

317033
-03

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)

고부가가치식품기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003058-01

국산 농산물 활용 는 건강증진 식품소재 발굴 및 이를 활용한 신제품 개발

최종보고서

2020. 03. 31.

주관연구기관 / 삼일제약(주)

제1협동연구기관 / (주)벡스퍼트

제2협동연구기관 / 한국한의학연구원

농 립 축 산 식 품 부

농림식품기술기획평가원

이
를
활
용
한
신
제
품
개
발
최
종
보
고
서

국
산
농
산
물
활
용
는
건
강
증
진
식
품
소
재
발
굴
및

2020
농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘국산 농산물 활용 눈 건강증진 식품소재 발굴 및 이를 활용한 신제품개발’(연구개발 기간 : 2017. 6. 15. ~ 2019. 12. 31.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2019. 12. 31.

주관연구기관명 : 삼일제약(주) (대표자) 허 승 범 (인)
제1협동연구기관명 : (주)백스퍼트 (대표자) 구 호 준 (인)
제2협동연구기관명 : 한국한의학연구원(대표자) 김 종 열 (인)

주관연구기관책임자: 이 정 민
제1협동연구기관책임자: 김 학 업
제2협동연구기관책임자: 김 찬 식



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구과제는 국내산 농림자원이며 식품원료로 등록되어있는 소재인 호장근을 이용하여 in vitro, in vivo 및 인체적용시험을 통해 눈 건강(안구건조증) 도움에 대한 효능과 작용기전을 규명하고, 부가가치 건강기능식품 원료 소재 개발을 통해 상용화 기술 및 제품 개발을 추진하고자 함. 또한 반려동물의 임상시험을 실시하여 동물용 의약부외품을 개발함으로써 제품의 다양화 및 시장의 확대를 목적으로 연구를 수행함.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>호장근의 분류학 및 DNA 동정을 통해 품질이 확보된 호장근 원료를 대상으로 눈 건강 효능을 가지는 추출물의 최적 추출방법 및 HPLC 분석법을 확립함. 인간 각막세포주를 이용한 in vitro시험과 안구건조증 동물모델을 이용한 in vivo시험을 통해 효능 및 기전을 규명하고, 유전독성, 설치류 단회투여독성, 비설치류 단회독성투여, 4주 용량 결정시험, 13주 반복투여 독성 동물실험을 통한 원료의 안전성을 확인함. 안구건조증 호소 대상으로 인체적용시험을 실시하여 원료의 눈건강 효능을 평가하고, 과학적으로 검증된 호장근 추출물 원료에 대하여 식약처 개별인정 원료 신청 및 건강기능식품 제품을 제작함. 또한 안구건조증 반려동물모델 대상 임상시험을 실시하여 호장근 추출물의 눈 건강 효능을 평가하고, 복용편의성을 확보한 jerky 형태의 건강기능식품 제품을 개발·출시 함. 안구건조 동물모델에 호장근 추출물 포함 점안제를 투여하여 효능 및 안전성을 확보하고 동물전용 점안제를 연구·개발 함. 본 연구를 통해 건강기능식품 및 시제품 등 제품 2건, 동물용 건강기능식품 제품 및 점안제 시제품 등 1건, PCT 포함 특허 출원 및 등록 8건, SCI논문 4건(평균 IF. 3.6), 비SCI논문 1건, 학술발표 및 수상 2건, 고용창출 5건, 기술실시 1건의 연구 성과를 달성 함.</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>안구건조증 개선 등 눈 건강 효능을 갖는 개별인정형 기능성 원료를 도출하고, 이를 포함한 건강기능식품을 개발함. 이는 눈건강 분야에서 건성안 타겟 건강기능식품개발은 최초로 신규한 건성안 타겟 인체적용 시험 기준 및 가이드라인을 제시함. 반려동물 건성안 개선에 도움을 주는 건강기능식품과 점안제 연구 개발은 향후 반려묘 등 다른 동물용 의약외품 개발시 기술을 접목할 수 있고, 향후 하나의 큰 사업으로 자리할 수 있을 것임. 또한 연구결과를 기반으로 국내외 수의과 대학 및 연구기관과의 협업을 통하여 동물용 안구건조증 점안제 및 long-acting 점안제 개발 등으로 해외시장 개척 및 화학요법 병용 투여 보충제 제품 개발에 활용할 수 있음.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>눈건강</p>	<p>건강기능식품</p>	<p>동물용의약외품</p>	<p>호장근</p>	<p>동물건강식품</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Eye health</p>	<p>Health functional food</p>	<p>Animal drug</p>	<p>Polygonum cuspidatum</p>	<p>Animal food</p>

< 목 차 >

제1장 연구개발과제의 개요	4
제1절 연구개발 목적	4
제2절 연구개발의 필요성	6
제3절 국내외 기술개발 현황	16
제4절 연구개발범위	36
제2장 연구수행 내용 및 결과	38
제1절 추출조건 최적화 및 표준화	38
제2절 효능평가 및 기전 연구	77
제3절 제형 연구 및 시제품 제작	129
제4절 안전성 평가	141
제5절 인체적용 시험 및 개별인정형 원료 신청	155
제6절 동물용 건강기능식품 개발 및 제품화	167
제7절 사업화성과 및 매출실적	179
제3장 목표 달성도 및 관련분야 기여도	181
제1절 목표	181
제2절 목표 달성 여부	182
제3절 목표 미달성시 원인 및 차후대책	185
제4장 연구결과 성과 및 활용계획	187
붙임. 참고 문헌	192

제1장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

본 연구과제는 국내산 농림자원인 호장근을 이용하여 in vitro, in vivo, 인체적용시험을 통해 눈 건강(안구건조증) 도움에 대한 효능과 작용기전을 규명하고, 부가가치 건강기능식품 원료 소재 개발을 통해 상용화 기술 및 제품 개발을 추진하고자 함. 또한 반려동물의 임상시험을 실시하여 동물용 의약외품을 개발함으로써 제품의 다양화 및 시장의 확대를 목적으로 함.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발 대상 기술 및 소재

가. 호장근 소재의 특징 및 효능

- 특징 : 마디풀과에 속하는 호장근(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)은 다년생초로 냇가나 산기슭에 자람. 키는 1m 정도이고 곧봉 모양의 뿌리줄기는 목질로 속이 비어있음. 넓은 난형의 잎은 길이가 6~15cm로 어긋나며, 꽃은 6~8월경 암쪽과 수꽃이 각각 다른 그루에 원추 꽃차례를 이루며 피. 한국 이외에 일본, 타이완, 중국에도 분포하며 어린잎은 나물로 먹고 식물은 밀원식물과 관상용으로 가치가 있음.
- 성분 : 뿌리에 배당체인 폴리고닌이 있으며, 폴리고닌은 에모딘과 당으로 분해됨. 그리고 에모딘, 에모딘모노메틸에테르, 크리소파놀 등이 있음. 잎에는 에모딘, 레우노우트린, 이소쿠에르씨트린, 쿠에르씨드린이 있음. 줄기와 잎에는 뿌리에서와 같은 옥시안트라키논유도체, 비타민 C, 혈당저하작용이 있는 활성싱아산, 탄닌, 클로르겐산, 카페산, 몰식자산이 있음.
- 효능 : 한의학에서는 호장근을 완하(緩下), 이뇨, 통경, 진해진정약, 거풍이습(祛風利濕), 파어(破瘀), 류마티즘에 의한 근골동통, 습열황달, 임탁(淋濁), 대하(帶下), 월경폐지, 산후의 악로체류, 복부의 결괴, 치루출혈, 타박상, 화상, 악창선질(惡瘡癰疾) 등에 사용함. 민간에서는 감초와 함께 달여 달고 신맛이 있는 청량 음료로 또는 기침약으로 쓰임.

나. 마디풀(*Polygonum aviculare*)의 특징 및 효능

- 특징 : 마디풀과에 속하는 1년생 초이며, 연초록색을 띠는 줄기는 단단하고 30cm 정도 곧추서서 자라지만 때때로 옆으로 비스듬히 누워 자라기도 함. 잎은 어긋나고 길이에 비해 너비가 매우 좁은 타원형이며 잎 가장자리는 밋밋함. 줄기를 감싸고 있는 턱잎의 위쪽에는 털들이 나있으며, 흰색 바탕에 홍백색의 꽃이 6~7월에 잎겨드랑이에서 1송이 또는 여러 송이가 무리져 피. 꽃잎은 없으나 꽃받침이 꽃잎처럼 보이고, 열매는 세모지며

꽃받침에 붙어 있음.

- 분포 : 우리나라 각처에 분포하며, 북반구 온대지방에 널리 분포함.
- 용도 : 이른봄에 어린잎을 캐서 삶은 다음 나물로 먹기도 함. 식물 전체를 가을에 태서 그늘에서 말린 편축은 한방에서 복통·이뇨·황달·구충 치료에 쓰임.
- 약리활성 : 성미는 쓰고, 무독(無毒), 미한(微汗) 하며, 전초를 이뇨제, 지혈제, 신장 및 방광결석, 위궤양, 기관지천식 등에 사용함.

다. 산사자(*Crataegi fructus*)의 특징 및 효능

- 특징 : 산사나무는 장미과에 속하는 낙엽활엽교목으로 산사자는 산사나무의 열매, 키는 6m가량이며, 가지에 가시가 약간 있음. 잎은 호생, 난형 깃모양으로 얇게 갈라지고, 가장자리에 거친 톱니가 있음. 잎의 윗면은 짙은 녹색, 뒷면은 노란빛을 띤 연두색, 양 면의 맥위에는 털이 있음. 꽃은 흰색, 지름 1.8cm 가량, 열매는 이과, 붉은색, 둥근 모양, 지름 1.5cm 가량, 흰반점이 있고, 3~4개의 씨가 들어 있음. 개화기는 5월, 결실기는 9~10월임.
- 분포 : 강원도 및 충북, 경기북부 지방 등 우리나라 각 처에 분포함.
- 용도 : 한방에서는 열매를 산사자라고 하며, 건위제, 소화제·정장제로 사용. 민간에서는 고기를 많이 먹은 다음 소화제로 쓰임.
- 약리활성 : 산사는 식적을 삭히고 오랜 체기를 풀어주며, 기가 몰린 것을 잘 돌아가게 하고, 적피, 담피, 혈피를 삭히고 비를 든든하게 하며, 가슴을 시원하게 하고 이질을 치료함.

2. 연구개발 적용분야

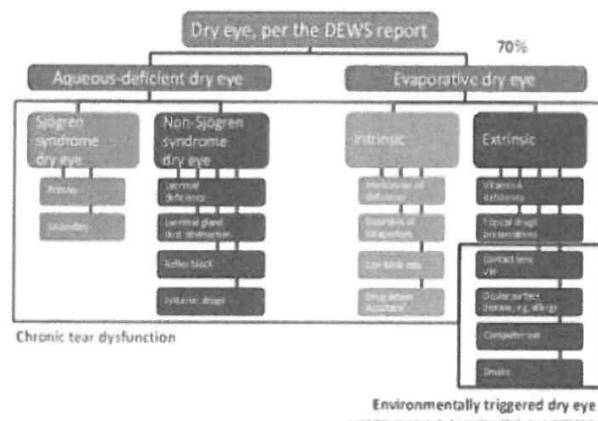
가. 눈건강 관련 기능성

- 눈 건강 관련 기능성 인자는 황반면성 억제(황반색소 밀도 증가), 눈의 피로 개선, 안구건조 개선, 시세포 활성화, 시야개선 등으로 구분할 수 있음.

나. 안구건조증(건성안증후군)

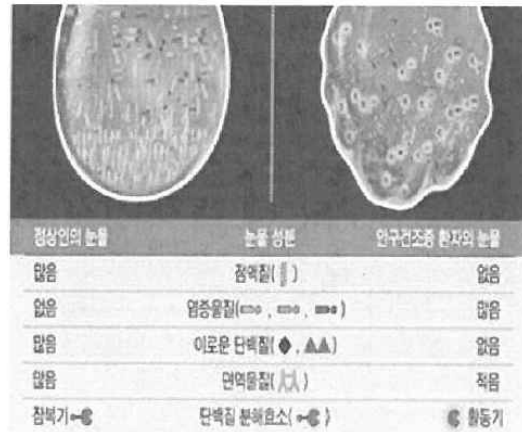
- 안구건조증이란, 특별한 병원균이나 원인이 없이 눈동자에 눈물이 원활하게 공급이 되지 않으면서 눈이 건조해서 나타나는 증상들을 말하는 것으로, 안구건조증, 눈마름증후군, 건성각결막염이라고도 함.
- 건성안은 국내에서 조사 인구 및 지역에 따라 26.2~50.6%의 유병률을 보이며, 안과 의사가 외래에서 마주하는 환자 중 20~30%를 차지할 정도로 흔한 질병임.

- 건성안 발생의 병리학적 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았지만 눈물막의 불안정성과 안구 표면의 염증 그리고 증가된 눈물의 삼투압을 동반하는 다요소적 질환임.
- 건성안은 병인에 따라 크게 두가지로 분류 되는데, 첫 번째는 눈물샘에서 수성 성분의 눈물 분비가 감소되어 발생하는 경우인데 다시 쇼그렌증후군과 연관된 건성안과 그렇지 않은 건성안, 즉 주로 전신 약제와 관련된 경우로 나뉨.
- 두 번째는 지질층의 장애로 눈물의 증발이 증가되어 발생하는 경우로서 마이봄샘 기능부전 및 비타민 A 결핍과 환경적인 요인 등 안구표면과 눈물층에 발생하는 다인성 질환임.



<그림 1> 건성안 발생 원인

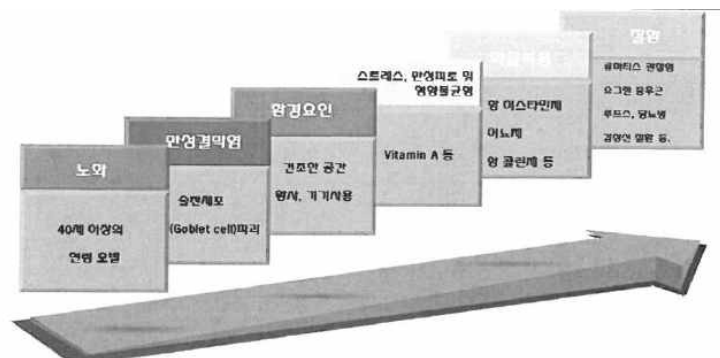
- 특히 눈물의 삼투압 증가는 안구 표면 노출과 눈물분비저하에 의한 과도한 눈물증발에 의해서 야기되는데, 이는 interleukin(IL)-1 α , IL-1 β , TNF- α 그리고 matrix metalloproteinases(MMP) 등염증성 사이토카인의 발현에 관여하며 mitogen-activated protein(MMP) kinase와 Nuclear factor- κ B 신호전달 시스템의 활성화와 연관되고, 안구 표면의 상피세포와 결막내 술잔세포의 세포사를 유발하여 눈물층이 불안정해져 안구 표면의 손상을 야기함으로써 눈물의 삼투압 재증가로 이어지는 악순환이 반복됨.
- 눈의 가장 바깥부분에 위치한 각막은 눈동자에 해당하는 투명한 구조로 유리창과 같은 역할을 하는데 각막표면이 투명하지 못하면 빛이 눈으로 들어올 때 산란되므로 시력저하, 눈부심 등의 증상이 나타날 수 있음.
- 각막을 덮고 있는 눈물막은 물성분, 점액성분 그리고 지방질 성분으로 구성되어 있으며 여러 비타민이나 성장인자 등을 포함하고 있는데 이는 눈을 외부로부터 보호하고 수분을 공급할 뿐만 아니라 깨끗하고 균일한 굴절면을 유지하여 좋은 시력을 유지하는 데에도 중요한 기능을 담당하고 있음.
- 안구건조증은 흔하게 발생하지만 이를 방치하면 만성 결막염이나 안검염, 시력저하 등으로 이어질 수 있기 때문에 증상을 예방 또는 완화하는 것이 필요함.



<그림 2> 정상인과 안구건조증 환자의 눈물 특성 비교

- 안구건조증은 나이, 호르몬 등 다양한 원인에 의해 발병함

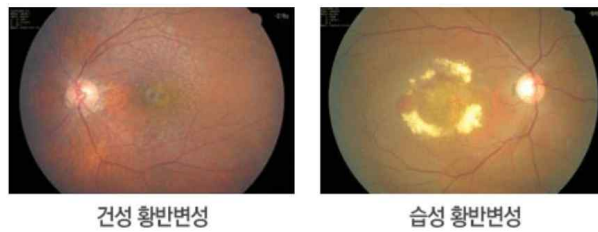
- ① 노화 : 40세 이상의 연령에서 호발
- ② 방사선이나 염증으로 인한 눈물샘 손상
- ③ 만성결막염 : 술잔세포(Goblet cell) 파괴
- ④ 굴절 수술 및 렌즈착용으로 각막 손상 및 예민함 감소
- ⑤ 과도한 눈물 증발 : 마이봄샘 이상으로 지질 부족
- ⑥ 안검(눈꺼풀)이상 : 눈꺼풀 말림, 안검염 등
- ⑦ 환경요인 : 건조한 공간, 황사, 기기사용
- ⑧ 스트레스, 만성피로 및 영양불균형(비타민 A 등)
- ⑨ 여성호르몬 감소 : 눈물 생성 감소
- ⑩ 약물복용(항히스타민, 이노제, 항콜린제 등) 및 질환(류마티스성 관절염, 쇼그렌 증후군, 루프스, 당뇨병, 갑상선 질환 등)



<그림 3> 안구 건조증 위험 요인

다. 황반변성

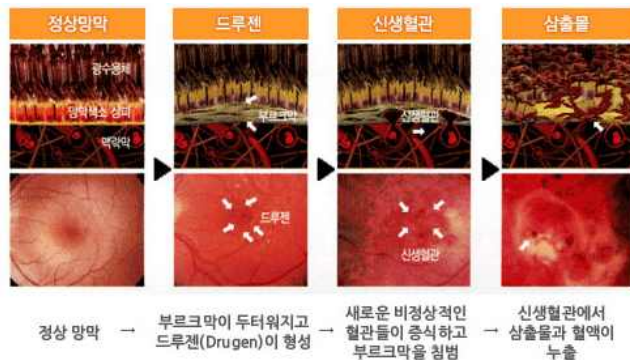
- 눈의 안쪽 망막의 중심부에 위치한 신경조직을 황반이라고 하는데, 시세포 중 원뿔세포가 밀집되어 있고 물체의 상이 맺히는 곳도 황반의 중심이므로 시력에 대단히 중요한 역할을 담당하고 있음.
- 책을 보거나 어떤 물체를 볼 때는 망막의 중심부인 황반부에 상이 맺히기 때문에 일반적으로 중심시력을 시력이라고 함. 노화, 유전적 요인, 독성, 염증 등에 의해 황반부의 변형이 일어나거나 기능이 떨어지면 시력이 감소되고, 심할 경우 시력을 완전히 잃을 수 있음.
- 황반변성은 크게 건성 및 습성 황반변성으로 나뉘는데 망막에 드루젠(노폐물들이 황반부에 쌓여가는 상태)이나 망막색소상피의 위축과 같은 병변이 생긴 경우를 건성황반변성이라고 하고 이는 흔히 나타나는 형태로 황반변성 증례의 약 90 %를 차지하고 있음. 보통 심한 시력상실을 유발하지는 않지만 습성 형태로 발전할 수 있기 때문에 정기적인 경과 관찰과 예방이 중요함. 습성황반변성은 전체 황반변성의 약 10 %를 차지하며 망막 아래에 맥락막 신생혈관이 자라서 생기는 질환임. 이러한 신생혈관은 우리 눈의 망막 중에서 특히 중요한 황반부에 삼출물, 출혈 등을 일으켜서 중심시력에 영향을 주며, 심한 경우 실명을 가져오기도 함.



-전체 황반변성 환자의 80%~90%
 -비신생혈관성 또는 위축성
 -심한 시력손상 없지만 습성으로 진행될 수 있음

-전체 황반변성 환자의 10%~20%
 -약 90% 환자에서 심각한 시력저하 발생
 -비정상적인 신생혈관에서 흘러나온 삼출물과 피로 인해 황반이 손상되고, 영구적인 시력상실 유발

<그림 4> 건성 황반변성과 습성 황반변성의 특징



<그림 5> 황반변성의 특징

라. 눈 피로

- 일반적으로 눈의 피로 원인은 오랜 근거리 작업이나 건조한 환경, 장시간 빛 노출에 의한 눈의 망막상피세포에 자유라디칼(free radical)이 생성되어 안구 내 망막세포의 직접적인 손상이나 망막에서 혈관수축이나 근육 수축으로 인한 혈관평활근 긴장에 기인한 여러 현상들로 정의할 수 있음.
- 눈의 피로 증상은 흐릿함, 눈물, 충혈, 눈부심, 뻗뻗함, 이물감 등의 증상이 나타나며 심한 경우 눈에 통증 및 두통이 생기기도 함. 눈의 피로는 현대사회에서 증가 추세에 있는데 그 중 스마트폰을 포함한 컴퓨터를 사용하는 직종의 사람들에게 50~90 % 나타난다고 보고되고 있음. 이러한 현상은 스마트폰이나 휴대용 전자장비의 증가로 인해 점점 늘어나고 있는 추세임.

마. 안구건조증 기능성 소재 발굴의 필요성 및 현재 문제점

(1) 안구건조증 치료제 현황

- 충혈과 안구 건조증 또한 황사와 미세먼지가 주요 발병요인으로 산업화와 더불어 2000년대 이후 주목받기 시작한 전형적인 삶의 질과 관련된 질환으로 지금까지 대부분의 건성안 증상에는 부족해진 눈물을 보충하기 위한 인공누액, 염증반응을 억제시키기 위한 스테로이드액 등을 사용해 왔으나 이러한 방법은 대증요법에 불과하다는 평가를 받음.
- 세계 최초 건성안 치료제인 '레스타시스'가 있으며 이에 대한 특허가 2015년 5월에 만료됨. 이에 따라 국내 여러 제약사가 비슷한 효능을 가진 개량신약들을 출시하였으나 마땅한 치료제는 부재함.
- 현재 국내 식약처에 허가받은 생약성분의 건성안 기능성 제품은 전무한 실정이며, 일부 한의원에서 자체 조제한 점안제들이 "한방안약"이라는 형태로 전임상 약효시험 및 독성 시험에 관한 자료 없이 상업적으로 판매되고 있음.

(2) 안구건조증 치료제의 특성 및 문제점

- 인공눈물

- ① 경증안구 건조증 치료에 사용함.
- ② 점성을 유지시켜주기 위한 성분(카르복시메틸셀룰로스)와 증발을 예방하기 위한 성분(히알루론산)으로 구성됨.
- ③ 일시적으로 증상완화 역할을 할 뿐 치료제가 아님.

- 레스타시스

- ① 항염증제로 염증반응을 억제하여 눈물샘 기능이상을 회복시키며, 경증부터 중증환자까지 사용되며 수술치료 등에도 동반됨.
- ② 부작용으로 작열감, 안구충혈, 안통증, 시야흐림, 이물감 등이 동반됨.

- ③ 투여 6주 후에 효과가 나타나기 시작하기 때문에 인공누액이나 보조약물이 반드시 투여되어야 하는 치명적인 단점이 있음.

<표 1> 레시타시스 임상시험에서 관찰된 부작용 현황

부작용 종류	Cyclosporin 0.05%	Cyclosporin 1.0%
Burning eyes	14.7%	16.1%
Stinging eyes	3.4%	4.5%
Discharge eyes	3.1%	0.7%
Foreign bodysensation	3.1%	1.0%
Conjunctival hyperemia	2.0%	3.1%
Visual disturbance	1.7%	3.1%
Eyepain	1.0%	3.4%

바. 호장근 추출물을 활용한 눈 건강기능식품 개발의 필요성

(1) 사회적 필요성

- 눈은 다른 장기와는 달리 점막이 공기 중에 그대로 노출되어 있기 때문에 전염성 질환(유행성 결막염)에 쉽게 전염되고, 날씨에 매우 민감하게 반응함. 또한 외부적인 영향(봄철의 황사, 꽃가루 등), 환경적인 영향(먼지, 알레르기 등) 등에 쉽게 반응하여 건조증 및 염증이 자주 나타나기 때문에 건성안 환자는 눈이 피로해지거나 찬바람을 맞을 때 눈물이 흐르기도 함. 하지만 평상시 눈물이 일정량 지속적으로 분비되지 못하기 때문에 눈의 습도를 유지하기가 어려우며, 유행성 감염에 의해 발생된 눈의 염증은 눈물샘을 막거나 눈물샘의 염증으로 이어져 눈물 분비량을 감소시켜 건성안이 악화됨.
- 일반적으로 40세 이후가 되면 가까운 곳이 잘 안 보이는 노안 증상 및 황반변성 현상이 나타나기 시작하고, 평균 수명의 증가로 눈 관련 기능성 식품 소재에 대한 관심이 증가하고 있는 추세임.
- 노인성 황반변성, 건성안 등 주요 눈 질환들의 경우 후기 단계로 질환이 진행될 경우 시력의 상실뿐만 아니라 심할 경우 실명으로까지 이어질 수 있기 때문에 이를 조기에 예방하고 관리하는 것이 매우 중요하나 현재의 눈 관련 시장은 주로 후기 질환 단계의 치료제 분야에 초점이 맞추어져 있음.

(2) 과학기술적 필요성

- 눈물은 술잔세포에서 점액층을 생성하고 눈물샘에서 수성 층이 생성되며 가장 바깥의 지방층은 마이봄샘에서 생성됨. 이렇게 눈물층은 세층으로 구성되어 있으며 눈물 점을 통해 눈물관으로 배출됨. 건성안은 눈물샘에서 분비되는 수성 층이 부족하여 발생하기도

하고 마이봄샘에서 분비되는 지방층이 문제가 되어 수성층이 빨리 증발하여 발생함.

- 눈물은 눈주위에 존재하는 여러개의 분비샘에서 만들어지고, 수분 층은 윗 눈꺼풀 바로 밑에 있는 눈물샘에서 생성. 눈꺼풀에 있는 여러 개의 작은 비장선(마이봄선)에서는 기름 성분의 눈물을 만들고 결막에 존재하는 술잔세포들은 주로 점액 성분의 눈물을 생성함.
- 선행연구를 통해 호장근 추출물의 안구 건조증 관련 특허 확보하고 이는 안구 건조증 및 안과 분야에 대한 확실한 IP position이 기확보됨에 따라 앞으로의 임상 연구 등을 통해 추가적인 IP position을 확보할 수 있을 것으로 예상됨.
- 호장근은 약용작물로 전통적으로 활용해 왔으며, 호장근 줄기의 경우 식품원료로 등재된 안전성이 확보된 소재로 본 연구과제를 통해 표준화 및 전임상, 임상시험을 통해 기능성이 인정된 건강기능식품으로 제품화 하고자 함.

식품원료목록

원재료명		호장근
이명		까치수염, 싱아, Mexican Bamboo, Japanese knotweed, Asian knotweed
학명		<i>Fallopia japonica</i> (Houtt.) RonseDecr. / <i>Reynoutria japonica</i> Houtt. / <i>Polygonum cuspidatum</i> Siebold & Zucc. / <i>Fallopia japonica</i> var. <i>compacta</i> (Hook.f.) Bailey
생약명		-
원재료 분류		식물
식품원료 사용가능 여부	가능	줄기
	제한적	-
	사용조건	-

<그림 6> 호장근 줄기 안전성(식용) 근거

(3) 건강기능식품의 새로운 변화 요구

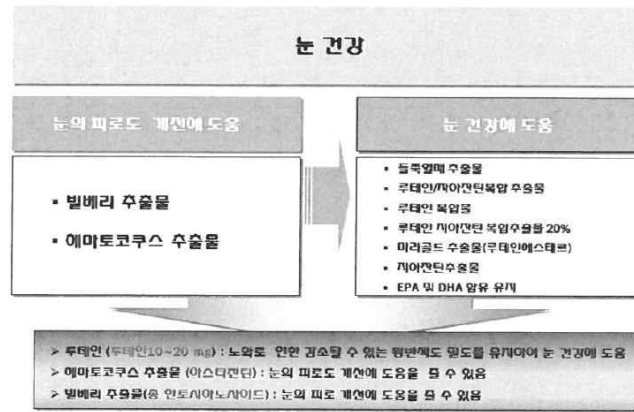
- 현재 개별인정형 건강기능식품으로 사용되는 눈 건강관련 제품(루테인, 지아잔틴, 오메가 3등)은 약 10%의 지연 효능을 보이고 있어 새로운 제품이 필요한 상황임.
- 따라서 호장근 추출물을 이용하여 시장의 니즈를 만족할 눈 건강 기능성 효과 검증을 통해 고부가가치 건강기능식품 소재 개발 및 상용화를 하고자 함.

<표 2> 생리활성기능의 분류

✓ 연도별 신규 기능성

2004년	2005년	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년	2013년	2014년	2015년
혈압 조절	면역 기능	지방 개선	천연천 건강	질소흡수	요로건강	장면기 영양 건강	당뇨의 예방 기능		피부피부 상태 개선	물결신 분문고 개선	수면의 질 향상
풍기환생 피부관호	피부건강	건강강	눈건강		피로개선	소화기능		장면기 영양 건강	장기 운동		
기억력 개선	항산화		운동수행능력 향상							역학적 질 건강	
콜레스테롤 개선	장건강		건강안화							여론기 건강질	
인지 능력											
체지방 감소											
관절 / 백건강											
혈당조절											
혈중중성지방개선											
6	4	2	4	1	2	2	1	0	2	4	1

※ 현재 32종의 기능성 인정



<그림 7> 눈 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황

- 미국의 시장조사 전문업체인 'Global Industry Analysis, Inc.(이하 GIA)'의 2012년 보고서에 따르면, 세계 보완대체의학 시장은 2012년 949억 5천만 달러에서 2015년 1,141억 8천만 달러로 성장할 것으로 예측하고 있으며, 천연물 의약품(Herbal Medicine)이 58.12%로 가장 많은 비중을 차지하며 그다음으로는 중의학(Traditional Chinese Medicine)이 29.41%, 그밖에 동종요법(Homeopathic Medicine), 아유르베다(Ayurvedic Medicine)가 세계 보완대체의학 시장을 구성하는 주요 전통 의학분야임.
- 재생 가능한 생명자원(식물, 동물, 미생물, 공충 등)을 원료로 하여 생물학적·화학적 전환 과정을 통한 농생명 소재산업은 미래 성장동력 전략산업 분야임.
- 생명공학 기술의 발달로 천연 소재의 활용가치가 급속도로 확대되어 천연의약품 및 건강기능성 식품, (기능성)화장품, 생물유래 신소재 개발, 종자개량, 유전체 연구 및 정보 등 다양한 산업분야에 고부가가치 제품을 창출함에 있어 생명공학 기술이 적용되고 있으며, 농업생명자원이 소재로서 활용되고 있음.

<표 3> 세계 보완대체 의학 시장 구성비

(단위: %)

구분	Herbal Medicine	Traditional Chinese Medicine	Homeopathic Medicine	Ayurvedic Medicine	Total
비율	58.12	29.41	8.88	3.59	100



<그림 8> 눈물의 생산과 소실과정(좌), 눈물층 3layer(가운데), 눈물막의 구성(우)

3. 인체용 기능성 제품 개발을 위한 전단계로서의 동물용 의약외품

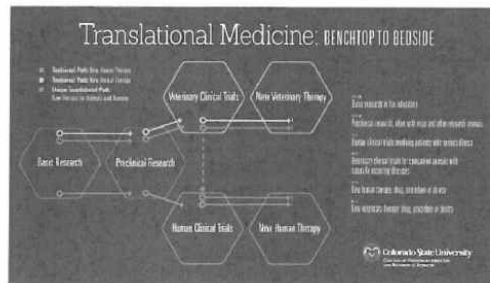
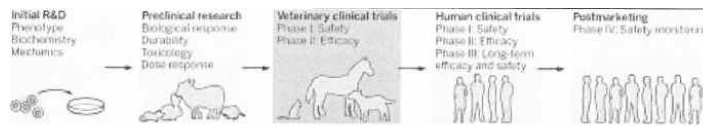
가. 동물용 의약품 개발의 필요성

- 인체용 의약품 및 건강기능식품 소재 개발에 있어 R&D 단계에서 활용하는 실험동물인 마우스, 랫드에서의 결과는 임상시험의 성공을 보장하지 못함.
- 실례로 항암제 개발연구에서 실험동물의 결과가 단 8% 정도만 이어진다는 보고가 있음.
- 아래의 표와 같이 인체질환을 연구하는데 있어 보다 적절한 모델 동물은 마우스나 랫드가 아닌 개나 고양이를 활용하는 것이 더 적절함.
- 최근의 인체용 기능성 소재 개발 전략은 성공 가능성이 낮은 기존의 인체용 제품 개발 트랙이 아닌 동물용 의약품 임상시험 전략을 포함한 translational medicine 개발 프로세스를 수립하여 적용하고 있음. 이는 동물용 의약품 임상시험 트랙을 실시하여 인체용 제품의 임상시험의 성공가능성을 높임과 동시에 동물용 의약품을 개발하여 새로운 수익을 창출하는 전략적 접근이 중요해 지고 있음.

<표 4> Human disease and parallels on companion animals

Human diseases and parallels in companion animals

Disease Category/Organ system	Specific disease in human	Relevant CA species
Cancer	Non-Hodgkin's lymphoma	Dog, cat
	Osteosarcoma, melanoma	
	Mammary/Soft tissue carcinoma	
Musculoskeletal	Chronic osteoarthritis	Dog, horse, rabbit
	Tendon/cruciate ligament injury	Horse, dog
	Mandibular reconstruction	Dog
Spinal cord injury and disorder	Intervertebral disk herniation, Neural defect	Dog
Genetic	Hemophilia, Narcolepsy, Cleft palate	Dog
	SCID X-linked	Dog, horse
	Duchenne muscular dystrophy	Dog
	Lysosomal storage disease	Dog, cat
Eye	KCS	Dog
Immune/inflammatory	IBD, Chronic gingivostomatitis	Dog, cat
Cardiovascular	Dilated/Hypertrophic cardiomyopathy	Dog, cat



<그림 9> Translational medicine

나. 동물용 의약품 개발의 우위성

- 일반적으로 인체용 신약개발에 필요한 기간은 임상시험(1상, 2상, 3상)을 포함하여 평균 13년 이상의 시간과 막대한 비용이 필요함.
- 동물용 의약품은 이러한 기간과 단계를 단축 가능함.
- 특히 후보소재가 도출된 상황일 경우 단회 및 non GLP 안정성 시험 후 반려견 임상시험을 거쳐 바로 품목허가를 진행할 수 있으며, 인체용 의약품 임상 시험에 비하여 상대적으로 매우 적은 비용으로 수행이 가능함. 동물용의약부외품의 경우는 제조업 허가를 가진자가 동물약품협회에 간단한 등록과정을 거쳐서 시판이 가능함.
- 본 연구를 통하여 개발된 반려견용 눈 건강(안구건조증) 제품은 빠른 상용화를 위하여 동물용의약부외품으로 등록할 예정이며, 시판 후 시장 상황을 고려하여 동물용의약품으로의 전환 가능성을 고려할 예정.

다. 반려동물에서의 안구건조증(Keratoconjunctivitis Sicca, KCS)의 특징 및 증상

- 안구건조증이란 눈물샘의 이상으로 안구에 눈물 공급이 부족하여 발생하는 안과 질환으

로 수의학 용어로 건성 각결막염(Keratoconjunctivitis Sicca)이라고 불리는데 이는 Kerato(각막)+ Conjunctivae(결막) + -Itis(염증) + Sicca(건조)의 뜻을 가진 합성어로서 염증 소견이 보이는 마른 각막과 결막을 의미

- 건성 각결막염의 원인

- ① 눈물샘의 면역매개성 질환
- ② 감염이나 외상 등의 눈물샘 상처
- ③ 만성 안구 감염(헤르페스 바이러스와 클라미디아 감염)
- ④ 약(예, 설펜아미드)에 반응

- 건성 각결막염의 임상 증상

- ① 눈을 심하게 깜빡임
- ② 결막 부위에 혈관 및 부족이 발생
- ③ 제3안검 돌출
- ④ 눈에 점액성 분비물
- ⑤ 만성일 경우, 각막의 색소 침착, 궤양 등이 발생
- ⑥ 아주 심각할 경우 시력 상실 가능

제 3 절 국내외 기술개발 현황

1. 국내 기술개발 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 안구건조증 환자 및 의료비의 급증

- 스마트폰과 같은 디지털 장비 사용의 증가를 비롯하여 황사, 미세먼지와 같은 환경적 요인으로 인하여 안구 건조증 환자가 급증하고 있음.
- 2012년 건강보험 진료비 지급자료를 따르면, 전체 눈질환 중 결막염과 눈물기관장애가 차지하는 비율의 전체 눈질환의 39%를 차지하고 있으며, 특히 눈물기관장애의 경우는 연평균 증가율이 10%에 이르고 있음.
- 특히 스마트폰으로 대변되는 디지털기기의 사용량이 폭발적으로 늘어남에 따라 건성안의 발생빈도 또한 급증하고 있음.
- 국가위기관리회보 2011년도 자료에 따르면 스마트폰 사용으로 인한 여러 가지 신체이상 증상 중 눈과 관련된 이상증상을 호소가 31%로 가장 높은 비율을 차지함.

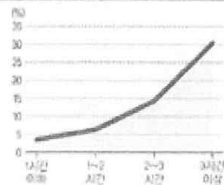
눈질환 관련 진료비도 상위 9개 현황 (단위: 명,%)

구분	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	연평균 증가율
1 결막염	5,658,104 (26.85)	5,484,513 (25.13)	5,627,090 (24.24)	6,529,927 (25.26)	6,376,482 (25.83)	3.0
2 눈물기관장애	2,812,369 (13.23)	2,995,792 (13.78)	3,349,395 (14.43)	3,751,279 (14.82)	4,096,522 (15.38)	8.8
3 결막·초막염	2,759,299 (12.81)	2,986,387 (13.81)	2,922,717 (12.81)	3,176,882 (12.38)	3,917,025 (15.41)	4.7
4 백내장	1,999,276 (9.23)	2,020,925 (9.23)	2,147,736 (9.23)	2,302,999 (8.93)	2,432,340 (9.58)	5.5
5 다래끼	1,722,951 (8.13)	1,801,136 (8.43)	1,902,296 (8.23)	2,003,879 (7.83)	2,072,967 (7.73)	4.7
6 각막염	1,525,714 (7.13)	1,495,257 (6.83)	1,595,611 (6.83)	1,826,253 (7.13)	1,924,413 (7.13)	5.0
7 망막 장애	1,099,618 (5.13)	1,299,922 (5.73)	1,429,984 (5.23)	1,603,635 (5.23)	1,627,321 (5.63)	13.8
8 눈꺼풀 장애	1,024,096 (4.83)	1,077,850 (4.83)	1,198,508 (5.03)	1,272,095 (4.93)	1,176,695 (4.43)	3.2
9 기타질환	881,827 (4.13)	929,266 (4.23)	1,027,291 (4.43)	1,134,317 (4.43)	1,232,025 (4.73)	10.9

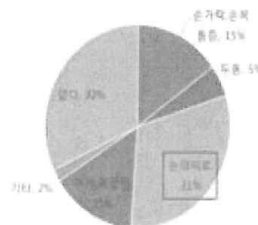
건강보험 진료비 지급자료 (2012)

<그림 10> 건강보험진료비 지급자료 2012

디지털기기 사용시간에 따른 건성안 발생빈도



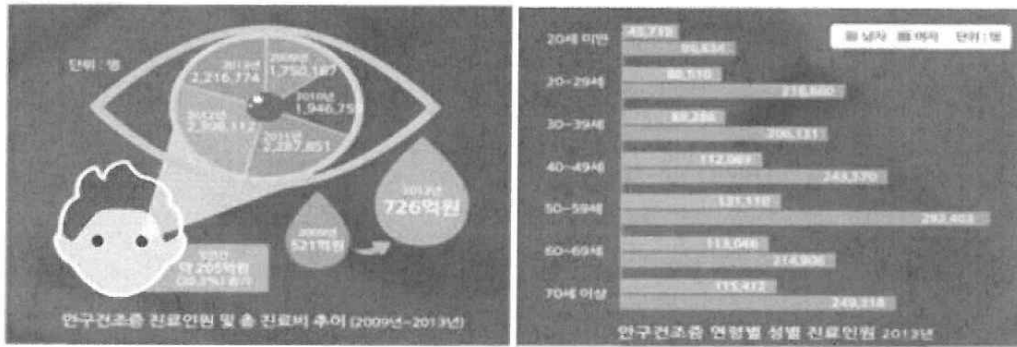
스마트폰 사용으로 인한 신체 이상증상 경험률



국가위기관리회보 2011. 8. 22. 20

<그림 11> 디지털기기 사용시간에 따른 건성안 발생빈도(좌), 신체이상증상 분류(우)

- 국민건강보험심사평가원에서는 봄철 환경적인 미세먼지유입으로 인한 안구질환 중 건성안, 결막염을 포함한 안구질환 환자의 수가 점점 늘어나고 있음을 발표함. 지난 2009년부터 2013년까지 진료인원은 2009년 175만 여명에서 2013년 222만여 명으로 5년간 약 47만 명(26.7%)이 증가하였으며, 연평균 증가율은 6.1%로 나타남. 총 진료비는 2009년 521억원에서 2013년 726억원으로 5년간 약 205억원(39.3%)이 증가하였으며, 연평균 증가율은 8.6%로 증가함.

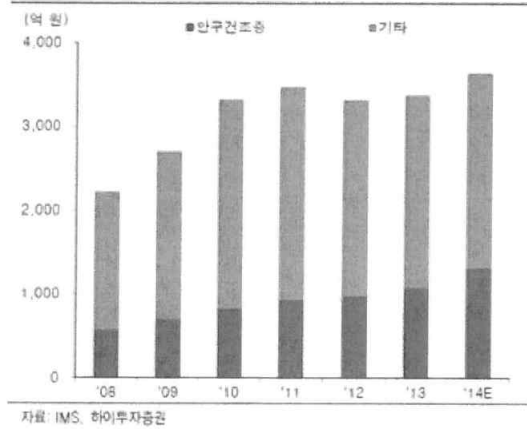


<그림 12> 건성안 진료인원 및 진료비 추이와 연령별 성별 진료인원

- 건성안의 연령별 점유율은 2013년을 기준으로 50대 구간이 19.1%로 가장 높았고, 70대 이상 16.5%, 40대 16.0% 순으로 나타났으며 2013년 총 진료인원은 2012년에 비해 7.6% 감소, 연령별 진료인원은 전반적으로 감소하였으나, 70대 이상 구간과 50대 구간의 연령별 점유율은 다소 증가함.
- 2013년 건성안 총 진료비는 726억원, 치료제 시장의 경우 과거 5년간 40% 이상 급속하게 성장하고 있음에도 불구하고 중증 건성안 환자 중에 30%만이 병원에서 치료를 받고 있어 건성안에 대한 국내의 잠재적 시장이 매우 큼.

(2) 국내 건성안 관련 시장 및 제품 현황

- 국내 안과의약품 시장규모는 2014년 기준으로 약 3천500억원에 달하고 있으며, 이중 안구건조증 관련 의약품이 차지하는 비중은 약 34%인 1천200억원에 달하고 있으며, 매년 약 10%씩 성장하고 있음.



<그림 13> 국내 안과의약품 시장규모 추이

- 현재 국내 건성안 치료제 시장은 한국산테제약의 '디쿠아스(다쿠아포솔나트륨)'와 엘러간의 '스타시스점안액(사이클로스포린)'이 양분

<표 5> 안구건조증 치료제 2016년 1분기 실적현황

제약사	제품명	실적
한국산테제약	디쿠아스	22억 5032만원
엘러간	레스타시스	18억 1118만원
태준제약	사이모린엔	3억 5894만원

- 최근 한미약품과 대웅제약, 삼진제약, 휴온스, 유유제약 등이 관련 임상을 이미 진행 중이거나 착수할 계획임.

회사	파이프라인	연구 내용	전임상	임상 1상	임상 2상	임상 3상
지트리비엔티	GBT-201	티모신 베타4를 주성분 치료제 개발 중 - 술잔 세포의 증식을 통한 상처치료와 항염증 효과가 가능한 안구건조증 치료제 - 미국 임상 진행 중	○	○	○	○
휴온스	HU024	항-TNF 약제를 안약형태로 전환투여가 가능하도록 개량한 바이오메네 약품 개발	○	○	○	○
현용바이오/마세웅제약	HL036	클릭스 펩타이드를 이용한 안구건조증 치료제	○	○	○	○
유유제약	-	미국 안구 전문연구개발 알레그로와 공동연구 및 전략적 투자 계약 체결	○	○	○	○
한미약품	-	-	○	○	○	○

자료: 각 사, 언론 보도, 신약개발투자

<그림 14> 건성안 관련 주요 소재 개발 진행 현황

- 지트리비엔티는 지난해 말 식약처에 건성안 치료제의 제3상 임상시험계획 승인신청서를 제출하였고, 지트리비엔티가 개발 중인 건성안약 'GBT-201'은 펩타이드 성분을 함유하는 바이오 신약임.
- 삼진제약의 경우 세계 최초로 경구용 치료제 'SA001'을 개발 중에 있으며, 지난 7월에는 식품의약품안전처로부터 눈에 넣는 점안액 'SJP-002'의 임상을 승인.

- 대응제약은 지난해 인수한 한올바이오파마의 파이프라인 중 항TNF-α 바이오베터 건성안 치료제 'HL306'이 올해 하반기 국내 임상 1상을 마칠 예정임
- 휴온스도 재조합 단백질 이용한 건성안 바이오신약 'HU024'의 미국임상 2상 초읽기에 들어갔으며, 유유제약도 부산백병원과 안과질환 신약개발 협력 네트워크를 구축하는 양해각서를 체결하고 고순도 콜라겐헵타이드를 이용한 건성안 치료제를 개발 중임.
- 동아에스티는 알러지성 결막염치료제 '타리온(Talion)' 점안액을 발매 중임.

(3) 국내 눈 건강 관련 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황

- 국내 눈건강 관련 건강기능 식품 원료성분 인정현황은 7건의 개별 인정형 원료인정과 루테인과 헤마토코쿠스 추출물 2건의 고시형 원료가 있음.
- 눈 건강기능식품의 대표적 소재로 고시형 소재인 루테인을 들 수 있으며, 항산화 소재인 베리류, 토마토 추출물 등도 눈 건강에 도움을 주는 식품으로 언급되고 있음.
- 고시형 원료인 베타카로틴과 비타민 A, 비타민 E 등을 여러 항산화 소재들에 부원료로 사용하여 눈 건강의 기능을 포함하는 것으로 홍보되고 있으나 주로 면역건강, 항노화와 관련된 포괄적 기능의 소재들로 눈 건강에 특화된 제품들은 소수인 상황임.
- 항산화 기능 소재의 2013년 생산실적은 전체 건강기능식품 생산실적의 약 20.6%인 3,055억원 규모로 추정됨.
- 반면, 한국식품안전관리인증원의 2016년 건기식 국내시장 동향 분석에 따르면 눈 건강 관련 대표소재인 루테인의 경우 2014년 매출액 111억원에서 2015년도 204억원으로 전년대비 83%로 급격한 성장세를 보이고 있으나 아직까지 눈 건강 관련 기능식품 시장이 제대로 형성되어 있지 않은 상황임.

(중 단종액, 단비 : 억원)

구분	2014	2015
총량	6,330	6,943
전년대비 성장률(%)	7.9	9.7
개별인정형	3,276	3,195
전년대비 성장률(%)	36.7	0.6
비타민 및 무기질	1,415	2,079
전년대비 성장률(%)	19	46.9
프로바이오틱스	1,388	1,579
전년대비 성장률(%)	72.6	13.8
밀크씨슬 추출물	676	704
전년대비 성장률(%)	119.5	4.1
달로에	575	560
전년대비 성장률(%)	-8.4	-2.6
EPA 및 DHA 함유 유지	396	485
전년대비 성장률(%)	-19.2	22.5
인삼	426	307
전년대비 성장률(%)	-8.6	-27.9
가르시니아캄보지아 추출물	221	277
전년대비 성장률(%)	-59.3	25.3
루테인	111	204
전년대비 성장률(%)	17.9	83.0

<그림 15> 2015년 건강기능식품 국내 시장규모 동향 분석

- 눈 건강 개선 및 질환 예방이 가능한 특화된 기능성 원료 소재가 개발될 경우 기존 시장








을 분할하는 형태가 아닌 새로운 기능성 소재 시장이 형성될 것으로 전망되는 유망한 분야임.

- 특히, 건성안의 경우 진료 환자가 급격히 증가하고 있으나 건성안 관련 건식식 원료로는 2016년 오메가3가 개별인정형 원료로 인정을 받았으나 건성안에 대한 사회적 관심이 지속적으로 증가하면서 기능성 식품에 대한 니즈 역시 지속적으로 확대되고 있는 추세로 건성안 개선 기능의 눈건강 건강식품이 개발될 경우, 2013년 기준 약 1천억원에 이르는 국내 건성안 시장의 미 충족된 니즈를 충족시킬 수 있을 것으로 기대됨.

나. 국내 눈관련 기능성 식품 경쟁 현황

(1) 국내 눈관련 건강기능식품 경쟁업체 및 제품

- 눈 관련 건강기능식품 및 약국에서 구입할 수 있는 일반의약품 제품들은 다음과 같음.

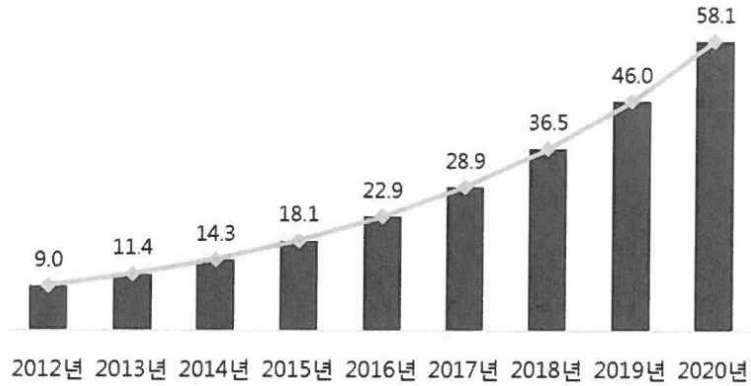
구분	기능성	기능성원료	주요제품		
건강 기능식품	눈의 피로도 개선의 도움	블베리추출물, 해마로보루스추출물 (2)	 <ul style="list-style-type: none"> • 제품명: 수블랑 프리미엄 피렉트 아이 • 업체명: 프록비어오 		
	눈 건강에 도움	폴립립추출물, 루테인/시아안틴 복합추출물, 루테인 복합물, 루테인 인지아산틴복합추출물(30%), 마리아 골드 추출물(루테인엑스텍트) 지 아안틴추출물 (6)	 <ul style="list-style-type: none"> • 제품명: 아이세아프루테인 • 업체명: 인국안강 	 <ul style="list-style-type: none"> • 제품명: 아이원루테인 • 업체명: 종근당건강 	 <ul style="list-style-type: none"> • 제품명: 아이시안 루테인 골드 • 업체명: CJ제일제당
일반약품	눈의 피로 및 안구건조증	레티놀, 베타카로틴, 루테인, 시아안틴, 당근, 구리, 비타민 B12, 비타민 B6, 폴립립추출물, 시아노코발린, 아스코르브산, 셀레늄, 아연, 호모 티올아세타이트 등	 <ul style="list-style-type: none"> • 제품명: 토비콜엑스 • 업체명: 인국약품 	 <ul style="list-style-type: none"> • 제품명: 크린브라이트 • 업체명: 종흥제약 	 <ul style="list-style-type: none"> • 제품명: 아로나민 아이 • 업체명: 일동제약

<그림 16> 국내 눈 관련 건강기능식품, 일반의약품 주요제품 및 업체

다. 안질환 관련 동물용의약품 국내 시장 및 연구 동향

(1) 국내 반려동물 시장규모 및 현황

- 2015년 1조 8000억원 이었던 반려동물 시장은 지난해 2조 3000억원 규모로 성장함.
- 반려동물 관련 전체 시장(1.8조) 중 의료 및 미용시장 1.1조원, 사료 및 식품성장 4,957억원, 의류 및 용품 1,836억원 등으로 추정됨.
- 국내 반려동물 관련 시장은 앞으로 5년간 연평균 25%의 성장세를 보이며 2020년엔 5조 8000억원까지 확대될 것으로 추정됨.



<그림 17> 반려동물 시장규모 전망

(2) 성장하고 있는 동물용 의약품 시장

- 동물용 의약품 시장은 2006년 3천8백억원 시장에서 2013년 기준 5천4백억원의 시장을 형성하고 있으며, 2015년 기준 6천5백억원의 시장규모를 가지고 있으며 매년 4%가량 성장하고 있는 성장 잠재력은 무궁무진한 상황임.
- 다국적 기업인 Mars의 사업분야 중 반려동물용 사료부문으로 이중 대표적인 브랜드가 기능성 사료인 Royal Canin으로 기능성 반려동물 제품의 매출이 상당히 높음.
- 국내에서도 반려동물 시장의 발달로 고품질제품(유기농 반려동물 식품, 기능성 식품)의 출시가 이어지고 있는 추세임.

(3) 국내 반려견 안구 건조증 발생현황

- 개의 각막 질환은 거의 모든 연령대에서 발생하는 가장 흔한 안질환의 하나이고, 이중 몇몇 질환은 시력에 막대한 영향을 주고 있으며 내과 및 외과 처치가 필요함
- 안구 건조증은 Kaswan 등(1998)에 의해 약 35%의 반려견에서 발생하는 것으로 보고가 되었고, 5세 이상의 반려견에서 많이 발생하는 것으로 조사됨. 조사된 자료에 따르면 안과질환으로 내원한 519 증례 중 건성각결막염(안구건조증, KCS)이 40%를 차지할 만큼 높은 발병을 보이고 있음.
- 2004~2005년 서울대 동물병원에서 조사된 자료에 따르면 안과질환 중 건성각결막염(안구건조증, KCS)이 19%를 차지함.

