

116169

동 아
충 토
하 피
초 피
와 부
소 염
리 예
쟁 방
이 개
 선
혼 조
합 절
물 용
을 식
활 품
용 개
한 발
 최
 종
 보
 고
 서
2020

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원
농
림
축
산
식
품
부

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

고부가가치식품기술개발사업 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003069-01

동충하초와 소리쟁이 혼합물을 활용한 아 토피 피부염 예방/개 선/조절용 식품 개발 최종보고서

2020. 3.26.

주관연구기관 / 가화에프앤씨(주)
협동연구기관 / 경희대학교, 호서대
학교, 차의과학대학교

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

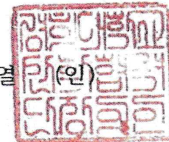
본 보고서를 “동충하초와 소리쟁이 혼합물을 활용한 아토피 피부염 예방/개선 /조절용 식품 개발 ”(개발기간 : 2016.12.15 ~ 2019.12.14)과제의 최종보고서 로 제출합니다.

2019. 12. 14.

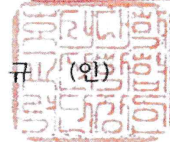
연구기관명 : 가화에프앤씨 (주) (대표자) 심 현 택



참여기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 이 재 열



참여기관명 : 호서대학교 (대표자) 박 승 규 (인)



참여기관명 : 차의과학대학교 (대표자) 이 상 초 (인)



주관연구책임자 : 김 태 영

참여기관책임자 : 김 형 민, 정 현 자, 박 건 영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116169-3	해당 단계 연구 기간	2016.12.15. ~2019.12.14	단 계 구 분	최종/3
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	동충하초와 소리쟁이 혼합물을 활용한 아토피 피부염 예방/개선/조절용 식품 개발			
연구 책임자	김 태 영	해당단계 참 여 연구원 수	총: 24 명 내부: 24 명 외부: 명	해당단계 연구 개발 비	정부: 257,000 천원 민간: 85,670 천원 계: 342,670 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 24 명 내부: 24 명 외부: 명	총 연구개발 비	정부: 530,000 천원 민간: 176,700 천원 계 : 706,700 천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	가화에프앤씨 (주) 경희대학교 한의학과 호서대학교 식품제약공학부 차의과학대학교 식품생명공학과			참여기업명 가화에프앤씨 (주)	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자: 김태영	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 본 연구 사업에서는 약식동원(藥食同源) 이치에 따른 한의학적 법칙을 적극 활용, 그 효능은 더욱 증대시키고 부작용 등은 최소화한 동충하초와 소리쟁이 추출물을 각각 40%/60% 비율로 혼합, 각 지표성분인 코디세핀과 크리소파놀 포함, 아토피 피부염 개선/예방/조절 효능을 상세히 분석한 연구 개발결과가 매우 우수하며 아토피 피부염 개선/예방/조절용 건강음료, 분말, 환, 과립 시제품의 개발 또는 건강기능식품으로서의 활용도 이루어지고 있으며 후속연구로 다양한 염증질환 치료기술 개발 등 기반 제공함.				보고서 면수	

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	목적: 동충하초와 소리쟁이 혼합물을 활용한 아토피 피부염 조절 제품 개발 내용: ○ <주관기관> • 원료의 기준 규격과 품질 관리 기준 설정 및 기시범 확립 • 생산공정 확립 및 표준화 확립 • 일반식품 개발 - 사업화 • IRB 승인 신청 및 인체적용시험실험 준비 ○ <참여기관 1-경희대학교> • 아토피 피부염 동물모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 효능 평가 및 기전 연구 ○ <참여기관 2-호서대학교> • 생체외 아토피 실험모델에서 동충하초와 소리쟁이 함유 성분들 효능 평가 및 기전연구 • 원료의 표준화 확립 ○ <참여기관 3-차의과학대학교> • 생체내/외 면역증진실험모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물 및 성분들의 효능 평가					
연구개발성과	<주관기관> • 원료의 기준 규격 확립과 지표성분 추출을 위한 법제기법과 추출/분체/선별 기준 확립 • 액상차, 기타가공품 환의 제품화 • ‘아토시아’ 브랜드 및 패키지 디자인 • CRO업체 선정 및 인체적용시험자료집 작성 • IRB 승인 심사 의뢰 <참여기관 1-경희대학교> • 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 항아토피 피부염 효과 및 기전을 규명하여 SCI/E 저널 논문 3편 게재 및 비 SCI/E 저널 1편 게재 <참여기관 2-호서대학교> • 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 항아토피 피부염 효과 및 기전을 규명하여 SCI/E 저널 논문 4편 게재 및 비 SCI/E 저널 1편 게재 <참여기관 3-차의과학대학교> • 동충하초와 소리쟁이 혼합물 및 성분들의 생체내외 면역증진 효과 및 기전을 규명하여 SCI/E 저널 논문 2편 게재 및 비 SCI/E 저널 3편 게재					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	• 시장성이 큰 일반 식품으로서 아토피 조절에 유익한 글로벌 제품 개발 • 건강기능식품으로서 동충하초와 소리쟁이 혼합물 또는 성분 활용 제품 개발 • 새로운 아토피 피부염 바이오마커를 이용한 아토피 피부염 예방/치료 물질 개발 • 국내 아토피 피부염 예방/치료제의 효능 평가 및 개발에 응용 • 신개념 바이오마커 등 발굴에 의한 아토피 개선 또는 치료 방안 제시 • 후속연구로 다양한 염증질환 치료기술 개발 등 기반 제공					
중심어 (5개 이내)	동충하초	소리쟁이	아토피 피부염	면역증진	인체적용시험 계획	

〈SUMMARY〉

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	Development of regulatory product for atopic dermatitis using compound of <i>Cordyceps militaris</i> and <i>Rumex crispus</i> L.					
Results	<p><Host institution: ></p> <ul style="list-style-type: none"> · Establishment of standards and quality control standards for raw materials · Prototype development of health beverages, powders, pills and granules for atopic dermatitis improvement/prevention/control · Application for IRB approval <p><1. Participating institution: Kyung Hee University></p> <ul style="list-style-type: none"> · Investigation of the effects and mechanisms of anti-atopic dermatitis of <i>Cordyceps militaris</i> and <i>Rumex crispus</i> L. mixture · Publication of 5 papers (3 papers in SCI/E journals and 1 papers in non SCI/E journals) · 3 presentations to the conference <p><2. Participating institution: Hoseo University></p> <ul style="list-style-type: none"> · Investigation of the effects and mechanisms of anti-atopic dermatitis of <i>Cordyceps militaris</i> and <i>Rumex crispus</i> L. mixture · Publication of 4 papers in SCI/E journals and 1 papers in non SCI/E journals) · 3 presentations to the conference <p><3. Participating institution: CHA University></p> <ul style="list-style-type: none"> · Investigation of the effects and mechanisms of anti-atopic dermatitis of <i>Cordyceps militaris</i> and <i>Rumex crispus</i> L. mixture · Publication of 2 papers in SCI/E journals and 3 papers in non SCI/E journals) · 3 presentations to the conference 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> · Development of global products beneficial to atopy control as a marketable general food · Development of global products using <i>Cordyceps militaris</i> and <i>Rumex crispus</i> L. mixture or ingredients as health functional food · Development of material of atopic dermatitis prevention/treatment using new atopic dermatitis biomarker · Application to the efficacy evaluation and development of domestic atopic dermatitis prevention/treatment · Proposal of ways to improve , treat atopic dermatitis by discovering new biomarkers · Providing a foundation for developing various inflammatory disease treatment technologies for subsequent research 					
Keywords	Cordyceps militaris	Rumex crispus L.	atopic dermatitis	immunity promote	clinical test plan	

< CONTENTS >

1. Introduction of Research and Development Project	8
2. Current Status of Domestic and Global Technical Development	19
3. Content and Result of Research and Development	27
4. Level of Achievement and Contribution	177
5. Outcome of Research and Development and the Plan for Practical Use	185
6. Scientific and Technical Information Collected Internationally during Research and Development	194
7. Security level of Outcome of Research and Development	195
8. Status of Facility Equipment	196
9. Results of Laboratory Safety Management	197
10. Research Achievements	200
11. Other Matters	204
12. References	205

<Attachment> Self Evaluation Report

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	8
제1절 연구개발목적	8
제2절 연구개발의 필요성	8
제3절 연구개발범위	13
제4절 연구개발의 중요성	17
2. 국내외 기술개발 현황	19
제1절 국내기술 수준 및 시장 현황	19
제2절 국외기술 수준 및 시장 현황	25
3. 연구수행 내용 및 결과	27
제 1 절 원료의 표준화 , 식품 개발 / 사업화 및 IRB승인 신청.....	27
제2절 아토피 피부염 동물모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물/함유성분의 효능 평가 및 TSLP/caspase-1 조절효능 기전 평가 (경희대학교).....	106
제3절 원료의 표준화 확립 , 생체의 아토피 실험모델에서 혼합물/함유 성분 효능 평가 및 세포수준의 아토피 피부염 모델에서의 TSLP /caspase-1 조절 효능기전 평가.....	118
제4절 면역증진실험모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물/함유성분의 면역증진 효능 평가 (차의과학대학교)	135
제5절 연구 개발 결과 성과.....	171
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	176
제1절 목표달성도.....	176
제2절 관련분야 기여도.....	182
5. 연구결과의 활용계획 등	184
제1절 국내외 사업화 방안.....	184
제2절 건강기능식품 기능성원료 등재를 위한 결과 활용 및 계획.....	186
제3절 일반식품 및 건강기능식품의 판매 전략.....	190
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	194
7. 연구개발성과의 보안등급	195
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황.....	196
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적.....	197
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	200
11. 기타사항	204
12. 참고문헌	205
 <별첨> 자체평가의견서	

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

제1절 연구개발 목적

1. 아토피 피부염 조절 및 면역 증진 개선 효과 기전 규명을 통한 임상시험계획
2. 시장이 큰 일반 식품으로서 아토피 조절에 유익한 글로벌 제품 개발
3. 건강기능식품으로서 동충하초와 소리쟁이 혼합물 또는 성분 활용 제품 개발
4. 동충하초와 소리쟁이 성분 활용 의약품 개발 위한 기초자료 확보
5. 동충하초와 소리쟁이 혼합물을 활용한 피부개선에 도움을 주는 다양한 고부가가치 식품 개발

제2절 연구개발의 필요성

1. 아토피 피부염 치료를 위한 제품의 시장경제규모 및 사회적 피해

가. 아토피피부염은 21세기 현대인의 난치병 중 하나로 소아기에 가장 흔히 볼 수 있는 이 질병은 만성적으로 재발하는 데다 극심한 가려움증이 동반되기에 **현대인의 기피 1순위**입니다. 심해지면 천식과 알레르기 비염, 만성 두드러기 등으로도 이어져 여간 골치 아픈 것이 아니며, 이에 전 세계 제약·바이오사들이 아토피 정복을 위해 다양한 연구와 각종 임상실험을 진행중에 있습니다.

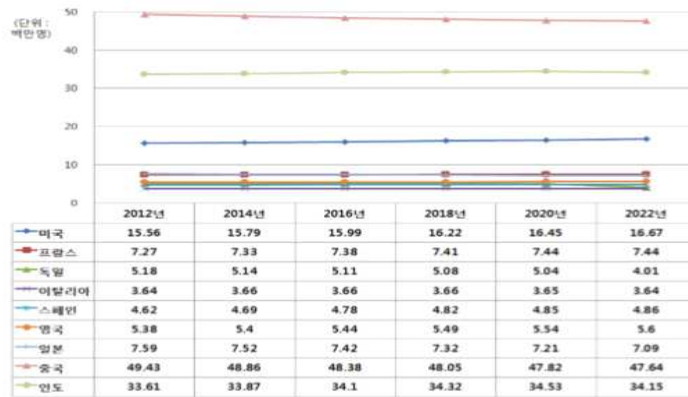


< 그림 1 전세계 아토피 피부염 관련 제품 시장 규모 >

나. 아토피 피부염은 유아기에 주로 발생하여 각질층 수분유지기능 및 **피부장벽 기능이 저하됨**에 따라 정상피부에서는 침입하기 어려운 항원 등의 자극유발물질이 각질층 내로 침입하여 **피부 알레르기, 심한 소양증** 등을 유발합니다.

다. 글로벌하게 아토피 피부염 환자는 **2022년 1.38억명**으로 증가할 것으로 보이며, 특히 아토피 피부염 환자 중 **9세 이하가 53.4%**를 차지한다는 조사결과가 있을 만큼 어린 유아에게 큰 아픔을 주고 있습니다.

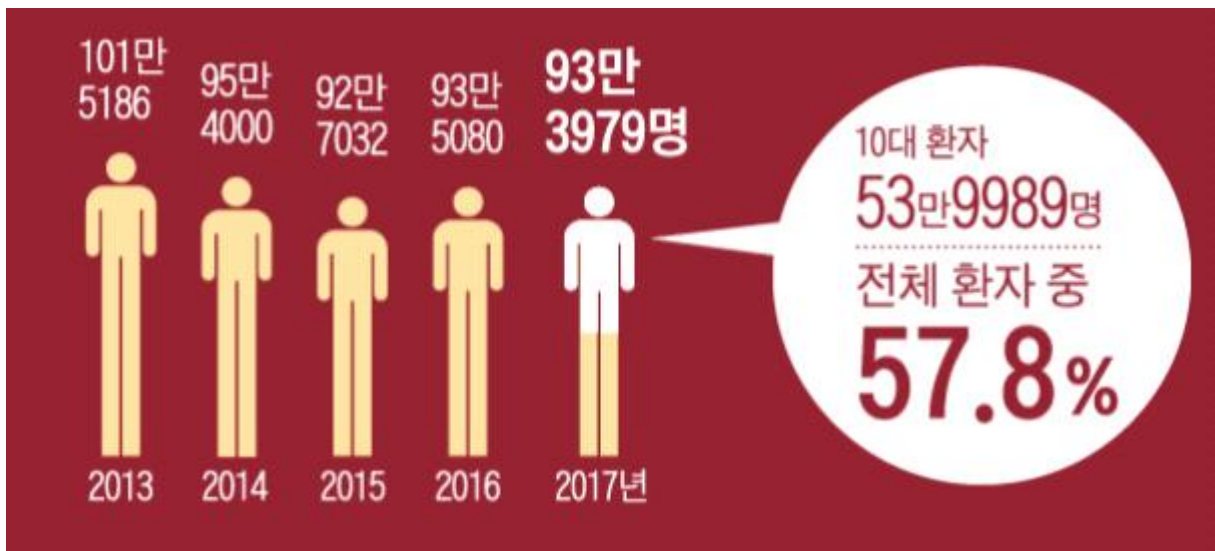
<주요 국가별 아토피 피부염 환자 수 예측>



※ 출처 : Atopic Dermatitis – Global Drug Forecast and Market Analysis to 2022, 2013, 생명공학정책센터 재가공

< 그림 2 주요국가별 아토피 피부염 환자수 및 향후 환자수 예측 >

라. 특히 국내도 아토피 질환 환자 수가 2017년 기준 100만명에 육박하고 있으며 꾸준히 증가하고 있으며 고혈압, 당뇨 보다 더 많은 환자가 고통을 받고 있는 실정입니다.



< 그림 3 아토피 피부염 환자수 (비급여 진료 , 한방병원 , 한의원 진료 환자 제외) >

마. 아토피 피부염은 습진 (아토피 피부염), 알레르기 결막염, 알레르기 비염, 천식 등을 동반하는 경우 있음. 알레르기 질환으로 세계 인구의 30% 이상이 고통 받고 있으며 선진국일수록 심함. WHO에서는 이미 알레르기 질환을 21세기에 가장 문제가 되는 제 7대 질병으로 포함하고 있는 실정입니다.

2. 아토피 피부염 치료제품의 한계

가. 아토피 피부염 환자가 증가되면서 현행 치료제 및 관련 제품들의 부작용이 크게 대두되고 있습니다.

대부분의 치료제는 **국소용 스테로이드 제제**로 구성되어 있으며, 이를 장기 적용시 피부가 얇아지거나 혈관이 확장되어 이차 감염이 발생하는 등 부작용이 뒤따르기도 하며 피부 면역이 약화될수록 장기 치료를 받기가 힘들고 가려움증을 일시적으로만 줄여줄뿐 여러 부작용으로 인해 적용이 제한적입니다.

나. 심각한 난치상태인 **아토피 피부염 환자가 주요 9개국에서 1.1억명**이 존재하고 있으며 이로 인해 부작용 없이 발병원인을 치료하는 새로운 치료법이 요구되고 있으며 이는 치료가 어려우며 장기복용이 어려운 치료약의 형태가 아닌 복용이 용이하면서 장기적인 복용이 가능한 식품, 보습제 등 부작용을 최소화하면서 장기적인 복용이 가능한 제품의 개발이 요구되고 있는 것입니다.

또한 이로 인해 새로운 시장창출이 되고 있습니다.

3. 개발의 필요성 (기술적 측면)

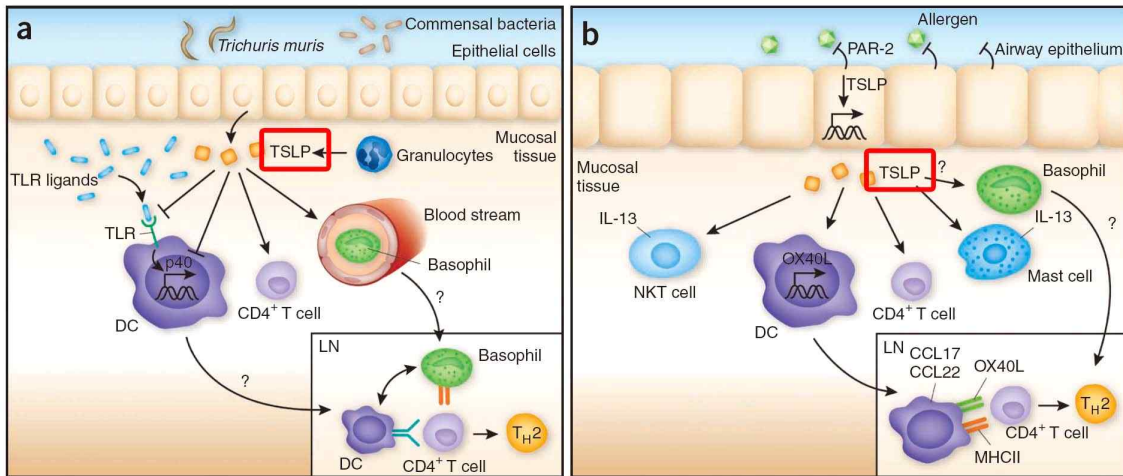
가. 새로운 아토피 피부염 치료용 **BIO-MARKER** (조절자)의 발굴

(1) Thymic stromal lymphopoietin (TSLP): 아토피 피부염의 새로운 조절자

TSLP는 처음 쥐과 (murine)의 B 세포 성장을 이끄는 growth factor로써 1994년 알려졌으며 2001년에 사람에서 처음 클로닝 되어 현재까지 867편의 논문이 발표되었습니다.

(2) TSLP는 주로 섬유아세포 (fibroblasts)와 표피세포 (epithelial cells)에서 생성되는 사이토카인으로, T 세포 활성화, Th2-매개성 알레르기 염증반응의 악화, Th2 세포로의 분화와 Th2 사이토카인의 분비를 직접적으로 유도하여 알레르기 염증반응을 악화시키는 것으로 확인되었습니다.

(3) TSLP의 발현이 알레르기 환자에서 증가할 뿐 아니라, 유전학적으로도 밀접히 연관되어 있는 것으로 확인 되었습니다. “Nature Immunology” 에서 다양한 항원에 의해 생성되는 첫 물질이 TSLP임이 밝혀졌으며 초기 생성된 TSLP에 의해서 여러 염증반응들이 증폭 심화됨을 볼수 있습니다.



< 그림 4. 다양한 항원에 의하여 초기에 생성되는 TSLP 및 Th2 반응 >

(4) 본 과제 1, 2 참여기관의 책임자들은 공동연구를 통해 2014년 Journal of Investigative Dermatology (JCR Dermatology 분야 1위)에 TSLP-아토피 피부염 관련 논문을 게재 한바 있습니다.

(5) 이는 TSLP는 아토피 피부염의 초기단계의 새로운 바이오마커로서, 새로운 아토피 피부염 개선용 건강기능성식품 및 신약 개발의 타겟 분자로 활용될 수 있음을 알 수 있습니다.

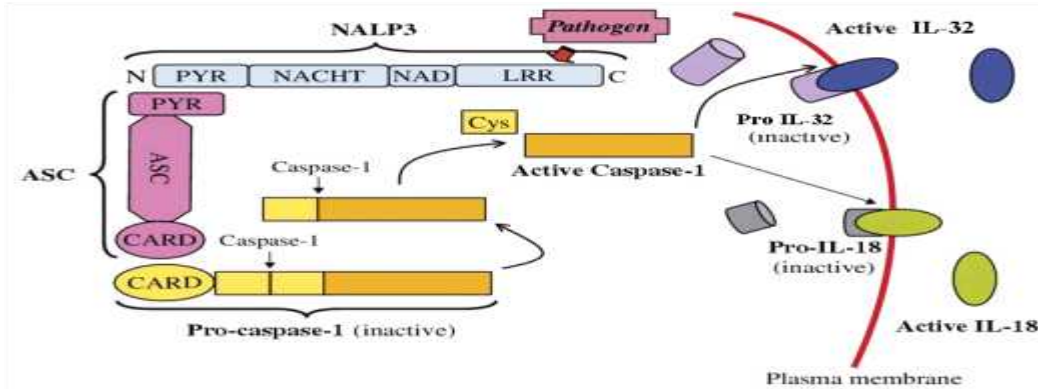
나. 아토피 피부염의 조절자 caspase-1의 역할을 조절하는 성분의 발굴 및 효능 평가

(1) Caspase-1은 세포고사와 염증반응의 중요한 매개체로 활성과 발현이 증가되었을 때 신경계 퇴행성 질환 (neurodegenerative disorder)이나 자가염증질환 (autoinflammatory disorder)을 유발합니다.

(2) Caspase-1은 1989년 블랙에 의해 발견되었으며 caspase-1이 IL-1 β 성숙에 중요한 기능을 발휘됨이 밝혀졌으며, caspase-1을 IL-1 β 전환 효소 (IL-1 β converting enzyme, ICE)로 명명 됩니다.

(3) 전구체 Caspase-1은 inflammasome을 형성하여 활성화구조로 전환되어 전사인자인, NF-kB를 활성화시킴으로써 사이토카인 IL-1 β , TNF- α , IL-18 등의 염증성 세포활성물질 분비를 촉진시켜 류마티스성 관절염이나 골관절염, 파킨슨병 등 유발시킴을 알 수 있습니다.

(4) Caspase-1은 IL-18, IL-32와 같은 염증성 세포활성물질들 활성화 시킴 알 수 있음.



< 그림 5. caspase-1에 의한 IL-32/IL-18 생성 >

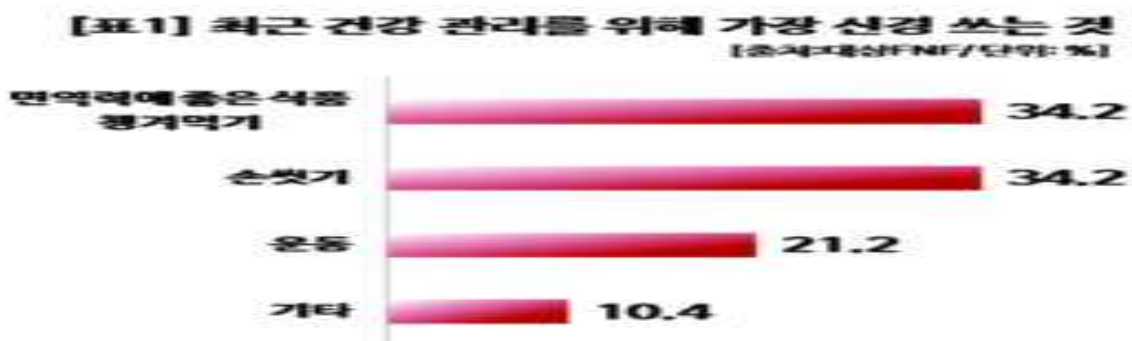
(5) Caspase-1의 upstream activator인 RIP2는 caspase-1의 oligomerization을 유도하여 활성화시키며, Caspase-1은 RIP2와 결합하여 IKK-complex를 인산화시켜 I κ B degradation으로 NF- κ B의 핵 내로의 translocation을 유도하며. 또한 caspase-1은 RIP2와 결합하여 p38 MAPK 인산화를 유도하여 전사인자인 NF- κ B transcription activation을 유도함.

(6) 최근에 본 연구팀은 비만세포에서 TSLP생성에 caspase-1이 관여함을 보고한바 있음.

(7) 이에 본 연구과제에서는 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 TSLP/caspase-1 조절 효능 및 그 상세기전을 규명하여 TSLP/caspase-1 억제를 통한 아토피 피부염 조절이 용이한 건강기능식품을 개발하고자 하고져 합니다.

다. 면역 증진을 통한 염증억제의 매커니즘 발굴 - 아토피 피부염 조절 및 억제

(1) 2015년 메르스 발생 등으로 국내 면역력 증강에 도움이 되는 제품의 관심도 증가하고 있습니다.



< 그림 6. 면역 증진 관심도 증가 >

- (2) 면역력은 신체 외부에서 침입하는 각종 바이러스들로부터 우리 몸을 지키는 방어적 기능을 하기때문에 건강한 신체를 유지하기 위해서 면역력 강화가 매우 중요합니다.
- (3) 면역력이 떨어지면 감기, 폐렴, 기관지염 등에 걸릴 가능성이 높아지고 천식과 아토피 등 알레르기질환에도 노출될 위험이 높아집니다.
- (4) 면역증진 활성을 보기 위해서는 면역 관련 세포들 수, 작용을 확인하여 세포 면역기능증진 효과를 확인하여야 하며, 세포 활성, IL-2 발현 능, 세포활성물질 분비능, TNF- α , IL-6 생성에 미치는 영향 등을 확인하여야 합니다.

제3절 연구개발 범위

1. 연구개발 범위

- 가. In-vivo실험에 의한 동충하초와 소리쟁이 혼합물을 활용한 아토피 피부염에 대한 효능 평가
- 나. In-vivo실험에 의한 동충하초 지표성분 코디세핀과 소리쟁이 지표성분 크리소파놀의 아토피 피부염에 대한 효능 평가
- 다. 동충하초와 소리쟁이 혼합물과 각 지표성분이 면역증진에 대한 In-vitro , In-vivo 실험을 통한 효능 및 기전평가
- 라. 상기 3항의 효능 평가를 통한 아토피 피부염의 개선/조절/예방용 고부가가치 식품 개발 및 태명청 법제법의 적용을 통한 생산 기술 고도화 실현

2. 주요 원료 및 특화된 적용기술에 대한 고찰

가. 태명청 (太明淸) 법제

- (1) 태명청 : 민간요법 및 한의학을 바탕으로, 여러 종류의 식재료 및 한약재를 법제 하는 전통 가공법입니다.
- (2) 태명청은 구전으로 전해 내려오는, 왕실이나 사대부 집안에서만 사용하던 우리 전통의 고유한 기법으로 천연물을 활용한 수치(修治法) 및 복방(複方)조제기법을 활용하여 우리 전통의 묘방(妙方)입니다.

- (3) 법제 수치법은 한방이론에 근거하여 천연물이 갖고 있는 독성이나 성질이 극렬하여 직접 복용이 어려운 성질 등 천연물이 갖고 있는 단점을 극복하고 천연물이 갖고 있는 효능을 극대화 할 수 있는 전통가공법입니다.
- (4) 태명청은 항산화기능, 저지방, 저콜레스테롤, 저칼로리 등 웰빙 제품으로 이로운 기능은 활성화 시켜주고 유해한 기능을 억제하여 세포를 정상화시킵니다.
- (5) 본 과제에서는 태명청 가공법을 통해 주요 원료인 동충하초와 소리쟁이를 가공 한 후 이의 혼합물이 아토피 피부염 조절 효과를 얼마큼인지 규명하고자 합니다.



< 그림 7. 동충하초 태명청 법제작업 >

나. 주재료 소개

(1) 동충하초 (*Cordyceps militaris*)

- (가) 대부분 곤충에 기생하여 숙주가 되는, 곤충의 시체에 자실체를 내는 자낭균류 맥각균목 동충하초과의 소형 버섯류.
- (나) 중국 의학서에 따르면 자실체의 미감(味感)은 달고 온화하여 신장의 기능을 돕고 폐를 강화하며, 출혈을 조절해 주는 기능을 하고, 담·가래를 삭이며, 계속되는 기침을 멎게 하고, 황경막에 유발되는 병을 치료한다고 함.
- (다) 본초강목(本草綱目)에는 동충하초를 상용하면 허약체질을 튼튼하게 하고, **면역력을 높이는 분명한 효과가** 있다고 함.
- (라) 현재까지 1066편의 *Cordyceps militaris* 연구 논문이 있음.
- (마) 동충하초 추출물은 암세포 증식을 억제함 [Song et al., 2016].
- (바) 동충하초 추출물은 **염증세포 침윤을 억제**, 대뇌허혈성 손상 억제 [Hwang et al., 2016].

로 키우면서 나물로 그리고 장아찌로 만들어 먹음.

- (나) 약성은 한(寒)하고 맛은 쓰며, 통변(通便)·이수(利水)·지혈·소종(消腫) 등의 효능이 있음. 변비·장염·소화불량·간염·황달·변혈(便血)·자궁출혈 등의 증상에 이용.
- (다) 특히 한의학에서는 소리쟁이의 뿌리를 양제근이라 하여 혈분에 작용하여 혈열을 끄고 지혈하는 효능이 있어 코피, 토혈, 대변출혈, 각혈, 자궁출혈, 옴, 버짐, 변비 등에 사용되며 혈액응고시간 단축, 피부진균억제, 감기예방, 백혈병 억제작용을 함.
- (라) 흥미롭게도 최근 탈모샴푸로 소리쟁이 한방샴푸는 MBN 천기누설과 MBC 매거진에 소개되었으며 소리쟁이의 주성분이 피부 염증, 부종, 지루성피부염 염증을 억제한다고 보고함.
- (마) 현재까지 53편의 *Rumex crispus* L. 연구 논문이 있음.
- (바) 소리쟁이 추출물은 아토피 피부염을 개선함 [Lee et al., 2006].
- (사) 소리쟁이 잎과 씨앗 추출물은 **항산화, 항균 효과**를 지님 [Yildirim et al., 2001].
- (아) 소리쟁이 열매 추출물은 항산화 효과를 지님 [Maksimović et al., 2011].
- (자) 소리쟁이 뿌리 추출물은 항산화, 항암 효과를 지님 [Shiwani et al., 2012].



< 그림 9. 소리쟁이 지표물질 크리소파놀의 주 효능 >

다. 최종목표

태명청법제 가공을 통한 주요 약물인 동충하초와 소리쟁이 혼합물을 활용한 아토피 피부염 조절 건강기능식품 개발을 목표로 함



< 그림10. 법제 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 아토피개선+면역증진 효능 검증후 임상시험계획수립 및 IRB 승인 >

제4절 연구개발의 중요성

1. 아토피 피부염은 호전과 악화를 반복하는 만성 경과를 취하며 완전히 호전된 뒤에도 재발하는 경우가 많아 꾸준한 관리 필요.
2. 아토피 피부염은 소아 알레르기 질환의 특징인 ‘알레르기 행진(allergic march)’의 시작으로 아토피 피부염 환자의 약 60-80%는 자라면서 천식이나 알레르기 비염 등의 호흡기 알레르기 증상을 보임.
3. 아토피 피부염의 치료법으로 중등도에 따라 국소 항염제, 항히스타민제를 사용하고 이에 호전되지 않으면 광선요법, 심리상담, 기후요법 등을 추가하며 호전되지 않는 난치성 아토피피부염인 경우에 입원, 전신적 면역 조절 약제사용이나 알레르겐 면역요법 등을 환자 연령과 증상 및 여건에 따라 시행함
4. 그러나 항히스타민 제제는 정신적으로는 우울증, 집중력 장애, 무기력증을 일으키고 육체적으로는 각종 기관의 기능을 방해하여 병증을 유발함.

난치성 (4단계)	일인, 전신면역억제제, 선택된 환자에게 대한 알레르기 면역요법
	제1세대 항히스타민제, 광선요법, 질리상당, 기후요법
	국소항염제(중간부터 높은강도의 스테로이드, TCI), 탈장제, 할비이리르제, 항진균제
	피부관리 및 보습, 약화인자회피, 교육
중등증 (3단계)	제1세대 항히스타민제, 광선요법, 질리상당, 기후요법
	국소항염제(중간부터 높은강도의 스테로이드, TCI), 탈장제, 할비이리르제, 항진균제
	피부 관리 및 보습, 약화인자회피, 교육
경증 (2단계)	제2세대 항히스타민제
	국소항염제(낮은것부터 중간강도의 스테로이드, TCI), 탈장제, 할비이리르제, 항진균제
	피부 관리 및 보습, 약화인자회피, 교육
기본관리 (1단계)	피부 관리 및 보습, 약화인자회피, 교육

< 그림 11. 아토피 피부염 단계별 치료 >

5. 구체적인 항히스타민제의 주된 부작용은 주로 졸음과 어지러움, 식욕감퇴, 오심, 구토, 변비, 설사, 구강건조, 호흡억제, 기침, 심계항진, 저혈압, 빈뇨, 배뇨곤란, 시야혼탁 등을 들 수 있음 [머니워크 2014.04.17.].
6. 항히스타민제는 인체의 면역기능을 방해함.
7. 새로운 방식의 아토피 피부염치료 방안 탐구는 복잡한 아토피 피부염 질환 치료를 위해 꼭 필요함.
8. 더욱이 영유아 어린이들은 약 섭취에 어려움을 겪는 경우가 많기 때문에 식품을 통한 아토피 피부염 조절제 개발이 새로운 대안이 될 수 있음.
9. 국내에서는 항히스타민제, 면역억제제 및 스테로이드 제제를 알레르기 치료에 주로 사용하고 있으나, 그 효과는 고식적이며 부작용이 심함. 따라서 아토피 피부염 예방 및 개선에 더하여 부작용을 최소화하기 위한 천연물 소재를 이용한 건강기능식품개발이 절실함.

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제1절 국내 기술 수준 및 시장 현황

1. 기술현황

가. 아토피 피부염을 개선하기 위한 개발/연구 현황 및 요구사항

- (1) 국내는 물론 선진국을 중심으로 전 인구의 20% 이상에서 발생하는 아토피 피부염을 효과적으로 개선시킬 수 있는 제품 개발을 위해 **항 아토피 활성 소재**를 절실히 찾고 있으며 이를 개발 실험중에 있습니다.
- (2) 활성 소재 개발을 위하여 글로벌 자원을 대상으로 데이터베이스를 구축, 이를 활용, 개발에 필요한 자원 확보에 대한 경제성을 고려한 소재 개발환경 구축이 요구됩니다.
- (3) 소재 개발의 효율성을 추구하기 위하여 분석의 자동화/고속화를 추구하고 통합적이고 차별화된 연구를 위한 인포매틱스 기술 활용이 필요합니다.
- (4) 개발 소재의 효율적 평가 및 아토피 피부염 관련 바이오마커로 활용키 위한 개발연구가 요구됩니다.
- (5) 아토피 피부염 조절능이 우수한 항 아토피 피부염 소재 구조 분석 및 분자 설계를 위하여 프로바이오틱스/미생물 소재 활용기술, 나노화/미세캡슐 설계 등 연구중에 있습니다.
- (6) 아토피 피부염 조절 소재의 대량 생산을 위한 활성 물질 대량 생산과 생산 공정 최적화 연구 수행이 다양하게 진행중입니다.

국내 아토피 치료제 개발 현황

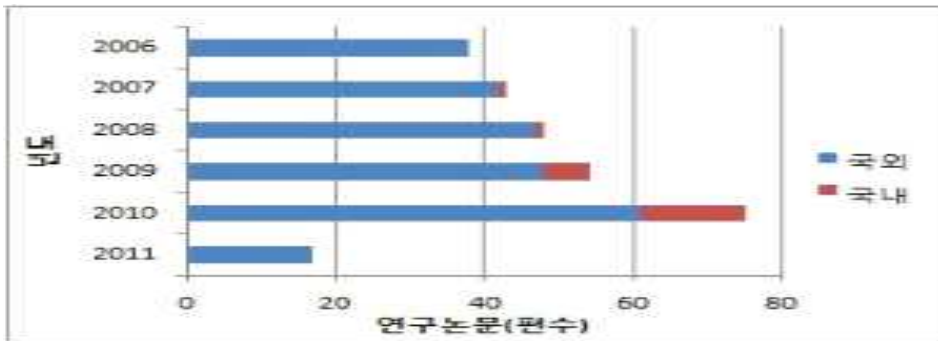
기업	치료제 개발단계
큐리언트	Q301 임상 2b상을 연말까지 중간 결과 발표
JW중외제약	JW1601 임상 1상 연내로 마무리
휴온스	YD-109 임상 3상 중
일동제약	RHT-3201 미국 특허 취득, 소아 임상 마무리
보로노이	신약후보물질 DYRK1A 및 RIPK1 억제제 내년 상반기 글로벌 임상 1상
삼성바이오로직스	미국 아이크노스 사이언스와 위탁생산 (CMO) 계약 추가 체결
강스탬바이오텍	퓨어스탬AD 임상 3상 실패

< 그림 12. 국내 아토피 치료제 개발 현황 >

(7) 아토피 피부염 소재 및 제품의 실용화와 표준화 연구를 수행하여, 소재의 경제성이 확보되어야 합니다.

신약이나 신물질이라고 해서 연간 치료비, 복용비가 너무 고가이면 시장진입 및 환자들에게 실질적인 도움을 주기에는 한계가 있을 것이다.

(8) 아토피 피부염과 관련된 융복합 기술 및 건강기능식품 소재 개발 연구는 년도 별로 증가 추세에 있습니다.



< 그림 13. 아토피 피부염 관련 융복합기술/건강기능식품 소재 개발 년도 별 현황 >

나. 아토피 피부염 개선용 천연물 활용 사례

(1) 새싹귀리 추출물 적용 (건국대학교 수의과대학 + 농촌진흥청) 사례

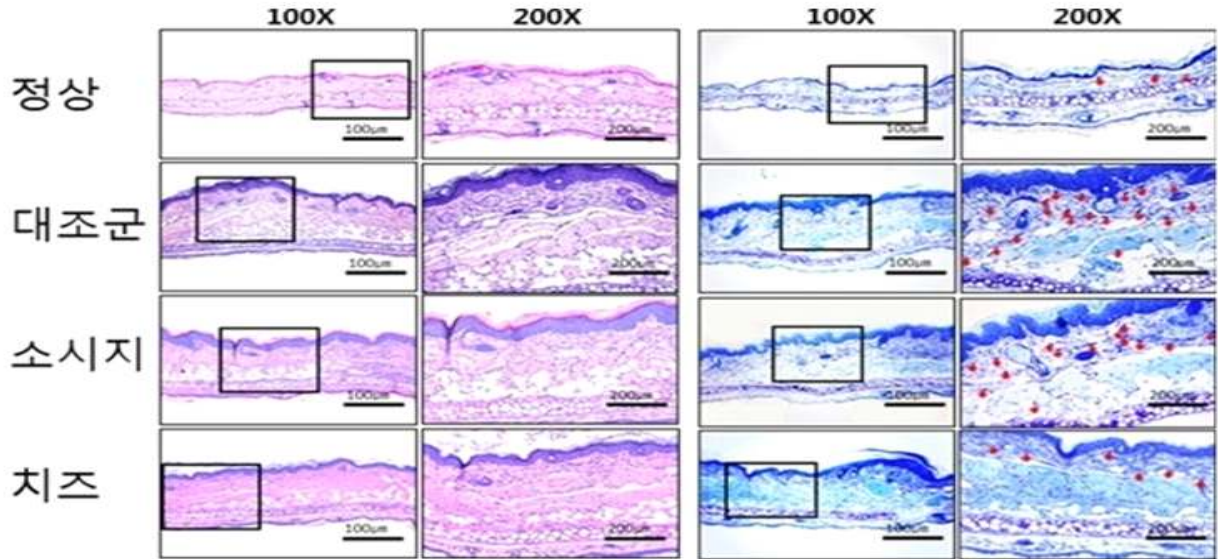
(가) 건국대학교 수의과대학 연구팀이 농촌진흥청과 함께 동물 실험을 진행한 결과 귀리 종자를 싹 틔워 5-7일 키운 15cm 정도 크기의 어린 잎이 가려움증이나 홍반 같은 피부 이상 증상을 완화 - 새싹귀리 추출물을 3주간 피부에 살포- 가려움증이나 홍반 같은 피부 이상 증상이 32% 감소 - 새싹귀리 추출물이 염증을 억제하고, 비만세포의 피부조직 내 침윤을 막아 피부 세포 증식과 항상성 유지에 기여한 것으로 분석

(나) 새싹귀리에 함유된 아베나코사이드류 사포닌을 활용한 아토피 피부염 개선 소재개발 및 유효성분 향상용 추출법 표준화 추진

(2) 토종유산균 함유 축산식품 적용 (전북대학교+농촌진흥청) 사례

(가) 자체 개발한 토종 유산균 함유 축산 식품의 아토피 피부염 완화에 효과 규명

(나) 한국인 신생아 장에서 찾아낸 비피도박테리움 롱검(KACC 91563)을 첨가한 발효소시지와 크박치즈를 복용한 실험동물에서 귀 두께와 피부염의 원인세포(mast cell) 수 모두 미복용 대조군의 절반 이하로 나타났고, 긁는 횟수도 38.8% 감소됨을 확인함.



< 그림 14. 실험쥐에 롱검균 첨가 축산식품 급여 시 피부염 조직병변 >

(3) 토종나물 쑥부쟁이 적용 (순천향대+농촌진흥청) 사례

(가) 아토피피부염 , 알레르기 피부질환에 치료효과 확인

(나) 농촌진흥청과 순천향대의 공동연구진에 따르면 알레르기 유발 물질을 넣은 생쥐에게 쑥부쟁이 추출물을 4 주 동안 먹인 결과, 아토피 피부염의 경우 빨간반점이나 피부 건조 증상이 40%나 감소.

(다) 사람에게 대한 임상 시험시 알레르기 코 결막염을 앓던 환자는 6 주 이후 재채기 콧물, 코 가려움 증상이 개선

2. 시장현황

가. 질병관리본부가 발표한 ‘소아 청소년기 질병부담 (DALY)’ 자료에 따르면 질병 부담이 가장 높은 1위, 2위 3위 모두 알레르기 질환이며 특히 피부 질환이 3위 차지함
나. 지난 10년 동안, 아토피 피부염 시장은 큰 변화 없이 초기에 진입하였던 치료제가 시장을 장악

<소아·청소년기 질병부담(DALY)>

순위		1위	2위	3위	4위
0-9세	질병명	천식	중이염	피부질환	간질
	DALY	4,379(78.4%)	509(9.1%)	195(3.4%)	154(2.7%)
10-19세	질병명	천식	소화성궤양	피부질환	정신분열병
	DALY	1,226(42.0%)	382(13.0%)	206(7.0%)	172(5.8%)

※ 자료원: 한국인의 질병부담 보고서, 질병관리본부 2005

※ DALY(Disability Adjusted Life Year): 인구집단에서 특정 질환으로 인한 장애와 사망으로 손실된 수명을 합산한 수치

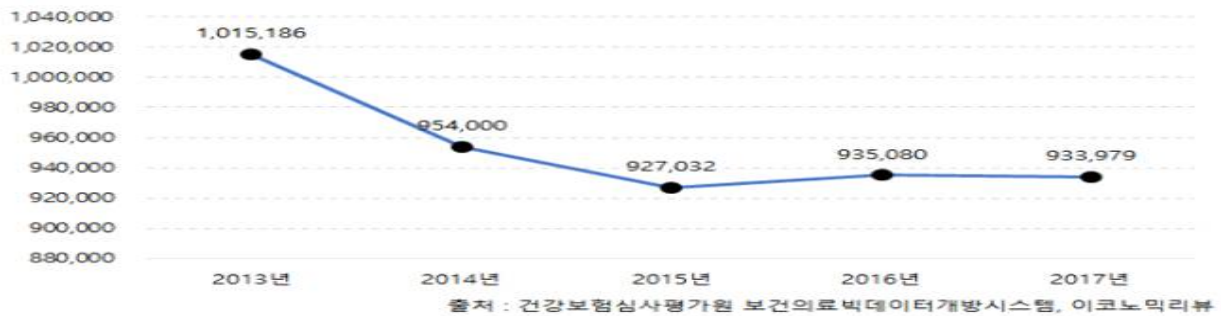
< 그림 15. 소아, 청소년기 질병부담 (DALY) >

하고 있어 이들이 커버하지 못하는 수많은 영역이 존재하는 실정입니다.
[생명공학정책연구센터].

다. 아토피 피부염의 복잡한 발생 원인으로 인해 환자의 유형 구분에 따라 각기 다른 치료방법이 필요하며, 이에 따라 현재 시장이 커버하지 못하는 심각한 난치 인구에 대한 치료 수요 충족의 필요성이 강조되고 있습니다. [생명공학정책연구센터].

라. 국내 아토피 관리와 관련된 보습제 시장은 1조원, 그 중 유아 아토피 시장은 2,000억원으로 업계에서는 추산하고 있으며, 연간 10% 내외의 꾸준한 성장을 예상함 .

국내 아토피성 피부염 환자 수 (단위: 명)



글로벌 아토피 치료제 시장 전망 (단위: 조원)



< 그림 16. 국내 아토피성 피부염 환자 수, 글로벌 아토피 치료제 시장 전망 >

마. 보건의료빅데이터개방시스템에 따르면 국내에서 아토피성 피부염을 겪는 환자는 2017년 기준 93만명으로 2013년 101만명에서 감소세를 보이다가 2015년 92만명에서 다시 소폭 증가했다. 시장조사 기관인 글로벌데이터는 “전 세계 아토피 치료제 시장 규모는 지난 2016년 45억 7500만달러(약 5조원) 규모에서 2024년에 73억달러(약 8조 2000억원) 규모로 성장할 것이다” 고 전망했다

3. 경쟁기관현황

가. SPASH의 인트리트는 다래추출물을 사용하여 국내 최초로 식약처에서 인정한 면역과민반응 개선에 도움을 주는 건강기능식품을 개발중.

나. Enterococcus faecalis 가열처리 건조분말, 구아바잎추출물등복합물 (안국건강, 코박사), 피카오프레토분말등복합물 등을 식약처에서 면역과민반응 개선에 도움을 주는 원료로 인정함.

다. 본 과제 1, 2참여기관의 책임자들과 주)두화와 공동연구를 통해 소엽추출물을 면역과민반응 개선에 도움을 주는 원료로 식약처로부터 인정 받은바 있습니다.

라. 한국콜마는 국내 자생식물 활용한 천연물 소재 아토피 피부염 치료제를 개발중이며 이는 해당 치료제 개발에 성공한다면 △치료제 원료의 국산화 △기존 치료제의 부작용 해소 등 다양한 장점을 갖게 될 전망입니다.

마. 동국제약은 오는 2023년 출시를 목표로 천연물 아토피치료제를 개발중, 천연물 오리나무 추출물을 활용해서 개발 진행중

바. 휴온스는 알레르기 관련 Th2 세포 및 비만 세포의 탈과립을 억제하는 ‘찔레나무열매 추출물 “ 로 아토피성 피부염과 알레르기성 질환(비염,천식,식품 등)을 개발중

사. 삼익제약은 올해 4월 한국과학기술연구원(KIST) 강릉분원 천연물연구소와 ‘단백 분해효소 표적의 피부과민반응 조절과 피부장벽 기능 강화 효능을 지닌 ’반변연 ‘을 이용한 신약개발’ 과 관련한 업무협약(MOU)을 체결했다.

4. 지식재산권현황

가. 동충하초 특허 실용 1617건이며 동충하초의 아토피 피부염 관련 특허는 138건임.

- (1) 피부 소양증 및 아토피 피부염 예방 및 치료용 노랑다발 동충하초의 알콜 추출물
(An alcohol extract of Cordyceps bassiana for treating and preventing atopy dermatitis and pruritic skin lesion)
- (2) 노랑다발 동충하초로부터 아토피성 피부염 억제 성분을 추출하는 방법 및 그를 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 조성물 (An effective method for extraction of component inhibiting atopic dermatitis from Cordyceps bassiana and compositions containing the component for prevention and treatment of atopic dermatitis)

나. Cordycepin 특허 실용 195건이며 아토피 피부염 관련 특허는 12건임.

- (1) 피부 소양증 및 아토피 피부염 예방 및 치료용 노랑다발 동충하초의 알콜 추출물
(An alcohol extract of Cordyceps bassiana for treating and preventing atopy dermatitis and pruritic skin lesion)
- (2) 코디세핀 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 피부 미백, 탄력, 주름 개선, 보습 또는 항염증용 화장품 또는 약학 조성물 (Cosmetic or pharmaceutical composition for skin whitening, elasticity, anti-wrinkle, skin moisturizing or anti-inflammation comprising cordycepin or a pharmaceutically acceptable salt thereof)

다. 소리쟁이 특허 실용 183건이며 소리쟁이의 아토피 피부염 관련 특허는 20건임.

- (1) 천연물질을 이용한 아토피 피부염 치료용 조성물 (COMPOSITION FOR TREATING ATOPIC DERMATITIS USING NATURAL MATERIALS)
- (2) 순비기나무, 도꼬마리, 소리쟁이, 호호바오일과 티트리오일을 이용한 아토피 피부용 조성물 및 이를 이용한 화장품 (The atto blood skin composition which uses Vitex rotundifolia, cocklebur, Curled Dockand, Jojoba Oil, Tea Tree oil and the cosmetics which uses this)

- 라. Chrysophanol의 특허 실용 2건이며 chrysophanol의 아토피 피부염 관련 특허는 0건임.
- 마. 기존 보고된 기술 극복을 위한 방안으로 이미 본 기업에서 검증해온 방식의 법제 및 다른 추출 방법을 통해 성분 조성 및 특정 유효성분의 함량이 증대되기 때문에 새로운 물질로 간주될 수 있음.
즉 본 과제에서는 동충하초를 특수 법제하여 코디셉핀의 함량을 증가시켰으며, 소리쟁이와의 다양한 비율로 혼합하여, 가장 효과적일 수 있는 4 : 6 비율로 정함. 따라서, 본 과제에 사용된 동충하초와 소리쟁이 혼합물은 기존의 보고와 진보적 차별성이 있다고 생각됨.
- 바. 또한 Chrysophanol과 cordycepin은 농도 의존적인 효과를 보이며, 다른 성분들과 각각 혼합 시, 상승효과를 보임 [Li et al., 2016; Chen et al. 2013; Cui et al., 2013]. 따라서, 기존의 연구에 비해 동충하초와 소리쟁이 혼합물은 보다 낮은 농도에서 효과가 예상되는 우월성이 예상됨.
- 사. 아토피 피부염 조절 건강기능식품으로써 동충하초와 소리쟁이 혼합물 또는 Cordycepin과 Chrysophanol 등 혼합물 배합비 등에 따른 신규성, 진보성 등의 인정으로 특허 등록이 가능할 것으로 변리사 통해 확인함.

제 2 절 국외 기술 수준 및 시장 현황

1. 기술현황

- 가. 아토피 피부염 치료제 시장은 초기에 진입했던 노바티스와 아스텔라스가 양분하고 있음.
- 나. 아토피 치료의 경우 한정된 치료 옵션으로 인해 일부 난치 증상에 대해서만 제한된 처방만 가능해 심각한 난치 인구에 대한 치료 수요 충족의 필요성이 점차 높아지는 실정 임.
- 다. 이같은 Unmet Needs(미충족) 시장을 도전하기 위해 2008년부터 2013년 사이 5년간 아토피 피부염 분야의 임상시험은 총 119건으로 조사됐음.
- 라. 아토피의 발생원인 및 발병 기전은 면역학적 복잡성 및 개인별 특이성이 크게 관여

하므로 융복합 기술을 활용하여 효과적인 건강기능식품을 개발할 경우 국민 건강의 증진시켜 사회적 비용 감소 및 삶의 질 개선에 크게 기여할 것임.

2. 시장현황

가. 아토피 피부염의 글로벌 시장 규모는 2012년 39억 달러이며, 10년 동안 연평균 성장률 (CAGR) 3.8%로 2022년에는 56억 달러 규모로 성장할 것으로 예측됨.

나. 아토피 피부염 제품 건강기능식품 수요가 증가함. 건강기능성 식품의 대중화로 인해 아토피 피부염 등의 알레르기 질환에 효과가 있다고 알려진 많은 건강식품들이 실제로 사용되고 있음.

다. 아토피 피부염 개선 천연물 소재 기반의 적용 시장은 점차 세계적으로 확산되고 있음.

중국의 경제 성장 및 어린이 care 증가에 따른 시장의 성장은 물론 미국, 동남아시아, 중동 지역에서의 수요가 꾸준히 증가하고 있음. 아토피 면역 관련 질환이 꾸준히 증가하는 것은 본 사업의 개발 제품의 적용 시장의 지속적으로 증가함을 의미함.

3. 지식재산권현황

가. 동충하초의 미국 및 유럽 특허는 0건, 일본 특허 5건이며 동충하초의 아토피 피부염 관련 특허는 1건임.

(1) 버섯류 추출물 함유 피부외용제 SKIN PREPARATION FOR EXTERNAL USE CONTAINING MUSHROOM EXTRACTS

(2) Cordycepin의 미국 특허는 951건, 유럽 특허 189건, 일본 특허 287건이며 아토피 피부염 관련 특허는 일본의 29건 임.

나. 소리쟁이 미국 및 유럽 특허는 0건, 일본 특허 313건이며 소리쟁이의 아토피 피부염 관련 특허는 0건임.

다. Chrysophanol의 미국 1건이며 chrysophanol의 아토피 피부염 관련 특허는 0건임.

