

(뒷면) (옆면)

(앞면)

<p>3 cm</p>	<p>11-1543 000-002 305-01</p> <p>4cm</p> <p>기술사업화지원사업 R&amp;D Report</p> <p>노각나무추출물을 이용한 관절건강 및 면역과민반응에 대한 피부상태 개선(아토피) 기능성식품개발을 통한 사업화</p> <p>최종보고서 (건고딕 14p)</p> <p>2018 (건고딕13p)</p> <p>5cm</p> <p>농림축산식품부</p>	<p>4cm</p> <p>기술사업화지원사업 R&amp;D Report</p> <p>( 건 고 딕 25p)</p>	<p>발 간 등 록 번 호 11-1543000-002305-01</p> <p>(건고딕31p) 5cm</p> <p>노각나무 추출물을 이용한 관절건강 및 면역과민반응에 대한 피부상태 개선 (아토피) 기능성식품개발을 통한 사업화 최종보고서</p> <p>(0.1cm)</p> <p>2018. 8 . 17. (건고딕15p)</p> <p>0.15cm (별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)</p> <p>주관연구기관 / (주)생명의나무 협동연구기관 / 경희대학교 2cm (건고딕 15.5p)</p> <p>(백색바탕)</p> <p>농림축산식품부 (건고딕 20p)</p>
<p>3 cm</p>	<p>(건고딕 17p)</p>		

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “노각나무 추출물을 이용한 관절건강 및 면역과민반응에 대한 피부상태 개선 (아토피) 기능성식품개발을 통한 사업화”(개발기간 : 2014. 10. 15 ~ 2018. 04. 13)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018 .

주관연구기관명 : (주)생명의나무 (대표자) 백 윤 희 (인)  
협동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 홍 충 선 (인)

주관연구책임자 : 나 천 수  
협동연구책임자 : 이 태 훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	814003-03	해당 단계 연구 기간	2014-10-15 ~ 2018-04-13	단 계 구 분	3/3
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	기술사업화지원사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	노각나무 추출물을 이용한 관절건강 및 면역과민반응에 대한 피부 상태 개선 (아토피) 기능성식품개발을 통한 사업화			
연구 책임자	나 천 수	해당단계 참여연구원 수	총: 13명 내부: 13명 외부:   명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간:75,000천원 계:375,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 13명 내부: 13명 외부:   명	총 연구개발비	정부:900,000천원 민간:225,000천원 계:1,125,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)생명의나무			참여기업명 (주)생명의나무	
	경희대학교				
위탁 연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수 216	

#### 4. 국문 요약문

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>노각나무잎 추출물을 이용한 개별인정 건강기능식품 소재 개발을 위하여 유효성 및 작용기전의 과학적 입증, 유효(지표)성분의 설정 및 분석법 확립, 생산공정의 표준화를 구축하며, 이와 동시에 기능성 소재에 대한 인체적용시험을 수행하고 골관절(관절염 및 팔다공증) 강화 기능 및 면역 과민반응에 의한 피부 상태(항염증/항알러지) 개선 소재를 활용하여 아토피 개선 및 예방 제품을 중점적으로 개발을 목표로 함.</p>	
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 노각나무 잎 추출물을 용매분획하고 Ethyl acetate 분획과 Dichloromethane 분획에서 단일 compound 23개 단리를 하여, 협동기관에 활성평가를 위하여 제공하였으며, 3-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, gallic acid, quercetin, trifolin, quercetin-3-O-(6" -O-galloyl)-β-glucopyranoside, quercitrin, quercetin-3-O-(2" -O-galloyl)-α-rhamnopyranoside, rutin, rhamnose, 2-Furoic acid, Menisdaurilide, Fraxetin 등 13개를 구조 동정하였음.</li> <li>- 관절 건강과 관련하여 70% 주정추출물(SKE)이 효과가 가장 좋았으며, 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피)에 대한 효과는 열수추출(SKW)이 더욱 효과가 뛰어난 것으로 나타나 두가지 방법을 사용하여 대량생산을 위한 Pilot생산을 수행하였음.</li> <li>- 단회경구투여 독성시험에서 시험물질의 랫드에 대한 개략치사량(ALD)은 한계량인 2,000 mg/kg 보다 높은 2,500 mg/kg을 상회하는 것으로 추정됨.</li> <li>- 인체적용시험을 수행하기 위하여 관절 건강 관련 노각나무 잎 주정추출물(SKE)은 Quercetin으로 480ug/g ~ 720ug/g, 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 관련 노각나무 잎 열수추출물(SKW)은 Quercetin으로 120ug/g ~ 180ug/g으로 기준규격을 설정함.</li> <li>- 양묘 및 종묘 보급을 위한 농민, 영농조합 등과의 협력을 진행하여 왔으며, 국립산림과학원, 전남산림자원연구소와 함께 노각나무 보급을 위한 협의를 진행함.</li> <li>- 노각나무 추출물은 대표적인 염증성 사이토카인들인 TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8의 발현을 강하게 저해하였으며, 이는 노각나무 추출물이 관절염 증상에 주요하게 관여하는 염증성 인자들의 발현을 광범위하게 저해할 수 있다는 의미의 결과임.</li> <li>- 염증 유도 물질인 TNF-α에 의해 유도되는 MMP-1, 3, 13의 발현을 노각나무 추출물 및 시제품1이 우수하게 저해하는 것을 확인할 수 있었으며, TNF-α에 의해 손상된 Col2의 재생 활성도 뛰어난을 확인할 수 있었음. 이는 관절에서 염증 발생 중 일어나는 연골의 손상 방지 및 손상된 연골의 재생에 관여하는 효과적인 물질로 사료됨.</li> <li>- 퇴행성관절염의 대표적 실험 모델인 OD 모델을 사용하기로 하여 실험한 결과 노각나무 추출물 및 시제품1은 손상된 연골을 재생하는 결과를 나타내 관절염 질환에서 손상된 연골 조직의 재생에 뛰어난 효과를 나타내는 물질임을 확인할 수 있었음.</li> </ul>	



연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 노각나무 잎 추출물의 아토피 피부염증 관련 인자 발현 비교한 결과 아토피 증상에 중요하게 관련되는 Th1/Th2 케모카인 중에서 대표적인 CCL17(TARC), CCL22(Macrophage-derived chemokine; MDC)의 유전자 발현이 강력하게 저해하는 것을 확인할 수 있었음.</li> <li>- 아토피 피부염 동물 모델을 대상으로 노각나무 추출물과 시제품2를 경구 투여하여 변화를 분석한 결과 DNCB에 의해 유도된 접촉성 피부염의 증상이 완화되는 것을 육안으로 확인할 수 있었음.</li> <li>- 또한 면역반응에 주요하게 관여하는 장기인 비장(spleen)과 림프절(lymph node)을 분리하여 장기의 크기를 비교한 결과 DNCB만 처리된 그룹에서는 비장 및 림프절 크기가 증가되었으며, 노각나무 추출물과 시제품2를 투여한 그룹에서는 비장과 림프절의 크기가 감소한 것을 확인하였음. 이는 염증 반응을 억제할 수 있다는 것을 확인할 수 있는 결과임.</li> <li>- 접촉성 피부염 유발 동물의 등 피부를 생검하여 변화를 관찰한 결과 DNCB만 처리된 그룹에서 증가된 mast cell의 침착 정도는 노각나무 추출물 및 시제품2의 투여에 의해 현저하게 침착 정도가 감소하는 것을 확인할 수 있었음.</li> <li>- 노각나무 추출물의 관절 건강 인체적용 시험에서 시험식품(SKE 100군)의 경우 통증평가 설문(VAS)에서는 통증 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났으며, 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC, LFI)에서는 통증 및 기능상태 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났음. 그러나 시험식품(SKE 100군)의 경우 염증성 cytokine(IL-6, TNF-<math>\alpha</math>) 평가에서는 염증성 완화 개선에는 큰 도움이 되지 않는 것으로 확인되어 추가적인 연구가 필요함.</li> <li>- 노각나무 추출물의 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선 인체적용시험은 현재 3개기관(성빈센트병원, 인천국제성모병원, 명지병원)에서 진행 중에 있으며, 유아 및 아동을 대상으로 하는 인체적용시험이라는 특성 때문에 대상자 모집의 어려움이 있어 현재 50%정도의 진행이 완료된 상태임.</li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미이용 자원인 노각나무내 기능성 소재의 고부가 건기식품 및 의약품 소재로의 진화 및 관련 기술의 국제 선도 및 우점화 기대</li> <li>○ 고령식 및 관절환자 유형별 기능적 원료 및 제품으로 활용과 삶의 질 향상기대</li> <li>○ 개별인정 기능성 원료로 인정받기 위한 과학적 근거자료 확보로 건기식품이외 의약품제제로의 점진적 개발 기대</li> <li>○ 소비자의 신뢰확보와 이해도 증가로 관련 산업의 발전기대</li> <li>○ 국제선도형 뼈건강 및 과민면역 관련 환자 TYPE별 천연물신약 개발관련 바이오소재 개발 및 관련 KNOW-HOW 정립에 있어 체계화 기대</li> <li>○ 관절건강 및 면역과민반응에 대한 피부상태 개선 관련 제품화 정립 기술 및 대량생산시스템으로 관련분야 국제선도화 기대</li> </ul>				
중심어 (5개 이내)	노각나무	뼈건강	관절염	아토피	건강기능식품

## < SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>For the development of individual health functional food materials using <i>Stewartia Koreana</i>(SKBE) Leaf Extract, scientific validation of effectiveness and mechanism of action, establishment of effective(index) composition and analysis method, establishment of standardization of production process, The goal is to focus on the development and improvement of atopy products using materials that improve the function of the osteoarthritis (arthritis and baldness) and improve the skin condition (anti-inflammatory / anti-allergy) by immune hypersensitivity.</p>		
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>- In this study, 23 isolates were isolated from Ethyl acetate fraction and Dichloromethane fractions by solvent fractionation was provided to the collaborating organizations for activity evaluation, and 3-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, gallic acid, quercetin , trifolin, quercetin-3-O-(6"-O-galloyl)-<math>\beta</math>-glucopyranoside, quercitrin, quercetin-3-O-acid, menisdaurilide, and Fraxetin was Structural identification was performed.</li> <li>- In relation to joint health, 70% ethanol extract (SKE) was the most effective, and SKW was more effective in improving skin condition (atopy) We have produced Pilot for mass production.</li> <li>- In the single oral toxicity study, the approximate lethal dose (ALD) of the test substance to the rats was estimated to be over 2,500 mg / kg, which is higher than the limit of 2,000 mg / kg.</li> <li>- For human test related to joint health, the content of Quercetin (480ug/g~720ug/g) and for skin health improvement(atopy), Set the reference standard to 120ug/g~180ug/g with Quecetin.</li> <li>- We have been cooperating with farmers, farmers' associations, etc. We also hold consultations with the National Forestry Academy and Jeonnam Forest Resources Research Institute for the supply of lumber trees.</li> <li>- SKBE extract strongly inhibited the expression of TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6 and IL-8, which are typical inflammatory cytokines. This is due to the fact that SKBE extract broadly expresses inflammatory factors, It is a result of the meaning that it can inhibit.</li> <li>- The expression of MMP-1, 3, and 13 induced by TNF-<math>\alpha</math>, which is an inflammation inducer, was found to be inhibited by the extract of SKBE and prototype 1, and it was confirmed that the regenerating activity of Col2 damaged by TNF-<math>\alpha</math> was excellent Yes. This is considered to be an effective material for preventing damage to cartilage occurring during inflammation in joints and regenerating damaged cartilage.</li> <li>- As a result of the experiment using OD model which is a representative experiment model of degenerative arthritis, it was confirmed that the extract of SKBE and prototype 1 showed a result of regenerating damaged cartilage and thus exhibited an excellent effect on the regeneration of damaged cartilage tissue in arthritic diseases.</li> <li>- The expression of atopy skin inflammation-related factors in SKBE strongly inhibited the expression of typical CCL17 (TARC) and CCL22 (Macrophage-derived chemokine;MDC) gene among Th1/Th2 chemokines that are important for atopic symptoms I could confirm.</li> <li>- In the atopic dermatitis animal model, changes in the oral administration of <i>Lentinus edulis</i> extract and Prototype 2 were observed, and it was confirmed</li> </ul>		

Results	<p>visually that the symptoms of contact dermatitis induced by DNCB were alleviated.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- In addition, spleen and lymph node, which are the main organs involved in the immune response, were isolated and compared with the size of organs, the spleen and lymph node size were increased in the DNCB treated group, And the size of the spleen and the lymph nodes were decreased in the group treated with SKBE. This is a result that can confirm that the inflammatory reaction can be suppressed.</li> <li>- The degree of deposition of mast cells in the group treated only with DNCB was significantly decreased by the administration of SKBE and prototype 2, as a result of biopsy of the dorsal skin of contact dermatitis induced animals There was.</li> <li>- In the joint health test of the SKBE, the pain evaluation was significantly improved in the pain assessment questionnaire (VAS) for the test food (SKE 100 group), and the pain and functional status evaluation questionnaire (WOMAC, LFI) Pain and functional status were significantly improved. However, in the case of test food (SKE 100 group), it was confirmed that inflammatory cytokine (IL-6, TNF-<math>\alpha</math>) evaluation does not contribute to improvement of inflammatory relief.</li> <li>- Improvement of the skin condition by immune hypersensitivity of SKBE the human body application test is currently being carried out in three institutions (St. Vincent Hospital, Incheon International St Mary's Hospital, Myongji Hospital) Because of the difficulty of raising the target population, 50% of them have already been completed.</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ High value-added dry ingredients of functional materials in unused wood, an unused resource, will evolve into food and pharmaceutical materials and expect international leading and right-wing technology</li> <li>○ Use as functional raw materials and products by type of elderly and joint patients and expect improvement of quality of life</li> <li>○ Progressive development expectation of pharmaceutical products other than dry foods by securing scientific evidence data to be recognized as individual approved functional raw materials</li> <li>○ The expectation of development of related industries due to the increase of consumer confidence and understanding</li> <li>○ We expect systematization in the development of biomaterials and related KNOW-HOW related to the development of natural products for newborns by type of international patient's bone health and irritable immune system</li> <li>○ joint health and Improvement of skin condition for immune hyperresponsiveness and Productization technology and mass production system.</li> </ul>				
Keywords	<i>Stewartia Koreana</i>	Bone disease	osteroporosis	Osteoarthritis	Functional Food

## < Table of contents >

1. Outline of research and development task	8
2. Status of domestic and overseas technology development	13
3. Research content and results	23
4. Achievement of goal and contribution to related field	118
5. Plan to use research results	127
6. Representative research achievements of R & D tasks	129
7. References	130

## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요 .....	8
2. 국내외 기술개발 현황 .....	13
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	23
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	118
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	127
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	128
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	128
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	128
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	129
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	129
11. 기타사항 .....	129
12. 참고문헌 .....	130

<별첨> 관절 건강 인체적용시험 보고서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1-1. 연구개발 목적

본 연구사업은 자생식물 추출물에 대한 연구개발 및 산업화(항염증 활성 류마티스 관절염/골 다공증/과민면역 관련 피부염증 및 유효성분에 대한 약리활성 및 기전평가)를 위하여 노각나무추출물의 기능성에 대한 효능규명(in vitro 및 in vivo)과 동시에 용도·용법(관절건강 개선 등) 관련 연구개발 결과를 확보하여 산업화를 목적으로 한다.

- 노각나무 잎의 활성에 대한 연구결과, 노각나무 잎 추출물의 항염증 활성 및 골 관절 강화 활성에 대한 연구와 유효 성분에 대한 연구가 진행하여 이를 기반으로 한 노각나무 잎 추출물을 활용한 식품 및 개별인정 기능성 소재 개발을 목표로 함.
- 노각나무 잎 추출물의 골관절(관절염 및 골다공증) 강화 기능 및 면역 과민반응에 의한 피부 상태(항염증/항알러지) 개선 소재를 활용하여 아토피 개선 및 예방 제품을 중점적으로 개발 함.
- 노각나무잎 추출물을 이용한 개별인정 건강기능식품 소재 개발을 위하여 유효성 및 작용기전의 과학적 입증, 유효(지표)성분의 설정 및 분석법 확립, 생산공정의 표준화를 구축하며, 이와 동시에 기능성 소재에 대한 인체적용시험을 수행함.
- 목표달성을 통해 향토수종인 노각나무를 새로운 농업계의 경쟁력 있는 식물자원으로서 확보함과 동시에 이를 활용한 식품의 고부가가치화 함.

본 사업을 통하여 노각나무의 기능성을 평가와 이를 근거로 건강기능식품을 개발함과 동시에 식의약 및 의약품 까지 제품화(용도용법)영역을 확대할 수 있는 근거를 마련한다면 국익차원의 중요한 연구라 할 수 있다.

## 1-2. 연구개발의 필요성

가. 자생식물(노각나무) 고부가 제품화 필요성(효능 및 산업화)

- 노각나무는 국내 주요자원식물로서 한반도 특산관속식물로서, 환경부 지정 식물구계학적 특정식물 III등급으로 지정되었음(Ministry of Environment, 2006).
- 노각나무는 차나무과에 속하며 낙엽활엽교목으로 6~7월에 동백꽃 모양의 꽃이 피고, 가을에는 단풍이 붉게 물드는 특성을 이용한 대부분은 조경수로 각광받고 있음.
- 현재, 노각나무 추출물 및 기능성 성분에 대한 미이용 고부가가치 제품화 가능성이 매우 높은 임산자원임.

- 자생식물인 노각나무의 효능과 관련한 보고사례는 다음과 같음. 즉, 동의보감에서는 노각나무를 다려서 먹은 경우 간염, 간경화증, 지방간 질환치료에 효과가 있음을 시작으로 최근 발표사례(1999~2010)에서는 항산화 효과, 위장병 및 신경통 저감, HIV-1 Protease억제, 해독, 염증 및 통증저하, 신생혈관축진 및 관절통 및 관절염에 효과 등과 관련한 발표가 속속 되고 있음. 본 과제에서는 이중 관절건강(관절통 및 관절염 및 골다공증) 및 과민면역(아토피) 개선에 주요목표를 두고 제품화개발을 실시할 예정임.

나. 자생식물(노각나무) 고부가 제품화 필요성

- 본 연구 사업을 통하여 노각나무의 기능성을 평가와 이를 근거로 건강기능식품을 개발함과 동시에 식의약 및 의약품 까지 제품화(용도용법)영역을 확대할 수 있는 근거를 마련한다면 이의 비록 귀중한 국내 임산자원의 유전자원은 기능성 관련 지적소유권을 구축하는 국익차원의 중요한 연구라 할 수 있음.
- 본 연구진은 상기사항에 주목하고, 노각나무 추출물의 기능성을 선행 연구개발을 통하여 규명(in vitro 및 in vivo)함과 동시에 용도·용법(골관절염 개선 등) 관련 기초연구 개발 결과를 확보하여 산업화를 전제로 국내 및 국외(미국)에 선행 특허출원을 완료 하였음.

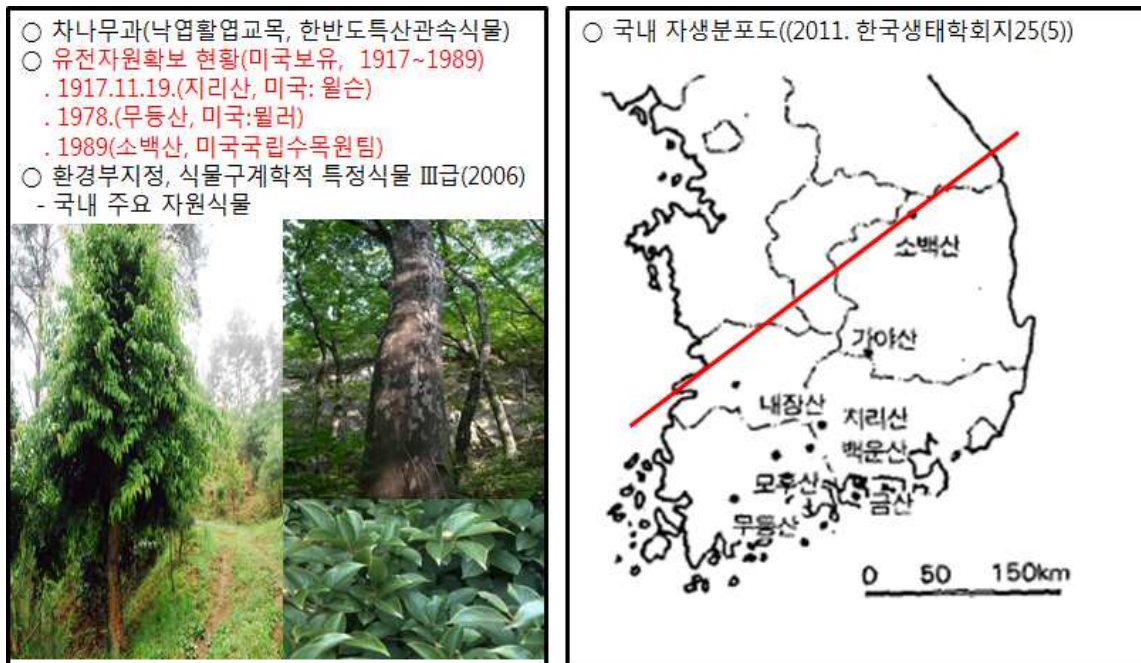


그림 1. 노각나무의 형태 및 부위별 형태(본 과제사용 적용원료 : 잎부위)

다. 본 과제관련 연구 필요성 및 방향

- 세계 각국에서는 이미 전 세계에 분포하는 식물자원에 대한 경제적 효용가치를 평가하여 다양한 식물 종의 확보에 주력하고 있으며, 이들로부터 신기능성 의약품 소재를 분리 생산하는 체계적인 개발에 주력하고 있음.

- 전 세계적으로 특용임산자원의 시장은 확대될 것으로 될 것으로 예측되고 있고 국내에서도 경제적 이용가치가 높은 기능성 식품으로 개발이 가능한 특용 임산자원을 개발하고 있음.
- 인구 고령화에 따른 만성, 난치성질환의 증가 등의 영향으로 전통의약 및 천연물 유래 신약에 대한 세계적 관심과 수요가 증가하고 있음.
- 건강기능성 식품 시장은 의료비 증가에 따른 국가 부담가중, 노령화 사회 진입, 소비자의 건강관심 고조, 식품산업계의 신제품 개발 방향 등을 고려할 때 건강기능식품의 수요는 지속적으로 증가될 것으로 전망됨.
- 국내 뿐 아니라 국외에서도 점차 증가하고 있는 기능성 식·약용식물 시장에 대응하기 위한 과학적이고 체계적인 접근이 필요하며 이를 위하여 새로운 방식의 임산물의 자원화 작업이 진행되어야 함.
- 유실수, 특용수 및 산채·산약초류 등 임산자원은 산림의 장기투자에서 오는 경제적 취약성을 극복할 수 있는 농산촌의 대표적인 산림단기소득원으로 중요하며, 최근 소득증대와 웰빙이 사회적 이슈로 부각되면서 웰빙, 로하스 시대의 미래 성장 동력 자원으로 활용 가능성이 매우 높아 고부가가치 기능성식품의 개발이 꼭 필요함.
- 산지를 활용한 임산물 생산은 환경보존 가치를 우선시 하면서 지속적인 소득창출이 가능하여 산지비율이 높은 우리나라에 적합하고, 숲에 대한 사회적 요구, 산촌주민의 소득화 요구, 지역균형발전을 충족시키면서 산지를 효율적으로 활용하수 있으므로 연구개발에 있어 최적요소를 구비하고 있음.
- 헛개나무는 (주)생명의나무(본과제 주관기관)에서 소재로 개발되어 건강기능식품 ‘쿠퍼스’로 사업화하여 성공한 사례가 있음(연매출 1,500억원 경제가치 창출).
- 개별인정형제품의 상위 5개 품목 중 2009년과 2010년 헛개나무 과병추출분말이 부동의 1위를 유지하며 2010년에는 440억원의 생산실적으로 다른 개별인정 기능성원료 제품에 비해 급속한 성장을 한 것으로 확인할 수 있음.
- 국내 임산물관련 기능성 식품소재로는 헛개나무, 가시오갈피, 상황버섯, 회화나무, 당귀, 도라지 등이 개발되어 상품화되어 있으나 헛개나무를 제외하고는 모두 미미한 상황임.
- 본 연구사업 관련 연구방향은 현재 단순 채취나 소규모 재배 등 1차 산업형태의 산업이 주를 이루고 있는 임산자원 고부가가치를 위해서 임산자원을 이용한 기능성 식품소재 개발로 연구방향을 맞춤.

### 1-3. 연구개발 범위

#### 가. 연구개발의 최종목표

- 자생식물(노각나무) 추출물 및 기능성 성분 대량생산시스템 정립



- 노각나무 추출물 및 기능성 성분의 장단기 제품 적용성 평가
- 노각나무 추출물 및 기능성 성분의 관절건강 및 과민면역반응 개선관련 약리활성 및 기전평가
  - 류마티스 관절염 개선관련 유효성 평가(in vitro 및 in vivo)
  - 퇴행성관절염 개선관련 유효성 평가(in vitro 및 in vivo)
  - 골다공증 개선관련 유효성 평가(in vitro 및 in vivo)
  - 알러지(아토피)피부염 개선관련 유효성 평가(in vitro 및 in vivo)
- 관절 및 과민면역 개선효능 인체적용시험 연구(CRO시스템 적용)
- 건강기능식품 개발(제품화)과 신약후보물질 개발

나. 연구개발의 주요내용

(1) 주관(세부) : 노각나무 추출물의 관절건강식품 개발(1~3년차)

**(종합연구내용)** 국내 특산 자생식물의 고부가 가치형 추출물 및 핵심 지표/기능성 성분의 규명과 이의 목표 대비 약리 및 기전평가를 확보함과 동시에 임상연구를 통한 신규 임상 자원의 고부가가치화 창출 및 임산농가의 신규 수익모델 제시 및 국내외 관절건강 소비자 요구충족형 기능성 식품개발(산업화)을 연구개발 목표로 함. 이를 위한 세부연구목표는 다음과 같음.

- 노각나무 추출물 제조 및 기능성분 분리/동정
- 노각나무 추출물 및 기능성분 대량생산공정 개발
- 노각나무 추출물의 생리활성성분 분리 정제 및 노각나무 추출물의 기준규격 설정
- 노각나무 추출물의 관절 및 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선 효능 인체적용시험 연구
- 노각나무 추출물의 건강기능식품 개발과 신약후보물질 개발

(2) 제 1 협동 : 노각나무 추출물의 골관절염 및 과민면역 개선 약리활성 및 기전연구

**(종합연구내용)** 항염증 활성이 우수한 노각나무 잎 추출물 소재 및 활성 성분을 이용하여 세포 모델 및 동물 모델을 이용하여 류마티스 관절염/퇴행성관절염/알러지(아토피) 피부염에 유효성 검증 및 작용기전 규명을 목표로 함. 이를 위한 세부연구목표는 다음과 같음.

(가) 노각나무 추출물 및 분리 동정 기능성 성분의 류마티스 관절염 유효성 평가

- ① In vitro 약리 및 기전평가
- ② In vivo(마우스) 약리 및 기전평가

(나) 노각나무 추출물 및 분리 동정 기능성 성분의 퇴행성관절염 유효성 평가

- ① In vitro 약리 및 기전평가
- ② In vivo(마우스) 약리 및 기전평가

(다) 노각나무 추출물 및 분리 동정 기능성 성분의 알러지(아토피)피부염 개선관련 유효성 평가

① In vitro 약리 및 기전평가

② In vivo(마우스) 약리 및 기전평가

(라) 최종 제품의 골관절염 및 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선 관련 약리활성 평가  
(In vivo)

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

### 가. 국내·외 기능성 식품 산업동향

- 현재 국내외적으로 기능성 식품에 대한 소비자 요구로, 효능 및 성분 안정성과 가격은 식품으로 품질은 의약품 수준을 요구하고 있으며, 또한 생산과 제품화에 친환경 등을 동시 요구하고 있음.
- 세계 및 국내 기능성식품 시장은 지속적 성장으로 2014년도에는 세계는 3,973억불, 국내는 4조 7,693억원로 증가할 것으로 추산되고 있음.
- 임산자원을 포함한 생물자원의 원산국에 지불해야 하는 로열티는 188~1,642억원에 달하는 수입대체효과를 얻을 수 있을 것으로 추정됨.
- 바이오식품 영역에서의 국내 수입액을 조사하여 보았더니 감소하였는데 이는 국내 기술력의 발전으로 소비자 요구에 부합하는 고부가 소재 및 제품의 개발과 연계하여 생산량의 증가로 인한 수입대체 효과가 이루어 졌음이 아닌가 하고 판단되었음. 따라서 고부가 기능성 소재 관련 기술력과 소재 및 제품이 개발되는 경우 관련 산업의 수입대체 효과와 더불어 해외수출까지 충분히 가능성을 알 수 있었음.
- 국내는 2002년 건강기능식품에 관한 법률을 제정한 이후 국내 연구개발제품에 대한 정책적 지원 프로그램이 미미한 상태였으나 최근 농림축산식품부와 식품의약품안전처를 중심으로 건강기능식품산업을 미래 식품산업의 캐시카우로 육성하기 위한 정책적 지원 프로그램을 추진하고 있어, 건강기능식품 개발을 촉진할 것으로 보임.
- 우리나라의 경우, 출산율 감소 추세가 진행됨에 따라 가구당 자녀수가 줄어들고 있는 반면 자녀의 건강을 위한 지출은 증가하고 있음. 또한 고령친화 건강기능식품 중 면역제제 및 두뇌 기능향상, 집중력, 기억력 관련 제품은 어린이 및 청소년과 수요층이 중복되므로 인구구조 변화는 이들 제품군에 대한 수요 촉진요인으로 분석됨. 따라서 과학의 진보가 인류의 수명연장을 가져옴에 따라 인간은 건강한 삶을 추구하였고 이러한 소비자의 요구가 건강기능식품의 개발로 이어지면서 건강기능식품은 미래식품산업의 돌파구로 부상하게 되었음.
- 건강기능식품의 발전은 정체기에 들어선 세계 식품산업의 새로운 발전의 계기가 되어 세계 식품산업의 전반에 걸쳐 커다란 지각변동을 일으킬 것 이라는 전문가들의 예측이 현실로 구현되고 있으며, 이러한 시장변화는 많은 기업에게 새로운 기회로 인식되어 식품산업체 뿐만 아니라 식품 관련 분야에 참여하고 있는 대기업, 다국적 유통업체 및 제약업체도 적극 적인 시장참여 의사를 밝히고 있음.
- 우리나라 식품산업은 원재료의 80%를 수입 원료에 의존하고 있으나, 건강기능식품산업은 선진기술을 바탕으로 국내 자생원료만으로 개발이 가능하므로, 국내식품산업 구조개선 전략분야로 인식되어 관련제도 및 국가적 지원규모가 크게 확대될 전망이고, 건강기능식품으로 촉발된 식품과 의약품의 산업간, 학문간, 시장 간의 부분적 통합 움직임이

활발히 이루어지고 있어 잠재적 시장성은 더욱 확대될 것으로 전망임.

- 국내 10대 질환별 건강기능식품 R&D 로드맵을 살펴보면, 생활습관병인 비만(치지방유지), 당뇨병(혈당유지), 고혈압(혈행개선), 이상지질혈증(콜레스테롤유지), 관절염(뼈건강), 면역증강과 환경질환병인 천식(호흡기질환), 아토피(피부염), 정신건강병인 치매(기억력개선), 우울증(스트레스해소)으로 선정한 바 있으며, 건강기능성식품의 연구개발 방향도 여기에 발맞추어 집중되고 있음.

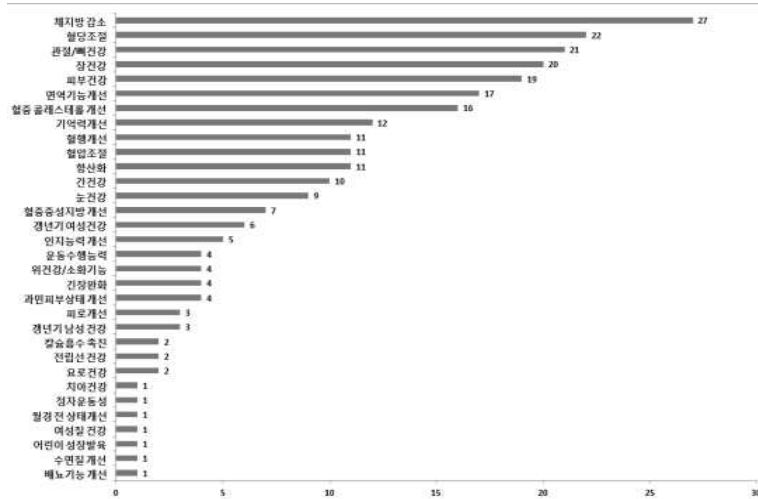


그림 2. 기능성 인정 현황(식품의약품안전처, 2016)

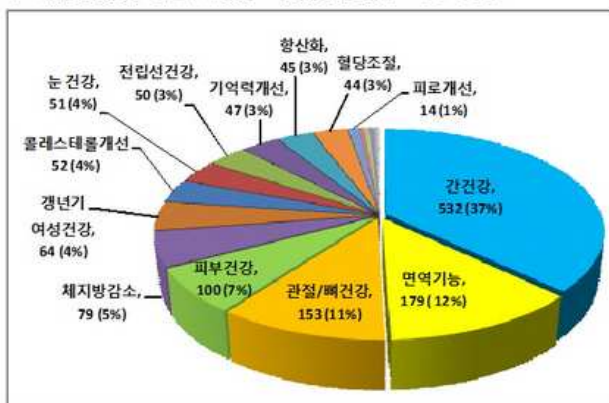
- 국내 기능성 개별인증 내용별 현황은 국내 10대 질환중 건강기능식품 10대 R&D로드맵과 일치하는 경향을 보이지만, 본 과제와 관련한 건강기능식품의 원료로 개별인정된 골건강 관련 소재로서는 관절건강소재(항염증/통증, 기능개선)로서는 해양 동물 기원성 소재로서는 글루코사민과 NAG 및 홍합추출오일 복합물 그리고 식물자원을 소재로 한 경우는 로즈힙 분말외 6종이 있음. 따라서 본 과제를 성공적으로 완료시 결과에 대한 동물 및 인체유효성 평가를 거쳐 개별인증을 확보(소비자 신뢰성 확보)한 경우 이들 해당 분야로의 신규시장 런칭이 가능할 것임.

표 1. 국내 건강기능식품의 원료로 개별인정 된 관절/뼈 건강 관련 소재(식품안전나라, 2018)

고시형 원료	개별인정형 원료
- 뮤코다당·단백	- 가시오갈피등복합추출물
- 비타민 D	- 로즈힙 분말
- 비타민 K	- 지방산복합물
- 망간	- 전칠삼추출물등복합물
- 칼슘	- 차조기등복합추출물
- 글루코사민	- 초록입홍합추출오일
- N-아세틸글루코사민	- 호프추출물
- Dimethylsulfone(MSM)	- 황금추출물등복합물
- 대두 이소플라본	- 흑효모배양액분말

○ 관절/뼈건강 분야 및 피부건강 분야 건강기능성식품 시장

- 개별인정형 품목(고시된 품목 이외에 안전성, 기능성을 개별로 인정받은 기능성 원료로 제조한 건강기능식품) 중 관절 및 뼈건강 제품 시장은 11%를 점유하고 있으며, 피부건강 관련 제품 시장은 7%를 점유하고 있음
- 관절/뼈건강 분야 시장규모는 2011년 기준 153억원 규모로 나타났으며, 피부건강 관련 시장 규모는 100억원으로 나타남



자료: 식품의약품안전청

그림 3. 개별인정형 제품 기능성 내용별 현황

- 현재까지 식물유래 천연물에 대한 연구가 많이 진행되어왔고, 지금도 진행되며 많은 연구비들이 투입되고 있으나 사업화 실적은 미미하며, 효능물질(Single compound) 위주의 연구로 산업화하기 위해서는 많은 추가연구가 필요하나 본 사업단에서는 임산자원 원재료를 이용한 기능성식품개발을 통해 빠른 산업화와 농민들에게 직접적인 소득원으로 임산자원의 활용을 추구함.
- 국내외 기능성식품 연구개발 및 산업화 방향을 토대로 국내 임산자원의 현재 제품화 경향 및 추후 장기적 국가정책성을 고려할 때, 국내 미이용 임산자원이 보유하는 기능성에 주목하고 임산농가의 수익성 창출과 더불어 국가경쟁력으로 연계되는 방향을 제시하고, 또한 기존의 수행되어진 연구와는 다른 임산자원 원재료를 이용하여 산업화를 하기 위한 소재 및 제품개발을 제시하고자 함.

나. 국내외 임산자원의 연구개발 동향 및 이용 현황

1) 국내 임산자원 연구개발 동향 및 이용현황

- 현재 국내는 강력한 구매력을 가진 40대 전후의 소비계층에서 건강지향, 웰빙(well-being) 추구 등을 통해 자신의 삶의 질을 높이려는 욕구가 유기농식품, 건강기능식품의 구매로 이어지면서 새로운 시장을 형성하고 있으나, 아직까지 세계 시장에 비추면 매우 작은 시장규모이며, 소재부분은 수입 원료의 의존도가 매우 높아 국내 생

산 건강기능식품의 국제경쟁력은 미약할 수밖에 없는 실정임.

- 국내 건강기능식품산업은 원재료의 80%를 수입에 의존하고 있어 기술개발을 통한 국내 자생원료의 활용성 확대가 가능하므로 국가적 연구지원이 시급.
- 기본적으로 자연계에 존재하는 식물체는 무한한 자원의 보고이며 인류에게 식량자원이 될 뿐만 아니라 기능성식품의 원료로 사용가치가 매우 높으며, 우리나라는 지형·지질·기후가 다양하여 온대지역 국가 중 상대적으로 식물종이 풍부한 나라로 유용자원의 발굴 용이함.
- 국내에서 식물자원으로부터 개발, 판매되고 있는 천연물의약은 7개 품목 정도이며, 2004~2010년 기간 중 천연물의약으로의 개발사례는 48건(골관절염 7건, 치매 5건, 천식 3건, 아토피 3건, 기타 주의력결핍, 당뇨, 간질환 등)으로 임상실험이 진행 중에 있음.
- 국내 임산물생산액은 7조 8,159억원(2014년 기준)이며, 순임목과 토석, 조경재가 전체의 64.9%를 차지하고 있으며, 약용 특산식물은 6.5%를 차지하고 있음.



그림 4. 2014 임산물 생산조사

- 국내 산림자원을 이용한 산업의 경우 주로 대부분 특용식물과 산채식물 등을 대상으로 단순채취 또는 소규모 재배에 의존하고 있으며, 수실류, 산채, 산약초류 등 특용임산자원의 경우 생산액이 지속적으로 증가하여 지난 10년간 250%의 증가세를 보임.
- 현재까지 산림관련연구기관에서는 특용임산자원을 활용한 신물질 개발에 중점을 두었으며, 국내의 기술 동향은 기능성 식품 및 신약개발, 임목유래 기능성 물질탐색 및 활용기술 개발 순으로 연구가 진행되었으며, 주로 식물의 효능물질을 추출하여 단일물질에 대한 생리활성 연구를 진행함.
- 잠재적 부가가치가 높은 특용임산 자원의 이용고도화 관련 연구개발이 이루어지고 있는데, 기능성 물질 특성평가와 관련해서는 주로 단일물질을 분리하여 활용 가능성 또는 생리활성 연구에 중점을 두고 있는 실정으로 아직까지 실용화 및 산업화를 위한 체계적인 연구가 다소 부족한 상황임.
- 국내 임산물관련 기능성 식품소재로는 헛개나무, 가시오갈피, 상항버섯, 회화나무, 당귀, 도라지, 느릅나무, 두충나무 등이 개발되어 상품화되어 있으나 헛개나무를 제외하고 모두 미미한 상황임.

## 2) 해외 임산자원의 연구개발 동향

- 미국은 식물유전자원 448천점을 수집하여 전국의 14개 센터에서 관리하고 있으며, 중국의 경우 1983년부터 약용자원탐사를 수행한 뒤 중약재자원보호법을 공포하여 무분별한 채취로부터 야생자원을 보호하는 한편, 약용임산자원의 재배 작물화 연구도 활발히 추진하고 있음.
- 일본의 국립위생시험소에서는 197과 2,858종 4971계통의 약용식물을 수집·보존하여 활용할 수 있는 기반을 조성함.
- 유럽이나 북미에서도 정부 차원에서 적극적인 지원시스템을 갖추고 보다 부가가치가 높은 천연물 소재로 활용하기 위한 기술개발에 박차를 가하고 있음.
- 세계 각국에서 분포하는 식물자원에 대한 경제적 효용가치를 평가하여 다양한 식물종의 확보에 주력하고 있으며, 이로부터 신기능성 의약품소재를 분리생산하는 체계적인 개발에 주력하고 있음.
- 기능성 식품 연구는 1989년 미국의 국립 암 연구소에서 암을 예방할 수 있는 식품개발 연구를 시작하면서 본격적으로 시작되어 현재는 항산화, 항암, 항균, 혈액순환개선, 장내균총 개선, 당뇨조절, 면역 등 다양한 분야의 연구가 진행되고 있으며, 미국 시장에서 천연 기능성 소재 이용은 1990년대 후반 전체 의약품 소재의 40% 이상을 차지함에 따라 식물소재 의약품의 매출이 매년 10억불 이상 급증하고 있는 추세임.
- 외국의 경우에서도 임산자원으로부터 단일물질을 추출하여 생리활성을 연구 개발하여 산업화를 위해 단일물질을 합성하여 제품화 하였으며, 대부분의 천연물 소재가 합성을 통해 제품화되었음.
- 질병치료나 예방 등에 활용되는 약용식물 또는 유효성분이용이 활성화 될 경우 세계적으로 약 8,000억원 규모의 시장이 형성될 것으로 추정됨.
- 캐나다에서는 설탕단풍나무의 삼목 번식법을 개발하고 수액 시럽을 상품화하여 세계적으로 1억 달러를 수출하고 있으며, 기능성 벌꿀로 유명한 뉴질랜드의 ‘마누카’ 꿀은 지속적인 연구개발과 품질관리로 고부가가치를 창출하고 있음.
- 미국, 유럽, 일본 등이 세계 시장의 87%를 차지함으로써 해외 기능성식품시장은 산업화된 선진 국가를 중심으로 발달되었음을 알 수 있음.

### 다. 기존 연구개발의 한계

- 특용 임산 자원을 포함한 식물 자원의 수집은 미국, 중국, 일본 등에서도 국가 주도적으로 이루어져지고 있음. 경제적으로 유용한 유실수 및 약용식물의 경우 약용으로 사용시 약 8,000억원 시장 형성될 것으로 예상되나 임산자원유래 물질의 연구개발은 미약한 수입.
- 기능성 식품 및 신약 개발 분야, 확보된 식물 기원 물질들의 생리 활성 연구는 민간 보다는 국가 연구기관에서 주로 진행되고 왔으나 이러한 연구를 특정 활성이 확인되었어도 대부분

의 연구들이 임산자원의 이용이 아닌 단일물질을 찾아 생리활성을 연구한 결과로 대량 생산에 어려움이 있어서 산업화 된 예는 극히 드물음.

- 국내 건강기능식품 시장은 연평균 10% 성장, 2011년 약 1조 2천억원의 시장이 형성되었으나, 그중의 6,000억원이 홍삼관련 제품으로 소재의 다양성이 결여됨.
- 국내 건강기능식품산업은 원재료의 80%를 수입에 의존하고 있어 기술개발을 통한 국내 자생원료의 활용성 확대가 가능하므로 국가적 연구지원이 시급.
- 국내에서는 특용임산자원은 유실수의 재배가 위주로 되어 있고 특용식물, 산채 식물 등을 대상으로 단순 채취나 소규모 재배에 의존하는 1차산업 위주로 생산 하고 있음.
- 임산자원에서 생리활성을 가진 단일물질에 대한 연구는 많이 되어있고 현재도 여러 부처에서 수행되고 있으나 그 자체로 산업화로 가기에는 많은 어려움이 있고, 임산농가에 직접적인 도움이 되지 않으며 특용임산자원을 재배하여도 판로를 확보하기 어려운 실정임.

#### 라. 관절건강(관절염 및 골다공증) 개선 및 강화 건강기능식품 개발

- 대표적 만성 질환 중 하나인 퇴행성관절염은 만성 관절염으로 난치성 질환이며 현재 임상에서 사용되고 있는 항염증 치료제 위주의 약물로는 완치가 어렵고, 또한 소화 장애, 위장관 장애 및 신장 기능 감소 등과 같은 전신적인 부작용을 유발하여 환자의 연령이 증가할수록 부작용 발생의 빈도가 높아져 노년층에 많은 골관절질환의 치료 시장기간에 걸친 전신투여는 많은 문제점을 내포하고 있음. 따라서 인구의 고령화에 비례하여 증가하는 퇴행성관절염에 항염증작용 등의 대증요법 접근보다는 좀 더 적극적인 증상의 호전 및 예방이 그 어느 때보다 절실하게 요구됨.
- 또한, 최근 들어 전 연령층을 가리지 않고 유발 되고 있는 류마티스 관절염 환자도 급증하고 있으며 류마티스 관절염은 퇴행성관절염과는 다르게 염증성 질환으로 분류되며, 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis)은 관절의 활막에 발생하는 만성적이고 전신적인 염증성 질환이며. 30-40대 성인의 1% 에서 발병하며, 여성이 3-4배 정도 많이 발병하는데 최근에는 어린이에게서도 발병 (Juvenile rheumatoid arthritis)이 될 수 있는 것으로 알려지고 있음.
- 주요 증상으로는 관절의 발열, 동통, 부종, 강직, 운동 제한과 기능의 소실 등이며, 빈혈과 골다공증을 수반하고, 전신 증상, 호흡계 증상, 심혈관계 증상, 류마티스 결절, 혈액학적 이상 등을 나타낼 수 있으며 면역력 저하로 인한 폐렴, 신우신염, 피부 감염 및 림프종, 백혈병 등의 악성 종양 발생률이 일반인에 비해 2-3배 정도 높다고 알려져 있음.
- 국내에서는 오랜 전통의 생약 효능들을 바탕으로 골관절염 치료제를 활발하게 개발하였으며, 그 결과 과루근, 하고초, 위령선의 천연물제제인 조인스정 (SK 제약), 봉독성분인 아피톡신주 (구주제약), 구척, 방풍 등 6종의 생약 복합제인 신바로캡슐(녹십자) 및 레일라(서울대) 등의 천연물 신약이 승인받아 국내 시장에 출시되었음. 이 중 2012년



조인스정이 매출액이 220억원 정도로 보고됨.

- 지금까지의 골다공증 및 골 관절염 치료제 및 보조제들은 호르몬 제제가 주류를 이루고 있으며 이는 파골세포의 기능을 저해함으로써 근본적인 뼈 손실을 막는데 있음. 그러나 노인성 골다공증은 뼈 손실뿐만 아니라 뼈 골절에 따른 복구가 되지 않는 것이 더욱 큰 문제임. 이에 본 연구진이 발굴한 노각나무 잎 추출물은 조골세포의 활성을 증가시킴으로 골 직경이 늘어나는 등 골 형성을 촉진해 골다공증의 최대 위험 증상인 골절 발생을 최소화할 뿐만 아니라 연골 재생에도 탁월한 효능을 보임. 이와 같은 새로운 기능의 기능성 식품을 개발하기 위하여 추가 연구의 지원이 필요함.
- 골다공증 및 골 관절염 치료제는 진단 후 증상완화 치료에 도움이 되지만 이 분야에서 아직 미결 상태에 있는 가장 중대한 문제 중 한 가지는 일차 예방과 위험상태에 있는 환자를 파악하여 치료를 시작하고 향후 치료비용이 높은 골절을 예방하는 것이 중요하므로 이를 위한 기능성 식품 연구가 절실히 요구됨.
- 본 연구진은 자체 연구를 통해 노각나무 잎 추출물은 항염증 효과가 탁월함을 입증하였고 (Lee et al., 2007. *Mol cells*; Lee et al., 2012. *Int Immunopharmacol.*) 또한 골 퇴화 및 골다공증 증상을 예방하는 강력한 효능을 입증하였음(Park et al., 2007. *Int Immunopharmacol.*). 그러나 골 강화 기능성 식품 소재로의 임상 및 제형 연구는 부족한 실정이며 새로운 골 강화 소재로서 산업화 연구가 절실히 요구됨.
- 골 질환을 예방하고 보호하는 기능성 식품으로 제품화를 시키기 위해서는 노각나무 잎 추출물 소재의 기능성 식품으로써 안전성, 안정성 등의 연구와 경제성 있는 소재 개발 연구가 수행되어야 하고 골다공증 및 골 관절염에 유효한 국내산 농작물을 이용한 골 질환 예방용 기능성 식품 개발 및 제품화 연구는 고부가 가치 작물의 재배를 활성화할 수 있으며 이를 통해 농가의 새로운 수익모델을 창출 할 수 있음.
- 최근 들어 골관절염 천연물치료제들은 이들 한약재들의 복합체제로 구성되어 있으며, 본 과제에서는 NF- $\kappa$ B 경로 저해작용을 하는 생약 추출물이나 AMPK를 활성화시키는 자생식물 추출물들을 스크리닝하여 노각나무의 골관절염 개선 효능을 높일 수 있는 최종 식물을 선정하여 노각나무 추출물과 함께 복합체로 골관절염 개선 건강기능식품으로 개발하고자 함.
  - 골관절염의 특성상 관절연골세포의 증식 이외에도 항염 작용, 체중감소 등 다양한 원인을 제거할 수 있는 여러 소재를 합쳐서 골관절염 완화시키는 노력이 요구됨.
  - 전사인자 nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)는 류마티스 관절염의 염증의 중요한 조절자로 관절염 환자의 관절 활액낭세포(synovial cell)에서 NF- $\kappa$ B 경로 활성화는 macrophage로부터 TNF- $\alpha$ , 활액낭 섬유화세포로부터 matrix metalloproteinases (MMPs), 면역세포를 끌어들이는 cytokine들을 포함하여 여러 염증관련 phenotype을 나타내는 유전자들의 발현을 증가시킴(그림 5).

- NF- $\kappa$ B는 류마티스 관절염 발병과정에서 활성화되며, 발병을 유지하는 만성염증단계에 중요한 역할을 함. 류마티스 관절염을 시작하는 분자는 아직 알려져 있지는 않으나 T세포의 표면에 있는 분자(T-cell receptors, TCRs), toll-like receptor family를 위한 리간드(TLR ligands). 또는 다른 알려지지 않은 분자들이 포함될 수 있음. 이러한 것은 활액낭에 있는 대식세포들을 활성화시켜 IKK 복합체에 의하여 I $\kappa$ B를 인산화시켜 I $\kappa$ B가 proteasome의 타겟이 되게 함.
- 이는 I $\kappa$ B와 p50/p65 복합체로부터 p50/p65와 같은 NF- $\kappa$ B dimer가 해리되어 이들이 핵내로 이동하여 전사인자로 작용하여 많은 inflammatory cytokines와 chemokines 등의 발현을 유도하고, 이들은 염증을 유발하고 많은 수의 면역세포들을 활액낭내로 침윤하게 함. 염증 매개체들 특히 TNF- $\alpha$ 는 autocrine(macrophages, M $\phi$ ) 또는 paracrine(fibroblast-like synoviocytes, FLS) 방법으로 활액낭 내의 세포들을 활성화시키며, 이들은 대부분 NF- $\kappa$ B 의존적임. FLS들은 TNF- $\alpha$ 나 IL-1dp 반응하여 많은 NF- $\kappa$ B-유도 유전자들을 합성하며 이들은 좀 더 염증반응을 증가시키고 MMP들은 관절의 파괴를 촉진함.

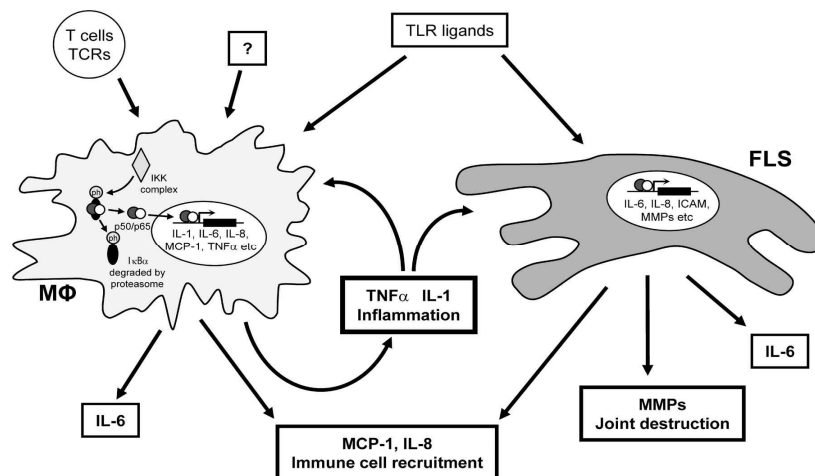


그림 5. 류마티스 관절염에서 NF- $\kappa$ B의 역할 (Rheumatology 2008;47:584-590)

- AMPK (AMP-activated protein kinase)는 세포 내의 에너지 항상성 유지에 센서 역할을 하는 효소로 대사성 스트레스나 운동에 의해 세포 내의 에너지가 감소하는 경우, 즉 ATP가 고갈되어 AMP/ATP 비율이 증가하는 경우에서 활성화되어 ATP를 소비하는 과정(예를 들어, 지방산 합성과 콜레스테롤 합성)을 억제하고 ATP를 생산하는 과정(예를 들어, 지방산 산화와 해당과정)을 촉진함. AMPK의 활성화에 대한 효과는 에너지 대사 조절과 밀접하게 연관되어 있는 표적장기들(간, 근육, 지방, 췌장)에 관여되어 있음 (그림 6).

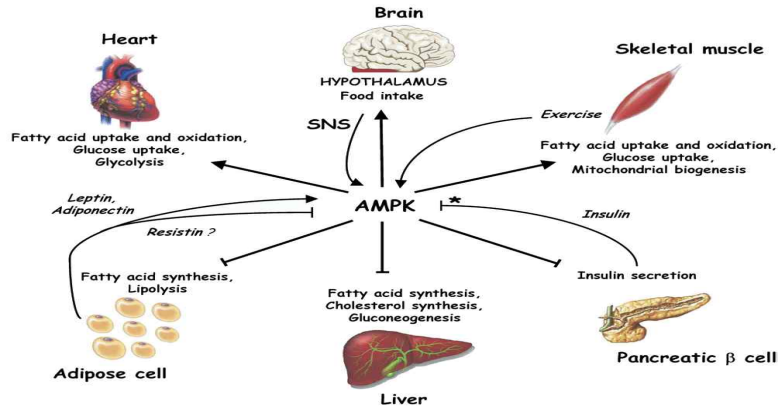


그림 6. 생체내 에너지 항상성 조절에서 AMPK 역할(대한내분비학회지 2010;25:9-17)

- 본 사업에서는 자생식물 중 예비선행 연구를 통하여 관절건강에 가장 효과가 있다고 평가 후 선발한 노각나무 잎 추출물 및 활성 물질을 이용하여 류마티스 관절염(CIA) 및 퇴행성관절염(OD) 모델을 활용하여 염증성 사이토카인 발현 저해 및 관절 활액 세포와 면역세포간의 결합 저해 활성에 따른 관절염 증상 완화 활성과 골다공증 동물모델을 적용한 개선관련 검증을 동시에 실시 하고자 함. 또한 기존에 본 연구진이 발굴한 다양한 골 관절 강화 활성을 복합적으로 가지는 천연물들을 복합하여 골 강화에 도움을 줄 수 있는 개별인정 건강기능식품을 개발하고자 함.

마. 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 건강기능식품 개발

- 아토피 피부염은 전체 인구의 20%가 평생에 한번정도는 겪는 만성적이고 고질적인 피부염중 하나로서 지난 30 여 년간 세계적으로 발병률이 30% 정도가 증가하고 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 과거에는 주로 유아기나 성장기에 주로 발병되어 성인기에 들어서면 거의 발병률이 급속히 떨어졌으나 최근에는 청장년층에서의 발병률도 증가하고 있어 전 연령층의 인구에서 문제가 되고 있는 실정임.
- 특히, 아토피 피부염은 현재까지 면역계의 이상 증상에 의한 것이 원인으로 추측되고 있으나 아직까지 정확한 발병 기작 및 치료 방법에 대해서 명확한 사실이 제시되어 있지 못한 실정임.
- 현재까지 알려진 아토피 피부염은 식품 또는 외부환경(환경 유래 알러젠 등)에 대한 면역계의 과잉 반응의 결과물이며, 혈액 내 immunoglobulin E (IgE)의 증가와 염증성 사이토카인의 분비 증가가 나타나 피부의 염증 반응의 증가, 홍반의 발생, 가려움증의 증가가 발생되고, 이로 인해 피부 장벽의 손상을 받아 세균이나 바이러스에 의한 이차 감염이 발생하면서 면역 반응이 유발되어 피부 염증 반응이 강해지는 등의 면역계 불균형이 악화되는 등의 악순환을 통해 증상이 악화되는 결과를 가져온다고 알려져 있음.

- 본 연구진의 연구 결과에 따르면 노각나무 추출물 유래 활성 성분이 피부 염증 세포에서 염증 반응 유도 물질을 저해 하는 것을 확인하였음(*Jung et al., 2012. BBRC*).
- 아토피 피부염에서 발생하는 피부학적 이상을 종합하면 아토피 피부염 환자의 피부 상태는 정상인에 비하여 수분함량이 낮은 건조하고 민감한 상태이며, 히스타민 및 염증 관련 사이토카인의 증가로 가려움증과 염증 반응이 유발되고, SOD level이 감소하여 항산화 활성이 낮아져 있으며, 2차 감염으로 인하여 다양한 세균 및 바이러스에 의한 감염증이 증가하는 것이라 할 수 있음.
- 아토피 피부염의 현재까지 치료 방법으로는 1) 면역 억제제 투여를 통한 면역 과반응의 약화, 2) steroid 제제를 중심으로 한 항염증 물질의 투여를 통한 염증 반응 억제, 3) 가려움증의 원인물질인 histamine의 분비를 억제하기 위한 항히스타민제제의 투여, 4) Ceramide 등의 피부 지질 성분의 보강을 통한 피부 장벽 복구, 5) 항산화 활성 성분의 보강을 통한 피부 항염증 및 피부 장벽 보강, 6) 보습 성분 도포를 통한 피부 건조화의 방지, 7) 항균 활성 물질의 도포로 2차 감염의 방지 등의 방법이 다수 사용되고 있음.
- 아토피 피부염의 처치 방법 중 면역억제제, steroid 제제 등은 장기간 사용 시 심각한 부작용을 동반할 수 있어 급성, 중증의 아토피 피부염 환자들에게만 제한적으로 사용할 수 있기 때문에 만성적 질환인 아토피 피부염의 적용에는 한계가 있으며, 또한 화장품과 같은 외용제의 경우는 피부 보습적인 측면으로 초점이 맞추어져 있음.
- 아토피 피부염의 질환이 만성적이고 재발의 가능성이 높기 때문에 의약품 보다는 지속적으로 적용 가능하고 만성적 처방에도 부작용이 동반되지 않은 안정적인 제품의 필요성이 매우 높으며, 이를 위하여 최근에는 아토피 피부염에 대한 접근이 서양의학적인 접근 보다는 항염증작용을 통한 피부 발진의 억제, 체내 면역계를 정상화 또는 피부의 재생을 목표로 하는 천연물의 개발 접근이 활발하게 진행되고 있으나, 아직까지 아토피 피부염을 앓고 있는 다수의 환자들이 쉽게 접근할 수 없다는 단점이 있음.
- 따라서 종래의 아토피 피부염 관련 제품이 거의 단기적인 처방에 중점을 둔 것인데 반해서 본 연구 개발에서는 체내의 면역 기능을 조절하여 염증 및 간지러움증을 유발하는 염증성 신경 전달 물질의 생성을 억제하는 것을 기본으로 하는 건강기능식품 소재를 개발하고, 여기에 2차 감염을 방지하기 위한 항균 활성과 피부 장벽의 손상 억제와 복구를 촉진할 수 있는 항산화 활성을 복합적으로 가지는 천연물들을 복합하여 아토피 개선에 도움을 줄 수 있는 개별인정 건강기능식품을 개발하고자 함.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

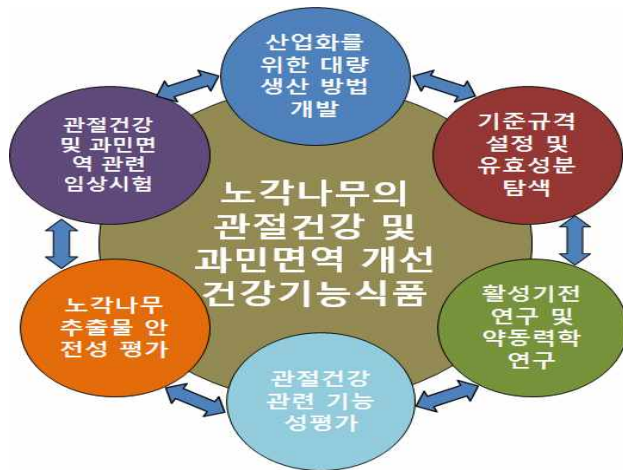
코드번호	D-05
------	------

#### 3-1. 연구수행 내용

가. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

(1) 연구개발 추진전략·방법

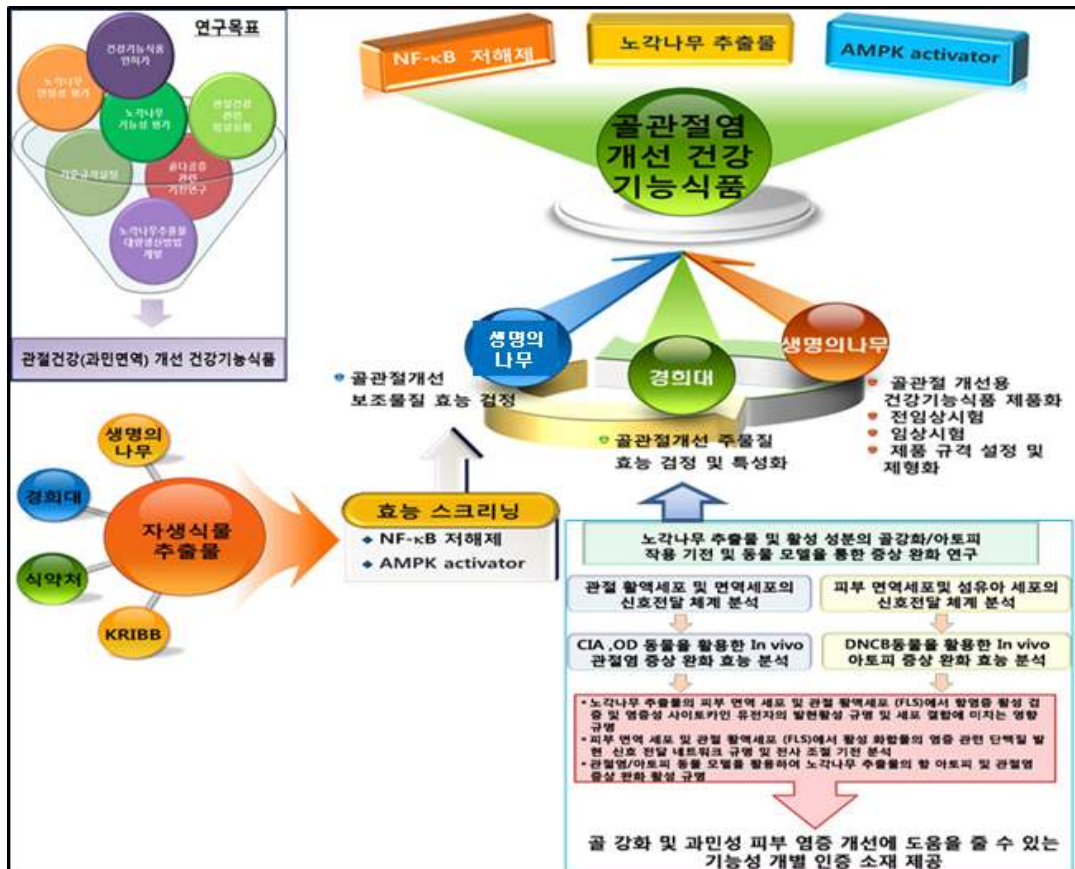
- 인구고령화 및 환경오염 등에 의하여 나타나는 관절염, 골다공증 및 과민면역반응(아토피) 개선과 관련된 여러 증상들을 분야별로 과학적으로 검증하여, 과학의 발달로 노령인구의 증가와 아토피·피부질환 등의 문제에서 벗어나 국민들의 건강한 생활에 기여할 수 있는 노각나무 추출물을 이용한 기능성원료 및 건강기능식품 개발을 위하여 본 사업을 국내 최고의 연구자들로 구성하였음.
- 본 사업에서는 노각나무 추출물의 대량생산을 추진하고, 대량 생산된 노각나무 추출물의 기준규격을 설정하여 표준화하여 다른 세부과제에 제공하여 표준화된 추출물을 가지고 골관절염 및 아토피 개선관련 기능성과 기전연구, 약물대사 등을 확인하는 시스템으로 사업을 추진함.
- 이는 단순한 기능성을 확인하는 것이 아니라 객관적인 기능성 평가 및 기전연구를 통해 식약청에서 요구하는 건강기능식품의 표준화에 부합하는 시스템으로 제품화 가능성을 높이는 시스템임.
- 노각나무를 이용하여 관절건강 및 과민면역반응 개선 건강기능식품과 신약후보물질의 개발을 위해 기능성 및 안전성, 임상실험, 기전연구, 기준규격 등의 연구를 진행하고 세부과제와의 유기적인 협력체계를 유지해 나갈 예정임.



- 본 사업의 제 1 협동연구기관에서는 노각나무를 이용한 관절건강 및 과민면역 개선 관련 특허 및 논문 등을 수행하여 결과들을 발표하였고, 이를 기초로 본 사업에서는 관절건강 및 과민면역 개선과 관련된 Biomaker개발 및 이와 관련된 질환모델을 만들어 이와 관련된 노각나무의 활성을 평가하여 목표 건강기능식품 및 신약 후보물질로 개발할 것임.

- 본 사업에서는 노각나무 건강기능식품의 개발을 위하여 각 세부과제별 유기적인 협력을 통하여 사업의 연구기간 동안에 건강기능식품 인허가를 완료하여 3차년도 중에 바로 사업화할 수 있도록 제품화에 대한 연구(임상시험, 생식독성 등)를 체계적으로 수행하려 함.
- 대량생산공정에서 생산한 노각나무추출물을 기준규격설정 및 유효성분 탐색 단일물질 분리 등의 연구 수행함.
- 기준규격이 설정된 노각나무 추출물은 협동연구기관에 전달되어 관련 Bio Maker를 측정하여 노각나무추출물로 목표 대비 골관절염, 골다공증 및 아토피 개선 약리활성 및 기전을 평가함. 그와 동시에 인체적용시험 연구를 수행하여 안전하면서 기능성을 나타내는 노각나무 추출물을 개발함.
- 노각나무추출물의 제품 연구를 통해 산업화 방향을 선택하고, 식품의약품안전처에 개별인정 건강기능식품으로 허가를 취득함.
- 제품의 판매 등을 위해 기존 협력사뿐만 아니라 최종 제품 판매사와의 MOU 등을 통해 마케팅 전략을 수립하도록 함.
- 원료의 안정적인 확보를 위해 농민단체 및 영농조합, 국립산림과학원, 지자체 등과 연계하고, 유기적인 협력관계를 통해 재배기술 및 보급에 노력함.

나. 추진 체계



다. 연구개발 추진일정

연구개발 추진내용	년차별추진일정												가중치
	1년차				2년차				3년차				
	3	6	9	12	3	6	9	12	3	6	9	12	
1. 노각나무 추출물의 대량생산기법 정립													10
2. 노각나무 추출물 내 기능성 성분 분리/동정 및 분석기법 정립													10
3. 노각나무 추출물의 장단기 제품 적용성 및 안전성 평가 (지표성분 및 기능성 성분류 기준)													10
4. 노각나무 추출물 유래 건강기능식품 소재 및 제품의 유효성 규명 - 동물시험을 통한 관절염/골다공증 및 항아토피 활성의 규명(in vitro)													10
5. 노각나무 추출물 유래 건강기능식품 소재 및 제품의 유효성 규명 - 노각나무 유래 분리 및 동정 기능성 소재의 관절염 및 항아토피 기능 작용 기전 규명(in vivo)													10
7. 노각나무 추출물 유래 건강기능식품 소재 및 제품의 유효성 규명 - 제품을 이용한 관절염 및 항아토피 효력시험													10
8. 노각나무 추출물의 제품화 정립 (제품적용 효능 평가)													10
9. 노각나무 추출물 인체유효성 평가 (인체적용시험 연구, CRO)													25
10. 사업화(제품화)													5
합계													100

### 3-2. 연구개발성과

#### 가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	The Methoxyflavonoid Isosakuranetin Suppresses UV-B-Induced Matrix Metalloproteinase-1 Expression and Collagen Degradation Relevant for Skin Photoaging	International Journal of Molecular Science	Lee TH	17(9)	미국	MDPI	SCI	2016.09.01	3.257, 2015 JCR
2	Cynandione A attenuates lipopolysaccharide-induced cell adhesion via suppression of VCAM-1 protein expression and NF- $\kappa$ B inactivation in human endothelial cells	International Journal of Molecular Medicine	Lee TH	41(3)	미국		SCI	2018.01.10	
3	Inhibitory effect of 5,6-dihydroergosteol-glucoside on atopic dermatitis-like skin lesions via suppression of NF- $\kappa$ B and STAT activation.	Journal of Dermatological Science	Jung MR, Lee TH	79(3)	일본	일본 피부과학회	SCI	2015.06.11	

#### 나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	PacificChem 2015	Lee TH	2015.12.18	미국, 하와이	미국
2	2017년도 (사)한국응용생명화학회 국제학술대회 및 제106차 정기총회	이상민	2017. 6. 15 - 17.	부산 해운대 그랜드 호텔	대한민국

#### 다. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	스피나스테롤 당 유도체를 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물	대한민국				(주)생명의나무	2015.02.10	1014938770000	100
2	PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF BONE DISEASES COMPRISING SPINASTEROL GLUCOSIDE DERIVATIVE	미국				Lifetree Biotech Co., Ltd.	2015.05.12	US 9,029,334 B2	100
3	노각나무 추출물의 제조 방법 및 이를 이용한 관절염 예방 및 개선용 약학 조성물	대한민국	(주)생명의나무	2016.10.31	10-2016-0142948				100



### 3-3. 연구결과

#### 가. 노각나무 추출물의 기능성분 분리/동정 및 구조분석

##### (1) 연구 방법

##### (가) 생리활성성분 분리 정제

- 노각나무 잎을 메탄올로 추출하여 농축한 후 (3회 추출), 헥산으로 분획하여 비극성 부분을 분리, 남은 수층을 에틸아세테이트로 분획하여 감압 농축, 남은 수층을 다시 부탄올로 분획하여 감압 농축 함.
- 극성별로 나누어진 헥산 층, 에틸아세테이트층, 부탄올 층, 물 층의 분획들을 silica gel로 세 분획 하고 다시 여러 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 각각의 세 분획을 계속하여 유효성분들을 분리 함.
- 분획 및 물질의 분리는 silica gel 뿐 아니라, sephadex LH-20, ODS-A, diol, preparative MPLC, 또는 preparative HPLC 등을 이용하여 시행함.

##### (나) 생리활성성분 구조 분석

- 분리된 단일 성분들의 순도는 TLC 및 analytical HPLC를 이용하여 분석 후 구조는 주로 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY, ROESY 와 같은 최신 1D 와 2D NMR법을 이용하여 분석하게 되고, UV, IR 과 low and high resolution MS를 이용하여 분석함.
- 분리된 활성 단일 물질 중 크리스탈화 되는 물질들은 x-ray crystallography 로 분자구조를 분석. 부재 탄소가 있는 입체구조의 경우 ROESY 와 NOESY NMR data를 이용하여 해결하고, computer Molecular Modeling Program을 이용하여 energy minimization 시킨 분자 모델을 얻어 dihedral angle을 계산하고 Karplus correlation graph 에 적용시켜 실제 <sup>1</sup>H NMR에 나타난 coupling constant 와 비교하여 입체구조의 증거를 얻어 상대적 입체구조를 결정하는데 응용함.
- 필요시는 화학적 유도체화, 가수분해 등을 응용하고, chiral 화합물일 경우는 Mosher method 또는 circular dichroism을 사용하여 절대구조를 동정

##### (2) 연구 결과

##### (가) 최대 농도 분리 용매분리방법 선발(동결건조 열수추출물 기준)

본 과제에 사용한 노각나무(*Stewartia pseudocamellia* Maxim.) 잎은 2014년 7월 전라남도 광양에서 채집하였으며 정확히 감정한 후 음건하여 사용하였음.

건조된 노각나무의 잎 14kg을 증류수 140L로 100℃ 에서 추출하고 여과 후 감압 농축하여 열수추출물 2.13kg을 얻었음. 이중 2kg을 증류수 2L에 현탁하고 n-Hexane (2L x 2), Dichloromethane (2L x 3), Ethyl acetate (2L x 6)을 사용하여 용매분획을 하였음. 위에서 분리된 용매 분획물은 n-Hexane (1.6g), Dichloromethane (17.6g), ethyl acetate (130.0g)을 각

각 얻었음.

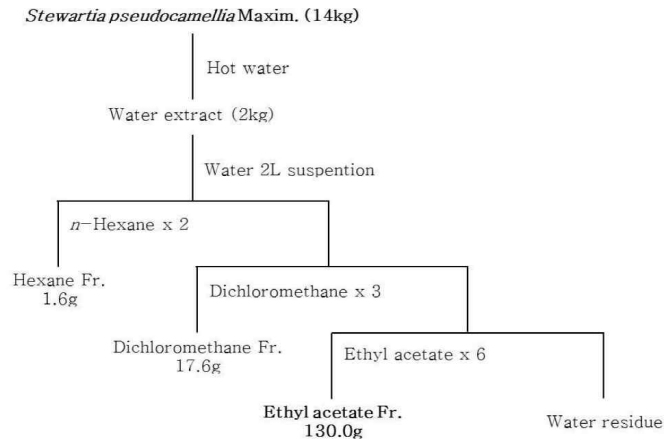


그림 7. 노각나무추출물의 용매분획 수율

(나) Ethyl acetate 분획으로부터 compounds의 분리

Ethyl acetate 분획 130g을 Chloroform : MeOH (7 : 1 → 0 : 1) 조성의 용매로 silica gel column chromatography를 진행하여 9개의 소분획(SPE1-SPE9) 으로 나누었으며, 각 분획의 실험 결과 5개의 분획(SPE2, SPE3, SPE6, SPE7, SPE8)에서 compounds 1 ~ 10을 분리 정제하였음.

