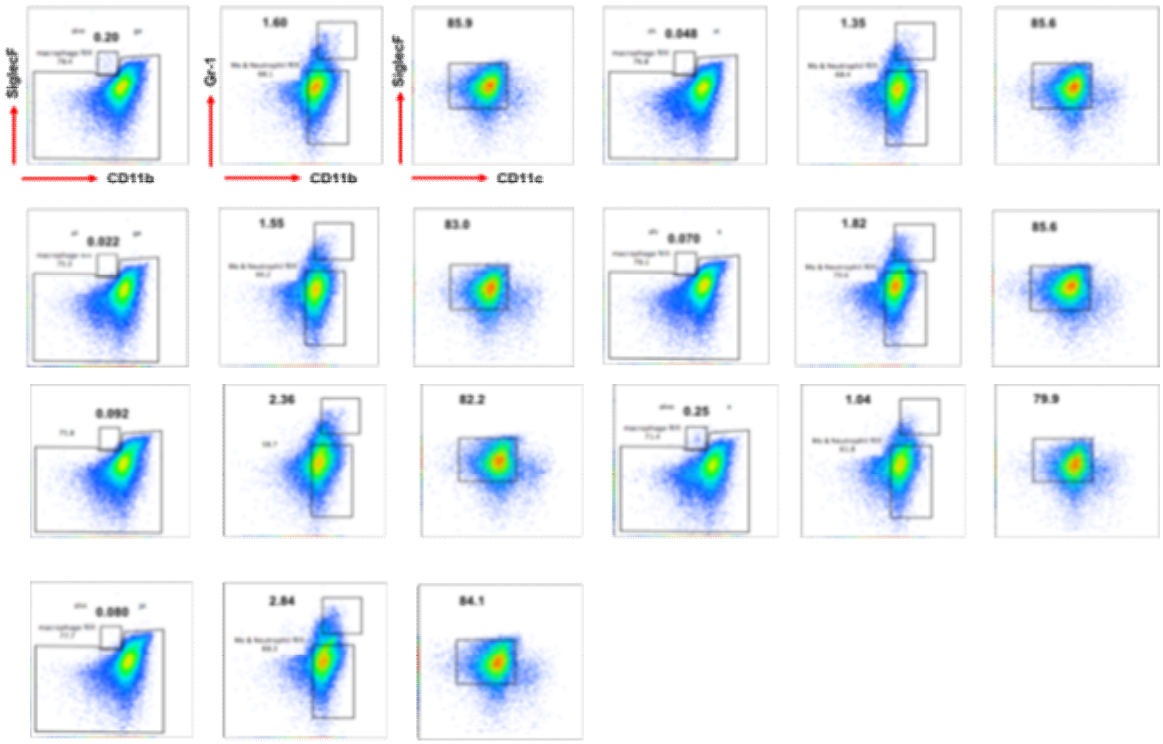
〈그림 2.106 폐의 granulocytes의 population측정〉

A + Dexa

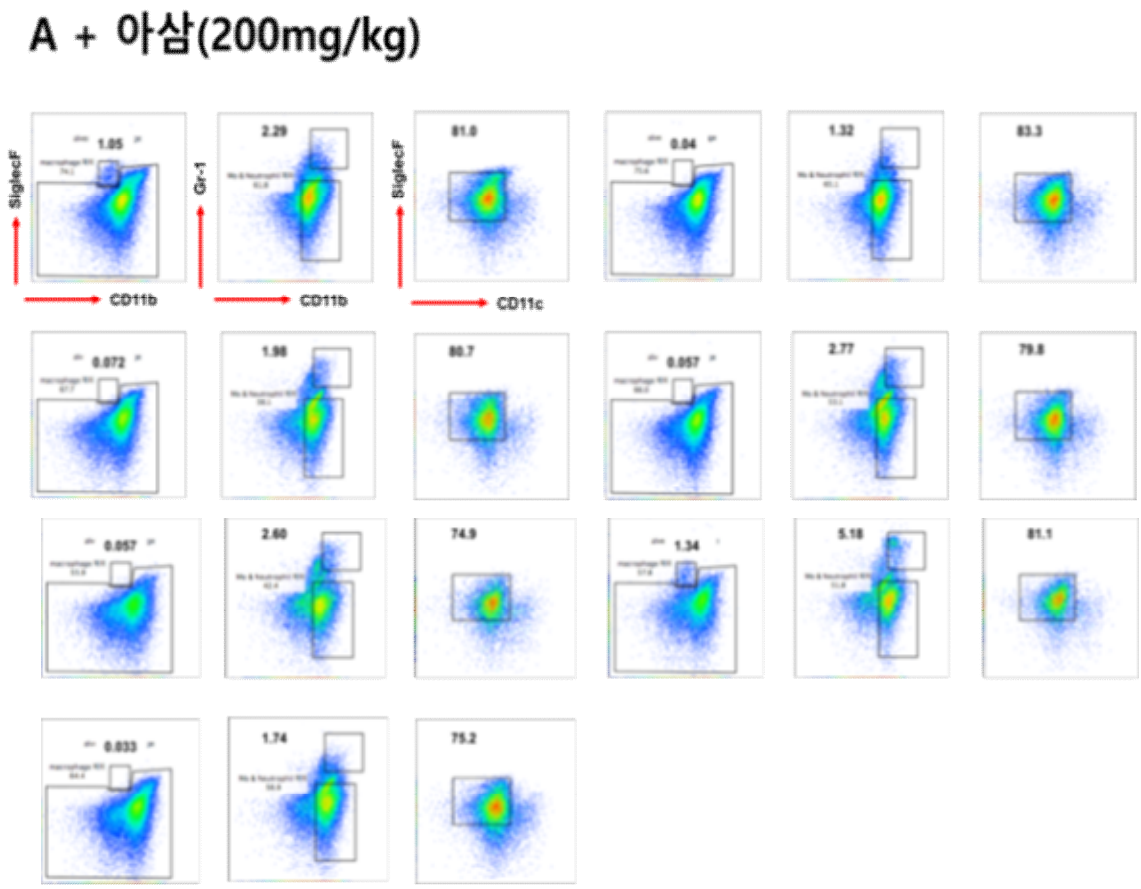


〈그림 2.107 폐의 granulocytes의 population측정〉

A + 아삼(100mg/kg)



〈그림 2.108 폐의 granulocytes의 population측정〉

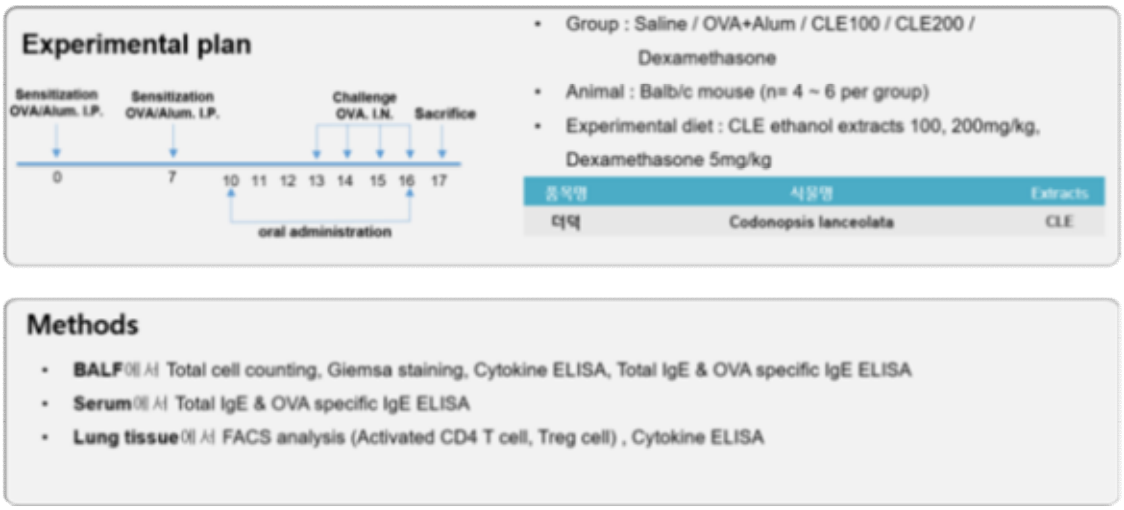


〈그림 2.109 폐의 granulocytes의 population측정〉

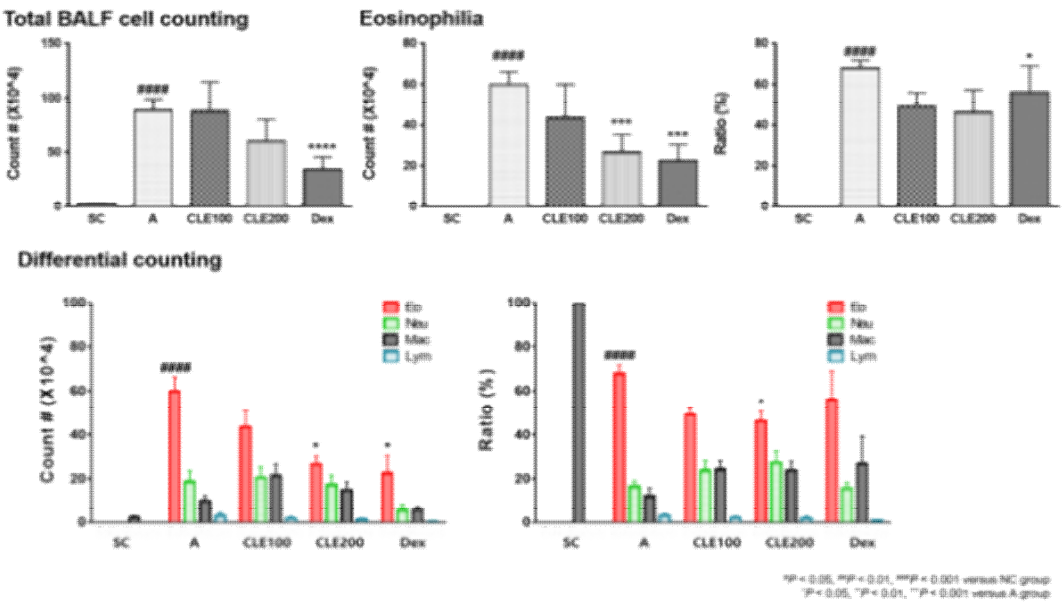
* Conclusion: 아삼의 호산구매개 과민반응을 억제하는 효과를 확인하였음. 또한 매개체인 싸이토카인(IL-4, 5, 13)의 조절능까지 확인하였으며 flowcytometry분석을 통해서 activaed CD T cell (CD4+CD25+)의 세포수 감소가 동반된다는 결과를 확인하였음. 추가적인 실험을 통해서 위 결과는 논문에 투고할 예정임.

(마) 더덕(양유) 저농도(100, 200 mg/kg)의 과민면역반응조절 동물실험

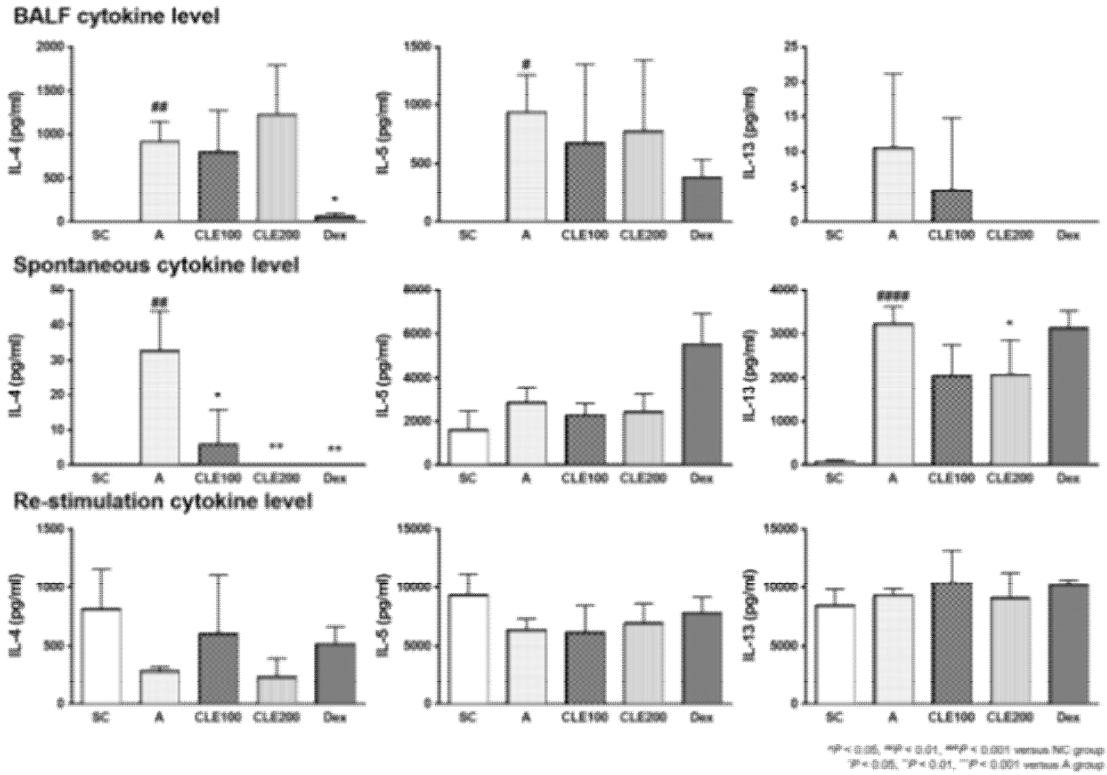
- 기존 우수 식품소재인 더덕(100, 200mg/kg)을 100ul로 경구투여 하였음.
- Dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 5mg/kg으로 100ul씩 경구투여 하였음.
- 기도내 면역세포 및 특히 호산구의 양이 증가하였고 약물에 의해 감소하였음.
- 더덕의 경우 다른 과민면역반응을 조절하는 인자들의 감소하는 경향성은 보이나 통계적 유의성은 보이지 않음.
- 경향성을 고려하려 고농도(200, 400mg/kg)로 투여하여 재실험이 필요하다고 판단됨.



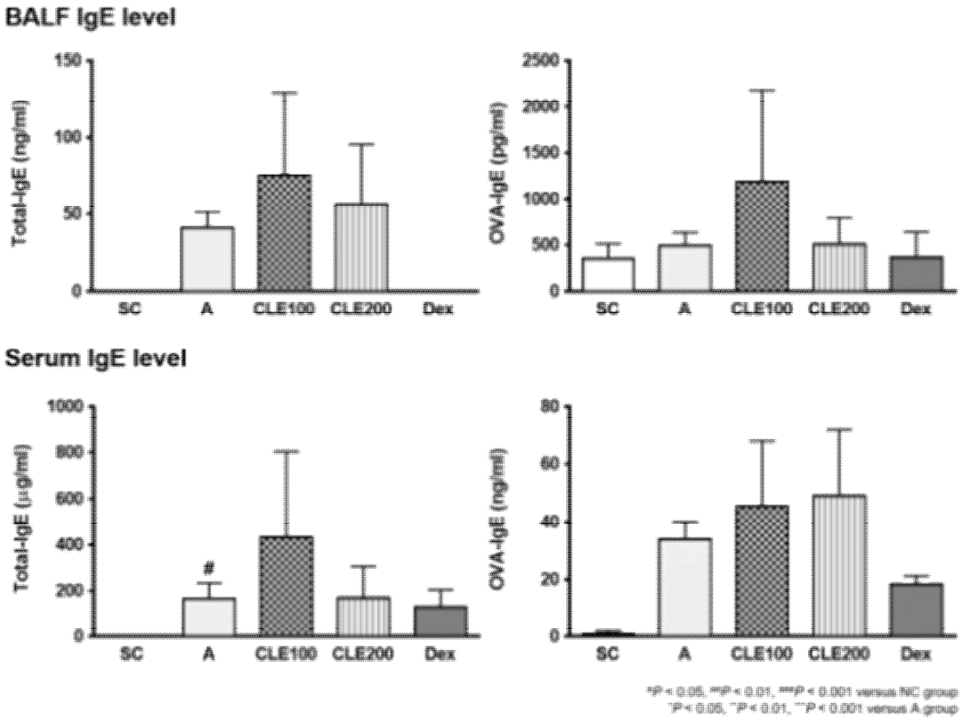
〈그림 2.110 과민면역유도 및 더덕의 투여 일정〉



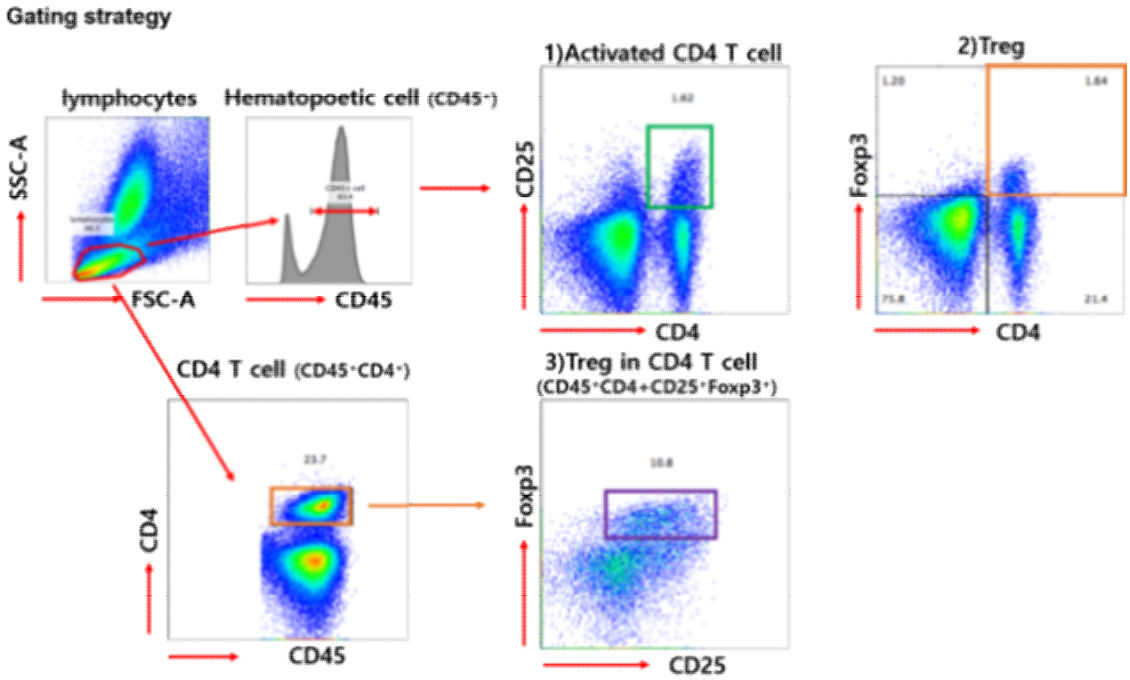
〈그림 2.111 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수와 비율〉



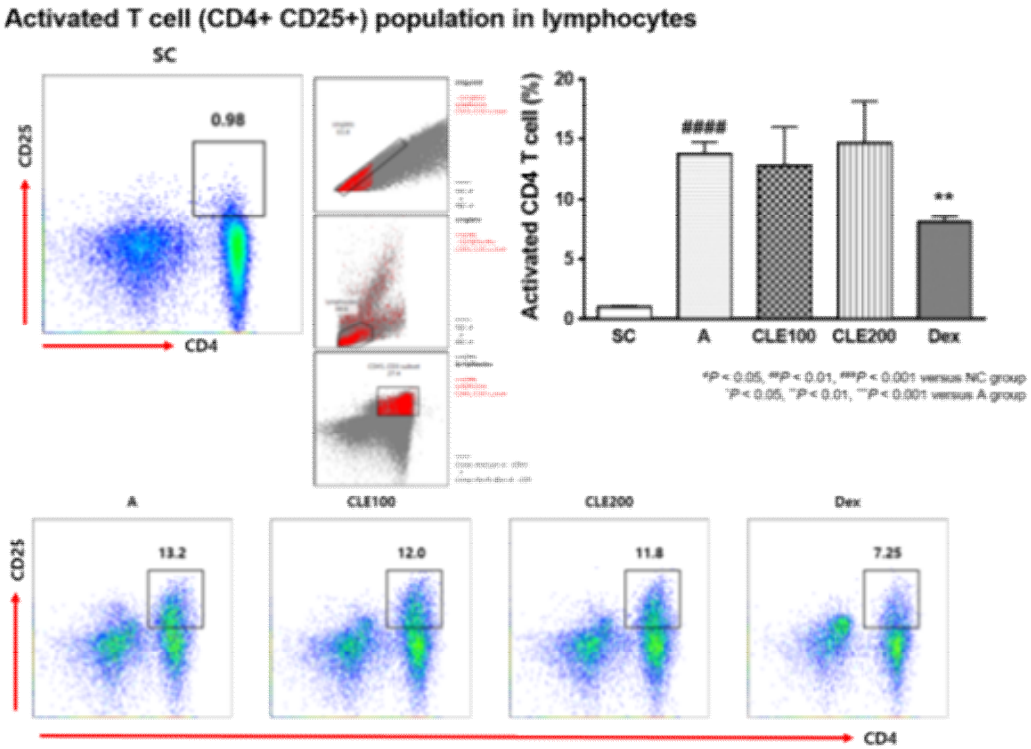
〈그림 2.112 기도세척액과 폐 세포에서의 염증매개체의 수준측정〉



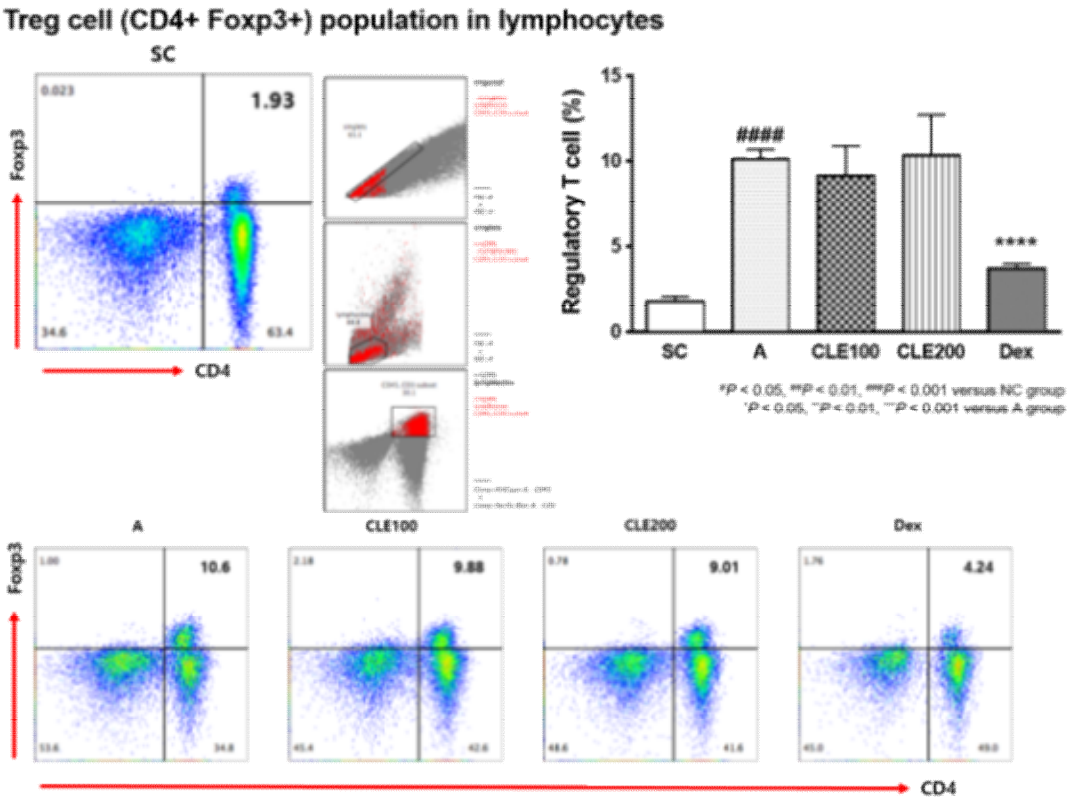
〈그림 2.113 기도세척액과 혈청 내의 Total IgE 와 OVA-IgE의 수준측정〉



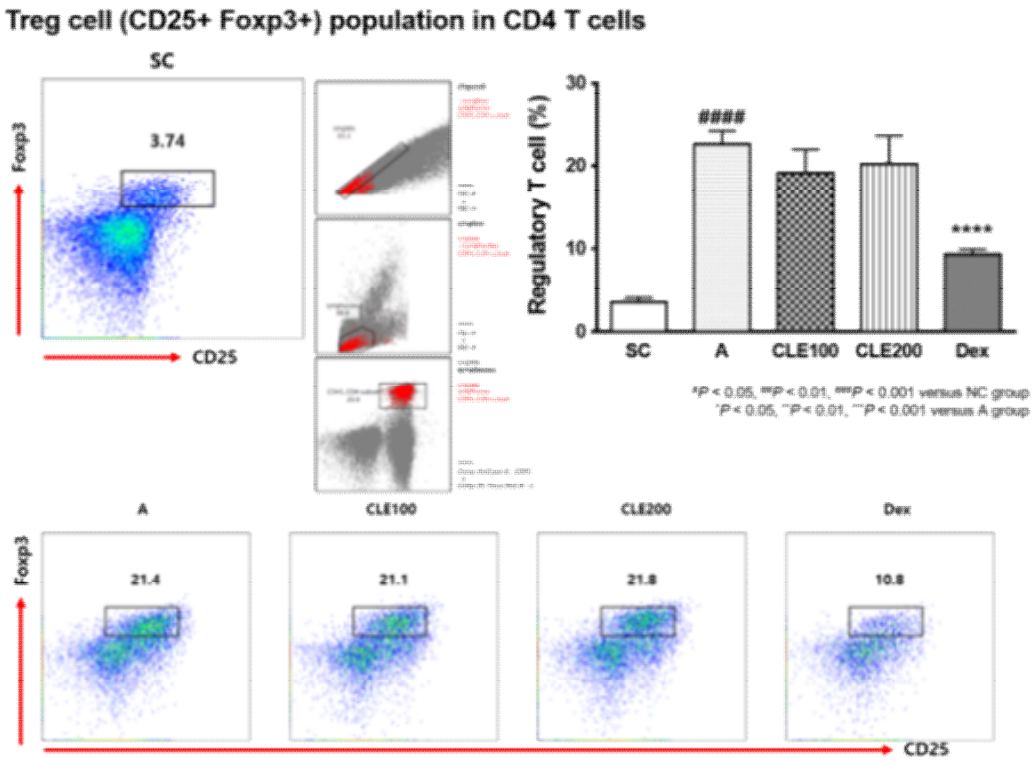
〈그림 2.114 Flowcytometry의 Gating strategy〉



〈그림 2.115 Lymphocytes의 activated CD4 T cell population 측정〉



〈그림 2.116 Lymphocytes의 Treg cell population 측정〉



〈그림 2.117 CD4 T cell의 Treg cell population 측정〉

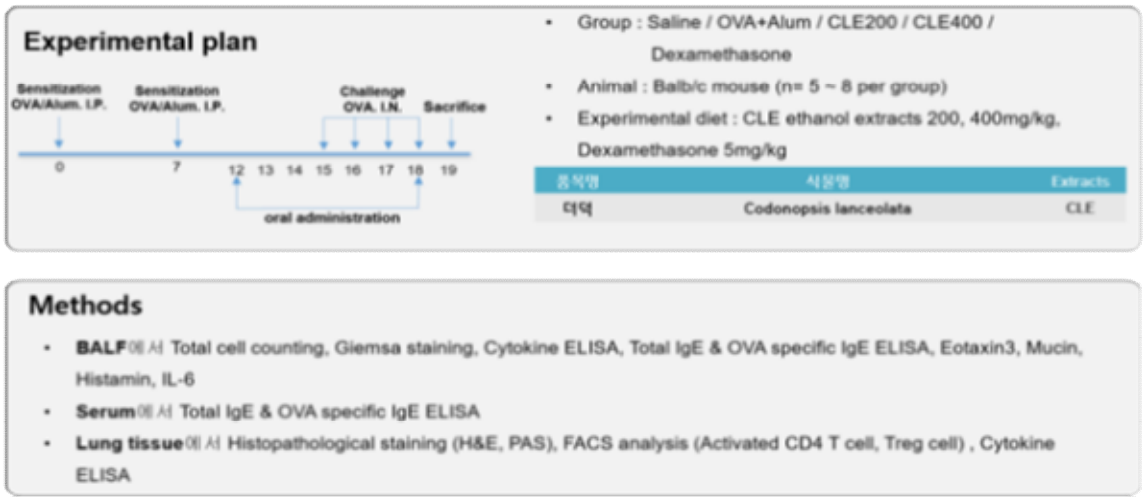
* Conclusion

- 더덕(양유)은 Immunogenic index I과 Tolerogenic index II에서 높은 수치를 보였음. 폐기도 세척액내

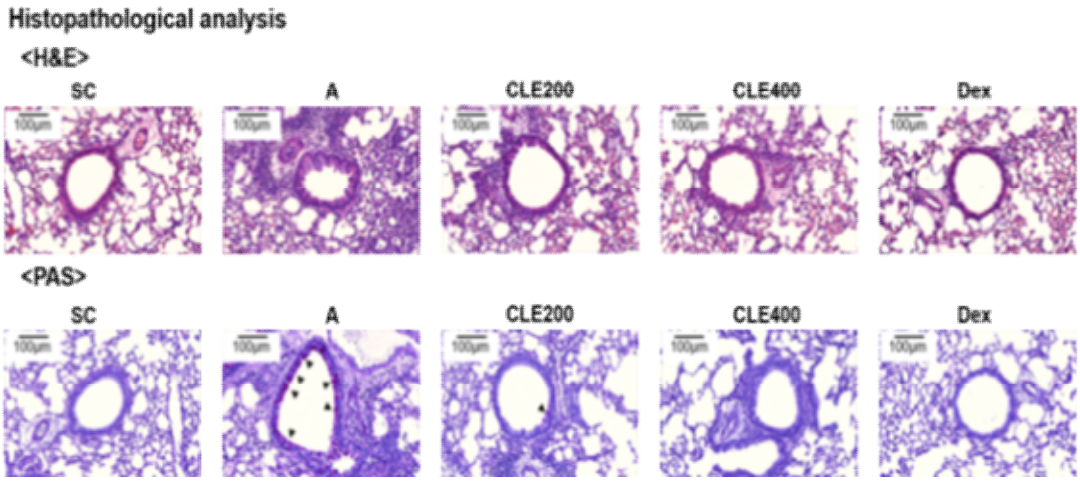
호산구의 수가 감소하였으나, 폐기도 세척액과 폐조직에서 염증매개체(IL-4, 5, 13)는 감소하지 않았음. 세포실험에서 예상된 바와 같이 과민면역 동물실험에서 뚜렷한 효과를 보이지 않음. 하지만 일부지표에서 효과가 있었고 전통적으로 과민면역 완화에 사용되었으므로, 농도를 높여 반복 실험을 진행하였음.

(바) 더덕(양유)고농도(200, 400 mg/kg)의과민면역반응조절동물실험

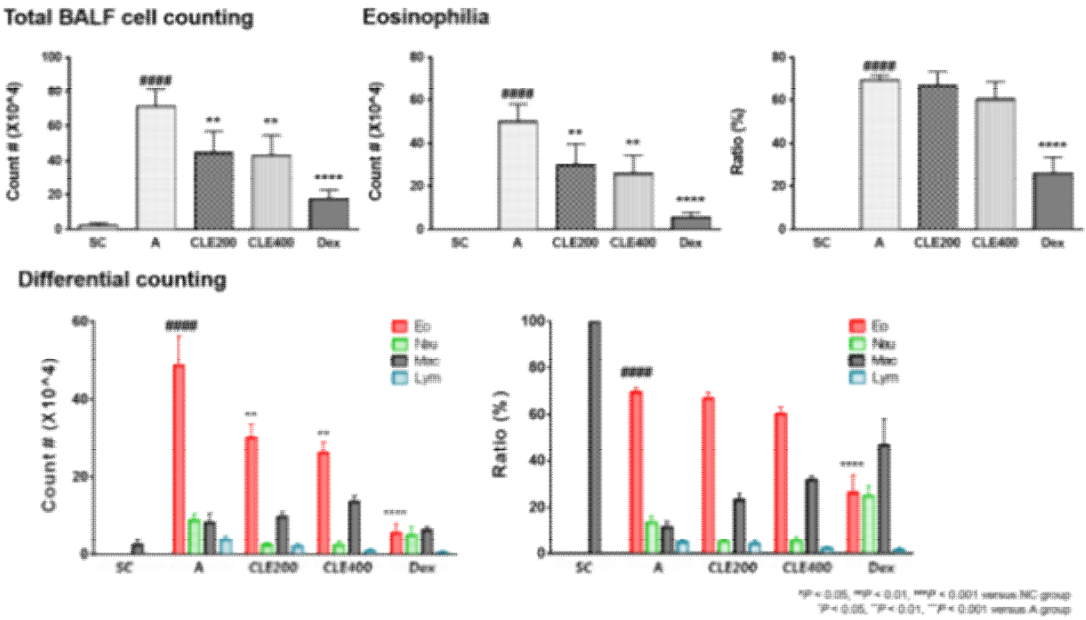
- 기존 우수 식품소재인 더덕(200, 400mg/kg)을 100ul로 경구투여 하였음.
- Dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 5mg/kg으로 100ul씩 경구투여 하였음.
- 기도내 면역세포 및 특히 호산구의 양이 증가하였고 약물에 의해 감소하였음
- 기도세척액 내 싸이토카인 (IL-4, 5, 6)의 양이 유도군에 비해 감소되었음.
- 기도세척액 내 Total-IgE 양이 감소하였으며 혈청내 Total-IgE 양은 감소하는 경향성은 보였으나 통계적으로 유의성이 나타나지 않았음
- 폐의 activated CD4 T cell의 population을 flowcytometry로 분석하였을 때 더덕 투여군에서 감소하는 유의성을 나타냄.
- 전체적인 경향성을 고려하였을 때 과민면역완화에 적합하다고 판단함.



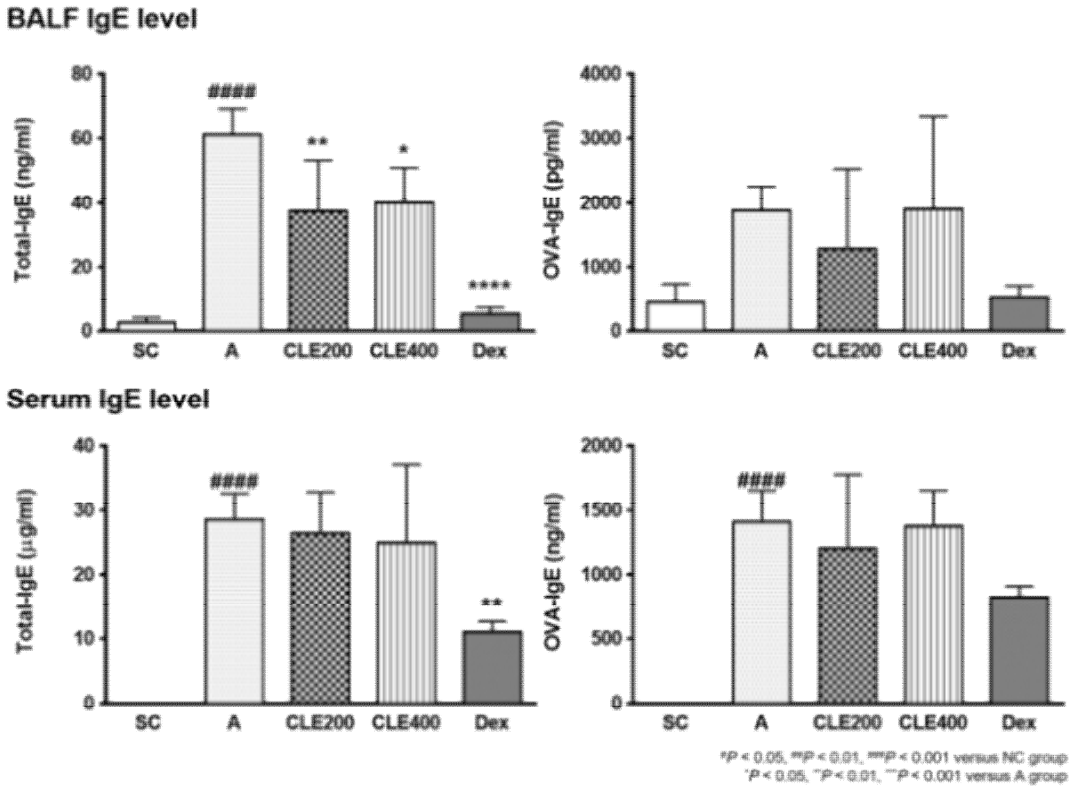
〈그림 2.118 과민면역유도 및 더덕의 투여일정〉



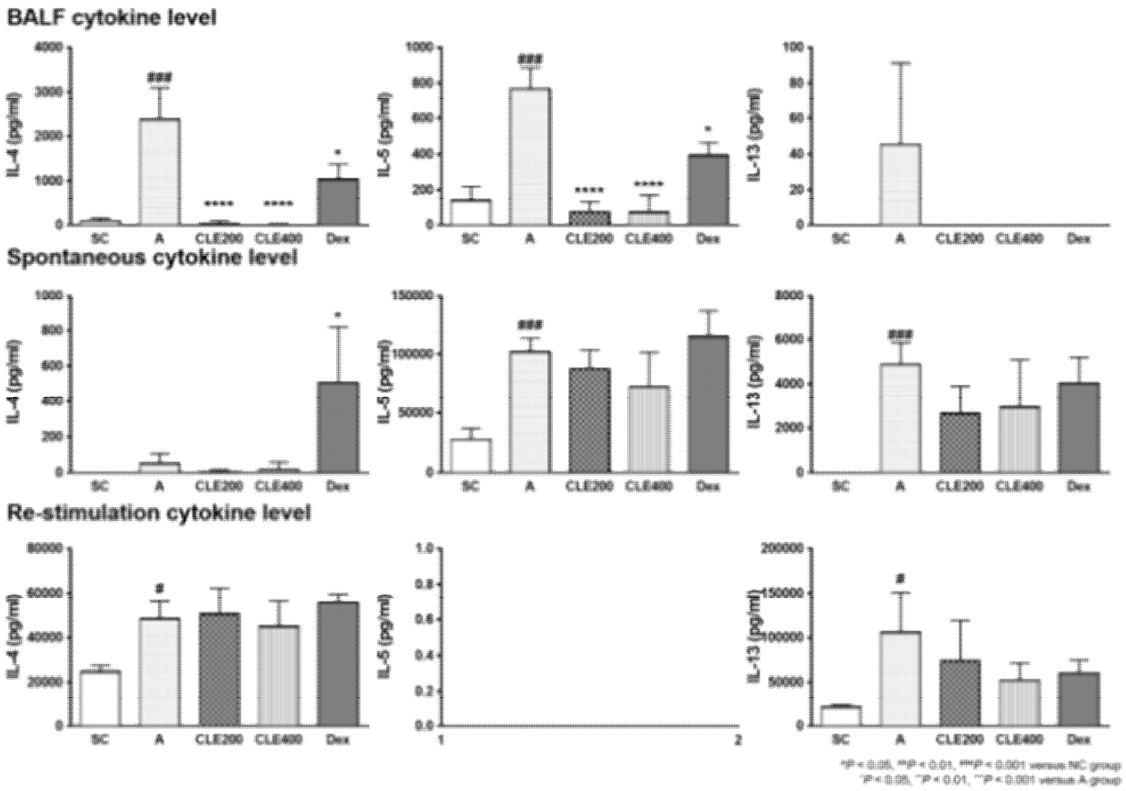
〈그림 2.119 폐조직의 H&E 및 PAS 염색〉

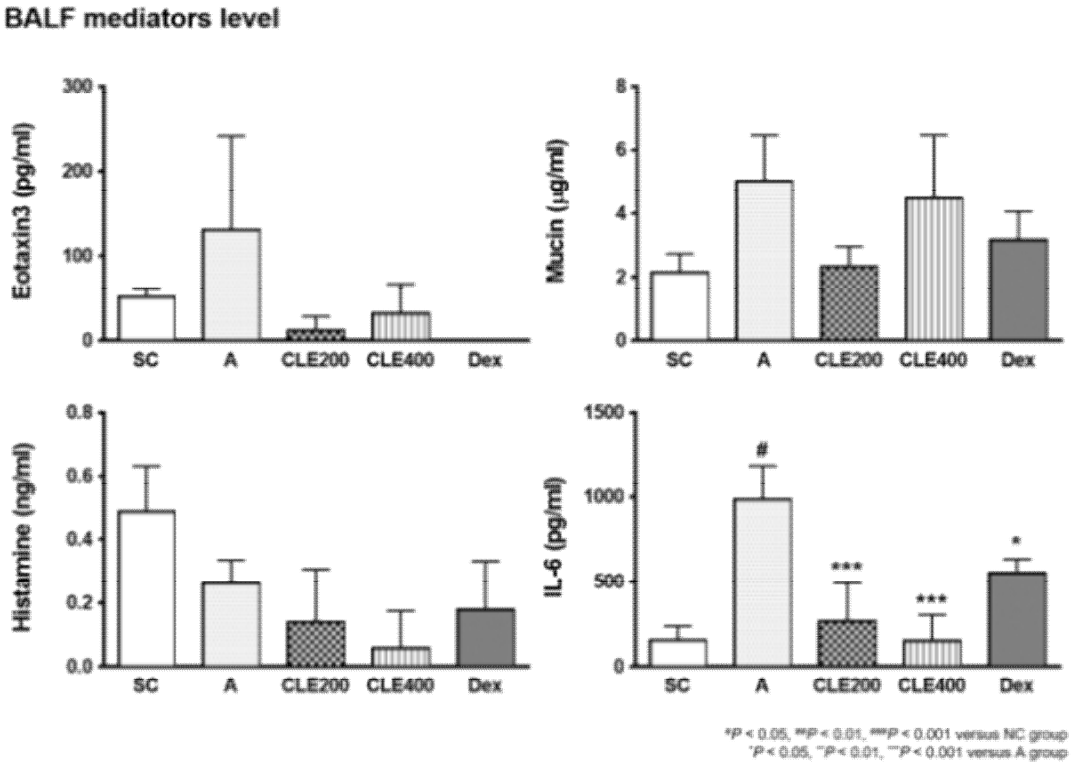


〈그림 2.120 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수와 비율〉

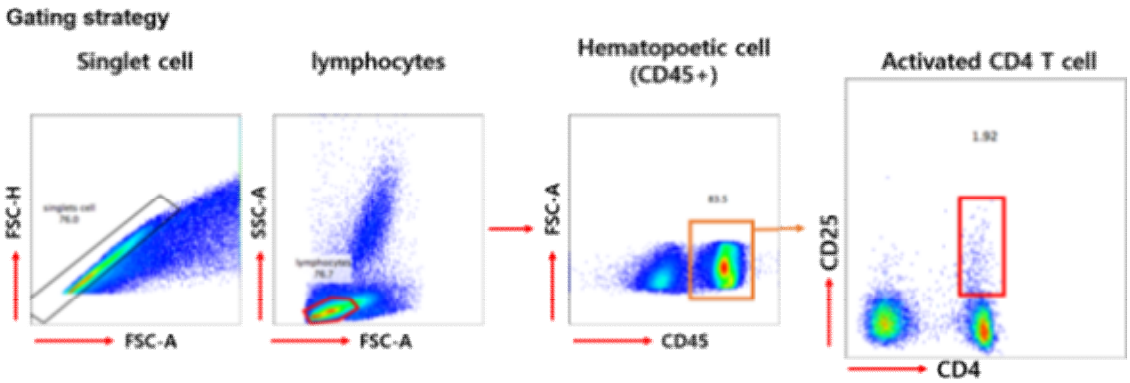


〈그림 2.121 기도세척액과 혈청 내의 Total IgE 와 OVA-IgE의 수준측정〉

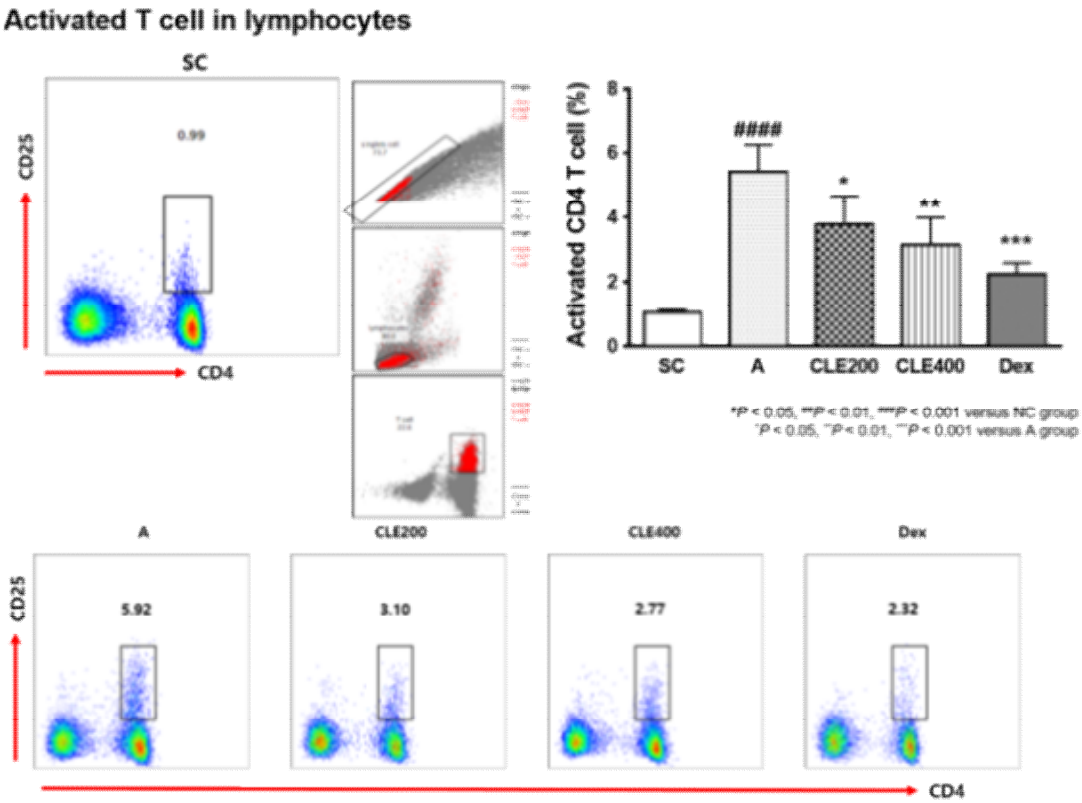




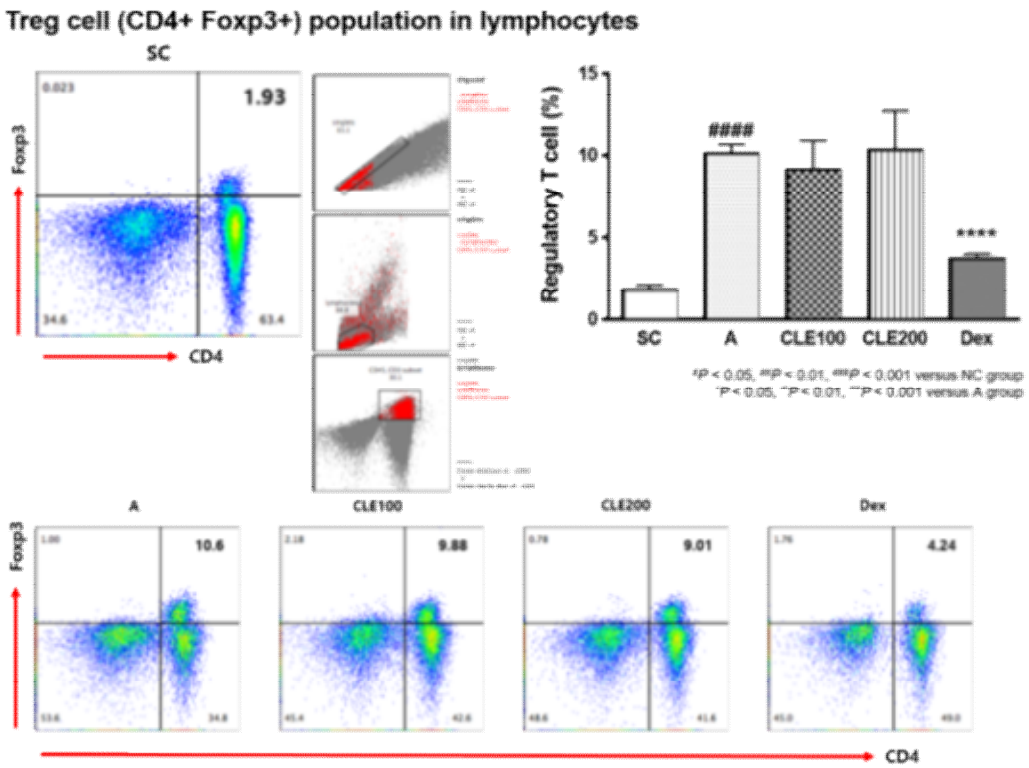
〈그림 2.122 기도세척액과 폐 세포에서의 염증매개체의 수준측정〉



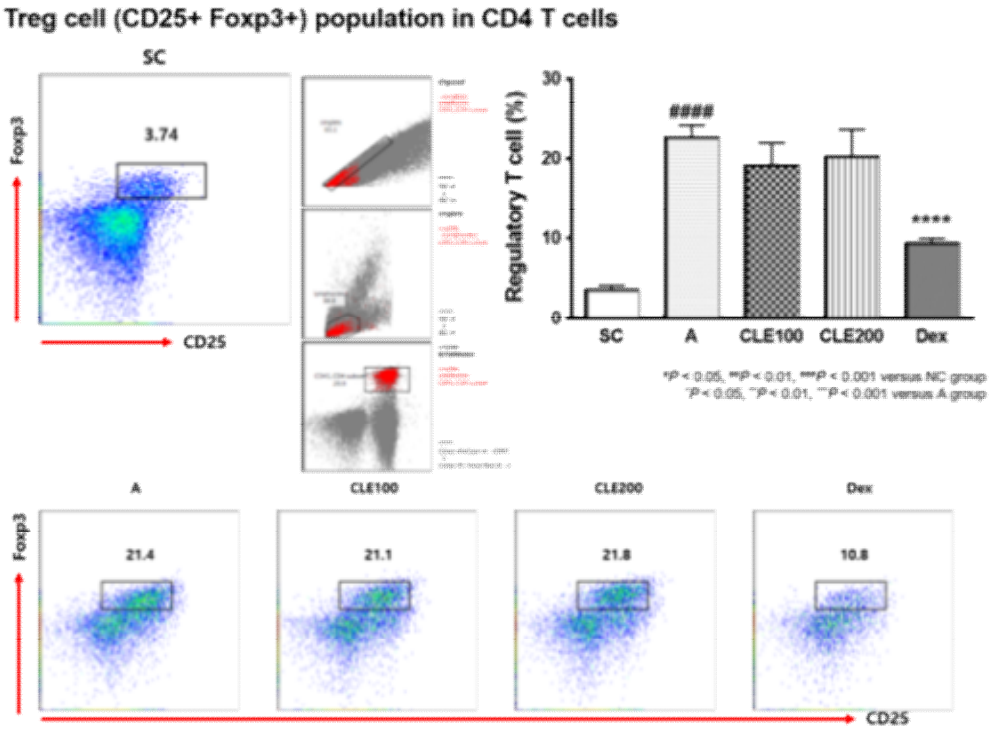
〈그림 2.123 Flowcytometry의 Gating strategy〉



〈그림 2.124 Lymphocytes의 activated CD4 T cell population 측정〉



〈그림 2.125 Lymphocytes의 Treg cell population 측정〉



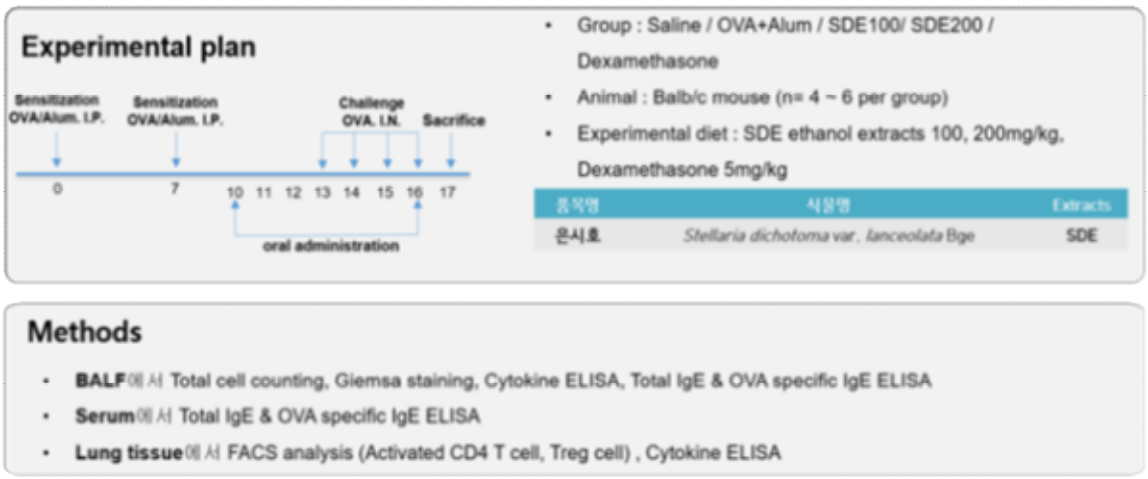
〈그림 2.126 CD4 T cell의 Treg cell population 측정〉

* Conclusion

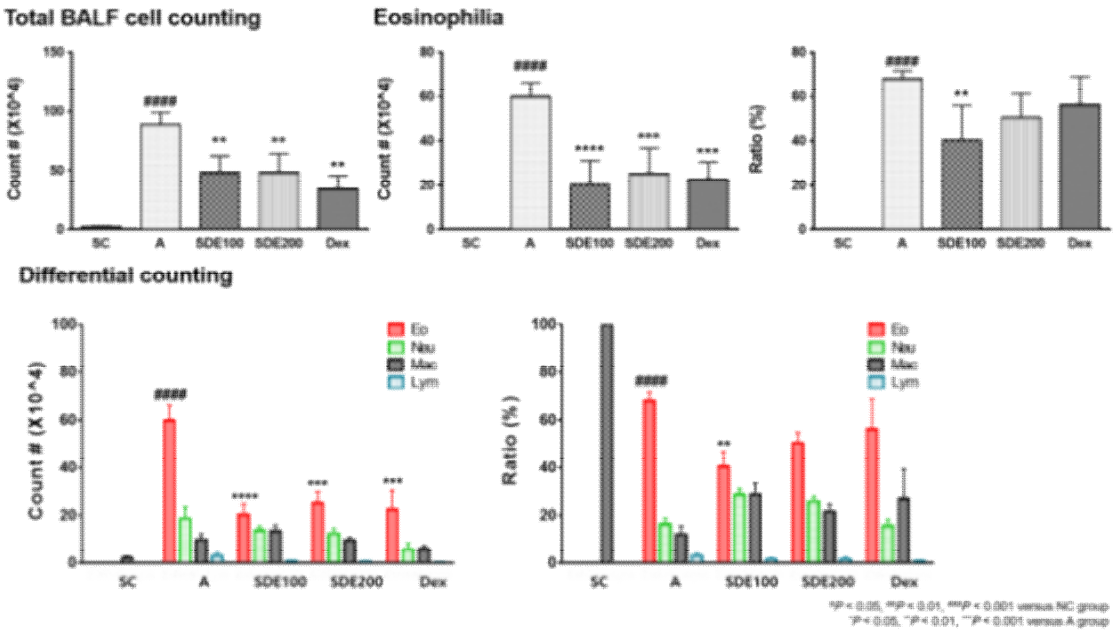
- 더덕(양유) 저농도 투여 실험결과 완만한 과민면역 조절능이 관찰되었음. 더덕의 전통의학적 효과를 고려하여 고농도로 투여한 결과 폐기도 세척액내 면역세포와 호산구의 수가 감소하고 염증매개체(IL-4, 5, 6, 13, eotaxin3, histamine)가 감소하는 것을 확인 할 수 있음. 또한 activated T cell의 population의 감소가 확인되었음.

(사) 은시호저농도(100, 200 mg/kg)의 과민면역반응조절 동물실험

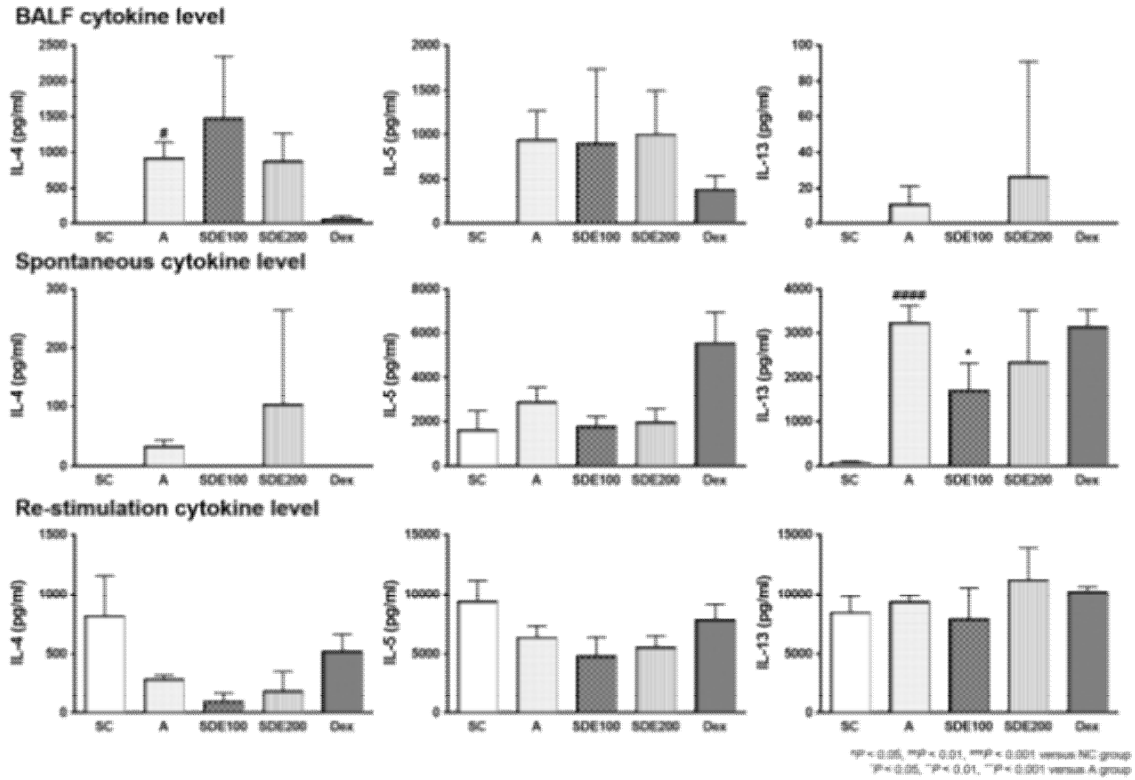
- 기존 우수 식품소재인 은시호(100, 200mg/kg)을 100ul로 경구투여 하였음.
- Dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 5mg/kg으로 100ul씩 경구투여 하였음.
- 기도내 면역세포 및 특히 호산구의 양이 증가하였고 약물에 의해 감소하였음.
- 은시호의 경우 다른 과민면역반응을 조절하는 인자들의 감소하는 경향성은 보이나 통계적 유의성은 보이지 않음.
- 경향성을 고려하려 고농도(200, 400mg/kg)로 투여하여 재실험이 필요하다고 판단됨.



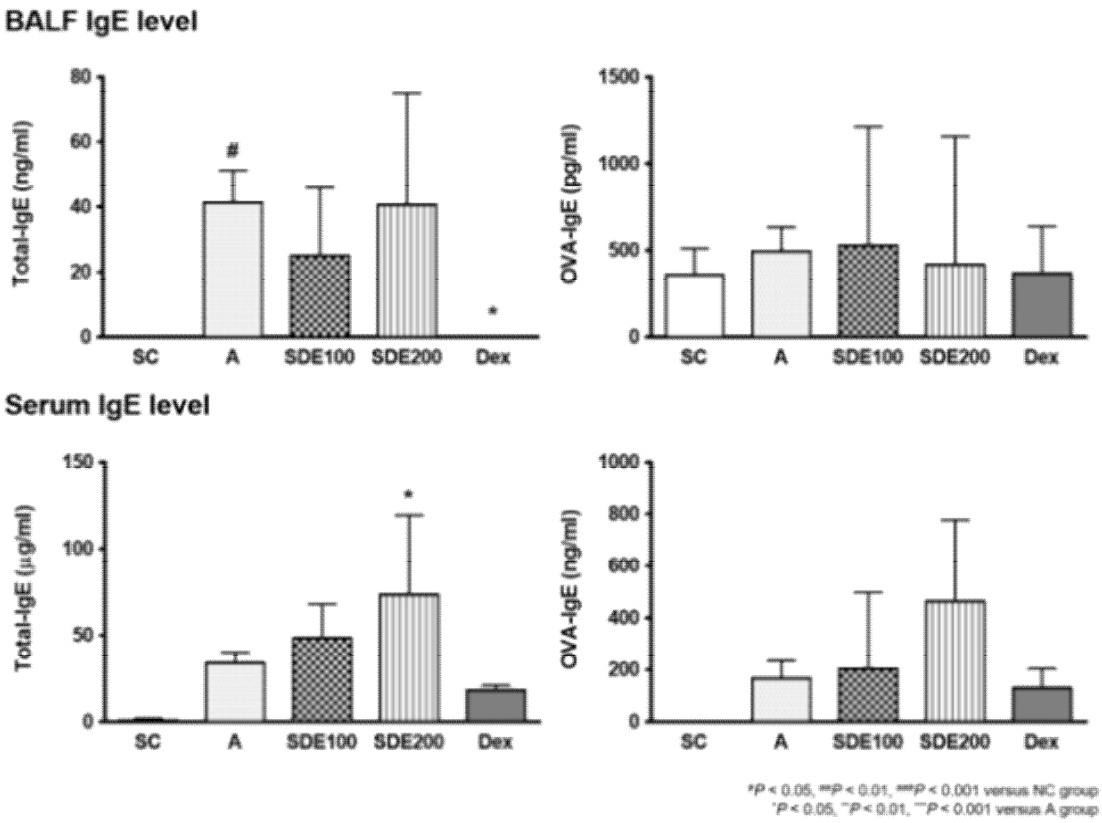
〈그림 2.127 과민면역유도 및 은시호의 투여 일정〉



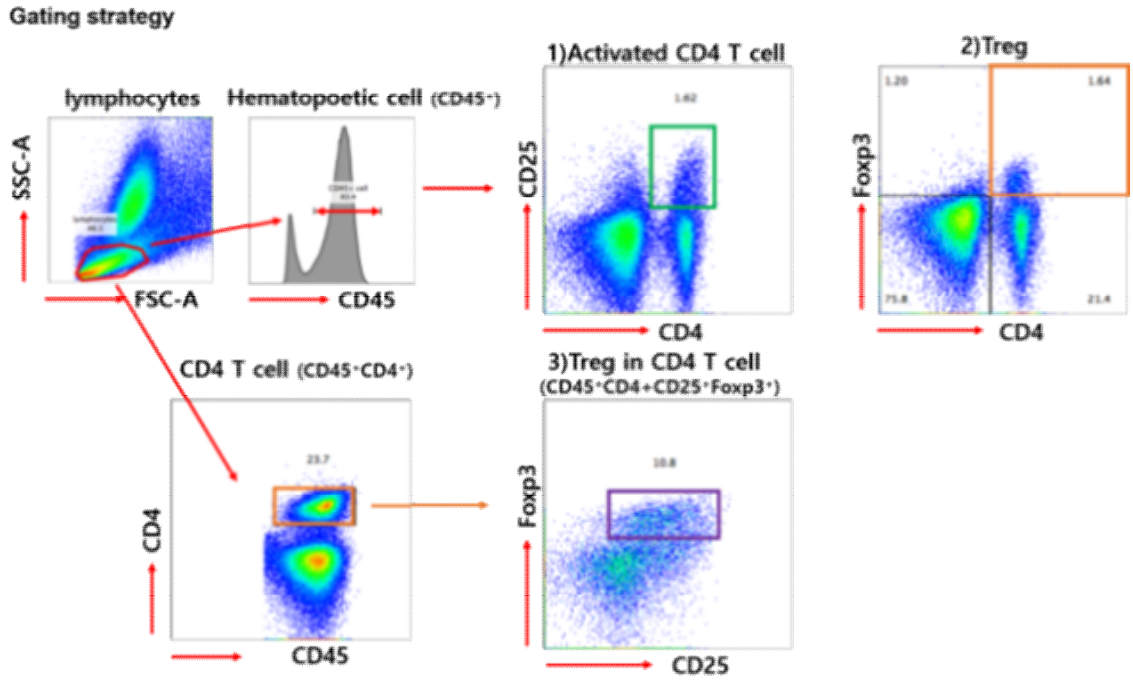
〈그림 2.128 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수와 비율〉



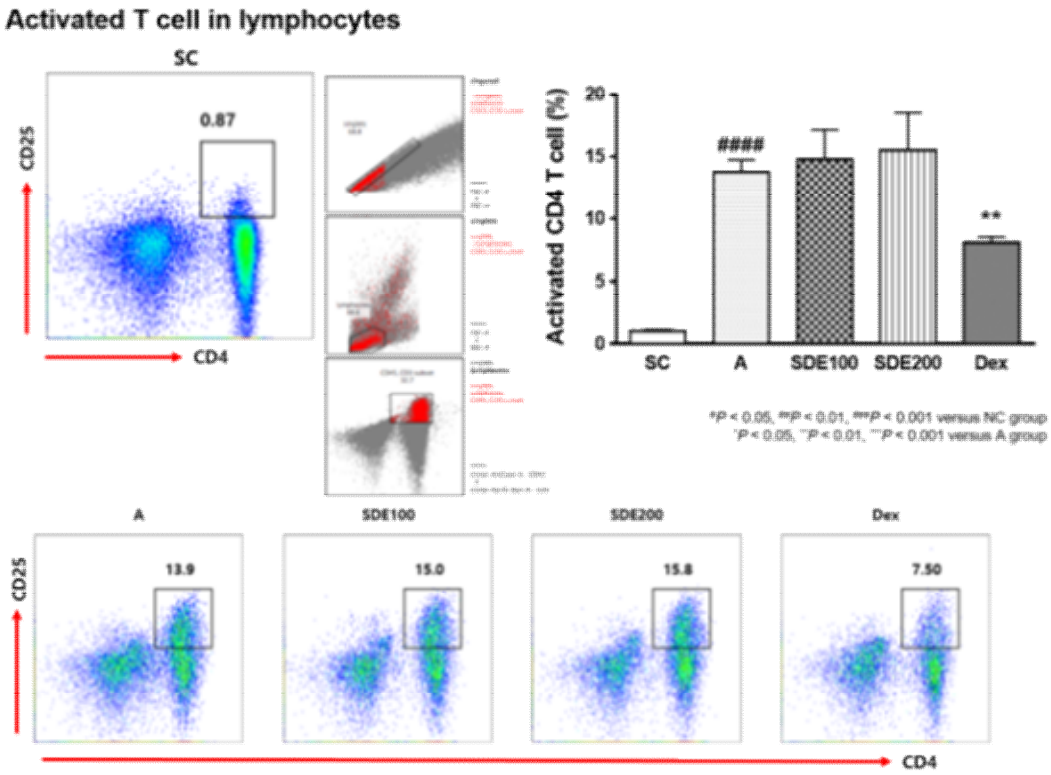
〈그림 2.129 기도세척액과 폐 세포에서의 염증매개체의 수준측정〉



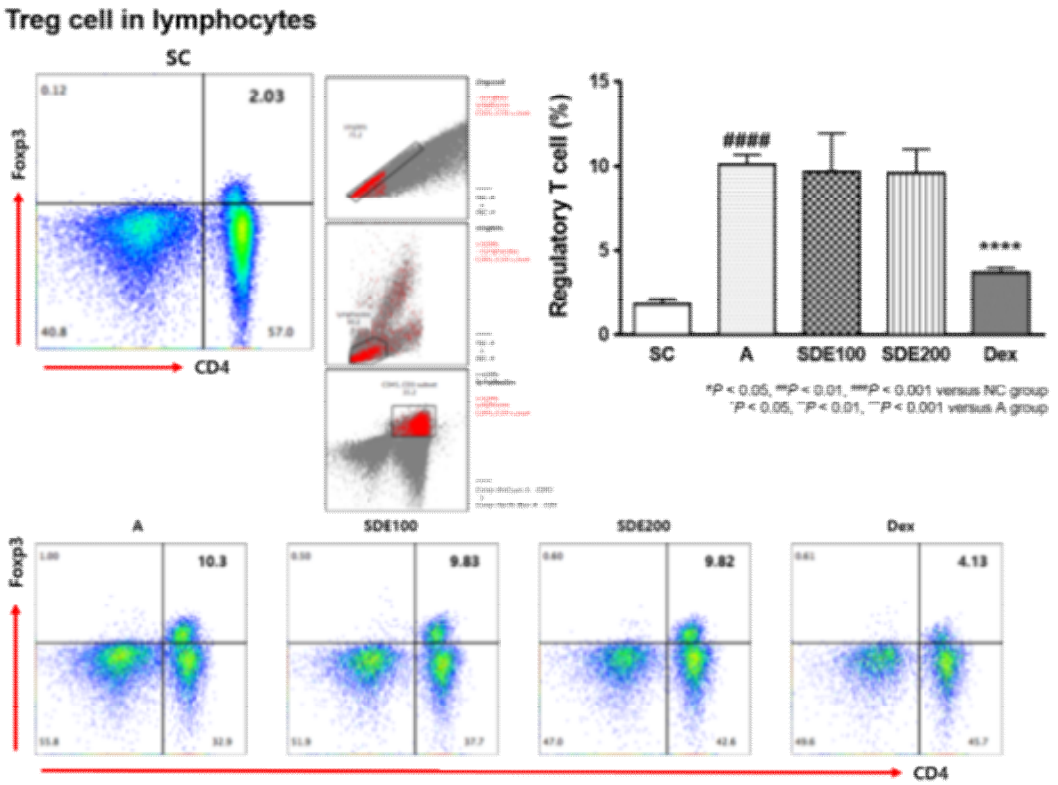
〈그림 2.130 기도세척액과 혈청 내의 Total IgE 와 OVA-IgE의 수준측정〉



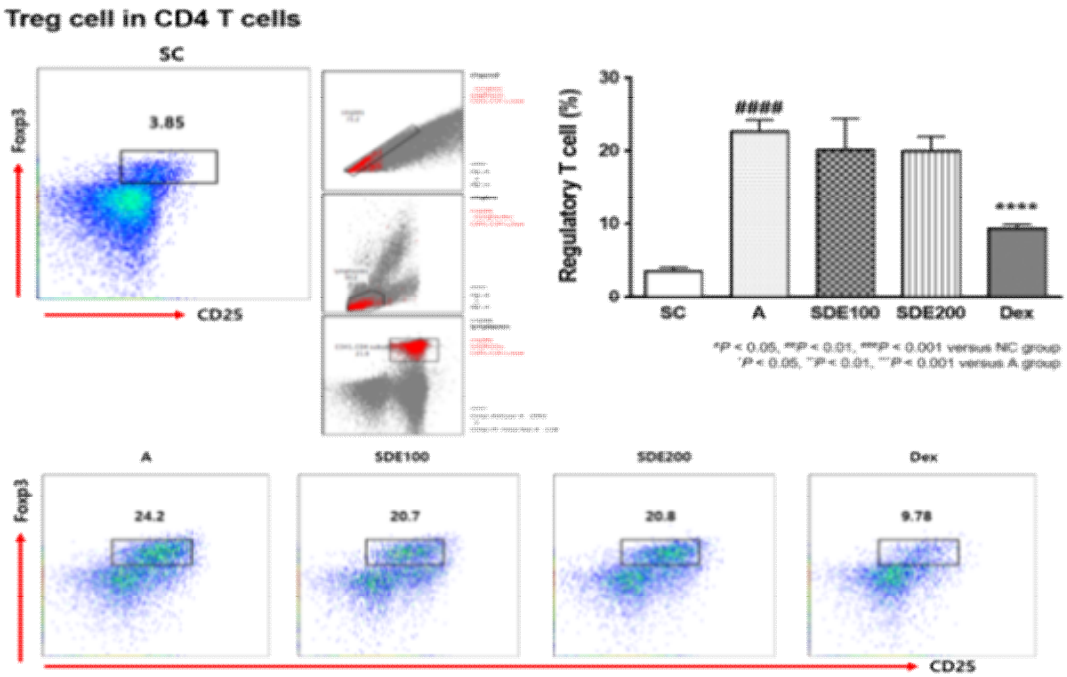
〈그림 2.131 Flowcytometry의 Gating strategy〉



〈그림 2.132 Lymphocytes의 activated CD4 T cell population 측정〉



〈그림 2.133 Lymphocytes의 Treg cell population 측정〉



〈그림 2.134 CD4 T cell의 Treg cell population 측정〉

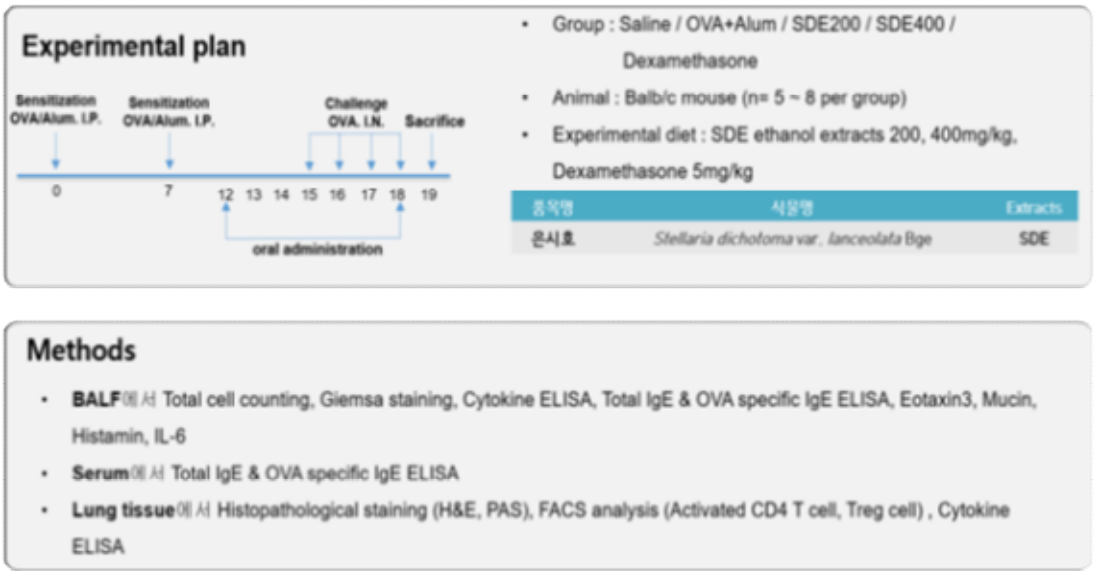
* Conclusion

- 은시호는 Tolerogenic Index I과 II에서 Immunogenic index에 비해 상대적으로 높은 수치를 보였음. 폐기도 세척액내 면역세포와 호산구의 수가 감소하였음. 세포실험 결과 tolerogenic DC로 유도하는 면

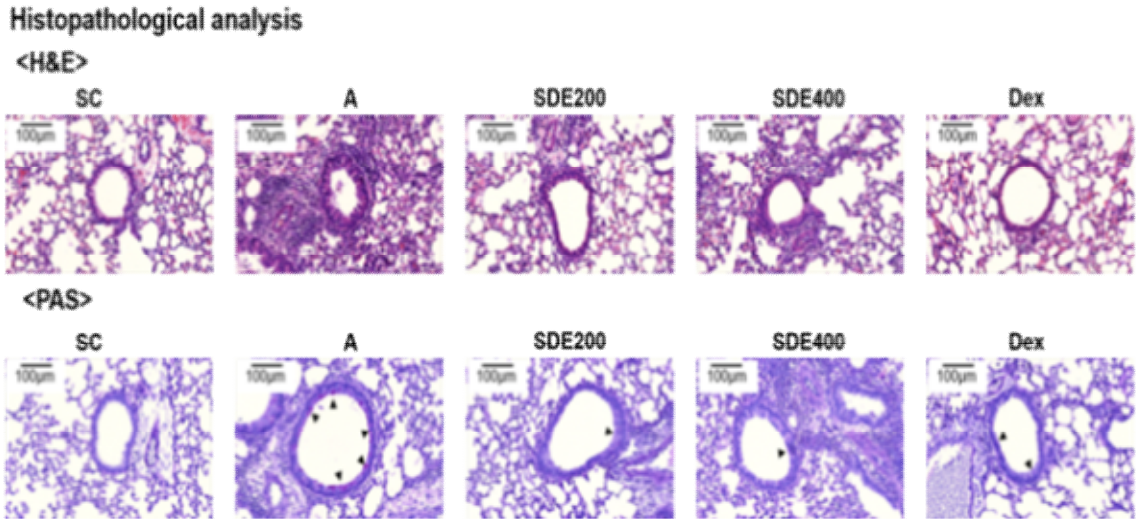
역능이 뚜렷하지 않는 것과 일치하게 동물실험 과민면역능 조절능 역시 일부 지표에서만 관찰되었음. 따라서 농도를 높여 반복 실험을 진행하였음.

(아) 은시호고농도(200, 400 mg/kg)의과민면역반응조절동물실험

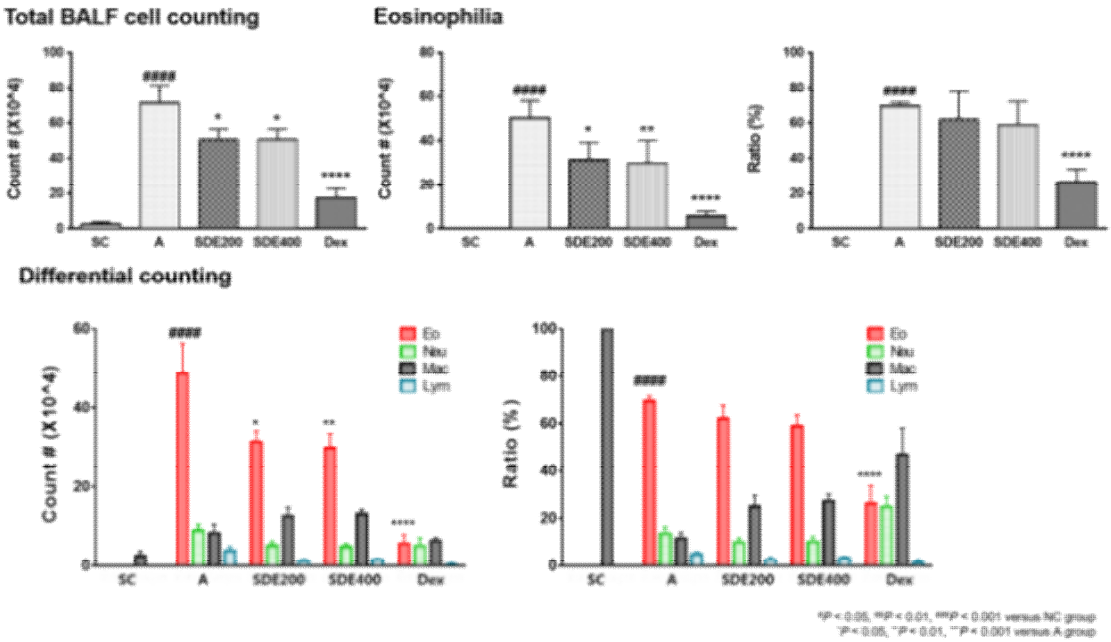
- 기존 우수 식품소재인 더덕(200, 400mg/kg)을 100ul로 경구투여 하였음.
- Dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 5mg/kg으로 100ul씩 경구투여 하였음.
- 기도내 면역세포 및 특히 호산구의 양이 증가하였고 약물에 의해 감소하였음.
- 기도세척액 내 Total-IgE와 혈청내 Total-IgE 양은 감소하는 경향성은 보였으나 통계적으로 유의성이 나타나지 않았음.
- 기도세척액 내 싸이토카인 (IL-4, 5, 6)의 양이 유도군에 비해 감소되었음.
- 전체적인 경향성을 고려하였을 때 과민면역완화에 적합하다고 판단함.



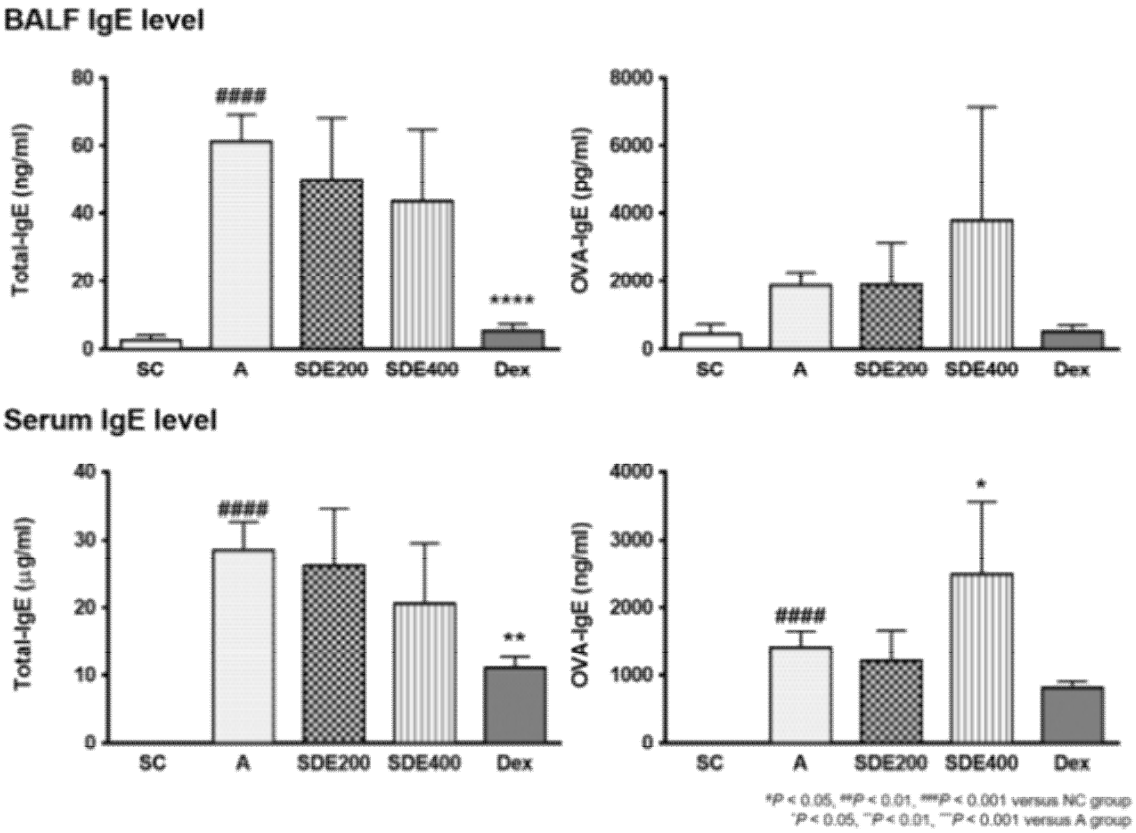
〈그림 2.135 과민면역유도 및 은시호의 투여일정〉



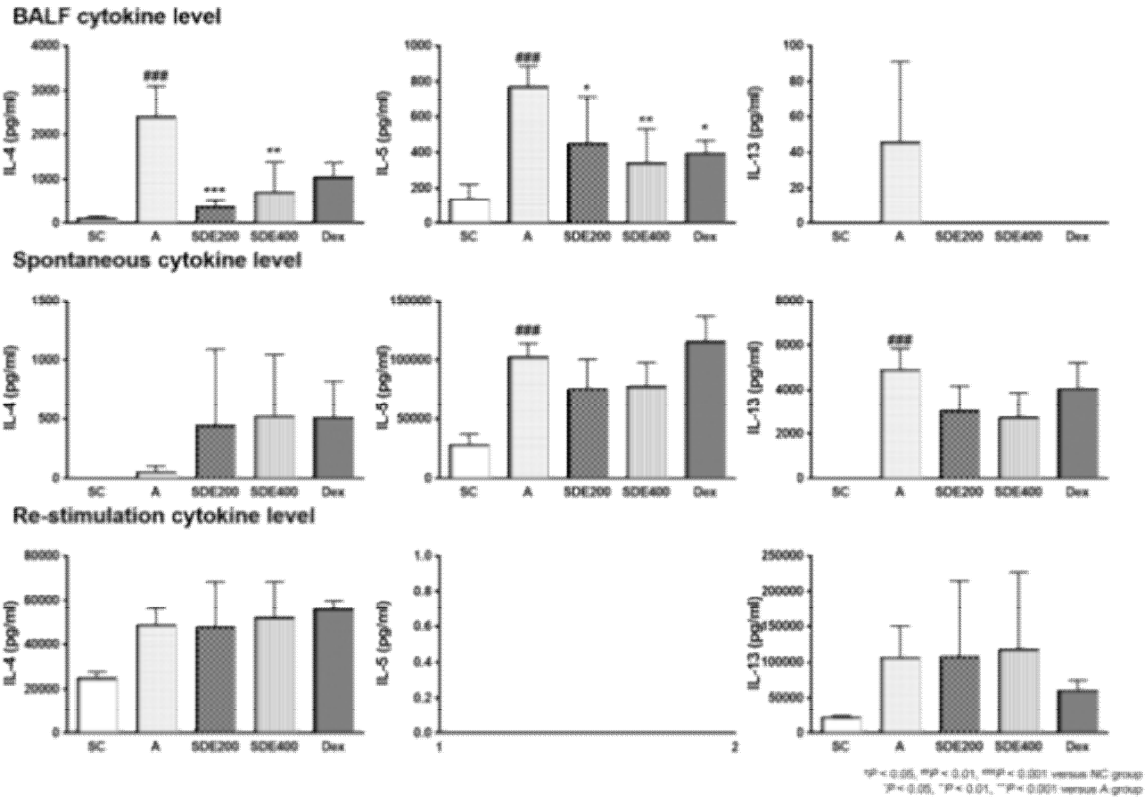
〈그림 2.136 폐조직의 H&E 및 PAS 염색〉



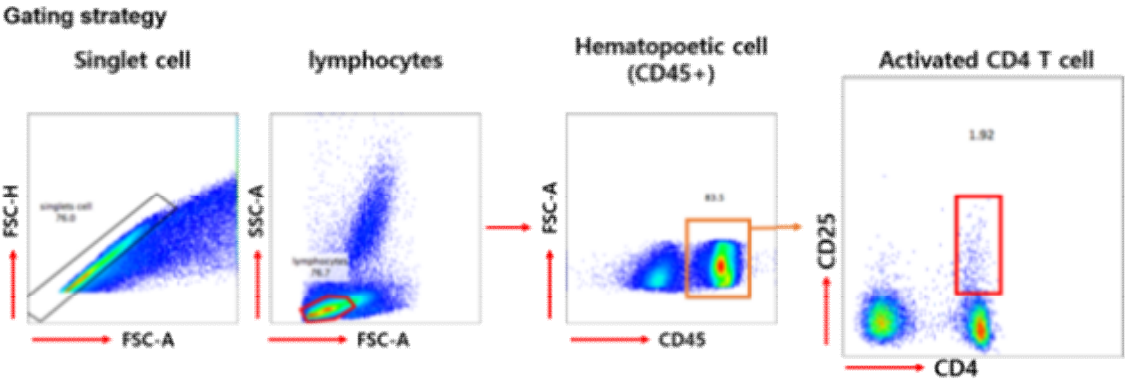
〈그림 2.137 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수와 비율〉



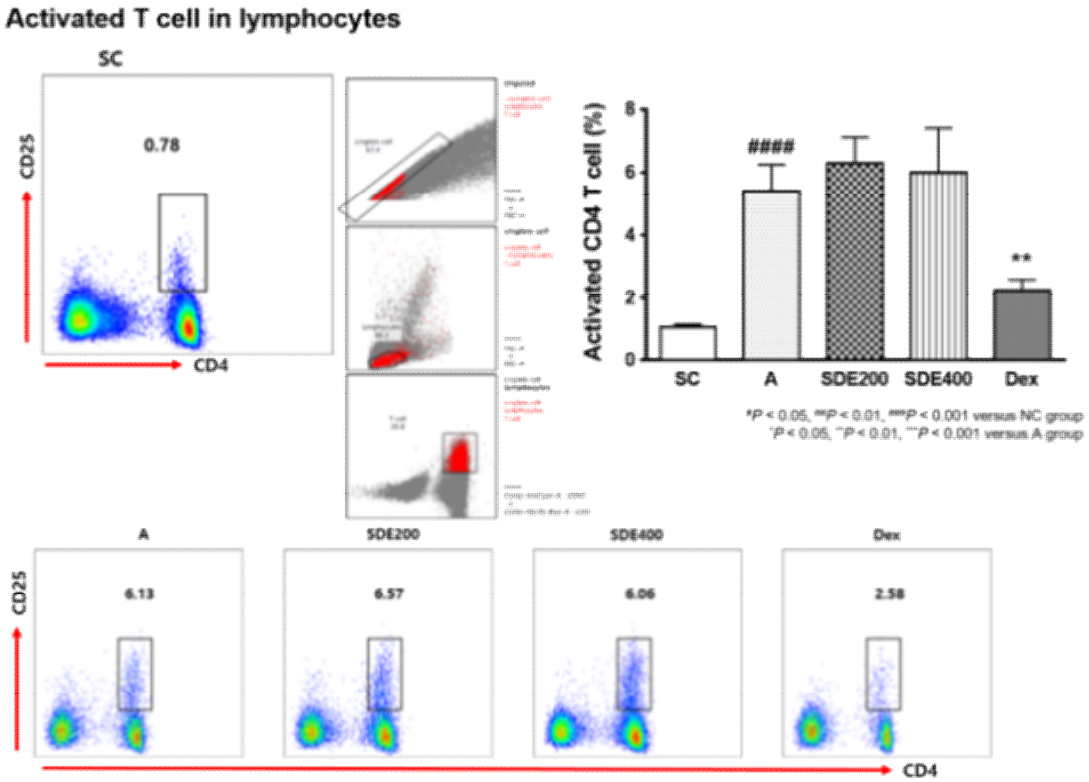
〈그림 2.138 기도세척액과 혈청 내의 Total IgE 와 OVA-IgE의 수준측정〉



〈그림 2.139 기도세척액과 폐 세포에서의 염증매개체의 수준측정〉



〈그림 2.140 Flowcytometry의 Gating strategy〉



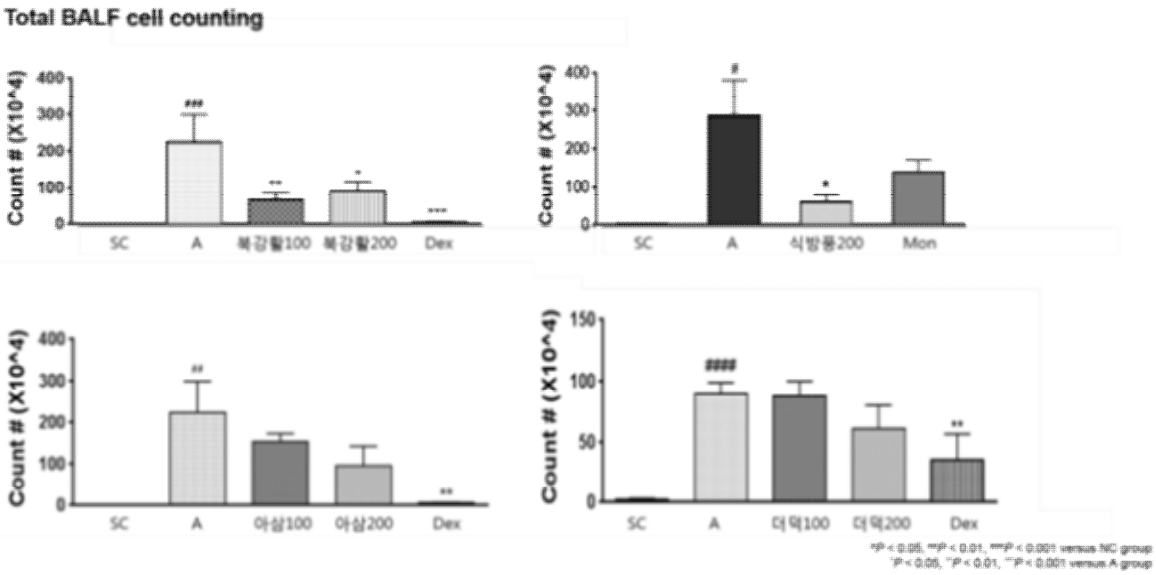
〈그림 2.141 Lymphocytes의 activated CD4 T cell population 측정〉

* Conclusion

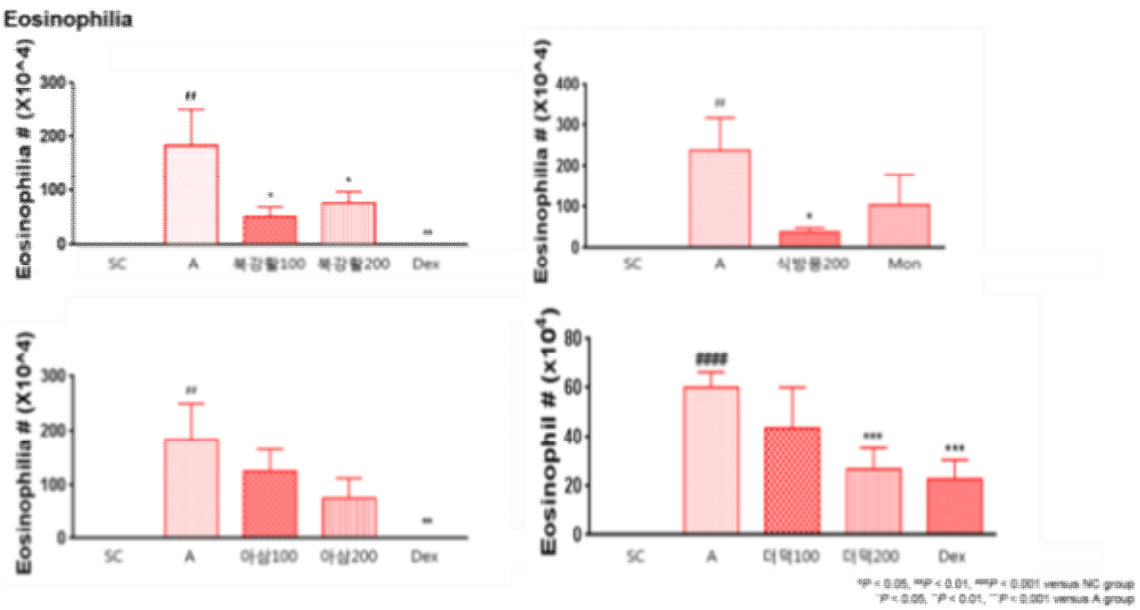
- 고농도의 은시호 투여 결과 저농도 대비 뚜렸한 과민면역 완화효과를 확인하였음. 구체적으로 폐기도 세척액내 면역세포와 호산구의 수가 감소하고 염증매개체(IL-4, 5, 6, 13, eotaxin3)가 감소하였음. 또한 조직병리학적으로 mucous의 분비와 염증세포의 침윤이 감소되었음. 따라서 세포실험시 고농도 처리를 한다면 더욱 뚜렸한 tolerogenic DC의 유도능을 보일 것으로 판단함.

