

발 간 등 록 번 호

11-1543000-002820-01

고부가가치식품기술개발사업 최종보고서

# 호흡기 보호 및 개선용 신규 기능성 식품개발 최종보고서

2019. 7. 26.

주 관 연 구 기 관 / (주)케 이 티 앤 지  
제1협동연구기관 / (주)한국인삼공사  
제2협동연구기관 / 대 전 대 학 교

농 립 축 산 식 품 부  
농림식품기술기획평가원



<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “호흡기 보호 및 개서용 신규 기능성 식품 개발”(개발기간 : 2015. 10. 23.  
~ 2019. 04. 22.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 07. 26.

주관연구기관명 : (주)케이티엔지 연구원 (대표자) 오 치 범 (인)

협동연구기관명 : (주)인삼공사 연구원 (대표자) 박 채 규 (인)

협동연구기관명 : 대전대학교 산학협력단 (대표자) 황 석 연 (인)

주관연구책임자 : 신 한 재

제1협동연구책임자 : 한 창 균

제2협동연구책임자 : 김 승 형

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.



<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	115002-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2015. 10. 23 ~2019. 04. 22	단 계 구 분	총 단 계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	호흡기 보호 및 개선용 신규 기능성 식품 개발			
연구책임자	신 한 재	해당단계 참여연구원 수	총: 23명 내부: 23명	3차년 연구개발비	정부:260,000천원 민간:260,000천원 계:520,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 63명 내부: 63명	총 연구 개발비	정부:780,000천원 민간:780,000천원 계:1,560,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)케이티앤지 연구원 분석연구소			참여기업명: (주)케이티앤지 (주)한국인삼공사	
1협동연구기관	연구기관명: (주)인삼공사 연구원			연구책임자: 한 창 균	
1협동연구기관	연구기관명: 대전대학교 산학협력단			연구책임자: 김 승 형	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

연구 내용 요약

보고서 면수

207면

1. 호흡기 효능 평가 및 유용 천연물 소재 선정
  - 대기 오염 물질 노출에 의한 호흡기 손상 모델 개발
  - 후보 천연물에 대한 호흡기 보호/개선 효과 비교 평가
  - 단일 및 복합제에 대한 활성 비교 평가
  - 최종 제품에 대한 호흡기 보호/개선 효과 검증
2. 효능 기전 연구
  - In vivo 미세먼지 / 폐질환 동물모델에서 유전자 마커 탐색 연구
  - In vitro 호흡기 보호 / 개선 작용기전 구명
3. 유효성분 도출 및 활성 성분 정제
  - 후보 천연물에 대한 유효성분 선정 및 분석법 정립
  - 신규 활성 성분 구명
4. 원재료 표준화 / 규격화 / 대량생산
  - 기간 및 산지별 원료 규격화
  - 규격화된 분획물의 효율적 생산을 위한 공정연구 및 pilot test 실행
  - 효율성 극대화를 위한 최적 생산 공정 확립
  - 비임상 및 인체적용시험에 필요한 시료 대량 확보
5. 국제기준 부합 제조 공정 최적화
  - 국제기준 부합 지표물질 표준품 분리·정제, 서류 작성 및 정합화(validated) 분석법 확립
6. 제형/제품별 제품의 안정성 조사
7. 단미 및 복합제 기준 및 시험법 guideline 확립
  - 기능성 원료 소재에 요구되는 각종 기준 설정
8. 인체적용시험(전북대 병원 기능성 식품 임상 지원 센터)
9. 특허 및 논문 / 식약처 「호흡기건강」 기능성 원료 인정 신청

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>[연구의 목적]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 호흡기 보호 및 개선용 신규 기능성 식품 개발</li> <li>- 대기오염에 의한 호흡기 염증/가래발생 억제 및 면역 활성을 위한 천연물 신소재 발굴</li> <li>- 고부가가치의 단일 또는 복합 기능성 천연물 소재 개발</li> <li>- 식약처 호흡기 개선 기능성 원료 개별 인증 신청</li> </ul> <p>[연구개발내용]</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 호흡기 효능 평가 및 유용 천연물 소재 선정             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대기 오염 물질 노출에 의한 호흡기 손상 모델 개발</li> <li>- 후보 천연물에 대한 호흡기 보호/개선 효과 비교 평가</li> <li>- 단일 및 복합제에 대한 활성 비교 평가</li> <li>- 최종 제품에 대한 호흡기 보호/개선 효과 검증</li> </ul> </li> <li>2. 효능 기전 연구             <ul style="list-style-type: none"> <li>- In vivo 미세먼지 / 폐질환 동물모델에서 유전자 마커 탐색 연구</li> <li>- In vitro 호흡기 보호 / 개선 작용기전 구명</li> </ul> </li> <li>3. 유효성분 도출 및 활성 성분 정제             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 후보 천연물에 대한 유효성분 선정 및 분석법 정립</li> <li>- 신규 활성 성분 구명</li> </ul> </li> <li>4. 원재료 표준화 / 규격화 / 대량생산             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기간 및 산지별 원료 규격화</li> <li>- 규격화된 분획물의 효율적 생산을 위한 공정연구 및 pilot test 실행</li> <li>- 효율성 극대화를 위한 최적 생산 공정 확립</li> <li>- 비임상 및 인체적용시험에 필요한 시료 대량 확보</li> </ul> </li> <li>5. 국제기준 부합 제조 공정 최적화             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국제기준 부합 지표물질 표준품 분리·정제, 서류 작성 및 정합화(validated) 분석법 확립</li> </ul> </li> <li>6. 제형/제품별 제품의 안정성 조사</li> <li>7. 단미 및 복합제 기준 및 시험법 guideline 확립             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기능성 원료 소재에 요구되는 각종 기준 설정</li> </ul> </li> <li>8. 비임상 연구</li> <li>9. 인체적용시험(전북대 병원 기능성 식품 임상 지원 센터)</li> <li>10. 특허 및 논문 / 식약처 「호흡기건강」 기능성 원료 인정 신청</li> </ol>
------------------------	---

<p>연구개발성과</p>	<p>□기술적 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사회적 문제가 되는 대기오염에 의한 호흡기 보호/개선용 신규 기능성 식품 개발</li> <li>- 고부가가치의 단일 또는 복합 기능성 천연물 소재 개발</li> </ul> <p>□ 경제적 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 자생식물을 이용한 호흡기 보호 및 개선용 기능성원료 개발로 신 부가가치 창출</li> <li>- 기술성 높은 제품으로 선진국 제품과의 경쟁력 확보 가능</li> </ul> <p>□ 사회적 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 안전성 및 약효가 높은 호흡기 유용 천연물 소재를 개발함으로써 삶의 질 향상 추구</li> </ul> <p>□ 상품화 및 사업화 방법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 건강기능 식품 국내 1위 회사인 한국인삼공사는 천연물에 대한 효능검증 및 제형화/제품화 연구를 위해 우수 인력 및 기술력을 확보하고 있으며, 제품 GMP생산/인체적용시험 및 식약처 건강 기능성 원료 인증을 통한 사업화에 풍부한 노하우가 있음</li> <li>- 본 연구과제 수행을 통해 사회적으로 문제가 되는 대기오염에 의한 호흡기 손상에 대한 보호/개선할 수 있는 신규 기능성 천연물 신소재를 개발해서 삶의 질을 향상 시킬 수 있는 고부가가치의 기능성 식품 제품 개발과 사업화에 성공할 수 있음</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1. 본 연구과제 수행의 궁극적인 목표는 사회적으로 문제가 되는 대기오염에 의한 호흡기 손상에 대한 보호/개선할 수 있는 신규 기능성 천연물 신소재를 개발함으로써 삶의 질을 향상시키고 고부가가치의 천연물을 발굴하고, 효능검증 및 소재 표준화와 비임상/인체적용시험 등을 통해서 천연소재의 안전성과 유효성을 검증하여, 식약처 건강 기능 원료 인증을 받고자 함.</p> <p>2. 이러한 호흡기 보호/개선 유용 신소재 개발을 위한 후보 생약 선정 과정에서 천연물 data base 및 추출물 library가 일정 부분 구축되어져 향후, 다른 영역의 천연물 신소재 개발에 활용가치가 높을 것으로 사료되며, 이에 따른 활성물질 연구가 촉진되어 천연물 유래 유도체 합성연구에 의한 신약 개발로의 적용 가능성도 크다고 할 수 있음.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>대기오염물질</p>	<p>호흡기</p>	<p>염증</p>	<p>천연물</p>	<p>기능성 식품</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Air pollutant</p>	<p>Respiratory</p>	<p>Inflammation</p>	<p>Natural product</p>	<p>Funtional food</p>

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	26
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	198
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	200

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서



# 1. 연구개발과제의 개요

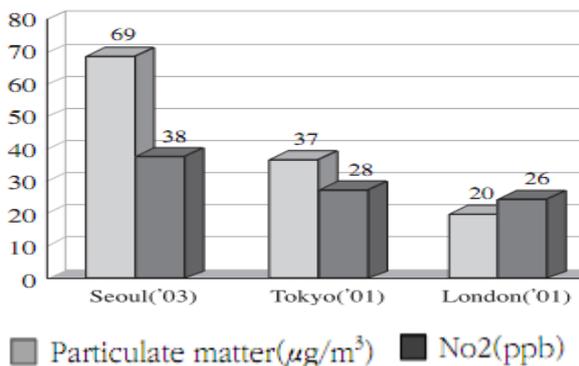
## 1-1. 연구개발 목적

- 호흡기 보호 및 개선용 신규 기능성 식품 개발
- 대기오염에 의한 호흡기 염증/가래발생 억제 및 면역 활성을 위한 천연물 신소재 발굴
- 고부가치의 단일 또는 복합 기능성 천연물 소재 개발
- 식약처 호흡기 보호제(또는 면역력 증강) 기능성 원료 개별 인증 신청

## 1-2. 연구개발의 필요성

### □ 연구 배경(미세먼지 등 대기오염에 의한 사회적 문제)

1. 국민건강보험공단 발표에 의하면 우리나라에서 최근 6년간 주요 환경성질환 진료환자를 분석한 결과, 알러지 비염 환자가 2002년 302만 명에서 2008년 495만 명으로 급증하는 등 2008년에는 전년(455만명) 대비 8.7 % 늘었으며, 특히 인구 1만 명당 환자 수는 1034명으로 2002년 631명에서 연평균 6.4 %씩 증가하고 있음.
2. 또한 알러지성 비염을 비롯해 천식·아토피 피부염 환자를 합하면 2002년 557만명이던 환경성질환 환자 수는 2008년 759만 명으로 200만 명 이상 늘었고, 만성기관지염과 폐렴과 같은 만성하기도 질환에 의한 사망률도 해마다 증가하고 있음(Kim *et al.*, Cause of death in COPD patients of a referral hospital, Tuberc Respir Dis 2006; 60(5): 510-515). 또한 대기오염원과 호흡기질환과의 관련성에 관한 연구도 많이 보고되고 있음 (Oh *et al.*, Genetoxic effect of air-borne particulate matter in residential area of Seoul city, J Environ Toxicol 2005; 20(4):365-374.).
3. 우리나라의 경우 최근 중국으로부터 유입된 미세먼지 증가와 급격한 산업화 및 도시화를 거치면서 호흡기 질환의 원인이 되는 공장/자동차 배기가스 등의 대기오염물질 및 외부적인 미세먼지 등에 대한 노출이 선진국에 비해 2배 이상 높아졌을 뿐만 아니라(미세먼지현황 2013, 환경부) 신종플루, MERS 등 새로운 바이러스들의 출현에 따라 천식을 포함한 기도손상 질환 및 급성 기관지염 등 생물학적 변화와 대기오염에 의한 호흡기 관련 질병의 유병률이 증가하고 있는 상황임.



4. 이에 따라, 면역력 증진에 의한 외인물질 제거와 염증 반응의 완화 및 인체에 유해한 미세먼지의 체내 흡입을 막아줄 뿐 아니라 미세먼지 등 대기오염 물질 노출에 의해 발생하는 호흡기 손상과 질환을 예방 및 치료할 수 있는 기능성 신소재 발굴을 통한 국민 건강증진이 시급함.

## □ 연구 개발의 필요성 및 연구 기관의 중요성

1. 기침 및 가래를 포함한 호흡기질환은 급속한 산업화로 인한 대기오염 및 미세먼지 등에 의해 더욱 더 심각해지고 있으며 전 세계적으로도 연구 및 치료약개발이 증가하는 추세이지만 국내에서는 전문적인 연구가 진행된다고보다 종합감기약의 형태로 유사한 성분들이 남용되는 경향을 가지고 있어 더욱더 체계적인 연구 및 효과적인 신소재 개발이 필요함.
2. 호흡기손상은 환자의 일상적인 생활에 영향을 일으키기 때문에 이 질병에 의해 야기되는 경제적 손실로, 미세먼지 등 대기오염에 인한 호흡기 보호 및 개선은 곧 사회적인 문제의 해결에 크게 기여할 것이며, 호흡기 유용 신소재 개발은 국가 기술력 향상에 기여함은 물론, 경제·산업과 관련된 측면에서 커다란 도움이 될 수 있음.
3. 최근 들어 천연물을 활용한 기능성 신소재 개발이 여러 질환군 별로 다양하게 이루어지고 있으나, 미세먼지 등 대기오염 물질에 인한 호흡기 손상 및 질환을 예방/치료하는 기능성 신소재 개발 연구는 현재까지 없는 실정인데, 이는 호흡기 유발 질병에 대한 연구가 어렵기 때문임. 호흡기 독성평가 시스템을 구축한 본 연구 기관에서는 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 호흡기 염증 평가를 통해서 호흡기 염증을 억제하는 다수의 천연물 소재를 발굴하였으며, 향후 미세먼지 등 대기오염 물질에 의한 호흡기 손상 시스템을 구축하여 지속적인 소재개발 연구와 활성 검색 연구를 진행하여 호흡기에 유용한 기능성 신소재를 개발하고 표준화/비임상/인체적용 시험 등 수행하고자 함. 이를 통한 식약처 건강 기능성 원료 인증을 획득 및 고부가가치의 신규 기능성 식품 소재를 개발해서 농가의 새로운 수입원을 창출하고자 함.
4. 한편, 천연물은 제품화에 있어 많은 제약을 가지고 있는데 특히, 용법용량의 문제, 원료 생약 및 추출물의 규격화 및 표준화의 문제, 그리고 제제화의 문제 등 여러 가지 어려움이 많아 연구자나 기업에서 산업화를 추진하는데 많은 애로사항들이 있는 것이 현실이나, 이러한 문제는 예로부터 사용해온 것을 현대화, 과학화하려는 노력의 부재로 볼 수 있으며 이러한 한계를 극복함으로써 무궁무진한 천연자원을 적절히 활용할 수 있으리라 사료됨. 이에 천연물을 원생약에서부터 추출물 및 분획물에 이르기까지 표준화/규격화/제형연구를 통한 소비자의 편리성을 높인다면 새로운 시장을 창출할 수 있으리라 기대됨.
5. 호흡기 유용 신소재 개발을 하기 위한 비임상 및 임상 단계에서는 활성이 우수한 소재를 발굴 할 수 있는 역량을 확보하여 이 분야에서 기술경쟁력을 확보해 나가야하며 대량생산 기술을 보유하여 이에 대한 노하우를 축적해야 함. 이를 위하여 호흡기 손상/질환 평가, 특히 흡입독성 시스템과 호흡기 손상 및 질환을 평가 하기위한 기반 기술, 신소재 발굴과 탐색기술 및 제품개발에 필요한 응용연구기술력이 있는 연구기관의 필요성이 있음.
6. 본 과제를 수행하려는 연구기관(KT&G 연구원)은 흡입독성 평가 시스템을 보유해서 다양한 호흡기 손상 및 질환에 관련된 연구 노하우가 축적되어 있음. 최근에 미세먼지 발생 및 노출 장치를 도입하였으며, 초미세먼지 사업단(사업단장 : 광주과기원) 연구과제에 관여해서 초미세먼지 대기오염물질에 의한 생물학적 독성 비교평가 연구를 수행하고 있음. 건강 기능 식품 국내 1위 회사인 한국인삼공사에서는 천연물에 대한 효능검증 및 제형화/제품화 연구를 위한 우수 인력 및 기술력이 이미 확보되어 있으며, 인체 적용 시험 및 식약처 건강기능성 원료 인증을 통한 제품개발 및 사업화에 풍부한 노하우가 있음

## □ 국내외 기술 동향

### 1. 호흡기 개선/보호 기능성 원료 연구 동향

호흡기 개선 기능성 원료에 대한 검증 시스템 구축의 어려움 때문에 활발하게 진행되는 연구는 없으며, 식약처로부터 호흡기 관련 건강 기능성 원료 인증을 받은 사례는 없음. 미국의 BIOTHERA에서 개발한 면역&글루칸 “웰문”은 베타 글루칸으로 코막힘, 콧물, 목아픔, 재채기, 기침, 피로, 두통 등의 상기도 감염 발생자에 대한 신체의 면역 체계를 강화하는데 도움을 주는 것으로 2013년 식약처로부터 개별 인전형(면역증강) 원료로 인증을 받음.

### 2. 미세먼지 등 대기오염물질에 대한 연구

정부에서는 2014년부터 미세먼지에 대한 사회문제 해결을 위해 2014년부터 3년간 80억을 지원해서 초미세먼지 피해저감(주관기관: 광주과학기술원(GIST)교수) 연구를 실시하고 있음. 한국기초과학지원연구원은 “미세먼지가 토양과 식물에 끼치는 영향” 한국지질자원연구원은 “대기중의 미세먼지가 인체에 미치는 영향”, 한국표준과학연구원은 “오존 측정” 등 분야별로 다양한 연구를 진행하고 있으며, 환경부에서는 “대기중 미세먼지의 건강위해성 평가” 및 “경유자동차의 미세먼지의 인체 위해성 영향 평가” 등을 수행 하였음.

### 3. 호흡기 질환 치료제 개발 연구 동향

- 한국에서는 최근 천식이 급격히 증가하였고, 국내의 천식환자는 500만명, 만성호흡기 질환 환자는 360만명으로 추산됨(천식의 사회적 비용. 서울대학교 보건대학원 2004년).
- 세계 상위 치료제 의약품 시장 중 호흡기 관련 제품은 상위(3위)를 차지하고 있으며, 336억 달러 (30조, 국내 7500억) 규모임. 현재까지의 천식 및 만성 호흡기 질환 치료약은 증상 완화제(reliever)와 예방약제(controller)로 구분됨. 현재까지 출시된 치료약물을 비교해보면, 천식 및 만성호흡기 질환(COPD)의 병리학적 기전이 분자수준에서 밝혀짐에 따라, 보다 명확한 대상을 가지고 그에 대한 길항제 개발 방향으로 진행되어 왔음.
- 거대 제약회사들의 호흡기질환 치료제 개발은 천식과 만성폐쇄성질환에 중점을 두고 연구하고 있는 실정임. 그러나 천식과 만성폐쇄성질환 환자에 처방되는 약의 32.1 %가 진해거담제로, 37.2 %의 기관지확장제를 뒤이어 2위로 처방되고 있는 실정임(Datamonitor, 2005년). 국내 호흡기질환 치료제 시장에서 기침, 감기용제 시장 2,387억 중 진해거담제가 1,588억으로 65 % 이상을 차지하고 있음(IMS data, 2006년).
- 국내 호흡기 치료제 연구의 특징은 생약 추출물을 이용한 천식치료제 개발이 대세라는 점임. 현재 개발 중인 생약 성분 천식 치료제는 SK 케미컬(산두근 추출물)과 영진약품(일지향 추출물)에서 진행하고 있으며 현재 임상 연구 진행 중임.

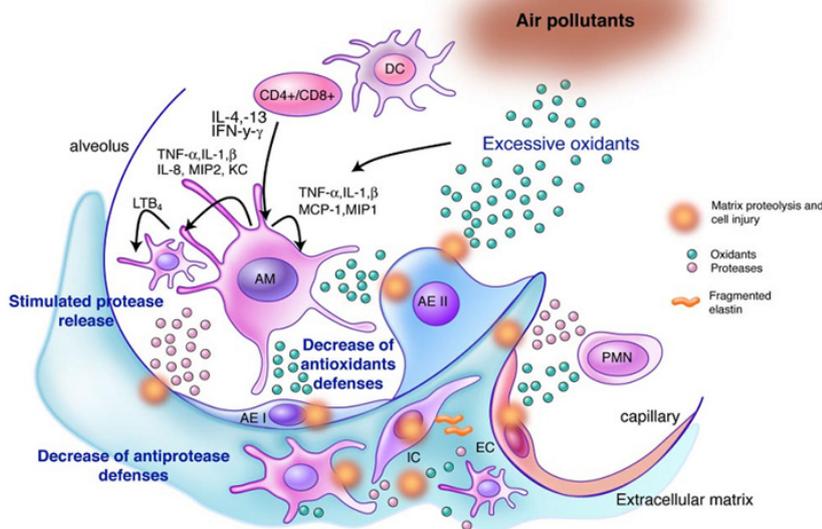
### 4. 향후전망

이에 따라, 미세먼지 등 대기오염 물질 노출에 의해 유발되는 호흡기 손상과 질환을 예방 및 치료할 수 있는 기능성 신소재를 발굴해서 호흡기 손상 및 질환에 특이적인 예방 및 치료제 개발로 인한 경제적 부가가치 및 국제적인 경쟁에서 우위를 차지할 수 있음.

□ 호흡기 손상 기전 및 선행 연구 결과

1. 호흡기 손상 및 질환 유발 원리 고찰

- 우리 몸의 호흡기는 자극물질에 대해 끊임없이 방어하고 있는 기관임. 즉, 자극물질이 호흡기로 들어오면 대부분의 자극물질은 코털에 걸려 호흡기로 들어오지 못하나 이를 통과한 미세한 자극물질은 점액으로 둘러싸여지고, 기도 벽에 위치한 미세한 섬모의 운동에 의해 자연적으로 위로 넘어가거나 혹은 기침에 의해 밖으로 내보내지게 됨.
- 호흡기 염증은 매연, 알레르겐, 바이러스, 찬바람, 운동, 호흡기 감염 등 매우 다양한 소인에 의하여 악화될 수 있으며, 지속적인 염증은 기도의 변형 및 기도의 과민성(hyper-responsiveness)을 야기함. 이러한 호흡기 염증에 의해 네 가지 병적 증상으로 요약될 수 있는데, 기도내의 호산구(eosinophils)의 유입이 현저하게 증가하고, 점액(mucus)이 과다하게 분비되며, 부종(Edema)이 관찰되기도 하고, 무엇보다 기도(airway)가 좁아지는 것을 특징적인 소견으로 하고 있음.
- 면역학적으로는 호산구(eosinophils)의 침윤, Th1 세포수에 비해 Th2 세포수의 증가, 활성화 비만세포(mast cell)수의 증가를 특징으로 하는 만성기도 염증질환임. 비만세포 등의 염증세포가 활성화되면 다양한 염증 매개인자를 유리, 기도에서 기관지수축, 혈관확장, 감각신경 감작화, 콜린성 기관지수축 등의 급성 염증 반응을 일으킴.
- 호흡기도는 크게 점막과 기관지 평활근이라는 근육으로 이루어져 있고 점막에는 많은 분비샘들이 있어 필요한 분비물을 계속 분비하고 있으며 기관지평활근이 수축하면 호흡기도가 좁아지게 됨. 미세먼지 등과 같은 대기오염 물질 및 호흡기 감염 등 매우 다양한 소인에 의하여 염증반응이 일어나면 분비샘에서 나오는 분비물이 더욱 증가하게 되고 이 분비물이 기도를 막아 점막이 기도 안쪽으로 부어오르게 되어 기도를 더욱 좁게 만듦.
- 천식은 기관지 협착증에서 만성적인 기관지염증 질환으로 개념이 새로 정립되었으며, 증상이 있을 때 완화시키는 것도 중요하지만 장기적으로 염증을 관리하는 근본적인 치료방법이 중요함.



▲ 대기오염 물질에 의해 유발되는 호흡기 염증 작용 기전

## 2. 선행 연구 결과

### 1) 가능성 있는 자생식물 선정

한국의 수천 년에 걸친 임상적 평가로 그 효능, 효과뿐만 아니라 안전성이 어느 정도 검증된 다양한 종류의 천연물이 사용되어 왔으며, 민간에서도 나름대로의 비법이 전수되어 활용되고지고 있는 실정임. 이러한 동양의학적 임상 경험에 대한 전문가 N/W, 문헌조사 등의 기초 연구하에 면역 증진 활성, 항산화 및 염증 억제 등에 대해 활성이 있을 것으로 사료되는 측백, 창포, 익모초 등 개발가능성 있는 후보 자생식물 154종을 1차 선별하였음

### 2) 154종 자생식물에 대한 추출물 조제 및 면역/염증 억제 활성 평가

⇒ 100 % MeOH 추출물, 건조 상태, 600 mg 조제

⇒ 추출물에 대한 면역 세포주를 이용한 항염증 작용 평가

- 염증성 Cytokine Interleukin 4 발현 inhibition 측정
- 초기 염증 발현지표 물질인 NO 발현 inhibition 측정
- 비장세포 증식 활성도 측정



⇒ 50 % 이상 저해율 및 증식활성도 기준으로 측백엽 등 자생식물 61종 선정

### 3) 호흡기 염증 억제를 위한 주요 Target 설정

미세먼지 등 대기오염물질에 대한 노출이 증가됨에 따라 천식을 포함한 기도손상 질환 및 급성 기관지염 등 호흡기 관련 질병의 유병률이 증가하고 있는 상황임. 그러므로 호흡기 염증 및 기도 리모델링 등을 일으키는데 주요하게 관여하는 물질인 Leukotrienes 생성에 관여하는 효소인 5-lipoxygenase를 저해 활성은 중요한 연구 Target 중에 하나임.

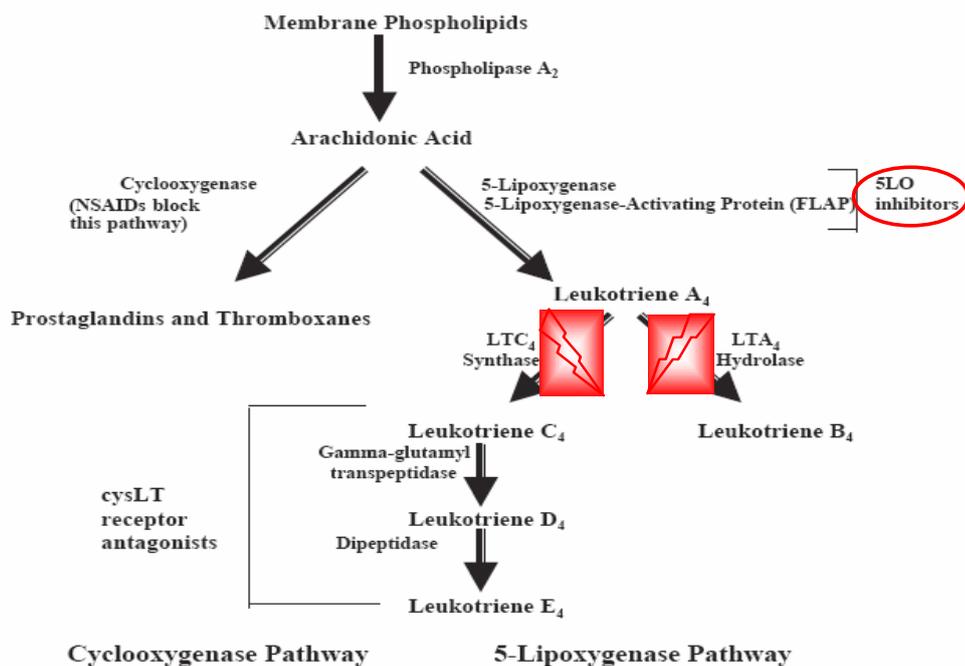
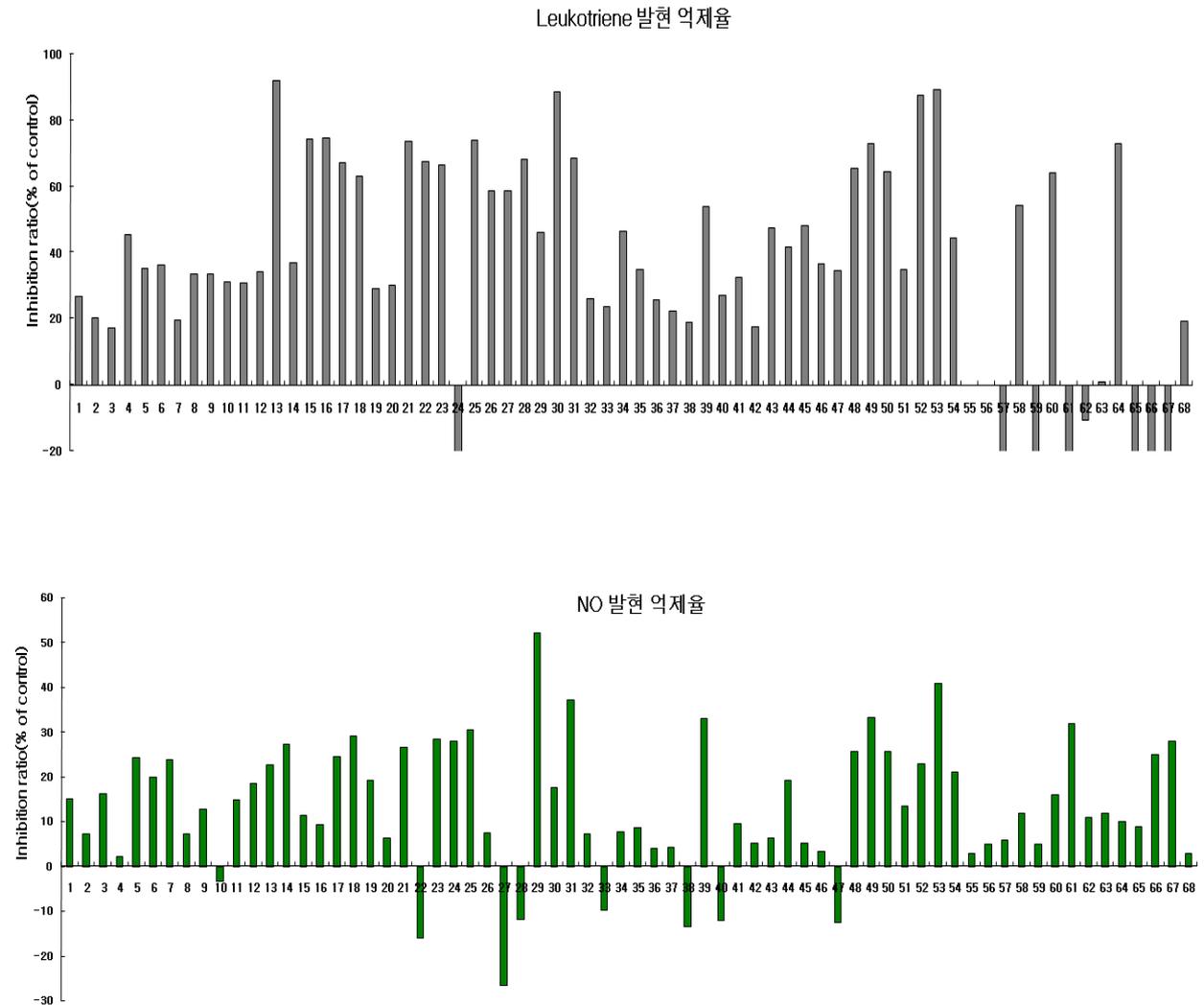


Fig. 1. The arachidonic acid cascade.

#### 4) Leukotriene 억제 활성의 평가에 의해 자생식물 3차 선별

2차 선별된 자생식물 63종에 대하여 70 % 에탄올을 이용해서 추출 및 분획하여 감압농축 및 건조과정을 통해 분말의 형태로 추출하여 NO 및 Leukotriene 발현 억제 활성을 비교 평가 하였음.

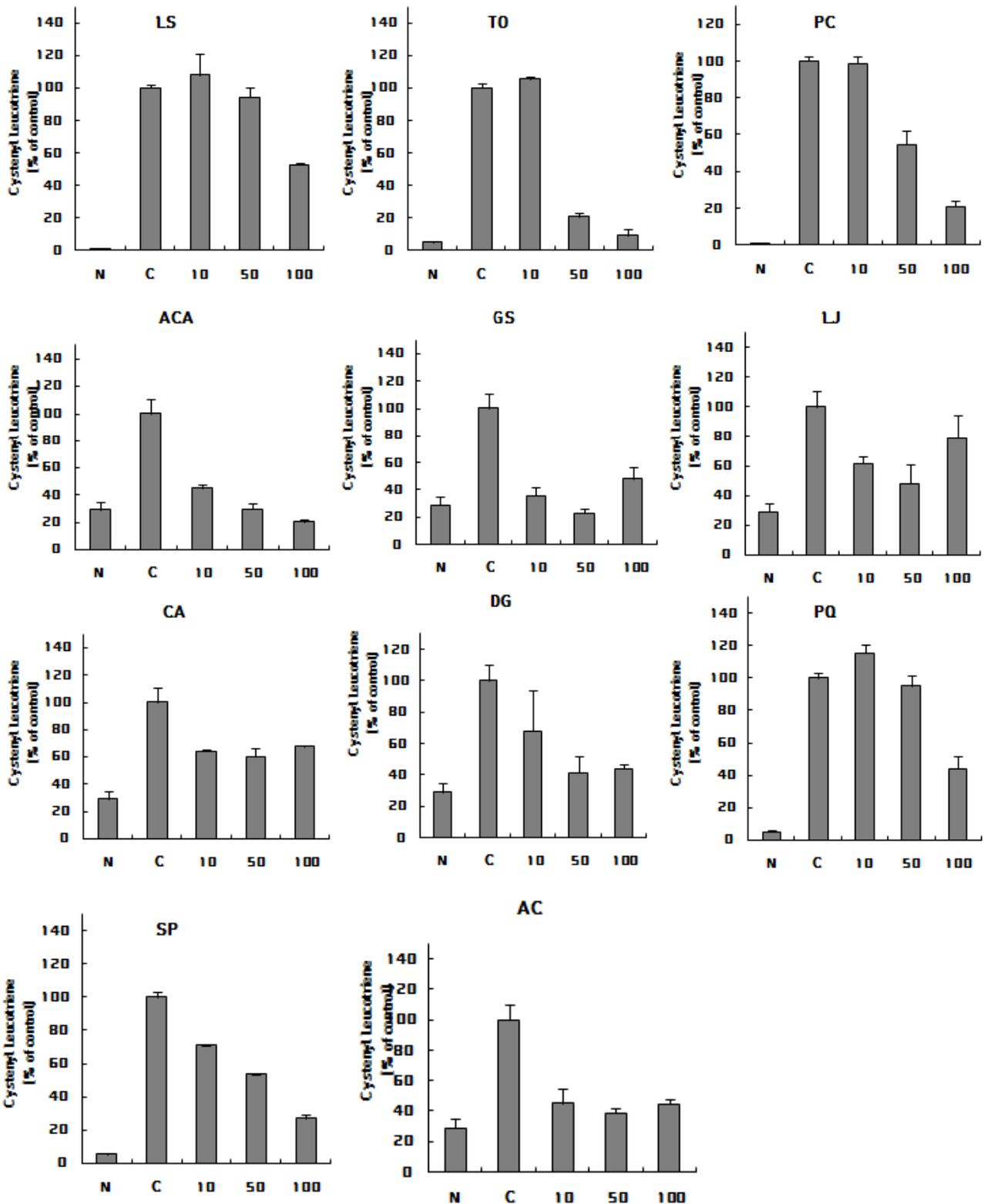


#### ▲ 자생식물 70 % 주정 추출물에 대한 in vitro 활성 비교

⇒ 자생식물(63종)의 70 % 주정 추출물에 대한 세포주로부터 NO 및 Leukotriene 발현 억제 활성을 비교 평가한 결과, 13, 30, 52, 53 등은 80 % 이상의 높은 Leukotriene 생성 억제 활성을 보였으며, 31과 29 등은 50 % 이상 NO 생성 억제활성을 보였음.

⇒ 최종적으로 양성대조약물(Montelukast, Rolipram) 대등 이상 효과를 보인 측백 등 자생식물 13종을 호흡기 유용 신소재 개발을 위한 후보로 선별하였음.

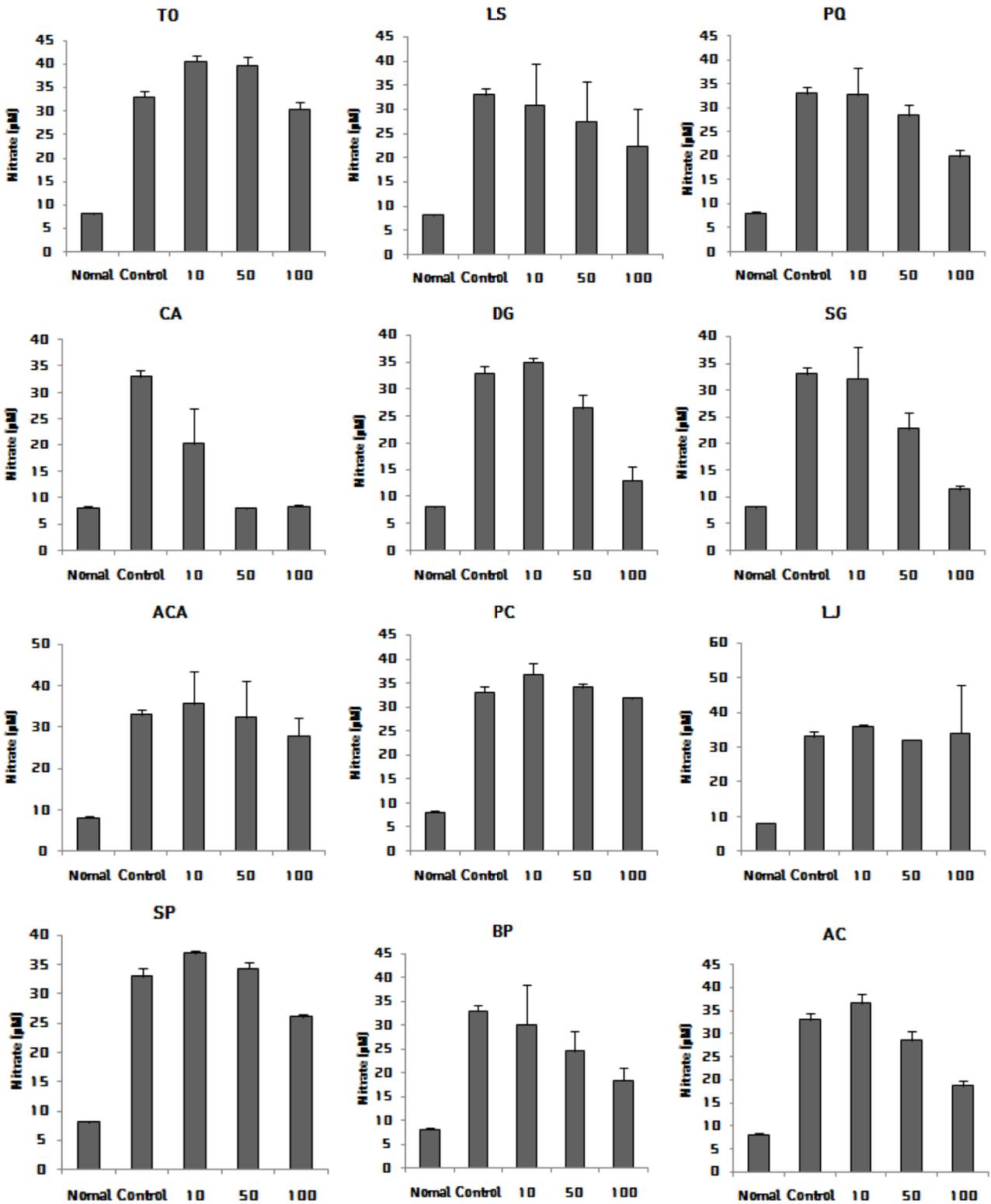
5) 후보 자생식물 추출물에 대한 농도별 염증 억제 활성 비교(In vitro)



▲ RBL-2H3 세포 이용 5-Lipoxygenase 활성(Leukotriene 발현) 억제 평가

⇒ RBL2H3세포를 이용 Leukotriene 발현에 대한 영향을 조사한 결과, 위의 11종의 추출물에서 농도 의존적인(10 μg/mL ~ 100 μg/mL) 억제 효과가 관찰됨

6) 후보 자생식물 추출물에 대한 농도별 염증 억제 활성 비교(In vitro)



▲ RAW 264.7 대식세포를 이용한 NO 발현 억제 평가

⇒ 대식세포를 이용한 NO 발현에 대한 영향을 조사한 결과, 위의 12종의 자생식물 추출물에서 농도 의존적인(10 µg/mL ~ 100 µg/mL) 억제 효과 관찰됨

7) 후보 자생식물의 대량 추출물 제조 및 in vitro 안전성 평가

▲ 13종 자생식물에 대한 특징 / 추출수율 / 유전 및 세포독성 비교

자생식물 (기호)	부위	식품공전	추출주정함량(% )	추출 수율	유전독성 (Ames)	세포독성(EC <sub>50</sub> ) (µg/mL )
DS	전초		50	18.3	음성	477
TO	줄기/잎	잎	50	20.4	음성	70
ACA	전초	뿌리/줄기	70	21.1	음성	36
PC	지상부	순/뿌리	50	14.9	음성	1000 이상
AC	전초	지상부	50	15.1	음성	288
CA	잎		50	10.1	음성	52
DG	꽃봉우리		70	23.5	음성	271
LJ	전초	지상부	70	12.2	음성	706
LS	전초	지상부	50	12.8	음성	233
SG	전초	잎	50	15.2	음성	144
BP	줄기		50	9.5	음성	172
PQ	줄기		50	4.6	양성	349
SP	잎	잎/식용	50	38.6	음성	751

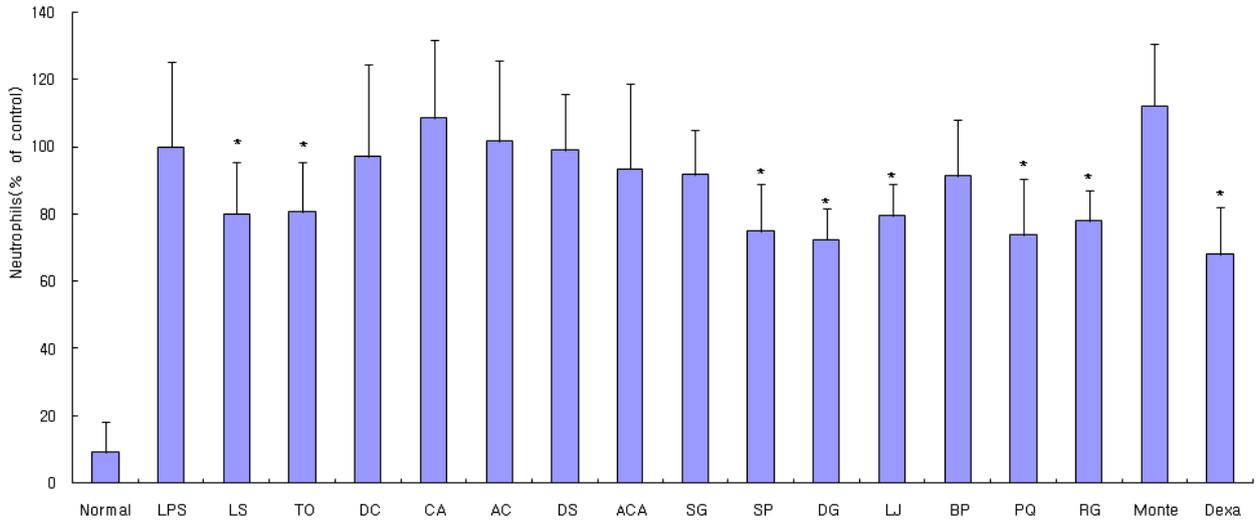
※ 유전독성은 “의약품 등의 독성 시험 기준”에 따른 평가

※ 세포독성은 CHO 세포주를 이용한 Neutral Red Uptake 방법에 따른 평가

⇒ 추출 수율은 곱보배추 및 측백엽이 20 % 이상 높았으며, 유전독성 평가에서 양성이 나온 PQ는 제품개발 포기함. PC/SP 등은 세포독성이 낮았음.

8) 후보 자생식물의 호흡기 염증 억제 효능 평가

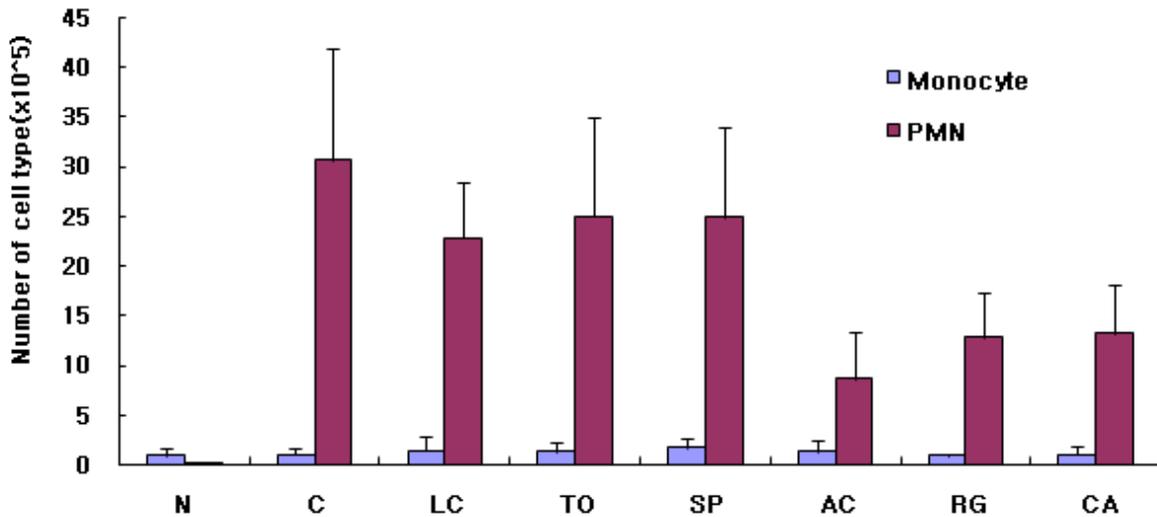
8-1) LPS에 의한 급성 호흡기 염증 억제 효과 평가(in vivo 평가)



양성 대조약물: Mont./Dexamethasone 등, 자생식물 시료: 200 mg/kg,BW 경구투여

→ 시료를 3일간 경구투여 후 기관지로부터 급성염증 세포인 Neutrophil의 함량을 비교 평가한 결과, 대조군 대비 측백엽 등 7종에서 급성 염증 억제 효과를 보였음

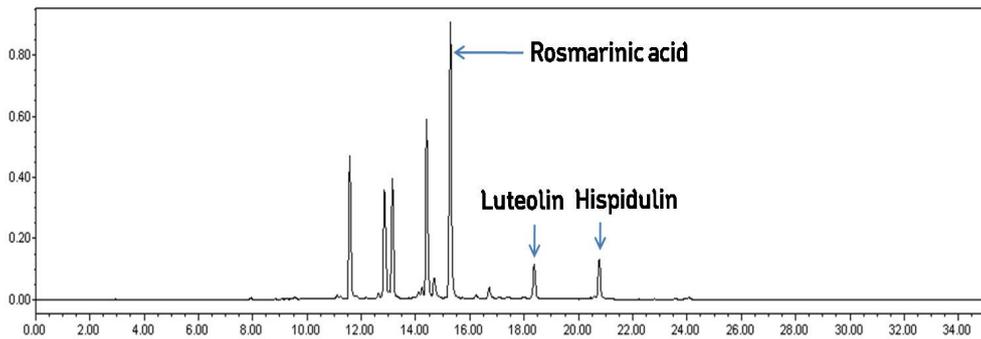
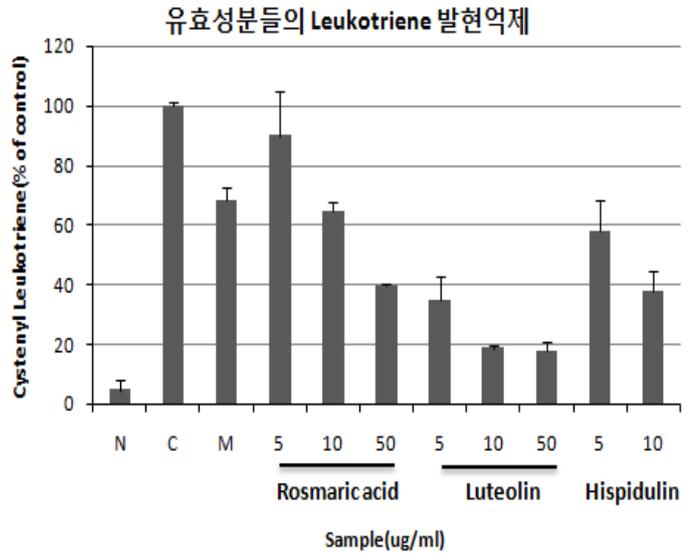
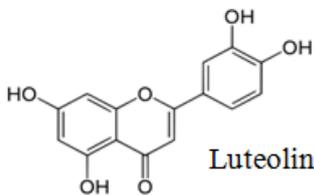
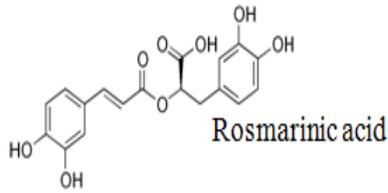
8-2) OVA(알부민)에 의한 알러지성 호흡기 천식 억제 효과 평가(in vivo 평가)



양성 대조약물: Cyclophomide, 자생식물 시료: 200 mg/kg,bw 경구투여(7일간)

→ 알러지성 천식 유발 후 자생식물 시료를 투여 후 기관지로부터 천식 지표인 Monocyte 및 PMN(Eopsinophil/Neutrophil)의 함량을 비교 평가한 결과, 대조군 대비 익모초 등 6종에서 알러지성 호흡기 염증 억제 효과를 보였음

9) 곰보배추 유효성분 선정 / 활성평가 및 성분 분석



▲ 곰보배추 50 % 에탄올 추출물의 크로마토그램 profile

10) 특허출원

- 자생식물(익모초, 측백, 곰보배추)에 대한 호흡기 보호/치료 특허 출원 완료(3건)
  - 익모초/측백엽 추출물을 유효성분으로 포함하는 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 조성물
  - 곰보배추 특정 조추출물 또는 이로부터 분리된 정제 분획물을 유효성분으로 포함하는 호흡기염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물

11) 결론

- 호흡기 염증 억제 활성을 나타내는 자생식물 후보 소재(익모초, 측백, 곰보배추, 인진호, 원화, 학슬, 홍삼) 발굴
- 이들 소재를 이용해서 미세먼지 등 환경오염물질로부터 호흡기 보호/개선을 위한 기능성 원료 소재 개발 가능

### 1-3. 연구개발 범위

#### □ 최종 목표

- 미세먼지 등 대기오염으로부터 호흡기 보호 및 개선용 신규 기능성 식품 개발
- 고부가치의 단일 또는 복합 기능성 천연물 소재 개발
- 식약처 호흡기 보호제(면역력 증가) 기능성 원료 개별 인증 신청

#### □ 연차별 연구내용

##### **【1차년도】 후보 천연물 소재 탐색 및 선정, 유효성분 도출(15. 4Q - 16. 3Q)**

- 호흡기 효능 평가 및 후보 천연물 소재 선정
  - 대기오염 물질 노출에 의한 호흡기 손상 모델 개발
  - 호흡기손상 보호/개선 효과 검증을 통한 후보 소재 선정
  - 단일/복합제에 대한 염증 억제 활성 비교 평가
- 유효성분 도출 및 분획별 성분함량 분석
  - 유효성분 선정 및 분석법 정립 과 활성 평가
  - 분획화 및 분획별 유효성분 함량 분석
- 공정 최적화 연구

##### **【2차년도】 호흡기 보호/개선 효능 검증, 소재 표준화/규격화, 예비 임상연구 (16. 4Q - 17. 3Q)**

- 호흡기 보호/개선 효능 검증
  - 기관지 세포 염증/섬모운동 관련 유전자 마커 탐색
  - 기관지 수축 억제, 진해거담 및 섬모 운동성 증가 등 효능 검증
- 원재료 및 공정 표준화와 제형화 연구
  - 대량 생산 및 표준화 연구
  - 제형화 및 제조 공정 표준화
- 인체적용 시료 제조 및 탐색적 인체적용시험
  - 예비 인체 적용 시험을 위한 GMP 생산 및 pilot study

##### **【3차년도】 기전 및 효능 연구, 제형화/안전성/안정성 연구, 임상연구(17. 4Q - 19. 4월)**

- 효능 기전 연구
  - 호흡기 개선/보호 작용의 기전 연구
  - 호흡량 개선 및 조직 검사
- 규격화 및 공정화 연구
  - 제형화 확립 및 안정성 연구
  - 단미/복합제에 대한 기준 및 시험 방법 확립
  - 최종 제품에 대한 GMP 생산
- 비임상 및 최종 인체 적용 시험
  - 유전독성 및 설치류를 이용한 단회/반복 독성 시험
  - 호흡기 개선/보호 인체 적용 시험
- 식약처 기능성 개별 인정형 원료 신청
  - 유효성분/효능기전 관련 논문 투고/특허 출원 및 자료 작성
  - 식약처에 기능성 원료 인증을 위한 자료 제출

□ 연구개발 Milestone

연구항목	추진 내용	15년	16년		17년		18/19년	
		4Q	1-2Q	3-4Q	1-2Q	3-4Q	1-4Q	4월
가능성 소재 선정 및 효능 검증	1) In vitro 효능 연구							
	• 단일/복합제에 대한 염증 억제 활성 비교 평가	→	→	→				
	• 기관지 세포 염증/섬모운동 관련 유전자 마커 탐색			→	→	→		
	• 호흡기 개선/보호 작용의 기전 연구					→	→	→
	2) In vivo 효능 연구							
	• 급성/알러지성 호흡기 염증 억제 효과 검증	→	→					
	• 대기오염물질 노출에 의한 호흡기손상 모델개발	→	→	→				
	• 호흡기손상 보호/개선 효과 검증		→	→	→		→	
	• 진해거담 및 기침 감소 효과 검증		→	→	→			
	• 호흡량 개선 및 섬모 운동성 효과 평가			→	→	→		
• 기관지 수축 억제 효과 검증			→	→	→			
• 기관지 조직 검사 및 기도 폐쇄 효과 검증				→		→	→	
유효성분 선정 및 활성성분 정제	1) 유효 지표 성분 도출							
	• 유효성분 선정 및 분석법 정립 / 활성 평가	→	→	→				
	• 분획화 및 분획별 유효성분 함량 분석		→	→	→			
• 활성물질 정제 및 구조 구명			→	→				
소재 표준화	1) 원재료 및 공정 표준화							
	• 원물 및 추출물 유효 성분 함량 기준 설정			→	→	→		
	• 원재료 및 제조공정 표준화			→	→	→	→	
• 단일/복합제에 대한 기준 및 시험 방법 확립				→	→	→		
제형 및 제품화	1) Formulation 연구			→	→	→	→	
	2) 완제품에 대한 기준 및 시험법 개발						→	
	3) 완제품에 대한 안정성 연구					→	→	
	4) 예비 인체적용 시험을 위한 GMP 생산			→				
비임상 시험	1) 제품에 대한 유전독성 평가				→			
	2) 설치류를 이용한 단회 및 반복 독성 시험					→	→	
인체적용 시험	1) 최종 제품에 대한 GMP 생산					→		
	2) 호흡기 개선/보호 인체 적용 시험				→		→	→
특허/논문 및 등록자료	1) 유효성분/효능기전 관련 논문 투고			→		→	→	
	2) 활성성분 및 조성물에 대한 특허 출원			→		→		
	3) 식약처에 기능성 원료 인증을 위한 자료 제출							→

## 1-4. 과제별(주관·협동 기관) 연구개발의 목표 및 내용

[제1세부] : 호흡기 유용 천연물 선정 및 효능 검증과 원재료 표준화 및 안전성 평가

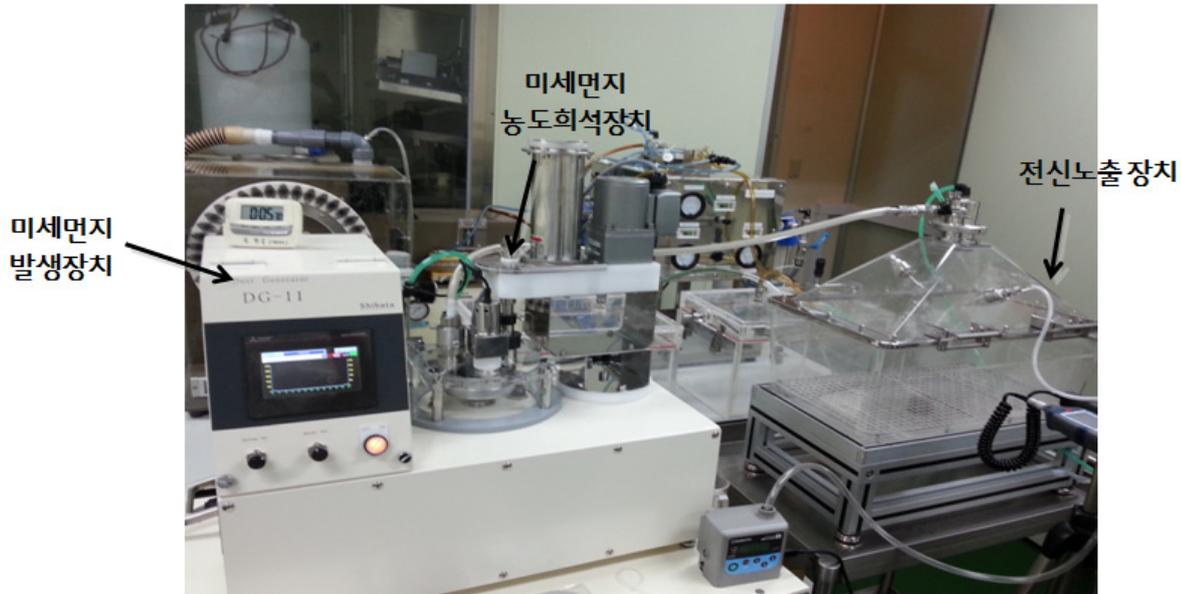
### □ 연구목표

- 미세먼지 등 대기오염 물질로부터 호흡기 보호/개선용 단미/복합제 천연물 소재 선정
- 원재료/공정 표준화와 안전성 평가를 통한 안전하고 유용한 기능성 신소재 개발

### □ 연구내용

#### 1. 호흡기 효능 평가 및 유용 천연물 소재 선정

##### 1) 대기오염 물질 노출에 의한 호흡기 손상 모델 개발



#### ▲ 미세먼지 등 대기오염물질 실험 동물 노출 장치

- Whole body chamber를 이용한 coal fly ash, carbon black, diesel exhaust particle 등 대기오염 물질의 농도 및 기간별 실험동물에 폭로 후 호흡량, 폐세정액 염증세포 분석, 가래 및 기침평가 등을 통한 대기오염 물질이 비강/기관지 등에 미치는 손상 평가

##### 2) 대기오염 물질에 의한 호흡기 보호/개선 효과 평가

- 곰보배추 등 천연물 소재들에 대한 효과 평가를 통한 후보 소재 선별

##### 3) 천연물 소재들에 대한 기도수축억제 및 거담/기침 감소 효과 평가

##### 4) 섬모 운동성 효과 평가 및 조직 검사

##### 5) 단일 및 복합제에 대한 활성 비교 평가

- In vitro/in vivo 염증 및 가래발생 억제 활성 평가를 통한 활성 시너지 최적 복합제 선정

##### 6) 최종 제품에 대한 호흡기 보호/개선 효과 검증

#### 2. 유효성분 도출 및 활성 성분 정제

##### 1) 후보 천연물에 대한 유효성분 선정 및 분석법 정립

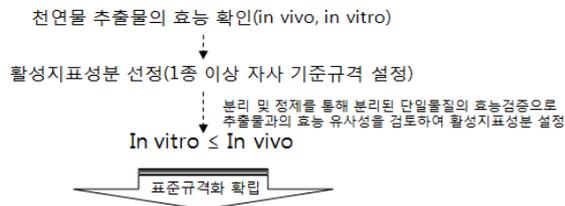
- 후보 천연물에 대한 유효성분 도출 및 활성 확인/LC 분석법 정립
- 용매 분획화 및 분획별 활성 및 유효성분 함량 분석

##### 2) 신규 활성 성분 구명

- Column chromatography를 통한 활성 성분 정제
- Spectrometric 기법 활용을 통한 구조 구명

### 3. 원재료 표준화 및 규격화 / 대량생산

- 1) 시기 및 산지별 원료 규격화
  - 유효성분 정량, 수율, HPLC 패턴분석
  - 제품의 가치 증진을 위한 추가적인 표준화 연구 수행
- 2) 안정적 sourcing 방안연구
  - 국가별, 산지별, 시기별 원재료 분석을 통한 최적 원료 확보
- 3) 규격화된 분획물의 효율적 생산을 위한 공정연구 및 pilot test 실행
  - 대량생산 공정의 scale-up test 및 최적 조건 확립을 위한 test 실행
  - 최종 원료 분획물의 spec. 설정
  - 강열잔분, 중금속 등 기타 성분들의 함량 규정
  - in-process quality control 기준 설정



항목	고려해야할 항목	대상식물	내용(Ex.)
원재료	원재료 유사종(정확한 종 확인)	선정된 후보 천연소재	Sp-6, 9...
	원재료의 부위		잎, 줄기, 뿌리, 꽃...
표준화	원산지		한국, 중국...
	채취시기(계절, 년생)		1, 2, 3, 10, 11, 12(1~년생)...
제조공정	추출 방법(추출용매 & 용매분획...)		30~95% 알코올 & 에틸아세테이트, 부탄올...
	추출 온도		실온~100
	용매 비율		생약대비 5~20배...
표준화	추출 시간		3~8시간...
	추출 횟수		1~3회...
	건조 방법		Spray dry, Freeze dry, Vacuum dry...
	원재료 monitoring	적합	

※ 원료의 특성에 따라 필요한 항목만을 선정하여 자료화 한다.  
 ※ 원료 표준화의 목적은 제품의 재현성 향상을 통해 유효성을 보장할 수 있는 원료를 생산하는 기반을 마련하기 위함.

#### ▲ 원재료 표준화 및 규격화 내용

### 4. 단미 및 복합제 기준 및 시험법 guideline 확립

- 기능성 원료 소재에 요구되는 각종 기준 설정
- 이를 통해 기준 및 시험방법 확립 / method validation

### 5. 비임상 연구

- 1) 제품에 대한 유전독성 평가(자체 및 GLP 기관)
- 2) 설치류 단회/4주 반복 투여 독성

### 6. 특허/논문/식약처 인증 자료

- 1) 유효성분/효능 기전 관련 논문 투고 및 활성 성분 및 조성물에 대한 특허 출원
- 2) 식약처 기능성 인증을 위한 타기관과 기술교류 강화

**[제1협동] : 제조공정 확립과 공정 표준화를 통한 제형화 및 인체적용 시험**

**□ 연구목표**

- 천연물 후보 식품 소재들에 대한 면역/염증 활성 비교평가
- 공정 최적화 및 제형화 연구를 통한 인체적용시험용 시료 제조 및 공급
- 식약처 개별인증을 위한 품질규격 자료 및 인체적용시험 자료 확보

**□ 연구내용**

**1. 천연물 소재 수집 및 면역 활성 평가**

- 1) 후보 천연 소재들에 대한 in vitro/in vivo 활성 평가
  - 자료조사 및 선행 연구 등을 통해 천연물 후보 소재 선발
  - 면역활성 및 염증 관련 in vitro/in vivo 활성 평가

**2. 제조 공정 최적화**

- 1) 대상 제품: 선행연구로부터 도출된 주요 자생식물 추출물로부터 제조된 제형
- 2) 제조공정: GMP 부합 공정 흐름도 작성 및 공정 최적화, routine quality control 및 in-process control (IPC)을 위한 공정단계/조사항목/규격기준 작성, alert plan 확립
- 3) 품질규격: 지표물질함량, 위해물질(잔류농약, 중금속, 아플라톡신), 미생물 관리
- 4) 임상시험용 제품의 clinical formula 구축
- 5) 3 batches analysis data 확보 x 3개 제품
- 6) Dissolution/disintegration, uniformity of dosage unit, loss on drying, pH 등

**3. 지표물질 표준품 분리·정제, 서류 작성 및 정합화(validated) 분석법 확립**

- 1) 대상 지표물질: ginsenoside Rb1, Rg1, (20S)Rg3, (20R)Rg3, 자생식물 추출물 지표성분
- 2) 표준품 4종의 증빙 서류: 동정(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, FAB/MS, IR, UV), 순도(elemental composition, optical rotation, water content, residual solvent, TLC, HPLC x 3 systems), mass balance
- 3) 지표물질의 validated 정량분석법 확립: 선택성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 범위, 정확성, 정밀성, 강건성, 시스템 적정성 조사(ICH guideline 준수)

**4. 제형/제품별 제품의 안정성 조사**

- 1) 조사 조건: real time 및 가속 조건하(6개월)
- 2) 조사 항목: 수분, 미생물, 지표물질의 경시적 변화

**5. 인체적용시험**

- 1) 임상시험 설계 및 계획서 작성
- 2) 임상시험용 제품의 clinical formulae 확립
- 3) 제형 및 위약 개발
- 4) 임상 시험용 제품 생산, 공급
- 5) 임상시험 연구기관 및 임상 시험 관리

**[제2협동] : 호흡기 보호/개선 효능 작용 기전 연구**

연구목표

인체 및 환경에 악영향을 미치는 미세먼지에 의해 발생하는 폐질환으로부터 호흡기 보호 및 개선에 대한을 위한 새로운 기능성 식품을 개발하고 그 작용기전을 규명

연구내용 요약

구분	연구개발목표	연구개발의 내용
제2협동 (대전대 학교)	호흡기 보호/개선 효능 검증 및 작용 기전 연구	<p><b>1. In vivo 미세먼지/폐질환 동물모델에서 유전자 마커 탐색 연구</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 식품소재(익모초/측백/곰보배추/홍삼 복합물)의 단일/복합제에 의한 in vivo 독성 분석</li> <li>2) 미세먼지 노출 후 식품소재의 단일/복합제 식이에 의한 몸무게 변화</li> <li>3) 폐와 기관지 세척액에서 염증, 활성산소, 세포주기 및 사멸 관련 등 유전자 발현 분석</li> <li>4) 반응성 활성산소 측정 : NO, ROS</li> <li>5) 폐와 기관지 폐포세척액에서 flow cytometry를 이용한 면역세포군 분포/활성 변화 분석</li> <li>6) Extracellular matrix proteases 발현 조사 (MMP-12 등)</li> <li>7) 기관지 폐포세척액에서 neutrophil과 eosinophil의 선택적 침윤 변화 조사</li> <li>8) 병리조직검사를 이용한 식품소재의 호흡기 보호 및 개선 효능 분석 : H&amp;E, Masson Trichrome staining</li> </ol> <p><b>2. In vitro(세포주이용) 활성 평가</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 단일/복합제에 대한 염증 억제 활성 비교 평가</li> <li>2) 호흡기 개선/보호 작용의 기전 연구</li> </ol>

상세 연구내용

**1. In vivo 미세먼지/폐질환 동물모델에서 유전자 마커 탐색 연구**

- 1) 식품소재(익모초/측백/곰보배추/홍삼 복합물)의 단일/복합제에 의한 in vivo 독성 분석
- 2) 미세먼지 노출 후 식품소재의 단일/복합제 식이에 의한 몸무게 변화
- 3) 폐와 기관지 세척액에서 염증, 활성산소, 세포주기 및 사멸 관련 등 유전자 발현 분석
  - 염증 cytokines : IL-1b, IL-6, TNF-a, IL-17, TGFb, IL-10
  - Chemokines : IL-8 (CXCL8), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), CXCL2, CXCR1
  - Stress proteins : Heme Oxygenase-1 (HO-1), Histone deacetylases (HDAC), Egr-1, Thioredoxin (TRX), Peroxiredoxin (PRX)
  - Stress 및 염증 관련 transcriptional regulator : NF-E2 related factor-2 (Nrf-2), NFkB
  - Signaling molecules : p38 등 MAPK, PI3/AKT
  - Cell cycle 및 apoptosis 관련 유전자 : p21, p53, BCL-2, Bax

- Adhesion molecules : Macrophage associated antigen-1 (Mac-1), intercellular adhesion
- 4) 반응성 활성산소 측정 : NO, ROS
- 5) 폐와 기관지 폐포세척액에서 flow cytometry를 이용한 면역세포군 분포/활성 변화 분석
- 6) Extracellular matrix proteases 발현 조사 (MMP-12 등)
- 7) 기관지 폐포세척액에서 neutrophil과 eosinophil의 선택적 침윤 변화 조사
- 8) 병리조직검사를 이용한 식품소재의 호흡기 보호 및 개선 효능 분석  
: H&E, Masson Trichrome staining

## 2. In vitro(세포주이용) 활성 평가

- 1) 단일/복합체에 대한 염증 억제 활성 비교 평가
  - 식품소재(익모초/즉백/곰보배추/홍삼 복합물)-단일/복합체의 in vitro 세포독성 분석
  - Primary fibroblast에서 미세먼지 노출 후 식품소재의 단일/복합체 처리에 의한 염증, 활성산소, 세포주기 및 사멸 관련 유전자 발현 분석
  - Alveolar macrophage(MH-S) 및 fibroblast(L929) cell line에서 유전자 발현 분석
  - Primary 및 cell line에서 세포증식 측정
  - Primary 및 cell line에서 flow cytometry를 이용한 세포주기 및 세포사멸 변화
  - Primary 및 cell line에서 반응성 활성산소(NO, ROS) 분석
- 2) 호흡기 개선/보호 작용의 기전 연구
  - 미세먼지 노출 후 식품소재의 단일/복합체에 특이적인 signaling molecules 및 transcriptional factor를 밝혀 signaling pathway를 규명한다.
  - 위 유전자 발현, 염증억제 및 면역세포 활성 조절 기전을 바탕으로, 미세먼지 노출에 따른 호흡기질환 발병기전에서 식품소재 특이적인 작용기전을 규명함

## □ 연차별 주요 내용

### 【1차년도】 in vitro 및 in vivo 효능 평가 (2015. 10.23 - 2016. 10.22)

#### ■ In vitro(세포주이용) 활성 평가]

- 1) 세포수준[Primary fibroblast, alveolar macrophage(MH-S) 및 fibroblast (L929) cell line]에서 미세먼지 처리 후, 곰보배추 등 후보소재(단일/복합체)들에 의한 염증억제 활성 평가
  - 염증 cytokine, 반응성 활성산소, 세포주기 및 사멸 관련 유전자발현 분석
  - Flow cytometry를 이용한 세포주기 및 세포사멸 변화
- 2) In vitro 후보 소재 선정
  - 후보소재의 단일/복합체별 염증억제 활성 비교를 통한 호흡기 개선 및 보호 효능을 나타내는 후보물질 선정
  - In vitro 처리농도를 토대로 한 in vivo 투여량 결정

#### ■ [In vivo 미세먼지/폐질환 마우스모델에서 효능 평가]

- 1) 미세먼지 노출 후, 후보물질의 염증억제 활성 평가
  - 기관지 폐포세척액에서 neutrophil과 eosinophil의 선택적 침윤 변화
  - 체액성, 세포매개 면역 및 점막면역 기능 분석
- 2) 병리조직검사를 이용한 후보물질의 호흡기 보호 및 개선 효능 평가

**【2차년도】 호흡기 보호/개선 효능 검증 (2016. 10.23 - 2017. 10.22)**

■ [In vitro 호흡기 개선 및 보호 효능 검증]

- 1) 후보물질에 특이적으로 조절되는 면역지표 발굴
  - 호흡기 개선 및 보호기능에 유효한 염증지표들의 억제기능 검증
- 2) 염증지표들의 억제 조절 기전을 바탕으로, 미세먼지 노출에 따른 호흡기 질환 억제기전 정립

■ [In vivo 미세먼지/폐질환 마우스모델에서 기도/폐염증 반응 억제기전 검증]

- 1) 폐와 기관지 폐포세척액에서 면역세포 침윤 및 Th세포의 활성 평가
- 2) 염증, 활성산소, 세포주기 및 사멸 관련 등 유전자 발현 분석
- 3) 폐와 기관지 폐포세척액에서 flow cytometry를 이용한 면역세포군 분포 및 활성 변화 분석
- 4) 후보물질에 특이적 폐염증반응 억제기능 검증

**【3차년도】 호흡기 보호/개선 조절기전 규명 (2017. 10.23 - 2018. 10.22)**

■ [호흡기 개선 및 보호 효능 조절기전 규명]

- 1) 후보물질의 in vitro 및 in vivo 유전자 마커 및 조절 유전자 규명
- 2) Signaling molecule 및 transcriptional factor 분석을 통한 signaling pathway 규명
- 3) 호흡기 개선 및 보호기능에 유효한 염증반응 억제 기전 규명

■ [임상 시제품의 호흡기 개선 및 보호 효능 증진]

- 1) 임상 시제품의 상용화에 필수적인 유효성 및 안정성 검증
- 2) 임상 시제품의 항염 효율 최적화 조건 구축
- 3) 임상 시제품의 호흡기 보호 및 개선 기능 증진방법 확립

□ 식품소재(익모초/측백/곰보배추/홍삼 복합물)의 단일/복합제의 기작 및 효능 규명을 위한 바이오 마커

① 면역증진 주요 바이오 마커

면역 증진 건강 기능성을 확인하기 위한 바이오마커별 측정 가능한 시험연구 유형은 다음과 같음.

기전	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		In vitro	In vivo	Human
선천면역	NK세포		○	○
	사이토카인(IFN- $\alpha$ ,IFN- $\beta$ ,TNF- $\alpha$ ,IL-1,IL-6,IL-12)	○	○	○
	탐식능	○		
	NO	○	○	
	iNOS	○		
	COX	○		
	보체계		○	○
적응면역	사이토카인(IFN- $\gamma$ ,TNF- $\beta$ ,IL-2,IL-4,IL-5,IL-6,IL-9,IL-10,IL-13)	○	○	○
	림프구 아집단 비율	○	○	○
	면역글로블린		○	○
공통	세포 생존율	○		
	비장세포 증식		○	
	조직무게(비장, 흉선)		○	

[위탁연구] : 인체 적용 시험 (전북대 병원 기능성 식품 임상 지원 센터)

1. 연구목표

천연물 소재에 대한 호흡기 보호 및 개선 효과 검증

2. 연구내용

<p>연구디자인</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조, 평행 인체적용시험</li> </ul> <p>스크리닝      V1(0주)      V2(6주)      V3(12주)</p>
<p>연구대상자</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>호흡기 손상에 의한 증상이 지속적으로 있는 자</li> </ul>
<p>연구 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>기침, 가래, 호흡곤란 등의 호흡기 증상이 지속적으로 있는 자를 대상으로 시험제품 12주 섭취 후 호흡기 증상과 기능의 변화, 염증 개선 정도, 상기도 감염 병발 등을 평가하고 플라세보 섭취에 의한 변화와 비교한다.</li> </ul>
<p>유효성평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>호흡기 증상 평가             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기침, 가래, 호흡곤란 등의 호흡기 증상 정도 변화</li> <li>- 호흡곤란 점수(mMRC; modified medical re-search council dyspnea scale)</li> <li>- COPF 평가 검사(CAT; COPD assessment test)</li> </ul> </li> <li>호흡기 기능 평가             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 폐기능 검사</li> <li>- 호흡기 염증 정도</li> </ul> </li> <li>상기도 감염 병발 평가             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 감기, 인플루엔자 등 상기도 감염 발생률</li> <li>- 상기도 감염에 의한 증상의 유무, 중증도 및 지속기간</li> </ul> </li> </ul>
<p>안전성평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>이상반응, 진단검사의학 검사, 활력증후 및 신체검진</li> </ul>

1-5. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

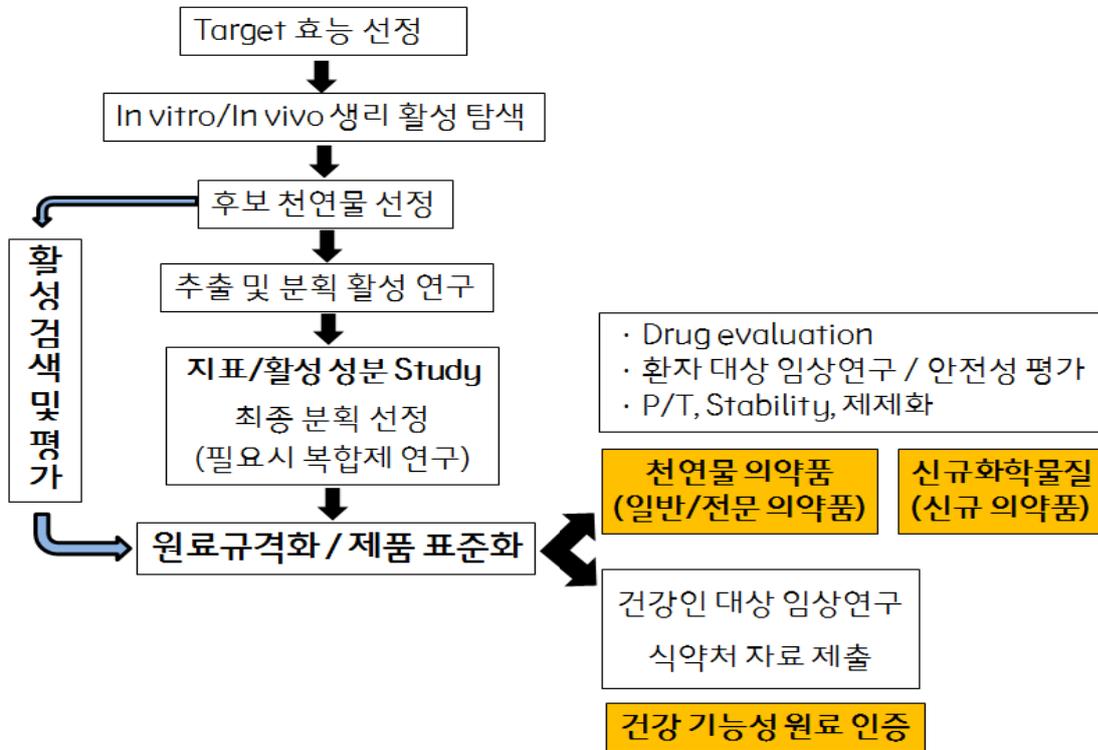
구분	연도	연구개발목표	연구개발의 내용
1차 년도	2015 4Q - 2016 3Q	[제1세부] 미세먼지 호흡기 손상 모델 정립/천연물 소재 효능 검증 및 유효성분 도출	<p><b>[호흡기 효능 평가 및 유용 천연물 소재 선정]</b></p> <p>1) 대기 오염 물질 노출에 의한 호흡기 손상 모델 개발                      - Whole body chamber를 이용한 coal fly ash, carbon black, diesel exhaust particle 등 대기오염 물질의 실험동물에 폭로                      - 호흡량, 폐세정액 염증세포 분석, 가래 및 기침평가 등을 통한 대기오염 물질이 비강/기관지 등에 미치는 손상 평가</p> <p>2) 대기오염 물질에 의한 호흡기 보호/개선 효과 평가                      - 곰보배추 등 후보 소재들에 대한 효과 평가를 통한 후보 소재 선발</p> <p>3) 거담 및 기침 감소 효과 평가</p> <p>4) 단일 및 복합제에 대한 활성 비교 평가                      - in vitro/in vivo 염증 및 가래발생 억제 활성 평가를 통한 활성 시너지 최적 복합제 선정</p> <p><b>[유효성분 도출 및 활성 성분 정제]</b></p> <p>1) 후보 천연물에 대한 유효성분 선정 및 분석법 정립                      - 후보 천연물에 대한 유효성분 도출 및 활성 확인/LC 분석법 정립                      - 용매 분획화 및 분획별 활성 및 유효성분 함량 분석</p> <p>2) 신규 활성 성분 구명                      - 활성 성분 정제 및 구조 구명</p>
		[제1협동] 천연물 소재 활성평가/제 조공정 최적화 및 분석화학적 연구	<p><b>[천연물 후보소재에 대한 염증 억제 활성 평가]</b></p> <p>1) 천연물 후보 소재 수집 및 면역활성/염증억제 활성 평가</p> <p><b>[제조공정 최적화 연구]</b></p> <p>1) 제조공정: 공정 최적화 및 cGMP 부합 공정 흐름도 확립, routine quality control 및 in-process control (IPC)을 위한 공정단계/조사항목/규격기준 작성, alert plan, SOP 확립</p> <p>2) 원료 sourcing 및 추출물 제조 공정 등 규격에 부합되는 표준화, 규격화 자료 확립</p> <p><b>[제형별 안정성 연구]</b></p> <p>1) 후보 소재의 제형별(타블렛, 캡슐 등) 안정성 시험</p>
		[제2협동] in vitro 및 in vivo 효능 평가	<p><b>[In vitro(세포주이용) 활성 평가]</b></p> <p>1) 세포수준[Primary fibroblast, alveolar macrophage(MH-S) 및 fibroblast (L929) cell line]에서 미세먼지 처리 후, 곰보배추 등 후보소재(단일/복합제)들에 의한 염증억제 활성 평가                      - 염증 cytokine, 반응성 활성산소, 세포주기 및 사멸 관련 유전자발현 분석                      - Flow cytometry를 이용한 세포주기 및 세포사멸 변화</p> <p>2) in vitro 후보 소재 선정                      - 후보소재의 단일/복합제별 염증억제 활성 비교를 통한 호흡기 개선 및 보호 효능을 나타내는 후보물질 선정                      - in vitro 처리농도를 토대로 한 in vivo 투여량 결정</p> <p><b>[In vivo 미세먼지/폐질환 마우스모델에서 효능 평가]</b></p> <p>1) 미세먼지 노출 후, 후보물질의 염증억제 활성 평가                      - 기관지 폐세척액에서 neutrophil과 eosinophil의 선택적 침윤변화                      - 체액성, 세포매개 면역 및 점막면역 기능 분석                      - 염증관련 유전자 발현 등 in vitro에서 분석한 지표들의 분석</p> <p>3) 병리조직검사를 이용한 후보물질의 호흡기 보호/개선 효능 평가</p>

구분	연도	연구개발목표	연구개발의 내용
2차 년도	2016 4Q - 2017 3Q	[제1세부] 호흡기 효능 검증 및 소재 표준화	<p><b>[호흡기 보호/개선 효능 검증]</b></p> <p>1) 대기오염 물질로부터 호흡기 보호/개선 효능 검증  - 단일 및 복합제의 효능 비교를 통한 최적 활성 복합제 선정  - 기관지 염증/가래 및 기침 억제 활성 평가</p> <p>2) 최종 제품에 대한 호흡량 개선 및 기관지 수축억제 활성 검증</p> <p>3) 섬모 운동성 효과 평가 및 조직 검사</p> <p><b>[원재료 표준화 및 대량생산]</b></p> <p>1) 산지별 원료 규격화  - 유효성분 정량, 수율, HPLC 패턴분석  - 제품의 가치 증진을 위한 추가적인 표준화 연구 수행</p> <p>2) 안정적 sourcing 방안연구  - 국가별, 산지별, 시기별 sample 분석을 통한 최적 원료 확보</p> <p>3) 규격화된 분획물의 효율적 생산 공정연구 및 pilot test 실행  - 대량생산 공정 scale-up test 및 최적 조건 확립을 위한 test 실행  - 최종 원료 분획물의 spec. 설정  - 강열잔분, 중금속 등 기타 성분들의 함량 규정  - in-process quality control 기준 설정</p>
		[제1협동] 공정 표준화 /제형화 및 안정성 연구 /임상시료 제공	<p><b>[제조공정 최적화 연구]</b></p> <p>1) 제형별 등록 서류 작성에 필요한 분석  - dissolution, disintegration, hardness, friability 등</p> <p><b>[분석화학적 연구]</b></p> <p>1) 초고순도 지표물질 대량 분리 및 정제</p> <p>2) 지표물질 표준품의 dossier 작성</p> <p>3) 성분들의 활성과 연계성 검증 및 함량범위를 포함한 규격 설정에 대한 객관적인 근거 확립</p> <p><b>[품질분석 및 임상 시험용 시료 제공]</b></p> <p>1) 품질규격 확립: 위해물질(잔류농약, 중금속, 아플라톡신 등), 미생물</p> <p>2) 제형별 등록 서류 작성에 필요한 분석: dissolution, disintegration, 제형 특성 연구</p> <p><b>[안정성 연구]</b></p> <p>1) Batch analysis data 확보: 3개 제품, 각 3 batches, 규격기준 모든 항목</p> <p>2) 안정성자료 확보(ICH guideline 준수)  - 조건: real time 및 가속 조건(6개월)  - 분석항목: 지표물질, 미생물, 수분, 제형 안정성 등</p> <p><b>[제형 연구]</b></p> <p>1) 인체적용 시험용 제품의 clinical formulae 확립</p> <p>2) 인체적용 시험용 제품 GMP 생산, 공급</p>
		[제2협동] 호흡기 보호/개선 효능 검증	<p><b>[In vitro 호흡기 개선 및 보호 효능 검증]</b></p> <p>1) 후보물질에 특이적으로 조절되는 면역지표 발굴  - 호흡기 개선 및 보호기능에 유효한 염증지표들의 억제기능 검증</p> <p>2) 염증지표들의 억제 조절 기전을 바탕으로, 미세먼지 노출에 따른 호흡기 질환 억제기전 정립</p> <p><b>[In vivo 미세먼지/폐질환 모델에서 염증 반응 억제기전 검증]</b></p> <p>1) 폐와 기관지 폐포세척액에서 면역세포 침윤 및 Th세포의 활성 평가</p> <p>2) 염증, 활성산소, 세포주기 및 사멸 관련 등 유전자 발현 분석</p> <p>3) 폐와 기관지 폐포세척액에서 flow cytometry를 이용한 면역세포군 분포 및 활성 변화 분석</p> <p>4) 후보물질에 특이적 폐염증반응 억제기능 검증</p>

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차 년도	2017 4Q - 2019 4월	<p><b>[제1세부]</b> 호흡기 효능 검증 및 소재 표준화</p>	<p><b>[호흡기 보호/개선 효능 검증]</b> 1) 최종 제품에 대한 호흡기 보호/개선 효과 검증</p> <p><b>[공정 표준화]</b> 1) 효율성 극대화를 위한 최적 생산 공정 확립 - 시간/비용을 고려한 생산 조건과 설비확립 및 공정 SOP 작성 2) 전임상/임상에 필요한 시료 대량 확보 - 설정된 생산 공정에 따라 원료의 대량 확보</p> <p><b>[기준 및 시험법 guideline 확립]</b> - 기능성 원료 소재에 요구되는 각종 기준 설정 - 이를 통해 기준 및 시험방법 확립 - 분석법 확립 및 method validation</p> <p><b>[전임상 연구]</b> 1) 제품에 대한 유전독성 평가(자체 및 GLP 기관) 2) 설치류 단회/4주 반복 투여 독성</p> <p><b>[특허/논문/식약처 인증]</b> 1) 유효 성분/효능 기전 관련 논문 투고 2) 활성 성분 및 조성물에 대한 특허 출원 3) 식약처 기능성 인증을 위한 네트워크 강화</p>
		<p><b>[제1협동]</b> 제품화 및 안정성 연구 /임상시료 제공/ 식약처 자료 작성</p>	<p><b>[인체적용 시험용 시료 제조 및 공급]</b> 1) 인체적용 시험용 제품의 clinical formulae 확립 2) 인체적용 시험용 제품 GMP 생산, 공급</p> <p><b>[분석화학적 연구]</b> 1) 지표물질의 validated 분석 방법 확립 - 선택성 등 9개 파라메타(ICH guideline 준용)</p> <p><b>[안정성 시험 연구]</b> 1) Batch analysis data 확보: 3개 제품, 3 batches 2) Real time stability 자료 확보 및 조사(국제기준 준수) - 지표물질 및 수분 함량, 미생물수 변화 등 - 조사항목: 수분 및 지표물질 함량, 미생물 등</p> <p><b>[마케팅 계획]</b> 1) 중화권(중국, 대만), 북미(미국, 캐나다), 일본 및 동남아 해외 법인 운영 2) 유럽지역 및 남미지역에 있는 회사들과의 다양한 partnership 진행, 지속적인 신규 거래처 발굴 및 해외 법인 확대 3) 국내외 공인기관 인증 자료 게재(국제 Journal 등) 4) 해외법인 유통망, partner 회사 등 적극적인 홍보 활동 전개</p> <p><b>[기타 연구]</b> 1) 식약처(KFDA) 기능식품 등재를 위한 서류 작성 및 제출</p>
		<p><b>[제2협동]</b> 호흡기 보호/개선 조절기전 규명</p>	<p><b>[호흡기 개선 및 보호 효능 조절기전 규명]</b> 1) 후보물질의 in vitro 및 in vivo 유전자 마커 및 조절 유전자 규명 2) Signaling molecule 및 transcriptional factor 분석을 통한 signaling pathway 규명 3) 호흡기 개선 및 보호기능에 유효한 염증반응 억제 기전 규명</p> <p><b>[임상 시제품의 호흡기 개선 및 보호 효능 증진]</b> 1) 임상 시제품의 상용화에 필수적인 유효성 및 안정성 검증 2) 임상 시제품의 항염 효율 최적화 조건 구축 3) 임상 시제품의 호흡기 보호 및 개선 기능 증진방법 확립</p>

1-6. 연구개발의 추진전략 · 방법 및 추진체계

□ 천연물 신소재 개발 process

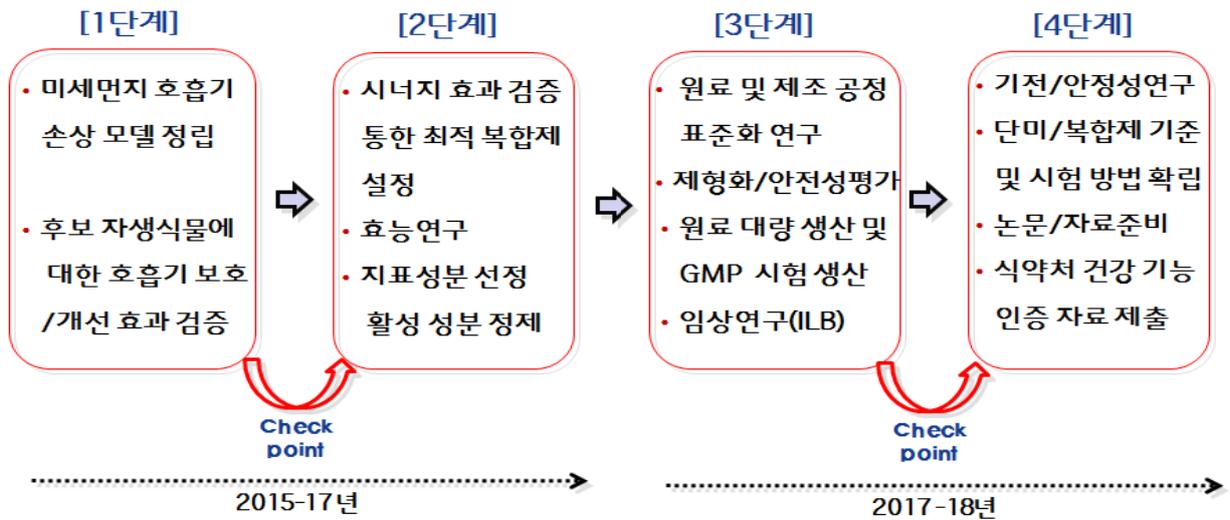


→ target 설정에 의한 기능성 천연물 선별 및 활성 유효성분 선정에 의한 표준화에 따른 제품의 안전성/약리/임상연구 성공에 따른 최종 활성 소재 개발

□ 기능성 신소재 개발 전략



□ 호흡기 유용 신소재 개발을 위한 단계별 추진전략



→ Check point(in vivo 효능 검증/임상시험) 결과에 따른 과제의 방향 결정

□ 호흡기 유용 신소재 개발을 위한 추진체계



→ 주관 연구기관(KT&G 연구원)은 흡입독성 평가 시스템을 보유하고 있어서 다양한 호흡기 질환 관련 연구 노하우가 축적되어 있으며, 최근에 초미세먼지 대기오염물질에 대한 독성 비교 평가 연구를 수행하고 있음. 건강기능 식품 국내 1위 회사인 한국인삼공사는 천연물에 대한 효능검증 및 제형화/제품화 연구를 위한 우수 인력 및 기술력이 이미 확보되어 있으며, 제품의 GMP 생산 및 인체 적용 시험 및 식약처 건강 기능성 원료 인증 관련 풍부한 노하우가 있음. 호흡기 관련 연구를 활발히 진행하는 대전대 산학 협력단과의 협업을 통해서 국내 자생식물을 이용해서 호흡기 보호/개선용 신규 기능성 식품 개발이 가능 할 것으로 사료됨.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 주요 연구개발 내용

세부 과제명	연구 결과
대기오염물질에 의한 호흡기 손상 모델 정립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대기오염물질 흡입 노출에 의한 호흡기 손상모델 확립</li> <li>- 대기오염물질을 이용한 급성 호흡기 손상 모델 정립</li> </ul>
호흡기 유용 천연물 소재의 효능평가 및 최적 시너지 활성의 복합제 선정	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연물 후보 소재의 거담/부종 및 산화적 손상억제 평가</li> <li>- 급성 호흡기 손상 모델에서 천연물 소재의 효능 평가</li> <li>- 선정된 천연물소재(곰보배추/홍삼) 시너지활성 비율설정</li> <li>- 곰보배추/홍삼 복합물의 호흡기 관련 효능 검증 (거담, 기관지수축, 기관지 염증 억제 등)</li> </ul>
원재료 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 곰보배추 추출물로부터 활성성분(6종) 구명</li> <li>- 곰보배추 추출물의 표준 HPLC chromatogram 확립</li> <li>- 지역별, 산지별, 시기별 곰보배추의 주요성분 함량 분석</li> <li>- 홍삼의 지표성분 및 위해물질 규격 설정</li> <li>- 곰보배추 및 홍삼의 지표성분 분석법 확립</li> </ul>
제조 공정 최적화 연구 및 제형 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 곰보배추 추출분말 및 홍삼농축액분말 제조공정 확립</li> <li>- 곰보배추/홍삼 복합물의 제조공정 확립</li> <li>- 원료 및 제품의 품질 규격 완성</li> <li>- 인체적용 시험용 제품의 clinical formulae 확립 및 생산</li> </ul>
안정성 시험 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료 및 제형의 안정성 실험</li> <li>- 원료 및 임상시험 제품의 영양성분/위해성분 함량 분석</li> <li>- 원료 및 제품의 안정성 시험(가속 6개월, 실온 2년) 완료</li> </ul>
인체적용 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 탐색적 인체적용시험(30명)을 통한 복용량 및 유효성 평가 지표 선정</li> <li>- 확증적 인체적용시험(100명) 수행</li> <li>- <b>상기도 감염 증상의 유의적 개선 효과</b> 확인(<math>p=0.0321</math>)</li> <li>- 호흡기 불편 증상의 객관적으로 판단 기준 CAT점수 7점으로 유효성에 대한 통계분석을 시행한 결과, <b>SGRQ(호흡기 이상증상에 대한 세인트조지 호흡기 설문)에서 유의적 개선을</b> 확인(<math>p=0.0371</math>) 하여 호흡기 증상으로 인한 부담이 상대적으로 높은 상태의 대상자군에서 호흡기 불편 증상 개선 효과가 더 뚜렷함</li> </ul>
곰보배추/홍삼 복합물(KGC-03-PS)의 호흡기 개선 및 보호 효과기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 곰보배추/홍삼 복합물 유전자마커 및 조절 유전자 규명</li> <li>- KGC-03-PS의 호흡기 염증억제 신호전달 pathway 규명</li> <li>- 조절 T세포 활성화에 의한 호흡기 염증억제 규명</li> </ul>
식약처 건강 기능성 개별 원료 인정 신청	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 홍삼/곰보배추 복합물의 기능성 원료 인정 신청서 작성</li> <li>- (호흡기 건강) 기능성 원료 인정 신청완료</li> </ul>

## 목 차

### 가. 대기오염물질에 의한 호흡기 손상 모델 정립

- 1) 대기오염물질 흡입 노출에 의한 호흡기 손상 모델 개발
- 2) 대기오염물질을 이용한 급성 호흡기 손상 모델 정립

### 나. 호흡기 유용 천연물 소재의 효능평가

- 1) 천연물 후보 소재들의 호흡기 유용 활성 평가(거담/부종 및 산화적 손상 억제)
- 2) 급성 호흡기 손상모델에서 곰보배추 및 천연물소재들의 활성 평가
- 3) 곰보배추 및 홍삼의 최적 시너지 활성 비율 선정
- 4) 곰보배추/홍삼 복합물(KGC-03-PS)에 대한 호흡기 보호 및 개선 효과 검증

### 다. 원재료 표준화

- 1) 곰보배추의 표준화 (활성성분 구명 및 수확 시기/지역별 성분 함량분석)
- 2) 홍삼의 표준화 (지표성분 및 위해물질 규격 설정)
- 3) 곰보배추 및 홍삼의 지표(유효) 성분 분석법 확립

### 라. 제조공정 최적화 연구

- 1) 원료의 제조공정
- 2) 곰보배추/홍삼 복합물 제조공정
- 3) 인체적용시험 타블렛 제조공정
- 4) 원료 및 제품의 기준규격

### 마. 안정성 연구

- 1) 원료 및 제형의 안정성 실험계획
- 2) 원료 및 임상시험 제품의 시험 분석 결과
- 3) 곰보배추/홍삼 단독 및 복합제의 저장 조건 및 기간별 안정성 실험 결과

### 바. 인체적용시험 연구

- 1) 인체적용시험 제품 제조
- 2) 제품의 clinical formulae 및 포장 규격
- 3) 인체적용시험 계획, 진행, 모니터링 및 연구결과

### 사. 곰보배추/홍삼 복합물의 호흡기 개선 및 보호 효과 기전 연구

- 1) 곰보배추/홍삼 복합물(KGC-03-PS) 유전자마커 및 조절 유전자 규명
- 2) 곰보배추/홍삼 복합물의 호흡기 염증억제 신호전달 pathway 규명
- 3) 곰보배추 유효성분의 조절 T세포의 활성화에 의한 호흡기 기능 개선 효과

### 아. 식약처 기능성 (호흡기 건강) 개별 인정 원료 신청

## 가. 호흡기 효능 평가 및 작용 기전 연구

### 1. 대기오염물질 흡입 노출에 의한 호흡기 손상모델 개발

#### 1.1. Fly ash 등 미세먼지에 대한 *in vitro* 독성 평가

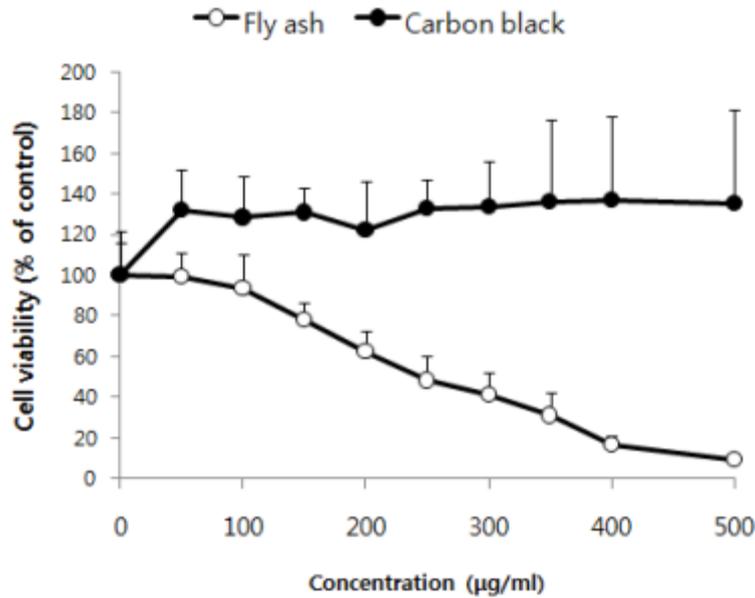


그림 31. Fly ash와 carbon black의 cell viability.