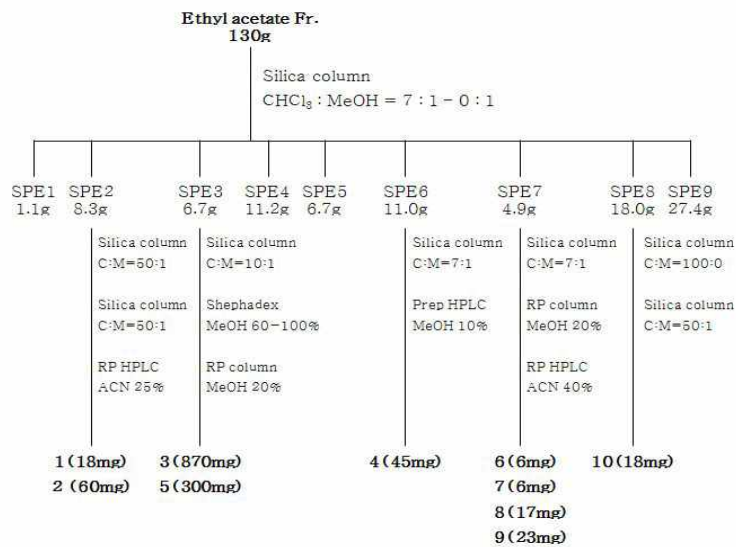


그림 8. 노각나무추출물 Ethyl acetate분획 분리 모식도

① Compound 1, 2의 분리 및 정제

SPE2 분획 8.3g을 Chloroform : MeOH (50 : 1 → 0 : 1) 조성의 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 5개의 소분획(SPE2-1-SPE2-5)을 얻었음. 이 중 소분획 SPE2-1

(2.1g)을 Chloroform : MeOH (50 : 1 → 0 : 1)의 용매로 silica gel column Chromatography를 거친 후 HPLC (20% ACN) 로 정제하여 compounds 1(18 mg), 2(60 mg)를 분리하였음.

Compound 1은 amorphous powder의 물질로서 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum에서 molecular ion peak가 137[M-H]<sup>-</sup>로 관찰되었으며, <sup>1</sup>HNMR 및 <sup>13</sup>C NMR data와 종합하여 molecular formula C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>로 추정하였음.

<sup>1</sup>H NMR spectrum에서 aromatic proton signal이 δ 7.50 (1H, dd, J = 1.8, 7.1 Hz, H-6), 7.40 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-2), 7.30 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-5), 7.00 (1H, dd, J = 1.9, 7.1 Hz, H-4)에서 관찰되었으며, <sup>13</sup>C NMR spectrum에서 6개의 aromatic carbon signal, 158.9 (C-3), 133.4 (C-1), 130.6 (C-5), 122.0 (C-6), 121.2 (C-4), 117.4 (C-2)이 관찰되었고 170.1 (C-7)에서 carbonyl carbon signal이 관찰되었음.

이상의 분석 결과를 근거로 이 화합물을 3-hydroxybenzoic acid 로 확인 동정하였음.

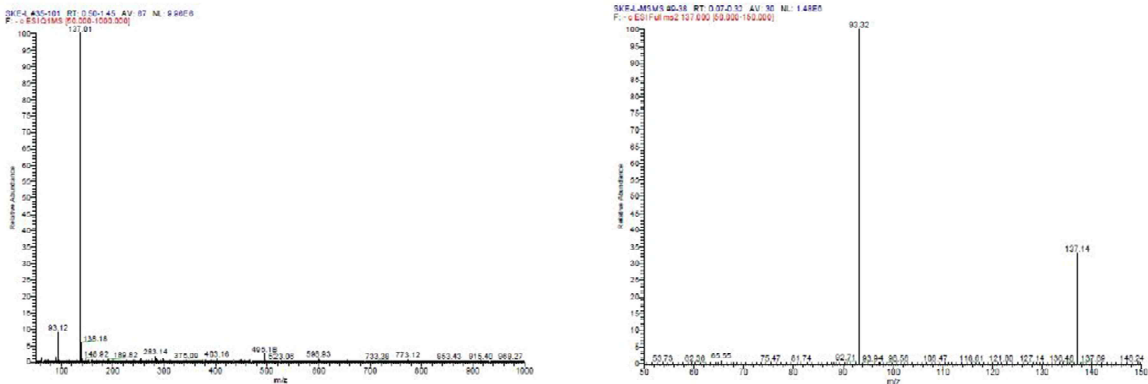


그림 9. Compound 1의 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum

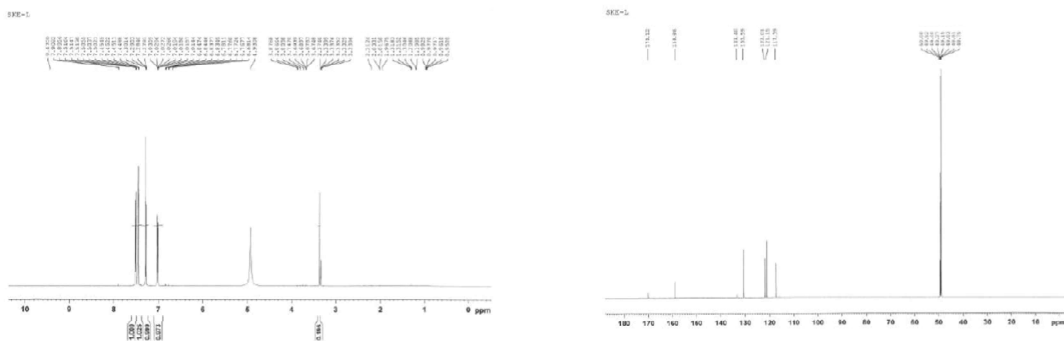


그림 10. Compound 1의 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectrum

Compound 2는 흰색의 amorphous powder의 물질로서 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum에서 molecular ion peak 가 137 [M-H]<sup>-</sup>로 관찰되었으며, <sup>1</sup>HNMR 및 <sup>13</sup>C NMR data와

종합하여 molecular formula  $C_7H_6O_3$ 로 추정하였음.

$^1H$  NMR spectrum에서 aromatic proton signal이  $\delta$  7.78 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-2, 6), 7.44 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-3, 5)에서 관찰 되었으며,  $^{13}C$  NMR spectrum에서 6개의 aromatic carbon signal 163.5 (C-4), 133.2 (C-2, 6), 122.9 (C-1), 116.2 (C-3, 5)이 관찰되었고 170.2 (C-7)에서 carbonyl carbon signal이 관찰되었음.

이상의 분석 결과를 근거로 이 화합물을 4-hydroxybenzoic acid로 확인 동정하였다.

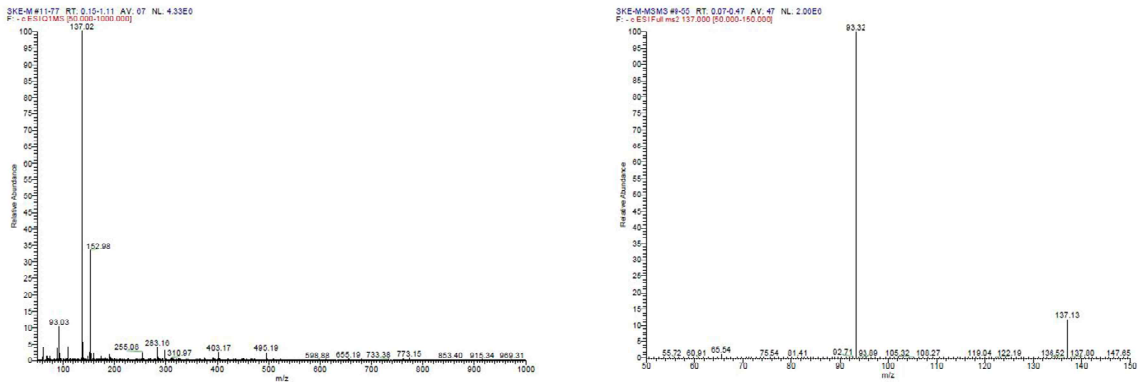


그림 11. Compound 2의 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum

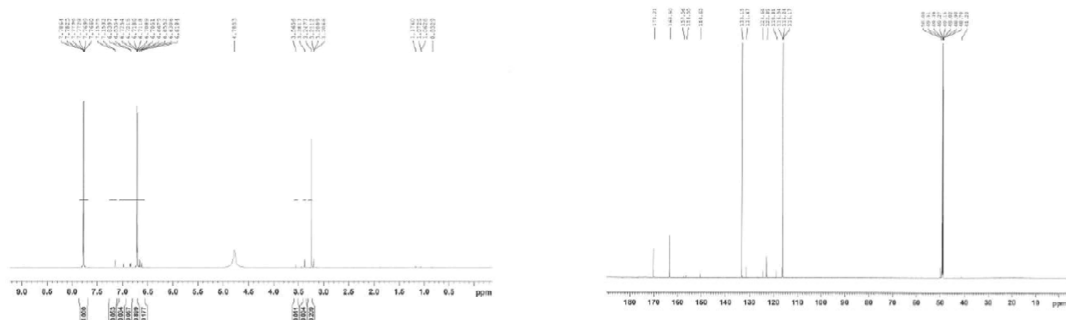


그림 12. Compound 2의  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR spectrum

## ② Compound 3, 5의 분리 및 정제

SPE3 분획 6.7 g을 Chloroform : MeOH (10 : 1  $\rightarrow$  0 : 1) 조성의 용매로 silica gel column chromatography를 거친 후 5개의 소분획(SPE3-1-SPE3-5)을 얻었고, 이 중 소분획 SPE3-2 (1.2g)을 Sephadex LH-20 open column (60-100 % MeOH) chromatography하여 compound 3 (300mg)을 얻었음. Compound 5 (37mg)는 SPE3-5 (870mg)를 20-100% MeOH 용매로 RP-18 column chromatography하여 얻었음.

Compound 3은 흰색 powder 성상의 물질로서 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum (Fig. 12)에서 molecular ion peak가  $153[M-H]^-$ 로 관찰되었으며,  $^1H$ NMR 및  $^{13}C$  NMR data와

종합하여 molecular formula  $C_7H_6O_4$ 로 추정하였음.

$^1H$  NMR spectrum에서 aromatic proton signal이  $\delta$  7.47(1H, s, H-2), 7.44 (1H, dd,  $J$  = 2.0, 8.1 Hz, H-6), 6.82 (1H, d,  $J$  = 8.1Hz, H-5)에서 관찰 되었으며,  $^{13}C$  NMR spectrum에서 6개의 aromatic carbon signal, 151.7 (C-4), 146.2 (C-3), 124.0 (C-6), 123.2 (C-1), 117.9 (C-5), 115.9 (C-2)이 관찰되었고 170.4 (C-7)에서 carbonyl carbon signal이 관찰되었음.

이상의 분석 결과를 근거로 이 화합물을 protocatechuic acid로 확인 동정하였음.

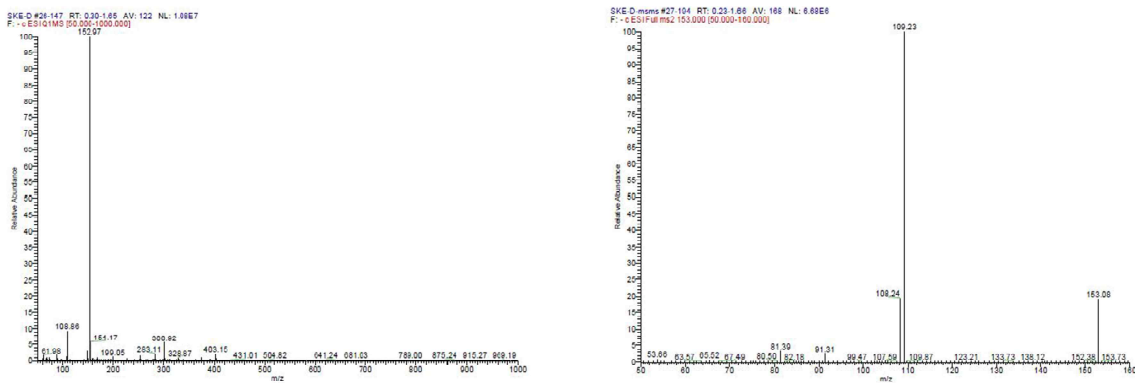


그림 13. Compound 3의 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum

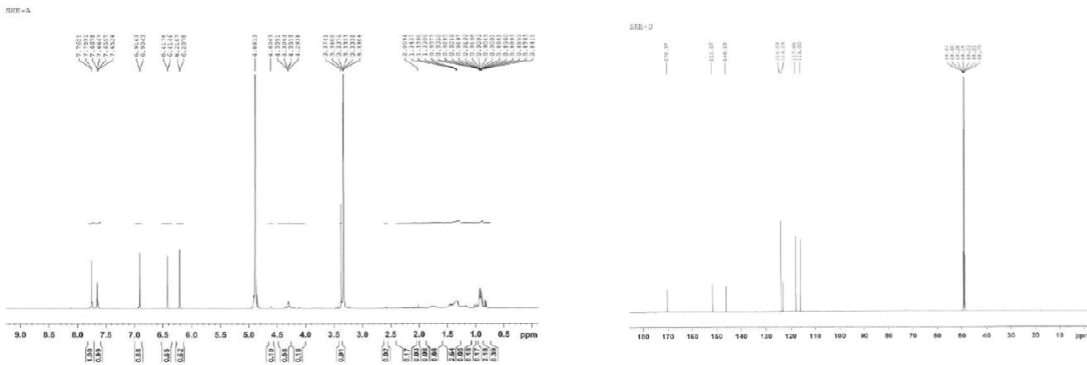


그림 14. Compound 3의  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR spectrum

Compound 5는 황색 powder 성상의 물질로서 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum 에서 molecular ion peak가  $301[M-H]$ 로 관찰되었으며,  $^1HNMR$  및  $^{13}C$  NMR data와 종합하여 molecular formula  $C_{15}H_{10}O_7$ 로 추정하였음.

$^1H$  NMR spectrum에서 flavonoid A ring의 proton이  $\delta$  7.75 (1H, d,  $J$  = 1.4 Hz, H-2' ), 7.60 (1H, dd,  $J$  = 1.4, 8.4 Hz, H-6' ), 6.90 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-5' )에서 관찰되었고, flavonoid B ring의 proton 이  $\delta$  6.40 (1H, s, H-8), 6.10 (1H, d,  $J$  = 1.4 Hz, H-6)에서 관찰 되었으며,  $^{13}C$  NMR spectrum로부터 15개의 flavonoid carbon signal을 175.9 (C-4), 164.0(C-7

), 161.1 (C-5), 156.0 (C-9), 147.3 (C-4' ), 146.5 (C-2), 144.8 (C-3' ), 135.8 (C-3), 122.7 (C-1' ), 120.2 (C-6' ), 114.8 (C-5' ), 114.5 (C-2' ), 103.1 (C-10), 97.8 (C-6), 92.9 (C-8)에서 확인할 수 있었음.

이상의 분석 결과를 근거로 이 화합물을 quercetin로 확인 동정하였음.

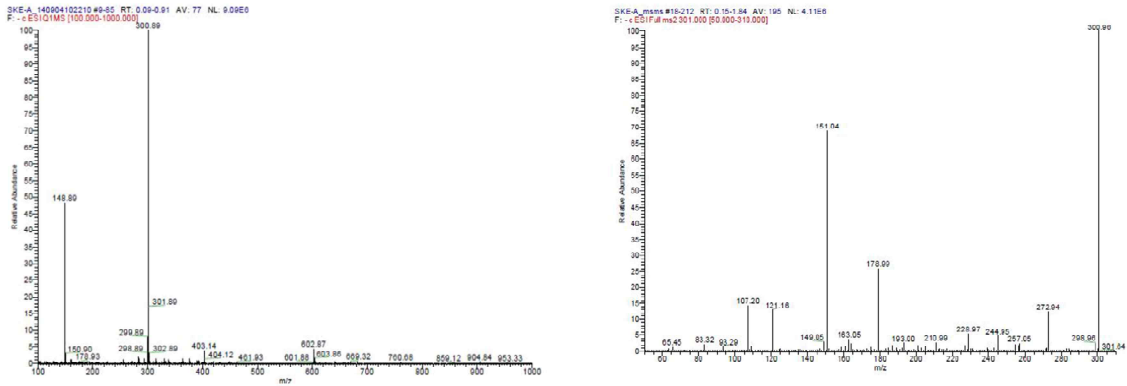


그림 15. Compound 5의 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum

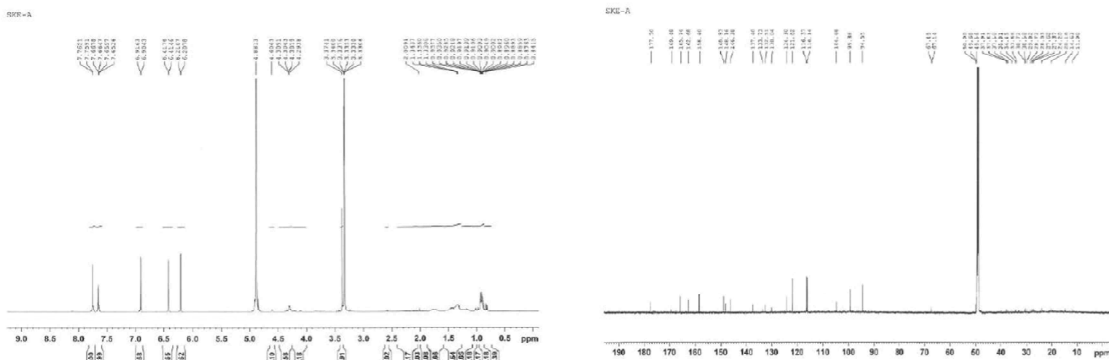


그림 16. Compound 5의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum

### ③ Compound 4 의 분리 및 정제

SPE6 분획 11.0 g을 Chloroform : MeOH (7 : 1) 조성의 용매로 silica gel column chromatography를 거친 후 4개의 소분획(SPE 6-1 ~ SPE 6-4)으로 나누었음. 그 중 SPE6-1 (553mg)을 H<sub>2</sub>O:MeOH(9 : 1→ 0 : 1) 조성의 용매로 prep HPLC를 통해 정제하여 compound 4 (45mg)를 얻었음.

Compound 4는 흰색 powder 성상의 물질로서 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum에서 molecular ion peak가 169[M-H]<sup>-</sup>로 관찰되었으며,  $^1\text{H}$  NMR 및  $^{13}\text{C}$  NMR data와 종합하여 molecular formula C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>로 추정하였음.

$^1\text{H}$  NMR spectrum에서 aromatic proton signal이 7.90 (2H, s, H-2, 6)에서 관찰되었음

며,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 6개의 aromatic carbon signal 146.5 (C-3, 5), 139.7 (C-4), 122.1 (C-1), 110.5 (C-2, 6)이 관찰되었고 170.6 (C-7)에서 carbonyl carbon signal이 관찰되었음.

이상의 분석 결과를 근거로 이 화합물을 gallic acid로 확인 동정하였음.

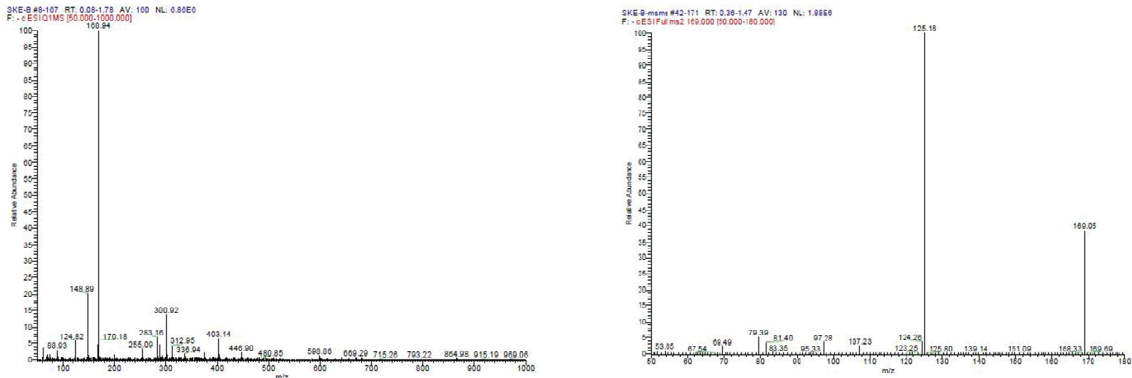


그림 17. Compound 4의 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum

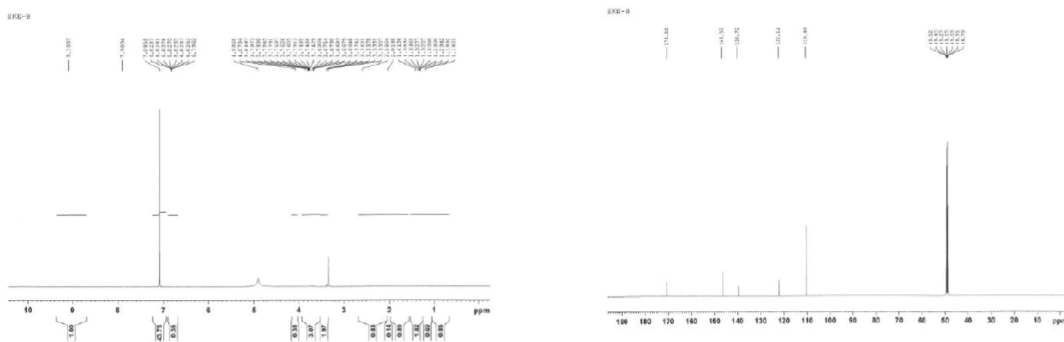


그림 18. Compound 4의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum

#### ④ Compound 6, 7, 8, 9 의 분리 및 정제

SPE 7 분획 4.9g을 Chloroform : MeOH (7 : 1) 조성의 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 4개의 소분획(SPE 7-1 ~ SPE 7-4)을 얻었음. SPE 7-4(2.2g)를 20% MeOH 용매로 RP-18 column chromatography하여 5개의 소분획 (SPE 7-4-1 ~ DPE 7-4-5)을 얻었고, 이 중 SPE7-4-2 (215mg), SPE7-4-4 (390mg), SPE7-4-5 (198mg)를 각각 HPLC(40% ACN)로 정제하여 compounds 6(6mg), 7(6mg), 8(17 mg), 9(23mg)를 얻었음.

Compound 6은 옅은 갈색 amorphous powder 성상의 물질로서 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum에서 molecular ion peak가 616[M-H]<sup>-</sup>로 관찰되었으며,  $^1\text{H}$ NMR 및  $^{13}\text{C}$  NMR data와 종합하여 molecular formula  $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_{16}$ 로 추정하였음.

$^1\text{H}$  NMR spectrum에서 quercetin의 flavonoid A ring의 proton이  $\delta$  7.81 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-2'), 7.59 (1H, dd  $J = 2.2, 8.5$  Hz, H-6'), 6.84 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-5')에서 관찰되었고, flavonoid B ring의 proton이  $\delta$  6.40 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 6.21 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6)에서 관찰 되었으며, 5.14 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-1''), 4.30-3.60 (6H, m, H-6'', 5'', 4'', 3'', 2'')의 signal들에 의해 glucose 가 있음을 예상할 수 있었고, 6.91 (1H, s, H-6''', 2''')으로 gallic acid의 존재를 예상할 수 있었음.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum로부터 15개의 flavonoid carbon signal을 179.6 (C-4), 166.2 (C-7), 163.0 (C-5), 159.1 (C-2) 158.5 (C-9), 150.1 (C-4'), 145.9 (C-3'), 135.8 (C-3), 123.2 (C-1'), 122.9 (C-6'), 117.9 (C-5'), 116.2 (C-2'), 100.1 (C-6), 95.0 (C-8)에서 확인할 수 있었으며, 105.7 (C-1'', 10), 79.6 (C-3''), 75.1 (C-5''), 74.6 (C-2''), 70.2 (C-4''), 63.9 (C-6'')에서 glucose 당이 있음을 예상할 수 있었고, 168.1 (C-7'), 146.5 (C-3''', 5'''), 139.9 (C-4'''), 121.2 (C-1'''), 110.2 (C-2''', 6''')으로 gallic acid를 예상할 수 있었음.

이상의 분석 결과를 근거로 이 화합물을 quercetin-3-O-(6'' -O-galloyl)- $\beta$ -glucopyranoside로 확인 동정하였음.

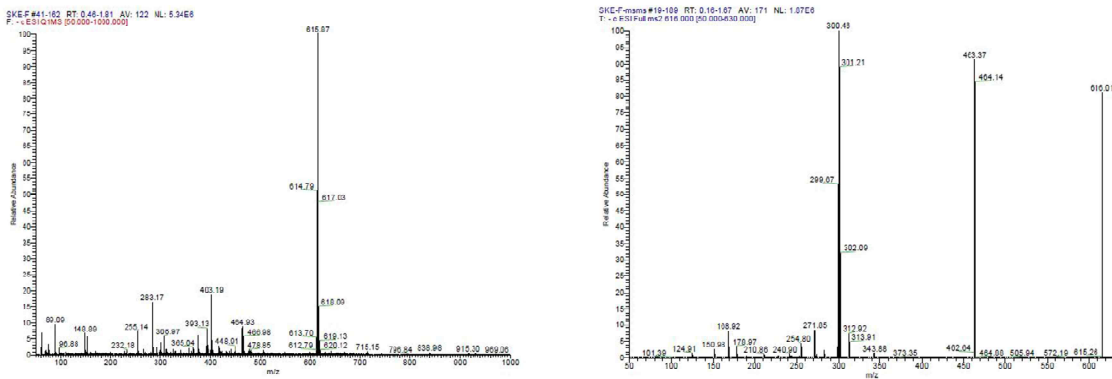


그림 19. Compound 6의 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum

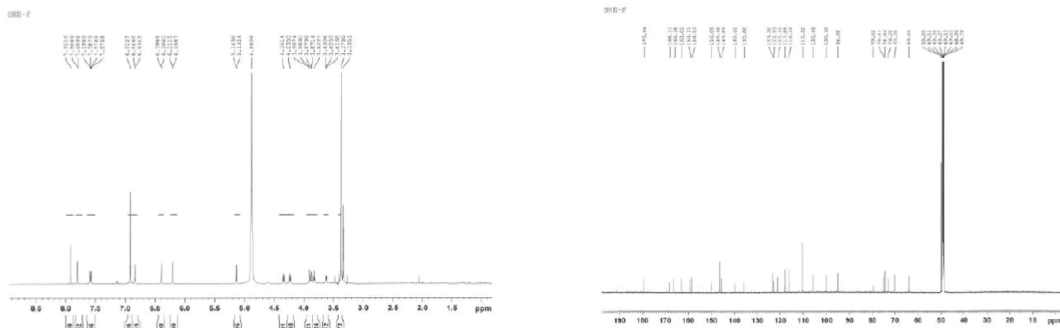


그림 20. Compound 6의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum



Compound 7은 황색 powder 성상의 물질로서 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum에서 molecular ion peak가 447[M-H]<sup>-</sup>로 관찰되었으며, <sup>1</sup>H NMR 및 <sup>13</sup>C NMR data와 종합하여 molecular formula C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>로 추정하였음.

<sup>1</sup>H NMR spectrum에서 keampferol의 flavonoid A ring의 proton이 δ 8.10 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.92 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-3', 5')에서 관찰되었고, flavonoid B ring의 proton이 δ 6.41 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6)에서 관찰되었으며, 5.11 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1''), 3.70-3.80 (6H, m, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6'')의 signals에 의해 galactose가 있음을 예상할 수 있었음.

<sup>13</sup>C NMR spectrum로부터 15개의 flavonoid carbon signal을 179.8 (C-4), 167.0 (C-7), 163.2 (C-5), 161.8 (C-4'), 159.1 (C-9), 158.8 (C-2), 135.7 (C-3), 132.5 (C-2', 6'), 122.9 (C-1'), 116.3 (C-3', 5'), 105.6 (C-10), 100.3 (C-6), 95.1 (C-8)에서 확인하였으며, δ 105.2 (C-1''), 77.3 (C-5''), 75.2 (C-3''), 73.2 (C-2''), 70.2 (C-4''), 62.1 (C-6'')에서 galactose 당의 peak를 관찰할 수 있었음.

이상의 분석 결과를 근거로 이 화합물을 trifolin으로 확인 동정하였음.

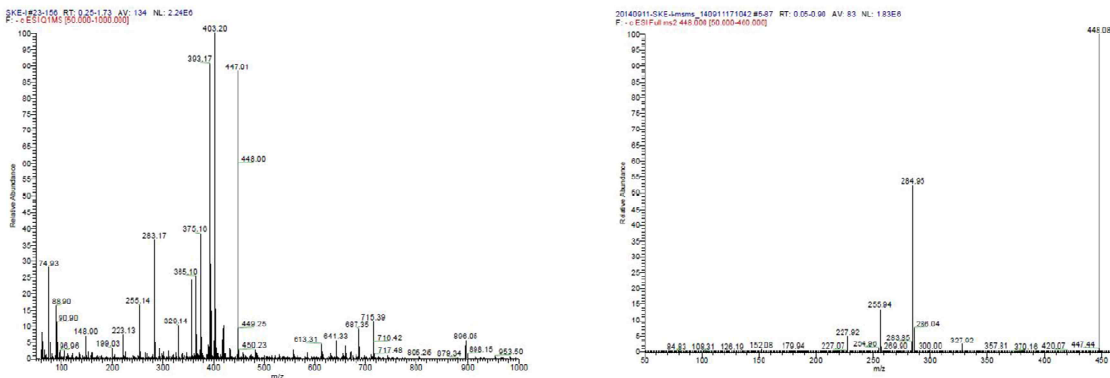


그림 21. Compound 7의 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum

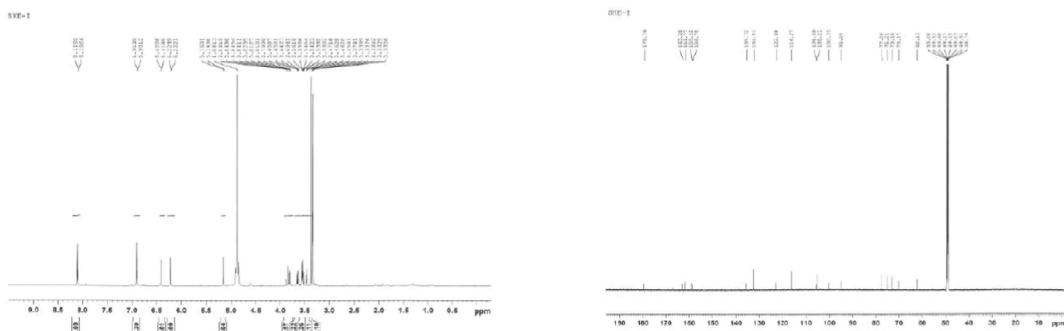


그림 22. Compound 7의 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectrum

Compound 8은 황색 powder 성상의 물질로서 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum

에서 molecular ion peak가 447[M-H]로 관찰되었으며,  $^1\text{H}$ NMR 및  $^{13}\text{C}$  NMR data와 종합하여 molecular formula  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ 로 추정하였음.

$^1\text{H}$  NMR spectrum에서 quercetin의 flavonoid A ring의 proton이  $\delta$  7.36 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-2'), 7.32 (1H, dd, J = 1.6, 8.2 Hz, H-6'), 6.94 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5')에서 관찰되었고, flavonoid B ring의 proton이  $\delta$  6.39 (1H, s, H-8), 6.22 (1H, s, H-6)에서 관찰되었음. 5.37 (1H, s, H-1'), 4.24-3.27 (4H, m, H-2'', 3'', 4'', 5'')으로 당의 존재를 예상할 수 있었고 0.90 (3H, d, J = 6.2 Hz, H-6'')으로 rhamnose를 예상할 수 있었음.

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum로부터 15개의 flavonoid carbon signal을 179.8 (C-4), 166.1 (C-7), 163.4 (C-5), 159.5 (C-2), 158.7 (C-9), 150.0 (C-4'), 146.6 (C-3'), 136.4 (C-3), 123.1 (C-6'), 123.0 (C-1'), 117.1 (C-5'), 116.5 (C-2'), 106.0 (C-10), 100.0 (C-6), 94.9 (C-8)에서 확인하였으며, 103.7 (C-1''), 73.4(C-2''), 72.2 (C-4''), 72.3 (C-3''), 72.1 (C-5''), 17.8 (C-6'')에서 rhamnose 당이 있음을 예상할 수 있었고, 이는 rhamnose가 flavonoid의 C-3의 O 위치에 결합되어 있음을 확인하였음.

이상의 분석 결과를 근거로 이 화합물을 quercitrin으로 확인 동정하였음.

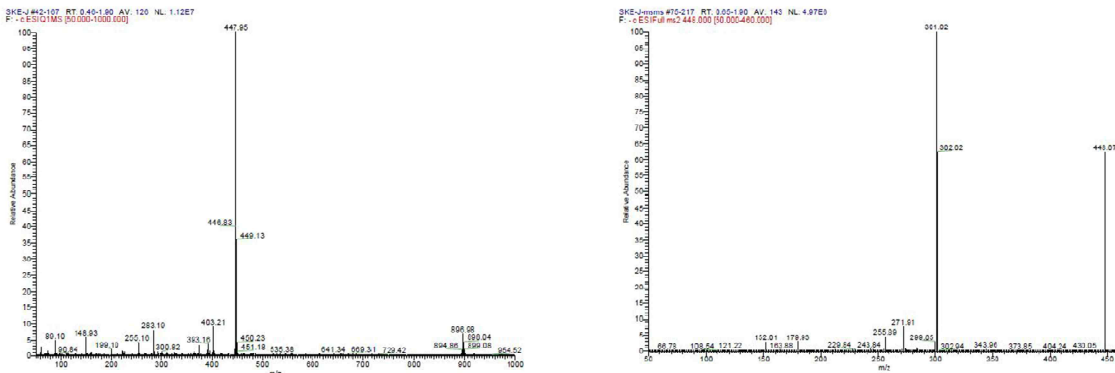


그림 23. Compound 8의 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum

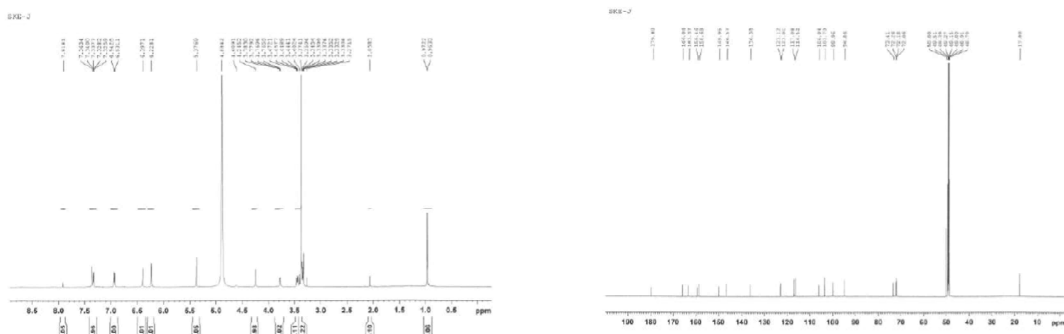


그림 24. Compound 8의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum

Compound 9는 옅은 갈색 amorphous powder 성상의 물질로서 ESI-MS spectrum과

MS/MS spectrum에서 molecular ion peak가 599[M-H]로 관찰되었으며,  $^1\text{H}$  NMR 및  $^{13}\text{C}$  NMR data와 종합하여 molecular formula  $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_{15}$ 으로 추정하였음.

$^1\text{H}$  NMR spectrum에서 quercetin의 flavonoid A ring의 proton이  $\delta$  7.26 (1G, br s, H-2'), 7.25 (1H, dd,  $J = 1.8, 8.3$  Hz, H-6'), 6.84 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-5')에서 관찰되었고, flavonoid B ring의 proton이  $\delta$  6.30 (1H, br s, H-8), 6.10 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz, H-6)에서 관찰되었으며 5.53 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-1''), 3.90-3.20 (4H, m, H-5'', 4'', 3'', 2''), 0.93 (2H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-6'')으로 rhamnose가 있음을 예상할 수 있었고, 6.97 (2H, s, H-6''', 2''')으로 gallic acid의 존재를 예상할 수 있었음.

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum로부터 14개의 flavonoid carbon signal을 179.5 (C-4), 166.0 (C-7), 163.4 (C-5), 159.4 (C-2), 158.7 (C-9), 150.0 (C-4'), 135.8 (C-3), 123.0 (C-1'), 123.0 (C-6'), 117.0 (C-2'), 116.6 (C-5'), 106.0 (C-10), 100.0 (C-6), 94.9 (C-8)에서 확인할 수 있었으며 100.7 (C-1''), 93.6 (C-2''), 73.9 (C-4''), 72.3 (C-5''), 70.9 (C-3''), 18.0 (C-6'')으로 rhamnose 당이 있음을 예상할 수 있었고, 167.6 (C-7'''), 146.6 (C-3'''), 146.6 (C-5'''), 140.1 (C-4'''), 121.4 (C-1'''), 110.5 (C-2''', 6''')으로 gallic acid를 예상할 수 있었음.

이상의 분석 결과를 근거로 이 화합물을 quercetin-3-O-(2'' -O-galloyl)- $\alpha$ -rhamnopyranoside 으로 확인 동정하였음.

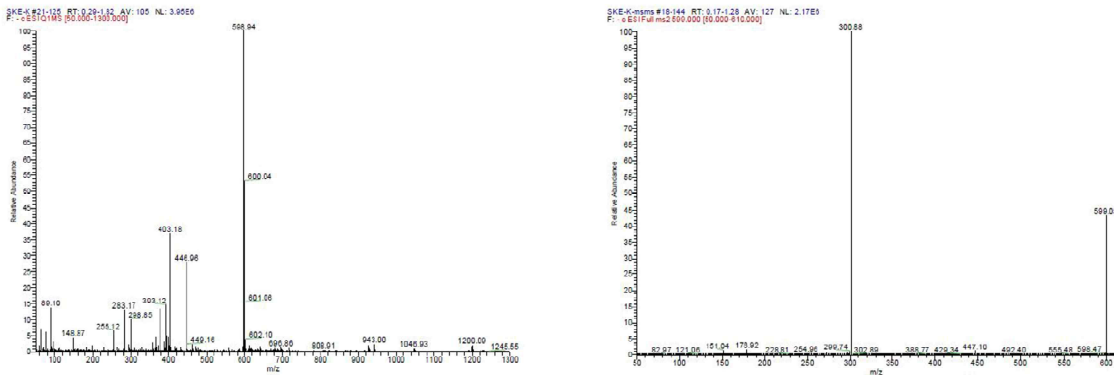


그림 25. Compound 9의 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum

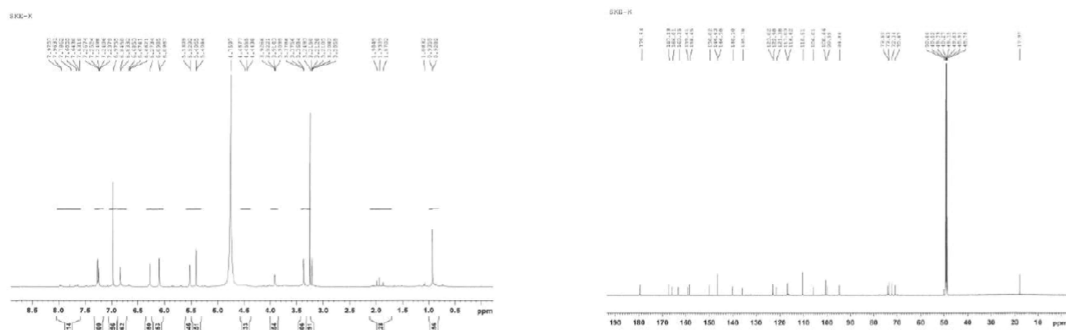


그림 26. Compound 9의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum

⑤ Compound 10 의 분리 및 정제

SPE 8 분획 18.0g을 H<sub>2</sub>O : MeOH(1 : 0 → 0 : 1) 조성의 용매로 MPLC를 실시하여 2개의 소분획(SPE 8-1 ~ SPE 8-2)을 얻었고, 이 중 SPE 8-2(2.2g)을 silica gel column chromatography (Chloroform : MeOH, 50 : 1 → 0 : 1)를 실시하여 compound 10 (18mg)을 얻었음.

Compound 10은 황색 amorphous powder 성상의 물질로서 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum에서 molecular ion peak가 609 [M-H]<sup>-</sup>로 관찰되었으며, <sup>1</sup>H NMR 및 <sup>13</sup>C NMR data와 종합하여 molecular formula C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>으로 추정하였음.

<sup>1</sup>H NMR spectrum에서 quercetin의 flavonoid A ring의 proton이 δ 7.55 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.52 (1H, dd, J = 2.0, 8.1 Hz, H-6'), 6.84 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5')에서 관찰되었고, flavonoid B ring의 proton이 δ 6.38 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-6), 6.19 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-8)에서 관찰되었음. 그리고 5.33 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1''), 5.10 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-1'''), 3.71-3.04 (10H, m, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6'', 2''', 3''', 4''', 5'''), 0.99 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-6''')으로 2개의 당인 glucose와 rhamnose를 예상할 수 있었음.

<sup>13</sup>C NMR spectrum으로부터 15개의 flavonoid carbon signal을 177.8 (C-4), 164.5 (C-7), 161.7 (C-5), 157.0 (C-9), 156.9 (C-2), 148.9 (C-4'), 145.2 (C-3'), 133.5 (C-3), 122.0 (C-6'), 121.7 (C-1'), 116.7 (C-5'), 115.7 (C-2'), 104.4 (C-10), 99.1 (C-6), 94.0 (C-8)에서 확인하였으며, 101.6 (C-1''), 101.2 (C-1'''), 76.9 (C-3''), 76.4 (C-5''), 74.5 (C-2''), 72.3 (C-4''), 71.0 (C-2'''), 70.8 (C-3'''), 70.7 (C-4'''), 68.7 (C-5'''), 67.4 (C-6''), 18.2 (C-6''')에서 2개의 당이 결합되고 rhamnose의 존재를 알 수 있었음.

이상의 분석 결과를 근거로 이 화합물을 rutin으로 확인 동정하였음.

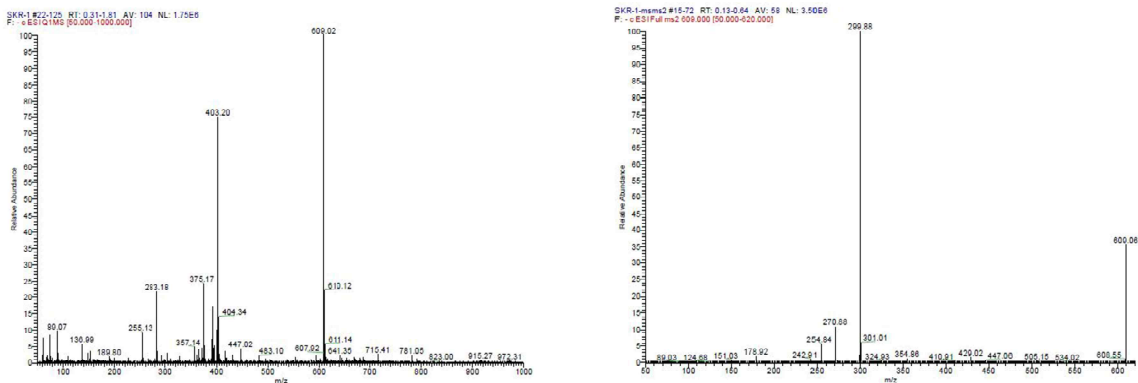


그림 27. Compound 10의 ESI-MS spectrum과 MS/MS spectrum

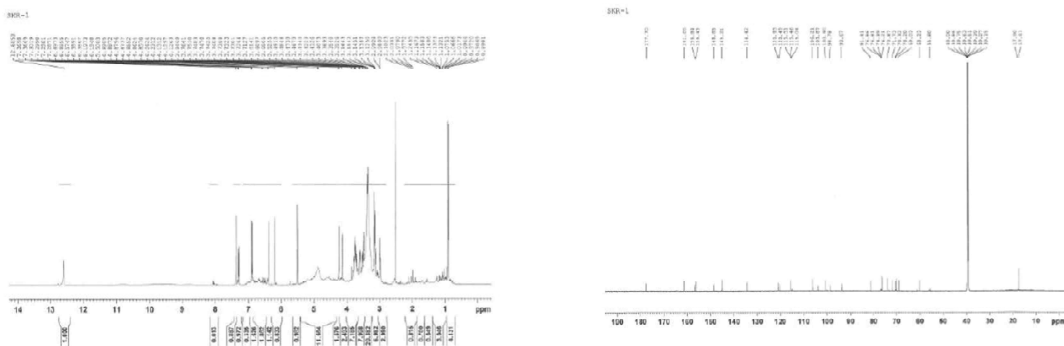


그림 28. Compound 10의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum

노각나무 잎 추출물을 용매분획하고 Ethyl acetate 분획에서 단일 compound 16개 단리를 하여, 협동기관에 활성평가를 위하여 제공하였으며, 3-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, gallic acid, quercetin, trifolin, quercetin-3-O-(6'' -O-galloyl)- $\beta$ -glucopyranoside, quercitrin, quercetin-3-O-(2'' -O-galloyl)- $\alpha$ -rhamnopyranoside, rutin, rhamnose 등 10개를 구조 동정하였음.

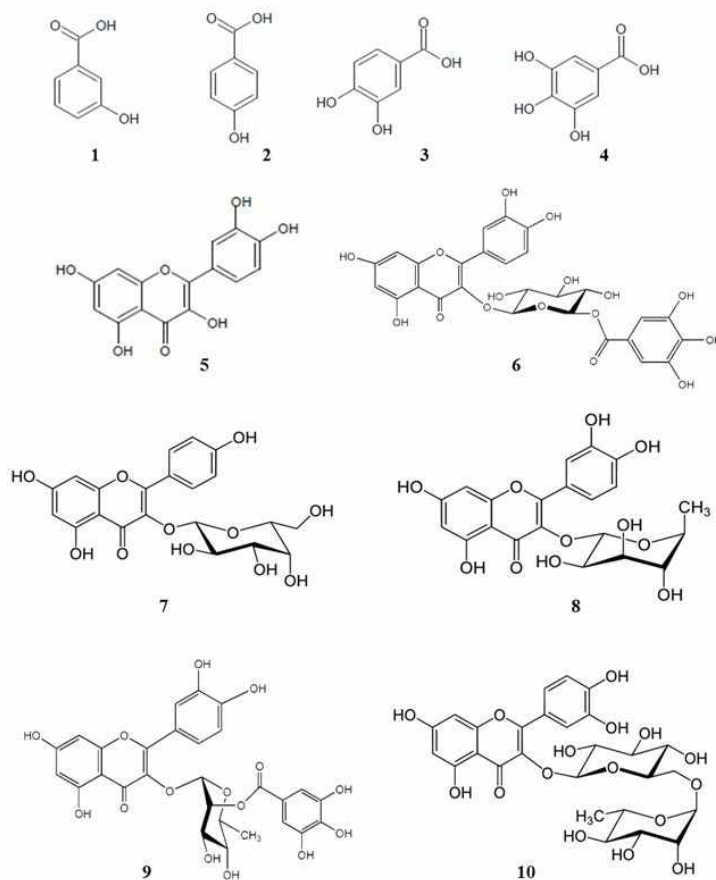
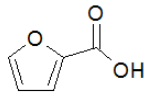
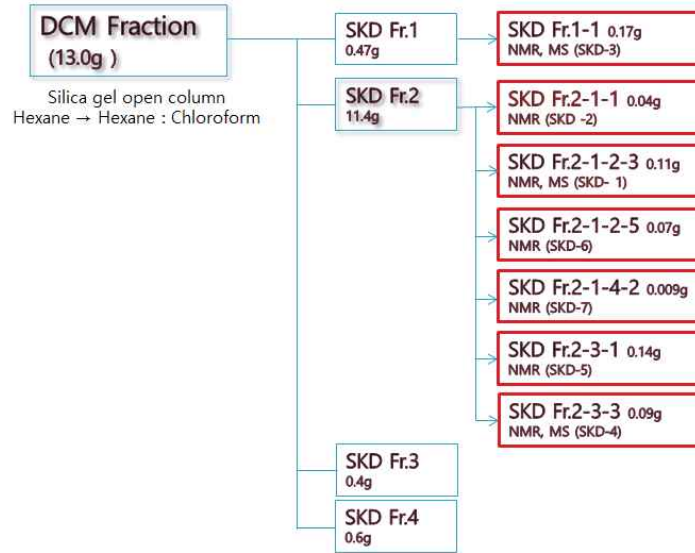
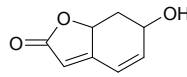


그림 29. 노각나무추출물로부터 분리된 단일화합물

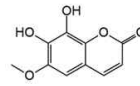
Dichloromethane 분획에서 단일 compound 7개 단리를 하였으며, 2-Furoic acid, Menis daurilide, Fraxetin을 규명하였음.



1. 2-Furoic acid



2. Menisdaurilide



3. Fraxetin

그림 30. 노각나무추출물 Dichloromethane 분획에서 분리된 단일화합물

#### 나. 노각나무 추출물 및 기능성분 대량생산공정 개발

##### (1) 연구 방법

##### (가) 대량생산방법 개발

- 노각나무 잎에 관한 경제성 있는 원료 확보 방안 수립
- 노각나무 잎의 이화학적 성질을 비교 분석
- 추출용매의 종류, 농도, pH, 염농도 등 추출조건에 따른 최대 유효성분 수율 조건 확립
- 물리적, 화학적 특성을 이용한 수율 변화 측정
- 기타 추출법을 이용한 추출방법의 최적화
- 추출액에 대한 건조방법의 결정(spray dry법 등)
- 최적화된 추출법에 의한 Pilot 생산을 통해 설정한 기준규격에 적합한지 측정(3Lot 3반복이상)
- Pilot 생산으로 설정된 생산방법으로 양산 시설에서 생산
- 양산품에 대한 기준규격 측정(3Lot 3반복이상)

##### (나) 개발된 제품의 실용화 연구

- 제품의 물리화학적 특성 분석
- 개발된 물질의 수분흡수력 및 품질변화 측정

- 타 세부과제와의 협의 및 시험결과를 통한 제형 선정
- 현장적용 시험 및 경제성 분석

(다) 건강기능성 식품의 대량생산 및 미비점 보완

- 최종 제품의 기술확립 및 관련 산업체 기술 개발
- 보완 기술개발을 통한 산업화 적용

(2) 연구 결과

(가) 노각나무 추출물 대량생산기법 정립(시료 : 잎기준)

① 노각나무 채취시기별 생산성 평가

노각나무 잎의 채취시기별 생산성 평가를 위하여 열수추출물을 기준으로 하여 생산수율을 측정하여 평가하였음. 표 2.에서 나타난 것과 같이 채취시기별 수율은 6월에서 7월에 채취한 잎이 수율이 좋았으며, 선행연구에서 활성 물질의 함량을 분석한 결과와 일치하는 결과를 나타냄.

표 2. 채취시기별 생산수율

채취시기	5월	6월	7월	8월	9월
수율	12.3%	14.9%	15.2%	13.9%	11.5%

② 노각나무 채취장소별 생산성 평가

노각나무 잎의 채취장소별 생산성 평가를 위하여 열수추출물을 기준으로 하여 경기 광릉수목원과 전남 완도 등 2곳의 자생지에서 노각나무 잎을 채취하여 생산수율을 측정하여 평가하였음. 노각나무의 자생지인 경기 광릉수목원과 전남 광양의 생산수율을 측정한 결과 표 3에서 보는 것과 같이 지역의 차이는 나타나지 않았음.

표 3. 채취장소별 생산성 평가

채취장소	경기 광릉	전남 광양
수율	15.2%	14.9%

③ 노각나무 추출분말 대량생산 공정 확립

노각나무 추출분말의 대량생산을 위한 공정 확립을 위하여 수율 및 활성도 등을 평가한 결과 관절 건강과 관련하여 70% 주정추출물(SKE)이 효과가 가장 좋았으며, 면역 과민 반응에 의한 피부 상태 개선(아토피)에 대한 효과는 열수추출(SKW)이 더욱 효과가 뛰어난 것으로 나타나 두가지 방법을 사용하여 대량생산을 위한 Pilot생산을 수행하였음. 노각나무

잎을 세절 또는 분말화 하여 70%주정 및 열수로 2차례 추출 후 추출액을 필터 한 후 농축하고 덱스트린을 혼합하여 분무건조 하였음.

- 관절 건강 관련 노각나무 잎 주정추출물(SKE) 제조 공정

- ㉠ 노각나무 잎을 세절한다.
- ㉡ 노각나무 잎에 70% 주정알코올을 원료가 침적되도록 투입하고 4시간 가열추출하고 여액을 분리
- ㉢ 70% 주정알코올을 원료가 침적되도록 2차 투입하고 2시간 가열추출하고 여액을 분리
- ㉣ 분리여액을 진공 농축하여 알코올이 없을 때까지 농축
- ㉤ 고형분대비 50%의 덱스트린을 혼합하고 필요시 건조조건에 맞도록 물 첨가
- ㉥ 95도 이상에서 30분 살균처리
- ㉦ 분무건조
- ㉧ 제품검사 후 합격품에 한하여 포장단위에 따라 포장한다.

- 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 관련 노각나무 잎 열수추출물(SKW) 제조 공정

- ㉠ 노각나무 잎을 세절한다.
- ㉡ 노각나무 잎에 적정량의 상수를 첨가하여 가열 추출하고 여액을 분리하고, 추출 잔사에 적정량의 상수를 2차 투입하여 가열 추출하고 여액을 분리한다.
- ㉢ 분리여액을 여과하고, 여과액을 농축한다.
- ㉣ 고형분 대비 50%의 덱스트린을 혼합하고 필요시 건조조건에 맞도록 물을 첨가한다.
- ㉤ 열처리를 하고, 분무건조 한다.
- ㉥ 체별기로 체별한다.
- ㉦ 제품검사 후 합격품에 한하여 포장단위에 따라 포장한다.



노각나무 잎 주정추출분말(SKE)



노각나무 잎 열수추출분말(SKW)

그림 31. 노각나무 추출분말



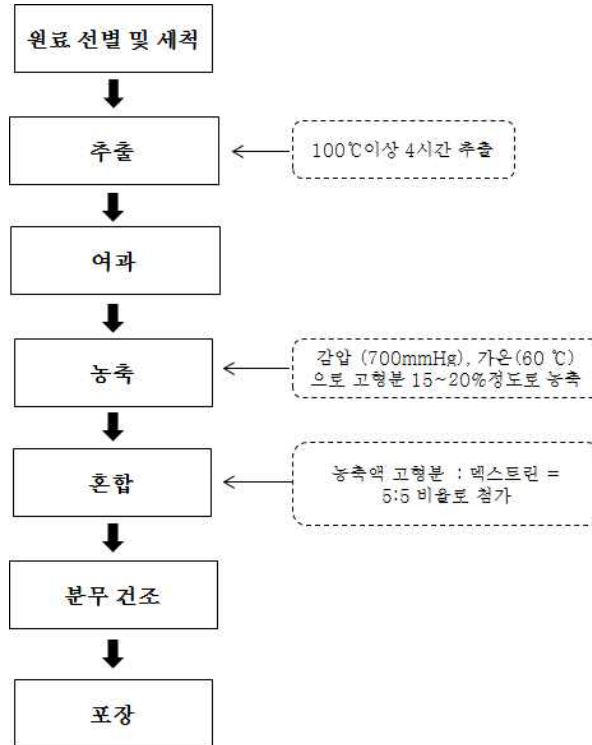


그림 32. 노각나무 추출물의 제조 공정도

#### 다. 노각나무 추출물을 이용한 시제품 개발

##### (1) 제형연구 및 인체적용시험을 위한 시제품 개발

###### (가) 시험방법

###### ① 제형 연구 및 원료안정성 연구

- 기초 물성 측정, 부형제와의 compatibility 연구

- 기초 물성 측정

㉠ 규정에 따라 원료의 흡습성 시험

㉡ 용해도시험: 물 (pH 1.0, 3.0, 5.0, 7.0), 유기용매 (에탄올, 메탄올, 아세톤 등)

- 부형제와의 compatibility 연구

㉠ 제제화에 사용되는 부형제의 선택을 위해 사용 가능한 부형제와 약물을 적당한 비율로 혼합한 후 가속조건에 보관하면서 시간 변화에 따른 함량 및 성상 변화를 관찰하여 적합한 부형제 선정

㉡ 평가방법으로 사용할 분석법 확립

###### ② 안정성연구 : Stability Study

- 원료 안정성 시험

㉠ 원료의 안정성 평가를 위해 식약처고시 의약품 등의 안정성시험기준에 따라 가속 시험 수행

- 경구제제화 연구

- ㉠ Preformulation 연구에서 compatibility test를 통과한 부형제를 선정하여 제제화 연구
  - ㉡ 본 제제의 특성상 신속한 약효를 나타내기 위한 제제화 연구
  - ㉢ *in vitro*에서 약물 약효를 예측할 수 있는 실험법 확립 및 처방 확정
  - ㉣ 수분에 대한 안정성 확보 및 신속한 약효를 발휘할 수 있는 코팅 처방 선정
  - ㉤ 인체적용시험을 통해 설정된 함량에 따라 처방 최적화
- ③ 물리적 특성이 개선된 유효물질을 이용한 새로운 제형의 제품 개발
- 일괄 공정으로 바람직한 물성을 가진 최종 물질 개발.

(나) 연구 결과

① 제형연구를 위한 시제품 개발

노각나무 추출물의 제품화를 위한 제형연구를 위하여 여러 가지 제형(캡슐, 정제, 액상, 젤리 등)으로 시제품을 제조하였음. 노각나무추출물을 이용한 분말, 정제, 액상, 젤리 등 제형별로 지표성분 후보군인 Rutin, Quercetin, Quercitrin, (+)Catechin에 대한 평가결과 제형에 따른 지표성분 후보군의 분석은 큰 영향을 미치지 않음을 나타내었음.



그림 33. 노각나무 추출물을 이용한 시제품

② 인체적용시험을 위한 시제품 제작

- 관절 건강 인체적용시험용 시제품

위의 시험결과를 적용하여 관절 건강 인체적용시험을 위한 시제품을 제작하였음. 관절 건강과 관련하여 대상자 모집군이 40대 이상의 성인들을 대상으로 하고 인체적용시험에 대한 이해 및 복용 순응도를 고려하여 캡슐로 섭취할 수 있도록 캡슐제형으로 제작하였음.

시험군과 대조군에게 투여할 진약과 위약의 조성은 아래와 같다.

㉠ 인체적용시험용 식품의 일반명, 코드명, 원료약품 및 분량, 성상 및 제형 등

	시험식품군	대조식품군
일반명	노각나무 추출물	위캡슐(placebo)
제품명(코드명)	SKE 100	SKE 위캡슐
원료약품 및 분량	1캡슐 중 SKE 100mg 함유	1캡슐 중 SKE 위캡슐 100mg 함유 (텍스트린)
성상 및 제형	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 진한 어두운 초록색의 분말이 들어 있는 타원형 캡슐	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 진한 어두운 초록색의 분말이 들어 있는 타원형 캡슐
저장방법	실온보관(1~30℃), 기밀용기	실온보관(1~30℃), 기밀용기

㉡ 인체적용시험용 식품의 생산, 포장, labeling 및 저장

인체적용시험용 식품은 제조 후 아래 예시(의약품 등의 안전에 관한 규칙 제 69조 6항에 준함)와 같은 라벨을 부착하고 포장하여 인체적용시험 실시기관의 시험 담당자에게 공급한다. 또한 시험 담당자와의 원활한 의사소통과 주기적인 모니터링을 통하여 필요한 시기에 적절한 수량을 공급할 수 있도록 한다. 시험식품 또는 대조식품으로 생산되는 제제는 각각 외형 및 성상이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않아야 하며, 중량 차이도 크지 않아야 한다.

인 체 적 용 시 험 용

1. 제품의 코드명 : SKE 100 또는 SKE 위캡슐
2. 제조번호 : LT415001P
3. 사용(유효)기한 또는 재검사일자 : 2017 년 6 월 29 일
4. 저장방법: 실온보관(1~30℃), 기밀용기
5. 제조업자: (주)생명의 나무
6. 인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없습니다.

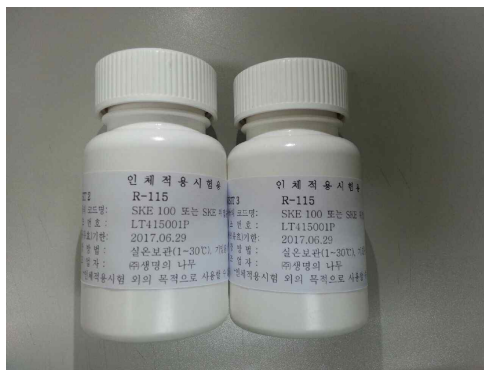


그림 34. 관절 건강 인체적용시험용 시제품

- 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 인체적용시험용 시제품 제작

위의 시험결과를 적용하여 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 인체적용시험을 위한 시제품을 제작하였음. 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피)과 관련하여

여 대상자 모집군이 3세부터 12세 미만의 어린이들을 대상으로 하고 인체적용시험에 대한 이해 및 복약 순응도를 고려하여 젤리로 섭취할 수 있도록 젤리제형으로 제작하였음.

시험군과 대조군에게 투여할 진약과 위약의 조성은 아래와 같다.

㉠ 시험식품

성상 및 제형 : 주황색 젤리(스틱젤리 : 망고맛)

함량 : 20g / 1스틱(노각나무 잎 추출물 100mg / 1스틱)

보관방법 : 상온

용법 및 용량 : 1회/일, 1스틱/회(노각나무 잎 추출물로서 100mg/day)

원재료 및 배합비율 :

원료명	함량(g)	비율(%)
노각나무잎추출물	0.10	0.50
결정과당	1.00	5.00
망고농축액	0.20	1.00
고과당	2.60	13.00
푸드 겔	0.32	1.60
구연산	0.11	0.55
알폰소망고향	0.24	1.20
정제수	15.43	77.15
합계	20	100

㉡ 대조식품

성상 및 제형 : 주황색 젤리(스틱젤리 : 망고맛)

함량 : 20g

보관방법 : 상온

용법 및 용량 : 1회/일, 1스틱/회

원재료 및 배합비율 :

원료명	함량(g)	비율(%)
결정과당	1.10	5.50
망고농축액	0.20	1.00
고과당	2.60	13.00
푸드 겔	0.32	1.60
구연산	0.11	0.55
알폰소망고향	0.24	1.20
정제수	15.43	77.15
합계	20	100



그림 35. 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 인체적용시험용 시제품

③ 관절 건강 관련 수출용 시제품 제작

협동과제에서 활성 평가를 통해 관절 건강에 효과가 있는 것으로 나타난 시제품1의 레시피를 참조하여 노각나무 추출물을 이용한 수출용 시제품을 제작하였음. 이 수출용 시제품을 중국, 베트남 등에 Sample로 전시회 등에 참석하였음.

㉠ 시제품 규격

용법 및 용량 : 1회/일, 2정/회, 1정 1000mg

원재료 및 배합비율 :

1차 원료	배합비율(%)	투입량(mg)
노각나무추출분말	20.0000	200.00
숫나무추출분말	20.0000	200.00
글루코사민	10.0000	100.00
히알루론산(95%)	0.0500	0.50
생선콜라겐(젤텍)	0.0500	0.50
해조분말(해조칼슘)	0.0500	0.50
결정셀룰로오스(102D)	43.3230	433.23
이산화규소	1.8000	18.00
스테아린산마그네슘	1.3000	13.00
[코팅]		-
HPMC	2.4000	24.00
글리세린지방산에스테르	0.2400	2.40
이산화티타늄	0.5200	5.20
치자황색600(#M4015)	0.1950	1.95
치자블루에스비(#M1637,치자청색소)	0.0715	0.72
과립주정		
코팅주정		
합계	100.000	1,000.00



④ 노각나무 추출물의 안정성 평가

㉠ 시험기준 : 안정성시험 (가속시험)

㉡ 시험조건 : 실온(25℃로 고정) 및 40℃. 단, 기울기를 확실히 하기 위해 4℃를 추가하여 3점으로 하고 1개월 간격으로 6개월 시험

㉢ 실험기간 : 2016. 8. 21 - 2017. 03. 12

㉣ 품질한계 : 노각나무 추출물의 안정성 실험을 위하여 분석을 실시한 항목은 정상, 대장균군, 중금속을 측정함.

㉔ 성상 및 수분

- 성상 : 관능검사를 통하여 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 분말을 확인
- 수분 : 10% 이하

㉕ 유해물질 기준

- 납, 총비소, 카드뮴, 총수은  
「식품공전」 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험에 따라 시험함.
- 대장균군  
「식품공전」 제10. 일반시험법 3.7 대장균군에 따라 시험함.

㉖ 실험결과

- 노각나무 추출물의 성상, 수분, 대장균군의 변화  
노각나무 추출물의 성상, 수분, 대장균군의 변화를 표 5, 6, 7에 나타내었으며 저장 기간 중 거의 변화가 없어 적합으로 판정되었음.

표 5. 성상

저장기간 저장온도	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월
4℃	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
25℃	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
40℃	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합

주) - 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 분말

표 6. 수분

저장기간 저장온도	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월
4℃	4.4	4.5	4.4	4.7	4.5	4.7	4.9
25℃	4.4	4.6	4.8	4.8	4.9	4.9	4.8
40℃	4.4	4.3	4.3	4.4	4.6	4.7	4.9

표 7. 대장균군

저장기간 저장온도	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월
4℃	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
25℃	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
40℃	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성

- 노각나무 추출물의 납, 총비소, 카드뮴, 총수은의 변화  
노각나무 추출물의 납, 총비소, 카드뮴, 총수은 변화를 표 8, 9, 10, 11에 나타내었으며 기준규격에 따라 적합범위로서 적합으로 판정됨.

표 8. 납(mg/kg)

저장온도 \ 저장기간	0개월	6개월
4℃	0.1304	0.1161
25℃		0.1209
40℃		0.1136

표 9. 총비소(mg/kg)

저장온도 \ 저장기간	0개월	6개월
4℃	0.2277	0.1619
25℃		0.1804
40℃		0.1933

표 10. 총수은(mg/kg)

저장온도 \ 저장기간	0개월	6개월
4℃	불검출	불검출
25℃		불검출
40℃		불검출

표 11. 카드뮴(mg/kg)

저장온도 \ 저장기간	0개월	6개월
4℃	0.0251	0.0231
25℃		0.0271
40℃		0.0268

라. 노각나무 추출물의 생리활성성분 분리 정제 및 노각나무 추출물의 기준규격 설정

(1) 시험방법(노각나무 잎의 생리활성성분 분석법 개발)

(가) HPLC를 이용한 분리된 물질의 순도 확인: 노각나무 잎으로부터 분리한 생리활성성분의 구조를 NMR 및 각종 기기분석 방법을 이용하여 구조 확인 후, 순도를 HPLC/ELSD 또는 HPLC/UV를 이용하여 확인

(나) HPLC와 LC/MS를 이용한 분석법 확립 및 validation

① HPLC condition: UV 조건에서 HPLC 동시정량 분석조건 (column, mobile phase, flow rate 및 gradient elution 조건 설정)확립, Photodiode array (DAD) 또는 ELSD를 활용한 gradient 조건에서의 동시정량 분석법 조건 확립, Gradient조건에서 baseline조건 확립

② LC/MS/MS condition: HPLC condition - Column, mobile phase, flow rate 및 gradient elution 조건 설정, Mass spectrometric parameter - Capillary voltage, cone voltage,

desolvation temperature, source temperature, desolvation gas flow, 및 collision energy(V) 등 조건 설정, 생리활성성분의 total ion chromatogram

(다) 분석법검증 (Validation) : 분석법 검증은 ICH 및 FDA Guideline에 따라 시행. Validation 자료는 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 감도 등을 포함하며 일내 (Intra-day) 와 일간(inter-day)으로 나누어 실시하며 각각 3회 이상 실시. 이하 validation 내용을 요약하면 다음과 같음

- ① 특이성 (Specificity): 검체처리 후 얻어진 크로마토그램이 기타 다른 성분들과 잘 분리되었는가를 나타냄
- ② 직선성 (Linearity): 농도는 2배, 1.5배, 1.0배, 0.5배, 0.1배, 0.01배, 0.001배 희석하여 직선성을 검토함(이때 R값은 0.995 이상이 되도록 함).
- ③ 정확성 (Accuracy): 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구함.
- ④ 정밀성 (Precision): 분석물질과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 분석물질과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구함. 하루에 3회 이상 시행하여 일내 정밀성을 구하고, 3일이상 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성 (%RSD)을 구함.
- ⑤ 회수실험(recovery):분리정제된 standard물질의 면적값을 기준으로 각물질들의 회수율을 구함.
- ⑥ 검출한계 (Detection Limit): 크로마토그램상에서 신호대 잡음비 (S/N ratio)를 3 으로 하고 검출은 가능하지만 정량은 불가능한(정밀성이 20% 이상) 가장 작은 농도를 산출함.
- ⑦ 정량한계 (limit of Quantification): 크로마토그램상에서 신호대 잡음비 (S/N ratio)를 10 으로 하고 정밀성이 20% 이하이고, 정확성이 80-120 %인 조건을 만족하는 농도로 구함.
- ⑧ 완건성 (Robustness): 완건성은 분석법을 개발하는 단계에서 수행하며, 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가한다. 측정값이 분석조건 변경에 따라 영향을 받기 쉬운 경우라면, 분석조건을 적절히 조정하거나 분석법 중에 사전 조심 문구를 포함. 완건성을 평가함에 따라 시스템적합성에 관한 일련의 파라미터를 확립할 수 있음

(라) 모니터링 분석 : 다양한 조건하(시기별, 지역별)에서 준비된 시료를 이용하여 개발된 노각나무 잎의 생리활성성분 분석법에 의해 활성성분의 모니터링을 수행하여 함량 기준 설정함

## (2) 연구 결과

(가) 노각나무 추출물의 spinasterol glucoside 분석



노각나무 추출물의 선행연구결과를 통하여 활성물질로 평가된 spinasterol glucoside를 본 과제를 통하여 대량생산한 노각나무 추출물과 추출물의 유기용매 분획에서 LC-MS를 사용하여 분석하였음.

Spinasterol glucoside를 LC-MS를 사용하여 분석한 결과 26.37 min.에서 peak가 나타나고 분자량은 619.41로 분석되었고, 본 과제를 통하여 생산된 노각나무 추출물에서도 확인되었으며, 특히 Hexane분획에서 확인되었음.

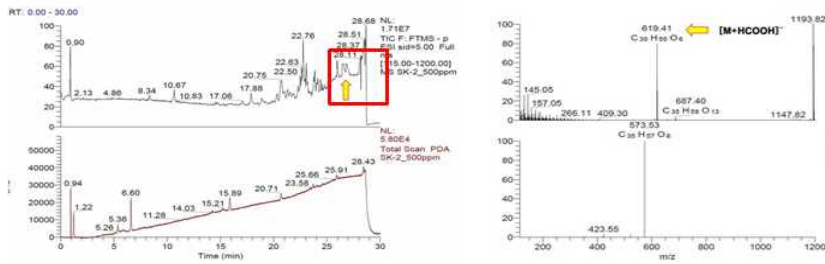


그림 37. spinasterol glucoside STD LS-MS Chromatogram

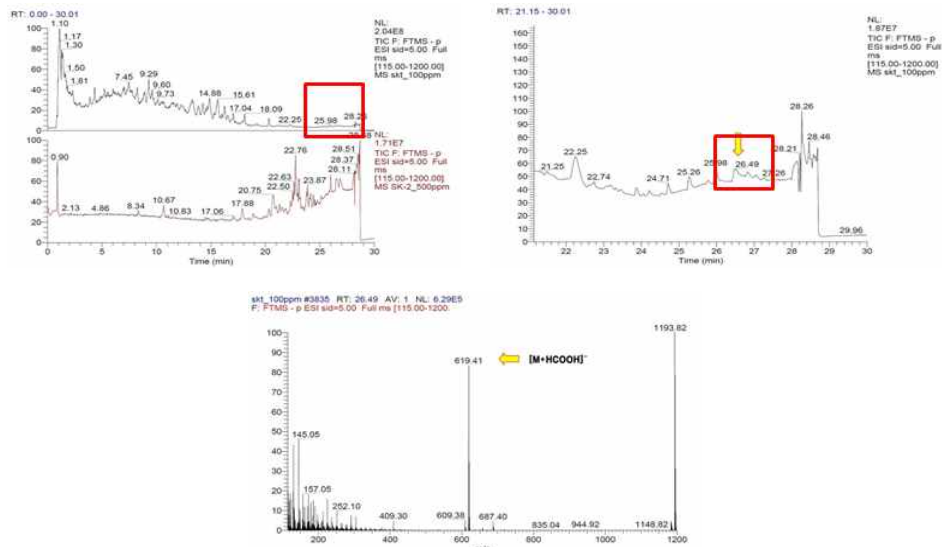


그림 38. 노각나무 잎 추출물의 LS-MS Chromatogram

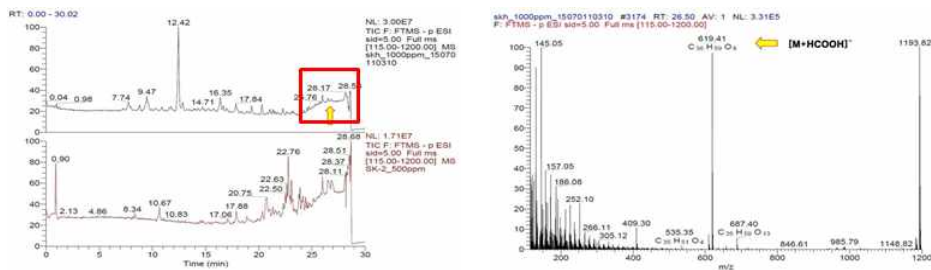


그림 39. 노각나무 잎 추출물 Hexane분획의 LS-MS Chromatogram

(나) 인체적용시험용 시제품의 지표성분 설정 및 분석

Spinasterol glucoside이 노각나무 추출물에서 분석되었으나, 상용화 된 표준품을 구하기 어려워 일반적인 지표성분으로 사용할 수 없어, 본 과제를 통하여 분리된 물질 중 인체적용 시험용 시제품의 지표성분으로 사용하기 위하여 노각나무 추출물의 분리된 단일화합물에 대한 지표성분 적합을 위한 실험을 진행하여 Quercetin, Quercitrin, Rutin, (+)-catechin 등을 지정하여 분석하였음.

① 노각나무 추출물의 제형별 지표성분 분석

노각나무 추출물을 이용한 캡슐, 정제, 액상 등 제형별 지표성분 후보군인 Rutin, Quercetin, Quercitrin, (+)Catechin에 대한 평가결과 제형에 따른 지표성분 후보군의 분석은 큰 영향을 미치지 않음을 나타내었음.

