

11-154300  
0-002881-  
01

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

고부가가치식품기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002881-01

# 천연물 유래 (시계꽃 열매, 잎) 수면 건강 증진 건강기능식품 소재 효능 평가 및 제품 개발

최종보고서

2019.07.25.

주관연구기관 / (주)네추럴에프앤피  
협동연구기관 / 순천향대학교 산학협력단

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

천연물 유래 수면 건강 증진 건강기능식품 소재 효능 평가 및 제품 개발

최종보고서

2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

## 2. 제출문

### 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “천연물유래 (시계꽃 열매, 잎) 수면건강증진 건강기능식품 소재 효능평가 및 제품개발”(개발기간 : 2015. 12. 11. ~ 2019. 06. 10.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 07. 25.

주관연구기관명 : (주)네추럴에프앤피

(대표자) 이현직



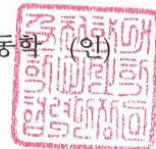
제1협동연구기관명 : 순천향대학교 산학협력단

(대표자) 김동학



제2협동연구기관명 : 순천향대학교 산학협력단

(대표자) 김동학



주관연구책임자 : 김미연

제1협동연구책임자 : 이순신

제2협동연구책임자 : 김신경

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	115044-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.12.11. ~ 2019.06.10	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	천연물 유래 (시계꽃 열매, 잎) 수면건강증진 건강기능식품 소재 효능평가 및 제품개발			
	세부 과제명	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주관연구기관 : 천연유래 (시계꽃 열매, 잎) 소재를 이용한 수면 건강 증진에 도움을 주는 표준화된 원료 개발 및 기능성 원료 개별인정 획득을 통한 건강기능식품 제품개발</li> <li>- 제1협동연구기관 : 천연유래 (시계꽃 열매, 잎) 소재를 이용한 수면건강 증진 효능 확인 및 기전 연구</li> <li>- 제2협동연구기관 : 천연물 유래 (시계꽃 열매, 잎) 소재의 수면 건강 증진 효과 분석을 위한 임상시험</li> </ul>			
연구책임자	김미연	해당단계 참여연구원 수	총: 33 명 내부: 31 명 외부: 2 명	해당단계 연구개발비	정부: 290,000천원 민간: 96,700천원 계: 386,700천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 41 명 내부: 38 명 외부: 3 명	총 연구개발비	정부: 870,000천원 민간: 290,100천원 계: 1,160,100천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)네추럴에프앤피 중앙연구소 순천향대학교 의료과학대학 임상병리학과 순천향대학교 부천병원 정신건강의학과			참여기업명 (주)네추럴에프앤피	
국제공동연구	상대국명:없음			상대국 연구기관명:없음	
위탁연구	연구기관명:없음			연구책임자:없음	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	비공개 (개별인정신청서 작성 내용은 기업 내부 기밀 자료로 식약처에서 인정되며, 현재 심의중임)				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록·기탁 번호	4	8									

1. 원료 및 대량공정 표준화
  - 시계꽃 식물의 지상부 (열매, 잎)을 활용한 대량공정 표준화 완료
  - 지표물질 (vitexin) 함량 확인 및 벨리데이션 완료
2. 원료의 수면 건강 효과 및 그 기전연구
  - 생체외 시험 (In vitro) 및 생체내 시험 (In vivo) 연구를 통한 원료의 수면 건강에 대한 과학적 효능 검증 및 그 기전 확인 완료
3. 수면 건강을 효과 및 안전성 확인을 위한 인체적용시험 연구
  - 인체적용시험 대상자를 통해 수면에 대한 설문과 수면다원 검사를 통한 수면 건강 증진의 효과 확인
  - 혈액/뇨 검사 등의 검사를 통한 원료의 안전성 입증
4. 수면 건강 개별인정형 원료 신청
  - 원료의 수면건강 개별인정형 원료로서의 인정을 위한 자료 작성
  - 개별인정형 원료로서 신청완료
  - 건강 증진 식품으로 제품 출시 완료

#### 4. 요약문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시계꽃 (열매, 잎) 소재의 원료 표준화 확립</li> <li>■ 시계꽃 소재의 수면 건강 과학적 효능 및 그 기전 확립 (in vitro/in vivo/인체적용시험)</li> <li>■ 개별인정형 원료 신청 완료</li> <li>■ 건강기능식품 제품 개발 및 마케팅 전략 수립</li> </ul>			
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시계꽃 (열매, 잎) 소재의 최적 추출조건 성립 및 지표성분 설정을 통한 원료 표준화 완료               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 소재의 대량생산공정 확립</li> <li>· 지표물질 설정 및 분석 방법 확립을 통한 원료 표준화 확립</li> <li>· 공인분석기관의 지표물질 함량 확인 및 식품 원료의 안전성 확보</li> </ul> </li> <li>■ In vitro/in vivo 및 인체적용시험을 통한 수면 건강 증진 기능의 과학적인 효과 확인 및 작용기전 규명               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 세포 실험을 통한 수면 촉진 효과 확인 및 기전 규명</li> <li>· 동물실험을 통한 수면 촉진 효과 확인 및 기전 규명</li> <li>· 수면효과가 뇌의 신경재생에 미치는 기전 규명</li> <li>· 질환 동물 모델별 (ovariectomy; OVX, Orchiectomy) 및 연령과 같은 병리학적, 생리학적 조건하의 수면 유도 효과 확인</li> <li>· 수면 건강 증진 임상적 요소 평가 및 효과 확인</li> </ul> </li> <li>■ 시계꽃 (열매, 잎) 소재의 수면 건강 증진 개별인정형 원료 신청</li> <li>■ 상용화를 위한 맞춤형 제품화 개발 및 마케팅 전략 수립</li> </ul> <p>&lt;핵심성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ (기술적 평가 지표) 특허 출원 7건, 등록 1건</li> <li>■ (제품 지표) 시제품 개발 1건</li> <li>■ (산업 지표) 신규 고용창출 2건, 식약처 개별인정형 원료 신청 1건</li> <li>■ (연구기반 지표) SCI(E) 1편 , 비SCI 3편 제출, 학술발표 12건</li> <li>■ (사업화 지표) 제품 출시 1건 및 매출 달성</li> </ul> <p>&lt;전략성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인체적용시험 결과보고서 1건</li> <li>■ 일반식품 및 건강기능식품 제형 개발 총 6건 이상</li> <li>■ 시제품 관능평가 보고서 1건, 디자인 보고서 1건</li> <li>■ 상용화를 위한 마케팅 전략 보고서 1건</li> </ul>			
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 천연소재의 안전성 평가를 위한 기술 개발 및 검증에 활용</li> <li>■ 시계꽃 소재를 통해 안전성이 확보된 수면 건강 증진 제품 개발</li> <li>■ 수면 건강 증진으로 국민의 삶의 질 증가 기대</li> <li>■ 수면 건강 증진 기능성 건강기능식품 출시로 매출창출</li> <li>■ 국내산 시계꽃 재배 및 원료 활용에 기여</li> <li>■ 국내외 온오프 건기식 시장과 홈쇼핑진출</li> </ul>			
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>수면 건강 증진</p>	<p>숙면</p>	<p>건강기능식품</p>	<p>시계꽃</p>

## 5. 본문 목차

### 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	7
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	25
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	159
4. 연구결과의 활용 계획 등.....	162
붙임. 참고 문헌 .....	167

## 1. 연구개발과제의 개요

### 가. 연구개발 목적

천연물 유래(시계꽃 열매, 잎) 소재를 이용한 수면 건강기능식품 소재 및 제품 개발이 최종 목표임. In vitro, In vivo 및 인체시험을 통해 과학적인 효과와 그 기전 및 안전성을 입증하여 안전한 수면 건강 증진 개별인정형 기능성 원료를 확보하고 건강기능식품으로 개발하고자 함.

### 나. 연구개발의 필요성

#### (1) “삶의 질” 새로운 화두 ‘수면의 질’이 삶의 질을 좌우한다.”

수면은 단순히 잠을 자는 것만이 아니며, 하루 동안 누적된 피로에 의하여 저하된 뇌의 활동을 주기적으로 회복하는 생리적인 의식 상실 상태로 외관적으로는 주위 환경에 대하여 반응하지 않게 되며, 감각이나 반사기능이 저하된 상태임.

따라서 인간은 수면 시간을 통해 조직, 특히 중추신경계의 항상성 회복, 에너지의 저장, 체온조절, 감각의 과부하에 의한 부적절한 기억의 제거 등의 기능을 수행하는 매우 중요한 생리학적 현상임.

일반적으로 하루 중 1/3을 차지하고 있는 잠은 육체적 뿐만 아니라 정신적 활력을 회복하는 시간으로 숙면을 취하지 못하는 경우, 정신병적인 증상인 자아해체, 환각, 망상 등 신체 및 정신적 문제를 야기함. 따라서, 수면장애는 심혈관질환, 대사성 질환의 위험성을 증가시키며, 면역학적 문제도 함께 야기하는 것으로 알려져 있음.

지속적인 수면장애에 대한 치료가 이루어지지 않는 경우 사람의 성격장애, 기억력 저하, 우울증, 불안장애 등의 증세를 증진시켜 일상적인 생활이 어려워질 수 있음.

빛과 활동시간, 활동량에도 수면의 질은 문제를 끼치며, 정기적으로 섭취하는 지나친 알코올 섭취와 약물들이 수면장애를 유도한다는 것도 잘 알려져 있음.

불규칙적인 수면장애는 생식능력의 저하, 순환기계통의 문제, 비만, 당뇨병 그리고 호르몬적인 문제가 발생하므로, 비정상적 수면장애가 정상적인 삶의 질에 대하여 충분히 누릴 수 없게 됨.

정상적인 수면은 건강한 삶에 필수적인 요소이지만, 업무의 과다, 스트레스, 생활환경 및 습관, 질환 등의 다양한 원인에 의하여 성인 중 10% 이상이 수면 장애를 호소하고 있으며, 국내외 연구에 의하면 현대인의 3명 중 1명은 살아가면서 불면증을 경험하고, 이 중 10%가 한 달 이상 잠을 자지 못하는 만성 불면증에 시달리고 있다고 보고됨.

숙면을 취하지 못하는 이유 중 하나가 바로 “**노령화**”인데, 나이가 들수록 전체 수면시간은 짧아지는 반면, 잠들기까지 소요되는 시간은 늘어나면서 깊은 수면의 비율이 적어지게 됨. 따라서 고령화가 진행됨에 따라 수면의 정상적인 유도과 지속이 어렵게 되면서 수면장애에 의한 수명단축과 다양한 질병으로 이완되는 현상을 보이고 있어, 고령화 시대에 있어 수면의 중요성은 더욱 크게 대두되고 있음.

## 성인기 수면 변화

구분	20세	40세	60세	70세	80세
입면잠복시간	16분	17분	18분	18.5분	19분
전체수면시간	7.5시간	7시간	6.2시간	6시간	5.8시간
2단계 수면	47%	51%	53%	55%	57%
깊은 수면	20%	15%	10%	9%	7.50%
렘수면	22%	21%	20%	19%	17%
수면 효율	95	88	84	82	79

그림1. 연령의 증가에 따른 수면의 변화

[출처: 서울대학교 수면의학센터, 2010]

### ■ 일반적으로 수면에 미치는 여러 가지 주요 요소들

- 수면중추와 환경과의 상호작용의 관계 : 호르몬적 이슈, 빛과 운동량과의 관계, 심리적 요인, 생활 및 식습관
- 연령과 성별 수면의 차이 : 연령과 성호르몬의 유/무의 차이점  
(예: 조기폐경여성/조기남성의 호르몬 불균형 또는 난소절제술을 받은 젊은 여성)
- REM (Rapid eye movement) 수면의 지속 시간
- 빛의 노출 시간과 수면의 관계 : Circadian rhythm에 의한 수면 특성
- 수면중추의 파괴에 의한 수면장애 유발 동물의 반응 (stereotaxic apparatus를 이용한 수면중추-(예)suprachiasmatic nucleus 파괴)
- 생체 Clock gene은 단순히 뇌에만 있는 것이 아니라 소화기계 (대표적으로 간장)에도 존재하므로 이에 대한 특성에 대하여 추가적으로 연구할 필요가 있음

미국 하버드 의대의 보고에 의하면 인간에게 중요한 5가지 요인과 함께 기억과 학습 (Learning and memory), 대사조절 및 체중 (Metabolism and weight), 안전 (Safety), 정서적 안정 (Mood), 질환 (Disease)과 함께 ‘숙면’이 매우 밀접하게 연관되어 있으며, 불면증을 비롯한 수면장애의 개선 및 수면의 질 향상이 삶의 질을 높일 수 있는 매우 중요한 부분임을 증명하였음.



## 수면장애가 건강에 미치는 영향

Hiboc



### 뇌/신경 질환

수면 부족, 피로, 스트레스, 우울증, 불안, 초조감, 기억력/집중력 저하, 면역력 저하, 뇌 회백질 감소로 인한 치매 자극, 두통, 안구충혈



### 심혈관/내분비 질환

협심증, 고혈압, 심근경색, 호르몬 불균형, 성장 장애, 당뇨병



### 소화기 질환

소화불량, 속쓰림, 복부통증, 헛배부름, 변비, 과민성 설사, 대장암



### 비뇨생식기 질환

성욕/성기능 저하, 생리통, 자연유산, 저체중아, 조산, 유방암

그림2. 수면부족에 의한 다양한 신체작용 및 위험요소의 결과

[출처: 원광대학교 수면센터, 2017]

위에서 언급한 것처럼 노령화에 의하여 전체적인 수면시간도 짧아지며, 수면유도에 필요한 시간도 증가하게 되어 깊은 수면의 비율이 저하됨. 이러한 사항은 다양한 질병의 발생에 대하여 매우 중요한 원인이 될 수 있는 것으로 알려짐.

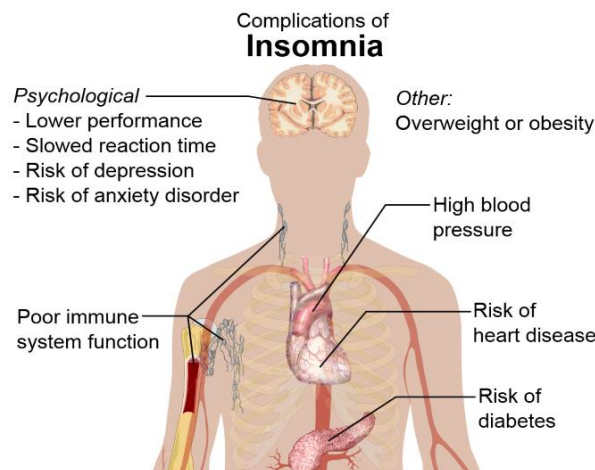


그림3. 수면장애가 신체/정신적 건강에 미치는 부작용

[출처: The Harvard Women's Health Watch suggests six reasons to get enough sleep, 2008]

수면장애의 구분은 다음과 같이 4가지로 나눌 수 있음.

- 일차성 수면장애: 정신장애 등과 관련이 없는 수면장애이며 수면곤란증 등이 이에 해당
- 기분장애나 불안장애와 같은 정신적 장애로부터 초래되는 수면장애
- 각종 질환 등에 의한 이차적 수면장애: 각성계에 직접적인 영향을 주어 나타나는 수면장애
- 물질 또는 투약물로 유발된 수면장애: 삼환계 항우울제나 정신자극제 등의 사용에 의하여 치유되는 수면장애

(2) 수면장애 인구의 점증적 증대

(가) 연도별, 연령별 수면장애 인구의 다양성 존재

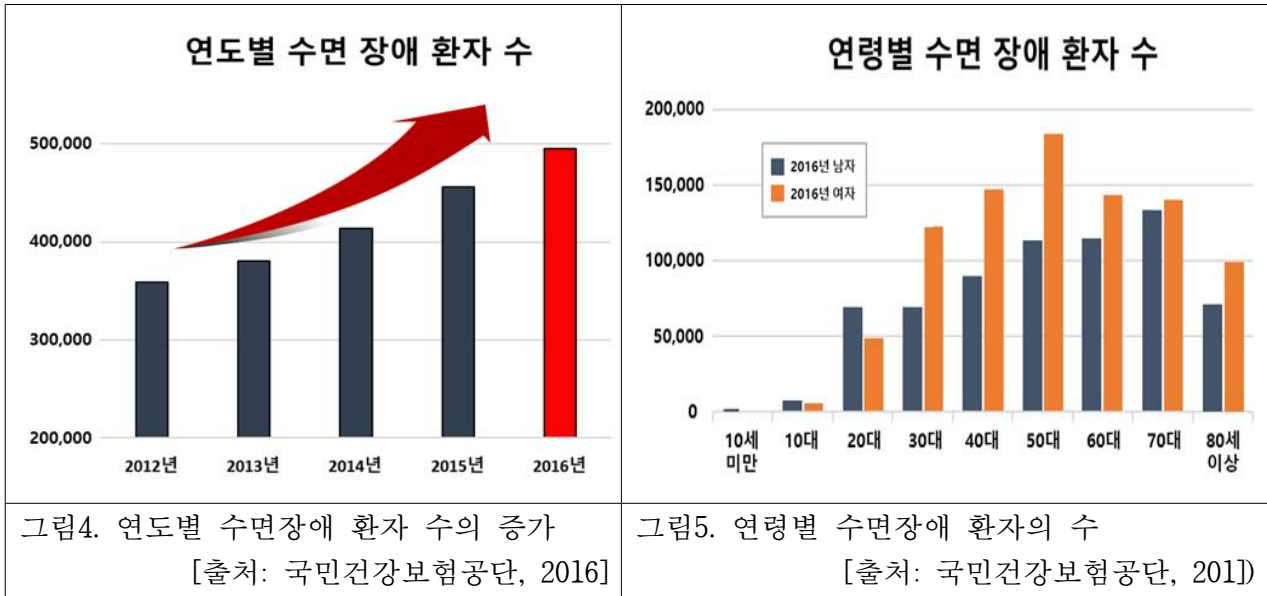


그림4. 연도별 수면장애 환자 수의 증가  
[출처: 국민건강보험공단, 2016]

그림5. 연령별 수면장애 환자의 수  
[출처: 국민건강보험공단, 2016]

국민건강보험공단 보고에 의하면 최근 5년간(2012~2016) 수면장애 환자의 수가 15만명 가까이 증가했으며, 연령별로 수면장애를 겪는 인구가 많았음.

그러나, 20~50대에서도 유병률이 매우 높았으며, 남성보다는 여성에서 더 많은 환자가 발생하는 것으로 나타났음.

특히, 여성의 경우 폐경이 발생하는 50대에서 높이 나타나, 호르몬 불균형에 의한 영향이 매우 높을 것으로 예측됨.

남성의 경우도 대부분 연령이 증가함에 따라 수면장애 인구가 증가하는 것으로 보아 성기능 저하가 하나의 원인이 될 수 있을 것으로 사료됨.

(진료통계에 의하면 2011~2015년까지 연간 10%의 수면장애 유병인구가 증가하였으며, 이로 인한 진료비 상승도 4년 사이 1.6배 증가하여 최근 수면장애를 호소하는 환자가 크게 증가하였음을 알 수 있음)

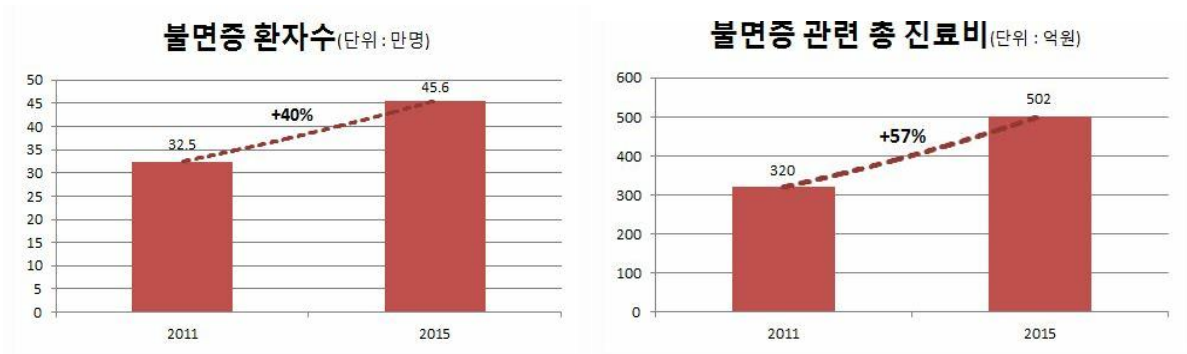


그림6. 연도별 수면장애 진료인원 및 진료비 현황  
[출처: 국민건강보험공단, 2016]

이러한 유병율의 증가와 더불어 보건복지부는 2018년 3월 20일 심사평가원에서 건강보험정책심의 위원회를 열었으며, 본 회의에서 수면장애 진단과 치료를 위한 수면다원검사의 급여화를 상정하였 음. 수면다원 검사는 통상 8시간 이상 수면 중 뇌파와 안구운동, 근긴장도, 심전도, 호흡, 혈중 산소 포화도, 코골이, 다리 움직임 채위 등의 생체신호를 기록해 주면단계와 각성빈도를 확인해 수면의 질을 평가하고 수면 중 신체 전반 문제를 진단하는 검사임. 건강보험정책심의위원회는 그동안 비급 여로 운영 중인 수면다원검사 관련 수면학회 의견을 반영해 치료방침 결정에 안전하고 유용하게 활용 가능하다고 판단하고 2018년 7월 1일부터 수면다원검사의 급여화를 결정함.

(출처 : 보건복지부 2018년 정책 변경사항)

### (3) 호르몬 불균형과 대사성질병에 의한 수면장애의 연관성

위에서 언급한 바와 같이 남성, 여성 모두에서 호르몬의 변화와 수면장애와 밀접한 연관성이 있는 것을 알 수 있으며, 특히 여성의 폐경 및 호르몬 불균형 그리고 남성의 hypogonadism에 의 한 불면증의 촉진 기전이 예상됨.

반대로 만성적인 수면장애가 유지될 경우 수컷, 암컷 실험동물 모두에서 생식능력의 저하가 나 타나고 있다는 연구가 보고되었으며(Torres et al., 2014), 최근에 나타나는 불임문제의 한 원인으 로 생각할 수 있음.

또한, 수면의 질에 따른 뇌기능 변화, 퇴행성 뇌기능, 대사성 질환 및 정신의학적 연관성도 함 께 보고되어 있으므로 (McClung, 2011; Summa & Turek, 2014), 단순한 수면장애에 의한 피로도 에만 집중하기보다 향후 연령증가에 따른 다양한 리스크를 고려해야만 함.

이러한 수면장애와 호르몬 불균형에 의한 생식능 저하는 동시에 뇌기능 저하로 이어지기도 하 여 삶을 질을 크게 낮추므로, 수면장애 개선물질은 수면장애와 함께 연결되는 이러한 호르몬, 대 사장애 및 뇌기능 평가가 함께 이루어져야 할 필요성이 있음.

### (4) 수면장애에 의한 뇌기능 저하 및 퇴행성 뇌질환의 관계성

빛과 어둠에 대한 노출시간이 일과 중 일정하게 유지되고, 일과 중 빛에 충분히 노출되어야만 질 높은 수면을 이룰 수 있음.

빛은 안구를 통하여 인지되고, 노출된 빛에 대한 신호가 뇌 (Suprachiasmatic nucleus & Pineal gland)에 전달됨으로써 일정한 Circadian rhythm이 유지되게 되어있음.

현대인들은 정상적인 일과시간과 상관없이 야간에도 밝은 빛에 노출되고 있으며, 휴대용 컴퓨 터, 스마트폰, TV 등에도 늦게까지 노출되어 불균형적이고 불규칙적인 빛에 노출되고 있어 수면 장애의 가능성을 항상 높게 가지고 있음.

따라서, 빛의 노출시간에 따른 뇌의 정상적인 기능 또한 함께 영향을 받아 호르몬, 대사기능, 뇌기능, 스트레스에 대한 반응, Learning & Memory에 대한 기능, 생식 및 감정에 대한 기능 등 에 직접적인 영향을 미치게 됨.

Circadian rhythm을 조절하는 gene(예: Clock gene)들은 뇌에서만 그 기능을 하지 않고, 신체 각

부분 (예: 소화기계 등)에서 함께 기능을 하는 것으로 알려져 있으므로, 수면장애에 대한 신체 각 장기에 대한 영향을 파악하여야 할 필요성이 있음.

수면시간과 질에 의한 뇌기능 및 뇌신경 생존율도 깊은 연관성을 가지고 있어, 빠른 수면유도와 충분한 Rem 수면을 이끌 수 있는 생활습관과 보조제가 필요함.

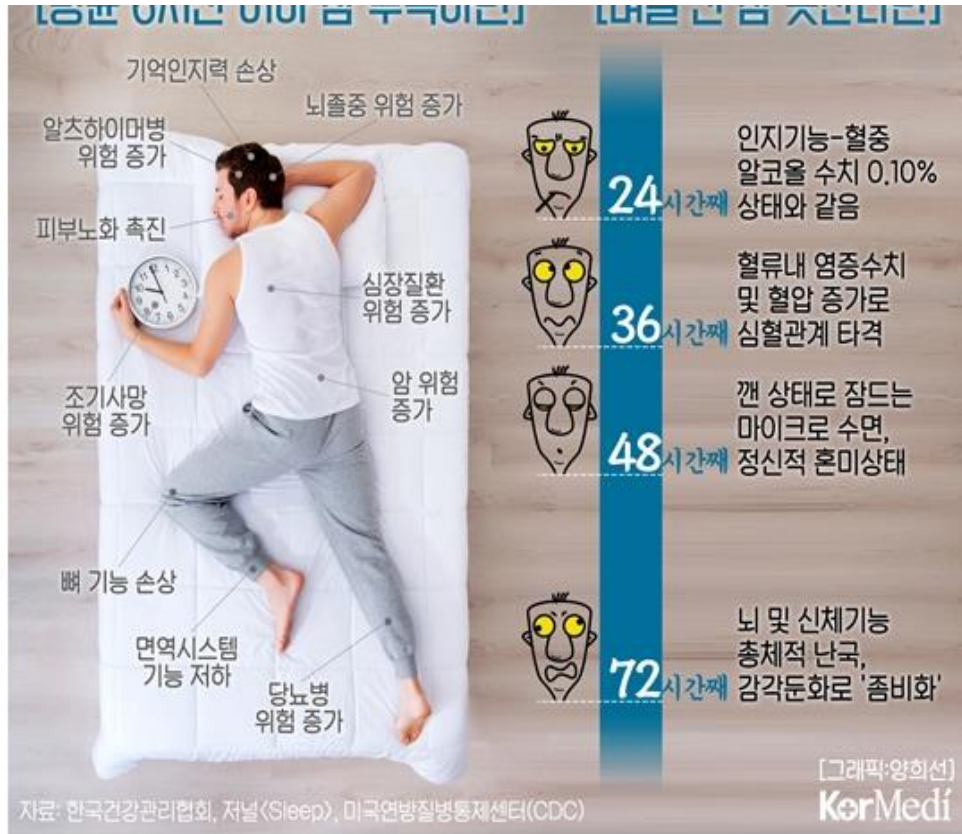


그림7. 수면부족이 신체의 각 기능에 미치는 영향  
 생식기능, 뇌기능, 대사기능, 스트레스 조절 기능 등 다양한 부분에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있음  
 [출처: 한국건강관리협회]

(5) 국내·외에서 보고되는 수면장애의 적신호

건강보험공단에서 2012~2016년 수면장애 진료 자료를 분석한 결과 국내 수면장애 환자는 매년 증가하고 있고, 2012년 기준 35만 8천명이던 수면장애 환자가 16년에는 49만 4천명까지 증가함.

지역별로는 경기도가 52만 9천명으로 전체 환자의 25%를 차지했고, 이어 서울 22.4%, 부산 7.4%, 경남 6.1%, 경북 5.4% 순이었음.

세계 인구의 1/4가 불면증을 경험하고 있고 수면장애로 인한 문제는 점차 확대되어 수면클리닉도 성업 중임.

표1. 주요 수면 질환의 종류와 증상

수면질환	증상
불면증	1. 잠드는데 30분이상 걸리는 날이 주 3일이상 2. 수면 중 자주 깬 3. 아침에 너무 일찍 깨고 다시 잠들기 힘들
수면무호흡증	1. 습관적인 코골이 (코골이가 있는 사람의 75%는 수면 중에 호흡이 멈추는 무호흡증을 동반함) 2. 수면무호흡으로 깊은 수면을 이루지 못해 낮동안에 피로감, 주간졸림 등이 나타남. 3. 자다가 숨이 멈추는 수면무호흡증 (병원 검사에서 1시간에 6번 이상 숨이 추면 확진)
하지불안증후군	1. 잠들 무렵 다리에 느껴지는 말로 표현하기 힘든 불편감 2. 다리의 불편감으로 수면 중 자주깬
과면증 및 기면증	1. 야간에 최소 7시간 이상 수면을 취하고서도 낮에 시도 때도 없이 졸림 2. 옷다가 힘이 빠져 주저앉는 경험 (탈력 발작) 3. 밤에 자주깬
수면지연증후군	1. 잠에드는 시간이 새벽 2시 이후 2. 아침에 일어나기 힘들
꿈 행동장애	1. 욕설, 발길질 등 꿈의 행동을 그대로 옮김
몽유병	1. 수면 중 일어나 돌아다님
야경증	1. 수면 중 일어나 소리지르고 놀란 행동을 보임

[출처: 보건복지부/대한의학회]

국제 의학계에서 공인된 수면 장애의 종류는 불면증, 수면무호흡증 등 80여 종류에 이르며, 일찍이 산업이 발달한 선진국에서는 수면장애에 대한 연구가 이미 2000년대 초부터 시작되어 미국에서는 오직 수면만을 연구하고 수면장애에 시달리는 이들을 치료하는 “수면의학전문기”가 각광 받고 있음.

경제협력기구(OECD)의 2013년 보고에 따르면 대한민국의 평균 수면시간은 7시간 49분으로 29개 OECD 가입국 중 가장 짧은 수면시간과 질이 낮은 것으로 나타남.

2011년 대한수면의학회가 발표한 연구에서도 이러한 결과가 뒷받침되어 있으며, 50%에 달하는 한국인의 수면시간이 6시간 30분 미만인 것으로 조사되었고, 그 중 수면에 문제를 느끼지 못하는 사람은 14.1%에 불과할 만큼 수면의 질도 낮은 것으로 조사되었음.

대한민국 성인의 70% 이상이 수면부족, 불면증 등의 수면장애로 인하여 고통 받은 경험이 있다고 밝혔으며, 또한 성인 5명 중 1명은 1주일에 3일 이상 불면증을 겪는다고 보고되고 있음.

## 한국인 평균 수면시간 OECD국가 중 최하위

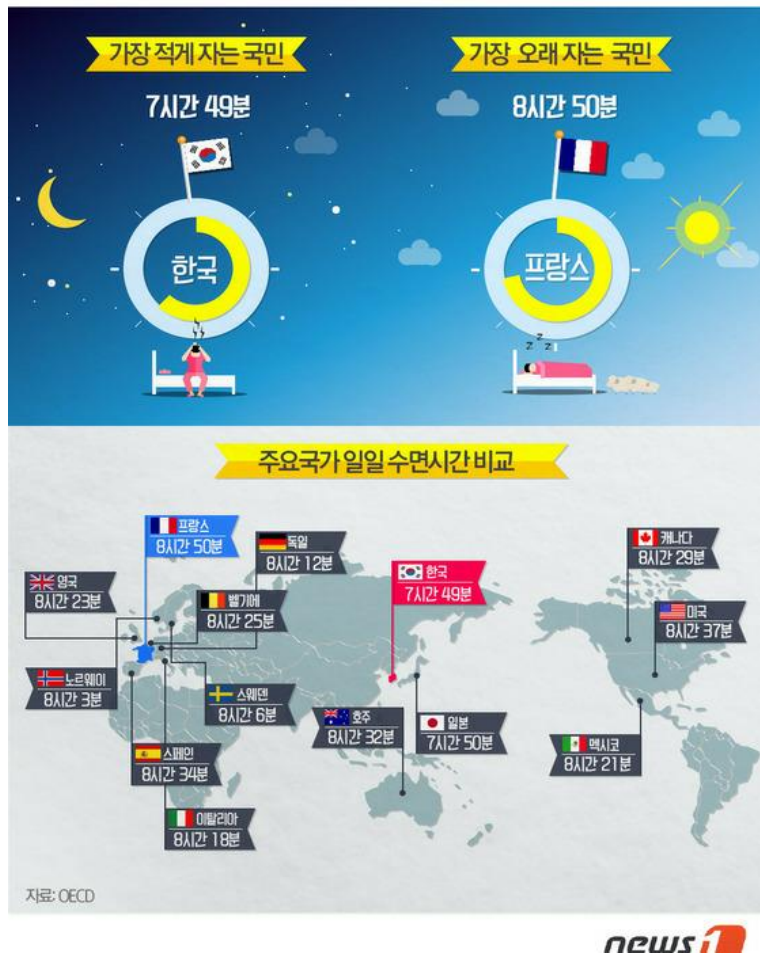


그림8. 주요 OECD 국가 국민들의 하루 평균 수면 시간  
[출처: 경제협력개발기구 2013 조사]

### (6) 부족한 수면에 의한 사망률 및 체중의 증가

최근 연구들에서 수면시간이 당뇨병 및 심혈관계 질환의 발병뿐만 아니라 사망률과 매우 밀접한 연관성을 가지고 있으며, 7~8시간의 수면을 취하는 사람들에 비해 7시간 이하의 수면시간을 취하는 사람들에서 만성질환의 발병률 및 이로 인한 사망률이 높아진다고 보고하고 있음.

수면시간은 체질량지수 (Body Mass Index; BMI)와 반비례 관계를 보이는 것으로 보고되고 있으며 (Marshall et al., 2008), 부족한 수면 시간을 갖는 사람들은 수면 시간이 긴 사람들보다 음식 및 간식의 섭취 횟수가 증가하고(Nedeltcheva et al., 2009), 지방을 통한 열량섭취가 유의적으로 증가한 것으로 보고되었음(Shi et al., 2008).

그러므로 부족한 수면 및 불면증을 가지고 있는 사람들은 비만이 될 가능성이 높으며, 그에 반하여 적절한 수면은 건강한 체중을 달성하고 유지하는데 도움이 될 수 있음.

(7) 수면 장애가 가져온 경제적 손실

수면장애로 인한 직·간접적 비용에 대한 보고는 국내에는 없으나, Daley 등은 불면증의 직·간접적 경제적 손실을 1인당 \$1,431/년으로 수면이 좋은 사람들의 \$421/년에 비하여 3배 이상 크며, 그 중 생산성에서의 손실이 가장 큰 것으로 보고되었음.

치료와 관련된 비용보다 결근(absence), 생산성(productivity)과 같은 불면증의 결과로 인한 손실이 더 큰 것으로 조사됨.

그러나 놀라운 것은 불면증이 있는 사람의 약70% 가까이는 불면증에 대하여 의사와 상의하지 않았으며, 25%는 다른 문제로 의사에게 상담을 받을 때 수면문제를 언급하고 이 중 5% 만이 불면증에 대한 치료를 받았다는 사실임(Daley et al., 2009).



그림9. 주요 5개국 수면 부족에 따른 경제적 손실  
[출처 : Rand europe, 2016]

(8) 국내·외 수면건강 시장 현황

(가) 국내 시장 현황

현대인의 수면 시간이 줄어들고, 건강에 대한 관심이 높아지면서 짧게 자더라도 질 좋은 수면을 취하기 위한 사회적 지출이 크게 증가하였고, 수면용품 및 식품 시장의 경제적 영향력이 커지게 되면서 잠(Sleep)과 경제(Economics)의 합성어인 슬리포노믹스(Sleeponomics)라는 단어가 등장하게 됨.

수면산업은 일반적으로 일상 생활의 기본 요소인 의식주가 충족된 이후에 활성화되는 선진국형 산업으로 분류되어 있음.

경제 성장이 이루어진 미국, 일본 등의 해외뿐만 아니라 국내에서도 수면산업에 대한 관심과 투자가 증가하고 있음.

한국의 경우 OECD 국가 중 수면 시간이 최하위에 가깝고, 수면의 질과 건강과의 상관관계에 대한 연구가 활발히 이루어짐에 따라, 국내 수면관련 제품의 판매율은 지속적으로 증가할 것이라 전망됨.

또한, 건강보험공단에서 2012~2016년 사이의 수면장애 진료 자료를 분석한 결과 국내 수면장애 환자는 매년 증가하고 있고, 2012년 기준 35만 8천명이던 수면장애 환자가 16년에는 49만 4천명 까지 증가함. 한국 수면사업협회에서 조사한 바로는 16년 기준으로 국내 수면관련 시장 규모가 약 1조 6000억 원에 달함. 수면산업이 발달한 미국의 경우 약 20조원, 일본의 경우 약 6조 원에 달하는 것을 감안하면 향후 발전 가능성이 큰 산업이라 볼 수 있음. 중국 또한 수면 시장이 확대되고 있는데, 이를 통해 수면산업의 해외 진출이 용이할 것으로 판단됨.

### ■ 국가별 수면시장 규모 (단위 : 원)

[자료 | 삼성경제연구소, 참고 | 2016년 기준]

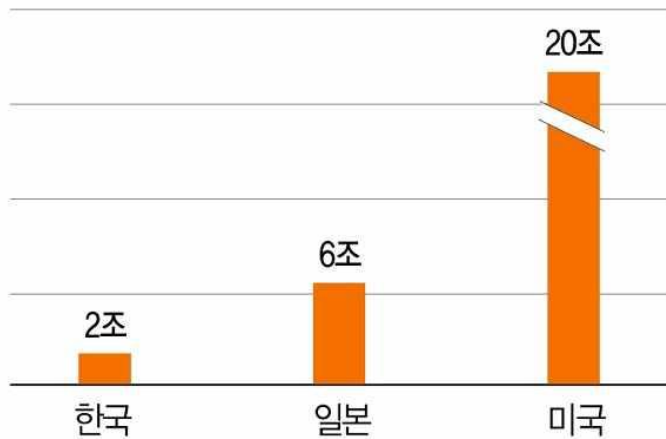


그림10. 국가별 수면시장 규모

#### (나) 해외 시장 현황

미국의 경우 15년도 기준 소비자들이 숙면을 위해 사용한 비용은 약 410억 달러에 달할 정도로 수면제품 소비가 활성화됨.

일본에서도 마찬가지로 수면장애 환자들은 점점 늘어나고 있고, 그에 따라 수면 보조제품 개발 과, 치료제품 개발 등의 개발도 이루어짐.

네덜란드의 기업인 PHILIPS는 근처에 있는 수면클리닉, 수면전문의를 찾아주는 서비스를 제공하는 등, 다양한 수면관련 산업이 발달하고 있음.

#### ① 미국

최근 미국에서는 수면장애 인구가 급증하고 있어 숙면을 유도하는 제품에 대한 수요가 증가하고 있음. 특히, 천연 수면보조제 (Over-the count sleep aids: 처방 없이 구입 가능한 수면 보조제)를 경기 주도산업 품목으로 꼽고 있음





그림11. 수면장애 효능을 가지는 해외 천연 수면보조제품

미국 성인의 20~40% 불면증에 시달리고 있음. 이들 중 70%는 고질적인 수면장애를 겪고 있으며, 전체 인구 중 1/3이 불면증 경험이 있고, 65세 이상 중 50% 이상이 수면장애를 경험한 적이 있다고 함. 이중 **불면증 환자 40% 이상이 수면보조제를 이용**하고 있으며, 약 25%에서 의사 처방이 필요한 수면제를 경험했다고 밝힘.

또한, 어린이 200만 명 이상이 수면장애 고통을 겪고 있고, 전체 어린이의 30~40%는 숙면을 못하고 있으며, 성인의 경우 여성은 남성보다 2배 이상 수면장애 경험이 있고, 갱년기 여성 및 임산부 수면장애는 더 심각한 실정임.

수면장애 치료 시장은 2010~2015년 5년간 연평균 성장률이 4.0%에 달했고, 2015년 기준 치료기관은 2,835개에 달함. 2015~2020년 5년간 연평균 성장률은 3.3%로 추측되고, 시장크기 87억달러, 치료기관 3,334개에 달할 것으로 전망됨. 수면장애로 인한 건강관리 비용은 159억 달러가 추가 지출될 것으로 추정됨.

표2. 미국 수면장애 치료시장 규모

(단위: 백만 달러, 개)

연도	시장크기	치료기관 수
2015	7,133.5	2,835
2016	7,475.9	2,933
2017	7,640.5	3,009
2018	7,865.0	3,009
2019	82,87.5	3,213
2020	8,686.6	3,334

(자료원: IBISWorld)

② 일본

- 재조명 받는 수면의 중요성, 그러나 수면의 질에 대해서는 60%이상이 불만족
  - 일본에서는 수면과 질병 및 사망 위험과의 관계, 수면부족으로 인한 경제적 손실 등에 대한 연구가 진행되면서 건강한 수면이 주요 이슈로 등장함.
  - 수면부족에 의한 일본의 연간 경제 손실률은 GDP 대비 2.9%인 1,380억 달러로 추측되며, GDP 대비 손실률은 조사 대상 5개국 중 최고 수준임.
  - 2010년에 후생노동성이 실시한 ‘2009년도 국민 건강, 영양조사’에서 최근 1개월 동안 잠을 통해 충분한 휴식을 취했는가에 대한 질문에 응답자 중 20%가 부정적이었음.
  - 특히 남녀 모두 부정적으로 응답한 사람이 20~40대에서 많았고, 평균 수면시간이 6~7시간 사이라고 응답한 사람이 가장 많았음.
  - 수면시간이 6시간 미만인 비율은 남성의 경우 30대가 45.1%로 가장 높았으며 여성은 40대가 45.7%로 가장 높았음.
  - 수면시간이 6시간 이하일 경우 동맥경화, 고혈압, 당뇨병 등의 질병 발병 가능성이 높다는 연구 결과가 있음. 따라서 향후 건강한 삶과 삶의 질 측면에서 질 좋은 수면에 대한 욕구가 점차 높아질 것으로 전망되며, 이에 따라 숙면을 도와주는 제품들이 경쟁적으로 출시되고 있다.
- 꾸준히 확대되고 있는 일본의 수면시장
  - 시장 조사기관인 야노 경제연구소에 따르면, 수면관련 침구류 및 식품 등을 포함한 모든 수면 제품들이 2009년 이후 지속적인 성장세를 보이고 있음.
  - 2016년 수면시장 규모는 전년대비 0.4% 증가한 8,600억엔에 달하는 것으로 예측됨.

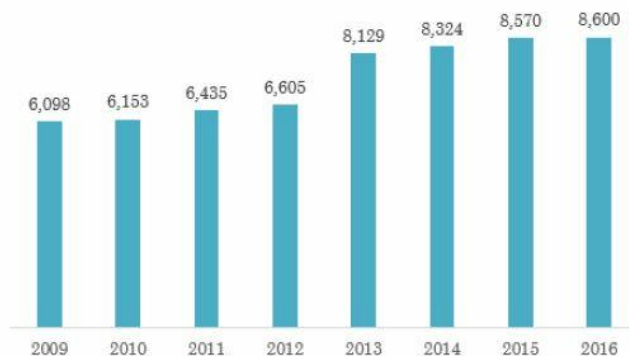


그림12. 일본 수면 관련 시장 규모 (단위: 억 엔)

[출처: 야노 경제연구소]

- 최근 10년간의 불황속에서도 수면 환경 용품 시장은 지속적으로 신장되고 있으며, 미국과 유사한 불면증 치료용 수면제 사업으로 시작되었음.
- 2003년 최초로 ‘에스에스제약’에서 처방전이 요구되지 않는 ‘도이메루’를 개발하여 4억엔/년 이상의 사전예약을 받아 주목을 받았음.

### ③ 중국

- 2015 중국수면지수 보고서

- 2015년 중국 시린먼그룹(Sleemon; 喜临门集团)은 ‘2015 중국수면지수보고서 (2015 中国睡眠指数报告)’를 발표하였음.
- 보고서에 의하면, 2014년 기준 중국인의 평균 수면시간은 7.3시간으로, 수면시간이 8.5시간인 프랑스와 1시간 이상 차이가 났음. 또한, 중국인의 48%는 얇은 수면을 취하고, 35%는 숙면에 지장이 있다고 답했으며, 17%는 불면증상이 있었음.
- 중국인들의 불면 인구 증가 및 소득이 높아질수록 중국의 수면산업도 활성화되는 것으로 나타났는데, 이는 면의 질과 삶의 질이 밀접한 관계를 갖고 있고, 중국인들이 삶의 질을 중시하고 있기 때문이라 사료됨.
- 보고서에 의하면, 2015년 기준 직업별 불면증 비율은 의료전문직이 22%로 가장 높았으며, 문화 · 예술직이 15%로 뒤를 이었음. 불면 비율이 가장 낮은 업종은 영업직으로 4%이었음.

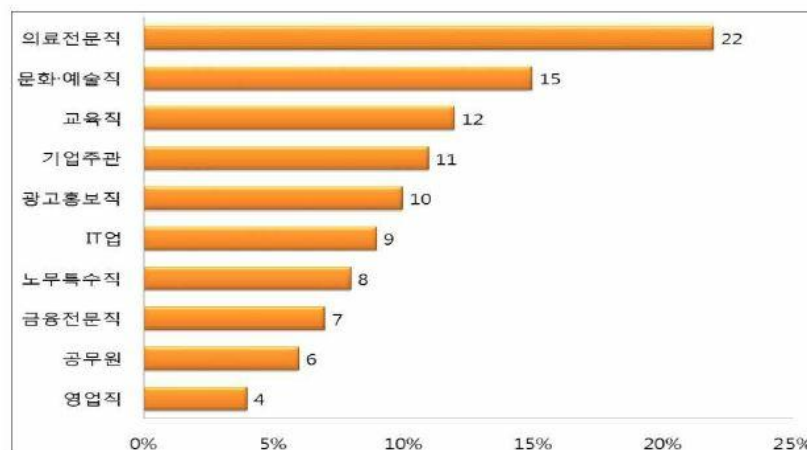


그림13. 직업별 불면증 비율

[출처: 2015 중국수면지수보고서]

- 중국의 수면산업 시장 현황 및 전망

- 2014년 수면산업 시장규모 2250억 위안에 달함. 최근 들어 중국에서 수면산업이 새롭게 주목받고 있음.
- 질 좋은 수면이 건강에 직접적으로 연결된다는 것을 인지하면서 침구류뿐 아니라 식품 및 의약품 분야까지 수면산업이 확장되고 있음.
- 2014년 중국 수면 사업 시장규모는 2,250억 위안 (약 362억 8,000만 달러)에 달했으며, 2010년부터 연평균 성장률은 24%에 달함.