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호 D-05

제1절 원료의 표준화, 식품 개발 / 사업화 및 IRB승인 신청
 [1차년도] 원료의 기준 규격과 품질관리 기준 설정 및 기시법 확립

1. 원료 지표물질의 표준화

가. 원료별 지표성분의 함유량 측정

Sample No.	분석결과(1+2회분석값)
Sample-1 누에동충하초 원물	1.2029mg/g
Sample-2 누에동충하초 법제	1.4821mg/g (23% 증가)
Sample-3 소이동충하초 원물	0.7991mg/g
Sample-4 소이동충하초 법제	0.6801mg/g
Sample-5 소리쟁이 원물	0.8166mg/g
Sample-6 소리쟁이 법제	1.3842mg/g (69% 증가)

나. 원료 선정 및 샘플 제조

- (1) 각 소재별 함유된 유효성분의 분석 측정을 통해 균일하게 일정량의 유효성분을 함유한 소리쟁이 + 동충하초 혼합물 생산 - 샘플 제조



- (2) 원료의 태명청 법제처리를 통한 소리쟁이 지표성분 크리소파놀과 밀리터리스 동충하초의 지표성분 코디세핀 추출량의 변화(차이)를 통한 법제처리의 필요성 확인

- 소리쟁이를 태명청법제처리시 **crysopanol**의 함량이 0.8166 mg/g에서 1.3842 mg/g으로 증가 - **69 % 증가**
- 누에동충하초를 태명청법제처리시 **cordycepin**의 함량이 1.2020 mg/g에서 1.4821mg/g으로 증가됨 - **23 % 증가**

(3) 동충하초의 자실체 (누에 : 소이) 선정

지표성분 코디세핀의 함유량 분석 측정을 통한 최적 자실체 선정

소이동충하초의 cordycepin 의 함유량이 법제전 / 후 = 0.7991 mg/g / 0.6801 mg/g 큰 차이도 없으며 cordycepin 함유량이 너무 기준에 미달됨

누에동충하초의 cordycepin 의 함유량이 법제전 / 후 = 1.2029 mg/g / 1.4821 mg/g로 측정되어 **효능을 최적화하기 위해 누에동충하초를 소재로 선정**

[2차년도] 생산공정 확립 및 / 일반식품 사업화

1. 생산 공정 확립

가. 생산공정 확립 및 규격화

(1) 누에동충하초와 소리쟁이 혼합물 및 각 함유성분의 효능평가에서 얻어진 배합비율에 의거하여 6차례에 걸쳐 추출작업 실시

다음과 같은 레시피 및 가공방법 규격화 실현 - 법제 작업을 통한 효능 강화 작업

(2) 주원료 - 누에동충하초 , 소리쟁이 태명청 법제 작업 실시



(법제가공 전 동충하초 원물)



(법제가공 후 동충하초)





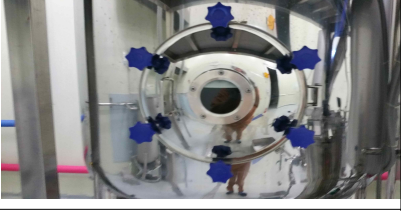



(법제가공 전 소리쟁이 원물)



(법제가공 후 소리쟁이)

(3) 법제처리된 누에동충하초 + 소리쟁이 열수 추출작업 실시
 지표성분 함량을 균일화 하기 위해 원료별 개별 직화 열수 추출 실시
 혼합 및 농도 조절을 위한 메인추출기 작업 실시

		
직화추출탱크 추출가공	직화추출탱크 추출액	직화추출탱크내 추출액 이송
		
시제품 농도 강화를 위한 메인추출기로 이송	시제품 농도 강화 및 혼합 작업 실시	시제품

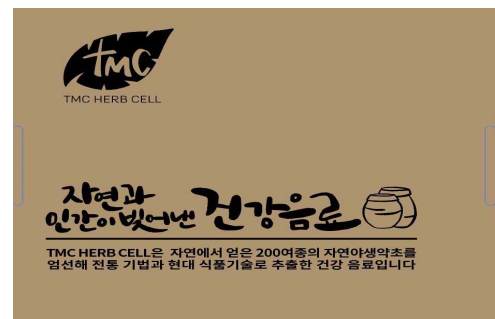
나. 제조공정 규격화
 열수 추출

누에동충하초:소리쟁이	정제수	가열시간	농축시간	가열온도	농축온도	포장용량
4 : 6	35배수	100℃도달 후 120분	85℃도달 후 90분	110℃	85℃	1회 80ml

2. 일반식품 사업화 추진

가. 일반식품 제품화를 위한 패키지

- (1) 제품명 : 아토시아 (Athosia) 확정
- (2) 기존 제품과의 통일성 부여를 위한 디자인 작업 실시



나. 일반식품 시장 출시를 위한 사업화 구현

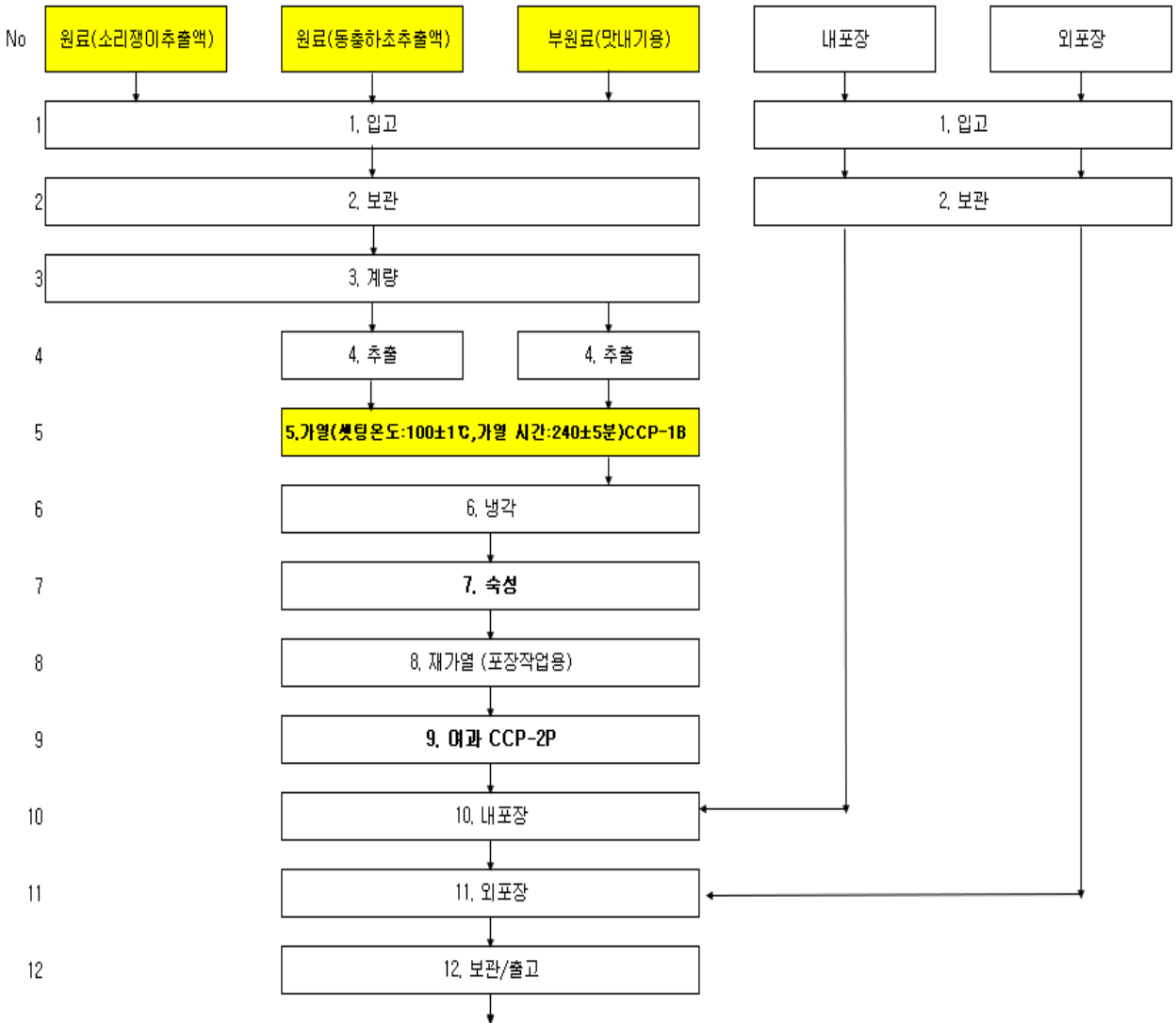
(1) 건강식품 및 건강용품 전문판매업체 (주)메디텍코리아 (대표이사 : 김병수) 와 액상차 식품유형으로 제품 판매계약 체결 - 80ml 30포 (스탠딩파우치 타입,인,아웃박스) 기준 1차 계약물량 500세트 계약 체결

[3차년도] IRB 승인 준비 & 신청 및 사업화 추진

1. 사업화 추진

가. 아토시아 제조 공정 확립

GH-HACCP-01 제조공정도(아토시아)



나. 아토시아 포장용 패키지 및 상품화

(1) 액상 제품 패키지 구성

스탠딩 파우치 타입/ PET+알루미늄+나일론+폴리프로필렌 4중지 살균용 타입

태명정
아토시아
Athosia

밀리타리스 동충하초
소리쟁이 추출물
선조들의 정성과 지혜가 담긴
전통 추출 음료

태명정 HACCP
인증
동충하초
소리쟁이
자연가득
건강음료
전통방식
80ml

태명정
아토시아
Athosia

- 제품명 : 아토시아
- 식품의 유형 : 액상차
- 내용량 : 80ml
- 품목제조보고번호 : 제 20170443021152호
- 원재료명 및 함량 : 소리쟁이 추출물(9.8%), 밀리타리스 동충하초 추출물(6.5%), 녹차 추출액(3.7%), 산백초 추출액, 겨우살이 추출액, 약모밀 추출액 (여성초), 동충뿌리즙기(해벌에말린 백술), 냉이, 산수유 추출액, 청미래덩굴 뿌리추출액(망개나무), 대나무잎, 싸리나무 추출액, 추출가공 식품(태명정 추출액N4), 정제수
- 포장재질 : PE / PP
- 섭취방법 : 1일 3회, 1회 1포씩 섭취하십시오. 따뜻하게 드시는 것이 좋지만, 기호에 따라 차갑게 드셔도 됩니다
- 보관방법 : 직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관 하십시오. 개봉 후 반드시 냉장보관하여야 하며 1일 이내에 드시길 바랍니다.
- 주의사항 :
 - 침전물이 생길 수 있으나 안심하고 잘 흔들어서 드십시오.
 - 제품 포장재의 윗단면에 상처를 입을 수 있으니 주의 하십시오.
 - 파우치를 전자레인지에 넣고 가열하지 마십시오.
 - 본 제품은 대두, 땅을 사용한 제품과 같은 사실에서 제조 되었습니다.
- 제조원 및 판매원 : (주)기희에프앤씨 (충청북도 진천군 덕산면 이덕로 730-15)
- 소비자 상담실 : 043-533-8526
- 유통기한 : 제품 상단에 별도 표시
- 반품 및 교환 : 유통 중 파손이나 문제가 발생 하였을 시 구입처나 고객센터로 문의 하세요.
- 본 제품은 공정거래위원회 고시 소비자 분쟁해결 기준에 의거 교환 또는 보상 받을 수 있습니다.
- 부정, 불량식품 신고는 국번없이 1399



- (2) 액상 일반식품 상품화
 (가) 식품유형 : 액상차
 (나) 복용법 : 1일 3회 복용
 (다) 포장단위 : 80 ml
 (라) 보관방법 : 상온 보관

- (3) 아토시아환 일반식품 상품화
 (가) 식품유형 : 기타가공품(환)
 (나) 복용법 : 1일 2회 40알씩 복용
 (다) 포장단위 : 100 g
 (라) 보관방법 : 상온 보관

다. 시제품 및 판매용 제품 생산

(1) 아토시아 액상차 생산작업

		
누에동충하초 법제 (증)	누에동충하초 법제 (포)	소리쟁이 법제 (증)
		
메인추출기 추출작업	스탠딩파우치 주입/포장작업	아토시아 액상차 제품 사진

(2) 아토시아환 생산작업



누에동충하초 분체

소리쟁이 분체

환 제조작업

환 건조 작업

환 병입 작업

아토시아환 제품 사진

(3) 아토시아, 아토시아환 품목제조보고 완료

발급번호 : 1A00-BJA-9001-0ME9-219C

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	성년필립(법인번호)	
	성현택	1970년 10월 15일	
	주소	전통번호	세대번호
충청북도 진천군 덕산면 이덕로 730-15			
영업소	영칭(상호)	영업등록번호	
	(주)가위에프앤씨	20170443021	
소재지		충청북도 진천군 덕산면 이덕로 730-15	
제품정보	식품의 유형	액상차	요청하는 품목제조 보고번호
	제품명	아토시아	20170443021152
	유통기한	제조일로부터 12개월	
	품질유지기한		
	주요제조 또는 성분명, 제조방법	맛장예 기재	
	용도 용법	맛장예 기재	
	보관방법 및 포장재질	맛장예 기재	
	포장량 및 무중량액	일봉포장 및 60g-5kg	
	성상	고유의 색채와 향미를 가진 액상으로 이며, 이취가 없어 맑다.	
	품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고열량·저열량 식품 해당 여부 []에 []하니오 [] 해당 없음 ■ 알콜인용 식품 해당 여부 []에 []하니오 ■ 영, 유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 []하니오 	
기타			

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. 2019년 10월 01일 보고인 성현택

진천군수 귀하

품목보고번호	20170443021-152
처리부서	미래도시국 축산위생과
차관차장명	오승환
처리일자	2019년 10월 02일

< 아토시아-액상차 품목제조보고서 >

발급번호 : 1A00-BJA-9001-0M7G-W1A6

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	성년필립(법인번호)	
	성현택	1970년 10월 15일	
	주소	전통번호	세대번호
충청북도 진천군 덕산면 이덕로 730-15			
영업소	영칭(상호)	영업등록번호	
	(주)가위에프앤씨	20170443021	
소재지		충청북도 진천군 덕산면 이덕로 730-15	
제품정보	식품의 유형	기타가공품	요청하는 품목제조 보고번호
	제품명	아토시아환	20170443021161
	유통기한	간년	
	품질유지기한		
	주요제조 또는 성분명, 제조방법	맛장예 기재	
	용도 용법	맛장예 기재	
	보관방법 및 포장재질	맛장예 기재	
	포장량 및 무중량액	일봉 및 10g-50kg	
	성상	고유의 색채와 향미를 가지며 이며, 이취가 없는 환	
	품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고열량·저열량 식품 해당 여부 []에 []하니오 [] 해당 없음 ■ 알콜인용 식품 해당 여부 []에 []하니오 ■ 영, 유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 []하니오 	
기타			

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. 2020년 02월 04일 보고인 성현택

진천군수 귀하

품목보고번호	20170443021-161
처리부서	미래도시국 농자라정책과
차관차장명	오승환
처리일자	2020년 02월 05일

< 아토시아환-기타가공품 품목제조보고서 >

(4) 아토시아 안전성 확인을 위한 품질검사 실시

시 험 성 적 서

발급번호 : 참190013692

접수번호	1910-1107	검 사 목 적	일반참고용
제 품 명	아토시아		
제품유형	-	제 조 일 자	
		유통 기 한	
업 소 명	주식회사 가화에프앤씨	의 료 인	심현택
스 재 지	충청북도 진천군 덕산면 이덕로 730-15		
접수년월일	2019.10.10	검사완료일	2019.10.21

시 험 결 과

시험항목	기준규격	결 과	판 정
납(mg/kg)		불검출	-
비소(mg/kg)		불검출	-
카드뮴(mg/kg)	-	불검출	-
수은(mg/kg)		0.00	-
세균수(/mL)		680	-
대장균군(/mL)		0	-

• 비교 : 생산일자:2019.10.08

2019년 10월 21일

(주) 한국분석기술연구원



• 이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전, 상업용, 민형사상의 분쟁 등에 사용할 수 없습니다. 본원에서는 이 요구를
 • 성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의문점이 있으시면 연락주시요.
 • 이 성적서는 KOLAS 인증과 관련 없습니다.
 주소 : 부산시 동구 대영로 267(초량동) 해양빌딩, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298

양식번호(KATRI-P-24-06)

개정번호(1)

개정일자(2019.01.02)

2. IRB 승인 작업

가. CRO업체 선정 , 업무분담 및 진행

(1) CRO업체명 : (주)네오뉴트라

(2) 선정사유 : 108번의 임상시험 수행 및 60건 기능성원료 등재 수행 업체
다양한 병원네트워크 구성 / 아토피피부염 임상시험 진행

(3) 업무분담 및 진행 일정

주요업무	일정	세부 업무	업무주체
식품 정보 및 생산일정	개시모임 전	배합비, 성상, 함량 결정 후 IP생산 가이드/IB에 따라 생산일정 확인 (IRB 제출일로부터 개시모임까지 최대 2.5개월 소요되므로 내년 1월 중순 전까지는 식품생산 및 기관 전달이 가능해야 합니다. 제조업체와 생산일정 미리 확인해 주셔야 합니다) *IP 생산가이드 첨부(+)	의뢰사
IRB 조심의	~10/18	시험계획서, CRF, ICF 등 시험 관련 자료의 초안 작성	CRO
	~10/18	검사수가 전달, 연구비 협의	기관/CRO
	~10/25	1. 시험관련 문서 최종화 2. 외부검사 필요여부에 따라 채혈, 전처리, 보관 주체 확인하고 외부 검사기관에 건적서 요청 후 의뢰사 전달	CRO
		1. 계획서 최종화 후 피해자보상규약 서명하여 CRO 전달 2. IB 최종화 3. 보험 가입 후 보험증권 전달 (필수 요건은 아님)	의뢰자
	10/31~	1. 실시기관계약서 초안 작성 및 기관 계약팀/의뢰사/PI 검토 요청 2. IP라벨링 가이드, 눈가림봉투 제작방법 안내 to 의뢰자 3. PMP, MP 작성 및 의뢰자 검토 요청	CRO
	IRB 승인후	기관 계약 날인(의뢰자-PI-병원장 간)	
개시모임 준비(기관과 일정조율, 발표자료 작성, 시험물품 제작 등)			

나. 임상시험 수행 기관 (병원) 선정

(1) 수행기관 및 주관자 : 카톨릭대학교 의정부성모병원 / 피부과 이영복 교수

(2) 선정사유 : 대한아토피피부염학회 추천병원 / 이영복 교수 홍보위원
아토피피부염 전문 연구 분야

다. 인체적용시험계획서 확정 및 인체시험적용자 자료집 작성

㈜가화에프앤씨
Clinical Study Protocol
Protocol No.: GHFNC-01
Version No.: 1.1(2019.12.17)

2 / 64

(주)가화에프앤씨



㉞ 인체적용시험계획서

인체적용시험 번호	GHFNC-01
인체적용시험 식품	시험식품: CAST(소리쟁이추출물등복합물)
	대조식품: Placebo
인체적용시험 제목	아토피피부염 증상을 가진 소아에서 CAST의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
시험 단계	기타(건강기능식품)
인체적용시험 책임자	이영복 교수 가톨릭대학교 의정부성모병원 피부과
인체적용시험 실시기관	가톨릭대학교 의정부성모병원 경기도 의정부시 천보로 271
인체적용시험 의뢰자	㈜가화에프앤씨 충청북도 진천군 덕산읍 이덕로 730-15
Confidential	© GAHWA F&C Co., Ltd. This protocol is the property of GAHWA F&C Co., Ltd. and may not - in full or in part-be passed on, reproduced, published or otherwise use without the express permission of GAHWA F&C Co., Ltd.

Protocol No. _____ Investigator's Brochure version (Date _____)

인체적용시험자 자료집 (Investigator's Brochure)

기능성원료명	소리쟁이추출물등복합물
Version	V 1.1
인체적용시험 계획서 번호	
인체적용시험 의뢰자	㈜ 가화에프앤씨 김태영

Version Date: 2019. 10. 31

CONFIDENTIAL

본 인체적용시험자 자료집에 포함되어 있는 모든 정보는 인체적용시험 책임자, 인체적용시험담당자, 임상시험심사위원회(IRB), 식품의약품안전처를 위해 제공된 것으로 ㈜가화에프앤씨의 사전 서면동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.

CONFIDENTIAL 1

라. 임상시험 진행시 발생할 피해에 대한 피해 보상 규약 작성 및 체결

㈜화이에프엔씨
PRT No.: GHFNC-01
Ver No.: 1.0

CR-E13_001V1.0
Effective Date: 2019.09.25

피해 보상에 대한 규약

1. 목적

- 1.1 ㈜화이에프엔씨는 인체적용시험 참여로 인한 인체적용시험대상자의 신체적 손상(사망 포함)에 대해 보상한다.
'인체적용시험 참여로 인한 손상'이란 인체적용시험계획서에 따라 투여된 인체적용시험용 식용 또는 인체적용시험계획서에 따라 행해진 의학적 치료 과정 또는 개입으로 인한 손상으로서, 인체적용시험에 참여하지 않았을 경우에는 발생하지 않았을 손상을 의미한다.
- 1.2 손상의 원인이 인체적용시험용 식용의 섭취로 인해 발생하였을 때 ㈜화이에프엔씨는 인체적용시험대상자에게 보상한다.
- 1.3 지속적이고 불구가 될 수 있을 정도의 손상뿐만 아니라 일시적 통증 또는 쉽게 치료될 수 있는 손상에 대해서도 보상한다.
- 1.4 인체적용시험용 식용에 의해 생긴 이상반응 또는 발현된 이상반응의 교정 조치 과정에서 발생한 손상의 경우, 인체적용시험용 식용이 직접적인 원인이 된 손상에 대하여 보상한다.
- 1.5 해당 이상반응으로 인한 손상이 예상되었던 인체적용시험 대상자가 자발적으로 해당 인체적용시험 참여에 동의하였다 하더라도 보상 대상으로 고려한다.
- 1.6 인체적용시험의 참여로 인한 대상자의 신체적 손상이 발생할 경우, 금전적 보상에 대하여 확정되기 전이라도 인체적용시험책임자(담당자)를 통한 적절한 치료 또는 치료 기회를 우선적으로 제공한다.

2. 다음 경우에는 보상하지 아니한다.

- 2.1 ㈜화이에프엔씨의 후원 하에 집행되지 않았거나 ㈜화이에프엔씨가 제공하지 않은 인체적용시험용 식용으로 발생한 손상
- 2.2 인체적용시험용 식용의 기대된 효과가 나타나지 않거나 그 밖의 혜택을 제공하지 못한 경우
- 2.3 위약(Placebo)을 투여한 인체적용시험 대상자에게 치료상의 이익을 제공할 수 없는 경우
- 2.4 질병의 악화 또는 진행 결과 중 발생하는 통상적 합병증에 의한 손상
- 2.5 인체적용시험 중이 아니어도 일어났을 것이라고 생각되는 사고 등에 기인한 것
- 2.6 인체적용시험 대상자의 고지의로 위반 및 고의 또는 중대한 과실로 발생한 손상
- 2.7 시험자의 명백한 과실이나 의무태만으로 인해 발생한 손상
- 2.8 인체적용시험 책임자가 인체적용시험 대상자에게 발생한 손상에 대하여 적절한 의학적 조치를 수행하여 회복된 경우
- 2.9 발생한 손상이 인체적용시험의 참여와 인과관계가 없다고 시험자가 판단한 경우
- 2.10 기타 위와 유사한 사유로서 ㈜화이에프엔씨가 인체적용시험대상자의 손상에 보상하는

Confidential

NEO

Page 1 / 2

㈜화이에프엔씨
PRT No.: GHFNC-01
Ver No.: 1.0

CR-E13_001V1.0
Effective Date: 2019.09.25

피해 보상에 대한 규약

것이 불합리한 경우

3. 보상 절차

- 3.1 ㈜화이에프엔씨는 인체적용시험실시기간(인체적용시험 책임자 등)이나 인체적용시험 대상자로부터 보상요청이 있는 경우 관련 기록을 상세히 작성하여 접수하고, 보상 해당 여부 조사, 필요한 경우 피해자 보상 위원회 구성 및 운영, 보상 평가 기준에 따른 보상 수준 결정, 인체적용시험 실시간 또는 인체적용시험 대상자에게 1개월 이내에 결과 회신(늦어질 경우 중간 회신), 피해자의 의료여부 확인을 진행한다.
- 3.2 보상수준에 대해서 인체적용시험 대상자 및 ㈜화이에프엔씨 사이에 이견이 있는 경우 중립적인 제3자(의학, 약학, 법률학의 외부 전문가(independent expert 등))를 선정하여 판정하도록 한다. 판정에 필요한 비용은 ㈜화이에프엔씨가 부담하며, 중립적인 제3자의 판정에 불복하는 경우 법원의 판결 및 이에 준하는 결정에 따른다.

4. 보상 평가기준 및 지급 원칙

- 4.1 보상수준은 손상의 본질, 그 정도, 지속성 여부 등에 적절한 액수여야하며, 대한민국의 법정에 의해 유사 손상들에 대해 일반적으로 지급되는 것과 동일해야 한다.
- 4.2 보상수준에 대해서 대상자와 ㈜화이에프엔씨 사이에 이견이 있을 경우, 양자가 수용할 수 있는 전문가의 자문을 구하여야 한다.
- 4.3 보상의 내용을 의료비(입원비용 포함), 실비(이상반응 치료를 위한 병원왕복 교통비, 치료에 소요되는 관련 비용 등) 및 필요한 경우 보상금으로 구성한다.
- 4.4 의료비 및 실비는 인체적용시험과 손상 사이의 인과관계에 합리적인 가능성이 있고 적어도 인과관계를 부정할 수 없다고 판단한 경우 신속하게 지급하고, 보상 개시 이후 인과관계가 없다고 판단된 경우에는 그 시점에서 보상 대상에서 제외한다.

패사는 앞에서 언급한 여러 제반 내용을 참고하며, 대상자가 본 연구에 의해 어떠한 불이익이라도 받지 않도록 주의하며, 만약 본 연구에 의해 손해점이 발생한 경우 피해 보상규약에 의거하여 책임을 질 것을 서약합니다.

2019년 11월 6일

㈜화이에프엔씨 대표 심헌택



Confidential

NEO

Page 2 / 2

마. 인체적용시험계획서 및 동의서

인체적용시험계획서

아토피피부염 증상을 가진 소아에서 **CAST**의
유효성 및 안전성을 평가하기 위한 **12주**,
무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

Protocol No. : GHFNC-01

Version No. : 1.1

Version Date : 2019년 12월 17일

(주)가화에프앤씨 소유

Confidential

본 인체적용시험계획서에는 (주)가화에프앤씨에 귀속되는 기밀정보가 포함되어 있습니다. 본 문서는 인체적용시험 책임자, 인체적용시험 공동연구자, 인체적용시험 코디네이터, 임상시험심사위원회 (IRB), 식품의약품안전처 등 인체적용시험의 실시와 관련된 자에게 제공된 것으로 인체적용시험용 식품을 섭취하는 사람에게 시험참가에 대한 서면 동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 (주)가화에프앤씨의 사전 서면 동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.

네오뉴트라(주)

Confidential

Protocol Signature Page

Study Title

아토피피부염 증상을 가진 소아에서 CAST의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험



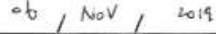


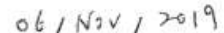
A 12 week, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Clinical Trial for the Evaluation of the Efficacy and Safety of CAST on Atopic Dermatitis in Children

Protocol No. GHFNC-01

Version 1.0 (06 November 2019)

CRO (Neonutra Co., Ltd.)

Written by :

 <hr style="width: 100%;"/> Printed Name	 <hr style="width: 100%;"/> Signature	 <hr style="width: 100%;"/> Date (DD-MMM-YYYY)
 <hr style="width: 100%;"/> Printed Name	 <hr style="width: 100%;"/> Signature	 <hr style="width: 100%;"/> Date (DD-MMM-YYYY)

Reviewed by :

 <hr style="width: 100%;"/> Printed Name	 <hr style="width: 100%;"/> Signature	 <hr style="width: 100%;"/> Date (DD-MMM-YYYY)
--	---	---

Sponsor (GAHWA F&C Co., Ltd.)

Reviewed by :

 <hr style="width: 100%;"/> Printed Name	 <hr style="width: 100%;"/> Signature	 <hr style="width: 100%;"/> Date (DD-MMM-YYYY)
--	---	---

Approved by :

 <hr style="width: 100%;"/> Printed Name	 <hr style="width: 100%;"/> Signature	 <hr style="width: 100%;"/> Date (DD-MMM-YYYY)
--	---	---

인체적용시험 책임자의 인체적용시험계획서 동의

인체적용시험계획서 제목: 아토피피부염 증상을 가진 소아에서 CAST의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

인체적용시험계획서 번호: GHFNC-01 (Version 1.1)

본인은 본 인체적용시험계획서를 검토하였으며, 인체적용시험의 수행에 필요한 모든 정보가 포함되어 있음을 확인하였습니다. 본인은 본 인체적용시험계획서에 따라 시험을 수행할 것에 동의합니다.

본인은 본 인체적용시험에 위임된 시험자들에게 본 인체적용시험계획서 및 모든 관련 정보의 사본을 제공합니다. 그들이 인체적용시험용 식품, 인체적용시험의 수행 및 기밀 유지 의무와 관련하여 완전히 이해할 수 있도록 그들과 함께 이 자료에 대해 논의합니다.

본인은 본 인체적용시험을 윤리적이고 과학적인 원칙에 따라 수행 및 관리하기 위한 국내 의약품 임상시험 관리기준 및 헬싱키선언과 소속병원 SOP 총칙, 세칙 & guideline에 따라 수행할 것에 동의합니다.

본인은 모니터요원, 점검자, 임상시험심사위원회(IRB) 또는 허가기관에서 요구하는 대로 근거문서와 의무기록을 포함한 모든 인체적용시험 관련 기록을 직접 열람할 수 있도록 하는데 동의합니다.

본인은 중대한 이상반응(SAE)의 정확한 보고를 위한 필요 요건에 대해 알고 있으며, 중대한 이상반응이 발생한 경우 요구되는 사항에 대해 보고하고 문서화할 책임이 있다는 것에 동의합니다.

인체적용시험 책임자

성명(정자로 기입) : _____

인체적용시험 실시기관 : _____ 소속 : _____

서명 : _____ 날짜 : _____
(DD-MMM-YYYY)

㈜가화에프앤씨



◎ 인체적용시험계획서

인체적용시험 번호	GHFNC-01
인체적용시험 식품	시험식품: CAST(소리쟁이추출물등복합물)
	대조식품: Placebo
인체적용시험 제목	아토피피부염 증상을 가진 소아에서 CAST의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
시험 단계	기타(건강기능식품)
인체적용시험 책임자	이영복 교수 가톨릭대학교 의정부성모병원 피부과
인체적용시험 실시기관	가톨릭대학교 의정부성모병원 경기도 의정부시 천보로 271
인체적용시험 의뢰자	㈜가화에프앤씨 충청북도 진천군 덕산읍 이덕로 730-15
Confidential	© GAHWA F&C Co., Ltd. This protocol is the property of GAHWA F&C Co., Ltd. and may not - in full or in part-be passed on, reproduced, published or otherwise use without the express permission of GAHWA F&C Co., Ltd.

◎ 인체적용시험계획서 요약

인체적용시험 제목	아토피피부염 증상을 가진 소아에서 CAST의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 의뢰자	쥬가화에프앤씨 충청북도 진천군 덕산읍 이덕로 730-15
인체적용시험 책임자	이영복 교수 가톨릭대학교 의정부성모병원 피부과
인체적용시험 실시기관	가톨릭대학교 의정부성모병원 경기도 의정부시 천보로 271
인체적용시험 기관	임상시험심사위원회(IRB)의 인체적용시험 승인일로부터 12개월
인체적용시험 대상	만 3세 이상, 만 11세 이하의 중등도의 아토피피부염 증상이 있는 소아
인체적용시험 목적	본 인체적용시험은 아토피피부염 증상이 있는 소아에게 CAST(소리쟁이추출물등복합물)를 섭취시켰을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 아토피피부염 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.
시험단계 및 디자인	단 계 : 기타(건강기능식품) 디자인 : 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
인체적용시험용 식품	시험식품 : CAST(소리쟁이추출물등복합물)
	대조식품 : Placebo
인체적용시험용 식품 섭취방법	시험식품(CAST) : 1일 3회, 1회 1포, 따뜻하게 섭취하는 것이 좋음 (소리쟁이추출물등복합물로서 26.88ml/day)
	대조식품(Placebo) : 시험식품과 동일한 방법으로 섭취
인체적용시험용 식품 섭취기간	12주

<p>인체적용시험 방법</p>	<p>인체적용시험 대상자와 부모(또는 법정대리인)는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험 대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정한다. 배정된 인체적용시험 대상자는 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취한다.</p>														
<p>인체적용시험 대상자 수</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군 (CAST)</th> <th>대조군 (Placebo)</th> <th>총 인체적용시험 대상자 수</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>최종 평가 레수 (PP Set)</td> <td>38</td> <td>38</td> <td>76</td> </tr> <tr> <td>Drop-out(24%) 고려레수</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>		시험군 (CAST)	대조군 (Placebo)	총 인체적용시험 대상자 수	최종 평가 레수 (PP Set)	38	38	76	Drop-out(24%) 고려레수	50	50	100		
	시험군 (CAST)	대조군 (Placebo)	총 인체적용시험 대상자 수												
최종 평가 레수 (PP Set)	38	38	76												
Drop-out(24%) 고려레수	50	50	100												
<p>선정기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)를 인체적용시험 대상자와 부모(또는 법정대리인)가 작성한 자 2) 만 3세 이상, 만 11세 이하인 자 3) 4개월 이상 간헐적 또는 지속적인 아토피피부염 증상이 있는 자 4) SCORAD(SCORing Atopic Dermatitis) 점수가 25-50점에 해당하는 자 														
<p>제외기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 아토피피부염 이외에 중증의 피부질환, 전신질환이 있는 자 2) 방문1 기준 2주 이내에 아토피피부염과 관련하여 전신적 항생제, 코르티코스테로이드제, 항히스타민제, 면역억제제를 투여한 자 3) 방문1 기준 2주 이내에 아토피피부염 개선을 위해 의약품, 한약, 건강기능 														

	<p>식품을 투여한 자</p> <p>4) 방문1 기준 4주 이내에 광선치료를 받은 자</p> <p>5) 방문1 기준 4주 이내에 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여할 계획이 있는 자</p> <p>6) 인체적용시험 시험자가 본 인체적용시험에 부적합하다고 판단하는 자</p>
유효성 평가 변수	<p>• 1차 유효성 평가 변수</p> <p>1) SCORAD total score</p> <p>• 2차 유효성 평가 변수</p> <p>1) SCORAD objective score</p> <p>2) SCORAD subjective score</p> <p>3) IGA</p> <p>4) IgE, Eosinophil count</p> <p>5) 국소용 스테로이드제 사용 비율 및 사용량</p>
안전성 평가 변수	<p>1) 이상반응</p> <p>2) 활력징후(맥박, 체온), 신체계측(체중)</p> <p>3) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)</p>
통계분석	<p>1. 유효성 평가 변수</p> <p>1) 1차 유효성 평가 변수</p> <p>1차 유효성 평가 변수인 SCORAD total score의 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도에 대해서는 주분석 방법으로 다음의 변수(알레르기 증상 가축력^{*)}, 출생 시 몸무게^{*)}, 육아형태^{*)}, 수유방식^{*)})를 공변량으로 하는 GLM(Generalized Linear Model)을 실시한다. 만약 기저특성 중, 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는 경우 해당 변수를 공변량으로 하는 GLM을 추가적으로 실시한다. 또한 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.</p> <p>2) 2차 유효성 평가 변수</p>

2차 유효성 평가 변수인 SCORAD objective score, SCORAD subjective score, IGA, IgE, Eosinophil count의 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.

국소용 스테로이드제 사용량의 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.

또한 다음의 변수(알레르기 증상 가족력, 출생 시 몸무게, 육아형태, 수유방식)를 공변량으로 하는 GLM(Generalized Linear Model)을 실시하며, 기저특성 중 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는 경우 해당 변수를 공변량으로 고려하여 GLM을 실시한다.

인체적용시험 기간 중 국소용 스테로이드제를 사용한 인체적용시험 대상자에 대하여 섭취 군간 비율(%)을 제시하고, 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 통해 섭취 군간 비율 차이를 비교한다.

2. 안전성 평가 변수

1) 이상반응

인체적용시험기간 동안 보고된 모든 이상반응(Treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA에 따라 Coding하며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험 대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석한다.

2) 활력징후(맥박, 체온), 신체계측(체중)

활력징후(맥박, 체온), 신체계측(체중) 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지

	<p>평가한다.</p> <p>3) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)</p> <p>혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type) 자료의 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 뇨검사는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교한다.</p>
--	---

◎ 인체적용시험 진행 일정표

Period		Screening ¹⁾	Active Treatment		
Visit		1	2	3	4
Week		-2	0	6	12
Window period(day) ²⁾				±7	±5
서면동의서		✓			
인구학적 조사 ³⁾		✓			
병력 및 약물투여력 조사 ⁴⁾		✓	✓		
이학적검사		✓		✓	✓
활력징후(맥박, 체온) 측정		✓		✓	✓
임상병리검사 ⁵⁾		✓			✓
신체계측	신장	✓			
	체중	✓		✓	✓
식사지도 및 식이조사 ⁶⁾			✓	✓	✓
국소용 스테로이드제 배부/반납 ⁷⁾			✓	✓	✓
표준 보습제 배부/반납 ⁸⁾			✓	✓	✓
유효성 평가	SCORAD index ⁹⁾	✓		✓	✓
	IGA		✓	✓	✓
	IgE, Eosinophil count		✓		✓
	국소용 스테로이드제 사용 비율 및 사용량 ⁷⁾			✓	✓
인체적용시험 대상자 적합성 평가		✓	✓		
무작위배정			✓		
인체적용시험용 식품 처방			✓	✓	
이상반응 확인				✓	✓
순응도 확인 ¹⁰⁾				✓	✓
병용약물 및 병용요법 변화 확인				✓	✓
자가평가 설문					✓

1) 방문1 이후 2주일 이내 방문2가 시행되어야 한다. 방문1에 검사결과가 모두 확인되는 경우, 방문1과 방문2를 동시에 실시할 수 있다. 방문1의 검사가 누락된 경우에는 방문2 무작위배정

전까지 실시할 수 있다.

- 2) 방문3의 방문일은 지정된 날짜 전·후 7일을 허용하며, 방문4의 방문일은 지정된 날짜 전·후 5일을 허용한다.
- 3) 방문1에 인체적용시험 대상자의 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 출생 시 몸무게, 재태기간, 분만방법, 같이 거주하는 사람, 형제관계, 알레르기 증상 가족력, 영아기 수유방식, 육아 형태, 영양제 섭취 여부, 아토피피부염 관련 정보(증상시작일, 최초 진단시기, 알레르기 관련 검사 여부, 의사 진단력, 약물치료 여부, 대상자 부모 연령, 목욕 방식, 목욕 빈도, 목욕 시 사용하는 물, 목욕 시 소요 시간, 비누 및 세정제 사용 여부, 보습제 사용 빈도, 애완동물 유무, 식습관)를 조사한다.
- 4) 방문1, 2에 방문1 기준으로 4주 이내의 외과적 수술력을 포함한 병력과 4주 이내의 약물투여력을 조사하여 기록한다.
- 5) 방문1 기준 7일 이내에 시행된 검사결과가 있다면 대체 가능하며, 인체적용시험 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 재검사를 시행할 수 있다.
 - 혈액학적검사: WBC, RBC, Hb, Hct, Platelet, Seg.Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, ESR
 - 혈액화학적검사: BUN, Total protein, Albumin, Alk.phos, AST(GOT), ALT(GPT), Creatinine
 - 뇨검사: S.G, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Urobilinogen, Nitrite, RBC(Erythrocyte), WBC(Leukocyte)
- 6) 방문2에서는 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 인체적용시험 코디네이터 또는 인체적용시험 대상자나 부모(또는 법정대리인)가 기록하며, 방문2, 3에 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)에게 식이조사지를 배부하여 방문3, 4에 회수하여 확인한다.
- 7) 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)가 완화제(rescue medication)가 필요하다고 판단하여 인체적용시험 시험자에게 유선 또는 진찰을 요청한 경우 hydrocortisone을 도포할 수 있도록 한다. 도포량은 어른 손바닥 2개 크기의 병변에 어른 손가락 1마디에 해당하는 양(fingertip unit)을 바를 수 있도록 교육하며, 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)는 매 방문 시 hydrocortisone을 가지고 방문하도록 하여 인체적용시험 코디네이터가 남은 잔량을 기록한다.
- 8) 인체적용시험 기간 동안 시험군과 대조군 모두 인체적용시험 실시기관에서 지급한 표준 보습제 사용이 가능하다. 방문2, 3에 표준 보습제를 배부하고, 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)는 방문3, 4에 보습제를 가지고 방문하도록 하여 인체적용시험 코디네이터가 남은

잔량을 기록한다.

- 9) 각 방문 시 SCORAD objective(병변의 범위, 정도) score의 평가는 동일한 시험자가 진행할 수 있도록 한다. 인체적용시험 대상자 본인이 SCORAD subjective(소양감, 수면방해) score의 평가가 어려울 경우, 동일한 인체적용시험 대상자의 부모(또는 법정대리인)가 대신 평가한다.
- 10) 방문3, 4에 인체적용시험 대상자가 지참하고 온 인체적용시험용 식품의 잔량을 비교하여 인체적용시험 코디네이터가 점검 및 기록한다('인체적용시험용 식품 처방 날~다음 방문 전날' 섭취).

◎ 약어

ADR	Adverse Drug Reaction
AE	Adverse Event
Alk.phos	Alkaline Phosphatase
CRA	Clinical Research Associate
CRF	Case Report Form
CRO	Contract Research Organization
FA	Full Analysis
GCP	Good Clinical Practice
GLM	Generalized Linear Model
Hb	Hemoglobin
Hct	Hematocrit
Ig	Immunoglobulin
IGA	Investigator's Global Assessment
IRB	Institutional Review Board
ITT	Intent-to-treat
LOCF	Last Observation carried Forward
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities
PP	Per protocol
RBC	Red Blood Cell
SAE	Serious Adverse Event
SCORAD	SCORing of Atopic Dermatitis
SG	Specific Gravity
TEAEs	Treatment-Emergent Adverse Events
Th	T helper type
WBC	White Blood Cell

목 차

◎ 인체적용시험계획서	2
◎ 인체적용시험계획서 요약.....	3
◎ 인체적용시험 진행 일정표.....	8
◎ 약어.....	11
1. 인체적용시험의 명칭 및 단계.....	16
1.1. 명칭.....	16
1.2. 단계.....	16
2. 시험자 및 실시기관 지원조직	16
2.1. 인체적용시험 실시기관(INSTITUTION).....	16
2.2. 인체적용시험 책임자(PRINCIPAL INVESTIGATOR).....	16
2.3. 인체적용시험 의뢰자(SPONSOR).....	16
2.4. 인체적용시험 수탁기관(CONTRACT RESEARCH ORGANIZATION, CRO).....	17
3. 인체적용시험의 목적 및 배경	17
3.1. 인체적용시험의 목적.....	17
3.2. 인체적용시험의 배경.....	17
4. 인체적용시험용 식품	20
4.1. 인체적용시험용 식품의 개요.....	20
4.1.1. 시험식품(CAST).....	20
4.1.2. 대조식품(Placebo).....	21
4.2. 인체적용시험용 식품의 생산/포장 및 라벨링.....	21
4.3. 인체적용시험용 식품의 교부.....	22
4.4. 인체적용시험용 식품의 관리 및 기록.....	22
4.5. 인체적용시험용 식품의 회수 및 폐기.....	23
4.6. 이중눈가림의 유지.....	23
5. 인체적용시험 기간	23
6. 인체적용시험 대상자의 선정기준, 제외기준 및 목표 인체적용시험 대상자의 수.....	24
6.1. 인체적용시험 대상자.....	24
6.1.1. 선정기준.....	24
6.1.2. 제외기준.....	24

6.2.	목표한 인체적용시험 대상자의 수 및 산정근거	25
6.2.1.	인체적용시험 대상자 수	25
6.2.2.	산정근거	25
7.	인체적용시험 방법	27
7.1.	인체적용시험의 설계	27
7.2.	섭취량, 섭취방법 및 섭취기간	27
7.2.1.	1일 섭취량 및 섭취방법	27
7.2.2.	섭취기간	27
7.2.3.	섭취량 설정사유	28
7.3.	병용요법	28
7.3.1.	병용가능 약물 및 건강기능식품	28
7.3.2.	병용금지 약물 및 건강기능식품/치료	28
7.4.	무작위배정	29
7.5.	인체적용시험 대상자 모집 방법	30
8.	인체적용시험 진행일정, 관찰 및 임상검사 항목과 방법	31
8.1.	인체적용시험 진행일정표	31
8.2.	관찰 항목 및 임상검사 항목	33
8.2.1.	인체적용시험 대상자 동의 및 인구학적 조사	33
8.2.2.	병력 및 약물투여력 조사, 병용약물 및 병용요법	33
8.2.3.	이학적검사	34
8.2.4.	활력징후(맥박, 체온) 측정	34
8.2.5.	임상병리검사	34
8.2.6.	신체계측(신장, 체중)	35
8.2.7.	식사지도 및 식이조사	35
8.2.8.	SCORAD index	36
8.2.9.	IGA	37
8.2.10.	IgE, Eosinophil count	38
8.2.11.	표준 보습제 사용량	38
8.2.12.	국소용 스테로이드제 사용 비율 및 사용량	38
8.2.13.	선정기준/제외기준 확인(인체적용시험 대상자 적합성 평가)	38
8.2.14.	무작위배정 및 섭취	39
8.2.15.	이상반응 확인	39
8.2.16.	순응도 확인	39
8.2.17.	자가평가 설문	40
8.3.	관찰 검사 방법(방문별)	40

8.3.1.	1차 방문(Screening visit, Week -2 이내)	40
8.3.2.	2차 방문(Randomization visit, Week 0)	40
8.3.3.	3차 방문(Interim visit, Week 6)	41
8.3.4.	4차 방문(Closing visit, Week 12)	42
8.3.5.	추가방문(필요 시)	42
9.	인체적용시험용 식품의 섭취 및 사용상 주의사항	42
10.	인체적용시험 대상자의 중지 및 탈락기준, 위반에 대한 처리	43
10.1.	인체적용시험 대상자의 중지 및 탈락기준	43
10.2.	인체적용시험계획서 위반에 대한 처리	44
11.	유효성 평가 변수 및 통계 분석 방법	45
11.1.	유효성 평가 변수	45
11.1.1.	1차 유효성 평가 변수	45
11.1.2.	2차 유효성 평가 변수	45
11.2.	유효성 평가 방법	45
11.2.1.	1차 유효성 평가 방법	45
11.2.2.	2차 유효성 평가 방법	46
11.3.	통계분석 방법	46
11.3.1.	결과분석의 일반적 원칙	46
11.3.2.	인구통계학적 기초자료	47
11.3.3.	유효성 평가 변수에 대한 분석	47
11.3.3.1.	1차 유효성 평가 변수 분석	48
11.3.3.2.	2차 유효성 평가 변수 분석	48
11.3.4.	안전성 평가 변수에 대한 분석	48
11.3.4.1.	이상반응	48
11.3.4.2.	활력징후(맥박, 체온), 신체계측(체중)	49
11.3.4.3.	영상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)	49
11.3.5.	중간분석	49
12.	이상반응을 포함한 안전성 평가방법, 평가기준 및 보고방법	49
12.1.	안전성 관련 용어의 정의	49
12.2.	평가 방법 및 점검	51
12.3.	평가기준	51
12.3.1.	자·타각적 증상	51
12.4.	인체적용시험용 식품과의 인과관계	52
12.5.	보고방법	53

12.5.1. 이상반응의 보고.....	53
12.5.2. 신속 보고.....	54
12.6. 예상하지 못한 중대한 약물이상반응 발생 시 각 담당자의 의무.....	54
13. 동의서, 보상 규약, 인체적용시험 후 인체적용시험 대상자 진료 및 치료.....	56
13.1. 동의서 및 설명문.....	56
13.2. 보상에 대한 규약.....	56
13.3. 인체적용시험 후 인체적용시험 대상자 진료에 관한 사항.....	56
14. 인체적용시험 대상자의 안전 보호에 관한 대책.....	57
14.1. 인체적용시험 실시기관.....	57
14.2. 인체적용시험계획서의 승인 및 수정.....	57
14.3. 인체적용시험계획서의 숙지.....	57
14.4. 인체적용시험의 동의.....	57
14.5. 적합한 인체적용시험 대상자의 선정.....	57
14.6. 취약한 대상자(원내 직원의 자녀) 보호대책 방안.....	58
14.7. 인체적용시험의 진행 점검.....	58
14.8. 인체적용시험 실시기관의 모니터링.....	59
14.9. 인체적용시험 대상자의 비밀유지.....	59
14.10. 인체적용시험용 식품 관리.....	60
14.11. 이상반응 발생 시 조치.....	60
15. 기타 인체적용시험을 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항.....	60
15.1. 인체적용시험의 중지 또는 중단.....	61
16. REFERENCES.....	62
부록1. 인체적용시험용 식품과의 인과관계 판정기준.....	63
부록2. 피해 보상에 대한 규약.....	64

1. 인체적용시험의 명칭 및 단계

1.1. 명칭

아토피피부염 증상을 가진 소아에서 CAST의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

A 12 week, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Clinical Trial for the Evaluation of the Efficacy and Safety of CAST on Atopic Dermatitis in Children

1.2. 단계

기타(건강기능식품)

2. 시험자 및 실시기관 지원조직

2.1. 인체적용시험 실시기관(Institution)

가톨릭대학교 의정부성모병원(경기도 의정부시 천보로 271)

2.2. 인체적용시험 책임자(Principal Investigator)

이영복 교수(가톨릭대학교 의정부성모병원 피부과)

2.3. 인체적용시험 의뢰자(Sponsor)

쥬가화에프앤씨
충청북도 진천군 덕산읍 이덕로 730-15

2.4. 인체적용시험 수탁기관(Contract Research Organization, CRO)

네오뉴트라㈜

서울특별시 종로구 대학로 44(효제동 20) 우일빌딩 4층

3. 인체적용시험의 목적 및 배경

3.1. 인체적용시험의 목적

본 인체적용시험은 아토피피부염 증상이 있는 소아에게 CAST(소리쟁이추출물등복합물)를 섭취시켰을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 아토피피부염 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.

3.2. 인체적용시험의 배경

아토피피부염(atopic dermatitis)은 유아기에 주로 발생하여 각질층 수분유지기능 및 피부장벽 기능이 저하됨에 따라 정상피부에서는 침입하기 어려운 항원 등의 자극유발물질이 각질층 내로 침입하여 피부 알레르기, 심한 소양증 등을 유발하는 만성적인 염증성 피부 질환이다.

2018년 국민건강보험공단의 보도자료에 따르면 2010년~2015년 진료받은 아토피피부염 환자 총 621만 9,762명 중 소아·청소년(0-19세)은 410만 명이며 소아·청소년의 연평균 진료인원은 68만 명으로 성인보다 두 배 가까이 더 많이 진료 받는 것으로 도출되었다. 특히 2015년을 기준으로, 전체 아토피피부염 환자 중 9세 이하 416,697명(42.62%), 10대 182,518명(18.67%), 20대 112,231명(11.48%) 순으로 나이가 어릴수록 아토피피부염 환자수가 많고 연령이 높아질수록 환자수가 줄어드는 것으로 나타났다.

아토피피부염 소아는 성장하면서 50%는 천식으로, 75%는 알레르기 비염으로 진행되어 알레르기 행진이 일어나는 것으로 알려져 있으며, 잦은 피부손상과 소양감으로 인해 신체적 문제와 사회 심리적 문제가 동반되는 경우가 많다. 소양감때문에 수면장애를 경험하고, 그로 인해 짜증이 심하거나 집중력이 떨어지고 늘 피곤하여 삶의 질이 저하될 수 있다. 피부 증상이나 약물에 대한

부작용으로 인하여 신체상 저하와 수치상 등 심리적 문제를 경험하면서 자신감을 상실하고 내성적인 성격을 갖게 되어 학습, 놀이, 운동 등의 활동에 제한을 받게 된다. 이로 인해 또래관계나 학교활동에 영향 주어 정상적인 성장 발달 과정을 경험하지 못할 수 있다. 보호자인 부모는 많은 스트레스와 부담감을 가지고 있으며, 그 외 에도 아동의 증상에 대한 죄책감, 증상이 완화되지 않을 경우 좌절, 절망감, 소진감 등 심리적 위기를 경험하게 된다¹⁾.

아토피피부염의 치료법으로 아직까지 확실한 치료방법이 제시되어 있지 않고 항히스타민제, 스테로이드제 등의 약제가 사용되고 있으나 이와 같은 약물들은 면역 응답성을 약화시켜서 염증을 경감시키는 것으로 장기간 사용시 각종 부작용이 보고되고 있다.

소리쟁이는 북반구 유럽 원산이며, 남반구에도 퍼져서 전 세계에 분포하는 마디풀과에 속하는 여러해살이풀로 우리나라에서는 전국 농촌 주변, 경작지 주변, 도랑가에 쉽게 볼 수 있고 조선 시대에는 채소로 키우면서 나물과 장아찌로 만들어 먹기도 하였다. 한의학에서는 소리쟁이의 뿌리를 양제근이라 하여 혈분에 작용하여 혈열을 끄고 지혈하는 효능이 있어 코피, 토혈, 대변출혈, 각혈, 자궁출혈, 음, 버짐, 변비 등에 사용되며 혈액응고 시간단축, 피부진균 억제, 감기에방, 백혈병 억제작용을 한다고 하였다.

히스타민은 비만세포가 생물학적으로 활성화될 때 염증인자들과 분비되므로 비만세포의 탈과립 지표로 알레르기 억제물질의 생물학적 측정에 이용되고 있다(Mastuda, Morikawa, Ueda, Managi, Yoshikawa, 2002). 히스타민은 histidine decarboxylase (HDC)에 의해 합성된다. 따라서 human mast cell-1 (HMC-1)세포에서 분비되는 히스타민 및 HDC의 활성을 측정된 결과, AST2017-01은 활성화된 HMC-1세포로부터 히스타민의 분비를 농도 의존적으로 억제하였고, HDC의 활성도 유의하게 억제한 것을 확인할 수 있었다²⁾.

동충하초는 대부분 곤충에 기생하여 숙주가 되는 곤충의 시체에 자실체를 내는 자낭균류 맥각균목 동충하초과의 소형 버섯류로, 동아시아 지역을 중심으로 다양한 생리활성이 보고되어 왔으며 대표적으로 면역증강, 항염, 항암, 항노화, 간기능 개선 및 피로회복 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 본초강목(本草綱目)에서는 동충하초를 상용하면 허약체질을 튼튼하게 하고, 면역력을 높이는 효과가 있다고 하였다. 진균이 자실체를 형성하는 대상에 따라 다양한 종으로 나뉘어지며, 시넨시스 동충하초(*Cordyceps sinensis*)와 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)가 대표적이다. 시넨시스 동충하초는 전통적으로 귀한 약재로 알려져 왔으나 야생에서 구하기가 힘들며 대량생산이 불가능하다. 하지만 밀리타리스 동충하초의 경우, 주요 유효성분인 cordycepin과

cordycepic acid의 함량이 시넨시스 동충하초에 비해 높으며 대량생산이 가능하여 최근 건강기능식품으로 각광받고 있다³⁾. 동충하초는 인체 면역체계의 선천면역(innate immunity)뿐 아니라 적응면역(adaptive immunity)에도 증강효능이 있는 것으로 알려져 있다. 동충하초 유래물질의 질병예방 효능에 대한 연구는 지난 수 십 년 간 활발히 진행되어 왔다. 현재, 국내외 연구진에 의해 동충하초 유래 생리활성물질 중 그 구조와 작용기전이 밝혀진 단일물질은 코디세핀(cordycepin), 싸이클로스포린(cyclosporin), 아세톡시스시르펜올(acetoxyscirpenol), 에르고스테롤 퍼옥사이드(ergosterol peroxide) 등이 있다.

아토피피부염 원인인자인 IL-6의 생성을 억제하는데 가장 효과를 보인 6:4 비율의 소리쟁이추출물등복합물(CAST)을 이용한 시험관 실험에서 활성성분인 chrysophanol과 cordycepin은 활성화된 비만세포(mast cell) 내의 칼슘 농도와 히스타민 분비, 히스타민 합성효소인 HDC의 활성, 활성화된 각질세포(HaCaTcell)에서 염증성 사이토카인의 생성을 감소시켰으며 세포독성은 관찰되지 않았다. 또한 활성성분인 chrysophanol은 세포 독성에는 영향을 주지 않고 활성화된 비만세포로부터 분비된 Th2 cytokine과 염증성 사이토카인의 생성 및 mRNA 발현을 유의하게 억제하였고, 활성화된 비만세포 내 IKK와 RIP2의 활성을 감소시켰으며, IKK와 RIP2의 downstream signal인 NF- κ B의 활성을 감소시켰다. LPS로 유도된 마우스 비장세포에서는 전염증성 사이토카인을 억제하였으나, 면역세포(Th1, Th2)의 response는 조절하였다. LPS로 유도된 염증관련인자인 iNOS와 COX-2를 억제하고, NO의 생성도 억제하였으나, LPS가 처리되지 않았을 때 이러한 인자들을 증가시키지는 않았다. 이러한 결과는 6:4 비율의 소리쟁이추출물등복합물이 면역세포인 Th1, Th2의 response를 조절하여 염증반응을 억제하는 것이며, 6:4 비율의 소리쟁이추출물등복합물에 풍부하게 함유된 phytochemical인 chrysophanol과 cordycepin로 인해 LPS로 유도된 염증을 조절하는 것으로 생각된다.

cordycepin은 TSLP에 의해 유도된 IL-13 생성을 차단시키고, IL-6 생성을 현저하게 감소시켜서 알레르기성 염증성 질환 치료에 잠재적인 영향을 미친다⁴⁾.

또한 아토피피부염 동물모델을 이용한 선행연구에서는 DNFB에 의한 scratching, epidermis thickness, 비만세포 침윤, skin lesions 내 TSLP, ICAM-1, MIP2 발현 및 TSLP, TARC, CCR3 mRNA 발현과 caspase-1 발현 및 활성, 혈청 내 histamine, IgE, TSLP, IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α 수준을 억제시켰다.

그리고 AST2017-01은 Rumex crispus와 Cordyceps militaris로 되었으며, AST2017-01 및

AST2017-01의 생리 활성 화합물인 chrysophanol과 cordycepin의 항아토피피부염 효과를 분석한 연구에서, AST2017-01, chrysophanol 및 cordycepin은 아토피 피부염의 임상적 중증도를 완화시키고 긁는 행동을 유의하게 감소시켰다. 또한 아토피피부염 유사 피부병변에서 표피의 두께 및 염증 세포의 침윤도 AST2017-01, chrysophanol, 또는 cordycepin에 의해 감소되었다. AST2017-01, chrysophanol, 또는 cordycepin은 아토피피부염 마우스의 혈청에서 histamine, immunoglobulin E, thymic stromal lymphopoietin (TSLP), interleukin IL-4, IL-6, TNF- α 의 수준을 유의하게 억제하였고, 아토피 피부염 조직의 TSLP, chemokine/CCL17, C-C chemokine receptor 3의 mRNA 발현도 억제하였다. 게다가, AST2017-01, chrysophanol, 또는 cordycepin은 피부 조직의 caspase-1 발현 및 활성을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 AST2017-01이 아토피 피부염 완화를 위한 건강 기능 식품으로 사용될 수 있음을 시사한다⁵⁾.

이에 본 인체적용시험에서는 중증도의 아토피피부염 증상을 가진 소아를 대상으로 CAST의 12주간 섭취가 아토피피부염 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하고자 한다.

4. 인체적용시험용 식품

4.1. 인체적용시험용 식품의 개요

4.1.1. 시험식품(CAST)

- 주성분명 : 소리쟁이추출물등복합물 (CAST)
- 성상 및 제형 : 액상
- 함량 : 80ml/포(소리쟁이추출물등복합물로서 26.88ml)
- 보관 방법 : 실온(1~30°C)보관
- 용법 및 용량 : 1일 3회, 1회 1포, 따뜻하게 섭취하는 것이 좋음
(소리쟁이추출물등복합물로서 80ml/day)
- 원재료 및 배합 비율 : 1포(80ml) 당

원료명	함량(ml)	배합비율(%)
정제수	53.12	66.4

소리쟁이추출물등복합물	26.88	33.6
합계	80.0	100

4.1.2. 대조식품(Placebo)

- 주성분명 : 볶은팥 추출물
- 성상 및 제형 : 액상
- 함량 : 80ml/포
- 보관 방법 : 실온(1~30°C)보관
- 용법 및 용량 : 시험군과 동일한 방법으로 섭취
- 원재료 및 배합 비율 : 1포(80ml) 당

원료명	함량(ml)	배합비율(%)
정제수	53.12	66.4
볶은팥 추출물	26.88	33.6
합계	80.0	100

4.2. 인체적용시험용 식품의 생산/포장 및 라벨링

인체적용시험용 식품은 인체적용시험 의뢰자가 제조 후 포장하여 인체적용시험 책임자에게 제공한다. 인체적용시험용 식품으로 생산되는 제품은 외형 및 성상이 동일하여 육안으로 관찰하였을 때 차이가 없어야 하며, 중량 차이도 크지 않아야 한다. 또한 인체적용시험용 식품은 동일한 라벨을 부착함으로써 인체적용시험 대상자 및 인체적용시험 시험자에게 눈가림(Blind)이 유지되도록 한다. 인체적용시험용 식품 라벨의 기재는 의약품 제조 및 품질관리에 관한 규정, 별표 11. 임상시험용의약품 제조의 7.7 표시기재에 따르며 군별 차이가 노출되지 않도록 제조번호(Lot No.)는 시험식품, 대조식품 제조번호를 병기한다. 눈가림을 위한 샘플의 생산과 유지방법은 다음과 같다.

- ① 분리보관 : 시험식품과 대조식품들은 라벨링 작업 전까지 제조번호별로 섞이지 않게 별도 보관한다.
- ② 라벨링 : 아래의 내용이 포함된 라벨을 제작한다.

1. 무작위배정번호
2. 고유코드번호
3. "인체적용시험용"이라는 표시
4. 인체적용시험계획서 번호
5. 성분명/코드명
6. 제조번호
7. 인체적용시험계획 승인을 받은 자의 상호와 주소, 전화번호
8. 저장방법
9. 유효기간 또는 재검사일자
10. 섭취방법
11. 유아의 손이 닿지 않는 곳에 보관

"인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없음"이라는 표시

- ③ 포장 및 고유 코드의 기록: 인체적용시험용 식품을 각각 6주분+여유분으로 소분 포장한 후, 무작위배정표에 따라 고유코드를 포장 라벨지에 기록한다.

4.3. 인체적용시험용 식품의 교부

인체적용시험용 식품의 불출은 인체적용시험 책임자의 업무 위임을 받은 인체적용시험 코디네이터가 배부한다. 이때, 인체적용시험 시험자의 서명이 있는 처방전에 의해 행해져야 하며 방문일, 인체적용시험용 식품 처방 수 등이 기록되어야 한다.

4.4. 인체적용시험용 식품의 관리 및 기록

인체적용시험 책임자의 업무 위임을 받은 인체적용시험 코디네이터는 수불대장에 인체적용시험 대상자의 무작위배정번호, 처방일, 인체적용시험용 식품 불출 수량, 인체적용시험용 식품 재고량 등을 기록하여야 한다. 인체적용시험용 식품의 입고가 필요한 경우 인체적용시험 수탁기관의 모니터요원에게 이를 알려야 하며, 모니터요원은 인체적용시험 의뢰자에게 이를 요청한다. 또한, 모니터요원은 정기적으로 관리 및 기록된 수불대장을 확인한다.

4.5. 인체적용시험용 식품의 회수 및 폐기

인체적용시험 코디네이터는 인체적용시험 대상자로부터 인체적용시험용 식품의 잔량을 회수해야 하며, 모니터요원은 회수된 인체적용시험용 식품을 인체적용시험 의뢰자에게 반납한다. 인체적용시험 의뢰자는 인체적용시험 실시기관으로부터 반납받은 인체적용시험용 식품을 폐기하고, 반납 및 폐기에 관한 기록을 작성·보관한다.

4.6. 이중논가림의 유지

이중논가림 유지를 위하여 4.2항 인체적용시험용 식품의 생산·포장 및 라벨링에서 언급된 내용 외에, 각 군별로 고유코드의 할당 내역(논가림에 대한 정보)은 인체적용시험 책임자가 봉인된 상태로 관리하며, 중대한 약물이상반응 발생으로 부득이하게 해당 코드 열람이 필요한 경우*를 제외하고는 인체적용시험 종료 시까지 공개하지 않는다. 인체적용시험 시험자는 선정된 인체적용시험 대상자에게 배정된 무작위배정코드와 일치하는 인체적용시험용 식품을 인체적용시험 대상자에게 공급하며, 인체적용시험용 식품의 결손 및 파손 시에는 여분(고유코드별)을 사용함으로써 논가림을 유지한다.

* 논가림 해제 절차: 인체적용시험 대상자에게 중대한 약물이상반응이나 기타 중요한 임상적 상황으로 섭취한 인체적용시험용 식품의 군을 확인해야 하는 상황이라고 인체적용시험 책임자의 판단이 들면 즉시, 전화나 Fax로 이 사실을 인체적용시험 수탁기관의 모니터요원에게 알린다.

이 사실을 전달받은 모니터요원은 인체적용시험 의뢰자에게 알리고 인체적용시험 관련자들과 논가림 해제가 꼭 필요한 사항인지 논의를 통하여 논가림 해제 여부를 결정 후 인체적용시험 책임자에게 결과를 통지해 준다. 인체적용시험 책임자는 논가림 해제 수락을 통보받은 경우에 한하여, 인체적용시험 대상자의 배정번호와 일치하는 봉투를 개봉하여 시험식품인지 대조식품인지 확인 후, 필요하다면 그에 따른 처치를 실시하도록 한다. 논가림 해제 시에는 해당 인체적용시험 대상자 정보와 해제 사유를 무작위배정 코드 파기 기록지에 기록하도록 하며, 무작위배정 코드가 해제된 인체적용시험 대상자는 인체적용시험을 지속할 수 없다.

5. 인체적용시험 기간

임상시험심사위원회(IRB) 승인일로부터 12개월

6. 인체적용시험 대상자의 선정기준, 제외기준 및 목표 인체적용시험 대상자의 수

6.1. 인체적용시험 대상자

만 3세 이상, 만 11세 이하의 중등도의 아토피피부염 증상이 있는 소아

6.1.1. 선정기준

다음 기술된 조건에 모두 부합되는 사람을 인체적용시험 대상자로 선정한다.

- 1) 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)를 인체적용시험 대상자와 부모(또는 법정대리인)가 작성한 자
- 2) 만 3세 이상, 만 11세 이하인 자
- 3) 4개월 이상 간헐적 또는 지속적인 아토피피부염 증상이 있는 자
- 4) SCORAD(SCORing Atopic Dermatitis) 점수가 25-50점에 해당하는 자

6.1.2. 제외기준

다음 기술된 조건에 하나 이상 해당되는 사람은 인체적용시험 대상자에서 제외한다.