<표 6> 연령별 안질환 분포

Table 2. Distribution of corneal diseases by age

Diseases	Age	0-4	5-8	9-12	>13	Total	Average (mean±SD)
Congenital		1(0.5)*				1(0.5)	1
Inflammatory							
Nonulcerative keratitis		25(13.2)	34(17.9)	29(15.3)	9(4.7)	97(51.1)	7.2±3.8
Ulcerative keratitis		40(21.1)	22(11.6)	12(6.3)	8(4.2)	82(43.2)	5.7±4.4
Metabolic		7(3.7)	1(0.5)	1(0.5)	1(0.5)	10(5.2)	4.9±3.5
Total		73(38.5)	57(30)	42(22.1)	18(9.4)	190(100)	6.4±4.1

*Heads (%)

Table 3. Distribution of corneal diseases by sex

Diseases	Sex	Male	Female	Total
Congenital		1(0.5)*		1(100)
Inflammatory				
Nonulcerative keratitis		41(42.3)	56(57.7)	97(100)
Ulcerative keratitis		35(42.7)	47(57.3)	82(100)
Metabolic		5(50)	5(50)	10(100)
Total		82(43.2)	108(56.8)	190(100)

*Heads (%)

(4) 경쟁 제품 현황

- 국내에는 동물전용 안과약이 거의 전무한 상황으로 현재 동물에게 사용되는 안구건조증 전문 의약품인 옵티문(안연고)이 FDA에 동물용 안구건조증 치료제로 승인받은 유일한 전문치료제로 사이클로스포린이 주요성분으로써 인체용 전문의약품을 재허가 받아 사용하고 있음.



<그림 18> 동물 안구건조증에 사용하는 안연고

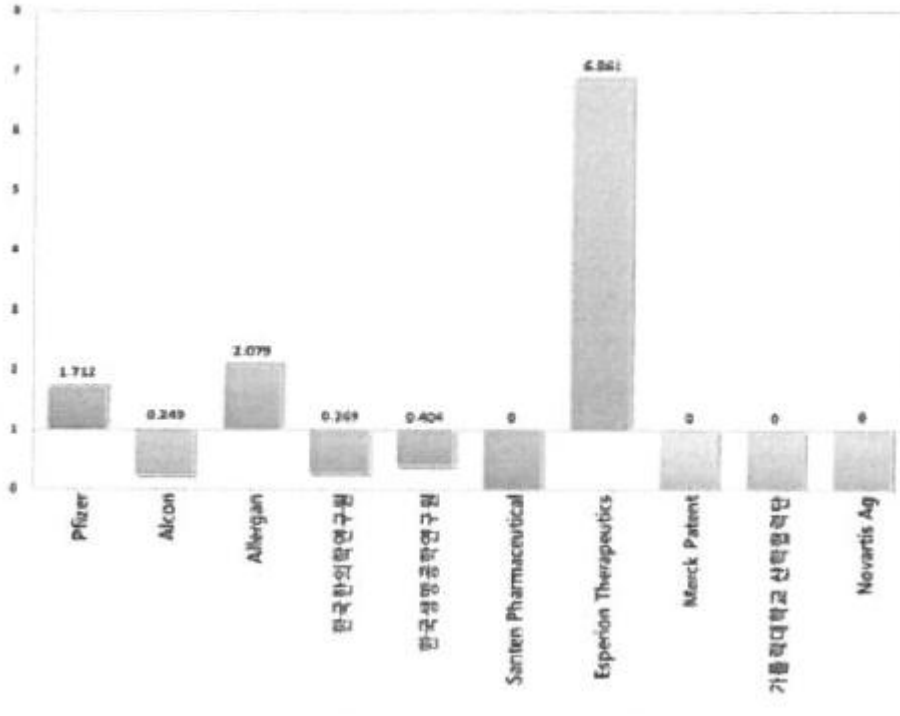
(5) 국내 지식재산권 현황

- 안과질환 관련 기술의 한국인 출원 동향을 살펴본 결과 다양한 출원인에 의해 연구가 진행되고 있었으며, 그 중 본 과제 참여연구기관인 한국한의학연구원이 29건으로 가장 많은 특허를 보유하고 있는 것으로 나타났음.
- 한국 출원이 Top15 중 산업계가 1건, 학계가 7건, 연구계가 5건 이었으며, 개인 출원인이 1건 있는 것으로 나타나 학계와 연구계에 의해 안과질환 관련 기술의 연구가 주로 진행되고 있음을 알 수 있음.



<그림 19> 한국 출원인별 특허건수

- 특허 수준지수란 특정 기술분야 전체 특허의 평균 피인용수에 대한 특정 국가 발표 특허의 평균 피인용수의 비로써 피인용수에 기반을 둔 질적 수준 평가 지표를 의미함.
- 수준 지수가 1.0인 경우 특정 국가가 출원한 특허의 평균 피인용수가 해당 분야 전체 특허의 평균 피인용수와 같음을 의미하며, 1.0을 초과하는 경우는 해당 분야 평균 피인용수에 비해 높음을 의미함.
- 2000년부터 2014년까지 Esperison Therapeutics는 20건의 특허를 출원하였으나 특허당 피인용수는 4.4건이며, 특허 수준지수는 6.861으로 매우 높은 것으로 나타남. 이는 질적으로 우수한 논문을 다수 보유하고 있음을 의미함.
- 그 다음으로 Allergan의 특허 수준지수가 2.079(평균 피인용수 1.333건), Pfizer가 1.712(피인용수 1.098건) 순이며, 한국한의학연구원은 0.269(평균 피인용수 0.172건)으로 나타남.



<그림 20> 출원인별 특허출원 현황

<표 7> 출원인별 수준 지수

기관명	특허 수	특허당 피인용수	수준 지수
Pfizer	51	1.098	1.712
Alcon	50	0.160	0.249
Allergan	33	1.333	2.079
한국한의학연구원	29	0.172	0.269
한국생명공학연구원	27	0.259	0.404
Santen Pharmaceutical	24	0	0
Esperion Therapeutics	20	4.400	6.861
Merck Patent	20	0	0
가톨릭대학교 산학협력단	19	0	0
Novartis Ag	16	0	0

(6) 눈건강과 관련된 연구현황

- 현재 국내에서 황반변성과 관련하여 연구재단, 보건산업진흥원, 범부처신약개발사업 등에서 발주한 R&D사업이 진행 중에 있음.
- 하지만 대부분의 연구가 치료제 개발에 집중되어 있음.

라. 천연소재를 활용한 눈 건강기능식품 개발 필요성

<표 8> 눈 건강 연구현황

구분	사업목적	추진방법	주요성과	지원기관	기타
한국한의학연구원	당뇨병성 망막증, 황반변성	천연물 신약	㈜안국약품에 기술이전	한국한의학연구원	2015년 종료
충남대	건성 황반변성	합성신약	㈜국제약품에 기술이전	범부처 신약개발사업	종료
생명공학연구원	당뇨망막병증 황반부종 치료를 위한 융합 세포치료제 개발 연구	줄기세포를 이용한 망막병증 치료제개발	-	연구재단	2015년 ~
건국대	인간배아줄기세포 분화기술을 이용한 당뇨병 망막손상 및 혈관손상 재건 가능성 세포치료제 개발	배아줄기세포를 이용한 치료제 개발	-	연구재단	2015년 ~
서울대	당뇨망막병증 황반부종과 건성 노인성 황반변성 치료용 융합 세포치료제 개발	세포치료제를 이용한 치료제 개발	-	연구재단	2015년 ~
경북대	마이크로RNA 조절을 통한 신생혈관성 당뇨병성 망막병증과 연령관련 황반변성에서의 신생혈관억제 기전규명 및 약물표적 검증	miRNA 이용한 망막병증 치료제개발	-	연구재단	2014년 ~
생명공학연구원	망막질환의 치료 및 진단을 위한 생체적합성 고분자의약품의 개발	나노화합물을 이용한 망막질환 진단 및 치료제 개발	-	연구재단	2012년 ~
인제대	망막 신생혈관질환 치료용 의료소재 개발을 위한 전임상 플랫폼 구축	망막질환 전임상 프로토타입 구축	-	연구재단	2012년 ~

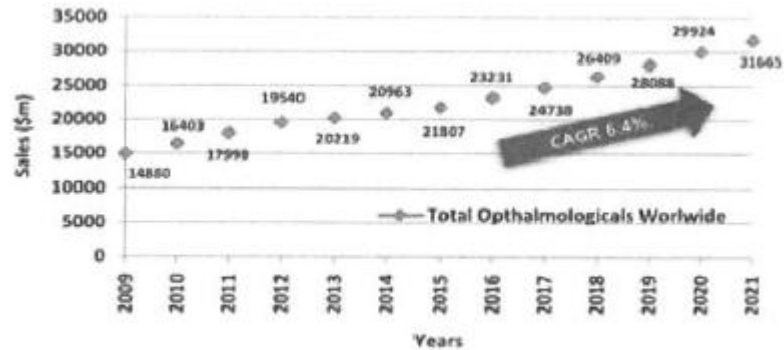
- 눈의 기능이 나빠질 경우, 눈의 피로가 증가하고 안구 건조증 등의 증상이 나타나기 쉬움. 일반적으로 40세 이후가 되면 가까운 곳이 잘 안 보이는 노안 증상 및 황반변성이 나타나기 시작하기 때문에 운택한 삶을 위해서는 눈 건강에 각별한 주의가 필요함.
- 특히, 현대인의 경우 컴퓨터, 텔레비전, 스마트폰 사용 등으로 눈 건강에 위협을 주는 환경에 과다 노출되어 있기 때문에 눈 건강을 유지하기 위한 노력이 필요하며, 이에 따라 눈 관련 기능성 식품소재에 대한 관심 역시 지속적으로 증가하고 있는 추세임.
- 최근 식품의약품안전처에서도 눈 건강과 관련한 기능성원료 개발이 많아짐에 따라 안구 건조증, 황반변성, 시세포 및 눈의 피로도 개선과 관련한 바이오마커 등의 정보를 제공하는 눈 건강 기능성 평가 가이드를 발간하였음.

2. 국외 기술개발 현황

가. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 국외 눈 건강 이상 환자들의 급증

- 전 세계적인 수명연장에 따른 고령화 및 디지털 기기의 발달에 따라 지나친 안구의 혹사에 따라 안과질환 환자가 급격히 증가하고 있으며, 안질환 치료제 시장은 급성장하고 있는 산업임.
- 2010년도 세계 제약시장 규모는 현재 약 8,250억 달러 규모이며, 이중 안과질환은 약 200억 달러 규모로 전체 제약시장에서 안과질환 치료제가 차지하는 비중은 점차 증가하고 있음.

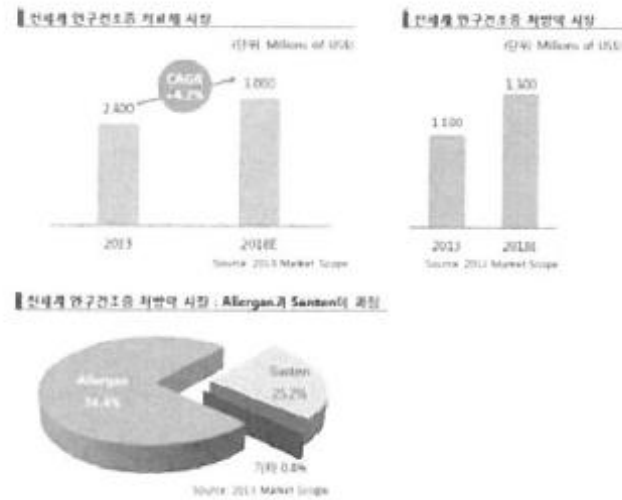


Source: visiongain 2017

<그림 21> 세계 안과질환 치료제 시장 전망, 2009~2021년

(2) 국외 안질환 관련 시장 현황

- BBC 리서치가 발간한 보고서에 따르면 세계 안질환 약물 시장은 2009년 155억 달러에서 2014년 201억 달러로 연 평균 5.9%의 성장률을 기록할 것으로 예상.
- 안구 건조증 치료제 시장은 미국의 경우 안과 6대 주요 시장 중 3번째로 큰 시장으로 연 평균 10% 이상 고성장이 예측되는 거대 시장임.
- 2013년 기준 건성안 시장규모는 24억 달러에 달하며, 2018년에는 30억 달러로 시장이 확대될 것으로 예측되며, 건성안 치료제로 개발 중인 약물은 다양하지만 건성안 처방약 1위 제품은 사이클로스포린 성분인 미국 알러간의 레스타시스와 1위 디쿠아포솔나트륨 성분인 산테사의 디투아스 두 제품이 과점, 그 외에는 수분분비 혹은 점액분비 촉진 작용을 가지는 물질과 기타 항염증제가 주류를 이루고 있음.
- 점안제 시장은 건성안 치료제 (연간 2.5조), 항균 점안제(320억원), 스테로이드점안제(178억), 항 히스타민 점안제(147억) 등이 사용되어지고 있음.
- 리서치회사 GolbalData 에서는 결막염 치료제 시장은 유럽 주요 6개국에서 치료제 개발 시장이 확장될 것으로 예상.
- 미쓰비시다나베제약이 개발해 2009년 9월에 알러지성 결막염치료제로 미국 FDA의 허가 승인을 받아 베프리브(Bepreve)라는 상품명으로 미국에서 판매.



<그림 22> 전 세계 건성안 치료제 시장 규모

(3) 건강기능식품관련 국외 기술현황

- 일반현황: 일본, 미국, 유럽 등에서의 식품산업 관련 기술은 단순한 식량 확보차원이 아닌 노화억제, 장수, 안전, 건강수명 연장 관련 식품을 발전 가능성이 높은 분야로 보고 이들 식품개발을 위한 식품 생명공학 기술 개발에 연구역량을 집중하고 있음. 건강기능식품 소재화 기술에 대한 해외 특허는 1991년부터 최근까지 총 4,456건이며, 2000년대 초반이후 매년 300건 이상 출원되는 것으로 보아 꾸준히 성장하는 추세임.
- 미국: 미국식품과학회 (IFT)에 따르면 미국 기능성식품의 키워드는 아동, 파이토케미컬즈 (phytochemicals), 50대 이상의 실버 세대, 유기농, 스포츠 연계, 저지방, 무설탕, 저인슐린, 글루텐제거, 자연친화 등이라고 보고함. 미국의 기능성식품 트렌드는 건강기능식품 품목의 다양화, 라이프 스타일을 향상시킬 수 있는 기능성식품의 소비, 스포츠 시장과의 연계 및 어린이 건강시장규모 확대, 성별, 연령 및 인종에 따른 기능성 식품의 차별화, 체중조절제품, 포만감지속/식욕저하 제품의 성장, 자연식품의 선호 등으로 정리할 수 있음.
- 일본: 일본 기능성식품의 키워드는 피부미용, 실버세대, 관절, 음료, 대사증후군, 아이케어, 멘탈케어, 면역 등으로 정리할 수 있음. 초고령화 사회의 도래로 인해 건강에 대한 관심이 매우 높으며, 이로 인해 일본의 건강기능식품에 대한 소비자 1인당 지출 비용은 전세계에서 가장 높고. 건강유지와 질병의 예방차원에서 건강 기능식품을 소비하고 있음.
- 서유럽: 서유럽지역 기능성 식품의 키워드는 비만, 인터넷, 대체요법, 고품격 등으로 정리할 수 있음. 영국의 경우 3분의 1수준이 과체중이며, 20% 정도가 위험한 비만수준으로 비만과 다이어트에 대한 관심이 급증하고 있으며, 독일의 경우 비타민과 무기질, 강장제 이외에 대체요법, 허브요법이 각광받고 있음. 스위스의 경우 '프리미엄 라인' 이라는 이름

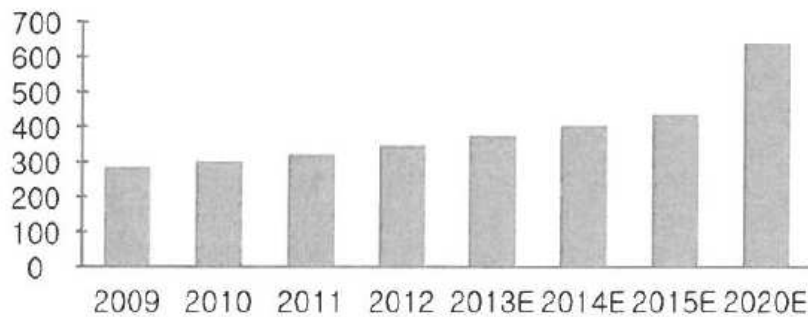
으로 고급식품이 대성공을 거두었으며, 주로 타깃은 유제품, 웰빙식품, 기능성 식품 분야임.

<표 9> 국가별 기능성 식품 키워드

미국	아동, 파이토케미컬즈, 50대 이상의 실버 세대, 유기농, 스포츠 연계, 저지방, 무설탕, 저인슐린, 글루텐 제거, 자연친화
일본	피부미용, 실버세대, 관절, 음료, 대사증후군, 아이케어, 멘탈케어, 면역
중국	급성장, 기능성 음료, 노인인구 증가, 질병 케어 등임. 여성미용 관련, 신장병 및 당뇨병 예방, 수면 개선, 소화계통 개선
서유럽	비만, 인터넷, 대체요법, 고품격

(4) 국외 기능성 식품 시장현황

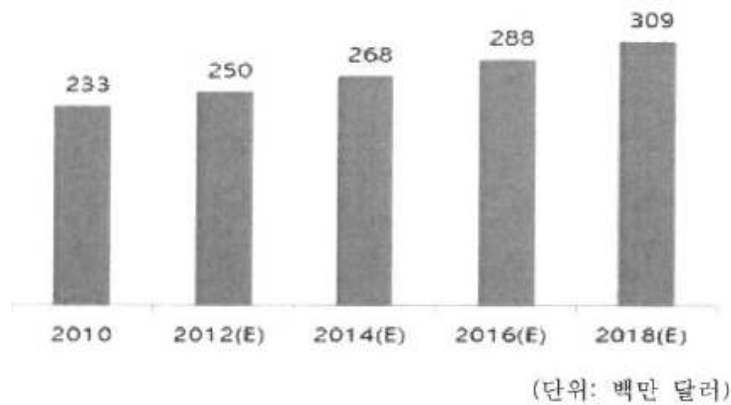
- 의료기술의 발달 등으로 인한 고령화 사회로의 진입은 전 세계적인 추세로 2025년경에는 전체 인구의 25%가 35세 이상일 것으로 추정됨.
- 점차 소비자의 건강기능식품에 대한 의식이 달라지고 있어 올바른 건강기능식품의 연구 개발과 제조 판매를 통해 국민의 건강유지에 도움이 되는 건강기능식품산업이 지속적으로 발전할 것으로 기대됨.
- 전 세계 기능성 식품 시장은 2012년 기준 3,646억달러(약 350조원)이며, 2020년까지 약 6,394억 달러로 확대될 것으로 예상됨. 연평균성장률(CAGR)은 7.7%로 지속적 성장을 나타낼 것으로 추정됨.
- 국가별 건강기능식품 시장규모는 2012년 미국이 전체 시장의 약 33.8%를 차지하고 있으며, 뒤이어 유럽(159억 달러), 중국(119억 달러), 일본(106억 달러) 등이 기능성 식품 시장의 성장을 이끌고 있음.



<그림 23> 전 세계 기능성 식품 시장규모

(5) 국외 눈 관련 기능성식품 시장현황

- 국외 눈 관련 기능성 식품 역시 루테인 제품이 시장을 주도하고 있음.
- 전 세계 루테인 시장규모는 2010년 기준 약 2억3천3백만 달러이며, 2018년까지 3억 9백만 달러로 성장할 것으로 전망됨(연 평균 성장률 3.6%)
- Lutein을 포함한 전반적인 눈 건강식품 시장은 미국이 45%의 점유율로 가장 많이 차지하고 있으며, 그 뒤를 이어 유럽이 27%, 아시아 10%, 호주 9% 순임.



<그림 24> 전 세계 루테인 시장

나. 동물용 의약품 국외 시장 및 연구현황

(1) 국외 동물용 의약품 시장 현황

- 글로벌 동물용 의약품 시장은 2014년 기준 230억불(약 25조원) 시장을 형성하고 있고, 국내 시장규모의 40배를 차지하고 있으며, 매년 4%가량 성장하고 있음.

Animal Health Industry (global)



<그림 25> 글로벌 동물용 의약품 시장

(2) 경쟁제품 현황

- 글로벌 동물용 안구 건조증 치료제는 국내에서도 수입판매하고 있는 옵티문(안연고)이 유일함.
- 기타 인공 눈물 관련 제품들이 있으나, 인체용 의약품을 그대로 사용하고 있는 실정임.
- 그 외에는 수분분비 혹은 점액분비촉진 작용을 가지는 물질관 기타 항염증제가 주류를 이루고 있음.



<그림 26> 글로벌 동물용 의약품 시장

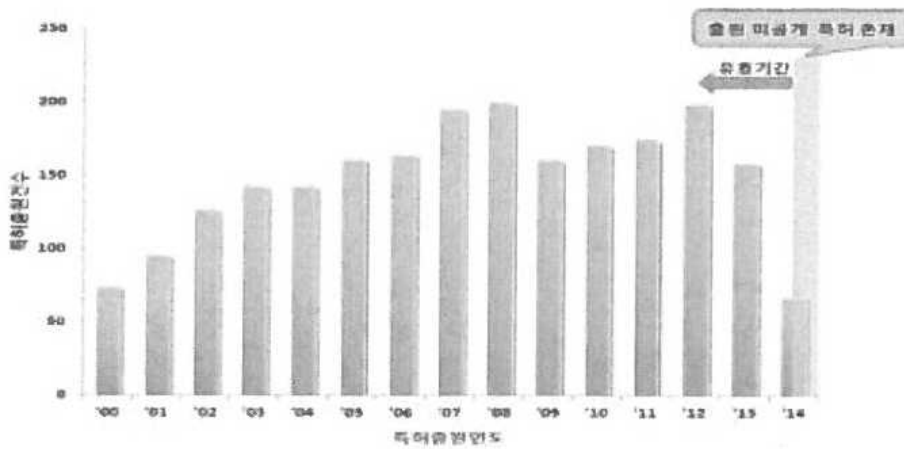
다. 국외 지식재산권 현황

(1) 안과관련 지식재산권 현황

- 안과질환 관련 기술은 200년대부터 2014년까지 총 2,236건의 특허가 출원되어 있으며, 2008년에는 200건, 2012년에는 199건의 특허가 출원되어 최근 활발한 연구성과를 나타내

있음. 이러한 추세를 보았을 때 앞으로 안과질환관련 기술의 특허는 증가할 것으로 예상됨.

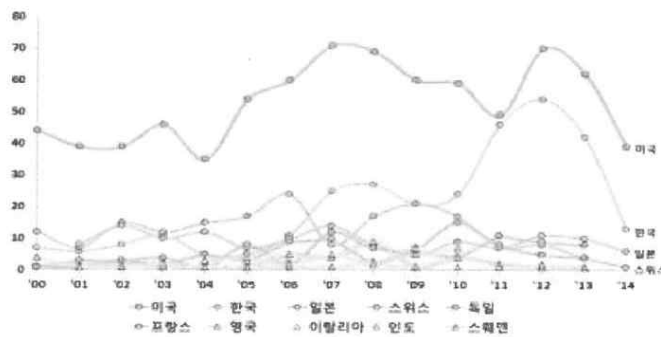
- 안과질환 관련 기술의 출원인 국적별 동향을 살펴본 결과, 다양한 국적의 출원인이 해당 기술을 연구하고 있으며, 그중에서도 특히 미국 출원인이 796건의 특허 출원하여 가장 활발하게 연구를 진행하고 있는 것으로 나타남.
- 한국 국적을 출원인은 305건의 특허를 보유하고 있으며, 특히 2012년에 54건의 특허가 출원되어 가장 활발한 연구성과를 나타내었음. 그 다음으로 일본이 200건, 스위스가 117건 순으로 나타남.



<그림 27> 안과질환 관련 기술의 특허건수 연도별 추이

<표 10> 안과질환 관련 기술의 연도별 특허출원 현황

연도	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
특허건수	74	96	127	143	143	161	164	196
연도	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	총합계
특허건수	200	161	171	175	199	159	67	2236



<그림 28> 출원인 국적별 동향 추이

<표 11> 출원인 국적별 - 연도별 특허출원 현황

연도	미국	한국	일본	스위스	독일	프랑스	영국	이탈리아	인도	스웨덴
2000	44	7	12	0	1	1	0	0	0	4
2001	39	6	7	8	1	3	1	1	1	1
2002	39	8	15	14	3	3	2	1	1	1
2003	46	11	12	10	4	2	1	2	2	0
2004	35	5	15	12	1	5	1	1	1	3
2005	54	5	17	7	8	3	1	3	1	4
2006	60	11	24	10	2	9	5	5	1	2
2007	71	25	8	14	12	10	4	1	1	5
2008	69	27	17	8	7	2	9	2	3	2
2009	60	21	21	5	7	6	1	7	5	1
2010	59	24	17	9	15	4	4	1	7	0
2011	49	46	8	7	8	11	2	1	0	0
2012	70	54	11	8	5	9	1	0	2	0
2013	62	42	10	4	4	8	1	1	1	1
2014	39	13	6	1	0	0	0	0	0	0

라. 국내·외 최신동향 및 여건 분석

(1) 외부환경 분석

	주요이슈	해당사업에 미치는 영향 또는 상관성
S (사회)	-고령화 사회 및 조기발병으로 인한 퇴행성 질환 환자 급증	-(노인성)퇴행성 난치성 질환의 예방·개선 기술 시급
	-디지털 기기사용의 급증 및 미세먼지 등에 의한 안과질환 환자 급증	-안질환 제어기술 개발 필요
	-국민삶의 질 향상	-한·양방 융합으로 투병기간 단축 및 예방 기술로 행복한 삶
T (과학 기술)	-합성신약, 단백질신약, 바이오신약의 높은 가격	-효능이 우수하고 치료비 부담이 비교적 낮은 MT-MC 기반의 천연소재기반기술 개발 필요
	-무반응, 내성, 부작용의 한계	
	-천연소재의 재현성 검증이 가능한 첨단장비 등장	-천연소재의 표준화 가능
	-약용작물(한약재)의 품질 표준화	-식약처 가이드라인에 맞는 과학적 전임상
	-안정성 이슈	-임상연구로 과학적 데이터 제시
E (경제)	-의료비 지출 급증	-전통 약용작물을 이용한 소재 개발로 공공 의료비용 절감
	-약용작물 시장 위축 및 고부가가치 글로벌 건강 기능소재 필요	-약용작물(한약재) 시장 확대를 위한 전략 필요
	-노동 인력 감소	-불편한 시력으로 인한 건강한(노인) 경제활동인구 감소

P (정치)	-노인성 질환으로 의료보험 증가	-예방기술 개발을 통한 노인의료보장 정책 기여
	-경제활동 인구감소로 국가적 부담	-건강한 경제 활동 인구 유지기여

(2) 내부 환경 분석

- 한의학(연)

- 지난 4년간 매년 수행하는 안과관련 과제의 연차 평가에서 B, A, S, S 및 최종평가에서 S 최우수 평가를 받아 천연물 분야 연구능력을 입증 함.
- 안과질환을 연구할 수 있는 연구 인프라 보유
- 천연소재의 표준화(natural compound natural herbal extract bank 보유, 지표(유효)물질 대량분리 능력), 효능(안구질환, 당뇨합병증, 비만 관련 동물모델(설치류, 제브라피시 보유) 및 기전 검증 시스템 구축
- 안과용 기능성 소재 기술이전 실적 3건(안국약품, (주)아이지, (주)큐라클에 기술이전)
- 지난 5년간 SCI(E) 논문 70편, 국내학진 16편 발표 및 특허 40편 국내외 등록

- 삼일제약(주)

- 전문성과 창의성을 겸비한 제약 전문가를 주축으로 의약품, 헬스케어 제품라인 확보로 우수 연구능력 입증
- 중추신경계, 안과, 소화기계, 간질환, 근골격, 순환계, 만성대사질환을 주력으로 연구하며 성공 즉시 제품생산이 가능할 수 있는 연구 인프라 및 생산라인 기 확보
- 전문가 그룹을 통해 기업 브랜딩, 기업 사회공헌(CRS), 공공 캠페인(학회캠페인, 국제 의료학술대회 등), MPR(제약, 의료기기, 바이오, 병원, 건강기능식품 등), Consumer Health(식품, 화장품, 생활용품 및 서비스) 등을 포함한 건강과 관련된 전문 영업, 홍보, 마케팅 라인 선점.
- 안산 반월공단 내에 위치한 생산라인 공장은 KGMP(한국 우수의약품제조 및 관리기준)시설을 확보되어 있어 원료의 입고, 제조, 포장, 완제품의 출고에 이르기까지 전 공정의 전산화를 통해 철저한 품질관리와 생산분석을 실시하여 고객이 원하는 품질 지향의 우수한 제조력을 자랑함.

- 벡스퍼트

- 대표이사 및 시험 책임자가 동물약품 및 신약 연구개발 20년 이상 경력의 수의사로 구성

<표 12> 한국의 안질환 기술 수준

분야	최고기술 보유국		한국 보유국 기술수준	최고기술 보유국 대비 한국 기술수준
	최고기술 보유국	최고기술 보유국 기술수준		
1. 안진단 도구 나사형상의 렌즈를 가진 시력계 측정 기술	미국	73.0	53.4	49.7
2. 안주상기 수술 정확 및 회복 기술	미국	48.8	43.1	43.7
3. 미세 조직연단 기술	미국	46.6	44.8	47.4
4. 안진단용 렌즈에 구멍을 뚫어 렌즈를 세척하는 기술	미국	36.3	41.1	71.0
5. 주요 안질환을 진단 치료 기술	미국	47.3	40.4	49.2
6. 난시정 교정용 렌즈 제조 기술	미국	33.9	33.7	45.9
7. 다중 초점용 콘택트 렌즈 기술	미국	79.3	62.1	78.3
8. 안질환 예방 치료 기술	미국	59.7	22.7	38.0
9. 안막 재형 치료 기술	미국	36.3	42.8	82.1
10. 비노출성각 질환 치료 기술	미국	49.9	40.3	74.7
11. 외안질환 예방 치료 기술	미국	49.9	47.2	48.2
12. 광학광학 및 광자외선 차단 예방 치료 기술	미국	43.1	45.0	71.3
13. 백내장 치료 기술	미국	49.2	53.8	77.2
14. 당뇨 망막 치료 기술	미국	30.9	45.6	64.7
15. 저시력 시력을 위한 콘택트 렌즈 제작 기술	미국	49.8	43.9	92.4
16. 글라우코마 수술	미국	74.0	61.1	81.2
17. 생체조직공학 기술	미국	72.5	51.5	69.7
18. 미세기공술 기술	미국	74.0	54.6	73.6
19. 저시력기 기술	미국	43.5	51.3	49.9
20. 의료영상시스템(e-Health) 기술	미국	36.3	45.0	48.4
21. 망막시력 기술	미국	49.5	43.4	79.1
22. 유전자 기술	미국	42.5	31.8	51.0
23. 난시제어시력 보정 및 통용 기술	미국	71.3	41.6	54.0
24. 광안막 치료 기술	미국	41.3	54.5	71.4
25. 광안막 광학 및 치료기 기술	미국	46.6	47.0	44.5
26. 광안막 광학 및 치료기 내시경 기술	미국	46.5	45.8	76.2
27. 광안막 치료 기술	미국	41.8	39.1	47.6
28. 광안막/광안막 수술 기술	미국	77.8	44.5	42.2
29. 레이저 외안막 기술	미국	49.3	40.0	74.8
30. 나노 진단 기술	미국	71.2	36.7	54.0
31. 나노 약물 전달 기술	미국	77.2	36.8	35.7
32. 안과 안과/안과/안과 진단 및 치료 기술	미국	40.4	72.5	62.0
33. 안과학 관련 기술	미국	41.7	36.9	40.1
34. 안질환 예방 예방 기술	미국	36.1	49.8	79.9

<표 13> 한국의 안질환 기술 격차

분야	최고기술 보유국		한국 보유국 기술수준	최고기술 보유국 대비 한국 기술격차
	최고기술 보유국	최고기술 보유국 기술수준		
1. 안진단 도구 나사형상의 렌즈를 가진 시력계 측정 기술	미국	73.0	53.4	31.1
2. 안주상기 수술 정확 및 회복 기술	미국	48.8	43.1	3.8
3. 미세 조직연단 기술	미국	46.6	44.8	4.9
4. 안진단용 렌즈에 구멍을 뚫어 렌즈를 세척하는 기술	미국	36.3	41.1	3.8
5. 주요 안질환을 진단 치료 기술	미국	47.3	40.4	7.9
6. 난시정 교정용 렌즈 제조 기술	미국	33.9	33.7	7.3
7. 다중 초점용 콘택트 렌즈 기술	미국	79.3	62.1	2.7
8. 안질환 예방 치료 기술	미국	59.7	22.7	47.7
9. 안막 재형 치료 기술	미국	36.3	42.8	2.8
10. 비노출성각 질환 치료 기술	미국	49.9	40.3	2.2
11. 외안질환 예방 치료 기술	미국	49.9	47.2	6.4
12. 광학광학 및 광자외선 차단 예방 치료 기술	미국	43.1	45.0	5.3
13. 백내장 치료 기술	미국	49.2	53.8	2.9
14. 당뇨 망막 치료 기술	미국	30.9	45.6	4.9
15. 저시력 시력을 위한 콘택트 렌즈 제작 기술	미국	49.8	43.9	3.8
16. 글라우코마 수술	미국	74.0	61.1	3.8
17. 생체조직공학 기술	미국	72.5	51.5	4.3
18. 미세기공술 기술	미국	74.0	54.6	4.3
19. 저시력기 기술	미국	43.5	51.3	4.3
20. 의료영상시스템(e-Health) 기술	미국	36.3	45.0	2.8
21. 망막시력 기술	미국	49.5	43.4	1.3
22. 유전자 기술	미국	42.5	31.8	3.9
23. 난시제어시력 보정 및 통용 기술	미국	71.3	41.6	4.3
24. 광안막 치료 기술	미국	41.3	54.5	4.3
25. 광안막 광학 및 치료기 기술	미국	46.6	47.0	3.0
26. 광안막 광학 및 치료기 내시경 기술	미국	46.5	45.8	3.2
27. 광안막 치료 기술	미국	41.8	39.1	8.1
28. 광안막/광안막 수술 기술	미국	77.8	44.5	6.8
29. 레이저 외안막 기술	미국	49.3	40.0	6.8
30. 나노 진단 기술	미국	71.2	36.7	5.6
31. 나노 약물 전달 기술	미국	77.2	36.8	3.3
32. 안과 안과/안과/안과 진단 및 치료 기술	미국	40.4	72.5	4.2
33. 안과학 관련 기술	미국	41.7	36.9	4.7
34. 안질환 예방 예방 기술	미국	36.1	49.8	3.1

- 관련 학계 및 전문가 그룹 네트워크 구성
- 수의과대학 및 동물병원들과 상호 협력 연구 협약을 통한 반려견 질환 공동 연구
- 전문 CRO인 (주)크로엔과 상호 협력 연구개발로 안전성/효능 실험실 인프라 확보
- 동물용의약품 관리 당국인 농식품부 수의과학검역검사본부와 협력 관계 구축
- 수도권 주요 동물병원들과 TRACS(translational research and animal clinical study) 수행 중
- 주요 동물용의약품 제조사들과 관계 유지하며 생산 아웃소싱 확보
- 국내 주요 사료회사(카길, CJ 등)들과 사료 첨가용 소재 협력 개발

마. 기타 동향 및 여건 분석

(1) 천연물 소재 안과 질환 기술개발 현황

- 안질환 예방 및 치료기술은 선진국 대비 기술격차가 가장 큰 보건의료기술 분야임.
- 2012년 발간된 보건의료기술 수준분석 및 동향 보고서에 따르면, HT(health technology) 관련 34개 중점 기술 중 안질환 예방 및 치료 기술이 최고기술 보유국 대비 한국의 기술 수준이 가장 낮은 기술로 선정되었음.

- ① 최고기술 보유국 대비 9.7년의 기술격차
- ② 특히, 황반변성과 같은 망막질환 치료기술의 경우 11.6년의 기술격차

③ 최고기술 수준 대비 38.7%의 기술 수준

- 이에 반하여, 한의학 및 천연물 신약개발 관련 기술수준은 34개 중점기술 중 최고기술 보유국 대비 기술 수준이 2번째 높은 분야이며, 기술격차에 있어서도 최고기술 보유국 대비 기술격차가 가장 좁은 기술임.

① 최고기술 대비 기술수준: 한의학 관련기술 92.2%, 천연물신약개발기술 79.9%

② 최고기술 보유국 대비: 한의학 관련기술 0.2년, 천연물신약개발기술 3.1년

- 따라서, 국내 HT 관련 가장 뒤쳐진 기술 분야인 안과질환 분야 기술에 대해 국내산 농림 약용 식품 자원을 이용한 소재 개발 기술들과 융합하여 한 단계 도약할 필요성이 대두됨.

제 4 절 연구개발범위

1. 최종 목표

호장근 추출물을 이용한 눈건강 개별 인정형 승인 및 건강기능식품 제품 개발 및 동물용 의약외품 개발

2. 세부 목표

가. 주관기관: 삼일제약(주)

- Pilot scale 생산 및 대량생산 공정 확립(문서화): 안정된 생산방법 확립
- 시제품제작: 가장 효율적인 공정으로 확인된 시제품 제작
- 제형연구: 건강기능식품 소재로서 적합한 제형 및 복합소재 제제 검토
- 안정성 평가: 유통기한 설정을 위한 안정성 평가 실시
- 임상시험약 제조 및 인체적용시험 진행: 임상 CRO를 선정하고, 인체적용시험 실시
- 개별인정형 원료 신청/승인 및 제품화: 개별인정형 원료 신청을 위한 문서화 및 신청을 실시하고 승인 후 제품화를 추진

나. 제1협동연구기관 : (주)백스퍼트

- 안정성평가: 유전독성, 단회(설치류/비설치류), 반복투여 독성시험
- 반려동물 효능 및 임상시험 실시
- 동물부외품 제제 연구 및 안정성 평가
- 농림축산식품부 “동물용 의약부외품 등록” 신청 및 제품화

다. 제2협동연구기관 : 한국한의학연구원

- 호장근 원료의 소재지별, 부위별 성분물질 규명
- 원료의 표준화 및 기준규격 설정
- Lab scale 추출공정 확보
- in vitro/ in vivo 유효성 평가: 안구건조증, 눈피로, 황반변성 모델에서 기능성 평가

라. 위탁연구기관 : (주)크로엔

- 호장근 추출물을 이용한 눈건강 개별 인정형 승인 및 건강기능식품 제품 개발을 위한 GLP인증기관에서 전임상 평가
- 안정성 평가
- 유전독성시험(복귀돌연변이, 염색체이상, 소핵시험)

- 설치류/비설치류 단회투여독성시험
- 설치류 4주 용량결정시험
- 설치류 13주 반복투여독성시험

제2장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 추출조건 최적화 및 표준화

1. 원료 확보 및 전처리 공정 표준화

가. 원료 확보 및 전처리

(1) 연구목적

안전성 및 품질이 보증된 원료를 확보하기 위해 표준화된 원료 수집 및 전처리 공정을 확립

(2) 연구방법

- CODE1(원료 채집)은 재료 및 가공 매뉴얼이 확보된 국가지정약용식물소재은행(ISO 인증기관)에서 수집한 원료임.
- CODE2(원료 구입)는 시중에 호장근을 유통하는 충북 괴산 및 충주소재의 업체로부터 건조물을 구입함.

(3) 연구결과

- 국가지정 약용식물소재은행 및 약초 전문가가 채집하여 시중에 유통하는 업체를 통해 구입·확보하였고, 원료의 수집 및 전처리 공정 확립을 통해 원료의 안전성을 확보함.



원산지 및 판매사실 증명서	
종명	호장근(좌)
원산지	충북 괴산/충주
납품일자	2017년8월8일
생산지	국내산
상호	청명약초
주소	경기도 여주시 주내로 494-15
주번번호(사업자)	126-92-86637
대표자	황상훈(인)
전화번호	031-882-3702
당사는 물품을 납품함에 있어서 원산지 및 판매사실이 실기와 같이 틀림없음을 증명합니다. 2017년07월30일 공급자 : 청명약초(126-22-86637) 대표: 황상훈(인)	

<그림 29> CODE1 원료확보 및 전처리(좌), CODE2 구매 원산지 판매사실 증명서(우)

<표 14> 원료확보 및 전처리 공정 기준

처리 공정	항목	공정 설명 및 기준
원료 확보	수집 대상	높이 2m 이상

	수집 위치	지상부 10cm 이상
	수집 부위	줄기
전처리	세척	현장에서 수세 2회 이상
	오염관리	해충 및 불순물 제거
	건조, 절단	1~3cm 절단하고, 독립된 공간에서 22~25°C에서 10~14일간 건조
	시료 포장	방제를 위해 30cm×90cm의 멸균된 vinyl bag에 개별 포장

2. 원료 동정

가. CODE1 분자마커 동정

(1) 연구목적

분자마커 동정을 통해 제품개발에 사용될 원료의 품질 확보

(2) 연구방법

- 중합효소연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)

• PCR 조건: 95°C 2min pre-denaturation, 30cycles [95°C 20sec-denaturation, 50°C 40sec- annealing, 72°C 1sec extension], 72°C 7min final extension

<표 15> PCR 및 sequencing에 이용한 샘플 목록

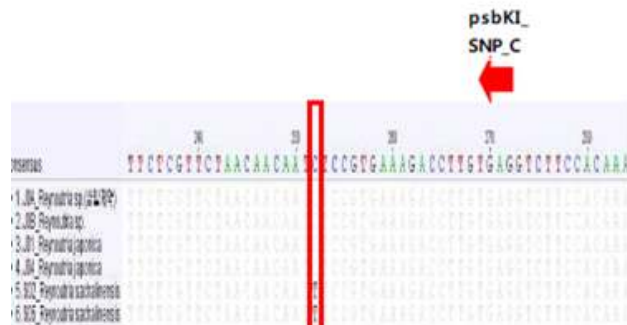
Scientific name	Serial No.	Voucher	Collecting sites
<i>R. sp.</i>	J0A	CODE2 9111	충청북도 옥천군 청성면
	J0B	170909001 MPRB	충청북도 옥천군 청성면
<i>R. japonica</i>	J01	KR-07-00472	충청북도 옥천군 청성면
	J04	S. C. Kim 20130915	충청북도 옥천군 청성면
<i>R. sachalinensis</i>	S02	KIOM 2013001	경상북도 울릉군 울릉읍
	S05	Hana 140820-1	경상북도 울릉군 울릉읍

<표 16> PCR 및 sequencing에 이용된 호장근류 특이 primer

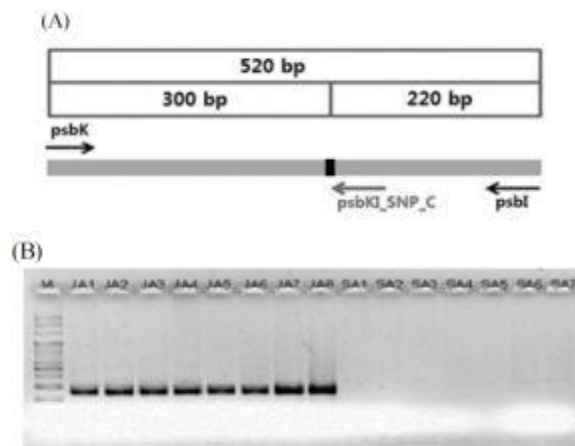
Primer name	Sequence	size(bp)	Tm(°C)	GC content(%)
psbK_F	5-TTA GCC TTT GTT TGG CAA G3	19	53	42
psbI_R	5-AGA GTT TGA GAG TAA GCA T-3	19	50.9	37
psbKI_SNP_C	5-CTC ACA AGG TCT TTC ACG GCG3	21	63.3	57

(3) 연구결과

- 기존에 종판별마커 기준시료로 사용된 3-6번시료(JO1, JO4, S02, S05)와 염기서열 비교 분석결과, (주)삼일제약에 2차에 걸쳐 납품한 호장근류 건조시료 2종은 (1. JOA, 2. JOB) 종판별마커의 기준인 색소체 DNA psb 유전자의 해당위치 염기가 C로 확인되어 제공된 시료는 호장근 (*R. japonica*)임이 확인되었음.



<그림 30> 호장근(*R.japonica*)과 왕호장근(*R.sachalinensis*)의 SNP site



<그림 31> 종판별 마커를 이용한 호장근과 왕호장근의 유전자증폭 전기영동사진

나. CODE2 분자마커 동정

(1) 연구목적

분자마커 동정을 통해 제품개발에 사용될 원료의 품질 확보

(2) 연구방법

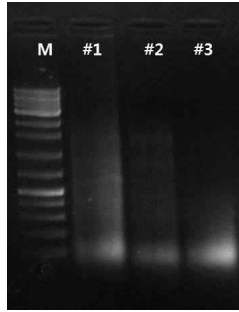
- 시료: 건조시료 1점의 genomic DNA를 kit를 사용하여 3반복(3개의 독립된 절편)을 추출한 후 본 실험의 재료로 사용함
- 중합효소연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)
 - PCR : 30 μ l의 PCR반응 용액에 genomic DNA (~30 ng)와 제작된 10 pmole의 forward primer 0.5 μ l, reverse primer 0.5 μ l, DSBio HSTMmix15 μ l, 멸균증류수를 첨가하여 혼합한 후, ABI 2720 thermal cycler (Applied Biosystems)를 이용하여 PCR을 수행함.

<표 17> 마커별 PCR 조건

Marker	Denaturation	Replication Cycle				Final Extension
		Denaturation	Annealing	Extension	No. of Cycle	
matK	95°C, 3min	95°C, 1min	52.5°C, 30sec	72°C, 80sec	35	72°C, 7min
rbcL	95°C, 3min	95°C, 30sec	55°C, 30sec	72°C, 90sec	35	72°C, 7min
rbcL-accD	95°C, 3min	95°C, 1min	54°C, 40sec	72°C, 45sec	35	72°C, 7min

<표 18> DNA 바코드 증폭을 위하여 사용된 프라이머

Marker	Primer name	Sequence(5'-3')	Size(bp)
matK	trnK_670F	CTG TAT CGC ACT ATG TAT C	1181
	matK_1326R	TCT AGC ACA CGA AAG TCG AAG T	
rbc L-accD	rbcL_50F	GAA GTA TGG AAG GAA ATC A	893
	accD_79R	ACA ACA TCG AAT TAA ACC AC	



<그림 32> PCR에 사용된 gDNA 전기영동 사진

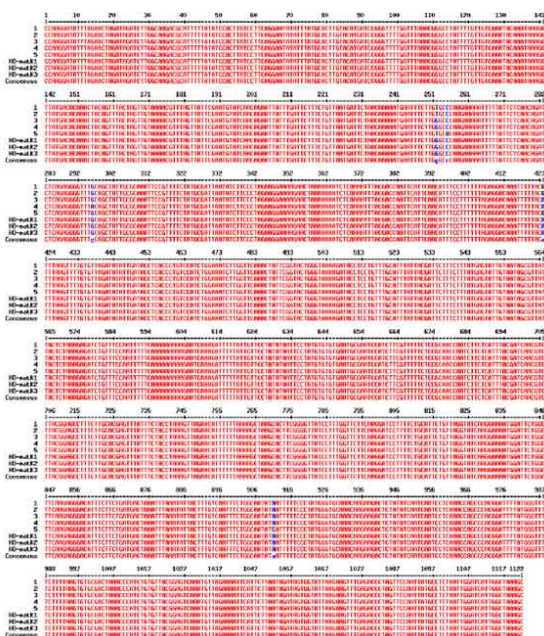
(3) 연구결과

- matK PCR 산물 염기서열 분석 결과

- 3반복 시료는 모두 동일한 염기 서열로 확인되었으며, BlastN 알고리즘을 이용한 NCBI nr database 검색 결과 CODE2는 호장근으로 확인.



<그림 33> 바코딩 마커를 이용한 PCR 산물의 전기영동 사진



1, 2: 감절대 matK 표준서열

3, 4, 5: 호장근 matK 표준서열

HO-matK1, HO-matK2, HO-matK3: 시료의 matK서열(3반복)

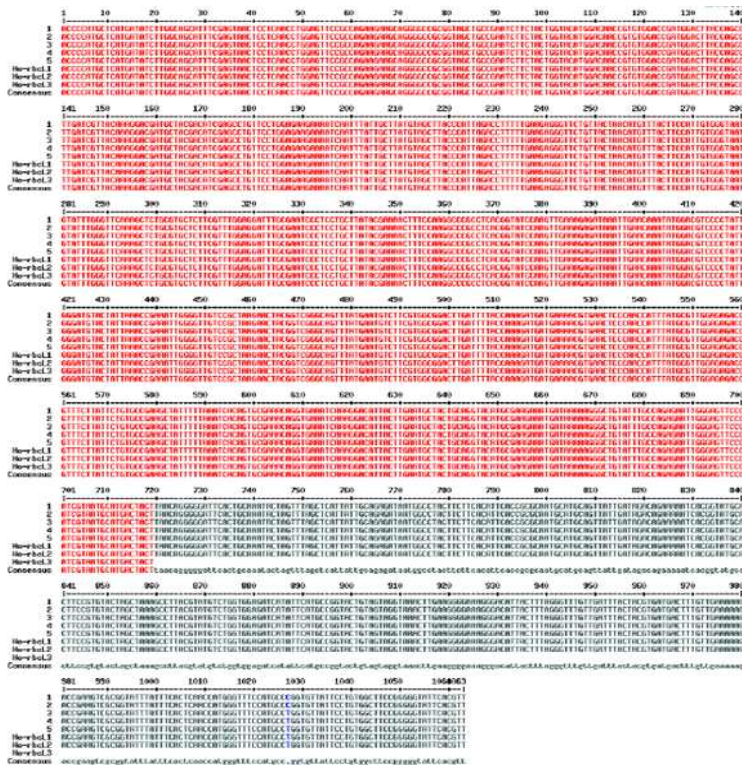
<그림 34> 증폭된 matK 염기서열의 multiple sequence alignment

<표 19> matK PCR 산물 에 대한 BlastN 검색 결과

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identity	Accession
Fallopia japonica isolate JAP_kr03 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	2073	2073	100%	0	100%	KJ863008.1
Fallopia japonica isolate JAP_kr22 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	2067	2067	100%	0	99%	KJ863016.1
Fallopia japonica isolate JAP_hn01 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	2061	2061	100%	0	99%	KJ862997.1
Fallopia forbesii isolate FOR_kr01 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	2061	2061	100%	0	99%	KJ862997.1
Fallopia sachalinensis isolate SAC_dk01 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	2056	2056	100%	0	99%	KJ863028.1

- rbcL PCR 산물 염기서열 분석 결과

- 3반복 시료에 대한 PCR 산물에 대해 염기서열을 분석한 결과 1건은 mixed된 결과로 나와 결과에서 제외하고, 나머지 2개의 시료는 동일한 염기서열로 확인함.
- 분석된 시료는 모두 1027번 염기서열에서 T염기형으로 호장근으로 확인 됨.



1, 2: 감절대 rbcL 표준서열

3,4,5: 호장근 rbcL 표준서열

HO- rbcL, HO- rbcL, HO- rbcL : 시료의 rbcL 서열(3반복)

<그림 35> 증폭된 rbcL 염기서열의 multiple sequence alignment

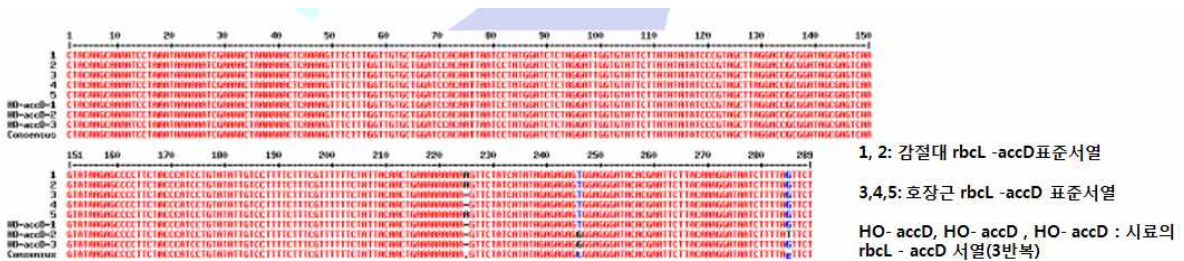
<표 20> matK PCR 산물 에 대한 BlastN 검색 결과

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identity	Accession
Fallopia japonica isolate J A P _ h n 0 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	1964	1964	100%	0	100%	KJ863211.1
Fallopia japonica isolate JAP_kr25 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	1958	1985	100%	0	99%	KJ863232.1
Fallopia forbesii isolate FOR_kr1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	1958	1958	100%	0	99%	KJ863208.1
Fallopia japonica isolate J A P _ h n 0 2 ribulose-1,5-bisphosphate	1953	1953	100%	0	99%	KJ863212.1

carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast							
Fallopia x bohémica chloroplast partial rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, isolated from Varese, Lombardy	1953	1953	100%	0	99%	FM883611.1	

- rbcL-accD PCR 산물 염기서열 분석 결과

- 3반복 시료는 모두 동일한 염기 서열로 확인
- BlastN 알고리즘을 이용한 NCBI nr database 검색 결과 220번째 염기서열 부근에서 A 염기가 9회 반복되어 호장근으로 확인되었으나 rbcL-accD는 근연종을 구분하기에는 적합하지 않은 바코딩 마커로 사료 됨.