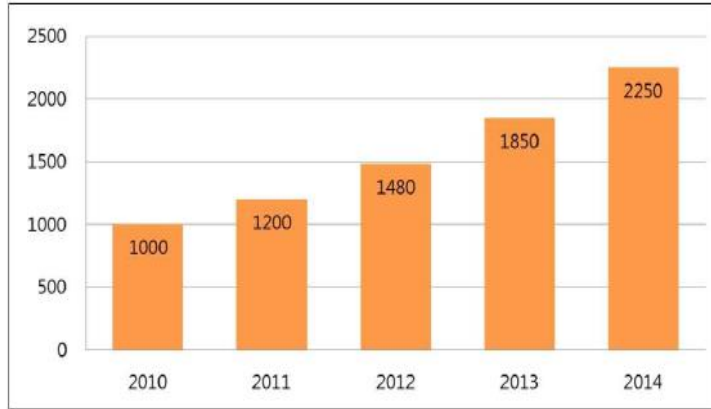


그림14. 2010~2014 중국 수면산업 시장 규모 (단위: 억 위안)

[출처 : 티엔티엔가구사이트]

- 중국 동방재부사이트(东方财富网)에 따르면 향후 5~10년 사이 중국의 수면 시장은 고속 성장할 것으로 보이며, 8,000억 위안(약 1,290억 달러)에 달하는 거대 시장이 될 것이라고 예상됨.
- 2014년 중국 수면산업시장 중 수면 가구(침구포함)의 점유율은 84%로 대부분을 차지하였고, 수면보조약품은 7%, 수면 건강보조식품 6% 및 수면 보조 의료기기 3%를 차지함.

■ 수면가구 ■ 수면보조약품 ■ 수면건강식품 ■ 수면보조 의료기기

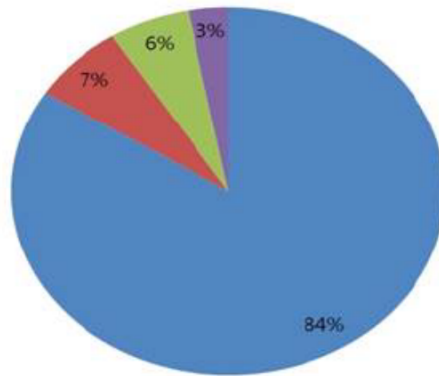


그림15. 수면상품 분류 및 시장점유율

[출처 : 중국산업정보사이트]

- 수면 보조약품은 대부분 수입되고 있으며, 병원 · 진료소 · 보건소 · 약국 등을 통해 판매되고 있음. 최근에는 약국의 온라인 매장을 통해 판매되는 물량도 증가하고 있음.
- 수면 건강보조식품은 주로 대형매장, 백화점, 약국에서 유통되고 있으며, 전자상거래 발전에 따라 이하오텐(一號店) 등 종합 온라인 쇼핑몰에서의 판매가 증가하고 있음.

(9) 수면장애에 관한 국내·외 연구 동향

수면장애는 대다수의 많은 사람들이 겪는 질환 중 하나임. 많은 연구자들이 수면장애의 특징이나, 치료 방법에 관한 연구들을 진행하고 있음. 수면장애에 관한 연구 동향을 살펴보기 위하여, 관련 논문과 특허들을 조사함. 연구는 의학계를 중심으로 점진적으로 증가하는 추세였으며, 국내 한의학과에서도 다양한 연구가 진행되어 있음.

수면 건강에 대해 가장 많은 연구가 진행된 나라는 미국이며, 그 뒤로 유럽, 일본 등의 나라가 확인됨. 수면 건강에 대한 중요성 인지가 상대적으로 낮은 우리나라의 경우 논문 및 연구 등의 반향은 앞선 나라들을 따라 잡고 있으나, 특허 및 제품에 대한 실용적인 개발은 많이 늦어진 상태임. 수면에 대한 중요성 인지가 우리나라 보다 낮은 중국의 경우 논문 및 연구 방향은 따라 잡지 못하고 있으나, 앞선 나라의 정보들을 토대로 실용 제품에 대한 연구 발전이 빠름.

(가) 국내 연구 동향

① 국내 논문 분석

수면장애 및 불면과 관련된 국내 학술 논문을 검색하여 총 316편의 연관 논문을 선별함.

1980년 수면관련 연구가 5건에 그쳤지만 2005~2009년 논문 발간 건수가 최고 정점으로 103 건수에 이룸. 2010~2012년 수면장애에 대한 연구 및 논문 발간 건수는 줄었지만, 특허 및 관련 상품 제품들에 대한 연구가 점차 늘고 있는 추세임.

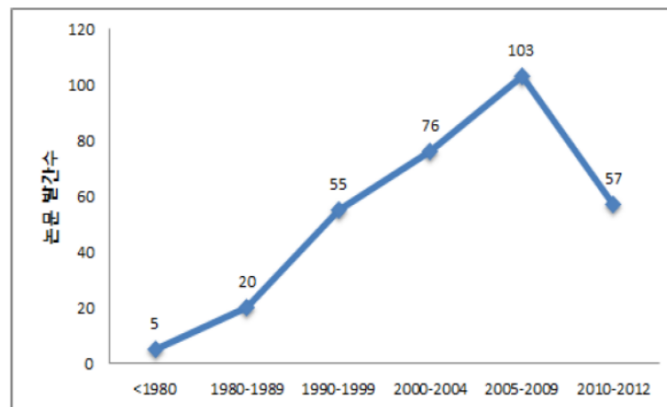


그림16. 연도별 수면장애 연구 추세

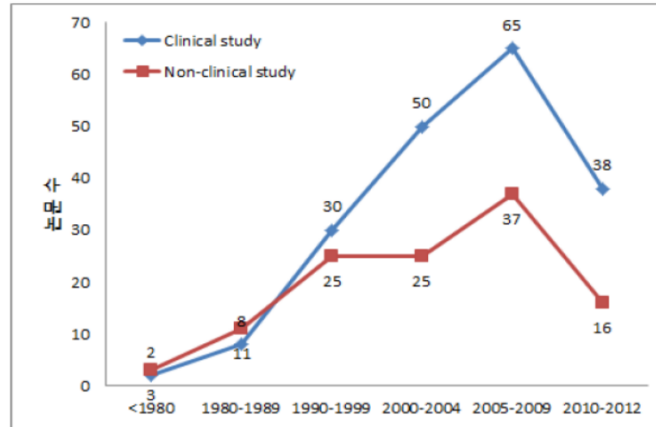


그림17. 연구 설계에 따른 연도별 논문 현황

[출처 : 한국콘텐츠학회논문지, 2013]

## ② 국내 특허 분석

국내 특허 불면 및 수면장애에 해당하는 유효 건수는 10여건임. 이중 생활품 관련 특허가 7건임. 특허는 연구 동향에 비하여 미비한 실정임(출처: 키프리스).

## (나) 국외 연구 동향

### ① 신경인지적 모델 연구

수면은 정서, 인지 및 생리 등 다양한 요인들에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 그 동안 많은 이론적 모델이 제기됨.

최근 연구결과를 반영하여 통합적으로 제시된 수면의 신경 인지적 이론모델은 과각성(hyperarousal)이 불면의 가장 핵심적 역할을 하는 것으로 여겨짐.

각성저하(dearousal) 능력이 부족한 것이 불면의 주요 원인 중 하나라 볼 수 있으며, 이로 인한 감각 및 정보처리(Sensory and information processing)의 이상도 주요한 병리기전으로 제기됨.

이에 대한 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 특히 뇌의 활동이나 생체 신호를 이용한 근거들이 축적되고 있음.

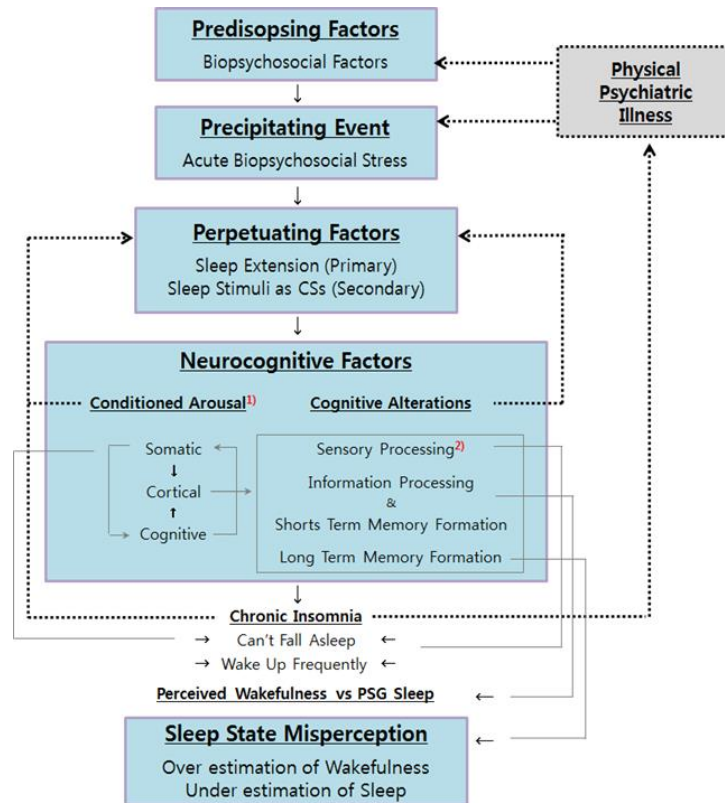


그림18. 불면증의 신경인지적 모델  
 [출처: Biopsychosocial model, 2011]

② 불면관련 뇌신호

뇌파(EEG)는 밀리세컨드(ms) 단위의 시간 해상도(temporal resolution)를 가지고 있어 1/1000 초 단위의 빠른 시간 내에 일어나는 뇌신호 처리 과정 측정 가능 또한 MRI, SPECT, PET과 같은 뇌 영상 기법에 비해 비교적 안전하고 비침습적(noninvasive)이며, 뇌 연구에서 뇌파는 뇌의 인지기능, 정보처리와 관련된 신경 생리학적 메커니즘을 이해하는 데 매우 유용한 방법임.

EEG의 도구 중에서 Event related potential (ERP)를 이용하면 과제로 구현 가능한 다양한 뇌기능에 대한 양적 측정이 가능. 특히 수면에 관한 ERP 연구 중에서 불면과 관련이 높은 몇몇 뇌신호가 확인되었고, 특히 arousal과 관련된 신호로 Oddball paradigm을 이용한 N1, P2, and N350 등이 연구된 바 있음.

N1은 집중(attention)과 경계(vigilance)를 나타내는 지표로 수면 시 감소하고, 외부자극의 억제를 나타내는 지표인 P2와 N350은 수면 시 증가.

불면증 환자의 경우 이러한 지표가 정상인과 다르며 수면 중이 아닌 깨어 있을 때에도 구별이 된다는 보고와 함께 불면증 환자는 정상인과 비교했을 때, 이상 자극에서 N350이 감소되어 있고, 표준자극에서 N1이 감소되어 있음.

다. 연구개발 범위

- (1) 시계꽃(열매, 잎) 추출물의 지표성분 스크리닝 및 기능성분 최적 추출조건 확립
- (2) 시계꽃(열매, 잎) 추출물의 대량생산공정 확립을 통한 원료 표준화
- (3) *In vitro, in vivo* 시험을 통한 수면 건강 증진 기능의 과학적으로 체계적인 작용기전 규명
- (4) 시계꽃(열매, 잎) 추출물의 안전성 및 안정성 평가
- (5) 시계꽃(열매, 잎) 추출물의 인체시험을 통한 수면효과의 확인
- (6) 시계꽃(열매, 잎) 추출물을 이용한 수면 건강 증진 개별인정 승인 신청
- (7) 수면 건강 기능 증진 원료의 상용화를 위한 건강기능식품 제품화 추진



## 2. 연구수행 내용 및 결과

가. 연차별 연구 개발의 목표 및 내용

(1) 1차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	
1 차 년 도	2 0 1 5	주 관	1. 시계꽃 (열매, 잎) 소재 기능성분 추출조건 확립	• 천연물 유래(시계꽃 열매, 잎) 소재 기능성분의 최적 추출조건 확립
			2. 대량생산 제조공정 표준화	• 대량생산 제조 공정 확립 및 표준화 • 기능성분 확인
			3. 원료 지표물질 설정	• 지표성분 설정 완료
			4. 지표성분 시험법 확립	• 지표성분 분석방법 확립
			5. 안전성 및 안정성 확립	• 유해물질 및 미생물 안전성 평가 완료 • WebMD 등 온라인 DB를 활용한 안전 섭취량 근거 자료 확보
			6. 해외시장 및 NDI 조사	• 시계꽃 추출물을 이용한 해외 supplement 제품 조사 • FDA, NDI 분석을 통한 최신 기능성 원료 등록 트렌드 분석
	제 1 협 동	2 0 1 5	1. 세포실험을 통한 수면촉진 기능의 약리학적 평가	• 추출물의 GABA 수용체 상호작용 확인 • 추출물의 안전성 및 효능 확인 • 소재에 의한 신경전달물질 및 신경펩타이드의 변화 확인
			2. 동물실험을 통한 수면촉진 및 수면장애요인 극복 효능 확인	• 소재에 의해 자극되는 뇌영역 확인 • 소재에 의한 수면중추영역의 변화 확인 • 소재에 의한 OVX 및 Orchiectomy 실시 동물의 수면 및 섭식행동 분석 완료 • 소재의 섭취에 의한 뇌 해마 부위의 신경세포재생 효과 확인 • 소재에 의한 GABA 활성화 및 interneuron의 표지자 발현 확인 • C.elegans 모델을 이용한 소재의 효능 신속 검증 완료

(2) 2차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	
2 차 년 도	2 0 1 6	주 관	1. 국내산 천연물 유래 (시계꽃 열매, 잎) 소재 함유 식품 개발을 위한 공정 표준화 확정	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 시계꽃 (열매, 잎) 소재 대량생산 공정개선 및 공정 표준화 검증</li> <li>• 시계꽃 (열매, 잎) 소재의 수면 개선 건강기능식품 제품 개발을 위한 표준공정 확립</li> </ul>
			2. 인체적용시험용 제품개발 완료	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 시계꽃 (열매, 잎) 소재의 식품 개발</li> <li>• 인체적용시험용 진약 및 위약 제형, 성상 개발 완료</li> </ul>
		제 1 협 동	1. 동물실험을 이용한 시계꽃 (열매, 잎)소재의 수면장애 및 circadian 관련 요소 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 시계꽃 (열매, 잎)소재의 신경전달물질, 호르몬 조절의 항상성, 수면유도와 관련된 효능 확인</li> </ul>
			2. (질환모델링) 수면장애에 의하여 나타날 수 있는 다양한 연관성 질환의 교정 효과 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 수면장애에 의하여 나타날 수 있는 다양한 기능장애에 대한 교정기능 확인</li> </ul>
			3. 신경전달물질 및 동물의 행동학적 변화 분석 완료	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 행동학적 분석을 통한 수면제품의 부작용인 약물 의존성 및 hang over 없음을 확인</li> </ul>
			4. 소재의 기전 예측	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 프로테오믹스 등을 이용한 key marker 분석</li> </ul>
			5. C.elegans 모델의 신속스 크리닝 모듈을 통한 소재 표준화 데이터 제공	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 신속 스크리닝 방법을 통한 표준화 속도 향상</li> </ul>
		제 2 협 동	1. 수면장애와 개선 효과에 대한 기초 자료 분석 완료	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 다학제적 의견 도출 및 원내 데이터 수집 완료</li> <li>• 대상자 모집 및 수면 관련 임상 지표, 신경생리학적 지표 및 HRV, 인지기능 및 정서 상태 확인</li> <li>• 수면시간에 영향을 주는 요인 분석</li> </ul>
			2. 시계꽃 (열매, 잎)소재의 인체적용시험을 통한 수면 개선 효과 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 인체적용시험 개시</li> </ul>

(3) 3차년도

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
3차년도	2017	주관	1. 개별인정 원료 승인	<ul style="list-style-type: none"> <li>개별인정 허가를 위한 신청 서류 작성 및 증빙 서류 구비 완료</li> <li>식약처 개별인정 원료 심의 신청</li> </ul>
			2. 시제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>제형별 시제품 제작                             <ul style="list-style-type: none"> <li>일반식품 3종 제형 개발</li> <li>건강기능식품 3종 제형 개발</li> </ul> </li> <li>시제품의 안정성 평가 (유통기한 설정)</li> <li>제품 출시 1종</li> </ul>
			3. 제품화를 위한 마케팅 전략 수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>수면 건강에 대한 마케팅 전략 수립</li> </ul>
			4. GLP 독성시험을 통한 소재의 안전성 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>GLP기관 단회 독성시험을 통한 소재의 안전성 평가</li> </ul>
	2018	제1협동	1. 동물실험을 이용한 시계꽃 (열매, 잎)소재의 수면장애 및 circadian 관련 요소 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>동물실험을 이용한 시계꽃 (열매, 잎)소재의 수면장애 및 circadian 관련 요소 확인</li> </ul>
			2. 선별된 key marker의 기전 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>선별된 Key marker의 기전 확립</li> </ul>
			3. 동물의 수면 유도 기능 확인을 위한 행동학적 실험 및 spermatozoa motility의 형태학적 비교를 통해 수면 유도 기능 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>동물의 수면 유도 기능 확인을 위한 행동학적 실험 및 spermatozoa motility를 비교함으로써 시계꽃의 수면 유도 기능의 규명</li> </ul>
	2019	제2협동	1. 시계꽃 (열매, 잎) 소재의 인체적용시험을 통한 수면 건강 개선 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>인체적용시험 수행 및 종료</li> <li>인체적용시험 결과보고서 작성</li> </ul>

## 나. 연구 개발 추진전략 및 방법

### (1) 수면 건강 증진 효능을 가지는 시계꽃 추출물 대량 생산

- (가) 시계꽃 식물의 식품으로 허용된 부위인 열매와 잎을 여러 방법으로 추출하여, 수면건강 증진 기능을 가지는 추출방법을 확보
- (나) 확보된 추출방법을 통한 대량공정 확립
- (다) 추출물의 지표물질 확정 및 지표성분 분석법 확립 및 밸리데이션을 통해 규격 확정

### (2) 시계꽃 추출물 소재의 안전성/효능 규명

- (가) 확보된 시계꽃 유래 추출물의 in vitro/in vivo 실험을 통해 단회 및 반복투여시 수면유도 기능성을 확인하여 이를 통해 인체적용시험시 진행할 적절한 투여 방법 및 섭취량 설정
- (나) 설정된 원료의 투여방법 및 섭취량을 바탕으로 in vitro/in vivo 연구를 통해 수면 장애를 개선하는 기전 규명
- (다) 원료의 기능성 기전 및 원료의 섭취량을 바탕으로 인체적용시험 프로토콜 개발을 통해 인체적용시험으로 효능 평가

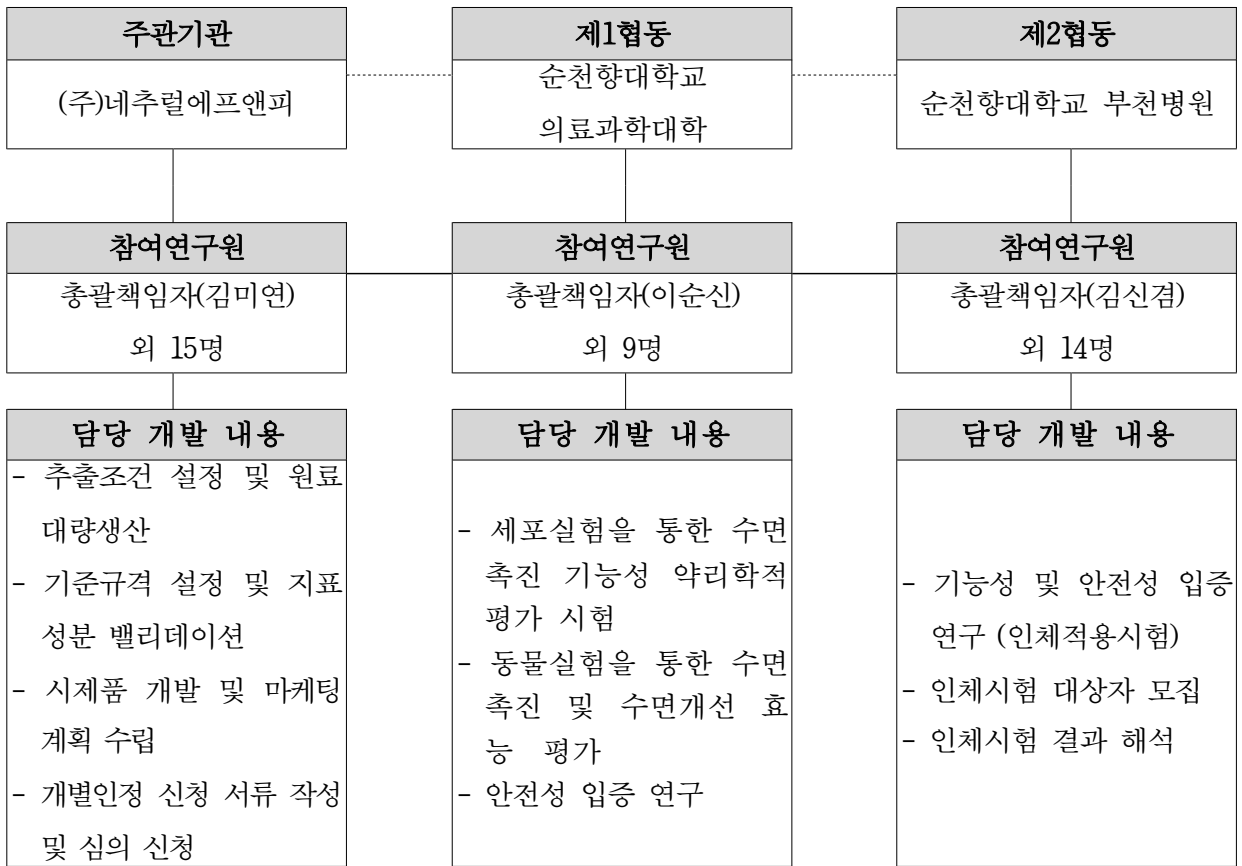
### (3) 수면 건강에 도움을 주는 개별인정형 원료 등재

- (가) 확립된 대량공정 및 원료의 규격/동물 및 인체 효력 기능성 자료/안전성 자료 등을 토대로 식품의약품안전처에 개별인정형 원료 승인에 필요한 증명서, 논문 준비
- (나) 서류 작성 및 심의 신청을 통하여 원료 기능성 인정

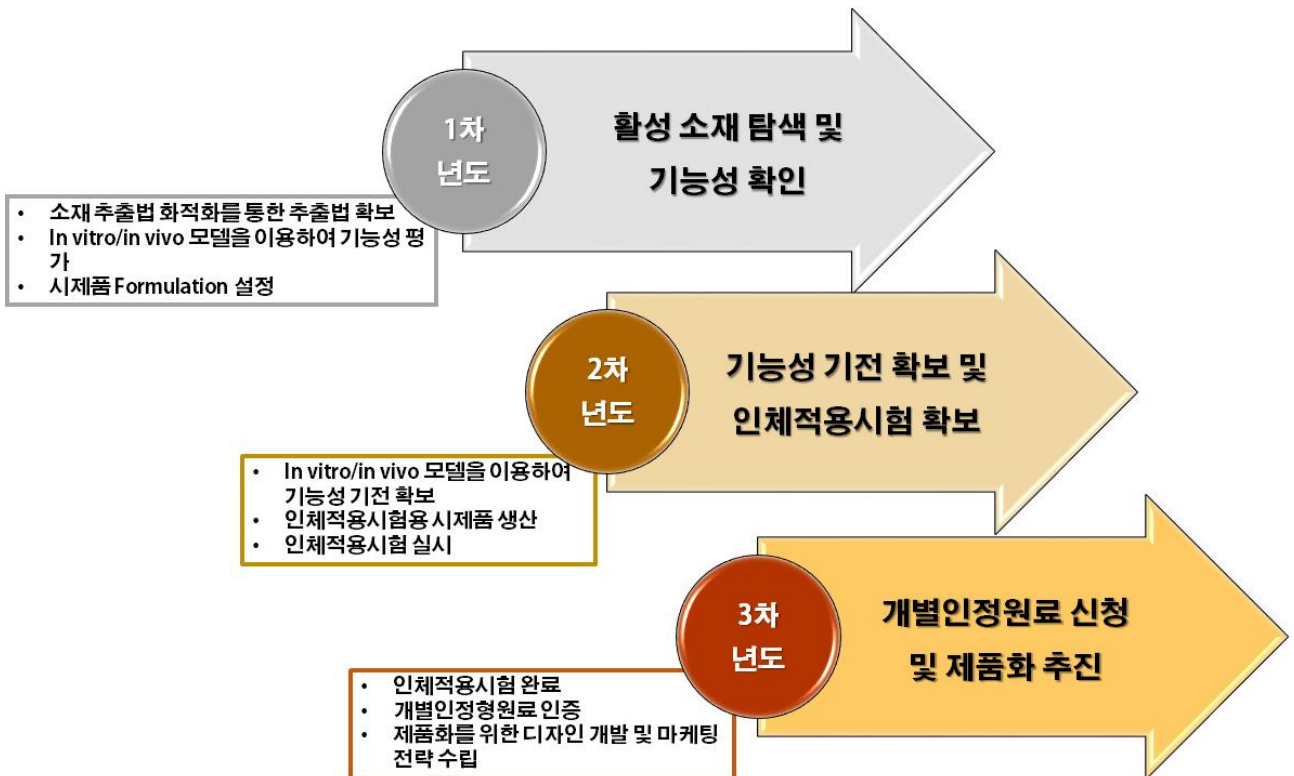
### (4) 수면 건강에 도움을 주는 제품 출시

- (가) 개별인정형 원료 승인으로 국민의 건강 증진에 도움을 주는 건강기능식품 제품화를 위한 마케팅 전략 수립
- (나) 소비자 선호도 조사를 통한 관능 및 디자인 개발

(4) 연구 개발을 위한 추진 체계



(5) 연차별 추진전략 모식도



(6) 연구개발 추진 일정

1차년도																
일련번호	연구내용	월별 추진 일정											연구개발비 (단위:천원)	책임자 (소속기관)		
		12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11	
1	국내산 시계꽃 소재 기능성분 추출 조건 확립	■	■	■	■										80,000	민은설 ((주)네추럴에프앤피)
2	원재료 지표물질 설정 및 시험법 확립				■	■	■	■	■	■					20,000	민은설 ((주)네추럴에프앤피)
3	대량생산 제조공정 표준화									■	■	■	■	■	20,000	민은설 ((주)네추럴에프앤피)
4	안전성 평가										■	■	■	■	5,000	민은설 ((주)네추럴에프앤피)
5	해외시장 및 NDI 조사			■	■	■	■	■							10,000	민은설 ((주)네추럴에프앤피)
6	수면 장애 및 circadian thym 장애에 대한 동물모델의 확립	■	■	■	■										35,000	이순신 (순천향대학교)
7	in vitro 및 in vivo 를 통한 신계 흥분 조절 효과 확인					■	■	■	■						35,000	이순신 (순천향대학교)
8	소재의 적정투여경로 및 투여용량의 설정							■	■	■	■				40,000	이순신 (순천향대학교)
9	수면 장애에 의한 기타 질환개선 모델 도입										■	■	■	■	25,000	이순신 (순천향대학교)
10	C.elegans를 통한 소재의 다양한 능력 스크리닝 모듈 확립									■	■	■	■	■	15,000	이순신 (순천향대학교)
2차년도																
일련번호	연구내용	월별 추진 일정											연구개발비 (단위:천원)	책임자 (소속기관)		
		12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11	
1	소재의 공정 표준화 확정	■	■	■	■	■	■	■	■						20,000	민은설 ((주)네추럴에프앤피)
2	인체적용시험용 시제품 생산 (위약/진약)					■	■	■	■	■	■				8,000	민은설 ((주)네추럴에프앤피)
3	소재를 이용한 시제품 개발										■	■	■	■	8,000	민은설 ((주)네추럴에프앤피)
4	동물 실험을 이용한 소재의 수면장애 및 circadian 요소 평가	■	■												20,000	이순신 (순천향대학교)

5	수면장애에 의한 다양한 질환의 전 효과 평가													30,000	이순신 (순천향대학교)
6	신경전달물질의 변화 및 동물의 행동학적 변화 측정													30,000	이순신 (순천향대학교)
7	시계꽃 유래 소재의 기전 예측													20,000	이순신 (순천향대학교)
8	C.elegans 모델을 통한 소재 표준화 데이터 제공													10,000	이순신 (순천향대학교)
9	수면 장애와 개선 효과에 대한 기초 자료 분석													6,000	김신겸 (순천향대학교)
10	인체적용시험을 통한 수면 개선 효과 (개시)													38,000	김신겸 (순천향대학교)

3차년도

일련번호	연구내용	월별 추진 일정											연구개발비 (단위:천원)	책임자 (소속기관)	
		12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11
1	시제품 개발 (일반식품 및 건강기능식품 제형)													10,000	김미연 ((주)네추럴에프앤피)
2	제품화를 위한 마케팅 전략 수립													8,000	김미연 ((주)네추럴에프앤피)
3	GLP 독성시험을 통한 소재의 안전성 확보													5,000	김미연 ((주)네추럴에프앤피)
4	개별인정형원료 허가 신청 및 승인													15,000	김미연 ((주)네추럴에프앤피)
5	동물실험을 이용한 소재의 수면 장애 평가 (식약처 가이드라인)													20,000	이순신 (순천향대학교)
6	소재의 수면 건강 개선 기전 확인													20,000	이순신 (순천향대학교)
7	소재의 수면유도 기능의 유의적 차이 규명													19,900	이순신 (순천향대학교)
8	인체적용시험을 통한 수면 개선 효과 (종료)													150,000	김신겸 (순천향대학교)
9	인체적용시험 결과 보고서 작성													29,000	김신겸 (순천향대학교)

다. 연구개발 성과

(1) 특허 성과

(가) 출원 7건

- ① 출원번호 : 10-2017-0162105  
특허명 : 시계꽃 추출물을 이용한 항균용 조성물  
출원인 : (주)네추럴에프앤피, 순천향대학교 산학협력단
- ② 출원번호 : 10-2017-062103  
특허명 : 시계꽃 추출물을 이용한 뇌기능 향상 및 뇌질환 예방용 조성물  
출원인 : (주)네추럴에프앤피, 순천향대학교 산학협력단
- ③ 출원번호 : 10-2017-0162104  
특허명 : 시계꽃 추출물을 이용한 세포 생존율 증진용 조성물  
출원인 : (주)네추럴에프앤피, 순천향대학교 산학협력단, 호서대학교 산학협력단
- ④ 출원번호 : 10-2017-0160414  
특허명 : 시계꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 수면장애의 예방 개선 또는 치료용 조성물  
출원인 : (주)네추럴에프앤피
- ⑤ 출원번호 : 10-2019-0059902  
특허명 : 시계꽃 추출물을 함유하는 수면 유도용 조성물  
출원인 : 순천향대학교 산학협력단
- ⑥ 출원번호 : 10-2019-0059901  
특허명 : 시계꽃 추출물을 함유하는 수면시간 향상용 조성물  
출원인 : 순천향대학교 산학협력단
- ⑦ 출원번호 : 10-2019-0059900  
특허명 : 시계꽃 추출물을 함유하는 기억력 감퇴 및 건망증의 개선, 예방 또는 치료용 조성물  
출원인 : 순천향대학교 산학협력단

(나) 등록 1건

- ① 등록번호 : 10-1828023  
등록연도 : 2018년  
특허명 : 시계꽃 추출물을 함유하는 항균용 조성물  
권리권자 : 순천향대학교 산학협력단  
출원번호 : 10-2016-0139092

(2) 학술성과

(가) 논문 게재 성과



번호	게재연도	논문명	저자명	학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분	기관
1	2017	Serum Vitamin D Level Related to Coffee Original Article Consumption in Korean Young Adults Using the 5th Korea National Health and Nutrition Examination Survey	Hae-Hyeog Lee, Hee Sook Lim, Dong-Won Byun, Bo-Ra Lee, Temuulee Enkhbold, Tae-Hee Kim	대한골대사학회지	24(3)	국내	비SCI	제2협동
2	2017	Role Identification of Passiflora incarnate L.: a mini review	Mijin Kim, Hee-Sook Lim, Hae-Hyeog Lee, Tae-Hee Kim	Journal of Menopausal Medicine	23(3)	국내	비SCI	제2협동
3	2018	Sharing Pathological Mechanisms of Insomnia and Osteoporosis, and a New Perspective on Safe Drug Choice	Sun Shin Yi, So o-Ho Chung, Pa n Soo Kim	Journal of Menopausal Medicine	24 (3): 143-149	국내	비SCI	제1협동
4	2019	Improvement in neurogenesis and memory function by administration Of Passiflora incarnata L. extract applied to sleep disorder in rodent models	Gwang-Ho Kim, Kyunghyun Lim, Hae Sung Yang, Ji-Kwang Lee, Yehlim Kim, Sang-Kyu Park, So-Hyeon Kim, Suhyeon Park, Tae-Hee Kim, Jong-Seok Moon, In Koo Hwang, Ye o Sung Yoon, H yung Seok Seo, Sung Min Nam, Mi-Yeon Kim, S eul Gi Yoon, Je Kyung Seong, S un Shin Yi	Journal of Chemical Neuroanatomy	98: 27-40	국외	SCI	제1협동

(나) 학술 발표 성과

번호	발표 일시	발표제목	발표자	학회명	발표 형태	국내외 구분	기관
1	2016	시계꽃 추출물의 다양한 효능 발 견 및 평가	이순신	2016 조직세포 검사학회	구연	국내 (서울)	제1 협동
2	2016	Neurogenesis in the hippocampu s is increased by passiflora inca rnate ethanol extracts administra tion in DBA/2 mice.	이순신	한국실험동물학회 국제심포지엄	포스 터	국내 (경주)	제1 협동
3	2017	Passion flower(Passiflora incarna te L.) extract oral administration shows highly increased neuronal differentiation at the hippocamp al dentate gyrus	이순신	The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscienc e Society	포스 터	국외 (일본)	제1 협동
4	2018	Novel effect of enhancing cogni tive function and anti-Alzheimer 's disease by Passion flower	이순신	2018 한국실험동물 학회 동계심포지엄	포스 터	국내 (원주)	제1 협동
5	2018	Verifying sleep-inducing effects by short-term oral administratio n of high-concentrated Passiflor a incarnata L. extracts in experi mental animals	이순신	2018 KALAS international symposium	포스 터	국내 (부산)	제1 협동
6	2018	Passiflora incarnata L. has pote ntial effects on anti-Alzheimer's Disease	이순신	26회 기초의학학술대회	포스 터	국내 (서울)	제1 협동
7	2018	Passiflora incarnata L. has pote ntial effects against Insomnia	이순신	26회 기초의학학술대회	포스 터	국내 (서울)	제1 협동
8	2018	시계꽃 추출물의 그람양성균 증 식 억제 효과 검증	이순신	2018 조직세포 검사학회	구연	국내 (서울)	제1 협동
9	2018	Psychological Factors associated with Sleep Misperception with Primary Insomnia	이지원	대한신경정신의학 회 추계학술대회	포스 터	국내 (부산)	제2 협동
10	2018	Psychological Factors associated with Sleep Misperception with Primary Insomnia	이지원	Society for Mental Health Research 2018 Conference	포스 터	국외 (호주)	제2 협동
11	2019	Effects of Passiflora incarnata L innaeus on polysomnographic sle ep parameters in subjects with insomnia disorder: A double-blin d randomized placebo-controlled study	이지원	2019년 대한신경 정신의학회 춘계학술대회	포스 터	국내 (서울)	제2 협동
12	2019	Sleep Misperception in Patients With Insomnia and Sleep Apnea	김신경	2019 Annual Meeting of Americ an Psychiatric Association	포스 터	국외 (미국)	제2 협동

(3) 기술인정 성과 (주관기관)

건강기능식품 기능성원료 인정 접수 완료 (접수번호 : 20190284918)

번호	민원사무명	접수번호	신청일	증명서 출력여부	진행사항	처리결과
	신청기관		접수일		상세내역	
6	건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)	20190284918	2019-06-20	-	신청	-
	식품의약품안전평가원 영양기능연구팀		-			

라. 연구결과

(1) 주관연구기관

(가) 시계꽃의 열매, 잎으로 부터 성분 추출 최적화 및 대량 생산 공정 확립

① 원료 수급

- ㉔ 시계꽃 열매의 경우 8월 ~ 9월초 확보 가능, 국내 정읍, 고창, 담양, 제주에서 재배
- ㉕ 시계꽃 열매는 대부분 생식용 과일로 kg당 15000원 정도의 가격으로 유통 판매되고 있으며, 생과가 아닌 가공용 열매로의 수확량 및 활용이 한정적이었음.  
호광성 작물이고 아열대성 작물로 국내에 도입되어 노지 및 하우스 재배로 생과를 생산하고 있으나, 최근 고온현상으로 시계꽃 수정이 원활하지 않아, 열매가 열리지 않는 등 농가에서 피해가 발생됨에 따라 수익 창출이 원활하게 진행되지 않았고 이에 재배를 포기하는 농가 발생 등 국내 남부지역과 제주도에 시계꽃 재배 확산이 더디게 진행되고 있음.
- ㉖ 시계꽃 잎은 열매수확 직후에 일부 회수하여 비료로 활용하거나, 폐기되는 원료로, 원료의 확보시기가 매우 제한적이었음.
- ㉗ 시계꽃 과실의 섭취 및 판매가 확대되어야 하고, 시계꽃 재배법이 안정이 되어 농가 피해없이 확대되어야 줄기 잎 지상부의 확보가 안정화될 것으로 보임. 생산되는 시계꽃 열매에 대한 공급 계약없이, 본 연구소재인 줄기 잎 부위에 대한 물량 확보가 어려워 농가로 부터 저가로 원료 확보가 어려웠음.
- ㉘ 국내 시계꽃 재배가 안정화 되는 시기까지 해외산과 병용하여 원료 수급을 진행할 필요가 있음.

표3. 원료 건조 수율 (%)

부 위	건조 수율 (%)
시계꽃 열매	16
시계꽃 잎	10



그림19. 시계꽃 열매 건조물



그림20. 시계꽃 잎 건조물

② 시계꽃 식물 부위별 추출 조건 확립

- ㉠ 원료 추출시 사용되는 용매 및 원료의 부위 비율에 따라 고형분 함량이 다름을 확인.
- ㉡ 시계꽃 열매의 비율이 감소되고 잎의 비율이 증가될수록 고형분 함량이 증가되는 것을 확인 할 수 있음.

표4. 추출조건에 따른 고형분 함량

번호	시계꽃 열매(g)	시계꽃 잎(g)	물(ml)	EtOH (ml)	추출온도 (°C)	고형분 함량(%)
1	1000	0	10000	0	80	2.70
2	800	200	10000	0	80	3.00
3	500	500	10000	0	80	2.90
4	200	800	10000	0	80	2.70
5	0	1000	10000	0	80	3.10
6	1000	0	5000	5000	80	2.80
7	800	200	5000	5000	80	3.10
8	500	500	5000	5000	80	3.30
9	200	800	5000	5000	80	3.30
10	0	1000	5000	5000	80	3.40
11	1000	0	3000	7000	80	3.20
12	800	200	3000	7000	80	3.20
13	500	500	3000	7000	80	3.60
14	200	800	3000	7000	80	3.70
15	0	1000	3000	7000	80	3.70

③ 대량생산 최적 제조 조건 선정

㉔ 파일럿 생산을 통한 품질 비교

제조조건별 품질 비교한 결과는 표5와 같음.

표5. 제조조건별 품질 비교

	A	B	C	D	E	F
시계꽃 사용부위	열매, 잎	<b>열매, 잎</b>	꽃	열매, 잎	꽃	열매, 잎
추출용매	50% EtOH	<b>70% EtOH</b>	50% EtOH	60% EtOH	50% EtOH	50% EtOH
부형제	덱스트린, 이산화규소	<b>덱스트린, 이산화규소</b>	덱스트린	덱스트린	덱스트린	덱스트린
농축비율	3.5~7 / 1	<b>4~6 / 1</b>	10 / 1	3.5~5 / 1	10 / 1	4.5 / 1
지표성분 함량	0.35%	<b>0.30%</b>	1.88%	0.21%	2.0%	0.19%
성상	갈색 또는 엷은 갈색 의 분말	<b>갈색의 분말</b>	갈색의 분말	엷은 갈색 의 분말	갈색의 분말	엷은 갈색 의 분말

- 대량 생산을 위하여 A 조건으로 파일럿 생산 완료 및 표준화를 진행하였으나, 낮은 제조 수율로 인한 원료가 상승으로 인하여 생산 불가로 애로사항 발생.
- 이에, 다수의 제조조건으로 파일럿 생산을 진행함으로써 적합한 대량생산 조건 선정.
- C와 E 조건의 경우, 높은 농축 비율과 지표성분의 함량 및 제조 수율로 인하여 적합하였으나, 국내에서 식품에 사용할 수 없는 부위인 꽃을 사용하여 부적합 제외함.
- F의 경우, 다른 조건에 비하여 텍스트린 높여 제조 수율이 증가하였으나 자사 분석법을 통한 지표 성분 함량 확인 결과 0.19%로 낮은 함량이 도출되어 제외함.
- D의 경우, 최초 선정하였던 A 조건 농축비율에 적합한 원료로 제조하였으나, F와 같이 지표성분의 함량 확인 결과 0.21%로 낮은 함량으로 인하여 제외함.

#### ㉠ 제조조건 선정

- 실험실에서 확립된 최적 추출용매인 70% EtOH 사용하여 제조 수율을 높임.
- 최종 제품의 분말 특성 상, 습기에 약한 것으로 판단되어 이산화규소를 소량 첨가함.
- 최종 B조건으로 대량생산 제조조건 결정.

#### ④ 최적화 제조공정도

##### ㉠ 시계꽃 지상부를 이용한 최적의 제조공정도를 설정함.

- 건조된 시계꽃 원료를 분쇄하여 추출 진행.
- 여과 및 농축 단계 진행.
- 말토텍스트린을 첨가하여, 분무 건조 진행. 추출분말의 용해도를 높여 제품화 시 여러 제형으로 개발될 수 있도록 제조함.

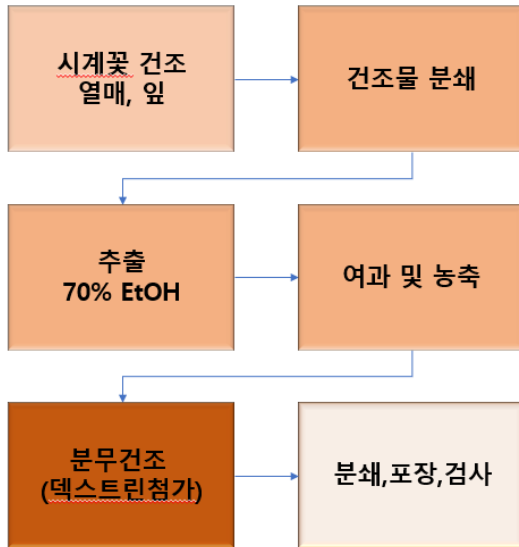


그림21. 제조공정도



그림22. 시계꽃 추출 분말



그림23. 추출 농축 및 분무건조 설비

㉔ 대량공정 단계에 따른 지표물질 함량 측정 결과

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	수율(kg)
시계꽃 잎, 열매				175~250
↓				
추출	70% 에탄올	**°C, **hr	0.5	
↓				
농축		**°C		
↓				
살균, 필터		95°C,		50
↓				
말토덱스트린 혼합	**%			
↓				
건조 및 분쇄		Spray-Dry		
↓				
시계꽃 추출분말		수분함량 : **% 미만	3.0	100

(나) 시계꽃 추출물의 지표성분 설정

- ① 시계꽃의 주요 성분인 flavonoids는 GABA 수용체의 GABA 부위에 결합함으로써 수면에 영향을 주는 것으로 보고되어 있음.
- ② 시계꽃의 플라보노이드 종류에 대한 문헌조사 결과 14종이 확인됨. 14종의 성분 중 benzodiazepine 수용체 사이에 상호 작용의 기능성이 있는 플라보노이드 성분인 vitexin, chrysin, rutin을 후보 물질로 선정함.

시계꽃에서 검출된 플라보노이드 성분 (14종)	chrysin, vitexin, vicenin- II, swertisin, schaftoside, saponarin, rutin, orientin, lucenin- II, isovitexin, isoschaftoside, isoorientin, 2-O-glucoside isovitexin, 2-O-glucoside isoorientin
---------------------------	--

- ③ 기능성 성분 중 지표성분으로 가장 중요한 항목인 안정성이 확보된 성분을 최종 물질로 선정하고자 위 3종의 성분을 각각 flavonoid C-Glycoside의 vitexin 및 flavonoid O-Glycoside의 rutin, aglycones의 chrysin으로 구분하여, 성분 안정성에 대한 문헌조사 결과, flavonoid C-Glycoside는 flavonoid O-Glycoside, aglycones 보다 효소와 산에 안정하며, C-Glycoside는 고온 고압 처리시에만 분해되므로 열처리 과정에서도 vitexin > rutin > chrysin 순서로 성분이 안정한 것으로 보고되어 시계꽃의 기능성분 중 본 신청 원료의 지표성분으로 vitexin을 선정하게 하게 됨.



- ④ 따라서, 본 연구과제에서 제조한 시계꽃 열매, 잎 추출물에 vitexin의 함유 여부를 확인하고 그 함량을 측정함. 또한 vitexin 분석 방법을 설정하고 분석법 validation을 시행함.