- 1) 아토피피부염 이외에 중증의 피부질환, 전신질환이 있는 자
- 2) 방문1 기준 2주 이내에 아토피피부염과 관련하여 전신적 항생제, 코르티코스테로이드제, 항히스타민제, 면역억제제를 투여한 자
- 3) 방문1 기준 2주 이내에 아토피피부염 개선을 위해 의약품, 한약, 건강기능식품을 투여한 자
- 4) 방문1 기준 4주 이내에 광선치료를 받은 자
- 5) 방문1 기준 4주 이내에 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여할 계획이 있는 자
- 6) 인체적용시험 시험자가 본 인체적용시험에 부적합하다고 판단하는 자

6.2. 목표한 인체적용시험 대상자의 수 및 산정근거

6.2.1. 인체적용시험 대상자 수

	시험군 (CAST)	대조군 (Placebo)	총 인체적용시험 대상자 수
최종 평가 레수(PP Set)	38	38	76
Drop-out(24%) 고려레수	50	50	100

인체적용시험 대상자 선정/제외기준에 적합한 100명을 확보하여 섭취하도록 하고, Protocol에 명시된 PP Set 기준에 적합한 최종 유효성 평가 레수로 76명 이상(군당 38명 이상)을 분석하기로 계획한다. 인체적용시험 진행 도중 인체적용시험 대상자가 중도탈락(drop-out)되는 경우 통계적 유의성 평가를 위한 군당 최소인원인 38명(합계 76명)에 도달할 때까지 새로운 인체적용시험 대상자를 모집하도록 한다.

6.2.2. 산정근거

본 인체적용시험의 일차적인 목적은 섭취 12주 후 SCORAD total score의 감소 효과가 시험군(CAST)이 대조군(Placebo)과 비교하여 우월하다는 것을 증명하고자 한다.

이를 검정하기 위한 가설은 다음과 같다.

$H_0 : \mu_t = \mu_c$ (시험 후 시험군의 평가변수 변화값이 대조군의 값과 같다.)

$H_1 : \mu_t \neq \mu_c$ (시험 후 시험군의 평가변수 변화값이 대조군의 값과 다르다.)

- 1) 우위성시험(superiority test)
- 2) 유의수준(level of significance), 5%, 양측검정
- 3) 제 2종 오류(β)는 0.2로 하여 검정력(power of test)은 80%로 유지
- 4) 시험군과 대조군의 시험레수의 비율은 1.
즉, n_t (시험군의 레수) = n_c (대조군의 레수), 1:1로 한다.
- 5) 기존의 연구 중 본 인체적용시험과 동일한 주 평가변수인 SCORAD total score을 이용한

임상시험인 Sergei V et al.(2010)⁶⁾의 논문의 결과를 이용하였고, 다음과 같은 평가변수의 변화 양상을 확인할 수 있었다. 시험군은 SCORAD total score에서 기저치(baseline) 대비 14.2 감소하였고 대조군은 7.8 감소하였다. 두 표준편차를 이용하여 합동표준편차를 추정하면 약 8.8을 추정할 수 있다. 단, 평가변수의 차이는 기존연구 효과의 임상적 유용 정도를 고려하여 약 89% 수준을 사용하였다.

	Treatment(n=43)		Placebo(n=47)
8주 후	평균	-14.2	-7.8
SCORAD total score 변화	표준편차	8.8	

위의 1)-5)를 가정하였을 때 인체적용시험에 필요한 시험례수는 다음과 같다. (양측검정)

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times \sigma^2 \times 2}{\Delta^2}$$

$Z_{\alpha/2}$: 표준정규분포에서 오른쪽 꼬리부분 면적이 $\alpha/2$ 가 되는 임계치 혹은 분위수

Z_{β} : 표준정규분포에서 오른쪽 꼬리부분 면적이 β 가 되는 임계치 혹은 분위수

α : 제1종 오류의 크기

β : 제2종 오류의 크기

σ : 표준편차

Δ : 임상적으로 의미가 있는 시험군과 대조군간의 평균변화 차이

상기 식으로 대상자의 수를 계산하면, 군당 최소 대상자 수는 군당 약 38명이다.

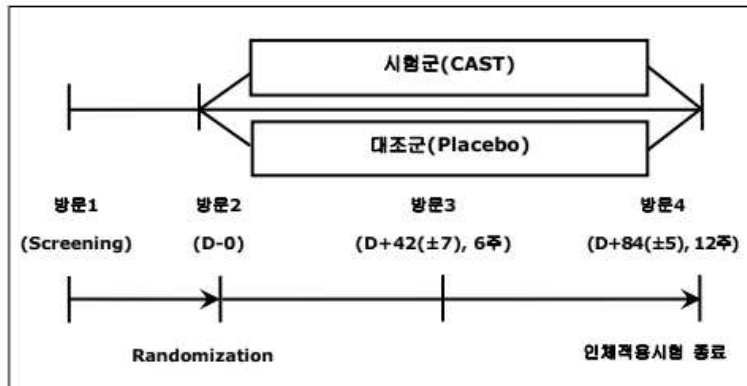
$$38 \approx \frac{(1.96 + 0.84)^2 \times 8.8^2 \times 2}{5.696^2}$$

따라서 탈락율(24%)을 고려한 적정 유효성 평가를 위해 군당 등록할 대상자 수는 약 50명이며, 두 군의 총 대상자 수는 100명을 등록하는 것으로 한다.

7. 인체적용시험 방법

7.1. 인체적용시험의 설계

본 인체적용시험은 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험으로 디자인되었다. 자의에 의해 인체적용시험 동의서를 작성한 사람이 본 인체적용시험에 참가하면 인구학적 조사, 병력 및 약물투여력 조사, 이학적검사, 활력징후(맥박, 체온) 측정, 임상병리검사, 신체계측(신장, 체중), SCORAD index 평가를 실시하여 선정/제외기준에 적합하면 무작위배정을 통한 인체적용시험 대상자 등록이 이루어진다. 시험군 또는 대조군으로 배정된 인체적용시험 대상자는 총 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취하게 된다. 각 군의 배정비율은 시험군 : 대조군 = 1 : 1로 한다.



7.2. 섭취량, 섭취방법 및 섭취기간

7.2.1. 1일 섭취량 및 섭취방법

- 시험식품(CAST) : 1일 3회, 1회 1포, 따뜻하게 섭취하는 것이 좋음
(소리쟁이추출물등복합물로서 26.88ml/day)
- 대조식품(Placebo) : 시험식품과 동일한 방법으로 섭취

7.2.2. 섭취기간

시험식품(CAST) 또는 대조식품(Placebo)을 12주간 섭취

7.2.3. 섭취량 설정사유

1일 주원료의 효능 극대화를 위해 눈에 밀리터리스 동충하초의 코디세핀 함량이 1.4821mg/g, 소리쟁이 크리소파놀 함량이 1.3842mg/g로 측정되므로 이에 대한 1포(80ml)당 최소 20mg 이상이 함유되도록 배합비율을 맞추고 이를 1일 3회, 1회 1포씩 섭취하도록 설정하였다.

7.3. 병용요법

7.3.1. 병용가능 약물 및 건강기능식품

다음의 경우 인체적용시험 기간 동안 병용이 가능하다.

- 1) 인체적용시험 기간 동안 시험군과 대조군 모두 인체적용시험 실시기관에서 지급한 표준 보습제 사용이 가능하다. 방문2, 3에 표준 보습제를 배부하고, 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)는 방문3, 4에 보습제를 가지고 방문하도록 하여 인체적용시험 코디네이터가 남은 잔량을 기록하도록 한다.
- 2) 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)가 완화제(rescue medication)가 필요하다고 판단하여 인체적용시험 시험자에게 유선 또는 진찰을 요청한 경우 hydrocortisone을 도포할 수 있도록 한다. 도포량은 어른 손바닥 2개 크기의 병변에 어른 손가락 1마디에 해당하는 양(fingertip unit)을 바를 수 있도록 교육하며, 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)는 매 방문 시 hydrocortisone을 가지고 방문하도록 하여 인체적용시험 코디네이터가 남은 잔량을 기록하도록 한다.
- 3) 인체적용시험 대상자가 본 인체적용시험에 참여하기 이전부터 투여하고 있던 약물 및 건강기능식품 중 본 인체적용시험의 결과 해석에 영향을 미치지 않을 것으로 사료되는 병용약물 및 건강기능식품은 인체적용시험 시험자의 판단 하에 허용한다.
- 4) 기타 질환의 일과성 치료를 목적으로 사용되는 약제는 인체적용시험 시험자와 상의를 통하여 병용 투여하기로 한다.

7.3.2. 병용금지 약물 및 건강기능식품/치료

다음의 약물 및 건강기능식품/치료는 안전성, 내약성 또는 유효성의 평가를 방해할 수 있다. 따라서, 다음에 열거하는 약물 및 건강기능식품/치료는 인체적용시험기간 동안 방문 1(Screening visit, week -2)부터 방문 4(Closing visit, week 12)까지 금지된다.

- 1) 항생제, 항히스타민제(단, 피부감염을 제외한 다른 질환에 의한 병용은 인체적용시험 시험자의 판단에 따라 허용하며, 피부감염에 의한 병용은 아토피피부염과의 연관성, 사용기간 및 약물의 종류를 고려하여 인체적용시험 시험자의 판단에 따라 허용한다.)
- 2) 전신적 코르티코스테로이드제
- 3) 면역억제제
- 4) 아토피피부염 개선을 위한 의약품, 한약, 건강기능식품
- 5) 광선치료
- 6) 지급된 표준 보습제 외의 보습제

인체적용시험 동안 인체적용시험 대상자가 이들 사항 중 어느 것이라도 해당하는 경우에는 인체적용시험 모니터요원에게 즉시 알리도록 한다. 인체적용시험 모니터요원에게 연락될 때까지는 인체적용시험 대상자를 인체적용시험에서 중도탈락시켜서는 안되며, 이들 사항에 해당한 인체적용시험 대상자의 시험 중단 여부 결정은 사례 별로 인체적용시험 시험자와 상의한 뒤에 인체적용시험 결과(유효성)에 영향을 미칠 수 있는 경우 인체적용시험에서 제외/탈락될 수 있다.

인체적용시험용 식품 섭취를 시작한 후에 새로운 약물 및 건강기능식품을 투여/섭취하거나 치료를 받은 경우 인체적용시험 시험자에게 보고하도록 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)를 교육한다. 인체적용시험 대상자의 인체적용시험용 식품 섭취 개시 이후의 모든 약물 및 건강기능식품의 투여/섭취는 증례기록서 '약물투여력 및 병용약물' 페이지에 기재하고, 유의한 비약물 치료(광선치료 등)는 증례기록서 '기타 치료력' 페이지에 기재한다.

7.4. 무작위배정

본 인체적용시험은 시험군 또는 대조군을 무작위배정하여 병행시험으로 진행하며, 필요한 인체적용시험 대상자 수는 탈락율(24%)을 고려하여 각 군당 50명씩 총 100명이다.

방문2(Randomization Visit, Week 0)에서 선정/제외기준에 적합한 모든 인체적용시험 대상자에

대하여 인체적용시험 실시기관에 따라 블록화 무작위배정법의 할당코드에 의하여 각 군으로 배정한다. 섭취 군간의 균형있는 무작위배정을 위하여 각 군의 인체적용시험 대상자 수의 비는 1:1로 동일하게 한다.

무작위배정표는 SAS® system의 Randomization program으로 발생된 난수(A, B의 Random number)의 순열을 인체적용시험 대상자 번호 1번부터 순차적으로 적용시킨 것으로 SAS®를 통해 인체적용시험 전에 미리 고안하여 생성한다. 인체적용시험 의뢰자는 인체적용시험용 식품 포장 시 무작위배정표에 따라 인체적용시험용 식품 라벨을 부착한 후, 인체적용시험 시작 전에 인체적용시험 실시기관에 공급한다.

인체적용시험 실시기관에서는 동의서에 서명하고, 스크리닝 검사를 시행하는 인체적용시험 대상자에게 다음의 스크리닝 번호를 부여한다.

AA-SZZZ {AA : 기관코드, S : Screening의 첫글자, ZZZ : 일련번호(001, 002~)}

이후, 방문2에서 해당 인체적용시험 대상자가 본 인체적용시험의 대상으로 적합한 경우에 다음의 인체적용시험 대상자 번호를 순서대로 부여하고, 이때 일련번호와 같은 번호의 인체적용시험용 식품을 섭취하도록 한다.

AA-RZZZ {AA : 기관코드, R : Randomization의 첫글자, ZZZ : 일련번호(001, 002~)}

시험기관 기관코드는 다음과 같다.

의정부성모병원 : 01

7.5. 인체적용시험 대상자 모집 방법

본 인체적용시험은 만 3세 이상, 만 11세 이하의 중등도의 아토피피부염 증상이 있는 소아 중 인체적용시험계획서와 인체적용시험 시험자의 임상적 판단에 따라 인체적용시험 대상자를 모집할 계획이다. 인체적용시험 대상자 모집 방법으로는 병원 내/외 포스터 부착 등이며, 이를 통해 100명의 인체적용시험 대상자가 등록될 때까지 지속한다.

8. 인체적용시험 진행일경, 관찰 및 임상검사 항목과 방법

8.1. 인체적용시험 진행일정표

Period		Screening ¹⁾	Active Treatment		
Visit		1	2	3	4
Week		-2	0	6	12
Window period(day) ²⁾				±7	±5
서면동의서		✓			
인구학적 조사 ³⁾		✓			
병력 및 약물투여력 조사 ⁴⁾		✓	✓		
이학적검사		✓		✓	✓
활력징후(맥박, 체온) 측정		✓		✓	✓
임상병리검사 ⁵⁾		✓			✓
신체계측	신장	✓			
	체중	✓		✓	✓
식사지도 및 식이조사 ⁶⁾			✓	✓	✓
국소용 스테로이드제 배부/반납 ⁷⁾			✓	✓	✓
표준 보습제 배부/반납 ⁸⁾			✓	✓	✓
유효성 평가	SCORAD index ⁹⁾	✓		✓	✓
	IGA		✓	✓	✓
	IgE, Eosinophil count		✓		✓
	국소용 스테로이드제 사용 비율 및 사용량 ⁷⁾			✓	✓
인체적용시험 대상자 적합성 평가		✓	✓		
무작위배정			✓		
인체적용시험용 식품 처방			✓	✓	
이상반응 확인				✓	✓
순응도 확인 ¹⁰⁾				✓	✓
병용약물 및 병용요법 변화 확인				✓	✓

자가평가 설문				✓
---------	--	--	--	---

- 1) 방문1 이후 2주일 이내 방문2가 시행되어야 한다. 방문1에 검사결과가 모두 확인되는 경우, 방문1과 방문2를 동시에 실시할 수 있다. 방문1의 검사가 누락된 경우에는 방문2 무작위배정 전까지 실시할 수 있다.
- 2) 방문3의 방문일은 지정된 날짜 전·후 7일을 허용하며, 방문4의 방문일은 지정된 날짜 전·후 5일을 허용한다.
- 3) 방문1에 인체적용시험 대상자의 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 출생 시 몸무게, 재태기간, 분만방법, 같이 거주하는 사람, 형제관계, 알레르기 증상 가족력, 영아기 수유방식, 육아 형태, 영양제 섭취 여부, 아토피피부염 관련 정보(증상시작일, 최초 진단시기, 알레르기 관련 검사 여부, 의사 진단력, 약물치료 여부, 대상자 부모 연령, 목욕 방식, 목욕 빈도, 목욕 시 사용하는 물, 목욕 시 소요 시간, 비누 및 세정제 사용 여부, 보습제 사용 빈도, 애완동물 유무, 식습관)를 조사한다.
- 4) 방문1, 2에 방문1 기준으로 4주 이내의 외과적 수술력을 포함한 병력과 4주 이내의 약물투여력을 조사하여 기록한다.
- 5) 방문1 기준 7일 이내에 시행된 검사결과가 있다면 대체 가능하며, 인체적용시험 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 재검사를 시행할 수 있다.
 - 혈액학적검사: WBC, RBC, Hb, Hct, Platelet, Seg.Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, ESR
 - 혈액화학적검사: BUN, Total protein, Albumin, Alk.phos, AST(GOT), ALT(GPT), Creatinine
 - 뇨검사: S.G, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Urobilinogen, Nitrite, RBC(Erythrocyte), WBC(Leukocyte)
- 6) 방문2에서는 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 인체적용시험 코디네이터 또는 인체적용시험 대상자나 부모(또는 법정대리인)가 기록하며, 방문2, 3에 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)에게 식이조사지를 배부하여 방문3, 4에 회수하여 확인한다.
- 7) 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)가 완화제(rescue medication)가 필요하다고 판단하여 인체적용시험 시험자에게 유선 또는 진찰을 요청한 경우 hydrocortisone을 도포할 수 있도록 한다. 도포량은 어른 손바닥 2개 크기의 병변에 어른 손가락 1마디에 해당하는 양(fingertip unit)을 바를 수 있도록 교육하며, 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)는 매 방문 시 hydrocortisone을 가지고 방문하도록 하여 인체적용시험 코디네이터가 남은 잔량을 기록한다.

- 8) 인체적용시험 기간 동안 시험군과 대조군 모두 인체적용시험 실시기관에서 지급한 표준 보습제 사용이 가능하다. 방문2, 3에 표준 보습제를 배부하고, 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)는 방문3, 4에 보습제를 가지고 방문하도록 하여 인체적용시험 코디네이터가 남은 잔량을 기록한다.
- 9) 각 방문 시 SCORAD objective(병변의 범위, 정도) score의 평가는 동일한 시험자가 진행할 수 있도록 한다. 인체적용시험 대상자 본인이 SCORAD subjective(소양감, 수면장애) score의 평가가 어려울 경우, 동일한 인체적용시험 대상자의 부모(또는 법정대리인)가 대신 평가한다.
- 10) 방문3, 4에 인체적용시험 대상자가 지참하고 온 인체적용시험용 식품의 잔량을 비교하여 인체적용시험 코디네이터가 점검 및 기록한다('인체적용시험용 식품 처방 날~다음 방문 전날' 섭취).

8.2. 관찰 항목 및 임상검사 항목

8.2.1. 인체적용시험 대상자 동의 및 인구학적 조사

인체적용시험에 들어가기 전, 본 인체적용시험의 목적과 내용에 대하여 인체적용시험 대상자와 인체적용시험 대상자의 부모(또는 법정대리인)에게 상세히 설명하고, 인체적용시험 대상자와 부모(또는 법정대리인)에게 서면 동의를 받는다. 서면 동의는 인체적용시험 대상자와 부모(또는 법정대리인)가 자의로 서명하여야 한다. 서면 동의를 받는 순서에 따라 스크리닝 번호를 부여한 후 인구학적 정보를 조사한다. 방문1에 실시하는 인구학적 조사의 기록사항은 인체적용시험 대상자의 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 출생 시 몸무게, 재태기간, 분만방법, 같이 거주하는 사람, 형제관계, 알레르기 증상 가족력, 영아기 수유방식, 육아 형태, 영양제 섭취 여부, 아토피피부염 관련 정보(증상시작일, 최초 진단시기, 알레르기 관련 검사 여부, 의사 진단력, 약물치료 여부, 대상자 부모님의 연령, 목욕 방식, 목욕 빈도, 목욕 시 사용하는 물, 목욕 시 소요 시간, 비누 및 세정제 사용 여부, 보습제 사용 빈도, 애완동물 유무, 식습관)이다.

8.2.2. 병력 및 약물투여력 조사, 병용약물 및 병용요법

방문1, 2에서 문진과 과거 진료 기록 점검 및 면담 등을 통하여 조사한다. 방문1을 기준으로 4주 이내의 외과적 수술력을 포함한 병력을 상세히 조사하여 기록한다. 과거력 및 현병력에 대하여 진단명, 진단일, 종료일, 지속여부, 등록 가능 여부를 기재한다. 약물투여력은 방문1을 기준으로

4주 이내의 선행약물을 모두 확인한다.

인체적용시험용 식품 섭취 이후 방문3, 4에서 병용약물 및 병용요법을 확인한다.

8.2.3. 이학적검사

방문1, 3, 4에서 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 대사/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관에 대한 인체적용시험 대상자의 임상적 상태를 근거로 이학적검사를 실시한다.

8.2.4. 활력징후(맥박, 체온) 측정

방문 1, 3, 4에 맥박 및 체온을 측정하여 기록한다. 인체적용시험 대상자에게 안정상태를 유지시킨 후 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 동일한 시간대에 동일한 인체적용시험 코디네이터가 측정할 수 있도록 최선을 다한다. 인체적용시험 코디네이터가 다른 경우 인체적용시험 코디네이터를 동일하게 교육하여 편차를 최소화한다.

8.2.5. 임상병리검사

방문1, 4에서 임상병리검사를 실시하여 인체적용시험 대상자의 전신적인 건강상태를 평가한다. 방문1 이전 7일 이내에 시행된 검사결과가 있다면 대체 가능하며, 인체적용시험 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 재검사를 실시할 수 있다.

- 혈액학적검사: WBC, RBC, Hb, Hct, Platelet, Seg.Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, ESR
- 혈액화학적검사: BUN, Total protein, Albumin, Alk.phos, AST(GOT), ALT(GPT), Creatinine
- 뇨검사: S.G, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Urobilinogen, Nitrite, RBC(Erythrocyte), WBC(Leukocyte)

임상적으로 의미가 있는 비정상 임상병리검사 결과는 인체적용시험 대상자의 증례기록서(CRF) 인체적용시험 시험자 의견(Comments)란에 평가를 기재하고, 인체적용시험 시험자가 적절하다고 판단하는 경우 추가 평가를 실시하여야 한다. 방문4의 비정상적 임상병리검사 결과로 인하여 임상적 징후/증상이 야기되거나 치료 중재술이 필요한 경우 인체적용시험 대상자의

증례기록서(CRF)의 '이상반응' 페이지에 진단 또는 의학적 상태를 입력하여야 한다.

8.2.6. 신체계측(신장, 체중)

방문1에서 신장, 방문1, 3, 4에서 체중을 측정하여 기록한다. 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 동일한 시간대에 동일한 인체적용시험 코디네이터가 측정할 수 있도록 최선을 다한다. 신장은 0.1cm 단위까지 반올림하여 기록하고, 체중은 가벼운 옷차림 상태에서 공복상태를 기준으로 0.1kg 단위까지 반올림하여 기록한다.

8.2.7. 식사지도 및 식이조사

인체적용시험 대상자로 적합하다고 판정될 경우, 인체적용시험 기간 동안 인체적용시험 대상자와 부모(또는 법정대리인)에게 인체적용시험 대상자가 평소 섭취하던 일반적인 식사형태, 신체활동량, 식이섭취량을 유지하고, 소리쟁이 및 동충하초 관련 식품을 정기적으로 먹지 않도록 권고한다. 이에 대한 방문1과 방문2 사이 최대 2주 간의 섭취여부를 방문2에 조사한다(방문1과 방문2를 동시에 실시하는 경우는 지난 1주 간의 섭취여부를 조사한다). 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)에게 인체적용시험 기간 동안 배부된 식이조사지에 인체적용시험 대상자가 섭취한 소리쟁이 및 동충하초 관련 식품의 빈도수를 매주 1회 기록하도록 교육한다.

방문2에서는 인체적용시험 대상자의 평상시 식이조사를 위해 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 인체적용시험 코디네이터나 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)가 기록한다. 인체적용시험 기간 동안의 인체적용시험 대상자의 식이를 조사하기 위해 방문2, 3에 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)에게 식이조사지를 배부한다. 인체적용시험 대상자 또는 부모는 식이조사지에 다음 방문일 전 최근 일주일 중 3일 동안(가능하면 주말 1일 포함) 평소의 식사와 유사한 날의 식사를 기록한다. 방문3, 4에 인체적용시험 코디네이터는 작성된 인체적용시험 대상자의 식이조사지를 확인한다.

인체적용시험 기간 동안 작성된 식이조사지는 한국영양학회의 Can pro program을 이용하여 식품 및 영양소 섭취량을 분석한다.

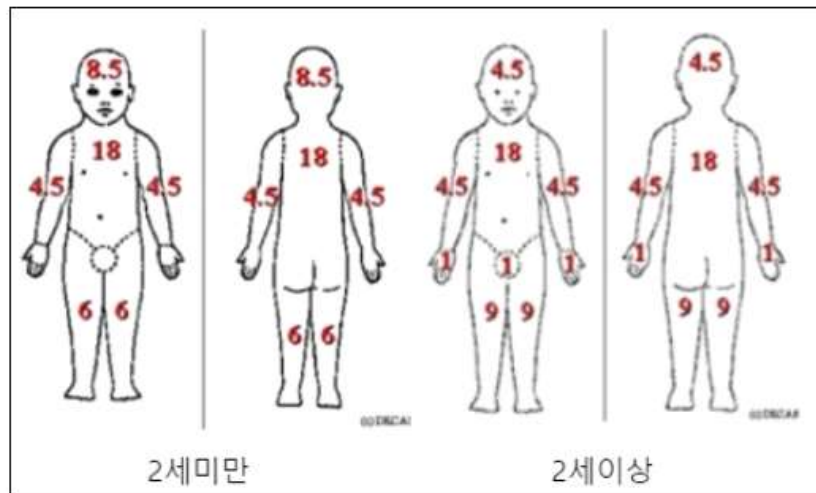
8.2.8. SCORAD index

방문 1, 3, 4에 SCORAD(SCORing of Atopic Dermatitis) index⁷⁾ 평가를 실시한다.

SCORAD index는 객관적(Objective), 주관적(Subjective) SCORAD로 나누어 평가한다.

SCORAD index	평가 항목	점수 범위
Objective	A 병변의 범위	0-100
	B 병변의 정도	0-18
Subjective	C 자각 증상	0-20

객관적 SCORAD(Objective SCORAD)는 인체적용시험 시험자가 인체적용시험 대상자의 신체 병변의 범위(Extent, %)와 정도(Intensity)를 객관적으로 평가한다. 병변의 범위(Extent, %)는 신체 부위별로 병변이 몇 퍼센트를 침범하고 있는가를 아래와 같이 평가한다.



병변의 정도(Intensity)는 홍반/암화(Erythema/Darkening), 부종/구진화(Edema/Papulation), 진물/가피(Oozing/Crusting), 찰상(Excoriation), 태선화(Lichenification), 건조(Xerosis) 6개 항목으로 나누어 심한 정도를 각 0-3점(0; 없음, 1; 경증, 2; 중간, 3; 중증)으로 평가한다. 각 방문 시 SCORAD objective(병변의 범위, 정도) score의 평가는 동일한 인체적용시험 시험자가 진행할 수 있도록 한다.

주관적 SCORAD(subjective SCORAD)는 인체적용시험 대상자 자신이 소양감(Pruritus)과

수면방해(Sleep loss) 증상의 정도를 0~100으로 나누어 표시하도록 하는 방법(Visual analog scale)이다. 단, 인체적용시험 대상자가 주관적 SCORAD 증상의 정도를 평가하기 어려울 경우, 인체적용시험 대상자의 부모(또는 법정대리인)가 대신 평가한다.



SCORAD total score는 A, B, C 3가지 항목 각각의 점수를 계산한 후 아래의 계산식으로 산정한다. 점수 범위는 0-103점이고, 고득점일수록 증상 정도가 심함을 의미한다.

$$\text{SCORAD total score} = (A/5) + (7B/2) + C$$

8.2.9. IGA

방문2, 3, 4에 IGA(전반적인 증상 개선 평가; Investigator's Global Assessment)를 실시하며, 인체적용시험 시험자는 인체적용시험 대상자의 아토피피부염 증상의 전반적인 개선 상태를 0-5점으로 나누어 평가한다.

Scale	기 준
0 Clear	아토피의 염증성 증상이 없음
1 Almost clear	약간의 인지할 수 있는 홍반(Erythema), 구진/침윤(Papulation/Infiltration)
2 Mild disease	경증의 홍반(Erythema), 구진/침윤(Papulation/Infiltration)
3 Moderate disease	중등증의 홍반(Erythema), 구진/침윤(Papulation/Infiltration)
4 Severe disease	중증의 홍반(Erythema), 구진/침윤(Papulation/Infiltration)
5 Very severe disease	상출성과 부스럼이 있는 중증의 홍반(Erythema), 구진/침윤(Papulation/Infiltration)

8.2.10. IgE, Eosinophil count

IgE, Eosinophil count 검사를 방문2, 4에 혈액을 채취하여 분석하며, 분석 후 폐기한다.

IgE는 알레르기 질환을 매개하는 가장 중요한 면역 지표로서 역할을 하며, 피부의 면역과민반응 상태가 IgE 매개성인 경우 혈청 총 IgE가 증가한다.

Eosinophil count는 알레르기 및 Th2(T helper type 2) 면역반응에서 가장 중요한 염증세포의 하나로 Eotaxin에 의해 활성화되어 염증 부위로 이동한 뒤 ECP를 포함한 다양한 세포독성단백질과 Cytokine 등을 분비하여 염증반응을 유도하는 것으로 알려져 있다.

8.2.11. 표준 보습제 사용량

인체적용시험 기간 동안 시험군과 대조군 모두 인체적용시험 실시기관에서 지급한 표준 보습제 사용이 가능하다. 방문2, 3에 표준 보습제를 배부하고, 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)는 방문3, 4에 보습제를 가지고 방문하도록 하여 인체적용시험 코디네이터가 남은 잔량을 기록하도록 한다.

8.2.12. 국소용 스테로이드제 사용 비율 및 사용량

인체적용시험 기간 동안 인체적용시험 대상자의 국소용 스테로이드제(hydrocortisone) 사용여부를 조사하기 위해 국소용 스테로이드제를 처방받은 인체적용시험 대상자를 확인하고, 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)는 매 방문 시 국소용 스테로이드제를 가지고 방문하도록 하여 인체적용시험 코디네이터가 남은 잔량을 기록한다. 필요 시 방문2 이후에 배부한다.

8.2.13. 선정기준/제외기준 확인(인체적용시험 대상자 적합성 평가)

방문1, 2에 이루어진 인체적용시험 대상자와 부모(또는 법정대리인)의 동의여부와 인구학적 조사, 병력 및 약물투여력 조사, 이학적검사, 활력징후, 임상병리검사, 신체계측, SCORAD index 평가 결과를 종합하여 6.1.1.항 및 6.1.2.항의 선정기준/제외기준에 적합한 인체적용시험 대상자인지를 방문1, 2에 평가하여 기록한다.

8.2.14. 무작위배정 및 섭취

방문2에서 선정기준 및 제외기준에 적합하다고 평가가 이루어진 인체적용시험 대상자를 대상으로 시험군 또는 대조군으로 무작위배정하고, 무작위배정번호에 인체적용시험용 식품을 배부하여 섭취하도록 한다. 섭취방법은 인체적용시험용 식품을 받은 날부터 섭취하도록 하며, 다음 방문일 전날까지 섭취하도록 지도한다.

8.2.15. 이상반응 확인

이상반응에 대한 정보는 인체적용시험 기간 동안의 각 방문에서 인체적용시험 대상자에게 우회적으로 질문(Non-directive questioning)하여 탐색해야 한다. 또한 방문 시 또는 방문 기간 사이에 인체적용시험 대상자가 자발적으로 보고하거나 이학적검사, 임상병리검사 또는 기타 평가를 통하여 확인할 수 있다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 인체적용시험용 식품과 관련하여 취해진 조치 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계, 인체적용시험용 식품 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함된다. 이상반응으로 분류되는 대표적인 증상조사에 대하여 아래에 기술하였다.

1) 자·타각적 증상에 대한 확인

자·타각적 증상은 인체적용시험 시험자의 진료를 통하여 이상반응 발현 여부를 조사하고, 평가 기준에 따라 발현 정도를 기록하며, 약제 투여 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계도 평가한다.

2) 임상병리검사에 대한 확인

임상병리검사에서 어떤 비정상적인 변화는 증상 호전 때까지 추적 검사를 실시하도록 하며, 발현 증상에 대한 예상 원인을 기록한다. 또한 임상병리검사 시 검사내용에 지장을 줄 수 있는 요인(심각한 피로 등)이 있었는지 면담을 통하여 기록한다.

8.2.16. 순응도 확인

인체적용시험용 식품의 섭취상황에 대하여 방문2, 3에 인체적용시험용 식품 처방 후 인체적용시험 코디네이터가 기록하고, 방문3, 4에 인체적용시험 대상자가 지참하고 온 인체적용시험용 식품의 잔량을 비교하여 인체적용시험 코디네이터가 점검 및 기록한다. '인체적용시험용 식품 처방 날~다음

방문 '전날' 섭취량을 원칙으로 하며, 순응도 확인 시 섭취율(%)은 반올림하여 소수점 1자리까지 표기한다.

- 섭취 순응도(%) = 실제 섭취한 식품 수 / 섭취해야 하는 식품 수 x 100

8.2.17. 자가평가 설문

방문4에 모든 검사 및 평가를 완료한 인체적용시험 대상자의 부모(또는 법정대리인)에게 본 인체적용시험에 대한 자가평가 설문을 실시한다.

8.3. 관찰 검사 방법(방문별)

8.3.1. 1차 방문(Screening visit, Week -2 이내)

본 인체적용시험에 참가하도록 인체적용시험 대상자는 인체적용시험에 대한 설명을 듣고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같다.

- ① 인체적용시험 대상자를 인체적용시험에 참여시키기 전에 인체적용시험 과정을 설명하고, 인체적용시험 대상자와 부모(또는 법정대리인)에게 서면 동의를 받는다.
- ② 인체적용시험 대상자는 순서대로 스크리닝 번호를 지정받는다.
- ③ 인체적용시험 대상자의 인구학적 정보, 병력(외과적 수술력을 포함한 과거력 및 현병력) 및 약물투여력을 조사한다.
- ④ 이학적검사를 실시한다.
- ⑤ 활력징후(맥박, 체온)를 측정한다.
- ⑥ 임상병리검사를 실시한다.
- ⑦ 신체계측(신장, 체중)을 실시한다.
- ⑧ SCORAD index 평가를 실시한다.
- ⑨ 1차 인체적용시험 대상자 적합성 평가 후 다음 방문 일을 지정해준다.

8.3.2. 2차 방문(Randomization visit, Week 0)

2차 방문은 1차 방문일 이후 14일 이내에 이루어지고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과

같다.

- ① 병력 및 약물투여력 변화를 조사하여 기록한다.
- ② IGA를 실시한다.
- ③ IgE, Eosinophil count 검사를 실시한다.
- ④ 1, 2차 방문 평가결과를 종합하여 선정기준/제외기준의 적합성을 평가한다.
- ⑤ 식사지도 및 식이조사를 실시한다.
- ⑥ 무작위배정번호를 부여한다.
- ⑦ 1차 표준 보습제를 배부한다.
- ⑧ 필요시 국소용 스테로이드제제를 처방한다.
- ⑨ 인체적용시험용 식품을 처방하고, 섭취 방법에 대하여 교육한다.
- ⑩ 인체적용시험 대상자의 다음 방문일을 지정한다.

8.3.3. 3차 방문(Interim visit, Week 6)

3차 방문은 2차 방문일 이후 42일(±7일)에 이루어지고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같다.

- ① 이상반응 유무를 확인한다.
- ② 병용약물 및 병용요법의 변화를 확인한다.
- ③ 이학적검사를 실시한다.
- ④ 활력징후(맥박, 체온) 측정 및 신체계측(체중)을 실시한다.
- ⑤ SCORAD index 평가를 실시한다.
- ⑥ IGA를 실시한다.
- ⑦ 식사지도 및 식이조사를 실시한다.
- ⑧ 1차 표준 보습제를 수거하여 잔량을 확인하고, 2차 표준 보습제를 배부한다.
- ⑨ 국소용 스테로이드제제를 처방받은 인체적용시험 대상자에 한하여 잔량을 확인하고, 필요 시 국소용 스테로이드제제를 처방한다.
- ⑩ 섭취 순응도를 확인한다.
- ⑪ 인체적용시험용 식품을 처방하고, 섭취방법을 다시 한 번 교육한다.
- ⑫ 인체적용시험 대상자의 다음 방문일을 지정한다.

8.3.4. 4차 방문(Closing visit, Week 12)

4차 방문은 2차 방문일 이후 84일(±5일)에 이루어지고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같다.

- ① 이상반응 유무를 확인한다.
- ② 병용약물 및 병용요법의 변화를 확인한다.
- ③ 이학적검사를 실시한다.
- ④ 활력징후(맥박, 체온) 측정 및 신체계측(체중)을 실시한다.
- ⑤ 임상병리검사를 실시한다.
- ⑥ SCORAD index 평가를 실시한다.
- ⑦ IGA를 실시한다.
- ⑧ IgE, Eosinophil count 검사를 실시한다.
- ⑨ 2차 표준 보습제를 수거하여 잔량을 확인한다.
- ⑩ 국소용 스테로이드제를 처방받은 인체적용시험 대상자에 한하여 사용량을 확인한다.
- ⑪ 식이조사를 실시한다.
- ⑫ 섭취 순응도를 확인한다.
- ⑬ 자가평가 설문을 실시한다.

8.3.5. 추가방문(필요 시)

추가방문은 예정된 방문 외에 인체적용시험 대상자의 요청 또는 인체적용시험 시험자의 판단에 의해 필요하다고 판단될 때 수시로 이루어질 수 있다. 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)가 예정되지 않은 날에 방문한 경우에는 이상반응, 병용약물, 시행한 검사의 결과 및 그에 따른 의학적 처치 등을 증례기록서에 기록하여야 한다.

중도탈락된 인체적용시험 대상자의 경우 추가방문을 실시하면 마지막 방문 시 실시해야 하는 검사를 모두 실시할 수 있도록 한다(자가평가 제외).

9. 인체적용시험용 식품의 섭취 및 사용상 주의사항

1) 예측 부작용 및 섭취 시 주의사항

- ① 경미한 소화불량이 있을 수 있습니다.
- ② 체질에 따른 알레르기 유발이 나타날 수 있습니다.
- ③ 따뜻하게 섭취하는 것이 좋습니다.

2) 보관 및 취급상의 주의

- ① 유아 또는 의약품의 잠재적 위험을 평가할 능력이 없는 사람의 손이 닿지 않는 곳에 보관할 것
- ② 직사광선을 피하고 가능한 습기가 적고 서늘한 곳에 밀봉하여 실온(1~30°C)보관할 것
- ③ 오용 및 남용을 피하고 품질을 유지하기 위해 다른 용기에 넣지 말 것

10. 인체적용시험 대상자의 중지 및 탈락기준, 위반에 대한 처리

10.1. 인체적용시험 대상자의 중지 및 탈락기준

인체적용시험에 참여하는 모든 인체적용시험 대상자의 인체적용시험 완료 여부를 기록하고, 인체적용시험용 식품 섭취나 관찰이 중단된 경우에는 그 이유를 기록한다. 인체적용시험이 진행중인 인체적용시험 대상자에 대하여 인체적용시험을 중단할 수 있는 경우는 다음과 같다.

- ① 선정기준/제외기준에 위배된 경우
- ② 인체적용시험 대상자에게 발생한 중대한 이상반응(Serious Adverse Events) 혹은 이상반응(Adverse Events)으로 인하여 인체적용시험 대상자가 시험 중단을 요구하는 경우
- ③ 섭취 전 검사에서 발견치 못한 전신질환이 발견된 인체적용시험 대상자
- ④ 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)가 인체적용시험 참가 동의를 철회한 경우
- ⑤ 인체적용시험 대상자의 추적이 안 되는 경우
- ⑥ 인체적용시험 대상자에게 인체적용시험용 식품을 섭취하는데 문제가 있는 경우
- ⑦ 인체적용시험 기간 동안 인체적용시험 시험자의 지시없이 시험 결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 및 식품 등을 투여한 경우
- ⑧ 인체적용시험 시험자의 판단에 의해 시험의 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우

인체적용시험 시험자가 어떤 사유로든 인체적용시험 대상자에게 최선이라고 결론을 내린 경우에는

언제든지 인체적용시험 대상자를 탈락시킬 수 있다. 계획서 위반이 인체적용시험 대상자의 안전성에 유의한 위험이 되지 않으면, 계획서 위반 때문에 인체적용시험 대상자를 탈락시키지 말아야 한다.

인체적용시험용 식품 섭취를 조기중단한 인체적용시험 대상자는 인체적용시험에서 탈락으로 간주되어서는 안 된다. 인체적용시험 대상자는 언제든지 어떤 사유로든 자발적으로 인체적용시험을 중단할 수 있다. 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)가 중단할 의사를 표현한 경우, 방문을 하지 않은 경우, 또는 어떤 사유로든 추적조사에 실패한 경우 탈락으로 간주된다.

어떤 사유로든 조기 탈락이 발생하게 되면, 인체적용시험 시험자는 인체적용시험 대상자가 인체적용시험에서 조기 탈락하게 된 일차 사유를 결정하여 이 정보를 증례기록서 '시험종결'에 기재하여야 한다.

추적조사에 실패한 인체적용시험 대상자(즉, 중단 의사를 표시하지 않고 인체적용시험 방문에 나타나지 않아서 인체적용시험 대상자의 상태가 불분명한 인체적용시험 대상자)에 대해서는 인체적용시험 대상자에게 연락하기 위해 다양한 조치를 취하고, 취한 조치사항을 근거문서에 기록한다. 무작위배정된 후 인체적용시험에서 조기 탈락한 인체적용시험 대상자를 다른 인체적용시험 대상으로 대체하지 않는다(단, 선정기준/제외기준에 위배된 경우는 제외).

10.2. 인체적용시험계획서 위반에 대한 처리

본 인체적용시험의 인체적용시험 시험자와 인체적용시험 코디네이터는 인체적용시험계획서의 위반이 발생하지 않도록 인체적용시험계획서에 대해 충분히 숙지하고 철저히 이행하여야 한다. 본 인체적용시험에서 인체적용시험 시험자와 인체적용시험 코디네이터는 인체적용시험 대상자가 처방된 인체적용시험용 식품을 지시된 사용방법을 준수하여 사용하도록 교육한다. 인체적용시험용 식품의 정확한 사용과 방문 일정 준수를 위하여 인체적용시험 코디네이터는 인체적용시험계획서에서 정한 방문 계획에 따라 외래 방문할 수 있도록 적절한 조치, 예컨대 차기 방문시간에 대한 서면 통보나 전화 모니터링 등을 필히 실시해야 한다. 인체적용시험을 진행하는 동안 부득이하게 계획서 위반이 발생한 경우, 인체적용시험 시험자는 인체적용시험 의뢰자에게 위반 사실을 알려야 하며 인체적용시험 대상자의 인체적용시험 참여 지속 여부를 결정한다. 중대한 계획서 위반으로 중도탈락한 경우 근거문서 및 증례기록서에 그 내용을 기록하여야 한다.

중대한 계획서 위반으로 간주되는 사항은 다음과 같다.

- 1) 선정기준/제외기준 위반
- 2) 병용금지 약물 및 건강기능식품, 치료 이용

3) 그 외 중대한 계획서 위반으로 고려되는 위반이 있는 경우

기타 인체적용시험 결과 해석에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되는 경미한 위반 사항은 위반 또는 지연 정도와 해당 사유를 정확히 기재하고, 인체적용시험에 영향을 주었는지 종합적으로 고찰하고, 제외여부를 결정한다.

선정기준/제외기준 위반인 인체적용시험 대상자가 등록되는 경우 총 등록인원에서 제외되므로 인체적용시험 대상자를 추가 모집할 수 있다.

11. 유효성 평가 변수 및 통계 분석 방법

11.1. 유효성 평가 변수

11.1.1. 1차 유효성 평가 변수

- 1) SCORAD total score

11.1.2. 2차 유효성 평가 변수

- 1) SCORAD objective score
- 2) SCORAD subjective score
- 3) IGA
- 4) IgE, Eosinophil count
- 5) 국소용 스테로이드제 사용 비율 및 사용량

11.2. 유효성 평가 방법

11.2.1. 1차 유효성 평가 방법

섭취 전(방문1 : Week -2)과 섭취 후(방문3, 4 : Week 6, 12)에 평가한 SCORAD total score의

변화를 확인하고, 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석, 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.

11.2.2. 2차 유효성 평가 방법

섭취 전(방문1, 2 : Week -2, 0)과 섭취 후(방문3, 4 : Week 6, 12)에 SCORAD objective score, SCORAD subjective score, IGA, IgE, Eosinophil count, 국소용 스테로이드제 사용 비율 및 사용량의 변화를 확인하고, 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석, 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.

11.3. 통계분석 방법

통계분석은 SAS®(Version 9.4, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 분석한다.

11.3.1. 결과분석의 일반적 원칙

본 인체적용시험의 인체적용시험 대상자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety Set 분석, FAS(Full Analysis Set) 분석과 PPS(Per Protocol Set) 분석의 세 가지 형태로 이루어진다.

Safety Set 분석은 안전성 평가 변수 분석 시 적용되는 분석법으로, 무작위배정 후 인체적용시험용 식품을 한번이라도 섭취한 인체적용시험 대상자 집단을 대상으로 이루어진다.

본 인체적용시험에 무작위배정을 받은 모든 인체적용시험 대상자를 분석 대상으로 하는 원칙(ITT)에 따라, FAS 분석은 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행한 인체적용시험 대상자며 주요 선정기준 위반에 해당되지 않는 집단을 대상으로 이루어진다.

PPS 분석은 FAS 중에서 인체적용시험을 종료하고, 인체적용시험 결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항(선정/제외기준 위반 등)이 없는 인체적용시험 대상자 집단을 대상으로 이루어진다.

유효성에 대한 자료는 PPS 분석을 주 분석으로 하고, FAS 분석을 추가적으로 실시한다. 인구학적 및 영양분석에 대한 자료는 PPS 분석을 주 분석으로 하고, 안전성에 대한 자료는 Safety Set 분석을 주 분석으로 실시한다.

결측치가 발생한 경우, 결측치가 발생한 시점을 기준으로 가장 최근에 얻어진 자료를 이용하여 보정(LOCF)하여 분석한다. 단, 인체적용시험용 식품을 섭취하기 이전의 자료(Baseline)로 대체하지 않으며, 유효성 평가 변수 이외의 모든 분석 항목에 대해서는 결측치를 대체하지 않고 있는 그대로의 자료로 분석을 시행한다.

본 인체적용시험에서 얻은 자료는 적당한 기술통계량으로 평균(Mean)과 표준편차(Standard deviation)를 산출하여 제시하며, 차이(Difference)에 대한 유의성은 양측검정으로 $p < 0.05$ 수준에서 검증한다.

Sub-set(group) analysis(소집단 분석)는 무작위배정 이전 또는 치료시작 전의 인체적용시험 대상자의 초기 특성으로 범주화하여 분석할 수 있다.

연속형 자료의 경우 분포에서 비정상적으로 벗어난 값에 대해 이상치로 정의하고, 분석에서 제외될 수 있다.

11.3.2. 인구통계학적 기초자료

인체적용시험 대상자의 인구통계학적 혹은 임상학적 특성을 파악하기 위하여 인체적용시험 전 인체적용시험 대상자의 특성에 대하여 기술한다. 인구통계학적 자료 및 생활습관 자료에 따라서 적당한 기술통계량(인체적용시험 대상자 수, 평균, 표준편차, 최솟값, 최댓값)을 제시하고, 연속형 자료는 구간 비교를 위하여 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하고 유의확률 값을 제시한다. 범주형 자료는 각 수준별로 빈도와 비율을 제시하고 독립성 검정을 위한 카이제곱 검정(Chi-square test) 혹은 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 실시하고 유의확률 값을 제시한다.

인구통계학적 정보에서 섭취 구간 유의한 차이를 보이는 항목은 주 유효성 평가 변수에 미치는 영향 여부에 따라 유효성 분석 시 보정하여 분석할 수 있다.

11.3.3. 유효성 평가 변수에 대한 분석

11.3.3.1. 1차 유효성 평가 변수 분석

1차 유효성 평가 변수인 SCORAD total score의 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도에 대해서는 주분석 방법으로 다음의 변수(알레르기 증상 가족력⁸⁾, 출생 시 몸무게⁹⁾, 육아형태⁹⁾, 수유방식⁹⁾를 공변량으로 하는 GLM(Generalized Linear Model)을 실시한다. 만약 기저특성 중, 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는 경우 해당 변수를 공변량으로 하는 GLM을 추가적으로 실시한다. 또한 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.

11.3.3.2. 2차 유효성 평가 변수 분석

2차 유효성 평가 변수인 SCORAD objective score, SCORAD subjective score, IGA, IgE, Eosinophil count의 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.

국소용 스테로이드제 사용량의 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.

또한 다음의 변수(알레르기 증상 가족력⁸⁾, 출생 시 몸무게⁹⁾, 육아형태⁹⁾, 수유방식⁹⁾를 공변량으로 하는 GLM(Generalized Linear Model)을 실시하며, 기저특성 중 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는 경우 해당 변수를 공변량으로 고려하여 GLM을 실시한다.

인체적용시험 기간 중 국소용 스테로이드제를 사용한 인체적용시험 대상자에 대하여 섭취 군간 비율(%)을 제시하고, 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 통해 섭취 군간 비율 차이를 비교한다.

11.3.4. 안전성 평가 변수에 대한 분석

11.3.4.1. 이상반응

인체적용시험 기간 동안 보고된 모든 이상반응(Treatment-emergent adverse events, TEAEs)은

MedDRA에 따라 Coding하며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험 대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석한다.

11.3.4.2. 활력징후(맥박, 체온), 신체계측(체중)

활력징후(맥박, 체온), 신체계측(체중) 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.

11.3.4.3. 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)

혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type) 자료의 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 뇨검사는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교한다.

11.3.5. 중간분석

본 인체적용시험에서는 적용하지 않는다.

12. 이상반응을 포함한 안전성 평가방법, 평가기준 및 보고방법

12.1. 안전성 관련 용어의 정의

1) 이상반응(Adverse Event, AE)

인체적용시험용 식품을 투여한 인체적용시험 대상자에게 발생한 모든 유해하고 의도하지 않은

증후(症候, Sign, 실험실 실험 결과의 이상 등을 포함한다), 증상(症狀, Symptom) 또는 질병을 말하며, 해당 인체적용시험용 식품과 반드시 인과관계를 가져야 하는 것은 아니다.

2) 약물이상반응(Adverse Drug Reaction, ADR)

인체적용시험용 식품의 임의 용량에서 발생한 모든 유해하고 의도하지 않은 반응으로서 인체적용시험용 식품과의 인과관계를 부정할 수 없는 경우를 말한다.

3) 중대한 이상반응·약물이상반응(Serious AE·ADR)

인체적용시험용 식품의 임의 용량에서 발생한 이상반응 또는 약물이상반응 중에서 다음 어느 하나에 해당하는 경우를 말한다.

- (1) 사망하거나 생명에 대한 위험이 발생한 경우
- (2) 입원할 필요가 있거나 입원 기간을 연장할 필요가 있는 경우
- (3) 영구적이거나 중대한 장애 및 기능 저하를 가져온 경우
- (4) 태아에게 기형 또는 이상이 발생한 경우
- (5) (1)부터 (4)까지의 사례 외에 약물 의존성이나 남용의 발생 또는 혈액질환 등 그 밖에 의학적으로 중요한 상황이 발생하는 사례

이 때, 다음의 사항들은 중대한 이상반응으로 간주되지 않는다.

- 요양, 건강검진, 미용을 위한 입원
- 기존에 갖고 있던 질환에 대해 선택적인 수술을 받기 위한 입원 또는 입원기간의 연장
- 인체적용시험 대상자 동의서 서명 이전에 계획된 입원
- 응급실을 외래로만 방문한 경우 및 응급실 방문 시 내원 시간이 24시간을 초과하지 않은 경우. 그러나 인체적용시험 시험자의 판단에 따라 24시간을 초과하지 않더라도 중대한 이상반응으로 간주될 수 있다.

4) 예상하지 못한 약물이상반응(Unexpected Adverse Drug Reaction)

인체적용시험자 자료집 또는 의약품의 첨부 문서 등 이용 가능한 의약품 관련 정보에 비추어 약물이상반응의 양상이나 위해의 정도에서 차이가 나는 것을 말한다.

위에서 열거한 상황이 아니더라도 의학적으로 인체적용시험 대상자의 안위와 건강상태에 중대한

영향을 미칠 것으로 사료되는 상황이 발생한 경우, 인체적용시험 시험자 및 관련 전문가의 의학적 판단에 따라 중대한 이상반응으로 간주할 것인가의 여부를 결정하고 이에 따라 적절한 조치를 취한다.

12.2. 평가 방법 및 점검

- 1) 본 인체적용시험에서 이상반응 평가는 인체적용시험 시작 전에 관찰되지 않은 증상이 방문2에 등록된 후 인체적용시험용 식품 섭취기간 중에 새로이 나타난 증상으로서 인체적용시험용 식품과의 인과관계에 상관없이 의도하지 않았던 증후(임상병리검사상 비정상치 포함) 및 증상과 인체적용시험용 식품 사용과 관련된 일시적인 현상 등을 총칭한다.
- 2) 인체적용시험용 식품의 이상반응으로 예상되는 현상(증세 및 증상, 시작일, 지속기간 등)은 증례기록서에 빠짐없이 기록하여야 하며, 기록하지 않은 것은 주관적인 증상으로 분류한다.
- 3) 이상반응 정도에 대한 평가는 인체적용시험 시험자가 평가기준을 참고하여 증상의 경중에 따라 단계별로 평가하는 것을 원칙으로 한다.
- 4) 인체적용시험용 식품과의 인과관계는 인체적용시험 시험자가 평가기준에 따라 6단계로 분류하여 평가를 실시한다.

(부록1. 인체적용시험용 식품과의 인과관계 판정기준 참조)

12.3. 평가기준

12.3.1. 자·타각적 증상

자·타각적 증상의 정도는 인체적용시험 시험자의 진료를 통하여 검사항목의 이상에 대한 기준이 있는 경우(WHO 이상반응 평가기준 등) 이들 기준에 따라 그 경중을 단계별로 나누어 평가하고, 기준 적용이 적절치 않을 경우는 Spilker 등의 3단계 분류법 및 다음의 일반 기준 분류법을 적용하여 평가한다. 그리고 기록상의 혼선을 방지하기 위하여 이상반응의 정도에 대한 분류는 다음과 같이 통일하도록 한다.

일반기준 분류법	없음(0)	경증(1)	중등도(2)	중증(3)	
WHO	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Spilker 분류법	None	Mild	Moderate	Severe	

1) 일반기준 분류법

- 경증(1) : 쉽게 견딜 수 있는 이상반응
중등도(2) : 일상 생활에 상당한 지장을 주는 이상반응
중증(3) : 정상적인 일상 생활을 할 수 없을 정도의 이상반응

2) WHO 5 단계 분류법

- Grade 0 : 어떤 구속 없이 정상적인 활동을 수행할 수 있는 상태
Grade 1 : 보행 및 일을 수행할 수 있으나 육체적으로 격한 활동이 제한되는 상태
Grade 2 : 보행 및 자기보호가 가능하나 깨어 있는 시간의 50% 이상 어떤 일을 수행할 수 없는 상태
Grade 3 : 오직 제한된 자기 보호가 가능하고 깨어 있는 시간의 50% 이상을 침대나 의자에 의존하는 상태
Grade 4 : 자기 보호가 불가능하고 의자에 전적으로 의존하고 상태

3) Spilker 등의 3단계 분류법

- Mild(1) : 처치가 필요치 않고 시험대상자의 정상생활(기능)을 크게 저해치 않는 경우
Moderate(2) : 시험대상자의 정상생활(기능)을 유의하게 저해하며, 처치가 필요할 수도 있으며 처치 후 회복되는 경우
Severe(3) : 심한 이상반응으로 고도의 처치가 필요하며, 후유증이 남는 경우

12.4. 인체적용시험용 식품과의 인과관계

이상반응 발현 시 인체적용시험용 식품과의 연관성 여부는 인체적용시험 시험자가 다음과 같이 분류하고, 필요 시 인체적용시험 시험자의 견해를 부가한다.

(부록 1. 인체적용시험용 식품과의 인과관계 판정기준 참조)

1. 명확히 관련이 있음
2. 관련이 있다고 생각됨
3. 관련이 있을 가능성이 있음
4. 관련이 없다고 생각됨

- 5. 명확히 관련이 없다고 생각됨
- 6. 불명

12.5. 보고방법

12.5.1. 이상반응의 보고

- 1) 인체적용시험 시험자 및 인체적용시험 코디네이터는 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)에게 인체적용시험용 식품 섭취 후 나타날 수 있는 모든 이상반응에 대하여 교육을 실시하고 섭취 후 나타나는 모든 현상에 대하여 보고하도록 교육을 실시한다.
- 2) 인체적용시험용 식품 사용 후 전신적 또는 임상병리학적으로 나타나는 제반증상에 대하여 종류, 발생시간, 정도, 처치, 치료약제, 경과, 인체적용시험용 식품과의 인과관계 등에 대한 기록 및 보관은 의약품 임상시험관리기준에 준하도록 인체적용시험 대상자 증례기록서에 기입한다.
- 3) 이상반응의 추적조사는 해당 이상반응이 다음과 같이 될 때까지 실시한다.
 - ① 이상반응의 소실
 - ② 이상반응의 안정화
 - ③ 기초 평가일 상태로 회복
 - ④ 추적조사 불가
 - ⑤ 추가적 정보를 얻을 수 없는 가능성이 높을 경우단, 인체적용시험용 식품 또는 인체적용시험 실시 이 외의 다른 사항에서 기인한 것으로 판단되는 이상반응의 경우는 해당 인체적용시험 대상자의 마지막 방문일까지 조사한다.
- 4) 인체적용시험 책임자는 인체적용시험 결과보고 시 인체적용시험 기간 중 발생된 모든 증상에 대하여 서술하고 평가를 실시하며, 인체적용시험 기간 중 “중대한 이상반응·약물이상반응(Serious AE·ADR)” 발생 시에는 임상시험심사위원회(IRB)에 보고하여 인체적용시험의 지속 또는 중단 여부를 결정하고, 신속 보고가 필요한 경우 인체적용시험 의뢰자를 통해서 각 항에서 정한 기간 내에 신속히 인체적용시험 실시기관 임상시험심사위원회(IRB) 규정에 따라 보고하도록 한다.

- 5) 인체적용시험 책임자는 인체적용시험을 시행함에 있어서 모든 제반 사항을 Declaration of Helsinki에 준하여 시행한다.

12.5.2. 신속 보고

1) 목적

인체적용시험 시험자 및 기타 관계자에게 중대한 약물이상반응에 대한 새롭고 중요한 정보를 알리기 위함이다.

2) 보고 대상

- ① 중대하고 예상하지 못한 약물이상반응의 단일 증례
- ② 신속한 의사소통이 필요한 경우

각각의 상황에서는 적절한 의학적, 과학적 판단이 이루어져야 한다. 일반적으로 인체적용시험용 식품의 위험·편익 평가에 영향을 줄 수 있는 정보, 인체적용시험용 식품에 섭취에 변화를 줄 수 있는 정보 또는 아래에 예로 들은 상황들이 이에 해당한다.

- a. 예상된 중대한 약물이상반응의 경우 임상적으로 중요하게 판단되는 발현률의 증가
- b. 생명을 위협하는 질환을 치료하는 인체적용시험용 식품에서의 약효 부족과 같이 인체적용시험 대상자에게 심각한 해를 끼칠 수 있는 경우
- c. 새로 시행된 동물실험에서 중요한 안전성 정보를 알게 된 경우(예 : 발암성)

3) 보고를 위한 최소기준 및 방법

- ① 이상반응의 보고를 위한 최종 기술 및 평가에 대한 정보는 상기 보고시기 내에 얻지 못할 수 있다. 그러나 규정상 정해진 상기 보고시기 내에 초회 보고를 하여야 한다.
- ② 추적 조사 정보는 상세히 조사, 제출되어 활용될 수 있도록 한다.
- ③ 이상반응 신속 보고 시에는 중대한 이상반응 보고서 양식을 이용하며, 신속보고 시점에서 모든 정보를 얻을 수는 없더라도 가능한 많은 정보를 얻기 위해 최대한 노력을 기울여야 한다.

12.6. 예상하지 못한 중대한 약물이상반응 발생 시 각 담당자의 의무

본 인체적용시험 기간 중 인체적용시험 책임자, 공동연구자, 인체적용시험 코디네이터는

인체적용시험 대상자의 안전에 만전을 기하여야 하며, 중대한 약물이상반응 발생 시에는 신속하고 적절한 조치를 취하여 이상반응을 최소화하여야 한다.

인체적용시험 중 "예상하지 못한 중대한 약물이상반응" 발생 시 각 담당자의 의무는 다음과 같다.

1) 인체적용시험 책임자, 공동연구자의 의무

인체적용시험 책임자, 공동연구자는 인체적용시험 중 예상하지 못한 중대한 약물이상반응이 발생한 때에는 즉시 임상시험심사위원회(IRB) 및 인체적용시험 의뢰자에게 보고하고 별도의 지시가 있을 때까지 해당 인체적용시험용 식품에 대한 인체적용시험의 일부 또는 전부를 중지하여야 한다.

2) 인체적용시험 코디네이터의 의무

인체적용시험 코디네이터는 인체적용시험 실시 중에 예상하지 못한 중대한 약물이상반응 등이 발생한 경우에는 즉시 인체적용시험 책임자, 인체적용시험 의뢰자 및 인체적용시험 실시기관의 임상시험심사위원회(IRB)에 보고하여야 한다.