표 12. 지표성분후보군 함량

지표물질	Quercetin	Quercitrin	Rutin	(+)-catechin
함량	2.6%	11.3%	7.4%	3.1%

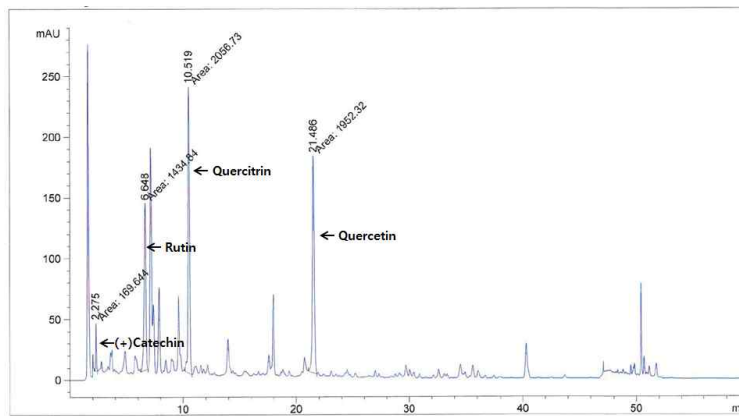


그림 40. 지표성분 분석 HPLC Chromatogram

표 13. 노각나무 추출물의 제형별 지표성분 후보군 함량변화(%)

	노각나무추출물	캡슐	정제	액상
Rutin	100	95	91	90
Quercetin	100	98	93	89
Quercitrin	100	99	90	87
(+)Catechin	100	94	92	95

② 분석법 개발(고속액체크로마토그래피에 의한 정성 및 정량)

- 시험용액의 조제

㉠ 시료에 따라 분말은 25g 을 취하여 비커를 이용하여 무게 정량

㉡ 용매(water) 50ml 비커에 넣고 교반기를 이용하여 시료를 녹임

㉢ 추출플라스크에 조심히 붓고 용매 50ml 이용하여 비커에 남은 잔사를 추출용기에

씻어 넣음

㉞ 환류추출 - 100°C, 3hr

㉟ 추출이 끝난 시료를 식힌 후 원심분리(4000rpm, 10min)

㊱ 추출액을 ethyl acetate 이용하여 분획(water 300ml, ethyl acetate 500ml 사용, 30분 간격으로 2시간 동안 교반)

㊲ 12시간 후 ethyl acetate층 분리하여 증발건조시키고 MeOH 10ml에 녹여 2ml 취하여 기기 분석

- 표준용액의 조제

㉿ Quercetin 표준품을 정밀히 취하여 메탄올 이용하여 5~40 $\mu$ g/ml의 농도로 조제하여 사용

- 측정조건

㊳ 검출기 : 자외부 검출기(UV)

㊴ 측정파장 : 355nm

㊵ 컬럼 : Tosoh ODS(4.5 × 250mm) 또는 이와 동등한 것

㊶ 이동상 : A : 2% 초산 - 45% 아세트나이트릴

B : 2% 초산 - 증류수

㊷ gradient : 0분 : 50% A용액

18분 : 100% A용액

20분 : 50% A용액

22분 : 50% A용액

㊸ 유속 : 1.0 ml/분

- 검량선의 작성

각 농도로 조제된 퀘르세틴 표준용액 20 $\mu$ l를 상기의 조건에 따라 고속액체크로마토그래피에 주입하여 얻어진 피크의 면적으로부터 검량선을 작성함.

- 정량

얻어진 시험용액 피크의 머무름시간과 루틴 표준용액의 머무름시간을 비교해서 정성 분석을 실시하고 얻어진 검량선과 비교하여 검체 중 루틴의 함량을 산출함.

③ 인체적용시험용 시제품 지표성분 설정

노각나무 추출물을 이용한 인체적용시험용 시제품 지표성분을 관절 건강과 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 두가지 기능성 평가를 위한 시제품의 지표성분은 Quercetin으로 설정하였음.

- 기준 규격 설정

관절 건강 관련 노각나무 잎 주정추출물(SKE)은 Quercetin으로 480 $\mu$ g/g ~ 720 $\mu$ g/g, 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 관련 노각나무 잎 열수추출물(SKW)은 Quercetin으로 120 $\mu$ g/g ~ 180 $\mu$ g/g으로 기준규격을 설정하였음.

마. 노각나무 추출물 및 기능성 성분의 장단기 제품적용성 평가

(1) 실험방법

(가) 기질류 대비 제조된 개발 노각나무 추출물 및 기능성 소재류의 반응성 평가

(나) 내열성(80℃, 30분, 1회), 내산성 및 내염기성 평가(정제수 대비 pH2, 6.7 및 10 기준)

- 분자량 감소 및 구조 변화 등 평가

(다) 연계하여, 기질 대비 첨가량을 다르게 각각 제조한 후 시료별 대상으로 안전성 평가 실시

(라) 제품적용성 평가

- ① 노각나무 추출물 시료에 대하여 우선 지표성분 및 기능성 성분의 최초 함유량을 측정함.
- ② 내열성 평가: 시유 및 음료 50g 대비 동결건조분말 1g비율로 혼합조건에서, 열처리 전후(70~90℃, 30분, 1회)의 물성(내열성/물리/이화학적 변화)변화를 확인함으로써 제품적용성을 확인
- ③ 내산성 및 내염기성 평가 : 시유 대신 생리식염수를 기준으로 pH를 1~12까지 농도구배를 부여한 후 역시 동일량의 노각나무 추출물을 첨가한 후, 이를 분리하여 상온, 냉장, 가혹(35℃)에서 각각 보관한 후 최대 30일 동안 지표성분 및 기능성 성분별 변화량을 측정함.
- ④ 장기보관 안정성 평가 : 준비된 멸균유 및 음료 50g 대비 동결건조분말 1g비율로 혼합하는 조건에서 제조 후 이를 냉장, 상온 및 가혹(35℃)조건으로 보관 후 일정 경과별(최대 30일) 물성(내열성/물리/이화학적 변화)변화를 확인함으로써 장단기 제품적용성을 확인함.

(2) 연구 결과

(가) 제품적용성 평가

① 내산성 및 내염기성 평가

유기산(0.01~1%), 산(HCl 0.01~1N), 알칼리(NaOH 0.01~1N)의 용액에 노각나무 추출물을 첨가한 후, 이를 상온, 냉장, 가혹(40℃)에서 각각 보관한 후 최대 30일 동안 지표성분 후보군별 변화량을 측정한 결과 산은(HCl 0.1N)과 알칼리(NaOH 1N)이상에서 영향을 받았음.

표 14. 지표성분 후보군의 내산성 및 내염기성 평가

지표물질 후보군	대조군	유기산(30일)			강산(HCl : 30일)			강알칼리(NaOH : 30일)		
		0.01%	0.1%	1%	0.01N	0.1N	1N	0.01N	0.1N	1N
Quercetin	100	98	103	105	95	90	50	101	90	67
Quercitrin	100	105	92	99	98	91	45	100	91	63
Rutin	100	99	97	102	99	95	61	99	93	50
(+)-catechin	100	102	108	100	94	91	52	97	89	58

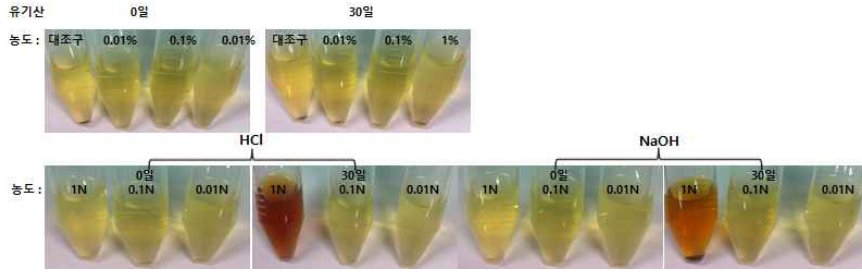


그림 41. 노각나무 추출물의 내산성 및 내염기성 평가

② 장기보관 안정성 평가

준비된 노각나무추출물을 물 50g에 1g비율로 혼합하는 조건에서 제조 후 이를 냉장, 상온 및 가혹(40℃)조건으로 보관 후 일정경과별(최대 6개월) 물성(물리/이화학적 변화)변화를 확인함으로써 장단기 제품적용성을 확인한 결과 안정한 것으로 나타남.

표 15. 지표물질 후보군의 장기보관 안정성 평가(%)

지표물질 후보군	대조군	4℃			25℃			40℃		
		1개월	3개월	6개월	1개월	3개월	6개월	1개월	3개월	6개월
Quercetin	100	95	94	92	96	93	90	101	90	87
Quercitrin	100	96	93	94	97	92	89	100	91	83
Rutin	100	94	95	90	98	90	90	99	93	90
(+)-catechin	100	95	96	92	95	91	92	97	89	88

③ 상용 제품에 대한 적용성 평가

노각나무 추출물 및 기능성 성분의 기능기가 외부물질(단백질, 지방, 탄수화물 등)과의 반응성이 있는지를 상용제품(멸균우유, 발효유, 음료 등)에 대해 적용 실험에서 노각나무 추출물 내 지표성분 후보군인 Rutin, Quercetin, Quercitrin, (+)Catechin에 대한 평가결과 10일 경과시 냉장보관 중인 우유 및 발효유 시험구에서 침전물이 생기나 지표물질 함량에는 영향을 주지 않으며, 3개월까지 오차범위 20% 이내로 분석되어 안정한 것으로 나옴.

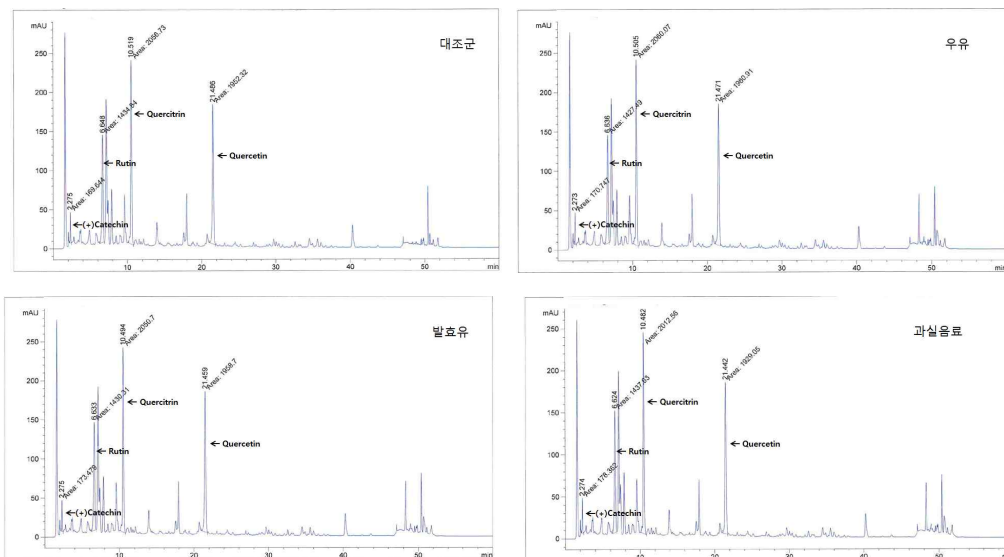


그림 42. 상용 제품에 대한 적용성 평가 HPLC Chromatogram

바. 노각나무 보급을 위한 양묘 및 종묘 연구

- 양묘 및 종묘 보급을 위한 농민, 영농조합 등과의 협력을 진행하여 왔으며, 국립산림과학원, 전남산림자원연구소와 함께 노각나무 보급을 위한 협의를 진행함.



그림 43. 노각나무 모종

- 노각나무 수급과 보급을 위하여 노각나무 묘목을 충북 영동에 1,000주를 심어 노각나무의 보급을 준비 중에 있음.



그림 44. 노각나무 묘목

사. 노각나무 추출물의 단회투여 독성 실험

노각나무는 가지, 잎, 수액을 식품으로 사용할 수 있는 원료로 안전성 평가를 하지 않아도 되지만 인체적용시험을 위하여 노각나무 잎 추출물을 설치류 단회투여 독성 실험을 수행하였음.

(1) 시험물질 및 대조물질

(가) 시험물질

- ① 명칭 : 노각나무 잎 추출분말(SKBE)
- ② 기원 : 노각나무
- ③ Lot 번호 : 150103-1
- ④ 입수량 : 500g
- ⑤ 입수일 : 2015. 01. 07
- ⑥ 외관 및 색상 : 황갈색 ~ 갈색 분말
- ⑦ 보관조건 : 냉장보관
- ⑧ 제조원 : 생명의나무

(나) 대조물질

- ① 명칭 : 멸균증류수
- ② 제조(로트)번호 : KAI2014
- ③ 입수일 : 2014. 11. 26
- ④ 입수량 : 1L
- ⑤ 외관 및 성상 : 무색 액체
- ⑥ 등급 : 일반의약품
- ⑦ 보관조건 : 실온
- ⑧ 제조원 : (주)중외제약

(2) 재료 및 방법

(가) 시험계

① 종 및 계통

SD(Sprague-Dawley) 계통의 특정병원균 부재(SPF) 랫드

② 공급원

(주) 오리엔트 바이오

주소 : 경기도 성남시 중원구 갈마치로 322

③ 시험계의 선택이유

본 시험에 사용하는 랫드는 크기가 작고, 다루기가 쉬우며, 계절변동이 적은 장점이 있는 동시에 스트레스에 덜 민감하면서 병에 대한 저항력이 강함. 또한 공급체제가 확립되어 있으며, 약물에 대한 반응이 일정하여 암수에 따른 성별 반응차이가 거의 없다. 그리고 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어서, 사람에의 외삽(extrapolation)이 가능하므로 일반독성시험에 널리 사용되고 있음.

④ 주령 및 체중범위

입수시 주령 : 암수 각 7주령

입수시 동물수 : 암컷 13마리, 수컷 13마리

입수시 체중 : 암컷 162.0 ~ 174.2 g

수컷 205.5 ~ 217.1 g

투여개시시 주령 : 암수 각 8주령

투여개시시 동물수 : 암수 각 10마리

투여개시시 체중 : 암컷 169.8 ~ 182.5 g

수컷 233.0 ~ 245.6 g

⑤ 검역 및 순화

동물 입수시 입수동물에 대한 검수검역을 실시하였으며, 동물의 순화는 입수 후 7일간 시험을 실시하는 동물실에서 실시하였음. 동물공급업체에서 제공한 시험계의 병원체검

사 성적서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었음. 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 투여일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였음.

(나) 사육환경

- ① 동물실 번호 : 생명의나무 동물실 1
- ② 온습도 범위 : 온도 23 ± 3℃, 상대습도 50 ± 20%
- ③ 명 암 cycle : 형광등조명 12hr (08:00 점등~20:00 소등)
- ④ 조 도 : 150 ~ 300 Lux
- ⑤ 환 기 횟 수 : 10~20 회/시간
- ⑥ 소 음 : 60dB 이하
- ⑦ 암모니아농도 : 20ppm 이하
- ⑧ 사육상자의 종류(크기)

순화, 투여 및 관찰기간 중 Polysulfone 사육상자 (260W×420L×150H mm)에 수용하였다. 절식 기간에는 대사케이지(260W×420L×150H mm)에 수용하였음.

- ⑨ 사육상자 당 동물수 : 검역 · 순화 및 관찰기간 2~3마리
- ⑩ 사육기자재 교환

사육상자 및 급수병은 주 1회 교환하였으며, 모든 사육기자재는 고압증기멸균기(K-1, 121℃ · 20분)로 멸균하여 사용하였음.

(다) 사료

- ① 종 류 : 실험동물용 고품사료(방사선 멸균사료)
- ② 제품명 : 로텐트 NIH-31
- ③ 공급원 : Zeigler Bros., Inc. (USA)
- ④ 급여법 : 급이기에 넣어 자유섭취 시켰음.

(라) 물

- ① 종 류 : 음용 수도수
- ② 급수방법

본 센터의 수돗물을 자외선유수살균기로 여과 후 사용하였음. 동물에게 공급은 급수병을 통해 자유섭취 시켰음.

(마) 시험군의 구성과 투여량

- ① 시험군의 구성

군	성별	동물수(마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg/1회)	투여량 (mg/kg/1회)
G1	Male	5	1101~1105	10	0
	Female	5	2101~2105	10	0
G2	Male	5	1201~1205	10	2,500
	Female	5	2201~2205	10	2,500

G1: Vehicle control, G2: 2,500 mg/kg



② 투여량 설정

본 시험물질은 건강기능식품 등록을 목적으로 개발되었으며, 물질의 특성상 높은 안전성용량이 예상되어 2,500 mg/kg을 최고 용량으로 설정하였음. 본시험에서는 투여 최고용량인 2,500 mg/kg을 시험물질 투여군으로 하고 멸균증류수를 투여하는 음성대조군을 두었으며, 투여 횟수는 1회/1일로 하였음.

(바) 군분리 방법

입수한 모든 동물 중 군분리일에 측정한 평균체중에 가장 가까운 암수 각 10마리를 선택하였음. 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2군, 군당 5마리로 군분리 하였음.

(사) 잔여동물 처리

잔여동물은 군분리 후 안락사 시켰음.

(아) 시험물질의 조제

본 시험물질은 시험물질 투여 전 1시간 이내에 준비하였으며, 본 시험물질은 순도에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였음. 시험물질을 칭량한 후 부형제에 현탁하여 투여에 사용하였음.

(자) 투여 시간 및 방법

투여일 오전 11:00 이전에 투여가 이루어졌으며, 경배부 피부를 고정하고 금속제 경구 투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였음.

(차) 관찰 및 검사항목

① 일반증상관찰

투여 당일은 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째 관찰하였으며, 익일부터 부검일 까지 1일 1회 일반증상을 관찰하였음.

② 체중측정

체중측정은 입수시, 군분리시(투여전), 투여후 1, 3, 7 및 14일에 측정하였음.

③ 부검소견

시험물질 투여 후 14일째 되는 날 전체 동물에 대해 체중을 측정하고 마취 하에 개복하여 복대동맥 및 정맥을 절단하여 방혈치사 시킨 후 부검을 실시하였음. 육안적으로 모든 내부장기의 이상 유무를 관찰하여 그 소견을 기록하였음.

(카) 통계학적 방법

SPSS 14.0K를 이용하여 일원배치분산분석(ANOVA test)을 통해 시험군의 독성지표를 대조군과 비교하였다.

(3) 결 과

(가) 사망동물 및 최소치사량 (표 16 ~ 17)

전 시험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았음. 따라서 본 시험에서 랫드의 최소치사량은 2,500 mg/kg을 상회하는 것으로 관찰되었음.

표 16. Mortality in male rats after single oral administration of SKBE.

Dose (mg/kg)	No. dead/No. dosed	Days after dosing									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9~14
0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ALD value : > 2,500 mg/kg

표 17. Mortality in female rats after single oral administration of SKBE.

Dose (mg/kg)	No. dead/No. dosed	Days after dosing									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9~14
0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ALD value : > 2,500 mg/kg

(나) 일반증상

전 시험기간 동안 모든 군에서 아무런 증상이 관찰되지 않았음.

(다) 체중

시험 전체 기간을 통해 체중변화(body weight changes) 및 증체량(weight gains)을 관찰한 결과 수컷 대조군과 시험군은 각각  $103.5 \pm 4.32$  g과  $97.5 \pm 17.34$  g의 증체량을 보였으며, 대조군에 비해 유의한 차이가 없었음( $p > 0.05$ ). 그리고 암컷 대조군과 시험군은 각각  $41.6 \pm 9.58$  g 및  $45.2 \pm 6.49$  g 으로 군간 증체량에 있어서 유의한 차이가 없었음( $p > 0.05$ ).

(라) 부검소견

관찰기관 동안 살아남은 동물에 대한 계획부검 시 이상소견은 관찰되지 않았음.

(4) 고찰 및 결론

본 시험물질인 노각나무잎 추출분말의 독성을 조사하기 위해 Sprague-Dawley 계 랫드 암수 각각에 0 및 2,500 mg/kg 용량으로 단회 경구 투여한 후 독성지표인 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였음. 관찰기간동안 사망동물은 없었으며, 일반증상에서 관찰기간동안 이상증상은 관찰되지 않았음. 관찰기간 동안 체중변화(body weight changes) 및 증체량(weight gains)을 관찰한 결과 대조군과 비교하여 군간 증체량에 있어서 유의한 차이가 없었음. 사망 동물도 없었으며, 증상관찰 및 부검소견 또한 특이증상이 관찰되지 않았으므로, 본 단회경구투여 독성시험에서 시험물질의 랫드에 대한 개략치사량(ALD)은 한계량인 2,000 mg/kg 보다 높은 2,500 mg/kg을 상회하는 것으로 추정됨.

아. 자생식물(노각나무) 추출물의 골관절염 개선 약리 활성 및 기전 연구

본 연구는 관절 활액 세포(FLS)에서 과발현된 염증성 세포 부착 분자, 염증성 케모카인 및 사이토카인의 영향으로 나타나는 질환인 류마티스 관절염 질환을 대상으로 노각나무 잎 추출물을 활용한 식품 및 개별인정 기능성 소재의 생리 활성 작용 기전을 규명하고 더 나아가 관절염 동물 모델(류마티스/퇴행성)에서 노각나무 추출물 및 분리된 활성물질의 활성을 검증하여 새로운 기능성 식품 소재를 제공하는 것을 최종 목표로 함.

(1) 노각나무 추출물로부터 분리한 단일물질 16종에 대한 산화질소 생성 저해 활성 및 세포독성 분석

주관기관인 (주)생명의 나무에서 노각나무 추출물로부터 분리한 16종의 단일 화합물질을 전달받았으며, 이 16종의 단일물질을 대상으로 세포독성 정도를 확인하고, 염증 반응에 주요하게 관여하는 산화질소의 생성 저해 활성을 확인하였음. 산화질소의 생성 저해와 세포독성의 확인에는 마우스의 대표적 면역세포인 RAW264.7 대식세포를 활용하였으며, 염증 반응 유발 물질로는 널리 알려진 Lipopolysaccharide (LPS)를 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 사용하였음. 산화질소의 생성 저해 분석에는 세포 배양액의 산화질소(NO)양을 측정하는 Griess assay 방법을 사용하였으며, 먼저 16종의 단일물질의 무게를 기준으로 DMSO에 녹여 고농도의 시료를 준비하고, 96-well cell culture plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 RAW264.7 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 LPS 단독 또는 LPS와 각 시료를 처리농도별로 녹여 각 well 당 200  $\mu\text{L}$ 씩 24시간 동안 처리하였음. 24시간 후 각 well에서 100  $\mu\text{L}$ 씩 취하여 새로운 96-well plate에 옮긴 후 Griess reagent를 동량 첨가한 후, 잘 섞어준 다음 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 산화질소의 생성량을 확인하였음.

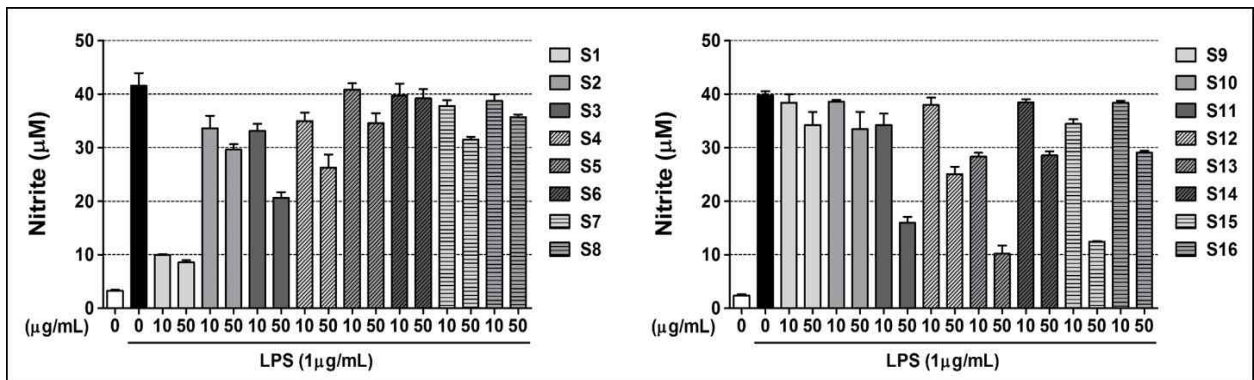


그림 45. 노각나무 추출물로부터 분리한 단일물질 16종의 산화질소 생성 저해 활성 비교

세포독성의 분석에는 대표적인 독성 분석법인 MTT assay 방법을 활용하여 검증하였으며, 96-well cell culture plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 RAW264.7 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 각 시료를 처리농도별로 녹여 각 well 당 100  $\mu\text{L}$ 씩 24시간 동안 처리하였음. 24시간 후 각 well에서 5  $\text{mg}/\text{mL}$ 로 준비된

MTT 용액을 20  $\mu\text{L}$ 씩 첨가한 후, 보라색 결정이 육안으로 확인 될 정도로 5%  $\text{CO}_2$ 가 제공 되는 37 $^\circ\text{C}$  배양기에서 배양한 뒤, 모든 용액을 제거하고 각 well에 DMSO 100  $\mu\text{L}$ 씩을 첨가 하여 녹여준 다음 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였음. 측정된 흡광도를 바탕으로 control well을 100%로 하여 각 시료들의 세포독성을 확인하였음.

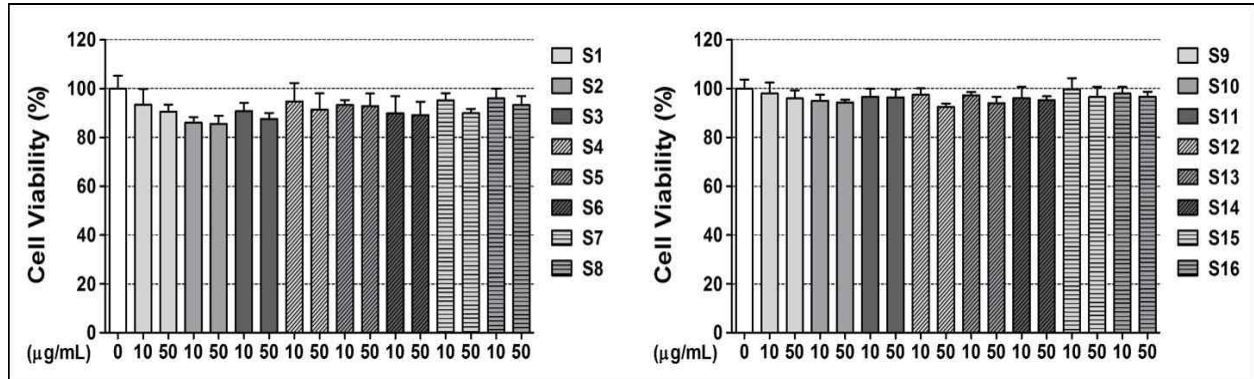


그림 46. 노각나무 추출물로부터 분리한 단일물질 16종의 세포독성 분석

두 가지 실험의 결과를 다음 표 16에 정리하였음. 노각나무 추출물로부터 분리한 16종의 단일물질 중 처리된 농도에서 특별히 세포독성을 나타내는 물질은 없었으며, 산화질소 생성 저해 활성은 이미 알려진 화합물로는 퀘르세틴이 가장 우수한 저해 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었음. 또한, 아직 화합물의 구조가 정확하게 밝혀지지 않은 물질 중에서는 11번과 15번 화합물의 산화질소 생성 저해 활성이 각각 59.8%, 68.6%로 뛰어난 저해 활성을 나타냄을 확인할 수 있었음.

표 18. 노각나무 추출물에서 분리된 단일물질에 대한 세포독성 및 산화질소 생성 저해 활성 결과

NO.	Name	Compound Name (MW)	Solvent	Cell Viability (%)	NO Inhibition (%)
S1	SKE-A	Quercetin	DMSO	91	76.2 (at 10 $\mu\text{g/mL}$ )
S2	SKE-B	Gallic acid	EtOH	86	28.7 (at 50 $\mu\text{g/mL}$ )
S3	SKE-E	Protocatechuic acid	DMSO	88	50.4 (이하 동일)
S4	SKE-F	Quercetin 3-O-(6''-O-galloyl)- $\beta$ -galactopyranoside	DMSO	91	36.8
S5	SKE-I	Astragalin	DMSO	93	16.8
S6	SKE-L	3-hydroxybenzoic acid	DMSO	89	5.7
S7	SKE-M	4-hydroxybenzoic acid	DMSO	90	24.2
S8	SKE-N	-	DMSO	93	14.0
S9	SKR-1	Rutin	DMSO	96	13.9
S10	SKD-1	-	DMSO	94	15.8
S11	SKD-2	-	DMSO	96	59.8
S12	SKD-3	2-furoic acid	DMSO	92	36.9
S13	SKD-4	7,8-Dihydroxy-6-methoxy coumarin	DMSO	94	74.5
S14	SKD-5	-	DMSO	95	28.2
S15	SKD-6	-	DMSO	97	68.6
S16	SKD-7	-	DMSO	97	26.9

다음 그림 47에서는 마우스 면역세포를 대상으로 산화질소 생성 저해 활성이 뛰어난 5종의 단일물질을 따로 정리하였음. 이 결과는 노각나무 추출물로부터 분리한 활성 단일물질에 대한 정보를 제공하는 결과이며, 지표 성분의 결정에 도움이 될 수 있음을 의미함. 또한, 11번과 15번 활성 단일물질의 구조를 확인한 뒤 신규물질로 판명된다면, 또 다른 새로운 연구의 근거가 될 수 있는 결과임.

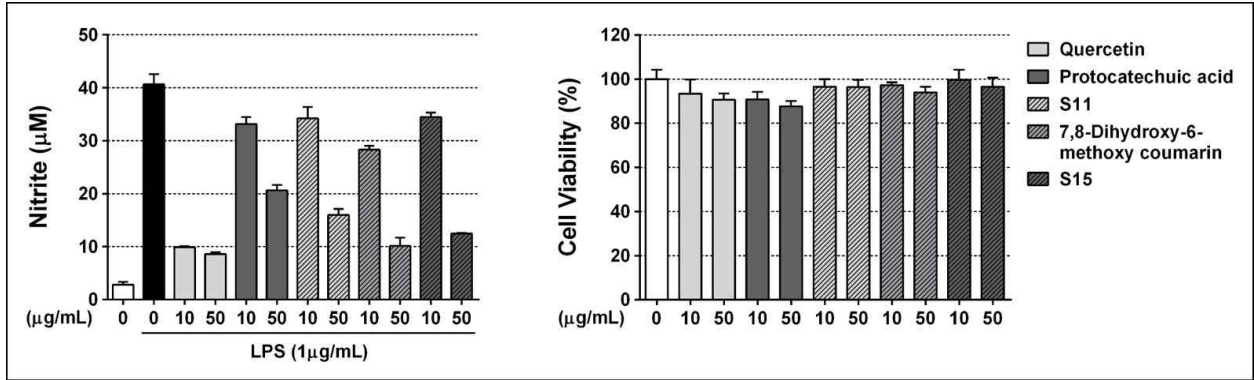


그림 47. 산화질소 생성 저해 활성이 뛰어난 5종의 단일물질 및 세포독성 분석

(2) 노각나무 잎 제품화 추출물의 산화질소 생성 저해 활성 및 세포독성 분석

제품화가 가능한 추출 방법에 따라 노각나무 잎으로부터 전체 추출물을 추출한 다음 산화질소 생성 저해 활성 및 세포독성을 확인하였음(그림 48). 그 결과 제품화가 가능한 방법으로 추출한 노각나무 잎 추출물은 1000 µg/mL의 농도에서도 마우스 RAW264.7 대식세포에 전혀 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었으며 고농도의 처리에도 매우 안전하다는 것을 확인할 수 있었음. 또한, 1 µg/mL의 LPS가 유도하는 산화질소의 생성을 노각나무 잎 추출물의 농도에 의존적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었으며, 50%의 저해 효율을 나타내는 IC<sub>50</sub> 값을 산정해 보았을 때 76.60 ± 1.05 µg/mL로 매우 효과적으로 저해함을 확인할 수 있었음. 이러한 결과는 기존의 선행 연구 결과와 상당히 유사한 양상을 나타내는 것을 확인할 수 있었음. 산화질소 생성저해 활성은 Griess assay 방법으로 분석하였으며, 세포독성은 MTT assay 방법으로 분석하였음. 제품화가 가능한 노각나무 추출물은 DMSO에 녹여 준비하였으며, 각 96-well plate를 사용하였음. 또한 IC<sub>50</sub> 값의 결정은 분석 프로그램인 Graphpad PRISM을 사용하여 결정하였음.

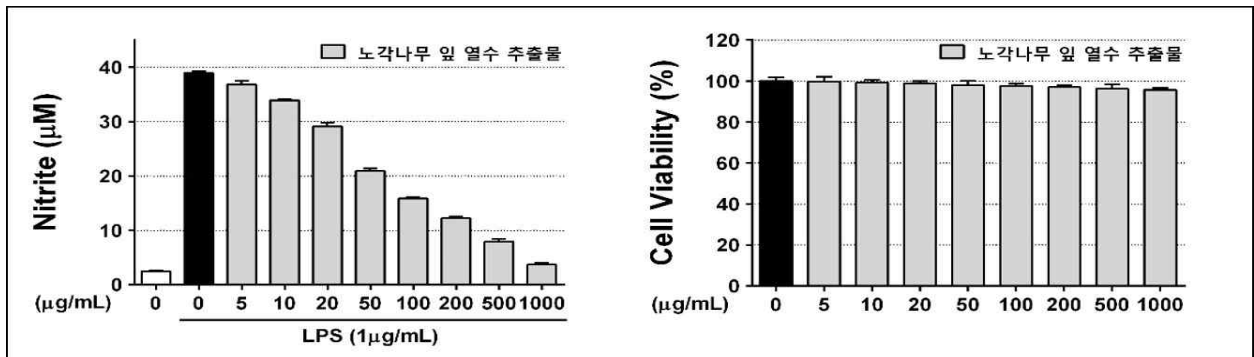


그림 48. 제품화 가능 추출 방식에 따른 노각나무 잎 추출물의 산화질소 생성 저해 활성 및 세포독성 분석

제품화가 가능한 노각나무 잎 추출물을 SKBE로 약칭하기로 하였으며, SKBE가 마우스 편염세포인 RAW264.7 세포에서 나타내는 산화질소 생성 저해 활성의 기전을 분석하기 위하여 산화질소 생성 유도 효소(iNOS)의 발현을 단백질 수준에서 확인하기 위하여 western-blot 방법을 활용하여 분석하였음. 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 RAW264.7 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 LPS 단독 또는 LPS와 SKBE를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 2mL씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후 각 well에서 용액을 제거하고 PBS로 씻어준 뒤, RIPA buffer를 사용하여 단백질을 회수하였음. 회수된 단백질의 농도를 bradford 용액을 사용하여 정량하고 동일한 단백질의 양을 사용하여 western-blot을 진행하였음. 그 결과 다음 그림 49에서 보는 바와 같이 1  $\mu$ g/mL의 LPS에 의해 유도되는 iNOS의 발현을 SKBE가 농도에 의존적으로 강력하게 저해하는 것을 확인할 수 있었으며 이는 하우스키핑 유전자인  $\beta$ -Actin과의 발현을 비교해 보았을 때, SKBE에 의한 iNOS 발현 저해 활성이 뛰어난 것을 확인할 수 있는 결과임.

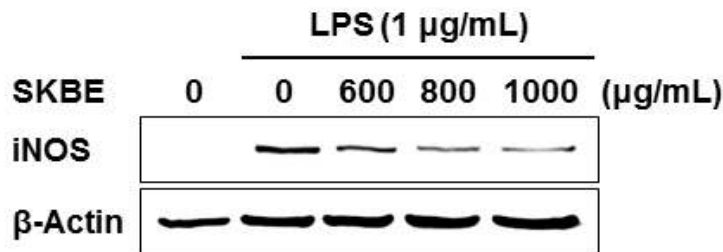


그림 49. SKBE에 의한 iNOS 발현 저해 활성 분석

### (3) 관절 활액세포(FLS)에서 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향 분석

관절 활액세포(FLS)에서 과발현된 염증성 케모카인 및 사이토카인의 영향으로 나타나는 질환인 류마티스 관절염을 대상으로 제품화가 가능한 노각나무 잎 추출물(SKBE)을 활용한 식품 및 개별인정형 기능성 소재의 생리 활성 작용 기전을 규명하고자 함. 또한, SKBE의 관절염 관련 염증 인자의 저해 활성을 검증하여 새로운 기능성 식품 소재를 제공하는 것을 최종 목표로, 관절 활액세포(FLS)를 이용하여 염증성 케모카인 및 사이토카인의 발현에 SKBE가 미치는 영향을 분석하고자 함. 먼저 SKBE를 단독으로 FLS에 농도별로 처리하여 세포독성을 MTT assay 방법으로 분석한 결과 1000  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여도 세포독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었음(그림 50). 96-well cell culture plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 FLS 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 SKBE를 처리농도별로 녹여 각 well 당 100  $\mu$ L씩 24시간 동안 처리하였음. 24시간 후 각 well에서 5mg/mL로 준비된 MTT 용액을 20  $\mu$ L씩 첨가한 후, 보라색 결정이 육안으로 확인될 정도로 5% CO<sub>2</sub>가 제공되는 37°C 배양기에서 배양한 뒤, 모든 용액을 제거하고 각 well에 DMSO 100  $\mu$ L씩을 첨가하여 녹여준 다음 570nm의 파장에서 흡광도를 측정하였음. 측정된 흡광도를 바탕으로 control well을 100%로 하여 각 시료들의 세포독성을 확인하였음.

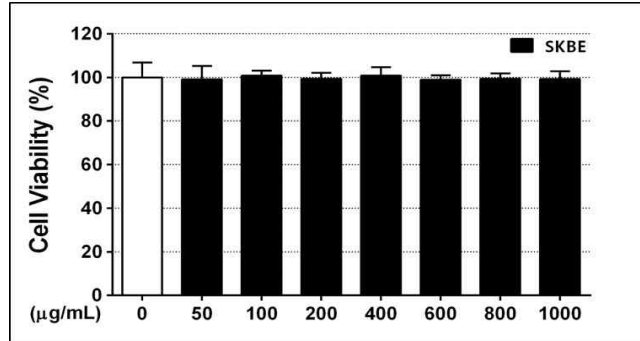


그림 50. 관절 활액세포(FLS)에 대한 SKBE의 세포독성 분석

다음으로 *in vitro* 상에서 관절염 환경을 조성하기 위하여 FLS에 염증 유도 물질을 처리한 후 SKBE의 염증성 사이토카인 유전자 및 단백질 발현 저해 활성을 분석하였음. 염증 유도 물질로는 널리 사용되고 있는 Tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 를 사용하였으며, 사전 실험 결과 FLS에서는 TNF- $\alpha$ 를 1ng/mL로 6시간 이상 처리하면 관절염에 관련된 사이토카인들의 발현이 증가함을 확인하였음.

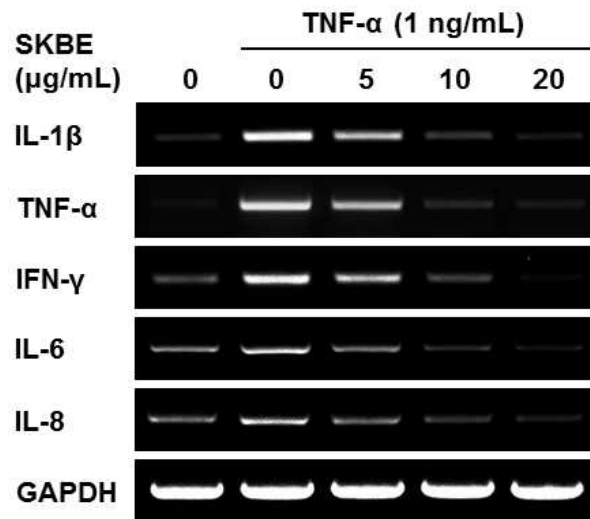


그림 51. FLS에서 SKBE에 의한 염증성 사이토카인 유전자 발현 저해 활성 분석

대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , Interleukin(IL)-1 $\beta$ , Interferon(IFN)- $\gamma$  등의 유전자 발현 정도를 측정하기 위하여 Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법을 사용하여 분석하였으며(그림 51), 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 FLS 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$  단독 또는 TNF- $\alpha$ 와 SKBE를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 2 mL씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후 각 well에서 용액을 제거하고 RNA-Bee 용액을 사용하여 RNA를 분리하였음. 분리한 RNA의 농도를 측정하고 5  $\mu$ g의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA를 사용하여 각 target gene에 따른 primer를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 10% agarose gel을 사용하여 전기영동 후 결과를 이미지화하였음.



염증성 사이토카인의 단백질을 정량하기 위하여 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 FLS 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$  단독 또는 TNF- $\alpha$ 와 SKBE를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 600  $\mu$ L 씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후, 각 well에서 배양액만을 회수하여 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 활용하여, kit에서 제공하는 실험방법에 따라 분비된 염증성 사이토카인의 양을 정량하였으며(그림 52), 여러 종류의 염증성 사이토카인들을 대상으로 profiling 하였음.

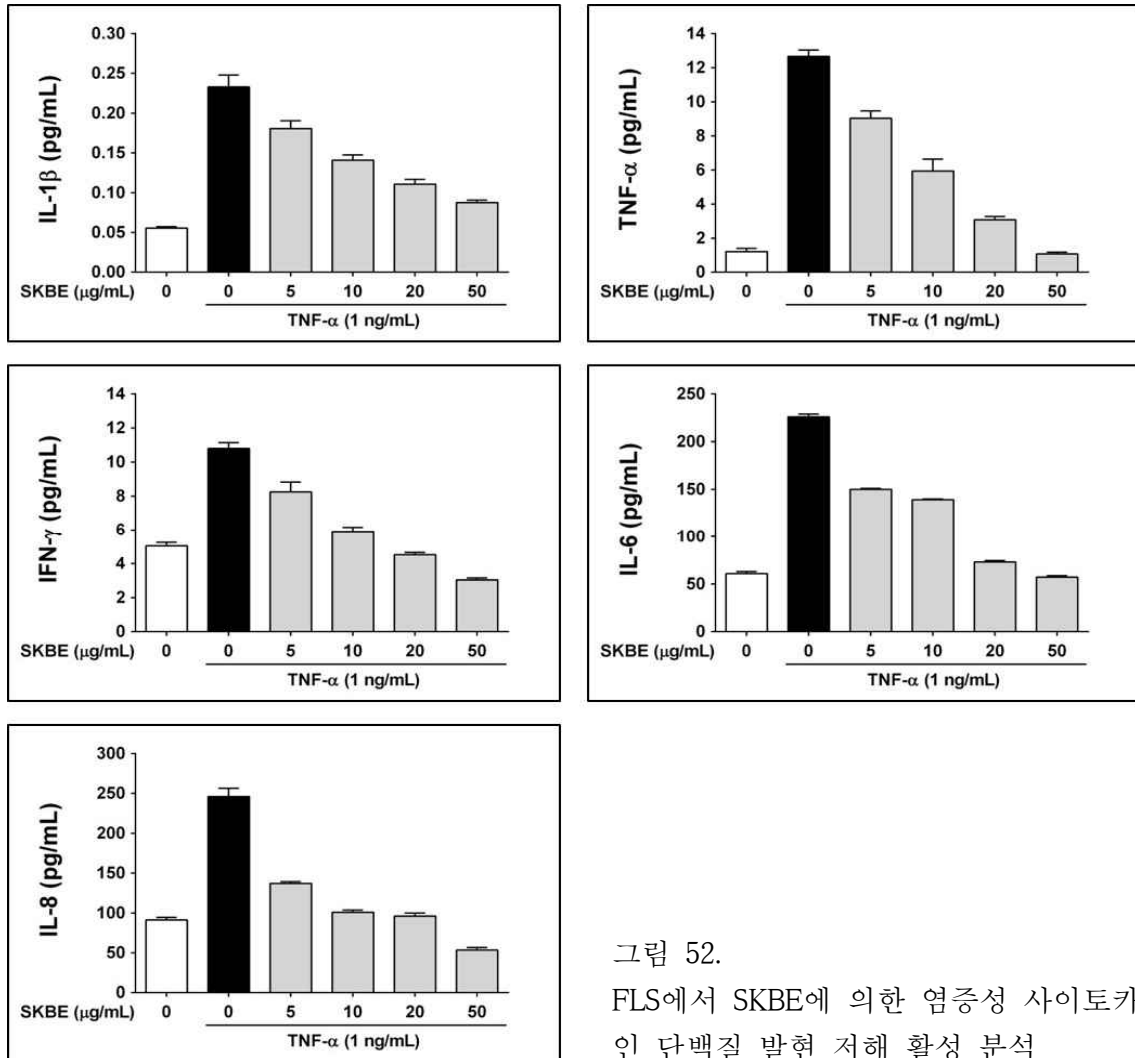


그림 52. FLS에서 SKBE에 의한 염증성 사이토카인 단백질 발현 저해 활성 분석

위의 실험에서 확인한 5종류의 대표적인 염증성 사이토카인들은 정도의 차이는 있지만, SKBE에 의해서 유전자 수준 및 단백질 수준에서도 발현이 저해됨을 확인할 수 있었음. RT-PCR 분석 결과 유전자 수준에서는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 발현을 강하게 저해하였으며, 정도는 약하지만 IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8 역시 저해 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었으며, ELISA assay 결과 역시 유전자 수준에서의 저해 양상과 유사한 결과를 확인할 수 있었음. 이상의 결과는 SKBE가 관절염 증상에 주요하게 관여하는 염증성 인자들의 발현을 광범위하게 저해할 수 있다는 의미의 결과로, SKBE가 관절염 증상의 치료 및 완화에 뛰어난 활성을 나타낼 수 있음



을 간접적으로 확인할 수 있는 결과임.

#### (4) 연골세포(chondrocyte)에서 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향 분석

과발현된 염증성 케모카인 및 사이토카인의 영향으로 나타나는 질환인 류마티스 관절염에는 관절 활액세포(FLS) 이외에 연골세포(chondrocyte) 역시 중요하게 관여하고 있음. 따라서 연골세포를 대상으로도 SKBE를 활용한 식품 및 개별인정형 기능성 소재의 생리 활성 작용 기전을 규명하고자 함. 연골세포를 대상으로 SKBE를 단독으로 농도별로 처리하여 세포독성을 MTT assay 방법으로 분석한 결과 SKBE를 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  까지 처리하여도 뚜렷한 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었음(그림 53). 96-well cell culture plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 chondrocyte 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 SKBE를 처리농도별로 녹여 각 well 당 100  $\mu\text{L}$ 씩 24시간 동안 처리하였음. 24시간 후 각 well에서 5 mg/mL로 준비된 MTT 용액을 20  $\mu\text{L}$ 씩 첨가한 후, 보라색 결정이 육안으로 확인 될 정도로 5%  $\text{CO}_2$ 가 제공되는 37°C 배양기에서 배양한 뒤, 모든 용액을 제거하고 각 well에 DMSO 100  $\mu\text{L}$ 씩을 첨가하여 녹여준 다음 570nm의 파장에서 흡광도를 측정하였음. 측정된 흡광도를 바탕으로 control well을 100%로 하여 각 시료들의 세포독성을 확인하였음.

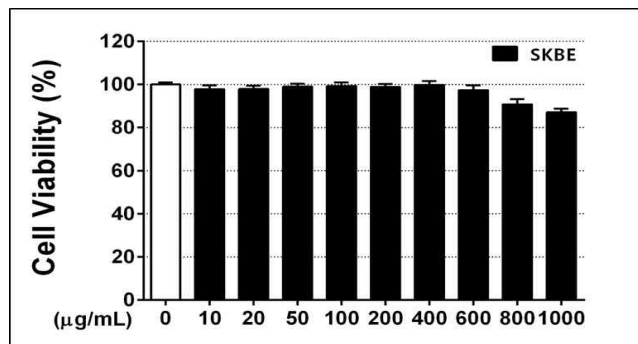


그림 53. 연골세포에 대한 SKBE의 세포독성 분석

다음으로 *in vitro* 상에서 관절염 환경을 조성하고 연골세포의 손상을 일으키기 위하여 염증 유도 물질을 처리한 후 SKBE의 염증성 사이토카인 유전자 및 단백질 발현 저해 활성을 분석하였음. 사전 실험 결과 연골 세포에서는  $\text{TNF-}\alpha$ 를 10ng/mL로 12시간 이상 처리하면 관절염에 관련된 사이토카인들의 발현이 증가함을 확인하였으며, 대표적인 염증성 사이토카인인  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  등의 유전자 발현 정도를 측정하기 위하여 RT-PCR 방법을 활용하여 SKBE의 활성을 분석하였음(그림 54). 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 chondrocyte 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에  $\text{TNF-}\alpha$  단독 또는  $\text{TNF-}\alpha$ 와 SKBE를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 2mL씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후 각 well에서 용액을 제거하고 RNA-Bee 용액을 사용하여 RNA를 분리하였음. 분리한 RNA의 농도를 측정하고 5  $\mu\text{g}$ 의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA를 사용하여 각 target gene에 따른 primer를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 10% agarose gel을 사용

하여 전기영동 후 결과를 이미지화하였음.

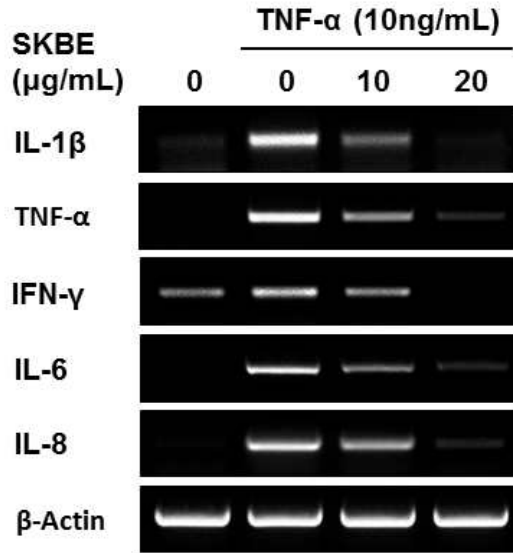


그림 54. 연골세포에서 SKBE에 의한 염증성 사이토카인 유전자 발현 저해 활성 분석

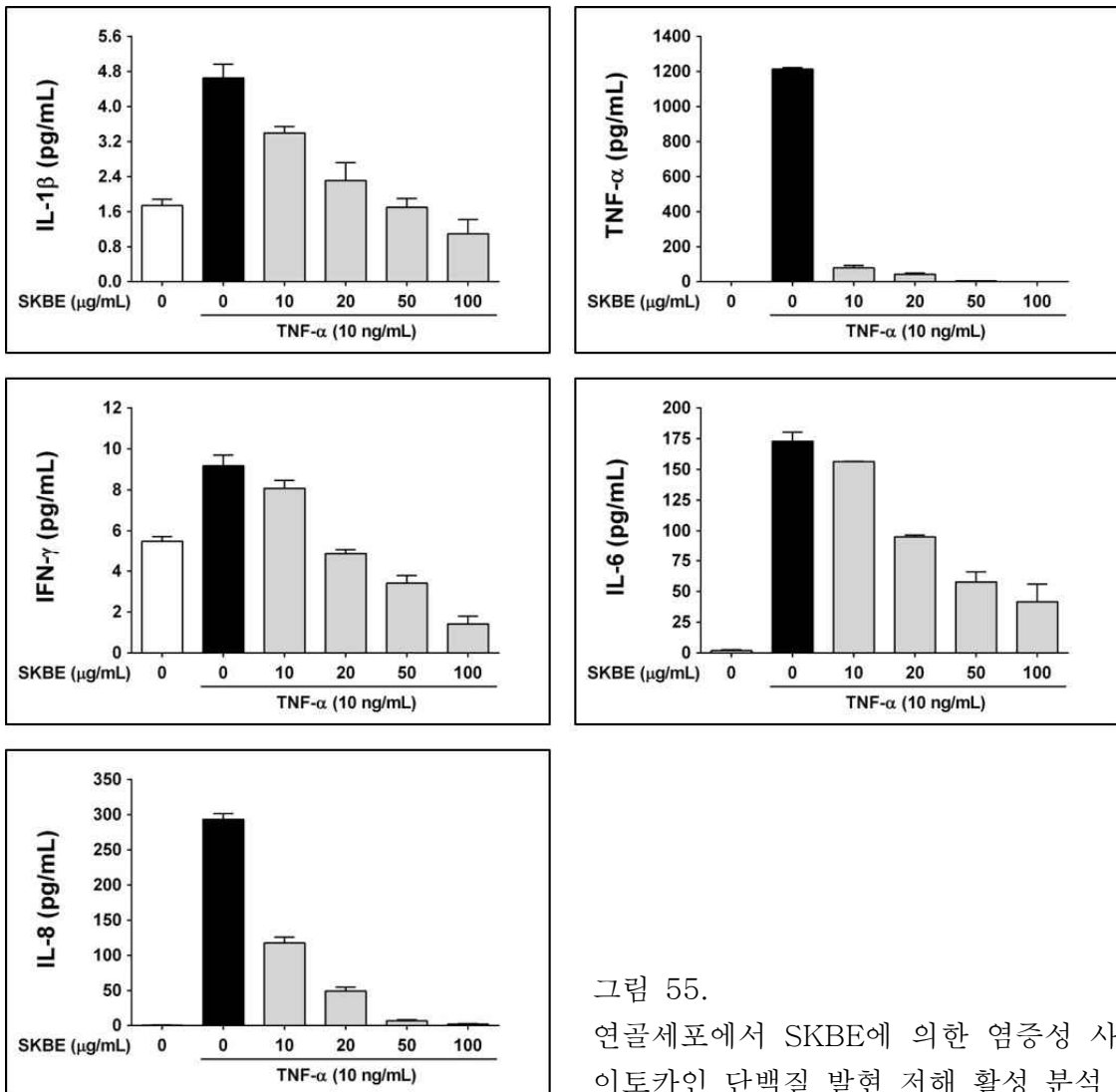


그림 55. 연골세포에서 SKBE에 의한 염증성 사이토카인 단백질 발현 저해 활성 분석

다음으로 각 염증성 사이토카인의 단백질량을 정량하기 위하여 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 chondrocyte 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$  단독 또는 TNF- $\alpha$ 와 SKBE를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 600  $\mu$ L씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후, 각 well에서 배양액을 회수하여 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit를 활용하여, kit에서 제공하는 실험방법에 따라 분비된 염증성 사이토카인의 양을 정량하였으며(그림 55), 여러 종류의 염증성 사이토카인들을 대상으로 profiling 하였음.

위의 실험에서 확인한 5종류의 대표적인 염증성 사이토카인들은 정도의 차이는 있지만, SKBE의 농도에 의존적으로 유전자 수준 및 단백질 수준에서의 발현이 저해됨을 확인할 수 있었음. RT-PCR 분석 결과 유전자 수준에서는 IFN- $\gamma$ 를 제외한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8의 발현을 강하게 저해하였으며, 정도는 약하지만 IFN- $\gamma$  역시 저해 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었음. ELISA assay 결과 역시 유전자 수준에서의 저해 양상과 유사한 결과를 확인할 수 있었으며, 특히 TNF- $\alpha$ 에 대한 저해 활성은 다른 사이토카인들에 비해서 아주 강력함을 확인할 수 있었음. 이상의 결과는 SKBE가 관절염 증상에 주요하게 관여하는 염증성 인자들의 발현을 광범위하게 저해할 수 있다는 의미의 결과로, SKBE가 관절염 증상의 치료 및 완화에 뛰어난 활성을 나타낼 수 있음을 간접적으로 확인할 수 있는 결과임.

#### (5) SKBE가 FLS에서 세포 부착 분자의 발현에 미치는 영향 분석

관절 활액세포(FLS)에서 유발된 염증 반응의 진행에 주요하게 관여하는 세포 부착 분자(cell adhesion molecule, CAM; ICAM, VCAM)의 유전자 및 단백질 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 western blot 방법으로 분석하였음. 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 FLS 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$  단독 또는 TNF- $\alpha$ 와 SKBE를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 2mL씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후 각 well에서 용액을 제거하고 RNA-Bee 용액을 사용하여 RNA를 분리하였음. 분리한 RNA의 농도를 측정하고 5  $\mu$ g의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA를 사용하여 각 target gene에 따른 primer를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 10% agarose gel을 사용하여 전기영동 후 결과를 이미지화 하였으며, 동일한 방법으로 세포를 준비하고 시료를 처리한 뒤, 18시간 후 각 well에서 용액을 제거하고 PBS로 씻어준 뒤, RIPA buffer를 사용하여 단백질을 회수하였음. 회수된 단백질의 농도를 bradford 용액을 사용하여 정량하고 동일한 단백질의 양을 사용하여 western-blot을 진행하였음.

그 결과 다음 그림 56에서 보는 바와 같이 염증 유도 물질인 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 세포 부착 분자인 ICAM-1과 VCAM-1의 발현을 SKBE가 우수하게 저해하는 것을 확인할 수 있었으며 이와 같은 결과는 아마도 관절에서 염증 발생 후 염증 반응의 진행에서 면역세포와의 상관관계를 규명하는 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료됨.

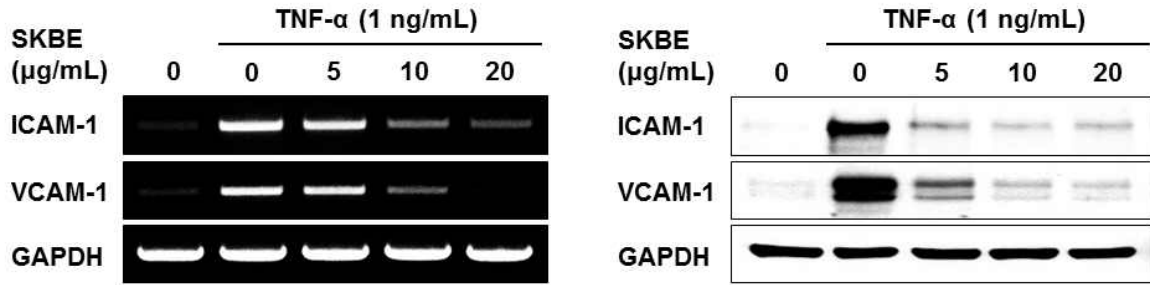


그림 56. FLS에서 SKBE에 의한 세포 부착 분자의 유전자 및 단백질 발현 저해 활성

(6) SKBE가 연골세포의 손상을 일으키는 MMPs의 발현 및 연골 재생에 미치는 영향 분석

관절염 질환의 대표적 증상은 관절내 연골의 손상이며, 이 증상은 연골세포에서 염증 반응이 일어나면서 연골의 손상을 일으키는 효소인 matrix metalloproteinases(MMPs)가 과발현되어 연골의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있음. 다양한 종류로 존재하는 체내의 MMPs 중에서 연골의 손상에 주요하게 관여한다고 알려진 MMPs에는 MMP-1, 3, 13이 많이 연구되고 있음. 따라서 MMP-1, 3, 13을 대상으로 유전자 및 단백질 발현에 SKBE가 미치는 영향을 RT-PCR 및 western blot 방법을 활용하여 분석하였음.

또한, 연골을 구성하는 단백질 중 collagen type II(Col2) 역시 중요하게 연구되고 있으며, SKBE가 염증 반응에 의해 손상된 연골의 주요 구성 성분인 Col2의 재생에 관여하는지 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR 및 western blot 방법을 활용하여 분석하였음. RT-PCR의 수행에는 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 chondrocyte 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$  단독 또는 TNF- $\alpha$ 와 SKBE를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 2 mL씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후 각 well에서 용액을 제거하고 RNA-Bee 용액을 사용하여 RNA를 분리하였음. 분리한 RNA의 농도를 측정하고 5  $\mu$ g의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA를 사용하여 각 target gene에 따른 primer를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 10% agarose gel 을 사용하여 전기영동 후 결과를 이미지화 하였으며, western-blot의 수행에는 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 chondrocyte 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$  단독 또는 TNF- $\alpha$ 와 SKBE를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 600  $\mu$ L씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후 각 well에서 배양액을 회수하여 supernatant로 분리된 단백질을 회수하고, 남은 세포를 PBS로 씻어준 뒤, RIPA buffer를 사용하여 cell lysate 부위의 단백질을 회수하였음. 회수된 단백질의 농도를 bradford 용액을 사용하여 정량하고 동일한 단백질의 양을 사용하여 western-blot을 진행하였음.

그 결과 다음 그림 57, 58에서 보는 바와 같이 염증 유도 물질인 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 MMP-1, 3, 13의 발현을 SKBE가 우수하게 저해하는 것을 확인할 수 있었으며, TNF- $\alpha$ 에 의해

손상된 Col2의 재생 활성도 뛰어남을 확인할 수 있었음. 이와 같은 결과는 아마도 SKBE가 관절에서 염증 발생 중 일어나는 연골의 손상 방지 및 손상된 연골의 재생에 관여하는 효과적인 물질로 사용될 수 있음을 검증하는 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료됨.

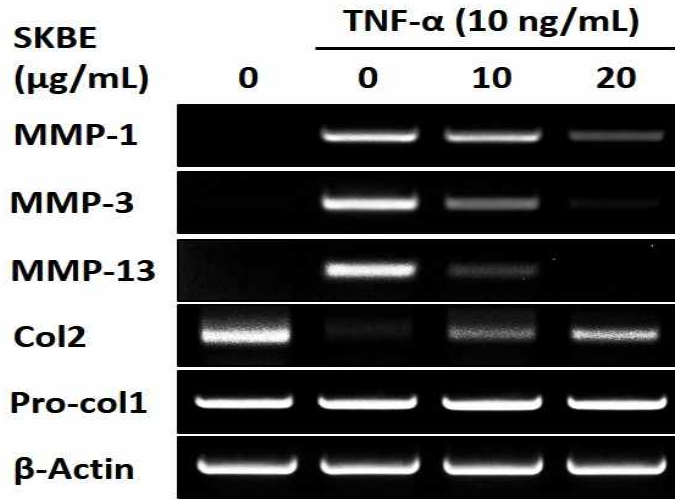


그림 57. 연골세포에서 SKBE에 의한 MMPs, Col2 유전자 발현 조절 분석

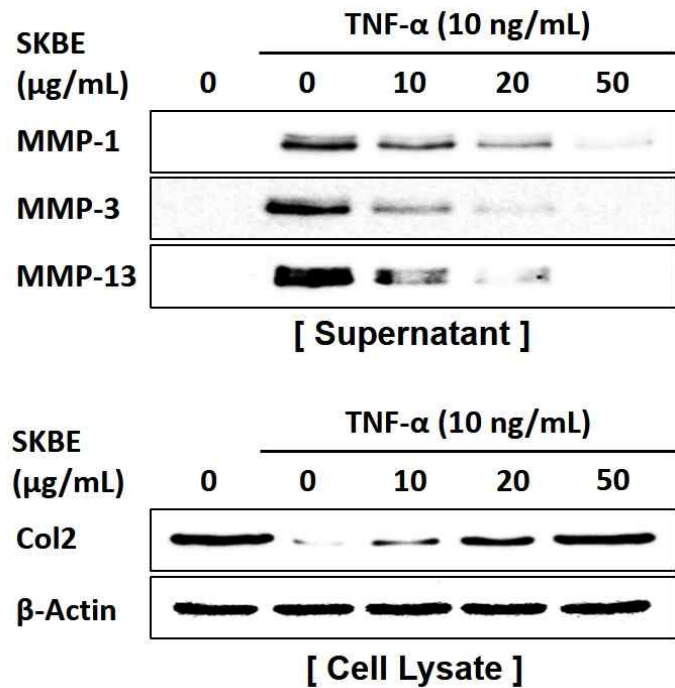


그림 58. 연골세포에서 SKBE에 의한 MMPs, Col2 단백질 발현 조절 분석

(7) 면역세포에서 SKBE가 염증 관련 인자의 발현에 미치는 영향 분석

염증 반응에는 염증 매개 인자의 발현 및 활성이 염증 반응의 시작으로 중요하게 연구되고 있으며, 대표적인 염증 매개 인자로는 산화질소(Nitric oxide, NO)와 프로스타글란딘

(Prostaglandin, PGEs) 등이 잘 알려져 있으며 현재에도 많은 연구가 이루어지고 있음. 산화질소 생성에 주요하게 관여하는 효소로는 Inducible nitric oxide synthase(iNOS)가 주목받고 있으며, 프로스타글란딘의 생성에 관여하는 효소로는 Cyclooxygenase-2(COX-2)가 잘 알려져 있음. 따라서 관절 활액세포(FLS)와 사람 연골세포를 대상으로 염증 매개 인자의 생성에 관여하는 두 종류의 중요한 효소인 iNOS와 COX-2의 유전자 및 단백질 발현에 SKBE가 미치는 영향을 RT-PCR 방법을 사용하여 분석하였음. RT-PCR의 수행에는 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 각 FLS와 chondrocyte 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$  단독 또는 TNF- $\alpha$ 와 SKBE를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 2mL씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후 각 well에서 용액을 제거하고 RNA-Bee 용액을 사용하여 RNA를 분리하였음. 분리한 RNA의 농도를 측정하고 5 $\mu$ g의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA를 사용하여 각 target gene에 따른 primer를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 10% agarose gel을 사용하여 전기영동 후 결과를 이미지화 하였으며, 다음 그림 59, 60에서 보는 바와 같이 염증 유도 물질인 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 iNOS, COX-2의 발현을 SKBE가 우수하게 저해하는 것을 확인할 수 있었으며, 연골세포와는 다르게 FLS의 경우에는 COX-2의 유전자 발현이 TNF- $\alpha$ 에 의해 현저하게 증가하지는 않지만, 증가된 COX-2의 유전자 발현은 SKBE에 의해서 강하게 저해됨을 확인할 수 있었음.

이와 같은 결과는 SKBE가 앞에서 언급한 관절염 발생 후 연골의 손상 방지와 손상된 연골의 재생에 효과적인 물질임을 확인함과 동시에 염증 반응의 시작을 저해하는 예방 차원에서도 효과를 보이는 물질로 활용될 수 있음을 검증하는 중요한 자료라고 사료됨.

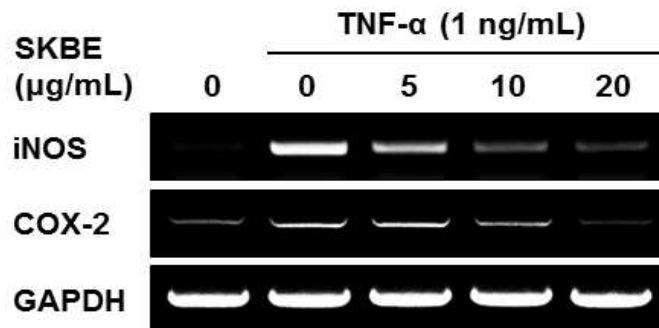


그림 59. FLS에서 SKBE에 의한 iNOS, COX-2 유전자 발현 저해 분석

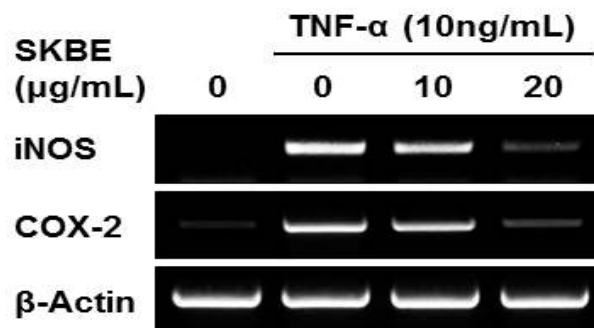


그림 60. 연골세포에서 SKBE에 의한 iNOS, COX-2 유전자 발현 저해 분석

(8) 관절염 동물 모델에 SKBE가 미치는 영향 분석

앞서 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포를 활용하여 보여준 결과를 바탕으로 SKBE의 *in vitro* 활성 농도를 결정하였으며, 세포독성이 없으며 iNOS 단백질을 background 수준으로 저해하는 농도를 근거로 1000  $\mu\text{g/mL}$ 로 결정하였음. 관절염 동물 모델에 사용할 *in vivo* 투여 농도의 결정은 식약처 준수 사항 및 동등의 동물 실험 논문들을 참조하여 *in vitro* 활성 농도의 5배(low dose, 5 mg/kg), 50배(high dose, 50 mg/kg) 두 가지 농도로 설정하여 *in vivo* 동물 실험을 진행하기로 계획함. 경구 투여할 시료는 용해도를 고려하여 5%의 DMSO가 포함된 PBS에 녹여 2가지의 농도로 준비하였음.

관절염 동물 모델로는 SKBE의 연골 재생 활성을 명확히 검증하기 위하여 연골에 손상을 가한 뒤 SKBE의 투여에 따른 회복 정도를 확인할 수 있는 Osteochondral defect(OD) 모델이 가장 적합하다고 판단하였음. 이에 따라 퇴행성관절염의 대표적 실험 모델인 OD 모델을 사용하기로 하였으며, 다음 그림 61과 같이 연골 손상 관절염 동물 모델 실험을 계획하였음.

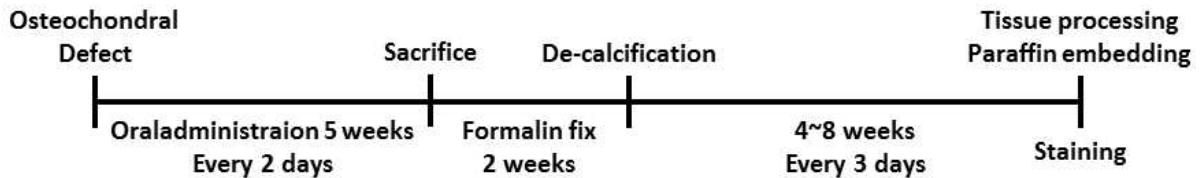


그림 61. 관절 조직에서 SKBE의 투여에 따른 연골 재생 검증 동물 실험 계획

9주령 이상의 Sprague Dawley(SD) rat의 한쪽 무릎 연골 부위에 직경 1.5 mm 드릴로 구멍을 뚫어 연골에 손상을 주어 osteochondral defect를 형성한 뒤(그림 62), 근 조직 및 지방조직을 봉합하여 정상 생활이 가능하도록 수술하였음. 총 5주 동안 2일 간격으로 SKBE를 체중에 따라 설정된 농도로 경구 투여하며 계획된 일정에 따라 실험을 진행하였음.

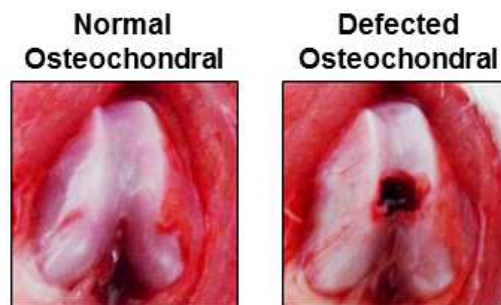


그림 62. 연골 손상 동물 모델 확립

5주 후 동물을 희생하여 무릎 부위를 적출한 다음, 육안으로 연골의 손상과 SKBE의 투여에 따른 연골 재생 정도를 확인하였음.

그림 63에서 보는 바와 같이 'Control' 그룹은 연골의 손상을 가하지 않은 그룹으로 매



끈한 연골의 상태를 확인할 수 있었으며, ‘Negative’ 그룹은 드릴로 연골에 손상을 가한 뒤, SKBE 대신에 vehicle을 투여한 그룹으로 연골의 손상이 심각하게 남아있음을 확인할 수 있었음. SKBE를 처리한 그룹에서는 드릴로 구멍을 뚫어 손상된 연골 부위가 ‘Negative’ 그룹과는 다르게 매끈하게 차올라 있음을 확인할 수 있었으며, SKBE가 뛰어난 연골 재생 능력을 나타냄을 간접적으로 확인할 수 있었음.

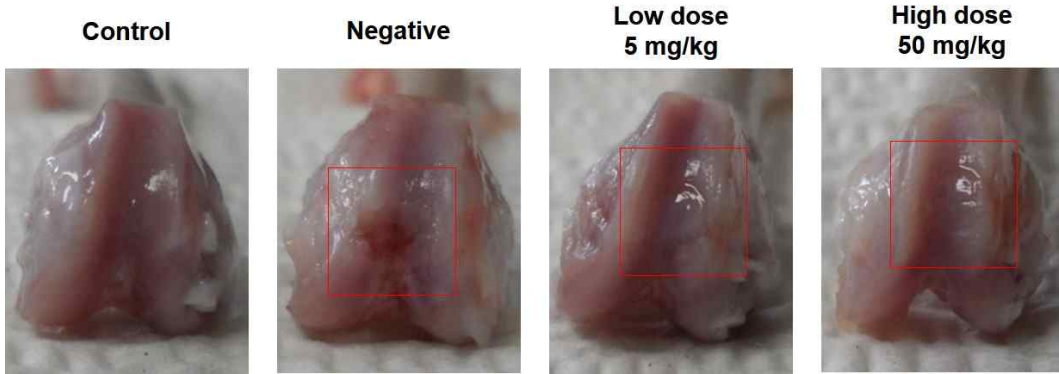


그림 63. 손상된 연골의 재생에 SKBE가 미치는 영향 분석

그리고 2주 동안 formalin에 조직을 고정하였으며, 다시 4-8주 정도 decalcification 과정을 진행하여 칼슘이 거의 제거될 때 까지 3일 간격으로 용액을 갈아주면서 진행하였음.

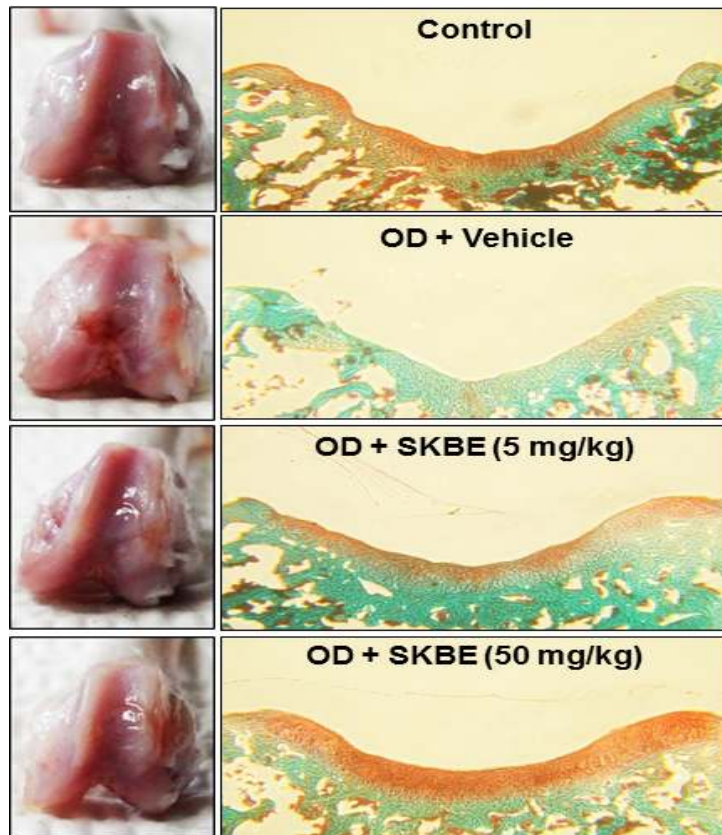


그림 64. 손상된 연골의 재생에 SKBE가 미치는 영향 분석 (조직 염색법)



다음으로 조직 처리 과정을 거쳐서 파라핀에 포매하여 절편을 만들고 safranin-O와 fast green 용액으로 염색하여 연골 부위를 확인하였음. 다음 그림 64에서 보는 바와 같이 safranin-O에 의해서 연골 조직은 주황색으로 염색이 되며, 각 그룹에 따른 연골 조직의 손상과 재생 정도는 이전 그림에서 확인한 결과와 동일한 양상임을 확인할 수 있었음.