- Fly ash : 실리카 주성분, 4.9 ~ 17 µm, JIS test powder 1 class 5
- carbon black : 0.03 µm ~ 0.2 µm, JIS class 1)
- Chinese hamster ovary cell (CHO cell)를 이용한 세포독성 (neutral red uptake, NRU) 평가 결과, Fly ash의 경우 100 ~ 400 µg/ml 처리구간에서 농도의존적 세포독성(EC50 : 245 µg/ml)이 나타났으나, carbon black은 이 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다.

#### 1.2. Fly ash 발생 시스템 구축

후보물질의 대기오염에 의한 호흡기 손상 치료 효과를 확인하기 위해서 위와 같은 호흡기 손상모델을 개발하였다 (그림 2). 분진 발생 장치 (dust generator)는 계량 공급 장치 (feeder) 및 고압 공기에 의해 발생하고자 하는 표준 먼지를 디지털 먼지 모니터와 연동시켜 흡입 노출 챔버(또는 분배기)에 연결하여 대상 농도범위 내에서 발생량을 자동 제어하는 장치로서 표준 먼지를 작은 동물에 폭로시킴으로서 생체에 미치는 영향연구와 동물병태 등을 측정하기 위한 시스템을 구축하였다. 미세먼지 발생을 위한 발생장치 및 정량적 폭로를 위한 농도 회석장치를 장착하였고 미세먼지는 미분탄을 사용하는 화력발전소의 연소보일러에서 부산되는 석탄재, 알루미늄과 실리카를 주성분으로 하는 Fly ash (입자크기: 4.9 ~ 17 µm, JIS test powder 1 class 5) 및 Carbon black(0.03 µm ~ 0.20 µm, JIS class 12) 등을 사용 하였다.

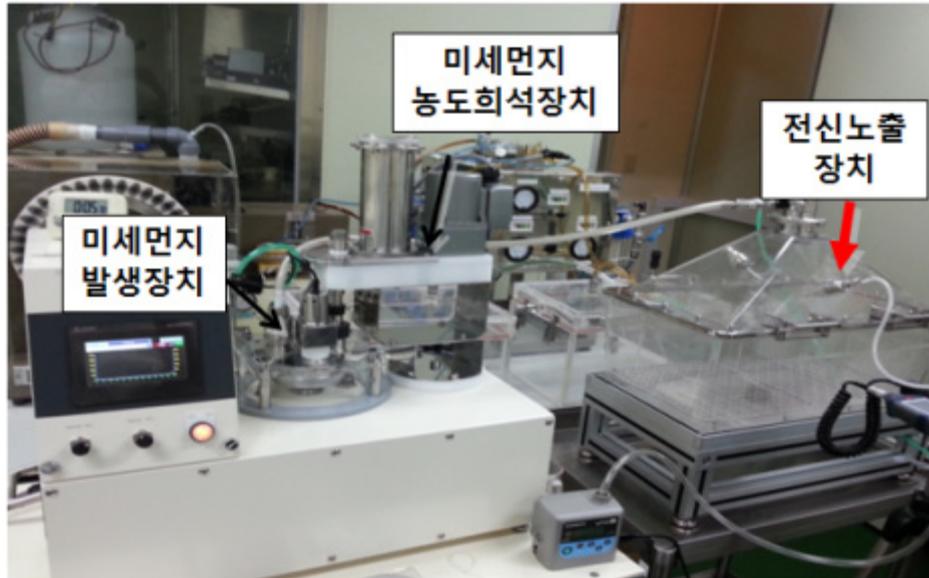


그림 32. 미세먼지 발생장치, 미세먼지 농도 희석장치, 전신노출 장치

### 1.3. Fly ash에 대한 흡입독성 평가

BALB/c mouse (7주령, 웅성)에 3일간 2.5 mg/ℓ의 농도로 매일 2시간씩 노출시켜 호흡기 손상을 유도한 후 폐세정액을 모아 염증세포 수를 비교한 결과 정상군과 대기오염물질 노출군에서 염증세포 수의 유의미한 차이가 발견되지 않았다 (그림 3).

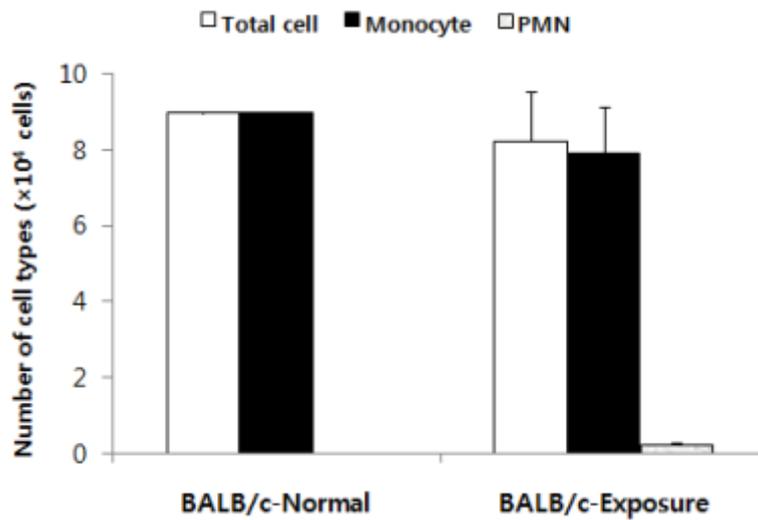


그림 33. 정상군과 Fly ash 노출군의 폐세정액 내 염증세포 수

#### 1.4. 석탄연소물 발생 시스템 구축

대기오염물질에 의한 호흡기 독성 유발을 유도하고자 다음과 같은 석탄연소 발생장치를 고안하였다 (그림 4).

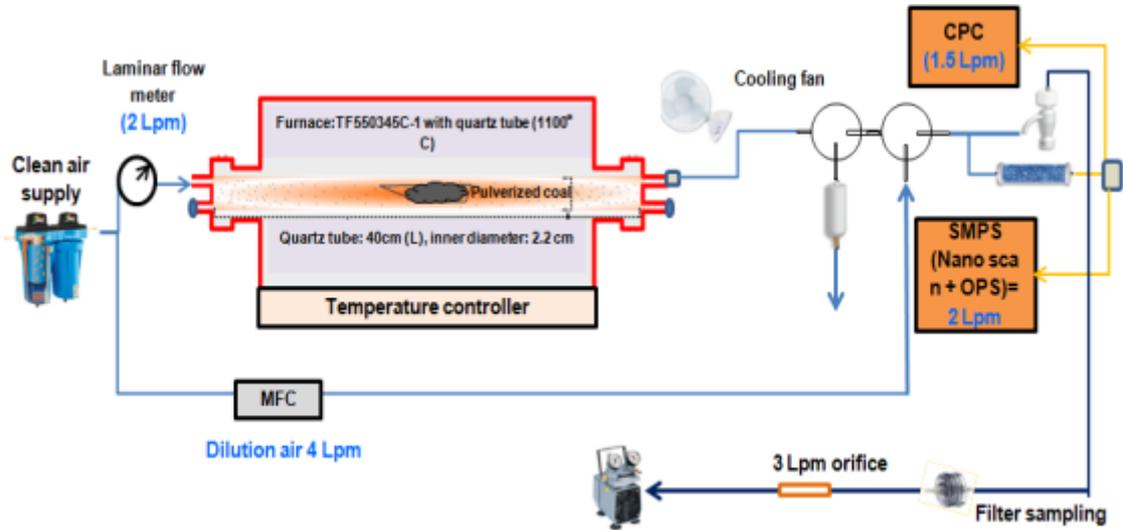


그림 34. 연소물질 발생장치의 구조

연소온도에 따른 독성을 파악하고자 500°C, 700°C에서 연소시켜 얻은 석탄 연소물을 CHO cell로 NRU assay를 통해 세포독성을 측정하였다. 그 결과 700°C에서 연소시킨 석탄연소물질이 더 높은 세포독성이 관찰 되었다 (그림 5).

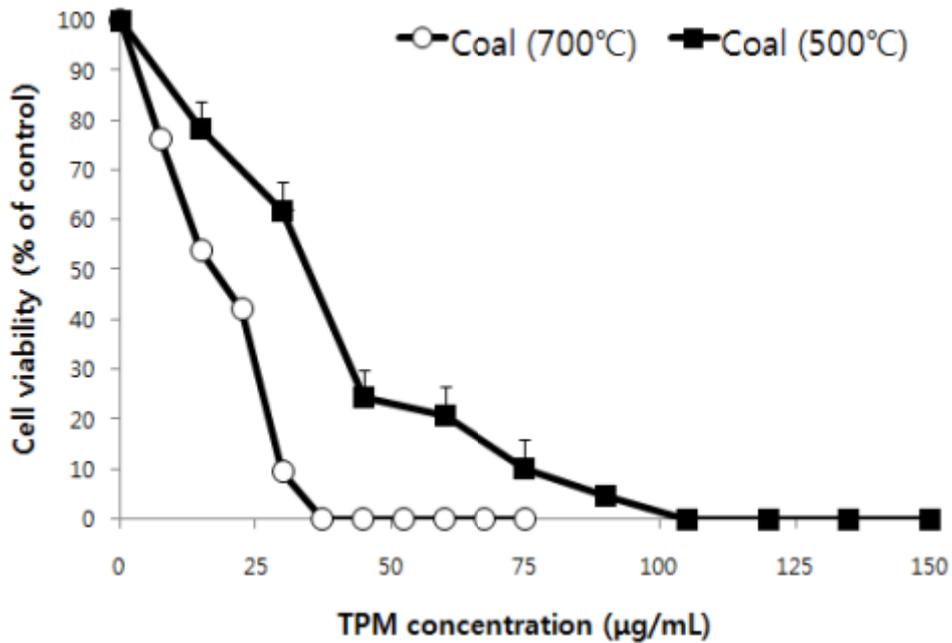


그림 35. 석탄 연소온도별 생성 물질의 세포 생존율

### 1.5. 대기오염물질 (Fly ash + 석탄연소물) 노출 시스템 개발

기존 (그림 2)의 노출장치에 연소물질 발생장치를 장착하여 아래와 같은 대기오염물질 노출 시스템을 개발하였다 (그림 6).

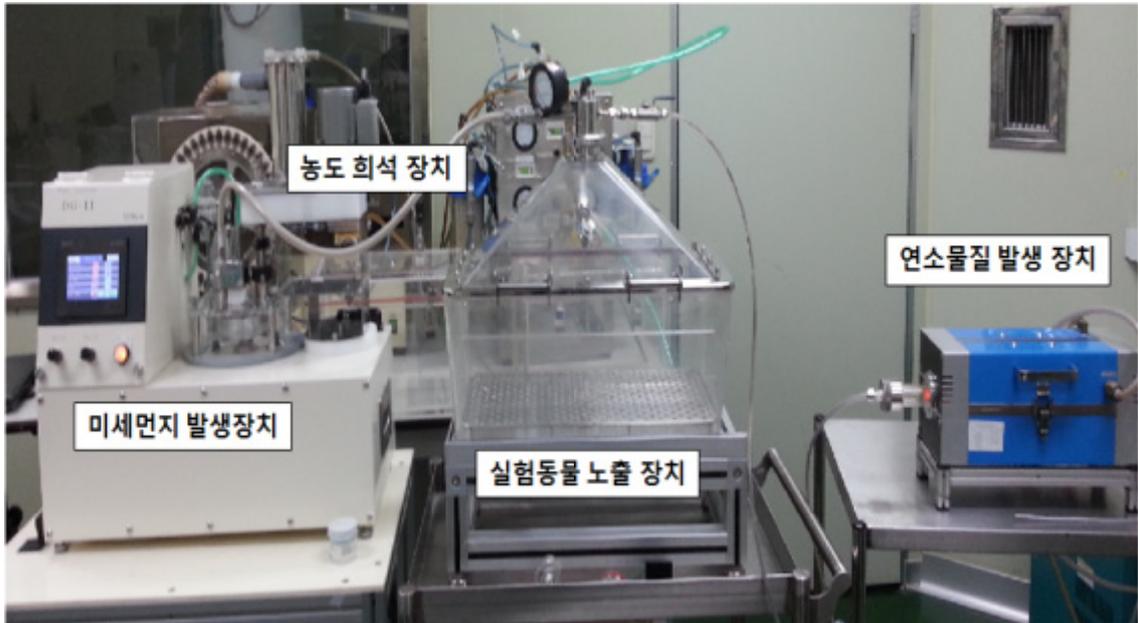


그림 36. Fly ash + 석탄연소물질 발생장치를 결합한 실험동물 노출장치

그림 5의 결과를 참고하여 석탄연소물 발생장치의 최적온도조건 700℃로 설정하였으며, 표 1의 노출조건, 그림 7과 온도 조건으로 대기오염물질을 발생시켰다.

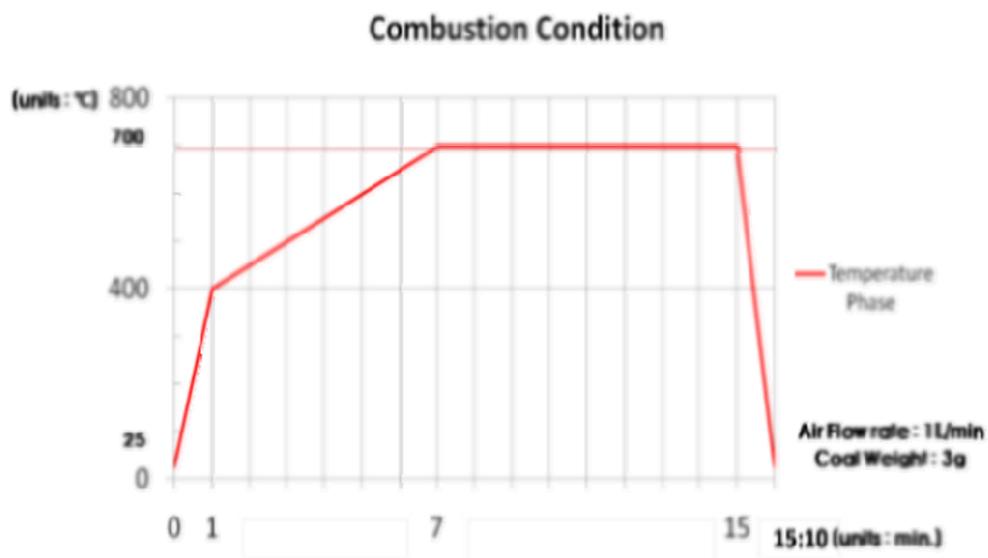


그림 37. 단위 cycle 당 연소물질 발생장치의 온도 조건

표 1. 대기오염물질 (Fly ash + Coal) 노출 조건

	Fly ash	석탄연소물
농도	1 mg/l/min	181 $\mu\text{g}/\text{l}$
시간	2 hours/day	15 min/day $\times$ 5 cycles

연소물질 발생장치의 작동 방식을 고려할 때, 미세먼지 노출 중 단위 cycle당 15분씩 총 5회 노출 조건을 확립하였다 (그림 8).



그림 38. 대기오염물질 노출 방법 및 노출 조건

### 1.6. 마우스별 대기오염물질 폭로에 의한 호흡기 영향 비교

실험동물에 따른 대기오염물질 영향을 살펴보기 위해 7주령의 BALB/c, C57BL/6 두 종에 대해 2주간 대기오염물질을 노출시켰다.

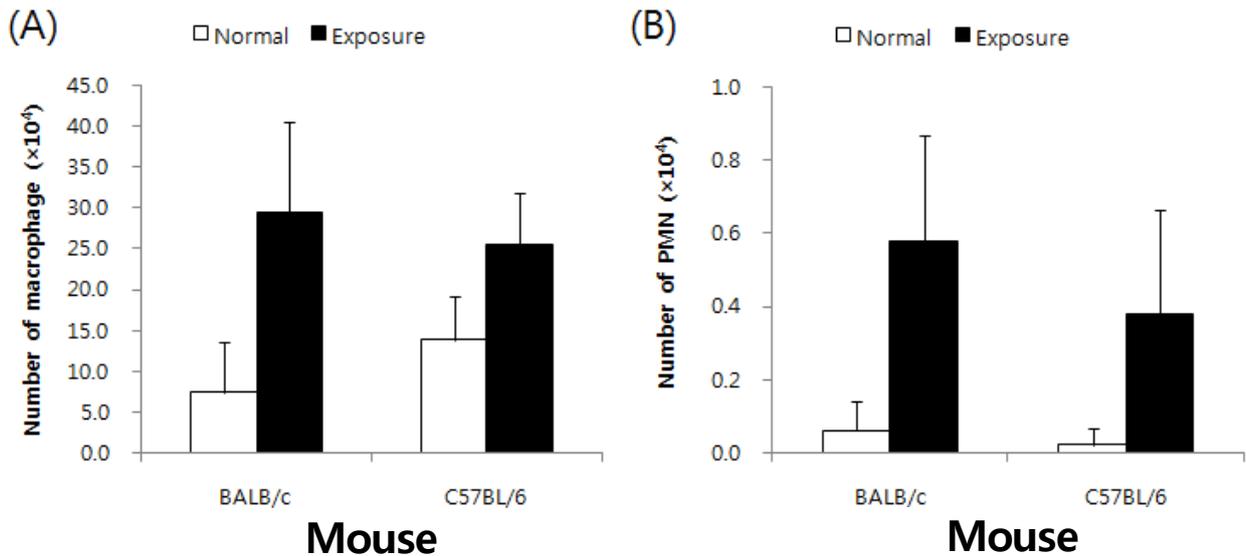


그림 39. BALB/c, C57BL/6 정상군과 대기오염물질 노출군의 (A) 대식세포 수와 (B) PMN 수

폐세정액에서 분리한 대식세포와 다핵형 호중구 (polymorphonuclear leukocyte, PMN)를 정량, 비교하였을 때, 두 종의 대식세포수의 유의미한 증가를 보여주었지만 C57BL/6보다 BALB/c mouse에서 더 많이 증가한 것을 관찰할 수 있었다. PMN 역시 두 종 모두 유의미한 차이를 보여주었으며, BALB/c의 경우에 더 큰 차이를 보여주었다 (그림 9).

폐세정액에 발현된 사이토카인을 분석한 결과를 살펴보면 대기오염물질에 폭로되었을 때 TNF- $\alpha$ , MIP2, CXCL-1은 C57BL/6보다 BALB/c에서 더 높은 발현량을 보였다. 하지만 IL-17A의 경우는, BALB/c에서는 조금 증가하기는 했지만 유의미한 차이를 보이지 않았으며, C57BL/6의 경우, 오히려 감소하였다. 위의 자료들을 종합적으로 살펴볼 때, BALB/c 종이 C57BL/6보다 호흡기 손상모델에서 호흡기의 손상정도를 정량하는데 적절한 것으로 결론지었다 (그림 10).

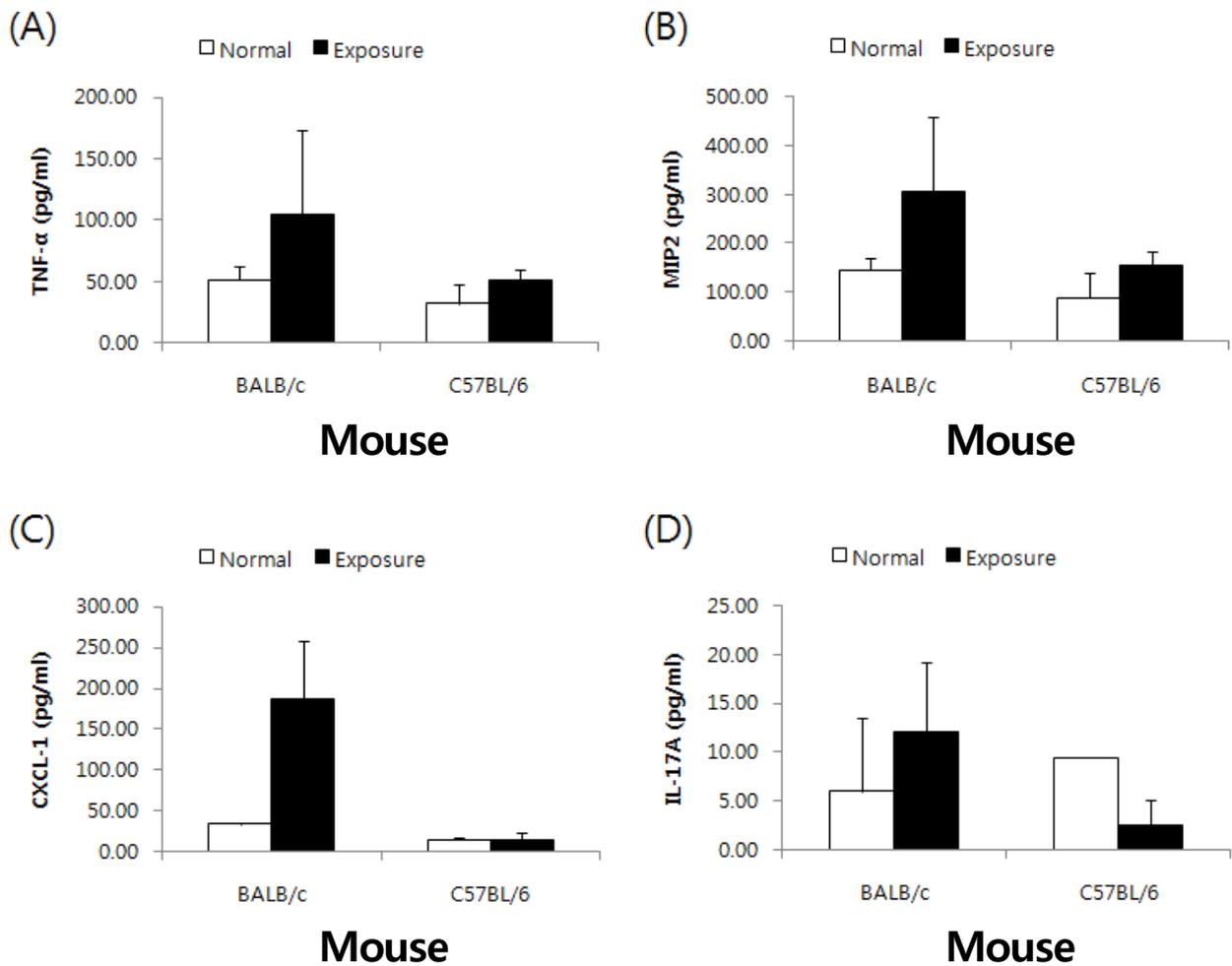


그림 40. BALB/c, C57BL/6 정상군과 대기오염물질 노출군의 (A) TNF- $\alpha$ , (B) MIP2, (C) CXCL-1, (D) IL-17A 농도

## 1.7. 대기오염물질 노출 기간별 호흡기 영향 비교

### 1.7.1. 호흡량 기능 평가

호흡기 손상 모델은 대기오염물질을 7주령의 BALB/c male mouse를 3주 (16. 5. 30 - 16. 6. 15.) 및 5주 (16. 5. 30. - 16. 7. 7.)간 노출시켰으며, 호흡기 손상 및 기능변화를 확인하기 위해 호흡량 및 기도저항을 분석하였다. 호흡량 측정은 폐기능의 정량적 측정을 통해 호흡기에 작용한 독성 및 효능을 평가하는 것으로, 실험동물의 호흡에 따라 변화하는 챔버 내부의 압력변화를 감지해 확인함으로써 측정가능하며, Buxco FinePoint™사의 Whole Body plethysmography 4-site system (WBP)를 사용하여 호흡량을 측정하였다.

표 2. 호흡기능(체적변동)분석에 사용한 파라미터

Parameter	Description	Unit
f	Respiratory rate	BPM
TVb	Tidal volume (volume inhaled)	ml
MVb	Minute volume	ml/min
PAU	Index of constriction	-
Rpef	The location into expiration where the peak occurs as a fraction of Te	-
Comp	The factor applied to box flow to estimate animal's flow	-
PIFb	Estimated peak inspiratory flow	ml/sec
PEFb	Estimated peak expiratory flow	ml/sec
Ti	Inspiratory time	sec
Te	Expiratory time	sec
EF50	Expiratory flow at 50% expired volume	ml/sec
Tr	Relaxation time	sec
TB	Duration of breaking. Percentage of the breath occupied by transitioning from inspiration to expiration	%
TP	Duration of pause before inspiration. Percentage of the breath occupied by transition from expiration to inspiration	%
Rinx	Rejection index. Percentage of breaths rejected before a breath is accepted	%

PEFb, EF50에서 정상군과 대기오염물질 노출군 간에 유의미한 차이 ( $p<0.05$ )가 있었지만 다른 지표들에서는 유의미한 차이가 발견되지 않아 정상군과 대기오염물질 노출군에 큰 차이가 있다고 볼 수 없었다 (표 3).

표 3. 3주, 5주 정상군과 대기오염물질 노출군의 체적변동 분석

Weeks	Groups	f	TVb	MVb	PAU	Rpef	Comp	PIFb	PEFb	Ti	Te	EF50	Tr	TB	TP	Rinx
3주	Normal	304.2	0.2	48.9	0.8	0.2	10.8	3.8	2.6	0.1	0.2	0.1	0.1	4.5	12.0	50.2
		±75.3	±0	±17.8	±0.1	±0.1	±0	±1.4	±0.9	±0	±0	±0.1	±0	±1.9	±3.3	±20.1
	Exposure	440.5	0.2	78.7	0.9	0.2	10.8	6.0	3.8	0.1	0.1	0.2	0.1	6.9	13.8	70.1
		±21.1	±0	±7	±0.1	±0	±0	±0.4	±0.4	±0	±0	±0	±0	±0.3	±1.2	±3.8
5주	Normal	387.6	0.2	62.5	0.8	0.3	10.8	5.2	3.2	0.1	0.1	0.2	0.1	6.4	11.9	68.8
		±27.6	±0	±6.6	±0.1	±0	±0	±0.3	±0.2	±0	±0	±0	±0	±1.2	±1.8	±2.6
	Exposure	300.0	0.2	51.0	2.2	0.2	10.8	5.1	3.8	0.1	0.2	0.2	0.1	6.3	20.3	68.0
		±52.5	±0	±9	±1.4	±0	±0	±0.5	±0.6	±0	±0.1	±0.1	±0	±0.9	±11.3	±4.1

기관지 천식과 관련된 기도과반응성 및 기도 과민성을 측정하기 위해 기도수축제인 methacholine을 흡입시켜 기도저항값 (Enhanced pause, Penh)을 측정하였고, 용량-반응곡선을 얻어 그림 11, 그림 12과 같이 나타내었다. 대기오염물질을 3주간 처리하였을 때 정상군과 대기오염물질 노출군에서 Penh 값의 유의미한 변화는 관찰되지 않았다.

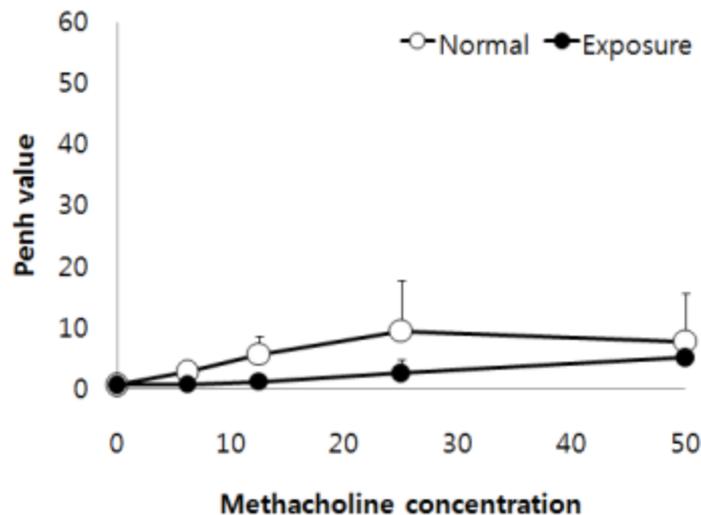


그림 11. 대기오염물질 3주 노출시 기도저항값

대기오염물질을 5주간 처리하였을 때, 대기오염물질 노출군에서 정상군 대비 Penh 값의 유의미한 증가를 보여주었으며, 대기오염물질을 5주 이상 처리하였을 때, 적절한 대기오염물질 노출모델이 생성되는 것으로 보인다.

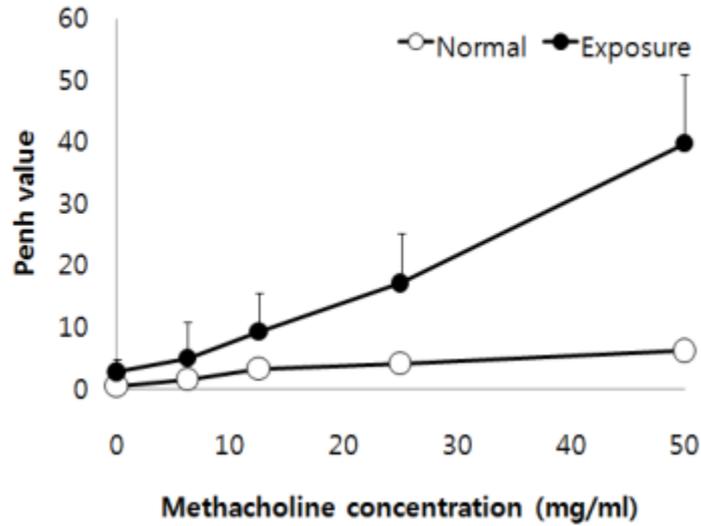


그림 42. 대기오염물질 5주 노출시 기도저항값

### 1.7.2. MUC5AC assay

MUC5AC는 기도 점막에서 분비되는 점액으로 외부 물질이나 균을 흡수해 체외로 제거하는 당단백질이다. 본 실험에서는 대기오염 물질 노출에 따른 폐세정액의 MUC5AC를 정량해 호흡기 손상 정도를 정량하기 위해 사용하였다.

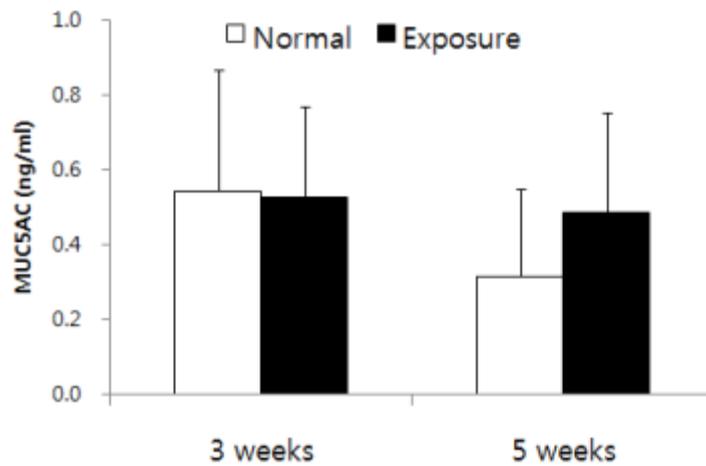


그림 43. 폐세정액 내 MUC5AC 농도

실험결과, 3주차 정상군은  $0.54 \pm 0.29$  ng/ml, 3주차 대기오염물질 노출군은  $0.53 \pm 0.21$  ng/ml, 5주차 정상군은  $0.31 \pm 0.24$  ng/ml, 5주차 대기오염물질 노출군은  $0.49 \pm 0.27$  ng/ml로 측정되었으며, 분석 결과, 정상군과 대기오염물질 노출군 그리고 3주군과 5주군 사이에 모두 유의미한 차이는 없었다 ( $p > 0.05$ ). 다만 일부 정상군, 대기오염물질 노출군에서 신뢰구간을 벗어나는 것으로 보이는 data가 발견되기 때문에, 이를 배제하였을 때, 대기오염물질 노출군에서 MUC5AC의 유의미한 증가가 관찰되었다 (그림 13).

### 1.7.3. Cytokine 분석

인체의 면역반응에서 신호전달물질로 사용되는 사이토카인을 분석해 염증반응과 관련성을 살펴보고자 TNF- $\alpha$ , MIP2, CXCL-1 세 종류의 사이토카인을 분석하였다. TNF- $\alpha$ 는 3주차 정상군에서  $146.1 \pm 31.1$  pg/ml, 3주차 대기오염물질 노출군에서  $209.9 \pm 43.9$  pg/ml, 5주차 정상군에서  $156.8 \pm 50.7$  pg/ml, 5주차 대기오염물질 노출군에서  $252.4 \pm 55.3$  pg/ml로 측정되었다. 3주, 5주간에 유의미한 차이는 없으나 대기오염물질을 처리하였을 때, TNF- $\alpha$ 의 유의미한 증가를 관찰할 수 있어 대기오염물질 노출에 따른 호흡기 손상이 있었음을 알 수 있다 ( $p < 0.01$ ). MIP-2는 3주차 정상군에서  $203.3 \pm 107.8$  pg/ml, 3주차 대기오염물질 노출군에서  $295.6 \pm 101.4$  pg/ml, 5주차 정상군에서  $314.2 \pm 97.7$  pg/ml, 5주차 대기오염물질 노출군에서  $483.3 \pm 72.2$  pg/ml로 측정되었다. 3주, 5주간에 유의미한 차이가 있었으며 ( $p < 0.05$ ), 역시 대기오염물질을 처리하였을 때 MIP-2의 유의미한 증가가 보여, 노출기간이 길어질수록 호흡기 손상이 커짐을 확인할 수 있었다 ( $p < 0.05$ ). CXCL-1은 3주차 정상군에서  $180.2 \pm 79.3$  pg/ml, 3주차 대기오염물질 노출군에서  $300.0 \pm 45.3$  pg/ml, 5주차 정상군에서  $127.2 \pm 49.9$  pg/ml, 5주차 대기오염물질 노출군에서  $256.4 \pm 45.9$  pg/ml로 측정되어, 대기오염물질에 노출되었을 때 증가하는 양상을 보이지만, 3주차와 5주차, 정상군과 대기오염물질 노출군사이에 유의미한 차이는 없었다 ( $p > 0.05$ ) (그림 14).

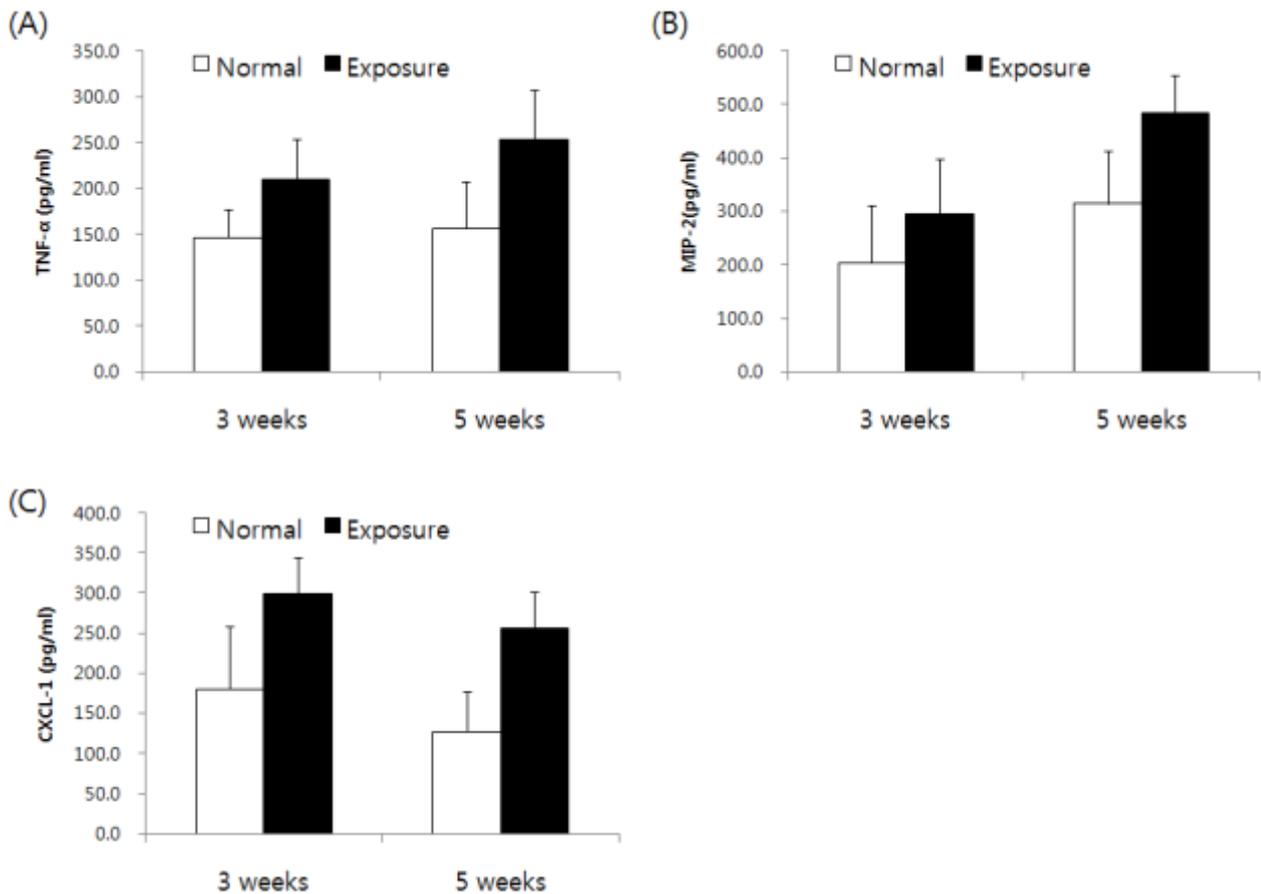


그림 14. 3주, 5주 대기오염물질 노출군의 폐세정액 내 (A) TNF- $\alpha$  농도, (B) MIP2 농도, (C) CXCL-1 농도

#### 1.7.4. 염증세포 분석

대식세포와 PMN(Polymorphonuclear leukocyte)은 다양한 면역세포 중 일부로써, 체내에 들어온 미생물이나 균을 식세포 작용을 통해 제거하는 역할을 수행한다. 염증이 발생한 부위에서 외부 항원에 대해 면역반응을 체내 대식세포, 백혈구등의 증가로 체내 염증을 확인할 수 있는 지표이다.

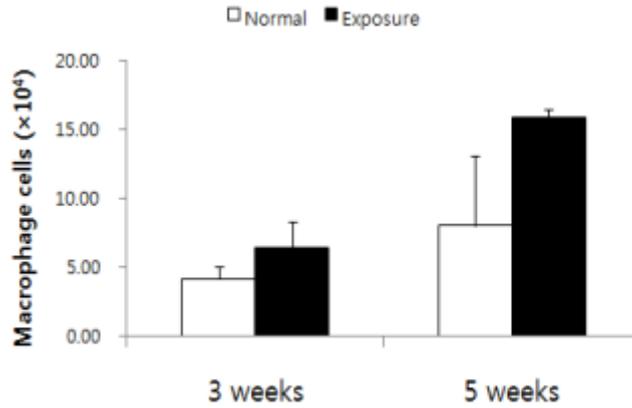


그림 45. 폐세정액내 대식세포 수

대식세포 수는 3주차 정상군에서  $4.2 \pm 0.9 \times 10^4$  cells, 3주차 대기오염물질 노출군에서  $6.5 \pm 1.8 \times 10^4$  cells, 5주차 정상군에서  $8.0 \pm 5.1 \times 10^4$  cells, 5주차 대기오염물질 노출군에서  $15.9 \pm 0.6 \times 10^4$  cells로 측정되었다. 3주차, 5주차 모두에서 대기오염물질을 처리하였을 때 유의미하게 증가하였다 ( $p < 0.05$ ) (그림 15).

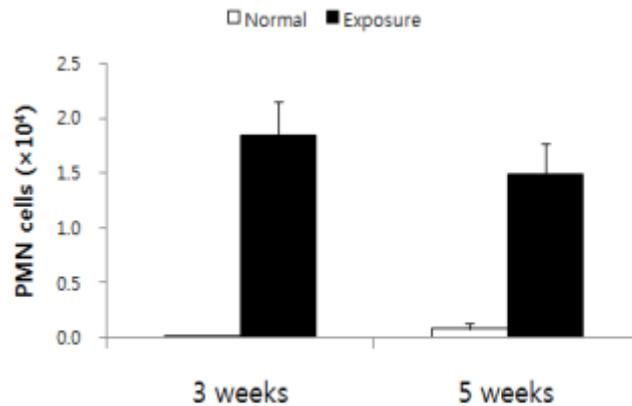


그림 46. 폐세정액내 PMN 수

PMN 수는 3주차 정상군에서  $0.02 \pm 0.01 \times 10^4$  cells, 3주차 대기오염물질 노출군에서  $1.8 \pm 0.3 \times 10^4$  cells, 5주차 정상군에서  $0.08 \pm 0.06 \times 10^4$  cells, 5주차 대기오염물질 노출군에서  $1.5 \pm 0.3 \times 10^4$  cells로 측정되었다. 이는 3주차, 5주차에서 노출 기간에 따른 PMN 수는 차이가 없지만 대기오염물질을 처리했을 때 유의미하게 증가하였다 ( $p < 0.01$ ) (그림 16).

### 1.7.5. 혈액 생화학 분석

혈액중의 단백질, 포도당등을 정량해 체내의 변화, 질병상태를 예측하는 검사이다. 본 실험에서는 AST, ALT, ALP, GLU, CHO, T-G, BUN, CREA, IP, CPK, CA, T-P, ALB 총 13가지의 바이오마커를 사용해 대기오염물질 노출군이 정상군에 비해 어떤 변화를 가졌는지 살펴보았다. 혈중 포도당 및 지질 대사등에 있어 정상군과 대기오염물질 노출군, 3주 노출군과 5주 노출군 사이에 유의미한 차이는 발견되지 않았으며, 간 기능과 관련된 지표역시 유의미한 변화를 보이지 않았다. 다만 신장 기능과 관련된 BUN과 경우, 오히려 대기오염물질 노출군에서 감소하는 경향을 발견할 수 있었다. 총 단백질량은 대기오염물질 노출군에서 유의미하게 증가하는 경향을 보이나, 크게 증가하지는 않으며, 전체적으로 보아 정상군과 대기오염물질 노출군에서 혈액 생화학적으로 유의미한 차이는 보이지 않는 것으로 확인된다 (표 4).

**표 4. 3주, 5주 정상군과 대기오염물질 노출군의 혈액 생화학적 분석 결과**

Weeks	Groups	AST	ALT	ALP	GLU	CHO	T-G	BUN	CREA	IP	CPK	CA	T-P	ALB
3주	Normal	69.2	29.6	389.6	196.8	124.6	56.4	38.3	0.4	6.3	197.8	10.4	4.8	1.9
		±13.7	±3.6	±73.3	±19.6	±13.6	±11.2	±15.7	±0	±0.8	±105.5	±0.7	±0.3	±0.1
	Exposure	74.8	42.8	420	155.8	125	73.8	21.5	0.3	7.8	187.2	10.1	5.0	2.0
		±15.3	±20.1	±26.2	±13.1	±4.8	±10.8	±1.6	±0	±1	±52.4	±0.7	±0.1	±0.1
5주	Normal	75	26	350.5	263	111.8	86.3	20.4	0.3	5.6	231	8.6	4.7	1.8
		±20.3	±0.7	±31.6	±20.6	±7.9	±10.2	±1.5	±0	±1.1	±118.7	±0.5	±0.2	±0.1
	Exposure	97.5	29.3	383	154.5	116	86.5	18.6	0.3	7.2	469.3	8.4	5.0	2.0
		±55.6	±2.8	±26.1	±15.1	±4.5	±17.5	±2	±0	±0.5	±572	±0.1	±0.1	±0.1

### 1.7.6. 조직병리학적 분석

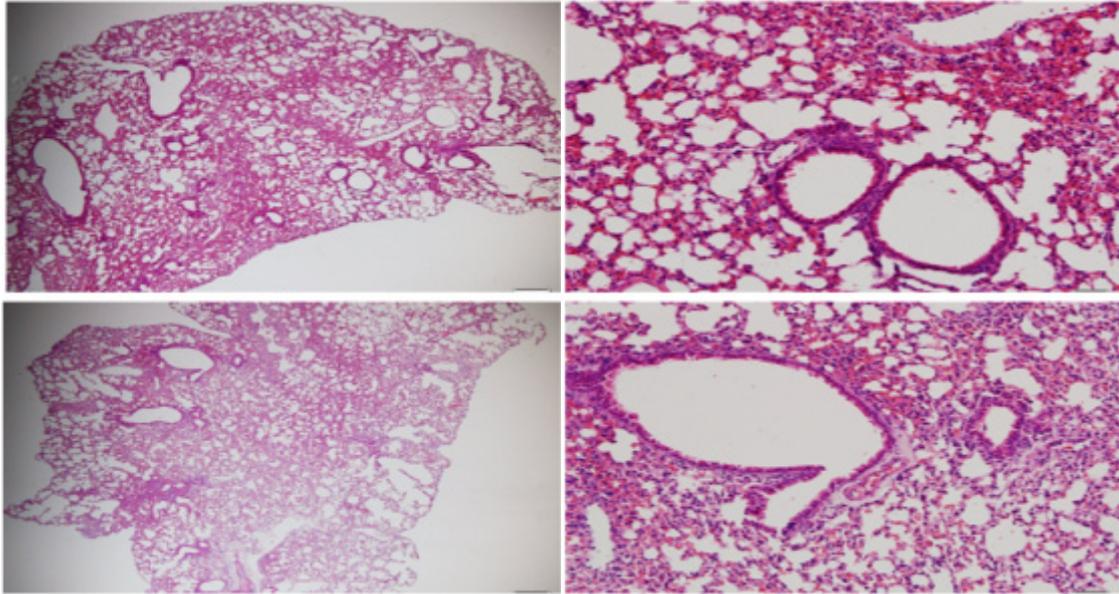


그림 47. BALB/c 마우스의 3주 정상군의 폐조직 병리학적 분석 결과

폐포벽이 다소 두꺼워진 부분이 존재하나 전체적으로 기관지 상피는 이상이 없는 것으로 보인다 (그림 17).

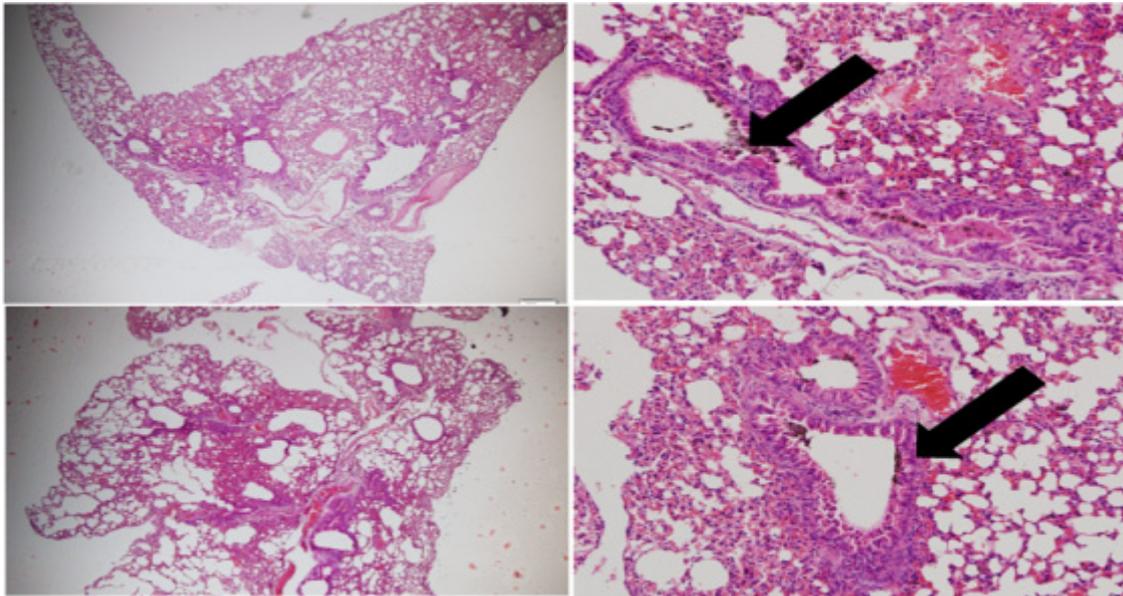
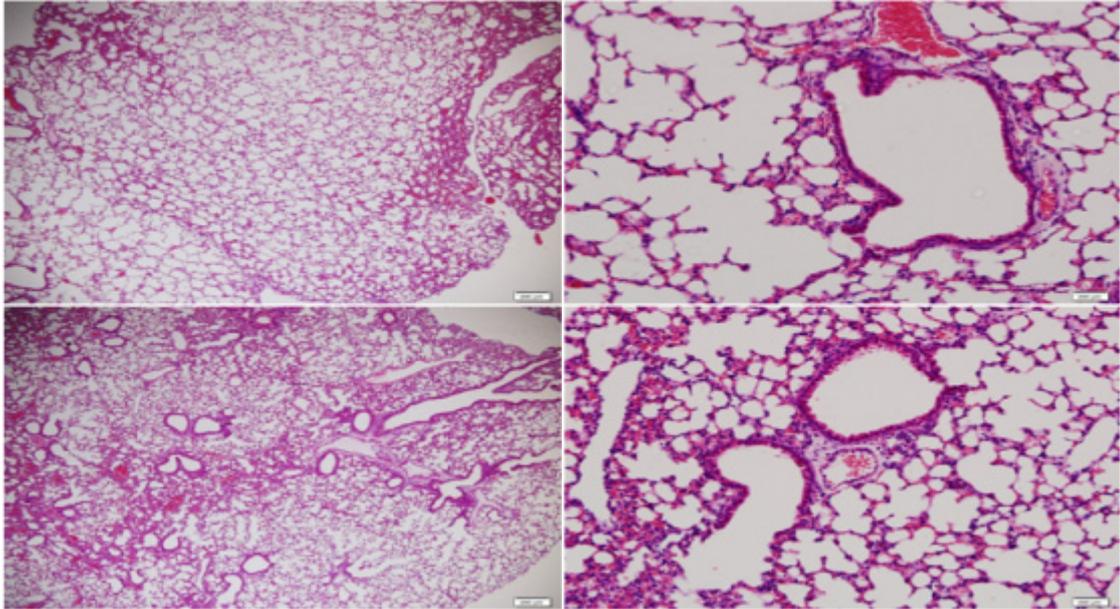


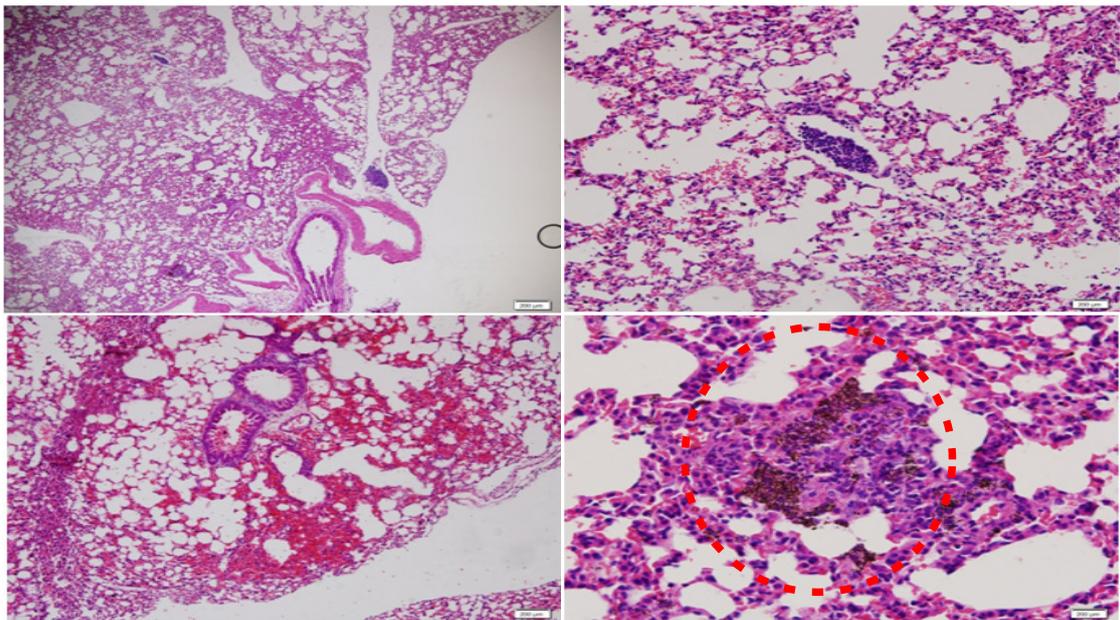
그림 48. 대기오염물질 폭로 3주 노출군의 폐조직 병리학적 분석 결과

대기오염물질 노출군에서 폐포벽이 국소적으로 두꺼워진 부분이 존재하며, 기관지 상피의 재생 증식이 관찰되었다. 또한 기관지 상피 및 폐포 전반에 걸쳐 탐식된 particle이 확인된다 (그림 18).



**그림 49. BALB/c 마우스의 5주, 정상군의 폐조직 병리학적 분석 결과**

전체적으로 특이적인 변화없이 정상으로 보인다 (그림 19).



**그림 50. 대기오염물질 폭로 5주, 노출군의 폐조직 병리학적 분석 결과**

국소적으로 폐포벽이 두꺼워진 부위가 존재하며, 염증세포 침윤이 확인된다. 또한 일부 개체에서 광범위한 출현외에도 기관지 상피 및 폐포 전반에 걸쳐 탐식된 particle이 확인된다 (그림 20).

## 2. 급성호흡기 손상 모델 정립

### 2.1. 급성호흡기 손상 모델 정립을 위한 INT injection 실험과정

미세먼지는 여러 가지 복잡한 성분을 가진 대기 중 부유 물질이다. 그 중 석탄연소물인 Coal 과 fly ash 와 diesel exhaust particles (DEP)를 섞은 혼합물을 aluminium hydroxide Gel adjuvant (Alum)과 함께 희석시켜 8주령 BALB/c 수컷 생쥐에 Intra-Nasal-Trachea (INT) injection 방법을 이용하여 기도를 통해 폐로 직접 주입하여 미세먼지 Coal + Fly ash + DEP (CFD) mouse model을 제작하고 천연물추출물의 효능을 알아보려고 하였다. CFD mouse 모델은 실험동물에 미세먼지의 구성성분인 CFD를 INT injection 방법으로 주입하여 기도와 폐 염증을 유발하고, 기관지 상피세포에서 섬유증을 일으켜 기도와 폐 손상과 염증을 유발시킨다. 천연물추출물은 10일 간 투여하며, 투여시작일로부터 3일 후, 6일 후에 총 2회 INT injection으로 CFD 혼합물을 주입하였다 (그림 13). 양성대조군인 Montelukast (2 mg/kg)는 처음 INT 후 하루 뒤부터 투여 시작하였다. CFD는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 Coal (5 mg/ml), fly ash (10 mg/ml), DEP (5 mg/ml) stock을 각각 coal (0.25 mg/ml), fly ash (0.5 mg/ml), DEP (0.25 mg/ml)로 희석하여 혼합하고 Alum을 8%로 희석되게 하여 최종적으로 미세먼지 혼합물을 제작하였다. INT injection 방법은 생쥐를 마취제 Ketamine (유한양행, SH35361504, 50 mg/ml) 0.5 ml과 Rompun (바이엘코리아, 41882) 0.1 ml를 혼합 후 복강에 주사하여 가마취시키고 고무줄로 고정하여 기도를 확보 한 후 구강을 통해 기도로 미세먼지 혼합물을 50  $\mu$ l 주입하고 바로 코에 미세먼지 혼합물을 50  $\mu$ l를 함께 넣어주어 생쥐가 숨을 쉬는 과정에서 기관지를 통해 폐로 미세먼지 혼합물이 흡입될 수 있게 하였다. 실험종료 후 실험동물은 ethyl ether로 마취시킨 후 BAL과 PBMC에서 FACS를 이용하여 면역세포를 확인하고 BALF, plasma에서 IL-17를 확인하였다. 또한 BAL cell cytopsin후 Diff-Quik Stain으로 neutrophils의 증가를 확인하였다. lung를 분리하여 폐 조직검사 (H&E, M-T stain)와 real-time qPCR 을 통해 IL-17의 증가를 확인하였다고 분석하여 *In vitro* 상에서 호흡기 질환 유사 조건을 ROS 생산량을 분석하여 구축하고자함.

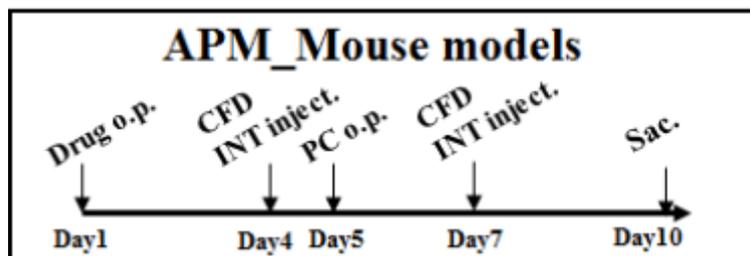


그림 51. CFD 유도 마우스 모델 제작 프로토콜

## 2.2. 폐 세정액내 염증 세포의 Gr-1/CD11b 발현 분석

BALB/C mouse에 CFD를 INT injection 방법으로 투여한 후 7일후 BAL에서 Gr-1/CD11b를 측정된 결과, 정상군과 대조군에 비해 coal과 fly ash를 투여한 군과 coal과 fly ash와 DEP를 투여한 군에서 Gr-1+/CD11b+ 가 증가됨을 확인 할 수 있었다. 또한 coal + fly ash + DEP 200 (0.25mg/ml + 0.5 mg/ml +0.25 mg/ml)투여 군에서 Gr-1+/CD11b+ 가 가장 크게 증가됨을 확인 할 수 있었다 (그림 40).

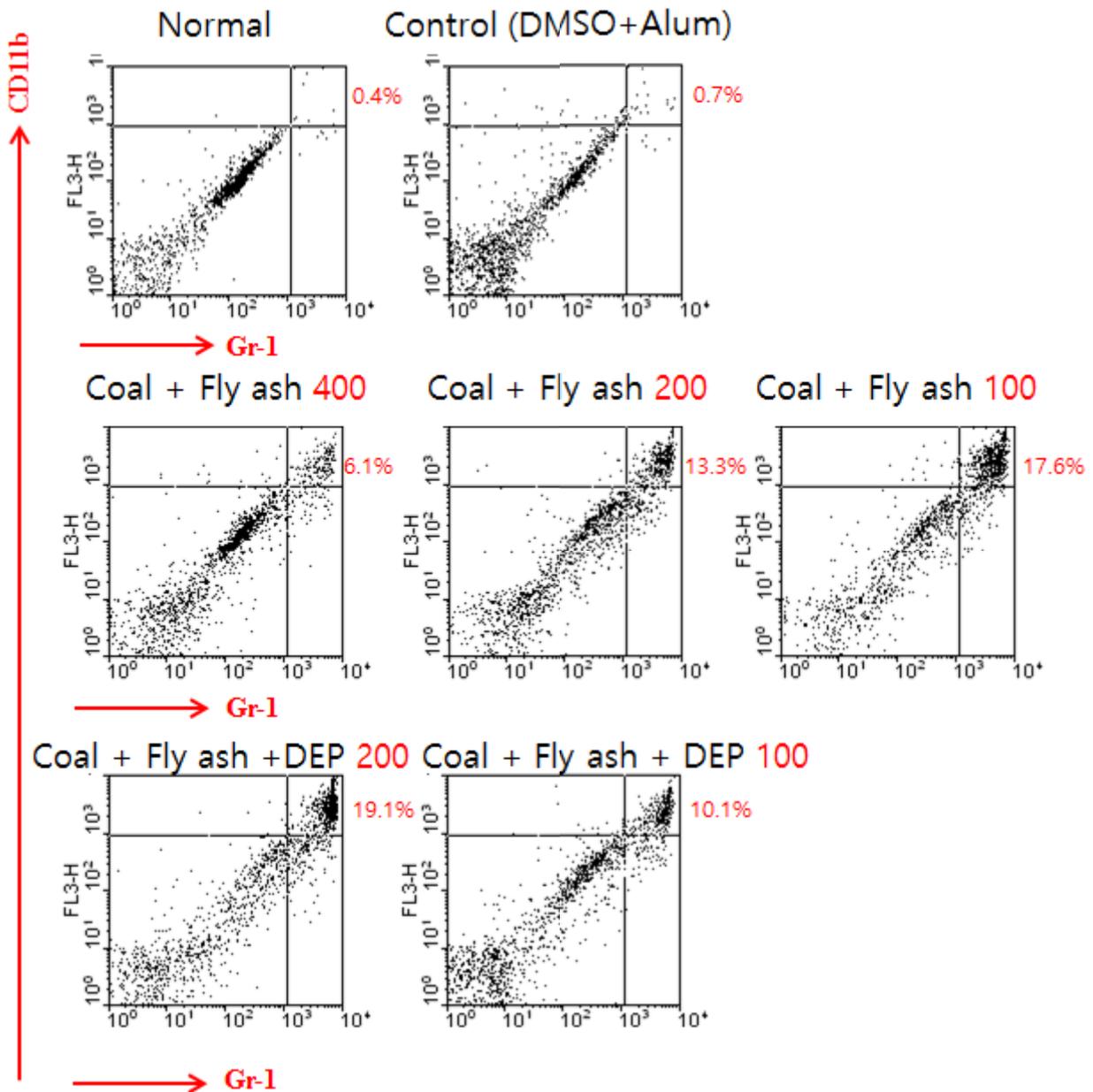


그림 52. CFD 유도 마우스 모델의 BAL에서 Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> FACS 분석

### 2.3. 폐 세정액내 염증 세포의 CD4/CD8 발현 분석

BALB/C mouse에 CFD를 INT injection방법으로 투여한후 7일후 BAL에서 CD8/CD4를 측정 한 결과, 정상군과 대조군에 비해 coal과 fly ash를 투여한 군에서 농도 의존적으로 CD8이 증가됨을 확인 할 수 있었다. 또한 CFD를 투여한 군에서도 정상군에 비해 농도 의존적으로 CD8이 증가됨을 확인 할 수 있었다. 마찬가지로 CD4도 증가됨을 알 수 있었다 (그림 41).

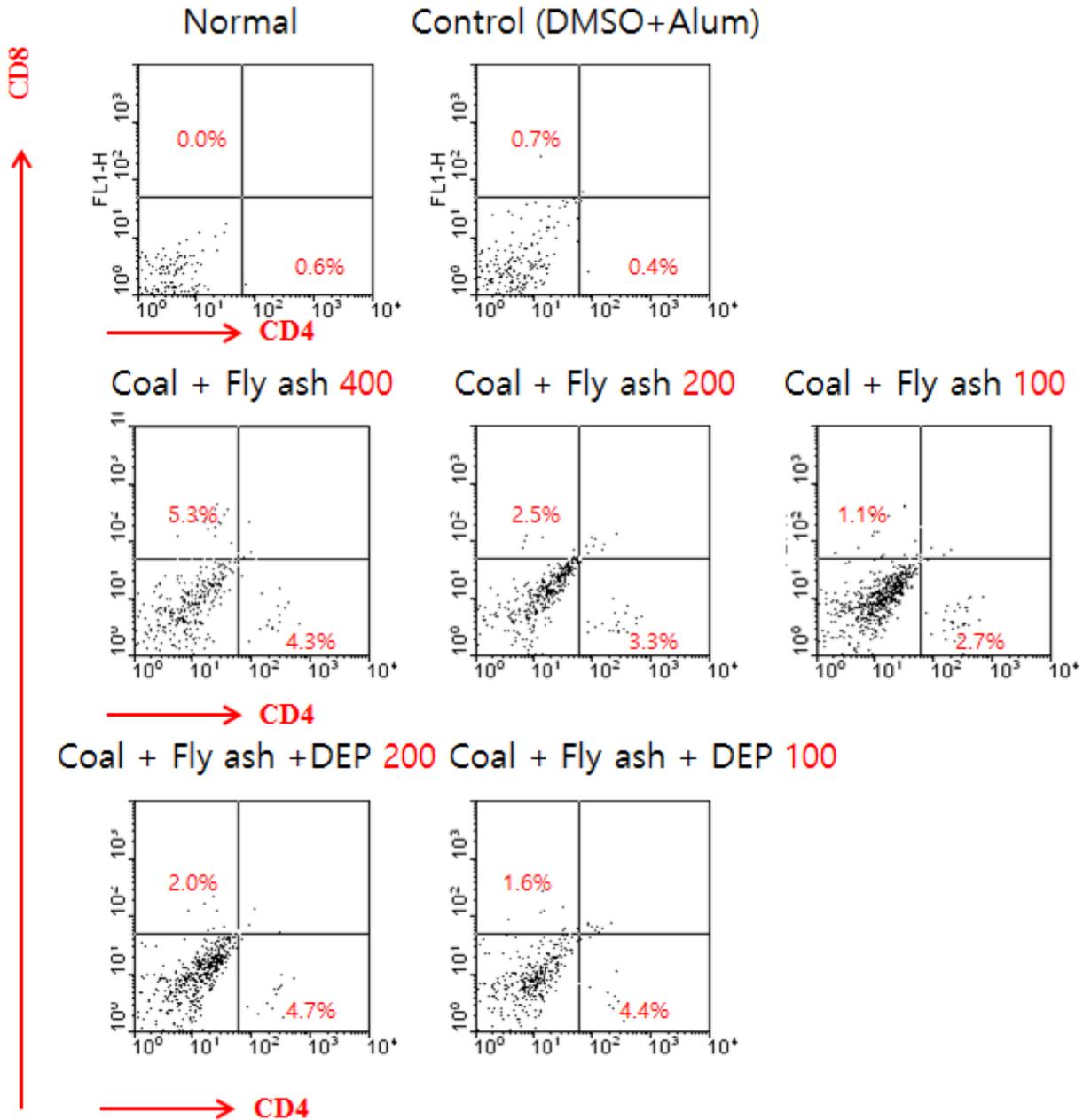


그림 53. CFD 유도 마우스 모델의 BAL에서 CD4/CD8 FACS 분석

#### 2.4. 말초혈액단세포의 염증 세포수 변화 분석

정상군과 대조군에서는 적은 양의 neutrophils를 확인하였다. 그리고 Coal + Fly ash 400 (0.5 mg/ml + 1.0 mg/ml) 를 처리한 군에서는 neutrophils의 수가 증가하였다. 마찬가지로 Coal + Fly ash 200 (0.25 mg/ml + 0.5 mg/ml)를 처리한 군에서도 neutrophils의 수가 증가됨을 확인 됨. CFD를 혼합한 coal + fly ash + DEP 200 (0.25 mg/ml + 0.5 mg/ml + 0.25 mg/ml)를 투여한 군에서 neutrophils의 수가 가장 크게 증가되었고, coal + fly ash + DEP 100 (0.125 mg/ml + 0.25 mg/ml + 0.125 mg/ml)를 처리한 군에서도 neutrophils의 수가 증가됨을 확인 할 수 있었다 (그림 42, 43).

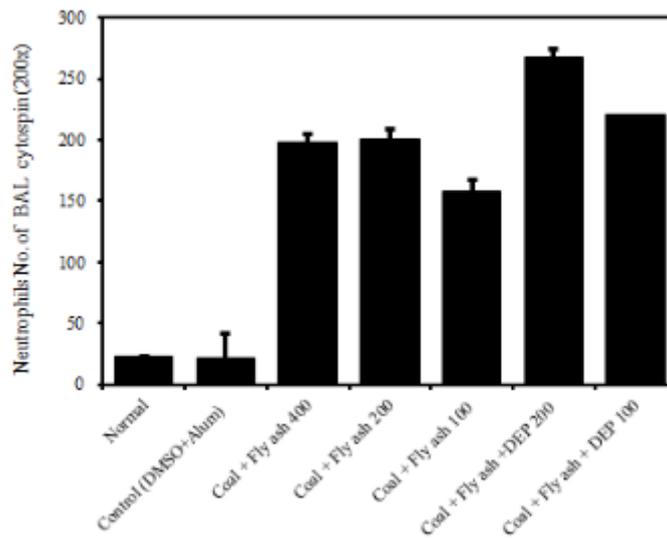


그림 54. CFD 유도 마우스 모델의 BAL에서 Cyospin분석

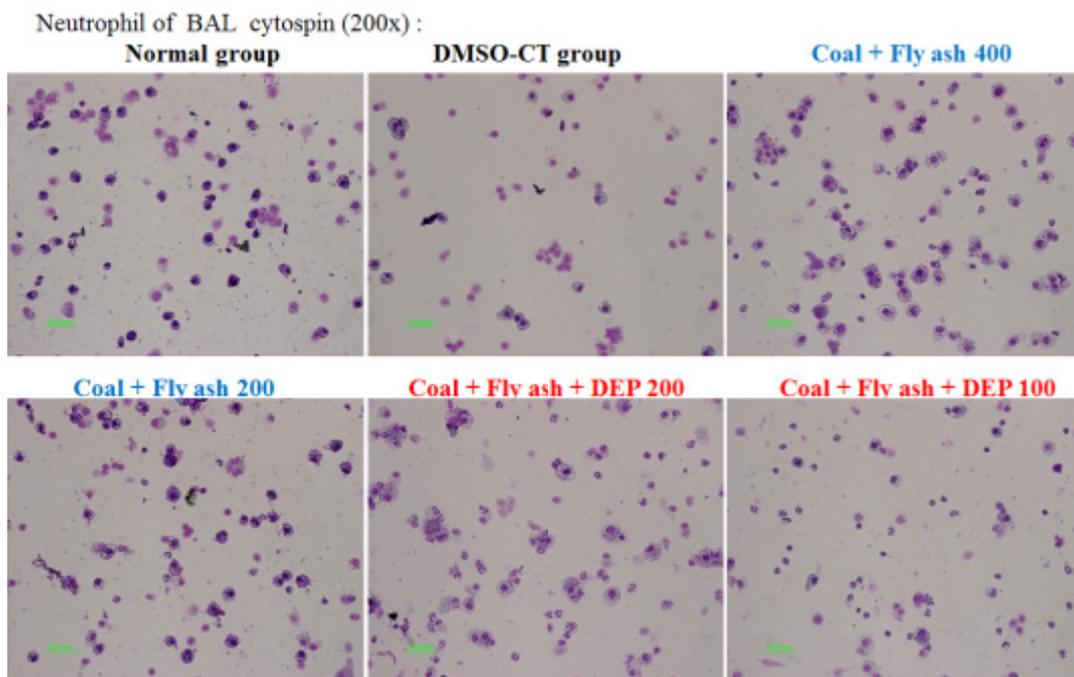


그림 55. CFD 유도 마우스 모델의 BAL에서 Cyospin photograph 분석

## 2.5. 말초혈액단세포의 CD4/CD8 발현 분석

BALB/c mouse에 CFD를 INT injection 방법으로 투여한 후 7일후 말초혈액단세포 (PBMC)에서 CD8/CD4를 측정된 결과, 정상군에 비해 coal과 fly ash를 투여한 군과 CFD를 투여한 군에서 CD8이 증가됨을 확인 할 수 있었다. 하지만 대조군에 비해서는 CD8이 큰 차이를 보이지 않았다 (그림 44).

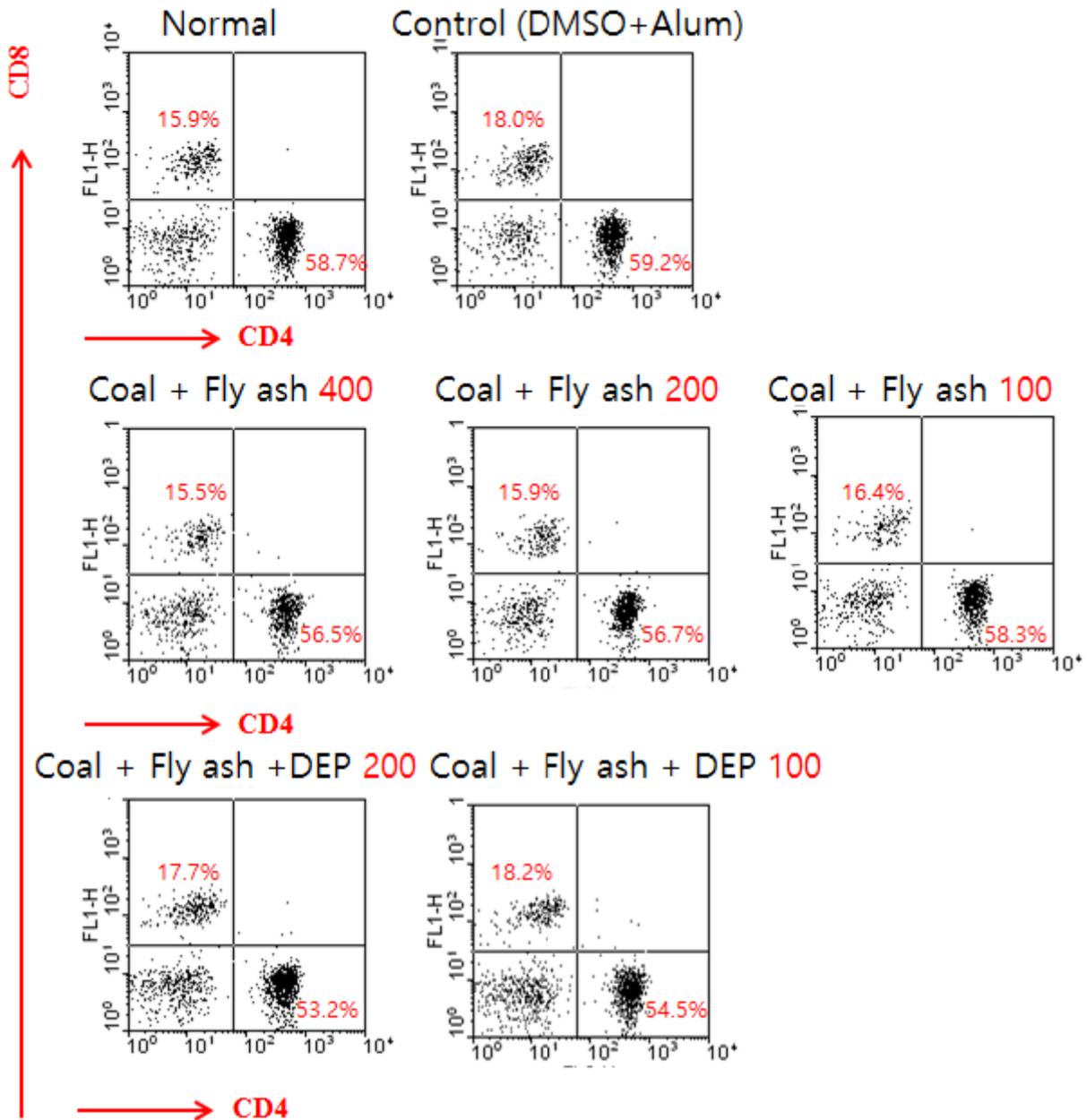


그림 56. CFD 유도 마우스 모델의 PBMC에서 CD4/CD8 FACS 분석

#### 2.5.1.6. 연구 결과의 의의 및 고찰

미세먼지는 여러 가지 복잡한 성분을 가진 대기 중 부유 물질이다. 그 중 석탄연소물인 coal과 fly ash와 DEP를 섞은 혼합물을 Alum과 함께 회석시켜 8주령 BALB/c 수컷 생쥐에 INT injection 방법을 이용하여 기도를 통해 폐로 직접 주입하여 CFD mouse model을 제작에 성공하였다. 즉, 미세먼지 모델은 실험동물에 미세먼지의 구성성분인 coal, Fly ash, DEP를 혼합하여 INT injection 방법으로 주입하여 기도와 폐 염증을 유발하고, 기관지 상피세포에서 섬유증을 일으켜 기도와 폐 손상과 염증을 유발 했는데, coal + fly ash로 미세먼지 염증 모델을 유도했을 때 보다는 CFD로 유도했을 때가 좀 더 현저하게 기도와 폐 염증 neutrophil 및 기관지 상피세포에서 섬유증을 일으켜 기도와 폐 손상과 염증을 유발됨을 BAL내 FACS 분석, cytopsin분석등을 확인하여 최종 미세먼지 동물모델은 CFD를 INT injection으로 제작 성공하였다.

## 나. 호흡기 유용 천연물 소재의 효능평가 및 최적 시너지 활성 복합제 선정

### 1. 후보 천연물 소재의 거담 억제 효능 평가

추출물의 거담효과 (expectorant effect)는 페놀레드 분비 시험법을 이용하여 기관지 분비액 증가를 측정하였다. 8주령의 수컷 ICR mouse를 코아텍 (평창, 경기도, 대한민국)으로부터 구입하여 1주일 순화후 군당 10수씩 분리 및 절식시켰다. 시험 당일 대조군, 양성대조군 및 시험군에 각각 부형제 (증류수), 250 mg/kg Ambroxol, 2.0 mg/kg 추출물을 경구투여 한 다음, 30분 후 5% Phenol red in normal saline을 10 ml/kg양만큼 복강투여하였다. 투여 30분 후, CO<sub>2</sub>로 마취 시킨 ICR mouse의 기관지를 절제하여 normal saline을 1 ml 넣고 15분간 ultra sonication하였으며, 원심분리 후 상등액에 1N NaOH를 10%첨가하여 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. 먼저 곰보배추, 홍삼, 측백엽, 익모초의 거담효과를 위의 실험방법으로 진행하였다. 각각의 흡광도는 정상군에서 0.14±0.04 nm, Ambroxol에서 0.22±0.03 nm, 곰보배추에서 0.22±0.11 nm, 홍삼에서 0.27±0.12 nm, 측백엽에서 0.23±0.08 nm, 익모초에서 0.28±0.07 nm로 측정되었다. 통계적 유의성을 확인하기 위해 일원배치분산분석을 진행하였으나, 각 군에서 유의미한 증가나 감소는 확인되지 않았다 ( $p>0.05$ ). 다만 이들 추출물이 정상군에 비해 약간의 거담효과는 가지고 있는 것으로 보이며, 거담효과를 억제하지는 않는 것을 알 수 있다 (그림 22).

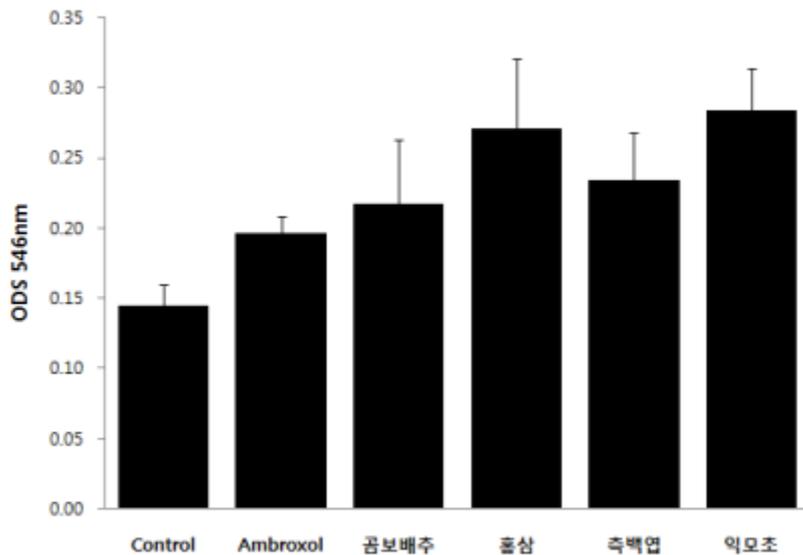


그림 57. 곰보배추, 홍삼, 측백엽, 익모초의 거담효과

각각의 흡광도는 정상군에서 0.15±0.05 nm, Ambroxol에서 0.21±0.10 nm, 인동에서 0.18±0.08 nm, 인진호에서 0.23±0.08 nm, 학슬에서 0.18±0.07 nm, 회령에서 0.21±0.15 nm로 측정되었다. 각 군에서 유의미한 증가나 감소는 확인되지 않았다 ( $p>0.05$ ) (그림 23).

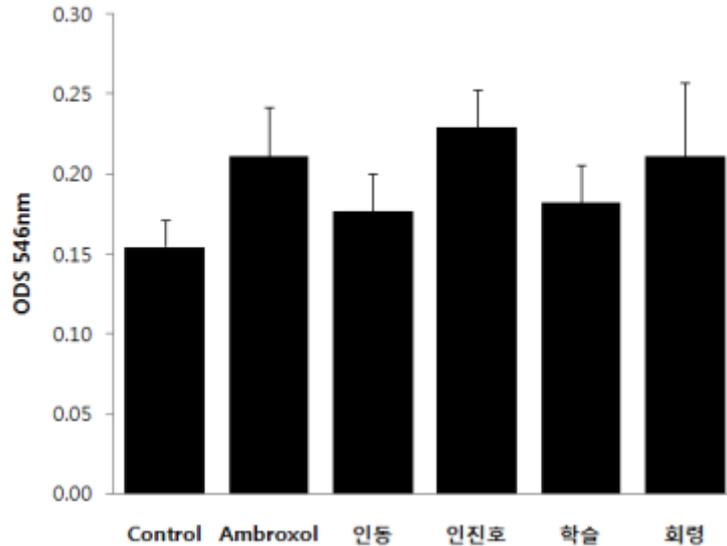


그림 58. 인동, 인진호, 학슬, 회령의 거담효과

## 2. 후보 천연물 소재의 부종억제 활성

### 2.1. 천연물 소재들의 귀부종 억제 효과

귀부종 실험은 추출물에 대한 항염증 효과를 확인하기 위한 실험방법으로, mouse의 귀 뒷면에 크로톤 오일을 사용하면 발적, 종창 및 수포등의 염증작용이 일어나게 되는데, 이 두께를 측정하여 반대편 귀와 비교, 억제율을 계산하는 방법이다. 본 실험에서는 6주령의 체중 약 30g의 수컷 ICR mouse를 이용하여 각 실험군별로 분리하고, 항염증 효과가 있을 것으로 예상되는 추출물을 일정기간 경구투여한 후, 아세톤에 녹인 2.5% 크로톤 오일을 mouse 오른쪽 귀 전체에 골고루 도포해 귀부종을 유발하였다. 부종 유발 4시간 이후 양쪽귀의 두께를 측정해 그 정도를 억제율로 환산하였다.

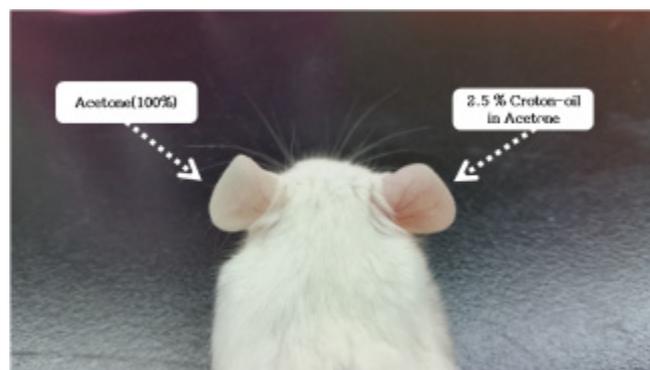


그림 29. 실험동물 귀부종 유발

(왼쪽 귀 : 100% Acetone, 오른쪽 귀 : 2.5%의 croton oil in Acetone)

실험은 50% 에탄올로 추출한 익모초, 측백엽, 곰보배추, 인진호, 원화, 학슬 및 홍삼정분을 7일간 경구 투여하였고, 뒤이어 귀부종 실험을 진행하였다. 각 추출물별 귀부종 두께를 측정

결과, 정상군은  $0.40 \pm 0.05$  mm, croton oil 처리군은  $0.88 \pm 0.03$  mm, 양성대조군인 indomethacin 처리군은  $0.69 \pm 0.04$  mm, 익모초처리군은  $0.72 \pm 0.03$  mm, 측백엽 처리군은  $0.77 \pm 0.06$  mm, 곰보배추 처리군은  $0.75 \pm 0.06$  mm, 홍삼 처리군은  $0.78 \pm 0.06$  mm, 인진호 처리군은  $0.63 \pm 0.12$  mm, 원화 처리군은  $0.71 \pm 0.09$  mm, 학슬 처리군은  $0.72 \pm 0.04$  mm이다. 분석결과 각군에 유의미한 차이를 확인할 수 있었으며 ( $p < 0.01$ ), Duncan 사후검증을 실시했을 때, 모든 추출물에서 항염증 효과를 확인할 수 있었으며, 가장 항염증 효과가 높은 것은 인진호로 확인되었다 (그림 25).

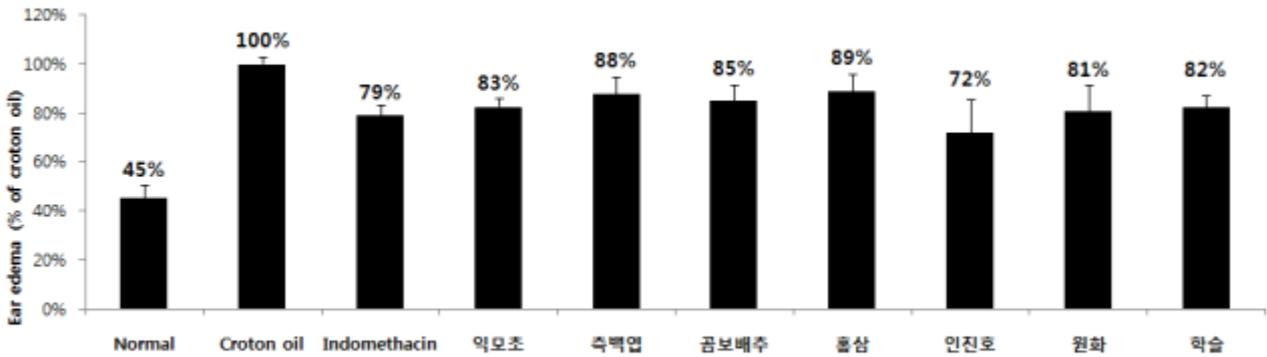


그림 60. 단미제 7종의 귀부종 억제 효과

## 2.2. 최적 활성 시너지활성 복합제 선정

### 2.2.1. 복합제의 귀부종 억제 효과

모든 추출물에서 귀부종 억제효과가 있음을 확인한바, 혼합제제에서 더 큰 효과가 있는지 살펴보기 위해 곰보배추, 인진호, 측백엽, 익모초를 조합해 실험을 진행하였다. 혼합제제의 귀부종 두께를 측정한 결과, 정상군은  $0.34 \pm 0.01$  mm, croton oil 처리군은  $0.86 \pm 0.02$  mm, 양성대조군인 indomethacin 처리군은  $0.66 \pm 0.02$  mm, 곰보배추+인진호 처리군은  $0.72 \pm 0.01$  mm, 곰보배추+측백엽 처리군은  $0.72 \pm 0.01$  mm, 곰보배추+익모초+측백엽 처리군은  $0.69 \pm 0.01$  mm, 익모초+측백엽 처리군은  $0.69 \pm 0.01$  mm, 익모초+인진호 처리군은  $0.73 \pm 0.01$  mm, 측백엽+인진호 처리군은  $0.71 \pm 0.01$  mm로 측정되었다. 모든 추출물에서 항염증 효과를 확인할 수 있었으며 그 중 가장 항염증 효과가 높은 것은 곰보배추 + 익모초 + 측백엽 혼합물로 확인되었다 (그림 26).

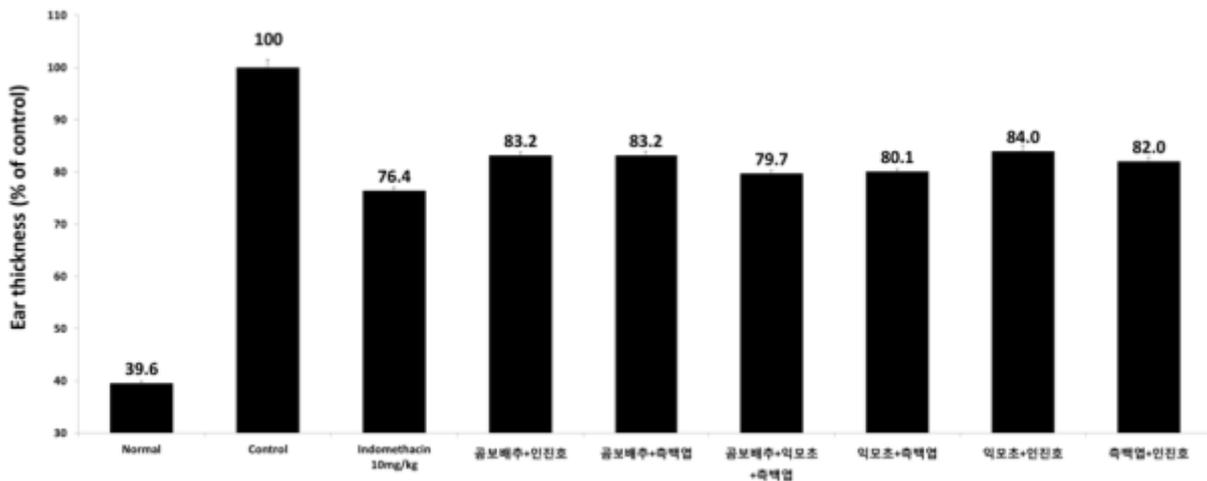


그림 61. 혼합제제 6종의 귀부종 억제 효과

### 2.2.2. 측백엽, 곰보배추, 익모초 혼합 비율별 귀부종 억제 효과

측백엽, 곰보배추, 익모초의 혼합비율별로 배합한 추출물을 5일간 경구 투여 후 croton oil을 mice 귀에 도포하여 부종을 측정하고 그 결과를 아래 표 5에 비교하였다. 각각 비율별 혼합 추출물은 mice 귀부종 동물모델에서 우수한 활성을 나타내었고, 1:2:1 배합 추출물 투여군에서 가장 우수한 상승작용 활성을 나타내었다.

표 5. 측백엽, 곰보배추, 익모초 복합 추출물의 비율별 croton oil 유도 귀부종 억제 효과

Groups	Combination	Inhibition (% of control)	
측백엽+곰보배추+익모초 200 (mg/kg)	Indomethacin	-	25.3±0.8**
		1:1:1	22.7±0.8**
		1:2:1	26.2±0.9**
		1:2:2	23.8±1.2**
		1:2:4	22.6±1.1**
		1:4:1	17.9±0.7*
		1:4:2	21.1±1.1**
		1:4:4	22.2±1.1**

\*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with mice treated with Croton oil alone (n=6).

### 2.2.3. 측백엽, 곰보배추, 익모초 혼합물 농도별 귀부종 억제 효과

표 6 에서 보는바와 같이 1:2:1 배합 추출물에서 농도의존적으로 부종을 억제하였고, 특히 200 mg/kg 이상 투여 용량에서 비슷한 활성을 보여 200 mg/kg 투여 용량이 최적 조건임을 확인하였다. 결과적으로 1:2:1 최적 배합 조건에 따른 200 mg/kg 투여 용량은 양성대조물질 indomethacin보다 우수한 상승적 항염 활성을 보였고 최적 용량 조건임을 제시하고 있다.

표 6. 측백엽, 곰보배추, 익모초 복합 추출물의 농도별 croton oil 유도 귀부종 억제 효과

Groups	Dose (mg/kg)	Inhibition (% of control)
Indomethacin	-	24.9±0.8**
측백엽+곰보배추+익모초 1:2:1 혼합물	50	13.0±0.5*
	100	17.8±0.8*
	200	25.9±0.6**

\*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with mice treated with croton oil alone (n=6).

### 3. 염증 및 산화적 손상 방어효과 비교 (*In vitro*)

#### 3.1. Alveolar macrophage (MH-S cell)를 이용한 염증 및 산화적 손상 방어 효과 비교

호흡기 면역에 중요한 폐 Alveolar macrophage인 MH-S cell에 호흡기 질환 개선 후보물질들의 세포에 대한 적정 처리 농도를 확립하고, 호흡기 질환 유도 물질인 석탄연소물과 fly ash를 비교 분석하여 *In vitro* 상에서 호흡기 질환 유사 조건을 염증 및 reactive oxygen species (ROS) 생성량을 분석하여 구축하고자 하였다.

#### 3.2.1. 후보 단미제의 처리 농도 결정

MH-S cell에 후보물질을 농도별로 처리하여 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium Bromide (MTT) assay를 통해 cell proliferation을 확인함으로써 후보물질의 EC50을 구함 (그림27, 표 7).

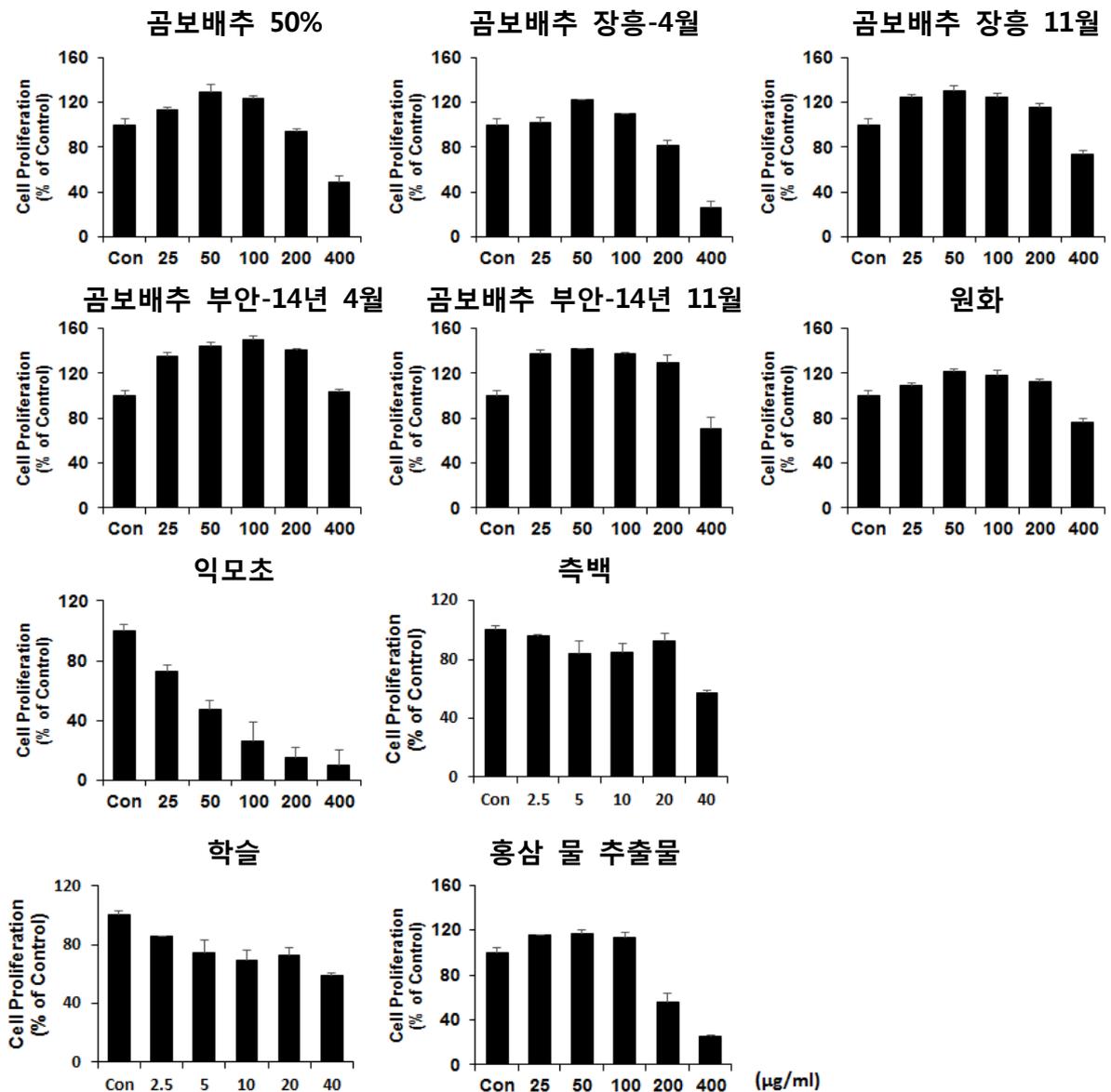


그림 32. 후보 물질의 농도별 처리에 따른 cell proliferation의 변화

표 7. 각 후보 소재의 표기 및 EC<sub>50</sub>

추출물	추출 용매	EC <sub>50</sub> (μg/ml)
곰보부안 14년 4월	50% 주정	50
곰보장흥 4월	30% 주정	50
곰보장흥 11월	30% 주정	100
곰보부안 14년 4월	30% 주정	100
곰보부안 15년 4월	30% 주정	100
원화	50% 주정	100
익모초	50% 주정	5
측백	50% 주정	10
학슬	50% 주정	5
홍삼	물	200

### 3.3. 대기오염물질 (Fly ash, 석탄연소물, 1:1 혼합물)의 처리 농도 결정

실험 세포주에 대기오염물질인 석탄연소물 및 fly ash를 단독 및 혼합하여 처리 한 후 ROS 생성량을 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA)로 염색하여 fluorescence activated cell sorting (FACS)로 분석하였다. 그 결과 석탄연소물을 25 μg/ml로 처리한 군에서 ROS 생성량이 가장 많은 것을 확인 하였고, 혼합 처리와 fly ash 단독으로 처리한 군에서는 ROS 생성량이 적은 것을 확인하였다. 이후 25 μg/ml의 석탄연소물을 단독으로 처리하여 세포주에 자극을 주어 실험을 진행하였다 (그림 28).