(자) 기존 소재 4종(북강활, 식방풍, 아삼, 더덕)의 과민면역반응 조절능 비교

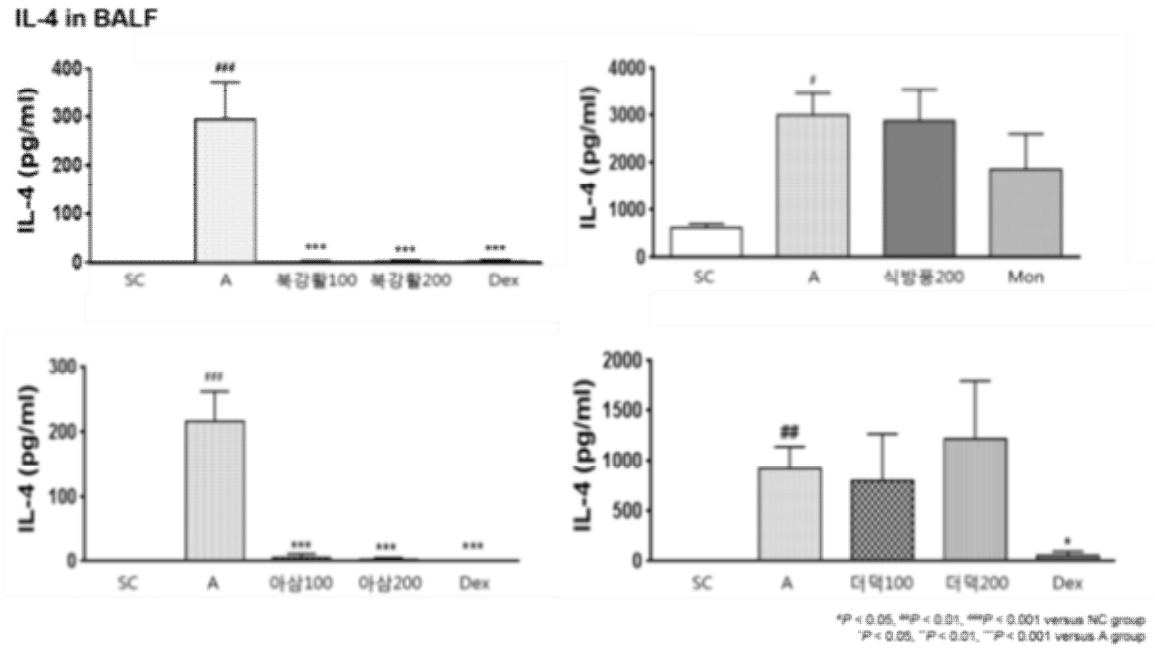
- 기존 소재 4종(북강활, 식방풍, 아삼, 더덕)을 100mg/kg 또는 200mg/kg 100ul씩 경구투여 하였음.
- 기도내 면역세포 및 특히 호산구의 양이 증가하였고 약물에 의해 감소하였음.
- 기도 세척액내 염증매개체(IL-4, 5, 13)의 발현량이 약물에 의해 감소하였음.
- 종합적인 과민면역 완화 효과는 북강활이 가장 우수하였고 식방풍과 아삼은 유사한 수준을 나타내었으며 양유는 상대적으로 약한 것으로 나타남.



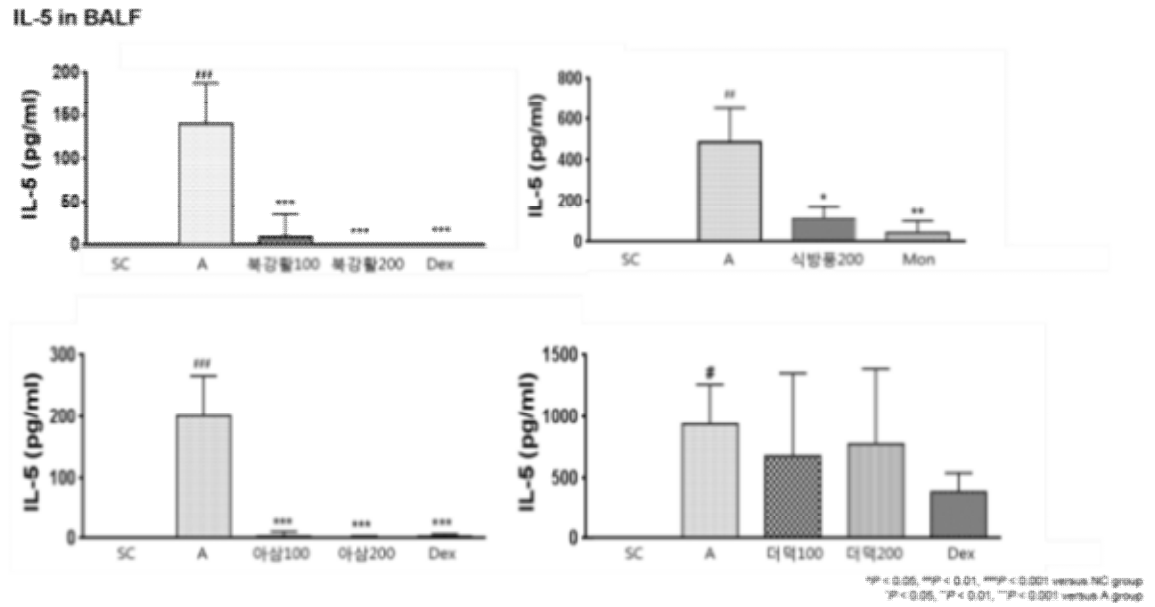
〈그림 2.142 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수와 비율〉



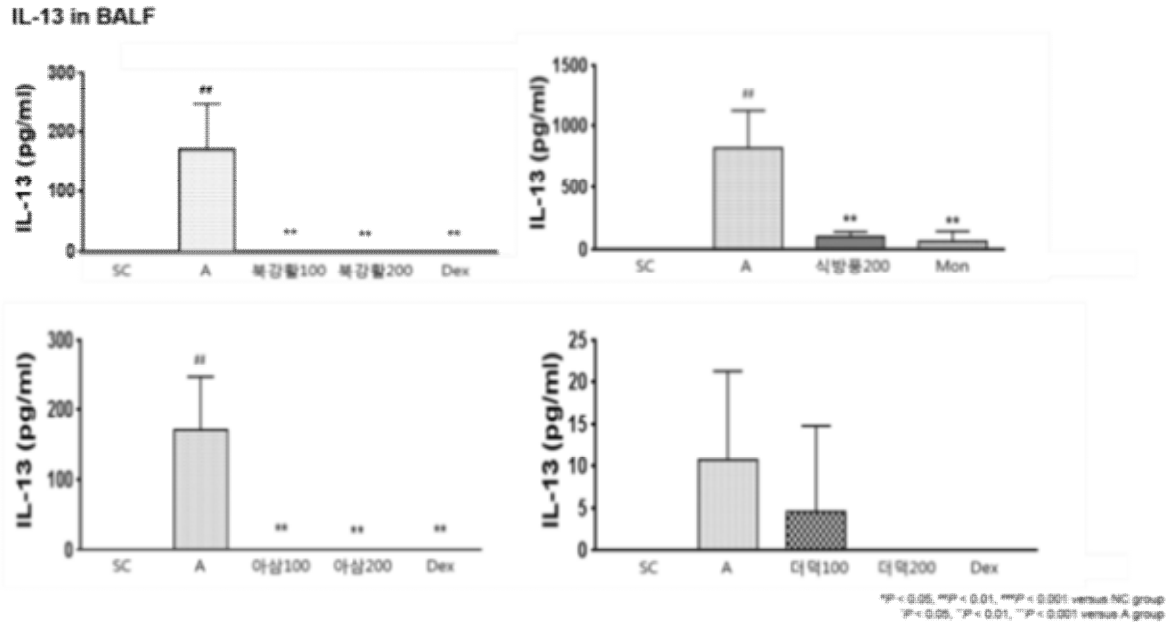
〈그림 2.143 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수와 비율〉



〈그림 2.144. 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉



〈그림 2.145 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉



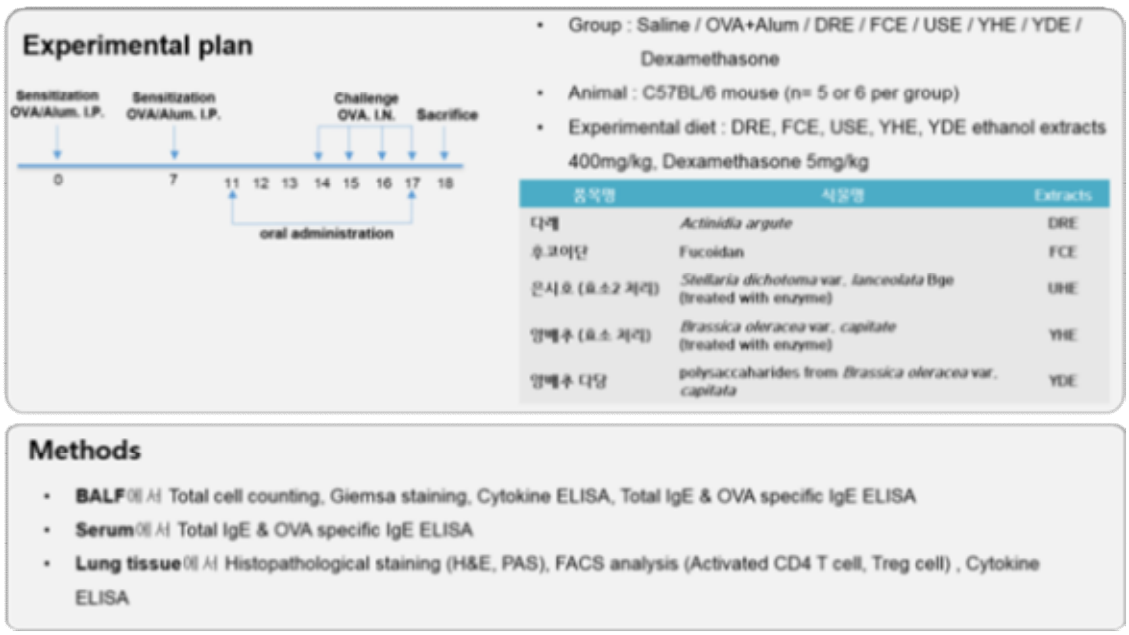
〈그림 2.146 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉

* Conclusion:

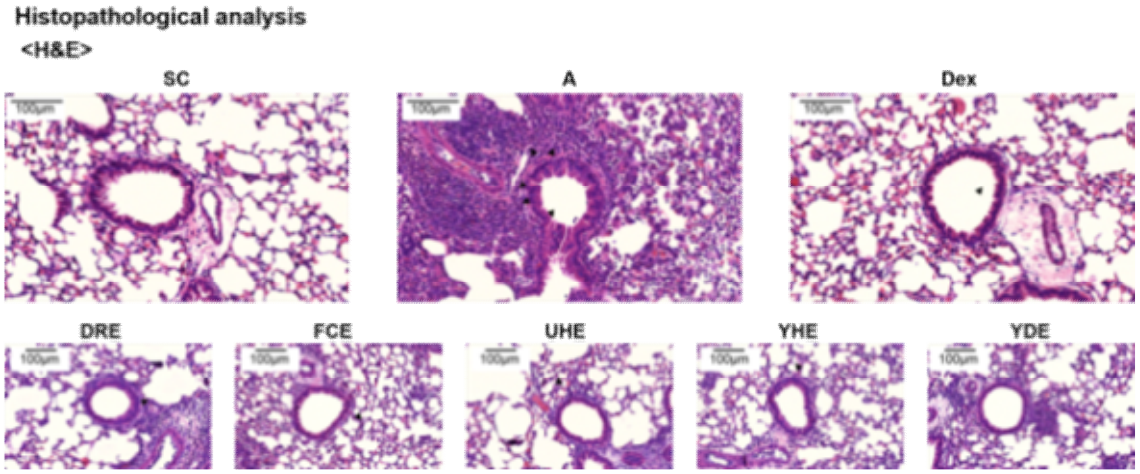
- in vitro 결과 Immunogenic Index 및 Tolerogenic Index를 기준으로 평가하였을 때 북강활, 식방풍 = 아삼, 더덕(양유)순으로 과민면역 억제효과가 있을 것으로 예상됨. In vivo 결과를 종합적으로 판단하였을 때 과민면역 완화 효과는 북강활, 식방풍 = 아삼, 더덕(양유) 순으로 우수함을 확인하였음. 따라서 in vitro와 in vivo 결과가 일치하였으므로 면역능 평가 세포 실험법이 타당한 것으로 판단됨.

(3) 면역능 소재 5종(다래, 후코이단, 은시호 효소2 처리, 양배추 효소 처리, 양배추 다당)의 과민면역 반응 조절 동물실험

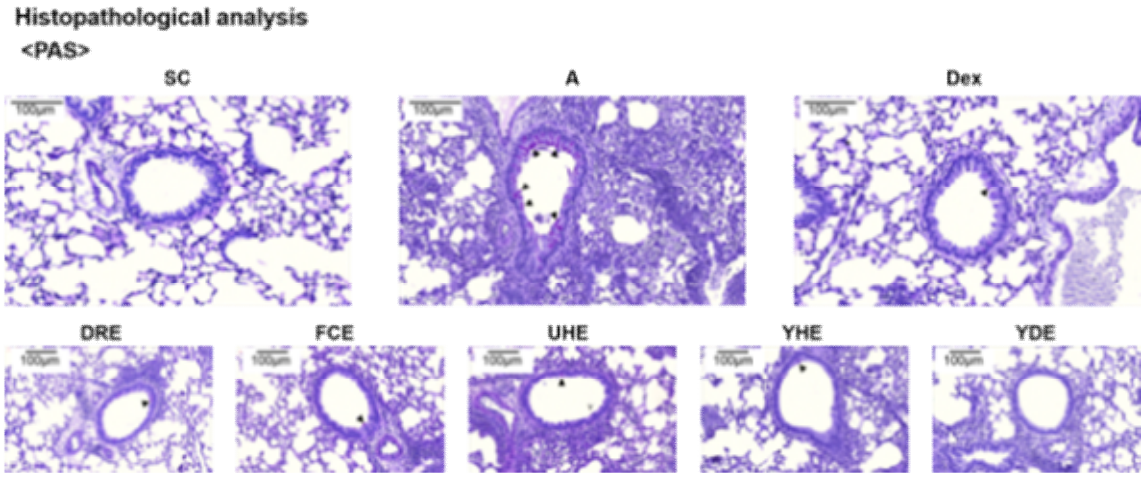
- 면역능 소재 5종(다래, 후코이단, 은시호 효소2 처리, 양배추 효소 처리, 양배추 다당)을 400mg/kg 100ul씩 경구투여 하였음.
- Dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 5mg/kg으로 100ul씩 경구투여 하였음.
- 기도내 면역세포 및 특히 호산구의 양이 증가하였고 약물에 의해 감소하였음.
- 다래, 은시호 효소2 처리, 양배추 효소 처리, 양배추 다당 투여군의 경우 조직병리학적으로 폐 조직내에 침윤된 면역세포와 mucous 생성이 약물에 의해 감소하였음.
- 은시호 효소2 처리와 양배추 효소처리 투여군의 경우 regulatory T Cell이 유의적으로 증가하였음.
- 양배추 다당 투여군의 경우 activated CD4 T cell이 감소하는 경향성을 보였음.
- 후코이단 투여군의 경우 다른 과민면역반응을 조절하는 인자들의 면역능은 보이지 않는 것으로 판단됨.



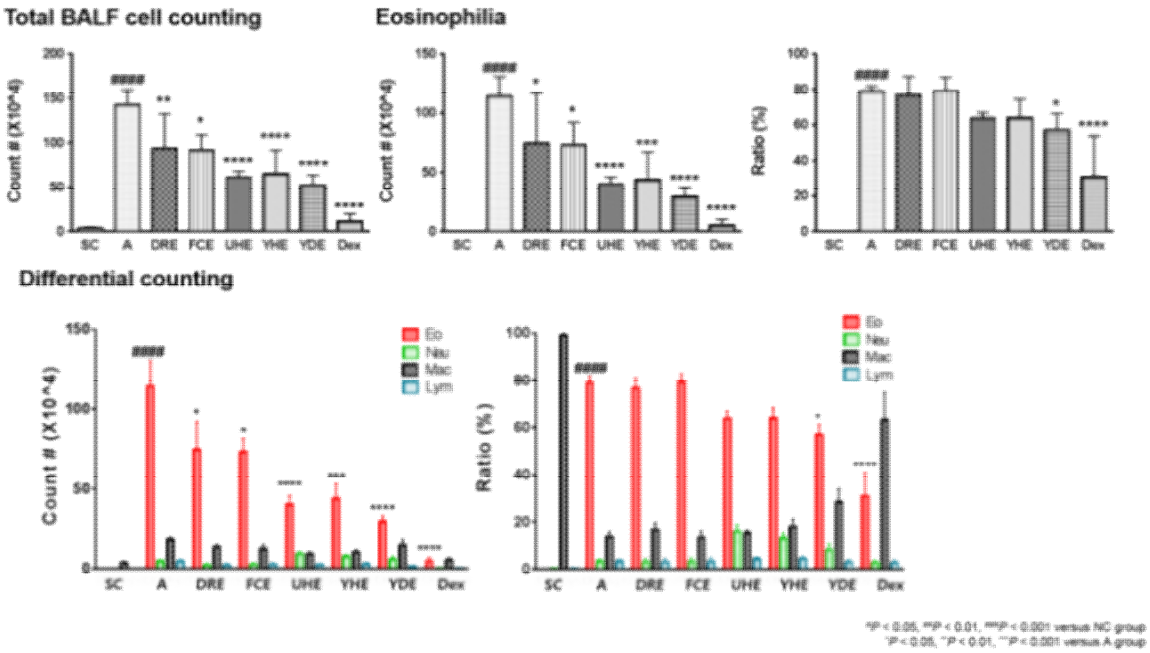
〈그림 2.147 과민면역유도 및 면역능 소재 5종(DRE, FCE, UHE, YHE, YDE)의 투여 일정〉



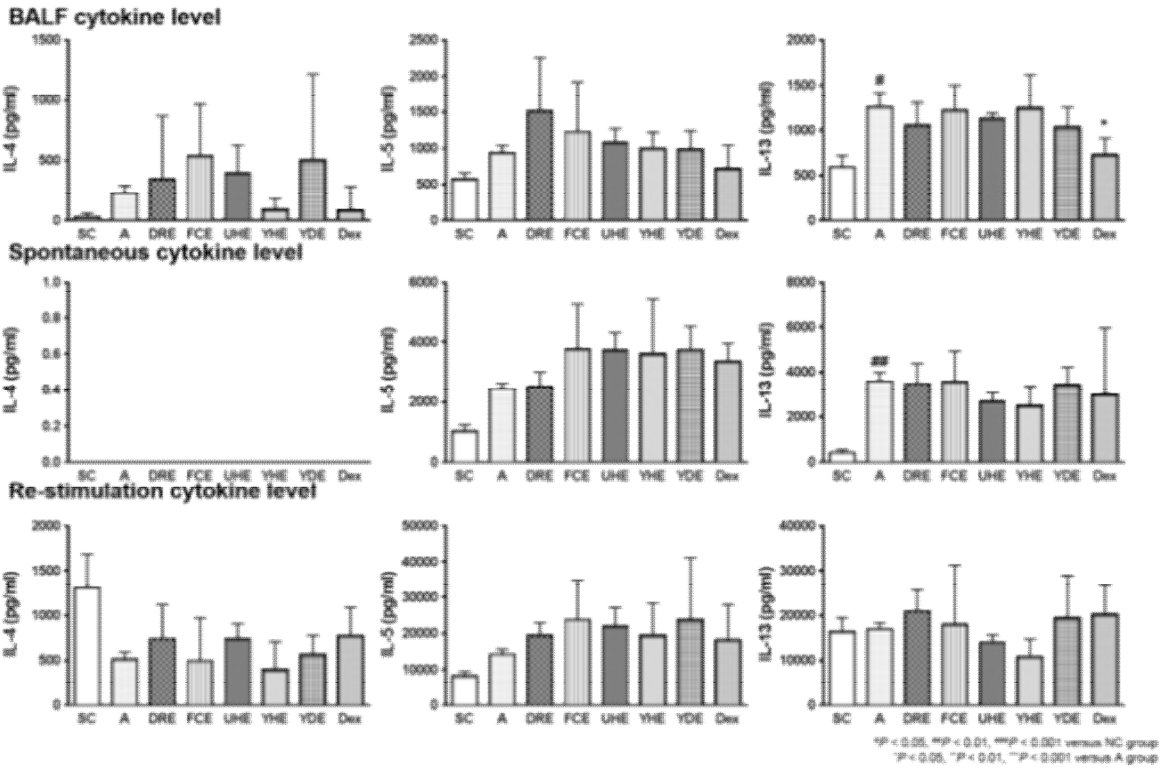
〈그림 2.148 폐 조직내 염증세포의 침윤〉



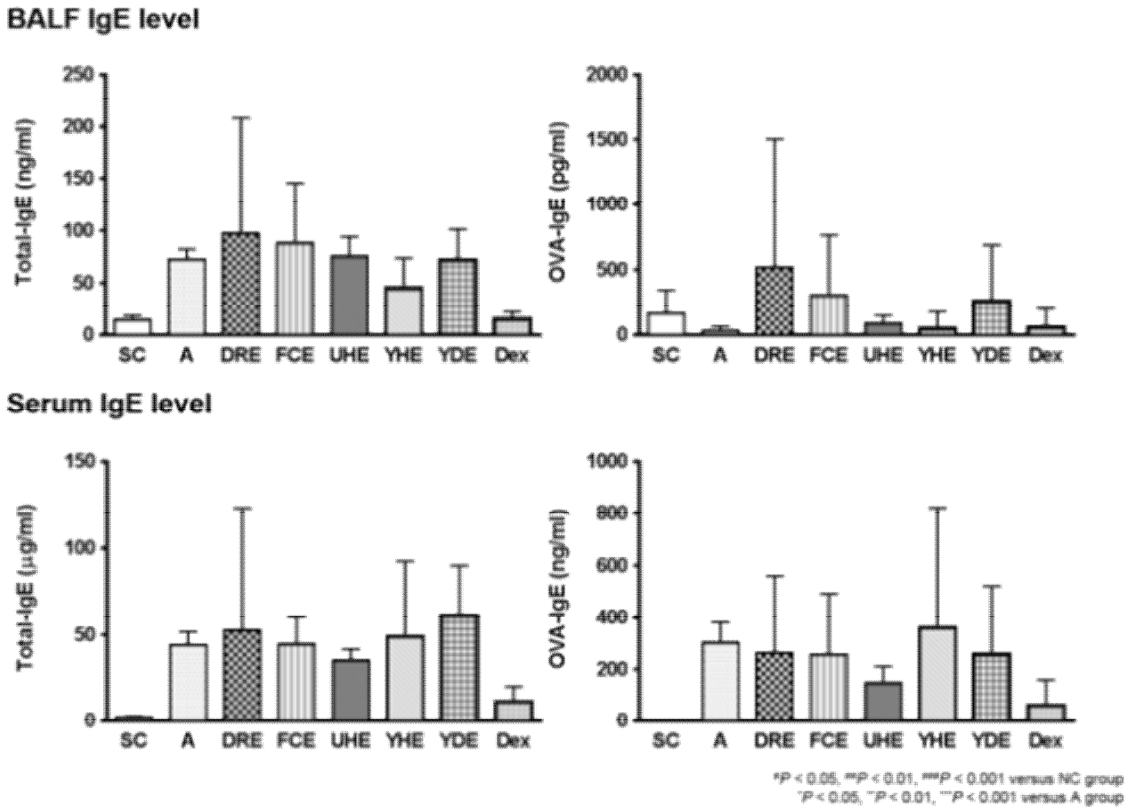
〈그림 2.149 폐 기도 상피세포의 mucous 분비〉



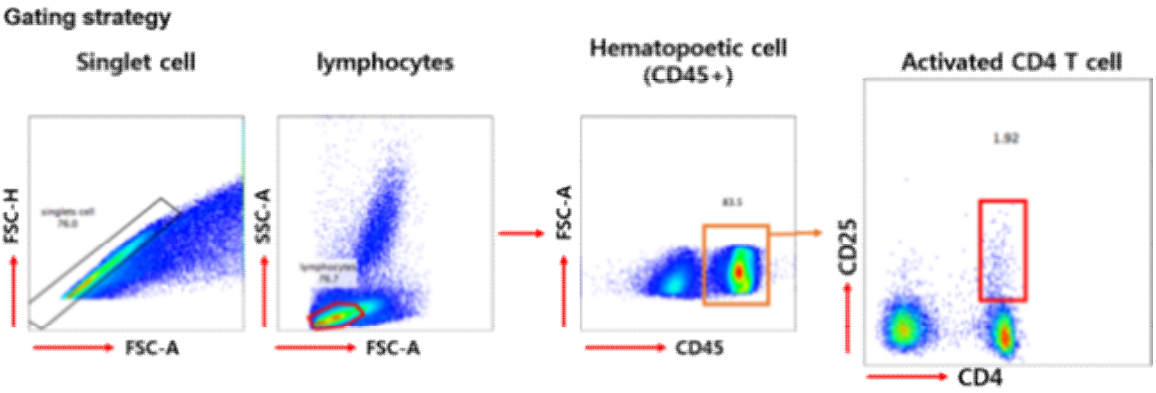
〈그림 2.150 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수와 비율〉



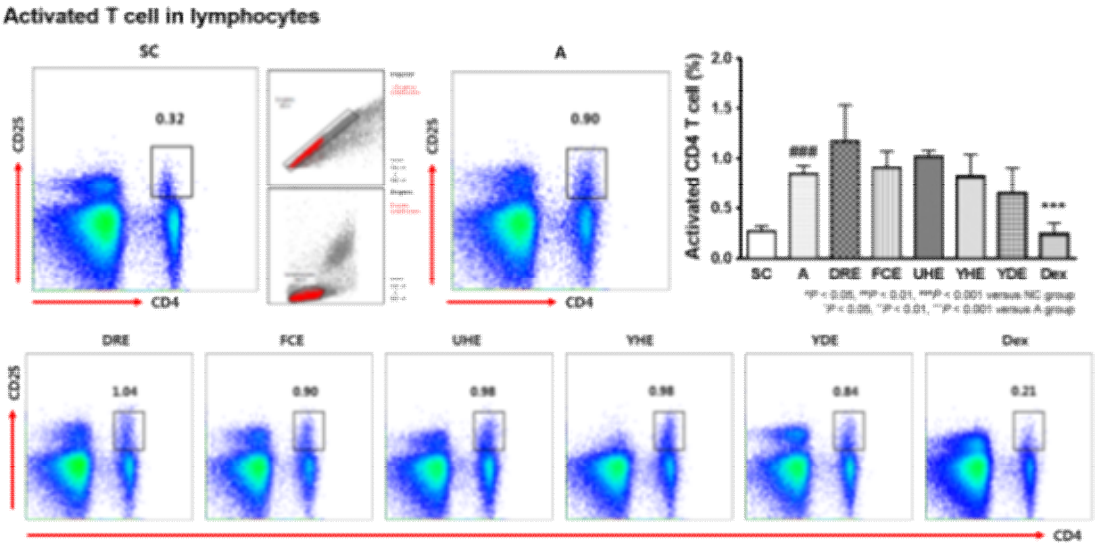
〈그림 2.151 기도세척액내 염증매개체의 수준측정 및 폐 조직 세포 분비 염증매개체의 수준 측정〉



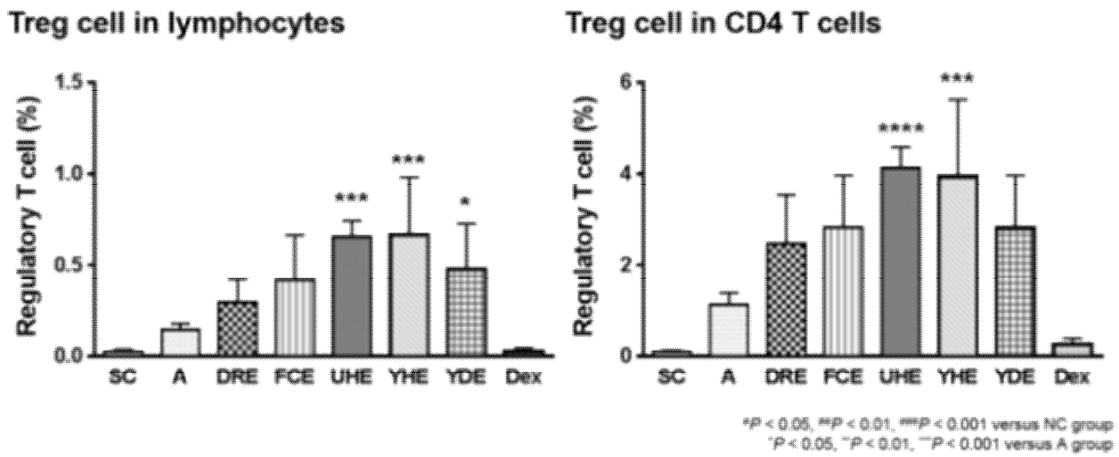
〈그림 2.152 기도세척액과 혈청 내의 Total IgE 와 OVA-IgE의 수준측정〉



〈그림 2.153 Flowcytometry의 Gating strategy〉



〈그림 2.154 Lymphocytes의 activated CD4 T cell population 측정〉



〈그림 2.155 Lymphocytes 및 CD4 T cell의 regulatory T cell population 측정〉

* Conclusion

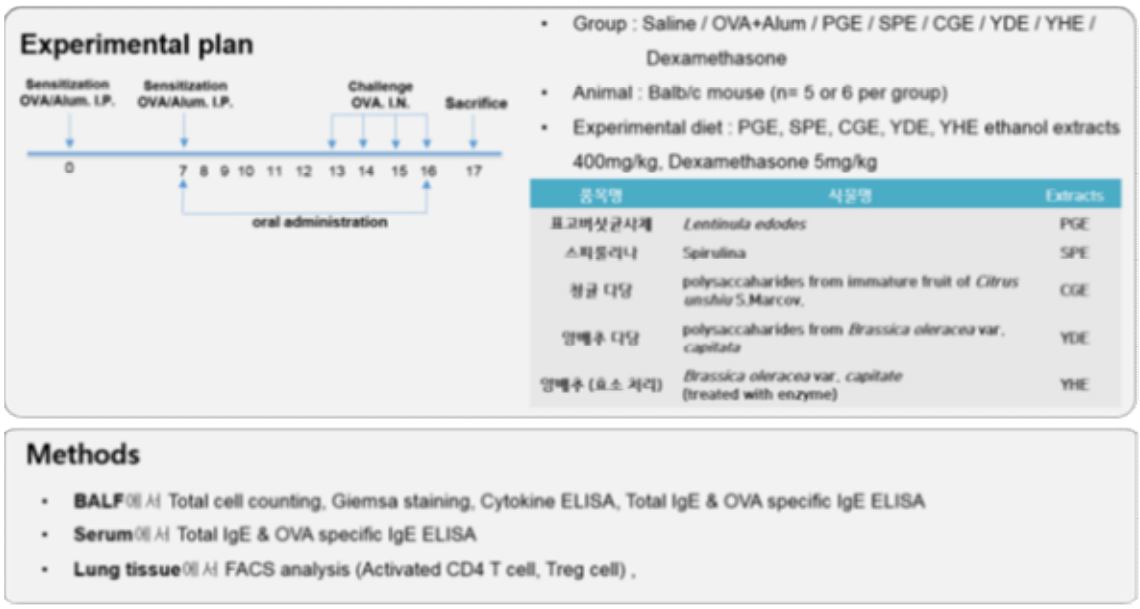
- 다래는 in vitro 실험 결과 Tolerogenic Index I에서 높은 수치를 기록하였음. in vivo 실험결과 염증 매개체에 대한 영향은 관찰되지 않았음. 따라서 in vitro와 in vivo 결과의 통일성이 없는 것으로 판단됨.
- 후코이단은 4가지 Index에서 모두 Med 수치를 얻었으며 CBA결과 별다른 특징을 확인 할 수 없었음. in vivo 실험결과 염증매개체에 대한 영향은 관찰되지 않았음. 따라서 in vitro와 in vivo 결과의 통일성이 있는 것으로 판단됨.
- 은시호(효소2 처리)는 Immunogenic Index I와 Immunogenic Index II에서 높은 수치를 얻었으며 in vivo 실험결과 regulatory T cell의 population이 증가하였음. Immunogenic Index의 높은 수치가 regulatory T cell population의 증가와 연관되어있을 것으로 보이며, 이것이 과민면역반응 완화의 주요 기전으로 판단됨. 따라서 in vitro와 in vivo 결과의 통일성이 있는 것으로 판단됨.
- 양배추(효소처리)는 Immunogenic Index I와 Immunogenic Index II에서 높은 수치를 얻었으며 CBA결과 INF-g(Th1)를 유도하였음. in vivo 실험결과 regulatory T cell의 population이 증가하였음.

Immunogenic Index의 높은 수치가 regulatory T cell population의 증가와 연관되어있을 것으로 보이며, Th1 cell을 유도함으로서 Th2 매개 과민면역을 억제하는 것으로 생각됨. 따라서 in vitro와 in vivo 결과의 통일성이 있는 것으로 판단됨.

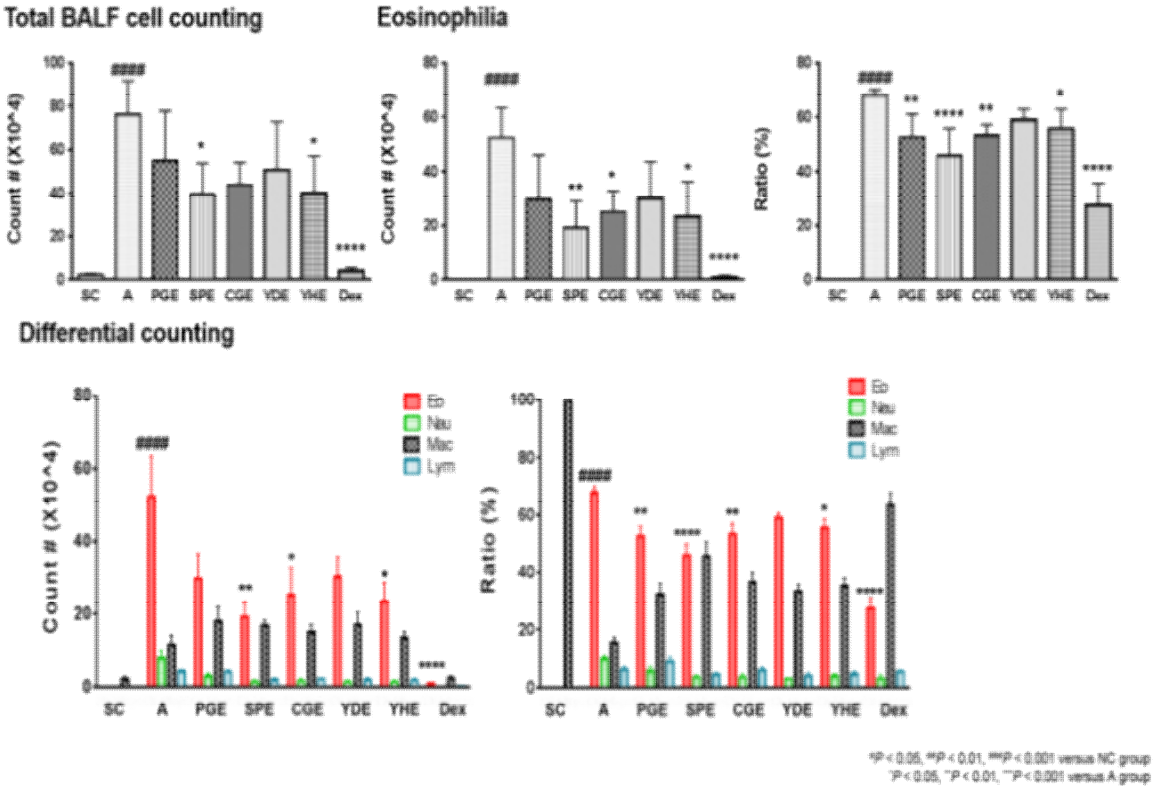
- 양배추 다당은 in vitro 실험 결과 Tolerogenic Index I에서 높은 수치를 기록하였으며 CBA결과 INF-g(Th1)를 유도하였음. in vivo 실험결과 기도세척액내 면역세포와 호산구의 수가 감소하였으며, regulatory T cell population이 증가하고 activated CD4 T cell population이 감소하는 경향성을 나타냄. Tolerogenic DC와 Th1, Treg cell을 유도함으로서 Th2 매개 과민면역을 억제하는 것으로 생각됨. 따라서 in vitro와 in vivo 결과의 통일성이 있는 것으로 판단됨.

(4) 면역능 소재 5종(표고버섯균사체, 스피룰리나, 청귤다당, 양배추다당, 양배추효소처리)의 과민면역 반응조절 동물실험

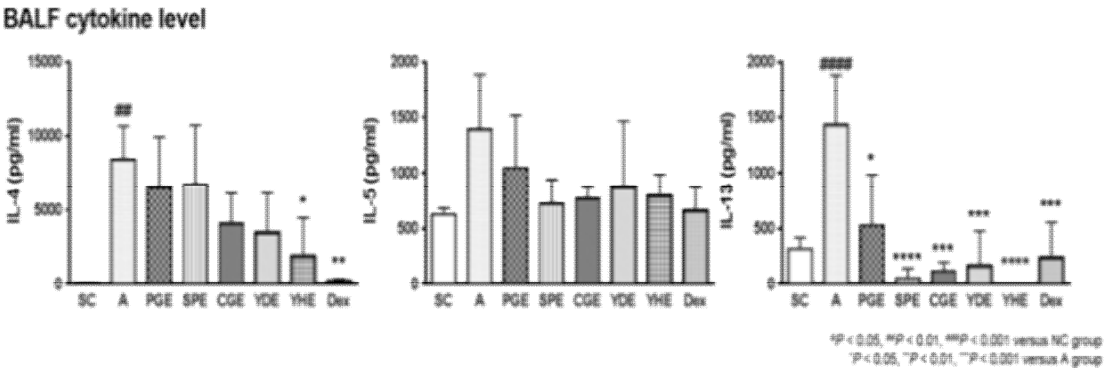
- 면역능 소재 5종(표고버섯균사체, 스피룰리나, 청귤 다당, 양배추 다당, 양배추 효소 처리)을 400mg/kg 100ul씩 경구투여 하였음.
- Dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 5mg/kg으로 100ul씩 경구투여 하였음.
- 기도내 면역세포 및 특히 호산구의 양이 증가하였고 약물에 의해 감소하였음
- 스피룰리나 청귤 다당, 양배추 다당, 양배추 효소처리 투여군에서 과민면역반응에서 중요한 역할을 하는 염증매개체(IL-4, 5, 13)가 감소하였음.
- 매개체생산의 중요한 세포인 Activated CD 4 T cell이 감소하는 경향성을 보임.
- 표고버섯 균사체 투여군에서 염증매개체의 변화가 관찰되지 않음.



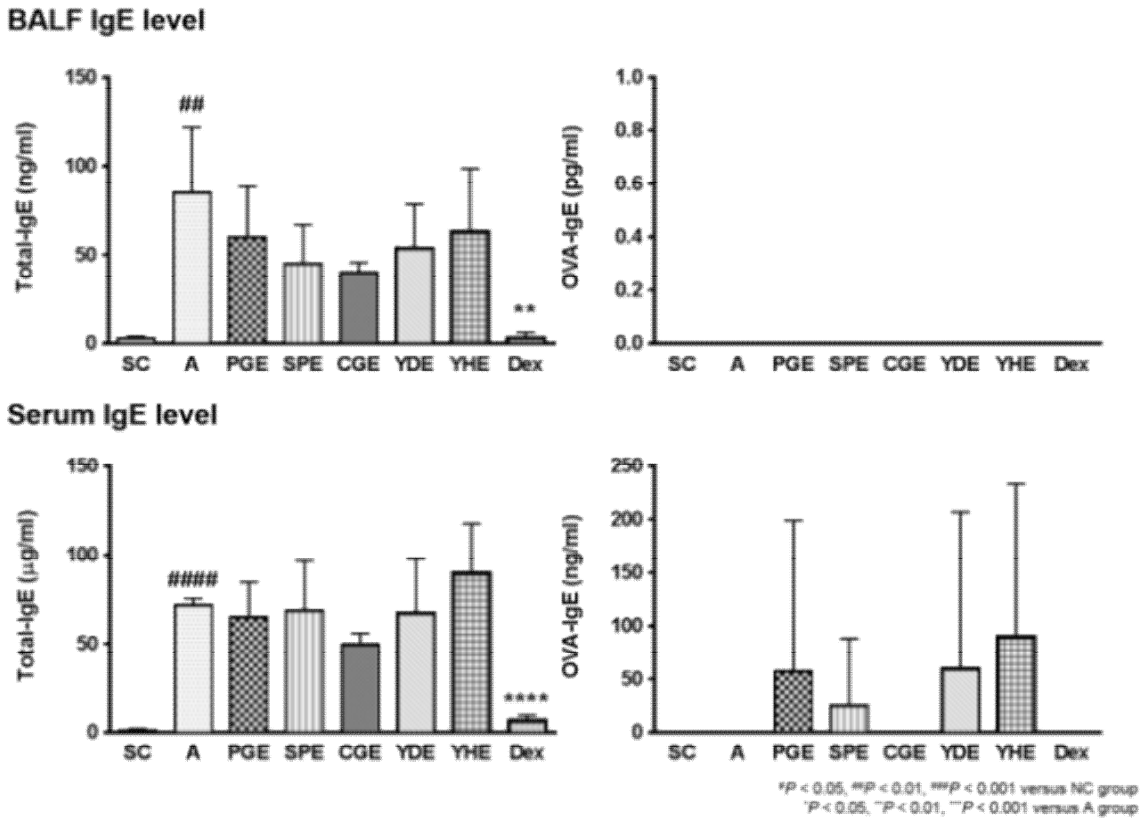
〈그림 2.156 과민면역유도 및 면역능 소재 5종(PGE, SPE, CGE, YDE, YHE)의 투여 일정〉



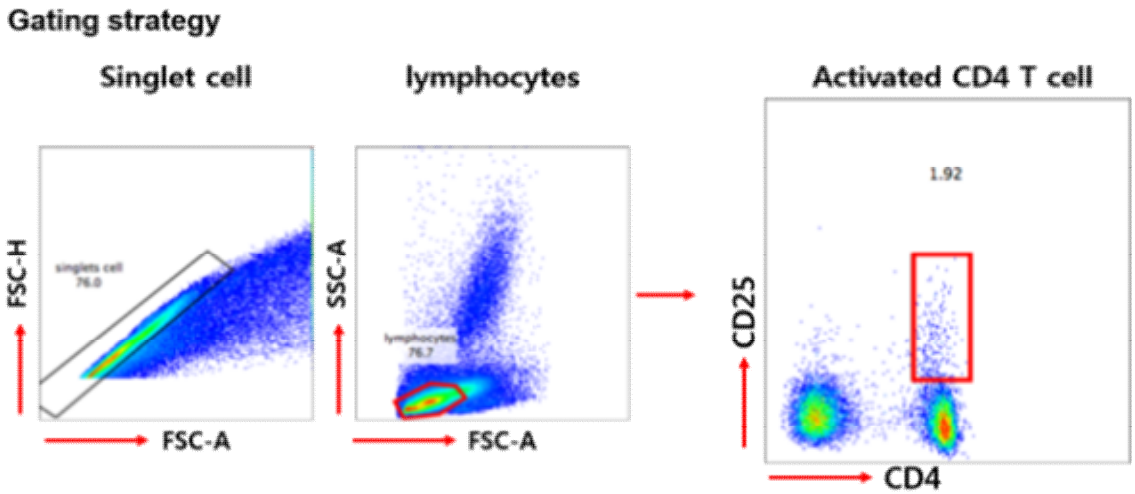
〈그림 2.157 기도세척액내 염증세포 및 호산구의 절대수와 비율〉



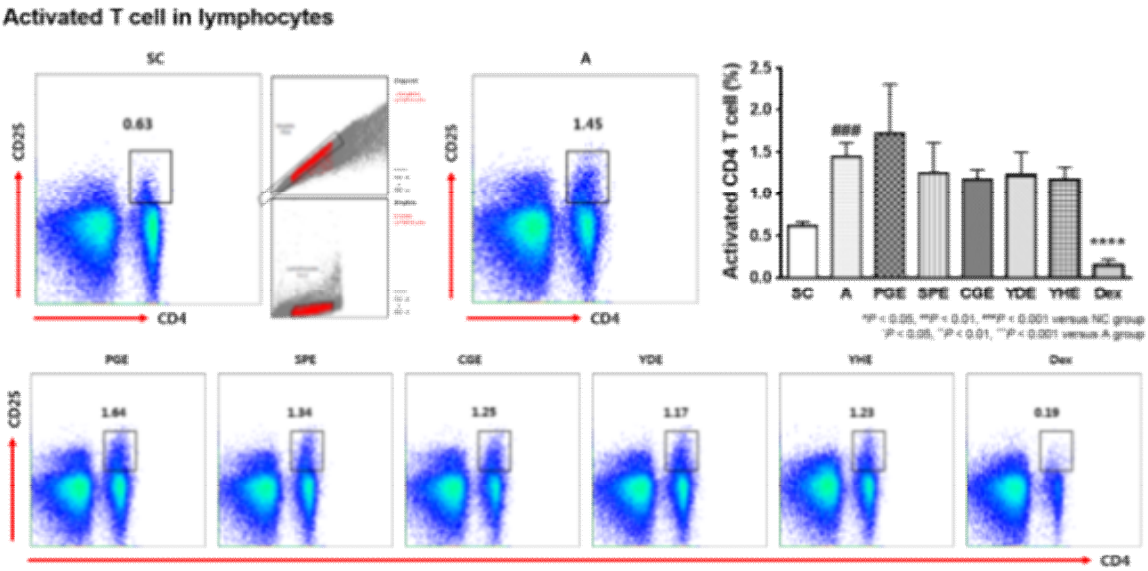
〈그림 2.158 기도세척액내 염증매개체의 수준측정〉



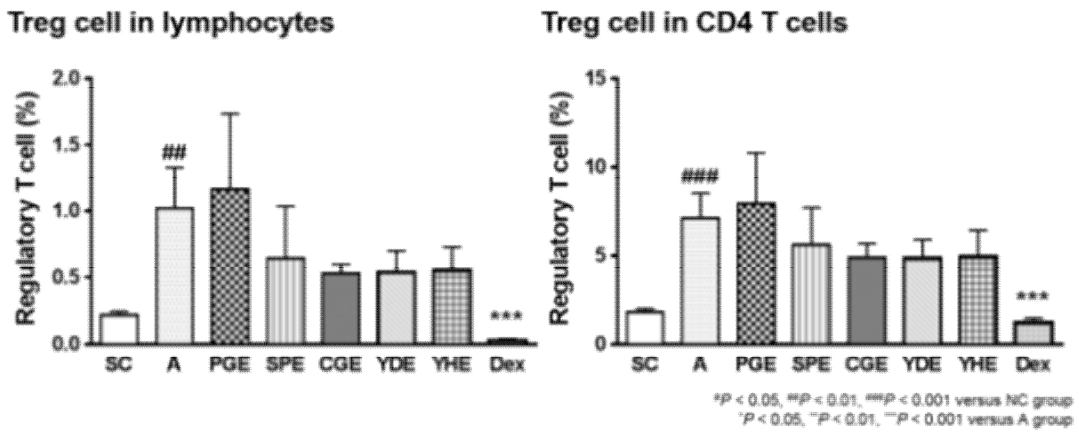
〈그림 2.159 기도세척액과 혈청 내의 Total IgE 와 OVA-IgE의 수준측정〉



〈그림 2.160 Flowcytometry의 Gating strategy〉



〈그림 2.161 Lymphocytes의 activated CD4 T cell population 측정〉



〈그림 2.162 Lymphocytes 및 CD4 T cell의 regulatory T cell population 측정〉

* Conclusion:

- 표고버섯균사체는 4가지 index상에서 모두 Med를 기록하였으며, 면역반응조절에 대한 명확한 방향성이 관찰되지 않았음. in vivo 결과 염증매개체에 대한 영향이 관찰되지 않았음. 따라서 in vitro와 in vivo 결과의 통일성이 있는 것으로 판단됨.
- 스피룰리나는 in vitro 실험 결과 Tolerogenic Index I과 Tolerogenic Index II에서 높은 수치를 보였음. in vivo 실험결과 기도세척액 내 호산구의 수와 염증매개체(IL-4, 5, 13)의 양이 감소함. Tolerogenic Index에서 확인한 면역억제작용을 통해 과민면역을 완화하는 것으로 생각됨. 따라서 in vitro와 in vivo 결과의 통일성이 있는 것으로 판단됨.
- 청귤다당은 in vitro 실험 결과 Immunogenic Index I과 Immunogenic Index II에서 높은 수치를 보였으며, CBA 결과 INF-g를 유도함. in vivo 실험결과 기도세척액 내 호산구의 수와 염증매개체(IL-4, 5, 13)의 양이 감소함. Immunogenic한 특성을 보이지만 Th1 cell을 유도함으로서 Th2 cell 매개 과민면역을 완화하는 것으로 생각됨. 따라서 in vitro와 in vivo 결과의 통일성이 있는 것으로 판단됨.

- 양배추 다당은 in vitro 실험 결과 Tolerogenic Index I에서 높은 수치를 기록하였으며 CBA결과 INF-g를 유도하였음. in vivo 실험결과 기도세척액내 염증매개체가 감소하였음. Tolerogenic DC와 Th1 cell을 유도함으로서 Th2 매개 과민면역을 억제하는 것으로 생각됨. 따라서 in vitro와 in vivo 결과의 통일성이 있는 것으로 판단됨.
- 양배추 (효소처리)는 Immunogenic Index I와 Immunogenic Index II에서 높은 수치를 얻었으며 CBA 결과 INF-g를 유도하였음. in vivo 실험결과 기도세척액내 면역세포와 호산구, 염증매개체가 감소하였음. Immunogenic Index의 높은 수치가 Th1 cell과 연관되어있을 것으로 보이며, Th1 cell을 유도함으로서 Th2 매개 과민면역을 억제하는 것으로 생각됨. 따라서 in vitro와 in vivo 결과의 통일성이 있는 것으로 판단됨.
- 양배추 다당 및 효소 처리 추출물은 다른 종의 mouse를 이용한 과민면역 유도실험에서 모두 과민면역완화 효과를 관찰 할 수 있었음. 따라서 소재의 과민면역조절능 평가 동물모델의 신뢰성을 판단 할 수 있는 근거자료로 생각됨.

다. 만성염증 질환 동물모델 신뢰도 검증

- 만성염증의 많은 부분이 자가면역에 기인하는데 이는 즉 체조직의 일부를 항원으로 인식하여 항체를 생산하는 등의 염증성 반응을 유발하는 현상임.
- 만성염증은 유전적소인, 환경적소인 (감염포함) 그리고 특히 자가면역적 소인에 기인함.
- 자가면역질환으로는 만성갑성샘염 (하시모토병, Hashimoto's disease), 전신성홍반성낭창 (systemic lupus)등이 있고 대표적으로 류마티스관절염이 있다.
- 만성염증 모델중 유병률이 높고 동물모델로 구축이 잘 되어 있는 류마티스관절염을 선택함.
- 류마티스관절염 동물모델은 만성염증 및 자가면역모델로서 광범위하게 사용되어 왔음.
- 실제 자가면역환자 뿐만 아니라 동물모델에서 자가항원특이항체가 면역세포 및 파골세포의 활성에 핵심적인 역할을 함.
- 만성염증으로 조직 (관절)의 부종 및 변형이 진행되고 항원특이 항체의 생성이 뚜렷하게 증가됨.
- 자가항원 (Collagen)에 대한 항체 Collagen specific IgG와 Total IgG, 염증매개체 (IL-1β, IL-6, TNF-α, INF-γ)를 혈청에서 측정하여 면역능을 평가함.

ㅇ 만성염증반응의 완화

면역학적 의미	기능	Markers
만성염증반응의 완화	T세포의 기능	제1형 및 17형 도움 T 세포의 활성 Cytokine 분비 (IL-17A, IL-17F, IFN-ɣ) 조절 T 세포의 활성
	매개체 (Mediator)	Pro-inflammatory cytokine의 분비 항원특이적 항체의 분비

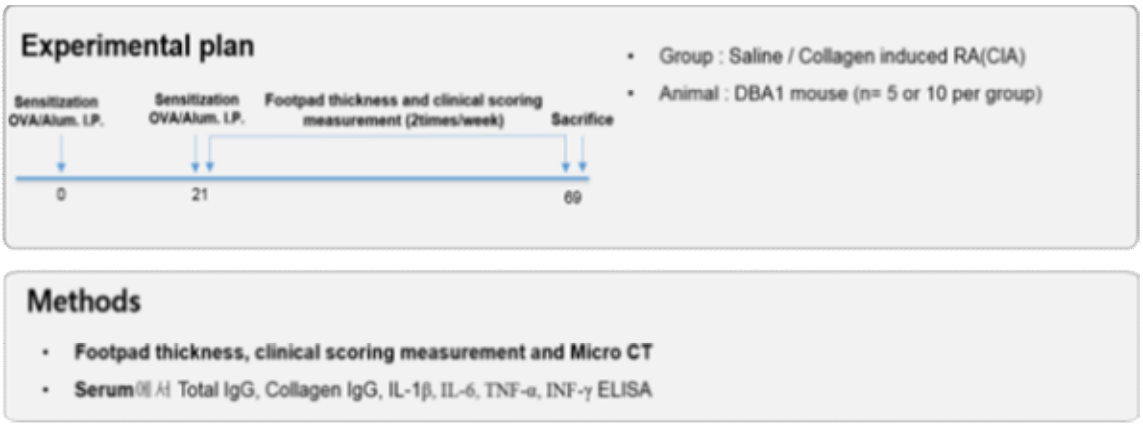
(1) 만성염증조절 질환모델 (Collagen-induced arthritis model)

- **동물**: DBA/1 (6~8주령)을 이용함.
- **식품투여**: 식품의 농도를 (50~200mg/kg/day)정도로 경구로 투여한다. 기간은 2nd CIA boosting이후 sacrifice기간까지 매일 먹인다.
- **만성염증유도**: Collagen을 CFA adjuvant 또는 IFA adjuvant와 함께 3주 간격으로 (D-0, 21) 100ug

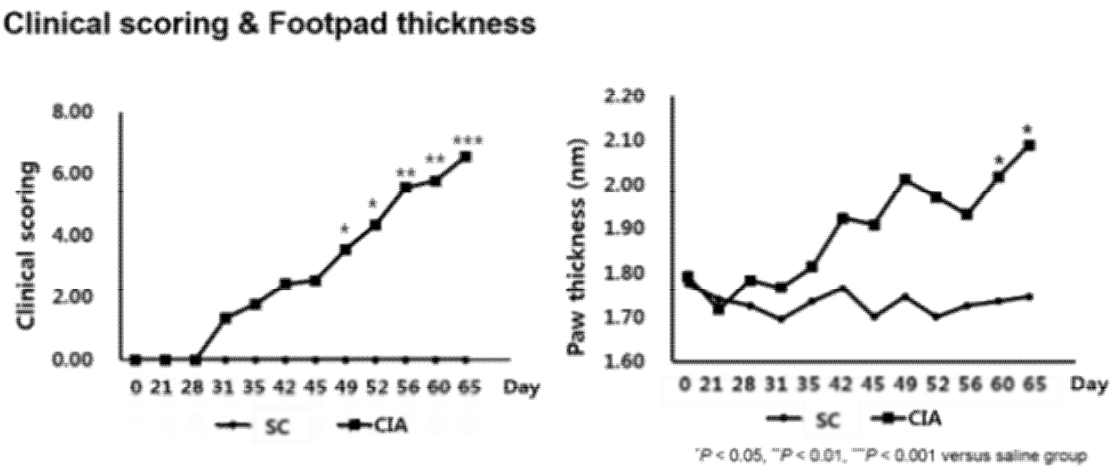
을 피하투여 (subcutaneous)한다.

- **관절변형측정**: 발두께 부종 (Footpad thickness)와 관절변형정도 (Clinical scoring: 0~4)를 전자두께 측정기 (electromagnetic thickness gauge) 와 유관으로 측정한다.
- **자가항원특이항체 측정**: 자가항원 (Collagen)에 대한 항체 (Collagen specific IgG)와 Total IgG를 혈청에서 측정한다.

(1) 만성염증조절 질환모델 1차 실험



〈그림 2.163 만성면역 유도 일정〉



〈그림 2.164 마우스의 기간별 발두께 및 관절변형정도〉

Micro CT

Saline (No. 210)

	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	53	50	46	53	50	46	53	50	46	53	50	46
Score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Footpad thickness		-			-			1.70			1.80	

Saline (No. 211)

	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	53	50	46	53	50	46	53	50	46	53	50	46
Score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Footpad thickness		-			-			1.70			1.70	

Saline (No. 214)

	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	53	50	46	53	50	46	53	50	46	53	50	46
Score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Footpad thickness		-			-			1.80			1.70	

Micro CT

CIA (No. 213)

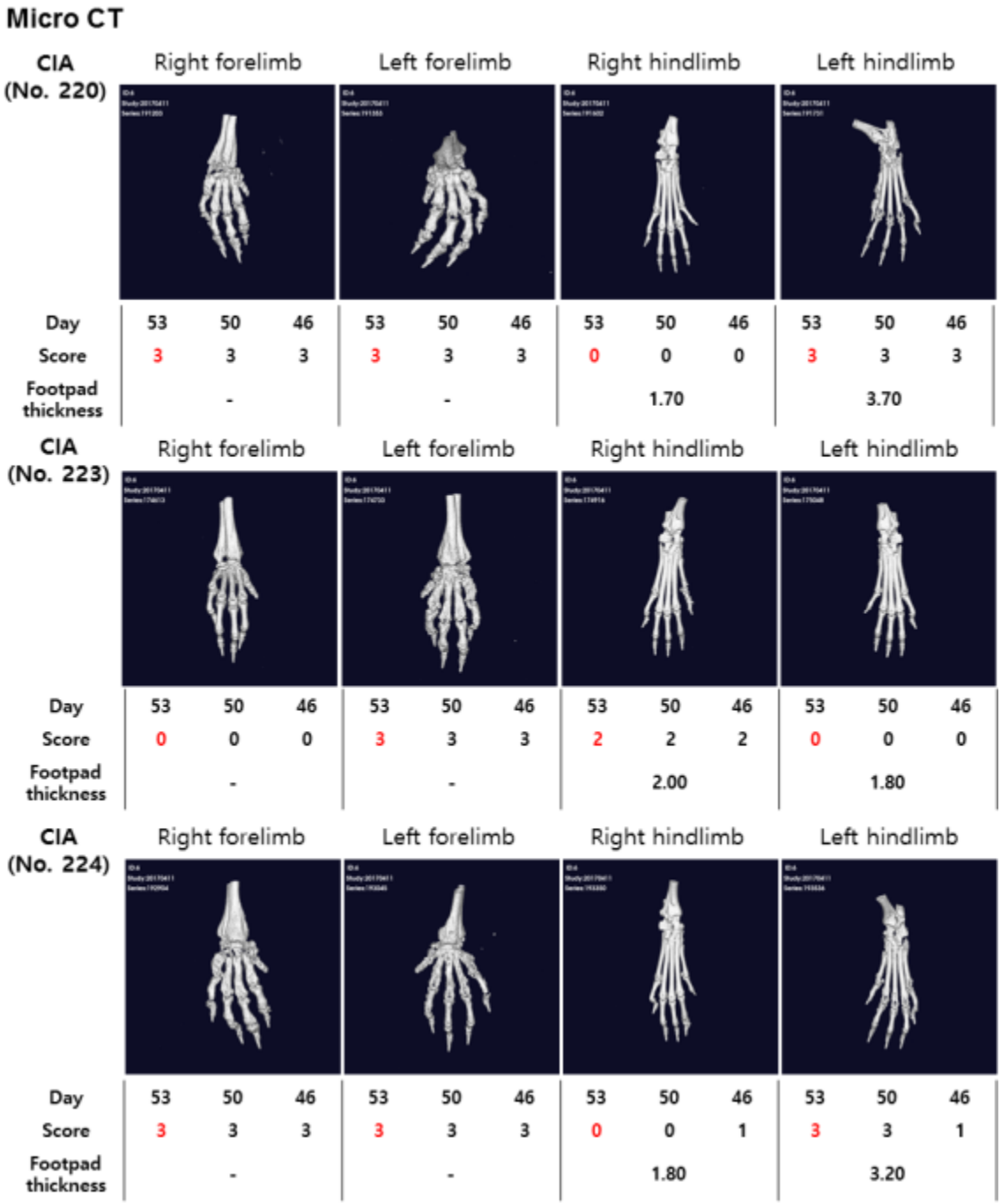
	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	53	50	46	53	50	46	53	50	46	53	50	46
Score	3	0	0	3	3	3	3	3	4	3	0	0
Footpad thickness		-			-			2.30			2.00	

CIA (No. 218)

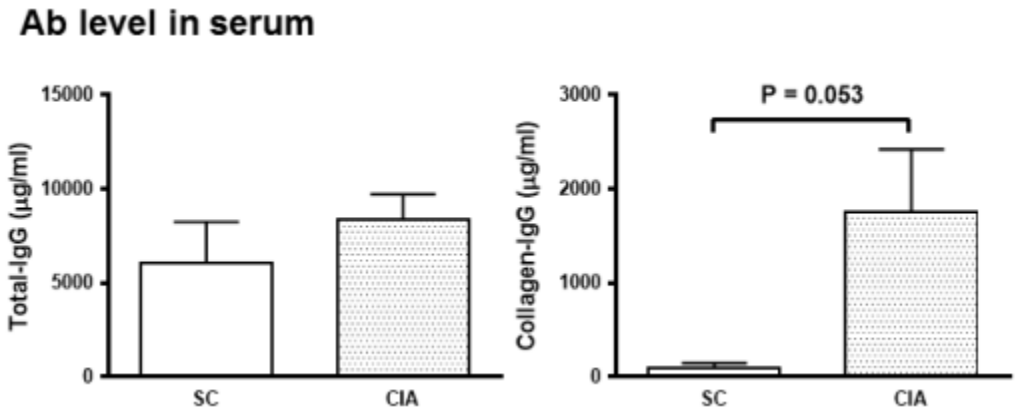
	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	53	50	46	53	50	46	53	50	46	53	50	46
Score	3	4	3	3	3	3	4	4	4	3	3	3
Footpad thickness		-			-			2.50			2.00	

CIA (No. 219)

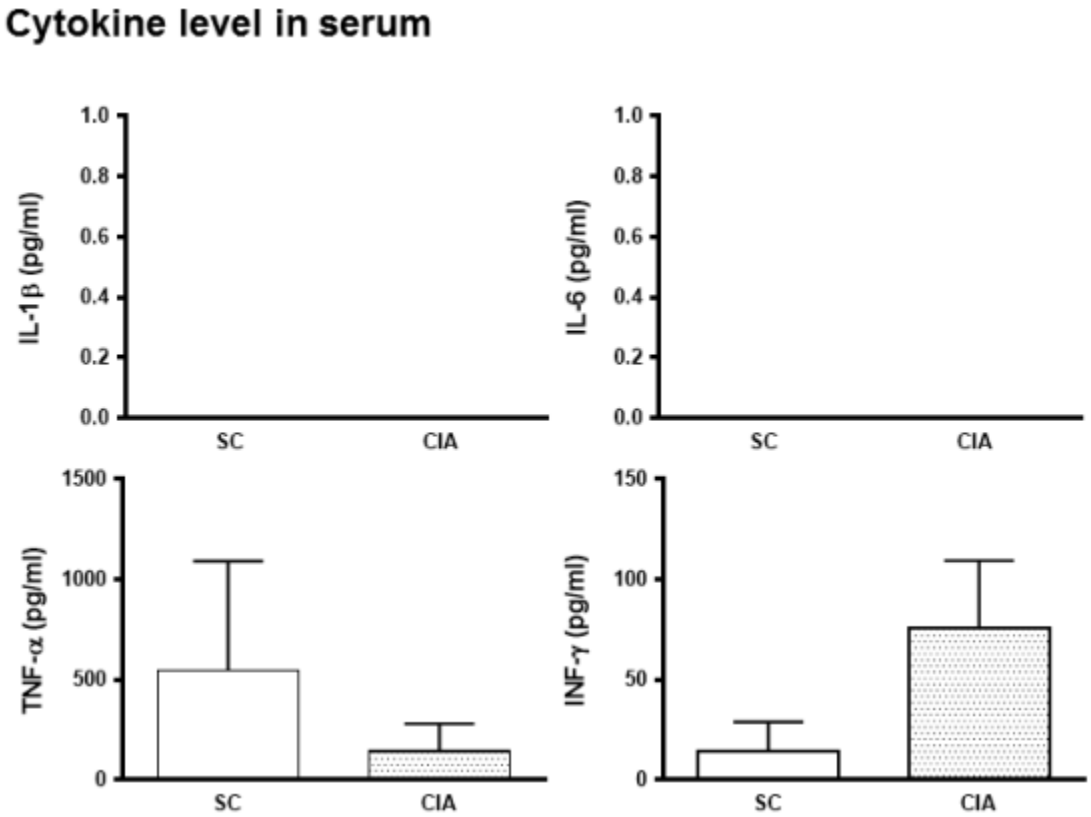
	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	53	50	46	53	50	46	53	50	46	53	50	46
Score	0	0	0	0	0	0	4	3	3	3	3	3
Footpad thickness		-			-			2.60			2.30	



〈그림 2.165 마우스의 기간별 Micro CT〉



〈그림 2.166 마우스 혈청내의 Total-IgE 및 Collagen-IgE〉



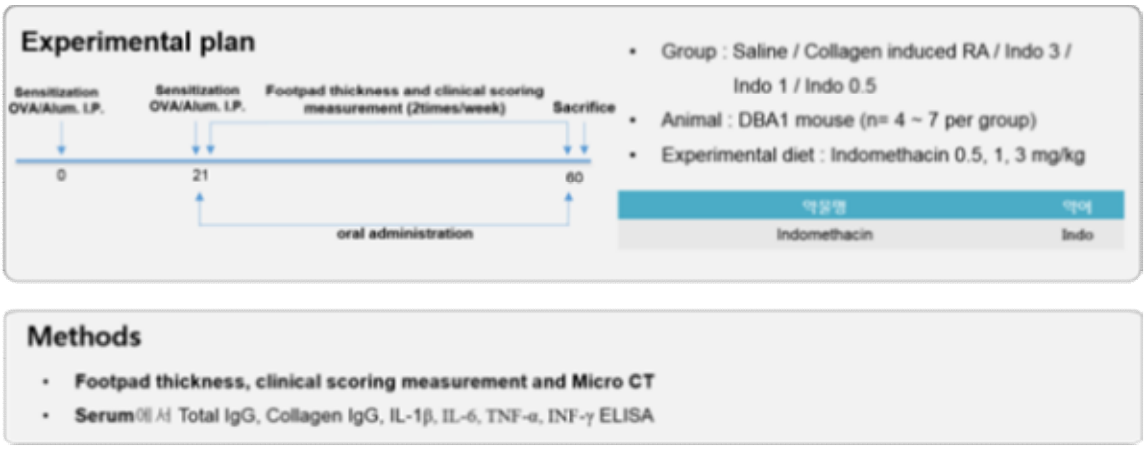
〈그림 2.167 마우스 혈청내의 Cytokine 발현〉

* Conclusion

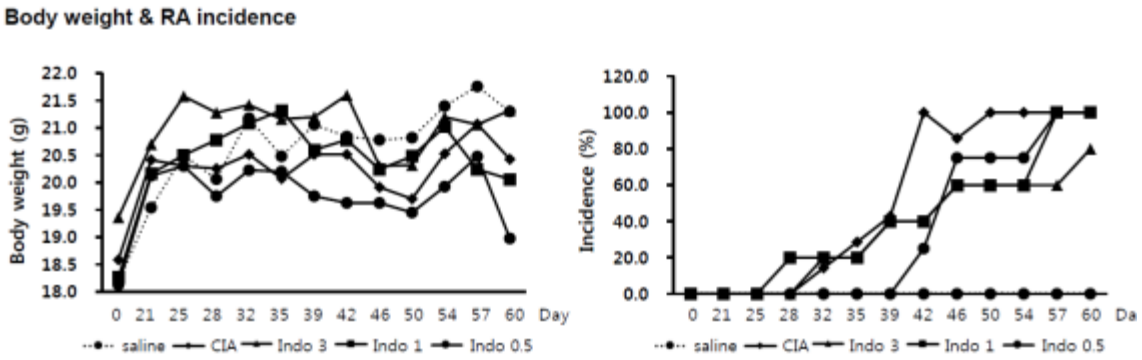
- Indomethacin 투여 시 Clinical score와 발 두께가 감소하였음.
- Micro CT 결과 골관절의 변화가 완화되었음.
- 혈청내 항체 수준 측정에서 투여 시 항체양이 감소하는 경향성을 보였음.
- 염증매개체의 경우 saline군과 유의적 차이가 관찰되지 않아 시기별 측정을 통한 phenotype과의 상관성 비교가 필요한 것으로 판단됨.
- phenotype과 관절 변형 등에서 명확한 차이가 관찰되어 양성대조군 구축이 잘된 것으로 판단됨.

(2) 만성염증조절 질환모델 2차 양성 대조군 설정실험

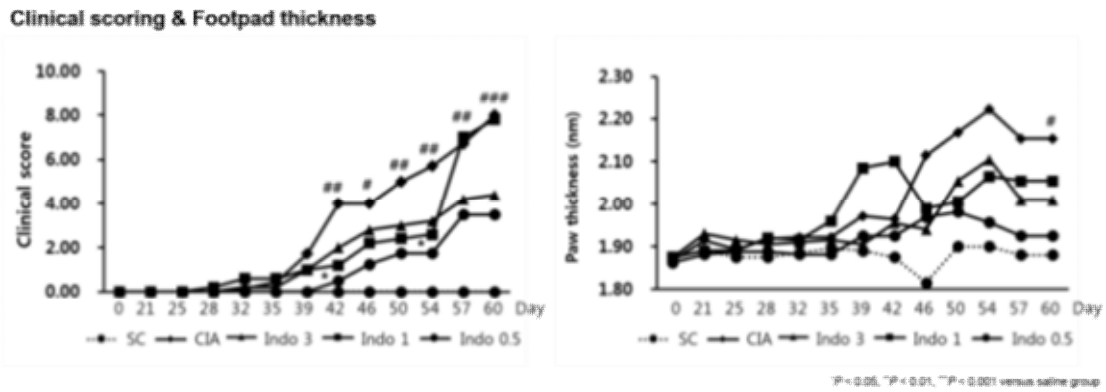
- 만성염증조절 질환모델의 양성대조군 확립을 위해 Indometacin 농도별로 투여하여 평가모델 구축함



〈그림 2.168 만성염증 유도모델(류마티스관절염)의 Indomethacin 평가모델 구축〉



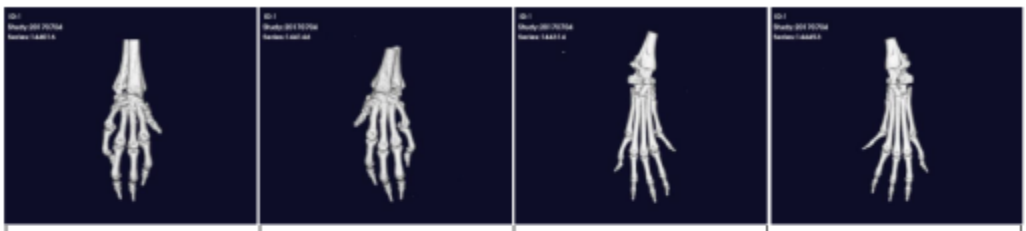
〈그림 2.169 만성염증 유도모델(류마티스관절염)의 체중변화 및 발현률 변화〉



〈그림 2.170 마우스의 기간별 발두께 및 관절변형정도〉

Micro CT

Saline (No. 414)

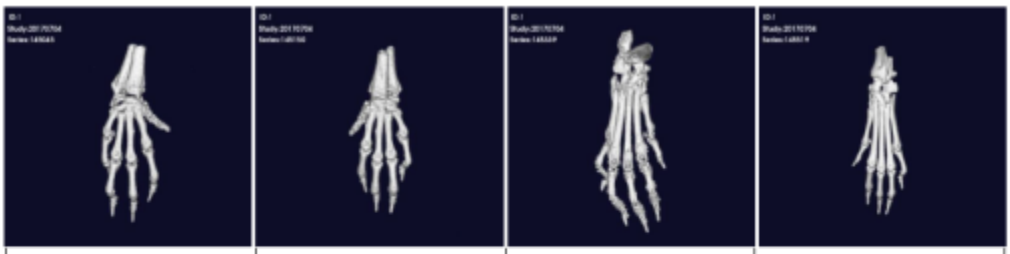


	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	57	53	50	57	53	50	57	53	50	57	53	50
Score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Footpad thickness		-			-			1.85			1.85	

Saline (No. 416)

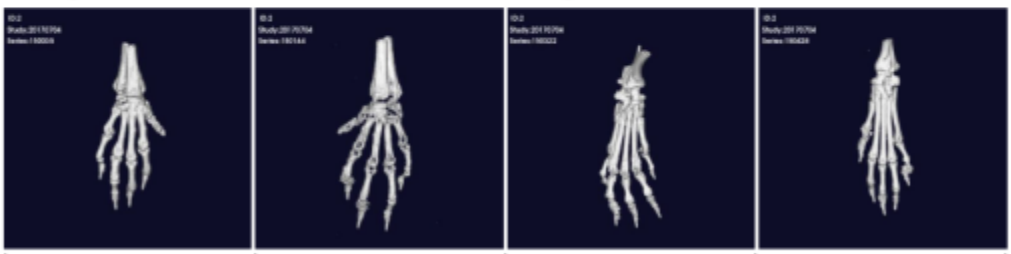
	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	57	53	50	57	53	50	57	53	50	57	53	50
Score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Footpad thickness		-			-			1.90			1.90	

CIA (No. 426)



	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	57	53	50	57	53	50	57	53	50	57	53	50
Score	3	0	0	0	0	0	4	3	3	0	0	0
Footpad thickness		-			-			3.25			2.10	

CIA (No. 429)



	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	57	53	50	57	53	50	57	53	50	57	53	50
Score	1	0	0	3	3	3	4	4	4	2	3	2
Footpad thickness		-			-			2.45			2.10	

Micro CT

Indo 3 (No. 431)

	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	57	53	50	57	53	50	57	53	50	57	53	50
Score	0	0	0	3	3	3	0	0	0	1	1	0
Footpad thickness		-			-			1.85			1.95	

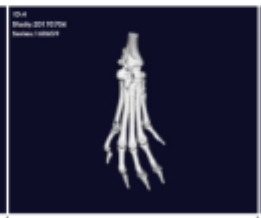
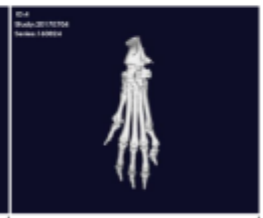
Indo 3 (No. 432)

	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	57	53	50	57	53	50	57	53	50	57	53	50
Score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Footpad thickness		-			-			1.90			1.85	

Indo 1 (No. 423)

	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	57	53	50	57	53	50	57	53	50	57	53	50
Score	0	0	0	3	1	0	3	2	2	1	1	1
Footpad thickness		-			-			2.35			2.00	

Indo 1 (No. 453)

	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
												
Day	57	53	50	57	53	50	57	53	50	57	53	50
Score	3	0	0	1	1	0	3	2	2	2	0	2
Footpad thickness		-			-			2.15			2.00	

Micro CT

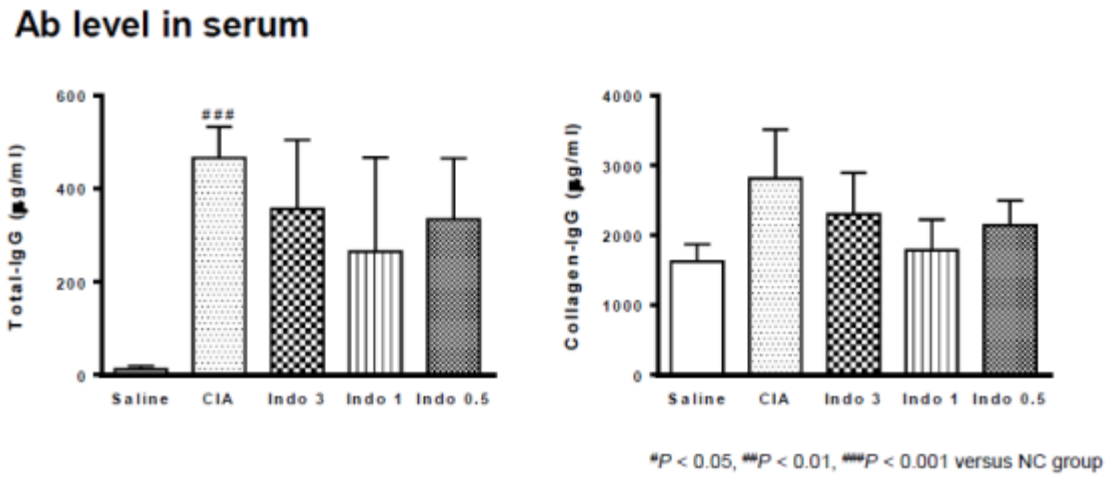
Indo 0.5 (No. 473)

	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	57	53	50	57	53	50	57	53	50	57	53	50
Score	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0
Footpad thickness		-			-			1.90			1.85	

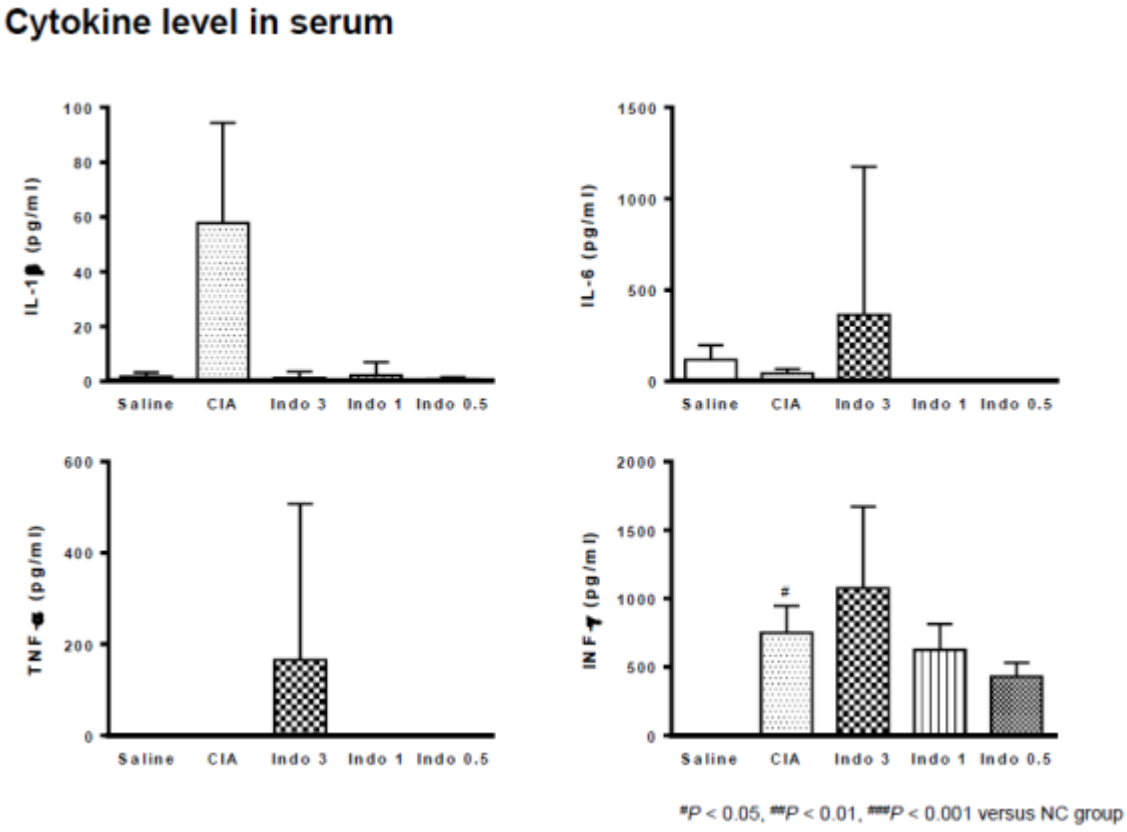
Indo 0.5 (No. 474)

	Right forelimb			Left forelimb			Right hindlimb			Left hindlimb		
Day	57	53	50	57	53	50	57	53	50	57	53	50
Score	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
Footpad thickness		-			-			1.85			1.90	

〈그림 2.171 마우스의 기간별 Micro CT〉



〈그림 2.172 마우스 혈청내의 Total-IgE 및 Collagen-IgE〉



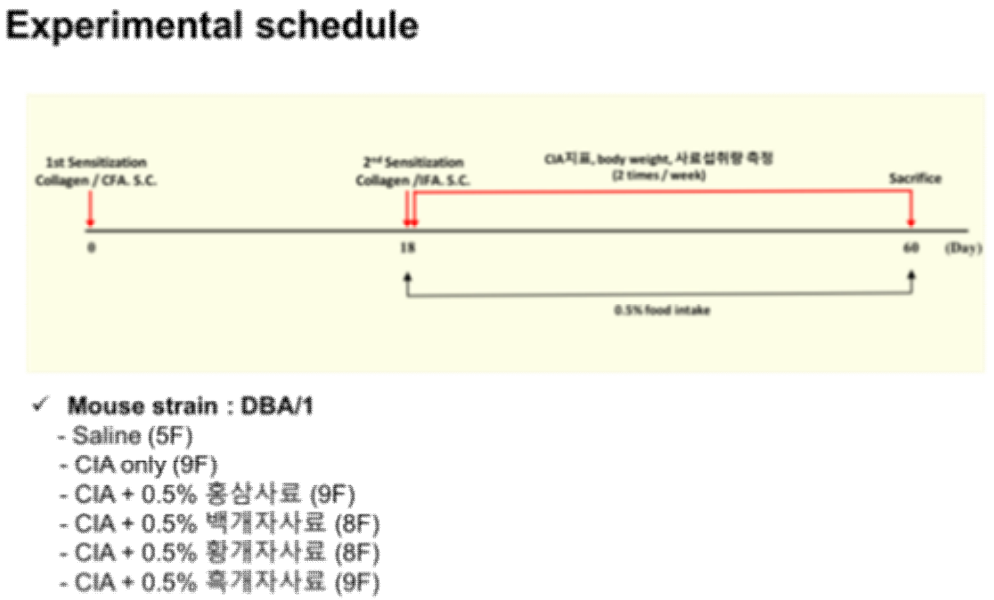
〈그림 2.173 마우스 혈청내의 Cytokine 발현〉

* Conclusion

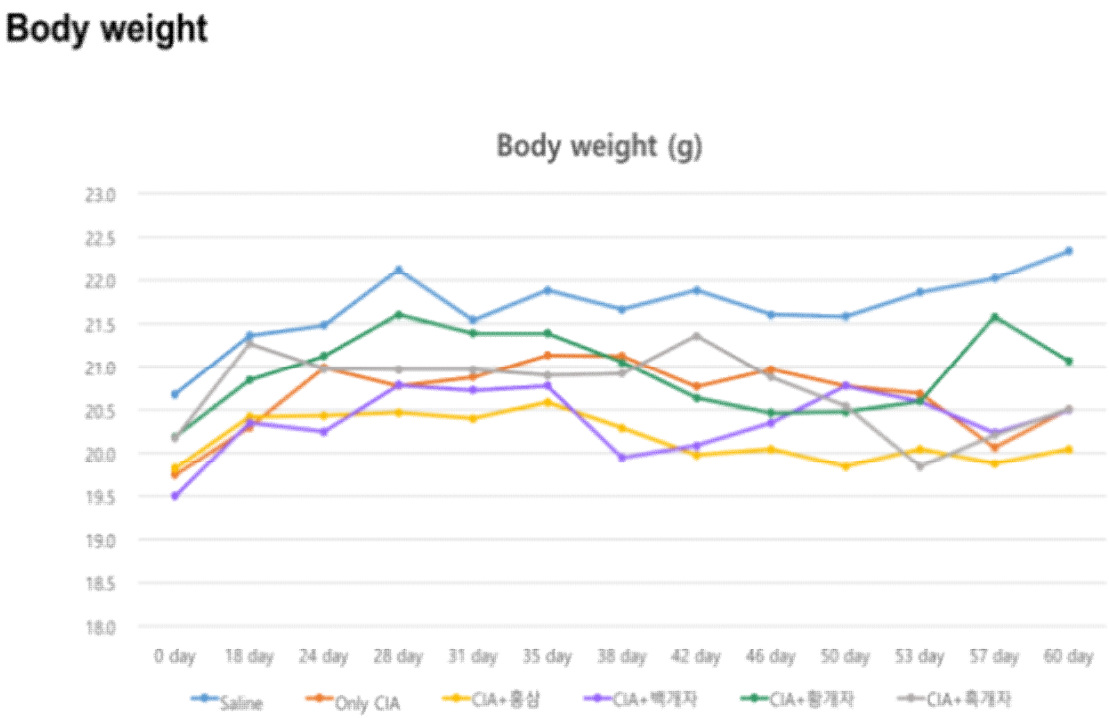
- Indomethacin 투여 시 Clinical score와 발 두께가 감소하였음.
- Micro CT 결과 골관절의 변화가 완화되었음.
- 혈청내 항체 수준 측정에서 투여 시 항체양이 감소하는 경향성을 보였음.
- 염증매개체의 경우 saline군과 유의적 차이가 관찰되지 않아 시기별 측정을 통한 phenotype과의 상관성 비교가 필요한 것으로 판단됨.