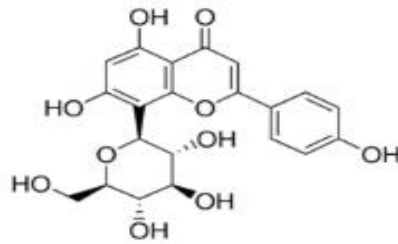


그림24. vitexin의 구조

(다) 지표물질 분석방법 확립 및 validation

① 지표물질 분석방법 validation

시계꽃 추출물의 지표물질 validation

- 분석방법

표6. HPLC 분석 조건

Item	Condition
Injection	20 ul
Column	Shim-pack vp ODS C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Shimadzu)
Mobile Phase	A solvent : 0.1% phosphoric acid B solvent : acetonitrile A : B = 87% : 13% (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector(nm)	360nm

- 지표성분 함량 계산법

$$\text{VITEXIN 함량 (mg/g)} = C \times V / W$$

C : 시험용액중의 vitexin 농도 (mg/ml)

V : 시험용액의 전량 (ml)

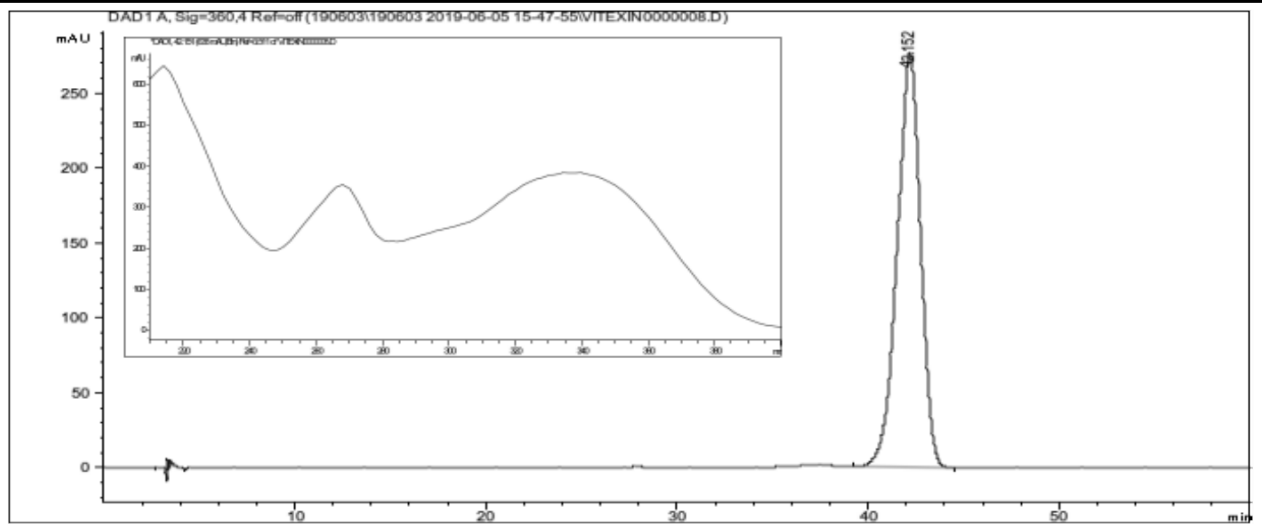
W : 시료채취량 (g)

- 분석방법 Validation

표7. 특이성

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분)		유해물질 (정량시험)
		정량시험	확인시험	
특이성 (Specificity)	불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력	예	예	예

표준용액의 크로마토그램(RT 42.152) 및 스펙트럼



시험용액의 크로마토그램(RT 42.584) 및 스펙트럼

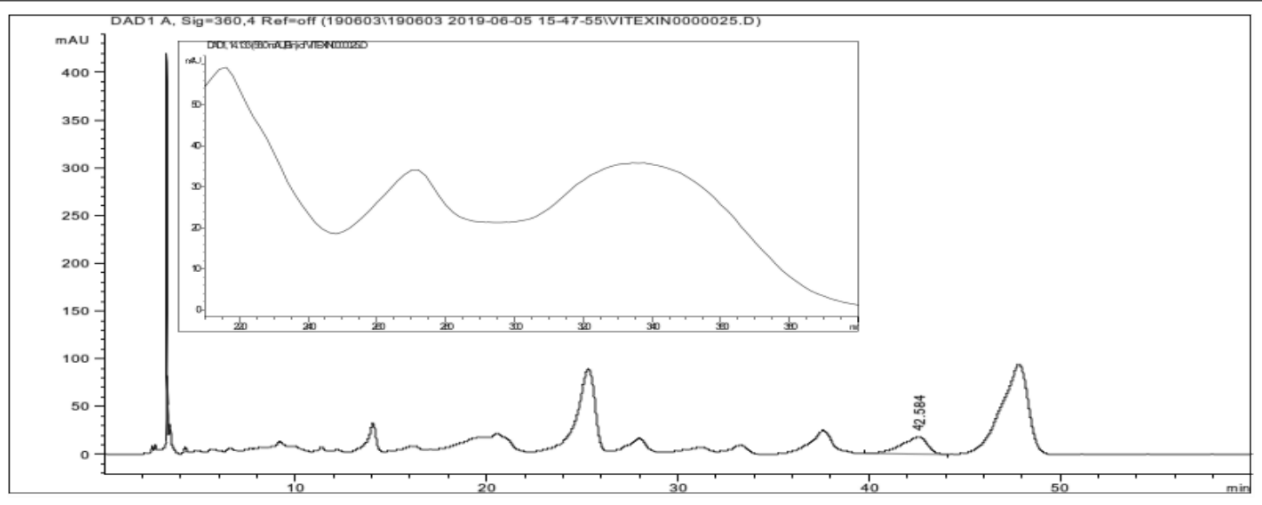


표8. 정확도

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분)		유해물질 (정량시험)
		정량시험	확인시험	
정확도 (Accuracy)	측정값이 이미 알고 있는 참조값에 근접한 정도	예	아니오	예

구분	합량(μg)		
	87.0	43.0	20.0
1	100.16	101.23	100.57
2	99.88	100.77	103.30
3	99.91	101.27	102.22
합량별 평균회수율(%)	99.98	101.09	102.03
전체 평균회수율(%)	101.03		
회수율 구간(%)	99.98 ~ 102.03		

표9. 정밀도

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분)		유해물질 (정량시험)
		정량시험	확인시험	
정밀도 (Precision)	균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)	예	아니오	예

<반복성>

구분	검체량		
	500 mg	1,000 mg	1,500 mg
1	1.94	2.04	2.08
2	1.95	2.05	2.09
3	1.85	2.03	2.09
4	1.87	2.04	2.09
5	1.89	2.02	2.07
분석값(μg/g)	1.90	2.04	2.08
RSD(%) [검체 측정값에 대한 RSD]	2.23	0.52	0.46
RSD 구간(%)	0.46 ~ 2.23		

<재현성>

구분	실험실	
	A	B
1	2.14	2.17
2	2.12	2.09
3	2.10	2.13
4	2.07	2.08
5	2.08	2.09
분석값(mg/g)	2.10	2.11
RSD(%) [검체 측정값에 대한 RSD]	1.53	

표10. 정량한계

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분)		유해물질 (정량시험)
		정량시험	확인시험	
정량한계 (Quantitation Limit)	적절한 정밀도와 정확도를 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량	아니오	아니오	예

1		2		3	
함량(μg)	피크 면적(Au)	함량(μg)	피크 면적(Au)	함량(μg)	피크 면적(Au)
0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
4.73	101.0	4.96	99.8	9.33	231.5
9.46	213.1	9.91	242.5	13.99	355.5
47.3	1010.8	49.55	1175.6	139.91	3262.8
283.79	6505.6	297.3	7207.2	466.35	12065.7
472.98	10800.8	495.5	11954.9	746.16	19077.5
기울기	22.89	기울기	24.17	기울기	25.70
y절편	-16.82	y절편	-6.62	y절편	-60.76
기울기 평균(s)	24.25		y절편의 표준편 차(σ)	28.77	
정량한계	11.86				

표11. 정량한계

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분)		유해물질 (정량시험)
		정량시험	확인시험	
정량한계 (Quantitation Limit)	적절한 정밀도와 정확도를 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량	아니오	아니오	예

1		2		3	
함량(μg)	피크 면적(Au)	함량(μg)	피크 면적(Au)	함량(μg)	피크 면적(Au)
0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
4.73	101.0	4.96	99.8	9.33	231.5
9.46	213.1	9.91	242.5	13.99	355.5
47.3	1010.8	49.55	1175.6	139.91	3262.8
283.79	6505.6	297.3	7207.2	466.35	12065.7
472.98	10800.8	495.5	11954.9	746.16	19077.5
기울기	22.89	기울기	24.17	기울기	25.70
y절편	-16.82	y절편	-6.62	y절편	-60.76
기울기 평균(s)	24.25		y절편의 표준편 차(σ)	28.77	
정량한계	11.86				

표12. 직선성

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분)		유해물질 (정량시험)
		정량시험	확인시험	
직선성 (Linearity)	적절한 정밀도, 정확도 등을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상 물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력	예	아니오	예

반복수	1차		2차		검량선
	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	피크면적	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	피크면적	
1	0.00	0.0	0.00	0.0	
2	49.55	1175.6	99.10	2267.5	
3	297.30	7207.2	297.30	7195.8	
4	495.52	11954.9	495.50	12316.2	
5	792.80	19021.2	792.80	19152.5	
6	991.00	23714.8	991.00	23628.8	
기울기	23.948		24.012		
y절편	30.521		51.858		
r2	1		0.9995		

(라) 원료의 지표물질 함량 확인 및 규격설정

국내 공인시험기관에서 원료 3 LOT에 대한 3 반복 분석 실험한 결과 평균은 2.1mg/g으로 결과값의 80~120% 범위를 규격으로 설정함.

표13. 한국 기능식품연구원 분석결과

Lot No. 반복수	1 (Lot N9105701)	2 (Lot S8492701)	3 (Lot J8052701)	평균
1반복	2.11	2.12	2.12	
2반복	2.13	2.10	2.11	
3반복	2.11	2.13	2.10	
평균	2.12	2.12	2.11	2.11

제 426호 (제정) 2019. 05. 02  
 문서확인 CVPO-4A36-R87N

### 시험·검사성적서

제품명	시계꽃추출분말	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명 (주)네추럴에프앤씨	성명	이원직
주소	충청북도 청주시 오창읍 양창송대원 39, 1층		
제조번호	J8052701	접수년월일	2019-04-23
검사의뢰목적	제출용	접수번호	D2019042110

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.  
 시험·검사 완료일: 2019-05-02  
 시험·검사 확인자: 김영경  
 검사관련 출력일자: 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Vitexin(mg/g)	2.11 mg/g(2.12, 2.11, 2.10)	장은숙

분석법-일체계통

2019년 05월 02일

**한국 기능 식품 연구원**

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화번호 031-331-6228-0400-1





(마) 시계꽃 추출물의 안전성 확보

검사 항목 : 중금속, 미생물, 대장균군, 이물, 잔류농약, 알칼로이드, 단회치사량

① 중금속

국내 공인분석기관 검사결과를 고려하여 중금속 안전성 규격을 설정함.

표14. 국내 공인분석기관 중금속 검사결과

구분	신청 원료 3 Lot 실측치 평균값	제안규격	최대 섭취량에 의한 1일 최대 노출량	1일 최대 노 출 허용량
납	0.0245 mg/kg	1.0 µg/g	0.06 µg/일	10.8 µg/일
총비소	불검출	1.0 µg/g	0.06 µg/일	150 µg/일
카드뮴	0.0201 mg/kg	0.3 µg/g	0.018 µg/일	3.0 µg/일
총수은	0.0534 mg/kg	0.5 µg/g	0.03 µg/일	2.1 µg/일

② 대장균군 및 이물

대장균군 이물에 대한 자사 검사 결과 대장균군 및 이물이 모두 불검출로 안전성 확인됨.

시험지시 및 성적서 TEST INSTRUCTION & REPORT					
고유번호 Code No. 13695	품명 Material 시계꽃추출물분말[표선물리위]		제조번호 Lot No. A033/088/A16	공급처 Supplier (주)네추럴에프앤피	
수량 Quantity 25,000	제조일자 Date.MFG 2016년02월02일	제조처 Manufactured by	뢰뢰일자 Date.request 2016년03월08일	뢰뢰번호 Requestion No. 16-0482	
발뢰뢰의뢰 Additional information 시계꽃 국책과제용				유풐기 한 Date.Exp 2018년01월30일	
입수일 2016년03월08일	시험번호 Analysis No 16-0482	시험뢰뢰자 Sampler 강세희	시험뢰뢰일 Date. sampling 2016년03월08일	시험뢰뢰장소 Sampling place 원료창고	시험뢰뢰량 Amount of sample 30
포장상태 Condition of package 양호	라벨상태 Condition of label 양호	저장상태 Condition of storage 양호	시험뢰뢰자 의견 Comment of sampler 이물없음		입수뢰뢰 담당 확인 강세희 03/08/16
시험항목 Item	시험기공 Specifications	시험결과 Results	시험자 Tested by	시험일 Date tested	
1. 산	고유의 색택을 가지고 이이.이취가 없어야 한다.	적합	강세희	2016.03.08	
2. 물	불검출	불검출	강세희	2016.03.08	
3. 분(%)	8.0 이하	적합	-	-	
4. 대장균군	음 성 (35-37℃.48±3시간)	음 성	강세희	2016.03.08-3.10	
결과 Results	확인 Checked by 강세희	승인 Approved by 이-은서	승인일자 Date 2016.03.10		



Q004-01 서식

③ 미생물 및 잔류농약

국내 공인분석기관에서 미생물 및 정밀검사대상 잔류농약 검사항목에 대하여 시험을 진행하고 안전성 관련 자료를 확보함.

제 D2019042407 호 분석확인 X970-EVQJ-6134			
시험·검사성적서			
제품명	시계꽃추출분말		제조일자 (유통기한)
의뢰인	업체명	(주)태우일여프렌리	성명
주소	충청북도 청원군 오창읍 양청송대인 39, 1층		
주소	충청북도 청원군 오창읍 양청송대인 39, 1층		
제조번호	NH106701	접수날일	2019-04-23
검사뢰과목	계승용	접수번호	D2019042407
귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.			
시험·검사 완료일 : 2019-05-07			
시험·검사 책임자 : 이정주			
검사관련 총 책임자 : 김진희			
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	
Diazinon(mg/kg)	불검출	연주혜	
DDT(mg/kg)	불검출	연주혜	
Dicofol(mg/kg)	불검출	연주혜	
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	연주혜	
Malathion(mg/kg)	불검출	연주혜	
Methomyl(mg/kg)	불검출	이선미	
Methidathion(mg/kg)	불검출	연주혜	
BHC(mg/kg)	불검출	연주혜	
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	연주혜	
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	연주혜	
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	연주혜	
Boscalid(mg/kg)	불검출	이선미	
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출	이선미	
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	연주혜	
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	이선미	
Azoxystrobin(mg/kg)	불검출	이선미	
Atrazine(mg/kg)	불검출	연주혜	
Ethion(mg/kg)	불검출	연주혜	
Endosulfan(mg/kg)	불검출	연주혜	
Imazalil(mg/kg)	불검출	연주혜	



시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Isoprothiolane(mg/kg)	불검출	연주혜
Iprodione(mg/kg)	불검출	연주혜
Carbaryl(mg/kg)	불검출	이선미
Carbofuran(mg/kg)	불검출	이선미
Captafent(mg/kg)	불검출	연주혜
Quintozene(mg/kg)	불검출	연주혜
Chlorothalonil(mg/kg)	불검출	연주혜
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	연주혜
Chlorfenapyr(mg/kg)	불검출	연주혜
Trisdimefent(mg/kg)	불검출	연주혜
Triazophos(mg/kg)	불검출	연주혜
Triflumizole(mg/kg)	불검출	연주혜
Triflumuron(mg/kg)	불검출	연주혜
Thiamethoxam(mg/kg)	불검출	이선미
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	연주혜
Piclobutrazol(mg/kg)	불검출	연주혜
Permethrin(mg/kg)	불검출	연주혜
Penitrothion(mg/kg)	불검출	연주혜
Fenvalerate(mg/kg)	불검출	연주혜
Phenthoate(mg/kg)	불검출	연주혜
Fenpropathrin(mg/kg)	불검출	연주혜
Fenhexamid(mg/kg)	불검출	이선미
Phosmet(mg/kg)	불검출	연주혜
Procymidone(mg/kg)	불검출	연주혜
Prochloraz(mg/kg)	불검출	연주혜
Profenofos(mg/kg)	불검출	연주혜
Flubendiamide(mg/kg)	불검출	이선미
Pyraclostrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Pyrimethanil(mg/kg)	0.0022 mg/kg	이선미
Pirimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	연주혜
Fludioxonil(mg/kg)	불검출	연주혜
Dimethoate(mg/kg)	불검출	연주혜
Chlorantraniliprole(mg/kg)	불검출	연주혜



시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Chlorobenzuron(mg/kg)	불검출	이선미
Pipronil(mg/kg)	불검출	연주혜
Luftenuron(mg/kg)	불검출	이선미
Tebuconazole(mg/kg)	불검출	연주혜
2,6-Diisopropyltriazothalene(mg/kg)	불검출	연주혜

분석법-업체제출

2019년 05월 07일

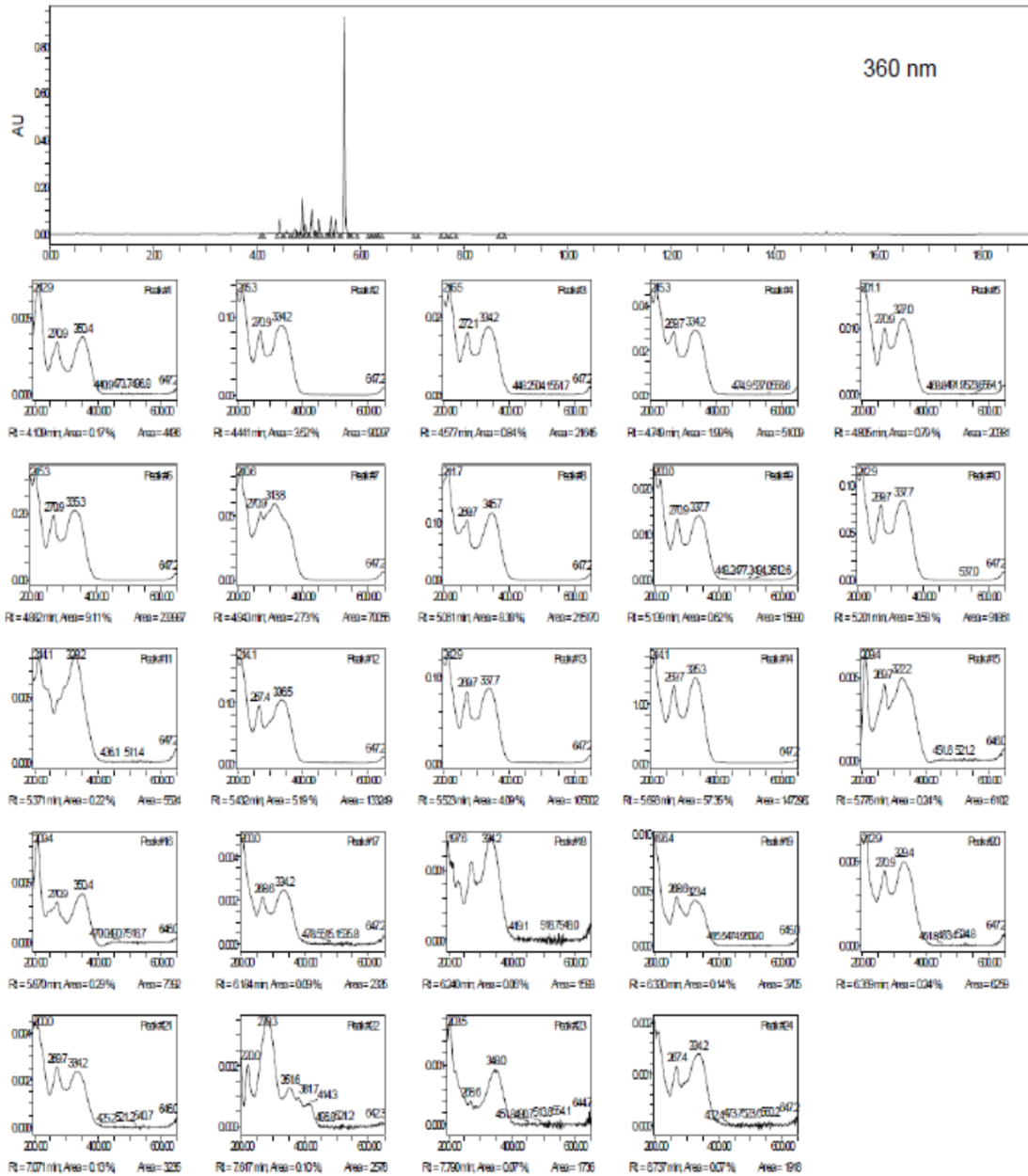
**한국기농식품연구원**

(사)한국기농식품연구원 분석확인 X970-EVQJ-6134 http://www.khsi.re.kr 전화번호 031-628-6400-1



④ 알칼로이드(환각성분)

원료 안전성에 대한 알칼로이드(환각성분)의 함유 여부 확인시 시계꽃의 열매, 잎 추출물에는 함유되지 않은 것으로 확인됨.



CUSTOMER SAMPLE	BATCH NUMBER	INTERNAL BATCH	Indole alkaloids content (expressed as harmane)
Passion flower	E048/005/A15	CS2398	Not detected (< 10 ppm)

⑤ 단회 독성 치사량

GLP기관에서 일반 경구투여 단회 독성시험 결과 치사량은 2,000mg/kg으로 판단되며, 특이한 일반 증상, 체중변화, 육안적 부검소견은 관찰되지 않았음.

Sprague-Dawley 랫드를 이용한 시계꽃 추출분말의 단회 경구투여 독성시험

최 종 보 고 서(안)

Sprague-Dawley 랫드를 이용한  
 시계꽃 추출분말의  
 단회 경구투여 독성시험  
 (시험번호 : GT18-00121)



4. 시험결과

- 1) 사망동물  
 실험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물이 관찰되지 않았다.
- 2) 일반증상  
 실험기간 동안 모든 시험동물에서 특이한 일반증상이 관찰되지 않았다.
- 3) 체중변화  
 체중측정결과, 암컷 부형제 대조군의 2 레(G1-21, G1-25 번)에서 시험물질 투여 후 7 일째 체중이 투여 후 4 일째에 비하여 감소하였다. 그 외 기간 및 시험동물에서는 정상적인 체중 증가가 관찰되었다. 통계학적 경정결과, 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 유의한 체중차이는 관찰되지 않았다.
- 4) 부검소견  
 실험종료 시 부검결과, 모든 시험동물에서 특이한 육안소견이 관찰되지 않았다.

(바) 수면건강식품 해외시장 조사 및 NDI 조사를 통한 제품화 전략

① 수면건강식품 해외 시장 조사

㉞ 세계 건강기능식품 시장현황

- 세계 건강기능식품 시장 규모는 1,179억 달러 (약 131조 원, 2015년 기준) 규모로 추산되며 연평균 7.3% 성장하여 1,677억 달러 (약 187조원, 2020년)에 이를 것으로 전망하고 있음.

<수면보조제시장 판매 동향>

(단위:백만달러)

구분	2010	2011	2012	2013	2014	2015
수면보조제	473.8	473.0	492.6	575.7	605.1	619.6

(Source: 유로모니터, 2016)

- 세계 시장에서 가장 큰 규모를 차지하는 곳은 미국으로 약 404억 달러 (약 45조 원, 점유율 34.3%) 규모이며, 중국 약 163억 달러 (약 18조원, 점유율 13.8%), 일본 약 109억 달러 (약 12조원, 점유율 9.2%) 순으로 (2015년 단일 국가 기준) 규모를 보이고 있음.

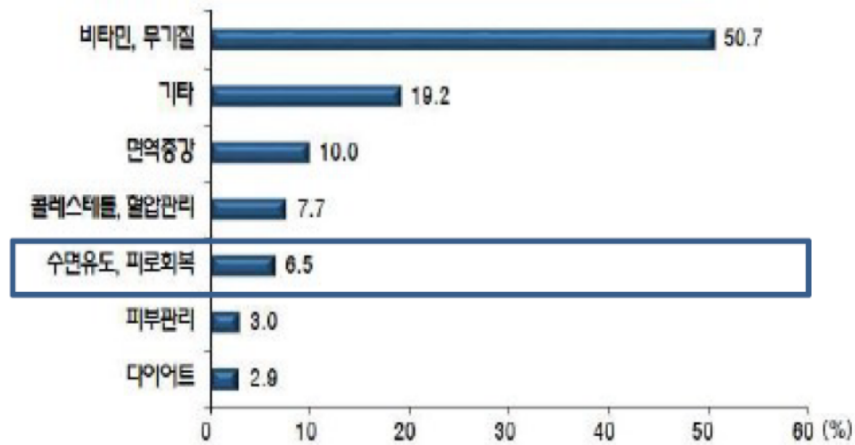


그림25. 중국시장 건강기능식품 판매 점유율(2015년 3/4분기)

[출처:1.CFDA 남방 의약경제연구소 데이터센터, 2. KOTRA 해외비즈니스포털 홈페이지]

- 한국은 21억 달러 규모의 시장을 형성하고 있으며, 세계 시장에서의 점유율은 1.78%를 차지하고 있음 (2015년 기준) (출처: IMS 2016년 통계)

㉔ 세계 수면관련 건강기능식품 제품 현황

• 소재 현황

- Melatonin

\* 순 식물성 약재 (Herbal Blend) 수면보조제이며, 특히 Kava Kava 뿌리와 Valerian 뿌리에서 추출된 식물성이므로 부작용이 거의 없는 100% 천연 수면 보조제임.

\* 흔히 알려진 부작용으로 두통, 어지러움, 복부팽만감 등이 나타날 수 있고, 보고되지 않은 중한 부작용이 있을 수 있음.

\* 국내에서는 인체의 호르몬 영향을 줄 수 있다는 보고로 식품으로써의 복용은 금하고 있음

- Valerian Root

\* 쥐오줌풀 뿌리로 수면보조, 진정, 불안제거, 항경련 등에 효과가 있으며 이완과 진정 작용에 특별한 효능이 있음.

\* 독성이 없지만 과량 복용하면 어지럼증, 방향 감각 장애 등을 유발하기도함. 그밖에 위통, 감정 둔마, 경미한 우울증, 정신 둔함 등을 동반하기도 함.

- 5-Hydroxytryptophane (5-HTP)

\* 필수 아미노산 (채내에서 생성되지 않아서 식사로 섭취해야 하는 아미노산) 중 트립토판이라는 것으로 주로 뇌의 흥분을 진정시키는 신경전달물질인 세로토닌의 원료 및 멜라토닌의 생합성 소재임.

\* 메스꺼움, 조울증, 불안, 소화불량, 피부염 등이 발생할 수 있으며 특히 심장병이 있다면 혈류로 수송되는 세로토닌이 부담을 줘서 피하여야 함.

- Passion flower extract

\* 성질은 따뜻해서 통증을 줄여주고 긴장을 풀어주므로 불안증, 불면증 등에 효과가 있음.

\* 독성이 없어서 별다른 부작용은 보고되지 않았으나 임산부는 사용을 금지하고 있음.

• 제품현황

- 중국

\* 중약대사전 <식물명실도고, 植物名實圖考>에 의하면 시계꽃은 서번련(西番蓮), 서양국(西洋菊), 전심연(轉心蓮), 옥예화(玉蕊花)라고 불리며, <사천중약지, 四川中藥誌>에서는 전지연(轉枝蓮)이라고 불린다.


\* 약용부위: 시계꽃과 식물 서번련의 전초이다.

- \* 약효: 1.<왕전상(王殿翔), 생약학(生藥學)>: 신경통, 불면증, 월경불통 및 하리(下痢)등의 증상에 쓰인다. 마취와 진통 작용이 있다.  
2.<사천중약지(四川中藥誌)>: 풍을 제거하고 열을 내리며 해수를 멎게 하고 가래를 삭인다.
- \* 용법 용량: 내복 1~3돈을 달여서 복용한다.(한돈 : 3.75g, 3.75~11.25g)

- 프랑스

프랑스 약전 (Pharmacopée Française)에 ‘Passiflora incarnata L.’ 으로 등재되어 있으며, 사용부위는 꽃과 열매로 기재되어 있다.

표15. 시계꽃 추출 분말 이용 프랑스 제품 현황

제품 사진	제품명	제조사	일일 섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도
	Passion flower	St. Francis Herb Farm	1일 1캡슐 (1500mg)	1500 mg, dried Certified Organic Passion Flower	임산부나 수유 중인 여성은 섭취 전 의사와 상담. 어린이는 섭취 금지 졸음유발	불안 및 불면증

- 유럽의약청 생약제품 평가위원회

유럽 의약청(European Medicines Agency, EMA)의 Committee for Herbal Medicinal Products (HMPC, 생약제품평가위원회)에 ‘Passiflora incarnata L.’ 으로 등재되어 있으며, 사용부위는 꽃과 열매로 기재되어 있다.

- 미국 식품의약국(FDA)





\* 미국 식품의약국(FDA)의 GRAS(Generally Recognized As Safe)에 ‘Passion flower, *Passiflora incarnata* L’ 으로 등재 되어있다.

\* 미국 FDA 웹사이트에 등재된 ‘식품첨가물현황목록 (Food Additive Status List) 에서 시계꽃의 잎과 꽃이 식품에 사용가능한 향료로 등록되어있다.

표16. 시계꽃 추출 분말 이용 미국 제품 현황

제품 사진	제품명	제조사	일일 섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도
	Passion Flower	Now Foods	1일 1-2캡슐 (700mg)	Passion flower extract ( <i>Passiflora incarnata</i> L., flower and Aerial parts)	현기증 유발할 수 있음, 임신부나 수유중인 여성은 섭취 전 의사와 상담 성인만 섭취	스트레스 완화
	Passion Flower	Solaray	1일 2캡슐 (700mg)	Passion flower whole aerial extract ( <i>Passiflora incarnata</i> L.)	임산부나 수유중인 여성은 섭취 전 의사와 상담 어린이는 섭취 금지	긴장완화
	Passion Flower Extract	Nature's Answer	1일 2캡슐 (1g)	Passion flower extract 500mg (3.5-4% isovitexin)	임산부나 수유중인 여성은 섭취 전 의사와 상담 어린이는 섭취 금지	스트레스 완화
	Passion flower extract	Puritans Pride	1일 4캡슐 (1g)	Passion flower extract 250mg	-	스트레스 완화
	Tadin Passion Flower Tea	Tadin Tea	1티백: 1g 시계꽃	Passion flower 100%	-	스트레스 및 근육 완화
	Passion flower ( <i>Passiflora incarnata</i> )	Herbal Extract Company of North America	1일 1캡슐 (360mg)	Passion flower extract 350mg	임산부나 수유중인 여성은 섭취 전 의사와 상담 어린이는 섭취 금지	불면증 및 긴장 완화




제품 사진	제품명	제조사	일일 섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도
	Passiflora 250mg	Natures Aid	1일 2캡슐 (500mg)	Passion flower extract 500mg, Lemon Balm 500mg, Avena sativa 500mg	12세 이하 섭취금지	긴장완화 및 불면증
	Nerve Relaxer	Nature's Health	1일 1캡슐 (400mg)	Passion flower extract	-	수면에 도움
	Passiflora 250mg	Nature's Plus	1일 1캡슐 (250mg)	Passion flower extract (Passiflora incarnata L.) flavonoids isovitexin 3.5~4%	-	긴장완화 및 수면 유도
	Passiflora 200mg	Eclectic Institute	1일 1캡슐 (200mg)	Freeze-dried passion flower 200mg	어린이는 섭취금지	긴장완화 및 수면 유도
	Passion flower liquid extract	Swanson	1일 1g	Passion Flower Extract (Passiflora incarnata L.)	임산부나 수유중인 여성은 섭취 전 의사와 상담 어린이는 섭취금지.	스트레스 완화

- 캐나다

캐나다 연방보건부 (Health Canada): 시계꽃 지상부 추출 분말이 수면 보조제 (일일 섭취량 : 건조 지상부 0.25~8g)로서 ‘자연건강제품 (NHP, NATURAL HEALTH PRODUCT)’의 원료로 등재되어있다.


표17. 시계꽃 추출 분말 이용 캐나다 제품 현황

제품 사진	제품명	제조사	일일 섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도
	Ortho Sleep (7가지 복합 원료)	AOR™	1일 2캡슐 복합 원료 중 64mg	lemon balm extract 300mg L-theanine 200 mg valerian Root extract 150mg GABA 100 mg L-5-Hydroxytryptophan (Griffonia Seed) 100 mg passionflower extract (3.5% vitexin) 32 mg melatonin 3 mg	임산부나 수유중인 여성은 섭취 전 의사와 상담. 어린이는 섭취 금지.	수면 유도, 수면의 질 향상

- 스위스

스위스 스위스메딕(스위스의 식약처급 기관, Swissmedic): 2002년 시계꽃 에탄올 추출 분말이 불면증, 신경과민 효과로 Swissmedic journal에 최초 인정된 후, 2022년 까지 허가가 연장되어 판매되고 있다.




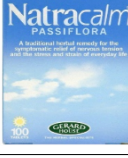
표18. 시계꽃 추출 분말 이용 스위스 제품 현황

제품사진	회사명 (제품명)	원료	효과	일일 섭취량
	ALPINAMED PASSELYT (Beruhigungstropfen) =comport drop	Passiflora incarnata Extract (60% ethanol)	불면증, 신경과민, 긴장두통	50mL/day 100mL/day

- 영국

영국 의약품 및 건강관리 제품 규제 기관 (MHRA; Medicines and Healthcare products Regulatory Agency): 시계꽃 지상부 추출 분말이 천연물 의약품 (THR; Herbal medicines granted a traditional registration)으로 인증되었다.

표19. 시계꽃 추출 분말 이용 영국 제품 현황

제품사진	회사명 (제품명)	원료	효과	일일 섭취량
	Schwabe Pharma UK Ltd (Relax Herb Coated tablets)	Passion Flower herb (dry aerial part) Extract (50% ethanol) ( <i>Passiflora incarnata</i> L.)	스트레스 완화 THR 23056/0008 2008/02/27	425mg/day
	Laboratoires Arkopharma_France (PhytoCalm)	Passion Flower herb (dry aerial part)	불안완화 및 수면에 도움 THR 12297/0014 2010/07/20	300mg/day
	Potters Ltd (Potter's Nodoff Tablets)	Passion Flower herb (aerial part 80% methanol)	수면에 도움 THR 00250/0221 2012/03/27	72mg/day
	Omega Pharma Ltd. (Omega Passiflora Tablets Natracalm)	Passion Flower herb (aerial part)	스트레스 완화 THR 02855/0036 2013/03/28	500mg/day

② FDA NDI 분석

㉠ FDA NDI 란?

- 미국은 식이보충제를 시판 전에 신고하거나 평가를 받지 않는으나, 신규 식이원료 (New Dietary Ingredient; NDI:1994년 10월 15일 이전에 미국 내에서 식이보충제로 판매된 적이 없는 원료)를 식이보충제의 원료로 사용할 경우에는 정해진 절차를 거쳐야 함.
- NDI를 식이보충제의 원료로 사용할 경우에는, 시판 75일 전에 FDA에 통지하여야 하며 FDA는 접수 후 90일간, 접수 사실 자체와 제출된 정보를 기밀로 취급하며, 접수 후 90일째에 모든 자료를 대중에게 공개해야함.
- 제품의 표지에는 제품명, 실중량, 원료명, 사용용도, 제조업자의 명칭과 주소를 표기하여야 하며, 또한 Supplement Facts 라고 표기한 후 Supplement Facts 패널에는 “per serving” 당정보를 표시하고 Daily value (DV)에 대한 비율 등을 표시하여야 함 “per

unit”혹은 “per day”당 정보는 원할 경우 추가 표시할 수 있고, 주요 식품 알러지원이 함유된 경우 이를 표시하여야 함

㉞ NDI 등록관련 사항

- NDI는 1994년 10월 15일 이전에 미국에서 식이보충제로 판매된 적이 없는 원료를 말함. 의약품은 NDI가 될 수 없음.
- NDI의 안전성을 입증하기 위해 필요한 자료는 반드시 제출할 필요는 없으나 제출할 경우, 제안된 섭취량에서 안전하다는 것을 증명할 수 있으므로 NDI 등록 시 유리할 수 있음. 안전성 근거 자료로는 논문 또는 해당원료를 이용해 실시한 독성연구 (유전독성 연구, 90일 독성연구, 이상반응을 관찰한 잘 설계된 임상시험) 자료가 이용될 수 있음.

㉟ FDA NDI List 현황

- FDA 공식 리스트는 없으나 미국 약전 (US Pharmacopeial convention, USP)에서 의약품 및 Supplement의 검증, 품질, 순도, 효능 등에 대한 정보를 제공하므로 이로부터 해당 정보를 확인 할 수 있음.

(사) 인체시험용 시제품 개발

이중맹검 인체시험에 필요한 위약과 진약 각각 개발

① 부원료 배합비 선정

㉞ 진약 : 1일 1회 1캡슐로 배합하여 개발 (추출물 60mg/capsule/day)

- 부원료의 경우 알레르기, 정신건강 등에 영향을 줄 수 있는 원료는 제외
- 캡슐안에 시계꽃(열매 및 잎)추출물의 균질화를 위하여 밀납 첨가
- 충전원료는 효능에 영향을 미치지 않는 대두유로 선택

품번	원료명	배합비 (%)	제품함량 (mg)
1	시계꽃 추출 분말	12	60
2	밀납 [황납]	3	15
3	대두유	85	425
합계		100	500

㉔ 위약 : 1일 1회 1캡슐로 배합

- 진약과 동일한 대두유를 충전원료로 선택
- 대두유가 오일타입으로 균질화를 위한 밀납 원료가 불필요함.

품번	원료명	배합비 (%)	제품합량 (mg)
1	대두유	100	500
합계		100	500

② 연질캡슐 피막 배합비 개발

- 원료의 연질캡슐의 투명도에 따른 원료 색상이 비쳐 위약과 진약이 구별정도에 대하여 검토시 연질캡슐의 색상에 따라 위약 진약이 구별이 가능하였음.
- 최종 배합 개발된 녹색 연질캡슐 피막의 경우 위약과 진약이 구별되지 않음.



그림26. 연질캡슐 피막 배합 개발

품번	원료명	배합비 (%)	제품합량 (mg)
1	젤라틴 (牛) 165 Bloom	67.51	141.7740
2	글리세린 (액상)	31.7332	66.6397
3	이산화티타늄 (합성착색료)	0.4710	0.9891
4	에틸바닐린	0.2060	0.4326
5	식용색소 황색 4호	0.0299	0.0628
6	식용색소 청색 1호	0.0299	0.0628
7	식용색소 황색 5호	0.0200	0.0420
합계		100	210

(아) 천연 추출 소재를 활용한 제품화 개발

① 일반식품 개발 연구

㉞ 제형 연구

- 수면 건강에 도움을 주기 위하여 수면 1시간 전에 섭취해야하는 복용을 특성을 고려하여, 섭취하기 편하며 소화 부담을 주지 않는 제형으로 선정함.
- 건강보험공단 자료에 따르면 국내 수면장애를 겪는 1/3은 젊은 청년층, 2/3는 50대 이상으로 확인됨.
- 복용 대상자의 연령대별로 구분하여 청년층, 중년층 타겟별 제형을 개발하기 위하여 분말형, 젤리형, 액상형을 개발함

- 분말스틱 제형 배합

- \* 난소화성 말토덱스트린을 함유하여 물 없이도 입안에서 부드럽게 녹을 수 있도록 배합하였음.
- \* 세인트존스워드 추출분말 및 L-트립토판을 함께 배합하여, 수면에 더욱 도움을 줄 수 있도록 배합하였음.

품번	원료명	배합비 (%)	제품함량 (mg)
1	시계꽃 추출 분말	10	100
2	난소화성말토덱스트린	55	550
3	세인트존스워드 추출분말	5	50
4	L-트립토판	20	200
5	치커리뿌리 추출분말	10	100
합계		100	1,000

- 스틱 젤리 제형 배합비

- \* 호프 추출물과 L-트립토판을 배합에 포함하여, 수면 및 심리 안정에 도움을 줄 수 있도록 배합하였음.
- \* 백포도 농축액과 풋사과 농축액을 포함하여, 맛과 향을 잡았음.
- \* 검베이스혼합제제 이후 배합은 스틱 젤리 제형을 만들기 위한 배합임.

품번	원료명	배합비 (%)	제품함량 (mg)
1	시계꽃 추출 분말	5	1,000
2	호프추출농축액분말	2.5	500
3	L-트립토판	1	200
4	프락토올리고당	8	1,600
5	백포도농축액	7	1,400
6	풋사과농축액	6	1,200
7	결정과당	3.74	748
8	검베이스혼합제제	1.7	340
9	시클로덱스트린시럽	1.5	300
10	젯산칼슘	0.5	100
11	한천	0.3	60
12	구연산삼나트륨	0.3	60
13	효소처리스테비아	0.2	40
14	복합황금추출물	0.2	40
15	구연산	0.04	8
16	자몽종자추출물	0.02	4
17	정제수	62	12,400
합계		100	20,000

- 액상형 배합비

\* 액상으로 맛과 향이 매우 중요함. 이에, 대중적으로 편안하고 익숙한 농축액 중에서 따뜻한 성질이 있어 소화에 도움을 주고 심신을 안정시켜주는 대추 추출농축액과 배농축액을 선정하여 맛과 향을 잡았음.

\* 수면에 도움을 줄 수 있도록 호프 추출농축액, 세인트존스워드 추출분말, L-트립토판을 함께 배합하였음.

품번	원료명	배합비 (%)	제품함량 (mg)
1	시계꽃 추출 분말	5	2,500
2	대추추출농축액분말	5	2,500
3	호프추출농축액분말	2	1,000
4	세인트존스워드추출분말	2	1,000
5	L-트립토판	1	500
6	정제수	70.62	35,310
7	시클로덱스트린시럽	3	1,500
8	무수구연산	0.3	150
9	구연산삼나트륨	0.05	25
10	말토덱스트린시럽	3	1,500
11	자몽종자추출물	0.03	15
12	치커리뿌리추출물분말	5	2,500
13	배농축액	3	1,500
합계		100	50,000

- 시제품 제형 형상





㉔ 제형별 관능 평가 결과

- 일반 패넬 45명을 대상으로 분말스틱, 스틱젤리, 액상파우치 제형의 관능평가 실시.  
(별첨. 관능평가 보고서 참조)
- 스틱 젤리 제형의 경우 여성 및 젊은층의 패넬에서 인기가 좋았음.
- 분말 스틱의 경우 남녀 모두 선호 하는 타입이며, 특히 젊은층에서 인기가 좋았음.
- 액상 파우치의 경우 남녀, 젊은층 및 중년층에서 모두 관능에 대한 인기는 좋았으나, 복용의 편의성에서 중년층에 더욱 인기가 있었음.
- 이를 바탕으로 스틱 젤리 제형과, 분말 스틱의 경우 젊은층 타겟으로 세련된 제품의 디자인 및 마케팅 전략을 수립해야 할 것으로 예상됨. 액상 파우치의 경우 중년층 타겟으로 고급스러운 디자인과 한눈에 제품의 특성을 파악할 수 있는 마케팅이 필요할 것으로 파악됨.

## <관능 평가 보고서>

- 모든 일반패널은 관능검사의 취지에 대한 설명을 듣고 동의서에 서명한 후 검사에 임했음. 평가자는 해당 시제품을 섭취한 후 주어진 관능검사지의 각 문항에 대해 직접 표기하였음. 개인적인 의견이나 개선사항에 대해서도 설문지의 해당 항목에 각각 작성하였음(관능평가 동의서, 관능평가지).

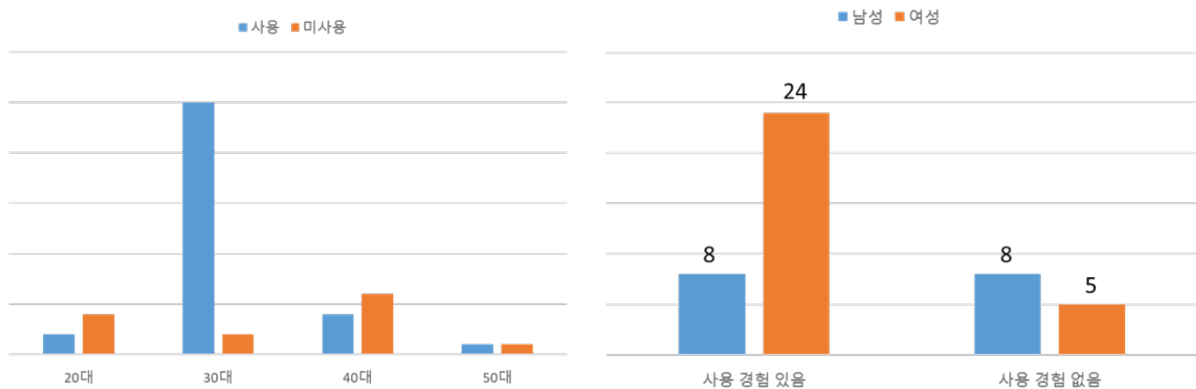
### 1. 인구학적 통계

연령(세)	남성	여성	합계
20~29	2	4	6
30~39	10	17	27
40~49	5	5	10
50~59	2	0	2
합계	19	26	45

- 시계꽃 지상부 추출 분말을 이용한 제품의 관능평가에 참여한 일반 패널은 총 45명으로 일반 패널 대상자의 인구학적 정보는 위의 표와 같음.

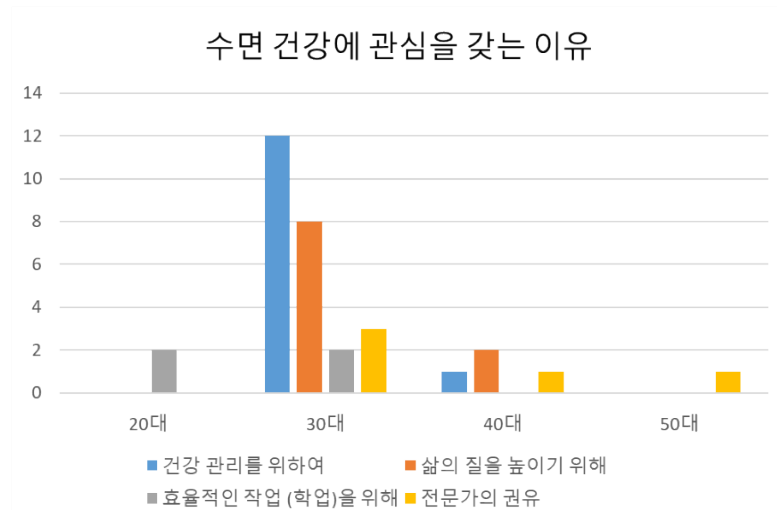
### 2. 수면 관련 제품 사용 여부

수면 관련 제품 사용



- 수면에 관련된 제품의 사용 경험을 조사한 결과 45명 중 32명이 사용한 경험이 있으며, 여성이 남성에 비해 약 3배 높았음.
- 30대에서 수면 관련 제품 사용이 많은 것으로 확인됨.

### 3. 수면 건강에 관심을 갖는 이유



- 수면 건강에 관심을 갖는 이유에 대해 조사한 결과 30대에서 '건강관리를 위해'라는 답변이 가장 많았음. 두번째로 삶의 질 향상이 있었으며, 40대의 경우 삶의 질을 위해서가 가장 높았음.

### 4. 제품의 제형에 대한 기호도

제형	싫다	보통	좋다
스틱 젤리	2	20	23
분말 스틱	5	25	15
액상 파우치	10	18	17

- 스틱 젤리의 경우 싫다는 2명으로 제형에 대한 기호는 높은 것으로 판단됨.
- 분말 스틱의 경우 보통이라는 의견이 가장 많아 호 불호가 없는 판매하기 좋은 제형으로 확인됨.
- 액상 파우치의 경우 싫다는 의견이 10명 이지만, 20대와 30대에 국한되어 있어, 중년층 타겟 제형으로 손색이 없을 것으로 판단됨.