<그림 36> 증폭된 rbcL-accD 염기서열의 multiple sequence alignment

<표 21> rbcL-accD PCR 산물 에 대한 BlastN 검색 결과

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identity	Accession
Fallopia sachalinensis isolate SAC_hn26 rbcL-accD intergenic spacer, partial sequence; and acetyl-CoA carboxylase (accD) gene, partial cds; chloroplast	532	532	100%	2.00E-147	100%	KJ862953.1
Fallopia sachalinensis isolate SAC_hn25 rbcL-accD intergenic spacer, partial sequence; and	532	532	100%	2.00E-147	100%	KJ862952.1

acetyl-CoA carboxylase (accD) gene, partial cds; chloroplast						
Fallopia sachalinensis isolate SAC_hn20 rbcL-accD intergenic spacer, partial sequence; and acetyl-CoA carboxylase (accD) gene, partial cds; chloroplast	532	532	100%	2.00E-147	100%	KJ862950.1
Fallopia sachalinensis isolate SAC_hn10 rbcL-accD intergenic spacer, partial sequence; and acetyl-CoA carboxylase (accD) gene, partial cds; chloroplast	532	532	100%	2.00E-147	100%	KJ862940.1
Fallopia sachalinensis isolate SAC_hk01 rbcL-accD intergenic spacer, partial sequence; and acetyl-CoA carboxylase (accD) gene, partial cds; chloroplast	532	532	100%	2.00E-147	100%	KJ862922.1
Fallopia japonica isolate JAP_ky03 rbcL-accD intergenic spacer, partial sequence; and acetyl-CoA carboxylase (accD) gene, partial cds; chloroplast	532	532	100%	2.00E-147	100%	KJ862913.1
Fallopia japonica isolate JAP_kr05 rbcL-accD intergenic spacer, partial sequence; and acetyl-CoA carboxylase (accD) gene, partial cds; chloroplast	532	532	100%	2.00E-147	100%	KJ862902.1
Fallopia japonica isolate JAP_kr03 rbcL-accD intergenic spacer, partial sequence; and acetyl-CoA carboxylase (accD) gene, partial cds; chloroplast	532	532	100%	2.00E-147	100%	KJ862901.1
Fallopia japonica isolate JAP_hn01 rbcL-accD intergenic spacer, partial sequence; and acetyl-CoA carboxylase (accD) gene, partial cds; chloroplast	532	532	100%	2.00E-147	100%	KJ862890

다. COED2 생물 종판별

(1) 연구목적

DNA동정을 통해 호장근으로 판명된 CODE2에 대하여 생물 표본을 이용한 종판별

동정을 실시함으로써 제품개발에 사용될 원료의 품질 확보

(2) 연구방법

- CODE2 시료의 잎, 줄기 등의 표본 시료를 확보하여 국립생물자원관에 의뢰 함.

(3) 연구결과

- 동정자(식물자원과 김진석 연구사, 남기흠 연구사, 임창건 박사)에 검사 결과. CODE2 는 마디풀과 호장근속의 주요 식별형질에 근거하여 호장근으로 동정함.

등록번호	식물자원과-1497	실무관	최정연주사	최정연주사	김창
등록일자	2018. 09. 11.	등록일자	2018. 09. 11.	등록일자	2018. 09. 11.
평가구분	비표본(7)	평가구분	비표본(7)	평가구분	비표본(7)

평가구분	평가구분	평가구분	평가구분
평가구분	평가구분	평가구분	평가구분

생물 종판별 의뢰건 결과 보고


삼일제약에서 의뢰한 마디풀과 호장근류 식물의 종판별 결과를 보고드립니다

□ 종 동정 의뢰 개요

- 일시 : 2017. 9. 4 (화)
- 내용 : 삼일제약에서 제품개발에 사용할 예정인 생물산업소재 마디풀과 호장근류의 종판별 요청

□ 종 동정 결과

- 동정자: 식물자원과 김진석 연구사, 남기흠 연구사, 임창건 박사
- 마디풀과 호장근속의 주요 식별형질에 근거하여 호장근으로 동정하였음

국명	학명	동정근거	비고
호장근	<i>Alpinia japonica</i> Blume Rosa Di	· 잎, 난형, 무늬형 · 잎사귀의 뒷면과 잎은 흰색으로 두 · 잎이 거칠 · 열매형태 비로써 식별형으로 평평한 형태	

□ 향후 추진일정

- 삼일제약 측에 종 동정 결과를 문서로 통보
- ※ 해당문서를 활용한 전시, 광고 등 상업적 또는 법적 이용 불가 사항 통보

라. 원료의 안정적 확보 방안 마련

- 소재 공급 협약 체결을 통한 안정적이고 원활한 원료 확보

마. 최종 결론

- 상기 엽록체 마코딩 마커로 수행한 염기서열 분석 결과와 표본을 이용한 생물종판별 결과를 종합하였을 때, 본 연구개발에 사용되는 가장 적합한 원료는 CODE2 호장근으로 판단되어 최종 제품개발 원료로 선정함.

- 선정된 최종 원료의 안정적이고 원활한 원료 확보를 위해 소재 공급 협약 체결

3. 추출 조건 최적화

가. 호장근 지상부 lab scale 추출물의 제조

(1) 연구목적

- 호장근 원료의 최적 추출 조건 확립을 위한 Lab scale 추출

(2) 연구방법 및 결과

(가) CODE1의 줄기 및 잎 추출물 제조

- 채집분인 CODE1에 대해 줄기와 잎으로 각각 나누어서 1차 증류수 또는 30% 에탄올을 이용한 추출을 수행하였으며 구체적인 추출과정과 추출수율은 아래 표와 같다. 줄기 추출의 경우 증류수와 30% 에탄올 모두 수율이 7%대로 비교적 낮은 추출 수율을 보인 반면, 잎 추출의 경우 증류수 및 30% 에탄올 추출 모두 약 20% 가량의 비교적 높은 추출수율을 나타냄.

<표 22> CODE1의 줄기 및 잎 추출 방법

구분	무게	추출 용매	추출방법	추출물무게(g)	수율(%)
CODE1-줄기-H ₂ O	700g	증류수 12L	열수추출 (3시간, 100℃±5)	50.21	7.17
CODE1-줄기-30E	700g	30% 에탄올 12L	30% 에탄올추출 (3시간, 90℃±5)	53.19	7.60
CODE1-잎-H ₂ O	520g	증류수 20L	열수추출 (3시간, 100℃±5)	106.13	20.38
CODE1-잎-30E	583g	30% 에탄올 20L	30% 에탄올추출 (3시간, 90℃±5)	112.80	19.48

(나) CODE2의 지상부 추출물 제조

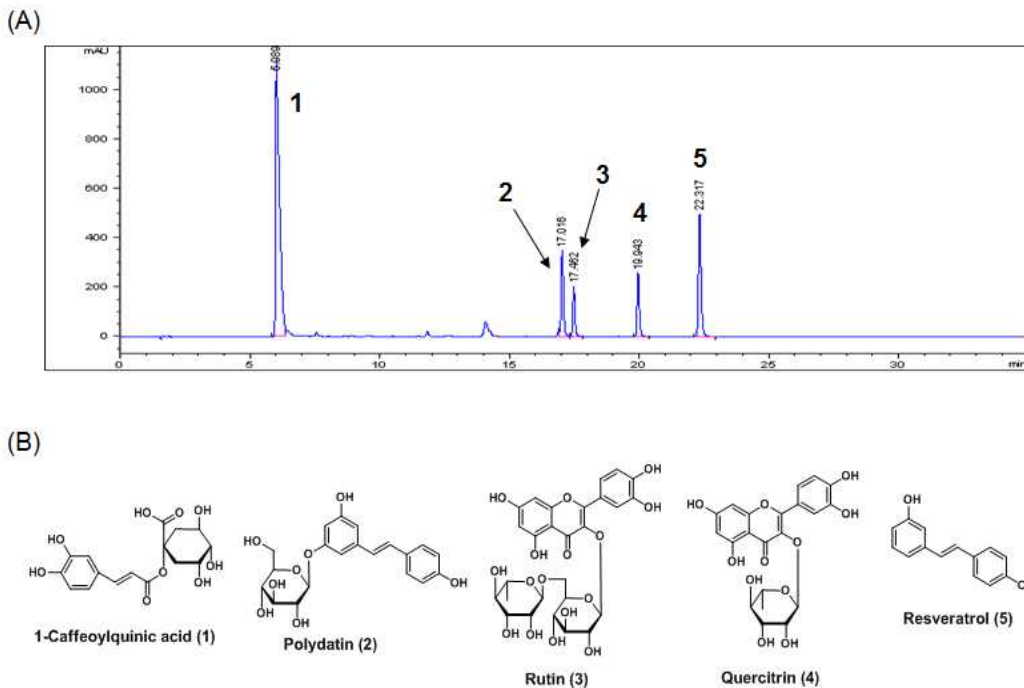
- 구입분인 CODE2의 지상부(줄기+잎)의 줄기와 잎을 1.4:1의 비율로 섞어 1차 증류수 또는 30% 에탄올을 이용한 추출을 수행하였으며 구체적인 추출과정과 추출 수율은 아래 표와 같다. 30% 에탄올로 추출 시 열수추출에 비해 추출 수율이 2% 정도 증가하는 것을 확인함.

<표 23> CODE2 지상부 추출 용매 및 조건

구분	약재 비율 (줄기:잎=1.4:1)	무게	추출 용매	추출방법	추출물 무게 (g)	수율(%)
CODE2-지상부-H ₂ O	28g(줄기), 20g(잎)	48g	1차수 0.96L	열수추출 (3시간, 100℃)	5.02	10.5
CODE2-지상부-30E	28g(줄기), 20g(잎)	48g	30% 에탄올 0.96L	30% 에탄올추출 (3시간, 90℃±5)	5.98	12.5

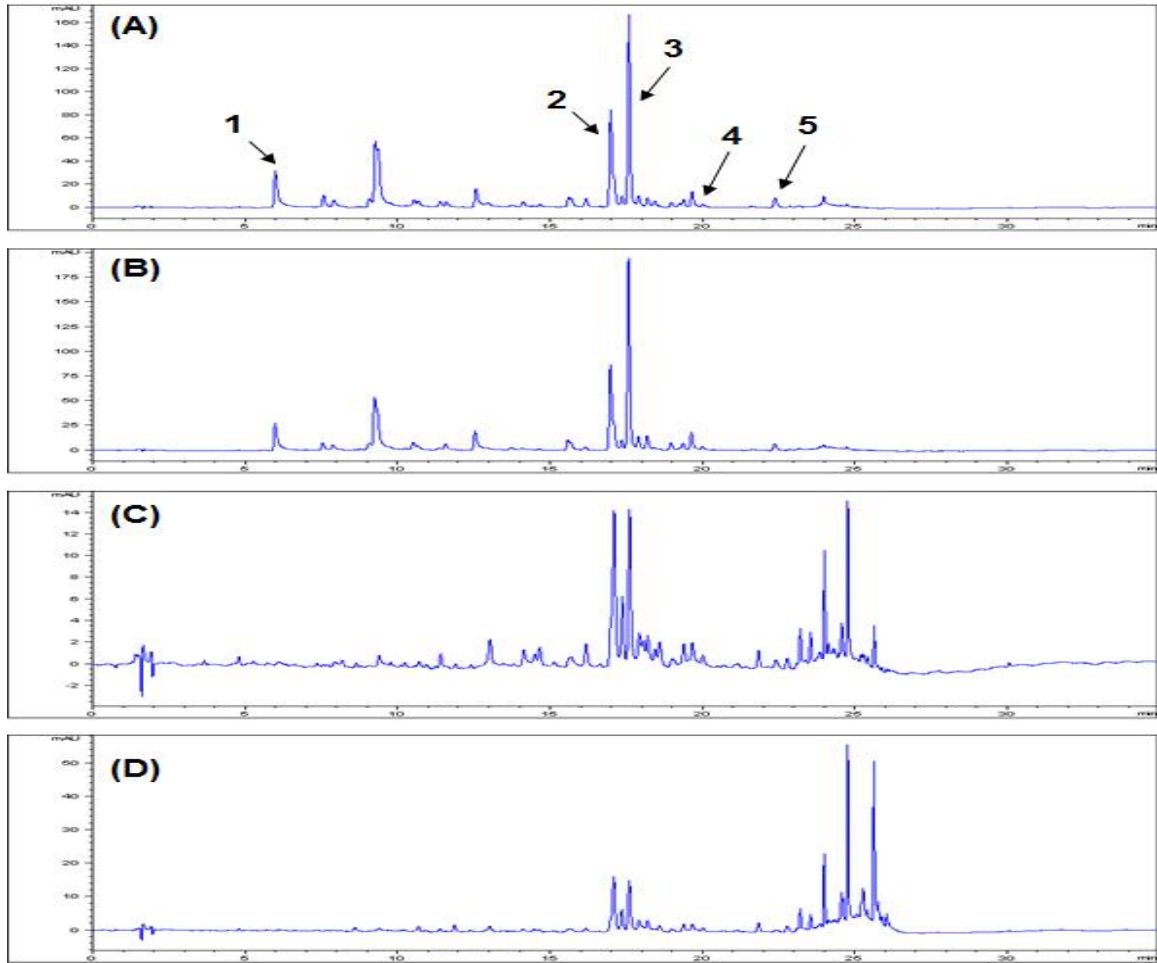
나. 호장근 지상부 추출물의 HPLC 분석

- 호장근 채집분(CODE1)의 줄기 및 잎 추출물의 주요성분에 대해 HPLC 분석을 수행함. 개발된 HPLC-DAD 분석법으로 1-caffeoylquinic acid, polydatin, rutin, quercitrin, resveratrol의 5종의 표준품에 대한 분석을 수행한 결과 5개의 표준품 성분이 크로마토그램 상에서 5.09, 17.02, 17.46, 19.94, 22.32 분에 순차적으로 검출됨.
- CODE1의 줄기 및 잎 추출물에 대한 HPLC 분석을 수행하였으며 각 추출물 속 5가지 성분은 표준품 크로마토그램과의 비교를 통하여 확인함. CODE1의 줄기 및 잎 추출물 속 5종의 화합물에 대한 피크면적을 구하고, 각 표준품의 피크면적과 비교하여 5개의 주요성분에 대한 함량을 구하였음. 줄기 및 잎 추출물 속 1-caffeoylquinic acid, polydatin, rutin, quercitrin, resveratrol의 함량수치는 Table 3 에서 보는 바와 같음. 잎 추출물의 경우 열수 및 30% 에탄올 추출 모두에서 rutin이 가장 많은 함량을 나타냄. 줄기 추출물의 경우 잎 추출물과 비교해서 5가지 유효성분의 함량이 매우 낮게 관찰되었음.



<그림 37> 5종 표준물질의 HPLC 분석

(A) UV 325 nm에서 5종 화합물의 HPLC 크로마토그램 (B) 5종 화합물의 화학구조



<그림 38> CODE1의 줄기와 잎 추출물 HPLC 분석

(A)CODE1의 잎 열수 추출물 (B)CODE1의 잎 30% 에탄올 추출물 (C)CODE1의 줄기 열수추출물 (D)CODE1의 줄기 30% 에탄올 추출물

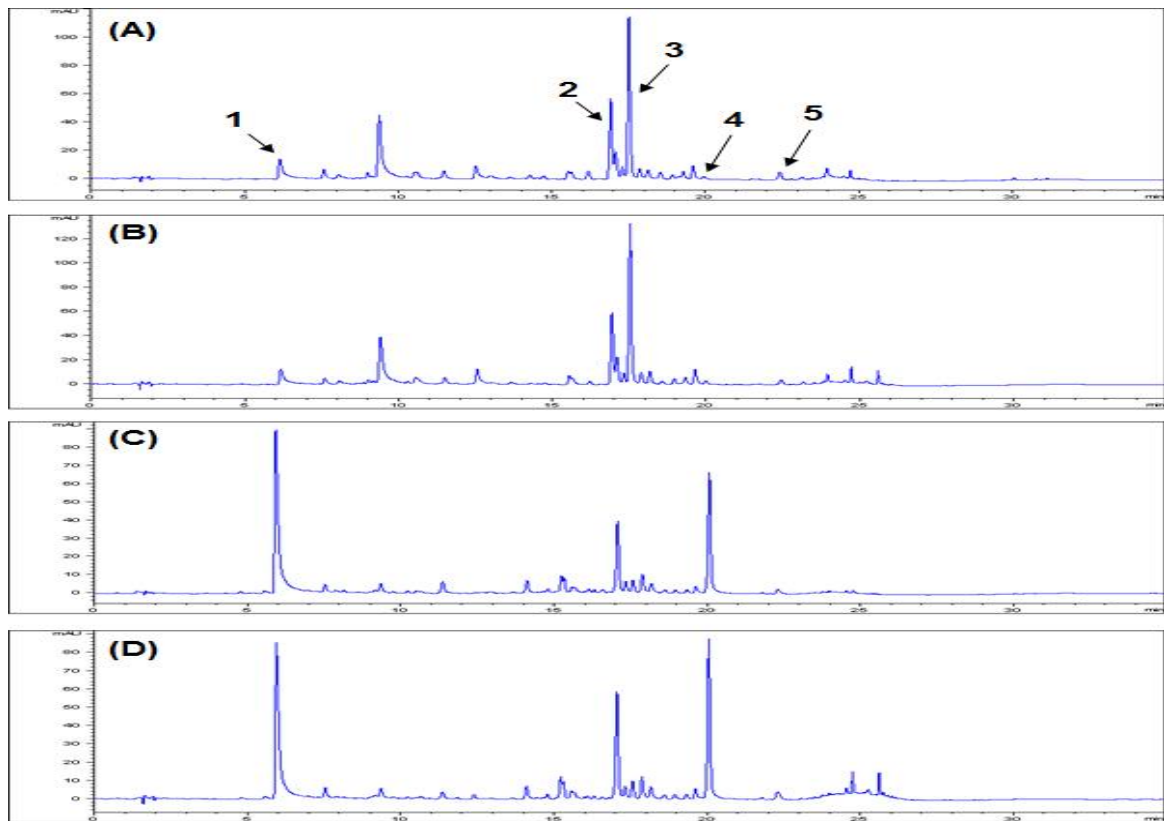
<표 24> CODE1 잎과 줄기의 열수 추출물의 5종 지표물질 함유량

구분	함량 (mg/g) (mean±SD, n = 3)				
	Caffeoylquinic acid (1)	Polydatin (2)	Rutin (3)	Quercitrin (4)	Resveratrol (5)
CODE1-잎-열수	3.81±0.20	1.46±0.01	22.26±0.45	0.83±0.07	0.39±0.01
CODE1-잎-30E	3.25±0.01	1.75±0.03	25.48±0.19	0.95±0.01	0.31±0.01
CODE1-줄기-열수	- ^{a)}	0.52±0.03	1.84±0.03	-	-
CODE1-줄기-30E	-	0.52±0.01	1.94±0.02	-	-

a)very low for detection

다. CODE1 및 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 분석

- CODE1과 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 주요성분에 대해 HPLC 분석을 수행함. CODE1 및 CODE2 지상부 추출물 속 5종의 화합물에 대한 피크면적을 구하고, 각 표준품의 피크면적과 비교하여 5개의 주요성분에 대한 함량을 구하였음. CODE1 지상부 추출물의 경우 rutin의 함량이 가장 큰 반면 CODE2 지상부 추출물의 경우 quercitrin의 함량이 가장 높게 관찰되었음.



<그림 39> CODE1과 CODE2 지상부 추출물의 HPLC 분석

(A)CODE1의 지상부 열수추출물 (B)CODE1의 지상부 30% 에탄올 추출물 (C)CODE2의 지상부 열수추출물 (D)CODE2의 지상부 30% 에탄올 추출물

<표 25> CODE1과 CODE2 지상부 추출물의 5종 지표물질 함유량

구분	함량 (mg/g) (mean±SD, n = 3)				
	Caffeoylquini c acid (1)	Polydatin (2)	Rutin (3)	Quercitrin (4)	Resveratrol (5)
CODE1-지상부-열수	1.89±0.02	1.24±0.01	15.47±0.05	0.46±0.01	0.26±0.01
CODE1-지상부-30%	1.75±0.01	1.43±0.01	17.95±0.7	0.66±0.03	0.20±0.01

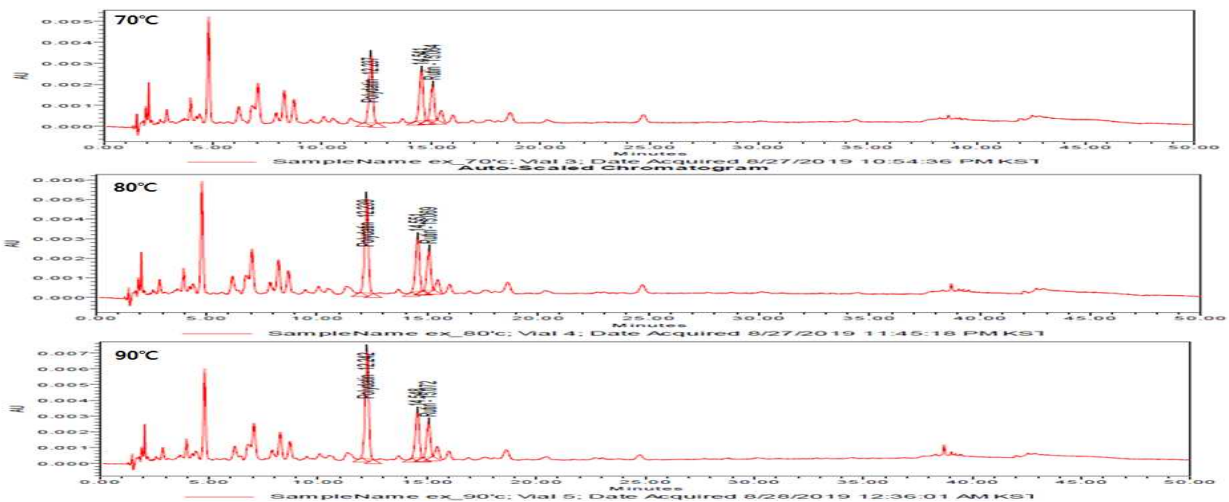
에탄올					
CODE2-지상부-열수	10.87±0.18	2.52±0.05	1.07±0.02	13.03±0.36	0.13±0.01
CODE2-지상부-30% 에탄올	10.45±0.39	3.64±0.14	1.44±0.05	17.21±0.56	0.23±0.01

마. 호장근 줄기 추출물(PSE)의 열수 추출 조건 선정

- 호장근 줄기부위 원료 350g을 흐르는 물로 수세하고, 70℃, 80℃, 90℃ 온도별로 3시간 동안 추출함.
- 결과, 추출온도가 증가할수록 수율과 표준물질 함량이 높아지는 것을 확인하였으나, 80℃와 90℃추출의 경우 높은 온도로 인한 추출물의 이화학적 변화로 최종 추출온도는 70℃로 선정함.

<표 26> 추출 온도별 지표물질 함량

추출온도 (℃)	무게 (g)	추출수 투입량(ℓ)	추출시간 (h)	수율 (%)	평균면적값	
					Polydatin	Rutin
70℃	350	3500	3	4.95	39572	19573
80℃				5.47	59425	24708
90℃				5.9	82710	26384



<그림 40> 추출 온도별 표준물질 함량

4. 연구 최종 결과

- 호장근을 종류별, 부위별, 용매별로 추출하고, HPLC 분석을 수행하여 추출물별 지표 성분에 대한 피크면적을 구하여 각 표준품 대비 추출물 내 5개의 지표성분에 대한 함량을 구함.
- 열수 추출물과 30% 에탄올 용매추출에서 Quercitrin이 가장 높은 함량을 차지하고, Caffeoylquinic acid, Polydatin, Rutin, Resveratrol 순서로 함량이 나타났음. 용매 간 지표성분의 함량이 유의적인 차이가 없어 최종 제품생산에는 잔류 용매에 대한 부담이 적은 열수 추출방법을 최종 추출용매로 선정함.
- 호장근 줄기 열수추출물에서는 Rutin과 Polydatin이 확인되었고, polydatin이 분리도와 정량한계가 적합한 것으로 확인되어 최종 지표성분으로 선정함.
- 추출온도가 증가할수록 수율과 표준물질 함량이 높아지는 것을 확인하였으나, 80℃와 90℃추출의 경우 높은 온도로 인한 추출물의 이화학적 변화로 최종 추출온도는 70℃로 선정함.

5. 대량 생산 공정 확립

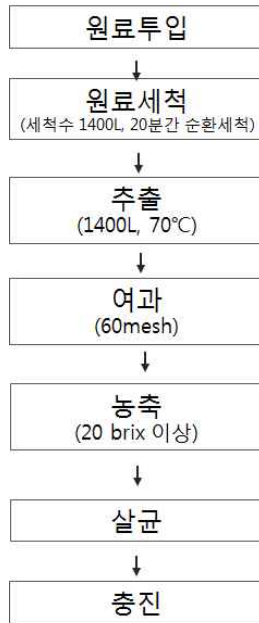
가. 대량 추출생산 공정 최적화

(1) 연구목적

대량 생산설비에 적절한 1회 추출생산 공정 및 기준 확립

(2) 연구방법 및 결과

- 제조 공정 확립을 위해 공정별 polydatin의 함량을 분석하고 조건을 최적화 함. 또한 연속 생산을 통해 대량생산 동등성을 확보함.
- 1회 생산 기준인 호장근 줄기 건조물 50kg 추출공정에서 농축액 20brix 이상, 수율 20% 이상 조건을 확립함.
- 최종추출 분말에서 표준물질 polydatin은 0.05~0.075%의 함량을 확인함.



<그림 41> 대량 생산 제조공정표

나. 시험방법 밸리데이션

(1) 연구목적

- 본 시험방법 밸리데이션은 Polydatin의 함량 시험방법이 과학적이고 합리적임을 증명하는 것을 목적으로 함. 시험방법 및 각 분석에 사용되는 기기와 시스템이 적절히 기능하고 있는지를 확인하고 증명하기 위하여 체계적으로 분석하고 검토, 판정함.

(2) 재료 및 방법

(가) 사용기기 및 시약

- 사용기기

기기명	모델번호	제조사
초순수 제조장치	Mill-Q direct16	Millipore
Balance	XS205	Mettler
Balance	MX5	Mettler
초음파 진탕기	8210	BRANSON
HPLC188	HP-1100 Series	Agilent

HPLC191	HP-1100 Series	Agilent
HPLC192	HP-1100 Series	Agilent
HPLC193	HP-1100 Series	Agilent
HPLC194	HP-1200 Series	Agilent
HPLC195	HP-1200 Series	Agilent
HPLC196	HP-1200 Series	Agilent
HPLC197	HP-1200 Series	Agilent
HPLC224	HP-1200 Series	Agilent
HPLC225	HP-1200 Series	Agilent
HPLC226	HP-1200 Series	Agilent
HPLC198	1260 μ minity	Agilent
HPLC 200	Alliance e2695	WATERS

- 시약

시약명	Grade	제조사	용도
정제수 Purified Water	HPLC grade	-	이동상 및 전처리용액 조제
아세토니트릴 Acetonitrile	HPLC grade	Honeywell	이동상 조제
포름산 Formic acid	GR grade	Kanto	이동상 조제
메탄올 Methanol	HPLC grade	Honeywell	전처리용액 조제

- 표준품

표준품명	표준품종류	Batch No.	유효기한	As is(%)
폴리다틴 Polydatin	상용표준품	23927903	2022. 01. 24	99.4

- 시험약

제 품 명	제조번호
호장근 추출물	SMHOLot-1

(나) 시험방법

① 표준액의 조제

Polydatin 표준품 약 4.0mg을 정밀하게 달아 10mL 용량 플라스크에 넣고 메탄올 5mL를 넣어 녹여 정제수로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인필터로 여과한 액을 표준액으로 함.

② 검액의 조제

호장근 추출물 약 100mg을 정확히 취하여 10 mL 용량 플라스크에 넣고 메탄올 5 mL를 넣어 20분간 초음파 추출하여 정제수로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인필터로 여과한 액을 검액으로 함.

③ 조작

검액, 표준액을 가지고 다음 조건에 따라 대한민국약전 일반시험법 중 액체크로마토그래프법에 따라 시험함.

[조작조건]

- 검 출 기 : 자외부흡광광도계(측정파장 : 330 nm)
- 칼 럼 : 안지름 4.6mm, 길이 150 mm의 스테인레스강관에 5 μ m 액체크로마토그래프용 옥타데실릴릴실리카겔을 충전한다.(Prontosil 4.6 × 150mm, 5 μ m 또는 이와 동등한 칼럼)
- 유 량 : 1.0mL/min
- 주 입 량 : 2 μ L
- 칼럼온도 : 50 $^{\circ}$ C 부근의 일정 온도

④ 계산

- Polydatin의 함량(%) =

$$\frac{\text{검액의 피크면적} \times \text{표준액의 농도} \times \text{표준물질의 순도}}{\text{표준액 피크 면적} \times \text{검액의 농도}}$$

(3) 특이성(Specificity)

① 공시험액의 조제

- 50% 메탄올로 함.

② 표준액의 조제

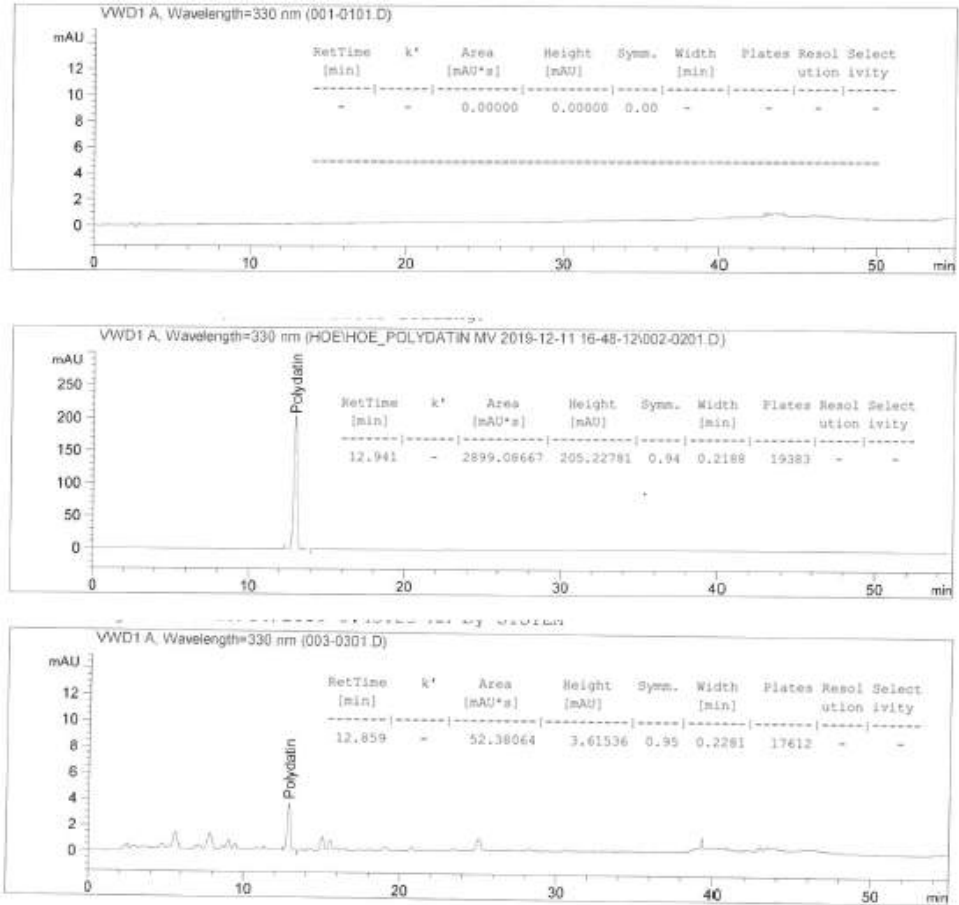
- Polydatin 표준품 약 4.0mg을 정밀하게 달아 10mL 용량 플라스크에 넣고 메탄올 5mL를 넣어 녹여 정제수로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 표준액으로 함.

③ 검액의 조제

- 호장근 약 100mg을 정확히 취하여 10mL 용량 플라스크에 넣고 메탄올 5mL를 넣어 20분간 초음파 추출 후 정제수로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 검액으로 함.

④ 조작 및 평가

- 각 시험액을 '(나) 시험방법 ③조작'의 조작조건에 따라 시험함.



<그림 42> 공시험액, 표준액, 검액 시험결과

(4) 직선성(Linearity)

① 표준원액의 조제(3 set 조제)

Polydatin 표준품 약 10.0mg을 정밀하게 달아 100mL 용량 플라스크에 넣고 메탄올 50mL를 넣어 녹여 정제수로 표선 함.

② 검량선 시험액의 조제(3 set 조제)

- 검량선 시험액 1의 조제

표준원액 1.0mL를 정확하게 취하여 50mL 용량 플라스크에 넣고 50% 메탄올로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 검량선 시험액 1로 함.

- 검량선 시험액 2의 조제

표준원액 2.0mL를 정확하게 취하여 50mL 용량 플라스크에 넣고 50% 메탄올로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 검량선 시험액 2로 함.

- 검량선 시험액 3의 조제

표준원액 3.5mL를 정확하게 취하여 50 mL 용량 플라스크에 넣고 50% 메탄올로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 검량선 시험액 3으로 함.

- 검량선 시험액 4의 조제

표준원액 5.0mL를 정확하게 취하여 50mL 용량 플라스크에 넣고 50% 메탄올로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 검량선 시험액 4으로 함.

- 검량선 시험액 5의 조제

표준원액 6.0mL를 정확하게 취하여 50mL 용량 플라스크에 넣고 50% 메탄올로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 검량선 시험액 5으로 함.

③ 조작 및 평가

- 각 시험액을 '(나) 시험방법 ③조작'의 조작조건에 따라 각 1 회씩 시험하여 직선성을 확인 함.

(5)검출한계(Detection limit)

- 검출한계란, 검체 중 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 의미함. 본 시험에서는 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 평가함.

[검출한계 계산식]

- 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법

$$= \frac{3.3 \times \text{반응의 표준편차}}{\text{검량선의 기울기}}$$

(6)정량한계(Quantitation limit)

- 정량한계란, 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 존재하는 분석 대상물질의 최소량으로 검체 중 존재하는 저농도의 물질을 정량하는 경우에 필요한 밸리데이션 파라미터 임. 본 시험에서는 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 평가함.

[정량한계 계산식]

- 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법

$$= \frac{10 \times \text{반응의 표준편차}}{\text{검량선의 기울기}}$$

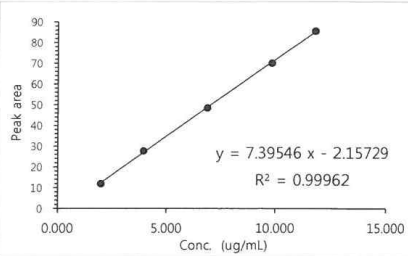
검량선의 기울기

<직선성(검출한계 & 정량한계) 결과>

농도 보정 Factor	폴리다틴 표준품 순도(%/100)	0.994	0.994
	표준품 분자량	1.00	
	유효성분 분자량	1.00	

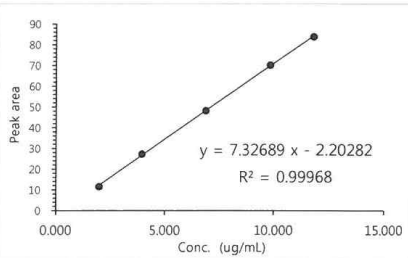
1. 검량선 1차

표준품 채취량(mg)		9.9	
	농도(ug/mL)	보정농도(ug/mL)	분석값
1	1.98	1.968	11.98771
2	3.96	3.936	27.77829
3	6.93	6.888	48.49246
4	9.90	9.841	70.10133
5	11.88	11.809	85.56892
Slope		7.39546	
Intercept		-2.15729	
Correlation coefficient (r2)		0.99962	



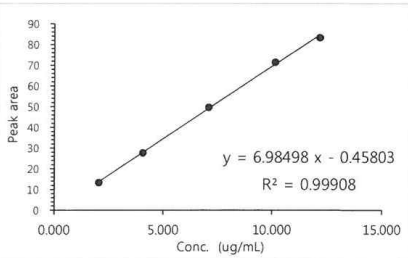
2. 검량선 2차

표준품 채취량(mg)		9.9	
	농도(ug/mL)	보정농도(ug/mL)	분석값
1	1.98	1.968	11.60024
2	3.96	3.936	27.33198
3	6.93	6.888	48.25507
4	9.90	9.841	70.23814
5	11.88	11.809	83.91386
Slope		7.32689	
Intercept		-2.20282	
Correlation coefficient (r2)		0.99968	



3. 검량선 3차

표준품 채취량(mg)		10.2	
	농도(ug/mL)	보정농도(ug/mL)	분석값
1	2.04	2.028	13.34432
2	4.08	4.056	27.66379
3	7.14	7.097	49.71691
4	10.20	10.139	71.48873
5	12.24	12.167	83.36356
Slope		6.98498	
Intercept		-0.45803	
Correlation coefficient (r2)		0.99908	



Mean of Slope	7.23577	Y = 7.23577 X - 1.60604, Y: 피크면적, X: 농도
Mean of Intercept	-1.60604	
Mean of R ²	0.99946	
SD of Slope	0.21989	
SD of Intercept	0.99447	

4. 검출한계 & 정량한계

4-1. 검출한계

계산식 : $QL = 3.3 \times \sigma / S$

σ (standard deviation of intercept) =	0.99447	S(Mean of Slope) =	7.23577
Detection Limit =	0.454		ug/mL

4-2. 정량한계

계산식 : $QL = 10 \times \sigma / S$

σ (standard deviation of intercept) =	0.99447	S(mean of slope) =	7.23577
Quantitation Limit =	1.374		ug/mL

9.9 ug
9.9 ug
10.2 ug

line

<그림 43> 직선성(검출한계, 정량한계) 시험결과

(7) 정확성(Accuracy)

① 표준원액의 조제(3 set 조제)

Polydatin 표준품 약 10.0mg을 정밀하게 달아 100mL 용량 플라스크에 넣고 메탄올 50mL를 넣어 녹여 정제수로 표선 함.

② 정확성 시험액의 조제(3 set 조제)

- 정확성 시험액 1의 조제

표준원액 2.0mL를 정확하게 취하여 50mL 용량 플라스크에 넣고 50% 메탄올로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 검량선 시험액 1로 함.

- 정확성 시험액 2의 조제

표준원액 3.5mL를 정확하게 취하여 50mL 용량 플라스크에 넣고 50% 메탄올로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 검량선 시험액 2로 함.

- 정확성 시험액 3의 조제

표준원액 5.0mL를 정확하게 취하여 50mL 용량 플라스크에 넣고 50% 메탄올로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 검량선 시험액 3로 함.

③ 조작 및 평가

- 각 시험액을 '(나) 시험방법 ③조작'의 조작조건에 따라 시험하고 직선의 검량식에 대입하여 평균 회수율을 확인 함.

<정확성 결과>


농도 보정 Factor	폴리다틴 표준품 순도(%/100)	0.994	0.994
	표준품 분자량	1.00	
	유효성분 분자량	1.00	

검역농도 (ug/mL)	표준품 채취량 (mg)	농도 (ug/mL)	보정농도 (ug/mL)	Peak Area	참값 (ug/mL)	회수율 (%)	Difference (%)	
4.00	10.1	4.04	4.02	27.86902	4.07	101.4	0.00	
	10.0	4.00	3.98	27.83413	4.07	102.3	0.01	
	10.1	4.04	4.02	27.99164	4.09	101.9	0.01	
					평균값	4.08	101.9	0.01
					표준편차	0.01	0.45	0.00

7.00	10.1	7.07	7.03	50.09435	7.15	101.7	0.22	
	10.0	7.00	6.96	47.25105	6.75	97.0	0.18	
	10.1	7.07	7.03	48.26870	6.89	98.1	0.04	
					평균값	6.93	98.9	0.14
					표준편차	0.20	2.43	0.09

10.00	10.1	10.10	10.04	73.01395	10.31	102.7	0.10	
	10.0	10.00	9.94	70.81306	10.01	100.7	0.20	
	10.1	10.10	10.04	73.00524	10.31	102.7	0.10	
					평균값	10.21	102.0	0.13
					표준편차	0.18	1.17	0.06

10.1 mg
10.0 mg
10.1 mg



	회수율(%)	Difference(%)
전체 평균값	100.9	0.10
전체 표준편차	2.04	0.09
표본의 크기	9	9
95% 신뢰구간	99.4 102.5	0.03 0.16

<그림 44> 정확성 시험결과

(8)정밀성(Precision)

(가) 반복성(Repeatability)

- 시험액1의 조제(6 set 조제)

호장근 추출물 약 80mg을 정확히 취하여 10mL 용량 플라스크에 넣고 메탄올 5mL를 넣어 20분간 초음파 추출하여 정제수로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 시험액1로 함.

- 시험액2의 조제(6 set 조제)

호장근 추출물 약 100mg을 정확히 취하여 10mL 용량 플라스크에 넣고 메탄올 5mL를 넣어 20분간 초음파 추출하여 정제수로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 시험액2로 함.

- 시험액3의 조제(6 set 조제)

호장근 추출물 약 120mg을 정확히 취하여 10mL 용량 플라스크에 넣고 메탄올 5mL를 넣어 20분간 초음파 추출하여 정제수로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 시험액3로 함.

터로 여과한 액을 시험액3로 함.

- 조작 및 평가

각 시험액을 '(나) 시험방법 ③조작'의 조작조건에 시험하여 RSD(%)를 확인 함.

5. 시험결과

: 면적값의 RSD는 2.18 %, 1.30 %, 1.53 %로 기준에 부합하였음

No.	Polydatin Area		
	4 ug/mL	7 ug/mL	10 ug/mL
1	39.04288	48.54185	60.30900
2	38.56795	47.63673	58.87469
3	38.70834	48.74363	57.51838
4	39.20116	48.47599	59.21478
5	39.69574	48.49525	59.37780
6	40.90219	49.60788	59.04292
AVG	39.35304	48.58356	59.05626
STDEV	0.86	0.63	0.91
RSD(%)	2.18	1.30	1.53



<그림 45> 반복성 시험결과

(나) 재현성(Reproducibility)

- 시험액1의 조제(6 set 조제)

호장근 추출물 약 100mg을 정확히 취하여 10mL 용량 플라스크에 넣고 메탄올 5mL를 넣어 20분간 초음파 추출하여 정제수로 표선을 맞춘 후 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 시험액으로 함.

- 조작 및 평가
 각 시험액을 '(나) 시험방법 ③조작'의 조작조건에 시험하여 Grand RSD(%)를 확인함.

5. 시험결과

: 면적값의 Grand RSD는 1.70 %로 기준에 부합하였음

No.	2019. 10. 13 / 조수운	2019. 10. 14 / 이연희
1	48.54185	50.41959
2	47.63673	50.26104
3	48.74363	49.82821
4	48.47599	49.47949
5	48.49525	49.75165
6	49.60788	49.09696
AVG	49.19486	
STDEV	0.84	
Grand RSD(%)	1.70	

100.0 mg
 100.0 mg
 100.0 mg
 99.9 mg
 100.0 mg
 99.9 mg

CAK

<그림 46> 재현성 시험결과

(3) 최종 연구 결론

#	평가 항목	기준	결과	판정
1	특이성 Specificity	▪ 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있어야 한다.	▪ 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있음	적합
2	직선성	▪ 상관계수 : 0.99 이상	▪ 상관계수 : 0.99946	적합

	Linearity	<ul style="list-style-type: none"> 검량선의 시각적 판정에서 불룩한 현상이 관찰되어서는 안된다. 	<ul style="list-style-type: none"> 검량선의 시각적 판정에서 불룩한 현상이 관찰되지 않음 	
3	검출한계 Detection Limit	-	<ul style="list-style-type: none"> 0.454μg/mL 	적합
4	정량한계 Quantitation Limit	-	<ul style="list-style-type: none"> 1.374μg/mL 	적합
5	정확성 Accuracy	<ul style="list-style-type: none"> 회수율(%) : 100 \pm 5% 	<ul style="list-style-type: none"> 회수율(%) : 100.9% 	적합
6. 정밀성 Precision				
6-1	반복성 Repeatability	<ul style="list-style-type: none"> RSD(%) : 5.0%이하 	<ul style="list-style-type: none"> RSD(4μg/mL) : 2.18% RSD(7μg/mL) : 1.30% RSD(10μg/mL) : 1.53% 	적합
6-2	재현성 Reproducibility	<ul style="list-style-type: none"> Grand RSD(%) : 5.0%이하 	<ul style="list-style-type: none"> Grand RSD : 1.70% 	적합

다. 확립된 분석조건을 활용한 지표성분함량 측정

(1) 연구목적

호장근 줄기 추출물 제조 생산시 확립된 HPLC 분석법을 이용한 지표성분함량변화 측정

(2) 연구방법

(가) 표준액 제조

- Polydatin(LKT Laboratories, P-5845), Rutin(Wako, 184-03131)을 각각 4mg씩 정확히 취해 10mL 용량플라스크에 넣고 메탄올 5mL을 넣어 용해 후 정제수로 표선을 맞춤.

(나) 검액 제조

- 호장근 추출물 100mg을 정확히 취해 10mL 용량플라스크에 넣고 메탄올 5mL을 넣어 20분간 초음파 진탕 시킨 후 정제수로 표선을 맞춤.

- 표준액과 시험용액은 0.45 μ m filter로 여과한 후 분석에 사용함.

(다) 시스템 적합성

- 표준액 2 μ L를 가지고 위의 조건으로 시험을 6회 반복할 때 Polydatin과 Rutin의 피크면적 상대표준편차는 2.0% 이하임.
- 시스템적합성 용액 2 μ L를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 Polydatin과 Rutin의 피크간 분리도는 1.3 이상임.

(라) 표준액 제조

- 표준액 및 검액을 가지고 다음의 조건으로 대한민국약전 일반시험법 중 액체 크로마토그래프법에 따라 시험함.

(마) 함량계산

$$\text{Polydatin(\%)} = \frac{\text{검액의 피크면적} \times \text{표준액의 농도} \times \text{표준물질의 순도}}{\text{표준액 피크 면적} \times \text{검액의 농도}}$$

(3) 연구결과

- 대량추출 3회 반복 호장근 줄기 열수추출물의 polydatin 지표물질 함량은 0.625 \pm 0.125% 으로 확인됨.

<표 27> 생산 Lot별 지표물질 함량

시료명	지표물질 polydatin함량(%)
Lot1	0.0623
Lot2	0.0626
Lot3	0.0627

라. 유해물질 및 영양성분 시험

(1) 연구목적

대량생산 제조 방법으로 제조된 제품의 유해물질 기준 및 영양성분 분석

(2) 연구방법

(가) 원재료 분류 및 관련규정:

「식품 및 식품첨가물 공전」 총칙 식품원료 분류에 따른 기준 및 규격 확인

(나) 성상:

- 원재료: 호장근 줄기(건조물)
- 시험기관(공인지위): 식품위생검사기관 제038호(식품의약품안전처, 2019.09.16)
 - 식품공전 8.1.1 성상시험법(관능시험법) 한국표준색이름 참조

(다) 중금속

①원재료 분류 및 관련규정:

- 「식품 및 식품첨가물 공전」 총칙 식품원료 분류에 따라 호장근은 채소류 엽경채류에 해당함.
- 식품의 기준 및 규격 제2. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격 3. 식품일반의 기준 및 규격에 따른 적합성 검토
 - 중금속 기준: 5) 오염물질 (2)중금속 기준

대상식품	납(mg/kg)	카드뮴(mg/kg)	무기비소(mg/kg)
곡류(현미 제외)	0.2 이하	0.1 이하 (밀, 쌀은 0.2 이하)	0.2 이하 (쌀에 한한다)*
서류	0.1 이하	0.1 이하	-

콩류		0.2 이하	0.1 이하 (대두는 0.2 이하)	-
견과 종실류	땅콩 또는 견과류	0.1 이하	0.3 이하	-
	유지 종실류	0.3 이하 (참깨, 들깨에 한한다)	0.2 이하 (참깨에 한한다)	-
과일류		0.1 이하	0.05 이하	-
엽채류 (결구 엽채류 포함)		0.3 이하	0.2 이하	-
엽경채류		0.1 이하	0.05 이하	-
근채류		0.1 이하 (인삼, 산양삼은 2.0 이하, 도라지, 더덕은 0.2 이하)	0.1 이하 (양파는 0.05 이하, 인삼, 산양삼은 0.2 이하)	-
과채류		0.1 이하 (고추, 호박은 0.2 이하)	0.05 이하 (고추, 호박은 0.1 이하)	-
버섯류		0.3 이하 (양송이버섯, 느타 리버섯, 새송이버 섯, 표고버섯, 송이 버섯, 팽이버섯, 목 이버섯에 한한다)	0.3 이하 (양송이버섯, 느타 리버섯, 새송이버 섯, 표고버섯, 송이 버섯, 팽이버섯, 목 이버섯에 한한다)	-
* 총비소 0.2mg/kg 초과 검출 시에만, 무기비소로 시험하여 기준 적용				

② 납, 카드뮴, 총비소 시험방법

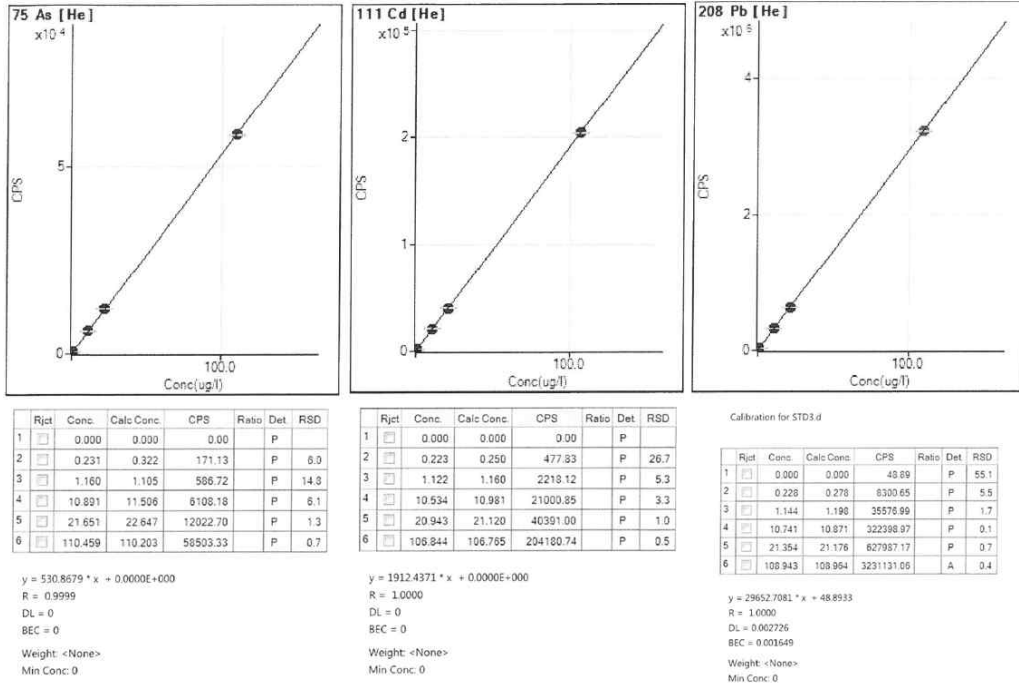
- 원재료: 호장근 줄기(건조물)

- 시험기관(공인지위): 식품위생검사기관 제038호(식품의약품안전처, 2019.09.16)

- 분석법:

·식품공전 제8. 일반시험법 9. 식품중 유해물질 시험법 9.1 중금속 9.1.2 납(Pb)
나)시험용액의 조제 1)습식 분해법 나)마이크로웨이브법 다)측정 2)유도결합플라
즈마법(ICP-MS)

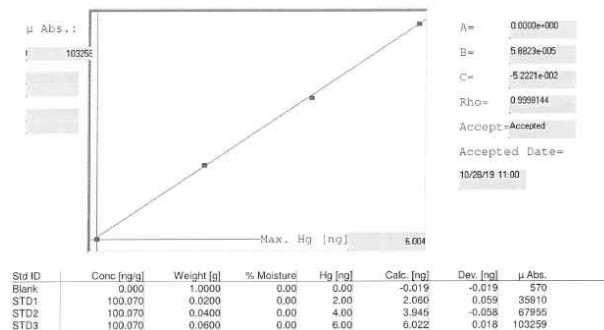
- 검량곡선



<그림 47> 비소, 카드뮴, 납 검량곡선

③ 총수은 시험방법:

- 원재료: 호장근 줄기(건조물)
- 시험기관(공인지위): 식품위생검사기관 제038호(식품의약품안전처, 2019.09.16)
- 분석법:
 - 식품공전 제8. 일반시험법 9. 식품 중 유해물질 시험법 9.1 중금속 9.1.6 수은 (Hg)
- 검량곡선

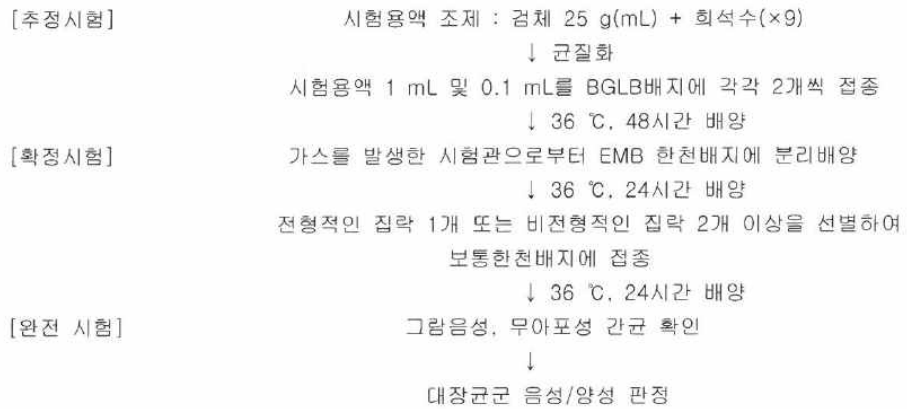


<그림 48> 총수은 검량곡선

(라) 식중독균 및 곰팡이독소

①시험 방법

- 원재료: 호장근 줄기(건조물)
- 시험기관(공인지위): 식품위생검사기관 제038호(식품의약품안전처, 2019.09.16)
- 식중독균 분석법:
 - 식품공전 제8. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.7 대장균군 4.7.1 정성시험 나 BGLB배지법

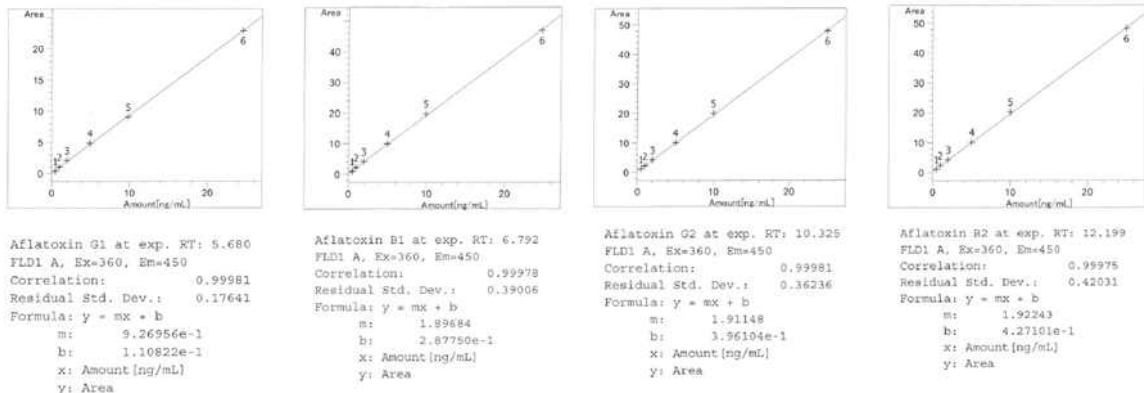


- 오크라톡신 A 분석법:

- 식품공전 제8. 일반시험법 9. 식품 중 유해물질 9.2 곰팡이독소 9.2.6 오크라톡신 A(Ochratoxin A) 마. 시험용액의 조제 1) 곡류 및 매주

- 총아플라톡신 분석법:

- 식품공전 제8. 일반시험법 9. 식품 중 유해물질 9.2 곰팡이 독소 9.2.2 아플라톡신(B1, B2, G1 및 G2) 9.2.2.2 액체크로마토그래피에 의한 시험



<그림 49> 아플라톡신 B1, B2, G1 및 G2 검량곡선

(마) 잔류농약: DDT, Methomyl, BHC 등 58종

①관련규정: 농산물에 잔류한 농약에 대하여 식품의 기준 및 규격 [별표 4]에 별도로 잔류허용기준을 정하지 않는 경우 0.01mg/kg 이하를 적용함. 따라서 호장근 줄기는 [별표 4]에 규정하지 않으므로 0.01mg/kg 이하로 적용함.