이상의 결과로 SKBE는 관절염 질환에서 손상된 연골 조직의 재생에 뛰어난 효과를 나타내는 물질임을 확인할 수 있으며, 그림 64에서 보여준 바와 같이 여러 장의 조직 절편을 염색한 뒤, 각 그룹의 연골 조직의 두께를 최소 10군데 이상 측정하여 수치화하고, 상대적인 값으로 표현한 결과(그림 65) SKBE의 뛰어난 연골 재생 활성을 확인할 수 있었음.

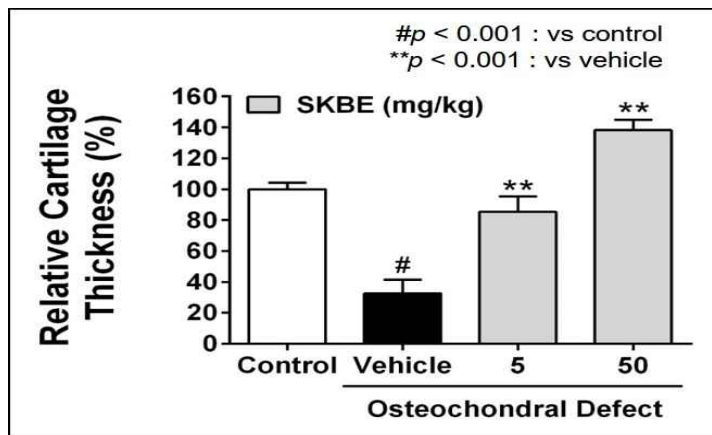


그림 65. OD 모델로 확인한 SKBE의 연골의 재생 활성

(9) 시제품 제조에 첨가할 부원료 선별을 위한 다양한 추출물의 MMPs 발현 저해 활성 분석

관절 건강을 위한 시제품에 첨가할 부원료를 선별하기 위하여 원재료 확보가 용이한 다양한 추출물들을 대상으로 연골 손상을 유발하는 효소인 MMPs의 발현 저해 활성을 분석하였음. 먼저 각 추출물들의 세포독성을 확인하기 위하여 연골세포를 대상으로 각 추출물들을 100  $\mu$ g/mL로 처리한 뒤 MTT assay 방법으로 세포독성을 확인한 결과(그림 66), 추출물 100  $\mu$ g/mL의 처리에서는 ‘꾸지뽕 열매’ 추출물에서 약간의 독성이 확인되었으며 다른 추출물들은 크게 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였음. 각 부원료 추출물의 무게를 기준으로 DMSO에 녹여 고농도의 시료를 준비하고, 96-well cell culture plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 chondrocyte 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 각 시료를 처리농도별로 녹여 각 well 당 100  $\mu$ L씩 24시간 동안 처리하였음. 24시간 후 각 well에서 5 mg/mL로 준비된 MTT 용액을 20  $\mu$ L씩 첨가한 후, 보라색 결정이 육안으로 확인 될 정도로 5% CO<sub>2</sub>가 제공되는 37°C 배양기에서 배양한 뒤, 모든 용액을 제거하고 각 well에 DMSO 100  $\mu$ L씩을 첨가하여 녹여준 다음 570nm의 파장에서 흡광도를 측정하였음. 측정된 흡광도를 바탕으로 control well을 100%로 하여 각 시료들의 세포독성을 확인하였음.

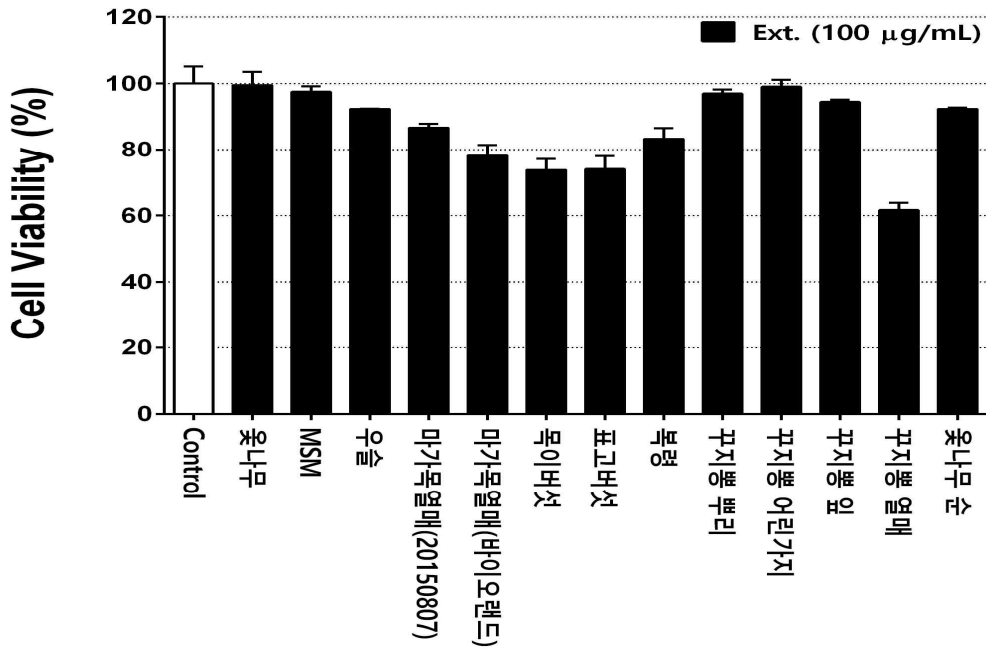


그림 66. 연골세포를 대상으로 시제품에 첨가될 부원료의 세포독성 확인

다음으로 각 부원료 추출물들의 MMPs 유전자 발현 저해 활성을 RT-PCR 방법을 활용하여 분석하였음(그림 67). 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 chondrocyte 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$  단독 또는 TNF- $\alpha$ 와 각 시료를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 2mL씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후 각 well에서 용액을 제거하고 RNA-Bee 용액을 사용하여 RNA를 분리하고, 농도를 측정하여 5  $\mu$ g의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA를 사용하여 각 target gene에 따른 primer를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 10% agarose gel을 사용하여 전기영동 후 결과를 이미지화하였음.

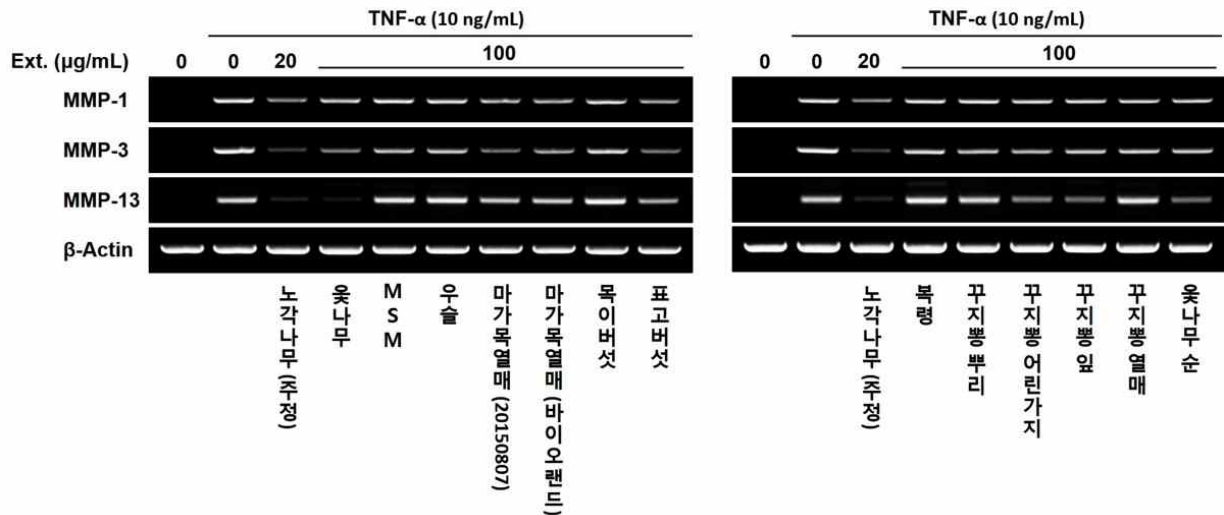


그림 67. 연골세포를 대상으로 시제품에 첨가될 부원료의 MMPs 유전자 발현 저해 활성 분석

각 추출물들은 다양한 정도의 발현 저해 양상을 나타내었으나 주원료인 노각나무 추출물에 비해서는 저해 활성이 약한 것을 확인할 수 있었음. 분석된 부원료 추출물들 중에서는 ‘옷나무’ 추출물이 가장 뛰어난 MMPs 유전자 발현 저해 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었으며, 제조될 시제품에 첨가할 부원료로 ‘옷나무’ 추출물을 선택하였음. 또한 (주)생명의나무에서는 시중에서 판매되고 있는 관절관련 건강식품에 많이 첨가되고 있는 ‘글루코사민’을 추가적인 부원료로 선택하였음.

(10) 시제품 레시피 확립과 제조된 시제품의 *in vitro* 활성 검증

관절 건강을 위한 시제품에 첨가할 부원료의 선별을 완료하였으며, 관절 건강 시제품을 ‘시제품1’로 가칭하였음. 시제품1에 첨가되는 주원료는 노각나무 잎 추출물이며, 부원료로는 옷나무추출물과 글루코사민을 첨가하기로 결정하였음. 연골세포를 대상으로 각 원료의 세포독성을 MTT assay 방법으로 확인한 결과 노각나무 추출물과 옷나무 추출물은 1000  $\mu$ g/mL의 농도에서도 세포에 독성을 전혀 나타내지 않았으며, 글루코사민은 800  $\mu$ g/mL의 농도에서부터 약하게 세포독성을 나타냄을 확인하였음(그림 68). 96-well cell culture plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 chondrocyte 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 각 시료를 처리농도별로 녹여 각 well 당 100  $\mu$ L씩 24시간 동안 처리하였음. 24시간 후 각 well에서 5mg/mL로 준비된 MTT 용액을 20  $\mu$ L씩 첨가한 후, 보라색 결정이 육안으로 확인 될 정도로 5% CO<sub>2</sub>가 제공되는 37°C 배양기에서 배양한 뒤, 모든 용액을 제거하고 각 well에 DMSO 100  $\mu$ L씩을 첨가하여 녹여준 다음 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였음. 측정된 흡광도를 바탕으로 control well을 100%로 하여 각 시료들의 세포독성을 확인하였음.

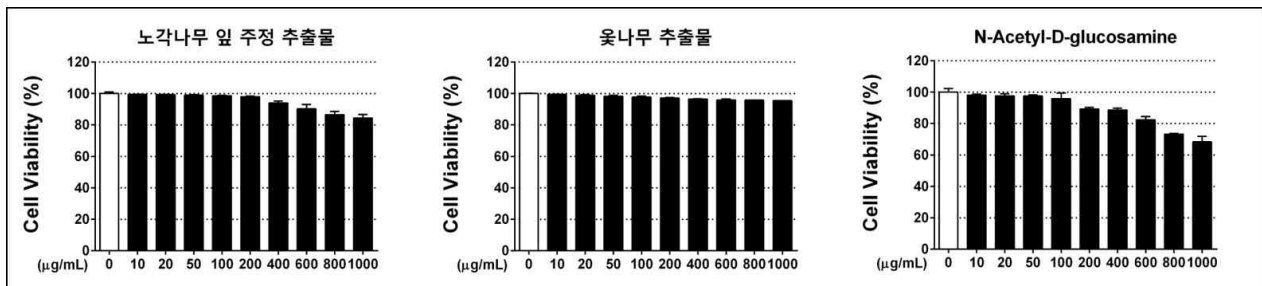


그림 68. 연골세포를 대상으로 시제품에 첨가될 원료의 세포독성 확인

다음으로 시제품1에 첨가할 원료의 배합비를 설정하기 위한 실험을 진행하였음. 주원료인 노각나무 추출물의 첨가 농도는 *in vitro* 활성 농도인 20  $\mu$ g/mL로 고정하였으며, 옷나무 추출물은 부원료 활성 분석시 MMPs 유전자 발현 저해 활성을 나타내는 100  $\mu$ g/mL로 설정하였으며, 글루코사민은 (주)생명의 나무에서 제시한 50  $\mu$ g/mL로 설정하였음. 설정된 농도에서 각 원료의 연골 손상 방지 및 재생 활성을 RT-PCR 방법으로 분석하였음. 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 chondrocyte 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$  단독 또는 TNF- $\alpha$ 와 각 시

료를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 2mL씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후 각 well에서 용액을 제거하고 RNA-Bee 용액을 사용하여 RNA를 분리하고, 농도를 측정하여 5  $\mu$ g의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA를 사용하여 각 target gene에 따른 primer를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 10% agarose gel을 사용하여 전기영동 후 결과를 이미지화하였음.

그 결과 노각나무 추출물의 경우 MMPs 유전자 발현 저해 활성화와 Col2 유전자 발현 증가 활성이 강력함을 다시 확인하였으며, 윗나무추출물의 경우에는 MMPs 유전자 발현 저해 활성은 뛰어나지만 Col2 유전자 증가에는 영향을 미치지 않았으며, 글루코사민은 MMPs 유전자 발현 저해 활성을 뚜렷하게 보이지는 않지만 미약하게 Col2 유전자의 발현을 증가시키는 결과를 확인하였음(그림 69).

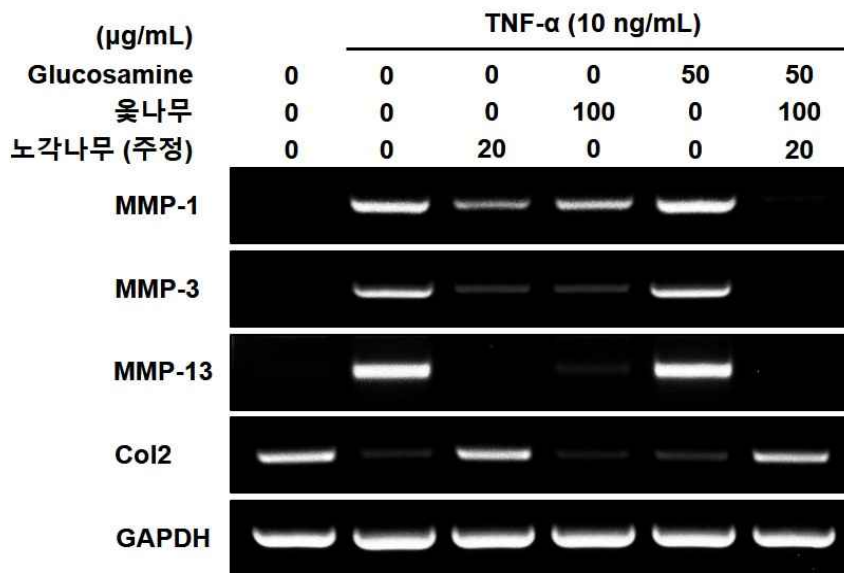


그림 69. 각 원료와 배합비에 따라 제조된 시제품1 활성 분석

설정된 농도에 맞추어 각 원료의 시제품 배합 레시피[노각나무 추출물 : 윗나무추출물 : 글루코사민 = 1 : 5 : 2.5]를 결정하였음. 레시피에 따라 배합된 시제품1의 경우에는 MMPs 유전자 발현 저해 및 Col2 유전자 발현 증가에 뛰어난 활성을 나타냄을 확인하였으며(그림 69), 연골세포에서 세포독성을 나타내지 않음을 MTT assay를 통해 확인하였음(그림 70).

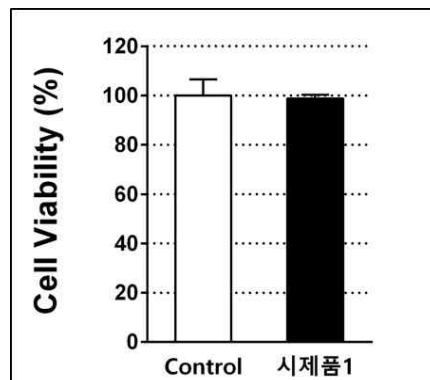


그림 70. 연골세포를 대상으로 시제품1의 세포독성 확인

(11) 제조된 시제품1의 *in vivo* 활성 검증

시제품의 *in vivo* 활성 검증에 사용할 관절염 동물 모델로는 노각나무 추출물(SKBE)의 활성 검증에 사용한 모델과 동일한 퇴행성관절염의 대표적 실험 모델인 OD 모델을 사용하였으며, 연골 재생 활성을 명확히 검증하기 위하여 연골에 손상을 가한 뒤 시제품1의 투여에 따른 회복정도를 확인하고자 하였음. 앞서 노각나무 추출물인 SKBE를 사용한 OD 모델 실험에서 보여준 결과를 바탕으로 시제품1의 활성 분석에 사용할 *in vivo* 투여 농도를 결정하였음. 시제품1은 설정된 배합비에 따라 배합하였으며 경구 투여 농도는 노각나무 추출물 50mg/kg을 기준으로 하여 각 동물의 체중에 따라 경구 투여하였으며, 다음 그림 71과 같이 연골 손상 관절염 동물 모델 실험을 계획하여 진행하였음. 경구 투여할 시료는 용해도를 고려하여 5%의 DMSO가 포함된 PBS에 녹여 준비하였음.

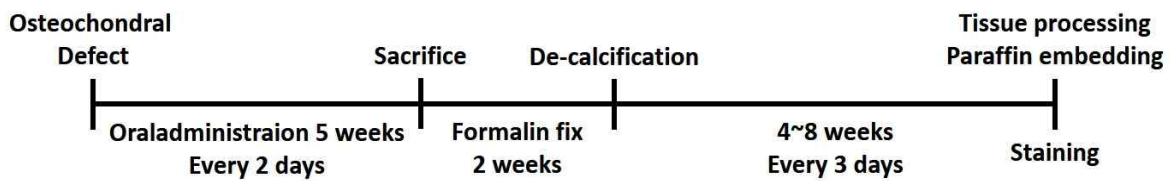


그림 71. 시제품1의 투여에 따른 연골 재생 검증 동물 실험 계획

9주령 이상의 SD rat의 한쪽 무릎 연골 부위에 직경 1.5mm 드릴로 구멍을 뚫어 연골을 손상시켜 osteochondral defect를 형성한 뒤(그림 72), 근 조직 및 지방조직을 봉합하여 정상 생활이 가능하도록 수술하였음. 총 5주 동안 2일 간격으로 시제품1을 체중에 따라 경구 투여하며 실험을 진행하였음.

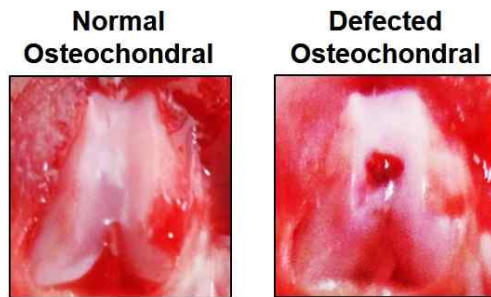


그림 72. 연골 손상 동물 모델 확립

5주 후 동물을 희생하여 무릎 부위를 적출한 다음, 육안으로 연골의 손상과 시제품1의 투여에 따른 연골 재생 정도를 확인하였음. 다음 그림 73에서 보는 바와 같이 ‘Control’ 그룹은 연골의 손상을 가하지 않은 그룹으로 매끈한 연골의 상태를 확인할 수 있었으며, ‘OD + vehicle’ 그룹은 드릴로 연골에 손상을 가한 뒤, 시제품1 대신에 vehicle을 투여한 그룹으로 연골의 손상이 심각하게 남아있음을 확인할 수 있었음. 시제품1을 처리한 ‘OD + 시제품1’ 그룹에서는 드릴로 구멍을 뚫어 손상된 연골 부위가 ‘Control’ 그룹에 비해서 매



끈하게 차올라 있음을 확인할 수 있었으며, 노각나무 추출물을 활용하여 관절 건강을 위해 개발한 시제품1은 뛰어난 연골 재생 능력을 나타냄을 간접적으로 확인할 수 있었음.

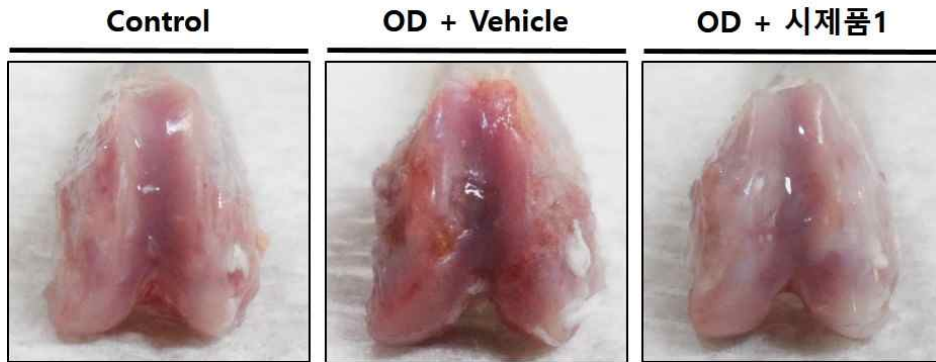


그림 73. 손상된 연골의 재생에 시제품1이 미치는 영향 분석

그리고 2주 동안 formalin에 조직을 고정하였으며, 다시 4~8주 동안 3일 간격으로 decalcification 용액을 갈아주며 칼슘이 거의 제거될 때 까지 진행하였음. 다음으로 조직 처리 과정을 거쳐서 파라핀에 포매하여 절편을 만들고 safranin-O와 fast green 용액으로 염색하여 연골 부위를 확인하였음. 다음 그림 74에서 보는 바와 같이 safranin-O에 의해서 연골 조직은 주황색으로 염색이 되며, 각 그룹에 따른 연골 조직의 손상과 재생 정도는 이전 그림에서 확인한 결과와 동일한 양상임을 확인할 수 있었음.

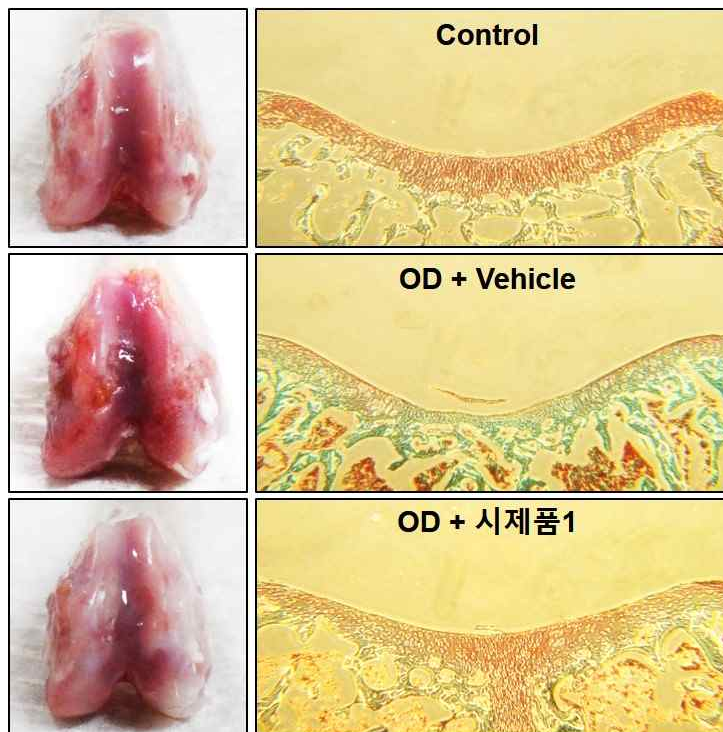


그림 74. 손상된 연골의 재생에 시제품1이 미치는 영향 분석  
(조직 염색법)

이상의 결과로 관절 건강을 위한 시제품1은 관절염 질환에서 손상된 연골 조직의 재생에 뛰어난 효과를 나타내는 시제품임을 확인할 수 있으며, 그림 74에서 보여준 바와 같이 여러 장의 조직 절편을 염색한 뒤, 각 그룹의 연골 조직의 두께를 최소 10군데 이상 측정하여 수치화하고, 상대적인 값으로 표현한 결과 시제품1의 뛰어난 연골 재생 활성을 수치화하여 확인할 수 있었음(그림 75).

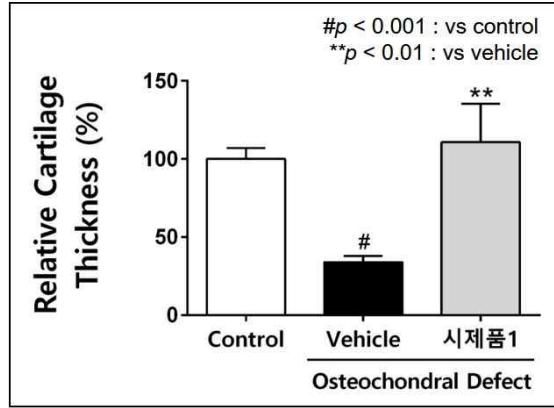


그림 75. OD 모델로 확인한 시제품1의 연골의 재생 활성

이상의 결과로 관절 건강을 위해서 개발한 시제품1은 연골 손상 방지 및 손상된 연골의 재생 활성이 뛰어나므로 관절 건강의 유지 및 개선에 효능이 뛰어난 제품이 될 것으로 예상됨. 시제품1의 조성을 주관기관인 (주)생명의나무에 전달하였음.

자. 자생식물(노각나무) 추출물의 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 약리 활성 및 기전 연구

본 연구는 피부세포(HaCaT)에서 과발현된 염증성 세포 부착 분자, 염증성 케모카인 및 사이토카인의 영향으로 나타나는 질환인 염증성 아토피 질환을 대상으로 노각나무 잎 추출물을 활용한 식품 및 개별인정 기능성 소재의 생리 활성 작용 기전을 규명하고 더 나아가 아토피 동물 모델에서 노각나무 추출물 및 분리된 활성물질의 활성을 검증하여 새로운 기능성 식품 소재를 제공하는 것을 최종 목표로 함.

(1) 노각나무 추출물에서 분리한 활성 성분의 *in vitro* 아토피 피부염증 관련 인자 발현 비교

앞서 본 연구진은 노각나무 유기용매 추출물을 활용하여 피부 염증 개선 효능을 확인하였음. 따라서 주관기관인 (주)생명의 나무에서 확보한 노각나무 추출물에서 분리한 활성 성분을 대상으로 아토피 증상에 중요 바이오 마커인 C-C motif chemokine ligand 17(CCL17/Thymus and activation-regulated chemokine; TARC)의 발현양을 사람 피부 각질세포(HaCaT)에서 비교 분석하였음. 먼저 기초 스크리닝을 통해 4가지 물질을 선별하였으며 각 시료의 처리 농도는 5, 10, 20, 50( $\mu$ M)로 결정하였음. CCL17의 발현양을 정량하기 위하여 6-well cell

culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 HaCaT 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  단독 또는 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 와 각 시료를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 600  $\mu$ L씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후, 각 well에서 배양액만을 회수하여 ELISA kit를 활용하여, kit에서 제공하는 실험방법에 따라 CCL17의 양을 정량하였음. 다음 그림 78에서 보는 바와 같이 선별된 활성 성분 중 Sipnasterol-Glc(S-Glc)의 활성이 가장 뛰어난 것을 확인할 수 있었으며 다음 동물 실험을 수행할 중요 자료로 활용하였음.

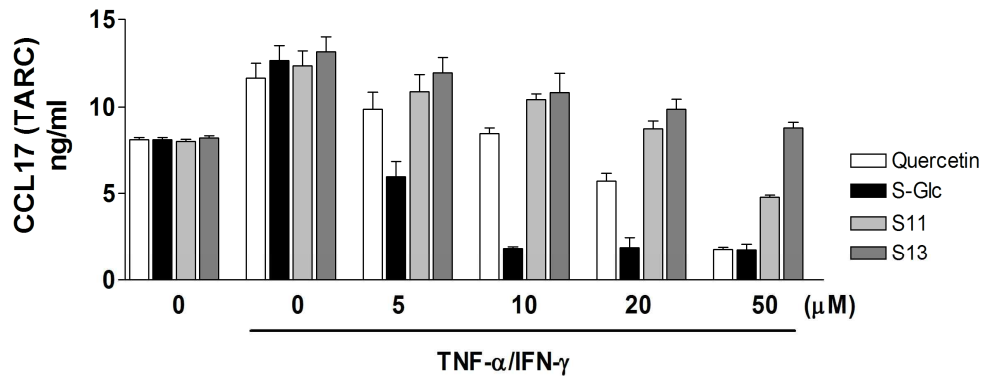


그림 78. 노각나무 추출물 유래 활성 성분의 항 아토피 인자 발현 비교

(2) 노각나무 추출물에서 분리한 스피나스테롤 글루코즈(S-Glc)가 아토피 피부염에 미치는 영향 분석

이상의 연구 결과에서, 사람 각질세포인 HaCaT 세포를 대상으로 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 에 의해 유도되는 아토피 증상에 중요 바이오 마커인 CCL17 사이토카인의 발현이 S-Glc에 의해 저해됨을 *in vitro* 상에서 확인하였으며, 다음으로 동물실험을 통한 *in vivo* 상에서의 분석을 통하여 S-Glc의 접촉성 피부염 개선 효능을 검증하고자 하였음. 접촉성 피부염 개선 효능 연구를 위한 동물 모델로는 아토피 피부염(AD) 연구에 널리 사용되는 DNCB 유도 마우스를 사용하여 S-Glc의 활성을 검증할 계획을 수립하고 본 연구를 수행하였음. 동물실험에 사용한 마우스의 등 피부의 체모를 면도하여 피부의 상태를 직관적으로 관찰하기에 편리하도록 하였으며, 총 20개체를 4개의 그룹(negative 5개체 / DNCB 5개체 / DNCB+S-Glc 20  $\mu$ g/kg 5개체 / DNCB+S-Glc 75  $\mu$ g/kg 5개체)으로 나누었음. 약 1~2주의 적응 기간을 거친 뒤, acetone:olive oil(3:1) 용액에 1%의 농도로 준비한 DNCB 100  $\mu$ L를 매일 일정한 시간에 마우스 등 피부에 도포 하였음. 약 4주간 처리하여 접촉성 피부염을 유도하여 AD의 유발이 확인되면, 노각나무 추출물에서 분리한 활성 성분을 크림에 용해하여 다음 그림 79와 같이 각 20, 75  $\mu$ g/kg을 약 8주 동안 발라주었으며 대조군은 일반 PBS에 비교군과 동일한 양의 크림을 섞어 발라주었음. 그 결과 S-Glc가 처리된 군에서 접촉성 피부염의 증상이 완화된 것을 확인할 수 있었음.



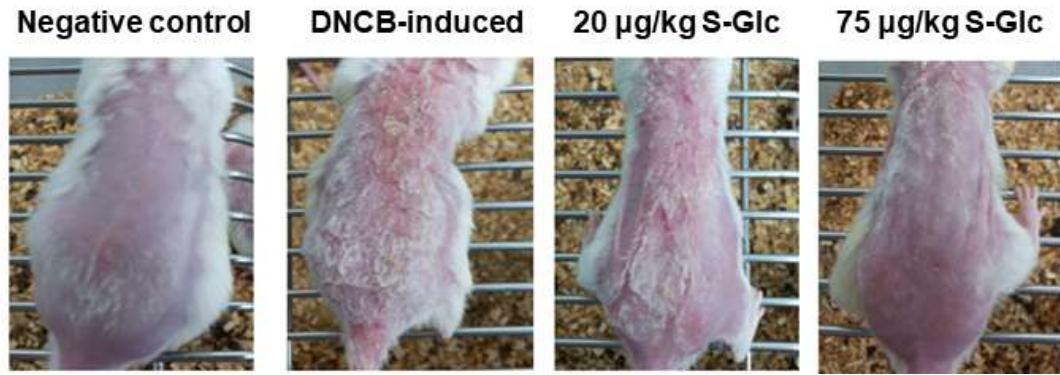


그림 79. 노각나무 추출물의 활성 성분이 접촉성 피부염에 미치는 영향 분석

(3) 아토피 피부염의 생화학 지표 분석 및 생물학 지표 분석

S-Glc의 생화학 지표를 분석하기 위해 접촉성 피부염 동물을 희생하여 혈액을 회수하였으며, 회수된 혈액으로부터 혈장을 분리하였음. 분리된 혈장으로부터 알레르기 생화학 지표인 Immunoglobulin E(IgE) 및 Histamine의 발현 정도를 ELISA kit를 사용하여 kit에서 제공하는 실험방법에 따라 IgE 및 Histamine의 양을 분석하였음. 상기의 두 생화학 지표는 아토피 및 염증 반응을 유도하고 가려움증을 유발하는 중요한 생화학적 인자로 이를 저해하기 위한 연구들이 많이 진행되고 있음. 다음 그림 80에서와 같이 S-Glc(75 µg/kg)가 처리된 군에서 대조군에 비하여 IgE 및 Histamine을 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었음.

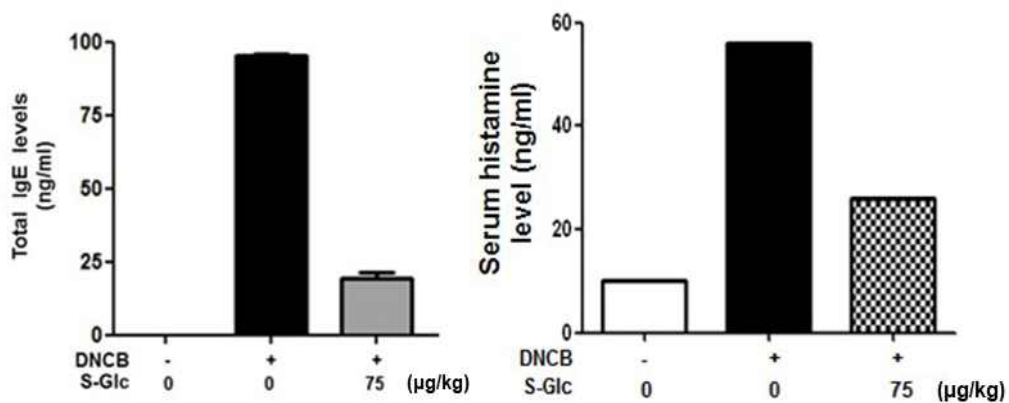


그림 80. 아토피 피부염에서의 생화학적 지표 분석

접촉성 피부염 동물 모델에서 생물학적 지표를 분석하기 위하여 실험동물의 피부 조직을 염색하여, 피부 두께(epidermis thickness; 각질상태) 및 염증세포의 침윤(mast cell infiltration, eosinophil 축적 등)을 평가할 수 있으며, 본 연구에서는 DNCB에 의해 유발된 AD 동물 모델의 등 피부를 생검하여 10% phosphate- buffered formalin(pH 7.2)에 고정하고 파라핀 포매한 뒤, 균일한 두께로 잘라 H&E / toluidine blue(TB) 두 가지 염색 시약을 사용하여 표피의 두께와 염증 부위에서의 면역세포 침착 정도를 비교 분석하였음.

다음 그림 81의 상단 패널에서 H&E 염색을 통해 피부 두께/각질화를 비교해 본 결과 DNCB 처리 그룹에서는 피부 염증으로 인해 각질화가 일어나 피부의 두께가 상당히 증가한 것을 확인할 수 있으며, S-Glc가 처리된 그룹에서는 DNCB에 의한 피부 염증 반응의 결과로 증가한 피부 두께가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 하단 패널에서 동일 부위에서 TB 염색을 통해 염증 부위에서 면역세포들의 침착 정도를 분석한 결과, 염증세포인 비만세포(mast cells)는 TB로 염색되어 파란색 점으로 확인되며, DNCB 처리 그룹에서는 mast cells의 침착이 상당한 정도로 관찰되는 반면에, S-Glc가 처리된 그룹에서는 침착 정도가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었음.

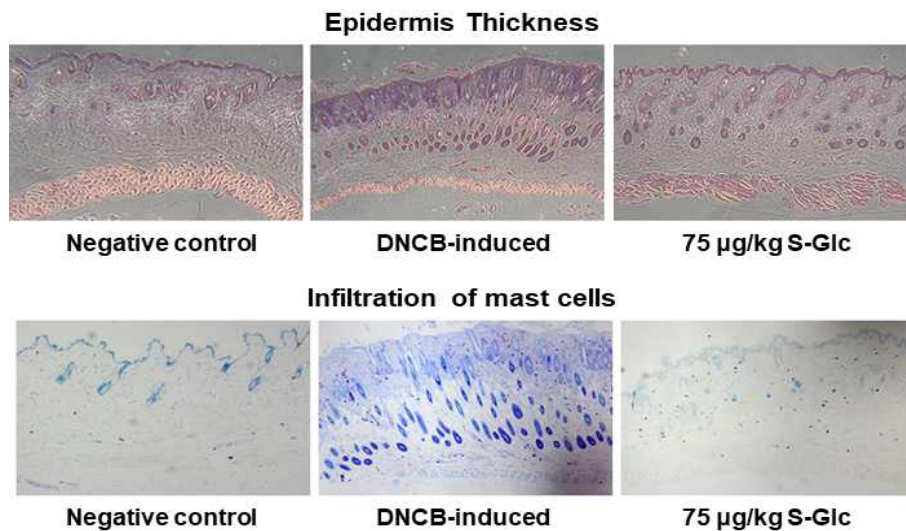


그림 81. 아토피 피부염에서의 생물학적 지표 분석

#### (4) 아토피 피부염의 신호전달 억제 기전 분석

상기 그림들에서 보여준 바와 같이 노각나무 추출물에서 분리한 활성 성분인 S-Glc는 접촉성 피부 염증의 증상을 저해하는 활성을 나타내며, 그 작용 기전을 분석하기 위하여 CCL17의 발현에 중요한 Nuclear Factor(NF)- $\kappa$ B 및 Signal transducer and activator of transcription (STAT) 신호전달 기전을 분석하고자 하였음. 사람 피부 각질세포(HaCaT)를 대상으로 S-Glc를 농도별로 처리하여 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 에 의해 유도되는 NF- $\kappa$ B 신호전달 기전에 주요하게 관여하는 단백질인 p38 단백질의 인산화 정도 및 IKK-I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화 정도를 비교 분석하였으며, 다음으로 IFN- $\gamma$ 의 주요 신호전달 기전을 담당하고 있는 STAT 단백질의 인산화 정도를 비교 분석하였음. 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 HaCaT 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  단독 또는 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 와 S-Glc를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 2 mL씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후 각 well에서 용액을 제거하고 PBS로 씻어준 뒤, RIPA buffer를 사용하여 단백질을 회수하였음. 회수된 단백질의 농도를 bradford 용액을 사용하여 정량하고 동일한 단백질의 양을 사용하여 western-blot을 진행하였음.

그 결과, 그림 82에서와 같이 p38 단백질의 인산화 정도가 S-Glc 처리에 의해 현저하게 감소하였으며 그 하위 신호전달 단백질인 IKK 단백질의 인산화 정도 역시 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 더 나아가 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화 정도를 분석해 본 결과, I $\kappa$ B 단백질은 NF- $\kappa$ B 전사인자와 복합체를 구성하고 있으나 인산화 정도에 따라 복합체에서 NF- $\kappa$ B 단백질이 유리되어 핵 내로 들어가 전사가 시작되게 되는데 S-Glc 처리에 따른 결과를 살펴보면 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화가 강력하게 저해되는 것을 확인할 수 있었음. 또한, IFN- $\gamma$ 는 STAT 전사인자에 영향을 주어 하위 단백질의 발현에 관여한다고 알려져 있는데 본 연구 결과에서 살펴보면 노각나무 추출물에서 분리한 활성 성분인 S-Glc에 의해 STAT의 인산화 정도 또한 강력하게 저해되는 것을 확인할 수 있었음.

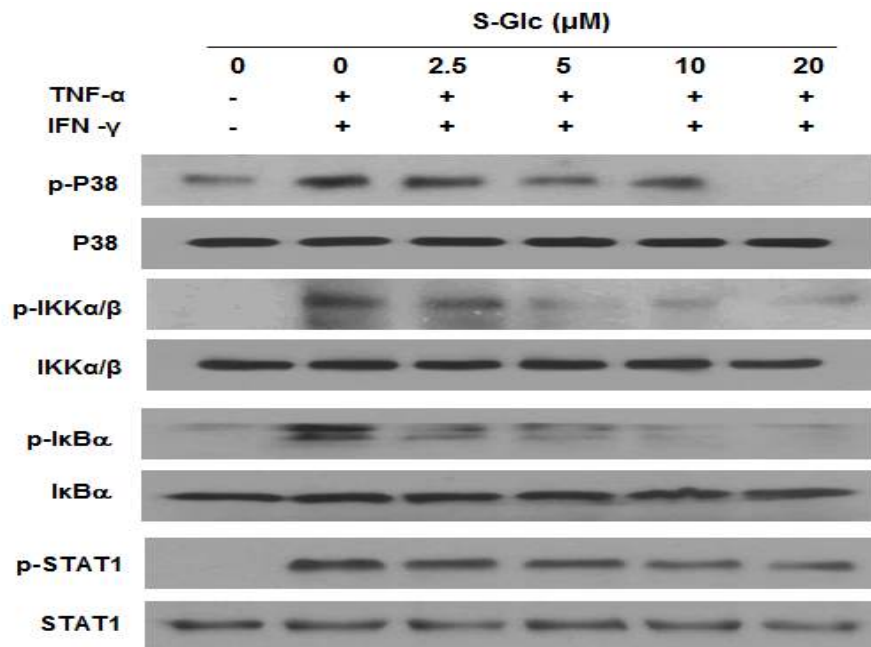


그림 82. 항 아토피 활성에 대한 세포내 신호전달 기전 분석

#### (5) 노각나무 잎 제품화 추출물(SKBE)의 아토피 피부염증 관련 인자 발현 비교

제품화가 가능한 추출 방법에 따라 노각나무 잎을 추출한 다음 사람 피부 각질세포(HaCaT)에서 먼저 세포독성을 MTT assay 방법을 사용하여 확인하였음(그림 83). 96-well cell culture plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 HaCaT 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 SKBE를 처리농도별로 녹여 각 well 당 100  $\mu$ L씩 24시간 동안 처리하였음. 24시간 후 각 well에서 5mg/mL로 준비된 MTT 용액을 20  $\mu$ L씩 첨가한 후, 보라색 결정이 육안으로 확인 될 정도로 5% CO<sub>2</sub>가 제공되는 37°C 배양기에서 배양한 뒤, 모든 용액을 제거하고 각 well에 DMSO 100  $\mu$ L씩을 첨가하여 녹여준 다음 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였음. 측정된 흡광도를 바탕으로 control well을 100%로 하여 각 시료들의 세포독성을 확인하였음. 그 결과 SKBE는 1000  $\mu$ g/mL의 농도에서도 HaCaT 세포에 전혀 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었으며 고농도의 섭취에도 매우 안전하다는 것을 확인할 수 있었음.

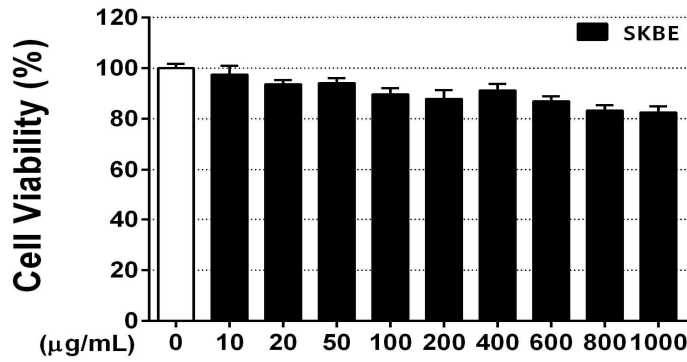


그림 83. HaCaT 세포에 대한 SKBE의 세포독성 분석

또한, 아토피 증상에 중요하게 관련되는 Th1/Th2 케모카인 중에서 대표적인 CCL17(TARC), CCL22(Macrophage-derived chemokine; MDC)의 유전자 발현을 RT-PCR 방법으로 확인해 본 결과, 다음 그림 84과 같이 10 ng/mL의 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 가 유도하는 CCL17, 22의 유전자 발현을 SKBE가 강력하게 저해하는 것을 확인할 수 있었으며 이는 하우스키핑 유전자인  $\beta$ -Actin과의 발현을 비교해 보았을 때, 발현 저해 활성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었음.

6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 HaCaT 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  단독 또는 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 와 SKBE를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 2mL씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후 각 well에서 용액을 제거하고 RNA-Bee 용액을 사용하여 RNA를 분리하고, 농도를 측정하여 5 $\mu$ g의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA를 사용하여 각 target gene에 따른 primer를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 10% agarose gel을 사용하여 전기영동 후 결과를 이미지화하였음. 이러한 결과는 기존의 연구 결과와 상당히 유사한 양상을 나타내는 것을 확인할 수 있었음.

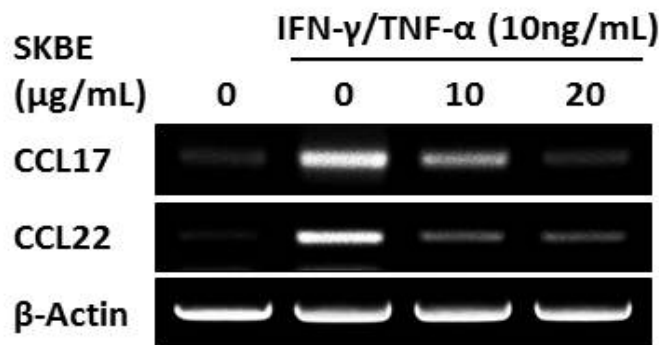


그림 84. 아토피 인자에 대한 SKBE의 유전자 발현 저해 활성

다음으로 CCL17 및 CCL22의 정확한 단백질 발현양을 확인하기 위하여 ELISA 방법을

사용하여 RT-PCR에서 유전자 발현을 검증한 조건과 동일하게 실험을 수행하였음. CCL17 및 CCL22의 발현양을 정량하기 위하여 6-well cell culture plate를 사용하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 HaCaT 세포를 균일하게 분배하고 80% 이상 자라면 serum-free 배지에 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  단독 또는 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 와 SKBE를 처리 농도별로 녹여 각 well 당 600  $\mu$ L씩 18시간 동안 처리하였음. 18시간 후, 각 well에서 배양액만을 회수하여 ELISA kit를 활용하여, kit에서 제공하는 실험방법에 따라 CCL17 및 CCL22의 양을 정량하였음. 아래 그림 85에서 보듯이 유전자 발현 억제 양상과 비슷한 패턴으로 단백질의 발현 양상이 억제되는 것을 확인할 수 있었음.

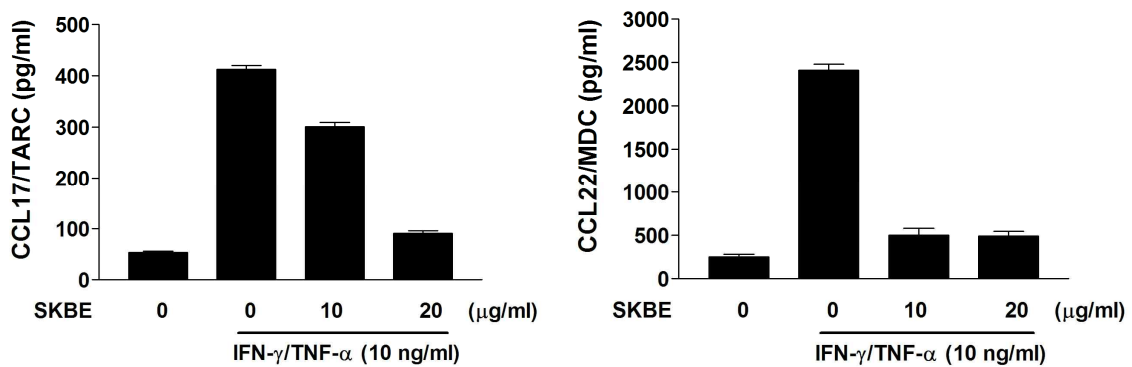


그림 85. 아토피 유발인자에 대한 SKBE의 단백질 발현 저해 활성

(6) 노각나무 잎 제품화 추출물(SKBE)의 *in vivo* 아토피 접촉성 피부염 억제 활성

노각나무 제품화 소재의 임상 진행을 위해 SKBE의 활성을 사전에 확인하기 위하여 아토피 피부염 동물 모델에서 SKBE를 경구 투여하여 접촉성 피부염 개선 활성을 검증하고자 하였음. 접촉성 피부염 개선 효능 연구를 위한 동물 모델로는 아토피 피부염(AD) 연구에 널리 사용되는 DNCB 유도 마우스를 사용하여 SKBE의 활성을 검증할 계획을 수립하고 본 연구를 수행하였음. 동물실험에 사용한 마우스의 등 피부의 체모를 면도하여 피부의 상태를 직관적으로 관찰하기에 편리하도록 하였으며, 총 20개체를 3개의 그룹(negative 6개체 / DNCB 7개체 / DNCB+SKBE 50 mg/kg 7개체)으로 나누었음. 약 1~2주의 적응 기간을 거친 뒤, acetone:olive oil(3:1) 용액에 1%의 농도로 준비한 DNCB 100  $\mu$ L를 매일 일정한 시간에 마우스 등 피부에 도포 하였음. 관절염 활성 분석에 사용한 농도와 동일한 농도로 SKBE의 투여 농도를 설정하고 DNCB로 미리 접촉성 피부염을 유도하였음. 약 2주간 DNCB를 도포하여 피부염을 유발한 다음 4주간 SKBE를 50 mg/kg의 농도로 매일 동일 시간에 경구 투여하였음. 그 결과 아래 그림 86에서와 같이 DNCB에 의해 유도된 접촉성 피부염의 증상이 완화되는 것을 확인할 수 있었음.



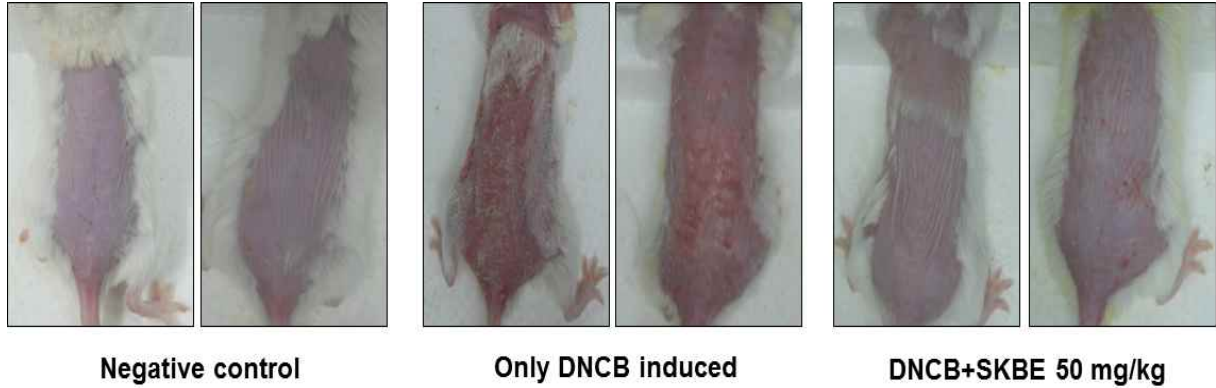


그림 86. SKBE의 경구 투여에 따른 접촉성 피부염 완화 활성

(7) 노각나무 잎 제품화 추출물의 *in vivo* 면역 억제 활성 분석

접촉성 피부염 동물 모델에서 노각나무 제품화 소재를 50mg/kg의 농도로 처리한 그룹과 DNCB만을 처리한 그룹의 동물을 희생하여 비장(spleen) 및 림프절(lymph node)을 분리하여 각 장기의 크기를 비교하여 보았음. 다음 그림 87에서와 같이 DNCB만 처리된 그룹에서는 음성대조군과 비교해 보았을 때 비장 및 림프절 크기가 상당히 증가된 것을 확인할 수 있었으며, SKBE를 50mg/kg 경구 투여한 그룹에서는 음성대조군과 비슷한 정도로 비장과 림프절의 크기가 감소한 것을 확인할 수 있었음. 이와 같은 결과는 SKBE가 전반적인 염증 반응을 잘 억제할 수 있다는 것을 확인할 수 있는 결과임. 추후 확인해야 할 비장 및 림프절 세포의 염증성 마커 비교와 생물학적 지표 분석 및 생화학적, 해부학적 지표의 분석은, SKBE를 기능성 소재로 등록하기 위한 목표에 따라 SKBE와 이를 활용한 아토피 개선 시제품(시제품2)을 함께 기능성 시험법에서 제시하는 분석법에 따른 분석 실험으로 대체하기로 하였음.



그림 87. SKBE 경구 투여에 따른 비장 및 림프절 사이즈 비교

(8) 건강기능식품 기능성 평가 가이드에 따른 기능성 시험법 개요 및 시험 연구유형

건강기능식품 소재로 SKBE를 등록하고자 하는 목표를 설정하고 ‘면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편을 참고하여 기능성 시험법에 제시된 분석법에 따른 실험을 진행하기로 계획하였으며 아래의 개요는 식품의약품안전처의 식품의약품안전평가원에서 제공하는 ‘건강기능식품 기능성 평가 가이드’의 내용을 참고하여 작성하였음.

피부의 면역 과민반응 기능 관련 인자에서 ‘과민반응’이란 특정 항원에 대해 과도한 면역반응이 일어나 조직 손상 등의 부적절한 피해를 주는 면역 반응을 지칭하며 제1형부터 제4형까지 분류되고, 제1형 과민반응은 알레르기로 잘 알려져 있음. 현대의 알레르기는 ‘다양한 항원에 대한 면역계의 반응으로 발생하는 질병’으로 이전 보다 제한된 의미로 정의되며, 알레르기는 과민반응으로서 면역 반응들의 여러 유해 반응들 중 하나이며, 이런 유해 반응들은 조직 손상을 일으키며 심각한 질병을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있음.

피부는 대다수 알레르겐들에 대한 효과적인 방어벽을 형성하나, 소량의 알레르겐이 국소적으로 주입되면 방어벽은 무너질 수 있으며, 표피나 진피로의 침입은 국소적인 알레르기 반응을 유발함. 피부에서 국소적으로 비만세포(mast cell)가 활성화되면 즉시 혈관 투과성을 증가시켜 수분(혈장 단백질과 혈장액)을 혈관 외로 이동시키며 부종을 일으킴. 활성화된 비만세포가 분비한 히스타민은 피부에 가려움을 동반하는 붉은 팽창을 일으키며, 때로는 오래 지속되는 염증 반응이 피부에서 나타나는데, 이것은 주로 알레르기 소인이 있는 어린이들에서 만성 염증 질환인 아토피 피부염의 형태로 발생함.

피부 면역 과민반응의 주요 작용 기전으로는 비정상적인 면역반응(면역조절기능 이상)과 피부 장벽 기능의 이상이 있으며, 피부의 면역 과민반응 시에는 혈청 IgE 및 알레르겐 감작 증가, 급성 병변에서 Th2 사이토카인 증가, 피부 림프구 관련 항원이 발현된 T세포의 증가, 랑게르한스 세포와 염증성 수지상 표피세포에서 FcεRI 발현 증가 등이 나타나며, 피부 장벽이 손상되면 외부 항원 및 균의 침투를 막기 위하여 피부에서는 각질 형성 세포와 항원 전달 세포들을 통하여 즉각적인 선천 면역반응이 일어나고 후천 면역반응도 이어지는데, 피부 면역 과민반응 상태에서는 이들 선천 면역계와 후천 면역계가 비정상적으로 반응하여 알레르기 염증 반응이 발생하는 것으로 알려져 있음.

이상의 개요를 바탕으로 건강기능식품 기능성 평가 가이드에 따른 기능성 시험 방법을 표 2에 첨부하였으며 ‘면역조절 기능 이상’에 대해서 SKBE와 아토피 개선 시제품(시제품2)의 활성을 접촉성 피부염 동물 모델을 대상으로 분석하였음.

아토피 피부염 동물 모델에 투여한 시료의 농도는 관절염 활성 분석에 사용한 농도와 동일한 농도로 SKBE의 투여 농도를 설정하였으며(50mg/kg), 시제품2에는 동일 농도의 SKBE와 부원료로 (주)생명의 나무에서 제시한 G-NANA를 첨가하여 시제품2(SKBE 50 mg/kg + G-NANA 15 mg/kg)를 제조하여 실험동물 개체의 체중에 따라 매일 동일 시간에 경구 투여하였음.

표 17. 과민피부상태 개선 기능성 평가 시 각 바이오마커 별 측정 가능한 시험 연구유형

구분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		시험관	동물	인체
면역조절 기능이상	IgE	○	○	○
	호산구 내 Fcε 수용체	○	○	○
	Th1 cytokine(IL-2, IFN-r 등)	○	○	○
	Th2 cytokine(IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등)	○	○	○
	Th1 cytokine/Th2 cytokine	○	○	○
	CD4+Tcell/CD8+Tcell	○	○	○
	TSLP(Thymic stromal lymphopietin)	○	○	○
	TARC(Thymus and activation-regulated chemokine)	○	○	○
	총 호산구수(total eosinophil count; TEC)		○	○
	호산구 양이온단백질(eosinophil cationic protein; ECP)		○	○
	Eotaxin		○	○
	Scratching behavior frequency(Itching time)		○	
	Dermatitis Severity 평가 사진		○	
	조직 병리학적 검사(Histological analysis)		○	
	피부단자검사			○
	RAST(Radioallergosorbent test)			○
	SCORAD score(Scoring of Atopic Dermatitis)			○

(9) 아토피 동물모델에서 SKBE 및 아토피 개선 시제품(시제품2)에 의한 IgE 발현 분석 결과 피부의 면역 과민반응과 IgE의 연관성은 혈청 IgE 증가가 습진의 증상 정도와 비례하며, 천식 및 알레르기 비염에서도 혈청 IgE가 증가하며, 항원 노출 후 호염구에서 IgE 분비가 증가하고, 비만세포와 호염구에서 IgE 수용체가 발견되는 것 등으로 설명됨. 하지만 경구 면역억제제를 사용하여 증상을 개선시켜도 혈청 IgE 수치는 비례하여 감소하지 않고 자가 IgE 항체가 발견되어 IgE 이외에 다른 요소들 또한 주목받기 시작함. 피부의 면역 과민반응 상태가 IgE 매개성인 경우 혈청내 총 IgE가 증가하는 것으로 알려져 있음.

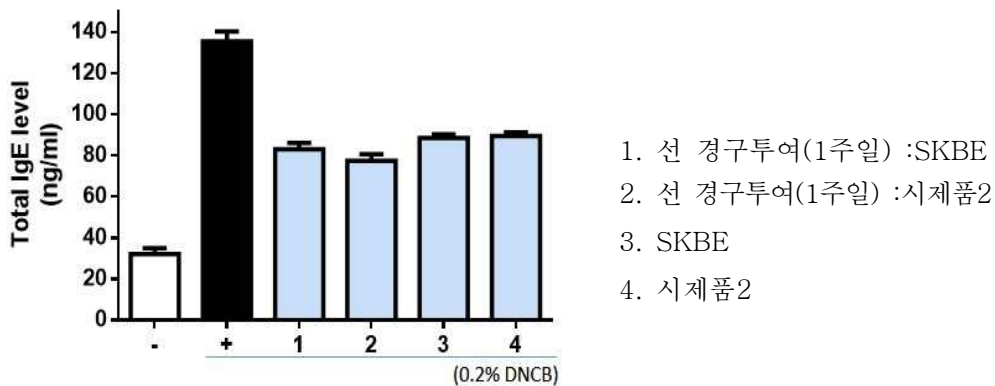


그림 88. SKBE 및 시제품2에 의한 IgE 발현 분석



따라서 그림 88와 같이 DNCB로 접촉성 피부염을 유발한 실험 동물의 혈액에서 혈장을 분리하여 ELISA 방법을 사용하여 IgE의 발현 양상을 분석하였음. 정도의 차이는 있으나 DNCB만 처리된 그룹에 비해서 SKBE 또는 시제품2가 투여된 그룹에서 총 IgE의 발현이 감소하는 양상을 확인할 수 있었음.

(10) 아토피 동물 모델에서 SKBE 및 시제품2에 의한 Th1 사이토카인 발현 분석 결과

후천 면역계 이상 반응에서 피부가 면역 과민반응 상태인 경우 후천 면역반응은 급성기 동안에 일어나는 Th2 사이토카인(IL-4, 13, 31)과 Th22 사이토카인(IL-22)의 증가와 연관되며, 급성기에는 피부 장벽 손상에 의해 외부 항원이 쉽게 침투하여 랑게르한스 세포에 의해 감각이 일어나며, Th2와 Th17의 염증 반응이 우세하여 관련 사이토카인들에 의해 호산구와 호중구가 모이게 되지만, 만성기에는 반복되는 자극물질과 알레르겐 등의 노출에 의해 Th1, Th2, Th22의 염증 반응이 우세하게 되어 관련 사이토카인에 의해 표피의 증식 및 각질 형성 세포 손상 등의 반응이 나타남.

이중에서 Th1 사이토카인의 경우 주로 IL-2, IFN- $\gamma$  등이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이들 Th1 사이토카인의 분석법에는 세포 실험의 경우 세포에 시험물질을 처리하고 일정 시간 후 배양 상층액을 취하여 각각의 사이토카인을 ELISA 방법으로 측정하거나 동물 시험에서 기관지 폐포 세척액을 원심분리한 상층액, 잘라낸 조직 세포를 배양한 배양 상층액, 생검을 통한 피부조직의 균질 상층액 등에서 ELISA 방법을 사용하여 분석함.

본 연구에서 역시 DNCB를 활용한 접촉성 피부염 동물 모델의 혈청을 분리하여 ELISA 방법을 사용하여 Th1 사이토카인인 IL-2, IFN- $\gamma$ 의 발현에 SKBE와 시제품2가 미치는 영향을 분석하였음. 그림 89에서와 같이 정도의 차이는 있으나 DNCB만 처리된 그룹에 비해서 SKBE 또는 시제품2가 투여된 그룹에서 총 IL-2의 발현이 약하게나마 감소하는 양상을 확인할 수 있었으며, IFN- $\gamma$ 의 발현에는 별다른 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었음.

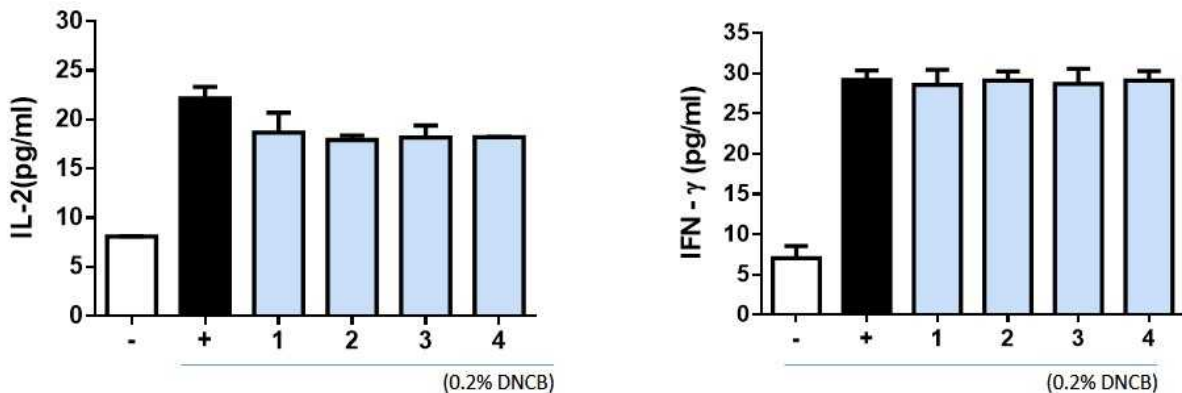


그림 89. SKBE 및 시제품2에 의한 Th1 사이토카인 발현 분석

1. 선 경구투여(1주일) : SKBE | 2. 선 경구투여(1주일) : 시제품2 | 3. SKBE | 4. 시제품2

(11) 아토피 동물 모델에서 SKBE 및 시제품2에 의한 Th2 사이토카인 발현 분석 결과

피부가 면역 과민반응 상태에서 후천 면역 반응은 급성기 동안에 일어나는 Th2 사이토카인(IL-4, 13, 31)과 Th22 사이토카인(IL-22)의 증가와 연관되며 관련 부위에는 피부 림프구 관련 항원이 발현된 T세포가 증가되어 있음. 손상된 피부 장벽을 통하여 외부 항원이 침투하게 되면 수지상 세포가 항원을 인식하여 Th2 세포를 활성화시키고, 활성화된 Th2 세포에서 IL-4, 5, 10, 13, 17, 31 등의 사이토카인이 분비되며, IL-4, 13에 의해 B 세포가 활성화되어 IgE가 분비되며, IL-5에 의해 호산구가 모여들며, 분비된 IgE가 비만세포와 호염구의 IgE 수용체에 결합한 후 히스타민, 중성 단백질 분해효소, 프로스타글란딘 D2, 류코트리엔 C4/D4/E4 등의 다양한 염증 매개 물질을 분비시켜 피부 면역 과민반응 상태의 임상증상을 만드는 것으로 알려져 있음.

아토피 피부염에 관여하는 Th2 사이토카인에는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등이 잘 알려져 있으며, 이들의 분석에는 세포 실험의 경우, 세포에 시험물질을 처리하고, 일정 시간 후 배양 상층액을 취하여 각각의 사이토카인을 ELISA 방법으로 측정하거나 동물 시험에서 기관지 폐포 세척액을 원심분리한 상층액, 잘라낸 조직 세포를 배양한 배양 상층액, 생검을 통한 피부 조직의 균질 상층액 등에서 ELISA 방법을 사용하여 분석할 수 있음.

본 연구에서 역시 DNCB를 활용한 접촉성 피부염 동물 모델의 혈청을 분리하여 ELISA 방법을 사용하여 Th2 사이토카인인 IL-4, 10의 발현에 SKBE와 시제품2가 미치는 영향을 분석하였음. 그림 90의 결과와 같이 DNCB만 처리된 그룹에 비해서 SKBE 또는 시제품2가 투여된 그룹에서 IL-4, 10의 발현에는 별다른 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었음.

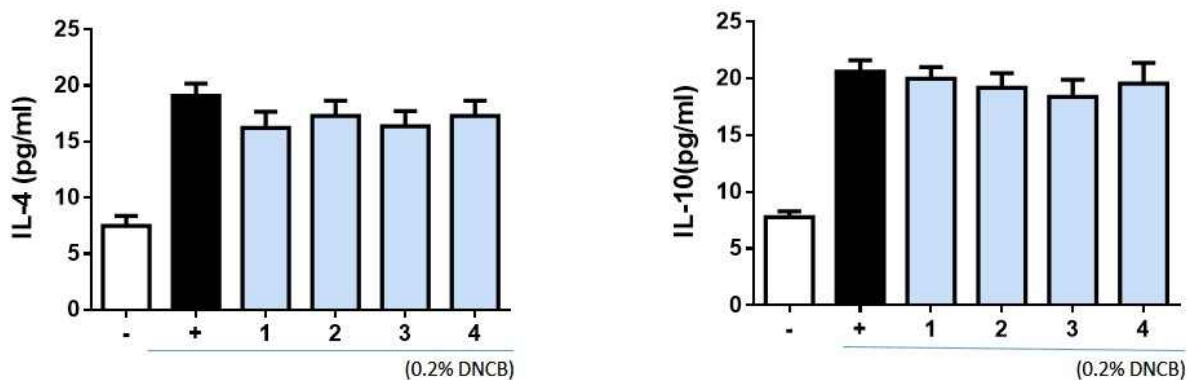


그림 90. SKBE 및 시제품2에 의한 Th2 사이토카인 발현 분석

1. 선 경구투여(1주일) : SKBE | 2. 선 경구투여(1주일) : 시제품2 | 3. SKBE | 4. 시제품2

(12) 아토피 동물 모델에서 SKBE 및 시제품2에 의한 TSLP 발현 분석 결과

아토피 피부염에서 유전 및 여러 환경 요인에 의해 피부 장벽이 손상되면 외부로부터 침투한 각종 알레르겐에 쉽게 노출되고, 각질 형성 세포에서는 IL-7과 유사한 사이토카인인

Thymic stromal lymphopoietin(TSLP)을 분비함. TSLP는 알레르기 염증 반응의 ‘master switch’ 라고도 불리는데 비만세포, 호염구, 호산구 등 피부 염증을 일으키는 주요 세포에 영향을 주고, 선천면역 및 후천면역 반응 모두에 영향을 주며, Th2 면역반응을 유도하여 피부를 면역 과민반응 상태로 이르게 함에 있어 매우 중요한 요소로 인식되고 있음.

또한, 선천 면역계 이상 반응에서 피부의 면역 과민반응 상태에서 또 하나의 중요한 사이토카인인 TSLP는 CD11c+ myeloid dendritic cell을 유도하여 Th2 염증 반응을 일으키는 것으로 알려져 있음. 이러한 TSLP는 과민 피부 상태에 따른 병변부에서 증가되어 있으며 과민 피부 상태의 중증도와도 연관됨. 세포 실험이나 실험 동물의 피부 생검 조직 등에서 TSLP의 mRNA 발현을 RT-PCR 방법을 이용하여 측정할 수 있으며, 채취 혈액에서 혈청을 분리하여 ELISA 방법을 사용하여 분석할 수 있음.

본 연구에서 역시 DNCB를 활용한 접촉성 피부염 동물 모델의 혈청을 분리하여 ELISA 방법을 사용하여 TSLP의 발현에 SKBE와 시제품2가 미치는 영향을 분석하였음. 그림 91의 결과와 같이 DNCB만 처리된 그룹에 비해서 SKBE 또는 시제품2가 투여된 그룹에서 TSLP의 발현은 약간 감소하는 양상을 보였음.

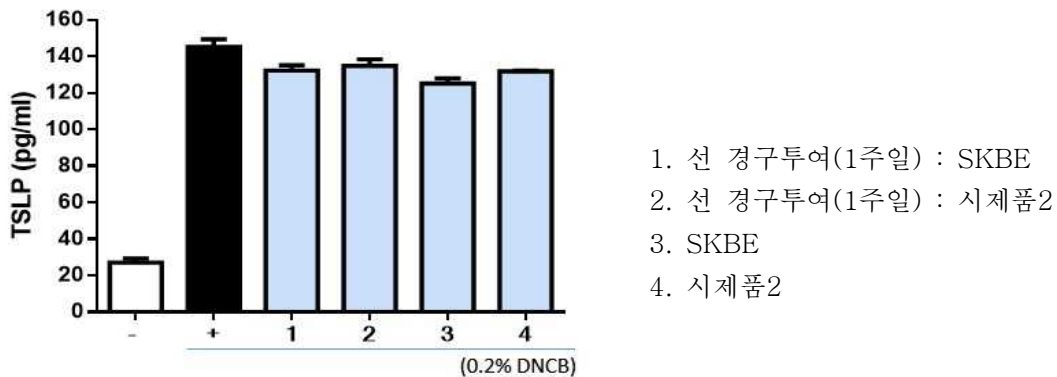


그림 91. SKBE 및 시제품2에 의한 TSLP 발현 분석

### (13) 아토피 동물 모델에서 SKBE 및 시제품2에 의한 CCL17(TARC) 발현 분석 결과

CCL17/TARC는 C-C motif chemokine receptor 4(CCR4) 세포의 반응을 불러일으키는 Th2 chemokine의 하나로서 피부의 면역 과민반응 상태에서 표피의 각질 형성 세포, 혈관 내피세포, T세포와 수지상 세포에서 발현하는 것으로 알려져 있음. 피부 생검을 이용하여 실험 동물의 피부에서 TARC 수준을 ELISA 방법으로 측정할 수 있으며, 본 연구에서 역시 DNCB로 접촉성 피부염을 유발한 동물 모델의 혈청을 분리하여 ELISA 방법을 사용하여 CCL17/TARC의 발현에 SKBE와 시제품2가 미치는 영향을 분석하였음. 그림 92의 결과와 같이 DNCB만 처리된 그룹에 비해서 SKBE 또는 시제품2가 투여된 그룹에서 CCL17/TARC의 발현은 정도의 차이는 있지만 뚜렷하게 감소하는 양상을 확인할 수 있었음.

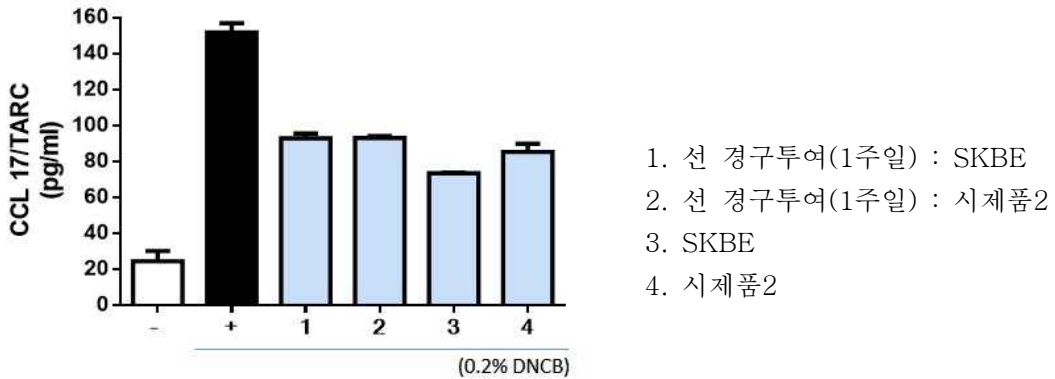


그림 92. SKBE 및 시제품2에 의한 CCL17/TARC 발현 분석

(14) 아토피 동물 모델에서 SKBE 및 시제품2에 의한 ECP 발현 분석 결과

호산구 양이온단백질(eosinophil cationic protein; ECP)은 호산구 과립에서 분비되는 물질로서, 염증 반응을 야기하는 것으로 알려져 있으며, 호산구의 탈과립은 IgA, IgG, IgE 등의 항체가 호산구 표면에 존재하는 수용체에 결합하는 것에서도 유발됨. 실험동물 또는 사람의 혈청에서 ELISA 방법으로 측정할 수 있음.

본 연구에서 역시 DNCB로 접촉성 피부염을 유발한 동물 모델의 혈청을 분리하여 ELISA 방법을 사용하여 ECP의 발현에 SKBE와 시제품2가 미치는 영향을 분석하였음. 그림 93의 결과와 같이 DNCB만 처리된 그룹에 비해서 SKBE 또는 시제품2가 투여된 그룹에서 ECP의 발현은 정도의 차이는 있지만 뚜렷하게 감소하는 양상을 확인할 수 있었으며, 미리 투여한 경우보다 DNCB 유도 후 투여한 그룹들에서 더 뛰어난 저해 활성을 확인할 수 있었음.