- phenotype과 관절 변형 등에서 명확한 차이가 관찰되어 양성대조군 구축이 잘된 것으로 판단됨.

(3) 면역능 기존 소재 4종(홍삼, 백개자, 황개자, 흑개자)의 만성염증 반응 조절 동물실험



〈그림 2.174 만성면역유도 및 식품의 섭취 일정〉



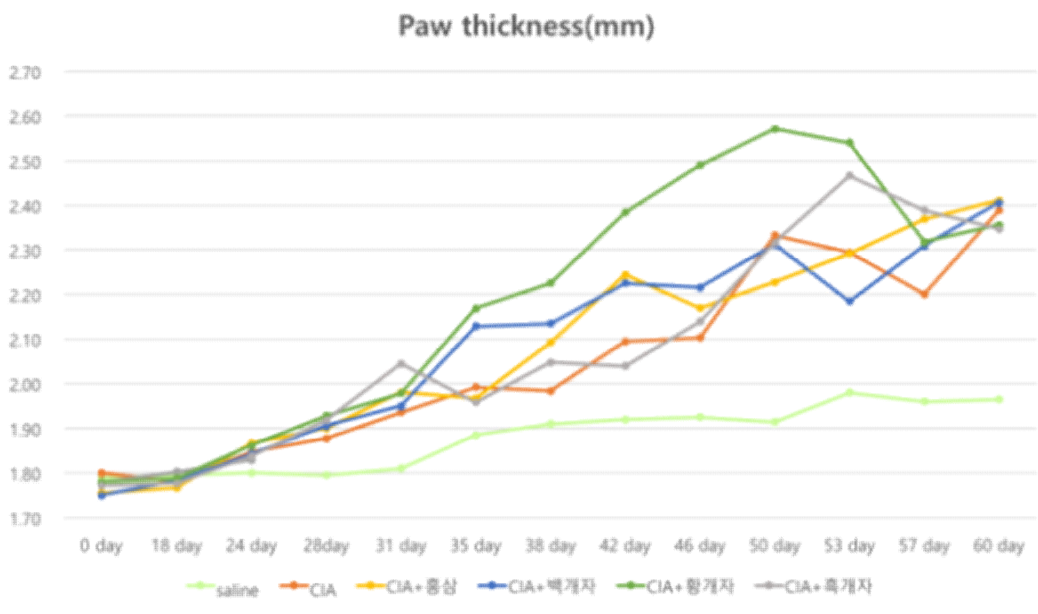
〈그림 2.175 마우스의 기간별 체중측정〉

Food intake

			saline(5)				CIA only(5)				홍삼(5)				백개자(5)				황개자(5)				흑개자(5)			
week	date	day	잔량 (g)	총급량 (g)	총섭취량	food intake (g/day)	잔량 (g)	총급량 (g)	총섭취량	food intake (g/day)	잔량 (g)	총급량 (g)	총섭취량	food intake (g/day)	잔량 (g)	총급량 (g)	총섭취량	food intake (g/day)	잔량 (g)	총급량 (g)	총섭취량	food intake (g/day)	잔량 (g)	총급량 (g)	총섭취량	food intake (g/day)
1	06월03일		-	153.3	82.9	2.8	-	305.1	161.6	3.0	-	303.4	150.2	2.8	-	304.9	140.7	2.9	-	305.6	144.6	3.0	-	305.2	157.0	2.9
	06월09일	6	70.4	99.2	63.9	3.20	140.5	201.1	109.1	3.03	153.2	205.9	119.5	3.32	164.2	205.9	112.2	3.51	161.0	206.3	108.7	3.40	148.2	205.7	110.2	3.06
2	06월13일	4	35.3	102.5	38.1	2.54	92.0	203.5	79.3	2.94	86.4	205.1	70.3	2.60	93.7	205.3	68.2	2.84	97.6	206.7	74.4	3.10	95.5	202.5	81.5	3.02
	06월16일	3	64.4	102.5	53.1	2.66	124.2	208.1	109.7	3.05	134.8	208.6	97.7	2.71	157.1	213.1	91.8	2.87	132.3	201.6	93.7	2.93	121.0	205.4	105.7	2.88
3	06월20일	4	49.4	101.2	40.8	2.72	98.4	208.2	66.6	2.47	111.9	203.4	63.4	2.35	121.3	202.5	48.4	2.02	107.9	205.9	68.2	2.84	101.7	208.6	73.1	2.71
	06월23일	3	68.4	104.3	53.5	2.68	141.6	203.6	102.6	2.85	140.0	207.9	85.8	2.38	154.1	203.9	86.4	2.70	137.7	208.0	82.8	2.59	130.5	202.2	107.8	2.99
4	06월27일	4	50.8	99.9	47.5	2.38	101.0	206.4	92.9	2.58	122.1	203.4	91.9	2.55	117.5	206.5	86.4	2.70	135.2	203.7	83.0	2.59	95.4	205.7	89.4	2.48
	07월01일	4	52.4	103.5	54.8	2.74	113.5	208.3	109.8	3.05	111.5	202.9	93.7	2.60	120.1	203.8	95.1	2.97	120.7	205.7	85.5	2.61	116.3	204.2	94.5	2.63
5	07월05일	4	48.7	103.9	41.5	2.77	98.5	207.3	70.8	2.62	109.2	208.7	69.4	2.57	108.7	206.7	65.4	2.73	122.2	209.5	65.6	2.73	109.7	208.3	59.6	2.21
	07월08일	3	62.4	101.6	52.2	2.61	136.5	204.9	85.8	2.38	140.3	207.0	92.3	2.56	141.3	206.5	82.4	2.58	143.9	205.8	97.1	3.03	148.7	208.6	98.7	2.74
6	07월12일	4	49.4	106.6	33.6	2.24	119.1	208.2	66.4	2.46	114.7	206.5	67.2	2.49	127.1	204.8	59.3	2.47	108.7	205.1	58.0	2.42	108.9	205.3	80.7	2.99
	07월15일	3	73.0	101.8			141.8	205.5			138.3	207.8			146.5	204.0			147.1	202.5			124.6	205.6		
7	07월19일	4																								

〈그림 2.176 마우스의 기간별 식품사료섭취량〉

Footpad thickness



〈그림 2.177 마우스의 기간별 발두께〉

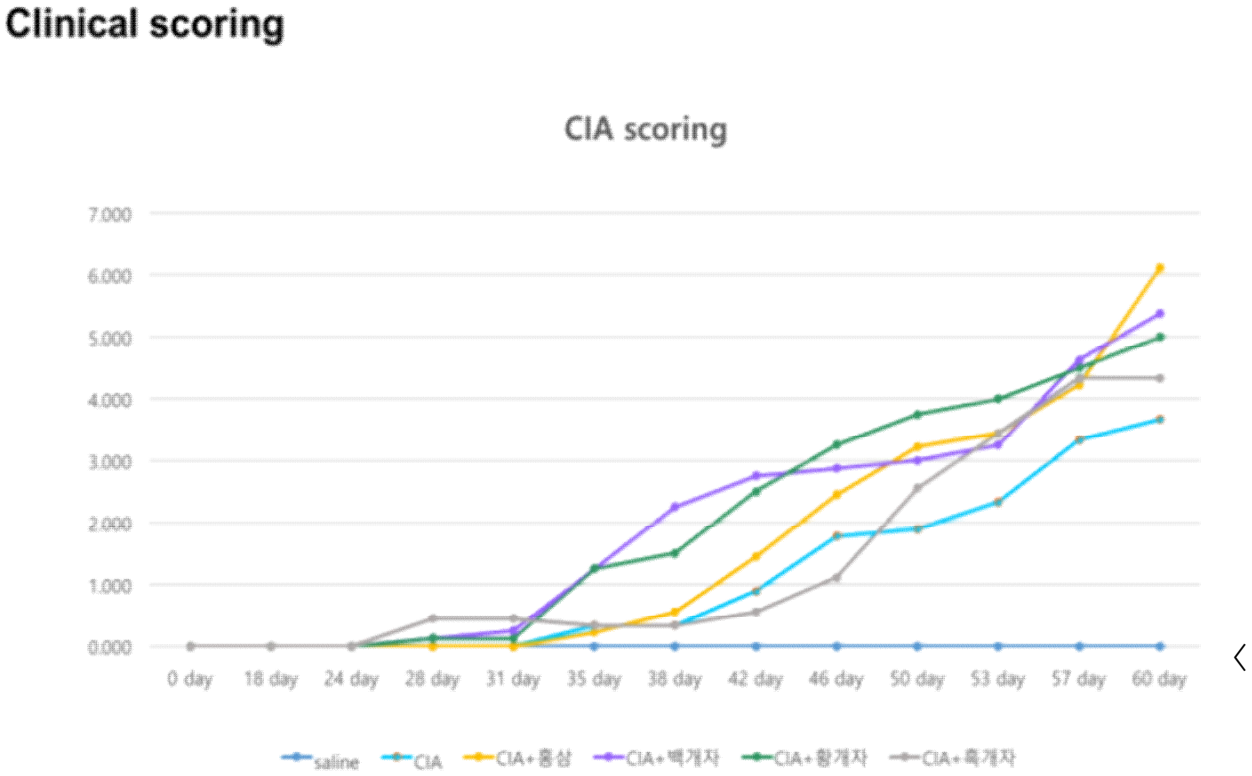
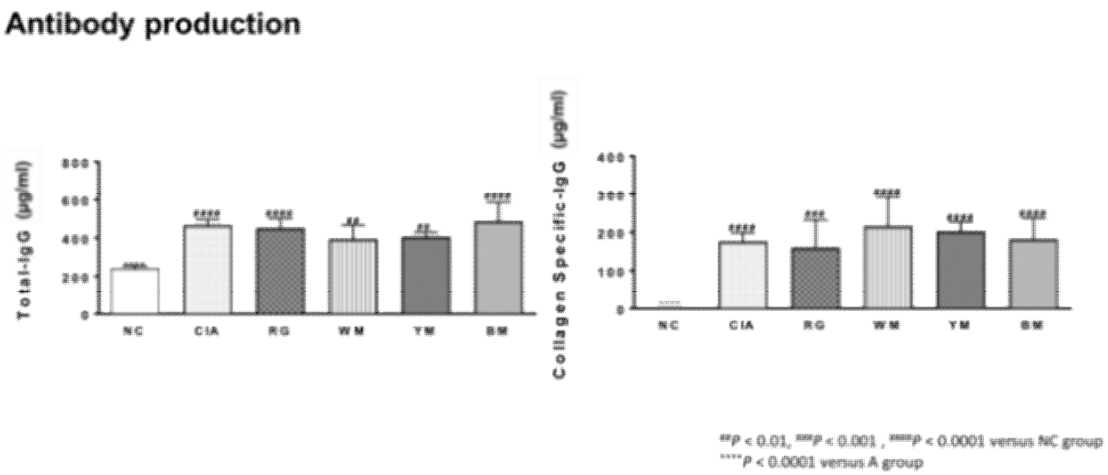
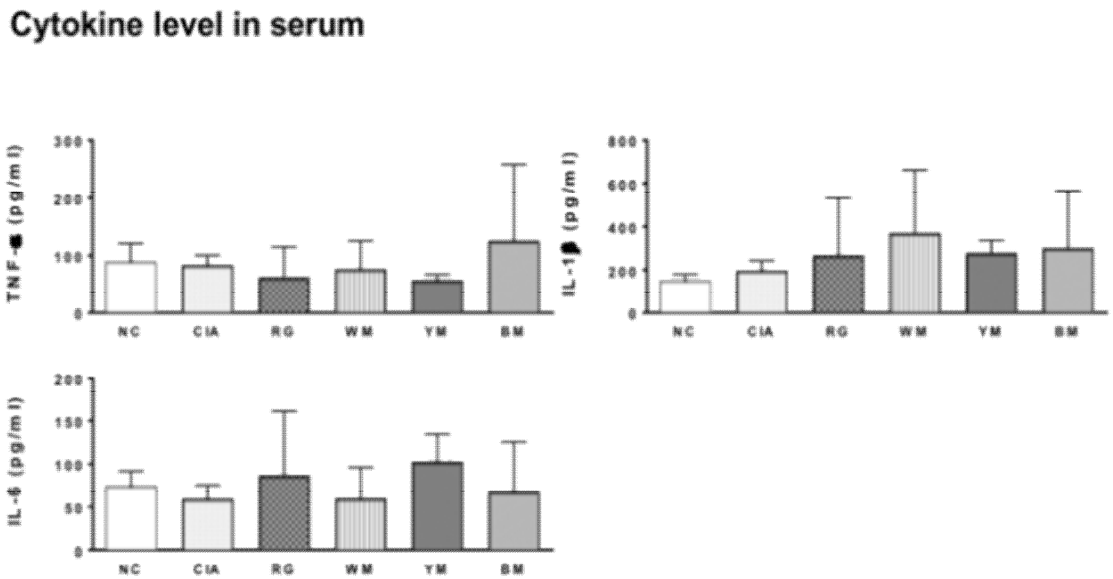


그림 2.178 마우스의 기간별 관절변형정도〉



〈그림 2.179 마우스 혈청내 항체측정〉

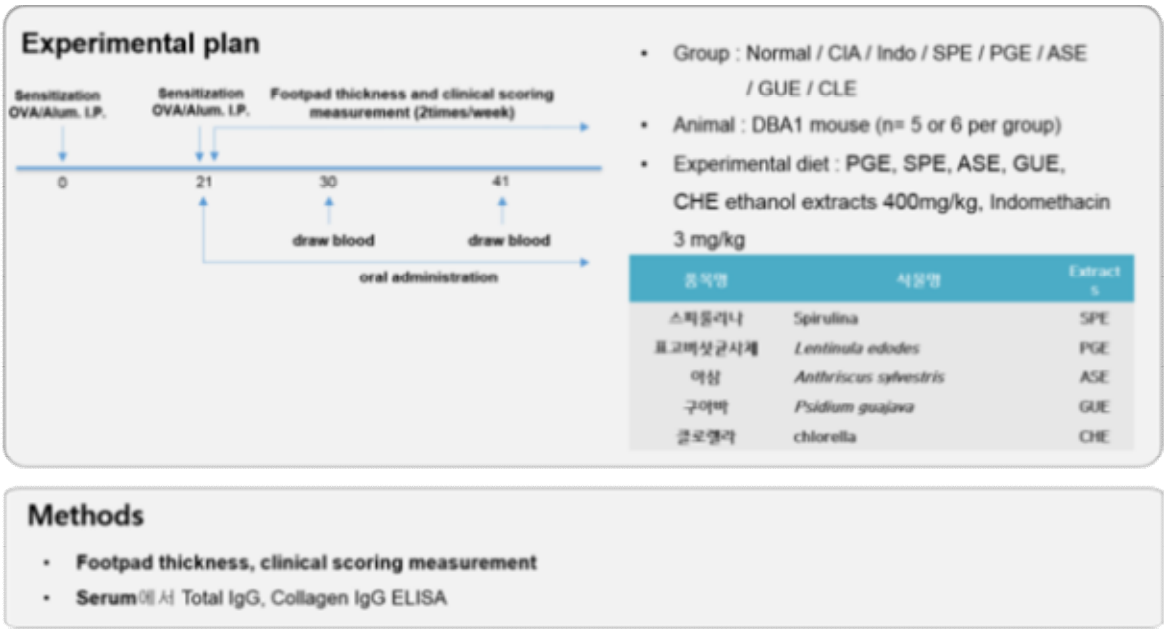


〈그림 2.180 마우스 혈청내 염증매개체 측정〉

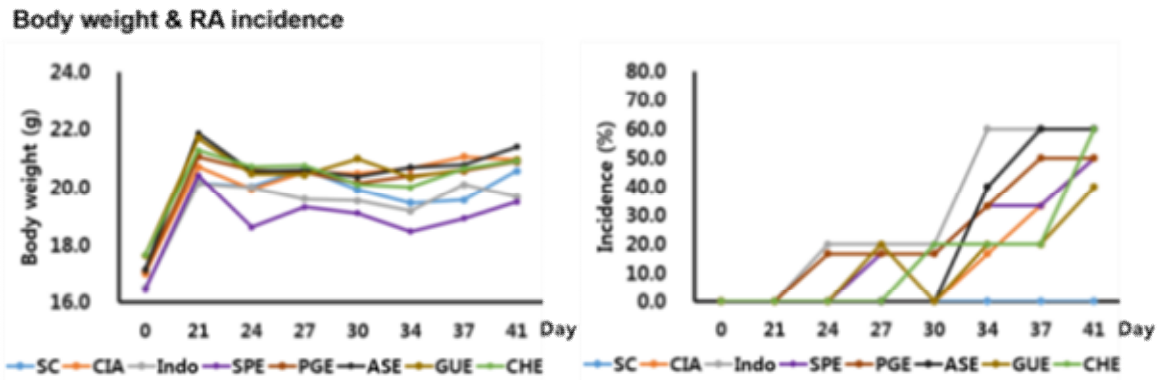
*** Conclusion: Collagen을 이용한 만성염증모델은 잘 정립된 것으로 판단됨.** 만성염증의 지표인 항원특이 항체 (Collagen specific IgG와 total IgG)가 유도군 혈청내에서 증가되어 있고 특히 Collagen IgG의 경우 그 차이가 매우 큼. 또한 같은 양상으로 CIA 유도군에서 발의 부종과 관절의 변형이 관찰됨으로서 만성염증이 심하게 진행된 것을 확인할 수 있었음. 다만 혈청내 cytokine의 양의 변화가 없는 것은 1st induction후 60일이 지난시점이므로 초기시점에서 측정할 필요가 있을것으로 생각됨. **홍삼 및 개자류의 경우 만성염증반응을 조절하는 면역능은 관찰할 수 없었음.**

(4) 면역능 소재 5종(스피룰리나, 표고버섯균사체, 아삼, 구아바, 클로렐라)의 만성염증반응조절 동물실험

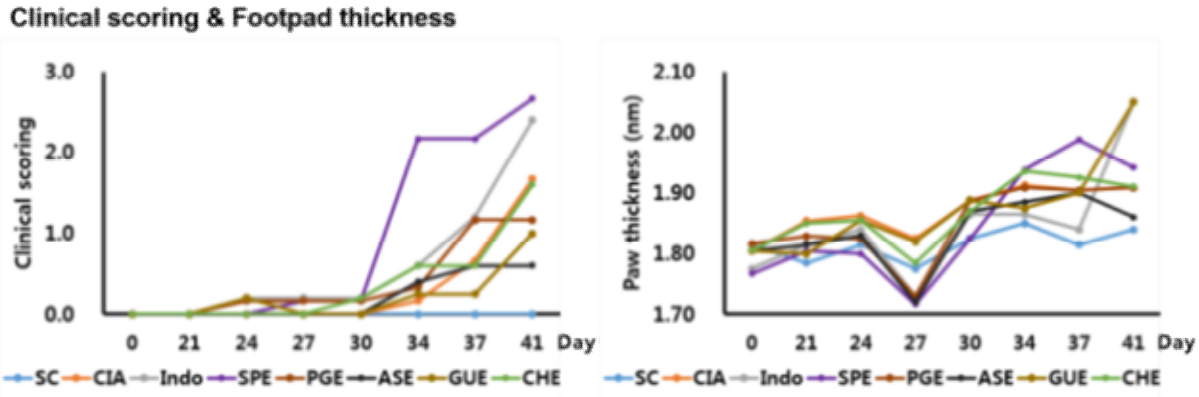
- 면역능 소재 5종(스피룰리나, 표고버섯균사체, 아삼, 구아바, 클로렐라)을 400mg/kg 100ul씩 경구투여 하였음.
- Indomethacin을 3mg/kg으로 100ul씩 경구투여 하였음.
- 구아바 투여군에서 발병률과 clinical score가 만성염증 유도군 대비 감소하였음.
- 스피룰리나, 표고버섯균사체, 아삼, 클로렐라 투여군의 경우 특이사항이 관찰되지 않음.



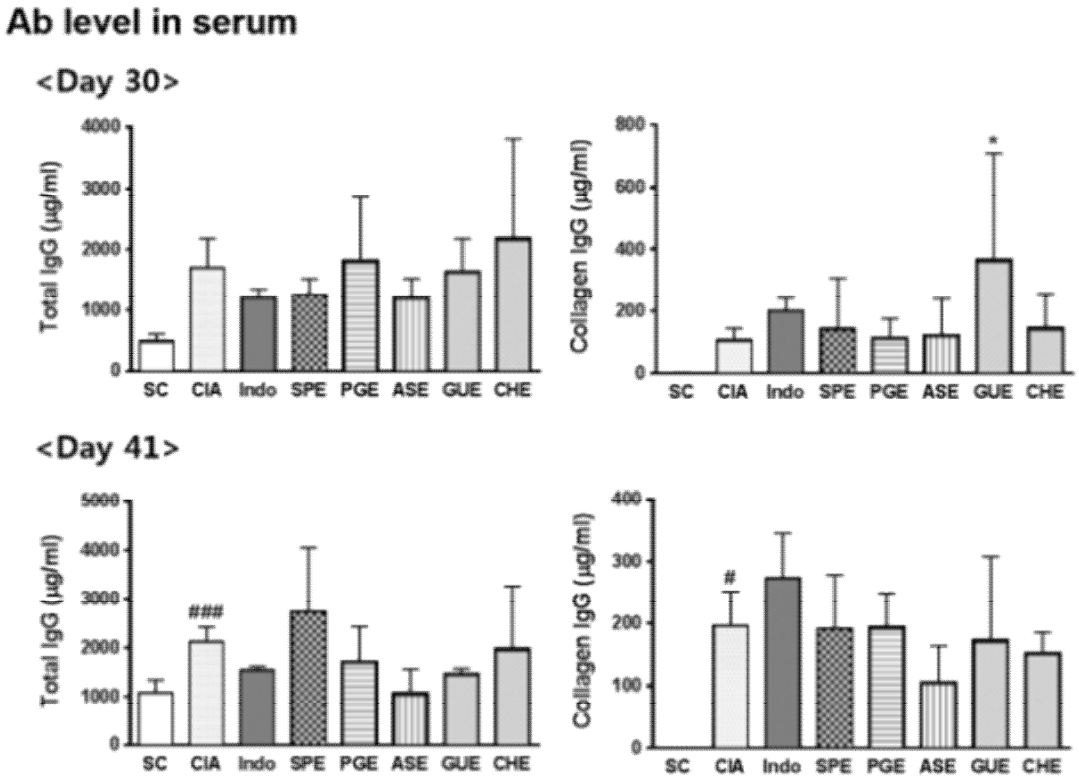
〈그림 2.181 과민면역유도 및 면역능 소재 5종(PGE, SPE, CGE, YDE, YHE) 투여 일정〉



〈그림 2.182 마우스의 기간별 체중 및 발병률〉



〈그림 2.183 마우스의 기간별 발두께 및 관절변형정도〉



〈그림 2.184 마우스의 기간별 혈청내의 Total-IgE 및 Collagen-IgE〉

* Conclusion:

- 구아바 추출물의 경우 발병률과 clinical score가 만성염증 유도군 대비 감소하였음.
  나머지 4종의 경우 특이적인 차이가 관찰되지 않았음.

3. In vitro – in vivo 소재별 결과 비교 분석 및 타당성 평가

Table 1. Immunosuppressed mouse model

no	Gender / strain	Inducing agent	Exposure / challenge	Responses to challenge	functional materials	Findings	만성염증 개선능 in vitro 평가 타당성 분석	비고
1	Female	Cyclophosphamide	I.P on day 0-2	**면역 억제** 1. T 세포 활성 감소 2. 항원에 대하여 염증반응을 일으키지 않음	**양배추 추출 분말** (Brassica oleracea)	**효과없음**	**효과 없음**	
	C57/b6						**불일치**	
2	Female	Cyclophosphamide	I.P on day 0-2	**면역 억제** 1. T 세포 활성 감소 2. 항원에 대하여 염증반응을 일으키지 않음	**청귤 다당** (Citrus nippokoreana Tanaka)	**림프구 활성증가 항원에 대하여 반응성 증가** IL-1β, IL-6, IFN-γ 증가	**면역능 증강**	
	C57/b6						**일치함 (적합)**	
3	Female	Cyclophosphamide	I.P on day 0-2	**면역 억제** 1. T 세포 활성 감소 2. 항원에 대하여 염증반응을 일으키지 않음	**한라봉 다당** (Citrus reticulata)	**림프구 활성증가 항원에 대하여 반응성 증가** IL-1β, IL-6, IFN-γ 증가	**면역능 증강**	
	C57/b6						**일치함 (적합)**	
4	Female	Cyclophosphamide	I.P on day 0-2	**면역 억제** 1. T 세포 활성 감소 2. 항원에 대하여 염증반응을 일으키지 않음	**당근박 다당** (Daucus carota)	**림프구 활성증가 항원에 대하여 반응성 증가** IL-1β, IL-6, IFN-γ 증가	**면역능 증강**	
	C57/b6						**일치함 (적합)**	

Table 2. Acute model of allergic lung inflammation

no	Gender / strain	Allergen / Sensitisation	Exposure / challenge	Responses to challenge	functional materials	Findings	과민면역 개선능 in vitro 평가 타당성 분석	비고
1	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 14-17	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**백개자** (White mustard seeds)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소	**효과 없음**	
	Balb/c	OVA/Alum					**결과 없음**	
2	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 14-17	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**황개자** (Yellow mustard seeds)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소	**효과 없음**	
	Balb/c	OVA/Alum					**결과 없음**	
3	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 15-18	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5,	**더덕** (Codonopsis lanceolata)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소 2. IL-4, 5,	**과민면역 완화**	**논문 투고** (Journal of ethnopharmacology)
	Balb/c	OVA/Al					**일치함**	

		um		13의 증가, 3.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가		13 감소 3.IgE의 감소 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**(적합)**	
4	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 15-18	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**은시호** (Stellaria dichotoma var. lanceolata Bge)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소 2. IL-4, 5, 13 감소	**과민면역 완화**	
	Balb/c	OVA/Alum					**일치함 (적합)**	
5	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 14-17	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**다래** (Actinidia argute)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소	**효과 없음**	
	C57bl/6	OVA/Alum					**불일치**	
6	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 14-17	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가	**후코이단** (Fucoidan)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소	**효과 없음**	
	C57bl/6	OVA/Alum					**불일치**	

				폐조직내 1.활성화된 도움 T 세포의 증가				
7	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 14-17	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**은시호 효소처리** (Stellaria dichotoma var. lanceolata Bge)-treated with enzyme	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소 **폐조직내** 1.억제T세포 증가	**과민면역 완화**	
	C57bl/6	OVA/Alum					**일치함 (적합)**	
8	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 14-17	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**양배추 효소처리** (Brassica oleracea var. capitate)-treated with enzyme	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소 **폐조직내** 1.억제T세포 증가	**과민면역 완화**	
	C57bl/6	OVA/Alum					**일치함 (적합)**	
9	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 14-17	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**양배추 다당** (polysaccharides from Brassica oleracea var. capitate)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소 **폐조직내** 1.억제T세포 증가	**과민면역 완화**	
	C57bl/6	OVA/Alum					**일치함 (적합)**	
	Female	OVA	OVA	**폐기도세척**	**표고버섯**	**vehicel군**	**효과 없음**	

10			(i.n.) on day 13-16	**액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **혈장내** 1.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**균사체** (Lentinula edodes)	**대비 폐기도세척액내** 1.IL-13 감소		
	Balb/c	OVA/Alum					**일치함 (적합)**	
11	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 13-16	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **혈장내** 1.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**스피루리나** (Spirulina)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소 1.IL-5, 13 감소	**과민면역 완화**	
	Balb/c	OVA/Alum					**일치함 (적합)**	
12	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 13-16	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **혈장내** 1.IgE의 증가	**청귤다당** (polysaccharides from immature fruit of Citrus unshiu S. Marcov.)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소 2.IL-13 감소	**과민면역 완화**	
	Balb/c	OVA/Alum					**일치함 (적합)**	

				폐조직내 1.활성화된 도움 T 세포의 증가				
13	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 13-16	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **혈장내** 1.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**양배추 다당** (polysaccharides from Brassica oleracea var. capitate)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.IL-13 감소 2.IgE의 감소	**과민면역 완화**	
	Balb/c	OVA/Alum					**일치함 (적합)**	
14	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 13-16	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가, 3.IgE의 증가 **혈장내** 1.IgE의 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**양배추 효소처리** (Brassica oleracea var. capitate)-treated with enzyme	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소 2.IL-4, 13 감소	**과민면역 완화**	
	Balb/c	OVA/Alum					**일치함 (적합)**	
	Female	OVA	OVA (i.n.) on day	**폐기도세척액내** 1.염증세포(	**식방풍** (Peucedanum japonicum)	**vehicel군 대비 폐기도세척액**	**과민면역**	**논문 게재** (Journal of

				호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가 3.Mucus 분비 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가		**내** 1.염증세포(호산구) 감소 2.IL-4, 5, 13 감소 3.Mucus 분비 감소 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 감소	**완화**	
15	Balb/c	OVA/Alum	13-16				**일치함 (적합)**	ethnopharmacology) 2018.01
16	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 13-16	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가 3.Mucus 분비 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**아삼** (Anthriscus sylvestris Hoffm)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소 2.IL-4, 5, 13 감소 3.Mucus 분비 감소 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 감소	**과민면역 완화**	**논문 투고** (Journal of ethnopharmacology)
	Balb/c	OVA/Alum					**일치함 (적합)**	
17	Female	OVA	OVA (i.n.) on day 13-16	**폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 증가 2.IL-4, 5, 13의 증가 3.Mucus 분비 증가 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 증가	**강활** (Ostericum koreanum (OK)Maximowicz)	**vehicel군 대비 폐기도세척액내** 1.염증세포(호산구) 감소 2.IL-4, 5, 13 감소 3.Mucus 분비 감소 **폐조직내** 1.활성화된 도움 T 세포의 감소	**과민면역 완화**	**논문 작성 중**
	Balb/c	OVA/Alum					**일치함 (적합)**	

Table 3. Chronic autoimmune model of Collagen induced arthritis(CIA)

no	Gender / strain	Allergen / Sensitisation	Exposure / challenge	Responses to challenge	functional materials	Findings	만성염증 개선능 in vitro 평가 타당성 분석	비고
1	Female	Bovine Type2 collagen	Collagen (s.c.) on day	**관절염** 1.관절변형	**스피루리나** (Spirulina)	**효과없음**	**효과 없음**	

	DBA/1	Collagen / CFA	0-21	증가 2.발등 부종 증가 **혈장내** 1.IgG 증가 2.colallagen specific IgG 증가			**불일치**	
2	Female	Bovine Type2 collagen	Collagen (s.c.) on day 0-21	**관절염** 1.관절변형 증가 2.발등 부종 증가 **혈장내** 1.IgG 증가 2.colallagen specific IgG 증가	**표고버섯 균사체** (Lentinula edodes)	**효과없음**	**효과 없음**	
	DBA/1	Collagen / CFA					**불일치**	
3	Female	Bovine Type2 collagen	Collagen (s.c.) on day 0-21	**관절염** 1.관절변형 증가 2.발등 부종 증가 **혈장내** 1.IgG 증가 2.colallagen specific IgG 증가	**아삼** (Anthriscus sylvestris Hoffm)	**관절염** 1.관절변형 감소 **혈장내** 1.IgG 감소 2.collagen specific IgG 감소	**만성염증 완화**	
	DBA/1	Collagen / CFA					**일치함 (적합)**	
4	Female	Bovine Type2 collagen	Collagen (s.c.) on day 0-21	**관절염** 1.관절변형 증가 2.발등 부종 증가 **혈장내** 1.IgG 증가 2.colallagen specific IgG 증가	**구아바** (Psidium guajava)	**관절염** 1.관절변형 감소 **혈장내** 1.IgG 감소	**만성염증 완화**	
	DBA/1	Collagen / CFA					**일치함 (적합)**	
5	Female	Bovine Type2 collagen	Collagen (s.c.) on day 0-21	**관절염** 1.관절변형 증가 2.발등 부종 증가	**클로랠라** (chlorella)	**효과없음**	**효과 없음**	
							불일치	

	DBA/1	Collagen / CFA		**혈장내** 1.IgG 증가 2.colallagen specific IgG 증가				

제 3 절. 제 2협동 ㈜비케이바이오
면역 식품 소재 발굴 및 산업화를 위한 평가 가이드라인 설계

3.1 우수소재 데이터베이스 활용을 통한 우수식품소재 수집

가. 산업화 및 연구완료 소재를 대상으로 국내외 소재들의 정보 수집

- 국내 소비자들은 면역능력과 관련하여 면역력증가 (37.8%), 감기예방 (24.3%), 질병예방 (15.3%) 등 기대효과를 예상하고 있는 것으로 조사되고 있으며, 건강기능식품 연구진행분야를 보면 면역기능증진은 33.3%로 항 산화, 관절건강과 함께 가장 높은 비율을 차지하고 있을 만큼 관심과 니즈가 증대되고 있는 연구 분야로 분석되고 있다.

- 웰빙트렌드에 따른 소비자의 니즈 증가 및 가속화되는 고령화 등의 이유로 기능성식품에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 면역관련 기능성 식품에 대한 성장 잠재력이 풍부한 시장으로 인식되어지고 있는 실정이다.

그림3.1 건강기능식품 연구 진행 분야 (기업, 소비자 중심)

*자료 : 보건의료기술진흥사업_미래 질환별 건강기능식품 융복합 핵심기술 연구개발 지원 (2011)

- 대부분의 면역기능 조절에 도움을 주는 식품들은 면역세포의 활성을 증가시켜 건강한 면역기능 유지에 도움을 줄 수 있는 것들이다. 하지만 천식, 아토피 등 과면역반응에 대한 억제기능의 식품소재들에 대한 개발 연구도 활발히 진행되고 있다.

- 국내 건강한 면역기능유지에 도움을 주는 대표적인 건강기능식품 소재로는 인삼, 홍삼, 알콕시글리세롤이 고시형 건강기능식품원료로 등재되어 있으며, 최근 다양한 면역 증강소재에 대한 관심이 높아지면서 개별인정형 건강기능식품원료들에 대한 연구 및 기술개발의 속도가 증가하고 있다.

- 기능성 원료로서 고시형 원료에는 인삼, 홍삼이 대표적이며 게르마늄효모, 금사상황버섯, 당귀혼합추출물, L-글루타민, 스피루리나 등은 면역력 증진에 도움을 주는 개별인정형 기능성 원료로 등록되어 있다.

- Enterococcus faecalis 가열처리 건조분말, 구아바잎추출물 등 복합물, 다래추출물, 소엽추출물, 피카오프레토분말 등 복합물은 과민면역반응 개선에 도움을 주는 개별인정형 기능성 원료로 등록되어 있는 상황이다.

- 우선 면역 우수식품소재 자료를 수집하기 위해 산업화 및 연구완료 소재를 대상으로 국내외 소재들의 규격과 제조법 정보 수집을 진행하였다. 주로 산업화가 되어 시장에서 판매되고 있는 제품들을 중심으로 하여 조사를 실시한 결과는 표 1과 같다.

표 3.1 국내 소재들의 정보 수집

구분	원료명	기능성 내용	기능(지표)성분	규격	제조법
기준 규격형	인삼	면역력 증진에 도움	진세노사이드	Rg1과 Rb1을 합하여 0.8~34mg/g	(1) 원재료 분말화 (2) 원재료를 물이나 주정으로 추출하여 여과하거나 여과한 후 농축 또는 발효
	홍삼	면역력 증진에 도움	진세노사이드	Rg1, Rb1 및 Rg3를 합하여 2.5~34 mg/g	(1) 원재료 분말화 (2) 원재료를 물이나 주정으로 추출하여 여과하거나 여과한 후 농축 또는 발효
	클로렐라	면역력 증진에 도움	총 엽록소	총 엽록소 10mg/g이상	클로렐라속 조류(藻類)를 인공적으로 배양하고 건조하여 제조
	알콕시글리세롤 함유상어간유	면역력 증진에 도움	알콕시글리세롤	알콕시글리세롤 180mg/g이상	원재료에서 추출한 유지에 스쿠알렌 및 검화물을 제거한 후 불검화물 부분을 물로 세척하고 탈취·가열·여과하여 제조
	알로에 겔	면역력 증진에 도움	총 다당체	총 다당체 30mg/g이상	(1) 원재료의 외피 제거 후 겔 부분을 분리하여 건조, 분말화하여 제조 (2) 원재료의 겔 부분만 분리하도록 분쇄, 여과하거나 착즙한 것 또는 분쇄, 착즙한 후 농축하거나 농축한 것을 건조, 분말화하여 제조
개별 인정형	게르마늄효모	면역력 증진에 도움 (생리활성기능 3등급)	게르마늄	-	효모를 종균 배양한 후 무기 게르마늄을 넣고 배양

개별 인정형	금사상황버섯	면역력 증진에 도움 (생리활성기능 2등급)	베타글루칸	베타글루칸 8.7~16.2%	3~4년생 건조상황버섯을 분쇄하여 추출
	당귀혼합추출물	면역력 증진에 도움 (생리활성기능 2등급)	nodakenin, paeoniflorin, chlorogenic acid	조다당 30~50%, nodakenin 0.1~0.4%, paeoniflorin 0.8~1.5%, chlorogenic acid 0.08~0.2%	-
	표고버섯균사체	면역력 증진에 도움 (생리활성기능 2등급)	a-glucan	글루칸 3.5~10%	표고버섯균사체 배양액을 알파-아밀라아제, 펙티나아제, 프로테아제를 처리한 후 건조
	L-글루타민	면역력 증진에 도움 (생리활성기능 2등급)	L-글루타민	L-글루타민 98.5~101.5%	액상포도당, 대두박분해물, 염화암모늄, 황산암모늄, 제일인산칼륨, 제이인산칼륨 수용액을 corynebacterium glutamicum으로 발효
	스피루리나	면역력 증진에 도움 (생리활성기능 3등급)	총 엽록소	총 엽록소 5mg/g이상	원재료를 열수 추출하고 여과, 농축하여 제조
	다래추출물	과민면역반응 개선에 도움 (생리활성기능 2등급)	Quinic acid, Citric acid	-	원재료를 열수 추출하고 여과, 농축하여 제조
	소엽추출물	과민면역반응 개선에 도움 (생리활성기능 3등급)	로즈마린산 (Rosmarinic acid)	-	원재료를 열수 및 주정 추출하고 여과, 농축하여 제조
	프로바이오틱스	과민면역반응 개선에 도움 (생리활성기능 3등급)	생균 수	-	배양
	피카오프레토분말등 복합물	과민면역반응 개선에 도움 (생리활성기능 2등급)	총 폴리페놀, 비타민C, 클로로겐산, 계피산	-	계피추출물, 아세로라농축물, 피카오프레토 3종 혼합물
	구아바잎추출물 등 복합물	과민면역반응 개선에 도움 (생리활성기능 2등급)	Ellagic acid, EGCG, Gallic acid	총 폴리페놀 250~450 mg/g	녹차잎, 구아바잎, 장미꽃잎 추출물로 이루어진 식물 복합물
	Enterococcus faecalis 가열처리건조분말	과민면역반응 개선에 도움 (생리활성기능 2등급)	Vaccenic acid	Vaccenic acid 0.6~0.9%	Enterococcus faecalis FK-23 효소 및 가열처리 분말(LFK)"은 Enterococcus faecalis FK-23를 사전배양한 후, 37도, 10시간 이상 본배양을 하여 정제 및 세척하고 효소처리

*자료 : 면역조절 기능성 식품의 구조 및 작용 (2016)

- 표 1에서 조사된 바와 같이 고시형은 5종, 개별인정형은 12종으로 조사되었다. 이중 시중에서 판매가 활성화되어 있거나 출시되어 소규모라도 시장이 형성되어 있는 원료의 경우 인삼, 홍삼, 클로렐라, 알로에겔, 프로바이오틱스로 대부분 대기업 또는 중견기업 규모 이상의 기업에서 생산하고 있는 고시형 원료에 집중되어 있고, 최근 1~2년 사이 프로바이오틱스 원료에 대한 관심이 증가되면 붐이 일어난 수준으로 국내 시장에서의 면역 관련 시장은 다양성은 위축되어 있다 분석할 수 있다. 그 만큼 홍삼 제품에 대한 소비자들의 두터운 신뢰와 더불어 이와 경쟁할 수 있는 제품 개발의 출현이 시급하다 분석할 수 있다.

- 개별인정형 원료의 증가세로 보면 면역기능증진식품과 관련하여, 미국, 유럽, 일본 등과 비교해 뒤지지 않는 활발한 연구 활동이 국내에서도 진행되고 있다고는 판단되었다.

- 일본, 미국, 유럽 등에서의 식품산업 관련기술은 예전부터 노화억제, 장수, 안전, 건강수명 연장 관련 식품을 발전 가능성이 높은 분야로 보고 이들 식품개발을 위한 식품생명공학 기술 개발에 연구역량을 집중하고 있었고, 건강기능식품 소재화 기술에 대한 해외 특허는 1991년부터 최근까지 총 4,456건이며 2000년대 초반 이후 매년 300건 이상 출원되는 것으로 보아 꾸준히 성장을 하는 추세로 분석하고 있다.

표 3.2 국가별 기능성 식품 키워드

국가	기능성 식품 키워드
미국	아동, 파이토케미컬, 50대 이상의 실버 세대, 유기농, 스포츠 연계, 저지방, 무설탕, 저인슐린, 글루텐 제거, 자연친화
일본	피부미용. 실버세대. 관절, 음료, 대사증후군, 아이케어, 맨탈케어, 면역
중국	급성장, 기능성 음료, 노인인구 증가, 질병 케어
서유럽	비만, 인터넷, 대체요법, 고품격

* 자료 : 한국보건산업진흥원_동향전망 (2012)

- 상기 표에서와 같이 국가별 주요 키워드는 노령화 사회로 함축될 수 있고, 이와 관련된 헬스케어 사업의 확정 및 건강기능식품 등의 관련 업계의 꾸준한 성장세는 이어질 것으로 예상할 수 있겠다.

- 2008년 미국 기능성식품 시장은 전년 대비 8.8% 성장한 1,040억불로 집계되었으며 소아비만, 체중과다, 성인병 등에 대한 경각심과 인구의 고령화 및 건강보험료에 대한 부담 등으로 인하여 질병의 예방에 대한 관심이 높아지고 있는 점 등을 미루어 볼 때 미국 기능성식품 시장은 향후에도 지속적으로 성장할 것이며 이에 따라 미국 Nutrition Business Journal은 2008년 대비 63.5% 성장한 1,700억 달러를 형성할 것으로 전망하고 있다.

- 일본의 경우 단일국가로는 미국 다음으로 큰 시장을 형성하고 일본 건강식품 시장은 건강식품에 대한 법 규제 및 행정 감시 강화, 부정 상법 적발 등에 의한 소비자 심리의 악화 등으로 2006년부터 2009년까지 4년 연속 하락을 지속하다 2010년에는 고령화 사회의 확대, 경제 환경의 악화로 인한 의료, 복지, 건강정책 불안, 건강식품에 대한 소비자의 기대치 상승 등의 원인으로 전년 대비 6.0% 성장을 하며 1조 1800억엔 (약 146억불) 시장을 형성하였다.

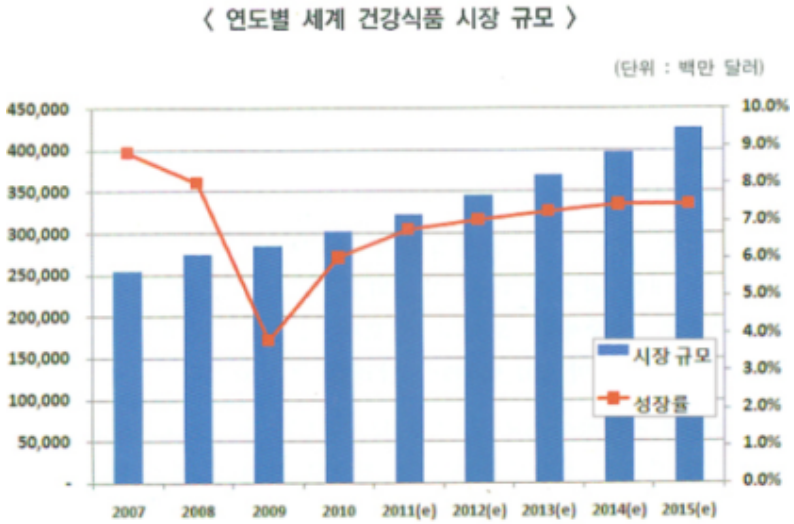


그림3.2 연도별 세계 건강식품 시장 규모 (2007~2015)

* 자료 : 국내외 건강기능식품 시장 트렌드 (2014)

- 국외의 산업화가 진행된 면역관련 소재들의 정보를 표 3 요약하였다.

표 3.3 국외 면역관련 소재들의 정보 수집

구분	원료명	기능성 내용	기능(지표)성분	규격	제조법
해외 주목할 원료	알콕시글리세롤	면역력 증진	알콕시글리세롤	-	원재료에서 추출한 유지에 스쿠알렌 및 검화물을 제거한 후 불검화물 부분을 물로 세척하고 탈취·가열·여과하여 제조
	알로에	면역력 증진	총 다당체	-	원재료를 분리하여 건조
	초유	면역력 증진	sIgA, IgG, IgF. TgF-β	-	탈지한 천연 초유(첫번째 우유)
	에키네시아(Echinacea)	면역력 증진	에키나신, 아라비노갈락탄, 알카마이드, 이눌린	-	-
	Arabinoxylan	면역력 증진	다당체	-	벼, 보리, 밀, 옥수수 등의 벼과 식물 중에 많이 포함되어 있는 헤미셀룰로오스를 효소가수분해
	MCP	면역력 증진	펙틴	-	화학적 합성
	PSK/PSP	면역력 증진	PSP	-	열수추출
	Mannitol	면역력 증진	Mannitol	-	화학적 합성

* 자료 : 식품의 면역조절 및 면역력 강화관련 특허 동향 (2001)

- 해외의 경우 일본에서 개발된 Arabinoxylan과 미국의 MCP가 다당류를 주요 기능성분으로 하는 원료로 주목할 만하다 판단되며, 알로에 제품들과 초유 제품들이 일반적으로 면역과 관련된 제품으로 꾸준한 수요가 있는 것으로 파악되었다.

• 면역소재 정보 수집은 기존에 알려진 면역식품소재의 면역기능 유효성에 대한 논문 분석을 수행하여 선별된 소재와 면역능 관련 연구 데이터를 확보하고 있는 소재를 기준으로 정보를 획득하여 조사하였으며, 수집된 국내/외 소재들의 효능 클레임별로 제시 효능 데이터 분석과 바이오마커 리스팅 및 관련 정보를 통해 소재를 후보화하여 나열하고 수집 및 제조 가능한 소재 중심으로 재배열해 보았다(표 4).

표 3.4 효능 클레임별 논문 정보 수집 분석

			키워드에 따른 사전 논문 조사(건 수)				
클레임별	원료명	기능성분	immuno modulation	inflammation	Asthma	Rheumatoid arthritis	Infection
면역증진	홍삼	진세노사이드	4		3	1	31
	클로렐라	총 엽록소	3		2	0	134
	알로에 겔	다당체	0	6	0	0	3
	L-글루타민	L-글루타민	2	60	5	0	68
	표고버섯균사체	a-glucan	4		3	0	10
	MCP	pectin	1	8	0	1	1
	한라봉 다당	다당체	0		0	0	0
	감귤 다당	다당체	0		2	0	0
	브로콜리 추출물	설포라판	1		11	3	33
	우유펩타이드	펩타이드	0	1	0	0	0
면역개선	구아바잎 추출물등복합물	총 폴리페놀	0		0	0	16
	스피루리나	총 엽록소	0		0	2	19
	유산균	프로바이오틱스	1		110	35	1898
	IgG	IgG	4		2009	4953	18909

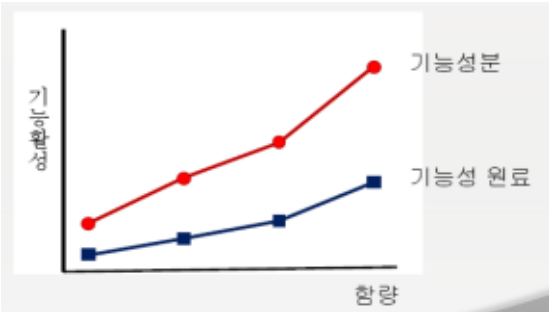
* 자료 : 1협동 (한국한의학연구원) 자료 제공

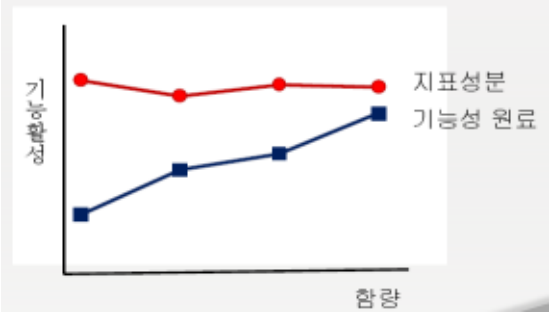
• 면역조절 기능에 대해서는 홍삼, 표고버섯균사체, IgG의 논문 건수가 많았으며, 염증에 대에서는 L-글루타민이 60건으로 가장 많았으며, MCP와 알로에 겔도 각 8, 6건이 검색이 되었다. 천식과 류마티스에 대해서는 IgG와 유산균이 거의 대부분의 건수가 조사되었으며, 감염 분야에서 높은 검색수를 나타내었다.

• 면역증진에 대한 논문 건수는 홍삼, 클로렐라, 표고버섯균사체, L-글루타민, 브로콜리추출물, 면역개선에 대한 논문은 유산균과 IgG에 편중되는 양상을 보였다.

나. 수집된 정보로부터 기능성분, 지표성분, 바이오마커를 중심으로 재배열을 통한 후보 계열화

- 기능성분이란 성분 자체가 단일성분 또는 높은 함량으로 존재하며 기능성을 나타내며 기능성분이 일정수준 이상으로 함유된 원료에서 기능성을 확인할 수 있는 성분이여야 하며, 지표성분이란 원재료의 사용여부를 확인할 수 있는 성분이며 제조공정의 표준화를 관리할 수 있는 성분으로서, 해당 성분의 농도와 기능성간의 상관은 없어도 된다.





- 상기에서 수집된 정보에서 기능성분, 지표성분, 바이오마커를 추가 조사하여 27종 소재들의 재배열을 통한 후보 계열화를 진행해 보았다(표 5).

표 3.5 원료별 기능성분, 지표성분, 바이오마커 조사 및 후보 계열화

원료명	기능성분	지표성분	바이오마커
인삼	진세노사이드	진세노사이드 Rg1,Rb1	NK 세포, 싸이토카인, NO, 탐식능, 면역글로불린, 세포 생존율
홍삼	진세노사이드	진세노사이드 Rg1,Rb1,Rg3	
클로렐라	총 엽록소	총 엽록소	
알콕시글리세롤 함유상어간유	Batyl alcohol, Chimyl alcohol, Selachyl alcohol	Batyl alcohol	
알로에 겔	총 다당체	총 다당체	
게르마늄 효모	게르마늄	게르마늄	
금사상황버섯	베타글루칸	베타글루칸	
당귀혼합추출물	조다당, nodakenin, paeoniflorin, chlorogenic acid	nodakenin, paeoniflorin, chlorogenic acid	
표고버섯균사체	베타글루칸, 알파글루칸	알파글루칸	
L-글루타민	L-글루타민	L-글루타민	
스피루리나	총 엽록소	Phycocyanin	면역글로불린, 히스타민, 싸이토카인, NO, 히스타민, 프로스타글란딘, 루코트리엔
다래추출물	Quinic acid, Citric acid	Quinic acid, Citric acid	NK 세포, 싸이토카인, NO, 탐식능, 면역글로불린, 세포 생존율
소엽추출물	로즈마린산	로즈마린산	

프로바이오틱스	생균수	생균수	면역글로불린, 히스타민, 싸이토카인, NO, 히스타민, 프로스타글란딘, 루코트리엔
피카오프레토분말 등 복합물	총 폴리페놀, 비타민C, 클로로렌산, 계피산	총 폴리페놀	NK 세포, 싸이토카인, NO, 탐식능, 면역글로불린, 세포 생존율
구아바잎추출물등 복합물	총 폴리페놀	총 폴리페놀	면역글로불린, 히스타민, 싸이토카인, NO, 히스타민, 프로스타글란딘, 루코트리엔
Enterococcus faecalis 가열처리건조분말	Vaccenic acid	Vaccenic acid	NK 세포, 싸이토카인, NO, 탐식능, 면역글로불린, 세포 생존율
키토산/키토올리고당	키토산/키토올리고당	키토산/키토올리고당	
초유	IgG	IgG	면역글로불린, 히스타민, 싸이토카인, NO, 히스타민, 프로스타글란딘, 루코트리엔
에키네시아(Echinacea)	Echinacea	Echinacea	NK 세포, 싸이토카인, NO, 탐식능, 면역글로불린, 세포 생존율
Arabinoxylan	arabinoxylan	arabinoxylan	
MCP	펙틴	펙틴	
PSK/PSP	PSK/PSP	PSK/PSP	
Mannitol	Mannitol	Mannitol	

*자료 : 건강기능식품 기능성 평가 가이드 (2014)

- 상기 표에서와 같이 대부분의 기능성 원료들은 지표성분과 기능성분을 달리하지 않고 기능성분을 지표성분으로 하여 규격화 하는 경우가 대부분인 것으로 조사되었다. 이는 면역 기능을 가지는 기능성분들이 제조공정의 표준화를 설정하고 관리할 수 있을 만큼 기능성분들이 안정적인 구조를 가진다는 점과 기능 성분들의 분석 방법이 비교적 검증된 방법일 것이라는 것을 예상할 수 있다.

- 기능 성분을 보면 Rg1, Rb1, Rg3의 진세노사이드, 엽록소, 글루칸, 아라비노자일란 등의 다당류, 아미노산이나 IgG 등의 단백질, 폴리페놀류로 구분되어 짐을 관찰할 수 있다.

- 효능 평가에 사용된 바이오마커의 경우 NK 세포, 싸이토카인, NO, 탐식능, 면역글로불린, 세포 생존율 등 거의 비슷한 마커들을 사용하여 평가된 것으로 분석되어, 이는 본 과제를 통해 소재 특성 별 바이오마커 종류별로 기능적 특이성을 나타내는 지 조사해볼 필요가 있다고 판단하였다.

다. 산업화 미진행 중요 식품 소재들의 정보 수집

- 아직 산업화가 미진행 되었거나 미흡한 식품 소재들 중 연구가 활발히 진행된 소재들의 수집과 제품 규격, 제조 기술 등의 정보 수집을 통해 신규 소재로의 개발 가능성과 개발 시스템의 검증을 위해 추가 검토 후보 소재를 선발해 보았다. 참여기업에서 산업화 개발에 관심을 가지고 연구해온 소재들을 중점적으로 검토를 실시하였다.

표 3.6 산업화 미진행 식품 소재들의 정보 수집

원료명	기능성분	제품규격	제조기술
유산균	생균수	생균수 10^14 이상	-
톳 추출분말	사이토카인	-	원물->믹서로 분쇄->1차추출 (55도,3hr) ->여과->2차추출 ->상등액 회수->농축->건조
미역 추출분말	사이토카인	-	
브로콜리 추출분말	Sulforaphane	20mg/100g D.W	원물->효소반응->MeOH 첨가 후 2시간 교반추출(1차) ->여과 및 재 추출(2차)->여과 및 재 추출(3차)->여과 및 상등액 회수 (1차+2차+3차)->농축 및 건조
한라봉 다당	다당체	고분자 다당	과피분말 추출 및 효소반응 (50도, pH 4~5, 15hr)->규조토 반응->여과 (진동체, 필터페이퍼, MF)->UF(10K 필터로 여과 1차, 2차)->건조
감귤 다당	다당체	고분자 다당	
브로콜리 다당	다당체	고분자 다당	원물 추출 및 효소반응 (50도, pH 4~5, 15hr)->규조토 반응->여과->EtOH 침전->건조
무 다당	다당체	고분자 다당	
오렌지과피 다당	다당체	고분자 다당	원물박 추출 및 효소반응 (50도, pH 4~5, 15hr)->규조토 반응->여과->EtOH 침전->건조
자몽과피 다당	다당체	고분자 다당	
케일박 다당	다당체	고분자 다당	
브로콜리박 다당	다당체	고분자 다당	
당근박 다당	다당체	고분자 다당	
우유펩타이드	펩타이드	펩타이드	우유->지방제거->pH조절 카제인 응고(pH 4.6까지)->카제인 회수(고형물 8%로 혼탁)->중화->효소처리 (효소 3가지 혼합)->여과->건조

- 이중 개발 가능성이 높은 소재를 중심으로 소재를 제조하였다. 대표적인 소재로 브로콜리추출분말, 감귤류 면역다당, 우유펩타이드, 유산균을 제조하였고, 이들의 제조공정도는 다음과 같다.

(1) 브로콜리추출분말 제조

- 참여기업의 특허 기술(PEF)로 처리된 브로콜리 원물 20g에 물 100ml (5배수)을 첨가하여 40도 조건으로 2시간동안 Glucoraphanin성분이 Sulforaphane으로 전환 되도록 효소반응을 유도한 후 MeOH 300ml (15배수)를 추가로 첨가하여 믹서로 갈아 균질화 하여 3시간동안 교반 추출을 진행하였다. 추출후 상등액 회수하여 농축 후 동결건조하여 분말상을 소재(상품명:슈퍼콜리)로 이용하였다.

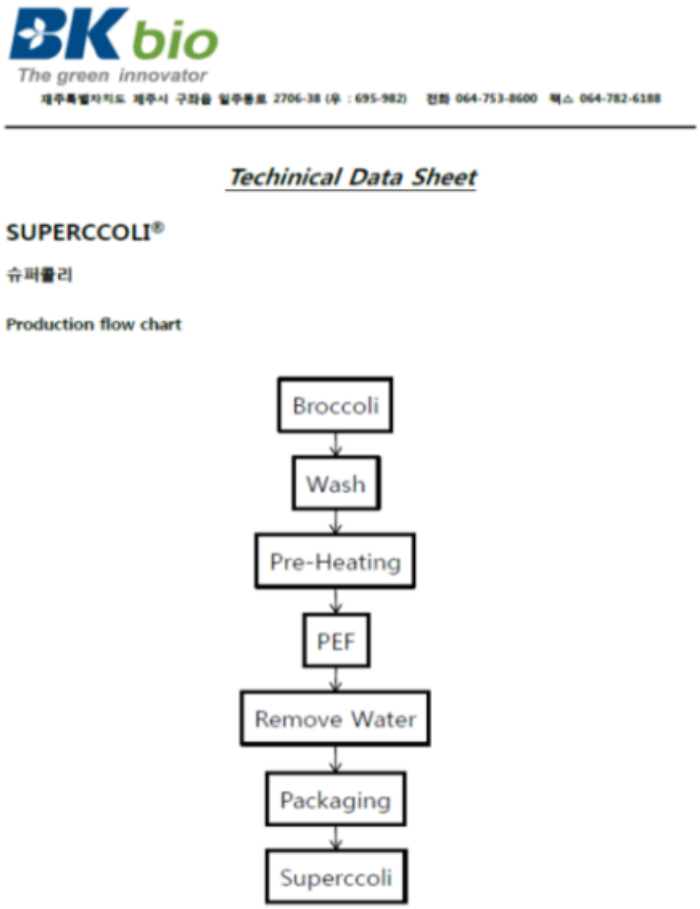


그림 3.3 제주산 브로콜리를 이용한 슈퍼콜리 제조 공정도

(2) 감귤류 다당의 제조

- 참여 기업의 특허 기술인 감귤류 다당의 제조법을 이용하여 원물 20g에 물 300ml (15배수)을 첨가하여 55도 조건으로 15시간 효소반응한 후 여과하여 상등액 UF를 진행한 후 Retentate 부분 회수하여 동결건조하여 분말상을 소재로 이용하였다.

- 참여기업에서 제조한 시료들은 기능평가를 위한 주관기관에 전달이 되어 종래에 개발된 면역소재들과 동일한 평가 시스템에서 평가를 통해 개발 가능성을 확인해 보았다 (실험결과는 3.3에서 논의).

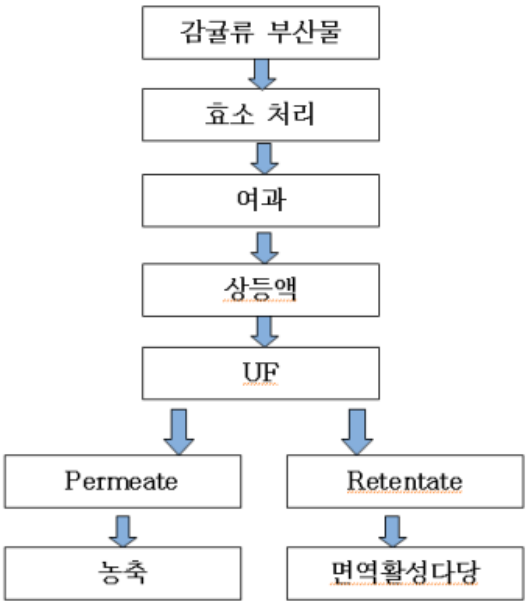


그림 3.4 감귤류 부산물을 이용한 면역다당 제조 공정

라. 소재화 제조를 위한 기능성분별 추출 제조법 가이드

- 정보 수집을 통해 대표적인 면역기능소재와 산업화 미진행 소재들에 대한 조사 결과를 참고하여 산업적으로 안전성이 보장된 식품원료로 제조 가능한 소재들을 선정하여 제조법 가이드를 제시해 보았다.

- 식품의 경우 물, 주정, 이산화탄소만을 이용하여 추출하는 방법이 안정성이 보장된 제조법으로 해석할 수 있으며, 특이한 경우 식품첨가물 공전에서 규정하는 첨가물이나 용제를 사용하는 경우도 있지만, 잔존의 문제로 인한 독성의 잠재성을 배제할 수 없으므로 지양하는 추출방법들로 평가되고 있다.
- 최근에는 초임계, 초고압, 펄스에너지, 플라즈마 기술 등 물리적인 가공처리 기술들을 적용하여 식품 제조 공정 중 안전성을 확보하는 추세로 가공 기술들이 발달되어 있다.

- 기능성분별로 추출법을 구분을 해 본다면 진세노사이드류의 경우 물 또는 주정혼합 용제를 사용하여 기능성분의 추출 효율을 높이는 경우가 일반적이며, 다당류의 경우 식품원료로 사용가능한 효소 반응과 더불어 열수 추출을 통하여 기능성분들을 추출하고 있다, 이외 단백질류는 수용계에서 pH 조절을 통해 분리와 분자량 차이를 이용한 UF공법을 많이 사용하고 있다. 폴리페놀 등의 저분자의 기능성분들의 경우 물과 주정의 혼합 추출 및 오픈형 크로마토그래피를 통해 고순도의 기능성분을 제조하는 방법을 많이 사용하고 있다. 대표적인 면역소재인 홍삼과 저분자의 기능성분의 가지는 브로콜리의 사례를 설명하면 다음과 같다.

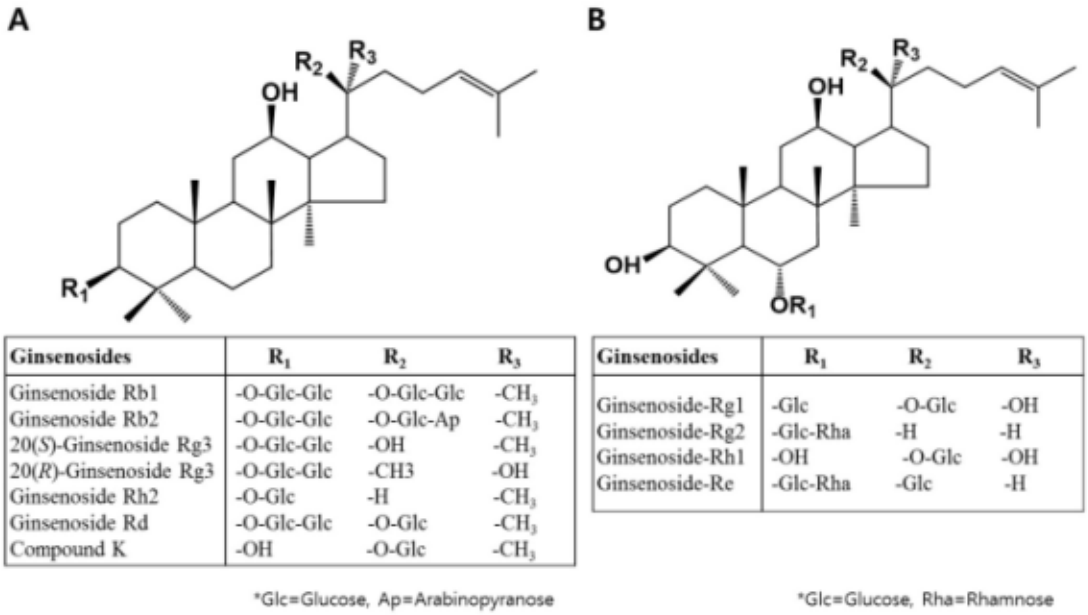
표 3.7 소재별 기능성분, 규격 및 제조법 조사

구분	원료명	기능(지표)성분	규격	제조법
기준 규격형	홍삼	진세노사이드	Rg1, Rb1 및 Rg3를 합하여 2.5~34 mg/g	(1) 원재료 분말화 (2) 원재료를 물이나 주정으로 추출하여 여과하거나 여과한 후 농축 또는 발효
	클로렐라	총 엽록소	총 엽록소 10mg/g이상	클로렐라속 조류(藻類)를 인공적으로 배양하고 건조하여 제조
	알로에 겔	총 다당체	총 다당체 30mg/g이상	(1) 원재료의 외피 제거 후 젤 부분을 분리하여 건조, 분말화하여 제조 (2) 원재료의 겔 부분만 분리하도록 분쇄, 여과하거나 착즙한 것 또는 분쇄, 착즙한 후 농축하거나 농축한 것을 건조, 분말화하여 제조
개별 인정형	표고버섯균사체	a-glucan	글루칸 3.5~10%	표고버섯균사체 배양액을 알파-아밀라아제, 펙티나아제, 프로테아제를 처리한 후 건조
	L-글루타민	L-글루타민	L-글루타민 98.5~101.5%	액상포도당, 대두박분해물, 염화암모늄, 황산암모늄, 제일인산칼륨, 제이인산칼륨 수용액을 corynebacterium glutamicum으로 발효
	스피루리나	총 엽록소	총 엽록소 5mg/g이상	원재료를 열수 추출하고 여과, 농축하여 제조
	구아바잎추출물 등 복합물	Ellagic acid, EGCG, Gallic acid	총 폴리페놀 250~450 mg/g	녹차잎, 구아바잎, 장미꽃잎 추출물로 이루어진 식물 복합물
산업화 미진행 식품 소 재	톳 추출분말	사이토카인	-	원물->믹서로 분쇄->1차추출 (55도,3hr) ->여과->2차추출 ->상등액 회수->농축->건조
	미역 추출분말	사이토카인	-	
	브로콜리 추출분말	Sulforaphane	20mg/100g D.W	원물->효소반응->MeOH 첨가 후 2시간 교반추출(1차) ->여과 및 재 추출(2차)->여과 및 재 추출(3차)->여과 및 상등액 회수 (1차+2차+3차)->농축 및 건조
	한라봉 다당	다당체	고분자 다당	과피분말 추출 및 효소반응 (50도, pH 4~5, 15hr)->규조토 반응->여과 (진동체, 필터페이퍼, MF)->UF(10K 필터로 여과 1차, 2차)->건조
	감귤 다당	다당체	고분자 다당	
	우유펩타이드	펩타이드	아미노태 질소	우유->지방제거->pH조절 카제인 응고(pH 4.6까지)->카제인 회수(고형물 8%로 혼탁)->중화->효소처리 (효소 3가지 혼합)->여과->건조

*자료 : 면역조절 기능성 식품의 구조 및 작용 (2016)

(1) 진세노사이드

- 인삼에는 major ginsenoside인 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re가 대부분을 차지하나 당이 많이 함유된 상태에서는 체내에 잘 흡수되지 않은 특성을 가지나, 홍삼 제조과정에서 당이 분해되어 저 분자로 전환되어 Rh2와 같은 홍삼특유의 성분이나 Rg3와 같이 인삼에 비해 함량이 증가한 성분들이 나타내는 특징을 가진다.



Ginsenosides	R_1	R_2	R_3
Ginsenoside Rb1	-O-Glc-Glc	-O-Glc-Glc	$-CH_3$
Ginsenoside Rb2	-O-Glc-Glc	-O-Glc-Ap	$-CH_3$
20(*S*)-Ginsenoside Rg3	-O-Glc-Glc	-OH	$-CH_3$
20(*R*)-Ginsenoside Rg3	-O-Glc-Glc	-CH3	-OH
Ginsenoside Rh2	-O-Glc	-H	$-CH_3$
Ginsenoside Rd	-O-Glc-Glc	-O-Glc	$-CH_3$
Compound K	-OH	-O-Glc	$-CH_3$

*Glc=Glucose, Ap=Arabinopyranose

Ginsenosides	R_1	R_2	R_3
Ginsenoside-Rg1	-Glc	-O-Glc	-OH
Ginsenoside-Rg2	-Glc-Rha	-H	-H
Ginsenoside-Rh1	-OH	-O-Glc	-OH
Ginsenoside-Re	-Glc-Rha	-Glc	-H

*Glc=Glucose, Rha=Rhamnose

그림 3.5 진세노사이드의 화학적 구조

*자료 : 면역조절 기능성 식품의 구조 및 작용 (2016)

- 이들은 원물 (홍삼)을 선별하여 열처리 후 정제수 또는 주정을 혼합(원물의 8배)하여 고온에서 추출한다(80~95도). 추출액을 가열하고 살균처리한 후 냉각하여 불순물을 분리 제거하고 저온 진공농축하여 추출액 농축 및 숙성하는 추출 방법을 갖는다.

(2) 설포라판(Sulforaphane)

- 원물의 세포벽이 파괴되면 Myrosinase에 의해 Glucoraphanin이 Sulforaphane으로 생물전환됨으로써 항암활성을 나타낸다. 전구체인 Glucoraphanin은 Myrosinase 효소에 의해 β-D-Glucose가 가수분해 되어 Sulforaphane으로 전환되게 된다. 이때 Sulforaphane에 노출된 황이 ESP와 결합하게 되면, 항암활성을 나타내는 Sulforaphane으로 전환되지 않고 Sulforaphane Nitrile로 전환되어 항암활성을 잃게 된다.

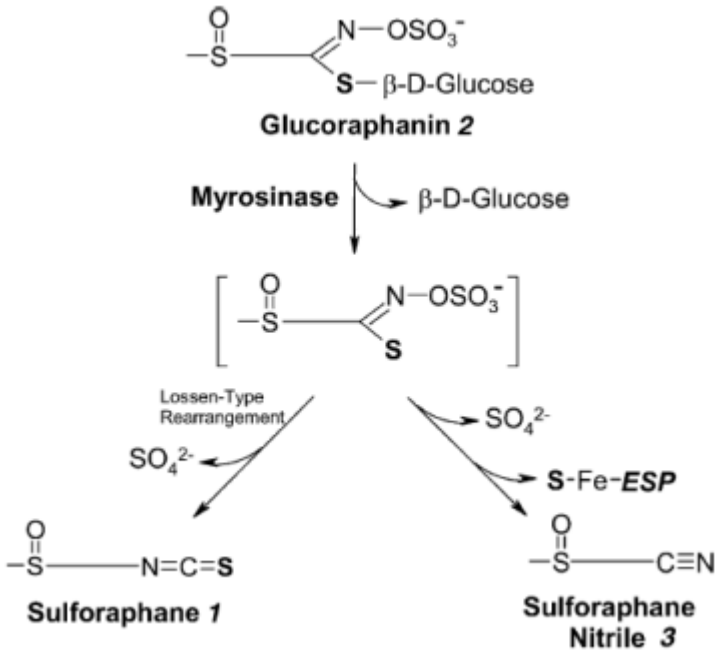


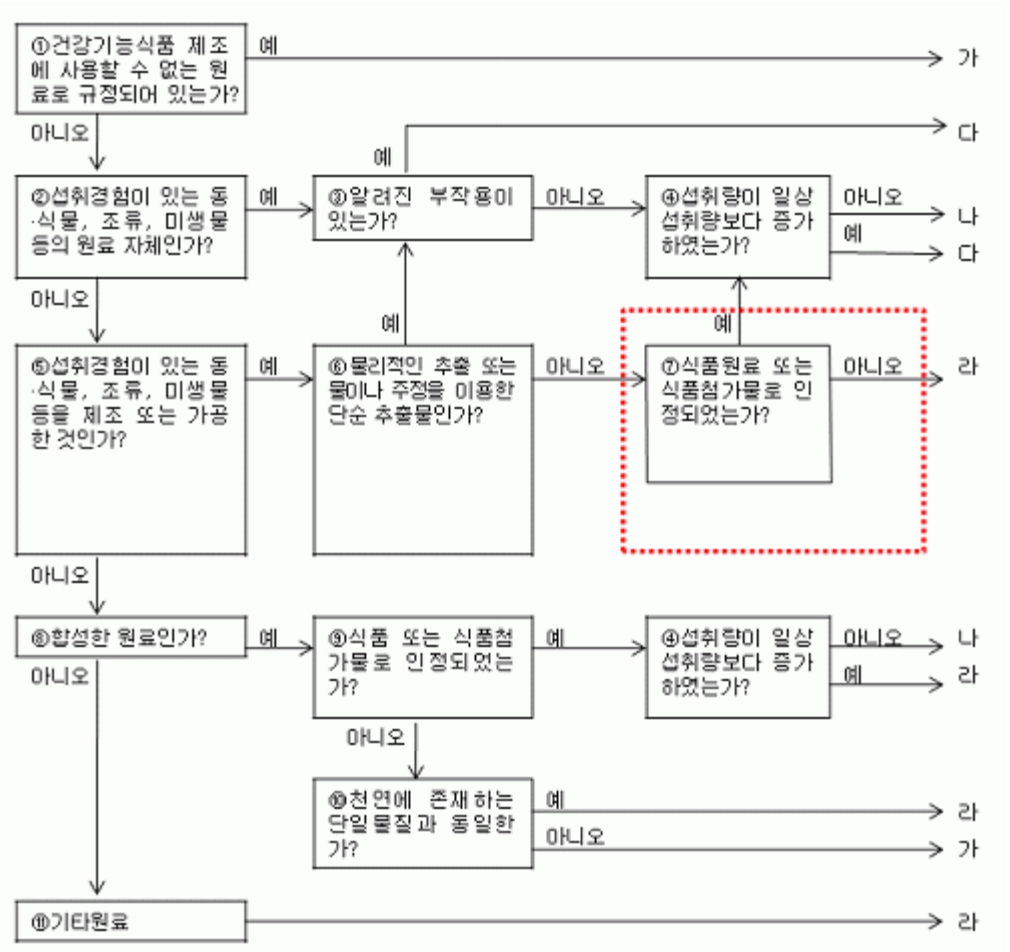
그림 3.6 설포라판의 생합성 과정 (myrosinase효소 활성에 의한 glucoraphanin의 생물전환)
*자료 : Phytochemistry 65(2004) 1273-1281

- 설포라판의 경우 참여기업의 특허 기술로 제조한 브로콜리(상품명 : 슈퍼콜리)를 이용하여 원물에 물 5배수를 첨가하여 40도 조건으로 2시간동안 Glucoraphanin성분이 Sulforaphane으로 전환 되도록 효소반응을 유도한 후 MeOH 300ml (15배수)를 추가로 첨가하여 믹서로 갈아 균질화 하여 3시간동안 교반 추출하여 분석을 하지만, 실제 제품화를 위한 추출의 방법은 물과 주정의 혼합용제를 이용하여 추출을 진행하게 된다.

마. 우수성이 확인된 후보 식품소재들의 안전성 확인

- 건강기능식품의 안전성 평가란 새로운 기능성 원료를 제안된 방법대로 섭취하였을 때 인체에 미치는 영향을 안전성 측면에서 평가하는 것이다. 건강기능식품법 제 15조에 따라 새로운 기능성 원료를 판매하고자 하는 영업자는 안전성 자료를 식품의약품안전청(이하" 식약청" 이라 함)에 제출하도록 되어 있으며, 식약청은 이를 검토하고 있다. 인정기준, 절차, 제출 자료의 범위 및 요건, 평가원칙 등은 식약청장이 정하도록 되어 있으므로, 인정업무의 적정을 기하기 위하여 [건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정](식약청고시 제2007-51호)이 제시되어 있어 이를 기준으로 후보 소재들을 평가해 보았다.

- 안전성 자료제출범위 설정을 위한 그림 7. 의사결정도는 섭취근거, 제조방법, 부작용 유무와 섭취량에 따라 안전성 평가 자료 요구도가 달라지고, 전통적 독성시험자료 이외의 자료를 안전성 확보에 이용할 수 있다는 장점이 있다.



제출자료 항목	가	나	다	라
건강기능식품으로 신청할 수 없음	V			
섭취 근거 자료		V	V	V
안전성 정보 자료		V	V	V
섭취량평가자료		V	V	V
인체시험자료, 생물학적유용성자료 등			V	V
독성시험자료				V

그림 3.7 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도

*자료 : 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도 (제14조제7호나목 관련)

- 수집된 정보 중 제법 자료를 통해 후보 면역소재들에 대해 상기 의사결정도에 따라 안전성 확인을 진행하였다.

표 3.8 후보 식품소재 안전성 확인 단계 진행

원료명	기능성분	안전성 확인 단계
인삼	진세노사이드	나
홍삼	진세노사이드	나
클로렐라	총 엽록소	나 또는 다
알로에 겔	총 다당체	나 또는 다
표고버섯균사체	베타글루칸, 알파글루칸	나 또는 다
L-글루타민	L-글루타민	나 또는 다
스피루리나	총 엽록소	나
프로바이오틱스	생균수	나
구아바잎추출물등 복합물	총 폴리페놀	나 또는 다
브로콜리 추출분말	Sulforaphane	나 또는 다
한라봉 다당	다당체	나
감귤 다당	다당체	나
브로콜리 다당	다당체	나 또는 다
무 다당	다당체	나 또는 다
오렌지과피 다당	다당체	나 또는 다
자몽과피 다당	다당체	나 또는 다
당근박 다당	다당체	나 또는 다
우유펩타이드	펩타이드	나 또는 다
IgG	IgG	나 또는 다

- 상기 표의 대부분의 원료들은 물 또는 물과 주정을 혼합하여 사용하는 공정으로 제조되어지고, 사용되는 원료 또한 식품원료로 섭취된 경험이 있으므로 섭취량에 따른 나 또는 다의 단계로 평가되어 지므로, 기능성식품 소재 개발을 위한 안전성 평가 비용의 저감과 안전성 검증의 수월한 수준으로 평가하였다.

- 다음은 후보 소재들 중 감귤류 다당 유래의 면역기능성 원료에 대한 안전성을 평가예시를 설명해 보았다.

원료	감귤류 과피	• 식품사용가능 원재료 (식품의약품안전처) • 감귤류 1일 섭취량 32g (2011 국민건강통계 국민영양조사)
첨가물	Pectinase (Cytolase CL)	• 천연첨가물 (식품첨가물공전)
제조공정	추출, 농축, 효소처리, 건조	• 식품 및 첨가물제조 기준에 부합 (물, 주정, 천연첨가물 이용)
제품 섭취량	48mg/day/60kg 성인 감귤류 : 7g 감귤류 침출차 : 0.6잔	• 동물실험모델 유효 활성농도 100ug/mouse/20g • 체표면적대비 환산계수 0.16 • 성인체중 60kg • 인체적용 섭취량 100mg/day/60kg 성인 (참고문헌: Guidance for Industry – Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trialsfor Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. U.S. FDA.)

- 상기 결과에 따라 식품의약품안전처 고시 '건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도' 에 의한 안전성 자료의 범위 판단 시 독성시험자료의 제출이 불필요한 제품으로 판단(나 항에 해당)된다.

- 또한 개별인정형 기능성 원료의 경우 원재료부터 최종 원료가 되기까지를 기술한 제조공정 과정을 요약 정리한 자료 및 각 제조공정단계에서의 기능성분/지표성분 및 수율 등에 대한 시험분석이 필요하고, 원료의 성상, 물성 등을 기재하고 기능성분을 정하고 설정 근거를 서술하여야 한다. 원료의 기본영양성분 등의 자료가 필요하며 다당체의 경우 분자량 프로파일 등의 finger print 자료 등의 원료 특성에 관한 자료가 필요하다.

바. 최종 검토 후보 소재의 제안

- 상기 조사를 통해 최종 검토 후보를 가능성 있는 소재 30종으로 단축하였으며 관련 소재를 제조 및 수집하여 효능 평가를 위한 주관기관에 전달하였으며, 전달된 소재리스트는 다음과 같다.

	원료명	기능성 내용	성상	구분
1	홍삼추출분말	면역증진	분말	기준규격형
2	홍삼농축액	면역증진	농축액	
3	클로렐라	면역증진	분말	
4	알로에 겔	면역증진	분말	
5	표고버섯균사체	면역증진	분말	개별인정형
6	L-글루타민	면역증진	분말	
7	스피루리나	면역개선	분말	
8	구아바잎추출분말	면역개선	분말	
9	과채유래유산균	면역개선	분말	당사 제안
10	다래추출물	면역개선	추출액	
11	한라봉 다당	면역증진	분말	
12	감귤 다당	면역증진	분말	
13	우유 펩타이드	면역증진	분말	
14	IgG	면역개선	분말	
15	브로콜리추출분말	면역증진	분말	
16	MCP	면역증진	분말	
17	해조다당	면역증진	분말	
18	양배추추출분말	-	분말	
19	방울양배추추출분말	-	분말	
20	유산균	면역증진	분말	
21	미역추출분말	면역증진	분말	
22	톳추출분말	면역증진	분말	
23	브로콜리 다당	면역증진	분말	
24	무다당	면역증진	분말	
25	자몽과피 다당	면역증진	분말	
26	오렌지과피 다당	면역증진	분말	
27	케일박 다당	면역증진	분말	
28	당근박 다당	면역증진	분말	
29	브로콜리박 다당	면역증진	분말	
30	감귤류 과피 폴리페놀	-	농축액	

- 기준규격형으로 시장 형성능과 안정된 시장을 가지고 있는 홍삼추출분말, 홍삼농축액, 클로렐라, 알로에 겔을 선정하였으며, 개별인정형의 경우 다당류, 아미노산류, 저분자류(엽록소, 폴리페놀)로 기능성분의 특징별로 대표성을 두어 표고버섯균사체, L-글루타민, 스피루리나, 구아바잎추출분말로 선정하였으며, 신규로 개발 가능성이 있는 소재로 유산균류, 다당류, 단백질류, 저분자류로 나누어 제안을 하였다(평가 결과는 3.3에서 제시).

3.2 유용성분의 분석 검증을 위한 분석 및 시료 전처리법 가이드

가. 핵심 유용성분별 기능성분과 지표성분들의 상관성 분석

- 검토 완료된 후보에 대한 핵심 유용성분별 기능성분과 지표성분들의 상관성 분석을 통한 가이드를 제시하기 위해 정보 수집을 진행하였다.
- 소재 평가를 위해 기존에 알려진 방법 외에 제조 가능한 소재의 분석 및 시료 전처리법을 수집, 제시를 통해 가능성을 확인하였다.
- 탄수화물, 단백질, 지방, 기타류로 분류하여 식품제조에 적합한 추출용제 및 추출법을 선정하고 각 추출물 또는 분획별 특징에 따른 DB근거와 기능성분을 선정하였다.

표 3.9 분석에 적합한 추출용제 및 추출방법 선정

구분	원료명	추출 용제	추출 방법	기능성분	분석
탄수화물	한라봉다당	물	수용성추출법	다당체	HPLC (GPC)
	감귤다당	물	수용성추출법	다당체	HPLC (GPC)
	해조다당	물	수용성추출법	다당체	HPLC (GPC)
	MCP (modified citrus pectin)	물	수용성추출법	펙틴	HPLC (GPC)
단백질	우유펩타이드	물	수용성추출법	펩타이드	아미노태 질소 측정
기타류	홍삼	물, 주정	수용성추출법	진세노사이드	UPLC
	클로렐라	물	수용성추출법	총엽록소	분광광도계
	알로에 겔	자체 건조	자체 건조	총다당체	분광광도계
	구아바잎추출물등 복합물	물	수용성추출법	총폴리페놀	분광광도계
	표고버섯균사체	물	수용성추출법	a-글루칸	분광광도계
	L-글루타민	-	-	L-글루타민	아미노산
	유산균	-	-	프로바이오틱스	유산균수
	IgG	-	-	IgG	ELISA
	스피루리나	-	-	총엽록소	분광광도계
	브로콜리추출분말	물, 주정	에탄올추출법	설포라판	UPLC

*자료 : 식품의약품안전처 건강기능식품

- 건강기능식품의 기준 및 규격, 식품의 기준 및 규격, 식품첨가물의 기준 및 규격, 국제식품위원회 규정 AOAC 방법 등에 따라 국,내외에서 공인된 방법을 사용할 경우 객관성이 보장되므로 가능한 검증된 분석법을 제시되는 것이 바람직하다. 따라서, 제시된 분석법들의 식품공전, 식품첨가물공전, 건강기능식품, AOAC 가이드를 기준으로 한 타당성 검토를 해보았다.

표 3.10 제시된 분석법들의 타당성 검토

구분	원료명	식품공전	식품첨가물공전	건강기능식품공전	AOAC
탄수화물	한라봉다당	O	-	-	-
	감귤다당	O	-	-	-
	해조다당	O	-	-	-
	MCP (modified citrus pectin)	O	-	-	-
단백질	우유펩타이드	-	-	-	O
기타류	홍삼	O	-	O	-
	클로렐라	-	-	O	-
	알로에 겔	-	-	O	-
	구아바잎추출물등 복합물	-	-	-	O
	표고버섯균사체	-	-	-	O
	L-글루타민	-	O	-	-
	유산균	O	-	-	-
	IgG	-	-	-	O
	스피루리나	-	-	O	-
	브로콜리추출분말	-	-	-	O

*자료 : 식품공전, 식품첨가물공전, 건강기능식품공전, AOAC

- 공인된 방법이 없거나 더 타당하다고 인정되는 (신규 분석법) 경우 신청자가 제시하는 시험방법을 사용할 수 있으나 이 경우는 시험법 검증을 통하여 타당성을 밝힐 수 있는 방법이여야 한다. 따라서, 별도의 validation 실험을 실시하여야 한다.

나. 보편 타당한 분석법의 경우 기능물질별 분석법 validation을 통한 검증

- 수집된 분석법 중 보편 타당한 분석법 개발이 가능하다고 판단된 소재(다당, IgG)의 경우 기능물질별 분석법 validation을 통한 검증을 진행하였다.

- 기능성분의 시험의 경우 특이성, 정확성, 정밀성, 정량한계, 직선성, 범위에 대한 정량 및 확인시험을 해야 하므로, 이에 준하여 실시하였다.

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

그림 3.8 기능물질별 분석법 validation 필요 절차

(1) 다당

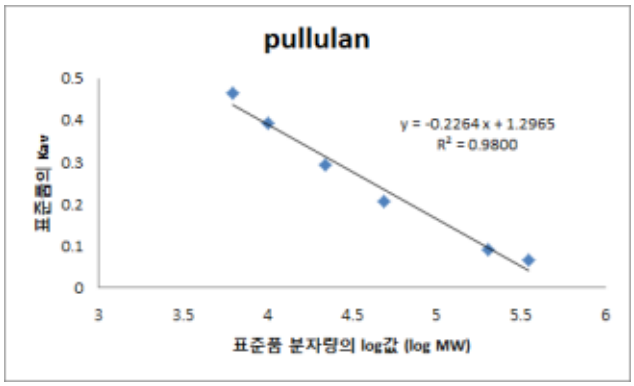
- 분자량 측정에 사용된 표준물질 Pullulan series(P-800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)는 Showa Denko사(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였으며 한라봉 및 감귤에서 정제한 다당획분 각 시료를 20 mg/mL의 농도로 증류수에 녹여 GPC column을 이용하여 아래의 분석조건으로 HPLC를 진행하였다.

Detector	Refractive index (RI)
Column	Shodex GS-220+GS-320+GS-520 packed column (Asahi Chemical Industry Co. Ltd., Japan)
Column size	ϕ 7.6x300㎜
Flow rate	0.5㎖/min
Eluent.	0.2M NaCl
Injection vol.	30㎕

(가) 직선성 (범위)

표준용액 P-800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5을 농도의 범위에서 5개 농도에 대하여 작성한 검량선과 직선성이며 R^2 값은 0.9800로 양호하였다.

pullulan	log MW	kav
p-5	3.792392	0.464
p-10	4	0.394
p-20	4.33646	0.293
p-50	4.68842	0.207
p-200	5.30103	0.093
p-400	5.541579	0.066



* kav

$$Kav = \frac{Ve-Vo}{Vt-Vo}$$

- Ve : elution volume of solute (RT (retention time) x Flow rate)
- Vo : void volume of column (통상적으로 분리능력 밖의 고분자 물질의 Ve값)
- Vt : Total column volume (통상적으로 분리능력 밖의 저분자 물질의 Ve값)

(나) 정확성 및 정밀성

- 일내 정밀성 (Interday precision)의 경우 kav값으로 진행하였으며 각 표준품별 %RSD는 1.4~8.4% 수준으로 우수하였다.

	1	2	3	Average	SD	RSD (%)
p-5	0.464	0.455	0.447	0.455	0.009	1.868
p-10	0.394	0.381	0.380	0.385	0.008	2.029
p-20	0.293	0.284	0.271	0.283	0.011	3.913
p-50	0.207	0.201	0.204	0.204	0.003	1.471
p-200	0.093	0.109	0.107	0.103	0.009	8.464
p-400	0.066	0.071	0.068	0.068	0.003	3.683

- 일간 정밀성 (Intraday precision)의 경우 kav값으로 진행하였으며 각 표준품별 %RSD는 1.2~6.8% 수준으로 우수하였다.

	1day	2day	3day	Average	SD	RSD (%)
p-5	0.458	0.453	0.469	0.460	0.008	1.779
p-10	0.389	0.383	0.392	0.388	0.005	1.181
p-20	0.266	0.282	0.279	0.276	0.009	3.085
p-50	0.199	0.207	0.205	0.204	0.004	2.044
p-200	0.090	0.102	0.101	0.098	0.007	6.817
p-400	0.063	0.069	0.069	0.067	0.003	5.170

(다) 샘플 분석 (정량 여부 확인)

– 샘플 제조 : Citus 과피에 물 15배수, 효소를 첨가한 후 50도 조건에서 15시간 교반 추출 및 효소반응을 하였으며, 반응 후 80도에서 1시간동안 효소반응을 정지하였다. 규조토 (원물 대비 10%) 투입 후 30분간 추가 가열없는 조건으로 교반한 후 여과한다 (3차 여과). UF를 이용하여 여과액을 1차 10K 필터로 여과 후 10배 물 첨가하여 (2차 여과) retentate 라인 액을 회수 한 후 동결건조한다.