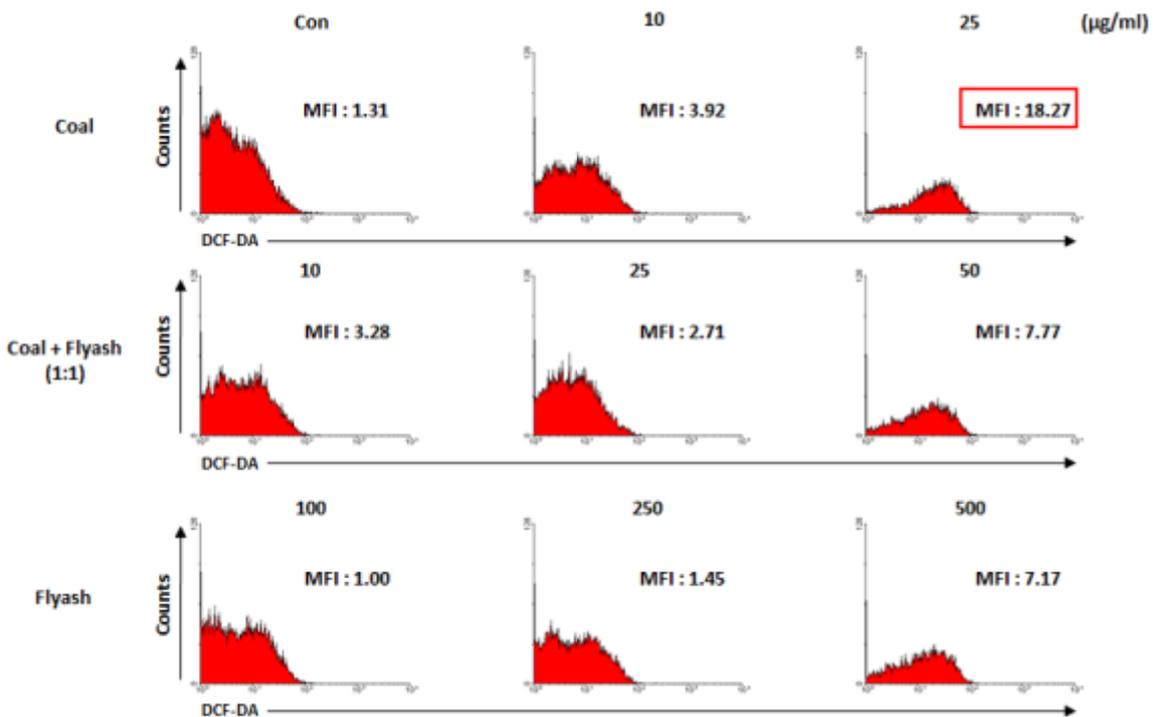


그림 63. 석탄연소물 및 Fly ash 처리에 따른 ROS 변화

### 3.4. 석탄연소물이 유발한 독성에 대한 후보 단미제의 방어 효과

#### 3.4.1. ROS 및 NO

MH-S cell 에 석탄연소물을 이용하여 자극 시킨 후 후보물질들을 처리하여 ROS 생성량을 분석하였다. 석탄연소물에 의해 증가한 ROS 생성량이 후보물질들에 의하여 대부분 감소하였고 그중 홍삼 물 추출물, 익모초, 학슬, 곰보배추 50%, 곰보배추 장흥-4월, 곰보배추 부안-14년 4월, 곰보배추 부안-15년 4월등이 ROS의 생성량을 감소시키는 것으로 보였다 (그림 29).

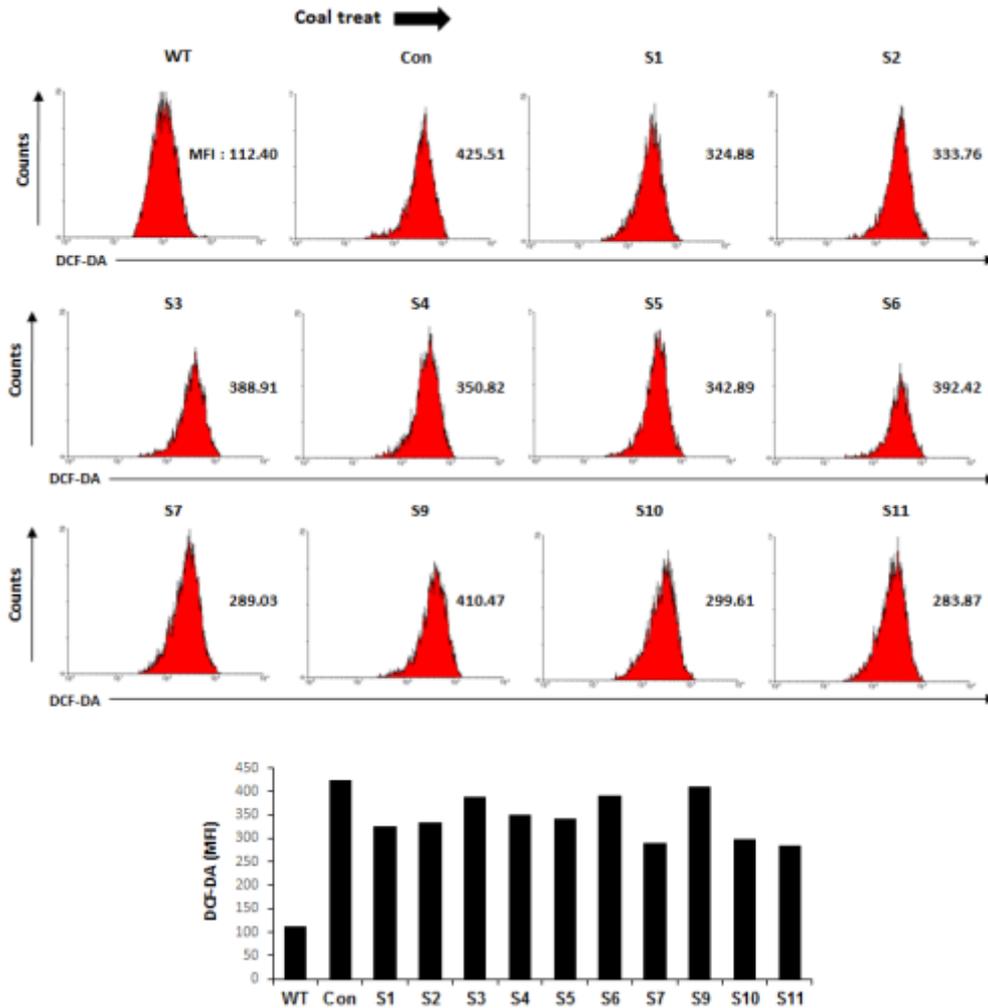


그림 64. 단미제에 의한 ROS 생성량 변화.

약어: S1, 곰보배추 50%(50 $\mu$ g/ml); S2, 곰보배추 장흥-4월(50 $\mu$ g/ml); S3, 곰보배추 장흥-11월 (100 $\mu$ g/ml); S4, 곰보배추 부안-14년 4월(100 $\mu$ g/ml); S5, 곰보배추 부안-15년 4월(100 $\mu$ g/ml); S6, 원화 추출물(100 $\mu$ g/ml); S7, 익모초 추출물(5 $\mu$ g/ml); S9, 측백 추출물(10 $\mu$ g/ml); S10, 학슬 추출물(5 $\mu$ g/ml); S11, 홍삼 물 추출물(50 $\mu$ g/ml).

MH-S cell에 석탄연소물을 이용하여 자극 시킨 후 후보물질들을 처리하여 nitrogen oxide (NO) 생성량을 분석하였다. 하지만 석탄연소물에 의한 MH-S cell의 NO 생성량이 매우 적어서 그룹 간에 큰 차이를 보이지 않았다 (그림 30).

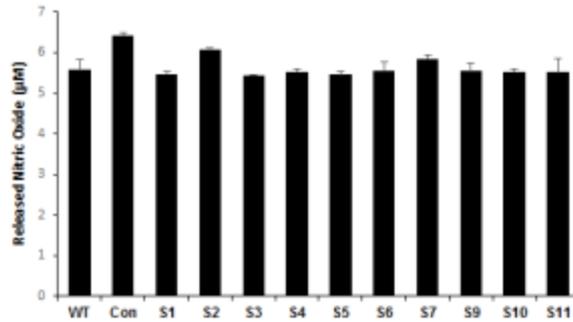


그림 65. 후보물질에 의한 NO 생성량 변화

### 3.4.2. 염증성 cytokine 유전자

MH-S cell 에 석탄연소물을 이용하여 자극 시킨 후 후보물질들을 처리하여 NO 생성량을 분석하였다. 염증성 cytokine 인 IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17, TGF- $\beta$ , IL-10 등을 확인한 결과 석탄연소물로 자극하면 IL-17이 특이적으로 증가를 하는 것을 확인 할 수 있었고, 곰보배추 50%, 곰보배추 장흥-4월, 곰보배추 부안-14년 4월, 곰보배추 부안 15년-4월, 학슬등이 IL-17을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다 (그림 31).

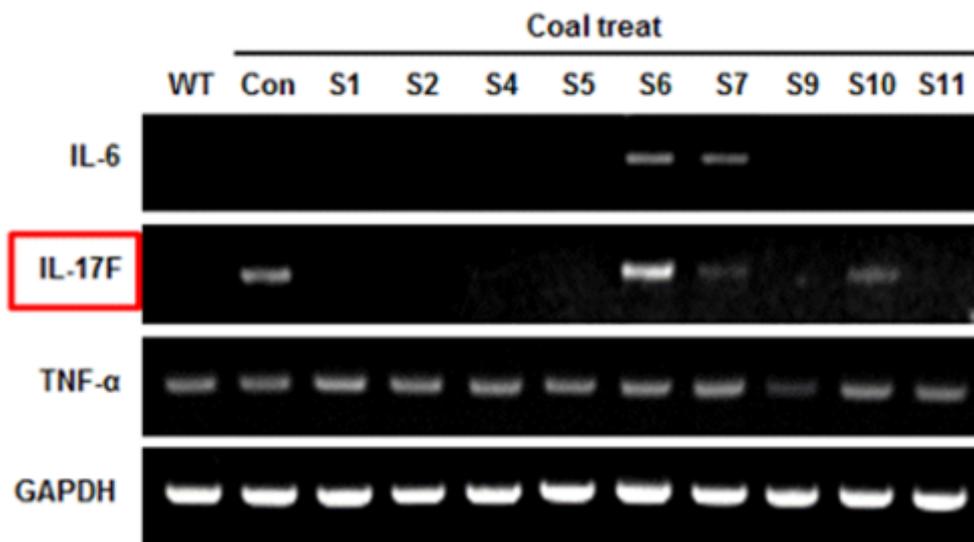


그림 66. 후보물질에 의한 염증성 사이토카인 유전자 발현 변화

약어: S1, 곰보배추 50%(50 $\mu$ g/ml); S2, 곰보배추 장흥-4월(50 $\mu$ g/ml); S3, 곰보배추 장흥-11월 (100 $\mu$ g/ml); S4, 곰보배추 부안-14년 4월(100 $\mu$ g/ml); S5, 곰보배추 부안-15년 4월(100 $\mu$ g/ml); S6, 원화 추출물(100 $\mu$ g/ml); S7, 익모초 추출물(5 $\mu$ g/ml); S9, 측백 추출물(10 $\mu$ g/ml); S10, 학슬 추출물(5 $\mu$ g/ml); S11, 홍삼 물 추출물(50 $\mu$ g/ml).

### 3.4.3. IL-17 유전자

MH-S cell에 석탄연소물을 이용하여 자극 시킨 후 후보물질들을 처리하여 특이적 반응을 보인 IL-17을 quantitative polymerase chain reaction (qPCR)을 이용하여 분석하였다. 곰보배추 50%, 곰보배추 장흥-4월, 곰보배추 부안-14년 4월, 곰보배추 부안-15년 4월등이 IL-17을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다 (그림 32).

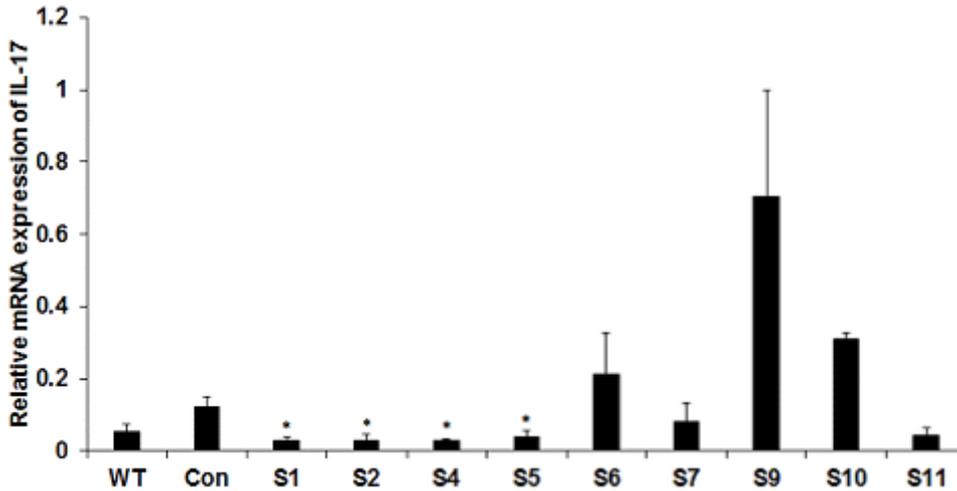


그림 67. 후보물질에 의한 IL-17 유전자 발현 변화.

약어: S1, 곰보배추 50%(50 $\mu$ g/ml); S2, 곰보배추 장흥-4월(50 $\mu$ g/ml); S3, 곰보배추 장흥-11월 (100 $\mu$ g/ml); S4, 곰보배추 부안-14년 4월(100 $\mu$ g/ml); S5, 곰보배추 부안-15년 4월(100 $\mu$ g/ml); S6, 원화 추출물(100 $\mu$ g/ml); S7, 익모초 추출물(5 $\mu$ g/ml); S9, 측백 추출물(10 $\mu$ g/ml); S10, 학슬 추출물(5 $\mu$ g/ml); S11, 홍삼 물 추출물(50 $\mu$ g/ml).

### 3.4.4. 연구 결과의 의의 및 고찰

호흡기 면역에 중요한 Alveolar macrophage인 MH-S cell에 호흡기 질환 개선 후보물질들의 세포에 대한 적정 처리 농도를 확립 하였고, 호흡기 질환 유도 물질인 석탄연소물과 fly ash 를 비교 분석하여 *In vitro* 상에서 호흡기 질환 유사 조건을 구축하였다. 구축된 *In vitro* 모델 에 후보물질들을 처리하여 ROS를 확인 한 결과에서는 대부분의 후보물질들에 의하여 석탄연 소물에 의해 증가한 ROS가 감소하는 효과를 확인하였다. 하지만 NO의 양은 석탄연소물에 의 해 유도되는 매우 적어 유의성 있는 차이를 볼 수는 없었다. 염증 관련 cytokine의 유전자 발 현에서는 흥미롭게도 IL-17의 발현이 특이적으로 석탄연소물에 의해 현저히 증가 하였고 이를 후보 물질들 중 곰보배추 50%, 곰보배추 장흥-4월, 곰보배추 부안-14년 4월, 곰보배추 부안 -15년 4월, 측백, 홍삼 물 추출물이 현저히 감소시키는 것을 볼 수 있었다. IL-17은 알레르기 반응과 주된 연관이 있고 다양한 염증 cytokine을 유도함에 있어 후보 물질들이 IL-17을 조절 하였다는 것은 매우 중요하다고 판단된다.

#### 4. 급성 호흡기 손상 모델에서 후보 천연물 소재 효능평가

##### 4.1. 호흡기 보호 및 개선용 후보물질 단독 투여 스크리닝

BALB/c 정상군 6마리, 대조군 6마리, 양성대조군으로 Montelukast (10 mg/kg) 투여군 6마리, 다른 양성대조군인 N-Acetyl-L-cysteine (NAC) (200 mg/kg) 투여군 6마리, 홍삼 추출물 투여군 (200 mg/kg) 6마리, 인진호 추출물 투여군 (200 mg/kg) 6마리, 측백 추출물 투여군 (200 mg/kg) 6마리, 곰보배추 추출물 투여군 (200 mg/kg) 6마리, 그리고 익모초 추출물 투여군 (200 mg/kg) 6마리씩으로 9그룹 54마리로 설정하였다. 약물회석은 0.5% Carboxymethyl Cellulose (CMC)로 혼탁하여 투여하고, 대조군은 0.5% CMC 용액을 동량 투여하였다. 약물투여는 경구투여용 금속제 존대 (zonde)를 이용하여 위내로 강제 경구투여 하였다. CFD mouse 모델은 실험동물에 미세먼지의 구성성분인 coal, fly ash, DEP를 혼합하여 INT injection 방법으로 주입하여 기도와 폐 염증을 유발하거나, 기관지 상피세포에서 섬유증을 일으켜 기도와 폐 손상과 염증을 유발시킨다. 실험 종료후 실험동물은 ethyl ether로 마취시킨 후 BAL과 PBMC에서 FACS를 이용하여 면역세포를 확인하고 BALF, plasma에서 면역관련 chemokine등을 확인하였다. 또한 BAL cell cytopsin으로 neutrophils의 증가를 확인하였다. 폐를 분리하여 폐 조직검사(H&E, M-T stain)와 real-time qPCR 을 통해 관련 유전자 발현을 확인하였다. BALB/c mouse에 CFD를 생쥐의 폐에 INT injection 방법을 이용하여 직접 주입하고 후보 물질을 각각 200 mg/kg씩 경구 투여한 후 부검하여 BAL cell을 Diff-Quick staining을 통해 neutrophils 수를 확인함으로써 후보물질의 효능을 알아보았다. BAL cell을 Diff-Quick staining을 통해 neutrophils 수를 확인함으로써 후보물질의 효능을 알아보았다. 그림 45, 46을 통해 CFD를 INT injection 방법으로 주입한 대조군에서 neutrophil의 수가 증가하는 것으로 보아 폐에서의 염증 수치가 함을 알 수 있었다. 또한 양성대조군인 Montelukast와 NAC를 투여한 그룹보다도 홍삼과 곰보배추 투여 그룹에서 상대적인 neutrophil의 수가 통계적으로 유의성 있게 감소함을 보아 폐에서의 염증 수준이 감소하였다고 예상할 수 있었다.

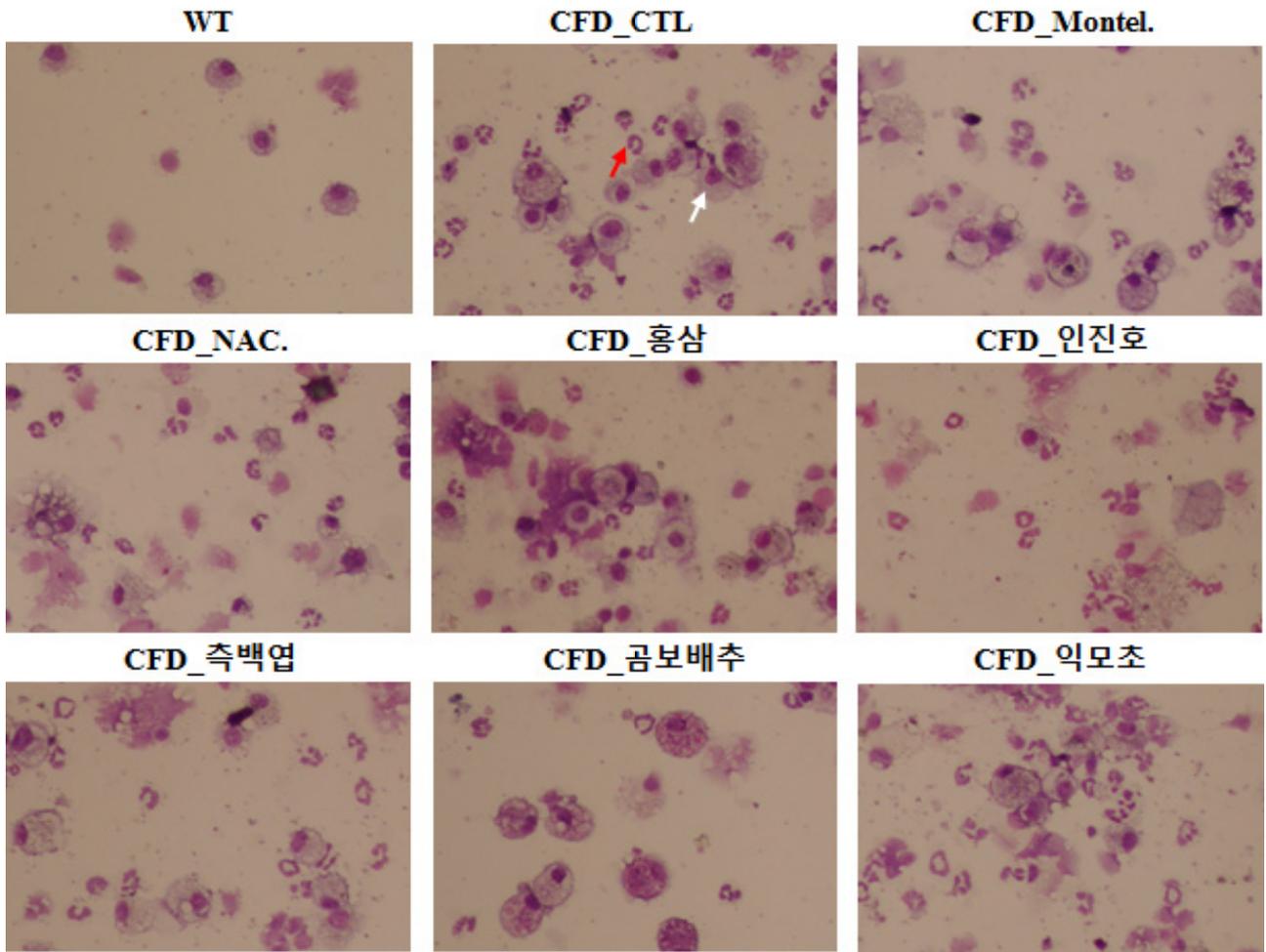


그림 68. CFD 유도 마우스 모델의 BAL에서 후보 물질 투여에 따른 neutrophil 수의 변화

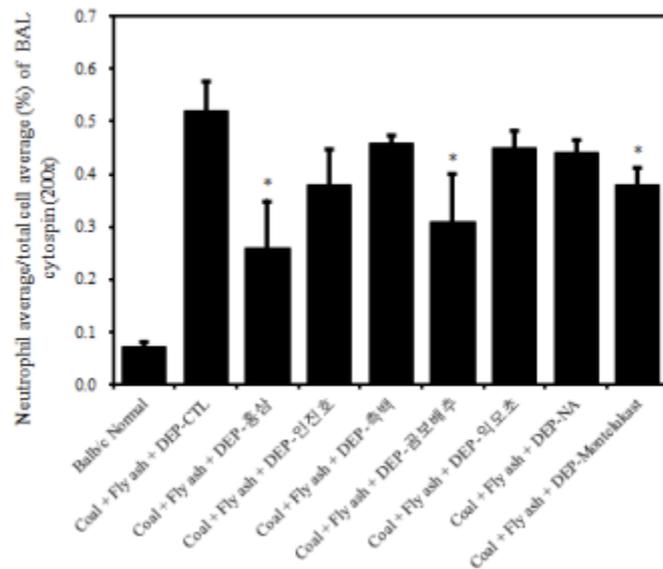


그림 69. CFD 유도 마우스 모델의 BAL에서 후보 물질 투여에 따른 BAL의 Granulocyte average/total cell average의 변화

BAL에서의 절대 총세포수 (absolute number)를 산출하였다. CFD를 INT injection 방법으로 주입한 대조군의 BAL에서 neutrophil+ /Gr-1+ 면역 세포 수가 증가하였고, 양성대조군인 Montelukast 투여 그룹과 또 다른 양성대조군인 NAC 투여 그룹의 BAL에서는 통계적 유의성을 찾을 수 없었다. BAL에서는 후보 물질 투여군중 인진호와 촉백을 제외한 나머지 투여군에서 모두 통계학적으로 유의성 있게 Neutrophil+ /Gr-1+ 면역 세포 수가 감소하였다 (그림 47).

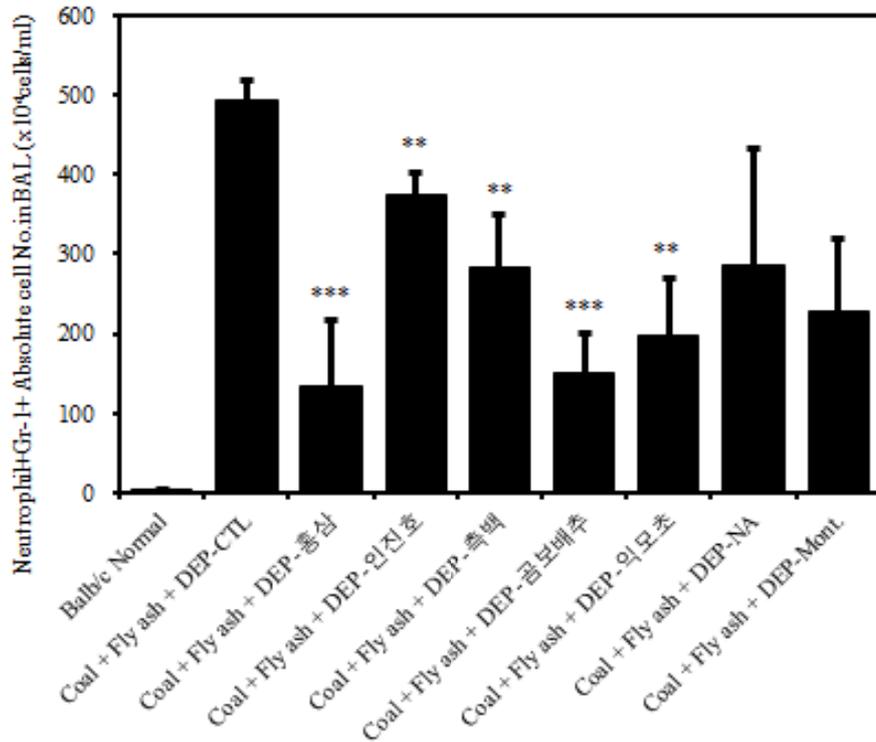


그림 70. CFD 유도 마우스 모델의 BAL에서 후보 물질 투여에 따른 BAL에서의 neutrophil + Gr-1 + absolute cell number의 변화.

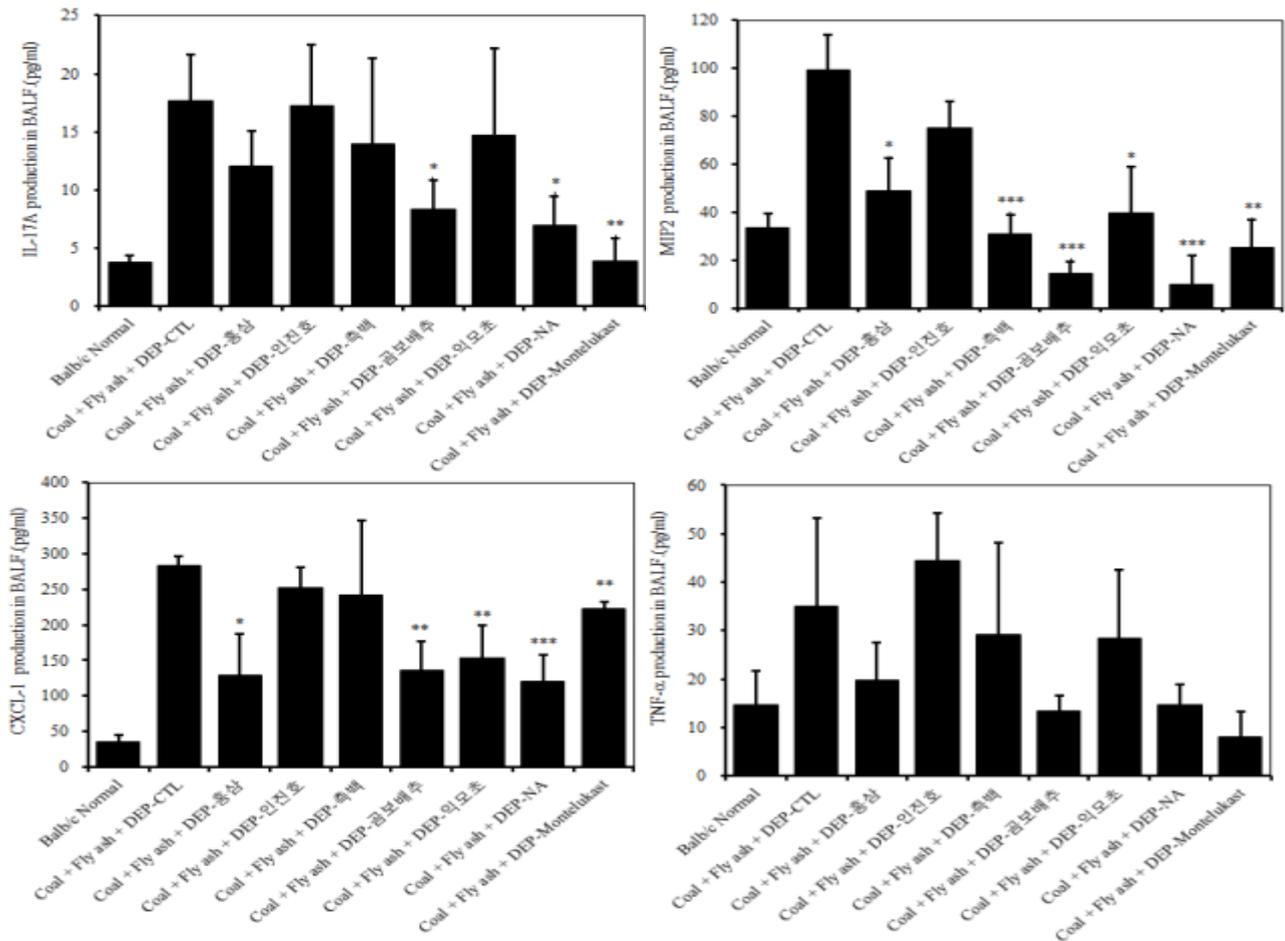


그림 71. CFD유도 마우스 모델의 BAL에서 후보물질 투여에 따른 BALF에서의 chemokine 생산량 측정

#### 4.2 연구 결과의 의의 및 고찰

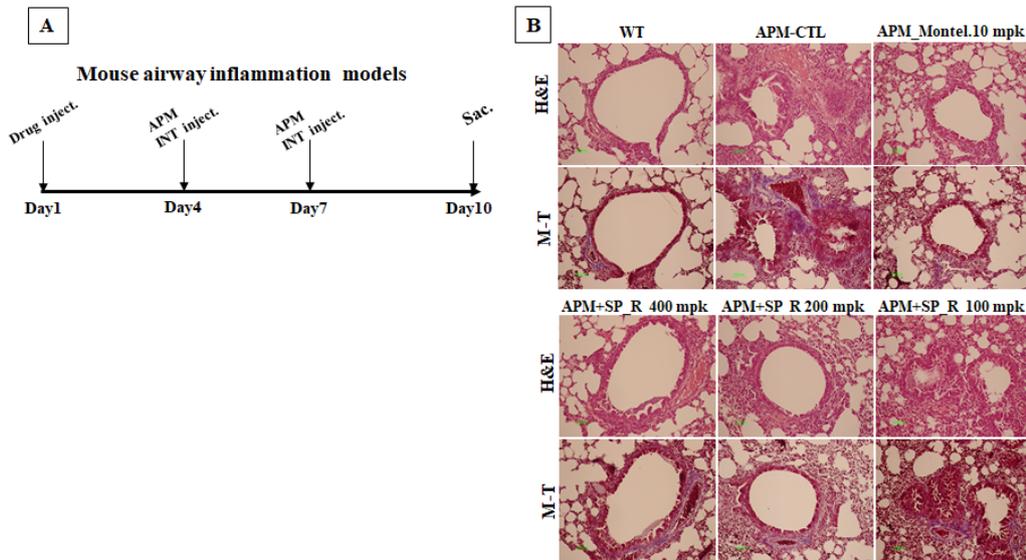
후보 물질을 투여한 군과 정상군, 대조군, 양성대조군 생쥐의 BALF에서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 통해 chemokine 생산량을 측정하였다. CFD INT injection 방법으로 주입한 대조군의 BALF에서 염증관련 chemokine 생산량이 모두 증가하였다. IL-17A의 발현은 양성대조군인 Montelukast와 NAC 투여 그룹에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소하였고, 후보 물질 투여군 중 홍삼을 투여한 그룹과 곰보배추를 투여한 그룹에서 IL-17A의 발현양이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. MIP2의 발현은 양성대조군인 Montelukast와 NAC 투여 그룹에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소하였고, 곰보배추를 투여한 그룹과 촉백을 투여한 그룹에서 통계학적으로 유의성 있게 양성대조군 수준 정도로 회복되는 것을 확인하였다. 또한 홍삼을 투여한 그룹과 익모초를 투여한 그룹에서 통계학적으로 유의성 있게 정상그룹 수준 정도로 MIP2의 발현이 회복되는 것을 확인하였다. CXCL-1의 발현은 양성대조군인 Montelukast와 NAC 투여 그룹에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소하였고, 후보 물질 투여군중 홍삼을 투여한 그룹과 곰보배추를 투여한 그룹, 익모초를 투여한 그룹에서 CXCL-1의 발현양이 통계학적으로 유의성 있게 감소하는 것

을 확인할 수 있었다. TNF- $\alpha$ 의 발현은 양성대조군인 Montelukast와 NAC 투여 그룹에서 대조군에 비해 감소하였고, 후보 물질 투여군중 홍삼을 투여한 그룹과 곰보배추를 투여한 그룹에서 TNF- $\alpha$ 의 발현양이 양성대조군 수준 정도로 감소하였지만 통계학적으로도 유의성은 띄지 않았다. 나머지 투여군에서 모두 통계학적으로 유의성 있게 neutrophil+/Gr-1+ 면역 세포 수가 감소하였다 (그림 48).

## 5. 호흡기 급성 손상 모델에서 곰보배추의 투여 용량별 호흡기 염증억제 활성 검증

### 5.1. 배암차즈기 (곰보배추) 추출물의 처리에 의한 호흡기 염증 증상 개선

10일간 미세먼지의 기관지 주입과 함께 배암차즈기 (곰보배추) 추출물을 매일 경구 투여하여 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델에서 배암차즈기 (곰보배추) 추출물의 호흡기 염증 증상의 개선 효과를 관찰하였다. H&E 염색법을 통하여 폐조직의 단면을 검사함으로써 호흡기 염증 증상을 확인하고 M-T 염색법을 통하여 교원 섬유양의 양을 측정하였다. 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델의 폐 세포 조직을 관찰한 결과임.

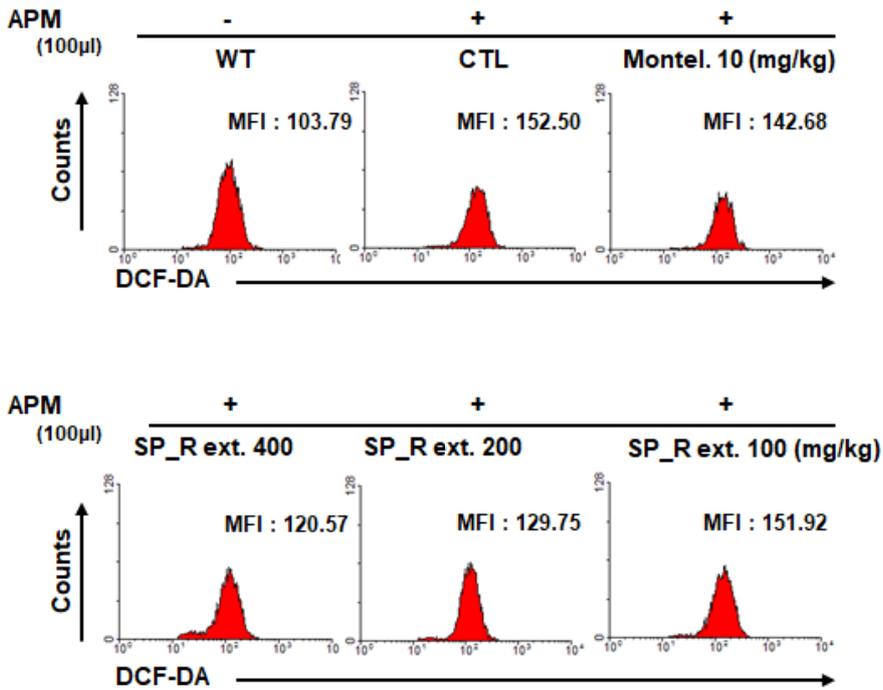


**Fig. 42.** Experimental schedule to make APM induced mice model and Histopathology. (A) Mice were treated with the *SP\_R* extract (400 mg/kg, 200 mg/kg, 100 mg/kg) and Montelukast 10 mg/kg daily for 10 days and intra-nasal trachea injected with APM (4 mg/kg) at day 4 and day 7. At day 10, mice were sacrificed. (B) The thickness of alveolar wall and detection of collagen fibers in lung tissue was measured by H&E (Hematoxylin&Eosin) staining and M-T (Masson's Trichrome) staining assay, respectively (WT: Balb/c Normal, APM-CTL: APM control, APM + Montel: APM induced and orally administration 10 mg/kg, APM+*SP\_R*: APM induced and orally administration *SP\_R* extract.).

- 폐 세포의 벽이 두꺼워지는 것을 확인하였으며, 교원 섬유양이 증가함을 확인하였다. 이러한 염증 증상은 배암차즈기 (곰보배추) 추출물을 경구 투여한 마우스 그룹에서 폐 세포의 벽 및 교원 섬유양이 정상군 수준으로 회복되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 42).

## 5.2. 기관지 폐포세척액에서 ROS 생성량 분석

미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델의 기관지폐포세척액에서 ROS 생성량을 관찰하기 위해, DCF-DA로 염색한 BAL fluid를 유세포 분석기를 이용하여 분석한 결과임.

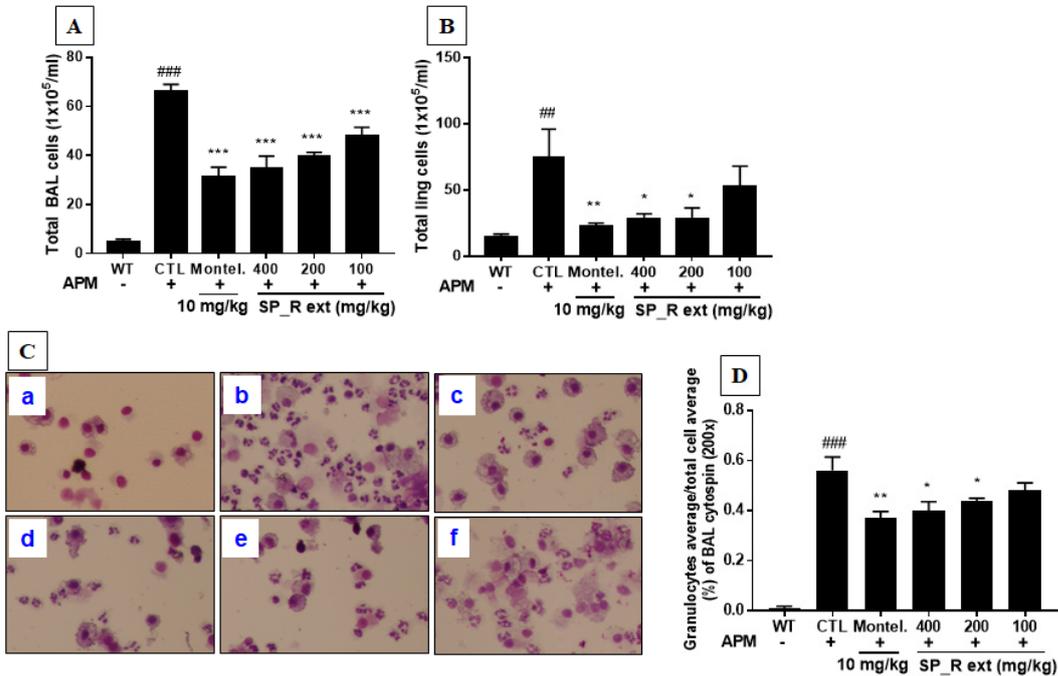


**Figure 43.** The reduced production of ROS by the *Salvia plebeian R* extracts in BAL fluid of APM-induced mice models. The ROS production of BAL fluid was analyzed by flow cytometry after staining with DCF-DA. The extracts of *SP\_R* reduced the ROS production in BAL fluid.

- 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 그룹의 BAL fluid에서 ROS의 생성량이 증가됨을 확인하였으며, 증가된 ROS의 생성량은 100, 200, 400 mg/kg의 농도에서 배암차즈기 (곰보배추) 추출물의 경구 투여에 의해 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다. 또한 양성 대조군Montelukast을 투여한 그룹의 BAL fluid에서도 미세먼지에 의해 증가된 ROS 생성량을 감소시킴을 확인하였다. 따라서 배암차즈기 (곰보배추) 추출물이 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환에서 미세먼지에 의해 증가된 염증 수준을 회복시킴을 알 수 있었다 (Fig. 43).

### 53. 총 세포수와 과립구의 population 조사

미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델의 마우스의 BAL 세포와 폐 세포의 총 세포 수를 관찰한 결과임.

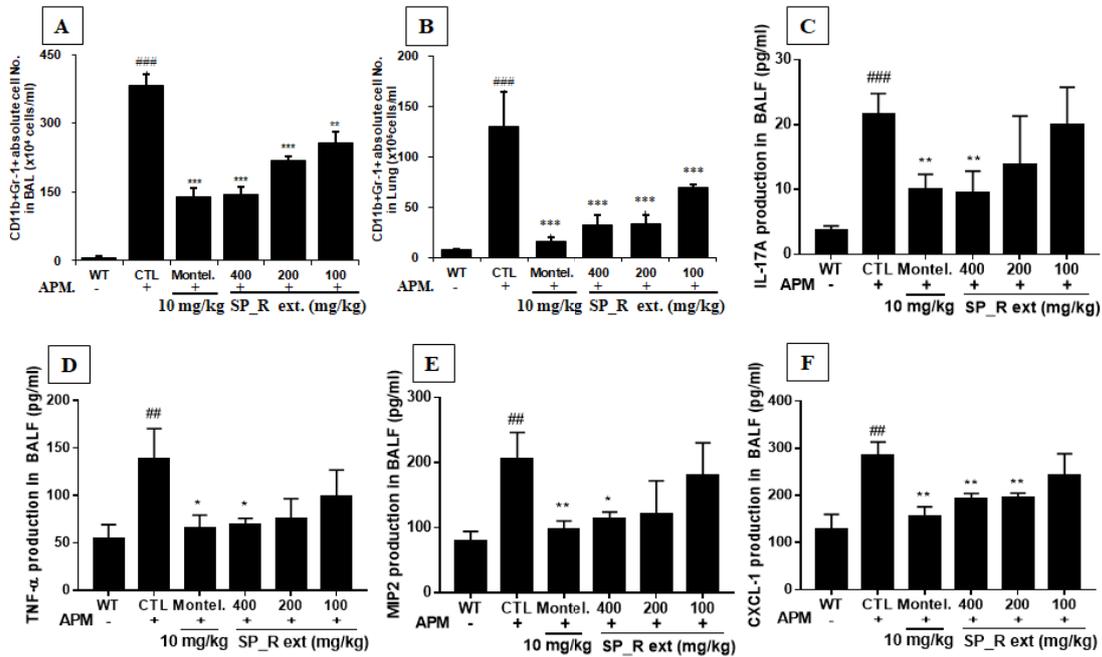


**Fig. 44.** The inhibition of infiltrated granulocytes by the *Salvia plebeian R* extracts in airway of APM-induced mice model. The total BAL (A) and lung cells (B) were counted using flow cytometry and the granulocytes infiltrated to BAL (C) were estimated by diff-quick staining. (a: Balb/c Normal, b: APM control, c : APM- Monteleukast\_10 mg/kg d: APM-*SP\_R* 400 mg/kg, e: APM-*SP\_R* 200 mg/kg, f: APM-*SP\_R* 100 mg/kg) (D) Granulocytes total cells No. in BALF. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. ## $p < 0.005$ , ### $p < 0.0005$  vs Nor; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs CTL.

- 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 그룹에서 BAL 및 폐의 전체 세포 수가 증가하였으며, 증가된 BAL 및 폐의 전체 세포 수가 배암차즈기 (곰보배추) 추출물을 경구 투여한 마우스 그룹에서 농도별로 감소됨을 확인 할 수 있었다. 또한 BAL 세포에서 호중구 수를 확인하기 위해 Diff-Quick 염색을 한 결과, 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 그룹에서 호중구의 수가 증가하였으며, 이는 폐의 염증 수치가 증가함을 의미한다. 미세먼지에 의해 증가된 호중구의 수가 배암차즈기 (곰보배추) 추출물을 경구 투여한 그룹에서 감소됨을 확인 하였으며 따라서 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환에서 배암차즈기 (곰보배추) 추출물이 주요 염증 세포인 호중구 수의 감소를 통해 폐의 염증 반응을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다 (Fig. 44).

#### 5.4. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)의 유전자 발현과 과립구 수의 상관관계

미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델의 마우스의 BAL과 폐 조직에서 flow cytometry 분석을 통해 세포빈도를 CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 총 세포 수를 산출하였다.



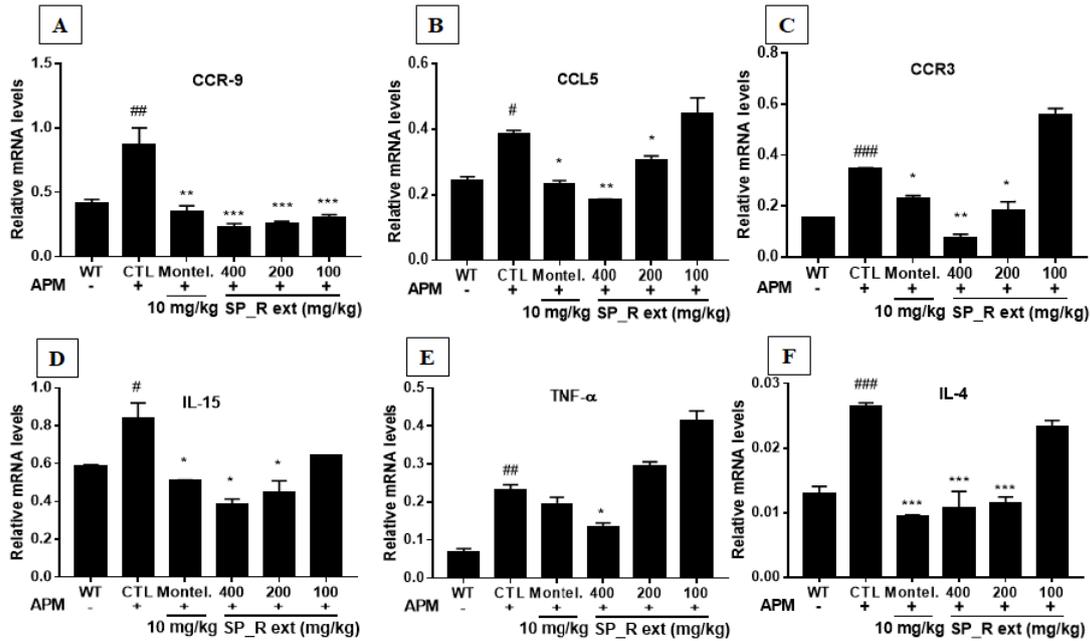
**Fig. 45.** The reduction of CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> cells number by the *Salvia plebeian R* extracts through inhibiting expression of IL-17A, TNF-α, MIP2 and CXCL-1 in airway of APM-induced mice model. The absolute number of CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> cells in airway (A~B) was evaluated by flow- cytometry. The production of IL-17A (C), TNF-α (D), MIP2 (E), and CXCL-1 (F) proteins in airway was measured by ELISA. Data are shown as mean±SEM. ##p<0.005, ###p<0.0005 vs Nor; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 vs CTL.

- 미세먼지를 주입한 대조군의 BAL과 폐에서 CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> 면역 세포 수가 유의성 있게 증가함을 확인하였다. 배암차즈기 (곰보배추) 투여군의 BAL과 폐에서는 배암차즈기 (곰보배추) 추출물의 농도별 투여에 따라 CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> 면역 세포 수가 유의성 있는 수준으로 감소함을 확인하였다. 또한 BAL fluid에서 ELISA를 통해 염증유발인자 IL-17A, TNF-α, MIP2, 그리고 CXCL-1의 생산량을 측정 한 결과 대조군의 BAL fluid에서 IL-17A, TNF-α, MIP2, 그리고 CXCL-1의 생산량이 모두 통계학적 유의성 있게 증가하였다. 그러나 배암차즈기 (곰보배추) 투여군에서 투여한 배암차즈기 (곰보배추)의 농도 의존적으로 IL-17A, TNF-α, MIP2, 그리고 CXCL-1의 생산량이 감소함을 확인하였다. CC 케모카인인 MIP2는 MCP-1, MIP-1a와 함께 단핵세포와 면역세포의 이동 및 침윤에 관여한다 (Ajuebor *et al.*, 1999). 염증사이토카인인 IL-17A과 TNF-α, 그리고 CXC 케모카인 ligand 계열인 CXCL은 염증과 관련하여 염증세포인 호중구의 염증반응에 관여한다는 연구결과들이 다수 보고됨에 따라 (Amulic *et al.*, 2012; De Filippo *et al.*, 2013; Kolaczowska *et al.*, 2013; Quinton *et al.*, 2004), 과립구의 세포 수 조절에 있어서 CXCL-2와 함께 CXCL-1이 관여하는 것으로 예

측 된다 (Fig. 45)

### 5.5. 폐조직의 염증관련 케모카인과 사이토카인 조사

CC 케모카인 수용체 CCR9과 CCR3, 케모카인 ligand인 CCL5는 기도의 염증에 반응하여 과립구의 염증을 증가시키고 기관지의 면역반응을 높이는 것으로 알려져 있다. 이에 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델의 폐 조직에서 염증관련 케모카인 수용체와 케모카인 ligand의 유전자 발현을 측정된 결과임.



**Fig. 46.** The restoration of airway immune response associated chemokines and inflammatory cytokines by the *Salvia plebeian R* extracts in APM-induced mice models. The gene expression of airway immune response associated chemokines (A-C) and inflammatory cytokines (D-F) in lung isolated from APM-induced mice models were analyzed by real-time PCR. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. #p<0.05, ##p<0.005, ###p<0.0005 vs Nor; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 vs CTL.

- 미세먼지에 의해 이들 염증유발인자들의 발현이 증가하였으며 배암차즈기 (곰보배추) 추출물 투여에 의해 감소하였다. 또한 염증반응에 대항하여 기관지의 면역반응을 높이는 염증성 사이토카인 IL-15, TNF- $\alpha$ , IL-4의 유전자 발현이 미세먼지에 의해 유도된 대조군에서 증가함을 확인하였으며, 증가된 사이토카인 발현은 배암차즈기 (곰보배추) 투여군에서 농도 의존적으로 회복하는 경향을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 46).

#### 이러한 결과로

종합하여 볼 때, 미세먼지에 의해 염증반응이 유도된 모델에서 배암차즈기 (곰보배추) 추출물이 시중에 있는 약제와 비슷한 회복효과를 보였고, 또한 염증 사이토카인과 케모카인의

회복을 관찰 할 수 있었다. 이는 미세먼지에 의해 유도된 염증을 배암차즈기 (곰보배추) 천연물질에 의해 회복되는 것으로 보인다. 따라서 배암차즈기 (곰보배추) 추출물이 호흡기의 염증을 개선하고 호흡기 관련 질병의 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 보인다.

## 6. 곰보배추/홍삼 복합물의 최적 시너지 활성 비율선정

### 6.1. 곰보배추/홍삼 비율별 복합제의 항산화 및 항염증 활성

이전의 연구 결과에서 항산화 및 항염증 활성이 보고된 배암차즈기와 홍삼에 대한 비율별 혼합물에 대한 효능을 비교 평가 하였다 (Song *et al.*, 2017)

50  $\mu\text{g/ml}$ 의 대기오염물질 복합물 (CFD) 처리한 MH-S 세포에 홍삼 및 배암차즈기 추출물을 10 : 1, 5 : 1, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 10의 비율로 섞은 혼합물 100  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 결과, CFD에 의해 증가된 ROS의 생성량이 감소되는 것을 관찰할 수 있었고, 특히 홍삼/배암차즈기 혼합 비율이 10 : 1, 5 : 1, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3에서 유의적인 ( $p < 0.01$ ) ROS 생성 억제를 보였다. RBL-2H3 세포주를 이용해서 홍삼 및 배암차즈기 비율별 혼합물 (100  $\mu\text{g/ml}$ )의 leukotriene 발현 억제 활성을 측정 한 결과, 배암차즈기/홍삼 복합물 비율이 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 10에서 유의적인 ( $p < 0.01$ ) leukotriene 발현 억제 활성이 나타냈다.

이와 같은 결과는, 항산화 활성은 홍삼 함량이 많을수록 높았고, 항염증 활성은 배암차즈기 함량이 많을수록 높았다. 그중 1 : 3의 홍삼/배암차즈기 혼합물에서만 대조군에 비해 높은 수준 ( $p < 0.01$ )의 ROS 생성 및 leukotriene 발현 억제 모두 나타났다.

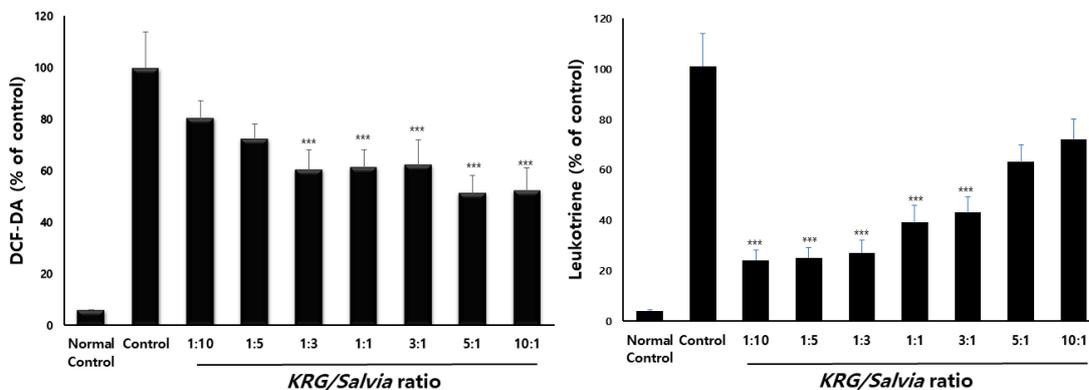


Fig. 47. Determination of optimal ratio between Korean red ginseng and *Salvia plebeia* R. Br on suppression of creating radical and leukotriene. (A) The MH-S cells were combinedly treated (100  $\mu\text{g/ml}$ ) with Korean red ginseng (KRG) and *Salvia plebeia* (Salvia) extract and after stimulation of CFD (50  $\mu\text{g/ml}$ ). (B) The RBL-2H3 cells were combinedly treated (100  $\mu\text{g/ml}$ ) with *Salvia plebeia* extract and Korean red ginseng after stimulation of calcium ionophore (20  $\mu\text{g/ml}$ ). Data are shown as means  $\pm$  SE. Significant difference from vehicle control; \*\*\*  $p < 0.01$

## 6.2. 호흡기 급성염증 모델에서 홍삼/곰보배추 최적혼합 비율 설정

### \* 실험배경

Balb/c mouse에 미세먼지의 구성성분인 Coal과 Fly ash와 DEP를 생쥐의 폐에 INT (Intra-Nasal-Trachea) injection 방법을 이용하여 직접 주입하였고, 실험군은 balb/c 정상군 6마리, 대조군 6마리, 홍삼 1: 곰보배추 1 투여군 (200 mg/kg) 6마리, 홍삼 1: 곰보배추 3 투여군 (200 mg/kg) 6마리, 홍삼 1: 곰보배추 5 투여군 (200 mg/kg) 6마리, 홍삼 1: 곰보배추 10 투여군 (200 mg/kg) 6마리, 홍삼 3: 곰보배추 1 투여군 (200 mg/kg) 6마리, 곰보배추 단독 투여군 (200 mg/kg) 6마리, 홍삼 단독투여군 (200 mg/kg) 6마리, 그리고 양성대조군 NAC투여군 (200 mg/kg) 6마,로 10그룹 60마리로 설정하였다. 약물희석은 0.5% CMC (Carboxymethyl Cellulose)로 혼합하여 투여하고, 대조군은 0.5% CMC 용액을 동량 투여하였다. 약물투여는 경구투여용 금속제 зонде를 이용하여 위내로 강제 경구투여 하였다. 미세먼지 CFD (Coal+ Fly ash + DEP) mouse model : mouse 모델은 실험동물에 미세먼지의 구성성분인 Coal (석탄 탄소물), Fly ash (화력발전소 등의 연소보일러에서 부산되는 석탄재), DEP (디젤연소분진)을 혼합하여 INT (Intra-Nasal-Trachea) injection 방법으로 주입하여 기도와 폐 염증을 유발하고, 기관지 상피세포에서 섬유증을 일으켜 기도와 폐 손상과 염증을 유발시킨다. 천연물추출물은 10일 간 투여하며, 투여시작일로부터 3일 후, 6일 후에 총 2회 INT로 미세먼지 혼합물을 주입한다. 양성대조군인 N-Acetyl-L-cysteine (200 mg/kg)는 처음 INT 후 하루 뒤부터 투여 시작한다. 미세먼지 혼합물은 DMSO에 녹인 Coal (5 mg/ml), Fly ash (10 mg/ml), DEP (5 mg/ml) stock을 각각 Coal (0.25 mg/ml), Fly ash (0.5 mg/ml), DEP (0.25 mg/ml)로 희석하여 혼합하고 Alum을 8%로 희석되게 하여 최종적으로 미세먼지 혼합물을 제작하였다. INT injection 방법은 생쥐를 urethan으로 가마취시키고 고무줄로 고정하여 기도를 확보 한 후 구강을 통해 기도로 미세먼지 혼합물을 50 $\mu$ l 주입하고 바로 코에 미세먼지 혼합물을 50 $\mu$ l를 함께 넣어주어 생쥐가 숨 쉬는 과정에서 기관지를 통해 폐로 미세먼지 혼합물이 흡입될 수 있게 한다.

### 실험그룹

7주령 male\_Balb/c 생쥐 : 각 그룹당 6마리씩

CFD+곰보배추+홍삼 1:1 200 mg/kg

CFD+곰보배추+홍삼 3:1 200 mg/kg

CFD+곰보배추+홍삼 5:1 200 mg/kg

CFD+ 곰보배추+홍삼 10:1 200 mg/kg

CFD+곰보배추+홍삼 1:3 200 mg/kg

CFD+양성물질 (NAC) 200 mg/kg

5. 대조군 (Coal +Fly ash + DEP)

6. Balb/c 정상군

### 6.2.1. Total BAL cell 과 Total lung cell의 변화

- 홍삼과 곰보배추를 각각 비율별로 (1:1, 1:3, 1:5, 1:10, 3:1) 투여한 군과 정상군, 대조군, 양성대조군 생쥐에서 분리한 BAL과 lung에서 total BAL cell과 total Lung cell의 수를 측정하였다. Coal과 Fly ash와 DEP를 INT방법으로 주입한 CTL 그룹에서 total BAL cell과 total Lung cell의 수가 증가함으로 보아 lung에서의 염증 수치가 함을 알 수 있었다. 또한 Positive Control인 N-Acetyl- L-cysteine 투여 그룹에서 total BAL cell과 total Lung cell의 수가 감소함을 보아 lung에서의 염증 수치가 감소한다고 예상할 수 있었다. BAL에서는 후보 물질 투여군중 홍삼과 곰보배추를 1:3비율로 혼합하여 투여한 그룹과 곰보배추를 단독으로 투여한 그룹에서 가장 크게 감소되었고, 이는 Positive Control 수준까지 감소되는 것을 통계학적으로 유의성 있게 확인 할 수 있었다. 나머지 후보 물질 투여군에서도 CTL 그룹과 비교하였을 때 total BAL cell이 감소함을 보아 lung에서의 염증 수치가 감소한다고 예상할 수 있었다. Lung에서는 후보 물질 투여군중 홍삼과 곰보배추를 1:1비율로 혼합하여 투여한 그룹을 제외한 모든 그룹에서 total Lung cell이 감소를 나타내었다. 그중에서 홍삼과 곰보배추를 1:3비율로 혼합하여 투여한 그룹과 홍삼과 곰보배추를 1:5비율로 혼합하여 투여한 그룹, 홍삼과 곰보배추를 1:10 비율로 혼합하여 투여한 그룹에서 통계학적으로 유의성 있게 높은 감소율을 보였다 (Fig.49).

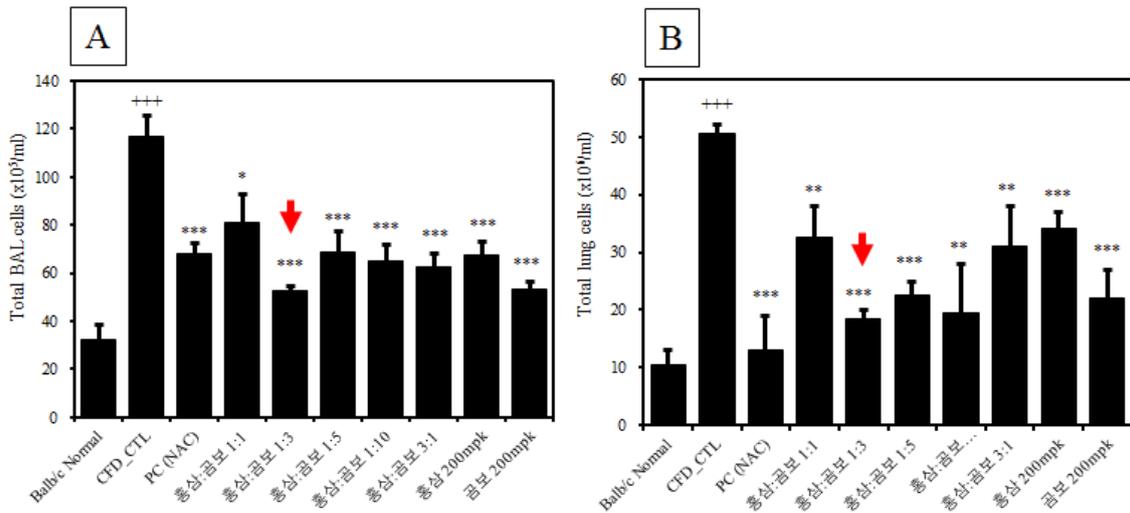


Fig 49. CFD 유도 마우스 모델의 홍삼 곰보배추 비율별 투여에 따른 Total BAL cell 과 Total lung cell의 변화

## 6.2.2 BAL과 lung에서의 CD11b+Gr-1+ cell number의 변화

- 미세먼지 유도 호흡기 질환 생쥐에서 분리한 BAL과 lung에서 유세포 (FACS) 분석을 통해 세포빈도를 CD11b+/Gr-1+ 백분율(%)로 분석하였다. Coal과 Fly ash와 DEP를 INT방법으로 주입한 CTL 그룹의 BAL에서 CD11b+/Gr-1+ 면역 세포 수가 증가하였다. 하지만 Positive Control인 N-Acetyl-L-cysteine 투여 그룹의 BAL에서는 CD11b+/Gr-1+ 면역 세포 수가 CTL 그룹과 비슷한 수준을 유지했다. 반면 후보 물질 투여군중 홍삼과 곰보배추를 1:3비율로 혼합하여 투여한 그룹과 홍삼과 곰보배추를 1:1비율로 혼합하여 투여한 그룹, 홍삼과 곰보배추를 3:1비율로 혼합하여 투여한 그룹에서 모두 통계학적으로 유의성 있게 CD11b+/Gr-1+ 면역 세포 수가 감소하였다. 그리고 곰보배추만 단독으로 200mpk 투여한 그룹에서는 CD11b+/Gr-1+ 면역 세포 수가 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다 ( $p < 0.001$ ).

- Lung에서는 정상군의 CD11b+/Gr-1+ 면역 세포 수가 CTL 그룹과 비슷한 수준을 유지했다. Positive Control인 N-Acetyl-L-cysteine투여 그룹의 lung에서는 CTL 그룹에 비해 CD11b+/Gr-1+ 면역 세포 수가 감소함을 보였지만, 통계학적으로 유의성을 띄지는 않았다. 그리고 투여군중 홍삼과 곰보배추를 1:3비율로 혼합하여 투여한 그룹에서 모두 통계학적으로 유의성 있게 CD11b+/Gr-1+ 면역 세포 수가 감소하였다. 후보 물질 투여군중 홍삼과 곰보배추를 1:1비율로 혼합하여 투여한 그룹과 홍삼만 단독으로 200mpk 투여한 그룹, 곰보배추만 단독으로 200mpk 투여한 그룹에서 CD11b+/Gr-1+ 면역 세포 수가 Positive Control인 N-Acetyl-L-cysteine투여 그룹수준 정도로 CD11b+/Gr-1+ 면역 세포 수가 회복되는 것을 확인하였다 (Fig. 50).

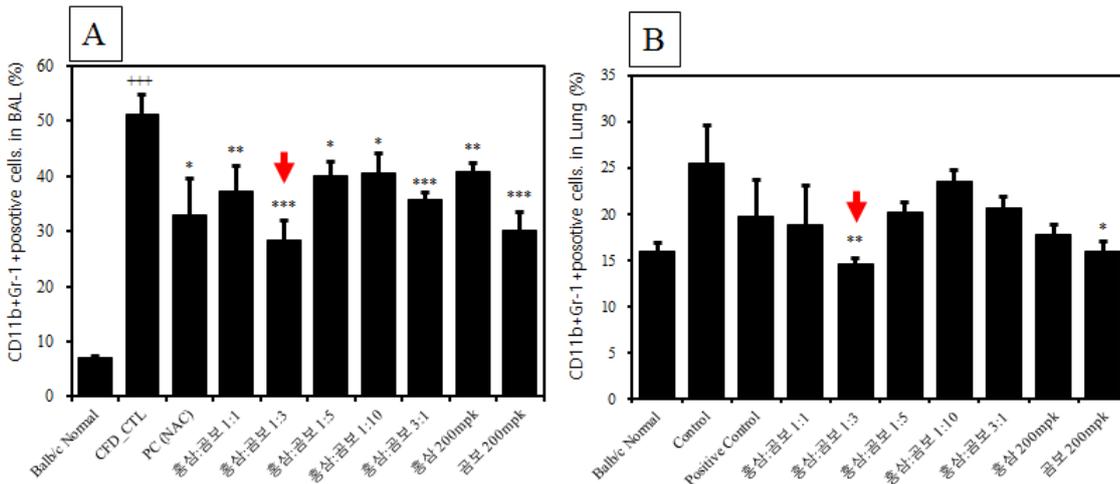


Fig. 50. CFD 유도 마우스 모델의 홍삼 곰보배추 비율별 투여에 따른 BAL과 lung에서의 CD11b+Gr-1+ positive cell number의 변화

▶ CFD 유도 마우스 모델에 홍삼:곰보배추를 비율별 (1 : 1, 1: 3, 1: 5, 1 : 10, 3 : 1) 투여에 따른 BALF에서의 염증인자 (IL-17A, TNF-a, MIP-2, CXCL-1) 단백질 수준을 측정 한 결과, Fig.15A-D에서처럼 모든 염증인자 (IL-17A, TNF-a, MIP-2, CXCL-1) 단백질 수준에서 홍삼:곰보배추의 비율 1 : 3이 대조군 (CFD\_CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다.

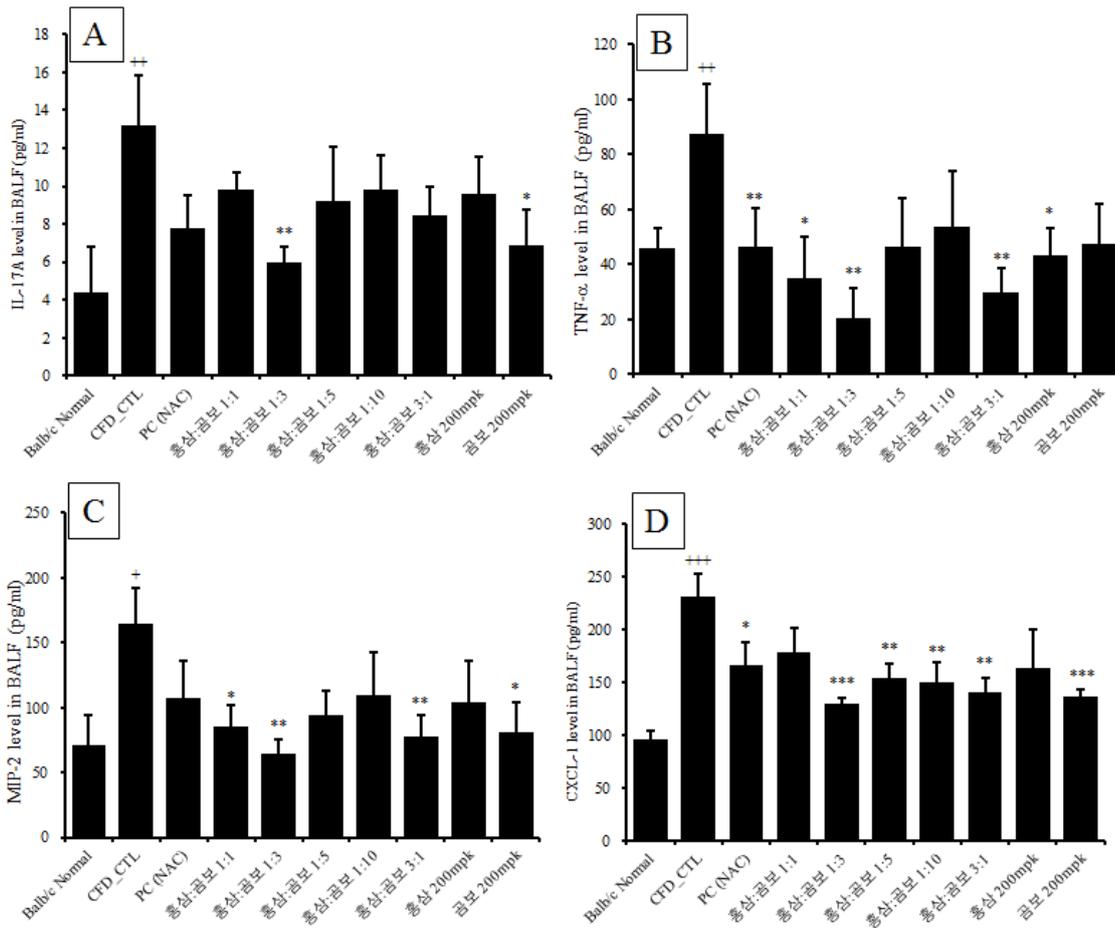


Fig. 51. CFD 유도 마우스 모델의 홍삼 곰보배추 비율별 투여에 따른 BALF에서의 염증 사이토카인 ELISA 수준 변화

▶ CFD 유도 마우스 모델에 홍삼:곰보배추를 비율별 (1 : 1, 1: 3, 1: 5, 1 : 10, 3 : 1) 투여에 따른 Lung에서의 염증사이토카인 (IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF-a) mRNA 유전자 발현을 측정된 결과, Fig.16A-D에서처럼 모든 염증사이토카인 (IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF-a) mRNA 유전자 발현에서 홍삼:곰보배추의 비율 1 : 3이 대조군 (CFD\_CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다.

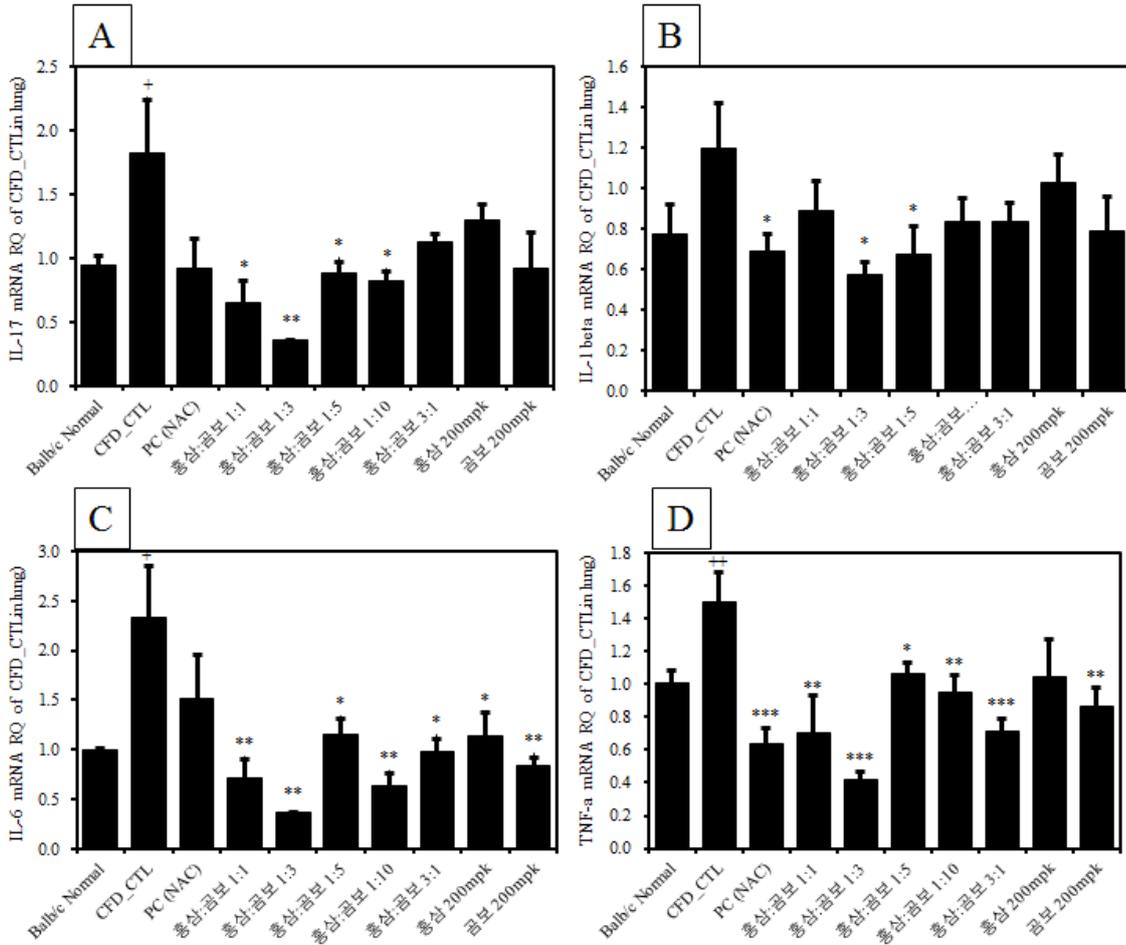


Fig. 52. CFD 유도 마우스 모델의 홍삼 곰보배추 비율별 투여에 따른 Lung에서의 real-time PCR 염증사이토카인 유전자 발현 변화

▶ CFD 유도 마우스 모델에 홍삼:곰보배추를 비율별 (1 : 1, 1: 3, 1: 5, 1 : 10, 3 : 1) 투여에 따른 Lung에서의 염증인자 (CCR3, MUC5AC, CCR5) mRNA 유전자 발현을 측정한 결과, Fig.17A-D에서처럼 모든 염증인자 (CCR3, MUC5AC, CCR5) mRNA 유전자 발현에서 홍삼:곰보배추의 비율 1 : 3이 대조군 (CFD\_CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다.

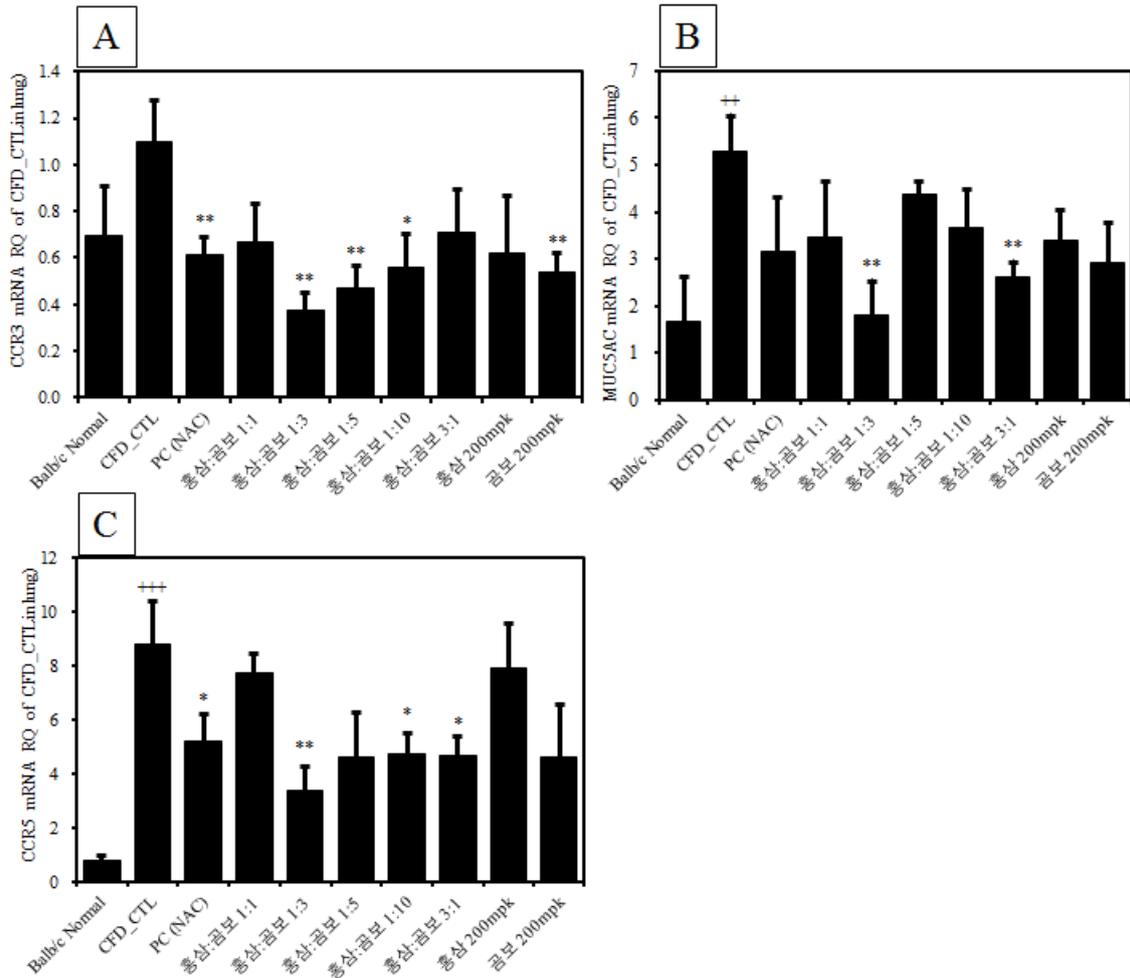


Fig. 53. CFD 유도 마우스 모델의 홍삼 곰보배추 비율별 투여에 따른 Lung에서의 real-time PCR Th2사이토카인 유전자 발현 변화

### 6.2.3. 폐조직 검사분석

- 홍삼과 곰보배추를 각각 비율별로 (1:1, 1:3, 1:5, 1:10, 3:1) 투여한 군과 정상군, 대조군, 양성대조군 생쥐에서 분리한 lung을 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 H&E, MT 염색을 수행하였다. 정상군에 비해 Coal과 Fly ash와 DEP를 INT방법으로 주입한 CTL 그룹에서 H&E 염색법을 통해 폐세포 벽이 두꺼워지는 것을 확인 할 수 있었고, M-T염색법을 통해 교원섬유가 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. Positive Control인 Montelukast 투여 그룹은 CTL 그룹에 비해 얇은 폐세포 벽과 교원섬유가 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 홍삼과 곰보배추를 단독으로 각각 투여한 그룹에서도 CTL 그룹에 비해 얇은 폐세포 벽과 교원섬유가 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 후보 물질 비율별 투여군중에서는 홍삼과 곰보배추를 1:3비율로 혼합하여 투여한 그룹에서 효과적으로 CTL 그룹에 비해 폐세포 벽이 얇아지고 교원섬유가 감소하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig.18).

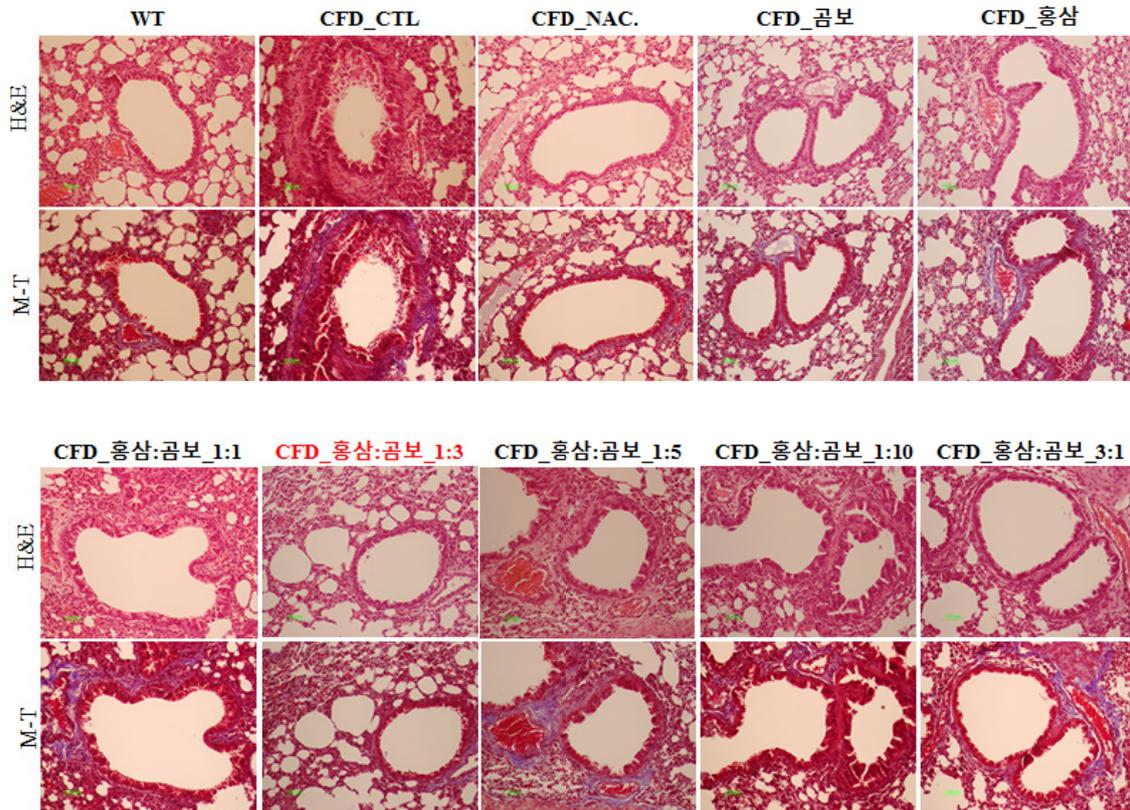


Fig. 54. CFD 유도 마우스 모델의 홍삼 곰보배추 비율별 투여에 따른 H&E, MT 염색을 통한 폐조직검사 분석

## 7. 대기오염물질 흡입에 의한 호흡기 손상에 대한 곰보배추/홍삼의 방어효과

### 7.1. 대기오염물질 노출 방법

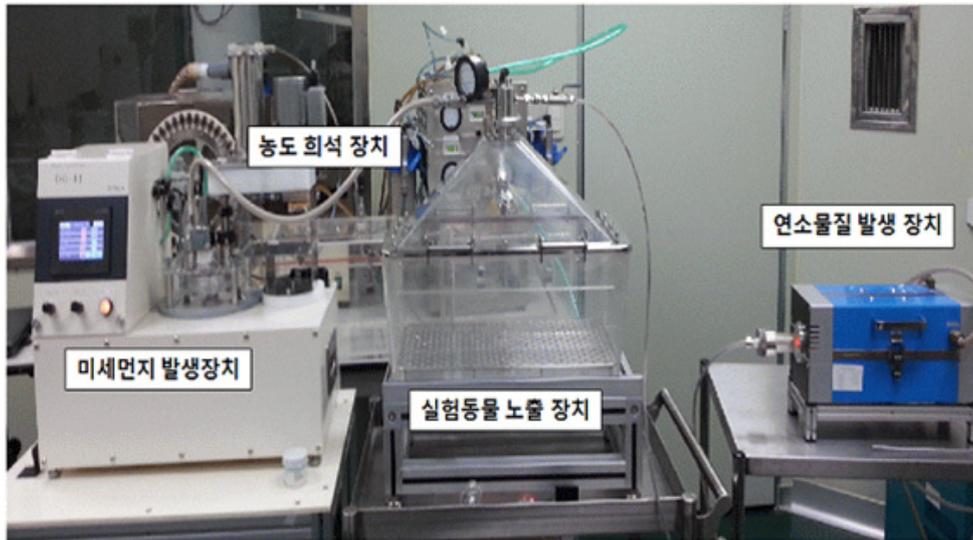


그림 55. Fly ash + 석탄연소물질 발생장치를 결합한 대기오염물질 노출장치

Fly ash 및 석탄연소물질 (대기오염물질) 흡입에 의한 호흡기 손상을 유도하고자 그림. 과 같은 대기오염물질 노출장치를 고안하였다. 실험동물 노출장치 내부의 농도는 fly ash는 되도록 1 mg/L을 유지할 수 있도록 설정하였다. Fly ash는 (입자크기: 4.9 ~ 17  $\mu\text{m}$ , JIS test powder 1 class 5)를 사용하였으며, 석탄연소물은 화력발전소에서 사용하는 미분탄 3 g을 연소물질 발생장치에서 가열해 얻은 연기를 직접 실험동물 노출 장치로 배출시켰다.

연소물질 발생 장치의 온도는 0분→1분, 20  $^{\circ}\text{C}$ →400  $^{\circ}\text{C}$ ; 1분→7분, 400  $^{\circ}\text{C}$ →700  $^{\circ}\text{C}$ ; 7분→15분, 700  $^{\circ}\text{C}$ →700  $^{\circ}\text{C}$ ; 15분→20분 700  $^{\circ}\text{C}$ →20  $^{\circ}\text{C}$  (수냉식)로 설정되어 있으며, 각 시간별 Fly ash 및 석탄연소물의 농도는 그림 56. 과 같다.

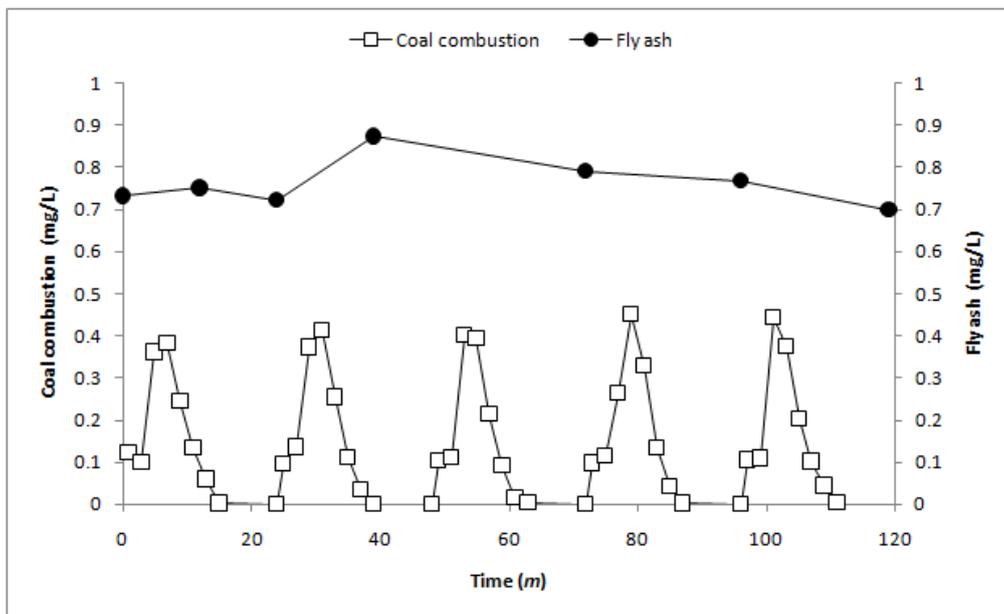


그림 56. 노출챔버내 석탄연소물 및 Fly ash 농도

## 7.2. in vivo 효능 평가

코아텍으로부터 7주령의 Balb/c male 생쥐를 구매해 1주간 순화시킨 후 정상군 (normal), 대조군 (control), 200 mg/kg b.w. 곰보배추 추출물 처리군 (S. plebeia), 200 mg/kg b.w. 홍삼 추출물 처리군 (Red ginseng), 200 mg/kg b.w. 곰보배추 추출물 및 홍삼 추출물 3:1 (v/v) 혼합 처리군 (S. plebeia + Red ginseng) 총 다섯 군으로 나누어 총 23일간 실험을 진행하였다. 대기오염물질은 정상군을 제외한 모든 군에 실험기간동안 매일 2시간씩, 매주 5일간 노출시켰다. 실험 22일째 되는날, 대기오염물질 노출이 완료된 생쥐를 Wholebody plethymography를 이용해 Penh값을 측정하였고, 실험 시작 23일째 되는날, 5% isofulane으로 마취시켜 심장에서 채혈하고, 기관에 튜브를 삽입하고 폐세정액을 회수하였다. 폐세정액은 3000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액은 폐세정액내 싸이토카인 분석을, 세포는 계수해 폐세정액내 전체 세포수를 계수하고, 슬라이드위에서 염색시켜 단핵구와 다핵구의 비율을 구하였다. 폐는 따로 회수해 폐내 IL-17A, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MUC5AC 유전자 발현과 폐조직 병리분석을 진행하였다.

### 7.2.1. 폐세정액내 단핵구와 다핵구 세포 계수

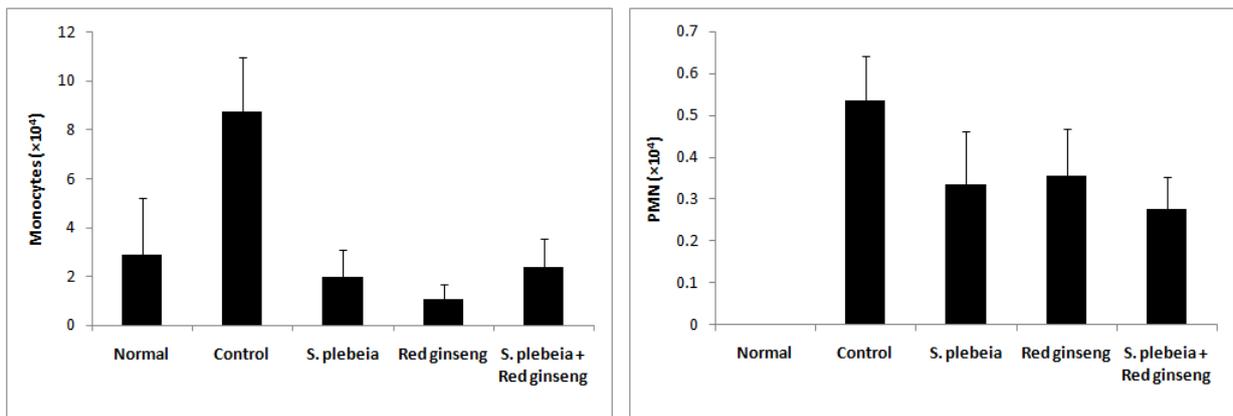


그림 57. 폐세정액내 단핵구 수 (좌)와 다핵구 수 (우) 비교

폐세정액내 단핵구 수는 정상군인  $2.9 \pm 2.3 \times 10^4$  개(평균  $\pm$  표준편차, 이하 형식 동일)에 비해 대조군에서  $8.8 \pm 2.2 \times 10^4$  개로 유의미한 증가를 보여주었다. 그리고 S. plebeia 군은  $2.0 \pm 1.1 \times 10^4$  개, Red ginseng 군은  $1.1 \pm 0.6 \times 10^4$  개 S. plebeia + Red ginseng 군은  $2.4 \pm 1.2 \times 10^4$  개로 대조군에 비해 크게 감소하여 정상군과 유사한 수치를 보여주어 곰보배추, 홍삼 그리고 곰보배추 + 홍삼 혼합물이 단핵구 증가 억제에 탁월함을 보여주었다.

다핵구는 정상군에서 발견되지 않았으나 대조군에서  $0.5 \pm 0.1 \times 10^4$  개가 발견되었으며 S. plebeia 군은  $0.3 \pm 0.1 \times 10^4$  개, Red ginseng 군은  $0.4 \pm 0.1 \times 10^4$  개 S. plebeia + Red ginseng 군은  $0.3 \pm 0.1 \times 10^4$  개로 약간 감소하였다. 이에 곰보배추, 홍삼, 그리고 곰보배추 + 홍삼 혼합물이 다핵구 증가 억제에 어느정도 효과가 있음을 보여주었다.

## 7.2.2. 폐세정액내 사이토카인 측정

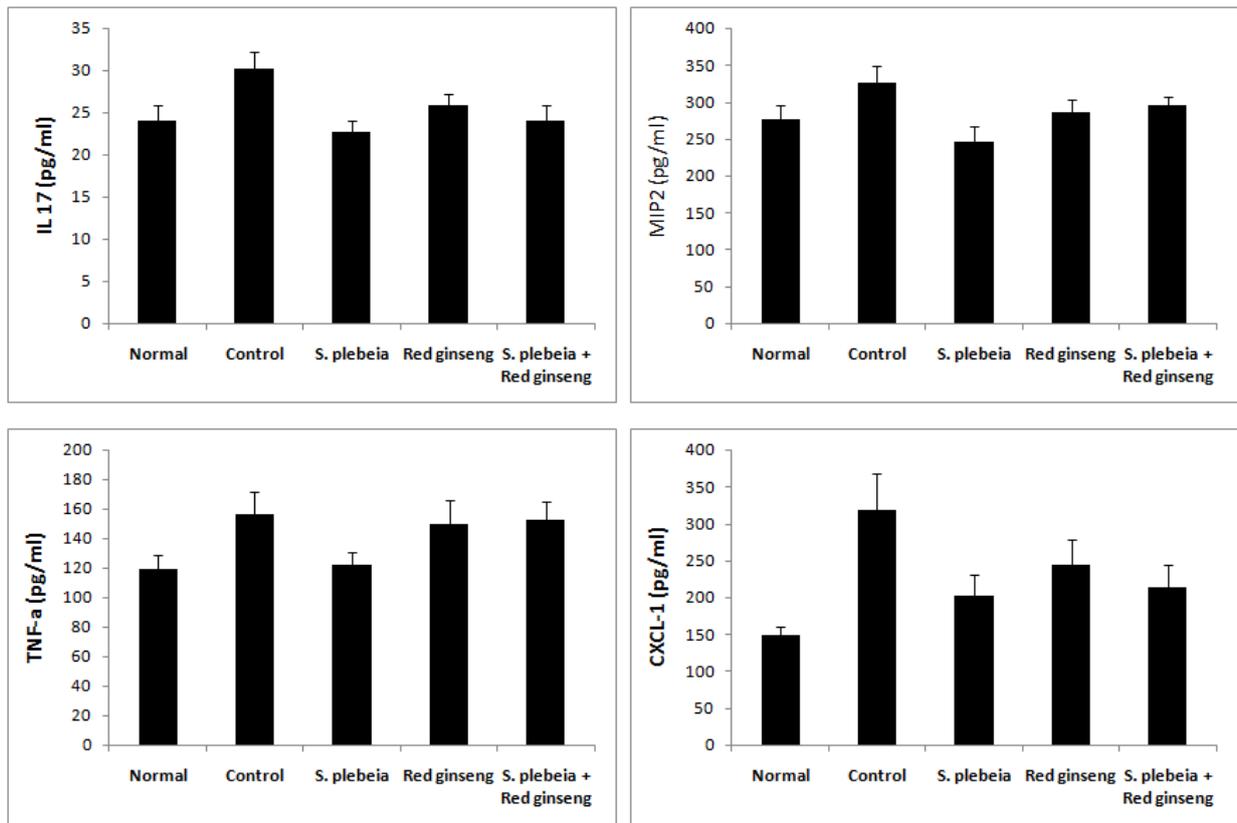


그림 58. 대기오염물질 노출에 따른 폐세정액내 IL-17A, MIP2, TNF- $\alpha$ , CXCL-1 농도 비교

IL-17A는 정상군에서  $24.0 \pm 1.9$  pg/ml (평균  $\pm$  표준오차, 이하 형식 동일), 대조군에서  $30.2 \pm 2.1$  pg/ml로 다소 높아졌으며, S. plebeia 군은  $22.7 \pm 1.3$  pg/ml, Red ginseng 군은  $25.9 \pm 1.3$  pg/ml, S. plebeia + Red ginseng 군은  $24.0 \pm 1.9$  pg/ml으로 정상군과 비슷한 농도로 감소해 IL-17A 농도 억제에 유용할 것으로 보인다.

MIP2는 정상군에서  $276.9 \pm 18.4$  pg/ml, 대조군에서  $325.0 \pm 24.7$  pg/ml로 소폭 증가했으며, S. plebeia 군은  $245.2 \pm 21.0$  pg/ml, Red ginseng 군은  $286.1 \pm 17.0$  pg/ml, S. plebeia + Red ginseng 군은  $295.4 \pm 12.2$  pg/ml으로 S. plebeia 군을 제외하고 정상군보다 소폭 증가하였으나, MIP2 농도억제에 기여하는 것으로 보인다.

TNF- $\alpha$ 는 정상군에서  $118.9 \pm 10.1$  pg/ml, 대조군에서  $156.6 \pm 15.0$  pg/ml로 소폭 증가했으며, S. plebeia 군은  $122.0 \pm 9.2$  pg/ml, Red ginseng 군은  $149.6 \pm 16.7$  pg/ml, S. plebeia + Red ginseng 군은  $151.9 \pm 13.2$  pg/ml으로 S. plebeia 처리군만이 대조군에 비해 소폭 감소한 것을 보인다.

CXCL-1은 정상군에서  $149.42 \pm 11.0$  pg/ml, 대조군에서  $317.5 \pm 49.8$  pg/ml로 다소 증가했으며, S. plebeia 군은  $201.4 \pm 29.5$  pg/ml, Red ginseng 군은  $243.6 \pm 34.8$  pg/ml, S. plebeia + Red ginseng 군은  $214.2 \pm 29.4$  pg/ml으로 모든 군에서 CXCL-1 억제에 효과가 있는 것을 보인다.