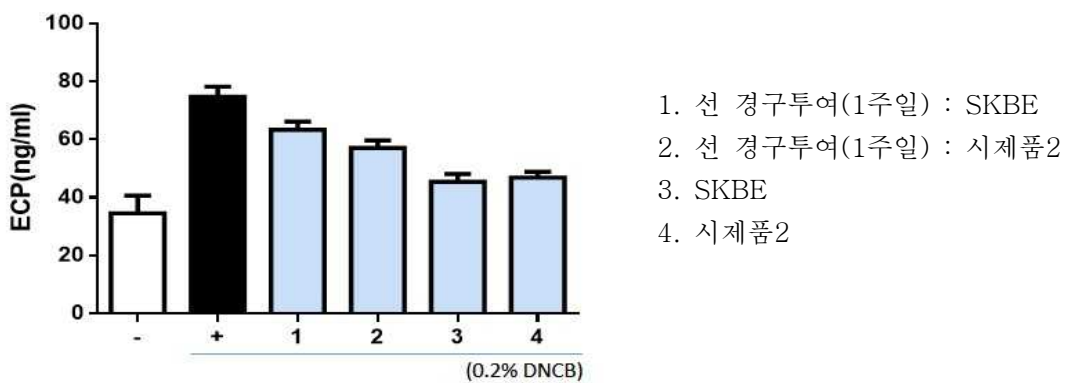


그림 93. SKBE 및 시제품2에 의한 ECP 발현 분석

(15) 아토피 동물 모델에서 SKBE 및 시제품2에 의한 Eotaxin 발현 분석 결과

Eosinophil chemotactic proteins(Eotaxin)은 CC 계열 케모카인의 일종으로서 호산구에 작용하여 조직 내 호산구 축적에 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 수치가 낮을수록 염증 개선

효과가 있다고 판정하며, 피부 생검을 이용하여 실험동물의 피부에서 eotaxin 수준을 ELISA 방법을 사용하여 측정할 수 있음.

본 연구에서 역시 DNCB를 활용한 접촉성 피부염 동물 모델의 혈청을 분리하여 ELISA 방법을 사용하여 Eotaxin의 발현에 SKBE와 시제품2가 미치는 영향을 분석하였음. 그림 94의 결과와 같이 DNCB만 처리된 그룹에 비해서 SKBE 또는 시제품2가 투여된 그룹에서 Eotaxin의 발현은 정도의 차이는 있지만 전체 그룹의 경우에서 감소하는 양상을 확인할 수 있었음.

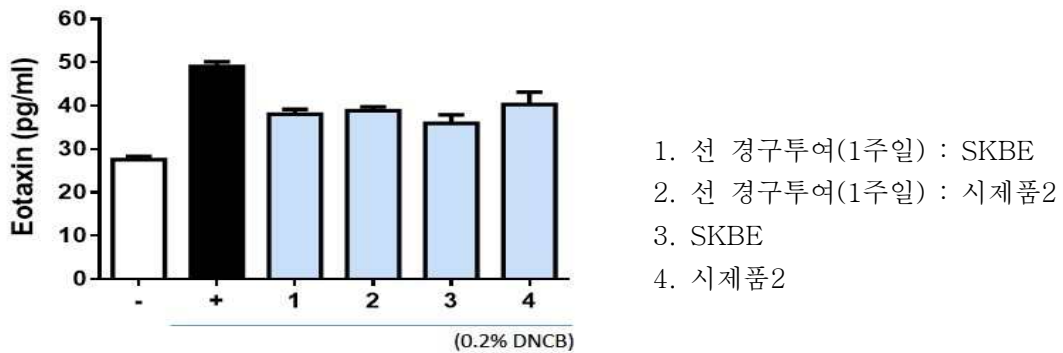
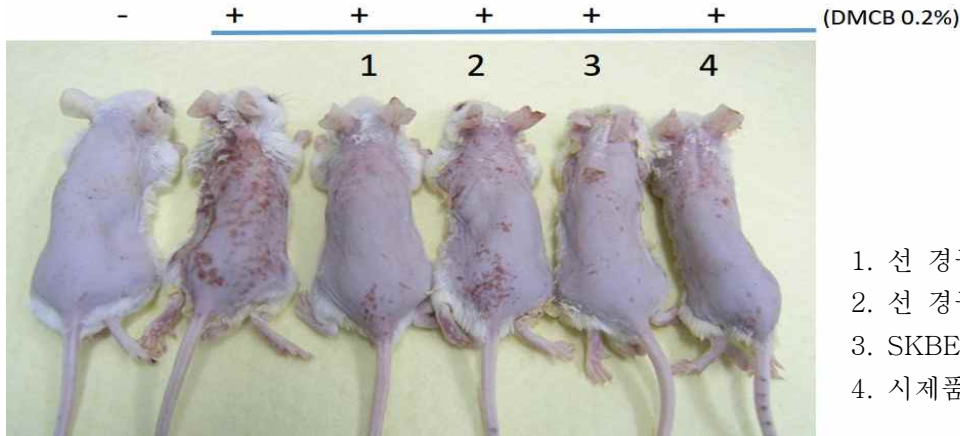


그림 94. SKBE 및 시제품2에 의한 Eotaxin 발현 분석

(16) 아토피 동물 모델에서 SKBE 및 시제품2의 피부염 개선 활성 분석(조직 병리학적 검사)

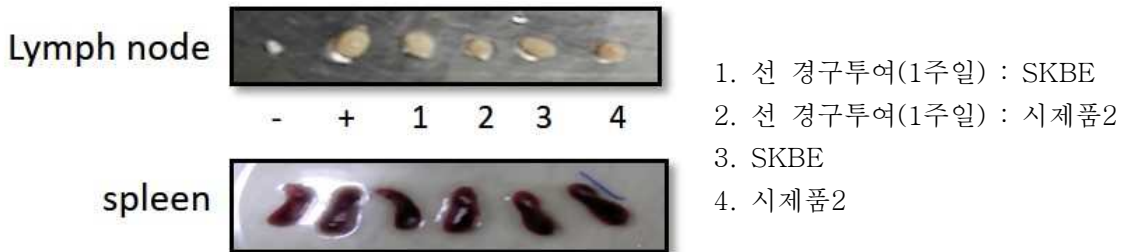
아토피 피부염 동물 모델에서 SKBE와 시제품2의 피부염증 개선 활성을 검증하기 위하여 접촉성 피부염 동물 모델을 대상으로 SKBE와 시제품2를 경구 투여하여 변화를 분석하였음. 관절염 활성 분석에 사용한 농도와 동일한 농도(50 mg/kg)로 SKBE의 투여 농도를 설정하였으며, 시제품2에는 동일 농도의 SKBE와 부원료로 G-NANA(15 mg/kg)를 첨가하였음. 동물실험에 사용한 마우스의 등 피부의 체모를 면도하여 피부의 상태를 직관적으로 관찰하기에 편리하도록 하였으며, 총 30개체를 6개의 그룹(negative 5개체 / DNCB 5개체 / SKBE 선 경구투여(1주일) 5개체 / 시제품2 선 경구투여(1주일) 5개체 / SKBE 5개체 / 시제품2 5개체)으로 나누었음. 약 2주간 DNCB를 미리 도포하여 접촉성 피부염을 유발한 다음 4주간 SKBE와 시제품2를 매일 동일 시간에 실험동물의 체중에 따라 경구 투여하였음. 그 결과 아래 그림 95에서와 같이 DNCB에 의해 유도된 접촉성 피부염의 증상이 완화되는 것을 육안으로 확인할 수 있었음.



1. 선 경구투여(1주일) : SKBE
2. 선 경구투여(1주일) : 시제품2
3. SKBE
4. 시제품2

그림 95. SKBE 및 시제품2에 의한 접촉성 피부염 개선 분석

접촉성 피부염 동물 모델을 희생하여 면역반응에 주요하게 관여하는 장기인 비장(spleen)과 림프절(lymph node)을 분리하여 각 장기의 크기를 비교하여 보았음. 다음 그림 96에서와 같이 DNCB만 처리된 그룹에서는 음성 대조군과 비교해 보았을 때 비장 및 림프절 크기가 상당히 증가된 것을 확인할 수 있었으며, SKBE와 시제품2를 투여한 그룹에서는 DNCB 처리 그룹에 비해서 비장과 림프절의 크기가 감소한 것을 확인할 수 있었음. 이와 같은 결과는 SKBE 및 시제품2가 전반적인 염증 반응을 억제할 수 있다는 것을 확인할 수 있는 결과이며 과민면역 억제제로 사용될 수 있는 가능성을 보여주는 결과임.



1. 선 경구투여(1주일) : SKBE
2. 선 경구투여(1주일) : 시제품2
3. SKBE
4. 시제품2

그림 96. SKBE 및 시제품2에 의한 염증 관련 장기 분석

접촉성 피부염 동물 모델에서 생물학적 지표를 분석하기 위하여 실험동물의 피부 조직을 취하여 염색하여, 피부 두께(각질상태) 및 염증세포의 침윤(mast cell infiltration, eosinophil 축적 등)을 평가할 수 있으며, 본 연구에서는 접촉성 피부염 유발 동물의 등 피부를 생검하여 10% phosphate-buffered formalin(pH 7.2)에 고정시킨 후 파라핀 포매한 뒤, 균일한 두께로 잘라 toluidine blue로 염색하여 현미경을 이용하여 확대하여 다양한 염증세포와 비만세포(mast cells)의 변화를 관찰하였음. 다음 그림 97에서 피부 염증세포인 msat cell은 toluidine blue로 염색되어 파란색 점으로 확인되며, DNCB만 처리된 그룹에서 증가된 mast cell의 침착 정도는 SKBE 및 시제품2의 투여에 의해 현저하게 침착 정도가 감소하는 것을 확인할 수 있었음.



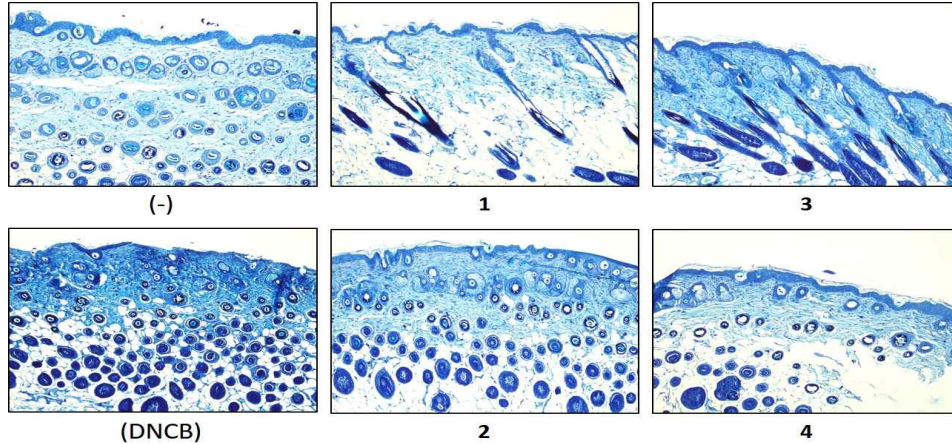


그림 97. SKBE 및 시제품2에 의한 피부 염증세포 침윤 저해 활성 분석  
 1. 선 경구투여(1주일) : SKBE | 2. 선 경구투여(1주일) : 시제품2 | 3. SKBE |  
 4. 시제품2

차. 노각나무 추출물을 이용한 인체적용시험

(1) 관절 건강 인체적용시험

본 과제에서는 노각나무 추출물의 기능성을 사람을 대상으로 평가하기 위하여 관절 건강 인체적용시험을 수행하였음.

(가) 인체적용시험 명칭

노각나무 추출물의 골관절염 개선에 대한 유효성 및 안전성 평가 : 8주, 무작위배정, 이중 눈가림, 평행, 위약대조 인체적용시험

(나) 인체적용시험의 목적

① 1차 목적

시험식품 투여군과 대조식품 투여군에 대해서 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지 통증평가 설문 [Visual analogue scale(이하 VAS)]의 변화를 비교하여 노각나무 추출물의 골관절염 개선을 평가한다.

② 2차 목적

㉞ 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 통증 및 기능상태평가 설문 [Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index(이하 WOMAC), Lequesne functional severity index(이하 LFI)] 의 변화를 비교한다.

㉟ 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 염증성 cytokine [IL-6, TNF- $\alpha$ ] 의 변화를 비교한다.

㊱ 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사, 임상적 이상반응 발현상황, 약물 복용력 등을 통하여 식품의 안전성을 평가한다.

(다) 실시기관 및 주소, 연구자, 인체적용시험 기간

- ① 실시기관 : 분당 서울대학교병원
- ② 주소 : (13620) 경기도 성남시 분당구 구미로 173번길 82
- ③ 시험책임자 : 내분비내과 장학철 교수
- ④ 공동연구자 : 내분비내과 임수 부교수, 내분비내과 최성희 부교수, 재활의학과 임재영 부교수
- ⑤ 인체적용시험 기간 : 인체적용시험 승인일로부터 12개월

(라) 주요 선정기준

- ① 만 40세 이상의 성인 남성 또는 여성
- ② 퇴행성 슬관절염의 임상적 진단 기준 및 Kellgren-Lawrence 방사선학적 Grade를 만족하는 자

[퇴행성 슬관절염의 임상적 진단 기준]

American College of Rheumatology classification criteria(이하 ACR criteria)를 기준으로 다음의 ㉠ 또는 ㉡에 해당하는 경우

- ㉠ knee pain AND radiographic osteophytes (무릎 통증 그리고 골극)
- ㉡ knee pain AND age ≥ 40 AND morning stiffness ≤ 30 minutes in duration AND crepitus on motion (무릎 통증 그리고 40세 이상의 나이 그리고 조조강직이 30분 이하 그리고 활동시 마찰음)

[Kellgren-Lawrence 방사선학적 Grade]

Kellgren-Lawrence Grade로 다음의 I 또는 II 또는 III 에 해당하는 경우

Grade	Osteoarthritis severity	Radiographic findings
0	None (정상)	Normal (정상)
I	Doubtful (의심)	Doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lipping (골극의 가능성만 존재)
II	Minimal (경증)	Definite osteophytes and possible narrowing of joint space (확실한 골극과 관절강의 좁아짐의 가능성이 있는 경우)
III	Moderate (중등도)	Moderate multiple osteophytes, definite narrowing of joint space and some sclerosis and possible deformity of bone ends (중간크기의 골극과 혹은 확실한 관절강의 좁아짐)
IV	Severe (중증)	Large osteophytes, marked narrowing of joint space, severe sclerosis and definite deformity of bone ends (커다란 골극, 심한 관절강의 좁아짐 혹은 골경화 양상이 존재하는 경우)

- ③ 슬관절 통증에 대해 VAS(100mm) 점수가 30mm 초과 80mm 미만인 자
- ④ 본 인체적용시험의 개요를 설명 받고 동의서에 서명한 자



(마) 주요 선정 제외기준

- ① 골관절염 치료를 위해 아세트아미노펜(acetaminophen), 이부프로펜(ibuprofen), 인도메타신(indomethacin)과 같은 비스테로이드성 항염증제(Non Steroidal Antiinflammatory Drugs, 이하 NSAIDs)를 복용하고 있는 자
- ② 시험 전 히알루론산(hyaluronic acid) 또는 스테로이드(steroid) 등의 약제로 관절강 내 주사를 시행한 자
- ③ 퇴행성 슬관절염으로 수술을 시행한 자
- ④ 시험 전 삼출액 천자를 시행한 자
- ⑤ X-ray 검사상 정상소견이거나 퇴행성 관절염 이외의 점액낭염, 건초염, 섬유근육통, 통풍, 류마티스 관절염, 염증성, 대사성, 신경병성, 종양, 감염, 자가면역질환 등으로 인하여 슬통을 호소하는 자
- ⑥ 알코올 중독 또는 약물 남용의 병력이 있는 자
- ⑦ BMI 45kg/m<sup>2</sup> 이상의 비만증인 자
- ⑧ ALT, AST, Total bilirubin, Alkaline Phosphatase 검사치가 정상 상한치의 2.5배 이상 높은 간기능 장애자
- ⑨ 신부전 병력이 있거나 혈청 Creatinine 검사치가 정상 상한치의 30% 이상 높은 신기능 장애자
- ⑩ Hepatitis B test 양성 반응을 보이는 자
- ⑪ 시험 전 심근경색증, 심부전, 뇌경색, 뇌출혈, 협심증, 뇌졸중, 일시적인 허혈성 심장질환 등의 병력이 있는 자
- ⑫ 암(cancer)의 병력이 있는 자
- ⑬ 임신 또는 수유 중인 여성
- ⑭ 적절한 피임(피임제 투여, 자궁 내 피임기구 또는 격막 삽입방법 등)을 하고 있지 않은 가임 여성

[가임 여성]

인체적용시험 기간 동안 임신가능성을 최소화할 수 있는 적절한 피임법을 사용해야 한다. ‘가임 여성’이라 함은 ① 불임수술(자궁절제술, 양측 나팔관 결찰 또는 양측 난소 절제술)을 받지 않았거나, ② 폐경(12개월간의 자연적인 무월경)이 되지 않은 여성을 말한다. 피임을 위하여 피임제 투여(경구용, 이식용, 주사용 등)를 사용하거나, 자궁 내 피임기구 또는 격막 삽입방법(피임용 격막, 콘돔, 살정제 등)을 쓰고 있는 경우, 금욕하고 있거나, 파트너가 불임(예: 정관절제술) 상태인 경우에도 가임 여성으로 간주한다.

- ⑮ 시험제품에 대한 과민 반응력이 있는 자
- ⑯ 병용약물로 인해 심각한 약물 상호작용의 위험성이 있는 자
- ⑰ 의학적, 정신적으로 연구약물 복용의 금기 사항을 가지는 자

- ⑱ 법적으로 인체적용시험에 참가가 불가능한 자
- ⑲ 현재 본 인체적용시험 이외에 연구개발 중인 다른 시험에 참가하고 있거나, 시험 전 4주 이내에 타 인체적용(임상)시험에 참여하였던 자
- ⑳ 본 인체적용시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 연구자가 판단하여 시험을 진행할 수 없다고 판단되는 자

(바) 인체적용시험 대상자 수

총 78 례

[시험식품군 39명, 대조식품군 39명 (탈락율 10%씩 고려)]

(취약한 연구대상자 수 : 해당사항 없음)

(사) 인체적용시험용 식품

- ① 시험식품군 : SKE 100
- ② 대조식품군 : SKE 위캡슐(텍스트린)

(아) 인체적용시험 설계

무작위배정, 이중 눈가림, 평행, 위약대조

(자) 용법 및 용량

- ① 시험식품군 : 1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구 투여, 8주간 복용 [ SKE 100mg \* 1캡슐 = 100mg/day ]
- ② 대조식품군 : 1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구 투여, 8주간 복용 [ SKE 위캡슐 100mg \* 1캡슐 = 100mg/day ]

(차) 인체적용시험 방법 및 검사/방문 일정

① 인체적용시험 방법

피험자는 총 78명 [시험식품군 39명, 대조식품군 39명]으로 이루어져 있으며, 본 연구에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 피험자를 선정하고 필요한 임상검사 및 설문지를 실시한다. Visit 2에 선정 및 제외기준에 적합한 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 시험식품군과 대조식품군으로 배정하여 총 8주간의 Treatment period를 진행한다.

Visit 1 -7d (-1wk)	Double-Blind treatment period		
	Visit 2 1d (0wk+7)	Visit 3 28d (4wk±7)	Visit 4 56d (8wk±7)
선별검사	무작위배정, 인체적용시험용 식품 처방	인체적용시험용 식품 반납 및 처방	인체적용시험용 식품 복용 종료

② 검사/방문 일정

방문일	검사 항목
방문 1 -7일 (-1주)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 인구학적, 병력 및 치료력 조사</li> <li>▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사(두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등), 신체 계측(키, 체중)</li> <li>▶ 임상실험실 검사 1 (일반혈액검사, 혈청생화학검사, 뇨검사)</li> <li>▶ 임상실험실 검사 2 (B형간염 검사), 심전도(ECG) 검사</li> <li>▶ 임신 여부 검사(가임 여성)</li> <li>▶ X-ray 검사(무릎), VAS 평가</li> </ul>
방문 2 1일 (0주+7, 방문1 기준)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사, 신체 계측</li> <li>▶ 임상실험실 검사 1, 임신 여부 검사(가임 여성)</li> <li>▶ VAS 평가, WOMAC 평가, LFI 평가</li> <li>▶ IL-6, TNF-<math>\alpha</math> 평가</li> </ul>
방문 3 28일 (4주±7, 방문2 기준)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사, 신체 계측</li> <li>▶ 임상실험실 검사 1, 임신 여부 검사(가임 여성)</li> <li>▶ VAS 평가, WOMAC 평가, LFI 평가</li> <li>▶ IL-6, TNF-<math>\alpha</math> 평가</li> </ul>
방문 4 56일 (8주±7, 방문2 기준)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사, 신체 계측</li> <li>▶ 임상실험실 검사 1, 심전도(ECG) 검사</li> <li>▶ 임신 여부 검사(가임 여성)</li> <li>▶ VAS 평가, WOMAC 평가, LFI 평가</li> <li>▶ IL-6, TNF-<math>\alpha</math> 평가</li> </ul>

(카) 유효성 평가 및 안전성 평가

① 유효성 평가

유효성에 대한 자료는 FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP(per protocol) 분석법을 실시하며, 유효성 평가변수에 대한 최종판정은 FAS 분석법으로 한다.

㉠ 1차 유효성 평가

기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 통증평가 설문 [VAS] 의 변화 비교를 통해 시험식품을 투여한 군이 대조식품 투여군에 비해 골관절염 개선의 우월함을 증명한다.

㉡ 2차 유효성 평가

기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 통증 및 기능상태평가 설문 [WOMAC, LFI], 염증성 cytokine [IL-6, TNF- $\alpha$ ] 의 변화를 비교한다.

② 안전성 평가

인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자를 대상으로 평가한다.

(타) 통계적 분석방법

① 인구학적 정보 및 건강 상태

인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자를 대상으로 인구학적 정보(성별, 연령, 신장, 체중 등) 및 건강 상태에 대하여 연속형 변수는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하고, 범주형 변수는 카이제곱 검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)으로 평가한다.

② 유효성 자료의 분석

㉠ 1차 유효성 평가

통증평가 설문 [VAS] 의 변화 비교에 대해 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다.

㉡ 2차 유효성 평가

- 통증 및 기능상태평가 설문 [WOMAC, LFI] 의 변화 비교에 대해 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다.
- 염증성 cytokine [IL-6, TNF- $\alpha$ ] 의 변화 비교에 대해 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다.

③ 안전성 자료의 분석

- ㉠ 통계량으로 기술하고, 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다.
- ㉡ 신체검사 결과는 각 방문별로 증례수를 계산하여 카이제곱검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)으로 평가한다.
- ㉢ 임상적 이상반응 발현상황에 대하여는 증례수를 계산하여 카이제곱검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)으로 평가한다.
- ㉣ 약물 복용력은 인체적용시험 기간 동안 인체적용시험용 식품 이외에 피험자가 복용한 모든 약물을 기록하고, 기록된 약물은 계열별로 분류하여 평가한다.

(파) 통계분석 결과

① 피험자의 인체적용시험 참여 상태

인체적용시험 실시기관인 분당 서울대학교병원 생명윤리심의위원회로부터 2016년 4월 1일 최종승인을 받은 후, 2016년 6월 8일부터 피험자가 등록되었다.

방문 1에 본 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 선별검사(screening)를 실시한 피험자 수는 총 90명이었으며, 그 중에 총 12명은 “선정/제외기준 부적합”의 이유로 무작위 배정되기 전에 탈락하였다. 방문 2에 선정 및 제외기준에 적합한 총 78명의 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 대조식품군(SKE 위캡슐)과 시험식품군(SKE 100)으로 배정하였다. 무작위 배정된 피험자는 대조식품 또는 시험식품을 1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 총 4주간 복용하였다. 방문 3에서 인체적용시험용 식품을 회수하였고, 중도탈락한 피험자는 없었다. 78명의 피험자는 방문 2에 배정된 시험식품 또는 대조식품을 재처방 받아 1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 총 4주간 복용하였다. 방문 4에서 인체적용시험용 식품을 회수하였으며, 총 8주간의 Treatment period 동안 중도탈락 피험자는 발생하지 않았다. 2016년 11월 15일에 총 78명의 피험자가 인체적용시험을 완료(피험자 최종방문 완료)하였다.

## ② 피험자의 인구학적 정보 및 건강 상태

본 인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자 78명[SKE 위캡슐군 39명, SKE 100군 39명]에 대해 분석을 실시하였다.

㉞ 성별 분포를 살펴보면 남자 피험자는 27명(34.6%), 여자 피험자는 51명(65.4%)으로 남자보다 여자의 비율이 약간 높게 나타났으며 성별에 따른 군간 차이는 통계적으로 유의( $p=0.475$ )하지 않았다. 평균 연령의 경우 SKE 100군(만  $63.95 \pm 7.17$ 세)이 SKE 위캡슐군(만  $61.05 \pm 6.63$ 세) 보다 약간 높게 나타났으며, 선정기준에 해당되었다. 키( $p=0.280$ )와 체중( $p=0.578$ ), BMI( $p=0.850$ )의 경우 모두 유의한 차이를 보이지 않아 최초 무작위 배정에 의한 대상자간의 편견이 없는 것으로 확인되었다.

㉟ 인체적용시험 선별 당시 병력(수술력 포함) 및 치료력을 조사한 결과, SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 병력 및 치료력이 없는 것으로 조사되었다. 병력 및 치료력이 있는 피험자들 중 본 인체적용시험용 식품과 병용 투여할 수 있는 약물인지를 평가하기 위하여 병용약물 여부를 조사한 결과, SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 현재 병력을 치료하기 위해 투여하는 병용약물이 없는 것으로 나타나 인체적용시험 진행에 문제가 없음을 확인하였다.

## ③ 안전성 평가

본 인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자 78명[SKE 위캡슐군 39명, SKE 100군 39명]을 대상으로 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사 결과, 임상적 이상반응 발현상황, 약물 복용력 등을 종합하여 평가하였다.

### ㉞ 활력 징후

- 수축기 혈압의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으며, SKE 위캡슐군( $p=0.709$ )과 SKE 100군( $p=0.283$ ) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다.

- 이완기 혈압의 경우에도 각 방문시기별 SKE 위캡술군과 SKE 100군 간의 비교에서 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, SKE 위캡술군( $p=0.888$ )과 SKE 100군( $p=0.105$ ) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었다.
- 맥박의 경우에도 각 방문시기별 SKE 위캡술군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화는 없었으며, SKE 위캡술군( $p=0.280$ )과 SKE 100군( $p=0.242$ ) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이는 없었다.
- 체온의 경우에서도 각 방문시기별 SKE 위캡술군과 SKE 100군 간에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, SKE 위캡술군( $p=0.478$ )과 SKE 100군( $p=0.564$ ) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

#### ㉠ 신체 계측

- 키와 체중, BMI 지수 모두 각 방문시기별 SKE 위캡술군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없었으며, SKE 위캡술군과 SKE 100군 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다.

#### ㉡ 신체검사

- 각 방문시마다 피험자들에게 두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등의 신체검사를 실시하여 비교한 결과, SKE 위캡술군과 SKE 100군 모두 비정상적인 경우가 전혀 없었다.

#### ㉢ 임상실험실 검사

- 일반혈액검사 수치를 비교한 결과, 각 방문시기별 SKE 위캡술군과 SKE 100군 간의 검사치를 비교한 결과, Hemoglobin, Hematocrit, WBC, RBC, Platelet, MCV, MCH, MCHC, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, Erythrocyte sedimentation rate(ESR) 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. SKE 100군의 경우 방문시기에 따라 일반혈액검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다. SKE 위캡술군의 경우에는 Basophil( $p=0.027$ )에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 검사치의 변화가 정상 수치의 범위 안에 있었다.
- 혈청생화학검사 수치를 비교한 결과, 각 방문시기별 SKE 위캡술군과 SKE 100군 간의 검사치를 비교한 결과에서는 Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Fasting plasma glucose, Total Bilirubin, AST, ALT, Alkaline phosphatase, Total cholesterol, Triglyceride, hsCRP 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다. 또한 SKE 위캡술군과 SKE 100군 모두 방문시기에 따라 혈청생화학검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다.
- 뇨검사(1) 수치를 비교한 결과, pH와 Specific gravity(S.G)의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡술군과 SKE 100군 간의 비교에서는 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. SKE 100군에서는 방문시기에 따라 뇨검사(1) 수치

모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다. SKE 위캡슐군의 경우에는 pH(p=0.034)에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 검사치의 변화가 정상 수치의 범위 안에 있었다.

- 뇨검사(2) 수치를 비교한 결과, Nitrate, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Urobilinogen 검사 수치는 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 정상으로 조사되었다. Protein 검사 수치가 비정상(NCS)으로 나온 피험자는 SKE 위캡슐군의 경우 0주차 3명(7.7%), 4주차 1명(2.6%), 8주차 2명(5.1%) 조사되었으나 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었으며 임상적인 의미는 없었다. Leukocyte esterase 검사 수치에서도 비정상(NCS)으로 나온 피험자는 SKE 위캡슐군의 경우 0주차 2명(5.1%), 4주차 6명(15.4%), 8주차 4명(10.3%), SKE 100군의 경우 0주차 4명(10.3%), 4주차 4명(10.3%), 8주차 7명(17.9%) 조사되었으나 군간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 임상적인 의미는 없었다.

㉞ 임상적 이상반응 발현상황

- 대조식품군(SKE 위캡슐)과 시험식품군(SKE 100)에서 인체적용시험 제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 모든 이상반응(AE)은 발생하지 않았다. 이상약물반응(ADR), 중대한 이상반응(Serious AE)과 중대한 이상약물반응(Serious ADR)의 경우에도 발현되지 않았다.

㉟ 약물 복용력

- 인체적용시험 선별 당시 병용약물이 없는 것으로 확인되었으며, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 1회 이상 복용한 이후의 병용약물도 전혀 없는 것으로 확인하였다.

④ 유효성 평가

유효성에 대한 자료는 FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP(per protocol) 분석법을 실시하기로 하였으나, PP 분석법에서 제외(인체적용시험계획서에서 명시한 기간을 채우지 못하고 중도 탈락한 경우, 병용금지약물(또는 식품)을 투여한 경우, 인체적용시험용 식품 순용도가 80% 이하인 경우, 인체적용시험계획서를 중대하게 위반하였다고 판단되는 경우)에 해당하는 피험자가 없었으므로 FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP(per protocol) 분석법에 해당하는 피험자의 수가 동일하여 FAS(Full Analysis Set) 분석법만 실시하였다. 최종 판정은 FAS(Full Analysis Set) 분석법으로 하였다.

㉠ FAS 분석법(최종 판정)

FAS 분석법은 인체적용시험에 등재되어 1회 이상 인체적용시험용 식품을 복용하고, 최소한 1회 이상 유효성 평가가 실시된 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 따라서 피험자 78명[SKE 위캡슐군 39명, SKE 100군 39명]을 대상으로 평가하였다.

- 1차 유효성 평가

통증평가 설문(VAS)의 경우 SKE 100군에서 방문시기에 따라 느끼는 통증평가가 통계

적으로 유의하게 감소( $p<0.001$ )하는 것으로 나타났다. 또한 방문시기별 SKE 위킵술군과 SKE 100군 간의 비교에서는 4주차( $p=0.026$ )와 8주차( $p<0.001$ )에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

통증평가 설문(VAS)의 변화율을 분석한 결과, SKE 위킵술군은 1.01% 개선된 반면 SKE 100군은 37.02% 개선되어 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p<0.001$ )되는 것으로 나타났다.

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS)을 분석한 결과, SKE 100군에서 방문시기에 따라 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  미만 그룹( $p<0.001$ )과 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상 그룹( $p<0.001$ ) 모두 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS) 변화율을 분석한 결과, Baseline의 검사치와 비교하였을 때 SKE 100군은 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  미만 그룹(41.36% 개선)과 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상 그룹(32.46% 개선) 모두 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p<0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상 그룹에 비해 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  미만 그룹에서 SKE 100군의 통증평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

#### - 2차 유효성 평가

통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 총점수의 경우 SKE 위킵술군과 SKE 100군 비교에서는 8주차( $p=0.003$ )에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 또한 SKE 100군에서 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소( $p<0.001$ )하여 개선되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 세분화하여 살펴본 결과, WOMAC 통증( $p=0.005$ ), WOMAC 뻣뻣함( $p=0.004$ ), WOMAC 일상생활 수행의 어려움( $p=0.003$ ) 모두 SKE 위킵술군과 SKE 100군 비교에서 8주차에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 특히 SKE 100군에서 WOMAC 통증, WOMAC 뻣뻣함, WOMAC 일상생활 수행의 어려움 모두 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소( $p<0.001$ )하여 개선되는 것으로 나타났다.

통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 총점수의 변화율을 분석한 결과, SKE 위킵술군은 1.95% 악화된 반면 SKE 100군은 39.79% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p<0.001$ )되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 세분화하여 살펴보면, SKE 위킵술군과 SKE 100군을 비교하였을 때 WOMAC 통증의 경우 SKE 100군(평균 47.19% 개선,  $p<0.001$ )에서, WOMAC 뻣뻣함의 경우 SKE 100군(평균 73.06% 개선,  $p<0.001$ )에서, WOMAC 일상생활 수행의 어려움의 경우 SKE 100군(평균 34.39% 개선,  $p<0.001$ )에서 유의하게 개선되는 것을 확인하였다.

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 분석한 결과, SKE 100군에서 방문시기에 따라 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  미만 그룹( $p<0.001$ )과 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상 그룹( $p=0.036$ ) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 정도가 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율을 분석한 결과, SKE 100군은 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  미만 그룹(45.46% 개선)과 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상 그룹(33.81% 개선) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 정도가 통계적으로 유의하게 개선



( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상 그룹에 비해 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 총점수의 경우 SKE 위캡술군과 SKE 100군 비교에서는 8주차( $p=0.002$ )에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 또한 방문시기에 따라 LFI 총점수는 SKE 위캡술군에서는 증가한 반면 SKE 100군에서는 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소( $p < 0.001$ )하여 개선되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 세분화하여 살펴본 결과, LFI 통증 또는 불편감( $p=0.006$ )과 LFI 일상생활 활동 어려움( $p=0.001$ )의 경우 방문시기별 SKE 위캡술군과 SKE 100군 간의 비교에서 8주차에서만 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 특히 SKE 100군에서 LFI 통증 또는 불편감, LFI 최대 걸을 수 있는 거리, LFI 일상생활 활동 어려움 모두 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소( $p < 0.001$ )하여 개선되는 것으로 나타났다.

통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 총점수의 변화율을 분석한 결과, SKE 위캡술군은 7.04% 악화된 반면 SKE 100군은 37.41% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 세분화하여 살펴보면, SKE 위캡술군과 SKE 100군을 비교하였을 때 LFI 통증 또는 불편감의 경우 SKE 100군(평균 46.56% 개선,  $p < 0.001$ )에서, LFI 최대 걸을 수 있는 거리의 경우 SKE 100군(평균 28.28% 개선,  $p < 0.001$ )에서, LFI 일상생활 활동 어려움의 경우 SKE 100군(평균 33.56% 개선,  $p < 0.001$ )에서 유의하게 개선되는 것을 확인하였다.

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 분석한 결과, SKE 100군에서 방문시기에 따라 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  미만 그룹( $p < 0.001$ )과 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상 그룹( $p=0.036$ ) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 정도가 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율을 분석한 결과, SKE 100군은 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  미만 그룹(40.76% 개선)과 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상 그룹(33.88% 개선) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 정도가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상 그룹에 비해 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

염증성 cytokine 검사치를 비교한 결과, IL-6의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡술군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없는 것으로 나타났으며, SKE 100군에서 방문시기별로 점차 염증성 수치가 증가하였으며 통계적으로 유의한 차이( $p=0.347$ )는 없었다. TNF- $\alpha$ 의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡술군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없는 것으로 나타났으며, SKE 100군에서 방문시기별로 점차 염증성 수치가 통계적으로 유의하게 증가( $p=0.003$ )하는 것으로 확인되었다.

염증성 cytokine 평가 변화량을 분석한 결과, IL-6의 경우 SKE 위캡술군은 염증성 정도가 평균  $0.30\text{pg}/\text{mL}$  증가된 반면 SKE 100군에서도 염증성 정도가 평균  $0.24\text{pg}/\text{mL}$  증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p=0.892$ )되지 않는 것으로 나타났다. TNF- $\alpha$ 의 경우에도 SKE 위캡술군(평균  $2.92\text{pg}/\text{mL}$  증가)과 비교하였을 때 SKE 100군에서도

염증성 정도가 평균 2.53pg/mL 증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선(p=0.632)되지 않는 것으로 나타났다.

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI 그룹별 염증성 cytokine 평가를 분석한 결과, IL-6의 경우 SKE 100군에서 방문시기에 따라 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(p=0.558)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(p=0.114) 모두 통계적으로 유의한 변화는 없는 것으로 나타났다. TNF- $\alpha$ 의 경우에는 SKE 100군에서 방문시기에 따라 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(p=0.535)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(p<0.001) 모두 점차 염증성 수치가 증가하는 것으로 확인되었다. BMI 그룹별 염증성 cytokine 평가 변화량을 분석한 결과, IL-6의 경우 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(평균 0.38pg/mL 감소, p=0.182)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(평균 0.90pg/mL 증가, p=0.152) 모두 통계적으로 유의하게 개선되지 않는 것으로 확인되었다. TNF- $\alpha$ 의 경우에도 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(평균 0.86pg/mL 증가, p=0.069)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(평균 4.29pg/mL 증가, p=0.366) 모두 통계적으로 유의하게 개선되지 않는 것으로 확인되었다.

#### (하) 결론

##### ① 안전성 평가

- 노각나무 추출물은 안전한 것으로 평가되었음.

##### ② 유효성 평가

FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP 분석법에 해당되는 피험자의 수는 동일하여 FAS(Full Analysis Set) 분석법만 실시하였음. 최종판정은 FAS(Full Analysis Set) 분석법으로 판정함.

㉠ 시험식품(SKE 100군)의 경우 통증평가 설문(VAS)에서는 통증 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났다.

㉡ 시험식품(SKE 100군)의 경우 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC, LFI)에서는 통증 및 기능상태 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났다.

㉢ 시험식품(SKE 100군)의 경우 염증성 cytokine(IL-6, TNF- $\alpha$ ) 평가에서는 염증성 완화 개선에는 큰 도움이 되지 않는 것으로 확인되었다.

##### ③ 1차 유효성 평가

통증평가 설문(VAS)의 경우 Baseline의 증상 정도와 비교하였을 때 SKE 100군은 37.02% 개선되어 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 개선(p<0.001)되는 것으로 나타났다.

BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS)의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(41.36% 개선)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(32.46% 개선) 모두 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 개선(p<0.001)되는 것으로 나타났다. BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에 비해 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

##### ④ 2차 유효성 평가

통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 총점수의 경우 SKE 100군은 39.79% 개선되어

느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다.

BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 총점수의 경우 SKE 100군은 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹(45.46% 개선)과 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹(33.81% 개선) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹에 비해 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

통증 및 기능상태 평가 설문(LFD) 총점수의 경우 SKE 100군은 37.41% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다.

BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 총점수의 경우 SKE 100군은 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹(40.76% 개선)과 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹(33.88% 개선) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹에 비해 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

IL-6의 경우 SKE 100군에서 염증성 정도가 평균 0.24pg/mL 증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p = 0.892$ )되지 않는 것으로 나타났다. TNF- $\alpha$ 의 경우에도 SKE 100군에서 염증성 정도가 평균 2.53pg/mL 증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p = 0.632$ )되지 않는 것을 확인하였다.

BMI 그룹별 IL-6 평가의 경우 SKE 100군은 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹(평균 0.38pg/mL 감소,  $p = 0.182$ )과 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹(평균 0.90pg/mL 증가,  $p = 0.152$ ) 모두 통계적으로 유의하게 개선되지 않는 것으로 확인되었다. TNF- $\alpha$  평가의 경우에도 SKE 100군은 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹(평균 0.86pg/mL 증가,  $p = 0.069$ )과 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹(평균 4.29pg/mL 증가,  $p = 0.366$ ) 모두 통계적으로 유의하게 개선되지 않는 것으로 확인되었다.

#### - 인체적용시험 보고서 별첨

##### (2) 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 인체적용시험

본 과제에서는 노각나무 추출물의 기능성을 사람을 대상으로 평가하기 위하여 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선 인체적용시험을 수행하였음.

##### (가) 인체적용시험 제목

아토피 피부염 증상을 가진 소아에서 SKBE의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

##### (나) 인체적용시험 실시기관 및 책임자

가톨릭대학교 성빈센트병원 (경기도 수원시 팔달구 중부대로 93)

가톨릭관동대학교 국제성모병원 (인천광역시 서구 심곡로 100번길 25)  
 의료법인명지의료재단 명지병원 (경기도 고양시 덕양구 화수로 14번길 55)  
 배정민 (가톨릭대학교 성빈센트병원 피부과 조교수)  
 유광호 (가톨릭관동대학교 국제성모병원 피부과 조교수)  
 고은정 (의료법인명지의료재단 명지병원 피부과 조교수)

(다) 인체적용시험 기간

임상시험심사위원회(IRB) 승인일로부터 12개월

(라) 인체적용시험 대상

만 2세 이상 만 12세 이하의 경증 및 중등도의 아토피 피부염 증상이 있는 소아

(마) 인체적용시험 목적

본 인체적용시험은 경증 및 중등도의 아토피 피부염 증상이 있는 소아에게 SKBE(노각나무잎추출물)을 섭취했을 때 대조식품과 비교하여 아토피 피부염 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.

(바) 인체적용시험 디자인

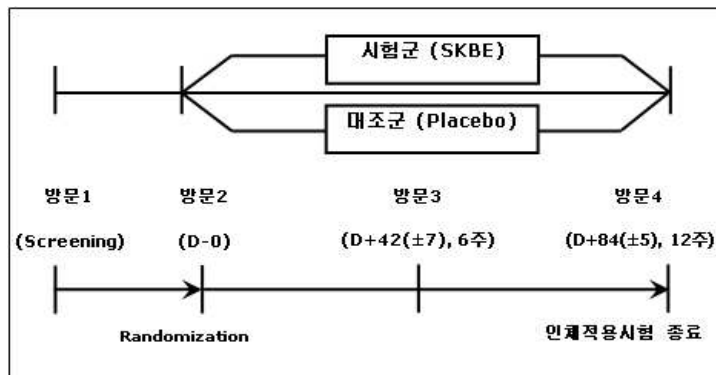
12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조

(사) 용량 및 섭취방법

- ① 시험식품(SKBE): 1일 1회, 1회 1스틱(노각나무잎추출물로써 100mg/day)
- ② 대조식품(Placebo): 시험군과 동일한 방법으로 섭취

(아) 인체적용시험 방법

인체적용시험대상자는 자의(또는 법정 대리인)에 의해 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문 평가를 통해 선정기준/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 시험대상자에 한해 등록된 순서에 따라 시험군 및 대조군 중 한 군으로 무작위배정 된다. 배정된 시험대상자는 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취한다.



(자) 시험대상자 수

	시험군	대조군	총 시험대상자 수
최종 평가 계수(PP)	30	30	60
Drop-out(25%) 고려예수	40	40	80

(차) 선정기준

- ① 본 인체적용시험에 참여할 것을 동의하고 서면 동의서에 시험대상자와 부모(또는 법정 대리인)가 자의로 서명한 자
- ② 만 2세 이상 만 12세 이하인 자
- ③ 6개월 이상 간헐적 또는 지속적인 아토피 피부염 증상이 있는 자
- ④ SCORAD 점수가 20점 ~ 50점(mild-moderate)에 해당하는 자

(카) 제외기준

- ① 아토피 피부염 이외에 중증의 피부질환, 전신질환이 있는 자
- ② 인체적용시험 시작 1주 이내에 아토피 피부염과 관련하여 전신적 항생제, 코르티코스테로이드제, 항히스타민제, 면역억제제를 투여한 자
- ③ 인체적용시험 시작 1주 이내에 아토피 피부염 개선을 위해 의약품, 한약, 건강기능식품을 투여한 자
- ④ 인체적용시험 시작 4주 이내에 광선치료를 받은 자
- ⑤ 인체적용시험 중에 다른 인체적용시험에 참가할 계획이 있는 자
- ⑥ 인체적용시험 시작 4주 이내에 다른 인체적용시험에 참여했던 자
- ⑦ 시험자가 본 인체적용시험에 부적합하다고 판단되는 자

(타) 유효성 평가 및 안전성 평가

- ① 1차 유효성 평가 변수
  - ㉠ SCORAD(SCORing of Atopic Dermatitis) total score
- ② 2차 유효성 평가 변수
  - ㉠ SCORAD objective(병변의 범위, 정도) score
  - ㉡ SCORAD subjective(소양감, 수면방해) score
  - ㉢ IGA(Investigator's Global Assessment)
  - ㉣ Eosinophil(count), IgE, TARC(CCL17)
  - ㉤ 국소용 스테로이드제 사용 비율 및 사용량
- ③ 안전성 평가
  - ㉠ 이상반응
  - ㉡ 활력징후(체온, 맥박), 신체계측(체중)

㉔ 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)

(과) 통계분석

① 유효성

㉕ 1차 유효성 평가변수

1차 유효성 평가 변수인 SCORAD total score의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 단, 정규성이 심각하게 위배되는 경우 로그변환방법(logarithm transformation) 등의 변수변환을 실시한 후 검정하거나 비모수검정법인 Wilcoxon rank sum test를 실시할 수 있다.

㉖ 2차 유효성 평가변수

2차 유효성 평가 변수인 SCORAD objective score, SCORAD subjective score, IGA, Eosinophil(count), IgE, TARC(CCL17)의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 단, 정규성이 심각하게 위배되는 경우 로그변환방법(logarithm transformation) 등의 변수변환을 실시한 후 검정하거나 비모수검정법인 Wilcoxon rank sum test를 실시할 수 있다.

시험기간 중 국소 스테로이드 제제를 사용한 시험대상자에 대하여 섭취 군간 비율(%)을 제시하고, Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 통해 섭취 군간 비율 차이를 비교한다. 또한 국소 스테로이드 제제 사용량에 대해 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.

② 안전성

㉗ 이상반응

인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 이상반응(treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA preferred term에 따라 Coding 하며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화 한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석한다.

㉘ 임상병리검사

혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석한다. 뇨검사의 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교한다.

㉙ 활력징후(체온, 맥박), 체중

활력징후(체온, 맥박), 체중 검사치에 대하여 해당 방문 시 검사하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석한다.

(하) 인체적용시험 진행상황

① 인체적용시험 초기계획

본 인체적용시험은 2017년 10월까지 80명의 대상자 모집을 완료하여 2018년 1월까지 시험을 완료하고 2018년 4월까지 결과보고서를 작성하는 것으로 계획하였음.

Year	2017					2018			
Month	8	9	10	11	12	1	2	3	4
Screening & Enrollment period	■	■	■						
Treatment/ Follow-up period	■	■	■	■	■	■			
DM/STAT/CSR							■	■	■

② 현재 인체적용시험 진행 상황

본 인체적용시험은 성빈센트병원, 국제성모병원과 명지병원의 3개 기관에서 수행하고 있으며 시험대상자 등록 레수는 총 80명임. 지금까지 3개 기관에서 33명이 등록되었으며, 이중 시험을 완료한 대상자는 27명, 시험 진행 중인 대상자는 3명, 중도 탈락자는 3명임.

(2018.04.13 기준)

Site	Planned Enrollment	Screened	S/F	Randomization(%)	Active	D/O	Completed
성빈센트병원	40	30	0	30(75%)	3	3	24
국제성모병원	10	3	0	3(30.0%)	0	0	3
명지병원	30	0	0	0(0.0%)	0	0	0
<b>합계</b>	<b>80</b>	<b>33</b>	<b>0</b>	<b>33(82.5%)</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>27</b>

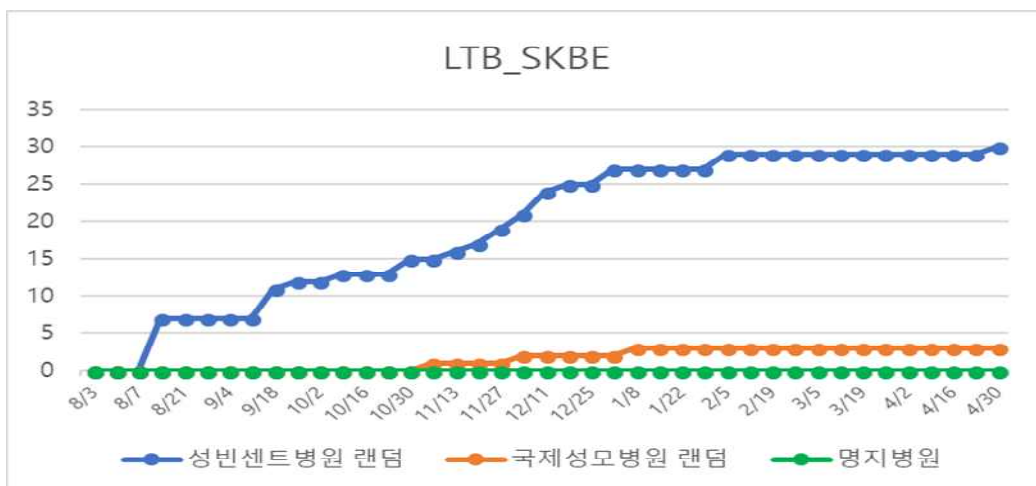


그림 98. LTB SKBE 연구 시험대상자 등록 현황(그래프)

③ 초기 계획 대비 연구진행이 늦어진 이유

본 연구는 최초에 제일병원 단일기관에서 연구를 진행하는 것으로 계획하여, 2017년 1월에 IRB에 심의를 접수하였음. 그러나 소아를 대상으로 하는 연구임을 감안하여 안전성 자료를 보완하라는 의견이 있었으며, 이미 독성시험이 수행되어 있었으나 현재의 안전성 자료 수준으로는 연구가 어렵다는 IRB 의견에 따라 2017년 3월 9일에 반려 처리되었음.

이후 시험이 지연된 점과 시험대상자 모집이 어려운 점을 고려하여 다기관에서 연구를 진행하고자 하였음. 2017년 4월에 중앙대병원은 초심의 신청하였고, 건국대병원은 초심의를 준비하였으나 연구비가 적어 두 기관 모두 심의 취소 및 진행되지 못하였으며, 시험기관 및 연구자 선정에 어려움이 있었음.

2017년 4월 19, 25일에 PSV를 통하여 최종적으로 성빈센트병원, 국제성모병원의 2개 기관이 선정되었으며, IRB 초기심의 과정에서 소아를 대상으로 진행되는 연구인 점, 노각나 무효에 대한 전임상시험 및 근거 자료, 관련 논문 등이 부족하여 IRB 심의 통과에 시간이 조금 지체되었음.

표 18. 기관별 초심의 진행 상황

실시기관	심의 상태	접수일	심의일	결과	PT	CRF	ICF	IB	승인 유효기간
성빈센트병원	초심의	2017.05.10	2017.05.30	시정 승인	1.0	1.0	1.0	1.0	-
	시정 승인	2017.06.16	2017.06.30	승인	-	-	1.1	-	2017.05.30~ 2018.05.30
국제성모병원	초심의	2017.04.28	2017.05.08	보완	1.0	1.0	1.0	1.0	-
	보완	2017.06.01	2017.06.12	승인	-	-	1.1	-	2017.06.12~ 2018.06.11
명지병원	초심의	2018.01.16	2018.01.31	승인	3.0	2.0	1.0	1.0	2018.01.31~ 2019.01.30

2017년 8월에 연구가 개시된 이후에도 위약이 포함된 연구인 점과 시험의 안전성과 유효성을 평가하기 위한 채혈에 시험대상자와 보호자들의 참여 거부가 너무 많았음.

④ 인체적용시험 피험자 모집을 위한 노력

인체적용시험기관의 시험책임자와 실무자, 의뢰자, CRO가 주기적인 미팅을 통해 시험자 모집을 위한 다양한 대책을 강구하였음. 2018년 1월에 명지병원을 추가하여 총 3개의 기관에서 연구를 진행하고 있음.

실시기관	심의 상태	접수일	심의일	결과	PT	CRF	ICF	IB	승인 유효기간
명지병원	초심의	2018.01.16	2018.01.31	승인	3.0	2.0	1.0	1.0	2018.01.31~ 2019.01.30

다양한 원내, 원외 모집 광고(배너, 포스터)를 통해 시험대상자 모집에 최선을 다하고 있음.



- 성빈센트병원: 원내 포스터 부착, 카페 광고
- 국제성모병원: 병원 홈페이지 및 카카오톡 병원 홈페이지에 광고 기재, 병원 연계된 유치원 광고, 원내 배너, 전단지 비치 중
- 명지병원: 원내 포스터

시험대상자 모집기간을 최대한 단축시키고자 3개 기관에서 경쟁등록(기관별 목표 레수 +  $\alpha$ )으로 시험대상자를 모집하고 있으며, 연구의 참여도를 높이기 위해 MAST(Multiple Allergen Simultaneous Test, 다중 알레르기항원 검사)를 지원하고 있음.

## 2-4. 사업화성과 및 매출실적

### 가. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	91 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	54 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 3% 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 0.28% 국외 : %	
	세계시장 경쟁력순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

### 나. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3		
	소요예산(백만원)		1,000		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			-	145	511
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	3	10
		국외	-	-	0.01
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		관절 건강 및 아토피 관련 건강기능식품 및 천연물 신약 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		-	-	100
	수 출		-	-	100

### 3-5. 결 론

- 노각나무 잎 추출물을 용매분획하고 Ethyl acetate 분획과 Dichloromethane 분획에서 단일 compound 23개 단리를 하여, 협동기관에 활성평가를 위하여 제공하였으며, 3-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, gallic acid, quercetin, trifolin, quercetin-3-O-(6" -O-galloyl)- $\beta$ -glucopyranoside, quercitrin, quercetin-3-O-(2" -O-galloyl)- $\alpha$ -rhamnopyranoside, rutin, rhamnose, 2-Furoic acid, Menisdaurilide, Fraxetin 등 13개를 구조 동정하였음
- 관절 건강과 관련하여 70% 주정추출물(SKE)이 효과가 가장 좋았으며, 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피)에 대한 효과는 열수추출(SKW)이 더욱 효과가 뛰어난 것으로 나타나 두가지 방법을 사용하여 대량생산을 위한 Pilot생산을 수행하였음.
- 단회경구투여 독성시험에서 시험물질의 랫드에 대한 개략치사량(ALD)은 한계량인 2,000 mg/kg 보다 높은 2,500 mg/kg을 상회하는 것으로 추정됨.
- 인체적용시험을 수행하기 위하여 관절 건강 관련 노각나무 잎 주정추출물(SKE)은 Quercetin으로 480ug/g ~ 720ug/g, 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 관련 노각나무 잎 열수추출물(SKW)은 Quercetin으로 120ug/g ~ 180ug/g으로 기준규격을 설정함.
- 양묘 및 종묘 보급을 위한 농민, 영농조합 등과의 협력을 진행하여 왔으며, 국립산림과학원, 전남산림자원연구소와 함께 노각나무 보급을 위한 협의를 진행함.
- 노각나무 추출물은 대표적인 염증성 사이토카인들인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8의 발현을 강하게 저해하였으며, 이는 노각나무 추출물이 관절염 증상에 주요하게 관여하는 염증성 인자들의 발현을 광범위하게 저해할 수 있다는 의미의 결과임.
- 염증 유도 물질인 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 MMP-1, 3, 13의 발현을 노각나무 추출물 및 시제품1이 우수하게 저해하는 것을 확인할 수 있었으며, TNF- $\alpha$ 에 의해 손상된 Col2의 재생 활성도 뛰어난 것을 확인할 수 있었음. 이는 관절에서 염증 발생 중 일어나는 연골의 손상 방지 및 손상된 연골의 재생에 관여하는 효과적인 물질로 사료됨.
- 퇴행성관절염의 대표적 실험 모델인 OD 모델을 사용하기로 하여 실험한 결과 노각나무 추출물 및 시제품1은 손상된 연골을 재생하는 결과를 나타내 관절염 질환에서 손상된 연골 조직의 재생에 뛰어난 효과를 나타내는 물질임을 확인할 수 있었음.
- 노각나무 잎 추출물의 아토피 피부염증 관련 인자 발현 비교한 결과 아토피 증상에 중요하게 관련되는 Th1/Th2 케모카인 중에서 대표적인 CCL17(TARC), CCL22(Macrophage-derived chemokine; MDC)의 유전자 발현이 강력하게 저해하는 것을 확인할 수 있었음.
- 아토피 피부염 동물 모델을 대상으로 노각나무 추출물과 시제품2를 경구 투여하여 변화를 분석한 결과 DNCB에 의해 유도된 접촉성 피부염의 증상이 완화되는 것을 육안으로 확인할 수 있었음.

- 또한 면역반응에 주요하게 관여하는 장기인 비장(spleen)과 림프절(lymph node)을 분리하여 각 장기의 크기를 비교한 결과 DNCB만 처리된 그룹에서는 비장 및 림프절 크기가 상당히 증가된 것을 확인할 수 있었으며, 노각나무 추출물과 시제품2를 투여한 그룹에서는 DNCB 처리 그룹에 비해서 비장과 림프절의 크기가 감소한 것을 확인하였음. 이와 같은 결과는 전반적인 염증 반응을 억제할 수 있다는 것을 확인할 수 있는 결과이며 과민 면역 억제제로 사용될 수 있는 가능성을 보여주는 결과임.
- 피부 조직을 취하여 염색하여, 피부 두께(각질상태) 및 염증세포의 침윤(mast cell infiltration, eosinophil 축적 등)을 평가할 수 있으며, 본 연구에서는 접촉성 피부염 유발 동물의 등 피부를 생검하여 변화를 관찰한 결과 DNCB만 처리된 그룹에서 증가된 mast cell의 침착 정도는 노각나무 추출물 및 시제품2의 투여에 의해 현저하게 침착 정도가 감소하는 것을 확인할 수 있었음.
- 노각나무 추출물의 관절 건강 인체적용 시험에서 시험식품(SKE 100군)의 경우 통증평가 설문(VAS)에서는 통증 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났으며, 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC, LFI)에서는 통증 및 기능상태 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났음. 그러나 시험식품(SKE 100군)의 경우 염증성 cytokine(IL-6, TNF- $\alpha$ ) 평가에서는 염증성 완화 개선에는 큰 도움이 되지 않는 것으로 확인되어 추가적인 연구가 필요함.
- 노각나무 추출물의 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선 인체적용시험은 현재 3개기관(성빈센트병원, 인천국제성모병원, 명지병원)에서 진행 중에 있으며, 유아 및 아동을 대상으로 하는 인체적용시험이라는 특성 때문에 대상자 모집의 어려움이 있어 현재 50%정도의 진행이 완료된 상태임.
- 지연된 인체적용시험을 최대한 빠르게 종료 하도록 하겠으며, 개별인정신청을 진행하겠습니다. 또한 관련 인체적용시험을 바탕으로 특허와 논문을 보완하도록 하겠습니다.
-

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

##### 4-1. 목표

###### 가. 최종목표

- 노각나무잎 추출물을 이용한 개별인정 건강기능식품 소재 개발을 위하여 유효성 및 작용기전의 과학적 입증, 유효(지표)성분의 설정 및 분석법 확립, 생산 공정의 표준화를 구축하며, 이와 동시에 기능성 소재에 대한 인체적용시험을 수행하고 골관절(관절염 및 골다공증) 강화 기능 및 과민면역(항염증/항알러지) 개선 소재를 활용하여 아토피 개선 및 예방 제품을 중점적으로 개발을 목표로 함.

###### 나. 연도별 연구개발 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2014	1. 노각나무 추출물 대량생산기법 정립	1. 노각나무 추출물 대량생산기법 정립 (시료 : 잎 기준) 가. 노각나무 채취시기별 생산성 평가 나. 노각나무 채취장소별 생산성 평가 2. 국내 자생 노각나무내 기능성 추출 (경제성)관련 Database화
		2. 노각나무 추출물내 기능성분 분리/동정 및 분석기법 정립	1. 노각나무 추출물 내 기능성분 분리 동정 가. 최대 농도 분리 용매분리방법 선발 - MeOH, EtOH, Hexan, EtOAc, BuOH 나. 용매분리 시료별 분리 효율성 평가 다. 용매분리 시료별 관절건강 등 기초 활성평가(cell-line) 2. 용매분리물 내 기능성분 분리 및 구조 동정 가. 지표성분 설정 나. 기능성분 규명 및 구조동정 1) Preb LC 및 MPLC 연계분리 동정(분리) 2) HPLC 분석조건정립 3) LC/MS분석(성분 및 구조확인) 4) LC/MSMS(신규성분 정밀확인 및 구조동정) 5) NMR분석 : 신규기능성 성분 및 구조 최종 확인 3. 노각나무 추출물 및 기능성 성분 규격화 및 표준화 기법 정립

		<p>3. 노각나무 추출물 유래 건강기능식품 소재 및 제품의 유효성 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동물시험을 통한 관절염/골다공증 및 항 알러지/항 아토피 활성의 규명 (in vitro)</li> </ul>	<p>1. CIA 및 OD 관절염 모델과 골다공증 동물 모델에서 노각나무 추출물을 경구 투여</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 관절염 증상 완화 유무 검증</li> <li>- 연골재생 정도 측정</li> <li>- 골 손실 저해 정도 측정</li> </ul> <p>2. NC/Nga DNCB 아토피 유도마우스활용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 노각나무 추출물을 경구 투여</li> <li>- 혈액내 히스타민 농도 측정</li> <li>- 비장 적출 후 비장 세포분리 하여 IL-4/IFN-<math>\gamma</math> 생성 T-세포 비율 비교</li> <li>- Th1/Th2 사이토카인 (IL-12/IL-4) 발현양 비교</li> <li>- 케모카인(TARC, CCR3 리간드) 발현저해 활성비교</li> <li>- 혈액 내 면역글로블린(IgE) 발현 저해 활성비교</li> </ul>
		<p>4. 노각나무 추출물 인체유효성 평가(관절건강)</p>	<p>1. 노각나무 추출물의 인체유효성 평가</p> <p>가. 평가방법</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) 실시기관 : 분당서울대병원</li> <li>(2) 시험책임자 : 장학철 교수</li> <li>(3) 대상질환 : 관절건강 개선 필요환자(골관절염, 골다공증)</li> <li>(4) 임상시험용 건강기능식품 : 시험식품군 : 노각나무 추출물 충전 캡슐, 대조식품군 : 위 캡슐</li> <li>(5) 임상시험 설계 : 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조</li> <li>(6) 임상시험기간 : 임상시험 승인일로부터 12개월</li> <li>(7) 투여 방법 및 기간 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시험식품군 : 노각나무 추출물 캡슐을 1일 1회, 1회 1캡슐, 8주간 복용</li> <li>- 대조식품군 : 위 캡슐을 1일 1회, 1회 1캡슐, 8주간 복용</li> </ul> </li> <li>(8) 임상시험 방법 : 피험자는 총 72명[시험식품군 36명, 대조식품군 36명]으로 이루어져 있으며, 본 연구에 참여할 것을 서면으로 동의</li> </ol>

			<p>한 자로 피험자를 선정하고 필요한 임상검사 및 설문받음. Visit 2에 선정 및 제외기준에 적합한 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 시험식품군과 대조식품군으로 배정하여 총 8주간의 Treatment period를 진행</p> <p>2. 시험 ■ 분석 ■ 검사 기준 : 건강기능식품 원료 인정에 대한 안전성 시험(식약처 기준)</p>
2차년도	2015	<p>5. 노각나무 추출물의 장단기 제품적용성 및 안정성 평가 (지표성분 및 기능성 성분류 기준)</p>	<p>1. 노각나무 추출물 및 기능성 성분 안정성 평가 및 제품적용성 평가(규격화, 표준화)</p> <p>가. 장단기, 제품적용성(대상 시료별 안정성) 평가(가혹시험)</p> <p>1) 적용시료 : 우유, 음료, 발효유산균 음료</p> <p>2) 온도조건별(상온, 가혹조건, 냉장)</p> <p>3) 실시조건 : 3개월 이상 - 식약처 설정방법 준수</p> <p>4) 측정항목 : 지표성분 및 기능성 성분류 장단기 반응성 평가</p> <p>나. 장단기, 물리이화학적 안정성 평가</p> <p>1) pH(1,3,5,7, 8, 10, 12)</p> <p>2) 온도조건별(상온, 가혹조건, 냉장)</p> <p>3) 실시조건 : 3개월 이상 - 식약처 설정방법 준수</p> <p>4) 측정항목 : 지표성분 및 기능성 성분 물성 및 구조변화 평가</p>
		<p>6. 노각나무 추출물 유래 건강기능식품 소재 및 제품의 유효성 규명</p> <p>- 노각나무 유래 분리 및 동정 기능성 소재의 관찰염 및 항알러지/항아토피 기능 작용 기전 규명(in vivo)</p>	<p>1. 노각나무 유래 활성 성분을 대상으로 활액 세포 및 면역 세포를 활용하여</p> <p>- 면역세포에서 염증성 사이토카인 발현 조절 pro filing 조사</p> <p>- 관찰 활액 세포 표면 세포 부착 분자 발현 정도 비교</p> <p>- 관찰 활액 세포 와 면역세포 부착 정도 비교</p> <p>- 세포 부착 분자 발현 및 염증성 사이토카인 발현 신호전달 기전 분석</p>

		<p>2. 노각나무 유래 활성 성분을 대상으로 PBMC 면역세포를 활용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Th2 분화 사이토카인 (IL-4) 발현 저해 활성 분석</li> <li>-Th2분화 사이토카인 발현저해 신호전달 기전 분석</li> <li>-Th2 분화 핵심 전사 인자 (GATA3, pSTAT6) 발현 저해 활성 분석</li> </ul>
	<p>7. 노각나무 추출물 유래 건강기능식품 소재 및 제품의 유효성 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제품을 이용한 관절염 및 항 알러지/항 아토피 효력시험</li> </ul>	<p>1. CIA 및 OD 관절염 모델에서 노각나무 추출물 함유 제품을 경구 투여</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 관절염 증상 완화 유무 검증</li> <li>- 연골재생 정도 측정</li> <li>- 골 손실 저해 정도 측정</li> </ul> <p>2. NC/Nga DNCB 아토피 유도 마우스활용, 노각나무 추출물 함유 제품을 경구 투여 하여</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Scratch behavior 측정</li> <li>- 피부조직에서 염증 정도 영향 분석</li> </ul>
	<p>8. 노각나무 추출물 인체유효성 평가(면역과민반응에 대한 피부상태 개선-아토피)</p>	<p>1. 레시피 적용 개발 기능성제품의 인체유효성 평가</p> <p>가. 평가방법</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) 실시기관 : 성빈센트병원, 국제성모병원, 명지병원</li> <li>(2) 시험책임자 : 배정민, 유광호, 고은정 교수</li> <li>(3) 대상질환 : 면역과민반응에 대한 피부상태 개선-아토피</li> <li>(4) 임상시험용 건강기능식품 : 시험식품군 : 노각나무 추출물 충전 젤리스틱, 대조식품군 : 위약 젤리스틱</li> <li>(5) 임상시험 설계 : 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조</li> <li>(6) 임상시험기간 : 임상시험 승인일로부터 12개월</li> <li>(7) 투여 방법 및 기간 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시험식품군 : 노각나무 추출물 젤리스틱을 1일 회, 1회 1스틱, 12주간 복용</li> </ul> </li> </ol>

			<p>- 대조식품군 : 위 캡슐을 1일 1회, 1회 1스틱, 12주간 복용</p> <p>(8) 임상시험 방법 : 피험자는 총 80명[시험식품군 40명, 대조식품군 40명]으로 이루어져 있으며, 본 연구에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 피험자를 선정하고 필요한 임상검사 및 설문 받음. Visit 2에 선정 및 제외기준에 적합한 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 시험식품군과 대조식품군으로 배정하여 총 12주간의 Treatment period를 진행</p> <p>2. 시험 ■ 분석 ■ 검사 기준 : 건강기능식품 원료 인정에 대한 안전성 시험(식약처 기준)</p>
3차년도	2016	9. 노각나무 추출물의 제품화 정립	<p>1. 제품의 관절건강 및 과민면역 개선 및 강화 효능확보(규격화 및 정형화)</p> <p>가. 원료 안정성 평가 - 원료 시제품을 통한 제품 안정성 평가(가혹실험 등)</p> <p>2. 제품의 효능평가</p> <p>가. 노각나무 추출물의 관절건강(관절염) 및 과민면역(아토피) 개선 약리활성연구</p> <p>나. 노각나무 추출물의 관절건강(골다공증)개선 약리활성연구</p>
		10. 사업화(제품화)	<p>1. 개별인증(식약청) 신청</p> <p>가. Product-1: 관절건강 개선 기능성 원료</p> <p>나. Product-2:면역과민반응에 대한 피부상태 개선(아토피) 기능성 원료</p> <p>2. 제품화 방향설정</p> <p>가. 관절건강 개선 기능성 식품</p> <p>나. 면역과민반응에 대한 피부상태 개선(아토피) 개선 기능성 식품</p> <p>다. 식의약품 및 의약품(추후)</p> <p>4. 시장조사 및 판매 전략 수립</p> <p>가. 판매회사와 MOU 등을 체결 마케팅 전략 수립</p> <p>나. 사전 수요 조사 등 판매 전략 수립</p>



### 3-2. 목표 달성여부

세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
노각나무 추출물 대량생산기법 정립	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 관절 건강과 관련하여 70% 주정추출물(SKE)이 효과가 가장 좋았으며, 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피)에 대한 효과는 열수추출(SKW)이 더욱 효과가 뛰어난 것으로 나타나 두가지 방법을 사용하여 대량생산을 위한 Pilot생산을 수행하였음.</li> </ul>
노각나무 추출물내 기능성분 분리/동정 및 분석기법 정립	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 노각나무 잎 추출물을 용매분획하고 Ethyl acetate 분획과 Dichloromethane 분획에서 단일 compound 23개 단리를 하여, 협동기관에 활성평가를 위하여 제공하였으며, 3-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, gallic acid, quercetin, trifolin, quercetin-3-O-(6"-O-galloyl)-<math>\beta</math>-glucopyranoside, quercitrin, quercetin-3-O-(2"-O-galloyl)-<math>\alpha</math>-rhamnopyranoside, rutin, rhamnose, 2-Furoic acid, Menisdaurilide, Fraxetin 등 13개를 구조 동정하였음.</li> <li>· 인체적용시험을 수행하기 위하여 관절 건강 관련 노각나무 잎 주정추출물(SKE)은 Quercetin으로 480ug/g ~ 720ug/g, 면역 과민반응에 의한 피부 상태 개선(아토피) 관련 노각나무 잎 열수추출물(SKW)은 Quercetin으로 120ug/g ~ 180ug/g으로 기준규격을 설정함.</li> </ul>
노각나무 추출물의 장단기 제품적용성 및 안정성 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 노각나무 추출물에 대한 강산, 강염기, 내열성 평가를 실시한 결과 산은(HCl 0.1N)과 알칼리(NaOH 1N)이상에서 영향을 받음.</li> <li>· 노각나무 추출물을 이용한 캡슐, 정제, 액상 등 제형별 지표성분 후보군에 대한 분석결과 제형에 따른 변화가 없었음.</li> <li>· 노각나무추출물을 물과 혼합하는 조건에서 제조 후 이를 냉장, 상온 및 가혹(40℃)조건으로 보관 후 일정경과별(최대 3개월) 물리/이화학적 변화로 장단기 제품 적용성을 확인한 결과 안정한 것으로 나타남.</li> <li>· 노각나무 추출물 내 지표성분 후보군에 대한 시판 제품 적용성 평가결과 10일 경과시 냉장보관 중인 우유 및 발효유 시험구에서 침전물이 생기나 지표물질 함량에는 영향을 주지 않으며, 3개월까지 오차범위 20% 이내로 분석되어 안정한 것으로 나옴.</li> </ul>

<p>노각나무 추출물 및 분리 동정 기능성 성분의 관절 건강 관련 유효성 평가 가. In vitro 약리 및 기전 나. In vivo(마우스) 약리 및 기전평가</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 노각나무 추출물은 대표적인 염증성 사이토카인 들인 TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6, IL-8의 발현을 강하게 저해하였으며, 이는 노각나무 추출물이 관절염 증상에 주요하게 관여하는 염증성 인자들의 발현을 광범위하게 저해할 수 있다는 의미의 결과임.</li> <li>· 염증 유도 물질인 TNF-<math>\alpha</math>에 의해 유도되는 MMP-1, 3, 13의 발현을 노각나무 추출물 및 시제품1이 우수하게 저해하는 것을 확인할 수 있었으며, TNF-<math>\alpha</math>에 의해 손상된 Col2의 재생 활성도 뛰어남을 확인할 수 있었음. 이는 관절에서 염증 발생 중 일어나는 연골의 손상 방지 및 손상된 연골의 재생에 관여하는 효과적인 물질로 사료됨.</li> <li>· 퇴행성관절염의 대표적 실험 모델인 OD 모델을 사용하기로 하여 실험한 결과 노각나무 추출물 및 시제품1은 손상된 연골을 재생하는 결과를 나타내 관절염 질환에서 손상된 연골 조직의 재생에 뛰어난 효과를 나타내는 물질임을 확인할 수 있었음.</li> </ul>
<p>노각나무 추출물 및 분리동정 기능성 성분의 알러지성(아토피)피부염 개선관련 유효성 평가 가. In vitro 약리 및 기전평가 나. In vivo(마우스) 약리 및 기전평가</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 노각나무 잎 추출물의 아토피 피부염증 관련 인자 발현 비교한 결과 Th1/Th2 케모카인 중에서 대표적인 CCL17(TARC), CCL22(Macrophage-derived chemokine; MDC)의 유전자 발현이 강력하게 저해하는 것을 확인할 수 있었음.</li> <li>· 아토피 피부염 동물 모델을 대상으로 노각나무 추출물과 시제품2를 경구 투여하여 변화를 분석한 결과 DNCB에 의해 유도된 접촉성 피부염의 증상이 완화되는 것을 육안으로 확인할 수 있었음.</li> <li>· 또한 면역반응에 주요하게 관여하는 장기인 비장(spleen)과 림프절(lymph node)을 분리하여 각 장기의 크기를 비교한 결과 DNCB만 처리된 그룹에 비해서 비장과 림프절의 크기가 감소한 것을 확인하였음. 이는 과민면역 억제제로 사용될 수 있는 가능성을 보여주는 결과임.</li> <li>· 본 연구에서는 접촉성 피부염 유발 동물의 등 피부를 생검하여 변화를 관찰한 결과 DNCB만 처리된 그룹에서 증가된 mast cell의 침착 정도는 노각나무 추출물 및 시제품2의 투여에 의해 현저하게 침착 정도가 감소하는 것을 확인할 수 있었음.</li> </ul>
<p>노각나무 추출물 인체유효성 평가(관절건강)</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 노각나무 추출물의 관절 건강 인체적용 시험에서 시험식품(SKE 100군)의 경우 통증평가 설문(VAS)에서는 통증 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났으며, 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC, LFD)에서는 통증 및 기능상태 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났음.</li> </ul>

노각나무 추출물 인체유효성 평가(면역과민반응에 대한 피부상태 개선-아토피)	50%	· 노각나무 추출물의 면역 과민반응에 의한 피부상태 개선 인체적용시험은 현재 3개기관(성빈센트병원, 국제성모병원, 명지병원)에서 진행 중에 있으며, 유아 및 아동을 대상으로 하는 인체적용시험이라는 특성 때문에 대상자 모집의 어려움이 있어 현재 50%정도의 진행이 완료된 상태임.
노각나무 보급을 위한 양묘 및 종묘 연구	100%	· 양묘 및 종묘 보급을 위한 농민, 영농조합 등과의 협력을 진행하여 왔으며, 국립산림과학원, 전남산림자원연구소와 함께 노각나무 보급을 위한 협의를 진행함.
노각나무추출물 안전성평가	100%	· 단회경구투여 독성시험에서 시험물질의 랫드에 대한 개략치사량(ALD)은 한계량인 2,000 mg/kg 보다 높은 2,500 mg/kg을 상회하는 것으로 추정됨.
노각나무 추출물의 제품화	80%	· 노각나무 추출물의 제품화를 위한 제형연구를 위하여 여러 가지 제형(캡슐, 정제, 액상, 젤리 등)으로 시제품을 제조. · 관절 건강 및 면역과민반응에 대한 피부상태 개선 인체적용시험용 시제품을 개발함. · 협동과제 개발 레시피를 적용한 수출용 시제품 제조 및 전시회 등 홍보 참여.