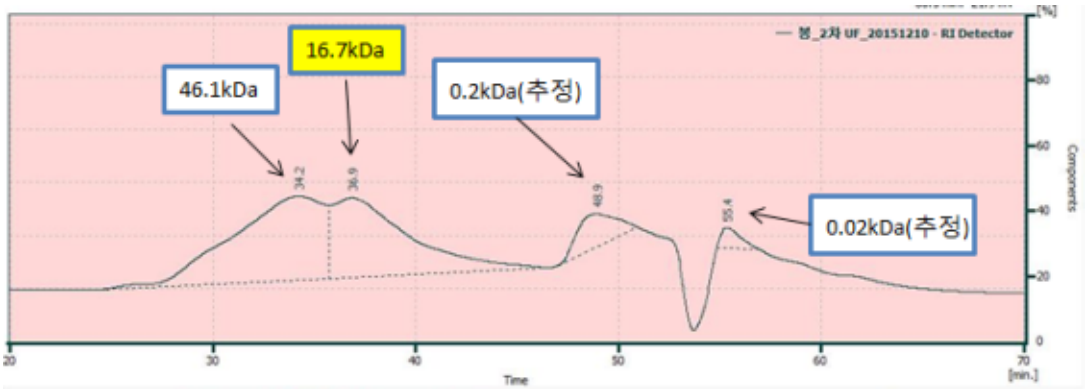


그림 3.9 한라봉 다당 샘플 GPC 분석 크로마토그램

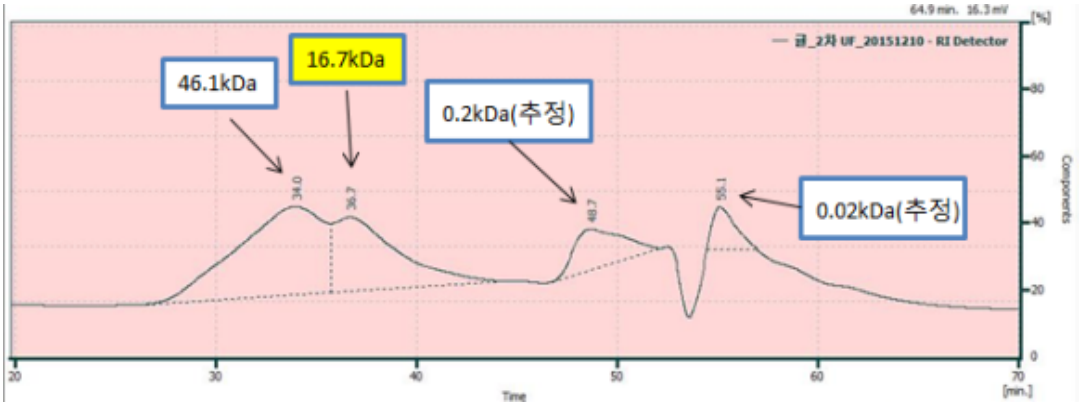


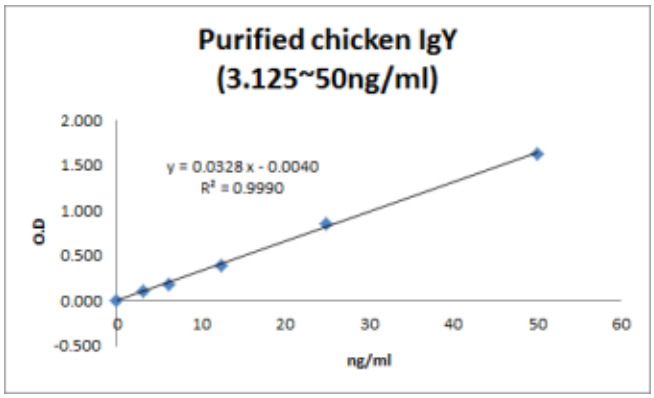
그림 3.10 감귤 다당 샘플 GPC 분석 크로마토그램

(2) IgG(Y)

(가) 직선성 (범위)

- 표준용액 3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50ng/㎖의 6개 농도에 대하여 작성한 검량선과 직선성은 다음과 같다. 검량선 작성 시 직선성을 나타내는 상관계수 (R^2)값은 0.9990의 값을 보여 정량 분석에 적합하다고 판단되었다.

	ng/ml	OD
STD	50	1.626
	25	0.848
	12.5	0.391
	6.25	0.182
	3.125	0.108
	0	0



(나) 정확성 및 정밀성

- 일내 정밀성 (Interday precision)의 경우 OD값을 이용하여 실측치로 진행하였으며 각 농도별 %RSD는 0.7~3.1% 수준으로 우수하였다.

	1	2	3	Average	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
6.25 (ng/ml)	5.943	6.147	5.820	5.970	0.165	2.767	95.52
12.5 (ng/ml)	13.395	13.318	14.095	13.603	0.428	3.147	108.82
25 (ng/ml)	25.180	26.367	26.001	25.849	0.608	2.352	103.40
50 (ng/ml)	49.724	49.165	49.160	49.350	0.324	0.657	98.70

- 일간 정밀성 (Intraday precision)의 경우 OD값을 이용하여 실측치로 진행하였으며 각 농도별 %RSD는 0.7~3.4% 수준으로 우수하였다.

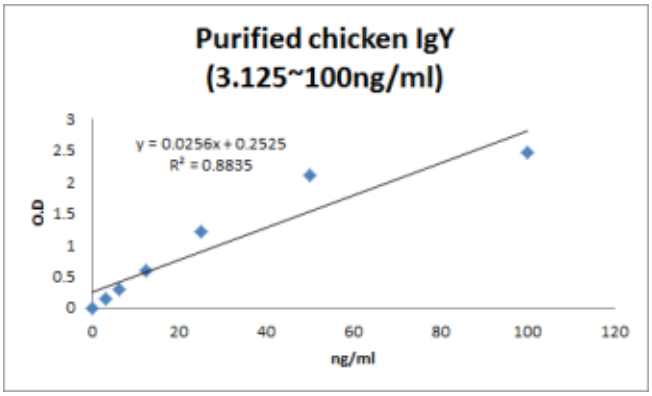
	1day	2day	3day	Average	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
6.25 (ng/ml)	6.157	5.947	5.820	5.975	0.170	2.849	95.52
12.5 (ng/ml)	13.274	13.282	14.095	13.550	0.472	3.481	18.40
25 (ng/ml)	26.298	25.192	26.001	25.830	0.572	2.216	103.32
50 (ng/ml)	49.274	49.836	49.160	49.423	0.362	0.732	98.85

- 표준품으로 사용되는 purified chicken IgY의 농도별 정량한계를 일간 5-6반복하여 총 3일 동안 측정하였다. 분석결과 일내 정확성은 0.66~3.14%이고, 일간 정확성은 0.73~3.48%의 분포를 보였다. 정량한계치 평가시험의 허용범위가 일내, 일간의 정밀성이 변동계수 20%미만이므로 정량한계치에서의 정량의 정확성이 확인되었다.

(다) 정량한계

- 위 실험은 Microplate reader 기기를 이용하여 정량하는 것으로 샘플 OD값이 blank OD값보다 낮으면 정량이 불가하며 100ng/ml 이상의 농도에서는 검출이 불가하다.

	ng/ml	OD
STD	100	2.4595
	50	2.108
	25	1.2155
	12.5	0.601
	6.25	0.287
	3.125	0.1445
	0	0



(3) 제조방법 특징별 기능성분 QC 가이드 제시

- 원물을 명확하게 정의하고 물리화학적 특징을 상세하게 확보하는 것은 품질자료의 가장 기본적이며 필수적인 요소이다.
- 따라서, 표준물질별로 구분하여 그 기능성분들의 특징이 이용하여 표준물질 가이드를 다음과 같이 제시해 보았다.

표 3.11 기능성분 QC 가이드

성분	시험법	표준물질	시험방법
총 다당체	시료로부터 다당체를 추출하여 페놀과 황산으로 발색시켜 분광광도계를 이용하여 정량	만노오스 (D-(+)-mannose, D-Mannopyranose)	건강기능식품공전
진세노사이드	증류수 및 유기용매를 이용하여 시료로부터 진세노사이드 성분을 추출하여 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석	진세노사이드 Rb1, Rg1, Rg3	건강기능식품공전
총 엽록소	엽록소를 알칼리성 피리딘을 이용하여 충분히 추출하여 비색법으로 분석	-	건강기능식품공전
총 폴리페놀	시료를 증류수에 용해하고 초음파 추출한 후 발색시약과 반응시켜 분광광도계 사용하여 정량	탄닌산 (Tannic acid)	건강기능식품공전
β-glucan	베타글루칸을 효소처리하여 글루코오스 형태로 분해하고 발색시켜 분광광도계로 정량	글루코오스(D-(+)-glucose)	건강기능식품공전
펩타이드	아미노태 질소 함량은 Formol법으로 분석	-	AOAC
IgY	Sandwich ELISA	Chicken Reference Serum	자체 분석법
다당	샘플 중 분자량, flavonoid 함량을 기기 분석을 통해 파악	P-82 Shodex STANDARD	자체 분석법
설포라판	샘플 중 sulforaphane 함량을 기기 분석을 통해 파악	sulforaphane	자체 분석법

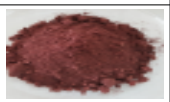
*자료 : 건강기능식품공전, AOAC

(4) 최종 완제품 내 기능성분을 위한 대표식품별 전처리 가이드

- 제안 후보로 검토되는 소재들은 완제품으로 제조 시 유통이 용이한 분말, 액상, 과립, 정제, 환, 캡슐 제형 등으로 제조될 것으로 예상된다. 소비자가 건강기능식품을 섭취하고 기대하는 효과를 얻기 위해서는 제조 가공 과정과 유통 과정에서의 품질관리가 매우 중요하다. 따라서, 객관적인 기능물질의 정량의 평가를 위해 완제품 종류별 전처리 가이드를 제시할 필요가 있다.

- 최근 건강기능식품의 제형자율화를 시행되어 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등 6가지로 제한되었던 제형을 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 바 등 6가지를 추가하여 12가지로 확대되었다.

표 3.12 제형별 전처리법 가이드 제시

제형	성상	시료채취	전처리법
분말		균질화	물 또는 유기용매를 시험액으로 하여 교반 추출 후 여액을 시험시료로 사용한다.
액상		균질화	물 또는 유기용매를 시험액으로 하여 교반 추출 또는 기능물질에 따라 액액분배 후 여액 또는 분리액을 시험시료로 사용한다.
과립		분쇄 후 균질화	체를 통과하는 시료의 양을 측정한 후 물 또는 용제를 시험액으로 하여 교반 추출 후 여액을 시험시료로 사용한다.
정제		분쇄 후 균질화	물 또는 유기용매를 시험액으로 하여 분쇄 후 교반 추출한 후 여액을 시험시료로 사용한다.
환		분쇄 후 균질화	물 또는 유기용매를 시험액으로 하여 분쇄 후 교반 추출한 후 여액을 시험시료로 사용한다.
캡슐		외피 제거 후 내용물을 취하여 균질화	내용물을 물 또는 유기용매를 시험액으로 하여 교반 추출 후 여액을 시험시료로 사용한다.

3.3 면역능 수치별(등급별) 가이드라인 설계

가. 면역소재들의 클레임별 특징 분석 및 면역능 구분을 통한 등급화 가이드 기반 자료 확보

- 면역 소재들의 면역능 수치와 경제성을 기본으로 하여 기능성 소재 개발 시 실용화가 가능하도록 하기 위해 기반 자료 확보를 진행하였다. 추후 기능성 소재 개발을 위해 개발 가능성을 시험관 시험을 통해 조기 판단할 수 있는 중요한 기준이 되므로 면역능과 경제성의 연관성은 매우 중요하다.
- 면역 후보 소재들의 면역증진(면역강화)과 면역개선(면역조절, 과면역억제)로 클레임을 구분하여 특징을 제시하였으며, 기능적, 경제적 가이드를 선정하기 위한 기반 자료를 다음의 표로 요약해 보았다.

표 3.13 클레임별 기능적, 경제적 가이드 선정을 위한 자료 분석

클레임	원료명	기능성분	일일섭취량	단가	규격
면역증진	홍삼	진세노사이드	Rg1, Rb1 및 Rg3를 합하여 2.5~34 mg/일	홍삼농축액(4년근) 150,000원/kg당 홍삼농축분말(4년근) 180,000원/kg당	진세노사이드 7mg/g (건기식) 진세노사이드 4mg/g (건기식)
	클로렐라	총 엽록소	총 엽록소로서 125mg/일	28,000원/kg (국산)	클로로필:1600mg/100g이상
	알로에 겔	다당체	총 다당체로서 100~420mg/일	70,000원/kg당 (미국산)	총다당체함량:460mg/g
	L-글루타민	L-글루타민	L-글루타민으로서 3~5g/일	25,000원/kg당 (국산)	99.65%
	표고버섯균사체	a-glucan	표고버섯 균사체로서 1.8~3.6g/일	84,000원/kg당 (국산)	151.96(mg/g)
	MCP	pectin	-	-	-
	한라봉 다당	다당체	인체적용 섭취량 100mg/일	500,000원/kg당	60%
	감귤 다당	다당체	인체적용 섭취량 100mg/일	500,000원/kg당	60%
	브로콜리 추출물	설포라판	-	-	20mg/100g
	우유펩타이드	펩타이드	-	-	-
면역개선	구아바잎추출물등 복합물	총 폴리페놀	구아바잎 추출물 등 복합물로서 800mg/일	구아바잎추출분말 90,000원/kg당 (인도)	30%
	스피루리나	총 엽록소	스피루리나로서 67~72mg/일	50,000원/kg당 (국산)	엽록소함량5mg/g 이상
	유산균	프로바이오틱스	생균수 100억 이내	락토바실러스 300만원/kg당 비피도박테리움 300만원/kg당	프로바이오틱스수 : 10,000,000,000 cfu/g 이상
	IgG	IgG	-	초유단백분말 95,000원/kg	25%

- 상기 면역 후보 소재들의 면 일일섭취량, 단가, 제품의 규격 자료는 제품으로서 실제 섭취량 산출이 가능한 기반자료로 활용이 가능하므로, 완제품 개발 및 제품 제형의 선택, 섭취방법, 경제성 등의 사업화를 위한 자료로 활용될 수 있다.

나. 면역능 수치 등급화 가이드 제시

- 주관기관의 기능성 평가 결과에 따라 후보 제품별 함량별 면역능 수치 등급화를 진행하였다. 각 시료들의 Cytotoxicity에 문제가 없는 농도를 선택하여 실험 진행되었으며 시료들의 등급 가이드는 각 농도에서 시료들의 marker 값을 비교하여 최고 값을 100으로 보고 나머지는 최고 값을 기준으로 백분율 구한 뒤 100을 5등분 (80-100을 5등급으로 설정)하여 각 marker (CD40, CD86, MHCⅡ, CD80)의 등급화를 가이드로 하여 평가하였으며, 최종적으로 전체 등급의 경우 각 marker들의 등급에서는 +는 +, -는 -끼리 서로 곱한 뒤 이 둘을 더해서 전체 등급을 구하였다.

표 3.14 주관기관 기능성 평가 결과에 따른 면역능 수치 등급화

성분	원료명	섭취량	면역능 수치 등급화 (전체 등급)
총 다당체	알로에 겔	200ug/ml	0
	한라봉 다당	400ug/ml	49
	감귤 다당	100ug/ml	39
진세노사이드	홍삼 추출분말	400ug/ml	18
	홍삼 농축액	200ug/ml	20
총 엽록소	스피루리나	20ug/ml	47
	클로렐라	-	-
총 폴리페놀	구아바잎추출물등복합물	400ug/ml	6
β-glucan	표고버섯균사체	20ug/ml	150
펩타이드	우유펩타이드	400ug/ml	0
IgG	IgG	400ug/ml	18
설포라판	브로콜리 추출물	50ug/ml	20
L-글루타민	L-글루타민	200ug/ml	8
pectin	MCP	200ug/ml	15
유산균	프로바이오틱스	200ug/ml	125

*자료 : 1세부 (충남대학교) 자료 제공

- 주관기관에서 진행한 바이오마커 CD40, CD86, MHCⅡ, CD80를 기준으로 각 원료별 기능성 결과를 보면, 표고버섯균사체, 한라봉다당, 감귤다당 등의 다당류와 엽록소, 유산균 원료들이 우수한 기능성을 나타내었다.
- 하지만, 표준원료로 제시되는 홍삼추출분말과 홍삼농축액의 경우 상대적으로 미약한 결과를 보여 종래의 바이오마커들에 대한 평가와 함께 비교 평가하여 기능성이 대한 기준 가이드라인의 재평가가 필요하다 판단하였다.

다. 최적의 유효 섭취량 설정을 위한 경제성 가이드와 품질 규격 설정 가이드 제시

- 제시된 클레임별 원료 기능성분을 기준으로 유효 섭취량 설정을 위해 경제성 가이드를 제시 하였다. 각 원료의 면역능 수치(A), 경제성(B) (일일섭취량에 따른 실제 일일 섭취비용) 파악 후 전체 등급(A+B)으로 나누어 우수 후보 소재를 구분해 보았다.

표 3.15 원료별 면역능 수치, 경제성 분석

클레임	원료명		기능성분	면역능 수치 (A)	경제성 (B)	전체 등급 (A+B)
면역증진	홍삼	농축분말	진세노사이드	18	150원/일	5
		농축액		20	180원/일	6
	클로렐라		총 엽록소	-	224원/일	9
	알로에 겔		다당체	0	35원/일	9
	L-글루타민		L-글루타민	8	100원/일	8
	표고버섯균사체		a-glucan	150	168원/일	4
	MCP		pectin	15	-	9
	한라봉 다당		다당체	49	50원/일	1
	감귤 다당		다당체	39	50원/일	3
	브로콜리 추출물		설포라판	20	-	9
	우유펩타이드		펩타이드	0	-	9
면역개선	구아바잎추출물등복합물		총 폴리페놀	6	72원/일	7
	스피루리나		총 엽록소	47	50원/일	2
	유산균		프로바이오틱스	125	-	9
	IgG		IgG	18	-	9

- 효능의 경우 한라봉 다당이 기능성이 우수할 뿐 아니라 경제성도 우수한 것으로 평가되었으며, 스피루리나, 감귤다당, 표고버섯균사체 등도 기능성 대비 경제성 우수한 것으로 평가되었으며, 홍삼의 경우 경제성 대비 기능성이 기대치에 못 미치는 것으로 분석되었다.

- 상기의 결과를 통해, 시장 경쟁력 있는 소재로 개발되기 위해선 최대 200원/일을 넘지 않으며, 100원/일 수준으로 소재가 출시되도록 유효섭취량 선정 및 제법이 개발되어할 할 것으로 판단되며, 다양한 식품 제형의 원료로 사용되기 위해선 10~200mg/일 수준의 섭취량 기준으로 설정되는 것이 타정, 캡슐, 과립스틱포장, 음료제형에 첨가 등의 완제품 개발에 바람직한 첨가량으로 제안할 수 있겠다.

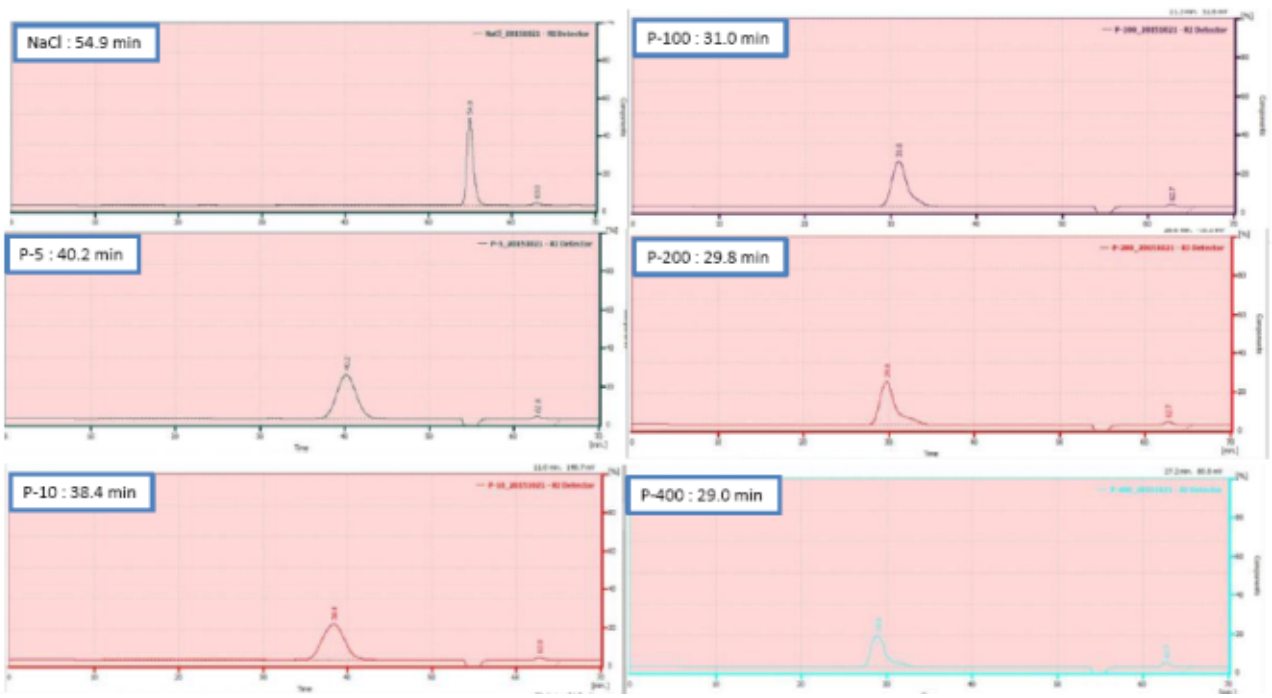
3.4 우수 면역식품 (소재) 기능 성분 분석

가. 우수한 효능을 가지는 다당류에 대한 기능성분 분석과 분자량을 기준으로 한 기능성분 획분을 표준으로 보완 제시

- 2협동기관에서 선정한 케일박다당의 기능성분 분석을 위해 표준물질을 이용한 분자량 측정 분석법을 재확립하였다. 표준물질은 Pullulan series(P-800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)는 Showa Denko사(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였으며 케일박에서 정제한 다당획분 각 시료를 20 mg/mL의 농도로 증류수에 녹여 GPC column을 이용하여 분석하였으며, HPLC 분석 조건은 다음과 같다.

Detector	Refractive index (RI)
Column	Shodex GS-220+GS-320+GS-520 packed column (Asahi Chemical Industry Co. Ltd., Japan)
Column size	φ 7.6x300㎜
Flow rate	0.5㎖/min
Eluent.	0.2M NaCl
Injection vol.	30㎕

*다당 표준품(20,000ppm)



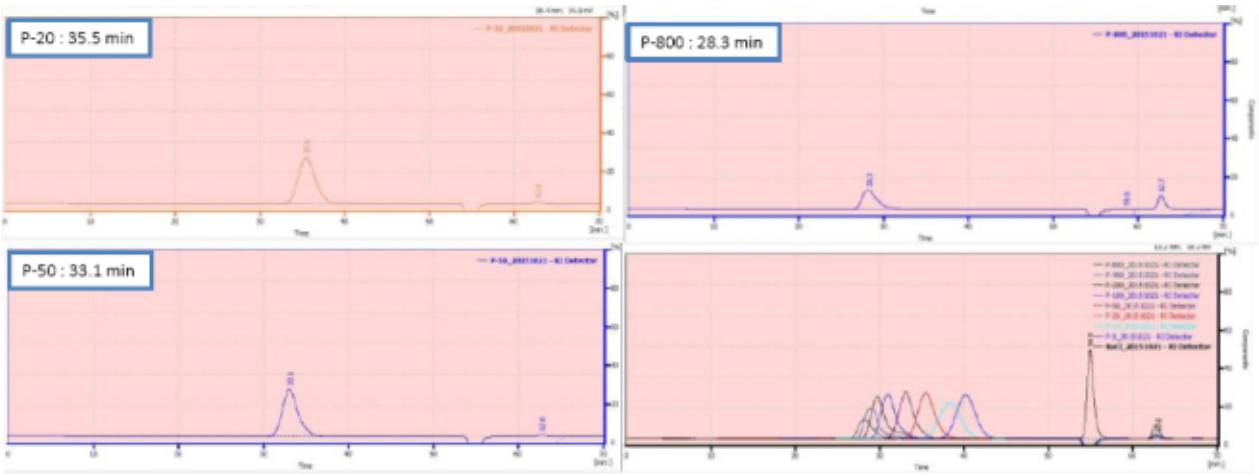


그림 3.11 표준품의 GPC 분석 크로마토그램

- 표준곡선의 직선성은 표준용액 P-800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5을 농도의 범위에서 5개 농도에 대하여 작성한 검량선과 직선성이며 R^2 값은 0.983으로 양호하였다.

pullulan	MW	log MW	RT	Ve	Vo	Vt	kav
NaCl	58.5	1.767156	54.90	27.45	14.15	27.45	1.000
p-5	6,200	3.792392	40.20	20.10	14.15	27.45	0.447
p-10	10,000	4	38.40	19.20	14.15	27.45	0.380
p-20	21,700	4.33646	35.50	17.75	14.15	27.45	0.271
p-50	48,800	4.68842	33.10	16.55	14.15	27.45	0.180
p-100	113,000	5.053078	31.00	15.50	14.15	27.45	0.102
p-200	200,000	5.30103	29.80	14.90	14.15	27.45	0.056
p-400	348,000	5.541579	29.00	14.50	14.15	27.45	0.026
p-800	736,000	5.866878	28.30	14.15	14.15	27.45	0.000
10kDa	10,000	4	38.2	19.1	14.15	27.45	0.373
25.1kDa	25,119	4.4	35.6	17.8	14.15	27.45	0.275

pullulan	log MW	kav
NaCl	1.767156	1.000
p-5	3.792392	0.447
p-10	4	0.380
p-20	4.33646	0.271
p-50	4.68842	0.180
p-100	5.053078	0.102
p-200	5.30103	0.056391
p-400	5.541579	0.026316
p-800	5.866878	0

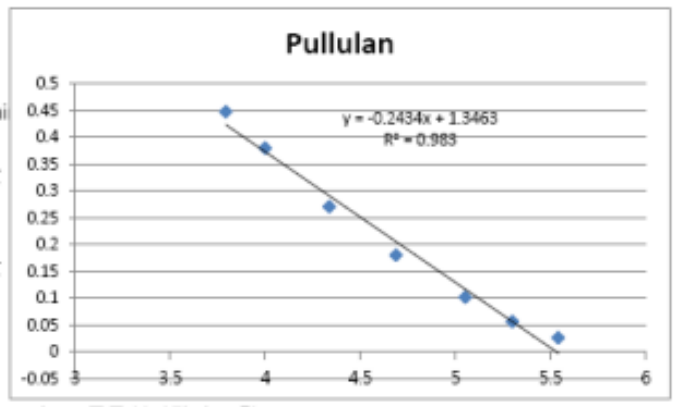
***면역활성 다당 (10~25kDa) = RT(35.6~38.2)**

Ve : elution volume of solute
- ➢ RT (retention time) x Flow rate
- ➢ Ex) p-100의 Ve값은 15.3ml (30.6min x 0.5ml/mi

Vo : void volume of column
- ➢ 통상적으로 분리능력 밖의 고분자 물질의 Ve값
- ➢ Ex) p-800의 Ve 값

Vt : Total column volume
- ➢ 통상적으로 분리능력 밖의 저분자 물질의 Ve값
- ➢ Ex) NaCl의 Ve 값

$$Kav = \frac{Ve-Vo}{Vt-Vo}$$



X축 : 표준품 분자량의 log값 (log MW)
Y축 : 표준품의 Kav
*** 미지 시료의 분자량은 Kav를 표준곡선 식에 대입, log MW을 산출하여 환산**

- 케일박다당의 분석은 케일박에 물 15배수, 효소를 첨가한 후 50도 조건에서 15시간 교반 추출 및 효소반응을 하였으며, 반응 후 80도에서 1시간동안 효소반응을 정지하였다. 규조토 (원물대비 10%) 투입 후 30분간 추가 가열없는 조건으로 교반한 후 여과하였다. 주정을 첨가하여 침전물을 회수하고 침전물을 2차 주정 침전을 통해 불순물을 제거한 후 정제수에 용해한 후 마이크로 필터로 여과를 하여 가용된 분획을 회수하여 동결건조(획득수율 6.7%/건조박) 하였다.

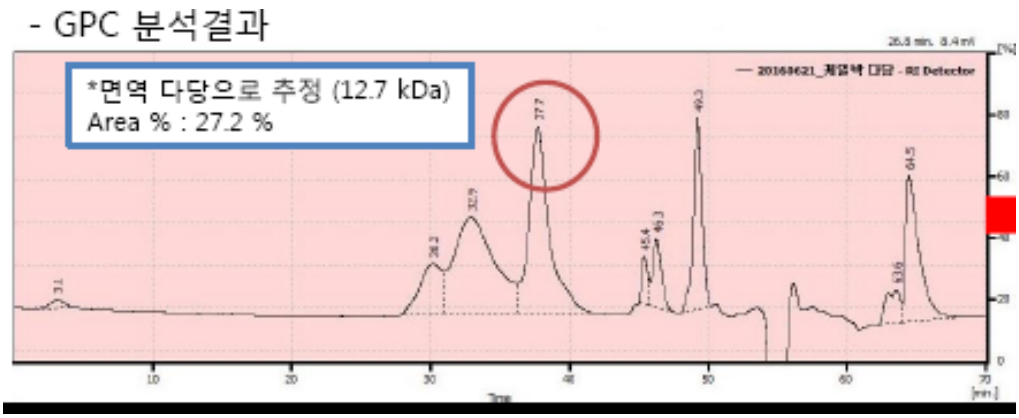


그림 3.12 케일박 다당 샘플 GPC 분석 크로마토그램

- 상기 결과를 통해 GPC 분석 크로마토그램을 통해 얻어지는 기능성분의 표준은 RT 35~40사이의 10~25kDa을 특징으로 같은 분획으로 제시할 수 있다.

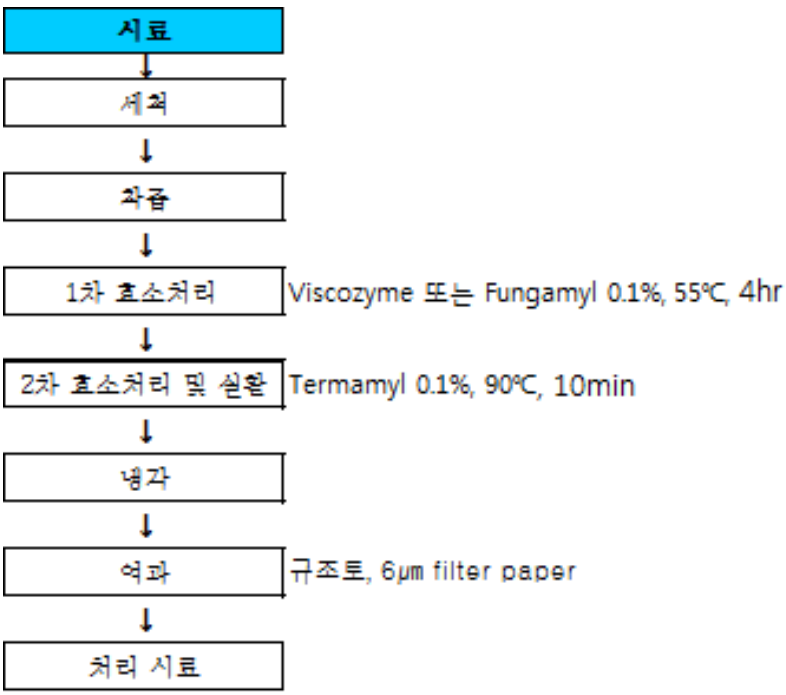
나. 유용성분 분석 확립을 위한 최적의 전처리 과정 (메트릭스 제거 및 분리능 향상)을 위한 방법 표준화

- 유용성분의 정확한 분석을 위한 매트릭스 제거 및 분리능 향상을 위한 방법으로 다당류 분석의 방해 물질로 예상할 수 있는 전분, 단백질, 지방질 중 용매를 이용한 분리가 수월한 지방과 침전, 효소분해 방법 등을 이용한 단백질 외에 여과 과정에서 가장 문제가 되는 전분과 cellulose로 알려져 있다. 단백질을 포함하여 분해를 통한 제거에 활용 가능한 효소들은 다음과 같다.

분류	효소명	제품번호	최적 온도(℃)	최적 pH	회사명	성상	Source
Protease	Protex 6L	-			㈜비전바이오켐	Liquid	
	Protease M	-			-		
	Protease N	-	55		AMANO	White powder	*Bacillus subtilis*
	Alcalase 2.4L FG	PLN05378 PLN05462	30-65	7-9	Novozymes	Liquid	*Bacillus licheniformis*
	Promod 279p	-	50-60	4.0-6.0	㈜비전바이오켐	White powder	*Aspergillus oryzae*
	Promozyme D2	-			-		
	Protease N "Amano"				-		
	Maxipro BAP	-			DSM		
	Maxipro NPU	-			DSM		
	Maxipro PSP	-			DSM		
	Collupulin MG	-			㈜비전바이오켐		파인애플
	Pectinex Ultra SP-L	KRN06009			Novozymes		*Aspergillus aculeatus*
	Neutrase 0.8L	- PWN10161	40-50	7	Novozymes	Liquid	*Bacillus amyloliquefaciens*
	Flavourzyme® 500MG	HP202415 PH202490			Novozymes	Brown powder	*Aspergillus oryzae*
	판크립신	-			㈜비전바이오켐	White powder	
	Alphalase NP	-			㈜비전바이오켐	Liquid	*Bacillus subtilis*
	Foodpro Alkaline protease	-			㈜비전바이오켐	Liquid	*Bacillus licheniformis*
	Sumizyme FP	-	45-55	4.0-8.0	풍양발효연구소	Powder	*Aspergillus oryzae*
	Sumizyme AC	-			㈜비전바이오켐		
	Pepsin 1:3000	-	40-55	2.0-5.5	㈜비전바이오켐	White powder	*Porcine gastric mucosa*
	Protamex	PW2A1109	35-60	5.5-7.5	Novozymes	Powder	*Bacillus*
Amylase	Termamyl 120L type L	AYS10066			Novozymes	Liquid	
	Fungamyl 4000SG	AF340048			Novozymes		*Aspergillus oryzae*
	AMG 1100BG	AM104043			Novozymes		*Aspergillus niger*
	Fungamyl 800L	AFN00895			Novozymes		*Aspergillus oryzae*
	Termamyl SC	AUS30084			Novozymes		*Bacillus microorganism*
	Saczyme	NAN01107			Novozymes		*Aspergillus niger*
	Fungamyl 800L	AFN00885			-	Liquid	
	Spezyme LT300	-			㈜비전바이오켐		
	BAN 480L	-	70-80	5.0-7.5	Novozymes		
	Spezyme LT	-			-	Liquid	*Bacillus subtilis*
	Spezyme Fred	-			㈜비전바이오켐	Liquid	*Bacillus licheniformis*
	Betalase 1500EL	-			㈜비전바이오켐	Liquid	
	Biowin AG	-			㈜비전바이오켐		

분류	효소명	제품번호	최적 온도(℃)	최적 pH	회사명	성상	Source
Pectinase	Rapidase C80 MAX	-			㈜비전바이오켐		
	Maxazyme NNP DS	-			㈜비전바이오켐		
	Rapidase TF	-			-		
	Cytolase PCL5	-			㈜비전바이오켐		
	Pectinex, XXL	-			-		*Aspergillus niger*
	Pectinex Ultra AFP	-			-		*Aspergillus aculeatus* *Aspergillus niger*
	Pectinex Ultra SP-L	-			-		*Aspergillus aculeatus*
	Pectinex Ultra pulp	KWN10045 KWN10045			Novozymes		
	Pectinase from Aspergillus niger	C4716			Sigma-Aldrich		
	Peclyve CP	-			㈜비전바이오켐		
	Pectinase from Aspergillus niger	17389			Sigma-Aldrich		
	PEC-600	-			Sunson Industry		
	Peclyve PR	-			㈜비전바이오켐	Liquid	
	Platase PR	-			㈜비전바이오켐	Liquid	*Aspergillus niger*
	Platase TL	-			㈜비전바이오켐	Liquid	*Aspergillus niger*
	Platase TCL	-			㈜비전바이오켐	Liquid	*Aspergillus niger*
	Viscozyme L	KTN02194 KTN02244	25-55	3.3-5.5	Novozymes	Liquid	*Aspergillus aculeatus*
Cellulase	Rohament CL	-	50-60	4.5-5.0	㈜비전바이오켐	Liquid	*Trichoderma reesei*
	Celluclast 1.5L	CCN03154	50-60	4.5-6.0	Novozymes		*Trichoderma reesei*
	Cellulase from Trichodermu reesei ATCC 26921	C8546			Sigma-Aldrich		*Trichodermu reesei*

- 시료에 따라 전분 또는 펙틴, 그리고 cellulose의 제거를 위한 방법으로 각 효소가 가지는 최적으로 반응 조건(제조사 제시 기술자료 참고)을 활용하여 다음과 같은 전처리를 실시하였다.



- 상기 전처리 과정을 통해 효과적으로 전분이 분해되어 여과 단계에서의 막힘 현장이 없어져, 타겟 획분의 회수율을 증가시킬 수 있었으며, 점질물과 침전물들의 효과적인 제거가 가능함을 확인할 수 있었다. 따라서, 정량분석을 위한 시료의 제조를 위한 전처리 방안으로서 제시될 수 있다 판단하였다.

3.5 기능성분별, 기능성분의 함량별 면역능 수치 등급화 가이드 제시

가. 대표적인 기능성 원료의 기능성분의 종류와 함량 따른 면역능 구분과 등급화를 위한 가이드 제시

- 개발된 시험관 시험법에 의해 도출된 BMDC Immunogenic Index I/II와 Tolerogenic Index I/II에 따라 immunogenic한 경향과 tolerogenic한 경향의 기준으로의서 대표군인 홍삼농축액과 산업화 후보 소재인 케일박 다당의 기능성분 농도별 효능 구분 및 등급화 실험을 진행하려 한다. 홍삼농축액의 경우 기능성원료의 대표성에 선정 이유가 있으며, 시장에서도 오랜기간 동안 시판을 통해 검증이 완료된 시료라 판단하였다. 홍삼 성분의 지표성분(기능성분과 동일) 각 3가지 물질의 합은 규격서상 표기가 의무이지만, 각각의 성분함량에 대한 표시는 의무사항이 아닌 이유로, 합이 비슷한 제품을 비교한다는 것을 가지고 의미를 찾기는 쉽지 않다. 따라서, 제조법이 다른, 즉 3가지 물질의 합이 비슷한 제품을 회사별로 비교해 보거나, 4년근 또는 6년근과의 차이를 보는 것이 더 적절하다고 판단되어, 3가지 물질의 농도 차이별 비교하는 것은 대표적인 한 가지 제품으로 희석배율을 조절하면서 기능성분 함량에 따른 효능 평가 실험하는 것으로 하고, 주정을 사용하는 제품(대동고려삼)과, 물을 사용하는 인삼공사나 농협 제품을 구매하여 3개의 제조사 제품(총 4 품목)을 구매하여 실험해 보는 것으로 진행하고 있다. 이의 결과를 통해 농도별 효능 구분 및 등급화에 대한 결과를 도출할 계획이다(2차년도 내 완료 예정).
- 우선 주관기관에서 도출한 Immunogenic Index I/II와 Tolerogenic Index I/II의 의해 각 immunogenic한 경향과 tolerogenic한 경향으로 구분하여 면역능이 강한 순서부터 나열을 통하여 원료 분포별 특징을 살펴보았다.
- 아래 결과와 같이 기존의 건기식으로 등재된 원료들인 홍삼, 알로에, 표고버섯 등은 immunogenic한 경향과 tolerogenic한 경향이 중간으로 평가되는 특징이 보였다. 반면에 immunogenic한 경향만 보이는 시료와 tolerogenic한 경향만 가지는 특징이 보이는 시료들도 있어, immunogenic한 경향과 tolerogenic한 경향을 둘다 보유한 범위를 표준 면역능 범위로 구분해 보았다. 홍삼 시료군의 경우 예상보다 우수한 면역능으로 평가가 되지 않아 등급판정에 있어 positive 레퍼런스로서의 기대는 낮아졌지만, 두가지 양상을 보이는 경향으로 분석되어 신규 시료의 경우 '면역능이 있을 가능성이 있다' 는 하나의 기준으로 평가할 수도 있겠다는 해석을 해 보았다. 따라서, 향후 면역능의 구분은 immunogenic index와 tolerogenic index으로 구분을 하고 각 index별 상/중/하로 나누어 등급화 하는 가이드를 선정해 보았다, 이는 동물모델 시험을 통해 구분된 면역능의 일치성과 효능평가 결과의 상관성에 대한 비교 연구를 통해 수치화와 함께 정리해 나갈 예정이다.

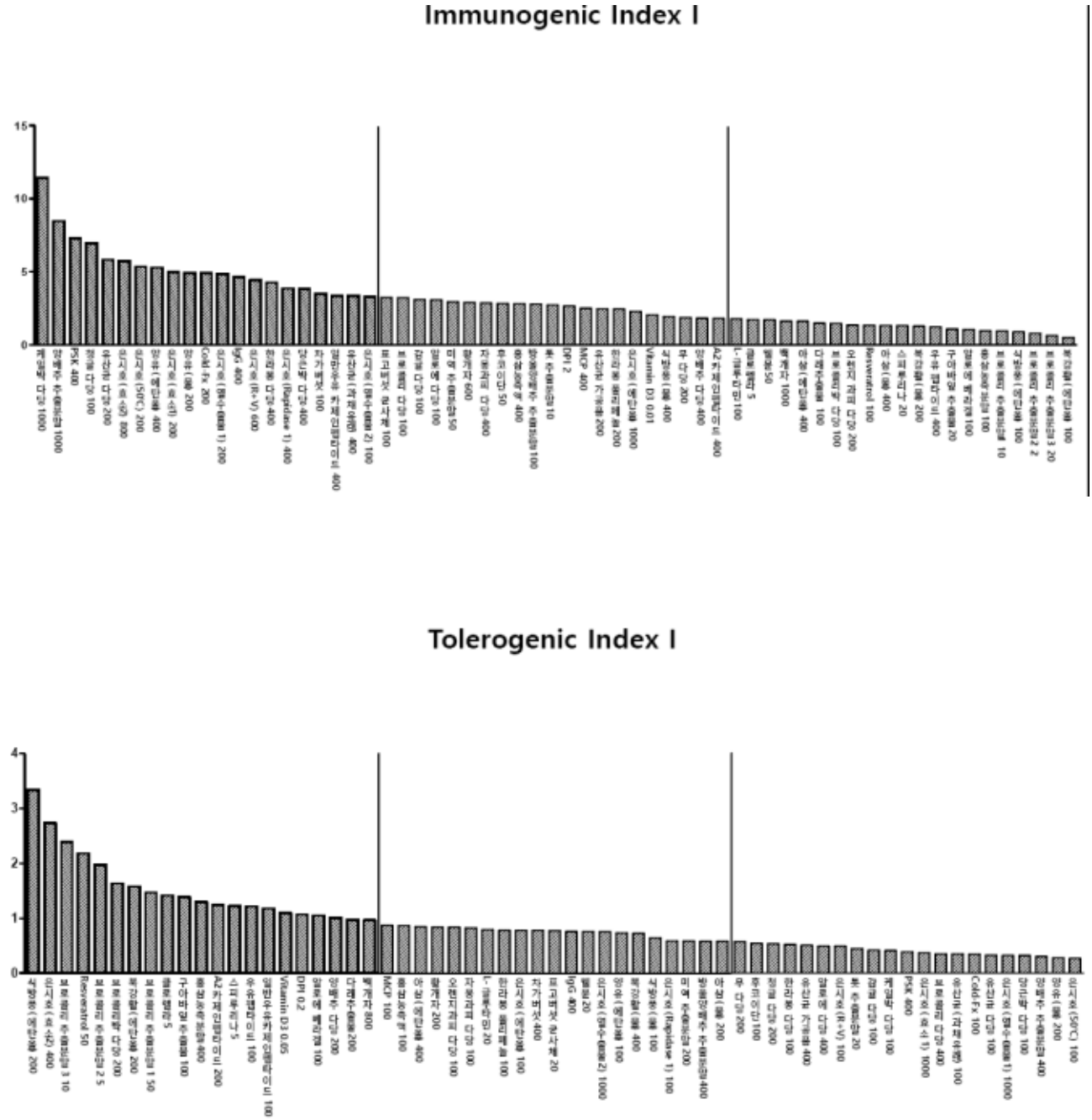


그림 3.13 우선 주관기관에서 도출한 소재별 Immunogenic Index I와 Tolerogenic Index I

3.6 우수 식품소재 5종 선정 가이드 제안 (기존 개별인정형 원료와 비교)

가. 측정법 개발을 위한 객관성 있는 식품 소재 5종 선정과 사업화 개발을 위한 우수 식품소재 5종 선정

- 2차년도에는 신규 검색된 기능성 원료들과 사업화 가능성이 있는 원료들을 추가로 수집, 제조하여 면역능 평가를 실시하였다. 추가로 수집된 원료들의 규격 및 제조에 대한 정보를 포함하는 내용은 다음과 같다.

(1) 홍삼농축액 : 제조사 더존PHC(한국)

시 험 성 적 서

제 품 명 : 홍삼농축액7
제품 유형 : 홍삼(원료성)
제조 일자 : 2015. 08. 31
LOT NO. : 15-K38-6PRE - 원료
작성 일자 : 2015. 09. 02

시험항목	규 격	시험결과	비 고
성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이물이 없어야 함	적색	
Rb1,Rg1,Rg3 의 합	Rb1,Rg1,Rg3 의 합 7.0 mg/g 이상	7.8 mg	
pH	5.0 이상	7.1	
고형분	60% 이상	64.1	
세균수	1ml당 3,000이하	합 격	
대장균군	음성이어야 함.	합 격	
내용량(%)	내용량의 97.0이상	합 격	

종합판정일자	판정 결과
2015. 09. 02	합 격

(주)젤존바이오
Tel:031)399-8730
Fax:031)399-8732

1. 제품명 : 홍삼농축액
2. 제공 업체 : 젤존바이오
3. 지표성분 : 진세노사이드 (Rb1, Rg1, Rg3)

(2) 홍삼농축액 : 제조사 대동고려삼(한국) : 4년근과 6년근을 원료로 사용하고 있으며, 주정을 사용하는 공정을 적용하고 있어 물로 추출하여 제조한 농축액과 비교할 수 있는 소재로 판단되어 제시함.

원료 제품 단가 -대동고려삼㈜

	원료명	종 류	규 격	단 가		비 고
				4년	6년	
홍 삼	홍삼원료		분말용	110,000	125,000	
			추출용	110,000	125,000	
	홍삼농축액	원료타입	4mg/g	140,000	155,000	
			7mg/g	150,000	165,000	
			11mg/g	155,000	170,000	
			15mg/g	165,000	180,000	
			18mg/g	185,000	200,000	
			20mg/g	195,000	210,000	
		정타입	7mg/g	170,000	185,000	
	홍삼분말		100mesh	125,000	140,000	

시 험 성 적 서

제품명	홍삼농축액플러스(1년)	관리번호	17 - 0728 - 01
거 래 처	비케이바이오		

시험항목	규격기준	결과	적부	비고
성 상	갈색의 점조성을 지닌 농축액	적합	적합	
Rg1+Rb1+Rg3 합계	7.0 mg/g 이상	9.6 mg/g	적합	
일 반 세 균	1ml당 3,000이하	0	적합	
대 장 균 군	음성	음성	적합	

대동고려삼주식회사
DAEDONG KOREA GINSENG CO., LTD.
본사/공장 : 충남 금산군 군북면 군북로 586
TEL : 041) 753 - 8803 FAX : 041) 753 - 9914

종합관정

대동고려삼(주) Quality Control Department

시 험 성 적 서

제품명	4년근홍삼농축액플러스	관리번호	17 - 0729 - 02
거 래 처	비케이바이오		

시험항목	규격기준	결과	적부	비고
성 상	갈색의 점조성을 지닌 농축액	적합	적합	
Rg1+Rb1+Rg3 합계	7.0 mg/g 이상	8.97 mg/g	적합	
일 반 세 균	1ml당 3,000이하	0	적합	
대 장 균 군	음성	음성	적합	

대동고려삼주식회사
DAEDONG KOREA GINSENG CO., LTD.
본사/공장 : 충남 금산군 군북면 군북로 586
TEL : 041) 753 - 8803 FAX : 041) 753 - 9914

종합관정

대동고려삼(주) Quality Control Department

(3) 홍삼농축분말 : 제조사 (주)세계에프엘(한국)

제품시험성적서

귀중

제품명	홍삼농축분말	Lot No.	
제조일		납품량	Sample
납품일		분석자	[illegible]

시험항목	성분규격	시험결과	적부	비고
성상	갈색의 분말상으로 홍삼고유의 향과 향이 있음	적합	적합	
이물	검출되어서는 안됨	불검출	적합	
수분	8% 이하	3.99	적합	
중금속	10mg/kg이하	적합	적합	
대장균군	음성	음성	적합	
진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합	4mg/g이상	9.21	적합	
종합판정	적합			

(주)세계에프엘

IBT 아이비티(주)
TEL:031)456-0150
FAX:031)456-3150

1. 제품명 : 홍삼농축분말
2. 제공 업체 : 아이비티㈜
3. 지표성분 : 진세노사이드 (Rb1, Rg1, Rg3)

(4) 클로렐라 : 제조사 (주)대상(한국)

DAESANG CORPORATION.

MIWON

C.P.O BOX 2156, SEOUL
26, [illegible], DONGDAEMUN-GU,
130-706, SEOUL, KOREA
Phone : 82-2-2220-9500
Fax No : 82-2-704-8421

BIO BUSINESS UNIT GUNSAN PLANT
208, OESANG 1-GIL, GUNSAN-SI,
JEOLLABUK-DO 573-879, KOREA
Phone : 82-63-469-2180
Fax No : 82-63-463-5220

제품검사성적서

제 품 명 : 대상 클로렐라 원말
출 하 처 : [illegible]
출 고 량 : kg
LOT No : [illegible]
제조연월일 : 2015년 11월 26일

분석항목		제조규격	분석결과	분석방법
성상		고유의 색택을 가지고 이미,이취가 없어야 한다	적합	외관 시험법
비소(As_2O_3)		1ppm 이하	적합	일반분석 비소 시험법
철(Fe)		10mg% 이상	47.30	원자 흡광광도법
조단백질		50% 이상	57.09	세미마이크로 킬달법
수분함량		5% 이하	4.05	건조 감량법
납(Pb)		3mg/kg 이하	적합	[illegible]
수은(Hg)		0.5mg/kg 이하	적합	Korea Health Food Code
카드뮴(Cd)		1mg/kg 이하	적합	Korea Health Food Code
회분		6% 이하	4.95	강열 잔류법
균수	생균수	3,000개/gr이하	ND	표준한천평판 배양법
	대장균군	음성	음성	데옥시콜레이트 한천평판 배양법
비타민 B_{12}		2.0ug/100g 이상	4.65	일반분석 비타민B_{12} 시험법
[illegible]		불검출	불검출	[illegible] 시험법
기존 PPB		50mg% 이하	[illegible]	[illegible]
총 PPB		70mg% 이하	30.30	[illegible]
엽록소		1,000mg% 이상	2,240	알카리성 피리딘 법
이물(잔류이물)		불검출	불검출	육안 관찰

대상주식회사
전북 군산시 외항1길 208
☎ (063) 469-2330

[illegible]

Daesang Corporation is certified of ISO 9001 : 2008 & FSSC 22000 : 2010

1. 제품명 : 클로넬라
2. 제공 업체 : 대상
3. 지표성분 : 총 엽록소

(5) 알로에베라겔 : 제조사 ALOE VERA PRODUCTS(미국)

[알로에베라겔100:1]

ALOE VERA products

197 Woodland Pkwy, Ste. 104-112 • San Marcos, CA 92069-3020 • 888-236-3

DESCRIPTION: ALOE VERA GEL FREEZE DRIED POWDER 100:1
FOOD GRADE, NO PRESERVATIVE
DATE OF MAUFACTURE: NOVEMBER 18, 2014
BATCH # 941143222
LOT # 140890
GROUP # 28
INGREDIENTS: ALOE VERA FREEZE DRIED POWDER 200:1-50%
MALTODEXTRIN-50%

CERTIFICATE OF ANALYSIS

ITEMS	SPECIFICATIONS	RESULTS
APPEARANCE	WHITE POWDER	PASSED
ODER	NONE	PASSED
MOISTURE %	BELOW 5.0%	4.2%
ANTHRAQUINONE	BELOW 0.5 mg/kg	0.10mg/kg
CRUDE PROTEIN	MORE THAN 0.3%	.44%
ASH CONTENT	BELOW 1.0%	.22%
ARSENIC	BELOW 1.5 mg/kg	0.20mg/kg
HEAVY METAL	BELOW 10.0 mg/kg	1.24 mg/kg
TOTAL PLATE COUNT	BELOW 100 cfu / g	PASSED
COLIFORM	0 MPN / 10g	PASSED
E. COLI	0	PASSED
POLYSACCHARIDE	ABOVE 30 mg/g	PASSED
PRESERVATIVE	NONE	NONE
STORAGE PERIOD	(3) YEARS IN SEALED UNIT	PASSED

JESSI GIBSON
QUALITY CONTROL

NOVEMBER 18, 2014
DATE

(주) 젤 존 바 이 오
Tel:031)399-8730
Fax:031)399-8732

1. 제품명 : 알로에베라겔
2. 제공 업체 : 젤존바이오
3. 지표성분 : 총 다당체

(6) 구아바잎추출물 : 제조사 PHYTOTECH EXTRACTS PVT LTD(인도)

[구아바잎추출분말]

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Botanical details	
Product name	[illegible]
Botanical name	[illegible]
Plant part used	[illegible]
Appearance	[illegible]
Odor	Characteristic
Taste	Characteristic
Shelf life	[illegible]
Method of analysis	[illegible]
Country of Origin	India
Batch no.	
Mfg. date	
Exp. date	
Quantity	

TESTS	RESULT	SPECIFICATION
[illegible]	[illegible]	[illegible]

#103 / 103, 1st Floor, Sri Krishna Nagar, [illegible], Bangalore - 560 [illegible], Karnataka, India
Phone: 080 - [illegible] Web: www.phytotech.in

(주) 젤 존 바 이 오
Tel:031)399-8730
Fax:031)399-8732

1. 제품명 : 구아바잎추출분말
2. 제공 업체 : 젤존바이오
3. 지표성분 : 총 폴리페놀

(7) 표고버섯균사체 : 제조사 (주)HK바이오텍(한국)

HK BIO
HK Biotech Co., Ltd.

시 험 성 적 서

검 체 명	HK표고버섯균사체		
시 험 항 목	규격적부 (기준 및 규격인정시험)		
로 트 번 호	30130207LEP		
시 험 목 적	자가품질검사	제 조 일 자 (유 통 기 한)	2013. 02. 07 (2015. 02. 06)

성 적 :

성상 ..... 갈색의 분말 (적합)
β-Glucan(mg/g) ..... 151.96 (규격: 110~200)
납(mg/kg) ..... 불검출 (규격: 1.0이하)
총비소(mg/kg) ..... 불검출 (규격: 1.0이하)
카드뮴(mg/kg) ..... 불검출 (규격: 0.5이하)
총수은(mg/kg) ..... 불검출 (규격: 0.5이하)
대장균군 ..... 음성 (규격:음성)
총아플라톡신 (B1,B2,G1 및 G2의 합, μg/kg) ..... 불검출 (규격: 15이하, 단 B1은 10이하)
판정 ..... 적합 끝.

2013년 02월 16일

(주)HK바이오텍

위의 내용은 자가품질검사 결과이며, 이 시험 성적서는 용도 이외의 선전, 소송, 기타 법적요건으로 사용할 수 없습니다.

1182 Igok-Ri Munsan-Up Jinju, Gyeongnam 660-841, Korea

iBT 아이비티(주)
TEL:(031)456-0150
FAX:(031)456-3150

1. 제품명 : 표고버섯균사체
2. 제공 업체 : 아이비티
3. 지표성분 : 베타글루칸

(8) L-글루타민 : 제조사 (주)대상(한국)

DAESANG CORPORATION.

MIWON

제 품 성 적 서

제 품 명	: L-글루타민
출 하 처	:
로트 번호	: 15044412
포장 단위	: 20 kg
출 하 량	: kg
제조연월일	: 2015. 04. 01.

시험 항목	규 격	결 과
성상	아이비티 글루타민 분말 (백색 이상)	적합
함량	98.5% ~ 101.5%	98.65
확인시험	적 합	적합
용상	무색, 거의 점명 이하	적합
비선광도	[illegible]	8.85
pH (1~50)	4.0 ~ 6.0	4.89
염화물	0.1% 이하	적합
Id(Pb)	5.0mg/kg 이하	적합
비소(as)	4mg/kg 이하	적합
건조감량	0.3% 이하	0.05
강열잔류물	0.1% 이하	0.03

오 경 현
품질보증팀장

Daesang Corporation is certified of ISO 9001 : 2008 & FSSC 22000 : 2010

1. 제품명 : L-글루타민
2. 제공 업체 : 아이비티
3. 지표성분 : L-글루타민

(9) 유산균 (과채유래유산균 함유 제품) : 제조사 (주)씨제이(한국)

제품 성분표

원료명 및 함량 과채유래유산균CJLP133(락토바실러스플란타룸 CJLP133, 말토덱스트린, 무수결정포도당)(우유,대두), 난소화성 말토덱스트린, 무수결정포도당, 에리스리톨

⚠ 주의사항 **주의사항을 꼭 확인해 주세요.**

- 섭취시 주의사항 : 특정 성분에 알레르기가 있으신 분은 원료명을 확인 후 섭취하십시오. 임산부, 수유부나 의약품을 섭취하시는 분은 제품을 드시기 전에 의사와 상담 후 섭취하십시오. 섭취량 및 섭취 방법을 확인한 후 섭취하시고, 기타 제품관련 사항은 고객행복센터로 문의하십시오. 제품의 개봉이나 섭취시 상처를 입을 수 있으니 주의하시기 바랍니다. 분말형태이므로 7세 이하의 어린이가 섭취할 경우에는 보호자의 지도, 감독하에 섭취하십시오.
- 보관방법 및 주의사항 : 실온보관 (본 제품은 살아있는 유산균제로서 온도에 민감하오니 직사광선을 피하고, 25℃ 이하의 서늘한 곳에 보관 유통 해주세요. 냉장 보관하시면 더욱 좋습니다.)

권장섭취량 및 방법 1일 2회, 1회 1포(2 g)

직접 섭취하거나 또는 물, 우유, 주스 등에 넣어 섭취할 수 있어서 아이들도 쉽게 섭취할 수 있어요!

- 건강기능식품전문제조원 : ㈜노바렉스 충북 청원군 오창읍 각리 1길 94
- 건강기능식품유통전문판매원 : 씨제이제일제당㈜ 서울특별시 중구 동호로 330
- 본 제품은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 가공한 건강기능식품으로 질병의 예방 및 치료를 위한 의약품이 아닙니다.
- 부작용 추정사례 신고는 국번없이 1577-2488

(10) 스피루리나 : 제조사 XIAMEN FOREVER GREEN SOURCE BIOCHEM TECH. CO., LTD(중국)

厦门恒绿源生化技术有限公司
XIAMEN FOREVER GREEN SOURCE BIOCHEM TECH. CO., LTD

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name: Spirulina Powder
Batch No.: CP15020
Production Date: Jun. 05, 2015
Expiration Date: Jun. 04, 2017

Test Items	Specifications	Test Results
Appearance	Fine green powder	Complies
Taste	Mild, like seaweed	Complies
Mesh Size	80 mesh	120 mesh
Protein	≥60%	65.0%
Water	≤7.0%	6.58%
Ash	≤8.0%	6.79%
Pb	≤2.0ppm	1.12ppm
As	≤1.0ppm	0.27ppm
Hg	≤0.5ppm	0.013ppm
Total Carotenoids Level	≤250mg/100g	451mg/100g
Chlorophyll	800-1200mg/100g	1051mg/100g
Tar Pigment	Negative	Negative
Pesticide	Negative	Negative
Total Bacterium	≤5000cfu/g	≤1000cfu/g
Salmonella	Negative	Negative
Staphylococcus	Negative	Negative
Pathogenic Bacteria	Negative	Negative

Conclusion: It meets the requirement.

Tested by: FGSQC01 Checked by: FGSQC02

杜永煌
GENERAL MANAGER

1. 제품명 : 스피루리나
2. 제공 업체 : 크레도코리아
3. 지표성분 : 총 엽록소

(11) 다래추추물 : 제조사 (주)서흥(한국)

제품명: 알렉스아이 제품의 유형: 개별인정형 건강기능식품

원료명 및 함량: 백년대추추출물(2009~5호), 미국산 참계산, 정제수, 프락토올리고당, 전래송백국산, 시네올, 베타시클로덱스트린, 칼슘추락, 도데카놀추락, 황금환추출물, 센티겔

섭취량 및 섭취방법: 1일 2회, 1회 1포를 그대로 섭취하시거나 충분한 물과 함께 섭취하십시오.

섭취시 주의사항: 1)섭취량 및 섭취방법을 확인하고 섭취하여 주십시오. 2)임신부 및 수유부는 섭취 전 의사와 상담하고, 특정 성분에 알레르기가 있으신 분은 원료명을 확인하신 후 섭취하십시오. 3)체질성 천연원료 함유로 인해 생신 단위별로 약간의 색상 차이 또는 침전물이 생기는 경우가 있을 수 있으나, 제품의 품질 및 기능에는 이상이 없으니 안심하고 사용하십시오. 4)제품 개봉 또는 섭취 시 내용물이 흘러 나올 수 있으니 주의하십시오. 5)제품 개봉 또는 섭취 시 포장 봉인면에 의해 상처를 입을 수 있으니 주의하십시오. 6)섭취 전에 유통기한을 확인한 후 섭취하십시오. 7)피우지 상태 그대로 진지제인하며 넣고 기밀하지 마십시오. 보관시 주의사항: 습기가 적고 직사광선을 받지 않는 서늘한 곳에 보관하시고, 제품 개봉 후에는 변질될 수 있으므로 바로 섭취하십시오.

식품이력추적관리번호: 이력추적등록번호 1234115 + 유통기한 (www.foodqr.go.kr에서 건강기능식품이력추적관리번호를 입력 하시면 식품의 정보를 확인하실 수 있습니다.)

내포장재질: 폴리프로필렌(PP)

제조원: (주)서흥 오창공장 / 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 216

개발 및 판매원: (주)바이로메드 / 서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 자연과학대학 기초과학연구동 203동

고객상담실: Tel.1577-7553 / 반품 및 교환처: 구입처 및 판매원

※구입 시 유통기한이 경과되었거나, 변질, 변패 또는 오손된 제품의 경우 구입처에서 교환하여 드리며, 공정거래위원회 고시 소비자분쟁해결기준에 의거, 소비자의 정당한 피해는 보상하여 드립니다.

※건강기능식품은 안전에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조기능한 식품입니다.

※본 제품은 질병의 예방 및 치료를 위한 의약품이 아닙니다.

※부작용 추정사례 신고는 국번없이 1577-2488

• 본 제품은 면역과민반응 개선 관련 기능으로는 국내 최초로 식품의약품안전처의 기능성 개별인정을 받은 원료로 제조한 건강기능식품입니다.
• 본 제품은 특허받은 다래추출물을 사용하였습니다.
(한국특허등록 제0615389호, 유럽특허등록 제2329835호, 일본특허등록 제5204805호, 중국특허등록 제ZL03819990.4호, 캐나다특허등록 제2495542호, 호주특허등록 제2003251197호)
• 다래추출물은 천연소재원료이므로 장기간 섭취하더라도 안전합니다.
• 다래추출물을 소재로 한 논문은 국제학술지에 다수 발표되었습니다.
(일레로기임상면역학회지 2005, 피부연구학회지 2007, 일레로기임상연구학회지 2009, 면역알레르기국제학회지 2009)

영양 · 기능정보

· 역방 대체추출물 : 면역과민반응 개선에 도움을 줄 수 있음 / 항미활성기능 2등급

1일 섭취량: 2포(30 ml)

1일 섭취량 당	함량	%영양소 기준치
열량	32 kcal	
탄수화물	7.6 g	2 %
당류	4 g	
단백질	0 g	0 %
지방	0 g	0 %
나트륨	0 mg	0 %
Quinic acid	43.2 mg	
Citric acid	57.6 mg	

※ %영양소 기준치 : 1일 영양소 기준치에 대한 비율

제조번호:

유통기한: 까지

GMP

8 806136 018283

(12) 후코이단 : 제조사 해원바이오텍(한국)

제품상세정보

제 품 명	"후코이단-100"
식품의 유형	고형차
제조원 및 생산자 수입품의 경우 수입자를 함께표기	제조사 : Haewon Biotech,Inc 소재지 : 전라남도 완도군 금일읍 공항길 3 공급원 : 고려인삼공사
제조연월일, 유통기한 또는 품질유지기한	제조일로부터 3년
포장단위별 용량, 수량	내용량 : 30g (1g×30포) × 5 BOX
원재료 및 함량	해조(다시마(국내산)100%)후코이단 추출분말 60%, 해조(미역포자엽(국내산)100%)후코이단 추출분말 40%
영양성분	식품위생법에 따른 영양성분 표시대상 품목이 아님.
유전자 재조합식품에 해당하는 경우의 표시	해당 없음
영유아식 또는 체중조절식품 등에 해당하는 경우 표시광고 사전심의필	해당 없음
수입식품의 경우 식품위생법에 따른 수입신고를 필합의 문구	해당없음
소비자상담실 전화번호	080-700-0209
제품가격	720,000원
제품구성	후코이단 추출분말 "후코이단-100" 150g, 고려인삼공사 대체요법 자료
음용대상	남녀노소 음용가능

(13) 후코이단 : 제조사 해림후코이단(한국) – 80만원/kg

주식회사 해림후코이단

주 소 : 전라남도 완도군 완도읍 농공단지 7길 20
전 화 : 061-554-9515 / FAX : 061-554-9568 / URL : www.haerimfucoidan.com

시 험 성 적 서

2017년 07월 03일

- 업 체 명 : 비케이바이오
- 제 품 명 : 후코이단 분말
- 원 산 지 : 국 내 산
- 제조일자 : 2017.04.03

항 목	기 준	결 과	비 고
성 상	고유의 맛과 향을 가지는 이황색의 분말	적 합	
수분 함량 (%)	10% 이하	0.44	
후코이단 함량 (%)	90% 이상	97.96	탄수화물+황산기
황산기 함량 (%)	27% 이상	27.91	
면역 활성 (%)	50% 이상	-	LPS 대비
대장균 군	음 성	적 합	
이 물	불 검 출	적 합	

담 당 자 : 박 정 일

주식회사 해림후코이단 대표이사 이지효

(14) 웰뮨: 제조사 내츄럴엔도텍(한국)

원재료명 및 함량

효모베타글루칸(β-glucan 780mg/g, 미국산)41.667%, 비타민E혼합제제(DL-알파-토코페롤 초산염, 변성전분, 덱스트린, 이산화규소), 건조효모(셀렌, 캐나다산), 산화아연, 결정셀룰로오스, 유당혼합분말(유당(미국산), 덱스트린), 홍마늘추출물분말, 황기추출분말, 도라지추출물분말, 스테아린산마그네슘, 합산망간, 홍삼농축액분말(6년근, 국내산/진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합 5mg/g)0.01% **우유함유**

캡슐기제 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 정제수, 카카오색소, 카라기난, 자당지방산에스테르, 맥芽, 염화마그네슘, 피로인산칼륨, 빙초산

영양 · 기능정보 1일 섭취량 2캡슐(600 mg) 총 30일 섭취량

- [효모베타글루칸] 면역기능 증진에 도움을 줄 수 있음
- [아연] 정상적인 면역기능에 필요, 정상적인 세포분열에 필요
- [셀렌] 유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요
- [비타민E] 유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요

1일 섭취량 당 함량
열량 0 kcal, 탄수화물 0 g(0 %), 단백질 0 g(0%), 지방 0 g(0%), 나트륨 0 mg(0 %),
기능성분 β-glucan 195 mg, 아연 8.5 mg(100 %), 셀렌 16.5 μg(30 %),
비타민E 3.3 mg α-TE(30 %)

※ ( )의 수치는 1일 영양성분기준치에 대한 비율임.

(15) 차가버섯 : 제조사 SibPribor ltd.(러시아)

BIOCHAGA INONOTUS OBLIQUUS
(Freeze-dried extract of Birch fungus CHAGA)

Composition : Extract of birch fungus chaga

Product : Powder

Areas of use : Recommended as a dietary food supplement - a source of polyphenolic compounds.

Index	The content of a daily dose of dietary supplement
The amount of polyphenols based on gallic acid	16-30mg

(16) MCP(modified citrus pectin)

– 미국에서 개발된 소재로 구체적인 제법 정보가 없음. 오렌지의 과피를 산가수분해를 통해 만들어 진다는 정보만 있음.

(17) 브로콜리추출분말

– Novanot사의 제품이며, 1% sulforaphane (자체 분석 시 0.3% 함유)을 함유하고 있는 제품과 10% sulforaphane (자체 분석 시 4.5% 함유)을 함유하고 있는 제품이 있음

(18) Cold-fx

– 미국 인삼으로 알려져 있으며, 환기삼으로서 산성다당체를 함유하고 있는 것으로 알려진 소재임. 해외 인삼 제품으로 홍삼 제품군과 대비하기 위해 제시함.

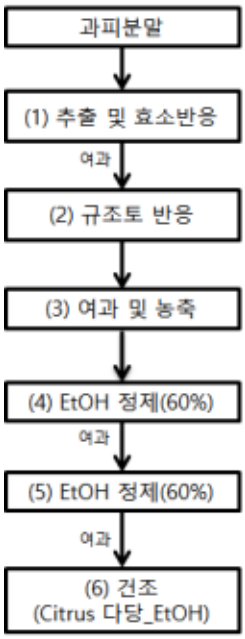
- 다음은 2협동기관에서 개발하고 있는 소재를 추가로 제조하여 시험에 사용하였다. 이는 사업화 아이템 발굴과 개발된 면역시스템을 이용할 시 경제성, 타당성 등의 검토를 위한 후보 소재로서의 가능성을 확인하기 위함 이었다.

(19) 한라봉다당 : 비케이바이오 개발 소재

- 한라봉 과피를 이용한 기 개발된 면역증가 기능의 원료로서, 이번 실험을 통해 기존에 진행한 시험관 및 동물실험들의 결과와 비교할 수 있는 레퍼런스 시료에 해당된다.

- 제법은 다음과 같으며, 상세 고정은 아래 그림과 같다.

원료(한라봉과피) -> 효소반응(Rapidase) -> 여과 -> 농축 -> Ethanol precipitation -> 원심분리 -> 침전물 회수 -> 동결건조



*Citrus 과피 (한라봉 과피분말)
(1) 추출 및 효소반응
: (한라봉 과피분말) 181g + (물 15배수) 1.5L + (Rapidase 1%(v/w원물) 1ml
(50℃, 15hr(Over Night) 교반 -> 80℃, 1시간 효소실활) -> 181g/1420ml 추출
* 한라봉 박 (속지 포함) 이용 ; 수분함량 45.22%

(1->2) 여과
1차 : bag filter (300mesh) * 추출 후 부피 : 1.5L / 여과 후 부피 : 1.4L, 5.21Bx

(2) 규조토 반응
: 여과 액 + 규조토 10g (건조원물대비 10%)
투입 후 30분간 교반 (추가 가열 없는 조건)

(3) 여과 및 농축
-> 여과 : 11um
-> 농축 : 1/3 부피 수준까지 농축 (약 1L 미만, 10~15 Bx 내외) * 농축 후 부피 : 0.7L, 10.058x

(4) EtOH 정제 (60%)
-> 여과액에 EtOH 혼합 (총 EtOH 비율 60%수준) -> (여과액 : EtOH = 1 : 2))
-> 교반실시
-> 원심분리 실시 (침전물 회수)
-> 침전물 용해

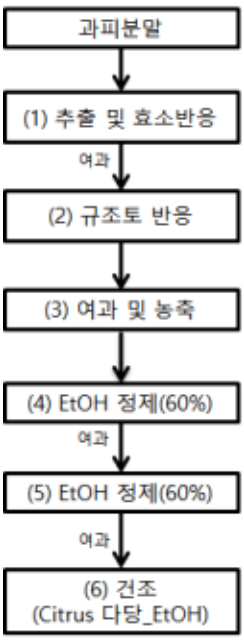
(5) EtOH 정제 (60%)
-> 용해액에 EtOH 혼합 (총 EtOH 비율 60%수준)
-> 교반실시
-> 원심분리 실시 (침전물 회수)

(6) 건조
-> 침전물 회수 후 물에 재 용해 (물 양은 최소로)
-> 동결건조 실시

(20) 감귤다당 : 비케이바이오 개발 소재

- 한라봉다당과 비교를 위한 시료로 이 또한 레퍼런스 샘플로서의 가능성을 판단하는데 목적이 있음.

- 원료(감귤과피) -> 효소반응(Rapidase) -> 여과 -> 농축 -> Ethanol precipitation -> 원심분리 -> 침전물 회수 -> 동결건조



*Citrus 과피 (감귤 과피분말)
(1) 추출 및 효소반응
: (감귤 과피분말) 181g + (물 15배수) 1.5L + (Rapidase 1%(v/w원물) 1ml
(50℃, 15hr(Over Night) 교반 -> 80℃, 1시간 효소실활) -> 181g/1420ml 추출

(1->2) 여과
1차 : bag filter (300mesh) * 추출 후 부피 : 1.5L / 여과 후 부피 : 1.4L, 5.21Bx

(2) 규조토 반응
: 여과 액 + 규조토 10g (건조원물대비 10%)
투입 후 30분간 교반 (추가 가열 없는 조건)

(3) 여과 및 농축
-> 여과 : 11um
-> 농축 : 1/3 부피 수준까지 농축 (약 1L 미만, 10~15 Bx 내외) * 농축 후 부피 : 0.7L, 10.05Bx

(4) EtOH 정제 (60%)
-> 여과액에 EtOH 혼합 (총 EtOH 비율 60%수준) -> (여과액 : EtOH = 1 : 2))
-> 교반실시
-> 원심분리 실시 (침전물 회수)
-> 침전물 용해

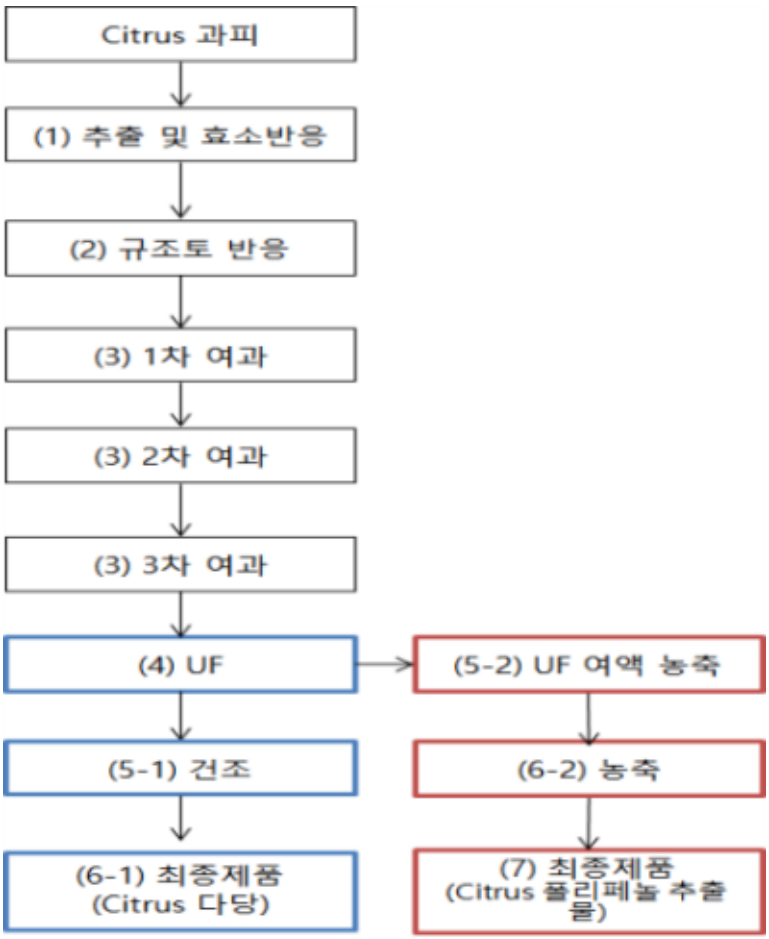
(5) EtOH 정제 (60%)
-> 용해액에 EtOH 혼합 (총 EtOH 비율 60%수준)
-> 교반실시
-> 원심분리 실시 (침전물 회수)

(6) 건조
-> 침전물 회수 후 물에 재 용해 (물 양은 최소로)
-> 동결건조 실시

(21) 감귤류과피 폴리페놀 : 비케이바이오 제조 소재

- 감귤 다당 분획이 제조되면서 파생되는 저분자 분획으로서 폴리페놀을 주요 기능물질로 함유하는 소재임. 다당과 대비되는 특성을 보유하는 것으로 예상하며, 대비 참고용으로 제시된 샘플임.

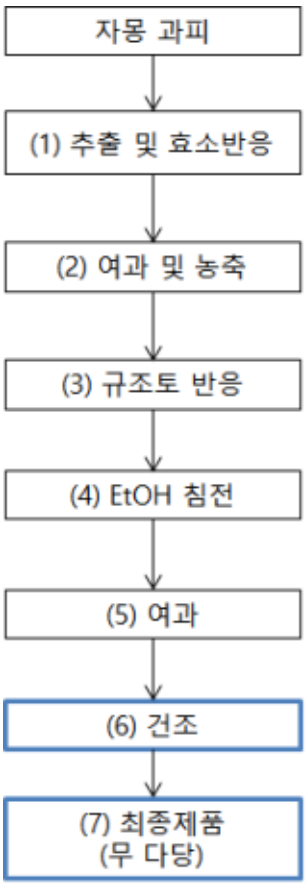
- 원료(감귤과피) -> 효소반응(Rapidase) -> 여과 -> 농축 -> Ethanol precipitation -> 원심분리 -> 상등액(저분자 분획) 회수 -> 농축



(22) 자몽과피 다당 : 비케이바이오 제조 소재

- 한라봉 또는 감귤 다당과 비교될 수 있는 동일 시트러스계 다당 분획물로서 레퍼런스 가능성을 확인하기 위해 제시됨.

- 원료(자몽과피) -> 효소반응(Rapidase) -> 여과 -> 농축 -> Ethanol precipitation -> 원심분리 -> 침전물 회수 -> 동결건조



* 자몽 과피 (과육 제거)
(1)추출 및 효소반응 (자몽 박)
: 자몽 박 600.58g + (물 5배수) 1050ml + (Rapidase 3%(v/w원물) 3.1ml (수분함량 : 82.82%)
(50℃, pH4~5, 15hr 교반 -> 80℃, 1시간 반응정지) -> 추출부피 : 1600ml

(2)여과 및 농축
여과 : 필터페이퍼 (No.5_2.5um)
농축 : 여액 농축 (45도)

(3)규조토 반응
: 규조토 1g(원물대비 1%) 투입 후 30분간 교반 (추가 가열 없는 조건)

(4)EtOH 침전
1차 침전 : 주정 첨가 (농축액 대비 4배 부피 (v/v)) -> 주정농도 (약 80%)
-> 30분 교반 (다당 침전) (규조토 혼합 상태) -> 침전물 회수 및 재용해 (최종 농축액과 동일한 물 양)

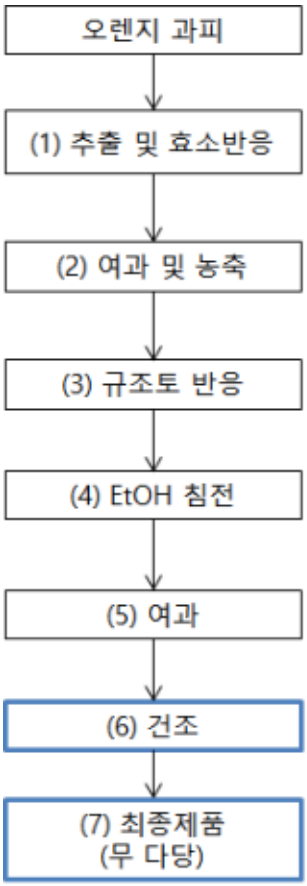
(5)여과
: 필터페이퍼 이용 여과 후 여액 회수 (규조토 제거)

(6) 건조
: FD 건조 실시 (건조 양 : 0.92g)

(23) 오렌지과피 다당 : 비케이바이오 제조 소재

- 한라봉 또는 감귤 다당과 비교될 수 있는 동일 시트러스계 다당 분획물로서 레퍼런스 가능성을 확인하기 위해 제시됨.

- 원료(오렌지과피) -> 효소반응(Rapidase) -> 여과 -> 농축 -> Ethanol precipitation -> 원심분리 -> 침전물 회수 -> 동결건조



* 오렌제 과피 (과육 제거)

(1)추출 및 효소반응 (오렌지 박)

: 오렌지 박 600.58g + (물 5배수) 1050ml + (Rapidase 3%(v/w원물) 3.1ml (수분함량 : 82.82%)

(50℃, pH4~5, 15hr 교반 -> 80℃, 1시간 반응정지) -> 추출부피 : 1600ml

(2)여과 및 농축

여과 : 필터페이퍼 (No.5_2.5um)

농축 : 여액 농축 (45도)

(3)규조토 반응

: 규조토 1g(원물대비 1%) 투입 후 30분간 교반 (추가 가열 없는 조건)

(4)EtOH 침전

1차 침전 : 주정 첨가 (농축액 대비 4배 부피 (v/v)) -> 주정농도 (약 80%)

-> 30분 교반 (다당 침전) (규조토 혼합 상태) -> 침전물 회수 및 재용해 (최종 농축액과 동일한 물 양)

(5)여과

: 필터페이퍼 이용 여과 후 여액 회수 (규조토 제거)

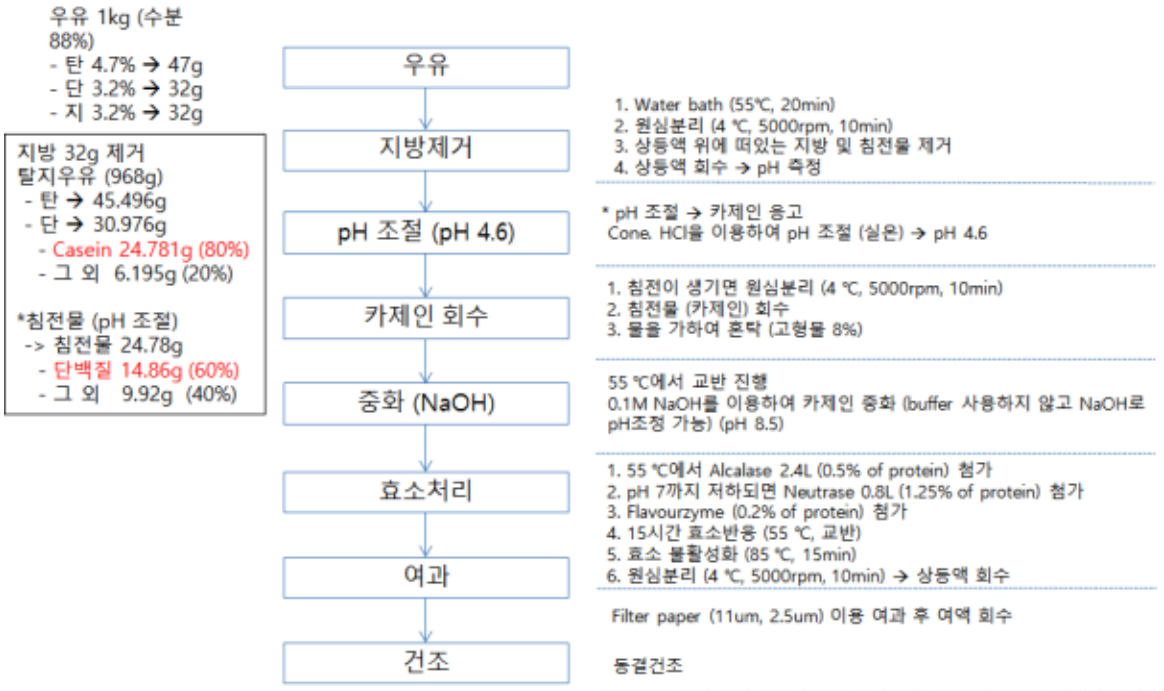
(6) 건조

: FD 건조 실시 (건조 양 : 0.92g)

(24) 우유펩타이드 : 비케이바이오 개발 소재

- 단백질을 기능물질로 제시할 수 있는 샘플로 판단함. 단백질이나 펩타이드를 기능물질로 하는 건기식 원료가 없으나, 해외 기능성 펩타이드에 대한 면역효과들이 보고되어 있어 가능성을 확인하기 위해 제시함.

- 우유 -> 탈지 -> pH 4.6 -> 카제인 분획 회수 -> 중화 -> 효소분해 -> 여과 -> 동결건조



(25) IgG : 비케이바이오 개발 소재

- 닭에 항원을 주입하여 유도된 항체들을 계란으로부터 회수하여 제조하는 것으로써 흔히 초유에 다량 함유되어 있어 면역효과가 있다는 면역글로블린으로서 기능성 확인을 위해 제시된 샘플임.

- 항원 -> 접종 -> 계란수집 -> 할란 -> 분리 -> 균질 -> 살균 -> 건조

(26) 미역추출분말 : 비케이바이오 제조 소재

- 해조류 유래의 원료 중 대표성을 가지는 미역을 원료로 하여 제조한 다당으로서, 농산물 유래의 다당과의 비교 가능성을 확인하기 위해 제시함.

- 원료 -> 분쇄 -> 물 추출(1회) -> 여과 -> 물 추출(2회) -> 여과 -> 농축 -> 건조

(27) 톳추출분말 : 비케이바이오 제조 소재

- 해조류 유래의 원료 중 대표성을 가지는 미역을 원료로 하여 제조한 다당으로서, 농산물 유래의 다당과의 비교 가능성을 확인하기 위해 제시함.

- 원료 -> 분쇄 -> 물 추출(1회) -> 여과 -> 물 추출(2회) -> 여과 -> 농축 -> 건조

(28) 양배추추출분말 : 비케이바이오 제조 소재

- 최근에 양배추의 영양(위보호, 항암작용 등)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, 추출액 등의 여러 가지 가공식품으로 개발되고 있으며, 2협동기관이 위치하고 있는 제주도에서의 주요 생산작물로서 개발에 의미가 있다 판단하여 제시함.

- 원료 -> 분쇄 -> 물 추출(1회) -> 여과 -> 물 추출(2회) -> 여과 -> 농축 -> 건조

(29) 방울양배추추출분말 : 비케이바이오 제조 소재

- 양배추의 영양적 가치를 보유하면서 특이성과 차별성을 보유하고 있는 양배추추출분말과의 비교 샘플로서 제시함.

- 원료 -> 분쇄 -> 물 추출(1회) -> 여과 -> 물 추출(2회) -> 여과 -> 농축 -> 건조

(30) 브로콜리추출분말 : 비케이바이오 제조 소재

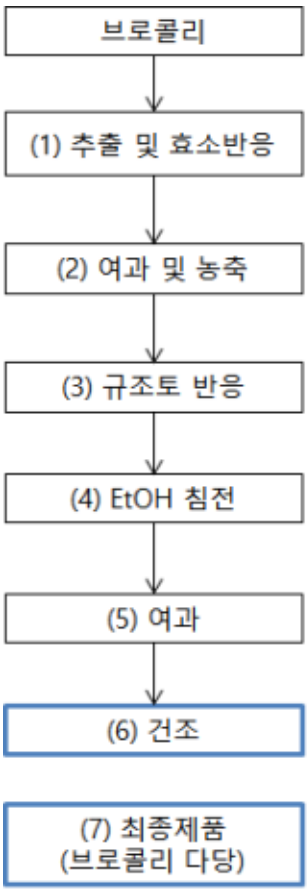
- 비케이바이오에서 보유하고 있는 특허기술인 PEF를 이용한 기술을 적용하여 제조한 브로콜리 추출 건조물임. 일반적으로 잘 알려진 항암성분인 설포라판의 함량을 증폭하여 만든 소재로서 저분자인 설포라판을 함유하는 소재의 항암효과를 확인하는데 목적으로 제시함.

- 브로콜리 -> PEF treatment -> 가식부 선별 -> 분쇄 -> Alcohol 추출 -> 여과 -> 농축 ->동결건조

(31) 브로콜리 다당 : 비케이바이오 제조 소재

- 브로콜리 유래의 다당 소재의 면역활성 가능성을 확인하기 위해 제시함. 브로콜리의 경우 전국의 80% 이상을 제주도에서 생산하고 있어 농산물 가공 활용에 의미가 있어 제시하게 됨.