3) 임상시험심사위원회(IRB)의 의무

임상시험심사위원회(IRB)는 예상하지 못한 중대한 약물이상반응이 나타난 경우에는 인체적용시험의 일부 또는 전부에 대하여 중지명령 등 필요한 조치를 인체적용시험 책임자에게 하여야 한다.

4) 인체적용시험 의뢰자의 의무

인체적용시험 의뢰자는 인체적용시험 책임자, 인체적용시험 공동연구자, 인체적용시험 코디네이터로부터 예상하지 못한 중대한 약물이상반응 보고를 받은 경우 인체적용시험 코디네이터로부터 제출 받은 보고서 사본을 식품의약품안전처장에게 제출하여야 한다. 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우에는 인체적용시험 의뢰자가 이 사실을 보고받거나 알게 된 날로부터 7일 이내에 보고하고, 상세한 정보를 최초로 해당 약물이상반응에 대한 사실을 보고받거나 알게된 날부터 15일 이내에 추가로 보고하여야 한다. 그 밖의 중대하고 예상하지 못한 약물이상반응의 경우 인체적용시험 의뢰자가 해당 사실을 보고받거나 알게 된 날부터 15일 이내 제출하여야 한다.

13. 동의서, 보상 규약, 인체적용시험 후 인체적용시험 대상자 진료 및 치료

13.1. 동의서 및 설명문

인체적용시험 책임자 및 인체적용시험 책임자의 위임을 받은 공동연구자는 인체적용시험 대상자의 선정에 있어 인권보호의 측면과 선정/제외기준에 기초하여 인체적용시험 대상자의 건강상태, 증상, 연령, 성별, 동의능력, 기타 인체적용시험 참가유무 등을 고려한 후에 인체적용시험에 참가하도록 권유하는 것을 신중히 검토한다. 본 인체적용시험은 취약한 인체적용시험 대상자가 참여하는 인체적용시험으로서 인체적용시험 책임자 및 인체적용시험 책임자의 위임을 받은 공동연구자는 본 인체적용시험의 실시에 있어 인체적용시험 대상자와 부모(또는 법정대리인) 모두에게 인체적용시험 내용 및 인체적용시험용 식품의 효과, 이상반응에 대해 사전에 충분히 설명하고 인체적용시험 대상자와 부모(또는 법정대리인)의 동의를 얻는다. 아래 연령 기준에 따라 인체적용시험 대상자의 구두 동의와 부모(또는 법정대리인)의 서면 동의 또는 인체적용시험 대상자 승낙서와 부모(또는 법정대리인)의 서면 동의를 반드시 획득한다.

의정부성모병원

- 만 6세 미만: 가능하다면 이해할 수 있는 수준으로 구두 설명한다.
- 만 6세 이상 ~ 만 11세 이하: 쉬운 언어로 기술된 짧은 문장의 어린이 승낙서에 동의를 얻는다.

13.2. 보상에 대한 규약

부록 2. 피해 보상에 대한 규약 참조

13.3. 인체적용시험 후 인체적용시험 대상자 진료에 관한 사항

인체적용시험 참여를 종료한 인체적용시험 대상자에 대하여 차후 적절한 진료 및 치료를 받을 수 있도록 지도한다. 또한 기대하지 않았던 자연 이상반응 발생에 대비하여 인체적용시험 시험자의 지시에 따라 언제든지 진료를 받을 수 있도록 한다.

14. 인체적용시험 대상자의 안전 보호에 관한 대책

14.1. 인체적용시험 실시기관

인체적용시험기관의 장은 각 인체적용시험 단계별로 해당 인체적용시험의 실시에 필요한 인체적용시험실 및 설비와 전문인력을 갖추고, 해당 인체적용시험을 적절하게 실시할 수 있도록 준비에 완벽을 기해야 한다.

14.2. 인체적용시험계획서의 승인 및 수정

인체적용시험의 승인을 얻거나 승인받은 인체적용시험을 변경하여 실시하고자 하는 경우, 인체적용시험 단계별로 계획서 또는 변경 계획서에 대하여 임상시험심사위원회(IRB)의 승인을 받는다. 승인 이전에 인체적용시험 대상자를 인체적용시험에 참여시킬 수 없다.

14.3. 인체적용시험계획서의 숙지

본 인체적용시험은 Helsinki 선언에 입각하여 인체적용시험 대상자의 권리와 복지를 영두에 두고 준비된 것으로서, 인체적용시험 책임자, 공동연구자, 인체적용시험 코디네이터들이 인체적용시험 계획을 정확히 분석 및 숙지한다.

14.4. 인체적용시험의 동의

인체적용시험에 들어가기 전 인체적용시험 대상자에게 인체적용시험 내용 및 인체적용시험용 식품의 효과, 이상반응 및 안전성에 대한 모든 사항을 설명한 후 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)가 자발적으로 동의한 동의서를 획득한다. 그 후 인체적용시험에 참여 가능하며 동의서의 사본을 인체적용시험 대상자 또는 부모(또는 법정대리인)에게 제공한다.

14.5. 적합한 인체적용시험 대상자의 선정

본 인체적용시험에 앞서 인체적용시험 대상자와의 충분한 면담 및 검사를 통하여 인체적용시험 대상자 적합여부에 대하여 철저히 평가한다.

14.6. 취약한 대상자(원내 직원의 자녀) 보호대책 방안

인체적용시험 실시기관 직원의 자녀가 본 인체적용시험에 자발적으로 참여를 원하는 경우, 병원 직원의 자녀를 취약한 환경의 대상자(Vulnerable subject)로 규정하고 취약한 대상자 보호대책 방안에 따라 본 인체적용시험에 의해 어떠한 불이익도 받지 않도록 한다. 본 인체적용시험 참여에 앞서 취약한 대상자(원내 직원의 자녀)에게 취약한 대상자 보호대책 방안에 대해 충분히 설명한 후 취약한 대상자(원내 직원의 자녀)의 동의를 얻는다. 취약한 대상자 보호대책 방안은 다음과 같다.

- 1) 인체적용시험 대상자 모집 목적으로 인체적용시험 시험자가 취약한 대상자(원내 직원의 자녀)와 직접적으로 상호작용을 하지 않는다.
- 2) 인체적용시험 모집이나 동의 과정은 취약한 대상자(원내 직원의 자녀) 부모(또는 법정대리인)의 상사가 없는 상태에서 진행하도록 한다.
- 3) 취약한 대상자(원내 직원의 자녀)가 인체적용시험에 참여하지 않기로 선택할 수 있고, 그러한 결정이 부모(또는 법정대리인)의 고용이나 직무 평가에 영향을 미치지 않음을 보장한다.
- 4) 취약한 대상자(원내 직원의 자녀)가 부당한 영향이나 강제를 받지 않을 것이고, 취약한 대상자(원내 직원의 자녀)의 사생활이 존중될 것이라는 점을 보장한다.
- 5) 인체적용시험 참여를 거절했다는 사실을 취약한 대상자(원내 직원의 자녀) 부모(또는 법정대리인)의 상사에게 알리지 않는다.
- 6) 가능하다면 인체적용시험 진행은 다른 원내 직원이 없는 상태에서 진행되어야 한다.

또한 본 인체적용시험은 아동을 대상으로 하여 이에 대한 보호대책 방안으로 13.1. 동의서 및 설명문 내용에 따라 동의 취득하며, 아동 당사자가 인체적용시험에 참여하거나 계속 참여하기를 거부할 경우 당사자의 의사가 존중되어야 한다.

14.7. 인체적용시험의 진행 점검

인체적용시험 책임자는 인체적용시험 의뢰자에게 주기적으로 이상반응, 인체적용시험 진행 상황, 결과 등에 대하여 보고하며, 인체적용시험 의뢰자는 주기적으로 인체적용시험 진행 상황에 대하여 점검을 실시할 수 있다.

14.8. 인체적용시험 실시기관의 모니터링

인체적용시험 대상자의 권리와 복지 보호, 보고된 인체적용시험 관련 자료가 근거문서와 대조하여 정확하고, 안전하며, 검증이 가능한지 여부 확인, 인체적용시험이 승인된 계획서, 의약품 임상시험관리기준 및 의약품 등 안전에 관한 규칙 제30조의 규정에 따라 수행되었는지의 여부 확인을 위하여 모니터링을 실시한다.

인체적용시험에 대한 모니터링은 쥬가화에프앤씨에서 인체적용시험 업무를 의뢰한 네오뉴트라쥬 모니터요원의 정기적인 인체적용시험 실시기관 방문과 전화를 통해서 이루어진다. 방문 시 모니터요원은 인체적용시험 대상자 기록 원본, 인체적용시험용 식품 관리 기록, 보관 자료(시험 파일)를 확인한다. 또한, 모니터요원은 인체적용시험 진행과정을 잘 살펴보고, 문제가 있을 경우 인체적용시험 시험자와 상의한다.

이들 방문의 적절한 시간은 인체적용시험 시험자와 모니터요원이 협의하여 배분하여야 한다. 인체적용시험 시험자는 또한 의약품 임상시험관리기준에 정의된 것과 같이, 모니터요원이 증례기록서(CRF)에 기입된 자료들을 확인할 수 있는 인체적용시험 대상자의 원 자료들(Source documents: 병원 또는 개인 차트, 실험실 결과 기록, 예약 기록 등)을 볼 수 있도록 해주어야 한다.

14.9. 인체적용시험 대상자의 비밀유지

인체적용시험 대상자의 신원을 파악할 수 있는 기록은 반드시 비밀로 보장되어야 하며, 인체적용시험의 결과가 출판될 경우에도 인체적용시험 대상자의 신원을 비밀상태로 유지한다. 수집되는 정보는 대상자의 이름, 성별, 생년월일, 주소, 전화번호, 계좌번호, 환자등록번호 또는 각종 검사와 절차의 형태, 날짜, 결과와 같은 신원을 밝히는데 사용될 수 있는 정보이다. 구체적인 내용은 다음과 같다.

본 인체적용시험에 관련된 인체적용시험 의뢰자, 모니터요원 및 점검자는 본 인체적용시험의 모니터링과 점검 및 진행사항 관리를 위한 목적으로 인체적용시험 대상자의 기록을 열람할 수 있다. 인체적용시험 시험자는 본 인체적용시험의 계약이 체결됨과 함께 인체적용시험 의뢰자 또는 인체적용시험 수탁기관의 모니터요원 및 점검자가 인체적용시험 대상자의 차트와 증례기록서 기록을 검증하기 위하여 해당 문서를 검토할 수도 있음을 숙지하여야 한다. 이러한 정보들은 기밀로 보관되어야 하며, 기밀 보관을 위한 시설과 그 관리 기준을 갖추고 있어야 한다.

한편, 증례기록서 등 인체적용시험에 관련된 모든 서류에는 인체적용시험 대상자 이름이 아닌 인체적용시험 대상자 식별코드(일반적으로 인체적용시험 대상자 이니셜)로 기록하고 구분한다.

14.10. 인체적용시험용 식품 관리

- 1) 인체적용시험용 식품은 밀폐용기에 넣어 직사광선을 피하여 습기가 적은 곳에 실온(1~30°C)보관하며 인체적용시험 책임자 및 공동연구자의 지시(처방)없이 사용할 수 없도록 한다.
- 2) 인체적용시험 의뢰자는 인체적용시험용 식품 등을 인체적용시험 책임자와 협의하여 인체적용시험 코디네이터에게 교부하여야 하며 인수증을 받아 보존하여야 한다. 이 때 인체적용시험용 식품에는 “인체적용시험용”이라는 표시가 있어야 한다.
- 3) 인체적용시험 책임자의 위임을 받은 인체적용시험 코디네이터는 인체적용시험용 식품 등이 인체적용시험 이외의 목적으로 사용되지 않도록 보관, 관리하여야 한다.
- 4) 인체적용시험 의뢰자는 인체적용시험 실시 중 인체적용시험용 식품 등의 수량 및 보관상태 등을 확인하고 인체적용시험이 적절히 진행될 수 있도록 조치하여야 한다.
- 5) 인체적용시험 의뢰자는 인체적용시험의 중지 및 종료 또는 인체적용시험 시험자가 계획서에 따라 인체적용시험을 실시하지 않는 경우 미사용 인체적용시험용 식품 등을 회수하여 폐기하도록 한다. 이 때 인체적용시험 책임자의 위임을 받은 인체적용시험 코디네이터는 인체적용시험 책임자와 협의 후, 미사용 인체적용시험용 식품을 인체적용시험 의뢰자에게 반납하고 그 반납증을 보존하여야 한다.

14.11. 이상반응 발생 시 조치

이상반응 발생 시 즉시 인체적용시험 시험자로부터 필요검사 및 치료를 받을 수 있도록 관리한다. 중대한 약물이상반응 발생 시는 인체적용시험을 중지하고 12.5항 보고방법 및 12.6항의 예상하지 못한 중대한 약물이상반응 발생 시 조치 사항에 따라 신속하고 적절한 조치를 취한다.

15. 기타 인체적용시험을 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항

인체적용시험 실시와 관련된 각종 자료 및 기록을 잘 보존하도록 보관하는 장소가 따로 준비되어

있도록 하여 보안을 유지하도록 한다. 인체적용시험 실시기관장은 임상시험심사위원회(IRB) 및 인체적용시험 책임자로부터 인계받은 기록 및 자료를 보관책임자를 정하여 보관하여야 한다. 문서는 결과보고서가 작성 완료되어 제출된 후 3년 동안 보관 후 폐기하도록 한다(단, 인체적용시험 시험자 또는 인체적용시험 의뢰자의 요청에 따라 보관기간 연장 가능).

15.1. 인체적용시험의 중지 또는 중단

인체적용시험 의뢰자는 다음 사례가 발생한 경우 인체적용시험 실시기관에서 해당 인체적용시험계획에 기초하여 인체적용시험의 계속 유무를 검토한다.

- 1) 인체적용시험용 식품의 품질, 유효성 및 안전성에 관하여 중대한 정보가 확인된 경우
- 2) 인체적용시험계획의 변경이 필요하며 인체적용시험 실시기관이 이에 대응할 수 없을 경우
- 3) 인체적용시험 실시기관의 임상시험심사위원회(IRB)의 의견에 기초하여 인체적용시험 실시기관장이 수정지시를 내렸을 때 이를 승낙할 수 없는 경우
- 4) 인체적용시험을 계속할 수 없다는 인체적용시험 실시기관의 임상시험심사위원회(IRB)의 의견에 따라 인체적용시험 실시기관장이 인체적용시험의 중지를 지시한 경우
- 5) 인체적용시험 실시기관이 KGCP, 본 인체적용시험 계획 또는 인체적용시험계약서에 중대하거나 계속적인 위반행위를 한 경우

또한 인체적용시험 의뢰자는 인체적용시험의 조기종료 또는 중지를 결정한 경우 신속하게 해당 사실과 사유를 인체적용시험 실시기관의 인체적용시험 책임자에게 문서로 통지한다.

인체적용시험 책임자는 인체적용시험 의뢰자로부터 인체적용시험을 조기종료 또는 중지한다는 취지의 통지를 접수한 경우, 신속하게 그 사실과 상세한 사유서를 임상시험심사위원회(IRB)에 제출하여야 한다. 또한 인체적용시험 책임자는 인체적용시험 의뢰자 또는 임상시험심사위원회(IRB)의 결정에 의해 인체적용시험이 조기종료 또는 중지된 경우 인체적용시험 대상자에게 신속하게 그 사실 및 취지를 통보하고 적절한 조치 및 추적조사가 이루어질 수 있도록 하여야 한다.

인체적용시험을 중지한 경우에 인체적용시험 대상자에 대한 대응에 대해서는 "10. 인체적용시험 대상자의 중지 및 탈락기준, 위반에 대한 처리"에 따른다.

16. References

- 1) Lee, Yun Mi, Hwang, Seon Wook. Prevalence and Risk Factors for Atopic Dermatitis in Pre-school and School Aged Children. J Korean Acad Child Health Nurs Vol.14 No.3, 285-294, July 2008.
- 2) Jeong HJ, Kim HY, Kim HM. Molecular mechanisms of anti-inflammatory effect of chrysophanol, an active component of AST2017-01 on atopic dermatitis in vitro models. Int Immunopharmacol. 2018 Jan;54:238-244
- 3) Zhou, X., Gong, Z., Su, Y., Lin, J. and Tang, K. : Cordyceps fungi : natural products, pharmacological functions and developmental products. J. Pharm. Pharmacol. 61, 279 (2009).
- 4) Youu MS, Yoon KW, Choi Y etc. Cordycepin diminishes thymic stromal lymphopoietin-induced interleukin-13 production. Eur J Pharmacol. 2017 May 5;802:1-6.
- 5) Han NR1, Moon PD1, Yoo MS2, Ryu KJ1, Kim HM3, Jeong HJ4. Regulatory effects of chrysophanol, a bioactive compound of AST2017-01 in a mouse model of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis. Int Immunopharmacol. 2018 Sep;62:220-226. doi: 10.1016/j.intimp.2018.06.046. Epub 2018 Jul 20.
- 6) Sergei V. Gerasimov, Volodymyr V. Vasjuta, Oksana O. Myhovych and Lyudmyla I. Bondarchuk. Probiotic Supplement Reduces Atopic Dermatitis in Preschool Children: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Clinical Trial. American Journal of Clinical Dermatology · October 2010
- 7) A.W. Zuercher, R. Fritsché, B. Corthésy, A. Mercenier, Food products and allergy development, prevention and treatment, Curr. Opin. Biotechnol. 17(2006) 198–203.
- 8) Zutavern, A., et al. "Atopic dermatitis, extrinsic atopic dermatitis and the hygiene hypothesis: results from a cross-sectional study." Clinical & Experimental Allergy 35.10 (2005): 1301-1308.
- 9) Kerkhof, Marjan, et al. "Risk factors for atopic dermatitis in infants at high risk of allergy: the PIAMA study." Clinical & Experimental Allergy 33.10 (2003): 1336-1341.

부록1. 인체적용시험용 식품과의 인과관계 판정기준

이상반응 발생 시 이상반응과 인체적용시험용 식품 섭취와의 관련 정도는 다음의 기준에 따라 판정한다.

• **Definitely related(명확히 관련이 있음)**

- ✓ 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우
- ✓ 이 인체적용시험용 식품 섭취가 다른 어떤 이유보다 가장 개연성 있게 설명되는 경우
- ✓ 섭취 중단으로 이상반응이 사라지는 경우
- ✓ 재섭취(Rechallenge, 가능한 경우에만 실시) 결과가 양성인 경우
- ✓ 이상반응이 이 인체적용시험용 식품 또는 동일계열의 이 식품에 대해 이미 알려져 있는 정보와 일관된 양상을 보이는 경우

• **Probably related(관련이 있다고 생각됨)**

- ✓ 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우
- ✓ 이 인체적용시험용 식품 섭취와 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
- ✓ 이상반응이 다른 원인보다 이 인체적용시험용 식품 섭취에 의해 더욱 개연성 있게 설명되는 경우
- ✓ 섭취 중단으로 이상반응이 사라지는 경우

• **Possibly related(관련이 있을 가능성이 있음)**

- ✓ 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우
- ✓ 이 인체적용시험용 식품 섭취와 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
- ✓ 이상반응이 다른 가능성 있는 원인들과 같은 수준으로 본체에 기인한다고 판단되는 경우
- ✓ 섭취중단으로(실시된 경우) 이상반응이 사라지는 경우

• **Probably not related(관련이 없다고 생각됨)**

- ✓ 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 없는 경우
- ✓ 이상반응에 대해 보다 가능성 있는 다른 원인이 있는 경우
- ✓ 섭취 중단 결과(실시된 경우)가 음성이거나 모호한 경우

• **Definitely not related(명확히 관련이 없다고 생각됨)**

- ✓ 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 없는 경우
- ✓ 이상반응에 대해 가장 개연성 있게 설명되는 다른 어떤 이유가 있는 경우
- ✓ 섭취 중단결과(실시된 경우)으로 이상반응이 소실되지 않는 경우

• **Unknown(불명)**

부록2. 피해 보상에 대한 규약

바. IRB 승인서

2020-03-05

가톨릭대학교 의정부성모병원 임상연구심사위원회 심사결과 통보서

주소:경기도 의정부시 천보로 271 / TEL:031-820-3886 / FAX:031-820-3887

문서번호	UIRB-신20200227-005		
과제제목	아토피피부염 증상을 가진 소아에서 CAST의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위 배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험		
과제번호	UC19HDDE0152	접수번호	2019-3887-0003
책임연구자	소속	의정부성모병원/피부과	성명 이영복
의뢰기관	가화에프앤씨 (주)		연구비지원기관 가화에프앤씨 (주)
심사대상	답변서		
심사일	2020년 02월 27일	승인일	2020년 02월 27일
심사결과	승인	<ul style="list-style-type: none"> ● 심사결과가 "승인"일 경우, 연구의 개시가 가능합니다. ● 심사결과가 "시정후승인"일 경우 3개월 이내에 답변서를 제출하여 주십시오(심사형태: 신속심사). ● 심사결과가 "보완"일 경우, 3개월 이내에 답변서를 제출하여 주십시오(심사형태: 정규심사). 	
연구승인유효기간	2021년 02월 26일	<ul style="list-style-type: none"> ● 연구의 지속을 위하여 연구승인유효기간 만료 전까지 지속심사 승인을 득하십시오. ● 임상연구 종료 시 승인유효기간 내에 종료보고서를 제출하여 주십시오. 	
심사내역			
심사 의견	<p>▶ <심사결과> 승인 관련 규정을 근거로 검토한 결과 IRB에서는 해당 연구의 답변서를 "승인"하는 것으로 결정 하였습니다.</p> <p>▶ IRB 결정사항 1. 승인유효기간 : 2020.02.27.~2021.02.26 2. 승인유효기간 이후에도 연구를 지속할 경우, 지속심사주기/승인유효기간 내에 지속심사를 제출하여 승인을 득하거나 연구가 종료된 경우 종료보고를 하여 주시기 바랍니다.</p>		
안내 사항	<ol style="list-style-type: none"> 1. 심사결과 통보서: 연구자가 반드시 보관해야 하는 서류이므로 해당 연구의 문서와 함께 보관하시기 바랍니다. 2. 임상연구가 종료된 경우 책임연구자께서는 승인만료일 이전에 종료보고서를 제출하여 승인을 득하여 주시기 바랍니다. 3. 연구기간 연장 시 변경계획서를 통하여 연구기간을 변경하여 주시기 바랍니다. 4. 연구대상자 동의서: 최종 승인을 득한 연구대상자 동의서를 전산으로 출력하여 사용하시기 바랍니다. 5. 연구대상자 동의서: "과제진행정보(과제정보)-동의서 출력"에서 승인유효기간이 찍힌 동의서를 출력하여 사용하시기 바랍니다. 6. 연구 완료 후 임상연구 관련 문서는 관련 법률 및 기관규정에 따라 이관절차를 진행하시기 바라며, 상세 절차는 임상시험센터 문서보관 담당자에게 문의하시기 바랍니다. 7. 심사결과 문의처: IRB 사무국 박선영 (031-820-3886) 8. 문서보관 문의처: 임상시험센터 송재은(031-820-3666) 		

파일명(제출자료명)	버전	첨부파일명
GHFNC-01_임상시험보험증권		GHFNC-01_임상시험보험증권.pdf

- 귀하가 신청한 심사안건에 대하여 본 임상연구심사위원회의 심사결과를 위와 같이 알려드립니다.
- 책임연구자는 IRB 심사결과에 이의가 있는 경우 IRB 심사일로부터 3주 이내에 이의 사유를 기록하여 이의를 제기 할 수 있습니다. 단, 동일 사항에 대하여 2회 연속으로 이의신청을 할 수 없습니다.
- 본 임상연구심사위원회는 KGCP 및 ICH-GCP 규정을 준수하며, 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련 법령을 준수합니다.

가톨릭대학교 의정부성모병원 임상연구심사위원회



가톨릭대학교 의정부성모병원장



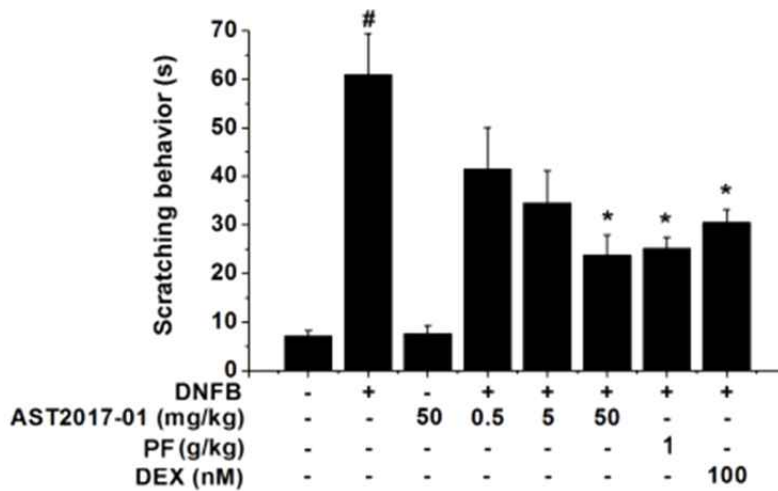
연구자의 임상시험/연구 수행 시 지켜야 할 사항

1. 위원회의 승인을 받은 계획서에 따라 연구를 수행하십시오.
2. 연구진행에 있어 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행하십시오. 연구대상자들의 보호를 위해 취해진 어떠한 응급사항에서의 변경도 즉각 위원회에 보고해야 합니다.
3. 위원회의 승인을 받은 연구대상자 동의서를 사용하십시오.
4. 모국어가 한국어가 아닌 연구대상자들에게는 승인된 동의서를 연구대상자의 모국어로 인증된 번역본을 사용할 것이며, 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회 승인을 받아야 합니다.
5. 강제 혹은 부당한 영향이 없는 상태에서 충분한 설명에 근거한 동의 과정을 수행할 것이며, 잠재적인 연구대상자에게 연구에의 참여 여부를 고려할 수 있도록 충분히 기회를 제공해야 합니다.
6. 연구대상자 모집광고는 사용 전에 위원회로부터 승인을 득한 후 사용해야 합니다.
7. 위원회에서 승인된 계획서에 따라 등록된 어떠한 연구대상자라도 사망, 입원, 심각한 부작용에 대하여는 위원회에 서면으로 보고해야 합니다.
8. 위원회의 요구가 있을 때에는 연구의 진행과 관련된 보고를 위원회에 제출해주시기 바랍니다.
9. 임상시험 또는 연구대상자의 안전에 대해 유해한 영향을 미칠 수 있는 어떠한 새로운 정보도 즉각적으로 위원회에 보고해야 합니다.
10. 초기심의회에서 승인된 연구의 지속을 위해서는 연구승인유효기간 이내에 지속심사를 신청하여 승인을 득해야 합니다.
11. 임상시험이 종료(조기종료를 포함한다)된 경우, 연구종료 요약자료와 함께 임상시험 종료 사실을 임상연구 종료보고서에 따라 위원회에 보고하여야 합니다.

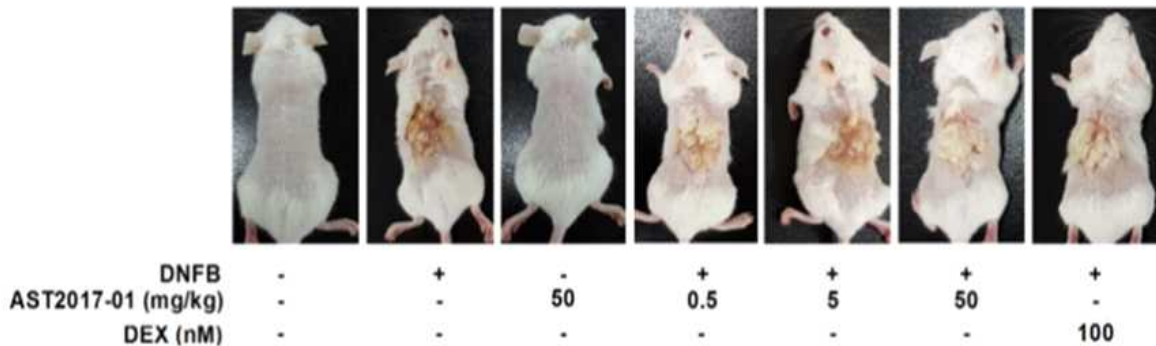
제2절 아토피 피부염 동물모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물/함유성분의 효능 평가 및 TSLP/caspase-1 조절효능 기전 평가 (경희대학교)

1. 아토피 피부염 동물모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 효능평가

가. 호서대학교 in vitro assay를 통해 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01) 비율이 가장 효과가 있음을 규명하여, 본 세부에서도 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01) 비율의 항 아토피 피부염 효과를 규명하였음. 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 DNFB에 의한 scratching을 유의하게 억제하였음. PF, 소엽추출물 (과민면역반응 완화에 도움이 되는 소엽추출물, positive control); Dexamethasone, 알레르기 치료제 (positive control).

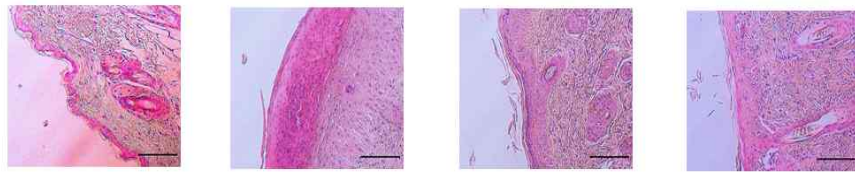


나. 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 DNFB에 의한 clinical symptoms을 억제시켰음. Dexamethasone (DEX, positive control).



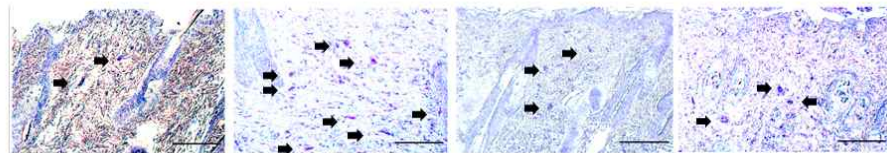
다. 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 DNFB에 의한 epidermis thickness를 감소시켰음. Damethasone (DEX, positive control).

DNFB	-	+	+	+
AST2017-1 (mg/kg)	-	-	50	-
DEX (nM)	-	-	-	100



라. 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 DNFB에 의한 비만세포 침윤을 감소시켰음. Damethasone (DEX, positive control).

DNFB	-	+	+	+
AST2017-1 (mg/kg)	-	-	50	-
DEX (nM)	-	-	-	100

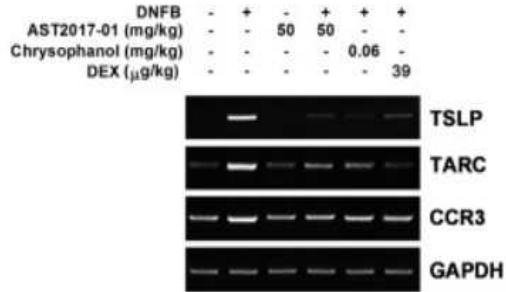


마. 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 DNFB에 의한 skin lesions 내 TSLP, ICAM-1, MIP2 발현을 억제시켰음. Damethasone (DEX, positive control). #<0.05, *<0.05.

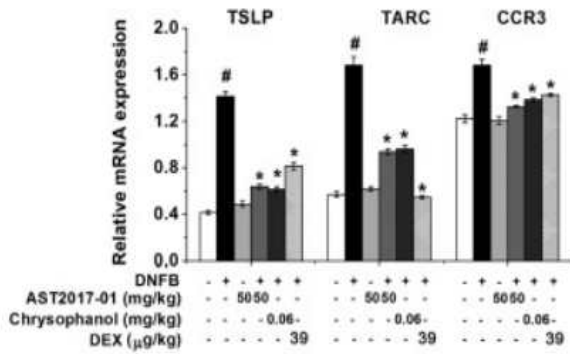
		Vehicle	DNFB	DNFB				DEX (nM) 100
				AST2017-01 (mg/kg)				
				50	0.5	5	50	
Lesional tissue	TSLP	0.14 ± 0.03	0.68 ± 0.08*	0.16 ± 0.03	1.06 ± 0.11	0.65 ± 0.04	0.29 ± 0.03*	0.33 ± 0.06*
	ICAM-1	6.82 ± 0.47	12.38 ± 0.56*	7.02 ± 0.37	10.10 ± 0.57	6.80 ± 0.46*	5.06 ± 0.73*	5.11 ± 0.47*
	MIP2	1.16 ± 0.21	4.23 ± 0.58*	1.37 ± 0.21	2.03 ± 0.14*	1.17 ± 0.05*	0.70 ± 0.11*	1.53 ± 0.17*

바. 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 DNFB에 의한 skin lesions 내 TSLP, TARC, CCR3 mRNA 발현을 억제시켰음. Damethasone (DEX, positive control). #<0.05, *<0.05.

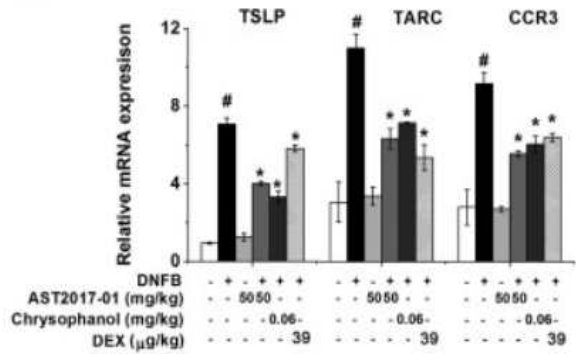
A



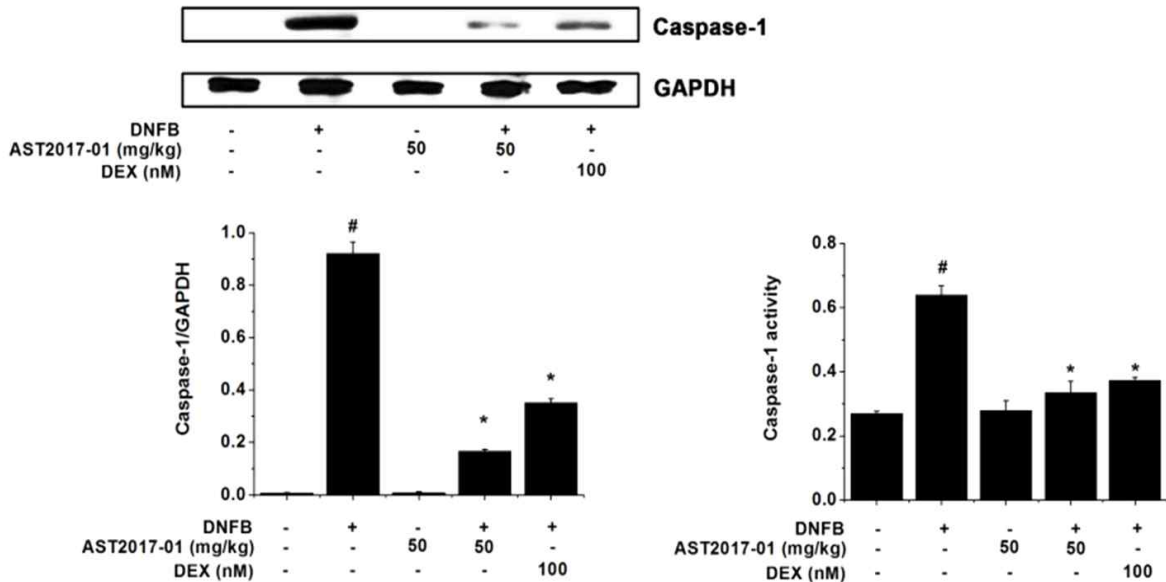
B



C



사. 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 DNFB에 의한 skin lesions 내 caspase-1 발현 및 활성을 억제시켰음. Damethasone (DEX, positive control). #<0.05, *<0.05.



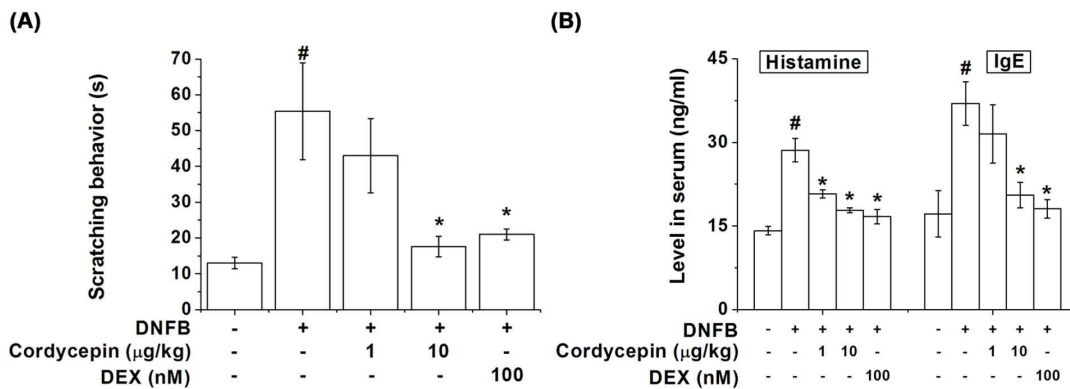
아. 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 DNFB에 의한 혈청 내 histamine, IgE, TSLP, IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α 수준을 억제시켰음. IFN- γ 는 유의적인 차이가 없었음. Damethasone (DEX, positive control). #<0.05, *<0.05.

	Vehicle	DNFB	DNFB					DEX (nM)
			AST2017-01 (mg/kg)					
			50	0.5	5	50		
Histamine	31.60 ± 2.46	53.95 ± 2.92 [#]	28.98 ± 3.20	44.98 ± 2.74	41.46 ± 1.04	34.97 ± 1.07*	34.85 ± 1.83*	
IgE	8.84 ± 1.00	16.55 ± 0.70 [#]	6.17 ± 0.58	17.78 ± 2.67	11.28 ± 1.48	9.62 ± 0.44*	9.24 ± 0.64*	
TSLP	1.07 ± 0.07	2.99 ± 0.29 [#]	0.86 ± 0.08	2.29 ± 0.19	1.47 ± 0.05*	1.27 ± 0.10*	1.35 ± 0.13*	
Serum IL-4	11.17 ± 0.30	17.01 ± 1.44 [#]	13.32 ± 1.21	14.06 ± 0.65	12.20 ± 0.65	11.77 ± 0.25*	11.18 ± 0.52*	
IL-6	0.68 ± 0.30	3.64 ± 1.02 [#]	0.21 ± 0.06	1.36 ± 0.74*	0.50 ± 0.14*	0.42 ± 0.09*	0.85 ± 0.24*	
IL-13	1.80 ± 0.10	2.68 ± 0.17 [#]	1.71 ± 0.08	2.39 ± 0.11	1.96 ± 0.11	1.57 ± 0.16*	1.60 ± 0.18*	
TNF- α	51.13 ± 3.75	79.32 ± 13.27 [#]	54.08 ± 2.39	49.95 ± 4.04*	47.60 ± 6.16*	42.73 ± 2.89*	28.40 ± 3.55*	
IFN- γ	1.10 ± 0.03	0.94 ± 0.04	1.16 ± 0.05	1.08 ± 0.04	1.13 ± 0.05	1.16 ± 0.10	0.99 ± 0.04	

2. 아토피 피부염 동물모델에서 동충하초와 소리쟁이 함유성분들의 효능평가

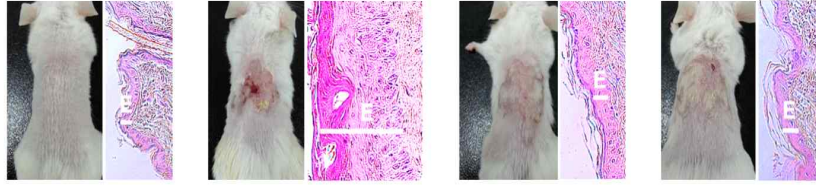
가. 동충하초 활성성분인 cordycepin의 항아토피 피부염 효능

나. 동충하초 활성성분인 cordycepin은 아토피 피부염 유사 마우스의 피부를 긁는 행위 시간을 감소시킴. 또한 혈청 내 histamine 및 IgE를 감소시킴. Dexamethasone, positive control.



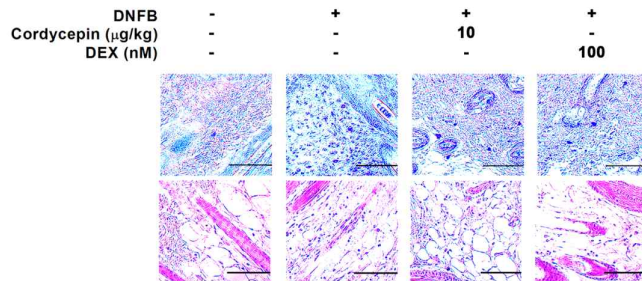
다. 동충하초 활성성분인 cordycepin은 아토피 피부염 유사 피부 병변 완화 및 병변의 표피 두께를 감소시킴. Dexamethasone, positive control.

DNFB	-	+	+	+
Cordycepin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	10	-
DEX (nM)	-	-	-	100

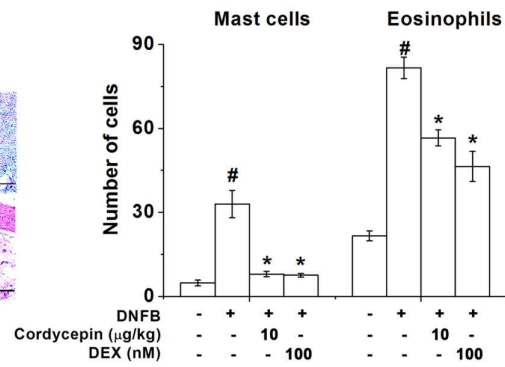


라. 동충하초 활성성분인 cordycepin은 아토피 피부염 유사 피부 병변에서 eosinophil 과 mast cell 침윤을 감소시킴. Dexamethasone, positive control.

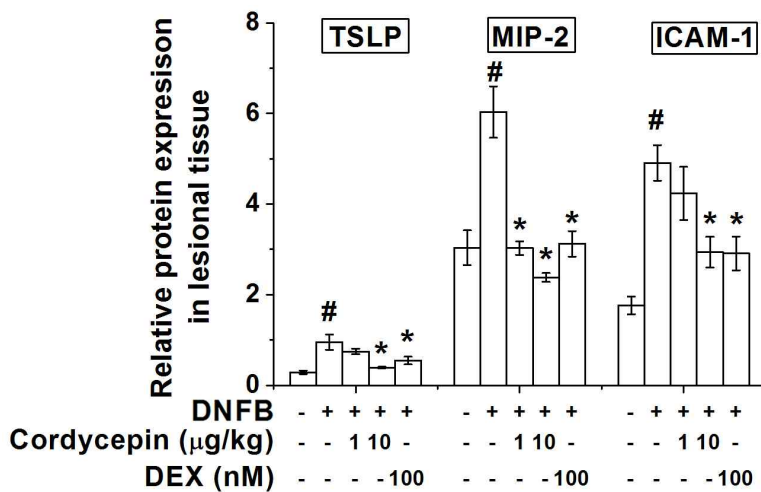
(A)



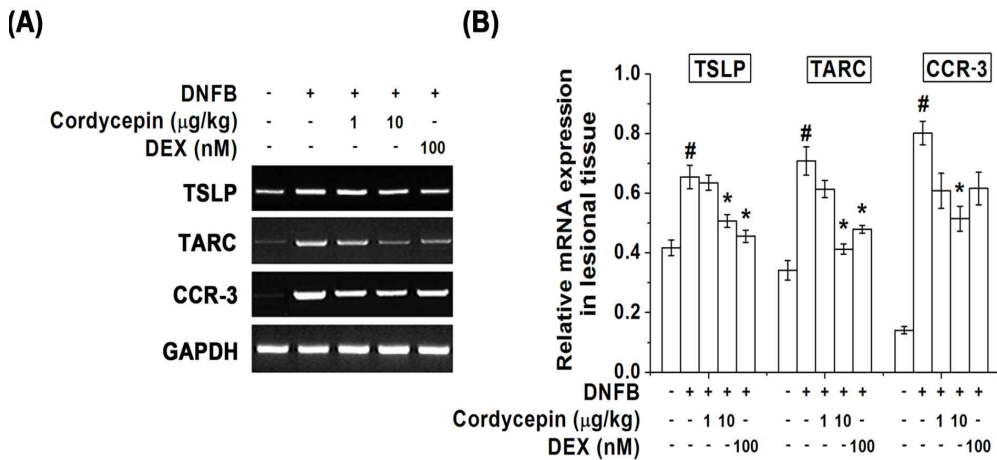
(B)



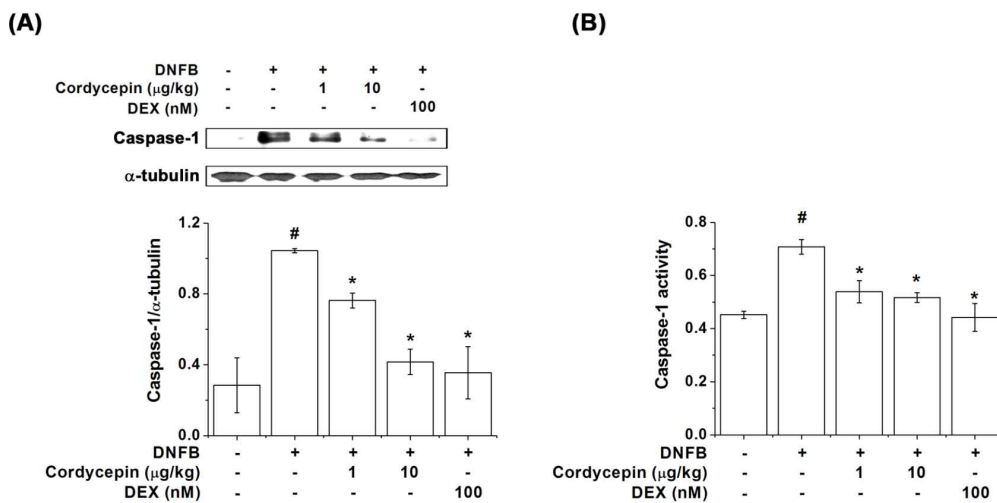
마. 동충하초 활성성분인 cordycepin은 아토피 피부염 유사 피부 병변에서 TSLP, MIP2, ICAM-1 발현을 감소시킴. Dexamethasone, positive control.



사. 동충하초 활성성분인 cordycepin은 아토피 피부염 유사 피부 병변에서 TSLP, TARC, CCR-3 mRNA 발현 감소시킴. Dexamethasone, positive control.



아. 동충하초 활성성분인 cordycepin은 아토피 피부염 유사 피부 병변에서 caspase-1 발현 및 활성을 감소시킴. Dexamethasone, positive control.

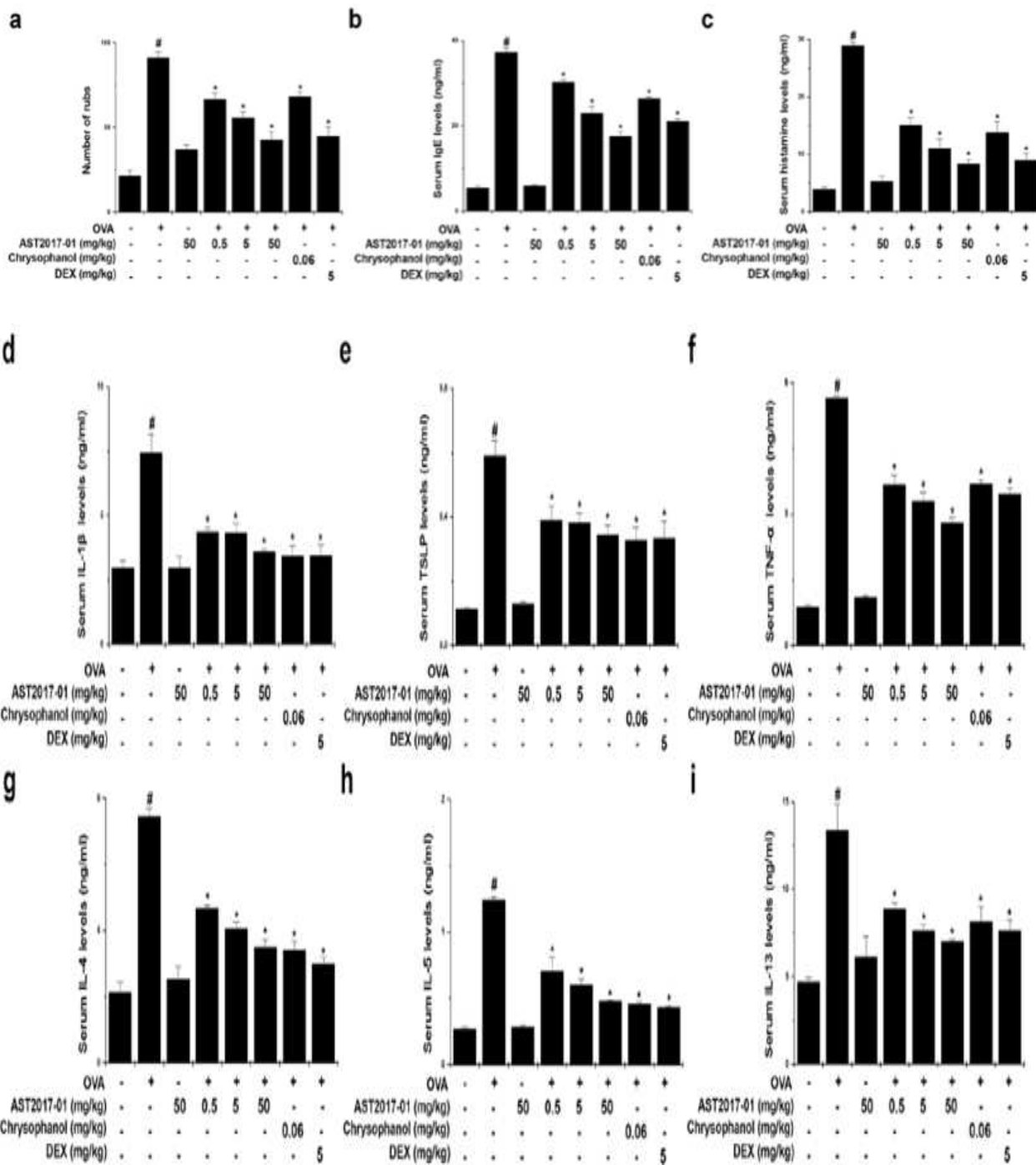


자. 동충하초 활성성분인 cordycepin은 아토피 피부염 유사 마우스의 혈청 내 TSLP, IL-4, IL-6, TNF- α 감소시킴. Dexamethasone, positive control.

	Vehicle	DNFB				
		-	Cordycepin ($\mu\text{g/kg}$)		DEX (nM)	
			1	10		100
Serum	TSLP	0.09 \pm 0.00	0.18 \pm 0.02#	0.18 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01*	0.13 \pm 0.00*
	IL-4	5.15 \pm 0.23	7.91 \pm 0.85#	6.86 \pm 0.52	4.12 \pm 0.60*	5.62 \pm 0.22*
	IL-6	0.17 \pm 0.07	1.19 \pm 0.29#	0.50 \pm 0.21	0.33 \pm 0.13*	0.26 \pm 0.08*
	TNF- α	25.58 \pm 2.64	35.49 \pm 1.23#	25.20 \pm 1.55*	23.42 \pm 0.82*	2.38 \pm 1.20*

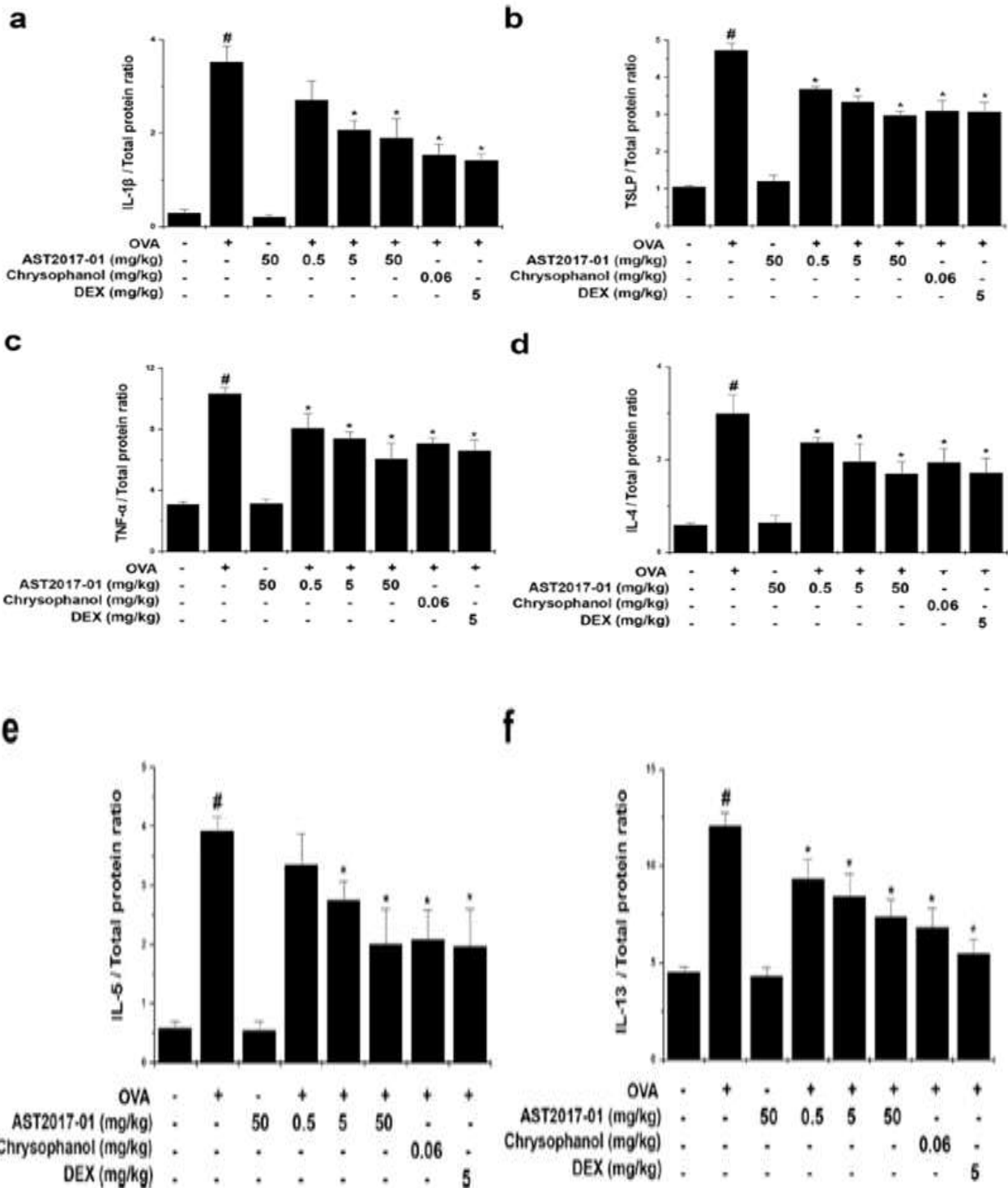
3. 아토피 피부염 동물모델에서 TSLP/caspase-1 조절 효능 기전 등 평가

가. 소리쟁이와 동충하초 혼합물 (AST2017-01)의 활성성분인 chrysophanol이 알레르기 유도 후 동물모델에서 급는 횡수와 혈청에서 IgE, histamine, 그리고 여러 사이토카인들이 감소되는 것을 확인. Dexamethasone, positive control. * <0.05 .

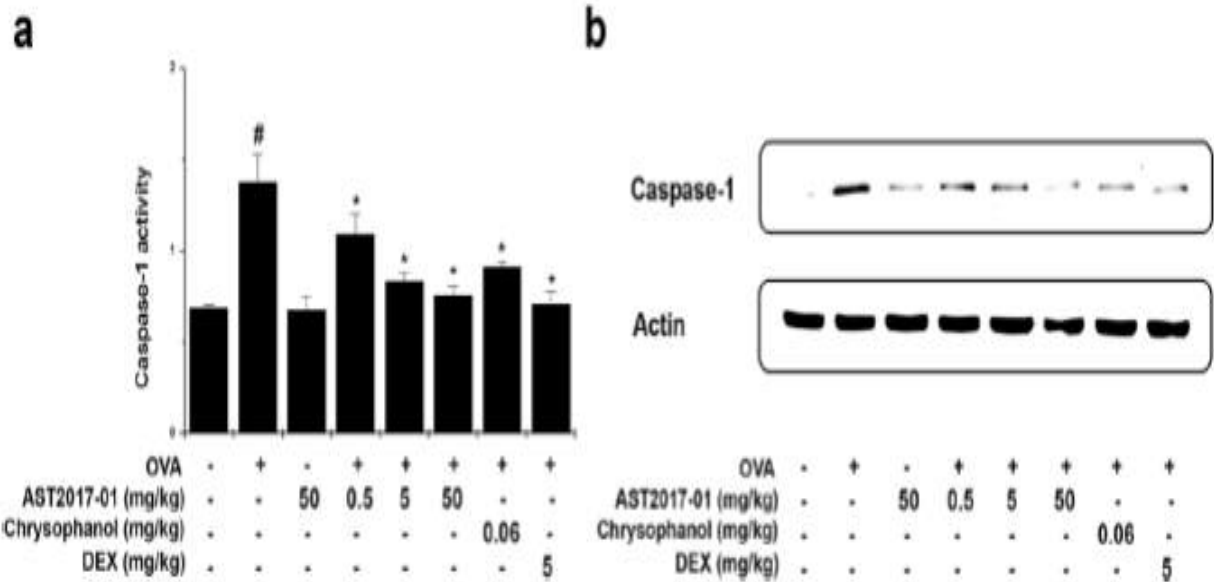


나. 소리쟁이와 동충하초 혼합물 (AST2017-01)의 활성성분인 chrysophanol이 알레르기 유도 후 동물모델의 조직에서 여러 사이토카인들이 감소되는 것을 확인.