### 7.2.3. 폐내 유전자 발현수준 분석

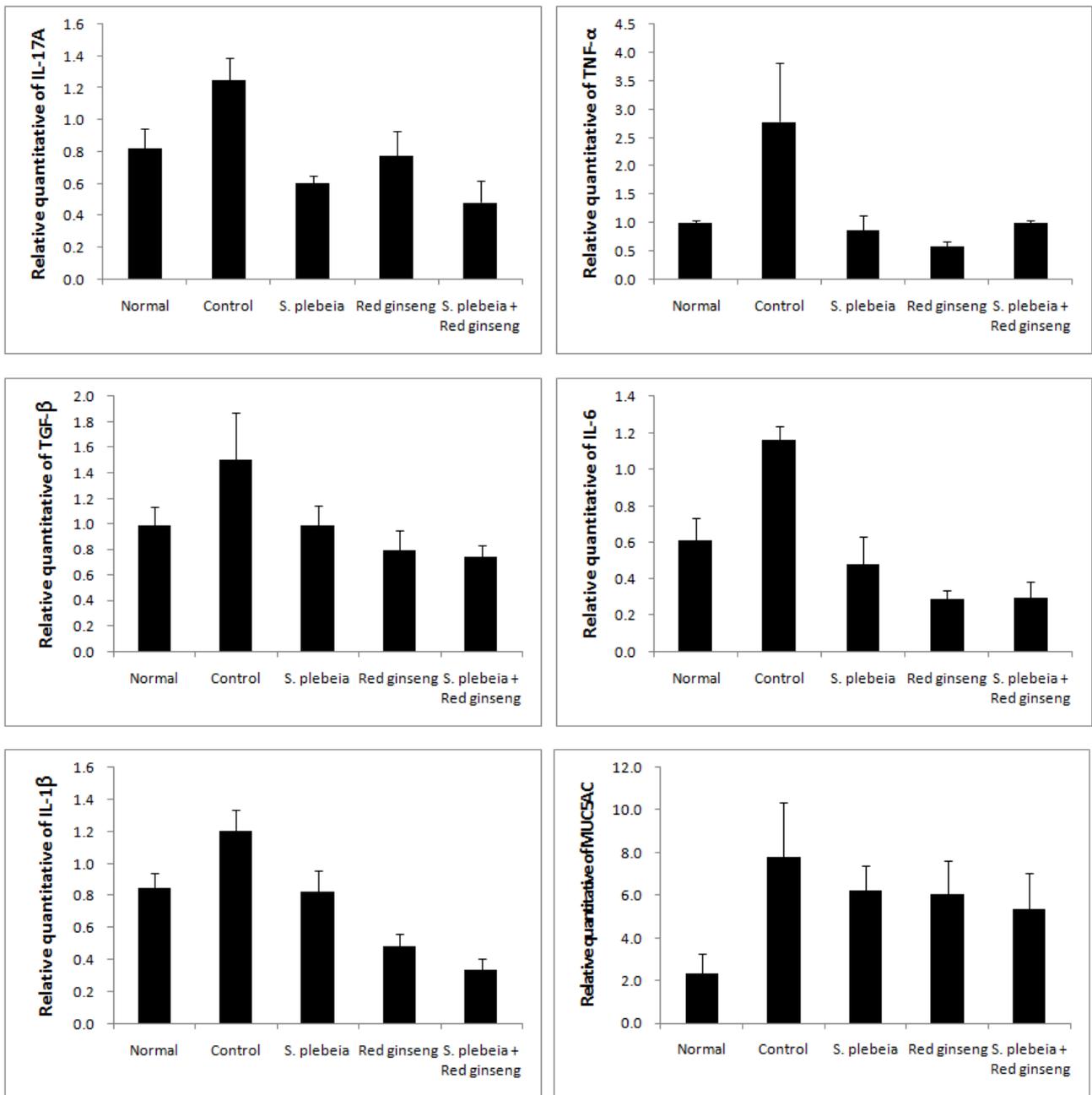


그림 59. 대기오염물질 노출에 따른 폐내 IL-17A, TNF-α, TGF-β, IL-6, IL-1β, MUC5AC 유전자 발현수준 비교

IL-17A은 정상군에서  $0.8 \pm 0.1$  (평균  $\pm$  표준오차, 이하 형식 동일), 대조군에서  $1.3 \pm 0.1$  로 다소 높아졌으며, S. plebeia 군은  $0.6 \pm 0.0$ , Red ginseng 군은  $0.7 \pm 0.2$ , S. plebeia + Red ginseng 군은  $0.5 \pm 0.1$ 로 정상군과 비슷하거나 낮은 값을 보여 IL-17A 유전자 발현 억제에 유용 것으로 보인다.

TNF-α는 정상군에서  $1.0 \pm 0.0$ , 대조군에서  $2.7 \pm 1.0$ 로 높아졌으며, S. plebeia 군은  $0.9 \pm 0.3$ , Red ginseng 군은  $0.6 \pm 0.1$ , S. plebeia + Red ginseng 군은  $1.0 \pm 0.0$ 으로 정상군과 비슷

하거나 낮은 값을 보여 TNF- $\alpha$  유전자 발현 억제에 유용한 것으로 보인다.

TGF- $\beta$ 는 정상군에서  $1.0 \pm 0.1$ , 대조군에서  $1.5 \pm 0.4$ 로 다소 높아졌으며, S. plebeia 군은  $1.0 \pm 0.2$ , Red ginseng 군은  $0.8 \pm 0.2$ , S. plebeia + Red ginseng 군은  $0.7 \pm 0.1$ 으로 정상군과 비슷하거나 낮은 값을 보여 TGF- $\beta$  유전자 발현 억제에 유용한 것으로 보인다.

IL-6는 정상군에서  $0.6 \pm 0.1$ , 대조군에서  $1.2 \pm 0.1$ 로 높아졌으며, S. plebeia 군은  $0.5 \pm 0.2$ , Red ginseng 군은  $0.3 \pm 0.0$ , S. plebeia + Red ginseng 군은  $0.3 \pm 0.1$ 으로 정상군보다 다소 낮은 농도를 보여 IL-6 유전자 발현 억제에 탁월한 것으로 보인다.

IL-1 $\beta$ 는 정상군에서  $0.8 \pm 0.1$ , 대조군에서  $1.2 \pm 0.1$ 로 다소 높아졌으며, S. plebeia 군은  $0.8 \pm 0.1$ , Red ginseng 군은  $0.5 \pm 0.1$ , S. plebeia + Red ginseng 군은  $0.4 \pm 0.1$ 으로 정상군과 비슷하거나 낮은 값을 보여 TGF- $\beta$  유전자 발현 억제에 유용한 것으로 보인다.

MUC5AC는 정상군에서  $2.4 \pm 1.0$ , 대조군에서  $7.8 \pm 2.6$ 으로 매우 높아졌으며, S. plebeia 군은  $6.2 \pm 1.1$ , Red ginseng 군은  $6.1 \pm 1.5$ , S. plebeia + Red ginseng 군은  $5.3 \pm 1.7$ 로 대조군에 비해 낮은 값을 보여 MUC5AC 유전자 발현 억제에 효과적인 것으로 보인다.

#### 7.2.4. 호흡량 측정

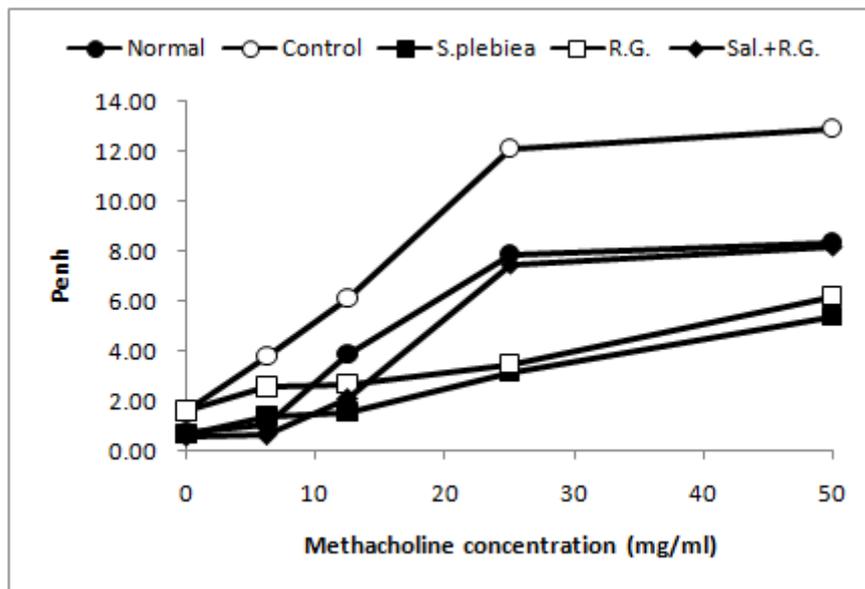
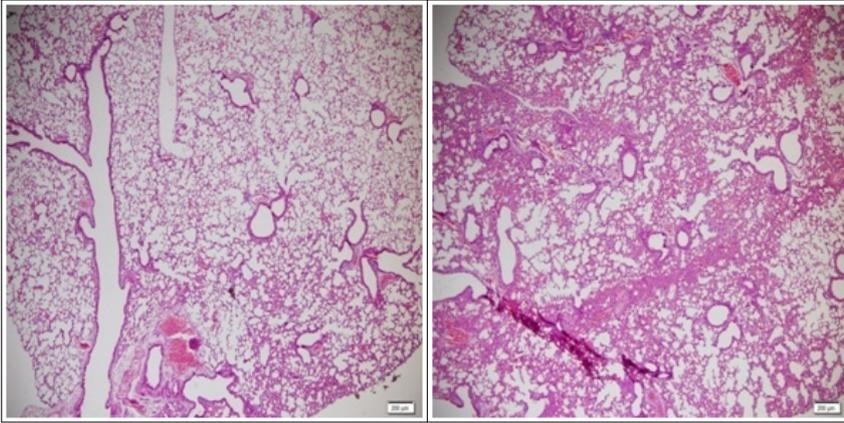


그림 60. 대기오염물질 노출에 따른 Penh 변화 비교

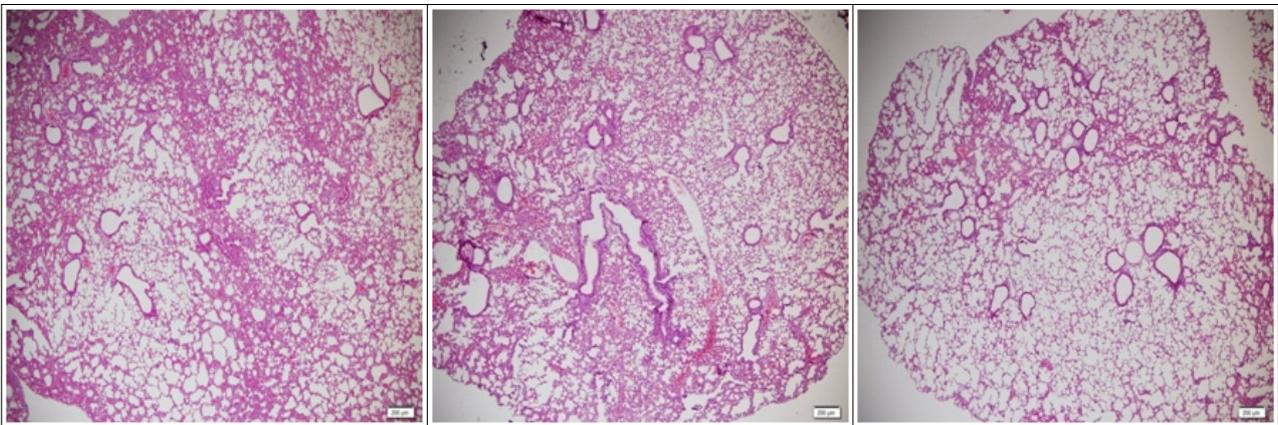
기도수축제인 methacholine을 농도별로 처리했을 때 25 mg/ml부터 각 군별 차이를 확인할 수 있었다. 정상군의 경우  $7.9 \pm 3.2$ 를 보이며 대조군에서  $12.1 \pm 7.3$ 의 다소 증가한 값을 보였다. 이에 S. plebeia 처리군 및 Red ginseng 처리군은 정상군 보다 낮은 각각  $3.1 \pm 2.4$ ,  $3.5 \pm 2.1$ 를 확인하여 기도수축의 저해에 탁월한 효과를 가지고 있음을 보여주었다. S. plebeia + Red ginseng 처리군은 탁월하지는 않지만 정상군 수준으로 감소시킴을 관찰하였다.

### 7.2.5. 조직 병리학적 분석



정상군

대기오염물질 흡입군



S. plebeia

Red ginseng

S. plebeia + Red ginseng

그림 61. 대기오염물질 노출에 따른 폐 조직 병리학적 비교

정상군에서 기관지 상피 및 폐포벽의 두께는 특이한 소견이 없으나 대조군에서 폐포벽이 국소적으로 두꺼워지고 폐포 전반에 탐식된 파티클이 관찰되었다. 또한 염증세포 침윤, 광범위한 출혈이 관찰되었다. S. plebeia 처리군 및 Red ginseng 처리군에서는 부분적으로 폐포벽이 두꺼워지는 소견이 관찰되었고, S. plebeia + Red ginseng 처리군에서는 위의 증상들이 발견되지 않고 정상군 수준의 소견을 보였다.

### 8. 곱보배추, 홍삼 단독 및 복합물의 거담활성

페놀레드 배출법에 의한 객담배출 함량을 측정함으로써 곱보배추, 홍삼 및 곱보배추/홍삼 3 : 1 복합물인 KGC-03-PS에 대한 거담 활성을 평가 하였다. 곱보배추, 홍삼 및 복합물의 200 mg/kg 경구 투여에 의해 모두 양성 대조군인 ambroxol 수준의 객담배출 효과를 보였으며, 홍삼 및 배암차즈기 단독투여군에 비해 KGC-03-PS 투여에 의해 가장 높은 거담활성이 나타났다 (Fig. 9).

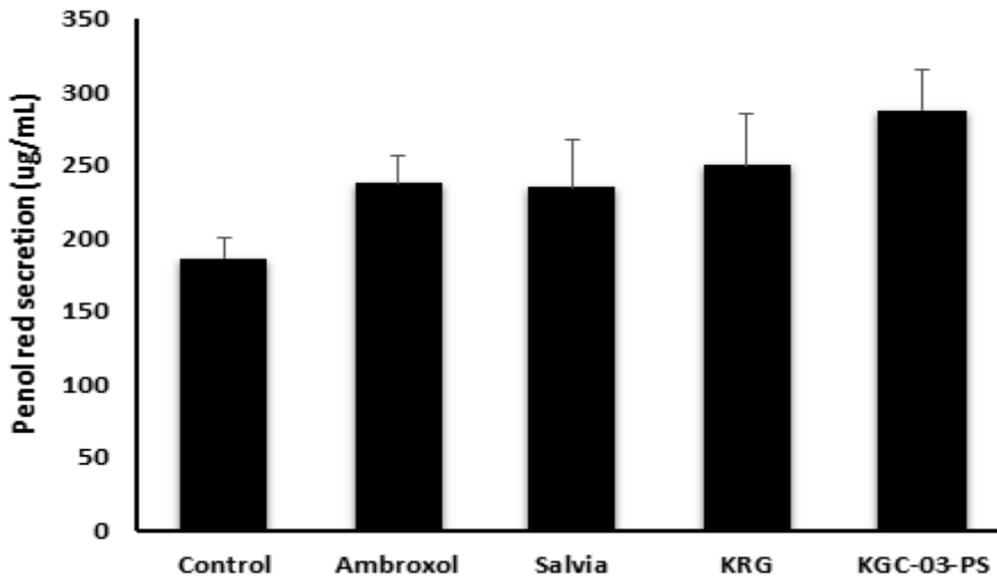


Fig. 62. Effect of Salvia, Korea Red ginseng and KGC-03-PS on the amount of tracheal phenol red secretion in mice.

Mice were orally treated with Ambroxol (250 mg/kg), Salvia (200 mg/kg), KRG (200 mg/kg) and KGC-03-PS (200 mg/kg). Results are expressed as means  $\pm$  S.D. 2 - 3 experiments. Significant difference from vehicle control; \*\*  $p < 0.05$ .

### 9. 곱보배추/홍삼 복합물의 용량별 기관지 수축 억제 활성

곱보배추/홍삼 3 : 1 복합물인 KGC-03-PS가 적출기관지 수축에 미치는 영향을 측정하여 Fig. 10에 나타내었다. 기니픽에서 적출한 기관지는 carbachol 처리에 의해 수축이 유발 되었다. 양성 대조군인 rolimpram에 의해 약 18% 기관지 수축억제 활성이 나타났으며, KGC-03-PS 투여에 의해 농도의존적으로 기관지 수축억제 활성이 나타났으며, 200 또는 400 mg/ml 처리시 통계학적으로 유의한 ( $p < 0.01$ ) 이완율을 나타내어 높은 기관지수축 억제 활성을 확인하였다.

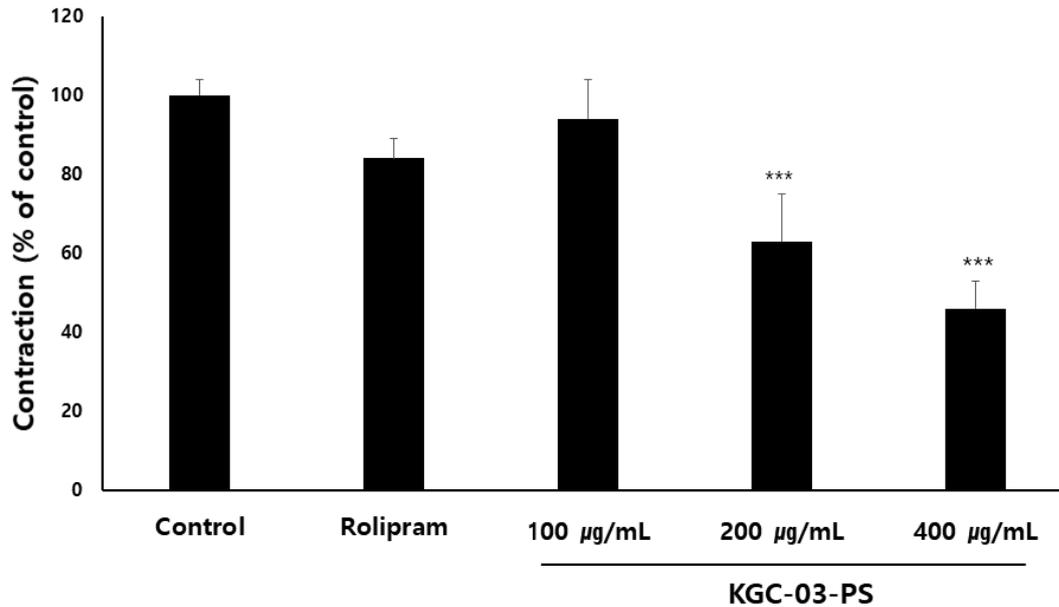


Fig. 63. Effect of KGC-03-PS on carbachol-induced contraction of isolated trachea from guinea pigs.

The concentration are expressed as a percentage of the maximal concentration induced by carbachol (25 ng/ml). Rolipram; 5 µg/ml. Each bar represents the means ± S.D. of 2 - 3 experiments. Significant difference from vehicle control; \*\*\*  $p < 0.01$ .

본 연구에서는 항산화 및 항염증 활성이 보고된 홍삼과 곰보배추에 대한 비율별 혼합물에 대한 효능을 비교한 결과, 항산화 활성은 홍삼함량이 많을수록 높았고, 항염증 활성은 곰보배추의 함량이 많을수록 높았다. 그중 곰보배추 홍삼 3 : 1 혼합물에서만 대조군에 비해 높은 수준 ( $p < 0.01$ )의 ROS 생성 및 leukotriene 발현 억제 활성이 모두 나타났다. 대기오염물질 (CFD)에 의해 유발된 호흡기 손상 마우스 모델에서 홍삼 및 곰보배추 단독 투여군에 비해 배암차즈기/홍삼 복합물에 의한 호흡기염증 억제 시너지 효과를 확인하였고, 또한 염증 사이토카인과 케모카인의 회복을 관찰할 수 있었다. 또한 거담활성 및 기관지 수축억제 실험을 통해서 곰보배추/홍삼 3 : 1 복합물 (KGC-03-PS)의 호흡기 기능 보호 및 개선 효능을 검증하였고, 지표 및 유효성분인 nepetin, ginsenoside Rg1, Rb1, Rg3의 함량을 분석하였다. 따라서 KGC-03-PS는 대기오염물질 등에 의해 유발된 호흡기 손상의 염증을 개선하고 호흡기 관련 질병의 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 보인다.

## 다. 원료의 표준화

### 1. 곰보배추 (배암차즈기)에 대한 표준화

#### 1.1. 곰보배추추출물의 분획화 및 활성 성분 구명

##### 1.1.1. 주정 농도별 항염증 효과 비교

곰보배추 추출물의 대량 제조를 위해 건조된 곰보배추(*Salvia Plebera* R. BR, 2014년 부안산) 지상부 500 g을 고루 섞은 후 3차 증류수에 희석하여 제조한 0, 10, 30, 50, 70 혹은 90% 주정 10 l 이용해서 80°C에서 2.5시간동안 열탕 추출하였다. 여액을 모은 후 잔사는 동일한 방법으로 재추출 하여 그 여액을 합하여 45°C에서 곰보배추 추출물이 건조될 때까지 감압 농축하였다. 이후 2 l의 증류수를 가해 현탁시킨 후 동결 건조하여 분말상태로 제조하였다.

Leukotriene은 arachidonic acid metabolism의 5-lipoxygenase (5-LO) pathway에 의해 합성되는 매개인자로 염증반응의 확인을 위한 바이오마커로 사용하고 있다.<sup>1)</sup> 이 합성과정에서 leukotriene receptor에 길항작용하는 Montelukast 같은 약물을 천식의 치료에도 사용하고 있다.<sup>2)</sup> 이에 본 연구에서는 호흡기염증 질환에 유효한 천연물 자원을 이용한 치료제 개발을 목표로 곰보배추 추출물을 대상으로 호염기성 백혈병 세포 (RBL-2H3 cell)을 이용한 5-LO 억제 주요 활성성분을 구명하고자 한다. 먼저 RBL-2H3 cell을 배양하기 위해 Rat basophilic leukemia cell (RBL-2H3)을 10% FBS, 1% Antibiotics가 포함된 DMEM (complete DMEM)으로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 T-75 culture flask에 배양하였다. 계대 배양은 세포가 T-75 culture flask에 70~80%가량 찼을 때, 배양액을 제거한 후, PBS 3 ml로 세척한 후, 0.25% TE 3 ml로 RBL-2H3를 부유상태로 만들어 같은 양의 complete DMEM을 넣어 1500× rpm, 4°C에서 5분간 RBL-2H3를 침전시켰다. 이후 상층액을 제거하고 hemocytometer로 세포수를 측정, 5×10<sup>5</sup>cells/plate의 농도로 분주해 complete DMEM 10 ml로 배양하였다. Leukotriene 농도 측정은 12-well plate에 RBL-2H3 cell을 5×10<sup>5</sup>cells/well만큼 분주하여 complete DMEM 1 ml로 배양한다. 24시간 후 PBS 1 ml로 세척한 후 곰보배추 추출물이 들어간 DMEM 500 μl로, 양성 대조군은 100 μM montelukast가 포함된 DMEM 500 μl로 10분간 배양한 후 1 mg/ml calcium ionophore 10 μl를 넣어 10분간 배양하였다. 이후 상층액을 모아 1500× rpm에서 원심 분리해 잔여세포를 침전시키고, 다시 상층액을 취해 -20°C에 보관한다. 상층액에 포함된 Leukotriene의 농도는 cysteinyl leukotriene EIA kit (Enzo, lifescience, ADI-901-070)를 이용해 제조사에서 제공한 방법으로 측정하였다. 배암차즈기에서 다른 곰보배추들 보다 더 높은 leukotriene 발현 억제를 보여주는 바, 다양한 농도로 희석한 주정 (0-95%)으로 추출한 곰보배추 조추출물을 50 μg/ml의 농도로 처리해 각각의 추출용매에 따른 leukotriene 발현 억제를 정량했다. 실험결과 10-50%의 주정에서 추출되었을 때, 각각 66.9±6.8%, 53.6±8.3%, 53.0±7.7%로 다른 농도의 주정으로 추출한 조추출물보다 높은 leukotriene 발현 억제를 보였다 (그림 64).

1) Goulet JL, Byrum RS, Key ML, Nguyen M, Wagoner VA and Koller BH. (2000). Genetic factors determine the contribution of leukotrienes to acute inflammatory responses. The Journal of Immunology. 164:4899-4907.

2) Drazen JM, Israel E and O'Byrne PM (1999). Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. New England Journal of Medicine. 340:197-206.

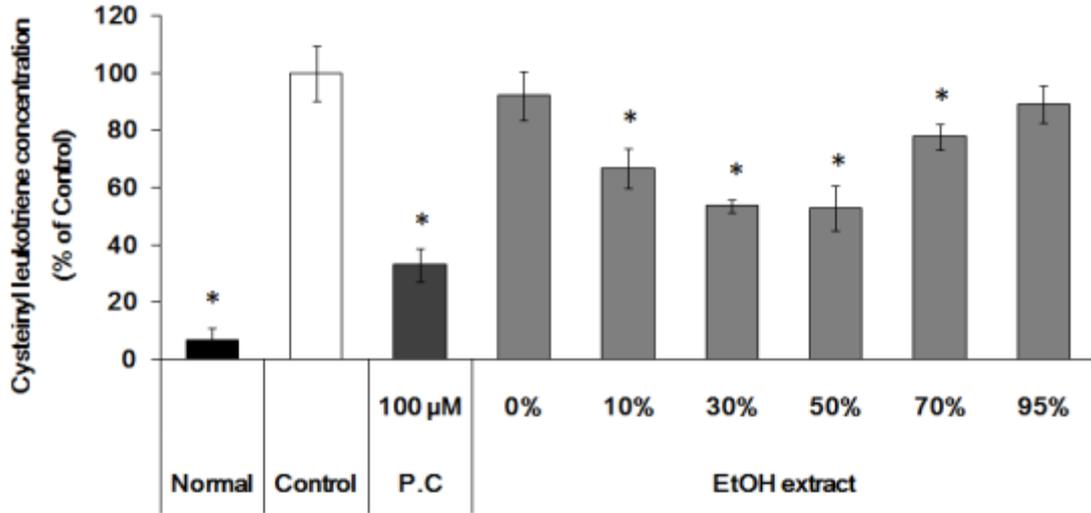


그림 64 각기 다른 농도의 주정으로 추출했을 때 leukotriene 생성량 비교.

\*은 control과 비교했을 때 유의수준 0.05로 유의미한 차이가 있음을 의미함. 약어: BtOH: 1-butanol, DW: distilled water, EA: ethyl acetate, HX: n-hexane, MC: methylene chloride, P.C: montelukast 처리군.

### 1.1.2. 용매별 분획물의 항염증 효과 비교

곰보배추 용매별 분획물은 2014년 4월 전북 부안에서 재배된 곰보배추를 사용해 50% 주정으로 추출한 곰보배추 조추출물 50 g을 1차 증류수 1 l에 녹인 후 순차적으로 n-hexane 3 l, chloroform 3 l, ethyl acetate 3 l, butanol 3 l로 3회 반복하여 분획하여 제조하였다. Leukotriene의 발현을 억제하는 효과적인 추출방법을 찾기위해 곰보배추 50% 주정 조추출물에서 n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, butanol, D.W.로 액체-액체 추출법을 이용해 얻은 분획물을 50 μg/ml의 농도로 처리해 leukotriene 발현 억제를 확인하였다 (Fig. 3). 증류수를 제외한 모든 용매에서 leukotriene 생성이 n-hexane에서 62.9±7.7%, methylene chloride에서 50.3±16.3%, ethyl acetate에서 19.7±2.4%, 1-butanol에서 68.8±2.1%으로 control 군 대비 유의미하게 감소한 것을 확인할 수 있었다. 하지만 ethyl acetate 분획물을 제외한 다른 용매 분획물에서는 곰보배추 50% 주정 조추출물과와 비슷하거나 보다 낮은 leukotriene 발현 억제를 확인할 수 있었다. 이를 통해 ethyl acetate 분획물에 항염증에 관련된 유효 활성성분이 보다 많이 추출되었음을 알 수 있다 (그림 65).

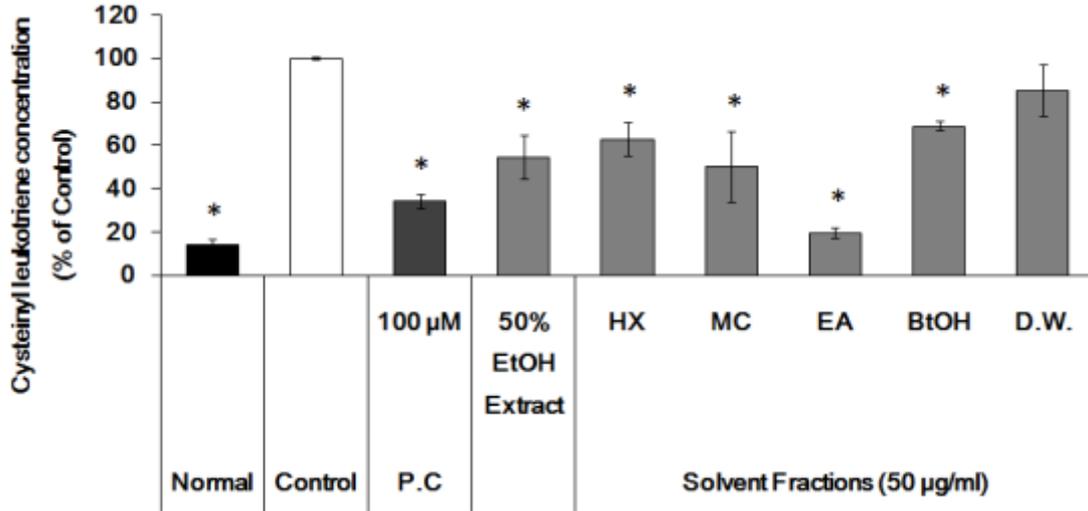


그림 65. 각기 다른 용매로 추출했을 때 leukotriene 생성량 비교

\*은 control과 비교했을 때 유의수준 0.05로 유의미한 차이가 있음을 의미함. 약어: BtOH: 1-butanol, DW: distilled water, EA: ethyl acetate, HX: n-hexane, MC: methylene chloride, P.C: montelukast 처리군.

### 1.1.3. 활성성분 분획물의 항염증 효과 비교

곰보배추 ethyl acetate 분획물은 50% 주정으로 추출한 곰보배추 조추출물 40 g을 1차 증류수 2 ℓ에 완전 용해시킨 후 분액 여두에 넣고 ethyl acetate 1 ℓ에 잘 희석시킨 후, 두 용매가 분리될 때까지 약 4시간 정도 방치하였다. 분리된 상층의 ethyl acetate 분획물을 취득하고 남은 여액에 다시 ethyl acetate 1 ℓ로 총 3회 반복, 분획해 모은 ethyl acetate 3 ℓ를 감압 농축하여 제조하였다. 그리고 column chromatography를 적용해 곰보배추 ethyl acetate 분획물 10 g을 silica column에 첨가시킨 후 chloroform과 methanol 비율 (100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, methanol)을 달리한 용액으로 추출해 제조하였다. Leukotriene 발현을 정량한 결과 chloroform:methanol의 비율이 20:1, 10:1, 5:1 경우 control 대비 각각 90.8%, 88.0%, 92.8% leukotriene의 유의미한 발현 억제를 확인할 수 있었다 (그림 66).

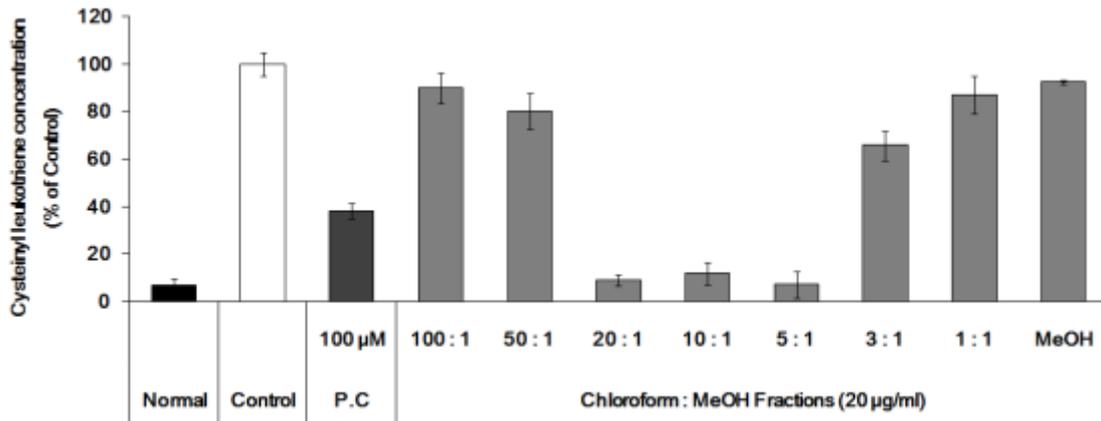


그림 66. 각기 다른 비율의 용매 (chloroform:MeOH)로 추출했을 때 leukotriene 생성량 비교 \*은 control과 비교했을 때 유의수준 0.05로 유의미한 차이가 있음을 의미함.

약어: P. C., montelukast 처리군.

### 3.1.4. 추출 및 분획화에 따른 수율

곰보배추를 50% 주정으로 추출했을 때, 수율은 약 36.5% 정도이며, 이를 다시 ethyl acetate 로 추출했을 때, 50% 주정 추출물의 약 19.0%가 추출된다. 전체적으로 초기 곰보배추의 약 6.94%가 ethyl acetate 추출물로 얻어지게 되며, 실험에 사용했던 곰보배추의 분획단계별 수율은 그림 67와 같다.

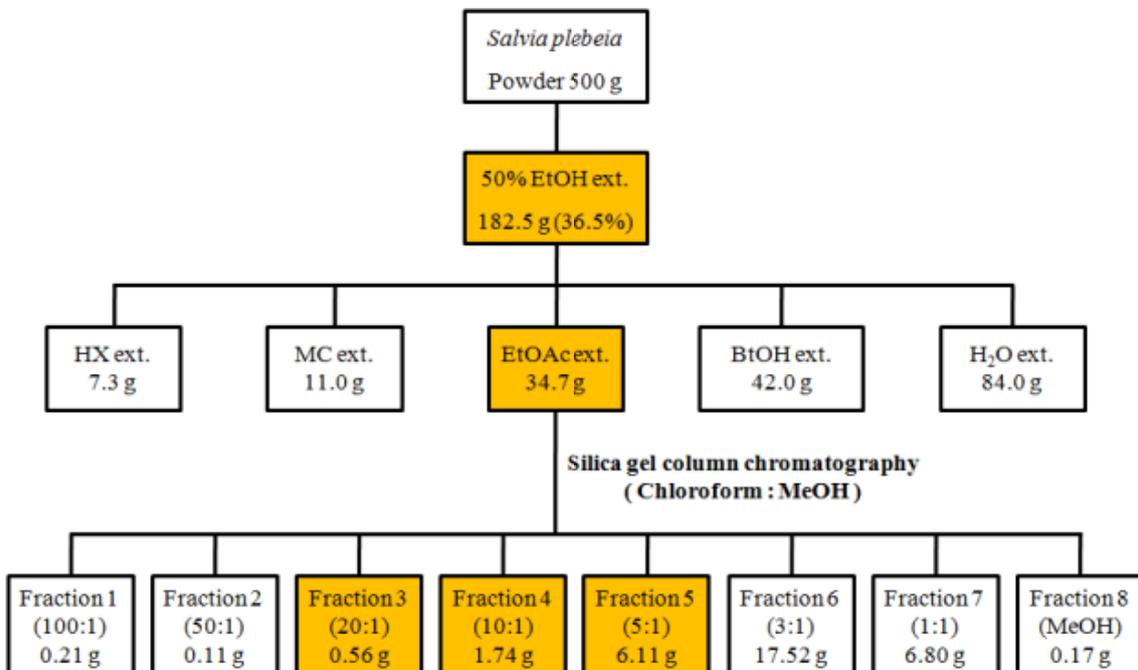


그림 67. 곰보배추 추출 및 분획화에 따른 수율

### 1.1.5. 곶보배추 단일성분 확인

추출물을 추출 시료 약 400 mg에 50% 에탄올 2 ml를 첨가해 30분간 초음파 처리하여 용해시킨 뒤, 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter를 이용해 부유물을 제거하고 아래 표와 같은 조건에서 분석하였다. 높은 leukotriene 억제력을 보인 20:1, 10:1, 5:1 곶보배추의 활성성분 분획물에 포함되어 있을 것으로 보이는 예상되는 물질인 rosmarinic acid, hispidulin, luteolin의 UV spectrum과, HPLC로 물질을 분리해 각 peak별 용출 시간 및 UV-spectrum을 비교해 실제 곶보배추 활성성분 분획물에 위의 물질들이 포함되어 있는지 확인하였다 (표 9).

표 9. HPLC-PDA operating parameters for the analysis of active compound in *salvia plebeia* extract

Parameter	Condition		
Column	Phenomenex Luna C18 (4.6 × 250 mm, 5 $\mu\text{m}$ )		
Column temperature	40°C		
Injection volume	10 $\mu\text{l}$		
Flow rate	1 ml/min		
Mobile phase	Gradient	Solvent A	Solvent B
	Time (min)	0.1% formic acid in H <sub>2</sub> O	Acetonitrile
	0.0	90%	10%
	10.0	90%	10%
	60.0	40%	60%
61.0	0%	100%	
Detector(wavelength)	Photodiode array(330 nm)		

5:1 곶보배추 활성성분 분획물에서 36.1분경 나타난 peak의 UV-spectrum을 rosmarinic acid의 UV-spectrum과 비교했을 때, 동일한 모양의 UV-spectrum이 관찰되어 rosmarinic acid가 포함되어 있을 것으로 보이며, 같은 추출물에서 29.2분경 얻은 peak에서 luteolin과 동일한 모양의 UV-spectrum을 얻어 luteolin이 있음을 추측할 수 있었다 (그림 67).

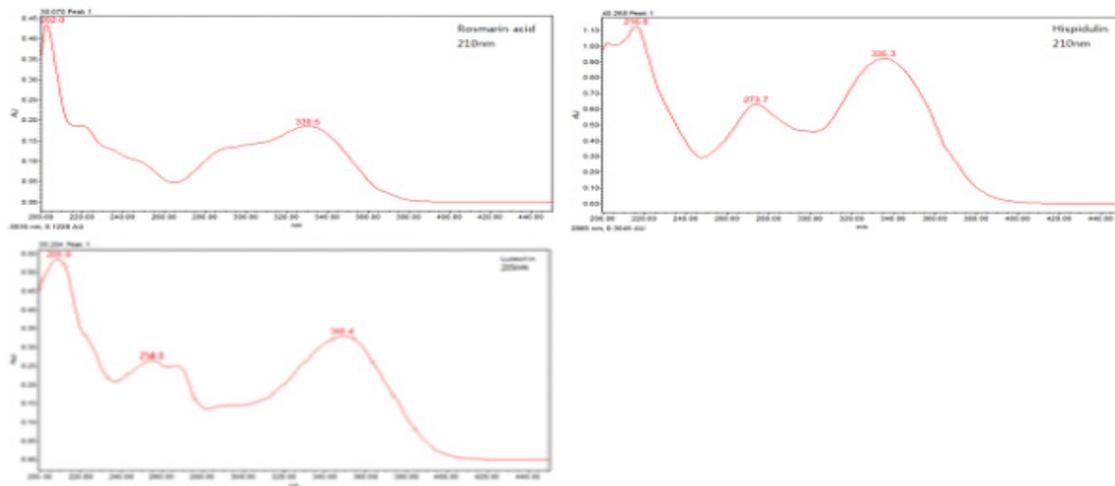


그림 67. UV-spectra of rosmarinic acid, hispidulin and luteolin

20:1, 10:1 곰보배추 활성성분 분획물을 HPLC로 확인한 결과, 여러 peak중 40.2분경에 용리된 peak에서 나타난 UV-spectrum은 단일 hispidulin의 UV-spectrum과 동일한 모양을 보여 곰보배추 활성성분 분획물에 hispidulin이 포함되어 있을 것으로 보인다 (그림 68).

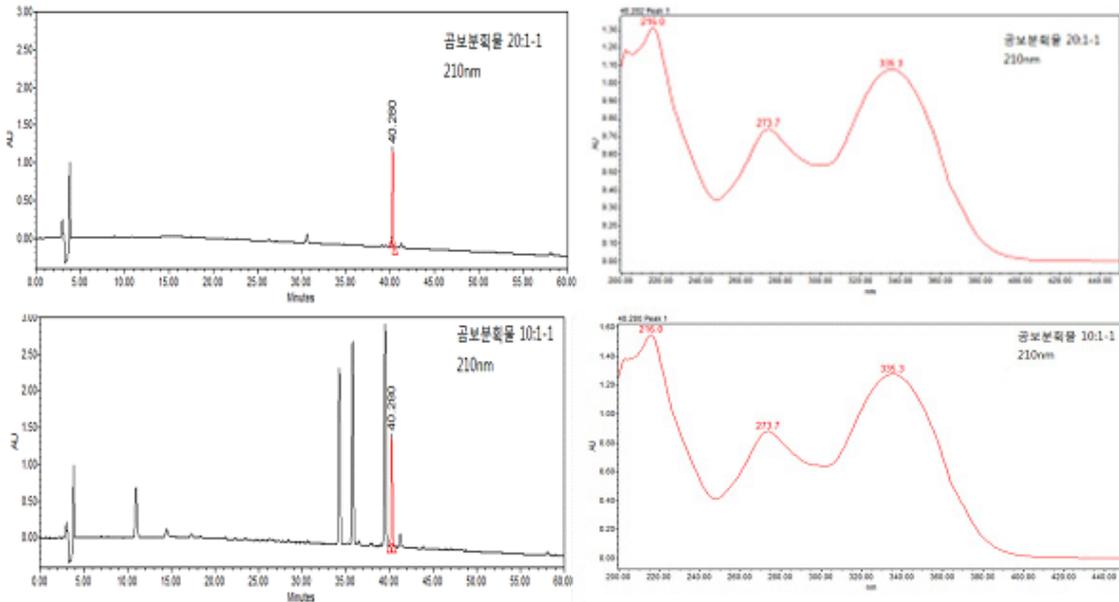


그림 68. Identification of hispidulin from 20:1 and 10:1 chloroform:methanol fraction.

### 1.1.6. Hispidulin, luteolin, rosmarinic acid의 항염증 효과 확인

실제 이들 화합물이 leukotriene 발현억제에 기여하는지를 확인하기 위해 확인한 결과, rosmarinic acid, hispidulin, luteolin을 각각 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때, 모두 농도 의존적으로 leukotriene 발현 억제가 증가하였다. 또한 같은 농도에서 luteolin의 leukotriene의 발현 억제력이 rosmarinic acid, hispidulin보다 높았다 (그림 69).

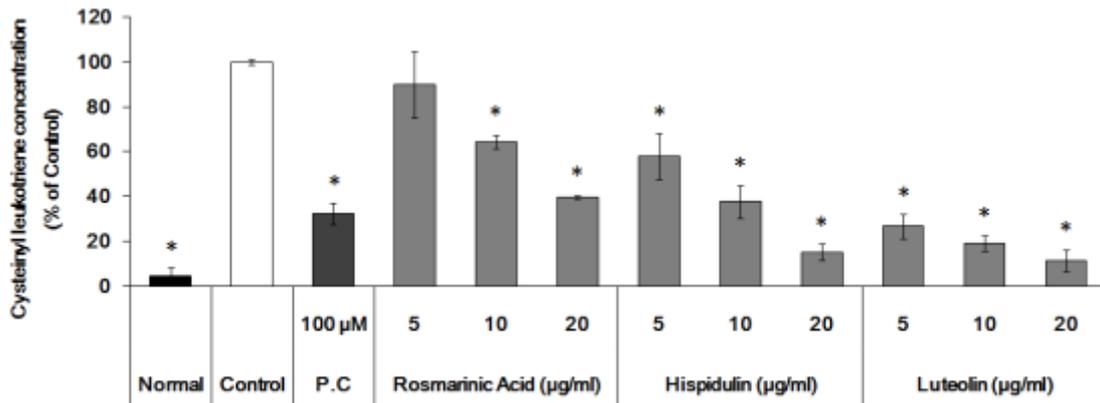


그림 69. rosmarinic acid, hispidulin, luteolin의 농도별 leukotriene 생성량 비교

\*은 control과 비교했을 때 유의수준 0.05로 유의미한 차이가 있음을 의미함. 약어: P. C., montelukast 처리군.

### 1.1.7. Ethanol 함량별 추출물에 대한 유효성분 함량 확인

곰보배추 추출물로부터 주요 활성 물질인 rosmarinic acid는 26~42 mg/g, luteolin은 0.4~5.5 mg/g, hispidulin은 0.6~4.5 mg/g 수준으로 에탄올 60%이하 용매의 추출 조건에서 골고루 높은 함량으로 추출되는 것을 알 수 있었다 (표 10).

**표 10. 곰보배추 추출물 종류별 유효 성분 함량**

추출물 성분	유효 성분 함량 (mg/g)					
	에탄올 0%	에탄올 10%	에탄올 30%	에탄올 50%	에탄올 70%	에탄올 90%
Rosmarinic acid	26.9	30.7	39.8	41.9	39.8	30.5
Luteolin	3.7	4.0	4.5	3.2	1.0	0.6
Hipidulin	4.2	4.9	5.5	2.7	0.8	0.4

곰보배추 500 g으로 추출한 유효 성분 총 함량은 rosmarinic acid는 2.04~7.65 g, luteolin은 0.05~0.86 mg/g, hispidulin은 0.07~0.71 mg/g 수준 물 혹은 에탄올 70% 및 90% 용매를 사용하는 것보다 10~50% 에탄올 용매를 이용할 때 약 5배 높은 함량의 유효성분을 얻을 수 있었다 (표 11).

**표 11. 500 g 곰보배추로부터 제조된 추출물 종류별 유효 성분 총 함량**

추출물 성분	유효 성분 함량 (g)					
	에탄올 0%	에탄올 10%	에탄올 30%	에탄올 50%	에탄올 70%	에탄올 90%
Rosmarinic acid	2.04	2.98	6.25	7.65	6.12	3.51
Luteolin	0.32	0.48	0.86	0.49	0.12	0.05
Hipidulin	0.28	0.39	0.71	0.58	0.15	0.07

### 1.1.8. 곰보배추 품종별 항염증 효과 확인



**그림 70. 왼쪽부터 배암차즈기, 참배암차즈기, 둥근배암차즈기**

곰보배추는 배암차즈기 (*Salvia plebeia*), 참배암차즈기 (*Salvia chanroenica*), 둥근배암차즈기 (*Salvia japonica*)가 있으며 먼저 배암차즈기 품종별 함유하고 있는 항염증 물질 농도가 다를 것으로 예상되는바 각각의 항염증 효과를 leukotriene 억제능을 통해 확인하였다.

먼저 곰보배추 종류별 성분 및 활성 비교 평가를 위해서 한국식물추출물은행에서 분양받은 배암차즈기 (PB4388.1, 한국식물추출물은행), 둥근배암차즈기 (PB4390.1, 한국식물추출물은행), 참배암차즈기 (PB4391.1, 한국식물추출물은행)의 메탄올 추출물을 사용하였다. 곰보배추 종류별 leukotriene 발생 억제 효과를 확인하기 위해 배암차즈기, 참배암차즈기, 둥근배암차즈기를 50% 주정으로 곰보배추 조추출물을 제조하여 leukotriene 정량하였다. 10 µg/ml의 배암차즈기, 참배암차즈기, 둥근배암차즈기 조추출물 (50% 주정)을 처리하였을 때, 각각 91.2±8.7%, 121.2±22.3%, 106.3±13.2%로 Control 군 대비 유의미한 변화는 관찰되지 않았다 ( $p>0.05$ ). 하지만 농도를 50 µg/ml로 처리하였을 때, 배암차즈기, 참배암차즈기, 둥근배암차즈기는, 각각 34.3±2.5%, 71.0±10.7%, 73.4±5.8%로 control 대비 leukotriene의 유의미한 감소가 관찰되었으며, 이중 배암차즈기 조추출물이 가장 높은 leukotriene 발현 억제가 관찰되어 배암차즈기에 유효 항염증 활성성분이 더 많이 포함되어 있을 것으로 볼 수 있다 (그림 71).

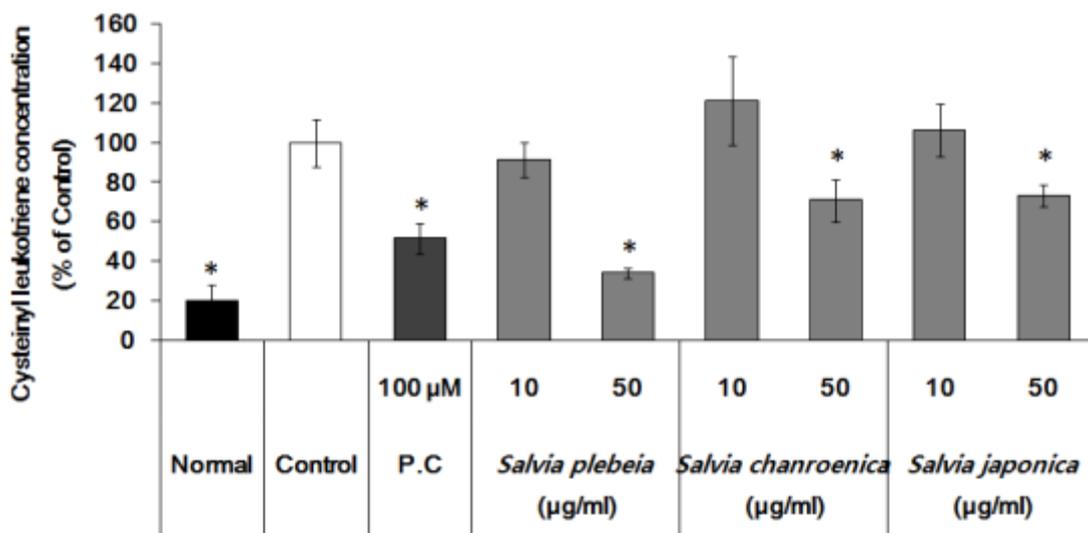


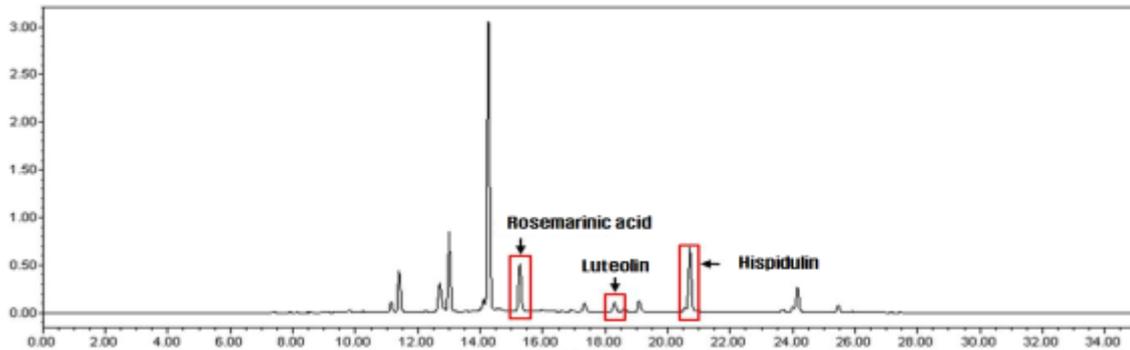
그림 71. 곰보배추 (배암차즈기, 둥근배암차즈기, 참배암차즈기)별 leukotriene 생성량 비교

\*은 control과 비교했을 때 유의수준 0.05로 유의미한 차이가 있음을 의미함. 약어: P. C., montelukast 처리군.

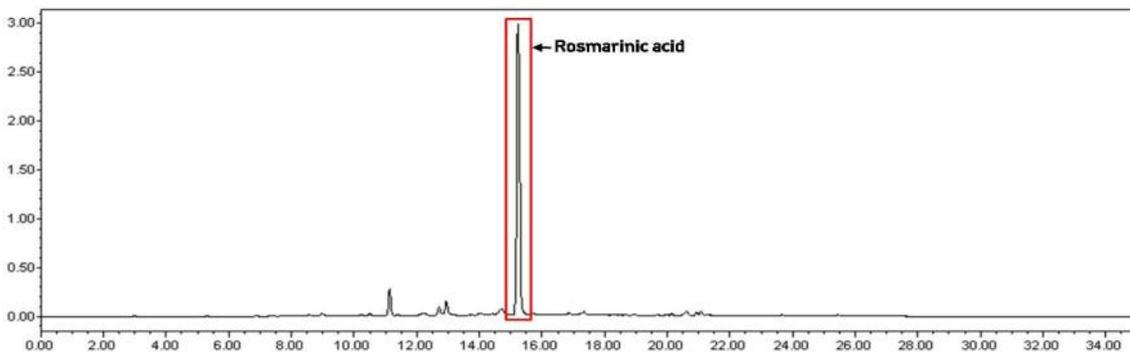
그리고 각 곰보배추에 포함된 유효 성분들을 정량하기 위해 표 12와 같은 조건으로 추출물을 분리했다.

**표 12. HPLC-PDA operating parameters for the analysis of hispidulin, luteolin, rosmarinic acid in salvia plebeia extract**

Parameter	Condition		
Column	Shishedo Capcell Pak MG C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm)		
Column temperature	25°C		
Injection volume	10 μℓ		
Flow rate	1 mL/min		
Mobile phase	Gradient	Solvent A	Solvent B
	Time (min)	0.1% formic acid in H <sub>2</sub> O	0.1% formic acid in acetonitrile
	0.0	95%	5%
	20.0	50%	50%
	25.0	30%	70%
	30.0	95%	5%
35.0	95%	5%	
Detector(wavelength)	Photodiode array (330 nm)		



**그림 72. 배암차즈기의 유효성분 크로마토그램**



**그림 73. 참배암차즈기의 유효성분 크로마토그램**

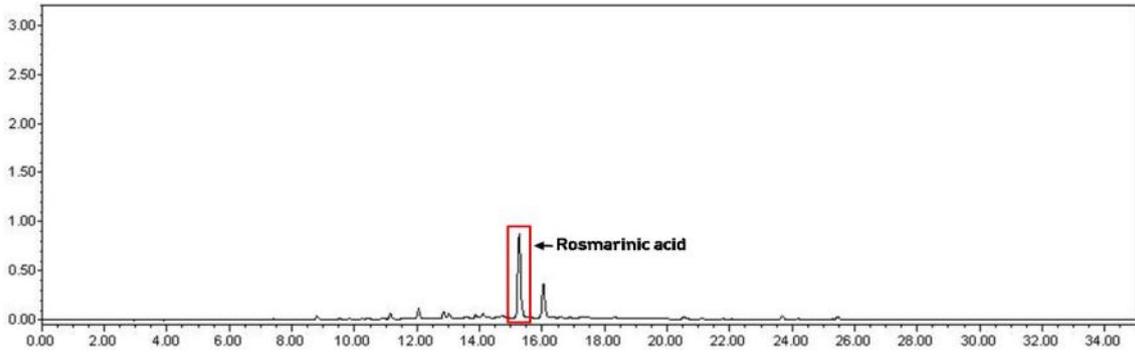


그림 74. 둥근배암차즈기의 유효성분 크로마토그램

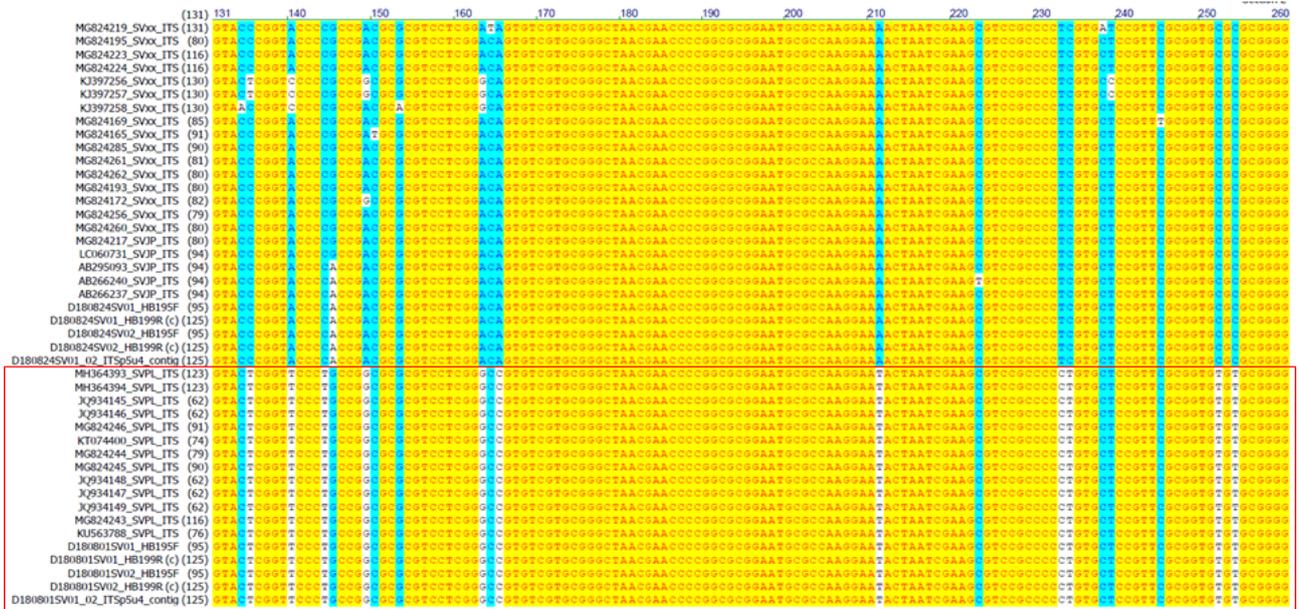
곰보배추 품종별 leukotriene 억제능 실험에서와 유사하게 leukotriene의 활성 억제력이 강한 hispidulin과 luteolin이 배암차즈기에서만 함유되어있는 것을 확인할 수 있었고, 이 실험결과를 통해 배암차즈기가 함염증 활성이 더 높다는 것을 확인할 수 있다 (표 13).

표 13. 곰보배추 품종별 rosmarinic acid, hispidulin, luteolin 함량

Sample	Rosmarinic acid (mg/g)	Hispidulin (mg/g)	Luteolin (mg/g)
배암차즈기 (Salvia plebeia)	5.7	4.7	1.1
참배암차즈기 (Salvia chanroenica)	36.6	0	0
둥근배암차즈기 (Salvia japonica)	10.1	0	0

### 1.2. 곰보배추 원재료 유전자 분석

- 유전자 분석을 통해 곰보배추(배암차즈기, *Salvia plebeia*)로 확인된 원료를 구입하여 곰보배추 추출물 제조에 사용함.
- 곰보배추(배암차즈기)의 유전자 분석 [분석기관 : (주)한국인삼공사]
  - 표준시료 ITS 유전자부위의 염기서열과 다중서열정렬 분석을 실행하여, 그 결과의 염기서열 동일성 값(Identity)을 확인하여 의뢰시료의 기원을 판정한다.
  - 다중서열정렬 (Multiple Sequence Alignment) 결과에서 상동성 테이블 (Identity Table) 값을 확인하여 표준염기서열과 염기서열 동일성 값이 98% 이상일 경우 *Salvia plebeia* (배암차즈기)로 판정한다.
- 곰보배추(배암차즈기)의 유전자 분석 다중서열정렬 결과, 시료(KGC03sp)와 배암차즈기 표준 염기서열과 동일함을 확인 함



○ 고품배추(배암차즈기)의 유전자 분석 상동성 테이블 결과, 시료(KGC03sp)와 배암차즈기 표준염기서열의 값이 모두 97% 이상을 나타냄

	MH9639	MH9639	KQ94145	KQ94145	KQ94146	MS82424	KT074400	MG82424	MG82424	KQ94146	KQ94147	KQ94149	MG82424	KU56788	D180801S	D180801S	D180801S	D180801S	D180801S	D180801S	
MG824219_Svxx_ITS	93	92	93	90	91	92	91	99	99	99	99	99	99	94	93	99	99	99	99	99	99
MG824195_Svxx_ITS	92	92	93	94	91	91	92	99	99	99	99	99	99	94	99	99	99	99	99	99	99
MG824223_Svxx_ITS	94	94	94	94	92	92	94	99	94	99	94	99	94	94	94	94	94	94	94	94	94
MG824224_Svxx_ITS	94	94	94	94	92	92	94	99	94	99	94	99	94	94	94	94	94	94	94	94	94
KJ397256_Svxx_ITS	93	93	94	94	90	91	92	91	94	99	94	99	94	94	99	94	99	94	99	94	99
KJ397257_Svxx_ITS	93	93	94	94	90	91	92	91	94	99	94	99	94	94	99	94	99	94	99	94	99
KJ397258_Svxx_ITS	92	92	93	93	90	91	92	91	93	99	93	99	94	99	92	94	92	94	92	94	93
MG824169_Svxx_ITS	92	92	93	93	90	91	92	91	93	99	99	99	94	99	92	93	92	93	92	93	92
MG824165_Svxx_ITS	91	91	93	93	90	91	92	92	93	99	99	99	92	93	91	92	91	92	91	92	91
MG824285_Svxx_ITS	92	92	93	93	90	91	92	92	93	99	99	99	92	93	91	92	91	92	91	92	91
MG824261_Svxx_ITS	92	92	93	94	91	91	92	92	93	99	99	99	94	99	92	94	92	94	92	94	92
MG824262_Svxx_ITS	92	92	93	93	91	91	92	92	93	99	99	99	94	99	92	93	92	93	92	93	92
MG824193_Svxx_ITS	92	92	93	93	91	91	92	92	93	99	99	99	94	99	92	93	92	93	92	93	92
MG824256_Svxx_ITS	92	92	94	94	91	91	92	92	94	99	94	99	94	94	99	94	99	94	99	94	99
MG824256_Svxx_ITS	92	92	93	93	91	91	92	92	93	99	99	99	94	99	92	93	92	93	92	93	92
MG824246_SvPL_ITS	92	92	93	94	91	91	92	92	93	99	99	99	94	99	92	94	92	94	92	94	92
MG824245_SvPL_ITS	92	92	93	93	91	91	92	92	93	99	99	99	94	99	92	93	92	93	92	93	92
KQ934146_SvPL_ITS	92	92	93	93	91	91	92	92	93	99	99	99	94	99	92	93	92	93	92	93	92
KQ934147_SvPL_ITS	92	92	93	94	91	91	92	92	93	99	99	99	94	99	92	93	92	93	92	93	92
KQ934149_SvPL_ITS	92	92	93	94	92	91	99	99	99	99	99	99	94	99	99	99	99	99	99	99	99
MG824243_SvPL_ITS	92	92	93	94	92	91	99	99	99	99	99	99	94	99	99	99	99	99	99	99	99
KU56788_SvPL_ITS	93	93	93	93	91	92	94	92	93	99	99	99	94	99	94	99	94	99	94	99	94
D180801SV01_HB195F	94	94	99	99	92	92	94	93	99	99	99	99	94	99	94	99	94	99	94	99	94
D180801SV01_HB199R (c)	94	94	99	99	92	92	94	93	99	99	99	99	94	99	94	99	94	99	94	99	94
D180801SV02_HB195F	94	94	99	99	92	92	94	93	99	99	99	99	94	99	94	99	94	99	94	99	94
D180801SV02_HB199R (c)	94	94	99	99	92	92	94	93	99	99	99	99	94	99	94	99	94	99	94	99	94
D180801SV01_D2_ITSp5u4_contig	94	94	99	99	92	92	94	93	99	99	99	99	94	99	94	94	94	94	94	94	94
MH9639_SvPL_ITS	100	100	100	97	98	99	98	100	100	100	100	99	99	100	100	100	100	100	100	100	100
MH9639_SvPL_ITS	100	100	100	97	98	99	98	100	100	100	100	99	99	100	100	100	100	100	100	100	100
KQ94145_SvPL_ITS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
KQ94146_SvPL_ITS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
KT074400_SvPL_ITS	98	98	97	98	99	99	99	99	99	99	99	97	98	97	97	97	97	97	97	97	97
MG824246_SvPL_ITS	98	98	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MG824245_SvPL_ITS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
KQ94148_SvPL_ITS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
KQ94147_SvPL_ITS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
KQ94149_SvPL_ITS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MG824243_SvPL_ITS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
KU56788_SvPL_ITS	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
D180801SV01_HB195F	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D180801SV01_HB199R (c)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D180801SV02_HB195F	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D180801SV02_HB199R (c)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D180801SV01_D2_ITSp5u4_contig	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

## 1.2. CPC 기술을 이용한 신규 유효성분 발굴

Gradient acetonitrile-water 용매 시스템을 사용하여 Atlantis T3 column (3 μm, 3.0 X 150 mm column)에 5 mg/ml의 곰보배추 추출물을 5μl씩 직접 주입하여서. 이동상은 acetonitrile-water로 다음과 같이 비율에 변화를 주었다. 0.1% formic acid가 포함된 acetonitrile과 0.1% formic acid가 포함된 물을 0분에서 40분까지 10:90에서 40:60, 40에서 50분까지 40:60에서 50:50, 50분에서 60분까지 50:50에서 100:0으로 흘려주었고, 유속은 0.2 ml/min이었으며 UV흡광도는 290 nm에서 측정하였다.

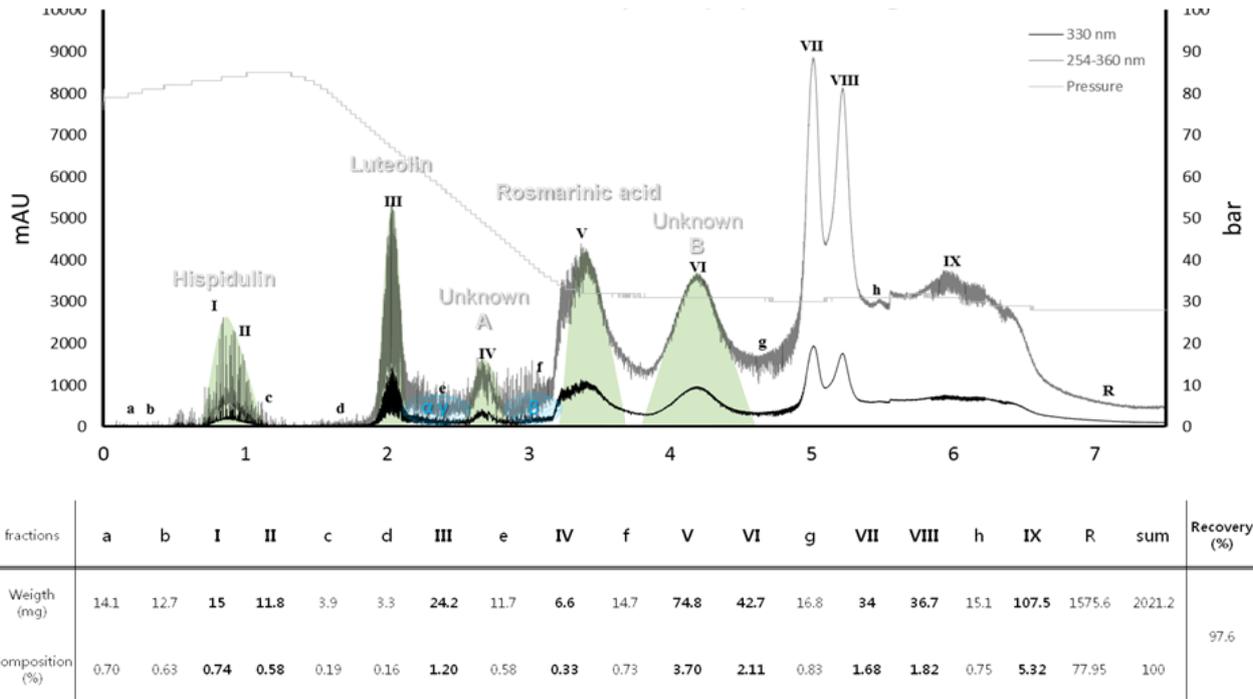


그림 75. 곰보배추 추출물의 CPC 크로마토그램

곰보배추 추출물을 CPC (centrifugal partition chromatography) 기술을 이용해 분획하였으며, 발견된 피크는 순서대로 로마자로 표현하였으며, 끝은 알파벳 소문자로 표현하였다. 분획된 피크를 분석하였을 때, hispidulin, luteolin, rosmarinic acid가 확인되었으며, 미지의 Unknown A와 Unknown B는 차후 분석을 진행할 예정이다.

### 1.2.1. 곰보배추 CPC 분획물들의 세포독성

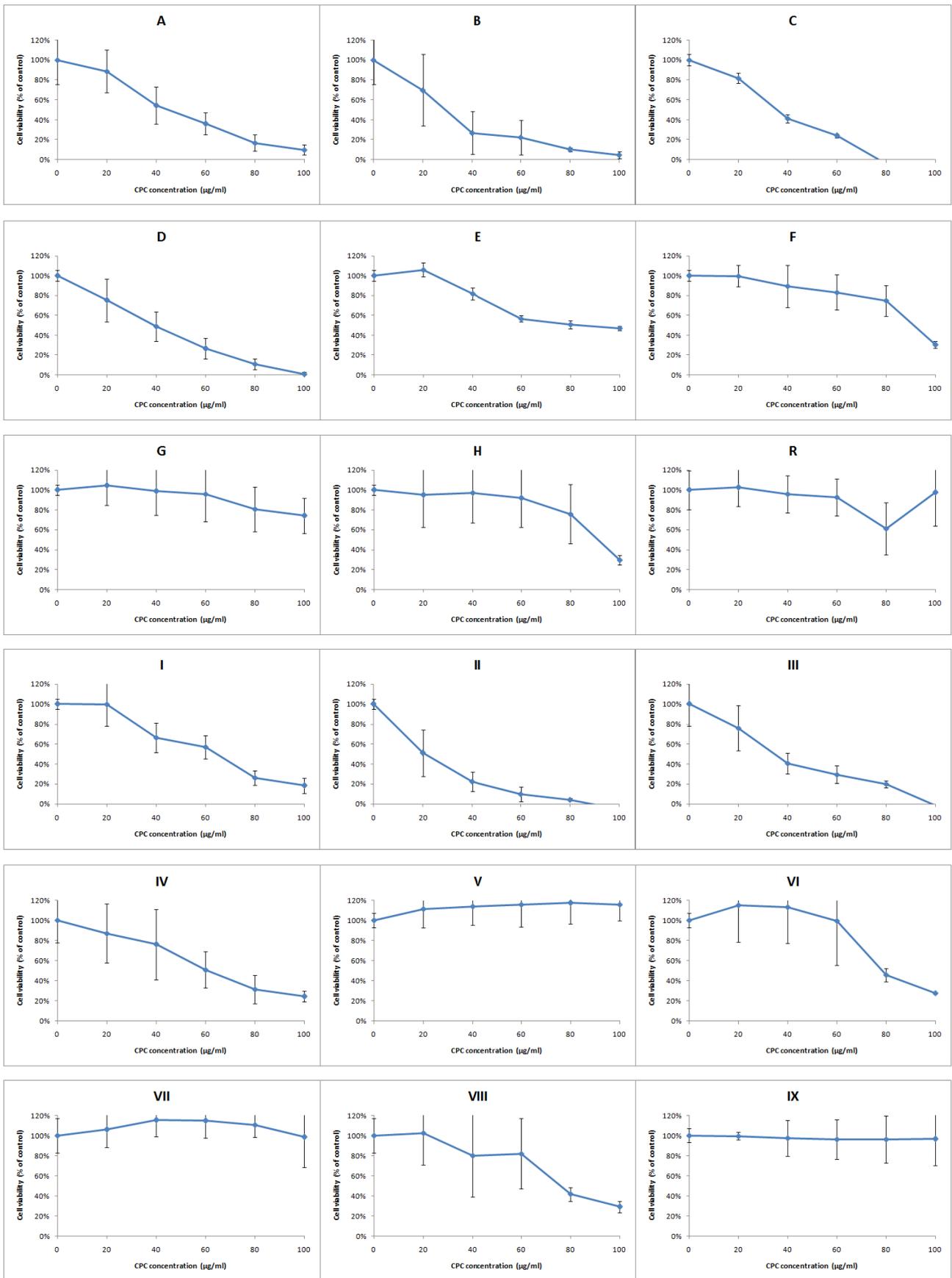


그림 76. 곰보배추 CPC 분획물들의 세포독성 비교

표 1. 곱보배추 CPC 분획물의 EC50(%) 농도 비교

	A	B	C	D	E	F	G	H	R	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
EC50(%) µg/ml	51	40	41	44	82	87	-	88	-	63	33	44	64	-	84	-	77	-

-, 계산불가.

곱보배추 CPC 분획물의 세포독성을 NRU (neutral red uptake) assay를 이용해 분석하였다. EC50는 표 1. 에 나타내었다.

### 1.2.2. 곱보배추 CPC 분획물의 leukotriene 생성 분석

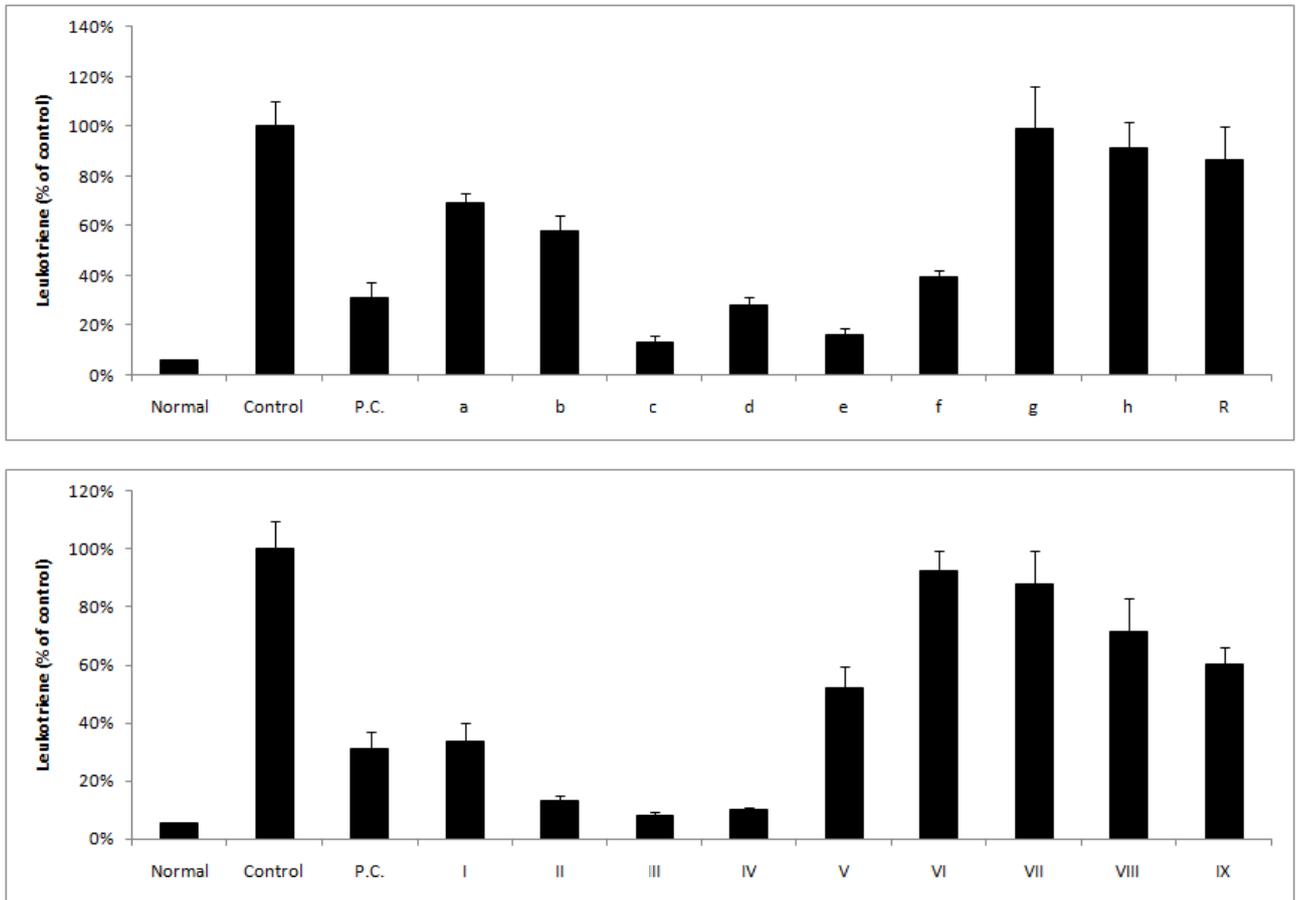
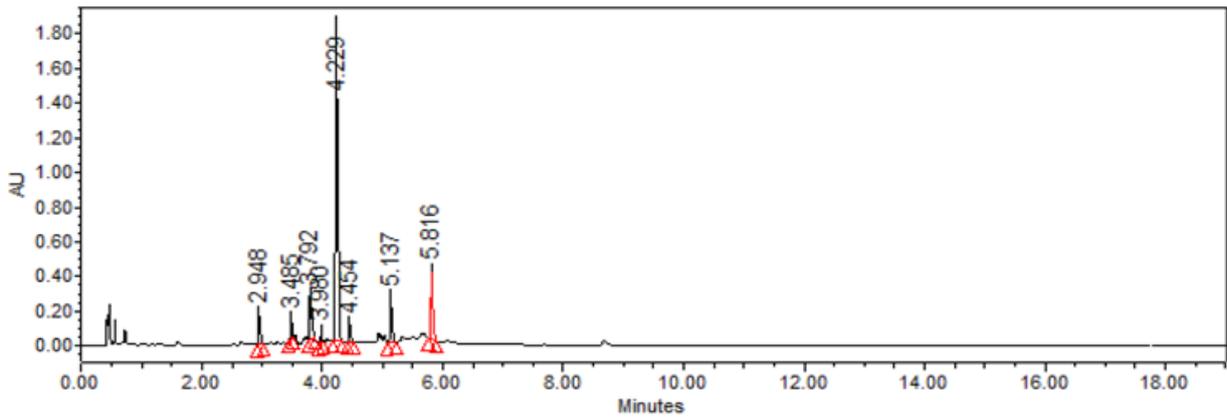


그림 77. 곱보배추 CPC 분획물의 leukotriene 생성량 비교

곱보배추 CPC 분획물들을 각 50 µg/ml의 농도로 처리하고 calcium ionophore를 처리해 leukotriene을 생성시켜 측정하였다. a, b, c, d, e, f 피크에서 얻은 분획물은 vehicle만 처리한 control에 비해 leukotriene의 양이 현저하게 줄어들며, c, d, e, f 피크에서 얻은 분획물은 양성 대조군인 100 µM Montelukast와 유사한 혹은 더 낮은 생성량을 보였다. 또한 일부 골에서 분획된 I, II, III, IV, V, VII, IX에서도 leukotriene 생성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

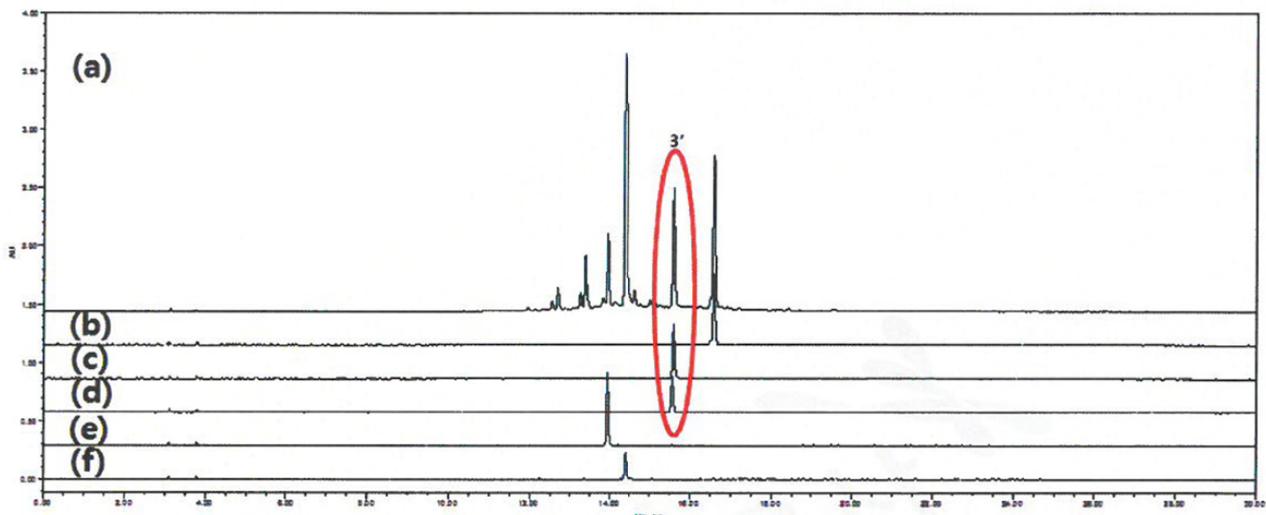
1.2.3. 신규물질의 효능평가 및 유효성분의 효능 기여도 평가



	[M+H] <sup>+</sup>	Exp. Comp.
2.9	465.16	
3.5	449.14	Luteolin 7-glucoside
3.8	479.18	
4.2	463.16	Luteolin-methyl ether-glucoside
4.5	287.04	Luteolin
5.1	317.08	Nepetin
5.8	301.08	Hispidulin

그림 78. 곰보배추 추출물의 UPLC-MS spectrum 및 MS 분석 결과

곰보배추 추출물의 유효성분을 UPLC-MS로 분석해본 결과 각기 1차년도에 분석한 물질 이외에도 luteolin 7-glucoside, luteolin-emthyl ether-glucoside, nepetin이 추가로 발견되었다. 또한 CPC 분획물 분석 결과 hispidulin-7-glucoside 역시 발견되었다. 특히 nepetin의 경우 luteolin에 methoxy가 결합되어 있는 구조로 luteolin과 매우 유사한 구조임을 확인하였다.



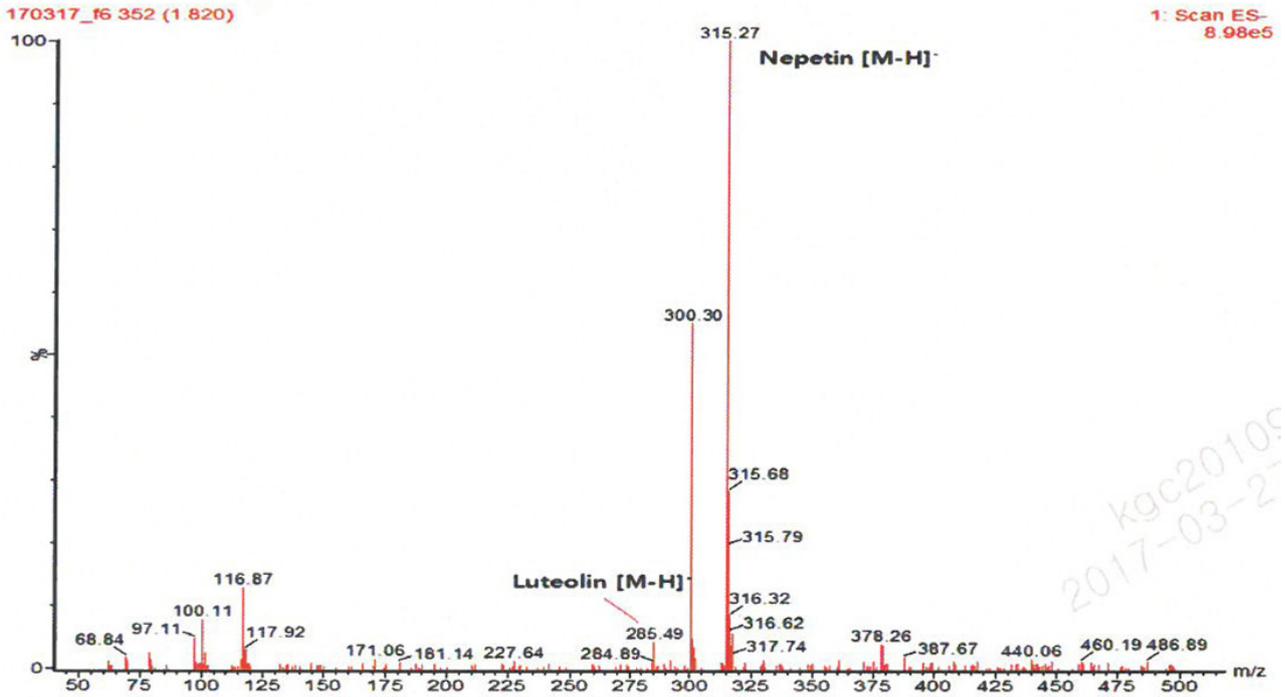


그림 79. 1차년도에 진행한 지표성분 분석방법에서 얻은 크로마토그램(a, 곰보배추 추출물; b, hispidulin; c, nepetin; d, luteolin; e, homoplantaganin; f, rosmarinic acid)과 luteolin으로만 알고있던 피크에서 확인된 luteolin과 nepetin의 MS spectrum

실제 1차년도에 진행했던 지표성분 분석방법으로는 luteolin과 nepetin이 혼재되어 있었으며, 이 부분을 분리해 낼 새로운 분석방법을 필요로 하였다.

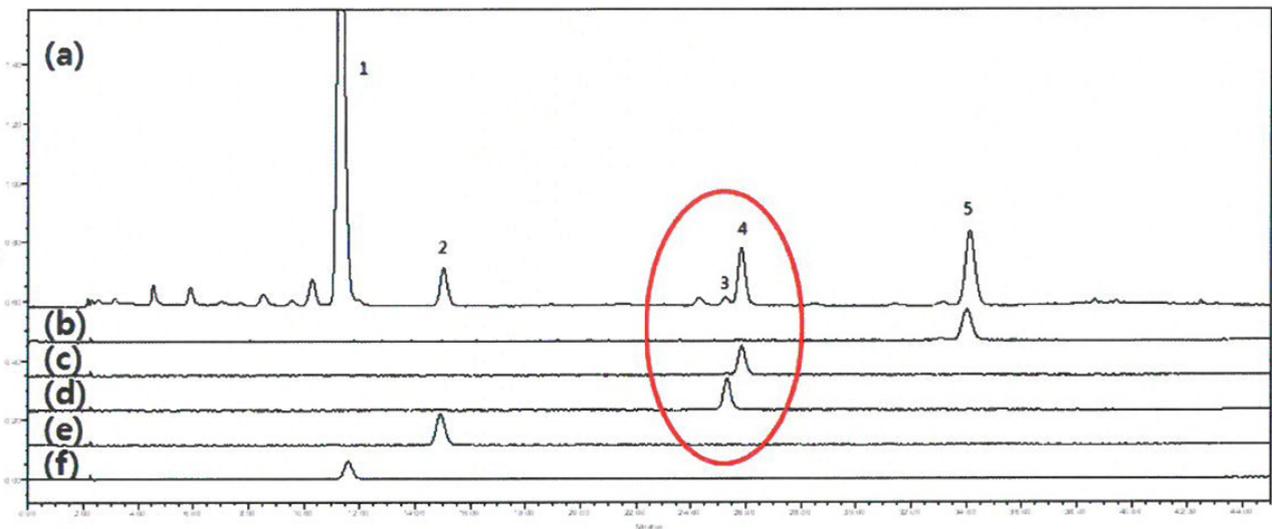


그림 80. Xiao-fen Jin *et al.*,의 분석방법을 적용해서 얻은 크로마토그램(a, 곰보배추 추출물; b, hispidulin; c, nepetin; d, luteolin; e, homoplantaganin; f, rosmarinic acid) 기존 문헌에서 곰보배추 추출물의 luteolin과 nepetin의 분리방법을 적용한 결과 그림과 같이 3, 4의 피크가 분리되었다.

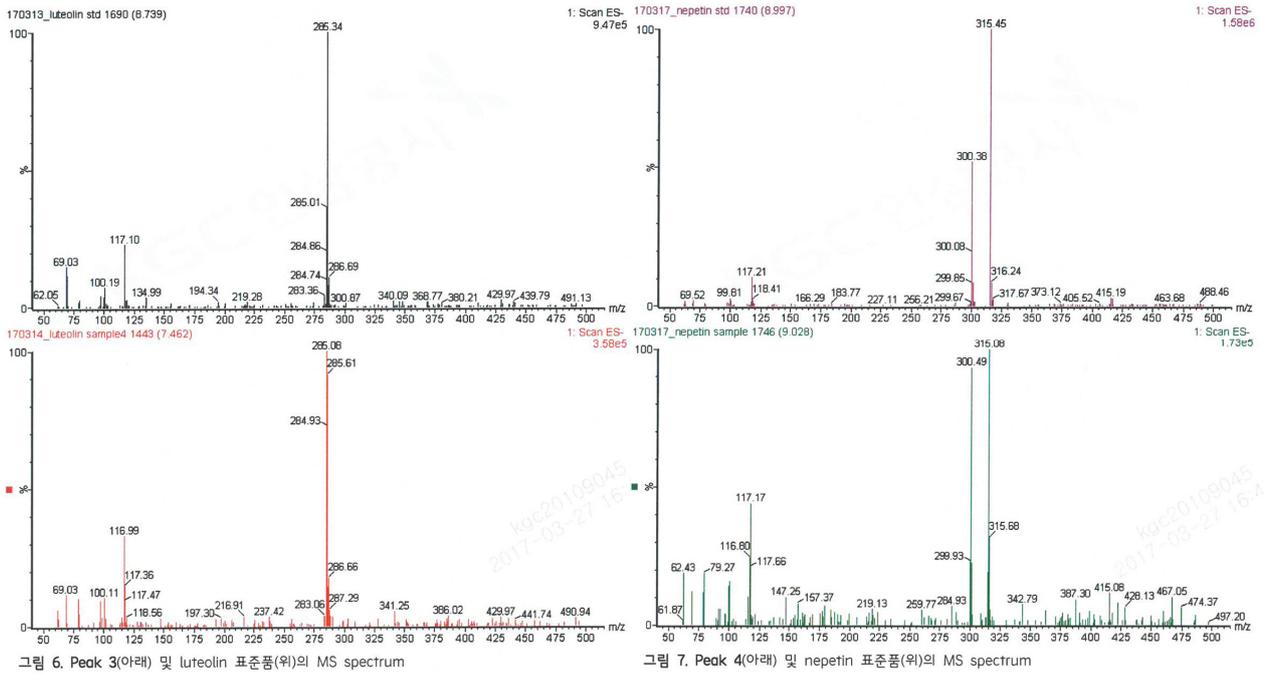


그림 6. Peak 3(아래) 및 luteolin 표준품(위)의 MS spectrum

그림 7. Peak 4(아래) 및 nepetin 표준품(위)의 MS spectrum

그림 81. Luteolin 표준품과 3번 피크, nepetin 표준품과 4번 피크의 MS spectrum 비교

3번과 4번의 피크가 luteolin과 nepetin임을 표준품의 MS spectrum과 비교하여 확인할 수 있었고, 기존에 더해 nepetin이란 새로운 유효성분을 발굴할 수 있었다.

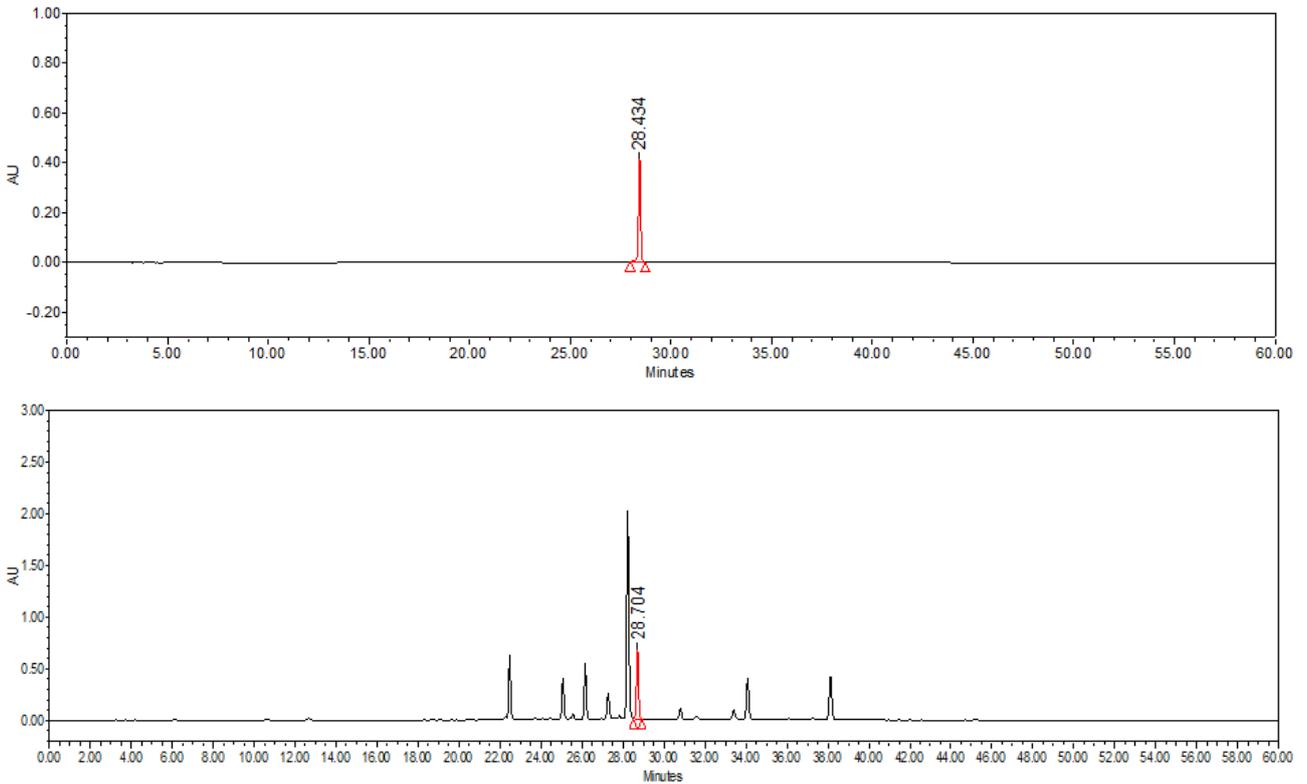


그림 82. Homoplantagin 표준품과 곰보배추 추출물의 크로마토그램 분석

CPC 분석결과 알게된 hispdulin-7-glucoside (homoplantaginin)은 표준품은 28.434분에 발견되는데, 이를 곰보배추 추출물에 적용하면 28.704분에 발견되는 피크와 동일한 것으로 보인다.

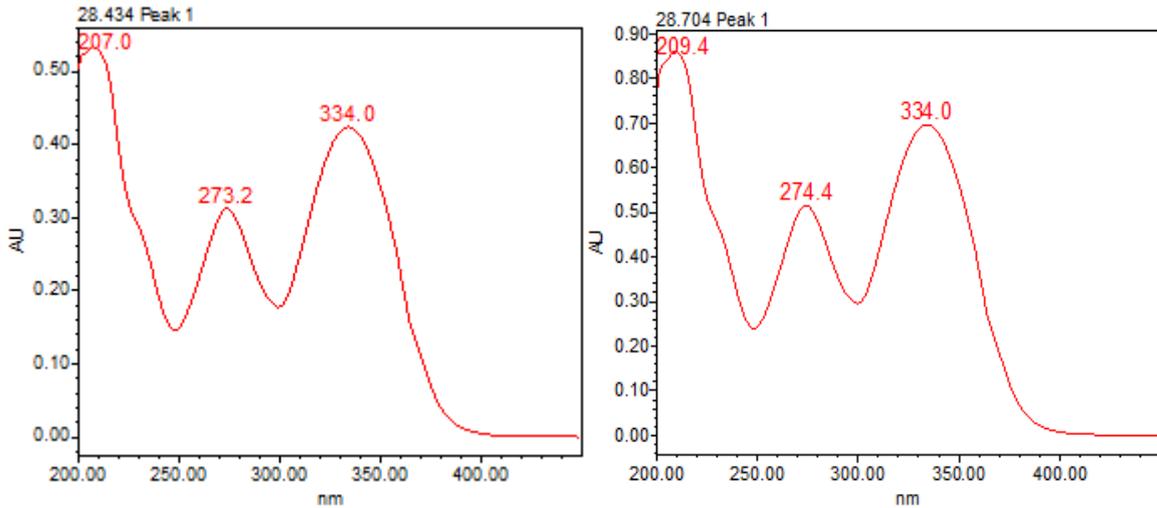


그림 83. Homoplantagin인 표준품과 같은 RT를 가진 곰보배추 추출물의 UV-spectrum 비교

이를 정확히 확인하기 위해 homoplantagin인 표준품과 28.704분에 발견된 피크의 UV-spectrum을 비교해 보았을 때 유사한 모양을 UV spectrum을 보여 같은 물질이라고 볼 수 있었다.

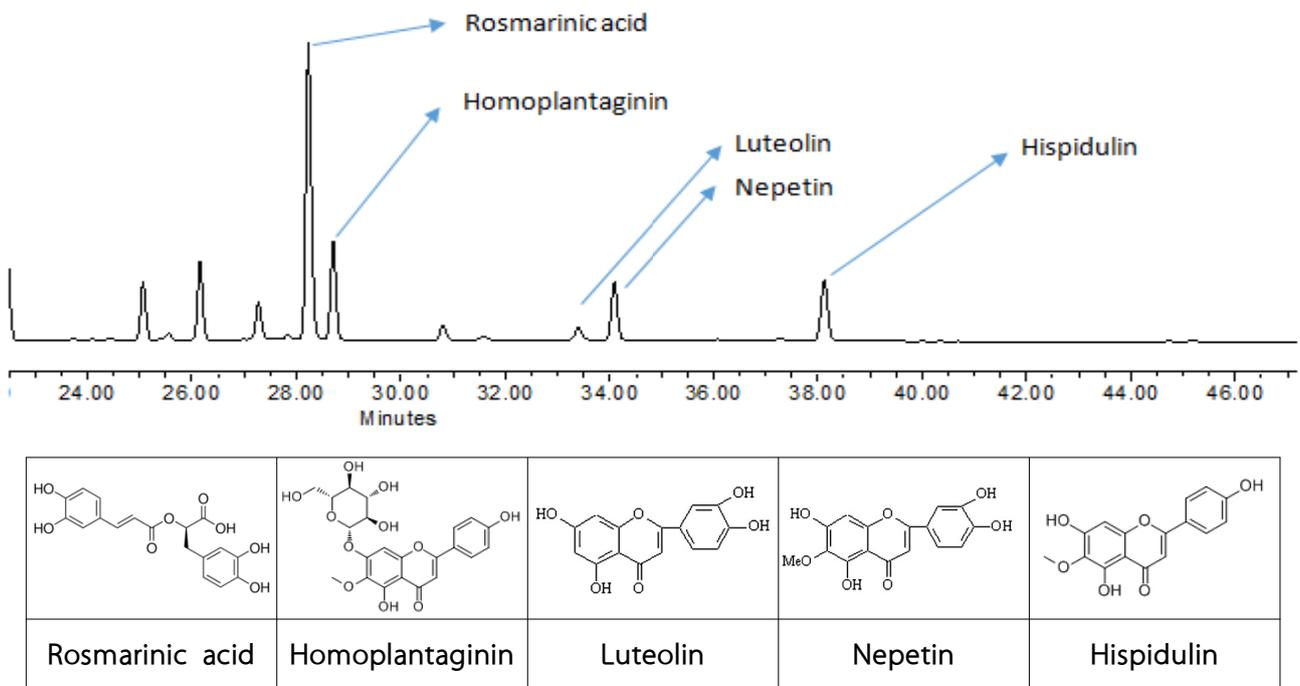


그림 84. 표준 곰보배추 추출물의 크로마토그램

이를 바탕으로 현재까지 확인된 네가지 지표성분을 표준 곰보배추 추출물의 각 피크에 대응하여 표현하였다.