### 5. 제품의 향과 맛 (관능의 기호도)

제형	싫다	보통	좋다
스틱 젤리	6 (무슨 맛인지 모르겠다) (맛이 없다)	34	5 (맛과 향이 강하지 않아 부담 없다)
분말 스틱	2 (향이 강하다)	17	19 (따뜻하게 먹으면 좋을 것 같다)
액상 파우치	10 (맛이 너무 강하다) (한약 맛 같다)	18	17

- 전체적으로 관능은 나쁘지 않은 것으로 판단되나, 스틱 젤리의 향, 액상의 농도에 대해 개선할 필요성이 있음.

② 건강기능식품 제품 연구

㉠ 제형 연구

- 수면 건강에 도움을 주는 건강기능식품으로써 경질 캡슐, 연질 캡슐 및 정제타입의 시제품을 개발함.
- 건강보험공단 자료에 따르면 국내 수면장애를 겪는 대상자들은 남성보다 여성의 비율이 매우 큼으로, 모든 제형의 크기는 최대한 작게 만들었음.
- 인체적용시험과 동일한 일일섭취량 60 mg을 맞추어 개발함.

- 경질 캡슐 배합비

\* 수면에 도움 및 스트레스로 인한 긴장완화에 도움이 되는 L-트립토판, L-테아닌, 홍경천추출물을 함께 배합하였음.

품번	원료명	배합비 (%)	제품함량 (mg)
1	시계꽃추출분말	20	60
2	결정셀룰로스	34.5	103.5
3	말토덱스트린	20	60
4	유당혼합분말	10	30
5	난소화성말토덱스트린	5	15
6	호프추출농축액분말	3.5	10.5
7	산화마그네슘	2	6
8	스테아린산마그네슘	1.5	4.5
9	이산화규소	1.5	4.5
10	L-트립토판	1	3
11	테아닌	1	3
합계		100	300
캡슐원료			
1	젤라틴	94.26	
2	정제수	3.6314	
3	이산화티타늄	1.8852	
4	빙초산	0.1697	
5	자당지반산에스테르	0.0471	
6	식용색소황색제4호	0.0066	
합계		100	

- 연질 캡슐 배합비

\* 수면에 도움 및 스트레스로 인한 긴장완화에 도움이 되는 L-트립토판, L-테아닌, 홍경천추출물을 함께 배합하였음.

\* 분말원료의 균질화 및 연질캡슐 충전시 배합액의 흐름성을 위하여 대두유, 밀납 등 유지성분의 원료를 함께 배합하였음.

\* 비타민D3혼합제제의 경우, 항산화 반응을 통한 유통중 원료의 안정성을 위하여 함께 배합하였음.

품번	원료명	배합비 (%)	제품함량 (mg)
1	시계꽃추출분말	30	60
2	대두유	46.2	92.4
3	밀납	5	10
4	포도씨유	4.5	9
5	L-트립토판	4.1	8.2
6	L-테아닌	4	8
7	홍경천추출물	3	6
8	대두레시틴	2.7	5.4
9	비타민D3혼합제제	0.5	1
합계		100	200
캡슐원료			
1	젤라틴	67.77	
2	글리세린	30.496	
3	카카오색소	1.634	
4	오징어먹물색소	0.1	
합계		100	

- 정제 배합비

\* 수면에 도움 및 스트레스로 인한 긴장완화에 도움이 되는 L-테아닌, 홍경천추출물을 함께 배합하였음.

\* 대추추출농축액분말과 식물혼합추출분말로 시계꽃 추출분말 특유의 강한 탄맛을 감소시키도록 배합하였음.

품번	원료명	배합비 (%)	제품함량 (mg)
1	시계꽃추출분말	24	60
2	결정셀룰로스	38.5	96.25
3	말토덱스트린	19	47.5
4	대추추출농축액분말	6.5	16.25
5	홍경천추출물	4.3	10.75
6	히드록시프로필메틸셀룰로스	2.7	6.75
7	식물혼합추출분말	1.5	3.75
8	이산화규소	1.3	3.25
9	테아닌(L-테아닌)	1.2	3
10	스테아린산마그네슘	1	2.5
합계		100	250

- 시제품의 제형 형상



㉔ 분말 제품의 안정성 평가 (유통기한 설정)

- \* 일반식품 제형 중 분말제품으로 제조 후 보관, 유통, 진열, 소비 전 보관 등 제조에서 소비에 이르기까지 일어날 수 있는 조건들을 고려하여 상온 유통 조건인 25° C ± 2° C (상대습도 70%)에서 보관하면서 실측 실험을 시행함.
- \* 제조시 (시험일자 : 18년 07월), 표시량의 108.76%로 규격 적합.
- \* 제조 후 3개월 시험결과(시험일자 : 18년 10월), 표시량의 107.46%로 규격 적합
- \* 제조 후 6개월 시험결과(시험일자 : 19년 1월), 표시량의 105.39%로 규격 적합
- \* 제조 후 9개월 시험결과(시험일자 : 19년 4월), 표시량의 104.79%로 규격 적합
- \* 제조 후 12개월 시험결과(시험일자 : 19년 6월) 표시량의 102.03%로 규격 적합

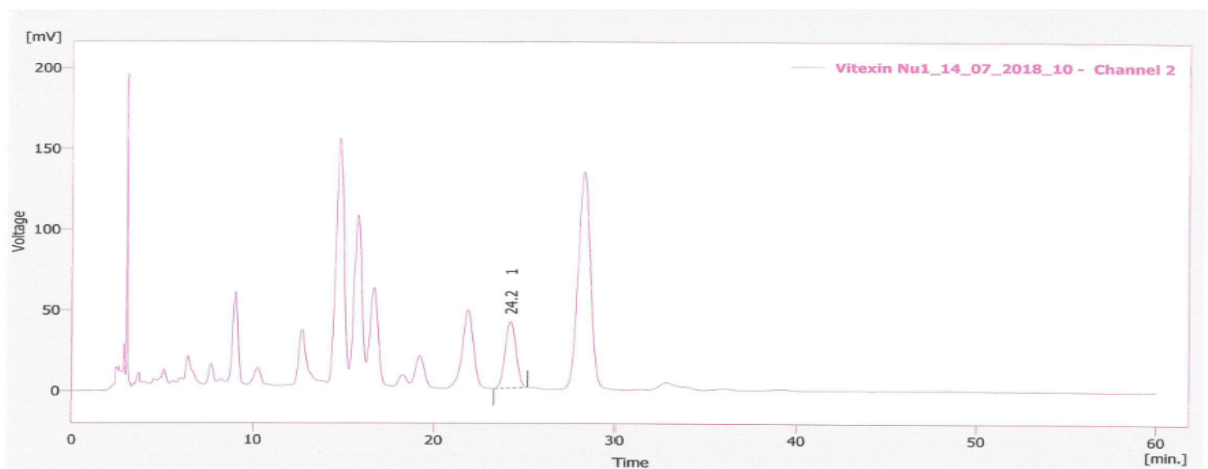


그림27. 제조시 0개월차 시계꽃 분말제품 HPLC 크로마토그램

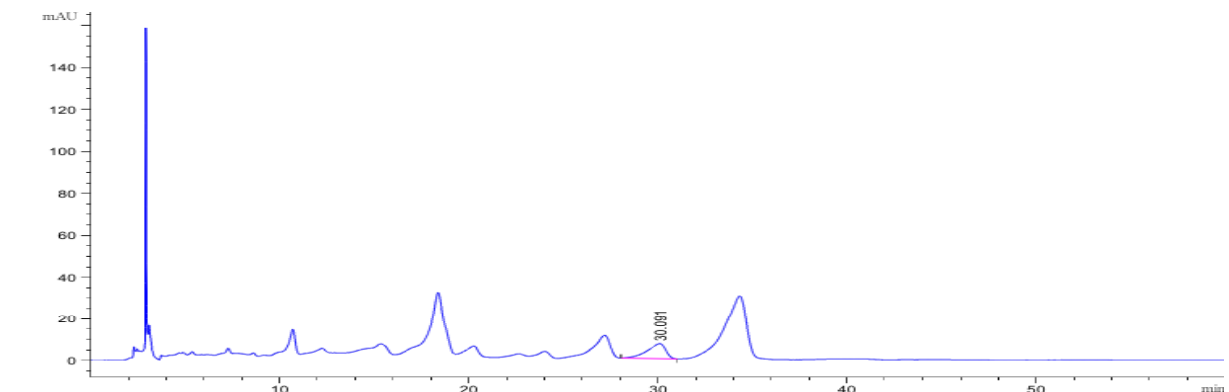


그림28. 제조 후 6개월 분말제품 HPLC 크로마토그램

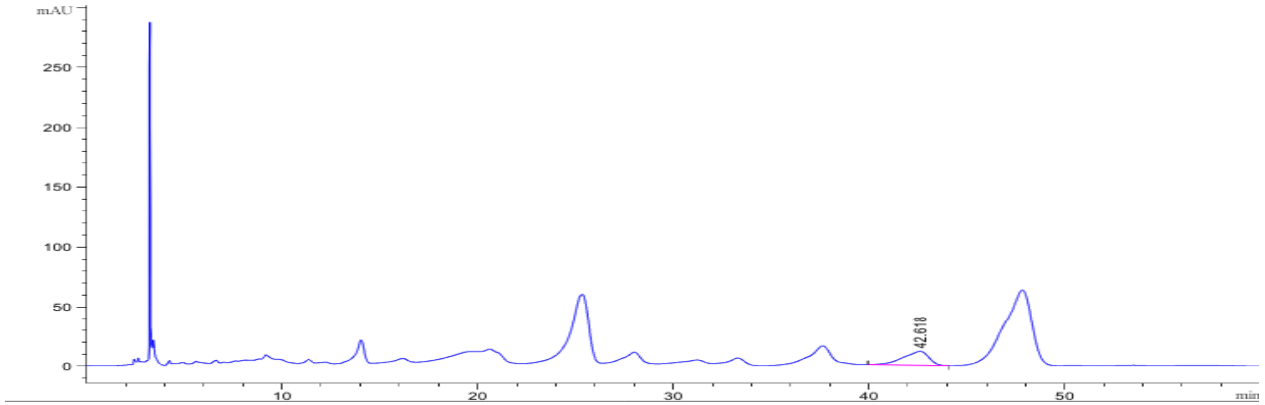


그림29. 제조 후 12개월 분말제품 HPLC 크로마토그램

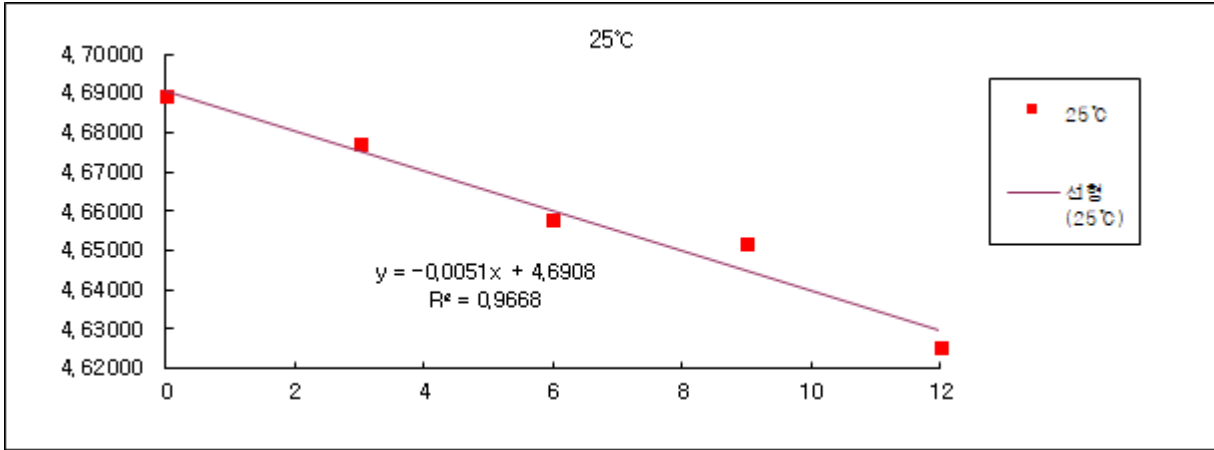
표 20. 시계꽃 분말제품의 지표성분 경시변화 평가

시험항목	시험기준	시험결과				
		제조사	3개월	6개월	9개월	12개월
성상	호린 노란 주황색의 원형 제피정제 표시량	적합	-	-	-	-
Vitexin	(0.35mg /1,000mg)의 80~120%	108.76% (0.413mg /1,000mg)	107.46% (0.408mg /1,000mg)	105.39% (0.4mg /1,000mg)	104.79% (0.398mg /1,000mg)	102.03% (0.388mg /1,000mg)
판정		적합	적합	적합	적합	적합

: 실측 실험으로부터 얻은 결과를 시간에 따른 품질변화를 반응속도상수로 표현하는 화학반응식에서 선형회귀분석한 결과, 80% 하한치를 적용하여 유통기한 60개월 산정됨.



- 소실속도상수(-기울기 ; k)의 계산



개월 (T)	함량% (C)	함량의 자연 로그값 (lnC)	Y절편 (b)	기울기 (m)	직선의 방정식 $y=mt + b$	속도소실상수(K) :기울기 절대값	80%하한치 적용(개월)
0	108.76	4.68914	4.6908	-0.0051	$y= -0.0051 t + 4.6908$	0.0051	60.581
3	107.46	4.67712					
6	105.39	4.65767					
9	104.79	4.65196					
12	102.03	4.62527					

③ 제품 디자인 개발

- 제품명 : 내일을 부탁해 디자인 개발 보고서

제품 타겟 연령층 및 제형에 따라 디자인의 다양화하여 개발함.

- 관능검사를 통해 수립된 전략을 바탕으로 스틱 젤리 제형과, 분말 스틱의 경우 젊은 층 타겟으로 세련된 제품의 디자인으로 개발을 진행함.
- 액상 파우치의 경우 중년층 타겟으로 고급스러운 디자인과 한눈에 제품의 특성을 파악할 수 있는 디자인으로 개발을 진행함.

별첨. 디자인개발보고서

# 내일을 부탁해 패키지 디자인 개발 보고서

2018. 08.

**업 체 명 : (주)네추럴F&P**

**컨설팅기관명 : (주)크리아**

# I. 디자인개발 개요

## 1. 디자인개발 목표

- 당사는 천연 물질을 이용한 건강기능식품, 기능성 화장품, 신약개발, 기능성원료개발 등 바이오 산업 전반에 걸쳐 생명공학을 응용한 고부가가치 제품을 연구 개발하는 바이오전문기업이다. 바이오 분야에 과감한 투자와 사업을 확장하기 위해 기업부설 중앙연구소를 운영하고 있으며, 생산시설의 지속적인 확충과 신규기술 개발을 하고있다.
- 당사는 우수한 중소기업이지만 수면 건강 제품 선발주자로서 금번 사업을 통해 수준 높고 차별화되며 경쟁력 있는 디자인을 개발하는 것을 목표로 하고 있다.
- 소비자가 중심에 있는 지금의 시장과 기업간 경쟁상황은 감성과 창의성을 바탕으로 소비자 가치를 다루는 디자인의 무한경쟁 시대라 하지 않을 수 없다. 이러한 시대적 배경에서 디자인의 역할은 과거 그 어느 때보다도 중요하게 인식 되어야 한다.
- 기업 경쟁력 확보와 성장을 위한 핵심 엔진으로 디자인을 활용하기 위해서는 마케팅과 생산을 지원하기위해 단편적 디자인 개발에 주력해온 전통적 디자인의 역할에서 기업 경영의 전략적 문제해결의 자원과 수단으로 디자인을 활용할 수 있는 통합자로서의 역할로 바뀌어야 한다.
- 회사 제품의 우수성에 비해 회사의 이미지와 디자인이 그 수준을 따라가지 못하고 있어, 본 사업을 통해 포장디자인을 새롭게 개발하여 기업과 제품 브랜드 가치를 높이고자 한다. 그에 있어 본 사업의 진행은 당사로서 매우 중요한 사업이다.

## 나. 시장 및 트렌드 분석

### 1. 수면 장애의 정의 및 필요성

- 수면 장애란? 잠과 관련된 모든 장애를 폭넓게 총칭하는 말. 밤새 충분한 잠을 자지 못하거나 충분하게 잠을 잤지만 낮 동안 정신이 깨어있지 못하는 경우 수면리듬이 흐트러진 경우, 깨어있을 때 어려움을 겪는 상태가 전무 수면장애에 해당한다.

- 수면 건강의 필요성

우리나라는 OECD 국가 중 수면 부족 국가 2위로 꼽혔다. 단 1시간만 tnus 을 놓쳐도 고혈압 발생위험 40%증가, 심혈관 질환 등의 위험이 높아질 뿐만 아니라 사망률 역시 8배가 높아진다.

- 국내 수면 장애 현황

우리나라는, 2017년 추산 10년 사이 50세 이상의 비율이 월등히 증가하고 있으며, 65세 인구 비율은 14.47%로 고령화 사회이다. 2017년 연령별 인구 현황을 확인하였을 때, 2027년 우리는 초 고령사회이며, 지금부터 이를 대비해야 한다.

건강보험공단 자료에 따르면 국내 수면장애를 겪는 3분의 2는 50대 이상이다. 수면장애 환자의 66%가 50대 이상인 것이다. 또한 저 성장 시대를 맞아 장기불황, 취업난 등의 외부적인 영향으로 젊은 연령층의 진료가 해마다 증가하고 있다.

### 2. 원료 정보

- 시계꽃 이란?

- 학명 : *Passiflora incarnate* L.
- 사용부위 : 시계꽃 식물의 잎, 열매

## II. 디자인개발 추진결과

### 1. 디자인개발 범위

#### 가. 개발품목

품명	제형	포장형태	비고
내일을 부탁해	분말 스틱 스틱 젤리 액상 파우치	파우치 및 박스	일반 식품
	연질 캡슐	PPT 및 박스	건강기능식품
4품목 3종 3건			

#### 나. 포장디자인 개발 절차



## 2. 유사 제품 현황

### - 국내



### - 국외



### 3. 디자인 방향 설정

#### 가. 개발 목표

- 수면 건강 제품의 특징을 소비자가 인지할 수 있는 디자인 개발  
: 수면의 어려움을 겪는 소비자가 중년층이 많다는 것을 염두하고 한눈에 알 수 있도록 디자인
- <청,장년층> <중년층> 두 타입의 타겟 디자인 개발
- 의약품과 같은 전문적인 이미지를 줄 수 있는 건강기능식품 디자인 개발

#### 나. 개발 컨셉

- 전문성
  - 분말 스틱, 스틱 젤리, 액상 파우치의 경우 일반 식품으로서 화려한 디자인을 통해 소비자의 이목을 집중 시킬 수 있는 디자인
  - 전문적인 건강기능식품 이미지를 나타내기 위하여 심플하고 모던한 디자인
- 차별성
  - 기존 경쟁 제품과의 차별화는 물론 사용자가 쉽게 사용할 수 있는 디자인
- 아이덴티티
  - 네추럴에프앤피만의 아이덴티티를 나타낼 수 있는 디자인

- 디자인 A안

- \* 분말 스틱과, 스틱 젤리의 경우 같은 디자인으로 진행
- \* 제형에 대한 차이를 알릴 수 있는 문구 삽입
- \* 밤의 오로라를 형상화한 디자인

• A안

- 분말 스틱과, 스틱 젤리 제형 제품의 디자인으로 밤의 몽환적이고 화려한 면을 강조한 디자인





- 디자인 B안

\* 액상 제품의 디자인으로 고급스럽고 편안한 색으로 파스텔 톤을 선정하였음

\* 잠을 자고 있는 모델을 박스디자인에 삽입하여 한눈에 제품의 특성을 파악할 수 있도록 함

• B안

- 중년층을 겨냥한 액상파우치 제형의 제품 디자인으로 한눈에 수면에 대한 제품으로 인지할 수 있는 디자인 설정



- 디자인 C안

- \* 건강기능식품 디자인으로 오른쪽 상단에 건강기능식품 마크를 삽입함
- \* 시계꽃 지상부 추출 분말/ 수면의 질 개선에 도움을 줄 수 있음 표시
- \* 숙면으로 인한 맑은 정신을 표현하는 맑은 푸른 계열의 색상을 사용하였음.

• C안

- 건강기능식품 디자인으로 배게, 안대와 구름을 이용하며, 스카이 색상으로 상쾌함을 세련되게 표현한 디자인



(자) 개별인정형 서류 작성

① 건강기능식품 기능성원료 등록을 위한 구비서류

본 연구를 통하여 수행된 결과 자료와 수집 분석된 자료를 종합하여 식품의약품안전처 건강기능식품 기능성원료 가이드라인에 따라 인정 신청을 위한 제출 자료를 작성하였음.

□ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부분호	비고
<b>1. 제출자료 전체의 총괄 요약본</b>				
		■ 예 □ 아니오		
<b>2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용연령 등에 관한 자료</b>				
2.1	기원	□ 국내 ■ 국외	1, 2	
2.2	개발경위	■ 국내 ■ 국외	3~14	
2.3	국내 외 인정 허가 현황	■ 국내 ■ 국외	15~25	
2.4	국내 외 사용 현황	■ 국내 ■ 국외	26	
<b>3. 제조방법 및 그에 관한 자료</b>				
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	■ 예 □ 아니오	33	
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	■ 예 □ 아니오	33	
3.3	사용된 원료 첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	■ 예 (모두, 일부) □ 아니오	34~36	
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 합량변화	■ 예 □ 아니오	33	
3.5	주요공정별 수율 변화	■ 예 □ 아니오	33	
<b>4. 원료의 특성에 관한 자료</b>				
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	■ 예 □ 아니오		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	■ 예 □ 아니오	37~53	
4.3	영양성분정보자료	■ 예 □ 아니오	54	
<b>5. 기능성분 또는 지표성분 규격 및 시험방법에 관한 자료</b>				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거 ※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 + 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	■ 예 □ 아니오 ■ 예 □ 아니오	55	
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)	■ 예 □ 아니오 * 시료: 표준품 □ 조상: 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법 (자사방법인 경우 별리테이션 자료 추가)	■ 예 □ 아니오 □ 공인 시험방법 ■ 고사: 시험방법	56	

연번	제출자료	제출여부	첨부분호
<b>6. 유효물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료</b>			
6.1	유효물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거 ※ 유효물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	■ 예 □ 아니오 ■ 예 □ 아니오	57
6.2	유효물질 규격 미설정 항목(간류농약)의 시험성적서 및 분석자료	■ 예 □ 아니오	58
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등) ※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	□ 예 ■ 아니오	
6.4	유효물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	■ 예 □ 아니오	
<b>7. 안전성에 관한 자료 [의사결정도 : 나 ]</b>			
7.1	섭취근거 정보	■ 예 □ 아니오	15~26
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	■ 예 □ 아니오	59~63
7.3	섭취량 평가 정보	■ 예 □ 아니오	64, 65
7.4	안전적용시험 정보	■ 예 □ 아니오	66
7.5	독성시험 + GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	■ 예 □ 아니오
		3개월 반복투여독성시험	□ 예 ■ 아니오
		유전독성시험	□ 예 ■ 아니오
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성 )	□ 예 ■ 아니오
<b>8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료</b>			
8.1	시험관시험 ■ 신형원료 (논문 1편) + 시험기관 : 순천향대학교 □ 유사원료 (논문 1편)		73
8.2	동물시험 ■ 신형원료 (논문 2편) + 시험기관 : 순천향대학교 □ 유사원료 (논문 1편)		73, 74
8.3	인체적용시험 ■ 신형원료 (IRB 승인 보고서 1 편, 논문 1 편) + 인체적용시험기관 : 순천향대학교 부천병원 □ 유사원료 (IRB 승인 보고서 1 편, 논문 1 편)		66
<b>9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료</b>			
9.1	섭취량 및 근거	■ 예 □ 아니오	
9.2	섭취방법 및 근거	■ 예 □ 아니오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	■ 예 □ 아니오	63
<b>10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료</b>			
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	■ 예 □ 아니오	
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	■ 예 □ 아니오	

(차) 수면 건강기능식품 마케팅 전략수립

① 수면 증진 건강기능식품 시장조사 및 마케팅 전략 수립

㉞ SWOT 요인 분석을 통한 마케팅 대응 방안

• SWOT 요인 분석

분석항목		강점 분석 내용
현 황 분 석	강점 (Strength)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 다양한 완제형 개발 능력</li> <li>● 제품에 대한 기술적, 과학적 근거자료 보유</li> <li>● 바이어 니즈에 맞는 제품 개발 능력 보유</li> </ul>

분석항목		약점 분석 내용
현 황 분 석	약점 (Weakness)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 신규 소재에 대한 소비자 이해 부족</li> <li>● 소비자 홍보 마케팅을 위한 자본력</li> </ul>

분석항목		기회 분석 내용
현 황 분 석	기회 (Opportunity)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 소비자 수준 향상에 따른 건강기능식품에 대한 수요 증가</li> <li>● 개별인정으로 신시장 개척의 기회 도래</li> <li>● 건기식 구매 온라인 유통 비중의 증가</li> </ul>

분석항목		위협 분석 내용
현 황 분 석	위협 (Threat)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 식약처 인허가에 대한 장벽 (기능성 원료 인정)</li> <li>● 마케팅에 대한 제조처의 비용 부담</li> <li>● 수입 유통 제품의 시장 진입</li> </ul>

• SWOT MATRIX

강점(Strengths), 약점(Weakness), 기회(Opportunities), 위협(Threats)의 4가지 요인에 따른 전략 적시사점을 도출하여 SO전략, ST전략, WO전략, WT전략에 따른 마케팅 대응방안을 분석.

		S(강점요인)	W(약점요인)
		내부 환경	
외부 환경	O(기회요인)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 다양한 완제형 개발 능력</li> <li>• 제품에 대한 기술적, 과학적 근거자료 보유</li> <li>• 바이어 니즈에 맞는 제품 개발 능력 보유</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 신규 소재에 대한 소비자 이해 부족</li> <li>• 소비자 홍보 마케팅을 위한 자본력</li> </ul>
	T(위협요인)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전기식 구매가 상승되고 있는 온라인 시장을 타겟으로 전략을 수립</li> <li>• 온라인시장의 주요고객층 또는 온라인 유통 니즈에 맞는 제품을 개발</li> <li>• 개별인정으로 신시장 개척</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 온라인 마케팅 통한 소비자 이해도 증강전략 수립</li> <li>• 자사 온라인몰 입점과 홍보로 비용절약을 통한 소비자 인식 증대 전략 수립</li> </ul>
		SO전략	WO전략
		ST전략	WT전략
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 소비자 수준 향상에 따른 건강 기능식품에 대한 수요 증가</li> <li>• 개별인정으로 신시장 개척의 기회 도래</li> <li>• 전기식 구매 온라인 유통 비중의 증가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기술적 과학적 근거자료를 바탕으로 식약처 인허가 취득</li> <li>• 제형에 대한 만족도를 높여 수입유통제품과의 경쟁력 확보 전략 수립</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식약처 인허가에 대한 장벽 (기능성 원료 인정)</li> <li>• 수입 유통 제품의 시장 진입</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 자사 온라인 몰의 제품 홍보 개시로 초기 마케팅 비용 감소</li> <li>• 개별인정형 등재로 수입제품 대비경쟁력을 확보</li> </ul>

## ㉔ 온라인 쇼핑 동향

### • 온라인 쇼핑 시장규모

정보통신정책연구원의 최근 보고서에 따르면 국내 온라인 쇼핑 시장은 2017년 78조 2270억원으로 조사됨. 2013년부터 최근 5년간 연평균 성장률은 19.4%를 기록함으로써, 이러한 추세에 미루어 2019년부터 시장규모가 100조원을 돌파한 11조 5000억원을 기록하고, 2022년에는 189조8000억원에 달할 것으로 예상됨.

현재, 온라인쇼핑 시장은 오픈마켓이 주도하고 있음. G마켓, 11번가 등 소비자와 상품 판매자를 중개하는 오픈마켓 규모는 지난 2011년 11조 4000억원에서 2017년 23조 3000억원으로 2배가 넘는 규모로 성장하였고, 쿠팡 등 소셜커머스의 경우 2011년 7900억원에서 2017년 12조 4000억원으로 약 15배 수준으로 성장함.

### 온라인쇼핑 시장 성장 전망

2017년	78조2000억 원
2018년	93조4000억 원
2019년	111조5000억 원
2020년	133조1000억 원
2021년	159조 원
2022년	189조8000억 원

그림30. 온라인 쇼핑 시장 성장 전망

[출처:정보통신정책연구원(문화일보, '온라인 쇼핑시장, 4년 뒤 189兆 규모로 커진다.' 2018.07.04인용)]

### • 온라인 쇼핑 트렌드

온라인 쇼핑의 상위 구매 물품은 '의류 및 패션잡화'가 여전히 강세이지만, 최근 1인 가구와 맞벌이 증가 및 주문과 배송의 기술 발달로 인해 식료품과 세제와 같은 생활용품 카테고리 구매건이 증가함.

2018년 9월 기준 통계청에서 발표한 온라인 쇼핑 거래액 리포트를 보면 '음식료품'은 쇼핑 거래액에서도 전체 3위 안에 들 뿐 아니라 온라인 쇼핑 상품거래액에서도 2019년 4월 기준 전년 대비 높은 비중을 차지하는 등 강세를 보이고 있음. 이에, 생활용품과 식료품은 자주, 주기적으로 구매하는 제품군이므로 앞으로 더욱 성장할 가능성이 높음.

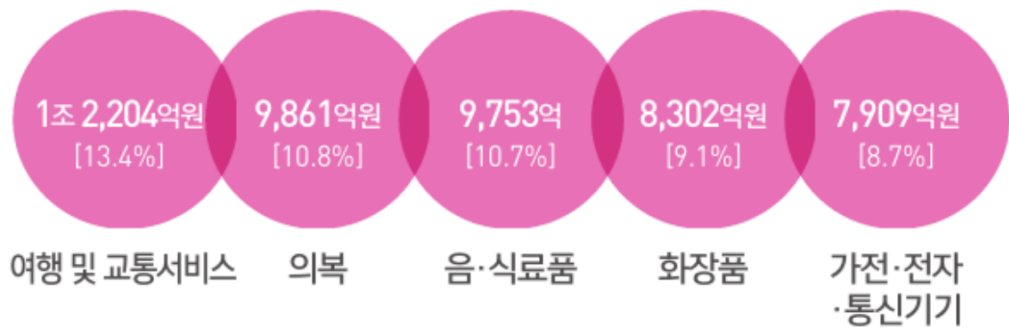
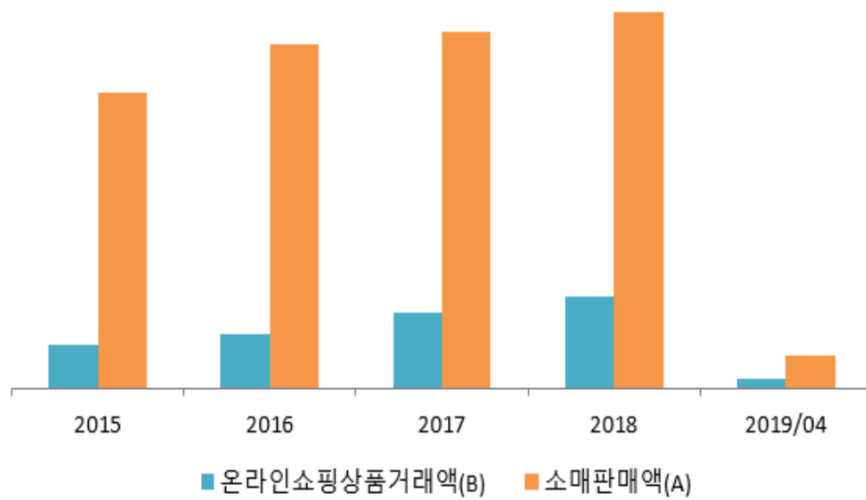


그림31. 온라인쇼핑 거래 상위 카테고리 (2018년 9월 기준)

[출처:통계청,온라인쇼핑동향.2018.09]



구분	2015	2016	2017	2018	2019/04
소매판매액(A)	3,665,180	4,243,460	4,401,105	4,649,923	388,811
온라인쇼핑상품거래액(B)	540,556	656,170	941,858	1,137,297	106,448
↳ 음·식료품(C)	52,428	70,677	79,970	105,327	10,524
<b>비중(B/C)</b>	<b>14.75%</b>	<b>15.46%</b>	<b>21.40%</b>	<b>24.46%</b>	<b>27.38%</b>
↳ 비중(C/B)	9.70%	10.77%	8.49%	9.26%	9.89%

그림32. 온라인쇼핑 동향조사 (단위:억원)

• 온라인 쇼핑 이용자 동향

남성은 오픈마켓, 여성은 종합쇼핑몰 이용을 선호하였고, 연령대가 낮을수록 소셜커머스, 높을수록 종합쇼핑몰을 이용하는 것으로 나타남. 이는 연령대가 높을수록 생소한 브랜드보다 인지도와 퀄리티를 중시하는 것으로 추측 가능함.

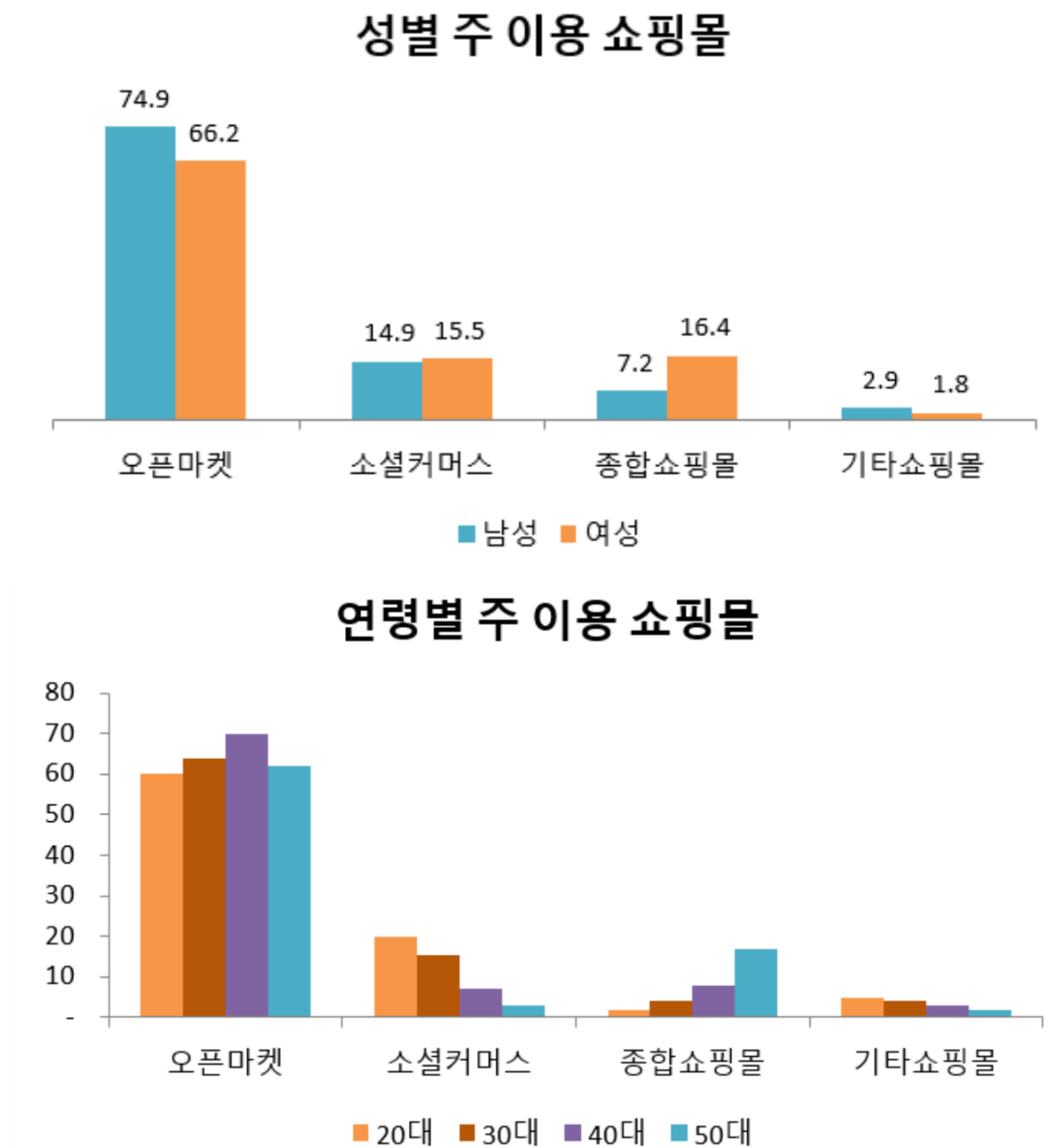


그림33. 온라인쇼핑 이용자 동향

[출처:DMC미디어,2017인터넷 쇼핑 행태와 쇼퍼 그룹 및 쇼핑물 분석보고서.2017.02]



㉔ 온라인 쇼핑의 건강기능식품 선호 제형

건강기능식품의 개별 포장은 젊은층에 특히 호응이 높음. 주로 지인 및 온라인(54.7%)을 통해 얻은 정보를 이용해 구매하는 주 연령층은 30대로 연령대가 낮을수록 온라인(블로그, 카페, 커뮤니티의 내용)을 통해 얻은 정보로 건강기능식품을 구입함.

구분		가족/지인/친구 등의 추천	온라인 블로그/카페/커뮤니티의 내용	TV 및 라디오 프로그램/뉴스/광고	유명 브랜드 여부	마트, 백화점 등의 점원 설명	홈쇼핑 등에서의 판매 정보	약국의 약사 설명	기타
전체 (n=1,570)		35.5	19.2	19.1	8.6	7.3	5.6	3.6	1.2
연령	30대 (n=462)	33.5	24.8	10.3	9.7	11.3	3.2	5.2	1.9
	40대 (n=543)	36.4	17.9	18.5	8.7	6.6	6.4	4.3	1.2
	50대 이상 (n=565)	36.4	15.3	27.5	7.5	4.3	6.9	1.4	0.6
직업	자영업 (n=93)	31.2	21.5	20.4	8.6	3.2	6.5	7.5	1.1
	경영/사무/기술직 (n=542)	35.8	20.7	17.2	9.0	7.0	5.5	3.3	1.5
	전문/자유직 (n=43)	37.2	23.3	14.0	7.0	4.7	9.3	4.7	0.0
	전업주부 (n=188)	34.0	17.0	25.5	7.4	8.5	4.8	1.6	1.1
	학생/무직/기타 (n=136)	39.0	13.2	18.4	8.8	10.3	5.1	4.4	0.7

그림34. 건강기능식품 구입에 영향을 미친 정보 취득 경로

[출처:한국농수산물공사,가공식품세분시장현황 건강기능식품시장.2016.12인용]

건강기능식품의 주 구매 수요층인 30대의 경우, 먹기편한 포장(19%), 총 용량(먹을 수 있는 총 개월 수)(7%) 등을 주요하게 살펴보는 것으로 조사됨.

구분		주요 원재료 (원산지 포함)	1회 분량 당 영양소 함유량	먹기 간편한 포장	유통기한	가격	브랜드	총 용량 (먹을 수 있는 총 개월 수)	기타
전체 (n=600)		35.7	21.5	14.8	8.5	7.8	6.0	5.5	0.2
연령	30대 (n=200)	28.0	24.0	19.0	6.0	10.0	5.5	7.0	0.5
	40대 (n=200)	40.5	26.0	10.5	8.0	6.5	4.5	4.0	0.0
	50대 이상 (n=200)	38.5	14.5	15.0	11.5	7.0	8.0	5.5	0.0

그림35. 건강기능식품 구입 시 주요 고려요인(제품속성)

[출처:한국농수산물공사,가공식품세분시장현황 건강기능식품시장.2016.12인용]

개별포장형 건강기능식품은 양복 주머니, 화장품 파우치에 쏙 들어가는 간편한 스틱형 등 높은 휴대성으로 꾸준한 섭취가 가능한 장점이 있음. 외식 잦고 집에 있는 시간이 적은 1인 가구에 호응이 높은 것으로 추측 가능함.

## ② 요약 및 시사점

- SWOT분석을 통한 신제품 개발 방향  
: 자사몰 입점을 통한 제품 홍보를 통해 초기 마케팅 비용 감소
- 온라인 쇼핑 동향 조사를 통한 주 타겟 층 선정  
: 주로 온라인 쇼핑으로 식료품을 구매하는 소비층인 20~30대로 선정
- 온라인 쇼핑 주 타겟 층 선호 제형 선정  
: 주 타겟층인 20~30대는 먹기편한 포장을 선호

## ③ 결론

수면 장애는 현대인의 건강에 위협 요소로 심각성이 증가되고 있음. 그러나 국내외 시장을 분석한 결과, 수면 관련 건강기능식품은 해외 직구를 통한 제품이 주가 되었고, 한국인을 대상으로 하여 효과가 입증된 수면 건강제품은 미비함.

SWOT 요인 분석을 통한 마케팅 대응 방안을 분석한 결과, 건기식 구매가 상승되고 있는 온라인 시장을 타겟으로 전략을 수립함.

니즈에 맞는 제품 개발 능력을 바탕으로 제형에 대한 만족도를 높이고, 자사 온라인몰 입점을 통한 온라인 마케팅으로 신규 소재에 대한 소비자 이해도 증강 및 제품 홍보의 초기 마케팅 비용을 절약함.

온라인 쇼핑의 주 소비층은 20~30대의 젊은 층으로, 주로 먹기 편한 포장의 건강기능식품을 선호하는 것으로 조사됨. 이에 개별포장형 식품으로 휴대성이 높고 꾸준한 섭취가 가능한 스틱형 제형으로 제품을 출시하고자 함.

## (2) 제1협동기관

(가) 시계꽃 소재의 약리학적 효능 평가를 위한 조사

① 소재사용의 안전성 확보를 위한 in vitro/in vivo 실험

㉠ 시계꽃 소재의 안전한 사용을 위하여 Bone marrow cell, calvarial cell, C.elegans를 이용하여 세포 또는 선충(C. elegans)의 생존률에 어떠한 영향을 미치는지 관찰

㉡ 시계꽃 소재의 인체적용 근거자료로 이용할 수 있는 데이터 축적

1) 세포독성 가능성 여부 관찰, 2) 지속적 투여용량 및 투여기간을 위한 선행 데이터로 사용 (BioDaq system 도입 및 이용에 필요)

㉢ 시계꽃 소재의 설치류 투여용량에 대한 동물의 반응 및 행동학적 반응을 관찰하여, 수면효능을 유도하는 제제들에서 나타나는 기타 이상행동들에 대한 사전 스크리닝 실시 필요

② 시계꽃 소재의 약리학적 효능의 확인

㉠ 시계꽃 소재의 실험동물모델 투여에 의한 약리학적 효능 확인 및 데이터 구축

· 실험동물모델의 구축

: 실험동물의 선택- DBA/2 mice (Sleep disorder inheritant model)

: 실험동물모델의 선택-ICR mice, C57BL/6J, SD rat의 이용

: 약물에 의한 수면장애-카페인, 알코올 등

: 질환모델동물-난소적출모델 (Ovariectomy model),

고환적출모델 (Orchiectomy model)

· 실험동물의 투여용량 및 투여기간의 설정

: 수면기전과 연관기전 미 부가기능에 대한 고찰 필요

: 투여용량에 따른 투여기간의 설정 및 구축 필요

: 사람으로의 외삽 데이터로써 이용 가능한 데이터 구축

- 시계꽃 소재의 생리학적 활성 확인
  - : 시계꽃 소재의 뇌에서의 직접 Target region 설정(기보고된 영역별 수면연관성확인)
  - : 시계꽃 소재의 다양한 생리학적 활성 및 특성 확인
  - : 시계꽃 소재의 수면 효능
  - : 시계꽃 소재의 수면효능 외 추가효능 및 부작용 유무의 확인
  - : 뇌의 신경학적활성특징 및 신경활성특징에 의한 기전 연구
  - : 시계꽃 소재의 수면기능 기전에 대한 in vitro/in vivo 활성기전을 통한 시계꽃 소재의 수면예측기능 확보
  - : 시계꽃 소재의 식품의약품안전처의 개별인정 획득을 위한 전임상/임상연구에서 나타날 수 있는 수면기능 외 부작용 가능성 스크리닝 필요 (뇌에서의 neuropeptide 변화, 행동학적 변화 연구)
  - : 동물의 수면을 위해서는 Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis의 deacceleration 이 필요
  - : 수면유도능력이 발휘되면서 신체의 스트레스 반응에 대한 반응도가 낮아지며, 이에 동원되는 신경전달물질로는 Corticotropin-releasing factor (CRF), Arginin vasopressin (AVP), Adrenocorticotrophin (ACTH), Glucocorticoid receptor (GR), 그리고 mineralocorticoin receptor (MR)이 있으며, 추가적으로 뇌가소성 마커인 BDNF의 활성도 발견될 수 있음. 또한 혈중의 Corticosterone level로써 판단할 수 있음
- 시계꽃 소재의 수면연관 유전자 추적 및 Biomarker의 유용성 관찰
  - : 시계꽃 소재의 투여에 의한 수면연관유전자 추적을 위한 프로테옴 분석
  - : 밝혀진 활성 Biomarker의 생물학적 특성 확인 (in vitro/in vivo)
- 설정된 투여용량/투여기간에 의한 수면기능증진에 대한 데이터 수집
  - : 연구를 통하여 확보된 최적의 투여용량/투여기간에 의한 시계꽃 소재의 실험동물투여에 의한 수면기능 확인
  - : 수면증진 효능/기능의 유효 데이터 확보

- ㉔ 시계꽃 소재의 실험동물모델 투여에 의한 수면기능/부가기능 및 신속스크리닝법 도입
  - 시계꽃 소재를 통한 효능, 기전예측을 위한 신속스크리닝법을 도입하여 소재 검색을 위한 다양한 경우에 대비한 신속성을 위하여 도입
  - C. elegans를 통한 시계꽃 소재의 추가 효능에 대한 데이터 확보 가능
  - in vitro (cell line or primary culture)를 통하여 기전검색 시도

(나) 시계꽃 소재의 약리학적 효능 평가

① 세포실험을 통한 수면촉진 기능 실험

㉕ 시계꽃 소재의 안전성 및 효능규명

- 시계꽃 소재의 안전성을 위한 MTT test, MTS test를 통하여 세포안전성 모듈의 확립
- 실험동물의 골수세포 추출 후 in vitro 단계에서 시계꽃 소재의 농도별 안전성 검증
- 수면촉진의 중요한 신경전달물질에 해당하는 GABA 활성 level의 측정을 통하여 시계꽃 소재의 수면기능활성에 대한 기전을 이해할 수 있음.

특히 GABA neuron의 증명, GABA 발현의 증감, GABA receptor의 활성 및 발현의 증감, GABA 합성을 촉진하는 enzyme GAD1의 활성 및 발현의 증감 등이 측정 지표가 됨.