②시험 방법

- 원재료: 호장근 줄기(건조물)

- 시험기관(공인지위): 식품위생검사기관 제038호(식품의약품안전처, 2019.09.16)

- 분석법:

· 식품공전 제8. 일반시험법 7. 식품 중 잔류농약 분석법 7.1 식품일반 7.1.2.2 다종농약다성분 시험법

(3) 연구결과

- 호장근 줄기 추출물의 지표성분 polydatin의 적합함량기준은 0.05~0.075%으로 3Lot 생산 추출물의 평균 함량은 0.0625%로 적합함.
- 「식품 및 식품첨가물 공전」 총칙 식품원료 분류에 따라 호장근은 채소류 엽경채류에 해당하므로 납 0.1mg/kg 이하, 카드뮴 0.05mg/kg 이하, 총비소 0.2mg/kg 이하로 「식품의 기준 및 규격」에 적합함.
- 식중독균 및 곰팡이독소 검사 모두 음성으로 「식품의 기준 및 규격」에 적합함.
- 호장근 줄기 추출물의 58종 잔류농약은 불검출되어 「식품의 기준 및 규격」의 잔류허용기준 최소량 0.01mg/kg보다 적음. 따라서 「식품의 기준 및 규격」에 적합함.
- 건강기능식품 규격의 '호장근 추출물'의 기준 및 규격을 다음과 같이 설정함.

<표 27> 호장근 줄기 추출물의 기준 및 규격

항목	규격	호장근 줄기 추출물		
		Lot1	Lot2	Lot3
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 갈색의 분말			
Polydatin(%)	0.05~0.075	0.0623	0.0626	0.0627
납(mg/kg)	0.1이하	0.0464	0.0497	0.0469
총수은(mg/kg)	-	0.0005	0.0002	0.0002
카드뮴(mg/kg)	0.05이하	0.0086	0.0069	0.0098
총비소(mg/kg)	0.2이하	0.0436	0.0324	0.0467
대장균군	음성	음성	음성	음성
총이플라톡신(ug/kg)	불검출	불검출	불검출	불검출
오크라톡신(ug/kg)	불검출	불검출	불검출	불검출
58종 농약(mg/kg)	0.01이하	불검출	불검출	불검출

(마) 영양성분

①시험 방법

- 원재료: 호장근 줄기(건조물)
- 시험기관(공인지위): 식품위생검사기관 제038호(식품의약품안전처, 2019.09.16)
- 열량, 탄수화물 분석법:
 - 식품공전 제8. 일반시험법 2.식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.6 열량의 계산 식품등의 표시기준 별지 1. 표시사항별 세부표시기준 1. 식품(수입식품을 포함한다) 아. 영양성분등 4)표시 방법
- 조지방 분석법:
 - 식품공전 제8. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.5 지질 2.1.5.1 조지방 2.1.5.1.2 산 분해법 다. 소맥분 빵류 및 마카로니 시험법
- 수분 분석법:

- 식품공전 제8. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.1수분 2.1.1.1 건조감량법 가.상압가열건조법 시험법

- 회분 분석법:

- 식품공전 제8. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.2 회분시험법

- 나트륨 분석법:

- 식품공전 제8. 일반시험법 2.2 미량영양성분시험법 2.2.1 무기질

(3) 연구결과

- 호장근 줄기 추출물의 영양성분은 열량 310.61 kcal/100g, 탄수화물 71.90%, 조단백질 4.61%, 조지방 0.50%, 수분 4.88%, 회분 18.09%, 나트륨 537.21mg/100g 임.

<표 28> 호장근 줄기 추출물의 영양성분 검사

항목	호장근 줄기 추출물 영양성분		
	Lot1	Lot2	Lot3
열량(Kcal/100g)	305.63	312.69	313.51
탄수화물(%)	70.51	72.49	72.71
조단백질(%)	4.75	4.58	4.52
조지방(%)	0.51	0.49	0.51
수분(%)	4.96	4.69	4.99
회분(%)	19.27	17.75	17.27
나트륨(mg/100g)	684.66	403.94	523.04

- 25±2℃, 60±5%RH 조건에서 12주간 보관한 추출물은 초기함량대비 98.6%로 변화량이 거의 없음. 40±2℃, 75±5%RH 조건에서 12주간 보관 후 초기함량대비 119.04%로 함량변화가 80~120% 적합기준 내 변화하는 것을 확인 함.
- 상기 시험은 단기 가혹 안정성 시험에 해당되므로 장기안정성 결과를 추가적으로 확인해야할 것으로 사료됨.

<표 29> 호장근 줄기 추출물 건조분말의 가혹조건 안정성 시험

항목	polydatin 함량(%)	
	25±2℃, 60±5%RH	40±2℃, 75±5%RH
보관 조건	25±2℃, 60±5%RH	40±2℃, 75±5%RH
샘플초기	0.0735	
4주차		0.073
8주차		0.0725
12주차	0.0725	0.0875

나. 정상 변화

(1) 연구목적

- 호장근 줄기 추출물의 정상변화를 확인하여 온도에 의한 원료분말 안정성 확인

(2) 연구방법

- 시료 준비 및 보관
 - 호장근 줄기 추출물을 제조공정에 따라 제작하고 샘플 1g씩 취하여 15mL 튜브에 분주하고 알루미늄 봉투에 넣어 밀폐함.
 - 40±2℃, 75±5%RH 조건의 안정성 챔버에서 3개월간 보관하고 초기, 4주, 8주차, 12주차에 꺼내 정상 확인에 사용함.

(3) 연구결과

- 40±2℃, 75±5%RH의 가혹 조건에서 시간이 경과함에 따라 색상이 거의 변하지 않음을 확인할 수 있음.
- 상기 시험은 단기 가혹 안정성 시험에 해당되므로 장기안정성 결과를 추가적으로 확인해야할 것으로 사료됨.



초기



4주차



8주차



12주차

<그림 51> 호장근 추출 건조분말의 가혹($40\pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\pm 5\% \text{RH}$) 조건에서 정상변화

제 2 절 효능평가 및 기전 연구

1. 눈 건강 기능성 확인을 위한 바이오마커의 설정

가. 바이오마커 설정 근거

- 전임상(동물실험) 바이오마커들 설정을 위해 식약처에서 2015년 12월에 발간한 “건강 기능식품 기능성 평가 가이드”, ‘눈건강에 도움을 줄 수 있음’편 18페이지 “기능성 시험방법”에 나와 있는 기준에서 안구건조개선 바이오마커를 참고하여 전임상의 기능성 평가 바이오마커로 설정하였음.



<그림 52> 건강기능식품 기능성평가 가이드 ‘눈건강에 도움을 줄 수 있음’ 편

<표 30> 눈 건강 기능성 평가를 위한 바이오마커

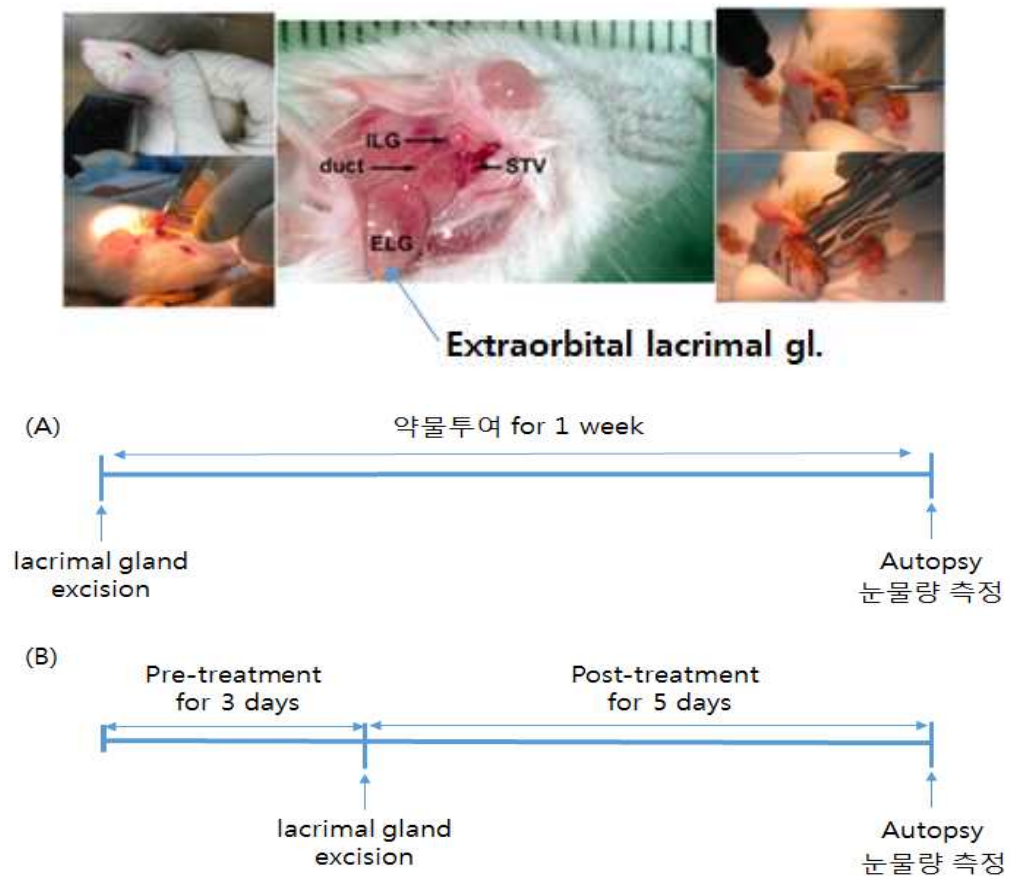
구분	바이오마커	측정 가능한 연구 유형			
		사람관	동물	인체	
황반변성 억제	황반 색소밀도(MPOD)		○	○	
	리포푸신(Lipofuscin) 축적량	○	○		
	A2E 축적 및 산화 억제	세포 생존율	○		
		A2E 및 산화 A2E 함량	○		
	광수용체 손상 보호	Outer Nuclear Layer(ONL)층 두께		○	
		중심황반두께		○	○
	광수용체 세포핵수		○		
	형광안저 촬영			○	
눈의 피로 개선	초음파 도플러 혈류		○	○	
	혈관 수축 억제	○	○		
	로돕신 생성	○			
	플리커테스트(Flicker test)			○	
	Visual analogue scale(VAS)			○	
	세포막 손상 억제(A2E 축적 저해)	○			
	신생 혈관 생성 저해	○	○		
안구 건조 개선	TBUT(tear break-up time)			○	
	샤머 검사(schirmer's test)			○	
	마이봄샘(meibomian gland)			○	
	진단적 염색법(rose bengal staining)			○	
	OSDI(Ocular Surface disease index)			○	
시세포 활성도	망막 전위도(ERG)		○	○	
시야 개선	시야계(Perimeter)			○	

2. CODE1 및 CODE2의 부위별, 용매별 추출물의 눈건강 기능성 평가

가. in vivo 유효성 평가 방법

(1) 외과적 눈물샘 제거의 의한 건성안 모델 제작 및 실험 디자인

- 6주령 SD RAT을 (주)오리엔트 (성남, 대한민국)에서 구입하여 1주일 동안 순화 후 사용하였음. 실험동물은 마취 후 옆면이 보이도록 놓은 후, 실험동물의 털을 알코올로 충분히 적셔 털을 정리함. 귀의 아래 가 쪽에서부터 아래턱뼈 가지(Ramus of mandibule)를 따라 피부 절개를 시행한 후 피하조직을 들어 올려 눈물샘(Lacrimal gland)을 잡아 당겨 주위 조직과의 이음새 부분을 절개하여 제거함. 소독된 auto clip을 이용하여 눈물샘을 제거한 수술부위를 봉합한 후 포비돈을 이용하여 봉합부위를 소독 함.



<그림 53> 동물실험 및 추출물 처리 실험 프로토콜

(2) 눈물량 및 각막 불규칙성 분석

- 눈물 분비량은 페놀-레드 thread 눈물량 검사지(FCI Ophthalmics Zone Quick, Japan)를 이용하여 눈꺼풀 외측 끝 부위 안구표면에 접촉시킨 후 30초 후 눈물에 의해 검사지의 색이 변한 길이를 측정하여 눈물 분비량을 측정하였음. 각막의 불규칙성은 ring type light illuminator를 각막에 비취 반사되는 형태를 촬영한 후 ring type 조명의 각막건조 손상에 의해 찌그러지는 정도를 평가하여 분석 함.

<표 31> 각막 상피 불규칙성 점수

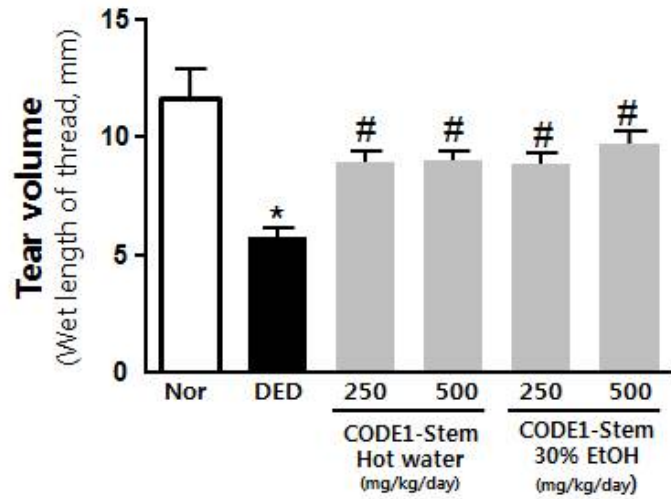
점수	판단 기준	점수	판단 기준
0 등급	왜곡 없음	3 등급	3개 사분면의 왜곡
1 등급	1개 사분면의 왜곡	4 등급	모든 사분면의 왜곡
2 등급	2개 사분면의 왜곡	5 등급	링이 인식되지 않는 심한 왜곡

나. in vivo 유효성 평가 결과

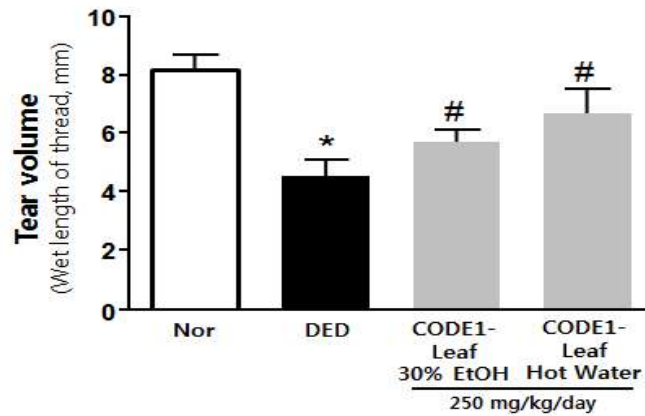
(1) CODE1 부위별(앞 또는 줄기) 추출물의 효능평가

(가) 건성안 모델에서 CODE1 부위별(앞 또는 줄기) 눈물양 및 각막형태 변화 기능성 평가

- 추출물은 CODE1을 줄기 및 앞으로 나누어 열수 및 30% 에탄올로 추출하여 실험을 수행함. 실험동물을 마취하고 Phenol Red Thread를 실험동물 양쪽 안구 외안각 하안검에 대고 1분간 방치하였을 때, 외과적 수술에 의하여 눈물 분비량을 유의성 있게 줄어들었으며, CODE1 줄기 및 앞 열수 추출물 및 30% 에탄올 추출물에 의하여 유의적으로 증가 하였음. .

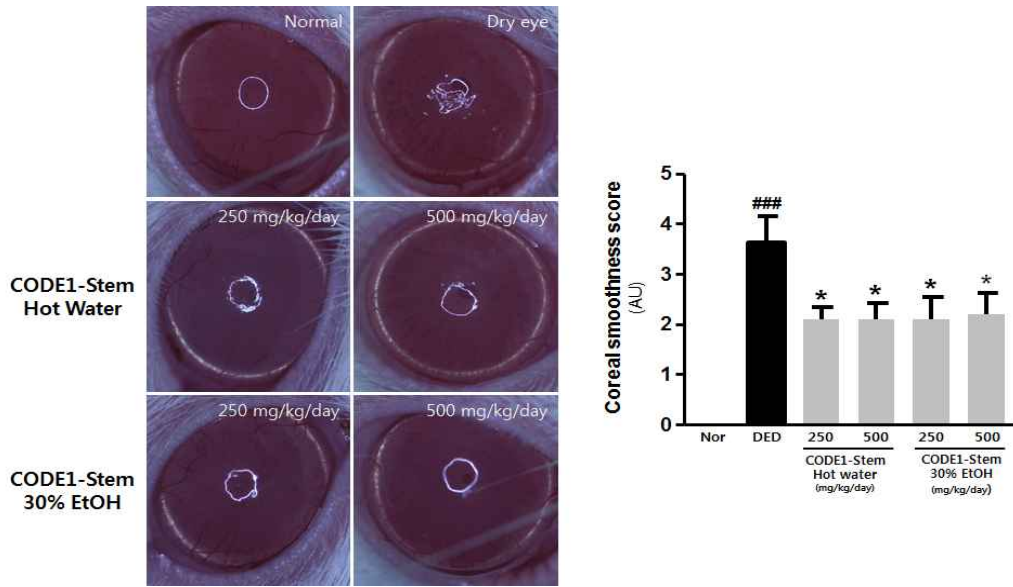


<그림 54> 눈물 분비량 감소에 대한 CODE1 줄기 추출물의 효과

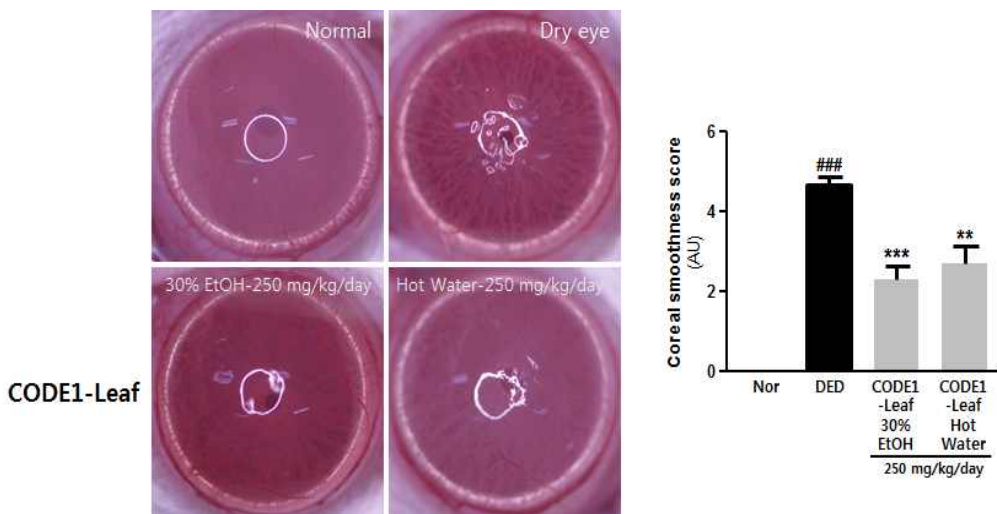


<그림 55> 눈물 분비량 감소에 대한 CODE1 잎 추출물의 효과

- 외과적 수술로 인한 각막의 형태 변화가 CODE1 줄기 열수 추출물 및 30% 에탄올 추출물에 의하여 회복되는 것을 관찰하였고, CODE1 잎 열수 추출물 및 30% 에탄올 추출물에 의하여 회복되는 것을 관찰함.



<그림 56> 각막 형태 변화에 대한 CODE1 줄기 추출물의 효과



<그림 57> 각막 형태 변화에 대한 CODE1 잎 추출물의 효과

3. CODE1 지상부(잎+줄기) 및 CODE2 지상부(잎+줄기)의 효능평가

가. in vivo 유효성 평가 방법

(1) 외과적 눈물샘 제거의 의한 건성안 모델 제작 및 실험 디자인

- 6주령 SD RAT을 (주)오리엔트 (성남, 대한민국)에서 구입하여 1주일 동안 순화 후 사용하였음. 실험동물은 마취 후 옆면이 보이도록 놓은 후, 실험동물의 털을 알코올

로 충분히 적셔 털을 정리함. 귀의 아래 가 쪽에서부터 아래턱뼈 가지(Ramus of mandibule)를 따라 피부 절개를 시행한 후 피하조직을 들어 올려 눈물샘(Lacrimal gland)을 잡아 당겨 주위 조직과의 이음새 부분을 절개하여 제거함. 소독된 auto clip 을 이용하여 눈물샘을 제거한 수술부위를 봉합한 후 포비돈을 이용하여 봉합부위를 소독 함.

(2) 눈물량 및 각막 불규칙성 분석

- 눈물 분비량은 페놀-레드 thread 눈물량 검사지(FCI Ophthalmics Zone Quick, Japan) 를 이용하여 눈꺼풀 외측 끝 부위 안구표면에 접촉시킨 후 30초 후 눈물에 의해 검사지의 색이 변한 길이를 측정하여 눈물 분비량을 측정하였음. 각막의 불규칙성은 ring type light illuminator를 각막에 비춰 반사되는 형태를 촬영한 후 ring type 조명의 각막건조 손상에 의해 찌그러지는 정도를 평가하여 분석함.

<표 32> 각막 상피 불규칙성 점수

점수	판단 기준	점수	판단 기준
0 등급	왜곡 없음	3 등급	3개 사분면의 왜곡
1 등급	1개 사분면의 왜곡	4 등급	모든 사분면의 왜곡
2 등급	2개 사분면의 왜곡	5 등급	링이 인식되지 않는 심한 왜곡

(3) 각막 건조 손상 분석

- 눈물샘을 제거하여 안구건조증을 유발한 랫(rat)을 마취하고 각막에 상피에 0.3% Lissamine Green B 염색시약을 처리 후 DP21 디지털 카메라(Olympus, Tokyo, Japan) 촬영함. 각막 손상 점수는 각막에 염색된 점의 정도에 따라 등급을 나눔.

<표 33> 각막 손상도 점수

점수	염색정도	판단 기준	점수	염색정도	판단 기준
0 등급		손상없음	3 등급		2 등급 보다 심한 손상 정도
1 등급		약간의 손상 정도	4 등급		3 등급 보다 심한 손상 정도
2 등급		1등급 보다 심한 손상 정도	5 등급	> 4등급	매우 심한 손상 정도

(4) 조직병리학적 평가

- 시험약물 투여 종료 후 부검을 실시하여 안구를 적출한 후, 10% 중성화 포르말린에 하루 동안 고정한 후 파라핀으로 포매하여 슬라이드 절편을 제작한 다음 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색하여 광학현미경 하에서 관찰하였음. RPE cell의 손상에 의한 outer nuclear layer의 folding부위를 counting 하여 평가하였음.

(5) TUNEL 염색

- 조직절편을 탈 파라핀 하여 수화시킨 후 PBS로 세척한 20ug/mL 농도의 proteinase K 용액에 15분간 37°C에서 처리한 다음 다시 PBS로 세척하였다. TUNEL reaction mixture 용액 (In situ cell death detection kit, AP, Roche, Germany)을 1시간 동안 37°C 반응시킨 후 현미경하에서 관찰하였음.

(6) 결막조직 술잔세포(goblet cell) 분석

- 부검시 분리한 각막조직으로부터 Trizol을 이용하여 RNA를 분리한 후 RNA 1 µg을 Oligo primer 가 포함된 RT-premix (Intron, Korea) 을 이용하여 cDNA를 합성하고 다음의 primer (Table 9) 를 이용하여 real-time PCR을 수행 하였음. mRNA 발현량 분석은 iQ5 optical system (Bio-Rad, USA)를 이용하여 실시하였음.

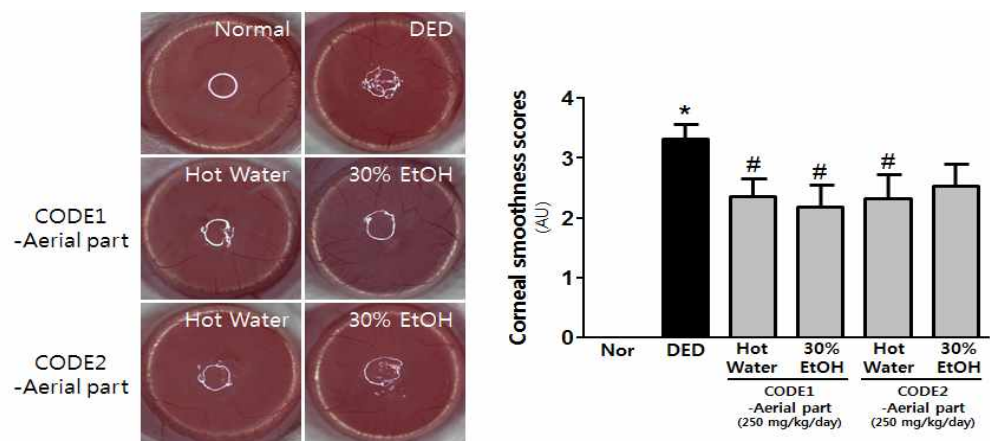
<표 34> Realtime PCR 염기서열

구분	염기서열	
rMuc4	Sense	5'-CGGATTCCTTCTACGTTACAG-3'
	antisense	5'-GAATCGATCTGGACGGTACTTC-3'
rIL-6	Sense	5'-AGAGACTTCCAGCCAGTTGC-3'
	antisense	5'-AGCCTCCGACTTGTGAAGTG-3'
rTNF-α	Sense	5'-TCGTCTACTCCTCAGAGCCC-3'
	antisense	5'-ACTTCAGCGTCTCGTGTGTT-3'
rMMP9	Sense	5'-CGCTTGATAACGAGTTCTCTC-3'
	antisense	5'-GCAGGAGGTCATAGGTCACG-3'
rGAPDH	Sense	5'-CGTGAAAAGATGACCCAGAT-3'
	antisense	5'-ACCCTCATAGATGGGCACA-3'

나. in vivo 유효성 평가 결과

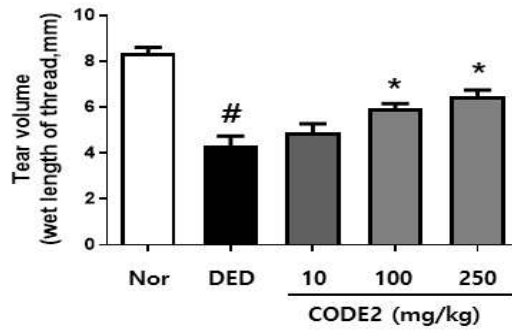
(1) 건성안 모델에서 CODE1 지상부(잇+줄기) 및 CODE2 지상부(잇+줄기)의 눈물양 및 각막형태 변화 기능성 평가

- 외과적 수술로 인한 각막의 형태 변화가 CODE1 지상부(잇+줄기) 열수 추출물 및 30% 에탄올추출물, CODE2 지상부(잇+줄기) 열수 추출물 및 30% 에탄올 추출물에 의하여 회복되는 것을 확인함.



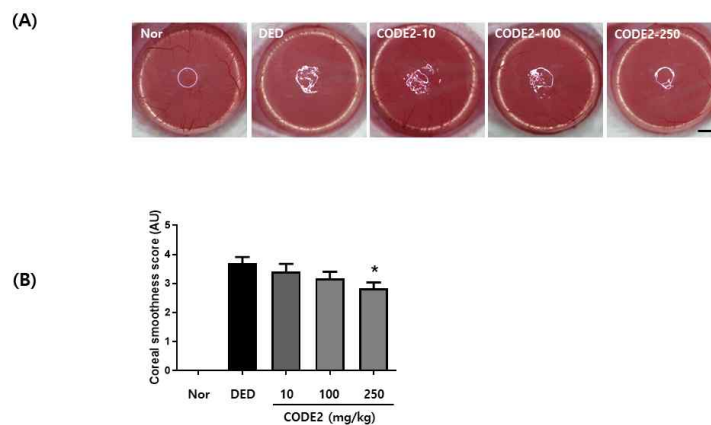
<그림 58> 각막형태 변화에 대한 CODE1 지상부 및 CODE2 지상부의 효과

- 전임상 효과 및 수술을 고려하여 CODE2 지상부(잇+줄기)을 농도별로 경구 투여함. 실험동물을 마취하고 Phenol Red Thread를 실험동물 양쪽 안구 외안각 하안검에 대고 1분간 방치하였을 때, 외과적 수술에 의하여 눈물 분비량을 유의성 있게 줄어들었으며, CODE2 지상부(잇+줄기) 추출물에 의하여 유의적으로 증가함.



<그림 59> 눈물 분비량 감소에 대한 CODE2 지상부의 효과

- 각막 상피 불규칙성 점수는 반사 된 백색 링에서 왜곡 된 사분면의 수에 따라 등급이 나뉨. 외과적 수술로 인한 각막의 형태 변화가 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물에 의하여 회복되는 것을 관찰함.

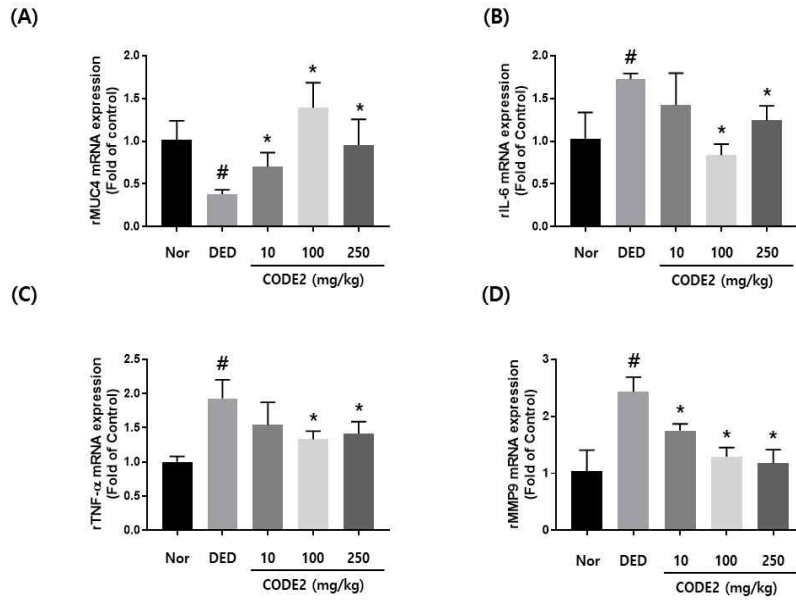


<그림 60> 각막 형태 변화에 대한 CODE2 지상부의 효과

(나) 건성안 모델에서 CODE2 지상부(잎+줄기)의 염증성 인자 및 세포사멸에 미치는 영향

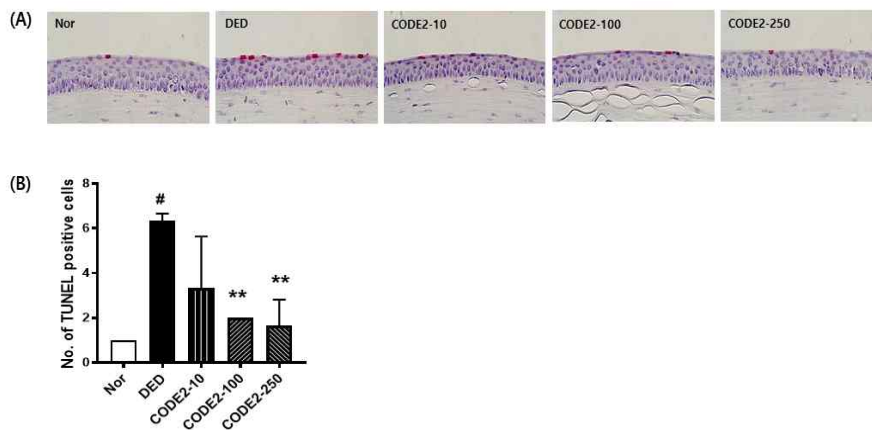
- CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물을 경구 투여 한 실험동물의 각막에서 얻은 mRNA에서 염증성 인자의 발현과 Mucin4 와 MMP9 의 발현을 확인 함. Mucin4의 mRNA 발현은 안구 건조증 유발 군에서 유의적으로 감소한 반면, CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물 (10, 100, 250mg/kg) 그룹에서는 안구건조증 유발군에 비교해 유의적인 회복을 보임. 그러나, 안구건조에 의해 증가된 염증성 인자 (IL-6, TNF-α)와 MMP9는

CODE2 지상부(잇+줄기)의 농도 의존적으로 감소됨을 확인함.



<그림 61> 건성안 모델의 각막에서 얻은 mRNA에서 CODE2 지상부의 효과

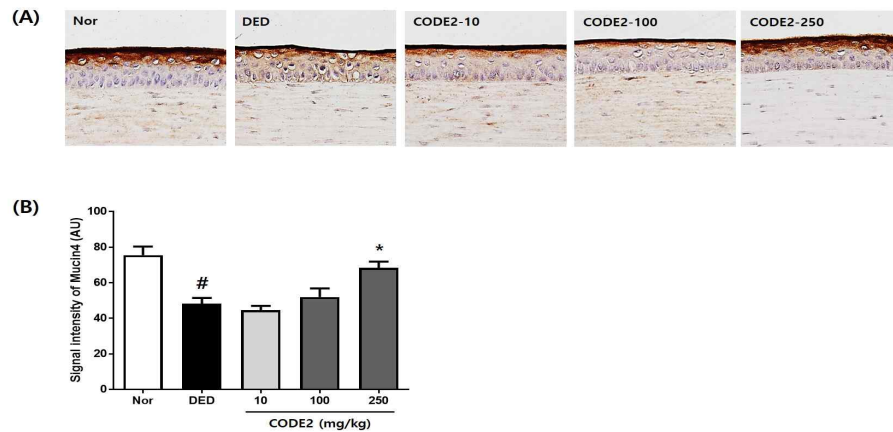
- 안구 건조증이 유발된 군에서는 정상군 보다 Tunnel의 양이 증가되는 것을 확인 하였고, 반면 CODE2 지상부(잇+줄기) 추출물을 투여한 군에서 Tunnel 염색된 조직의 수가 유의적으로 회복됨.



<그림 62> 건성안 모델의 조직내 세포사멸에서 CODE2 지상부의 효과

- 안구 건조증이 유발된 군에서는 정상군 보다 Mucin4의 양이 감소되는 것을 확인 하

였고, 반면 CODE2지상부(잎+줄기) 추출물을 투여한 군에서 점차 회복되어 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물(250mg/kg)군에서 유의적으로 Mucin4가 회복되는 것을 확인 함.



<그림 63> 안구건조에 의해 감소된 Mucin4에 대한 CODE2 지상부(잎+줄기)의 효과

다. in vitro 활성 및 작용기전 규명 방법

(1) 세포 배양 및 cell viability assay

- 사람 각막 상피 세포 (human corneal epithelial cell, PCS-700-010, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 corneal epithelial cell basal medium containing growth supplements (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)을 이용하여 계대배양 하였음. 또한 사람의 결막 상피 세포(Human conjunctival epithelial cell, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) 를 10% FBS 가 포함된 RPMI 배지에 계대 배양하였음. Cell viability는 MTS assay kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였음. 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 seeding한 후 세포가 2×10^5 cells/well 정도 되었을 때 시험물질을 처리하였고, 24시간 후에 cell viability를 측정하였음.

(2) 건조 스트레스 (desiccating stress) 유발 및 cell viability 분석

- 건조 스트레스를 유발하기 위해 세포 배양 배지에 sodium chloride 120mM (삼투압 농도: 528 mOsm)를 유지 하였고, 세포에 다양한 농도의 시험 물질과 24시간 동안 동시 처리 후 Assay를 통해 cell viability를 측정하였음.

(3) Real-Time PCR

- Total RNA를 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출한 후 cDNA 는 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 합성 하였음. 이후 real-time PCR은 iQ5 Continuous Fluorescence Detector System (Bio-Rad, CA, USA) 장비에서 2xSYBR Green PCR Master Mix (SYBR Premix Ex Taq TM, TaKaRa, Tokyo, Japan)를 이용하여 실시하였음.

<표 35> Realtime PCR primer 염기서열

구분	염기서열	
hMuc4	Sense	5'-GCCCAAGCTACAGTGTGACTCA-3'
	antisense	5'-ATGGTGCCGTTGTAATTTGTTGT-3'
hIL-6	Sense	5'-AAATTCGGTACATCCTCGAC-3'
	antisense	5'-CAGGAACTGGATCAGGACTT-3'
hTNF-α	Sense	5'-TTCTCCTTCCTGCTTGIG-3'
	antisense	5'-CTGAGTGTGAGTGTCTGG-3'
hGAPDH	Sense	5'-CCAGCCGAGCCACATCGCTC-3'
	antisense	5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'

(4) Western Blot

- 모든 세포 시료는 1×PBS (Phosphate Buffered Saline)로 2회 세척 후 Laemmli Sample Buffer (cat. no. 161-0737, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)를 처리하여 세포를 포집하였음. 포집된 세포는 100°C에서 5분간 끓인 후, BCA (Bicinchoninic Acid) (Pierce Biotechnology, IL, USA)로 단백질 정량 후 실험에 사용하였음. SDS가 포함된 10% polyacrylamide gel (PAGE)에 준비된 protein sample을 전기영동 (120 V, 2hr) 후 transfer buffer (0.25M Tris, 1.92M Glycine, pH 8.3-8.4)를 사용하여 PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)으로 단백질을 transfer (250 mA, 1시간 30분)하였음. TBS-T (200mM Tris, 1.37 NaCl, 0.05% Tween 20) 용액에 5% non fat milk를 녹여 30 분 blocking한 후, Anti-p65, COX2, p-p65, HO-1, SOD-1, GPx, BAX, Bcl-2, PARP, Caspase 3 antibody를 4°C에서 incubation하였음. TBS-T로 10 분씩 3회 세척 후 HRP-conjugated된 이차 항체를 반응시키고 다시 TBS-T로 10분 씩 3회 세척한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) 용액으로 반응 시켜 LAS-3000 (Fuji film, Japan)으로 확인 함.

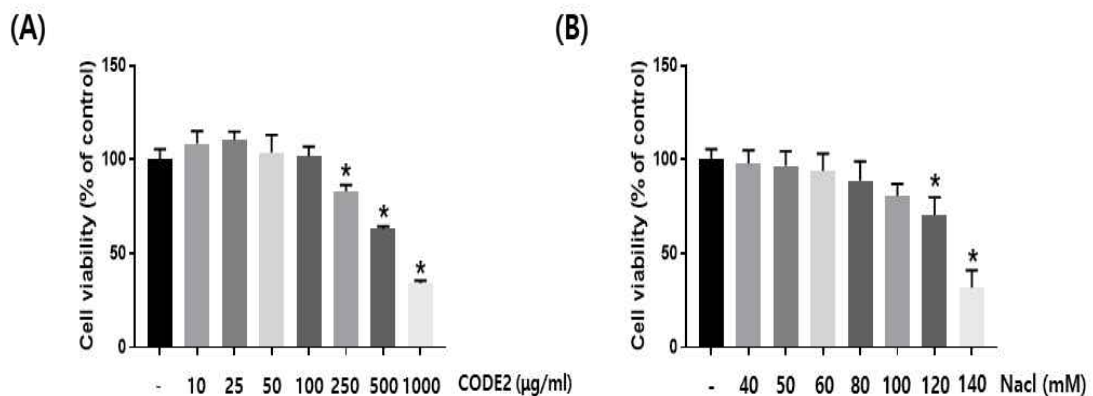
(5) 활성산소 (Reactive Oxygen species, ROS) 측정

- 고 삼투압에 의한 세포내에서의 활성산소 생성을 확인하고자 세포에 528mOsM 고 삼투압을 시간별 처리 후 활성산소를 측정할 수 있는 형광물질 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 10 μ M 처리하여 Fluorence와 ELISA reader 을 통해 활성산소의 생성을 확인하였음.

라. in vitro 활성 및 작용기전 규명 결과

(1) 각막 상피세포[Human corneal epithelial cell (HCECs)]에서 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 효과 확인

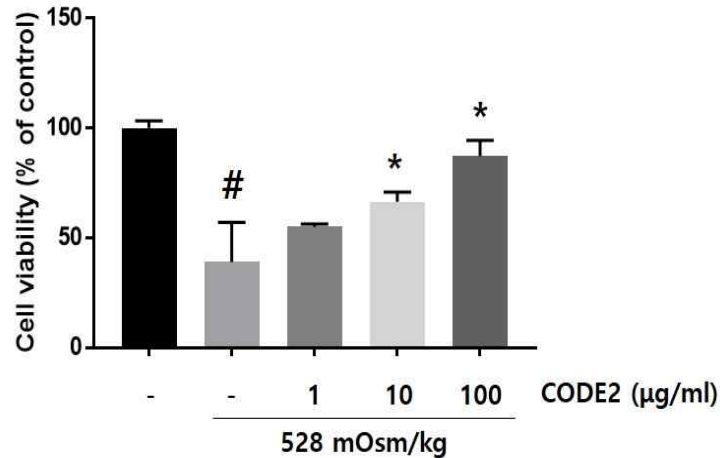
- CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 세포 독성이 있는지를 확인하기 위해 각막 상피세포에 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물을 농도별 (10~1000 μ g/mL)을 24시간 처리 후 CCK-8 (cell counting kit-8)을 이용하여 세포 생존율을 측정함. 그 결과, CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물 (> 250 μ g/mL)부터 세포 독성이 나타나 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 농도를 1, 10, 100 μ g/mL 으로 설정 함. 세포 내 안구건조증과 유사한 환경을 만들어 주기 위해 고 삼투압 (hyperosmolarity) 유발을 위해 Nacl를 사용 함. Nacl의 농도 별로 사람의 각막상피세포에 24시간 처리 하고 세포 독성을 확인함. 그 결과, Nacl 120mM부터 세포독성이 나타나 고 삼투압을 위해 120mM의 Nacl를 사용 함. 120mM 의 Nacl 은 528 mOsm/kg 의 삼투압을 나타냄.



<그림 64> 각막상피 세포에서 CODE2 지상부 추출물과 Nacl의 세포독성 확인

(2) 고 삼투압을 유발한 각막상피 세포에서 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 효과

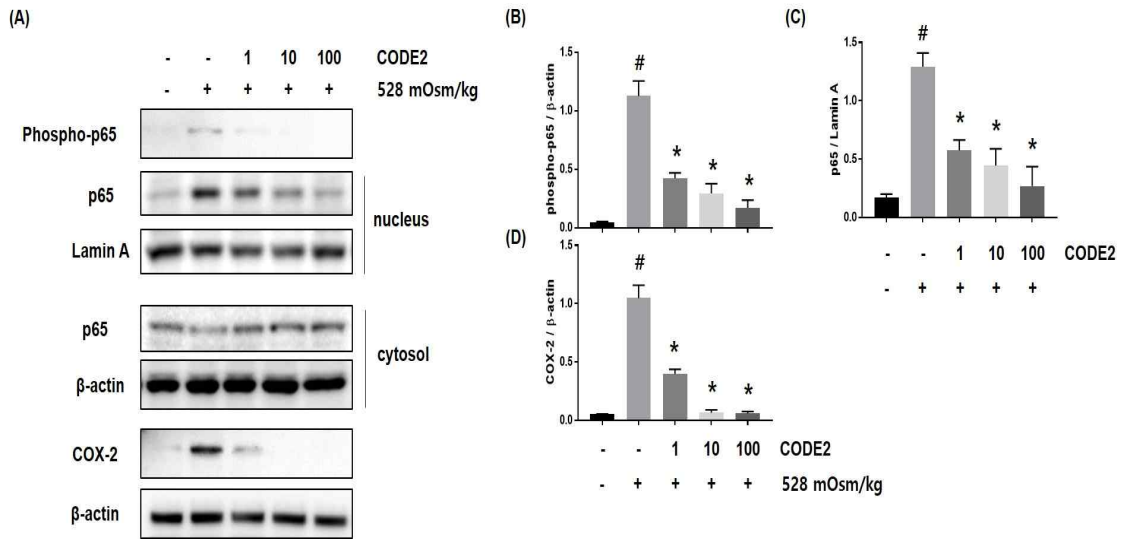
- 고 삼투압에 의해 각막상피세포의 손상에서 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 효과를 확인하기 위해 NaCl (528 mOsm/kg)과 CODE2 각 농도별로 (1, 10, 100 μ g/mL) 24시간 동안 동시 처리 후, CCK-8 kit를 이용하여 세포 생존율을 확인함. 그 결과, 고 삼투압에 의한 세포 죽음은 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물 10, 100 μ g/mL 군에서 유의적인 세포 생존율이 회복됨.



<그림 65> 고 삼투압이 유도된 세포독성에서 CODE2 지상부 추출물의 효과

(3) 고 삼투압에 의한 발현된 염증성 단백질에서의 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 효과

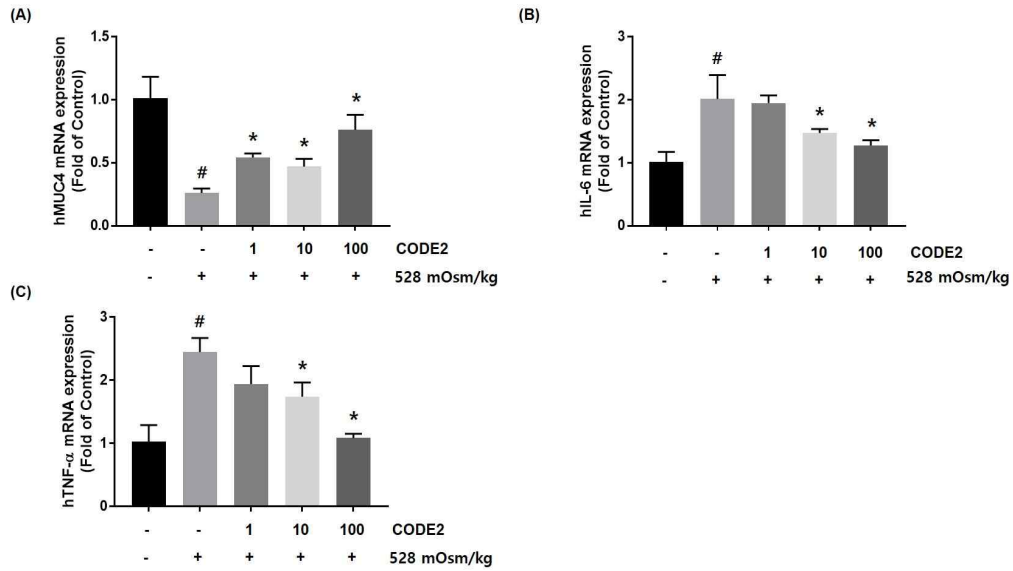
- 고 삼투압에 의해 염증성 단백질의 발현과정에서 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해 western blot를 통해 확인함. phospho-p65는 고 삼투압에 의해 단백질 발현이 증가 되었지만, CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 농도 의존적으로 감소함을 확인 함. 또한 p65 단백질의 핵 내 이동을 확인하기 위해 핵과 세포질을 분리하여 p65의 단백질 발현을 확인함. 고 삼투압에 의해 p65의 단백질은 핵 내로 많이 이동한 반면, CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 농도 의존적으로 p65의 핵 안으로의 이동이 감소함. 또한 COX-2의 단백질 경우 고 삼투압에 의해 발현양이 증가 되었으나, CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 농도 의존적으로 COX-2 단백질의 발현을 감소시킴.



<그림 66> 고 삼투압에 의한 발현된 염증성 단백질에서의 CODE2 지상부 추출물의 효과

(4) 고 삼투압에 의해 발현되는 염증성 사이토카인 mRNA 발현 및 Mucin4 의 발현에서 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 효과

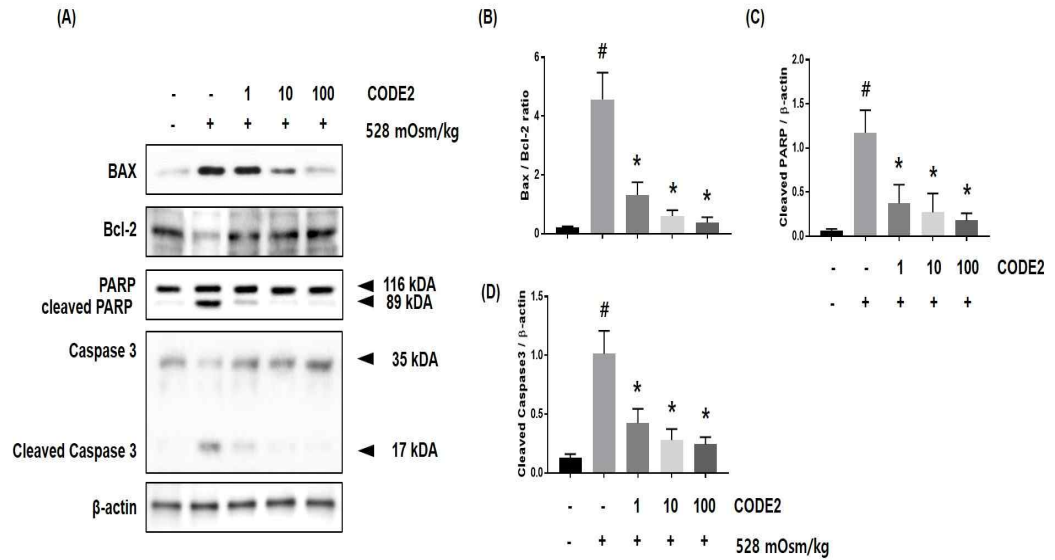
- 사람의 각막 상피세포에서 고 삼투압에 의해 mRNA 발현이 억제 되는 Mucin4 에서 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 효과를 확인함. 고 삼투압에 의해 Mucin4 의 mRNA 발현은 유의적으로 감소하였으나, CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 농도 의존적으로 Mucin4 의 mRNA 발현을 회복시킴. 또한, 고 삼투압에 의해 증가 되었던 염증성 사이토카인 IL-6 와 TNF-α 의 mRNA 발현은 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물 10, 100μg/mL 군에서 유의적인 감소를 나타냄.



<그림 67> 고 삼투압에 의해 발현되는 염증성 사이토카인 mRNA 발현 및 Mucin4의 발현에서 CODE2 지상부 추출물의 효과

(5) 고 삼투압에 의한 각막 상피세포의 세포 사멸에서 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 효과

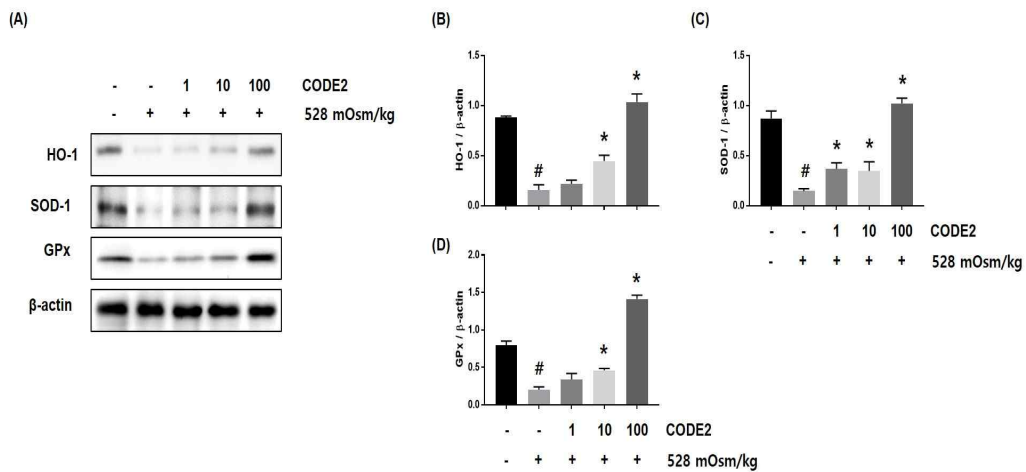
- 고 삼투압에 의해 각막 상피세포의 세포 사멸과정에서 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 효과를 확인하기 위해 세포 사멸과 관련된 단백질의 발현을 확인함. 세포사멸 단백질인 BAX 의 경우 고 삼투압에 의해 단백질 발현이 증가 되었지만, CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 농도 의존적으로 BAX 단백질 발현이 감소되는 것을 확인함. 반면, 세포 생존 단백질인 Bcl-2 의 경우, 고 삼투압에 의해 Bcl-2 의 단백질 발현이 감소되었지만, CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물에 의해 발현이 회복됨. 또한 세포의 사멸 과정에서 활성이 되는 PARP와 Caspase 3에서 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 효과를 확인해 본 결과, 고 삼투압에 의해 활성이 된 PARP과 Caspase3는 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물에 의해 농도 의존적으로 단백질 발현이 감소됨.