### 1.2.4. 신규 물질의 leukotriene 효능 평가

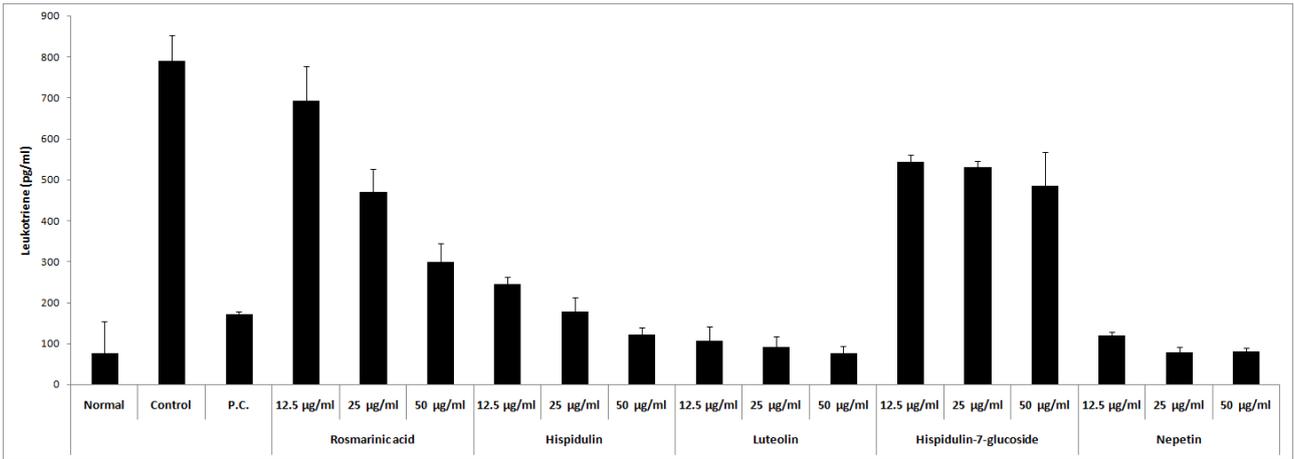


그림 85. Rosmarinic acid, hispidulin, luteolin, hispidulin-7-glucoside (homoplantagin), nepetin의 leukotriene 생성량 비교

기존 rosmarinic acid, hispidulin, luteolin 외에 새로이 확인된 homoplantagin, nepetin의 leukotriene 생성량을 비교해 본 결과 homoplantagin을 제외한 모든 물질이 농도의존적으로 leukotriene 생성을 농도-의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 다만 homoplantagin은 leukotriene 생성량을 크게 감소시키지 않았다.

### 1.3 곶보배추 수확 지역, 시기, 년산별 지표성분 함량 및 leukotriene 활성 비교

각 시기별, 지역별로 수확한 곶보배추를 blender를 이용해 만든 곶보배추 powder 20 g을 30% 주정으로 1차는 250 ml, 2차는 200 ml의 양으로 3시간 가열 추출한 후 60°C에서 농축하고 동결 건조해 보관하였다.

#### 1.3.1. 수확 지역별 비교

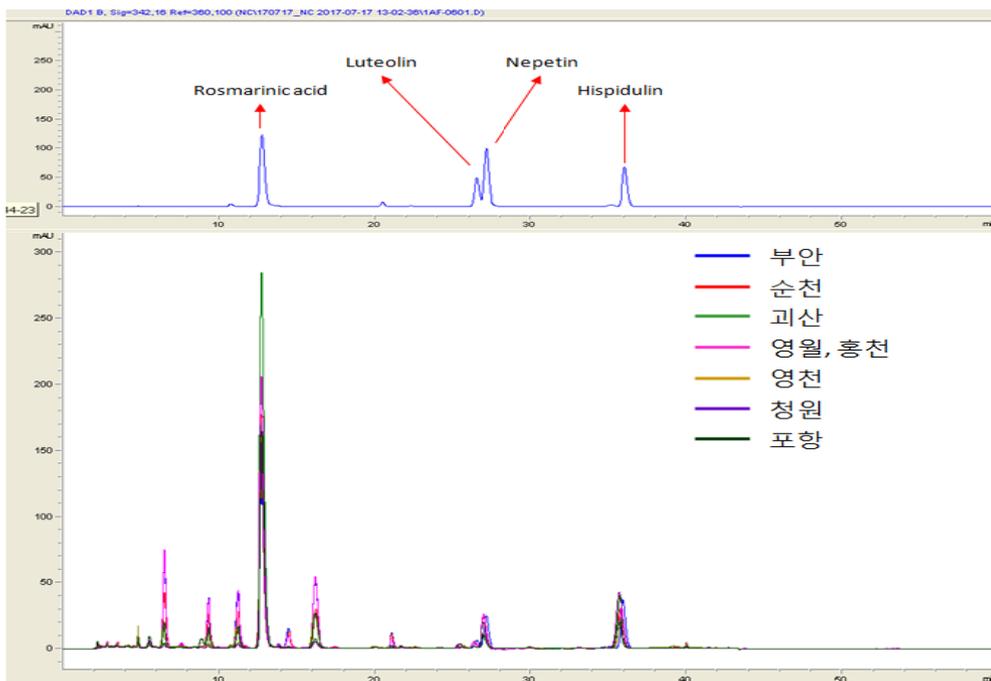


그림 86. 산지별 곶보배추 추출물의 크로마토그램 비교

2015년 11월에 수확한 산지별 곰보배추를 추출해 얻은 크로마토그램을 겹쳐서 표현하였다. 이때 분석한 rosmarinic acid, luteolin, nepetin, hispidulin 외에 공통적으로 확인되는 피크가 4개 더 있는 것으로 확인되나 Rosmarinic acid 뒤에 이어서 오는 피크는 homoplantagin인 것으로 추측된다.

표 1. 산지별 곰보배추 추출물의 지표성분 함량 비교

	추출 수율 (%)	Rosmarinic acid (mg/kg)	Luteolin (mg/kg)	Nepetin (mg/kg)	Hispidulin (mg/kg)
15.11 부안	27.7	107.29	0.37	4.69	8.49
15.11 순천	28.1	62.23	0.28	2.70	4.76
15.11 청원	24.5	63.12	0.38	4.88	9.35
15.11 흥천	31.7	62.87	0.38	2.54	4.32
15.11 괴산	29.1	41.15	0.19	0.78	1.94
15.11 영천	29.5	109.64	0.00	0.68	1.42
15.11 포항	27.6	69.85	0.00	2.35	4.37

표를 기준으로 지표성분 함량을 비교해 볼 때, 다른 지역에 비해 부안에서 수확한 곰보배추의 지표성분이 전체적으로 타지역에 비해 높은 것을 확인하였으며, 이를 바탕으로 부안산 곰보배추를 표준 곰보배추를 설정하였다.

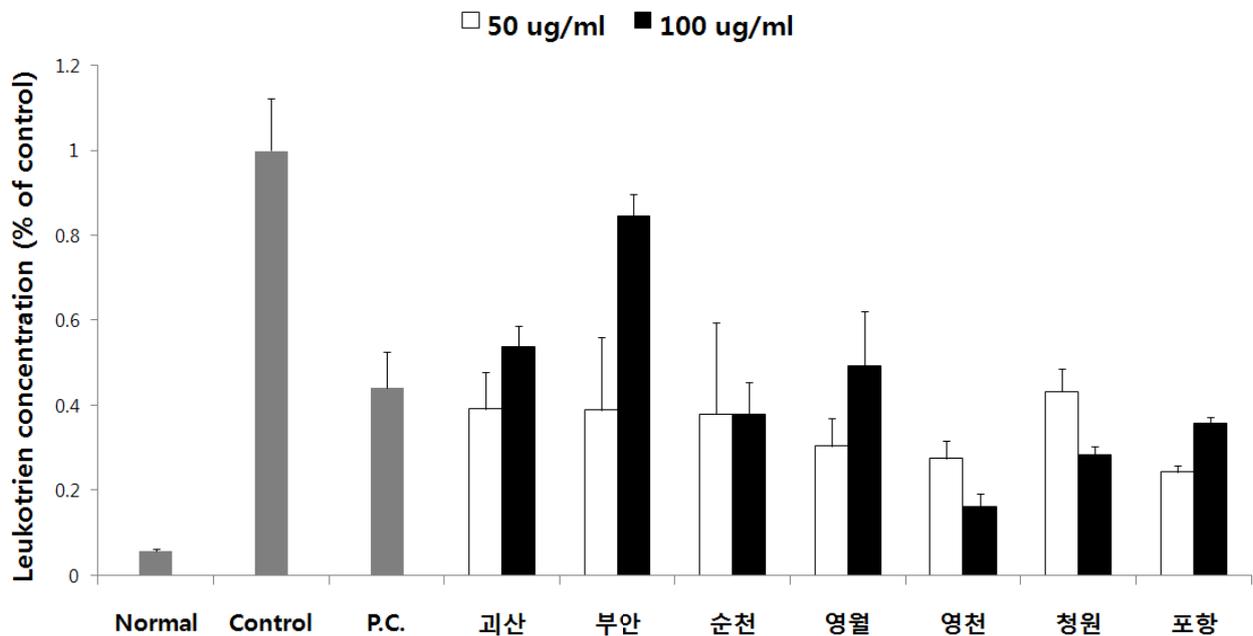


그림 87. 수확 지역별 항염증 활성 비교

곰보배추 수확지역별로 leukotriene 항염증 활성을 살펴보면 50 µg/ml에선 control 대비 57~76%의 leukotriene 생성을 보였으며, 100 µg/ml에선 16~85%의 억제력을 보여 전체적으로 leukotriene 활성이 낮아진 것을 확인할 수 있었다.

### 1.3.2. 수확 시기별 비교

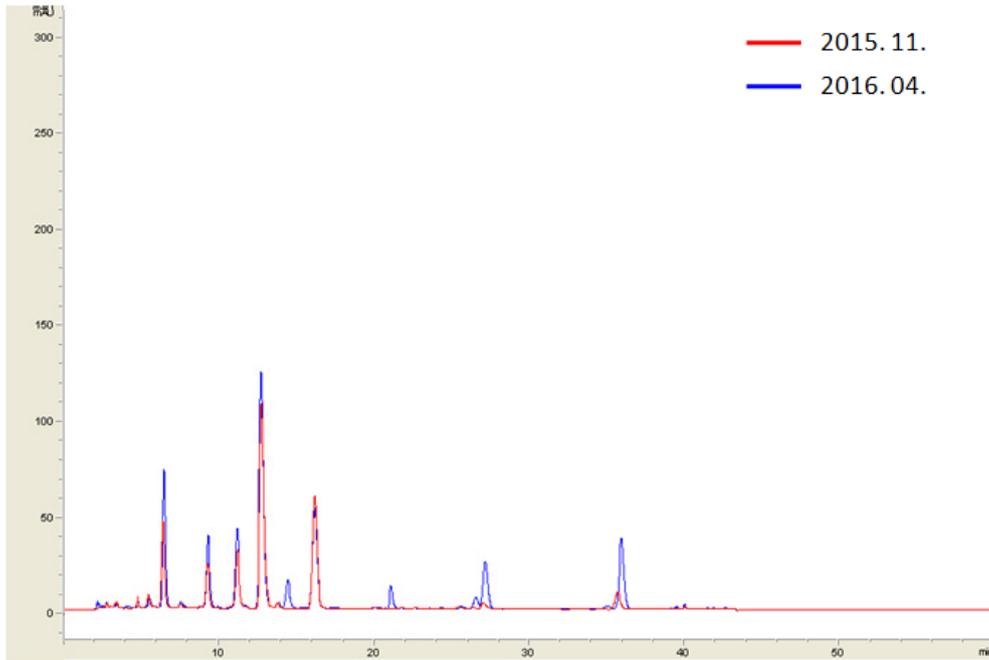


그림 88. 수확시기별 곰보배추 추출물의 크로마토그램 비교

수확시기별 곰보배추 추출물의 크로마토그램을 비교하면 역시 전체적으로 유사한 양상을 보이며 공통된 지표성분 이외의 미지의 피크가 4개 확인됨을 알 수 있었다.

표 2. 수확시기별 곰보배추 추출물의 지표성분 함량 비교

	추출 수율 (%)	Rosmarinic acid (mg/kg)	Luteolin (mg/kg)	Nepetin (mg/kg)	Hispidulin (mg/kg)
15.11 부안	27.7%	107.29	0.37	4.69	8.49
16.4 부안	31.1%	74.05	1.35	6.50	6.74

지표성분 함량을 분석해보면 그해 가을에 생산한 것은 rosmarinic acid, hispidulin의 함량이 보다 높지만 이듬해 봄에 생산한 경우 luteolin과 nepetin의 함량이 보다 높음을 알 수 있었다.

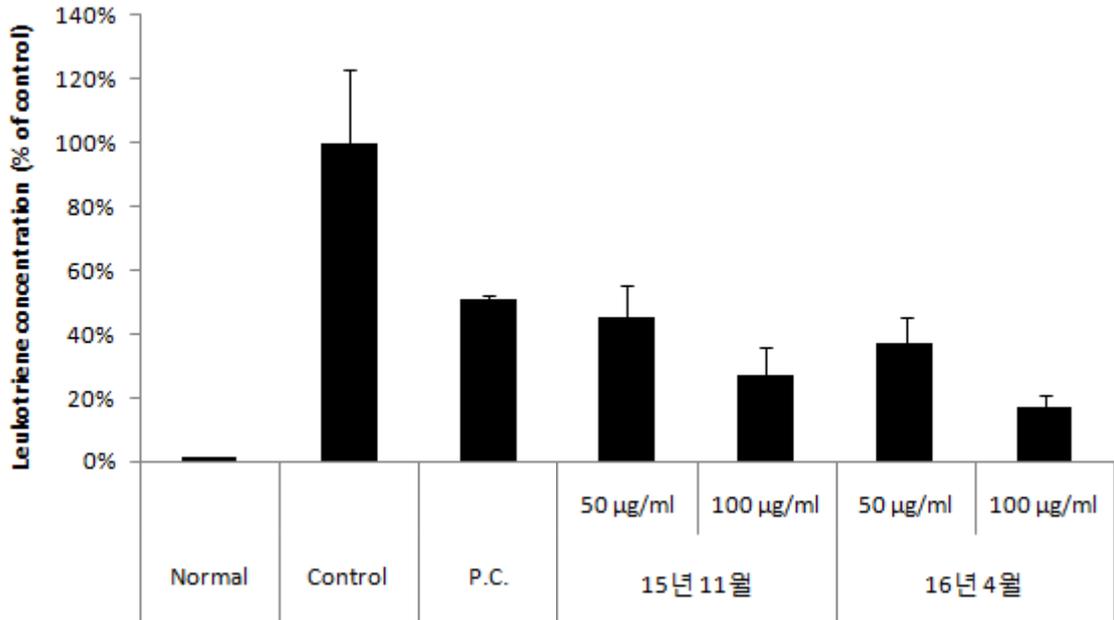


그림 89. 수확 시기별 항염증 활성 비교

수확 시기별 leukotriene 농도는 부안에서 수확한 곰보배추를 이용해 측정하였다. leukotriene는 농도 의존적으로 감소하였으며, 또한 15년 11월에 수확한 곰보배추에 비해 16년 4월에 수확한 곰보배추가 더 높은 leukotriene 억제를 보여주었다. 이를 바탕으로 그해 가을에 수확한 곰보배추에 비해 이듬해 봄에 수확한 곰보배추의 항염 활성이 뛰어나다고 유추할 수 있다.

### 3-3. 수확 연도별 비교

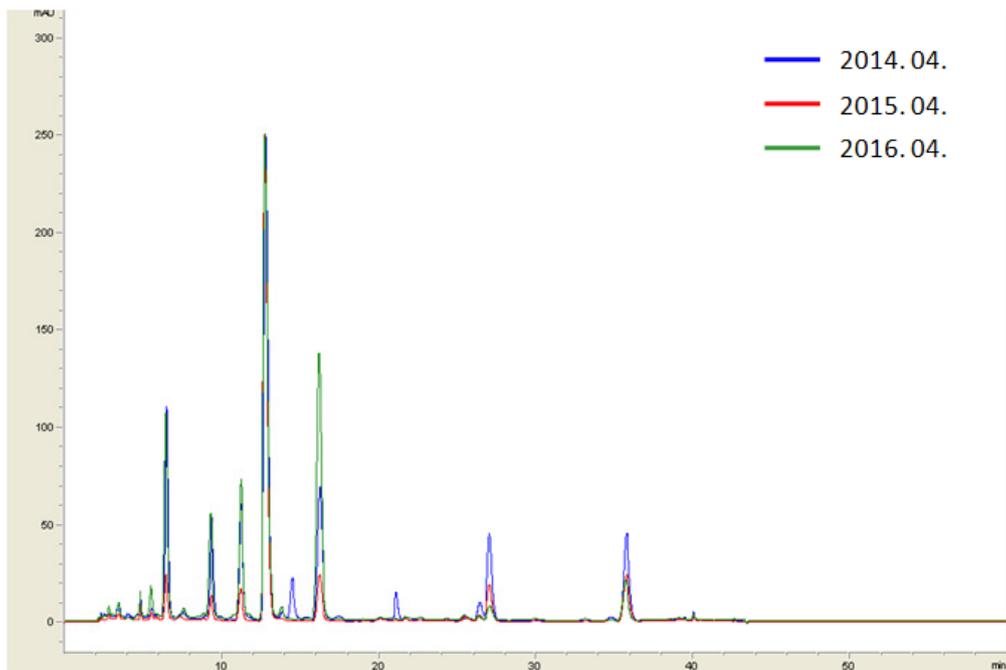


그림 90. 수확 연도별 곰보배추 추출물의 크로마토그램 비교

2014년 4월부터 2015년 4월, 2016년 4월에 수확한 곰보배추 추출물을 비교해보면 지표성분 외에 공통적으로 확인되는 피크는 총 4개가 확인된다.

표 3. 수확 연도별 곰보배추 추출물의 지표성분 함량 비교

	추출 수율 (%)	Rosmarinic acid (mg/kg)	Luteolin (mg/kg)	Nepetin (mg/kg)	Hispidulin (mg/kg)
2014.4 부안	34.35%	46.68	1.44	5.93	6.91
2015.4 부안	35.35%	66.33	1.28	6.11	6.18
2016.4 부안	31.10%	74.05	1.35	6.50	6.74

수확 연도별로 각 지표성분을 비교해 보았을 때, 비교적 최근에 수확된 곰보배추일수록 Rosmarinic acid의 함량이 높은 것을 확인할 수 있었고, luteolin, nepetin, hispidulin은 큰 차이를 보이지 않았다.

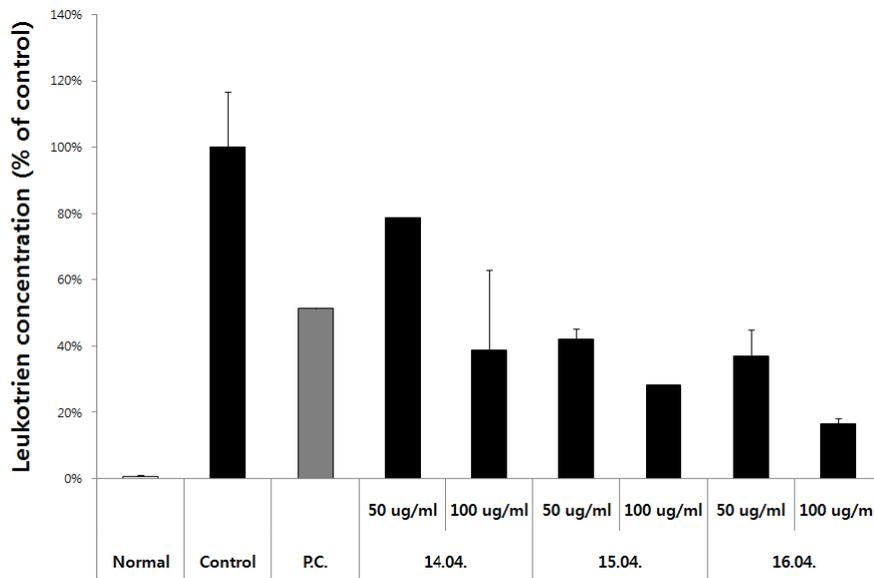


그림 91. 수확 연도별 항염증 활성 비교

수확 연도별 leukotriene 농도는 부안에서 수확한 곰보배추를 이용했으며, 50 µg/ml와 100 µg/ml에서 농도 의존적인 감소를 관찰할 수 있었으며, 14년에 수확한 곰보배추에 비해 15년 및 16년에 수확한 곰보배추가 보다 leukotriene 활성 억제에 효과적임을 확인할 수 있었다.

## 2. 홍삼에 대한 표준화

### 2.1. 외관 특성 및 관능 특성

홍삼은 긴 원주형~방추형을 띠며 전체 길이는 5~25 cm이고 주근의 지름은 5~30 mm이다. 바깥면(주근표피)의 색깔은 황갈색~적갈색을 띠고 껍은 면은 평탄하며 횡단면을 현미경으로 들여다 보면 호화된 전분이 보인다. 특이한 향 (단내와 구수한 냄새)이 있고 맛은 처음에는 약간 달고 나중에는 약간 쓰며 질은 단단하고 조직은 치밀하다 (표 14).

표 14. 홍삼의 외관 특성 및 관능 특성

지표	홍삼	백삼	
외관 특성	외관	긴 원주형~방추형	긴 원주형~방추형
	전체 길이	5-25 cm	12-20 cm
	주근 지름	5-30 mm	10-20 mm
	바깥 면 색깔	황갈색~적갈색	연황갈색~연회갈색
	껍은 면	평탄함	평탄함
	횡단면의 현미경 조사	호화(糊化)된 전분	전분립 수지도-수산칼슘 집정 및 단정
관능 특성	냄새	단내, 구수한 냄새	풀 냄새, 흙내
	맛	처음에는 약간 달고 나중에는 약간 쓴	처음에는 약간 달고 나중에는 약간 쓴
	질감	단단함	-
	조직	치밀함	치밀하지 않음

### 2.2. 주요 생리활성 물질

인삼에는 ginsenosides, polyacetylenes, phenolic compounds, sesquiterpenes, phytosterol, alkaloids, amino-sugars acidic polysaccharide 등 다양한 생리활성물질이 함유되어 있다. 수삼을 증기로 찌서 말리는 과정, 즉 홍삼 제조과정에서 수삼에 원래 함유되어 있던 성분들의 일부가 다른 화합물로 전환된다. 예를 들면 수삼에 존재하는 malonyl ginsenoside Rb1, Rb2 및 Rc는 열에 매우 불안정하여 40°C 이상의 온도에서 malonyl group이 떨어져나가면서 각각 ginsenoside Rb1, Rb2 및 Rc로 전환되며 ginsenoside Rg1, Re 및 Rb1은 일부가 가수 분해되어 ginsenoside Rh1, Rg2 및 Rg3으로 각각 전환된다. 또 홍삼을 제조하는 과정에서 폴리아세틸렌성분의 일종인 panaxytriol이 생성되는데 이 화합물은 panaxydol의 가수분해에 의하여 생성되는 것으로 추정되고 있다. 한편 수삼에 존재하는 전분은 채굴 후 저온저장 기간이 길어질수록 빠른 속도로 분해되어 maltose, glucose 등과 같은 유리당으로 전환되는데, 이들 유리당은 홍삼을 제조하는 과정에서 수삼에 존재하는 arginine과 반응하여 arginine-fructose-glucose (AFG) 및 arginine-fructose (AF) 같은 아미노-당 화합물(amino-sugars)로 전환되며 이들 화합물은 복잡한 과정을 거쳐서 홍삼의 대표적인 향산화 물질로 알려져 있는 maltol과 그 유도체

로 전환된다. Ginsenoside Rg3, panaxytriol, AFG, AF, maltol 등은 수삼이나 백삼에서는 보고된 적이 없는 홍삼 특유성분들이다.

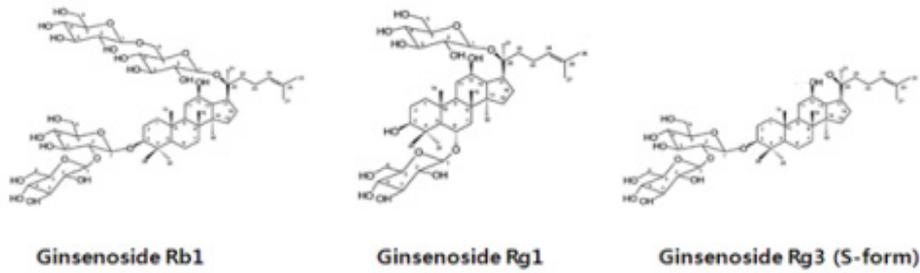
**표 15. 홍삼의 주요 생리활성물질**

화합물명	홍삼	백삼/수삼
Ginsenoside Rb1	○	○
Ginsenoside Rb2	○	○
Ginsenoside Rc	○	○
Ginsenoside Rd	○	○
Ginsenoside Re	○	○
Ginsenoside Rf	○	○
Ginsenoside Rg1	○	○
Ginsenoside Rg2	S-form & R-form	S-form
Ginsenoside Rg3	S-form & R-form	R-form
Ginsenoside Rh1	S-form & R-form	S-form
Ginsenoside Rh2	○	X
Malonylginsenosides	X	○
Panaxynol	○	○
Panaxydol	○	○
Panaxytriol	○	X
Maltol	○	X
AFG	○	X
AF	○	X
Acidic polysaccharide	+++	+

약어: AFG, arginine-fructose-glucose; AF, arginine-fructose

### 2.3. 지표물질 및 지표물질 함량

홍삼의 지표성분은 「인삼산업법」, 「European Pharmacopoeia (2010)」에 준하여 ginsenoside Rb1과 ginsenoside Rg1로 설정하였고 홍삼농축액, 홍삼농축액분말 및 홍삼농축액 분말캡슐 지표성분은 한국식품의약품안전처(Korea Food and Drug Administration; KFDA)가 개정한 「건강기능식품공전(2013)」의 홍삼 항에 준하여 이들 두 가지 지표성분 이외에 ginsenoside Rg3 (S-form)을 추가로 설정하였다.



**그림 92. 홍삼의 지표물질 구조**

홍삼농축액을 제조할 때 추출용매로 물을 사용한다. 홍삼에 물을 가하여 가열 추출하면, 추출하는 과정뿐만 아니라 장시간 농축하는 과정에서 홍삼에 존재하는 성분들의 일부가 다른 물질로 전환되는데, 대표적인 예가 ginsenoside Rg3의 생성이다.

홍삼 중의 ginsenoside Rg3 함량은 ginsenosides 총 함량의 1~2%에 불과한 반면에 홍삼 물-추출물의 ginsenoside Rg3 함량은 ginsenoside 총 함량의 30~40% 수준으로 증가한다 (표 3). 이는 홍삼에 함유되어 있는 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc 등과 같은 protopanaxadiol(PPD)계 사포닌화합물의 20번째 탄소(C-20)와 결합되어 있는 당(sugar)이 홍삼 물-추출물 제조과정에서 가수분해되어 프로사포게닌(prosapogenin) 화합물인 ginsenoside Rg3으로 전환되기 때문이다.

**표 16. 원료홍삼과 홍삼 물 추출물의 ginsenosides 함량 조성**

진세노사이드	함량 조성(%)	
	원료홍삼	홍삼 물-추출물
Ginsenoside Rb1	3.43	4.33
Ginsenoside Rb2	0.81	1.65
Ginsenoside Rc	0.99	2.30
Ginsenoside Rd	0.16	0.76
Ginsenoside Re	1.22	1.02
Ginsenoside Rf	0.85	1.20
Ginsenoside Rg1	3.44	0.80
Ginsenoside Rg2	0.10	1.63
Ginsenoside Rg3	0.06	1.74
Ginsenoside Rh1	0.10	0.73
Others	0.14	1.99
<b>Sum</b>	<b>11.30</b>	<b>18.15</b>

## 2.4. 홍삼의 위해물질

### 2.4.1. 작물보호제

한국인삼공사는 2010년부터 KOLAS(국제공인시험기관)인정 받아 운영하고 있으며 모든 분석은 KOLAS 시스템에 준하여 시행하였다. 홍삼의 잔류농약 분석은 식약처안전성기준 (2014)의 방법에 따라 분석하였으며, 105건(KOLAS 인정성분)의 분석결과 잔류농약이 검출되지 않음을 확인하였다 (표 17).

표 17 원료혼삼에 대한 위해물질(잔류농약) 분석결과

No.	Pesticide	Results	No.	Pesticide	Results
1	Aldicarb	ND	54	Methabenzthiazuron	ND
2	Amisulbrom	ND	55	Methiocarb	ND
3	Azinphos-methyl	ND	56	Methoxychlor	ND
4	Bendiocarb	ND	57	metobromuron	ND
5	Benthiavalicarb-isopropyl	ND	58	Metolahlor	ND
6	Benzoximate	ND	59	Metolcarn	ND
7	Bifenox	ND	60	Mevinphos	ND
8	Bitertanol	ND	61	Mloinate	ND
9	Bromobutide	ND	62	Nuarimol	ND
10	Chlorantraniliprole	ND	63	Ofurace	ND
11	Chlorfluazuron	ND	64	Oxadiazon	ND
12	Chromafenazide	ND	65	Oxamyl	ND
13	Cyflufenamid	ND	66	Oxaziclomefon	ND
14	Cyhalofop-butyl	ND	67	Oxyfluorfen	ND
15	Cyproconazole	ND	68	Paclobutrazole	ND
16	Diflubenzuron	ND	69	Parathion	ND
17	Dimepiperate	ND	70	Penoxazone	ND
18	Dimethenamid	ND	71	Permethrin (cis &trans)	ND
19	Dimethoate	ND	72	Phorate	ND
20	Dimethylvinphos (E,Z)	ND	73	Phosphamidon	ND
21	Dinotefuran	ND	74	Piperophos	ND
22	Dithianon	ND	75	Propoxur	ND
23	Diuron	ND	76	Prothiofos	ND
24	Emamectin benzoate	ND	77	Pyraclufos	ND
25	Esprocarb	ND	78	Pyrazopho	ND
26	Etofenprox	ND	79	Pyribenzoxims	ND
27	Fenamiphos	ND	80	Pyributicarb	ND
28	Fenoxanil	ND	81	Pyridalyl	ND
29	Fenpyroximate	ND	82	Pyrimidifen	ND
30	Ferimazone	ND	83	Pyriminobac-methyl (E,Z)	ND
31	Fipronil	ND	84	Pyriproxyfen	ND
32	Fluacryprim	ND	85	Pyriquilon	ND
33	Flubendiamide	ND	86	Quinoclamine	ND
34	Flumioxazine	ND	87	Sethoxydim	ND
35	Fluopicolide	ND	88	Silafluofen	ND
36	Forchlorfenuron	ND	89	Simazine	ND
37	Fosthiazate	ND	90	Simeconazole	ND
38	Fthalide	ND	91	Simetryn	ND
39	Furathiocarb	ND	92	Spirodiclofen	ND
40	Heptachlor (Including heptachlor-epoxide)	ND	93	Spiromesifen	ND
41	hexaflumuron	ND	94	Tebufenozide	ND
42	Hexythiazox	ND	95	Terbuthylazine	ND
43	Imazalil	ND	96	Tetradifon	ND
44	Imibenconazole	ND	97	Thiazopyr	ND
45	Indanofan	ND	98	Thiodicarb	ND
46	Indoxacarb	ND	99	Tiadinil	ND
47	Iprodione	ND	100	Tralomethrin	ND
48	Isofenphos	ND	101	Triazophos	ND
49	Isoprothiolane	ND	102	Tricyclazol	ND
50	Lufenuron	ND	103	Triflumurone	ND
51	Malathion	ND	104	Trifluralin	ND
52	Mecarbam	ND	105	Vinclozolin	ND
53	Metamifop	ND	-		ND

#### 2.4.2. 중금속

홍삼의 중금속 분석은 식약처안전성기준 (2014)의 방법에 따라 분석하였으며, 나트륨이 113.16 mg/100g, 칼슘 93.91 mg/100g, 철 9.03 mg/100g이었으며 (표 18), 납, 카드뮴, 비소 및 수은은 검출 되지 않았다 (표 19).

**표 18. 원료홍삼에 대한 금속이온(나트륨, 칼슘, 철) 분석결과**

Sample name	Test item	Unit	Result	Measurement uncertainty (Confidence level about %, $k =$ )
Korean Red Ginseng Extract Lot No. 2030-4005	Na	mg/100 g	113.16	-
	Ca	mg/100 g	93.91	-
	Fe	mg/100 g	9.03	-

**표 19. 원료홍삼에 대한 중금속(납, 카드뮴, 비소, 수은) 분석결과**

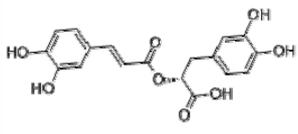
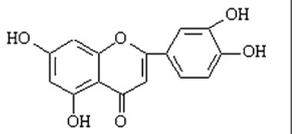
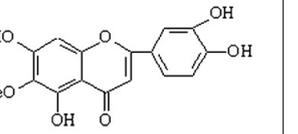
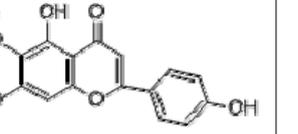
Sample name	Test item	Unit	Result	Measurement uncertainty (Confidence level about %, $k =$ )
Korean Red Ginseng Extract Lot No. 2030-4005	Pb	mg/100 g	ND	-
	Cd	mg/100 g	ND	-
	As	mg/100 g	ND	-
	Hg	mg/100 g	ND	-

Abberviation: ND, Not detected.

### 3. 지표물질 분석법 확립

#### 3.1. 곶보배추의 지표성분 분석법 확립

##### 3.1.1. 지표 성분

			
Rosmarinic acid	Luteolin	Nepetin	Hispidulin

지표성분을 설정하기 위하여 곶보배추의 성분 4종을 이용하여 분석법을 확립하였으나, 그 중 Nepetin 성분이 in vitro 실험에서 더 높은 활성을 보이는 활성성분임을 확인하여 지표성분으로 확정하였음

##### 3.1.2. 분석방법

###### 3.1.2.1 추출 및 전처리

- 시료(약 0.1 g)에 50 % 메탄올 용액 20 mL 첨가
  - \* 용해도 : 50 % MeOH 수용액  $\geq$  100 % 수용액 > 100 % MeOH
- 30분간 초음파 처리
- 0.45  $\mu$ m syringe filter를 이용하여 여과
- LC 분석

###### 3.1.2.2. 표준용액 조제

- Stock solution : 메탄올 제조
- Working solution : 50 % 메탄올 제조
- 검량선 범위
  - Rosmarinic acid : (50 ~ 800)  $\mu$ g/mL
  - Luteolin : (5 ~ 80)  $\mu$ g/mL
  - Nepetin : (5 ~ 80)  $\mu$ g/mL
  - Hispidulin : (5 ~ 80)  $\mu$ g/mL
- 유효기간 : 냉장보관 1년

###### 3.1.2.3. LC 분석조건

- 컬럼 : Agilent, Zorbax Eclipse XDB C18, 5 $\mu$ m, 250 mm x 4.6 mm
- Column Temperature : 30  $^{\circ}$ C
- Injection Volume : 10  $\mu$ L
- Detector : PDA 342 nm(정량)
- Eluent : gradient
  - A - 0.5 % Acetic acid in H<sub>2</sub>O
  - B - 0.5 % Acetic acid in MeOH

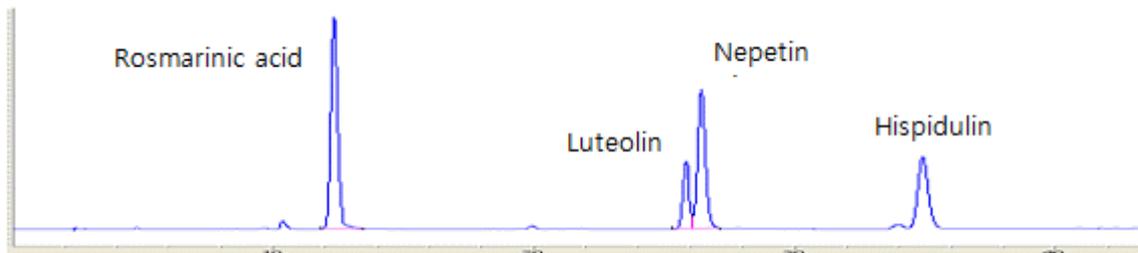
Time (min)	유속 (ml/min)	A (%)	B (%)
0	1.0	62	38
14.0	1.0	58	42
17.0	1.0	55	45
17.1	1.0	52	48
32.0	1.0	50	50
40.0	1.0	15	85
45.0	1.0	62	38

### 3.1.3. 분석 유효화 데이터

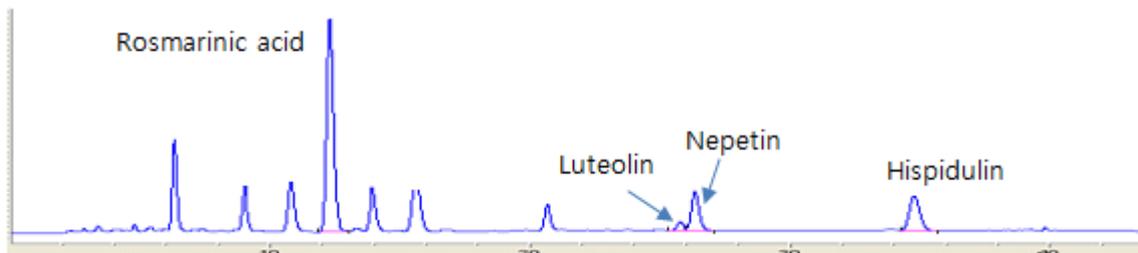
Compound	검량선 (R <sup>2</sup> )	회수율 (%)	RSD (%)	정량한계 (µg/mL)
Rosmarinic acid	0.9998	108	4.1	-
Luteolin	1.0000	99	3.4	-
Nepetin	1.0000	105	4.7	-
Hispidulin	0.9999	97	9.1	-

### 3.1.4. 크로마토그램

Standard(342 nm)

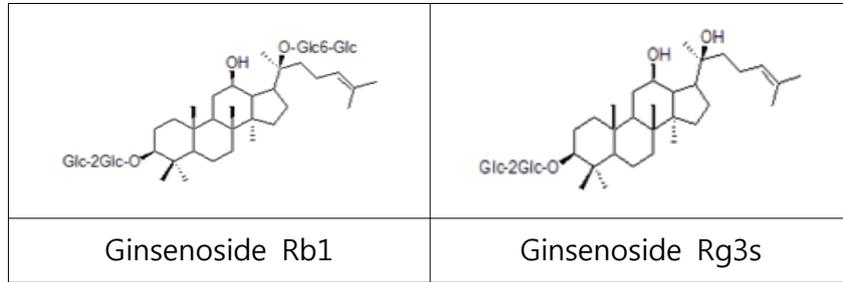


Sample(342 nm)



### 3.2. 홍삼의 지표성분 분석법 확립

#### 3.2.1. 지표 성분



- 홍삼은 일반적으로 ginsenoside Rg1, Rb1, Rg3s의 합으로 지표성분의 함량을 측정하며, 그 분석법이 자체적으로 확립되어 있다. 곰보배추 홍삼 복합분말 분석 결과 곰보배추의 성분과 ginsenoside Rg1의 겹침으로 인하여 Rg1의 정량이 불가능 하였으며, 원료 및 인체적용시험용 시료의 지속적인 안정성 연구를 진행하기 위하여 ginsenoside Rb1과 Rg3s의 합으로 지표함량을 설정을 하였다.

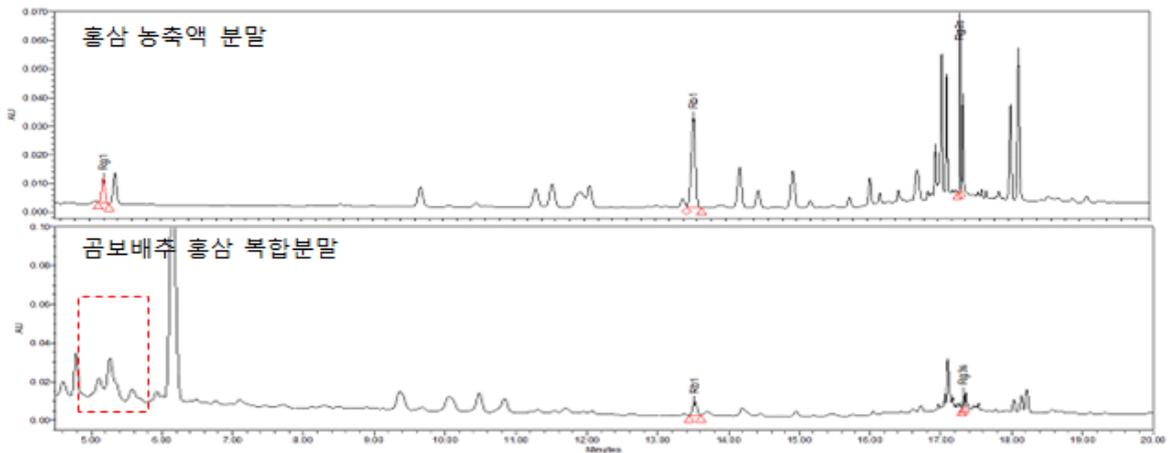


그림 93. 홍삼 농축액 분말 및 곰보배추 홍삼 복합 분말의 ginsenoside 분석 비교

- Ginsenoside Rg1의 안정성을 모니터링하기 위해 장기보존 4개월 시료들의 MS 분석을 통해 함량의 변화가 없음을 확인하였으며, 이로써 ginsenoside Rb1과 Rg3s의 합으로 지표함량 설정 및 안정성 연구 진행이 가능 할 것으로 사료된다.

	(mg/g)	
	Rg1 (측정량)	Rg1 (이론량)
복합분말 Lot. 1 (실온4개월)	0.359	0.33
복합분말 Lot. 1 (실온4개월)	0.343	
복합분말 Lot. 1 (실온4개월)	0.344	
임상 타블렛 고용량 (실온4개월)	0.209	0.15
임상 타블렛 저용량 (실온4개월)	0.298	0.30

그림 94. 장기보존 4개월 시료의 MS 분석 정량 결과 및 이론량 비교 분석

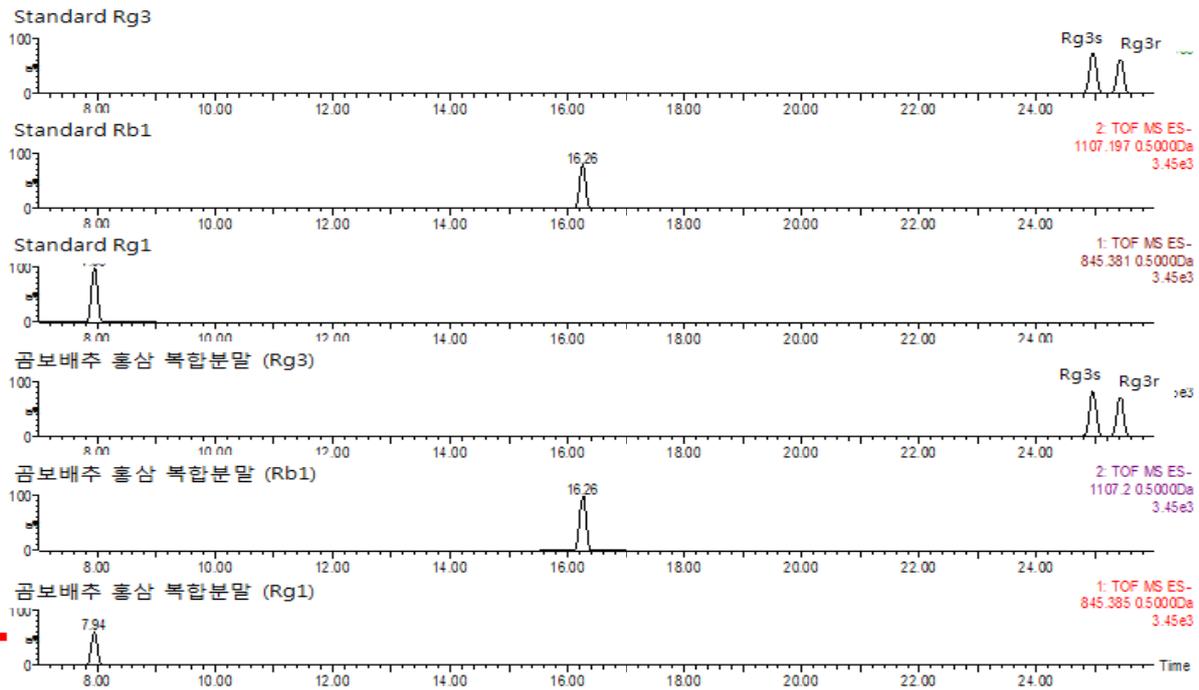


그림 95. ginsenoside standard와 장기보존 4개월 시료의 MS 분석 결과

### 3.2.2. 분석방법

#### 3.2.2.1. 추출 및 전처리

- 시료(약 1 g)를 50 ml 용량플라스크에 넣고 DW 45ml 첨가
- 30분간 초음파 처리
- DW 정용
- 0.2 μm syringe filter를 이용하여 여과
- UPLC/PDA 분석

#### 3.2.2.2. 표준용액 조제

- Ginsenoside 표준물질 : Ginsenoside 표준물질은 각각 순도가 보정된 RM의 사용을 권장한다. (Chromadex(USA)에서 구입 후 사용하였음)
- 정량시험용 표준용액 : 위 표준물질을 적당량취하여 10 mL 용량플라스크에 취한 후 메탄올로 정용하여 사용하였다.
- 표준물질 종류 : Ginsenoside Rg1, Ginsenoside Rb1, Ginsenoside Rg3(s)
- 기준규격의 적합사항을 판정하는 경우 : 해당제품의 기준규격의 115 %의 농도에 해당하는 표준용액을 조제한다.
- Multi point calibration을 해야 하는 경우 적당한 농도로 표준용액을 조제, 사용

### 3.2.2.3. LC 분석조건

- Column : Acquity BEH C18 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm
- Column Temperature : 40 °C
- Injection Volume : 2 uL
- Detector : UV 203 nm
- Eluent : gradient
- 용매 조건 : A; 증류수, B; 아세토니트릴

Time (min)	A (%)	B (%)
0	85	15
0.5	85	15
14.5	70	30
15.5	68	32
16.5	60	40
17.0	45	55
21.0	10	90
25.0	85	15
27.0	85	15

### 3.2.3. 시험용액 중 Ginsenoside 함량 분석

- 시험용액을 분석 장비에 주입하여 분석 조건으로 분석하고 각 성분의 피크 면적을 얻는다.
- 따로 정량시험용 표준용액을 동일 방법으로 주입하여 분석하고 각 성분의 피크 면적을 얻는다.

### 3.2.4. 시료 중 Ginsenoside 함량 계산

- 검량선을 이용하여 시료에 함유되어 있는 Ginsenoside를 다음 식에 준하여 계산하며 시료의 Ginsenoside 함량을 mg/g으로 표시한다.

$$U_{\text{UPLC}} \times \frac{S_{\text{Solvent}}}{W_{\text{Weight}}} \times \frac{1}{1000} \quad [\text{Ginsenoside의 함량계산식}]$$

$U_{\text{UPLC}}$  : 시료 중 Ginsenoside의 기기 검출량 (μg/mL)

$S_{\text{Solvent}}$  : 추출량 (mL)

$W_{\text{Weight}}$  : 정량시험에 사용한 시료의 양(g)

라. 제조공정 최적화 연구

1. 원료의 제조 공정

곰보배추 홍삼타블렛 생산에 필요한 2가지 원료인 곰보배추 추출분말 및 홍삼농축액분말의 제조공정을 Figure 96 ~ 99에 도식화하였다.

1.1. 곰보배추 추출분말 제조방법

규격에 적합한 원료 곰보배추를 준비하여 추출기에 투입하고, 원료량 대비 15배수 30% 발효 주정을 계량하여 투입한다. 추출온도 80℃에서 4시간 2회 추출한 후 혼합하여 고형분 약 40% 이상으로 농축한다. 후살균 후 분무건조기를 이용하여 건조하고 곰보배추 추출분말 원료로 사용한다.

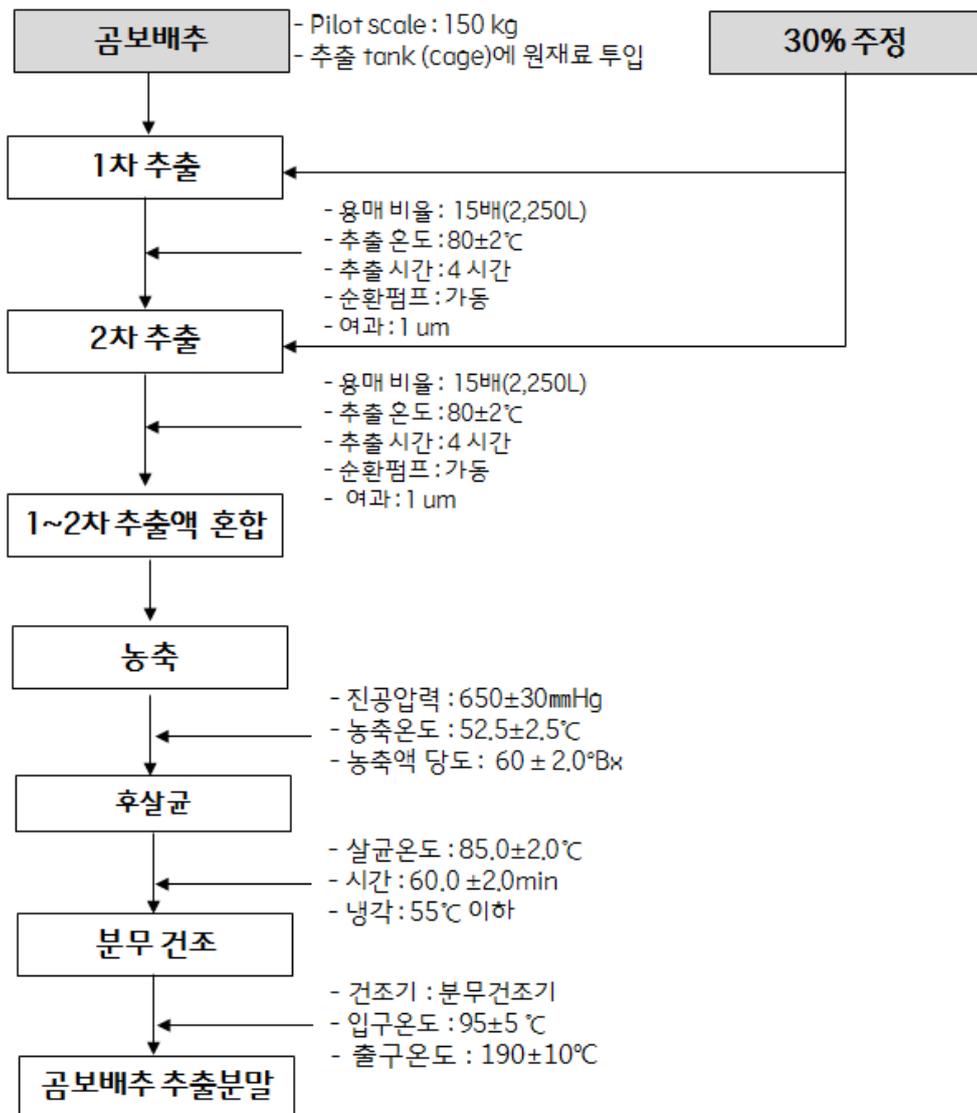


그림 96. 곰보배추 추출분말 제조공정도

## 1.2. 홍삼 제조 방법

규격에 적합한 원료 홍삼농축액의 제조를 위한 홍삼의 제조 방법은 그림 97과 같다.

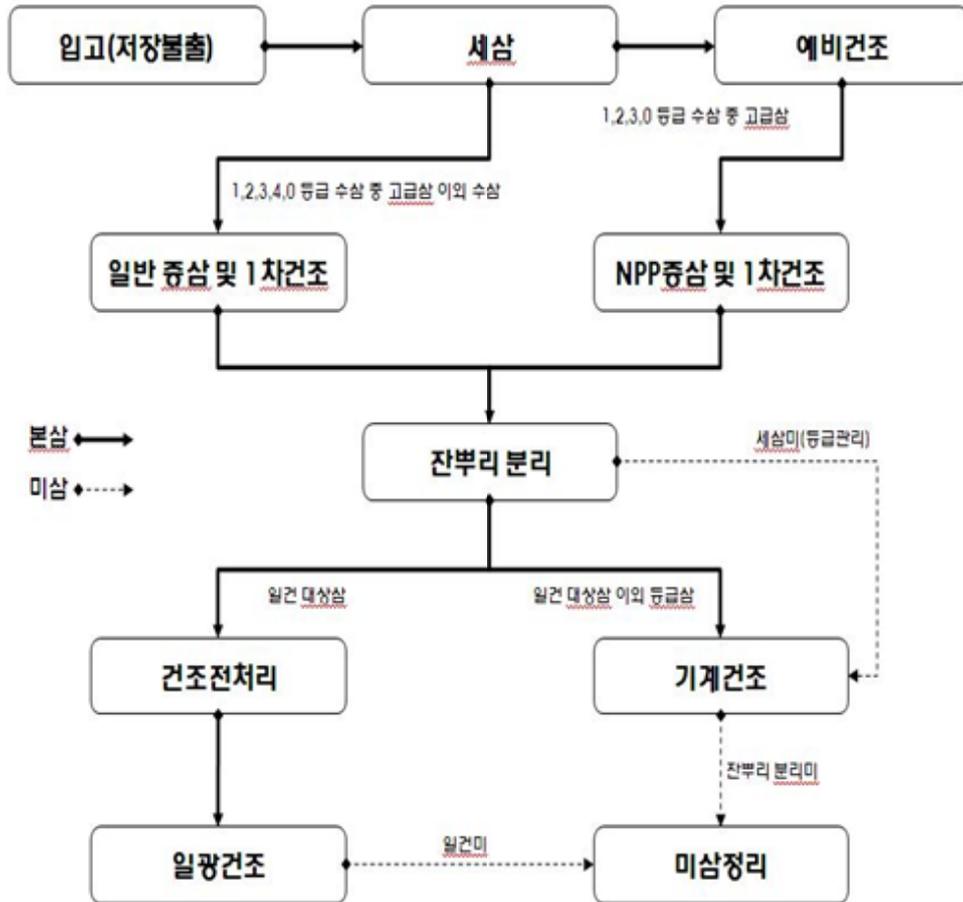


그림 97. 홍삼 제조공정도

### 1.3. 홍삼농축액 제조방법

규격에 적합한 원료 홍삼농축액 분말의 제조를 위한 홍삼 농축액 제조 방법은 그림 98과 같다.

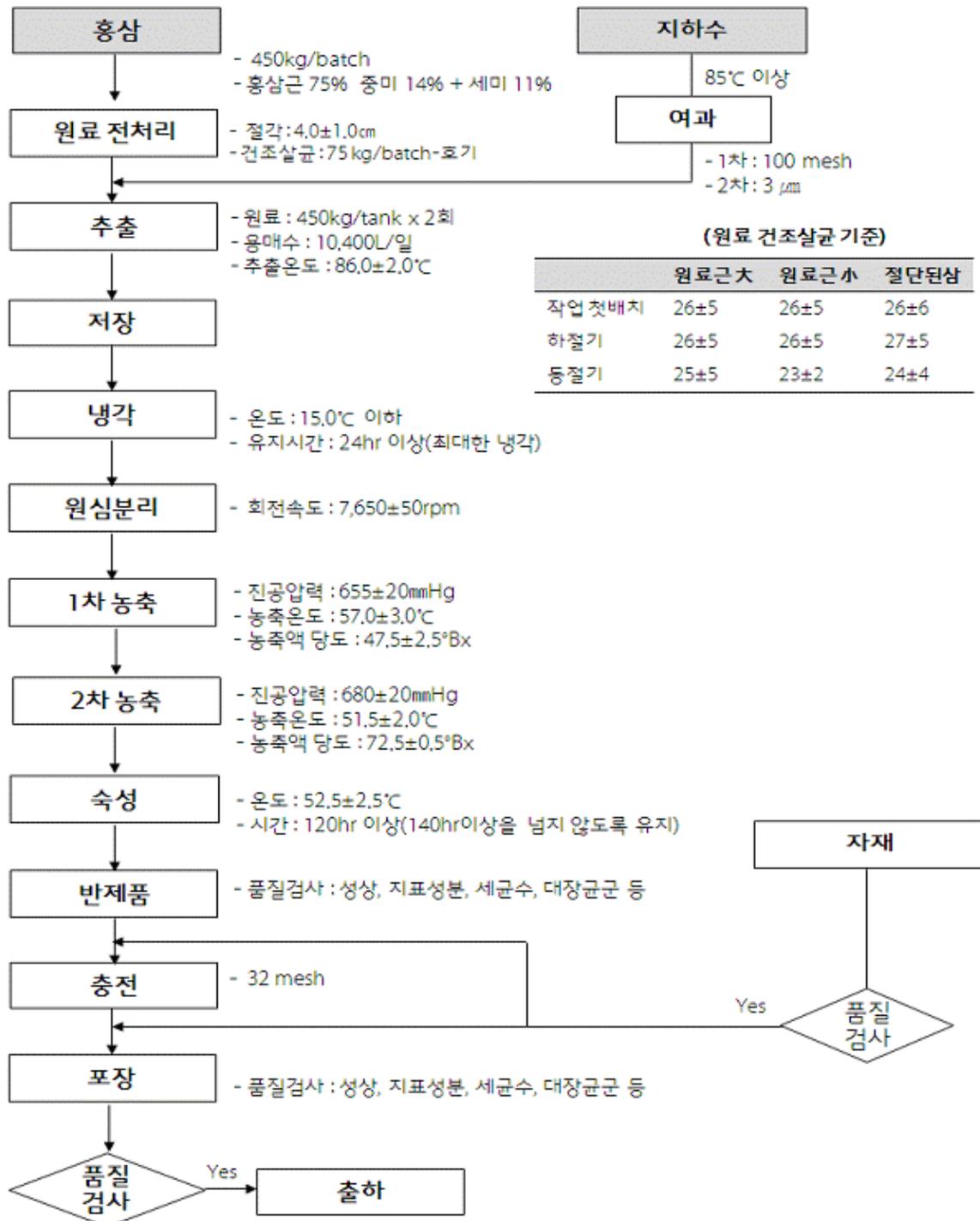


그림 98. 홍삼농축액 제조공정도

### 1.4. 홍삼농축액분말 제조방법

규격에 적합한 원료 홍삼농축액 분말의 제조 방법은 그림 99.와 같다.

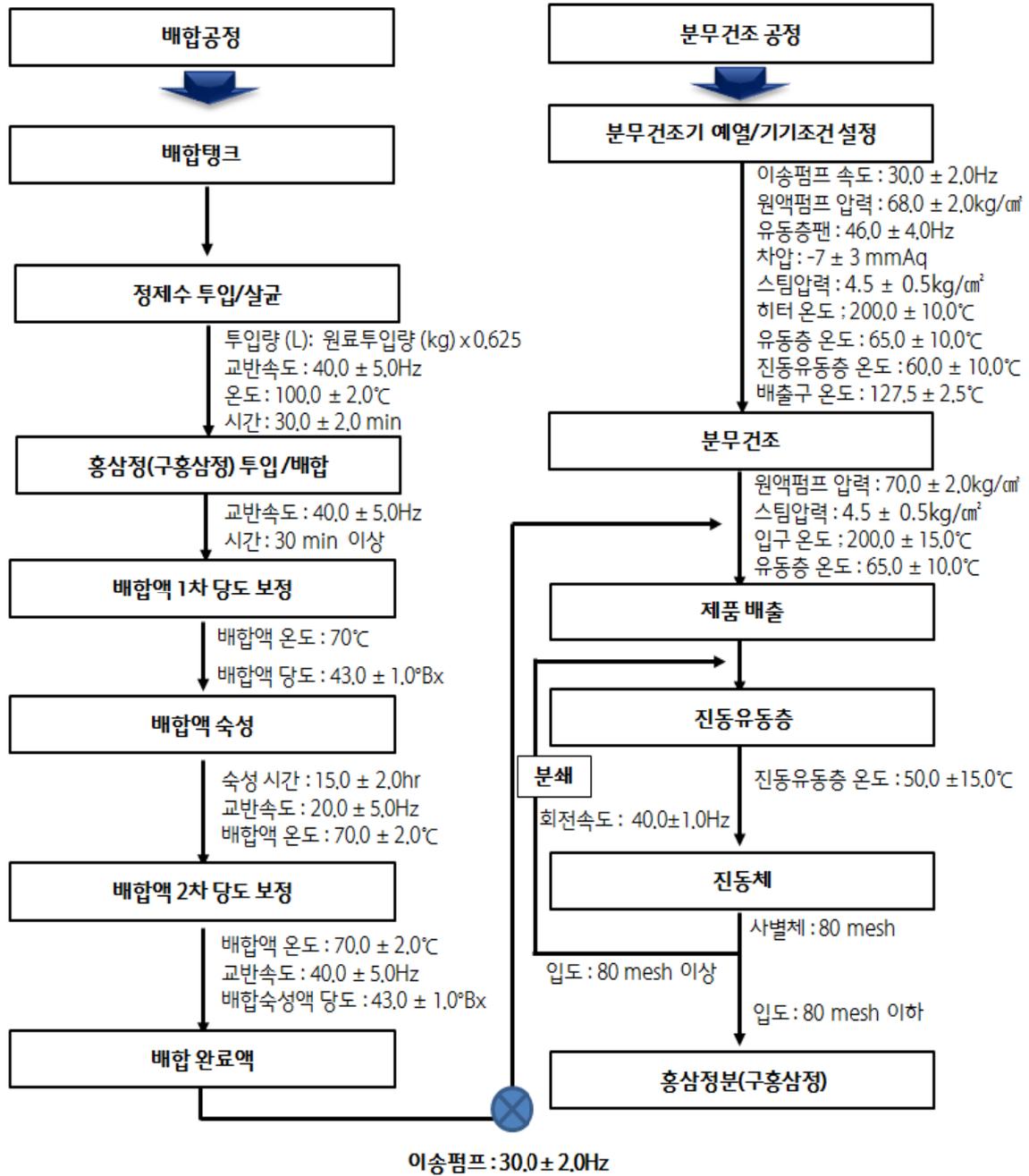


그림 99. 홍삼농축액분말 제조공정도

## 2. 곰보배추 홍삼 복합물 제조 공정

### 2.1. 곰보배추 홍삼 복합물 제조 방법

곰보배추와 홍삼의 복합물 제조 방법은 그림 100과 같다.

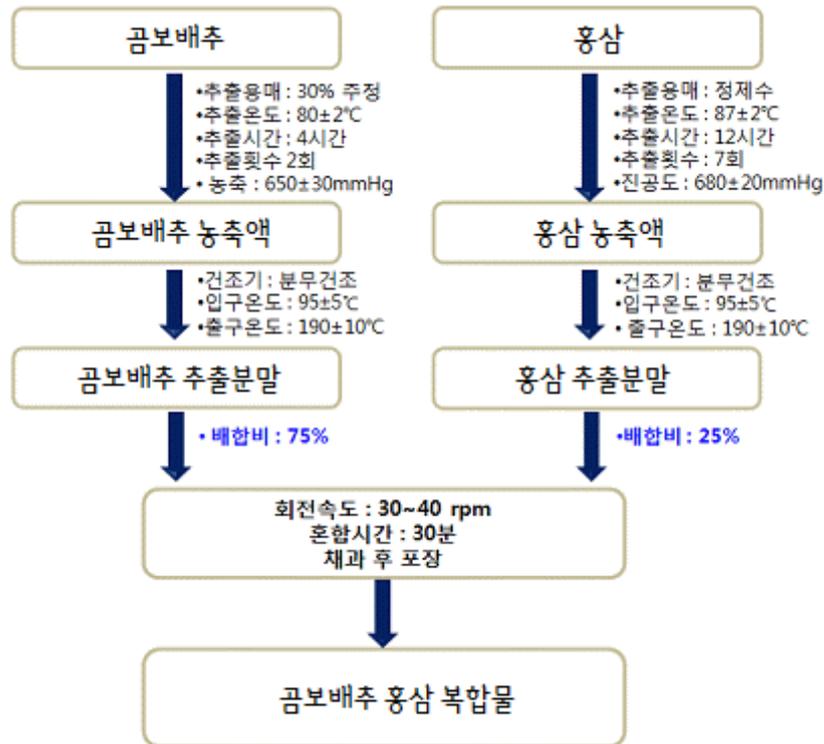


그림 100. 곰보배추 홍삼 복합물 제조공정도

## 3. 인체적용시험 타블렛 제조 공정

### 3-1. 곰보배추 홍삼 타블렛 제조방법

곰보배추 홍삼 복합물 분말 및 부원료의 무게를 칭량하고 무게대비 15%의 주정을 혼합하여 스피드 믹서에서 10분간 1,500rpm으로 혼합하였다. 혼합 후 캐비닛 건조기에서 건조 온도 50°C로 수분 5% 이하가 될 때까지 건조하였고, 건조가 완료되면 30호체로 정립하였다. 혼합된 원료는 타정기(KTM-36)를 이용하여 타정하였으며, 타정속도는 25rpm을 유지하였다. 타정된 제품은 하이드록시프로메틸셀룰로오스를 정제수와 발효주정에 녹인 후 60°C의 온도에서 코팅 후 40°C에서 20분간 건조 하였다. 코팅이 완료된 정제에 대하여 코팅불량 정제 및 깨진 정제를 선별하여 흡습을 방지한 조건에서 알루미늄 및 PVDC로 이중 포장을 실시하였다. 제조공정은 그림 101에 도식화하였다.

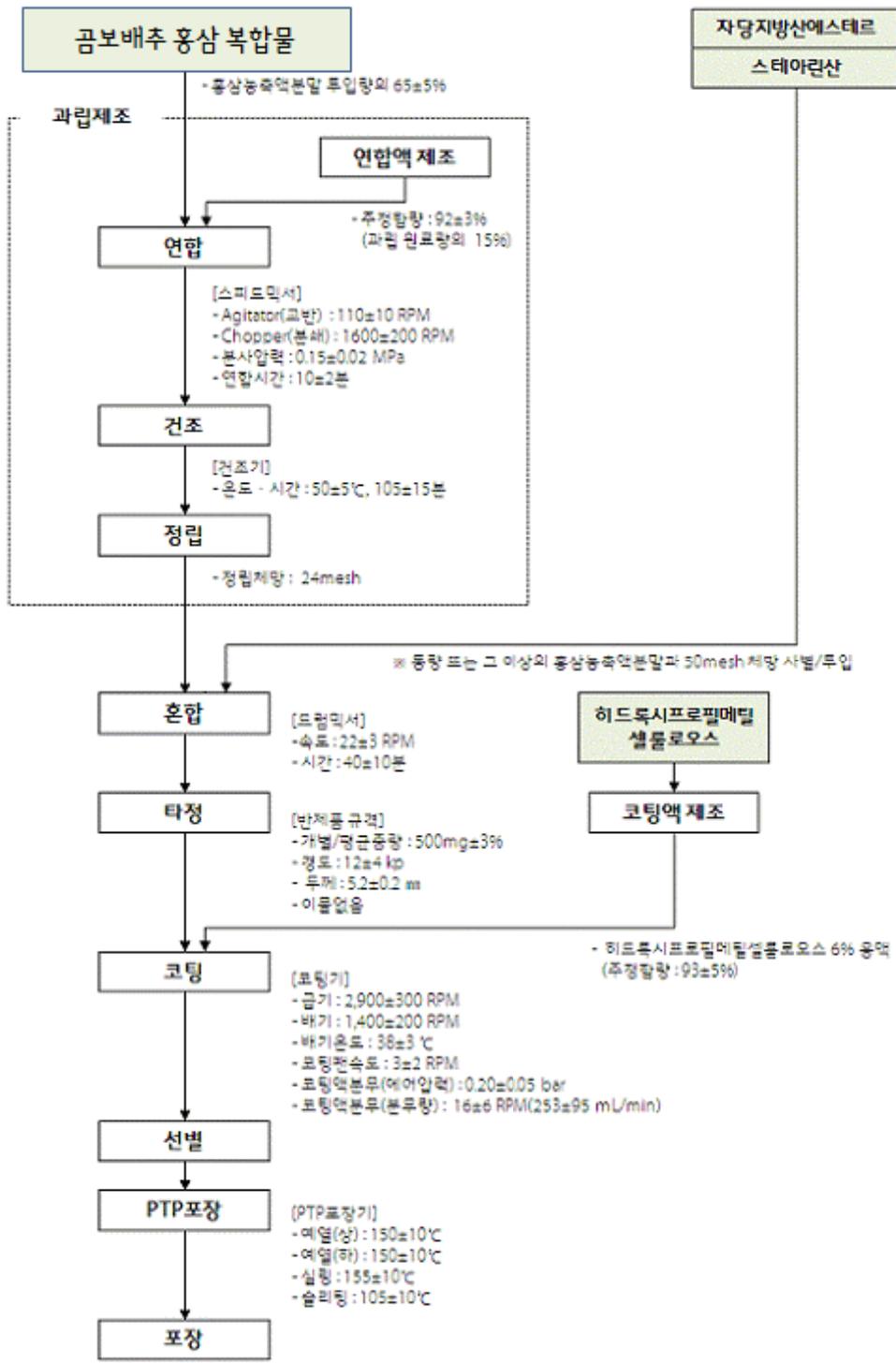


그림 101. 곰보배추 홍삼타블렛 제조공정도

#### 4. 원료 및 제품의 기준규격

##### 4.1. 곶보배추 원료 기준

###### 4.1.1. 원료 명칭

원료명	규격	비고
곶보배추	별첨	학명 : <i>Salvia plebeia</i>

###### 4.1.2. 곶보배추 농축액분말 기준규격

성상	갈색의 분말로 이미, 이취가 없어야 함.
지표성분 함량	Nepetin = 6.0 ± 1.8 mg/g
중금속	납(mg/kg) 1.0 이하
	비소(mg/kg) 1.0 이하
	카드뮴(mg/kg) 0.3 이하
	수은(mg/kg) 0.3 이하
세균수	1g 당 1,000 cfu 이하
대장균군	음성

#### 4.2. 수삼 원료 기준

##### 4.2.1. 원료 명칭

원료명	규격	비고
수삼(6년근)	별첨	학명:Panax Ginseng C.A. Meyer

##### 4.2.2. 외관 및 성상

구분	1 등	2 등	3 등	등외	
① 체형	머리	몸통과 균형을 이룬 머리가 있는 것	몸통과 균형을 이룬 머리가 있는 것	몸통과 균형을 이룬 머리가 있는 것	제한없음
	몸통 및 다리	몸통이 부분적으로 비대하거나 굴곡이 심하지 아니한 것	몸통이 부분적으로 비대하거나 굴곡이 심하지 아니한 것	몸통이 부분적으로 비대하거나 굴곡이 심하지 아니한 것	제한없음
		몸통의 길이가 6 cm 이상이고 5 cm 이상의 다리가 2 개 이상인 것이나 몸통의 길이가 10 cm 이상이고 직립형인 것. 다만 몸통 지름이 몸통길이의 2/5 이하이어야 한다.	몸통의 길이가 4 cm 이상이고 3 cm 이상의 다리가 2 개 이상인 것이나 몸통의 길이가 8 cm 이상이고 직립형인 것. 다만 몸통 지름이 몸통길이의 1/2 이하이어야 한다.	몸통의 길이가 3 cm 이상이고 몸통과 균형을 이룬 다리가 있는 것이나 몸통의 길이가 5 cm 이상이고 직립형인 것. 다만 무게가 50 g 이상인 체형 불량삼을 포함한다.	제한없음
② 내용 조직	치밀하고 탄력성 있는 것	치밀하고 탄력성 있는 것	치밀하고 탄력성 있는 것	제한없음	
③ 색택 및 표피	부패부위가 없는 것	부패부위가 없는 것	부패부위가 없는 것	부패부위가 없는 것	
	미황색, 미황백색인 것	미황색, 미황백색인 것	미황색, 미황백색인 것		
	윤활하고 균열이 없는 것	윤활하고 균열이 없는 것	윤활하고 균열이 약간 있는 것		
④ 개체당중량	75g 이상	40g 이상	30g 이상	제한없음	
⑤ 피해삼 허용 범위	썩은삼, 은피삼 및 주름삼이 아닌 것	썩은삼, 은피삼 및 주름삼이 아닌 것	썩은삼, 은피삼 및 주름삼이 아닌 것	좌동	
	.얇은 적변이나 치유된 흔	.얇은 적변이나 치유된 흔	.얇은 적변이나 치유된 흔적		

	적이 몸통면적의 20%이하인 것 머리 및 다리부분의 손상이 각각 10% 및 30% 이하인 것 부패성이 아닌 병반점이 전체 표면적의 5% 이하인 것	적이 몸통면적의 20%이하인 것 머리 및 다리부분의 손상이 각각 10% 및 30% 이하인 것 부패성이 아닌 병반점이 전체 표면적의 5% 이하인 것	이 몸통면적의 20%이하인 것 머리 및 다리부분의 손상이 각각 10% 및 30% 이하인 것 부패성이 아닌 병반점이 전체 표면적의 5% 이하인 것 적변삼 중 표피가 콜크화된 것 외에 무게가 50g 이상인 것은 포함된다.
⑥혼품 허용정도(포장단위 기준)	2 등 해당품위 개체가 5% 이내 일 것	3 등 해당품위 개체가 5% 이내 일 것	등외 해당품위 개체가 5% 이내 일 것

[근기] : 수삼 품질검사 기준(2014년도, 원료사업실)

#### 4.2.3. 그 외의 외관 기준

	항목	기준·규격	비고
1	토사 함유율	0.95% 미만	자체규격
2	줄기 자름(절경)	1cm 미만	자체규격
3	등급 착오율	1 개 등급 착오 10% 미만	자체규격

[근기] : 수삼 품질검사 기준(2014년도, 원료사업실)

#### 4.2.4. 농약 잔류 허용기준

(단위 : ppm)

	성분명	기준		성분명	기준
1	DDT(p,p'-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE의 합)	0.01	36	Buprofezin	0.07
2	Metalaxyl	0.5	37	Cyhalothrin(이성질체의 합)	0.05
3	BHC( $\alpha$ , $\beta$ 및 $\delta$ -BHC의 합)	0.01	38	Flusilazole	0.07
4	Aldrin & Dieldrin(Aldrin 과 Dieldrin의 합)	0.01	39	Prochloraz(Prochloraz와 2,4,6-trichlorophenol 기를 포함하고 있는 대사산물의 합)	0.3
5	Endrin(Endrin과 $\delta$ -keto-endrin의 합)	0.01	40	Dithianon	0.2
6	Carbendazim(Benomyl, carbendazim 및 thiophanate-methyl)	0.2	41	Cymoxanil*	0.2
7	Quintozene(quintozene, pentachloroaniline and methyl pentachlorophenyl sulfate의 합계)	0.1	42	Clothianidin	0.2
8	Diethofencarb	0.3	43	Thiamethoxam	0.1
9	Difenoconazole	0.5	44	Ethaboxam	0.2
10	Cypermethrin(이성질체의 합)	0.1	45	Cyfluthrin(이성질체의 합)	0.1
11	Azoxystrobin	0.1	46	Fluazinam	0.7
12	Tolyfluanid	0.20	47	Tebuconazole	0.5
13	Tolclofos-Methyl	1.0	48	Mandipropamid	0.1
14	Iminoctadine	0.1	49	Methoxyfenozide	0.2
15	Pyrimethanil	1.0	50	Metconazole	1.0
16	Fenhexamid	0.3	51	Bifenthrin	0.5
17	Cyazofamid	0.3	52	Sethoxydim	0.05
18	Cyprodinil	2.0	53	Emamectin benzoate(Emamectin benzoate B1a와 emamectin benzoate B1b의 합)	0.05
19	Kresoxim-methyl	0.2	54	Etridiazole	3.0
20	(Ethylenebis(dithiocarbamate)s)* Dithiocarbamate계 농약들의 합	0.3	55	Thiacloprid	0.1

21	Cadusafos*	0.05	56	Propamocarb	0.5
22	Pencycuron*	0.7	57	Hexaconazole	0.5
23	Fludioxonil	0.5	58	Fluopicolide	0.1
24	Carbosulfan(Carbofuran,3-hydroxycarbofuran의 합)	0.1	59	Triflumizole	0.1
25	Thifluzamide*	1.0	60	Fosetyl-aluminium	2.0
26	Flutolanil*	1.0	61	Simeconazole	0.7
27	Tebupirimfos*	0.01	62	Amisulbrom	0.3
28	Trifloxystrobin	0.1	63	Acetamiprid	0.1
29	Boscalid	0.3	64	Chlorfenapyr	0.1
30	Dimethomorph*(Dimethomorph ((E), (Z)형태의 합)	3.0	65	Dinotefuran	0.05
31	Chlorothalonil*	0.1	66	Carbofuran(Carbofuran 과 3-hydroxycarbofuran 의 합)	0.03
32	Tefluthrin*	0.1	67	Clethodim*(Clethodim, 5-(2-ethylthiopropyl)cyclohexene-3-one 기를 포함하고 있는 대사산물, 5-(2-ethylthiopropyl)-5-hydroxycyclohexene-3-one 기를 포함하고 있는 대사산물 및 각각의 sulfoxide, sulfone 형태의 합)	0.05
33	Fluquinconazole*	0.2	68	Iprovalicarb	0.1
34	Pyraclostrobin	2.0	69	Lindane(γ-BHC)	0.01
35	Amitraz(아미트라즈와 (2,4-Dimethylphenyl)-N'-methylformamidine 의 합)	0.05	기타	Procymidone	0.2

[근기] : 식품위생법(인삼의 농약 잔류 허용 기준)

### 4.3. 홍삼의 원료 기준

#### 4.3.1. 품질 규격

항목		규격	비고								
1	수분(%)	14.0 이하	인삼산업법 기준 : 15.0 이하								
2	회분(%)	5.0이하(미삼의 경우에는 6.0이하일 것)									
3	농약잔류 허용기준 <sup>1)</sup>	농산물품질관리법」 및 「식품위생법」에 따른 인삼의 농약잔류 허용기준에 의할 것	(별지 규격)								
4	중금속(ppm) <sup>2)</sup>	<table border="1"> <tr> <td>Pb</td> <td>As</td> <td>Hg</td> <td>Cd</td> </tr> <tr> <td>2.0이하</td> <td>3.0이하</td> <td>0.2이하</td> <td>0.2이하</td> </tr> </table>	Pb	As	Hg	Cd	2.0이하	3.0이하	0.2이하	0.2이하	「식품위생법」과 「약사법」에 따른 인삼의 중금속 기준 중 중한 기준에 의할 것
Pb	As	Hg	Cd								
2.0이하	3.0이하	0.2이하	0.2이하								
5	이물	인삼류는 원료의 처리과정에서 세척 등으로 제거 가능한 이물과 제조과정에서 오염된 비위생적인 이물을 함유하지 아니할 것									
6	보존료, 인공색소및표백제	검출되지 아니할 것									
7	세균수(cfu/g)	50,000이하	진공포장 한 제품은 3,000이하								
8	대장균군	음성일 것									
9	내용량	표시량 이상일 것									
10	인삼 성분	n-부탄올 추출물 (조사포닌)의 함량(%)	본삼류 2.0이상 대미,중미류, 분쇄인삼 3.0이상 세미류 5.0이상								
		뮌에탄올 추출물의 함량(%)	18.0이상								
11	진세노사이드 함량(mg/g)	Rg1: 0.10이상, Rb1: 0.20이상									

#### 4.3.2. 농약잔류 허용기준(mg/kg)

	성분명	기준		성분명	기준
1	DDT(ppp-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE의 합)	0.05	36	Buprofezin	0.56
2	Metalaxyl	0.5	37	Cyhalothrin(이성질체의 합)	0.4
3	BHC( $\alpha$ , $\beta$ 및 $\delta$ -BHC의 합)	0.05	38	Flusilazole	0.56
4	Aldrin & Dieldrin(Aldrin과 Dieldrin의 합)	0.05	39	Prochloraz(Prochloraz와 2,4,6-trichlorophenol 기를 포함하고 있는 대사산물의 합)	2.4
5	Endrin(Endrin과 $\delta$ -keto-endrin의 합)	0.05	40	Dithianon	1.6
6	Carbendazim(Benomyl, carbendazim 및 thiophanate-methyl)	0.5	41	Cymoxanil*	0.2
7	Quintozene(quintozene, pentachloroaniline and methyl pentachlorophenyl sulfate의 합계)	0.5	42	Clothianidin	1.6
8	Diethofencarb	0.3	43	Thiamethoxam	0.8
9	Difenoconazole	0.5	44	Ethaboxam	1.6
10	Cypermethrin(이성질체의 합)	0.1	45	Cyfluthrin(이성질체의 합)	0.3
11	Azoxystrobin	0.5	46	Fluazinam	5.6
12	Tolyfluanid	0.01	47	Tebuconazole	4.0
13	Tolclofos-Methyl	2.0	48	Mandipropamid	0.8
14	Iminoctadine	0.2	49	Methoxyfenozide	1.6
15	Pyrimethanil	0.3	50	Metconazole	8.0
16	Fenhexamid	0.3	51	Bifenthrin	4.0
17	Cyazofamid	0.3	52	Sethoxydim	0.4
18	Cyprodinil	5.0	53	Eprinomectin benzoate(Eprinomectin benzoate B1a와 eprinomectin benzoate B1b의 합)	0.4
19	Kresoxim-methyl	1.0	54	Etridiazole	24.0
20	(Ethylenebis(dithiocarbamate)s) * Dithiocarbamate계 농약들의 합	0.3	55	Thiacloprid	0.8
21	Cadusafos*	0.1	56	Propamocarb	4.0
22	Pencycuron*	0.7	57	Hexaconazole	4.0
23	Fludioxonil	3.0	58	Fluopicolide	0.8
24	Carbosulfan (Carbofuran,3-hydroxycarbofuran의 합)	0.3	59	Triflumizole	0.8
25	Thifluzamide*	2.0	60	Fosetyl-aluminium	16.0
26	Flutolanil*	1.0	61	Simeconazole	5.6
27	Tebupirimfos*	0.01	62	Amisulbrom	2.4
28	Trifloxystrobin	0.2	63	Acetamiprid	0.8
29	Boscalid	2.4	64	Chlorfenapyr	0.8
30	Dimethomorph*(Dimethomorph ((E), (Z)형태의 합)	3.0	65	Dinotefuran	0.4
31	Chlorothalonil*	0.1	66	Carbofuran(Carbofuran과 3-hydroxycarbofuran의 합)	0.24
32	Tefluthrin*	0.1	67	Clethodim*cyclohexene-3-one기를 포함하고 있는 대사산물, 5-(2-ethylthiopropyl)-5- hydroxy cyclohexene-3-one기를 포함하고 있는 대사산물 및 각각의 sulfoxide, sulfone 형태의 합)	0.05
33	Fluquinconazole*	0.2	68	Iprovalicarb	0.8
34	Pyraclostrobin	16.0	69	Lindane( $\gamma$ -BHC)	0.1
35	Amitraz(아미트라즈와 (2,4-Dimethylphenyl)-N'-methylformamidine의 합)	0.4	기타	Procymidone	1.6

#### 4.3.3. 중금속 기준 비교(식품위생법 vs. 대한민국약전)

	Pb	As	Hg	Cd
식품위생법	<u>2.0이하</u>	-	-	<u>0.2이하</u>
대한민국 약전	5.0이하	<u>3.0이하</u>	<u>0.2이하</u>	0.3이하

#### 4.4 홍삼농축액 원료 기준규격

기준규격	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 정상 : 암갈색의 농축액으로서 이미, 이취가 없어야 한다.</li> <li>- 고형분 : 64%</li> <li>- 진세노사이드 Rg1과 Rb1 및 Rg3(s)의 합(원료성제품) : 표시량(5.5mg/g) 이상</li> <li>- 세균수 : 1g 당 300 cfu 이하</li> <li>- 대장균군 : 음성</li> </ul>
------	---

※ 본 품질기준에 정하지 않은 사항은 식품공전 등 해당 법령의 기준에 따른다.

#### 4.5. 홍삼 농축액 분말 원료 기준규격

기준규격	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 정상 : 암갈색의 분말로 이미, 이취가 없어야 함.</li> <li>- 수분 : 4.3 ± 1.5%</li> <li>- 입도 : #100 mesh 92% 이상 통과</li> <li>- 진세노사이드 Rg1과 Rb1 및 Rg3(s)의 합(원료성제품) : 표시량(7 mg/g) 이상</li> <li>- 세균수 : 1g 당 300 cfu 이하</li> <li>- 대장균군 : 음성</li> </ul>
------	--

※ 본 품질기준에 정하지 않은 사항은 식품공전 등 해당 법령의 기준에 따른다.

#### 4.6. 첨가제 기준 규격

타블렛 제조 시 들어가는 첨가제는 다음과 같다.

첨가 원료	함량	첨가제 용도
자당지방산에스테르 (Sucrose Esters of Fatty Acids)	1.1%	<b>유화제</b> : 물과 기름처럼 혼합되지 않는 두 액체를 안정하게 혼합시켜 장시간 유화상태를 유지할 수 있도록 한다.
스테아린산 (Stearic acid)	1%	<b>유화제</b> : 물과 기름처럼 혼합되지 않는 두 액체를 안정하게 혼합시켜 장시간 유화상태를 유지할 수 있도록 한다.
히드록시프로필메틸셀룰로오스 (Hydroxypropylmethyl Cellulose)	0.9%	<b>안정제(코팅제)</b> : 식품에 대한 점착성을 증가시키고, 유화안정성을 증가시킨다. 가열이나 보존 중의 변화에 관여해 신선도를 유지하고 형태를 보존하는데 도움을 주며 식품의 식감이나 촉감을 좋게 한다.

마. 안정성 연구

1. 실험계획

1.1. 원료 및 제형의 안정성 실험

원료 및 제품에 대한 제형화 연구를 실시하였고 안정성 실험은 ICH 가이드라인에 준하여 장기보관조건 및 가속조건에서 시료를 보관하고 정해진 시험주기에 따라 실험을 진행하고 있다.

Table 1. 안정성시험 보관 조건 및 시험 주기

	보관조건	시험주기
장기보존실험	25 ± 2°C, 60 ± 5% RH	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 개월
가속실험	40 ± 2°C, 75 ± 5% RH	0, 2, 4, 6 개월

2. 원료 및 임상시험 제품의 시험 분석 결과

2.1. 곶보배추 추출분말

곶보배추 농축액을 분말화하여 제조된 3 배치의 곶보배추 추출분말의 시험분석 결과는 Table 2와 같이 시험기준에 적합하게 제조되었음을 확인하였고 안정성실험의 시료로 사용하였다.

Table 2. 곶보배추 추출분말 시험분석 결과 (3 배치)

시험 항목	시험 기준	Batch Analysis		
		배치 1	배치 2	배치 3
외관 및 색상	갈색의 분말로 이미, 이취가 없어야 한다.	적합	적합	적합
이물	불검출	불검출	불검출	불검출
세균수	300 cfu/g 이하	이하	이하	이하
대장균군	음성	음성	음성	음성
지표 성분 함량	Nepetin : 8.0 ± 1.6 m/g	7.70	8.13	8.27

Batch No.	영양성분 (%)									(kcal/100g)
	수분	조회분	조지방	포화지방	불포화지방	트랜스지방	콜레스테롤	조단백질	탄수화물	
1	5.02	17.93	0.05	0.05	ND	ND	ND	9.69	67.31	308.45
2	4.95	17.12	0.01	ND	ND	ND	ND	9.76	68.16	311.76
3	5.06	15.74	0.05	0.05	ND	ND	ND	9.29	69.86	317.04

Batch No.	아플라톡신 (µg/kg)				중금속 (mg/kg)							
	B1	B2	G1	G2	As	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb	Sn	Zn
1	ND	ND	ND	ND	0.10	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	0.13	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	0.13	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Batch No.	작물보호제 (동시분석 292종, µg/kg)*								미생물	
	Boscalid	Cypermethrin	Fludioxonil	Flutolanil	Tolclofos-methyl	Tebuconazole	Cyprodinil	Flubendiamide	일반세균수 (CFU/g)	대장균군
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<10	음성
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.4	<10	음성
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.24	<10	음성

\* 그 외 성분 : ND(Not Detected)

## 2.2. 홍삼정분말

홍삼농축액을 분말화하여 제조된 3 배치의 홍삼농축액분말의 시험분석 결과는 Table 3과 같이 시험기준에 적합하게 제조되었음을 확인하였고 안정성실험의 시료로 사용하였다.

Table 3. 홍삼농축액분말 시험분석 결과(3 배치)

시험 항목	시험 기준	Batch Analysis		
		배치 1	배치 2	배치 3
외관 및 성상	암갈색의 분말로 이미, 이취가 없어야 한다.	적합	적합	적합
이물	불검출	없음	없음	없음
세균수	300 cfu/g 이하	이하	이하	이하
대장균군	음성	음성	음성	음성
지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 8.0 mg/g	12.47	12.19	12.42

Batch No.	영양성분 (%)									(kcal/100g)
	수분	조지방	조지방	포화지방	불포화지방	트랜스지방	클레스테롤	조단백질	탄수화물	칼로리
1	4.65	6.76	0.17	ND	ND	ND	ND	13.49	74.93	355.22
2	4.40	6.75	0.23	ND	ND	ND	ND	13.58	75.04	356.55
3	3.50	7.39	0.08	ND	ND	ND	ND	13.22	75.81	356.83

Batch No.	아플라톡신 (µg/kg)				중금속 (mg/kg)							
	B1	B2	G1	G2	As	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb	Sn	Zn
1	ND	ND	ND	ND	0.06	0.04	ND	ND	ND	0.15	6.85	23.71
2	ND	ND	ND	ND	0.07	0.03	ND	ND	ND	0.02	6.92	25.85
3	ND	ND	ND	ND	0.08	0.03	ND	ND	ND	0.06	4.94	23.57

Batch No.	작물보호제 (동시분석 291종, µg/kg)*								미생물	
	Boscalid	Cypermethrin	Fludioxonil	Flutolanil	Methoxyfenozide	Tebuconazole	Metalaxyl	Thifluzamide	일반세균수 (CFU/g)	대장균군
1	0.01	0.02	0.01	ND	ND	ND	0.01	ND	<10	음성
2	ND	0.01	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	<10	음성
3	ND	0.02	0.02	0.01	ND	ND	ND	ND	<10	음성

\* 그 외 성분 : ND(Not Detected)

## 2.3. 곰보배추 홍삼 복합분말

곰보배추 홍삼을 혼합하여 제조한 복합분말 3 배치의 시험분석 결과는 Table 4와 같이 시험기준에 적합하게 제조되었음을 확인하였고 안정성실험의 시료로 사용하였다.

Table 4. 곰보배추 홍삼 복합분말 시험분석 결과(3 배치)

시험 항목	시험 기준	Batch Analysis		
		배치 1	배치 2	배치 3
외관 및 성상	암갈색의 분말로 이미, 이취가 없어야 한다.	적합	적합	적합
이물	불검출	불검출	불검출	불검출
세균수	300 cfu/g 이하	이하	이하	이하
대장균군	음성	음성	음성	음성
지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 1.5 mg/g	3.06	2.92	3.06
	Nepetin : 6.0 ± 1.2 m/g			

Batch No.	영양성분 (%)									(kcal/100g)
	수분	조회분	조지방	포화지방	불포화지방	트랜스지방	콜레스테롤	조단백질	탄수화물	칼로리
1	5.63	15.60	13.75	ND	ND	ND	ND	10.31	68.33	315.60
2	5.55	14.72	12.35	ND	ND	ND	ND	10.65	68.67	320.99
3	5.42	13.79	12.39	ND	ND	ND	ND	10.06	70.57	323.97

Batch No.	아플라톡신(µg/kg)				중금속(mg/kg)							
	B1	B2	G1	G2	As	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb	Sn	Zn
1	ND	ND	ND	ND	0.14	0.01	ND	ND	ND	0.01	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	0.09	0.02	ND	ND	ND	0.02	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	0.12	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Batch No.	작물보호제 (동시분석 292종, µg/kg)*								미생물	
	Boscalid	Cypermethrin	Fludioxonil	Flutolanil	Tolclofos-methyl	Tebuconazole	Cyprodinil	Flubendiamide	일반세균수 (CFU/g)	대장균군
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.43	< 10	음성
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.30	< 10	음성
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.30	< 10	음성

\* 그 외 성분 : ND(Not Detected)

#### 2.4. 곰보배추 홍삼 타블렛 고용량

곰보배추 홍삼 복합분말의 고용량 제품 1 배치의 곰보배추 홍삼 정타블렛의 시험분석 결과는 아래 Table 5과 같이 시험기준에 적합하게 제조되었음을 확인하였고 안정성실험의 시료로 사용하였다.

Table 5. 곰보배추 홍삼 타블렛 고용량 시험분석 결과 (1 배치)

시험 항목	시험 기준	분석 결과	
외관 및 성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없는 연갈색 정제	적합	
지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 1.75 mg/g	2.76	
	Nepetin = 5.6 ± 1.7 m/g	5.76	
붕해도	60분 이내	적합	
경도	8.0 kg·f/cm <sup>2</sup> 이상	11.37	
세균수	1,000 cfu/g 이하	이하	
대장균군	음성	음성	
중량	평균중량	600 mg 이상	601.2
	중량 편차	5 ~ 10 %(±T1) : 2개 이하	x
		10 % 초과(±T2) : 없을 것	x
정제의 크기	높이	5.2 ~ 5.7 mm	5.45
	단폭	7.5 ~ 7.7 mm	-
	장폭	13.5 ~ 13.7 mm	13.57
포장 기밀성	기밀일 것	적합	

항목	영양성분 (%)									(kcal/100g)
	수분	조회분	조지방	포화지방	불포화지방	트랜스지방	콜레스테롤	조단백질	탄수화물	
결과	4.37	7.84	0.67	ND	ND	ND	ND	3.86	83.26	354.53

항목	아플라톡신(µg/kg)				ND							
	B1	B2	G1	G2	As	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb	Sn	Zn
결과	ND	ND	ND	ND	0.08	0.01	ND	ND	ND	0.22	ND	ND

항목	작물보호제 (동시분석 292종, µg/kg)*								미생물	
	Boscalid	Cypermethrin	Fludioxonil	Flutolanil	Tolclofos-methyl	Tebuconazole	Cyprodinil	Flubendiamide	일반세균수 (CFU/g)	대장균군
결과	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.12	< 10	음성

\* 그 외 성분 : ND(Not Detected)

## 2.5. 곰보배추 홍삼 타블렛 저용량

곰보배추 홍삼 복합분말의 저용량 제품 3 배치의 곰보배추 홍삼 정타블렛의 시험분석 결과는 아래 Table 6과 같이 시험기준에 적합하게 제조되었음을 확인하였고 안정성실험의 시료로 사용하였다.

Table 6. 곰보배추 홍삼 타블렛 저용량 시험분석 결과 (1 배치)

시험 항목		시험 기준	분석 결과
외관 및 성상		고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없는 연갈색 정제	적합
지표 성분 함량		Rg1+Rb1+Rg3(s) > 0.9 mg/g	1.22
		Nepetin = 2.8 ± 0.84 m/g	2.37
붕해도		60분 이내	적합
경도		8.0 kg·f/cm <sup>2</sup> 이상	11.37
세균수		1,000 cfu/g 이하	이하
대장균군		음성	음성
중량	평균중량	600 mg 이상	601.2
	중량 편차	5 ~ 10 %(±T1) : 2개 이하	x
		10 % 초과(±T2) : 없을 것	x
정제의 크기	높이	5.2 ~ 5.7 mm	5.45
	단폭	7.5 ~ 7.7 mm	-
	장폭	13.5 ~ 13.7 mm	13.57
포장 기밀성		기밀일 것	적합

항목	영양성분 (%)									(kcal/100g)
	수분	조회분	조지방	포화지방	불포화지방	트랜스지방	콜레스테롤	조단백질	탄수화물	
결과	4.89	6.28	3.82	0.78	0.51	ND	ND	15.26	69.75	374.42

항목	아플라톡신( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				중금속( $\text{mg}/\text{kg}$ )							
	B1	B2	G1	G2	As	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb	Sn	Zn
결과	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16.11	ND	ND	ND	4.00	27.96

항목	작물보호제 (동시분석 292종, $\mu\text{g}/\text{kg}$ )*								미생물	
	Boscalid	Cypermethrin	Fludioxonil	Flutolanil	Tolclofos-methyl	Tebuconazole	Cyprodinil	Thifluzamide	일반세균수 (CFU/g)	대장균군
결과	ND	ND	0.01	0.01	ND	ND	ND	0.07	0	음성

\* 그 외 성분 : ND(Not Detected)

### 3. 저장 조건 및 기간별 안정성 실험 결과

#### 3.1. 곶보배추 농축액 분말

표준화된 곶보배추 농축액분말을 가속조건 및 장기보존조건에서 안정성실험을 실시한 결과 설정된 규격에 적합함을 확인하였다 (Table 7-8).

##### 3.1.1. 가속조건

Table 7. 곶보배추 농축액분말 가속조건 안정성 실험 결과

	시험 항목	시험 기준	경과월수			
			0	2	4	6
			<b>1 배치</b>	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합
	수분	10 % 이하	5.02	5.43	5.46	5.48
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
	지표 성분 함량	Nepetin = $8 \pm 1.6$ m/g	7.70	7.64	6.75	6.65
	시험 항목	시험 기준	경과월수			
			0	2	4	6
			<b>2 배치</b>	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합
	수분	10 % 이하	4.95	5.22	5.41	5.49
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
	지표 성분 함량	Nepetin = $8 \pm 1.6$ m/g	8.13	8.01	7.09	6.95
	시험 항목	시험 기준	경과월수			
			0	2	4	6
			<b>3 배치</b>	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합
	수분	10 % 이하	5.06	5.04	5.37	5.36
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
	지표 성분 함량	Nepetin = $8 \pm 1.6$ m/g	8.27	8.24	7.46	7.37

### 3.1.2. 장기보존조건

Table 8. 곰보배추 농축액분말 장기보존조건 안정성 실험 결과

	시험 항목	시험 기준	경과월수							
			0	3	6	9	12	18	24	36
1 배치	외관 및 색상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합							
	수분	10 % 이하	5.02	4.67	5.06	5.15	5.02	4.67	4.86	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표 성분 함량	Nepetin = 8 ± 1.6 mg/g	7.64	7.62	6.71	7.07	7.36	7.05	7.23	
2 배치	외관 및 색상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합							
	수분	10 % 이하	4.95	4.74	5.02	4.67	5.06	5.15	4.74	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표 성분 함량	Nepetin = 8 ± 1.6 mg/g	8.01	7.98	7.07	7.42	7.27	7.35	7.41	
3 배치	외관 및 색상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합							
	수분	10 % 이하	5.06	5.15	5.02	4.67	5.02	4.67	4.74	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표 성분 함량	Nepetin = 8 ± 1.6 mg/g	8.24	8.24	7.45	7.80	7.58	7.81	7.52	

### 3.2. 홍삼 농축액 분말

표준화된 홍삼 농축액분말을 가속조건 및 장기보존조건에서 안정성실험을 실시한 결과 설정된 규격에 적합함을 확인하였다 (Table 9-10).