### 3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 본 연구과제에서 면역과민반응에 대한 피부상태 개선 인체적용시험을 수행하면서 최초에 제일병원 단일기관에서 연구를 진행하는 것으로 계획하여, 2017년 1월에 IRB에 심의를 접수하였음. 그러나 소아를 대상으로 하는 연구임을 감안하여 안전성 자료를 보완하라는 의견이 있었으며, 이미 독성시험이 수행되어 있었으나 현재의 안전성 자료 수준으로는 연구가 어렵다는 IRB 의견에 따라 2017년 3월 9일에 반려 처리되었음.
- 이후 시험이 지연된 점과 시험대상자 모집이 어려운 점을 고려하여 다기관에서 연구를 진행하고자 하였음. 2017년 4월에 중앙대병원은 초심의 신청하였고, 건국대병원은 초심의를 준비하였으나 연구비가 적어 두 기관 모두 심의 취소 및 진행되지 못하였으며, 시험기관 및 연구자 선정에 어려움이 있었음.
- 2017년 4월 19, 25일에 PSV를 통하여 최종적으로 성빈센트병원, 국제성모병원의 2개 기관이 선정되었으며, IRB 초기심의 과정에서 소아를 대상으로 진행되는 연구인 점, 노각나무 잎에 대한 전임상시험 및 근거 자료, 관련 논문 등이 부족하여 IRB 심의 통과에 시간이 지체되었음.
- 2017년 8월에 연구가 개시된 이후에도 위약이 포함된 연구인 점과 시험의 안전성과 유효성을 평가하기 위한 채혈(식약처 권고사항)에 시험대상자와 보호자들의 참여 거부가 너무 많았음.

- 현재 인체적용시험이 50%정도 진행되고 있어 인체적용시험이 끝나면 바로 기능성원료 개별인정 신청을 식약처에 진행할 수 있도록 준비를 하고 있음.
- 제품화 관련하여 관절 건강 수출용 시제품에 대한 문의는 지속되고 있으며, 연골재생과 관련하여 추가적인 인체적용시험을 계획 중에 있음.

## 5. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

### 가. 활용방안(상품화)

- 1) 임산자원의 기능성 바이오 원료소재(관절건강, 면역과민반응에 대한 피부상태 개선)로서 제품화
- 2) 관절건강 및 면역과민반응에 대한 피부상태 개선제로서 기능성 식품군(제품화)
  - 가) 관절 건강 개선관련 건강기능식품
  - 나) 면역과민반응에 대한 피부상태 개선(아토피) 관련 건강기능식품
- 3) 관절건강 및 과민면역 치료제로서 천연물 신약 제품화
  - 가) 동물 및 인체유효성 평가 결과(개별인정 획득)를 기초자료 활용
  - 나) 국내외, 고령친화식 및 아토피환자용으로 의약품으로 차별화 전략 확대
    - 관절염 관련 천연물 신약
    - 아토피 관련 천연물 신약
- 4) 의약이의 관련 산업 연계 용도용법별 차별화 후 상품화
- 5) 개발 기능성 바이오소재의 임상결과 적극응용 및 고부가가치 제품화(용도·용법)

### 나. 기대효과

#### 1) 기술적 측면

- 가) 본 과제는 그동안 임산자원의 고부가제품화 개발 및 산업화 KNOW-HOW를 접목한 국내외적 요구성에 부합한 제품화임.
- 나) 현재, 국내외적 임산자원의 고부가 가치 소재개발에 대한 지속적인 연구개발 경쟁에서 우위를 점유함과 동시에 소재 개발 및 관련 용도개발에 대한 기술력 확보를 통해서 여러 가지 건강식품 및 식의약품의 소재로 사용하고 저 함.
- 다) 특히, 용도개발을 통해서 관절건강 요구환자에 대한 환자식 및 노인식 등에 적용함으로써 고부가가치 제품화를 시도하려 함.
- 라) 국내의 경우도 본 과제연구 수행을 통해서 국외 연구개발 진행 및 용도개발 사례들을 참조하여 신규 제품개발에 적극 활용할 예정이며, 이와 함께 기능식품 소재개발 기술수립을 통해서 국내외적으로 선도화가 가능한 개발이 가능할 것으로 판단되며, 또한 기술적인 측면에서 기능성 식품소재 산업에 대한 파급효과가 클 것으로 예상됨.

#### 2) 경제적 측면

- 가) 국내외 임산자원의 무기화를 위한 치열한 경쟁이 진행되고 있으나 시장현황 및 시장규모는 초기경쟁 상태를 유지하고 있으며, 따라서, 본 과제이외의 제품화 및 용도개발 측면에서도 연구개발 활동이 다소 미흡한 것이 현실임.
- 나) 이에 대해 본 연구과제 완성을 통해서 소재 및 제품화로 연구개발 활성화와 용도개발을

통한 시장규모의 확대를 통해서 매출규모가 신장될 것으로 예상되며 이를 통해서 국내외 시장창출 및 확대의 견인차 역할을 수행할 것으로 예상됨.

다) 또한, 더 나아가서는 국내 기술개발 능력을 해외시장에 선보임으로서 국내 기술력의 경제적 가치는 높아질 것으로 예상됨. 따라서, 본 연구과제의 완성을 통해서 미이용 임산자원의 제품화에 따른 경제적 측면에서의 시장이 활성화 될 것으로 판단됨.

3) 기타 경제적 효과

가) 본 연구에서 목표로 하는 노각나무 유용성분을 이용한 기능성의 규명은 암산자생식물의 고부가 산업을 2차 산업으로 발전시켜 1차 산업과 2차 산업의 조화를 이룰 수 있어 농산업 발전에 이바지할 것으로 기대됨.

나) 현재 많은 지자체에서 핵심 산업으로 육성 중에 있으며, 본 사업과 유기적인 협력관계를 통해 재배면적이 많은 노각나무 산업의 새로운 활력이 될 것으로 기대됨.

다) 현재 1조 2천억원 규모의 건강기능식품 시장에 관절건강 및 과민면역 개선이라는 기능성을 인정받는 건강기능식품의 개발로 새로운 성장 동력을 얻을 수 있을 것이며, 이는 세계적으로도 경쟁력 있는 산업이 될 것으로 기대됨.

라) 노각나무에서 관절건강 및 과민면역(아토피) 개선관련 소재 개발의 경우는 본 연구진이 다년간(7년 이상)의 연구를 거쳐 세계최초로 개발되어지는 것으로 이를 뼈건강 관련 신약후보물질로 개발하여 다국적 제약기업과 제휴 등으로 활용이 가능함.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○ 해당사항없음		

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

### 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
○ 해당사항없음		

### 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	The Methoxyflavonoid Isosakuranetin Suppresses UV-B-Induced Matrix Metalloproteinase-1 Expression and Collagen Degradation Relevant for Skin Photoaging	경희대학교		International Journal of Molecular Sciences /미국	3.257	2016.09.01	중복사사	SCI
2	논문	Cyanidone A attenuates lipopolysaccharide-induced cell adhesion via suppression of VCAM-1 protein expression and NF-κB inactivation in human endothelial cells	경희대학교		International Journal of Molecular Medicine /미국	2.341	2018.01.10	중복사사	SCI
3	논문	Inhibitory effect of 5,6-dihydroergosterol-β-D-glucoside on atopic dermatitis-like skin lesions via suppression of NF-κB and STAT activation.	경희대학교		Journal of Dermatological Science /일본	3.419	2015.06.11	중복사사	SCI
4	특허	스피나스테롤 당 유도체를 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물	(주)생명의 나무	특허권자	대한민국		2015.02.10	단독사사	
5	특허	PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF BONE DISEASES COMPRISING SPINASTEROL β-D-GLUCOSIDE DERIVATIVE	(주)생명의 나무	특허권자	미국		2015.05.12	단독사사	
6	특허	노각나무 추출물의 제조방법 및 이를 이용한 관절염 예방 및 개선용 약학 조성물	(주)생명의 나무	특허권자	대한민국		2016.10.31	단독사사	

## 11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항없음		


## 12. 참고문헌

	코드번호	D-14		
<p>1. 이창복, 원색대한식물도감. 2006</p> <p>2. Tae Hoon Lee, Han Bok Kwak, Hong-Hee Kim, Zang Hee Lee, Dae Kyun Chung, Nam-In Baek, Jiyoung Kim. 2007. Methanol Extracts of <i>Stewartia koreana</i> Inhibit Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Gene Expression by Blocking NF-<math>\kappa</math>B Transactivation in LPS-activated RAW 264.7 Cells. <i>Mol. Cells</i>, Vol. 23, No. 3, pp. 398-404</p> <p>3. Cheol Kyu Park, Hyung Joon Kim, Han Bok Kwak, Tae Hoon Lee, Myun-Ho Bang, Chul Min Kim, Youngkyun Lee, Dae Kyun Chung, Nam-In Baek, Jiyoung Kim, Zang Hee Lee, Hong-Hee Kim. 2007. Inhibitory effects of <i>Stewartia koreana</i> on osteoclast differentiation and bone resorption. <i>International Immunopharmacology</i> 7 (2007) 1507-1516</p> <p>4. Tae Hoon Lee, Mira Jung, Myun-Ho Bang, Dae Kyun Chung, Jiyoung Kim, 2012. Inhibitory effects of a spinasterol glycoside on lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines via down-regulating MAP kinase pathways and NF-<math>\kappa</math>B activation in RAW264.7 macrophage cells. <i>International Immunopharmacology</i> 13 (2012) 264-270</p> <p>5. R. E. Simmonds B. M. Foxwell 2008, Signalling, inflammation and arthritis: NF-<math>\kappa</math>B and its relevance to arthritis and inflammation. <i>Rheumatology</i>, Volume 47, Issue 5, Pages 584-590,</p> <p>6. 하주현, 이수호 2010, 생체 에너지 대사 조절에서 AMPK의 역할. <i>대한내분비학회지</i> 25권 1호, 9-17</p> <p>7. Tae Woo Jung, Myung Won Lee, Yong Jik Lee, Seon Mee Kim 2012, Metformin prevents endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through AMPK-PI3K-c-Jun NH2 pathway. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>, Volume 417, Issue 1, Pages 147-152</p> <p>8 .지식경제부, 2011, 「기술가치평가실무가이드」</p> <p>9. 원혜숙, 2011, 「기능성식품산업동향」, 이화여대, 이오 푸드 네트워크</p>				



10. 신라대학교 산학협력단 RIS사업단, 「건강기능식품 개발자를 위한 실무교육 건강 기능 식품의 마케팅」
11. 식품의약품안전처, 2017, 「2016년 식품 및 식품첨가물 생산실적 통계집」
12. 식품의약품안전처, 2017, 「건강기능식품의 기능성원료 인정 현황」
13. 식품의약품안전처, 2017, 「건강기능식품 유통시장 현황」
14. 경희대학교 산학협력단, 보건복지부, 2011, 「미래 질환별 건강기능식품 융복합 핵심기술 연구개발 지원」
15. 이암허브, 2010, 「간기능 개선용 천연물 소재 추출물 기술사업화 전략수립」
16. 식품의약품안전처, 2012, 「건강기능식품 기능성 평가 가이드 - (2) ‘뼈/관절 건강에 도움’ 편」
17. Fiasal Khan. Ministry of Environment & Forests Notification 2006
18. 식품안전나라. 국내 건강기능식품의 원료로 개별인정 된 관절/뼈 건강 관련 소재 2018
19. 산림청. 2014 임산물 생산조사
20. 비임상시험관리기준, 식품의약품안전청 고시 제 2012-121호
21. 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시 제 2012-86호
22. OECD (2002). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. TG 420.
23. Farrar P.L.(1997): Diagnostic Exercise: Interstitial pneumonia in viral and mycoplasmal antibody-free Sprague Dawley rats. ACLAD NEWSLETTER (American Committee on Laboratory Animal Diseases). Vol. 18. No. 1.

별첨. 관절 건강 인체적용시험 보고서

연구비 지원기관명 :  (주)생명의나무  
Lifetree Biotech Co., Ltd.

시험식품명 : 노각나무 추출물


Protocol NO : 16LBSKE02

# 인 체 적 용 시 험 결 과 보 고 서

노각나무 추출물의 골관절염 개선에 대한 유효성  
및 안전성 평가 : 8주, 무작위배정, 이중 눈가림,  
평행, 위약대조 인체적용시험

본 문서와 관련된 모든 정보는 (주)생명의 나무 측의  
기밀사항(CONFIDENTIAL)이므로, 관계자외의 접근을 금지합니다.

 (주)생명의나무  
Lifetree Biotech Co., Ltd.

연구비 지원기관명 :  (주)생명의나무  
Lifetree Biotech Co., Ltd.

시험식품명 : 노각나무 추출물

Protocol NO : 16LBSKE02

# 인 체 적 용 시 험 결 과 보 고 서

노각나무 추출물의 골관절염 개선에 대한 유효성  
및 안전성 평가 : 8주, 무작위배정, 이중 눈가림,  
평행, 위약대조 인체적용시험

본 문서와 관련된 모든 정보는 (주)생명의 나무 측의  
기밀사항(CONFIDENTIAL)이므로, 관계자외의 접근을 금지합니다.

인체적용시험 명칭	노각나무 추출물의 골관절염 개선에 대한 유효성 및 안전성 평가 : 8주, 무작위배정, 이중 눈가림, 평행, 위약대조 인체적용시험		
시험식품명	노각나무 추출물		
인체적용시험 시작일/종료일	시작일 : 2016년 06월 08일 (First patient enrolled) 종료일 : 2016년 11월 15일 (Last patient completed)		
인체적용시험책임자 및 공동연구자, 기관명	구분	성명	기관명
	책임자	내분비내과 장학철 교수	분당 서울대학교병원
	공동연구자	내분비내과 임수 부교수, 내분비내과 최성희 부교수, 재활의학과 임재영 부교수	
인체적용시험 연구비 지원기관명	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)		
보고서 제출일	2017년 01월 25일		

2017. 01. 25.

인체적용시험 책임연구자 : \_\_\_\_\_ (서명: \_\_\_\_\_)

## 목 차

1.	요약(Synopsis) .....	1
2.	약어 및 용어 정의 .....	13
3.	윤리적 고려 .....	14
3.1	인체적용시험의 윤리성 확보를 위한 기본 방안 .....	14
3.2	피험자 설명 및 동의 .....	14
3.3	비밀유지 .....	14
3.4	인체적용시험계획의 승인 .....	15
4.	시험자와 연구지원 조직 .....	16
4.1	인체적용시험 실시기관명 및 주소 .....	16
4.2	인체적용시험 책임자, 공동연구자 및 담당자 .....	16
4.2.1	인체적용시험 책임자 .....	16
4.2.2	인체적용시험 공동연구자 .....	16
4.2.3	인체적용시험 담당자 .....	16
4.3	인체적용시험용 식품 관리 .....	16
4.4	인체적용시험 의뢰자 및 중앙검사실 .....	16
4.5	인체적용시험 연구비 지원기관 .....	16
5.	서론 .....	17
5.1	목적 .....	17
5.2	배경 .....	17
6.	인체적용시험용 식품 .....	19
6.1	인체적용시험용 식품의 일반명, 코드명, 원료약품 및 분량, 성상 및 제형 등 .....	19
6.2	인체적용시험용 식품의 생산, 포장, labeling 및 저장 .....	19
6.3	인체적용시험용 식품의 관리 및 기록 .....	19
7.	인체적용시험 계획 .....	20
7.1	인체적용시험의 기간 .....	20
7.2	대상 질환 .....	20
7.3	피험자의 선정기준, 제외기준, 목표한 피험자의 수 및 그 근거 .....	20
7.3.1	선정기준 .....	20
7.3.2	제외기준 .....	21
7.3.3	목표한 피험자 수 및 그 근거 .....	22
7.4	인체적용시험의 방법 .....	22
7.4.1	전반적인 인체적용시험의 방법에 대한 기술 .....	23
7.4.2	투여량, 투여방법, 투여기간 .....	23
7.4.3	무작위 배정 .....	23

7.4.4	눈가림/눈가림 해제 .....	23
7.4.5	순응도 평가 .....	24
7.4.6	병용요법 및 병용금지 약물 .....	24
7.5	관찰항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법 .....	24
7.5.1	인체적용시험 진행 일정표 .....	24
7.5.2	관찰항목 및 임상검사 항목 .....	26
7.5.3	관찰검사 방법 .....	30
7.6	예측 부작용 및 사용상의 주의사항 .....	31
7.6.1	예측 부작용(Investigator's Brochure 참조) .....	31
7.6.2	일반적 주의사항 .....	31
7.7	중지 및 탈락 기준, 계획서 위반에 대한 처리 .....	32
7.7.1	중지 및 탈락 기준 .....	32
7.7.2	인체적용시험계획서 위반에 대한 처리 .....	32
7.8	유효성 평가기준 및 평가방법 .....	32
7.8.1	유효성 평가기준 .....	33
7.8.2	유효성 평가방법 .....	33
7.8.2.1	1차 유효성 평가변수 .....	33
7.8.2.2	2차 유효성 평가변수 .....	33
7.9	이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법 .....	33
7.9.1	안전성 평가기준 .....	34
7.9.2	안전성 평가방법 .....	34
7.9.3	안전성 보고 방법 .....	34
7.9.3.1	정의 .....	34
7.9.3.2	이상반응의 기록 .....	35
7.9.3.3	심각한 정도의 평가 .....	35
7.9.3.4	약물과의 인과관계 평가 .....	35
7.9.3.5	이상반응과 관련하여 취해진 조치 .....	36
7.9.3.6	이상반응의 결과 .....	36
7.9.3.7	중대한 이상반응/이상약물반응의 보고 .....	36
7.10	통계 분석 방법 .....	37
7.10.1	인구학적 정보 및 건강 상태 .....	37
7.10.2	유효성 자료의 분석 .....	37
7.10.2.1	1차 유효성 평가변수의 분석 .....	37
7.10.2.2	2차 유효성 평가변수의 분석 .....	37
7.10.3	안전성 자료의 분석 .....	38
8.	피험자 .....	39
8.1	피험자의 인체적용시험 참여 상태 .....	39

9. 인체적용시험의 결과 .....	40
9.1 피험자의 인구학적 정보 및 건강 상태 .....	40
9.1.1 피험자의 인구학적 정보 .....	40
9.1.2 병력 및 치료력, 병용약물 여부 .....	40
9.2 안전성 평가 .....	41
9.2.1 활력 징후 .....	41
9.2.2 신체 계측 .....	42
9.2.3 신체검사 .....	43
9.2.4 임상실험실 검사 .....	43
9.2.5 임상적 이상반응 발현상황 .....	50
9.2.6 약물 복용력 .....	50
9.3 유효성 평가 .....	50
9.3.1 FAS 분석(최종 판정) .....	50
9.3.1.1 1차 유효성 평가 .....	50
9.3.1.2 2차 유효성 평가 .....	53
10. 결론 .....	67
11. 참고문헌 .....	69
별첨 1. 식사요법 지침 .....	70
별첨 2. 운동요법 지침 .....	74

표 목 차

표 1. 인구학적 정보 ..... 40

표 2. 병력 및 치료력, 병용약물 여부 ..... 41

표 3. 활력 징후 비교 ..... 42

표 4. 신체 계측 비교 ..... 43

표 5. 신체검사 비교 ..... 43

표 6. 일반혈액검사 비교 ..... 44

표 7. 일반혈액검사 비교 (계속) ..... 45

표 8. 일반혈액검사 비교 (계속) ..... 46

표 9. 혈청생화학검사 비교 ..... 46

표 10. 혈청생화학검사 비교 (계속) ..... 47

표 11. 혈청생화학검사 비교 (계속) ..... 48

표 12. 뇨검사(1) ..... 48

표 13. 뇨검사(2) ..... 49

표 14. 통증평가 설문(VAS) 비교 ..... 51

표 15. 통증평가 설문(VAS) 변화율 비교 ..... 51

표 16. BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS) 비교 ..... 52

표 17. BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS) 변화율 비교 ..... 53

표 18. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 비교 ..... 54

표 19. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율 비교 ..... 55

표 20. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 비교 ..... 56

표 21. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율 비교 ..... 57

표 22. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 비교 ..... 59

표 23. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율 비교 ..... 60

표 24. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 비교 ..... 61

표 25. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율 비교 ..... 62

표 26. 염증성 cytokine 평가 비교 ..... 63

표 27. 염증성 cytokine 평가 변화량 비교 ..... 64

표 28. BMI 그룹별 염증성 cytokine 평가 비교 ..... 65

표 29. BMI 그룹별 염증성 cytokine 평가 변화량 비교 ..... 66



그림 목 차

그림 1. 피험자의 인체적용시험 참여 상태 ..... 39  
그림 2. 통증평가 설문(VAS) 비교 ..... 51  
그림 3. 통증평가 설문(VAS) 변화율 비교 ..... 52  
그림 4. BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS) 변화율 비교 ..... 53  
그림 5. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 비교 ..... 55  
그림 6. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율 비교 ..... 56  
그림 7. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율 비교 ..... 58  
그림 8. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 비교 ..... 60  
그림 9. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율 비교 ..... 61  
그림 10. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율 비교 ..... 63  
그림 11. 염증성 cytokine 평가 비교 ..... 64  
그림 12. 염증성 cytokine 평가 변화량 비교 ..... 65  
그림 13. BMI 그룹별 염증성 cytokine 평가 변화량 비교 ..... 66

1. 요약(Synopsis)

인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)	Volume : 12 pages Page : 1 of 12									
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐										
인체적용시험 명칭	노각나무 추출물의 골관절염 개선에 대한 유효성 및 안전성 평가 : 8주, 무작위 배정, 이중 눈가림, 평행, 위약대조 인체적용시험										
인체적용시험의 목적	<p>▶ 1차 목적</p> <p>시험식품 투여군과 대조식품 투여군에 대해서 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지 통증평가 설문 [Visual analogue scale(이하 VAS)] 의 변화를 비교하여 노각나무 추출물의 골관절염 개선을 평가한다.</p> <p>▶ 2차 목적</p> <p>① 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 통증 및 기능상태 평가 설문 [Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index(이하 WOMAC), Lequesne functional severity index(이하 LFI)] 의 변화를 비교한다.</p> <p>② 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 염증성 cytokine [IL-6, TNF-<math>\alpha</math>] 의 변화를 비교한다.</p> <p>③ 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사, 임상적 이상반응 발현 상황, 약물 복용력 등을 통하여 식품의 안전성을 평가한다.</p>										
실시기관 및 주소, 연구자	<p>▶ 실시기관 : 분당 서울대학교병원</p> <p>▶ 주소 : (13620) 경기도 성남시 분당구 구미로 173번길 82</p> <p>▶ 시험책임자 : 내분비내과 장학철 교수</p> <p>▶ 공동연구자 : 내분비내과 임수 부교수, 내분비내과 최성희 부교수, 재활의학과 임재영 부교수</p>										
인체적용시험 기간	인체적용시험 승인일로부터 12개월										
주요 선정기준	<p>1) 만 40세 이상의 성인 남성 또는 여성</p> <p>2) 퇴행성 슬관절염의 임상적 진단 기준 및 Kellgren-Lawrence 방사선학적 Grade를 만족하는 자</p> <p>[퇴행성 슬관절염의 임상적 진단 기준]</p> <p>American College of Rheumatology classification criteria(이하 ACR criteria)를 기준으로 다음의 ㉠ 또는 ㉡에 해당하는 경우</p> <p>㉠ knee pain AND radiographic osteophytes (무릎 통증 그리고 골극)</p> <p>㉡ knee pain AND age<math>\geq</math>40 AND morning stiffness<math>\leq</math>30 minutes in duration AND crepitus on motion (무릎 통증 그리고 40세 이상의 나이 그리고 조조강직이 30분 이하 그리고 활동시 마찰음)</p> <p>[Kellgren-Lawrence 방사선학적 Grade]</p> <p>Kellgren-Lawrence Grade로 다음의 I 또는 II 또는 III 에 해당하는 경우</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Grade</th> <th>Osteoarthritis severity</th> <th>Radiographic findings</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>None (정상)</td> <td>Normal (정상)</td> </tr> <tr> <td>I</td> <td>Doubtful (의심)</td> <td>Doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lipping (골극의 가능성만 존재)</td> </tr> </tbody> </table>		Grade	Osteoarthritis severity	Radiographic findings	0	None (정상)	Normal (정상)	I	Doubtful (의심)	Doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lipping (골극의 가능성만 존재)
Grade	Osteoarthritis severity	Radiographic findings									
0	None (정상)	Normal (정상)									
I	Doubtful (의심)	Doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lipping (골극의 가능성만 존재)									

인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)		Volume : 12 pages
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐		Page : 2 of 12
주요 선정기준	Grade	Osteoarthritis severity	Radiographic findings
	II	Minimal (경증)	Definite osteophytes and possible narrowing of joint space (확실한 골극과 관절강의 좁아짐의 가능성이 있는 경우)
	III	Moderate (중등도)	Moderate multiple osteophytes, definite narrowing of joint space and some sclerosis and possible deformity of bone ends (중간크기의 골극과 혹은 확실한 관절강의 좁아짐)
	IV	Severe (중증)	Large osteophytes, marked narrowing of joint space, severe sclerosis and definite deformity of bone ends (커다란 골극, 심한 관절강의 좁아짐 혹은 골경화 양상이 존재하는 경우)
	3) 슬관절 통증에 대해 VAS(100mm) 점수가 30mm 초과 80mm 미만인 자 4) 본 인체적용시험의 개요를 설명 받고 동의서에 서명한 자		
주요 선정 제외기준	1) 골관절염 치료를 위해 아세트아미노펜(acetaminophen), 이부프로펜(ibuprofen), 인도메타신(indomethacin)과 같은 비스테로이드성 항염증제(Non Steroidal Antiinflammatory Drugs, 이하 NSAIDs)를 복용하고 있는 자 2) 시험 전 히알루론산(hyaluronic acid) 또는 스테로이드(steroid) 등의 약제로 관절강 내 주사를 시행한 자 3) 퇴행성 슬관절염으로 수술을 시행한 자 4) 시험 전 삼출액 천자를 시행한 자 5) X-ray 검사상 정상소견이거나 퇴행성 관절염 이외의 점액낭염, 건초염, 섬유근육통, 통풍, 류마티스 관절염, 염증성, 대사성, 신경병성, 종양, 감염, 자가면역질환 등으로 인하여 슬통을 호소하는 자 6) 알코올 중독 또는 약물 남용의 병력이 있는 자 7) BMI 45kg/m <sup>2</sup> 이상의 비만증인 자 8) ALT, AST, Total bilirubin, Alkaline Phosphatase 검사치가 정상 상한치의 2.5 배 이상 높은 간기능 장애자 9) 신부전 병력이 있거나 혈청 Creatinine 검사치가 정상 상한치의 30% 이상 높은 신기능 장애자 10) Hepatitis B test 양성 반응을 보이는 자 11) 시험 전 심근경색증, 심부전, 뇌경색, 뇌출혈, 협심증, 뇌졸중, 일시적인 허혈성 심장질환 등의 병력이 있는 자 12) 암(cancer)의 병력이 있는 자 13) 임신 또는 수유 중인 여성		

인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)	Volume : 12 pages											
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐	Page : 3 of 12											
주요 선정 제외기준	<p>14) 적절한 피임(피임제 투여, 자궁 내 피임기구 또는 격막 삽입방법 등)을 하고 있지 않은 가임 여성 [가임 여성] 인체적용시험 기간 동안 임신가능성을 최소화할 수 있는 적절한 피임법을 사용해야 한다. ‘가임 여성’이라 함은 ① 불임수술(자궁절제술, 양측 나팔관 결찰 또는 양측 난소 절제술)을 받지 않았거나, ② 폐경(12개월간의 자연적인 무월경)이 되지 않은 여성을 말한다. 피임을 위하여 피임제 투여(경구용, 이식용, 주사용 등)를 사용하거나, 자궁 내 피임기구 또는 격막 삽입방법(피임용 격막, 콘돔, 살정제 등)을 쓰고 있는 경우, 금욕하고 있거나, 파트너가 불임(예: 정관절제술) 상태인 경우에도 가임 여성으로 간주한다.</p> <p>15) 시험제품에 대한 과민 반응력이 있는 자 16) 병용약물로 인해 심각한 약물 상호작용의 위험성이 있는 자 17) 의학적, 정신적으로 연구약물 복용의 금기 사항을 가지는 자 18) 법적으로 인체적용시험에 참가가 불가능한 자 19) 현재 본 인체적용시험 이외에 연구개발 중인 다른 시험에 참가하고 있거나, 시험 전 4주 이내에 타 인체적용(임상)시험에 참여하였던 자 20) 본 인체적용시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 연구자가 판단하여 시험을 진행할 수 없다고 판단되는 자</p>												
인체적용시험 대상자 수	<p>총 78 례 [시험식품군 39명, 대조식품군 39명 (탈락을 10%씩 고려)] (취약한 연구대상자 수 : 해당사항 없음)</p>												
인체적용시험용 식품	<p>▶ 시험식품군 : SKE 100 ▶ 대조식품군 : SKE 위캡슐(덱스트린)</p>												
인체적용시험 설계	무작위배정, 이중 눈가림, 평행, 위약대조												
용법 및 용량	<p>▶ 시험식품군 : 1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구투여, 8주간 복용 [ SKE 100mg * 1캡슐 = 100mg/day ] ▶ 대조식품군 : 1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구투여, 8주간 복용 [ SKE 위캡슐 100mg * 1캡슐 = 100mg/day ]</p>												
인체적용시험 방법	<p>피험자는 총 78명 [시험식품군 39명, 대조식품군 39명]으로 이루어져 있으며, 본 연구에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 피험자를 선정하고 필요한 임상검사 및 설문을 실시한다. Visit 2에 선정 및 제외기준에 적합한 피험자에 한하여 시험책임자가 무작위로 시험식품군과 대조식품군으로 배정하여 총 8주간의 Treatment period를 진행한다.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Visit 1 -7d (-1wk)</th> <th colspan="3">Double-Blind treatment period</th> </tr> <tr> <th>Visit 2 1d (0wk+7)</th> <th>Visit 3 28d (4wk±7)</th> <th>Visit 4 56d (8wk±7)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>선별검사</td> <td>무작위배정, 인체적용시험용 식품 처방</td> <td>인체적용시험용 식품 반납 및 처방</td> <td>인체적용시험용 식품 복용 종료</td> </tr> </tbody> </table>		Visit 1 -7d (-1wk)	Double-Blind treatment period			Visit 2 1d (0wk+7)	Visit 3 28d (4wk±7)	Visit 4 56d (8wk±7)	선별검사	무작위배정, 인체적용시험용 식품 처방	인체적용시험용 식품 반납 및 처방	인체적용시험용 식품 복용 종료
Visit 1 -7d (-1wk)	Double-Blind treatment period												
	Visit 2 1d (0wk+7)	Visit 3 28d (4wk±7)	Visit 4 56d (8wk±7)										
선별검사	무작위배정, 인체적용시험용 식품 처방	인체적용시험용 식품 반납 및 처방	인체적용시험용 식품 복용 종료										

인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)		Volume : 12 pages
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐		Page : 4 of 12
검사/방문 일정	방문일	검사 항목	
	방문 1 -7일 (-1주)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 인구학적, 병력 및 치료력 조사</li> <li>▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사(두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등), 신체 계측(키, 체중)</li> <li>▶ 임상실험실 검사 1 (일반혈액검사, 혈청생화학검사, 뇨검사)</li> <li>▶ 임상실험실 검사 2 (B형간염 검사), 심전도(ECG) 검사</li> <li>▶ 임신 여부 검사(가임 여성)</li> <li>▶ X-ray 검사(무릎), VAS 평가</li> </ul>	
	방문 2 1일 (0주+7, 방문1 기준)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사, 신체 계측</li> <li>▶ 임상실험실 검사 1, 임신 여부 검사(가임 여성)</li> <li>▶ VAS 평가, WOMAC 평가, LFI 평가</li> <li>▶ IL-6, TNF-<math>\alpha</math> 평가</li> </ul>	
	방문 3 28일 (4주 $\pm$ 7, 방문2 기준)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사, 신체 계측</li> <li>▶ 임상실험실 검사 1, 임신 여부 검사(가임 여성)</li> <li>▶ VAS 평가, WOMAC 평가, LFI 평가</li> <li>▶ IL-6, TNF-<math>\alpha</math> 평가</li> </ul>	
	방문 4 56일 (8주 $\pm$ 7, 방문2 기준)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사, 신체 계측</li> <li>▶ 임상실험실 검사 1, 심전도(ECG) 검사</li> <li>▶ 임신 여부 검사(가임 여성)</li> <li>▶ VAS 평가, WOMAC 평가, LFI 평가</li> <li>▶ IL-6, TNF-<math>\alpha</math> 평가</li> </ul>	
유효성 평가	<p>유효성에 대한 자료는 FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP(per protocol) 분석법을 실시하며, 유효성 평가변수에 대한 최종판정은 FAS 분석법으로 한다.</p> <p>▶ 1차 유효성 평가</p> <p>기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 통증평가 설문 [VAS]의 변화 비교를 통해 시험식품을 투여한 군이 대조식품 투여군에 비해 골관절염 개선의 우월함을 증명한다.</p> <p>▶ 2차 유효성 평가</p> <p>기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 통증 및 기능상태평가 설문 [WOMAC, LFI], 염증성 cytokine [IL-6, TNF-<math>\alpha</math>]의 변화를 비교한다.</p>		
안전성 평가	<p>인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자를 대상으로 평가한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 활력증후 및 신체계측, 임상실험실 결과 평가</li> <li>▶ 신체검사 결과 평가</li> <li>▶ 임상적 이상반응 발현상황 평가</li> <li>▶ 약물 복용력 평가</li> </ul>		

인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)	Volume : 12 pages
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐	Page : 5 of 12
통계적 분석방법	<p>▶ 인구학적 정보 및 건강 상태 인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자를 대상으로 인구학적 정보(성별, 연령, 신장, 체중 등) 및 건강 상태에 대하여 연속형 변수는 독립표본 t-검정 (independence samples t-test)을 실시하고, 범주형 변수는 카이제곱 검정 (chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)으로 평가한다.</p> <p>▶ 유효성 자료의 분석 <u>1차 유효성 평가</u> 통증평가 설문 [VAS] 의 변화 비교에 대해 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다. <u>2차 유효성 평가</u> ① 통증 및 기능상태평가 설문 [WOMAC, LFI] 의 변화 비교에 대해 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다. ② 염증성 cytokine [IL-6, TNF-<math>\alpha</math>] 의 변화 비교에 대해 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다.</p> <p>▶ 안전성 자료의 분석 1) 활력징후 및 신체계측, 임상실험실 결과는 각 방문 시점별 평균 및 표준편차 등의 기술통계량으로 기술하고, 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정 (independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다. 2) 신체검사 결과는 각 방문별로 증례수를 계산하여 카이제곱검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)으로 평가한다. 3) 임상적 이상반응 발현상황에 대하여는 증례수를 계산하여 카이제곱검정 (chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)으로 평가한다. 4) 약물 복용력은 인체적용시험 기간 동안 인체적용시험용 식품 이외에 피험자가 복용한 모든 약물을 기록하고, 기록된 약물은 계열별로 분류하여 평가한다.</p>	

인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)	Volume : 12 pages Page : 6 of 12
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐	

● 통계분석 결과

1. 피험자의 인체적용시험 참여 상태

인체적용시험 실시기관인 분당 서울대학교병원 생명윤리심의위원회로부터 2016년 4월 1일 최종승인을 받은 후, 2016년 6월 8일부터 피험자가 등록되었다.

방문 1에 본 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 선별검사(screening)를 실시한 피험자 수는 총 90명이었으며, 그 중에 총 12명은 “선정/제외기준 부적합”의 이유로 무작위 배정되기 전에 탈락하였다.

방문 2에 선정 및 제외기준에 적합한 총 78명의 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 대조식품군(SKE 위캡슐)과 시험식품군(SKE 100)으로 배정하였다. 무작위 배정된 피험자는 대조식품 또는 시험식품을 1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 총 4주간 복용하였다.

방문 3에서 인체적용시험용 식품을 회수하였고, 중도탈락한 피험자는 없었다. 78명의 피험자는 방문 2에 배정된 시험식품 또는 대조식품을 재처방 받아 1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 총 4주간 복용하였다.

방문 4에서 인체적용시험용 식품을 회수하였으며, 총 8주간의 Treatment period 동안 중도탈락 피험자는 발생하지 않았다. 2016년 11월 15일에 총 78명의 피험자가 인체적용시험을 완료(피험자 최종방문 완료)하였다.

2. 피험자의 인구학적 정보 및 건강 상태

본 인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자 78명[SKE 위캡슐군 39명, SKE 100군 39명]에 대해 분석을 실시하였다.

① 성별 분포를 살펴보면 남자 피험자는 27명(34.6%), 여자 피험자는 51명(65.4%)으로 남자보다 여자의 비율이 약간 높게 나타났으며 성별에 따른 군간 차이는 통계적으로 유의(p=0.475)하지 않았다. 평균 연령의 경우 SKE 100군(만 63.95±7.17세)이 SKE 위캡슐군(만 61.05±6.63세) 보다 약간 높게 나타났으며, 선정기준에 해당되었다. 키(p=0.280)와 체중(p=0.578), BMI(p=0.850)의 경우 모두 유의한 차이를 보이지 않아 최초 무작위 배정에 의한 대상자간의 편견이 없는 것으로 확인되었다.

② 인체적용시험 선별 당시 병력(수술력 포함) 및 치료력을 조사한 결과, SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 병력 및 치료력이 없는 것으로 조사되었다. 병력 및 치료력이 있는 피험자들 중 본 인체적용시험용 식품과 병용 투여할 수 있는 약물인지를 평가하기 위하여 병용약물 여부를 조사한 결과, SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 현재 병력을 치료하기 위해 투여하는 병용약물이 없는 것으로 나타나 인체적용시험 진행에 문제가 없음을 확인하였다.

3. 안전성 평가

본 인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자 78명[SKE 위캡슐군 39명, SKE 100군 39명]을 대상으로 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사 결과, 임상적 이상반응 발현상황, 약물 복용력 등을 종합하여 평가하였다.

인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)	Volume : 12 pages Page : 7 of 12
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐	

● 통계분석 결과

① 활력 징후

수축기 혈압의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으며, SKE 위캡슐군( $p=0.709$ )과 SKE 100군( $p=0.283$ ) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다.

이완기 혈압의 경우에도 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 비교에서 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, SKE 위캡슐군( $p=0.888$ )과 SKE 100군( $p=0.105$ ) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

맥박의 경우에도 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화는 없었으며, SKE 위캡슐군( $p=0.280$ )과 SKE 100군( $p=0.242$ ) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

체온의 경우에서도 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, SKE 위캡슐군( $p=0.478$ )과 SKE 100군( $p=0.564$ ) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

② 신체 계측

키와 체중, BMI 지수 모두 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없었으며, SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다.

③ 신체검사

각 방문시마다 피험자들에게 두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등의 신체검사를 실시하여 비교한 결과, SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 비정상적 경우가 전혀 없었다.

④ 임상실험실 검사

일반혈액검사 수치를 비교한 결과, 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 검사치를 비교한 결과, Hemoglobin, Hematocrit, WBC, RBC, Platelet, MCV, MCH, MCHC, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, Erythrocyte sedimentation rate(ESR) 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. SKE 100군의 경우 방문시기에 따라 일반혈액검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다. SKE 위캡슐군의 경우에는 Basophil( $p=0.027$ )에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 검사치의 변화가 정상 수치의 범위 안에 있었다.

혈청생화학검사 수치를 비교한 결과, 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 검사치를 비교한 결과에서는 Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Fasting plasma glucose, Total Bilirubin, AST, ALT, Alkaline phosphatase, Total cholesterol, Triglyceride, hsCRP 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다. 또한 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 방문시기에 따라 혈청생화학검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다.



인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)	Volume : 12 pages Page : 8 of 12
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐	

● 통계분석 결과

④ 임상실험실 검사(계속)

뇨검사(1) 수치를 비교한 결과, pH와 Specific gravity(S.G)의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 비교에서는 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. SKE 100군에서는 방문시기에 따라 뇨검사(1) 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다. SKE 위캡슐군의 경우에는 pH(p=0.034)에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 검사치의 변화가 정상 수치의 범위 안에 있었다.

뇨검사(2) 수치를 비교한 결과, Nitrate, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Urobilinogen 검사 수치는 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 정상으로 조사되었다. Protein 검사 수치가 비정상(NCS)으로 나온 피험자는 SKE 위캡슐군의 경우 0주차 3명(7.7%), 4주차 1명(2.6%), 8주차 2명(5.1%) 조사되었으나 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었으며 임상적인 의미는 없었다. Leukocyte esterase 검사 수치에서도 비정상(NCS)으로 나온 피험자는 SKE 위캡슐군의 경우 0주차 2명(5.1%), 4주차 6명(15.4%), 8주차 4명(10.3%), SKE 100군의 경우 0주차 4명(10.3%), 4주차 4명(10.3%), 8주차 7명(17.9%) 조사되었으나 군간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 임상적인 의미는 없었다.

⑤ 임상적 이상반응 발현상황

대조식품군(SKE 위캡슐)과 시험식품군(SKE 100)에서 인체적용시험 제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 모든 이상반응(AE)은 발생하지 않았다. 이상약물반응(ADR), 중대한 이상반응(Serious AE)과 중대한 이상약물반응(Serious ADR)의 경우에도 발현되지 않았다.

⑥ 약물 복용력

인체적용시험 선별 당시 병용약물이 없는 것으로 확인되었으며, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 1회 이상 복용한 이후의 병용약물도 전혀 없는 것으로 확인하였다.

4. 유효성 평가

유효성에 대한 자료는 FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP(per protocol) 분석법을 실시하기로 하였으나, PP 분석법에서 제외(인체적용시험계획서에서 명시한 기간을 채우지 못하고 중도 탈락한 경우, 병용금지약물(또는 식품)을 투여한 경우, 인체적용시험용 식품 순응도가 80% 이하인 경우, 인체적용시험계획서를 중대하게 위반하였다고 판단되는 경우)에 해당하는 피험자가 없었으므로 FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP(per protocol) 분석법에 해당되는 피험자의 수가 동일하여 FAS(Full Analysis Set) 분석법만 실시하였다. 최종 판정은 FAS(Full Analysis Set) 분석법으로 하였다.

1) FAS 분석법(최종 판정)

FAS 분석법은 인체적용시험에 등재되어 1회 이상 인체적용시험용 식품을 복용하고, 최소한 1회 이상 유효성 평가가 실시된 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 따라서 피험자 78명 [SKE 위캡슐군 39명, SKE 100군 39명]을 대상으로 평가하였다.

인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)	Volume : 12 pages Page : 9 of 12
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐	

● 통계분석 결과

① 1차 유효성 평가

통증평가 설문(VAS)의 경우 SKE 100군에서 방문시기에 따라 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 감소( $p < 0.001$ )하는 것으로 나타났다. 또한 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 비교에서는 4주차( $p = 0.026$ )와 8주차( $p < 0.001$ )에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

통증평가 설문(VAS)의 변화율을 분석한 결과, SKE 위캡슐군은 1.01% 개선된 반면 SKE 100군은 37.02% 개선되어 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다.

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS)을 분석한 결과, SKE 100군에서 방문시기에 따라 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹( $p < 0.001$ )과 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹( $p < 0.001$ ) 모두 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS) 변화율을 분석한 결과, Baseline의 검사치와 비교하였을 때 SKE 100군은 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹(41.36% 개선)과 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹(32.46% 개선) 모두 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹에 비해 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

② 2차 유효성 평가

통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 총점수의 경우 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 비교에서는 8주차( $p = 0.003$ )에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 또한 SKE 100군에서 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소( $p < 0.001$ )하여 개선되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 세분화하여 살펴본 결과, WOMAC 통증( $p = 0.005$ ), WOMAC 뻣뻣함( $p = 0.004$ ), WOMAC 일상생활 수행의 어려움( $p = 0.003$ ) 모두 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 비교에서 8주차에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 특히 SKE 100군에서 WOMAC 통증, WOMAC 뻣뻣함, WOMAC 일상생활 수행의 어려움 모두 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소( $p < 0.001$ )하여 개선되는 것으로 나타났다.

통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 총점수의 변화율을 분석한 결과, SKE 위캡슐군은 1.95% 악화된 반면 SKE 100군은 39.79% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 세분화하여 살펴보면, SKE 위캡슐군과 SKE 100군을 비교하였을 때 WOMAC 통증의 경우 SKE 100군(평균 47.19% 개선,  $p < 0.001$ )에서, WOMAC 뻣뻣함의 경우 SKE 100군(평균 73.06% 개선,  $p < 0.001$ )에서, WOMAC 일상생활 수행의 어려움의 경우 SKE 100군(평균 34.39% 개선,  $p < 0.001$ )에서 유의하게 개선되는 것을 확인하였다.

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 분석한 결과, SKE 100군에서 방문시기에 따라 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹( $p < 0.001$ )과 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹( $p = 0.036$ ) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 정도가 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율을 분석한 결과, SKE 100군은 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹(45.46% 개선)과 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹(33.81% 개선) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 정도가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹에 비해 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)	Volume : 12 pages Page : 10 of 12
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐	

● 통계분석 결과

② 2차 유효성 평가(계속)

통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 총점수의 경우 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 비교에서는 8주차 ( $p=0.002$ )에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 또한 방문시기에 따라 LFI 총점수는 SKE 위캡슐군에서는 증가한 반면 SKE 100군에서는 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소( $p<0.001$ )하여 개선되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 세분화하여 살펴본 결과, LFI 통증 또는 불편감( $p=0.006$ )과 LFI 일상생활 활동 어려움( $p=0.001$ )의 경우 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 비교에서 8주차에서만 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 특히 SKE 100군에서 LFI 통증 또는 불편감, LFI 최대 걸을 수 있는 거리, LFI 일상생활 활동 어려움 모두 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소( $p<0.001$ )하여 개선되는 것으로 나타났다.

통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 총점수의 변화율을 분석한 결과, SKE 위캡슐군은 7.04% 악화된 반면 SKE 100군은 37.41% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p<0.001$ )되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 세분화하여 살펴보면, SKE 위캡슐군과 SKE 100군을 비교하였을 때 LFI 통증 또는 불편감의 경우 SKE 100군(평균 46.56% 개선,  $p<0.001$ )에서, LFI 최대 걸을 수 있는 거리의 경우 SKE 100군(평균 28.28% 개선,  $p<0.001$ )에서, LFI 일상생활 활동 어려움의 경우 SKE 100군(평균 33.56% 개선,  $p<0.001$ )에서 유의하게 개선되는 것을 확인하였다.

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 분석한 결과, SKE 100군에서 방문시기에 따라 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹( $p<0.001$ )과 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹( $p=0.036$ ) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 정도가 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율을 분석한 결과, SKE 100군은 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹(40.76% 개선)과 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹(33.88% 개선) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 정도가 통계적으로 유의하게 개선( $p<0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹에 비해 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

염증성 cytokine 검사치를 비교한 결과, IL-6의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없는 것으로 나타났으며, SKE 100군에서 방문시기별로 점차 염증성 수치가 증가하였으며 통계적으로 유의한 차이( $p=0.347$ )는 없었다. TNF- $\alpha$ 의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없는 것으로 나타났으며, SKE 100군에서 방문시기별로 점차 염증성 수치가 통계적으로 유의하게 증가( $p=0.003$ )하는 것으로 확인되었다.

염증성 cytokine 평가 변화량을 분석한 결과, IL-6의 경우 SKE 위캡슐군은 염증성 정도가 평균 0.30pg/mL 증가된 반면 SKE 100군에서도 염증성 정도가 평균 0.24pg/mL 증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p=0.892$ )되지 않는 것으로 나타났다. TNF- $\alpha$ 의 경우에도 SKE 위캡슐군(평균 2.92pg/mL 증가)과 비교하였을 때 SKE 100군에서도 염증성 정도가 평균 2.53pg/mL 증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p=0.632$ )되지 않는 것으로 나타났다.

인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)	Volume : 12 pages Page : 11 of 12
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐	

● 통계분석 결과

② 2차 유효성 평가(계속)

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI 그룹별 염증성 cytokine 평가를 분석한 결과, IL-6의 경우 SKE 100군에서 방문시기에 따라 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(p=0.558)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(p=0.114) 모두 통계적으로 유의한 변화는 없는 것으로 나타났다. TNF-α의 경우에는 SKE 100군에서 방문시기에 따라 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(p=0.535)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(p=<0.001) 모두 점차 염증성 수치가 증가하는 것으로 확인되었다. BMI 그룹별 염증성 cytokine 평가 변화량을 분석한 결과, IL-6의 경우 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(평균 0.38pg/mL 감소, p=0.182)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(평균 0.90pg/mL 증가, p=0.152) 모두 통계적으로 유의하게 개선되지 않는 것으로 확인되었다. TNF-α의 경우에도 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(평균 0.86pg/mL 증가, p=0.069)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(평균 4.29pg/mL 증가, p=0.366) 모두 통계적으로 유의하게 개선되지 않는 것으로 확인되었다.

● 결론

1. 안전성 평가

1) 노각나무 추출물은 안전한 것으로 평가되었음.

2. 유효성 평가

1) FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP 분석법에 해당되는 피험자의 수는 동일하여 FAS(Full Analysis Set) 분석법만 실시하였음. 최종판정은 FAS(Full Analysis Set) 분석법으로 판정함.

2) 시험식품(SKE 100군)의 경우 통증평가 설문(VAS)에서는 통증 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났다.

3) 시험식품(SKE 100군)의 경우 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC, LFI)에서는 통증 및 기능상태 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났다.

4) 시험식품(SKE 100군)의 경우 염증성 cytokine(IL-6, TNF-α) 평가에서는 염증성 완화 개선에는 큰 도움이 되지 않는 것으로 확인되었다.

① 1차 유효성 평가

- 통증평가 설문(VAS)의 경우 Baseline의 증상 정도와 비교하였을 때 SKE 100군은 37.02% 개선되어 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 개선(p<0.001)되는 것으로 나타났다.

- BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS)의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(41.36% 개선)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(32.46% 개선) 모두 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 개선(p<0.001)되는 것으로 나타났다. BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에 비해 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

인체적용시험 연구비 지원기관	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 의뢰자 : 크로벤CRO)	Volume : 12 pages Page : 12 of 12
인체적용시험 제품명	SKE 100, SKE 위캡슐	

● 결론

2. 유효성 평가 (계속)

② 2차 유효성 평가

- 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 총점수의 경우 SKE 100군은 39.79% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다.
- BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 총점수의 경우 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(45.46% 개선)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(33.81% 개선) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에 비해 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.
- 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 총점수의 경우 SKE 100군은 37.41% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다.
- BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 총점수의 경우 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(40.76% 개선)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(33.88% 개선) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에 비해 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.
- IL-6의 경우 SKE 100군에서 염증성 정도가 평균 0.24pg/mL 증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p = 0.892$ )되지 않는 것으로 나타났다. TNF- $\alpha$ 의 경우에도 SKE 100군에서 염증성 정도가 평균 2.53pg/mL 증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p = 0.632$ )되지 않는 것을 확인하였다.
- BMI 그룹별 IL-6 평가의 경우 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(평균 0.38pg/mL 감소,  $p = 0.182$ )과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(평균 0.90pg/mL 증가,  $p = 0.152$ ) 모두 통계적으로 유의하게 개선되지 않는 것으로 확인되었다. TNF- $\alpha$  평가의 경우에도 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(평균 0.86pg/mL 증가,  $p = 0.069$ )과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(평균 4.29pg/mL 증가,  $p = 0.366$ ) 모두 통계적으로 유의하게 개선되지 않는 것으로 확인되었다.

## 2. 약어 및 용어 정의

시험식품군 : SKE 100을 복용한 피험자  
대조식품군 : SKE 위캡슐을 복용한 피험자  
인체적용시험용 식품 : 인체적용시험에 사용되는 시험식품 또는 대조식품  
ADR : Adverse Drug Reaction, 이상약물반응  
AE : Adverse Event, 이상반응  
ALT : Alanine aminotransferase (효소검사, 간기능의 지표)  
AST : Aspartate aminotransferase (효소검사, 간기능의 지표)  
BMI : Body Mass Index, 체질량지수  
BUN : Blood urea nitrogen, 요소 질소(신장기능 검사)  
CRA : Clinical research associate, 인체적용시험모니터요원  
CRC : Clinical research coordinator, 연구코디네이터  
CRO : Contract Research Organization, 인체적용시험수탁기관  
ECG : Electrocardiography, 심전도기록법  
ESR : Erythrocyte sedimentation rate, 적혈구 침강속도  
FAS : Full Analysis Set, 배정된 대로 분석  
GCP : Good Clinical Practice, 인체적용시험 관리기준  
HBsAg : Hepatitis B virus surface antigen, B형 간염 바이러스 표면항원  
hsCRP : high sensitivity CRP, 고감도C-반응성단백  
IL-6 : Interleukin 6(염증성 cytokine)  
LFI : Lequesne functional severity index, 통증 및 기능상태평가 설문  
MCH : Mean corpuscular hemoglobin, 적혈구의 평균 혈색소량  
MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration, 적혈구의 혈색소 평균 농도  
MCV : Mean Corpuscular Volume, 적혈구의 평균 용적  
PP : Per Protocol, 계획서순응  
RBC : Red Blood Cell, 적혈구  
SG : specific gravity, 비중  
SKE : Stewartia koreana extract, 노각나무 추출물  
TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor- $\alpha$ , 종양괴사인자(염증성 cytokine)  
VAS : Visual analogue scale, 통증평가 설문  
WBC : White Blood Cell, 백혈구  
WOMAC : Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index, 통증 및 기능상태평가 설문



### 3. 윤리적 고려

#### 3.1 인체적용시험의 윤리성 확보를 위한 기본 방안

본 인체적용시험은 인체적용시험관리기준(Good Clinical Practice, 이하 GCP) 및 관련 규정에 따라 과학적이고 윤리적으로 진행되었으며, 헬싱키 선언에 입각하여 인간의 존엄성 및 권익을 존중함과 더불어 피험자에게 불이익이 초래되지 않도록 실시되었다.

#### 3.2 피험자 설명 및 동의

시험 책임자와 시험 담당자는 인체적용시험에 참여하는 피험자에게 ‘피험자 동의를 위한 설명서’의 내용에 대하여 이해 가능한 용어로 짧고 간결하게 설명하며, 대략 중학생이 이해할 수 있는 수준으로 하였다. 영어나 외국어는 한글 뒤 괄호 안에 표기하였다. 또한 피험자가 인체적용시험에 참여 또는 지속하도록 강요하거나 부당한 영향의 가능성을 최소화하기 위해 ‘피험자 동의를 위한 설명서’에 “귀하가 이 인체적용시험에 꼭 참여해 주시기를 바랍니다.”와 같은 내용의 문구를 넣지 않았다. ‘인체적용시험 참여 동의서’에 서명하기 전에 피험자는 충분한 시간을 가지고 심사숙고하며, 원하신다면 가족이나 다른 사람과 상의할 기회도 제공하였다. 피험자와 충분한 질의응답 시간을 통해 다양한 질문에 성실히 답변한 후, 준비된 양식에 자필로 날짜와 이름을 적고 서면으로 참가동의를 구하였다.

피험자의 이해능력·의사표현능력의 결여 등으로 대리인(친권자 또는 후견인)의 동의를 받아야 인체적용시험 참여가 가능한 경우 시험책임자 및 시험 담당자는 피험자에게 피험자 자신이 이해할 수 있는 정도까지 인체적용시험에 관한 정보를 주었다. 피험자 또는 대리인이 인체적용시험 참여 동의서, 피험자 동의를 위한 설명서, 그 밖의 문서화된 정보를 읽을 수 없는 경우에는 참관인이 동의를 받는 모든 과정에 참석하도록 하였다.

인체적용시험에 참여여부 결정은 자발적인 것이며, 인체적용시험 기간 중 언제라도 개인적인 사유 등으로 지속적인 참여를 중도에 거부하거나 자유로이 참가를 중단할 수 있으며, 이로 인해 진료 및 기타 어떠한 불이익도 받지 않음을 설명하였다. 인체적용시험 진행 중에 시험식품과 관련된 새로운 과학적 자료나 정보, 안전성과 관련된 새로운 사실이 알려지면 즉시 알려드려 인체적용시험의 계속 참여여부를 결정할 수 있도록 하였다. 인체적용시험에 계속 참여하기를 원하셔도 ‘피험자 인체적용시험 중지 및 탈락’에 해당되는 경우에는 시험 책임자가 인체적용시험에서 중단시킬 수 있음을 설명하였다. 또한 ‘피험자 동의를 위한 설명서’를 모두 읽고 이해한 후, 모든 의문점에 대해 시험 책임자의 답변이 완벽하게 이루어지지 않는 한, 서명하지 않아도 됨을 설명하였다. 피험자가 인체적용시험 참여 동의서에 서명함으로써 모든 법적 권리가 소멸되는 것은 아니며, 여전히 인체적용시험 피험자로서의 권리를 가지고 있음을 설명하였다.

#### 3.3 비밀유지

모든 피험자명은 비밀을 유지하고 인체적용시험 진행 중 부여한 번호에 의해 기록 및 평가 시 피험자를 확인하였다. 피험자에게 모든 시험자료가 컴퓨터에 저장되고 엄격히 비밀사항으로 다루어진다는 것을 알려주었다.

인체적용시험에 참여하는 피험자의 의무기록번호 및 개인정보 관련 자료는 시험 책임자의 책임하에 별도의 패스워드가 걸린 파일에 저장하며 연구데이터를 통하여 개인 신상확인이 불가능하

도록 관리하며 시험 책임자 연구실에 보관하였다. 인체적용시험 진행에 이용되는 PC(또는 노트북)에는 P2P 프로그램 및 상용웹하드 사용금지, 공유폴더 설정 금지, 부팅(CMOS) 암호 및 윈도우 로그인 암호를 반드시 설정하였다. PC(또는 노트북)에 백신프로그램을 설치하고 실시간 업데이트가 되도록 설정하였다. 비밀번호는 타인이 추측하기 어려운 번호(숫자, 영문, 특수문자를 혼용하여 9자리 이상)를 설정하고 주기적으로 변경하였다. 시스템 등을 사용하지 않을 경우에는 반드시 전원차단(30분 이상 자리 비울시), 화면보호기(10분 이하), 비밀번호 설정 등을 하여 타인의 사용을 예방하였다. 팩스 및 복사기, 프린터 이용시 개인정보가 포함되거나 보안상 주요 문서가 장시간 방치되지 않도록 주의, 조치하였다.

서명을 받은 인체적용시험 참여 동의서는 인체적용시험이 종료된 후에는 실시기관의 보관책임자가 보관하였다. 본 계획서에 서명함으로써 시험 책임자는 시험에 참가하는 피험자로부터 올바르게 인체적용시험 참여 동의서를 획득하기로 동의한 것이며 요청이 있는 경우 실사를 받는 데에도 동의한 것임을 확인하였다.

생명윤리법 시행규칙 제15조에 따라 본 인체적용시험과 관련된 모든 기본문서를 인체적용시험의 완료일로부터 3년간 지정된 장소에서 보관하며, 보관기간이 지난 문서는 개인정보보호법 시행령 제 16조에 의해 파기한다는 것을 알려주었다.

### 3.4 인체적용시험계획의 승인

인체적용시험 실시기관인 분당 서울대학교병원 생명윤리심의위원회로부터 2016년 2월 22일 정규심의를 실시하여 조건부승인(수정 후 신속심의)을 받았다. 인체적용시험계획서, 피험자 동의를 위한 설명서 및 인체적용시험 참여 동의서 등을 수정·보완하여 2016년 4월 1일 최종 승인을 받았다.



#### 4. 시험자와 연구지원 조직

##### 4.1 인체적용시험 실시기관명 및 주소

- 1) 실시 기관명 : 분당 서울대학교병원
- 2) 주소 :

##### 4.2 인체적용시험 책임자, 공동연구자 및 담당자

###### 4.2.1 인체적용시험 책임자

분당서울대학교 병원 내분비내과 장학철 교수

###### 4.2.2 인체적용시험 공동연구자

분당서울대학교 병원 내분비내과 임수 부교수, 내분비내과 최성희 부교수, 재활의학과 임재영 부교수

###### 4.2.3 인체적용시험 담당자

분당서울대학교 병원 이윤희 CRC, 박선미 CRC, 최미소 CRC

##### 4.3 인체적용시험용 식품 관리

분당서울대학교 병원 인체적용시험 담당자 이윤희 CRC, 박선미 CRC, 최미소 CRC

##### 4.4 인체적용시험 의뢰자 및 중앙검사실

- 1) 의뢰자명 : 크로벤CRO
- 2) 주 소 :
- 3) 인체적용시험모니터요원 : 김종배 CRA

##### 4.5 인체적용시험 연구비 지원기관

- 1) 연구비 지원기관명 : ㈜생명의 나무 (대표이사 : 나천수)
- 2) 주소 :
- 3) 담당자 : 김진범

## 5. 서론

### 5.1 목적

- 1차 목적 : 시험식품 투여군과 대조식품 투여군에 대해서 기초상태(baseline)에서 최종 평가 시점(endpoint)까지 통증평가 설문 [Visual analogue scale(이하 VAS)] 의 변화를 비교하여 노각나무 추출물의 골관절염 개선을 평가한다.
- 2차 목적 : ① 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 통증 및 기능상태평가 설문 [Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index(이하 WOMAC), Lequesne functional severity index(이하 LFI)] 의 변화를 비교한다.  
② 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 염증성 cytokine [IL-6, TNF- $\alpha$ ] 의 변화를 비교한다.  
③ 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사, 임상적 이상반응 발현상황, 약물 복용력 등을 통하여 식품의 안전성을 평가한다.

### 5.2 배경

골관절염(Osteoarthritis, 이하 OA)은 퇴행성관절염이라고도 하며, 무릎, 손, 척추, 고관절의 점진적인 관절연골의 손상으로 인하여 관절자체의 손상이나 변형이 발생하여 관절통증과 관절운동의 제한 등을 유발하는 만성질환이다.<sup>[1]</sup>

전 세계 65세 이상의 인구에서 약 50% 이상이 앓고 있을 정도로 가장 흔한 질환중의 하나이다.<sup>[2]</sup> 사회가 급속하게 노령화됨에 따라 골관절염 환자 수가 급격히 증가하고 있으며, 골관절염 장애로 인한 노동력 상실과 이를 위한 의료비 증가는 사회적인 문제로 나타나고 있다.<sup>[3]</sup> 우리나라의 경우 75세 이상 인구 1,000명당 320명이 골관절염을 앓고 있으며,<sup>[4]</sup> 40대부터 급격히 증가해서 50-60대에 이르면 33.8%로 10명 중 적어도 3명에게서 나타나고 있다. 또한 남성(24%)보다 여성(76%)에서 더 흔한 질환이며, 취약한 부위는 체중부하를 많이 받는 무릎관절(82.6%)에서 가장 높은 것으로 보고되고 있다.<sup>[5]</sup>

골관절염은 주로 큰 무게를 지탱하는 무릎관절에서 다발하며, 물리적인 자극에 저항하는 연골의 생리 화학적 능력이 저하되어 발생한다.<sup>[6]</sup> 그러나 골관절염은 단순히 연골이 닳아서 발생하는 것이 아니며 연골뿐만 아니라 관절을 구성하는 근육, 건, 인대, 활액 등의 염증과 기능 저하에 따라 증상이 더욱 가중된다. 근육과 건, 인대는 외부로부터의 충격에 저항하는 역할을 하고, 활액막이 분비하는 활액은 연골에 영양분을 공급하며 물리적 마찰을 낮추는 역할을 한다. 이처럼 골관절염은 연골뿐만 아니라 관절을 구성하는 결합조직을 포함한 전체의 질환으로 종창, 강직, 통증, 발적 및 관절운동 범위제한 등의 증상이 나타나기 때문에<sup>[7]</sup> 단순히 염증을 억제하는 것보다는 연골이 닳는 속도를 지연시켜주고 근육, 인대, 건 등을 튼튼하게 해주는 복합적인 치료방법이 필요하다.<sup>[8]</sup>

골관절염의 치료목적은 변형의 예방과 교정, 기능의 보존 및 회복, 통증의 완화에 있으며, 치료방법은 크게 비수술적 치료요법과 수술적 치료요법으로 구분된다.<sup>[9]</sup> 중증 골관절염은 관절경을 이용한 유리체 및 활액막 제거, 활막 절제, 소파관절 성형, 다발성 천공, 인공관절 치환 등 수술적 방법으로 치료하며 중증이 아닌 경우 약물요법이 주 치료방법이다.<sup>[10]</sup> 골관절염의 치료 혹은 개선에 사용되는 천연물 의약품에는 조인스정, 디세렌(Diacerein), 이모트, 사데닌정, 황산글루코사민, 황산콘드로이친 등의 제품이 있고 골관절염의 치료에 사용되는 약물에는 아세트아미노

펜(acetaminophen), 이부프로펜(ibuprofen), 인도메타신(indomethacin)과 같은 비스테로이드성 항염제(NSAIDs), 히알루론산(hyaluronic acid) 혹은 합성스테로이드(steroid)가 있으나 질병의 근원적인 치료가 불가능하고 장기간 사용 시 위장관 및 신장 부작용, 심혈관계 부작용, 과민반응, 면역체계 약화 등을 야기할 수 있다.<sup>[11-13]</sup>

따라서 이러한 부작용을 줄이고 단순히 증상을 일시적으로 완화시키는 것이 아닌 복합적인 효능을 높이기 위해 여러 가지 식용물질에 대해서도 골관절염 치료법에 대한 연구가 활발해지고 있으며, 현재 식약처에서 인정한 개별인정 원료로는 초록잎홍합추출오일, 황금추출물등복합물, 로즈힙분말, Dimethylsulfone(MSM), 차조기등복합추출물, 지방산복합물, 호프추출물, 전철삼추출물등복합물, 가시오갈피등복합추출물이 있다.<sup>[14]</sup>

이에 ‘(주)생명의 나무’에서는 안전한 천연물로 골관절염을 개선시키는 건강기능성 식품을 개발하려 한다.

식물 자원 중 노각나무(*Stewartia koreana*)는 한국에만 있는 특산 수종으로 대표서식처(군락지 기준)는 지리산의 전역, 속리산, 가야산, 월출산, 덕유산, 백운산, 모후산, 무등산, 내장산과 남해금산 및 소백산 등이다. 차나무과에 속하며 낙엽활엽교목으로 꽃은 흰색이며 6-7월 무렵 잎이 달리는 자리에 핀다. 꽃은 동백꽃 모양의 갈래꽃으로 꽃잎이 다섯 장이며, 수술이 많다. 10월에 익는 단단한 열매는 부드러운 털로 곁이 덮여 있다. 나무껍질에 얼룩무늬가 있어 비단나무 또는 금수목(錦繡木)이라고도 한다. 잎이 가을에 노랗게 물들고, 꽃이 마치 동백꽃처럼 생겨 흔히 정원이나 공원 등에 관상수로 심는다. 목재는 단단해서 가구용으로 많이 쓰인다. 한국본초도감에서는 활혈(活血) 작용이 있어서 타박상으로 어혈(瘀血)이 진 것을 풀어주고, 풍습성(風濕性)으로 인한 사지마비와 동통이 있을 때에 유효하다고 전한다. 또한 민간에서는 급성위장염, 간질환, 사지마비, 통증 등의 치료에 사용하며 특히 열매를 급성 위장병, 이노의 치료제로 사용하였다. 노각나무 추출물은 뛰어난 항산화 및 항염활성을 가지고 있는 것이 보고되었다. 또한 동의보감에서는 노각나무를 다려서 먹은 경우 간염, 간경화증, 지방간 질환치료에 효과가 있음을 시작으로 최근(1999~2010)에는 항산화 효과, 위장병 및 신경통 저감, HIV-1 Protease 억제, 해독, 염증 및 통증저하, 신생혈관촉진 및 관절통, 관절염에 효과가 있다고 알려지고 있다.

따라서 본 인체적용시험에서는 노각나무 추출물의 골관절염 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가한다.

## 6. 인체적용시험용 식품

### 6.1 인체적용시험용 식품의 일반명, 코드명, 원료약품 및 분량, 성상 및 제형 등

	시험식품군	대조식품군
일반명	노각나무 추출물	위캡슐(placebo)
제품명(코드명)	SKE 100	SKE 위캡슐
원료약품 및 분량	1캡슐 중 SKE 100mg 함유	1캡슐 중 SKE 위캡슐 100mg 함유 (텍스트린)
성상 및 제형	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 진한 어두운 초록색의 분말이 들어 있는 타원형 캡슐	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 진한 어두운 초록색의 분말이 들어 있는 타원형 캡슐
저장방법	실온보관(1~30℃), 기밀용기	실온보관(1~30℃), 기밀용기

### 6.2 인체적용시험용 식품의 생산, 포장, labeling 및 저장

인체적용시험용 식품은 제조 후 아래 예시(의약품 등의 안전에 관한 규칙 제 69조 6항에 준함)와 같은 라벨을 부착하고 포장하여 인체적용시험 실시기관의 시험 담당자에게 공급한다. 또한 시험 담당자와의 원활한 의사소통과 주기적인 모니터링을 통하여 필요한 시기에 적절한 수량을 공급할 수 있도록 한다. 시험식품 또는 대조식품으로 생산되는 제제는 각각 외형 및 성상이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않아야 하며, 중량 차이도 크지 않아야 한다.

#### 인 체 적 용 시 험 용

1. 제품의 코드명 : SKE 100 또는 SKE 위캡슐
2. 제조번호 : LT415001P
3. 사용(유효)기한 또는 재검사일자 : 2017 년 6 월 29 일
4. 저장방법: 실온보관(1~30℃), 기밀용기
5. 제조업자: (주)생명의 나무
6. 인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없습니다.

### 6.3 인체적용시험용 식품의 관리 및 기록

시험 담당자는 인체적용시험용 식품의 인수·관리·처방 및 반납에 대한 책임을 갖는다. 또한 인체적용시험용 식품의 수령사실 및 수량을 서면으로 확인하고 서명해야 하며, 안전한 장소에 취급·보관하여야 한다.

시험 담당자는 공급 받은 인체적용시험용 식품의 수량, 피험자에게 처방 및 반납된 수량, 인체적용시험 종료 후 사용되지 않고 남아 있는 수량 등에 대한 정확한 기록을 보관하는 것을 원칙으로 한다. 또한 인체적용시험 종료 시 모든 사용/미사용 인체적용시험용 식품, 사용/미사용 용기는 (주)생명의 나무에 반납하며, 인체적용시험용 식품 관리 기록의 복사본을 인체적용시험모니터요원에게 제출한다.

## 7. 인체적용시험 계획

### 7.1 인체적용시험의 기간

인체적용시험 승인일로부터 12개월

### 7.2 대상 질환

골관절염(퇴행성 슬관절염)

### 7.3 피험자의 선정기준, 제외기준, 목표한 피험자의 수 및 그 근거

대상 피험자 선정/제외 기준은 선별기간(Visit 1) 시점이다.

#### 7.3.1 선정기준

- 1) 만 40세 이상의 성인 남성 또는 여성
- 2) 퇴행성 슬관절염의 임상적 진단 기준 및 Kellgren-Lawrence 방사선학적 Grade를 만족하는 자  
[퇴행성 슬관절염의 임상적 진단 기준]

American College of Rheumatology classification criteria(이하 ACR criteria)를 기준으로 다음의 ① 또는 ②에 해당하는 경우

① knee pain AND radiographic osteophytes (무릎 통증 그리고 골극)

② knee pain AND age $\geq$ 40 AND morning stiffness $\leq$ 30 minutes in duration AND crepitus on motion (무릎 통증 그리고 40세 이상의 나이 그리고 조조강직이 30분 이하 그리고 활동시 마찰음)

[Kellgren-Lawrence 방사선학적 Grade]

Kellgren-Lawrence Grade로 다음의 I 또는 II 또는 III 에 해당하는 경우

Grade	Osteoarthritis severity	Radiographic findings
0	None (정상)	Normal (정상)
I	Doubtful (의심)	Doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lipping (골극의 가능성만 존재)
II	Minimal (경증)	Definite osteophytes and possible narrowing of joint space (확실한 골극과 관절강의 좁아짐의 가능성이 있는 경우)
III	Moderate (중등도)	Moderate multiple osteophytes, definite narrowing of joint space and some sclerosis and possible deformity of bone ends (중간 크기의 골극과 혹은 확실한 관절강의 좁아짐)
IV	Severe (중증)	Large osteophytes, marked narrowing of joint space, severe sclerosis and definite deformity of bone ends (커다란 골극, 심한 관절강의 좁아짐 혹은 골경화 양상이 존재하는 경우)

- 3) 슬관절 통증에 대해 VAS 점수가 30mm 초과 80mm 미만인 자
- 4) 본 인체적용시험의 개요를 설명 받고 동의서에 서명한 자

### 7.3.2 제외기준

- 1) 골관절염 치료를 위해 아세트아미노펜(acetaminophen), 이부프로펜(ibuprofen), 인도메타신(indomethacin)과 같은 비스테로이드성 항염증제(Non Steroidal Antiinflammatory Drugs, 이하 NSAIDs)를 복용하고 있는 자
- 2) 시험 전 히알루론산(hyaluronic acid) 또는 스테로이드(steroid) 등의 약제로 관절강 내 주사를 시행한 자
- 3) 퇴행성 슬관절염으로 수술을 시행한 자
- 4) 시험 전 삼출액 천자를 시행한 자
- 5) X-ray 검사상 정상소견이거나 퇴행성 관절염 이외의 점액낭염, 건초염, 섬유근육통, 통풍, 류마티스 관절염, 염증성, 대사성, 신경병성, 종양, 감염, 자가면역질환 등으로 인하여 슬통을 호소하는 자
- 6) 알코올 중독 또는 약물 남용의 병력이 있는 자
- 7) BMI 45kg/m<sup>2</sup> 이상의 비만증인 자
- 8) ALT, AST, Total bilirubin, Alkaline Phosphatase 검사치가 정상 상한치의 2.5배 이상 높은 간기능 장애자
- 9) 신부전 병력이 있거나 혈청 Creatinine 검사치가 정상 상한치의 30% 이상 높은 신기능 장애자
- 10) Hepatitis B test 양성 반응을 보이는 자
- 11) 시험 전 심근경색증, 심부전, 뇌경색, 뇌출혈, 협심증, 뇌졸중, 일시적인 허혈성 심장질환 등의 병력이 있는 자
- 12) 암(cancer)의 병력이 있는 자
- 13) 임신 또는 수유 중인 여성
- 14) 적절한 피임(피임제 투여, 자궁 내 피임기구 또는 격막 삽입방법 등)을 하고 있지 않은 가임 여성

#### [가임 여성]

인체적용시험 기간 동안 임신가능성을 최소화할 수 있는 적절한 피임법을 사용해야 한다. ‘가임 여성’이라 함은 ① 불임수술(자궁절제술, 양측 나팔관 결찰 또는 양측 난소 절제술)을 받지 않았거나, ② 폐경(12개월간의 자연적인 무월경)이 되지 않은 여성을 말한다. 피임을 위하여 피임제 투여(경구용, 이식용, 주사용 등)를 사용하거나, 자궁 내 피임기구 또는 격막 삽입방법(피임용 격막, 콘돔, 살정제 등)을 쓰고 있는 경우, 금욕하고 있거나, 파트너가 불임(예: 정관절제술) 상태인 경우에도 가임 여성으로 간주한다.