시계꽃 소재의 주요 효능이 될 수 있는 중요 지표로써, in vitro/in vivo의 공통기전여부를 확인하기 위하여 신경세포주, 시계꽃 소재의 투여를 한 동물의 뇌조직을 통하여 GABA, GABA receptor 그리고 GAD enzyme의 발현여부를 측정

㉔ 시계꽃 소재의 투여에 의한 수면중추영역 탐색

- 지금까지 여러 세기 동안 시계꽃을 달여 음용하는 방식으로 수면, 불안, 진정 등의 민간요법으로 시계꽃 성분들이 사용되었으나, 시계꽃 소재에 의하여 활성화되는 뇌영역 또한 밝혀지지 않았으므로 이에 대한 증거가 매우 중요한 부분임.
- 이 소재의 주요 수면유도중추 자극영역을 밝히는 것은 세계적으로도 첫 번째임.
- c-fos 유전자는 뇌자극에 대하여 곧바로 반응하는 전사유전자로써 시계꽃 소재를 투여한 후 1~2시간 사이에 피실험동물을 희생하여 뇌를 적출하고 anti-c-fos antibody를 이용한 immunohistochemistry를 실시하여 뇌의 활성부위를 추적할 수 있음.
- 확보된 뇌조직을 olfactory bulb로부터 대뇌의 마지막 부분까지 30 $\mu$ m간격으로 Coronal section하여 (Bregma 1.98~ Bregma - 4.72mm) 조직을 준비하였으며, 이들 모두를 immunohistochemistry를 통하여 anti-c-fos antibody에 대한 positive 반응을 관찰

㉔ 시계꽃 소재의 투여에 의한 신경전달물질/호르몬의 변화 측정

- 시계꽃 소재의 단회 및 반복투여에 의하여 sleep/wake cycle에 매우 중요한 serotonin, melatonin의 혈액내의 발현 차이를 통하여 동물의 수면기능촉진여부를 탐색 가능
  - 시계꽃 소재의 횡수 외 투여용량에 의한 변화 확인
  - 시계꽃 소재의 투여에 의하여 신경전달물질 GABA를 발현하는 GABA neuron의 발현량을 측정하고, melatonin receptor1 발현량을 본 소재의 수면기능촉진의 증거 확인
  - 시계꽃에 의하여 변화하는 신경전달물질의 변화 확인
- 동물의 수면을 위해서는 Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis의 deacceleration이 필요.
- 시계꽃 소재의 투여를 한 실험동물의 뇌에서 CRF, GR, BDNF를 측정하여 HPA axis의 deacceleration 여부를 확인할 수 있음.

㉕ 시계꽃 소재의 투여에 의한 수면기능촉진 효능 확인

- 시계꽃 소재의 다양한 투여용량별 수면기능 발휘 여부 확인
  - 수면촉진기능과 연관된 뇌중추의 분자적 수준의 현상 관찰 (해마, 시상하부)  
GABA 활성화에 의하여 나타나는 변화 (hippocampal neurogenesis, interneuron의 활성화 등)
  - 투여용량/투여기간에 의한 수면현상의 기록 및 평가
- 식약처에서 제시하고 있는 Immobility (Low locomotor activity), 눈안검검사 (palpebral closing time) 등의 측정 및 분석
- 단회 및 반복투여에 의한 수면촉진기능성 분석

㉖ 시계꽃 소재의 특수기전 연구

- 시계꽃 소재의 일반 수면촉진기전 뿐만 아니라, 이 소재만의 특수기전을 통하여 소재의 활용에 보다 정확한 이해와 함께 응용분야의 확장이 가능함.
- 시계꽃 소재의 투여 후 실험동물의 뇌를 적출하여 곧바로 단백질을 추출하고 LC/MS/MS를 기본으로 한 다양한 단백질 발현의 변화를 확인하고 유효하게 변화가 예상되는 특정 유전자 선별

- 선별된 유전자에 대한 validation을 위하여 cortical neuron primary culture/in vivo 실험을 통하여 시계꽃 소재 투여에 의한 선별된 유전자의 관계를 밝혀 기전으로써 이해

(다) 연구내용 및 결과

① 시계꽃 소재의 안전성 확인

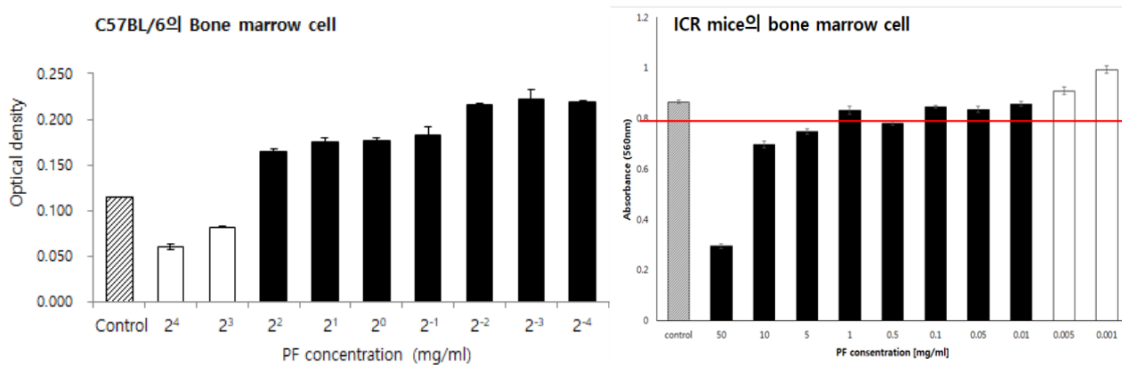


그림36. C57BL/6와 ICR 마우스의 골수세포를 분리하고 MTT assay를 실시하여 농도별 세포의 독성여부를 평가. 특히 ICR 마우스의 골수세포의 경우는 고농도 (50mg/kg, 10mg/kg) 외에 모두 대조군(control)과 비슷한 정도의 활성을 보임.

시계꽃 추출물의 세포독성을 MTT assay를 통하여 반복적으로 관찰하였고, 매우 고농도일 경우만 제외하고 세포독성이 발견되지 않았음. 이것은 ICR 마우스, C57BL/6의 Bone marrow cell (BMC) 두 가지 종류 마우스의 세포를 사용하여 실시하였으며, 결과 역시 세포독성은 발견되지 않았음.

추가적으로 시계꽃 소재가 가지고 있는 ROS level의 변화 및 cell viability를 C6 glioma cell line을 통하여 추가적으로 확인.

시계꽃 소재를 C6 glioma cell line에 6시간, 24시간 처치를 하고 각각 ROS 및 cell viability를 측정.

C6 glioma cell 을 60mm plate에 2×10<sup>4</sup> cell을 seeding 하고, 12시간 배양하고 시계꽃 추출물을 표시된 농도대로 6시간, 24시간 처리한 후, intracellular ROS production level을 측정. 시계꽃 추출물의 항산화 효능 확인.

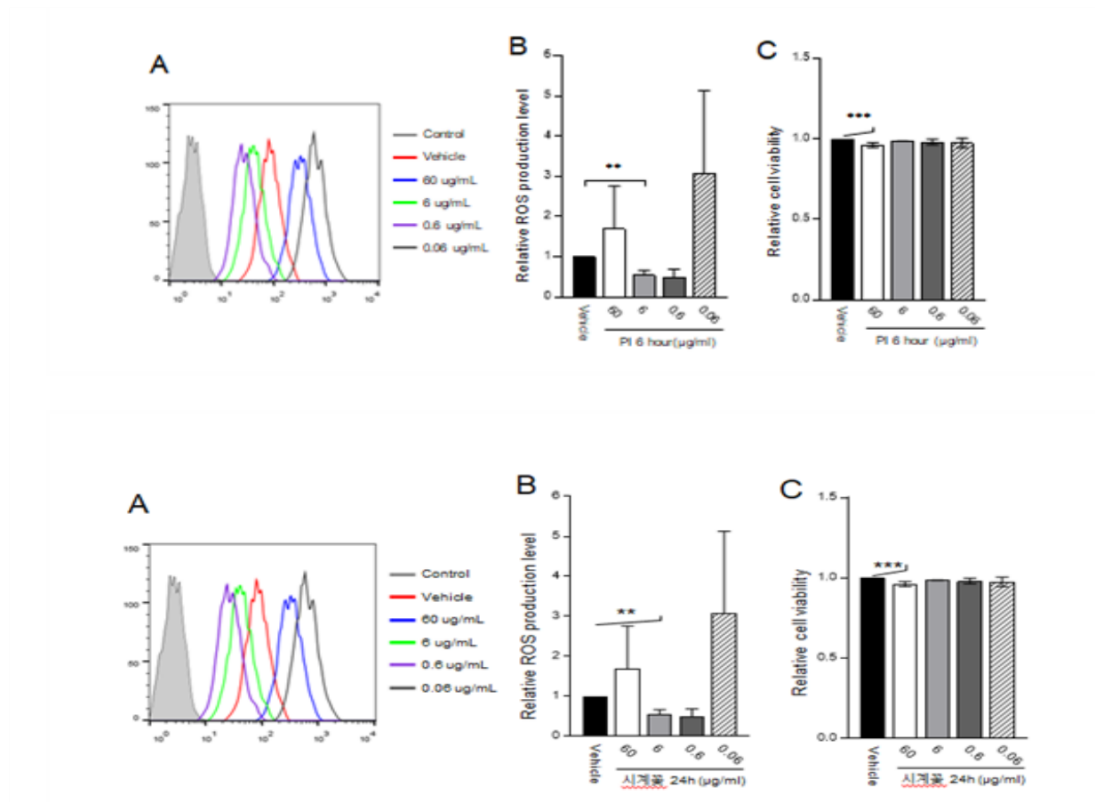


그림37. 시계꽃 추출물의 cell viability와 intracellular ROS 생성에 미치는 효능 (6시간, 24시간 처치)

시계꽃 추출물을 신경세포주인 C6 glioma cell에 처치하여 항 ROS와 Cell viability를 측정하였음.

ROS의 조절능력은 수면기능조절에 매우 중요한 인자로 알려져 있기 때문에 시계꽃 소재의 ROS 조절 능력은 매우 중요한 고려 인자로서 인정될 수 있음.

또한 6, 24시간의 시계꽃 처치에 의하여 세포의 viability에도 영향을 주지 않는 것을 확인하였음.

이상에서처럼 BMC(중배엽유래), C6 glioma cell (외배엽유래)와 같은 다양한 종류의 세포에 직접적 독성을 미치지 않는 것으로 보이며, 따라서 시계꽃의 사용은 세포수준에서 독성이 인정되지 않을 것으로 사료됨.



② C.elegans 모델을 통한 시계꽃 추출물의 환경스트레스 및 생존률에 미치는 영향 분석

C.elegans를 이용한 environmental stressors에 대한 저항성, lifespan 증가여부를 관찰하였음.

수면을 촉진하는 GABA 도 신경세포의 과흥분 및 세포생존률에 영향을 미치는 만큼, C. elegans를 통하여 environmental stressors 처리와 oxidative stress에 의한 생존 및 life span 정도의 측정 결과가 시계꽃 추출물의 기능을 이해하는데 도움이 될 것임.

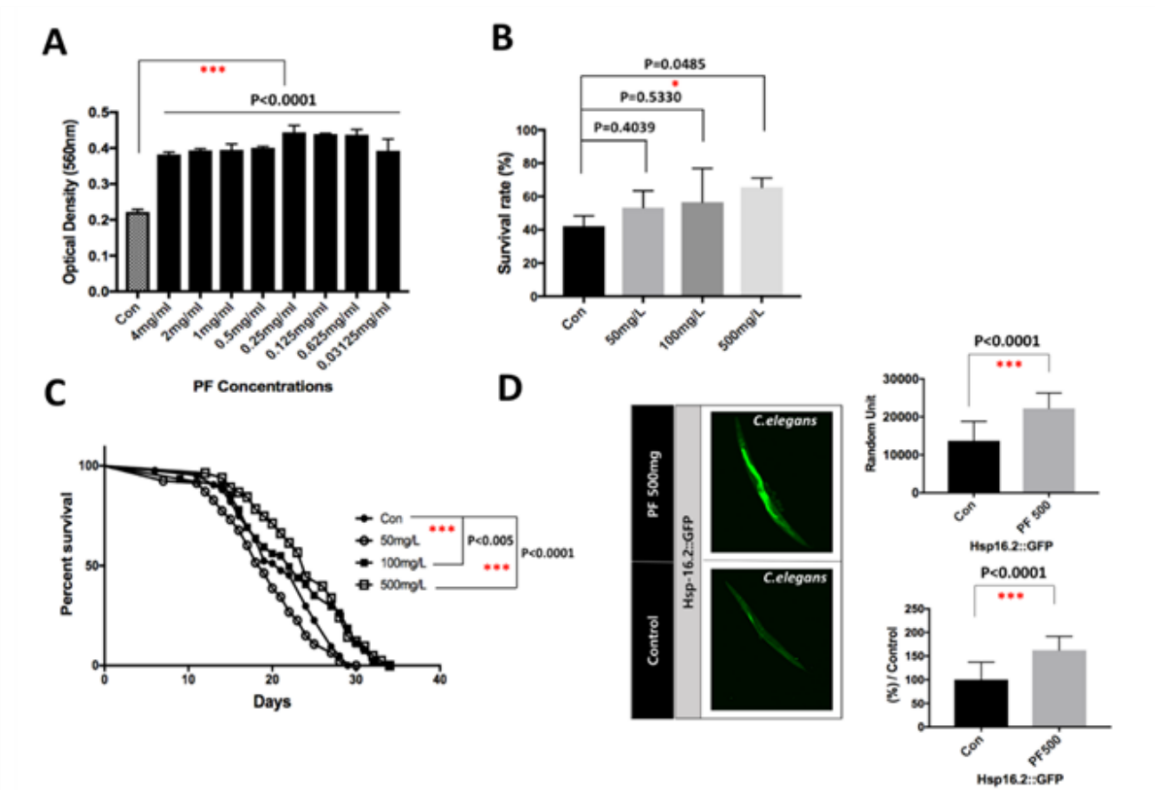


그림38. C.elegans를 이용한 environmental stressor 및 life span 증가 분석

Lifespan extending effect of PF extract in *C. elegans*.

		Conc. (mg/L)	Mean lifespan(day) <sup>1)</sup>	Maximum lifespan(day) <sup>2)</sup>	p-value <sup>3)</sup>	% increase <sup>4)</sup>	
1 <sup>st</sup>	Experiment	control	17.6	27			
		PF	50	19.8	31	0.025	12.4
	Experiment	PF	100	21.2	34	0.001	20.8
		PF	500	21.1	33	0.001	19.8
2 <sup>nd</sup>	Experiment	control	21.3	29			
		PF	50	19.7	30	0.314	-7.2
	Experiment	PF	100	22.5	34	0.085	5.5
		PF	500	24.2	34	0.012	13.6

<sup>1)</sup> Mean lifespan is the day when 50% of worms were survived.

<sup>2)</sup> Maximum lifespan is the greatest age reached by the last surviving worm.

<sup>3)</sup> p-value was calculated using the long-rank test by comparing the survival of control and PF-treated groups.

<sup>4)</sup> % effects were calculated by (A/C)\*100, where A is the mean lifespan of *C. elegans* treated with each concentration of PF and C is the mean lifespan of control.

그림39. C.elegans를 이용한 environmental stressor 및 life span 증가 분석표

C. elegans의 생존률 분석을 위하여 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 oxidative stress를 가하고 시계꽃 50, 100 그리고 500mg/L의 농도로 처리하고 분석 실시.

hsp-16.2의 발현을 통해 C.elegans의 environmental stressor에 대한 저항성을 측정.

C.elegans에 대한 본 연구결과는 Journal of Chemical Neuroanatomy (2019) 98: 27~40에 게재 되었음.

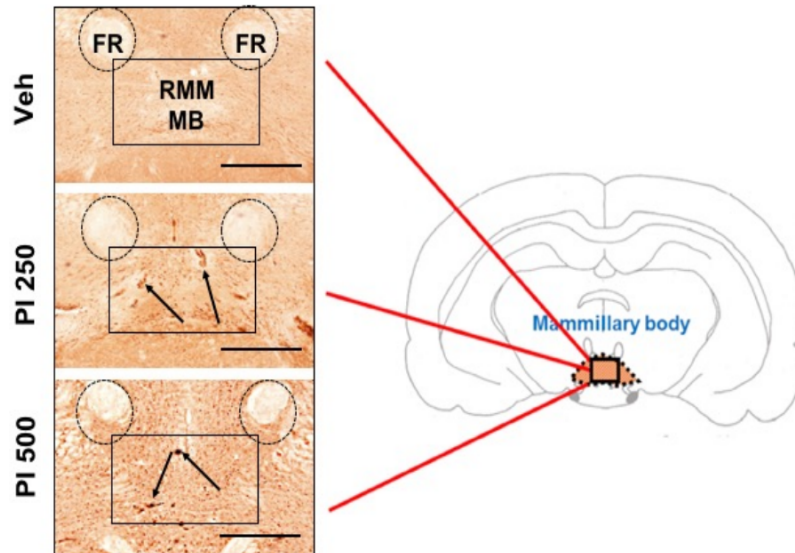


그림40. 시계꽃 소재 (250mg/kg, 500mg/kg)를 투여한 후 c-fos 항체를 이용하여 시계꽃 소재에 의하여 자극받았을 것으로 예상되는 부위를 관찰 (MB: Mamillary body, RMM: Retromammillary nu, medial)

### ③ 시계꽃 소재 투여에 의한 뇌의 target region 추적

위에서 설명한 바와 같이 시계꽃이 직접적으로 자극하는 뇌의 영역을 찾아내는 것이 물질의 작용원리와 기전을 이해하는데 반드시 동반되어야 할 연구내용임.

시계꽃을 투여받은 동물의 뇌를 분리하여 고정하고 동물의 뇌의 가장 앞(olfactory bulb)에서 대뇌의 마지막 부위까지 30 $\mu$ m간격으로 모두 박절하여 c-fos 항체를 이용하여 자극받은 뇌의 위치를 확인하였음.

설치류(마우스)의 뇌지도에 의하면 (Bregma 1.98~ Bregma - 4.72mm)에 해당하는 뇌조직을 모두 박절하여 면역조직화학염색법(immunohistochemistry) 방법을 이용하여 c-fos 양성 부위를 찾아냄.

위에 보이는 면역조직화학염색법에 의하여 c-fos positive cell이 관찰된 곳은 Mammillary body라고 하는 부위이며 Bregma - 2.46 ~ Bregma - 2.80에 해당함.

본 연구결과에서 알게된 Mammillary body는 시상하부에 해당하는 영역으로써, 2018년 Fifel 등 (Neurobiol Dis; 109(PtA): 54-63)에 의하면 이 영역은 수면에 매우 중요한 부위라고 결론을 내었으며, Vann과 Aggleton (2004; Nat Rev Neurosci 5:35-44)의 보고에 의하면 이 부위는 수면 뿐만이 아니라 동물의 기억력의 기능에도 매우 밀접한 영역이라고 할 수 있음.

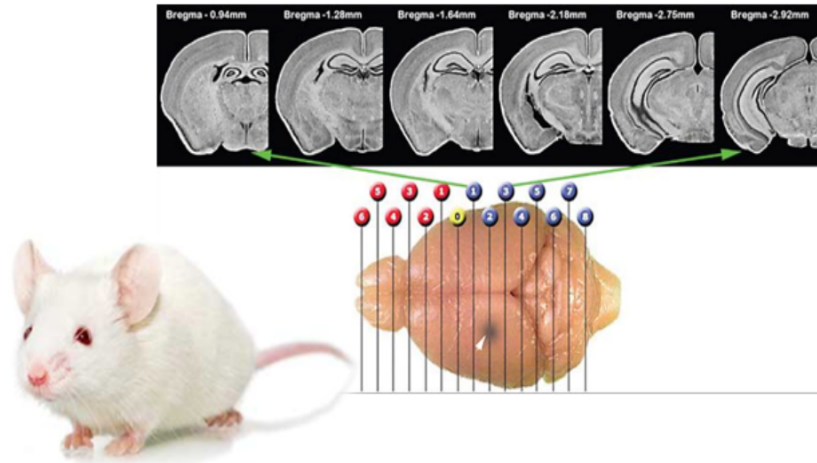


그림41. 실험동물로부터 적출한 뇌의 분석부위를 위의 그림과 같이 olfactory bulb에서 cerebrum까지 설정하여 박절

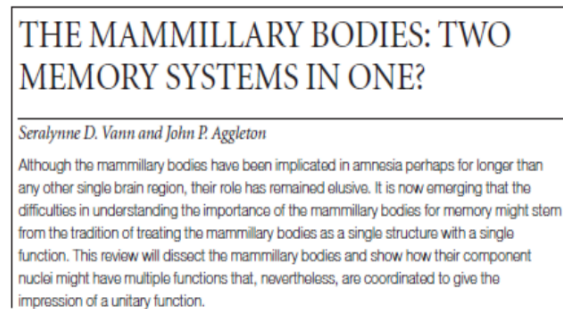
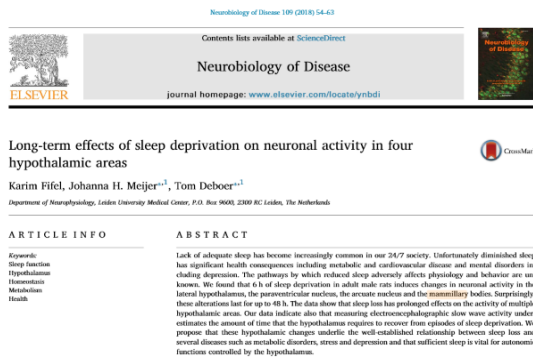


그림42. (좌) Mammillary body와 수면과의 관계성, (우) Mammillary body와 기억력과의 밀접한 관계성을 밝힌 연구보고들

질 좋은 수면과 기억력과의 관계는 오래 전부터 알려져 있던 바이나, 최근 알츠하이머병의 유병률이 높아지고 있기 때문에 이러한 관계성은 더 중요하게 고려되고 있음.

시계꽃 추출물의 복용에 의하여 수면을 촉진하는 1차적 목표도 중요하지만, 이를 통하여 발생할 수 있는 기억력 저하와 알츠하이머병(치매)과 같은 어찌면 더욱 치명적인 결과를 예방할 수 있는 효능을 부가적으로 가지고 있다는 것은 제품으로써의 부가가치를 향상시킬 수 있을 것임 (Nature, 559: 518-520 (2018)).

PREVENTIVE MEDICINE

# A quest to stave off the inevitable

The idea that certain lifestyle choices could help to prevent Alzheimer's disease is gaining broader acceptance.

BY EMILY SONN

Alzheimer's disease has long been considered an inevitable consequence of aging that is exacerbated by a genetic predisposition. Increasingly, however, it is thought to be influenced by modifiable lifestyle behaviours that might enable a person's risk of developing the condition to be controlled. But even as evidence to support this idea has accumulated over the past decade, the research community has been slow to adopt the idea.

This reluctance was obvious as recently as 2010, when the US National Institutes of Health (NIH) brought together a panel of 15 researchers to consider the state of research on preventing Alzheimer's disease, at a conference in Bethesda, Maryland. Tantalizing findings had begun to emerge that suggested that behavioural choices such as engaging in physical exercise, intellectual stimulation and healthy eating could reduce the risk of brain degeneration. In a 2006 study (ref. 1) that followed more than 2,200 people in New York for four years, researchers found that people who adhered to a Mediterranean diet — full of whole grains, fruit and vegetables, fish and olive oil — had an up to 40% lower risk of dementia than people who ate more dairy products and meat.

For three days, the NIH panel listened to presentations on the state of the science, but its members were unconvinced. They concluded that the evidence was not strong enough to show causality between lifestyle choices and Alzheimer's disease. There was little consistency in the methods and diagnostic definitions of the condition used by different studies, and the panel pointed to conflicting results from studies that were limited by size or length, among other flaws. Plenty of promising research was under way, the panel recognized, but there was a crucial need for more long-term, large-scale population studies and rigorous, randomized controlled trials to determine which lifestyle behaviours, if any, could help to stem the tide of Alzheimer's disease.

In the eight years since then, observational studies and new trials have led to a sea change in thinking about Alzheimer's disease. Just

three years after the NIH published its sceptical stance, 109 scientists from 36 countries issued a letter to the G8 Dementia Summit in London that proposed that there was enough evidence to justify encouraging middle-aged people to ward off dementia by avoiding obesity and stopping smoking, among other advice, with the potential to prevent up to one-fifth of new cases by 2025. In a 2017 study that compiled the latest evidence on nine factors linked to dementia, including education in childhood and high blood pressure in mid life, researchers estimated that 35% of the dementia burden could be attributed to potentially controllable factors — making such factors more influential than the gene variant most commonly linked to sporadic Alzheimer's disease.

Some of the most powerful evidence to support the possibility of prevention comes from prevalence data. In the past two decades, rates of dementia have fallen by up to 20% in high-income countries such as the United States, United Kingdom and Canada<sup>2</sup>. The trend cannot be ascribed to better treatment because there are no effective therapies for halting Alzheimer's disease, which is estimated to account for around two-thirds of dementia cases. And the decline has come even as the prevalence of dementia worldwide has increased. This effect is probably the result of changes in the lifestyles of people in high-income countries. "If we had a drug that did that, people would be saying it's a miracle drug," says Gill Livingston, a psychiatrist at University College London.

**BRAIN FOOD**

The long-held view that cognitive decline is a natural consequence of aging and genetics is borne of simple reasoning: in people over the age of 65, the risk of developing Alzheimer's disease doubles every five years. And people who carry the apolipoprotein E gene variant APOE-ε4 have up to a five-times-higher risk of developing the condition than do those who lack the variant.

But even as the NIH panel urged caution, some researchers were beginning to compile a clearer case for being able to prevent Alzheimer's disease, says Leon Flicker, director of the Western Australia Centre for Health and Ageing at the University of Western



Australia in Perth. In the years since 2010, he says, a growing number of high-quality studies have built an even stronger argument.

Diet, in particular, is now thought to be an important modifiable factor. In a 2013 study<sup>3</sup>, researchers from Spain randomly assigned more than 500 people aged between 55 and 80 and at high risk of developing cardiovascular diseases, to either a low-fat diet plan or a Mediterranean diet. Follow-up assessments performed after participants had followed the diets for around six and a half years showed that those who ate a Mediterranean diet scored highest on cognitive tests.

More recently, researchers have begun to determine how diet might affect the brain. Earlier this year, two studies<sup>4,5</sup> showed that the brains of healthy, middle-aged people who faithfully followed a Mediterranean diet showed less atrophy on magnetic resonance imaging scans, and accumulated less of the protein amyloid-β that is a hallmark of Alzheimer's disease than did people who did not stick to the regimen. "It is the first time we are showing changes in the brain related to diet in people who are young," says Lisa Mosconi, co-author of the studies and a neuroscientist at New York University School of Medicine and the Alzheimer's Prevention Clinic at Weill Cornell Medicine in New York.

"If you follow a Western diet, your brain ages faster. A Mediterranean diet is protective." The mechanism that underlies this protection is starting to become clear. Diet seems to influence inflammation and oxidative

As evidence from larger and longer-term studies accumulates, other risk factors for Alzheimer's disease, including depression

**"If you follow a Western diet, your brain ages faster. A Mediterranean diet is protective."**

and a lack of sleep, are emerging. Indeed, a 2017 meta-analysis<sup>13</sup> of 27 studies found that sleep problems raise the risk of cognitive impairment by 65%, and that dysfunctional sleep could explain as

many as 15% of cases of Alzheimer's disease. Another considerable risk factor is traumatic brain injury (TBI). In a study<sup>14</sup> published this year that included data on almost 2.8 million people in Denmark, gathered over 36 years, researchers reported that such injuries were associated with a higher risk of dementia, and that risk increased with the number of TBIs received and when TBIs occurred at a younger age.

그림43. "How to stack up for preventing Alzheimer's disease" 수면과 인지기능, 기억력과 같은 인간의 삶에 중요한 기능의 유지를 위한 수면기능에 대하여 설명하고 있음.

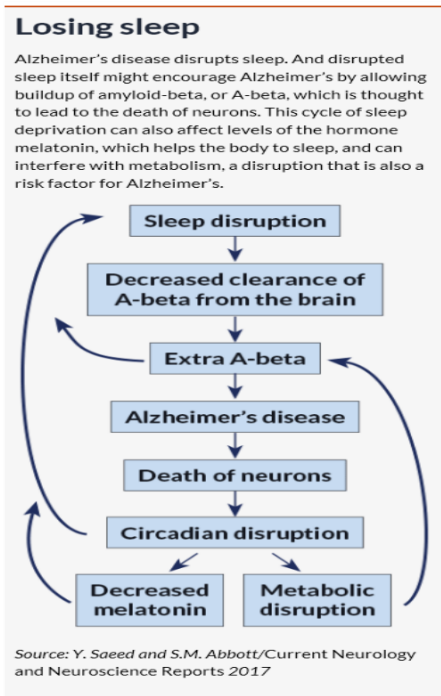


그림44. 수면이상(losing sleep)에 의하여 나타날 수 있는 다양한 임상증상은 수면촉진기능을 가지고 있는 소재가 보여야 할 교정 능력의 조건들을 반영함.

최근 네이처의 보고에 의하면 불면증은, 알츠하이머, 우울증 및 인지기능의 위험요소로서 중요한 역할을 하고 있다고 함. 이를 통하여 수면과 다른 기타 질병과의 연관성을 통하여 수면촉진 기능에 의하여 기타 질병들의 교정능력을 살펴보는 것도 유의한 정보를 확보하는 것임.

수면부족과 대사이능장애, 세포사, 인지기능감소, 광주기성 이상, 알츠하이머병은 매우 밀접한 연관성을 동시에 가지고 있으며, 수면기능촉진 물질은 이들 모두를 확인하여야 기능성과 안전성을 동반할 수 있다는 것을 모두 확보하는 방향으로 연구를 진행함.

#### ④ 수면촉진기능을 보유한 시계꽃 소재의 신경학적 특성 분석

수면촉진기능을 가지고 있는 시계꽃 소재의 신경학적 분석 내용은 본 연구팀에 의하여 최근 Journal of Chemical Neuroanatomy (2019) 98: 27~40에 출판되었고, 시계꽃 소재의 추가적 기능들에 대하여 인정받았음.



It is worth investigating whether energy utilization can be differentiated through FF in the future. Taken together, an behavioral, physiological, or metabolic change of significance were caused by FF administration for about 2 weeks through BioMAP<sup>®</sup>, Phenometer<sup>®</sup>, and Mini spec equipment, we found using rats or mice.

The results of observing markers related to brain plasticity by FF administration rate, are shown in Fig. 5. It was confirmed that CCK, FAV, BDNF and MeCP1 at hippocampus, and CCK and GSK were significantly different by administration of FF. Interestingly, although not statistically significant, we found conflicting results with high CCK2 and low the 1 in the FF treated group. However, in our data and previous reports (Choi et al., 2013), we observed a marked decrease in neurogenesis following CX3C2 inhibition (Fig. 6), indicating that CCK2 is not necessarily involved in neuroinflammation but is a necessary enzyme for high neurogenesis. Therefore, FF administration is thought to contribute to increasing brain plasticity by inhibiting the activity of microglia in the brain, without inducing neuroinflammation by CCK2 (Fig. 6). According to the immunohistochemistry for Iba1 expression, the most of the Iba1 positive cells in the hippocampus of the Web and Fp groups (Microglia count cortex) were not much different each other. However, more classified microglia observed at Web group than those of Fp group. In particular, microglia had little round and vesicular cell bodies and were less activated in Fp group than those of Web group. These results are consistent with the data of Western blot for Iba1, and morphologically confirmed that microglial cells are more inactive and stable in the hippocampal area by FF treatment in the animals.

There have been reports that AD progression can be inhibited by inhibiting the activity of microglia (Choi et al., 2013; Choi et al., 2017; Wadhvani et al., 2017). We also found that FF can inhibit neuroinflammation as well as C-EGF gene in this study.

From prior work, we hypothesized that administration of FF could substantially improve memory in animals and confer some level of resistance to AD. Mice were naive mice not used to measure hippocampal-dependent learning, including acquisition of spatial memory and long-term spatial memory following treatment with FF (Shimizu-Hirata et al., 2011). The results showed that recognition function was significantly improved with FF treatment (Fig. 7). These results indicate that *Passiflora incarnata* was significantly lower in the FF treated group (Fig. 7), and showed that FF provides resistance to AD with memory improvement.

Before designing genetically engineered AD animals, we needed to verify the safety and efficacy of FF through normal rodent models. Taken together, all of the above results indicate that administration of FF has both memory and learning enhancement, and provides resistance to AD. These results are due to the regulation of the neuroinflammatory response and by providing strong resistance to neuronal structures. Therefore, based on the results of the present study, we will find the target mechanism of FF through various genetically-engineered mice and achieve therapeutic approaches to effective, safety, memory and cognitive brain disease.

Introduction for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (TFF) through High Value-added Food Technology Development Program funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (115044 603 10000), Republic of Korea, and supported by Jeonju National University Research Fund. On behalf of all authors, we sincerely appreciate technical support from Korea Mouse Phenotyping Center (KMPC), Seoul, Republic of Korea.

**Appendix A. Supplementary data**  
Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.jchemna.2019.03.005>.

**References**

Alford, R., Patel, A.D., M. Shih, M. Shih, M. Shih, M. Shih, 2013. Neuroinflammation in amyloid-beta-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 249–259.

Alzheimer, A., 1907. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 12, 112–148.

Alzheimer, A., 1911. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 22, 112–148.

Alzheimer, A., 1912. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 32, 112–148.

Alzheimer, A., 1913. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 42, 112–148.

Alzheimer, A., 1914. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 52, 112–148.

Alzheimer, A., 1915. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 62, 112–148.

Alzheimer, A., 1916. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 72, 112–148.

Alzheimer, A., 1917. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 82, 112–148.

Alzheimer, A., 1918. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 92, 112–148.

Alzheimer, A., 1919. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 102, 112–148.

Alzheimer, A., 1920. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 112, 112–148.

Alzheimer, A., 1921. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 122, 112–148.

Alzheimer, A., 1922. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 132, 112–148.

Alzheimer, A., 1923. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 142, 112–148.

Alzheimer, A., 1924. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 152, 112–148.

Alzheimer, A., 1925. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 162, 112–148.

Alzheimer, A., 1926. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 172, 112–148.

Alzheimer, A., 1927. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 182, 112–148.

Alzheimer, A., 1928. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 192, 112–148.

Alzheimer, A., 1929. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 202, 112–148.

Alzheimer, A., 1930. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 212, 112–148.

Alzheimer, A., 1931. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 222, 112–148.

Alzheimer, A., 1932. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 232, 112–148.

Alzheimer, A., 1933. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 242, 112–148.

Alzheimer, A., 1934. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 252, 112–148.

Alzheimer, A., 1935. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 262, 112–148.

Alzheimer, A., 1936. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 272, 112–148.

Alzheimer, A., 1937. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 282, 112–148.

Alzheimer, A., 1938. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 292, 112–148.

Alzheimer, A., 1939. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 302, 112–148.

Alzheimer, A., 1940. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 312, 112–148.

Alzheimer, A., 1941. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 322, 112–148.

Alzheimer, A., 1942. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 332, 112–148.

Alzheimer, A., 1943. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 342, 112–148.

Alzheimer, A., 1944. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 352, 112–148.

Alzheimer, A., 1945. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 362, 112–148.

Alzheimer, A., 1946. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 372, 112–148.

Alzheimer, A., 1947. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 382, 112–148.

Alzheimer, A., 1948. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 392, 112–148.

Alzheimer, A., 1949. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 402, 112–148.

Alzheimer, A., 1950. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 412, 112–148.

Alzheimer, A., 1951. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 422, 112–148.

Alzheimer, A., 1952. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 432, 112–148.

Alzheimer, A., 1953. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 442, 112–148.

Alzheimer, A., 1954. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 452, 112–148.

Alzheimer, A., 1955. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 462, 112–148.

Alzheimer, A., 1956. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 472, 112–148.

Alzheimer, A., 1957. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 482, 112–148.

Alzheimer, A., 1958. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 492, 112–148.

Alzheimer, A., 1959. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 502, 112–148.

Alzheimer, A., 1960. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 512, 112–148.

Alzheimer, A., 1961. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 522, 112–148.

Alzheimer, A., 1962. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 532, 112–148.

Alzheimer, A., 1963. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 542, 112–148.

Alzheimer, A., 1964. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 552, 112–148.

Alzheimer, A., 1965. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 562, 112–148.

Alzheimer, A., 1966. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 572, 112–148.

Alzheimer, A., 1967. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 582, 112–148.

Alzheimer, A., 1968. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 592, 112–148.

Alzheimer, A., 1969. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 602, 112–148.

Alzheimer, A., 1970. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 612, 112–148.

Alzheimer, A., 1971. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 622, 112–148.

Alzheimer, A., 1972. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 632, 112–148.

Alzheimer, A., 1973. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 642, 112–148.

Alzheimer, A., 1974. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 652, 112–148.

Alzheimer, A., 1975. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 662, 112–148.

Alzheimer, A., 1976. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 672, 112–148.

Alzheimer, A., 1977. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 682, 112–148.

Alzheimer, A., 1978. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 692, 112–148.

Alzheimer, A., 1979. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 702, 112–148.

Alzheimer, A., 1980. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 712, 112–148.

Alzheimer, A., 1981. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 722, 112–148.

Alzheimer, A., 1982. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 732, 112–148.

Alzheimer, A., 1983. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 742, 112–148.

Alzheimer, A., 1984. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 752, 112–148.

Alzheimer, A., 1985. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 762, 112–148.

Alzheimer, A., 1986. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 772, 112–148.

Alzheimer, A., 1987. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 782, 112–148.

Alzheimer, A., 1988. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 792, 112–148.

Alzheimer, A., 1989. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 802, 112–148.

Alzheimer, A., 1990. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 812, 112–148.

Alzheimer, A., 1991. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 822, 112–148.

Alzheimer, A., 1992. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 832, 112–148.

Alzheimer, A., 1993. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 842, 112–148.

Alzheimer, A., 1994. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 852, 112–148.

Alzheimer, A., 1995. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 862, 112–148.

Alzheimer, A., 1996. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 872, 112–148.

Alzheimer, A., 1997. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 882, 112–148.

Alzheimer, A., 1998. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 892, 112–148.

Alzheimer, A., 1999. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 902, 112–148.

Alzheimer, A., 2000. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 912, 112–148.

Alzheimer, A., 2001. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 922, 112–148.

Alzheimer, A., 2002. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 932, 112–148.

Alzheimer, A., 2003. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 942, 112–148.

Alzheimer, A., 2004. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 952, 112–148.

Alzheimer, A., 2005. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 962, 112–148.

Alzheimer, A., 2006. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 972, 112–148.

Alzheimer, A., 2007. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 982, 112–148.

Alzheimer, A., 2008. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 992, 112–148.

Alzheimer, A., 2009. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1002, 112–148.

Alzheimer, A., 2010. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1012, 112–148.

Alzheimer, A., 2011. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1022, 112–148.

Alzheimer, A., 2012. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1032, 112–148.

Alzheimer, A., 2013. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1042, 112–148.

Alzheimer, A., 2014. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1052, 112–148.

Alzheimer, A., 2015. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1062, 112–148.

Alzheimer, A., 2016. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1072, 112–148.

Alzheimer, A., 2017. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1082, 112–148.

Alzheimer, A., 2018. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1092, 112–148.

Alzheimer, A., 2019. Über die eigenartige Erkrankung des "Alzheimer'schen" Typus. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1102, 112–148.

그림45. 시계꽃 소재의 사용을 통한 수면이상 동물에서의 신경재생 및 기억력 향상 논문

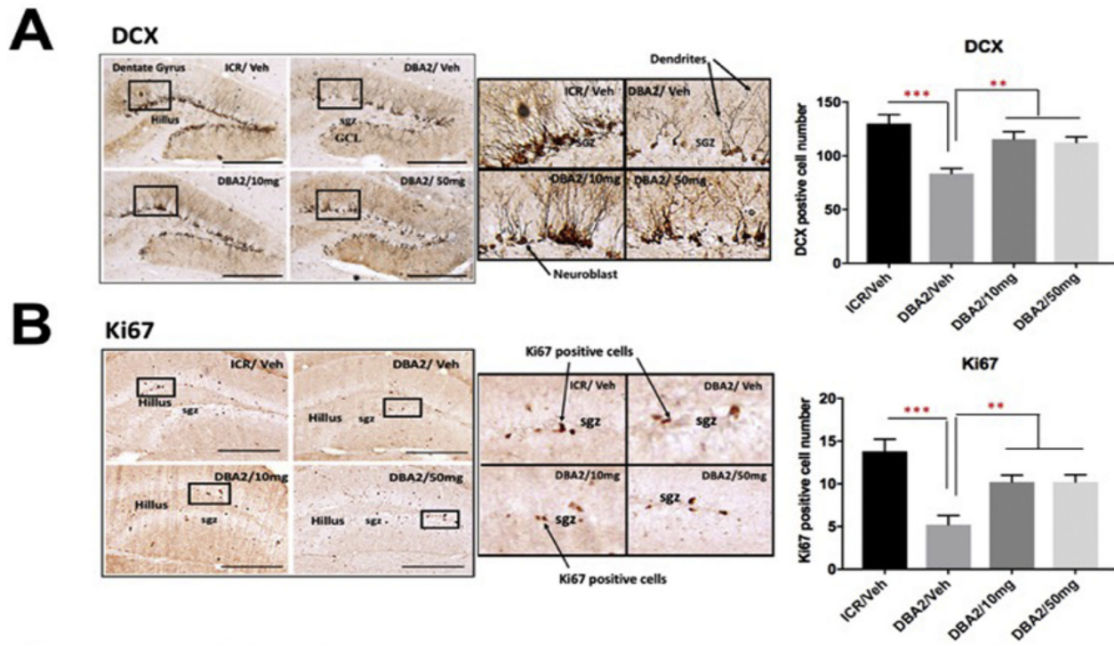


그림46. 선천적으로 수면이상을 가지고 있는 DBA/2 마우스의 해마에서의 신경재생을 Doublecortin (DCX) 항체와 Ki67을 이용하여 면역조직화학염색법을 이용하여 분석

위의 내용처럼 수면촉진기능을 가지고 있는 시계꽃 소재의 신경학적 특징을 알아보고자 선천적으로 수면 이상을 가지고 있는 DBA/2 마우스에게 시계꽃 소재를 주어 단기 기억력의 중추인 해마의 신경재생능력을 관찰하였음.

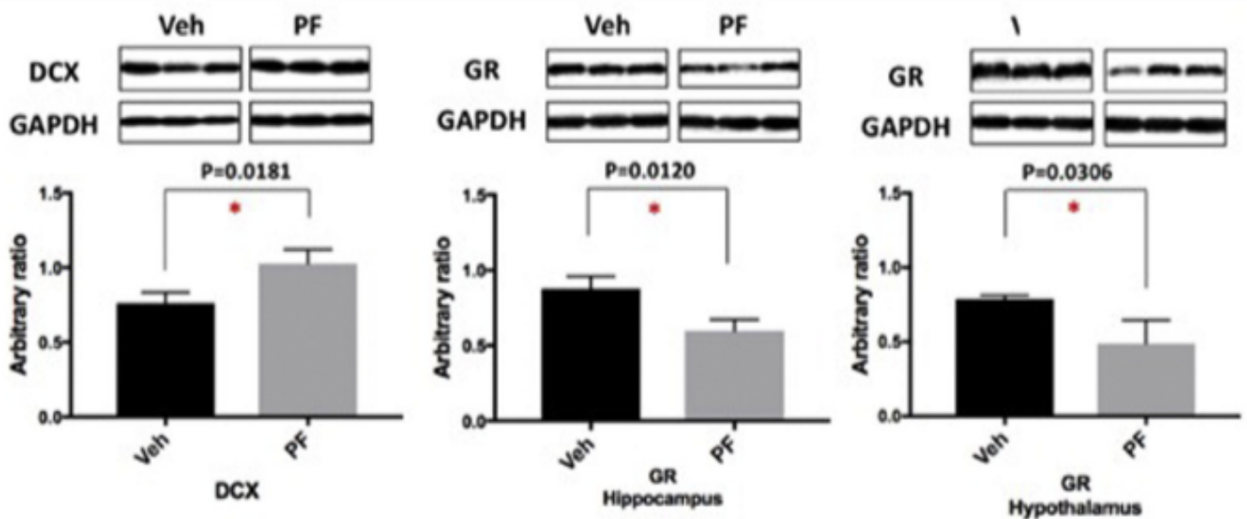


그림47. DBA/2 마우스는 선천적으로 수면장애를 가지고 있기 때문에 일반적으로 스트레스의 반응에 대한 항상성 유지에 필요한 HPA axis에 대한 반응에 대하여 과민반응(hyper-reactivity)을 나타낼 수 있게 됨. 그러나, 시계꽃 투여군(PF)에서 Glucocorticoid receptor (GR)의 발현이 hippocampus와 hypothalamus의 대조군에서 유의하게 낮아지는 현상도 추가적으로 발견하였음.

수면이상 시 신경재생에 대한 반응이 매우 저하된다는 보고들은 많이 알려져 있으며, 이들의 보고와 같이 DBA/2 마우스는 해마에서 신경재생 반응이 매우 미약하게 나타났으나, 시계꽃 소재를 투여한 후에는 DBA/2 마우스의 신경재생 반응이 유의하게 증가하는 것을 확인하였음.

동시에 해마(hippocampus)와 시상하부(hypothalamus)에서 HPA axis 마커 중 하나인 Glucocorticoid receptor (GR)의 발현이 감소하는 결과를 관찰할 수 있었음.

이것은 수면촉진기능 물질이 함께 가지고 있어야 할 중요한 동반기능이어야 함.

BioDAQ system 도입을 통하여 시계꽃 소재의 투여에 의한 수면유도 시간 및 섭식행동 추적의 객관적 정량화 가능.

· Real-time으로 시계꽃 투여 이후 motility의 변화 및 섭식행동의 변화를 직접적으로 관찰가능하며, 수면의 유도에 대한 섭식행동 중지 등에 관련된 시간 데이터를 얻을 수 있음.