#### 3.2.1. 가속조건

Table 9. 홍삼 농축액분말 가속조건 안정성 실험 결과

	시험 항목	시험 기준	경과월수			
			0	2	4	6
1 배치	외관 및 색상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합
	수분	10 % 이하	4.65	4.29	4.43	4.47
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
	지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 8.0 mg/g	12.47	11.49	11.25	13.19
2 배치	외관 및 색상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합
	수분	10 % 이하	4.40	4.37	4.64	4.68
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
	지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 8.0 mg/g	12.19	11.20	11.17	12.75
3 배치	시험 항목	시험 기준	경과월수			

			0	2	4	6
	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합
	수분	10 % 이하	3.50	3.77	4.07	4.12
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
	지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 8.0 mg/g	12.42	11.53	11.76	12.93

### 3.2.2. 장기보존조건

Table 10. 홍삼 농축액분말 장기보존조건 안정성 실험 결과

	시험 항목	시험 기준	경과월수							
			0	3	6	9	12	18	24	36
1 배치	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합							
	수분	10 % 이하	4.65	4.67	4.40	5.15	4.75	4.90	5.15	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 8.0 mg/g	12.47	11.34	13.19	12.93	13.02	13.08	13.11	
2 배치	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합							
	수분	10 % 이하	4.40	4.74	4.79	4.40	5.15	5.08	5.23	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 8.0 mg/g	12.19	11.65	12.77	12.53	12.73	19.35	12.89	
3 배치	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합							
	수분	10 % 이하	3.50	5.15	5.15	5.04	5.21	5.13	5.25	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 8.0 mg/g	12.42	11.90	13.10	12.98	12.98	12.63	12.68	

### 3.3. 복합분말

표준화된 곰보배추 홍삼 복합분말을 가속조건 및 장기보존조건에서 안정성실험을 실시한 결과 설정된 규격에 적합함을 확인하였다 (Table 11-12).

#### 3.3.1. 가속조건

Table 11. 복합분말 가속조건 안정성 실험 결과

	시험 항목	시험 기준	경과월수			
			0	2	4	6
1 배치	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합
	수분	10 % 이하	5.63	4.98	5.60	5.69
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
	지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 1.5 mg/g	2.79	2.84	2.87	2.82

		Nepetin = 6 ± 1.2 m/g	5.79	5.64	4.97	4.95
2 배치	시험 항목	시험 기준	경과월수			
			0	2	4	6
	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합
	수분	10 % 이하	5.55	5.04	5.29	5.35
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 1.5 mg/g	2.74	2.73	2.80	2.70	
	Nepetin = 6 ± 1.2 m/g	5.42	6.08	5.27	5.19	

		Nepetin = 6 ± 1.2 m/g	5.79	5.64	4.97	4.95
3 배치	시험 항목	시험 기준	경과월수			
			0	2	4	6
	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합
	수분	10 % 이하	5.42	4.97	4.97	5.06
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 1.5 mg/g	2.82	2.81	2.81	2.90	
	Nepetin = 6 ± 1.2 m/g	5.81	6.26	5.52	5.45	

### 3.3.2. 장기보존조건

Table 12. 복합분말 장기보존조건 안정성 실험 결과

	시험 항목	시험 기준	경과월수							
			0	3	6	9	12	18	24	36
1 배치	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합							
	수분	10 % 이하	5.63	4.43	4.50	4.58	5.14	4.87	3.29	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 1.5 mg/g	2.79	2.86	2.82	2.79	2.86	2.93	2.83	
		Nepetin = 6 ± 1.2 m/g	5.19	5.70	5.01	5.21	4.93	4.98	5.08	

	시험 항목	시험 기준	경과월수							
			0	3	6	9	12	18	24	36
2 배치	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합							
	수분	10 % 이하	5.55	4.50	4.20	5.14	3.19	3.67	4.58	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 1.5 mg/g	2.74	2.76	2.70	2.73	2.79	2.79	2.81	
		Nepetin = 6 ± 1.2 m/g	5.42	5.87	5.28	5.53	5.39	5.36	5.39	

	시험 항목	시험 기준	경과월수							
			0	3	6	9	12	18	24	36
3 배치	외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합							
	수분	10 % 이하	5.42	4.51	4.12	3.98	5.19	5.77	4.58	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 1.5 mg/g	2.82	2.82	2.90	2.88	2.85	2.87	2.85	
		Nepetin = 6 ± 1.2 m/g	5.81	6.41	5.57	5.86	5.52	5.59	5.63	

### 3.4. 곰보배추 홍삼 타블렛 고용량

표준화된 곰보배추 홍삼 타블렛 고용량을 가속조건 및 장기보존조건에서 안정성실험을 실시한 결과 설정된 규격에 적합함을 확인하였다 (Table 13-14).

#### 3.4.1. 가속조건

Table 13. 곰보배추 홍삼 타블렛 고용량 가속조건 안정성 실험 결과

시험 항목	시험 기준	경과월수			
		0	2	4	6
외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합
수분	10 % 이하	4.37	5.79	2.85	4.23
세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 1.3 mg/g	2.53	2.43	2.43	2.48
	Nepetin = 5 ± 1.0 m/g	4.63	5.18	4.46	4.38

#### 3.4.2. 장기보존조건

Table 14. 곰보배추 홍삼 타블렛 고용량 장기보존조건 안정성 실험 결과

시험 항목	시험 기준	경과월수							
		0	3	6	9	12	18	24	36
외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합							
수분	10 % 이하	4.37	5.66	5.16	4.23	5.11	4.87	3.98	
세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 1.3 mg/g	2.53	5.46	2.46	2.45	2.47	2.40	2.51	
	Nepetin = 5 ± 1.0 m/g	4.63	5.26	4.29	4.64	4.34	4.46	4.27	

### 3.5. 곰보배추 홍삼 타블렛 저용량

표준화된 곰보배추 홍삼 타블렛 저용량을 가속조건 및 장기보존조건에서 안정성실험을 실시한 결과 설정된 규격에 적합함을 확인하였다 (Table 15-16).

#### 3.5.1. 가속조건

Table 15. 곰보배추 홍삼 타블렛 저용량 가속조건 안정성 실험 결과

시험 항목	시험 기준	경과월수			
		0	2	4	6
외관 및 성상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합
수분	10 % 이하	4.89	3.25	5.33	5.10
세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 0.6 mg/g	1.22	1.22	1.17	1.20
	Nepetin = 2.5 ± 0.5 m/g	2.37	2.42	2.28	2.00

### 3.5.2. 장기보존조건

Table 16. 곰보배추 홍삼 타블렛 저용량 장기보존조건 안정성 실험 결과

시험 항목	시험 기준	경과월수							
		0	3	6	9	12	18	24	36
외관 및 색상	갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합						
수분	10 % 이하	4.89	2.82	4.15	3.94	4.23	4.61	5.02	
세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s) > 0.6 mg/g	1.22	1.20	1.20	1.21	1.20	1.18	1.22	
	Nepetin = 2.5 ± 0.5 m/g	2.37	2.35	2.10	2.20	2.19	2.25	2.23	

## 바. 인체적용시험 연구

### 1. 인체적용시험 제품 제조

시험대상자에게 제공되는 총 2회의 제품을 제공하기 위한 제품을 제조 공급하였다.

#### 1.1. 인체적용시험 제품 제조기관

임상시험용 타블렛은 홍삼농축액분말을 (주)한국인삼공사에서 공급받았으며, 곰보배추 농축액 분말을 (주)성신 BST에서 제조하였다. 위약은 네추럴에프엔피에서 원료사로부터 원료를 공급 받아 제조하였다. (주)내추럴에프엔피는 건강기능식품 제조 전문회사(제2005-대전청-0001호)로 GMP(우수 의약품 제조 관리 기준)를 갖추고 있으며, 모든 인체적용시험 식품 생산은 GMP 하에서 제조하였다.

#### 1.2 인체적용시험

인체적용시험 식품은 연한 흑갈색 분말의 정제이고, 대조식품은 시험식품과 동일한 성상의 옥수수전분과 셀룰로오스 홍삼향이 첨가된 정제이다. 섭취방법은 1일 2회, 1회 1,200 mg(600 mg x 2정)으로 아침과 저녁 식사 30분 후에 복용한다. 섭취기간은 12주(3개월)이다(Table 17).

Table 17. 인체적용시험식품 및 대조식품 특성

	시험식품	대조식품
지표(유효)성분	Rg1+Rg1+Rg3 > 1.75 mg/g Nepetin = 5.6 ± 1.7 mg/g	시험식품과 동일한 성상의 결정셀룰로오스 함유된 연한 정제
제형 및 성상	연한 흑갈색 분말의 정제	
저장방법	고온 다습한 곳에 두면 흡습되어 변질의 우려가 있으므로 습기와 직사광선을 피하여 서늘한 장소에 보관	
1일 섭취량 및 섭취방법	1일 2회, 1회 1,200 mg (600mg x 2정)	
섭취기간	12주간	

#### 1.3. 인체적용시험 포장 및 라벨

##### 1.3.1. 인체적용시험 제품포장

인체적용시험 IP는 기본적으로 42일씩 제공하고 방문일을 고려하여 7일간의 여유분을 합하여 총 196정을 1회 방문당 시험대상자에게 제공하였다. 포장은 7일분을 소포장하고, 소포장한 7 box를 1 box로 중포장 하였다.

##### 1.3.2. 인체적용시험 포장라벨

인체적용시험 라벨은 그림 102와 같이 소포장 박스에는 박스번호를 라벨 하였고, 중포장 상단 정중앙에는 제품코드, 제조번호, 사용기간, 저장방법, 제조업자 및 주의사항을 인쇄하였으며, 측면에는 제품코드를 라벨링 하였다. 소포장 박스에는 안정성을 고려하여 실리카겔을 넣어 포장하였다.



그림 102. 인체적용시험식품 포장 및 라벨 상태

### 1.3.3. 인체적용시험 무작위 배정코드 및 맹검봉투

인체적용시험 무작위배정코드는 CRO (헬스케어 크레임스) 로부터 받았으며, 위급 시 블라인드를 해제하기 위하여 맹검봉투를 작성하였다. 시험대상자에게 제공되는 2회분을 구별하는 코드는 1회분(A), 2회분(B)로 구분하였다.

### 1.3.4. 인체적용시험 IP 보관 및 배송

인체적용시험 IP는 전북대병원 임상지원센터의 직사광선을 피하여 온·습도가 유지되는 IP 전용 보관창고에 보관하였다. 인체적용시험 IP는 한국인삼공사에서 직접 배송하였다.

## 2. 인체적용시험용 제품의 clinical formulae 및 포장 규격

### 2.1 시험식품 및 대조식품의 clinical formulae

#### 2.1.1. 시험식품 (임상시험용 타블렛\_고함량)

원료명	배합비율(%)	중량/정(mg)	특이사항
곰보배추농축액분말	62.500	375.000	연합
홍삼농축액분말	20.834	125.004	연합
결정셀룰로오스	5.716	34.296	연합
이산화규소	2.000	12.000	후혼합
카르복시메틸셀룰로오스칼슘	2.000	12.000	후혼합
히드록시프로필메틸셀룰로오스(바인더)	1.500	9.000	연합(바인더)
스테아린산마그네슘	0.700	4.200	후혼합
히드록시프로필메틸셀룰로오스(코팅)	3.150	18.900	코팅(90kg 기준 2.835 kg)
카라멜색소분말	0.450	2.700	코팅(90kg 기준 0.405 kg)
자당지방산에스테르	0.350	2.100	코팅(90kg 기준 0.315 kg)
이산화티타늄	0.800	4.800	코팅(90kg 기준 0.720 kg)
합 계	100.0	600.0	

2.1.2. 시험식품 (임상시험용 타블렛)

원료명	배합비율(%)	중량/정(mg)	특이사항
주약 (고함량) 최종혼합물	47.628	285.768	
위약 최종혼합물	47.628	285.768	
히드록시프로필메틸셀룰로오스(코팅)	3.144	18.864	코팅(90kg 기준 2.835 kg)
카라멜색소분말	0.450	2.700	코팅(90kg 기준 0.405 kg)
자당지방산에스테르	0.350	2.100	코팅(90kg 기준 0.315 kg)
이산화티타늄	0.800	4.800	코팅(90kg 기준 0.720 kg)
합 계	100.0	600.0	

2.1.3. 대조식품

원료명	배합비율(%)	중량/정(mg)	특이사항
결정셀룰로오스(101)	70.450	422.700	연합
말토덱스트린	11.532	69.192	연합
말토덱스트린	10.000	60.000	후혼합
이산화규소	2.000	12.0000	후혼합
스테아린산마그네슘	1.000	6.000	후혼합
식용색소 황색 제4호	0.200	1.200	연합(바인더)
식용색소 적색 제40호	0.050	0.300	연합(바인더)
식용색소 청색 제1호	0.018	0.108	연합(바인더)
히드록시프로필메틸셀룰로오스	3.150	18.900	코팅(90kg 기준 2.835 kg)
카라멜색소분말	0.450	2.700	코팅(90kg 기준 0.405 kg)
자당지방산에스테르	0.350	2.100	코팅(90kg 기준 0.315 kg)
이산화티타늄	0.800	4.800	코팅(90kg 기준 0.720 kg)
합 계	100.000	600.000	

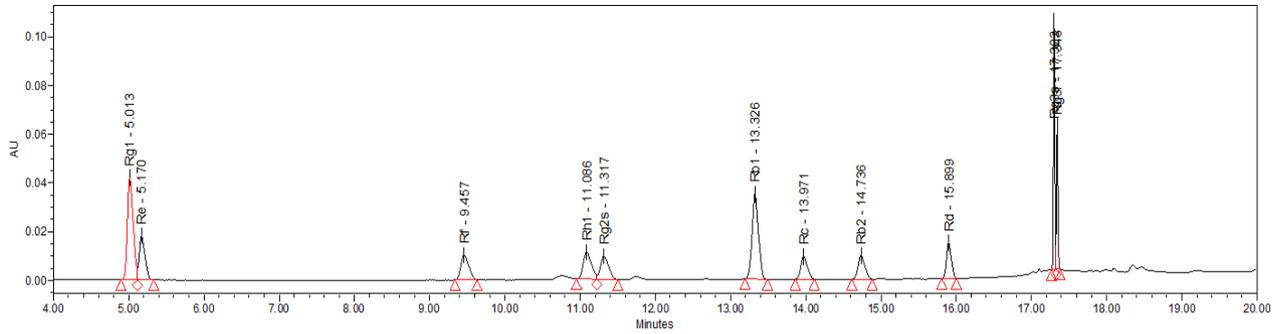
2.2. 포장규격 : 600 mg/정\*4정/PTP\*15PTP/단위

구분	항목	내 용	인쇄	비고	
PTP	상	크기(mm)	47*65 (1매 사이즈, 가로*세로)	무인쇄	
		재질 (μm)	PVDC 335		
	하	크기(mm)	47*65 (1매 사이즈, 가로*세로)	무인쇄	
		재질 (μm)	AL30/PVDC		
파우치	크기(mm)	98*170*52 (가로*세로*폭)	무인쇄	M자 봉합지, End Sealing 10mm Side Sealing 8mm	
	재질(g/m <sup>2</sup> )	PET12/ AL7/ PE23/ LLDPE30			
파우치 내부케이스	크기(mm)	97*48*66 (장*폭*고)	무인쇄	무광코팅, 3면 접착	
	재질(g/m <sup>2</sup> )	VM PET12(금) / IV350			
내부케이스 칸막이	크기(mm)	348*46 (가로*세로)		무광코팅, 단위지함당 1개씩 삽입 PTP 5개를 3등분하여 포장	
	재질(g/m <sup>2</sup> )	VMPET12(금)/ SC300G			
실리카겔	크기(mm)	50*60 (가로*세로)		단위지함 내 파우치 1매당 1개 투입 (내부 케이스에 넣지 말 것)	
	중량(g)	3g			

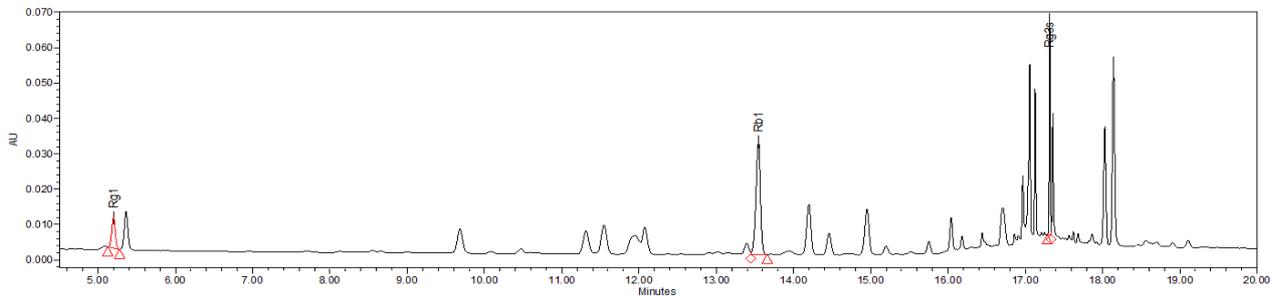
### 2.3. 분석법에 의한 원료 및 임상시험 제품의 Ginsenoside 크로마토그램

본 시험법에 따라 분석한 표준용액 및 시료의 HPLC 크로마토그램은 다음의 그림과 같다

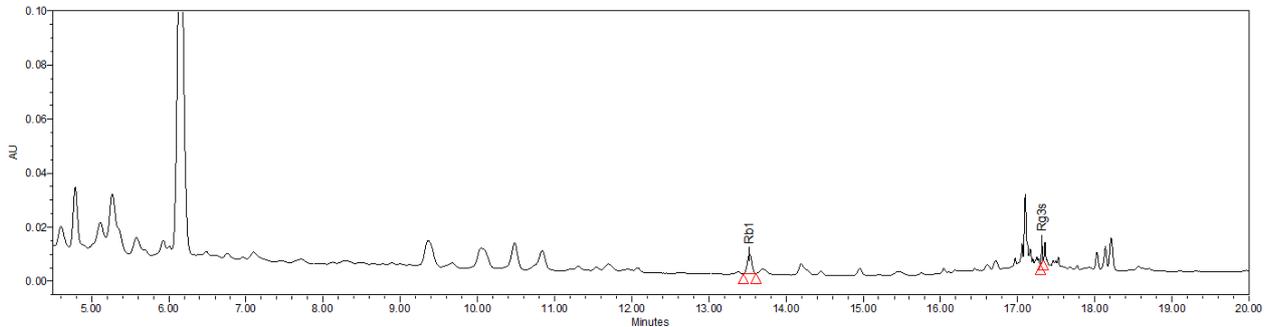
#### 2.3.1. Ginsenoside 표준용액의 크로마토그램



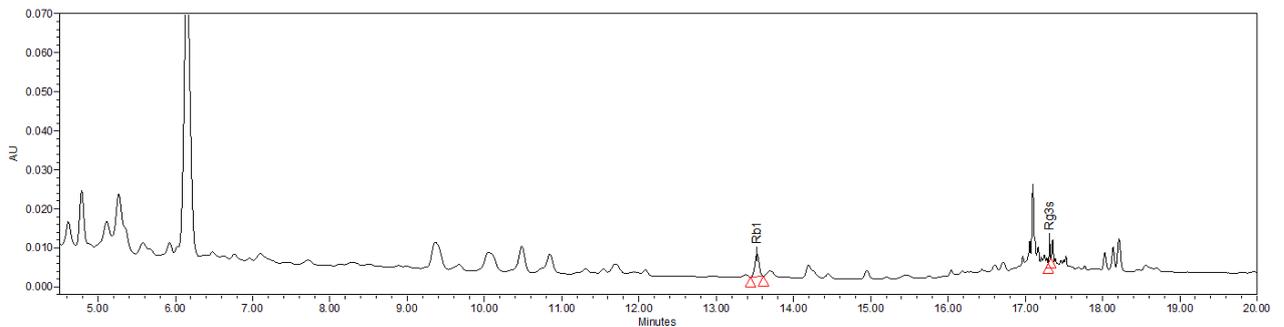
#### 2.3.2. 홍삼에 농축액 분말 크로마토그램



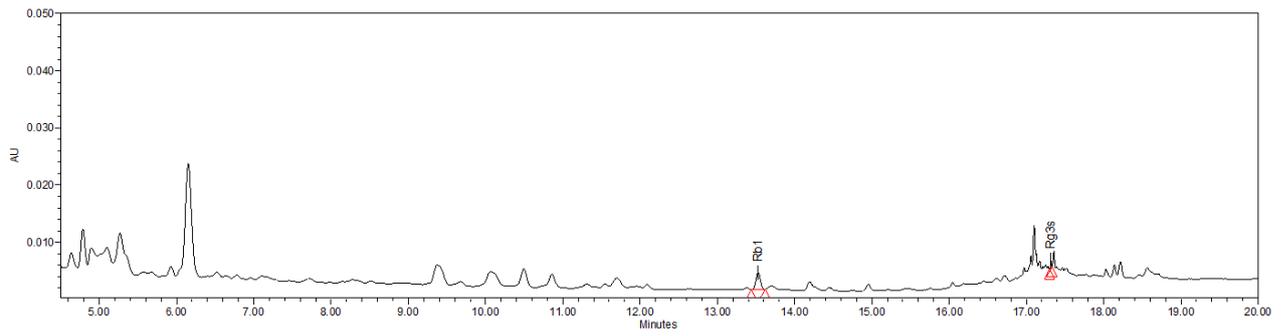
#### 2.3.3. 곰보배추 홍삼 복합분말 크로마토그램



#### 2.3.4. 곰보배추 홍삼 타블렛 고용량 크로마토그램



### 2.3.5. 곱보배추 홍삼 타블렛 저용량 크로마토그램



### 3. 인체적용시험

인체적용시험은 전문기관인 전북대학교병원 임상의학센터와 아래와 같이 체결하여 실시하였다.

### 3-1. 용역연구계약 체결

## 용역연구계약서

- KGC-03-PS의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조, 인체적용시험 -

2018. 01.

위임자 : 한국인삼공사(주)  
수임자 : 전북대학교병원

kgc20140149 2018-01-25 14:03:45 이 문서는 한국인삼공사의 동의없이 수정, 변경 및 복사할 수 없습니다.

## 계약 일반 조건

위임자 : 한국인삼공사(주)  
수임자 : 전북대학교병원

당사는 부패 없는 투명한 기업경영과 공정한 행정이 사회발전과 국가경쟁력에 중요한 관건이 됨을 깊이 인식하며, 위 위임자·수임자 양자는 위임자의 사업을 수행함에 있어서 "KGC-03-PS의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조, 인체적용시험" 지원 업무를 수행하기 위하여 본 용역 계약을 체결한다.

### 제 1 조 [ 계약의 범위 및 수행방법 ]

본 계약을 체결함에 있어 한국인삼공사(이하 위임자라 칭함)와 전북대학교병원(이하 수임자라 칭함)은 위임자의 사업 활동과 관련하여 발생하는 "KGC-03-PS의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조, 인체적용시험"을 목적으로 한다.

가. 본 계약은 쌍방이 합의한 전부이며, 어떠한 사건에 합의한 모든 서면 및 구두 합의보다 우선한다. 각 계약서 및 부속서류의 충돌 시 우선순위는 계약일반조건으로 한다.

나. 수임자는 계약 체결 즉시 모든 부속서류 및 제반 조건을 재확인하고 계약이행에 착수하여야 한다. 수임자는 계약내용이 불명확하거나 이견이 있을 경우 서류 수령 후 5일 내에 위임자에게 서면 통지해야 하며, 그렇지 않을 경우에는 모든 조건을 이해하고 합의한 것으로 간주한다. 이의 불이행으로 인하여 발생하는 모든 불이익은 수임자의 책임으로 한다.

다. 수임자는 위임자가 제시하는 의견, 방향 제시 등의 사항을 계약 수행에 최대한 반영하도록 한다.

라. 위임자는 계약 체결 이후 추가로 시험의 내용 변경이나 형식의 수정 등을 요구하지 아니한다.

마. 계약서에 언급되지 않은 기타 사항이 발생할 경우 위임자와 수임자의 상호 협의 하에 변경 진행할 수 있다.

바. 수임자는 연구기간 종료 30일 이내에 최종보고서를 위임자에게 제출하여야 한다.

사. 수임자는 위임자에게 계약수행 관련하여 발생한 일체의 자료를 제출하여야 한다.

아. 수임자는 위임자가 요청할 경우 보고회를 개최하며 구체적인 일정에 대해서는 위임자와 수임자의 협의에 따라 결정한다.

- 1 -

kgc20140149 2018-01-25 14:03:45 이 문서는 한국인삼공사의 동의없이 수정, 변경 및 복사할 수 없습니다.

자. 부득이한 사정으로 인하여 사전에 확정된 보고서 제출 및 보고회 개최 일정을 변경하고자 하는 경우, 수임자는 위임자에게 해당 사유를 사전에 서면 통보하여 일정 변경에 대한 허가를 얻어야 한다.

차. 위임자가 연구결과에 대해 검수 후 서면 승인을 한 경우 연구가 완료된 것으로 본다. 서면 승인 후 위임자가 위임자의 사정으로 변경이나 재작업을 요청할 경우 이에 따른 추가비용은 별도 협의 한다.

### 제 2 조 [ 조건 ]

업무에 따른 세부사항은 아래와 같으며, 업무에 대한 내용은 인체적용시험계획서(Protocol No. CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2)를 참고한다.

비목	세목	세부 내역	금액(원)
직접비	인건비	연구책임자, 연구원 등	45,000,000
		재료비	1,600,000
	연구활동비	검사비	26,100,000
		계획서 등 개발비	9,000,000
		통계 및 결과분석비	11,000,000
		연구대상자비	40,000,000
		복사·인쇄비	1,300,000
	연구과제추진비	국내 출장여비	500,000
		사무용품비	2,000,000
		회의비	1,000,000
연구수당	인건비 20% 내외	8,900,000	
	소계	146,400,000	
기타비	제품관리비	직접비의 3% 이상	4,400,000
간접비	연구간접비		
	병원관리비	직접비의 20% 내외	29,200,000
공급가액			180,000,000
비고	<ul style="list-style-type: none"> <li>연구대상자 수: 100명</li> <li>기능성: 호흡기 보호 및 증상개선</li> <li>디자인: 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조, 인체적용시험</li> <li>평가항목: 호흡기 증상 관련 설문(SGRQ, CAT, mMRC), 폐기능검사, hs-CRP, ESR, 상기도감염 증상 설문, 안전성 평가 항목</li> <li>부가세 별도</li> </ul>		

### 제 3 조 [ 기간 ]

본 계약의 기간은 계약체결일로부터 위임자가 위탁한 모든 업무가 완료될 때까지로 함을 원칙으로

- 2 -

kgc20140149 2018-01-25 14:03:45 이 문서는 한국인삼공사의 동의없이 수정, 변경 및 복사할 수 없습니다.

한다. 업무가 완료될 때까지 소요될 것으로 예측되는 기간은 계약일로부터 18개월까지이다. 단, 인체적용시험용제품 입고일정 및 연구 대상자 모집일정에 따라 변동 될 수 있다.

### 제 4 조 [ 계약금액 및 지불방법 ]

가. 수임자는 본 계약서에 따라 계약상 의무를 완료하고 이에 대한 보고와 위임자의 서면 승인을 받은 후 청구서, 세금계산서, 부가세 등의 자료를 첨부하여 지불조건(계약체결 시 40%, 연구대상자 모집완료 후 30%, IRB 종료보고 후 30%)에 따라 계약금액 지급을 위임자에게 청구할 수 있다. 위임자는 위임자의 승인일로부터 14일 이내 수임자의 계좌로 현금 입금하며(수임자의 계좌: 전북은행, 538-23-0310679, 전북대병원), 수임자에게 기 지급된 간접비는 반환이 불가하다.

나. 수행업무 시 별도의 계약대금은 용역수행금액의 일부(40%)인 일금(일천이백만원정, 72,000,000 원), 부가세 별도)으로 하며 위임자는 본 계약상의 용역수행금액을 위임자와 수임자가 정한 지급방법에 따라 아래와 같이 분할 지급하기로 한다.

회차	납부일시	금액(원)
1	계약체결 14일 이내	72,000,000
2	연구대상자 모집완료 후 14일 이내	54,000,000
3	IRB 종료보고 후 14일 이내	54,000,000
합 계		180,000,000

다. 위임자는 계약위약금, 손해배상금, 기타 오류에 의한 연구비 지급분등 비용 정산사유가 발생할 경우 계약금액에서 공제 후 대금을 정산 지급할 수 있다. 수임자에게 지급할 잔액이 있을 때에는 수임자는 즉시 위임자가 지정하는 계좌에 차액을 입금한다.

라. 위임자가 가격증빙자료의 제출 또는 열람을 요구할 때에는 수임자는 즉시 이에 응하여야 한다.

마. 수임자는 계좌번호 변경 시 수임자의 인감이 찍힌 서면을 통하여 변경을 요청한다.

### 제 5 조 [보증보험증권]

① 수임자는 위임자에게 본 계약 체결 후 14일 이내에 계약서에 명시된 선급금보증보험증권(선급금=선급+중도금, 일억이천육백만원정/126,000,000, 부가세별도)과 계약이행보증보험(계약 총 금액의 10%, 천팔백만원정/18,000,000원, 부가세별도)을 납부하여야 한다. 보험기간은 계약일로부터 18개월까지 유효할 것이어야 한다.

② 수임자가 본 계약상 의무를 이행하지 아니하거나, 또는 수임자의 책임 있는 사유로 계약이 해제·해지되는 경우에는 선급금보증금은 위임자에게 귀속되며, 이에 대해 수임자는 어떠한 이의도

- 3 -

kgc20140149 2018-01-25 14:03:45 이 문서는 한국인삼공사의 동의없이 수정, 변경 및 복사할 수 없습니다.

제기할 수 있다.

③ 수입자의 귀책사유로 인하여 위임자에게 발생한 손해가 선급금보충금을 초과하는 경우, 수입자는 선급금보충금의 귀속과는 별도로 위임자에 대하여 그 초과손해에 대한 손해를 배상하여야 한다.

④ 선급금보충보충금으로 납부한 경우 계약이 정상적으로 이행된 후, 수입자의 청구에 의하여 위임자가 반환 또는 폐기한다.

**제 6 조 [ 비밀유지의 의무 ]**

가. 위임자와 수입자는 본 계약의 수행 상 알게 된 계약내용 및 상대의 보안사항이나 대외비 사항 등에 대해 제 3자에게 절대 누설하지 않는다.

나. 수입자는 본 용역을 통해 수집된 모든 정보 및 경영의 내용과 본 업무와 관련하여 위임자가 제공한 일체의 자료에 대하여 비밀을 유지하여야 하며, 이를 위임자의 사전 서면 동의 없이 제 3자에게 공개 할 수 없다. 제공받은 일체의 자료는 "의약품 임상시험 관리기준(KGCP)"에 따라 인체적용시험 완료일로부터 3년간 보관하고 이후 위임자와 합의 하에 자료를 폐기한다.

다. 위임자는 본 용역을 통해 수집된 모든 정보 및 등록절차의 내용과 본 업무와 관련하여 수입자가 제공한 일체의 자료에 대하여 비밀을 유지하여야 하며, 이를 수입자의 사전 서면 동의 없이 제 3자에게 공개 할 수 없다. 계약 종료 후, 제공받은 일체의 자료를 폐기하고 이에 대한 비밀을 유지하여야 한다.

라. 만일 해당 관리업무에 따른 비밀유지 보안이 지켜지지 않을 시 위임자는 수입자에게, 수입자는 위임자에게 민사상 법적 기업 비밀누설에 해당하는 손해배상의 책임을 진다.

마. 본 조에서 정한 양사의 비밀보장의무는 본 계약이 종료된 후에도 효력이 있다.

**제 7 조 [ 업무협조와 자료제공 ]**

가. 위임자는 수입자가 요구하는 업무상 필요한 기본정보를 제공 할 것을 적극 협조하여야 한다.

나. 위임자는 수입자가 요구하는 업무상 필요한 자료를 미제공시 책임을 질 것을 약속한다.

다. 위임자는 연구가 시작되기 전에 인체적용시험용제품에 의해 발생할 수 있는 지금까지 알려진 모든 부작용은 물론 앞으로 발생할 수 있는 부작용에 대한 정보와 지식 등에 관한 시험의 자료와 이미 실시한 임상 성적에 관한 자료, 기술 등을 수입자에게 제공하여야 한다.

라. 인체적용시험 시작 전에 수입자에게 고지하지 않은 부작용에 의한 손상은 위임자가 전적으로 책임진다.

마. 위임자는 인체적용시험 중에 발생한 중대한 부작용 또는 예기치 않은 상황의 발생을 수입자에게

- 4 -

kgp20140149 2018-01-25 14:03:45 이 문서는 한국인삼공사의 동의없이 수정, 변경 및 복사할 수 없습니다.

제기할 수 있다.

③ 수입자의 귀책사유로 인하여 위임자에게 발생한 손해가 선급금보충금을 초과하는 경우, 수입자는 선급금보충금의 귀속과는 별도로 위임자에 대하여 그 초과손해에 대한 손해를 배상하여야 한다.

④ 선급금보충보충금으로 납부한 경우 계약이 정상적으로 이행된 후, 수입자의 청구에 의하여 위임자가 반환 또는 폐기한다.

**제 6 조 [ 비밀유지의 의무 ]**

가. 위임자와 수입자는 본 계약의 수행 상 알게 된 계약내용 및 상대의 보안사항이나 대외비 사항 등에 대해 제 3자에게 절대 누설하지 않는다.

나. 수입자는 본 용역을 통해 수집된 모든 정보 및 경영의 내용과 본 업무와 관련하여 위임자가 제공한 일체의 자료에 대하여 비밀을 유지하여야 하며, 이를 위임자의 사전 서면 동의 없이 제 3자에게 공개 할 수 없다. 제공받은 일체의 자료는 "의약품 임상시험 관리기준(KGCP)"에 따라 인체적용시험 완료일로부터 3년간 보관하고 이후 위임자와 합의 하에 자료를 폐기한다.

다. 위임자는 본 용역을 통해 수집된 모든 정보 및 등록절차의 내용과 본 업무와 관련하여 수입자가 제공한 일체의 자료에 대하여 비밀을 유지하여야 하며, 이를 수입자의 사전 서면 동의 없이 제 3자에게 공개 할 수 없다. 계약 종료 후, 제공받은 일체의 자료를 폐기하고 이에 대한 비밀을 유지하여야 한다.

라. 만일 해당 관리업무에 따른 비밀유지 보안이 지켜지지 않을 시 위임자는 수입자에게, 수입자는 위임자에게 민사상 법적 기업 비밀누설에 해당하는 손해배상의 책임을 진다.

마. 본 조에서 정한 양사의 비밀보장의무는 본 계약이 종료된 후에도 효력이 있다.

**제 7 조 [ 업무협조와 자료제공 ]**

가. 위임자는 수입자가 요구하는 업무상 필요한 기본정보를 제공 할 것을 적극 협조하여야 한다.

나. 위임자는 수입자가 요구하는 업무상 필요한 자료를 미제공시 책임을 질 것을 약속한다.

다. 위임자는 연구가 시작되기 전에 인체적용시험용제품에 의해 발생할 수 있는 지금까지 알려진 모든 부작용은 물론 앞으로 발생할 수 있는 부작용에 대한 정보와 지식 등에 관한 시험의 자료와 이미 실시한 임상 성적에 관한 자료, 기술 등을 수입자에게 제공하여야 한다.

라. 인체적용시험 시작 전에 수입자에게 고지하지 않은 부작용에 의한 손상은 위임자가 전적으로 책임진다.

마. 위임자는 인체적용시험 중에 발생한 중대한 부작용 또는 예기치 않은 상황의 발생을 수입자에게

- 4 -

kgp20140149 2018-01-25 14:03:45 이 문서는 한국인삼공사의 동의없이 수정, 변경 및 복사할 수 없습니다.

**제 11 조 [ 양도금지 ]**

위임자와 수입자는 상대방의 사전 서면동의 없이는 본 계약에 의하여 발생하는 권리, 의무를 제3자에게 양도 또는 위임할 수 없다.

**제 12 조 [ 계약의 해석 및 관할 ]**

가. 본 계약서에 명시되어 있지 않은 사항이 있거나 해석상 견해가 다를 때에는 관계법령 및 상관례에 따른다.

나. 본 계약과 관련하여 소송을 제기할 경우에는 서울중앙지방법원을 관할법원으로 한다.

다. 본 계약 내용을 증명하기 위해 계약서 2통을 작성하여 위임자와 수입자가 각기 1통씩 보관한다.

**제 13 조 [ 연구 결과 귀속 ]**

가. 본 연구의 결과는 위임자의 소유로 한다.

나. 수입자는 해당 인체적용시험 결과를 학술지에 게재 발표할 수 있다. 이 경우에 발표 시기와 발표 학술지 선정은 위임자와 수입자의 상호 협의 하에 진행해야 한다.

**제 14 조 [ 기타 ]**

가. 본 계약서 제2조 조건에 해당하는 절차에 따라 일부 미 진행 발생 시 수입자는 위임자에게 계약비용 전액을 환불하기로 하며 만일 위임자의 문제로 미 진행이 될 경우 수입자는 위임자에게 환불하지 않는 것으로 한다.

2018년 01월 30일

위임자 한국인삼공사(주)      수입자 전북대학교병원  
 R&D 본부 기초연구소      전라북도 전주시 덕진구 건지로 20  
 대전광역시 유성구 가정로 30      병원장 : 강 명 재  
 대표이사의 대리인 한 장 균 (인)      (인)

- 6 -

kgp20140149 2018-01-25 14:03:45 이 문서는 한국인삼공사의 동의없이 수정, 변경 및 복사할 수 없습니다.

**제 11 조 [ 양도금지 ]**

위임자와 수입자는 상대방의 사전 서면동의 없이는 본 계약에 의하여 발생하는 권리, 의무를 제3자에게 양도 또는 위임할 수 없다.

**제 12 조 [ 계약의 해석 및 관할 ]**

가. 본 계약서에 명시되어 있지 않은 사항이 있거나 해석상 견해가 다를 때에는 관계법령 및 상관례에 따른다.

나. 본 계약과 관련하여 소송을 제기할 경우에는 서울중앙지방법원을 관할법원으로 한다.

다. 본 계약 내용을 증명하기 위해 계약서 2통을 작성하여 위임자와 수입자가 각기 1통씩 보관한다.

**제 13 조 [ 연구 결과 귀속 ]**

가. 본 연구의 결과는 위임자의 소유로 한다.

나. 수입자는 해당 인체적용시험 결과를 학술지에 게재 발표할 수 있다. 이 경우에 발표 시기와 발표 학술지 선정은 위임자와 수입자의 상호 협의 하에 진행해야 한다.

**제 14 조 [ 기타 ]**

가. 본 계약서 제2조 조건에 해당하는 절차에 따라 일부 미 진행 발생 시 수입자는 위임자에게 계약비용 전액을 환불하기로 하며 만일 위임자의 문제로 미 진행이 될 경우 수입자는 위임자에게 환불하지 않는 것으로 한다.

2018년 01월 30일

위임자 한국인삼공사(주)      수입자 전북대학교병원  
 R&D 본부 기초연구소      전라북도 전주시 덕진구 건지로 20  
 대전광역시 유성구 가정로 30      병원장 : 강 명 재  
 대표이사의 대리인 한 장 균 (인)      (인)

- 6 -

kgp20140149 2018-01-25 14:03:45 이 문서는 한국인삼공사의 동의없이 수정, 변경 및 복사할 수 없습니다.

### 3.2. IRB 서류 준비 및 승인

IRB 심의를 위하여 인체적용시험자 자료집, 연구계획서 및 증례기록서 등을 준비하였으며, 전북대학교병원 기관생명윤리위원회로부터 승인 통지를 받음

KGC인상공사      CTCF2\_2018\_KGC035P      Version 1.0 [2018. 01. 08]

#### 1. 제출자료 전체의 총괄 요약본

**1.1. 품목명**  
공보배추주출물과 홍삼주출물의 복합물(KGC035P)

**1.2. 목표기능**  
호중기 보호 및 증식개선

**1.3. 실험량**  
공보배추주출물과 홍삼주출물말의 복합물로서 1,000 mg/일

**1.4. 원료의 성분**

지표성분명	지표성분의 기능	구조
공보배추 주출물분말	Neperin (Mini-Review in Medicinal Chemistry, 2009, 9:31-59)	
홍삼 주출물분말	Ginsenoside Rg1 황산화(프러리디칼 제거) 및 면역증진활성 (Biochemical Pharmacology 1999, 58:1685-93)	
	Ginsenoside Rb1 황산화(프러리디칼 제거) 및 면역증진활성 (Biochemical Pharmacology 1999, 58:1685-93)	
	Ginsenoside Rg3 염증억제 및 뇌기능강화 (Biological and Pharmaceutical Bulletin 2002, 25:58-63)	

**1.5. 제안 기준 · 규격**

항목	기준 · 규격
성상	갈색의 분말로 이미, 아취가 없어야 한다.
지표성분	Nepetin (mg/g) 4.8~7.2 이어야 한다.
	Ginsenosides(mg/g) 2.2 이상이어야 한다.
중금속	납(mg/kg) 1.0 이하 이어야 한다.
	비소(mg/kg) 1.0 이하 이어야 한다.
	카드뮴(mg/kg) 1.0 이하 이어야 한다.
	수은(mg/kg) 1.0 이하 이어야 한다.
세균수(cfu/g)	3,000 이하 이어야 한다.
대장균군	음성 이어야 한다.

\* Ginsenosides : Ginsenoside Rg1, Rb1, Rg3의 합

KGC인상공사      CTCF2\_2018\_KGC035P      Version 1.0 [2018. 01. 08]

#### 1.6. 안전성

- 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도: "나"
- 공보배추주출물과 홍삼주출물의 복합물은 섭취경험이 있는 공보배추, 홍삼 2종의 원재료를 각각 30% 주정과 물을 이용하여 추출/농축/건조한 단순주출물이며,
- 알려진 부작용이 없고,
- 섭취량이 일상섭취량보다 증가하지 않은 것으로 판단

#### 1.7. 기능성

- 시험관시험

시료	세포주	MH-5 cell (Aveolar macrophage)
실험 방법	Rh-2H3	12-well plate에 RBL-2H3 cell을 5×10 <sup>5</sup> cells/well만큼 분주하여 complete DMEM 1 ml로 배양한다. 24시간 후 공보배추/홍삼 복합물(50 µg/ml)이 용이한 DMEM 500 µl로 양성 대조군에 100 µM montelukast이 포함된 DMEM 500 µl로 10분간 배양한 후 1 µg/ml calcium ionophore 10 µM을 넣어 10분간 배양한다. 이후 상층액을 포이 Leukotriene를 측정
측정 방법	Luciferase reporter system	Catmethyl leukotriene ELISA kit (Enzo, Lifescience, ADI-R01-070)를 이용
결과	공보배추/홍삼 3:1-1:10 비율 처리군에서 대조군에 비해 ROS의 생성억제활성이 가장 높았음	공보배추/홍삼 3:1-1:10 비율 처리군에서 대조군에 비해 leukotriene 생성억제활성이 가장 높았음

시료	세포주	MH-5 cell
실험 방법	Rh-2H3	Rh-2H3 및 대만연소를 1:1 혼합물(총합을 처리농도 25 µg/ml) 처리 후 공보배추 및 홍삼 3:1 복합물(50µg/ml) 처리
측정 방법	Luciferase reporter system	IL-17 mRNA를 quantitative polymerase chain reaction (qPCR)을 이용하여 분석
결과	공보배추와 홍삼 및 그 3:1 혼합물에서 대조군 대비 유의미한 IL-17 mRNA 감소가 관찰됨	

- 동물시험

시�험동물	시험방법	실험항목	유효성 평가 지표	결과
Balb/c mouse	비세균성 구강염증인 Coal (석탄 탄소물), Fly ash (회) 복합염색 등의 연소보유물에서 부식성인 성분에서 DEP (디젤연소분진)을 혼합한 항원여 인트라-나зал-트래키아 인젝션 방법으로 주입하여 기도내 세균 감염을 유발하고 기도내 염색을 염색하여 세균의 증식과 기도내 세균의 분포를 관찰	공보배추/홍삼 3:1 복합물, INT + 50 mg/kg, SAL, Neutrophil + 100 mg/kg, 세균수 + 200 mg/kg, ROS 측정 + 400 mg/kg	* Total BAL cell, * Total lung cell, * BAL Neutrophil, * BAL의 ROS 측정	* BAL의 Lung에서 세균수 감소, * BAL에 Neutrophil 증가, * 세균수 감소, * ROS 감소

- 3 -

CUH201801018002-HE001      2018.12.23 개정본

## 통지서

본 기관의 문서보유기간은 3년입니다.

특수(지원)기관 한국인상공사 R&D본부

신청 연구책임자 홍승기 임원모기 내과 박성주

IRB File No. CUH 2018-01-018-002 심사내용 시정계획서 통지일자 2018.02.14

연구과제명 국문 KGC-03-P8의 호중기 보호 및 증식 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험

영문

임상시험코드 Study Nick Name

연구분류1  약물  생물학적 제제  세포치료제  건강기능식품

의약품  의료기기 (  1등급  2등급  3등급  4등급 )

행정사항 위류

연구분류2  인간대상연구  인체유래물(결핵)연구  의무기록연구

유전자연구  유전자 치료

연구분류3  예방연구  진단연구  치료연구  진단연구  예방연구

기타 ( )

연구분류4  예방연구  진단연구  치료연구  진단연구  예방연구

기타 ( )

연구분류5  인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (In vitro, In vivo preclinical study)

일련번호 HGC-03-P8 상용명

진행도착자명/수/진행 100명 / 국내 100명 / 본원 100명

연구승인기간 2018.02.07 ~ 2019.02.06

지원의뢰기관 기관명 한국인상공사 R&D본부 대표(직위) 성명 박정욱

제출서류목록 (첨부) 연구계획서요약 [1.1] [06 / Feb / 18]  
(첨부) 연구계획서 [1.1] [06 / Feb / 18]  
(첨부) 연구대상자 설명서 및 동의서 [1.1] [06 / Feb / 18]  
(첨부) 증명기록서 [1.1] [06 / Feb / 18]  
(첨부) 변경대기표 [1.1] [06 / Feb / 18]

CUH201801018002-HE001      2018.12.23 개정본

제출서류목록	(첨부) 설명서(별첨1~별첨2) [1.1] [06 / Feb / 18]
공통연구자 추가: 박정욱	
관한근거	평가일자 2018.02.07
기간보고시기	2018년 12월 05일까지 보고
심사결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 시정 내용 및 답변이 적절하며 추가 변경 사항도 연구 수행에 필요한 것으로 판단하여 승인함입니다.

본 위원회는 국제 임상시험 통일안(ICM) 및 임상시험관리기준(GCP), 생명윤리 및 안전에 관한 법률을 준수합니다. 이 연구의 승인유료기간은 최대 1년입니다. 본 통지서에 기재된 승인유료기간을 초과하여 연구를 지속하고자 하는 경우에는 반드시 위원회에서 지정한 기간보고 시기에 기간보고서를 제출하여 승인유료기간을 연장하시기 바랍니다. 이 승인된 연구도 필요한 경우에는 연구계획서에서 기재하여 변경이나 보충을 요청할 수 있습니다. 본 위원회에서 승인된 연구계획서에 따라 연구를 수행하여 하, 위원회의 승인을 받은 연구대상자 설명서 및 동의서, 연구대상자 모집 광고문을 사용해야 합니다. 이 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고, 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행해야 합니다. 또한 연구대상자의 보호를 위해 사전 승인 없이 취해진 변경도 위원회에 즉시 보고해야 합니다. 이 연구 중에 위대중 예상하지 못한 이상 약물 / 의료기기 반응이나, 연구대상자에게 위험을 줄 수 있는 예상하지 못한 문제가 발생할 경우, 연구책임자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다. 이 연구 종료 시 종료 / 결과보고서를 제출할 주시기 바랍니다. 이 연구 결과와 관련하여 본 기관의 사전 서명동의 유효성은 어떤 경우라도 학술목적 이외에 실시 기관명을 사용할 수 없습니다. 본 통지서는 임상시험 관리기준 제6호(가목)에 따른 심사결과 통보서로 사용할 수 있습니다.

**전북대학교병원 생명의학연구윤리심의위원회 위원장**

1 / 2

2 / 2

### 3.3. 임상 연구 계획서

전북대학교 호흡기 알레르기 내과의 전문의들과 임상지원센터와의 협의를 통해 인체적용시험 프로토콜을 완성하였음

<p>KGC인삼공사    CTCF2_2018_KGC-03-PS2    Version 1.0 [2018. 01. 12]</p> <hr/> <h2 style="text-align: center;">인 체 적 용 시 험 계 획 서</h2> <hr/> <p>KGC-03-P8 의 호흡기 보호 및 증상 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>시험용제명</td> <td>KGC-03-P8, 플라세보</td> </tr> <tr> <td>시험계획서번호</td> <td>CTCF2_2018_KGC-03-P82</td> </tr> <tr> <td>시험단계</td> <td>인체적용시험</td> </tr> <tr> <td>의뢰기관</td> <td>한국인삼공사㈜</td> </tr> <tr> <td>시험기관</td> <td>전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터</td> </tr> <tr> <td>시험책임자</td> <td>전북대학교 의과대학 내과학(호흡기학)교실 박 성 주 M.D., Ph.D.</td> </tr> </table> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p>본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 시험책임자 및 시험담당자, 심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험용제품을 제공받은 사람에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 한국인삼공사(주)의 사전서면 동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">기    일    문    서</p> </div> <p style="text-align: right;">Confidential 1   57</p>	시험용제명	KGC-03-P8, 플라세보	시험계획서번호	CTCF2_2018_KGC-03-P82	시험단계	인체적용시험	의뢰기관	한국인삼공사㈜	시험기관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터	시험책임자	전북대학교 의과대학 내과학(호흡기학)교실 박 성 주 M.D., Ph.D.	<p>KGC인삼공사    CTCF2_2018_KGC-03-PS2    Version 1.0 [2018. 01. 12]</p> <p style="text-align: center;">PROTOCOL SIGNATURE PAGE</p> <p>Protocol Title: KGC-03-P8 의 호흡기 보호 및 증상 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험</p> <p>Protocol Number: CTCF2_2018_KGC-03-PS2</p> <p>Protocol Version/ Date: 1.0 / 2018-01-12</p> <p>Sponsor Name: 한국인삼공사(주)</p> <p>Declaration of Investigator</p> <p>I confirm that I have read the above-mentioned protocol and its attachments. I agree to conduct the described trial in compliance with all stipulations of the protocol, regulations and ICH E6 Guideline for Good Clinical Practice (GCP).</p> <p>Principal Investigator Name:    박 성 주</p> <p>Principal Investigator Signature: </p> <p>Date:    2018-01-12</p> <p style="text-align: right;">Confidential 2   60</p>				
시험용제명	KGC-03-P8, 플라세보																
시험계획서번호	CTCF2_2018_KGC-03-P82																
시험단계	인체적용시험																
의뢰기관	한국인삼공사㈜																
시험기관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터																
시험책임자	전북대학교 의과대학 내과학(호흡기학)교실 박 성 주 M.D., Ph.D.																
<p>KGC인삼공사    CTCF2_2018_KGC-03-PS2    Version 1.0 [2018. 01. 12]</p> <p>✦ 인체적용시험계획서 개요</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>제 목</td> <td>KGC-03-P8 의 호흡기 보호 및 증상 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험</td> </tr> <tr> <td>시험계획서번호</td> <td>CTCF2_2018_KGC-03-P82</td> </tr> <tr> <td>의뢰기관</td> <td>한국인삼공사(주)</td> </tr> <tr> <td>시험기관</td> <td>전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터</td> </tr> <tr> <td>시험책임자</td> <td>전북대학교 의과대학 내과학(호흡기학)교실 박 성 주 M.D., Ph.D.</td> </tr> <tr> <td>시험단계</td> <td>인체적용시험</td> </tr> <tr> <td>시험기간</td> <td>IRB 승인일로부터 18개월</td> </tr> </table> <p>지속적인 호흡기 불편 증상이 있는 자를 대상으로 KGC-03-P8 12주 섭취가 호흡기 보호 및 증상 개선에 미치는 효과와 안전성을 평가한다.</p> <p>목    적</p> <p>(1) 1차 목적 SGRQ (Saint George's Respiratory Questionnaire; 세인트조지 호흡기 설문)로 평가되는 KGC-03-P8의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과를 플라세보 섭취와 비교 평가한다.</p> <p>(2) 2차 목적</p> <p style="text-align: right;">Confidential 3   57</p>	제 목	KGC-03-P8 의 호흡기 보호 및 증상 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험	시험계획서번호	CTCF2_2018_KGC-03-P82	의뢰기관	한국인삼공사(주)	시험기관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터	시험책임자	전북대학교 의과대학 내과학(호흡기학)교실 박 성 주 M.D., Ph.D.	시험단계	인체적용시험	시험기간	IRB 승인일로부터 18개월	<p>KGC인삼공사    CTCF2_2018_KGC-03-PS2    Version 1.0 [2018. 01. 12]</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>연구대상자 선 별 기 준</td> <td> <p>폐기능검사, CAT (Chronic Obstructive Pulmonary Disease Assessment Test: 만성폐색성폐질환 평가검사), mMRC (modified Medical Research Council Dyspnea Scale: 호흡곤란점수), 열중지표, 상기도감염 발생 정도로 평가되는 KGC-03-P8의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과와 안전성을 플라세보 섭취와 비교 평가한다.</p> <p>대상자 수    총 100명(KGC-03-P8군 50명, 플라세보군 50명)</p> <p>(1) 스크리닝 당시 만 19세 이상 70세 이하의 성인 남·여 (2) 최근 1개월 이상 호흡기 불편 증상(기침, 가래, 호흡곤란 등)이 지속적으로 있는 자 (3) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</p> <p>연구대상자 제 외 기 준</p> <p>(1) 만성폐색성폐질환(COPD) 또는 천식, 기타 임상적으로 유의한 호흡기 질환을 진단받거나 의심되는 자 (2) 기관지확장제 폐기능검사서 FEV<sub>1</sub>/FVC가 70% 미만이거나 FVC가 80% 미만인 자 (3) 기관지과민성이 있는 자(폐기능검사서 기관지확장제 흡입 10~15분 후 FEV<sub>1</sub>이 12% 이상, 그리고 200 mL 이상 증가한 자) (4) 단순흡부활영에서 임상적으로 유의한 폐질환 소견이 있는 자 (5) 약물 및 인체적용시험용제물에 대한 과민반응 또는 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자 (6) 스크리닝 검사일로부터 2주 이내에 시험 결과에 영향을 줄 수 있는 전문의약품, 한약, 일반의약품(OTC: Over-the-Counter) 또는 건강기능식품을 복용한 자</p> </td> </tr> </table> <p style="text-align: right;">Confidential 4   57</p>	연구대상자 선 별 기 준	<p>폐기능검사, CAT (Chronic Obstructive Pulmonary Disease Assessment Test: 만성폐색성폐질환 평가검사), mMRC (modified Medical Research Council Dyspnea Scale: 호흡곤란점수), 열중지표, 상기도감염 발생 정도로 평가되는 KGC-03-P8의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과와 안전성을 플라세보 섭취와 비교 평가한다.</p> <p>대상자 수    총 100명(KGC-03-P8군 50명, 플라세보군 50명)</p> <p>(1) 스크리닝 당시 만 19세 이상 70세 이하의 성인 남·여 (2) 최근 1개월 이상 호흡기 불편 증상(기침, 가래, 호흡곤란 등)이 지속적으로 있는 자 (3) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</p> <p>연구대상자 제 외 기 준</p> <p>(1) 만성폐색성폐질환(COPD) 또는 천식, 기타 임상적으로 유의한 호흡기 질환을 진단받거나 의심되는 자 (2) 기관지확장제 폐기능검사서 FEV<sub>1</sub>/FVC가 70% 미만이거나 FVC가 80% 미만인 자 (3) 기관지과민성이 있는 자(폐기능검사서 기관지확장제 흡입 10~15분 후 FEV<sub>1</sub>이 12% 이상, 그리고 200 mL 이상 증가한 자) (4) 단순흡부활영에서 임상적으로 유의한 폐질환 소견이 있는 자 (5) 약물 및 인체적용시험용제물에 대한 과민반응 또는 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자 (6) 스크리닝 검사일로부터 2주 이내에 시험 결과에 영향을 줄 수 있는 전문의약품, 한약, 일반의약품(OTC: Over-the-Counter) 또는 건강기능식품을 복용한 자</p>
제 목	KGC-03-P8 의 호흡기 보호 및 증상 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험																
시험계획서번호	CTCF2_2018_KGC-03-P82																
의뢰기관	한국인삼공사(주)																
시험기관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터																
시험책임자	전북대학교 의과대학 내과학(호흡기학)교실 박 성 주 M.D., Ph.D.																
시험단계	인체적용시험																
시험기간	IRB 승인일로부터 18개월																
연구대상자 선 별 기 준	<p>폐기능검사, CAT (Chronic Obstructive Pulmonary Disease Assessment Test: 만성폐색성폐질환 평가검사), mMRC (modified Medical Research Council Dyspnea Scale: 호흡곤란점수), 열중지표, 상기도감염 발생 정도로 평가되는 KGC-03-P8의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과와 안전성을 플라세보 섭취와 비교 평가한다.</p> <p>대상자 수    총 100명(KGC-03-P8군 50명, 플라세보군 50명)</p> <p>(1) 스크리닝 당시 만 19세 이상 70세 이하의 성인 남·여 (2) 최근 1개월 이상 호흡기 불편 증상(기침, 가래, 호흡곤란 등)이 지속적으로 있는 자 (3) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</p> <p>연구대상자 제 외 기 준</p> <p>(1) 만성폐색성폐질환(COPD) 또는 천식, 기타 임상적으로 유의한 호흡기 질환을 진단받거나 의심되는 자 (2) 기관지확장제 폐기능검사서 FEV<sub>1</sub>/FVC가 70% 미만이거나 FVC가 80% 미만인 자 (3) 기관지과민성이 있는 자(폐기능검사서 기관지확장제 흡입 10~15분 후 FEV<sub>1</sub>이 12% 이상, 그리고 200 mL 이상 증가한 자) (4) 단순흡부활영에서 임상적으로 유의한 폐질환 소견이 있는 자 (5) 약물 및 인체적용시험용제물에 대한 과민반응 또는 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자 (6) 스크리닝 검사일로부터 2주 이내에 시험 결과에 영향을 줄 수 있는 전문의약품, 한약, 일반의약품(OTC: Over-the-Counter) 또는 건강기능식품을 복용한 자</p>																

시행용 제품명	<p>(7) 임상적으로 유의한 신경계 질환, 정신계 질환, 라일환, 내분비계 질환, 알레르기 및 면역계 질환, 심장질환, 악성종양, 자기면역질환 등을 앓거나 과거력이 있는 자</p> <p>(8) 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등 급성 중증 심혈관계 질환이 있는 자</p> <p>(9) 수축기혈압 160 mmHg, 이완기혈압 100 mmHg 이상인 자(단, 약물 치료 등으로 혈압을 안정적으로 조절 중인 자는 참여 가능)</p> <p>(10) 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론씨 병)이 있거나 위장관계 수술(단, 단순흡수술기절제술이나 발장수술은 제외) 과거력이 있는 자</p> <p>(11) 진단검사의학검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ AST, ALT &gt; 정상범위 상한치의 2 배</li> <li>☞ serum creatinine &gt; 2.0 mg/dL</li> </ul> <p>(12) 알코올 중독 또는 약물 남용 병력이 있거나 의심되는 자</p> <p>(13) 임신부, 수유부 또는 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 기형기 여성</p> <p>(14) 스크리닝 전 2개월 이내에 다른 인체적용시험에 참여한 자</p> <p>(15) 그 외 시험자 편의에 따라 인체적용시험 참여가 불가능할 것으로 판단된 자</p>
시험용 제품명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• KGC-03-P8 (홍삼추출물과 글보배추추출물의 복합물)</li> <li>• 플라세보</li> </ul>
섭취 방법	<p>연구대상자는 인체적용시험용제품을 하루 2 회, 아침과 저녁 식후에 물과 함께 섭취한다.</p> <p>(1) KGC-03-P8 (800 mg/정) : 1 일 2 회, 1 회 2 정(2,400 mg/일), 글보배추추출물과 홍삼추출물의</p>

Confidential 6 | 57

시험용 제품명	<p>복합물트러 1,000 mg/일)</p> <p>(2) 플라세보(800 mg/정) : 1 일 2 회, 1 회 2 정(2,400 mg/일)</p>
섭취 기간	12 주
시험 방법	<p>12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 맹행군, 플라세보-대조 인체적용시험 [스크리닝, 제-21 일 ~ 제-1 일]</p> <p>자원자에 한하여 인체적용시험 예정일(0 주)로부터 3 주 이내(제-21 일 ~-1 일)에 문진, 신체검진, 진단검사의학 검사 등 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험에 연구대상자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정한다.</p> <p>[1차방문, 제 1 일]</p> <p>연구대상자는 제 1 일(0 주) 시험기간에 방문하여 정해진 검사를 수행한다. 연구대상자는 KGC-03-P8 또는 플라세보 섭취군에 무작위배정되며, 6 주 분량의 인체적용시험용제품을 제공받는다. 이후 6 주간 매일 인체적용시험용제품을 섭취하며 일상생활을 한다.</p> <p>[2차방문, 제 43 일]</p> <p>연구대상자는 제 43 일(6 주)에 시험기간에 방문하여 정해진 검사를 수행하며, 지난 6 주간 섭취하고 남은 제품을 반납하고, 다시 6 주 분량의 제품을 제공받는다. 이후 6 주간 매일 인체적용시험용제품을 섭취하며 일상생활을 한다.</p> <p>[3차방문, 제 85 일]</p> <p>연구대상자는 제 85 일(12 주)에 시험기간에 방문하여 정해진 검사를 수행하며, 지난 6 주간 섭취하고 남은 제품을 반납한다. 이로써 총 12 주간의 인체적용시험 참여를 마친다.</p>

Confidential 6 | 57

평가 방법	<p>(1) 유효성 평가</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 1 차 유효성평가             <ul style="list-style-type: none"> <li>• SGRO 점수</li> </ul> </li> <li>2) 2 차 유효성평가             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 폐기능검사                 <ul style="list-style-type: none"> <li>- FVC (Forced Vital Capacity: 노력최활량)</li> <li>- FEV<sub>1</sub> (Forced Expiratory Volume in 1 second: 1 초노력호기량)</li> <li>- FVC/FEV<sub>1</sub> (일초율)</li> </ul> </li> <li>• CAT 점수</li> <li>• mMRC 점수</li> <li>• 염증지표                 <ul style="list-style-type: none"> <li>- PGE2 (Prostaglandin E2)</li> <li>- hs-CRP (High Sensitive C-Reactive Protein: 고감도 C 반응단백)</li> <li>- ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate: 적혈구침강속도)</li> </ul> </li> <li>• 상기도감염 발생 정도                 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 상기도감염 발생률</li> </ul> </li> </ul> </li> </ol>
-------	--

Confidential 7 | 57

평가 방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 상기도감염 증상 중증도</li> <li>- 상기도감염 발생 기간</li> </ul> <p>(2) 안전성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 자·타감 증상 등 이상반응 모니터링</li> <li>• 신체검진</li> <li>• 진단검사의학 검사</li> <li>• 심전도 및 활력징후</li> </ul> <p>(3) 평가변수 및 통계분석 방법</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>① 인구학적 정보             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 연속형 변수는 군별 평균과 표준편차를 제시하고, independent t-test를 적용하여 분석한다.</li> <li>• 범주형 변수는 각 수준별로 빈도와 비율을 제시하고 Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 적용하여 분석한다.</li> </ul> </li> <li>② 유효성 평가             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 각 섭취군 내의 기지치(시험용제품 섭취 전: 0 주) 대비 섭취 6 주, 12 주 후의 변화는 paired t-test를 적용하여 분석한다.</li> <li>• 기지치 대비 섭취 6 주 후의 변화 분석은 SGRO 점수, CAT 점수, mMRC 점수에 한한다.</li> <li>• 유효성 평가항목 변화량(섭취 6 주 후 값 - 섭취 전 값, 섭취 12 주 후 값 - 섭취 전 값)에 대한 섭취군 간의 차이는 independent t-test를 적용하여 분석한다.</li> <li>• 섭취 6 주 후 값 - 섭취 전 값에 대한 섭취군 간의 차이</li> </ul> </li> </ol>
-------	---

Confidential 8 | 57

분석은 8GRQ 점수, CAT 점수, mMRC 점수에 한한다.

- 유효성 평가항목 중 상기도암 발생 빈도는 각 설취군에서 상기도암 발생률이 발생한 연구대상자의 비율을 계산하고 설취군 간의 차이는 chi-square test 또는 Fisher's exact test 를 적용하여 분석한다. 상기도암 발생률 증상 중증도와 발생 기간에 대한 설취군 간의 차이는 independent t-test 를 적용하여 분석한다.

③ 안전성 평가

- 이상반응 발생률은 인체적용시험 기간 동안 보고된 모든 이상반응을 대표화한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각 설취군에서 이상반응이 발생한 연구대상자의 비율을 계산하고 설취군 간의 차이는 chi-square test 또는 Fisher's exact test 를 적용하여 평가한다.
- 진단검사의학검사, 활력징후 등의 각 설취군 내의 기저치 대비 설취 12 주 후의 변화는 paired t-test 를 적용하여 분석한다. 변화량(설취 12 주 후 값 - 설취 전 값)에 대한 설취군 간의 차이는 independent t-test 를 적용하여 분석한다.

④ 중도탈락 등에 의한 결측치는 LOCF (Last Observation Carried Forward) 방법을 통해 처리한다.

◆ 일경요약

항목	스크리닝 <sup>1)</sup>	설취기간 <sup>2)</sup>			
		-3 주 이내	1 차방문	2 차방문	3 차방문
		주-1 일~1 일	0 주(제 1 일)	6 주(제 43 일)	12 주(제 85 일)
사면통지서 <sup>3)</sup> , 인구학적 정보 · 병력 조사	●				
약물부여제 조사	●	●	●	●	●
종연력 · 음주력 조사	●	●	●	●	●
선명/재외기관 확인	●	●			
부락위탁명		●			
신체감진, 신체계측 <sup>4)</sup>	●				●
의학적 상태 변화 및 이상반응 조사 <sup>5)</sup>		●	●	●	●
활력징후 <sup>6)</sup>	●	●	●	●	●
진단검사의학 검사 <sup>7)</sup> , 상전도 <sup>8)</sup>	●				●
다문통부활명	●				
유효성 평가	8GRQ, CAT, mMRC		●	●	●
	활력징후 <sup>6)</sup>	●			●
	영양지표 <sup>9)</sup>		●		●
	상기도암 발생 정도		●	●	●
추가분석을 위한 혈액 샘플 수집		●			●
인체적용시험장계통 계량		●	●		
식사지도 및 식이기록지 평가	●	●	●		
신이성제조사 <sup>10)</sup>		●	●	●	
방납기록 회수, 순응도 평가				●	●

<sup>1)</sup>선명/재외기관을 만족시키지 못하는 연구대상자에 대해서는 이후 계획된 검사를 실시하지 않을 수 있다.  
<sup>2)</sup>Visit window: 2 차, 3 차 방문은 예정 방문일 전 7 일, 후 7 일 이내 방문을 허용한다.

<sup>1)</sup>진단검사의학 검사, 유전도: 스크리닝 전 최근 4 주 이내의 검사 결과로 인정할 수 있다(단, 진단검사의학사는 예외임).  
<sup>2)</sup>연구대상자가 사면통지한 후에 본 시험에 참여할 수 있다.  
<sup>3)</sup>스크리닝, 3 차방문 시 동일한 신장검사와 정맥혈을 이용하여 신장과 정맥을 측정하며, 3 차방문 시 신장은 스크리닝 측정항목로 대신한다.  
<sup>4)</sup>1 차방문 시에는 의학적 상태 변화율, 2 차와 3 차방문 시에는 이상반응을 조사한다.  
<sup>5)</sup>수축기 · 이완기 혈압, 맥박수를 측정한다.  
<sup>6)</sup>활력학적 검사, 활력생화학적 검사, 노령사, 진단검사의학(어두기 여색) 항여색을 시행한다.  
<sup>7)</sup>PVC, FEV1, FVC/FEV1 을 측정한다.  
<sup>8)</sup>PGEE, hs-CRP, ESR 을 측정한다.  
<sup>9)</sup>식이(특정) 작성법: 1 차, 2 차, 3 차방문일 직전 하루 동안 섭취한 모든 음식, 음료를 기록한다.

목 차

1. 인체적용시험의 명칭	1 7
2. 인체적용시험의 실시기관명 및 주소	1 7
3. 인체적용시험의 책임자 및 시험담당자의 성명 및 직명	1 7
4. 인체적용시험 의뢰자명 및 주소	1 8
5. 인체적용시험의 목적 및 배경	1 8
5.1. 인체적용시험의 목적	1 8
5.2. 인체적용시험의 배경	1 8
6. 인체적용시험용제품의 분량 및 제형	2 0
6.1. 인체적용시험에 사용하는 제품의 포장	2 1
6.2. 인체적용시험에 사용하는 제품의 라벨링	2 1
6.3. 인체적용시험에 사용하는 제품의 견본	2 1
6.4. 인체적용시험용제품의 이동가능성 유지 및 폐기	2 2
7. 연구대상자의 선정기준, 제외기준, 목표한 연구대상자의 수 및 그 근거	2 2
7.1. 선정기준	2 2
7.2. 제외기준	2 2
7.3. 목표한 연구대상자 수 및 설정근거	2 4
8. 인체적용시험 기간	2 6
9. 인체적용시험의 방법	2 6
9.1. 시험디자인	2 6
9.2. 시험일정	2 8
9.3. 설취량, 설취방법 및 설취기간	2 7
9.4. 통량 설정 근거	2 7
9.5. 스크리닝 번호와 연구대상자 번호 부여방법	2 8

9.6. 약물요법 ..... 2 8

9.7. 주의사항 ..... 2 9

9.8. 병용가능 약물 ..... 2 9

9.9. 병용금지 약물 ..... 3 0

10. 관찰·임상경사 항목과 방법 ..... 3 0

10.1. 관찰·임상경사항목 ..... 3 0

10.2. 관찰·임상경사방법 ..... 3 2

10.3. 저혈량 ..... 3 9

10.4. 생물과 자료의 보관 및 폐기 ..... 3 9

11. 예측 부작용 및 사용상의 주의사항 ..... 4 0

12. 중지, 탈락기준 ..... 4 0

12.1. 인체적용시험중재품 섭취의 일시적 중지 ..... 4 0

12.2. 인체적용시험중재품 섭취의 중지 ..... 4 1

12.3. 탈락기준 ..... 4 1

12.4. 인체적용시험의 중지 ..... 4 2

12.5. 시험 종료 ..... 4 8

12.6. 연구대상자의 대접 ..... 4 8

13. 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법(통계분석방법) ..... 4 8

13.1. 인구학적 정보 ..... 4 8

13.2. 유효성평가 ..... 4 4

13.3. 안전성평가 ..... 4 6

13.4. 통계분석방법 ..... 4 6

14. 부작용을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법 ..... 4 7

14.1. 이상반응 및 중대한 이상반응의 정의 ..... 4 7

14.2. 이상반응의 기록 ..... 4 8

14.3. 이상반응의 중정도 및 인체적용시험중재품과의 인과관계 평가 ..... 4 9

14.4. 중대한 이상반응·이상약물반응의 보고 ..... 6 1

14.5. 이상반응의 추적 관찰 ..... 6 1

15. 피해자 보상 ..... 6 1

16. 인체적용시험 후 연구대상자의 진료 및 치료기준 ..... 6 2

17. 연구대상자의 안전보호에 관한 대책 ..... 6 2

18. 그 밖에 인체적용시험을 안전하게 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항 ..... 6 8

18.1. 시험기관 ..... 6 8

18.2. 계획서의 변경 ..... 6 4

18.3. 평가 및 실험조사 ..... 6 4

18.4. 자료의 보관 및 열람 ..... 6 4

18.5. 자료의 기록 및 관리 ..... 6 6

18.6. 연구대상자의 신분 기밀 보장 ..... 6 8

18.7. 비밀 유지 및 시험결과의 공표 ..... 6 8

19. 참고문헌 ..... 6 7

※ 약어 및 용어정의

AE	Adverse Events
ALP	Alkaline Phosphatase
ALT	L-Alanine Aminotransferase
AST	L-Aspartate Aminotransferase
BPM	Beat Per Minute
BUN	Blood Urea Nitrogen
CAT	Chronic Obstructive Pulmonary Disease Assessment Test
CK	Creatine Kinase
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
ECG	Electrocardiogram
ESR	Erythrocyte Sedimentation Rate
FEV <sub>1</sub>	Forced Expiratory Volume In 1 second
FVC	Forced Vital Capacity
GCP	Good Clinical Practice
GGT	Gamma-glutamyltransferase
Hb	Hemoglobin
Hct	Hematocrit
hs-CRP	High Sensitive C-Reactive Protein
ICD	Informed Consent Document
ICH	International Conference on Harmonization
IRB	Institutional Review Board
LOCF	Last Observation Carried Forward
mMRC	Modified Medical Research Council Dyspnea Scale

OTC	Over-the-Counter
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PLT	Platelet count
PY	Pack Year
RBC	Red Blood Cell
SGRQ	Saint George's Respiratory Questionnaire
WBC	White Blood Cell

#### 4. 인체 적용 시험 진행 사항 (전북대학교병원)

##### 4.1. 연구대상자 모집 및 선별검사

##### 4.1.1. 연구대상자 모집 및 선별검사(Screening)

인체적용시험계획서에 제시된 목표 연구대상자 수 모집 및 선정 및 제외기준에 적합한 연구 대상자 선정을 위한 선별 검사

##### 4-1-2. 인체적용시험 수행

인체적용시험계획서에 따라 선정된 연구대상자를 토대로 수행



##### 4.1.3. 인체적용시험 수행 현황

- 목표 연구대상자 수: 80명
- 총 선별검사(Screening) 수: 100명
- 총 연구대상자 등록 수: 100명
- 중도탈락자 수: 10명

##### 4.1.4. 연구대상자 인체적용시험 참여 실태

- 본 인체적용시험의 등록 목표 연구대상자 수는 80명으로 총 100명의 자원자가 서면동의를 한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자중 10명이 중도탈락(시험군 6명, 대조군 4명)하고 2명이 계획서를 위한(시험군 2명)하여 총 88명(시험군 42명, 대조군 46명)이 인체적용 시험 계획서에 명시된 모든 절차를 수행 완료하였다.
- 본 인체적용시험에 등록된 연구대상자의 인구학적 정보를 아래에 제시하였다.

##### 인구학적 정보

		Total (n=100)
Sex (n)	남성	39 (39 %)
	여성	61 (61 %)
Age (years)		41.25 ± 15.56
Height (cm)		164.47 ± 10.30
Weight (kg)		64.97 ± 13.26
음주여부 (%)	예	47 (47 %)

	아니오	53 (53 %)
흡연여부 (%)	예	16 (16 %)
	아니오	80 (80 %)
	과거흡연자	4 (4 %)
수축기 혈압(mmHg)		119.76 ± 16.41
이완기 혈압 (mmHg)		73.27 ± 11.67
맥박수 (bpm)		75.95 ± 10.02

#### 4.2. 연구 결과

- 100명을 대상으로 한 인체적용시험 연구가 종료 되었으며(1/24), 프로토콜의 통계분석 방법에 따라 결과를 확인하였다.
- 인체적용시험 결과

연구정보	인체적용시험 보고서			
	Vol		게재연도	시작페이지
연구제목	홍삼공보배추복합물(KGC-03-PS)의 호흡기 보호 및 증상개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험			
연구목적	지속적인 호흡기 불편 증상이 있는 자를 대상으로 KGC-03-PS 12주 섭취가 호흡기 보호 및 증상 개선에 미치는 효과와 안전성을 평가			
연구유형	인체적용시험	IRB 구성 및 승인		Y
실험설계	Randomized	Double-blind	Paralled	Placebo controlled
대상자 특징	<b>대상자 선정 기준</b> 1) 만 19세 이상 70세 이하의 성인 남·녀 2) 최근 1개월 이상 호흡기 불편 증상(기침, 가래, 호흡곤란 등)이 지속적으로 있는 사람 ↳ 전문의 진단에 의한 선정(설문, 검사 등을 통한 종합적 판단) 3) 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 사람			
	<b>대상자 제외기준</b> 1) 만성폐쇄성질환(COPD) 또는 천식, 기타 임상적으로 유의한 호흡기 질환을 진단받거나 의심되는 자   ↳ 폐기능검사, 혈액검사, 흉부 X-ray 검사, 병력 및 약물사용 조사 등 2) 기관지확장제 폐기능검사에서 FEV1/FVC 70% 미만이거나 FVC가 80% 미만인 자 3) 기관지과민성이 있는 자 (폐기능검사에서 기관지확장제 흡입 10~15분 후 FEV1이 12% 이상, 그리고 200ml 이상 증가한 자) 4) 단순흉부촬영에서 임상적으로 유의한 폐질환 소견이 있는 자 5) 약물 및 인체적용시험용제품에 대한 과민반응 또는 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자 6) 스크리닝 검사일로부터 2주 이내 시험 결과에 영향을 줄 수 있는 전문의약품, 한약, 일반의약품(OTC) 또는 건강기능식품을 복용한 자 7) 임상적으로 유의한 신경계 질환, 정신계 질환, 간질환, 내분비계 질환, 알레르기 및 면역계 질환, 신장질환, 약성중양, 자가면역질환 등을 앓거나 과거력이 있는 자 8) 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 자			

	<p>9) 수축기혈압 160 mmHg, 이완기혈압 100 mmHg 이상인 사람 (단, 약물치료 등으로 혈압을 안정적으로 조절 중인 자는 참여 가능)</p> <p>10) 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론씨병)이 있거나 위장관계 수술(단, 단순충수돌기절제술이나 탈장수술 등은 제외) 과거력이 있는 자</p> <p>11) 진단검사의학검사서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자  - AST, ALT &gt; 참고범위 상한치의 2배  - Serum creatinine &gt; 2.0 mg/dL</p> <p>12) 알코올 중독 또는 약물 남용 병력이 있거나 의심되는 자</p> <p>13) 임신부, 수유부 또는 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임기 여성</p> <p>14) 스크리닝 전 2개월 이내에 다른 인체적용시험에 참여한 자</p> <p>15) 그 외 시험자 판단에 따라 인체적용시험 참여가 불가능할 것으로 판단된 자</p>								
<b>특징</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 연령 : 만 19세 이상 70세 이하의 남·녀</li> <li>■ 대상 : 1개월 이상 호흡기 불편 증상(기침, 가래, 호흡곤란 등)이 있는 건강인 또는 반건강인</li> </ul>								
<b>시험물질</b>	홍삼곰보배추복합물 KGC-0 3 -PS (홍삼추출분말과(1) 곰보배추추출분말(3)의 복합물)								
<b>시험디자인</b>	<table border="1"> <tr> <td>대조군</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>placebo  <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 결정셀룰로오스 101 (70.450%), 말토덱스트린 (21.532%), 이산화규소 (2.000%), 스테아린산마그네슘(1.000%), 식용색소 황색 제4호(0.200%), 식용색소 적색 제40호(0.050%), 식용색소 청색 제1호 (0.018%), 히드록시프로필메틸셀룰로오스 (3.150%), 카라멜색소분말 (0.450%), 자당지방산에스테르 (0.350%), 이산화티타늄 (0.800%)</li> </ul> </li> <li>positive 없음</li> <li>negative 없음</li> </ul> </td> </tr> <tr> <td>시험군</td> <td>홍삼추출물분말, 곰보배추추출물분말 3:1 복합물 (타블렛, 50명)</td> </tr> <tr> <td>디자인</td> <td> <p>12주간, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조</p> <p>스크리닝 (-3 주 이내)   무작위배정 (0 주)   1차방문 (6 주)   2차방문 (12 주)   시험종료 (12 주)</p> <p>무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험</p> <p>KGC-03-PS 군 (n=50)  플라세보군 (n=50)</p> <p>섭취량: 홍삼곰보배추복합물 1g/day</p> <p>섭취기간: 12주</p> </td> </tr> <tr> <td>식이조절</td> <td>식이섭취조사는 식사기록법에 따르며 연구대상자는 인체적용시험용제품 섭취 전과 섭취 12주 후에 작성한 식이기록지를 CAN Pro 4.0 프로그램을 이용하여 분석하였다.</td> </tr> </table>	대조군	<ul style="list-style-type: none"> <li>placebo  <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 결정셀룰로오스 101 (70.450%), 말토덱스트린 (21.532%), 이산화규소 (2.000%), 스테아린산마그네슘(1.000%), 식용색소 황색 제4호(0.200%), 식용색소 적색 제40호(0.050%), 식용색소 청색 제1호 (0.018%), 히드록시프로필메틸셀룰로오스 (3.150%), 카라멜색소분말 (0.450%), 자당지방산에스테르 (0.350%), 이산화티타늄 (0.800%)</li> </ul> </li> <li>positive 없음</li> <li>negative 없음</li> </ul>	시험군	홍삼추출물분말, 곰보배추추출물분말 3:1 복합물 (타블렛, 50명)	디자인	<p>12주간, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조</p> <p>스크리닝 (-3 주 이내)   무작위배정 (0 주)   1차방문 (6 주)   2차방문 (12 주)   시험종료 (12 주)</p> <p>무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험</p> <p>KGC-03-PS 군 (n=50)  플라세보군 (n=50)</p> <p>섭취량: 홍삼곰보배추복합물 1g/day</p> <p>섭취기간: 12주</p>	식이조절	식이섭취조사는 식사기록법에 따르며 연구대상자는 인체적용시험용제품 섭취 전과 섭취 12주 후에 작성한 식이기록지를 CAN Pro 4.0 프로그램을 이용하여 분석하였다.
	대조군	<ul style="list-style-type: none"> <li>placebo  <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 결정셀룰로오스 101 (70.450%), 말토덱스트린 (21.532%), 이산화규소 (2.000%), 스테아린산마그네슘(1.000%), 식용색소 황색 제4호(0.200%), 식용색소 적색 제40호(0.050%), 식용색소 청색 제1호 (0.018%), 히드록시프로필메틸셀룰로오스 (3.150%), 카라멜색소분말 (0.450%), 자당지방산에스테르 (0.350%), 이산화티타늄 (0.800%)</li> </ul> </li> <li>positive 없음</li> <li>negative 없음</li> </ul>							
	시험군	홍삼추출물분말, 곰보배추추출물분말 3:1 복합물 (타블렛, 50명)							
	디자인	<p>12주간, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조</p> <p>스크리닝 (-3 주 이내)   무작위배정 (0 주)   1차방문 (6 주)   2차방문 (12 주)   시험종료 (12 주)</p> <p>무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험</p> <p>KGC-03-PS 군 (n=50)  플라세보군 (n=50)</p> <p>섭취량: 홍삼곰보배추복합물 1g/day</p> <p>섭취기간: 12주</p>							
식이조절	식이섭취조사는 식사기록법에 따르며 연구대상자는 인체적용시험용제품 섭취 전과 섭취 12주 후에 작성한 식이기록지를 CAN Pro 4.0 프로그램을 이용하여 분석하였다.								
<b>평가방법</b>	<p><b>[1차 유효성 평가]</b></p> <p>1) 세인트조지 호흡기 설문지 (SGRQ ; Saint George's Respiratory Questionnaire)</p> <p><b>[2차 유효성 평가]</b></p> <p>1) 폐기능검사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 노력폐활량 (FVC, Forced Vital Capacity)</li> <li>- 1초 노력호기량 (FEV1, Forced Expiratory Volume in 1 second)</li> </ul>								

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 일초율 (FEV1 / FVC)</li> <li>2) 호흡기증상검사 (CAT ; COPD assessment test)</li> <li>3) 호흡곤란점수(mMRC; modified Medical Research Council dyspnea scale)</li> <li>4) 염증지표: PGE2(Prostaglandin E2), hs-CRP(high sensitivity C-reactive protein) ESR(Erythrocyte Sedimentation Rate)</li> <li>5) 상기도감염 발생 정도 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 상기도감염 발생률</li> <li>- 상기도감염 증상 중증도</li> <li>- 상기도감염 발생 기간</li> </ul> </li> </ul> <p><b>[안전성평가]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>1) 자, 타각 증상 등 이상반응 모니터링 2) 신체검진</li> <li>3) 진단검사의학 검사</li> <li>3) 심전도 및 활력징후</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>통계처리</b></p>	<p>분석에 사용할 프로그램은 windows용 SAS 9.4를 이용하였고, 통계학적 유의수준인 p값은 0.05 미만으로 설정하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>1. 인구학적 정보 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연속형 변수는 군별 평균과 표준편차를 제시하고, independent t-test를 적용하여 분석한다.</li> <li>- 범주형 변수는 각 수준별로 빈도와 비율을 제시하고 Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 적용하여 분석한다.</li> </ul> </li> <li>2. 유효성 분석방법 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 각 섭취군 내의 기저치(시험용제품 섭취 전; 0주) 대비 섭취 6주, 12주 후의 변화는 paired t-test를 적용하여 분석한다.(기저치 대비 섭취 6주 후의 변화 분석은 SGRQ 점수, CAT 점수, mMRC 점수에 한한다.)</li> <li>- 유효성 평가항목 변화량(섭취 6주 후 값 - 섭취 전 값, 섭취 12주 후 값 - 섭취 전 값)에 대한 섭취군 간의 차이는 independent t-test를 적용하여 분석한다. (섭취 6주 후 값 - 섭취 전 값에 대한 섭취군 간의 차이 분석은 SGRQ 점수, CAT 점수, mMRC 점수에 한한다.)</li> <li>- 유효성 평가항목 중 상기도 감염 발생 빈도는 각 섭취군에서 상기도감염 증상이 발생한 연구대상자의 비율을 계산하고 섭취군 간의 차이는 chi-square test 또는 Fisher's exact test를 적용하여 분석한다. 상기도감염 증상 중증도와 발생기간에 대한 섭취군 간의 차이는 independent t-test를 적용하여 분석한다.</li> </ul> </li> <li>3. 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 이상반응 발생률은 인체적용시험 기간 동안 보고된 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각 섭취군에서 이상반응이 발생한 연구대상자의 비율을 계산하고 섭취</li> </ul> </li> </ul>

군 간의 차이는 chi-square test 또는 Fisher's exact test를 적용하여 평가한다.

- 진단검사의학검사, 활력징후 등의 각 섭취군 내의 기저치 대비 섭취 12주 후의 변화는 paired t-test를 적용하여 분석한다. 변화량(섭취 12주 후 값 - 섭취 전 값)에 대한 섭취군 간의 차이는 independent t-test를 적용하여 분석한다.

4. 결측치 통계

- 중도탈락 등에 의한 결측치는 LOCF(Last Observation Carried Forward) 방법을 통해 처리한다.

**[인체적용시험 기관 및 책임자]**

실시기관명	책임자	전공분야
전북대학교병원	박성주 교수	호흡기알레르기내과

**[피험자 정보 : FA set]**

		시험군	대조군	p-value
피험자 수	남성	18	21	0.5385
	여성	32	29	
	Total	50	50	
연령		41.12±15.42	41.38±15.86	0.9339

**[1차 유효성 평가]**

1) 세인트조지 호흡기 설문 점수 : SGRQ(Saint George's Respiratory Questionnaire)

- FA set (Full Analysis) : 유의적 결과 없음

항목	시험군 (n=47)	대조군 (n=47)	p-value
Symptom	18.40±15.09	18.28±13.87	0.9678
Activity	10.25±15.10	9.35±11.17	0.7434
Impact	9.93±11.30	6.39±10.23	0.1143
Total	11.53±10.03	9.40±7.79	0.2539

- 추가분석 : CAT 점수 7 이상 → SGRQ 유의적 개선 확인

항목	시험군 (n=23)	대조군 (n=19)	p-value
Symptom	23.54±14.90	14.02±13.77	<b>0.0391</b>
Activity	14.77±18.27	11.56±12.60	0.5209
Impact	15.86±11.18	9.20±12.50	0.0759
Total	16.88±9.39	10.78±8.81	<b>0.0371</b>

- 추가분석 : CAT 점수 7 미만 → symptom 항목 유의성 있음

시험결과

항목	시험군 (n=24)	대조군 (n=28)	p-value
Symptom	13.48±13.83	21.17±13.42	<b>0.0474</b>
Activity	5.91±9.81	7.84±10.05	0.4882
Impact	4.25±8.18	4.48±8.04	0.9184
Total	6.39±7.79	8.46±7.02	0.3178

※ SGRQ 세인트조지 호흡기 설문지 [첨부 1]

## [2차 유효성 평가]

### 1) 폐기능 검사

- **FA set** : 기관지 확장제 투여 전, **FEV1/FVC**는 FA군과 기저치 CAT 점수 7점 이상인 하위 그룹에서 인체적용시험용제품 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 **유의하게 감소함**( $p=0.025, 0.0117$ ).

인체적용시험에 참여한 연구대상자는 지속적인 호흡기 증상은 있으나, 폐기능검사등을 통해 평가하였을 때 평균적으로 FEV1/FVC 가 80% 이상인 임상적으로 질환이 없다고 판단되는 건강인 또는 준건강인으로 폐기능 검사수치는 일반적으로 치료제를 통해서도 유의한 변화를 나타내지 않는 것으로 알려져 있으며, 본 연구 검사 결과 전체적으로 기저치 대비 12주 후에 폐기능 검사 수치가 저하된 것을 확인할 수 있다. 따라서, 본 연구에서 나타난 폐기능검사 수치 변화는 대다수 건강인이 포함된 연구대상자들에게서 반복되는 폐기능검사에 따른 학습효과와 함께 호흡 검사 시 수반되는 노력의 정도에 의한 차이라고 사료된다.

	시험군 (n=47)	대조군 (n=47)	p-value
FVC(L)	-0.13±0.28	-0.12±0.28	0.8395
FVC(%)	-2.64±6.69	-3.13±7.01	0.7299
FEV1(L)	-0.16±0.23	-0.11±0.22	0.2794
FEV1(%)	-4.62±6.70	-3.38±7.01	0.3852
FEV1/FVC	-1.47±2.15	-0.11±2.10	<b>0.0025</b>

- 추가분석 : CAT 점수 7 이상

	시험군 (n=23)	대조군 (n=19)	p-value
FVC(L)	-0.08±0.22	-0.16±0.27	0.2990
FVC(%)	-1.39±6.05	-4.05±6.63	0.1818
FEV1(L)	-0.12±0.19	-0.14±0.23	0.8567
FEV1(%)	-3.57±6.89	-4.26±7.59	0.7566
FEV1/FVC	-1.61±2.21	-0.05±1.43	<b>0.0117</b>

- 추가분석 : CAT 점수 7 미만

	시험군 (n=24)	대조군 (n=28)	p-value
FVC(L)	-0.18±0.33	-0.09±0.30	0.3216
FVC(%)	-3.83±7.17	-2.50±7.31	0.5113
FEV1(L)	-0.20±0.26	-0.09±0.21	0.1259
FEV1(%)	-5.63±6.49	-2.79±6.66	0.1275
FEV1/FVC	-1.33±2.12	-0.14±2.48	0.0708

### 3) CAT(COPD Assessment Test) 점수

- FA set : 수면 항목에서 유의성 있음

항목	시험군 (n=47)	대조군 (n=47)	p-value
기침	0.70±1.33	0.36±0.92	0.1534
객담	0.32±1.20	0.47±1.12	0.5354
가슴 답답함	0.45±0.93	0.45±0.8	>.999
숨이 참	0.62±1.19	0.79±0.81	0.4191
일상생활에서의 활동 정도	0.17±0.60	0.13±0.49	0.7087
자신감	0.23±0.56	0.04±0.20	0.9347
수면	0.74±0.97	0.32±0.96	<b>0.0347</b>
활력	0.66±1.03	0.72±1.17	0.7797
총점	3.89±4.76	3.28±3.44	0.4735

- 추가분석 : CAT 점수 7 이상 → 기침, 수면 항목의 유의적 개선

항목	시험군 (n=23)	대조군 (n=19)	p-value
기침	1.13±1.25	0.21±1.03	<b>0.0144</b>
객담	0.78±1.41	0.68±1.11	0.8061
가슴 답답함	0.78±1.09	0.68±1.06	0.7688
숨이 참	1.22±1.24	1.26±0.81	0.8907
일상생활에서의 활동 정도	0.22±0.52	0.32±0.75	0.6187
자신감	0.43±0.73	0.11±0.32	0.8687
수면	1.26±1.01	0.53±1.39	0.0544
활력	0.96±1.11	1.26±1.56	0.4611
총점	6.78±4.45	5.05±4.20	0.2057

- 추가분석 2 : CAT score 7 미만 → 유의적 결과 없음

항목	시험군 (n=24)	대조군 (n=28)	p-value
기침	0.29±1.30	0.46±0.84	0.5800
객담	0.13±0.74	0.32±1.12	0.0934
가슴 답답함	0.13±0.61	0.29±0.53	0.3170

숨이 참	0.04±0.81	0.46±0.64	<b>0.0399</b>
일상생활에서의 활동 정도	0.13±0.68	0.00±0.00	0.3769
자신감	0.04±0.20	0.00±0.00	0.3277
수면	0.25±0.61	0.18±0.48	0.6368
활력	0.38±0.88	0.36±0.62	0.9320
총점	1.13±3.17	2.07±2.18	0.2097

※ CAT(COPD Assessment Test) 설문지 [첨부 2]

#### 4) mMRC 점수

- FA set : 유의적 변화 없음

	시험군 (n=47)	대조군 (n=47)	p-value
mMRC	0.34±0.94	0.30±0.66	0.2097

- 추가분석 : CAT 점수 7 이상

	시험군 (n=23)	대조군 (n=19)	p-value
mMRC	0.74±1.14	0.42±0.61	0.2552

- 추가분석 : CAT 점수 7 미만

	시험군 (n=24)	대조군 (n=28)	p-value
mMRC	0.04±0.46	0.21±0.69	0.1280

※ 호흡곤란점수 설문지

#### 5) 염증지표

- FA set : 유의적 변화 없음

	시험군 (n=47)	대조군 (n=47)	p-value
hs-CRP	0.06±0.73	0.56±1.85	0.0884
ESR	0.72±6.86	1.09±8.85	0.3280
PGE2	22.13±281.59	25.44±353.26	0.4740

- 추가분석 : CAT 점수 7 이상

	시험군 (n=23)	대조군 (n=19)	p-value
hs-CRP	0.01±0.65	0.45±1.95	0.3534
ESR	0.95±7.22	2.62±6.71	0.1646
PGE2	86.05±259.75	24.87±346.69	0.5218

- 추가분석 : CAT 점수 7 미만

	시험군 (n=24)	대조군 (n=28)	p-value
hs-CRP	0.12±0.81	0.64±1.81	0.1737
ESR	0.47±6.65	0.18±9.94	0.8086
PGE2	39.13±293.33	57.79±359.91	0.8402

6) 상기도감염 발생 정도

- FA set : 총점, 가래, 쉼소리 점수에서 유의성 있음

		시험군 (n=47)	대조군 (n=47)	p-value
Total	Yes, N(%)	47(100%)	46(97.87%)	> .999
	Score	1.16±0.21	1.28±0.32	<b>0.0321</b>
	Duration	28.47±22.84	31.35±23.58	0.5512
콧물 (Rhinorrhea)	Yes, N(%)	32(68.09%)	30(63.83%)	0.6633
	Score	1.17±0.35	1.25±0.57	0.5212
	Duration	11.34±11.99	10.77±12.33	0.8525
코막힘 (Nasal Congestion)	Yes, N(%)	26(55.32%)	29(61.70%)	0.5300
	Score	1.29±0.49	1.29±0.43	0.9705
	Duration	12.62±12.91	16.52±18.32	0.3705
목아픔 (Sore throat)	Yes, N(%)	29(61.70%)	32(68.09%)	0.5168
	Score	1.28±0.45	1.25±0.38	0.8100
	Duration	13.62±13.47	13.06±13.67	0.8731
기침 (Cough)	Yes, N(%)	29(61.70%)	31(65.96%)	0.6677
	Score	1.26±0.44	1.39±0.63	0.3644
	Duration	16.24±18.59	21.77±24.74	0.3341
가래 (Sputum)	Yes, N(%)	43(91.49%)	40(85.11%)	0.3357
	Score	1.17±0.33	1.41±0.52	<b>0.0154</b>
	Duration	26.60±23.31	27.83±22.79	0.8103
호흡곤란 (Dyspnea)	Yes, N(%)	8(17.02%)	6(12.77%)	0.5623
	Score	1.25±0.46	1.33±0.52	0.7563
	Duration	17.00±27.66	7.17±8.89	0.3708
설사 (Diarrhea)	Yes, N(%)	3(6.38%)	0(0.00%)	0.2419
	Score	1.00±0.00	-	-
	Duration	2.00±1.00	-	-
매스꺼움 (Nausea)	Yes, N(%)	6(12.77%)	1(2.13%)	0.1109
	Score	1.08±0.20	1.00	0.7210
	Duration	10.50±8.34	9.00	0.8742
구토 (Vomiting)	Yes, N(%)	-	-	-
	Score	-	-	-
	Duration	-	-	-
두통 (Headache)	Yes, N(%)	11(23.40%)	12(25.53%)	0.8104
	Score	1.18±0.40	1.13±0.31	0.7080
	Duration	6.55±6.64	4.17±2.55	0.2854
근육통 (Myalgia)	Yes, N(%)	8(17.02%)	6(12.77%)	0.5623
	Score	1.06±0.18	1.17±0.41	0.5784
	Duration	4.63±4.53	7.67±11.08	0.5485
쉼소리 (Hoarseness)	Yes, N(%)	19(40.43%)	12(25.53%)	0.1246
	Score	1.05±0.23	1.33±0.39	<b>0.0381</b>
	Duration	11.74±11.74	15.17±13.93	0.4669
재채기 (Sneezing)	Yes, N(%)	23(48.94%)	29(61.70%)	0.2132
	Score	1.15±0.32	1.26±0.47	0.3604
	Duration	10.35±9.36	14.45±15.49	0.3604
이통	Yes, N(%)	3(6.38%)	3(6.38%)	> .999

(Earache)	Score	1.00±0.00	1.00±0.00	-
	Duration	3.67±1.53	1.33±0.58	0.0686

- 추가분석 : CAT 점수 7 이상

		시험군 (n=23)	대조군 (n=19)	p-value
Total	Yes, N(%)	23(100%)	19(100%)	-
	Score	1.19±0.25	1.40±0.34	<b>0.0259</b>
	Duration	27.13±24.01	35.00±23.82	0.2951
콧물 (Rhinorrhea)	Yes, N(%)	15(65.22%)	15(78.95%)	0.3269
	Score	1.27±0.42	1.20±0.56	0.7145
	Duration	12.93±14.81	7.27±5.62	0.1829
코막힘 (Nasal Congestion)	Yes, N(%)	14(60.87%)	15(78.95%)	0.2072
	Score	1.39±0.59	1.27±0.37	0.4955
	Duration	12.29±16.33	17.13±21.95	0.8001
목아픔 (Sore throat)	Yes, N(%)	17(73.91%)	16(84.21%)	0.4766
	Score	1.29±0.53	1.44±0.44	0.4080
	Duration	11.94±13.24	15.88±15.48	0.4378
기침 (Cough)	Yes, N(%)	19(82.61%)	14(73.68%)	0.7075
	Score	1.32±0.48	1.79±0.73	<b>0.0321</b>
	Duration	16.32±18.93	29.93±28.14	0.1064
가래 (Sputum)	Yes, N(%)	19(82.61%)	17(89.47%)	0.6729
	Score	1.21±0.35	1.53±0.62	0.0743
	Duration	25.58±25.86	25.88±22.51	0.9704
호흡곤란 (Dyspnea)	Yes, N(%)	5(21.74%)	4(21.05%)	>.999
	Score	1.40±0.55	1.50±0.58	0.7980
	Duration	21.80±34.86	9.00±10.80	0.5069
설사 (Diarrhea)	Yes, N(%)	3(13.04%)	0(0.00%)	0.2387
	Score	1.00±0.00	-	-
	Duration	2.00±1.00	-	-
매스꺼움 (Nausea)	Yes, N(%)	4(17.39%)	1(5.26%)	0.3558
	Score	1.13±0.25	1.00	0.6850
	Duration	11.00±9.31	9.00	0.8599
구토 (Vomiting)	Yes, N(%)	-	-	-
	Score	-	-	-
	Duration	-	-	-
두통 (Headache)	Yes, N(%)	6(26.09%)	4(21.05%)	>.999
	Score	1.17±0.41	1.00±0.00	0.3632
	Duration	5.50±6.28	5.50±3.11	>.999
근육통 (Myalgia)	Yes, N(%)	5(21.74%)	3(15.79%)	0.7092
	Score	1.10±0.22	1.00±0.00	0.3739
	Duration	6.20±5.26	3.67±2.52	0.4734
쉰목소리 (Hoarseness)	Yes, N(%)	11(47.83%)	7(36.84%)	0.4740
	Score	1.00±0.00	1.36±0.38	<b>0.0465</b>
	Duration	10.00±11.41	11.14±5.18	0.8079
재채기 (Sneezing)	Yes, N(%)	12(52.17%)	14(73.68%)	0.1531
	Score	1.25±0.40	1.39±0.59	0.4866
	Duration	10.08±9.14	16.36±19.82	0.3025
이통	Yes, N(%)	2(8.70%)	1(5.26%)	>.999

(Earache)	Score	1.00±0.00	1.00	-
	Duration	3.00±1.41	2.00	0.6667

- 추가분석 : CAT 점수 7 미만

		시험군 (n=24)	대조군 (n=28)	p-value
Total	Yes, N(%)	24(100%)	27(96.43%)	> .999
	Score	1.13±0.16	1.20±0.29	0.2785
	Duration	29.75±22.10	28.78±23.51	0.8801
콧물 (Rhinorrhea)	Yes, N(%)	17(70.83%)	15(53.57%)	0.2585
	Score	1.09±0.26	1.30±0.59	0.2166
	Duration	9.94±9.07	14.27±16.04	0.3665
코막힘 (Nasal Congestion)	Yes, N(%)	12(50.00%)	14(40.00%)	> .999
	Score	1.17±0.33	1.32±0.50	0.3711
	Duration	9.50±6.65	15.86±14.24	0.1523
목아픔 (Sore throat)	Yes, N(%)	12(50.00%)	16(57.14%)	0.6065
	Score	1.25±0.34	1.06±0.17	0.0977
	Duration	16.00±14.01	10.25±10.39	0.2417
기침 (Cough)	Yes, N(%)	10(41.67%)	17(60.71%)	0.1705
	Score	1.15±0.34	1.06±0.24	0.4223
	Duration	16.10±18.95	15.06±19.94	0.8950
가래 (Sputum)	Yes, N(%)	24(100%)	23(82.14%)	0.0542
	Score	1.15±0.31	1.33±0.42	0.0988
	Duration	27.42±21.62	29.26±23.39	0.7801
호흡곤란 (Dyspnea)	Yes, N(%)	3(12.50%)	2(7.14%)	0.6521
	Score	1.00±0.00	1.00±0.00	-
	Duration	9.00±9.64	3.50±2.12	0.5046
설사 (Diarrhea)	Yes, N(%)	-	-	-
	Score	-	-	-
	Duration	-	-	-
매스꺼움 (Nausea)	Yes, N(%)	2(8.33%)	0(0.00%)	0.2081
	Score	1.00±0.00	-	-
	Duration	9.50±9.19	-	-
구토 (Vomiting)	Yes, N(%)	-	-	-
	Score	-	-	-
	Duration	-	-	-
두통 (Headache)	Yes, N(%)	5(20.83%)	8(28.57%)	0.5206
	Score	1.20±0.45	1.19±0.37	0.9574
	Duration	7.80±7.56	3.50±2.14	0.2767
근육통 (Myalgia)	Yes, N(%)	3(12.50%)	3(10.71%)	> .999
	Score	1.00±0.00	1.33±0.58	0.4226
	Duration	2.00±0.00	11.67±15.89	0.4024
쉰목소리 (Hoarseness)	Yes, N(%)	8(33.33%)	5(17.86%)	0.1989
	Score	1.13±0.35	1.30±0.45	0.4481
	Duration	14.13±12.53	20.80±20.63	0.4785
재채기	Yes, N(%)	11(45.83%)	15(53.57%)	0.5780

	(Sneezing)	Score	1.05±0.15	1.13±0.30	0.3348
		Duration	10.64±10.03	12.67±10.40	0.6222
	이통 (Earache)	Yes, N(%)	1(4.17%)	2(7.14%)	>.999
		Score	1.00	1.00±0.00	-
		Duration	5.00	1.00±0.00	-
※ 상기도 감염 발생률 및 증상 정도 설문지 [첨부 4]					
안전성평가	연구기간동안 섭취 후 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 홍삼곰보배추복합물의 섭취가 인체에 안전하다고 판단함				
결론	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 상기도 감염 증상의 유의적 개선 효과 확인(p=0.0321)</li> <li>■ 호흡기 불편 증상의 객관적으로 판단 기준 CAT점수 7점으로 유효성에 대한 통계분석을 시행한 결과 <b>SGRQ(호흡기 이상증상에 대한 세인트조지 호흡기 설문)에서 유의적 개선</b>을 확인(p=0.0371) 하여 호흡기 증상으로 인한 부담이 상대적으로 높은 상태의 대상자군에서 호흡기 불편 증상 개선 효과가 더 뚜렷함</li> </ul>				

- 인체적용시험 결과보고서의 IRB 심의를 진행하였으며 승인을 통보 받음  
[결과보고서 IRB 심의 신청]

### 결과보고서

접수처 기재(IRB에서 기재하는 항목입니다.)				
IRB File No.	CUH 2018-01-018-016	접수처 확인	오신애	접수일 2019.05.28

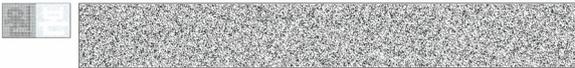
e-IRB 사용권한 (아래의 내용은 e-IRB에서 조회, 신청이 가능한 권한을 부여합니다.)