- 15) 시험제품에 대한 과민 반응력이 있는 자
- 16) 병용약물로 인해 심각한 약물 상호작용의 위험성이 있는 자
- 17) 의학적, 정신적으로 연구약물 복용의 금기 사항을 가지는 자
- 18) 법적으로 인체적용시험에 참가가 불가능한 자
- 19) 현재 본 인체적용시험 이외에 연구개발 중인 다른 시험에 참가하고 있거나, 시험 전 4주

- 이내에 타 인체적용(임상)시험에 참여하였던 자
- 20) 본 인체적용시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 연구자가 판단하여 시험을 진행할 수 없다고 판단되는 자

### 7.3.3 목표한 피험자 수 및 그 근거

시험식품 투여군이 대조식품 투여군에 비해 골관절염 개선의 우월함을 증명하기 위해, 총 78명 [시험식품군 39명, 대조식품군 39명]의 피험자를 모집할 예정이다. 이는 유효성 평가에서 제외되는 피험자의 비율(non-evaluable rate)을 10%로 가정할 때이다. 본 인체적용시험의 목적을 증명하기 위한 가설과 수식은 아래와 같다.

<산출 근거>

Effects of hyaluronate sodium on pain and physical functioning in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial 에서 SPS(a self-paced stepping) pain의 경우에서 VAS outcome measures가 대조군(Group 4) 2.15±1.00cm, 시험군(Group 2) 3.12±1.76cm으로 확인된 연구 결과로 군간의 차와 분산추정치를 예상하였다.

$H_0 : \mu_1 - \mu_2 \leq \delta \quad vs \quad H_1 : \mu_1 - \mu_2 > \delta$

$\mu_1$  : 대조군의 평균  
 $\mu_2$  : 시험군의 평균  
 $\delta$  : 군간 차이  
 $\sigma_\delta^2$  : 분산추정치  
 $\alpha = 0.05, Z_{1-\alpha/2} = 1.960$   
 $\beta = 0.2, Z_{1-\beta} = 0.842$

$$\sigma_\delta^2 = \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} = \frac{((28 - 1) \times 1.00^2) + (29 - 1) \times 1.76^2}{(28 + 29 - 2)} = 2.068$$

$$n \geq \frac{2(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 \sigma_\delta^2}{\delta^2} = \frac{2(1.96 + 0.842)^2 \times 2.068}{0.97^2} = 34.51$$

<참고문헌><sup>[15]</sup>  
 Petrella RJ, DiSilvestro MD, Hildebrand C. Effects of hyaluronate sodium on pain and physical functioning in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Arch Intern Med. 2002;162(3):292-298.

따라서 최종 표본 산정은 그룹별 35명 정도가 적당할 것으로 산정되었으나, 예상 탈락률을 10%로 고려하여 35/(1-0.1)로서 그룹별 39명[시험식품군 39명, 대조식품군 39명]으로 총 78명의 샘플이 적당할 것으로 사료된다.

### 7.4 인체적용시험의 방법

### 7.4.1 전반적인 인체적용시험의 방법에 대한 기술

본 인체적용시험은 무작위배정, 이중 눈가림, 평행, 위약대조 연구로 시행한다. 피험자는 총 78명 [시험식품군 39명, 대조식품군 39명]으로 이루어져 있으며, 본 연구에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 피험자를 선정하고 필요한 임상검사 및 설문을 실시한다. Visit 2에 선정 및 제외기준에 적합한 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 시험식품군과 대조식품군으로 배정하여 총 8주간의 Treatment period를 진행한다.

Visit 1 -7d (-1wk)	Double-Blind treatment period		
	Visit 2 1d (0wk+7)	Visit 3 28d (4wk±7)	Visit 4 56d (8wk±7)
선별검사	무작위배정, 인체적용시험용 식품 처방	인체적용시험용 식품 반납 및 처방	인체적용시험용 식품 복용 종료

### 7.4.2 투여량, 투여방법, 투여기간

#### 1) 시험식품군

1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구투여, 8주간 복용한다.

[SKE 100mg \* 1캡슐 = 100mg/day]

#### 2) 대조식품군

1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구투여, 8주간 복용한다.

[SKE 위캡슐 100mg \* 1캡슐 = 100mg/day]

### 7.4.3 무작위배정

인체적용시험계획서에서 제시된 선정 및 제외 기준을 만족한 피험자는 시험식품군 또는 대조식품군에 각각 무작위로 배정될 것이다. 무작위배정표는 인체적용시험 시작 전에 인체적용시험 의뢰기관인 크로벤CRO에서 작성하며, 무작위배정 방법은 block randomization 방법을 적용할 것이고 SPSS의 균등분포에 따른 난수 발생을 이용한 프로그램을 통하여 실시될 것이다. 시험 책임자는 인체적용시험 시작 시점에 무작위배정 봉투를 각각 개별로 봉합된 상태로 전달받게 된다. 전달된 무작위배정 봉투는 피험자의 안전과 관련된 응급상황을 제외하고는 각 피험자별로 8주간 인체적용시험용 식품 투여 후 종료될 때까지는 봉합된 상태로 유지되어야 하고, 인체적용시험이 종료되면 크로벤CRO에 다시 반납하여야 한다.

### 7.4.4 눈가림/눈가림 해제

눈가림(Blind)은 인체적용시험을 안전하게 실시하는데 있어 중요하다. 피험자 및 시험 책임자는 8주간 인체적용시험용 식품 투여 후 종료될 때까지 무작위배정에 대하여 눈가림 상태(Double-Blind)로 유지하여야 한다. 그러나 어떤 피험자에게 중대한 이상반응이 발생한 경우나 의학적으로 위급한 상



황 또는 어떤 약물을 투여 받고 있는지를 아는 것이 피험자를 관리하는데 절대적으로 중요한 상황 등에서 시험 책임자는 해당 피험자의 눈가림을 해제할 수 있다.

피험자의 눈가림 상태의 치료를 해제하기 전에 시험 책임자는 그 정보가 꼭 필요한지, 즉 치료정보가 피험자의 즉각적인 관리를 변경하게 될 정보인지를 판단해야 한다. 만일, 피험자의 안전과 관련된 응급상황이 발생하는 경우 시험 책임자는 즉시 개봉사실과 개봉사유를 (주)생명의 나무와 상의하고, 눈가림이 해제된 피험자는 중도 탈락으로 더 이상의 인체적용시험용 식품을 투여해서는 안 된다.

#### 7.4.5 순응도 평가

인체적용시험에 참여하여 무작위 배정된 각 피험자들이 인체적용시험 기간 동안 복용한 인체적용시험용 식품의 개수를 복용해야 하는 인체적용시험용 식품의 개수로 나누어 퍼센트로 환산하여 순응도를 평가한다. 소수점 둘째 자리에서 반올림하여 소수점 첫째 자리까지 기록한다.

$$\text{복약 순응도 (\%)} = \frac{\text{방문 전까지 복용한 수량}}{\text{방문 전까지 복용하여야 할 수량}} \times 100$$

#### 7.4.6 병용요법 및 병용금지 약물

인체적용시험 선별 당시 이미 받고 있던 치료 및 인체적용시험 기간 중 추가되는 치료는 병용요법으로 간주하며, 인체적용시험 기간 중 복용하는 새로운 약물 또는 비 약물 치료에 대하여 시험자에게 통보하도록 피험자를 교육한다. 인체적용시험 기간 중 병용한 모든 약물에 대해서는 용법, 용량, 투여 기간, 투여 목적 등을 증례기록서와 피험자 진료차트에 기록(가능하면 성분명 기재)해야 하며 가능한 한 인체적용시험 기간 중에는 병용요법을 변경하지 않는다.

즉, 인체적용시험 기간 중 병용약물의 투여는 최소화해야 하며, 피험자의 복지를 위해 필요하고 인체적용시험용 식품에 영향을 주지 않는다고 판단될 경우에만 시험 책임자의 판단에 따라 투여할 수 있다.

그러나 아래 약물의 사용은 허용하지 않으며, 이외에도 시험자 판단 하에 본 인체적용시험 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 다른 약물이 있을 경우 병용금지 할 수 있다.

- 1) 골관절염 치료 의약품 또는 건강기능식품
- 2) 아세트아미노펜(acetaminophen), 이부프로펜(ibuprofen), 인도메타신(indomethacin)과 같은 비스테로이드성 항염제(NSAIDs)
- 3) 히알루론산(hyaluronic acid) 또는 스테로이드(steroid) 등의 관절강 내 주사제

### 7.5 관찰항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법

#### 7.5.1 인체적용시험 진행 일정표\*

관찰항목	Screening <sup>1</sup>	Double-blind treatment period		
	Visit 1 -7d (-1wk)	Visit 2 1d (0wk+7)	Visit 3 28d (4wk±7)	Visit 4 56d (8wk±7)
피험자 방문 <sup>2</sup>	√	√	√	√
서면동의 및 Baseline Number 부여	√			
인구학적, 병력 및 치료력 조사	√			
임신 여부 검사(가임 여성) <sup>3</sup>	√	√	√	√
활력 징후, 신체검사 및 계측 <sup>4</sup>	√	√	√	√
임상실험실 검사 <sup>5</sup>	√	√	√	√
심전도(ECG)	√			√
X-ray 검사(무릎) <sup>6</sup>	√			
VAS 평가 <sup>6,7</sup>	√	√	√	√
WOMAC, LFI 평가 <sup>7</sup>		√	√	√
염증성 cytokine 평가(IL-6, TNF-α) <sup>7</sup>		√	√	√
선정/제외 기준 판정 <sup>8</sup>	√			
Randomization Number 부여 및 무작위배정		√		
인체적용시험용 식품 처방 <sup>9</sup>		√	√	
반납약 회수 및 복약 순응도 평가 <sup>10</sup>			√	√
병용약물 확인	√	√	√	√
이상반응 평가		√	√	√
식사 및 운동요법 교육 <sup>11</sup>	√	√	√	√

[Note]

\* 모든 인체적용시험은 계획된 진행 일정표를 따른다. 단, 부득이한 사정 때문에 정해진 방문일에 방문하지 못할 경우를 대비하여 피험자의 복약 순응도를 유지하고 개선의 정확한 판정을 위하여 예비식품을 추가로 배부한다. 또한 남성과 여성으로 구분하지 않은 검사는 모든 피험자에게 실시한다.

<sup>1</sup> Screening 방문 절차는 여러 방문에 걸쳐 시행할 수 있다.

<sup>2</sup> 피험자는 가급적 공복 상태여야 하고, 오전 방문을 권장한다.

방문일 오차범위 : V2는 +7일(V1 기준), V3은 ±7일(V2 기준), V4는 ±7일(V2 기준)

또한, 여러 가지 사유로 인체적용시험 기간을 완료하지 않은 피험자는 인체적용시험 중단 시점에서 Visit 4(종료 방문)의 모든 절차를 시행해야 하며, 마지막 방문(Visit 4) 페이지 및 인체적용시험 종료 페이지의 기록이 완료 되어야 한다.

<sup>3</sup> 불임수술을 받지 않았거나 폐경(12개월간의 자연적인 무월경)이 되지 않은 가임 여성에 한하여, 매 방문시마다 임신 여부 검사를 시행한다. Urine-HCG 검사를 시행하며, 적절한 피임을 하고 있는 방법을 확인한다. Screening 검사 후 임신이 확인되면 제외기준에 해당하며, 그 이후 방문에서 양성일 경우 인체적용시험을 즉시 중단한다.

<sup>4</sup> 활력 징후, 신체검사 및 계측 항목은 다음과 같다.

- ① 활력 징후 : 혈압, 맥박, 체온
- ② 신체검사 : 두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지
- ③ 신체 계측 : 키, 체중, 체질량지수

<sup>5</sup> 임상실험실 검사는 아래와 같으며, 중앙검사실(SCL)에 의뢰하여 분석한다.

- ① 일반혈액검사 : Hematocrit, Hemoglobin, RBC, WBC, Platelet count, MCV, MCH, MCHC, Differential count(Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil), ESR
- ② 혈청생화학검사 : Fasting plasma glucose, AST, ALT, Total Bilirubin, Creatinine, BUN, Alkaline Phosphatase, Albumin, Total protein, Total cholesterol, Triglyceride, hsCRP
- ③ 뇨검사 : PH, Nitrite, SG, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Urobilinogen, Leukocyte esterase
- ④ 혈청검사 : HBsAg (Visit 1에서만 실시)

<sup>6</sup> 선별검사는 다음과 같다. 구조화된 설문지는 자기기입식 방법을 통하여 이루어진다.

- ① X-ray 검사 : 퇴행성 슬관절염 진단 및 방사선학적 Grade 검사로서 촬영은 AP view, Lat view가 기본이고,

추가로 Rosenberg view도 촬영한다.

② VAS 평가 : 통증평가 설문으로, 피험자에게 전반적 통증 정도를 100mm 직선에 표시하게 한 후 ‘통증 없음’에서 표시된 지점까지의 길이를 측정한다.

<sup>7</sup> 유효성 평가변수는 아래와 같으며, 설문 평가를 제외한 유효성 평가변수는 중앙검사실(SCL)에 의뢰하여 분석한다. 또한 구조화된 설문지는 자기기입식 방법을 통하여 이루어진다.

① VAS 평가

② WOMAC 평가 : 통증 및 기능상태 평가 설문으로 총 24개 문항, 3개의 세부척도(통증 5문항, 뻣뻣함 2문항, 신체적 기능과 관련한 일상생활 수행의 어려움 17문항)로 이루어져 있다. 모든 문항은 5점 척도(0=없음, 1=약간, 2=보통, 3=심함, 4=매우 심함)로 정량화하였다. 총점의 범위는 0~96점이며, 총점이 높을수록 악화된 증상, 제한된 활동, 나쁜 건강을 의미한다.

③ LFI 평가 : 통증 및 기능상태 평가 설문으로 총 12개 문항, 3개의 세부척도(통증 또는 불편함 5문항, 최대 걸을 수 있는 거리 2문항, 일상생활 활동 5문항)로 이루어져 있다. 모든 문항은 0점에서 1점 또는 0점에서 2점 또는 0점에서 6점으로 정량화하였다. 총점의 범위는 0~26점이며, 총점이 높을수록 슬관절의 장애가 심한 것을 의미한다.

④ 염증성 cytokine 평가 : IL-6, TNF- $\alpha$

<sup>8</sup> 피험자의 선정/제외 기준 판정은 Screening 검사 후 최종 결과로 판단한다.

<sup>9</sup> 선별검사를 통과한 모든 피험자에게 Visit 2부터 무작위배정 받은 인체적용시험용 식품을 처방한다.

<sup>10</sup> 반납약 회수 시에는 모든 미사용 인체적용시험용 식품, 사용/미사용 용기도 같이 반납을 받고, 복약 순응도는 아래와 같이 계산한다. 소수점 둘째 자리에서 반올림하여 소수점 첫째 자리까지 기록한다.

$$\text{복약 순응도 (\%)} = \frac{\text{방문 전까지 복용한 수량}}{\text{방문 전까지 복용하여야 할 수량}} \times 100$$

<sup>11</sup> 식사 및 운동요법 교육을 매 방문시마다 시행한다(별첨 : 식사요법 및 운동요법 지침 참조).

## 7.5.2 관찰항목 및 임상검사 항목

임상실험실 검사와 유효성 평가변수 측정을 위해 9ml(방문 1 ~ 방문 4)의 채혈을 실시하게 되고, 8ml(방문 1~방문4)의 소변검사를 진행한다.

### 1) Visit 1 : -7d (-1wk)

(1) 피험자 방문 및 서면 동의서 취득

본 인체적용시험에 참가할 수 있다고 판단되는 피험자를 선정하여, ‘피험자 동의를 위한 설명서’를 통해 본 인체적용시험과 관련된 모든 정보를 제공하고, 피험자 자필 성명과 서명, 날짜가 포함된 ‘인체적용시험 참여 동의서’를 취득한다.

(2) Baseline Number(이하 BN) 부여

피험자 동의를 받는 순서대로 BN을 부여한다. BN은 공통으로 B가 앞에 붙고, 피험자 번호(001, 002~)가 뒤에 붙으며, ‘-’로 연결한다. 예를 들면, 첫 피험자의 BN은 ‘B-001’로 부여한다.

(3) 인구학적, 병력 및 치료력 조사

BN을 부여 받은 피험자의 연령을 확인한다. 또한 과거 및 현재 병력(수술력 포함)과 그에 따른 치료력을 조사한다. 병용하고 있는 약물이 있다면 이에 대한 정확한 정보를 증례기록서에 작성하고 해당 약물이 본 인체적용시험용 식품과 병용 투여할 수

있는 약물인지 평가하여야 한다.

(4) 임신 여부 검사(가임 여성)

불임수술을 받지 않았거나 폐경(12개월간의 자연적인 무월경)이 되지 않은 가임 여성에 한하여, Urine-HCG 검사를 시행하며 적절한 피임을 하고 있는 방법을 확인한다. 임신 반응 검사 후 임신이 확인되면 본 인체적용시험에 참여할 수 없다.

(5) 활력 징후, 신체검사 및 계측

- ① 활력 징후 : 혈압, 맥박, 체온
- ② 신체검사 : 두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지
- ③ 신체 계측 : 키, 체중, 체질량지수

(6) 임상실험실 검사

아래 항목과 같으며, 중앙검사실(SCL)을 이용한다.

- ① 일반혈액검사 : Hematocrit, Hemoglobin, RBC, WBC, Platelet count, MCV, MCH, MCHC, Differential count(Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil), ESR
- ② 혈청생화학검사 : Fasting plasma glucose, AST, ALT, Total Bilirubin, Creatinine, BUN, Alkaline Phosphatase, Albumin, Total protein, Total cholesterol, Triglyceride, hsCRP
- ③ 뇨검사 : PH, Nitrite, SG, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Urobilinogen, Leukocyte esterase
- ④ 혈청검사(Hepatitis B) : HBsAg (Visit 1에서만 실시)

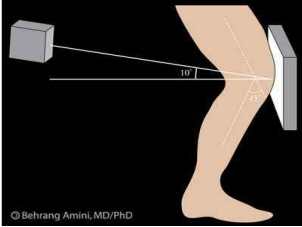

(7) 심전도(ECG) 검사

피험자는 선별 검사 시 심전도를 측정한다.

(8) X-ray 검사(무릎)

퇴행성 슬관절염 진단 및 방사선학적 Grade 검사로서 촬영은 AP view, Lat view가 기본이고, 추가로 Rosenberg view도 촬영한다.

	촬영방법	영상 예시
KNEE AP	1) 선 자세로 촬영 합니다. 2) 다리와 무릎의 장축을 필름 중심선에 일치 시킵니다. 3) 다리를 안쪽으로 5°정도 돌려줍니다. (정면자세) 4) 생식부위는 차폐를 해줍니다.	
K N E E LAT	1) 옆으로 누운 자세로 촬영 합니다. 2) KNEE JOINT가 필름에 수직이 되도록 환자의 자세를 조절합니다. 3) 무릎을 15~20° 구부리고 KNEE JOINT가 필름 중앙에 오도록 합니다. 4) 생식부위는 차폐를 해줍니다.	

<p>KNEE Rosenberg PA</p>	<p>1) 선 자세로 촬영 합니다. 2) KNEE JOINT 앞 쪽을 필름에 닿도록 구부립니다. 이때 FEMUR와 TIBIA 각도는 45도가 되도록 합니다</p> 	
----------------------------------	--	---

(9) VAS 평가

통증평가 설문으로, 피험자에게 전반적 통증 정도를 100mm 직선에 표시하게 한 후 ‘통증 없음’ 에서 표시된 지점까지의 길이를 측정한다.

(10) 선정 및 제외 기준 판정

인체적용시험 피험자로 선정되어 문서 동의를 받은 피험자에 대하여 상기 항목들을 조사하여 포함기준을 모두 만족하고, 제외기준 중 어디에도 해당되지 않는지를 판정하여 피험자를 최종적으로 결정한다.

(11) 병용약물 확인

시험 책임자는 문진 및 근거문서를 통해 선정 및 제외기준을 바탕으로 병용약물을 확인한다. 만약 본 인체적용시험에서 명시한 병용금지 약물을 복용하고 있는 경우 인체적용시험에 참여할 수 없다.

(12) 식사 및 운동요법 교육

별첨된 자료(별첨 2, 3)를 활용하여 식사 및 운동요법을 교육한다.

2) Visit 2 : 1d (0wk+7, Visit 1 기준)

Visit 2 시점에 검사한 활력징후, 신체검사, 임상실험실 검사, 유효성 평가변수 측정 결과 등은 인체적용시험용 식품 투여 후 검사에 대한 기저치(Baseline)로 이용된다.

(1) Randomization Number(이하 RN) 부여

시험 책임자는 선별 검사를 통과한 모든 피험자에게 무작위배정표에 따라 인체적용 시험용 식품을 처방하는 순서대로 배정번호(RN)를 부여한다. RN은 공통으로 ROI 앞에 붙고, 피험자 번호(3자리 무작위배정번호)가 뒤에 붙으며, ‘-’ 로 연결한다. 이 배정번호(RN)는 본 인체적용시험이 끝날 때까지 피험자를 인식하는 피험자식별코드(Subject Identification Code)로써 사용된다. 예를 들면, 첫 피험자의 RN은 ‘R-123’으로 부여한다.

(2) 임신 여부 검사(가임 여성)

(3) 활력 징후, 신체검사 및 계측

(4) 임상실험실 검사

(5) 유효성 평가변수 측정

① VAS 평가

② WOMAC 평가

통증 및 기능상태 평가 설문으로 총 24개 문항, 3개의 세부척도(통증 5문항, 뻣뻣함 2문항, 신체적 기능과 관련한 일상생활 수행의 어려움 17문항)로 이루어져 있다. 모든 문항은 5점 척도(0=없음, 1=약간, 2=보통, 3=심함, 4=매우 심함)로 정량화하였다. 총점의 범위는 0~96점이며, 총점이 높을수록 악화된 증상, 제한된 활동, 나쁜 건강을 의미한다.

③ LFI 평가

통증 및 기능상태 평가 설문으로 총 12개 문항, 3개의 세부척도(통증 또는 불편함 5문항, 최대 걸을 수 있는 거리 2문항, 일상생활 활동 5문항)로 이루어져 있다. 모든 문항은 0점에서 1점 또는 0점에서 2점 또는 0점에서 6점으로 정량화하였다. 총점의 범위는 0~26점이며, 총점이 높을수록 슬관절의 장애가 심한 것을 의미한다.

④ 염증성 cytokine 평가(IL-6, TNF- $\alpha$ )

(6) 인체적용시험용 식품 처방

해당 피험자의 배정번호(RN)에 따라 시험 책임자는 다음 방문 시기까지 인체적용시험용 식품을 처방한다.

(7) 병용약물 확인

(8) 이상반응 평가

피험자의 상태를 평가하여 시험 책임자 판단에 따라 이상반응 여부를 기록한다.

(9) 식사 및 운동요법 교육

### 3) Visit 3 : 28d (4wk $\pm$ 7, Visit 2 기준)

(1) 임신 여부 검사(가임 여성)

(2) 활력 징후, 신체검사 및 계측

(3) 임상실험실 검사

(4) 유효성 평가변수 측정

(5) 인체적용시험용 식품 처방

(6) 반납약 회수 및 복약 순응도 평가

지난 방문에 처방 받은 인체적용시험용 식품에 대해 피험자는 모든 미사용 인체적용시험용 식품, 사용/미사용 용기도 같이 시험 담당자에게 반납하고, 시험 담당자는 복약 순응도를 평가한다.

(7) 병용약물 확인

(8) 이상반응 평가

(9) 식사 및 운동요법 교육

#### 4) Visit 4 : 56d (8wk±7, Visit 2 기준)

Visit 4 시점에 검사한 활력 징후, 신체검사, 임상실험실 검사, 유효성 평가변수 측정 결과 등은 인체적용시험용 식품 투여 후 검사에 대한 최종 평가시점(endpoint)로 이용된다.

- (1) 임신 여부 검사(가임 여성)
- (2) 활력 징후, 신체검사 및 계측
- (3) 임상실험실 검사
- (4) 심전도(ECG) 검사
- (5) 유효성 평가변수 측정
- (6) 반납약 회수 및 복약 순응도 평가
- (7) 병용약물 확인
- (8) 이상반응 평가
- (9) 식사 및 운동요법 교육

#### 5) Unscheduled Visit

인체적용시험 진행 중 시험 책임자가 이상약물반응이나 중대한 이상반응이라고 판단할 증상을 피험자가 호소하는 경우 또는 그밖에 필요한 경우에는 정규 방문 이외에 unscheduled visit을 할 수 있다. 시험 책임자는 피험자에 대하여 활력징후, 신체검사 및 계측, 임상실험실 검사, 심전도(ECG) 검사, 임신 여부 검사(가임 여성), VAS 평가, WOMAC 평가, LFI 평가, 염증성 cytokine 평가(IL-6, TNF- $\alpha$ ), 병용약물 확인, 이상반응 평가 등 필요하다고 판단되는 검사를 시행할 수 있고, 해당 내용을 증례기록서에 기록한다.

### 7.5.3 관찰검사 방법

#### 1) 유효성 평가

설문 조사를 제외한 모든 유효성 평가변수는 결과 분석의 객관성 유지를 위하여 중앙검사실(SCL)에 의뢰하여 측정한다. 단, 오전 방문(공복상태)을 권장하여 가급적 비슷한 시간대에 검체를 채취하고, 되도록 빨리 수거를 하도록 한다.

VAS, WOMAC, LFI 등의 구조화된 설문지는 자기기입식 방법을 통하여 이루어지며, 설문조사가 완료되면 합계점수를 파악하고 증례기록서에 정확하게 옮겨 적도록 하며, 전자의무기록(EMR)에도 기록을 남긴다. 설문조사를 완료한 설문지는 근거문서로 보관하며, 증례기록서와 전자의무기록(EMR)에 확인 서명을 한다.

- ① 1차 유효성 평가변수 측정 : VAS 평가
- ② 2차 유효성 평가변수 측정 : WOMAC 평가, LFI 평가, 염증성 cytokine 평가(IL-6, TNF- $\alpha$ )

#### 2) 안전성 평가

이상반응은 정기적/비정기적 문진, 활력 징후, 신체검사, 임상실험실 검사 등을 통해 평가한다. 피험자의 상태는 인체적용시험 참여 동의서 취득 이후부터 모니터링 및 평가하며, 문진은 피험자가 상태를 설명할 수 있는 방법으로 한다(예: '지난 번 방문 이후로 어떻습니까?').

① 활력 징후 : 혈압, 맥박, 체온

피험자는 최소 5~10분간 앉은 자세로 안정을 시킨 후에 측정하되, 혈압은 매번 동일한 팔에서 측정한다. 피험자는 조용한 환경에서 발을 바닥에 편평하게 펴고, 등을 의자에 대고 앉아 팔을 탁자 위나 다른 지지대 위에 올려놓아 cuff 중앙이 심장높이와 같도록 한다.

② 신체검사 및 계측 : 이학적 검사, 키, 체중, 체질량지수

㉠ 신체검사 : 두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등을 확인한다.

㉡ 신체 계측 : 키, 체중, 체질량지수를 계측하여 소수점 둘째자리에서 반올림하여 첫째자리까지 기록한다.

- 키 : 신발은 벗은 채로, 무릎을 펴고 머리를 똑바로 한 상태에서 시선을 앞으로 향하게 한 후 측정한다. 모든 방문시 동일한 신장계로 측정해야 한다.

- 체중 : 실내복을 입고, 신발은 벗고, 소변을 본 상태에서 측정한다. 모든 방문시 동일한 체중계로 측정해야 한다.

- 체질량지수 : 체중(kg)을 키(m)의 제곱으로 나눈 값(체중/(키)<sup>2</sup>)으로 계산한다.

③ 임신 여부 검사(가임 여성)

불임수술을 받지 않았거나 폐경(12개월간의 자연적인 무월경)이 되지 않은 가임 여성에 한하여, Urine-HCG 검사를 시행하며 적절한 피임을 하고 있는 방법을 확인한다. 임신 반응 검사 후 임신이 확인되면 본 인체적용시험에 참여할 수 없다.

④ 임상실험실 검사

일반혈액검사, 혈청생화학검사, 뇨검사, 혈청검사 등을 중앙검사실에 의뢰하여 측정하며, 모든 검사는 가급적 공복상태에서 시행한다.

## 7.6 예측 부작용 및 사용상의 주의사항

### 7.6.1 예측 부작용(Investigator's Brochure 참조)

식품의약품안전처 식품원재료데이터베이스에 식품에 사용할 수 있는 원료 목록에 등재되어 있으며, 노각나무의 가지, 잎, 수액에 대하여 국내식용근거 및 안정성이 확인되어 식품의 원료로 사용이 가능한 것으로 기재되어 있다. 노각나무의 맛은 맵고 쓰며 성질은 서늘하고 독이 없어 특별히 보고된 부작용은 없다.

인체를 대상으로 한 과량복용시의 증상에 대해서는 알려진바 없다.

### 7.6.2 일반적 주의사항

1) 간기능 이상은 시험 책임자에게서 확인되어야 하며, 투약기간 중 효소수치를 정기적으



- 로 관찰하고 만일 수치가 높아진 경우에는 투여를 중지한다.
- 2) 시험 책임자에게서 확인되어진 병용요법을 실시하는 경우, 각 사용약품의 설명서를 숙지한다.
  - 3) 정해진 용법 및 용량을 잘 지킨다.
  - 4) 어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관한다.
  - 5) 직사광선을 피하고 되도록 습기가 적은 서늘한 곳에 보관한다(사용 후 반드시 밀폐 보관할 것).
  - 6) 인체적용시험용 식품을 원래 용기에서 꺼내어 다른 용기에 보관하는 것은 인체적용시험용 식품 오용(잘못 사용)에 의한 사고 발생이나 인체적용시험용 식품 품질 저하의 원인이 될 수 있으므로 원래의 용기에 넣고 꼭 닫아 보관한다.

## 7.7 중지 및 탈락 기준, 계획서 위반에 대한 처리

### 7.7.1 중지 및 탈락 기준

인체적용시험을 중지 및 탈락할 경우, 인체적용시험 중단 시점에서 최종방문(Visit 4)에 계획된 모든 검사를 실시하는 것을 원칙으로 하며, 그 원인이 증례기록서(최종 방문 페이지 및 인체적용시험 종료 페이지)와 피험자 진료차트에 자세하게 기록되어야 한다.

무작위 배정되었거나 인체적용시험용 식품을 투여 받았지만 어떤 이유에서든 본 인체적용시험 전 기간에 참여할 수 없는 피험자는 탈락으로 분류된다. 또한 피험자가 요구하거나 시험 책임자가 피험자를 탈락해야 된다고 판단될 경우에는 어느 시기든 관계없이 피험자는 탈락 가능하며 안전성 평가 대상에 포함된다.

다음 경우에 1가지라도 해당하는 피험자는 중지 및 탈락될 수 있다.

- ▶ 피험자 또는 대리인의 시험 중지요구
- ▶ 이상반응 발생 (중대한 이상반응 포함)
- ▶ 피험자의 불순응
- ▶ 병용금지 식품 또는 약물을 복용
- ▶ 기타 연구자의 판단

### 7.7.2 인체적용시험계획서 위반에 대한 처리

인체적용시험을 진행하는 동안 인체적용시험계획서를 위반하였음이 알려진 경우, 시험 책임자는 가능한 빨리 (주)생명의 나무에게 위반 사실을 알려야 하며, 해당 피험자가 인체적용시험을 지속해야 할지, 중단해야 할지를 결정해야 한다. 해당 내용을 deviation 보고서에 자세하게 기록하여야 한다.

## 7.8 유효성 평가기준 및 평가방법

### 7.8.1 유효성 평가기준

유효성에 대한 자료는 FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP(per protocol) 분석법을 실시하며, 유효성 평가변수에 대한 최종판정은 FAS 분석법으로 한다.

FAS 분석법은 피험자들이 실제 받은 처리, 인체적용시험계획서의 단순한 위반, 피험자의 순응 또는 중도탈락과는 상관없이 처음 처리가 배정된 대로 모든 피험자들을 분석대상으로 한다. 즉 인체적용시험에 등재되어 무작위 배정 받은 후 1회 이상 인체적용시험용 식품을 복용하고, 최소한 1회 이상 유효성 평가가 실시된 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하는 것이다. 이때 어떤 시점에서 결측치가 발생되면 발생한 시점을 기준으로 가장 최근에 얻은 자료를 해당시점에서 얻어진 것처럼 처리하는 LOCF(Last Observation Carried Forward) 방법을 적용한다. FAS 분석 대상군에서 편의 없이 피험자를 제외시킬 수 있는 사유는 다음과 같다.

- ▶ 피험자 선정/제외 기준을 위반한 피험자
- ▶ 인체적용시험용 식품을 단 한번이라도 투여 받지 않은 피험자
- ▶ 무작위 배정 이후 자료가 전무한 피험자

PP 분석법은 무작위 배정된 피험자군 중에서 인체적용시험계획서에 순응한 피험자들만이 분석 대상이 된다. 여기서 순응이란 최소한의 처리기간, 측정치의 활용가능성, 주요한 인체적용시험계획서 위반사항이 없다는 것을 말한다. PP 분석 대상군에서 피험자를 제외시킬 수 있는 사유는 다음과 같다.

- ▶ 인체적용시험계획서에서 명시한 기간을 채우지 못하고 중도 탈락한 피험자
- ▶ 병용금지약물(또는 식품)을 투여한 피험자
- ▶ 인체적용시험용 식품 순응도가 80% 이하인 피험자
- ▶ 인체적용시험계획서를 중대하게 위반하였다고 판단되는 피험자

### 7.8.2 유효성 평가방법

#### 7.8.2.1 1차 유효성 평가변수

- 1) 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지 통증평가 설문 [VAS] 의 변화 비교

#### 7.8.2.2 2차 유효성 평가변수

- 1) 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 통증 및 기능상태평가 설문 [WOMAC, LFI] 의 변화 비교
- 2) 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 염증성 cytokine [IL-6, TNF- $\alpha$ ] 의 변화 비교

### 7.9 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법

### 7.9.1 안전성 평가기준

인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자를 대상으로 평가한다.

### 7.9.2 안전성 평가방법

- 1) 활력징후 및 신체계측, 임상실험실 결과를 평가한다.
- 2) 신체검사 결과를 평가한다.
- 3) 임상적 이상반응 발현상황에 대하여 평가한다.
- 4) 약물 복용력을 평가한다.

### 7.9.3 안전성 보고 방법

#### 7.9.3.1 정의

- 1) “이상반응(Adverse Event, 이하 AE)”이라 함은 인체적용시험용 식품을 투여 받은 피험자에서 발생한, 바람직하지 않고 의도되지 않은 증후(sign, 예; 실험실적 검사치의 이상), 증상(symptom), 질병을 말하며, 해당 인체적용시험용 식품과 반드시 인과관계를 가져야 하는 것은 아니다.
- 2) “이상약물반응(Adverse Drug Reaction, 이하 ADR)” 이라 함은 인체적용시험용 식품의 임의의 용량에서 발생한, 모든 유해하고 의도되지 않은 반응으로서, 인체적용시험용 식품과의 인과관계를 배제할 수 없는 경우를 말한다.
- 3) “중대한 이상반응/이상약물반응(Serious AE/ADR)” 이라 함은 인체적용시험에 사용되는 식품의 임의의 용량에서 발생한 이상반응 또는 이상약물반응 중에서 다음 항목의 어느 하나에 해당하는 경우를 말한다.
  - ① 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우
  - ② 입원 또는 입원 기간의 연장이 필요한 경우
  - ③ 지속적 또는 의미 있는 불구나 기능 저하를 초래하는 경우
  - ④ 선천적 기형 또는 이상을 초래하는 경우
  - ⑤ 기타 의학적으로 중요한 상황
- 4) “예상하지 못한 이상약물반응(Unexpected Adverse Drug Reaction)” 이라 함은 이용가능한 인체적용시험용 식품 관련 정보(예를 들어 인체적용시험자 자료집 또는 인체적용시험용 식품의 첨부문서)에 비추어 이상약물반응의 양상이나 위해의 정도에서 차이가 나는 것을 말한다.

### 7.9.3.2 이상반응의 기록

인체적용시험 중 발생하는 모든 이상반응을 기록하는 것은 시험 책임자와 시험 담당자의 의무이다. 이상반응은 의학 진단 용어로 기록하여야 하며, 이것이 불가능한 경우 시험 책임자 또는 시험 담당자가 관찰하거나, 피험자가 보고한 증상 및 징후에 대한 용어를 기록하여야 한다.

### 7.9.3.3 심각한 정도의 평가

이상반응의 중증도는 아래와 같이 3단계로 분류하여 평가한다.

- 1) 경 증(Mild) : 피험자가 거의 느끼지 못할 정도로 정상적인 일상생활(기능)을 저해하지 않는 정도. 대부분 치료가 필요하지 않는 정도
- 2) 중등증(Moderate) : 피험자가 불편함을 느낄 수 있으며, 정상적인 일상생활(기능)을 저해하는 정도. 피험자가 시험을 계속 할 수는 있으나 치료가 필요할 수도 있는 정도
- 3) 중 증(Severe) : 피험자가 매우 불편하여 일상생활(기능)이 불가능하고, 시험의 지속적인 참여가 불가능한 정도. 치료나 입원이 필요할 수 있는 정도

### 7.9.3.4 약물과의 인과관계 평가

시험물질과의 인과관계는 아래와 같이 분류하여 평가한다.

- 1) 관련성이 명백함(Definitely related)
  - ▶ 약물을 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
  - ▶ 이상반응이 다른 어떤 이유보다 이 약 투여에 의해 가장 개연성 있게 설명되는 경우
  - ▶ 투여 중단으로 이상반응이 사라지는 경우
  - ▶ 재 투여(가능한 경우에만 실시) 결과가 양성인 경우
  - ▶ 이상반응이 약물 또는 동일 계열의 약물에 대해 이미 알려져 있는 정보와 일관된 양상을 보이는 경우
- 2) 관련성이 많음(Probably related)
  - ▶ 약물을 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
  - ▶ 이상반응이 다른 어떤 이유보다 이 약 투여에 의해 더욱 개연성 있게 설명되는 경우
  - ▶ 투여 중단으로 이상반응이 사라지는 경우
- 3) 관련성이 의심됨(Possibly related)
  - ▶ 약물을 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
  - ▶ 이상반응이 다른 가능성 있는 원인들과 같은 수준으로 약물 투여에 기인한다고 판단되는 경우
  - ▶ 투여 중단(실시된 경우)으로 이상반응이 사라지는 경우

- 4) 관련성이 적음(Unlikely)
  - ▶ 약물을 투여하였다는 증거가 있는 경우
  - ▶ 이상반응보다 가능성이 있는 원인이 있는 경우
  - ▶ 투여 중단(실시된 경우) 결과 음성이거나 모호한 경우
  - ▶ 재 투여(실시된 경우) 결과 음성이거나 모호한 경우
- 5) 관련성이 없음(Not related)
  - ▶ 피험자가 약물을 투여 받지 않은 경우
  - ▶ 약물 투여와 이상반응 발현과의 시간적 순서가 타당하지 않는 경우
  - ▶ 이상반응에 대해 다른 명백한 원인이 있는 경우
- 6) 불명(Unknown)
  - ▶ 연관성을 판단하기에 근거가 부족한 경우
  - ▶ 정보가 불충분하거나 상충되어 판단할 수 없고 이를 보완하거나 확인할 수 없는 경우

#### 7.9.3.5 이상반응과 관련하여 취해진 조치

- 1) 취해진 조치 없음(No action taken)
- 2) 투여용량 변경 / 일시적 중단(Study drug dosage adjusted / temporarily interrupted)
- 3) 영구적 중단(Study drug permanently discontinued due to this adverse event)
- 4) 치료약물 병용 투여(Concomitant medication taken)
- 5) 비약물 치료(Non-drug therapy given)
- 6) 입원 / 입원 기간의 연장(Hospitalization / prolonged hospitalization)

#### 7.9.3.6 이상반응의 결과

- 1) 회복, 후유증 없음(recovered without sequel AE)
- 2) 회복, 후유증 있음(recovered with sequel AE)
- 3) 이상반응 존재, 진행 없음(AE still +, no further treatment)
- 4) 이상반응 지속, 진행중(AE still +, treatment continuing)
- 5) 사망(death)

#### 7.9.3.7 중대한 이상반응/이상약물반응의 보고

본 인체적용시험 기간 중 시험 책임자 및 시험 담당자는 피험자의 안전에 만전을 기해야 하며, 중대한 이상반응 발생시에는 신속하고 적절한 조치를 위하여 이상반응을 최소화하여야 한다.

인체적용시험 중 중대한 이상반응 발생시 각 담당자의 의무는 다음과 같다.

- 1) 시험 책임자

중대한 이상반응이 인체적용시험 기간 도중에 발생하는 경우, 인체적용시험용 식품과의 상관유무와 관계없이 발생 후 24시간이내, 혹은 늦어도 다음 근무일까지 인체적용시험 연구비 지원기관 또는 인체적용시험모니터요원에게 보고해야 한다.

- ▶ 성명 : 김종배
- ▶ 전화 : 031-219-4099 (fax: 031-219-5901)
- ▶ E-mail : kjbrabbit@hanmail.net

## 2) 시험 담당자

중대한 이상반응이 인체적용시험 기간 도중에 발생하는 경우 즉시 시험 책임자에게 보고하여야 한다.

## 3) 인체적용시험 연구비 지원기관

인체적용시험 연구비 지원기관은 기타 관련된 시험자, 심사위원회 및 식품의약품안전처장에게 중대하고 예상하지 못한 이상약물반응을 정한 기간 내에 신속히 보고해야 한다.

- ① 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우에는 인체적용시험 연구비 지원기관이 이 사실을 보고 받거나 알게 된 날로부터 7일 이내(단, 이 경우 상세한 정보를 최초 보고일로부터 8일 이내에 추가로 보고)
- ② 다른 모든 중대하고 예상하지 못한 이상약물반응의 경우에는 인체적용시험 연구비 지원기관이 이 사실을 보고 받거나 알게 된 날로부터 15일 이내

## 7.10 통계 분석 방법

### 7.10.1 인구학적 정보 및 건강 상태

인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자를 대상으로 인구학적 정보(성별, 연령, 신장, 체중 등) 및 건강 상태에 대하여 연속형 변수는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하고, 범주형 변수는 카이제곱 검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)으로 평가한다.

### 7.10.2 유효성 자료의 분석

#### 7.10.2.1 1차 유효성 평가변수의 분석

- 1) 통증평가 설문 [VAS] 의 변화 비교에 대해 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다.

#### 7.10.2.2 2차 유효성 평가변수의 분석

- 1) 통증 및 기능상태평가 설문 [WOMAC, LFI] 의 변화 비교에 대해 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복 측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다.
- 2) 염증성 cytokine [IL-6, TNF- $\alpha$ ] 의 변화 비교에 대해 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산 분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다.

### 7.10.3 안전성 자료의 분석

- 1) 활력징후 및 신체계측, 임상실험실 결과는 각 방문 시점별 평균 및 표준편차 등의 기술통계량으로 기술하고, 치료군 간의 비교는 독립표본 t-검정(independence samples t-test)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다.
- 2) 신체검사 결과는 각 방문별로 증례수를 계산하여 카이제곱검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)으로 평가한다.
- 3) 임상적 이상반응 발현상황에 대하여는 증례수를 계산하여 카이제곱검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)으로 평가한다.
- 4) 약물 복용력은 인체적용시험 기간 동안 인체적용시험용 식품 이외에 피험자가 복용한 모든 약물을 기록하고, 기록된 약물은 계열별로 분류하여 평가한다.

## 8. 피험자

### 8.1 피험자의 인체적용시험 참여 상태

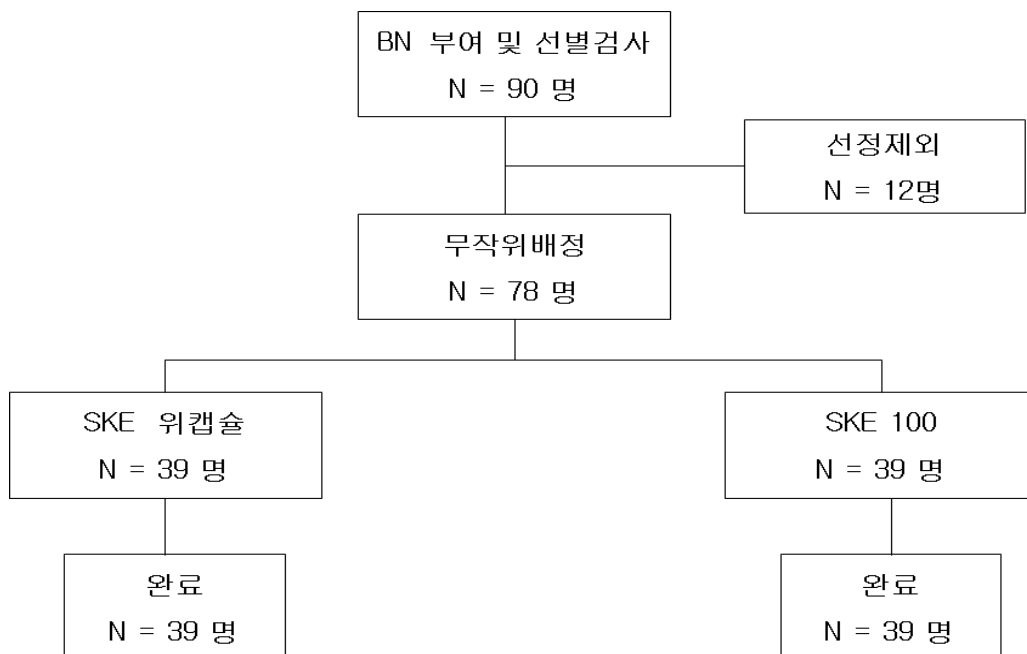
인체적용시험 실시기관인 분당 서울대학교병원 생명윤리심의위원회로부터 2016년 4월 1일 최종승인을 받은 후, 2016년 6월 8일부터 피험자가 등록되었다.

방문 1에 본 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 선별검사(screening)를 실시한 피험자 수는 총 90명이었으며, 그 중에 총 12명은 “선정/제외기준 부적합”의 이유로 무작위 배정되기 전에 탈락하였다.

방문 2에 선정 및 제외기준에 적합한 총 78명의 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 대조식품군(SKE 위캡슐)과 시험식품군(SKE 100)으로 배정하였다. 무작위 배정된 피험자는 대조식품 또는 시험식품을 1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 총 4주간 복용하였다.

방문 3에서 인체적용시험용 식품을 회수하였고, 중도탈락한 피험자는 없었다. 78명의 피험자는 방문 2에 배정된 시험식품 또는 대조식품을 재처방 받아 1일 1회(아침), 1회 1캡슐, 총 4주간 복용하였다.

방문 4에서 인체적용시험용 식품을 회수하였으며, 총 8주간의 Treatment period 동안 중도탈락 피험자는 발생하지 않았다. 2016년 11월 15일에 총 78명의 피험자가 인체적용시험을 완료(피험자 최종방문 완료)하였다(그림 1).



< 그림 1. 피험자의 인체적용시험 참여 상태 >



## 9. 인체적용시험의 결과

### 9.1 피험자의 인구학적 정보 및 건강 상태

본 인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자 78명[SKE 위캡슐군 39명, SKE 100군 39명]에 대해 분석을 실시하였다.

#### 9.1.1 피험자의 인구학적 정보

< 표 1. 인구학적 정보 >

단위: 명(%), 세, 평균±표준편차(최소값-최대값)

항목	SKE 위캡슐 (N=39)	SKE 100 (N=39)	p
성별	남자	15(38.5%)	0.475
	여자	24(61.5%)	
연령 (만 나이)	61.05±6.63 (43-74)	63.95±7.17 (46-78)	0.068
키 (cm)	161.32±9.82 (142.5-180.7)	159.03±8.76 (144-177.8)	0.280
체중 (kg)	64.55±11.11 (47-89.5)	63.15±10.93 (45.7-91.9)	0.578
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.77±3.52 (19.1-34.8)	24.92±3.38 (18.9-31.4)	0.850

인체적용시험에 참여한 피험자의 성별 분포를 살펴보면 남자 피험자는 27명(34.6%), 여자 피험자는 51명(65.4%)으로 남자보다 여자의 비율이 약간 높게 나타났으며 성별에 따른 군간 차이는 통계적으로 유의(p=0.475)하지 않았다. 평균 연령의 경우 SKE 100군(만 63.95±7.17세)이 SKE 위캡슐군(만 61.05±6.63세) 보다 약간 높게 나타났으며, 선정기준에 해당되었다. 키(p=0.280)와 체중(p=0.578), BMI(p=0.850)의 경우 모두 유의한 차이를 보이지 않아 최초 무작위 배정에 의한 대상자간의 편견이 없는 것으로 확인되었다(표 1).

#### 9.1.2 병력 및 치료력, 병용약물 여부

피험자들의 인체적용시험 선별 당시 병력(수술력 포함) 및 치료력을 조사한 결과, SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 병력 및 치료력이 없는 것으로 조사되었다.

병력 및 치료력이 있는 피험자들 중 본 인체적용시험용 식품과 병용 투여할 수 있는 약물인지를 평가하기 위하여 병용약물 여부를 조사한 결과, SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 현재 병력을 치료하기 위해 투여하는 병용약물이 없는 것으로 나타나 인체적용시험 진행에 문제가 없음을 확

인하였다(표 2).

< 표 2. 병력 및 치료력, 병용약물 여부 >

단위 : 명(%)

항목	SKE 위캡슐 (N=39)	SKE 100 (N=39)	Total (N=78)	p*
<u>병력 및 치료력</u>				
없음	39(100.0)	39(100.0)	78(100.0)	-
있음	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
<u>병력 및 치료력이 있는 경우 병용약물 여부</u>				
없음	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
있음	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	

p\* : Fisher's exact test

## 9.2 안전성 평가

본 인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자 78명[SKE 위캡슐군 39명, SKE 100군 39명]을 대상으로 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사 결과, 임상적 이상반응 발현상황, 약물 복용력 등을 종합하여 평가하였다.

### 9.2.1 활력 징후

피험자들의 활력 징후 검사치를 비교하였다. 수축기 혈압의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으며, SKE 위캡슐군(p=0.709)과 SKE 100군(p=0.283) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다.

이완기 혈압의 경우에도 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 비교에서 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, SKE 위캡슐군(p=0.888)과 SKE 100군(p=0.105) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

맥박의 경우에도 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화는 없었으며, SKE 위캡슐군(p=0.280)과 SKE 100군(p=0.242) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

체온의 경우에서도 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, SKE 위캡슐군(p=0.478)과 SKE 100군(p=0.564) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었다(표 3).

< 표 3. 활력 징후 비교 >

Variables	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
수축기혈압 (mmHg)	0주	116.05±5.14 (104-124)	0.709	117.03±4.52 (106-124)	0.283	0.377
	4주	115.85±4.93 (104-124)		116.67±4.03 (108-124)		0.424
	8주	115.90±4.79 (106-124)		116.87±3.97 (108-122)		0.331
이완기혈압 (mmHg)	0주	73.85±5.95 (62-84)	0.888	74.87±6.05 (60-84)	0.105	0.453
	4주	73.74±5.45 (64-84)		74.41±5.99 (60-82)		0.609
	8주	73.74±5.37 (64-82)		74.41±5.90 (60-82)		0.603
맥박 (회)	0주	72.10±7.28 (54-86)	0.280	72.26±7.61 (58-88)	0.242	0.928
	4주	71.79±7.28 (54-86)		72.15±7.54 (56-88)		0.831
	8주	71.64±7.21 (54-86)		71.90±7.37 (56-88)		0.877
체온 (℃)	0주	36.19±0.09 (36-36.4)	0.478	36.23±0.12 (36-36.4)	0.564	0.090
	4주	36.19±0.09 (36-36.3)		36.22±0.09 (36.1-36.4)		0.082
	8주	36.20±0.09 (36-36.4)		36.24±0.10 (36.1-36.4)		0.091

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

### 9.2.2 신체 계측

피험자들의 신체 계측 검사치를 비교하였다. 키와 체중, BMI 지수 모두 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없었으며, SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다(표 4).

< 표 4. 신체 계측 비교 >

Variables	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
키 (cm)	0주	161.36±9.82 (142.5-180.9)	0.833	159.06±8.73 (143.9-177.4)	0.093	0.279
	4주	161.37±9.78 (142.5-180.3)		159.06±8.75 (144-177.6)		0.276
	8주	161.35±9.79 (142.3-180.5)		159.12±8.72 (144.1-177.6)		0.291
체중 (kg)	0주	64.47±11.10 (47.4-89.7)	0.114	63.16±10.83 (46.1-91.9)	0.110	0.599
	4주	64.30±11.03 (47.2-89.1)		63.00±10.90 (45.7-91.2)		0.603
	8주	64.35±10.97 (47.9-89.4)		63.15±11.10 (45-91.7)		0.633
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0주	24.73±3.51 (18.9-34.7)	0.098	24.92±3.32 (19.1-31.2)	0.216	0.807
	4주	24.66±3.43 (19.2-34.5)		24.86±3.33 (19-31.4)		0.797
	8주	24.68±3.40 (19.2-34.5)		24.89±3.33 (18.9-31.7)		0.794

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

### 9.2.3 신체검사

각 방문시마다 피험자들에게 두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등의 신체검사를 실시하여 비교한 결과, SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 비정상인 경우가 전혀 없었다(표 5).

< 표 5. 신체검사 비교 >

단위 : 명(%)

항목	SKE 위캡슐 (N=39)	SKE 100 (N=39)	Total (N=78)	p*
정상	39(100.0)	39(100.0)	78(100.0)	
비정상(NCS)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
비정상(CS)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	

p\* : Fisher's exact test

### 9.2.4 임상실험실 검사

임상실험실 검사 중 일반혈액검사 결과를 비교하였다. 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100

군 간의 검사치를 비교한 결과, Hemoglobin, Hematocrit, WBC, RBC, Platelet, MCV, MCH, MCHC, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, Erythrocyte sedimentation rate(ESR) 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

SKE 100군의 경우 방문시기에 따라 일반혈액검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다. SKE 위궤술군의 경우에는 Basophil(p=0.027)에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 검사치의 변화가 정상 수치의 범위 안에 있었다(표 6, 표 7, 표 8).

< 표 6. 일반혈액검사 비교 >

Variables	방문	SKE 위궤술 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
Hemoglobin (g/dL)	0주	13.92±1.14 (11.6-16)	0.770	13.59±1.03 (11.9-15.8)	0.110	0.193
	4주	13.87±1.24 (11.6-16.3)		13.52±0.98 (11.8-15.6)		0.172
	8주	13.85±1.23 (11.3-16.2)		13.68±1.13 (11.6-15.7)		0.510
Hematocrit (%)	0주	43.43±3.39 (35.2-49.7)	0.197	42.35±3.15 (37.2-50.4)	0.090	0.150
	4주	43.04±3.61 (37.4-51)		41.81±3.33 (35.2-50.3)		0.119
	8주	42.89±3.44 (35.5-49.7)		42.43±3.28 (35.9-49.6)		0.548
WBC (Thous/uL)	0주	5.31±1.17 (3.6-7.9)	0.077	5.42±1.31 (3-8.2)	0.177	0.690
	4주	5.49±1.43 (3.6-10.1)		5.48±1.12 (3.2-9.1)		0.979
	8주	5.55±1.18 (3.8-8)		5.70±1.36 (3.5-8.5)		0.595
RBC (Mil/uL)	0주	4.55±0.40 (3.75-5.38)	0.317	4.45±0.36 (3.96-5.53)	0.125	0.266
	4주	4.54±0.43 (3.9-5.5)		4.40±0.35 (3.67-5.5)		0.114
	8주	4.50±0.41 (3.74-5.62)		4.45±0.38 (3.67-5.32)		0.565
Platelet (Thous/uL)	0주	233.51±61.00 (119-415)	0.296	243.69±49.68 (176-425)	0.249	0.422
	4주	228.21±52.04 (131-316)		244.05±52.01 (132-412)		0.183
	8주	232.36±53.00 (134-362)		250.33±54.35 (157-430)		0.143

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위궤술군과 SKE 100군)

< 표 7. 일반혈액검사 비교 (계속) >

Variables	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
MCV (fL)	0주	95.66±3.66 (87.4-103.2)	0.110	95.29±4.08 (87.3-102.9)	0.056	0.673
	4주	94.91±4.05 (84.4-103.3)		94.69±3.66 (85.6-101.8)		0.804
	8주	95.38±4.14 (85.5-102.1)		95.45±4.05 (87.2-102.6)		0.934
MCH (pg)	0주	30.63±1.48 (27.3-33.4)	0.093	30.58±1.43 (27.3-33.5)	0.268	0.883
	4주	30.65±1.61 (27.2-33.7)		30.68±1.42 (27.6-33.3)		0.929
	8주	30.81±1.48 (27.9-33.3)		30.76±1.50 (27.7-33.7)		0.886
MCHC (%)	0주	32.02±0.94 (29.6-34)	0.072	32.10±0.71 (30.5-33.6)	0.050	0.644
	4주	32.23±0.90 (29.8-34.3)		32.43±0.89 (30.5-34.6)		0.335
	8주	32.30±0.89 (29.6-34)		32.22±0.72 (30.8-33.8)		0.666
Neutrophils (%)	0주	54.83±6.37 (41.2-68.2)	0.498	56.05±7.09 (43.1-73)	0.594	0.426
	4주	56.24±7.97 (41.4-77.2)		55.36±7.57 (41-72.8)		0.621
	8주	55.34±7.60 (41.4-70.7)		56.43±7.59 (45.9-78.3)		0.531
Lymphocyte (%)	0주	35.82±6.00 (23.3-46)	0.617	34.06±7.62 (12.2-45.1)	0.789	0.260
	4주	34.83±7.73 (17.4-49.9)		34.76±8.10 (17.5-49.3)		0.969
	8주	35.94±7.49 (20.9-50.8)		34.37±7.56 (16-46.3)		0.361
Monocyte (%)	0주	5.88±1.30 (3.7-9.4)	0.095	5.45±1.22 (2.8-7.9)	0.057	0.133
	4주	5.67±1.36 (2.8-9.9)		5.82±1.42 (3.6-8.9)		0.649
	8주	5.46±1.22 (3.1-8.1)		5.34±1.35 (3-8.6)		0.674
Eosinophil (%)	0주	2.72±1.86 (0.6-9.1)	0.428	3.57±2.18 (1-9.3)	0.102	0.066
	4주	2.68±1.74 (0.6-9)		3.41±1.93 (1.1-8.9)		0.085
	8주	2.47±1.19 (0.8-6.4)		3.12±1.87 (0.5-8.8)		0.071

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

< 표 8. 일반혈액검사 비교 (계속) >

Variables	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
Basophil (%)	0주	0.69±0.31 (0.1-1.9)	0.027	0.73±0.31 (0.1-1.9)	0.051	0.565
	4주	0.70±0.31 (0.2-1.3)		0.66±0.20 (0.3-1.2)		0.435
	8주	0.79±0.35 (0.3-1.8)		0.75±0.28 (0.2-1.4)		0.569
ESR (mm/hr)	0주	5.18±4.97 (1-22)	0.939	5.69±4.37 (1-22)	0.090	0.630
	4주	5.00±3.78 (1-19)		4.87±3.39 (1-13)		0.875
	8주	5.03±3.30 (1-18)		4.26±3.22 (1-17)		0.301

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

임상실험실 검사 중 혈청생화학검사 결과를 비교하였다. 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 검사치를 비교한 결과에서는 Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Fasting plasma glucose, Total Bilirubin, AST, ALT, Alkaline phosphatase, Total cholesterol, Triglyceride, hsCRP 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

또한 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 방문시기에 따라 혈청생화학검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다(표 9, 표 10, 표 11).

< 표 9. 혈청생화학검사 비교 >

Variables	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
Total protein (g/dL)	0주	7.01±0.31 (6.5-7.5)	0.978	7.08±0.30 (6.6-7.8)	0.484	0.301
	4주	7.01±0.29 (6.5-7.5)		7.03±0.32 (6.5-8.1)		0.740
	8주	7.02±0.31 (6.3-7.5)		7.06±0.30 (6.5-7.8)		0.506
Albumin (g/dL)	0주	4.29±0.19 (4-4.7)	0.088	4.27±0.17 (3.9-4.7)	0.366	0.618
	4주	4.24±0.16 (4-4.6)		4.24±0.19 (3.7-4.6)		0.847
	8주	4.30±0.19 (3.9-4.8)		4.26±0.17 (3.9-4.8)		0.292

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

< 표 10. 혈청생화학검사 비교 (계속) >

Variables	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
BUN (mg/dL)	0주	14.79±3.57 (7.2-21.2)		15.91±3.29 (10-22.8)		0.154
	4주	14.47±3.45 (7.5-21.9)	0.612	15.43±3.29 (9.4-21.4)	0.082	0.213
	8주	14.53±3.20 (8.6-21.2)		15.18±3.03 (10-20.9)		0.357
Creatinine (mg/dL)	0주	0.90±0.13 (0.68-1.26)		0.88±0.11 (0.69-1.28)		0.451
	4주	0.91±0.11 (0.71-1.14)	0.586	0.89±0.13 (0.69-1.27)	0.053	0.399
	8주	0.90±0.10 (0.73-1.09)		0.90±0.12 (0.72-1.26)		0.929
Fasting plasma glucose (mg/dL)	0주	92.64±6.16 (82-106)		93.05±7.62 (81-108)		0.794
	4주	90.36±6.38 (81-105)	0.051	91.79±7.89 (80-108)	0.185	0.380
	8주	91.69±6.07 (82-107)		91.77±6.95 (80-106)		0.959
Total Bilirubin (mg/dL)	0주	0.81±0.17 (0.35-1.16)		0.76±0.19 (0.29-1.09)		0.168
	4주	0.77±0.17 (0.45-1.11)	0.202	0.74±0.20 (0.41-1.11)	0.804	0.464
	8주	0.76±0.20 (0.31-1.07)		0.74±0.22 (0.33-1.11)		0.671
AST (U/L)	0주	21.41±3.26 (16-32)		22.85±3.46 (16-31)		0.063
	4주	22.44±2.94 (16-29)	0.067	23.38±3.20 (17-29)	0.287	0.177
	8주	21.85±2.10 (18-27)		22.82±2.75 (17-29)		0.083
ALT (U/L)	0주	19.15±4.50 (11-29)		19.46±4.22 (12-29)		0.756
	4주	19.87±4.38 (12-30)	0.431	19.46±4.04 (12-28)	0.976	0.669
	8주	19.85±3.88 (12-28)		19.59±5.18 (12-31)		0.805
Alkaline phosphatase (U/L)	0주	69.44±13.32 (46-98)		70.41±14.71 (45-103)		0.760
	4주	68.51±15.55 (44-105)	0.546	68.46±14.32 (44-108)	0.052	0.988
	8주	68.18±13.43 (46-103)		69.10±13.16 (44-90)		0.760

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)



< 표 11. 혈청생화학검사 비교 (계속) >

Variables	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
Total cholesterol (mg/dL)	0주	167.03±23.42 (112-204)	0.674	169.79±22.09 (118-205)	0.116	0.593
	4주	165.15±25.30 (112-210)		163.92±23.62 (116-207)		0.825
	8주	165.05±23.77 (119-203)		167.95±22.08 (119-209)		0.579
Triglyceride (mg/dL)	0주	113.82±37.56 (55-197)	0.306	115.72±41.23 (50-211)	0.944	0.832
	4주	112.28±38.32 (55-198)		114.67±44.47 (50-197)		0.800
	8주	106.97±40.91 (53-211)		113.87±37.72 (55-198)		0.441
hsCRP (mg/L)	0주	0.90±1.03 (0.15-5.9)	0.401	1.05±1.03 (0.12-5.5)	0.152	0.524
	4주	0.88±0.60 (0.18-2.26)		0.81±0.56 (0.2-2.66)		0.621
	8주	1.16±1.29 (0.18-6.65)		0.86±0.79 (0.13-4.49)		0.224

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

< 표 12. 뇨검사(1) >

Variables	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
pH	0주	5.51±0.51 (5-7)	0.034	5.45±0.65 (5-7.5)	0.060	0.627
	4주	5.74±0.55 (5-7)		5.71±0.70 (5-7)		0.787
	8주	5.49±0.57 (5-7)		5.47±0.69 (5-7.5)		0.929
S.G	0주	1.02±0.01 (1.002-1.029)	0.999	1.02±0.01 (1.005-1.028)	0.087	0.815
	4주	1.02±0.00 (1.007-1.027)		1.02±0.01 (1.005-1.029)		0.278
	8주	1.02±0.01 (1.005-1.03)		1.02±0.01 (1.005-1.029)		0.063

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

임상실험실 검사 중 뇨검사(1) 결과를 비교하였다. pH와 Specific gravity(S.G)의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 비교에서는 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

SKE 100군에서는 방문시기에 따라 뇨검사(1) 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다. SKE 위캡슐군의 경우에는 pH(p=0.034)에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 검사치의 변화가 정상 수치의 범위 안에 있었다(표 12).

< 표 13. 뇨검사(2) >

단위: 명(%)

Variables	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		정상	비정상(NCS)	정상	비정상(NCS)	
Nitrate	0주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	4주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	8주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
Protein	0주	36(92.3%)	3(7.7%)	39(100.0%)	0(0.0%)	0.240
	4주	38(97.4%)	1(2.6%)	39(100.0%)	0(0.0%)	1.000
	8주	37(94.9%)	2(5.1%)	39(100.0%)	0(0.0%)	0.494
Glucose	0주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	4주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	8주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
Ketone	0주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	4주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	8주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
Bilirubin	0주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	4주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	8주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
Blood	0주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	4주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	8주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
Urobilinogen	0주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	4주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
	8주	39(100.0%)	0(0.0%)	39(100.0%)	0(0.0%)	-
Leukocyte esterase	0주	37(94.9%)	2(5.1%)	35(89.7%)	4(10.3%)	0.675
	4주	33(84.6%)	6(15.4%)	35(89.7%)	4(10.3%)	0.737
	8주	35(89.7%)	4(10.3%)	32(82.1%)	7(17.9%)	0.517

p\* : Fisher's exact test

임상실험실 검사 중 뇨검사(2) 결과를 비교하였다. Nitrate, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Urobilinogen 검사 수치는 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 모두 정상으로 조사되었다.

Protein 검사 수치가 비정상(NCS)으로 나온 피험자는 SKE 위캡슐군의 경우 0주차 3명(7.7%), 4주차 1명(2.6%), 8주차 2명(5.1%) 조사되었으나 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었으며 임상적인 의미는 없었다.

Leukocyte esterase 검사 수치에서도 비정상(NCS)으로 나온 피험자는 SKE 위캡슐군의 경우 0

주차 2명(5.1%), 4주차 6명(15.4%), 8주차 4명(10.3%), SKE 100군의 경우 0주차 4명(10.3%), 4주차 4명(10.3%), 8주차 7명(17.9%) 조사되었으나 군간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 임상적인 의미는 없었다(표 13).

### 9.2.5 임상적 이상반응 발현상황

피험자들의 대조식품군(SKE 위캡슐)과 시험식품군(SKE 100)에서 인체적용시험 제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 모든 이상반응(AE)은 발생하지 않았다.

이상약물반응(ADR), 중대한 이상반응(Serious AE)과 중대한 이상약물반응(Serious ADR)의 경우에도 발현되지 않았다.

### 9.2.6 약물 복용력

피험자들의 인체적용시험 선별 당시 병용약물이 없는 것으로 확인되었으며, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 식품을 1회 이상 복용한 이후의 병용약물도 전혀 없는 것으로 확인하였다.

## 9.3 유효성 평가

유효성에 대한 자료는 FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP(per protocol) 분석법을 실시하기로 하였으나, PP 분석법에서 제외(인체적용시험계획서에서 명시한 기간을 채우지 못하고 중도 탈락한 경우, 병용금지약물(또는 식품)을 투여한 경우, 인체적용시험용 식품 순응도가 80% 이하인 경우, 인체적용시험계획서를 중대하게 위반하였다고 판단되는 경우)에 해당하는 피험자가 없었으므로 FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP(per protocol) 분석법에 해당되는 피험자의 수가 동일하여 FAS(Full Analysis Set) 분석법만 실시하였다. 최종 판정은 FAS(Full Analysis Set) 분석법으로 하였다.

### 9.3.1 FAS 분석(최종 판정)

FAS 분석법은 인체적용시험에 등재되어 1회 이상 인체적용시험용 식품을 복용하고, 최소한 1회 이상 유효성 평가가 실시된 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 따라서 피험자 78명[SKE 위캡슐군 39명, SKE 100군 39명]을 대상으로 평가하였다.

#### 9.3.1.1 1차 유효성 평가

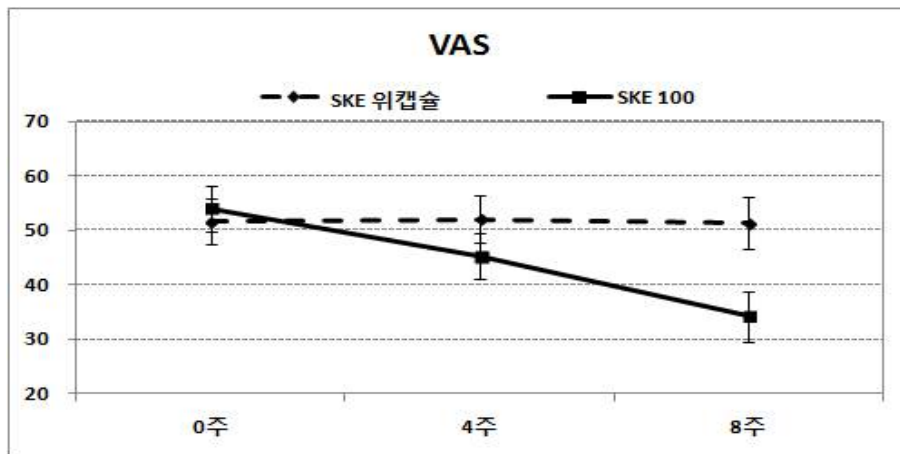
< 표 14. 통증평가 설문(VAS) 비교 >

항목	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
VAS (mm)	0주	51.67±13.25 (35-75)	0.617	53.97±12.78 (35-75)	<0.001	0.436
	4주	52.05±13.41 (35-75)		45.26±12.92 (20-75)		0.026
	8주	51.28±14.86 (20-75)		34.23±14.31 (10-70)		<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 통증평가 설문(VAS)을 비교하였다. 통증평가 설문(VAS)은 피험자에게 전반적 통증 정도를 100mm 직선에 표시하게 한 후 ‘통증 없음’에서 표시된 지점까지의 길이를 측정한다.

통증평가 설문(VAS)의 경우 SKE 100군에서 방문시기에 따라 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 감소(p<0.001)하는 것으로 나타났다. 또한 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 비교에서는 4주차(p=0.026)와 8주차(p<0.001)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다(표 14, 그림 2).



< 그림 2. 통증평가 설문(VAS) 비교 >

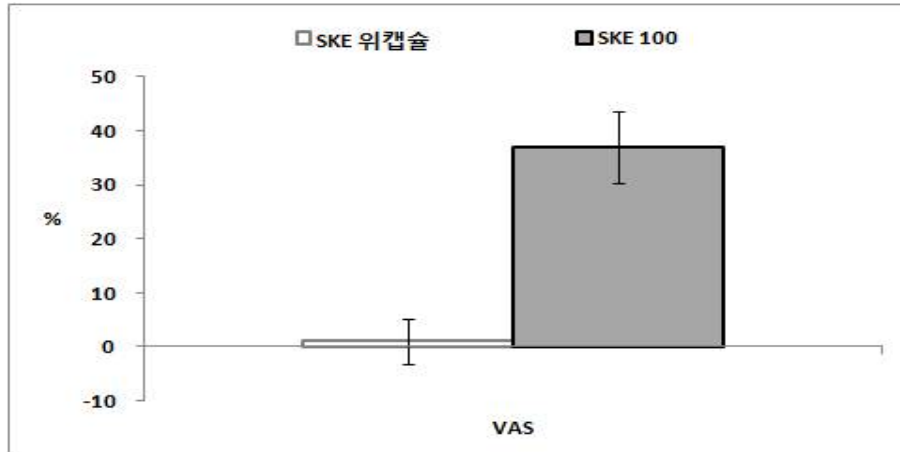
< 표 15. 통증평가 설문(VAS) 변화율 비교 >

항목	SKE 위캡슐 (N=39)	SKE 100 (N=39)	p
	평균±표준편차(95% C.I.)	평균±표준편차(95% C.I.)	
VAS	1.01±13.18 (-3.26 ~ 5.29)	37.02±20.49 (30.38 ~ 43.66)	<0.001

p : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 통증평가 설문(VAS) 변화율을 분석하였다. 통증평가 설문(VAS)의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 SKE 위캡슐군은 1.01% 개선된 반면 SKE 100군은 37.02% 개선되어 느끼는

통증평가가 통계적으로 유의하게 개선(p<0.001)되는 것으로 나타났다(표 15, 그림 3).



