

항균활성 및 항암면역강화를유효성분으로 하는
유청유래 기능성 바이오소재의 제품화

Commercialization of
Whey oriented functional bio-material using Antigerm
activation and anticancer immunity strengthening
as effective ingredient

농업회사법인 (주)생명의나무

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “항균활성 및 항암면역강화를 유효성분으로 하는 유청유래 기능성 바이오 소재의 제품화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2016년 01월 20일

주관연구기관명 : (주)생명의나무

주관연구책임자 : 나 천 수

연 구 원 : 김 진 범

연 구 원 : 정 진 호

연 구 원 : 나 대 승

협동연구기관명 : 전남의대 암병원

협동연구책임자 : 범 희 승

요 약 문

I. 제 목

- 항균활성 및 항암면역강화를 유효성분으로 하는 유청유래 기능성 바이오소재의 제품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 현재 암환자에 대한 치료방법은 국소요법과 전신요법으로 대별되는데 단일보다는 복합 처방되는 경우가 대부분이라 할 수 있음. 하지만 이들 요법은 부작용이 너무 심하여 부작용이 없고 안전성이 극대화된 글라이코믹스 기술 개발이 향후 바이오제품 개발의 성패를 좌우할 것으로 생각됨.
- 총체적 고민거리인 잉여 원유의 안정적인 소비방법을 확보에 있어 정부 또한 뚜렷한 대안이 없으며 이는 결국 국내 낙농산업의 총체적인 피해로 연결되고 있음. 현재 우유소재 및 연구개발부분으로서 산업화에 치중되는 기초소재에 주안점을 둔 단편적인 연구가 학교주관으로 수행되고 있으며, 인력공급의 핵심인 낙농 관련 대학/학과 등 관련분야의 축소 및 폐지 등으로 연구인력 인프라는 점차적으로 축소되고있음.
- 최근 유제품 관련 연구경향은, 우유유래 소재의 효용가치와 첨단화 개발 요구성이 매우 높음에 따라 기능성 연구와 제품개발도 동일한 컨셉에 맞추어 지고 있으며, 이는 보다 고차원의 요구를 받게 될 것임.
- 최근들어 바이오의약품 중 단백질 의약품 분야가 가장 큰 시장을 차지할 것으로 전망되며, 특히 당사슬 리모델링을 통한 효능 및 안전성을 극대화 할 수 있는 Glycomics based drug 개발은 향후 세계 제약시장을 주도 할 것으로 기대함.

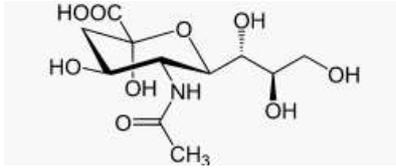
III. 연구개발 내용 및 범위

- 미이용자원인 유청으로부터 총 14종의 항균, 항암 그리고 면역증정 효과를 보유하는 기능성 바이오 소재 대량생산 시스템 정립 및 원료성분의 상용화를 이루는 것.
- 개발소재의 위염 및 위암유발인자인 헬리코박터의 활성 저하 및 사멸형 기능성 바이오소재의 개발 및 제품화와 항암면역강화형 기능성 바이오 소재의 선발 및 제품화, 항균 및 항암 면역 증가 등 생리활성 평가 시스템 개발.
- 유청 유래의 기능성 바이오소재 원료성분의 데이터베이스화 및 활용기술을 구축하며 개발 기능성 소재의 효능평가를 통한 바이오마커 및 종합평가시스템 구축.
- 총 4종이상의 기능성 바이오소재의 원료, 성분의 식약처 승인 획득 및 상용화와 연구개발 결과의 지적소유권 확보 및 사업화.