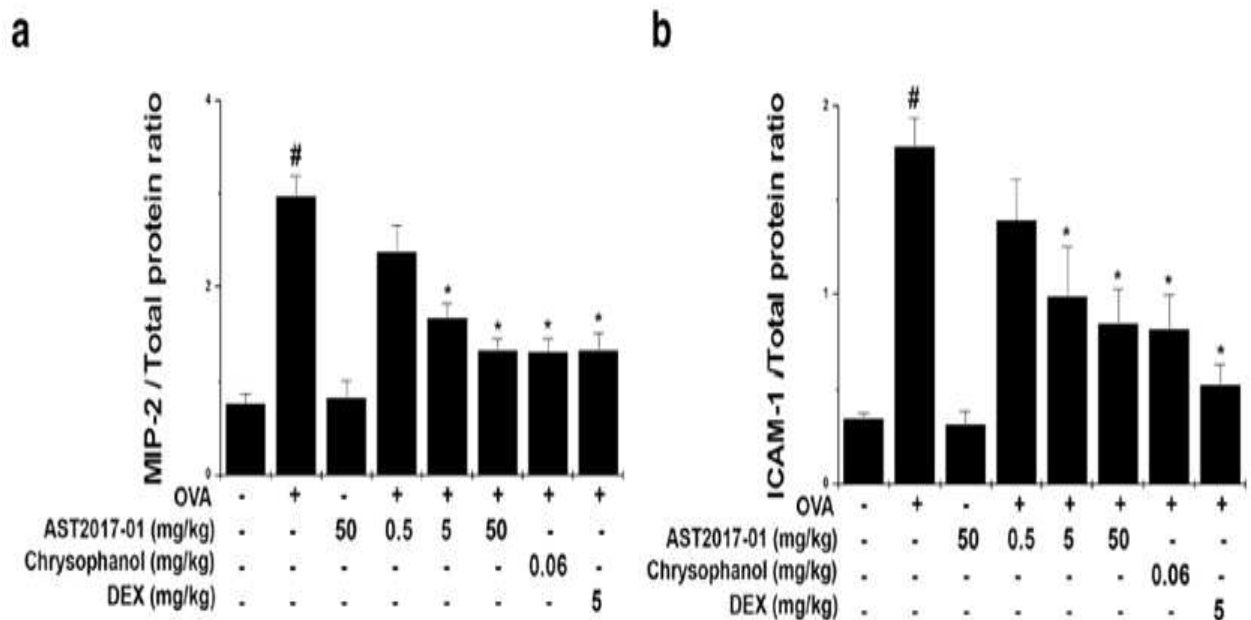
Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



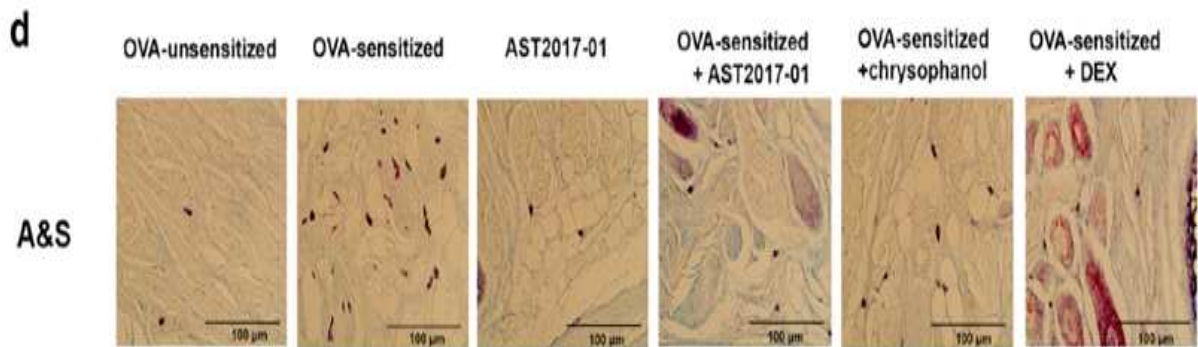
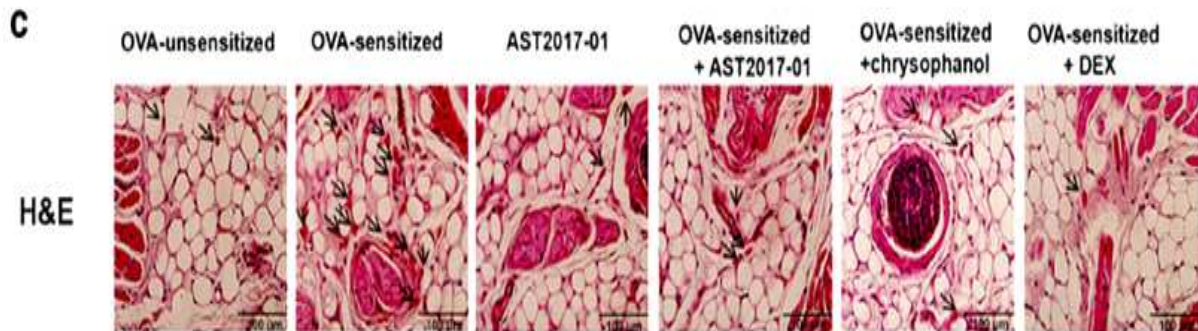
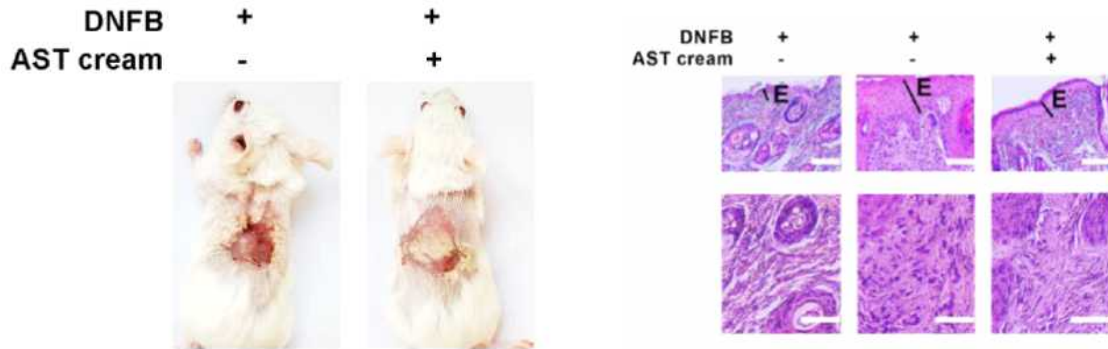
다. 소리쟁이와 동충하초 혼합물 (AST2017-01)의 활성성분인 chrysophanol이 알레르기 유도 후 동물모델의 조직에서 caspase-1 활성이 감소되는 것을 확인. Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



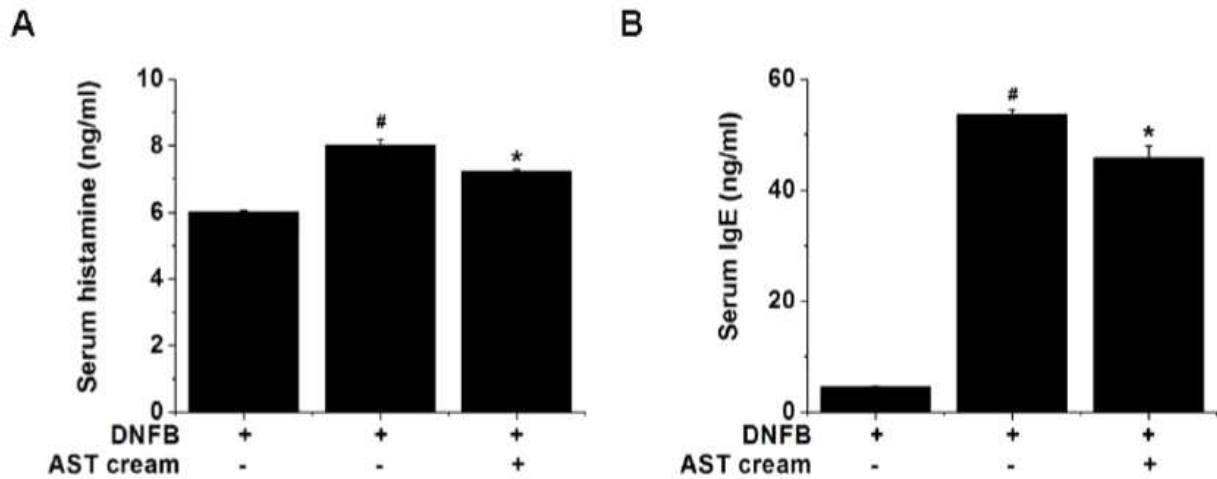
라. 소리쟁이와 동충하초 혼합물 (AST2017-01)의 활성성분인 chrysophanol이 알레르기 유도후 동물모델의 조직에서 chemokine 과 면역세포들의 활성이 감소되는 것을 확인. Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



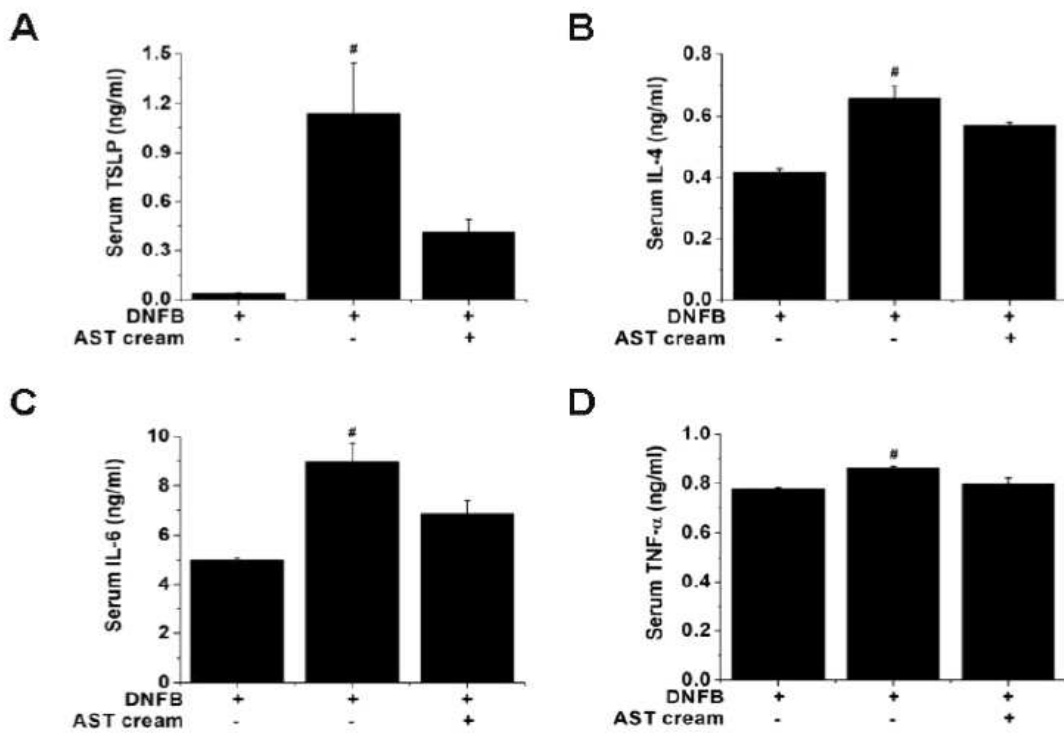
바. 소리쟁이와 동충하초 크림 (AST2017-01)이 아토피 피부염을 유도한 후 동물모델의 피부에서 아토피 피부염 유사 피부 병변 완화되는 것을 확인. Dexamethasone, positive control. $* < 0.05$.



사. 소리쟁이와 동충하초 크림 (AST2017-01)이 아토피 피부염을 유도한 후 동물모델의 혈청 내 histamine 및 IgE를 감소시킴. Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



아. 소리쟁이와 동충하초 크림 (AST2017-01)이 아토피 피부염을 유도한 후 동물모델의 혈청내 사이토카인을 감소시킴. Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



자. 소리쟁이와 동충하초 크림 (AST2017-01)이 아토피 피부염을 유도한 후 동물모델의 피부내 사이토카인과 caspase-1을 감소시킴. Dexamethasone, positive control. * <0.05 .

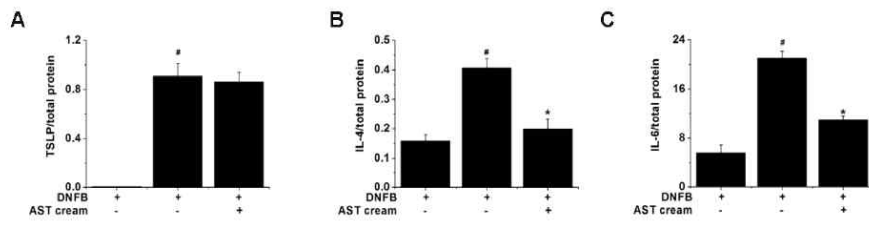
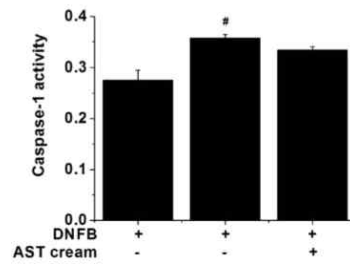


Fig. 5. The protein expression levels of TSLP, IL-4, and IL-6 detected by ELISA in the lesional skin. # <0.05 vs vehicle group. * $p < 0.05$ vs DNFB group.

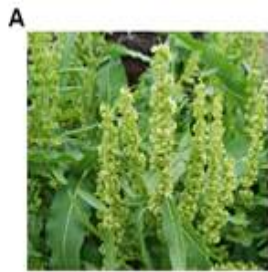


제3절 원료의 표준화 확립 , 생체의 아토피 실험모델에서 혼합물/ 함유성분 효능 평가 및 세포수준의 아토피 피부염 모델에서의 TSLP/caspase-1 조절 효능기전 평가 (호서대학교)

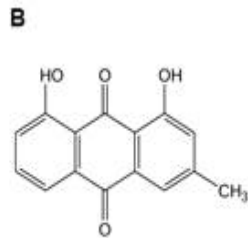
1. 원료의 표준화 확립 및 생체의 아토피 실험모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 효능 평가

가. 원료의 지표성분 또는 유효 성분 분석 및 조건 확립

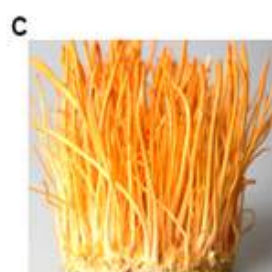
(1) 동충하초 소리쟁이 혼합물의 지표성분 분석 조건 확립- LC-MS/MS를 사용하여 각 지표성분 분석



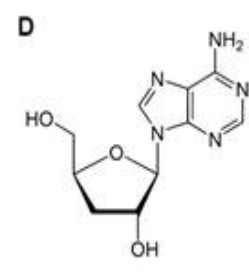
소리쟁이



chrysophanol



동충하초



cordycepin

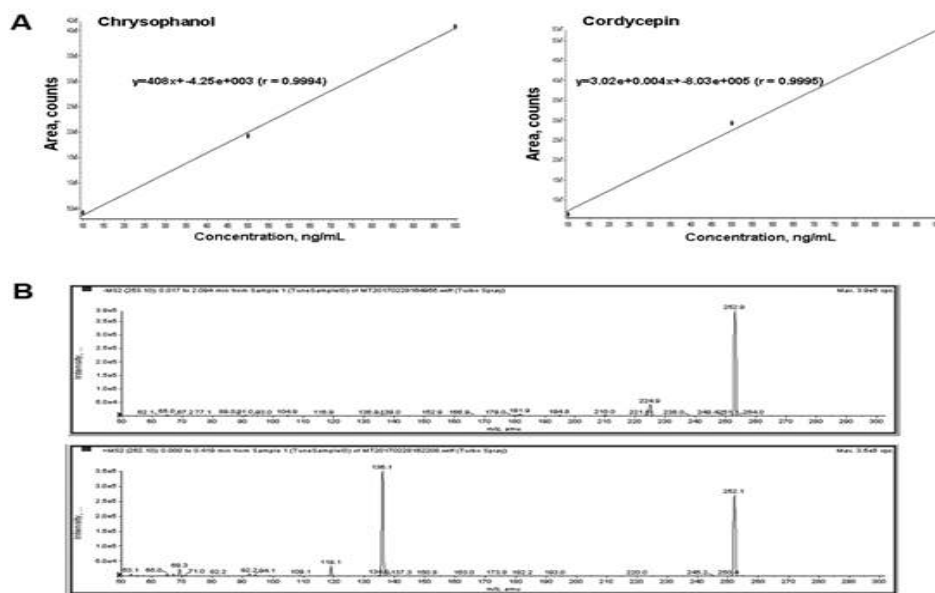
(2) 각 성분 분석에 대한 조건 확립

Table 1. Analytical conditions of LC-MS/MS for analysis of chrysophanol

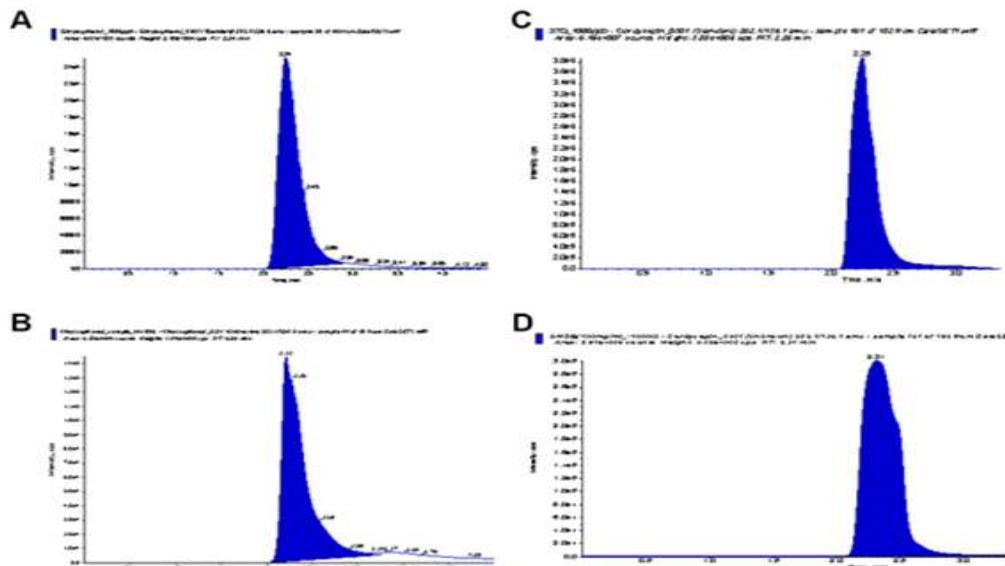
Column	Thermo Synchronis HILIC column (150 X 2.1mm, 5 μm)
Column temp.	25°C
Mobile phase	Methanol / 0.1%formic acid = 85/15(v/v)
Flow rate	200 ml /min
Injection volume	5 ml
Autosampler temp.	25°C
Detector (MS/MS)	Native ion mode, MRM mode Target Compound(m/z) 253.1→224.9 DP. : -77.09 EP -10.96 CE -37.95 CXP: -15.75

Table 2. Analytical conditions of LC–MS/MS for analysis of cordycepin

Column	Thermo Synchronis C ₁₈ column(150X2.1mm,5μm)	
Column temp.	25°C	
Mobile phase	Methanol / 0.1%formic acid = 85/15(v/v)	
Flow rate	200 ml /min	
Injection volume	5 ml	
Autosampler temp.	25°C	
	Positive ion mode, MRM mode	
Detector (MS/MS)	Target Compound(m/z)	252.1→136.1
	DP. :	66.03
	EP	10.89
	CE	21.45
	CXP:	7.09



< (A) Calibration curve. (B) LC–MS/MS spectrum >



< LC-MS/MS pattern of standard and marker compounds >

(A) Chrysophanol standard. (B) 법제 소리쟁이 내 chrysophanol.
 (C) Cordycepin standard. (D) 법제 동충하초 내 cordycepin.

(3) 원물 약제보다 법제한 샘플에서 각각의 지표성분이 증가됨.

Table 3. Contents of marker compounds by LC-MS/MS.

Samples	Chrysophanol (mg/g)	Cordycepin (mg/g)
<i>Rumex crispus</i> (소리쟁이)	0.8166	
Processed- <i>Rumex crispus</i> (법제소리쟁이)	1.3842	
<i>Cordyceps militaris</i> (동충하초)		1.2029
Processed- <i>Cordyceps militaris</i> (법제동충하초)		1.4821

(4) 동충하초와 소리쟁이 혼합물에서 함유 지표성분 각각 chrysophanol 0.13%, cordycepin 0.028%로 분석됨.

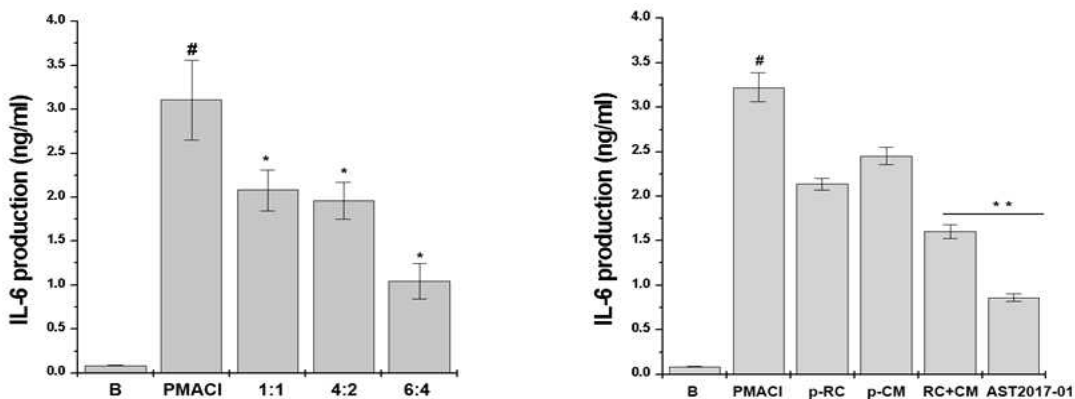
Table 4. Contents of marker compounds in herbal mixture by LC-MS/MS.

Samples	Chrysophanol (%)	Cordycepin (%)
Herbal mixture 법제소리쟁이:법제동충하초 (6:4)	0.13	0.028

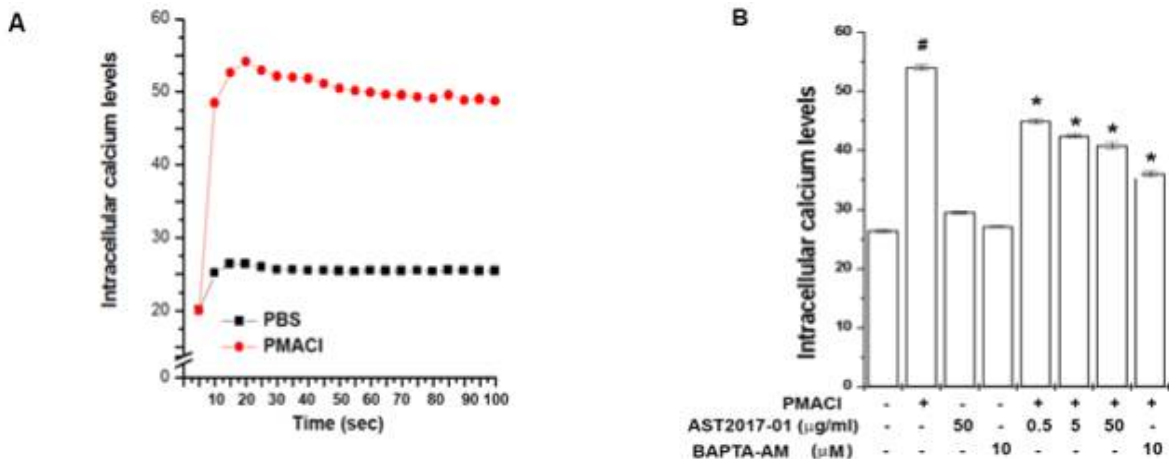
나. 생체의 아토피 실험모델에서 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)혼합물 효능 평가

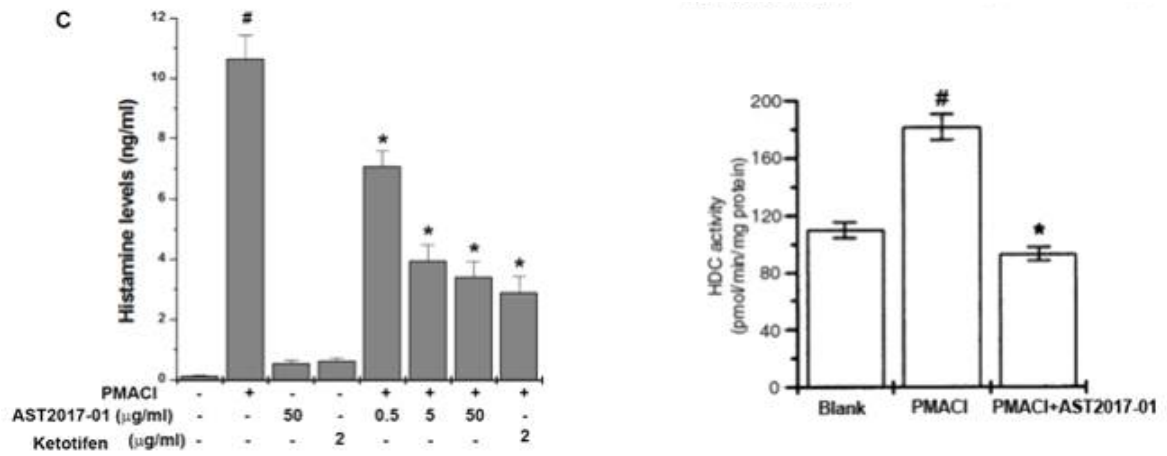
(1) 소리쟁이와 동충하초 비율별 효과를 비교하기 위해 각각 소리쟁이와 동충하초를 1:1, 4:2, 6:4로 섞어서 아토피 피부염 원인인자인 IL-6의 생성 억제효과를 알아본 결과, 소리쟁이 동충하초 비율이 6:4일 때 가장 효과가 있음을 알 수 있었음. 또한 각각 약물과 혼합되었을 때, 법제하였을 때를 비교한 결과 AST2017-01에서 가장 효과가 좋았음.

PMACI: 비만세포 활성화물질; p-RC, 법제 소리쟁이; p-CM, 법제 동충하초; RC+CM, 소리쟁이+동충하초 6:4비율.

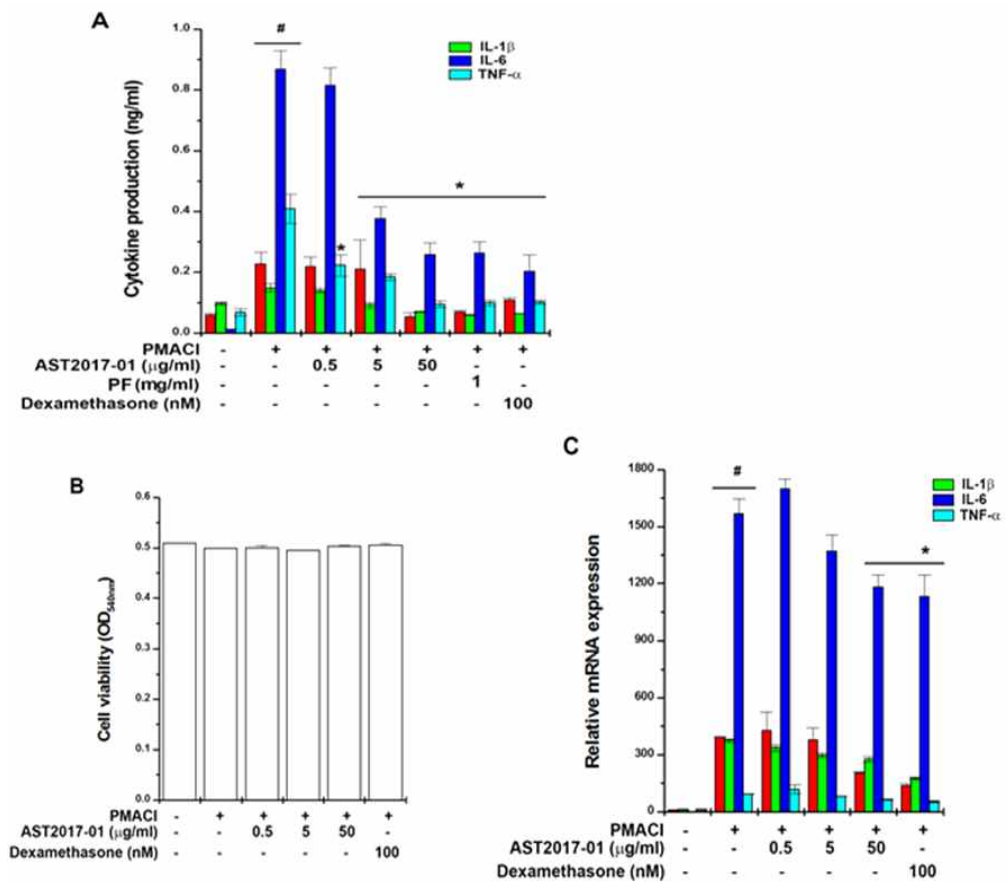


(2) 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 활성화된 비만세포 (mast cell) 내의 칼슘농도와 히스타민 분비를 농도 의존적으로 감소시킴. 또한 히스타민 합성효소인 HDC의 활성화도 유의하게 감소시킴. PMACI: 비만세포 활성화물질; BAPTA-AM, calcium chelator; ketotifen, 항히스타민제 및 분비 억제제 (positive control), * <0.05 .



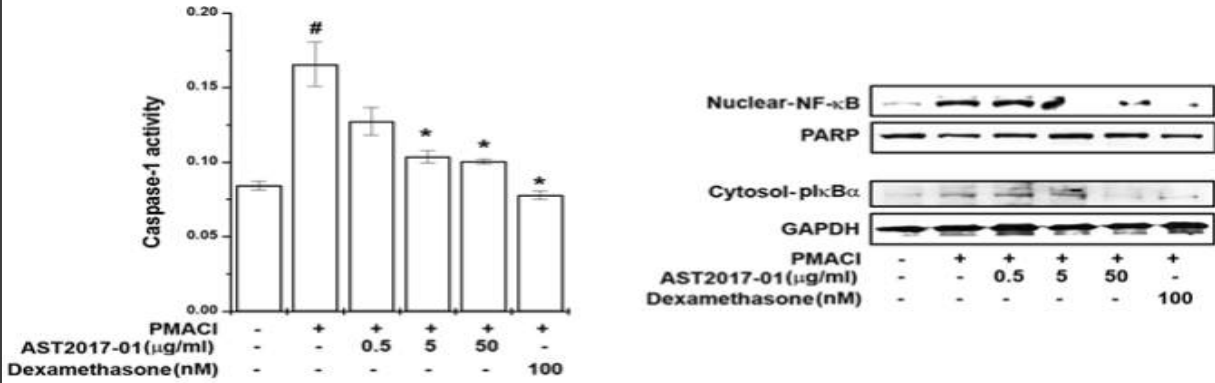


(3) 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 활성화된 비만세포로부터 분비된 Th2 cytokine과 염증성 사이토카인의 생성 및 mRNA 발현을 유의하게 억제하였음. 또한 세포독성에도 영향이 없었음. PMACI: 비만세포 활성화물질; PF, 소엽추출물, positive control); Dexamethasone, positive control. * < 0.05.



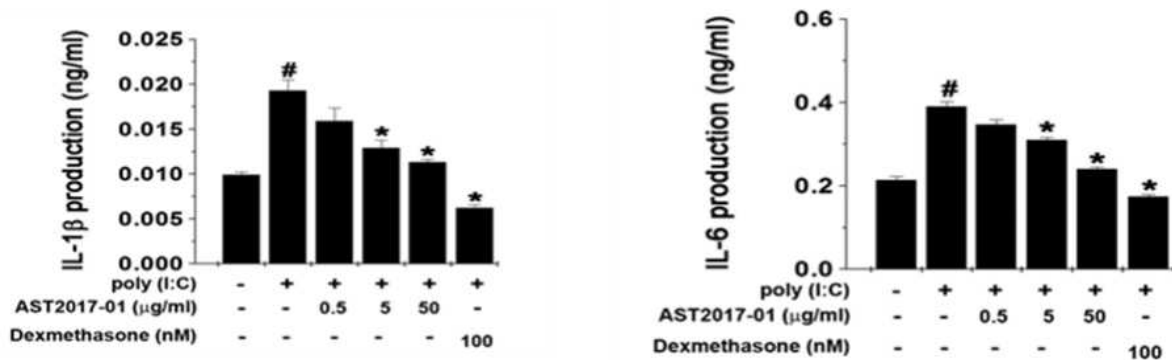
(4) 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 활성화된 비만세포 내 caspase-1 및 NF-kB의 활성을 감소시켰으며, NF-kB억제제인 인산화된 IκBα 수준도 감소시켰음.

PMACI: 비만세포 활성화물질; Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



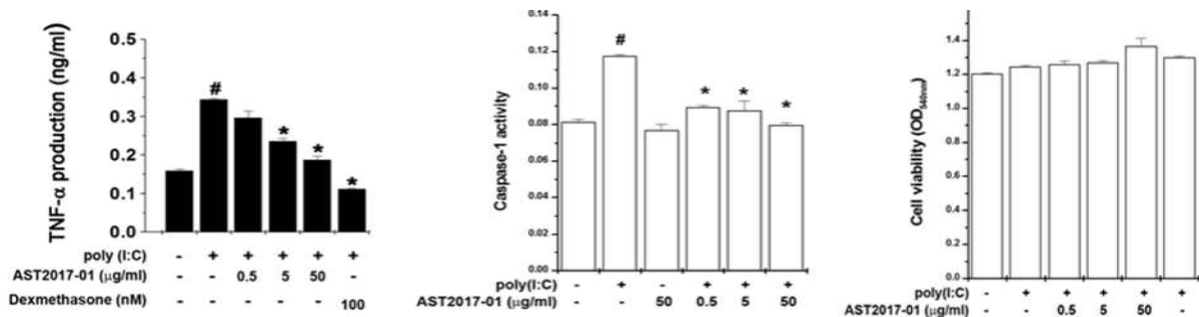
(5) 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 활성화된 각질세포 (HaCaTcell)에서 염증성 사이토카인의 생성을 감소시킴. 또한 세포독성도 관찰되지 않았음.

poly (I:C), 각질세포 활성화물질; Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



(6) 소리쟁이와 동충하초 6:4 (AST2017-01)은 활성화된 각질세포 (HaCaTcell)에서 caspase-1 활성을 유의하게 감소시킴.

poly (I:C), 각질세포 활성화물질. * <0.05 .



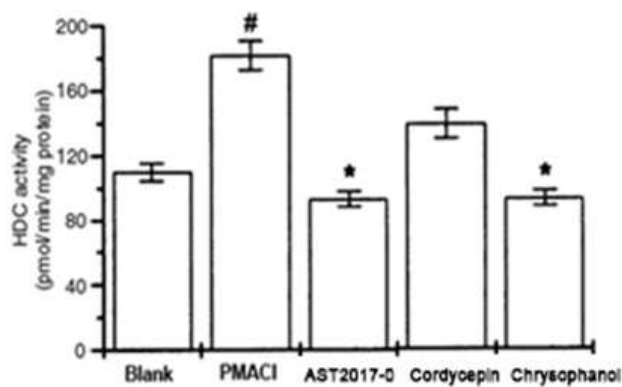
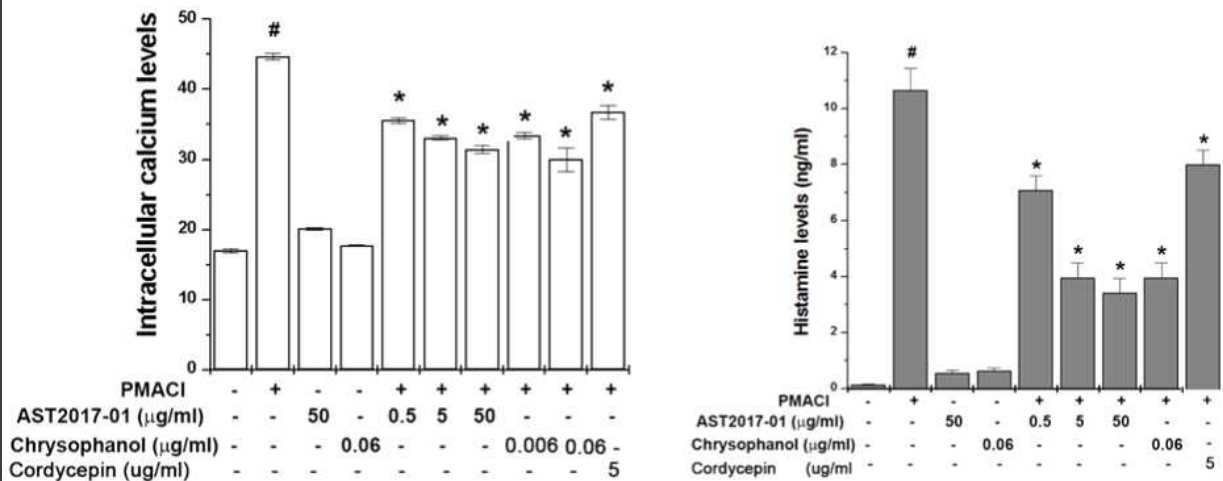
2. 체외 아토피 실험모델에서 동충하초와 소리쟁이 함유 성분들의 효능 평가

가. 체외 아토피 실험모델에서 동충하초 함유성분 (코디세핀), 소리쟁이 함유 성분(크리소파놀)의 효능 평가

(1) 소리쟁이와 동충하초 혼합물 (AST2017-01)의 활성성분인 chrysophanol과 cordycepin은 활성화된 비만세포 (mast cell) 내의 칼슘농도와 히스타민 분비를 유의하게 감소시킴. 또한 히스타민 합성효소인 HDC의 활성도 유의하게 감소시킴. Cordycepin보다 chrysophanol이 억제효과가 더 높았음.

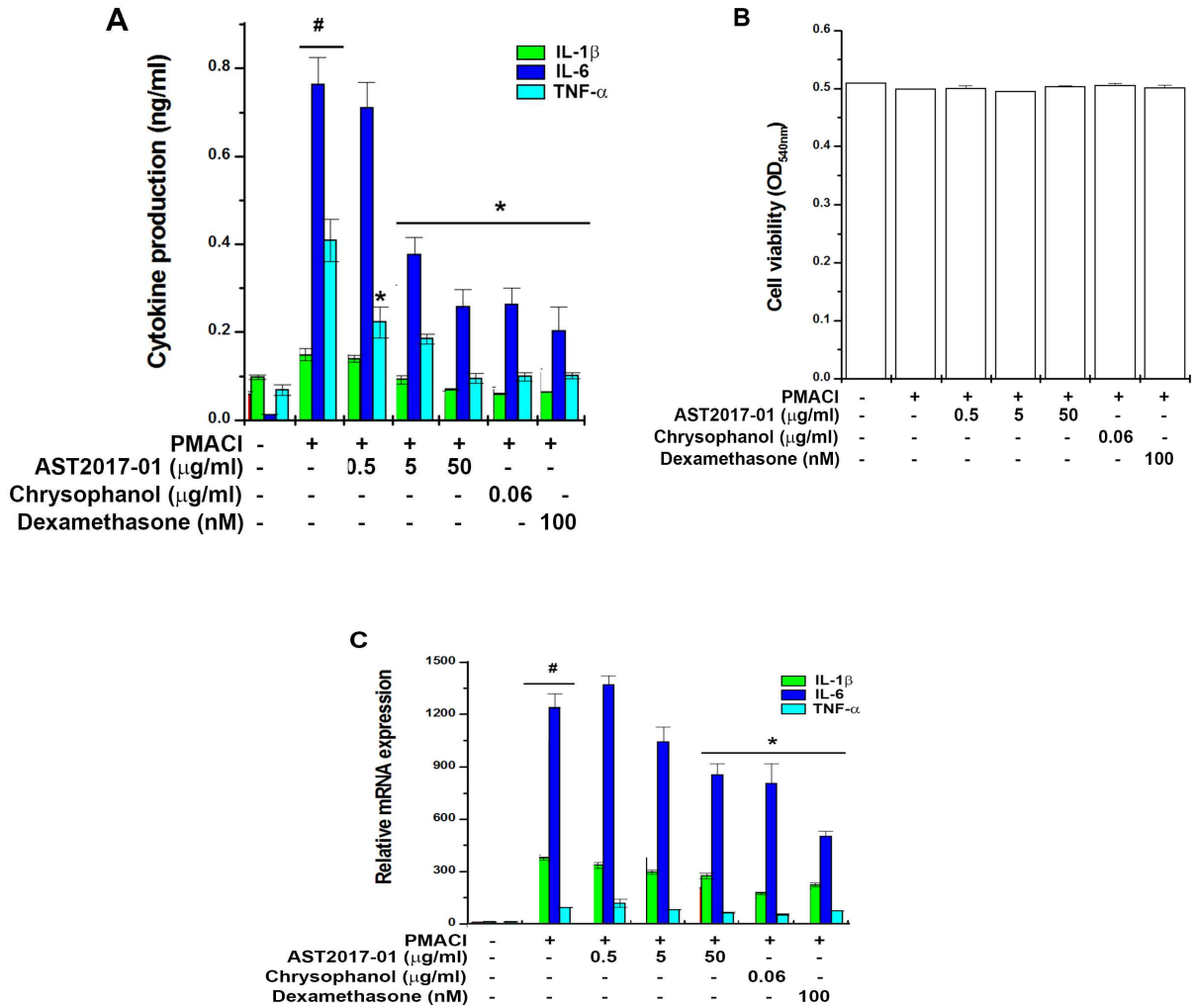
다음 실험부터 chrysophanol에 의한 효능 실험을 수행함.

PMACI: 비만세포 활성화물질. $p < 0.05$.



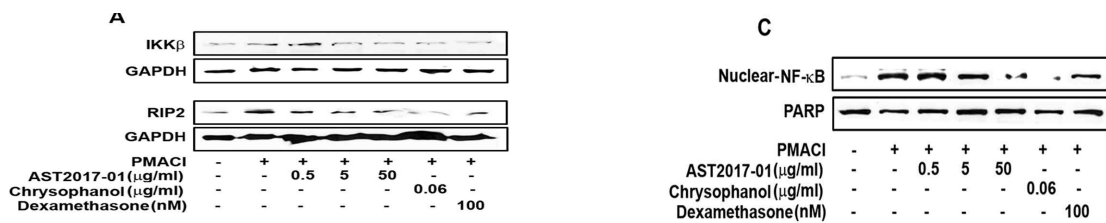
(2) AST2017-01의 활성성분인 chrysophanol은 활성화된 비만세포로부터 분비된 Th2 cytokine과 염증성 사이토카인의 생성 및 mRNA발현을 유의하게 억제하였음. 또한 세포독성에도 영향이 없었음.

PMACI: 비만세포 활성화물질; Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



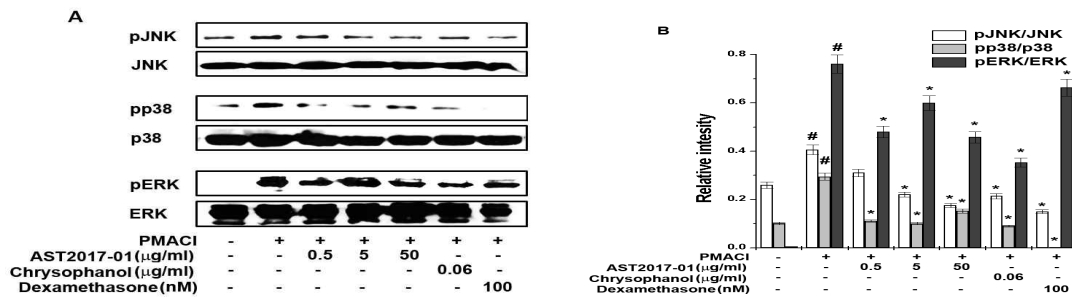
(3) AST2017-01의 활성성분인 chrysophanol은 활성화된 비만세포 내 IKK와 RIP2의 활성을 감소시켰으며, IKK와 RIP2의 down stream signal인 NF- κ B의 활성을 감소시켰음.

PMACI: 비만세포 활성화물질; Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



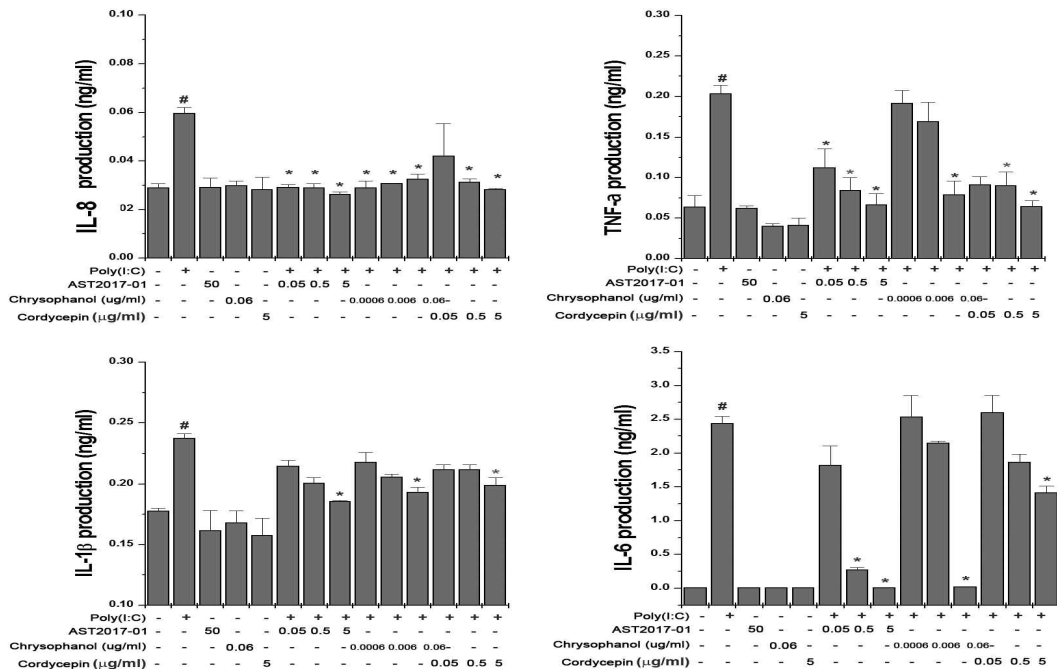
(4) AST2017-01의 활성성분인 chrysophanol은 활성화된 비만세포 내 IKK와 RIP2의 up-stream signal인 mitogen-activated protein kinase family (JNK, ERK, P38)의 인산화를 유의하게 감소시켰음. B는 그림 A를 덴시토미터로 측정한 결과임.

PMACI: 비만세포 활성화물질; Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



(5) AST2017-01의 활성성분인 chrysophanol과 cordycepin은 활성화된 각질세포 (HaCaTcell)에서 염증성 사이토카인의 생성을 감소시킴. Cordycepin보다 chrysophanol이 억제효과가 더 높았음. 또한 세포독성도 관찰되지 않았음 (data not shown).

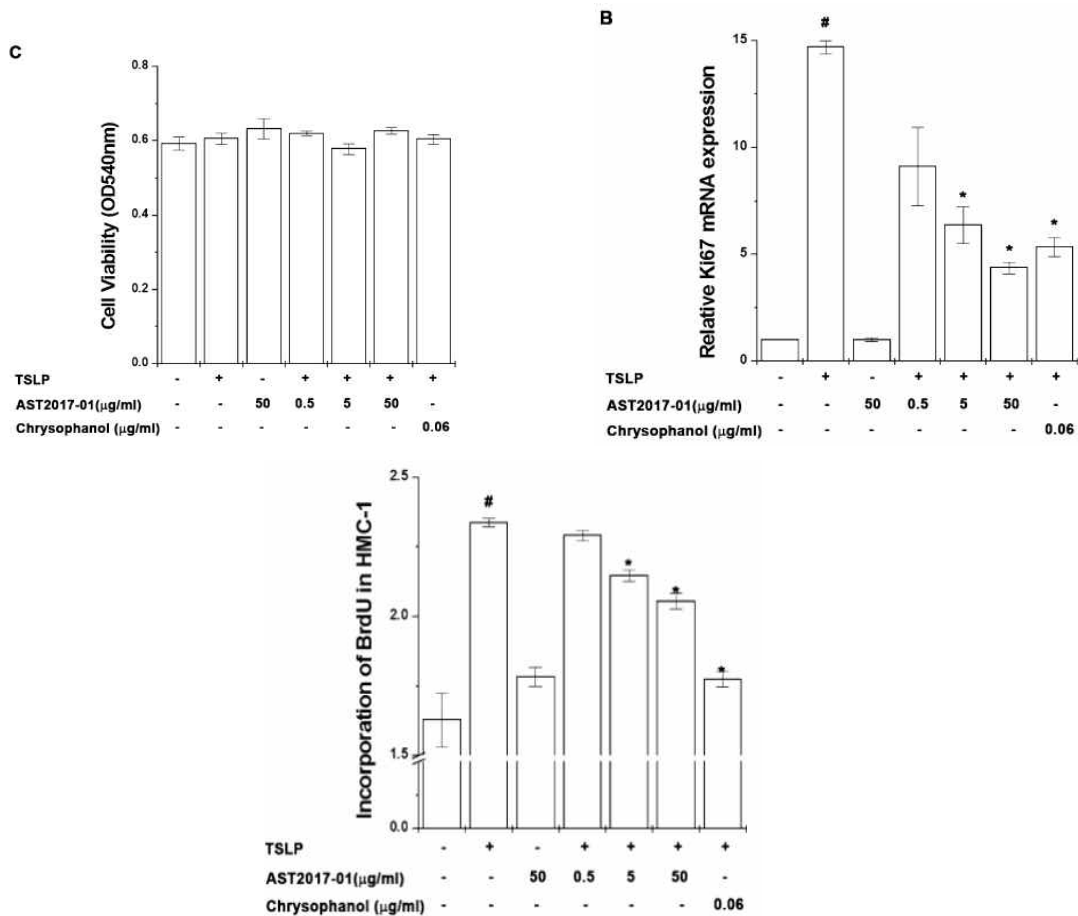
poly (I:C), 각질세포 활성화물질; Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



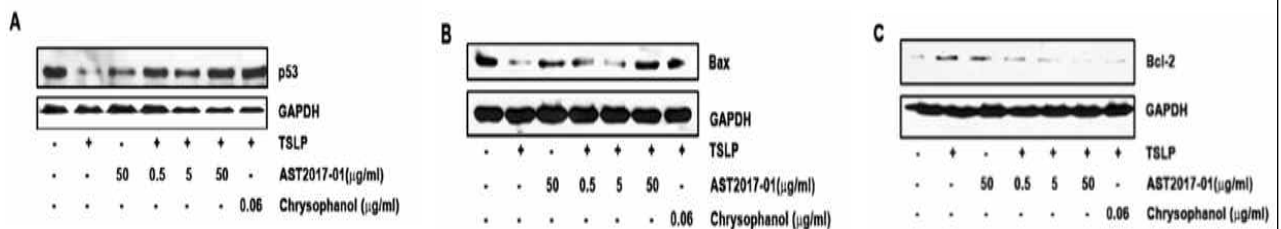
3. 세포수준의 아토피 피부염 모델에서 TSLP/caspase-1 조절 효능 기전 등 평가

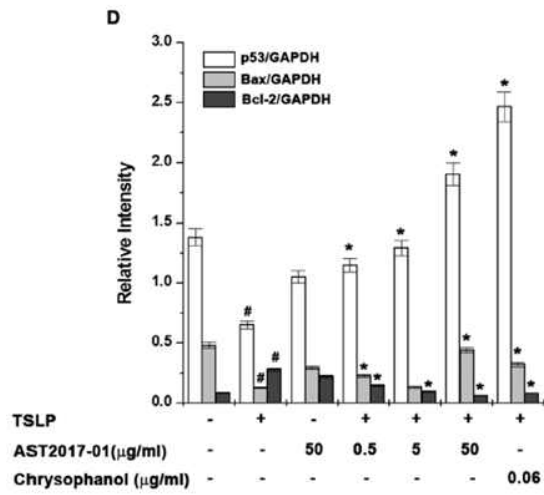
가. 세포수준의 아토피 피부염 모델에서 TSLP/caspase-1 조절 효능 기전 등 평가 - 크리소파놀

(1) AST2017-01의 활성성분인 chrysophanol은 TSLP로 활성화된 비만세포를 억제하는 것을 확인. 세포 독성에는 영향이 없는 것을 확인. $* < 0.05$.

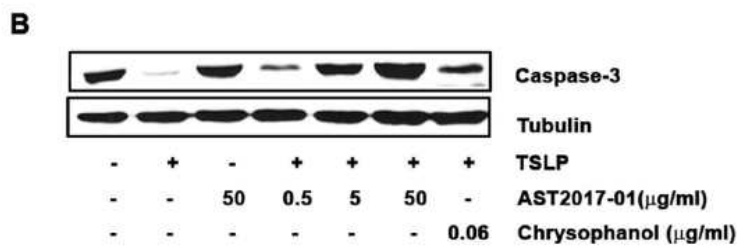
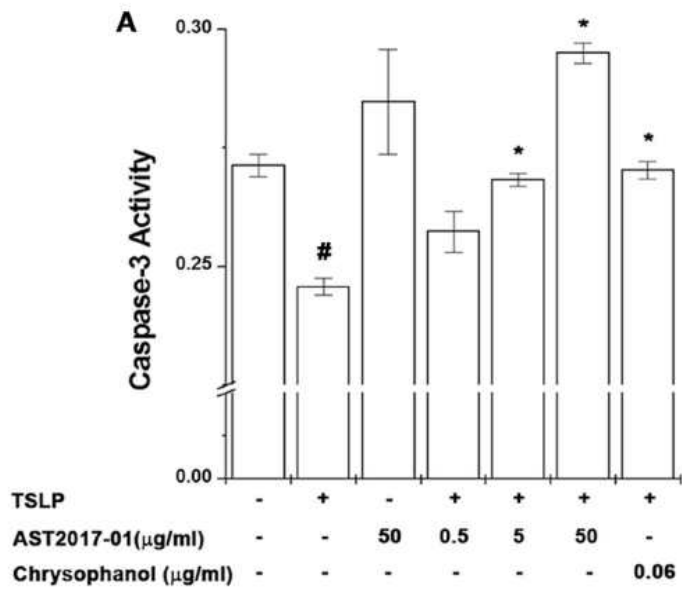


(2) AST2017-01의 활성성분인 chrysophanol은 TSLP로 활성화된 비만세포의 apoptosis를 억제하는 것을 확인. $* < 0.05$.

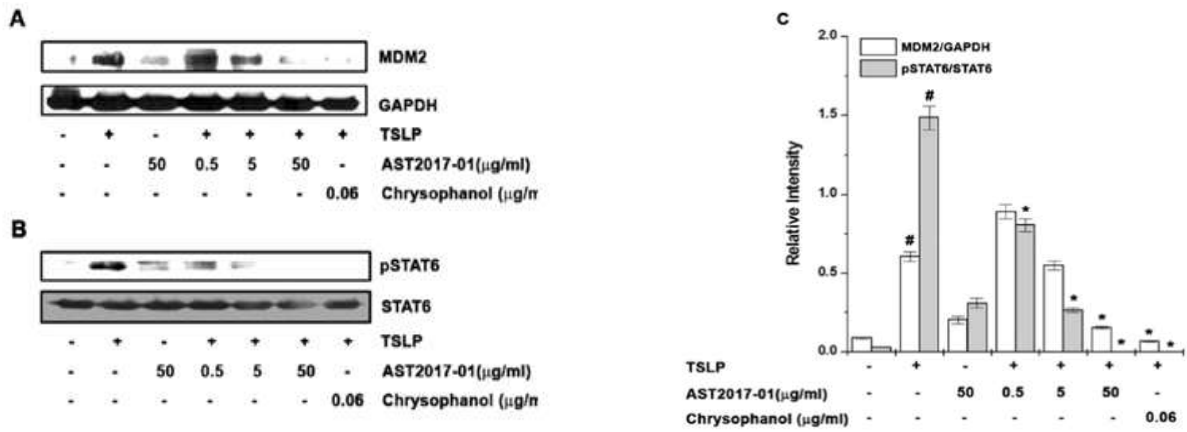




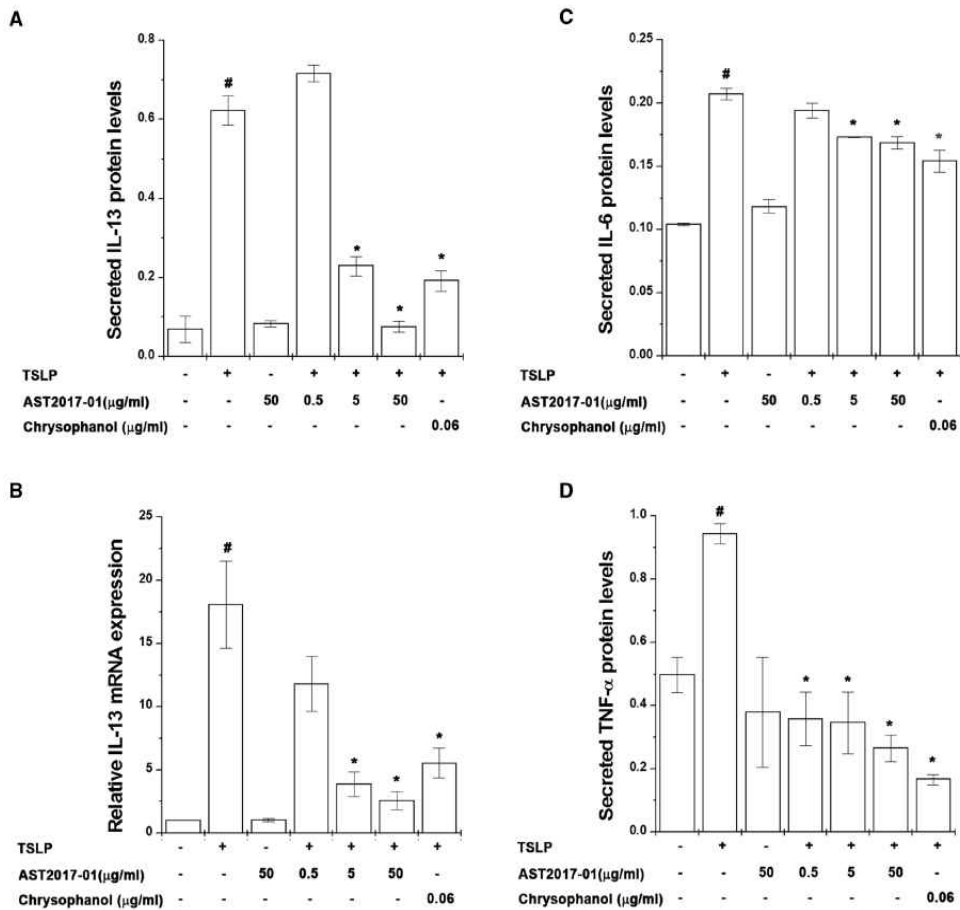
(3) AST2017-01의 활성성분인 chrysophanol은 TSLP로 활성화된 비만세포가 억제시킨 caspase-3를 증가시키는 것을 확인. * <0.05 .



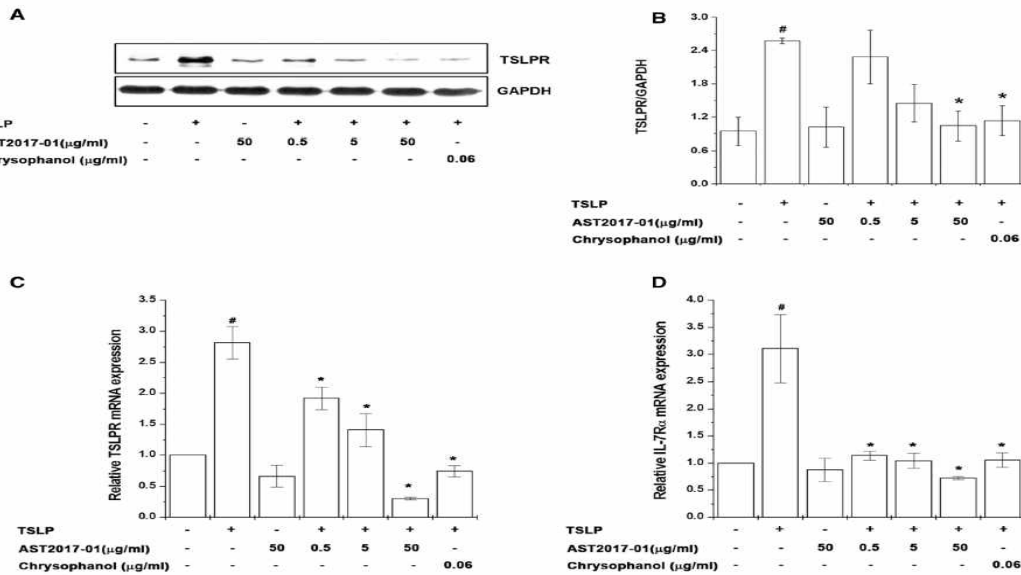
(4) AST2017-01의 활성성분인 chrysophanol은 TSLP로 활성화된 비만세포에 의해 증가된 MDM2, pSTAT6를 억제시키는 것을 확인. $* < 0.05$.



(5) AST2017-01의 활성성분인 chrysophanol은 TSLP로 활성화된 비만세포에 의해 증가된 사이토카인을 억제시키는 것을 확인. $* < 0.05$.

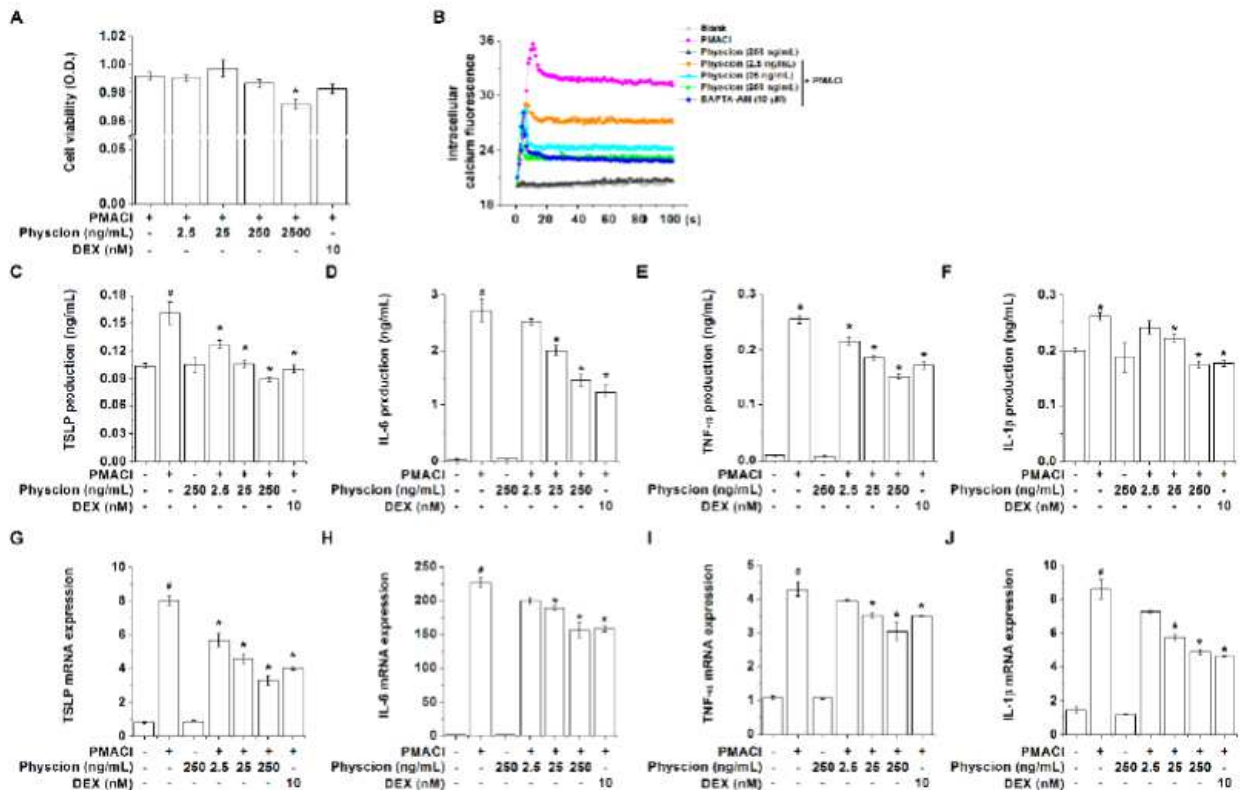


(6) AST2017-01의 활성성분인 chrysophanol은 TSLP로 활성화된 비만세포에 의해 증가된 TSLPR과 IL-7Ra를 억제시키는 것을 확인. * <0.05 .