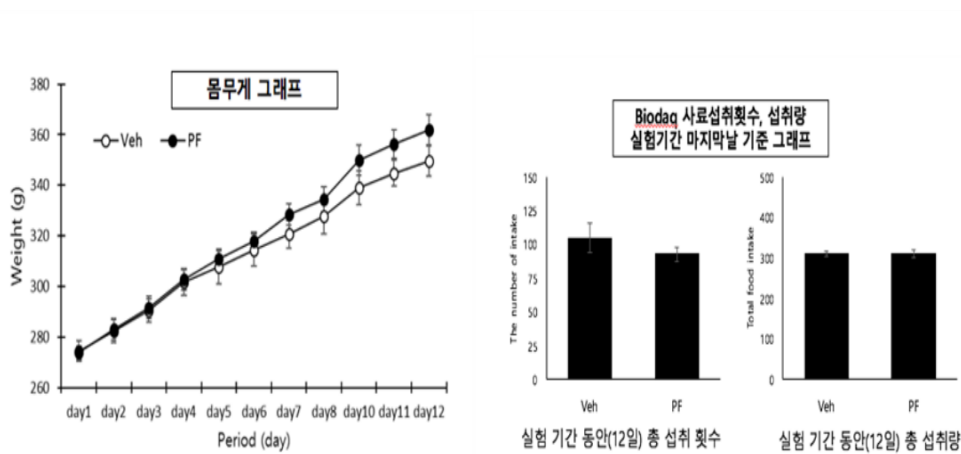


그림48. 시계꽃 상시투여 후 체중의 변화 감시 (SD rat)- 반복상시투여에 의한 체중변화와 수면과의 관계를 밝힐 필요가 있음

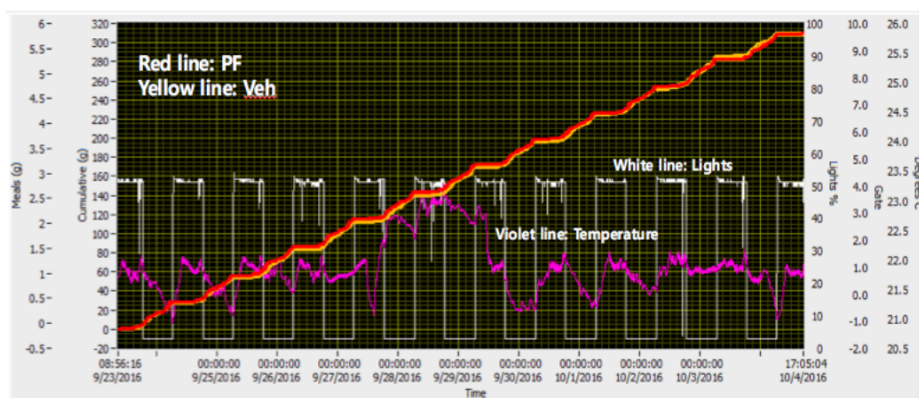


그림49. 시계꽃 상시투여에 의한 섭식행동의 패턴, 실험사육실의 온도, 광주기의 일정함 등을 리얼타임으로 기록할 수 있는 BioDAQ system 분석화면

· SD rat에 반복투여에 의하여 통계적으로 유의하지는 않으나 약간 증가하는 경향에 대한 면밀한 분석이 필요하여 SD rat 및 마우스 모델에서 추가 분석 후 이러한 현상이 발생하지 않음을 확인

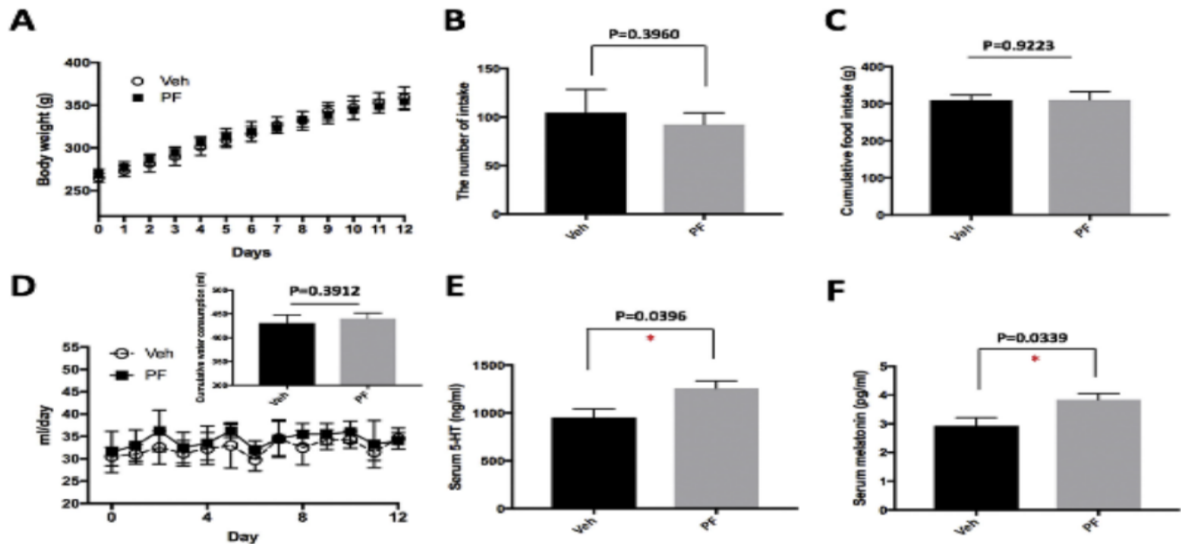


그림50. BioDAQ 장비를 이용해서 체중, 사료섭취, 사료누적소비량, 음수섭취량 등을 추적하였으며, 혈액 중 serotonin과 melatonin의 측정치를 반복확인

위에서 보이고 있는 시계꽃 추출물의 반복투여에 의한 변화 추적은 본 시계꽃 소재가 제품화 되었을 때 나타날 수 있을지 모르는 기타 부작용등을 미연에 스크리닝하여 위험요소 제거를 위하여 매우 필요한 과정임.

사료의 섭취 증가 및 체중이 증가하게 되었을 경우 복용에 의하여 작용할 수 있는 가능성은 시계꽃 소재의 반복투여에 의하여 발생되지 않음을 확인하였음.



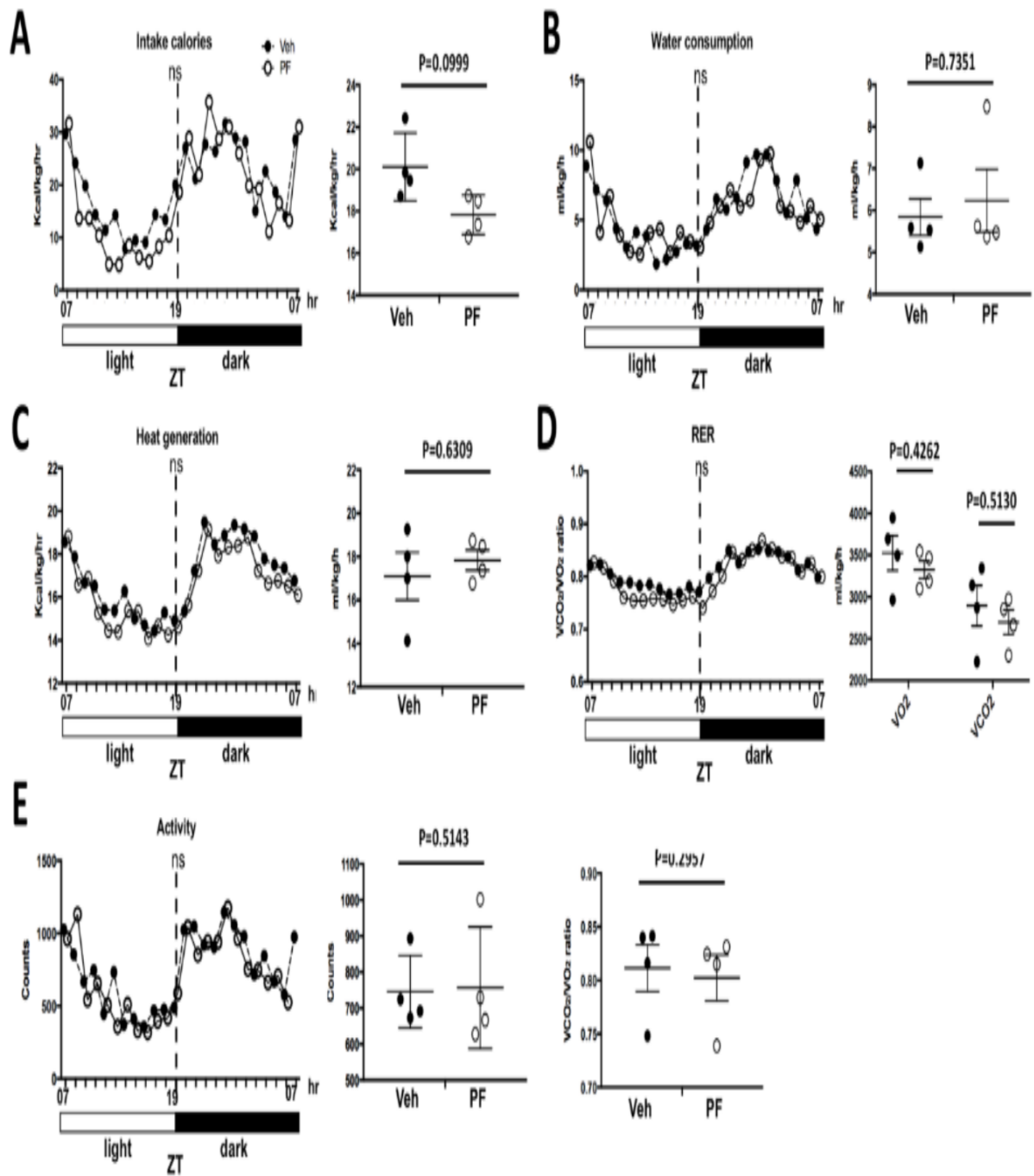


그림51. 시계꽃 소재를 저농도에서 반복투여했을 경우 나타날 수 있는 대사기전의 변화에 유의적 변화가 발견되지 않음. 사료섭취 칼로리, 음수섭취량, 열생산, 가스교환율, 활동성 등에 대한 유의적 변화는 발견되지 않음

· 과기부 소속 한국마우스표현형분석사업단(KMPC)에서 지원하고 있는 대사측정장비(TSE사의 Phenomaster 및 Brucker사의 Body composition 측정장비)를 이용하여 실험동물에 시계꽃 소재를 투여하고 유의한 변화가 있는지에 대한 관찰 실시

시계꽃 소재의 저농도 반복투여 하에서 대사기전의 변화에 의하여 발견될 수 있는 다양한 지표에 대한 측정을 통하여 대사기전에 특정 이상을 보이는 것은 발견되지 않았음.

또한, 시계꽃 소재의 저농도 반복투여에 의하여 body composition의 변화도 측정하였으나 대조군과의 어떤 변화도 관찰되지 않음.

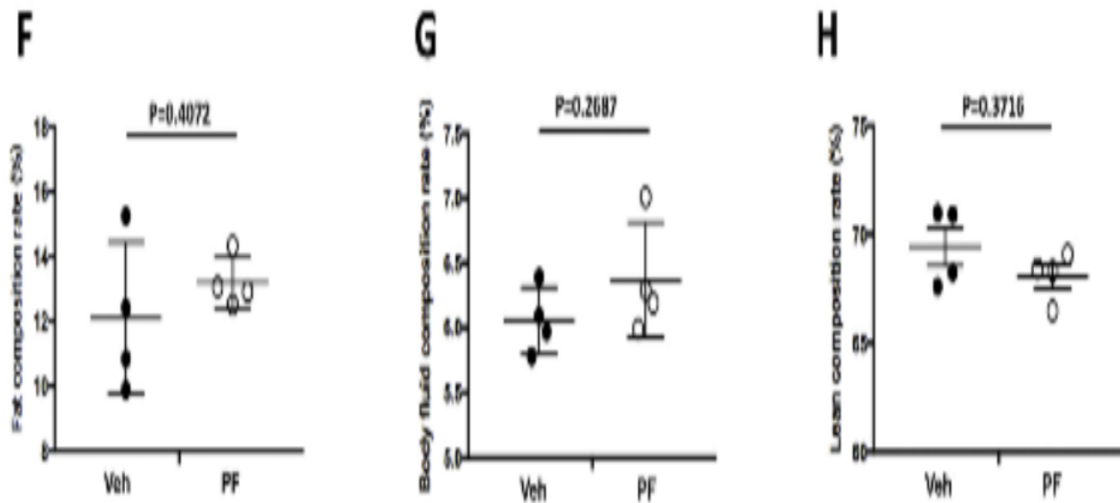


그림52. 시계꽃 소재의 저농도 반복투여의 경우 나타날 수 있는 body composition 변화에 유의적 변화가 발견되지 않음

시계꽃 소재의 결과를 임상에 외삽하기 위한 고농도의 투여에 의한 대사기전의 변화를 추가적으로 확인하여 시계꽃 추출물의 사용에 대한 안전성을 동물실험 중에서 추가 확인할 필요 있음.

· 고농도에서 GABA neuron의 활성화 (해마, 시상하부)의 확인 및 혈액 중 serotonin, melatonin level의 확인을 통한 수면촉진기능의 확인

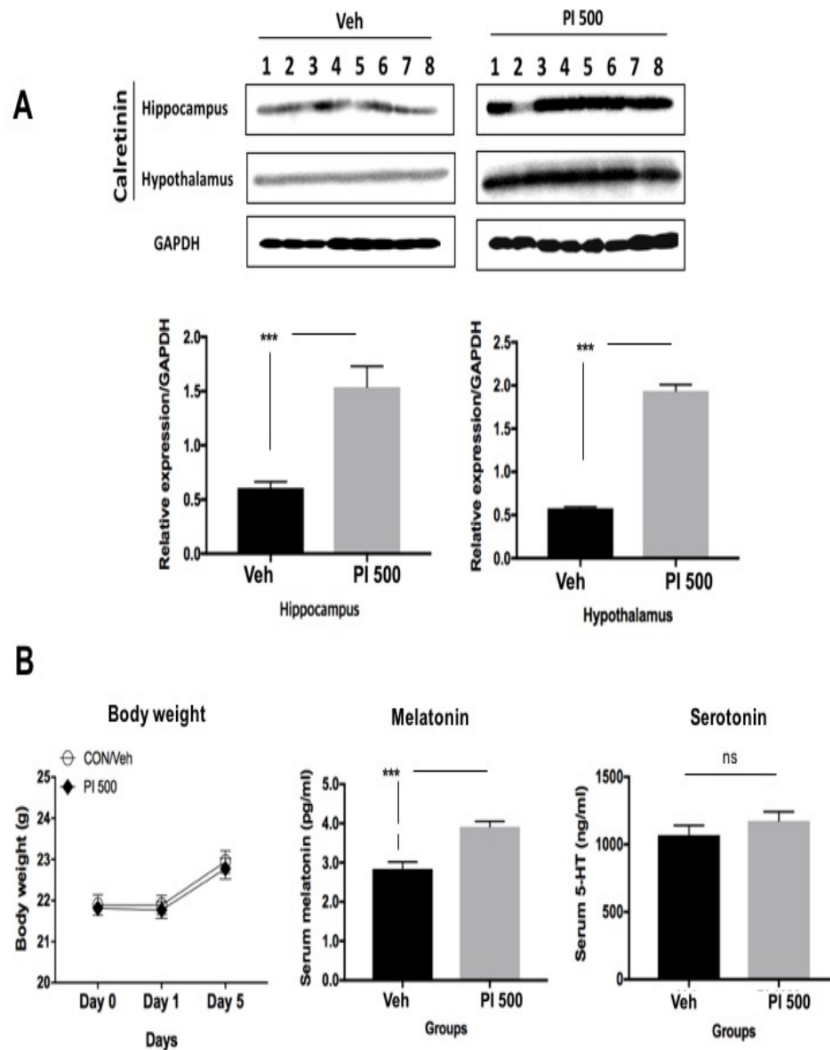


그림53. 고농도 시계꽃 추출물의 반복투여에 의하여 해마, 시상하부에서 증가하는 GABA 발현의 증가, 체중무변화, melatonin 레벨을 증가 관찰

고농도의 반복투여에서도 GABA neuron의 정량적 증가, 수면호르몬인 melatonin의 증가가 확인되었음.

고농도의 반복투여에서도 체중의 변화는 관찰되지 않았음.

앞에서 고려되었던 사료섭취량, 음수섭취량의 추적관찰을 TSE Phenomaster 대사챔버에서 5일간 실시되었고, 5일간 같은 시간의 평균값을 24시간으로 나누어 연속측정값으로 표현하였음.

결과에 따르면 일부 구간에서 사료섭취량, 음수섭취량의 유의적 감소 구간이 관찰되지만 24시간 전체 섭취량에는 큰 변화가 없음.

일부 감소 구간은 시계꽃 소재의 투여에 의한 수면 구간으로 사료됨.

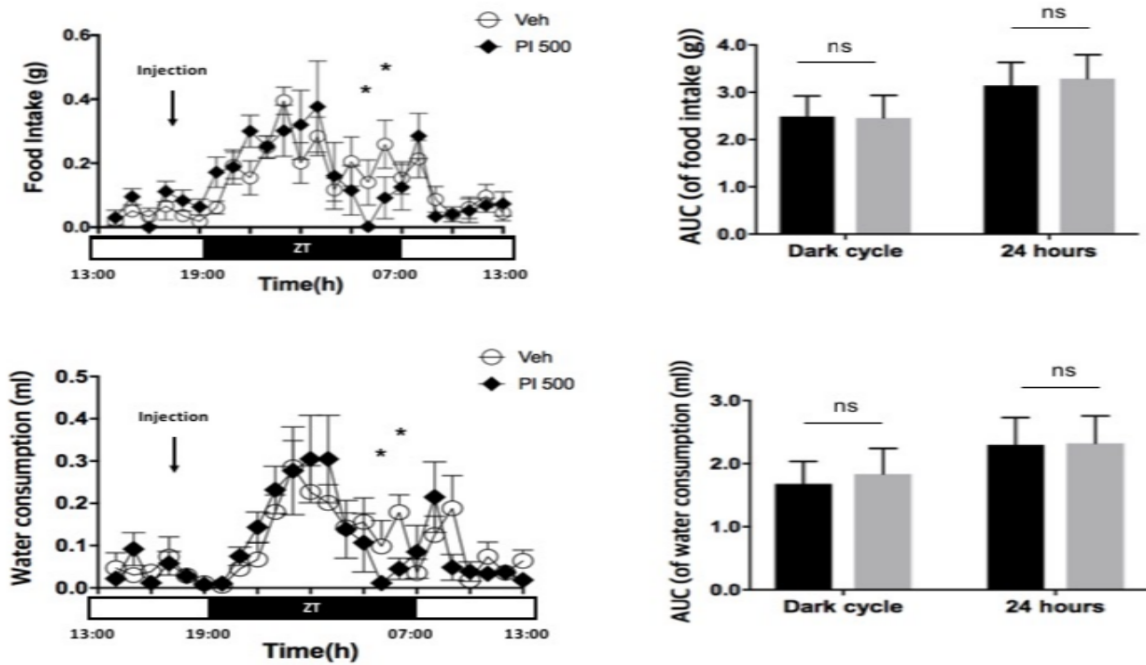


그림54. 실험동물의 real-time 대사기록 챔버에 의한 사료섭취량, 음수섭취량의 연속기록 결과, 전체 섭취한 총량에 대하여 시계꽃 투여군과 대조군은 유의적 차이를 보이지 않았음.

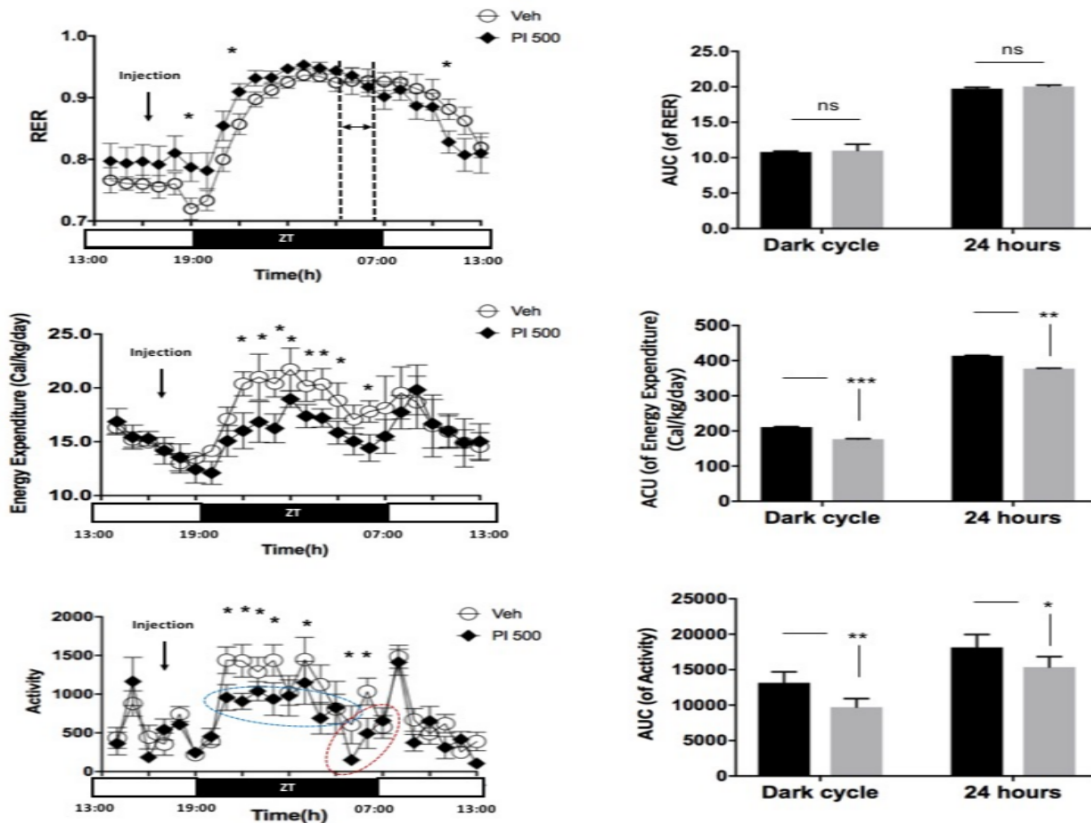


그림55. 고농도의 시계꽃 추출물의 투여에 대한 RER, Energy expenditure, Activity의 변화를 TSE Phenomaster의 측정을 통하여 데이터를 나타내었음.

앞에서 고려되었던 시계꽃 소재의 투여에 의한 실험동물의 가스교환율, 에너지 사용률, 운동성을 TSE phenomaster 대사챔버에서 5일간 실시되었고, 5일간 같은 시간의 평균값을 24시간으로 나누어 연속측정값으로 표현하였음.

결과에 따르면 가스교환율(RER)은 일부구간에서 유의적 차이가 발견되는 구간이 발생하였으나 전체적 가스교환율의 유의적 차이는 관찰되지 않았음.

시계꽃 추출물 투여에 의하여 Activity는 Dark cycle (ZT)에서 다수구간에서 유의적으로 감소하며, 에너지 소모에 대하여도 Activity와 비슷한 시간대의 구간에서 유의적으로 감소한 것을 확인하였음.

고농도의 시계꽃 추출물의 반복투여에 의하여 실험동물의 body composition에 대하여 살펴본 결과 대조군과 어떤 유의적 변화도 발견되지 않음.

고농도의 시계꽃 소재투여는 수면효능 외에 다른 대사적 변화에 영향을 미치지 않는 것으로 평가됨.

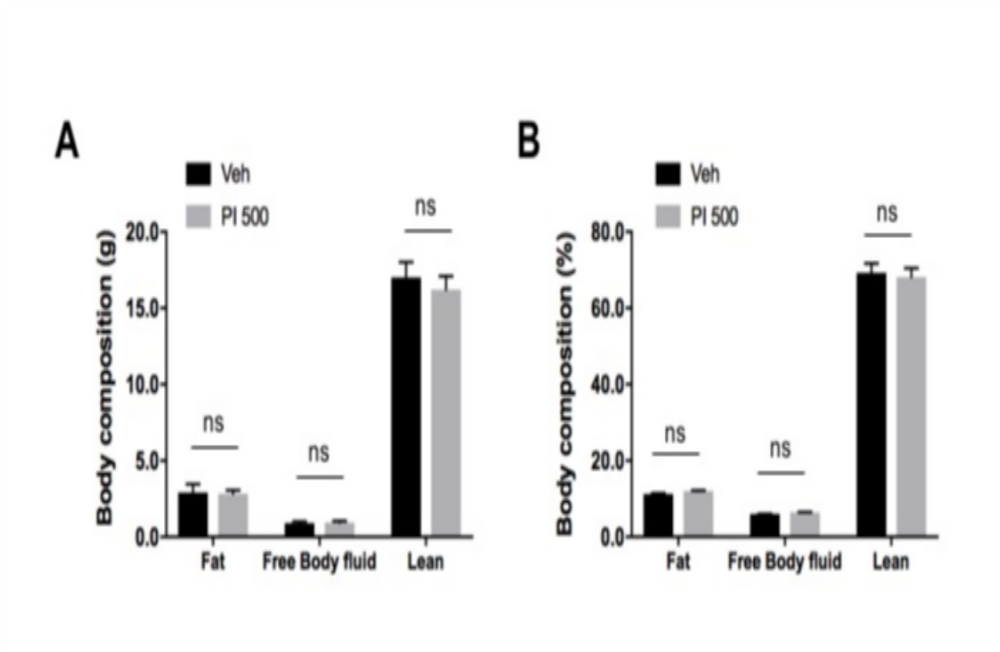


그림56. 고농도의 시계꽃 추출물의 반복투여에 의하여 Body composition에 대한 유의적 차이점은 발견되지 않음.

이 결과를 통하여 Activity와 Energy expenditure는 고농도의 시계꽃 소재의 반복투여에 의하여 저농도의 사용보다 훨씬 넓은 구간에서 유의적으로 감소되었으며, 다른 parameters (Food intake, Water consumption, RER)에서 유의적 변화가 발견되지 않음을 확인하였음.

· 실험동물에 시계꽃을 반복투여 하였을 때 뇌신경학적 변화에 대한 관찰을 하기 위하여, DCX, COX2, Iba-1, Parvalbumin, BDNF, GR, melatonin receptor, CRF, Calretinin과 같은 마커들을 이용한 발현차이를 관찰

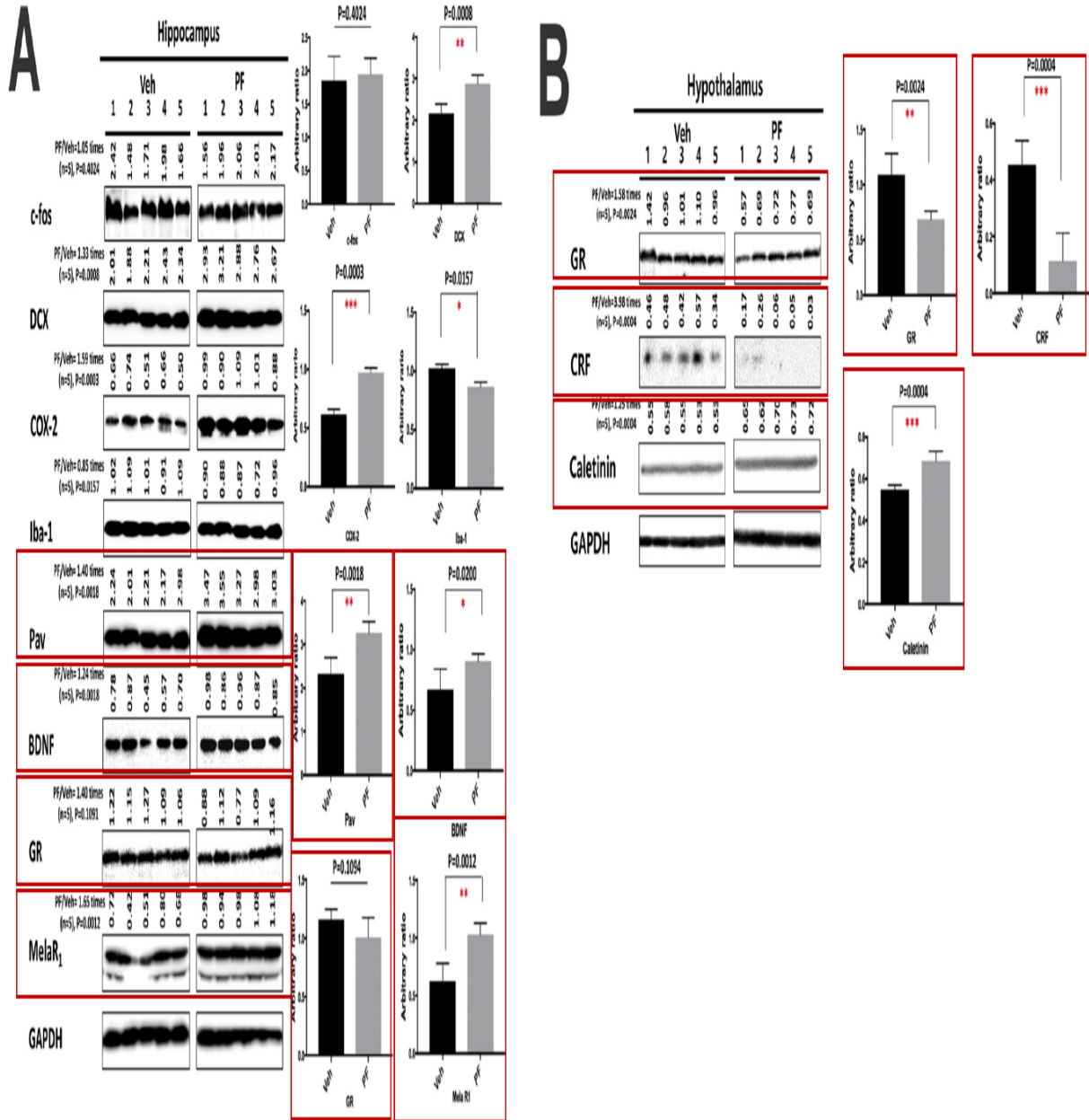


그림57. neuroinflammation (COX2, Iba-1), GABA expressing neuron (Pav, Calretinin), neurotropic factor (BDNF), HPA axis regulation (CRF, GR), sleeping related gene (MelaR1) 의 변화를 관찰

본 연구를 통하여, 시계꽃의 반복투여는 DCX의 발현증가에 대하여 일관적으로 증명되었으며, 뇌의 염증인자의 감소, 뇌가소성 증가, GABA 발현량의 향상 등 수면효능으로 유도되는 다양한 부분에서 일치되는 결과를 확보하였음.

특히 microglia 활성을 감소시키는 결과를 가지고 있음을 확인하여, 수면효능 뿐 아니라 뇌건강의 유지에도 긍정적으로 이용할 수 있는 가능성을 가지고 있음을 확인.

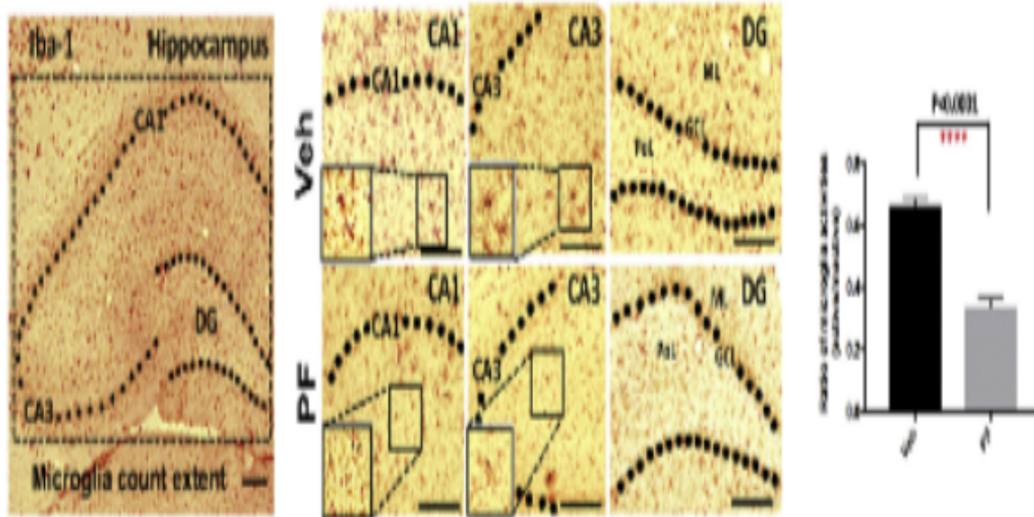


그림58. 해마에서 Iba-1의 발현위치 및 형태학적 변화를 관찰함으로써, 시계꽃의 반복투여에 의한 neuroinflammation의 감소가 확인되었고, 이것은 위의 Western blot의 결과와도 일치함.



· 시계꽃 소재의 수면효능과 신경재생촉진 기능이 기능적 기억력 향상에 미치는 영향

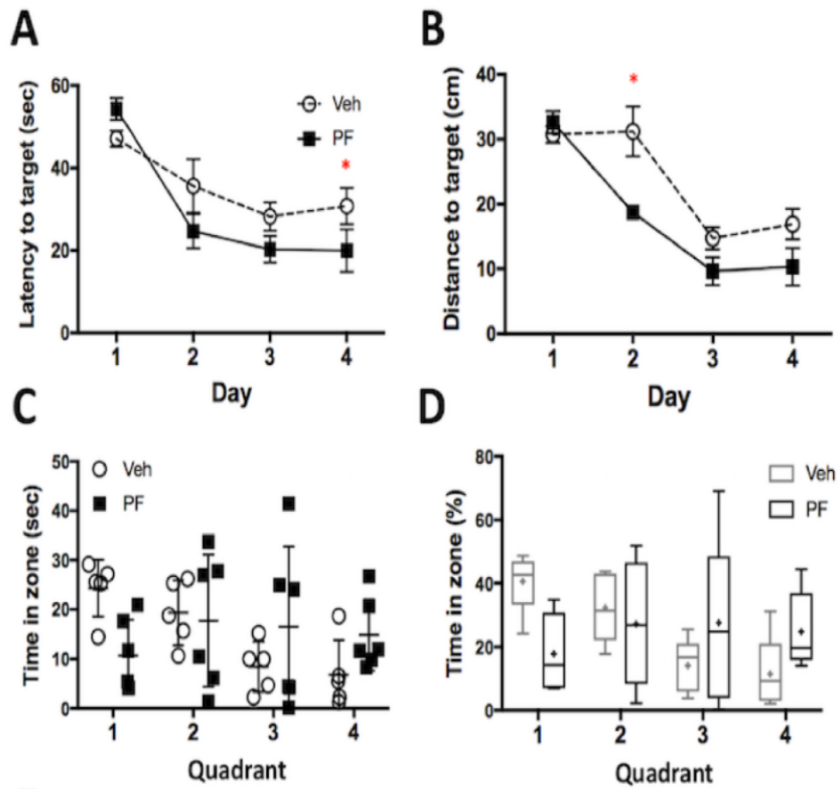


그림59. 시계꽃 추출물을 반복투여한 실험동물을 표준 Morris water maze 법을 통하여 얼마나 기능적 기억력 향상에 도움이 되는지 행동학적 평가를 실시하여, 투여군에서 유의한 증가를 확인하였음.

시계꽃 추출물을 지속적으로 공급받은 실험동물에서 해마의 일관된 신경재생활성이 수면기능 활성화와 함께 관찰되었고, 이러한 현상이 실제로 기억력 향상에도 기능적으로 유효한지에 대한 동물실험이 필요하였음.

시계꽃 추출물을 반복투여한 동물을 Morris water maze 테스트를 통하여 수조 안에서 얼마나 빨리 부표를 찾을 수 있는지 행동학 실험을 실시한 결과 이들은 시계꽃 추출물을 투여받지 않은 군에 비하여 유의적으로 기억력 향상이 발견되었음.

· 시계꽃 소재의 수면효능향상과 Alzheimer's disease agent로서의 가능성

시계꽃 추출물을 지속적으로 공급받은 동물들의 수면촉진기능이 관찰되었으며, 해마의 neuro genesis 향상은 기능적으로도 동물에서 기억력향상의 결과로 관찰되었음.

이는 앞에서 제시하였던 수면과 알츠하이머병과의 연관성, 그리고 대사기능의 유지등에 있어 전체적인 밸런스를 유지시켜줄 수 있는 agent로서 작용할 가능성을 시사하는 것임.

따라서, 시계꽃 소재의 투여에 의한 Anti-Alzheimer's disease의 관계성 설정도 중요함.

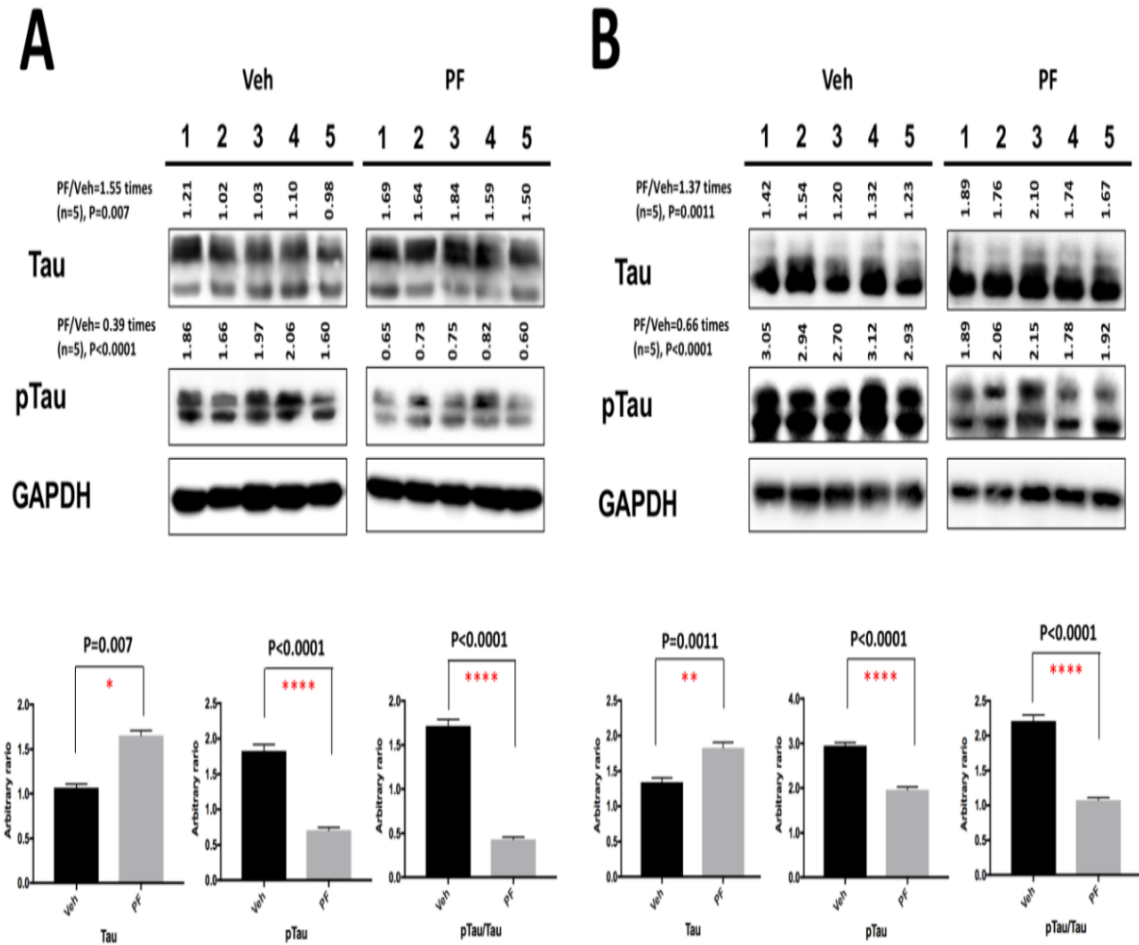


그림60. 시계꽃 추출물을 반복투여한 실험동물(ICR mice, SD rat)의 해마에서 보이는 항알츠하이머병 효과도 추가적으로 확인하였음. Tau와 phosphorylated Tau에 대한 비율을 비교하였을 때, 시계꽃 투여군에서 비투여군에 비하여 매우 유효한 효과가 발견되어, 시계꽃 추출물의 수면효능 외 항알츠하이머병 효능을 가지고 있음을 확인하였음.

⑤ 시계꽃 소재에 의한 수면촉진효과

시계꽃 소재의 건강식품으로 인정받고, 이들의 수면촉진기능에 대한 직접적인 기능성을 증명하고자 하였으며, 이것을 위하여 네추럴 F&P에서 공급받은 시계꽃 추출물의 250mg/kg, 500mg/kg 두 농도를 통하여 측정.

in vitro와 in vivo를 통한 시계꽃 추출물의 효능을 동시에 만족시킬 수 있는 환경을 찾아야 하였음.

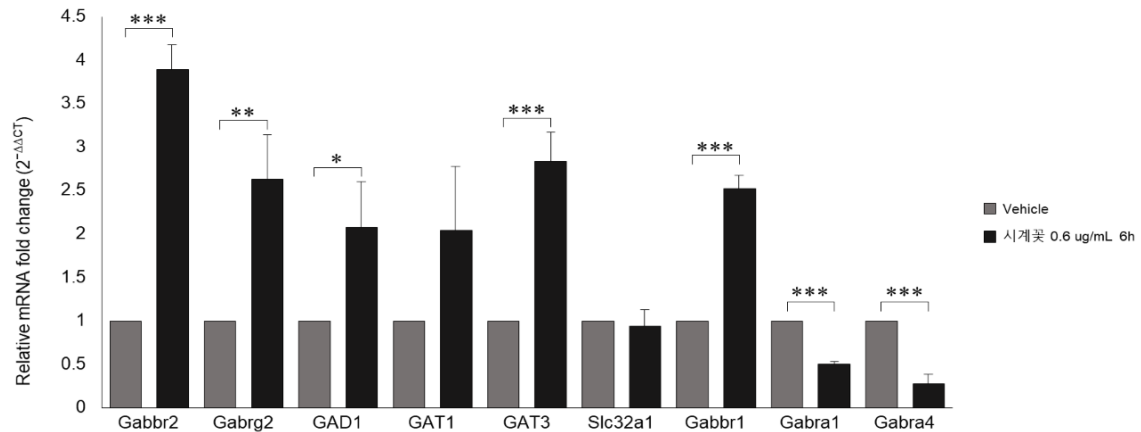


그림61. C6 glioma cells에 시계꽃 추출물 0.6 $\mu$ g/ml의 농도로 6시간 처리한 뒤, total RNA를 isolation하여 cDNA를 합성. 10ng의 cDNA를 SYBR green dye로 RT-PCR 실시하여, 방법을 통해 GABA receptors, GABA transporter, GABA synthesis hormone 등의 발현을 측정

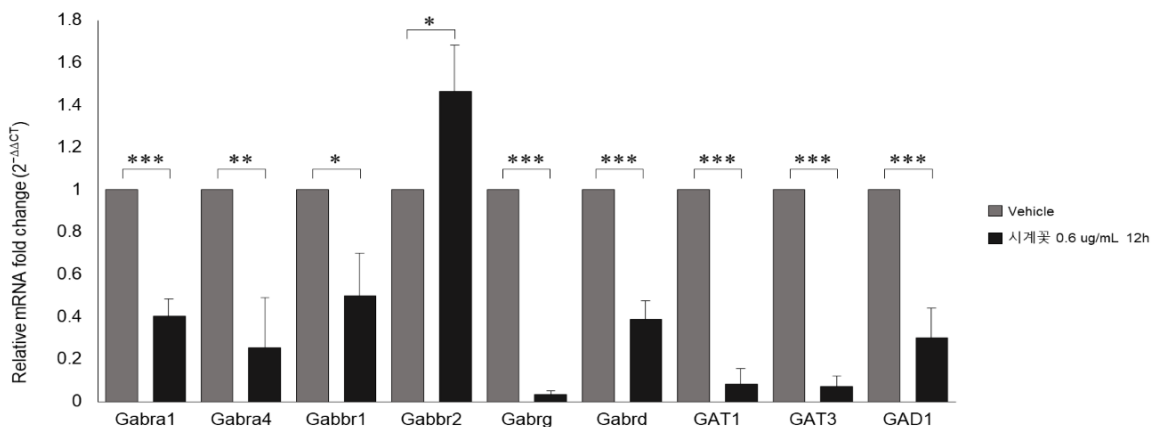


그림62. C6 glioma cells에 시계꽃 추출물 0.6 $\mu$ g/ml의 농도로 12시간 처리한 뒤, total RNA를 isolation하여 cDNA를 합성. 10ng의 cDNA를 SYBR green dye로 RT-PCR 실시하여, 방법을 통해 GABA receptors, GABA transporter, GABA synthesis hormone 등의 발현을 측정

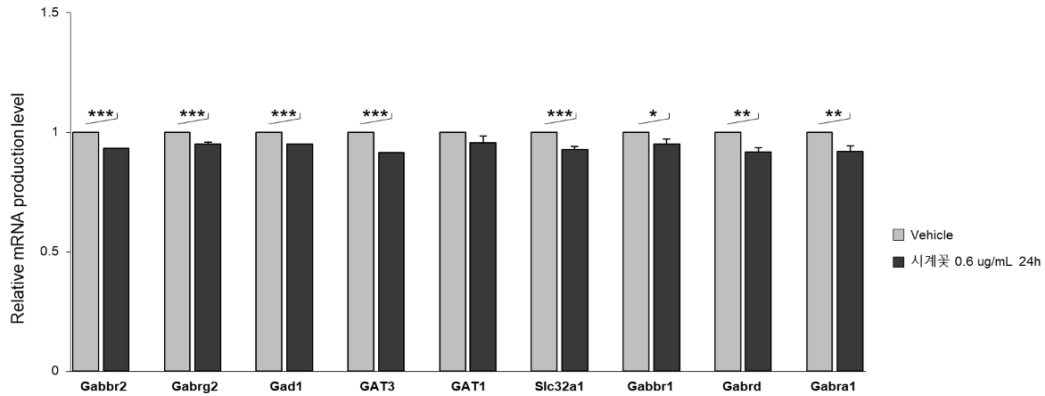


그림63. C6 glioma cells에 시계꽃 추출물 0.6 $\mu$ g/ml의 농도로 24시간 처리한 뒤, total RNA를 isolation하여 cDNA를 합성. 10ng의 cDNA를 SYBR green dye로 RT-PCR 실시하여, 방법을 통해 GABA receptors, GABA transporter, GABA synthesis hormone 등의 발현을 측정

Genes <sup>o</sup>	Sequences (5' → 3') <sup>o</sup>	
<b>Gabra1<sup>o</sup></b>	<i>Forward<sup>o</sup></i>	5'- GAC CGT GAG AGC TGA ATG CC -3' <sup>o</sup>
	<i>Reverse<sup>o</sup></i>	5'- ACG TGA CCC ATC TTC TGC TAC A -3' <sup>o</sup>
<b>Gabra4<sup>o</sup></b>	<i>Forward<sup>o</sup></i>	5'- AGC TGC TCC TGT GCT GAA GG -3' <sup>o</sup>
	<i>Reverse<sup>o</sup></i>	5'- TGA GCC TTA GGC GTG GCT TC -3' <sup>o</sup>
<b>Gabbr1<sup>o</sup></b>	<i>Forward<sup>o</sup></i>	5'-CTC TGA ACT GCG CCA TCA GC -3' <sup>o</sup>
	<i>Reverse<sup>o</sup></i>	5'-TCA CAG CTA AGC CGG TCA GG -3' <sup>o</sup>
<b>Gabbr2<sup>o</sup></b>	<i>Forward<sup>o</sup></i>	5'-AGG ATG CTG TTC CTG CCA GA -3' <sup>o</sup>
	<i>Reverse<sup>o</sup></i>	5'-TGC AGG GTG CCA TAC TCC AC -3' <sup>o</sup>
<b>Gabrg2<sup>o</sup></b>	<i>Forward<sup>o</sup></i>	5'-AGG ATG CTG TTC CTG CCA GA -3' <sup>o</sup>
	<i>Reverse<sup>o</sup></i>	5'-TGC AGG GTG CCA TAC TCC AC -3' <sup>o</sup>
<b>GAT1<sup>o</sup></b>	<i>Forward<sup>o</sup></i>	5'- GCT GGC ATT CTT GGC GTA CC -3' <sup>o</sup>
	<i>Reverse<sup>o</sup></i>	5'- GCA CAC GGC AGC AAT GAA GA -3' <sup>o</sup>
<b>GAT3<sup>o</sup></b>	<i>Forward<sup>o</sup></i>	5'- ATC TGC CTG GGC TGC CTA AC -3' <sup>o</sup>
	<i>Reverse<sup>o</sup></i>	5'- TCT GCC ACC TCG GCA ATA GG -3' <sup>o</sup>
<b>Slc32a1<sup>o</sup></b>	<i>Forward<sup>o</sup></i>	5'- CAT GCT GCG CTC <u>CAC</u> GAT TC -3' <sup>o</sup>
	<i>Reverse<sup>o</sup></i>	5'- GGA CCA GGA CTT CTG CGA CA -3' <sup>o</sup>
<b>GAD1<sup>o</sup></b>	<i>Forward<sup>o</sup></i>	5'- CTA CCA ACC TGC GCC CTA CA -3' <sup>o</sup>
	<i>Reverse<sup>o</sup></i>	5'- TTG GAG GAC TGC CTC TCC CT -3' <sup>o</sup>
<b>GAPDH<sup>o</sup></b>	<i>Forward<sup>o</sup></i>	5'-TGC MTC CTG CAC <u>CAC</u> CAA CT-3' <sup>o</sup> (M = A or C)
	<i>Reverse<sup>o</sup></i>	5'-YGC CTG CTT CAC <u>CAC</u> CTT C-3' <sup>o</sup> (Y = T or C)

그림64. RT-PCR에 사용된 Primers의 구성

위의 경우 C6 glioma 세포주를 통하여 시계꽃 추출물을 처리한 후 GABAa receptors, GABA transporters, GABA synthesizing hormone의 발현 패턴을 살펴보면, 세포에 시계꽃 추출물의 처리 시간에 따라 결과가 바뀌는 것을 확인하였음.