IV. 연구개발결과

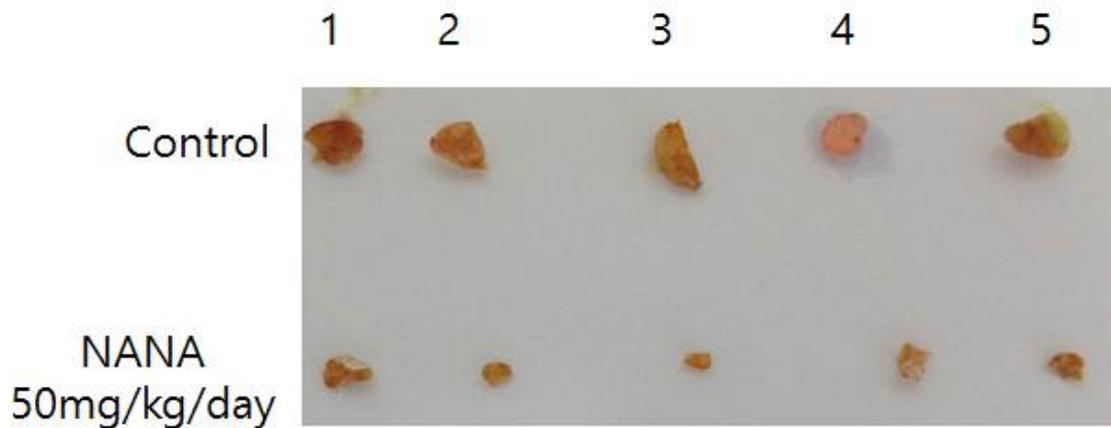
- 유청 유래의 항균, 항암 그리고 면역증진 효과를 보유하는 기능성 바이오소재 생산기법 정립하였으며 실제 대량생산에도 적용할 수 있는 공정을 확립함.

- 바이오소재의 지표물질 및 유효성분 분석법 정립 : 건강기능식품협회에 의뢰하여 분석법을 정립하였으며, 이 시험법은 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 범위에 모두 적합하다고 판단되



어졌으며 실험에 의해 기준규격은 65mg/g으로 정함

- 항암 면역 강화형 개발소재에 대한 동물 시험 평가 : 총 23마리의 BALB/c mice를 이용하여 NANA의 항암효과를 관찰함. NANA의 농도를 50mg/kg/day로 고정하였고, HepG2 cell line을 mice에 주입하여 암세포의 크기변화를 관찰한 결과 아무것도 처리하지 않은 군에 비하여 암세포의 크기가 두드러지게 작아진 것을 확인함.



- 헬리코박터에 대한 NANA의 살균, 제균력 확인 : 총 84명의 대상자로 헬리코박터의 제균 인체적용시험을 진행 한 결과 활력징후, 신체계측, 일반혈액검사 등에서는 군별로 통계적으로 유의차가 없는 것으로 밝혀져 안전성에 문제가없는 것으로 밝혀졌고 헬리코박터 제균력은 Sialic acid 500군에서만 통계적으로 유의한 변화가 있는 것으로 나타나 헬리코박터 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인함.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- NANA의 건강기능식품 원료로의 개별인정을 취득하여 헬리코박터의 제균기능이 있으며 면역력을 높여 암세포까지도 억제할 수 있는 건강기능식품, 복합제형의 건강기능식품 등 다양한 제품 개발.

- NANA연구 및 건강기능식품 관련 다양한 정보 및 동향에 대한 워크샵을 개최하여 과제의 성과 홍보 및 동향에 대한 정보를 수집하고 더 나아가 교육연수 프로그램, 단기 강좌 등을 개최하여 맞춤형 인재를 양성할 수 있도록 지원.

SUMMARY

I. Title of the project

- Development of functional food material having an antibacterial effect of H. pylori

II. The purpose and need for research and development

- Helicobacter pylori (Helicobacter pylori) are formatted between mucous membranes and upper parasitic slime bacteria in the stomach. The bacteria are known to be distributed in a high incidence in our country, and 20 percent of children, according to the survey, 70% of middle-aged, in the case of older people found that 90% are infected. They also gastritis, gastric ulcer, because it is classified as a risk factor for stomach cancer, etc. must be the eradication. However, often the drug can not reach enough to the place where the bacteria, if that have been exposed to several antibiotics, since it is resistant to a drug handsome treatment is not easy.

III. Research Content

- If we receive a just treatment of H. pylori is known as a high risk factor for health, but new treatments are required, please, it is in danger of resistance to antibiotics and rate.