- 원료 -> 효소반응(Rapidase) -> 여과 -> 농축 -> Ethanol precipitation -> 원심분리 -> 침전물 회수 -> 동결건조



*브로콜리 원물

(1)추출 및 효소반응 (브로콜리)
: 브로콜리 100g + (물 15배수) 1.5L + (Rapidase 3%(v/w원물) 3ml (con 동시 실험 진행)
(50℃, pH4~5, 15hr 교반 -> 80℃, 1시간 반응정지)
: 브로콜리 + 물 혼합의 경우 pH 6.8 이므로 ascorbic acid 첨가 (1g, 1%) -> pH 4.4

(2)여과 및 농축
여과 : 필터페이퍼 (No.5_2.5um)
농축 : 여액 농축 (35도)

(3)규조토 반응
: 규조토 1g(원물대비 1%) 투입 후 30분간 교반 (추가 가열 없는 조건)

(4)EtOH 침전
1차 침전 : 주정 첨가 (농축액 대비 4배 부피 (v/v)) -> 주정농도 (약 80%)
-> 30분 교반 (다당 침전) (규조토 혼합 상태) -> 침전물 회수 및 재용해 (최종 농축액과 동일한 물 양)
2차 침전 : 주정 첨가 (농축액 대비 4배 부피 (v/v)) -> 주정농도 (약 80%)
-> 30분 교반 (다당 침전) (규조토 혼합 상태) -> 침전물 회수 및 재용해 (최종 농축액과 동일한 물 양)

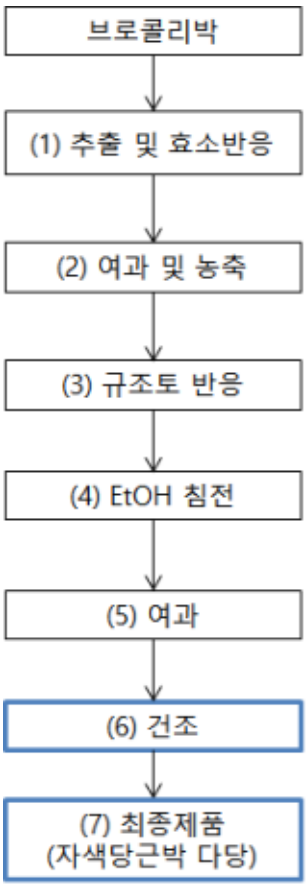
(5)여과
: 필터페이퍼 이용 여과 후 여액 회수 (규조토 제거)

(6) 건조
: FD 건조 실시 (건조 양 : 0.06g)

(32) 브로콜리박 다당 : 비케이바이오 제조 소재

- 2협동기관에서 생산하고 있는 브로콜리 착즙액 가공 시 발생되는 부산물을 이용한다는 의미에서 이를 가지고 다당 획분을 제조하여 제시함.

- 원료(브로콜리를 압착방식으로 주스를 착즙하고 남은 잔사) -> 효소반응(Rapidase) -> 여과 -> 농축 -> Ethanol precipitation -> 원심분리 -> 침전물 회수 -> 동결건조



*브로콜리박

(1)추출 및 효소반응 (브로콜리박)
: 브로콜리박 800.47g + (물 5배수) 830ml + (Rapidase 3%(v/w원물) 3.1ml (수분함량 : 87.27%)
(50℃, pH4~5, 15hr 교반 -> 80℃, 1시간 반응정지) -> 추출부피 : 1720ml

(2)여과 및 농축
여과 : 필터페이퍼 (No.5_2.5um)
농축 : 여액 농축 (45도)

(3)규조토 반응
: 규조토 1g(원물대비 1%) 투입 후 30분간 교반 (추가 가열 없는 조건)

(4)EtOH 침전
1차 침전 : 주정 첨가 (농축액 대비 4배 부피 (v/v)) -> 주정농도 (약 80%)
-> 30분 교반 (다당 침전) (규조토 혼합 상태) -> 침전물 회수 및 재용해 (최종 농축액과 동일한 물 양)

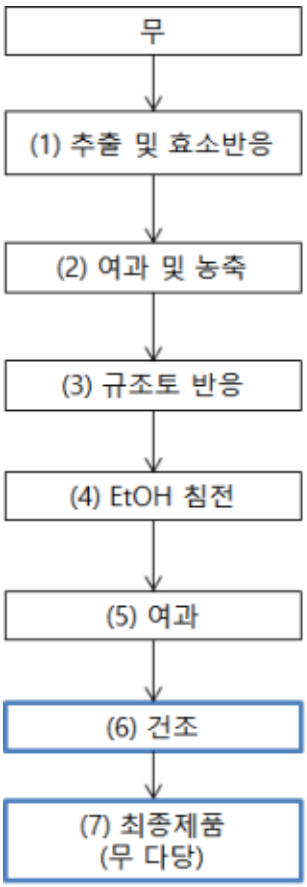
(5)여과
: 필터페이퍼 이용 여과 후 여액 회수 (규조토 제거)

(6) 건조
: FD 건조 실시 (건조 양 : 13.58g)

(33) 무 다당 : 비케이바이오 제조 소재

- 무는 2협동기관이 위치한 제주도 내 주요 작물이며, 무 착즙액 가공 시 발생되는 부산물을 이용한다는 의미에서 이를 가지고 다당 획분을 제조하여 제시함.

- 원료 -> 효소반응(Rapidase) -> 여과 -> 농축 -> Ethanol precipitation -> 원심분리 -> 침전물 회수 -> 동결건조



*무

(1)추출 및 효소반응 (무)

: 무 600.58g + (물 5배수) 1050ml + (Rapidase 3%(v/w원물) 3.1ml (수분함량 : 82.82%)

(50℃, pH4~5, 15hr 교반 -> 80℃, 1시간 반응정지) -> 추출부피 : 1600ml

(2)여과 및 농축

여과 : 필터페이퍼 (No.5_2.5um)

농축 : 여액 농축 (45도)

(3)규조토 반응

: 규조토 1g(원물대비 1%) 투입 후 30분간 교반 (추가 가열 없는 조건)

(4)EtOH 침전

1차 침전 : 주정 첨가 (농축액 대비 4배 부피 (v/v)) -> 주정농도 (약 80%)

-> 30분 교반 (다당 침전) (규조토 혼합 상태) -> 침전물 회수 및 재용해 (최종 농축액과 동일한 물 양)

(5)여과

: 필터페이퍼 이용 여과 후 여액 회수 (규조토 제거)

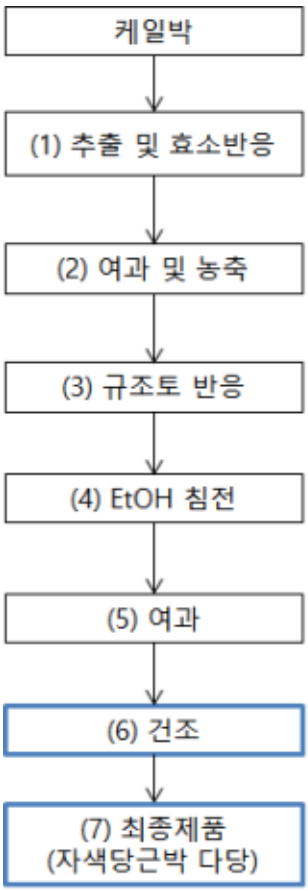
(6) 건조

: FD 건조 실시 (건조 양 : 0.92g)

(34) 케일박 다당 : 비케이바이오 제조 소재

- 2협동기관에서 생산하고 있는 케일 착즙액 가공 시 발생되는 부산물을 이용한다는 의미에서 이를 가지고 다당 획분을 제조하여 제시함.

- 원료(케일을 압착방식으로 주스를 착즙하고 남은 잔사) –> 효소반응(Rapidase) –> 여과 –> 농축 –> Ethanol precipitation –> 원심분리 –> 침전물 회수 –> 동결건조



*케일박

(1)추출 및 효소반응 (자색당근박)
: 케일박 301.31g + (물 5배수) 1100ml + (Rapidase 3%(v/w원물) 1.6ml (수분함량 : 82.36%)
(50℃, pH4~5, 15hr 교반 -> 80℃, 1시간 반응정지) -> 추출부피 : 880ml

(2)여과 및 농축
여과 : 필터페이퍼 (No.5_2.5um)
농축 : 여액 농축 (45도)

(3)규조토 반응
: 규조토 1g(원물대비 1%) 투입 후 30분간 교반 (추가 가열 없는 조건)

(4)EtOH 침전
1차 침전 : 주정 첨가 (농축액 대비 4배 부피 (v/v)) -> 주정농도 (약 80%)
-> 30분 교반 (다당 침전) (규조토 혼합 상태) -> 침전물 회수 및 재용해 (최종 농축액과 동일한 물 양)

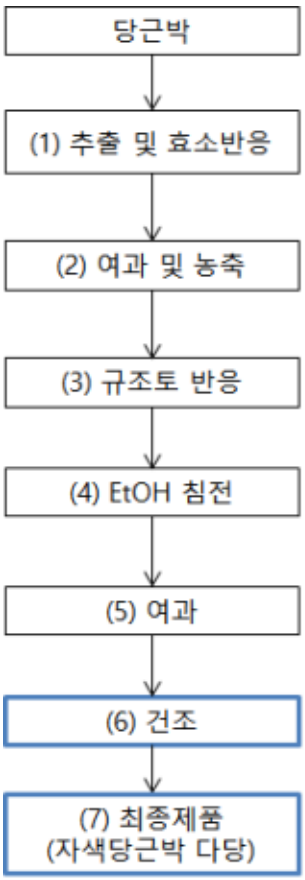
(5)여과
: 필터페이퍼 이용 여과 후 여액 회수 (규조토 제거)

(6) 건조
: FD 건조 실시 (건조 양 : 1.63g)

(35) 당근박 다당 : 비케이바이오 제조 소재

- 당근은 2협동기관이 위치한 제주도 내에서 전국 생산량의 50% 이상을 생산하는 주요 재배 농산물이며, 2협동기관에서 생산하고 있는 당근 착즙액 가공 시 발생되는 부산물을 이용한다는 의미에서 이를 가지고 다당 획분을 제조하여 제시함.

- 원료(당근을 압착방식으로 주스를 착즙하고 남은 잔사) -> 효소반응(Rapidase) -> 여과 -> 농축 -> Ethanol precipitation -> 원심분리 -> 침전물 회수 -> 동결건조



*당근박

(1)추출 및 효소반응 (당근박)
: 당근박 600.58g + (물 5배수) 1050ml + (Rapidase 3%(v/w원물) 3.1ml (수분함량 : 82.82%)
(50℃, pH4~5, 15hr 교반 -> 80℃, 1시간 반응정지) -> 추출부피 : 1600ml

(2)여과 및 농축
여과 : 필터페이퍼 (No.5_2.5um)
농축 : 여액 농축 (45도)

(3)규조토 반응
: 규조토 1g(원물대비 1%) 투입 후 30분간 교반 (추가 가열 없는 조건)

(4)EtOH 침전
1차 침전 : 주정 첨가 (농축액 대비 4배 부피 (v/v)) -> 주정농도 (약 80%)
-> 30분 교반 (다당 침전) (규조토 혼합 상태) -> 침전물 회수 및 재용해 (최종 농축액과 동일한 물 양)

(5)여과
: 필터페이퍼 이용 여과 후 여액 회수 (규조토 제거)

(6) 건조
: FD 건조 실시 (건조 양 : 0.92g)

(36) 자색당근 : 비케이바이오 제조 소재

- 안토시아닌이 풍부한 자색당근의 면역 소재로의 가능성을 확인하게 위해 제시함. 역시 제주도에서 재배한 자색당근을 이용하여 제조한 시료임.

- 자색당근 -> 세척 -> 선별 -> 슬라이스 -> 열풍건조 -> 분쇄

- 1, 2차년도에 제시된 샘플에 대한 주관기관에서의 시험관 시험법을 통한 측정 결과의 요약은 다음 그림과 같음.

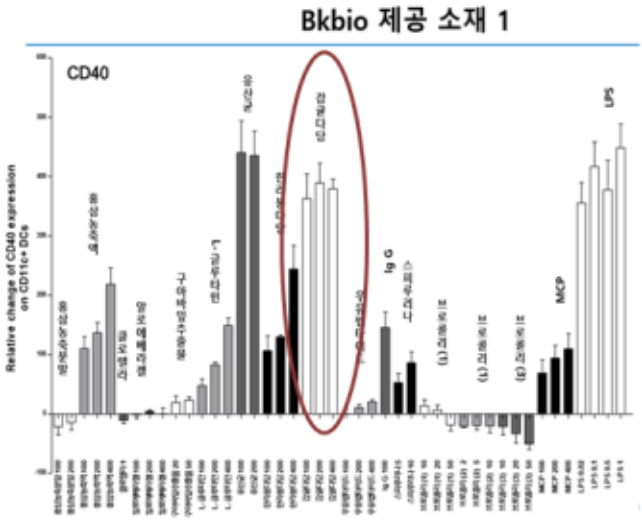


Figure 40. 새로운 BMDC 분화 방법에서 농도를 달리한 각 시료들 처리가 공동자극인자 CD40 발현에 미치는 효과

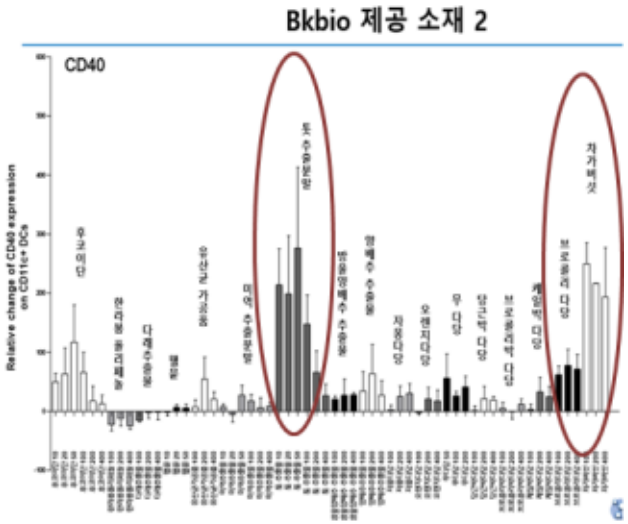


Figure 41. 새로운 BMDC 분화 방법에서 농도를 달리한 각 시료들 처리가 공동자극인자 CD40 발현에 미치는 효과

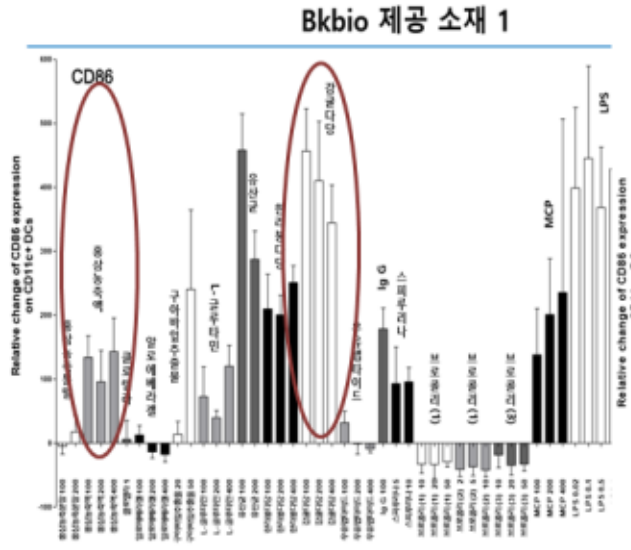


Figure 43. 새로운 BMDC 분화 방법에서 농도를 달리한 각 시료들 처리가 공동자극인자 CD86 발현에 미치는 효과

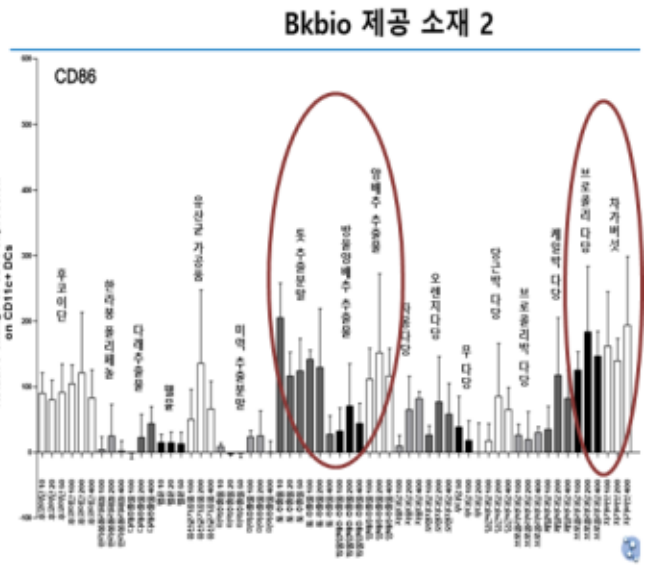


Figure 44. 새로운 BMDC 분화 방법에서 농도를 달리한 각 시료들 처리가 공동자극인자 CD86 발현에 미치는 효과

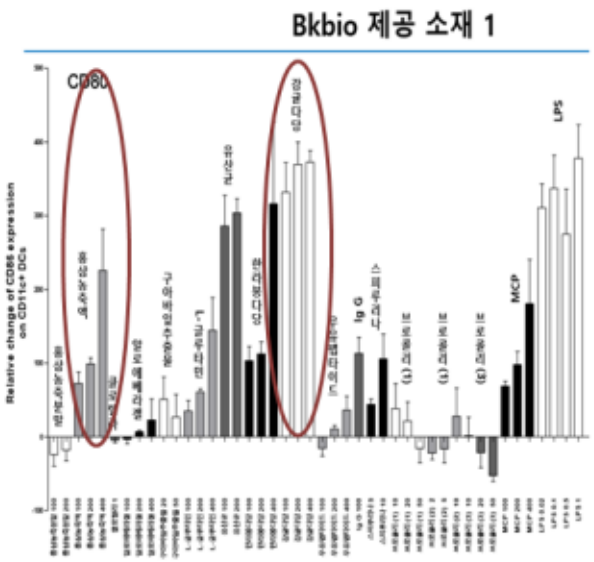


Figure 49. 새로운 BMDC 분화 방법에서 농도를 달리 한 각 시료들 처리가 공동 자극인자 CD80 발현에 미치는 효과

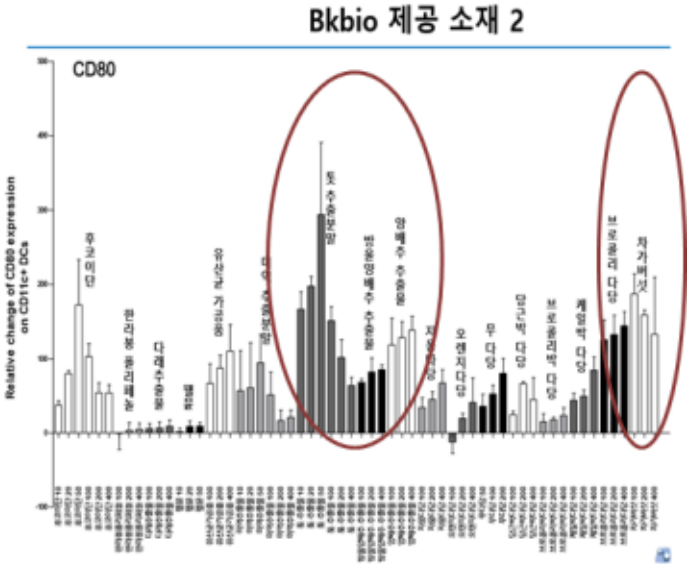


Figure 50. 새로운 BMDC 분화 방법에서 농도를 달리 한 각 시료들 처리가 공동 자극인자 CD80 발현에 미치는 효과

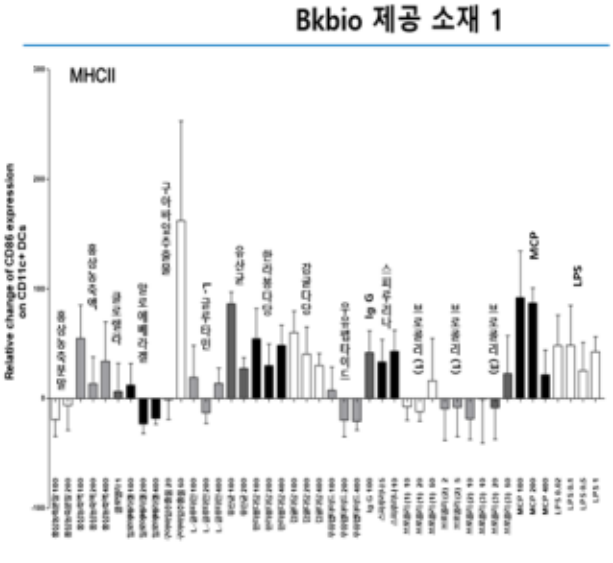


Figure 46. 새로운 BMDC 분화 방법에서 농도를 달리 한 각 시료들 처리가 공동 자극인자 MHCII 발현에 미치는 효과

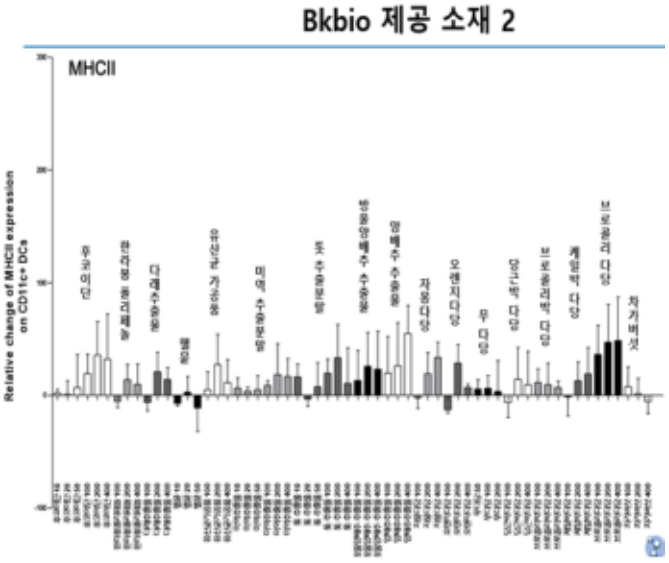


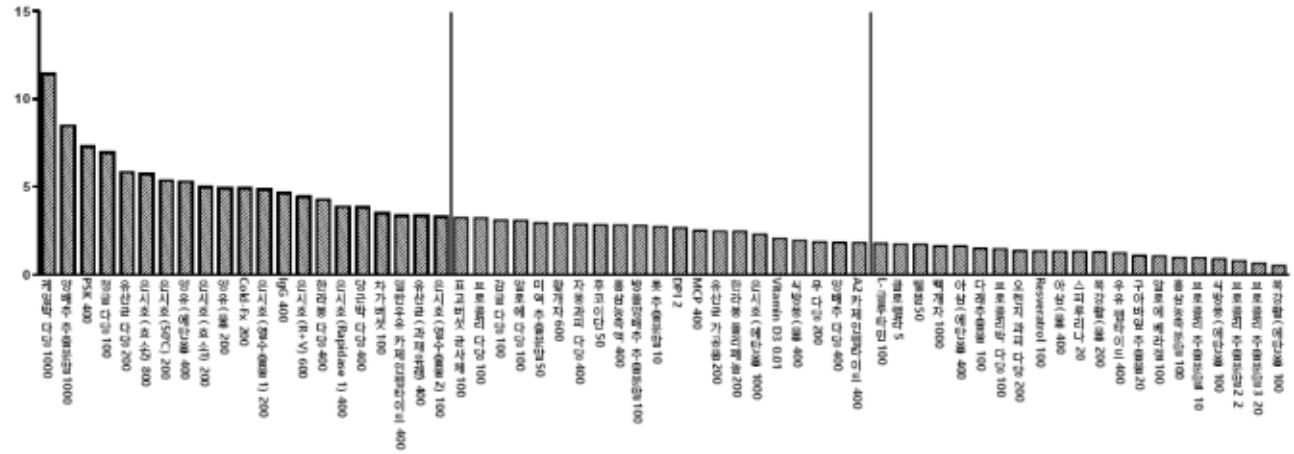
Figure 47. 새로운 BMDC 분화 방법에서 농도를 달리 한 각 시료들 처리가 공동 자극인자 MHCII 발현에 미치는 효과

- 상기 결과를 통해 면역시스템 검증을 위한 소재 후보로서 홍삼농축액, 표고버섯자실체, 후코이단, 유산균, 스피루리나, 다래추출물을 선정하였으며, 사업화를 위한 아이템 후보로서 양배추다당, 양배추박다당, 브로콜리다당, 브로콜리박다당, 당근박다당, 케일박다당, 한라봉피다당, 한라봉폴리페놀를 후보로 도출하였음.

- 이후 주관기관에서의 새로운 immunity index를 Immunogenic index와 Tolerogenic index로 구별하여 제시된 결과는 다음과 같으며, 이를 가지고 최종적으로 우수 소재 후보 선정을 진행하였다.

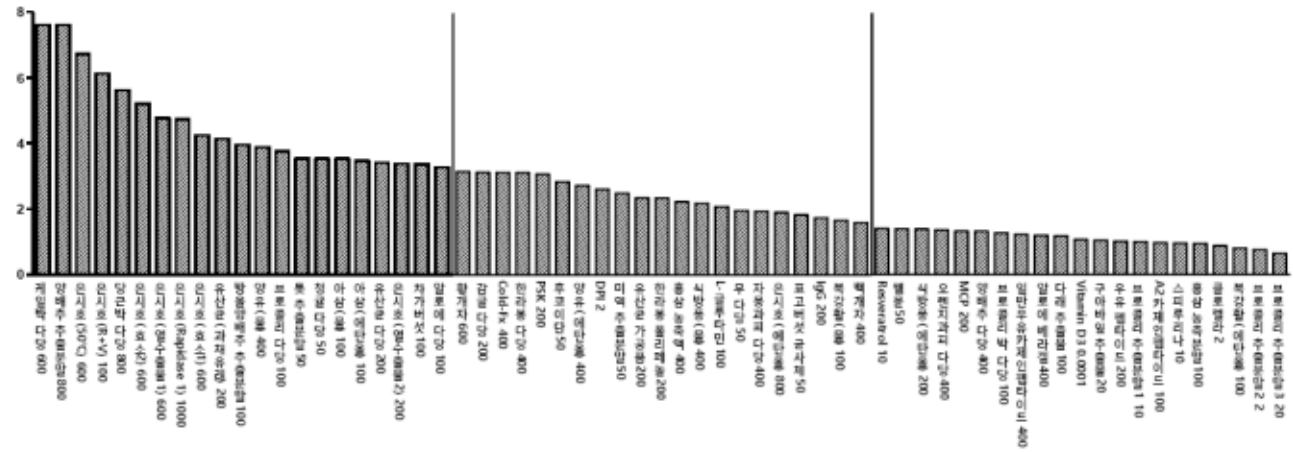
CD11c+ MHCII+ -> CD11b/MHCII

Immunogenic Index I



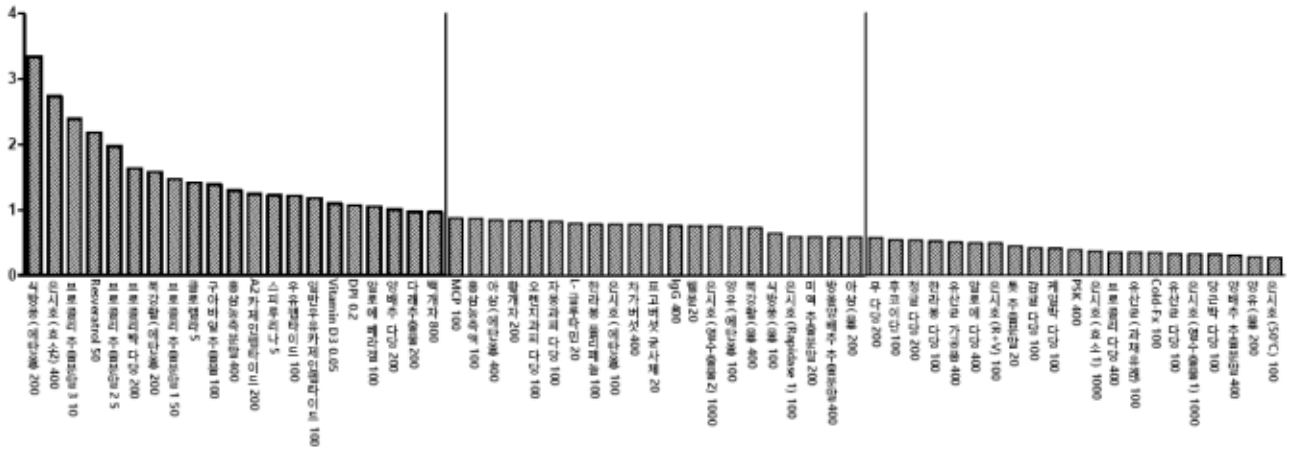
Live cells

Immunogenic Index II



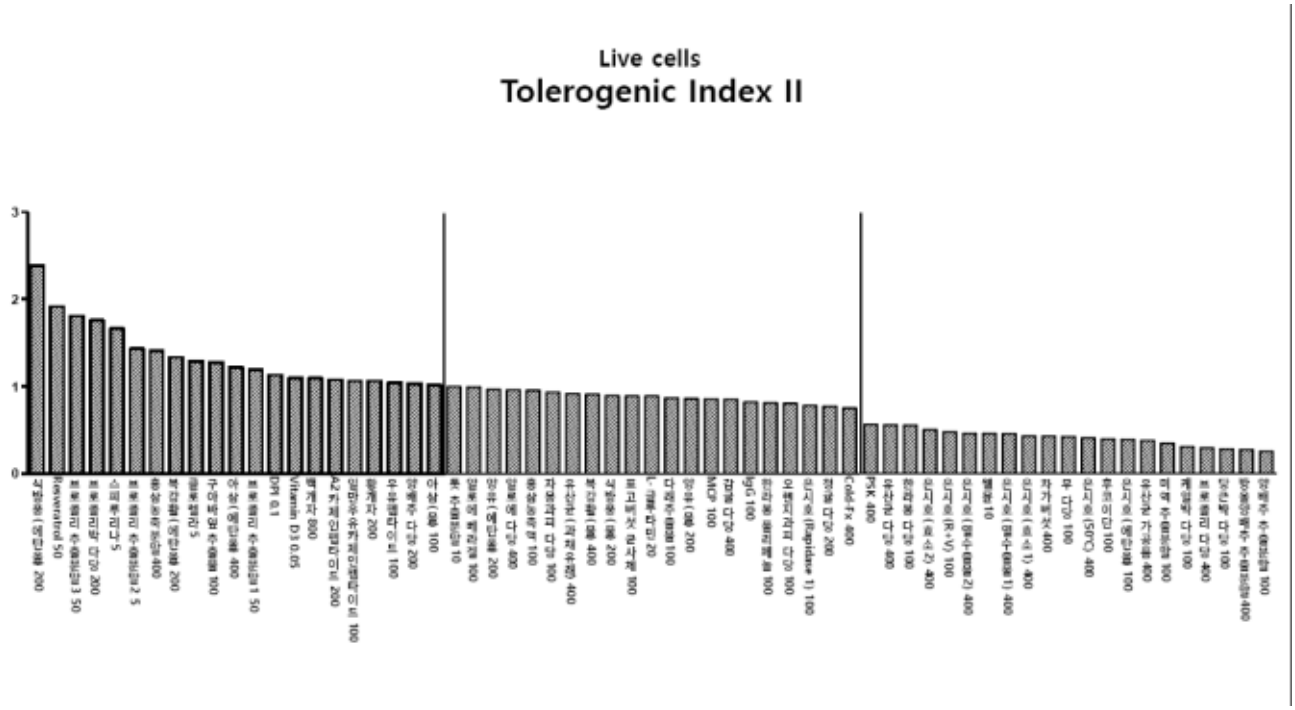
Live cells

Tolerogenic Index I



Live cells

Tolerogenic Index II



- 상기의 분석 결과를 토대로 면역시스템 검증 소재로서 5종을 선정을 검토 하였으며, 이중 홍삼농축액, 표고버섯자실체, 후코이단, 유산균, 다래추출물을 최종 검토 대상으로 선정하였다. 이중홍삼농축액, 표고버섯자실체, 후코이단, 유산균은 immunogenic 한 대표군으로서, 다래추출물은 tolerogenic한 대표군으로 선정을 하여 동물 실험을 통한 검증의 대상 시료로 제시하였다.

- 홍삼농축액의 경우 기능성원료의 대표성에 선정 이유가 있으며, 표고버섯 자실체와 후코이단은 일관성 있는 immunogenic 결과와 농산물 유래와 해양자원 유래로 대표성이 있다고 판단되었으며, 시장에서 시판을 통해 검증이 완료된 시료라 판단하였다. 유산균의 경우 최근 시장에서의 활발한 출시와 많은 연그들을 통해 면역 식품으로서 전 연령층에 걸쳐 많은 소비가 되고 있다는 보편성의 중요성이 있다는 판단을 하였으며, 다래추출물은 개별인정형 원료로서 tolerogenic특성을 잘 나타내는 대표로서의 의미가 있다 판단하였다.

- 특히 홍삼농축액의 경우 케일박 다당과 함께 기능성분의 함량별 면역지표 가이드 설정에 활용할 예정이며, 홍삼 성분의 지표성분(기능성분과 동일) 각 3가지 물질의 합은 규격서상 표기가 의무이지만, 각각의 성분함량에 대한 표시는 의무사항이 아닌 이유로, 합이 비슷한 제품을 비교한다는 것을 가지고 의미를 찾기는 쉽지 않다 판단하였다. 따라서, 제조법이 다른, 즉 3가지 물질의 합이 비슷한 제품을 회사별로 비교해 보거나, 4년근 또는 6년근과의 차이를 보는 것이 더 적절하다고 판단되어, 3가지 물질의 농도 차이별 비교하는 것은 대표적인 한 가지 제품으로 희석배율을 조절하면서 기능성분 함량에 따른 효능 평가 실험하는 것으로 하고, 주정을 사용하는 제품(대동고려삼)과, 물을 사용하는 인삼공사나 농협 제품을 구매하여 3개의 제조사 제품(총 4 품목)을 구매하여 실험을 통해 결과를 비교해 보는 것으로 진행하고 있다.

표 3.16 홍삼농축액 종류별 특성

제품명	원료	지표성분 함량
정관장 홍삼정 로얄 플러스	홍삼농축액 (고형분 64%)	Rg1 + Rb1 + Rg3 = 5.5 mg/g
대동고려삼 (4년근, 6년근)	홍삼농축액 (고형분 60% 이상)	Rg1 + Rb1 + Rg3 = 7 mg/g
농협한삼인 홍삼정 골드	홍삼농축액 (고형분 50% 이상)	Rg1 + Rb1 + Rg3 = 4 mg/g

- 사업화를 위한 후보 시료로는 양배추다당, 양배추박 다당, 브로콜리다당, 브로콜리박다당, 당근박다당, 케일박다당, 한라봉피다당을 우선 검토 대상으로 선정하였으며, 대부분 전형적인 immunogenic 한 특성을 두드러지게 나타냄과 동시에 지역 내 재배활성, 각 원료에 대한 건강 인식 고조되는 사회적 관심, 농산물 및 식품 원료로서 안전성 입증되었다는 점, 기술이전 등의 산업화를 위한 접근성, 부산물을 사용하여 부가가치가 높을 수 있는 경제성 등을 고려하여 선정하게 되었다.

나. 기능성 원료로의 우선 사업화 대상 선정을 위한 생산 가능성, 경제성 검토

- 사업화 대상으로의 상세 검토는 주관기관에서 진행한 시험법을 통해 우수한 면역능을 보이는 시료를 우선 검토 대상으로 하였다. 2협동기관에서 제조하여 제공된 시료 중에 양배추다당, 양배추박 다당, 브로콜리다당, 브로콜리박다당, 당근박다당, 케일박다당, 한라봉피다당이 우수한 면역능을 나타내는 것으로 판단하여 우선 검토 대상으로 선정하였으며, 기존 개발 기술과의 중첩성과 산업화 가능성, 즉 경제성을 중심으로 검토를 하여 부산물을 원료로 하는 케일박다당과 당근박다당을 검토 범위를 좁히었으며, 이 중 강한 immunogenic한 특성을 보이는 케일박다당을 최우선 검토 대상으로 선정하였다.
- 검토된 2종의 원료는 2협동기관이 위치한 제주도 지역 내 재배가 활성화 되어 있고, 지역 내에서도 양채류 사업단에서도 양채류의 산업화에 대한 연구와 개발이 활발히 진행되고 있다는 점도 국가 정책 부합성이 합당하다 판단하였다. 또한 국내에서 해당 원료들에 대한 건강 인식 고조되면서 최근 클린징 주스로서의 독소 제거, 항암기능 등의 기능성 연구와 건강즙, 음료, 분말 등으로의 산업화 진행 속도가 활발한 특성을 가지고 있다.
- 또한 단순한 착즙이라는 공정을 통해 착즙액을 제조하면서 발생되는 부산물을 이용하다는 측면에서도 높은 경제성이 보유하고 있으며, 원료 또한 오래기간 동안 농산물로 안전하게 섭취되고 있었다는 것 또한 안전성 확보에 장점이 있다고 판단하였다.
- 케일박다당의 경우 물과 주정을 이용하여 다당 분획을 제조한다는 점과 제조 시 사용되는 효소의 경우 식품원료로서 허가된 원료이므로, 사용되는 원료 또한 식품원료로 섭취된 경험이 있으므로 섭취량에 따른 나 또는 다의 단계로 평가되어 질 것으로 예상되므로, 기능성식품 소재 개발을 위한 안전성 평가 비용의 저감과 안전성 검증의 수월한 개발 수준으로 평가되었다.

케일박 다당 유래의 면역기능성 원료에 대한 안전성을 평가를 다음과 같이 실시해 보았다.

원료	케일(박)	• 식품사용가능 원재료 (식품의약품안전처) • 야채류 1일 섭취량 400g(USDA)
첨가물	Pectinase	• 천연첨가물 (식품첨가물공전)
제조공정	추출, 효소처리, 농축, 건조	• 식품 및 첨가물제조 기준에 부합 (물, 주정, 천연첨가물 이용)
제품 섭취량	24~48mg/day/60kg 성인 => 케일 : 24~48g에 해당됨	• 기존 개발 소재인 한라봉 다당의 경우 동물실험모델을 통한 유효 활성농도 100ug/mouse/20g 였음. • 주관기관의 시험관 시험을 통해 면역능을 비교한 결과 케일박 다당은 한라봉 다당의 약 2배의 효과를 보임. 따라서 이를 기준으로서 가정하여 산출해 보았음. • 즉 동물실험모델을 통한 유효 활성농도는 50ug/mouse/20g 으로 추정하였음. • 체표면적대비 환산계수 0.16 • 성인체중 60kg • 인체적용 섭취량 24~48mg/day/60kg 성인 (Ref: Guidance for Industry – Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trialsfor Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. U.S. FDA.)

- 상기 결과에 따라 식품의약품안전처 고시 ‘건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도’에 의한 안전성 자료의 범위 판단 시 독성시험자료의 제출이 불필요한 제품으로 판단(나 항에 해당)하여, 개발 시 투자 비용의 부담을 줄일 수 있을 것으로 평가하였다.

- 또한 아래 Table 에서와 같이 기존에 개발된 한라봉 다당의 경우 500,000원/kg으로서 일일섭취량 기준 50원/일 수준보다 더 경제성이 있는 13~25원/일 수준으로 분석(면역능이 우수함으로 예상되어 상대적으로 낮은 섭취량에 의해 기인됨)되어 경제성 측면에서도 우수한 것으로 평가하였다.

표 3.17 개발 원료와 기존 원료들간의 경제성 비교

클레임	원료명	기능성분	일일섭취량	단가	규격
면역증진	홍삼	진세노사이드	Rg1, Rb1 및 Rg3를 합하여 2.5~34 mg/일	홍삼농축액(4년근) 150,000원/kg당 -> 180원/일	진세노사이드 7mg/g (건기식)
	표고버섯 균사체	a-glucan	표고버섯 균사체로서 1.8~3.6g/일	84,000원/kg당 -> 168원/일	151.96(mg/g)
	한라봉 다당	다당체	인체적용 섭취량 100mg/일	500,000원/kg당 -> 50원/일	60%
	감귤 다당	다당체	인체적용 섭취량 100mg/일	500,000원/kg당 -> 50원/일	60%
	케일박 다당	다당체	인체적용 섭취량 24~48mg/일	500,000원/kg당 -> 13~25원/일	25~30% / 10~25kDa

- 따라서, 사용되는 원료의 안전성, 제조법과 투입 부원료에 대한 안전성, 면역능, 그리고 산업화 경제성을 고려해 볼 때 동물실험을 통해 그 효능이 입증된다면 산업화 가능성과 개별인정형 건기식 원료로서의 개발 가능성이 높다고 평가하고 있다.

3.7 우수 면역식품(소재)와 기능성성분의 화학적 특성이 유사한 기 개발소재 선정

가. 개발소재 및 우수 면역식품(소재) 면역활성 다당 GPC 분석

- 상2협동기관에서 선정한 우수 면역식품(소재)의 기능성분 면역활성 다당 GPC 분석을 재현성 확인 및 타당성 확인을 위해 공인인증 분석기관인 한국고분자시험연구소(주)에 GPC 분석을 의뢰하여 분자량 측정 분석법을 재확인하였다.

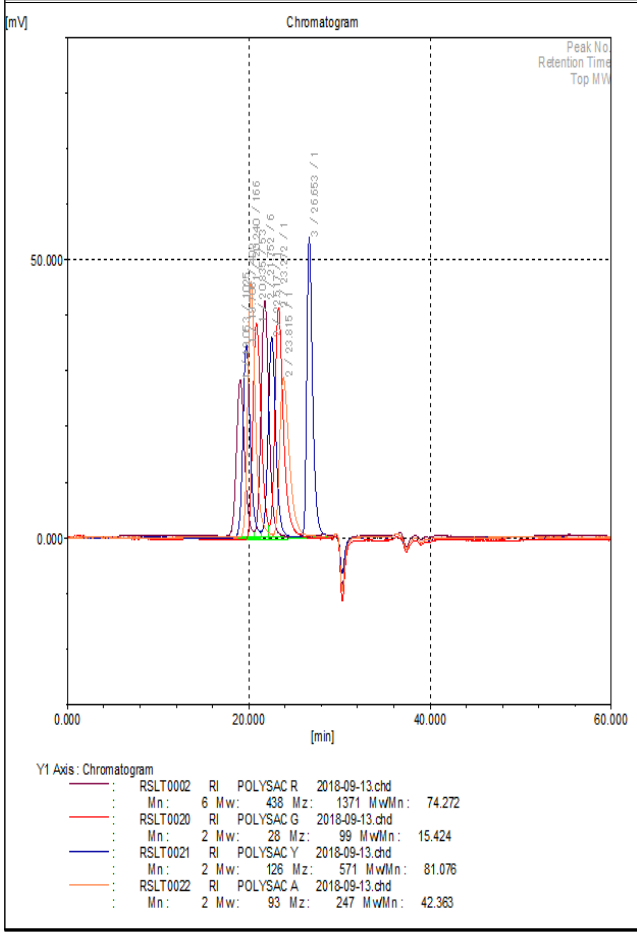
- 다당체의 가장 중요한 특징은, 분자량이 높으며 분자량 분포(저분자량~고분자량)를 가지고 있다는 것이다. 고분자의 분자량은 분포를 갖기 때문에, 이 분자량과 분포특성이 결국 다당체의 활성에 많은 영향을 미치기 때문에, 고분자의 분자량분석은 다당체 확인의 가장 기본적이면서 중요한 분석입니다. GPC(Gel Permeation Chromatography)를 이용하여 분자량과 분포의 측정을 전문적으로 수행하였다.

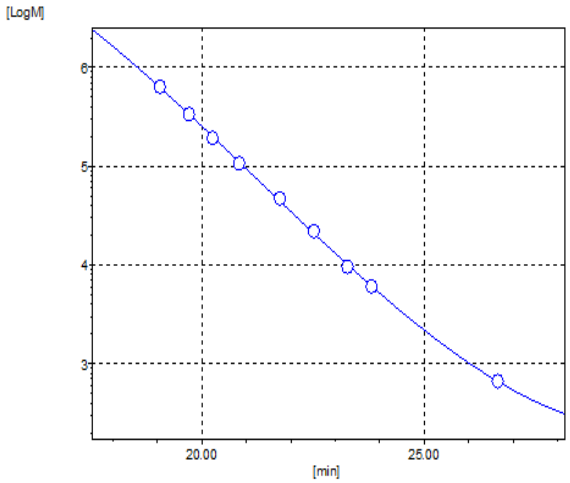
(1) 분석방법
① GPC (Gel permeation chromatograph) 시료전처리 : 물에 희석
② 시료용해상태 : 완전 용해
③ 시료용액여과 : 0.45 mm Nylon filter
④ 안료/색상유무 : 해당사항 없음
⑤ 나노입자 유무 : 해당사항 없음
⑥ 기타 특이사항 : 해당사항 없음

(2) GPC (Gel permeation chromatograph) 분석기기 조건
① 분석기기: Tosoh 社 EcoSEC HLC-8320 GPC
② 검출기: RI-detector
③ 전개용매: 0.1M NaNO3
④ 컬럼 (maker, model no.): 2 x TSKgel GMPWxl +
TSKgel G2500PWxl(7.8 x 300 mm)
⑤ 온도: 40 ℃
⑥ 유속: 1 mL/min
⑦ 주입양: 100 mL, 3 mg/mL
⑧ 표준물질: Polysaccharide
⑨ 데이터처리: EcoSEC software

(3) GPC 표준물질

GPC 표준물질 크로마토그램	GPC calibration curve



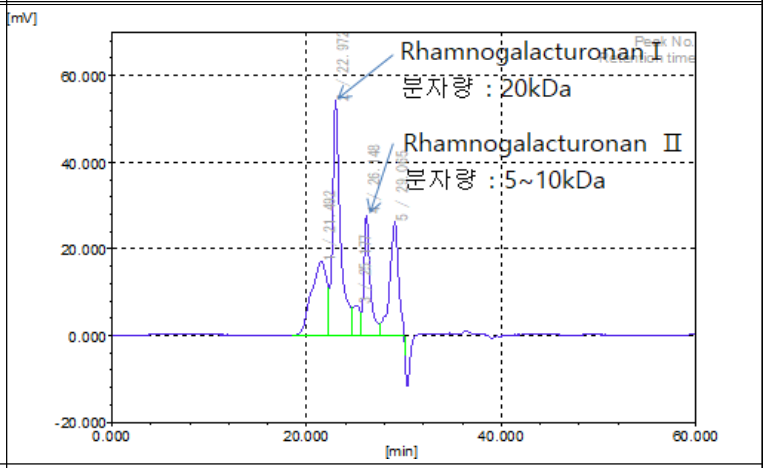
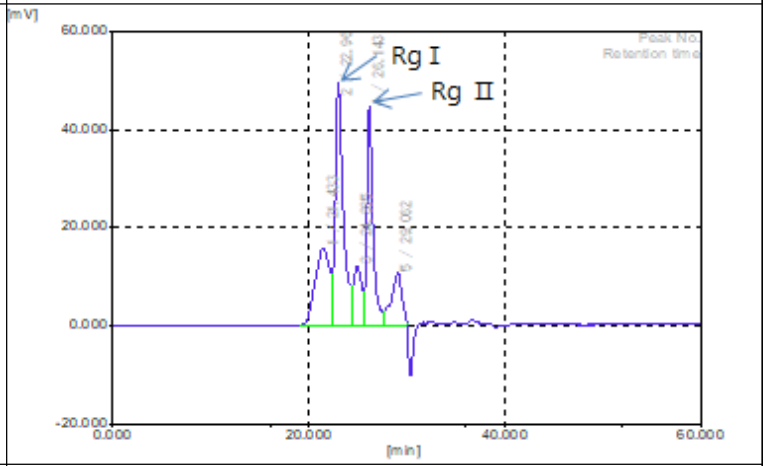
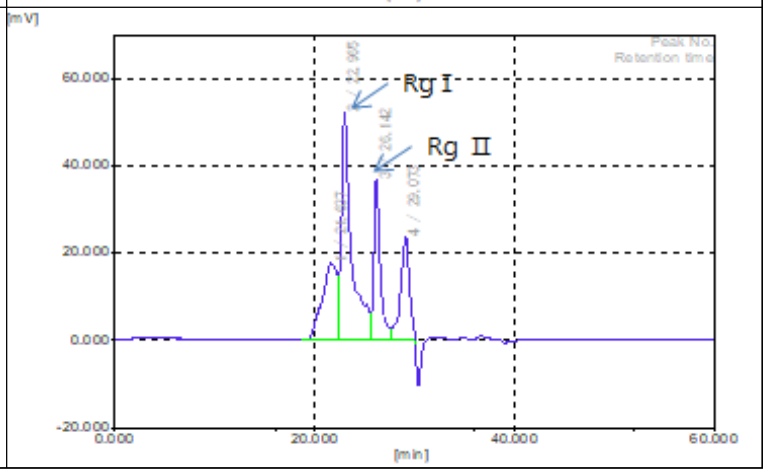


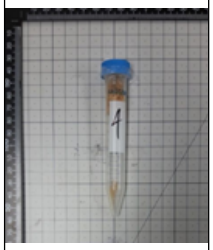
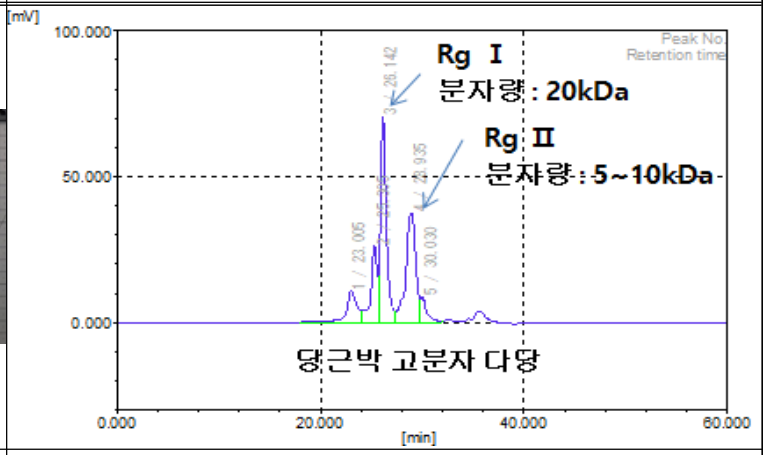
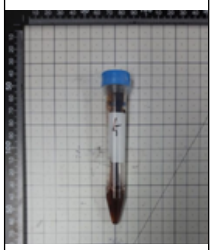
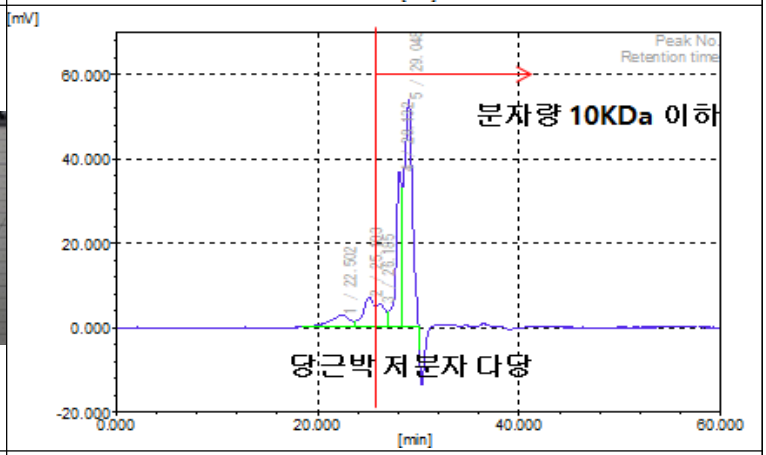
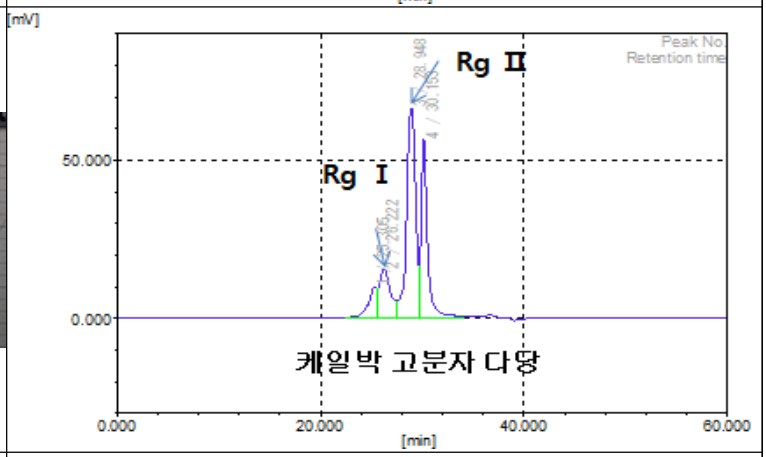
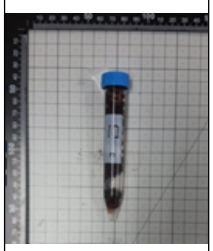
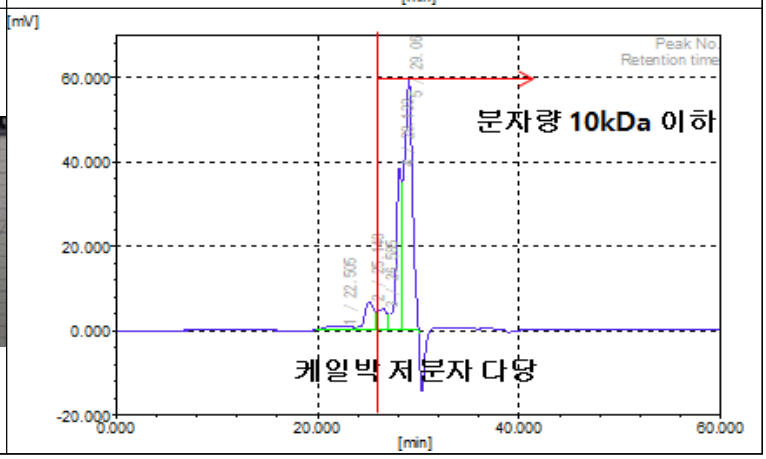
Calibration data (RI)

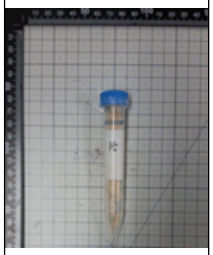
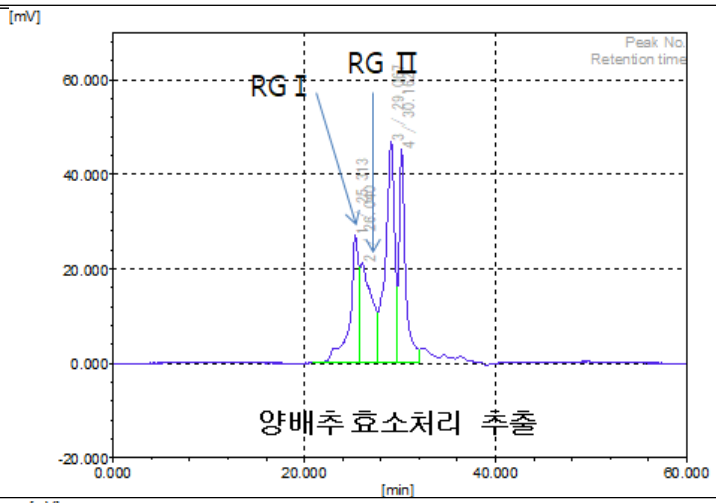
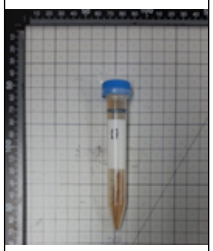
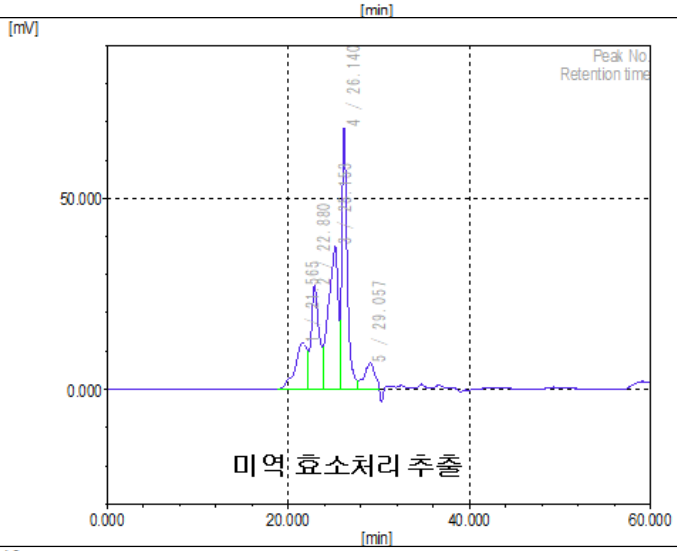
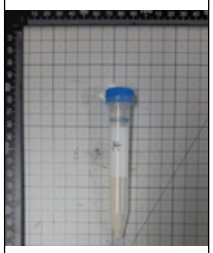
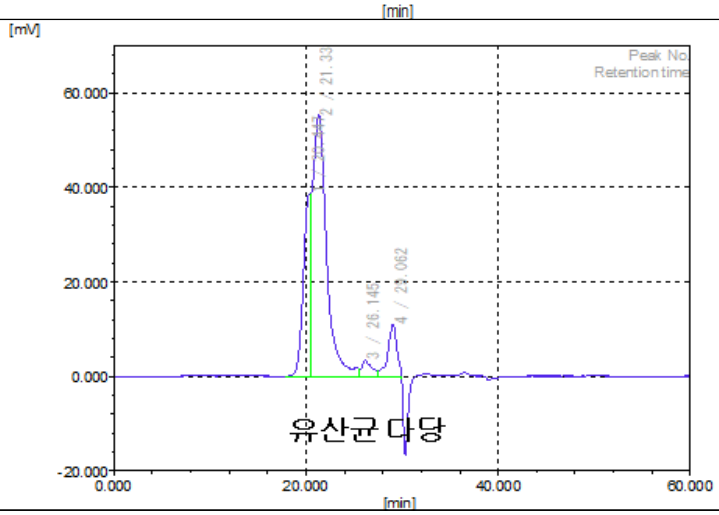
Time [min]	Molecular weight	Error [%]	Weight	Mark	Data name
19.053	642,000	1.82694	1	STD	RSLT0002
19.708	337,000	-0.05765	1	STD	RSLT0021
20.240	194,000	-3.29009	1	STD	RSLT0022
20.835	107,000	-3.79593	1	STD	RSLT0020
21.752	47,100	5.48103	1	STD	RSLT0002
22.517	22,000	4.84483	1	STD	RSLT0021
23.272	9,600	-5.55884	1	STD	RSLT0020
23.815	6,100	-0.37187	1	STD	RSLT0022
26.653	667	0.35387	1	STD	RSLT0021

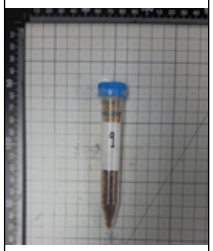
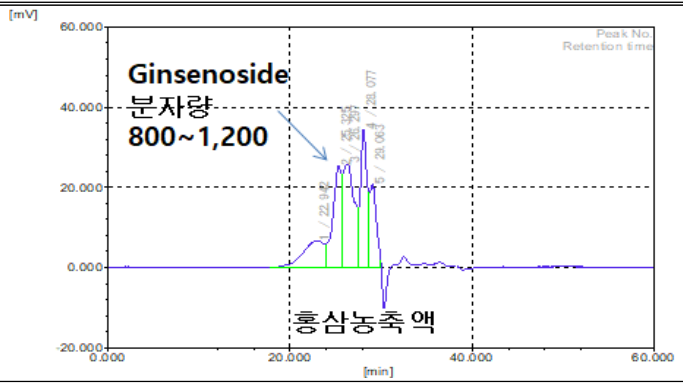
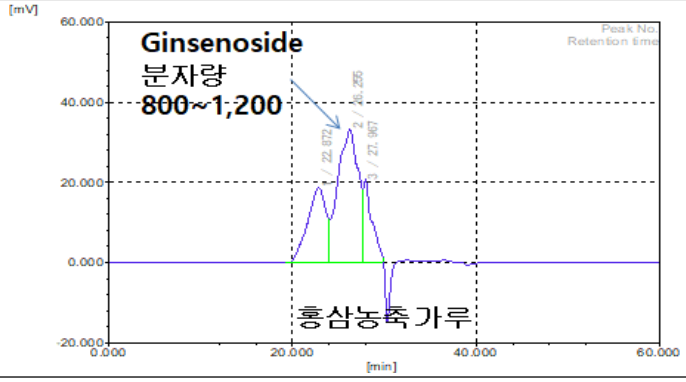
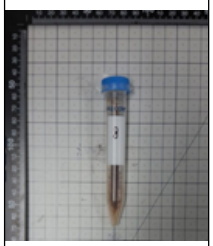
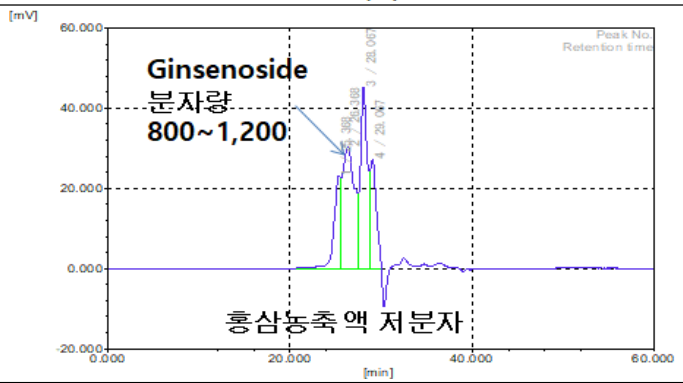
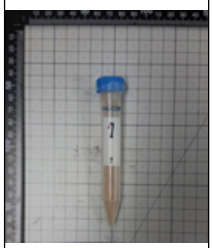
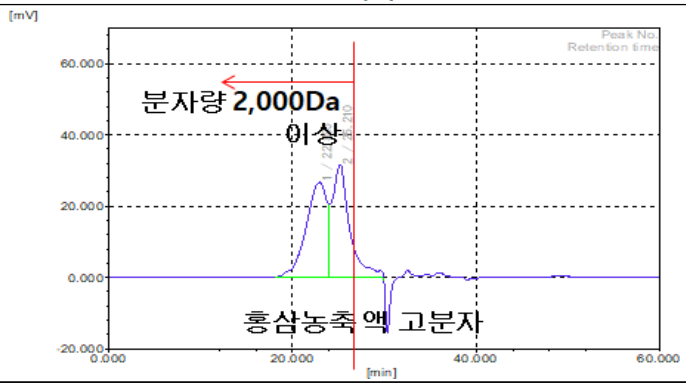
Coefficient	
A =	1.846528e-003
B =	-1.174733e-001
C =	2.057769e+000
D =	-3.533968e+000
Correlation	-0.998

(4) GPC 분석결과

No.	시료명	시료사진	분석 결과
1	감귤다당		
2	청귤다당		
3	한라봉다당		

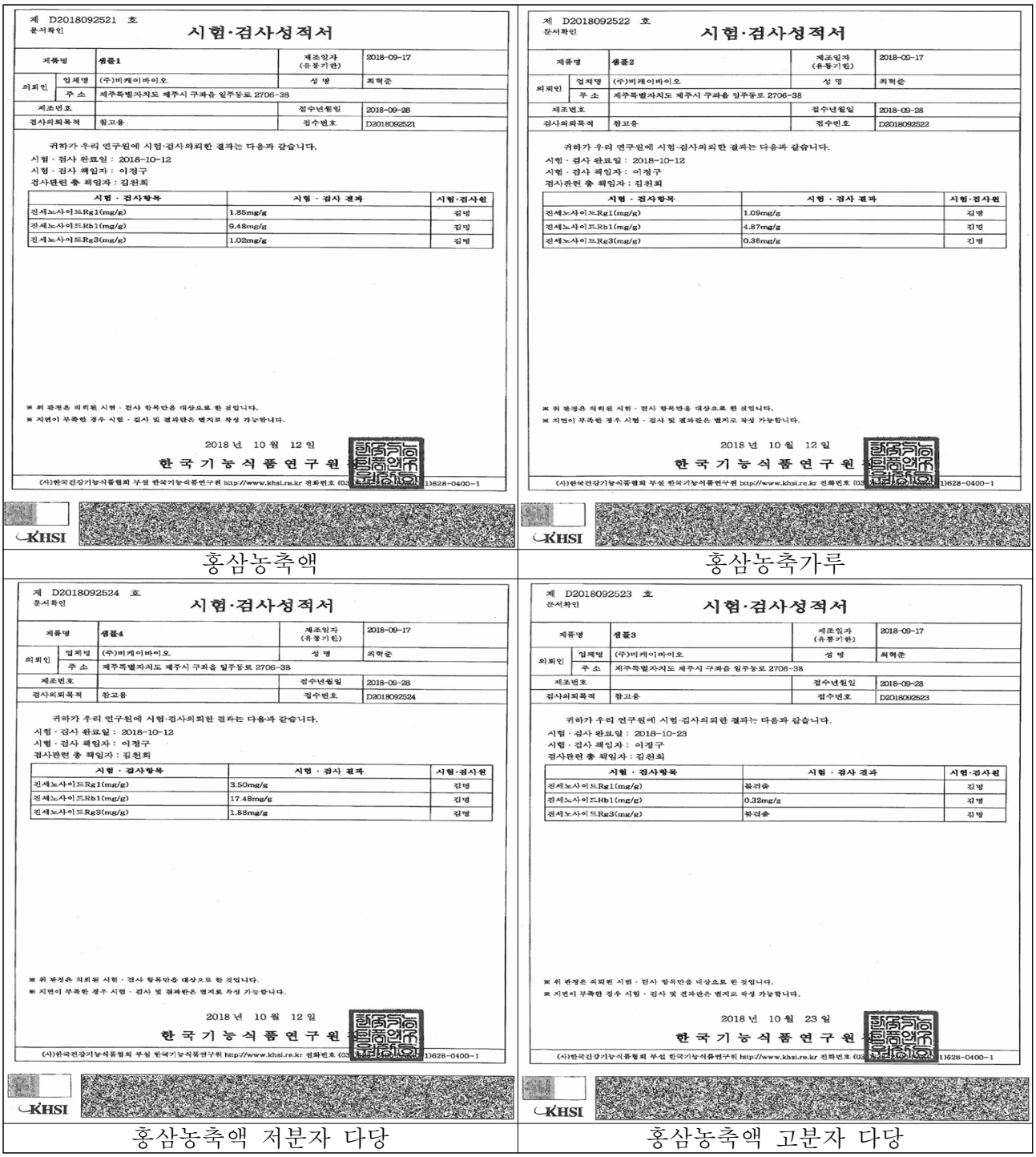
No.	시료명	시료사진	분석 결과
4	당근박 고분자 다당		
5	당근박 저분자 다당		
6	케일박 고분자 다당		
7	케일박 저분자 다당		

No.	시료명	시료사진	분석 결과
8	양배추 효소처리 추출		
9	미역 효소처리 추출		
10	유산균 다당		

No.	시료명	시료사진	분석 결과
11	홍삼 농축액		
12	홍삼 농축가루		
13	홍삼 농축액 저분자 다당		
14	홍삼 농축액 고분자 다당		

Ginsenoside Rb1,Rg1,Rg3		Rg1(mg/g)	Rb1(mg/g)	Rg3(mg/g)	합계
11	홍삼농축액	1.85	9.48	1.02	12.35
12	홍삼농축가루	1.09	4.87	0.36	6.32
13	홍삼농축액 저분자 다당	3.5	17.48	1.88	22.86
14	홍삼농축액 고분자 다당	불검출	0.32	불검출	0.32

표 3.18 홍삼 Ginsenoside Rb1,Rg1,Rg3 함량 분석 결과



제 D2018092521 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	샘플1	제조일자 (유통기한)	2018-09-17
의뢰인 업체명	(주)비케이바이오	성 명	최혁준
의뢰인 주 소	제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-38		
제조번호		접수년월일	2018-09-28
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018092521

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
시험·검사 완료일 : 2018-10-12
시험·검사 책임자 : 이정구
검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
진세노사이드Rg1(mg/g)	1.85mg/g	김명
진세노사이드Rb1(mg/g)	9.48mg/g	김명
진세노사이드Rg3(mg/g)	1.02mg/g	김명

※ 위 결과는 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2018 년 10 월 12 일
한 국 기 능 식 품 연 구 원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-0400-1

KHSI

홍삼농축액

제 D2018092522 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	샘플2	제조일자 (유통기한)	2018-09-17
의뢰인 업체명	(주)비케이바이오	성 명	최혁준
의뢰인 주 소	제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-38		
제조번호		접수년월일	2018-09-28
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018092522

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
시험·검사 완료일 : 2018-10-12
시험·검사 책임자 : 이정구
검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
진세노사이드Rg1(mg/g)	1.09mg/g	김명
진세노사이드Rb1(mg/g)	4.87mg/g	김명
진세노사이드Rg3(mg/g)	0.36mg/g	김명

※ 위 결과는 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2018 년 10 월 12 일
한 국 기 능 식 품 연 구 원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-0400-1

KHSI

홍삼농축가루

제 D2018092524 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	샘플4	제조일자 (유통기한)	2018-09-17
의뢰인 업체명	(주)비케이바이오	성 명	최혁준
의뢰인 주 소	제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-38		
제조번호		접수년월일	2018-09-28
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018092524

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
시험·검사 완료일 : 2018-10-12
시험·검사 책임자 : 이정구
검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
진세노사이드Rg1(mg/g)	3.50mg/g	김명
진세노사이드Rb1(mg/g)	17.48mg/g	김명
진세노사이드Rg3(mg/g)	1.88mg/g	김명

※ 위 결과는 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2018 년 10 월 12 일
한 국 기 능 식 품 연 구 원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-0400-1

KHSI

홍삼농축액 저분자 다당

제 D2018092523 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	샘플3	제조일자 (유통기한)	2018-09-17
의뢰인 업체명	(주)비케이바이오	성 명	최혁준
의뢰인 주 소	제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-38		
제조번호		접수년월일	2018-09-28
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018092523

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
시험·검사 완료일 : 2018-10-23
시험·검사 책임자 : 이정구
검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
진세노사이드Rg1(mg/g)	불검출	김명
진세노사이드Rb1(mg/g)	0.32mg/g	김명
진세노사이드Rg3(mg/g)	불검출	김명

※ 위 결과는 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2018 년 10 월 23 일
한 국 기 능 식 품 연 구 원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-0400-1

KHSI

홍삼농축액 고분자 다당

표 3.19 홍삼 Ginsenoside Rb1,Rg1,Rg3 분석 공인성적서

나. 우수 면역식품(소재)와 기능성성분의 화학적 특성이 유사한 기 개발소재 선정

- 2협동기관에서 개발한 면역다당과 선정한 우수 면역식품(소재) 중 우수한 소재로 결정된 감귤다당, 한라봉다당, 청귤다당, 당근박다당, 케일박다당, 유산균다당, 양배추출물, 미역추출물, 홍삼농축액에 대한 다당류에 대한 분자량을 기준으로 기능성분 분석을 하였다.

- 펙틴은 전체분자의 많은 부분은 homogalacturonan으로 구성되어 있지만 여기에 다양한 oligo- 및 polysaccharide로 분지된 rhamnogalacturonan류가 공유적으로 결합되어 있는 것으로 보고되고 있는데 rhamnogalacturonan I (RG-I)및 rhamnogalacturonan II (RG-II)가 알려지고 있으며, 펙틴류에서 관찰되는 대부분의 약리활성은 이들 RG-I과 RG-II의 미세구조의 차이에 기인 한 것으로 알려지고 있는데 시트러스 과피에서 추출한 다당은 높은 면역활성을 나타 나였다.

- 펙틴은 과거 galacturonic acid의 단순 중합체로만 여겨져 왔으나, 최근 면역 생리활성이 우수한 rhamnogalacturonan (RG)류가 공유적으로 결합되어 존재한다는 사실이 밝혀지면서 기능성 물질로 새로운 주목을 받고 있으므로 특히 RG류만을 선택적으로 분리할 경우, 생리활성이 우수한 고부가가치 기능성 소재로의 개발이 가능하다고 판단된다.

- 이들의 펙틴물질을 단순 추출할 경우, 수율과 활성이 모두 상대적으로 낮은 추출물이 얻어지게 되기 때문에 고분자 다당, 저분자 다당 분획을 통하여 높은 추출물과 활성이 높은 다당체를 얻을 수 있다. 펙틴은 시트러스류 껍질에 많이 함유되어있으며 감귤, 한라봉, 청귤 착즙 후 남은 박을 이용하여 효소처리 하여 가수분해시킨 후 물과 주정을 이용하여 다당 분획을 제조하였다.

- 이뿐 아니라 농산부산물(당근, 케일 추출박)으로부터 면역활성 다당 rhamnogalacturonan을 선택적으로 분리하였고, GPC 다당 분석을 통하여 확인되었으며, 개발된 면역능 평가에서 분리된 다당이 높은 면역활성을 가진 것을 확인할 수 있었다. 이는 값싼 부산물로부터 고부가가치의 기능 식품소재의 개발 측면에서도 의미하는 바가 크다고 판단되며, 면역식품 소재로써 가격경쟁력을 가진 사업화 대상으로 판단된다.

- 홍삼은 면역조절에 관련하여 동물 및 인체시험으로 입증된 대표적인 것은 ginsenoside Rg1, Rb1, Rg3 및 인삼 다당체 등이 있으며, Rg1의 경우 각 항원에 대한 T helper cell, macrophage, NK cell의 활성을 증가시켜 체액성면역(humoral immunity)과 세포성면역(cell-mediated immunity)을 증강시켜주는 것으로 보고되고 있다. Rg1은 최근 macrophage에서 선천성면역(innate immunity) 조절에도 관여할 수 있음 알려졌다.

- 홍삼농축액 경우 immunogenic 결과를 나타 나였고, 홍삼농축분말 경우 tolerogenic 결과를 나타 나였다. 홍삼농축액과 농삼농축분말의 같은 ginsenoside Rg1, Rb1, Rg3 함량 이외도 다당 GPC 분석결과 다른 다당체가 검출되었고, 이를 통해 홍삼의 ginsenoside Rg1, Rb1, Rg3 뿐만 아니라 다당체가 면역효능에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

- 또한, 천연물 유래 면역기능 연구로는 표고버섯의 lentinan, 도꼬마리 추출물의 면역억제 작용, 당귀추출물의 면역계 증강에 의한 B lymphocyte 증식 효과 등 천연물로부터 보고되는 macrophage 활성화 성분으로 식물 기원성 다당류들이 대부분인데 특히 이들 다당류는 antitumor 및 anticomplement activity을 동시에 나타내기도 하며 antiviral activity, RES activation(reticuloendothelial activation), antiinflammatory activity, hypoglycemic activity를 나타낸다고 보고되어 있다.

- 이를 통하여 다당체는 우수 면역식품(소재)와 기능성성분의 화학적 특성이 유사한 기 개발 소재 선정에 기준으로 판단된다.

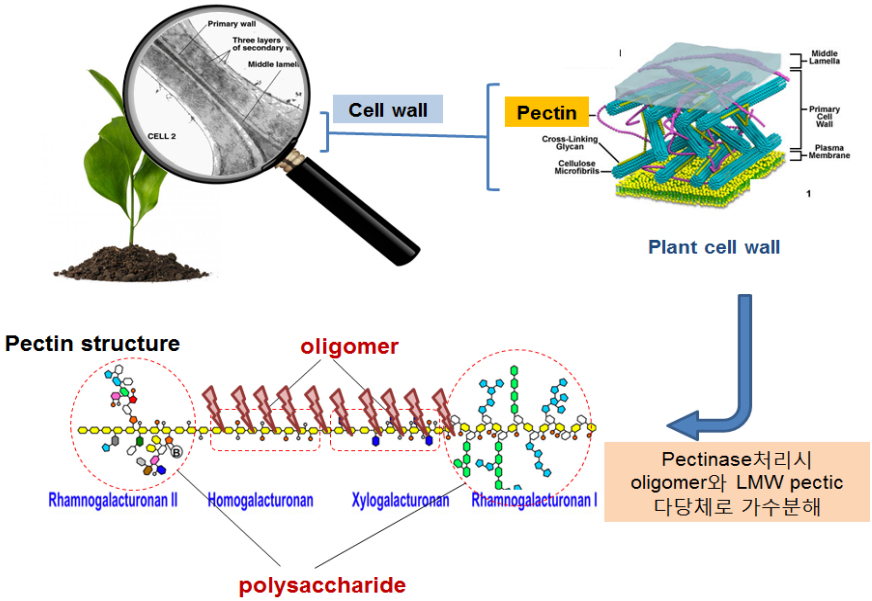


그림3.13 개발 면역다당 기술의 개략도

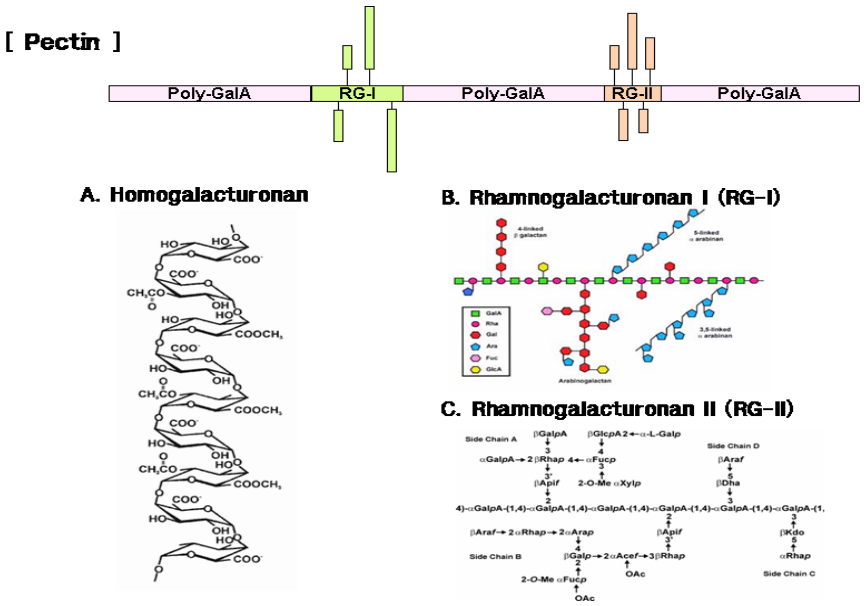


그림3.14 Proposed structure of pectic substances

다. 우수 효능 소재의 산업화를 위한 재현성 확인 및 공정 최적화 확립

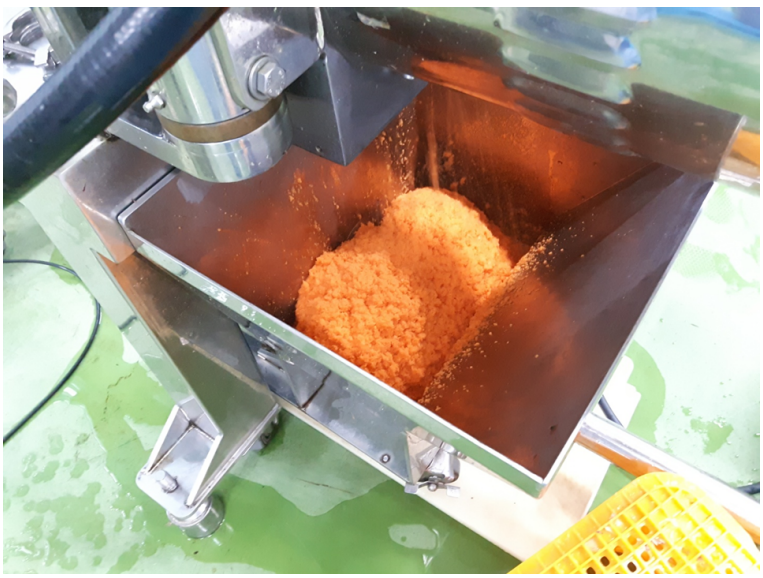
(1) 면역활성 다당체 분리공정의 산업화

- 개발한 면역다당 중 우수한 소재로 결정된 당근박, 케일박 다당을 산업화 대상 소재로 선정하였으며, 당근박 다당의 분리공정을 대량생산에 적합하도록 공정화 최적화하기 위해 생산규모로 생산 시 반복공정의 배제, 주정 사용의 최소화, 효율적 작업 시간의 안배, 경제성 등을 고려하여 다음과 같은 공정 모식도 안을 도출하고, 이를 기준으로 공정 단계별 연구결과를 토대로 공정 조건을 pilot 규모의 scale-up 실험으로 시행하였다.

그림3.15 면역다당 제조공정 모식도

- 우선 원재료인 당근박의 경우 안전성 검토 항목인 총 245항목의 잔류농약성분 검사 모두 잔류허용기준을 초과하지 않았었다. 따라서 농약을 제거하기 위한 약품 세척 등을 배제하고 물과 공기를 이용한 폭기 세척의 방법으로 충분한 이물 세척이 가능하다고 판단하였다. 하지만 원료의 입고 전 잔류농약성분분석 실시를 통해 원재료의 안전성 관련 자료를 확보하는 것은 위해요인 제어를 위해 기본으로 수반되어야 할 절차다.

- 입고된 원료는 원활한 효소 반응을 위해 분쇄 과정을 통해 최대의 반응 표면적을 확보해야 한다. 일반적으로 산업적으로 분쇄는 그 목적이나 원료의 특성에 따라 입도를 달리하는데, 효소 반응의 경우 일반적으로 20~100mesh 사이의 입도로 제조하는 경우가 일반적이며, 이 정도의 입도는 반응시간 동안 원활한 교반, 균질, 반응 후 여과 공정의 원활함을 위해 현장 설비에 적절하도록 조절할 수 있다.



- 당근박의 최적 효소 반응을 위하여, 공정의 경우 우선 최적의 용량의 물을 투입하는 것이 중요하다. 이유는 물의 양이 너무 과대로 설정될 경우 효소반응을 통해 생산되는 다당의 양이 적어지므로 수율이 너무 낮아지는 문제가 발생한다. 따라서 원활한 효소반응을 위하여 최적으로 효소와 물의 총량을 설정하는 것이 중요하다.

- 2차년도 실험결과 건조물 대비 5배의 물을 첨가하는 것으로 제시하였으며, 효소의 첨가량은 3%를 기준으로 하였으며, 50℃에서 15시간 반응하였다. 이는 생산작업 효율이 적합하도록 15시간 이내에서 작업하도록 반응시간 기준을 설정하였다. 효소 반응의 정지 조건으로, 효소 불활성화 조건이 80℃이상의 온도이며, 또한 또한 미생물의 제어 효과도 기대할 수 있도록 60분의 시간을 설정하여 효소 반응 공정 기준으로 제시하였다.

- 효소반응 후 효소 반응액은 적절한 여과 공정을 통해 슬러지 제거를 하였으며, 이후 4배(v/v) 부피의 95% ethanol을 가하여 24시간 교반하여 다당을 침전시킨 후, 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리하는 공정의 최적화 하였다. 다당 침천 후 침전 획분 회수 공정으로 연속형 원심분리 조건인 3,000rpm에서 슬러지로 배출되는 분획을 회수하는 방법을 사용하였다.

- 분획을 통한 타겟 고분자량 분획을 통한 rhamnogalacturonan I (RG-I) 분자량 10kDa 및 rhamnogalacturonan II (RG-II)의 분자량 20~25kDa를 가진 고분자 다당으로 확인 되었다.

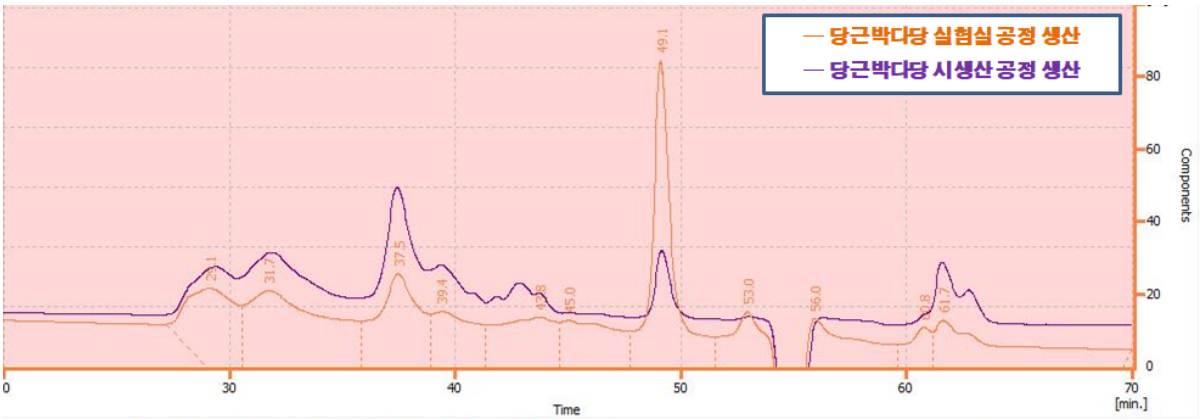


그림3.16 당근박다당 GPC 재현성 확인

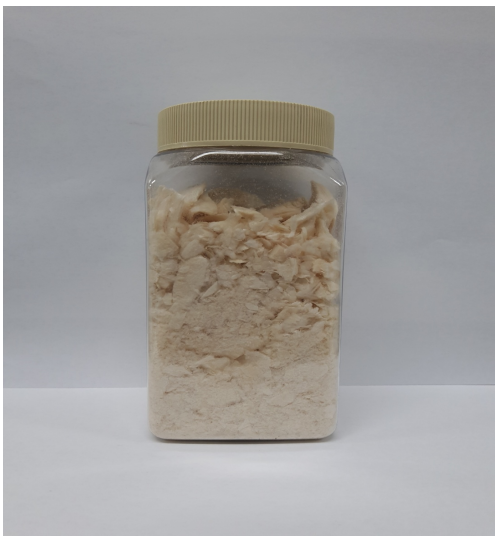


그림3.17 시제품 당근박 다당

(2) 면역활성 당근박다당 소재로의 품질 규격 가이드 설정

- 면역활성 당근박다당의 제품 규격을 설정하기 위하여 식품위생법 식품공전에 준하였으며, 식품안전관리를 위해 한국식품안전관리인증(HACPP)을 받고자함. 이에 따라 생물학적, 화학적, 물리적 위해요소를 설정하였음. 생물학적으로 대장균군은 음성이며, 화학적 위해요소는 불검출 되어야함. 또한 물리적 위해요소는 세척 및 미산성수 처리를 반복적으로 실시함으로서 불검출을 목표로함.

BK bio
The green innovator

㈜비케이바이오
제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-38
Tel. 064-753-8600, Fax. 064-782-6188

규 격 서

제품명 : 당근박다당
식품의유형 : 가공식품 (당근 기능소재)
주요성분 : 당근 100%

항 목	규 격	분석법
원산지	국내산 100%	-
성상	고유의 색택을 가지고 이미 이취가 없는 분말	관능검사
수분 (%)	5.0%이하	식품공전 일반시험법
분자량	50k~300kDa	GPC
이물질	불검출	관능검사
총 아플라톡신(ug/kg)	15.0 이하 (단 B1 은 10.0ug/kg 이하)	식품공전 일반시험법 (1 개월 1 회)
살모넬라	불검출	식품공전 일반시험법

저장
: 실온보관

유통기한
: 제조일로부터 24개월

그림3.18 당근박 다당 규격서

문서확인번호 : SXUU-SZKX-OFPN-O7FO

시험 · 검사성적서

atc

식품의약품안전처 지정번호 : 식품 제093호

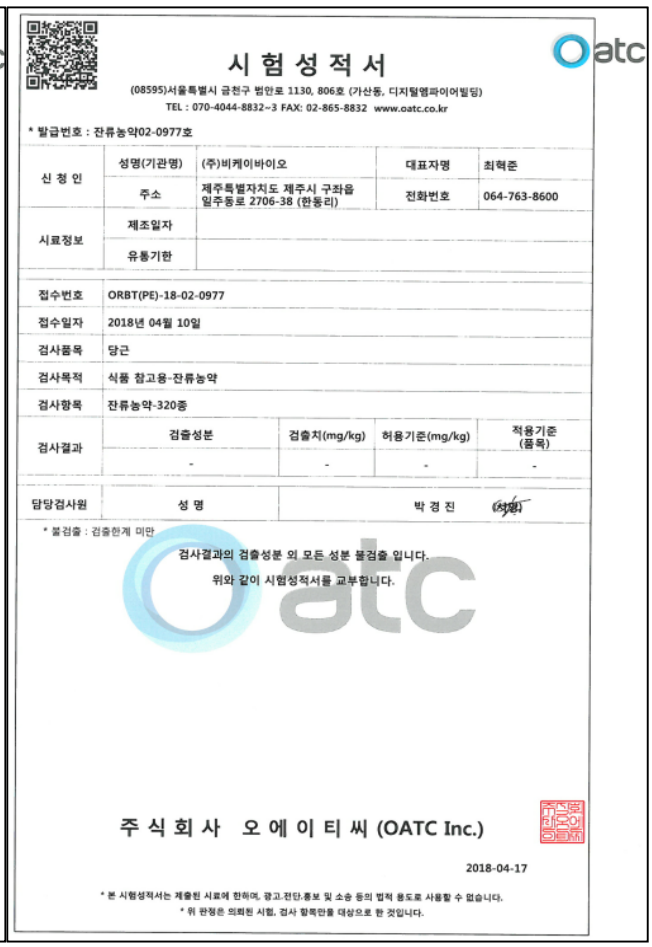
발행번호	R20180419-0217	접수번호	180101345-001
검사완료일	2018-04-19	접수연월일	2018-04-10
제품명	당근		
(품목)제조번호		품목제조신고번호	
유형 · 재질 · 품목명	기타		
제조(수입)일		유통(품질유지)기한	
의뢰자 성명	최혁준	업체명	(주)비케이바이오
의뢰자 소재지	(63359)제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-38 전화번호: 064 - 753 - 8600 팩스번호: 064 - 782 - 6188 전자우편:		
제조원 업체명		제조국	
제조원 소재지			
시험 · 검사목적	식품 | 기타(참고용)		

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
황색포도상구균	기준없음	음성	상기시험확인함	
바실러스세레우스	기준없음	음성	상기시험확인함	
클로스트리디움퍼프린젠스	기준없음	음성	상기시험확인함	
장출혈성대장균	기준없음	음성	상기시험확인함	
리스테리아모노사이토제네스	기준없음	음성	상기시험확인함	
살모넬라	기준없음	음성	상기시험확인함	
납(mg/kg)	기준없음	불검출	상기시험확인함	
카드뮴(mg/kg)	기준없음	0.01	상기시험확인함	

※ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.
또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.

Page 1 of2



atc

시 험 성 적 서

(08595)서울특별시 금천구 범안로 1130, 806호 (가산동, 디지털엠파이어빌딩)
TEL : 070-4044-8832~3 FAX: 02-865-8832 www.oatc.co.kr

* 발급번호 : 잔류농약02-0977호

신 청 인	성명(기관명)	(주)비케이바이오	대표자명	최혁준
	주소	제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-38 (한동리)	전화번호	064-763-8600
시료정보	제조일자			
	유통기한			

접수번호	ORBT(PE)-18-02-0977
접수일자	2018년 04월 10일
검사품목	당근
검사목적	식품 참고용-잔류농약
검사항목	잔류농약-320종

검사결과	검출성분	검출치(mg/kg)	허용기준(mg/kg)	적용기준 (품목)
	-	-	-	-

담당검사원 성 명 박 경 진 (서명)

* 불검출 : 검출한계 미만

검사결과의 검출성분 외 모든 성분 불검출 입니다.
위와 같이 시험성적서를 교부합니다.

주 식 회 사 오 에 이 티 씨 (OATC Inc.)