<그림 68> 고 삼투압에 의한 각막 상피세포의 세포 사멸에서 CODE2 지상부 추출물의 효과

(6) 각막 상피세포에서 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 항산화 효과 확인

- CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위해 항산화와 관련된 단백질 (HO-1, SOD-1, GPx)의 발현양을 확인함. 고 삼투압에 의해 사람 각막 상피 세포내에서 산화 과정이 일어나 항산화와 관련된 단백질의 발현이 유의적으로 감소하였으나 CODE2 지상부(잎+줄기) 추출물의 처리군에서는 농도 의존적으로 항산화단백질의 발현이 회복 되는 것을 확인함.



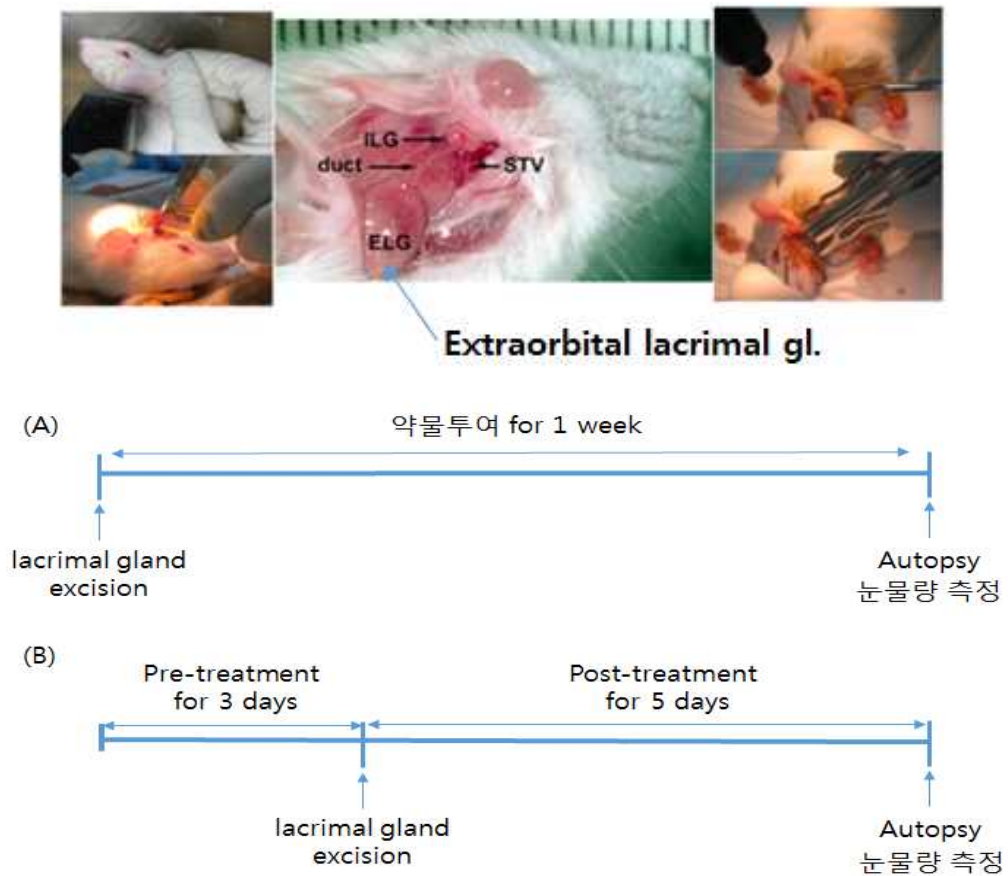
<그림 69> 사람 각막 상피세포에서 CODE2 지상부 추출물의 항산화 효과 확인

3. 호장근 줄기 열수 추출물(PSE)의 눈 건강 기능성 평가

가. in vivo 유효성 평가 방법

(1) 외과적 눈물샘 제거의 의한 건성안 모델 제작 및 실험 디자인

- 6주령 SD RAT을 (주)오리엔트 (성남, 대한민국)에서 구입하여 1주일 동안 순화 후 사용하였음. 실험동물은 마취 후 옆면이 보이도록 놓은 후, 실험동물의 털을 알코올로 충분히 적셔 털을 정리함. 귀의 아래 가 쪽에서부터 아래턱뼈 가지(Ramus of mandibule)를 따라 피부 절개를 시행한 후 피하조직을 들어 올려 눈물샘(Lacrimal gland)을 잡아 당겨 주위 조직과의 이음새 부분을 절개하여 제거함. 소독된 auto clip을 이용하여 눈물샘을 제거한 수술부위를 봉합한 후 포비돈을 이용하여 봉합부위를 소독 함.



<그림 70> 동물실험 및 추출물 처리 실험 프로토콜

(2) 눈물량 및 각막 불규칙성 분석

- 눈물 분비량은 페놀-레드 thread 눈물량 검사지(FCI Ophthalmics Zone Quick, Japan)를 이용하여 눈꺼풀 외측 끝 부위 안구표면에 접촉시킨 후 30초 후 눈물에 의해 검사지의 색이 변한 길이를 측정하여 눈물 분비량을 측정 함.

(3) 각막 건조 손상 분석

- 눈물샘을 제거하여 안구건조증을 유발한 랫(rat)을 마취하고 각막에 상피에 0.3% Lissamine Green B 염색시약을 처리 후 DP21 디지털 카메라(Olympus, Tokyo, Japan) 촬영함. 각막 손상 점수는 각막에 염색된 점의 정도에 따라 등급이 나눔.

<Table 36> 각막 손상도 점수

점수	염색정도	판단 기준	점수	염색정도	판단 기준
0 등급		손상없음	3 등급		2 등급 보다 심한 손상 정도
1 등급		약간의 손상 정도	4 등급		3 등급 보다 심한 손상 정도
2 등급		1등급 보다 심한 손상 정도	5 등급	> 4등급	매우 심한 손상 정도

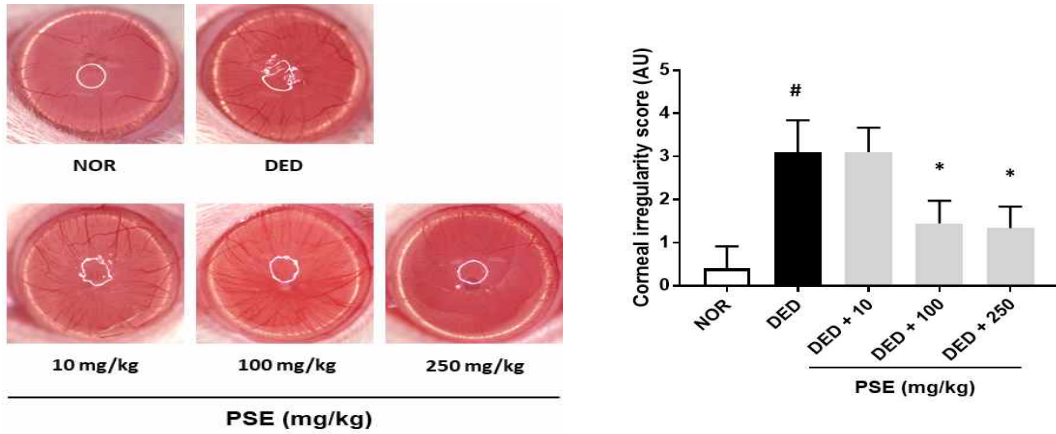
(4) 결막조직 술잔세포(goblet cell) 분석

- 조직절편을 탈 파라핀 하여 수화시킨 후 1% PAS (Periodic acid Schiff) 염색약 얻고 수세 후 5분간 H&E 염색을 함 수세 후 현미경하에서 관찰하였음.

나. in vivo 유효성 평가 결과

(가) 건성안 모델에서 호장근 줄기 열수 추출물(PSE)의 각막 형태 및 눈물량에 대한 효능 평가

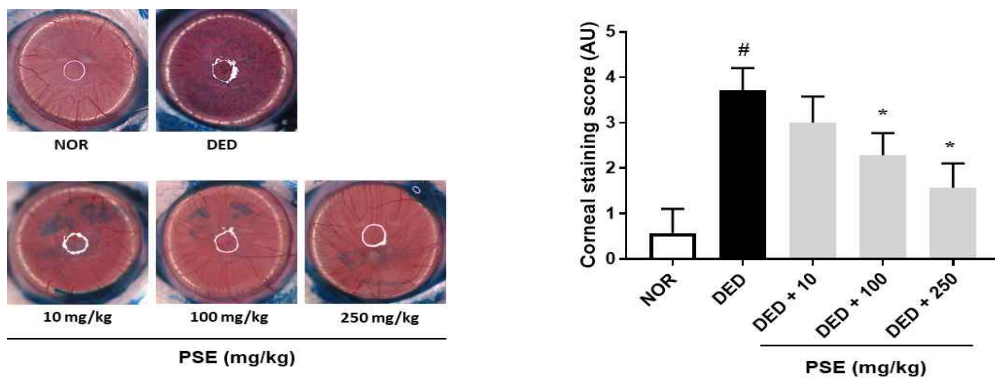
- CODE2의 경우 잎+줄기이지만 실제 호장근은 줄기 부위가 식용으로 사용 가능하므로, 호장근 줄기 추출물(PSE)의 효과를 검증하고자 함. 외과적 수술로 눈물샘을 제거한 후, PSE 추출물을 경구 투여함. 실험동물을 마취하고 Phenol Red Thread를 실험동물 양쪽 안구 외안각 하안검에 대고 1분간 방치하였을 때, 외과적 수술에 의하여 눈물 분비량을 유의성 있게 줄어들었으며, PSE에 의하여 유의적으로 증가함.



<그림 71> 각막 형태 변화에 대한 PSE의 효과

(나) 건성안 모델에서 호장근 줄기 열수 추출물(PSE)의 각막손상 및 술잔세포 손상에 대한 효능평가

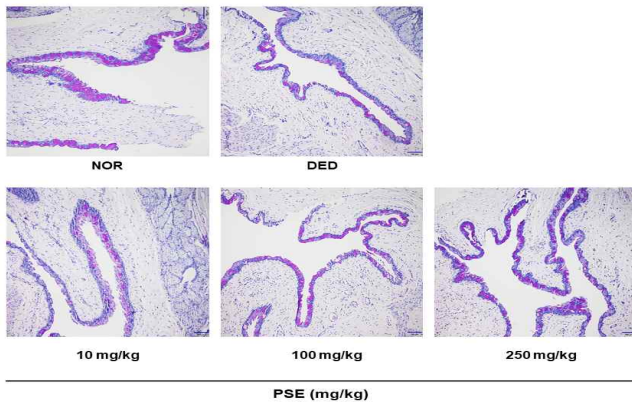
- 건성안 수술에 의해 각막에 심한 손상이 나타났으나 PSE에 의해 각막의 손상이 감소 되는 것을 관찰함.



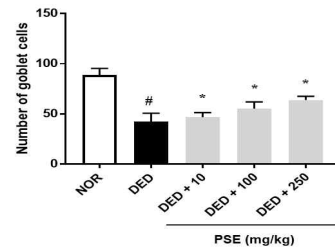
<그림 72> 각막 손상에 대한 PSE의 효과

- 눈물샘 제거한 실험동물의 결막 조직에 PAS 염색을 통해 술잔세포의 수를 확인한 결과 눈물샘 제거에 의해 술잔 세포의 수는 감소하였으나, PSE에 의해 유의적인 술잔 세포의 수가 증가함을 알 수 있었음.

(A)



(B)



<그림 73> 결막조직에서 술잔세포 손상에 대한 PSE의 효과

다. in vitro 활성 및 작용기전 규명 방법

(1) 세포 배양 및 cell viability assay

- 사람의 결막 상피 세포(Human conjunctival epithelial cell American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) 를 10% FBS 가 포함된 RPMI 배지에 계대 배양 하였음. Cell viability는 MTS assay kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였음. 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 seeding한 후 세포가 2×10^5 cells/well 정도 되었을 때 시험물질을 처리하였고, 24시간 후에 cell viability를 측정하였음.

(2) Real-Time PCR

- Total RNA를 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출한 후 cDNA 는 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 합성하였음. 이후 real-time PCR은 iQ5 Continuous Fluorescence Detector System (Bio-Rad, CA, USA) 장비에서 2xSYBR Green PCR Master Mix (SYBR Premix Ex Taq TM, TaKaRa, Tokyo, Japan)를 이용하여 실시하였음.

(3) Western Blot

- 모든 세포 시료는 $1 \times$ PBS (Phosphate Buffered Saline)로 2회 세척 후 Laemmli Sample Buffer (cat. no. 161-0737, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)를 처리하여 세포를 포집하였음. 포집된 세포는 100°C 에서 5분간 끓인 후, BCA (Bicinchoninic Acid) (Pierce Biotechnology, IL, USA)로 단백질 정량 후 실험에 사용하였음. SDS가 포함된

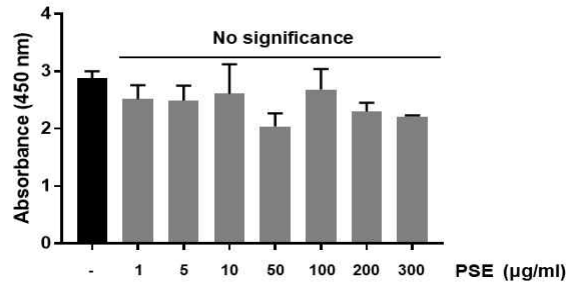
10% polyacrylamide gel (PAGE)에 준비된 protein sample을 전기영동 (120 V, 2hr) 후 transfer buffer (0.25M Tris, 1.92M Glycine, pH 8.3-8.4)를 사용하여 PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)으로 단백질을 transfer (250 mA, 1시간 30분)하였다. TBS-T (200mM Tris, 1.37 NaCl, 0.05% Tween 20) 용액에 5% non fat milk를 녹여 30 분 blocking한 후, IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-1 β antibody를 4°C에서 incubation하였다. TBS-T로 10 분씩 3회 세척 후 HRP-conjugated된 이차 항체를 반응시키고 다시 TBS-T로 10분 씩 3회 세척한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) 용액으로 반응 시켜 LAS-3000 (Fuji film, Japan)으로 확인하였다.

라. in vitro 활성 및 작용기전 규명 결과

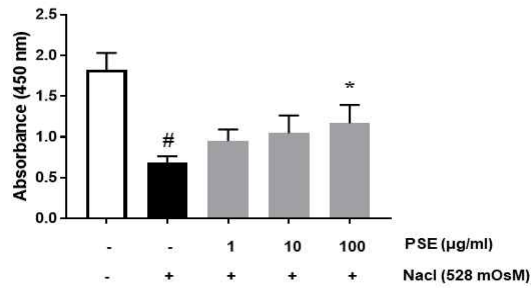
(1) 결막 세포주[Human conjunctival cells (HCCs)] 에서 PSE 의 효과 확인

- PSE의 세포 독성이 있는지를 확인하기 위해 결막 세포주에 PSE를 농도별 (10~300 μ g/mL)을 24시간 처리 후 CCK-8 (cell counting kit-8)를 이용하여 세포 생존율을 측정함. 그 결과, PSE 유의적이진 않지만 200 μ g/mL부터 세포 독성이 나타나 PSE 의 농도를 1, 10, 100 μ g/mL 으로 설정 함. 고 삼투압에 의해 결막세포주의 손상에서 PSE 의 효과를 확인하기 위해 NaCl (528 mOsm/kg) 과 PSE 각 농도별로 (1, 10, 100 μ g/mL) 24시간 동안 동시 처리 후, CCK-8 kit를 이용하여 세포 생존율을 확인함. 그 결과, 고 삼투압에 의한 세포 죽음은 PSE 100 μ g/mL 군에서 유의적인 세포 생존율이 회복됨.

(A)



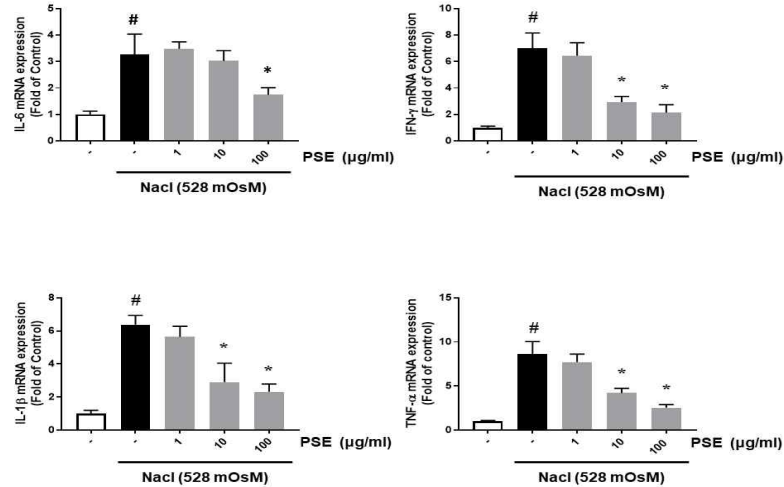
(B)



<그림 74> 고 삼투압 자극된 결막 세포주에서 PSE의 효과

(2) 고 삼투압에 의해 발현되는 염증성 사이토카인 mRNA 발현에서 PSE의 효과

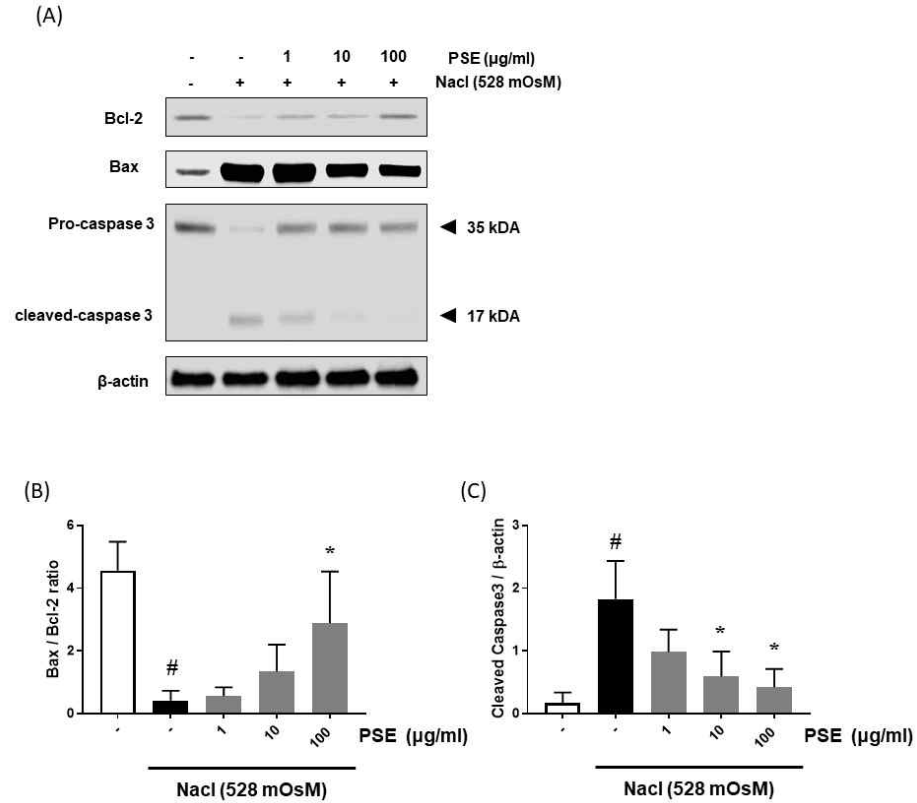
- 결막 세포주에 고 삼투압(528 mOsM) 를 24시간 처리 후 발현되는 염증성 사이토카인에서 PSE 의 효과를 확인함. 고 삼투압에 의해 증가 되었던 IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-1 β 의 mRNA 발현은 PSE 의 농도 의존에 의해 유의적인 mRNA 발현 감소를 나타냄.



<그림 75> 고 삼투압에 의해 발현 되는 염증성 사이토카인 mRNA 발현에서 PSE의 효과

(3) 고 삼투압에 의한 결막 세포주의 세포 사멸에서 PSE의 효과

- 고 삼투압에 의해 결막 세포주의 세포 사멸과정에서 PSE의 효과를 확인하기 위해 세포 사멸과 관련된 단백질의 발현을 확인함. 세포사멸 단백질인 BAX의 경우 고 삼투압에 의해 단백질 발현이 증가되었지만, PSE의 농도 의존적으로 BAX 단백질 발현이 감소되는 것을 확인함. 반면, 세포 생존 단백질인 Bcl-2의 경우, 고 삼투압에 의해 Bcl-2의 단백질 발현이 감소되었지만, PSE에 의해 발현이 회복됨. 또한 세포의 사멸 과정에서 활성이 되는 Caspase 3에서 PSE의 효과를 확인해 본 결과, 고 삼투압에 의해 활성이 된 Caspase 3는 PSE에 의해 농도 의존적으로 단백질 발현이 감소됨.



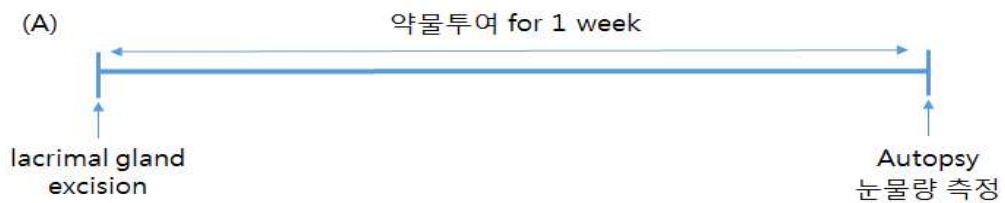
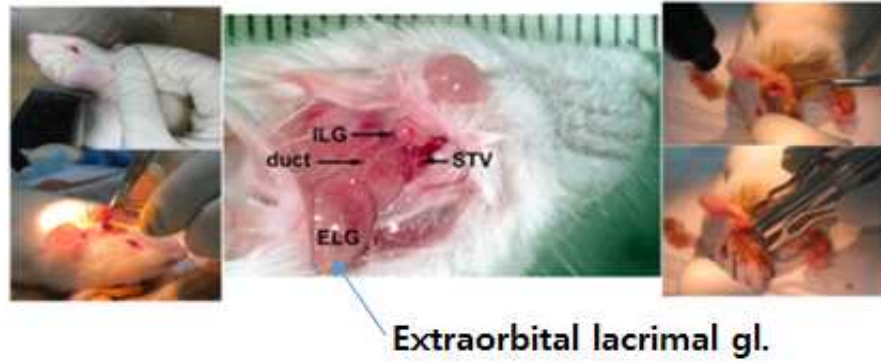
<그림 76> 고 삼투압에 의한 결막세포주의 세포 사멸에서 PSE의 효과

4. 호장근 추출물의 지표성분인 Polydatin의 눈건강 기능성 평가

가. in vivo 유효성 평가 방법

(1) 외과적 눈물샘 제거에 의한 건성안 모델 제작 및 실험 디자인

- 6주령 SD RAT을 (주)오리엔트 (성남, 대한민국)에서 구입하여 1주일 동안 순화 후 사용하였음. 실험동물은 마취 후 옆면이 보이도록 놓은 후, 실험동물의 털을 알코올로 충분히 적셔 털을 정리함. 귀의 아래 가 쪽에서부터 아래턱뼈 가지(Ramus of mandibule)를 따라 피부 절개를 시행한 후 피하조직을 들어 올려 눈물샘(Lacrimal gland)을 잡아 당겨 주위 조직과의 이음새 부분을 절개하여 제거함. 소독된 auto clip을 이용하여 눈물샘을 제거한 수술부위를 봉합한 후 포비돈을 이용하여 봉합부위를 소독 함.



<그림 77> 동물실험 및 추출물 처리 실험 프로토콜

(2) 눈물량 및 각막 불규칙성 분석

- 눈물 분비량은 페놀-레드 thread 눈물량 검사지(FCI Ophthalmics Zone Quick, Japan)를 이용하여 눈꺼풀 외측 끝 부위 안구표면에 접촉시킨 후 30초 후 눈물에 의해 검사지의 색이 변한 길이를 측정하여 눈물 분비량을 측정하였음. 각막의 불규칙성은 ring type light illuminator를 각막에 비춰 반사되는 형태를 촬영한 후 ring type 조명기의 각막건조 손상에 의해 찌그러지는 정도를 평가하여 분석하였음.

(3)TBUT(Tear breakup time)

- 건성안 유도 동물 모델 눈에 Fluoserin을 넣은후 극동 현미경의 배율 16배, 직접조명 45°로 하여 최초로 중심부로 침투하여 Fluoserin 이 점의 형태로 나타나는 순간까지의 시간을 3회 반복 측정한 후 그 평균값을 눈물 막 파괴시간(TBUT)로 나타냄.

(4) 각막 건조 손상 분석

- 눈물샘을 제거하여 안구건조증을 유발한 랫(rat)을 마취하고 각막에 상피에 0.3%

Lissamine Green B 염색시약을 처리 후 DP21 디지털 카메라(Olympus, Tokyo, Japan) 촬영함. 각막 손상 점수는 각막에 염색된 점의 정도에 따라 등급을 나눔.

(5) 조직병리학적 평가

- 시험약물 투여 종료 후 부검을 실시하여 안구를 적출한 후, 10% 중성화 포르말린에 하루 동안 고정한 후 파라핀으로 포매하여 슬라이드 절편을 제작한 다음 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색하여 광학현미경 하에서 관찰하였음. RPE cell의 손상에 의한 outer nuclear layer의 folding부위를 counting 하여 평가하였음.

(6) 결막조직 술잔세포(goblet cell) 분석

- 조직절편을 탈 파라핀 하여 수화시킨 후 1% PAS (Periodic acid Schiff) 염색약 얻고 수세 후 5분간 H&E 염색을 함 수세 후 현미경하에서 관찰하였음.

(7) 결막조직에서 mRNA 발현량 분석을 위한 Real-time PCR

- 부검시 분리한 결막조직으로부터 Trizol을 이용하여 RNA를 분리한 후 RNA 1 µg을 Oligo primer 가 포함된 RT-premix (Intron, Korea) 을 이용하여 cDNA를 합성하고 real-time PCR을 수행하였음. mRNA 발현량 분석은 iQ5 optical system (Bio-Rad, USA)를 이용하여 실시하였음.

<표 36> Realtime PCR 염기서열

구분	염기서열	
rINF-r	Sense	5'-ATCTGGAGGAACTGGCAAAGGACG-3'
	antisense	5'-CCTTAGGCTAGATTCTGGTGACAGC-3'
rIL-6	Sense	5'-AGAGACTTCCAGCCAGTTGC-3'
	antisense	5'-AGCCTCCGACTTGTGAAGTG-3'
rTNF-α	Sense	5'-TCGTCTACTCCTCAGAGCCC-3'
	antisense	5'-ACTTCAGCGTCTCGTGTGTT-3'
rIL1b	Sense	5'-CCAGGATGAGGACCCAAGCA-3'
	antisense	5'-TCCCGACCATTGCTGTTTCC-3'
rMUC5AC	Sense	5'-TCCGGCCTCATCTTCTCC-3'
	antisense	5'-ACTTGGGCACTGGTGCTG-3'

rNLRP3	Sense	5'-ATCTGGAGGAACTGGCAAAGGACG-3'
	antisense	5'-CCTTAGGCTAGATTCTGGTGACAGC-3'
rGAPDH	Sense	5'-CGTGAAAAGATGACCCAGAT-3'
	antisense	5'-ACCCTCATAGATGGGCACA-3'

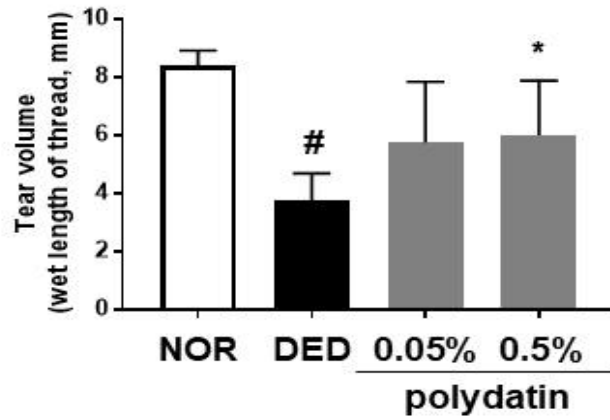
(8) 염증 조절 복합체 분석: NLRP3 (LRR and PYD domains-containing protein3) 염색

- 탈파라핀 과정과 흡수과정을 거친 slide를 내인성 peroxidase 활성을 제거하기 위하여 3% H₂O₂ 용액에 10분 간 반응시킨 후 0.05% tween 20이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 비특이적 반응을 제거하기 위하여 5% casein을 이용하여 blocking한 후, 1차 antibody (anti-NLRP3 antibody, 1:200)를 1시간 적용하였다. PBS로 세척한 후 labeled streptoavidin biotin (LSAB) kit (Dako, USA)를 적용한 후 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) chromogen으로 발색하여 광학현미경 하에서 관찰함.

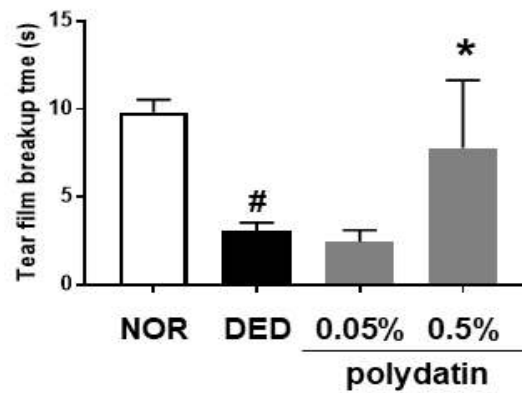
나. in vivo 유효성 평가 결과

(1) 건성안 모델에서 polydain의 눈물 분비량 및 눈물막 파괴에 대한 효과 확인

- 외과적 수술로 눈물샘을 제거한 후, polydatin을 점안 투여함. 실험동물을 마취하고 Phenol Red Thread를 실험동물 양쪽 안구 외안각 하안검에 대고 1분간 방치하였을 때, 외과적 수술에 의하여 눈물 분비량을 유의성 있게 줄어들었으며, polydatin 0.5%에 의하여 유의적으로 증가함.
- 건성안 유도군 에서는 TBUT 의 시간이 짧았으나, polydatin 0.5% 점안한 군에서는 유의적으로 TBUT의 시간이 길어짐.



<그림 78> 눈물 분비량 감소에 대한 polydatin의 효과

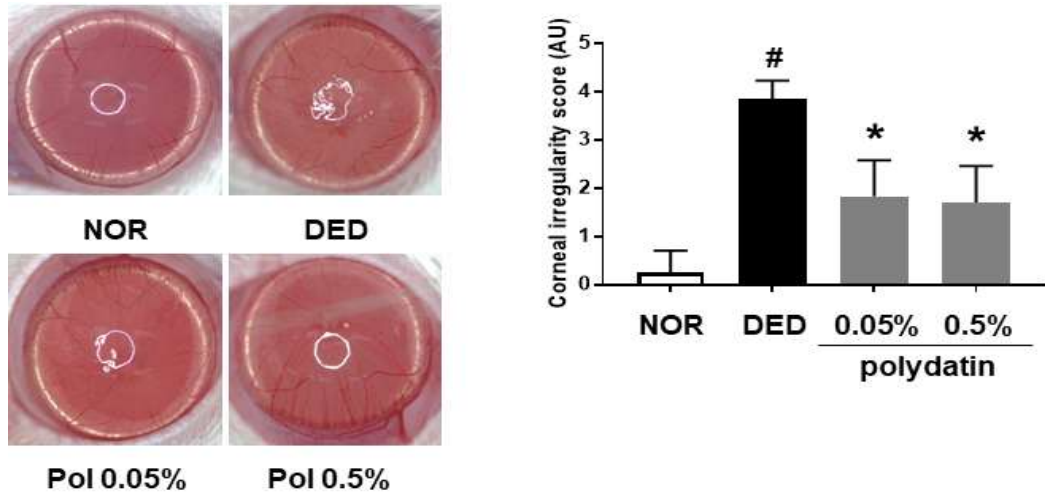


<그림 79> 눈물 막 파괴 시간 감소에 대한 polydatin의 효과

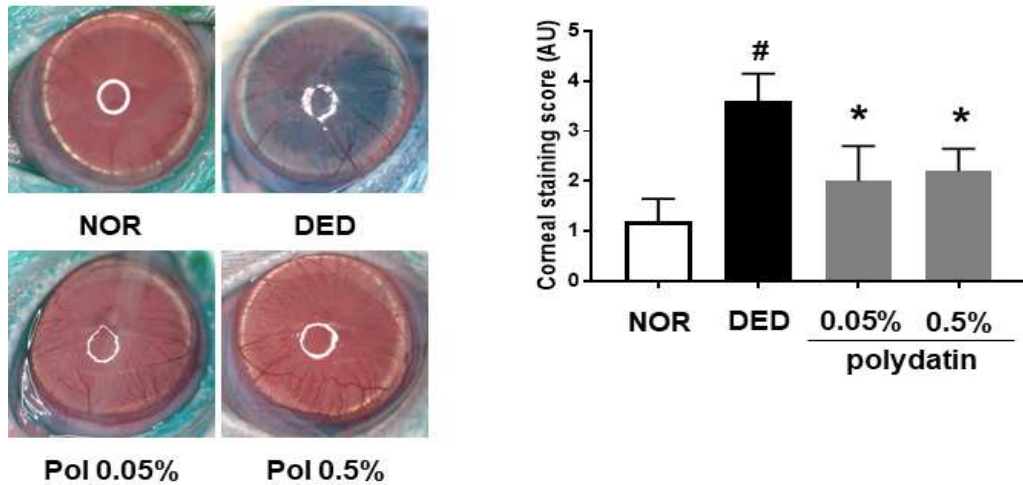
(2) 건성안 모델에서 polydatin의 각막형태 및 각막손상에 대한 효과 확인

- 외과적 수술로 인한 각막의 형태 변화가 polydatin 점안에 의하여 회복되는 것을 관찰함.

- 외과적 수술로 인한 각막의 손상은 polydatin 0.05, 0.5% 점안에 의하여 회복되는 것을 관찰함.



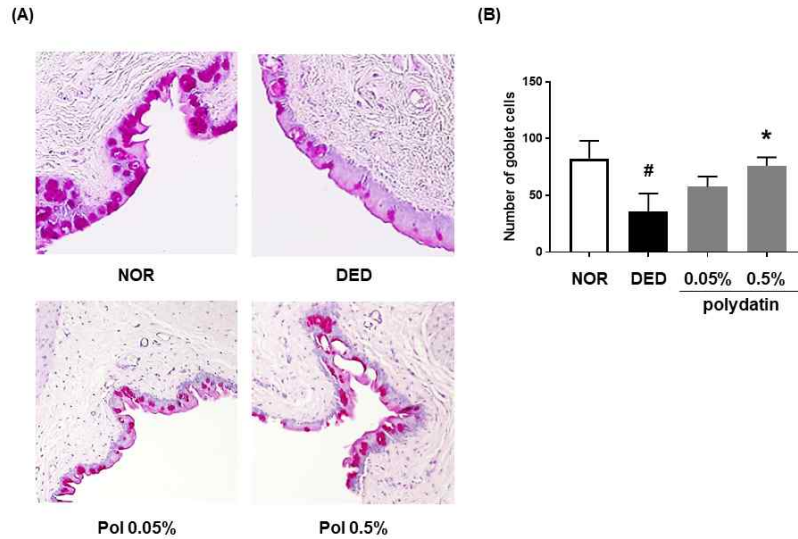
<그림 80> 각막 형태 변화에 대한 polydatin의 효과



<그림 81> 각막 손상에 대한 polydatin의 효과

(3) 건성안 모델에서 polydatin의 결막조직 내 술잔세포에 대한 효과 확인

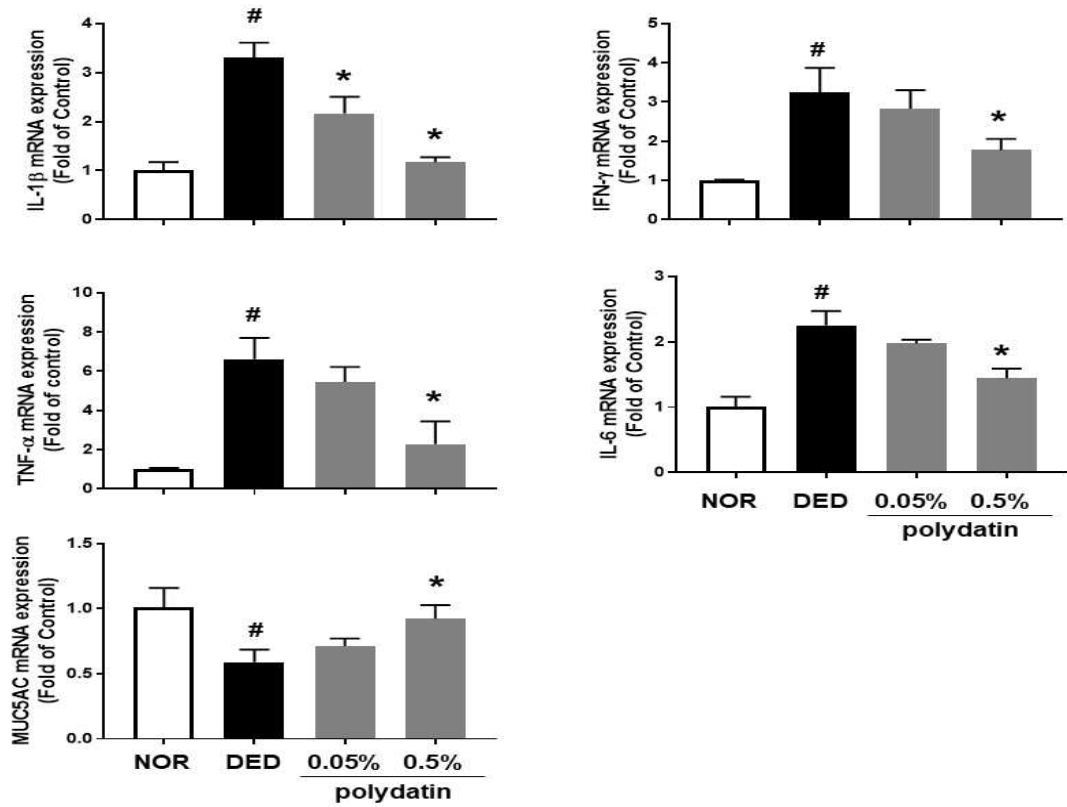
- 눈물샘 제거한 실험동물의 결막 조직에 PAS 염색을 통해 술잔세포의 수를 확인한 결과 눈물샘 제거에 의해 술잔 세포의 수는 감소하였으나, polydatin 0.5% 점안한 군에서는 술잔 세포의 수가 유의적으로 회복됨을 알 수 있었음.



<그림 82> 결막조직에서 술잔세포 손상에 대한 polydatin의 효과

(4) 건성안 모델에서 염증성 인자에 대한 polydatin의 효과 확인

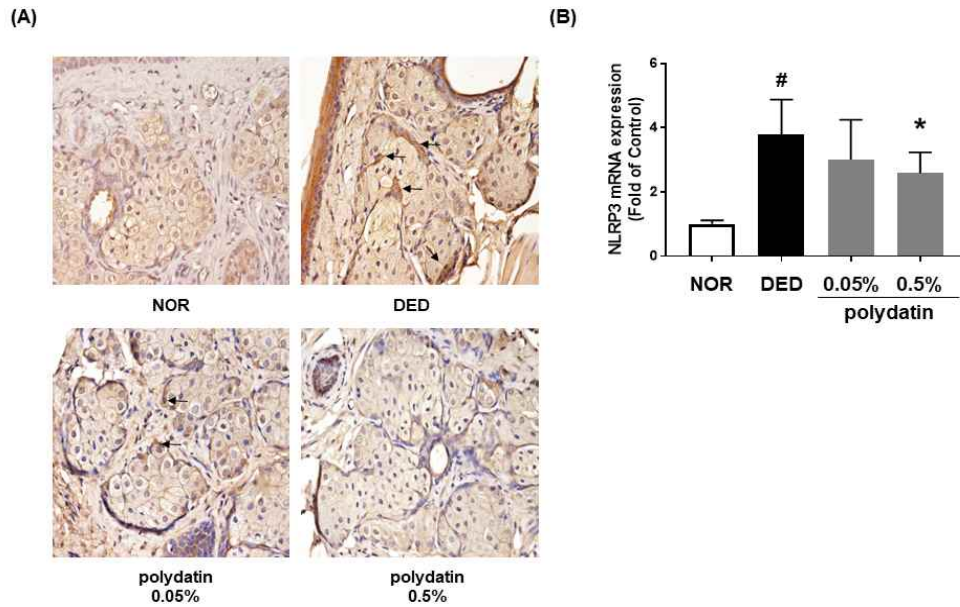
- polydatin을 점안 한 후, 실험동물의 결막에서 얻은 mRNA에서 염증성 인자의 발현과 Mucin5AC의 발현을 확인 함. Mucin5AC의 mRNA 발현은 안구 건조증 유발 군에서 유의적으로 감소한 반면, polydatin 0.5% 그룹에서는 안구건조증 유발군에 비교해 유의적인 회복을 보임. 그러나, 안구건조에 의해 증가된 염증성 인자 IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-1 β 는 polydatin 0.5%에서 유의적으로 감소됨을 확인함.



<그림 83> 결막조직에서 증가된 염증성 사이토카인과 감소된 MUC5AC mRNA 발현에서 polydatin의 효과

(5) 건성안 모델에서 inflammasome 형성에 polydatin의 효과 확인

- 건성안 유도된 결막조직에서는 NLRP3의 발현이 확연히 관찰이 됨. 반면, polydatin 이 점안된 그룹에서는 눈에 띄게 NLRP3의 발현이 감소됨을 확인함. 재확인을 위해 결막조직에서 NLRP3 mRNA 발현을 확인한 결과, 건성안 유도군에서는 NLRP3 mRNA 발현이 증가 되었고, polydatin 0.5% 점안한 군에서는 유의적으로 NLRP3 mRNA 발현이 감소됨을 알 수 있었음.



<그림 84> 건성안 유도된 결막조직에서 증가된 NLRP3의 발현에서 polydatin의 효과

다. in vitro 활성 및 작용기전 규명 방법

(1) 세포 배양 및 cell viability assay

- 사람의 결막 상피 세포(Human conjunctival epithelial cell, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) 를 10% FBS 가 포함된 RPMI 배지에 계대 배양 하였음. Cell viability는 MTS assay kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였음. 세포를 96well plate에 1×10^4 cells/well로 seeding한 후 세포가 2×10^5 cells/well 정도 되었을 때 시험물질을 처리하였고, 24시간 후에 cell viability를 측정하였음.

(2) 건조 스트레스 (desiccating stress) 유발 및 cell viability 분석

- 건조 스트레스를 유발하기 위해 세포 배양 배지에 sodium chloride 120mM (삼투압 농도:528 mOsM)를 유지 하였고, 세포에 다양한 농도의 polydatin과 24시간 동안 동시 처리 후 Assay를 통해 cell viability를 측정하였음.

(3) Real-Time PCR

- Total RNA를 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출한 후 cDNA 는 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 합성 하였음. 이후 real-time PCR은 iQ5 Continuous Fluorescence Detector System (Bio-Rad, CA, USA) 장비에서 2xSYBR Green PCR Master Mix (SYBR Premix Ex Taq TM, TaKaRa, Tokyo, Japan)를 이용하여 실시하였음.

<표 37> Realtime PCR 염기서열

구분	염기서열	
hIL-6	Sense	5'-AAATTCGGTACATCCTCGAC-3'
	antisense	5'-CAGGAAGTGGATCAGGACTT-3'
hTNF-α	Sense	5'-TTCTCCTTCCTGCTTGTG-3'
	antisense	5'-CTGAGTGTGAGTGTCTGG-3'
hIL-1β	Sense	5'-CCACAGACCTTCCAGGAGAATG-3'
	antisense	5'-GTGCAGTTCAGTGATCGATCGTACAGG-3'
hMMP9	Sense	5'-GGGACGCAGACATCGTCATC-3'
	antisense	5'-TCGTCATCGTCGAAATGGGC-3'
hGAPDH	Sense	5'-CCAGCCGAGCCACATCGCTC-3'
	antisense	5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'

(4) Western Blot

- 모든 세포 시료는 1× PBS (Phosphate Buffered Saline)로 2회 세척 후 Laemmli Sample Buffer (cat. no. 161-0737, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)를 처리하여 세포를 포집하였음. 포집된 세포는 100°C에서 5분간 끓인 후, BCA (Bicinchoninic Acid) (Pierce Biotechnology, IL, USA)로 단백질 정량 후 실험에 사용하였음. SDS가 포함된 10% polyacrylamide gel (PAGE)에 준비된 protein sample을 전기영동 (120 V, 2hr) 후 transfer buffer (0.25M Tris, 1.92M Glycine, pH 8.3-8.4)를 사용하여 PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)으로 단백질을 transfer (250 mA, 1시간

30분)하였음. TBS-T (200mM Tris, 1.37 NaCl, 0.05% Tween 20) 용액에 5% non fat milk를 녹여 30 분 blocking한 후, p-p65, p65, Lamin A, COX-2, NLRP3, pro-caspase1, cleaved-caspase 3 antibody를 4°C에서 incubation하였음. TBS-T로 10 분씩 3회 세척 후 HRP-conjugated된 이차 항체를 반응시키고 다시 TBS-T로 10분씩 3회 세척한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) 용액으로 반응 시켜 LAS-3000 (Fuji film, Japan)으로 확인하였음.

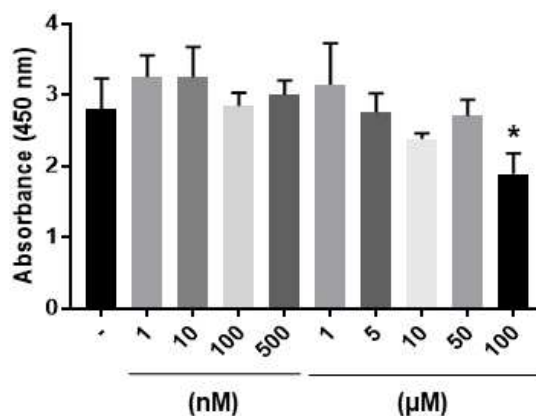
(5) 활성산소 (Reactive Oxygen species, ROS) 측정

- 고 삼투압에 의한 세포내에서의 활성산소 생성을 확인하고자 세포에 528mOsM 고 삼투압을 시간별 처리 후 활성산소를 측정할 수 있는 형광물질 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 10 μ M 처리하여 Fluorence 와 ELISA reader 을 통해 활성산소의 생성을 확인하였음.

라. in vitro 활성 및 작용기전 규명 결과

(1) 결막 상피세포에서 polydatin 세포독성 확인

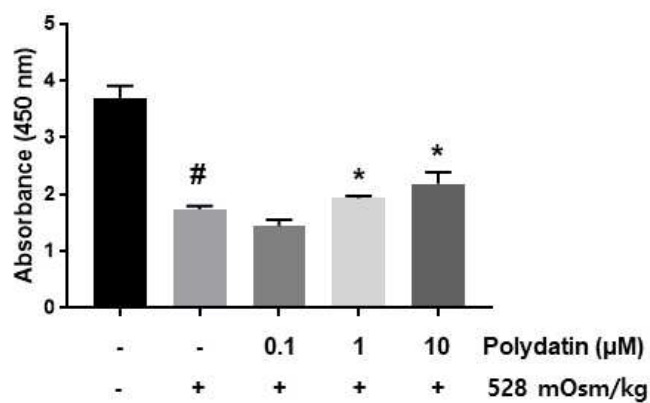
- polydatin (> 100 μ M)부터 세포 독성이 나타나 polydatin 의 농도를 0.1, 1, 10 μ M 으 로 설정 함.



<그림 85> 결막 상피세포에서 polydatin의 세포독성 확인

(2) 고 삼투압 유도된 결막 세포주[Human conjunctival cells (HCCs)]에서 polydatin의 세포 독성 효과 확인

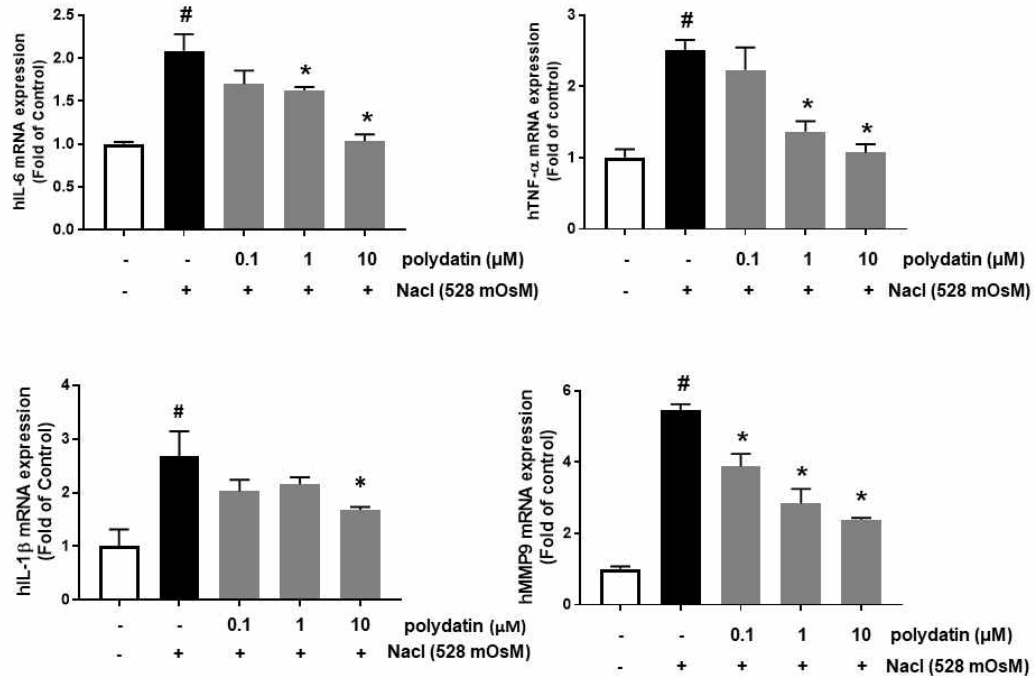
- 고 삼투압에 의해 결막세포주의 손상에서 polydatin의 효과를 확인하기 위해 NaCl (528 mOsm/kg) 과 polydatin 각 농도별로 (0.1, 1, 10 μ M) 24시간 동안 동시 처리 후, CCK-8 kit를 이용하여 세포 생존율을 확인함. 그 결과, 고 삼투압에 의한 세포 죽음은 polydatin 1, 10 μ M 군에서 유의적인 세포 생존율이 회복되고 삼투압에 의한 세포 사멸이 polydatin 10, 100 μ M에서 유의적으로 세포 생존율이 회복됨.



<그림 86> 고 삼투압 유도 세포독성에서 polydatin의 효과

(3) 고 삼투압에 의해 발현되는 염증성 사이토카인 mRNA 발현에서 polydatin의 효과

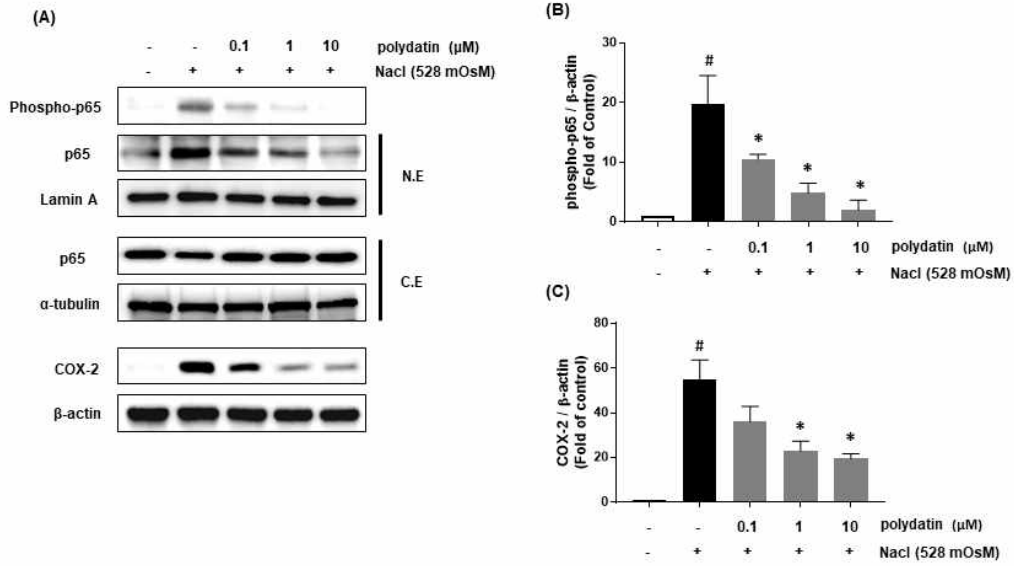
- 결막 세포주에 고 삼투압(528 mOsM) 를 24시간 처리 후 발현되는 염증성 사이토카인에서 polydatin 의 효과를 확인함. 고 삼투압에 의해 증가 되었던 IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-1 β 의 mRNA 발현은 polydatin의 농도 의존에 의해 유의적인 mRNA 발현 감소를 나타냄.