Sialic acid in the case of separated milk whey to remove the H. pylori, and a material contained in the body of milk constituents, and the side-effects and there is no problem in a new functional biomaterials resistant. New material assistance to high value creation and unused resources within the public health of the milk to the development of functional food for H. pylori inhibition and apoptosis using the Sialic acid is considered bar.

IV. Research and development results

- Functional material is separated from milk whey is Sialic acid showed antibacterial effects on Helicobacter pylori infection in in vitro and animal models experiments using mice was performed tests applied to the human body.

As a result, a total of 56 patients (placebo, 28; jinyak 28) of the subjects ingested the Sialic acid for 9 weeks , 15 said the a negative decision (Fully eradication), and the remaining 13 showed decreased brightness 80% of bacteria.

V. Research and performance utilization plan

- The development of functional food using Sialic acid isolated from milk whey is a technology development and the unused resources of the whey retained the functional evolution and related technologies into high value-added materials Materials International Leading and right fields that can be ignited using a new bio-materials be. The development of new functional biomaterials is regarded as a very promising sector in terms of economic needs and technology development, the extent of benefits to mankind will be too large.

CONTENTS

Chapter 1.	Summary of research and development projects	11
Chapter 2.	Results of research carried out	18
Chapter 3.	Goal achievement and contribution to the relevant field	303
Chapter 4.	Research and performance utilization plan	313
Chapter 5.	Research facilities Equipments	319
Chapter 6.	References	320

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	11
제 2 장	연구개발 수행 내용 및 결과	18
제 3 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	303
제 4 장	연구성과 및 성과활용 계획	313
제 5 장	연구시설·장비 현황	319
제 6 장	참고문헌	320

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 사업의 수행을 통해 미이용 자원인 유청으로부터 총 14종(4부류)의 항균·항암 그리고 면역증진효과를 보유하는 기능성 바이오 소재 대량생산시스템 정립 및 원료성분의 상용화를 이루고 개발 소재의 위염 및 위암유발인자인 *Helicobacter pylori* 활성 저하 및 사멸형 기능성과 항암면역강화형 기능성 바이오소재 개발 및 제품화를 시행하고 항균 및 항암면역증가 등 생리활성 평가시스템을 개발한다. 이를 토대로 유청유래의 기능성 바이오 소재 원료성분의 데이터베이스화 및 활용기술을 구축하고 이의 효능평가를 통한 바이오마커 및 종합평가시스템을 구축하고 총 4종이상의 기능성바이오소재의 원료, 성분의 식약청 승인 획득 및 상용화를 이루고 연구개발 결과의 지적소유권을 확보하여 미이용 자원을 이용하는 신소득원 창출과 과학적이고 안전한 기능성 제품을 통한 국민의 건강향상 및 삶의 질 향상을 연구의 목적으로 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 해외기술개발동향

가. 구소련의 체르노빌 원전사고를 포함한 일본 후쿠시마 원전폭발로 인하여, 자연발생적 암환자이외 이로 인한 암환자 발생수치는 급격히 증가될 것으로 예측되고 있음. 더불어, 암환자들은 안전 특수목적식품(맛역치 해소형, 암환자 유형별 선택적 영양요구성 충족형, 면역증가형, 항염증예방 및 치료형, 장기능개선 효과 등)에 대한 요구성이 극대화 될 것으로 예상된다.

나. 현재, 암환자에 대한 치료방법은 국소요법(수술요법, 방사선요법)과 전신요법(화학요법 및 면역요법)으로 대별되는데 단일보다는 복합 처방되는 경우가 대부분이라 할 수 있음.

- 특히 방사선 요법(대장암 기준, 방사성동위원소 포함)처방시, 최초 생체내 면역시스템(면역인자)소멸, 소화흡수(섬모궤사)시스템 및 장내 세균총(사멸)등이 바닥상태로 전환됨에 따라, 연계 발생하는 문제(생리활성메카니즘 회복, 소화흡수 저해 및 맛역치값 등)를 해결할 수 있는 개발이 환자 및 의사 요구성이라 할 수 있음.
- 암환자는 기본적으로 의학적인 치료이외에 암환자를 대상으로 한 검증된 기능성바이오소재를 적용한 제품(가격은 식품으로 효능은 의약품)을 동시에 절실히 요구하고 있음.