< 그림 3. 통증평가 설문(VAS) 변화율 비교 >

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만과 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상의 2그룹으로 나누어 통증평가 설문(VAS)을 분석하였다.

< 표 16. BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS) 비교 >

항목	방문	BMI < 25(kg/m <sup>2</sup> )				BMI ≥ 25(kg/m <sup>2</sup> )					
		SKE 위캡슐 (N=22)		SKE 100 (N=20)		p*	SKE 위캡슐 (N=17)		SKE 100 (N=19)		p*
		mean±SD (min-max)	p	mean±SD (min-max)	p		mean±SD (min-max)	p	mean±SD (min-max)	p	
VAS (mm)	0주	49.09±12.88 (35-75)		53.50±13.68 (35-75)		0.288	55.00±13.35 (40-75)		54.47±12.12 (35-75)		0.902
	4주	48.86±13.36 (35-75)	0.252	44.00±13.53 (30-70)	<0.001	0.248	56.18±12.69 (40-75)	0.189	46.58±12.48 (20-75)	<0.001	0.029
	8주	46.82±13.76 (20-75)		31.50±14.06 (10-65)		0.001	57.06±14.58 (30-75)		37.11±14.37 (15-70)		<0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS)을 비교하였다. 통증평가 설문(VAS)은 피험자에게 전반적 통증 정도를 100mm 직선에 표시하게 한 후 '통증 없음' 에서 표시된 지점까지의 길이를 측정한다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹의 경우 SKE 100군에서 방문시기에 따라 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 감소(p<0.001)하는 것으로 나타났다. 또한 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 비교에서는 8주차(p=0.001)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹의 경우에도 SKE 100군에서 방문시기에 따라 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 감소(p<0.001)하였으며, 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 비교에서도 4주차(p=0.029)와 8주차(p<0.001)에서 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(표 16).

< 표 17. BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS) 변화율 비교 >

항목	BMI < 25(kg/m <sup>2</sup> )			BMI ≥ 25(kg/m <sup>2</sup> )		
	SKE 위캡슐 (N=22)	SKE 100 (N=20)	p	SKE 위캡슐 (N=17)	SKE 100 (N=19)	p
	mean±SD (95% C.I.)	mean±SD (95% C.I.)		mean±SD (95% C.I.)	mean±SD (95% C.I.)	
VAS	4.66±13.97 (-1.53 ~ 10.85)	41.36±21.17 (31.45 ~ 51.27)	<0.001	-3.71±10.71 (-9.21 ~ 1.80)	32.46±19.23 (23.19 ~ 41.73)	<0.001

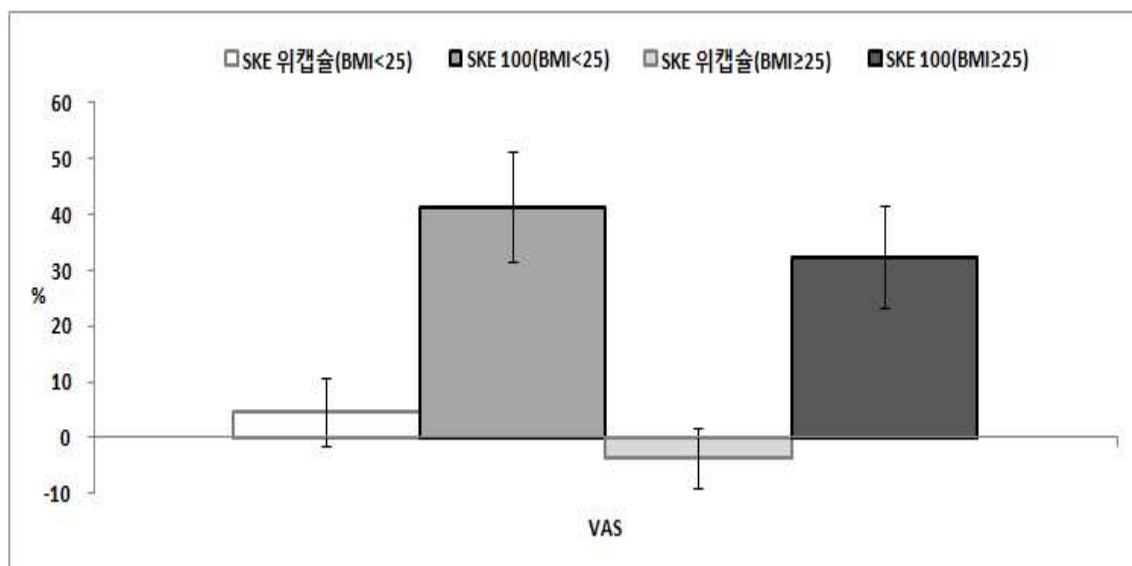
p : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS) 변화율을 분석하였다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 SKE 위캡슐군은 4.66% 개선된 반면 SKE 100군은 41.36% 개선되어 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의한 개선효과(p<0.001)를 보였다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹의 경우에도 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 SKE 위캡슐군은 3.71% 악화된 반면 SKE 100군은 32.46% 개선되어 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 개선(p<0.001)되는 것으로 나타났다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에 비해 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다(표 17, 그림 4).



< 그림 4. BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS) 변화율 비교 >

9.3.1.2 2차 유효성 평가

< 표 18. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 비교 >

항목	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
WOMAC 총점수 (24문항)	0주	18.82±12.43 (6-62)	0.796	20.54±11.82 (4-72)	<0.001	0.534
	4주	18.77±12.15 (5-60)		16.31±8.20 (4-48)		0.298
	8주	19.05±12.98 (5-66)		11.74±6.92 (1-26)		0.003
WOMAC 통증 (5문항)	0주	3.54±2.71 (1-12)	0.802	4.03±2.66 (0-15)	<0.001	0.426
	4주	3.51±2.73 (1-12)		2.97±1.87 (0-10)		0.313
	8주	3.62±3.04 (1-14)		2.03±1.50 (0-6)		0.005
WOMAC 뻣뻣함 (2문항)	0주	1.13±1.15 (0-4)	0.727	1.38±1.33 (0-6)	<0.001	0.366
	4주	1.13±1.10 (0-4)		1.10±0.94 (0-4)		0.912
	8주	1.08±1.22 (0-5)		0.41±0.68 (0-2)		0.004
WOMAC 수행 어려움 (17문항)	0주	14.15±9.02 (5-46)	0.709	15.13±8.50 (0-51)	<0.001	0.625
	4주	14.13±8.69 (3-44)		12.23±5.97 (0-34)		0.264
	8주	14.36±9.08 (3-47)		9.31±5.14 (1-19)		0.003

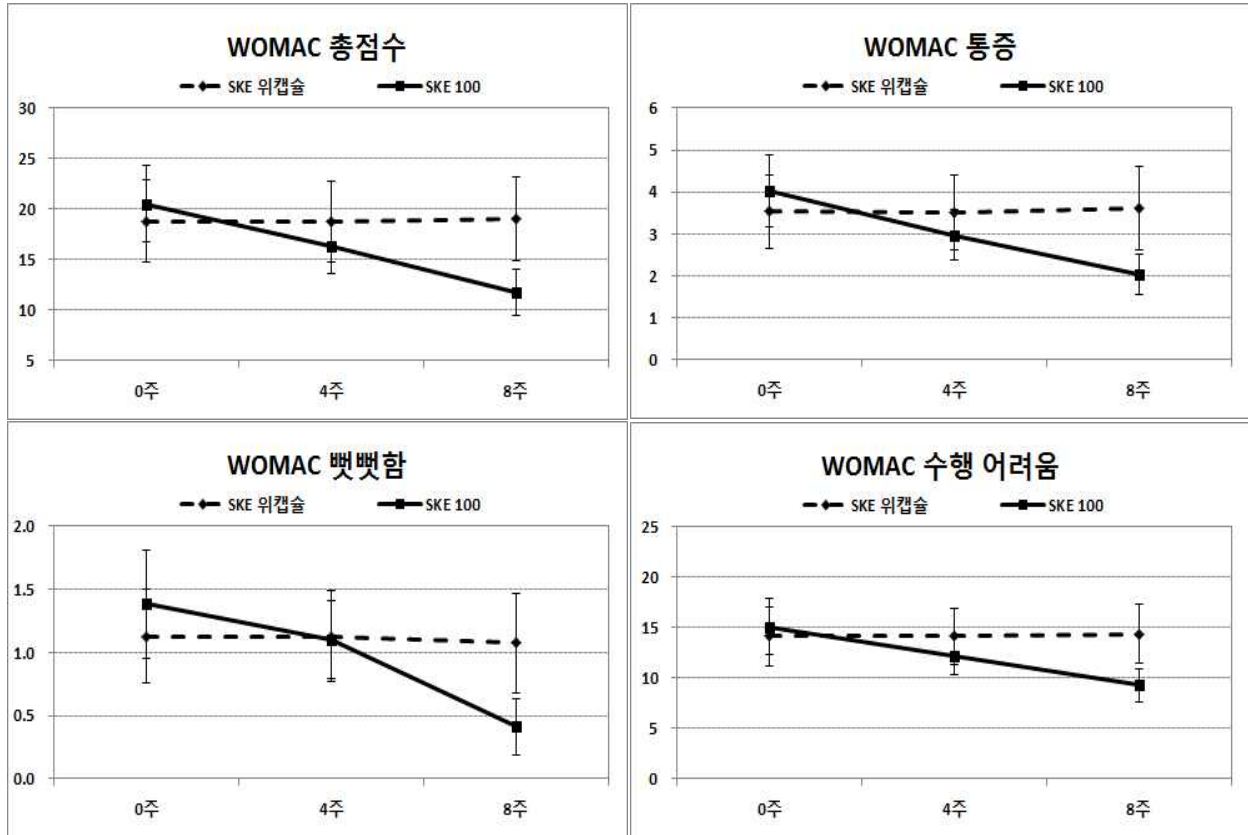
p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 비교하였다. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)은 총 24개 문항, 3개의 세부척도(통증 5문항, 뻣뻣함 2문항, 신체적 기능과 관련한 일상생활 수행의 어려움 17문항)로 이루어져 있다. 모든 문항은 5점 척도(0=없음, 1=약간, 2=보통, 3=심함, 4=매우 심함)로 정량화하였다. 총점의 범위는 0~96점이며, 총점이 높을수록 악화된 증상, 제한된 활동, 나쁜 건강을 의미한다.

WOMAC 총점수의 경우 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 비교에서는 8주차(p=0.003)에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 또한 SKE 100군에서 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소(p<0.001)하여 개선되는 것으로 나타났다.

통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 세분화하여 살펴본 결과, WOMAC 통증(p=0.005), WOMAC 뻣뻣함(p=0.004), WOMAC 일상생활 수행의 어려움(p=0.003) 모두 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 비교에서 8주차에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 특히 SKE 100군에서 WOMAC 통증, WOMAC 뻣뻣함, WOMAC 일상생활 수행의 어려움 모두 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소

( $p < 0.001$ )하여 개선되는 것으로 나타났다(표 18, 그림 5).



< 그림 5. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 비교 >

< 표 19. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율 비교 >

항목	SKE 위캡슐 (N=39)	SKE 100 (N=39)	p
	평균±표준편차(95% C.I.)	평균±표준편차(95% C.I.)	
WOMAC 총점수	-1.95±17.07 (-7.49 ~ 3.58)	39.79±26.47 (31.21 ~ 48.37)	<0.001
WOMAC 통증	-0.18±21.07 (-7.01 ~ 6.65)	47.19±28.19 (37.93 ~ 56.44)	<0.001
WOMAC 뻣뻣함	13.00±42.77 (-4.32 ~ 30.32)	73.06±38.76 (58.73 ~ 87.38)	<0.001
WOMAC 수행 어려움	-3.54±19.39 (-9.82 ~ 2.75)	34.39±28.46 (25.05 ~ 43.74)	<0.001

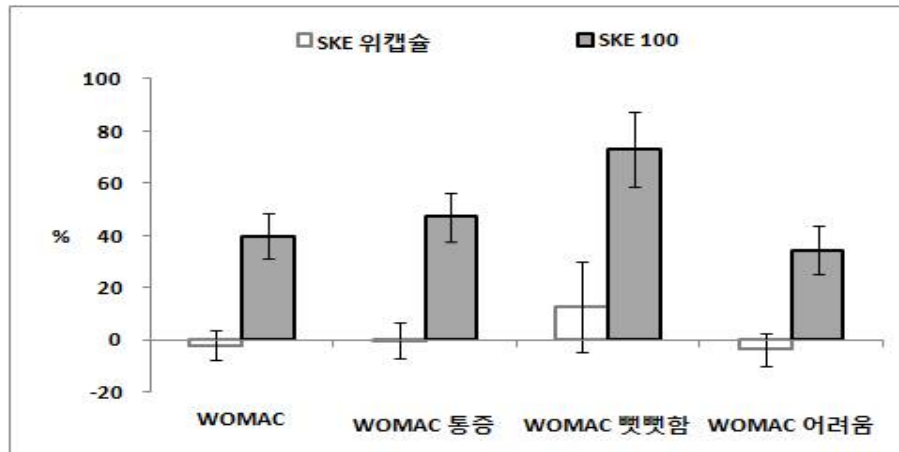
p : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율을 분석하였다. WOMAC 총점수의 경우 SKE 위캡슐군은 1.95% 악화된 반면 SKE 100군은 39.79% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다.

통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 세분화하여 살펴보면, SKE 위캡슐군과 SKE 100군을 비교하였을 때 WOMAC 통증의 경우 SKE 100군(평균 47.19% 개선,  $p < 0.001$ )에서, WOMAC 뻣뻣함의 경



우 SKE 100군(평균 73.06% 개선,  $p < 0.001$ )에서, WOMAC 일상생활 수행의 어려움의 경우 SKE 100군(평균 34.39% 개선,  $p < 0.001$ )에서 유의하게 개선되는 것을 확인하였다(표 19, 그림 6).



< 그림 6. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율 비교 >

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  미만과  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상의 2그룹으로 나누어 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 분석하였다.

< 표 20. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 비교 >

항목	방문	BMI < 25(kg/m <sup>2</sup> )				BMI ≥ 25(kg/m <sup>2</sup> )					
		SKE 위캡슐 (N=22)		SKE 100 (N=20)		p*	SKE 위캡슐 (N=17)		SKE 100 (N=19)		p*
		mean±SD (min-max)	p	mean±SD (min-max)	p		mean±SD (min-max)	p	mean±SD (min-max)	p	
WOMAC 총점수 (24문항)	0주	16.77±7.9 2 (6-40)		21.75±8.8 3 (6-42)		0.061	21.47±16. 48 (6-62)		19.26±14. 47 (4-72)		0.67 1
	4주	16.41±8.0 0 (5-38)	0.42 6	17.15±5.9 2 (6-26)	<0.0 01	0.737	21.82±15. 78 (8-60)	0.08 5	15.42±10. 16 (4-48)	0.03 6	0.15 3
	8주	16.27±7.6 0 (5-35)		11.25±6.6 8 (1-24)		0.029	22.65±17. 32 (7-66)		12.26±7.3 1 (1-26)		0.03 2
WOMAC 통증 (5문항)	0주	3.09±1.72 (1-7)		4.10±2.15 (1-9)		0.099	4.12±3.60 (1-12)		3.95±3.17 (0-15)		0.88 1
	4주	3.00±1.83 (1-7)	0.48 6	3.00±1.49 (1-5)	<0.0 01	1.000	4.18±3.54 (1-12)	0.27 6	2.95±2.25 (0-10)	0.01 5	0.21 7
	8주	2.95±1.73 (1-7)		1.95±1.39 (0-6)		0.046	4.47±4.08 (1-14)		2.11±1.63 (0-5)		0.03 7
WOMAC 뺏뺏함 (2문항)	0주	0.95±0.79 (0-2)		1.40±1.31 (0-4)		0.198	1.35±1.50 (0-4)		1.37±1.38 (0-6)		0.97 4
	4주	0.86±0.71 (0-2)	0.32 6	1.05±0.89 (0-3)	0.00 1	0.455	1.47±1.42 (0-4)	0.33 0	1.16±1.01 (0-4)	0.00 4	0.44 9
	8주	0.82±0.80 (0-2)		0.35±0.67 (0-2)		0.047	1.41±1.58 (0-5)		0.47±0.70 (0-2)		0.03 5
WOMAC 수행 어려움 (17문항)	0주	12.73±6.1 7 (5-32)		16.25±6.2 3 (5-30)		0.073	16.00±11. 69 (5-46)		13.95±10. 43 (0-51)		0.58 1
	4주	12.55±6.0 9 (3-30)	0.64 6	13.10±4.0 8 (5-19)	<0.0 01	0.733	16.18±11. 07 (7-44)	0.21 5	11.32±7.4 8 (0-34)	0.08 2	0.12 8
	8주	12.50±5.7 6 (3-29)		8.95±5.04 (1-17)		0.041	16.76±11. 89 (6-47)		9.68±5.34 (1-19)		0.03 4

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 비교하였다. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)은 총 24개 문항, 3개의 세부척도(통증 5문항, 뺏뺏함 2문항, 신체적 기능과 관련한 일상생활 수행의 어려움 17문항)로 이루어져 있다. 모든 문항은 5점 척도(0=없음, 1=약간, 2=보통, 3=심함, 4=매우 심함)로 정량화하였다. 총점의 범위는 0~96점이며, 총점이 높을수록 악화된 증상, 제한된 활동, 나쁜 건강을 의미한다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서는 WOMAC 총점수의 경우 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 비교에서는 8주차(p=0.029)에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 또한 SKE 100군에서 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소(p<0.001)하여 개선되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 세분화하여 살펴본 결과, WOMAC 통증(p=0.046), WOMAC 뺏뺏함(p=0.047), WOMAC 일상생활 수행의 어려움(p=0.041) 모두 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 비교에서 8주차에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 특히 SKE 100군에서 WOMAC 통증(p<0.001), WOMAC 뺏뺏함(p=0.001),

WOMAC 일상생활 수행의 어려움( $p < 0.001$ ) 모두 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소하여 개선되는 것으로 나타났다.

BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상 그룹에서는 WOMAC 총점수의 경우 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 비교에서는 8주차( $p=0.032$ )에서 통계적으로 유의한 변화가 있었으며, SKE 100군에서 방문시기에 따라 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 개선( $p=0.036$ )되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 세분화하여 살펴본 결과, WOMAC 통증( $p=0.037$ ), WOMAC 뻣뻣함( $p=0.035$ ), WOMAC 일상생활 수행의 어려움( $p=0.034$ ) 모두 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 비교에서 8주차에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 특히 SKE 100군에서는 WOMAC 통증( $p=0.015$ )과 WOMAC 뻣뻣함( $p=0.004$ )의 경우에서만 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소하였다(표 20).

< 표 21. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율 비교 >

항목	BMI < $25(\text{kg}/\text{m}^2)$			BMI $\geq 25(\text{kg}/\text{m}^2)$		
	SKE 위캡슐 (N=22)	SKE 100 (N=20)	p	SKE 위캡슐 (N=17)	SKE 100 (N=19)	p
	mean $\pm$ SD (95% C.I.)	mean $\pm$ SD (95% C.I.)		mean $\pm$ SD (95% C.I.)	mean $\pm$ SD (95% C.I.)	
WOMAC 총점수	2.66 $\pm$ 15.86 (-4.38 ~ 9.69)	45.46 $\pm$ 28.13 (32.30 ~ 58.63)	<0.001	-7.92 $\pm$ 17.16 (-16.75 ~ 0.90)	33.81 $\pm$ 23.89 (22.30 ~ 45.33)	<0.001
WOMAC 통증	3.92 $\pm$ 24.86 (-7.10 ~ 14.94)	47.99 $\pm$ 27.09 (35.31 ~ 60.66)	<0.001	-5.49 $\pm$ 13.79 (-12.58 ~ 1.60)	46.30 $\pm$ 30.14 (31.31 ~ 61.28)	<0.001
WOMAC 뻣뻣함	13.33 $\pm$ 48.06 (-13.28 ~ 39.95)	80.56 $\pm$ 32.68 (62.46 ~ 98.65)	<0.001	12.50 $\pm$ 35.84 (-13.14 ~ 38.14)	65.56 $\pm$ 43.86 (41.27 ~ 89.84)	0.004
WOMAC 수행 어려움	1.11 $\pm$ 15.36 (-5.70 ~ 7.92)	41.61 $\pm$ 30.26 (27.45 ~ 55.78)	<0.001	-9.55 $\pm$ 22.69 (-21.22 ~ 2.12)	26.37 $\pm$ 24.68 (14.09 ~ 38.64)	<0.001

p : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

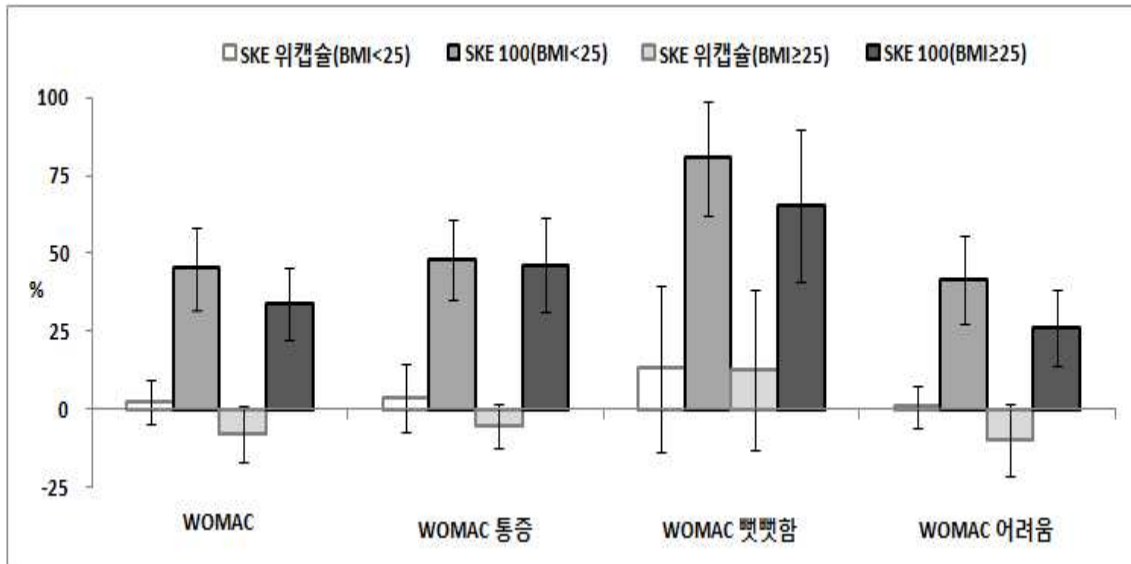
피험자들의 BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율을 분석하였다.

BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  미만 그룹에서는 WOMAC 총점수의 경우 SKE 위캡슐군(2.66% 개선)에 비해 SKE 100군은 45.46% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되었다. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 세분화하여 살펴보면, SKE 위캡슐군과 SKE 100군을 비교하였을 때 WOMAC 통증의 경우 SKE 100군(평균 47.99% 개선,  $p < 0.001$ )에서, WOMAC 뻣뻣함의 경우 SKE 100군(평균 80.56% 개선,  $p < 0.001$ )에서, WOMAC 일상생활 수행의 어려움의 경우 SKE 100군(평균 41.61% 개선,  $p < 0.001$ )에서 유의하게 개선되는 것으로 나타났다.

BMI  $25(\text{kg}/\text{m}^2)$  이상 그룹에서는 WOMAC 총점수의 경우 SKE 위캡슐군은 7.92% 악화된 반면 SKE 100군은 33.81% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC)을 세분화하여 살펴보면, SKE 위캡슐군과 SKE 100군을 비교하였을 때 WOMAC 통증의 경우 SKE 100군(평균 46.30% 개선,  $p < 0.001$ )에서,

WOMAC 뻗뻗함의 경우 SKE 100군(평균 65.56% 개선,  $p=0.004$ )에서, WOMAC 일상생활 수행의 어려움의 경우 SKE 100군(평균 26.37% 개선,  $p<0.001$ )에서 유의하게 개선되었다.

BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 이상 그룹에 비해 BMI 25( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다(표 21, 그림 7).



< 그림 7. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 변화율 비교 >

< 표 22. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 비교 >

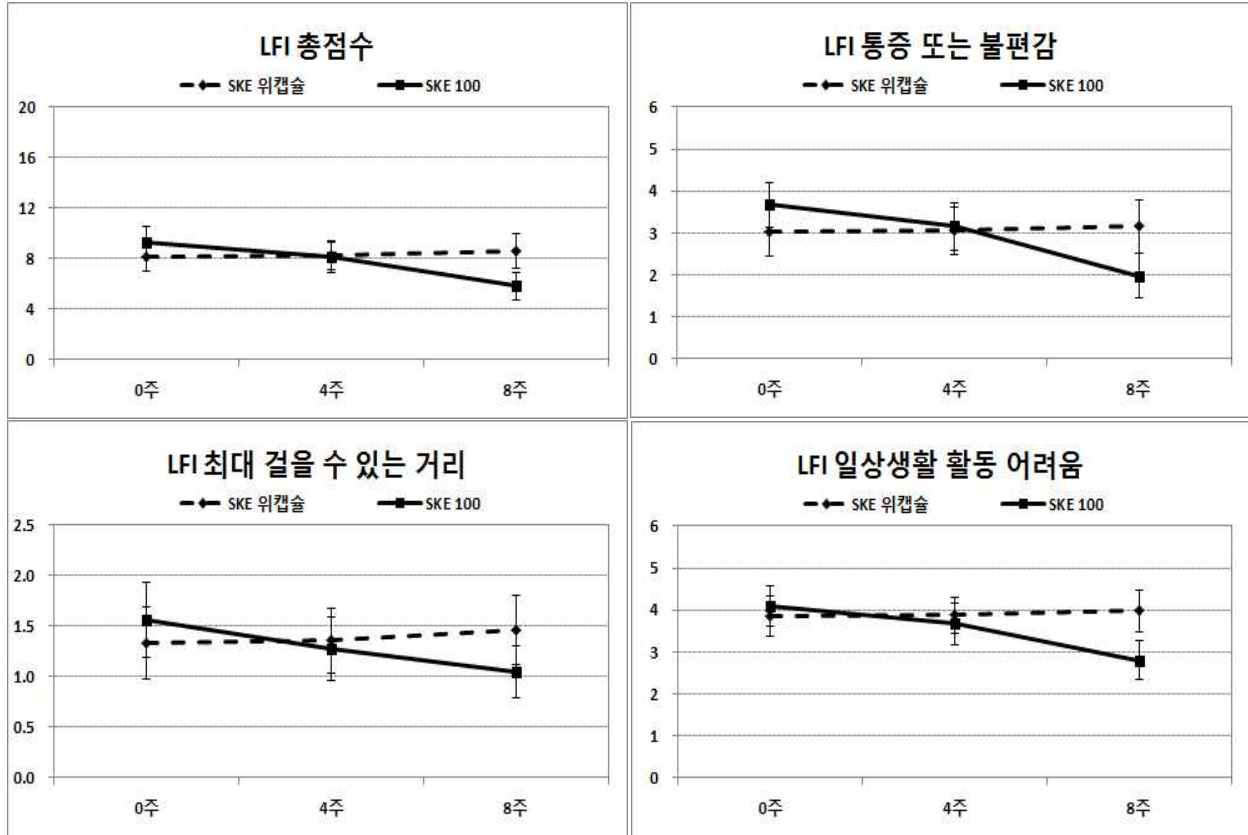
항목	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
LFI 총점수 (12문항)	0주	8.21±3.83 (1-20)	0.482	9.33±3.69 (1-21)	<0.001	0.189
	4주	8.28±3.54 (1-17)		8.10±3.68 (1-20)		0.827
	8주	8.59±4.14 (1-21)		5.82±3.35 (1-14)		0.002
LFI 통증 또는 불편감 (5문항)	0주	3.03±1.75 (0-8)	0.723	3.67±1.59 (0-8)	<0.001	0.095
	4주	3.05±1.76 (0-8)		3.15±1.79 (0-8)		0.799
	8주	3.15±1.99 (0-8)		1.97±1.66 (0-5)		0.006
LFI 최대 걸을 수 있는 거리 (2문항)	0주	1.33±1.11 (0-5)	0.723	1.56±1.14 (0-6)	<0.001	0.368
	4주	1.36±0.99 (0-4)		1.28±0.97 (0-5)		0.730
	8주	1.46±1.07 (0-5)		1.05±0.79 (0-4)		0.058
LFI 일상생활 활동 어려움 (5문항)	0주	3.85±1.48 (0-7)	0.693	4.10±1.47 (0-7)	<0.001	0.444
	4주	3.87±1.34 (0-6)		3.67±1.56 (0-7)		0.536
	8주	3.97±1.51 (0-8)		2.79±1.42 (0-5)		0.001

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 비교하였다. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)은 총 12개 문항, 3개의 세부척도(통증 또는 불편함 5문항, 최대 걸을 수 있는 거리 2문항, 일상생활 활동 어려움 5문항)로 이루어져 있다. 모든 문항은 0점에서 1점 또는 0점에서 2점 또는 0점에서 6점으로 정량화하였다. 총점의 범위는 0~26점이며, 총점이 높을수록 슬관절의 장애가 심한 것을 의미한다.

LFI 총점수의 경우 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 비교에서는 8주차(p=0.002)에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 또한 방문시기에 따라 LFI 총점수는 SKE 위캡슐군에서는 증가한 반면 SKE 100군에서는 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소(p<0.001)하여 개선되는 것으로 나타났다.

통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 세분화하여 살펴본 결과, LFI 통증 또는 불편감(p=0.006)과 LFI 일상생활 활동 어려움(p=0.001)의 경우 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 비교에서 8주차에서만 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 특히 SKE 100군에서 LFI 통증 또는 불편감, LFI 최대 걸을 수 있는 거리, LFI 일상생활 활동 어려움 모두 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소(p<0.001)하여 개선되는 것으로 나타났다(표 22, 그림 8).



< 그림 8. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 비교 >

< 표 23. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율 비교 >

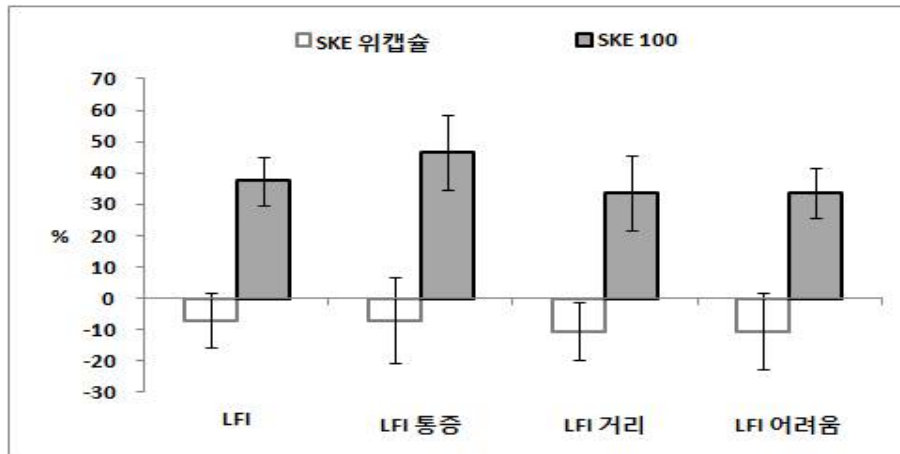
항목	SKE 위캡슐 (N=39)	SKE 100 (N=39)	p
	평균±표준편차(95% C.I.)	평균±표준편차(95% C.I.)	
LFI 총점수	-7.04±26.58 (-15.65 ~ 1.58)	37.41±23.40 (29.82 ~ 44.99)	<0.001
LFI 통증 또는 불편감	-6.98±40.61 (-20.50 ~ 6.53)	46.56±36.65 (34.52 ~ 58.59)	<0.001
LFI 최대 걸을 수 있는 거리	-1.88±24.88 (-10.93 ~ 7.16)	28.28±33.46 (16.49 ~ 40.07)	<0.001
LFI 일상생활 활동 어려움	-10.51±36.92 (-22.63 ~ 1.62)	33.56±24.41 (25.44 ~ 41.69)	<0.001

p : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율을 분석하였다. LFI 총점수의 경우 SKE 위캡슐군은 7.04% 악화된 반면 SKE 100군은 37.41% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선(p<0.001)되는 것으로 나타났다.

통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 세분화하여 살펴보면, SKE 위캡슐군과 SKE 100군을 비교하였을 때 LFI 통증 또는 불편감의 경우 SKE 100군(평균 46.56% 개선, p<0.001)에서, LFI 최대 걸을 수 있는 거리의 경우 SKE 100군(평균 28.28% 개선, p<0.001)에서, LFI 일상생활 활동 어려움

음의 경우 SKE 100군(평균 33.56% 개선,  $p < 0.001$ )에서 유의하게 개선되는 것을 확인하였다(표 23, 그림 9).



< 그림 9. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율 비교 >

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만과 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상의 2그룹으로 나누어 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 분석하였다.

< 표 24. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 비교 >

항목	방문	BMI < 25(kg/m <sup>2</sup> )				BMI ≥ 25(kg/m <sup>2</sup> )					
		SKE 위캡슐 (N=22)		SKE 100 (N=20)		p*	SKE 위캡슐 (N=17)		SKE 100 (N=19)		p*
		mean±SD (min-max)	p	mean±SD (min-max)	p		mean±SD (min-max)	p	mean±SD (min-max)	p	
LFI 총점수 (12문항)	0주	8.14±3.2 3 (1-14)		9.55±2.7 8 (4-14)		0.138	8.29±4.59 (3-20)		9.11±4.52 (1-21)		0.59 7
	4주	7.82±3.3 0 (1-14)	0.39 3	8.45±3.0 3 (3-12)	<0.00 1	0.524	8.88±3.84 (3-17)	0.05 6	7.74±4.32 (1-20)	<0.00 1	0.40 8
	8주	8.00±3.3 5 (1-14)		5.60±3.1 0 (1-12)		0.021	9.35±4.99 (3-21)		6.05±3.66 (1-14)		0.02 9
LFI 통증 또는 불편감 (5문항)	0주	2.95±1.4 3 (1-5)		3.70±1.5 6 (0-6)		0.114	3.12±2.15 (0-8)		3.63±1.67 (1-8)		0.42 6
	4주	2.82±1.4 7 (1-5)	0.22 6	3.10±1.7 7 (0-5)	<0.00 1	0.577	3.35±2.09 (0-8)	0.10 6	3.21±1.84 (1-8)	<0.00 1	0.82 9
	8주	2.91±1.6 6 (0-6)		1.75±1.6 2 (0-5)		0.028	3.47±2.37 (0-8)		2.21±1.72 (0-5)		0.07 5
LFI 최대 걸을 수 있는 거리 (2문항)	0주	1.23±0.9 7 (0-4)		1.55±0.8 3 (0-3)		0.256	1.47±1.28 (0-5)		1.58±1.43 (0-6)		0.81 3
	4주	1.27±0.9 4 (0-4)	0.62 8	1.25±0.7 9 (0-2)	0.003	0.933	1.47±1.07 (0-4)	0.09 9	1.32±1.16 (0-5)	0.058	0.68 0
	8주	1.27±0.7 0 (0-3)		0.95±0.6 0 (0-2)		0.120	1.71±1.40 (0-5)		1.16±0.96 (0-4)		0.17 6
LFI 일상생활 활동 어려움 (5문항)	0주	3.95±1.4 0 (0-5)		4.30±0.8 6 (2-5)		0.347	3.71±1.61 (1-7)		3.89±1.91 (0-7)		0.75 2
	4주	3.73±1.4 9 (0-5)	0.47 8	4.10±1.0 7 (2-7)	<0.00 1	0.361	4.06±1.14 (2-6)	0.19 0	3.21±1.87 (0-7)	<0.00 1	0.10 8
	8주	3.82±1.5 0 (0-7)		2.90±1.2 9 (1-5)		0.041	4.18±1.55 (2-8)		2.68±1.57 (0-5)		0.00 7

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 비교하였다. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)은 총 12개 문항, 3개의 세부척도(통증 또는 불편함 5문항, 최대 걸을 수 있는 거리 2문항, 일상생활 활동 어려움 5문항)로 이루어져 있다. 모든 문항은 0점에서 1점 또는 0점에서 2점 또는 0점에서 6점으로 정량화하였다. 총점의 범위는 0~26점이며, 총점이 높을수록 슬관절의 장애가 심한 것을 의미한다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서는 LFI 총점수의 경우 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 비교에서는 8주차(p=0.021)에서 통계적으로 유의한 변화가 있었으며, 방문시기에 따라 SKE 100군에서 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소(p<0.001)하였다. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 세분화하여 살펴본 결과, LFI 통증 또는 불편감(p=0.028)과 LFI 일상생활 활동 어려움(p=0.041)의 경우 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간의 비교에서 8주차에서만 통계적으로 유의한 변화가 있



었다. 특히 SKE 100군에서 LFI 통증 또는 불편감(p<0.001), LFI 최대 걸을 수 있는 거리(p=0.003), LFI 일상생활 활동 어려움(p<0.001) 모두 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소하여 개선되는 것으로 나타났다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에서는 LFI 총점수의 경우 SKE 위캡술군과 SKE 100군 비교에서는 8주차(p=0.029)에서 통계적으로 유의하게 개선되었으며, SKE 100군에서 방문시기에 따라 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 개선(p<0.001)되는 것으로 나타났다. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 세분화하여 살펴본 결과, LFI 일상생활 활동 어려움(p=0.007)의 경우에서만 SKE 위캡술군과 SKE 100군 비교에서 8주차에서 통계적으로 유의한 변화가 있었다. 특히 SKE 100군에서는 LFI 통증 또는 불편감(p<0.001)과 LFI 일상생활 활동 어려움(p<0.001)의 경우에서만 방문시기별로 통증 및 기능상태 정도가 유의하게 감소하였다(표 24).

< 표 25. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율 비교 >

항목	BMI < 25(kg/m <sup>2</sup> )			BMI ≥ 25(kg/m <sup>2</sup> )		
	SKE 위캡술 (N=22)	SKE 100 (N=20)	p	SKE 위캡술 (N=17)	SKE 100 (N=19)	p
	mean±SD (95% C.I.)	mean±SD (95% C.I.)		mean±SD (95% C.I.)	mean±SD (95% C.I.)	
LFI 총점수	-1.01±26.27 (-12.65 ~ 10.64)	40.76±25.18 (28.98 ~ 52.54)	<0.001	-14.84±25.65 (-28.03 ~ -1.65)	33.88±21.49 (23.53 ~ 44.24)	<0.001
LFI 통증 또는 불편감	-2.73±45.38 (-22.85 ~ 17.39)	53.16±34.90 (36.34 ~ 69.98)	<0.001	-13.22±32.90 (-31.44 ~ 5.00)	39.96±38.09 (21.60 ~ 58.31)	<0.001
LFI 최대 걸을 수 있는 거리	0.46±28.93 (-13.93 ~ 14.85)	36.11±38.03 (17.20 ~ 55.02)	0.003	-5.13±18.49 (-16.30 ~ 6.05)	18.89±25.09 (4.99 ~ 32.78)	0.007
LFI 일상생활 활동 어려움	-0.48±30.22 (-14.23 ~ 13.28)	32.08±27.42 (19.25 ~ 44.92)	0.001	-22.90±41.41 (-44.19 ~ -1.61)	35.31±21.02 (24.50 ~ 46.12)	<0.001

p : independence samples t-test (SKE 위캡술군과 SKE 100군)

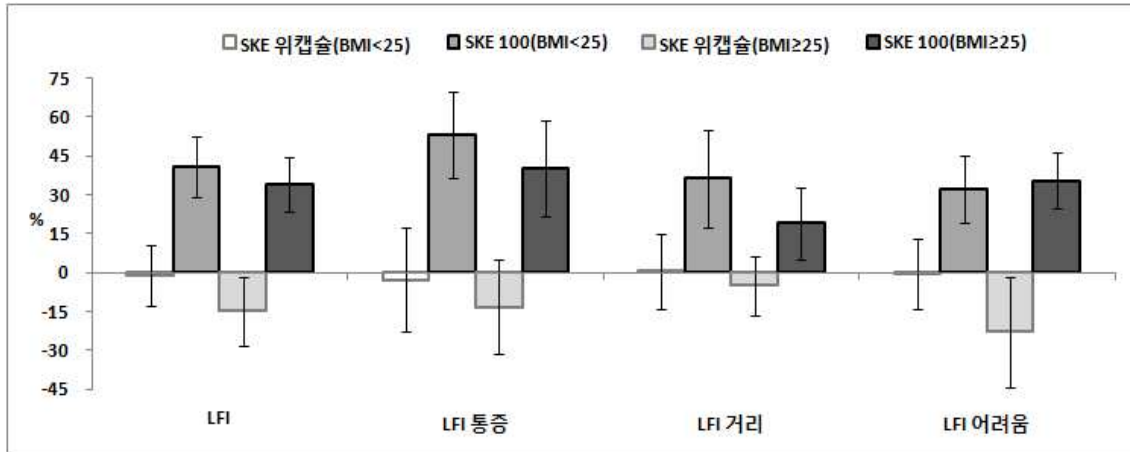
피험자들의 BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율을 분석하였다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서는 LFI 총점수의 경우 SKE 위캡술군은 1.01% 악화된 반면 SKE 100군은 40.76% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선(p<0.001)되었다. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 세분화하여 살펴보면, LFI 통증 또는 불편감의 경우 SKE 100군(평균 53.16% 개선, p<0.001)에서, LFI 최대 걸을 수 있는 거리의 경우 SKE 100군(평균 36.11% 개선, p=0.003)에서, LFI 일상생활 활동 어려움의 경우 SKE 100군(평균 32.08% 개선, p=0.001)에서 유의하게 개선되는 것으로 나타났다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에서는 LFI 총점수의 경우 SKE 위캡술군은 14.84% 악화된 반면 SKE 100군은 33.88% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선효과(p<0.001)를 보였다. 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI)을 세분화하여 살펴보면, SKE 100군에서 LFI 통증 또는 불편감(평균 39.96% 개선, p<0.001), LFI 최대 걸을 수 있는 거리(평균 18.89% 개선, p=0.007), LFI 일상생활 활동 어려움(평균 35.31% 개선, p<0.001) 모두 유의하게 개선되

었다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에 비해 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다(표 25, 그림 10).



< 그림 10. BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 변화율 비교 >

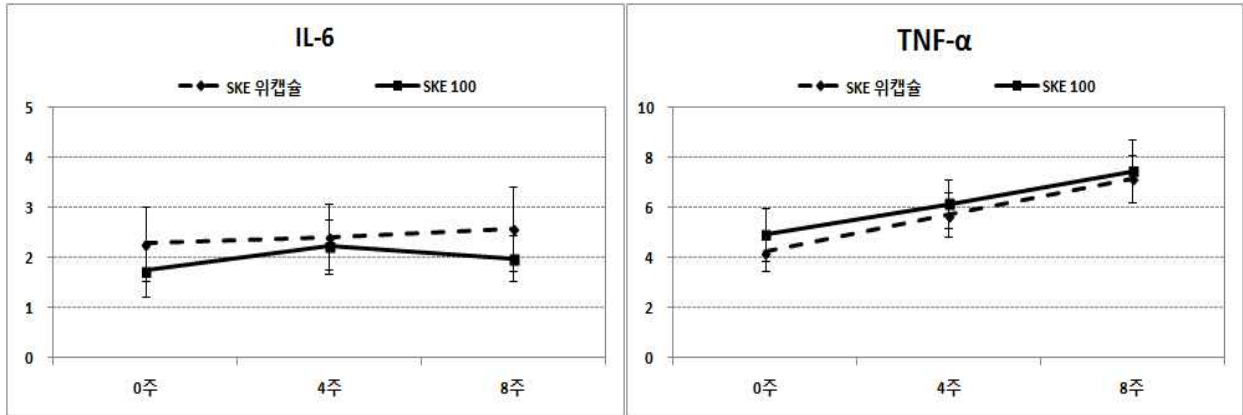
< 표 26. 염증성 cytokine 평가 비교 >

항목	방문	SKE 위캡슐 (N=39)		SKE 100 (N=39)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
IL-6 (pg/mL)	0주	2.28±2.26 (0.1-11.72)	0.597	1.75±1.65 (0.1-8.89)	0.347	0.237
	4주	2.42±1.99 (0.12-9.17)		2.24±1.67 (0.2-7.62)		0.654
	8주	2.58±2.59 (0.05-16.02)		1.99±1.42 (0.02-5.09)		0.216
TNF-α (pg/mL)	0주	4.23±2.38 (1.01-12.66)	<0.001	4.94±3.31 (0.47-16.24)	0.003	0.286
	4주	5.71±2.74 (1.71-14.22)		6.16±2.99 (1.81-15.85)		0.489
	8주	7.16±2.96 (2.77-14.97)		7.46±3.86 (1.22-16.9)		0.694

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 염증성 cytokine 검사치를 비교하였다. IL-6의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없는 것으로 나타났으며, SKE 100군에서 방문시기별로 점차 염증성 수치가 증가하였으며 통계적으로 유의한 차이(p=0.347)는 없었다.

TNF-α의 경우 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없는 것으로 나타났으며, SKE 100군에서 방문시기별로 점차 염증성 수치가 통계적으로 유의하게 증가(p=0.003)하는 것으로 확인되었다(표 26, 그림 11).



< 그림 11. 염증성 cytokine 평가 비교 >

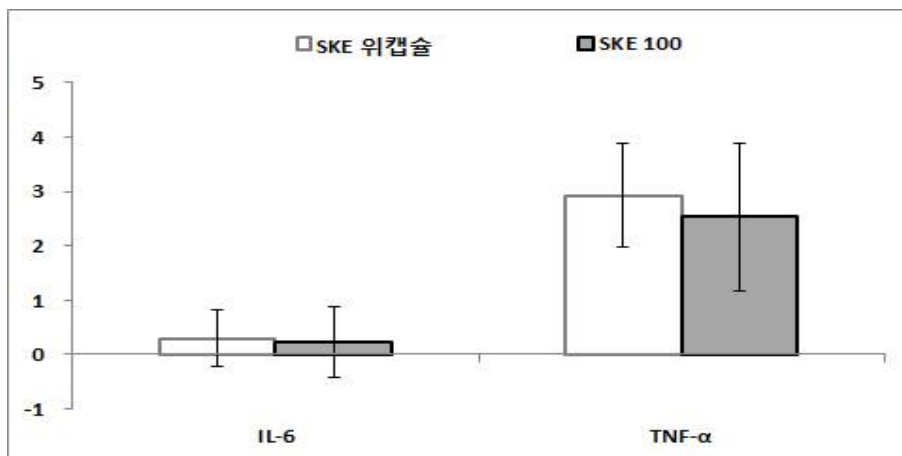
< 표 27. 염증성 cytokine 평가 변화량 비교 >

항목	SKE 위캡슐 (N=39)	SKE 100 (N=39)	p
	평균±표준편차 (95% C.I.)	평균±표준편차 (95% C.I.)	
IL-6	0.30±1.60 (-0.22 ~ 0.82)	0.24±2.01 (-0.41 ~ 0.89)	0.892
TNF-α	2.92±2.95 (1.97 ~ 3.88)	2.53±4.17 (1.18 ~ 3.88)	0.632

p : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 염증성 cytokine 평가 변화량을 분석하였다. IL-6의 경우 SKE 위캡슐군은 염증성 정도가 평균 0.30pg/mL 증가된 반면 SKE 100군에서도 염증성 정도가 평균 0.24pg/mL 증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선(p=0.892)되지 않는 것으로 나타났다.

TNF-α의 경우에도 SKE 위캡슐군(평균 2.92pg/mL 증가)과 비교하였을 때 SKE 100군에서도 염증성 정도가 평균 2.53pg/mL 증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선(p=0.632)되지 않는 것으로 나타났다(표 27, 그림 12).



< 그림 12. 염증성 cytokine 평가 변화량 비교 >

퇴행성관절염과 비만이 관계성이 있으므로 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만과 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상의 2그룹으로 나누어 염증성 cytokine 평가를 분석하였다.

< 표 28. BMI 그룹별 염증성 cytokine 평가 비교 >

항목	방문	BMI < 25(kg/m <sup>2</sup> )				BMI ≥ 25(kg/m <sup>2</sup> )					
		SKE 위캡슐 (N=22)		SKE 100 (N=20)		p*	SKE 위캡슐 (N=17)		SKE 100 (N=19)		p*
		mean±SD (min-max)	p	mean±SD (min-max)	p		mean±SD (min-max)	p	mean±SD (min-max)	p	
IL-6 (pg/mL)	0주	2.44±2.68 (0.1-11.7 2)	0.308	2.03±1.89 (0.25-8.8 9)	0.565	2.08±1.62 (0.24-5.9 2)	0.828	1.46±1.34 (0.1-4.61)	0.114	0.221	
	4주	2.38±2.01 (0.12-9.1 7)	0.308	2.04±1.31 (0.2-4.16)	0.516	2.48±2.03 (0.42-8.4 1)	0.828	2.45±2.00 (0.51-7.6 2)	0.114	0.966	
	8주	2.88±3.27 (0.05-16. 02)		1.65±1.32 (0.02-4.8 4)	0.124	2.20±1.26 (0.51-5.5 6)		2.36±1.47 (0.25-5.0 9)		0.736	
TNF-α (pg/mL)	0주	4.34±2.02 (1.74-8.1 9)		5.84±3.82 (0.47-16. 24)	0.128	4.10±2.84 (1.01-12. 66)		3.99±2.42 (1.21-10. 67)		0.895	
	4주	5.55±2.13 (2.39-10. 04)	<0.001	6.07±2.32 (1.81-10. 63)	0.456	5.93±3.43 (1.71-14. 22)	0.004	6.27±3.62 (1.81-15. 85)	<0.001	0.773	
	8주	7.07±2.59 (3.18-13. 35)		6.69±3.84 (1.22-16. 9)	0.713	7.28±3.45 (2.77-14. 97)		8.28±3.82 (1.76-14. 9)		0.417	

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p\* : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 BMI 그룹별 염증성 cytokine 검사치를 비교하였다.

IL-6의 경우 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹 모두 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없는 것으로 나타났다. BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹의 경우 SKE 100군에서 방문시기별로 점차 염증성 수치가 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이(p=0.558)는 없었다. BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹의 경우에는 SKE 100군에서 방문시기별로 점차 염증성 수치가 증가하였으며 통계적으로 유의한 차이(p=0.114)는 없었다.

TNF-α의 경우에도 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹 모두 각 방문시기별 SKE 위캡슐군과 SKE 100군 간에 통계적으로 유의한 변화가 없었다. BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(p=0.535)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(p<0.001) 모두 SKE 100군에서 방문시기에 따라 점차 염증성 수치가 증가하는 것으로 확인되었다(표 28).

< 표 29. BMI 그룹별 염증성 cytokine 평가 변화량 비교 >

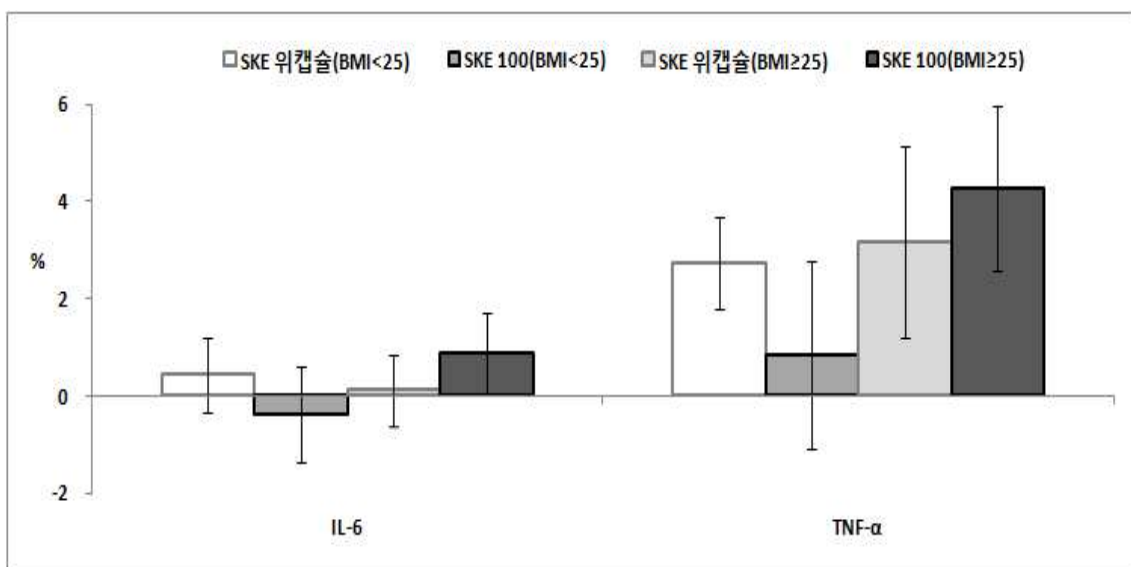
항목	BMI < 25(kg/m <sup>2</sup> )		p	BMI ≥ 25(kg/m <sup>2</sup> )		p
	SKE 위캡슐 (N=22)	SKE 100 (N=20)		SKE 위캡슐 (N=17)	SKE 100 (N=19)	
	mean±SD (95% C.I.)	mean±SD (95% C.I.)		mean±SD (95% C.I.)	mean±SD (95% C.I.)	
IL-6	0.43±1.75 (-0.35 ~ 1.21)	-0.38±2.12 (-1.37 ~ 0.61)	0.182	0.13±1.42 (-0.60 ~ 0.86)	0.90±1.71 (0.07 ~ 1.72)	0.152
TNF-α	2.73±2.16 (1.77 ~ 3.69)	0.86±4.12 (-1.07 ~ 2.79)	0.069	3.17±3.80 (1.22 ~ 5.13)	4.29±3.51 (2.60 ~ 5.98)	0.366

p : independence samples t-test (SKE 위캡슐군과 SKE 100군)

피험자들의 BMI 그룹별 염증성 cytokine 평가 변화량을 분석하였다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서는 IL-6의 경우 SKE 위캡슐군은 염증성 정도가 평균 0.43pg/mL 증가된 반면 SKE 100군에서는 염증성 정도가 평균 0.38pg/mL 감소되었으나 통계적으로 유의하게 개선(p=0.182)되지 않는 것으로 나타났다. TNF-α의 경우 SKE 위캡슐군(평균 2.73pg/mL 증가)과 비교하였을 때 SKE 100군에서도 염증성 정도가 평균 0.86pg/mL 증가되어 통계적으로 유의하게 개선(p=0.069)되지 않는 것으로 확인되었다.

BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에서는 IL-6의 경우 SKE 위캡슐군은 염증성 정도가 평균 0.13pg/mL 증가된 반면 SKE 100군에서도 염증성 정도가 평균 0.90pg/mL 증가(p=0.152)되었으며, TNF-α의 경우에도 SKE 위캡슐군(평균 3.17pg/mL 증가)과 비교하였을 때 SKE 100군에서도 염증성 정도가 평균 4.29pg/mL 증가되어 통계적으로 유의하게 개선(p=0.366)되지 않는 것으로 확인되었다(표 29, 그림 13).



< 그림 13. BMI 그룹별 염증성 cytokine 평가 변화량 비교 >

## 10. 결론

### 10.1 안전성 평가

- 1) 노각나무 추출물은 안전한 것으로 평가되었음.

### 10.2 유효성 평가

- 1) FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP 분석법에 해당되는 피험자의 수는 동일하여 FAS(Full Analysis Set) 분석법만 실시하였음. 최종판정은 FAS(Full Analysis Set) 분석법으로 판정함.
- 2) 시험식품(SKE 100군)의 경우 통증평가 설문(VAS)에서는 통증 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났다.
- 3) 시험식품(SKE 100군)의 경우 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC, LFI)에서는 통증 및 기능상태 평가가 유의하게 개선되는 것으로 나타났다.
- 4) 시험식품(SKE 100군)의 경우 염증성 cytokine(IL-6, TNF- $\alpha$ ) 평가에서는 염증성 완화 개선에는 큰 도움이 되지 않는 것으로 확인되었다.

#### ① 1차 유효성 평가

- 통증평가 설문(VAS)의 경우 Baseline의 증상 정도와 비교하였을 때 SKE 100군은 37.02% 개선되어 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다.
- BMI 그룹별 통증평가 설문(VAS)의 경우 Baseline의 검사치와 비교하였을 때 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(41.36% 개선)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(32.46% 개선) 모두 느끼는 통증평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에 비해 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

#### ② 2차 유효성 평가

- 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 총점수의 경우 SKE 100군은 39.79% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다.
- BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(WOMAC) 총점수의 경우 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(45.46% 개선)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(33.81% 개선) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에 비해 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 평가 정도의 개선효과가 더 높은 것으로 확인되었다.
- 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 총점수의 경우 SKE 100군은 37.41% 개선되어 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다.

- BMI 그룹별 통증 및 기능상태 평가 설문(LFI) 총점수의 경우 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(40.76% 개선)과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(33.88% 개선) 모두 느끼는 통증 및 기능상태 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p < 0.001$ )되는 것으로 나타났다. BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹에 비해 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹에서 SKE 100군의 통증 및 기능상태 평가 정도의 개선 효과가 더 높은 것으로 확인되었다.
- IL-6의 경우 SKE 100군에서 염증성 정도가 평균 0.24pg/mL 증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p = 0.892$ )되지 않는 것으로 나타났다. TNF- $\alpha$ 의 경우에도 SKE 100군에서 염증성 정도가 평균 2.53pg/mL 증가되어 염증성 cytokine 평가가 통계적으로 유의하게 개선( $p = 0.632$ )되지 않는 것을 확인하였다.
- BMI 그룹별 IL-6 평가의 경우 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(평균 0.38pg/mL 감소,  $p = 0.182$ )과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(평균 0.90pg/mL 증가,  $p = 0.152$ ) 모두 통계적으로 유의하게 개선되지 않는 것으로 확인되었다. TNF- $\alpha$  평가의 경우에도 SKE 100군은 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 미만 그룹(평균 0.86pg/mL 증가,  $p = 0.069$ )과 BMI 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상 그룹(평균 4.29pg/mL 증가,  $p = 0.366$ ) 모두 통계적으로 유의하게 개선되지 않는 것으로 확인되었다.

## 11. 참고문헌

- [1] 식품의약품안전청 의약품안전국 의약품심사부 순환계약품과. 골관절염치료제에 대한 임상 시험 평가 가이드라인. 의약품평가지침 76. 2012.
- [2] Metcalf MH, Larson RV. Painful disorders of the thigh and knee. In Bonica's management of pain. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. 2001:1593-613.
- [3] Dunlop DD, Manheim LM, Yelin EH, Song J, Chang RW. The costs of arthritis. Arthritis Rheum. 2003;49(1):101-113.
- [4] The Korea Institute for Health and Social Affairs : National Health and Nutrition Survey. 2001.
- [5] Lee HK, Kim HS, Kim CH. An effect of exercise on pain, helplessness, and perceived benefits of patients with knee osteoarthritis. Korea Sports Industry Development Institute. 2002;60:1-16.
- [6] Aigner T, Sachse A, Gebhard PM, Roach HI. Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. Adv Drug Deliv Rev. 2006;58(2): 128-149.
- [7] Couture R, Cuello AC. Studies on the trigeminal antidromic vasodilation and plasma extravasation in the rat. J Physiol. 1984;346:273-285.
- [8] The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. Seoul : Choisin Euihaksa. 2003:1133-1135.
- [9] 대한정형외과학회. 정형외과학 제 6판. 서울 : 최신의학사. 2006:253-261.
- [10] Castaneda S, Blas JAR, Largo R, Beaumont GH. Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. Biochem Pharmacol. 2012;83(3):315-323.
- [11] Laine L, White WB, Rostom A, Hochberg M. COX-2 selective inhibitors in the treatment of osteoarthritis. Semin. Arthritis Rheum. 2008;38(3):165-187.
- [12] Boer TN, Huisman AM, Polak AA, Neihoff AG, Rinsum AC, Saris D, Bijlsma JWJ, Lafeber FJPG, Mastbergen SC. The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: Ex vivo evaluation of human cartilage tissue after in vivo treatment. Osteoarthritis Cartilage. 2009;17(4):482-488.
- [13] Bdouet L, Pascale F, Bonneau M, Wassef M, Laurent A. In vitro evaluation of (S)-ibuprofen toxicity on joint cells and explants of cartilage and synovial membrane. Toxicol Vitro. 2011;25(8):1944-52.
- [14] 식품의약품안전처 건강기능식품 기준과. 건강기능식품 기능성 평가 가이드. (2) '뼈/관절 건강에 도움' 편. 2012.
- [15] Petrella RJ, DiSilvestro MD, Hildebrand C. Effects of hyaluronate sodium on pain and physical functioning in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Arch Intern Med. 2002;162(3):292-298.



## 별첨 1. 식사요법

### 식사요법 지침

● 올바른 식생활이란 제때에, 다양한 식품들을 골고루, 자신의 체중과 활동량에 알맞게, 싱겁게 그리고 온 가족이 한 자리에 모여 즐겁게 먹는 것입니다. 식습관의 불균형은 뇌혈관질환, 심장병, 위암, 고혈압성질환, 당뇨병 등의 만성질환을 유발하므로 질병 위험을 감소시키고 건강을 증진시키기 위해 올바른 식습관을 유지하는 것이 필요합니다(출처: 보건복지부, 질병관리본부, 대한당뇨병학회, 국제비만전문위원회(International Obesity Taskforce), 대한영양사협회, 한국영양학회).

#### 1. 규칙적인 식생활

신체리듬에 맞춰 규칙적으로 식사합니다. 특히 아침식사는 자동차에 시동을 걸듯이 인체에 시동을 걸어주므로 꼭 챙겨 먹는 것이 좋습니다. 아침을 거르면 혈당치 저하로 무기력해지고 집중력이 떨어지며 과식으로 이어져 영양불균형을 초래합니다. 이러한 불규칙적인 식사를 계속하면 소화기 관련질환의 발병으로 건강을 해치게 됩니다.

#### 2. 균형 잡힌 식생활

영양소는 한 가지 식품에 균형 있게 함유되어 있는 것이 아니라 여러 종류의 식품에 골고루 포함되어 있으므로 영양적으로 균형 잡힌 식사를 하려면 다양한 식품을 선택해 부족한 영양소가 없도록 해야 합니다.

#### 3. 싱겁게 먹는 식생활

소금의 과잉섭취는 고혈압을 비롯한 순환기계질환의 주요 요인이 되므로 건강을 위해 소금 섭취를 하루 10g 이하로 줄입니다. 소금 섭취를 줄이려면 소금절임, 가공, 인스턴트 식품의 섭취를 줄이고 외식의 빈도를 줄이는 것이 좋습니다.

구 분	소금이 많은 식품 예
소금에 절인 식품	젓갈류, 장아찌, 자반고등어, 굴비
훈연·어육 식품	햄, 소세지, 베이컨, 훈연연어
소금이 많이 첨가된 스낵 식품	포테이토칩, 팝콘, 크래커
인스턴트식품	라면, 즉석식품류, 통조림식품류
가공식품	치즈, 마가린, 버터, 케첩
조미료	간장, 된장, 고추장, 우스타소스, 바비큐소스

#### 4. 즐겁게 먹는 식생활

식사는 가능한 한 여럿이 함께 하는 것이 좋습니다. 더욱이 가족끼리 즐겁게 하는 식사는 그 자체가 즐거움이고 그 자체가 성인병 관리가 되는 것입니다.

5. 식이 섬유소 섭취의 좋은 점

식이 섬유소는 주로 채소, 과일, 콩, 잡곡류에 많습니다. 체내에서 소화, 분해되지 않아 식후 혈당의 상승을 억제합니다. 장내에서 콜레스테롤과 결합하여 콜레스테롤 농도를 낮추어 줍니다. 위장 통과 및 위 배출을 지연시켜 공복감을 줄여줍니다. 변의 양을 증가시켜 변비를 예방해 줍니다.

6. 식품구성자전거

식품구성자전거는 6개의 식품군에 권장식사 패턴의 섭취 횟수와 분량에 맞추어 바퀴 면적을 배분한 형태로, 다양한 식품 섭취를 통한 균형 잡힌 식사와 수분 섭취의 중요성 그리고 적절한 운동을 통한 비만 예방이라는 기본 개념을 나타냅니다. 하루에 이들 6가지 식품군을 골고루 섭취해야 균형 잡힌 식사를 할 수 있습니다.

[ 식품구성자전거 ]



KNS 식품 한국영양학회

7. 표준 체중을 유지하기 위한 하루에 필요한 적정열량

1) 표준체중 구하기

남자(kg) = 신장(m) × 신장(m) × 22	여자(kg) = 신장(m) × 신장(m) × 21
-----------------------------	-----------------------------

2) 비만도 구하기

체질량지수(BMI) = 현재 체중(kg) / (신장(m) × 신장(m))

체질량지수(BMI)	평가
≥ 30	중등도 비만
25 - 30 미만	경도 비만
23 - 25 미만	과체중
18.5 - 23 미만	정상
< 18.5	저체중

3) 활동량 구분

구분	활동정도 예
저활동적	대부분의 시간을 앉아서 하는 정적 활동으로 보내는 경우, 여가시간을 활용하여 적극적으로 규칙적으로 운동을 수행하지 않는 일반 사무직 종사자인 경우
활동적	주로 앉아서 보내지만 서서 하는 직업, 통근, 물건구입, 가사노동, 보통 속도로 걷기, 빨래, 청소, 아이보기, 경공업, 어부일, 규칙적인 가벼운 운동을 하는 경우
매우 활동적	등산, 무거운 짐 운반, 빠르게 달리기, 농사일, 광산일, 운동선수, 철강공 일, 주로 서서 하는 작업 종사 또는 운동 등 활발한 여가 활동을 하는 경우

4) 비만도와 활동량에 따른 적정 열량 구하기

하루 필요한 적정 열량 = 표준체중(kg) × 활동량에 따른 열량(kcal/kg)
---

구분	체중 1kg 당 필요한 열량(kcal)		
	저체중 ( BMI < 18.5 )	정상 ( 18.5 ≤ BMI < 25 )	비만 ( 25 ≤ BMI )
저활동적	35	30	20~25
활동적	40	35	30
매우 활동적	45~50	40	35

(예) 키 176cm, 체중 71kg, 활동적인 남자의 경우 하루 필요한 적정 열량 구하기

① 표준체중 =  $1.76 \times 1.76 \times 22 = 68.1\text{kg}$  , 비만도 =  $71 / (1.76 \times 1.76) = 22.9$  (정상)

② 하루 필요한 적정 열량 = 표준체중(kg) × 활동량에 따른 열량(kcal/kg)  
=  $68.1 \times 35 = 2,383.5\text{kcal}$  (약 2,400kcal)

8. 외식의 열량표(1인분 기준)

우리가 외식으로 즐겨 먹는 한식, 일식, 양식, 중식, 분식부터 패스트푸드, 음료수, 빵/과자류까지 식품별 열량표를 확인하여 메뉴를 선택할 때 참고하세요. 음식별로 1회 섭취량 및 구성식품의 양에 따라 열량이 차이가 날 수 있습니다.

[ 외식의 열량표 (1인분 기준) ]

한식		
음식명	1회 섭취량	열량(kcal)
공기밥	1공기(210g)	300
비빔밥	1인분	580
갈비탕	갈비 1대+ 밥1공기	580
갈비구이	1인분(250g)	550
불고기	1인분(250g)	300
물냉면	냉면사리300g	450
비빔냉면	냉면사리300g	500
김치찌개	400g+ 밥1공기	450
된장찌개	뚝배기(소)+ 밥1공기	390
순두부찌개	뚝배기(소)+ 밥1공기	580
육개장	고기50g+ 밥1공기	490
설렁탕	고기50g+ 밥1공기	460
삼계탕	영계1마리+ 찹쌀30g	800
전복죽	1대접	290

일식		
음식명	1회 섭취량	열량(kcal)
대구매운탕	뚝배기(대)+ 밥1공기	510
메밀국수	면350g	450
생선초밥	1인분(10개)	340
유부초밥	1인분(10개)	500
김초밥	1줄	360
회덮밥	1인분	520

양식		
음식명	1회 섭취량	열량(kcal)
돈가스	1인분(빵, 스프 포함)	980
안심스테이크	1인분(빵, 스프 포함)	860
생선가스	1인분(빵, 스프 포함)	880
햄버그스테이크	1인분(빵, 스프 포함)	900
김치볶음밥	1인분(400g)	610
오프라이스	1인분(400g)	680
카레라이스	1인분	600

중식		
음식명	1회 섭취량	열량(kcal)
자장면	1인분	660
짬뽕	1인분	540
볶음밥	1인분	720
탕수육	1접시(직경29cm)	1,780

패스트푸드		
음식명	1회 섭취량	열량(kcal)
라면	1개	500
컵라면	1개	300
피자	레귤러1판	1,120
햄버거	1개	330
후라이드치킨	1쪽(70g)	210

음료수		
음식명	1회 섭취량	열량(kcal)
콜라	1캔(250ml)	100
라이트콜라	1캔(250ml)	30
사이다	1캔(250ml)	100
미에로화이바	1병(100ml)	50
게토레이	1캔(250ml)	80
우유	1팩(200ml)	125
두유	1팩(200ml)	125
요플레	1개(110g)	120
한국야쿠르트	1개(65ml)	80

빵/과자류		
음식명	1회 섭취량	열량(kcal)
소보로빵	1개(60g)	200
도우넛	1개(60g)	250
파운드케이크	1쪽(70g)	230
애플파이	1쪽(90g)	295
아이스크림	1개(60g)	100
초콜릿	1개(30g)	150
사탕	6개(30g)	110
초코빼빼로	1봉지(40g)	175
에이스	1봉지(154g)	810
양과링	1봉지(95g)	470
새우깡	1봉지(85g)	440
초코파이	1봉지(38g)	160

분식		
음식명	1회 섭취량	열량(kcal)
돌냄비우동	1인분	550
수제비	1인분	410
칼국수	1인분(800g)	460
고기만두	10개	340
사골만두국	1인분	420

## 별첨 2. 운동요법

### 운동요법 지침

● 운동 부족은 신체의 정상적 발달과 기능을 저하시킴으로써 각종 질병을 유발하며 영양섭취는 증가된 반면 신체 활동 부족으로 인하여 유발되는 비만은 성인병 유발의 주된 원인으로 현대인들의 건강을 위협하는 요인이 되고 있습니다. 규칙적인 운동은 현대 생활에서 건강을 위협하는 운동 부족, 정신적 스트레스, 비만 등의 문제를 해소할 수 있는 현대인들의 건강 유지 및 증진에 필수적인 수단입니다. 하지만, 무리한 운동은 오히려 위험하므로 주의가 필요합니다(출처: 보건복지부, 질병관리본부, 국민건강보험공단, 사단법인 한국운동지도협회 「성인병 예방 관리를 위한 운동지도 지침서, 2000」).

#### 1. 운동의 종류

스포츠나 체조뿐만 아니라 집안일이나 간단한 산책, 걷기도 운동이라 할 수 있습니다. 운동의 종류나 강약 보다는 자신에게 가장 알맞은 운동을 규칙적으로 하는 것이 더 중요합니다.

#### 2. 운동요법의 효과

하루에 최소한 만보 걷기 운동과 규칙적인 운동을 하게 되면 다음과 같은 많은 이로운 점을 경험할 수 있습니다.

- 1) 순환기 : 혈압 감소, 심장 기능 향상, 혈액순환 원활
- 2) 호흡기 : 폐 기능 향상
- 3) 골격근 : 근력 향상, 노화와 발암의 원인인 활성산소 제거 효과
- 4) 대사기능 : 체지방량과 체중 감소, 뼈가 단단해짐, 나쁜 콜레스테롤(LDL-콜레스테롤) 감소, 좋은 콜레스테롤(HDL-콜레스테롤) 증가, 인슐린의 효과 강화로 적은 양의 인슐린으로도 혈당 조절 가능
- 5) 정신적 효과 : 불안감 해소, 우울한 감정 감소, 성욕 증가, 자기 자신에 대한 자긍심 향상

#### 3. 운동의 방법

운동하기에 편안한 신발을 착용하며, 낮은 강도의 운동부터 시작하여 서서히 강도를 높여 나가야 합니다. 운동의 효과를 극대화하기 위해서 준비운동, 본 운동, 정리운동 등 3단계의 과정을 거쳐서 진행하는 것이 바람직합니다.

##### 1) 준비운동

보통 5~10분 정도 맨손체조, 스트레칭, 허리 굽혔다 펴기, 느린 속도로 걷기 등을 합니다. 준비운동은 체온과 근육의 온도를 높여 주고 심박수와 호흡량을 증가시키고 혈액 순환을 증가시키며, 운동 중에 일어날 수 있는 근육이나 관절의 부상을 방지합니다.

##### 2) 본 운동

- ① 운동형태 : 유산소운동(예: 빨리 걷기, 조깅, 수영, 등산, 수중운동, 고정식 자전거 타기, 댄스스포츠 등) 또는 무산소운동(예: 기구나 지지물 등을 이용한 운동, 건강 밴드 등)
- ② 운동 빈도 : 일주일에 3일 이상 (개인의 체력수준에 맞게 조절)
- ③ 운동 시간 : 20~60분/1회 (개인의 체력수준에 맞게 조절)

- ④ 운동 강도 : 약간 힘들다는 정도로 등에 땀이 약간 나면서 옆 사람과 대화가 가능한 정도  
3) 마무리 운동

운동을 마칠 때 5~10분 이상 스트레칭 체조와 유연성 운동을 통해 천천히 운동 강도 감소와 맥박을 감소시켜 운동 전 본래의 몸 상태로 만들어 줍니다.

**4. 운동시 주의 사항**

- 1) 운동 중 부상을 방지하려면 준비운동과 스트레칭은 필수입니다.
- 2) 허리가 아프거나, 무릎 등이 아픈 병이 있으면 걷기 운동을 하지 않습니다.
- 3) 감기 기운이 있거나 수면부족 등 몸 상태가 좋지 않을 때에는 운동을 중지합니다.
- 4) 늦은 밤의 심한 운동은 새벽 저혈당을 발생시킬 수 있으므로 피하도록 합니다.
- 5) 운동 전이나 운동 후 적당하게 수분을 섭취하여 운동으로 인해 일어날 수도 있는 탈수 증상을 예방해야 합니다.

**5. 1시간 운동에 따른 소모 칼로리 표**

운 동	소모 칼로리(Kcal)	운 동	소모 칼로리(Kcal)
가벼운 가사	120~150	계단 오르내리기	310
빨래	180	정원 손질	340
체조	180	스케이팅	360~420
걷기(5.6km/시간)	240~300	자전거 타기(16km/시간)	360~420
골프	240~300	수상 스키	420~480
볼링	240~300	빠르게 걷기(8km/시간)	420~480
자전거 타기(9.6km/시간)	240~300	테니스(단식)	420~480
설거지	270	스키	480~600
배구, 배드민턴, 탁구	300~360	자전거 타기(21km/시간)	600~650
에어로빅	300~360	달리기(9km/시간)	600~660
테니스(복식)	300~360	수영	720
자전거 타기(12.8km/시간)	300~360	등산	780

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 00000사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 00000사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.