<그림 87> 고 삼투압에 의해 발현되는 염증성 사이토카인 mRNA 발현에서 polydatin의 효과

(4) 고 삼투압에 의한 발현된 염증성 단백질에서의 polydatin 의 효과

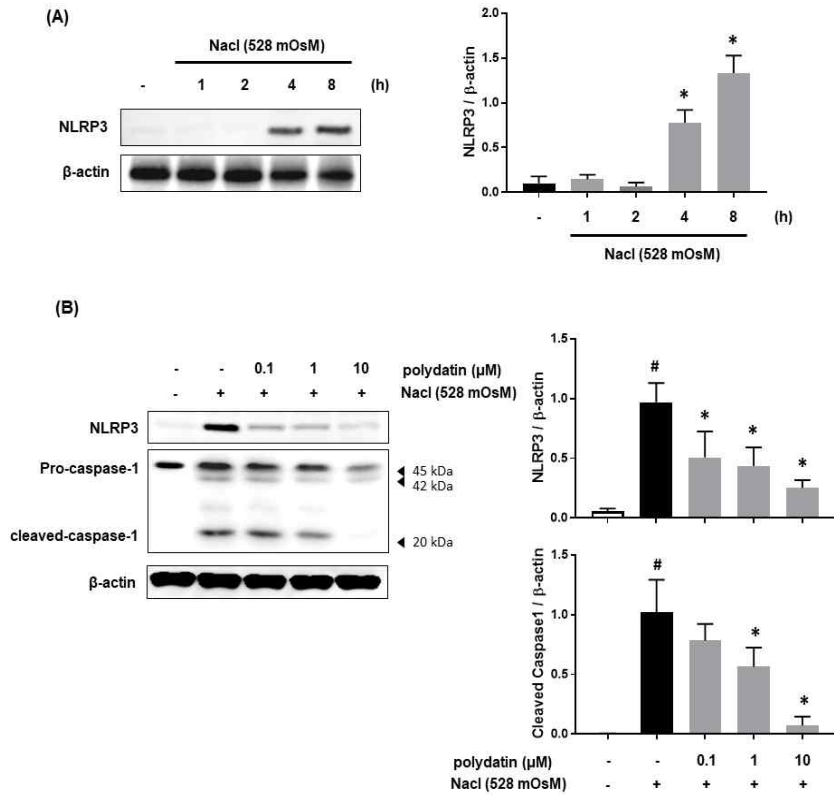
- 고 삼투압에 의해 염증성 단백질의 발현과정에서 polydatin 의 항염증 효과를 확인하기 위해 western blot를 통해 확인함. phospho-p65 는 고 삼투압에 의해 단백질 발현이 증가 되었지만, polydatin 의 농도 의존적으로 감소함을 확인 함. 또한 p65 단백질의 핵 내 이동을 확인하기 위해 핵과 세포질을 분리 하여 p65의 단백질 발현을 확인함. 고 삼투압에 의해 p65 의 단백질은 핵 내로 많이 이동한 반면, polydatin의 농도 의존적으로 p65의 핵 안으로의 이동이 감소함. 또한 COX-2 의 단백질 경우도, 고 삼투압에 의해 발현양이 증가 되었으나, polydatin의 농도 의존적으로 COX-2 단백질의 발현을 감소시킴.



<그림 88> 고 삼투압에 의해 발현되는 염증성 사이토카인 단백질 발현에서 polydatin의 효과

(5) 고 삼투압에 의한 inflammasome 형성에서 polydatin 의 효과

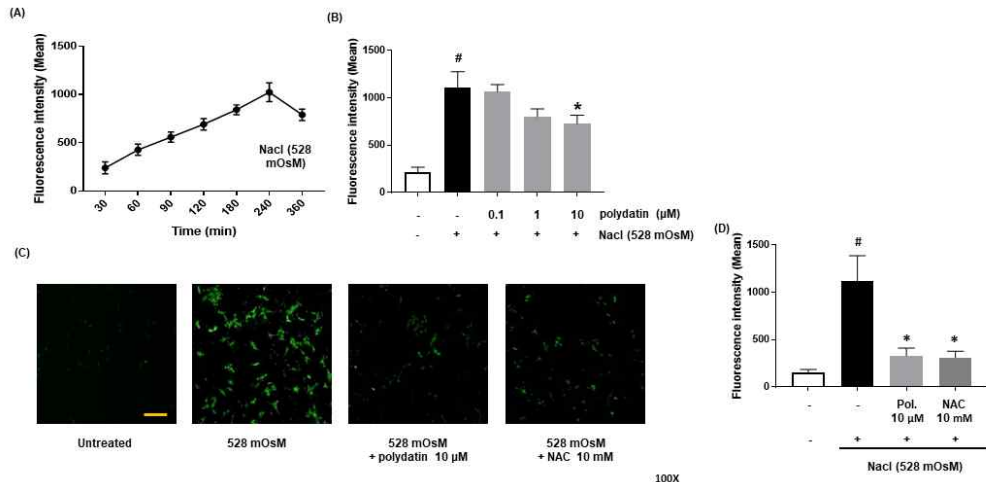
- 결막 세포주에서 고 삼투압 자극을 주었을 때 inflammasome 형성되는지를 확인하기 위해 시간별로 고 삼투압을 주었을 때, NLRP3 의 발현이 4시간일 때부터 증가 하는 것을 확인함. 그리고 결막세포주에 고 삼투압 8시간과 polydatin을 농도별로 처리 한 후 inflammasome 을 형성하는 단백질인 NLRP3와 Caspase-1 의 활성을 확인 한 결과 polydatin의 농도 의존적으로 NLRP3와 Caspase-1 의 활성을 유의적으로 억제 시키는 것을 확인함.



<그림 89> 고 삼투압에 의한 inflammasome 형성에서 polydatin 의 효과

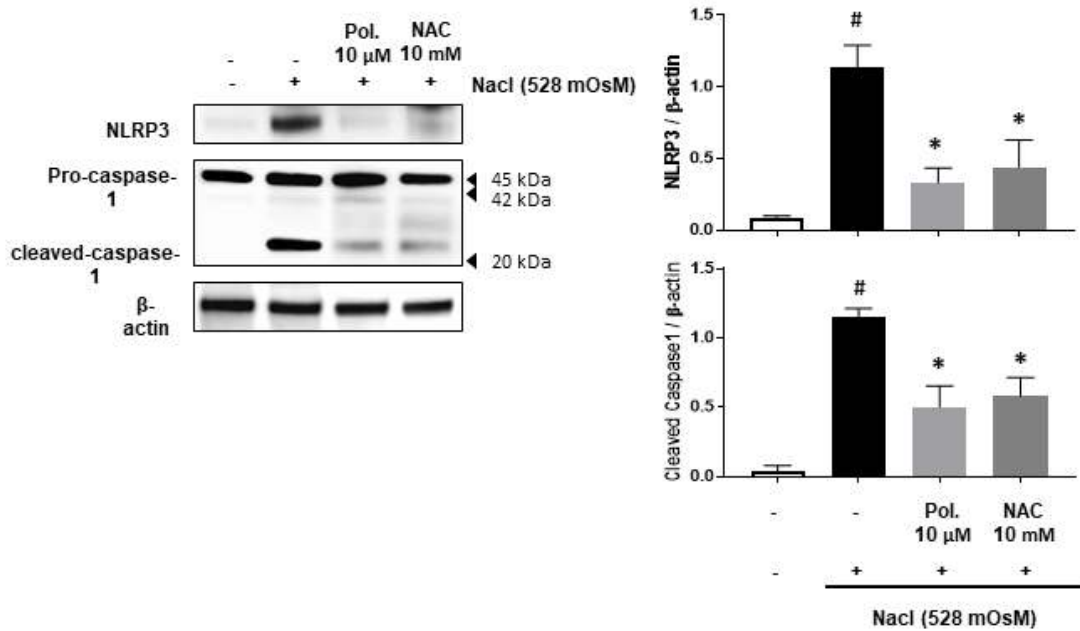
(6) 고 삼투압에 의한 산화적 스트레스 (intracellular oxidative stress)에서 polydatin 의 효과

- 결막 세포주에서 고 삼투압에 의해 세포내 산화적 스트레스가 발생하는지 확인하기 위해 고 삼투압 (528 mOsM)을 시간대 별(0~360 min) 로 처리 하였을 시 30분부터 ROS (reactive oxygen species) 가 발생하여 240분일 때 최고지점을 찍고 감소하는 경향을 나타냄. 그래서 240분에 고 삼투압과 polydatin을 처리 하고 ROS 의 발현을 확인한 결과, polydatin 10 μ M 에서 유의적으로 ROS를 억제시킴을 알 수 있었음. 또한 ROS specific inhibitor 인 NAC (N-acetyl-L-cysteine)과 polydatin을 처리 후 ROS 발현을 비교 실험한 결과 NAC 만큼이나 ROS를 감소시킴을 확인 함.



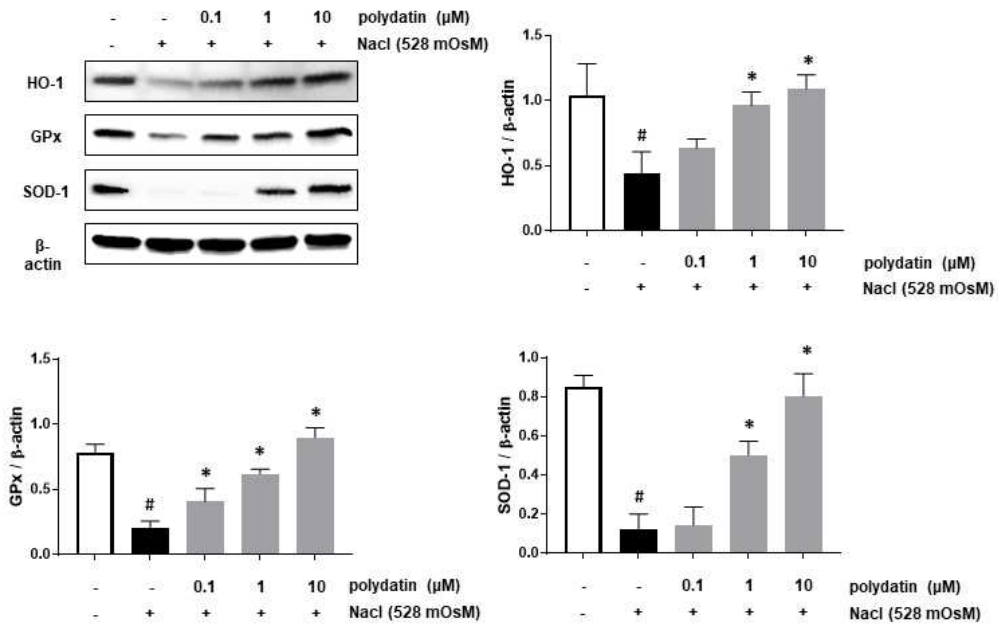
<그림 90> 고 삼투압에 의한 산화적 스트레스에서 polydatin의 효과

- Inflammasome을 다시 한 번 확인 한 결과, ROS specific inhibitor인 NAC과 polydatin 10 μ M 모두에서 유의적인 억제를 확인하였음.



<그림 91> 고 삼투압에 의한 산화적 스트레스에서 polydatin의 효과

- 마지막으로 polydatin의 항산화 효과를 재확인을 위해 항산화 단백질들의 발현을 확인한 결과, 고 삼투압에 의해 HO-1, GPx, SOD-1의 단백질 발현이 감소됨을 확인하였고, 반면 polydatin을 농도별로 처리한 결과, 농도 의존적으로 항산화 단백질들의 발현이 회복됨을 알 수 있었음.



<그림 92> 고 삼투압에 의한 산화적 스트레스에서 polydatin의 효과

5. 추가 후보소재의 눈건강 기능성 평가

가. 건성안 모델에서 사삼, 사삼+감초 추출물의 눈 건강 기능성 평가

(1) in vivo 유효성 평가 방법

(가)외과적 눈물샘 제거에 의한 건성안 모델 실험 디자인 및 제작

- 실험동물은 오리엔트(주) (성남, 대한민국)에서 구입 하고, 실험동물은 마취 후 옆면이 보이도록 놓은 후, 실험동물의 털을 알코올로 충분히 적셔 털을 정리함. 귀의 아래쪽에서부터 아래턱뼈 가지(Ramus of mandibule)를 따라 피부 절개를 시행한 후 피하조직을 들어 올려 눈물샘(Lacrimal gland)을 잡아 당겨 주위 조직과의 이음새 부분을 절개하여 제거함. 소독된 auto clip을 이용하여 눈물샘을 제거한 수술부위를 봉합함

후 포비돈을 이용하여 봉합부위를 소독함. 추출물의 투여는 외과적 눈물샘 제거 전 3일부터 눈물샘 제거 후 5일 총 8일간 경구 투여함.

그룹	약물농도
Normal	-
Dry eye	-
사삼	250 mg/kg/day
사삼+감초 (9:1)	250 mg/kg/day (225+25)



<그림 93> 외과적 눈물샘 제거 건성안 모델 및 추출물 처리 실험 프로토콜

(나) 눈물량 및 각막 불규칙성 분석

- 실험동물을 마취하고 각막 상피에 세극등 현미경(SZ51, Olympus, Tokyo, Japan)의 ring-shape light로 부터의 링 모양의 빛의 반사 선을 투사하고 반사 된 선을 DP21 디지털 카메라(Olympus, Tokyo, Japan) 촬영함. 각막 상피 불규칙성 점수는 반사 된 백색 링에서 왜곡 된 사분면의 수에 따라 등급을 나눔.

<표 38> 각막 상피 불규칙성 점수

점수	판단 기준	점수	판단 기준
0 등급	왜곡 없음	3 등급	3개 사분면의 왜곡
1 등급	1개 사분면의 왜곡	4 등급	모든 사분면의 왜곡
2 등급	2개 사분면의 왜곡	5 등급	링이 인식되지 않는 심한 왜곡

(다) 각막 건조 손상 분석

- 눈물샘을 제거하여 안구건조증을 유발한 랫(rat)을 마취하고 각막에 상피에 0.3% Lissamine Green B 염색시약을 처리 후 DP21 디지털 카메라(Olympus, Tokyo, Japan) 촬영함. 각막 손상 점수는 각막에 염색된 점의 정도에 따라 등급이 나눔.

<표 39> 각막 손상도 점수

점수	염색정도	판단 기준	점수	염색정도	판단 기준
0 등급		손상없음	3 등급		2 등급 보다 심한 손상 정도
1 등급		약간의 손상 정도	4 등급		3 등급 보다 심한 손상 정도
2 등급		1등급 보다 심한 손상 정도	5 등급	> 4등급	매우 심한 손상 정도

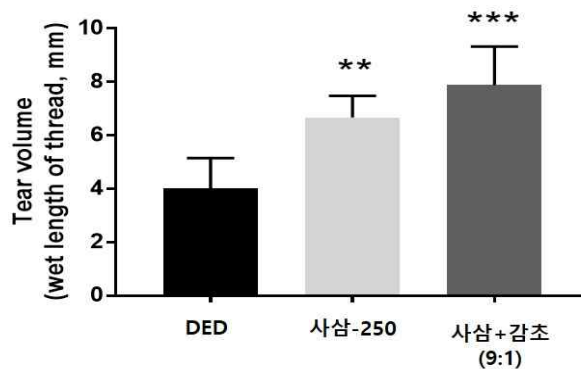
(라) 눈물막 변형분석

- 실험동물을 마취하고 0.1% fluorescein sodium fluorescein staining solution 을 동물의 눈에 직접 넣은 후 cobalt blue lights를 비춰 눈물막 의 깨짐 정도를 시간으로 측정하여 눈물막의 깨짐 정도를 측정함.

(2) in vivo 유효성 평가 결과

(가) 건성안 모델에서 눈물 분비량에 대한 사삼, 사삼+감초 추출물 효과

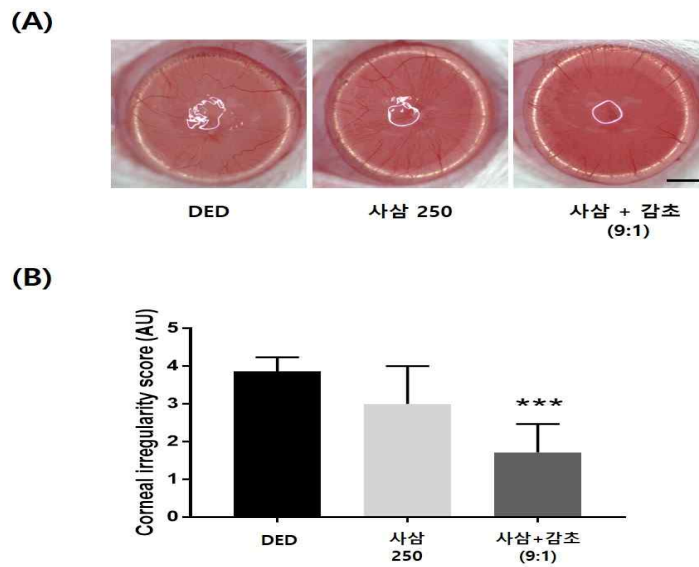
- 외과적 수술로 눈물샘을 제거한 후, 사삼, 사삼+감초 추출물을 경구 투여 함. 실험동물을 마취하고 Phenol Red Thread를 실험동물 양쪽 안구 외안각 하안검에 대고 1분간 방치하였을 때, 외과적 수술에 의하여 눈물 분비량을 유의성 있게 줄어들었으며, 사삼, 사삼+감초 추출물에 의하여 유의적으로 증가 함.



<그림 94> 눈물 분비량 감소에 대한 사삼, 사삼+감초 추출물의 효과

(나) 건성안 모델에서 각막의 형태 변화 및 손상에 대한 사삼, 사삼+감초 추출물 효과

- 각막 상피 불규칙성 점수는 반사 된 백색링에서 왜곡 된 사분면의 수에 따라 등급이 나뉨. 외과적 수술로 인한 각막의 형태 변화가 사삼+감초 추출물에 의해 유의적으로 회복되는 것을 관찰 함.
- 각막의 손상도는 5등급으로 나눌 수 있으며, 외과적 수술로 인한 각막의 손상정도가 심하게 관찰 되었고, 사삼, 사삼+감초 추출물에 의해 유의적으로 회복되는 것을 관찰 함.

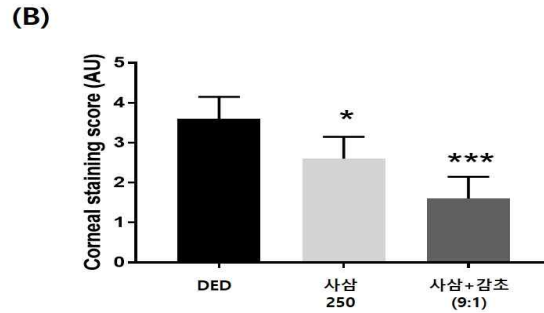
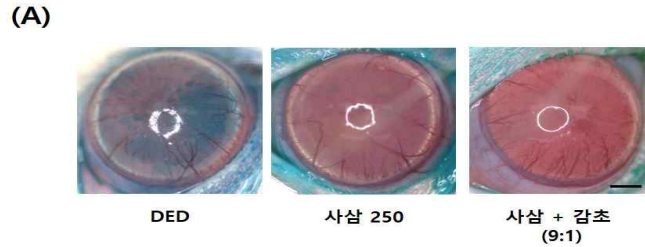


사삼+감초 (9:1) = 사삼 225+감초 25 mg/kg

<그림 95> 각막 형태 변화에 대한 사삼, 사삼+감초 추출물의 효과

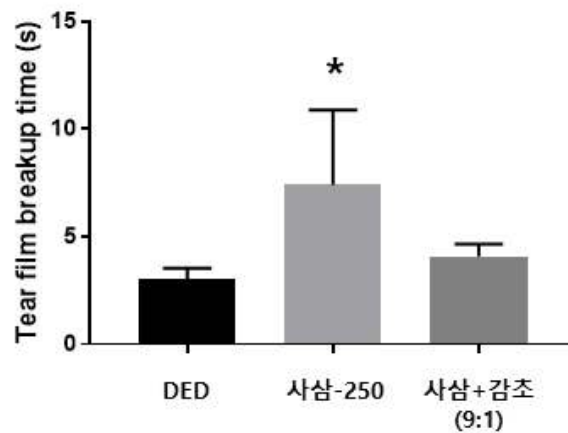
(다) 건성안 모델에서 눈물막 변형에 대한 사삼, 사삼+감초 추출물 효과

- 건성안 모델에서는 눈물막 깨지는 시간이 짧은 반면, 사삼 추출물 군에서는 눈물막 깨지는 시간이 유의적으로 지연 됨.



사삼+감초 (9:1) = 사삼 225+감초 25 mg/kg

<그림 96> 각막 손상에 대한 사삼, 사삼+감초 추출물의 효과



<그림 97> 눈물 막 손상에 대한 사삼, 사삼+감초 추출물의 효과

(3) in vitro 활성 및 작용기전 규명 방법

(가) 세포 처리 및 cell viability assay

- 고 삼투압에 의해 결막상피세포의 손상에서 10종류의 약용작물 추출물의 효과를 확인하기 위해 NaCl (528mOsm/kg) 와 각 10종 추출물 각 농도별로 (1, 10, 100 μ g/mL) 24시간 동안 동시 처리 후, CCK-8 kit를 이용하여 세포 생존율을 확인 함.

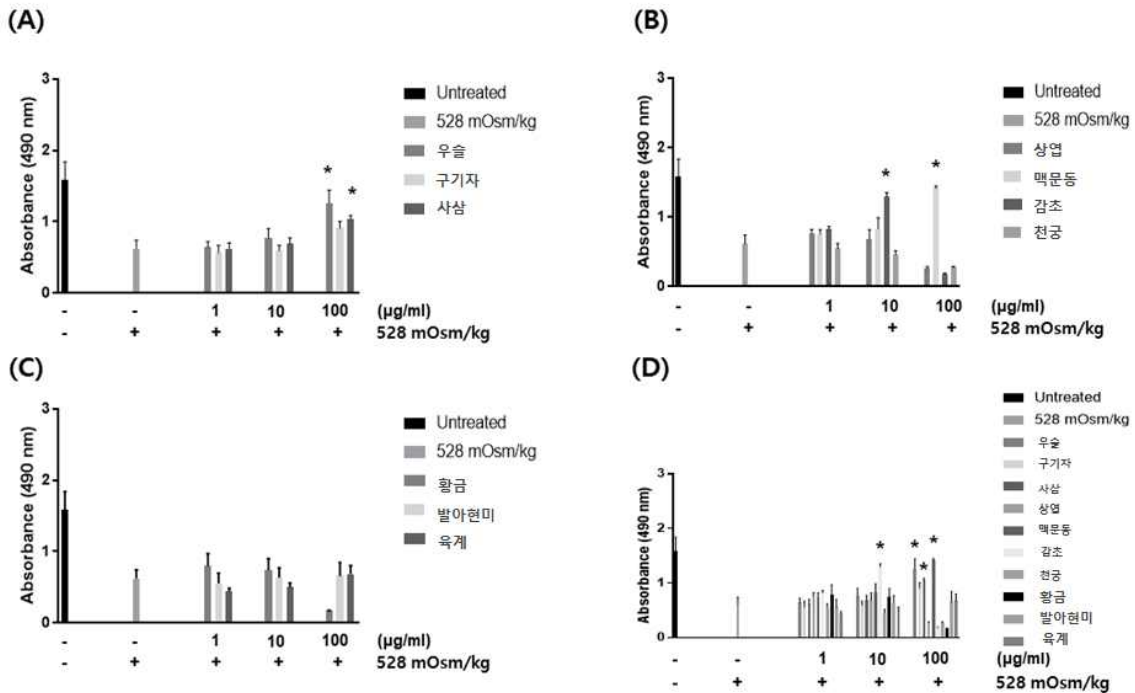
(나) 고 삼투압을 유발한 결막상피세포에서 사삼추출물을 처리 후 mRNA 발현양 측정

- 결막상피세포에 사삼추출물과 NaCl(528 mOsm/kg)를 24시간 처리 후 얻은 mRNA에서 염증성 인자의 발현과 Mucin4와 MMP9의 발현을 확인함.

(4) in vitro 활성 및 작용기전 규명 결과

(가) 10종 약용작물 추출물의 고 삼투압 유도 세포독성에 대한 효과

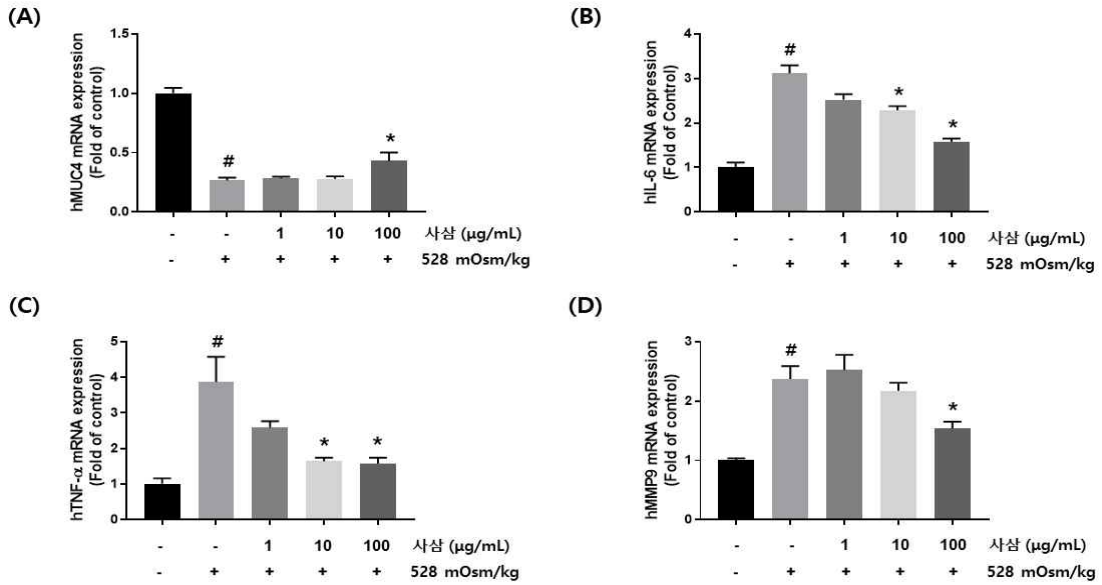
- 고 삼투압에 의한 세포 사멸은 우슬, 사삼, 맥문동, 감초 처리군에서 세포 생존율이 유의적으로 회복 됨.



<그림 98> 고 삼투압 유도된 결막상피 세포에서 10종류의 약용작물 추출물의 효과

(나) 고삼투압 유도 결막상피세포 손상에서 사삼추출물의 세포독성에 대한 효과

- 결막상피세포에 사삼추출물과 NaCl(528 mOsm/kg)를 24시간 처리 후 얻은 mRNA에서 염증성 인자의 발현과 Mucin4와 MMP9의 발현을 확인 함. Mucin4의 mRNA 발현은 고 삼투압 유발 군에서 유의적으로 감소한 반면, 사삼추출물 (100µg/mL) 에서는 고 삼투압군에 비교해 유의적인 회복을 보임. 그러나, 고 삼투압 의해 증가된 염증성 인자 (IL-6, TNF-α) 와 MMP9는 사삼추출물 처리군에서 농도 의존적으로 감소됨.



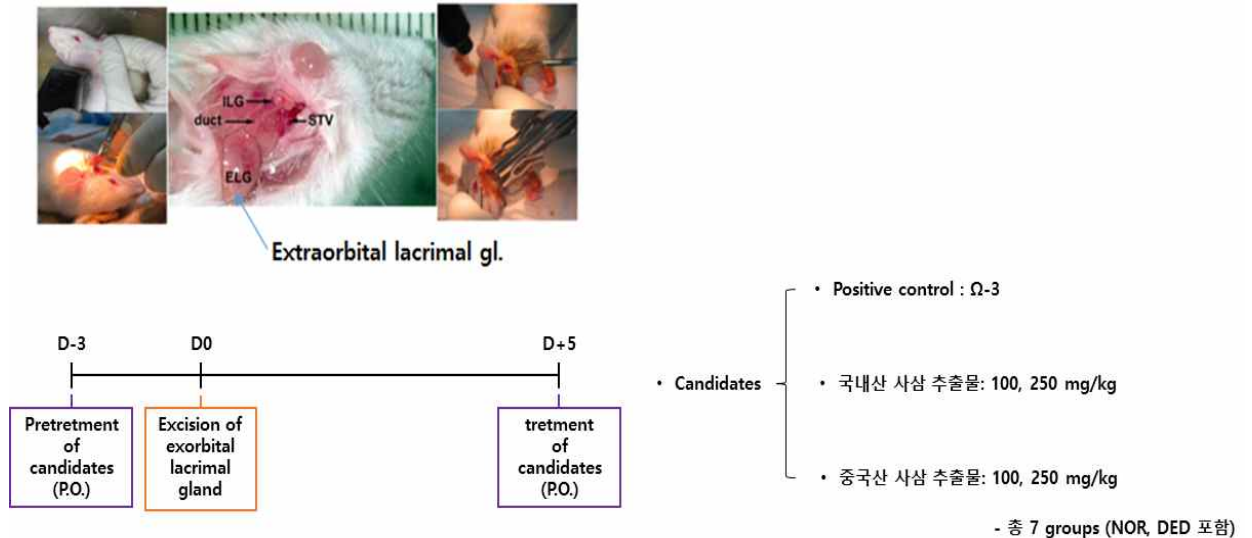
<그림 99> 고 삼투압이 유도된 결막상피세포에서 사삼추출물의 효과

나. 한국산 또는 중국산 사삼추출물의 눈 건강 기능성 평가

(1) in vivo 유효성 평가 방법

(가) 외과적 눈물샘 제거에 의한 건성안 모델 실험 디자인 및 제작

- 실험동물은 오리엔트(주) (성남, 대한민국)에서 구입 하였으며 실험진행은 그림 51과 같음. 실험동물은 마취 후 옆면이 보이도록 놓은 후, 실험동물의 털을 알코올로 충분히 적셔 털을 정리하였고, 귀의 아래 가 쪽에서부터 아래턱뼈 가지(Ramus of mandibule)를 따라 피부 절개를 시행한 후 피하조직을 들어 올려 눈물샘(Lacrimal gland)을 잡아 당겨 주위 조직과의 이음새 부분을 절개하여 제거함. 소독된 auto clip 을 이용하여 눈물샘을 제거한 수술부위를 봉합한 후 포비돈을 이용하여 봉합부위를 소독함. 추출물 투여는 외과적 눈물샘 제거 전 3일부터 눈물샘 제거 후 5일 총 8일간 경구 투여함.



<그림 100> 외과적 눈물샘 제거 건성안 모델 및 추출물 처리 실험 프로토콜

(2) 눈물량 및 각막 불규칙성 분석

- 눈물 분비량은 페놀-레드 thread 눈물량 검사지(FCI Ophthalmics Zone Quick, Japan)를 이용하여 눈꺼풀 외측 끝 부위 안구표면에 접촉시킨 후 30초 후 눈물에 의해 검사지의 색이 변한 길이를 측정하여 눈물 분비량을 측정하였음. 각막의 불규칙성은 ring type light illuminator를 각막에 비춰 반사되는 형태를 촬영한 후 ring type 조명의 각막건조 손상에 의해 찌그러지는 정도를 평가하여 분석하였음.

(3) 각막 건조 손상 분석

- 눈물샘을 제거하여 안구건조증을 유발한 랫(rat)을 마취하고 각막에 상피에 0.3% Lissamine Green B 염색시약을 처리 후 DP21 디지털 카메라(Olympus, Tokyo, Japan) 촬영함. 각막 손상 점수는 각막에 염색된 점의 정도에 따라 등급이 나눔.

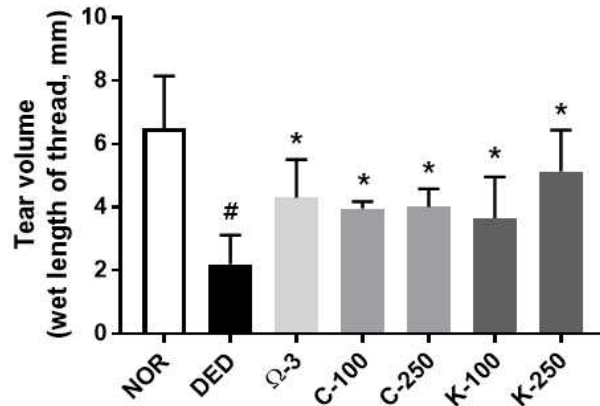
(4) Real-Time PCR

- Total RNA를 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출한 후 cDNA 는 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 합성하였음. 이후 real-time PCR은 iQ5 Continuous Fluorescence Detector System (Bio-Rad, CA, USA) 장비에서 2xSYBR Green PCR Master Mix (SYBR Premix Ex Taq TM, TaKaRa, Tokyo, Japan)를 이용하여 실시하였음.

나. in vivo 유효성 평가 결과

(1) 눈물 분비량 감소에 대한 한국 또는 중국의 사삼추출물의 효과

- 한국산 또는 중국산의 사삼 추출물을 경구 투여함. 실험동물을 마취하고 Phenol Red Thread를 실험동물 양쪽 안구 외안각 하안검에 대고 1분간 방치하였을 때, 외과적 수술에 의하여 눈물 분비량을 유의성 있게 줄어들었으며, 중국산(C)/한국산(K) 사삼 추출물에 의하여 유의적으로 증가함.



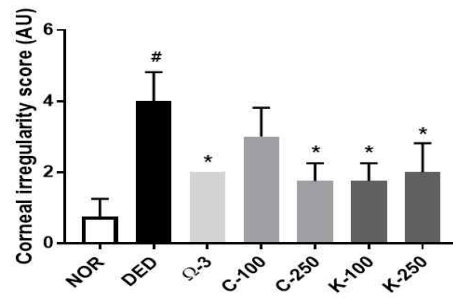
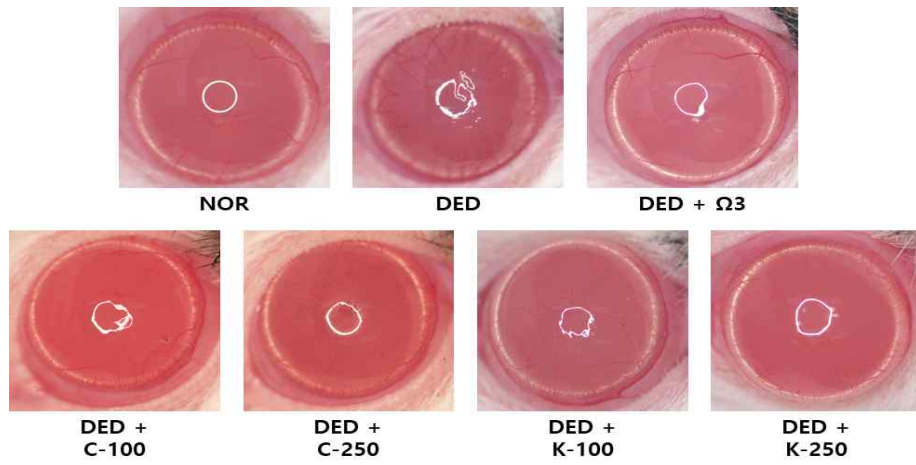
<그림 101> 눈물 분비량 감소에 대한 한국 또는 중국 사삼추출물의 효과

(2) 각막 형태 변화에 대한 한국 또는 중국 사삼추출물의 효과

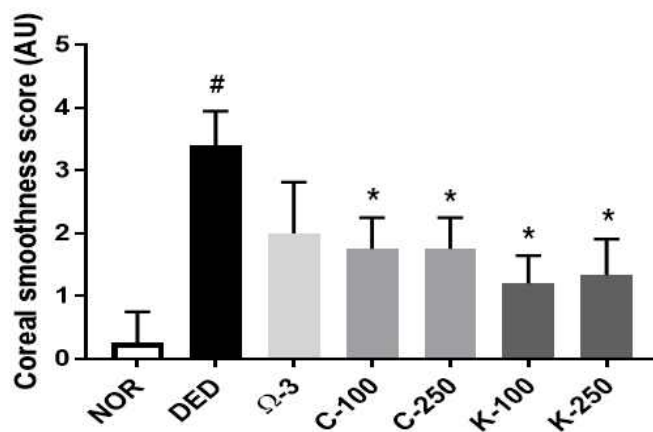
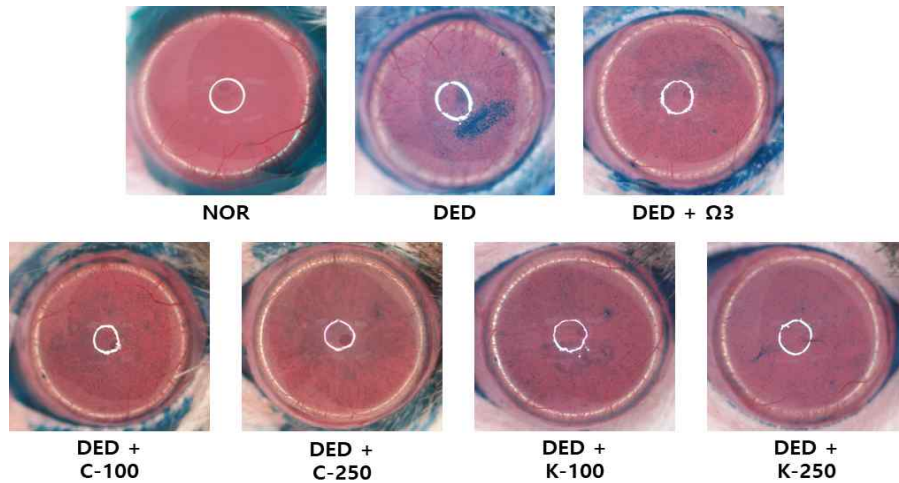
- 외과적 수술로 인한 각막의 형태 변화가 중국산 사삼 추출물 250mg/kg, 한국산 사삼 추출물 100, 250mg/kg 에 의하여 회복되는 것을 관찰함.

(3) 각막 손상에 대한 한국산 또는 중국산 사삼추출물의 효과

- 외과적 수술로 인한 각막의 손상은 한국산 또는 중국산 사삼추출물 두 농도(100, 250 mg/kg) 모두에 의해 회복되는 것을 관찰함.



<그림 102> 각막 형태 변화에 대한 한국 또는 중국 사삼추출물의 효과



<그림 103> 각막 손상에 대한 중국산 또는 한국산 사삼추출물의 효과

다. in vitro 활성 및 작용기전 규명 방법

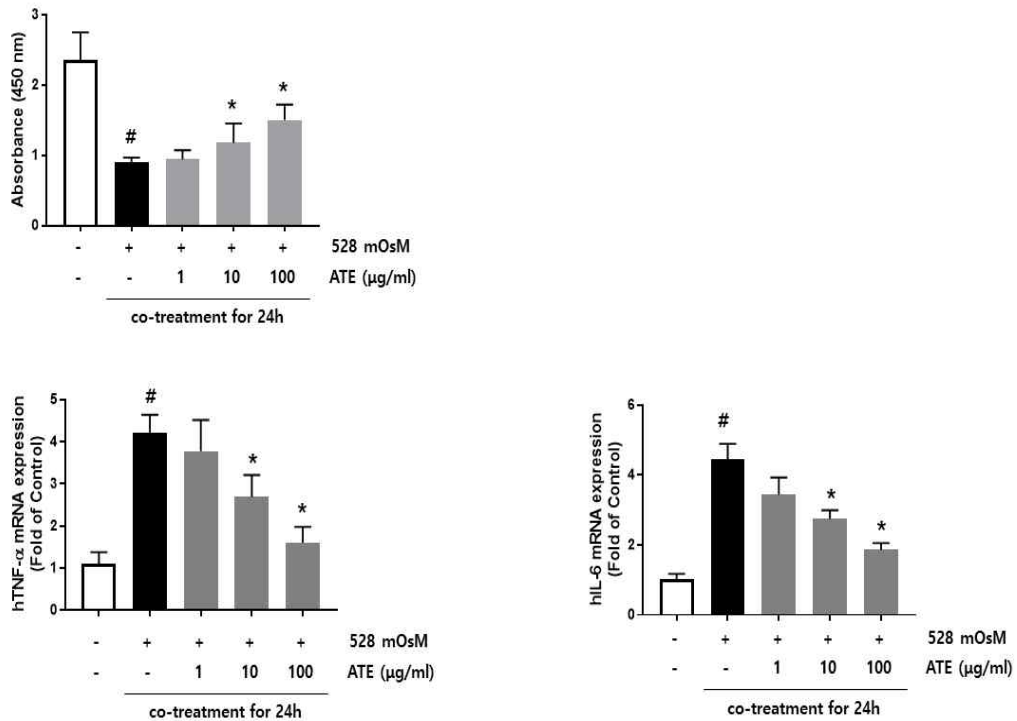
(1) 세포 배양 및 cell viability assay

- 사람의 결막 상피 세포(Human conjunctival epithelial cell American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 10% FBS 가 포함된 RPMI 배지에 계대 배양 하였음. Cell viability는 MTS assay kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였음. 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 seeding한 후 세포가 2×10^5 cells/well 정도 되었을 때 시험물질을 처리하였고, 24시간 후에 cell viability를 측정하였음.

라. in vitro 활성 및 작용기전 규명 결과

(1) 고 삼투압 유도된 결막 세포주[Human conjunctival cells (HCCs)] 에서 국내산 사삼 추출물(ATE)의 효과 확인

- 고 삼투압에 의해 결막세포주의 손상에서 사삼추출물의 효과를 확인하기 위해 NaCl (528 mOsm/kg) 과 사삼추출물 각 농도별로 (1, 10, 100 μ g/mL) 24시간 동안 동시 처리 후, CCK-8 kit를 이용하여 세포 생존율을 확인함. 그 결과, 고 삼투압에 의한 세포 죽음은 ATE 10, 100 μ g/mL 군에서 유의적인 세포 생존율이 회복됨. 그리고 고 삼투압(528 mOsM)을 24시간 처리 후 발현되는 염증성 싸이토카인에서 사삼추출물의 효과를 확인함. 고 삼투압에 의해 증가 되었던 IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현은 사삼추출물의 농도 의존에 의해 유의적인 mRNA 발현 감소를 나타냄.



<그림 104> 고 삼투압에 의해 자극된 결막 세포주의 세포 생존율과 염증성 싸이토카인 mRNA 발현에서 사삼추출물의 효과

제 3 절 제형 연구 및 시제품 제작

1. 제형 연구

가. 점안제

- 주성분(호장근)의 특성에 적합한 가용화제 선정을 위해 Castor oil 또는 Kolliphor H15s를 넣어 3종의 후보제품 제작함

(1) 원료약품 및 분량

<표 40> 호장근 추출물 점안제 함량 및 분량

배합목적	원료명	SA1	SA2	SA3	비고
		mg/mL	mg/mL	mg/mL	
주성분	호장근	0.5	0.5	0.5	
안정화제	에데트산나트륨수화물	-	-	-	
등장화제	염화나트륨	-	-	-	삼투압 : 290 mOsm
완충제	붕산	-	-	-	
가용화제	폴리소르베이트80	-	-	-	
가용화제	Castor oil 40 hydrogenated Castor oil	-	-	-	
가용화제	Kolliphor H15S	-	-	-	
보존제	Benzalkonium chloride solution (10%)	-	-	-	
pH 조절제	Hydrochloric acid	-	-	-	
pH 조절제	Sodium Hydroxide	-	-	-	
용제	주사용수	-	-	-	

(2) 제조공정

<표 41> 호장근 추출물 점안제 제조공정

공정번호	공정명칭	원료·시약·용매 등
1	부원료 용해	염화나트륨, 붕산, 에데트산나트륨수화물
2	가용화제 용해	폴리소르베이트80 또는 Castor oil 또는 Kolliphor H15s
3	주성분 용해	호장근
4	보존제 용해	벤잘코늄염화물액 10%
5	pH 조정	염산 및 수산화나트륨
6	여과	0.22 μ m 필터 여과
7	충전	용기 충전



혼합



충전



후보 제품

<그림 42> 호장근 추출물 점안제 연구 과정 및 제품

나. 경질캡슐

(1) 원료약품 및 분량

<표 43> 호장근 추출물 캡슐 함량 및 분량

함량기준	배합목적	성분명	분량	단위	비고
------	------	-----	----	----	----

호장근 1캡슐 중 (320.0mg)	주성분	호장근	200	밀리그램	
		미결정셀룰로오스 102	-	밀리그램	
		카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	-	밀리그램	
		스테아르산마그네슘	-	밀리그램	

(2) 제조방법: 대한민국약전 제제총칙 중 캡슐항에 준하여 제조함.

<표 44> 호장근 추출물 캡슐 제조공정

공정 번호	공정명칭	원료 · 시약 · 용매 등	비고
1	원료칭량	주 성 분 호장근 부 형 제 미결정셀룰로오스 102 붕 해 제 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘 활 택 제 스테아르산마그네슘	
2	혼 합	주 성 분 호장근 부 형 제 미결정셀룰로오스 102 붕 해 제 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	
3	최종혼합	공정 2의 혼합물 활 택 제 스테아르산마그네슘	
4	충 전	공정 3의 최종혼합물	
5	포 장	공정 4의 반제품	용기재질: HDPE, Alu/Alu, PVDC, PVC



<그림 105> 호장근 추출물 캡슐연구 제품

다. 정제(tablet)

(1) 주성분 500mg/정 원료약품 및 분량

구분	성분명	합량(mg)
주성분	호장근추출물	500
부형제	덱스트린	-
	결정셀룰로오스	-
	유당95	-
	HPMC	-
	스테아린산마그네슘	-
	이산화티타늄	-
	카라멜색소858	-
	미바셋-액상	-
총합		700

(2) 주성분 250mg/정 원료약품 및 분량

구분	성분명	합량(mg)
주성분	호장근추출물	250
부형제	덱스트린	-
	결정셀룰로오스	-
	유당95	-
	HPMC	-
	스테아린산마그네슘	-
	이산화티타늄	-
	카라멜색소858	-
	미바셋-액상	-
총합		700



타정



나정



제품(코팅정)

<그림 106> 호장근 추출물 정제 연구 과정 및 제품



개선 전



개선 후

<그림 107> 정제 제제 개선

라. 연구결과

- 호장근 추출물을 포함한 제품 개발을 위해 후보 제형으로 점안제, 경질캡슐, 정제에 대한 제형 검토를 실시함.
- 결과, 원료의 특성, 편의성 및 안정성을 고려하여 타원형 정제 및 캡슐을 최종 제형으로 선정함.

2. 시제품 안정성 시험

가. 시제품 안정성시험 개요

- (1) 시험품(제품명): 비타마스아이
- (2) 시험기준: 안정성시험, 자사 기준
- (3) 시험조건: 4℃, 20℃, 40±2℃, 75±5%RH
- (4) 시험기간: 2019. 11. 18. ~ 2020. 2. 18.

나. 성상: 관능검사를 통한 정제의 형태 및 색상 변화 확인

(1) 지표성분 분석 방법

- 표준액 제조

Polydatin(LKT Laboratories, P-5845), Rutin(Wako, 184-03131)을 각각 4mg씩 정확히 취해 10mL 용량플라스크에 넣고 메탄올 5mL을 넣어 용해 후 정제수로 표선을 맞춘다.

- 검액 제조

정제를 원료100mg에 해당되는 양을 정확히 취해 10mL 용량플라스크에 넣고 메탄올 5mL을 넣어 20분간 초음파 진탕 시킨 후 정제수로 표선을 맞춘다. 표준액과 시험용액은 0.45 μm filter로 여과한 후 분석에 사용함.

- 시스템 적합성

표준액 2uL를 가지고 위의 조건으로 시험을 6회 반복할 때 Polydatin과 Rutin의 피크면적 상대표준편차는 2.0% 이하임. 시스템적합성 용액 2uL를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 Polydatin과 Rutin의 피크간 분리도는 1.3 이상임.

- 표준액 제조

표준액 및 검액을 가지고 다음의 조건으로 대한민국약전 일반시험법 중 액체크로마토그래프법에 따라 시험함.

- 함량계산

$$\text{Polydatin(\%)} = \frac{\text{검액의 피크면적}}{\text{표준액 피크 면적}} \times \frac{\text{표준액의 농도}}{\text{검액의 농도}}$$

*각 농도는 표준액의 순도(%)를 포함함.

라. 수분

(1) 시험방법

- 정제를 분쇄하여 수분 측정기기에 넣고 105℃에서 10분간 건조하여 수분측정 실시함.

마. 봉해시험

(1) 시험방법

- 식품 및 식품첨가물공전 제8. 일반시험법 1. 식품일반시험법 1.6 봉해시험법에 따라 수행함.

(2) 시험결과

- 性状: 이미, 이취, 이물이 없는 갈색의 타원형 정제로서 변화 없음.
- 지표물질: 80.0~120%로 적합함.
- 수분: 10%이하로 적합함.
- 봉해도: 30분 이내로 적합함.

호장근 추출물 250mg								
조건 기간	기준 및 규격	제조시	4℃		실온(20℃)		40±2℃,75±5%RH	
시험항목		-	30일	60일	30일	60일	30일	60일
지표물질 (%)	0.052 ~0.078	0.065	0.065	0.066	0.063	0.066	0.064	0.064

성상	갈색의 타원형 정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
수분(%)	10이하	3.72	3.20	3.46	3.66	3.89	4.64	4.70
붕해(분)	30분 이내	27	23	27	27	26	27	25

호장근 추출물 500mg								
조건 기간	기준 및 규격	제조시	4℃		실온(20℃)		40±2℃,75±5%RH	
시험항목		-	30일	60일	30일	60일	30일	60일
지표물질 (%)	0.0048 ~0.072	0.06	0.054	0.056	0.053	0.053	0.053	0.056
성상	갈색의 타원형 정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
수분(%)	10이하	3.63	3.66	3.87	3.79	3.90	4.44	4.64
붕해(분)	30분 이내	29	27	26	28	28	27	28

3. 생산 공정 확인을 위한 시제품 제작

가. 연질캡슐 시제품 제작(파인케어 아이)

(1) 제품의 특성

- 제품유형: 건강기능식품
- 성상: 적색의 내용물을 함유한 갈색의 연질캡슐
- 사용원료: 호장근의 줄기 추출물 및 눈건강 기능성 원료
- 원료 제조·가공 공정: 호장근 줄기 → 건조 → 열수추출 → 여과 → 농축 → 건조
- 포장재질, 포장 방법, 포장단위:

• 포장재질: PTP

• 포장방법 및 단위: PTP 및 지합, 600mg × 30 캡슐 × 2개

-보존 및 유통온도: 실온(직사광선을 피함)

(2) 원료

원 료 명
루테인
코엔자임Q10
베타카로틴30%오일
D-알파토코페롤
산화아연
비타민A(retinol)Oil
포도씨유-1
호장근추출물(텍스트린50%, 무상사급)
밀납
대두레시틴

(3) 제조 공정

공정명	공정 내용	결과
조제	피막조제	소분된 원료를 점검 후 젤라틴 조제탱크에서 교반 및 용해 피막 조제 탱크에서 피막 점도 조성
	내용물 조제	왁스 혼합물 조제 내용물을 교반하면서 작업
	수율정산	캡셀에 대한 확인이 끝나면 수율계산(목표수율: 99.0%)
성형	성형	성형기에 내용물을 넣고 성형, 충전
	건조	성형완료 후 건조기에서 24~48시간 건조
	선별	건조완료 후 선별하여 수량 파악
	수율정산	캡셀에 대한 확인이 끝나면 수율계산(목표수율: 98.0%)
포장	인쇄	케이스에 인쇄된 사항을 제조지시서와 대조 확인

	PTP 포장	충전호퍼에 캡셀을 투입하고 포장
	수율정산	완제품에 대한 수율 계산(목표수율 97.5%)

(4) 주요 원료 적합성 평가

항목	시험 내용	시험 기준	시험 결과
호장근추출물	성상	고유의 성상과 색택을 가지며 이물, 이취가 없어야 함	적합
	이물	이물이 없어야 함	적합
	대장균군	음성	음성
코엔자임Q10	성상	고유의 성상과 색택을 가지며 이물, 이취가 없어야 함	적합
	이물	이물이 없어야 함	적합
	대장균군	음성	적합
	코엔자임Q10	98~101%	99.6%
루테인	성상	점황색의 점성이 있는 오일상의 액체	적합
	이물	이물이 없어야 함	적합
	대장균	음성	음성
	납(mg/kg)	1.0이하	불검출
	카드뮴(mg/kg)	1.0이하	불검출
	총수은(mg/kg)	1.0이하	불검출
	총비소(mg/kg)	1.0이하	불검출
	헥산(mg/kg)	5.0이하	0.44
루테인(mg/g)	20.0% 이상	205.81mg(20.58%)	

나. 정제 시제품 제작(비타민스아이)

(1) 제품의 특성

- 제품유형: 건강기능식품
- 성상: 흑갈색의 내용물을 함유한 흑갈색의 타원형 정제
- 사용원료: 호장근의 줄기 추출물 및 눈건강 기능성 원료
- 원료 제조·가공 공정: 호장근 줄기 → 건조 → 열수추출 → 여과 → 농축 → 건조
- 포장재질, 포장 방법, 포장단위:
 - 포장재질: HDPE
 - 포장방법 및 단위: 500mg × 30정 × 2개
- 보존 및 유통온도: 실온(직사광선을 피함)



<그림 113> 호장근 추출물 포함 눈건강
기능식품 비타민스아이 시제품



<그림 114> 비타민스아이 정제

제 4 절 안전성 평가

1. 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물 GLP 독성시험

가. 유전독성시험

(1) 염색체이상시험

(가) 시험제목: 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물의 Chinese Hamster Lung(CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험

(나) 시험목적

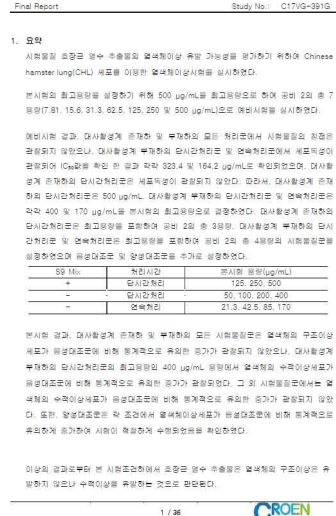
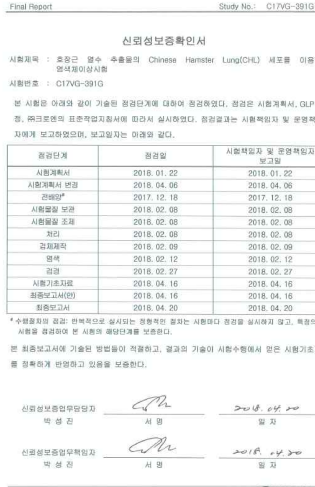
- 본시험은 시험물질 호장근 줄기+잎 열수 추출물을 포유동물 세포주인 Chinese Hamster Lung(CHL) 세포에 노출시켜 염색체의 구조 및 수적이상을 측정함으로써 유전독성을 평가

(다) 시험방법

- 본 염색체 이상시험에 HCL세포를 이용하여 예비시험을 통해 시험 최고용량을 설정하고, 본시험을 통해 대사활성계 존재하 및 부재하에서 염색체 구조이상 및 수적이상을 판단함. 양성대조물은 고시 및 가이드라인으로 제시된 Mitomycin(MMC), Benzo[a]pyrene(B[a]P)을 사용함

(라) 시험결과

- 예비시험 결과, 대사활성계 존재하 및 부재하 모든 처리군에서 시험물질의 침전은 관찰되지 않으나 대사활성계 부재하의 단시간처리군 및 연속처리군에서 세포독성이 관찰되어 IC50값이 각각 323.4 및 164.2 μ g/mL로 확인.
- 본시험 결과, 대사활성계 존재하 및 부재하의 모든 시험물질군은 염색체 구조이상 세포가 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가가 관찰되지 않았으나, 대사활성계 부재하의 단시간 처리군의 최고용량인 400 μ g/mL 용량에서 염색체의 수적이상세포가 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가가 관찰됨.
- 그 외 시험물질군에서 염색체의 수적이상세포가 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가가 관찰되지 않음. 이상의 결과로, 호장근 줄기+잎 열수 추출물은 염색체의 구조이상은 유발하지 않으나 수적이상을 유발하는 것으로 판단됨.