2018-04-17

* 본 시험성적서는 제출된 시료에 한하며, 광고,전단,홍보 및 소송 등의 법적 용도로 사용할 수 없습니다.
* 위 판정은 의뢰된 시험, 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

그림3.19 당근박 다당 미생물 평가

그림3.20 당근박 다당 잔류농약 검사(320종)

3.8 기 개발소재에 대한 시험관내 검사법과 동물시험 실행 후 효능결과 비교 및 타당성 평가

가. 바이오마커 선정

- 면역관련 기능은 건강기능식품을 개발하는 많은 연구자들이 관심을 가지고 있고 연구도 매우 활발한 분야지만, 국내에서 그 효능을 밝히는데 필요한 대상자의 선정, 시험설계, 바이오마커의 선택, 평가 기준 등이 제대로 제시되지 않은 실정이다.

- 이에 식약청 “면역관련 기능성평가 가이드라인”을 기초로 하고 “건강기능식품의 기능성 시험 가이드”를 참고하여 사람들을 대상으로 면역기능을 확인에 사용하는 바이오마커를 정리하였다. 또한, 본 과제를 통하여 개발한 가이드라인을 비교하기 위해 위해서 식품 섭취에 의하여 기대되는 면역 기능성을 둘로 (1) 저하된 면역의 증강을 목적으로 하는 것과 (2) 민감해진 면역반응(알레르기)을 조절해주는 것으로 구분하였다.

< 기능성 내용 인정 범위 >

1) 인정되는 기능성 내용 : 면역기능 개선에 도움
- 면역기능 기능성은 ‘면역기능 증진’과 ‘과민면역반응 완화’에 관련된 바이오마커의 개선을 의미한다.
- 면역기능 증진’의 기능성은 면역을 조절하여 생체방어 능력을 증강시키는 기능을 의미한다.
- 과민면역반응 완화’의 기능성은 외부 물질에 반응하여 초래되는 알레르기 반응, 자기항원 또는 변형된 자기항원에 대한 반응 등 바람직하지 않게 증가된 면역반응을 억제시키기 위한 기능을 의미한다.

2) 인정되지 않는 기능성 사례
- 일반적으로 건강기능식품의 기능성은 질병의 치료·예방 효과를 표현하거나 의약품의 효능·효과로 사용되는 ‘증상’과 동일한 표현은 타당하지 않으므로 다음과 같은 사례는 적합하지 않다.

(예시)
◦ 면역기능 증진을 통한 감기 예방에 도움
◦ 과민면역반응 개선을 통한 아토피 질환 치료

3) 기능성 인정 등급에 따른 기능성 내용의 표현

① 질병발생 위험 감소 기능 : 해당 없음

② 생리활성기능 1등급 : 면역기능 증진에 도움을 줌

③ 생리활성기능 2등급 : 면역기능 증진에 도움을 줄 수 있음

④ 생리활성기능 3등급 : 면역기능 증진에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함

-> 기능성 등급제 폐지(안 제16조, 별표 4)

① 안 제16조 및 별표 4에서 등급을 삭제하고, 기능성 원료평가결과에 따라 기능성을 인정함

② 안 제16조의 “기능성 인정 등급 및 내용”을 “기능성 인정 평가기준”으로 변경하고, 별표 4에서 “생리활성기능 1등급, 2등급, 3등급”의 등급을 삭제

③ 소비자가 쉽게 이해하기 어려운 등급을 삭제하고, 건강기능식품 기능성 원료의 현 2등급 이상의 기준으로 인정기준을 상향 조정

(1) 면역기능 증진 바이오마커

- 면역기능 증진 기능성을 확인하기 위한 바이오마커별 측정 가능한 시험 연구유형은 다음과 같다.

기전	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		In vitro	In vivo	Human
선천 면역	NK 세포		O	O
	싸이토카인(IFN-α, IFN-β, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12)	O	O	O
	탐식능	O		
	NO	O	O	
	iNOS	O		
	COX2	O		
	보체계		O	O
적응 면역	싸이토카인(IFN-γ, TNF-β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13)	O	O	O
	림프구 아집단 비율	O	O	O
	면역글로불린		O	O
공통	세포 생존율	O		
	비장세포 증식		O	
	조직무게(비장, 흉선)		O	

표 3.20 면역기능 증진 기능성 확인을 위한 바이오마커

(2) 과민면역반응 완화 바이오마커

- 과민면역반응 완화 기능성을 확인하기 위한 바이오마커 별 측정 가능한 시험 연구유형은 다음과 같다.

바이오마커	측정 가능한 연구유형		
	In vitro	In vivo	Human
면역글로불린(IgE)	O	O	O
FcεRI 및 FcεRI의 아형	O	O	
프로스타글란딘	O	O	O
루코트리엔	O	O	O
히스타민	O	O	O
β-hexosaminidase	O		
싸이토카인(TNF, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13)	O	O	O
NO	O		
iNOS	O		
COX2	O		
비만세포 수		O	
비만세포 탈과립률		O	
아나필락시스 쇼크 반응시험		O	
ECP		O	
MHC class II		O	
호산구, 호중구, 총 백혈구, 단핵백혈구 및 림프구 수		O	O

표 3.21 과민면역반응 완화 기능성 확인을 위한 바이오마커

(3) 면역 활성 기전 바이오마커

- 면역증강 기능성을 확인하기 위한 바이오마커별 측정 가능한 시험 연구유형은 다음과 같다.

구분		바이오마커	측정가능한 연구유형		
			시험관내	동물시험	인체시험
면역세포증식	면역 기관 증식	흉선 무게		○	
		비장 무게		○	
	림프구 증식	비장세포 증식능	○	○	
		B 림프구 증식능	○	○	○
		T 림프구 증식능	○	○	○
		CD4+ T 림프구 증식능		○	○
		CD8+ T 림프구 증식능		○	○
면역세포기능활성화	식균작용	대식세포 활성	○	○	
		대식세포의 NO 생성	○		
	세포독성	NK cell 활성		○	
		T 림프구 활성			○
	항체생성	Ig A 생성	○	○	○
		Ig G 생성	○	○	○
		Ig M 생성	○	○	○
	면역세포 활성물질 (싸이토카인) 생성	TNF-α	○	○	○
		IFN-γ	○	○	○
		IL-1β	○	○	○
		IL-2	○	○	○
		IL-6	○	○	○
		IL-10	○	○	○
	보체계 활성	보체계 활성화능	○		
면역 활성		CD4+/CD8+ ratio		○	
		감염억제 활성		○	
		감기(몸살) 유병률 및 증상			○

표 3.22 면역 활성 기전에 따른 바이오마커

나. 식약처 가이드 면역기능 평가 실험방법

(1) 실험관내 및 세포실험법

(가) 싸이토카인(Cytokine)

- 싸이토카인은 세포사이의 신호전달을 매개하는 단백질로서, 인터루킨(Interluekin; IL), 인터페론(Interferon; IFN), 종양과사인자(Tumor necrosis factors; TNF) 등이 있다. 주로 활성화된 대식세포나 림프구에 의해 생성된다. TH1 보조 T림프구에서 분비되는 싸이토카인의 종류는 IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN-γ, TNF-α 등이 있으며, 이들은 염증성 싸이토카인으로서 세포독성을 나타내며, 세포매개성 면역반응에 관여한다.
- 또한 비만세포에서 생산되는 싸이토카인은 T 림프구 중 TH2 보조 T림프구의 반응을 증가시켜 IL-4, IL-5, IL-13 등의 싸이토카인 생성을 유도하고, 이들은 B세포에 작용하여 IgE의 생산을 촉진시킴으로써 만성 알레르기 반을에 기여하게 된다. 이에 반해 TH1 보조 T림프구가 분비하는 IFN-γ는 TH2 보조 T림프구들의 분화를 억제한다. 또한 IgE의 생성을 억제하고, IgG2a의 생성을 유도하여 알레르기 반응을 억제시켜주는 것으로 알려져 있다.
- TH1 계열의 싸이토카인은 cell-mediated 면역과 관련이 있다. 특히 IFN-γ, IL-2 등의 싸이토카인은 탐식세포를 활성화시키고 cytotoxic T cell이 관여하는 상해성 작용에 관련한다.
- 반면 TH2 계열의 싸이토카인은 IL-4, IL-5, IL-13 등이 있는데 이들은 체액성 면역과 관련이 있으며, IgE 관련 알레르기 반응이나 조직을 손상시킬 수 있는 eosinophils을 활성화 시킨다. IL-4와 IL-13은 일차적으로 B 세포의 분화를 유도하여 항체를 생산하고 IL-5는 eosinophils를 자극하게 한다.
- 몇몇 싸이토카인은 TH1과 TH2의 신호전달에 관여하는데, IL-4는 TH2의 세포 증식을 유도하는 반면 TH1의 세포증식은 방해하며, IFN-γ는 TH1의 증식을 촉진하지만 TH2의 성장은 방해한다. 이러한 싸이토카인의 환경이 TH1/TH2의 비율을 결정하게 된다.

(나) NO(Nitric oxide)

- NO는 대식세포의 iNOS(inducible nitric oxide synthase)효소의 작용에 의하여 생성된다. 생성된 NO는 포식된 미생물(병원체) 구성분자들의 변형과 Fe-S를 함유하는 효소의 작용을 억제시켜 항 미생물 작용을 나타낸다. 또한 NO는 활성화된 대식세포나 호중구들로부터 분비되어 세포외 병원체들을 사멸시킨다. NO의 증가는 면역력이 증강되었음을 의미한다.

① T 림프구 증식능

구분	면역기능	링크	면역세포 활성화
실험 배경	T 세포는 특이적 면역 반응을 담당하는 면역세포로, 항원 제시 세포가 포식하여 제시한 항원을 세포가 직접 인식하여 반응하는 세포매개성 면역(cell-mediated immune)을 담당한다. 세포매개성 면역 반응은 면역세포 자신이 직접 매개하는 것으로 T 림프구 등의 면역세포가 세균의 감염이나 종양성장으로부터 생체를 보호하며 동시에 면역세포는 인터페론(interferon), 인터루킨(interleukin), 종양괴사인자(TNF-α) 등을 분비하여 면역계 전체를 활성화한다. 림프구의 증식능은 측정하는 방법은 면역 활성 평가 방법 중 가장 광범위하게 이용되는 방법으로 T세포를 기능성 소재를 가하여 배양하면서 T세포의 증식능을 측정함으로써 기능성 소재의 면역 증강 효과를 평가할 수 있다.		
실험 재료	<필요장비 및 소모품> CO2 배양기, 무균 작업대(Clean bench), 광학현미경, 원심분리기, hemocytometer, 배양 plate (24well/96well), 피펫 (10~200μL), 피펫 팁 (2~200μL), 멀티 채널 피펫, ELISA reader <필요시약> RPMI 1640, FBS(fetal bovine serum), penicillin, streptomycin, fungizone, amphothericin B, trypan blue solution, Concanavain A(Con A), DMSO <세포주> T 세포 (Molt-4)		
실험 방법	T세포 증식능 측정은 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 효소 (dehydrogenase) 작용에 의해 황색 수용성 물질인 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 시약이 환원되어 생기는 자줏빛 (purple) formazan의 양을 측정함으로써 세포독성 (cytotoxicity), 생세포 수 (viability), 세포증식능 (proliferation) 등을 측정하는데 자주 사용되는 MTT assay를 이용한다. 1. T세포 배양 1) 세포 분주 : 10% FBS RPMI 1640 배지에 1X105 cell/mL의 농도로 현탁된 T세포를 96-well plate에 well 당 100 μL 씩 분주한다. 2) 적당한 농도로 희석한 시료를 well 당 20 μL 씩 분주한다. 미토젠으로 Con A(5 μg/mL)를, 대조군으로는 10% FBS-RPMI 1640 배지를 동량 분주한다. 3) 배양 : 37℃, 5% CO2 배양기에 넣고 72-96시간 배양한다. 2. MTT assay 1) 배양이 끝나기 4시간 전에 각 well에 MTT 용액 10 μL 가하고, 알루미늄 호일로 밀폐하여 4시간 동안 다시 배양하여 formazan crystal 형성을 유도한다. 2) 배양이 끝난 후 plate를 4℃, 1500 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거한다. 3) 각 well에 DMSO 150 μL를 가하여 10분간 방치하여 MTT-formazan 결정을 용해시킨다. 4) ELISA reader로 540nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 5) T세포의 증식능은 다음의 공식에 의해 계산한다. Proliferation index = 시료(sample)의 흡광도 / 대조군(control)의 흡광도		
결과 해석	T세포의 증식이 증가하면 세포매개성 면역 반응을 활성화됨으로써 세균의 감염이나 종양성장으로부터 생체를 보호하고 면역 활성화 물질을 분비하는 등 면역 증강 효과를 나타내리라 기대할 수 있다.		
참고 문헌	1. 유아름, 박호영, 김윤숙, 하상근, 홍희도, 최희돈., 종자 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 면역증강 효과., 한국식품영양과학회지., 41(12) p1671-1676, 2012		

② 비장세포/대식세포의 Interferon-gamma(IFN-γ) 생성 측정

구분	면역기능	링크	면역세포 활성화
실험 배경	싸이토카인은 면역세포에서 생성되는 수용성 단백질로서 이들은 하나의 네트워크를 형성하여 세포의 증식과 활성, 분화의 조절과 염증세포를 활성화시키고 싸이토카인의 생성을 증가 또는 억제하는 등 외부 항원에 대한 여러 면역세포간의 협력을 중재하므로, 이들의 생성과 분비는 면역반응조절에 있어서 매우 중요하다. TH1 계열의 싸이토카인은 세포 매개성 면역과 관련이 있다. IFN-r, IL-2 등의 싸이토카인은 탐식세포를 활성화시킨다. IFN-γ는 면역인터페론으로 불리며 세포 매개성 면역과 관련이 있다. Th1 계열의 싸이토카인으로 활성화된 CD4 및 CD8 T 림프구, 그리고 NK 세포에 의해서 생성된다. T 림프구에 작용하며 이들의 분화를 증진하고 대식세포를 활성화하여 Th1 세포의 분화를 촉진하는 IL-12를 합성하고, B세포에 작용하여 IgG 항체 생성을 촉진하며 Th2 세포 증식을 억제하는 기능을 한다. 대식세포 또는 비장세포에 시험물질을 가하여 배양하면서 IFN-γ 생성에 미치는 영향을 관찰함으로써 기능성 소재의 면역 증강 효과를 평가할 수 있다.		
실험 재료	<필요장비 및 소모품> CO2 배양기, 무균 작업대(Clean bench), 광학현미경, 원심분리기, hemocytometer, 배양 plate (24well/96well), 분석용 저울, Homogenizer, 교반기(vortex mixer, Mini centrifuge, 항온기(Incubator), ELISA reader 피펫 (10~200㎕), 피펫 팁 (2~200㎕), 멀티 채널 피펫, EP tube (2㎖) <필요시약> RPMI 1640, FBS(fetal bovine serum), penicillin, streptomycin, fungizone, amphothericin B, trypan blue solution, lipoploysaccharide(LPS), IFN-γ 측정용 commercial kit, PBS(Phosphate buffered saline) <세포주> RAW 265.7 cell, 비장세포, 복강 대식세포		
실험 방법	Sandwich enzyme immunoassay 방법을 이용하여 측정한다. IFN-γ에 대한 항체로 코팅되어 있는 plate에 시료를 넣어 반응시킨 후 비오틴과 결합된 IFN-γ 항체를 반응시킨다. 이후, 아비딘과 결합된 Horseradish Peroxidase (HRP) 효소를 넣어 반응시키고, 이후 HRP 효소에 대한 기질로 TMB 용액을 넣어 반응시킨다. 시료에 IFN-γ 가 존재하면 색상의 변화가 나타나게 된다. 황산 용액을 넣어 HRP 효소와 TMB 기질의 반응을 종결시키고 색상의 변화를 450 nm에서 흡광도로 측정한다. 1. 시료 준비 1) 세포를 배양 배지로 현탁하여 배양 plate (24well/96well)에 분주한다. 2) 세포에 농도별로 희석된 시료를 분주한다. 양의 대조군으로 LPS(1-10 μg/mL)를 사용한다. 3) 37℃, 5% CO2 배양기에 넣고 24-48시간 배양하고 상층액을 취하여 분석 시료로 사용한다. 2. 분석 1) 효소결합면역흡착검사 (enzymelinked immumosorbent assay, ELISA)를 이용한 키트 시약을 사용하여 분석한다. 2) 96 well plate에 IFN-γ 항체를 넣어 코팅한다. 3) 증류수 (blank), IFN-γ 표준액, 시료를 각각 100 μL 씩 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. 4) 비오틴과 결합된 IFN-γ 항체를 100 μL 씩 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. 5) 아비딘과 결합된 horseradish peroxidase (HRP)를 100 μL 씩 넣고 실온 또는 37℃에서 30분간 반응시킨다. 6) TMB 기질 용액을 100 μL 씩 넣고 실온에서 4-14분간 반응시킨다. 7) Stop solution (황산)을 100 μL 씩 넣어 반응을 종결시킨다. 8) ELISA reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정한다. 9) 표준액의 흡광도와 비교하여 시료의 IFN-γ 함량을 계산한다.		
결과 해석	흡광도가 높을수록 IFN-γ 함량이 높은 것이다. IFN-γ 생성이 증가하면 T 림프구의 분화 증진, 대식세포를 활성화, B세포에서의 IgG 항체 생성 촉진 등 면역력을 증진시키는데 효과가 있다고 해석할 수 있다.		
참고 문헌	Kim JJ, Lee HJ, Yee ST., Effect of Peuraria thunbergiana extracts on the activation of immune cells, J of Life Science, 22(8) p1107-1113, 2012		

③ 비장세포/대식세포의 Interleukin (IL)-1β 생성 측정

구분	면역기능	링크	면역세포 활성화
실험 배경	싸이토카인은 면역세포에서 생성되는 수용성 단백질로서 이들은 하나의 네트워크를 형성하여 세포의 증식과 활성, 분화의 조절과 염증세포를 활성화시키고 싸이토카인의 생성을 증가 또는 억제하는 등 외부 항원에 대한 여러 면역세포간의 협력을 중재하므로, 이들의 생성과 분비는 면역반응조절에 있어서 매우 중요하다. IL-1β는 단핵 백혈구와 대식세포계 세포에 의해 생성되는 싸이토카인으로 T세포를 활성화시키고 T세포에서 분비되는 IL-2 와 같은 싸이토카인의 활성을 증진시키는 등 싸이토카인 network에 중요한 역할을 한다. IL-1β는 국소 염증반응을 매개하며 혈관 내피세포에 작용하여 백혈구의 부착을 매개하는 표면분자의 발현을 증가시키는 기능을 한다. 시험물질을 공급하면서 사육한 실험동물의 비장세포를 배양하여 IL-1β 생성에 미치는 영향을 관찰함으로써 기능성 소재의 면역 증강 효과를 평가할 수 있다.		
실험 재료	<필요장비 및 소모품> CO2 배양기, 무균 작업대(Clean bench), 광학현미경, 원심분리기, hemocytometer, 배양 plate (24well/96well), 분석용 저울, Homogenizer, 교반기(vortex mixer, Mini centrifuge, 항온기(Incubator), ELISA reader 피펫 (10~200㎕), 피펫 팁 (2~200㎕), 멀티 채널 피펫, EP tube (2㎖) <필요시약> RPMI 1640, FBS(fetal bovine serum), penicillin, streptomycin, fungizone, amphothericin B, trypan blue solution, lipoploysaccharide(LPS), IL-1β 측정용 commercial kit, PBS(Phosphate buffered saline) <세포주> RAW 265.7 cell, 비장세포, 복강 대식세포		
실험 방법	Sandwich enzyme immunoassay 방법을 이용하여 측정한다. IL-1β에 대한 항체로 코팅되어 있는 plate에 시료를 넣어 반응시킨 후 비오틴과 결합된 IL-1β 항체를 반응시킨다. 이후, 아비딘과 결합된 Horseradish Peroxidase (HRP) 효소를 넣어 반응시키고, 이후 HRP 효소에 대한 기질로 TMB 용액을 넣어 반응시킨다. 시료에 IL-1β 가 존재하면 색상의 변화가 나타나게 된다. 황산 용액을 넣어 HRP 효소와 TMB 기질의 반응을 종결시키고 색상의 변화를 450 nm에서 흡광도로 측정한다. 1. 시료 준비 1) 세포를 배양 배지로 현탁하여 배양 plate (24well/96well)에 분주한다. 2) 세포에 농도별로 희석된 시료를 분주한다. 양의 대조군으로 LPS(1-10 μg/mL)를 사용한다. 3) 37℃, 5% CO2 배양기에 넣고 24-48시간 배양하고 상층액을 취하여 분석 시료로 사용한다. 2. 분석 1) 효소결합면역흡착검사 (enzymelinked immumosorbent assay, ELISA)를 이용한 키트 시약을 사용하여 분석한다. 2) 96 well plate에 IL-1β 항체를 넣어 코팅한다. 3) 증류수(blank), IL-1β 표준액, 시료를 각각 100 μL 씩 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. 4) 비오틴과 결합된 IL-1β 항체를 100 μL 씩 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. 5) 아비딘과 결합된 horseradish peroxidase (HRP)를 100 μL 씩 넣고 실온 또는 37℃에서 30분간 반응시킨다. 6) TMB 기질 용액을 100 μL 씩 넣고 실온에서 11-21분간 반응시킨다. 7) Stop solution (황산)을 100 μL 씩 넣어 반응을 종결시킨다. 8) ELISA reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정한다. 9) 표준액의 흡광도와 비교하여 시료의 IL-1β 함량을 계산한다.		
결과 해석	흡광도가 높을수록 IL-1β 함량이 높은 것이다. IL-1β 생성이 증가하면 T세포를 활성화시키고 국소 염증반응을 매개하며 혈관 내피세포에 작용하여 백혈구의 부착을 매개하는 등 면역력 증강에 효과가 있다고 해석할 수 있다.		
참고 문헌	류혜숙, 김정희, 김현숙, 식물 혼합(고들빼기, 돌미나리, 메밀, 톳, 생강) 추출물이 마우스 면역 세포 활성에 미치는 영향, 한국식품영양학회지, 20(1) p74-78, 2007		

④ 비장세포/대식세포의 Interleukin (IL)-6 생성 측정

구분	면역기능	링크	면역세포 활성화
실험 배경	싸이토카인은 면역세포에서 생성되는 수용성 단백질로서 이들은 하나의 네트워크를 형성하여 세포의 증식과 활성, 분화의 조절과 염증세포를 활성화시키고 싸이토카인의 생성을 증가 또는 억제하는 등 외부 항원에 대한 여러 면역세포간의 협력을 중재하므로, 이들의 생성과 분비는 면역반응조절에 있어서 매우 중요하다. IL-6는 면역반응을 조절에 다양한 기능을 가진 싸이토카인으로 B세포의 항체생성 세포인 plasma cell의 최종 분화를 유도하는 활성을 가진 B세포 성장인자로 작용하여 면역글로불린의 합성을 증진하고, 다른 싸이토카인고 협동하여 상승작용을 나타내는 등 다양한 면역 기능을 담당한다. 또한 IL-6는 활성화된 대식세포로부터 분비되는 염증성 싸이토카인으로 인체에 침입한 병원체 및 종양세포들에 대한 제거 활성을 증진시킨다. 대식세포 또는 비장세포에 시험물질을 가하여 배양하면서 IL-6 생성에 미치는 영향을 관찰함으로써 기능성 소재의 면역 증강 효과를 평가할 수 있다.		
실험 재료	<필요장비 및 소모품> CO2 배양기, 무균 작업대(Clean bench), 광학현미경, 원심분리기, hemocytometer, 배양 plate (24well/96well), 분석용 저울, Homogenizer, 교반기(vortex mixer, Mini centrifuge, 항온기(Incubator), ELISA reader 피펫 (10~200㎕), 피펫 팁 (2~200㎕), 멀티 채널 피펫, EP tube (2㎖) <필요시약> RPMI 1640, FBS(fetal bovine serum), penicillin, streptomycin, fungizone, amphothericin B, trypan blue solution, lipoploysaccharide(LPS), IL-6 측정용 commercial kit, PBS(Phosphate□buffered saline) <세포주> RAW 265.7 cell, 비장세포, 복강 대식세포		
실험 방법	Sandwich enzyme immunoassay 방법을 이용하여 측정한다. IL-6에 대한 항체로 코팅되어 있는 plate에 시료를 넣어 반응시킨 후 비오틴과 결합된 IL-6 항체를 반응시킨다. 이후, 아비딘과 결합된 Horseradish Peroxidase (HRP) 효소를 넣어 반응시키고, 이후 HRP 효소에 대한 기질로 TMB 용액을 넣어 반응시킨다. 시료에 IL-6 가 존재하면 색상의 변화가 나타나게 된다. 황산 용액을 넣어 HRP 효소와 TMB 기질의 반응을 종결시키고 색상의 변화를 450 nm에서 흡광도로 측정한다. 1. 시료 준비 1) 세포를 배양 배지로 현탁하여 배양 plate (24well/96well)에 분주한다. 2) 세포에 농도별로 희석된 시료를 분주한다. 양의 대조군으로 LPS(1-10 ㎍g/mL)를 사용한다. 3) 37℃, 5% CO2 배양기에 넣고 24-48시간 배양하고 상층액을 취하여 분석 시료로 사용한다. 2. 분석 1) 효소결합면역흡착검사 (enzymelinked immumosorbent assay, ELISA)를 이용한 키트 시약을 사용하여 분석한다. 2) 96 well plate에 IL-6 항체를 넣어 코팅한다. 3) 증류수 (blank), IL-6 표준액, 시료를 각각 100 ㎕ 씩 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. 4) 비오틴과 결합된 IL-6 항체를 100 ㎕ 씩 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. 5) 아비딘과 결합된 horseradish peroxidase (HRP)를 100 ㎕ 씩 넣고 실온 또는 37℃에서 30분간 반응시킨다. 6) TMB 기질 용액을 100 ㎕ 씩 넣고 실온에서 11-21분간 반응시킨다. 7) Stop solution (황산)을 100 ㎕ 씩 넣어 반응을 종결시킨다. 8) ELISA reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정한다. 9) 표준액의 흡광도와 비교하여 시료의 IL-6 함량을 계산한다.		
결과 해석	흡광도가 높을수록 IL-6 함량이 높은 것이다. IL-6 생성이 증가하면 B세포 성장인자로 작용하여 면역글로불린의 합성을 증가시키고 인체에 침입한 병원체 및 종양세포들에 대한 제거 활성을 증진시키는 등 면역력 증강에 효과가 있다고 해석할 수 있다.		
참고 문헌	1. Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Kim NH, Kim KH, Rhu EJ, Jeong YK., Effecf of fermented Cudrania tricuspidata fruit extracs on the generation of the cytokines in mouse spleen cells, J of Life Science, 23(5) p682-688, 2013		

⑤ 비장세포/대식세포의 Interleukin (IL)-10 생성 측정

구분	면역기능	링크	면역세포 활성화
실험 배경	싸이토카인은 면역세포에서 생성되는 수용성 단백질로서 이들은 하나의 네트워크를 형성하여 세포의 증식과 활성, 분화의 조절과 염증세포를 활성화시키고 싸이토카인의 생성을 증가 또는 억제하는 등 외부 항원에 대한 여러 면역세포간의 협력을 중재하므로, 이들의 생성과 분비는 면역반응조절에 있어서 매우 중요하다. IL-10은 B 세포의 증식을 유도하여 IgM, IgG, IgA 항체의 생산을 증가시키며 T 세포에 대한 싸이토카인 합성 억제 역할을 하는 등 생체 내에서 면역 억제 역할과 부분적으로 림프구의 성장 촉진의 역할을 동시에 수행한다. 대식세포 또는 비장세포에 시험물질을 가하여 배양하면서 IL-10 생성에 미치는 영향을 관찰함으로써 기능성 소재의 면역 증강 효과를 평가할 수 있다.		
실험 재료	<필요장비 및 소모품> CO2 배양기, 무균 작업대(Clean bench), 광학현미경, 원심분리기, hemocytometer, 배양 plate (24well/96well), 분석용 저울, Homogenizer, 교반기(vortex mixer, Mini centrifuge, 항온기(Incubator), ELISA reader 피펫 (10~200㎕), 피펫 팁 (2~200㎕), 멀티 채널 피펫, EP tube (2㎖) <필요시약> RPMI 1640, FBS(fetal bovine serum), penicillin, streptomycin, fungizone, amphothericin B, trypan blue solution, lipoploysaccharide(LPS), IL-6 측정용 commercial kit, PBS(Phosphate buffered saline) <세포주> RAW 265.7 cell, 비장세포, 복강 대식세포		
실험 방법	Sandwich enzyme immunoassay 방법을 이용하여 측정한다. IL-10에 대한 항체로 코팅되어 있는 plate에 시료를 넣어 반응시킨 후 비오틴과 결합된 IL-10 항체를 반응시킨다. 이후, 아비딘과 결합된 Horseradish Peroxidase (HRP) 효소를 넣어 반응시키고, 이후 HRP 효소에 대한 기질로 TMB 용액을 넣어 반응시킨다. 시료에 IL-10 가 존재하면 색상의 변화가 나타나게 된다. 황산 용액을 넣어 HRP 효소와 TMB 기질의 반응을 종결시키고 색상의 변화를 450 nm에서 흡광도로 측정한다. 1. 시료 준비 1) 실험동물을 희생한 후 대장 말단 부위를 적출하고 PBS로 세척한다. 2) 조직에 PBS를 넣고 homogenizer를 이용하여 균질화시킨다. 3) 20,000g, 4℃에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 분석 시료로 사용한다. 2. 분석 1) 효소결합면역흡착검사 (enzymelinked immumosorbent assay, ELISA)를 이용한 키트 시약을 사용하여 분석한다. 2) 96 well plate에 IL-10 항체를 넣어 코팅한다. 3) 증류수 (blank), IL-10 표준액, 시료를 각각 100 μL 씩 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. 4) 비오틴과 결합된 IL-10 항체를 100 μL 씩 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. 5) 아비딘과 결합된 horseradish peroxidase (HRP)를 100 μL 씩 넣고 실온 또는 37℃에서 30분간 반응시킨다. 6) TMB 기질 용액을 100 μL 씩 넣고 실온에서 1-8분간 반응시킨다. 7) Stop solution (황산)을 100 μL 씩 넣어 반응을 종결시킨다. 8) ELISA reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정한다. 9) 표준액의 흡광도와 비교하여 시료의 IL-10 함량을 계산한다.		
결과 해석	흡광도가 높을수록 IL-10 함량이 높은 것이다. L-10의 생성을 증가하면 B 세포를 조절하여 항체 생성에 영향을 주어 체액성 면역증강 효과에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.		
참고 문헌	1. 서이슬, 신광순., 천년초에서 분리한 점질다당의 면역자극 활성, 한국식품영양과학회지, 41(1) p95-102, 2012		

⑥ 대식세포의 일산화질소(NO) 생성

구분	면역기능	링크	면역세포 활성화
실험 배경	일산화질소(nitric oxide, NO)는 면역계에서 외부물질에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호 전달 물질로 notric oxide synthase(NOS)의 작용에 의해 L-arginine이 L-citruline으로 변화되는 과정에서 생성되며 면역계에서는 방어 물질로 작용하는 것으로 알려져 있다. 면역계에서는 면역전달물질인 세포활성물질의 영향을 받아 면역효과세포가 많은 양의 NO를 생성할 수 있게 유도되면 많은 양의 NO가 면역 염증반응 부위에 유리되어 면역반응을 나타낸다고 알려져 있다. 특히 박테리아가 대식세포 내 살균작용에 의해 분해될 때 박테리아를 죽이기 위해 대식세포가 NO를 분비하게 된다. 따라서 활성화된 대식세포가 분비하는 것으로 알려진 NO의 생성량을 측정함으로써 시료의 대식세포의 활성화에 따른 면역기능의 증진 활성을 확인할 수 있다.		
실험 재료	<필요장비 및 소모품> CO2 배양기, 무균 작업대(Clean bench), 광학현미경, 원심분리기, 배양 plate (96well), 피펫 (10~200㎕), 피펫 팁 (2~200㎕), 멀티 채널 피펫, hemocytometer, ELISA reader <필요시약> DMEM(Dulbecco’s Modified Eagle Medium), FBS(fetal bovine serum), NaHCO3, penicillin/streptomycin, amphotericin B, 2-ME(2-mercaptoethanol), NO detection kit, lipoploysaccharide(LPS) □<세포주> : RAW 264.7 세포		
실험 방법	NO의 생성량은 안정된 nitric oxide 산화된 형태인 NO2-(nitrite)의 농도를 Griess 반응을 이용하여 비색법(colorimetric method)으로 측정한다. 1. 대식세포와 시료의 배양 1) 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 적당한 농도 (1X10^6 - 5X10^4 cell/mL)로 10% FBS를 함유한 DMEM 배지로 현탁하여 96 well plate에 분주한다. 2) 적당한 농도로 희석한 시료를 첨가하고, 양성 대조군으로 LPS (1-10 ug/mL)를 첨가한다. 3) 37℃, 5% CO2 배양기에서 24-48시간 배양한다. 2. 일산화질소(NO) 측정 1) 배양 상층액을 취하여 96-well plate에 각 well 당 100 ㎕ 씩 분주한다. 2) Sulfanilamide가 함유된 기질 용액(substrate solution을 50 ㎕ 첨가한 후 5-10분간 반응시킨다. 3) Naphthyethylenediamine이 함유된 발색 용액(coloring solution)를 첨가하여 10분간 발색시킨다. 4) ELISA reader로 520-560nm에서 흡광도를 측정한다. 5) Nitrite 표준액을 이용하여 0-1,000 ㎛M 농도 범위에서 표준곡선을 작성한 후 시료의 nitrite를 계산하여 측정한다.		
결과 해석	NO 생성이 증가하면 대식세포가 활성화되어 외부 물질 침입 등의 감염에 대한 1차 방어 등 면역반응이 일어나는 초기에 생체 방어에 체내 면역 증강 효과를 나타낼 것으로 기대할 수 있다.		
참고 문헌	Zhang L, Cheng YX, Liu AL, Wang HD, Wang YL, Du GH., Antioxidant, anti-inflammatory and anti-influenza properties of components from Chaenomeles speciosa., Molecules., 22(15(11):) p8507-8517, 2010		

(2) 동물실험법

① Cyclophosphamide(CY) 유도 면역억제 동물실험 모델

구분	면역기능	링크	동물모델
실험 배경	Cyclophosphamide (CY)는 각종 암과 육종, 백혈병, 악성림프종에 널리 사용되는 면역억제제이다. 면역억제제인 cyclophosphamide 처리에 의해 면역이 억제된 마우스의 면역력 증강 활성을 측정함으로써 시험물질의 면역 증강 소재로서의 가능성을 평가해볼 수 있다.		
실험 재료	<필요장비 및 소모품> Cage, 깔집, 주사기 (1 mL), 마취통, 시험관 <필요시약> 고형사료, Ethyl ether, Cyclophosphamide, 생리식염수 <실험동물>		
실험 방법	1. 실험 동물을 준비한다. (5~8주령의 숫컷 흰쥐, 또는 마우스) 2. 실험동물을 에테르를 사용하여 약하게 마취시킨 후, cyclophosphamide를 생리식염수에 녹여 주사기를 사용하여 복강으로 주사한다. 1) 투여량 : 실험 동물 체중 1kg 당 100-150 mg 으로 투여한다. 2) 투여횟수 : 단회 투여 하거나, 1-2일 간격으로 2-3회 투여한다. 2회 투여 시기는 1회 투여 2-3일 후로 한다. 3. 시험물질은 cyclophosphamide 투여 24시간 이후부터 공급한다. 4. Cyclophosphamide 투여 후 3-14일째에 실험동물을 희생하여 혈액 및 조직을 적출하여 비교 분석한다. 5. 시험물질 공급의 시기는 실험 목적에 따라 다음과 같이 한다. 1) 시험물질의 면역억제 예방 및 개선 효과 측정 : cyclophosphamide 투여 전과 주입 24시간 이후부터 희생 전까지 시험물질을 공급한다. 2) 시험물질의 면역억제 개선 효과 측정 : cyclophosphamide 투여 주입 24시간 이후부터 희생 전까지 시험물질을 공급한다. (1-2주)		
결과 해석	Cyclophosphamide를 투여하고 수일 후에 실험동물을 희생하여 면역 활성을 관찰한다. Cyclophosphamide에 의해 면역력이 억제되면 면역 조직인 흉선의 무게와 흉선 세포수가 감소하고 면역억제에 대한 방어기작으로 비장의 무게가 증가한다. 또한 T 세포와 B 세포의 분화 감소, 대식세포의 탐식작용 저하, 면역 활성물질인 싸이토카인들의 분비와 NK 세포 활성이 감소 등 전반적인 면역 기능 저하가 나타난다.		
참고 문헌	1. Jang SE, Joh EH, Lee HY, Ahn YT, Lee JH, Huh CS, Han MJ, Kim DH., Lactobacillus plantarum HY7712 ameliorates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice., J Microbiol Biotechnol, 23(3) p414-421, 2013		

② 인플루엔자 감염 동물실험 모델

구분	면역기능	링크	동물모델
실험 배경	인플루엔자 바이러스는 호흡기 점막을 통해 감염이 되고 면역기능이 낮은 사람이 잘 걸린다. 시험물질을 공급하고 인플루엔자 바이러스를 접종한 후 실험동물에서 인플루엔자 감염 방어 시 어떤 면역학적 변화가 일어나는지 살펴봄으로써 시험물질의 면역 증강 소재로서의 가능성을 평가해볼 수 있다.		
실험 재료	<필요장비 및 소모품> Cage, 깔집, 항온기(Incubator), 원심분리기, 0.2 μm syringe filter, 주사기 (1 mL), 시험관 <필요시약> 고형사료, Zoletil, Bovine Serum Albumin (BSA), N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), Minimun Essential Medium alph (MEM-α), 유정란, A/PR/8/34 virus (H1N1), PBS (Phosphate buffered saline) <실험동물>		
실험 방법	1. 실험 동물을 준비한다. (5~8주령의 흰쥐, 또는 마우스) 2. 실험동물을 약하게 마취시킨 후, 인플루엔자 A (H1N1)를 PBS로 희석하여 비강을 통해 (intranasally) 한방울씩 점적주입(instillation)하여 감염시킨다. 1) 인플루엔자 증폭 : 인플루엔자를 10-11일령의 부화란에 접종한 후 37℃의 배양기에서 48-72시간 배양한다. 배양액으로 MEM-α을 사용한다. 2) 주입량: 실험동물 당 0.1~2.0 LD50 virus를 주입한다. 3. 시험물질은 인플루엔자 접종 4-24시간 이후부터 3-14일간 공급한다. 4. 인플루엔자 접종 후 7-21일째에 실험동물을 희생하고 혈액 및 조직을 적출하여 비교 분석한다.		
결과 해석	인플루엔자 바이러스를 접종한 후 수일 후에 실험동물을 희생하여 면역 활성을 관찰한다. 시험물질에 의해 면역 지표들이 개선되고 항바이러스 활성이 확인되면 면역력 증강 효과가 있다고 해석할 수 있다.		
참고 문헌	1. Lee JS, Hwang HS, Ko EJ, Lee YN, Kwon YM, Kim MC, Kang SM. ., Immunomodulatory Activity of Red Ginseng against Influenza A Virus Infection, Nutrients, 27(6(2)) p517-529, 2014 2. Yin SY, Kim HJ, Kim HJ.., A comparative study of the effects of whole red ginseng extract and polysaccharide and saponin fractions on influenza A (H1N1) virus infection, Biol Pharm Bull., 36(36) p1002-1007, 2013		

다. 면역기능 평가 타당성 분석

(1) 비교를 위한 기존 평가법 선정

- 식품의약품안전처 건강기능식품 기능성 평가 가이드 '면역기능 개선에 도움을 줄 수 있음' 바이오바커와 개발 면역능 평가법 결과 비교를 통한 타당성 평가

(가) 싸이토카인(Cytokine)

- 싸이토카인은 면역세포에서 생성되는 수용성 단백질로서 이들은 하나의 네트워크를 형성하여 세포의 증식과 활성, 분화의 조절과 염증세포를 활성화시키고 싸이토카인의 생성을 증가 또는 억제하는 등 외부 항원에 대한 여러 면역세포간의 협력을 중재하므로, 이들의 생성과 분비는 면역반응조절에 있어서 매우 중요하다.
- 면역력을 평가하기 위한 측정 물질로서 IL-4, IL-6, IL-17, TNF-alpha, IFN-gamma를 측정하였으며, 간단히 위 cytokine들의 기능에 대해 서론에서 알아보고 넘어가고자 한다.
- 면역기능 증진 기능으로 Th1 보조 T 림프구에서 분비되는 싸이토카인의 종류는 IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 IFN-γ, TNF-α 등이 있으며, 이들은 염증성 싸이토카인 으로서 세포독성을 나타내며, 세포매개성 면역반응에 관여한다.
- 과민면역반응 완화 기능으로 비만세포에서 생산되는 싸이토카인은 T림프구 중 Th2보조 T림프구의 반응을 증가시켜 IL-4, IL-5, IL-13 등의 싸이토카인 생성을 유도하고, 이들은 B세포에 작용하여 IgE의 생산을 촉진시킴으로써 만성 알레르기 반응에 기여하게 된다. 이에 반해 Th1보조 T림프구가 분비하는 IFN-γ는 Th2보조 T림프구들의 분화를 억제한다. 또한, IgE의 생성을 억제하고, IgG2a의 생성을 유도하여 알레르기 반응을 억제시켜주는 것으로 알려져 있다.

○ Interleukin-4(IL-4)

- IL-4는 적응 면역을 매개하고 조절하는 싸이토카인이다. IgE 항체 생성과 미감작 CD4+보조 T 세포로부터의 TH2세포 발달을 위한 주된 자극자이다. TH2 세포와 비만세포에서 생성된다.
- IL-4는 활성화된 B 세포와 T 세포를 자극하거나, B세포가를 형질세포로 분화시키는 등의 많은 생물학적 기능을 갖고 있으며, 체액성 면역과 후천성 면역의 중요한 조절자이다. 또한, IL-4는 B 전구세포에서 IgE 및 IgG4 생산이 가능한 B세포로 전환되는 종류변환(class switching)을 유도할 뿐만 아니라, MHC 클래스 II의 생산을 촉진한다고 알려져 있다.
- 반대로 IL-4는 Th1 세포, 대식세포, 인터페론 감마, 그리고 수지상세포의 IL-12의 양을 감소시킨다고 알려져 있다. 또한, IL-4의 과량 생산은 알러지와 관련이 있다.

○ Interleukin-6(IL-6)

- IL-6는 면역반응을 조절에 다양한 기능을 가진 싸이토카인으로 B세포의 항체생성 세포인 plasma cell의 최종 분화를 유도하는 활성을 가진 B세포 성장인자로 작용하여 면역글로불린의 합성을 증진하고, 다른 싸이토카인고 협동하여 상승작용을 나타내는 등 다양한 면역 기능을 담당한다. 또한 IL-6는 활성화된 대식세포로부터 분비되는 염증성 싸이토카인으로 인체에 침입한 병원체 및 종양세포들에 대한 제거 활성을 증진시킨다.
- 대식세포 또는 비장세포에 시험물질을 가하여 배양하면서 IL-6 생성에 미치는 영향을 관찰함으로써 기능성 소재의 면역 증강 효과를 평가할 수 있다.
- IL-6 생성이 증가하면 B세포 성장인자로 작용하여 면역글로불린의 합성을 증가시키고 인체에 침입한 병원체 및 종양세포들에 대한 제거 활성을 증진시키는 등 면역력 증강에 효과가 있다

○ Interferon-gamma(IFN-γ)

- IFN-γ는 면역인터페론으로 불리며 세포 매개성 면역과 관련이 있다. Th1 계열의 싸이토카인으로 활성화된 CD4 및 CD8 T 림프구, 그리고 NK 세포에 의해서 생성된다. T 림프구에 작용하며 이들의 분화를 증진하고 대식세포를 활성화하여 Th1 세포의 분화를 촉진하는 IL-12를 합성하고, B세포에 작용하여 IgG 항체 생성을 촉진하며 Th2 세포 증식을 억제하는 기능을 한다.
- 대식세포 또는 비장세포에 시험물질을 가하여 배양하면서 IFN-γ 생성에 미치는 영향을 관찰함으로써 기능성 소재의 면역 증강 효과를 평가할 수 있다.
- IFN-γ 생성 증가는 T 림프구의 분화 증진, 대식세포 활성화, B세포에서의 IgG 항체 생성 촉진 등 면역력을 증진시키는데 효과가 있다고 해석할 수 있다.

○ Tumor necrosis factor(TNF)-α

- TNF-α는 활성화된 대식세포 또는 비장세포에서 분비되는 염증성 싸이토카인으로 인체에 침입한 병원체 및 종양세포들에 대한 제거 활성을 증진시킨다. TNF-α는 림프구와 상호작용하여 림프구의 활성과 성장 등을 조절하며 특히 Th-1 세포 반응을 유도하는 싸이토카인으로 뇌경색이나 암 같은 질병에 있어 면역을 증강시킨다. 또한 TNF-α는 종양괴사인사(tumor necrosis factor)로 알려진 물질로 암세포의 세포 용해를 유도함으로써 직접적인 항암 작용을 나타내기도 한다.
- 대식세포 또는 비장세포에 시험물질을 가하여 배양하면서 TNF-α 생성에 미치는 영향을 관찰함으로써 기능성 소재의 면역 증강 효과를 평가할 수 있다.
- TNF-α 생성을 증가는 면역력을 증진시키는데 효과가 있다고 해석할 수 있다.

○ Interleukin-17(IL-17)

- IL-17 억제제는 면역 조절 기능에 관여하기 때문에 류마티스 성 관절염 , 건선 및 염증성 장 질환 과 같은 자가 면역 질환에 대한 가능한 치료법으로 연구되고 있습니다.
- 또한 현재까지는 많은 염증매개 자가면역질환의 치료로 TNF 억제를 통한 효과가 인정되었으나 30% 이상의 환자는 이러한 치료에 반응하지 않아 새로운 약물 또는 치료 방법이 필요한 실정이며, TNF 억제제에 반응하지 않거나 불충분하게 반응하는 환자에서 IL-17/Th17을 표적화 하는 것은 지금까지 연구결과로 성공적인 제안으로 평가 되고 있다.

(2) 기존평가법과 개발평가법 교차검증 실험 결과

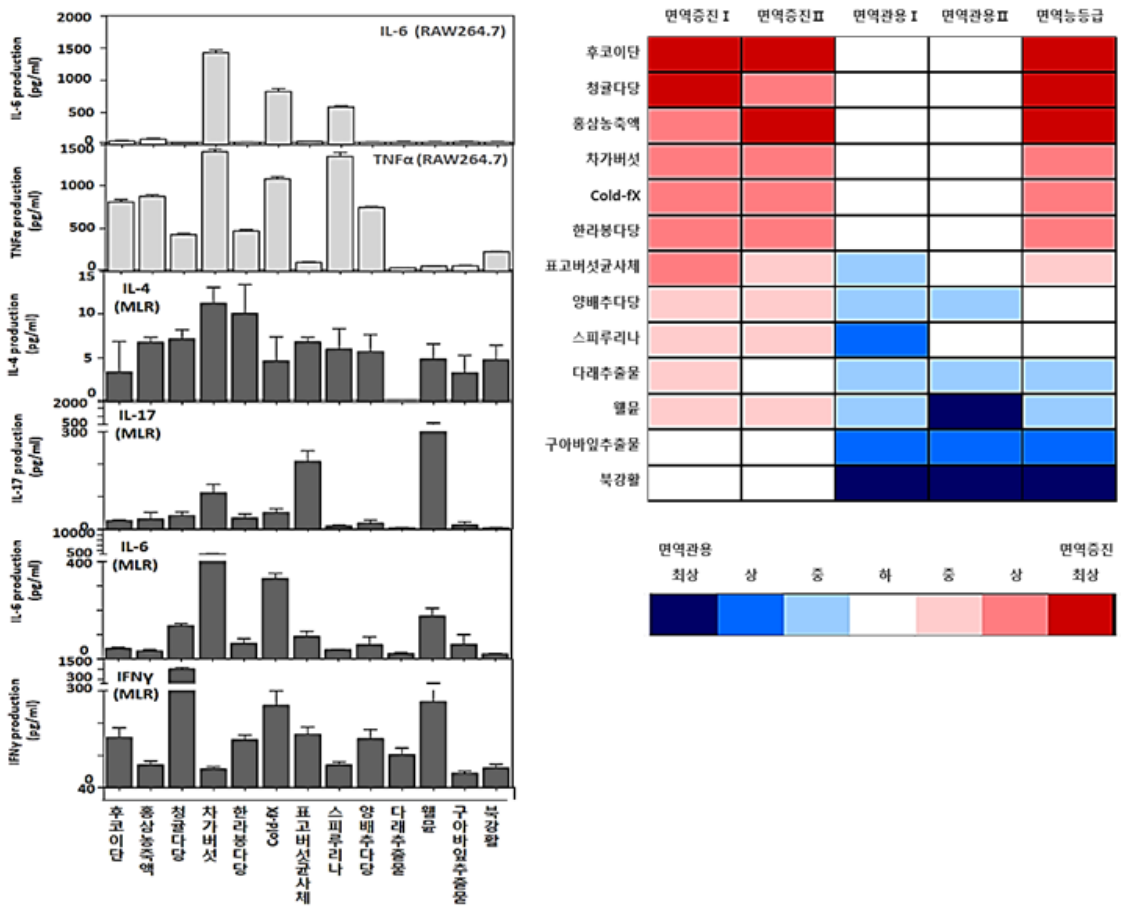


그림3.21 표준 면역식품소재 싸이토카인 생성능 평가

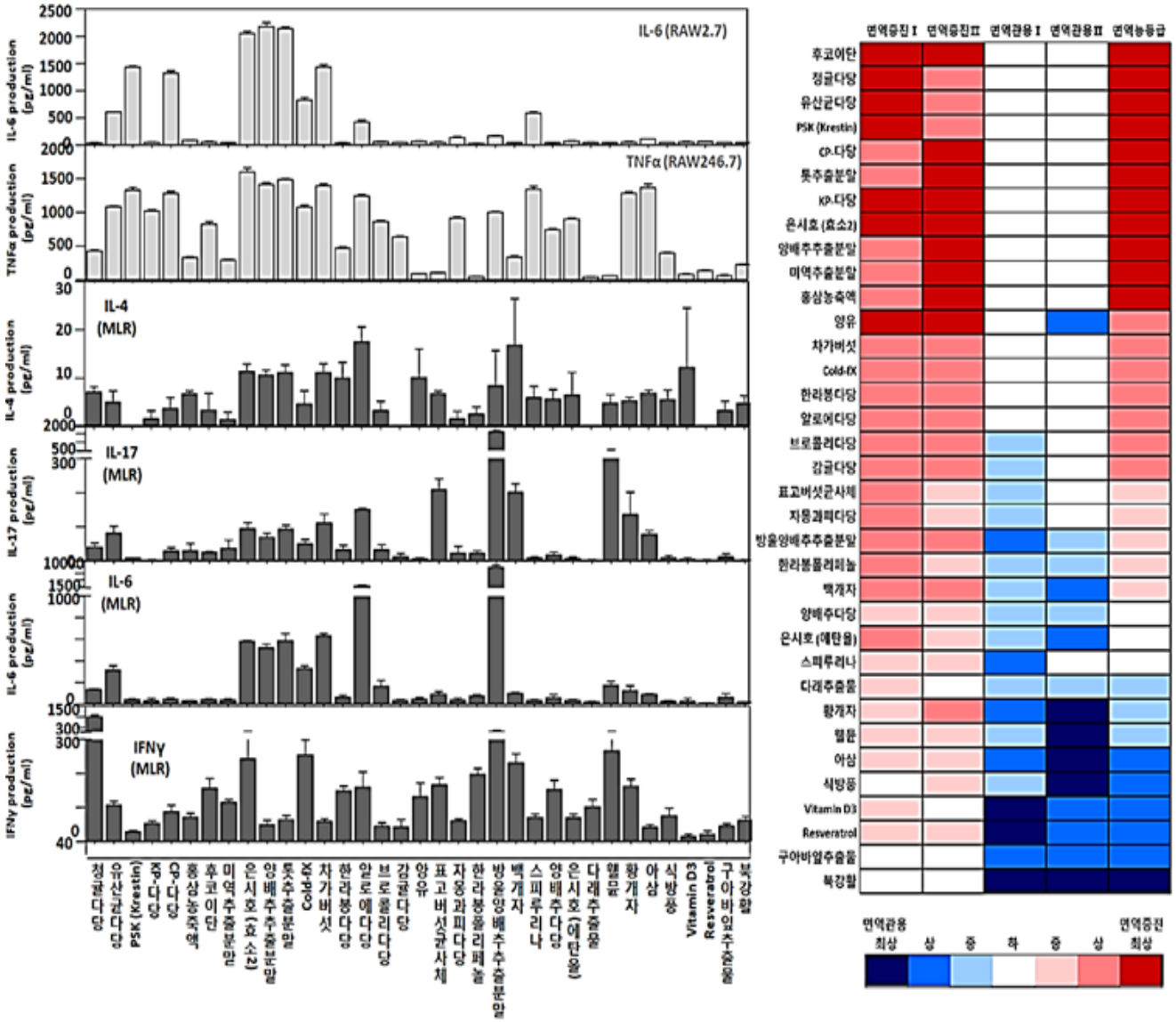


그림3.22 개발 면역식품소재 싸이토카인 생성능 평가

- 상기의 분석결과 개발된 시험관 시험법에 의해 도출된 BMDC Immunogenic Index I/II와 Tolerogenic Index I/II에 따라 immunogenic한 경향과 tolerogenic한 경향의 기준으로의서 효능 구분 및 등급화와 싸이토카인 측정결과와 경향성이 유사하였다.

- 싸이토카인이 면역계의 조절 작용에 큰 역할을 하며, 림프구들의 성장, 분화, 활성화에 결정적이지만, 싸이토카인들의 수치를 측정함으로써 면역소재의 면역력에 대한 정확한 평가가 가능하다.

- 하지만 이러한 싸이토카인은 면역학상의 작용물에 대한 면역반응과 무감각간의 균형을 유지하는데 근본적인 요소임을 이해함으로써, 비정상적인 면역반응에 의해 발생하는 질병칠에 탁월한 해결책이기 때문에, 싸이토카인 투여량 또는 in vitro 상에서 싸이토카인들의 표적이 된 세포들의 종류에 따라 T 세포의 면역관용 현상을 유도하기도 하고, 이와는 상반되게 오히려 특정 면역세포들의 기능을 활성화 시키기도 하였다.

- 이와 같은 현상은 면역식품(소재) 싸이토카인 측정에서도 관찰되기도 하였다. 다시 말해, 면역관용 소재에서 친염증성 싸이토카인인 TNF-α의 높은 수치가 관찰되기도 한다는 것이다.

- 이는 표적이 되는 세포의 종류 및 사이토카인의 작용 시점에 따라 각 사이토카인에 대한 수용체의 발현량이 다르거나, 한 수용체의 하위에 있는 신호 전달계가 표적 세포마다 다르기 때문에 나타나는 현상으로 추측해 볼 수 있다.

- 따라서 본 실험에서 측정한 싸이토카인을 통한 면역평가 시 면역반응에 영향을 미치는 다른 기전들에 대한 보다 세부적인 이해가 있어야 면역능 평가가 가능할 것이다.

- 개발된 면역능 평가는 면역능의 구분은 immunogenic index와 tolerogenic index으로 구분을 하고 각 index별 최상/상/중/하로 나누어 등급화 하는 가이드를 선정하였으며, 이를 싸이토카인 측정법과 결과 비교를 통해 타당성을 확인하였으며, 복잡한 작용을 하는 싸이토카인의 세부적인 이해가 있어야 면역능 평가가 가능하지만, 개발된 면역능 평가는 쉽게 이해 할 수 있는 면역능 평가 가이드를 제시할 수 있으며, 비교 시험을 통해 구분된 면역능의 일치성과 효능평가 결과의 상관성에 대한 비교를 통해 타당성을 확인할 수 있었다.

(3) 소재에 대한 기술수준진단 기준 제시

- 기술수준진단은 건강기능식품 신청 소재에 대한 개발 면역능 평가법의 수준을 진단하는 것으로, 건강기능식품의 개발과 인·허가를 위해 필요한 면역능 효과, 소재의 immunogenic한 경향과 tolerogenic한 경향기능성, 안전성, 기준규격을 제시하고 면역 건강기능식품의 개발 기능성 소재의 과학적 근거를 확보할 수 있는 객관적이고 합리적 연구 방향을 제시하는 것이 목적이다.

(가) 원료표준화 및 기준규격

- 연구·개발 중인 원료의 제조방법이 식품으로서 타당한 제조과정을 갖추었는가, 제조과정 중의 표준화를 목적으로 기능성분 또는 지표성분의 최적 효능농도선정

(나) 안전성 자료

- 독성 평가 및 효능 농도에 따라 섭취근거자료, 독성시험자료, 일일 섭취량의 근거, 기타 안전성과 관련된 DB에서의 자료 확보 여부를 점검

(다) 기능성 자료

- 제안한 기능성이 건강기능식품으로 적합한지와 이에 대한 과학적인 근거자료인 시험관 시험, 동물실험, 인체적용실험의 확보여부와 이를 통한 제안 섭취량의 설정 여부를 점검

(라) 면역능 평가 등급

- 기술수준진단표에 의해 기술수준단계가 구분되며, 최상/상/중/하로 나눠진다.

- 건강기능식품은 안전성에 초점이 맞춰진 일반식품과 달리 원료에 대한 기능성을 확인할 수 있어야 한다. 그러나 기능성을 확인하였다고 해서 바로 제품으로 만들 수 있는 것은 아니다. 기능성을 나타내는 물질을 얼마나 섭취하였을 때 기능성도 나타나고 인체에도 안전한지를 알아야 한다. 따라서 기능성 원료가 항상 일정한 기능성을 나타낼 수 있도록 생산되는지 확인할 수 있는 마커가 있어야 한다. 건강기능식품에서는 그 마커를 기능성분 또는 지표성분이라고 부르며 제품의 표준화를 확인하기 위하여 반드시 설정하여 관리해야 한다.

3.9 평가를 통한 BC (Benefit-Cost analysis) 도출

- 넓은 의미의 BC (Benefit-Cost analysis) 비용/편익분석은 경쟁적인 공공투자 기회의 긍정적인 효과와 부정적인 효과를 체계적으로 평가하고 가능한 이들을 계량화하여 대안의 비교평가에 명시적으로 포함시키는 일련의 방법론을 지칭한다.

- 개발된 평가법에 따라 기존 평가법을 개선시키고 이로부터 비용 절감과 긍정적 효과를 편익이라고 한다. 즉 개발된 평가법에 따른 편익이란, 크게 두 갈래인 면역증진 식품과 알레르기 개선 식품 혹 과대면역개선 식품 가운데 어느 그룹에 속하는지를 판별하게 되고, 수지상세포를 통한 T helper 발달의 방향성을 조사함으로써 구체적인 후천면역 방향성을 판별하여 동물모델이나 임상시험 디자인에 가이드라인을 제공함으로써 개발 시간 단축 및 비용 절감 효과를 통하여 경제적 이익을 기대할 수 있다.

가. 개발 면역능 검사법 영향 분석

(1) 개발 면역능 검사법 필요성

- 기존 검사법에 대한 단점에 대한 개선 방안 필요
- 면역기능 검사법 및 검사과정 표준화, 면역기능 검사치의 수량화 및 등급화
- 면역능 검사 동물모델 구축 및 시험관내 검사법의 유효성 검증
- 면역능 평가 시스템 개발 및 민간보급 프로세스 구축

(2) 개발 면역능 검사법 에 따른 예상편익 추정

- 기존 평가법 비교를 통한 타당성 확보
- 개발법의 도입으로 인해 추가적인 비용은 발생하지 않으며, 오히려 비용 절감 및 검사 시간 감소 등 추가적인 편익이 발생
- 우수소재 데이터베이스 활용을 통한 우수식품소재 수집에 의한 기능적, 경제적 가이드 선정 기반 자료 제공을 통한 면역 식품소재 발굴 및 산업화를 위한 평가 및 가이드 제시
- 표준화된 시험관내 면역능 검사법 제시 및 민간보급 프로세스 개발
- 따라서 본 개발법은 검사법 및 경제적 타당성을 확보하고 있으므로 경제적 효율성을 고려할 때 시행될 필요가 있음

나. 식약처에서 가이드 면역 평가법과 비교를 통한 BC (Benefit-Cost analysis)

(1) 사전 비용편익분석 개요

구 분	내 용	
대 안	수지상세포기반 시험관내 및 동물실험 검사법에 의한 면역기능평가	
항 목	면역능 평가	
비용편익항목	비 용	편 익
	1. 평가 실험 비용 2. 평가 방법 및 기간비용 3. 평가 항목에 따른 비용	1. 기존 평가법 대비 비용 절감 -면역증가, 면역관용 동시 측정 2. 기존 평가법 대비 기간 단축 -평가방법 단일화로 기간 단축 3. 면역증진, 면역관용 평가편익 -평가로 면역능 방향 제시

(2) 비용편익분석

		기존 평가법(싸이토카인 측정)	개발 면역능 평가법
평가시간	비용산정	• **실험시간 계산 (총 6시간)** - Staining : 5시간(반응시간 총 4시간) - ELISA reader 분석 : 1시간	• **실험시간 계산 (총 4시간)** - Staining : 2시간(반응시간 총 1시간) - Flow cytomer 분석 : 2시간
	편익산정	• 면역기능 증진 및 과민면역반응 완화 바이오마커로 사용가능 하지만 유형에 따른 바이오마커가 다양하여 면역능 방향성 평가에 있어 많은 시간 필요함	• 실험시간 계산 시 **기존 평가법 대비 40% 감소** • 면역기능 증진 및 과민면역반응 완화 바이오마커로 사용가능 하고 Flow cytometer 분석을 통해 면역능 방향성 동시 분석 가능하여 시간 감소
평가비용	비용산정	• **분석 싸이토카인 종류** - 면역증진 싸이토카인 : IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α, IFN-α, IFN-β 등 다양 - 면역관용 싸이토카인 : IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TGF-β등 다양 ※자세한 비용은 아래 분석비용 첨부	• **분석 안티바디 종류 : 7종** - PD-L2, PD-L1, MHCⅡ, CD80, CD11c, CD11b, CD40 발현정도 측정을 통하여 면역능 평가 • **기존 평가법 대비 분석비용 60% 감소** ※자세한 비용은 아래 분석비용 첨부
	편익산정	• Kit 비용이 높고 일회성 실험으로 반복 실험이 필요한 평가법으론 비용이 많이 필요함 • 각 다양한 싸이토카인 기전들의 세부작용 이해를 통한 면역능 평가가 가능 - 면역증진, 면역관용에 따른 다양한 싸이토카인 측정이 필요함에 따른 비용 증가	• 지상세포의 보조자극인자 및 억제인자의 발현 정도를 유세포분석법을 이용하여 측정결과에 따른 면역증진, 면역관용 평가 **- 면역증진, 면역관용 동시 평가 가능함 이에 따른 비용 절감** • 안티바디 사용으로 **반복실험 가능에 따른 비용 절감으로 평가법으로 적정**

(3) 분석 비용 비교

- 기존 면역능 평가법(싸이토카인 측정)

회사	내용	규격	금액(원)
Enzo, ALX-620-056-M001	DAF-2 DA for NO detection	kit	810,700
R&D Systems, DY410	Mouse TNF-aELISA	kit	974,600
R&D Systems, DY401	Mouse IL-1b ELISA	kit	974,600
BD OptEIA™, 555240	Mouse IL-6 ELISA	kit	665,500
BD OptEIA™, 555252	Mouse IL-10 ELISA	kit	665,500
R&D Systems, DY1679	Mouse TGF-b ELISA	kit	974,600
합계		5,065,500 원	

- 개발 면역능 평가법

회사	내용	규격	금액(원)
BD, 562846	BD HorizonTMBV421 Rat Anti-mouse CD40 (Clone : 3/23)	50ug /EA	226,600
e-bioscience, 25-0801-82	Anti-mouse CD80 PE-Cyanine7 (clone : 16-10A1)	100ug /EA	378,400
BD, 558091	PE, Rat, Anti-Mouse, CD274, MIH5, RUO	0.1mg /EA	231,000
e-bioscience, 11-9972-81	Anti-mouse CD273 (B7-DC) FITC (Clone : 122)	500ug /ml	148,500
biolegend, 107623	PerCP anti-mouse I-A/I-E Antibody	25ug /EA	144,100
TONBO, 20-0114-U100	APC Anti-mouse CD11c (N418)	100ug /EA	216,700
biolegend, 101226	APC/Cy7 anti-mouse/human CD11b	100ug /EA	310,200
Invitrogen™, L34966	LIVE/DEAD FIX AQUA-400 1Kit	400 assay	489,500
합계		2,145,000 원	

다. 우수 효능 소재의 기존 면역 건강기능식품 원료들 간의 경제성 비교

(1) 건강기능식품 기능성 원료의 인정 현황 2016. 12 식품의약안전처

① 건강기능식품

건강기능식품이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조한(가공을 포함한다) 식품을 의미한다.

② 기능성

인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.

건강기능식품의 기능성은 다음과 같이 분류하고 있다.

기능성 구분	기능성 내용
질병발생 위험감소 기능	질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용

③ 기능성을 가진 원료나 성분

식약처장이 고시하거나 별도로 인정하는 것으로 나눌 수 있다.
1. 식약처장이 고시한 원료 또는 성분 (고시 원료)
2. 식약처장이 별도로 인정한 원료 또는 성분 (개별인정 원료)

④ 기능성별 원료 인정 현황

13년간 면역기능개선 기능성 원료 17건 인정으로 최근 높은 관심과 연구가 진행되고 있다.

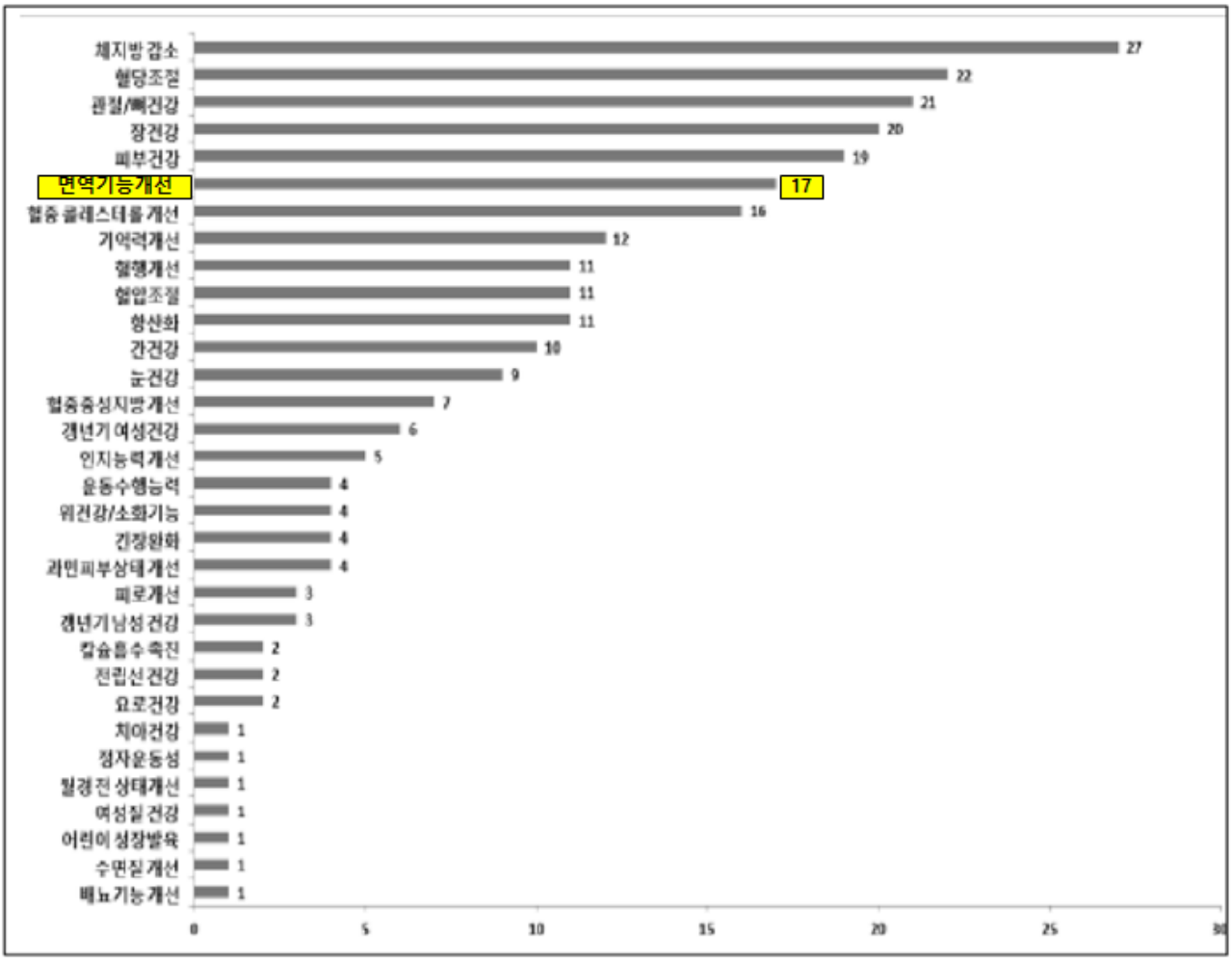


그림3.23 3년간(’04-’16) 기능성별 원료 인정 현황

(가) **면역력 증진에 도움**

원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
당귀혼합추출물	제2006-17호	생리활성기능 2등급	1.nodakenin 2.paeoniflorin 3.chlorogenicacid	당귀혼합 추출물로서 20~40g/일	1.임신부,수유여성,월경불순이나 출혈성 질환이 있는 경우 의사와 상담 2.6세미만소아섭취삼가 3.천궁,백작약은섭취시발열및 알러지를 유발할 수 있으므로 주의
Enteroccus faecalis 가열처리건조분말	제2006-23호	생리활성기능 3등급	1.Enterococcus faecalisFK-23 사균체 2.Cis-백센산	-	-
L-글루타민	제2007-1호	생리활성기능 2등급	L-글루타민	L-글루타민 으로서 3~5g/일	1.Methotrexate,anticonvulsants, lactulose의 효과를 경감시킬 우려가 있음 2.MSG에 민감한 사람 섭취주의 3.신장 및 간질환이 있는 환자섭취주의 4.임산부, 수유부는 의사 처방 없이는 섭취 삼가
	제2008-7호				
게르마늄효모	제2007-15호	생리활성기능 3등급	게르마늄	게란티바이오-Ge효모로서 1.2 g/일	임산부, 수유여성 및 12세 이하 어린이는 섭취에 주의
금사상황버섯	제2008-32호	생리활성기능 2등급	베타글루칸	금사상황버섯 추출물로서 3.3g/일	-
표고버섯 균사체	제2006-5호	생리활성기능 3등급	α-1,4 glucan	표고버섯 균사체로서 3.3g/일	-
	제2008-32호		α-glucan		
	제2008-78호	생리활성기능 2등급			
스피루리나	제2010-4호	생리활성기능 3등급	총 엽록소	스피루리나로서 62~72mg/일	-
글로렐라 (고시된원료로 전환)	제2010-52호	생리활성기능 2등급	총 엽록소	총엽록소로서 125mg/일	-
청국장균 배양 정제물	제2012-25호	생리활성기능 2등급	폴리감마글루탐산 칼륨	폴리감마글루탐산칼륨으로서 1,000mg/일	어린이, 임신 또는 수유중인여성은 섭취에 주의
동충하초 주정 추출물	제2013-16호	생리활성기능 2등급	Cordycepin	동충하초 주정추출물로서 1.5g/일	-
효모베타 글루칸	제2013-34호	생리활성기능 2등급	베타글루칸	효모베타글루칸 으로서 250mg/일	-
인삼다당체 추출물	제2015-11호	생리활성기능 2등급	Galactose와 Arabinose의합, 진세노사이드Rg1과 Rb1의 합, 인삼성분 확인	인삼다당체추출물로서6g/일	1.특이체질 또는 알레르기체질인 경우에는 성분을 확인한 후 섭취 2.의약품(당뇨치료제, 혈액항응고제) 복용 시 섭취에 주의

(나) 과민면역반응 개선에 도움

원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
Enterococcus faecalis 가열처리 건조분말	제2008호-31호	생리활성기능 2등급	Vaccenic acid	Enterococcus faecalisFK-23호소 및 가열처리건조분말로서1g/일	임산부, 수유 여성 섭취 삼가
구아바잎 추출물등 복합물	제2009-16호	생리활성기능 2등급	1.Ellagicacid 2.EGCG 3.Gallicacid	구아바잎 추출물 등 복합물로서 800mg/일	-
다래추출물	제2009-18호	생리활성기능 2등급	1.Quinicacid 2.Citricacid	다래추출물로서 2g/일	임산부, 수유기 여성은 섭취 전 의사와 상담
	제2009-58호			액상다래추출물로서1.4~1.7g/일	
피카오프레토 분말등복합물	제2010-28호	생리활성기능 2등급	1.TotalPolyphenol 2.VitC 3.Chlorogenicacid 4.Cinnamicacid	신청원료 중 아세로라 농축물, 계피추출물, 피카오프레토 분말3종 혼합물로서 1,350mg/일	임산부, 수유부, 어린이 섭취 주의
소엽추출물	제2010-48호	생리활성기능 3등급	Rosmarinic acid	-	-
합성 PLAG	제2013-35호	생리활성기능 3등급	1-palmitoly-2-linoleoyl-3-acetylrac-glycerol	합성PLAG로서 1g/일	1.장기간(6개울이상)섭취시주의 2.어린이, 임산부, 수유부 및 기임 여성은 섭취 삼가 3.위장 장애가 발생할 수 있으므로 주의

(다) 식약처장이 별도로 인정한 원료 또는 성분

면역기능 개 선	면역력 증진에 도움 (12종)	L-글루타민, 게르마늄효모, 금사상황버섯, 동충하초주정추출물, Enterococcusfaecalis 가열처리건조분말, 당귀혼합추출물, 스피루리나, 글로렐라, 표고버섯균사체, 청국장균배양정제물(폴리감마글루탐산칼륨), 효모베타글루칸, 인삼다당체추출
	과민면역반응 완화에 도움 (6종)	Enterococcusfaecalis 가열처리건조분말, 구아바잎추출물등복합물, 다래추출물, 소엽추출물, 피카로프레토분말등복합물, 합성PLAG

(라) 건강기능식품 기능성 원료의 인정 현황 : 기능성 원료

원료	기능성 내용	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
인삼	면역력증진, 피로개선에 도움을 줄 수 있음	진세노사이드 Rg1과Rb1의합	Rg1과 Rb1 합계로서 3~80mg	의약품 (당뇨치료제, 혈액항응고제) 복용 시 섭취에 주의
홍삼	면역력증진, 피로개선, 혈소판 응집억제를 통한 혈액흐름, 기억력개선, 항산화에 도움을 줄 수 있음	진세노사이드 Rg1과Rb1및 Rg3의합	Rg1과 Rb1 및 Rg3의 합으로서 1) 3~80mg (면역력증진, 피로개선) 2) 2.4~80mg (혈액흐름, 항산화, 기억력개선)	의약품 (당뇨치료제, 혈액항응고제) 복용 시 섭취에 주의
클로렐라	피부건강, 항산화, 면역력 증진에 도움을 줄 수 있음	총 엽록소	총 엽록소로서 1) 8~150mg (피부건강, 항산화) 2) 125~150mg (면역력증진)	-
알콕시글리세롤 함유상어간유	면역력 증진에 도움을 줄 수 있음	알콕시글리세롤	알콕시글리세롤로서 0.6~2.7g	-
알로에겔	피부건강, 장건강, 면역력 증진에 도움을 줄 수 있음	고형분 중 총 다당체	총 다당체 함량으로서 100~420mg	-
상활버섯추출물	면역기능개선에 도움을 줄 수 있음 (17.7.1 부터 시행)	베타글루칸	상황버섯추출물로서 3.3g (베타글루칸으로서 287.1~534.6mg)	-

(마) 건강기능식품 제품 분석

제품명	주요성분	주된 기능성	가격
BYO 피부생유산균 CJLP133	과채유래유산균 (L.plantarum CJLP133)	1. 면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음 (생리활성기능2등급) 2. 유산균증식 및 유해균억제, 배변활동원활에 도움을 줄 수 있음 <임상실험> 12개월에서 13세사이의 소아에서 L.plantarumCJLP133을 1일2회 12주 진행. 아토피성피부염(SCORAD) 점수, 호산구수, 혈청 총 IgE 및 싸이토카인의 SCOring을 평가 시 가려움과 SCORAD 점수개선 및 총 호산구수 및 IFN-γ, IL-4는 유의하게 감소	30포 45,000원 1포 1,500원 <권장섭취> 1일 2포 1일 3,000원
정관장 홍삼정	홍삼농축액 (6년근, 고형분64%) 1일 기준 진세노사이드 Rg1+Rb1+Rg 316.5mg	1.면역력증진, 2. 피로개선, 3. 혈소판 응집 억제를 통한 혈액흐름 완활, 4.기억력개선, 5. 항산화에 도움을 줄 수 있음 - 1, 2효능 : 지금까지 발표된 홍삼관련 연구 자료를 바탕으로 식약청에서 인정	120g 102,000원 <권장섭취> 1일 3g 1일 2550원
알렉스아이	액상다래추출물 (PG102)	면역과민반응 개선에 도움을 줄 수 있음 (생리활성기능2등급) <임상실험> 100명의 혈중 총 IgE가 300 IU/ml 이상인 자를 대상으로 임상시험을 진행. PG102(다래추출물)가 혈중 총 IgE, ECP, eotaxin 농도 및 혈중 호산구 수치를 통계적으로 유의하게 감소시키는 것으로 확인	30포 52,000원 1포 1700원 <권장섭취> 1일 2포 1일 3,400원
고려인삼공사 후코이단-100	후코이단 추출분말 100%	면역체계의 주요인자인 NK세포를 활성화시키고, 면역전달물질을 생성	30포 150,000원 1포 5,000원 <권장섭취> 1일 6포 1일 30,000원
종근당 그린스피루리나	스피루리나(미국산), 산화마그네슘, 건조효모 (미국산, 셀렌), 산화아연, 비타민D_3 혼합제제분말	[엽록소함유식물제품] ①피부건강에 도움을 줄 수 있음 ②항산화에 도움을 줄 수 있음 [마그네슘] ①에너지이용에 필요 ②신경과 근육기능 유지에 필요 [아연] ①정상적인 면역기능에 필요 ②정상적인 세포분열에 필요 [비타민D] ①칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요 ②뼈의 형성과 유지에 필요 ③골다공증발생 위험 감소에 도움을 줌 [셀레늄(또는 셀렌)] ①유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요	120정 16,900원 <권장섭취> 1일 4정 1일 570원
안국건강 코박사	구아바잎 추출물 등 복합물 폴리페놀 Ellagicacid2.5mg EGCG100mg Gallicacid2,2mg	과민반응에 의한 코 상태(코 가려움, 재채기, 콧물) 개선에 도움을 줄 수 있음 (생리활성기능2등급)	120정 45,000원 <권장섭취> 1일 4정 1일 1,500원
㈜케이씨에프 코리아 표고버섯균사체 AHCC	표고버섯균사체 AHCC (Active Hexose Correlated Compund) 주성분아 세일화 알파글루칸	면역기능증진에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능2등급) 표고버섯균사체 AHCC는 신체방어능력 향상에 도움이 될 수 있으나 인체시험을 통한 확인이 필요	60포 280,000원 1포 4,700원 <권장섭취> 1일 2포 9,400원

(3) 사업화 선정 대상에 대한 평가

- 2차년도 기능성 원료로의 우수 사업화 대상 선정을 위한 생산 가능성, 경제성 검토 개발 원료와 기존 원료들간의 경제성 비교한 우수 사업화 대상을 기존 건강기능식품 원료들 간의 경제성 비교 한 결과 사용되는 원료의 안전성, 제조법과 투입 부원료에 대한 안전성, 면역능, 그리고 산업화 경제성을 고려해 볼 때 시험관 실험 및 동물실험에서 높은 효능을 입증하여 산업화 가능성과 개별인정형 건강기능식품 원료로서의 개발 가능성이 높다고 평가하고 있다.

클레임	원료명	기능성분	일일섭취량	단가	규격
면역증진	한라봉 다당	다당체	인체적용 섭취량 100mg/일	500,000원/kg당 -> 50원/일	60%
	청귤 다당	다당체	인체적용 섭취량 100mg/일	200,000원/kg당 -> 20원/일	60%
	유산균 다당	다당체	인체적용 섭취량 4mg/일	108,000원/g당 ->440 원/일	100%
	케일박 다당	다당체	인체적용 섭취량 24~48mg/일	400,000원/kg당 -> 10~20원/일	25~30% / 10~25kDa
	당근박 다당	다당체	인체적용 섭취량 24~48mg/일	200,000원/kg당 -> 5~10원/일	25~30% / 10~25kDa
면역관용	브로콜리 추출물	추출물	인체적용 섭취량 100mg/일	300,000원/kg당 -> 8~15원/일	60%

그림3.24 사업화 선정 우수 면역소재에 대한 개발 면역능 평가 등급

라. 민간보급 면역능 평가시스템 구축

(1) 시스템 개발의 배경 및 목적

(가) 시스템 개발의 배경

- 사회가 고령화되면서 많은 면역기능 문제가 대두되고 면역력 저하로 인한 감염성 질환에 노출되는 상황에서 면역능 조절 의약품 개발에 많은 시간과 비용이 투자되고 있는 실정이다
- 다양한 면역세포들의 특이적 기능들과 소통인자인 싸이토카인, 염증성 매개물질등의 매개인자들에 의한 소통들로 이루어진 인체의 면역체계는 면역식품(소재)로부터 영향을 받아 그 면역기능이 변화될 수 있어 면역기능 증진 및 과민반응 완화에 면역식품(소재)를 발굴해야 할 필요성이 있다
- 현재 학계에서 면역기능 향상에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있고 국내 식품시장에서 면역력 향상에 대한 기능성 식품의 수요가 증가함에 따라 객관적으로 면역기능 식품의 기준을 설정해야할 필요성이 대두된다
- MERS와 같은 감염성 질병이 증가한다고 보고되는 실정에서 면역력 증강에 대한 관심이 고조되고 있어 근거가 부족한 제품이 무분별하게 개발될 가능성이 농후하여 표준화된 검사법의 필요성이 절실하다

(나) 시스템 개발의 목표

- 면역능 평가 시스템 개발 및 민간보급 프로세스 구축
- 안드로이드폰 및 애플폰을 통해 접근 가능한 앱을 만들고 연구내용을 담고 있는 웹페이지를 개발
- 본 기술은 식품 소재의 면역효과의 특성과 강도에 대한 합리적인 평가방법 및 면역기능 소재의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 수지상세포를 이용하여 면역소재의 면역증진 혹 면역개선 효과 평가기술 및 면역기능 소재의 스크리닝 기술에 관한 것

(2) 시스템 개발 상세

(가) 개발환경

- 안드로이드폰과 애플폰 모두를 지원 가능하도록 구성하기 위해 WebApp 형태로 개발
- 웹 페이지 개발을 위해 웹서버를 구축
- 시스템 개발 언어는 JAVA를 활용
- 개발환경의 상세 내용은 아래와 같음

구분	내용	부가정보
개발 언어	JAVA	작 업 툴 IntelliJ
웹 서버	Tomcat	버 전 7.0.39
앱 형태	WebAPP	하이브리드
안드로이드 테스트 기기	Samsung Galaxy S7	회사 보유
애플폰 테스트 기기	iPhone 6S	회사 보유
이미지 툴	Adobe illustrator	cs 6

(3) 면역능 평가시스템 웹 부문 개발

○ 서비스 Layout

연구결과에 대한 내용 위주의 서비스 제공을 위해 서비스 타이틀 부분과 콘텐츠부분, 하단의 네비게이션 부분으로 화면 Loyout을 정의함.

초기화면에는 타이틀 부분과 연구결과의 목록을 출력하고, 콘텐츠 화면에서는 타이틀과 연구내용(콘텐츠), 하단에 네비게이션을 적용함.

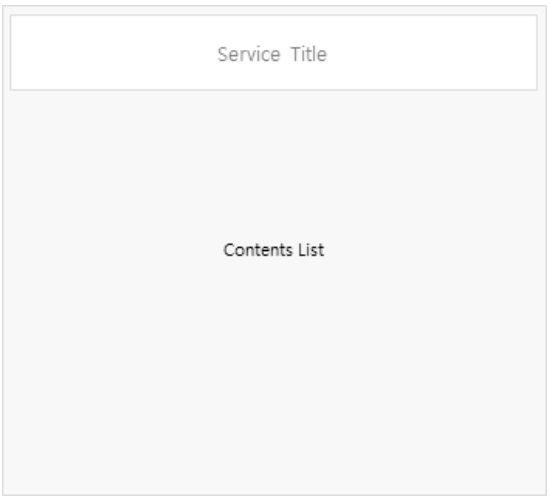


그림 3.25 초기화면 Grid

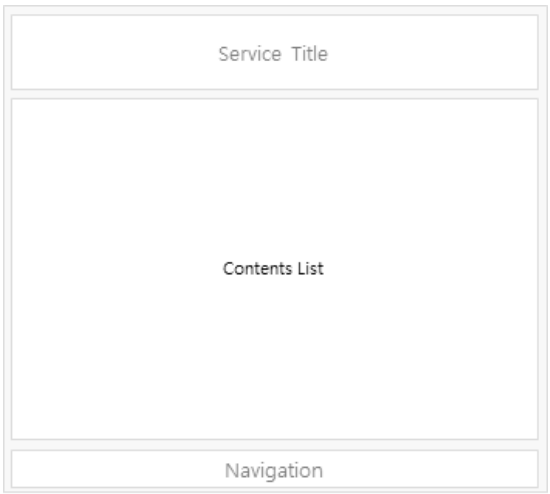


그림 3.26 콘텐츠 화면 Grid

○ 네비게이션

초기화면의 네비게이션은 3부분, 콘텐츠 화면에서의 네비게이션은 5개의 부분으로 구성함.