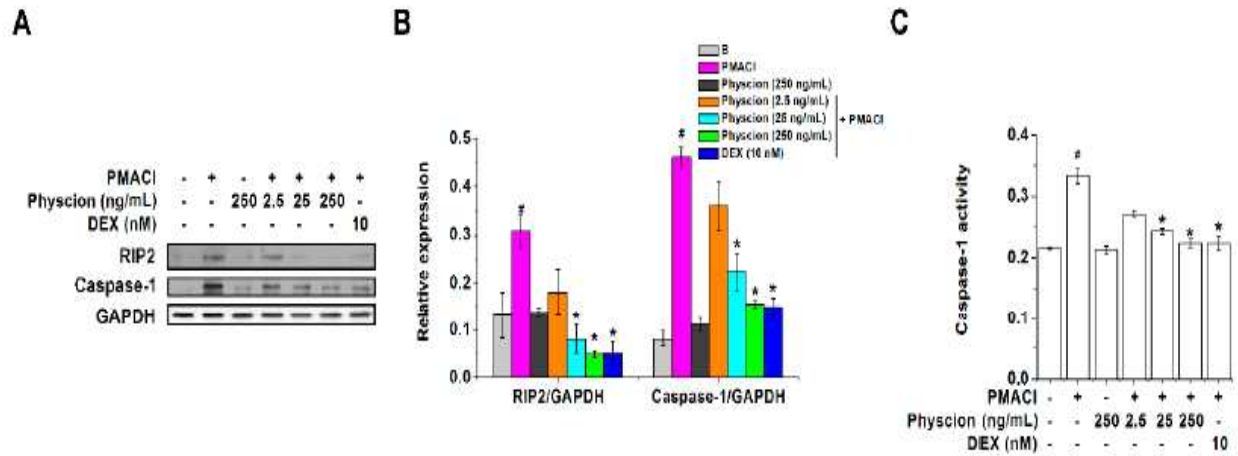
(7) AST2017-01의 활성성분인 physcion은 활성화된 비만세포 내 증가된 칼슘농도와 사이토카인을 억제시키는 것을 확인. 세포 독성은 영향이 없었음.

PMACI: 비만세포 활성화물질; Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



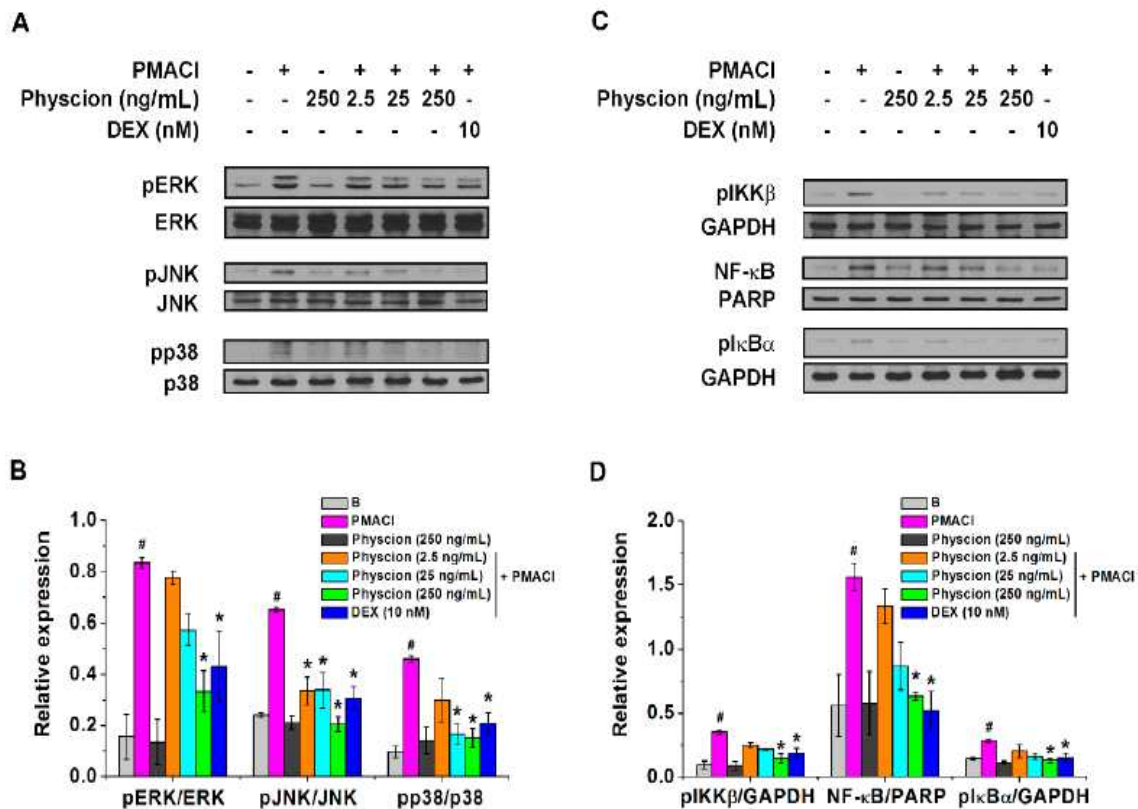
(8) AST2017-01의 활성성분인 physcion은 활성화된 비만세포 내 증가된 caspase-1과 RIP2를 억제시키는 것을 확인.

PMACI: 비만세포 활성물질; Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



(9) AST2017-01의 활성성분인 physcion은 활성화된 비만세포 내 증가된 pERK, pJNK, pp38, pIKK, NF- κ b, pI κ Ba를 억제시키는 것을 확인.

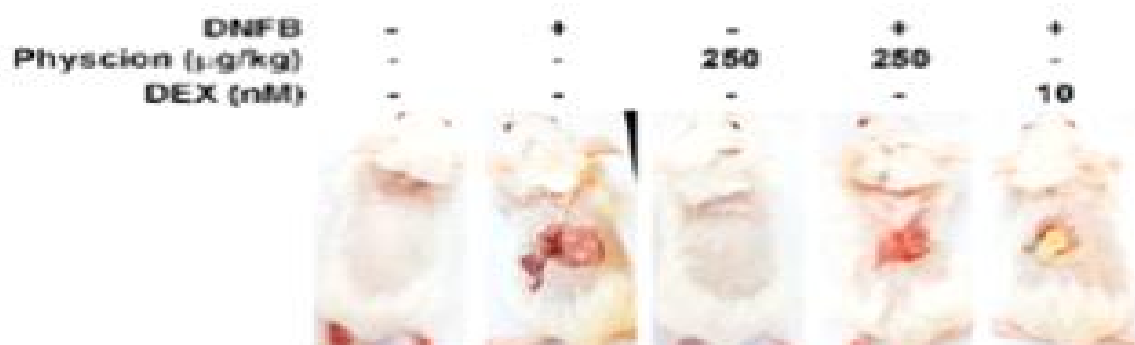
PMACI: 비만세포 활성물질; Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



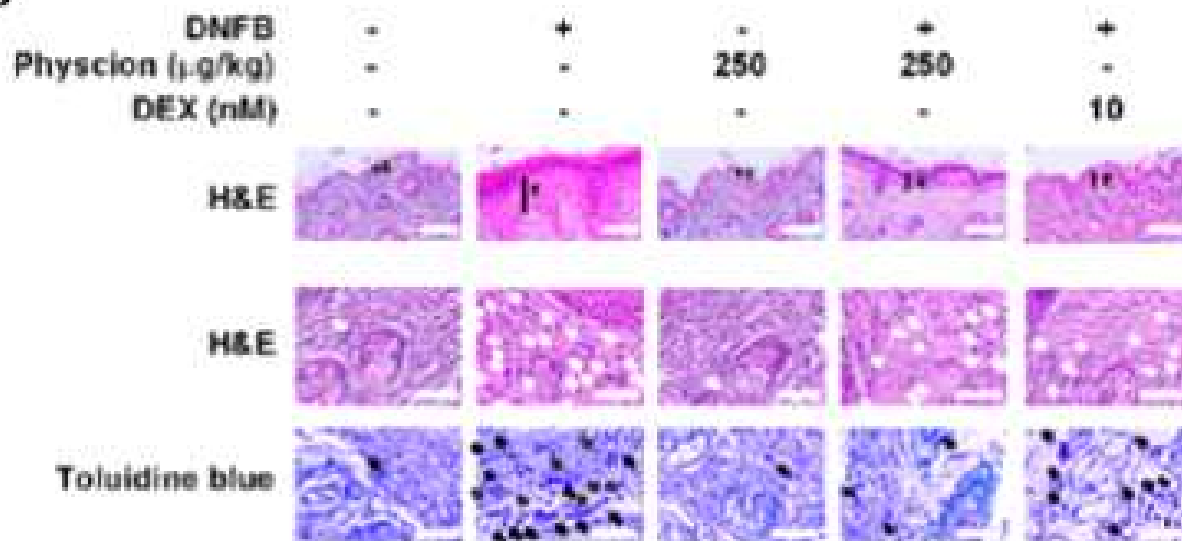
(10) AST2017-01의 활성성분인 physcion은 아토피 피부염을 유도한 후 동물모델의 피부에서 아토피 피부염 유사 피부 병변 완화되는 것을 확인.

Dexamethasone, positive control. * <0.05 .

A

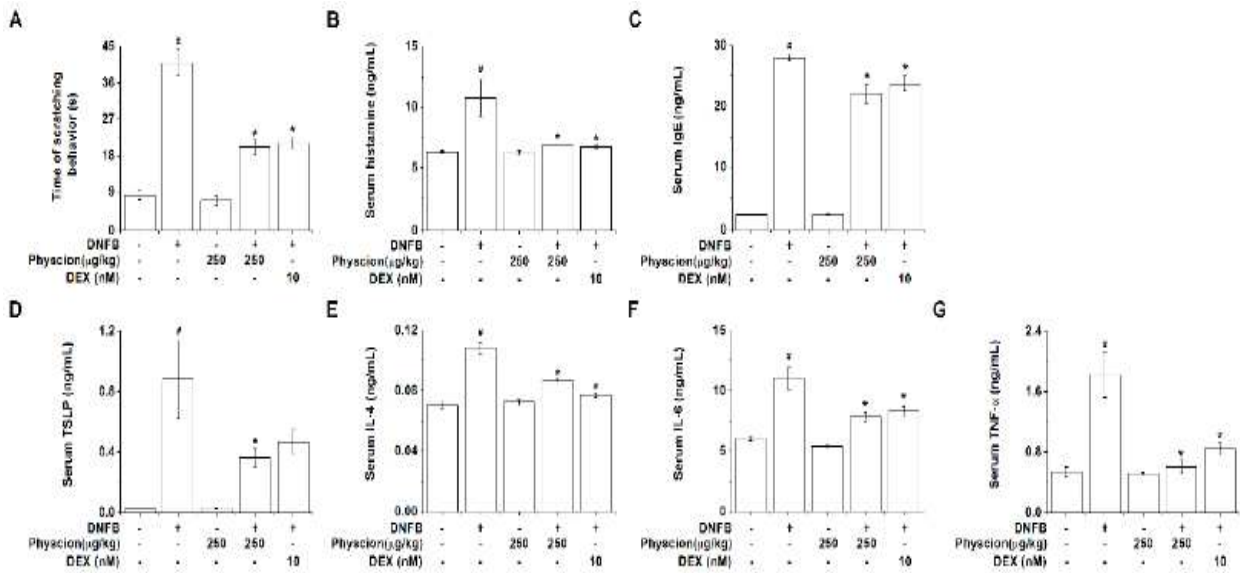


B



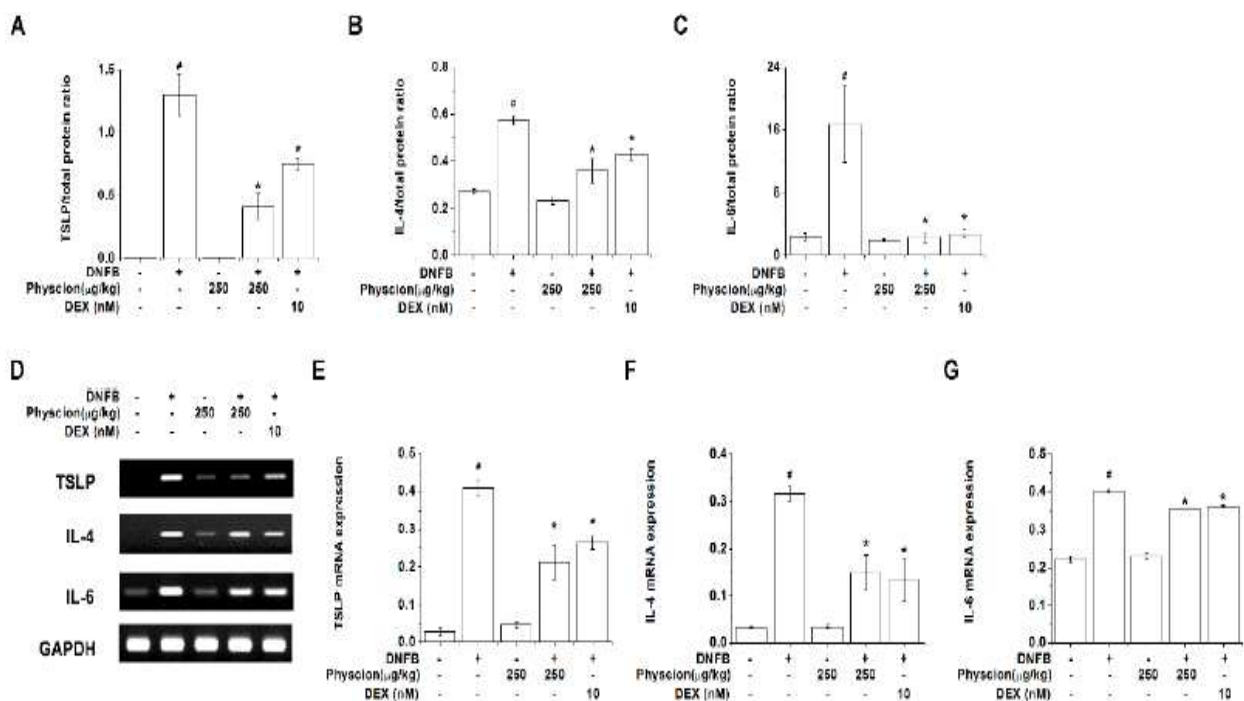
(11) AST2017-01의 활성성분인 phycion은 아토피 피부염을 유도한 후 동물 모델의 피부에서 긁는 횟수와 혈청에서 IgE, histamine, 그리고 사이토카인들이 감소하는 것을 확인.

Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



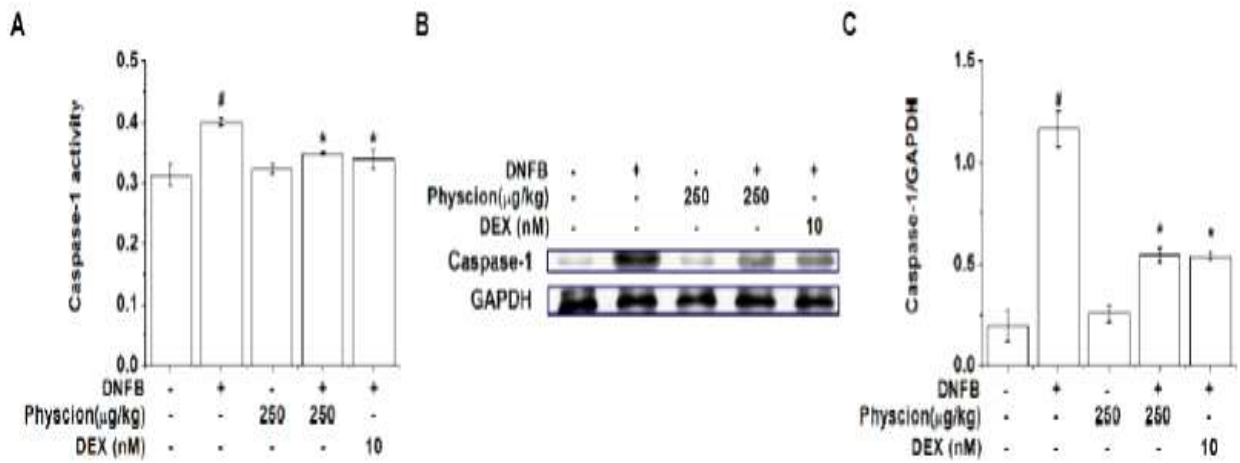
(12) AST2017-01의 활성성분인 phycion은 아토피 피부염을 유도한 후 동물 모델의 피부에서 사이토카인들이 감소하는 것을 확인.

Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



(13) AST2017-01의 활성성분인 physcion은 아토피 피부염을 유도한 후 동물 모델의 피부에서 caspase-1이 감소하는 것을 확인.

Dexamethasone, positive control. * <0.05 .



제4절 면역증진실험모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물/함유성분의 면역증진 효능 평가 (차의과학대학교)

1. 생체의 면역증진모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 효능 및 기전 평가

가. 면역반응의 정의

면역 반응(免疫反應, immune response)은 인체에 침입하는 병원체나 이물질을 제거하여 몸을 보호하는 작용이다.

인체는 수많은 병원체로 둘러싸여 있으며, 병원체로부터 끊임없이 공격을 받는다. 그러나 우리에게서 병원체의 침입을 막는 기능과 침입하더라도 이를 물리치는 방어 기능이 있어 병원체로부터 우리 몸을 보호할 수 있다.

인체의 이러한 방어 작용을 ‘면역(immunity, 免疫)’ 이라고 한다.

인체의 방어 작용(면역)은 크게 1차 방어 작용과 2차 방어 작용으로 구분한다. 1차 방어 작용은 태어날 때부터 누구나 타고나는 선천성 면역 반응이다. 선천성 면역 반응은 이전에 병원체의 침입 여부와 관계없이 감염 즉시 작동하고 병원체의 종류와 관계없이 병원체의 공통된 특성을 인식해 감지하여 동일한 방식으로 이루어지므로 ‘비특이적 방어 작용’ 이라고 한다.

1차 방어 수단이 무너지고 항원이 몸 안으로 침투하면 조금은 느리지만 효과적인 2차 방어 작용이 작동한다. 2차 방어 작용은 후천적으로 획득되는 후천성 면역 반응이다. 후천성 면역 반응은 병원체의 특정 부위만을 인식하고 이에 따라 다르게 대응하기 때문에 ‘특이적 방어 작용’ 이라고 한다.

인체의 1차 방어에는 방어벽, 식세포 작용, 항미생물 단백질, 염증 반응, 자연 살생 세포(natural killer cell) 등이 있다. 피부나 점막은 병원체의 침입을 막는 물리적인 장벽의 역할 뿐만 아니라 땀, 침, 눈물, 점액 등의 물질을 분비해 미생물의 침입을 막는다.

백혈구의 일종인 호중성 백혈구나 대식 세포는 병원체를 세포 내로 끌어들여 분해시키는 식세포 작용을 한다. 항미생물 단백질은 미생물을 죽이거나 증식을 방해하는 단백질로, 인터페론이 대표적이다. 염증 반응은 감염된 조직 부위에서 방출된 화학 물질에 의해 충혈, 부종, 통증, 열, 고름 등이 나타나는 반응이다. 자연 살생 세포는 병든 세포를 인식하여 제거해서 체내에 바이러스나 암세포가 퍼지는 것을 막아준다.

선천성 면역 반응으로 병원체의 침입을 막기가 불충분하면 2차 방어 작용인 후천성 면역 반응이 일어난다. 후천성 면역에서는 림프구의 수용체를 통해 병원체를 특이적으로 인식하고 이에 대응한다. 이러한 면역은 홍역처럼 오래 지속될 수도 있고 인플루엔자처럼 짧은 동안만 지속될 수도 있다. 후천성 면역 반응에는 T 림프구가 표적 세포를 찾아 파괴하는 과정인 세

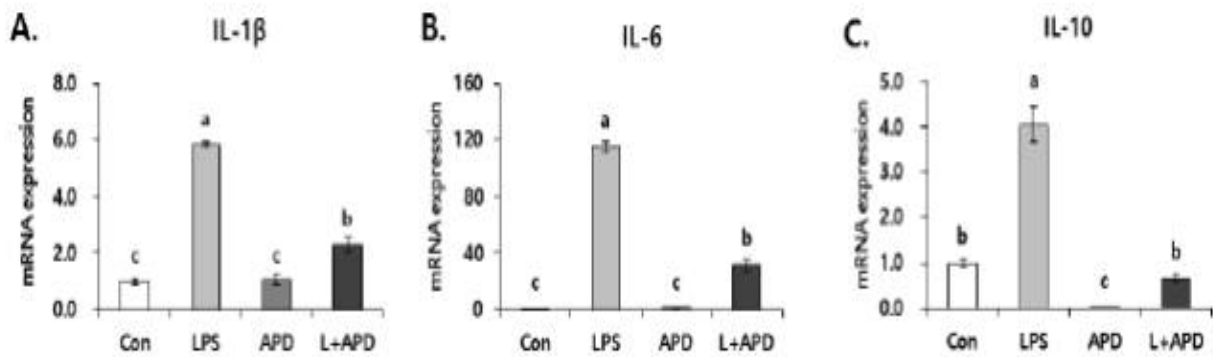
포성 면역과 B 림프구에 의해 혈액이나 림프를 통해 온몸을 순환하는 항체에 의한 체액성 면역이 있다.

나. 생체외 면역증진모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 효능 평가

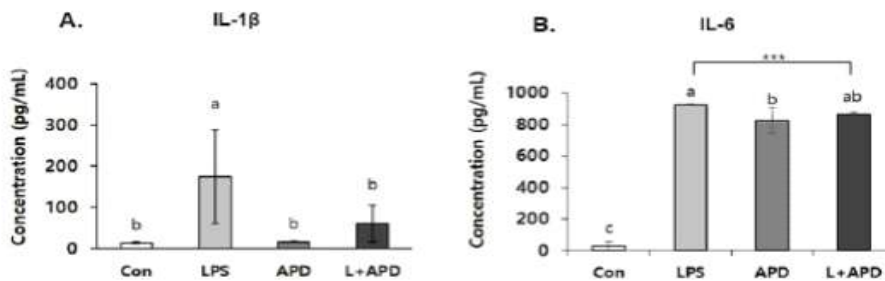
(1) 동충하초와 소리쟁이의 혼합물 음료인 APD(AST-2017-01)는 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-6, IL-10의 mRNA 수준(그림 1)과, IL-1 β , IL-6의 단백질 수준(그림 2)에서 면역반응을 억제시킨다.

또한 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 수준(그림3)을 감소시킨다.

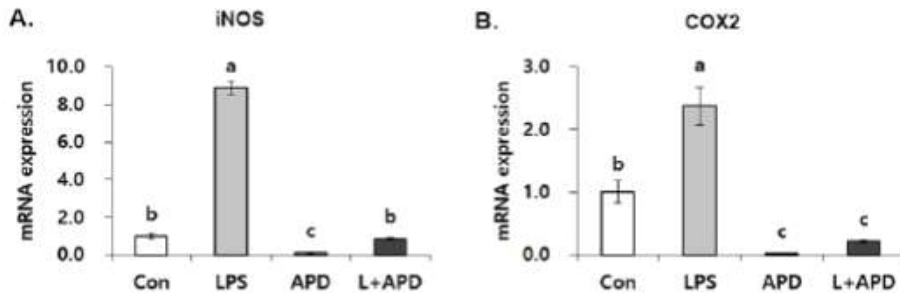
Raw 264.7 대식세포(면역세포)에 LPS를 처리하게 되면 염증반응으로 인해 면역반응을 비정상적으로 증진시키고 전염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6, IL-10 등)과 염증관련 효소(iNOS, COX-2 등)을 증가시킨다. 하지만 LPS와 APD(AST-2017-01)를 함께 처리하게 되면 LPS만 처리한 대식세포(Raw 264.7)에 비해 전염증성 사이토카인과 염증관련 효소의 발현을 감소시킨다. 따라서 APD(AST-2017-01)는 LPS로 비정상적으로 유도된 면역반응을 감소시키는데 효과가 있다.



< 그림 1. LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 APD(AST-2017-01)의 전염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, IL-10)의 mRNA의 수준 조절 >



< 그림 2. LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 APD(AST-2017-01)의 전염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6)의 단백질 수준 조절 >



< 그림 3. LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 APD(AST-2017-01)의 염증관련 효소 (iNOS, COX-2)의 mRNA 수준 조절 >

- (2) 본 연구에서는 LPS로 유도된 Th2 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, IL-10을 중심으로 관찰하였고, APD(AST-2017-01) 처리시 Th2 사이토카인이 감소하는 것을 관찰하였다.

이는 알레르기(allergy)가 발생했을 때 Th2 사이토카인이 비정상적으로 증가되는 것을 조절하기 위해서이다.

알레르기의 경우 면역반응이 과도하게 일어나 생겨나는 질병으로 LPS 처리와 유사하게 전염증성 사이토카인 중 특히 Th2 사이토카인, 염증관련 효소를 증진시킨다.

따라서 알레르기가 있을 때 APD(AST-2017-01)를 섭취하면 아마도 현재 데이터에서 제시한 Th2 전염증성 사이토카인과 염증관련 효소를 조절하여 알레르기를 조절할 가능성이 있음을 확인하였다.

2. 생체의 실험모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 면역 증진 효능 평가

가. 소리쟁이와 동충하초 혼합물의 LPS로 유도된 마우스 비장세포에서 전염증성 사이토카인의 생성 억제

(1) 소리쟁이와 동충하초 혼합물(Rc-Cs, 6:4)는 LPS를 처리한 비장세포에서 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6의 protein expression을 감소시켰다. 또한 태명청(TMC)도 Rc-Cs와 비슷한 결과가 나타났다. 하지만 아무것도 처리하지 않은 비장세포에서 Rc-Cs는 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6의 수치를 증가시켰다 (그림. 1).

만성적인 염증반응은 다양한 장기에 영향을 주고 비만, 당뇨, 심혈관계질환, 암, 치매, 천식에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 다양한 염증관련 요인 중 LPS는 포유류의 세포를 자극하고, LPS binding protein(LBP)나 toll-like receptor-4(TLR4)과 같은 단백질에 영향을 미친다.

LPS로 활성화된 TLR4는 nuclear factor κ B(NF- κ B)를 활성화 시키고, 활성화된 NF- κ B는 pro-inflammatory cytokine인 interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumornecrosis factor- α (TNF- α)와 type 1 interferon(IFN)를 활성화 시키며, 핵에서 염증관련 효소인 nitric oxide synthase(iNOS)과 cyclo-oxygenase-2 (COX-2)를 활성화 시킨다.

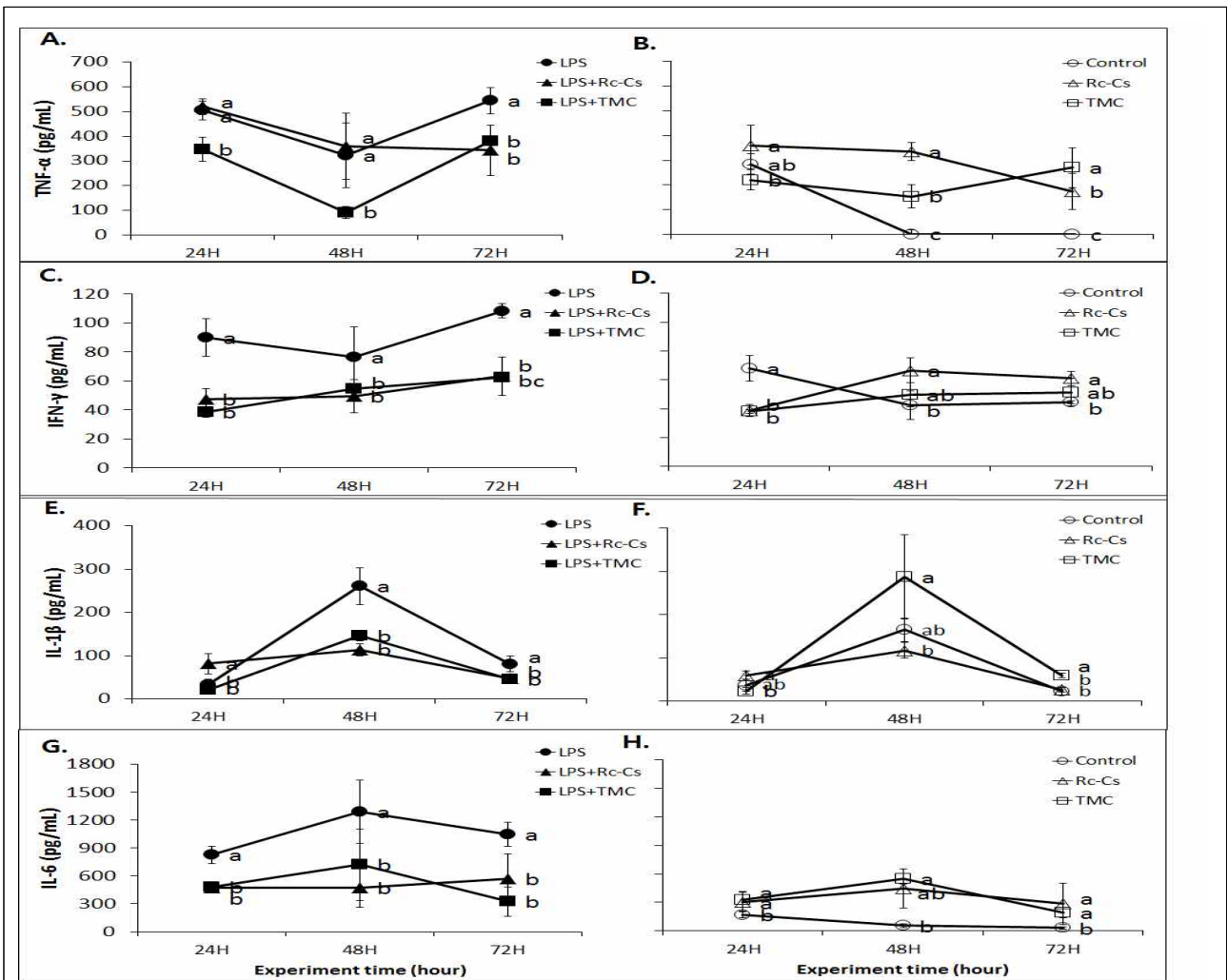
Nitric oxide(NO)는 iNOS의 생성을 증진시키고, 염증반응의 활성을 통해 reactive oxygen species(ROS)를 생성하는 것으로 알려져 있다.

또한 T helper cell(Th)은 B cell을 조절하여 염증반응과 immune response를 조절한다.

Th는 그 역할과 종류에 따라 Th1, Th2, Th17, Treg로 분류된다.

각각의 Th은 각기 다른 cytokine이 Naive T cell을 자극하여 Th로 분류되는데, 이때 역할을 담당하는 cytokine을 pro-inflammatory cytokine으로 부른다. Th1 cytokine의 주요 인자는 TNF- α 과 IFN- γ , 한편, Th2 cytokine의 주요 인자는 IL-1 β 와 IL-6가 있으며, 이러한 pro-inflammatory cytokine은 전사인자인 NF- κ B에 의해 활성화 되고, 인체의 염증반응에 관여한다.

따라서 외부 자극으로 인한 염증 관련 유전자의 활성을 억제한다면 염증으로 유도되는 다양한 질병을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.



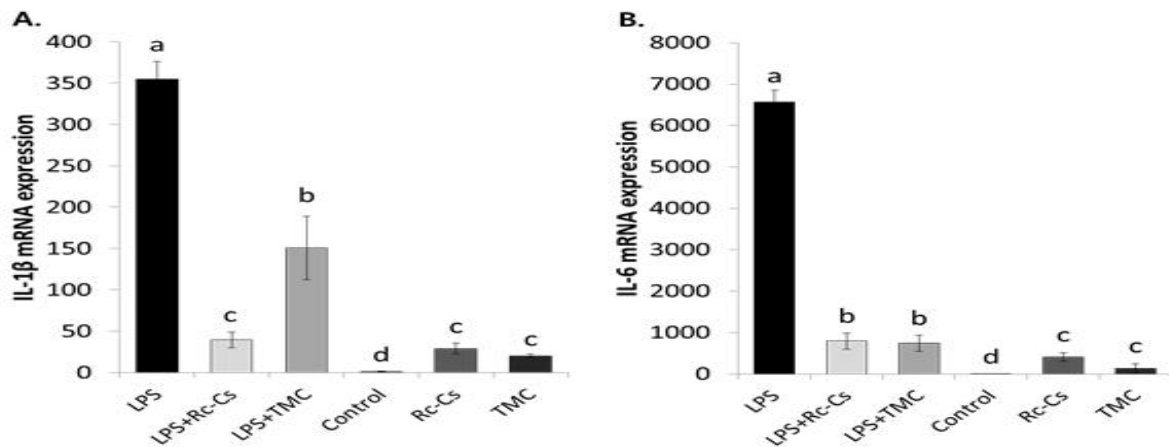
< 그림 1. Pro-inflammatory cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , and IL-6 in mice splenocytes during different incubation times >

- . LPS : 2 μ g / mL of LPS-added mice splenocytes
- . LPS+Rc-Cs : 2 μ g / mL LPS + 0.05 mg/mL of Rumex crispus and Cordyceps mixture (Rc-Cs) added mice splenocytes
- . LPS+TMC : 2 μ g / mL of LPS + 0.1 mg/mL Taemyeongcheong added mice splenocytes
- . Control : no treatment
- . Rc-Cs : 0.05 mg/mL of Rumex crispus and Cordyceps mixture (Rc-Cs) added mice splenocytes,
- . TMC : 0.1 mg/mL of Taemyeongcheong added mice splenocytes

^{a-c}Means with different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range tests.

(2) LPS로 염증이 유도된 비장세포에서 Rc-Cs는 IL-1 β , IL-6의 mRNA expression을 감소시켰다. 또한 Figure 1과 유사하게 Rc-Cs는 아무것도 처리하지 않은 비장세포에서 IL-1 β , IL-6의 mRNA expression을 증가시켰다 (그림. 2).

이는 앞선 ELISA 결과와 유사한 mRNA expression이 나타났으며, 선행연구인 Song 등의 연구와도 유사하게 나타났다. 따라서 Rc-Cs는 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인을 감소시키지만, LPS가 처리되지 않은 비장세포에서는 증가시키는 것으로 나타났다.



< 그림 2. mRNA levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 in mice splenocytes at 48 h. >

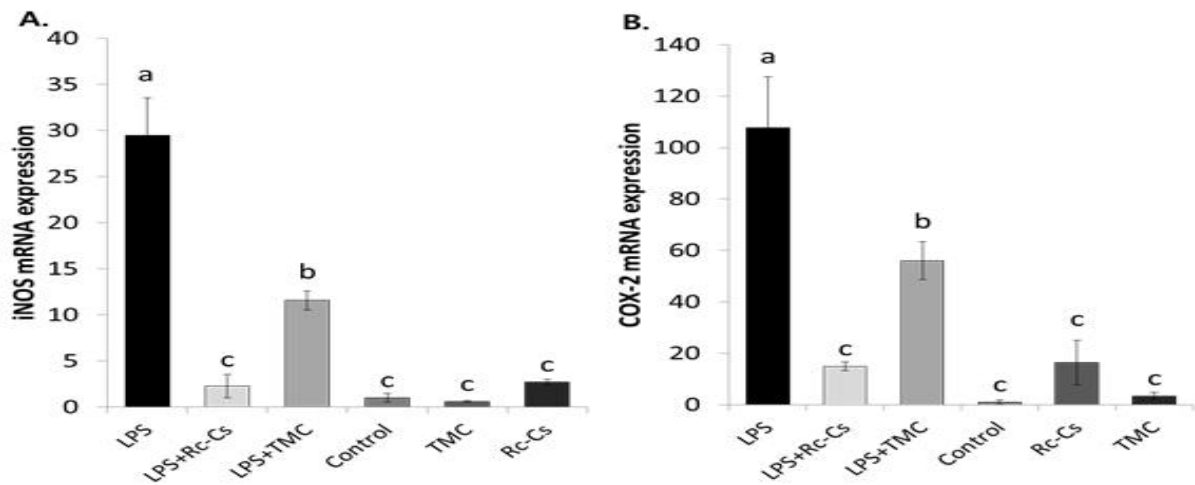
¹⁾ Abbreviations are same as shown in 그림 1.

The mRNA expression levels were calculated based on 18s rRNA, which was used as a control (control fold ratio = 1).

^{a-d} Means with different letters on the bar are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

(3) Rc-Cs는 LPS로 염증을 유도한 비장세포에서 염증관련 인자인 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시켰다. 흥미롭게도 아무것도 처리하지 않은 비장세포에서 Rc-Cs는 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 증가시키지는 않았다(그림. 3) iNOS와 COX-2는 pro-inflammatory cytokine과 마찬가지로 핵에서의 전사 인자인 NF- κ B에 의해 활성화 되며(5, 6), 다양한 염증 지표 중 중요한 인자이다.

따라서 Rc-Cs를 처리했을 때 LPS로 유도된 염증반응을 억제하지만, 아무것도 처리하지 않은 비장세포에서는 염증반응을 증가하지 않는 것으로 생각된다.



< 그림 3. mRNA levels of inflammation-related genes iNOS and COX-2 in mice splenocytes at 48 h. >

¹⁾ Abbreviations are same as shown in Figure 1.

The mRNA expression levels were calculated based on 18s rRNA, which was used as a control (control fold ratio = 1).

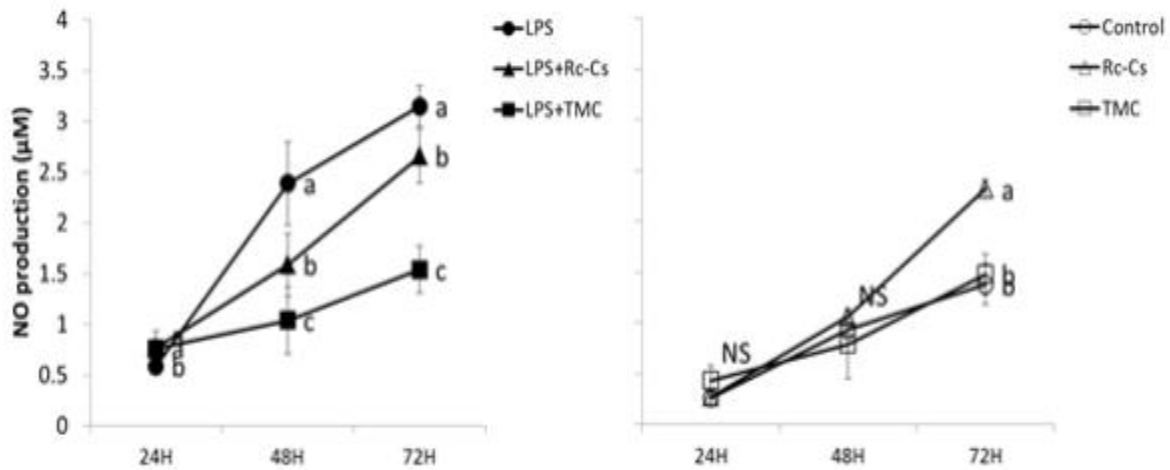
^{a-c} Means with different letters on the bar are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

(4) 앞선 결과와 마찬가지로 Rc-Cs는 LPS로 염증을 유도한 마우스 비장세포에서 NO의 생성을 억제시켰다. 하지만 아무것도 처리하지 않은 비장세포에서 NO의 생성을 증가시키지는 않았다.

TMC는 Rc-Cs와 유사한 결과를 나타내었다(그림. 4).

NO는 iNOS에 의해 활성화되며, 이 수치가 증가하면 염증반응이 증가된 것으로 볼 수 있다.

앞선 결과와 마찬가지로 Rc-Cs가 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인과 iNOS, COX-2의 수치를 감소한 것처럼 NO도 감소시켜 Rc-Cs가 LPS로 유도된 염증을 억제하는 것으로 생각된다.



< 그림 4. Nitric oxide (NO) production in mice splenocytes during different incubation times. >

1) Abbreviations are same as shown in Figure 1.

^{a-c}Means with different letters on right side of mark are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

NS : not significantly different

(5) 결론적으로, Rc-Cs는 비장세포에서 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인을 억제 하였으나, 면역세포(Th1, Th2)의 response는 조절하였다.

또한 Rc-Cs는 LPS로 유도된 염증관련인자인 iNOS와 COX-2를 억제하고, NO의 생성도 억제하였으나, LPS가 처리되지 않았을 때 이러한 인자들을 증가시키지는 않았다.

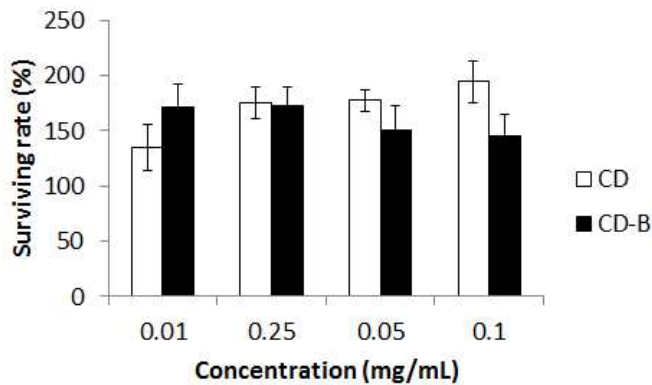
건강기능 음료인 TMC는 소리쟁이와 동충하초가 주된 원료인 건강기능음료인데, TMC도 Rc-Cs와 유사한 결과가 나타났다.

이러한 결과는 Rc-Cs가 면역세포인 Th1, Th2의 response를 조절하여 염증반응을 억제하는 것이며, Rc-Cs에 풍부하게 함유된 phytochemical인 chrysophanol와 cordycepin로 인해 LPS로 유도된 염증을 조절하는 것으로 생각된다.

따라서 자연에서 유래된 항염증 재료인 소리쟁이와 동충하초를 이용한다면 아토피, 천식, 알러지 등의 질병을 효과적으로 조절할 수 있는 약품이나 음료를 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

나. Raw 264.7 대식세포와 마우스 비장세포에서 법제한 소리쟁이의 LPS에 대한 염증 억제 증진 효과

(1) Raw 264.7 마우스 대식세포에서 소리쟁이(CD)와 법제한 소리쟁이(CD-B)는 0.01 ~ 0.1 mg/mL의 농도에서 48시간과 72시간 모두 세포독성이 나타나지 않았다(그림. 5). 따라서 0.1 mg/mL의 농도로 실험을 진행하였다.



< 그림. 5. Cytotoxicity of curly dock and curly dock with Beopje in Raw 264.7 cells. >

CD : curly dock, CD-B : curly dock with Beopje

(2) Raw 264.7 세포와 마우스의 비장세포에서 NO 생성능은 LPS 처리군이 미처리 군에 비해 48시간과 72시간 모두 유의적으로 증가하였다(Table 1,2). 그러나 LPS(48H : $2.39 \pm 0.51 \mu\text{M}$, 72H : $3.15 \pm 0.20 \mu\text{M}$)군에 비해 LPS+CD(48H : $1.48 \pm 0.23 \mu\text{M}$, 72H : $2.43 \pm 0.35 \mu\text{M}$)와 LPS+CD-B(48H : $1.06 \pm 0.04 \mu\text{M}$, 72H : $2.20 \pm 0.15 \mu\text{M}$)를 처리한 군은 NO 생성능이 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). 또한 48시간에 LPS+CD-B($1.06 \pm 0.04 \mu\text{M}$)는 LPS+CD($1.48 \pm 0.23 \mu\text{M}$)보다 NO 생성능이 유의적으로 감소하였으나($P < 0.05$), 72시간에는 큰 차이를 보이지 않았다. 소리쟁이는 폴리페놀과 플라보노이드 성분들이 풍부하고, 항산화능이 높은 것으로 보고되어 있으며, 한의학에서는 소리쟁이를 피부병, 비장질환, 임파선 질환과 여러 종양이나 암의 보조치료제로 이용하기도 한다. 소리쟁이가 LPS로 유도된 염증반응을 억제하여 NO의 생성을 감소시킨 것으로 생각된다. 또한 소리쟁이를 법제한 법제한 소리쟁이보다 NO의 생성을 더욱 억제한 것은 법제를 통해 독성을 감소시키고, 유효성분을 증진시켜 더욱 효과적으로 염증반응을 억제 한 것으로 생각된다.

Table 1. Nitric oxide(NO) production in Raw 264.7 cells by treatment of LPS, curly dock(CD) and curly dock with Beopje(CD-B) (0.1 mg/mL). (μ M)

	48H	72H
No treatment	2.13 \pm 2.77 ^{cd}	1.36 \pm 0.23 ^d
CD	4.24 \pm 0.55 ^c	4.46 \pm 0.69 ^c
CD-B	2.60 \pm 0.52 ^d	3.60 \pm 0.60 ^c
LPS	13.13 \pm 1.70 ^a	26.23 \pm 2.38 ^a
LPS+CD	14.90 \pm 1.00 ^a	21.00 \pm 1.50 ^b
LPS+CD-B	11.92 \pm 2.34 ^b	20.16 \pm 1.18 ^b

. LPS : lipopolysaccharide

. CD : curly dock(0.1 mg/mL), LPS+CD : lipopolysaccharide + curly dock(0.1 mg/mL)

. CD-B : curly dock with Beopje(0.1 mg/mL)

. LPS+CD-B : lipopolysaccharide + curly dock with Beopje(0.1 mg/mL)

^{a-d}Means(\pm SD, n=3-4) with the different letters in the same column are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 2. Nitric oxide(NO) production in mice splenocyte by treatment of LPS, curly dock(CD) and curly dock with Beopje(CD-B) (0.1 mg/mL). (μ M)

	48H	72H
No treatment	0.93 \pm 0.08 ^c	1.38 \pm 0.20 ^c
CD	1.01 \pm 0.51 ^c	1.34 \pm 0.20 ^c
CD-B	0.77 \pm 0.13 ^c	1.00 \pm 0.16 ^d
LPS	2.39 \pm 0.23 ^a	3.15 \pm 0.35 ^a
LPS+CD	1.48 \pm 0.17 ^b	2.43 \pm 0.08 ^b
LPS+CD-B	1.06 \pm 0.04 ^c	2.20 \pm 0.15 ^b

. LPS : lipopolysaccharide

. CD : curly dock(0.1 mg/mL)

. LPS+CD : lipopolysaccharide + curly dock(0.1 mg/mL)

- . CD-B : curly dock with Beopje(0.1 mg/mL)
 - . LPS+CD-B : lipopolysaccharide + curly dock with Beopje(0.1 mg/mL)
- ^{a-d}Means(\pm SD, n=3) with the different letters in the same column are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

(3) Raw 264.7 세포와 마우스의 비장세포에 LPS를 처리하면 미처리군에 비해 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 와 IL-6가 유의적으로 급격히 증가하였다 (P<0.05) (그림. 6, 7).

하지만 LPS와 함께 CD, CD-B를 처리한 군은 LPS군에 비해 각각의 사이토카인이 유의적으로 감소하였다(P<0.05).

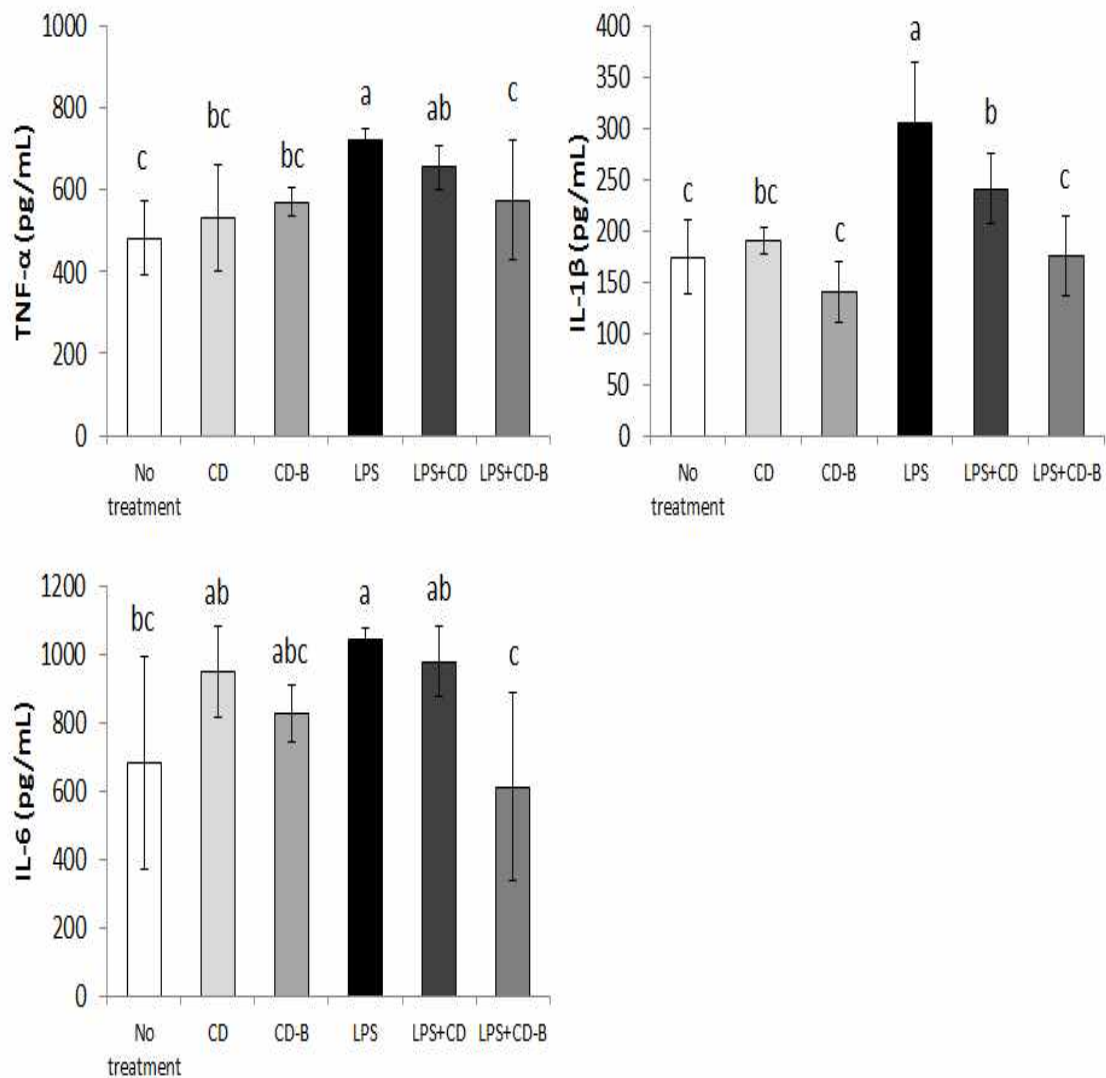
특히 IFN- γ 는 72시간에서 LPS+CD-B(76.73 \pm 21.89 pg/mL)이 LPS+CD(127.07 \pm 63.29 pg/mL)보다 감소하였다. 또한 IL-1 β 는 72시간에 LPS+CD-B(21.81 \pm 5.76 pg/mL)이 LPS+CD(75.20 \pm 16.88 pg/mL)보다 유의적으로 감소하였고(P<0.05), IL-6는 마찬가지로 72시간에 LPS+CD-B(303.96 \pm 195.50 pg/mL)이 LPS+CD(837.27 \pm 94.92 pg/mL)보다 유의적으로 감소하여(P<0.05), 소리쟁이를 법제하였을 때 법제하지 않을 때 보다 72시간에 pro-inflammatory cytokine을 현저히 감소시킨 것으로 나타났다.

면역세포에 LPS를 처리하면 염증관련 인자(TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2)가 급격히 증가하는데, 이는 LPS 자극으로 염증반응이 활발히 일어나 전반적인 염증관련 인자가 증가하는 것이다. 다른 연구에 의한 보고에 의하면 소리쟁이가 dinitrochlorobenzene(DNCB)로 아토피를 유도한 Balb/c 마우스에서 아토피 증상이 억제되고, 비장의 무게가 감소하였다.

아토피 피부염이 발생되면 Th2 사이토카인인 IL-1 β , IL-6가 증가하게 되는데, 본 연구에서도 LPS로 유도된 염증반응으로 증가된 IL-1 β , IL-6가 소리쟁이를 처리하면 감소하는 것으로 나타났다.

그리고 소리쟁이의 항산화작용으로 LPS로 유도된 Th1, 2 cytokine을 감소시키는 것으로도 생각된다.

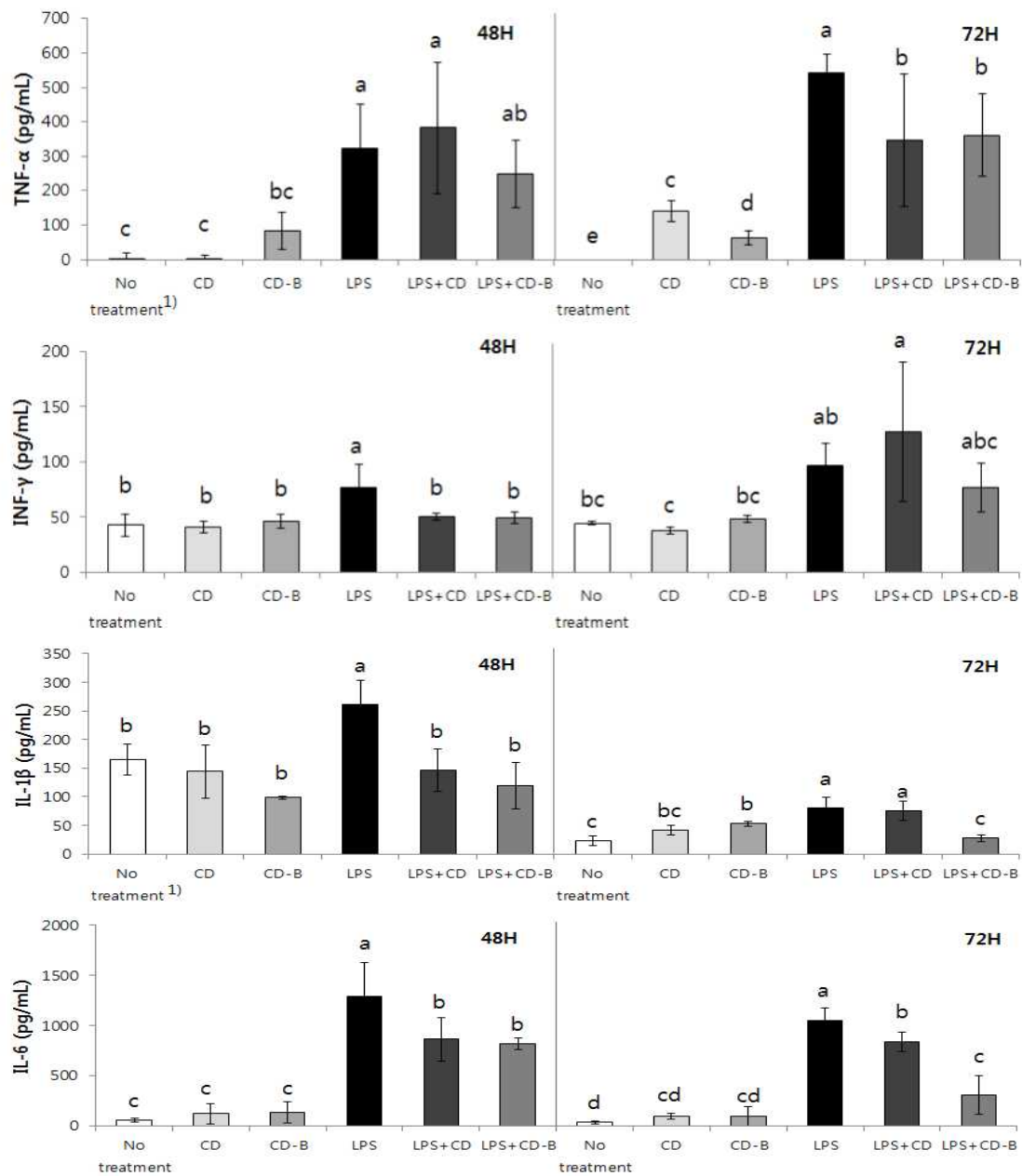
또한 법제된 소리쟁이(CD-B)는 법제되지 않은 것(CD)보다 pro-inflammatory cytokine을 감소시키는 효과가 컸으며 이는 법제를 통해 anti-nutritional한 요인은 제거하고, 인체에 유용한 물질을 증진시켜 더욱 높은 염증억제 효과를 나타낸 것으로 생각된다.



< 그림. 6 Pro-inflammatory cytokines of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in Raw 264.7 cells by the treatment of LPS, curly dock and curly dock with Beopje(48H). >

¹⁾Abbreviations are same as shown in Table 1.

^{a-c}Means (\pm SD, n=3-4) with the different letters on the bars are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.



< 그림. 7 Pro-inflammatory cytokines of TNF- α , INF- γ , IL-1 β and IL-6 in mice splenocyte by the treatment of LPS, curly dock and curly dock with Beopje. >

¹⁾Abbreviations are same as shown in Table 1.

^{a-e}Means (\pm SD, n=3) with the different letters on the bars are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

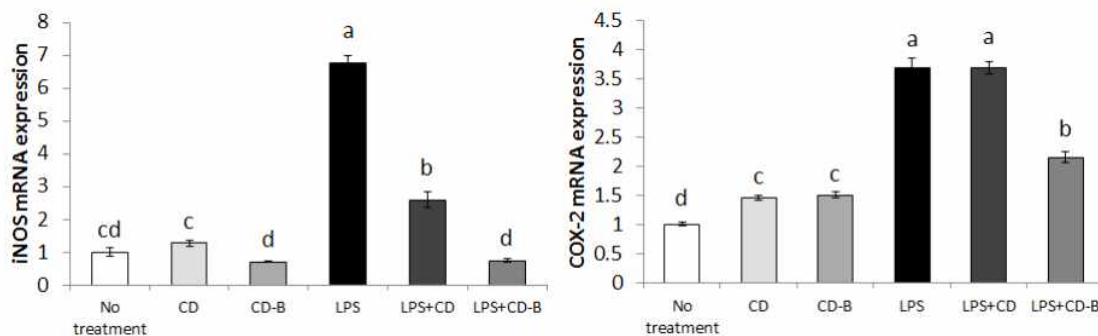
(3) iNOS와 COX-2는 pro-inflammatory cytokine과 마찬가지로 핵에서의 전사 인자인 NF- κ B에 의해 활성화 되며, 다양한 염증 지표 중 중요한 인자이다. Raw 264.7 세포와 마우스의 비장세포에 LPS를 처리하면 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현이 미처리군에 비해 급격히 증가하였다(P<0.05)(그림. 8, 9). 하지만 LPS+CD, LPS+CD-B는 미처리군과 유사한 mRNA 발현수준을 나타내어 소리쟁이와 법제된 소리쟁이가 LPS로 과발현된 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 감소시킨 것으로 나타났다(P<0.05).

특히 COX-2의 mRNA 발현의 경우 LPS+CD에 비해 LPS+CD-B가 유의적으로 감소한 것으로 나타나(P<0.05), 법제된 소리쟁이가 COX-2의 발현을 더욱 효과적으로 감소시킨 것으로 확인되었다.

Raw 264.7 cells에 LPS로 염증반응을 유도한 후 소리쟁이를 처리하면 염증반응에 관련된 β -hexosaminidase 효소를 감소시켜 염증 반응을 감소시킨다.

연구에 의하면 arachidonic acid(AA)로 ICR 마우스에 염증반응을 일으킨 후 소리쟁이를 섭취하면 소리쟁이를 섭취하지 않은 군에 비해 부종을 감소시켰다. AA는 COX pathway를 거쳐 prostlandins(PG)과 leukotrienes이 염증반응을 유도하는데, 본 연구에서도 소리쟁이가 LPS로 유도된 COX-2의 mRNA 발현을 억제시켜 염증반응을 억제하였고, iNOS까지 감소시켜 이전 연구와 유사한 염증 억제효과를 확인하였다.

특히 법제한 소리쟁이는 법제하지 않는 것 보다 COX-2의 발현을 더욱 효과적으로 감소시켰다.