<그림 115> 염색체이상시험 최종 보고서

(2) 복귀돌연변이

(가) 시험제목: 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물의 박테리아 균주를 이용한 복귀 돌연변이 시험

(나) 시험목적

- 본 시험은 시험물질 호장근 줄기+잎 열수 추출물의 히스티딘 요구성 시험균주 (Salmonella typhimurium)와 트리토판 요구성 시험균주(Escherichia coli)을 이용하여 유전독성 여부를 평가함.

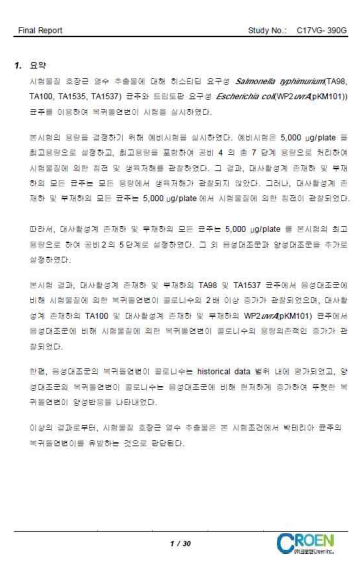
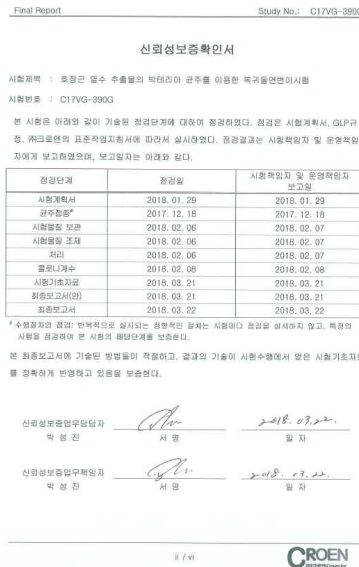
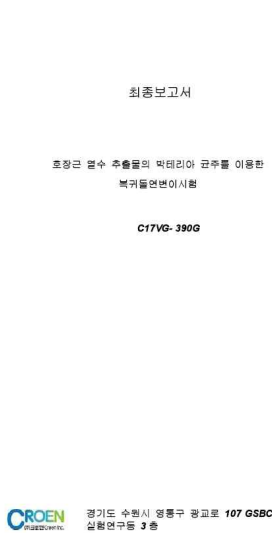
(다) 시험방법

- Salmonella typhimurium와 Escherichia coli를 이용하여 5000µg/plate를 최고 용량으로 하여 시험물질에 의한 침전 및 생육저해 예비시험을 실시하고, 이를 바탕으로 음성 대조군과 양성대조군을 추가하여 복귀돌연변이를 판단함. 양성대조물은 고시 및 가이드라인으로 제시된 2-Nitrofluorene, 2-Aminoanthracene, Benzo[a]pyrene(B[a]P), 9-Aminoacridine, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide 을 사용함.

(라) 시험결과

- 예비시험 결과, 대사활성계 존재하 및 부재하의 모든 균주는 5000µg/plate에서 시험 물질에 의한 침전이 관찰됨
- 본시험 결과, 대사활성계 존재하 및 부재하의 TA98 및 TA137 균주에서 음성대조군 대비해 시험물질에 의한 복귀돌연변이 콜로니수의 2개 이상 증가가 관찰되었으며, 대

사활성계 존재하의 TA100 및 대사활성계 존재하 및 부재하의 WP2uvrA(pKM101) 균주에서 음성대조군에 비해 시험물질에 의한 복귀돌연변이 콜로니수의 용량의존적인 증가가 관찰됨. 이상의 결과로, 호장근 줄기+잎 열수 추출물은 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀돌연변이를 유발하는 것으로 판단됨.



<그림 116> 복귀돌연변이 최종 보고서

(3) 소핵시험

(가) 시험제목: 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물의 ICR마우스를 이용한 소핵시험

(나) 시험목적

- 시험물질 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물의 유전독성을 평가하기 위해 ICR 마우스 골수세포를 이용하여 소핵 유발 여부를 검토함.

(다) 시험방법

- 특정병원체 부재(SPF) CrIori:CD1(ICR) 마우스를 사용하여 음성대조군 및 시험물질군을 1회/일, 2일단 투여하며, 양성대조군은 골수채취 24시간전에 1회경구투여 함. 예비시험시 투여용량은 가이드라인에서 정하고 있는 2,000mg/kg을 최고용량으로하며, 총 3용량군(500, 1,000 및 2,000mg/kg)로 설정 및 군당 암·수 각각 3마리로 설정함. 본시험은 예비시험결과 암·수 모든 투여 동물에서 일반증상 및 사망동물이 관찰되지 않은 농도내에서 음성대조군(0mg/kg, 부형제) 및 양성대조군(MMC)를 추가로 설정하여 실시함.

(라) 시험결과

- 최고용량 결정을 위한 예비실험에서 500, 1,000 및 2,000mg/kg용량으로 투여한결과 암·수 모든 투여 동물에서 일반증상 및 사망동물이 관찰되지 않음.
- 본시험에서는 수컷동물말 사용하여 2,000mg/kg을 최고용량으로 음성 및 양성대조군을 추가 설정하여 실시한 결과, 시험물질군에서 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 증가가 관찰되지 않음.
- 또한, 다염성적혈구의 출현빈도는 모든 투여용량군에서 음성대조군과 비교하여 유의한 증가가 관찰되지 않음. 이상의 결과로, 호장근 지상부 (줄기+잎)열수 추출물은 마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단됨.



<그림 117> 소핵시험 최종 보고서

나. 설치류 단회투여 독성시험

(1) 설치류 단회투여 독성시험

(가) 시험제목: 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

(나) 시험목적

- 시험물질 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물의 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때의 독성조사 및 개략의 치사량을 설정함.

(다) 시험방법

- Sprague-Dawley 랫드를 사용하여 음성대조군 및 시험물질군으로 1회/일 경구투여함. 투여량은 시험물질이 건간기능식품으로 개발되는 점을 고려하여 5,000mg/kg 용량을 고용량으로 설정하고 총 3용량군(1,250, 2,500 및 5,000mg/kg)로 설정 및 군당 암·수 각각 5마리로 설정함. 시험기간 14일동안 일반증상 관찰, 체중측정을 실시하고, 관찰 기간 종료 후 모든 동물을 안락사 및 부검을 실시하여 장기에 대한 육안검사를 실시함.

(라) 시험결과

- 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않음
- 일반증상 관찰시 모든 관찰기간 동안 이상변화는 관찰되지 않음
- 암컷 고용량군에서 체중의 감소 및 증체량의 감소가 관찰됨
- 부검소견에서 시험물질에 의한 이상변화는 관찰되지 않음. 이상의 결과로, 본 시험조건에서 시험물질 호장군 열수 추출물의 SD 랫드에서 개략의 치사량(Approximate lethal dose:ALD)은 5,000mg/kg 이상으로 판단됨.

최종보고서

호장군 열수 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

C17RA-386G

신뢰성보증확인서

시험목적 : 호장군 열수 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험
 시험번호 : C17RA-386G

본 시험은 아래와 같이 기술된 용량단계에 대하여 수행하였다. 용량은 시험계획서, GEP규정, 워크로드의 표준작업지침서에 따라서 실시하였다. 정량결과는 시험목적 및 용량계획 자체에 보고하였으며, 보고일자는 아래와 같다.

관측단계	관찰일	시험계획일자	용량계획일자
시험계획서	2018.01.04	2018.01.04	2018.01.04
동물입수	2018.01.04	2018.01.04	2018.01.04
시험물질 보관/조제	2018.01.09	2018.01.09	2018.01.09
투여/관측/수용물	2018.01.09	2018.01.09	2018.01.09
부검	2018.01.23	2018.01.23	2018.01.23
시험기초자료	2018.02.02	2018.02.02	2018.02.02
최종보고서(안)	2018.02.02	2018.02.02	2018.02.02
최종보고서	2018.03.06	2018.03.06	2018.03.06

본 최종보고서에 기술된 방법들이 적절하고, 결과의 기술이 시험수행에서 얻은 시험기초자료를 정확하게 반영하고 있음을 보증한다.

신뢰성보증담당자 이 규 민 2018.03.06
 시험 목적자

신뢰성보증담당자 박 성 문 2018.03.06
 시험 목적자


1. 요약

본 시험은 시험물질 호장군 열수 추출물의 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여 한 것을 주요 목적으로 실시하고, 개략의 치사량을 알아보기 위하여 실시하였다. 시험군으로는 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 을 투여하는 시험물질 투여군과 투여량을 투여하는 대조군을 설정하였고, 암수 각각 5 마리를 사용하였다. 관찰항목으로는 시험물질 투여 후 14 일간의 사망률, 일반증상 변화, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

그 결과는 다음과 같다.


1) 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다.
 2) 일반증상 관찰 시 모든 관찰 기간 동안 이상변화가 관찰되지 않았다.
 3) 암컷 고용량 군에서 체중의 감소 및 증체량의 감소가 관찰되었다.
 4) 부검소견에서 시험물질에 의한 이상변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과, 본 시험 조건에서 시험물질 호장군 열수 추출물의 Sprague-Dawley 랫드에서의 개략의 치사량(Approximate lethal dose: ALD)은 5,000 mg/kg 이상으로 판단하였다.




경기도 수원시 영통구 광교로 107
GSBC 실험연구동 3층

11 / 11



1 / 28



<그림 118> 설치류단회 투여 독성 최종 보고서

다. 설치류 4주 용량결정 시험

(1) 4주 용량결정 시험

(가) 시험제목: 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4주간 반복 경구투여 용량결정시험

(나) 시험목적

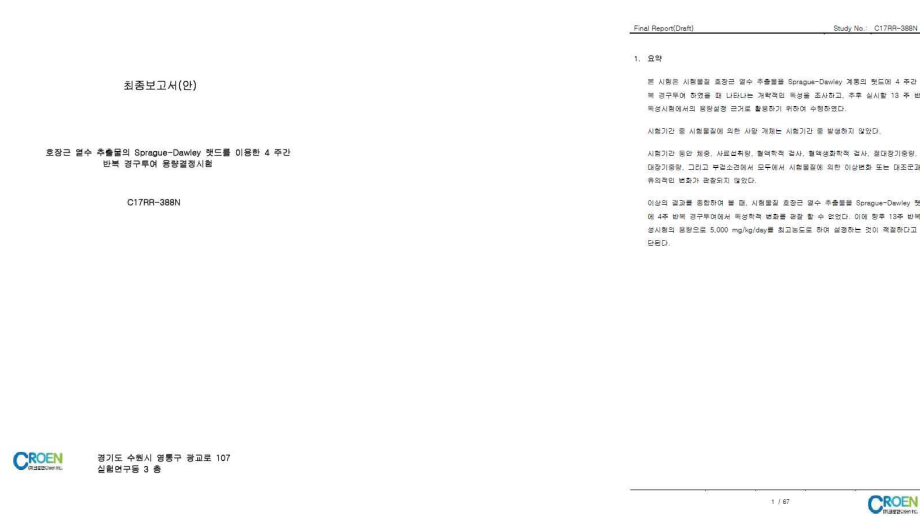
- 시험물질 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물의 Sprague-Dawley 랫드에 4주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 조사하고, 추후 실시할 13주 반복 독성시험에서의 용량설정 근거를 마련함.

(다) 시험방법

- Sprague-Dawley 랫드를 사용하여 음성대조군 및 시험물질군으로 1회/1일, 4주간 경구투여함. 투여량은 단회 경구투여독성시험의 결과를 바탕으로 5,000mg/kg를 고용량군으로 설정하고 총 3용량군(1,250, 2,500 및 5,000mg/kg)로 설정 및 군당 암·수 각각 5마리로 설정함. 시험기간 4주동안 일반증상(1일 2회), 체중특징(주 1회) 및 사료소비량 측정(주 1회)을 실시하고, 부검 시 임상병리(혈액학적검사, 혈액생화학적 검사) 및 조직병리(장기중량 측정, 육안관찰)을 실시함.

(라) 시험결과

- 시험기간 중 시험물질에 의한 사망 개체는 발생하지 않음.
- 체중, 사료섭취량, 혈액학적검사, 혈액생화학적 검사, 절대장기중량, 상대장기중량, 그리고 부검소견에서 시험물질에 의한 이상변화 또는 대조군과의 유의적인 변화가 관찰되지 않음. 이상의 결과로, 시험물질 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물을 SD 랫드에 4주 반복 경구투여에서 독성학적 변화를 관찰할 수 없음.



<그림 119> 4주 용량 결정시험 최종 보고서

라. 설치류 13주 반복투여 독성시험

(1) 13주 용량결정 시험

(가) 시험제목: 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주간 반복 경구투여 독성시험, 4주간 회복시험

(나) 시험목적

- 시험물질 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물의 Sprague-Dawley 랫드에 13주간 반복 경구투여 하였을 때 시험물질이 전신노출에 의한 표적장기, 무독성량(NOAEL; No Observed Adverse Effect Level)의 독성학적인 변화를 조사하고, 4주간 회복기간을 두어 회복성을 알아보고자 수행함.

(다) 시험방법

- 시험군은 호장근 추출물 1250mg/kg/day, 2500mg/kg/day 및 5000mg/kg/day 투여군 및 시험물질에 부형제인 멸균주사용수를 투여하는 대조군을 설정하여 시험을 진행하였음. 관찰기간 동안 멸균주사용수를 투여하는 대조군을 설정하여 시험을 진행하였음. 관찰기간동안 일반증상관찰, 체중측정, 사료 소비량 측정, 안과학적 검사 및 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검시 육안검사, 조직병리학적 검사를 수행함 .

(라) 시험결과

- 실험시간 동안 수컷 1250mg/kg/day 투여군에서 투여 75일차에 사망이 1례 관찰됨. 육안적 부검소견은 없었으나 조직병리검사 결과 폐에서 섬유소성기관지폐렴(Fibrinous bronchopneumonia)과 혈전(Thrombosi)이 관찰되어 이로 인한 폐사로 사료됨.
- 일반증상 관찰결과, 수컷과 암컷 2500mg/kg/day 및 5000mg/kg/day 투여군에서 시험물질 혼입변(Compound colored stool), 착색뇨(Chromaturia) 및 몇몇 개체에서 간헐적으로 유연(Salivation)이 관찰됨. 회복기간 중에 수컷과 암컷 모두 회복 3일차(투여 94일차)까지는 전 개체에서 시험물질 혼입변 및 착색뇨가 관찰되었으나 그 이후로는 관찰되지 않음. 투여가 진행되는 도중 관찰된 이러한 증상들은 모두 시험물질의 투여로 인해 유발된 시험물질의 영향이며, 회복기간 중에 모두 사라진 것으로 미루어 보아, 독성학적인 영향은 없는 것으로 사료됨.
- 주요군의 암수 전 개체에서는 부검시 특별한 육안소견이 관찰되지 않았으나, 암컷 5000mg/kg/day 회복군의 부검시 왼쪽 신장이 황적색으로 변색된 것이 관찰됨. 그러

나 조직병리학적 검사 결과 특이사항은 없음.

- 그 외 체중 측정, 사료 섭취량 측정, 절대 및 상대장기중량 측정, 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사, 뇨검사, 안검사 및 조직병리학적 검사에서 관찰된 변화들은 모두 용량 의존성 및 관련 지표의 변화가 없으며, 생물학적 변동범위 내의 결과로써 우발적 또는 산발적으로 나타나는 소견으로 시험물질 투여와 무관한 변화라고 사료됨.
- 이상의 결과를 종합하여 볼 때 호장근 줄기+잎 추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 13주간 반복 경구투여 하였을 때, 무독성량은 암수 모두 5000mg/kg/day로 판단됨.

최종보고서

호장근 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
13주간 반복 경구투여 독성시험, 4주간 회복시험

C179R-389G

CROEN 경기도 수원시 권선구 시호로 89

시험물질: 호장근 추출물
시험동물: Beagle Dog
시험기간: 13주간

호장근 추출물 1,250 mg/kg/day, 2,500 mg/kg/day, 5,000 mg/kg/day 투여군 및 시험물질 부형제인 알루미나수산화물 투여군에 대한 시험을 진행하였다. 관찰기간 동안 관찰된 임상적, 생화학, 사료 섭취량 측정, 혈액학적 검사 및 뇨 검사 결과는 다음과 같다.

항목	시험물질 투여군	시험물질 투여군	시험물질 투여군	시험물질 투여군	시험물질 투여군	시험물질 투여군	시험물질 투여군
체중	2018.11.28	2018.12.05	2018.12.12	2018.12.19	2018.12.26	2019.01.02	2019.01.09
사료섭취량	2018.11.28	2018.12.05	2018.12.12	2018.12.19	2018.12.26	2019.01.02	2019.01.09
혈액검사	2018.11.28	2018.12.05	2018.12.12	2018.12.19	2018.12.26	2019.01.02	2019.01.09
뇨검사	2018.11.28	2018.12.05	2018.12.12	2018.12.19	2018.12.26	2019.01.02	2019.01.09
안검사	2018.11.28	2018.12.05	2018.12.12	2018.12.19	2018.12.26	2019.01.02	2019.01.09
조직검사	2018.11.28	2018.12.05	2018.12.12	2018.12.19	2018.12.26	2019.01.02	2019.01.09

Final Report Study No.: C179R-389G

1. 요약

본 시험은 시험물질 호장근추출물을 Sprague-Dawley 랫드(19주)에 대해 경구투여 한 것을 그 목적으로 실시하였다. 호장근 추출물 1,250 mg/kg/day, 2,500 mg/kg/day, 5,000 mg/kg/day 투여군 및 시험물질 부형제인 알루미나수산화물 투여군에 대한 시험을 진행하였다. 관찰기간 동안 관찰된 임상적, 생화학, 사료 섭취량 측정, 혈액학적 검사 및 뇨 검사 결과는 다음과 같다.

그 외 체중 측정, 사료 섭취량 측정, 절대 및 상대장기중량 측정, 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사, 뇨검사, 안검사 및 조직병리학적 검사에서 관찰된 변화들은 모두 용량 의존성 및 관련 지표의 변화가 없으며, 생물학적 변동범위 내의 결과로써 우발적 또는 산발적으로 나타나는 소견으로 시험물질 투여와 무관한 변화라고 사료됨.



<그림 120> 13주 반복투여 독성시험 최종 보고서

마. 비설치류 단회 경구투여 독성시험

(1) 비글견에 단회 경구 투여 독성시험

(가) 시험제목: 호장근 지상부 (줄기+잎)의 Beagle Dog에 DE(dose escalation)법을 이용한 단회 경구투여 독성시험

(나) 시험목적

- 본 시험은 시험물질 호장근 지상부 (줄기+잎)을 Beagle Dog에 DE(dose escalation)법을 이용하여 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 조사하기 위하여 수행

(다) 시험방법

- 시험물질 호장근 지상부 (줄기+잎)추출물을 1000, 2500 및 5000mg/kg으로 투여하는 시험물질 투여군을 설정하여 암수 각 2마리에 단회 경구투여함. 1차(1000mg/kg) 및 2차 (2500mg/kg) 투여 후 7일간 관찰한 뒤 5000mg/kg로 3차 투여함. 3차 투여 후 2

주간 사망을 포함한 일반증상, 체중변화, 부검 소견을 관찰 함.

(라) 시험결과

- 사망 및 반사동물은 관찰되지 않음.
- 일반증상 관찰결과, 2500 및 5000mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 시험 물질 성상의 구도가 관찰됨.
- 체중변화 관찰결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.
- 부검소견 관찰결과, 육안적 이상소견은 관찰되지 않음.
- 결과를 종합하여 볼 때, 시험물질 호장근 추출물의 독성작용에 의한 이상이 관찰되지 않는 최대용량은 암수 모두 5000mg/kg으로 판단함.

최종보고서

신뢰성보증확인서

시 행 번 호: 18-DA-0594
 시 행 제 목: 호장근추출물의 Beagle Dog® OC (dose escalation)시험을 이용한 단회 경구투여 독성시험
 시 행 기 간: 2018.06.04 ~ 2018.09.13
 시 행 의 의: 兩백스파트

호장근추출물의 Beagle Dog® DE (dose escalation)법을 이용한 단회 경구투여 독성시험

시험번호: 18-DA-0594

시험의뢰자: 兩백스파트

시험은 비임상연구소

요 약

본 시험은 시험물질 호장근추출물(Beagle Dog® DE (dose escalation)법을 이용한 단회 경구 투여시험)을 실시하는 데 필요한 독성을 조사하기 위하여 수행되었다.

시험물질량 1000, 2500 및 5000 mg/kg으로 투여하는 시험물질의 안전성을 평가하기 위하여 단회 경구 투여 시험을 실시하였다. 1차 (1000 mg/kg) 및 2차 (2500 mg/kg) 투여 후 7일간 관찰한 후 5000 mg/kg으로 3차 투여하였다. 3차 투여 후 2주간 사망을 포함한 일반증상, 체중변화, 부검 소견을 관찰하였고, 그 결과는 다음과 같다.

1. 사망 및 반사동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상: 5000 및 5000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 시험물질 성상의 구도가 관찰되었다.
3. 체중변화: 관찰결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
4. 부검소견: 관찰결과, 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상과 결과에 준하여 본 회, 시험물질 호장근추출물(Beagle Dog® DE (dose escalation)법을 이용하여 단회 경구투여시험)을 실시하는 데 필요한 독성을 조사하기 위하여 수행되었다. 시험물질의 안전성을 평가하기 위하여 단회 경구 투여 시험을 실시하였다. 1차 (1000 mg/kg) 및 2차 (2500 mg/kg) 투여 후 7일간 관찰한 후 5000 mg/kg으로 3차 투여하였다. 3차 투여 후 2주간 사망을 포함한 일반증상, 체중변화, 부검 소견을 관찰하였고, 그 결과는 다음과 같다.

항목내용	시험실시일	시험목적의 확인일	발행처(지) 부고일
시험개시일	2018.06.04	2018.06.04	2018.06.05
시험종료일	2018.06.14	2018.06.14	2018.06.15
시험물질/제조일자	2018.06.28	2018.06.28	2018.06.28
시험물질/제조일자	2018.07.05	2018.07.05	2018.07.06
시험물질/제조일자	2018.07.12	2018.07.12	2018.07.13
시험물질/제조일자	2018.06.28	2018.06.28	2018.06.28
시험물질/제조일자	2018.07.05	2018.07.05	2018.07.06
시험물질/제조일자	2018.07.12	2018.07.12	2018.07.13
시험물질/제조일자	2018.06.28	2018.06.28	2018.06.28
시험물질/제조일자	2018.07.05	2018.07.05	2018.07.06
시험물질/제조일자	2018.07.12	2018.07.12	2018.07.13
시험물질/제조일자	2018.06.21	2018.06.21	2018.06.22
시험물질/제조일자	2018.06.28	2018.06.28	2018.06.28
시험물질/제조일자	2018.07.05	2018.07.05	2018.07.06
시험물질/제조일자	2018.07.12	2018.07.12	2018.07.13
시험물질/제조일자	2018.07.19	2018.07.19	2018.07.19
시험물질/제조일자	2018.07.26	2018.07.26	2018.07.26
시험물질/제조일자	2018.08.02	2018.08.02	2018.08.02
시험물질/제조일자	2018.08.21	2018.08.21	2018.08.30
시험물질/제조일자	2018.08.27	2018.08.27	2018.08.30
시험물질/제조일자	2018.09.13	2018.09.13	2018.09.13

신뢰성보증확인서
 246, Yungpoo-ro, Yungpoo-gu, Gwangju-si, Gwangju-do,
 71452, Republic of Korea.

최종보고서 작성자: 김서영
 시험실시 담당자: 김서영

<그림 121> 비설치류 단회 독성시험 최종 보고서

2. 유전독성 결과에 따른 개발전략 수정

- 호장근 지상부 (줄기+잎) 열수 추출물은 염색체의 구조이상은 유발하지 않으나 수적이 상 및 복귀돌연변이를 유발하는 것으로 확인됨.
- 기존 호장근 추출부위를 지상부 (줄기+잎)에서 줄기(식품원료목록 등록)부분으로 변경하여 연구개발 진행함(식품 및 식품첨가물공전, 별표1, 고유번호A가184500).

식품원료목록

원재료명		호장근
이명	까치수염, 심아, Mexican Bamboo, Japanese knotweed, Asian knotweed	
학명	<i>Fallopia japonica</i> (Houtt.) RonsaDecr. / <i>Reynoutria japonica</i> Houtt. / <i>Polygonum cuspidatum</i> Siebold & Zucc. / <i>Fallopia japonica</i> var. <i>compacta</i> (Hook.f.) Bailey	
생약명	-	
원재료 분류	식물	
식품원료 사용가능 여부	기능	줄기
	제한적	-
	사용조건	-

<그림 122> 호장근 줄기 안전성(식용) 근거

3. 호장근 줄기 열수 추출물 GLP 독성시험

가. 유전독성시험

(1) 염색체이상시험

(가) 시험제목: 호장근 줄기 열수 추출물의 Chinese Hamster Lung(CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험

(나) 시험목적

- 본시험은 시험물질 호장근 줄기 열수 추출물을 포유동물 세포주인 Chinese Hamster Lung(CHL) 세포에 노출시켜 염색체의 구조 및 수적이상을 측정함으로써 유전독성을 평가

(다) 시험방법

- 본 염색체 이상시험에 HCL세포를 이용하여 예비시험을 통해 시험 최고용량(5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 적용하여 2500, 1250, 625, 313, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.8, 2.44 및 1.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 용량설정시험을 실시함. 시험별 용량을 설정하고 음성대조군 및 양성대조군을 설정하여 수행함.


<표 45> 세포 처리 조건

계열	S9	처리군	조제량 (mL)	분주량
----	----	-----	----------	-----

	mix		EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성(양성)대조물질 또는 시험물질	(mL/plate)
단시간 처리법	-	음성대조군	12.87	-	0.13	5
		시험물질	12.87		0.13	5
		양성대조	12.87		0.13	5
	+	음성대조군	10.70	2.17	0.13	5
		시험물질	10.70		0.13	5
		양성대조	10.70		0.13	5
연속처리법	-	음성대조군	12.87	-	0.13	5
		시험물질	12.87		0.13	5
		양성대조	12.87		0.13	5

(라) 시험결과

- 단시간 처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않음.
- 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인됨. 이상의 결과로부터 본 시험조건 하에서 시험물질 호장근 열수 추출물은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단됨.



시험목적 : 호장근 열수 추출물의 마우스를 이용한 소핵시험
시험번호 : B18949

시험대상 : 호장근 열수 추출물
표준화 제정세균을 이용한 염색체이상시험

시험번호: B18949

시험일자

시험일자	시험일자	시험일자
2019년 7월 1일	2019년 7월 1일	2019년 7월 1일
2019년 8월 21일	2019년 8월 21일	2019년 8월 21일
2019년 8월 5일	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
2019년 8월 5일	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
2019년 8월 5일	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
2019년 8월 7일	2019년 8월 7일	2019년 8월 7일
2019년 8월 8일	2019년 8월 8일	2019년 8월 8일
2019년 8월 19일	2019년 8월 19일	2019년 8월 19일
2019년 9월 25일	2019년 9월 25일	2019년 9월 25일
2019년 10월 11일	2019년 10월 11일	2019년 10월 11일

시험일자: 2019년 10월 11일

시험목적 : 호장근 열수 추출물의 마우스를 이용한 소핵시험
시험번호 : B18949

시험대상 : 호장근 열수 추출물
표준화 제정세균을 이용한 염색체이상시험

시험번호: B18949

시험일자

시험일자	시험일자	시험일자
2019년 7월 1일	2019년 7월 1일	2019년 7월 1일
2019년 8월 21일	2019년 8월 21일	2019년 8월 21일
2019년 8월 5일	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
2019년 8월 5일	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
2019년 8월 5일	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
2019년 8월 7일	2019년 8월 7일	2019년 8월 7일
2019년 8월 8일	2019년 8월 8일	2019년 8월 8일
2019년 8월 19일	2019년 8월 19일	2019년 8월 19일
2019년 9월 25일	2019년 9월 25일	2019년 9월 25일
2019년 10월 11일	2019년 10월 11일	2019년 10월 11일

시험일자: 2019년 10월 11일

시험목적 : 호장근 열수 추출물의 마우스를 이용한 소핵시험
시험번호 : B18949

시험대상 : 호장근 열수 추출물
표준화 제정세균을 이용한 염색체이상시험

시험번호: B18949

시험일자

시험일자	시험일자	시험일자
2019년 7월 1일	2019년 7월 1일	2019년 7월 1일
2019년 8월 21일	2019년 8월 21일	2019년 8월 21일
2019년 8월 5일	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
2019년 8월 5일	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
2019년 8월 5일	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
2019년 8월 7일	2019년 8월 7일	2019년 8월 7일
2019년 8월 8일	2019년 8월 8일	2019년 8월 8일
2019년 8월 19일	2019년 8월 19일	2019년 8월 19일
2019년 9월 25일	2019년 9월 25일	2019년 9월 25일
2019년 10월 11일	2019년 10월 11일	2019년 10월 11일

시험일자: 2019년 10월 11일

<그림 123> 염색체이상시험 최종 보고서

(2) 복귀돌연변이시험

(가) 시험제목: 호장근 줄기 열수 추출물의 박테리아 균주를 이용한 복귀돌연변이 시험

(나) 시험목적

- 본 시험은 시험물질 호장근 줄기 열수 추출물의 히스티딘 요구성 시험균주 (*Salmonella typhimurium*)와 트리토판 요구성 시험균주(*Escherichia coli*)을 이용하여 대사활성화비존재하 및 존재하의 경우에 유전독성 여부를 평가함.

(다) 시험방법

- *Salmonella typhimurium*와 *Escherichia coli*를 이용하여 5000 μ g/plate를 최고 용량으로 하여 시험물질에 의한 침전 및 생육저해 예비시험을 실시하고, 이를 바탕으로 음성 대조균과 양성대조균을 추가하여 복귀돌연변이를 판단함. 양성대조물은 고시 및 가이드라인으로 제시된 2-Nitrofluorene, 2-Aminoanthracene, Benzo[a]pyrene(B[a]P), 9-Aminoacridine, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide 을 사용함.

(라) 시험결과

- 시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수는 음성대조균의 2배를 초과하지 않았고, 각 균주에 대한 양성대조균의 복귀변이콜로니수는 음성대조균과 비교하여 2배 이상 유의적으로 증가함.
- 이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 호장근 줄기 열수 추출물의 유전자 돌연변이 유발성이 없음을 확인함.

신원성보존서

시험목적 : 호장근 줄수 추출물의 미생학적 이용성을 위한 소독시험
 시험번호 : B18049

항목명	용량/일자	시험결과 및 판정기준
시험목적	2019년 7월 1일	2019년 7월 1일
용량/일자	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
시험물질의 보관	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
시험물질의 조제	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
배양액 (음수대조)	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
양성대조 (양성)	2019년 8월 7일	2019년 8월 7일
양성대조 (양성)	2019년 8월 8일	2019년 8월 8일
양성대조	2019년 8월 19일	2019년 8월 19일
시험균주(음성대조)의 배양	2019년 8월 23일	2019년 8월 23일
시험결과 (양성)	2019년 9월 23일	2019년 9월 23일
시험결과 (양성)	2019년 10월 11일	2019년 10월 11일

2019. 08. 26

<그림 124> 복귀돌연변이 최종 보고서

(3) 소핵시험

(가) 시험제목: 호장근 줄기 열수 추출물의 마우스를 이용한 소핵시험

(나) 시험목적

- 시험물질 호장근 줄기+열수 추출물의 유전독성을 평가하기 위해 ICR 마우스 골수 세포를 이용하여 소핵 유발 여부를 검토함.

(다) 시험방법

- 특정병원체 부재(SPF) CrI:Ori:CD1(ICR) 마우스를 사용하여 5,000mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여 용량설정시험을 실시한 결과, 암수 모두 모든용량에서 시험물질에 의한 일반증상의 이상 및 사망동물은 관찰되지 않음. 본 시험의 최고용량은 5,000mg/kg으로하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여 2,500mg/kg 및 1,250mg/kg의 시험물질군을 설정함. 용량설정시험에서 암수 모두 사망동물이 관찰되지 않았기 때문에 본시험은 소핵유발에 감수성이 좋다고 알려진 수컷을 사용 함.

(라) 시험결과

- 시험물질군의 다염성적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구(Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도는 음성대조군관비교하여 통계학적 유의한 차이가 확인되지 않음. 또한 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않음.
- 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵아염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었음. 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않음
- 이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 호장근 줄기 열수 추출물의 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발성이 없는 것으로 판단됨.

최종보고서

홍준근 교수 주축문의
마우스를 이용한 소해시험

시험번호: B18949

㈜바이오텍스텍
우38115 충청북도 청주시 흥덕구 오성읍 연구단지길 53

신뢰성보증서

시험목적 : 홍준근 교수 주축문의 마우스를 이용한 소해시험
시험번호 : B18949

㈜바이오텍스텍 신뢰성보증업무담당자는 본 최종보고서에 기술된 시험에 대해 아래와 같이 검증하였다. 홍준근 교수, 시험계획서, ㈜바이오텍스텍의 표준작업수순서에 따라서 실시하였으며, 각각의 검증결과를 시험착검 및 운영착검사항에 보고하였다.

항상수행단계 및 시험착검단계 운영착검사항에 보고된 일자는 아래와 같다.

항상단계	항상일자	시험착검 및 운영착검일
시험계획서	2019년 7월 1일	2019년 7월 1일
동물의 입수*	2019년 6월 21일	2019년 6월 21일
시험동물의 보관	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
시험동물의 조제	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
투약	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
검체채취 (검수채취)	2019년 8월 7일	2019년 8월 7일
임체채취 (도출)	2019년 8월 7일	2019년 8월 7일
검체채취 (영식)	2019년 8월 8일	2019년 8월 8일
검체채취	2019년 8월 19일	2019년 8월 19일
시험기록자료의 기록	2019년 9월 25일	2019년 9월 25일
최종보고서 (B)	2019년 10월 11일	2019년 10월 11일

* 수형동물의 출생, 양육적으로 실시하는 동물실험 절차는 시험일자 2일전 실시하며, 평균 2개월의 시험을 운영하며 본 시험의 최종단계를 보충한다.

본 최종보고서에 기술된 방법들이 적절하고, 결과의 기술이 시험항목에서 얻은 시험기록자료를 정확하게 반영하고 있음을 보증한다.

㈜바이오텍스텍
신뢰성보증책임자 겸부원

3019년 10월 11일

요약

시험동물 홍준근 교수 주축문의 마우스 교수세대에 대한 소해 유발 유무를 평가하기 위하여 마우스를 이용하여 24시간 간격으로 2회 구두투약하여 검토하였다.

본시험의 시험물 (시험액) 농도가 5,000 mg/kg를 최고농도로 하고, 이차 농도는 2배를 적용하여, 2,500 및 1,250 mg/kg의 시험농도시험을 실시한 결과, 모두 양수 결론을 증명해서 시험동물에 의한 실험동물의 이상 및 시험동물은 관찰되지 않았다.

만약서, 본시험의 최고농도 5,000 mg/kg로 하고, 이차 농도는 2배 적용하여, 2,500 및 1,250 mg/kg의 시험농도를 검토하였다. 또한, 임상대조군 및 임상대조군을 증명하였다. 임상대조군시험에서 양수 결론 시험동물이 관찰되지 않았기 때문에, 본시험은 소해 유발에 양수결이 없다고 결론지을 수 있음을 사용한다.

본시험의 결과, 시험동물은 폴리염화합물 (Polychlorinated ethylene, PCE) 중 스킨다염화합물 (Microchlorinated polychlorinated ethylene, MPECE)의 총합도에는 임상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. 또한, 총 염화수소염 대한 다염화합물류의 비율도 임상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다.

임상대조군에서는 다염화합물류 중 스킨다염화합물류의 총합도(염화수소염)에 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되었다. 총 염화수소염 대한 다염화합물류의 비율은 임상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험동물 조양군 중 주축문의 마우스 교수세대에 대한 소해 유발성이 없는 것으로 판단된다.

<그림 125> 소해시험 최종 보고서

제 5 절 인체적용 시험 및 개별인정형 원료 신청

1. 인체적용시험

가. 인체적용시험을 위한 CRO업체선정

(1) 연구목적: 호장근추출물의 안구건조 증상 개선에 대한 기능성 및 안전성 검증을 위한 인체적용시험 진행을 위한 적합한 CRO업체 선정

(2) 연구내용

- 비교업체로는 전북대학교 기능성식품임상지원센터, (주)네오뉴트라를 비교하였으며 건적수령 및 인체적용시험 경험 등을 자체 평가하여 CRO업체를 최종 선정하였음.

(3) 연구결과

- 하기 내용으로 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 비교 인체적용시험 CRO 업체로 선정함.

<표 46> 인체적용시험 개요

항목		내용		
인체적용시험 명칭		호장근추출물의 안구건조 증상 개선에 대한 기능성 및 안전성 검증을 위한 인체적용시험 (단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험)		
연구자	책임연구자	단국대학교병원	안과	조교수 조 경 진
	연구담당자	단국대학교병원	안과	연구원 신 선 필
		단국대학교병원	임상의학연구소	이 성
	코디네이터	단국대학교병원	안과	연구원 이 효 순
	인원수	90명		
대상 피험자	선정기준	안구건조 증상을 호소하는 아래기준을 만족하는 대상자 ① 만 19세 이상 75세 미만의 성인 남·녀 ② 스크리닝 시점에 안구건조 증상(건조함(dryness), 불편감(discomfort), 이물감(foreign body sensation), 통증(pain), 시력변동(vision fluctuation) 등]을 가진 자로서 OSDI 설문을 통해 총점 13 ~ 32 이내 인 자 ③ 본 연구 기간 동안 제공하는 인체적용시험식품 이외의 인공누액 및 점안제 등을 사용하지 않는 것에 동의한 자 ④ 본 임상시험을 이해할 수 있고, 자발적으로 서면 동의한 자		

	제외기준	①안구건조증에 기인하지 않는 임상적으로 유의한 안과 질환(각막표면질환, 비정상적인 각막 민감성, 비정상적인 눈물 과다 등)으로 임상시험 결과의 해석에 혼동을 줄 수 있는 경우 ②스테로이드 또는 비스테로이드성 항염증 점안제, 자가혈청 안약 등 안구건조증에 대한 항염증 요법으로 치료 중인 경우 ③스테로이드, 면역억제제(아자티오프린, 타크롤리무스, 사이클로스포린, 미코페놀산모페틸 등)를 투여하는 경우 ④스크리닝 전 72시간 이내 콘택트렌즈를 착용했거나 임상시험 기간 동안 콘택트렌즈를 착용 해야 하는 자 ⑤스크리닝 전 90일 이내 안과 수술(intraocular surgery)을 받은 병력이 있는 자 등
시험기관		단국대학교, 충남 천안시 동남구 망향로 201
섭취기간	섭취기간	방문1(Baseline 0주)부터 6주간 복용
섭취량		1일 2회, 1회 1정을 충분한 물과 함께 섭취함

나. 시험약 및 위약 제조

(1) 연구목적: 인체적용시험에 사용될 시험약과 위약 제조

(2) 연구내용

- 인체적용시험에 사용될 식품을 원료의 특성 및 피험자 섭취를 고려하여 정제로 제조함. 분말제형의 경우 흡습성이 있고, 농축액의 형태는 장기간 보관시 변형의 우려가 있음.

(3) 연구결과

(가) 시험약: 주성분 250mg/정

- ① 주성분명: 호장근 줄기 열수추출물
- ② 성상 및 제형: 갈색 타원형의 정제
- ③ 보관방법: 직사광선을 피하고 서늘한 곳

- ④ 용법 및 용량: 1일 2회, 1회 1정을 충분한 물과 함께 섭취함
 ⑤ 원재료 및 배합비율:

구분	성분명	함량(mg)
주성분	호장근추출물	250
부형제	텍스트린	-
	결정셀룰로오스	-
	유당95	-
	HPMC	-
	스테아린산마그네슘	-
	이산화티타늄	-
	카라멜색소858	-
	미바셋-액상	-
총합		700

(나) 시험약: 주성분 500mg/정

- ① 주성분명: 호장근 줄기 열수추출물
 ② 성상 및 제형: 갈색 타원형의 정제
 ③ 보관방법: 직사광선을 피하고 서늘한 곳
 ④ 용법 및 용량: 1일 2회, 1회 1정을 충분한 물과 함께 섭취함
 ⑤ 원재료 및 배합비율:

구분	성분명	함량(mg)
주성분	호장근추출물	500
부형제	텍스트린	-
	결정셀룰로오스	-
	유당95	-
	HPMC	-
	스테아린산마그네슘	-
	이산화티타늄	-
	카라멜색소858	-

	미바셋-액상	-
	총합	700

(다) 위약

- ① 주성분명: 정제수
- ② 성상 및 제형: 갈색 타원형의 정제
- ③ 보관방법: 직사광선을 피하고 서늘한 곳
- ④ 용법 및 용량: 1일 2회, 1회 1정을 충분한 물과 함께 섭취함
- ⑤ 원재료 및 배합비율

구분	성분명	기준량
부형제	텍스트린	280
	결정셀룰로오스	-
	유당95	-
	HPMC	-
	스테아린산마그네슘	-
	이산화티타늄	-
	카라멜색소858	-
	미바셋-액상	-
	카카오색소	--
	총합	700



◆ 임상시험 지원자 모집 ◆

**효장근추출물의 연구진조 용상 개선에 대한
가능성 및 안전성 검증을 위한 인체적용시험**

1. 임상시험 목적
효장근추출물의 연구진조 용상 개선에 대한 가능성 및 안전성 평가
2. 임상시험 기간 및 방법
대규모 용량 범위
사용군 또는 대조군 1:1 무작위배정
원격적용사, 방문도봉사, 원격평가 및 소변 검사
3. 지원 대상
1) 18~45세 건강한 성인 남녀
2) 연구진조 용상을 거부 자
4. 제외가능 부처용
질환에 걸린 복통, 설사, 과민성, 건강이상 등이 나타날 수 있음
그 외 임의적이 안전성 부처용이 나타날 수 있습니다.
5. 임상시험 용인 시 제공사항
1) 임상시험 지원용 식음 제공
2) 방문 방문 시 연구 수당을 위한 편의의 차등 및 주차
3) 임상시험을 통해 수혜되는 진료비 및 검사비 지원
4) 소정의 교통비 제공
6. 후원문의
단국대학교병원 안과 연구의과대학안과
서울특별시 : 단국대학교병원
충청북도 : 보성병원 (서울특별시 서초구 효창동 155)

단국대학교병원 www.dankyu.ac.kr
1588-0000

<그림 126> 인체적용 시험약(좌), 인체적용 시험 지원자 모집 공고(우)

다. 인체적용시험 진행 및 모니터링

(1) 연구내용

본 인체적용시험은 안구건조증 증상 개선에 대한 기능성 및 안전성 검증을 위한 단일 기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험임. 본 인체적용시험에 자발적으로 서면 동의한 시험대상자는 스크리닝 방문, 1~2주간의 run-in 기간, 12주간의 투여기간 (Treatment period), 총13~14주 동안 시험을 수행하게 되며, 스크리닝(2주 이내 허용) 및 6주 간격으로 2회 방문, 총 4번 방문하여 계획된 안전성 및 유효성 평가를 실시한다 (유효성 평가 변수의 설정에 따라 시험기간은 재 산정될 수 있음). 방문 시 검사해야 되는 항목: 인구학적 정보(성별, 연령, 신장, 체중), 병력, 신체검사, 활력징후, 임신검사, 혈액 샘플 채취(혈액학적, 혈액이화학적, 뇨검사, 혈행개선관련 지표검사, 지질성분검사, hs-CRP, HbA1c), 병용약물, 기준 시점 증상 및 징후/ 이상반응, 순응도 등을 실시함.

(가) 인체적용시험 방문 일정

Period	스크리닝 검사	투여기간			추가 방문 (필요 시)
방문번호	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4	
방문오차	-14일~-2일	0 week(±7)	3week(±7)	6week(±7)	
서면동의서 ¹⁾	●				
인구학적 조사	●				
병력 및 약물투여력 조사	●	●	●	●	
선정/제외기준 조사	●	●			
무작위배정		●			
이학적 검사	●	●	●	●	
활력징후	●	●	●	●	(●)
신체계측 ²⁾	●			●	(●)
안구표면질환(OSDI) 설문	●	●	●	●	(●)
나안시력		●	●	●	(●)
교정시력(굴절검사)		●	●	●	(●)
안압		●	●	●	(●)
유효성 평가 검사 ³⁾		●	●	●	(●)
세극등 현미경 검사		●	●	●	(●)
진단검사의학 검사 ⁴⁾	●		●*	●	(●)
심전도 및 임신반응 검사 ⁵⁾	●			●	(●)
임상시험용 식품 처방		●	●		
복용일지 교육 및 배부		●	●		
이상반응 확인			●	●	(●)
일지 및 복용식품 회수			●	●	

제품순응도 확인			●	●	
* 선정/제외기준을 만족시키지 못하는 대상자에 대해서는 이후 계획한 검사를 실시하지 않을 수 있다.					
* 스크리닝 방문을 제외하고 각 방문은 전 7일, 후 7일을 허용한다.					
1) 연구대상자가 동의서에 서명을 한 후에 본 연구에 참여시킬 수 있다.					
2) 신체계측 : 신장, 체중, 체질량지수(BMI, kg/m ²) 단, 신장은 스크리닝 방문 시의 측정값으로 연구 종료 시까지 기재한다.					
3) 유효성 평가 검사 : 눈물막파괴시간(BUT), 눈물분비량(쉬르머), 안구표면염색(각막, 결막), 눈물 내 염증 검사					
4) 진단검사의학 검사 항목					
■ 혈액학적 검사 : WBC, RBC, Hb, Hct, PLT					
■ 혈액생화학적 검사 : total bilirubin, ALP, gamma-GT, ALT, AST, total cholesterol, triglyceride, glucose, total protein, albumin, BUN, creatinine, creatine, kinase(CK), LD(LDH), uric acid, HbAlc, hs-CRP					
■ 뇨 검사 : specific gravity, pH, WBC, nitrite, protein, glucose, ketone, urobilinogen, bilirubin, blood					
* 단 Visit 3 에 혈액생화학적검사 (total bilirubin, ALP, gamma-GT, ALT, AST,LD(LDH)만 시행					
5) 임신반응검사(Urine-HCG)는 폐경 전 가임기 여성의 경우에 한해서 실시한다.					
# 스크리닝 검사는 스크리닝 방문 전 최근 1개월 이내 심전도 및 진단검사의학 검사 결과로 대체할 수 있다. 추가로 필요한 진단검사의학 검사항목은 해당 연구 스크리닝 방문일에 검사한다.					
단, 유효성평가항목 검사는 예외임(재검사 필요함).					

(나) 유효성평가 변수(1차)

- ① Baseline 기준 대비 3, 6 주간의 안구표면질환지수 설문 점수(OSDI, ocular surface disease index)의 변화량
- ② Baseline 기준 대비 6주 후의 눈물막파괴시간(BUT) 변화량
- ③ Baseline 기준 대비 6주 후의 눈물분비량 (쉬르머 검사) 변화량
- ④ Baseline 기준 대비 6주 후의 각막표면염색 점수(Fluorescein corneal staining score -Oxford grading)의 변화량
- ⑤ Baseline 기준 대비 6주 후의 결막표면염색 점수(Lissamine green conjunctival staining score - Oxford grading)의 변화량

(다) 유효성 평가 변수(2차)

- ① Screening 기준 대비 12주 후의 눈물 내 염증 수치의 변화량

② Baseline 기준 대비 6주 후의 안압검사 변화량

(라) 안전성 평가

- ① 선정 시점부터 시험 종료까지 자, 타각 증상 등 이상반응
- ② 스크리닝 방문, 종료 방문시 실험실적 검사(혈액학적 검사, 혈액이화학적 검사, 뇨검사) 방문3 혈액이화학적 검사(Total bilirubin, ALP, gamma-GT, ALT, AST, LDH) 시행
- ③ 심전도 검사는 스크리닝 시점과 종료 방문시 시행한다. 만약 시험자가 임상적으로 필요하다고 판단하는 경우 추가적으로 실시할 수 있음.

분류	검사항목
일반혈액검사	RBC, WBC, Hb, Hct, PLT
생화학검사	Total bilirubin, ALP, gamma-GT, ALT, AST, Total cholesterol, Triglyceride, HDL, LDL, Glucose, Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Creatinine kinase, LDH, Uric acid, HbA1c, hs-CRP
요분석	specific gravity, pH, WBC, protein, glucose, blood, keton, bilirubin, nitrite, urobilinogen
임신검사	Urine HCG test

④ 신체검사, 활력징후

(마) 통계분석 방법

본 인체적용시험은 호장근추출물과 placebo와의 대조를 통하여 안전성 및 유효성을 평가 하고자 하는 시험으로 PP 분석법을 주 분석법으로 한다. 모든 통계적 검증은 유의수준 0.05 이하에서 실시함.

- ① 유효성 분석: 유효성 평가변수의 각 변화량은 평균, 표준편차, 최소값, 최대값, 중앙값 등으로 표현하며 이들 변화량의 통계적 유의성을 확인하기 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 paired t-test를 시행하며, 정규분포를 따르지 않을 경우 비모수방법인 Wilcoxon signed-rank test를 실시함.
- ② 안전성 분석: 안전성평가는 이상반응 발생 비율을 계산하여 군내에서 95% 신뢰구

간을 구하고 군 간 비교, 각 실험실적 검사 결과, 활력징후와 같은 연속형 자료는 Baseline과 비교하여 어떤 변화가 있는지 paired t-test 혹은 ANOVA를 이용하여 분석함. 범주형 자료는 각 범주별 빈도 및 비율을 제시하며, 군간 차이가 있는지를 chi-square test, Fisher's exact test 등을 이용하여 분석함.

(바) 무작위 배정방법

자동생성(<http://randomization.com>) 프로그램을 이용하여 Randomization number (R-No.) 1번~90번까지 난수로 자동 생성하여 부여받는다. 시험대상자는 인체적용시험에 참여하는 순서대로 R-No.를 부여받는다. 무작위 배정 이후에는 시험대상자 모두 무작위 배정된 시험식품 정보를 알 수 없도록 이중 눈가림법으로 진행

(사) 안구표면질환지수(Ocular surface disease index score, OSDI)

안구표면질환지수는 안구표면질환에 대한 평가임. 총 12문항이며, 시력관련 항목이 3가지, 안구증상관련 항목이 5가지, 일상생활지장과 관련된 항목이 4가지로 구성되어있음. 증상이 없으면 0점, 가끔 증상이 있으면 1점, 반나절정도 증상이 있으면 2점, 대부분 증상이 있으면 3점, 하루종일 증상이 있으면 4점으로 각 5점 척도로 평가함. 안구표면 질환지수의 점수는 다음과 같이 계산되어 0점에서 100점까지이며 점수가 높을수록 증상이 심한 상황임.

$$\text{OSDI 점수} = [\text{대답한 모든 항목의 합계} \times 100] / [\text{대답한 질문의 총 수} \times 4]$$

(아)셔머 test

마취 없는 상태에서 셔머용지를 이용하여 5분간 측정함.

(Tear secretion - Schirmer test (without anesthesia) for 5 min)

OD()mm/OS()

(자) 눈물막 파괴시간 측정(Tear break up time)

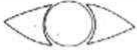




황색 필터를 이용한 코발트블루 광원의 세극등 조명하에 플루오레세인 염색후 눈을

TBUT (fluorescein dye) OD () sec / OS () sec
 깜박이게 한 후 마지막으로 깜박인 시점부터 플루오레세인으로 염색된 눈물층에서 검은점, 줄의형태 또는 플루오레세인의 결손이 관찰될 때 까지의 시간을 초 단위로 측정한다. 측정결과는 3회 반복 측정하여 평균값을 사용함.

(차) 안구표면 염색 검사(ocular surface staining, 각막, 결막)

① 각막염색검사 : 황색필터를 이용한 코발트블루광원의 세극등조명하에 플루오레세인 염색 후 각막염색정도를 아래의 oxford grading system에 따라 6점 척도로 평가함.

② 결막염색검사 : 세극등하에서 리사민그린염색 후 결막을 비측과 이측 영역으로 나누어 비측결막 및 이측결막염색정도를 oxford grading system에 따라 6점 척도로 평가함. 이측결막 평가를 위하여 시험대상자는 코방향을 보도록 하며, 비측결막평가를 위하여 귀방향을 보도록 함.

PANEL	Grade	Criteria
A 	0	Equal to or less than panel A
B 	I	Equal to or less than panel B, greater than A
C 	II	Equal to or less than panel C, greater than B
D 	III	Equal to or less than panel D, greater than C
E 	IV	Equal to or less than panel E, greater than D
>E	V	Greater than panel E

<그림 127> 각막 및 결막의 염색

(카) 눈물 내 염증 검사 (세극등 현미경 검사)

세극등 현미경 검사는 양안에 대하여 방수 흐림 정도 및 염증 등급을 평가하는데, Fluorescein 염색을 하지 않고 동공을 확대하지 않은 상태에서 전방(Anterior Chamber)을 관찰하여 염증 등급을 0~4점으로 평가함.