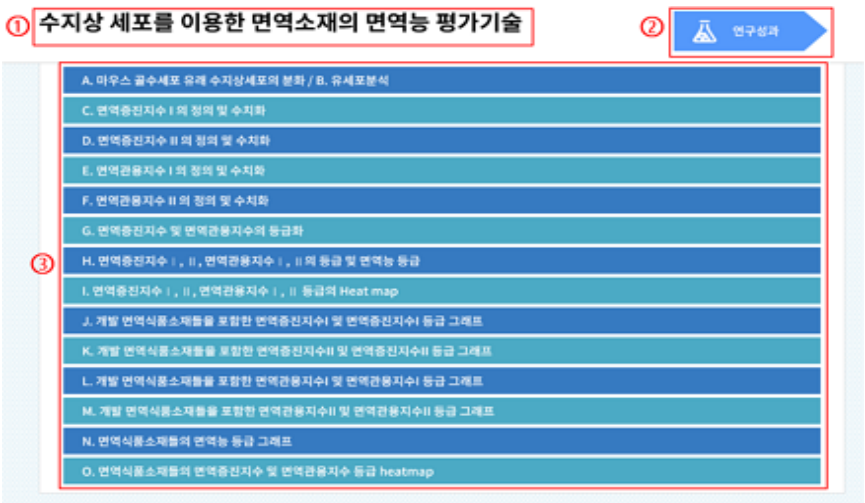


그림 3.27 초기화면 네비게이션 구성

① 기술개발의 배경 설명 화면으로 이동

② 연구 성과 목록(위 그림 3 화면)으로 이동

③ 각 연구성과 내용 화면으로 이동

○ 서비스 접속 URL

http://61.250.224.151/immunity/main.html

그림 3.28 콘텐츠 화면 네비게이션 구성

① 기술개발의 배경 설명 화면으로 이동
② 연구 성과 목록(위 그림 3 화면)으로 이동
③ 현재 보고 있는 연구성과 내용 이전 연구성과 화면으로 이동
④ 연구 성과 목록(위 그림 3 화면)으로 이동
⑤ 현재 보고 있는 연구성과 내용 다음 연구성과 화면으로 이동

○ 초기화면

그림 3.29 초기화면

○ 수지상 세포를 이용한 면역소재의 면역능 평가기술 소개 화면

그림 3.30 평가 기술 소개 화면

○ 연구성과 내용 화면

그림 3.31 연구성과 내용 화면 A, B

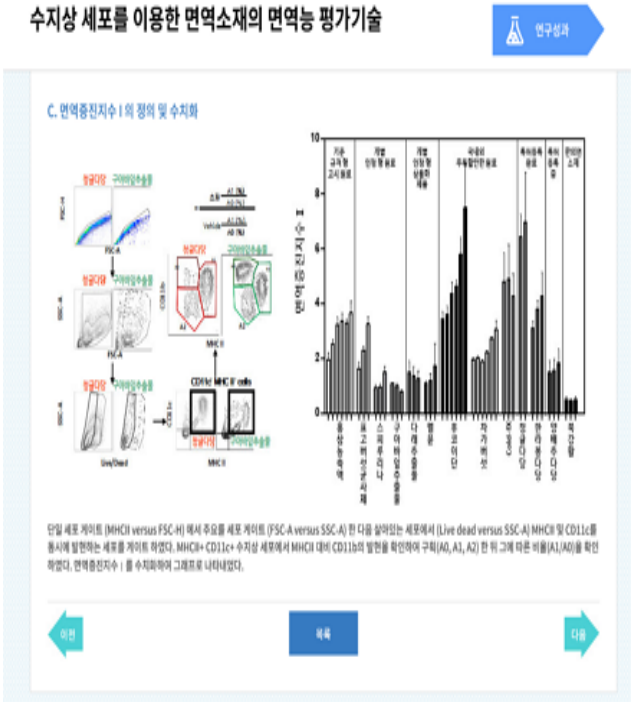


그림 3.32 연구성과 내용 화면 C

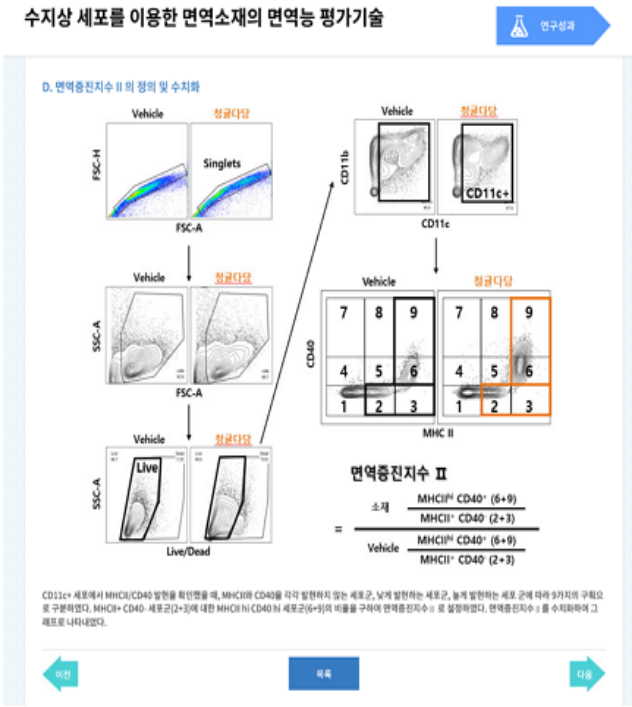


그림 3.33 연구성과 내용 화면 D

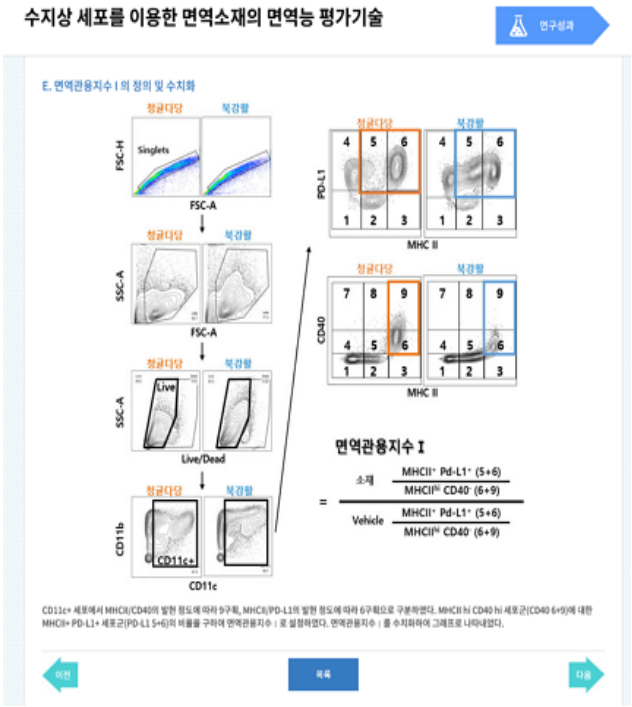


그림 3.34 연구성과 내용 화면 E

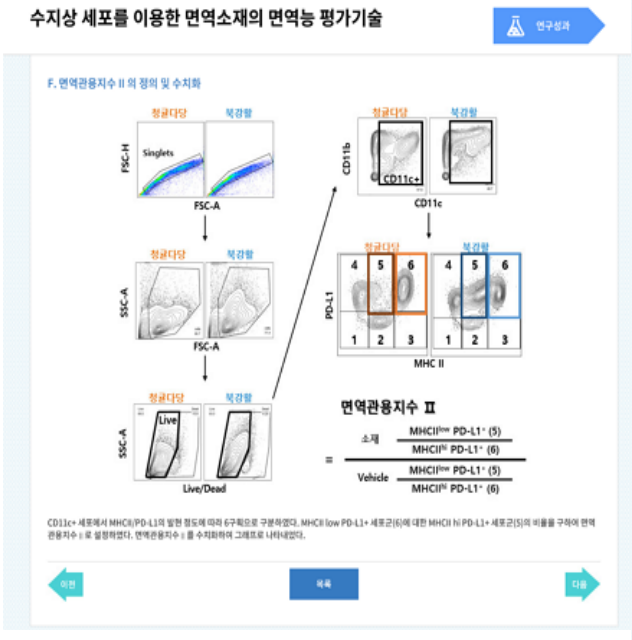


그림 3.35 연구성과 내용 화면 F >

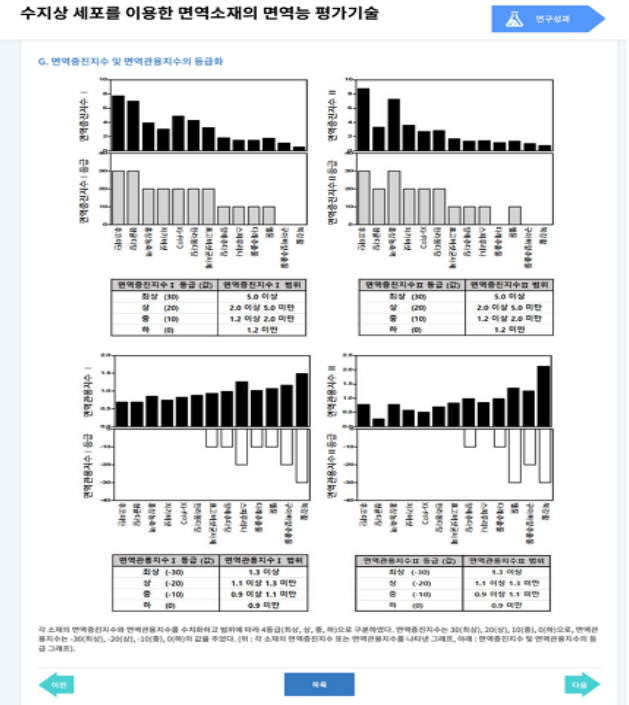


그림 3.36 연구성과 내용 화면 G

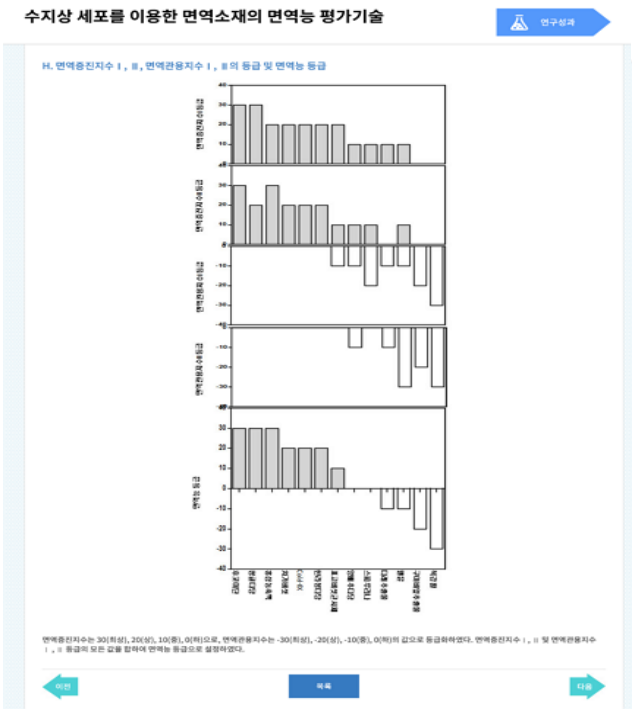


그림 3.37 연구성과 내용 화면 H

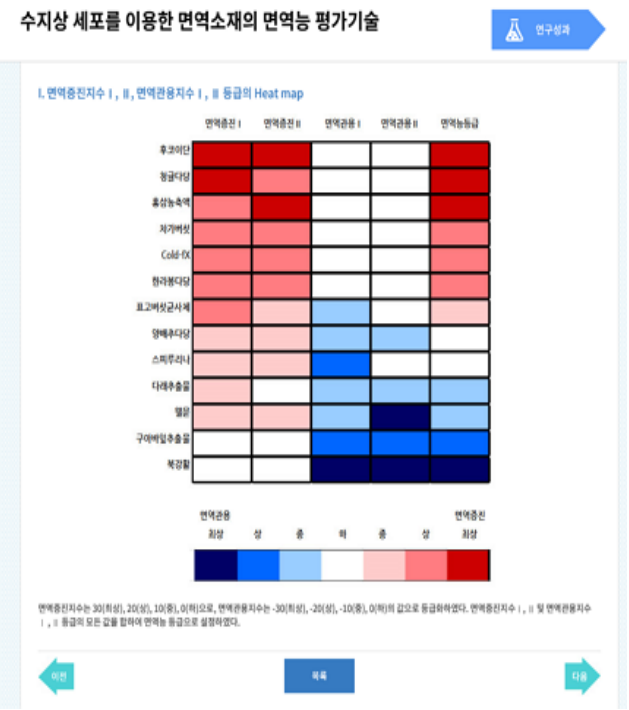


그림 3.38 연구성과 내용 화면 I

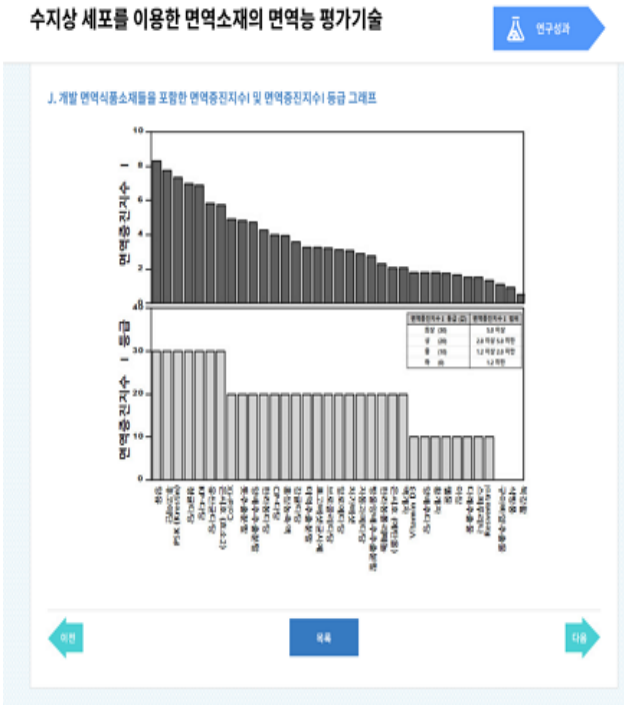


그림 3.39 연구성과 내용 화면 J

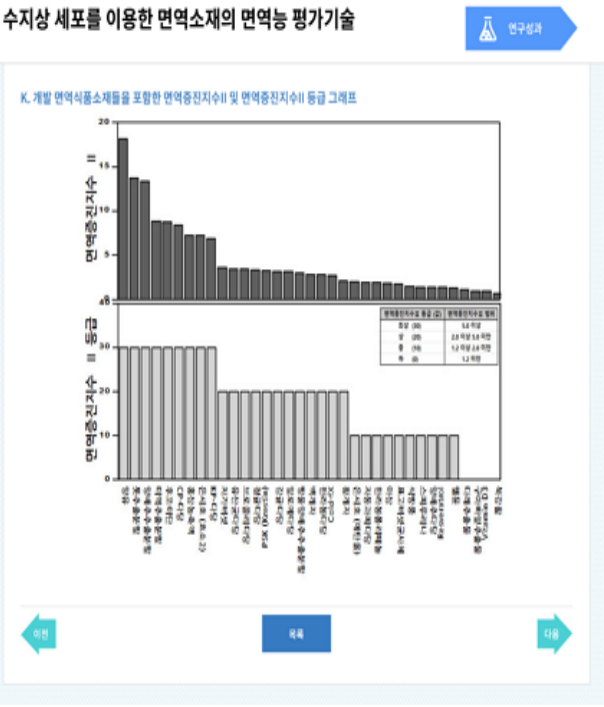


그림 3.40 연구성과 내용 화면 K

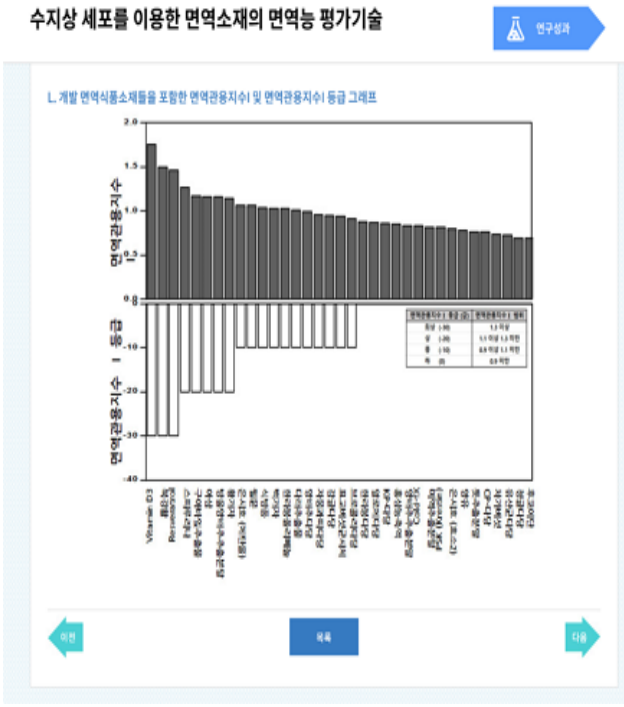


그림 3.41 연구성과 내용 화면 L

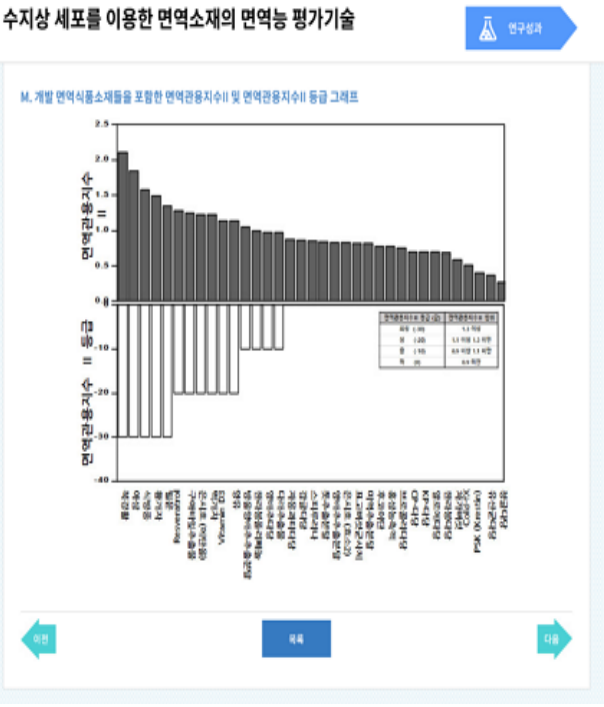


그림 3.42 연구성과 내용 화면 M

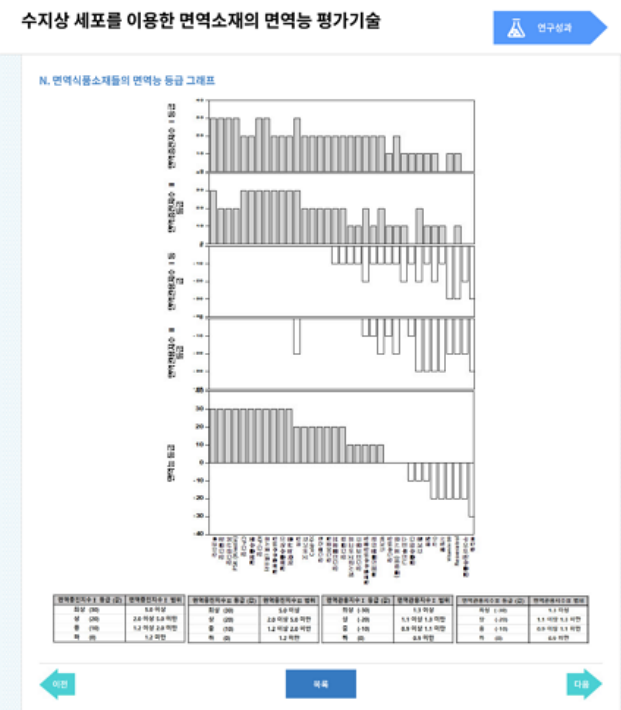


그림 3.43 연구성과 내용 화면 N >

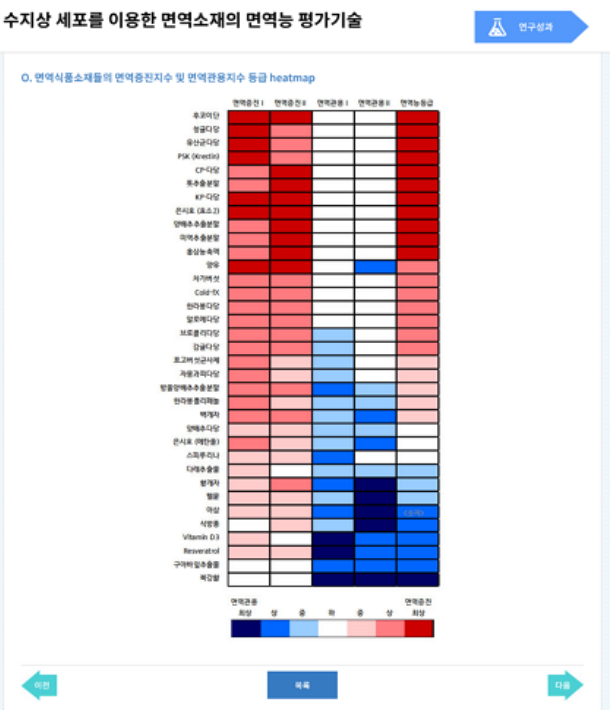
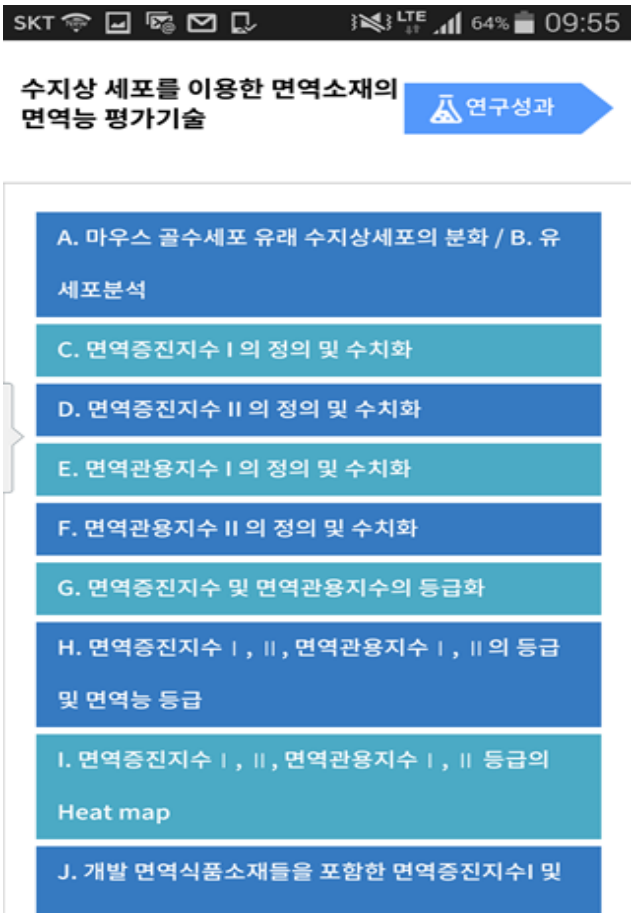
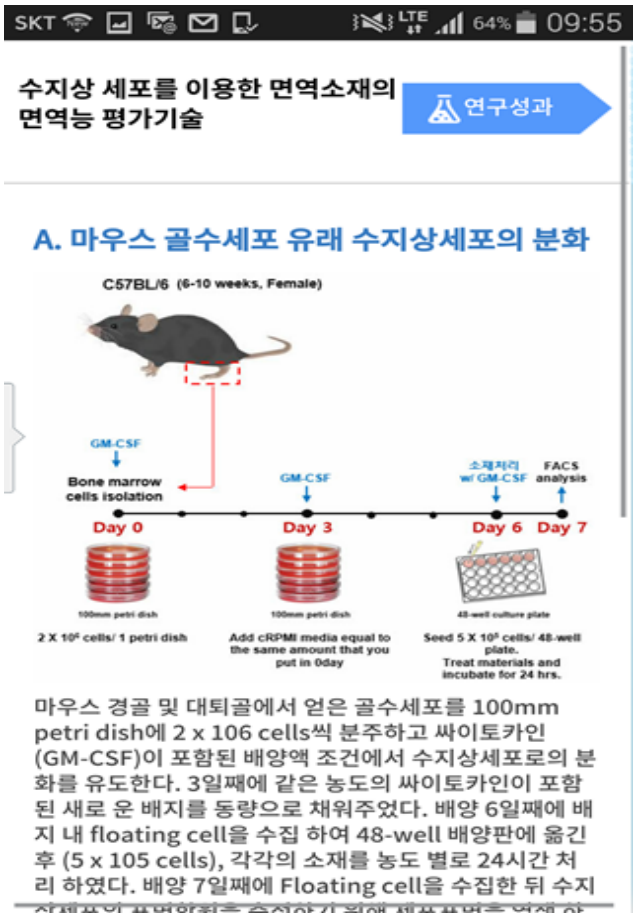
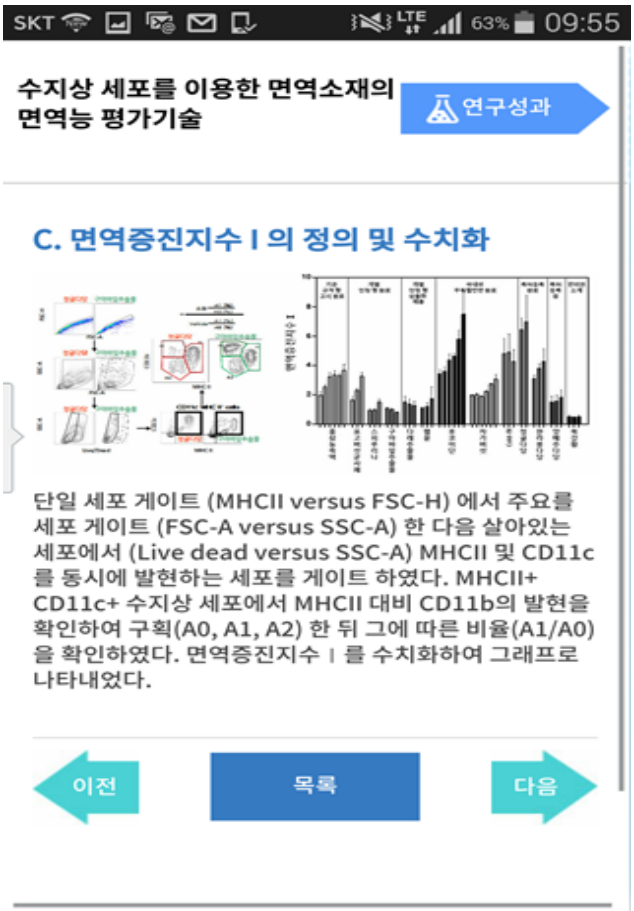
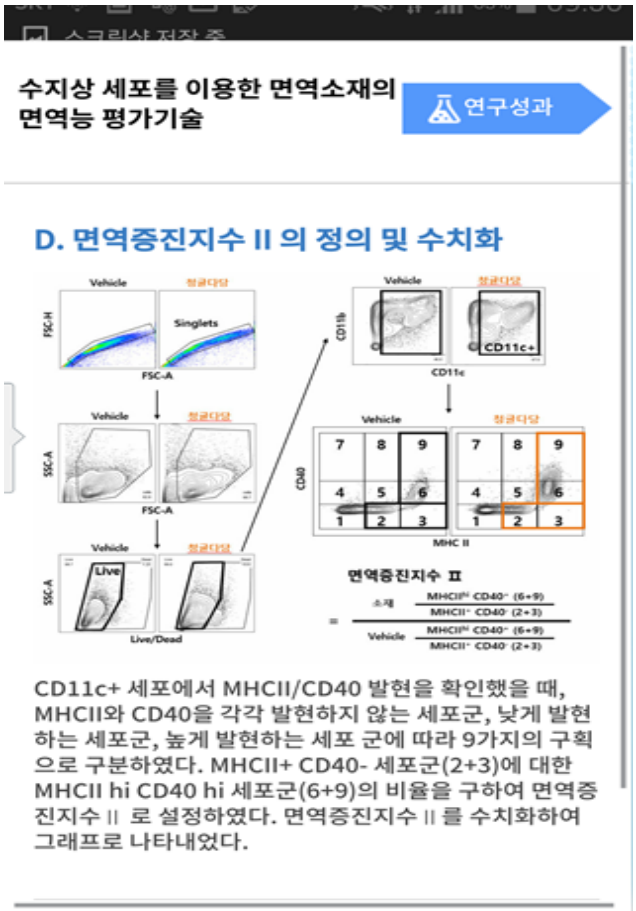


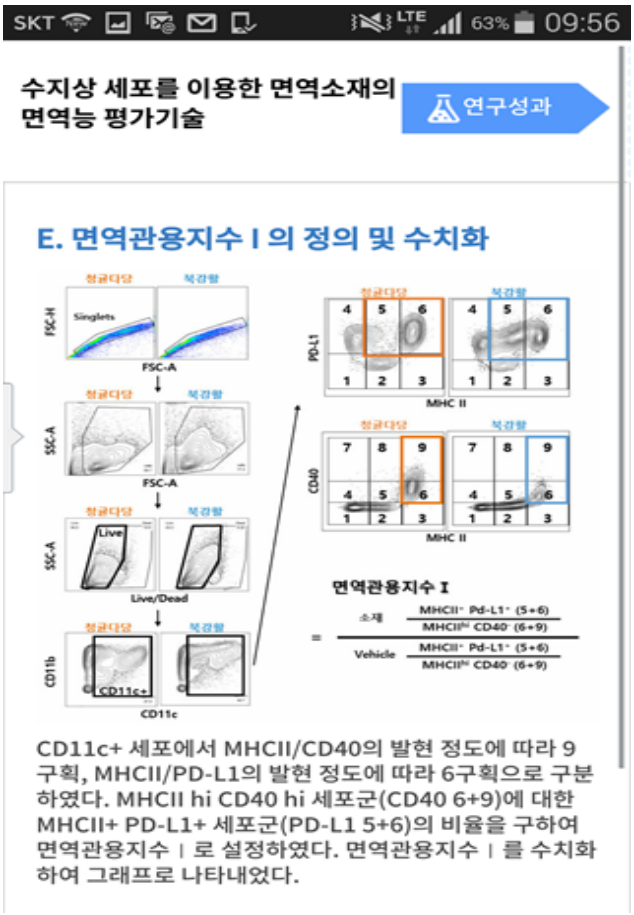
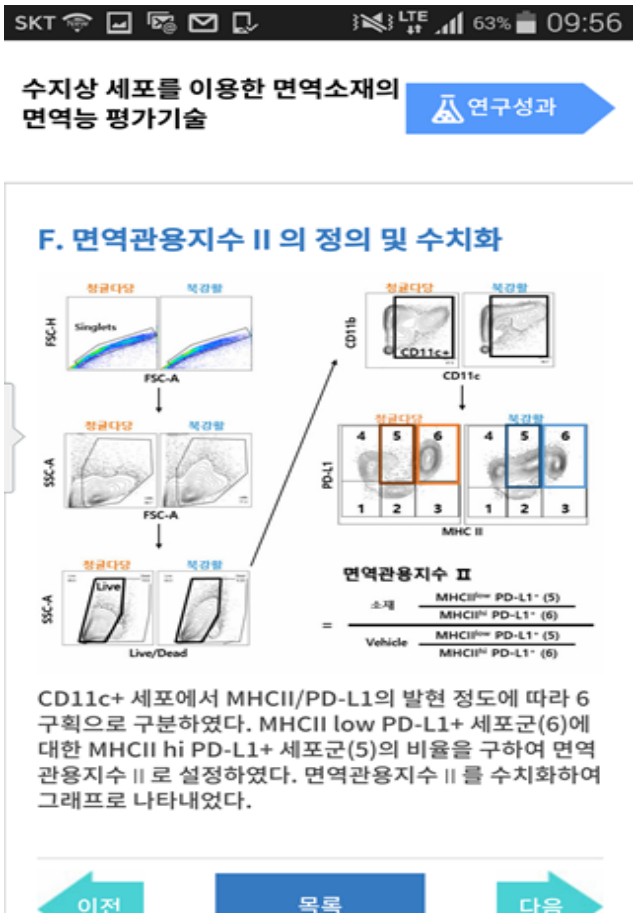
그림 3.44 연구성과 내용 화면 O

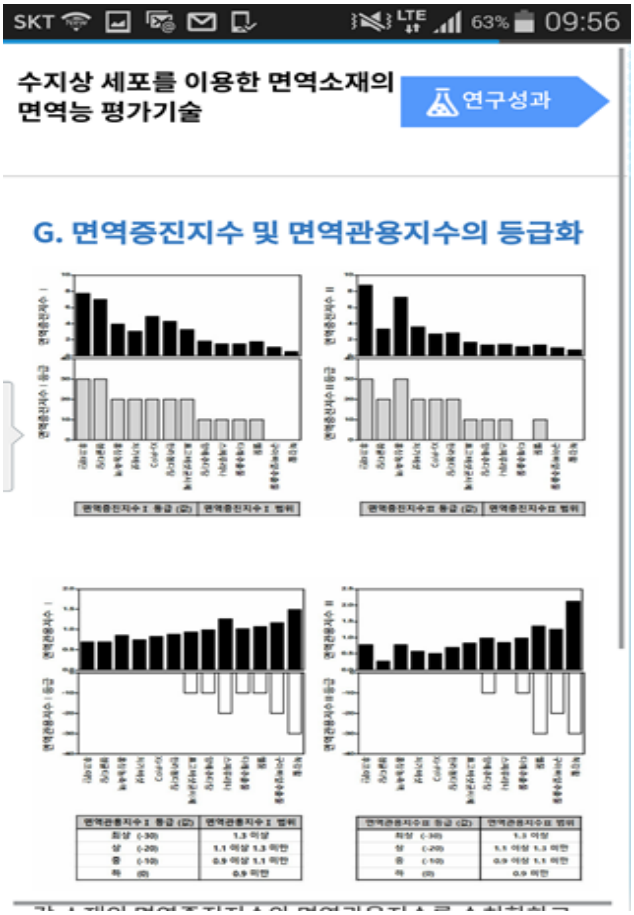
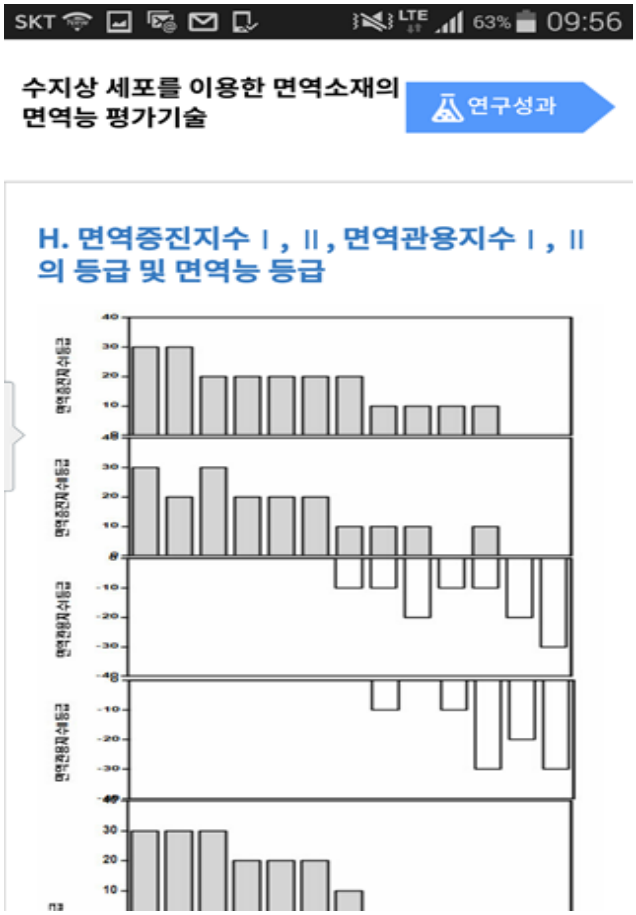
(4) 면역능 평가시스템 앱 부문 개발

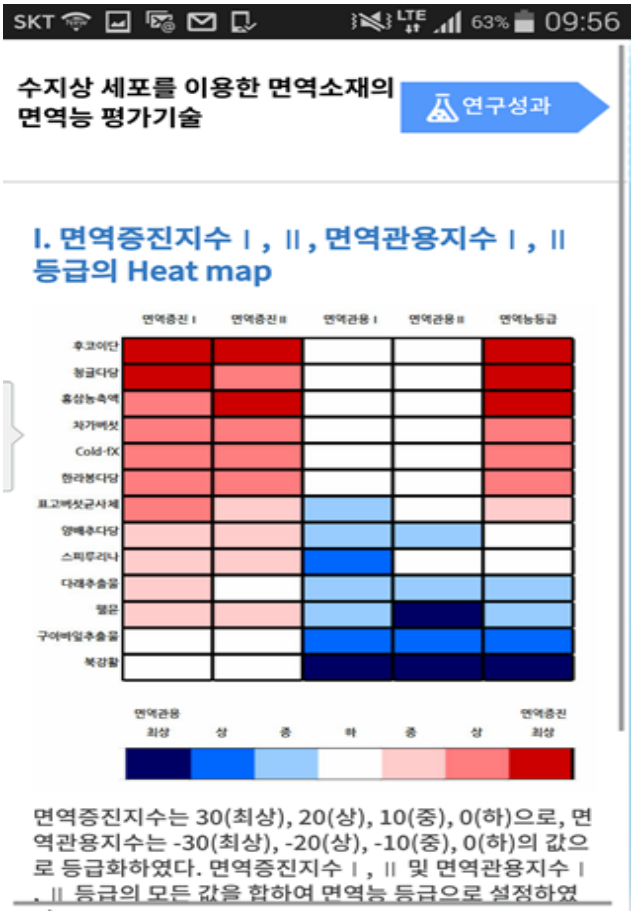
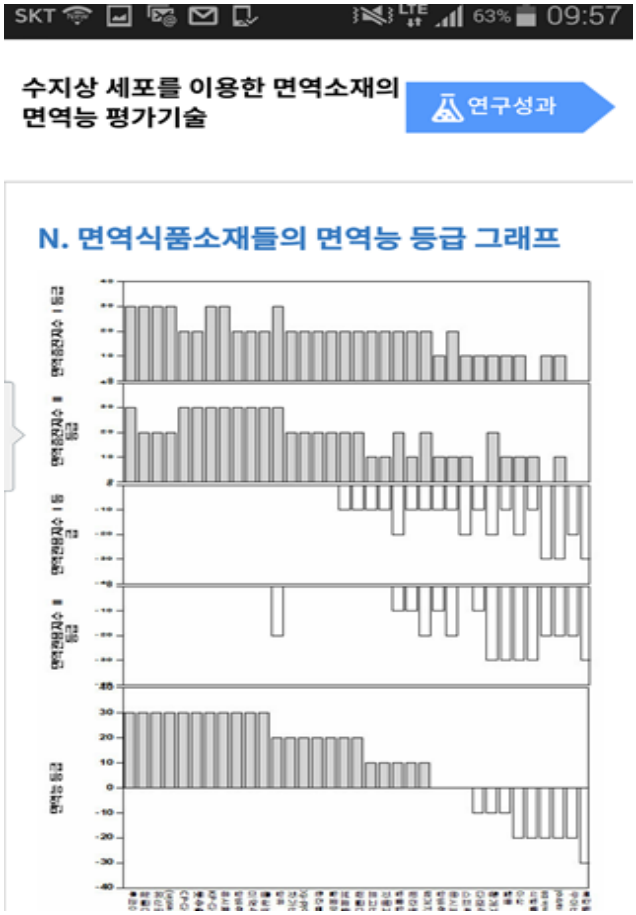
가. 인트로 화면	나. 연구소개 화면
○ 안드로이드폰과 애플폰에서 차이없이 동작하며 웹앱(WebAPP)의 형태를 가짐. 연구소개와 연구결과의 두 가지 메뉴를 제공함. ○ http://61.250.224.151/immunity url을 사용하며 스마트폰에서 웹브라우저를 실행하고 url을 입력하는 칸에 입력하면 해당 사이트로 이동함. 사이트 이동 후 바탕화면에 바로가기를 등록 시 일반 앱과 동일한 방식으로 사용이 가능함.	○ 신기술개발의 배경을 포함한 연구 내용에 대한 설명을 텍스트 컨텐츠 형태로 제공 – 기술분야 – 신기술개발의 배경 · 면역기능식품의 소비 급증에 따른 객관적인 평가 가이드라인 필요성 · 면역기능식품의 면역증진 혹 면역관용 효과를 구별하는 면역기능평가법 필요성 · 면역기능식품의 면역능 평가 및 개발을 객관적이며 신속한 기술의 필요성

다. 연구성과 목록 화면	라. 마우스 골수세포 유래 수지상세포의 분화 화면
	
○ 연구성과 목록을 표출하며 A ~ O 까지 총 15개의 목록을 제시함	○ 마우스 골수세포 유래 수지상세포(BMDC) 유도 및 배양과정 및 유세포분석을 통한 측정 검사법 표준화 ○ 실험방법 표준화를 통한 가이드라인 제시

마. 면역증진지수 I 의 정의 및 수치화 화면	바. 면역증진지수 II 의 정의 및 수치화 화면
	
○ 연구성과 목록 중 C. 면역증진지수 I 의 정의 및 수치화에 해당하는 컨텐츠를 표출함 ○ 면역식품소재 면역능을 수치로 나타내는 “면역지수” 정의 및 확립 ○ “면역지수” 정의 및 확립을 위한 컨텐츠로 면역지수 가운데 첫 지수로 면역항원성의 척도로 Immunogenic Index I 을 정의 및 그 값을 구하여 수치화 가이드	○ 연구성과 목록 중 D. 면역증진지수 II 의 정의 및 수치화에 해당하는 컨텐츠를 표출함 ○ “면역지수” 정의 및 확립을 위한 컨텐츠로 면역지수 가운데 첫 지수로 면역항원성의 척도로 Immunogenic Index II 을 정의 및 그 값을 구하여 수치화 가이드

사. 면역관용지수 I 의 정의 및 수치화 화면	아. 면역관용지수 II 의 정의 및 수치화 화면
	
○ 연구성과 목록 중 E. 면역관용지수 I 의 정의 및 수치화에 해당하는 컨텐츠를 표출함 ○ “면역지수” 정의 및 확립을 위한 컨텐츠로 면역지수 가운데 첫 지수로 면역항원성의 척도로 Tolerogenic Index I 을 정의 및 그 값을 구하여 수치화 가이드	○ 연구성과 목록 중 F. 면역관용지수 II 의 정의 및 수치화에 해당하는 컨텐츠를 표출함 ○ “면역지수” 정의 및 확립을 위한 컨텐츠로 면역지수 가운데 첫 지수로 면역항원성의 척도로 Tolerogenic Index II 을 정의 및 그 값을 구하여 수치화 가이드

자. 면역증진지수 및 면역관용지수의 등급화 화면	차. 면역증진지수 I, II 및 면역관용지수 I, II 의 등급 및 면역능 등급 화면
	
○ 연구성과 목록 중 G. 면역증진지수 및 면역관용지수의 등급화에 해당하는 컨텐츠를 표출함 ○ 각 소재의 면역증진지수와 면역관용지수를 수치화하고 범위에 따라 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 구분 ○ 등급화를 통한 면역력 평가 가이드 제시	○ 연구성과 목록 중 H. 면역증진지수 I, II 및 면역관용 지수 I, II 의 등급 및 면역능 등급에 해당하는 컨텐츠를 표출함 ○ 면역증진지수는 30(최상), 20(상), 10(중), 0(하)으로, 면역관용지수는 −30(최상), −20(상), −10(중), 0(하)의 값으로 등급화 ○ 면역증진지수 I , II 및 면역관용지수 I , II 등급의 모든 값을 합하여 면역능 등급으로 설정

카. 면역증진지수 I, II 및 면역관용지수 I, II 의 등급의 Heat map 화면	타. 면역식품소재들의 면역능 등급 그래프 화면
	
○ 연구성과 목록 중 I. 면역증진지수 I, II 및 면역관용지수 I, II 의 등급의 Heat map에 해당하는 컨텐츠를 표출함 ○ 면역증진지수는 30(최상), 20(상), 10(중), 0(하)으로, 면역관용지수는 -30(최상), -20(상), -10(중), 0(하)의 값으로 등급화 ○ 면역증진지수 I , II 및 면역관용지수 I , II 등급의 모든 값을 합하여 면역능 등급으로 설정	○ 개발 면역식품소재들을 포함한 N. 면역식품소재들의 면역능 등급 그래프 화면에 해당하는 컨텐츠를 표출함 ○ 소재별 면역증진지수 I, 면역증진 지수 II, 면역관용 지수 I, 면역관용 지수 II 등급 그래프에 해당하는 컨텐츠를 표출함

하. 면역식품소재들의 면역증진지수 및 면역관용지수 등급 heatmap 화면

○ 개발 면역식품소재들을 포함한 O. 면역식품소재들의 면역증진지수 및 면역관용지수 등급 heatmap에 해당하는 컨텐츠를 표출함

(4) 개발 시스템 활용

건강기능식품 기능성 원료로 인정받기 위해서는 “건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(식약처)”에 따라 지능/지표 성분에 관한 자료를 제출해야 하는데, 단순히 기능/지표 성분의 함량만 제출하는 것이 아니라, 기능/지표 성분의 특성(구조식, 분자식, 분자량 등), 제조단계에 따른 수율, 함량변화 등의 자료를 제출해야 한다.

‘표준화’는 제조 시 제품 배치간의 일관성을 유지하기 위하여 사용하는 과정으로, 원재료로부터 기능/지표 성분의 분리 및 특성화, 유효성 있는 분석법 확립, 제조공정 관리에 따른 생산 루트간 변이 감소를 통한 재현성 증가가 표준화 목적이다.

본 라이브러리는 원료표준화에 필요한 기술, 즉 원료검토, 기능/지표성분 설정, 원재료 및 제조공정 표준화, 기준규격 설정에 필요한 요소 기술에 평가에 있어 기초로 필요한 면역능 평가에 대한 정보를 제공하는 것을 목적으로 한다.

1) 개발 시스템 평가를 통한 개발하고자 하는 식품의 원료 및 소재의 가능성 평가

2) 개발하고자 하는 소재의 면역효과의 특성과 강도에 대한 합리적인 평가방법 및 면역기능 소재의 스크리닝을 통하여 면역증진 혹 면역개선 효과 평가

3) 건강기능식품 개발에 요구되는 기능성 원료 소재화와 기능성 평가법 관련 요소 기술을 검증하고 이를 응용기술 및 통합기술로 개발하여 수요기업이 공통으로 활용 가능한 건강기능식품 개발 플랫폼 시스템 구축

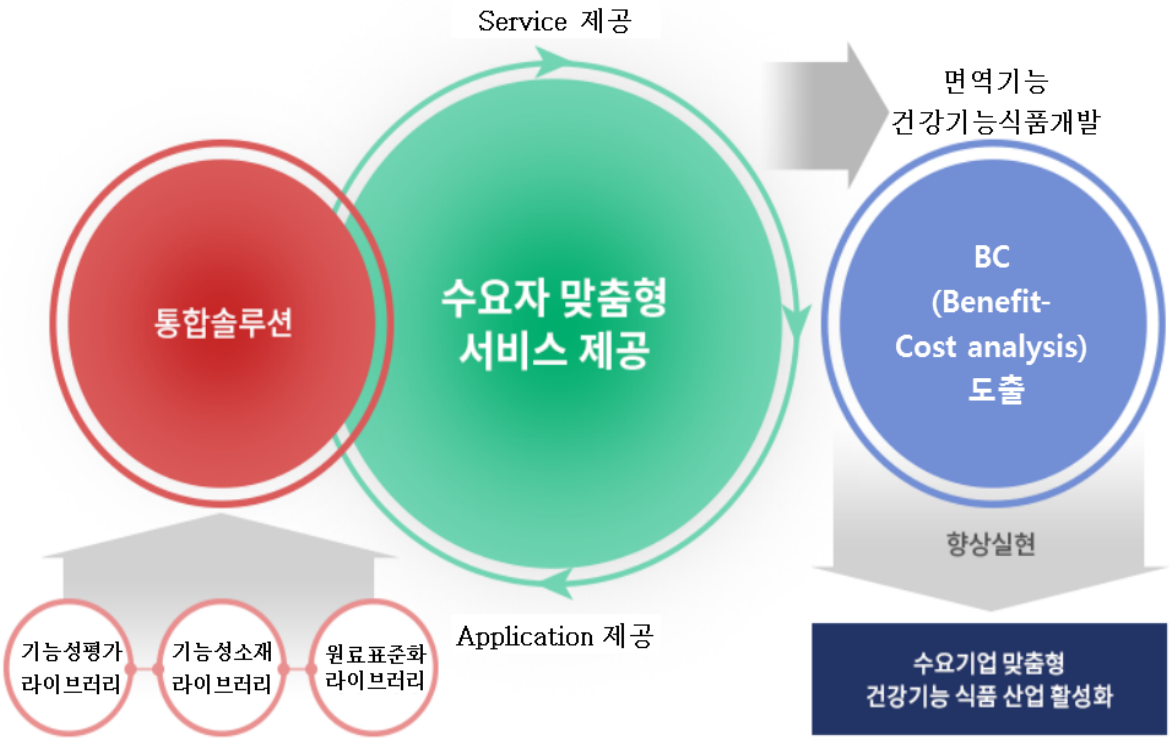


그림 3.45 개발 시스템 활용 개요

제4절 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계, 추진일정

가. 연구개발 추진전략·방법

코드번호	C-14-01

가) 연구대상 면역식품소재 발굴 및 선정 (제1/2 협동)

■ 제1협동기관이 보유하고 있는 면역소재 DB와 산업화 DB에 근거하여 선행연구자료를 분석하고 이 결과를 소재 선정 및 평가우선순위에 적용하였다

■ 일차 검사대상 식품시료 선정 및 제공 (제1/2협동) -기준규격형, 개별인정형으로 인정된 면역소재들, 비케이바이오 개발 소재, 및 한의연 후보 소재들로 일차 검사대상 선정

■ 표준화된 소재 생산 및 공급 (제2협동) - LC-MS등을 통해 소재의 성분 분석 과정 및 표준품과 일치여부 확인하는 소재 validation 과정을 거쳐, GMP시설에서의 생산을 통해 표준화된 소재를 생산하여 연구개발에 사용한다.

나) 시험관내 검사법 개발(I) (제1세부)

■ 기존에 개발된 면역능검사법 및 면역능평가시스템에 관한 조사

■ 시험관내 검사법 적용 대상세포 및 면역기능 선정

■ 일차 검사법을 일차 검사대상에 적용

■ 검사과정의 표준화, 면역능 수량화 및 등급화

■ 우수 면역소재 선정 - 기존 평가된 면역식품 소재 및 새로운 소재들 가운데 일차 시험관내 검사법을 통해 우수 면역소재 선정

다) 동물검사법 선정 및 개발 (제1협동)

■ 기능성 모델과 질환 모델을 함께 개발 - 장관면역 기능성 모델 (면역력향상 측정 모델), 항감염능 기능성 모델, 과민면역 질환모델, 만성염증 조절 질환모델

■ 우수 식품소재의 면역능 평가 -일차적으로 장관면역 기능성 모델 적용, 항감염능 기능성 모델로 확대하고 이후 질환 모델을 통해 평가

■ 시험관내 검사법의 일차 유효성 평가 (I)

라) 시험관내 검사법 개발 (II) 및 동물 유효성 평가 (II) (제1세부 및 제1 협동)

■ 면역능 검사법 개선 및 새로운 면역능 검사법 도입

■ 효과적인 동물모델 시험을 통해 시험관내 검사법에 대한 유효성 평가 (II)

■ 면역능 검사법 과정의 표준화, 면역능 수량화 및 등급화 완성

마) 면역능 평가 시스템 및 민간보급프로세스 구축 (제1협동)

■ 표준화되고 등급화된 시험관내 검사법 개발 - 면역능 평가의 표준화, 신속화

■ 각 소재의 면역능을 등급화하는 평가시스템을 개발

■ 앱등을 통한 민간보급프로세스 구축 - 면역능 평가 시스템을 민간에 보급하여 면역기능식품의 개발을 가속화하게 도울 것이다.

바) 소재의 표준화 및 가이드라인제시 (제2협동)

■ 면역능 우수 식품소재 수집 및 추출, 분석법 개발 원료를 표준화한다.

■ 주요 기능별 분석법 가이드를 제시하여 기능 소재의 개발 가이드라인을 제시한다.

■ 면역능 수치(등급)별 가이드라인 설계 및 소재 5종 이상 선정하여 가이드를 제안한다.

■ 제품화 사례 적용을 통한 BC(Benefit-Cost analysis) 도출방안 제시 및 홍보한다.

나. 연구개발 추진체계

코드번호	C-14-02

◯ 과제목표 달성을 위해 세부간 협력을 최대화 할 유기적 추진체계 구축

○ 과제별 목표달성을 위한 전문인력의 참여

연구개발과제		총 참 여 연 구 원
과제명	**면역식품(소재)의 면역능 검증을 위한 표준 설정 연구 및 민간 보급 프로세스 구축**	주관연구책임자 외 총 28명

기 관 별 참 여 현 황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기 업		
중견기업		
중소기업	1(비케이바이오)	11
대 학	1(충남대학교)	10
국공립(연)		
출 연 (연)	1(한국한의학연구원)	7
기 타		

충남대학교 산학협력단	**한국한의학연구원**	**비케이바이오**
세포실험기반 면역능 검증 평가법 비교연구 및 민간보급체계 개발	동물시험기반 면역능 검증평가법 비교 연구를 통한 신뢰도 검증	면역 식품 소재 발굴 및 산업화를 위한 평가 가이드라인 설계
권재열외 9명	권보인외 6명	한복경외 10명
담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용
· 표준화된 시험관내 면역능 검사법 제시 및 민간보급 프로세스 개발	면역능 동물시험법 구축 및 시험관내 시험법 검증	· 면역 식품 소재 발굴 및 산업화를 위한 평가 가이드라인 설계

다. 추진 일정

(2)차년도															
일련번호	연구내용	추진 일정												연구개발비(단위: 천원)	책임자(소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	동물시험 결과를 예측할 수 있는 새로운 시험관내 검사법 개발														권재열 (충남대학교)
2	시험관내 검사법 과정의 표준화 확립														권재열 (충남대학교)
3	동물시험에 의해 타당성 입증된 시험관내 검사법 확립														권재열 (충남대학교)
4	시험관내 검사법 결과의 수량화 및 등급화 기준 확립														권재열 (충남대학교)

(2)차년도															
일련번호	연구내용	추진 일정												연구개발비(단위: 천원)	책임자(소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	기존 우수 면역식품(소재)에 대한 동물실험														권보인 (한의학연구원)
2	면역지표들 측정 및 분석														권보인 (한의학연구원)
3	동물시험 결과와 시험관내 검사법의 등급화 결과를 비교분석하여 시험관내 검사법의 타당성 평가														권보인 (한의학연구원)

(2)차년도															
일련번호	연구내용	추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	우수 면역소재 기능 성분 분석														한복경 (Bk bio)
2	식품 소재 선정을 위한 산업화 관점에서의 가이드														한복경 (Bk bio)
3	효능평가, 경제성, 안전성 등 비교 후 우수소재 선정														한복경 (Bk bio)
4	선정 소재와 기존 개별인정형 원료 비교														한복경 (Bk bio)
5	우수 식품소재 5종 선정 가이드 제안														한복경 (Bk bio)
6	보급화 가능성 (단가 및 제조 경제성) 안전성 분석														한복경 (Bk bio)
7	개별인정형 건강기능식품 등재 가능성 분석														한복경 (Bk bio)
8	국가 정책 부합성에 따른 산업화 가능성 분석														한복경 (Bk bio)
9	선정 소재 산업화 개발을 위한 개발 가이드														한복경 (Bk bio)

코드번호	C-14-03

(3)차년도															
일련번호	연구내용	추진 일정												연구개발비(단위: 천원)	책임자(소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	기 개발소재 시험관내 검사법 수행														권재열 (충남대학교)
2	시험관내 검사법과 동물시험 과정 및 결과 정리, 존 결과와의 비교 분석														권재열 (충남대학교)
3	후보 면역식품 소재들의 면역능 검사과정, 절차 및 결과들을 포함한 웹 페이지 개발														권재열 (충남대학교)
4	면역능 평가 시스템 구축														권재열 (충남대학교)

(3)차년도															
일련번호	연구내용	추진 일정												연구개발비(단위: 천원)	책임자(소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	우수 면역식품(소재)에 대한 동물시험 (면역력 증진능 평가 위주)														권보인 (상지대학교)
2	동물시험 결과를 통해 타당성이 확립된 우수 면역식품(소재) 선정														권보인 (상지대학교)
3	기 개발소재의 동물시험 (면역력 증진능 평가 위주)														권보인 (상지대학교)

(3)차년도															
일련번호	연구내용	추진 일정												연구개발비(단위: 천원)	책임자(소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	우수 면역식품(소재)와 기능성성분의 화학적 특성이 유사한 기 개발소재 선정														한복경 (비케이바이오)
2	기 개발소재에 대한 시험관내 검사법과 동물시험 실행 후 효능결과 비교 및 타당성 평가														한복경 (비케이바이오)

3	평가를 통한 BC (Benefit-Cost analysis) 도출														한복경 (비케이바이오)

제5절 연구개발 성과 및 결과

가. 국내외 논문 게재

						코드번호	C-06-01		
No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Reduced allergic lung inflammation by root extracts from two species of Peucedannum through inhibition of Th2 cell activation	Journal of Ethnopharmacology	이아름	196		ELAEVIER	SCI	2017.01.20	10.1016/j.jep.2016.12.015
2	Roles of Reactive Oxygen Species in Rheumatoid Arthritis Pathogenesis	Journal of Rheumatic Diseases	유수진 고은별	23	6	The Korean College of Rheumatology	비SCI	2016.12.01	10.4078/jrd.2016.23.6.340
3	Enhanced Th2 cell differentiation and function in the absence of Nox2.	Allergy	Bo-In Kwon			Willey Online Library	SCI	2016.06.02.	10.1111/all.12944
4	Reduced allergic lung inflammation by root extracts from two species of Peucedanum through inhibition of Th2 cell activation	Journal of Ethnopharmacology	이아름	196: 75-83.		ELSEVIER	SCI	2017.01	10.1016/j.jep.2016.12.015.
5	Codonosis lanceolata L. attenuates allergic lung inflammation by inhibiting Th2 cell activation mediated by mitochondrial reactive oxygen species	scientific reports	서윤수				SCI		revision
6	Anthriscus sylvestris root extract reduce allergic lung inflammation by regulating interferon regulatory factor 4-mediated Th2 cell activation	Journal of ethnopharmacology	김성배				SCI		revision

1.

Journal of Ethnopharmacology
Volume 196, 20 January 2017, Pages 75-83

Reduced allergic lung inflammation by root extracts from two species of *Peucedanum* through inhibition of Th2 cell activation

A.-Reum Lee, Jin Mi Chun, A. Yeong Lee, Hyo Seon Kim, Gyo Jeong Gu, Bo-In Kwon

Show more

https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.015

Get rights and content

2.

Journal of Rheumatic Diseases Vol. 23, No. 6, December, 2016
https://doi.org/10.4078/jrd.2016.23.6.340

Review Article

Roles of Reactive Oxygen Species in Rheumatoid Arthritis Pathogenesis

Su-Jin Yoo[2,*], Eunbyeol Go[1,*], Ye-Eun Kim[1], Sunyoung Lee[2], Jaeyul Kwon[1]
Departments of [1]Medical Education and [2]Internal Medicine, Chungnam National University School of Medicine, Daejeon, Korea

3.

Allergy EUROPEAN JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY

EAACI

Allergy

ORIGINAL ARTICLE EXPERIMENTAL ALLERGY AND IMMUNOLOGY

Enhanced Th2 cell differentiation and function in the absence of Nox2

B.-I. Kwon[1,2], T. W. Kim[1], K. Shin[1,3], Y. H. Kim[1,4], C. M. Yuk[1], J.-M. Yuk[5], D.-M. Shin[5], E.-K. Jo[5], C.-H. Lee[6] & S.-H. Lee[1]

[1]Graduate School of Medical Science and Engineering (GSMSE), Biomedical Research Center, KAIST Institute of the BioCentury, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST); [2]K-herb Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon; [3]Department of Dermatology, School of Medicine, Pusan National University, Busan; [4]Korean Medicine Convergence Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine; [5]Department of Microbiology, Infection Signaling Network Research Center, Chungnam National University School of Medicine; [6]Animal Model Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea

To cite this article: Kwon B-I, Kim TW, Shin K, Kim YH, Yuk CM, Yuk J-M, Shin D-M, Jo E-K, Lee C-H, Lee S-H. Enhanced Th2 cell differentiation and function in the absence of Nox2. *Allergy* 2016; DOI: 10.1111/all.12944.

4.

ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

Reduced allergic lung inflammation by root extracts from two species of *Peucedanum* through inhibition of Th2 cell activation

A.-Reum Lee, Jin Mi Chun, A. Yeong Lee, Hyo Seon Kim, Gyo Jeong Gu, Bo-In Kwon*

K-herb Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), Daejeon 34054, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Keywords:
Peucedanum praeruptorum Dunn (PPD)
Peucedanum decursivum (Miq.) Maxim (PDM)
Allergic lung inflammation
Th2 cell activation
Type2 cytokines
Histamine

ABSTRACT

Ethnopharmacological evidence: Peucedani Radix (PR), the root of *Peucedanum praeruptorum* Dunn (PPD) or *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim. (PDM), has long been used in Korea to eliminate sputum, relieve cough, and reduce bronchus contraction. Furthermore, these therapeutic strategies are recognized as general and effective methods in western medicine as well as traditional Korean medicine.

Aim of the study: To determine and compare the anti-inflammatory effects of PPD extracts (PPDE) and PDM extracts (PDME) on allergic lung inflammation, using in vivo OVA-induced airway inflammation in mice and in vitro primary cell culture systems.

Materials and methods: Eight-week-old female C57BL/6 mice were placed into four groups (n=4 per group): saline control, OVA-induced allergic lung inflammation with vehicle, or PPDE (200 mg/kg) or PDME (200 mg/kg) treatment. PR extracts (PRE) were administered from 1 week before 1st OVA sensitization to the day before sacrifice. Mice were sacrificed 18 h after last OVA intra-nasal challenge followed by histological and biochemical analyses.

Results: Inflammatory phenotypes were alleviated with oral administration of PRE. PRE treatment decreased mucus production in airway epithelium, inflammatory cell number, eosinophilia, type 2 cytokines, and histamine in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Mice with PRE administration showed diminished activated CD4 T cell ($CD4^+CD25^+$ cell) and GATA-3 level in the lung. In addition, PRE treatment reduced Th2 cell activation *in vitro*, using Th2 polarization system.

Conclusion: Our findings indicate that the anti-inflammatory effects of PRE arise from reduced Th2 cell activation and validate the clinical use of PR in traditional Korean medicine.

5.

Codonopsis lanceolata L. attenuates allergic lung inflammation by inhibiting Th2 cell activation mediated by mitochondrial reactive oxygen species

Yun-Soo Seo[a], Hyo Seon Kim[a], A Yeong Lee[a], Jin Mi Chun[a], Sung bae Kim[a], Byeong Cheol Moon[a], and Bo-In Kwon[ab*]

[a] *Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon, 34054, Republic of Korea*

[b]*Department of Pathology, College of Korean Medicine, Sangji University, Wonju-si, Gangwon-do,* 26339*, Republic of Korea*

*Corresponding author: Bo-In Kwon, MD (Korean Medicine), PhD

Department of Pathology, College of Korean medicine, Sangji University, Wonju-si, Gangwon-do, 26339, Republic of Korea

Tel.: 82-33-730-0662; Fax: 82-33-730-0654; E-mail: kbi34812@sangji.ac.kr

6.

Anthriscus sylvestris root extract reduces allergic lung inflammation by regulating interferon regulatory factor 4-mediated Th2 cell activation

Sung-Bae Kim[a], A. Yeong Lee[a], Jin Mi Chun[a], A. Reum Lee[a], Hyo Seon Kim[a], Yun Soo Seo[a], Byeong Cheol Moon[a], Bo-In Kwon[a,b,*]

[a]*Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 34054, Korea*

[b]*Department of Pathology, College of Korean Medicine, Sangji University, Wonju-si, Gangwon-do, 26339, Korea*

*Corresponding author.

Bo-In Kwon, MD (Korean Medicine), PhD

Department of Pathology, College of Korean Medicine, Sangji University, Wonju-si, Gangwon-do, 26339, Republic of Korea

나. 국내 및 국제학술회의 발표

코드번호	C-06-02

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2016 Keystone symposia (Immunometabolism)	Bo-In Kwon	2016.02.23	Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta	Canada
2	2016 FASEB (IgE and Allergy)	Bo-In Kwon	2016.07.24	West Palm Beach, Florida	U.S.
3	생화학분자생물학회 KSBMB	권재열	2017.05.18	BEXCO	Korea
4	13th World Congress on Inflammation	권재열	2017.07.11	Hilton londen metropole hotel London,	U.K.
5	Experimental biology 2017	천진미,권보인	2017.04.22	McCormick place	U.S.

라. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

코드번호	C-06-04

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	특허	북강활 추출물을 유효성분으로 하는 천식 예방 또는 치료용 약학 조성물	한국한의학연구원	2017.04.10	10-2017-0046163				
2	특허	면역기능 증진 활성이 있는 당근박 유래 다당 분획물 및 이의 제조방법	㈜비케이바이오충남대학교	2018.04.06	1020180040319	㈜비케이바이오충남대학교	2018.10.31	1019157150000	1:1
2	특허	면역기능 증진 활성이 있는 케일박 유래 다당 분획물 및 이의 제조방법	㈜비케이바이오충남대학교	2018.04.06	1020180040320	㈜비케이바이오충남대학교	2018.09.28	1019050090000	1:1
4	특허	수지상 세포를 이용한 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법 및 면역 소재 스크리닝 방법	충남대학교 산학협력단	2018.03.26	1020180034625				
5	특허	수지상세포를 이용한 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법 및 면역 소재 스크리닝 방법	충남대학교 산학협력단	2018.09.27	1020180114899				
6	특허	수지상세포를 이용한 면역 소재의 면역관용 효과 평가방법 및 면역 소재 스크리닝 방법	충남대학교 산학협력단	2018.10.22	1020180125684				

1. 북강활 추출물을 유효성분으로 하는 천식 예방 또는 치료용 약학 조성물

관인생략

출원번호통지서

출원일자	2017.04.10
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호	10-2017-0046163 (접수번호 1-1-2017-0349116-17)
출원인 명칭	한국 한의학 연구원(3-1998-112907-3)
대리인 성명	손민(9-1999-000420-6)
발명자 성명	권보인 이아름 김효선 이아영 천진미 김성배 구교정
발명의 명칭	북강활 추출물을 유효성분으로 하는 천식 예방 또는 치료용 약학 조성물

특 허 청 장

2. 면역기능 증진 활성이 있는 당근박 유래 다당 분획물 및 이의 제조방법 특허증

특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허 Patent Number 제 10-1915715 호

출원번호 Application Number 제 10-2018-0040319 호

출원일 Filing Date 2018년 04월 06일

등록일 Registration Date 2018년 10월 31일

발명의 명칭 Title of the Invention
면역기능 증진 활성이 있는 당근박 유래 다당 분획물 및 이의 제조방법

특허권자 Patentee
등록사항란에 기재

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

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

특허청
Korean Intellectual Property Office

2018년 10월 31일

QR코드로 현재기준 등록사항을 확인하세요

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

박 원 주

3. 면역기능 증진 활성이 있는 케일박 유래 다당 분획물 및 이의 제조방법 특허증

특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허 Patent Number 제 10-1905009 호

출원번호 Application Number 제 10-2018-0040320 호

출원일 Filing Date 2018년 04월 06일

등록일 Registration Date 2018년 09월 28일

발명의 명칭 Title of the Invention
면역기능 증진 활성이 있는 케일박 유래 다당 분획물 및 이의 제조방법

특허권자 Patentee
등록사항란에 기재

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

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

2018년 09월 28일

QR코드로 현재기준 등록사항을 확인하세요

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
박 원주

특허청
Korean Intellectual Property Office

4. 수지상 세포를 이용한 면역소재의 면역 증진 효과 평가방법 및 면역 소재 스크리닝 방법

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2018.03.26
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P0318177)
출 원 번 호	10-2018-0034625 (접수번호 1-1-2018-0299751-17)
출원인 명칭	충남대학교산학협력단(2-2004-008410-4)
대리인 성명	김원준(9-1998-000674-0)
발명자 성명	권재열 김예은 고은별 선푸름 이재형 최인욱 강성욱 한욱경
발명의 명칭	수지상 세포를 이용한 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법 및 면역 소재 스크리닝 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드)+접수번호

3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식

4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.

5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.

8.기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

5. 수지상 세포를 이용한 면역소재의 면역 증진 효과 평가방법 및 면역 소재 스크리닝 방법

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2018.09.27
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P0918556)
출 원 번 호	10-2018-0114899 (접수번호 1-1-2018-0953641-67)
출원인 명칭	충남대학교산학협력단(2-2004-008410-4)
대 리 인 성 명	김원준(9-1998-000674-0)
발 명 자 성 명	권재열 김예은 이영하 선푸름 강성욱
발 명 의 명 칭	수지상세포를 이용한 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법 및 면역 소재 스크리닝 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호

3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식

4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.

5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.

8.기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

6. 수지상 세포를 이용한 면역소재의 면역관용 효과 평가방법 및 면역 소재 스크리닝 방법

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2018.10.22
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P1018623)
출 원 번 호	10-2018-0125684 (접수번호 1-1-2018-1036722-82)
출원인 명칭	충남대학교산학협력단(2-2004-008410-4)
대 리 인 성 명	김원준(9-1998-000674-0)
발 명 자 성 명	권재열 김예은 이영하 선푸름 강성욱
발 명 의 명 칭	수지상 세포를 이용한 면역 소재의 면역관용 효과 평가방법 및 면역 소재 스크리닝 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호

3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식

4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.

5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.

바. 전문연구 인력양성

	코드번호	C-06-06

No 1	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	석사학위	2016		1				1		1			
2	학사학위	2016			1			1		1			
3	석사학위	2017		2				2		2			
4	석사학위	2018		2			1	1		2			

증빙자료 1. 김예은 학위증

증빙자료 2. 고은별 학위증

증빙자료 3. 선푸름 석사 학위 증명서

증빙자료 4. 김지혜 석사 학위 증명서

증빙자료 5. 고은별 석사 학위 증명서

증빙자료 6. 이재형 석사 학위 증명서

사. 산업기술 인력양성
교육지도

				코드번호	C-06-07
No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
1	교육지도	면역능 검사지표들 연구동향 및 검사법 이해	비케이바이오 제주공장	1	2	8
2	교육지도	면역반응에서의 수지상세포의 역할 이해 및 수지상세포 기반 면역기능검사법 개발	충남대학교	1	2	8
3	교육지도	유세포 분석기를 이용한 면역능 검사법의 이해	충남대학교	1	2	8

CNU 충남대학교

교육지도-1차년

면역능 검사지표들 연구동향 및 검사법 이해

교육기관: 충남대학교

교육자: 권재열 의과대학 부교수

- **교육날짜:** 5월 11일
- **교육장소:** (주)비케이바이오 제주공장
- **교육시간:** 2시간
- **교육대상자:**

  (주)비케이바이오 참여연구원7명, 한의연 참여연구원 1명 (총 8명)

- **교육내용:**

◇ 시험관내에서 측정 면역 기능지표 선정

◇ 2013년 British Journal of Nutrition에 발표된 시험관내에서 측정가능한 면역기능

◇ 각 면역세포군들의 면역기능 측정 유형과 검사법

◇ 다중 매개변수 유동세포계측법에 기초한 방법론 이해

- Cytokine Beads Array (CBA) 법
- PBMC 분리 및 세포 표면 염색법
- NK세포 세포용해능 측정
- 세포내 싸이토카인 염색법 (ICS)

◇ 면역식품(소재)의 면역능 검사를 위한 일차 시험관내 검사법 개발

- 면역능 검사 대상이 될 면역세포 유형 선정
- 우리가 선택한 면역능 지표들

◇ 마우스 골수세포 유래 수지상세포 분화 및 성숙화를 이용한 면역능 검사법

■ 교육지도-2차년

면역반응에서의 수지상세포의 역할 이해 및 수지상세포 기반 면역기능검사법 개발

교육기관: 충남대학교
교육자: 권재열 의과대학 부교수

- **교육날짜:** 1월 13일, 2017년
- **교육장소:** (주)비케이바이오 제주공장
- **교육시간:** 2시간
- **교육대상자:** (주)비케이바이오 참여연구원 5명, 한의연 참여연구원 3명 (총 8명)

- **교육내용:**

◇ 수지상세포의 발견 : 역사
◇ 수지상세포의 면역학에서의 중요성
선천면역과 후천면역의 연결점
주위 정보의 통합자
전문적 항원제시세포
항원 특이적 면역반응의 조정자
◇ 수지상세포 성숙화가 갖는 의미
주위 정보의 통합
수지상세포의 분화 단계 및 종류에 다른 면역조절의 다양성
면역 혹 면역관용에 대한 조절
◇ Naive T cell 활성화를 위한 신호들
- 수지상세포에 의한 신호들
- 신호 I, II, III
- T 세포 극성화

◇ 마우스 골수세포 유래 수지상세포 분화 및 성숙화를 이용한 시험관내 면역능 검사법의 중요성 및 실용성

3. 3차년도 교육지도 <유세포 분석기를 이용한 면역능 검사법의 이해>

자. 정책활용 및 홍보

(1) 정책활용

(가) 식품클러스터

연구과제의 결과물에 대한 정부기관 전문가의 조언과 활용에 대한 의견을 위한 표준화 연구, 효능평가 연구, 안전성 평가가 체계적으로 진행될 수 있는 기반을 보유한 국가식품클러스터 식품기능성평가지원센터를 방문하였으며, 개발된 시험관내 시험법에 대한 정부기관 전문가이신 이현순 박사님의 조언과 향후 연구에 대한 가이딩, 또한 정책 제언을 위한 현행 적용 방향 등의 숙제에 대한 논의를 하였다.
논의 결과 기존 식약처 가이드 면역평가법과 교차검증을 통하여 개발 평가법 타당성을 증명하는 방안을 선정하였으며, 이에 기존평가법 바이오바커 설정 및 실험을 센터에서 의뢰하여 수행하고자 하였으나, 높은 실험비용과 실험 기반이 부족하여 충남대학교에서 직접 기존평가법과 개발평가법의 교차검증 실험을 추진하였으며, 이에 결과를 본문 2. 연구수행 내용 및 결과에 작성하였다.

(나) 식품의약품 안전평가원

본 연구결과인 면역능 평가 시스템은 면역효능 건강기능식품 개발 초기단계의 면역 기능성 소재 발굴을 면역증진 및 과민면역 완화 측면의 평가로 통하여 과학적이고 체계적인 제품 개발을 지원할 수 있는 콘텐츠를 담고 있다. 이를 식품의약품 안전평가원 홈페이지를 통하여 활용하기 위하여 식품의약품 안전평가원 식품위해평가부와 활용방안에 대하여 논의하였으며, 식품의약품 안전평가원에서는 개발 평가법의 기술력은 뛰어나지만 아직 초기 개발단계여서 타당성을 위해서 많은 데이터베이스와 식품이 아닌 화합물 수준에서 평가가 필요하다는 의견을 주셨으며, 이에 최종목표인 면역식품(소재)의 면역능 검증을 위한 표준 설정 및 민간 보급 프로세스 구축으로 식품평가 결과로서도 충분한 과학적 입증을 하였으며, 기존 평가법 결과를 비교 시 유사한 결과와 더 우수한 면을 중점으로 설득하고자 하였다. 이 후 개발 평가법을 통한 식품소재에 대한 데이터 확보 및 활용방안 구축 시 식품의약품 안전평가원 홈페이지에서 활용 가능성에 대한 긍정적인 답변을 받았다. 이에 개발한 면역능 평가 시스템을 웹페이지 및 앱 개발을 통한 민간보급 구축을 통한 활용 계획을 본문4. 연구결과의 활용 계획에 작성하였다.

(2) 홍보전시

개발 면역능 평가법을 활용하여 면역능 우수 식품소재 수집 기업의 면역식품 개발영역 연구효율 증대 및 소비자의 제품 선택과정 신뢰성 향상에 기여할 수 있도록 전시참석을 통한 면역능 평가법을 홍보하였다. 홍보를 통하여 면역능 우수 식품소재 수집 기업의 면역식품 개발영역 증대를 통한 데이터베이스 확보 및 소비자의 제품 선택과정 신뢰성 향상에 기여할 수 있었다.

(가) 서울국제식품산업대전 2018

(나) IP(지식재산) 페스티벌 특허기술 제품 홍보 전시회

차. 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

							코드번호		C-06-10	
No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
	기술이전 자기실시	신제품개발 기존제품개선 신공정개발 기존공정개선 기타	국내 국외							

타. 기술요약정보

			코드번호	C-06-12
연도	기술명	요약내용	기술완성도	등록번호

㉦ 기술요약정보

- 기술완성도는 1.아이디어창안 2.특허만신청 3.기술개발진행중 4.기술개발완료 5.실용화단계 6.시장개척단계 7.기타
- 등록번호는 연구개발성과 관리·유통 전담기관에 등록한 번호를 기재

파. 보고서 원문

			코드번호	C-06-13
연도	보고서 구분	발간일	등록번호	

㉧ 보고서 원문

- 보고서 구분은 1.중간보고서, 2.최종보고서
- 등록번호는 연구개발성과 관리·유통 전담기관에 등록한 번호를 기재

하.홍보

1. 독서신문

천식치료에 국내 자생종 자화전호 '효과'

한의학연, 자화전호와 백화전호의 천식치료 효과 논문 발표

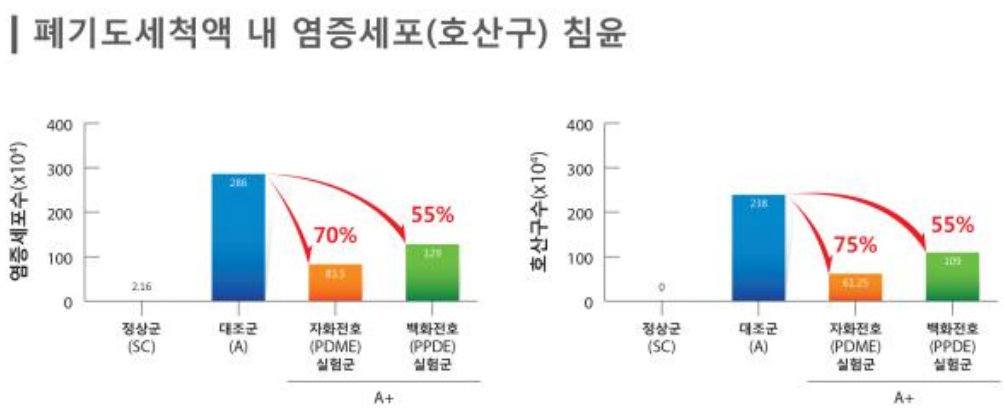
박재붕 기자 승인 2017.02.28 18:34 댓글 0

[리더스뉴스/독서신문 박재붕 기자] 국내 연구진이 국내 자생식물종인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 있음을 과학적으로 밝혔다.

특히 자화전호의 효과가 백화전호 대비 우수하게 나타나 국내 자생 한약재의 확보와 활용에 기여할 것으로 기대된다.

미래창조과학부(장관 최양희) 산하 한국한의학연구원(원장 이혜정, KIOM) K-herb연구단 권보인 박사 연구팀은 국내 자생종 자화전호와 중국산 백화전호의 천식치료 효과를 입증했다. 이번 연구 결과는 국제 학술지 'Journal of Ethnopharmacology(약리학)' 최신호에 게재됐다.

한약재 전호(前胡)는 식약처가 발간하는 '대한민국약전외한약(생약)규격집'에 백화전호 또는 자화전호(바디나물)로 규정되어 있다.



전호는 본초강목에 따르면 담(痰)이 그득하여 가슴과 옆구리가 답답하고 저린 것, 명치부위에 기(氣)가 뭉친 것, 풍두통(風頭痛)을 치료하는데 쓰인다. 특히 전호는 임상적으로 기침이 심한 감기나 천식 을 치료하는 한약처방인 삼소음, 인삼패독산 등을 구성하는 주요 약재이다.

이와 같은 임상적 효능에도 불구하고 국내 생산량이 미미해 국내자생종 자화전호 대신 수입산 백화전호에 의존하고 있는 실정이다. 한국의약품수출입협회에서 발표한 '2015년 수입한약재 통관실적'에 따르면 백화전호는 연간 약 19톤(약 2.3억 원 상당)을 수입하고 있다.

실험 결과 자화전호와 백화전호 모두 천식 증상 개선과 염증세포 침윤 억제에 효과가 있었다. 특히 국내 자생종 자화전호가 객담 생성, 염증관련 세포 침윤 억제 등에서 중국산 백화전호보다 더 우수한 효능을 보였다.

연구팀은 동물실험에서 실험쥐(mouse)를 정상군, 알레르기 천식을 유발한 대조군, 천식 유발 실험쥐에 자화전호와 백화전호 추출물을 각각 경구 투여한 2개 실험군으로 나눠 차이를 관찰했다.

실험 결과 기도 내 천식 관련 염증세포인 호산구의 침윤 정도가 자화전호 실험군에서 75%, 백화전호 실험군에서 55%씩 감소됐다.

또한 천식을 일으키는 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13)이 자화전호 실험군에서 각 각 60%, 84%, 87%, 백화전호 실험군에서는 47%, 77%, 84% 감소한 것으로 나타났다.

이번 연구는 한약재 전호의 천식 치료 효과를 과학적으로 검증했을 뿐만 아니라 동시에 수입산 백화전호 대비 국내 자생종인 자화전호의 천식치료 효과 우수성을 실험을 통해 밝혀낸 것으로 평가할 수 있다.

건강보험심사평가원 자료에 따르면 천식으로 병원을 찾은 환자 160만명(2015년 기준)의 59%가 10세 미만의 아동이거나 60세 이상 노년층으로 소아기와 노년기에 천식에 걸릴 확률이 높아 해당 연령층에 각별한 주의가 요구된다.

연구책임자인 권보인 박사는 "이번 연구성과는 국내 자생 한약재인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 우수한 것을 과학적으로 입증한 것"이라며 "국내 자생 한약재의 생산을 촉진하여 농가 소득증대는 물론 올바른 한약재 소비 확립에 기여할 것"이라고 강조했다.

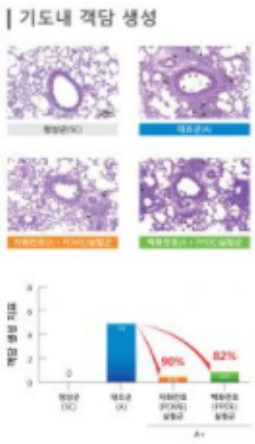
박재붕 기자 tihub@naver.com

<저작권자 © 독서신문, 무단 전재 및 재배포 금지>

2. 한의신문

한약재 전호(前胡)의 천식치료 효과 과학적으로 입증

객담 생성 90% 감소, 염증세포 호산구 침윤 75% 감소
한의학연, 자화전호와 백화전호의 천식치료 효과 논문 발표



[한의신문=김대영 기자] 한약재 전호(前胡)의 천식 치료 효과가 과학적으로 입증돼 주목된다.
한약재 전호(前胡)는 식품의약품안전처가 발간하는 '대한민국약전외한약(생약)규격집'에 자화전호(국내 자생식물종인 바디나물) 또는 백화전호(중국산)로 규정돼 있는데 이번 연구결과 자화전호의 치료 효과가 백화전호 보다 우수한 것으로 나타나 국내 자생 한약재 확보와 활용에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

28일 한국한의학연구원(이하 한의학연)에 따르면 K-herb연구단 권보인 박사 연구팀은 동물실험에서 실험쥐(mouse)를 정상군, 알레르기 천식을 유발한 대조군, 천식 유발 실험쥐에 자화전호와 백화전호 추출물을 각각 경구 투여한 2개 실험군으로 나눠 그 차이를 관찰했다.

기도의 객담(가래) 생성 정도를 확인하기 위해 폐 조직을 적출, 파스염색(PAS Staining)을 실시한 결과 실험군에서 객담이 자화전호 투여 시 90%, 백화전호 투여 시 82% 씩 각각 감소했다.

기도 내 염증세포의 침윤 정도와 천식을 유발하는 염증성 사이토카인 분비량을 측정하기 위해 폐기도세척액을 채취, 세포염색법(giemsa staining)과 효소면역측정법을 각각 시행한 결과에서는 기도 내 천식 관련 염증세포인 호산구의 침윤 정도가 자화전호 실험군에서 75%, 백화전호 실험군에서 55% 씩 감소된 것을 확인했다.

또한 천식을 일으키는 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13)이 자화전호 실험군에서 각각 60%, 84%, 87%, 백화전호 실험군에서는 47%, 77%, 84% 감소한 것으로 나타났다.

연구책임자인 한의학연 권보인 박사는 "이번 연구성과는 한약재 전호의 천식 치료 효과를 과학적으로 검증했을 뿐만 아니라 국내 자생 한약재인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 우수한 것을 과학적으로 입증한 것"이라고 강조했다.

이어 이름이 비슷해 혼·오용 우려가 있는 산형과 식물인 전호(한약명 아삼, Anthriscus sylvestris (L.) Hoffm.)는 자화전호, 백화전호와 다르므로 각별한 주의가 요구된다고 덧붙였다.

이번 연구결과는 국제 학술지 'Journal of Ethnopharmacology(약리학)' 최신호에 게재됐다.

한편 본초강목에 따르면 전호는 담(痰)이 그득해 가슴과 옆구리가 답답하고 저린 것, 명치부위에 기(氣)가 뭉친 것, 풍두통(風頭痛)을 치료하는데 쓰인다. 특히 임상적으로 기침이 심한 감기나 천식을 치료하는 한약처방인 삼소음, 인삼패독산 등을 구성하는 주요 약재이기도 하다.

<용어설명>
파스염색(PAS Staining) : 과옥소산에 의한 산화반응과 시프시약에 의한 발색반응의 2가지 과정을 포함하는 염색법임

사이토카인(cytokine) : 세포 사이의 신호 전달을 매개하는 단백질 인자의 총칭

효소면역측정법 (Enzyme-linked immunosorbent assay, enzyme immunoassay(EIA)) : 특이적인 항원항체 반응을 이용해 표식자 항원 또는 항체를 정량하는 방법.

김자염색(giemsa staining) : 세포, 조직의 산 호성(好性) 및 염기 호성 물질을 이중 염색하는 데 오래 전부터 사용되고 있는 염색법으로, 염색액은 염기성 색소로서 메틸렌 아쥴, 메틸렌 블루, 산성 색소로서 에오신을 메틸알코올-글리세롤에 용해한 것이다.

<한의신문(www.akomnews.com) 무단전재 및 재배포 금지>

3.파이낸셜

한의학硏 "천식치료에 국내 자생종 자화전호, 효과"

파이낸셜뉴스 | 입력 : 2017.02.28 15:06 | 수정 : 2017.02.28 15:06

국내 연구진이 국내 자생식물종인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 있음을 과학적으로 밝혔다. 특히 자화전호의 효과가 백화전호 대비 우수하게 나타나 국내 자생 한약재의 확보와 활용에 기여할 것으로 기대된다.

한국한의학연구원 K-허브(herb)연구단 권보인 박사 연구팀은 국내 자생종 자화전호와 중국산 백화전호의 천식치료 효과를 입증했다. 이번 연구 결과는 국제 학술지 'Journal of Ethnopharmacology(약리학)' 최신호에 게재됐다.

한약재 전호(前胡)는 식약처가 발간하는 '대한민국약전외한약(생약)규격집'에 백화전호 또는 자화전호(바디나물)로 규정돼 있다.

전호는 본초강목에 따르면 담(痰)이 그득해 가슴과 옆구리가 답답하고 저린 것, 명치부위에 기(氣)가 뭉친 것, 풍두통(風頭痛)을 치료하는데 쓰인다. 특히 전호는 임상적으로 기침이 심한 감기나 천식 을 치료하는 한약처방인 삼소음, 인삼패독산 등을 구성하는 주요 약재다.

이와 같은 임상적 효능에도 불구하고 국내 생산량이 미미해 국내자생종 자화전호 대신 수입산 백화전호에 의존하고 있는 실정이다. 한국의약품수출입협회에서 발표한 '2015년 수입한약재 통관실적'에 따르면 백화전호는 연간 약 19t(약 2억3000원 상당)을 수입하고 있다.

실험 결과 자화전호와 백화전호 모두 천식 증상 개선과 염증세포 침윤 억제에 효과가 있었다. 특히 국내 자생종 자화전호가 객담 생성, 염증관련 세포 침윤 억제 등에서 중국산 백화전호보다 더 우수한 효능을 보였다.

연구팀은 동물실험에서 실험쥐(mouse)를 정상군, 알레르기 천식을 유발한 대조군, 천식 유발 실험쥐에 자화전호와 백화전호 추출물을 각각 경구 투여한 2개 실험군으로 나눠 차이를 관찰했다.

먼저 연구팀은 기도의 객담 생성 정도를 확인하기 위해 폐 조직을 적출해 파스염색(PAS Staining)을 실시했다. 그 결과 실험군에서 객담이 자화전호 투여 시 90%, 백화전호 투여 시 82%씩 각각 감소했다.

이어서 연구팀은 기도 내 염증세포의 침윤 정도와 천식을 유발하는 염증성 사이토카인 분비량을 측정하기 위해 폐기도세척액을 채취해 세포염색법(giemsa staining)과 효소면역측정법을 각각 시행했다.

실험 결과 기도 내 천식 관련 염증세포인 호산구의 침윤 정도가 자화전호 실험군에서 75%, 백화전호 실험군에서 55%씩 감소됐다.

또한 천식을 일으키는 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13)이 자화전호 실험군에서 각각 60%, 84%, 87%, 백화전호 실험군에서는 47%, 77%, 84% 감소한 것으로 나타났다.

이번 연구는 한약재 전호의 천식 치료 효과를 과학적으로 검증했을 뿐만 아니라 동시에 수입산 백화전호 대비 국내 자생종인 자화전호의 천식치료 효과 우수성을 실험을 통해 밝혀낸 것으로 평가할 수 있다.

건강보험심사평가원 자료에 따르면 천식으로 병원을 찾은 환자 160만명(2015년 기준)의 59%가 10세 미만의 아동이거나 60세 이상 노년층으로 소아기와 노년기에 천식에 걸릴 확률이 높아 해당 연령층에 각별한 주의가 요구된다.
연구책임자인 권보인 박사는 "이번 연구성과는 국내 자생 한약재인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 우수한 것을 과학적으로 입증한 것"이라며, "국내 자생 한약재의 생산을 촉진하여 농가 소득증대는 물론 올바른 한약재 소비 확립에 기여할 것"이라고 말했다.

한편, 이름이 비슷해 혼·오용 우려가 있는 산형과 식물인 전호(한약명 아삼, Anthriscus sylvestris (L.) Hoffm.)는 자화전호, 백화전호와 다르므로 각별한 주의가 요구된다.이번 연구는 미래창조과학부, 농림축산식품부 부처 공동지원으로 이뤄졌다.

kwj5797@fnnews.com 김원준 기자

4.연합뉴스

최신기사

국내 자생약재식물 '자화전호' 천식치료 효과 '탁월'

송고시간 | 2017/02/28 16:04

한의학연구원 "자화전호 투여 쥐, 객담 90%·염증세포 호산구 침윤 75% 감소"

(대전=연합뉴스) 이주영 기자 = 국내 자생식물종인 '자화전호'와 중국산 '백화전호'가 천식 치료에 효과가 있으며, 자화전호의 효과가 백화전호보다 우수하다는 연구 결과가 나왔다.

한국한의학연구원(KIOM) K-herb연구단 권보인 박사 연구팀은 동물실험 결과 자화전호와 백화전호 모두 천식 증상 개선과 염증세포 침윤 억제에 효과가 있었고 국내 자생종 자화전호가 중국산 백화전호보다 더 우수한 효능을 보였다고 28일 밝혔다.

국내 자생식물종 '자화전호'
[한국한의학연구원 제공=연합뉴스]

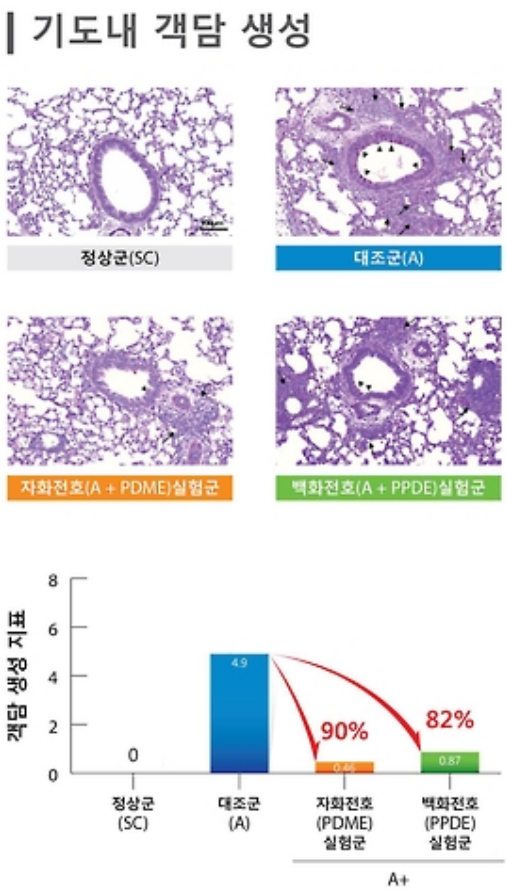
한약재 전호(前胡)는 식약처 '대한민국약전외한약(생약)규격집'에 백화전호 또는 자화전호(바디나물)로 규정돼 있는 약재로 임상적으로 기침이 심한 감기나 천식을 치료하는 한

약처방인 삼소음, 인삼패독산 등에 사용된다.

그러나 전호는 국내 생산량이 미미해 국내자생종 자화전호 대신 수입산 백화전호에 의존하고 있다.

'2015년 수입 한약재 통관실적'(한국의약품수출입협회)에 따르면 백화전호는 연간 19t(약 2억3천만원 상당) 정도 수입된다.

연구팀은 동물실험에서 실험용 쥐(mouse)를 정상군, 알레르기 천식을 유발한 대조군, 천식 유발 실험용 쥐에 자화전호와 백화전호 추출물을 각각 경구 투여한 2개 실험군으로 나눠 차이를 관찰했다.



자화전호·백화전호 투여군 객담 생성 정도 비교
[한국한의학연구원 제공=연합뉴스]

권보인 박사는 "이 연구는 국내 자생 한약재인 자화전호와 중국산 백화전호 모두 천식 치료에 효과가 우수할 뿐 아니라 국내산의 효과가 더 좋다는 것을 과학적으로 입증한 것"이라며 "국내 자생 한약재의 생산을 촉진해 농가 소득증대는 물론 올바른 한약재 소비 확립에 기여할 것으로 기대한다"고 말했다.