연구책임자	박성주	전북대학교병원	호흡기 알레르기 내과	신청일	2019.05.27
연구담당자	최민준	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터 임상기획팀	의뢰일	2019.05.27
담당모니터	임은화	헬스케어크레임스앤드 엔내지먼트(주)	CRA팀	의뢰일	

연구과제명	국문	KGC-03-PS의 호흡기 보호 및 증상 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체작용시험
영문		
임상시험코드		Study Nick Name

◎ 연구관련자 정보

구분	성명	소속	부서	전화번호	교육완료일
연구책임자	박성주	전북대학교병원	호흡기 알레르기 내과	063-250-1798	2019.11.23
공동연구자	박병현	전북대학교병원	전북대학교병원	063-270-3139	2020.04.19
공동연구자	채수완	전북대학교병원	임상시험센터	063-250-2348	2020.04.19
공동연구자	김영근	전북대학교병원	비뇨기과	063-250-1567	2019.06.08
공동연구자	최은경	전북대학교병원	기능성식품 임상시험지원센터	063-259-3582	2019.05.23
공동연구자	경재석	전북대학교	전북대학교병원 호흡기 알레르기내과	063-259-3283	2020.10.25
연구실무담당자	박수현	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터	063 259-3040	2020.04.19
연구실무담당자	최민준	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터	063-259-3042	2020.05.10
연구실무담당자	윤주향	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터	063-255-2541	2021.04.27



◎ 연구관련자 정보

구분	성명	소속	부서	전화번호	교육완료일
연구실무담당자	박미현	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터	063-259-3586	2021.05.02
연구실무담당자	나혜선	전북대학교병원	ctcf2	063-259-3586	2020.03.15
연구실무담당자	이애란	전북대학교병원	기능성식품센터	063-259-3587	2020.05.02
연구실무담당자	장경아	전북대학교병원	임상연구지원센터 연구 간호사	063-259-3589	2020.03.15
연구실무담당자	박태영	전북대학교병원	임상연구지원센터	063-259-3581	2020.04.03
연구실무담당자	노순옥	전북대학교병원	임상시험지원센터	063-259-3593	2020.04.19
연구실무담당자	최재순	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터	063-259-3594	2020.04.19
연구실무담당자	김경수	전북대학교병원			2019.04.27
연구실무담당자	김순영	전북대학교병원	임상시험부	063-259-3583	2020.05.02
연구실무담당자	서은경	전북대학교병원	ctcf2	063-259-9584	2020.05.15
연구실무담당자	경수진	전북대학교병원	의생명연구원 기능성식품임상시험지원센터	063-259-3044	2019.11.23
연구실무담당자	황지현	전북대학교병원	임상시험기획팀	063-259-3051	2020.04.19
연구실무담당자	김우림	전북대학교병원	전북대학교병원 기능성식품임상시험센터	063-259-3052	2020.04.19
모니터	임은화	헬스케어크레임스앤드 엔내지먼트(주)	CRA팀	063-276-8284	
모니터	김봉림	헬스케어크레임스앤드 엔내지먼트(주)	CRA	063-276-8287	

Phase  I (  First - in - human  First - non - human )

II  III  IV  PMS  기타

연구분류1  약물  생물학적 제제  세포치료제  건강기능식품

의료기술  의료기기 (  1등급  2등급  3등급  4등급 )

해당사항 없음



◎ 연구관련자 정보

구분	성명	소속	부서	전화번호	교육완료일
연구실무담당자	박미현	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터	063-259-3586	2021.05.02
연구실무담당자	나혜선	전북대학교병원	ctcf2	063-259-3586	2020.03.15
연구실무담당자	이애란	전북대학교병원	기능성식품센터	063-259-3587	2020.05.02
연구실무담당자	장경아	전북대학교병원	임상연구지원센터 연구 간호사	063-259-3589	2020.03.15
연구실무담당자	박태영	전북대학교병원	임상연구지원센터	063-259-3581	2020.04.03
연구실무담당자	노순옥	전북대학교병원	임상시험지원센터	063-259-3593	2020.04.19
연구실무담당자	최재순	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터	063-259-3594	2020.04.19
연구실무담당자	김경수	전북대학교병원			2019.04.27
연구실무담당자	김순영	전북대학교병원	임상시험부	063-259-3583	2020.05.02
연구실무담당자	서은경	전북대학교병원	ctcf2	063-259-9584	2020.05.15
연구실무담당자	경수진	전북대학교병원	의생명연구원 기능성식품임상시험지원센터	063-259-3044	2019.11.23
연구실무담당자	황지현	전북대학교병원	임상시험기획팀	063-259-3051	2020.04.19
연구실무담당자	김우림	전북대학교병원	전북대학교병원 기능성식품임상시험센터	063-259-3052	2020.04.19
모니터	임은화	헬스케어크레임스앤드 엔내지먼트(주)	CRA팀	063-276-8284	
모니터	김봉림	헬스케어크레임스앤드 엔내지먼트(주)	CRA	063-276-8287	

Phase  I (  First - in - human  First - non - human )

II  III  IV  PMS  기타

연구분류1  약물  생물학적 제제  세포치료제  건강기능식품

의료기술  의료기기 (  1등급  2등급  3등급  4등급 )

해당사항 없음



[결과보고서 IRB 승인]

**결과보고서**

임수처 기재(IRB에서 기재하는 항목입니다.)

IRB File No.	CUH 2018-01-018-016	임수처 확인	오신애	검수일	2019.05.28
--------------	------------------------	--------	-----	-----	------------

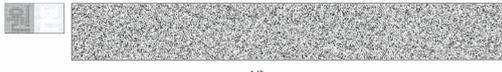
e-IRB 사용권한 (아래의 내용은 e-IRB에서 조회, 신청이 가능한 권한을 부여합니다.)

연구책임자	박성주	전북대학교병원	호흡기 알레르기 내과	신청일	2019.05.27
연구담당자	최민준	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터 임상기획팀	의뢰일	2019.05.27
담당요원	임은화	헬스케어크레임스앤드멘네지먼트(주)	CRA팀	의뢰일	

연구과제명	국문	KGC-03-PS의 호흡기 보호 및 증상 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험
영문		
임상시험코드		Study Nick Name

© 연구관련자 정보

구분	성명	소속	부서	전화번호	교육연료일
연구책임자	박성주	전북대학교병원	호흡기 알레르기 내과	063-250-1798	2019.11.23
공동연구자	박병현	전북대학교병원	전북대학교병원	063-270-3139	2020.04.19
공동연구자	채수환	전북대학교병원	임상시험센터	063-250-2348	2020.04.19
공동연구자	김영곤	전북대학교병원	박노과과	063-250-1567	2019.06.08
공동연구자	최은경	전북대학교병원	기능성식품 임상시험지원센터	063-259-3582	2019.05.23
공동연구자	경재석	전북대학교	전북대학교병원 호흡기 알레르기내과	063-259-3283	2020.10.25
연구실무담당자	박수현	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터	063 259 3046	2020.04.19
연구실무담당자	최민준	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터 임상기획팀	063-259-3042	2020.05.10
연구실무담당자	윤주랑	전북대학교병원	기능성식품임상시험지원센터	063-255-2541	2021.04.27



지원의뢰기관	기관명	(주) 한국인삼공사	대표(직위)		성명	김재수
제출서류목록	(항부) CTCF2_2018_KGC-03-PS2_CSR_호흡기보호결과보고서_(학종) (항부) CTCF2_2018_KGC-03-PS2_CSR_호흡기보호결과보고서_(학종)별첨					
관련연구	평가일자	2019.05.29				
중간보고시기	비고					
심사결과	<input checked="" type="radio"/> 승인 <input type="radio"/> 시정승인					
심사결과	연구 결과보고를 승인합니다.					

- 본 위원회는 국제 임상시험 통일안(ICH) 및 임상시험관리기준(GCP), 생명윤리 및 안전에 관한 법률을 준수합니다.
- 연구의 승인유효기간은 최대 1년입니다. 본 통지서에 기재된 승인유효기간을 초과하여 연구를 지속하고자 하는 경우에는 반드시 위원회에서 지정한 중간보고 시기에 중간보고서를 제출하여 승인유효기간을 연장하시기 바랍니다.
- 승인된 연구도 필요한 경우에는 경구심의에서 재평가하여 변경이나 보완을 요청할 수 있습니다.
- 본 위원회에서 승인한 연구계획서에 따라 연구를 수행해야 하며, 위원회의 승인을 받은 연구대상자 설명문 및 동의서, 연구대상자 오진 고지문을 사용해야 합니다.
- 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고, 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행해야 합니다. 또한 연구대상자의 보호를 위해 사전 승인 없이 위대한 변경도 위원회에 즉시 보고해야 합니다.
- 연구 중에 중대하고 예상하지 못한 이상 약물 / 의료기기 반응이나, 연구대상자에게 위험을 줄 수 있는 예상하지 못한 문제가 발생할 경우, 연구책임자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.
- 연구 종료 시 종료 / 결과보고서를 제출해 주시기 바랍니다.
- 연구 결과와 관련하여 본 기관의 사전 서면동의 없이는 어떤 경우라도 학술목적 이외에 실시 기관명을 사용할 수 없습니다.
- 본 통지서는 임상시험 관리기준 제6회기(2018)에 따른 심사결과 통보서로 사용할 수 있습니다.

전북대학교병원 생명의학연구소윤리심의위원회위원장



**5. 인체적용시험 모니터링 (헬스크레임스앤드멘내지먼트)**  
**5.1. 연구 계약**

연구의 질과 신뢰성을 보증하기 위하여 전문기관인 연구 수탁기관(CRO; Contract Research Organization)과 연구계약을 체결하고 연구 전반 과정에 대해 모니터링 실시

**용역연구계약서**

- KGC-03-PS의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조, 인체적용시험 모니터링 -

**2018. 01. 26.**

위임자 : 한국인삼공사(주)  
수입자 : 헬스케어크레임스앤드멘내지먼트(주)

계약 일반 조건

위임자 : ㈜ 한국인삼공사  
수입자 : ㈜ 헬스케어크레임스앤드멘내지먼트

당사는 부대 없는 투명한 기업경영과 공정한 행정이 사회발전과 국가경쟁력에 중요한 관건이 됨을 깊이 인식하며, 위의 위임자·수입자 양자는 위임자의 사업을 수행함에 있어서 "KGC03-PS의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조, 인체적용시험 모니터링" 지원 업무를 수행하기 위하여 본 용역 계약을 체결한다.

**제 1 조 [ 계약의 범위 및 수행방법 ]**

본 계약을 체결함에 있어 한국인삼공사(주) (이하 위임자라 칭함) 과(와) (주)헬스케어크레임스앤드멘내지먼트 (이하 수입자라 칭함)은 위임자의 사업 활동과 관련하여 발생하는 "KGC-03-PS의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조, 인체적용시험 모니터링"을 목적으로 한다.

가. 본 계약은 쌍방이 합의한 전부이며, 어떠한 사전에 합의한 모든 서면 및 구두 합의보다 우선한다. 각 계약서 및 부속서류의 중등 시 우선순위는 계약일반조건으로 한다.

나. 수입자는 계약 체결 즉시 모든 부속서류 및 제반 조건을 재확인하고 계약이행에 착수하여야 한다. 수입자는 계약내용이 불명확하거나 이견이 있을 경우 서류 수령 후 5일 내에 위임자에게 서면 통지해야 하며, 그렇지 않을 경우에는 모든 조건을 이해하고 합의한 것으로 간주한다. 이의 불이행으로 인하여 발생하는 모든 불이익은 수입자의 책임으로 한다.

다. 수입자는 위임자가 제시하는 의견, 방향 제시 등의 사항을 계약 수행에 최대한 반영하도록 한다.

라. 수입자는 연구기간 종료 30일 이내에 최종보고서를 위임자에게 제출하여야 한다.

마. 수입자는 위임자에게 계약수행 관련하여 발생한 일체의 자료를 제출하여야 한다.

바. 수입자는 위임자가 요청할 경우 보고회를 개최하며 구체적인 일정에 대해서는 위임자와 수입자의 협의에 따라 결정한다.

사. 부득이한 사정으로 인하여 사전에 확정된 보고서 제출 및 보고회 개최 일정을 변경하고자 하는

- 1 -

kgp:20140149 2018-01-25 13:13:45 이 문서는 한국인삼공사의 동의없이 수정, 변경 및 복사할 수 없습니다.

- 1 -

kgp:20140149 2018-01-25 13:13:45 이 문서는 한국인삼공사의 동의없이 수정, 변경 및 복사할 수 없습니다.

는 경우, 수입자는 위임자에게 해당 사유를 사전에 서면 통보하여 일정 변경에 대한 허가를 얻어야 한다.

아. 위임자가 연구결과에 대해 접수 후 서면 승인을 한 경우 연구가 완료된 것으로 본다. 서면 승인 후 위임자가 위임자의 사정으로 변경이나 재작업을 요청할 경우 이에 따른 추가비용은 별도 협의 한다.

**제 2 조 [ 조건 ]**

업무에 따른 세부사항은 아래와 같으며, 업무의 범위는 임상시험에 관한 모니터링으로 한다.

(단위 : 원)

항 목		금 액	비율 (%)	
인건비	인건비	29,500,000	70.2	
	소계	29,500,000		
직접비	연구과제추진비	국내출장여비	800,000	1.9
		사무용품비	500,000	1.2
		회의비	500,000	1.2
		식대 등	500,000	1.2
	연구수당	2,950,000	7	
	소계	5,250,000		
간접비	간접경비	3,431,800	8.2	
	소계	3,431,800		
공급가액		38,181,800	90.9	
부가가치세		3,818,200	9.1	
합계		42,000,000	100	
비고	- 연구대상자 수 : 100 명 - 인체적용시험 실시기관 : 전북대학교병원 1처			

**제 3 조 [ 기간 ]**

본 계약의 기간은 계약체결일로부터 위임자가 위탁한 모든 업무가 완료될 때까지 합을 원칙으로 한다. 업무가 완료될 때까지 소요될 것으로 예측되는 기간은 계약일로부터 18개월까지 이다. 단, 연구 대상자 모집일정에 따라 변동 될 수 있다.

**제 4 조 [ 계약금액 및 지불방법 ]**

가. 수입자는 본 계약서에 따라 계약상 의무를 완료하고 이에 대한 보고와 위임자의 서면 승인을 받은 후 청구서, 세금계산서, 보고서 등의 자료를 첨부하여 지불조건(계약체결 시 50%, 모니터링 보고서 승인 후 50%)에 따라 계약금액 지급을 위임자에게 청구할 수 있으며, 위임자는 위임자의 승인일로부터 14일 이내 수입자의 계좌로 현금 입금한다. (수입자의 계좌 : 기업은행, 181-084965-04-014, 헬스케어크레딧인스엔드앤내지먼트(주))

나. 수행업무 시 별도의 계약대금은 용역수행금액의 일부(50%)인 일금(이천백만원정, 21,000,000(원)부가세 포함)으로 하며 위임자는 본 계약상의 용역수행금액을 위임자와 수입자가 정한 지급방법에 따라 아래와 같이 분할 지급하기로 한다.

회차	납부일시	금액 (원)
1	계약체결 14일 이내	21,000,000
2	모니터링 보고서 승인 후	21,000,000
합 계		42,000,000

다. 위임자는 계약위약금, 손해배상금, 연구비 과다채정, 기타 오류에 의한 연구비 지급분류 비용 정산사유가 발생할 경우 계약금액에서 공제 후 대금을 정산 지급할 수 있다. 수입자에게 지급할 잔액이 있을 때에는 수입자는 즉시 위임자가 지정한 계좌에 차액을 입금한다.

라. 위임자가 가격증빙자료의 제출 또는 열람을 요구할 때에는 수입자는 즉시 이에 응하여야 한다.

마. 수입자는 계좌번호 변경 시 수입자의 위기가 찍힌 서면을 통하여 변경을 요청한다.

**제 5 조 [ 보증보험증권 ]**

① 수입자는 위임자에게 본 계약 체결 후 7일 이내에 계약서에 명시된 선급금보증보험증권(이천백만원정, ₩21,000,000)과 계약이행보증보험(계약 총 금액의 10%, 사전이백만원정, ₩2,000,000)을 납부하여야 한다. 보험기간은 계약일로부터 18개월까지 유효한 것이어야 한다.

② 수입자가 본 계약상 의무를 이행하지 아니하거나, 또는 수입자의 책임 있는 사유로 계약이 해

제·해지되는 경우에는 선급금보증금은 위임자에게 귀속되며, 이에 대해 수입자는 어떠한 이의도 제기할 수 없다.

- ③ 수입자의 귀책사유로 인하여 위임자에게 발생한 손해가 선급금보증금을 초과하는 경우, 수입자는 선급금보증금의 귀속과는 별도로 위임자에 대하여 그 초과손해에 대한 손해를 배상하여야 한다.
- ④ 선급금보증보험증권으로 납부한 경우 계약이 정상적으로 이행된 후, 수입자의 청구에 의하여 위임자가 반환 또는 폐기한다.

**제 6 조 [ 비밀유지의 의무 ]**

가. 위임자와 수입자는 본 계약의 수행 상 알게 된 계약내용 및 상태의 보안사항이나 대외비 사항 등에 대해 제 3자에게 절대 누설하지 않는다.

나. 수입자는 본 용역을 통해 수집된 모든 정보 및 경영의 내용과 본 업무와 관련하여 위임자가 제공한 일체의 자료에 대하여 비밀을 유지하여야 하며, 이를 위임자의 사전 서면 동의 없이 제 3자에게 공개 할 수 없다. 계약 종료 후, 제공받은 일체의 자료를 폐기하고 이에 대한 비밀을 유지하여야 한다.

다. 위임자는 본 용역을 통해 수집된 모든 정보 및 등록설자의 내용과 본 업무와 관련하여 수입자가 제공한 일체의 자료에 대하여 비밀을 유지하여야 하며, 이를 수입자의 사전 서면 동의 없이 제 3자에게 공개 할 수 없다. 계약 종료 후, 제공받은 일체의 자료를 폐기하고 이에 대한 비밀을 유지하여야 한다.

라. 민일 해당 관리업무에 따른 비밀유지 보안이 지켜지지 않을 시 위임자는 수입자에게, 수입자는 위임자에게 민사상 법적 기업 비밀누설에 해당하는 손해배상의 책임을 진다.

마. 본 조에서 정한 양사의 비밀보장무는 본 계약이 종료된 후에도 효력이 있다.

**제 7 조 [ 업무협조와 자료제공 ]**

가. 위임자는 수입자가 요구하는 업무상 필요한 기본정보를 제공 할 것을 적극 협조하여야 한다.

나. 위임자는 수입자가 요구하는 업무상 필요한 자료를 미제공시 책임을 질 것을 약속한다.

**제 8 조 [ 실무회의 및 시정요구권 ]**

가. 위임자는 수입자에게 본 계약에 따른 수입자의 용역 진행사항에 대한 검토 및 관련된 문제의 합의를 위한 회의를 요구할 수 있다.

나. 위임자는 수입자의 행위가 본 계약에 따른 위임자의 요구에 위반된다고 판단하는 경우 이를

해명하거나 시정할 것을 요구할 수 있다.

**제 9 조 [ 계약의 책임 ]**

가. 위임자와 수입자는 "KGC03-FS의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과에 대한 무작위배정 이중눈가림 플라세보-대조, 인체적용시험 모니터링" 업무가 진행되지 못하는 경우 그 책임은 당해 귀책사유에 해당하는 상대방에 있다. 본 계약기간이 종료될 때까지 어느 일방에 의해 변경할 수 없다.

나. 위임자가 수입자에게 아무런 귀책사유가 없음에도 불구하고 상기 명시된 계약기간 내 일방적으로 해약통보 시는 해당 계약기간내의 "KGC03-FS의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과에 대한 무작위배정 이중눈가림 플라세보-대조, 인체적용시험 모니터링" (계약금액의 100%)를 전액 지급한다.

다. 또한 수입자가 위임자에게 아무런 귀책사유가 없음에도 불구하고 상기 명시된 계약기간 내 일방적으로 해약통보 시는 해당 계약기간내의 "KGC03-FS의 호흡기 보호 및 증상 개선 효과에 대한 무작위배정 이중눈가림 플라세보-대조, 인체적용시험 모니터링" (계약금액의 100%)를 전액 환불한다.

**제 10 조 [ 분쟁의 처리&상호협의 ]**

가. 본 계약에 명시되지 아니한 사항은 상호 협의에 의하여 정한다.

나. 또한 본 계약 내용에 대하여 분쟁이 발생하였을 때에는 상호 합의하여 결성하되 합의에 이르지 못할 때에는 일반 상 관례에 따른다.

**제 11 조 [ 양도금지 ]**

위임자와 수입자는 상대방의 사전 서면동의 없이는 본 계약에 의하여 발생하는 권리, 의무를 제3자에게 양도 또는 위임할 수 없다.

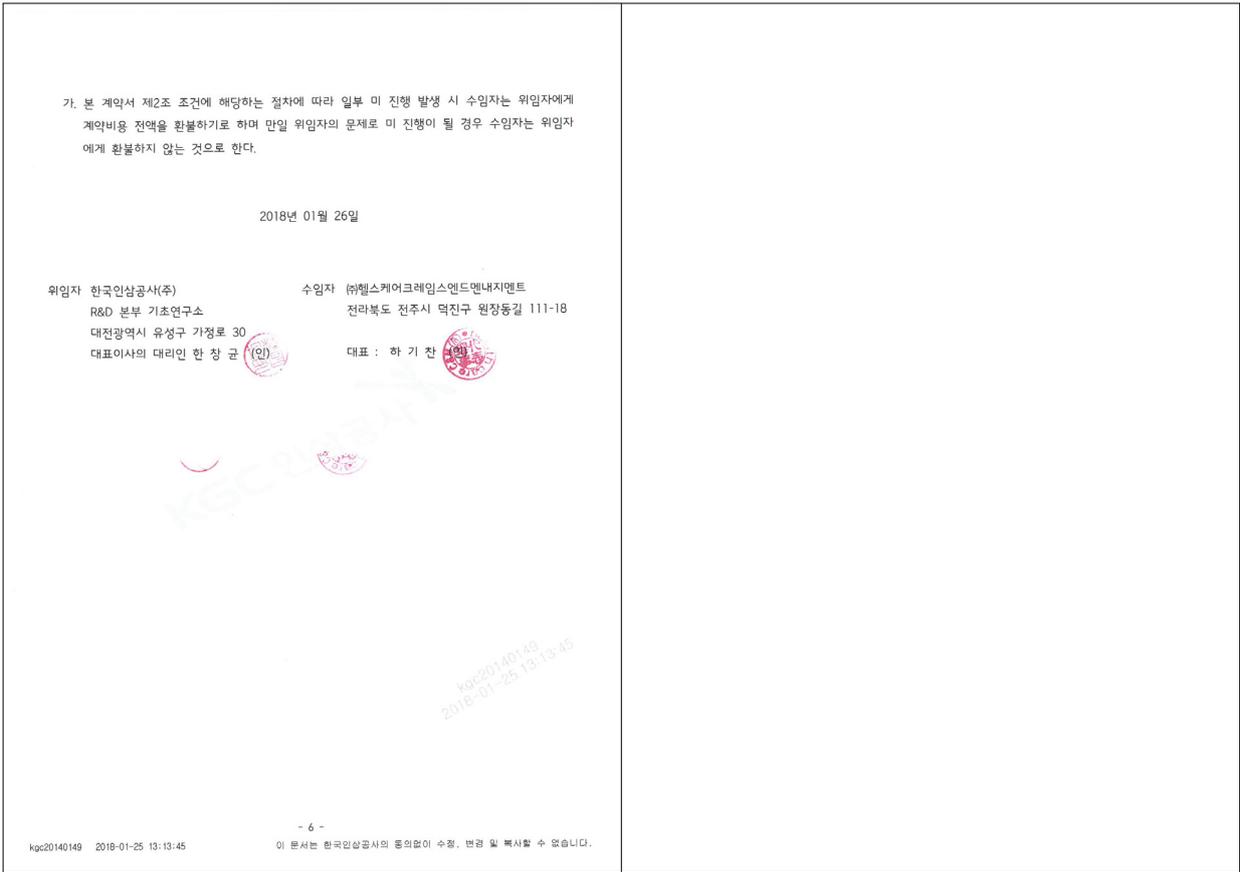
**제 12 조 [ 계약의 해석 및 관할 ]**

가. 본 계약서에 명시되어 있지 않은 사항이 있거나 해석상 견해가 다를 때에는 관계법령 및 상관례에 따른다.

나. 본 계약과 관련하여 소송을 제기할 경우에는 서울중앙지방법원을 관할법원으로 한다.

다. 본 계약 내용을 증명하기 위해 계약서 2통을 작성하여 위임자와 수입자가 각기 1통씩 보관한다.

**제 13 조 [ 기타 ]**



## 5.2. 모니터링

연구 착수 전, 모니터링 계획을 문서로 수립하며, 모니터 요원은 계획서 및 증례기록서, 연구 대상자 동의서, 연구자에게 제공되는 서면 정보, 사용되는 시험용 제품, 연구 관리기준 및 관련 규정 및 본 연구를 위하여 수립된 모니터링 계획에 따라 모니터링 실시

## 5.3. 모니터링 항목

- 시험자 및 관련 연구 인력들에 대한 교육
- 근거 문서 확인(Source Data Verification: SDV)
- 자료 처리에 관한 절차
- 시험제품 관리에 대한 절차
- 임상별리 자료 및 샘플 처리 절차
- 기타: 임상시험에서 사용될 여러 문서 template나 임상시험팀 연락처 등을 확인함

## 5.4. 모니터링 방문 및 follow-up

사전에 수립된 모니터링 계획서에 따라 담당 수행기관에 대한 개별 monitoring visit 계획을 세우고, 현장 방문 시 확인해야 할 내용 및 만나야 할 대상을 정하여 미리 일정을 짜고 연구자와 방문 약속을 조정함. 현장 모니터링 시에 연구 관리요원이 확인해야 하는 항목들이 현장 방문 때 빠짐없이 check되어 자세히 기록되도록 확인함.

### 5.5. Source Data Verification (SDV)

모니터 요원의 routine monitoring 시에 자료의 질적인 측면을 보장하기 위한 활동으로서 가장 중요한 것이 증례기록서에 적힌 정보의 source data를 source document를 통하여 대조 확인하는 작업임.

### 5.6. 모니터링 보고서

- 모니터링 방문 활동 또는 다른 연구와 관련된 교신은 모니터링 보고서로 작성함. 개별 모니터링 방문에 대한 보고서는 방문 요약 및 서술적 기술, issues, checklist results 등의 부분으로 구성되며 연구대상자 등재 현황 및 방문의 진행, data monitoring과 SDV 등 활동 영역이 포함됨.
- 모니터링 방문: 진행 중이며, 그동안 진행한 일정 및 계획은 아래와 같음.
- 모니터링 방문일정

회차	방문 일시	
1	2018.03.15	개시방문
2	2017.04.13	
3	2018.05.09~2018.05.11	
4	2018.07.03~2018.07.05	
5	2018.07.19~2018.07.20	
6	2018.08.27~2018.08.30	
7	2018.09.18~2018.09.19	
8	2018.10.30~2018.10.31	
9	2018.11.27~2018.11.29	
10	2018.12.27	
11	2019.01.16	
12	2019.02.22	최종방문

#### 5.6.1. 모니터링 방문 보고서 첨부

- 모니터링 실시에 따른 보고서는 매회 작성하였으며 내용은 아래와 같음
- 총 12회를 실시하였으며, 특이한 사항이나 잘못된 사항은 없음
- 12회 중 1, 3, 6, 9, 12회차에 해당하는 보고서만 첨부 함

### Monitoring Report

과 제 번 호	CTCF2_2018_KGC-03-PS2	의 회 기 관	한국민삼공사(주)
시 험 책 일 자	박 성 주	실 시 기 관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터
공 동 연 구 자	채수원, 김영근, 박병환, 최은경, 정재석	시 험 답 당 자	이 매 칸
방 문 회 차	1회	모 니 터	임 재 현 (☎)
방 문 목 적	Routine Monitoring Visit	방 문 일	2018.03.15

**1. 모집상황**

계획대상자	스크리닝	스크리닝완료	무작위배정	주도발락	완료대상자
100(명)	7(명)	2(명)	4(명)	0(명)	0(명)

**2. 모니터링**

실시한 모니터링 활동	예	아니오	N/A
<b>1. 시험 진행상황</b>			
• 목표한 대상자가 등록되었는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 대상자 선별/동재 기록이 적절히 이루어지고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험참여자와 대상자 모집 관련 문제에 대해 검토하였는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 비고 : 등록예정자 : 1명			
<b>2. 시험참여자와 선별</b>			
• 시험 참여자와 선별은 여전히 적절한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험에 사용하는 장비는 적절히 유지되고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험 참여자가 변경되었는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
① 새로운 참여자가 서명부에 기록되고, 현재 이력서가 보관되어 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
② 새로운 참여자는 적절한 교육 및 업무의 위임에 대한 기록이 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
• 샘플링 시점의 수거, 취급, 라벨링, 보관 및 운반 과정은 적절한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 실험실 인증서 또는 정상범위에 변화가 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>3. 시험참여자와 동의</b>			
• 지난 방문에서 알게 된 문제점 중 이번 방문에서 해결된 것이 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
• 이번 방문에서 알게 된 새로운 문제가 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 문제점에 대해서 논의하였고 해결방법은 찾았는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험기관 방문 기록에 날짜를 기록하고 서명하였는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Monitoring Report Ver 1.1  
Effective Date 2017.12.21. CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2 (1)

실시한 모니터링 활동	예	아니오	N/A
<b>4. 시험에 사용되는 제품 / 그 외 관련 품목</b>			
• 시험용 제품 수불 기록을 정확하고 현재까지의 기록이 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험용 제품은 계획서에 따라 보관되고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험용 제품의 재고 및 사용기원은 충분한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험용 제품과 그 외 관련 품목의 수량은 충분한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>5. 시험기관 / 시험자 준수</b>			
• 시험자는 계획서 / 변경계획서 및 관련규정을 준수하고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험자는 IRB에 대한 승인 / 보고를 적절히 수행하고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>5-1. 안전성 관련 정보</b>			
• 모든 중대한 이상반응이 의뢰자 및 IRB에 적절히 보고되었고, 추적조사가 제대로 이루어지고 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
• 대상자 무작위배정 코드를 해제하고 그 사용을 적절히 기록한 것이 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
• 이상반응으로 인한 조기종료 대상자가 있었는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
• 새로 개정된 안전성 정보가 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 비고 : AE - 0명, SAE - 0명 [AE - 총 0명, SAE - 총 0명]			
<b>6. 동의서</b>			
• 동의서의 시험관련 절차가 시작되기 전에, 각 대상자 또는 대리인으로부터 적절히 획득하였으며 서명도 날짜가 기록되어 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 동의서에 대상자 동의를 설명한 사항이 서명하고 날짜를 기록하였는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• IRB의 승인을 유지하고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>7. 근거문서 및 중재기록서(CRF) 검토</b>			
• 개인의 시험기관 기록과 대조하여 CRF 데이터들 근거문서와 확인하였는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 중재기록서는 근거문서 내용과 일치하며 읽기 쉽고 정확하며, 완전하게 기재되었는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 중재기록서의 수정은 적절한 방법으로 이루어지고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 미해결된 중재기록서 / Query를 시험담당자와 논의하였는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>8. 시험자 파일 / 기본문서</b>			
• 시험자는 필요한 모든 기본문서를 적절히 확보하고 시험자 파일에 유지하고 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Monitoring Report Ver 1.1  
Effective Date 2017.12.21. CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2 (1)

**3. 중도탈락**

대상자번호	이니셜	사유

※ 이번 방문에 중도탈락이 없음을 확인함

**4. 이상반응과 중대한 이상반응**

대상자번호	이니셜	발생일 (YY/MM/DD)	중대성	이상반응 종류	이상반응 내용

※ 이번 방문에 AE / SAE 없음을 확인함

**5. 근거문서 및 중재기록서 확인 / 중대한 발견사항(문제점/불일치/논쟁/계획서 이탈 등)**

1) SDV : Screening : S001-S003, S005-S006, Screening failure : S004,S007  
Visit1 : PS2-R001 - PS2-R004

- 방문마다 실시되어야 할 항목들이 모두 이루어졌고, 진단검사의학 검사 결과지, 심전도 검사 결과지 등의 근거문서가 잘 보관됨. 일부 시험대상자의 기록에서 누락 및 오류가 있음.
- 계획서에 맞게 시험대상자별로 방문수행이 이루어졌음.
- 1차 방문에서 의뢰검사 항목(PFE2) 결과가 종료 방문 시기에 나오므로, 1차 방문 날짜로 서명 하기로 함.
- 일반반응 검사에서 검사결과가 Positive 이면 재검여부에 "□예" "□아니오" 표기하고, Negative 또는 기타일 경우이면 재검여부에 "NA" 표기하도록 함.
- 상기도감염 발생 정도에서 중상기간을 1차방문은 최대 365일까지, 2차방문은 V1에서 V2까지 방문일수 만큼, 3차방문은 V2에서 V3까지 방문일수 만큼, 이상반응으로 잡지 않기로 함.
- 제외기준 2번 폐기능검사에서 FEV1/PVC가 70% 미만인 것은 Pre(BEST)결과와 같으므로, PVC가 80% 미만인 것은 Pre(%PRED) 값으로 보기로 함.
- 제외기준 3번 폐기능 검사에서 FEV1이 12% 이상인 것은 Post(%CHG), 200ML 이상인 것은 Post(%PRED) 값으로 보기로 함.
- 1차 방문 PS2-R001 대상자의 중재기록서와 EMR에 기록된 내용이 불일치하여 확인 요청함

2) ICF Screening S001-S007

- 대상자 동의서 및 설명문이 오류 없이 작성 되었으며, 사전동의, 자발적 동의, 사본제부 여부 확인함.
- 모든 대상자의 서명된 동의서가 적절하게 보관되어 있음을 확인함.
- 2018년 02월 07일 IRB 승인받은 1.1version 동의서 내용 확인함.

3) ISF

- 이종능기침 유지 및 해체에 관한 내용이 Filing 되지 않아, 첨부 자료 요청함.
- 연구자 이력서에 주민등록번호가 기재 되어 있어, 개인정보 보호 차원에 주민번호 앞자리만 남기고 삭제 하도록 요청함.
- 6번 목록에 모니터링 방문 보고서 항목이 잘못 기재되어 있어 삭제 요청함.
- 시험계획서에 있는 인체적용시험계획의 미충수거일 유지 및 해체에 관한 내용을 9번 목록에 Filing 하도록 함.

Monitoring Report Ver 1.1  
Effective Date 2017.12.21. CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2 (1)

**3. 중도탈락**

대상자번호	이니셜	사유

※ 이번 방문에 중도탈락이 없음을 확인함

**4. 이상반응과 중대한 이상반응**

대상자번호	이니셜	발생일 (YY/MM/DD)	중대성	이상반응 종류	이상반응 내용

※ 이번 방문에 AE / SAE 없음을 확인함

**5. 근거문서 및 중재기록서 확인 / 중대한 발견사항(문제점/불일치/논쟁/계획서 이탈 등)**

1) SDV : Screening : S001-S003, S005-S006, Screening failure : S004,S007  
Visit1 : PS2-R001 - PS2-R004

- 방문마다 실시되어야 할 항목들이 모두 이루어졌고, 진단검사의학 검사 결과지, 심전도 검사 결과지 등의 근거문서가 잘 보관됨. 일부 시험대상자의 기록에서 누락 및 오류가 있음.
- 계획서에 맞게 시험대상자별로 방문수행이 이루어졌음.
- 1차 방문에서 의뢰검사 항목(PFE2) 결과가 종료 방문 시기에 나오므로, 1차 방문 날짜로 서명 하기로 함.
- 일반반응 검사에서 검사결과가 Positive 이면 재검여부에 "□예" "□아니오" 표기하고, Negative 또는 기타일 경우이면 재검여부에 "NA" 표기하도록 함.
- 상기도감염 발생 정도에서 중상기간을 1차방문은 최대 365일까지, 2차방문은 V1에서 V2까지 방문일수 만큼, 3차방문은 V2에서 V3까지 방문일수 만큼, 이상반응으로 잡지 않기로 함.
- 제외기준 2번 폐기능검사에서 FEV1/PVC가 70% 미만인 것은 Pre(BEST)결과와 같으므로, PVC가 80% 미만인 것은 Pre(%PRED) 값으로 보기로 함.
- 제외기준 3번 폐기능 검사에서 FEV1이 12% 이상인 것은 Post(%CHG), 200ML 이상인 것은 Post(%PRED) 값으로 보기로 함.
- 1차 방문 PS2-R001 대상자의 중재기록서와 EMR에 기록된 내용이 불일치하여 확인 요청함

2) ICF Screening S001-S007

- 대상자 동의서 및 설명문이 오류 없이 작성 되었으며, 사전동의, 자발적 동의, 사본제부 여부 확인함.
- 모든 대상자의 서명된 동의서가 적절하게 보관되어 있음을 확인함.
- 2018년 02월 07일 IRB 승인받은 1.1version 동의서 내용 확인함.

3) ISF

- 이종능기침 유지 및 해체에 관한 내용이 Filing 되지 않아, 첨부 자료 요청함.
- 연구자 이력서에 주민등록번호가 기재 되어 있어, 개인정보 보호 차원에 주민번호 앞자리만 남기고 삭제 하도록 요청함.
- 6번 목록에 모니터링 방문 보고서 항목이 잘못 기재되어 있어 삭제 요청함.
- 시험계획서에 있는 인체적용시험계획의 미충수거일 유지 및 해체에 관한 내용을 9번 목록에 Filing 하도록 함.

Monitoring Report Ver 1.1  
Effective Date 2017.12.21. CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2 (1)

### Monitoring Report

과 제 번 호	CTCF2_2018_KGC-03-PS2	의 회 기 관	한국인삼공사(주)
시 험 책 임 자	박 성 주	실 시 기 관	전북대학교병원 기능성식품안전지원센터
중 중 연 구 자	채수원, 김영근, 박병현, 최은경, 정재석	시 험 담 당 자	이 예 란
발 문 회 차	4-6회	모 니 터	임 재 현 (4회)
방 문 목 적	Routine Monitoring Visit	방 문 일	2018.05.09 ~ 2018.05.11

**1. 모집상황**

계획대상자	스크리닝	스크리닝율	무작위배정	중도탈락	완료대상자
100(명)	36(명)	4(명)	30(명)	0(명)	0(명)

**2. 모니터링**

실시간 모니터링 활동	예	아니오	N/A
<b>1. 시험 진행상황</b>			
• 목표한 대상자가 등록되었는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 대상자 선별/동지 기록이 적절히 이루어지고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험참여자와 대상자 모집 관련 문제에 대해 검토하였는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 비고 : 등록대기자 2명			
<b>2. 시험참여자와 장비</b>			
• 시험 참여자와 장비는 여전히 적절합니까?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험에 사용하는 장비는 적절히 유지되고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험 참여자가 변경되었는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
① 새로운 참여자가 시험에 기록되고, 현재 마커서가 보관되어 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
② 새로운 참여자는 적절한 교육 및 입구의 위생에 대한 기록이 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
• 생물학적 샘플의 수거, 취급, 라벨링, 보관 및 운반 과정은 적절합니까?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 실험실 인종서 또는 정상범위에 변화가 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>3. 시험참여자와의 동의</b>			
• 지난 방문에서 알게 된 문제점 중 이번 방문에서 해결된 것이 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 이번 방문에서 알게 된 새로운 문제가 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 문제점에 대해서 논의하였고 해결방법은 찾았는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험기간 방문 기록에 날짜를 기록하고 서명하였는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Monitoring Report Ver 1.1  
Effective Date 2017.12.21. CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2(4-6)

실시간 모니터링 활동	예	아니오	N/A
<b>4. 시험에 사용되는 제품 / 그 외 관련 물품</b>			
• 시험용 제품 수불 기록은 정확하고 현재까지의 기록이 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험용 제품은 계획서에 따라 보관되고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험용 제품의 재고 및 사용기한은 충분합니까?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험용 물품과 그 외 관련 물품의 수량은 충분합니까?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>5. 시험기간 / 시험자 준수</b>			
• 시험자는 계획서 / 변경계획서 및 관련규정을 준수하고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 시험자는 IR8에 대한 승인 / 보고를 적절히 수행하고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>5-1. 안전성 관련 정보</b>			
• 모든 중요한 이상반응이 의뢰자 및 IR8에 적절히 보고되었고, 추적조사가 제대로 이루어지고 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
• 대상자 무작위배정 코드를 해제하고 그 사유를 적절히 기록한 것이 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
• 이상반응으로 인한 조기종료 대상자가 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 새로 개정된 안전성 정보가 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 비고 : AE - 2례, SAE - 0례 [AE - 총 2례, SAE - 총 0례]			
<b>6. 동의서</b>			
• 동의서는 시험관련 절차가 시작되기 전에, 각 대상자 또는 대리인으로부터 적절히 획득하였으며 서명과 날짜가 기록되어 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 동의서에 대상자 동의를 설명한 사람이 서명하고 날짜를 기록하였는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• IR8의 승인을 유지하고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>7. 근거문서 및 종래기록서(CRF) 검토</b>			
• 개인외 시험기간 기록과 대조하여 CRF 데이터를 근거문서와 확인하였는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 종래기록서는 근거문서 내용과 일치하며 읽기 쉽고 정확하게, 완전하게 기재되었는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 종래기록서의 수정은 적절한 방법으로 이루어지고 있는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• 미해결된 종래기록서 / Query 시험담당자와 논의하였는가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>8. 시험자 역할 / 기준문서</b>			
• 시험자는 필요한 모든 기준문서를 적절히 확보하고 시험자 파일에 유지하고 있는가?	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Monitoring Report Ver 1.1  
Effective Date 2017.12.21. CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2(4-6)

**3. 중도탈락**

대상자번호	이탈사유	사유

※ 이번 방문에 중도탈락이 없음을 확인함

**4. 이상반응과 증대한 이상반응**

대상자번호	이탈사유	발생일 (YY/MM/DD)	중대성	이상반응 종류	이상반응 내용
PS2-R002	GSJ	18/04/14	N	콧물	취해진 조치 없이 완료됨; IP와 관련없음
PS2-R007	GHH	18/04/03	N	상기도 감염	취해진 조치 없이 완료됨; IP와 관련없음

※ 이번 방문에 AE 2례 / SAE 없음을 확인함

**5. 근거문서 및 종래기록서 확인 / 증대한 발현(사건/중대성/중요성/논쟁/계획서 이탈 등)**

1) SDV - Screening : S015 ~ S030  
 Visit1 : PS2-R015 ~ PS2-R030  
 Visit2 : PS2-R001 ~ PS2-R007

- 발판다다 실시되어 할 항목들이 모두 이루어졌고, 심전도 검사 결과지 등의 근거문서가 잘 보관됨.
- 계획서에 맞게 시험대상자별로 방문수행이 이루어졌음.
- V1.1->V1.2로 Version up이 되어도 약물대어지는 원래 V1.1로 이어가도록 함. 단 아무것도 작성되지 않았을 경우에는 업데이트 된 버전으로 사용하도록 함.
- 근거문서에 신개량동물생산지 전체적으로 서명 누락 되어 확인 요청함.
- 종래기록서에 송문도 기저시 소수 셋째자리까지 표기 하기로 함.

2) ICF Screening S028-S036  
 • 1.1 Version 동의서 내용 확인함.  
 • 대상자 사전동의, 자발적 동의, 사본해부 여부 확인함.  
 • 모든 대상자의 서명된 동의서가 적절하게 보관되어 있음을 확인함.

3) ISF  
 • 2018년 우수임상실 실험 인증서, 2018년 임상임상시험도조사서업 참가증 요청됨.  
 • 일부 시험담당자의 GCP이수증이 filling 되지 않아 해당 중사들 담당자에게 요청됨.

4) 연구자 training  
 • 없음

Monitoring Report Ver 1.1  
Effective Date 2017.12.21. CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2(4-6)



### Monitoring Report

과 제 번 호	CTCF2_2018_KGC-03-PS2	의 회 기 관	한국인삼공사(주)
시 험 책 입 자	박 성 주	실 시 기 관	전북대학교병원 기능성식품임상지원센터
공 동 연 구 자	채수준, 김영진, 박영민, 최은영, 정채서	시 험 담 당 자	이 예 란, 최 민 준
방 문 회 차	20 - 22 회	모 니 터	임 은 화 (9명)
방 문 목 적	Routine Monitoring Visit	방 문 일	2018.11.27.~11.29.

**1. 모집상황**

계획대상자	스크리닝	스크리닝일차	무작위배정	중도탈락	완료대상자
100(명)	118(명)	18(명)	100(명)	9(명)	77(명)

**2. 모니터링**

실시간 모니터링 활동	예	아니오	N/A
<b>1. 시험 진행상황</b>			
• 목표한 대상자가 등록되었는가?	■	□	□
• 대상자 신발/동재 기록이 적절히 이루어지고 있는가?	■	□	□
• 시험참여자와 대상자 모집 관련 문제에 대해 검토하였는가?	□	□	■
• 비고 : 등록 완료됨			
<b>2. 시험참여자와 심비</b>			
• 시험 참여자와 심비는 여전히 적절한가?	■	□	□
• 시험에 사용하는 장비는 적절히 유지되고 있는가?	■	□	□
• 시험 참여자가 변경되었는가?	□	■	□
① 새로운 참여자가 서명부에 기록되고, 현재 이력서가 보관되어 있는가?	□	□	■
② 새로운 참여자는 적절한 교육 및 업무의 위임에 대한 기록이 있는가?	□	□	■
• 생물학적 샘플의 수거, 취급, 라벨링, 보관 및 운반 과정은 적절한가?	■	□	□
• 살균실 인증서 또는 정상범위에 변화가 있는가?	□	■	□
<b>3. 시험참여자와의 토의</b>			
• 지난 방문에서 알게 된 문제점 중 이번 방문에서 해결된 것이 있는가?	■	□	□
• 이번 방문에서 알게 된 새로운 문제가 있는가?	■	□	□
• 문제점에 대해서 논의하였고 해결방법은 찾았는가?	■	□	□
• 시험기관 방문 기록에 날짜를 기록하고 서명하였는가?	■	□	□

Monitoring Report Ver 1.1  
Effective Date 2017.12.21.      - 1 -      CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2(20-22)

실시간 모니터링 활동	예	아니오	N/A
<b>4. 시험에 사용되는 제품 / 그 외 관련 물품</b>			
• 시험용 제품 수송 기록은 정확하고 현재까지의 기록이 있는가?	■	□	□
• 시험용 제품은 계획서에 따라 보관되고 있는가?	■	□	□
• 시험용 제품의 재고 및 사용기한은 충분한가?	■	□	□
• 시험용 물품과 그 외 관련 물품의 수량은 충분한가?	■	□	□
<b>5. 시험기관 / 시험자 준수</b>			
• 시험하는 계획서 / 변경계획서 및 관련규정을 준수하고 있는가?	■	□	□
• 시험자는 IRB에 대한 승인 / 보고를 적절히 수행하고 있는가?	■	□	□
<b>S-1 안전성 관련 정보</b>			
• 모든 중대한 이상반응이 의뢰자 및 IRB에 적절히 보고 되었으며, 추적조사가 제대로 이루어지고 있는가?	□	□	■
• 대상자 무작위배정 코드를 해제하고 그 사유를 적절히 기록한 것이 있는가?	□	□	■
• 이상반응으로 인한 조기종료 대상자가 있었는가?	□	■	□
• 새로 개정된 안전성 정보가 있는가?	□	■	□
• 비고 : AE - 8례, SAE - 0례 [AE - 총 36례, SAE - 총 0례]			
<b>6. 동의서</b>			
• 동의서는 시험관련 절차가 시작되기 전에, 각 대상자 또는 대리인으로부터 적절히 획득하였으며 시험과 날짜가 기록되어 있는가?	□	□	■
• 동의서에 대상자 동의를 설명한 사항이 서명하고 날짜를 기록하였는가?	□	□	■
• IRB의 승인을 유지하고 있는가?	□	□	■
<b>7. 근거문서 및 증례기록서(CRF) 검토</b>			
• 개인의 시험기관 기록과 대조하여 CRF 데이터를 근거문서와 확인하였는가?	■	□	□
• 증례기록서는 근거문서 내용과 일치하며 읽기 쉽고 정확하게, 완전하게 기재되었는가?	□	■	□
• 증례기록서의 수정은 적절한 방법으로 이루어지고 있는가?	■	□	□
• 미해결된 증례기록서 / Query를 시험담당자와 논의하였는가?	■	□	□
<b>8. 시험자 파일 / 기본문서</b>			
• 시험자는 필요한 모든 기본문서를 적절히 확보하고 시험자 파일에 유지하고 있는가?	■	□	□

Monitoring Report Ver 1.1  
Effective Date 2017.12.21.      - 2 -      CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2(20-22)

**3. 중도탈락**

대상자번호	이니셜	사유
PS2-R009	IHC	동일월회 (개인사정)
PS2-R023	CJV	동일월회 (개인사정)
PS2-R059	GDS	동일월회 (개인사정)
PS2-R071	IHI	동일월회 (개인사정)
PS2-R077	AJS	동일월회 (개인사정)
PS2-R052	BSY	동일월회 (개인사정)
PS2-R058	YHH	동일월회 (개인사정)
PS2-R075	STI	동일월회 (개인사정)
PS2-R086	MGR	동일월회 (개인사정)

※ 지난 방문이후 중도탈락자 없음을 확인함.

**4. 이상반응과 중대한 이상반응**

대상자번호	이니셜	발생일 (YY/MM/DD)	중대성	이상반응 종류	이상반응 내용
PS2-R081	GME	18/11/17	AE	질염	치료에 투여중으로 진행중, IP관련 가능성 없음.
PS2-R088	CBJ	18/10/26	AE	상기도감염	조치없이 완치, IP관련 없음.
PS2-R090	IHG	18/10/24	AE	두통	치료약 투여 후 완치, IP관련 가능성 있음.
PS2-R091	IHS	18/10/07	AE	탈장크다	조치없이 완치, IP관련 가능성 있음.
PS2-R093	SSI	18/11/06	AE	상기도감염	조치없이 완치, IP관련 가능성 없음.
PS2-R095	CDB	18/11/14	AE	장염	조치없이 완치, IP관련 가능성 있음.
PS2-R097	BHJ	18/11/11	AE	상기도감염	조치없이 완치, IP관련 가능성 없음.
PS2-R079	CSJ	18/11/05	AE	상기도감염	조치없이 완치, IP관련 가능성 없음.

※ 이번 방문에 AE 8례 / SAE 없음을 확인함.

**5. 근거문서 및 증례기록서 확인 / 중대한 발견사항(문제점/불일치/논쟁/계획서 이탈 등)**

1) SDV  
- Visit 2 : PS2-R087 ~ PS2-R099  
- Visit 3 : PS2-R075 ~ PS2-R087  
- Review : PS2-R001 ~ PS2-R080  
• 방문마다 실시되어야 할 문서항목들이 모두 수행되었고, 심전도 검사 결과지 등의 근거문서가 잘 보관됨.  
• 지난 방문시 발견된 Queries는 적절하게 수정되었음을 확인함.  
• PS2-R091 대상자의 전자전투기록 확인 중 산부인과진료(Ovarian cyst) 확인되어 AE수입 확인 요청함.  
• PS2-R099 대상자의 식이기록지 기록상 평소와 다르게 복통 기록이 있어 지속복통약류 확인 후 연구자에게 복용가능 여부 확인하도록 요청함.

2) ICF  
• ICF version 1.1가 current version 이며, 본 연구에 등록된 모든 시험대상자는 IRB 승인된 동의서를 적절하게 동의 취득되었음을 확인함.

Monitoring Report Ver 1.1  
Effective Date 2017.12.21.      - 3 -      CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2(20-22)

3) IS-TMF  
• 방문 시 IS-TMF가 기관의 시인장지가 되어 있는 문서 보관장에 보관되어 있음을 확인하였고, 모든 기본문서가 적절하게 filing 되어 있음을 확인함.

4) 연구자 training  
• NA

5) Protocol deviation

Issue 1	
Category	
Comments	
Action	

**6. 시험제품(수출대상, 대상자별 부여기록, 처방전, 수검증)**

- 본 방문 시 pharmacy monitoring을 시행하였고, Investigational Products는 접근이 제한된 장소에 실온 보관되어 있으며 IP accountability log 및 inventory log가 적절하게 기록되어 있음을 확인하였음.
- 시험제품 및 기록이 상호 일치함을 확인함.

**7. 기타**

- IRB 연구승인기간 : 18.02.07~19.02.06 (중간보고예정) ; 18.12.06
- IRB 대문수부고 승인 확인(PS2-R037, PS2-R048) ; 18.11.08.
- 다음 모니터링은 시험담당자와 일정 조율 후 진행 예정함.

Reviewer Of The Report	Date / Signature	20181210, (26) (YYYY/MM/DD) / (서명)
------------------------	------------------	---------------------------------------

Monitoring Report Ver 1.1  
Effective Date 2017.12.21.      - 4 -      CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2(20-22)

### Monitoring Report

과 제 번 호	CTCF2_2018_KGC-03-PS2	의 회 기 관	한국인삼공사(주)
시 험 제 직 자	박 성 우	실 시 기 관	전북대학교병원 기능성식품임상지원센터
중 동 연 구 자	제수원, 김광준, 박명현, 최은영, 정재서	시 험 담 당 자	이 대 람, 최 민 준
방 문 회 차	25 회	모 니 터	임 은 화 (서명)
방 문 목 적	Routine Monitoring Visit	방 문 일	2019.02.22.

#### 1. 오일상황

계획대상자	스크리닝	스크리닝일차	무작위배정	중도탈락	완료대상자
100(명)	118(명)	18(명)	100(명)	10(명)	90(명)

#### 2. 모니터링

실시한 모니터링 활동	예	아니오	N/A
<b>1. 시험 진행상황</b>			
• 시험 참여자가 실비는 여전히 적절한가?	■	□	□
• 대상자 선별/등록 기록이 적절히 이루어지고 있는가?	■	□	□
• 시험참여자와 대상자 모집 관련 문제에 대해 검토하였는가?	□	□	■
• 비고 : 등록 완료됨			
<b>2. 시험참여자와 실비</b>			
• 시험 참여자와 실비는 여전히 적절한가?	■	□	□
• 시험에 사용하는 장비는 적절히 유지되고 있는가?	■	□	□
• 시험 참여자가 변경되었는가?	□	■	□
① 새로운 참여자가 서양쪽에 기록되고, 현재 이력서가 보관되어 있는가?	□	□	■
② 새로운 참여자는 적절한 교육 및 업무의 위임에 대한 기록이 있는가?	□	□	■
• 생물학적 샘플의 수거, 취급, 라벨링, 보관 및 운반 과정은 적절한가?	■	□	□
• 실험실 인증서 또는 정상범위에 변화가 있는가?	□	■	□
<b>3. 시험참여자와 동의</b>			
• 지난 방문에서 알게 된 문제점 중 이번 방문에서 해결된 것이 있는가?	■	□	□
• 이번 방문에서 알게 된 새로운 문제가 있는가?	□	■	□
• 문제점에 대해서 논의하였고 해결방안은 나왔는가?	□	□	■
• 시험기관 방문 기록에 날짜를 기록하고 서명하였는가?	■	□	□

Monitoring Report Ver 1.1 Effective Date 2017.12.21.      - 1 -      CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2(25)

실시한 모니터링 활동	예	아니오	N/A
<b>4. 시험에 사용되는 제품 / 그 외 관련 물품</b>			
• 시험용 제품 수불 기록은 정확하고 현재까지의 기록이 있는가?	□	□	■
• 시험용 제품은 계획서에 따라 보관되고 있는가?	□	□	■
• 시험용 제품의 재고 및 사용기한은 충분한가?	□	□	■
• 시험용 물품과 그 외 관련 물품의 수량은 충분한가?	□	□	■
<b>5. 시험기관 / 시험자 준수</b>			
• 시험자는 계획서 / 변경계획서 및 관련규정을 준수하고 있는가?	■	□	□
• 시험자는 IRB에 대한 승인 / 보고를 적절히 수행하고 있는가?	■	□	□
<b>5-1. 안전성 관련 정보</b>			
• 모든 중대한 이상반응이 의뢰자 및 IRB에 적절히 보고되었고, 추적조사가 제대로 이루어지고 있는가?	□	□	■
• 대상자 무작위배정 크드를 해제하고 그 사유를 적절히 기록한 것이 있는가?	□	□	■
• 이상반응으로 인한 초기종료 대상자가 있었는가?	□	□	■
• 새로 개항한 안전성 정보가 있는가?	□	■	□
• 비고 : AE - 0명, SAE - 0명 [AE - 총 41명, SAE - 총 0명]			
<b>6. 동의서</b>			
• 동의서는 시험관련 절차가 시작되기 전에, 각 대상자 또는 대리인으로부터 적절히 획득하였으며 서명과 날짜가 기록되어 있는가?	□	□	■
• 동의서에 대상자 동의를 설명한 사람이 서명하고 날짜를 기록하였는가?	□	□	■
• IRB의 승인을 유지하고 있는가?	□	□	■
<b>7. 근거문서 및 중재기록서(CRF) 검토</b>			
• 개인의 시험기관 기록과 대조하여 CRF 데이터를 근거문서와 확인하였는가?	■	□	□
• 중재기록서는 근거문서 내용과 일치하며 읽기 쉽고 정확하게, 완전하게 기재되었는가?	■	□	□
• 중재기록서의 수정은 적절한 방법으로 이루어지고 있는가?	■	□	□
• 이해결정 중재기록서 / Query를 시험담당자와 논의하였는가?	□	□	■
<b>8. 시험자 파일 / 기본문서</b>			
• 시험자는 필요한 모든 기본문서를 적절히 확보하고 시험자 파일에 유지하고 있는가?	■	□	□

Monitoring Report Ver 1.1 Effective Date 2017.12.21.      - 2 -      CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2(25)

#### 3. 중도탈락

대상자번호	이니셜	사유
PS2-R009	IHC	동의철회 (개인사유)
PS2-R023	CIY	동의철회 (개인사유)
PS2-R059	GDS	동의철회 (개인사유)
PS2-R071	IHI	동의철회 (개인사유)
PS2-R077	AJS	동의철회 (개인사유)
PS2-R052	BSY	동의철회 (개인사유)
PS2-R058	YHH	동의철회 (개인사유)
PS2-R075	SH	동의철회 (개인사유)
PS2-R086	MGR	동의철회 (개인사유)
PS2-R089	CHI	동의철회 (개인사유)

※ 지난 방문이후 중도탈락자 없음.

#### 4. 이상반응과 중대한 이상반응

대상자번호	이니셜	발생일 (YY/MM/DD)	중대성	이상반응 종류	이상반응 내용

※ 지난 방문이후 AE / SAE 없음을 확인함.

#### 5. 근거문서 및 중재기록서 확인 / 중대한 발현(중재점/발열지/논쟁/계획서 이탈 등)

- SDV
  - 의뢰장서 - 최종서명 : PS2-R001 ~ PS2-R100, Screening Failure
  - 방문마다 실시되어야 할 검사항목들이 모두 수행되었고, 심전도 검사 결과지 등의 근거문서가 잘 보관됨.
  - 지난 방문시 발견된 Queries는 적절하게 수정되었음을 확인함.
  - 더 이상 Query 발견되지 않음.
- ICF
  - ICF version 1.1가 current version 이며, 본 연구에 등록된 모든 시험대상자의 동의서가 보관장에 적절하게 보관되어 있음을 확인함.
- ISF-TMF
  - 본 방문 시 ISF-TMF가 기관의 시간장치가 되어 있는 문서 보관장에 보관되어 있음을 확인하였고, 모든 기본문서가 적절하게 filing 되어 있음을 확인함.
- 연구자 training
  - NA

Monitoring Report Ver 1.1 Effective Date 2017.12.21.      - 3 -      CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2(25)

#### 5) Protocol deviation

Category	Issue 1
Comments	
Action	

#### 6. 시험제품(수불대상, 대상자별 투여기록, 처방지, 수량증)

- 본 방문 시 pharmacy monitoring을 시행하지 않았고, Investigational Product는 접근이 제한된 장소에 실은 보관되어 있음.
- 빈납된 시험제품 및 미사용 시험제품을 의뢰사에 반납할 수 있도록 절차 안내함.

#### 7. 기타

- Next plan : 종료보고 및 결과보고서 승인 후 종료방문 예정.

Reviewer Of The Report	Date / Signature	2019.02.25 (YYYY/MM/DD) / (서명)
------------------------	------------------	-----------------------------------

Monitoring Report Ver 1.1 Effective Date 2017.12.21.      - 4 -      CTCF2\_2018\_KGC-03-PS2(25)

## 사. 곰보배추/홍삼 복합물의 호흡기 개선 및 보호 효과 기전 연구

### 1. 홍삼과 곰보배추 복합물 (KGC3P)의 유전자 마커 및 조절 유전자 규명

#### 1.1. Effects of KGC3P and nepetin in vitro on MH-S cells and signal transduction via the

##### NF- $\kappa$ B and MAPK pathways

- 홍삼과 곰보배추 복합물 (KGC3P)을 UPLC와 HPLC를 사용하여 3개의 ginsenosides (Rg1, Rb1, and Rg3s)와 nepetin을 분리 정제하였고, 각각의 함량은 Rg1, Rb1, Rg3s, 그리고 nepetin 은  $0.22 \pm 0.03$ ,  $2.06 \pm 0.06$ ,  $0.51 \pm 0.05$ , 그리고  $5.42 \pm 0.39$  mg g<sup>-1</sup>이었다.

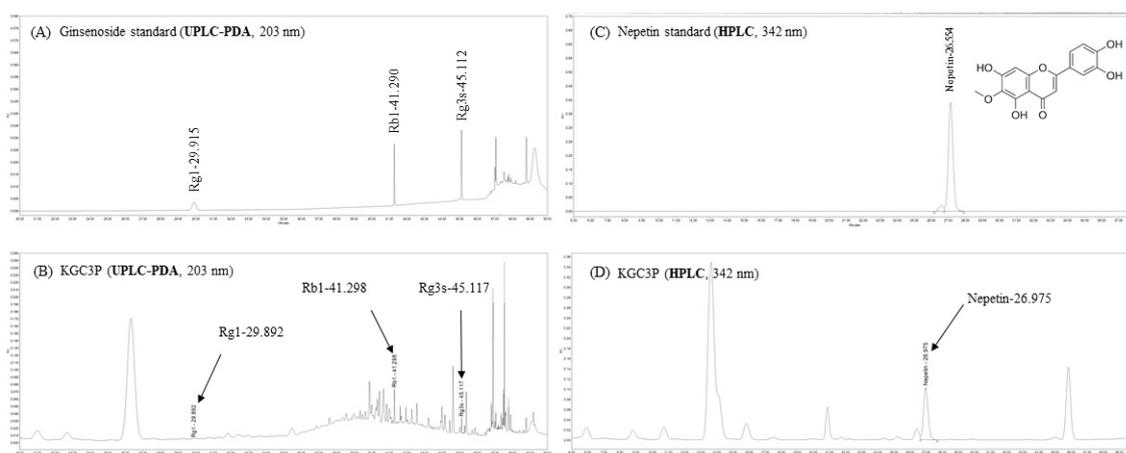
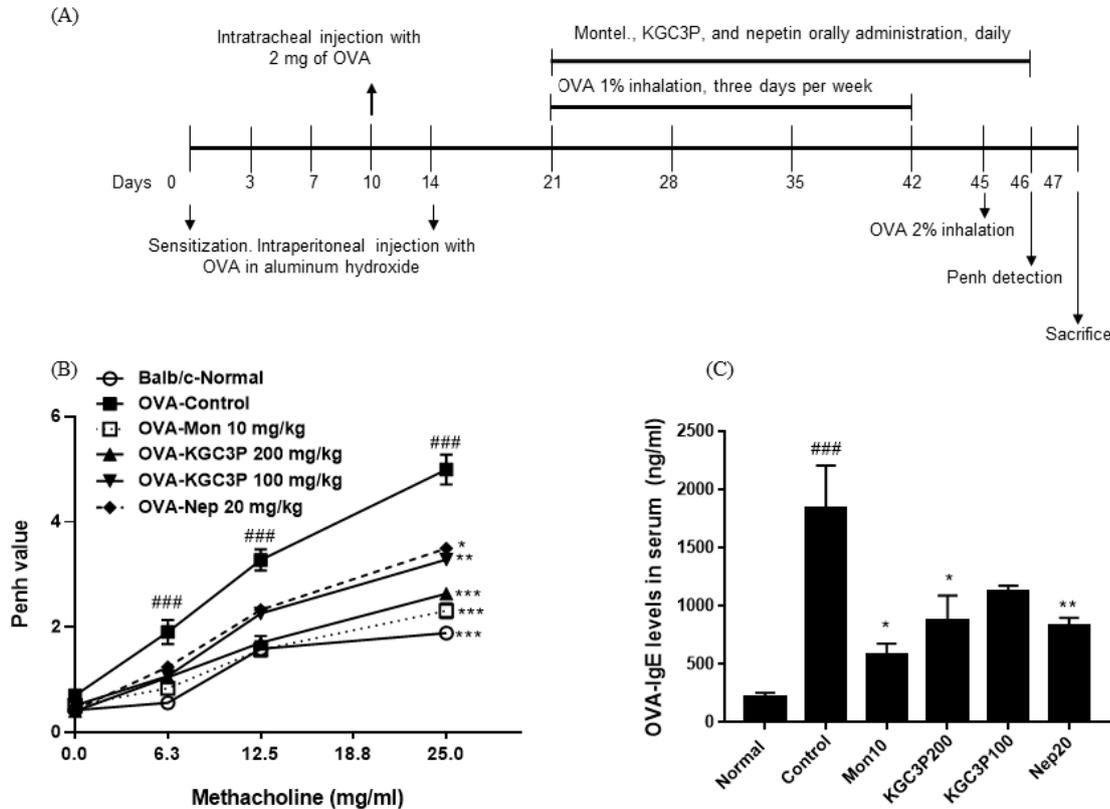


Fig. 1. Chromatogram and structure of four compounds purified from KGC-03-PS mixture (KGC3P). Rg1, Rb1, Rg3s, and nepetin were identified as marker compounds of the Korean red ginseng/*Salvia plebeia* R.Br. mixture (KGC3P). UPLC-PDA chromatograms of three standard ginsenoside mixtures (A) at  $\lambda = 203$  nm and KGC3P mixture (B) and HPLC chromatograms of standard nepetin (C) at  $\lambda = 342$  nm and KGC3P mixture (D). Rg1, Rb1, Rg3s, and nepetin appeared at retention times of  $\sim 29.8$ , 41.2, 45.1, and 26.9 min, respectively. UPLC-PDA: ultra-performance liquid chromatography-photodiode array detector, HPLC: high-performance liquid chromatography.

#### 1.2. Inhibitory effects of KGC3P and nepetin on airway inflammation

- KGC3P와 nepetin이 AHR에 미치는 영향은 메타 콜린에 대한 Penh값이 정상군에 비해 OVA-대조군의 Penh 값이 메타 콜린 투여량으로 증가에 따라 증가하는데, KGC3P (100 및 200 mg kg<sup>-1</sup>), nepetin (20 mg kg<sup>-1</sup>) 및 몬테루카스트 (10 mgkg<sup>-1</sup>) 군은 OVA- 대조군보다 유의하게 낮은 Penh 값을 보였다 (Fig.2B). OVA 민감성 유도는 OVA 특이적 IgE 생산을 유도 하였는데, 알레르기 성 천식의 발병 기전에 관여하는 염증 세포. Fig. 2c에 도시 된 바와 같이, OVA-특이 IgE 수치는 OVA- 대조군에서 정상보다 유의하게 높았다. 그러나 KGC3P (200 mg kg<sup>-1</sup>), nepetin (20 mg kg<sup>-1</sup>), 및 몬테루카스트 (10 mg kg<sup>-1</sup>) 군에서 감소하였다. Fig.2D 에서 폐 및 기관의 조직병리학적 변화 및 염증 세포 침윤을 관찰 한 것으로 PAS 염색은 정상 대조군에 비해, OVA- 대조군은 섬유증을 나타내며, 상승 된 폐 조직으로 염증 세포 침윤,

goblet cell 증식, 및 점액의 과다 생성을 증가시켰는데, KGC3P (100 및 200 mg kg<sup>-1</sup>), nepetin (20 mg kg<sup>-1</sup>) 및 montelukast 10 (mg kg<sup>-1</sup>)은 이들을 감소시켰다 (Fig.2).



**Fig.2. Effects of KGC3P on airway inflammation in OVA mice**

(A) Experimental scheme, (B) Airway responsiveness to aerosolized methacholine (Penh), (C) OVA-specific IgE levels in serum, (D) Histopathology of lung and trachea tissues, and (E) Quantitative analyses of the degree of lung tissue damage. Normal: normal control; OVA-control: OVA-sensitized control; KGC3P: a 1:3 mixture of Korean red ginseng and *Salvia plebeia* R.Br.; Mon 10: 10 mg kg<sup>-1</sup> montelukast; Nep 20: 20 mg kg<sup>-1</sup> nepetin; H&E: Hematoxylin-eosin; MT: Masson's trichrome; AB-PAS: Alcian blue-Periodic acid Schiff. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10/group). <sup>###</sup>P < 0.005 vs. normal control group; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.005 vs. OVA-control group.

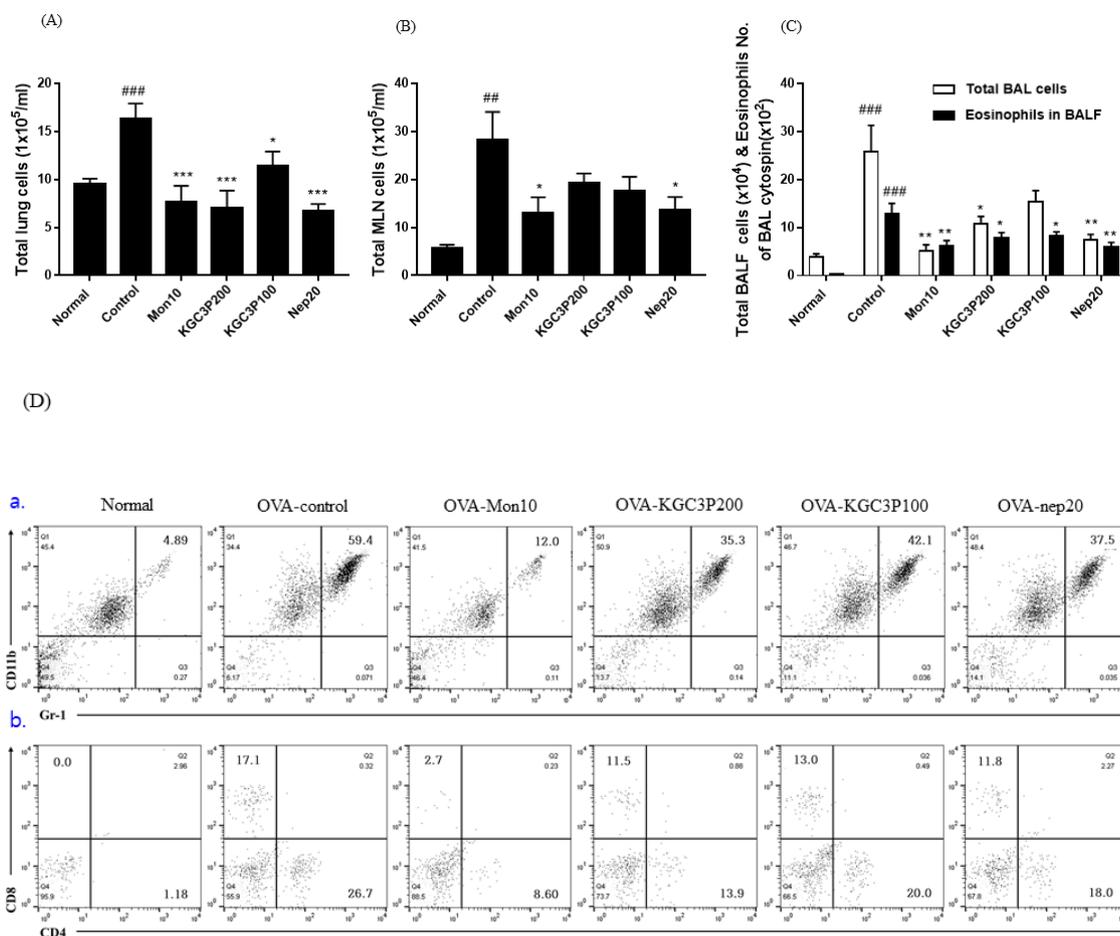
### 1.3. Effects of KGC3P and nepetin on the cell number in lung, MLN, and BALF

- 정상군에 비하여 OVA-대조군에서 총 폐세포수와 MLN 세포수가 증가 하였고, 총 폐세포의 수는 KGC3P (100 및 200 mg kg<sup>-1</sup>), nepetin (20 mg kg<sup>-1</sup>) 및 몬테루카스트 (10 mg kg<sup>-1</sup>) (Fig.3A). 그리고 총 MLN 세포의 수는 KGC3P (200 mg kg<sup>-1</sup>)에서 감소를 나타내었다 (Fig.3B). 정상군에 비하여 OVA-대조군에서는 BALF내 세포 수와 호산구 수가 유의성 있게 증가하였고, 그러나 이들 BAL 세포의 수는 현저하게 KGC3P (100 및 200 mg kg<sup>-1</sup>), nepetin (20 mg kg<sup>-1</sup>) 및 몬테루카스트 (10 mgkg<sup>-1</sup>) 군에서 유의성 있게 감소를 나타내었다 (Fig.3C).

#### 1.4. Effects of KGC3P and nepetin on the absolute number of immune cell subtype in lung,

##### BALF and MLN

- 폐, BALF 및 MLN의 CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD4+/CD69+ 및 Gr-1+/CD11b+ 활성세포의 절대 세포수치는 OVA-대조군에서 증가했고, 각각 세포의 절대 세포수치는 KGC3P (100 및 200 mg kg<sup>-1</sup>), nepetin (20 mg kg<sup>-1</sup>) 및 montelukast (10 mg kg<sup>-1</sup>) 투여군은 OVA-대조군에 비하여 감소를 나타내었고, BALF 그리고 MLN에서는 CD3+/CD4+, CD3+/CD8+ 및 Gr-1+/CD11b+도 KGC3P (100 및 200), nepetin (20 mg kg<sup>-1</sup>) 및 montelukast (10 mg kg<sup>-1</sup>) 군에서도 감소를 나타냄 (Fig.3D, Table 2).



**Fig.3. Effects of KGC3P on cell numbers in lungs, MLN, and BALF in OVA mice** (A) Lung, (B) MLN, (C) BAL cells and eosinophil numbers in BALF, (D) Dot plot of representative flow cytometry profiles on gated immune cells in BALF. Normal: normal control; OVA-control: OVA-sensitized control; KGC3P: a 1:3 mixture of Korean red ginseng and *Salvia plebeia* R.Br.; Mon 10: 10 mg kg<sup>-1</sup> montelukast; Nep 20: 20 mg kg<sup>-1</sup> nepetin. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10/group). ###*P* < 0.005 vs. normal control group; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, and \*\*\**P* < 0.005 vs. OVA-control group.

**Table 2**

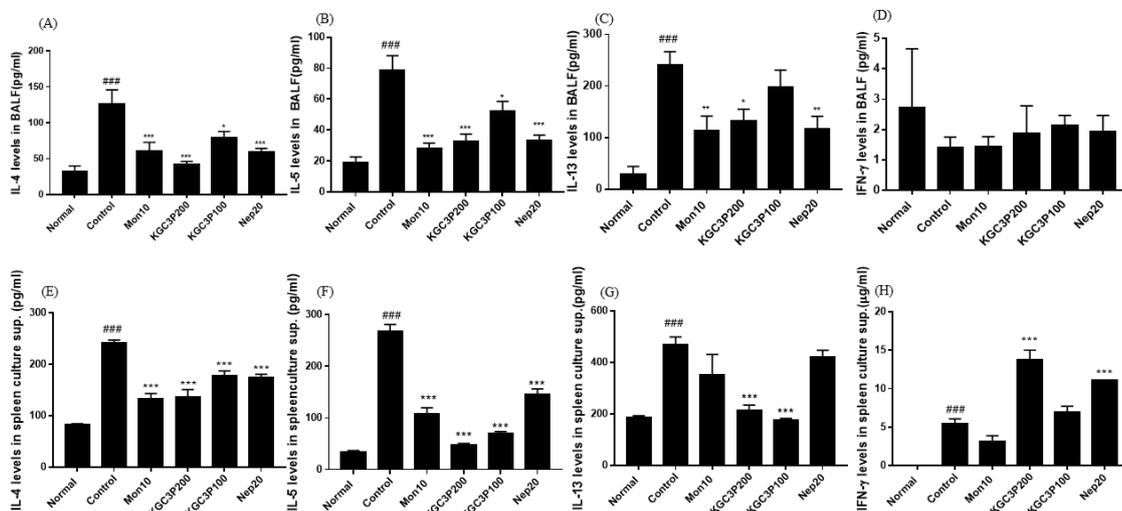
Quantification by FACS analysis of immune cell subtypes in lung, BALF, and MLN. Each point represents the mean  $\pm$  SEM values for 6 mice.

Cell phenotypes in Lung, BALF, MLN		OVA-induced airway inflammation murine asthma model (absolute No.)					
		Normal	Control	Mon 10	KGC3P 200	KGC3P 100	Nep 20
CD3+/CD4+ ( $\times 106$ cells)	Lung	2.0 $\pm$ 0.47	3.5 $\pm$ 0.36**	1.7 $\pm$ 0.39**	1.6 $\pm$ 0.55**	2.3 $\pm$ 0.33*	1.5 $\pm$ 0.18**
CD3+/CD8+ ( $\times 105$ cells)		1.7 $\pm$ 0.22	2.9 $\pm$ 0.45**	1.4 $\pm$ 0.42*	1.1 $\pm$ 0.39**	2.0 $\pm$ 0.24	1.3 $\pm$ 0.34**
CD4+/CD69+ ( $\times 105$ cells)		1.2 $\pm$ 0.47	4.1 $\pm$ 0.23***	1.7 $\pm$ 0.47***	1.7 $\pm$ 0.61**	2.6 $\pm$ 0.58*	1.1 $\pm$ 0.11**
Gr-1+/CD11b+ ( $\times 105$ cells)		1.2 $\pm$ 0.08	2.6 $\pm$ 0.13***	1.3 $\pm$ 0.30**	1.2 $\pm$ 0.44**	1.5 $\pm$ 0.18***	1.1 $\pm$ 0.13**
CD3+/CD4+ ( $\times 104$ cells)	BALF	0.1 $\pm$ 0.02	4.2 $\pm$ 1.22**	0.9 $\pm$ 0.40**	1.6 $\pm$ 0.65*	2.7 $\pm$ 0.96	1.6 $\pm$ 0.18*
CD3+/CD8+ ( $\times 104$ cells)		0.1 $\pm$ 0.03	1.6 $\pm$ 0.26***	0.3 $\pm$ 0.13***	0.8 $\pm$ 0.08**	1.3 $\pm$ 0.42	0.6 $\pm$ 0.27**
Gr-1+/CD11b+ ( $\times 104$ cells)		0.7 $\pm$ 0.23	3.0 $\pm$ 0.95*	0.5 $\pm$ 0.29*	0.8 $\pm$ 0.23*	1.8 $\pm$ 0.26	0.9 $\pm$ 0.27*
CD3+/CD4+ ( $\times 106$ cells)	MLN	2.3 $\pm$ 0.09	11.0 $\pm$ 2.83**	3.3 $\pm$ 0.82**	4.4 $\pm$ 0.61*	5.4 $\pm$ 1.48	5.0 $\pm$ 0.72*
CD4+/CD69+ ( $\times 105$ cells)		0.3 $\pm$ 0.04	3.6 $\pm$ 0.44***	1.3 $\pm$ 0.42**	1.1 $\pm$ 0.21***	1.9 $\pm$ 0.91	1.3 $\pm$ 0.35**

Absolute numbers of immune cell subtypes in lung, BALF, MLN were counted (described in Section "Materials and methods"). Lung, BALF, and MLN cells were stained with anti-CD3, CD4, CD8, CD69, CD11b, Gr-1 mAb, etc. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  (compared with WT), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  (compared with OVA CTL) as determined by unpaired Student's  $t$ -tests and analyses of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range tests. WT: BALB/c normal; OVA CTL: OVA-sensitized control, Mon 10: 10 mg/kg montelukast, OVA KGC3P: 200 mg/kg & 100 mg/kg KGC3P-treated OVA-sensitized mice, and OVA, nepetin: 20 mg/kg nepetin-treated OVA-sensitized mice. BALF: bronchoalveolar lavage fluid, MLN: Mediastinal lymph node.

### 1.5. Effects of KGC3P and nepetin on inflammatory cytokine levels in BALF and splenocytes

- Fig.4에 나타난 바와 같이, IL-4, IL-5 및 IL-13 수준은 정상군에 비하여 OVA-대조군에 비하여 BALF 및 비장 세포에서 통계학적으로 유의성 있게 증가를 하였고, 그러나 이러한 사이토카인의 수준은 KGC3P (100 및 200 mg kg<sup>-1</sup>), nepetin (20 mg kg<sup>-1</sup>) 및 몬테루카스트 (10 mg kg<sup>-1</sup>) 군에서 유의상 있게 감소하였다. 한편, OVA-대조군과 비교하여 KGC3P, nepetin 및 몬테루카스트는 BALF에서 INF- $\gamma$  수준에 영향을 미치지 않았지만 KGC3P 및 nepetin은 비장 세포 배양에서는 증가하였다.

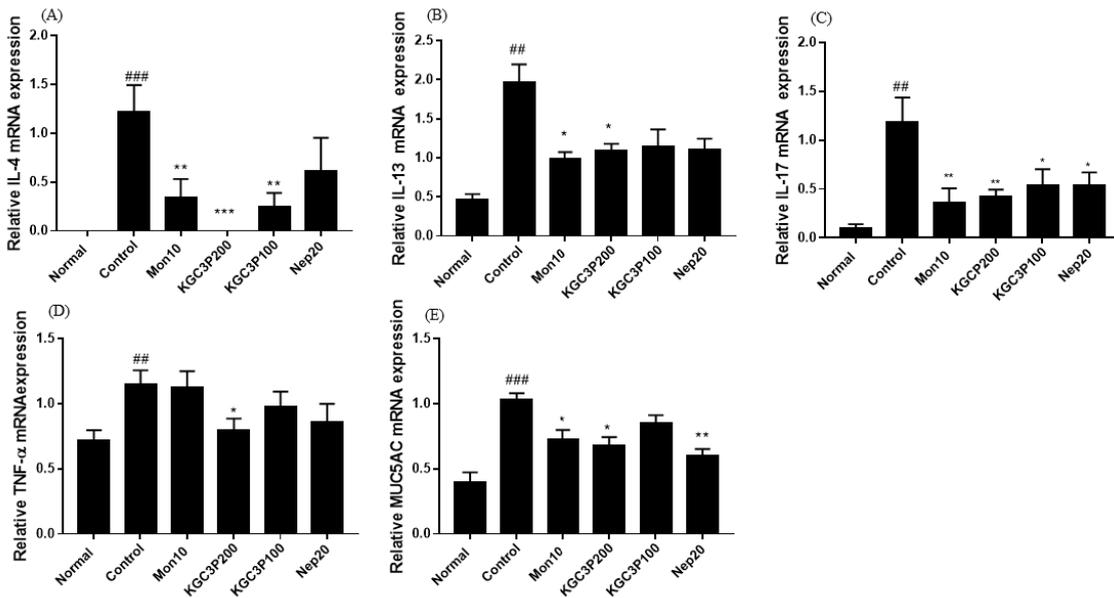


**Fig.4. Effects of KGC3P on inflammation cytokines levels in OVA mice**

(A) IL-4, (B) IL-5, (C) IL-13, and (D) IFN- $\gamma$  in BALF. (E) IL-4, (F) IL-5, (G) IL-13, and (H) IFN- $\gamma$  in spleenocyte. Normal: normal control; OVA-control: OVA-sensitized control; KGC3P: a 1:3 mixture of Korean red ginseng and Salvia plebeia R.Br.; Mon 10: 10 mg kg<sup>-1</sup> montelukast; Nep 20: 20 mg kg<sup>-1</sup> nepetin. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10/group). ### $P < 0.005$  vs. normal control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.005$  vs. OVA-control group.

## 1.6. Effects of KGCP and nepetin on gene expression of inflammatory cytokines levels in the lung

- Fig.5에 나타난 바와 같이, IL-4, IL-13, IL-17, TNF- $\alpha$  및 MUC5AC mRNA는 정상 대조군에 비해 OVA-대조군의 폐에서 상향 조절되었다. 그러나 KGC3P와 montelukast는 IL-4, IL-13, IL-17, TNF- $\alpha$ , MUC5AC mRNA 유전자 발현을 유의하게 낮추었으며 nepetin은 IL-17과 MUC5AC mRNA를 하향 조절 하였다.

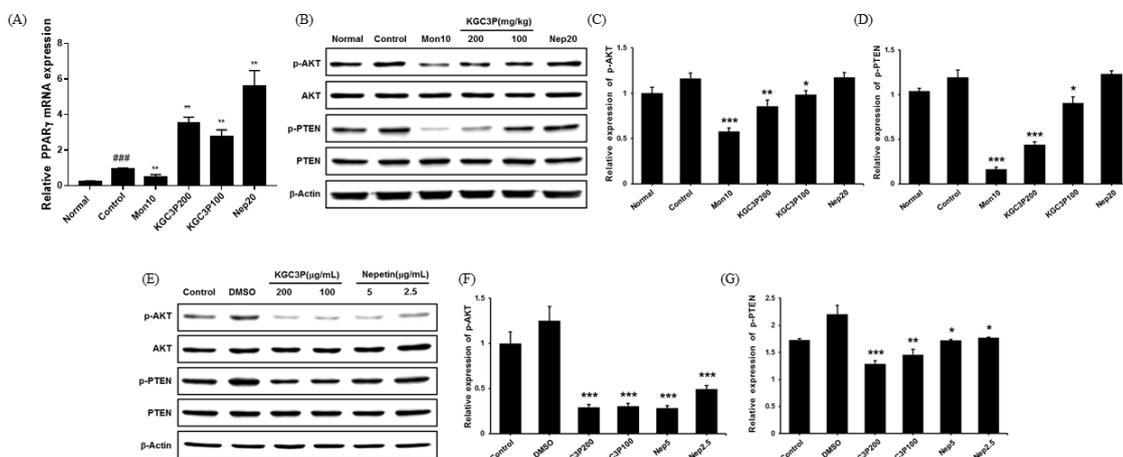


**Fig.5. Effects of KGC3P on gene expression levels of inflammation cytokines in lung of OVA mice**

(A) IL-4, (B) IL-13, (C) IL-17, (D) TNF- $\alpha$ , (E) MUC5AC 3. Normal: normal control; OVA-control: OVA-sensitized control; KGC3P: a 1:3 mixture of Korean red ginseng and *Salvia plebeia* R.Br.; Mon 10: 10 mg kg<sup>-1</sup> montelukast; Nep 20: 20 mg kg<sup>-1</sup> nepetin. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10/group). ## $P$  < 0.01 and ### $P$  < 0.005 vs. normal control group; \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, and \*\*\* $P$  < 0.005 vs. OVA-control group.

### 1.7. Effects of KGC3P and nepetin on the PPAR-PTEN signal pathway in the lungs

- PPAR $\gamma$  mRNA 유전자 발현은 정상 대조군에 비해 OVA-대조군에서 상향 조절되었고, PPAR $\gamma$  mRNA는 KGC3P (100 및 200 mg kg<sup>-1</sup>) 및 nepetin (20 mg kg<sup>-1</sup>) 군에서 유의하게 증가되었지만, 몬테루카스트 (10 mg kg<sup>-1</sup>) 군에서는 감소 하였다 (Fig.5A). 그리고 KGC3P (100 및 200 mg kg<sup>-1</sup>)와 montelukast (10 mg kg<sup>-1</sup>)는 AKT와 PTEN의 인산화 수준을 모두 낮추었다 (Fig.6B-D). 폐 조직의 데이터와 일치하여, AKT 및 PTEN의 인산화 수준은 LA-4 세포를 KGC3P (100 및 200 $\mu$ g / ml)와 nepetin (2.5 및 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>)로 처리하여 감소되었다 (Fig.6E-G).



**Fig.6. Effects of KGC3P on PPAR $\gamma$  expression and PTEN signal pathway in the lungs of OVA mice and LA-4 lung epithelial cells.**

(A) PPAR $\gamma$ , (B) representative protein expression in the lung tissue of OVA mice. (C) Densitometric analyses of p-Akt and (D) p-PTEN levels were quantitatively analyzed by normalization with non-phospho forms of AKT and PTEN using a densitometry. (E) Representative protein expression of LA-4 lung epithelial cells. (F) Densitometric analyses of p-Akt and (G) p-PTEN levels in LA-4 cells. Normal: normal control; OVA-control: OVA-sensitized control; KGC3P: a 1:3 mixture of Korean red ginseng and *Salvia plebeia*

R.Br.; Mon 10: 10 mg kg<sup>-1</sup> montelukast; Nep 20: 20 mg kg<sup>-1</sup> nepetin; DMSO: DMSO-treated control. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=10/group, n=3/group cells) ###p < 0.005 vs. normal control group; \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.005 vs. OVA-control group or DMSO-control group respectively.

## 2. Signaling molecule 및 transcriptional factor 분석을 통한 signaling pathway 규명

### 2.1. Sample preparation for KGC-03-PS (KGC3P). Sample preparation for KGC-03-PS (KGC3P).

- Korean Red Ginseng extract powder은 한국 인삼 공사에서 조달되었습니다. 건재 *Salvia plebeia* R. Br. 동진농장 (전북 부안)에서 구입하여 30% 알코올/물 15 배량으로 2 시간에 걸쳐 80 °C에서 4 시간 추출 하였다. 추출액을 1  $\mu$ m 공경으로 여과 한 후 증발기로 농축하고 분무 건조하여 분말상으로 제조 하였다. KGC-03-PS (KGC3P)는 Korean Red Ginseng:*Salvia plebeia* R. Br., (1 : 3)의 혼합물로 제조 하였다. 그 후 고성능 액체 크로마토 그래피 (HPLC) 로 분석 한 결과, 진 세노 사이드 Rg1 ( $0.22 \pm 0.03$  mg/g), Rb1 ( $2.06 \pm 0.06$  mg/g), 20 (S)-Rg3 ( $0.51 \pm 0.05$  mg/ g), nepetin ( $5.42 \pm 0.39$  mg/g)이 함유 분석됨 (Fig.1A-D).

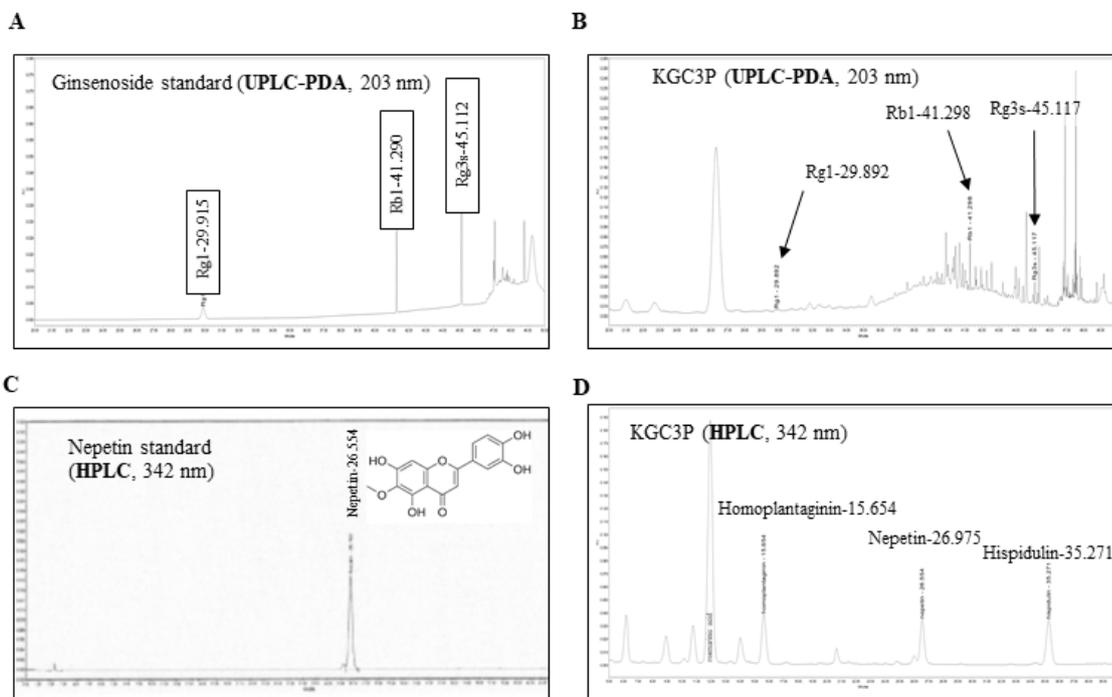


Fig.7. Chromatogram and structure of four compounds purified from the KGC-03-PS mixture (KGC3P).