이에 대하여 12시간, 24시간 처리의 경우 C6 glioma cell에서 각 지표의 발현이 너무 오래되어 시계꽃 추출물의 처리군에서 mRNA 발현이 오히려 감소하는 경향을 관찰하였고, 6시간의 데이터를 데이터로써의 가치가 있다고 판단하였음.

이상 in vitro 데이터의 최적 시간 (시계꽃 추출물 처치시간)을 확정하고, 본 결과를 기전이해에 사용하였음.

고농도 (250mg/kg, 500mg/kg) 시계꽃 추출물의 단회 또는 반복투여에 의하여 실험동물의 immobility time (low locomotor activity) 및 눈꺼풀이 닫힌 시간 (Palpebral closing time)을 측정하여 실제로 실험동물이 수면욕을 느끼는 시간에 대하여 영상촬영을 통하여 분석하였으며, 움직임 시간의 길이와 눈꺼풀의 닫힌 시간 (10초 단위)에 대한 가중치 score를 측정하여 효과를 수치화하였음.

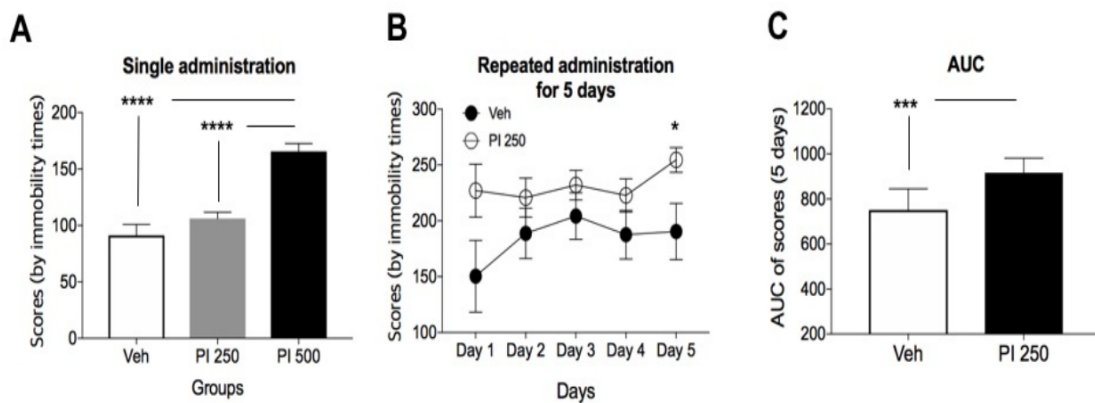


그림65. 고농도의 시계꽃 추출물을 단회/반복투여하고 대조군과의 부동유지 시간을 측정하여 그래프로 나타냄. 250mg/kg 농도를 5일간 반복투여하고 부동유지 시간이 증가함을 확인하고, 이 그래프가 그리고 있는 면적을 계산하였을 때(AUC) 유의한 차이가 나는 것을 확인

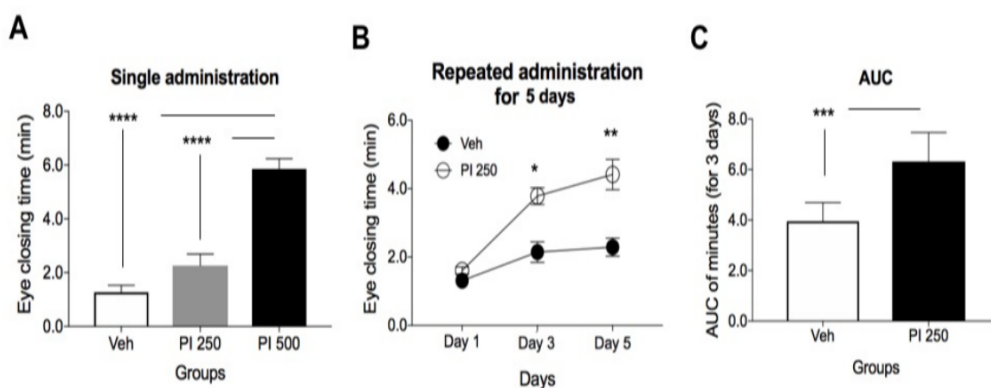


그림66. 고농도의 시계꽃 추출물을 단회/반복투여하고 대조군과의 눈꺼풀을 감고 있는 시간을 측정하여 그래프로 나타냄. 250mg/kg 농도를 5일간 반복투여하고 눈꺼풀을 감고 있는 시간이 증가함을 확인하고, 이 그래프가 그리고 있는 면적을 계산하였을 때(AUC) 유의한 차이가 나는 것을 확인

⑥ 시계꽃 소재의 투여에 의한 유효 유전자의 증감 validation

시계꽃 추출물의 투여에 의하여 유효유전자를 찾아내기 위하여 proteomic analysis (LC/MS/MS)를 실시하여, 증감하는 유전자 리스트를 확보하였음.

유전자의 리스트를 통하여 일반적으로 많이 알려져 있는 수면유전자의 존재를 확인할 수 있기를 기대하였으나, 발견되지는 않았고, 본 연구방법을 통하여 ‘ $\alpha$ -synuclein’이 시계꽃 추출물의 투여에 의하여 동물의 뇌에서 감소하는 것을 확인하였음.

‘ $\alpha$ -synuclein’은 퇴행성 신경질환(알차하이머병, 파킨슨병)의 주요 바이오마커로써 알려져 있는 유전자였기 때문에 연구팀은 현재까지 확보한 데이터에서도 수면촉진현상과 신경재생, Tau 단백질의 변환등을 감소시키는 등 퇴행성신경질환의 조절과의 관계가 확인되었기 때문에 ‘ $\alpha$ -synuclein’의 유전자 발견에 대하여 수면기능과 직접적으로 연결시켜 검토하였음.

Spot label	Name	NCBI ID	Protein name	Score	Mass
P250	10P_000801	100801	alpha synuclein (Mus musculus)	100	14.6
	20E212.1	20E212	Reclame, full-Karatin, type 1 cytoskeletal 6b, Aflame full-Cytokeratin 6b	100	46.8
	10L04007.1	10L04007	RKIN (DNA 4750001), partial (Mus musculus)	100	38.4
	10L04008.1	10L04008	myosin basic protein, isoform CRA a (Mus musculus)	100	36.1
	10L04010.1	10L04010	serpin like protein 1 (Mus musculus)	100	22.9
	10P_000816	100816	cardiomyosin like cytoskeleton 1 isoform 1 precursor (Mus musculus)	100	23.9
	10P_000817	100817	RKIN (DNA 4750200), partial (Mus musculus)	100	24.0
	10L04011.1	10L04011	SRGAP3-specific septinase (Mus musculus)	100	87.0
	10A000001	10A00000	Kap1 protein, partial (Mus musculus)	100	43.8
	10A000002	10A00000	immunoglobulin heavy chain variable region, partial (Mus musculus)	100	14.1
P260	11Q_00012	11Q0012	Reclame, full-N-adenosine methyltransferase subunit METTL3, Aflame full-Methyltransferase like protein 1, Aflame full-N-adenosine methyltransferase 30 kDa subunit, Short-6F-A20	100	63.0
	10P_000744	100744	serpin domain 7, isoform 1, apparent	100	16.8
	10P_000745	100745	PCG14986, partial (Mus musculus)	100	38.0
	10L04007.1	10L04007	RKIN (DNA 4750001), partial (Mus musculus)	100	38.4
	10L04010.1	10L04010	cardiomyosin like cytoskeleton 1 isoform 1 precursor (Mus musculus)	100	23.9
	10P_000747	100747	ankyrin repeat domain-containing protein SORAF1 (Mus musculus)	100	53.4
	10A000001	10A00000	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000750	100750	SRGAP3-specific septinase (Mus musculus)	100	87.0
	10L04011.1	10L04011	SRGAP3-specific septinase associated protein like 2 isoform X3 (Mus musculus)	100	17.0
	10P_000751	100751	procollagen, type IX, alpha 1 (Mus musculus)	100	28.1
P270	10P_000752	100752	19 kDa glucose-regulated protein precursor (Mus musculus)	100	17.5
	10A000001	10A00000	hair keratin basic 3 (Mus musculus)	100	57.8
	10A000002	10A00000	TPA, type 1 keratin (K12) (Mus musculus)	100	56.5
	10A000003	10A00000	glucose-regulated protein 78, partial (Mus musculus)	100	70.4
	10L04011.1	10L04011	PCG14986, partial (Mus musculus)	100	38.0
	10P_000753	100753	SRGAP3-specific septinase (Mus musculus)	100	87.0
	10A000004	10A00000	Reclame, full-Karatin, type 1 cytoskeletal 6b, Aflame full-Cytokeratin 6b, Short-CK 6b, Aflame full-Karatin 6b beta, Short-m6 beta, Aflame full-Karatin 6b, Short-K6B	100	63.7
	10A000005	10A00000	hair keratin acidic 1 (Mus musculus)	100	49.3
	10L04011.1	10L04011	PCG14986, partial (Mus musculus)	100	38.0
	10L04011.1	10L04011	RKIN (DNA 4750001), partial (Mus musculus)	100	38.4
P280	10P_000754	100754	type 8 hair keratin (Mus musculus)	100	51.2
	11P_000755	11P00755	myo-b dependent interacting protein 1 isoform 1 (Mus musculus)	100	64.2
	10L04011.1	10L04011	Reclame, full-Karatin, type 1 cytoskeletal 6b, Aflame full-Cytokeratin 6b, Short-CK 6b, Aflame full-Karatin 6b beta, Short-m6 beta, Aflame full-Karatin 6b, Short-K6B	100	63.7
	10P_000756	100756	keratin, type 1 cuticular hair 8 (Mus musculus)	100	54.3
	10P_000757	100757	keratin, type 1 cuticular hair 9 (Mus musculus)	100	47.4
	10A000006	10A00000	KR6B protein, partial (Mus musculus)	100	53.0
	10P_000758	100758	PCG14986, partial (Mus musculus)	100	38.0
	10P_000759	100759	off adhesion molecule 2 isoform 1 precursor (Mus musculus)	100	44.0
	10P_000760	100760	PREDCTD, ankyrin repeat 2 like protein isoform X1 (Mus musculus)	100	13.4
	10A000007	10A00000	KR6B protein, partial (Mus musculus)	100	53.0
P290	10P_000761	100761	PREDCTD, keratin, type 1 cytoskeletal 12 isoform X1 (Mus musculus)	100	53.7
	10A000008	10A00000	anti-tau 15CA heavy chain (Mus musculus)	100	53.9
	10A000009	10A00000	intermediate filament protein 10, partial (Mus musculus)	100	20.8
	10A000010	10A00000	troponin, partial (Mus musculus)	100	21.6
	10P_000762	100762	19 kDa glucose-regulated protein (Mus musculus)	100	17.5
	10P_000763	100763	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000764	100764	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000765	100765	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000766	100766	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000767	100767	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
P300	10P_000768	100768	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000769	100769	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000770	100770	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000771	100771	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000772	100772	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000773	100773	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000774	100774	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000775	100775	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000776	100776	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000777	100777	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
P310	10P_000778	100778	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000779	100779	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000780	100780	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000781	100781	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000782	100782	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000783	100783	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000784	100784	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000785	100785	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000786	100786	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0
	10P_000787	100787	IGF1R_T1, partial (Mus musculus)	100	18.0

그림67. 시계꽃 추출물의 관련기전을 보다 잘 이해하기 위하여 시계꽃 투여에 의해 뇌에서 변화(증, 감)하는 유효유전자를 찾아내기 위하여 proteomic analysis를 실시하였음.

‘ $\alpha$ -synuclein’의 유효성을 확인하기 위하여 cortex neuronal primary culture를 통하여 시계꽃 처치를 통한 ‘ $\alpha$ -synuclein’의 발현양상, 실험동물에서 ‘ $\alpha$ -synuclein’의 발현증감을 확인하여 시계꽃 투여의 ‘ $\alpha$ -synuclein’ 유효성을 확인하고 있는 중임.

‘ $\alpha$ -synuclein’은 일반적으로 퇴행성신경질환의 주요 바이오마커로써 알려져 있으나, 문헌을 조사한 결과 ‘ $\alpha$ -synuclein’의 축적은 뇌혈관에 존재하는 Blood-brain barrier의 구조를 파괴하여 직간접적으로 뇌실질의 안전성을 낮추며, 이러한 이유를 통하여 신경재생의 감소, 신경염증의 항진 등을 동반한 수면이상을 가져올 수 있다고 함.



그림68. ‘ $\alpha$ -synuclein’의 증감이 Sleep과 BBB에 미치는 영향에 대한 연구들이 최근 많이 소개 되고 있으며, 우리가 발견한 ‘ $\alpha$ -synuclein’은 수면과 밀접한 관계가 있음을 문헌들에 의하여 확인하였고, 이를 통하여 시계꽃 추출물의 유효유전자가 ‘ $\alpha$ -synuclein’일 것이라는 예상을 하고 있음.

(라) 고찰

사람의 뇌파특징과는 상당히 다른 실험동물의 EEG 데이터를 얻기보다는 수면촉진기능의 현상을 행동학, 분자생물학, 혈액학적으로 확인하여 신뢰도를 높이기 위하여 노력하였음. 이에 본 연구에 사용된 시계꽃 추출물 소재는 동물에서 수면시간의 증가에 대한 효능이 발견되었고, 일부 수면제제에서 발견되어 문제가 되고 있는 체중증가, 이상섭식행동, 기면활동 등의 부작용에 대한 어떠한 현상도 발견되지 않았음.

특히, 본 시계꽃 소재의 기전을 연구하기 위하여 세포실험, C.elegans를 이용한 생존실험, 항ROS 실험, 실험동물을 이용한 효능/안전성 실험 등의 다각적 연구를 실시하였으며, 지금까지 수면, 불안, 진정효과에 대한 약용식물으로써만 알려져 있고, 정확한 효능기전 및 효능부위에 대한 보고가 없었던 것을 이번 연구를 통하여 밝히게 되었음.

시계꽃 소재의 수면기능은 과기부의 국가마우스표현형분석사업단의 실험동물의 행동학 측정장비를 이용하여 분석하였음.

사람이 수면과 깨어나는 주기에 비하여 설치류의 주기가 매우 차이가 크므로, 시계꽃 추출물의 투약 및 적용시기 그리고 Dark/Light 사이클 별 투여시기에 대한 세심한 실험으로 고도의 실험 숙련도가 요구되었음.



### (3) 제2협동기관

#### (가) 인체적용시험 제품

##### ① 시험식품

- 품목명: 시계꽃 열매, 잎 추출물
- 기능: GABA 수용체의 benzodiazepine 결합부위에 결합하여 불면증상 등 수면건강을 개선시키는 건강기능식품
- 제형: 캡슐
- 중량: 500mg(시계꽃 잎 추출물 60mg 함유)
- 보관방법: 상온보관
- 섭취방법: 1일 1회, 1회 1캡슐을 물과 함께 자기전 경구 섭취
- 임상시험용 주약 배합비

성분명	배합비(%)	함량(mg)	기능성분 함량
시계꽃 추출물 분말	12.00	60.00	100%
밀납(황납)	3.00	15.00	
신규=대두유(롯데/100%)	85.00	425.00	
합계	100.00	500.00	

##### ② 대조식품

- 품목명: 위약
- 기능: 위약
- 제형: 캡슐
- 중량: 500mg(시계꽃 잎 추출물 미함유)
- 보관방법: 상온보관
- 섭취방법: 1일 1회, 1회 1캡슐을 물과 함께 경구 섭취
- 임상시험용 주약 배합비

성분명	배합비(%)	함량(mg)	기능성분 함량
신규=대두유(롯데/100%)	100.00	500.00	
합계	100.00	500.00	

## (나) 인체적용시험 계획

### ① 인체적용시험의 윤리적 고려

#### ㉠ 인체적용시험 관리기준

본 연구는 헬싱키 선언 및 ICH-GCP에 기초를 두고 IRB 위원회의 승인을 받은 후 진행되었다. 연구 시작 전 환자들에게 연구에 대해 설명한 뒤 동의서를 받고 진행하였다. 또한 본 임상시험은 인간의 존엄성 및 권익을 존중함과 더불어 시험대상자에게 불이익이 초래되지 않도록 실시되었다.

#### ㉡ 인체적용시험계획서의 승인

본 연구는 2017년 9월 17일 IRB 위원회의 승인을 받았다. 시험 계획서의 변경이 있는 경우, 의뢰자와 시험자의 동의하에 수정내용에 대해 IRB 위원회의 승인을 받고 변경하였다.

#### ㉢ 피험자 동의

대상자의 동의는 연구책임자가 진료실에서 연구방법, 약물에 대한 정보 및 부작용에 대하여 1시간 가량의 충분한 설명을 통하여 이루어졌다. 연구에 대한 설명과 동의 취득 과정에서 대상자가 충분히 이해할 수 있도록 가능한 한 대상자에게 익숙한 말로 설명하였다. 대상자의 안전 확보를 위하여 방문 시마다 약물 부작용에 대해 체크하고 치료자에게 언제든지 연락할 수 있도록 조치를 취했으며, 대상자 기록은 주민등록번호를 수집하지 않고, 코드명으로 암호화하여 비밀이 보장될 수 있도록 하였다.

#### ㉣ 비밀보장

연구대상자의 개인정보의 보호 및 처리, 연구데이터 및 기록의 비밀 보장을 위해 연구를 위해 수집되는 정보는 잠금 장치가 있는 연구실에 비밀번호가 걸린 파일로 보관한다.

연구 파일에 접근할 수 있는 사람은 IRB에 등록된 시험자 및 연구담당자로 제한한다.

수집되는 자료의 불필요한 개인식별자는 제거한다. 특히, 증례기록지에는 연구대상자의 이름, 주민등록번호, 환자등록번호를 기재하지 않으며, 연구등록번호로 대체한다. 신상정보와 관련된 식별자 코드는 별도로 관리한다.

연구 결과 발표 시, 개인의 신원을 확인할 수 없는 형태로 발표할 것이며, 피험자에게 이와 관련된 내용을 설명하고 동의서를 받는다.

연구진행과정에서 수집된 정보를 담고 있는 문서 및 자료는 연구완료 후 보고서 및 논문

작성 후 연구 파일에 접근할 수 있는 연구원이 폐기한다.

생명윤리법 시행규칙 제15조에 따라 연구 관련 기록을 연구가 종료된 시점부터 3년간 보관하여야 하며, 보관기관이 지난 문서 중 개인정보에 관한 사항은 개인정보보호법 시행령 제16조에 따라 파기할 예정이다.

## ② 인체적용시험의 설계

### ㉠ 절차

1차 방문 시 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 지원자는 연구대상자 선정 및 제외기준에 의해 적합여부를 판정받았다. 선정된 대상자는 14일 이내 방문하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위 배정되어 2주 동안 시험식품 또는 대조식품을 섭취하였다. 효과와 안정성은 screening/baseline과 2주째 방문하여 평가하였고, 중간에 연구가 중단된 경우에는 중지된 시점에서 평가하였다.

### ㉡ 시험기간

2017년 11월 10일(첫 연구대상자 동의일) ~ 2018년 12월 4일(마지막 대상자 동의일)

## ③ 대상자의 선정, 제외기준 및 탈락기준

### ㉠ 선정기준

다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 연구대상자로 선정하였다.

- 만 19세-59세 사이의 성인
- 다음 3가지 중 1가지 이상의 수면의 어려움을 지난 한 달간 주 3회 이상 느끼는 경우: 수면 개시의 어려움, 수면 유지의 어려움으로 자주 깨거나 깬 뒤에 다시 잠들기 어려움, 이른 아침 각성하여 다시 잠들기 어려움
- 연구 참여에 자발적으로 동의한 경우
- 연구 방문 일정을 잘 지킬 수 있고 연구에서 규정한 평가를 완료할 수 있으며 연구기간 동안 약물을 복용할 수 있는 경우

#### ㉔ 제외기준

다음 기술된 조건에 해당되는 사람을 제외하였다.

- 정신과 질환으로 진단받은 과거력: 지적장애, 자폐스펙트럼장애, 조현병, 양극성장애(조울증), 주요 우울증, 알코올/물질 사용장애, 치매, 섬망
- 자살 시도 과거력
- 최근 1개월간 정신과 약물 치료 받은 경우
- 최근 1개월간 수면제/수면유도제 복용한 경우
- 갑상선 기능항진증/저하증으로 진단받은 과거력
- 수면무호흡증, 하지불안증후군, 또는 주기적 사지운동장애로 진단받은 과거력
- BMI (체질량 지수) 30kg/m<sup>2</sup>이상
- 코골이가 심한 경우
- 기질성 뇌질환으로 진단받은 과거력: 뇌전증, 뇌경색, 뇌출혈
- 현재 스테로이드 제제 복용 중
- 교대근무자
- 현재 심각한 의학적 상태에 있는 경우
- 1일 3회 이상 카페인 음료 복용
- 임신부/수유부
- 혈액, 소변검사서 임상적으로 의미 있는 이상소견 발견된 경우

#### ㉕ 탈락기준

아래의 경우 연구대상자는 시험군 혹은 대조군을 임상시험에서 시험 중지 및 중도탈락할 수 있다.

- 동의 철회
- 이상반응
- 추적관찰 실패
- 비순응(약물 80%미만 복용)
- 연구 제외기준에 해당하는 사항 발생
- 검사 비협조

㉔ 목표한 연구대상자의 수 및 설정 근거

시계꽃 허브 티백을 온수에 추출하여 차음료 형태로 일주일간 섭취 후 불면증 개선효과를 평가한 연구에서 주간 수면일기(sleep diary)를 통해 평가한 수면의 질(sleep quality) 점수가 시험군의 경우  $3.83 \pm 0.61$ , 대조군의 경우  $3.57 \pm 0.56$ (점)으로 나타났다(A.Ngan and R. Conduit, 2011).

본 임상시험의 경우, 시험약 복용기간이 약 2주로 기존 연구결과에 비해 약 2배 더 길고 유효성 평가변수가 주관적 보고가 아닌 객관적이고 더 민감한 지표인 수면다원검사 지표이기 때문에, 위약 대비 효과가 더 크게 나타날 것으로 예상되어, 시험군과 대조군에서 수면의 질 점수가 기존의 두 군에서의 차이 0.26의 최소 30% 이상 증가될 것으로 간주하여  $0.26 \times 1.3 = 0.338$ 점의 차이를 가정하였고, 양측 유의수준 0.05, 검정력 80% 가정 하에서 이분산 T-test 통계량을 바탕으로 두 군의 차이 0.338을 탐지해내기 위한 표본수를 계산한 결과, 군당 49명으로 도출되며, 중도탈락률 10%를 고려하였을 때,  $49 / (1 - 0.1) = 54.44$ 로 군당 55명씩 총 110명이 필요하였다.

표본수 산출 프로그램 PASS (12 version; NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA)을 이용한 산출결과는 다음과 같다.

㉕ 대상자 모집방법

- 외래 및 사내 게시판 웹사이트 게시
- 게시판에는 포스터를 제작해서 게시함
- 웹사이트는 사내 웹사이트와 수면학회 홈페이지 등을 통해 모집함.
- 원내 LED 전광판 광고 게시함
- 병원 인근 부천지역 아파트 엘리베이터 LED 광고 게시
- 부천지역 보건소 및 복지센터에 광고문 게시
- 원내에 광고문 게시
- 지하철 광고

④ 인체적용시험 방법

㉠ 배정방법

대상으로 선정된 경우 대상자의 평가 및 약물 투여에 관여하지 않는 연구자에 의해 컴퓨터를 이용하여 무작위배정이 되도록 하여 이중맹검을 통해서 시험군과 위약군을 1대1의 비율로 무작위 배정하였다.

㉡ 이중맹검 유지 및 해제

이중맹검 유지를 위하여 각 연구대상자별 배정군 내역은 연구책임자가 봉인된 상태로 관리하였고, 인체적용시험 종료 시까지 공개하지 않았다. 연구담당자는 선정된 연구대상자의 무작위 배정번호(Random No.)와 일치하는 고유코드 식품을 연구대상자에게 공급하였고, 배부되는 식품은 모니터링을 위한 일련번호 외에는 모두 동일하게 표기하여 맹검을 유지하였다. 연구대상자의 배정 및 식품의 배포와 관련된 정보는 연구 과정에 직접 참여하지 않는 제 3자가 관리하였다.

⑤ 관찰 항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법

㉠ 인체적용시험 진행 일정표

Visit	Baseline	Visit 2	Endpoint	UV <sub>5</sub>
Week	-2주	0주	2주	
서면 동의서	○			
선정/제외 기준	○			
인구학적 정보	○			
과거 병력	○			
병용약물조사	○		○	
생체 징후 및 신체검사	○		○	△
실험실적 검사	○		○	△
이상반응 확인			○	△
불면증 심각도 척도(ISI)	○		○	△
피츠버그 수면의 질 지수(PSQI)	○		○	△
엠펙스 주간졸음 척도(KESS)	○		○	△
수면 일지(sleep diary)	○		○	△
환자 건강 설문지(PHQ-9)	○		○	△
역학연구센터 우울 척도(CES-D)	○		○	△
상태-특성 불안척도(STAI)	○		○	△

백 불안 척도(BAI)	○		○	△
전반적인 스트레스 평가척도 (GARS)	○		○	△
성인 ADHD 자가보고척도(ASRS)	○			△
성인 스마트폰 중독 자가진단 척도	○		△	△
임상시험용 의약품 처방		○		
타액 cortisol, 타액 melatonin		○	○	△
수면다원검사(PSG)		○	○	△

○: 반드시 실시

△: 연구자 판단 하에 필요 실시

1차 방문의 혈액 및 소변검사를 당일 시행하지 못하는 경우, 시험약 투약 전이라면 다른 날에도 시행 가능함.

㉔ 관찰 및 임상검사 항목

· 수면

- 수면다원검사 (Polysomnography)

각종 수면장애의 진단에 유용하고 필요한 검사이다. 수면다원검사는 피검자가 저녁에 병원의 수면검사실에 와서 뇌파, 안전도, 근전도, 심전도, 호흡, 가슴/복부 움직임, 혈액 산소포화도, 코골이, 다리움직임 등을 측정할 수 있는 센서를 붙이고 잠을 자면서 아침에 깬 때까지 기록하는 검사로 밤 수면 중에 발생하는 수면무호흡, 코골이, 주기적 사지운동증, REM수면 행동장애 등의 사건수면 등을 진단하는데 필수적이며, 이차성 불면증의 원인을 찾는 데 유용하다.

- 불면증 심각도 척도 (insomnia severity index, ISI)

ISI는 불면증의 정도를 측정하기 위해 개발된 자가보고 설문지로 불면증의 성격, 심각성 및 영향을 평가하는 5가지 항목으로 구성되어 있다. 평가 항목은 수면 발병의 중증도, 수면불만, 주간 기능 장애로 인한 수면장애, 다른 사람에 의한 수면장애의 현저함, 수면 장애로 인한 고통 등이다. 각 항목의 점수는 0-4점 범위이며, 총점은 최소 0점에서 최대 28점이 가능하다. 0~7점은 불면증이 없는 것으로, 8~14점은 약간의 불면증이 있는 것으로, 15~21점은 중증도의 불면증으로 22~28점이면 심한 불면증으로 정의하였다.

- 피츠버그 수면의 질 지수 (Pittsburgh Sleep Quality Index, PSQI)

PSQI는 수면의 질을 평가하기 위하여 개발된 19문항으로 이루어진 자가보고 설문지이다. 첫 4개의 항목은 열린 질문으로 구성되어 있으며 5~19 문항은 척도로 평가된다. 총점은 7개의 구성요소를 점수화 방법에 따라 각각 0~3점까지 부여하여 총점 0~21점까지로 한다. 점수가 높을수록 수면의 질이 나쁜 것을 의미한다. 주관적인 수면의 질을 평가하여 '수면 문제 있음(bad sleepers)'과 '수면 문제 없음(good sleepers)'으로 구분 할 수 있다. 5점 이상인 경우 '수면 문제 있음'으로 판별한다.

- 주간졸음 척도 (Epworth Sleepiness Scale, ESS)

ESS는 주간졸음 정도를 평가하기 위해 개발되었으며, 8문항으로 구성된 자가보고 설문지이다. 평소 각기 다른 8가지 상황에서 졸거나 잠이 드는 행동을 측정한다. 각 문항에 대해 0-3점으로 평가하는 4점 척도이며, 총점은 0-24까지의 범위에서 산출한다. 점수가 높을수록 평균 수면성향이 높거나 낮 시간의 졸음도가 높다고 해석된다. 0-10점이면 정상으로, 11점 이상은 의미있는 졸음증(significant sleepiness)으로, 16 점 이상은 병적 졸음증(pathological sleepiness)으로 정의하였다.

- 수면 일기 (sleep diary)

수면일기는 취침시각, 불끄고 잠드는데 걸리는 시간, 밤 수면 중 각성빈도 및 시간, 기상 시각, 총 수면시간, 기상 시 느낌, 낮잠시간, 커피, 음주, 약물 복용 여부 및 시간 등의 정보를 매일 기록한다. 2주간의 수면일기는 환자의 수면습관과 수면위생을 판단하고, 치료결과를 평가하는데 도움이 된다.

· 정서검사

- CES-D 척도 (Center for Epidemiologic Studies Depression Scale)

CES-D는 우울증상의 유무와 심한 정도를 측정하는 도구이다. 20문항, 총점 60점으로 지난 일주간 경험한 우울증상의 빈도에 따라 0~3점의 4단계 수준으로 측정한다. 점수가 높을수록 우울증이 심한 상태를 의미한다. 절단점은 대체로 16점과 25점을 많이 사용하며, 16점은 유력한 우울증(probable depression), 25점은 확실한 우울증(definite depression)을 의미한다. 주요우울장애 진단기준을 만족하는 케이스를 판별하기 위해서는 25점이 적절하며, 임상적 진단과는 별개로 우울 증상이 있는 사람을 판별하는 선별 도구로 사용하기 위해서는 21점이 적절하다.

- 환자 건강 설문지 (Patient Health Questionnaire-9, PHQ-9)

PHQ는 DSM-IV의 진단기준에 의거하여 지난 2주간의 무쾌감, 우울감, 수면의 변화, 피로감, 식욕의 변화, 죄책감, 무가치감, 집중력 저하, 좌불안석 또는 처진 느낌, 자살사고의 9가



지 요소로 구성된 자기 보고식 설문지 이다. 각 항목 당 0-3점까지 채점이 되어 총점 27점으로 점수가 높을수록 우울증의 심각도가 높다는 것을 반영한다. 0~4점을 우울증이 아님, 5~9점을 가벼운 우울증, 10~19점을 중간 정도 우울증, 20~27점을 심한 우울증으로 정의하였다.

- 상태-특성 불안 척도 (State-Trait Anxiety Inventory, STAI)

상태-특성 불안척도는 2개의 불안척도로 구성된 자가보고 척도이다. '상태 불안 척도(STAI-X-I)'는 특수한 상황을 바로 그 순간에 어떻게 느끼는가를 묻는 20개 문항으로 구성되어 있고, '특성 불안 척도(STAI-X-II)'는 개인이 선천적으로 타고난 정서적 불안 특성을 묻는 20개 문항으로 구성되어 있다. 각 항목은 1-4점의 4점 척도로 각각의 불안 척도의 채점결과는 최하 20점에서 최고 80점까지 채점한다. 점수가 높을수록 불안 수준이 높은 것을 의미한다.

- 벡 불안 척도 (Beck Anxiety Inventory, BAI)

BAI는 우울로부터 불안을 구별해내기 위한 자가 보고 형식의 도구로 불안을 측정하는데 사용된다. 총 21문항이며 각 문항당 0-3점으로 평가되고 0-9점을 정상수준, 10-18점은 경한 수준의 불안, 19-30점은 심한 수준의 불안, 31-63점을 매우 심한 수준의 불안으로 정의하였다.

- 전반적인 스트레스 평가척도 (Global Assessment of Recent Stress Scale, GARS)

GARS척도는 최근 일 주일간 스트레스인자에 대한 지각의 정도를 평가할 수 있는 척도로서 일, 직장, 학교생활, 대인관계 관계의 변화, 질병 및 상해, 경제적 문제, 비일상적인 사건, 일상생활의 변화유무, 전반적인 스트레스지각 등 8개의 항목으로 이루어져 있다. 점수는 각 항목마다 스트레스가 전혀 없는 경우 0점, 극도로 심한 경우를 9점으로 하였다. 점수가 높을수록 스트레스가 높다는 것을 의미한다.

· Melatonin, Cortisol 수치 변화

- Melatonin 수치 변화: 자기전 1회 타액으로 측정

- Cortisol 수치 변화: 자기전, 기상직후, 기상 30분 후 3회 타액으로 측정

- Melatonin, Cortisol 수치변화는 '갱년기 건강센터'에서 타액을 분석합니다. 정신건강의학과 외래 냉동고에 보관할 예정이며 1달에 1회 운송서비스를 이용하여 업체로 이송하여 분석합니다.

- 실험실적 검사
  - 혈액학 검사(WBC count, RBC count, Hb, Hct, Platelet Count, ESR, hs-CRP)
  - 혈액화학 검사(Total Protein, Albumin, Glucose, BUN, Creatine, AST, ALT, Uric acid, Tri glyceride, Total Cholesterol)
  - 소변검사(S.G, pH, Protein, Glucose, Bilirubin, Urobilinogen, Ketone, Blood, Leukocyte, Nitrite)

㉔ 관찰검사 방법(방문별)

· 1차 방문(Baseline)

선정제외기준 확인, 서면동의서 취득, 기초정보, 신체검사 및 생체징후, 과거병력, 병용약물, 수면 관련 설문지, 정서 관련 설문지, 혈액검사, 소변검사가 시행된다.

· 2차 방문(Visit 2)

2차방문은 1차 방문 후 14일 이내 방문하도록 하여 수면다원검사, 타액 cortisol(자기전, 기상직후, 기상 30분 후 총 3회) 및 melatonin(자기전 1회) 검사 시행되고 이때 임상 시험 약물을 처방한다.

· 3차 방문(Endpoint)

3차 방문은 2차 방문 2주 후 시행되며, 수면다원검사, 타액 cortisol(자기전, 기상직후, 기상 30분 후 총 3회) 및 melatonin(자기전 1회) 검사, 혈액검사, 소변검사, 생체 징후 및 신체검사, 병용약물, 수면 관련 설문지, 정서 관련 설문지, 이상반응 확인을 시행한다.

· 추가 방문(Unscheduled Visit)

연구 진행 중 시험대상자는 필요한 경우 실시기관을 방문하여 필요한 검사를 시행할 수 있다. 계획되지 않은 방문을 한 경우 해당 내용을 근거 문서 및 CRF에 기록한다.

## ⑥ 통계분석 방법

### ㉠ 결과분석의 일반적 원칙

본 임상시험의 통계적 검정은 유의수준 0.05하에서 양측검정을 실시한다. 어떤 시점에서 결측치가 발생되거나 임상시험이 종료되기 전에 시험 대상자가 탈락하면 기저치 이후 한번 이상 유효성 평가가 시행된 환자에 한하여 LOCF(Last Observation Carried Forward) 방법을 적용하여 유효성 분석을 실시하고, 안전성 분석은 LOCF 적용없이 원자료를 그대로 분석한다.

#### · ITT (intention-to-treat) 분석군

선정/제외기준을 모두 만족하고 본 임상시험 참여에 동의한 시험 대상자 중 무작위 배정이 이루어져서 배정약을 1회 이상 복용한 사람을 대상으로 한다.

#### · PP (Per Protocol) 분석군

ITT를 만족하는 시험 대상자 중 중대한 임상시험계획서 위반사항 없이 임상시험을 완료한 시험 대상자를 대상으로 한다.

#### \* 중대한 임상시험계획서 위반사항

1) 약제 복용을 제대로 수행하지 않은 경우

2) 안전성, 유효성 평가에 영향을 줄 수 있는 의료기기 및 수술 또는 약물을 병용하여 사용한 경우

#### · SS(Safety Set) 분석군

선정/제외기준을 모두 만족하고 본 임상시험 참여에 동의한 시험 대상자 중 무작위 배정이 이루어지고 배정약을 1회 이상 복용한 모든 사람을 대상으로 한다.

㉔ 인구통계학적 기초자료

시험대상자의 인구학적 정보, 병력, 혈액학적 상태, 병용약물 등에 대하여 투여군 별로 요약한다. 성별 등의 범주형 자료는 전체 시험대상자 대비 각 범주의 시행대상자 수와 백분율을 제시하고 연령과 같은 연속형 자료는 평균, 표준편차, 중위수, 최소값, 최대값 등의 기술통계량을 제시한다.

㉕ 기능성 평가변수

· 1차 유효성 평가변수

- 수면다원검사 지표 중 총 수면 시간 (Total Sleep Time)

· 2차 유효성 평가변수

- 불면증 심각도 척도 (insomnia severity index, ISI)

- 수면 일지상 수면의 질(Quality of Sleep)

- 피츠버그 수면의 질 설문지 (Pittsburgh Sleep Quality Index : PSQI)

- 역학연구센터 우울 척도 (Center for Epidemiological Studies Depression Scale, CES-D)

- 9-항목 환자 건강 설문지 (Patient Health Questionnaire-9, PHQ-9)

- 상태-특성 불안 척도 (State-Trait Anxiety Inventory, STAI)

- 벡 불안 척도 (Beck Anxiety Inventory, BAI)

- 전반적인 스트레스 평가척도 (Global Assessment of Recent Stress Scale, GARS)

· 기능성 평가변수에 대한 분석

본 임상시험의 일차 유효성 평가변수는 기저치 대비 2주 후의 수면다원검사상 총수면시간(Total Sleep Time) 평균 변화량으로 시험군의 치료 효과가 대조군의 치료효과에 비해 효과적 인지를 확인한다. 추가적으로 유효성 평가에 영향을 미친다고 생각되는 요인 등은 공변량을 보정한 결과를 함께 제시한다. 기저치 대비 2주 후의 2차 유효성 평가변수의 변화량에 대하여 군간 비교를 독립표본 t-검정을 이용하여 통계적 유의성 여부를 확인한다. 한편, 본 연구 최종 분석에서는 최종분석군 n수가 적고, 정규성 검정이 만족되지 않아 Mann-whitey 검정을 추가적으로 실시하였다.

#### ㉔ 안전성 평가변수

생체징후 및 신체검사, 혈액검사, 소변검사, melatonin 및 cortisol 등 타액검사, 이상반응 기록지 등을 통해 평가하였다.

#### · 안전성 평가변수에 대한 분석

본 임상시험 중에 발생한 이상반응에 대하여 코딩하고 신체기관별로 구분하여 증례수를 계산하여 카이제곱검정 또는 피셔의 정확검정을 통해 구간 비교를 한다. 중대한 이상반응 및 시험약과 인관관계가 있는 이상반응에 대해서도 이상반응별 증례 수를 산출하고 구간 비교를 수행한다.

#### (다) 연구 대상자

##### ① 연구대상자 등록 및 진행

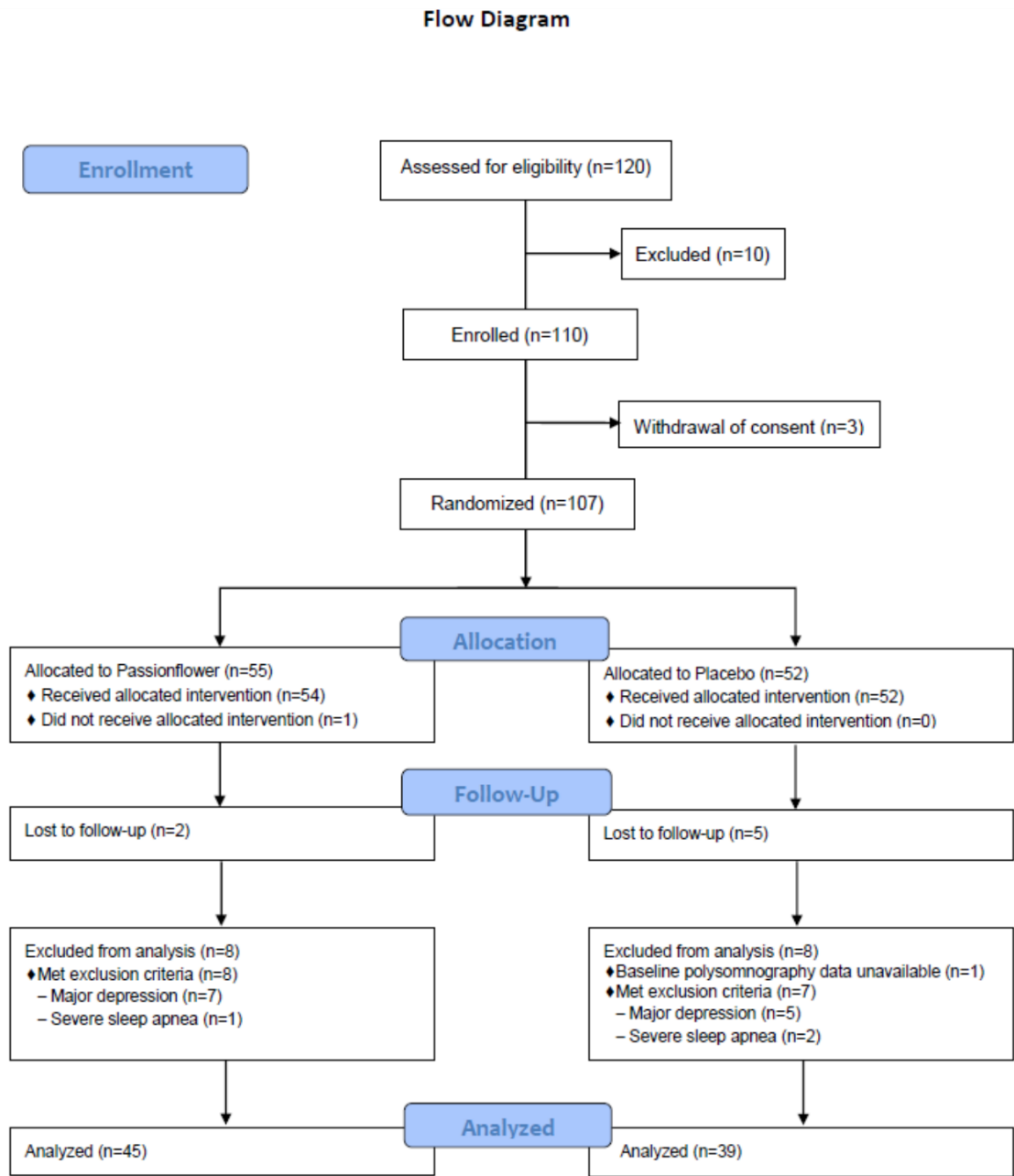
본 연구의 진행은 그림 69와 같다. 선정/제외기준에 만족하는 110명이 연구대상자로 선정되어 등록하였고, 등록 이후 3명이 동의 철회하여 총 107명의 무작위 배정이 이루어졌다.

각각 시험군은 55명, 대조군은 52명이다. 무작위 배정 이후에 시험군에서는 2명, 대조군에서는 5명이 동의 철회하여 추적관찰에 실패하였다.

중도탈락기준 중 제외기준에 해당한 경우가 총 15명이었다. screening 당시 우울증의 병력 및 현재 주관적인 우울감 호소, 수면무호흡증의 병력 및 코골이 증상 호소가 있을 경우에 우울증과 수면무호흡증 가능성이 있는 경우 제외하였다. 하지만 연구대상자 등록 이후 CES-D결과상 중증의 우울증 심각도인 경우, 중증 수면 무호흡 지수가 나온 경우는 일차성 불면증으로 보기 어려워 병력이나 주관적인 증상 호소가 없었어도 제외기준인 우울증과 수면무호흡증에 해당한다고 평가하였다. 시험군에서는 7명이 CES-D 결과상 주요 우울증으로 진단되었고, 1명이 수면다원검사 결과상 중증의 수면무호흡증으로 진단하여 총 8명이 제외기준에 해당하였다. 대조군에서는 5명이 CES-D 결과상 주요우울증, 2명이 중증의 수면무호흡증으로 진단되어 제외기준에 해당하였다.

마지막으로 대조군에서 1명은, 1차 수면다원검사 결과가 기계오류로 인해 결과가 잘못 기록되어 기저 수면다원검사 결과가 없어 불가피하게 분석에서 제외함으로써 결국, 시험군 45명, 대조군 39명이 최종 분석군에 해당하였다.

그림 69. 연구대상자 등록 및 진행



② 연구 대상자 특성

㉠ 인구사회학적 특성: Baseline

선정된 연구대상자들의 인구사회학적 특성은 표 21과 같았다. 연령, 학력, 성별에서 시험군과 대조군 사이의 유의한 차이는 없었다.