미래창조과학부와 농림축산식품부 공동지원으로 수행된 이 연구 결과는 국제학술지 약리학 저널(Journal of Ethnopharmacology) 최신호에 게재됐다.

scitech@yna.co.kr

<저작권자(c) 연합뉴스, 무단 전재-재배포 금지>2017/02/28 16:04 송고

5.서울경제

국내 자생종 자화전호, 천식치료에 '효과'

한의학연 권보인 박사 연구팀, 천식치료 효과 입증

박희윤 기자 | 2017-02-28 14:20:35 | 전국

가 가

국내 연구진이 국내 자생식물종인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 있음을 과학적으로 밝혔다.

한국한의학연구원(원장 이혜정)은 K-herb연구단 권보인 박사 연구팀이 국내 자생종 자화전호와 중국산 백화전호의 천식치료 효과를 입증했다고 28일 밝혔다.

특히 자화전호의 효과가 백화전호 대비 우수하게 나타나 국내 자생 한약재의 확보와 활용에 기여할 것으로 기대된다.

한약재 전호(前胡)는 식약처가 발간하는 '대한민국약전외한약(생약)규격집'에 백화전호 또는 자화전호(바디나물)로 규정돼 있다. 전호는 본초강목에 따르면 담(痰)이 그득해 가슴과 옆구리가 답답하고 저린 것, 명치부위에 기(氣)가 뭉친 것, 풍두통(風頭痛)을 치료하는데 쓰인다. 특히 전호는 임상적으로 기침이 심한 감기나 천식 을 치료하는 한약처방인 삼소음, 인삼패독산 등을 구성하는 주요 약재이다.

이 같은 임상적 효능에도 불구하고 국내 생산량이 미미해 국내 자생종 자화전호 대신 수입산 백화전호에 의존하고 있는 실정이다. 한국의약품수출입협회에서 발표한 '2015년 수입한약재 통관실적'에 따르면 백화전호는 연간 약 19톤을 수입하고 있다.

연구팀 실험 결과 자화전호와 백화전호 모두 천식 증상 개선과 염증세포 침윤 억제에 효과가 있었다. 특히 국내 자생종 자화전호가 객담 생성, 염증관련 세포 침윤 억제 등에서 중국산 백화전호보다 더 우수한 효능을 보였다.

연구팀은 동물실험에서 실험쥐(mouse)를 정상군, 알레르기 천식을 유발한 대조군, 천식 유발 실험쥐에 자화전호와 백화전호 추출물을 각각 경구 투여한 2개 실험군으로 나눠 차이를 관찰했다.

먼저 연구팀은 기도의 객담 생성 정도를 확인하기 위해 폐 조직을 적출해 파스염색(PAS Staining)을 실시했다. 그 결과 실험군에서 객담이 자화전호 투여 시 90%, 백화전호 투여 시 82%씩 각각 감소했다.

이어 연구팀은 기도내 염증세포의 침윤 정도와 천식을 유발하는 염증성 사이토카인 분비량을 측정하기 위해 폐기도세척액을 채취해 세포염색법(giemsa staining)과 효소면역측정법을 각각 시행했고 실험결과 기도내 천식 관련 염증세포인 호산구의 침윤 정도가 자화전호 실험군에서 75%, 백화전호 실험군에서 55%씩 감소됐다.

또한 천식을 일으키는 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13)이 자화전호 실험군에서 각각 60%, 84%, 87%, 백화전호 실험군에서는 47%, 77%, 84% 감소한 것으로 나타났다.

연구책임자인 권보인 박사는 "이번 연구성과는 국내 자생 한약재인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 우수한 것을 과학적으로 입증한 것"이라며 "국내 자생 한약재의 생산을 촉진하여 농가 소득증대는 물론 올바른 한약재 소비 확립에 기여할 것"이라고 말했다.

미래창조과학부, 농림축산식품부 부처 공동지원으로 이뤄진 이번 연구 결과는 국제 학술지 'Journal of Ethnopharmacology(약리학)' 최신호에 게재됐다.

/대전=박희윤기자 hypark@sedaily.com

<저작권자 ⓒ 서울경제, 무단 전재 및 재배포 금지>

6.국민일보

국내 자생종 前胡 천식치료 효능 입증

입력 : 2017-02-28 22:52

천식치료 등에 사용되는 전호(前胡)의 효능이 과학적으로 입증됐다.

특히 국내 자생종인 자화전호가 중국산 백화전호보다 효능이 뛰어난 것으로 확인됐다.

한국한의학연구원은 K-herb연구단 권보인 박사 연구팀이 국내 자생종 자화전호와 중국산 백화전호의 천식 치료 효과를 입증했다고 28일 밝혔다.

산형과 식물인 전호는 약학서인 본초강목(本草綱目)에 '담(痰)이 그득해 가슴과 옆구리가 답답하고 저린 것, 명치부위에 기(氣)가 뭉친 것 등을 치료하는데 쓰인다'고 기록돼 기침이나 천식을 치료하는 한약재로 사용되고 있다.

자주색 꽃이 피는 자화전호가 국내에서 자생하지만 생산량이 미미해 주로 백화전호를 수입해 이용하고 있다.

일부에서는 아삼(蛾蔘)이 똑같은 이름으로 불리며 오용되고 있다.

연구팀은 이들의 효능을 과학적으로 확인하기 위해 정상 쥐와 알레르기 천식을 유발한 실험쥐에 각각 자화전호와 백화전호 추출물을 투여한 뒤 관찰했다.

그 결과 자화전호를 투여한 실험군의 객담 생성이 90%, 천식 관련 염증세포인 호산구의 흡수량이 75%, 천식을 일으키는 사이토카인이 최대 87% 감소했다.

백화전호 역시 효과가 나타났지만 자화전호보다 감소량이 낮아 자화전호가 백화전호보다 더 효능이 뛰어난 것으로 확인됐다.

연구책임자인 권보인 박사는 "이번 연구로 한약재 전호, 특히 자화전호의 천식 치료 효과가 과학적으로 입증됐다"며 "자화전화의 국내 생산이 촉진돼 농가 소득증대 등의 효과가 기대된다"고 말했다.

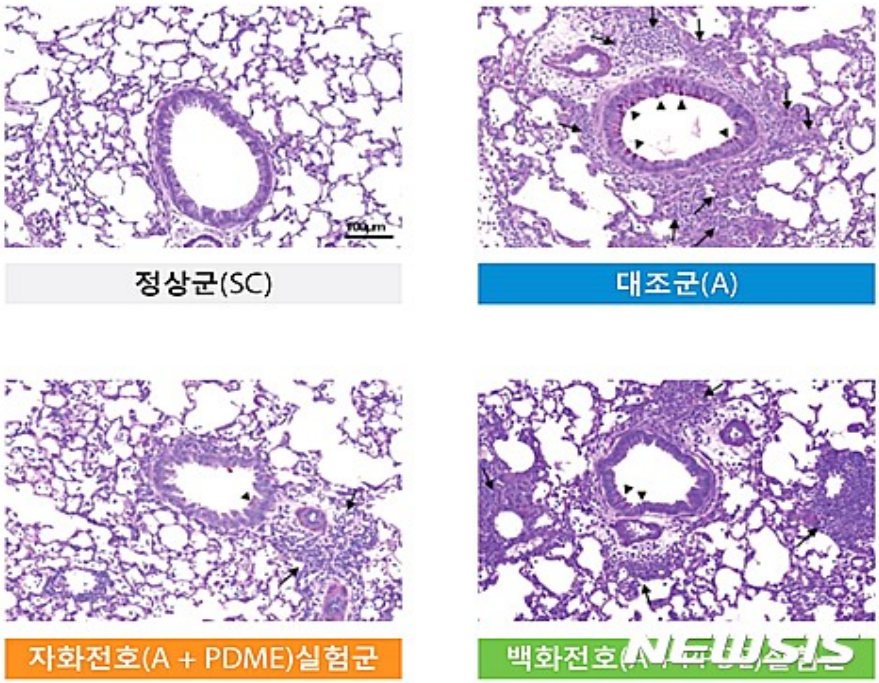
한편 이번 연구는 미래창조과학부와 농림축산식품부의 공동지원으로 이뤄졌고 연구 결과는 국제 학술지 '약리학(Journal of Ethnopharmacology)'에 게재됐다. 논문 제목은 'Identification of effective equivalence of anti-asthmatics between two species of peucedanum'이다.

인천=정창교 기자 jcgyo@kmib.co.kr

7.뉴시스

자생식물 '전호' 천식 치료 효과 입증

[뉴시스] 입력 2017.02.28 16:16 수정 2017.02.28 16:21



【대전=뉴시스】이시우 기자 = 천식치료 등에 사용되는 전호(前胡)의 효능이 과학적으로 입증됐다.

특히 국내 자생종인 자화전호가 중국산 백화전호보다 효능이 뛰어난 것으로 확인됐다.

한국한의학연구원은 K-herb연구단 권보인 박사 연구팀이 국내 자생종 자화전호와 중국산 백화전호의 천식 치료 효과를 입증했다고 28일 밝혔다.

산형과 식물인 전호는 약학서인 본초강목(本草綱目)에 '담(痰)이 그득해 가슴과 옆구리가 답답하고 저린 것, 명치부위에 기(氣)가 뭉친 것 등을

치료하는데 쓰인다'고 기록돼 기침이나 천식을 치료하는 한약재로 사용되고 있다.

자주색 꽃이 피는 자화전호가 국내에서 자생하지만 생산량이 미미해 주로 백화전호를 수입해 이용하고 있다.

일부에서는 아삼(蛾蔘)이 똑같은 이름으로 불리며 오용되고 있다.

연구팀은 이들의 효능을 과학적으로 확인하기 위해 정상 쥐와 알레르기 천식을 유발한 실험쥐에 각각 자화전호와 백화전호 추출물을 투여한 뒤 관찰했다.

그 결과 자화전호를 투여한 실험군의 객담 생성이 90%, 천식 관련 염증세포인 호산구의 흡수량이 75%, 천식을 일으키는 사이토카인이 최대 87% 감소했다.

백화전호 역시 효과가 나타났지만
자화전호보다 감소량이 낮아 자화전호가
백화전호보다 더 효능이 뛰어난 것으로
확인됐다.

연구책임자인 권보인 박사는 "이번
연구로 한약재 전호, 특히 자화전호의
천식 치료 효과가 과학적으로
입증됐다"라며 "자화전화의 국내 생산이
촉진돼 농가 소득증대 등의 효과가 기대된다"라고 말했다.

한편, 이번 연구는 미래창조과학부와 농림축산식품부의 공동지원으로

이뤄졌고 연구 결과는 국제 학술지 '약리학(Journal of Ethnopharmacology)'에 게재됐다. 논문 제목은 'Identification of effective equivalence of anti-asthmatics between two species of peucedanum'이다.

issue@newsis.com

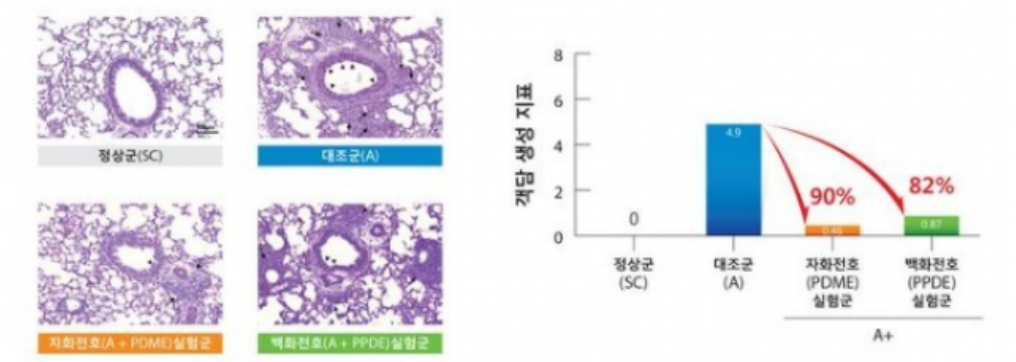
<저작권자ⓒ '한국언론 뉴스허브' 뉴시스통신사. 무단전재-재배포 금지.>

8.헬로디디

국내 자생식물 '자화전호' 천식치료 효과 '탁월'

한의학연, 자화전호·백화전호 천식치료 효과 논문 발표
"객담 생성 90% 감소…염증세포 호산구 침윤 75% 감소"

박성민 기자 sungmin8497@hellodd.com



자화전호와 백화전호의 기도내 객담 생성 정도.<사진=연구팀 제공>

국내 연구팀이 국내 자생식물 자화전호와 중국산 백화전호가 천식치료에 효과가 있음을 과학적으로 밝혀냈다.

한국한의학연구원(원장 이혜정)은 권보인 K-herb연구단 박사 연구팀이 자화전호와 백화전호의 천식치료 효과를 입증했다고 1일 밝혔다.

연구팀은 이들의 효능을 과학적으로 확인하기 위해 정상 실험쥐와 알레르기 천식을 유발한 실험쥐에 각각 자화전호와 백화전호 추출물을 투여한 뒤 관찰했다.

그 결과 자화전호를 투여한 실험군의 객담 생성이 90%, 천식 관련 염증세포인 호산구의 흡수량이 75%, 천식을 일으키는 사이토카인이 최대 87% 감소했다.

백화전호 역시 효과가 나타났지만 자화전호보다 감소량이 낮아 자화전호가 백화전호보다 더 효능이 뛰어난 것으로 확인됐다.

권보인 박사는 "국내 자생 한약재인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 우수한 것을 과학적으로 입증한 것"이라며 "자화전화의 국내 생산이 촉진돼 농가 소득증대 등의 효과가 기대된다"라고 밝혔다.

9.민족의학신문

천식치료에 국내 자생종 자화전호 '효과'

한의학연, 자화전호와 백화전호의 천식치료 효과 논문 발표

2017년 02월 28일 () 14:41:16 김춘호 기자 ✉ what@mjmedi.com

[민족의학신문=김춘호 기자] 국내 연구진이 국내 자생식물종인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식치료에 효과가 있음을 과학적으로 밝혔다. 특히 자화전호의 효과가 백화전호 대비 우수하게 나타나 국내 자생 한약재의 확보와 활용에 기여할 것으로 기대된다.

한국한의학연구원(원장 이혜정) K-herb연구단 권보인 박사 연구팀은 국내 자생종 자화전호와 중국산 백화전호의 천식치료 효과를 입증했다. 이번 연구 결과는 국제 학술지 'Journal of Ethnopharmacology(약리학)' 최신호에 게재됐다.

한약재 전호(前胡)는 식약처가 발간하는 '대한민국약전외한약(생약)규격집'에 백화전호 또는 자화전호(바디나물)로 규정되어 있다.

전호는 본초강목에 따르면 담(痰)이 그득하여 가슴과 옆구리가 답답하고 저린 것, 명치부위에 기(氣)가 뭉친 것, 풍두통(風頭痛)을 치료하는데 쓰인다. 특히 전호는 임상적으로 기침이 심한 감기나 천식을 치료하는 한약처방인 삼소음, 인삼패독산 등을 구성하는 주요 약재이다.

이와 같은 임상적 효능에도 불구하고 국내 생산량이 미미해 국내자생종 자화전호 대신 수입산 백화전호에 의존하고 있는 실정이다. 한국의약품수출입협회에서 발표한 '2015년 수입한약재 통관실적'에 따르면 백화전호는 연간 약 19톤(약 2억3000만원 상당)을 수입하고 있다.

실험 결과 자화전호와 백화전호 모두 천식 증상 개선과 염증세포 침윤 억제에 효과가 있었다. 특히 국내 자생종 자화전호가 객담 생성, 염증관련 세포 침윤 억제 등에서 중국산 백화전호보다 더 우수한 효능을 보였다.

연구팀은 동물실험에서 실험쥐(mouse)를 정상군, 알레르기 천식을 유발한 대조군, 천식 유발 실험쥐에 자화전호와 백화전호 추출물을 각각 경구 투여한 2개 실험군으로 나눠 차이를 관찰했다.

먼저 연구팀은 기도의 객담 생성 정도를 확인하기 위해 폐 조직을 적출해 파스염색(PAS Staining)을 실시했다. 그 결과 실험군에서 객담이 자화전호 투여 시 90%, 백화전호 투여 시 82%씩 각각 감소했다.

이어 기도 내 염증세포의 침윤 정도와 천식을 유발하는 염증성 사이토카인 분비량을 측정하기 위해 폐 기도세척액을 채취해 세포염색법(giemsa staining)과 효소면역측정법을 각각 시행했다.

실험 결과 기도 내 천식 관련 염증세포인 호산구의 침윤 정도가 자화전호 실험군에서 75%, 백화전호 실험군에서 55%씩 감소되었다.

또한 천식을 일으키는 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13)이 자화전호 실험군에서 각각 60%, 84%, 87%, 백화전호 실험군에서는 47%, 77%, 84% 감소한 것으로 나타났다.

이번 연구는 한약재 전호의 천식 치료 효과를 과학적으로 검증했을 뿐만 아니라 동시에 수입산 백화전호 대비 국내 자생종인 자화전호의 천식치료 효과 우수성을 실험을 통해 밝혀낸 것으로 평가할 수 있다.

건강보험심사평가원 자료에 따르면 천식으로 병원을 찾은 환자 160만명(2015년 기준)의 59%가 10세 미만의 아동이거나 60세 이상 노년층으로 소아기와 노년기에 천식에 걸릴 확률이 높아 해당 연령층에 각별한 주의가 요구된다.

연구책임자인 권보인 박사는 "이번 연구성과는 국내 자생 한약재인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 우수한 것을 과학적으로 입증한 것"이라며, "국내 자생 한약재의 생산을 촉진하여 농가 소득증대는 물론 올바른 한약재 소비 확립에 기여할 것"이라고 강조했다.

한편, 이름이 비슷해 혼·오용 우려가 있는 산형과 식물인 전호(한약명 아삼, Anthriscus sylvestris (L.) Hoffm.)는 자화전호, 백화전호와 다르므로 각별한 주의가 요구된다.

이번 연구는 미래창조과학부, 농림축산식품부 부처 공동지원으로 이뤄졌다.

김춘호 기자의 다른기사 보기

© 민족의학신문(http://www.mjmedi.com) 무단전재 및 재배포금지 | 저작권문의

10. 금강일보

경제

[사이언스 톡톡] 국내 자생종 자화전호 천식치료 효과 입증

한의학硏 권보인 박사 연구팀…"중국 백화전호보다 효과 우수"

데스크승인 [9면] 2017.03.01

강정의 | justice@ggilbo.com

산형과 식물로 한국, 중국, 일본, 타이완등에서 자생한다. 꽃이 자주색이라서 자화전호로 명명하며 외면이 흑갈색 또는 회황색을 띠며 단면은 황백색으로 섬유 속이 엉성하고 수선이 뚜렷하지 않다. 한국한의학연구원 제공

국내 연구진이 국내 자생식물종인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 있음을 밝혀냈다.

한국한의학연구원 K-herb연구단 권보인 박사 연구팀은 국내 자생종 자화전호와 중국산 백화전호의 천식치료 효과를 입증하는데 성공했다. 이번 연구 성과는 저널 오브 에스노파마콜로지(Journal of Ethnopharmacology) 최신호에 게재됐다.

한약재인 전호는 식약처가 발간하는 대한민국약전외한약(생약)규격집에 백화전호 또는 자화전호로 규정돼 있다. 본초강목에 따르면 전호는 담이 가득해 가슴과 옆구리가 답답하고 저린 것, 명치부위에 기가 뭉친 것, 풍두통(풍으로 인한 두통)을 치료하는데 쓰인다. 특히 기침이 심한 감기나 천식을 치료하는 한약처방인 삼소음, 인삼패독산 등을 구성하는 주요 약재다.

연구팀은 실험을 통해 자화전호와 백화전호 모두 천식 증상 개선과 염증세포 침윤 억제에 효과가 있음을 규명했다. 특히 자화전호가 객담 생성, 염증관련 세포 침윤 억제 등에서 백화전호보다 우수하다는 것도 밝혀냈다.

연구팀은 실험쥐 기도의 객담(가래) 생성 정도를 확인하기 위해 폐 조직을 적출해 파스염색(과옥소산에 의한 산화반응과 시프시약에 의한 발색반응의 2가지 과정을 포함하는 염색법)을 이용했다. 그 결과 실험쥐의 객담이 자화전호 투여 시 90%, 백화전호 투여 시 82%씩 각각 감소하는 것을 확인했다. 이어 기도 내 염증세포의 침윤 정도와 천식을 유발하는 염증성 사이토카인 분비량을 측정하기 위해 폐기도세척액을 채취해 세포염색법과 효소면역측정법을 각각 적용했다. 실험 결과 기도 내 천식 관련 염증세포인 호산구의 침윤 정도가 자화전호 실험군에서 75%, 백화전호 실험군에서 55%씩 감소했다.

한의학면 관계자는 "천식으로 병원을 찾은 환자 160만 명(2015년 기준)의 59%가 10세 미만의 아동이거나 60세 이상 노년층으로 소아기와 노년기에 천식에 걸릴 확률이 높다"며 "한약재인 전호의 천식 치료 효과를 과학적으로 검증했을 뿐만 아니라 동시에 수입산 백화전호 대비 국내 자생종인 자화전호의 천식치료 효과 우수성을 밝혀낸 만큼 치료에 도움이 될 것이다"라고 말했다.

강정의 기자 justice@ggilbo.com

11. 대전일보

한의학연, 자화전호와 백화전호의 천식치료 효과 논문 발표

2017-03-01기사 편집 2017-03-01 15:19:27

대전일보 > 사회 > 종합

추천 0개

국내 연구진이 국내 자생식물종인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 있음을 과학적으로 밝혔다.

특히 자화전호의 효과가 백화전호 대비 우수하게 나타나 국내 자생 한약재의 확보와 활용에 기여할 것으로 기대된다.

한국한의학연구원(KIOM) K-herb연구단 권보인 박사 연구팀은 국내 자생종 자화전호와 중국산 백화전호의 천식치료 효과를 입증했다고 1일 밝혔다. 이번 연구 결과는 국제 학술지 '약리학(Journal of Ethnopharmacology)' 최신호에 게재됐다.

본초강목에 전호는 △담(痰)이 그득해 가슴과 옆구리가 답답하고 저린 것 △명치부위에 기(氣)가 뭉친 것 △풍두통(風頭痛)을 치료하는데 쓰인다고 기술돼 있다. 특히 전호는 임상적으로 기침이 심한 감기나 천식을 치료하는 한약처방인 삼소음, 인삼패독산 등을 구성하는 주요 약재이다.

연구팀의 실험 결과 자화전호와 백화전호 모두 천식 증상 개선과 염증세포 침윤 억제에 효과가 있었다.

연구팀은 동물실험에서 실험쥐를 정상군, 알레르기 천식을 유발한 대조군, 천식 유발 실험쥐에 자화전호와 백화전호 추출물을 각각 입으로 투여한 2개 실험군으로 나눠 차이를 관찰했다.

먼저 연구팀은 기도의 객담 생성 정도를 확인하기 위해 허파 조직을 적출해 파스염색(PAS Staining)을 실시했다. 그 결과 실험군에서 객담이 자화전호 투여 시 90%, 백화전호 투여 시 82%씩 각각 감소했다. 이어 기도 내 염증세포의 침윤 정도와 천식을 유발하는 염증성 사이토카인 분비량을 측정하기 위해 폐기도세척액을 채취해 세포염색법(giemsa staining)과 효소면역측정법을 각각 시행했다.

실험 결과 기도 내 천식 관련 염증세포인 호산구의 침윤 정도가 자화전호 실험군에서 75%, 백화전호 실험군에서 55%씩 감소됐다. 또 천식을 일으키는 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13)이 자화전호 실험군에서 각각 60%, 84%, 87%, 백화전호 실험군에서는 47%, 77%, 84% 감소한 것으로 나타났다.

연구책임자인 권보인 박사는 "이번 연구성과는 국내 자생 한약재인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 우수한 것을 과학적으로 입증한 것"이라며 "국내 자생 한약재의 생산을 촉진해 농가 소득증대는 물론 올바른 한약재 소비 확립에 기여할 것"이라고 강조했다.

김달호 기자

<저작권자ⓒ대전일보사. 무단전재-재배포 금지>

12. 닥터 더블유

doctorW
의·약학 전문 경제지

뉴스 | 머니테크 | 이슈추적 | 업계는지금 | 헬스블로그 | 오피니언

기획 | 뉴스 | 제약 | 포토뉴스 | 의료 | 정책 | 의료기기 | 의약외품 | 화장품

홈 > 뉴스 > 의료

한의학硏 "국내 약재식물 '자화전호' 천식에 효과"

김남주 기자 | dw@doctorw.co.kr

승인 2017.03.02 10:20:30

국내 자생약재식물인 '자화전호'와 중국산 '백화전호'가 천식 치료에 효과가 있으며, 특히 국내산 자화전호가 백화전호보다 치료효과 면에서 우수하다는 연구 결과가 나왔다.

2일 한국한의학연구원(KIOM) K-herb연구단 권보인 박사 연구팀은 동물실험 결과 자화전호와 백화전호 모두 천식 증상 개선과 염증세포 침윤 억제에 효과가 있었다고 밝혔다.

연구팀은 특히 국내 자생종 자화전호가 중국산 백화전호보다 더 우수한 효능을 보였다고 덧붙였다.

<저작권자 © 닥터더블유 무단전재 및 재배포금지>

13. 충청투데이

국내 자생식물 '자화전호' 천식 특효약

정재훈 기자 jjh119@cctoday.co.kr 2017년 03월 02일 목요일 제7면 승인시간 : 2017년 03월 01일 19시 10분

댓글 0 지면보기 폰트

중국 '백화전호'도 효과 입증돼, 가래 90% 감소… 유사식물 주의

국내 자생식물인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과 있는 것으로 입증됐다.

한국한의학연구원은 1일 권보인 K-herb연구단 박사팀이 동물실험을 통해 자화전호, 백화전호가 천식 치료에 대한 효과를 보였다고 밝혔다.

한약재인 전호(前胡)는 식품의약품안전처가 발간하는 '대한민국약전외한약(생약)규격집'에 백화전호 또는 자화전호(바디나물)로 규정돼 있다.

본초강목에서는 전호를 두고 담이 그득해 가슴과 옆구리가 답답하고 저린 것, 명치에 기가 뭉친 것, 풍두통(風頭痛)을 치료하는데 쓰인다고 기술돼 있다.

특히 임상적으로 기침이 심한 감기와 천식을 치료하는 한약처방인 삼소음과 인삼패독산을 구성하는 주요 약재이지만 국내에서는 생산량이 적어 수입산인 백화전호에 의존하고 있다.

연구팀은 실험쥐를 정상군과 알레르기 천식을 유발한 대조군 2개 실험군으로 나눠 자화전호와 백화전호 추출물을 투여해 차이를 관찰했다.

그 결과 기도의 객담(가래) 생성의 경우 실험군에서 자화전호는 90%, 백화전호는 82%가 감소했다.

특히 천식 관련 염증세포인 호산구의 침윤 정도도 자화전호는 75%, 백화전호는 55%가 감소했으며 천식을 일으키는 사이토카인 IL-4, IL-5, IL13이 자화전호는 각각 60%, 84%, 87%, 실험구는 47%, 77%, 84% 줄어든 것으로 나타났다.

권보인 한의학연 박사는 “이번 성과는 국내 자생 한약인 자화전호와 중국산 백화전호가 천식 치료에 효과가 우수한 것을 과학적으로 입증한 것”이라고 말했다.

한편 이름이 똑같아 혼·오용 우려가 있는 산형과 식물인 '전호(한약명 아삼·Anthriscus sylvestris (L.) Hoffm.)'는 자화전호와 백화전호와 다르므로 각별한 주의가 요구된다.

정재훈 기자 jjh119@cctoday.co.kr

〈저작권자 © 충청투데이 (http://www.cctoday.co.kr) 무단전재 및 재배포 금지〉

정재훈 기자의 다른 기사보기

14. YTN

[앵커]
미나리과 식물인 한약재 '전호'가 천식에 효과가 있다는 사실이 과학적으로 밝혀졌습니다.

특히, 국내 자생종이 중국산에 비해 효능이 더 우수한 것으로 나타나, 국산 한약재 확보에 도움이 될 전망입니다.

이정우 기자입니다.

[기자]
우리나라에서 천식으로 병원을 찾은 환자 수는 연간 160만 명.

이 가운데 60% 정도가 10살 미만 아동이거나 60살 이상 어르신으로 소아기와 노년기에 많이 발병하는 것으로 나타났습니다.

한의학에서는 기침이 심한 감기나 천식 등에 한약재 '전호'를 활용하고 있는데, 국내 자생종 '자화전호'의 생산량이 적어 중국산 '백화전호'에 의존하고 있습니다.

이런 가운데 국내 연구진이 처음으로 한약재 '전호'가 천식 치료에 효과가 있음을 과학적으로 입증했습니다.

[권보인 / 한국한의학연구원 K-herb연구단 : 자화전호, 백화전호 두 종을 투여한 결과 천식을 유발한 쥐에서 천식에 관련된 어떤 여러 가지 인자들이 감소하는 것을 확인할 수 있었습니다.]

연구팀은 특히, 국내 자생종 자화전호가 가래 생성과 염증 관련 세포 억제 등에서 중국산보다 효능이 더

우수하다는 사실을 밝혔습니다.

가래의 경우 국산 자화전호는 90%, 중국산 백화전호는 82%씩 감소했습니다.

또, 기도 내 천식 관련 염증세포의 경우 국산은 75%, 중국산은 55%씩 줄었고, 천식을 일으키는 단백질인 사이토카인 역시 각각 84%와 77% 감소했습니다.

이번 연구 결과는 국내 자생종 한약재 확보와 한의약 산업에 도움을 줄 것으로 보입니다.

국산 자화전호의 우수성이 과학적으로 입증되면서 국내 한약재 생산도 촉진할 전망입니다.

[권보인 / 한국한의학연구원 K-herb연구단 : 농민들이 많이 재배함으로 인해서 국내 자생 약재를 사용하게 된다면 저희도 안정적 자원 확보에도 도움이 되고 농민들의 소득 증대에도 도움이 될 것이라고 생각합니다.]

미래창조과학부와 농림축산식품부가 공동으로 지원한 이번 연구 성과는 국제 학술지 '약리학 저널'에 실렸습니다.

YTN 이정우[ljwwow@ytn.co.kr]입니다.
- Copyright ⓒ YTN Science, 무단 전재 및 재배포 금지 -

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

제1세부 충남대학교

구분	세부과제명	세부연구목표	연구개발의 내용
1차년도 (2016)	[제1세부] 표준화된 시험관내 검사법 제시 및 민간보급 프로세스 개발	시험관내 면역능 검사법 개발	• 면역능 검사 대상이 될 면역세포 유형 선정 및 시험관내에서 측정가능한 면역기능 선택
			• 기존개발 우수 면역식품 소재를 이용하여 면역기능 검사법 개발 및 검사과정의 표준화 시도
			• 면역기능 검사치의 수량화 및 등급화
			• 일차 개발된 검사법을 통한 우수 면역식품 소재 선정
2차년도 (2017)	[제1세부] 표준화된 시험관내 검사법 제시 및 민간보급 프로세스 개발	표준화된 시험관내 면역능 검사법 확립	• 동물시험 결과를 예측할 수 있는 새로운 시험관내 검사법 개발
			• 동물시험에 의해 타당성 입증된 시험관내 검사법 확립
			•시험관내 검사법 과정의 표준화 확립
			•시험관내 검사법 결과의 수량화 및 등급화 기준 확립
3차년도 (2018)	[제1세부] 표준화된 시험관내 검사법 제시 및 민간보급 프로세스 개발	면역능 평가 시스템 구축	• 시험관내 검사법과 동물시험 과정 및 결과 정리, 기존 결과와의 비교 분석
			• 기 개발소재 시험관내 검사법 수행
			• 후보 면역식품(소재)들의 면역능 검사과정, 절차 및 결과들을 포함한 웹 페이지 개발
			• 면역능 평가 시스템 구축-전문가·기업·소비자가 함께 참여하여 면역식품(소재) 개발을 지원할 수 있는 체제

제1협동 상지대학교

구분	세부과제명	세부연구목표	연구개발의 내용
1차년도 (2016)	[제1협동] 선정된 우수 효능 소재에 대한 동물 시험법 구축 및 검증	동물시험에 대한 면역 지표 설정 및 설계법 도출	우수면역능 소재 선정기준 마련
			동물실험을 통한 시험관내 검사법의 타당성 검증의 방향성 설정
			동물시험을 위한 동물모델 설계 및 면역지표 설정
			기존 우수 면역식품(소재)에 대한 동물시험
2-3차년도 (2017-8)	[제1협동] 선정된 우수 효능 소재에 대한 동물 시험법 구축 및 검증	우수 면역식품 (소재)에 대한 동물 실험	기존 우수 면역식품(소재)에 대한 동물시험
			면역지표들 측정 및 분석
			BK바이오 제공 우수 면역 식품(소재)에 대한 동물 실험
			동물시험 면역지표들 결과와 시험관내 검사법에 의한 등급화 결과를 비교분석하여 시험관내 검사법의 타당성 평가 (면역능이 이미 알려진 소재와 비교분석을 통한 등급화)

제2협동 BK 바이오

구분	세부과제명	세부연구목표	연구개발의 내용
1차년도 (2016)	[제2협동] 면역 식품소재 발굴 및 산업화를 위한 평가 가이드라인 설계	면역능 우수 식품소재 수집	• 우수소재 데이터베이스 활용을 통한 우수식품소재 수집
			• 유용 성분의 분석검증을 위한 분석 및 시료 전처리법 가이드 제시
			• 면역능 수치별(등급별) 가이드라인 설계
2차년도 (2017)	[제2협동] 면역 식품소재 발굴 및 산업화를 위한 평가 가이드라인 설계	우수 면역식품 (소재) 선정 가이드라인 설계	• 우수 면역식품(소재) 기능 성분 분석
			• 기능성분별 · 기능성분의 함량별 면역능 수치 등급화 가이드 제시
			• 우수 식품소재 5종 선정 가이드 제안 (기존 개별인정형 원료와 비교)
3차년도 (2018)	[제2협동] 면역 식품소재 발굴 및 산업화를 위한 평가 가이드라인 설계	사례적용을 통한 면역능 평가시스템의 재현성 확인 및 BC 도출	• 우수 면역식품(소재)와 기능성성분의 화학적 특성이 유사한 기 개발소재 선정
			• 기 개발소재에 대한 시험관내 검사법과 동물시험 실행 후 효능결과 비교 및 타당성 평가
			• 평가를 통한 BC (Benefit-Cost analysis)도출

3-2. 목표 달성여부

제1세부 충남대학교

구분	연구개발의 내용	달성도(%)	연구개발 수행내용
1차년도(2016)	• 시험관내에서 측정가능한 면역기능 선택	100	• 수지상세포 활성화과정 유세포분석에 의한 분자적 변화 측정
	• 면역능 검사 대상이 될 면역세포 유형 선정	100	• 선천면역과 후천면역의 종합 조절세포인 수지상세포 기반 겁사법 개발
	• 기존 개발 우수 면역식품소재를 이용하여 면역기능 검사법 개발 및 검사과정의 표준화	100	• 시중 유통중이거나 특허 출원된 인증 면역식품소재 선정 후 수지상세포 활성화에 미치는 영향 분석
	• 면역기능 검사치의 수량화 및 등급화	100	• 면역능에 대한 수치석 해석과 등급을 가능하게 하는 모듈에 대한 탐구
	• 일차 개발된 검사법을 통한 우수 면역식품(소재) 선정	100	• 시중 유통중이거나 특허 출원된 인증 면역식품소재들가운데 일관적인 반응ㄹ deh하는 소재들을 표준면역식품소재로 선정
2차년도(2017)	• 동물시험 결과를 예측할 수 있는 새로운 시험관내 검사법 개발	100	• 시험관내 검사법 개발 • 수지상세포 시험관내 활성화 단계 모니터링 • 활성화 지표 단백질 발현량 유세포분석법 확립
	• 동물시험에 의해 타당성 입증된 시험관내 검사법 확립	100	• 시험관내 면역능 검사치와 동물실험 결과 상호비교 분석
	• 시험관내 검사법 과정의 표준화 확립	100	•BMDC 유도 및 배양과정 표준화 •면역식품소재 처리과정 표준화 •Flow cytometer 방법론에 기초한 수지상세포 성숙화 정도 및 방향 측정 및 분석과정 표준화 •혼합림프구 반응과정 표준화 •Cytokine Beads Array 방법에 의한 여러 싸이토카인 측정 및 분석과정 표준화
	• 시험관내 검사법 결과의 수량화 및 등급화 기준 확립	100	• 면역지수들을 정의하고 측정하여 수량화 및 등급화의 기준으로 확립 •면역능 평가 지수 확립 (면역증진지수 I, II & 면역관용지수 I, II) •각 면역시료들의 면역지수들

3차년도 (2018)	• 시험관내 검사법과 동물시험 과정 및 결과 정리, 기존 결과와의 비교 분석	100	• 표준면역식품소재의 면역능 등급화 •개발 면역식품소재의 등급화 및 우수 면역식품소재 선정 •시장에서 유통되는 기능성 면역식품소재 품질 평가 •면역식품소재의 혼합림프구 반응을 통한 T helper 세포 분화 조절 능력 측정 •대식세포 싸이토카인 생성능과 비교 분석
	• 기 개발소재에 대한 시험관내 검사법과 동물시험 실행 후 효능결과 비교 및 타당성 평가	100	• 동물실험 결과를 통해 표준면역소재 및 개발면역소재, 우수개발소재 면역능 평가 유효성 검증
	• 후보 면역식품(소재)들의 면역능 검사과정, 절차 및 결과들을 포함한 웹 페이지 개발	100	•민간보급 프로세스 구축을 위한 면역능 평가 시스템을 소개하는 웹페이지 및 앱 개발
	• 면역능 평가 시스템 구축-전문가·기업·소비자가 함께 참여하여 면역식품(소재) 개발을 지원할 수 있는 체제	100	• 민간보급 프로세스 구축을 위한 면역능 평가 시스템 앱 개발 • 면역능 평가시스템 개발 및 앱 개발로 통한 민간보급 프로세스 구축

제1협동 상지대학교

구분	연구개발의 내용	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년도 (2016)	우수면역능 소재 선정기준 마련	100	-식약처 건강기능식품에 대한 면역능 문헌조사 -식약공용소재의 면역능 문헌조사 -연구진내 선행연구가 진행된 면역능소재를 이용
	동물실험을 통한 시험관내 검사법의 타당성 검증의 방향성 설정	100	-항감염능 기능성모델 -과민면역조절 질환 모델 -만성염증조절 질환모델
	동물시험을 위한 동물모델 설계 및 면역지표 설정	100	-항감염능 기능성모델 -과민면역조절 질환 모델 -만성염증조절 질환모델

	기존 우수 면역식품(소재)에 대한 동물시험	100	홍삼, 아삼, 식방풍, 백개자, 황개자, 흑개자
2-3차년도 (2017-8)	기존 우수 면역식품(소재)에 대한 동물시험	100	-백개자의 과민면역반응조절 동물실험 황개자의 과민면역반응조절 동물실험 -더덕 저농도의 과민면역반응조절 동물실험 -은시호 저농도의 과민면역반응조절 동물실험 -더덕 고농도의 과민면역반응조절 동물실험 -은시호 고농도의 과민면역반응조절 동물실험
	면역지표들 측정 및 분석	100	과민면역 질환의 면역지표 분석 다양한 Allergic asthma model을 이용한 평가법 만성염증 질환의 면역지표 분석 류마티스 관절염 평가모델 구축
	BK바이오 제공 우수 면역 식품(소재)에 대한 동물 실험	100	-면역능 소재 4종(양배추 추출분말, 청귤 다당, 한라봉 다당, 당근박 다당)의 항감염능 동물 실험
	동물시험 면역지표들 결과와 시험관내 검사법에 의한 등급화 결과를 비교분석하여 시험관내 검사법의 타당성 평가 (면역능이 이미 알려진 소재와 비교분석을 통한 등급화)	100	- 면역능 소재 5종(다래, 후코이단, 은시호 효소2 처리, 양배추효소처리, 양배추다당)의 과민면역 반응조절 동물실험 - 역능 소재 5종(표고버섯균사체, 스피룰리나, 청귤다당, 양배추다당, 양배추효소처리)의 과민면역 반응조절 동물실험 - 존 소재 4종(북강활, 식방풍, 아삼, 더덕)의 과민면역반응조절능 비교 - 역능 소재 5종(스피룰리나, 표고버섯균사체, 아삼, 구아바, 클로렐라)의 만성염증반응조절 동물실험 -n vitro - in vivo 소재별 결과 비교 분석 및 타당성 평가

제2협동 BK 바이오

구분	연구개발의 내용	달성도(%)	연구개발 수행내용
1차년도 (2016)	• 우수소재 데이터베이스 활용을 통한 우수식품소재 수집	100	• 면역조절 기능성 소재에 대한 면역증가, 면역관용에 따른 조사 및 수집된 정보로부터 기능성분, 지표성분, 바이오마커를 중심으로 분석을 통해 검토 최종 검토 후보 30종으로 단축 및 관련 소재 제조 및 수집하여 개발 면역 효능평가를 위해 주관기관에 전달 – 식약처 고시된 기준규격형, 개별인정형, 사업화를 위한 비케이바이오 제안
	• 유용 성분의 분석검증을 위한 분석 및 시료 전처리법 가이드 제시	100	• 각 소내에 대한 기능성분, 지표성분, 바이로마커를 중심으로 분석법의 타당성, validation, 안전성 검증, 기능성분 QC 가이드를 통해 완제품 내 기능성분을 위한 전처리법 가이드 제시 • 소재별 기능성분, 규격 및 제조법 조사 및 제조를 위한 기능성분별 추출 제조법 가이드 및 우수성이 확인된 후보 소재 안전성 확인
	• 면역능 수치별(등급별) 가이드라인 설계	100	• 기능적, 경제적 가이드 선정을 위한 기반 자료 조사 • 최적의 유효 섭취량 설정을 위한 원료에 대한 기능성분 및 면역능 수치, 경제성 가이드를 제시하여 우수 후보 소재 등급화
2차년도 (2017)	• 우수 면역식품(소재) 기능 성분 분석	100	• 우수한 효능을 가지는 다당류에 대한 기능성분 분석 실시를 통한 면역 다당 확인 • 분자량을 기준으로 한 기능성분 획분을 표준으로 보완 제시 • 유용성분의 정확한 분석을 위한 최적의 전처리 과정(메트릭스 제거 및 분리능 향상)을 위한 방법 표준화
	• 기능성분별 · 기능성분의 함량별 면역능 수치 등급화 가이드 제시	100	• 대표적인 기능성 원료의 기능성분의 종류에 따른 면역능 구분과 등급화를 위한 가이드 제시 – 개발된 시험관 시험법에 의해 도출된 immunogenic한 경향과 tolerogenic한 경향의 기준으로 등급화 • 대표 기능성분의 함량별 면역능 등급화 가이드 제시
	• 우수 식품소재 5종 선정 가이드 제안 (기존 개별인정형 원료와 비교)	100	• 측정법 개발을 위한 객관성 있는 식품 소재 5종 선정 : 홍삼농축액, 표고버섯자실체, 후코이단, 유산균, 다래추출물 • 사업화 개발을 위한 우수 식품소재 5종 선정 : 당근박다당, 케일박다당, 한라봉피다당, 청귤박다당, 브로콜리추출물 • 기능성 원료로의 우선 사업화 대상 선정을 위한 생산 가능성, 경제성 검토 및 비교

3차년도 (2018)	• 우수 면역식품(소재)와 기능성성분의 화학적 특성이 유사한 기 개발소재 선정	100	• 개발소재 및 우수 면역식품(소재) 지표물질 면역활성 다당 공인인증 분석을 통한 신뢰성 확인 및 사업화 개발을 위한 우수 식품소재의 타당성 확인(면역활성 다당 함유에 따른 면역능 효과 확인) • 우수 면역식품(소재)와 기능성성분의 화학적 특성이 유사한 면역활성 다당체(RgⅠ,Ⅱ, 홍삼다당, 진세노사이드, 유산균 다당) 선정 • 우수 효능 소재의 산업화를 위한 공정 최적화를 통한 시생산 공정 조건 확정 및 당근박다당 재현성 확인 – 당근박, 케일박다당 특허 2건 등록
	• 기 개발소재에 대한 시험관내 검사법과 동물시험 실행 후 효능결과 비교 및 타당성 평가	100	• 개발 면역능 평가와 식약처 가이드 효능결과 비교 및 타당성 평가를 위한 기존 면역능 평가 바이오마커 선정 – 식약청 “면역관련 기능성평가 가이드라인” 면역기능 증진, 과민면역반응 완화 바이오마커를 통한 비교군으로 싸이토카인 선정 • 면역기능 평가 타당성 분석 및 기술수준진단 – 면역기능 증진, 과민면역반응 완화 동시 측정 가능과 연관성을 고려하여 바이오마커로 싸이토카인 선정, 개발 면역능 측정법과 교차 검증 실험 결과를 비교 분석하여 개발 면역능 측정법 타당성 증명
	• 평가를 통한 BC (Benefit-Cost analysis)도출	100	• 식약처에서 가이드 면역 평가법과 비교를 통한 BC (Benefit-Cost analysis) 도출 – 분석 비용, 시간, 타당성 등 비교를 통한 개발 면역능 평가법 우수성 확인 • 우수 효능 소재의 기존 면역 건강기능식품 원료들 간의 경제성 비교 – 개발 소재의 사업화 가능성 및 우수성 확인 • 앱 개발로 통한 민간보급 면역능 평가시스템 구축 및 국내 전시회 참가 및 면역능 평가법 홍보

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

가. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표		사업화지표											연구기반지표								
		지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용 등)
													1논문								
		특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위		건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건	건	명	건	건	
가중치																					
최종목표		3	3		1		1					1	3	2		2	3	6	2	2	
1차년도	목표																1	2			
	실적												1	1		2	1	2			
2차년도	목표	2	1										1	1		1	1	2		1	
	실적	1											1	1		1	1	2		0	
3차년도	목표	1	2		1		1					1	2	1		1	1	2	2	1	
	실적	5	2				1									1	1	2	2	16	
4차년도	목표																				
	실적																				
5차년도	목표																				
	실적																				
소계	목표	3	3		1		1					1	3	2		2	3	6	2	2	
	실적	6	2		0		1					0	2	2	4.39	4	3	6	2	16	
종료 1차년도			2		1		0					1	1								
종료 2차년도			1										2								
종료 3차년도																					
종료																					

4차년도																				
종료 5차년도																				
소 계		3		1							1	3								
합 계	6	5		1		1					1	5	2		4	3	6	2	16	

나. 후속 진행계획

1) 후속정책과정의 필요성

면역능 평가 시스템 구축-전문가·기업·소비자가 함께 참여하여 면역식품(소재) 개발을 지원할 수 있는 체제를 위한 기본 골격들은 이 연구과제를 통해 갖추었다. 하지만 이를 현실적으로 집행하기 위해서는 다양한 기관들이 협력해야 하기 때문에 이 후 개발성과물들 발표 밑 공유, 정책자료 제시를 통해 면역능 평가 시스템이 현실화되도록 노력한다.

2) 개발성과의 표준화 및 식약처 가이드라인 반영을 위한 후속 진행계획

- 개발 평가법의 SOP(Standard of procedure) 확보
- 기존 분석법과의 제 3자 비교평가를 통한 객관화 데이터 확보
- 식약처 기능성평가팀에 개발성과 소개 및 가이드 표준화 방안 협의

4. 연구결과의 활용 계획 등

4.1. 개발한 면역능 평가 시스템을 웹페이지 및 앱 개발을 통한 민간보급 구축

본 연구결과인 면역능 평가 시스템은 면역효능 건강기능식품 개발 초기단계의 면역 기능성 소재 발굴을 면역증진 및 과민면역 완화 측면의 평가로 통하여 과학적이고 체계적인 제품 개발을 지원할 수 있는 콘텐츠를 담고 있다.

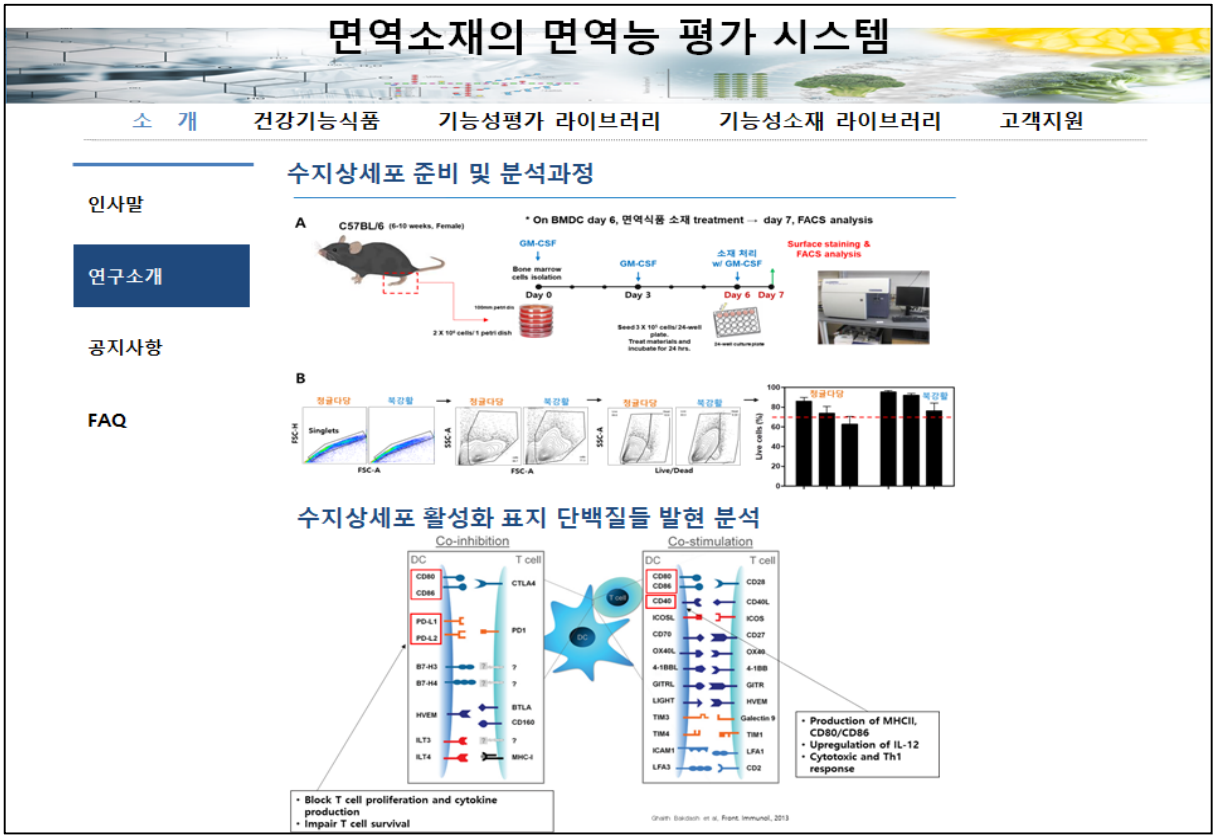
이 연구결과를 활용하여 면역능 우수 식품소재 수집 기업의 면역식품 개발영역 연구효율 증대 및 소비자의 제품 선택과정 신뢰성 향상에 기여할 수 있다.

면역식품(소재)의 면역능을 검사하기 위해서 동물모델 시험을 통해 타당성이 검증된 표준화되고 등급화된 일차 시험관내 검사법들의 평가방법을 지원하고, 민간영역 면역식품(소재) 개발연구의 효율성을 돕기 위해서 확립된 검사법을 웹기반 프로그램과 스마트폰 앱으로 면역능 평가 시스템을 구축하여 보급 체계를 마련할 계획이다.

가. 웹페이지 주요 내용

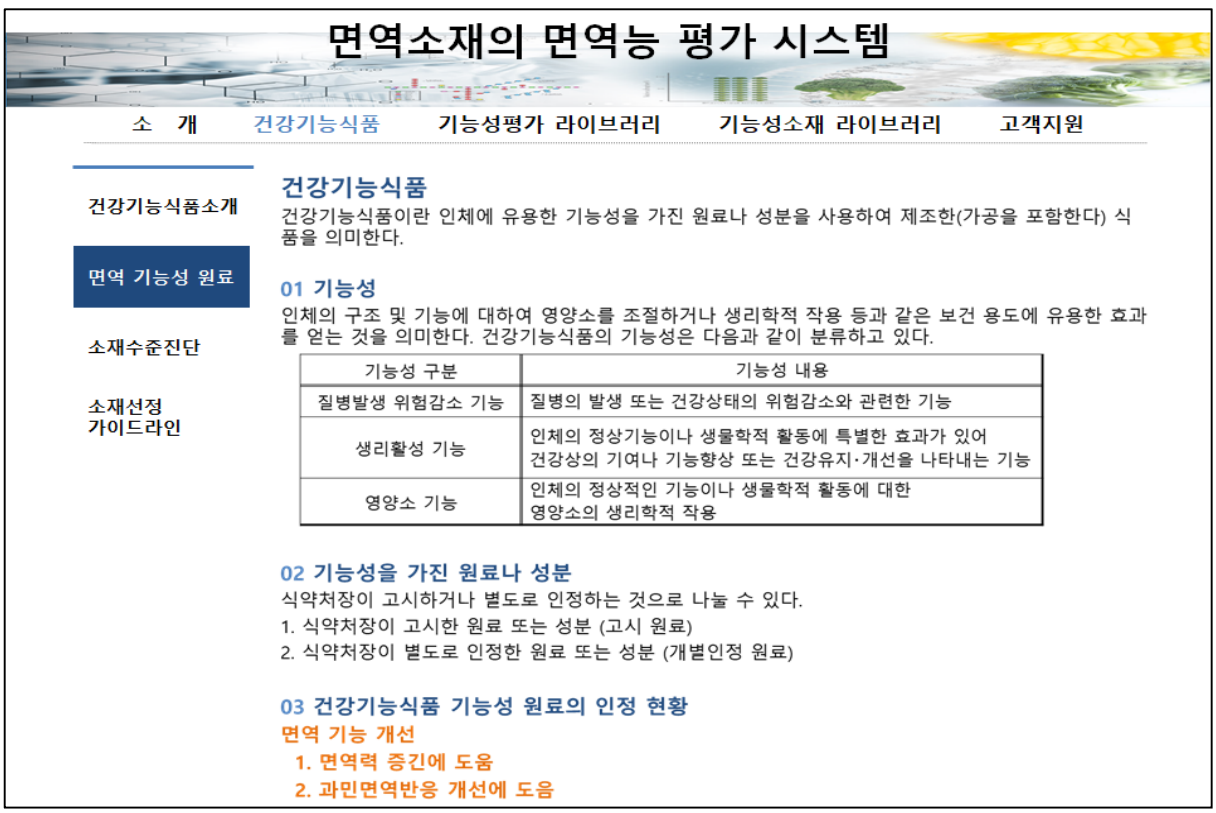
(1) 면역능 평가 시스템 소개

- 시험관내 검사법 및 동물모델 소개
- 시험관내 검사 및 동물모델 절차 안내



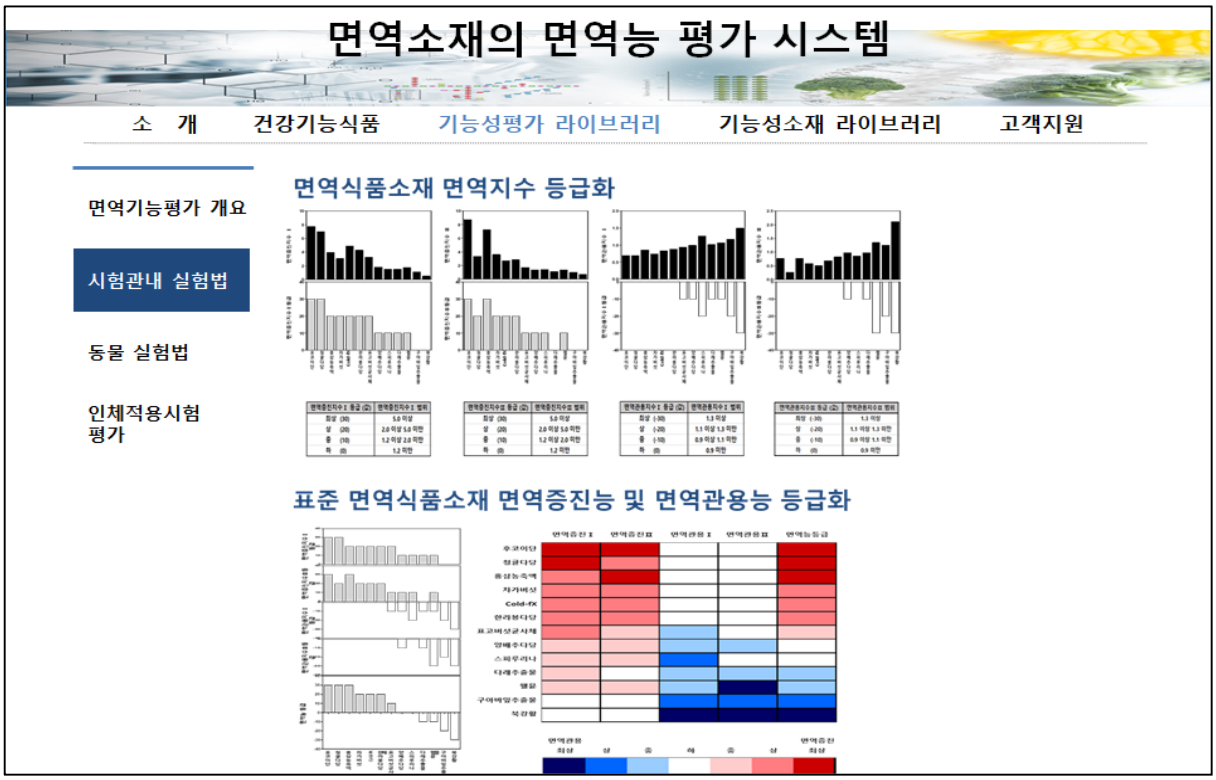
(2) 건강기능식품 현황 소개

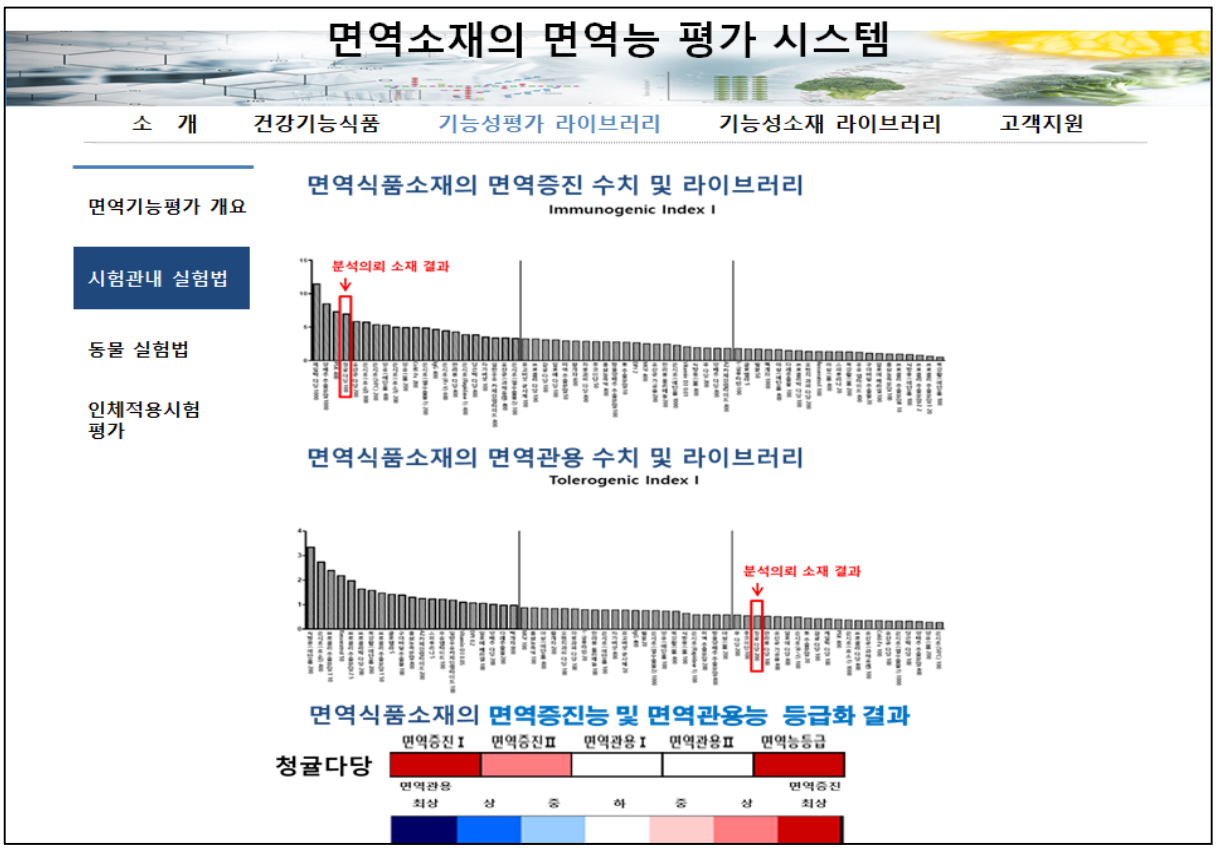
– 식품의약품안전처 ‘건강기능식품 기능성 원료 인정 현황’ 등 건강기능식품 개요 및 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 인정 방법을 통한 소재수준 진단 및 소재선정 가이드라인 제시



(3) 면역능 평가시스템을 위한 DB 구축

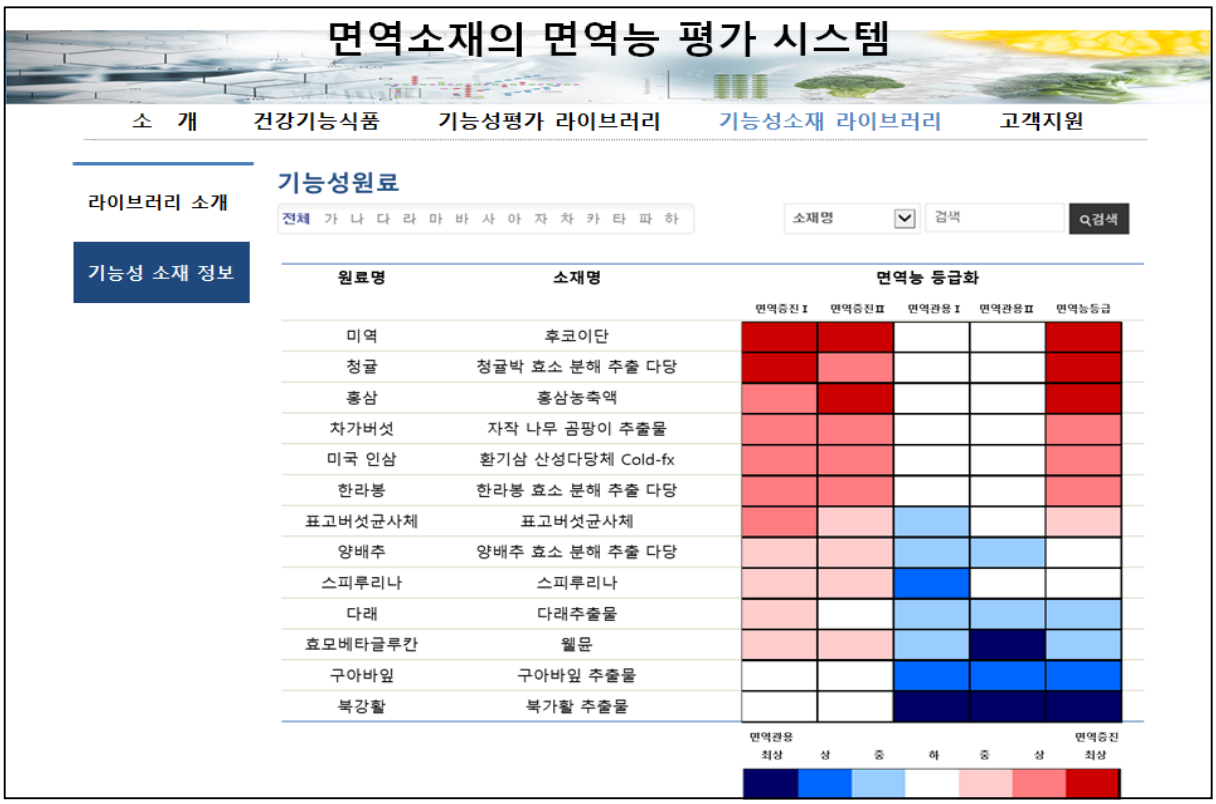
– 자료관리 기능 지원을 통한 개발된 면역능 평가 시스템을 통한 면역능 측정 결과를 분석, 마련되는 면역능 평가시스템에서 사용되는 여러 입력 자료와 라이브러리, 지표, 결과 자료 등의 DB를 관리를 통한 소재에 대한 면역 기능성 방향성 및 등급화를 통한 면역능 평가, 건강기능식품 가능성 확인할 수 있다.





(4) 기능성소재 라이브러리

- 식품소재의 면역능 평가 연구 자료를 소재별로 구분하고 현재까지 진행된 연구 현황을 진단하여 결과를 소개하는 라이브러리로서 면역 건강기능 식품 제품 개발 전략의 수립에 도움을 주고자 구축된 데이터베이스이다. 개발 평가법에 의해 면역증진, 면역관용에 따른 등급화를 통한 데이터베이스화 및 연구 자료들을 수집하였다.



(5) 면역능 평가시스템 구축과 배포

- 웹기반 평가 프로그램 개발을 위하여 JSP를 이용한 웹에서 실행가능한 평가 프로그램을 개발하여 일차 시험관내 검사법의 결과를 도출하고, 동물모델 결과와 비교하여 검증하고 통계분석할 수 있는 기능 및 프로세스를 지원함
- 기업의 면역식품(소재)의 효율적인 개발을 지원하기 위해 웹기반 평가 프로그램과 동일한 기능의 스마트폰 앱을 개발하여 배포하여 민간 영역의 면역식품(소재) 개발에 활용하도록 함. 스마트폰은 안드로이드 폰과 애플 아이폰 모두 지원 가능하도록 개발함

4.2 면역능 평가 실용화 · 산업화 계획

가. 면역능 평가로 입증된 면역(식품) 소재의 면역식품 시장 확대 전략 방향

(1) 체계화된 면역제품 생산 방향 설정 : 면역다당

○ 제2협동기관인 ㈜비케이바이오의 지금까지 진출하였던 주사업 분야는 국내 식품 대기업 및 유가공회사에 주요 식품소재류를 납품하는 것으로 관련 시장의 규모는 대단히 크지만, 성장의 한계는 분명 있다. 그에 따라 당사는 제주도 원물을 활용한 다양한 소비자용 제품 및 식품소재를 개발하여 신규 매출을 발굴하고자 한다.

○ 당사의 향후 3년간 추진하려는 분야는 냉장 착즙주스, 유제품, 건강즙 제품, 면역강화 제품 시장임. 착즙주스 시장의 전체시장은 350억, 건강즙시장은 1조, 면역강화제품 시장 1조, 유제품시장은 5조의 시장을 형성하고 있음. 당사는 2019년부터 주력 제품을 출시할 계획으로 이전 기간의 매출은 발생하지 않음.

○ 본 과제 연구개발로 면역증진 효능을 확보된 면역다당의 생산 기술을 바탕으로 수입되고 있는 관련 소재의 대체 및 국내외 관련 시장에서 경쟁력의 확보. 특히 부산물을 원료로 활용하기 때문에, 가격경쟁력을 확보하여, 해외 시장 진입장벽을 낮춤으로써, 국산 소재의 세계화 진출 초석 마련하고자 한다.

○ 영양식품 및 건강기능식품의 개발 및 임상결과를 토대로, 면역소재의 건강기능식품 개별인증을 추진함으로써, 부가가치 상승 및 한국형 면역신약의 토대 구축하고자 한다.

○ 면역다당류의 해외시장 전체 규모는 다당류만으로 산정이 어려우나 제품이 다양한 일본, 미국 등 유사시장 합산규모는 대략 수백억 이상 될 것으로 판단된다.

○ 면역다당류는 국내 개발 사례도 아직 없어 국내시장을 개척할 수 있으며 소재 및 제품이 개발되어 국내시장이 형성되면 그때부터 해외 소재와의 경쟁이 있을 것으로 예상되며, 국내개발 선발업체의 이점과 해외소재 대비 경쟁력 있는 가격을 근거로 초기 시장부터 약진한다는 전략으로 과감하게 시장을 선점해 나갈 계획이다.
○ 따라서 사업 종료 후 1-2차년까지는 지속적인 해외 프로모션이 주로 이루어져야 하므로

실질 매출은 10만불 미만으로 예상되며, 프로모션 효과가 예상되는 3차 년도부터는 50만-100만불 이상의 매출 및 매년 20-30% 이상 성장을 예상한다.

○ 국내 건강식품 시장은 최근 5년간 연평균 11.5%씩 지속적으로 성장하는 추세이고 그 중, 40%의 시장이 면역기능 관련 제품이며, 2013 건식 5.2% 상승, 2014 1조 1920억 40%가 면역관련 제품인데, 가격 및 품질적으로 경쟁력 있는 상품을 개발함으로써 시장 확대 가능함. 글로벌 항암제 시장은 연평균 15%씩 성장하고 있는 고속성장 시장으로서, 미국 사이언스 학술지에서 350억$에 달하는 면역 치료제 분야를 가장 주목하고 있고, 세계적으로 면역관련 소재 시장의 지속적 증가 및 매출 확대 예상되며 기존 항암제와 표적 항암제의 부작용을 방지한, 인체의 면역 메커니즘을 이용해 암을 치료하는 면역항암제 시장이 발전(cf. 카터 전 미국 대통령의 뇌종양 완치에 집중 적용 방법)되고 있으며 국제적인 제약사들도 글로벌 빅파마들과 면역항암제 R&D 개발 진행 중이고 향후 부산물로부터 생산되는 면역다당을 경쟁력 있게 제약화함으로써, 면역제제의 국산화를 이루고, 해외 수출 및 라이센싱함으로써 시장점유율의 확대 예상한다.

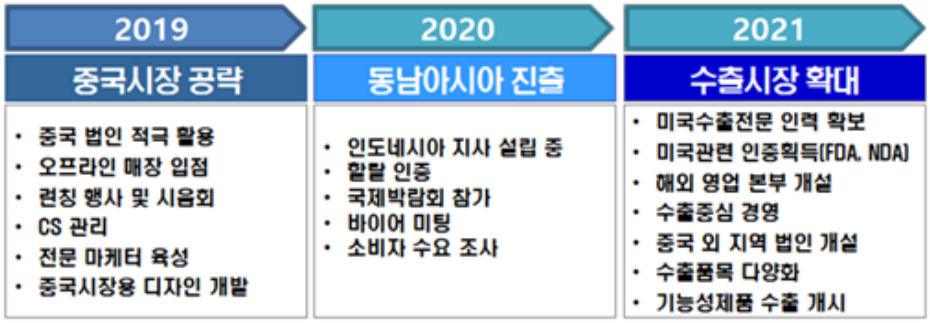
(2) 판로확보방안

○ 해외 사업 지속 시장을 위해 최근 제주 관광 시장이 급성장하고 있는 중국, 일본, 인도네시아, 동남아 등의 신규마켓 대륙에 집중 판촉 전략을 수립하고, 기하급수적으로 증가하는 해외 관광객에게 적극 홍보하며, 동시에 현재 당 사가 기보유하고 있는 해외 유통라인을 적극 활용하여 시장 진출을 진행할 것이다.

○ 2017년 사업 개시부터 제품 포트폴리오를 구성하고 기존 네트워크를 이루었던 기업들과의 협업과 안정적인 판매망을 바탕으로 한 성장 기반을 마련할 것이며, 2019년부터 본격적인 제품 양산을 통해 신유통 시장을 중심으로 고급화 음료의 상업화를 통해 기업 가치를 극대화해 나갈 계획이다.

○ 대학, 연구소, 협력업체, 대기업 등 외부 네트워크 활용 방안. 펄스 에너지에 대한 원천 가공 기술을 보유하고 있는 독일의 베를린 공과 대학 및 세계 최초로 산업화 설비를 생산하는 독일 DIL 연구소의 Dr. Heinz, Dr. Stephan 과 지속적 교류 및 자문을 통해 국내 사업화 전문 인력 양성 및 전략 수립에 대한 자문을 의뢰할 것이다.

○ 국내/해외 고객 및 파트너를 활용하여 수요의사를 타진



- 국내 기업 영업망 : 당사 보유하고 있는 제주, 서울 영업팀의 고객사 대상
- 해외 영업망 : 당사가 보유하고 있는 아시아 유통망 활용 해외 협력사 대상
- 해외 기술이전 전문 파트너를 통한 기술 수요자 조사
- 해외 파트너인 독일 DIL 연구소를 활용하여 해외 기술이전에 대한 기술마케팅을 추진하여 기술 수요자 조사

(3) SWOT 분석에 따른 성장전략 목표 및 도출

< SWOT분석에 따른 전략과제 도출 >

	강 점	약 점
	○ 바이오소재 개발·유통 경험	○ 약한 브랜드 ○ 비숙련 생산·관리 실무인력
기 회	강점강화 + 기회 포착	기회 포착 + 약점 보완
○ 타깃 시장(중국·동남아·젊은 층 등)에서 제주(천연물) 브랜드 가치 상승	○ 제주 천연물 기반의 신 콘셉트 제품 개발·공급	○ 천연물 소재 개발·생산·유통을 지원하는 전주기 협업체계 구축
위 협	강점 강화 + 위협 극복	약점 보완 + 위협 극복
○ 범람하는 유사 천연물 브랜드·공장	○ '생산 거점(제주 공장)' 의 브랜드화로 타사와 차별화 지향	○ 고객 맞춤형 유연 생산 역량을 갖춘 ODM 생산 역량 확보

(4) 사업화 전략 : 제 2협동 비케이바이오

구분	구체적인 내용
형태/규모	● 상용화 형태 : 산업용 원료로 판매하기 위한 분말형태, 액상형태 (20kg, 200kg 벌크포장), 소비자 제품용 액상/분말스틱 포장, 파우치 포장제품, 건강기능식품류. ● 수요처 : 현재 공급 중인 식품생산 대기업에 원료로 공급, 해외지사를 통한 중국 시장 진출, 온라인 판매 ● 예상 단가 : – 분말형 면역다당 350,000~500,000원/kg ● 개발 투입인력 및 기간 – 신규 투입인력으로 인한 고용 창출 3명 – 개발기간 ~24개월,
상용화 능력 및 자원보유	● 생산공장 보유 ● 원료 및 제품 저장, 상온, 냉장, 냉동창고 등 저장을 위한 설비 보유 ● 효소반응, 분리 정제, 농축, 제품화를 위한 제반 설비 보유 ● 파이롯 생산 및 파이롯 제품화 생산 설비 보유 ● 자체 품질 및 공정 관리 시스템 및 인력보유
상용화 계획 및 일정	● 실험실적 생산조건 개발 및 파이롯 생산공정 확립 : 2019년 ● 대량생산을 위한 품질 및 공정확립 조건 설정 : 2019년 ● 시생산 및 제품화 완료 후 시장 출시 : 2019~2020년
매출목표	● 연구종료 후 성과창출 매출액 : 5억원 ● 연구종료 후 성과창출 수출액 : 1억원

4.3. 개발성과의 표준화 및 식약처 가이드라인 반영을 위한 후속 진행계획

가. 식약처 기능성평가팀에 개발성과 소개 및 가이드 표준화 방안 협의

나. 개발 평가법의 표준작업지침서(Standard Operating Procedures(SOP)) 확보

본 과제를 통하여 개발한 면역능 평가시스템을 의뢰자나 실험실시기관에 의해 수행되는 면역능 평가법 실험에 관련된 전반적 업무에 대한 표준작업지침서(Standard Operating Procedures(SOPs))의 작성 시 필요한 일반적인 원칙을 제시하여, 면역능 평가법을 실시하는 사람들이 가능한 동일한 품질(Quality)을 제공할 수 있어 평가법 신뢰성을 목표로 하고 있다.

(1) 수지상세포를 이용한 평가법의 표준작업지침서(SOP)

- 표준작업지침서(Standard Operating Procedures, 이하 SOP)라 함은 특정 업무를 표준화된 방법에 따라 일관되게 실시할 목적으로 해당 절차 및 수행 방법 등을 상세하게 기술한 문서를 말한다. 즉, 특별한 업무를 수행하는 자에게 그 "표준작업"에 대한 상세한 지침을 제공하여 일관되게 업무를 수행하게끔 하는 문서이다.

- 이러한 SOP는 여러 면역평가 실험이 유기적으로 행해지고 여러 상황에서 각기 다른 자료가 얻어지는 복잡한 면역능 평가법에서는 필요하다.

- SOP의 목적은 앞서 말한 대로 임상시험과 관련된 업무를 표준화된 방법에 따라 일관되게 수행할 수 있도록 해당 절차 및 수행 방법 등을 전달하기 위함이다.

- 본 과제 연구개발 결과로 수지상세포를 이용한 면역(식품) 소재의 면역능 시험관 평가법을 검사 방법 및 검사 과정 표준화, 면역기능 검사치의 수량화 및 등급화를 통하여 개발한 면역능 평가시스템을 SOP화하여, 면역(식품) 소재를 검증하고 이를 라이브러리로써 면역제품 개발 전략의 수립에 도움을 주고자 하며, 데이터베이스화로 인한 평가법의 신뢰성을 확보할 계획이다.

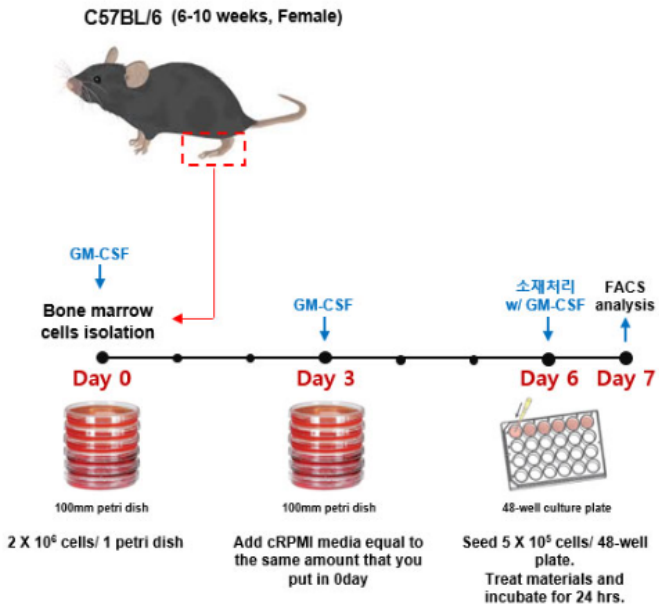
(2) 수지상세포를 이용한 평가법의 표준작업지침서(SOP) 예시

Standard Operating Procedure	유효일자 :
수지상세포를 이용한 면역(식품) 소재의 면역능 시험관 평가법	

실험 실시업체	
직책/이름	
소속부서	
실험날짜	

실험방법 (※자세한 실험방법은 본문에 작성, 이후 SOP에 반영 계획)

A. 마우스 골수세포 유래 수지상세포의 분화

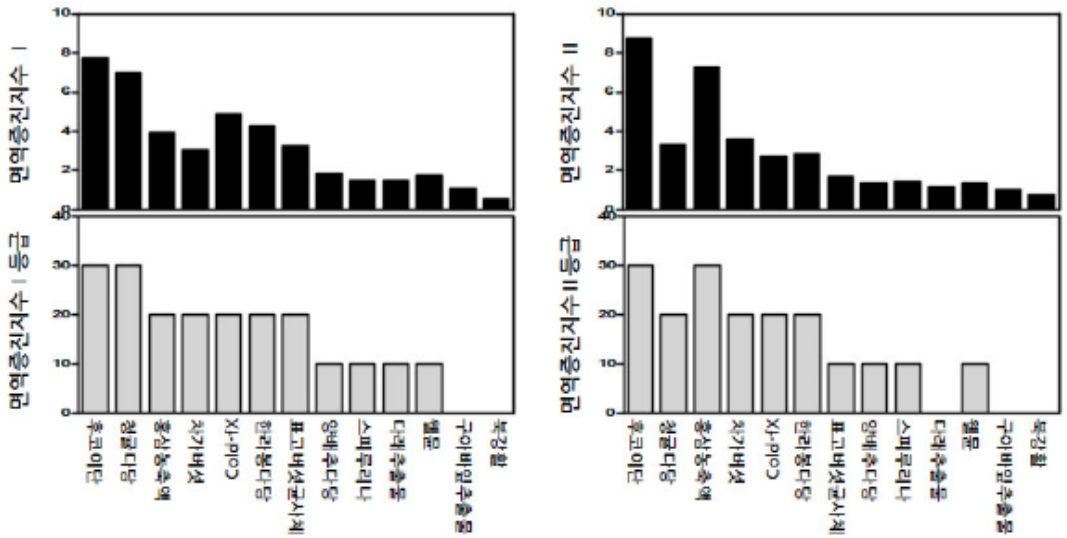


마우스 경골 및 대퇴골에서 얻은 골수세포를 100mm petri dish에 2 x 106 cells씩 분주하고 싸이토카인(GM-CSF)이 포함된 배양액 조건에서 수지상세포로의 분화를 유도한다. 3일째에 같은 농도의 싸이토카인이 포함된 새로 운 배지를 동량으로 채워주었다. 배양 6일째에 배지 내 floating cell을 수집 하여 48-well 배양판에 옮긴 후 (5 x 105 cells), 각각의 소재를 농도 별로 24시간 처리 하였다. 배양 7일째에 Floating cell을 수집한 뒤 수지상세포의 표면항원을 측정하기 위해 세포표면을 염색 하고 유세포계측기(Flow cytometry)를 사용하여 측정하였다.

B. 유세포분석

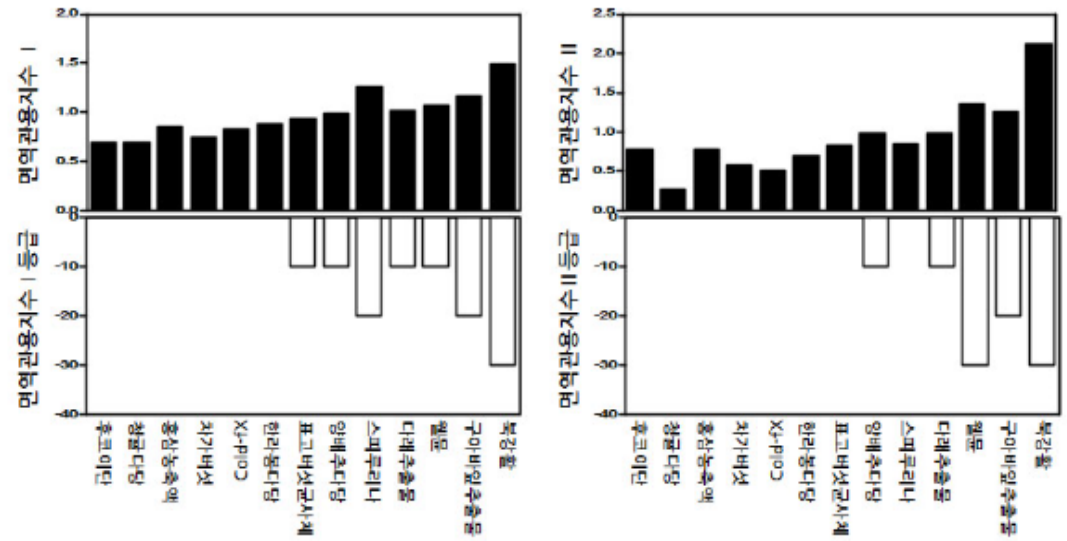
수지상세포의 생존률과 세포표면 활성인자 및 억제인자의 발현 정도를 측정하기 위하여 유세포분석을 실시하였다.

실험결과 (※등급화를 통한 평가 소재 평가 및 면역 방향성 제시)



면역증진지수 I 등급 (값)	면역증진지수 I 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만

면역증진지수II 등급 (값)	면역증진지수II 범위
최상 (30)	5.0 이상
상 (20)	2.0 이상 5.0 미만
중 (10)	1.2 이상 2.0 미만
하 (0)	1.2 미만



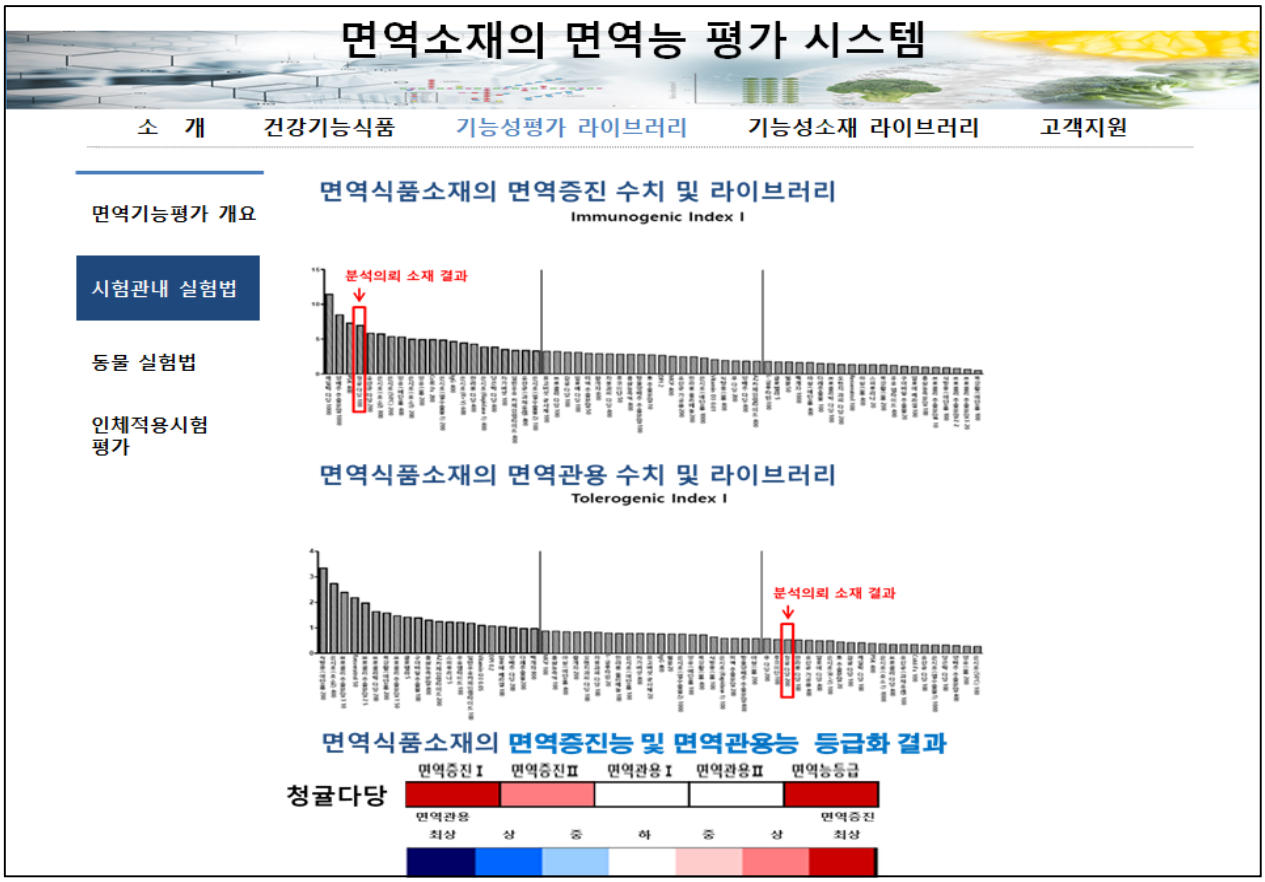
면역관용지수 I 등급 (값)	면역관용지수 I 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

면역관용지수II 등급 (값)	면역관용지수II 범위
최상 (-30)	1.3 이상
상 (-20)	1.1 이상 1.3 미만
중 (-10)	0.9 이상 1.1 미만
하 (0)	0.9 미만

각 소재의 면역증진지수와 면역관용지수를 수치화하고 범위에 따라 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 구분하였다. 면역증진지수는 30(최상), 20(상), 10(중), 0(하)으로, 면역관용지수는 -30(최상), -20(상), -10(중), 0(하)의 값을 주었다. (위 : 각 소재의 면역증진지수 또는 면역관용지수를 나타낸 그래프, 아래 : 면역증진지수 및 면역관용지수의 등급 그래프).

(3) SOP를 통한 실시 데이터 라이브러리

○ SOP를 통한 동일한 품질(Quality)의 데이터 확보 및 비교를 통한 객관화, 평가법 표준화, 기업 등 민간을 대상으로 기능성 소재 스크리닝 등 제3자 비교평가를 통한 객관화 데이터 확보를 통하여 개발 평가법의 추가적인 연구를 통하여 장기간 검증과 협의 계획이며, 식약처 가이드라인에 반영할 수 있는 단계까지 발전시킬 계획이다.



4.4. 면역능 평가기술 개발성과의 민간 활용을 위한 계획

◦ 주관기관 내 분석 서비스 운영 시스템 구축

◦ 한국식품연구원 건강기능식품 플랫폼, 국가식품클러스터의 평가 지원 프로그램에 참여

4.5. 면역능 평가기술 사업화 및 마케팅 계획

◦ 기술의 사업화 : 충남대학교 내 분석서비스 운영 시스템 구축하고 외부 건강기능식품 원료 개발 원기관과 분석 서비스 연계 방안을 구축한다.

◦ 마케팅 계획 : 국내 건강기능식품 제조사, 지원기관, 학교에 본 연구개발 평가법을 다양한 방법으로 홍보하고, 평가법에 사용된 분석장비 업체와의 협력을 추진한다. 또한 국내외 학회에 성과발표와 박람회 참여를 통해 현 개발 기술을 소개한다

붙임. 참고문헌

- 식품의약품안전처 “건강기능식품 시능성 원료 인정 현황” 2016. 12.
- 식품의약품안전처 “건강기능식품 기능성 평가 가이드 ‘면역기능 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편” 2014. 12.
- 면역조절 기능성 식품의 구조 및 작용. BRIC View 2016-T08
- HPLC를 이용한 농식품 중 당류의 신속정량 분석. 사업식품공학 Vol.20, No.4 pp.406~410(2016.11)
- 귤피 유래 면역활성 람노갈락투로난류의 신속 분리방법. 한국식품과학회지 Vo.47. No3. pp286~292(2013)
- 감잎으로부터 면역 활성 다당의 선택 분리를 위한 간편 방법. 한국식품영양과학회지. 45(1), 52~60(2016)
- Structural and immunological feature of RG-I-rich polysaccharide from Korean persimmon vinegar. International Journal of Biological Macromoleculue 89 (2016) 319~327

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

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