Rg1, Rb1, Rg3s, and nepetin were identified as marker compounds of the Korean Red Ginseng and *Salvia plebeia* R. Br. mixture (KGC3P). (A) UPLC-PDA chromatograms of three standard ginsenoside mixtures at 203 nm. (B) UPLC-PDA chromatogram for KGC3P mixture at 203 nm. (C) HPLC chromatograms for standard nepetin at 342 nm and (D) HPLC chromatograms for KGC3P mixture at 342 nm. Rg1 ( $0.22$  mg/g  $\pm$   $0.03$ ), Rb1 ( $2.06$  mg/g  $\pm$   $0.06$ ), Rg3s ( $0.51$  mg/g  $\pm$   $0.05$ ), and nepetin ( $5.42$  mg/g  $\pm$   $0.39$ ) appeared at a retention time of approximately 29.8, 41.2, 45.1, and 26.9 min, respectively. UPLC-PDA, Ultra-performance liquid chromatography-photodiode array detector; HPLC, high-performance liquid chromatography.

## 2.2. Effects of KGC3P and nepetin *in vitro* on MH-S cells and signal transduction via the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways.

- 우리의 HPLC 결과를 바탕으로, KGC3P는 3 가지의 성분인 hispidulin, nepetin 및 rosmarin acid를 분석하였고, 따라서 우리는 추출물과 그 개별 성분이 CFA에 의해 자극된 alviolar MH-S 세포에서 효과적인지 검증하기위 한 *in vitro* 연구를 수행했다. Fig.2A-B에 나타낸 바와 같이, KGC3P는 NO 생산 및 염증 매개 물질 및 염증사이토킨의 발현을 용량 의존적으로 강력하게 억제 하였다. 개별 성분, 특히 네페틴 (nepetin)도이 강력한 억제를 나타냈다. 또한, KGC3P와 nepetin의 가장 많은 용량은 주로 MH-S 세포에서 NF- $\kappa$ B와 MAPK 경로의 모든 하류 요인의 인산화를 저해했다 (Fig.2C-D). Nepetin은 3 가지 개별 성분 중 가장 많이 포함하고 효과적인 것으로 입증되었으므로 nepetin과 KGC3P만을 사용하여 *in vivo* 연구를 수행했습니다.

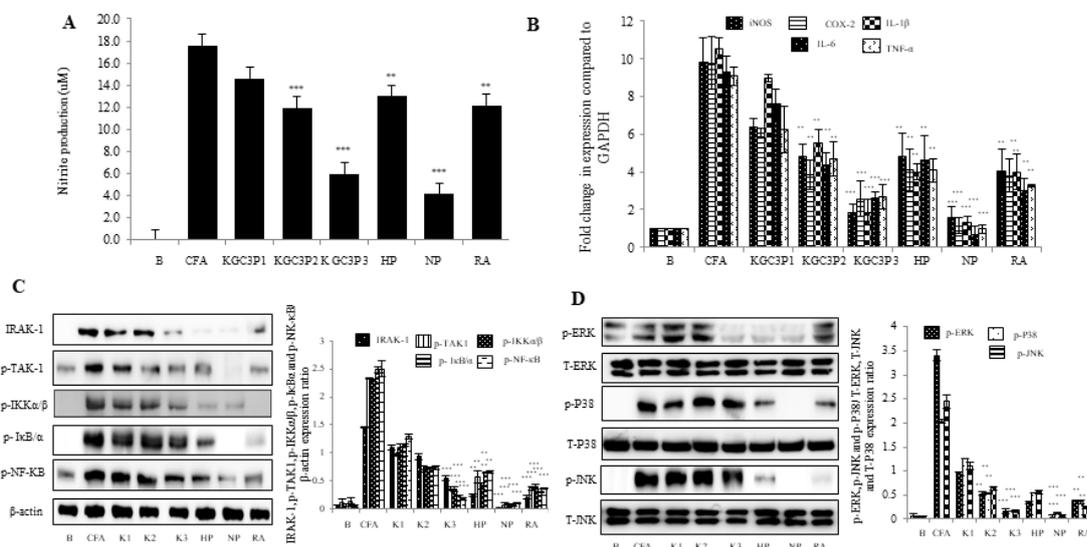


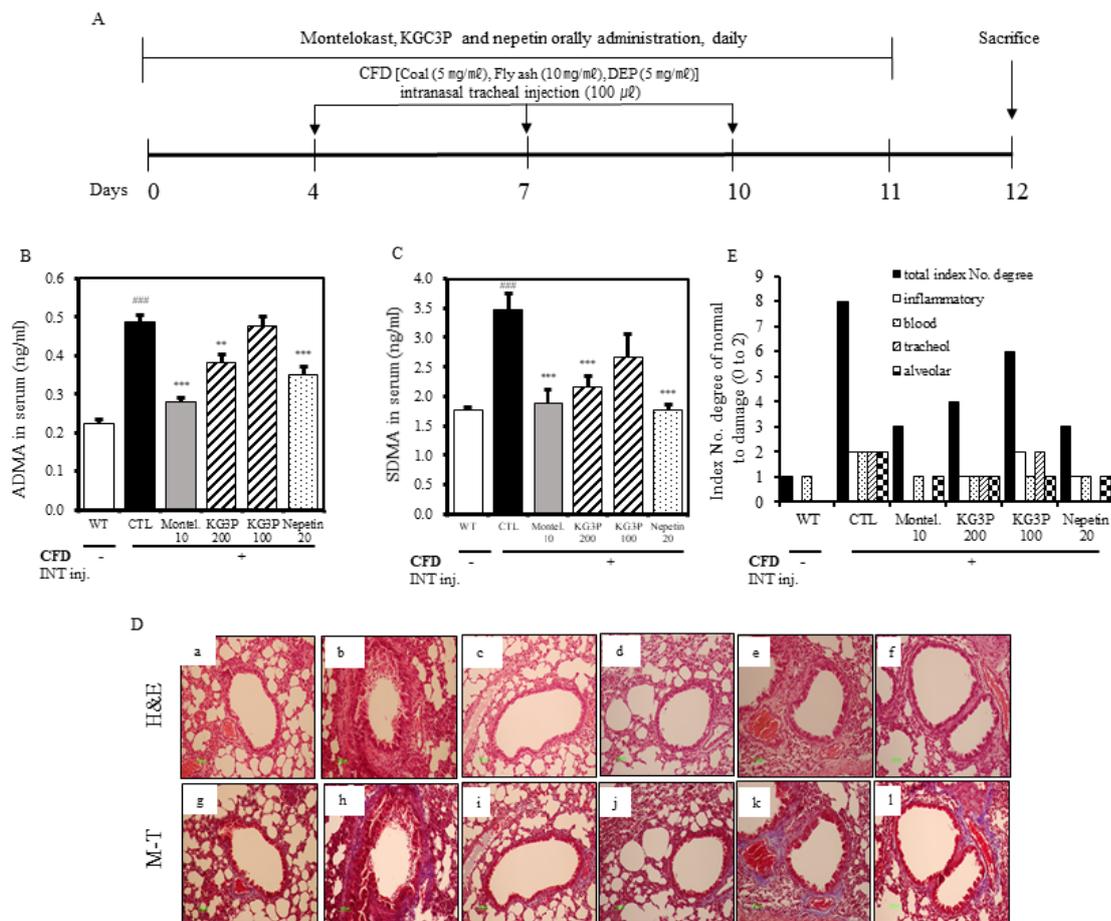
Fig. 7.

## Effects of KGC3P and nepetin *in vitro* on MH-S cells and 433 signal transduction via the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways.

(A) Nitrite production was inhibited by dose dependent concentrations of KGC3P (25, 50 and 100  $\mu$ g/mL) and hispidulin (HP; 20  $\mu$ M), nepetin (NP; 20  $\mu$ M) and rosmarinic acid (RA; 20  $\mu$ M). Values in the bar graphs represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*\* $p$  < 0.001 and \*\* $p$  < 0.05 are considered significant compared to the CFA-only group. (B) Real-Time PCR for KGC3P and single compounds. Values in the bar graphs represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*\* $p$  < 0.001 and \*\* $p$  < 0.05 are considered significant compared to the CFA-only group. (C-D) Signal transduction of KGC3P and single compounds through the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways in MH-S cells. Values in the bar graphs represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*\* $p$  < 0.001 and \*\* $p$  < 0.05 are considered significant compared to the CFA-only group. K1= KGC3P 25  $\mu$ g/mL, K2= KGC3P 50  $\mu$ g/mL, K3= KGC3P 100  $\mu$ g/mL. Full length blots are shown in Supplementary figure 2a-b.

### 2.3. Inhibitory effects of KGC3P and nepetin on serum ADMA and SDMA levels, and restoration of histopathological lesions.

- arginine의 구조상 유사체는 AD synthase를 경쟁적으로 회귀시키는 ADMA와 SDMA이며, 궁극적으로는 NO 생성을 감소시킨다. Fig.3B-C에서 보듯이 ADMA와 SDMA 모두 양성 대조군인 montelukast에 의해 강력하게 감소되었으며, KGC3P와 nepetin에 의해 투여에서도 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다. 그리고 Fig.3D-E에서 관찰된 바와 같이, KGC3P 및 nepetin의 투여량이 많을수록 폐 조직학이 정상으로 회복되고 조직병리학적 점수는 감소하였다.



**Fig.8. Inhibition of airway inflammation by the KGC3P and nepetin in a CFD-induced murine model of airway inflammation.**

(A) Scheme for the CFD sensitization and challenge protocol. Mice were exposed to 100  $\mu$ l of CFD [Coal (5 mg/mL), Fly ash (10 mg/mL), Diesel exhaust particles (DEP, 5 mg/mL)] mixed solution by intranasal tracheal injection thrice in 3 day intervals for 12 days. (B-C) KGC3P and nepetin inhibited asymmetric dimethyl-arginine (ADMA) and symmetric dimethyl-arginine (SDMA) production in serum obtained from CFD mice. (D) Effect of KGC3P and nepetin treatment on lung histopathology in CFD-CTL mice. Representative sections from each treatment group are shown. (a) BALB/c normal, (b)

CFD-sensitized control mice, (c) 10 mg/kg montelukast-treated CFD-sensitized mice, (d) 200 mg/kg KGC3P-treated CFD-sensitized mice, (e) 100 mg/kg KGC3P-treated CFD-sensitized mice, and (f) 20 mg/kg nepetin-treated CFD-sensitized mice. M-T staining pictures have the same order for groups in H&E staining (g-1). (E) Quantitative analyses of the degree of lung tissue damage in the sections. Data are from individual mice, with arithmetic mean points shown in histograms. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n = 8). #*p* <0.05, ##*p* <0.01, and ###*p* <0.001 (compared to WT), and \**p* <0.05, \*\**p* <0.01, and \*\*\**p* <0.001 (compared to CFD).

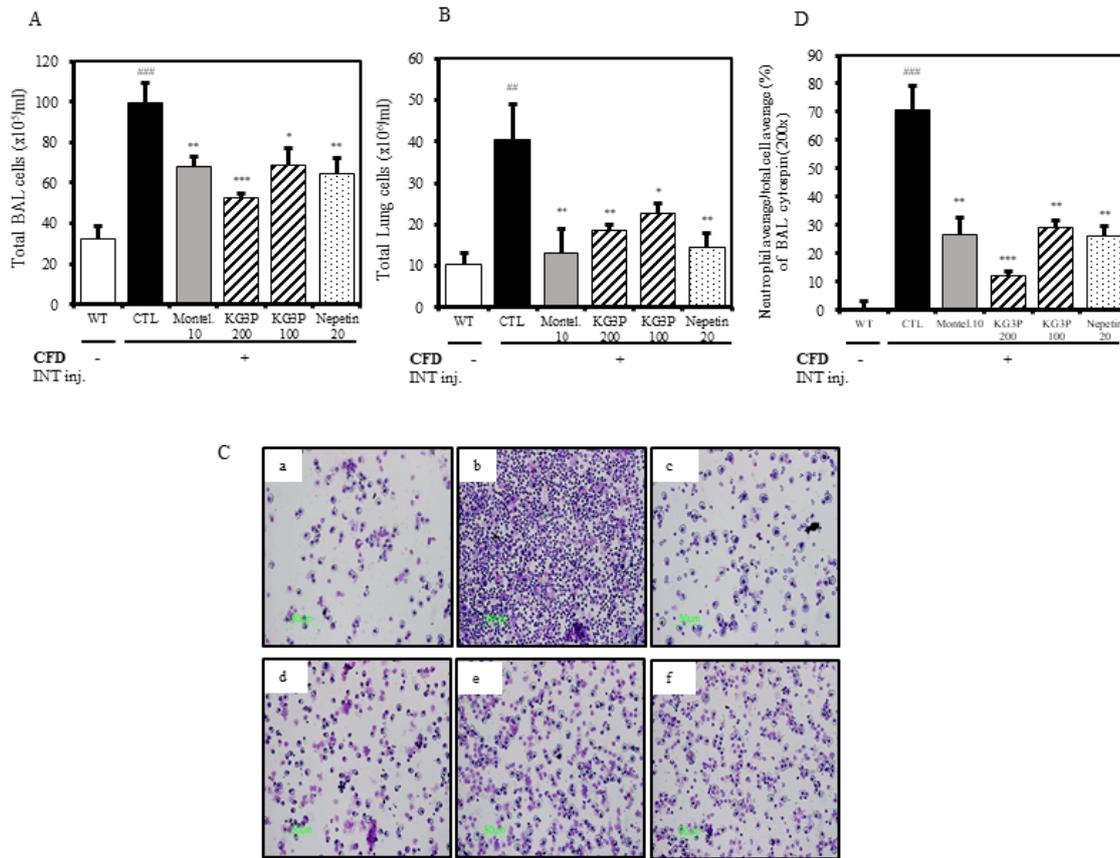
## 2.4. Decreased number of immune cells in BALF and lung tissue

- 일반적으로, 신체에서 이물질이 침입하는 동안 면역 세포가 증가한다. Fig.4A-D에 제시된 바와 같이, montelukast, KGC3P 및 nepetin 모두는 BALF와 폐에서 총 면역 세포수 및 호중구의 수를 강력하게 억제했다. 또한 FACS분석을 이용하여 BALF와 폐 세포에서 CD4+, CD8+, CD11b+ 세포가 현저하게 감소되어 높은 용량의 KGC3P와 nepetin에 의해 CFD에 의한 면역계의 과도한 활성화가 적극적으로 억제되었으며, 염증의 악화를 감소시킨다 (Table 2).

**Table 2. Fluorescence-activated cell sorting analysis (FACS) of immune cell subtypes in lung and BALF.**

Cell phenotypes in Lung, BALF	CFD-induced airway inflammation murine model (Absolute No.)					
	Normal BALB/c (WT)	CFD	Montel. (10 mg/kg)	KGC3P (200 mg/kg)	KGC3P (100 mg/kg)	Nepetin (20 mg/kg)
CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> ( $\times 10^6$ cells)	9.8 $\pm$ 4.73	79.1 $\pm$ 9.5###	27.6 $\pm$ 12.1**	29.4 $\pm$ 5.05***	37.1 $\pm$ 0.55***	25.0 $\pm$ 8.89***
CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> ( $\times 10^5$ cells)	12.5 $\pm$ 1.40	73.3 $\pm$ 4.16###	15.6 $\pm$ 0.82***	25.7 $\pm$ 6.13***	25.1 $\pm$ 1.66***	21.5 $\pm$ 0.97***
Lung						
CD4 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup> ( $\times 10^5$ cells)	0.4 $\pm$ 0.02	9.10 $\pm$ 2.65##	1.40 $\pm$ 0.37**	4.80 $\pm$ 2.21	2.70 $\pm$ 0.69*	5.40 $\pm$ 1.03
Gr-1 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup> ( $\times 10^5$ cells)	16.6 $\pm$ 3.1	78.2 $\pm$ 16.4##	23.5 $\pm$ 6.9**	32.6 $\pm$ 0.57**	36.3 $\pm$ 6.2*	33.7 $\pm$ 6.5**
CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ cells)	1.30 $\pm$ 0.22	9.0 $\pm$ 0.36###	3.4 $\pm$ 0.11***	3.5 $\pm$ 1.54***	2.4 $\pm$ 0.46***	2.8 $\pm$ 1.01***
CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ cells)	1.40 $\pm$ 0.17	6.7 $\pm$ 2.43#	2.8 $\pm$ 0.09	2.8 $\pm$ 1.40	2.5 $\pm$ 1.49	2.1 $\pm$ 1.30
BALF						
Gr-1 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ cells)	2.10 $\pm$ 0.25	53.6 $\pm$ 3.12###	22.5 $\pm$ 4.49***	21.5 $\pm$ 1.94***	20.9 $\pm$ 2.78***	26.4 $\pm$ 3.04***

Each point represents the mean  $\pm$  SEM values for 6 mice. #*p* <0.05, ##*p* <0.01, and ###*p* <0.001 (compared with WT), \**p* <0.05, \*\**p* <0.01, and \*\*\**p* <0.001 (compared with CFD)

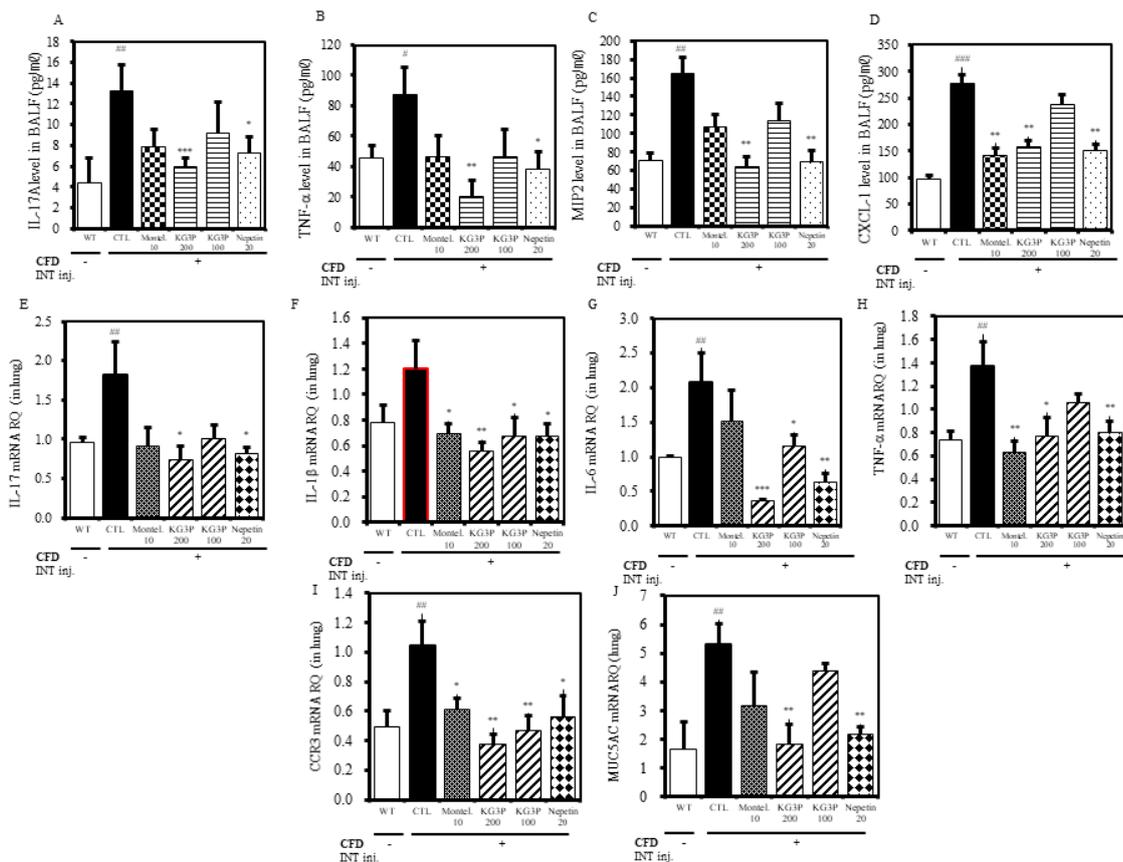


**Fig.9.** The effects of KGC3P and nepetin on airway immune cell number and neutrophilic airway inflammation in CFD-induced airway inflammation murine model.

(A) Total BALF cells from each treatment group. (B) Total lung cells from each treatment group. (C) Photomicrograph of BALF cytopsin from mice with CFD-induced airway inflammation (magnification, 200 $\times$ ), (a) BALB/c normal, (b) CFD-sensitized control mice, (c) 10 mg/kg montelukast-treated CFD-sensitized mice, (d) 200 mg/kg KGC3P-treated CFD-sensitized mice, (e) 100 mg/kg KGC3P-treated CFD-sensitized mice, and (f) 20 mg/kg nepetin-treated CFD-sensitized mice. (D) KGC3P and nepetin suppressed neutrophilia in BALF. Data are from individual mice, with arithmetic mean points shown in histograms. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n = 8). # $p$  <0.05, ## $p$  <0.01, and ### $p$  <0.001 (compared to WT), and \* $p$  <0.05, \*\* $p$  <0.01, and \*\*\* $p$  <0.001 (compared to CFD).

## 2.4. Suppression of pro-inflammatory cytokines expression in BALF and lung tissue.

- Pro-inflammatory cytokine은 염증 반응을 통하여 분비되고 조절이 필수적이다. 이러한 화학 물질들이 조절되지 않은 분비가 조직을 비가역적으로 손상시킬 수 있기 때문이다. Fig.5A-D로부터, KGC3P 및 nepetin의 다량 투여는 마우스로부터의 BALF 샘플에서 IL-17, TNF- $\alpha$ , MIP2 및 CXCL-1의 수준을 유의하게 억제하는 것으로 나타났다. 또한 montelukast는 KGC3P와 nepetin을 함께 투여 하였을 때 IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CCR3 및 MUC5AC의 발현을 유의하게 억제하여 추출물과 각 성분이 실제로 강력한 항염증성 작용을 하는것으로 생각된다 (Fig.5E-J).

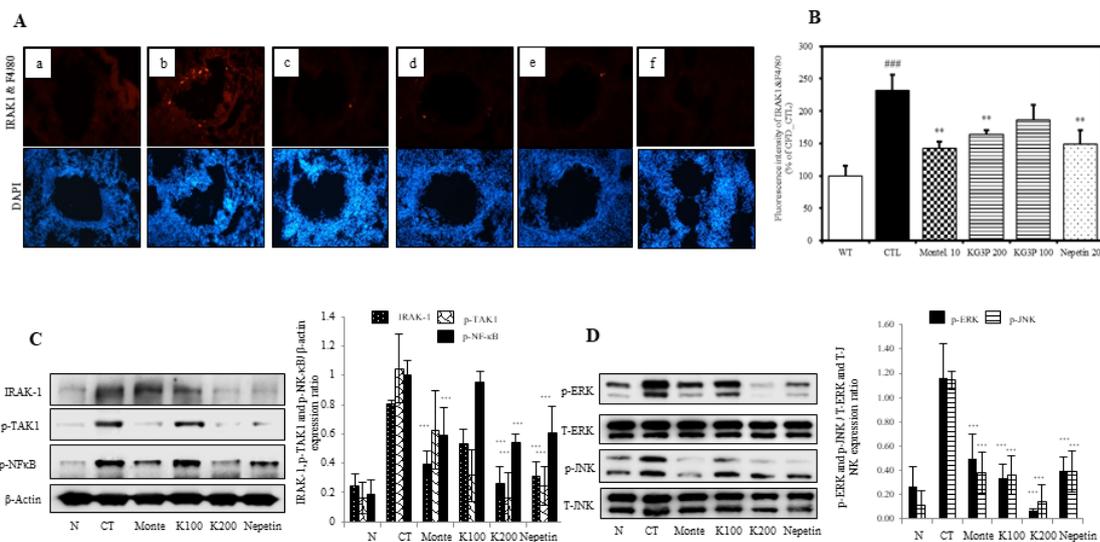


**Fig.10. The effects of KGC3P and nepetin on pro-inflammatory cytokines in BALF and lung.**

KGC3P and nepetin reduced (A) IL-17A, (B) TNF- $\alpha$ , (C) MIP2, (D) and CXCL1 levels in the BALF obtained from serum collected from WT-, CFD-, Montelukast- (10 mg/kg), KGC3P- (200 mg/kg, 100 mg/kg), and nepetin- (20 mg/kg) treated mice; these levels were measured using ELISA. (E) Effects of 469 KGC3P and nepetin on the expression of cytokine mRNA in lung tissues. IL-17, (F) IL-1 $\beta$ , (G) IL-6 (H) TNF- $\alpha$ , (I) CCR3, (J) and MUC5AC expression was determined by Real-Time PCR. Expression is presented as relative quantitation (RQ). Data are from individual mice, with arithmetic mean points shown in histograms. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n = 8). #*p* <0.05, ##*p* <0.01, and ###*p* <0.001 (compared to WT), and \**p* <0.05, \*\**p* <0.01, and \*\*\**p* <0.001 (compared to CFD).

## 2.5. Inhibition of fluorescence intensity of IRAK-1 and signal transduction of KGC3P and nepetin via the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways.

- 폐 조직을 IRAK-1 항체로 염색하여 KGC3P 및 nepetin에서 IRAK-1 활성세포의 존재를 관찰하였다. Fig.6A-B에 나타낸 바와 같이, IRAK-1 활성세포는 montelukast, KGC3P 및 nepetin 모두의 투여군의 폐 조직에서 강력하게 억제되었다. 이는 또한 KGC3P와 nepetin의 높은 용량이 IRAK-1, p-TAK1, p-NF- $\kappa$ B, p-ERK 및 p-JNK의 발현을 강력히 억제하는 것을 폐 조직 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인되었다 (Fig.6C-D). 이러한 결과는 KGC3P와 단일 화합물인 nepetin이 CFD에 의한 기도염증 과정에서 NF- $\kappa$ B와 MAPK 경로를 통해 항염증 효과를 나타냄을 강력하게 시사한다 (Fig.12).



**Fig.11. Immunohistofluorescence (IHF) staining of IRAK1 and signal transduction of KGC3P and nepetin via the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways in lung tissue.**

(A) IRAK1 (green), F4/80 (red) and DAPI (DNA) (grey) in lung tissue. (a) BALB/c normal, (b) CFD-sensitized control mice, (c) 10 mg/kg montelukast-treated CFD-sensitized mice, (d) 200 mg/kg KGC3P-treated CFD-sensitized mice, (e) 100 mg/kg KGC3P-treated CFD-sensitized mice, and (f) 20 mg/kg nepetin-treated CFD-sensitized mice. (B) Data are from individual mice, with arithmetic mean points shown in bar graphs. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n = 8). #*p* <0.05, ##*p* <0.01, and ###*p* <0.001 (compared to WT), and \**p* <0.05, \*\**p* <0.01, and \*\*\**p* <0.001 (compared to CFD). (C-D) Signal transduction of KGC3P and nepetin through the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways in lung tissue in the CFD mice airway inflammation model. Values in the bar graphs are presented as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*\**p* <0.001 and \*\**p* <0.05 are considered significant compared to the CFD group. K100 = KGC3P 100 mg/kg, K200 = KGC3P 200 mg/kg, Montelukast 10 mg/kg and nepetin 20 mg/kg. Full length blots are shown in Supplementary figure 2c-d.

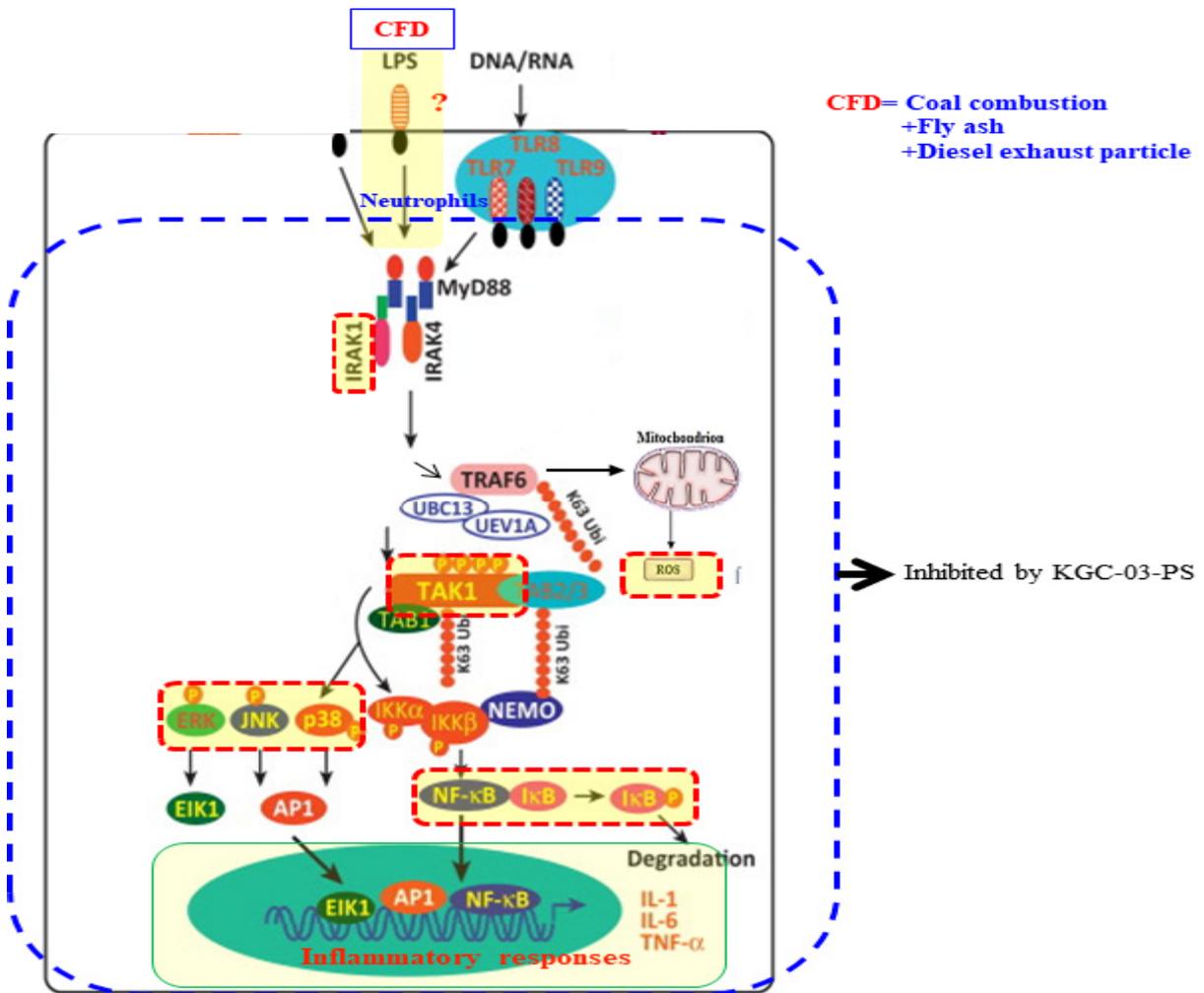


Fig.12. Protective mechanism of KGC3P and its components in Ambient Particulate Matter (Coal+FlyAsh)-induced airway inflammation.

### 3. 호흡기 개선/보호기능에 유효한 곰보배추/홍삼 복합물의 염증반응 억제 기전 규명

#### 3.1. KGC-03-PS (KGC3P)와 그 구성소재 및 그 성분들에 대한 NO 억제효과.

- Alveola MH-S 세포주에 미세먼지 (APM, CFD)로 산화적 자극을 주고 KGC3P와 그 구성소재 그리고 성분 (nepetin, hispidulin, rosmarinic acid)에 대한 NO 생산량을 다양한 농도로 측정 한 결과, 미세먼지 무처리군 (control)에 비하여 미세먼지 처리 대조군 (APM, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 현저한 NO증가를 나타냈고, 모든 실험군에서 농도의존적으로 NO생산량이 감소를 나타내었다 (Fig.13).

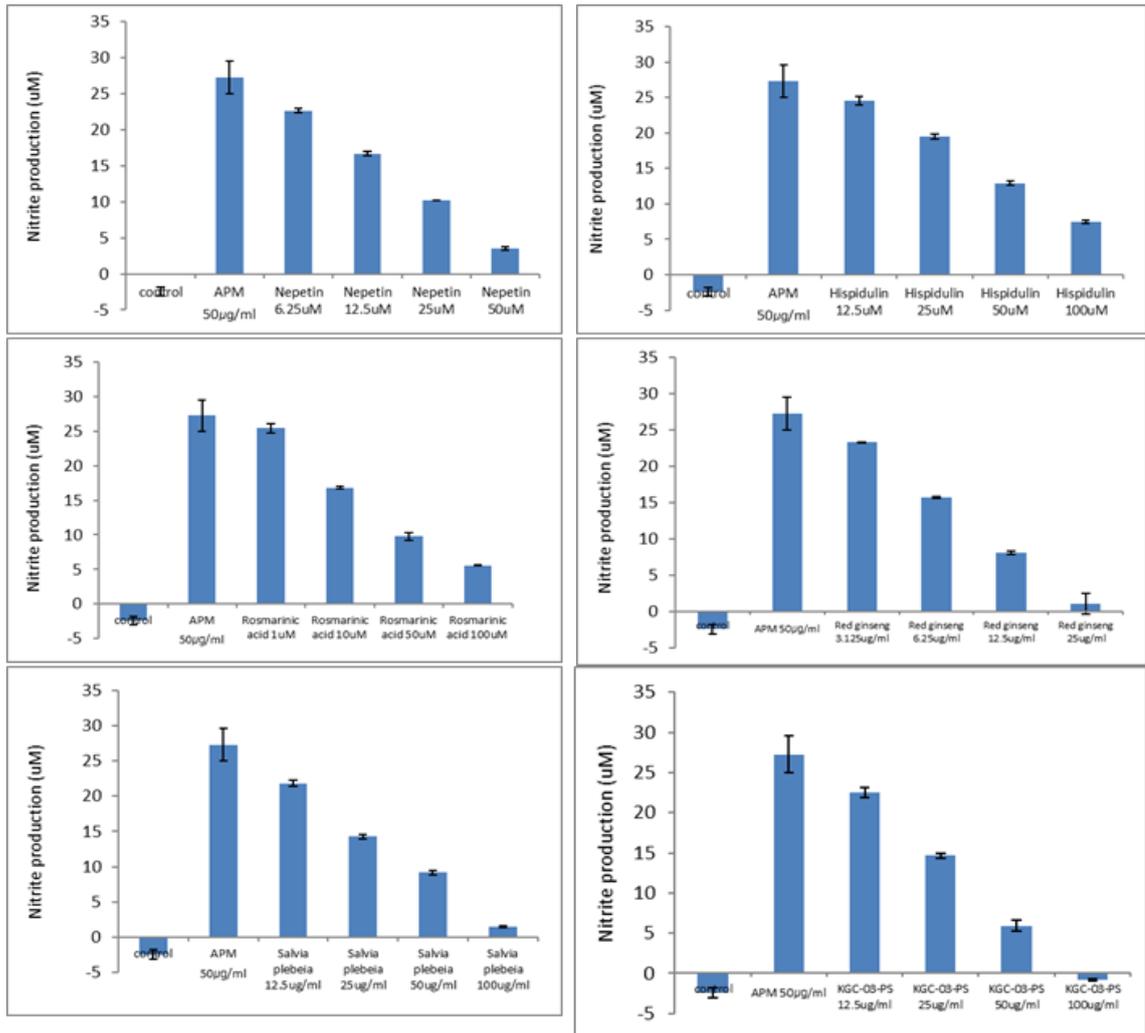


Fig.13. NO assay with single compounds and KGC-03-PS

#### 3.2. KGC-03-PS (KGC3P)와 그 구성소재 및 그 성분들에 대한 MTT 분석.

- Alveola MH-S 세포주에 미세먼지 (APM, CFD)로 산화적 자극을 주고 KGC3P와 그 구성소재 그리고 성분 (nepetin, hispidulin, rosmarinic acid)에 대한 MTT로 세포독성을 다양한 농도로 측정 한 결과, 미세먼지 무처리군 (control)에 비하여 미세먼지 처리 대조군 (APM, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )은 세포독성이 큰 차이가 없었고, 또한 모든 약물처리군에서 다양한 농도에 따른 세포생존율에서도 차이가 나타나지 않았다 (Fig.14).

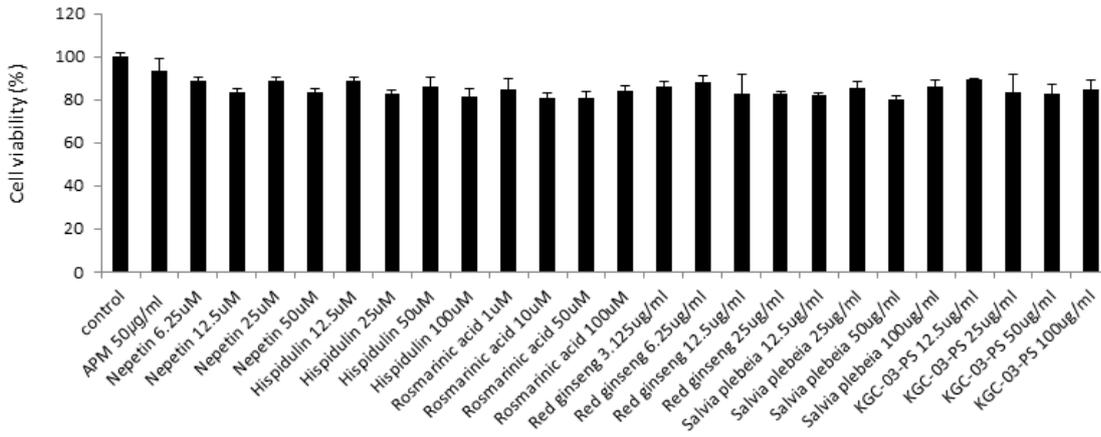


Fig.14. MTT assay with single compounds and KGC-03-PS

### 3.3. KGC-03-PS (KGC3P)와 그 성분의 NO와 MTT 분석.

- Alveola MH-S 세포주에 미세먼지 (APM, CFD)로 산화적 자극을 주고 KGC3P와 그 성분 (nepetin, hispidulin, rosmarinic acid)에 대한 NO 생산량과 MTT로 세포독성을 다양한 농도로 측정된 결과, 미세먼지 무처리군 (control)에 비하여 미세먼지 처리 대조군 (APM, 50 µg/ml)에 현저한 NO증가를 나타냈고, KGC3P 처리군은 농도의존적으로 NO생산량이 감소를 나타내었고, 그 성분중 NO생산량은 rosmarinic acid > nepetin > hispidulin 순으로 감소를 나타내었다. 또한 미세먼지 무처리군 (control)에 비하여 미세먼지 처리 대조군 (APM, 50 µg/ml)은 세포독성이 큰 차이가 없었고, 또한 모든 약물처리군에서 다양한 농도에 따른 세포생존율에서도 차이가 나타나지 않았다 (Fig.15).

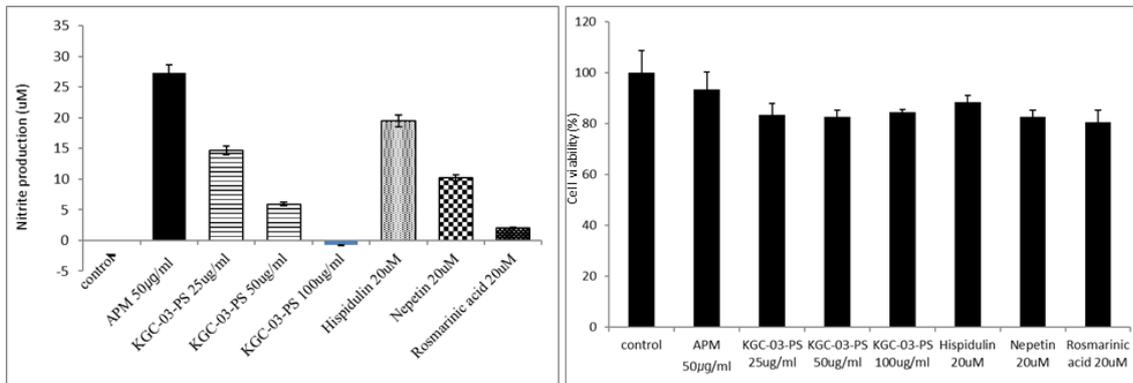


Fig.15. NO and MTT assay with single compounds and KGC-03-PS

### 3.4. KGC-03-PS (KGC3P)와 그 성분의 real-time PCR을 이용한 염증사이토카인 유전자 (iNOS, COX-2, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) 발현 분석.

- Alveola MH-S 세포주에 미세먼지 (APM, CFD)로 산화적 자극을 주고 KGC3P와 그 성분 (nepetin, hispidulin, rosmarinic acid)에 대한 염증사이토카인 유전자 (iNOS, COX-2, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) 발현을 분석한 결과, 미세먼지 무처리군 (control)에 처리 대조군 (APM, 50 µg/ml)에 현저한 염증사이토카인 유전자 (iNOS, COX-2, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) mRNA

유전자 발현이 증가를 나타냈고, KGC3P 처리군은 농도의존적으로 iNOS, COX-2, IL-6, TNF-alpha mRNA 유전자 발현이 감소를 나타내었고, 그 성분 중 iNOS, COX-2, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha mRNA 유전자 발현은 rosmarinic acid > nepetin순으로 감소를 나타내었고 hispidulin은 억제효과가 나타나지 않았다 (Fig.16).

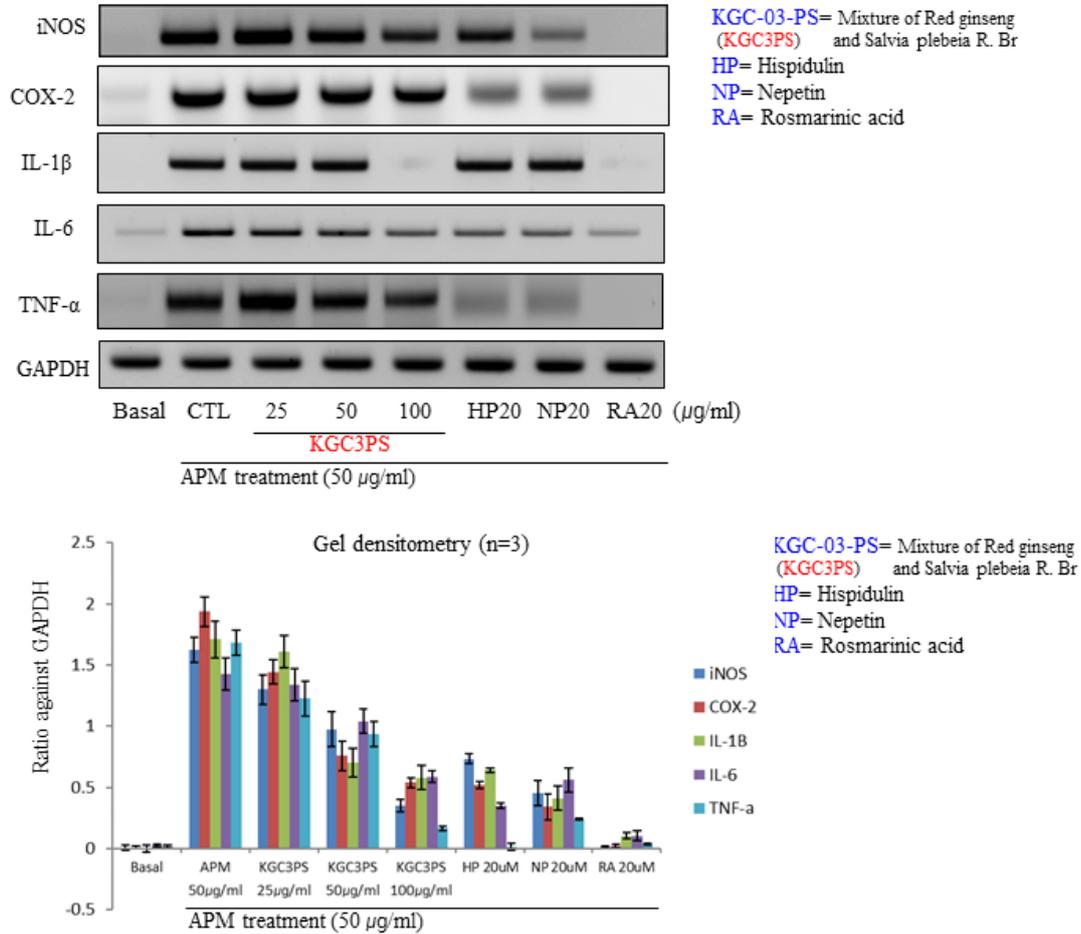


Fig.16. RT-PCR assay with single compounds and KGC-03-PS

### 3.5. KGC-03-PS (KGC3P)와 그 성분의 western blot을 이용한 염증사이토카인 유전자 (iNOS, COX-2) 발현 분석.

- Alveola MH-S 세포주에 미세먼지 (APM, CFD)로 산화적 자극을 주고 KGC3P와 그 성분 (nepetin, hispidulin, rosmarinic acid)에 대한 염증사이토카인 (iNOS, COX-2) 발현을 분석한 결과, 미세먼지 무처리군 (control)에 처리 대조군 (APM, 50 μg/ml)에 현저한 염증사이토카인 (iNOS, COX-2) 단백질 발현이 증가를 나타냈고, KGC3P 처리군은 농도 의존적으로 iNOS, COX-2 단백질 발현이 감소를 나타내었다. 그 성분 중 iNOS, COX-2 단백질 발현은 rosmarinic acid ≥ nepetin순으로 감소를 나타내었고 hispidulin은 억제효과가 나타나지 않았다 (Fig.17).

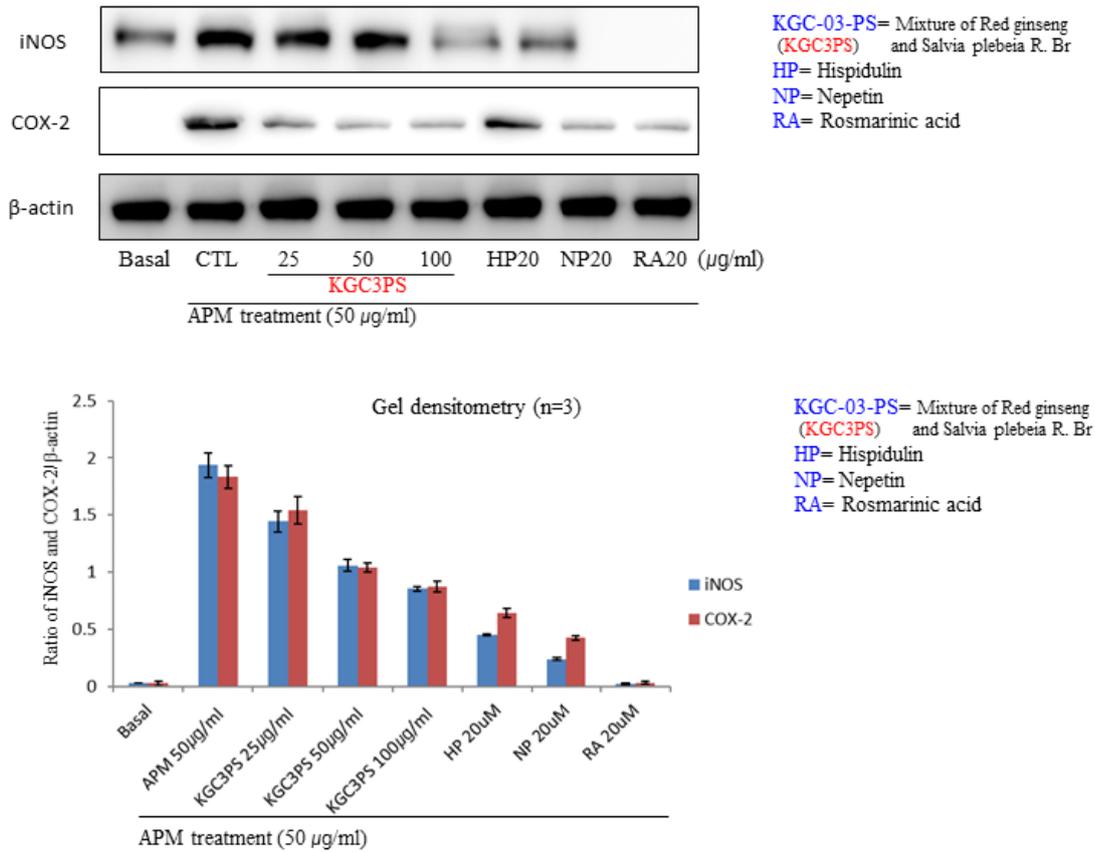


Fig.17. Protein extraction and western blot with single compounds and KGC-03-PS

### 3.6. KGC-03-PS (KGC3P)와 그 성분의 western blot을 이용한 IRAK1 발현, 그리고, signal transduction (p-TAK1, NF-κB 인산화) 발현 분석.

- Alveola MH-S 세포주에 미세먼지 (APM, CFD)로 산화적 자극을 주고 KGC3P와 그 성분 (nepetin, hispidulin, rosmarinic acid)에 대한 IRAK1 발현, 그리고, signal transduction (p-TAK1, p-IKKaB, p-NF-κB, p-IKB/a 인산화) 발현을 WB으로 분석한 결과, 미세먼지 무처리군 (CTL)에 처리 대조군 (APM, 50 μg/ml)에 IRAK1 발현, 그리고, signal transduction (p-TAK1, p-IKKaB, p-NF-κB, p-IKB/a 인산화) 발현이 증가를 나타냈고, KGC3P 처리군은 농도 의존적으로 iNOS, COX-2 단백질 발현이 감소를 나타내었다. 그 성분 중 IRAK1 발현, 그리고, signal transduction (p-TAK1, p-IKKaB, p-NF-κB, p-IKB/a 인산화) 발현 발현은 rosmarinic acid ≥ nepetin > hispidulin순으로 억제효과를 나타내었다 (Fig.18).

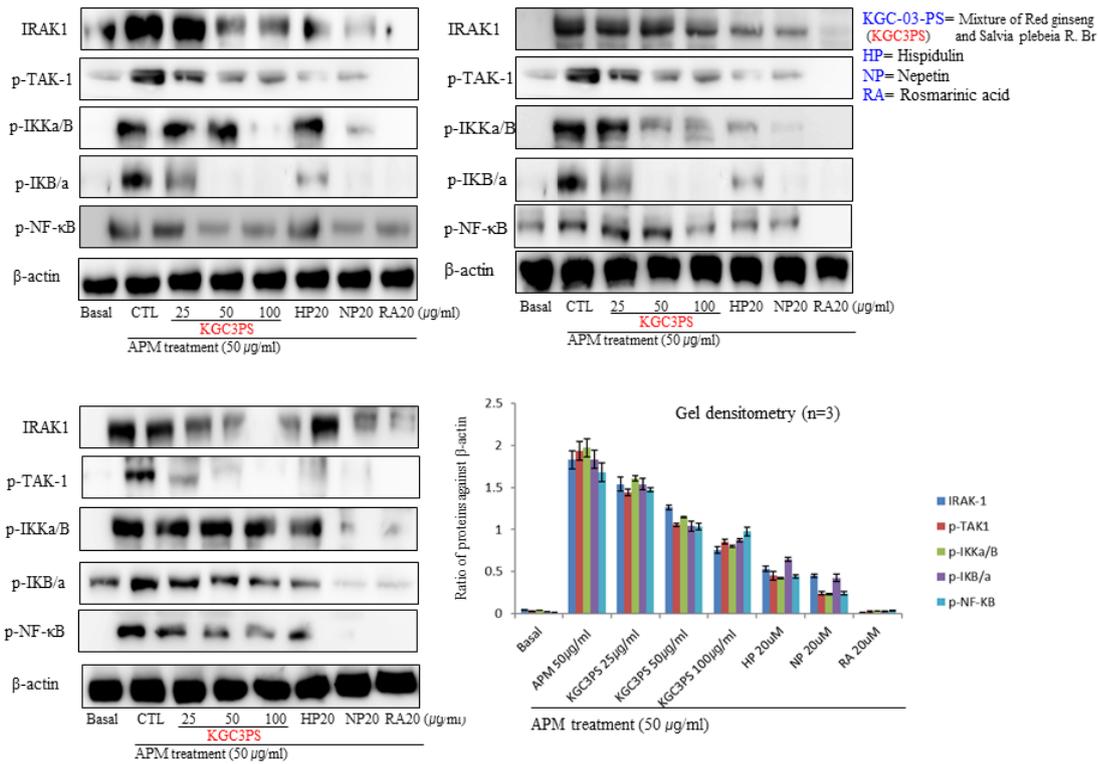


Fig.18. Protein extraction and western blot (IRAK-1 and signal transduction) with single compounds and KGC-03-PS

### 3.7. KGC-03-PS (KGC3P)와 그 성분의 western blot을 이용한 signal transduction (MAPK pathway (P-p38, P-JNK, P-ERK) 인산화 발현 분석.

- Alveola MH-S 세포주에 미세먼지 (APM, CFD)로 산화적 자극을 주고 KGC3P와 그 성분 (nepetin, hispidulin, rosmarinic acid)에 대한 signal transduction (MAPK pathway (P-p38, P-JNK, P-ERK) 인산화 발현을 WB으로 분석한 결과, 미세먼지 무처리군 (CTL)에 처리 대조군 (APM, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 비하여 signal transduction (MAPK pathway (P-p38, P-JNK, P-ERK) 인산화 발현이 증가를 나타냈고, KGC3P 처리군은 농도 의존적으로 signal transduction (MAPK pathway (P-p38, P-JNK, P-ERK) 인산화 발현이 감소를 나타내었다. 그 성분 중 IRAK1 발현, 그리고, signal transduction (p-TAK1, p-IKKaB, p-NF- $\kappa$ B, p-IKB/a 인산화) 발현 발현은 rosmarinic acid > nepetin  $\geq$  hispidulin순으로 억제효과를 나타내었다 (Fig.19). 이러한 결과는 KGC3P와 단일 화합물인 nepetin이 CFD에 의한 기도염증 과정에서 NF- $\kappa$ B와 MAPK 경로를 통해 항염증 효과를 나타냄을 강력하게 시사한다 (Fig.20).

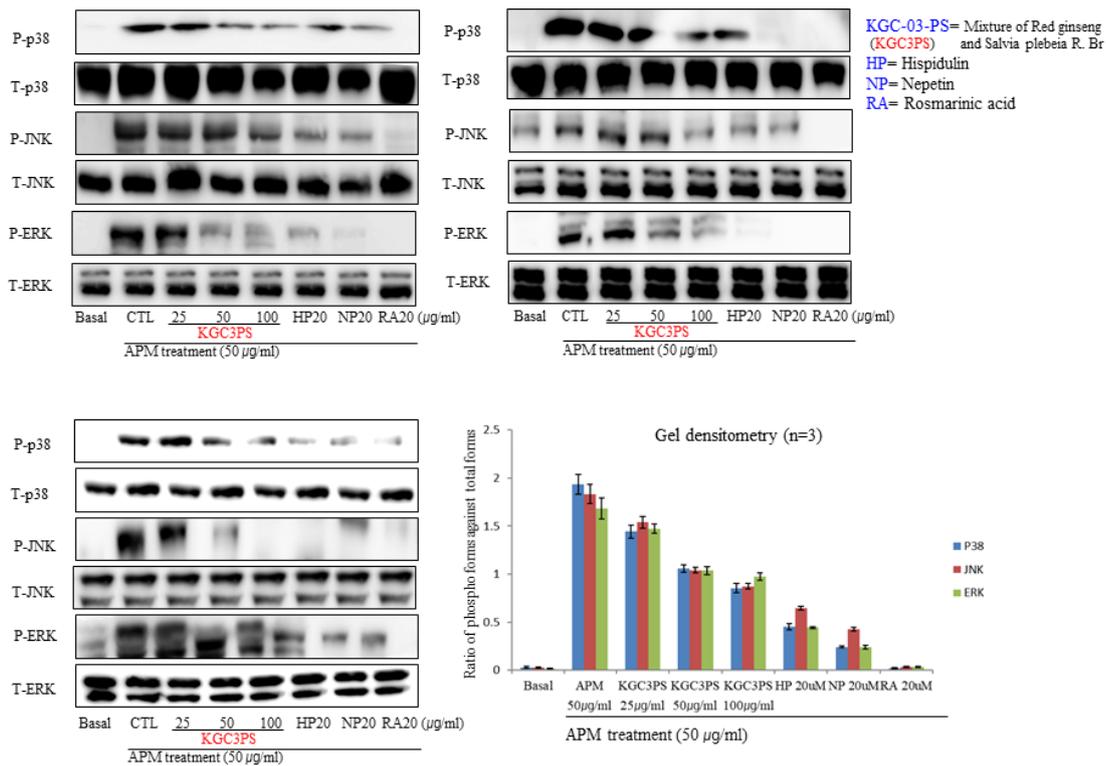


Fig.19. Protein extraction and western blot (MAPK signal transduction) with single compounds and KGC-03-PS (TAK1 Negatively Regulates NF- $\kappa$ B and p38 MAPKinase Activation in Gr-1+CD11b+ Neutrophils. *Immunity* 36, 43-54, January 27, 2012.)

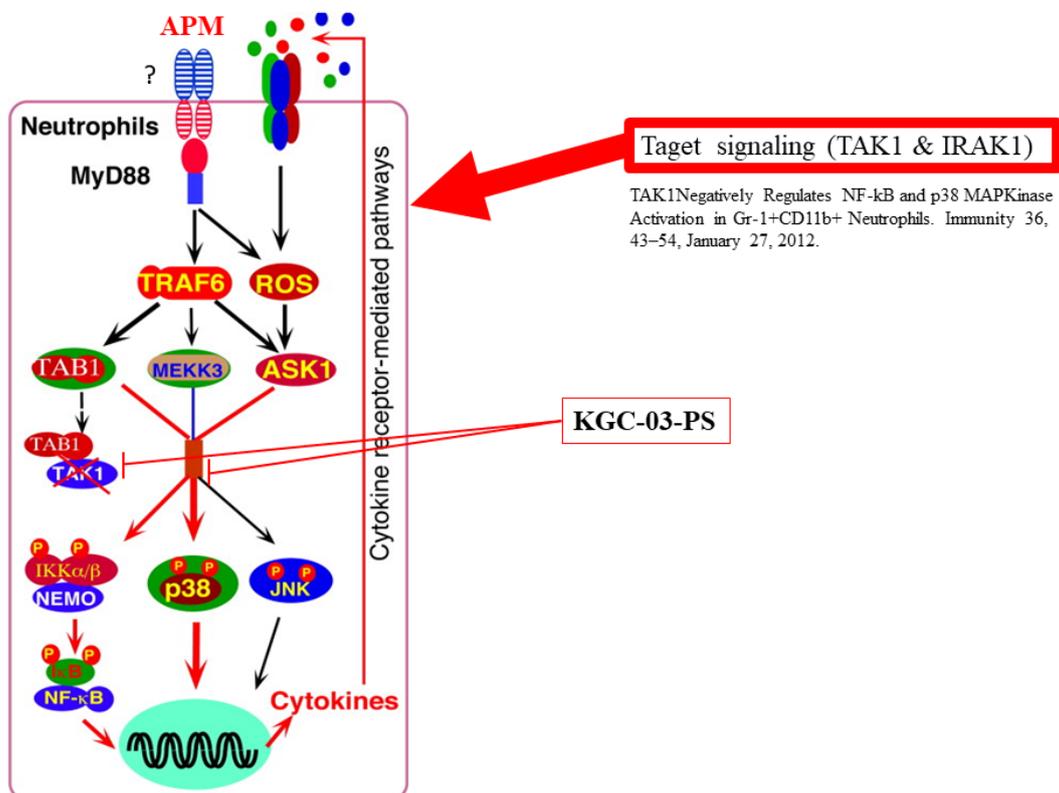


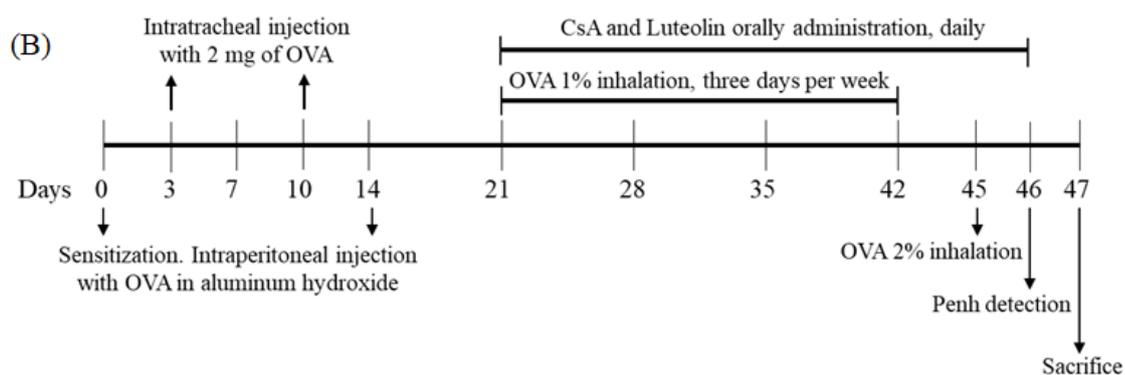
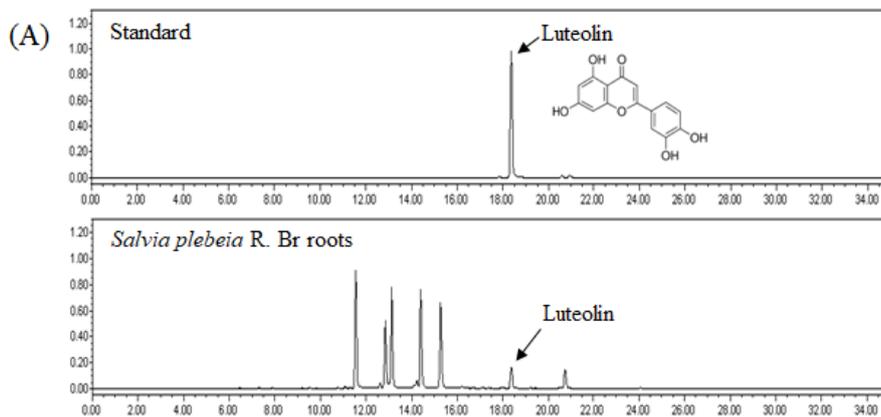
Fig.20. Target signaling (TAK1 & IRAK1)

#### 4. Luteolin (곰보배추의 유효성분)의 폐염증 억제 기전 연구

우리는 천연물 라이브러리 (PB4388.1, Korea Plant Extract Bank)를 스크리닝하여 *Salvia plebeia* R. Br.의 뿌리에서 화합물 luteolin을 분리했다. 강력한 면역 억제기능을 확인하기 위해서 만성 염증성 OVA-천식 질환 치료제로써 luteolin의 효능을 평가하기 위해서 OVA-유도 천식 마우스모델에 적용하여 예방적 또는 치료학적으로 luteolin의 항염증 기전 및 치료기전을 구명하였다. 우리의 결과는 luteolin이 OVA-민감성 마우스의 만성 AHR을 유의하게 억제 했으며, 이 작용은 생체내에서 CD4+CD25+ 조절 T 세포의 증가로 기전을 나타냄을 확인하였고, Luteolin을 처리한 동물의 폐조직에서 CD4+CD25+ 조절 T 세포 marker인 foxp3 생산 및 TGF- $\beta$  발현의 증가되는 것을 입증했다.

##### 4.1. Effects of luteolin on airway inflammation in OVA-sensitized mice

- OVA 천식 마우스 모델에서 luteolin이 항천식 및 항염 효과를 나타내었다 (Figure 1).



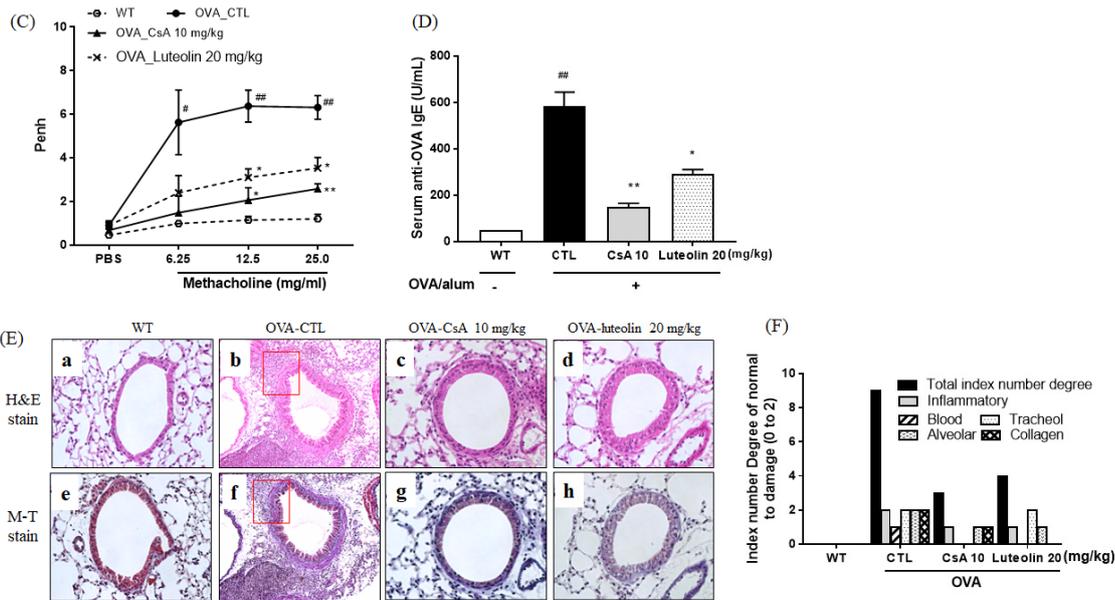


Figure 1. Inhibition of airway inflammation by luteolin in an OVA-induced mouse model of asthma.

#### 4.2. Decreased numbers of immune cells and eosinophilic airway inflammation in OVA plus luteolin-treated mice

- OVA 친식 마우스 모델에서 luteolin에 의하여 폐기도내 호산구와 염증면역세포 수를 감소시켰다 (Figure 2).

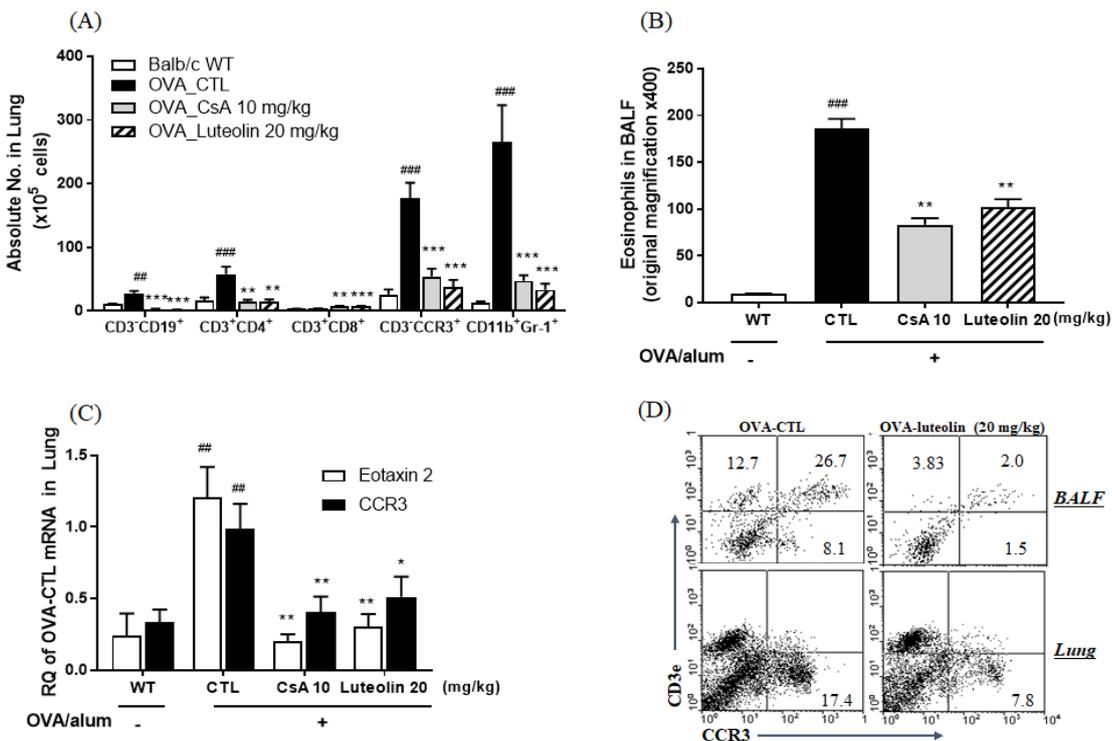


Figure 2. Protective effects of luteolin against lymphocyte infiltration into the lung during airway inflammation.

### 4.3. Cytokine expression in OVA plus luteolin-treated mice

- OVA 천식 마우스 모델에서 luteolin에 의하여 폐조직에서 Th2 cytokine 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군 (OVA\_CTL)에 비하여 Th2 싸이토카인이 감소를 나타내었고, 또한 Treg 세포관련 유전자인 IL-10, TGF- $\beta$ 1, 래테3 유전자 발현이 증가를 나타내었고, IFN- $\gamma$  도 증가하였다 (Figure 3).

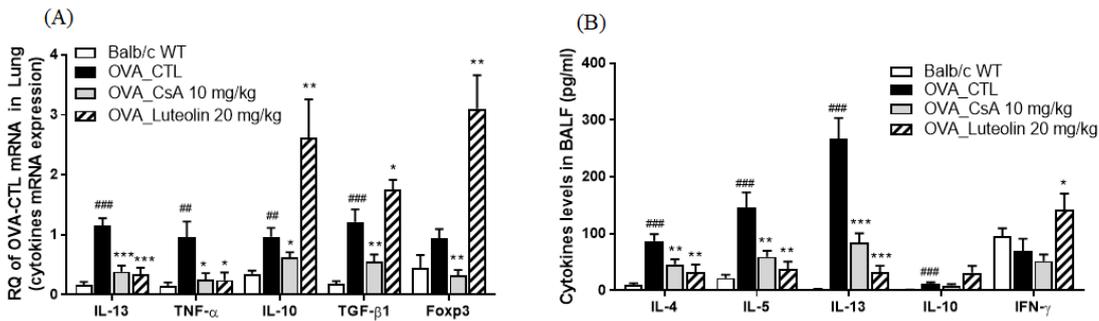


Figure 3. Changes in cytokine production in BALF from OVA-induced asthma model mice following luteolin treatment.

### 4.4. Effects of luteolin on regulatory T cells *in vitro*

- *in vitro*에서 luteolin에 의하여 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포의 증가를 확인하였다 (Figure 4).

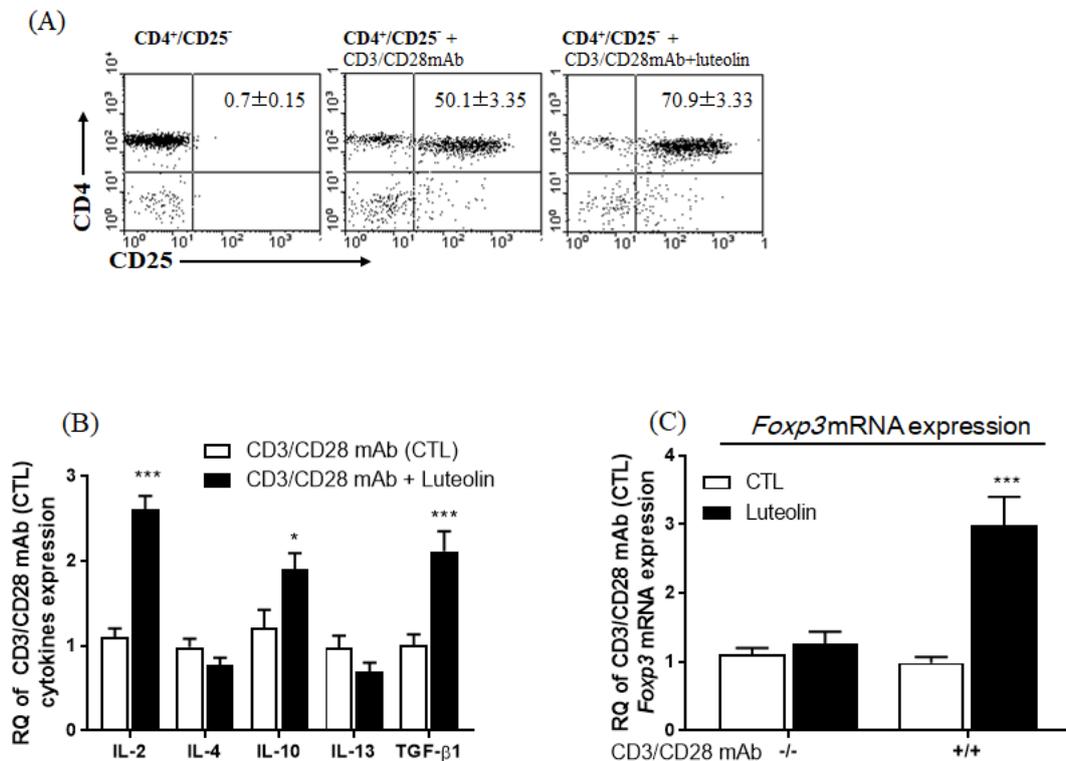


Figure 4. Luteolin induced phenotype switching of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells toward CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells *in vitro*.

## 5. Effect of luteolin in OVA-sensitized eosinophilia mice induced by CD25-depleted and Treg-adoptive transfer

- CD25 결핍 OVA 천식 생쥐모델에 iTreg (luteolin)을 이식하여 항천식 효과를 확인하였다. 즉, iTreg (luteolin)을 이식에 의하여 폐기도에서 염증면역세포, 호산구세포, 호중구세포 등이 대조군에 비하여 감소를 나타내음을 확인하였다 (Figure 6).

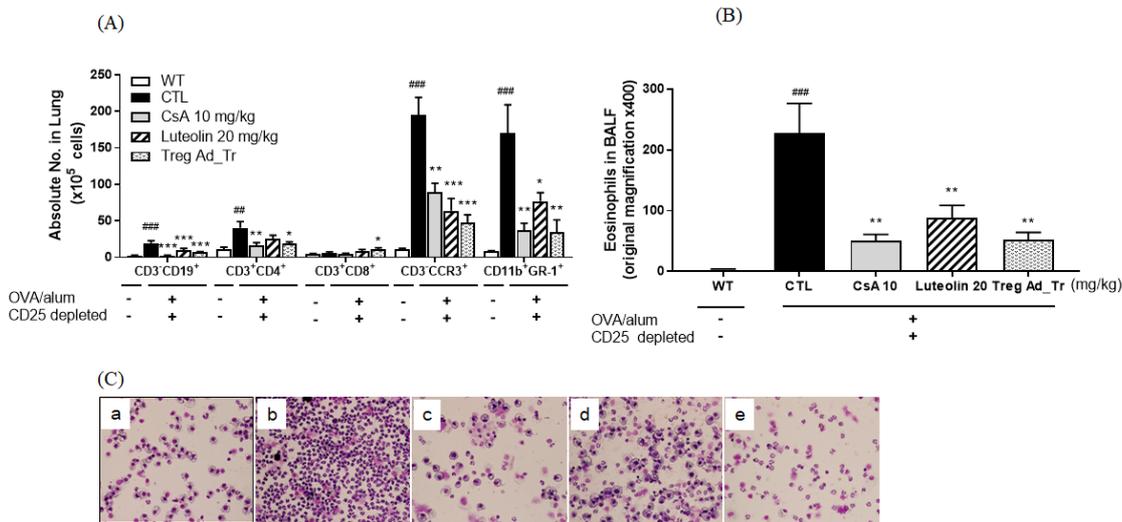


Figure 6. Adoptive transfer of luteolin-induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells (iTreg) in CD25-depleted OVA-mice.

## 4.6. Effect of luteolin in OVA-sensitized eosinophilia mice induced by CD25-depleted and Treg-adoptive transfer

- CD25 결핍 OVA 천식 생쥐모델에 iTreg (luteolin)을 이식하여 폐기도 조직에서 Foxp3와 TGF- $\beta$ 1 유전자 발현을 확인하였고, 폐세척액에서 Eotaxin, IgE, IL-5, IL-13 발현이 대조군에 비하여 억제되었고, IFN- $\gamma$ 는 증가를 나타내었다. 즉, iTreg (luteolin)을 이식에 의하여 폐기도에서 항천식 효과를 확인하였다 (Figure 7).

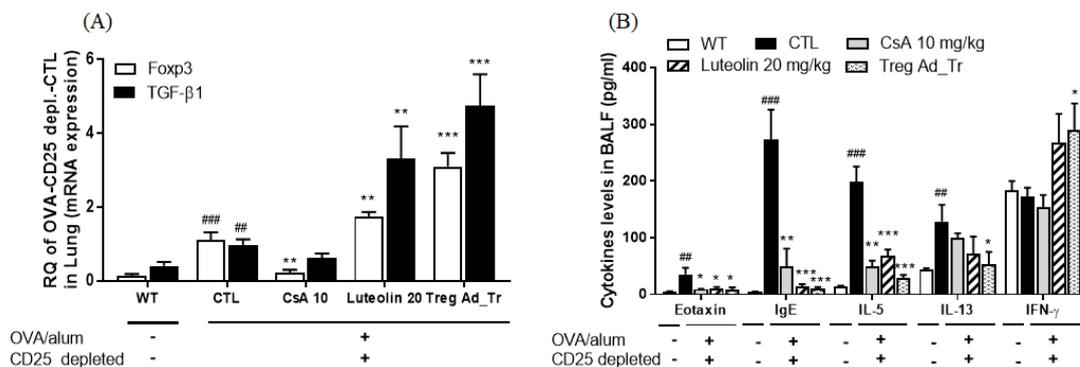


Figure 7. Induction of Tregs by Treg-adoptive transfer in OVA-treated mice.

#### 4.7. Suppression of airway inflammation by iTreg-adoptive transfer in OVA-sensitized mice

- CD25 결핍 OVA 천식 생쥐모델에 iTreg (luteolin)을 이식하여 폐기도 조직에서 염증이 억제되었고, 기도저항 수치도 감소를 하였다 (Figure 8).

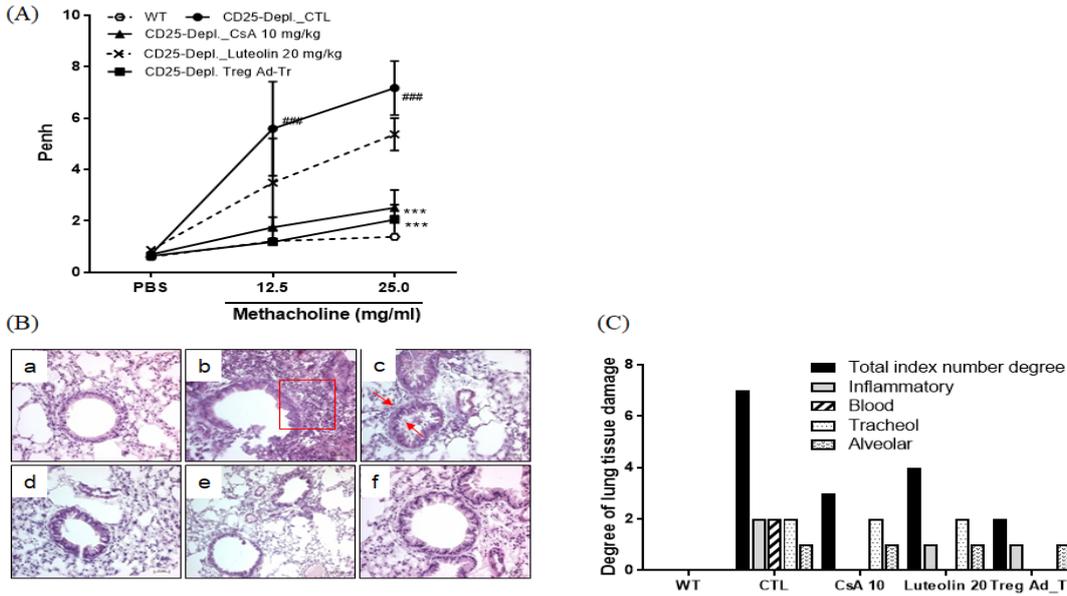


Figure 8. Suppression of airway inflammation by iTreg-adoptive transfer into OVA-treated mice.

결론적으로

Luteolin은 OVA-sensitized mice에서기도 염증의 억제와 조절 T 세포의 상향 조절에 효과가 있는 것으로 나타났다. Luteolin은 OVA - 천식 마우스의 폐에서 CD4+CD25+foxp3+ 조절 T 세포의 비율을 증가시키는 중요한 foxp3 및 TGF-β1 발현을 유도했다. 이러한 관찰은 iTreg 세포 활성을 조절하는 데 관여하는 분자가 천식에 대한 새로운 치료법의 개발을 위한 잠재적 기전이라고 제안한다. 여기서 우리는 처음으로 OVA-천식 마우스에서 iTreg 세포의 유도가 생체 내 알레르기기도 질환을 억제/완화한다는 직접적인 증거를 제시했다. 이러한 결과는 감소된 호산구와 Th2 세포수, AHR 및 Th2 사이토 카인 생산 억제등이 확인되었다. 또한 CD25 결핍 천식 마우스에 적용하여 luteolin유도 iTregs 이식 그룹에서 폐내 TGF-β와 foxp3 발현이 동시에 증가하면서 염증의 하향 조절되는 기전을 구명하였다. 따라서, 우리의 데이터는 luteolin에 의해 유도된 Tregs의 기능을 극대화하여 생체 내 전략이 알레르기성 천식 환자에게 도움이 될 수 있음을 시사한다.

# 아. 식약처 기능성 인정 신청

## 1. 홍삼곰보배추 복합물 원료의 기능성 인정 신청서 작성 및 신청 완료 (2019. 06. 07)

건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서		처리기간	
		120일	60일
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
대표자	김재수		
업체명(기관명)	(주)한국인삼공사	영업외 종류	건강기능식품원료제조업
소재지	(주소)대전광역시 대덕구 빛동길 71 (전화번호) 042-870-3192 (Fax) 042-870-3007	허가/신고/등록번호	제20040020013
수입건강 기능식품 제조회사	수위번호		
	수출국		
	소재지		
	소재지		
원료명	홍삼곰보배추복합물(KGC-03-PS)		
「건강기능식품 기능성 원료 및 기준-규격 인정에 관한 규정」 제5조에 따라 건강기능식품 기능성 원료 인정을 신청합니다.			
2019년 06월 4일 신청인 (주)한국인삼공사 (서명 또는 인)			
식품의약품안전처장 귀하			
※ 구비서류	수수료		
1. 제출자료 1부		신규	1,900,000원
2. 제출자료 수록 저장매체(CD 등) 1개		변경	800,000원
3. 원료, 제품 또는 시제품			
4. 기능성분(또는 지표성분) 표준품			
5. 국내·외 시험·검사기관이 발행한 시험성적서			
※ 제출자료 1. 제출자료 전체의 총괄 요약본 2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료 3. 제조방법에 관한 자료 4. 원료의 특성에 관한 자료 5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 6. 유효물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 7. 안전성에 관한 자료 8. 기능성 대우에 관한 자료 9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 원인에 관한 자료 10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료			

### 기능성원료 인정 신청을 위한 제출 자료

KGC인삼공사

### 1. 제출자료의 총괄 요약본

신청원료 개요 (※최초, □변경)

원 재 영(기관명)	한국인삼공사(주) (대표자 : 김재수)			
업체의 종류	건강기능식품원료제조업	허가/신고/등록번호	제20040020013	
주소 및 연락처	* 대전광역시 유성구 가람로 30 (팩스) 042-870-3007 * (연락처) 042-870-3192 (연락처) 010-9425-9796			
담당자	(이름) 정경화 (연락처) 010-9425-9796			
신청 품목명	홍삼곰보배추복합물(KGC-03-PS)			
심사 대상 분류	개발인정 원료	·새로운 원료	<input checked="" type="checkbox"/> 신형 기능성	호환이 가능한 도출물 을 수 있음
			<input type="checkbox"/> 신형 성취량	1 일
		·기능성 추가	<input type="checkbox"/> (변경 전)	
		·성취량 변경	<input type="checkbox"/> (변경 후)	
		·제조방법 변경	<input type="checkbox"/> (변경 후)	
	고시된 원료	·기준규격 변경	<input type="checkbox"/>	
		·시험방법 변경	<input type="checkbox"/>	
		·기타 변경	<input type="checkbox"/>	
		·기능성 추가	<input type="checkbox"/> (변경 전)	
		·성취량 변경	<input type="checkbox"/> (변경 후)	
·제조방법 변경	<input type="checkbox"/>			
·기준규격 변경	<input type="checkbox"/>			
·시험방법 변경	<input type="checkbox"/>			
·기타 변경	<input type="checkbox"/>			
국내 제조 수입	<input checked="" type="checkbox"/> 수입인 경우	수위번호	수출국	
제조회사	소재지			
모동동의	발시 날짜 : 2017.01.12			

\* (최초) 고시되지 않고 새롭게 개발인정 신청하는 원료  
(변경) 고시된 원료 또는 개발인정원료의 기능성 추가 또는 변경(성취량, 제조기준, 기준규격, 제조방법 또는 시험방법)

### □ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부분종	비고
<b>1. 제출자료 전체의 총괄 요약본</b>				
		<input checked="" type="checkbox"/> 예	○ 아니요	
<b>2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료</b>				
2.1	기원	<input checked="" type="checkbox"/> 국내	<input checked="" type="checkbox"/> 해외	-
2.2	개발경위	<input checked="" type="checkbox"/> 국내	<input type="checkbox"/> 해외	
2.3	국내·외 인정·허가 현황	<input checked="" type="checkbox"/> 국내	<input checked="" type="checkbox"/> 해외	2-1 -2-9
2.4	국내·외 사용 현황	<input checked="" type="checkbox"/> 국내	<input checked="" type="checkbox"/> 해외	2-10 ~2-23
<b>3. 제조방법 및 그에 관한 자료</b>				
3.1	제조과정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조조성기 발행한 자료	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	3-1 ~3-15
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	
3.3	사료용 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부 (양쪽)	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	
3.5	주요공정별 수율 변화	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	
<b>4. 원료의 특성에 관한 자료</b>				
4.1	원료를 획득·제조할 수 있는 성상, 풍상 등	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	8-1
4.3	양양성분정보자료	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	5-1
<b>5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료</b>				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	5-1
5.2	표준품 정보 (지시표준품의 경우 온도, 구조, 용량, 유효기간 등 정보 추가)	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	5-2 ~5-16
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	5-7
	지시방법의 경우 발리데이션 자료 추가	<input checked="" type="checkbox"/> 예	<input type="checkbox"/> 아니요	5-8 ~5-9



	<p><b>관련 세포수 유의적 감소를 통한 효능을 확인 함.</b></p> <p>○ CFD 이용한 호흡기손상 마우스 모델에서 호흡 기관 연구 을 통한 결과</p> <p>BALF 내 염증관련 인자(IL-17, IL-18, IL-6, MIP2, CXCL-1) 발현 유의적 감소(대조군 대비 p&lt;0.001) 에 조직 용해 효과 호흡기손상 대조군에 비해 체세포 핵이 많아지고 교질생성기 감소 확인 에 조직의 HAVC 면역세포 결과 positive control 수준 억제 확인(대조군 대비 p&lt;0.01)</p> <p>공생체의 변형관련 인자(PP4K-1, p-TAK1, p-NF-κB, p-ERK, p-JNK) 발현 유의적 감소(대조군 대비 p&lt;0.001) 상 기전적 수축이완 관련 : BALF 내 수축이완 조절 인자(QCMA, QMA) 유의적 감소(대조군 대비 p&lt;0.01) 상 기전적 생리 관련 : BALF 내의 가역성 호흡 인자(MUC5AC, TNF-α) 발현 유의적 감소(대조군 대비 p&lt;0.01) 을 통한 결과</p> <p>BALF 내의 면역세포 조절 인자(CD4+, CD8+, CD11b+) 발현 유의적 감소(대조군 대비, p&lt;0.001) 체조직의 FACS 분석 결과 (total 수, 폐세포수, neutrophil 수) 유의적 감소(대조군 대비, p&lt;0.01)</p> <p>→ <b>CFD활용 호흡기 손상 모델에서 염증관련인자 유의적 감소, 기관지 수축이완 조절 인자의 유 의적 감소, 기전 생리 관련 인자의 유의적 감소, 면역세포 및 면역세포 조절인자의 유의적 감소 를 통한 효능을 확인 함.</b></p> <p>[신뢰성도]</p> <p>KCQ-Q3-P3의 호흡기 보호 및 증상 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험</p> <p>- 1개월 이상 지속적인 호흡기 불편증상이 있는 70세 이하 성인 100명</p> <p>- 통상코브비추적값 1g/일, 12주(FCT, DB, Parallel)</p> <p>- 결론</p> <p>1. 상기도 감염 증상의 유의적 개선 효과 확인(대조군 대비, p=0.0321)</p> <p>2. 호흡기 불편 증상의 객관적으로 판단 기준 CAT점수 7점으로 유효성에 대 한 통계분석을 시행한 결과 <b>SGRQ(COPD)기 이상증상에 대한 세인트조지 호흡기 제품)에서 유의적 개선률 확인(대조군 대비, p=0.0371)</b> 하며 호흡기 증상으로 인한 부담이 상대적으로 높은 대상자에서 호흡기 불편 증상 개선 효과가 더 우렷함</p> <p>○ 본 기능성식품 임상연구에 참여한 연구대상자의 선정기준이 기침, 가래, 호 흡관련 등의 호흡기 불편증상을 지속적으로 호소하지만 임상적으로 유의한 호 흡기 불편이 없으면서 폐기능검사 또한 정상소견인 건강인이며 따라 연구대상 자가 호소하는 증상이 주관적인 성격이라는 점이 본 임상연구가 가지는 제한점 이다. 실제로 연구대상자군에 CAT 점수 0점인 연구대상자도 5명 포함되었다. 이에 따라 본 연구자본은 연구대상자가 가지는 본질적 특성에 따른 한계를 크 게하기 위해서 연구대상자가 호소하는 호흡기 불편 증상을 객관적으로 증명할 증거 연구결과를 분석할 필요성이 있다고 판단하였다. 이를 위해 연구대상자의 CAT 기저치를 근거로 기저치 CAT 점수가 7점 이상인 경우 그 그룹과 7점 미만의 행위 그룹으로 나누어 추가 분석을 시행하였으며, 그 결과로 호흡기 증상 경중 에 따른 인체적용시험결과들의 효과성을 평가 할 수 있었다.</p> <p>○ 인체적용시험기관 : 경북대학교 기능성식품 임상시험지원센터 (연구책임자 :김성중 교수)</p>
인체적용시험	
기타 사항	-

## 2. 식약처 기능성 인정 신청서 접수

- 접수번호 : 식약처로부터 추후 통보 예정
- 기능성 : 호흡기 건강에 도움을 줄 수 있음
- 접수증 : 식약처로부터 추후 송부 예정

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

- 호흡기 보호 및 개선용 신규 기능성 식품 개발
- 대기오염에 의한 호흡기 염증/가래발생 억제 및 면역 활성을 위한 천연물 신소재 발굴
- 고부가가치의 단일 또는 복합 기능성 천연물 소재 개발
- 식약처 호흡기 개선 기능성 원료 개별 인증 신청

#### 3-2. 목표 달성여부 : 연구 목표 달성 하였음

#### [정량적 목표 달성]

성과목표	사업화 지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성			교육지도	인력양성	정책홍보		기타 (타연구용)
	특허출원	특허등록	품질인증	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	2	2		1		1	330억					4	4	5			1	1	
1차년도	목표												1	1					
	실적	1											1	1					
2차년도	목표	1	1									1	1	2					
	실적	2	2									1	1	2					
3차년도	목표	1			0							1	2	2				1	
	실적	1	1									2	2	2				1	
소계	목표	2	1		1							2	4	5				1	
	실적	4	2		0							3	4	5				1	
종료 1차년도		1				1						1					1		
종료 2차년도							30억					1							
종료 3차년도							50억												
종료 4차년도							100억												
종료 5차년도							100억												
소계		1				1	330					2					1		
합계		2	2		1	1	330					4	4	5			1	1	

[정성적 목표 달성]

세부 과제명	연구 결과
대기오염물질에 의한 호흡기 손상 모델 정립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대기오염물질 흡입 노출에 의한 호흡기 손상모델 확립</li> <li>- 대기오염물질을 이용한 급성 호흡기 손상 모델 정립</li> </ul>
호흡기 유용 천연물 소재의 효능평가 및 최적 시너지 활성의 복합제 선정	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연물 후보 소재의 거담/부종 및 산화적 손상억제 평가</li> <li>- 급성 호흡기 손상 모델에서 천연물 소재의 효능 평가</li> <li>- 선정된 천연물소재(곰보배추/홍삼) 시너지활성 비율설정</li> <li>- 곰보배추/홍삼 복합물의 호흡기 관련 효능 검증 (거담, 기관지수축, 기관지 염증 억제 등)</li> </ul>
원재료 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 곰보배추 추출물로부터 활성성분(6종) 구명</li> <li>- 곰보배추 추출물의 표준 HPLC chromatogram 확립</li> <li>- 지역별, 산지별, 시기별 곰보배추의 주요성분 함량 분석</li> <li>- 홍삼의 지표성분 및 위해물질 규격 설정</li> <li>- 곰보배추 및 홍삼의 지표성분 분석법 확립</li> </ul>
제조 공정 최적화 연구 및 제형 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 곰보배추 추출분말 및 홍삼농축액분말 제조공정 확립</li> <li>- 곰보배추/홍삼 복합물의 제조공정 확립</li> <li>- 원료 및 제품의 품질 규격 완성</li> <li>- 인체적용 시험용 제품의 clinical formulae 확립 및 생산</li> </ul>
안정성 시험 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료 및 제형의 안정성 실험</li> <li>- 원료 및 임상시험 제품의 영양성분/위해성분 함량 분석</li> <li>- 원료 및 제품의 안정성 시험(가속 6개월, 실온 2년) 완료</li> </ul>
인체적용 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 탐색적 인체적용시험(30명)을 통한 복용량 및 유효성 평가 지표 선정</li> <li>- 확증적 인체적용시험(100명) 수행</li> <li>- <b>상기도 감염 증상의 유의적 개선 효과</b> 확인(<math>p=0.0321</math>)</li> </ul>
곰보배추/홍삼 복합물(KGC-03-PS)의 호흡기 개선 및 보호 효과기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 곰보배추/홍삼 복합물 유전자마커 및 조절 유전자 규명</li> <li>- KGC-03-PS의 호흡기 염증억제 신호전달 pathway 규명</li> <li>- 조절 T세포 활성화에 의한 호흡기 염증억제 규명</li> </ul>
식약처 건강 기능성 개별 원료 인정 신청	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 홍삼/곰보배추 복합물의 기능성 원료 인정 신청서 작성</li> <li>- (호흡기 건강) 기능성 원료 인정 신청완료</li> </ul>

#### 4. 연구결과의 활용 계획 등

##### □ 활용방안

1. 본 연구과제 수행의 궁극적인 목표는 사회적으로 문제가 되는 대기오염에 의한 호흡기 손상에 대한 보호/개선할 수 있는 신규 기능성 천연물 신소재를 개발함으로써 삶의 질을 향상시키고 고부가가치의 천연물을 발굴하는것임. 즉, 미세먼지 등의 흡입독성에 대한 천연물의 효능검증 및 소재 표준화와 비임상/인체적용시험 등을 통해서 천연소재의 안전성과 유효성을 검증하고, 객관적이고 과학적인 임상 Protocol 연구를 수행하여 식약처 건강 기능 원료 인증을 받고자 함.
2. 이러한 호흡기 보호/개선 유용 신소재 개발을 위한 후보 생약 선정 과정에서 전통의학을 응용한 천연물 data base 및 추출물 library가 일정 부분 구축되어져 있으므로 향후, 다른 영역의 천연물 신약 개발 또는 신소재 개발에 활용가치가 높을 것으로 사료되며, 이에 따른 활성물질 연구가 촉진되어 천연물 유래 유도체 합성연구에 의한 신물질신약 개발로의 적용 가능성도 크다고 할 수 있음.
3. 본 과제를 통하여 천연물 기능성 신소재의 제품화가 가능하게 되면 유사한 산업체 연구가 활성화되어 여타 천연물 소재 개발 및 제품화를 하고자 하는 사회적, 산업적 분위기가 고조 될 것이며, 이는 연관된 산업으로의 파급 효과가 매우 클 것으로 사료됨.

##### □ 기대성과

###### 1. 기술적 측면

- 본 과제의 궁극적인 목적인 천연물 기능성 소재를 개발함으로써 그 임상적 유효성과 안전성이 1차 검증된 동양의학과 민간요법 등에 사용되었던 많은 잠재성 우수소재생약 효능물질들의 과학적 발굴을 기대할 수 있고 나아가 전통의학의 과학화 및 관련 학문 분야의 연구 활성화를 이끌어 연구기술의 국가 경쟁력을 강화할 수 있을 것으로 사료됨.
- 본 과제에서는 세포주/동물실험, 천연물, 정량정성 분석, 독성평가, 임상연구 등을 망라하여 신소재 개발에 관한 연구가 집중적이고 체계적으로 진행되고 있으므로, 각 기술에 대한 객관적 평가가 가능하며, 각 기술에 표준화와 객관성을 부여할 수 있고, 따라서 산업체나 다른 연구기간에 본 개발기술을 신뢰하고 쉽게 도입할 수 있으므로 기술적 파급효과를 가져 올 수 있을 것으로 사료됨.

###### 2. 경제적 측면

- 현재 호흡기 보호 및 개선을 위한 건강기능 제품은 없는 실정인데, 본 과제 수행을 통해서 대기오염에 의한 호흡기 손상에 대한 보호 및 개선할 수 있는 신규 기능성 천연물 신소재를 개발함으로써 시장에서 월등한 경쟁력을 발휘하여 국내 호흡기질환 시장을 보호하고 수백억 원의 수입대체 효과와 기술 및 상품 수출을 통한 외화 획득으로 국가 경제에 기여할 것으로 사료됨.
- 통계에 의하면 국내 호흡기질환은 삶의 질 저하 등 많은 사회, 경제적인 손실을 초래하는 질병 중의 하나로 판단되며 매년 증가추세에 있어 본 과제 개발로 경제적인 손실을 줄일 수 있을 것으로 판단됨.

#### 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.