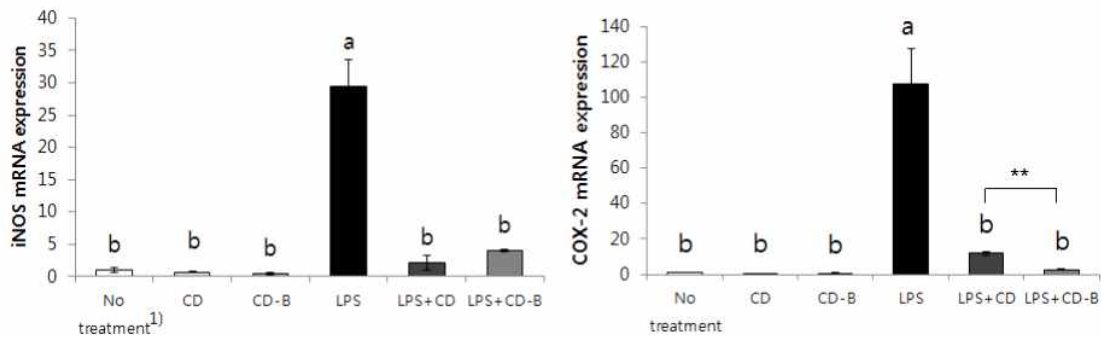
< 그림. 8 mRNA expression of inflammation related genes (iNOS and COX-2) in Raw 264.7 cells by the treatment of LPS, curly dock and curly dock with Beopje(48H). >

1) Abbreviations are same as shown in Table 1.

The mRNA expression levels were calculated based on 18S rRNA, which was used as a control(no treatment fold ratio = 1). Student t-test(** P<0.01).

^{a-d}Means(\pm SE, n=4) with the different letters on the bars are

significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



< 그림. 9 mRNA expression of inflammation related genes (iNOS and COX-2) in mice splenocyte by the treatment of LPS, curly dock and curly dock with Beopje(48H). >

¹⁾Abbreviations are same as shown in Table 1.

The mRNA expression levels were calculated based on 18S rRNA, which was used as a control(no treatment fold ratio = 1). Student t-test(** $P < 0.01$).

^{a,b}Means(\pm SE, $n=4$) with the different letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

- (4) 결론적으로, 법제는 우리나라의 전통적인 방법으로 독성은 제거하고 유용한 물질을 높인다. 콩을 법제하게 되면 anti-nutritional 요인인 tannin, phytic acid, trypsin inhibitor를 감소시키고 소리쟁이의 유용성분은 폴리페놀, 플라보노이드, 사포닌, chrysophanol, emodin, anthraquinone 등이 알려져 있는데, 법제를 하면 이러한 유용한 성분이 증가하게 되고, 본 연구실의 연구에 의하면 소리쟁이를 법제하면 chrysophanol이 1.7배 증가하는 것으로 나타나(data not shown), 이로 인해 더욱 높은 항염증 효과를 나타낸 것으로 생각된다. 따라서 이러한 부분에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

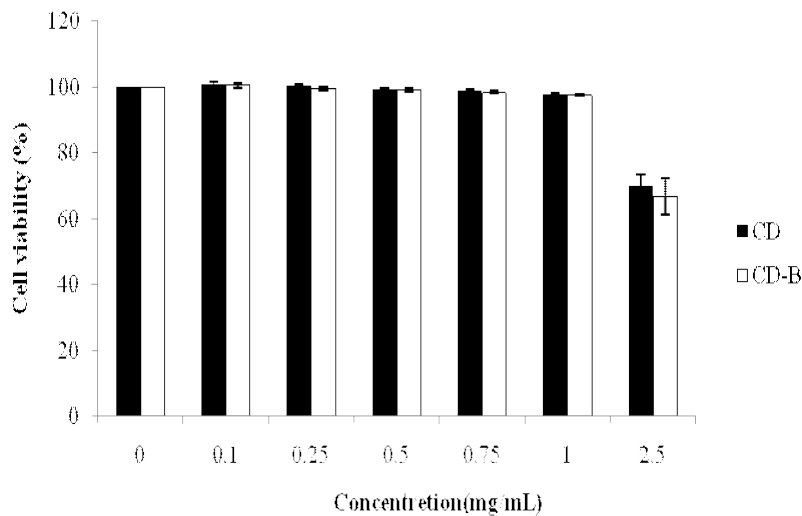
3. 생체내 동충하초와 소리쟁이 혼합물 및 성분들의 면역증진 기전 평가

가. LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 법제 소리쟁이(*Rumex crispus L.*)추출물의 항염증 효과

(1) 0.1~1 mg/mL 농도에서 대조군과 비교하였을 때, CD와 CD-B 는 Raw 264.7 세포의 성장에 유의한 영향을 미치지 않았다($p>0.05$). 이는 CD 및 CD-B 추출물이 0.1~1 mg/mL 농도 범위 내에서 세포 독성이 없음을 의미한다.

그리고 세포 생존율은 1 mg/mL 농도에서 CD, CD-B 각각 $97.7 \pm 0.6\%$ 와 $97.6 \pm 0.3\%$ 임을 확인하였다.

2.5 mg/mL 농도에서 CD와 CD-B를 대조군과 비교하였을 때, Raw 264.7 세포 생존율을 현저히 감소시키는 것을 확인하였고, 그 차이는 통계적으로 유의하였다($p<0.001$).



< 그림 1. Effect of curly dock and curly dock with Beopje on viability of RAW 264.7 cell line. >

CD: curly dock, CD-B: curly dock with Beopje.

(2) 염증 반응 시에 대식세포, 호중구 및 수지상 세포와 같은 면역세포에 의해 NO(nitric oxide)등이 생성되며, 이렇게 생성된 NO는 사이토카인 및 Th 세포의 증식을 조절하는데 중요한 역할을 한다.

그렇기 때문에 NO는 아토피와 관련된 염증의 지표로 사용되기도 한다.

NO 생성능에 대한 본 연구결과를 보면(Table 4) LPS 처리군 ($45.01 \pm 1.03 \mu\text{M}$)보다 LPS+CD ($35.08 \pm 1.38 \mu\text{M}$), LPS+CD-B ($27.19 \pm 1.19 \mu\text{M}$)군

이 더 낮은 결과 값을 보였으며, 그 중 특히 LPS+CD-B가 염증 반응을 감소시키는데 좀 더 효과적이었다.

Table 1. Nitric oxide production in mice splenocyte by treatment of LPS, curly dock, and curly dock with Beopje.

No	Treatment	NO production μM
	No Treatment	1.31 \pm 0.13 ^e
	CD	3.18 \pm 0.20 ^d
	CD-B	3.12 \pm 0.15 ^d
	LPS	45.01 \pm 1.03 ^a
	LPS+CD	35.08 \pm 1.38 ^b
	LPS+CD-B	27.19 \pm 1.19 ^c

- . No Treatment, cells treated with media
- . CD: curly dock (1 mg/mL)
- . CD-B: curly dock with Beopje (1 mg/mL)
- . LPS: lipopolysaccharide (2 μg / mL)
- . LPS+CD: lipopolysaccharide+curly dock (1 mg/mL)
- . LPS+CD-B: lipopolysaccharide +curly dock with Beopje (1 mg/mL)

(3) Raw 264.7 세포에서의 IL-6, IL-10, IL-1 β 와 TNF- α 사이토카인의 발현이 LPS군에서 가장 높았다.

그리고 Raw 264.7 세포에 소리쟁이와 법제한 소리쟁이를 처리한 후, IL-6, IL-10, IL-1 β 와 TNF- α 염증성 사이토카인의 발현 수준을 확인하였을 때, 그 수준이 감소하였으며, 각 군 간의 차이는 매우 유의하였다(p<0.05)

(그림. 2). 따라서 소리쟁이가 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도된 전염증성 비해 항염증 효과가 더 우수하다고 하겠다.

염증성 사이토카인은 염증의 정도를 확인할 수 있는 정량적 지표로 활용할 수 있다. 본 연구에서 관찰한 IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF- α 중에서 IL-1 β , TNF- α 는 염증 반응의 개시 인자로서 작용한다.

TNF- α 는 면역세포에서 중요한 전염증성 사이토카인으로 IL-1 β , IL-6 등의 생성을 유도하여 발열반응과 세포사멸(apoptosis)과정을 통해 염증의 발생을 유도한다.

뿐만 아니라 NF- κ B를 활성화시켜 염증반응을 유발하기도 한다.

따라서, TNF- α 가 적정수준 이상으로 존재하게 되면 여러 질병의 발생과 밀접한 연관을 가지게 된다.

IL-6는 체액성 면역반응(humoral immune response)에 관여하는 T helper 2(Th2)세포에서 분비되는 사이토카인으로, T 림프구의 분화와 증식, 항체 생산을 촉진시키고, 과립구의 발현을 증가시켜 인체 염증반응을 일으킨다.

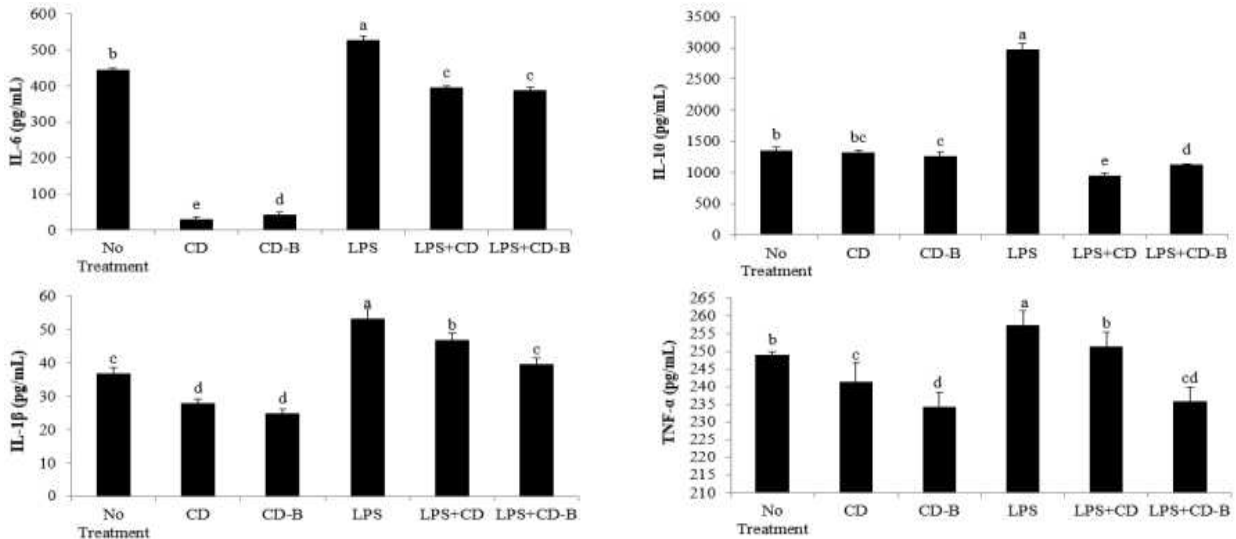
체내에 염증이 발생하면 많은 양의 IL-6가 방출되어 LPS와 IL-1 β 에 Positive control로 작용한다.

단핵대식세포는 NF- κ B, p65, p50을 활성화시켜 LPS를 활성화시키는데 이는, IL-10 유전자의 전사를 활성화시키고 다양한 내외인성 요인에 의해 IL-10을 분비하며 T helper 2(Th2) 또한 IL-10을 생산한다.

분화되지 않은 T cell(Th0)가 알레르기 항원에 노출되면 면역 반응에 관여하는 Th1, Th2로 분화된다.

이와 동시에 Th2를 자극하는 IL-1 β 가 분비되어 Th2의 생성을 촉진시킨다. 그리고 IL-1 β 는 호중구를 끌어당겨 염증인자의 방출을 유도하는 사이토카인이기도 하다.

LPS를 처리함으로써 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 불균형을 유발해 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 수준을 증가시킬 수 있다.



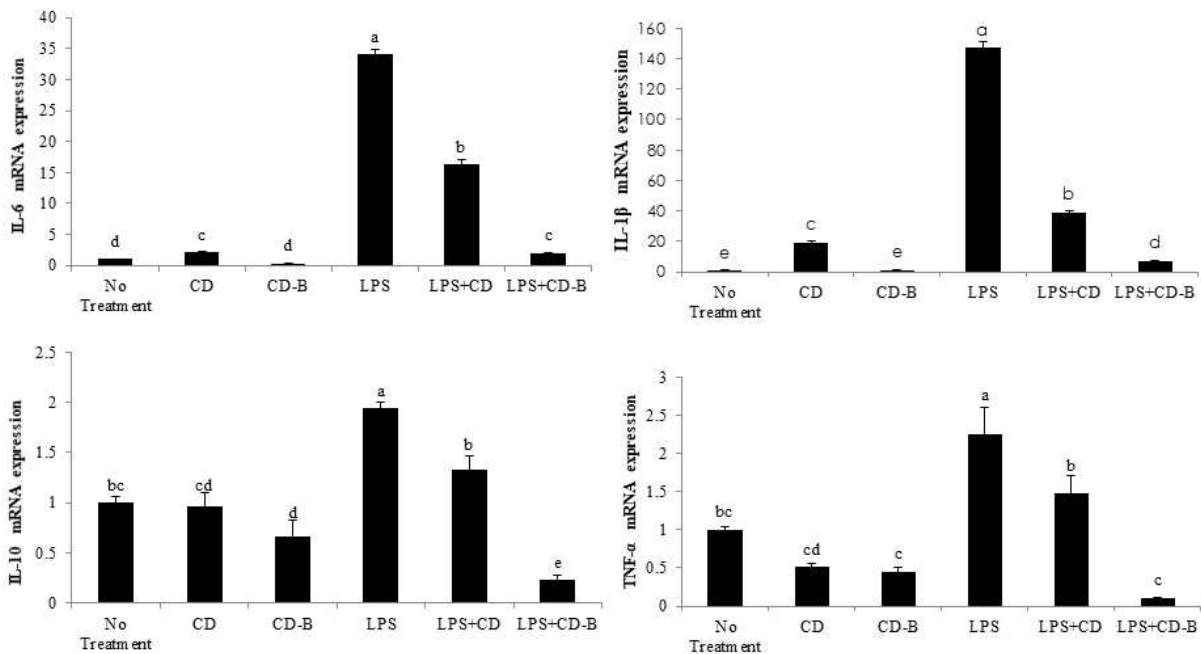
< 그림 2. Pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF- α concentrations in cell media of RAW 264.7 cell line by the treatment of LPS, curly dock, and curly dock with Beopje. >

- . No Treatment, cells treated with media
- . CD : curly dock (1 mg/mL)
- . CD-B : curly dock with Beopje (1 mg/mL)

- . LPS: lipopolysaccharide (2 μ g / mL)
- . LPS+CD: lipopolysaccharide+curly dock (1 mg/mL)
- . LPS+CD-B: lipopolysaccharide +curly dock with Beopje (1 mg/mL)
- . a-d Means with the different letters right side of mark are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.a-d Means with the different letters right side of mark are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

(4) Raw 264.7 세포에서 IL-6, IL-1 β , IL-10과 TNF- α 의 mRNA 발현은 LPS 처리군에서 가장 높았고, LPS + CD군과 LPS + CD-B에서 유의하게 낮았다($p < 0.05$) (그림. 3).

LPS를 처리하지 않은 군의 경우, IL-10과 TNF- α 의 mRNA 발현은 아무것도 처리하지 않은 군보다 낮았다.



< 그림 3. mRNA expression of IL-1 β , TNF- α IL-6 and IL-10 in cell media of RAW 264.7 cell line by the treatment of LPS, curly dock, and curly dock with Beopje. >

- . Values presented are the means \pm standard deviation (N=3/group).
- . No Treatment, cells treated with media
- . CD : curly dock (1 mg/mL)
- . CD-B : curly dock with Beopje (1 mg/mL)

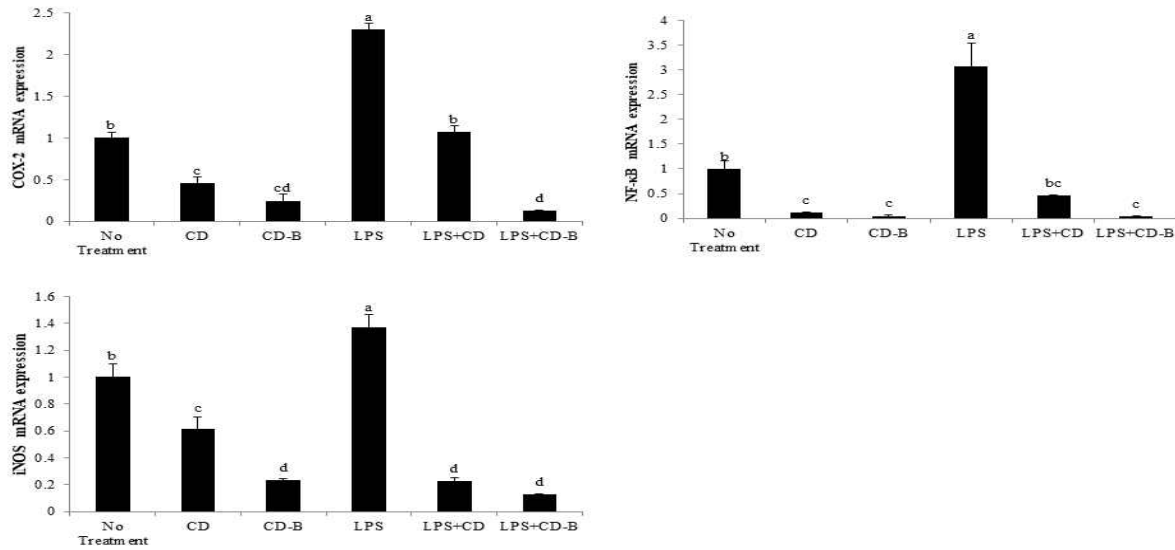
- . LPS: lipopolysaccharide (2 μ g / mL)
- . LPS+CD : lipopolysaccharide+curly dock (1 mg/mL)
- . LPS+CD-B: lipopolysaccharide +curly dock with Beopje (1 mg/mL)
- . a-f Mean values with different letters in the same bars are significantly different ($p < 0.05$) and those with the same letter in the same column are not significantly different ($p > 0.05$) according to Duncan' s new MRT.

(5) COX-2, NF- κ B, iNOS의 mRNA 발현 수준은(Fig. 16) LPS를 처리한 군의 mRNA 발현이 다른 군과 비교하였을 때, 유의적으로 상승한 것을 확인할 수 있다($p < 0.05$).

소리쟁이를 처리한 군과 법제한 소리쟁이를 처리한 Raw 264.7 세포에서의 COX-2, NF- κ B, iNOS의 mRNA 발현 수준은 LPS를 처리하지 않은 군과 LPS를 처리한 군에서 보다 그 양이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$).

이 실험에서, 2 μ g/mL의 LPS를 처리하는데 이렇게 처리한 LPS가 대식세포를 자극하게 되고, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 의 발현을 유의적으로 증가시키는데 ELISA 결과를 보면 염증 유발인자가 상대적으로 발현된 것을 보여준다 그리고 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10에 대한 mRNA의 발현량 역시 증가한 것을 볼 수 있으며 이는 이미 세포가 심한 염증반응을 일으키고 있다는 것을 말하고 이러한 상태의 세포에 소리쟁이와 법제한 소리쟁이를 처리함으로써 염증반응이 확실히 줄어든 것을 볼 수 있다.

따라서 소리쟁이와 법제한 소리쟁이가 염증반응을 억제하는데 효과가 있다고 말할 수 있으며, 특히 법제한 소리쟁이가 항염증에 좀 더 뛰어난 효과를 나타낸다고 할 수 있다.

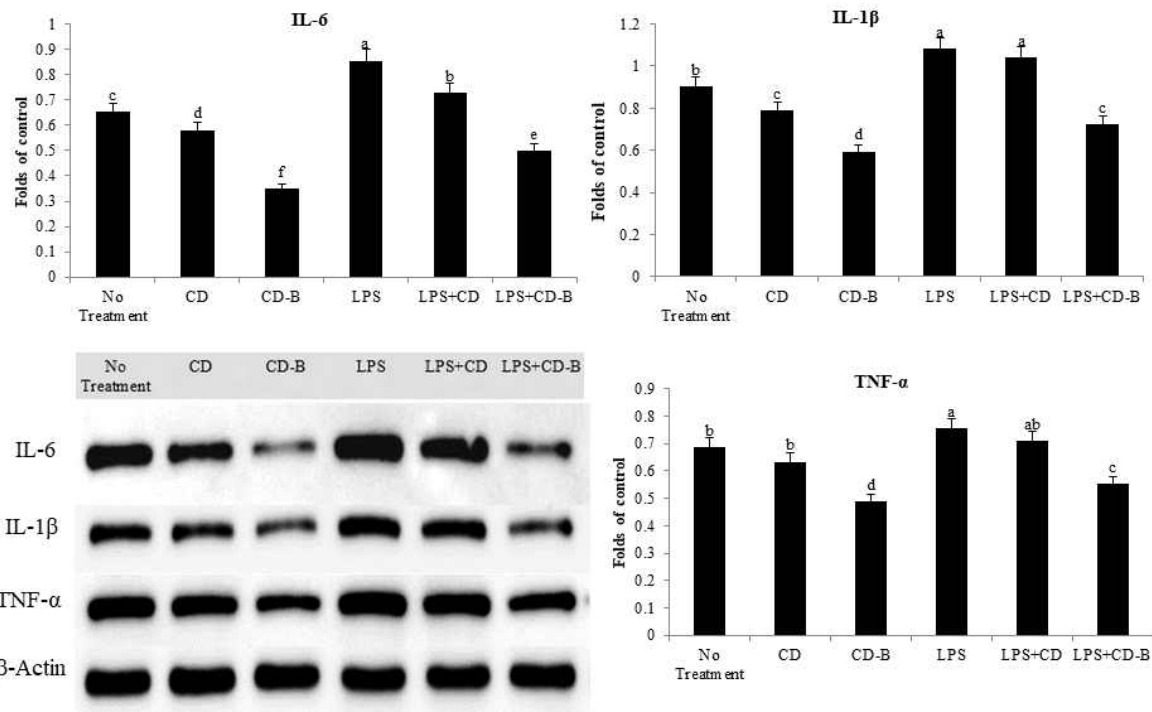


< 그림. 4 mRNA expression of NF- κ B, iNOS and COX-2 of RAW 264.7 cell line by the treatment of LPS, curly dock, and curly dock with Beopje. >

- . No Treatment, cells treated with media
- . CD : curly dock (1 mg/mL)
- . CD-B: curly dock with Beopje (1 mg/mL)
- . LPS: lipopolysaccharide (2 μ g / mL)
- . LPS+CD: lipopolysaccharide+curly dock (1 mg/mL)
- . LPS+CD-B: lipopolysaccharide +curly dock with Beopje (1 mg/mL)
- . Values presented are the means \pm standard deviation (N = 3/group).
- . a-e Mean values with different letters in the same bars are significantly different ($p < 0.05$) and those with the same letter in the same column are not significantly different ($p > 0.05$) according to Duncan' s new MRT.

(6) 그림 5.를 보면, 법제한 소리쟁이를 처리한 군의 경우, LPS를 처리하지 않은 군에 비해 Raw 264.7 세포에서의 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 단백질 발현 정도가 훨씬 약했다.

LPS를 처리한 Raw 264.7 세포에서도 LPS+CD-B군이 LPS, LPS+CD군에 비해 유의적으로 감소한 것을 관찰할 수 있다($p < 0.05$).



< 그림 5. IL-1 β , TNF- α and IL-6 protein expressions of RAW 264.7 cell line by the treatment of LPS, curly dock, and curly dock with Beopje. >

- . No Treatment, cells treated with media
- . CD : curly dock (1 mg/mL)
- . CD-B: curly dock with Beopje (1 mg/mL)
- . LPS: lipopolysaccharide (2 μ g / mL)
- . LPS+CD: lipopolysaccharide+curly dock (1 mg/mL)
- . LPS+CD-B: lipopolysaccharide +curly dock with Beopje (1 mg/mL)
- . Values presented are the means \pm standard deviation (N = 3/group).
- . a-e Mean values with different letters in the same bars are significantly different ($p < 0.05$) and those with the same letter in the same column are not significantly different ($p > 0.05$) according to Duncan' s new MRT.

(7) Raw 264.7 세포의 NF- κ B, iNOS, COX-2 단백질 발현은 CD-B군에서 가장 약했고, LPS군에서 가장 강하게 나타났다. CD, CD-B, LPS + CD, LPS + CD-B군 모두에서 NF- κ B, iNOS, COX-2 단백질 발현을 어느 정도 약화시켰으나, CD-B군과 LPS + CD-B군이 CD군과 LPS + CD군에 비해 더 두드러지는 것을 볼 수 있다 (그림. 6).

NF- κ B 억제제인 PDTTC는 주로 NF- κ B의 활성을 억제하고, PDTTC의 농도에 따라 염증 관련 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 발현과 분비가 상대적으로 억제될 수 있다고 알려져 있다.

TNF- α , IL-1 β , IL-6의 유전자 promotor는 NF- κ B와 결합할 수 있는 결합부위를 갖는데, 이들의 발현은 NF- κ B에 의해 활성이 조절된다는 것을 확인하였다.

NF- κ B 발현을 억제하면 이와 연관된 염증성 사이토카인의 분비를 억제할 수 있다고 보고되고 있다.

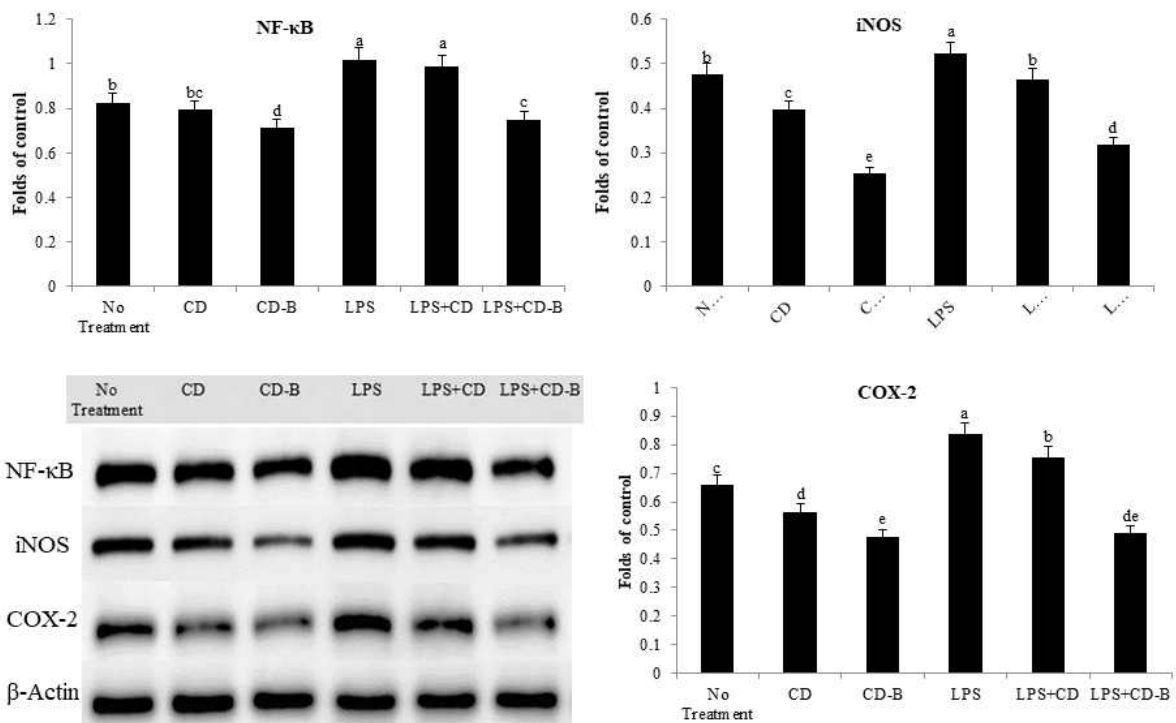
이러한 연구를 보면 소리쟁이와 법제한 소리쟁이가 NF- κ B의 발현을 억제하여 LPS에 의해 자극받은 대식세포에서도 염증인자의 분비를 억제 하는 것이라고 생각된다.

NF- κ B 신호전달경로는 RAW 264.7 세포의 LPS 자극에 의한 염증인자를 분비하는데 중요하게 작용하며, iNOS, COX-2와 같은 전염증성 효소의 발현에도 중요한 작용을 한다고 알려져 있다.

NF- κ B의 발현량이 높은 경우 치명적인 염증성 손상을 일으킬 수 있다.

정상적인 경우 NF- κ B는 동중이량체 또는 이중이량체의 형태로 세포질에 존재하지만, LPS에 의해 자극이 가해지면, I κ B의 인산화로 분해되어 염증성 사이토카인을 분비한다.

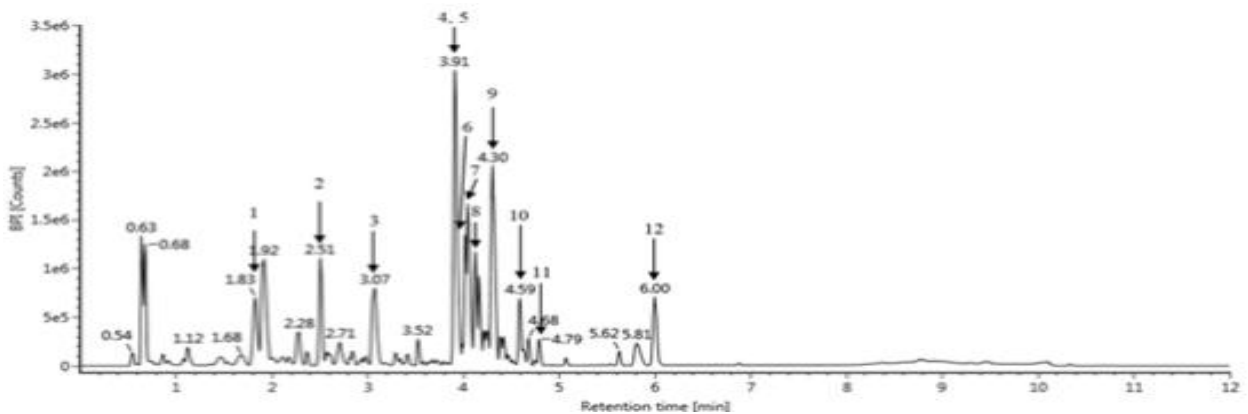
COX-2의 경우 중요한 염증성 지표이다. 염증에 의해 세포에 손상이 발생하면 COX-2가 다량 발현되고 이로 인해 NF- κ B가 활성화되어 COX-2를 포함한 iNOS와 같은 다양한 염증성 사이토카인이 분비된다.



< 그림 6. NF- κ B, iNOS and COX-2 protein expressions of RAW 264.7 cell line by the treatment of LPS, curly dock, and curly dock with Beopje. >

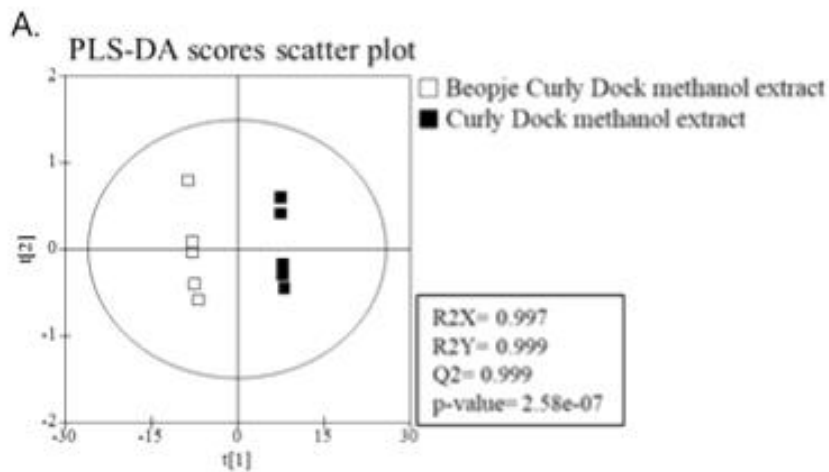
- . No Treatment, cells treated with media
- . CD : curly dock (1 mg/mL)
- . CD-B: curly dock with Beopje (1 mg/mL)
- . LPS: lipopolysaccharide (2 μ g / mL)
- . LPS+CD: lipopolysaccharide+curly dock (1 mg/mL)
- . LPS+CD-B: lipopolysaccharide +curly dock with Beopje (1 mg/mL)
- . Values presented are the means \pm standard deviation (N = 3/group).
- . a-e Mean values with different letters in the same bars are significantly different (p < 0.05) and those with the same letter in the same column are not significantly different (p > 0.05) according to Duncan' s new MRT.

(8) 그림 7.은 UPLC-Q-TOF MS 분석을 사용하여 ion chromatogram을 통한 CD와 CD-B 메탄올 추출물의 총 이온 크로마토그램이다. 소리쟁이 추출물을 LC/MS로 분석한 data sets을 다변량 통계 분석하여 PLS-DA로 시각화한 결과 (그림. 8A) PLS-DA quality parameter인 R2X, R2Y, Q2 값이 각각 대략 0.998, 0.999, 0.999로 매우 높으며 permutation test를 이용하여 교차 검증한 결과 (그림. 8B) R2와 Q2값이 -0.1 이하로 낮아 본 실험을 통해 얻어진 PLS-DA models은 통계적으로 문제가 없는 것으로 확인되었다.

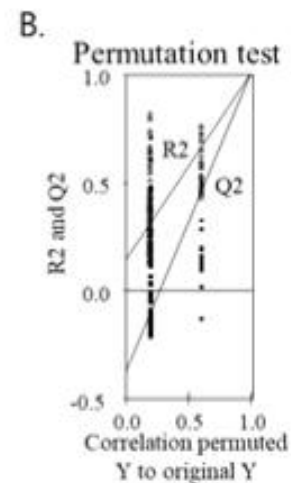


< 그림 7. Total ion chromatogram of curly dock and Beopje curly dock methanol extracts in negative ion mode. >

- . 1 : aloesin
- . 2 : cianidanol / catechin
- . 3 : (-)-CATECHIN GALLATE
- . 4 : 2-Acetyl-8-hydroxy-3-methyl-1-naphthyl beta-D-glucopyranoside
- . 5 : thalassiolinC
- . 6 : Nodakenin / Ammijin / Torachryson 8-O-glucoside / tinnevellin glucoside
- . 7 : 7-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-8-ylhexopyranoside / apigenin / beta-genistin / vitexin
- . 8 : chrysophanol+glucose
- . 9 : 2,2'-[(9-Oxo-9H-fluorene-2,7-diyl)bis(oxy)]diacetate
- . 10 : cochinelide β -glucopyranoside / rhaponticin;
- . 11 : chrysophanol;
- . 12 : 4,4'-Carbonyldibenzoic acid / 4-benzoylphthalic acid



< 그림 8A. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) score plots of curly dock and Beopje curly dock >



< 그림 8B. analyzed using gas chromatography-mass spectrometry. The qualification of the PLS-DA models was evaluated with R2X, R2Y, Q2, and P value, and validated by cross validation with a permutation test >

(9) CD, CD-B 추출물의 대사산물의 차이를 시각화하기 위해 boxplot이 사용되었으며 (그림. 9) 데이터를 Z value로 환산 heat map(그림. 10)을 작성하였다. Boxplot 결과(그림. 10)을 보면 11개의 대사산물에서 CD와 CD-B 사이에 유의적 차이를 보였으며, CD-B가 CD보다 더 높은 함량을 보였다. heatmap(그림. 10) 또한 4,4'-Carbonyldibenzoic acid, 4-benzoylphthalic acid을 제외한 나머지 대사산물에서 CD-B가 CD보다 상대적으로 높은 함량을 나타냄을 확인할 수 있다.

Aloesin은 알로에의 활성성분으로, DSS로 유도된 Sprague Dawley rat 대장염 모델에서 대조군과 비교하여 aloesin을 처리한 그룹이 대장염 발현에 있어 염증 관련 유전자인 TNF- α , IL-1 β mRNA의 발현이 현저히 감소하였다.

Cianidanol은 Uncariu Gambir과 식물에서 추출한 플라보노이드 화합물로 에탄올, 사염화탄소, galactosamine, phalloidin 및 기타 독성화합물에 의한 간독성을 감소시켰다.

또한 세포면역을 증가시키는 강력한 free radical 소거제 인 것으로 밝혀졌다.

카테킨은 항암, 항종양, 항돌연변이, 항염증 등과 같은 여러 약리학적 작용을 하는 물질로 알려져 있다.

(-)-CATECHIN GALLATE는 신경, 특히 β -amyloid에 의해 유발된 염증에 대한 보호 효과가 있다는 것이 연구되었다.

또한, (-)-CATECHIN GALLATE는 지방세포의 포도당 흡수를 억제하여 지방세포의 성장을 억제 할 수 있다.

Nodakenin은 Angelicae gigas뿌리에서 추출한 물질로 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 항염증 효과가 있어 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 등의 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것으로 보고되어있다.

분자학적 관점으로 볼 때, Nodakenin이 I κ B- α 분해 및 I κ B kinase- α/β 인산화를 억제하여 최종적으로 NF- κ B의 전사를 억제한다.

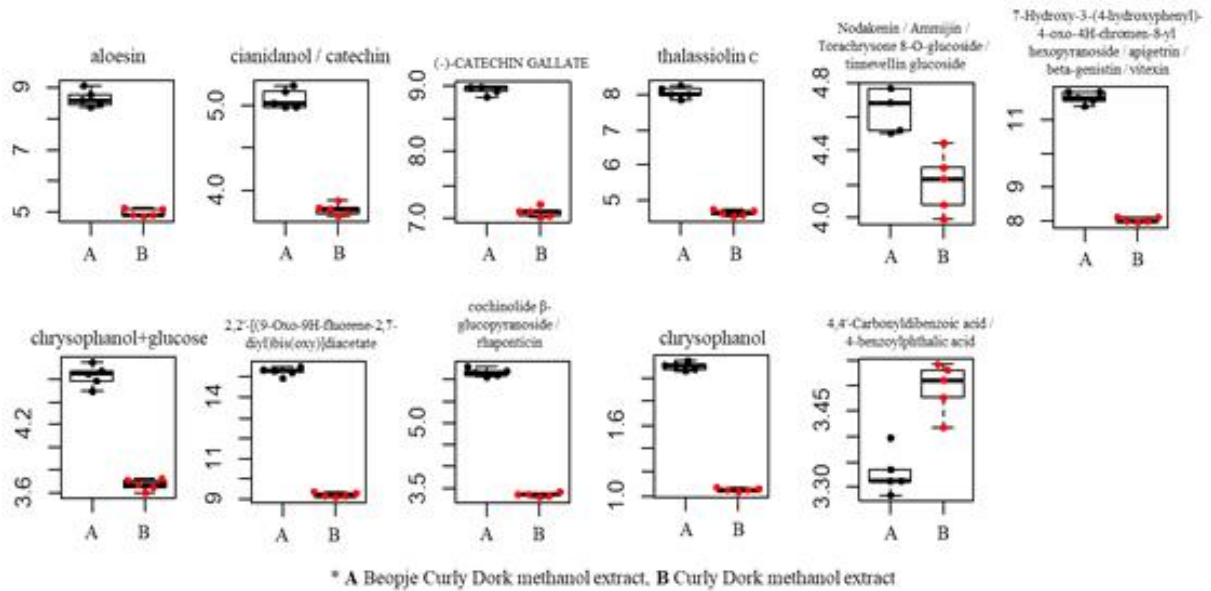
Apigetrin은 항염증, 항산화 효과가 있어 LPS로 인한 염증반응을 억제할 수 있으며, 신경 염증을 억제하고 신경 보호 효과를 나타낸다.

Vitexin은 Crataeguspinnatifida Bunge의 잎에서 분리된 flavone glycoside이며, 강력한 자유 라디칼 소거능을 가지고 있다.

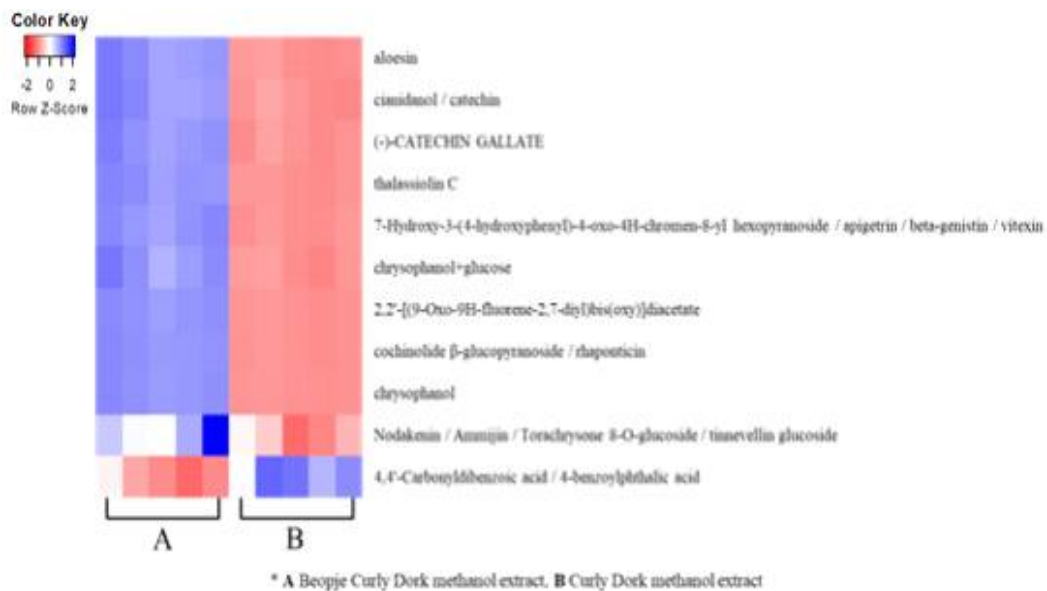
Chrysophanol은 곱팡이, 식물 추출물에서 발견되는 anthraquinone 계열이다.

마지막으로 chrysophanol은 염증성 질환을 억제하는 효과가 있다.

위 물질들은 본 연구에서 CD, CD-B 추출물에서 확인된 대사산물들로, 화합물의 개별적이 효과뿐만 아니라 다양한 화합물들이 서로 합쳐져 시너지 효과를 가져 항염증 효과를 향상시킬 수 있다.



< 그림 9. Box plot analysis of Beopje curly dock methanol extract (A) curly dock methanol extract (B) metabolite >



< 그림 10. Heat maps of Beopje curly dock methanol extract (A) curly dock methanol extract (B) metabolites analyzed using UPLC-Q-TOF MS analysis. Heat map color represents the z-score transformed raw data of metabolites with significant difference between both rice sample groups and were plotted in a blue-red color scale, in which red and blue indicate increase and decrease in metabolite levels, respectively.

(10) 결론적으로, LPS로 RAW 264.7 대식세포에 염증반응을 유도하여 NO 측정결과 CD와 CD-B 군의 NO 생성능이 다른 군과 비교하여 감소한 것을 볼 수 있다. 또한, ELISA 측정결과 이 역시 CD와 CD-B군이 염증성 사이토카인인 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10의 발현량을 감소 시켰고 추가적으로 mRNA와 단백질 발현량을 확인해본 결과 IL-1 β , TNF- α , IL-6 뿐만 아니라 NF- κ B, iNOS, COX-2의 발현 역시 감소함을 확인할 수 있었다.

특히, CD군에 비해 CD-B의 항염증효과가 좀 더 우수하였다.

성분분석결과를 보면, CD와 CD-B 모두 항염증제 물질을 함유하고 있으며 그중 CD-B에서 항염증제 화합물 함량이 CD에 비해 훨씬 많이 함유하고 있었다. 모든 결과를 통틀어보면, 법제 처리한 소리쟁이가 그렇지 않은 소리쟁이에 비해 염증 억제효과가 우수하다고 할 수 있겠다.

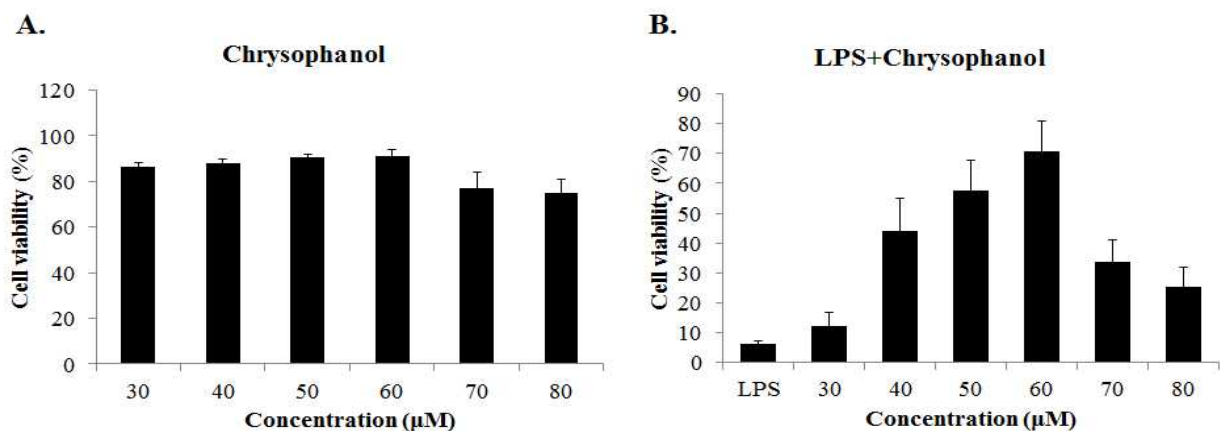
나. Raw 264.7 대식세포에서 Chrysophanol의 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인 억제효과

(1) 30~60 μ M 범위에서 chrysophanol의 농도가 30 μ M일 때 86.6 \pm 1.6%, 60 μ M일 때는 91.3 \pm 2.7%로 Raw 264.7 세포의 성장에 큰 영향을 미치지 않지만, 70 μ M 이상의 농도에서는 세포독성이 확인되었다(그림. 1A).

또한 LPS와 chrysophanol을 세포에 함께 처리했을 때, LPS만 처리하면 6.4 \pm 1.1%의 생존율을 보이지만 LPS와 60 μ M의 chrysophanol을 함께 처리했을 때 70.7 \pm 10.1%로 LPS로 인한 세포독성을 억제하는 것으로 확인되었다(그림. 1B).

연구에 의하면 chrysophanol은 HMC-1세포에 60 ng/mL 농도로 처리하였을 때 세포독성을 관찰하지 못하였고, 또한 Raw 264.7 세포에서 1, 10, 100 μ M 농도로 chrysophanol을 처리했을 때 세포독성을 관찰하지 못하였다.

따라서 본 실험의 결과를 바탕으로 30 μ M(Low), 60 μ M(High)의 chrysophanol 농도를 선정하여 이후 실험을 진행하였다.



< 그림 1. Viability of Raw 264.7 cells by the treatment of chrysophanol and LPS. The cells were induced with various concentrations(30, 40, 50, 60, 70, 80 μ M) for 48 hours. >

(2) LPS가 처리된 Raw 246.7 세포에서 NO 생성능은 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였다(Table 1) ($P < 0.05$).

LPS+Low($40.60 \pm 4.31 \mu$ M)와 LPS+High($14.68 \pm 0.17 \mu$ M)는 LPS($59.68 \pm 0.68 \mu$ M)군 보다 NO 수준이 유의적으로 낮아졌다($P < 0.05$). LPS를 처리하지 않은 Low($4.84 \pm 0.09 \mu$ M)와 High($5.24 \pm 0.09 \mu$ M)에서는 대조군($7.89 \pm 0.25 \mu$ M)과 비교하여 NO 생성능이 유의적으로 낮아졌지만, Low와 High사이에 군 간의 유의적인 차이는 없었다.

Chrysophanol은 BV2 murine microglia 세포에서 free radical로 유도된 산화적 손상에 의한 NO 생성을 억제하였고, Raw 264.7 세포에서 LPS에 의한 NO 생성도 억제하였다.

NO의 생성은 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 촉매 되어 L-arginine으로부터 합성된다.

NOS 다양한 형태의 자극에 의해 활성화되고 그로 인해 NO의 생성을 증가시키며, 다양한 유도물질 중 LPS는 전염증성 사이토카인과 iNOS를 활성화 시켜 NO의 생성을 증가시킨다.

따라서 실제로 chrysophanol이 LPS로 유도한 전염증성 사이토카인을 조절하는 지에 대해 연구를 진행하였다.

Table 1. Nitric oxide production in Raw 264.7 cells by treatment of LPS and chrysophanol.

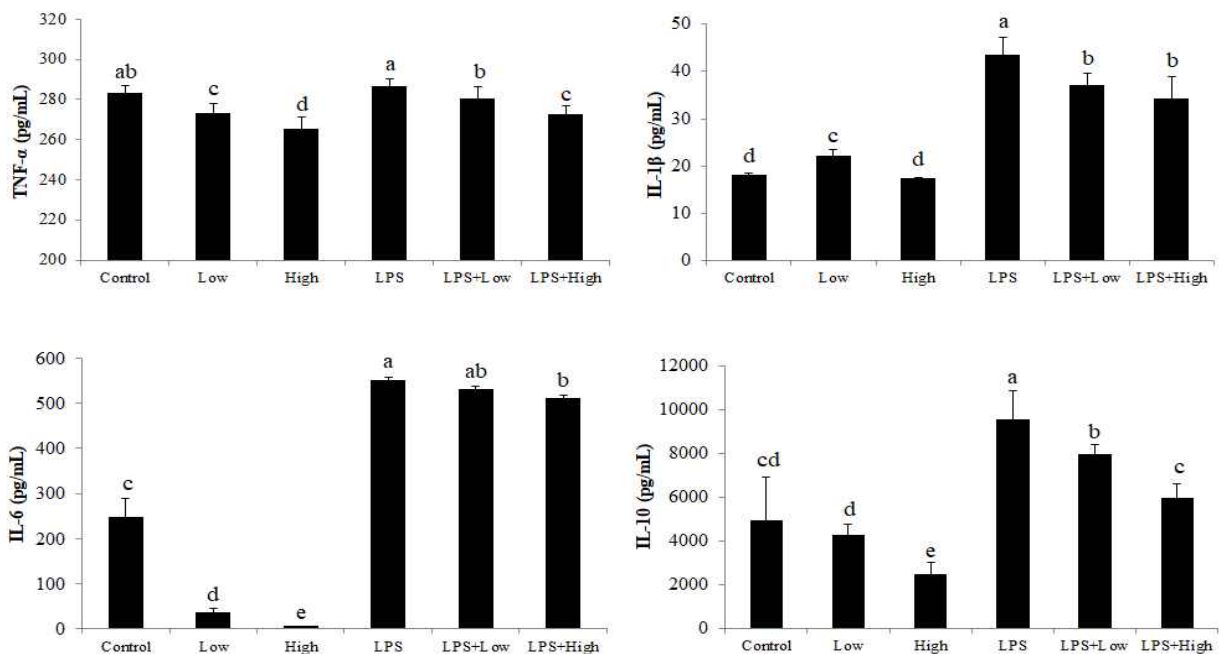
	NO production (μ M)
Control	7.89 ± 0.25^d
Low	4.84 ± 0.09^e
High	5.24 ± 0.09^e
LPS	59.68 ± 0.68^a
LPS+Low	40.60 ± 4.31^b
LPS+High	14.68 ± 0.17^c

- . Low : chrysophanol(30 μ M)
- . High : chrysophanol(60 μ M)
- . LPS : lipopolysaccharide(2 μ g/mL)
- . LPS+Low : lipopolysaccharide+chrysophanol(30 μ M)
- . LPS+High : lipopolysaccharide+chrysophanol(60 μ M)
- . Means with different letters(a–e) at the colum are significantly different($P < 0.05$) by Duncan' s multiple range test

(3) Raw 264.7 세포에 LPS를 처리하였을 때 처리하지 않은 군과 비교하여 전염증성 사이토카인 인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, 및 IL-10 생성을 유의하게 증가시켰다($P < 0.05$)(그림. 2).

LPS와 함께 chrysophanol을 Low, High농도로 Raw 264.7 세포에 처리하면 LPS만 처리한 군과 비교해 TNF- α (LPS : 286.8 \pm 3.8 pg/mL, LPS+Low : 280.5 \pm 6.1 pg/mL, LPS+High : 273.0 \pm 3.8 pg/mL), IL-1 β (LPS : 43.5 \pm 3.8 pg/mL, LPS+Low : 37.3 \pm 2.3 pg/mL, LPS+High : 34.3 \pm 4.7 pg/mL), IL-6(LPS : 551.1 \pm 7.1 pg/mL, LPS+Low : 530.6 \pm 8.4 pg/mL, LPS+High : 512.6 \pm 4.2 pg/mL), 및 IL-10(LPS : 9571.9 \pm 1316.8 pg/mL, LPS+Low : 7947.5 \pm 453.9 pg/mL, LPS+High : 5971.1 \pm 631.5 pg/mL)의 발현 수준으로 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$).

따라서 chrysophanol은 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인을 감소시켰다고 하겠다.



< 그림 2. Pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 concentrations in Raw 264.7 cell line by the treatment of LPS and chrysophanol in ELISA. >

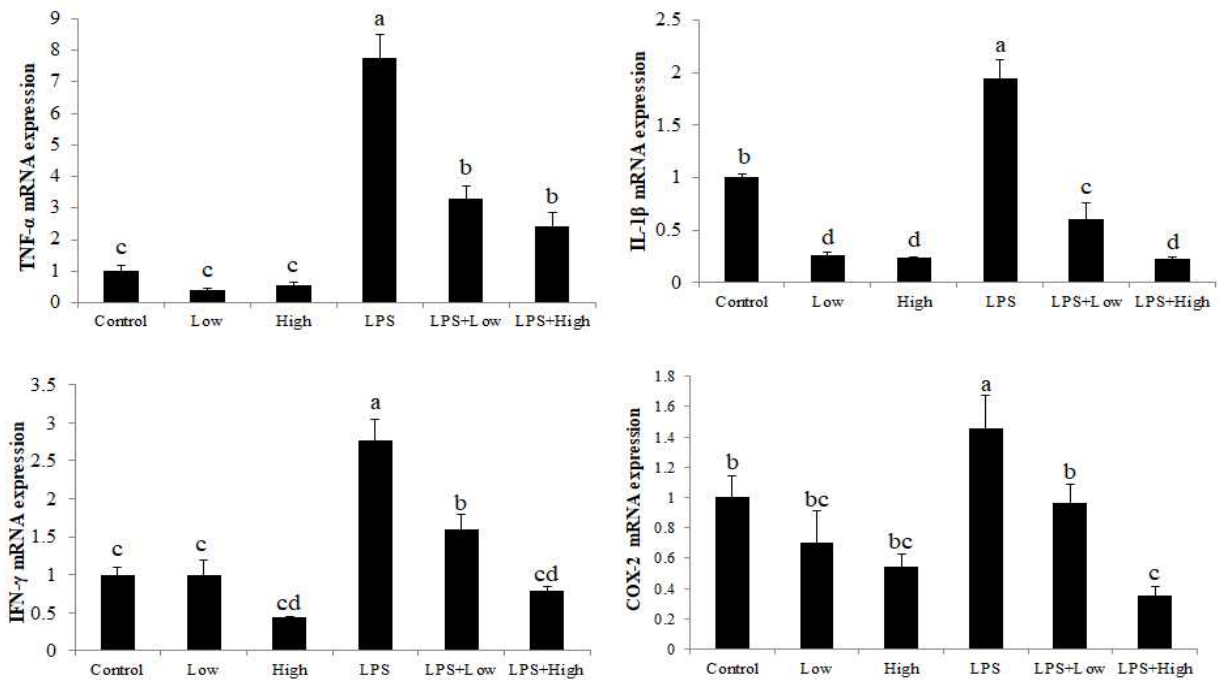
- . Low : chrysophanol(30 μ M)
- . High : chrysophanol(60 μ M)
- . LPS : lipopolysaccharide(2 μ g/mL)
- . LPS+Low : lipopolysaccharide+chrysophanol(30 μ M)
- . LPS+High : lipopolysaccharide+chrysophanol(60 μ M)
- . Means with different letters(a-e) at the colum are significantly different($P < 0.05$) by Duncan' s multiple range test

(4) Raw 264.7 세포에서 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , COX-2의 mRNA 발현은 LPS군이 미처리군에 비해 유의적으로 높았다($P < 0.05$) (그림. 3).

LPS와 chrysophanol을 함께 처리했을 때, 전염증성 사이토카인인 TNF- α 의 mRNA 발현 수준은 LPS+Low군이 2.3배, LPS+High군이 3.2배 LPS군보다 감소하였다.

또한 IL-1 β 의 mRNA 발현 수준은 LPS+Low군이 3.2배, LPS+High군이 8.4배 LPS군보다 감소하였고, IFN- γ 는 LPS+Low군이 1.7배, LPS+High군이 3.5배 감소하였다.

염증관련 효소인 COX-2의 mRNA 발현 수준은 LPS+Low군이 1.5배, LPS+High군이 4.1배 LPS군보다 감소하여 전반적으로 chrysophanol을 처리했을 때 전염증성 사이토카인, 염증관련효소의 mRNA 발현 수준이 유의적으로 감소했으며($P < 0.05$), 농도가 높아(High)졌을 때 낮은 농도(Low)보다 더욱 현저히 감소시켰다.



< 그림 3. mRNA expression of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , and an inflammation related gene COX-2 in Raw 264.7 cells by the treatment of LPS and chrysophanol. >

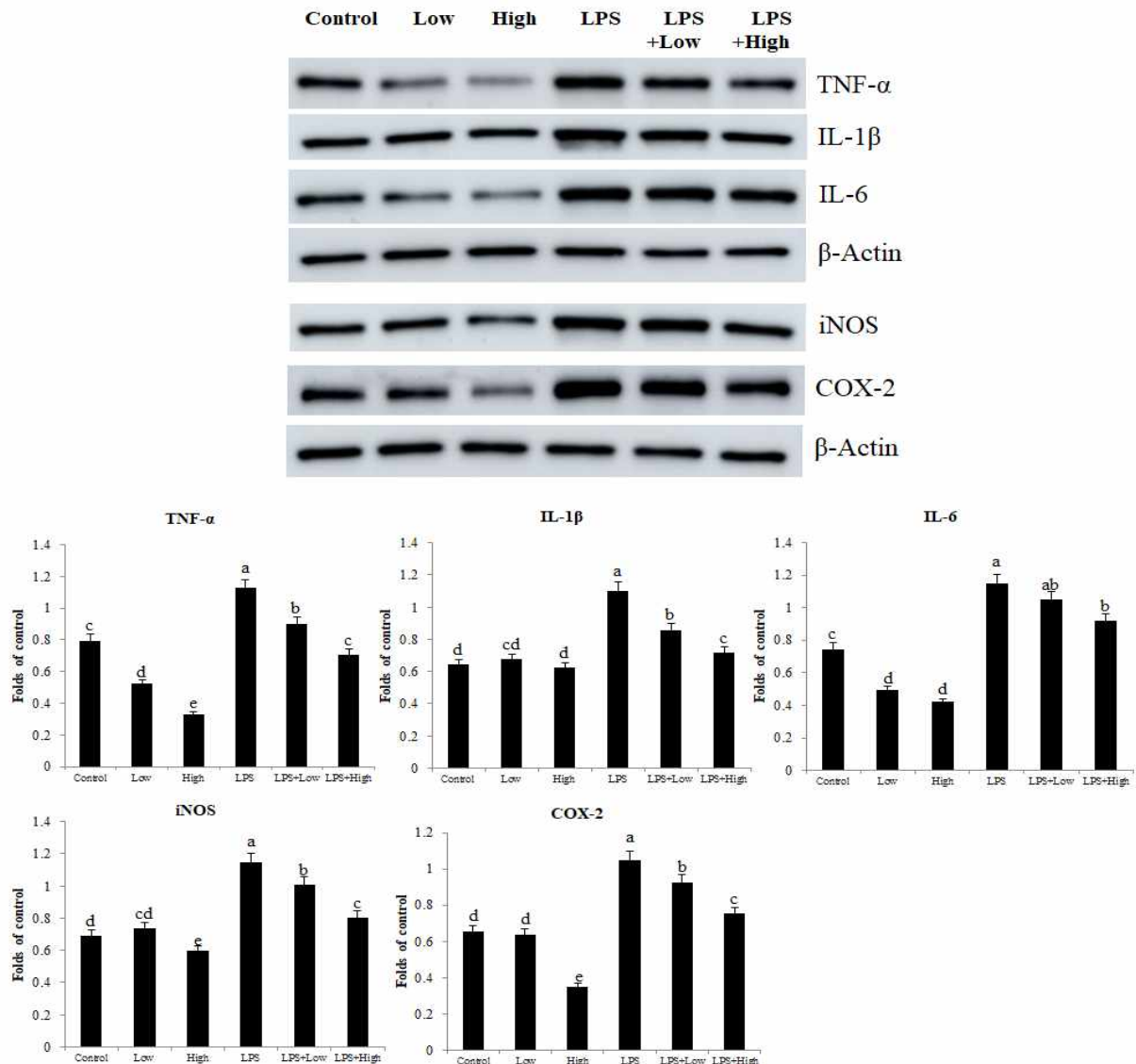
- . Low : chrysophanol(30 μ M)
- . High : chrysophanol(60 μ M)
- . LPS : lipopolysaccharide(2 μ g/mL)
- . LPS+Low : lipopolysaccharide+chrysophanol(30 μ M)
- . LPS+High : lipopolysaccharide+chrysophanol(60 μ M)
- . Means with different letters(a-e) at the column are significantly different($P < 0.05$) by Duncan' s multiple range test

(5) 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 와 IL-6, 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현은 LPS를 처리했을 때 미처리 군에 비해 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$)(그림. 4).