	방수흐림정도 (Aqueous Flare)	방수 내 염증 세포 정도
0점	전혀 없음	전혀 없음
1점	거의 없음	1~5 cells
2점	약간 흐리나 홍채와 수정체의 세부는 맑음	6~10 cells
3점	흐리며 홍채와 수정체의 세부도 흐림	11~20 cells
4점	현저히 흐리며 방수 내 피브린 생성	>20 cells

(타) 안압검사 (IOP)

매 방문 시 비접촉식 안압계를 사용하여 2회 측정값의 평균값(Mean)을 사용 함.

안구건조증 테스트 (OSDI, Ocular Surface Disease Index)

Screening No. _____ Initial _____

지난 일주일 동안 다음과 같이 느낀 적이 있습니까?

(해당하는 칸에 ○ 또는 √ 해주세요)

	항상 그렇다 (4)	대부분 그렇다 (3)	절반 정도 (2)	간혹 그렇다 (1)	그렇지 않다 (0)	
1. 눈이 빛에 예민하다.						
2. 눈에 까칠한 느낌이 있다.						
3. 눈이 따갑거나 쉰다.						
4. 시야가 흐리다.						
5. 앞을 보기가 힘들다.						
6. 독서하기가 불편하다.						해당 없음
7. 마간운전 하기가 불편하다.						해당 없음
8. 컴퓨터 또는 현금지급기 사용이 불편하다.						해당 없음
9. TV 시청이 불편하다.						해당 없음
10. 바람이 부는 날씨에 불편한 적이 있다.						해당 없음
11. 건조한 장소에서 불편한 적이 있다.						해당 없음
12. 에어컨이 가동되는 곳에서 불편한 적이 있다.						해당 없음

작성일: _____

연구담당자 확인 _____ 서명 _____

CONFIDENTIAL

Version 2.1

<그림 128> 인체적용 시험 평가표

(2) 인체적용시험 진행현황(2020년 2월 기준)

- 목표 90명 중 총 80명을 스크리닝하여 현재 60명 등록 완료
- 2020년 상반기까지 인체적용시험 완료 목표

제 6 절 동물용 건강기능식품 개발 및 제품화

1. 반려동물 경구용 건강기능식품 및 점안제 제형연구

가. 경구용

- 경구용 건강식품에 적합한 jerky 형태로 진행
- 원재료 섭취 근거에 따라 섭취 용량 설정
- 반려동물용 건강기능식품 제작 경험이 있는 기관을 선정해 제형 제작 의뢰

<표 47> 호장근 추출물의 동물용 기능성식품 개발

제품명	아이벡스(호장근 원료 경구용 눈건강기능식품)
제작기관	(주)미래생명자원
제품형태	jerky
원료함량	300mg/5kg
권장량	1ea/체중 5kg



<그림 130> 반려동물 건강기능식품 제형(좌), 아이벡스 상표등록(우)

나. 점안제

- 개에 투여할 점안제의 preformulation 결정 및 dose selection, 안정성(osmolality, pH)검토

(1) 용해제

- 안과형 제제 용해를 위한 sorensen's modified Phosphate buffer를 제조하여 사용

- 용매가 완전히 녹지 않을 경우 부형제 첨가 이용
- beta-cyclodextrin 부형제 사용 가능

(2) Osmolarity

- 점안제의 표준 권고 삼투압 290~320사이 설정 완료
- 호장근의 함량별로 하여 삼투압 측정
- 삼투압 조절은 NaCl 첨가를 통해 조절

(3) pH

- 개의 안구에 부적합한 pH사용할 경우, 충혈 등 부작용이 나타남
- 최적 pH는 8.0으로 최종 제조사용

<표 48> 호장근 추출물 1% 원료 점안제 안정성 검토

원료 함량	Osmolarity	pH
호장근 1%	327	7.54
호장근 2%	371	7.28
호장근 3%	365	7.25
호장근 4%	380	7.29
호장근 5%	410	7.05

<표 49> 호장근 추출물 1%+양파추출물 10% 원료 점안제 안정성 검토

원료 함량	Osmolarity	pH
호장근 1%	331	7.62
양파추출물 원액	176	5.83
호장근 1%+양파추출물 10%	285	7.25

<표 50> 호장근 추출물 1%+양파추출물 10% 원료의 NaCl 삼투압 조절

원료 함량	Osmolality
NaCl 0.45%	331
NaCl 0.9%	445
NaCl 1.35%	563
NaCl 1.8%	647

2. 반려동물 경구용 건강기능식품 및 점안제 임상시험

가. 경구용 건강식품 임상시험 설계 및 유효성 평가

(1) 임상시험 설계

- 의약품 안구건조증 치료제 임상시험 가이드라인을 참고하여 국제적 기준에 적합한 반려동물 경구용 건강식품 임상시험 프로토콜 개발 및 효능평가

(가) 시험제목

안구건조증 환견에서 호장근 함유 경구용 비스킷 건강식품 투여로 건성안 개선 효능평가

(나) 시험목적

호장근이 포함된 비스킷을 안구건조증 환견에 투여하고 눈물양 및 안구상태를 평가하여 건성안 개선 확인

(다) 시험방법

- 호장근 비스킷

① 급여량 : 호장근 300mg in 3.5g 비스킷/1 ea/ 5kg body

- 시험 대상

① 시험군 구성: 안구건조증을 가지고 있는 반려견 20마리(시험 1군: 5마리-A Sample 급여, 시험 2군: 15마리-B Sample 급여)

② 피험견 모집방법: 실시기관을 내원한 안구건조증 환견, 기존에 실시기관을 내원한 이력이 있는 안구건조증 환견의 참여 유도, 지역 동물병원의 협조를 통한 안구건조증환견, 일반 보호자 대상 홍보모집

③ 선정 기준: 보호자가 임상참가 및 임상 프로토콜을 준수하는 의지를 갖고 임상에

동의를 받은 대상자, 생후 1년 이상의 성인 안구건조증 환견, Schimer Tear Test(SST) 눈물량 수치가 10 이하인 경우, 안구건조증으로 인한 안구변화를 보이는 경우

- 검사항목: 투여 6주, 투여 전, 14일, 28일, 42일 방문

	시험일차	항목
투여 전	Day 0	Schimer Tear Test(안구건조증 진단)
		Tear Break Up Time(눈물막 파괴 시간)
		Clinical observation(일반증상 확인)
투여 후	Day 21	Schimer Tear Test(눈물양 변화 확인)
		Tear Break Up Time(눈물막 파괴 시간)
		Clinical observation(일반증상 확인)
	Day 42	Adverse events(부작용 확인)
		Schimer Tear Test(눈물양 변화 확인)
		Tear Break Up Time(눈물막 파괴 시간)
		Clinical observation(일반증상 확인)
		Adverse events(부작용 확인)

※ 진단 검사 후 7일 이내에 최초 급여가 개시되도록 함

(2) 시험 결과

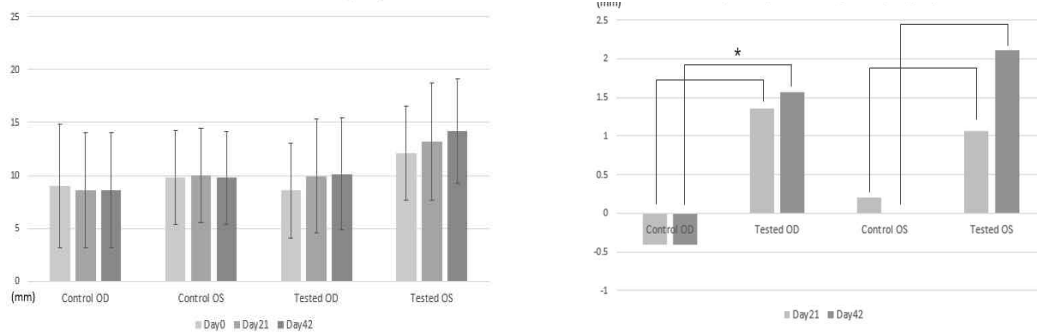
- 대조군에 비해 시험군은 시간에 따라 눈물 분비량이 증가하는 경향을 보였으나 대조군 과 시험군 모두에서 Day 0, Day 21, Day 42 사이의 유의적인 차이는 확인되지 않음.
- 호장근 비스킷 투여 후 안구상태는 양호하며 42일 후까지 부작용은 확인되지 않음.
- 호장근 비스킷은 안구건조증이 있는 환견에서 부작용 없이 눈물량을 조금씩 늘릴 것으로 사료되며 추후 장기적인 투여에 의한 눈물 분비, 윤활 단백질 동태 및 부작용 확인이 필요할 것으로 사료됨.

<표 51> 호장근 비스킷 투여 전후 눈물량 측정값

Schirmer Tear Test		Day			
		Day 0	Day 21	Day 42	p value
Control (n=5)	OD	9.00±5.83	8.60±5.41	8.60±5.46	0.437
	OS	9.80±4.44	10.00±4.42	9.80±4.38	0.585

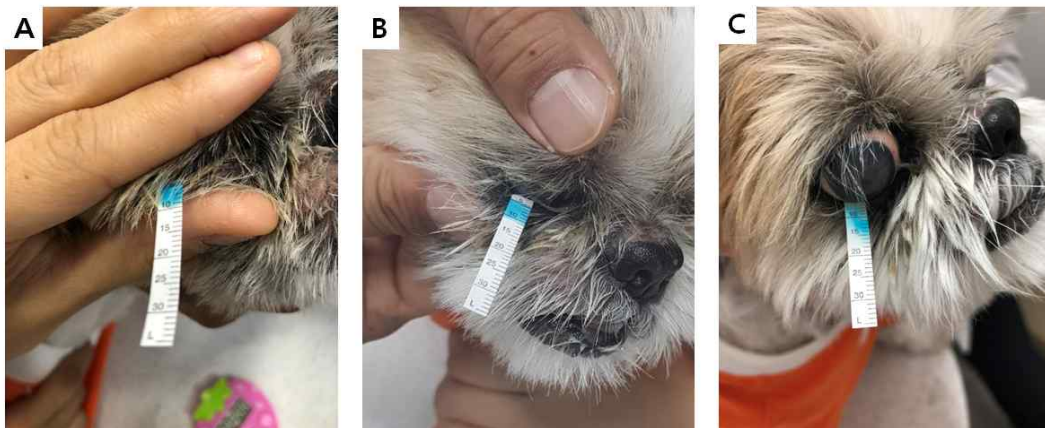
Tested (n=14)	OD	8.57±4.50	9.93±5.40	10.14±5.26	0.930
	OS	12.11±4.41	13.18±5.52	14.21±4.96	0.952

OD: oculus dexter, OS: oculus sinister



투여 전 후 눈물량 변화평가 투여 전을 기준으로 평가한 변화량 그래프

<그림 131> 반려동물 비스킷 임상시험



A: 투여 전, B: 투여 후 21일째, C: 투여 후 42일째
<그림 132> 호장근 비스킷 투여 전, 투여 후 눈물량 변화

나. 점안제 임상시험 설계 및 유효성 평가

(1) 임상시험 설계

의약품 연구건조증 치료제 임상시험 가이드라인을 참고하여 국제적 기준에 적합한 반려동물 임상시험 프로토콜 개발 및 효능평가

(가) 시험제목

안구건조증 환견에서 호장근 함유 점안제의 건성안 개선 효능평가

(나) 시험목적

호장근이 포함된 점안제를 안구건조증 환견에 투여하고 눈물양 및 안구상태를 평가하여 건성안 개선 확인

(다) 시험방법

- 호장근 안과용 제제 시험물질

① 투여량 : 1-2 drop(400 μ g 호장근 in 20 μ l)/ 2회 투여/ 1day

② 시험물질정보 : 호장근 1% + 양파추출물 10%

- 시험 대상

① 시험군 구성: 안구건조증을 가지고 있는 반려견 10마리

② 피험견 모집방법: 실시기관을 내원한 안구건조증 환견, 기존에 실시기관을 내원한 이력이 있는 안구건조증 환견의 참여 유도, 지역 동물병원의 협조를 통한 안구건조증환견, 일반 보호자 대상 홍보모집

③ 선정 기준: 보호자가 임상참가 및 임상 프로토콜을 준수하는 의지를 갖고 임상에 동의한 대상자, 생후 1년 이상의 성인 안구건조증환견, Schimer Tear Test(STT) 눈물량 수치가 10 이하인 경우, 안구건조증으로 인한 안구변화를 보이는 경우

- 처리방법

① 환견은 매일 오전, 오후 2회 1주 동안 호장근 안과용 제제를 투여함. 단, 이상반응 여부를 면밀히 관찰하여야 함.

② 시험기간동안 내원하는 경우, 담당책임자가 호장근 안과용 제제 투여 전 후에 눈검사를 실시하고 투여 2시간 후에 STT 진행

③ 최종 방문시 시험 책임자가 안구검사를 실시하고, STT, OSDI, 부작용 검사를 하고 호장근 안과용 제제 2시간 후에 STT 검사를 실시 후 임상 종료

- 검사항목

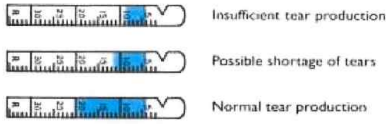
구분	시험일차	항목
투여 전	Day 1	Schimer Tear Test(안구건조증 진단)

		Clinical observation(일반증상 확인)
투여 후	Day 7	Schirmer Tear Test(안구건조증 진단) Clinical observation(일반증상 확인) Adverse events(부작용 확인)

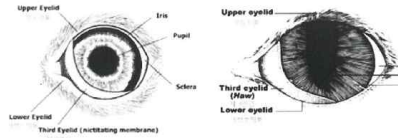
Schirmer Tear Test strip and procedure



Results



Schirmer Tear Test



안약투여

이상반응 [Adverse Events]		
□ 있음	Events 1	Events 2
명세상 및 일회 (YYYY/MM/DD) YYYY/MM/DD		
종(om going)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
이상반응대부	<input type="checkbox"/> Mild/Grade 1 <input type="checkbox"/> Moderate/Grade 2 <input type="checkbox"/> Severe/Grade 3 <input type="checkbox"/> Severe/Grade 4 <input type="checkbox"/> Severe/Grade 5	<input type="checkbox"/> Mild/Grade 1 <input type="checkbox"/> Moderate/Grade 2 <input type="checkbox"/> Severe/Grade 3 <input type="checkbox"/> Severe/Grade 4 <input type="checkbox"/> Severe/Grade 5
종류	<input type="checkbox"/> 물체의 침투 <input type="checkbox"/> 부형화	<input type="checkbox"/> 물체의 침투 <input type="checkbox"/> 부형화
결과	<input type="checkbox"/> 계속됨 <input type="checkbox"/> 간헐적 <input type="checkbox"/> 1회	<input type="checkbox"/> 계속됨 <input type="checkbox"/> 간헐적 <input type="checkbox"/> 1회
평가	<input type="checkbox"/> 회복 후유증 없음 <input type="checkbox"/> 회복 후유증 있음 <input type="checkbox"/> 유해사태 지속, 조치 없음 <input type="checkbox"/> 유해사태 지속, 조치 지속 <input type="checkbox"/> 사망 <input type="checkbox"/> 죽은동물 상태	<input type="checkbox"/> 회복 후유증 없음 <input type="checkbox"/> 회복 후유증 있음 <input type="checkbox"/> 유해사태 지속, 조치 없음 <input type="checkbox"/> 유해사태 지속, 조치 지속 <input type="checkbox"/> 사망 <input type="checkbox"/> 죽은동물 상태
평가의 연관관계*	<input type="checkbox"/> Definitely related(관연성이 명백함) <input type="checkbox"/> Probably related(관연성이 있음) <input type="checkbox"/> Possibly related(관연성이 의심됨) <input type="checkbox"/> Unlikely related(관연성이 의심) <input type="checkbox"/> Not related(관연성이 없음)	<input type="checkbox"/> Definitely related(관연성이 명백함) <input type="checkbox"/> Probably related(관연성이 있음) <input type="checkbox"/> Possibly related(관연성이 의심됨) <input type="checkbox"/> Unlikely related(관연성이 의심) <input type="checkbox"/> Not related(관연성이 없음)
발단 조치*	<input type="checkbox"/> 특별한 조치 없음 <input type="checkbox"/> 시정/회복을 위한 추가 조치 중단 <input type="checkbox"/> 시정/회복을 위한 추가 중단 <input type="checkbox"/> 시정/회복을 위한 추가 중단 <input type="checkbox"/> 시정/회복을 위한 추가 중단 <input type="checkbox"/> 사망 <input type="checkbox"/> 기타 상세	<input type="checkbox"/> 특별한 조치 없음 <input type="checkbox"/> 시정/회복을 위한 추가 조치 중단 <input type="checkbox"/> 시정/회복을 위한 추가 중단 <input type="checkbox"/> 시정/회복을 위한 추가 중단 <input type="checkbox"/> 시정/회복을 위한 추가 중단 <input type="checkbox"/> 사망 <input type="checkbox"/> 기타 상세
* 이상반응이나 불합당한 임상적 징후에서 발생하지만, 유해가 없거나 경증(미미)의 증세를 가지고 있는 경우 치료 가 필요하지 않거나 일시적 증상에 한한 경우 ** Grade 2: 최소한으로 유해사태가 재발하거나 치료가 요구되는 경우, 이상반응을 종료할 충분한 치료 * Grade 3: 심각한 또는 치명적으로 중요하지만 '중대한 이상반응(Grade 4)'에 해당하지 않는 경우도 이상반응을 종료할 충분한 치료 Grade 4: 중대한 이상반응에 해당되는 것으로서, 심각한 생명의 위험, 불구 및 영구적 기능장애 초래, 입원이나 입 원의 연장, 수술적 처치의 선별적 기술 조차 유용하지 않음 Grade 5: 사망		
시정 Signature _____	날짜 Date 년 YYYY 월 MM 일 DD	

이상반응 기록서

<그림 133> 반려동물 점안제 임상시험

(2) 시험 결과

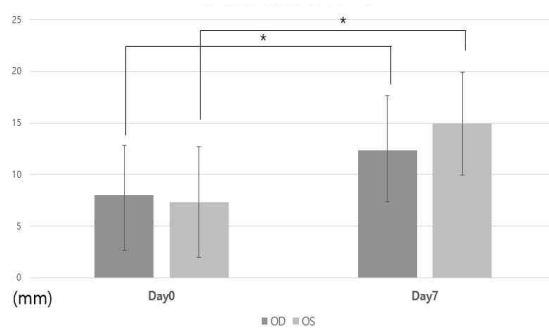
- 호장근 안과용 제제 투여 전 눈물량 측정값 (STT) 은 오른쪽 눈 (OD) 8.00±4.85 mm 이며 왼쪽 눈 (OS)은 7.32±5.35 mm을 보임. 호장근 안과용 제제 투여 전, 투여 7일 후 눈물량 측정값을 비교한 결과 양안 모두 증가한 것을 확인할 수 있었고, 안구의 병적 상태 및 부작용을 확인할 수 없었음.
- 호장근 안과용 제제의 안전성은 7일 후까지는 안전하지만 추후 장기적으로 추적 관찰이 필요할 것으로 보이며, 호장근 안과용 제제는 안구건조증이 있는 환경에서 부작용 없이 효과적으로 눈물량을 늘릴 것으로 확인되며 추후 장기적인 투여 및 반응, 부작용 확인이 필요할 것으로 사료됨.

<표 52> 실험군의 호장근 안과용 제제 투여 전후 눈물량 측정값

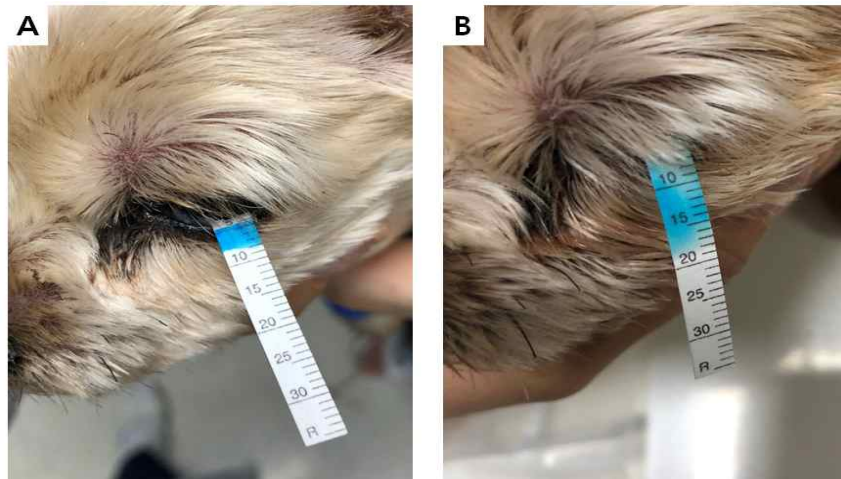
Parameter		Tested (n=11)		
		Day 0	Day 7	p-value
Schirmer Tear Test	OD	8.00±4.85	12.32±5.35	0.025
	OS	7.32±5.35	14.91±4.97	0.001

OD: oculus dexter, OS: oculus sinister

* P value < 0.05



<그림 134> 호장근 안과용 제제 투약 전후로 평가한 눈물량 그래프



<그림 135> 호장근 안과용 제제 투여 전후 눈물량 변화(A: 투여 전, B: 투여 후)

다. 호장근 추출물의 동물용 건강기능식품 개발 및 제품화

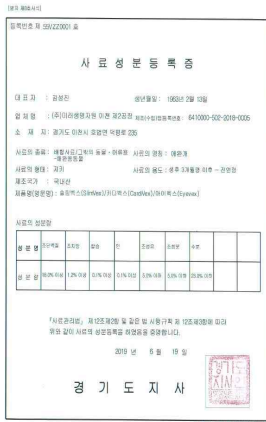
(1) 임상시험 진행 후 건강기능식품인 아이백스 제품화 진행

- 경구용 건강식품에 적합한 jerky 형태로 진행
- 원재료 섭취 근거에 따라 섭취 용량 설정

- 원료추출 및 분무건조 경험이 있는 기관을 선정하여 원료추출 의뢰
- 반려동물용 건강기능식품 제작 경험이 있는 기관을 선정해 제형 제작 의뢰
- 아이백스 기술자료집 제작

<표 53> 호장근 추출물의 동물용 기능성식품 개발

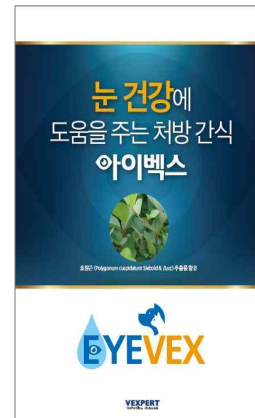
제품명	아이백스(호장근 원료 경구용 눈건강기능식품)			
원료추출	삼우다연			
제작기관	(주)미래생명자원			
제품형태	jerky			
원료함량	300mg/5kg			
성분량	조단백질	18.0% 이상	조섬유	5.0% 이하
	조지방	1.2% 이상	조회분	5.0% 이하
	칼슘	0.1% 이상	수분	23.0% 이하
	인	0.1% 이상		
권장량	1ea/체중 5kg			



사료성분 등록증



아이백스 제품사진



아이백스 기술자료집

<그림 136> 반려동물 비스킷 제품화



<그림 137> 반려동물 점안제 제품화

라. 동물용의약품 품목허가를 위한 문서화 신청

(1) 동물용의약품 품목 허가를 위한 규정

- 약사법 제 85조
- 동물용의약품등 취급규칙 (농림축산식품부령)
- 동물용의약품등 안전성, 유효성 심사에 관한 규정 (농림축산검역본부 고시)
- 동물용의약품등 기술검토 요령 (농림축산검역본부 예규)
- 동물용의약품등 임상시험 관리지침 (농림축산검역본부 고시)
- 동물용의약품등 안정성 시험지침 (농림축산검역본부 고시)
- 동물용의약품등 독성 시험지침 (농림축산검역본부 고시)

(2) 위 규정에 따른 허가 절차 및 항목

①신약, 자료제출용, 카피약 등록은 농림축산검역본부에서 진행하며, 협회신고약 등록은 KAHPA에서 진행함.

- 농림축산검역본부

- 신약으로 등록하기 위해서는 기술검토 후 야외임상시험을 진행한 후 문제가 없다면 허가승인을 받을 수 있음.
- 자료제출용은 기술검토만 받는다면 허가 승인 받을 수 있음.
- 카피약은 다른 절차 없이 허가승인 받을 수 있음.

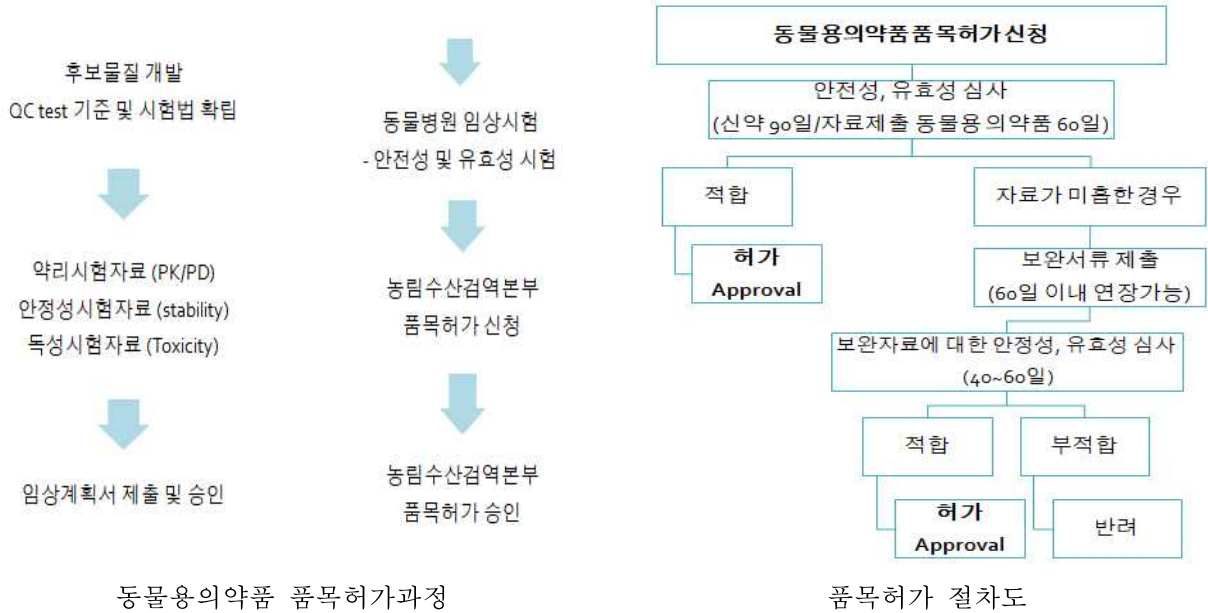
- KAHPA

- 협회 신고약은 기술검토 후 문제가 없다면 신고가 가능함.



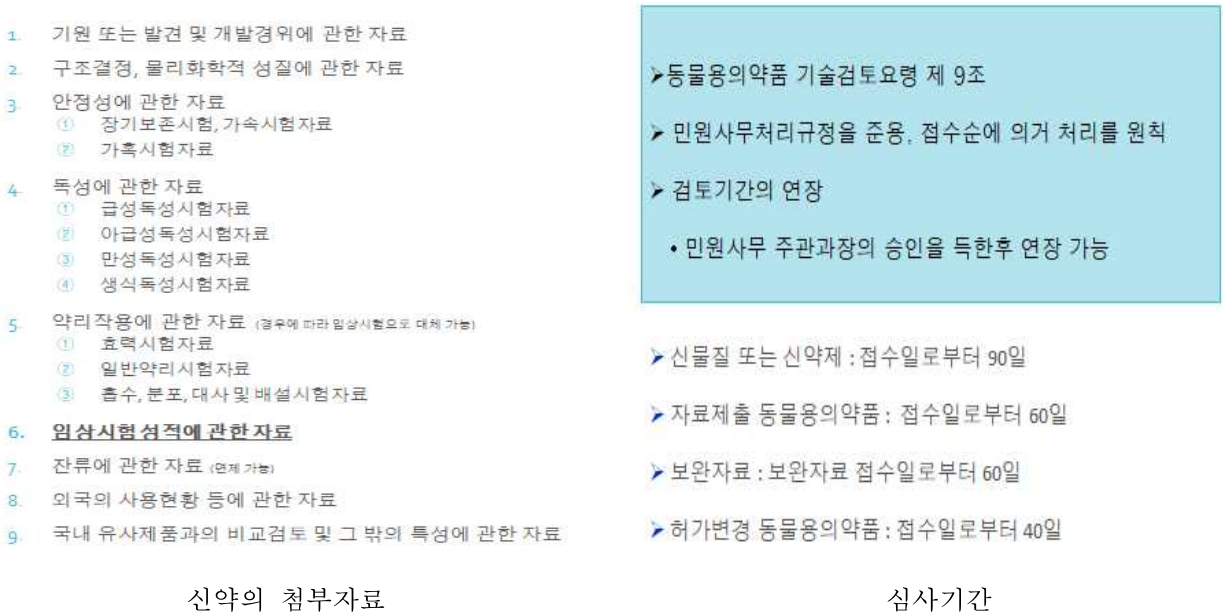
<그림 138> 동물용의약품 허가 절차

②동물용의약품의 품목허가과정은 아래와 같은 절차로 이루어짐.



<그림 139> 동물의약품 품목허가과정 및 허가 절차도

③동물용의약품의 등록자료는 기원 또는 발견 및 개발경위에 관한 자료와 구조결정, 물리학적 성질에 관한 자료, 안정성에 관한 자료 등이 필요하며, 심사기간은 신물질 또는 신약제인 경우에 접수일로부터 90일이 걸림.



<그림 140> 동물의약품의 첨부자료 및 심사기간

- 규정에 따라 준비된 시험 항목 서류 목록

1. 기원 또는 발견 및 개발경위에 관한 자료
2. 구조결정, 물리화학적 성질에 관한 자료
3. 안정성에 관한 자료
 - 3-1. 장기보존시험, 가속시험자료
 - 3-2. 가혹시험자료
4. 독성에 관한 자료
 - 4-1. 급성독성시험자료
 - 4-2. 아급성독성시험자료
 - 4-3. 만성독성시험자료
 - 4-4. 생식독성시험자료
 - 4-5. 변이원성시험자료
 - 4-6. 암원성시험자료
 - 4-7. 국소독성시험자료

· 동물용의약품의 특성에 따라 우발적으로 또는 의도적으로 사람 및 동물의 피부 또는 점막에 접촉 가능성이 있는 것에 한함
5. 약리작용에 관한 자료
 - 5-1. 효력시험자료
 - 5-2. 일반약리시험자료
6. 임상시험 성적에 관한자료 (대상동물에 대한 안전시험성적 자료 포함)
 - 6-1. 임상시험자료
7. 잔류에 관한 자료
 - 7-1. 잔류허용한계 설정 근거 자료
 - 7-2. 체내잔류와 잔류분석방법 및 휴약기간에 관한 자료
8. 외국의 사용현황 등에 관한 자료
9. 국내 유사제품과의 비교 검토 및 그 밖의 특성에 관한 자료

(3) 동물약품 품목허가를 위한 문서화 및 신청 진행사항

- 동물용의약품 등록을 위해 호장근 줄기+잎 추출물에 대한 유전독성 시험을 GLP기관인 크로엔에 위탁연구를 의뢰함. 그 결과 염색체이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험에서 염색체의 구조적 이상 - 음성, 염색체이상시험 - 수적이상 양성, 복귀돌연변이시험 - 양성, 소핵시험 - 음성으로 판단됨.
- 독성시험 중 염색체이상시험 중 수적이상 양성, 복귀돌연변이시험에서 양성으로 판명되어 동물용의약품 규정에 허가가 불가능하여 동물건강기능식품인 보조사료로 품목 전환하여 시제품을 생산함.

제 7 절 사업화성과 및 매출실적

1. 사업화 성과

가. 삼일제약(주)

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	100억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : 0.0%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		-
		3년 후 제품 세계시장 경쟁력 순위		-

나. (주)백스퍼트

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	621만원
			향후 3년간 매출	3,000만원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.4% 국외 : 0.0%
			향후 3년간 매출	국내 : 0.7% 국외 : 0.2%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		4위
		3년 후 제품 세계시장 경쟁력 순위		2위

2. 사업화 계획 및 매출 실적

가. 삼일제약(주)

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		-	100	120	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	5	5
국외		-	-	-	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		- 제형연구를 통한 점안제 등 치료제 개발 - 기능성 원료를 활용한 천연물 신약 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	100	120	
	수 출	-	-	-	

나. (주)백스퍼트

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3년			
	소요예산(백만원)	2,000			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		100	300	800	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.4	0.7	1.0
국외		0.0	0.2	0.4	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		- 반려견 및 반려묘의 노령화에 따른 안과 질환 증가에 적절한 치료제 개발 - 안구건조증 점안제 - 결막염 등 염증성 질환 예방 치료제 - long acting 점안제 등의 개발 계획			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	100	300	800	
	수 출	-	300	500	

제3장 목표달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절 목표

1. 최종 목표

호장근 추출물을 이용한 눈건강 개별 인정형 승인 및 건강기능식품 제품 개발 및 동물용 의약외품 개발

2. 세부 목표

가. 주관기관 : 삼일제약(주)

- Pilot scale 생산 및 대량생산 공정 확립(문서화): 안정된 생산방법 확립
- 시제품제작: 가장 효율적인 공정으로 확인된 시제품 제작
- 제형연구: 건강기능식품 소재로서 적합한 제형 및 복합소재 제제 검토
- 안정성 평가: 유통기한 설정을 위한 안정성 평가 실시
- 임상시험약 제조 및 인체적용시험 진행: 임상 CRO를 선정하고, 인체적용시험 실시
- 개별인정형 원료 신청/승인 및 제품화: 개별인정형 원료 신청을 위한 문서화 및 신청을 실시하고 승인 후 제품화를 추진

나. 제1협동연구기관 : (주)백스퍼트

- 안정성평가: 유전독성, 단회(설치류/비설치류), 반복투여 독성시험
- 반려동물 효능 및 임상시험 실시
- 동물부외품 제제 연구 및 안정성 평가
- 농림축산식품부 “동물용 의약부외품 등록” 신청 및 제품화

다. 제2협동연구기관 : 한국한의학연구원

- 호장근 원료의 소재지별, 부위별 성분물질 규명
- 원료의 표준화 및 기준규격 설정
- Lab scale 추출공정 확보
- in vitro/in vivo 유효성 평가: 안구건조증, 눈피로, 황반변성 모델에서 기능성 평가

라. 위탁연구기관 : (주)크로엔

- 호장근 추출물을 이용한 눈건강 개별 인정형 승인 및 건강기능식품 제품 개발을 위한 GLP인증기관에서 전임상 평가
- 안정성 평가

- 유전독성시험(복귀돌연변이, 염색체이상, 소핵시험)
- 설치류/비설치류 단회투여독성시험
- 설치류 4주 용량결정시험
- 설치류 13주 반복투여독성시험

제 2 절 목표 달성여부

1. 목표 달성도

구분	수행기관	연구개발 목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	[주관기관] 삼일제약(주)	원료 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> • 원료의 표본 및 DNA 동정을 통한 원료 품질 확보 • 소재 공급 협약을 통한 안정적인 원료 확보
		대량생산 공정 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> • scale up 추출공정 최적화 • 추출용매 및 온도 조건 최적화: 70℃, 3시간, 열수 추출 조건 선정
		GMP 3배치 대량생산	100	<ul style="list-style-type: none"> • 제조공정 확립: 추출, 여과, 농축 등 조건 확립 • 생산배치별 동등성 확보
		생산 배치간 동등성 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> • 지표성분 선정 및 기준설정: polydatin 등 • 이화학적 특성 분석 및 규격 설정
	[제1협동연구기관] 백스퍼트	안전성평가	100	<ul style="list-style-type: none"> • 유전독성, 설치류 단회투여독성, 비설치류 단회독성투여, 4주 용량결정시험, 13주 반복투여 독성시험 진행
		동물용 건강기능식품 제형연구	100	<ul style="list-style-type: none"> • 안과형제제 preformulation 결정 및 용량 결정, 안정성 검토
		반려동물 예비임상시험	100	<ul style="list-style-type: none"> • 효능시험 프로토콜개발 및 검토 • 정상견에서 안과형제제 투여 후 효능 및 부작용 검토 • 안구건조증 환경에서 안과형제제 투여 후 효능 및 부작용 검토
	[제2협동연구기관] 한의학연구원	원료생약의 표준화, 기능성물질	100	<ul style="list-style-type: none"> • 용매별 추출물 제조 비교 및 최종 용매 선정 • HPLC분석 조건 설정 및 밸리데이션

		선정		<ul style="list-style-type: none"> 추출물 속 주요성분 5종 성분 규명: polydatin 등
		전임상가능성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> 건성안 in vivo모델에서 눈물 분비량 개선확인 건성안 in vivo모델에서 각막 형태변화 개선확인
2차 년도	[주관기관] 삼일제약(주)	제형연구 및 안정성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> 캡슐, 점안제, 정제 제형연구 및 최종 제형선정 제형별 제조 공정 확보 가속 및 장기안정성 시험
		임상시험약 제조	100	<ul style="list-style-type: none"> 임상약 제조업체 선정 및 preformulation 임상약 원료약품 및 분량 시험
		인체적용 시험	100	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 전문 CRO 기관 선정 인체적용시험 프로토콜 개발
	[제1]협동연구기관 벡스퍼트	안전성평가	100	<ul style="list-style-type: none"> 유전독성, 설치류 단회투여독성, 비설치류 단회독성투여, 4주 용량결정시험, 13주 반복투여 독성시험 완료
		반려동물 임상시험	100	<ul style="list-style-type: none"> 반려동물 임상시험 최종 프로토콜 개발 완료 반려동물 점안제 임상시험 환견 모집 및 경구형 비스켓 임상시험 진행
	[제2]협동연구기관 한의학연구원	유효성평가 및 기전연구 (in vitro)	100	<ul style="list-style-type: none"> 고삼투압으로 자극한 결막상피세포에서 polydatin의 세포보호 및 항염 효과 확인 결막상피세포에서 polydatin의 MUC4 회복 효과 확인 결막상피세포에서 고 삼투압에 의해 증가된 MMP9 mRNA 발현감소 확인
		유효성평가 및 기전연구 (in vivo)	100	<ul style="list-style-type: none"> 건성안 동물모델에서 눈 각막조직의 세포 사멸 억제 확인 건성안 동물모델에서 눈물 분비량 및 각막형태 개선 확인 각막조직 내 뮤신층 감소 회복 및 염증성 사이토카인 mRNA 발현 억제 확인
		추가소재 전임상가능성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> 고삼투압 자극 결막상피세포에서 후보 약용작물 추출물 10종 screening 및 4종의 후보 소재에서 세포독성 감소 확인

		(in vitro)		<ul style="list-style-type: none"> • 후보 추출물인 사삼추출물에 의한 염증성 사이토카인 IL-6, TNF-a의 mRNA 발현 감소확인 • 사삼 추출물에 의한 Mucin 4 및 MMP의 mRNA발현 개선 확인 • 한국산 및 중국산 사삼의 원산지에 따른 세포 독성 및 효능평가
		추가소재 전임상가능성 평가 (in vivo)	100	<ul style="list-style-type: none"> • 건성안 동물모델에서 사삼+감초추출물 처리에 의한 눈물양 및 각막 회복 개선 확인 • 건성안 모델에서 사삼추출물 처리에 의한 눈물막 깨짐 증상 개선 확인 • 건성안 동물모델에서 한국산 및 중국산 사삼의 원산지에 따른 눈물양 및 각막 회복 개선 확인
3차 년도	[주관기관] 삼일제약(주)	인체적용 시험	90	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험 시험자 모집 및 진행 현황 모니터링 • 2020년 상반기 완료 예정
		건기식 개별인정형 신청 및 승인	90	<ul style="list-style-type: none"> • 개별인정형 인허가 문서화를 위한 기준규격, 영양성분, 잔류농약, 중금속 등 공인기관 분석 진행 • 식품 품목제조 신고 및 등록완료 • 개별인정형 인허가 문서화
		건기식 제품화	100	<ul style="list-style-type: none"> • 건강기능식품 생산 공정 최적화 • 호장근 추출물 포함 눈건강 건강기능식품 임상약 및 시제품 제작
	[제]협동연구기관 백스퍼트	반려동물 임상실험	100	<ul style="list-style-type: none"> • 반려동물 비스킷 안구건조증 환견모델에서 임상시험 완료 및 효능확인 • 반려동물 점안제 안구건조증 환견모델에서 임상시험 완료 및 효능확인
		동물용 의약부외품 등록	100	<ul style="list-style-type: none"> • 동물건강기능식품인 보조 사료성분등록 문서화 • 사료성분 등록 및 기술자료집 발간
		동물용 의약부외품 제품화	100	<ul style="list-style-type: none"> • 동물용 점안제 연구용 시제품 제작 • 경구용 눈 건강기능식품 제품 출시 및 판매

제 3 절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책

1. 목표 미달성 시 원인(사유)

- 호장근 지상부(줄기+잎) 열수 추출물은 염색체의 구조 이상은 유발하지 않으나 수적 이상을 유발하는 것으로 확인됨에 따라 사용 원료를 식품 소재로 사용이 가능한 호장근 줄기로 변경 하였음. 이런 과정에서 식약처 관련 부서 및 협동 연구자들과 공동 협의를 통해 해결 방안을 모색하여 개발 소재를 호장근 줄기로 변경하기 위한 명확한 근거를 확보하였고, 호장근 지상부 보다 채집 공정이 추가된 원생약 확보 기간 및 안전성 여부를 재 확인하기 위해 유전독성 시험을 추가로 진행하는 과정에서 연구 일정이 순연 되었음.
- 최근 중국발 신종 코로나 바이러스로 인한 국가 보건의료 비상 상황에서 목표대비 70% 가까이 진행되고 있던 인체적용시험이 스크리닝을 위한 대상자의 의료기관 방문 자제요청 및 의료기관 방문을 꺼리고 있어 신규 대상자 모집 뿐만 아니라 기존 시험 대상자들의 자발적 동의 취하로 인체적용시험 진행이 어려운 상황으로 2020년 상반기 완료 목표로 진행하고 있었으나 연구일정 순연이 예상 됨.

2. 차후대책

- 연구 진행과정에서 발생된 연구순연 사유에 대해 최대한 조기에 마무리하여 허가 신청을 진행하는 것을 계획하고 있음

·인체적용 시험 대상자 신규 모집 방안

인체적용시험 초기 빠르게 모집하기 위해 대규모 스크리닝 및 진료를 통해 대상자를 모집하였으나, 현재 중국발 코로나 바이러스로 인해 병원측의 방문 자제요청, 의료기관 방문 기피 등 신규대상자 모집이 어려운 상황임. 가능한 최소한의 스크리닝을 통해 의료기관내 감염의 가능성을 최소화하여 모집할 계획임

·진행 중인 시험 대상자의 자발적 동의 취하에 대한 대책

코로나바이러스 감염환자 발생 이전에 등록된 대상자의 경우 총 4회의 방문 중 3회 또는 4회 방문자가 다수 임. 이들 중 상당 수가 의료기관 내 2-3차 감염을 우려하여 병원방문을 거부하고 있어 이로 인한 대상자 탈락이 증가하고 있음. 임상 간호사가 대상자에게 지속적으로 전화 상담을 통해 현재 연구를 진행 중인 의료기관은 신종 코로나바이러스에 안전한 지역이고, 철저하게 관리하고 있다는 안내를 함으로써 의료기관 방문을 하도록 유도할 계획임.

·인체적용시험 대상자 모집인원 추가 여부

예상치 못한 국가보건 비상상황에 탈락자 수가 증가하고 있어 향후 추가 예상 탈락되는 대상자를 고려하여 랜덤 90명에서 추가 모집을 통해 통계적 유의성을 확보할 수 있도록 CRO기관 및 임상연구자와 협의 중임.

·인체적용시험 완료 후 빠른 허가 신청

현재 인체적용시험 결과만 추가하면 식약처 허가 신청이 가능한 정도로 허가 신청에 대한 documentation이 완료되어 있어 인체적용시험이 완료되어 최종 보고서 발행과 함께 허가 신청서를 제출할 계획임.

제4장 연구개발 성과 및 활용계획

1. 연구개발 결과 및 성과

가. 학술발표

(1) 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	The protective effect of Polygonum cuspidatum (PCE) aqueous extract in a dry eye	Nutrients	Bongkyun Park	10(10)	스위스	MDPI AG	SCIE	2018.10.19	https://doi.org/10.3390/nu10101550
2	Improvement in diabetic retinopathy through protection against retinal apoptosis in spontaneously diabetic Torii rats mediated by ethanol extract of Osteomeles schwerinae C.K. Schneid.	Nutrients	Chan-Sik Kim	11(3)	스위스	MDPI AG	SCIE	2019.03.04	doi:10.3390/nu11030546
3	Pueraria lobata extract protects hydrogen peroxide-induced human retinal pigment epithelial cells death and membrane permeability	Evidence-based Complementary and Alternative Medicine	Nu Ri Kang	2019	영국	HINDAWI	SCIE	2019.07.04	https://doi.org/10.1155/2019/5710289
4	Polydatin inhibits NLRP3 inflammasome in dry eye disease by attenuating oxidative stress and inhibiting the NF-κB pathway	Nutrients	Bongkyun Park	11(11)	스위스	MDPI AG	SCIE	2019.11.15	doi:10.3390/nu11112792
5	Polygonum cuspidatum stem	Journal of Exercise	박봉균	23(4)	한국	운동영양학회	비SCI	2019.12.31	https://doi.org/

	extract (PSE) attenuates dry eye disease by inhibiting inflammation and apoptosis	Nutrition and Biochemistry (운동영양학회지)							10.20463/jenb.2019.0026
6	Toxicological effects of urban particulate matter on corneal and conjunctival epithelial cells	Toxicological Research			한국	한국독성학회지	비SCI	게재확정	

(2)국내외 학술대회 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2018년 한국운동영양학회 춘계학술대회	박봉균	2018.05.25	부산 호메르스 호텔	대한민국
2	2018년 (사)한국약용작물학회 추계학술발표회 및 한중 국제심포지엄	박봉균	2018.10.17	제주 호텔빠레브	대한민국

나. 지식재산권

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	호장근 줄기 추출물 또는 이로부터 분리된 폴리다틴 및 루틴 혼합물을 유효성분으로 포함하는 안구건조증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	대한민국	삼일제약(주)	2018.11.28	10-2018-0150009				100
2	호장근 줄기 추출물을 유효성분으로 포함하는 안구건조증의 예방 및 치료용 조성물의 제조방법	대한민국	삼일제약(주)	2018.11.28	10-2018-0150007				100

3	폴리다틴을 유효성분으로 포함하는 전안부 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	대한민국	한국학 의학연 구원	2018.10.25	10-2018-01 28432				100
4	사삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 전안부 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	대한민국	한국학 의학연 구원	2018.12.17	102056926 0000				100
5	사삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 전안부 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	대한민국				한국학 의학연 구원	2019.1 2.11	10-205692 6	100
6	안정성이 증진된 경구투여용 호장근 추출물을 포함하는 고형제제 및 이의 제조방법	대한민국	삼일제 약(주)	2018.11.28	10-2019-01 54796				100
7	안정성이 증진된 경구투여용 호장근 추출물을 포함하는 고형제제 및 이의 제조방법	PCT	삼일제 약(주)	2019.11.27	KR2019-01 6503				100
8	호장근 지상부 추출물을 유효성분으로 포함하는 전안부질환의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	한국학 의학연 구원	2019.12.17	10-2019-01 69075				100

2. 연구개발 성과 활용계획

- 삼일제약(주)은 KGMP(한국 우수의약품제조 및 관리기준)시설을 통해 철저한 품질 관리와 생산분석을 통해 안과계 의약품을 제조생산 판매하는 안과전문 제약회사로서 2019년 기준 1200억원대 매출 달성.
- 본 연구결과를 토대로 기존 눈 건강 기능성제품과 차별화되는 건성안 개선 효능을 갖는 기능성 식품으로 제품화 할 계획임.
- 삼일제약(주)은 2019년 최근, 질환 및 의약품 분류 스펙트럼을 확장하여 ‘비타민스’라는 고용량 비타민제를 개발 출시하였음. 본 연구 결과물인 ‘파인케어 아이’ 눈건강 기능식품의 출시는 사업의 다각화와 현재 정체되어 있는 눈건강 관련 기능식품 시장에 활력소가 될 것임.
- 본 과제를 통해 눈 건강 기능성을 인정을 받은 호장근 추출물 원료를 이용하여 향후 추가연구를 통해 천연물 신약으로 개발 가능여부 검토.
- ㈜백스퍼트는 동물약품 및 신약연구개발에 20년 이상의 많은 노하우와 경력을 보유한 전문가를 주축으로 서울대 및 건국대 동물병원과 연구협약을 통해 다양한 동물용의약품을 개발 판매하는 회사임.
- 본 연구를 통해 개발된 기술은 반려견 뿐만 아니라 반려묘에서도 적용 가능할 것으로 생각되며, 이는 개발된 제품의 시장 확장에 도움이 될 것으로 기대됨. 특히 jerky 형태의 건강기능식품 ‘아이백스’는 시장에 출시된 상태로 동물병원 임상수의사를 위한 기술자료집에 수록되어 안구건조증 질환 보조 치료에 도움을 주는 기능성 보조제로 판매될 것임.
- 반려동물의 노령화에 따른 안구 질환의 증가로 이를 예방/치료하기 위한 다양한 동물용 의약품 및 기능성 제품들에 대한 요구가 커지는 상황에서 본 연구를 기반으로 결막염, 녹내장 추가 적응증 시험 및 대규모 임상 시험을 실시 예정임. 또한 국내외 수의과 대학 및 연구기관의 협업을 통해 안구건조증 점안제 및 long-acting 점안제 등 후속제품 개발 및 해외시장 개척 등을 계획하고 있음.
- 현재 동물병원에서 사용되고 있는 다양한 화학요법과 함께 병용 투여하는 보충제 개념의 제품이 시장에서 요구되고 있는 상황임. 본 과제에서 활용된 기술은 협동기관인 한의학연구소에서 보유하고 있는 특허를 기반으로 수행되었으며 이는 인간의 눈 건강을 목적으로 개발된 기술이기 때문에 동물용 제품으로의 용도 특허 및 기술은 추후 백스퍼트에 의해 재창출 되어야 할 것으로 사료됨.

국내 시장

동물용의약품 산업 비전관련 주요 지표

구분	2015년	2017년	2020년	15년 대비 성장수준
국내 생산 규모 (A+B)	6,454억	7,800억	10,600억	1.6배
국내 생산 내수 판매액(A)	4,091억	4,400억	4,900억	1.2배
수출액(B)	2,433억 (214억만불)	3,400억 (300억만불)	5,700억 (500억만불)	2.3배
수출비율	38%	44%	54%	1.5배
수출 품목수 (10억원이상)	15개	24개	40개	2.7배
수출업체 수	67개 사	75개 사	90개 사	1.3배
수입액	2,449억	2,600억	2,900억	1.2배
세계시장규모 (추정)	286조 (252억불)	322조 (285억불)	384조 (339억불)	1.3배
세계시장 점유율	2.3%	2.4%	2.8%	1.2배

✓ 동물용의약품 산업의 수출 산업화 추진 중

✓ 17년 기준 세계시장규모 **285억불**
세계시장 점유율 **2.4%**

✓ 2020년까지 국내 생산 규모 **1조원** 목표
수출 **5억불**
수출비율 **54%**
세계시장 점유율 **2.8%**

출처: 동물용의약품협회, 2018

Page.16

해외 시장

글로벌 동물약품시장 매출 톱5

순위	회사명	매출액(억달러)
①	조에티스	53.1
②	베링거인겔하임 동물건강	46.7
③	머크 동물건강	38.8
④	엘랑코 동물건강	30.9
⑤	바이엘 동물건강	16.6

※ 2017년 기준

자료:스태티스타

✓ 세계 동물용 의약품 시장 중 산업동물용 의약품 **64%**
반려동물 의약품 **36%**

✓ 선진국으로 갈수록 반려동물 비중 ↑

✓ 현재 세계 동물약품 시장은 다국적 기업이 장악

✓ 이 분야 세계 매출 1위 기업 '**조에티스**'

→ 지난해 매출 6조 8,000억원

✓ 인체의약품시장과 달리 연간 2,500만 달러 이상 제품은 대성공

Page.15



자료: 국립축산과학원
조사 방법: 국내 동물병원 11곳 전자차트 분석

- 2016년 기준, 서울 및 전주 지역 11개 동물병원
1만 1,085마리 진료내역(1만 5,531건) 분석

DailyOVET

붙임. 참고문헌

- 건강보험진료비 지급자료. 2012
- 농림축산식품부 축산정책국. 2014
- 농협경제연구소. 2013
- 체재민 등. 국내 개에서 각막질환의 발생양상, Journal of Veterinary clinics. 2007. 557-562.
- 한국건강기능식품협회, 유진투자증권. 2015
- The global market for carotenoids, ReportsnReports. 2011
- Nutitional outlook megazine, By Innova Market Insights. 2014
- Asbell, Penny A., Lemp, Michael a. Dry Eye. 2006
- Theriot Od, Pamela E. Alleviate Dry Eye. 2018
- Asbell, Penny A. , Lemp, Michael a. Dry Eye Disease. 2006
- Gadhiya, Rajesh. Dry Eye Syndrome -An Ayurvedic Perspective. 2017
- 눈치코치한의원. 침침한 눈 건조한 눈. 2012
- 임상진, 차민욱. 눈이 먹는 건강. 2018
- 코구레 노리오. 내 강아지를 위한 질병사진. 2014. 54-55
- 김옥진, 김현주, 정태호, 황인수, 홍선화. 동물질병학. 2015. 19-20
- Nicole K. Scripsema, Dan-Ning Hu, Richard B. Rosen.Lutein, Zeaxanthin, and meso-Zeaxanthin in the Clinical Management of Eye Disease. 2015

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.