표 21. 인구사회학적 특성

구분	시험군	대조군	P-value
Total N	45	39	
연령(세)			
N	45	39	
mean	40.51	41.59	.270 <sup>1)</sup>
SD	10.19	11.99	
교육년수			
N	45	39	
mean	15.37	15.15	.579 <sup>1)</sup>
SD	2.50	1.64	
성별			
남(N/%)	18(40.00%)	16(41.03%)	.924 <sup>2)</sup>
여(N/%)	27(60.00%)	23(58.97%)	

1) Mann-Whitney test

2) chi-square tes

③ 안전성 평가

한번이라도 시험약을 복용한 시험군 54명과 대조군 49명의 SS군을 대상으로 모든 이상반응이 발생한 경우는 시험군에서 0명(0%), 대조군은 2명(4.1%)로 나타났다. 모두 경도 증상을 나타냈고 완전 치유하였다. 이상반응은 각각 졸림반응과 두통으로 나타났으며, 이상반응 발현율에 대해 두 군간 유의한 차이는 나타나지 않았다. 본 인체적용시험을 진행하면서 중대한 이상반응은 나타나지 않았다.

(라) 유효성 평가

① 분석에 포함된 대상군

본 인체적용시험의 유효성 PP 분석결과를 주분석으로 하였다. 군간 비교는 정규성을 만족하면 independent t-test를 정규성을 만족하지 못하면 Mann-whitney test를 시행하여 p값을 제시하였고, 군내 비교는 paired t-test의 p 값을 제시하였다.

② 1차 유효성 평가

㉠ 수면다원검사상 총 수면시간 (Total Sleep Time, TST) 변화량

수면다원검사 상 TST의 변화량은 표 22와 같다. 시험군의 경우 평균 23.05분이 증가하였으며, 대조군은 평균 -0.16분이 감소하였다. 이는 두 군간 유의한 차이가 있었다(p=.049). 시험군과 대조군 각각 군내 치료전후 총수면시간 변화량에 대해선 시험군에서만 유의하게 증가한 것으로 나타났다 (p=.005).

표 22. TST(Total Sleep Time) 변화량

구분	시험군	대조군	P-value <sup>1)</sup>
Total N	45	39	
TST 변화량			
Baseline			
mean	395.28	412.01	
SD	58.84	56.4	
Endpoint			
mean	418.33	411.85	
SD	45.12	63.04	
difference(mean/SD)	23.05(54.26)	-0.16(53.12)	.049*
P-value <sup>2)</sup>	.005**	.807	

1) 변화량 군간 비교: Independent t-test

2) 변화량 군내 비교: paired t-test

difference: Baseline-Endpoint, P-value: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001



③ 2차 유효성 평가

㉔ TST 외 수면다원검사 지표 변화량

수면다원검사 상 TST외 수면다원검사 지표 변화량은 표 23과 같다. 시험군과 대조군 각각의 변화량에 대해 Sleep Efficiency(p=.008), WASO(p=0.025)에서 모두 시험군에서만 유의하게 개선된 것으로 나타났다.

표 23. TST외 수면다원검사 지표 변화량

구분	시험군	대조군	P-value <sup>1)</sup>
Total N	45	39	
Sleep Efficiency 변화량			
Baseline			
mean	82.88	85.82	
SD	12.73	11.76	
Endpoint			
mean	87.16	85.82	
SD	9.37	13.12	
difference(mean/SD)	4.28(11.27)	0.01(11.04)	.074
P-value <sup>2)</sup>	.008**	.759	
Sleep Latency 변화량			
Baseline			
mean	17.30	13.57	
SD	26.26	16.03	
Endpoint			
mean	12.20	17.26	
SD	20.62	35.13	
difference(mean/SD)	-5.1(27.62)	3.69(26.43)	.141
P-value <sup>2)</sup>	.053	.389	
WASO min 변화량			
Baseline			
mean	64.93	54.50	
SD	48.95	53.35	

Endpoint				
mean	49.43	50.42		
SD	36.60	48.51		
difference(mean/SD)	-15.50(44.91)	-4.08(45.23)	.25	
P-value <sup>2)</sup>	.025*	.577		
Total Arousal No				
변화량				
Baseline				
mean	105.8	112.0		
SD	44.99	56.42		
Endpoint				
mean	156.49	108.74		
SD	289.76	49.23		
difference(mean/SD)	50.69(282.03)	-3.26(38.37)	.240	
P-value <sup>2)</sup>	.337	.781		

1) 변화량 군간 비교: Mann-Whitney test

2) 변화량 군내 비교: paired t-test

difference: Baseline-Endpoint, P-value: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001

㉔ 수면 만족도 자가보고지 변화량

수면 만족도 자가보고지 변화량은 표 24와 같으며, 모든 변인에서 군간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 24. 수면 만족도 자가보고지 변화량

구분	시험군	대조군	P-value <sup>1)</sup>
Total N	45	39	
ISI 변화량			
Baseline			
mean	13.24	14.31	
SD	3.65	4.26	
Endpoint			
mean	9.93	9.87	
SD	1.61	1.52	
Difference(mean/SD)	-3.31(3.6)	-4.44(3.74)	.166
P-value <sup>2)</sup>	.001***	.001***	
PSQI 변화량			
Baseline N			
mean	8.27	8.56	
SD	1.60	1.39	
Endpoint			
mean	6.91	7.05	
SD	1.61	1.521	
difference(mean/SD)	-1.36(1.96)	-1.51(1.14)	.26
P-value <sup>2)</sup>	.001***	.001***	

1) 변화량 군간 비교: Mann-Whitney test

2) 변화량 군내 비교: paired t-test

difference: Baseline-Endpoint, P-value: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001

㉔ 정서 관련 자가보고지 변화량

정서 관련 자가보고지 변화량은 표 25와 같으며, 모든 변인에서 군간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 시험군과 대조군 각각의 변화량에 대해선 PHQ(p=.002)와 BAI(p=.009) 및 GARS(p=.024)에서 모두 시험군에서만 유의하게 치료전후 유의하게 개선된 것으로 나타났으며, 대조군과 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다.

표 25. 정서 관련 자가보고지 변화량

구분	시험군	대조군	P-value <sup>1)</sup>
Total N	45	39	
CESD 변화량			
Baseline			
mean	9.82	9.18	
SD	5.80	5.68	
Endpoint			
mean	7.56	7.82	
SD	6.99	6.52	
difference(mean/SD)	-2.27(5.25)	-1.36(5.52)	.273
P-value <sup>2)</sup>	.002**	.076	
BAI 변화량			
Baseline			
mean	7.02	8.05	
SD	5.13	5.85	
Endpoint			
mean	5.36	7.03	
SD	5.10	5.21	
difference(mean/SD)	-1.67(4.12)	-1.03(4.91)	.395
P-value <sup>2)</sup>	.009**	.2	
GARS 변화량			
Baseline			
mean	19.82	22.41	
SD	11.16	8.18	
Endpoint			

mean	17.78	21.33	
SD	11.21	9.71	
difference(mean/SD)	-2.04(8.3)	-1.08(8.33)	.587
P-value <sup>2)</sup>	.024*	.369	

1) 변화량 구간 비교: Mann-Whitney test

2) 변화량 군내 비교: paired t-test

difference: Baseline-Endpoint, P-value: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001

(마) 안전성 평가

① 분석에 포함된 대상군

선정/제외 기준을 만족하고 무작위배정 번호를 부여 받은 후 시험약/위약을 1회 이상 복용한 대상자 총 103명에 대해 안정성 평가를 진행하였다. (SS군)

② 이상반응

시험군 54명과 대조군 49명의 SS군을 대상으로 모든 이상반응이 발생한 경우는 표 26과 같으며, 시험군에서 0명(0%), 대조군은 2명(4.1%)로 나타났다. 모두 경도 증상을 나타냈고 완전 치유하였다. 이상반응은 각각 졸림반응과 두통으로 나타났으며, 이상반응 발현율에 대해 두 군간 유의한 차이는 나타나지 않았다.

표 26. 이상반응

구분	시험군	대조군	P-value
Total N	54	49	
이상반응 발생			
유(N/%)	0(0%)	2(4.1%)	.134 <sup>1)</sup>
무(N/%)	54(100%)	47(95.9%)	
중등도			
경도(N/%)	0(0%)	2(100%)	
중등도(N/%)	0(0%)	0(0%)	
중증(N/%)	0(0%)	0(0%)	
결과			

완전치유(휴우증 없음)	0(0%)	2(100%)
치유(휴우증 있음)	0(0%)	0(0%)
진행중	0(0%)	0(0%)
영구적 손상	0(0%)	0(0%)
사망	0(0%)	0(0%)

1) chi-square test

본 인체적용시험을 진행하면서 중대한 이상반응은 나타나지 않았다.

③ 활력징후

활력 징후의 변화량은 표 27과 같으며, 모든 변인에서 군간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 시험군과 대조군 각각의 변화량에 대해선 수축기혈압에서 시험군(p=.35)과 대조군(p=.006)이 모두 유의한 것으로 나타났다. 이완기혈압의 경우 대조군(p=.006)에서만 유의한 것으로 나타났다.

표 27. 활력징후 변화량

구분	시험군	대조군	P-value <sup>1)</sup>
Total N	54	49	
맥박 변화량			
Baseline			
mean	78.61	79.69	.754
SD	10.99	12.36	
Endpoint			
mean	78.48	78.92	
SD	10.57	11.17	
difference(mean/SD)	-0.13(11.01)	-0.78(9.72)	
P-value <sup>2)</sup>	.931	.579	
수축기혈압(mmHG)			
변화량			
Baseline			
mean	121.00	124.14	.604
SD	16.77	12.31	

Endpoint			
mean	117.50		119.45
SD	14.99		12.73
difference(mean/SD)	-3.50(11.87)		-4.69(11.38)
P-value <sup>2)</sup>	.035*		.006**
이완기혈압(mmHG)			
변화량			
Baseline			
mean	70.09		74.27
SD	12.37		11.12
Endpoint			.090
mean	69.63		70.59
SD	11.29		9.74
difference(mean/SD)	-0.46(9.96)		-3.67(8.96)
P-value <sup>2)</sup>	.734		.006**

1) 변화량 군간 비교: independent t-test

2) 변화량 군내 비교: paired t-test

difference: Baseline-Endpoint

P-value: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001

#### ④ 신체계측

활력 징후의 변화량은 표 28과 같으며, 모든 변인에서 군간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 28. 신체계측 변화량

	시험군	대조군	P-value <sup>1)</sup>
Total N	54	49	
신장(cm)			
변화량			
Baseline			.582

mean	166.30	167.01	
SD	8.75	9.72	
Endpoint			
mean	166.12	166.64	
SD	8.72	9.69	
difference(mean/SD)	-0.18(1.63)	-0.37(1.96)	
P-value <sup>2)</sup>	.431	.190	
체중(kg)			
변화량			
Baseline			
mean	65.47	67.05	
SD	11.52	12.29	
Endpoint			
mean	65.46	66.57	
SD	11.65	12.76	
difference(mean/SD)	-0.1(1.28)	-0.48(3.02)	.298
P-value <sup>2)</sup>	.958	.271	
BMI(kg/m <sup>2</sup> )			
변화량			
Baseline			
mean	23.59	23.75	
SD	2.71	2.65	
Endpoint			.342
mean	23.64	23.80	
SD	2.67	2.85	
difference(mean/SD)	0.72(4.83)	0.04(1.16)	
P-value <sup>2)</sup>	.601	.794	

1) 변화량 군간 비교: independent t-test

2) 변화량 군내 비교: paired t-test

difference: Baseline-Endpoint, P-value: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001



⑤ 혈액검사

혈액검사의 변화량은 표 29과 같다. Hb에서 시험군이 평균 0.19 증가, 대조군이 평균 -0.03 감소하였으며, 이는 군간 유의한 차이가 있었다(p=.041). Total Protein에서는 시험군에서 평균 -0.09 감소, 대조군에서 평균 -0.27 감소하였으며, 이는 군간 차이가 있었다(p=.006). 시험군과 대조군 각각의 변화량에 대해선 RBC count에서 시험군(p=.034), Hb에서 시험군(p=.019), Hct에서 시험군(p=.020), Uric acid에서 시험군(p=.033)에서 유의한 것으로 나타났다. 또한 Total Protein에서 시험군(p=.013)과 대조군(p=.000), Albumin은 시험군(p=.000), 대조군(p=.000)에서 모두 유의한 것으로 나타났다.

표 29. 혈액검사 변화량

구분	시험군	대조군	P-value <sup>1)</sup>
Total N	54	49	
혈액학			
[Whold Blood]			
WBC count			
변화량			
Baseline			
mean	6.49	6.23	
SD	1.79	1.92	
Endpoint			.975
mean	6.42	6.14	
SD	1.99	1.64	
difference(mean/SD)	-0.07(1.56)	-0.08(1.86)	
P-value <sup>2)</sup>	.737	.758	
RBC count			
변화량			
Baseline			
mean	4.63	4.63	
SD	0.43	0.50	
Endpoint			.090
mean	4.69	4.63	
SD	0.43	0.52	

difference(mean/SD)	0.06(0.19)	0.00(0.15)	
P-value <sup>2)</sup>	.034*	.917	
Hb(Hemoglobin)			
변화량			
Baseline			
mean	14.02	14.29	
SD	1.36	1.44	
Endpoint			.041*
mean	14.21	14.26	
SD	1.43	1.50	
difference(mean/SD)	0.19(0.57)	-0.03(0.49)	
P-value <sup>2)</sup>	.019*	.683	
Hct			
변화량			
Baseline			
mean	41.46	41.80	
SD	3.41	3.68	
Endpoint			.065
mean	42.14	41.80	
SD	4.06	3.90	
difference(mean/SD)	0.68(2.07)	0.00(1.51)	
P-value <sup>2)</sup>	.020*	.985	
Platelet Count			
변화량			
Baseline			
mean	252.81	250.18	
SD	66.75	47.15	
Endpoint			.096
mean	258.48	243.39	
SD	65.94	45.08	
difference(mean/SD)	5.67(46.51)	-6.80(24.05)	
P-value <sup>2)</sup>	.375	.054	

ESR			
변화량			
Baseline			
mean	10.48	9.67	
SD	10.39	8.23	
Endpoint			.561
mean	10.37	10.43	
SD	9.29	11.17	
difference(mean/SD)	-0.11(5.73)	0.76(9.11)	
P-value <sup>2)</sup>	.887	.565	
효소단백[Serum]			
hs-CRP변화량			
Baseline			
mean	0.08	0.17	
SD	0.12	0.41	
Endpoint			.595
mean	0.07	0.20	
SD	0.06	0.45	
difference(mean/SD)	-0.01(0.10)	0.03(0.62)	
P-value <sup>2)</sup>	.322	.697	
일반화학[Serum]			
Total Protein변화량			
Baseline			
mean	7.30	7.28	
SD	0.35	0.31	
Endpoint			.006**
mean	7.21	7.02	
SD	0.36	0.34	
difference(mean/SD)	-0.09(0.26)	-0.27(0.37)	
P-value <sup>2)</sup>	.013*	.000***	
Albumin			
변화량			
Baseline			
			.086

mean	4.62	4.63	
SD	0.26	0.26	
Endpoint			
mean	4.53	4.47	
SD	0.26	0.28	
difference(mean/SD)	-0.09(0.16)	-0.16(0.24)	
P-value <sup>2)</sup>	.000***	.000***	
Glucose변화량			
Baseline			
mean	101.06	107.51	
SD	18.85	24.47	
Endpoint			.393
mean	99.94	103.02	
SD	18.46	14.67	
difference(mean/SD)	-1.11(17.95)	-4.49(21.93)	
P-value <sup>2)</sup>	.651	.158	
BUN변화량			
Baseline			
mean	13.17	13.48	
SD	4.11	3.97	
Endpoint			.959
mean	12.55	12.82	
SD	3.58	2.91	
difference(mean/SD)	-0.62(3.90)	-0.66(3.36)	
P-value <sup>2)</sup>	.248	.177	
Creatine변화량			
Baseline			
mean	0.97	1.01	
SD	0.15	0.18	
Endpoint			.169
mean	0.97	0.98	
SD	0.14	0.19	
difference(mean/SD)	0.00(0.10)	-0.02(0.09)	
P-value <sup>2)</sup>	.784	.094	

AST변화량			
Baseline			
mean	19.28	22.22	
SD	5.91	9.78	.293
Endpoint			
mean	20.07	22.12	
SD	6.09	9.08	
difference(mean/SD)	0.80(2.92)	-0.10(5.25)	
P-value <sup>2)</sup>	.050	.892	
ALT변화량			
Baseline			
mean	18.11	23.29	
SD	11.48	18.53	.366
Endpoint			
mean	19.76	23.69	
SD	12.57	18.11	
difference(mean/SD)	1.65(6.08)	0.41(7.73)	
P-value <sup>2)</sup>	.051	.713	
Uric acid변화량			
Baseline			
mean	5.18	5.19	
SD	1.42	1.37	.129
Endpoint			
mean	5.37	5.16	
SD	1.51	1.49	
difference(mean/SD)	0.19(0.65)	-0.02(0.79)	
P-value <sup>2)</sup>	.033*	.842	
Triglyceride변화량			
Baseline			
mean	129.00	162.18	
SD	86.29	100.65	.590
Endpoint			
mean	128.24	153.45	

SD	87.94	120.65	
difference(mean/SD)	-0.76(73.03)	-8.73(76.51)	
P-value <sup>2)</sup>	.939	.428	
Total Cholesterol변화량			
Baseline			
mean	198.69	196.14	
SD	37.17	32.07	
Endpoint			.430
mean	195.72	190.06	
SD	31.14	35.58	
difference(mean/SD)	-2.96(17.96)	-6.08(21.91)	
P-value <sup>2)</sup>	.231	.058	

1) 변화량 군간 비교: independent t-test

2) 변화량 군내 비교: paired t-test

difference: Baseline-Endpoint, P-value: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001

#### ⑥ 소변검사

소변검사의 변화량은 표 30과 같다. Leukocyte에서 Baseline 측정 시 군간 유의한 차이가 있었으나(p=.049), Endpoint 측정 시 군 간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(p=.408).

시험군과 대조군 각각의 변화량에 대해선 pH에서 대조군이 평균 -0.49 줄어들었고, 군 내 차이가 유의한 것으로 나타났다(p=.015). 소변검사 참고치는 표 31과 같다.

표 30. 소변검사 변화량

구분	시험군	대조군	P-value
Total N	54	49	
S.G			
변화량			
Baseline			
mean	1.02	1.02	.797 <sup>1)</sup>
SD	0.01	0.01	

Endpoint			
mean	1.02	1.02	
SD	0.01	0.01	
difference(mean/SD)	0.00(0.01)	0.00(0.01)	
P-value <sup>2)</sup>	.621	.453	
pH변화량			
Baseline			
mean	6.09	6.32	
SD	1.01	0.88	.407 <sup>1)</sup>
Endpoint			
mean	5.81	5.83	
SD	0.79	1.11	
difference(mean/SD)	-0.29(1.08)	-0.49(1.36)	
P-value <sup>2)</sup>	.055	.015*	
Protein			
Baseline			
Negative(N/%)	52(96.3%)	43(87.8%)	.234 <sup>2)</sup>
Trace(N/%)	2(3.7%)	5(10.2%)	
Positive(N/%)	0(0%)	1(2.0%)	
Endpoint			
Negative(N/%)	46(85.2%)	45(91.8%)	.504 <sup>2)</sup>
Trace(N/%)	7(13%)	3(6.1%)	
Positive(N/%)	1(1.9%)	1(2%)	
Glucose			
Baseline			
Negative(N/%)	52(96.3%)	46(93.9%)	.345 <sup>2)</sup>
Trace(N/%)	1(1.9%)	3(6.1%)	
Positive(N/%)	1(1.9%)	0(0%)	
Endpoint			
Negative(N/%)	52(96.3%)	47(95.9%)	.510 <sup>2)</sup>
Trace(N/%)	2(3.7%)	1(2%)	
Positive(N/%)	0(0%)	1(2%)	
Bilirubin			
Baseline			
Negative(N/%)	46(85.2%)	47(95.9%)	.066 <sup>2)</sup>

Trace(N/%)	0(0%)	0(0%)	
Positive(N/%)	8(14.8%)	2(4.1%)	
Endpoint			
Negative(N/%)	47(87%)	44(89.8%)	.880 <sup>2)</sup>
Trace(N/%)	1(1.9%)	1(2%)	
Positive(N/%)	6(11.1%)	4(8.2%)	
Urobilinogen			
Baseline			
Negative(N/%)	0(0%)	1(2%)	
Trace(N/%)	52(96.3%)	47(95.9%)	.510 <sup>2)</sup>
Positive(N/%)	2(3.7%)	1(2%)	
Endpoint			
Negative(N/%)	1(1.9%)	1(2.0%)	
Trace(N/%)	53(98.1%)	48(98%)	.945 <sup>2)</sup>
Positive(N/%)	0(0%)	0(0%)	
Ketone			
Baseline			
Negative(N/%)	50(92.6%)	42(85.7%)	
Trace(N/%)	4(7.4%)	6(12.2%)	.395 <sup>2)</sup>
Positive(N/%)	0(0%)	1(2%)	
Endpoint			
Negative(N/%)	50(92.6%)	43(87.8%)	.180 <sup>2)</sup>
Trace(N/%)	4(7.4%)	3(6.1%)	
Positive(N/%)	0(0%)	3(6.1%)	
Blood			
Baseline			
Negative(N/%)	40(74.1%)	44(89.8%)	.086 <sup>2)</sup>
Trace(N/%)	5(9.3%)	3(6.1%)	
Positive(N/%)	9(16.7%)	2(4.1%)	
Endpoint			
Negative(N/%)	38(70.4%)	43(87.8%)	.093 <sup>2)</sup>
Trace(N/%)	4(7.4%)	2(4.1%)	
Positive(N/%)	12(22.2%)	4(8.2%)	
Leukocyte			
Baseline			
Negative(N/%)	42(88.8%)	45(91.8%)	.049 <sup>*2)</sup>
Trace(N/%)	0(0%)	0(0%)	



Positive(N%)	12(22.2%)	4(8.2%)	
Endpoint			
Negative(N%)	38(70.4%)	38(77.6%)	.408 <sup>2)</sup>
Trace(N%)	0(0%)	0(0%)	
Positive(N%)	16(29.6%)	11(22.4%)	
Nitrite			
Baseline			
Negative(N%)	54(100%)	49(100%)	100% negative이
Trace(N%)	0(0%)	0(0%)	므로
Positive(N%)	0(0%)	0(0%)	$x^2$ 은 제시되지
Endpoint			않습니다.
Negative(N%)	53(98.1%)	49(100%)	.338 <sup>2)</sup>
Trace(N%)	0(0%)	0(0%)	
Positive(N%)	1(1.9%)	0(0%)	

1) independent t-test

2) chi-square test difference: Baseline-Endpoint

P-value: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001

표 31. 혈액검사 및 소변검사 참고치

구분	단위	참고치
혈액학		
[Whole Blood]		
WBC Count	10 <sup>3</sup> /uL	4~10
RBC Count	10 <sup>6</sup> /uL	4~5.5
Hb(Hemoglobin)	g/dL	12~16
Hct	%	36~48
Platelet Count	10 <sup>3</sup> /uL	150~450
ESR	mm/hr	0~27
효소단백		
[Serum]		
hs-CRP	mg/dL	0~0.5

일반화학

[serum]

Total Protein	g/dL	6.6~8.0
Albumin	g/dL	3.3~5.2
Glucose	mg/dL	60~108
BUN	mg/dL	8~20
Creatine	mg/dL	0.6~1.3
AST	IU/L	5~40
ALT	IU/L	0~40
Uric acid	mg/dL	3~8
Triglyceride	mg/dL	0~200
Total Cholesterol	mg/dL	0~200

[소변검사]

S.G.		1.005~1.030
pH	PH	4.6~8.0
Protein		Negative
Glucose		Negative
Billirubin		Negative
Urobilinogen		Trace
Keton		Negative
Leukocyte		Negative
Nitrite		Negative

⑦ 타액검사

타액검사의 변화량은 표 32와 같다. melatonin, cortisol 수치는 군내 치료전후에서 유의한 차이는 없었다. Cortisol(기상 30분 후)의 경우 시험군과 대조군 사이에서 유의한 치료전후 변화량 차이가 나타났지만 (p=0.036) 각각 군내 치료전후 차이가 유의하지 않았고 모든 수치가 임상적 범위안에 (Table 23) 해당되어 임상적으로 유의미하지 않다고 평가되었다. Leukocyte 에서 Baseline 측정 시 군간 유의한 차이가 있었으나(p=.049), Endpoint 측정 시 군 간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(p=.408). 혈액검사 참고치는 표 33과 같다.

표 32. 타액검사 변화량

구분	시험군	대조군	P-value <sup>1)</sup>
Total N	54	49	
melatonin 변화량			
N	44	42	
결측	10	7	
Baseline			
mean	1.99	2.75	
SD	2.00	3.96	
Endpoint			.134
mean	2.53	2.16	
SD	3.49	2.43	
difference(mean/SD)	0.70(3.03)	-0.49(3.34)	
P-value <sup>2)</sup>	.231	.345	
cortisol(자기전) 변화량			
N	53	48	
결측	1	1	
Baseline			
mean	1.07	1.32	
SD	0.90	1.68	
Endpoint			.579
mean	0.92	1.27	
SD	0.71	0.93	
difference(mean/SD)	-0.17(0.96)	-0.03(1.46)	
P-value <sup>2)</sup>	.212	.885	
cortisol(기상후) 변화량			
N	53	47	
결측	1	2	
Baseline			
mean	5.37	6.48	
SD	4.00	4.75	
Endpoint			.345
mean	6.17	6.54	

SD	4.22	4.44	
difference(mean/SD)	0.83(3.96)	0.06(4.24)	
P-value <sup>2)</sup>	.131	.929	
cortisol(기상30분후)변화량			
N	51	48	
결측	3	1	
Baseline			
mean	11.07	13.43	
SD	8.39	7.73	
Endpoint			.036*
mean	13.37	12.07	
SD	10.33	6.19	
difference(mean/SD)	2.12(8.30)	-1.45(8.44)	
P-value <sup>2)</sup>	.074	.238	

1) 변화량 구간 비교: independent t-test

2) 변화량 군내 비교: paired t-test

difference: Baseline-Endpoint, P-value: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001

표 33. 타액검사 참고치

variables	단위	참고치
Melatonin	pg/mL	>10.0
Cortisol(자기전)		0.17 - 2.98
Cortisol(기상 직후)	nmol/L	3.12 - 22.17
Cortisol(기상 30분 후)		5.52 - 29.7

## (바) 결론 및 고찰

본 연구는 불면증을 호소하는 19~59세 성인들을 대상으로 시계꽃 추출물의 섭취가 불면증 개선 효과가 있는지 평가하였다. 총 110명에 연구 선정/제외기준을 만족하여 연구에 등록되었으며, 동의철회 3명을 제외한 107명이 시험군에 55명, 대조군에 52명이 무작위 배정되었다. 이후 중도탈락기준에 해당하지 않고 12주간 연구를 완료한 대상자들은 총 84명이었다.

시계꽃 추출물의 유효성 평가를 위해서 수면다원 검사를 통해 객관적인 불면증 개선 효과를 평가하였고, 피츠버그 수면의 질 설문과 주간졸음척도 설문검사 등을 이용하여 주관적인 수면의 질 평가를 하였다.

유효성평가 결과, 1차 유효성 평가 변수였던 수면다원검사상 총 수면 시간 (Total Sleep Time, TST)이 대조군 대비 시험군에서 유의하게 증가하였다 ( $p=0.049$ ).

본 연구를 통하여 시계꽃 추출물을 2주간 섭취시 대조군 대비 수면개시 이후 깨어있는 시간을 감소시킴으로써 수면 시간 증가 및 수면 효율 개선으로 수면의 질을 향상시키는데 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

안정성 평가 결과, 활력징후 및 혈액, 소변검사 결과 모든 지표에서 임상적으로 유의미한 변화가 없었고, 대상자에서 중대한 이상반응은 나타나지 않았으며, 이상반응의 발생, 종류, 증상 정도 및 시험약과의 관련성 모두 군 간에 차이가 없었다.

본 연구 계획시 1차 유효성 평가지표를 주관적인 수면에 대한 만족도로 설정하였으나, 여러 가지 제외기준으로 인하여 심각한 불면증이 있는 환자군은 제외함으로써 비교적 양호한 수면의 어려움이나 불면 증상을 호소하는 대상자들을 대상으로 하였다.

수면건강은 플라시보 효과가 주요한 변수로 작용할 수 있어, 객관적인 지표의 개선효과로 확인하고자 모든 대상자들에 대해서 치료 전후로 수면다원검사를 실시하도록 계획을 변경하고, 1차 유효성 평가 지표를 수면다원검사 결과상의 지표인 총 수면시간으로 변경하였다.

통상적으로 실험설계를 계획할 때 적당한 피험자 수 또는 표본의 크기의 결정이 매우 중요하다. 특히 불면증은 잠들기 어려운 증상, 자다가 자주 깨는 증상, 이른 아침에 깨는 증상, 아침에 일어나면 개운하지 않은 증상을 단독 혹은 복합적으로 보이는 상태로 주관적인 호소에 초점을 맞추게 된다. 본 연구에서 대상자가 주관적으로 느끼는 수면의 어려움과 객관적인 수면의 차이가 존재할 것으로 판단되어 모든 대상자들에게 수면다원검사를 실시하게 된 배경이다.

결론적으로, 수면의 어려움을 호소하는 1차성 불면증에 해당하는 대상자들에게 시계꽃 추출물을 2주간 섭취시킨 결과, 수면다원검사상 총 수면시간에서 대조군 비해 유의하게 증가하여 수면개선 효과를 확인하였다. 안전성 평가 결과, 활력징후 및 임상병리검사 결과 모든 지표에서 임상적으로 유의미한 변화가 없었고, 이상반응 관련지표도 군간에 차이가 없어서 안전함을 확인할 수 있었다.

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

(가) 목표

국내산 천연물 유래(시계꽃 열매, 잎) 소재를 이용한 수면 건강기능식품 소재 및 제품 개발

(나) 목표 달성여부

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인정	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	3	3		1		3			2		1	6	6	5	3	3			
1차년도									1				1	1	1	1			
2차년도														1	1	1			
3차년도																			
소계	3	3		1		3			2		1	6	6	5	3	3			
1차년도									1				1	1	1				
2차년도	3					1						2	4	2	1	2			
3차년도	4					1							2	2	1	3			
소계	3	1		1		1						3	1	2	1				
1차년도	3	1		1	1	2			2			1	1	9	1				
소계	3	1		1		2			1		1	5	6	5	3	3			
1차년도	7	1		1	1	3			2			1	3	12	3	4			
종료 1차년도											1	2	3						
종료 2차년도		1				1			1			1							
종료 3차년도		1																	
소계		2				1			1		1	3	3						
합계	7	3		1	1	4			3		1	4	6	12	3	4			

(다) 목표 달성 분야 기여도

- ① 사업화지표에서 연구사업의 성과를 바탕으로 지식 재산권 성과 출원 초과 달성- 시계꽃 추출물의 수면의 기능성의 추가 기능성을 특허로 출원하였음.
- ② 사업화지표에서 (주)네추럴에프앤피의 인력 고용창출 초과 달성하였음.
- ③ 사업화지표에서 연구사업의 성과를 바탕으로 일반 식품 및 건강기능식품 제품 연구 완료. 시제품 출시 및 제품화 완료(연구기간내 시제품화 2건 100% 달성)
- ④ 사업화지표에서 네추럴에프앤피에서 자체기술 실시를 통하여 제품 출시 및 매출발생함.
- ⑤ 연구기반지표에서 학술 성과 발표 초과 달성하였음.
- ⑥ 연구기반지표에서 인력양성 초과 달성하였음.

(라) 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

① 논문게재 미달성

주관기관에서 제조한 시계꽃 추출물의 추출과정 및 보관 안정성에 있어서, 소재의 효력이 일정하지 않은 점이 연구기간 동안 확인되어, 추가로 소재의 표준화 연구가 진행되면서 협동기관에서 진행하는 동물실험 시료에 여러 배치로 효력을 평가하게 되어 연구 완료에 시간이 추가로 소요됨. (1협동기관)

개별인정원료로 승인받기 위하여 단회 및 반복 투여하여 기능을 확인하였고, 부작용에 대한 가능성을 동물모델에서 심화연구하여 면밀히 검토하였으며, 논문갯수의 목표량 달성보다도 시계꽃 소재의 기능에 대한 “전임상” 단계에서의 확실성을 확보하기 위하여 반복적으로 효과와 안전성을 확보하는 것에 집중하여 연구를 진행하여 논문의 투고가 늦어지게 됨. (1협동기관)

현재 논문 SCI급 논문1편 외 2편이 현재 심사중이며, 시계꽃의 일반수면기전 외에 특수수면기전이라 판단되는 마커를 발견하여 추가 확인 중에 있으며 1편의 저널을 추가로 투고할 예정임. (1협동기관)

인체적용시험 진행 중 2018년 7월 수면다원검사가 급여화로 전환되면서 수면다원검사를 받으려는 환자들이 급격히 증가하면서 연구를 위한 수면다원검사 예약이 어려워져 인체적용시험이 예상보다 늦은 시기인 2018년 12월에 완료됨. 그 이후 데이터 정리 및 통계분석을 실시하여 이에 대한 SCI논문을 작성하여 (제목: Effects of Passiflora incarnata Linnaeus on polysomnographic sleep parameters in subjects with insomnia disorder: A double-blind randomized placebo-controlled study) SCI급 논문인 International Clinical Psychopharmacology에 투고하여 현재 under review 중으로, 과제 종료 1년 이내에 publish 가능할 것으로 예상됨. (2협동기관)



또한, 불만을 호소하는 대상자들의 주관적인 수면에 대한 보고와 수면다원검사를 통해 본 객관적인 자료 사이의 간극에 대한 통계분석 및 고찰에 대해서 2번째 SCI급 논문 작성 중이며, 과제 종료 후 1년 이내에 발표할 예정임. (2협동기관)

## ② 기술인정 미달성

주관기관에서는 국내 시료 수급의 애로사항 및 국내 원료가격의 제품화 비현실성 등으로 해외 시료의 추가 검토를 추가적으로 실시하였고, 이로 인한 시료의 지표성분 표준화 애로사항 발생, 1협동기관의 식약처 요청 동물 모델 반복 실험과 시료 공급일정의 차질발생, 2 협동 기관의 인체시험 피험자의 모집의 애로사항, 수면다원검사관련 국가 의료 정책 변경 등 다수의 애로사항이 발생하여 본 연구과제의 연구기간의 연장으로 이어졌으나, 각 기관의 노력으로 식약처에 개별인정 심의 신청을 최종적으로 마무리하였으며, 연내(종료 1년차)에 심의 후 개별인정등록 기술인정목표의 성공이 예측됨.

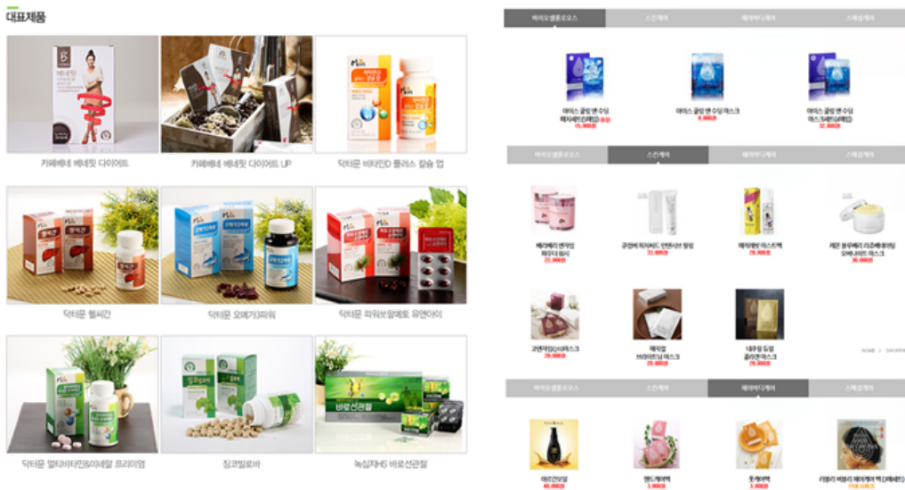
#### 4. 연구결과의 활용 계획 등

(가) 활용방안 - 다양한 유통 채널을 통한 제품출시



본 연구과제의 성과물을 이용하여 건강기능식품 및 건강지향식품을 출시하여 홈쇼핑, 인터넷 쇼핑, OEM 제안 등을 통해 제품 출시용 과학적 근거 자료로 활용.

**㈜네추럴에프앤피 제품개발 현황**



또한, 본 과제의 연구 결과를 바탕으로 건강 지향 식품인 ‘내일을 부탁해’를 온라인에 출시하여 매출액 1,700만원의 성과를 달성하였음.



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)		
	조정환	1970년 02월 14일		
	주소 충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청송대길 39	전화번호 휴대전화		
영업소	명칭(상호)	영업등록번호		
	(주)내추얼에프앤피	20040415081		
	소재지 충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청송대길 39			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	요청하는 품목제조 보고번호	20040415081365
	제품명	내일을 부탁해 풀리		
	유통기한	제조일로부터 18개월		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 해당부분	빛장애 기재		
	용도 용법	빛장애 기재		
	보관방법 및 포장재질	빛장애 기재		
	포장방법 및 포장단위	내면 PE재질 포에 밀봉 포장한 후 포장 단위별로 박스 포장한다. / 포장단위 : 20 g x [7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63포 등]		
	성상	호린노란색의 풀리		
	품목의 특성	<input type="checkbox"/> 고열량 · 저영양 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 에 <input type="checkbox"/> 아나오 <input type="checkbox"/> 해당 없음 <input type="checkbox"/> 알러진종 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 에 <input type="checkbox"/> 아나오		

기타

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2018년 10월 31일  
보고인 조정환

청주시장 귀하

품목보고번호	20040415081-365
처리부서	복지국 위생정책과
처리자성명	장정희
장장회	
처리일자	2018년 11월 01일

시험·검사성적서

발행번호	R20190213-0083	접수번호	190102799-001	
검사관일자	2019-02-13	접수연월일	2019-01-31	
제품명	내일을 부탁해			
(품목)제조번호	0369-0001	품목제조신고번호	20040415081365	
유형·재질·품목명	기타가공품			
제조(수입)일		유통(품질유지기한) 기한	2020-07-20	
성명	조정환			
업체명	(주)내추얼에프앤피			
소재지	(주)내추얼에프앤피			
주소	충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청송대길 39			
전화번호	070-4466-3725	팩스번호	02-400-4419	
전자우편	naturaltea@naturaltea.com			
제조업	(주)내추얼에프앤피			
소재지	충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청송대길 39			
제조국				
시험·검사목적	식품   자가품질위탁검사			
시험·검사 항목 및 결과				
시험·검사 항목	시험·검사 기준	시험·검사 결과	판정	비고
성상	적합하여야 한다.	이미, 이렇기 있는 호린 노란색의 풀리	적합	
이물	불검출	불검출	적합	
대량균근	n=5, c=1, m=0, M=10	0, 0, 0, 0, 0	적합	

종합판정 : 적합  
 시험검사원 : 김영국, 김진영, 이현아      시험검사책임자 : 가미현, 김진희, 이현영, 장정순

비고 :

※ 위 판정은 위뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.  
 ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 항목 및 결과는 별지로 작성 가능합니다.  
 ※ 검사결과를 광고하거나 용기·포장 등에 표시할 때에는 시험·검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.  
 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험·검사성적서를 발급합니다.      2019년 02월 13일

(사)한국건강기능식품협회부설 한국기능식품연구원



13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700 A동 102호(상범동, 코리아이비아오      T:031-628-2400      F:031-628-0400-13)

그림 70. '내일을 부탁해' 품목제조보고서 및 시험 검사성적서





그림 71. ‘내일을 부탁해’ 온라인 홍보 상세 페이지

현재 식약처에서 심의 중인 본 연구과제의 최종 성과물인 ‘수면건강에 도움을 주는 개별인정형 원료’를 활용하여 수면건강 건강기능식품 제품을 출시할 예정이다.

(나) 활용계획 - 국내외 시장 진입을 위한 단계적 전략 구축

<h2 style="text-align: center;">제품력</h2> <p style="text-align: center;">제품개발을 위한 폭넓은 R&amp;D 네트워크 보유</p>	<h2 style="text-align: center;">유통</h2> <p style="text-align: center;">TV 홈쇼핑과 온라인 쇼핑몰을 통한 자체 유통 channel 확보</p>	<h2 style="text-align: center;">브랜드</h2> <p style="text-align: center;">식약처 GMP1호 지정업체로서의 차별화된 신뢰성 확보</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>제품개발을 위한 자체 기업부설연구소 운영</li> <li>연구전문 벤처기업과의 제휴 등을 통해 우수기술 도입</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>자사 브랜드 “닥터문” 건강기능식품 및 일반식품 제품 라인 구축</li> <li>자사 브랜드 “퓨어스킨” 화장품 라인 제품 개발 및 집중 육성</li> <li>TV 홈쇼핑은 건식의 새로운 빅(Big) 유통으로 떠오르고 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>협회 및 식약처를 통한 국내외 관련 기업의 견학 제도</li> <li>국내 최초 건강기능식품 GMP 설비</li> </ul>
<h3 style="text-align: center;">베타글루칸 등 특허 보유 및 인체적용 시험 수행 능력 보유</h3>	<h3 style="text-align: center;">해외 협력사를 통한 해외 진출</h3>	<h3 style="text-align: center;">자사 브랜드 구축</h3>
<ul style="list-style-type: none"> <li>당사 18가지 특허 기술보유 및 특허 기술의 우수성을 극대화 한 제품 개발로 시장 선도</li> <li>: 개별인정형 원료 허가 3건 획득</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>동남아(말레이시아, 몽골, 베트남, 대만 등)에 해외 진출 경험 보유</li> <li>일본, 중국을 비롯하여 전 세계 시장으로 확장을 도모</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>TV홈쇼핑, 온라인 쇼핑몰, 네트워크 판매를 통한 기업 홍보</li> <li>대기업, 제약회사 등 OEM 납품을 통한 제품 신뢰도 확보</li> </ul>

본 연구과제의 최종목표로 개발된 개별인정형 원료를 활용해 건강기능식품으로 국내 시장 진입뿐만 아니라 자사의 해외 수출 네트워크(중국, 대만, 베트남 등)을 활용하여 해외시장 진출을 통해 매출 증대를 확대할 계획임.



(다) 기대성과 - 제품의 사업화 가능성

① 기술적 측면

- ㉠ 새로운 식품 소재의 산업적 활용을 위하여, 가공 추출조건 확립 및 대량공정 표준화 자료로 활용할 수 있음.
- ㉡ 기능적으로 우수한 식품 소재를 개발하고, 소비자가 선호하는 제형 개발 기술을 통해 소비자가 섭취하기 간편한 제품으로 개발할 수 있음.
- ㉢ 수면건강 증진을 위한 인체시험 가이드라인으로 활용할 수 있음, 특히, 주관적인 설문지와 객관적인 수면다원 검사간의 차이에 대한 고찰로 수면개선 평가시 효력 평가 차이에 대한 과학적 근거를 제시하였음.
- ㉣ 수면건강 증진을 위한 동물시험시에도 수면효율을 평가하기 위한 실험 가이드라인으로 활용 가치가 높음.

② 경제·산업적 측면

- ㉠ 건강기능식품 시장에는 새로운 기능성 제품을 제시하여 시장에 활력을 불어넣어야 할 필요가 있음.
- ㉡ 본 연구과제로부터 도출된 수면 건강 개선에 도움을 줄 수 있는 개별인정형 원료 (시계꽃 열매, 잎 추출분말)를 활용하여 다양한 OEM, ODM 유통망 보유, 국내 건강기능식품 1호 GMP 기업으로써 우수한 제품 제조역량 등의 강점을 보유한 (주)네추럴에프앤피의 강점으로 시장 진입할 예정으로, 산업적으로 높이 평가 되고 있음.
- ㉢ 본 연구로 개발된 신규 원료를 기존 거래업체에 적극적인 OEM, ODM 홍보를 진행하여 1차적인 매출 창출 유도를 시작으로, 자매회사 ‘(주)넥스트BT’ 사 및 고객사를 통해 국내외 시장 확대와 흡쇼핑, 소셜 네트워크 시장 진출을 도모할 예정.
- ㉣ 최근 들어 수면 건강에 대한 관심 고조와 한류 열풍에 힘입어 국내뿐만 아니라 해외 시장 개척으로 이어질 수 있을 것으로 분석됨.
- ㉤ 아열대 작물인 시계꽃 가공품의 수요 증대로 국내 재배 확대에 기여.

## 붙임. 참고문헌

1. 국민건강보험공단, 2013.
2. 식약처 식품원재료DB
3. Daley M et al. 2009. The economic burden of insomnia: direct and indirect costs for individuals with insomnia syndrome, insomnia symptoms, and good sleepers. *Sleep*. 32(1):55-64.
4. Dhawan K et al. 2001. Correct Identification of *Passiflora incarnata* Linn., a Promising Herbal Anxiolytic and Sedative. *J Med Food*. Autumn;4(3):137-144.
5. Marshall NS, Glozier N and Grunstein RR. 2008. Reply to Taheri and Thomas: is sleep duration associated with obesity-U cannot be serious. *Sleep Med Rev*. 12(4):303-5. doi: 10.1016/j.smr.2008.04.005.
6. McClung CA. 2011. Circadian rhythms and mood regulation: insights from pre-clinical models. *Eur Neuropsychopharmacol*. 4:S683-93. doi: 10.1016/j.euroneuro.
7. Milner CE et al. 2009. Sensory gating impairments in poor sleepers during presleep wakefulness. *Neuroreport*. 18:20(3):331-6.
8. Nedeltcheva AV et al. 2009. Sleep curtailment is accompanied by increased intake of calories from snacks. *Am J Clin Nutr*. 89(1):126-33. doi: 10.3945/ajcn.2008.26574.
9. Ngan A and Conduit R. 2011. A double-blind, placebo-controlled investigation of the effects of *Passiflora incarnata* (passionflower) herbal tea on subjective sleep quality. *Phytother Res*. 25(8):1153-9. doi: 10.1002/ptr.3400
10. Shi Z et al 2008. Dietary fat and sleep duration in Chinese men and women. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Dec;32(12):1835-40. doi: 10.1038/ijo.2008.191.
11. Summa KC and Turek FW. 2014. Chronobiology and obesity: Interactions between circadian rhythms and energy regulation. *Adv Nutr*. 14;5(3):312S-9S. doi: 10.3945/an.113.005132.
12. Torres M et al. 2014. Male fertility is reduced by chronic intermittent hypoxia mimicking sleep apnea in mice. *Sleep*. 1;37(11):1757-65. doi: 10.5665/sleep.4166

#### 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.