TNF- α 의 단백질 발현 수준은 LPS+Low군이 20%, LPS+High군이 60% LPS군보다 감소하였다.

또한 IL-1 β 의 단백질 발현 수준은 LPS+Low군이 30%, LPS+High군이 50% LPS군보다 감소하였고, IL-6는 LPS+High군이 20% 감소하였다. iNOS의 단백질 발현 수준은 LPS+Low군, LPS+High군 모두 LPS군보다 감소하였고, COX-2도 LPS+Low군, LPS+High군이 모두 유의적으로 감소하였다(P

<0.05). 이러한 결과는 ELISA에서 확인된 전염증성 사이토카인의 생성과 mRNA 발현과 마찬가지로 단백질 발현에서도 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 와 IL-6, 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2가 유의적으로 감소하여 LPS로 증가된 전염증성 사이토카인과 염증관련 효소를 chrysophanol이 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다.



< 그림 4. Protein expression of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6, and inflammation related genes iNOS, and COX-2 in Raw 264.7 cell line by the treatment of LPS and chrysophanol.

. Low : chrysophanol (30 μ M)

. High : chrysophanol (60 μ M)

- . LPS : lipopolysaccharide (2 μ g/mL)
- . LPS+Low : lipopolysaccharide+chrysophanol (30 μ M)
- . LPS+High : lipopolysaccharide+chrysophanol (60 μ M)
- . Means with different letters(a-e) at the column are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test

(6) 전염증성 사이토카인은 각각의 다른 사이토카인이 Naive T cell을 자극하여 T helper cell(Th)로 분류시키는 역할을 하며, Th는 종류와 역할에 따라 Th1, Th2, Th17, Treg로 분류된다.

이러한 전염증성 사이토카인은 transcription factor인 NF- κ B에 의해 활성화되고, 인체의 염증반응에 관여한다. Raw 264.7 세포에 LPS를 처리하면 전염증성 사이토카인과 염증관련 효소가 급격히 증가하는데, 이는 LPS 자극으로 염증반응이 활발히 일어나 전반적인 염증관련 인자가 증가하는 것이다.

전염증성 사이토카인은 다양한 질병에서 마커로 사용되며, 특히 염증반응 (inflammatory response)에서 중요한 역할을 하고 있다.

따라서 본 연구에서 chrysophanol이 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인을 억제한 것은 실제적으로 질병 발생 시 처리했을 때 염증 반응을 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

(7) 본 연구에서는 chrysophanol이 소리쟁이(*Rumex crispus L.*)의 주요활성 성분으로 확인되었으며, 이 chrysophanol의 사이토카인 생성 억제효과를 통하여 소리쟁이가 염증을 억제하는 중요한 기능성 원료로 사용 될 수 있음을 확인하였다.

또한 이 연구에서 LPS를 처리하지 않은 Raw 264.7 대식세포에 chrysophanol의 Low와 High 농도를 처리하면 염증관련 인자, 염증관련 mRNA 및 단백질의 발현을 낮추는 효과도 있어 chrysophanol은 일반세포에서도 염증을 억제할 수 있는 가능성을 보여주었다고 하겠다. 이러한 연구를 비롯하여 chrysophanol과 같은 식물유래 화합물에 대한 연구가 지속적으로 필요하다고 하겠다.

(8) 결론적으로, Chrysophanol은 30~60 μ M 범위에서 Raw 264.7 세포에서 세포증식을 억제하지 않았다.

또한 LPS와 함께 chrysophanol을 처리했을 때 60 μ M 처리 시 가장 높은 세포 성장률을 보였다.

Raw 264.7 세포에 LPS만 단독으로 처리했을 때 처리하지 않은 군 보다 NO 생성이 증가하였으나 chrysophanol을 Low(30 μ M), High(60 μ M) 농도로 처리했을 때 NO의 생성이 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$).

전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10는 LPS군에 비해 chrysophanol을 Low, High 농도로 처리했을 때 유의적으로 감소했으며, 마찬가지로 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 의 mRNA 수준도 감소하였다. 또한 염증관련 효소인 COX-2의 mRNA 수준도 억제하였다.

단백질 발현 수준에서도 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 와 IL-6, 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 발현이 LPS와 chrysophanol을 Low, High 농도로 함께 처리했을 때 LPS만 처리한 군에 비해 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$).

이러한 결과를 종합해 볼 때, 식물유래 화합물인 chrysophanol은 LPS로 유도된 염증반응을 억제하며, 특히 전염증성 사이토카인과 염증관련 효소(iNOS, COX-2)의 발현을 억제하여 염증반응을 조절하는 것으로 나타났다.

제5절 연구 개발 결과 성과

1. 연구개발 성과

가. 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Cordycepin diminishes thymic stromal lymphopoietin-induced interleukin-13 production	European Journal of Pharmacology	정현자	802	SCI	2017.05.05	doi: 10.1016/j.ejphar.2017.02.033
2	An Atopic Drink (APD(AST-2017-01)) reduces Th2 cytokines in LPS-treated RAW 264.7 cells	TANG[HUMANITAS MEDICINE]	박건영	7(3)	비SCI	2017.08.31	http://dx.doi.org/10.5667/tang.2017.0014
3	Validation of chrysophanol and cordycepin as marker compounds for standardization of a new herbal mixture AST2017-01	TANG[HUMANITAS MEDICINE]	김형민	7(3)	비SCI	2017.8.31	doi: http://dx.doi.org/10.5667/tang.2017.0013
4	Molecular mechanisms of anti-inflammatory effect of chrysophanol, an active component of AST2017-01 on atopic dermatitis in vitro models.	International Immunopharmacology	정현자	54	SCI	2018.01.30	doi: 10.1016/j.intimp.2017.11.019

5	Regulatory effects of chrysophanol, a bioactive compound of AST2017-01 in a mouse model of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis.	International Immunopharmacology	김형민	62	SCI	2018.09.01	doi: 10.1016/j.intimp.2018.06.046
6	Cordycepin ameliorates skin inflammation in a DNFB-challenged murine model of atopic dermatitis.	Immunopharmacology and Immunotoxicology	김형민	40(5)	SCI	2018.09.05	doi: 10.1080/08923973.2018.1510964
7	Increased Anti-Inflammatory Effects of Processed Curly Dock (<i>Rumex crispus</i> L.) in Ex Vivo LPS-Induced Mice Splenocytes	J Korean Soc Food Sci Nutr	박건영	47	비SCI	2018. 5	https://doi.org/10.3746/jkfn.2018.47.5.599
8	<i>Rumex crispus</i> and <i>Cordyceps sinensis</i> Mixture Ameliorates Production of Pro-inflammatory Cytokines Induced by Lipopolysaccharide in C57BL/6 mice Splenocytes	Prev Nutrition and Food Science	박건영	23(4)	비SCI	2018. 12월	
9	Use of Phycion to Improve Atopic Dermatitis-Like	Molecules	정현자	24(8)	SCI	2019.04.15	doi: 10.3390/molecules

	Skin Lesions through Blocking of Thymic Stromal Lymphopoietin.						24081484
10	Chrysophanol, an anthraquinone from AST2017-01, possesses the anti-proliferative effect through increasing p53 protein levels in human mast cells.	Inflammation Research	정현자	68(7)	SCI	2019.06	doi: 10.1007/s00011-019-01239-7.
11	The ameliorative effect of AST2017-01 in an ovalbumin-induced allergic rhinitis animal model.	Inflammation Research	김형민	68(5)	SCI	2019.05	doi: 10.1007/s00011-019-01226-y.
12	The regulatory effect of AST cream on atopic dermatitis-like skin disease.	TANG[HUMANITAS MEDICINE]	김형민	9(3)	비SCI	2019.08	http://dx.doi.org/10.5667/tang.2019.0015
13	LPS로 유도된 RAW264.7 세포주 염증모델에서 소리쟁이의 법제처리에 따른 항염증 효과	한국식품영양학회지 = The Korean journal of food and nutrition	박건영	32(5)	비SCI	2019.10.15	https://doi.org/10.9799/ksfan.2019.32.5.408

나. 국내 및 국제학술대회 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods	김형민	2017-10-23	전북 군산 GSCO	한국
2	The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods	정현자	2017-10-23	전북 군산 GSCO	
3	The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods	박건영	2017-10-23	전북 군산 GSCO	
4	2018 KoSFoST International Symposium and Annunal Meeting	김형민	2018-06-27	부산 BEXCO	
5	2018 KoSFoST International Symposium and Annunal Meeting	정현자	2018-06-27	부산 BEXCO	
6	한국식품영양과학회 2018 정기학술대회	유정	2018-11-02	부산 BEXCO	
7	2019 The Pharmaceutical Society of Korea	정현자	2019-10-15	여수 엑스포	
8	2019 KOREAN SOCIETY FOR MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY	김형민	2019-10-02	서울 코엑스	
9	한국식품영양과학회 2019 정기학술대회	박건영	2019-10-24	ICC 제주	

다. 기술적 측면의 결과

- (1) 아토피 피부염 치료/예방에 대한 실질적이고 전망 있는 아토피 피부염 진단 지표 및 아토피 피부염 개선 제품 개발에 필요한 시스템으로 사용될 것으로 사료됨.
- (2) 약용작물은 생리적 · 약리적 유효성을 근간으로 하여 식품, 의약품 등의 분야에서 **고부가가치의 기능 소재**로 활용가치가 높으며, 국민소득의 증가와 더불어 건강과 대체의학에 대한 관심의 고조되고 **합성의약품의 부작용**에 대한 우려 등으로 수요가 꾸준히 증가할 것으로 예상됨.
- (3) 전 세계적으로 항원, 알레르겐에 대한 관심 고조로 인해 면역력 증진 관련 시장은 증가 추세를 보이고 있는 실정임. 따라서 본 연구과제의 수행결과는 면역력 증진과 관련된 국민 건강 및 삶의 질 향상에 기여하는 바가 클 것으로 예상됨.
- (4) 태명칭 법제기법의 적용을 통한 원료가 보유한 **지표성분의 추출율 향상 및 성분의 순기능 향상과 역기능을 순화시킨 제품의 개발**
- (5) 생산공정 및 표준화 확립을 통해 열수 추출을 통한 순수한 제품 개발 및 동충하초와 소리쟁이가 함유한 지표성분의 적절 혼합비의 산출을 통한 아토피 피부염의 개선 효능을 보유한 제품 개발
- (6) 제품화 실현
안정성 및 유아에게 복용이 용이한 액상차 식품유형의 제품화 실현
미세분말 가공 및 섯가루 선별을 통한 위생적 생산을 통해 복용성 및 함유성분의 극대화를 꾀한 기타가공품 환 타입의 제품화 실현
- (7) 안정성 검사 실시

라. 경제적·산업적 측면의 결과

- (1) 지난 수십 년간 아토피 피부염 치료 연구를 위한 막대한 투자가 이루어졌음에도 불구하고 아토피 피부염의 발생률은 줄어들지 않고, 이에 따른 사회적 비용이 크게 증가함. 본 연구기술은 천연식물 추출물 또는 추출물 유래 후보물질을 이용한 아토피 피부염 개선 제품 개발에 대한 기초자료로 활용 가능하며, 이는 건강기능식품 개발 시장 활성화를 통한 막대한 부가가치 창출로 이어질 수 있을 것임.
- (2) 아토피 피부염은 여러 가지 알레르기 질환을 동반할 수 있는 질환이며, 소아부터 중/장년층까지 전 연령층에 나타나는 질환으로, 우리나라의 관련 수요는 상당할 것으로 예상됨.
- (3) 구성 약용작물들의 국내 재배와 수요창출을 이끌어 재배농가의 소득 증대 및 저변 확대 등, 농업의 산업화에 이바지하는 새로운 수익 모델을 제공함과 동시에 국산 건강기능성 식품 산업의 경쟁력 신장에 도움을 줄 것으로 기대됨.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
제1절 목표달성도			
1. 주관연구기관 (주) 가화에프앤비			
구분	개발 내용	달성도 (%)	개발 범위
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> 원료의 기준 규격과 품질관리 기준 설정 기시법 확립 원료 지표물질의 표준화 추출조건 및 공정 확립 개발 제품 제형 선정 제품화 기술 개발 및 제품의 규격화 	100%	<ul style="list-style-type: none"> 추출 조건 및 공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> 추출용매, 성상, 온도 등 확립 안정성, 영양성분 조사
		100%	<ul style="list-style-type: none"> 동충하초와 소리쟁이 혼합물을 이용한 향아토피 피부염용 천연물 소재 개발
		100%	<ul style="list-style-type: none"> 제품조성 결정 <ul style="list-style-type: none"> 기 시판 제품 허가요건, 특성 등 조사에 의한 신규 효능 규명을 위한 최적 제제 선정 고려 및 샘플제조 1, 2, 3 세부연구자에게 제공 신규 스펙트럼 확인 및 1,2,3 세부연구자 제공
		100%	<ul style="list-style-type: none"> 농축/분말화 공정 확립
		100%	<ul style="list-style-type: none"> 원료의 표준화 (기준 및 시험법) <ul style="list-style-type: none"> 각 약물의 기준 및 표준화 확립 각 약물의 지표성분 또는 유효성분 분석 등 분석
		100%	<ul style="list-style-type: none"> 연구진행 결과에 대한 자체 평가 4회 실시: 미진 부분 보완책 강구, 개선
		100%	<ul style="list-style-type: none"> 연구진행 결과에 대한 자체 평가 4회 실시: 미진 부분 보완책 강구, 개선
2차년 도	<ul style="list-style-type: none"> 생산 공정 확립 조건/성상/기준규격의 표준화(용매, 온도, 배합비) 제품 개발메뉴얼, 포물러, 제조공정 구축 시제품, 향아토피 기능성 일반식품 상품화 	100%	<ul style="list-style-type: none"> 동충하초와 소리쟁이 혼합물을 이용한 아토피 피부염 억제 식품소재 개발 및 생물활성 연구
		100%	<ul style="list-style-type: none"> 제품화 연구 <ul style="list-style-type: none"> 제형 검토 및 확립 / pilot생산 조건 확립 / 시작품 제작
		100%	<ul style="list-style-type: none"> 원료의 규격화 <ul style="list-style-type: none"> 품질관리를 위한 기준 및 시험방법 확립 향아토피 피부염 제품화 기술 개발 및 제품의 규격화 추출용매별, 추출용매 농도별 향아토피 피부염 천연물 소재 성분분석, 지표물질 함량 측정
		70%	<ul style="list-style-type: none"> 향아토피 기능성 일반 식품 사업화 <ul style="list-style-type: none"> 일반식품(액상차, 기타가공품) 제형으로 효능 및 관

			<p>능평가 (관능평가 미 실시)</p> <p>소비자 기호도 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 패키지 개발 , 상품화 , 마케팅
	, 시판	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 연구진행 결과에 대한 자체 평가 4회 실시: 미진 부분 보완책 강구, 개선 - 4차 평가 시 미달 기관 페널티 책정
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> • IRB 신청 • 인체적용시험 준비 • 건강기능성식품 제조공정 확립, 사업화 	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 항아토피 피부염 시제품 개발 및 산업화 제품별 제조 공정 구축
		100%	<ul style="list-style-type: none"> - 아토피 피부염 억제 소재 제품화 기술 개발 및 제품의 규격화, 평가
		100%	<ul style="list-style-type: none"> - 기 시판 제품 활용한 신규 효능 임상시험계획 검토 - 인체적용시험 실시 기관 및 CRO 선정 - 인체적용시험 프로토콜 개발 및 작성 - 인체적용시험 기본문서 개발 - 실시기관의 IRB 임상승인 신청
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • 연구결과에 대한 자체 평가 실시 - 미진부분 보완책 강구, 개선

2. 연구기관 경희대학교

구분	개발 내용	달성도 (%)	개발 범위
1차년도	아토피 피부염 동물 모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 효능 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 아토피 임상증상의 평가 - 경표피 수분 증발 / 피부 홍반 측정 / Scratching behavior - 관능 평가 시험 (홍반, 가려움, 피부건조, 부종, 혈종, 짓무름, 태선화)
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • 조직/혈청 내에 아토피 유발 인자 및 염증 원인 인자 분석 - Th2 cytokine (IL-4, IL-5, IL-13) 측정 - Histamine 측정 - IgE 측정 - 염증성 사이토카인 (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8) 측정
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • 피부조직에서 Th2 분화관련 전사인자의 발현 분석 - GATA3 발현 분석 / pSTAT6 발현 분석

		100%	<ul style="list-style-type: none"> • Th1/Th2 cytokine, chemokine 농도 및 혈구조성에 대한 효과 분석 - 혈중 Th1/Th2 cytokine (IL-12, IL-4) 측정 - Chemokine (eotaxin, TARC, ICAM-1, MIP-2) 측정 - 혈구 (total leukocyte, eosinophil) 조성 분석
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • 피부조직에서의 염증세포 침윤에 대한 영향 분석 - H&E (Haematoxylin and eosin stain) 분석 - Toluidine blue stain 분석
2차년 도	아토피 피부염 동물 모델에서 동충하초와 소리쟁이 함유 성분들의 효능 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 아토피 임상증상의 평가 - 경표피 수분 증발 - 피부 홍반 측정 - Scratching behavior - 관능 평가 시험 (홍반, 가려움, 피부건조, 부종, 혈중, 짓무름, 태선화)
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • 조직/혈청 내에 아토피 유발 인자 및 염증 원인 인자 분석 - Th2 cytokine (IL-4, IL-5, IL-13) 측정 - Histamine 측정 - IgE 측정 - 염증성 사이토카인 (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8) 측정
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • 피부조직에서 Th2 분화관련 전사인자의 발현 분석 - GATA3 발현 분석 - pSTAT6 발현 분석
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • Th1/Th2 cytokine, chemokine 농도 및 혈구조성에 대한 효과 분석 - 혈중 Th1/Th2 cytokine (IL-12, IL-4) 측정 - Chemokine (eotaxin, TARC, ICAM-1, MIP-2) 측정 - 혈구 (total leukocyte, eosinophil) 조성 분석
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • 피부조직에서의 염증세포 침윤에 대한 영향 분석 - H&E (Haematoxylin and eosin stain) 분석

			- Toluidine blue stain 분석
3차년 도	아토피 피부염 동물 모 델 에 서 TSLP/caspase-1 조절 효능 기전 등 평가	100%	- 혈청에서 TSLP 측정
		100%	- 아토피 피부염 조직에서 TSLP/caspase-1 측정 - 아토피 피부염 조직에서 TSLP mRNA 발현 측정 - 아토피 피부염 조직에서 caspase-1 생성 및 단백질 발현 측정
		100%	- 아토피 피부염 조직의 병리표본 제작, 염색 및 관찰

3. 연구기관 호서대학교

구분	개발 내용	달성도 (%)	개발 범위
1차 년도	원료의 표준화 확립 및 생체 외 아토피 실험모델에서 동충 하초와 소리쟁이 혼 합물의 효능 평가	100%	• 동충하초와 소리쟁이의 지표성분 또는 유효성분 분석 [원료의 표준화 확립]
		100%	• 비만세포 - Th2 cytokine 생성 및 mRNA 발현 측정 - Histamine release 측정 - 염증성 사이토카인 생성 측정 - Histidine carboxylase activity assay - NF- κ B, I κ B assay - caspase-1/inflammasome assay
		100%	• 각질세포 - IFN- γ + TNF- α 로 자극 한 후 TARC 의 생성 측정 - 염증성 사이토카인 (IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α) 측정 - NF- κ B & I κ B & IKK β 기전 분석
2차년 도	생체의 아토피 실험 모델에서 동충하초 와 소리쟁이 함유 성분들의 효능 평가	100%	• 비만세포 - Th2 cytokine 생성 및 mRNA 발현 측정 - Histamine release 측정 - 염증성 사이토카인 생성 측정 - Histidine carboxylase activity assay - NF- κ B, I κ B assay

			- caspase-1/inflammasome assay
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • 각질세포 <ul style="list-style-type: none"> - IFN-γ + TNF-α로 자극 한 후 TARC 의 생성 측정 - 염증성 사이토카인 (IL-8, IL-1β, IL-6, TNF-α) 측정 - NF-κB & IκB & IKKβ 기전 분석
3차년 도	세포수준에서 새로운 바이오마커 효능 및 기전 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 비만세포에서 TSLP/caspase-1 단백질 level 측정 - 비만세포에서 TSLP mRNA level 측정
		100%	- 아토피 피부염 관련 인자 (Hexosaminidase, HDC, calcium, cytokines) level 측정
		100%	- Caspase-1/inflammasome 분석
		100%	- RIP2 활성 분석
		100%	- MAPKs 활성 분석
		100%	- NF- κ B & I κ B & IKK 기전 분석
		100%	- 사이토카인 분석

4. 연구기관 차의과학대학교

구분	개발 내용	달성도 (%)	개발 범위
1차 년도	생체외 면역증진 모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물 효능 및 기전 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 비장세포 증식능 기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 마우스에서 채취한 비장세포(Ex. vivo)에서 NO 생성능 측정 - 비장세포에서 염증관련 인자 발현 분석(ELISA) - 비장세포에서 염증관련 인자 mRNA 발현 분석(RT-qPCR)
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • 대식세포에서 면역관련 세포 활성 물질 생성 기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 마우스의 대식세포(Raw 264.7)에서 NO 생성능 측정 - 대식세포에서 염증관련 인자 발현 분석 - 대식세포에서 염증관련 인자 mRNA 분석
2차년 도	생체외 실험모델에서 동충하초와 소리쟁이 혼합물의 면역	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 비장세포 증식능 기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 마우스에서 채취한 비장세포(Ex vivo)에서 NO 생성능 측정

	증진 효능 평가		<ul style="list-style-type: none"> - 비장세포에서 염증관련 인자(단백질) 발현 분석 (ELISA) - 비장세포에서 염증관련 인자 mRNA 발현 분석 (RT-qPCR)
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • 대식세포에서 면역관련 기전 연구 - 마우스의 대식세포(Raw 264.7)에서 NO 생성능 측정 - 대식세포에서 염증관련 인자 발현 분석 - 대식세포에서 염증관련 인자 mRNA 분석
3차년도	생체내 동충하초와 소리쟁이 혼합물 및 성분들의 면역증진 기전 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> • LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 법제 소리쟁이(<i>Rumex crispus L.</i>)추출물의 항염증 효과 - Raw 264.7 세포에서의 IL-6, IL-10, IL-1β와 TNF-α 사이토카인 측정 - Raw 264.7 세포에서 IL-6, IL-1β, IL-10과 TNF-α의 mRNA 발현 측정 - COX-2, NF-κB, iNOS의 mRNA 발현 측정 - Raw 264.7 세포의 NF-κB, iNOS, COX-2 단백질 발현 측정
		100%	<ul style="list-style-type: none"> • Raw 264.7 대식세포에서 Chrysophanol의 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인 억제효과 - LPS가 처리된 Raw 246.7 세포에서 NO 생성능 측정 - Raw 264.7 세포에 LPS를 처리후 TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 사이토카인 생성 측정 - Raw 264.7 세포에서 LPS를 처리후 TNF-α, IL-1β, IFN-γ, COX-2의 mRNA 발현 측정 - 전염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β와 IL-6, 염증관련 효소인 iNOS 와 COX-2의 단백질 발현 측정

제2절 관련분야 기여도



1. 일반 식품으로서 동충하초와 소리쟁이 혼합물 제품 개발 - 액상차, 환, 스틱
2. 건강기능식품으로서 동충하초와 소리쟁이 혼합물 또는 성분 활용 제품 개발
3. 의약품으로서 동충하초와 소리쟁이 성분 활용 제품 개발
4. 새로운 아토피 피부염 바이오마커를 이용한 아토피 피부염 예방 /치료 물질 개발은 실질적으로 의약생명과학과 그 관련 분야들에 광범위하게 이용될 수 있음.
5. 이러한 기술은 고부가가치 건강기능식품 신소재를 개발, 생산할 수 있는 기반 구축에 있어 필수적이며, 21세기에 주목 받는 건강기능식품 시장에서 가장 중요한 핵심 기술이 될 것이라 생각됨.
6. 아울러 본 연구의 기술은 아토피 피부염 예방/치료의 한계성을 극복하고 실질적으로 아토피 피부염 발생을 낮출 수 있는 전략으로 활용될 수 있으며 국내 아토피 피부염 예방/치료제의 효능 평가 및 개발에 응용할 수 있으리라 생각됨.
7. 본 연구개발과제는 약용작물을 기반으로 하는 제품 개발로써, 효율적인 제조공정과 기준 및 시험법 확립을 통한 규격화된 기능성원료 생산과 과학적이고 합리적인 인체적용시험 계획서를 바탕으로 성공적인 인체적용시험을 진행, 완료할 것으로 기대함.

8. 발굴된 아토피 피부염 억제 선도물질 세포 신호 전달 체계는 신약개발에 적극 활용하도록 하고, 아토피 피부염 발병과정의 분자 기전의 해명에 기여.
9. 본 연구과제의 성공적 수행을 통해 얻어진 연구결과를 바탕으로 후속연구로 차후 활용하며 이를 이용한 다양한 치료기술을 개발하는 기반을 제공할 것으로 사료됨.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

제 1 절 국내외 사업화 방안

1. 다음과 같은 설비를 완비하고 본 연구과제를 통해 아토피 피부염 개선/예방/조절용 제품의 연구/개발하여 시장에 출시

가. 혼합음료/액상차 제작시설 완비

일일 4톤 (100ml 파우치 4만포) 생산능력을 갖춘 일괄 음료 생산공정을 갖추었으며, 위생적이고 안정적인 생산시설과 생산 Process를 인정받아 2015년 9월 23일 한국식품안전관리인증원 으로부터 혼합음료/액상차 HACCP인증을 획득.

나. 식품제형의 다양화를 위한 분말/환 제조라인 완비

다양한 식품유형의 제조를 위해 초정밀고속분쇄기, 이물질선별기, 다목적 혼합기, 자동제환기, 대용량 당의기의 분말 - 환 제조라인을 완비하여 이를 활용한 위생적 환 제품화

다. 개발제품 고급화(맞춤형)/고기능화를 통한 판매신장

당사 개발제품의 컨셉인 기능성 건강음료 및 제형에 에 맞추어 복용 시 효능을 볼 수 있도록 레시피 조정 및 제품을 제조하여 고기능성을 실현하고, 나아가 소비자에게 맞춤형으로 제품을 제조/제공하는 시스템을 갖추어 꼭 필요한 소비자에게 적시 에 적량을 제공하는 매카니즘으로 고급 맞춤형제품으로 제작함. 이러한 고급화(맞춤형)/ 고기능화를 실현하여 제품을 시장에 출시한 다면 아토피 피부염으로 말 못할 고생을 하는 경, 중환자들에게 희망을 주는 제품으로 관련 제품시장에 진입하였음

라. 국내외 식품박람회 등의 참가

화장품 , 연고 형태의 아토피 피부염용 제품이 대세인 현재 시장 환경에서 국내외 아토피 피부염 질환자에게 건강음료 등 식품유형으로 식품시장에 진입하여 이를 널리 알리고 시장 및 소비자의 요구사항 및 반응을 접하기 위해 국내식품박람회에 적극 참여하며, 나아가 글로벌시장에서 경쟁력을 확보하기 위해서 국제식품박람회에 출전

마. 유통채널 확보 계획

국내 아토피 피부염 환우들의 모임 (아토피맘 등)에 홍보 강화, 원료공급업체와 공동 브랜드 및 OEM 브랜드 공급을 통한 판매촉진, 유통력을 가진 업체와의 제휴 (약초 명가, 금산 F&B와 제휴), 대형마트 부스확보 및 공동판매촉진 추진 - 홍보용 특가 판매 행사, 우수 다단계 / 방문판매 업체에 납품을 통한 판매량 증대

2. 상용화 형태

가. 항아토피 피부염용 음료 및 분말, 환 의 다양한 제형 제품 개발

나. 사용 계층별 제품 개발

- (1) 어린이용(키드용) : 복용이 용이하고 면역력 강화에 주력한 제품형태 - 젤, 스틱
- (2) 여성용 : 피부 재생 강화 및 면역력 강화에 주력한 제품 형태 - 스탠딩파우치
- (3) 성인용 : 면역력 강화에 주력한 제품 형태 - 환. 타정 타입

3. 수요처

가. 시장규모 : 글로벌 아토피 피부염 환자 수는 2022년 1.38억 명까지 증가할 것으로 보며 환경적 요인과 가공식품의 수요증대로 인해 국내뿐 만아니라 중국 및 인도의 환자 수가 폭발적으로 환자가 늘어나고 있음

나. 난치 환자의 증대 : 아토피 피부염 시장은 치료제 개념의 제품(Elidel, Protopic)과 피부보습에 대한 크림제형의 제품이 시장을 장악하고 있으나 아토피 피부염의 복잡한 발생 원인으로 인해 커버 못하는 난치 환자가 급증하는 실정

다. 아토피 피부염의 발생억제 및 난치화 예방 : 아토피 피부염 유병군중 가장 많은 비중을 차지하는 가벼운 증상 환자군은 새로운 약물치료가 필요하지 않으며, 특히 질병 환자군의 70%를 차지하고 있는 소아 환자에 대해서는 이를 예방/개선키 위해 아토피 피부염의 발생 억제 및 개선 효력이 뛰어나면서 복용성이 높은 식품형태의 제품군이 필요

라. 난치 환자의 증상 개선 : 주요 환자보유국(미국, 한국, 중국, 인도 등) 1.1억 명의 인구는 심각한 난치상태이나 치료제 요건이 충족되지 않아 아직 시장에서 미개발 영역으로 남아있어 이들에 대한 새로운 아토피 피부염 개선제품으로 제공

제2절 건강기능식품 기능성원료 등재를 위한 결과 활용 및 계획

1. 개별인정형 원료 등재를 위한 원료 평가 및 바이오마커에 대한 연구실험 적용

가. 과민피부개선 기능성 평가 시 바이오마커별 측정과 연구실험 적용

(면역과민반응에 의한 피부상태개선에 도움을 줄 수 있음)

건강기능식품 기능성 평가 가이드에서 제시된 바이오마커별 시험연구유형과 본 연구실험과 결과의 평가 적용여부

바이오마커	연구유형별 실험적용		
	시험관	동물	인체
IgE		◎	
호산구 내 Fcε 수용체			
Th1 cytokine (IL-2, IFN-γ 등)		◎	
Th2 cytokine (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등)	◎	◎	
Th12 cytokine / Th2 cytokine		◎	
CD4 + T cell / CD8+T cell			
TSLP (Thymic stromal lymphopietin)	◎	◎	
TARC (Thymic and activation-regulated chemokine)		◎	
총 호산구수 (total eosinophil count; TEC)		◎	
호산구 양이온 단백질 (eosinophil cationic protein; ECP)			
Eotaxin			
Scratching behavior frequency (Itching time)		◎	
Dermatitis Severity 평가		◎	
조직 병리학적 검사		◎	
피부단자검사			
RAST (Radioallergosorbent test)			
SCORAD score (Scoring of Atopic Dermatitis)			

본 과제를 통해 진행한 연구결과를 건강기능식품 개별인정형 원료 등재에 활용하고 IRB 승인획득후 2020년에 진행 할 인체적용시험을 통해 검증후 이를 통해 개별인정형 원료 등재 작업을 진행할 예정입니다.

2. 건강기능식품 개별인정형 등재를 위한 인체시험 진행 사항

가. 인체적용시험용 식품 생산

인체적용시험용 식품 생산량 안내

Site Identification	<input type="checkbox"/> 선정 () <input checked="" type="checkbox"/> 미정		
Investigator	<input type="checkbox"/> 선정 () <input checked="" type="checkbox"/> 미정		
Sponsor	㈜가화에프앤씨	Date	2019.09.20(금)

1. 전체 생산량

- 1) 여분 20% 이상 추가 생산
* 대상자수 + 20% 추가 = 총 생산량

2. 1인 생산량 (12주 섭취, 2회 불출 기준(6주 간격), 1차 방문 허용기간 ±7일, 2차 방문허용기간±5일)

- 1) 1일 섭취 횟수 * 1회 섭취량 = 1일 섭취량
- 2) 1일 섭취량 * (섭취기간 + 방문 허용기간) = 1인 생산량
*예시(1차 불출) : 1일 2회 섭취, 1회 2캡슐 6주 = 2회*2캡슐(42일+7일) = 196캡슐
*예시(2차 불출) : 1일 2회 섭취, 1회 2캡슐 6주 = 2회*2캡슐(42일+12일) = 216캡슐
*시험식품과 대조식품의 1, 2차 불출식품 수는 동일합니다.
- 3) IB 작성 완료 및 Protocol 개발 완료 후 인체적용시험용 식품을 생산하는 것이 바람직합니다.
- 4) 인체적용시험 초상의 접수 후 인체적용시험용 식품 최종생산량 및 라벨링에 대한 가이드를 발송해 드립니다.

3. 제형

- 1) 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 등 제형의 제한은 없으나, 시험식품과 대조식품의 성상(향, 색, 맛 등)이 동등한 수준이 되도록 제작하실 것을 권고 드립니다.

4. 원료

- 1) 인체적용시험용 식품(시험식품 및 대조식품)의 제조 시 「식품의 기준 및 규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」, 「축산물의 가공기준 및 성분규격」에 적합한 원료를 사용하며, 부원료(식물추출물, 비타민, 무기질, 미생물 등)의 사용을 자제해 주시고 부형제(제형을 잡기 위한 원료)만을 사용하여 제조하기를 권고드립니다.
- 2) 장용성 캡슐·과립·정제 제제의 목적으로 사용되는 캡슐기체나 첨가제는 「식품첨가물의 기준 및 규격」에 적합한 것이거나, 「의약품의 품목허가·신고·심사 규정」 [별표 7] 1, 마, (6) 장용성기체 및 사. 장용성필름코팅기체에 적합한 것을 사용할 수 있습니다.
- 3) 인체적용시험용 식품 제조 시 사용되는 원료, 부형제 등의 변동(명칭, 배합비)이 있는 경우 IRB 변경 신청 대상이므로 당사로 신속히 연락 바랍니다.

5. 포장

- 1) PTP, PE Bottle 등 포장용기를 선정해 주시고, PE Bottle인 경우에는 뚜껑 완충지, 실리카겔 등으로 완전 밀봉된 상태로 포장되도록 제작 부탁드립니다.

6. 일정

- 1) IP의 생산은 개시모임 전에 완료되어야 하며, 라벨이 부착된 IP가 개시모임 시 연구자 측에 전달

인체적용시험용 식품 생산량 안내

Site Identification	<input type="checkbox"/> 선정 () <input checked="" type="checkbox"/> 미정		
Investigator	<input type="checkbox"/> 선정 () <input checked="" type="checkbox"/> 미정		
Sponsor	쥬가화에프앤씨	Date	2019.09.20(금)

되어야 합니다.
2) 개시모임은 IRB 초심의 신청 후 일반적으로 1개월~2개월 사이에 이루어 집니다.

나. 인체적용시험을 위한 최적 생산품 제조를 위한 법제법 (태명청) 소개

1) 태명청 법제 가공법

태명청 법제는 엄선된 약재를 선별하여 음건(陰乾)과 폭건(暴乾), 채취시기, 생숙(生熟), 산지(產地), 진위(眞僞), 신진(新陳)에 따라 수치하는 법을 달리 하여 수치가공을 하여 그 효능을 극대화하는 과정을 거친 후 이를 건조하여 사용함.

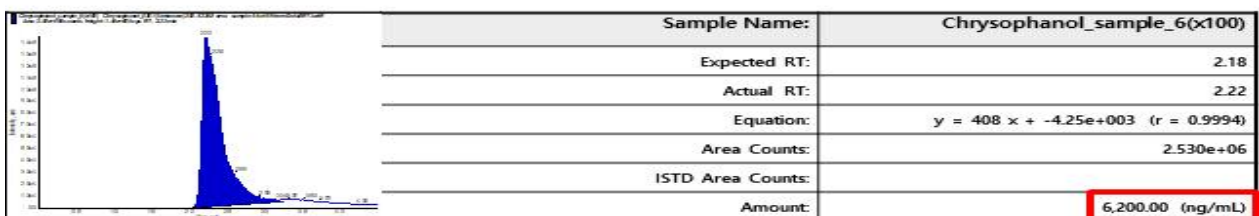
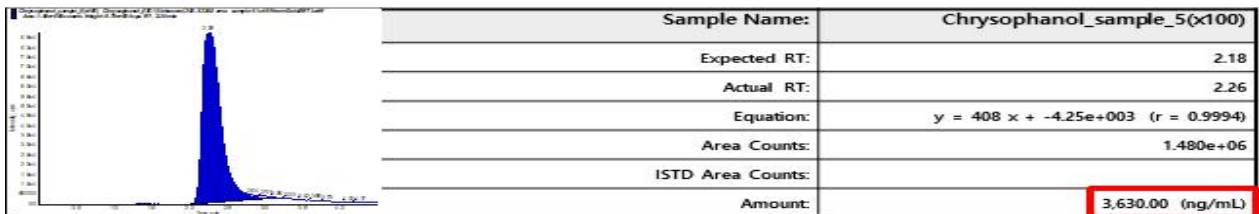


2) 태명청 법제 활용 사례

소리쟁이에 함유된 유효성분 크리소파놀(Chrysophano) 성분의 태명청 법제 약재로 가공시 추출함량 증가

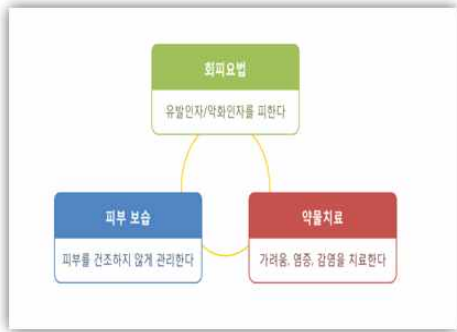
소리쟁이 법제전 3,630.00 ng/ml의 크리소파놀 함량

태명청 법제 약재로 가공후 6,200.00 ng/ml로 추출함량이 41.45% 증가



제3절 일반식품 및 건강기능식품의 판매 전략

1. 아토피피부염의 치료의 한계 및 대안 치료제의 필요성



단계별 아토피피부염의 치료

- 1단계 : 유발/악화인자를 피하는 회피요법
- 2단계 : 피부 건조방지 / 피부 관리
- 3단계 : 적절한 약물을 통한 약물치료

아토피성 피부염은 장기간 치료/관리 요구되며 만성전신면역질환으로 중증환자는 일상생활이 힘든 수준으로 1,2 단계로는 치료 및 호전이 안되어 부득이 3단계의 약물치료가 필요하나 국소 항염제 / 항히스타민제를 주로 사용하는 실정임.

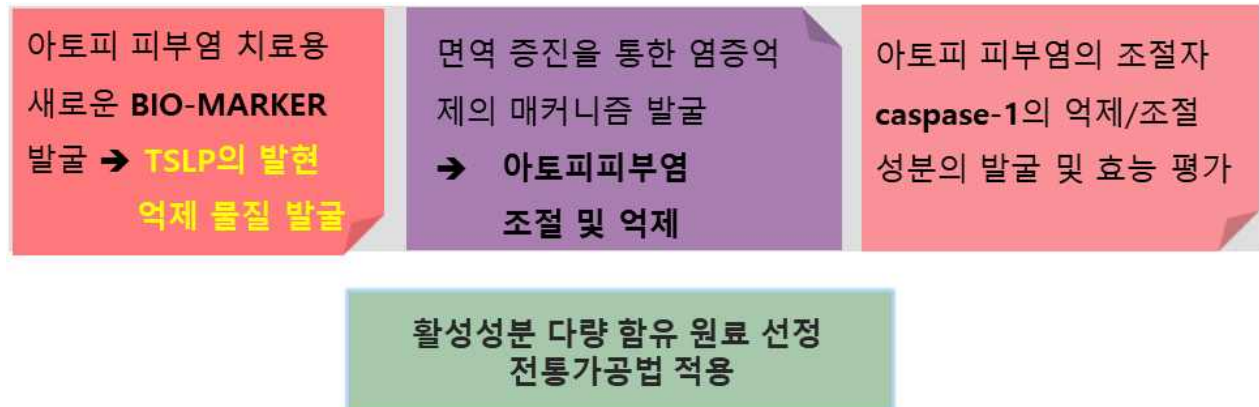
이러한 국소용 스테로이드제를 사용케 되면

- . 피부가 얇아지거나 혈관이 확장되어 이차 감염이 발생 하기도 함.
- . 정신적으로는 우울증, 집중력 장애, 무기력증을 일으킬 수 있음.
- . 피부면역이 약화되어 장기치료가 어려움.

의 발병원인 및 적절히 부작용이 없이 아토피 피부염을 조절/개선하는 새로운 대안치료제가 필요함.

2. 아토피피부염의 난치성을 극복하는 기능성 식품 발굴

아토피피부염 개선/조절 패러다임 발굴



3. 사업화 추진을 위한 제품개발 목표 및 개요

가. 아토피 피부염 개선 효과 보유

- 1) 알러지 반응을 억제하는 효능 보유
- 2) 면역증진을 통한 항염 효과 보유
- 3) 항산화 / 면역력 증강 효능 보유

나. 특화된 원료 및 정통가공법 적용

- 1) 효능강화를 위한 태명칭 법제기법 적용
- 2) 항염+면역력 강화+피부개선 효능을 보유한 천연물 채용 (동충하초+소리쟁이)
- 3) 활성성분의 최적 추출 및 선별 가공법 적용
- 4) 1일 섭취량을 달성하는 활성성분 함유 - 크리스파놀 , 코디세핀

다. 적용대상별 적합한 제형 다양화 제품 생산

- 1) 유아용 아토피피부염 조절용 제품 개발 - 액상 (80ml 1일 3회 복용)
 - . 염증 발현 사이토카인 억제 효능 확증
 - . 피부개선을 가려움 등 합병증 억제 효능 확증
 - . 법제기법 적용을 통한 유효성분 함유량 충족

- 2) 성인용 아토피피부염 조절용 제품 개발 - 분말/환 (고용량)
 - . 재발 및 고질화 방지를 위한 고농도 제형 제공
 - . 스테로이드제제과 동일한 효능, 부작용 최소화 목표
 - . 법제기법 적용을 통한 유효성분 함유량 충족

3) 적용대상에 적합한 제품 개발

예방용 건강음료 : 피부개선/염증억제&면역력 강화

환자 개선용 : 중증 및 성인재발환자 대응용

제품 제형 다양화 : 분말, 캡슐, 정, 티백 제형 추가 개발



4. 일반식품 - 고부가식품 - 피부보습 + 면역증진용 식품으로 마케팅 추진

면역력 증진 및 피부건강 증진용 식품 = 고부가가치 식품



최종목표	구상요소	농림수산물 소재 기능성식품 개발		
환경/시장 니즈		기능성 강화를 통한 고부가 식품 산업 육성 다산업과의 융복합 강화 건강기능식품의 범위 확대 및 산업 성장을 증가		
연도별 목표		소재개발	소재개발	제품화
면역증진식품개발기술	대사성 질환 개선	제지방감소기능 소재 확보	제지방감소 인체적용시험	면역증진식품 제품화
항고지혈식품개발기술		혈중지질개선 소재 확보	항고지혈 인체적용시험	항고지혈식품 제품화
항산화식품개발기술	항산화 및 피부 건강	항산화기능성 소재 확보	항산화소재 인체적용시험	항산화식품 제품화
피부보습식품개발기술		피부보습 소재 확보	피부보습 인체적용시험	피부보습식품 제품화
장년기개선식품개발기술	장년기 및 관절 개선	난소용제(OVA) 등골무혈 기능성소재 확보	장년기여성건강 인체적용시험	장년기개선식품 제품화
관절건강식품개발기술		관절건강기능성 소재 확보	관절건강소재 인체적용시험	관절건강식품 제품화
면역증진식품개발기술		면역증진 소재 확보	면역증진 인체적용시험	면역증진식품 제품화
간기능개선식품개발기술	면역증진 및 기타	간손상억제 기능성 소재 확보	간기능개선 인체적용시험	간기능개선식품 제품화
피로회복식품개발기술		피로회복 소재 확보	피로회복 인체적용시험	피로회복식품 제품화
눈건강식품개발기술		눈건강기능성 소재 확보	눈건강 인체적용시험	눈건강식품 제품화

5. 식품 + 의약외용품 + 이너뷰티 의 콜라보레이션 구축 = 매출증대 및 효능 극대화



6. 단계별 연구결과의 활용 및 사업 확대안



7. 아토피 피부염 조절 제품의 마케팅 전략

가. 타겟 및 차별화 전략

- 1) 주요 타겟 소비층
유병환자+난치환자에 대한 집중 공략
가벼운 유병환자에게 일반식품의 제형으로 판매
- 2) 천연물 유래 성분 (크리소파놀+코디세핀) + 태명청 법제의 기능성 부각을 통한 차별화 전략 - 피부건강 및 면역력 증진 제품임을 강조

나. 홍보 및 판매 전략

- 1) 온라인 쇼핑몰 및 아토피 환우 카페를 우선 공략
-> 소비자들의 인지도 확보 (바이럴마케팅)
- 2) 오프라인 매장 지속적으로 확장하여 접근성 강화
- 3) 홈쇼핑 및 온라인 쇼핑몰 최대 활용

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

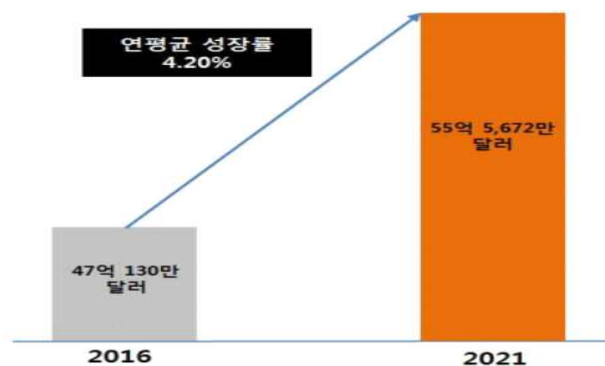
코드번호

D-08

제 1 절 국외 제품생산 및 시장 현황

1. 피부질환 치료제의 약 20% 정도가 아토피 치료제의 시장이며 2022년까지 56억달러 규모로 성장할 것이란 전망. 아토피 피부염의 환자 수는 2022년에 1억3800만명으로 증가할 것이며 특히 중국은 4800만명의 환자가 발생할 것으로 예측함 [GlobalData에서 2013년 11월 발표한 ‘ATOPIC DERMATITIS-Global Drug Forecast and Market analysis to 2022’].
2. 2014년 총 36억 달러 규모를 형성했던 주요 7개국, 미국, 영국, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인 및 일본은 아토피 피부염 치료제 시장이 오는 2024년에 이르면 2014년 보다 2배 이상 성장해 73억 달러 안팎에 도달할 수 있을 것으로 전망함 [영국 런던에 글로벌 본사를 둔 리서치 및 컨설팅기관 글로벌데이터사 ‘아토피 피부염: 오는 2024년까지 글로벌 전망 및 시장분석’ 보고서].
3. 2012년에는 8억300만 달러, 2013년에는 8 억2,900만 달러, 2014년에는 8억5,600만 달러에서 2017년에는 9억 4,200만 달러에 이를 것으로 예상되며, 2017년 이후로는 성장률이 다소 둔화되기 시작하면서 2020년 10억 2,900만 달러에 이를 것으로 예상됨 [2012 InnopolisBizReport, 연구개발특구진흥재단].
4. 아토피 피부염 치료제 산업의 특성
아토피 피부염 치료제 시장은 복잡한 발생 원인으로 인해 환자의 유형 구분에 따라 치료방법이 다양하게 필요하며, 이로 인해 커버하지 못하는 난치환자가 증대되고 있으며 이러한 미충족 수요로 인해 새로운 시장 창출의 기회가 큰 분야로 평가됨.
5. FDA의 승인을 받은 아토피 피부염 치료제는 ‘Elidel’ 과 ‘Protopic’ 2가지 치료제 만 존재하고 있었으며, 이들 치료제가 지난 10년 동안 시장을 독점하고 있는 실정임

[그림] 글로벌 아토피 치료제 시장 규모 및 전망



※ 자료 : TechNavio, Global Atopic Dermatitis Drugs Market, 2017

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
<input type="radio"/> 해당사항 없음	

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

		코드번호	D-11
구분	세부내용		
일일안전 점검	*점검횟수 : 매일 1회 *점검대상 : 전체 실험 실습실 *점검내용 : 일일안전점검표를 이용하여 실험 전·후 시약관리상태 및 정리정돈 점검 *점검자 : 연구활동종사자 및 연구실 책임자 *주관 : 연구실 책임자(주임교수)		
정기안전 진단	*점검횟수 : 연 1회 이상 *점검대상 : 전체 실험 실습실 *점검내용 : 8개분야 점검(일반안전, 산업위생, 전기안전, 소방안전, 화공안전, 가스안전, 기계안전, 생물안전) *점검자 : 안전진단 전문업체 위탁 *주관 : 사무처 관리팀		
정밀안전 진단	*점검횟수 : 2년 1회 *점검대상 : 정기안전진단에 따른 1~5등급 실험실 중 위험성이 높다고 판단되는 실험실(유해화학물질 및 독성가스 취급, 위험등급이 높은 실험실 등) *점검내용 : 8개분야 점검(일반안전, 산업위생, 전기안전, 소방안전, 화공안전, 가스안전, 기계안전, 생물안전) *점검자 : 안전진단 전문업체 위탁 *주관 : 사무처 관리팀		
안전순찰	*점검횟수 : 상시 또는 필요시 *점검대상 : 전체 실험 실습실 *점검내용 : 연구실 관리상태 및 일일안전점검표, 퇴실체크리스트 작성여부 점검, 위험기구 사용여부 확인 *점검자 : 연구실 책임자(주임교수) 또는 연구실 안전환경관리자(사무처 관리팀)		
1. 관리 위험등급 지정 가. 1등급 : 안전성이 유지된 실험실 나. 2등급 : 경미한 결함이 발견된 실험실 다. 3등급 : 일부 보수 및 보강이 필요한 실험실 라. 4등급 : 결함이 심해 긴급보수 및 보강이 필요한 실험실			

마. 5등급 : 심각한 결함이 있어 즉시 사용금지 및 보강이 필요한 실험실

2. 실험실 정밀안전진단 실시

가. 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학 물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실

나. 실시 : 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고

3. 교육 훈련

가. 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강

나. 홈페이지 명칭 : 경희대학교 안전정보망 (<http://safety.khu.ac.kr/>)

다. 교육대상 : 실험 및 실습에 참여하는 모든 연구활동종사자(학부생, 대학원생, 수료생, 기타연구원 등)

라. 교육 이수시간 : 반기별 6시간 이상 (온라인교육, 집체교육)

4. 교육내용

가. 온라인 안전교육: 12과목 (1학기: 공통 6과목 / 2학기: 선택 6과목)

나. 집체교육: 1회 이상 (안전환경관리자가 집체교육이 필요하다고 판단되는 경우)

다. 과목 : 연구실 안전법 및 규정, 안전과 심리, 캠퍼스 안전, 전기안전, 화재 및 소방안전, 사고대응 및 처리, 기계안전, 가스안전, 화학안전, 방사성안전, 생물학안전, 연구실 관리와 MSDS, 연구실 사고대처, 연구실 사고 예방, 화재로 인한 신체 피해, 화재 및 폭발

5. 진행사항

가. 교육대상자외의 기타 연구원 및 교육수강 희망자는 홈페이지에서 등록 후 수강가능

나. 이수증 발급 후 제출

다. 온라인 안전교육 수강 후에 평가시험을 실시하여 60점 이상은 교육 이수증 발급

라. 발급받은 이수증은 2부를 출력하여 1부는 출입 실험실에 게시 및 보관하고, 다른 1

부는 소속 행정실에서 모두 취합하여 관리팀으로 제출하여야 함

6. 실험실 안전 환경교육 미 이수자 조치사항

가. 장학금의 미배정 및 불이익

나. 지도교수의 개별 면담

다. 안전사고에 대한 보험처리 불이익

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

코드번호

D-12

1. 특허 출원

특 허 출 원 서

출원인참조번호 :

대리인참조번호 : PN122843KR

출원번호	특허출원 제18-174234호	심사청구
출원일자	2018년 12월 31일	유
발명의 명칭	법제된 소리쟁이를 포함하는 염증성 질환 치료용 조성물, 및 이의 제조방법 Composition for treating inflammatory diseases comprising detoxicated Rumex crispus L., and method for preparing the same	

독립항	3
종속항	13
명세서	26
도면수	5
도 수	6

출원인	차의과학대학교 산학협력단, (주)가화에프앤씨
발명자	박건영, 박의성, 송길훈, 유정, 김태영, 김홍규

2. 논문 실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사 사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Molecular mechanisms of anti-inflammatory effect of chrysophanol, an active component of AST2017-01 on atopic dermatitis in vitro models.	호서대학교	교신	International Immunopharmacology	3.361	2018.01.30	단독	SCI/
2	논문	Regulatory effects of chrysophanol, a bioactive compound of AST2017-01 in a mouse model of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis.	경희대학교	교신	International Immunopharmacology	3.361	2018.09.01	단독	SCI/
3	논문	Use of Physcion to Improve Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions through Blocking of Thymic Stromal Lymphopoietin.	호서대학교	교신	Molecules	3.060	2019.04.15	단독	SCIE/
4	논문	Chrysophanol, an anthraquinone	호서대학교	교신	Inflammation Research	3.061	2019.06	단독	SCI/

		from AST2017-01, possesses the anti-proliferative effect through increasing p53 protein levels in human mast cells.							
5	논문	The ameliorative effect of AST2017-01 in an ovalbumin-induced allergic rhinitis animal model.	김형민	교신	Inflammation Research	3.061	2019.05	단독	SCI/
6	논문	Cordycepin diminishes thymic stromal lymphopoietin-induced interleukin-13 production	정현자	교신	European Journal of Pharmacology	2.896	2017.05.05	단독	SCI/
7	논문	An Atopic Drink (APD(AST-2017-01)) reduces Th2 cytokines in LPS-treated RAW 264.7 cells	박건영	교신	TANG[HUMANITAS MEDICI		2017. 8.31	단독	비SCI/
8	논문	Validation of chryso- phanol and cordycepin as marker compounds for standardization of a new herbal mixture AST2017-01	김형민	교신	TANG[HUMANITAS MEDICINE]		2017.8.31	단독	비SCI/
9	논문	Cordycepin ameliorates skin inflammation in a DNFB-challenged murine model of	김형민	교신	Immunopharmacology and Immunotoxicology		2018. 9. 5	단독	비SCI/

		atopic dermatitis.							
10	논문	Increased Anti-Inflammatory Effects of Processed Curly Dock (<i>Rumex crispus</i> L.) in Ex Vivo LPS-Induced Mice Splenocytes	박건영	교신	J Korean Soc Food Sci Nutr		2018. 5.10	단독	비SCI/
11	논문	Rumex crispus and Cordyceps sinensis Mixture Ameliorates Production of Pro-inflammatory Cytokines Induced by Lipopolysaccharide in C57BL/6 mice Splenocytes	박건영	교신	Prev Nutrition and Food Science		2018.12.10	단독	비SCI/
12	논문	The regulatory effect of AST cream on atopic dermatitis-like skin disease.	김형민	교신	TANG[HUMANITAS MEDICINE]		2019. 8.10	단독	비SCI/
13	논문	LPS로 유도된 RAW264.7 세포주 염증모델에서 소리쟁이의 법제처리에 따른 항염증 효과	박건영	교신	한국식품영양학회지		2019.10.15	단독	비SCI

11. 기타사항

코드번호	D-13
<input type="radio"/> 해당사항 없음	

12. 참고문헌

코드번호	D-14
Chen YH, Wang JY, Pan BS, Mu YF, Lai MS, So EC, Wong TS, Huang BM. Cordycepin enhances cisplatin apoptotic effect through caspase/MAPK pathways in human head and neck tumor cells. <i>Onco Targets Ther.</i> 2013;6:983-98.	
Choi YH, Kim GY, Lee HH. Anti-inflammatory effects of cordycepin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages through Toll-like receptor 4-mediated suppression of mitogen-activated protein kinases and NF- κ B signaling pathways. <i>Drug Des Devel Ther.</i> 2014;8:1941-53.	
Cui J, Culbertson R, Mao Z and Mock BA. Novel therapeutic treatment utilizing cordycepin and cladribine synergy to decrease adverse treatment effects in various cancer cell lines. <i>JESS</i> 2013;2:20-4.	
Hwang S, Cho GS, Ryu S, Kim HJ, Song HY, Yune TY, Ju C, Kim WK. Post-ischemic Treatment of WIB801C, Standardized Cordyceps Extract, Reduces Cerebral Ischemic Injury via Inhibition of Inflammatory Cell Migration. <i>J Ethnopharmacol.</i> 2016;186:169-80.	
Kim SJ, Kim MC, Lee BJ, Park DH, Hong SH, Um JY. Anti-Inflammatory activity of chrysophanol through the suppression of NF-kappaB/caspase-1 activation in vitro and in vivo. <i>Molecules.</i> 2010;15(9):6436-51.	
Lee HS, Kim SK, Han JB, Choi HM, Park JH, Kim EC, Choi MS, An HJ, Um JY, Kim HM, Min BI. Inhibitory effects of <i>Rumex japonicus</i> Houtt. on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. <i>Br J Dermatol.</i> 2006 ;155(1):33-8.	
Li Y, Tian S, Yang X, Wang X, Guo Y, Ni H. Transcriptomic analysis reveals distinct resistant response by physcion and chrysophanol against cucumber powdery mildew. <i>Peer J.</i> 2016;4:e1991.	
Liu JY, Feng CP, Li X, Chang MC, Meng JL, Xu LJ. Immunomodulatory and antioxidative activity of <i>Cordyceps militaris</i> polysaccharides in mice. <i>Int J Biol Macromol.</i> 2016 ;86:594-8.	
Maksimović Z, Kovacević N, Lakusić B, Cebović T. Antioxidant activity of yellow dock (<i>Rumex crispus</i> L., Polygonaceae) fruit extract. <i>Phytother Res.</i> 2011;25(1):101-5.	
Rim HK, Moon PD, Choi IH, Lee EH, Kim HM, Jeong HJ. SoSoSo or its active ingredient chrysophanol regulates production of inflammatory cytokines & adipokine in both macrophages & adipocytes. <i>Indian J Med Res.</i> 2013;137:142-50.	

- Shiwani S, Singh NK, Wang MH. Carbohydrase inhibition and anti-cancerous and free radical scavenging properties along with DNA and protein protection ability of methanolic root extracts of *Rumex crispus*. *Nutr Res Pract*. 2012;6(5):389–95.
- Song J, Wang Y, Liu C, Huang Y, He L, Cai X, Lu J, Liu Y, Wang D. Cordyceps *militaris* fruit body extract ameliorates membranous glomerulonephritis by attenuating oxidative stress and renal inflammation via the NF- κ B pathway. *Food Funct*. 2016;7(4):2006–15.
- Song J, Wang Y, Teng M, Zhang S, Yin M, Lu J, Liu Y, Lee RJ, Wang D, Teng L. Cordyceps *militaris* induces tumor cell death via the caspase-dependent mitochondrial pathway in HepG2 and MCF-7 cells. *Mol Med Rep*. 2016;13(6):5132–40.
- Wang D, Zhang Y, Lu J, Wang Y, Wang J, Meng Q, Lee RJ, Wang D, Teng L. Cordycepin, a Natural Antineoplastic Agent, Induces Apoptosis of Breast Cancer Cells via Caspase-dependent Pathways. *Nat Prod Commun*. 2016 Jan;11(1):63–8.
- Wu G, Li L, Sung GH, Kim TW, Byeon SE, Cho JY, Park CW, Park HJ. Inhibition of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis by topical application of the butanol extract of *Cordyceps bassiana* in NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol*. 2011;134(2):504–9.
- Yang X, Li Y, He Y, Li T, Wang W, Zhang J, Wei J, Deng Y, Lin R. Cordycepin alleviates airway hyperreactivity in a murine model of asthma by attenuating the inflammatory process. *Int Immunopharmacol*. 2015;26(2):401–8.
- Yildirim A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J Agric Food Chem*. 2001;49(8):4083–9.
- Zhang DW, Wang ZL, Qi W, Lei W, Zhao GY. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) down-regulates the proinflammatory cytokines in inflammation-induced osteoporosis model. *Inflammation*. 2014;37(4):1044–9.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.