- 현재 본 제안과 관련하여 효능이 입증 되어 의사처방이 가능한 암환자 제품은, 암환자 보조식품[인삼 및 홍삼류, 후코이단, 키토산 및 섬유소(녹즙 등)]과 한약제제 부분으로 대별되고 있음(치료효과 비표시).
- 따라서, 이들의 문제점 해결에 도움이 될 수 있도록 안전한 기능성 바이오 소재로 인정된 유제품내 암환자요구성에 부합되는 미개발 특수기능성 제품(소재적용) 개발과 동물 및 인체 임상검증을 거쳐 최종 임상처방제품의 개발을 실시하져 함.

다. 현재, 의사처방(암환자용 제제 및 제품 효능입증 전제)이 가능한 제품은_국내외적으로 없음에 따라 암환자는 자가 처방 및 자가 처방식에 의존하고 있는 실정이고, 국내도 동일(한약제제 제외)함[근거 : 국내외 특허조사결과(2010.09). 검색건수 : 한국(172건),일본(717건)기준.]

- 암환자는 단순히 영양성 및 흡수성(원료의 가수분해)만을 고려하여 제조된 완전균형영양 식품[식품공전(식약청), 9-5 특수의료용도등 식품. 2009]을 최후로 선택 및 이를 섭취하고 있는데, 약 420억 시장(성장률 19%)을 형성하고 있으며, 대표적인 기초원료는 유제품임 [350억('08년)->420억(' 09), 근거:2010년 매일유업 분석자료].

라. 세계 항암제시장은 503억달러('05)에서 2010년에는 853억달러 규모(근거:Cancer Market Trends 2006-2010, Urch Publishing Ltd. 2006.12.)이고 매년 11%이상이 증가하고 있는데, 국내시장은 3,489억원(' 05년)에서 2015년에는 약 1조시장 이상으로 역시 매년 11%이상 증가(수입판매 기인성)할 것으로 판단됨(Asian Cancer Market Regional Market analysis. Business Insights. 2006.12.).

마. 본 제안서와 가장 연관성이 있는 바이오의약품 중 단백질 의약품 분야가 가장 큰 시장을 차지할 것으로 전망되며, 특히 당사슬 리모델링을 통한 효능 및 안전성을 극대화 할 수 있는 Glycomics based drugs개발은 향후 세계 제약시장을 주도 할 것으로 기대함.

- '06년 기준 단백질 의약품의 세계 시장은 474억 달러의 규모이며, 개량형(글라이코믹스 기술포함)항체 분야가 265억 달러(전체의 56%)로 가장 큰 시장을 형성하고 있음.
- 2011년 단백질 의약품 시장은 557억 달러로 전망되고 있으며, 이중 개량형 항체 시장이 절반 이상을 차지하며 가장 큰 시장을 형성하며 호르몬 시장이 5.1%의 높은 성장률로 두각을 나타낼 것으로 전망됨.
- 최근 5년(2001~2005) 세계 재조합 단백질 의약품의 판매액 기준 상위 10위 제품들을 살펴볼 때 대부분이 당단백질로, 당단백질의 당사슬 구조 리모델링을 통하여 효능 및 안전성 극대화와 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 글라이코믹스 기술개발은 향후 바이오제품 개발의 성패를 좌우할 것임.

바. 따라서, 국내항암제 시장(수입판매 기인성 근거)을 살펴볼 때 만약 해외에서 본과제와 관

련한 제품이 개발 될 경우, 국내시장은 다국적 제약사에 의하여 선점 및 잠식될 것으로 판단되고, 이로 인한 경제적 손실은 수치화가 불가능 할 것으로 예측 됨.

2. 국내기술개발동향

가. 총체적 고민거리인 잉여 원유(최근 3년 년평균 재고량 : 10만톤)의 안정적인 소비방법을 확보(생산자 정부에 전적으로 대책 의존)에 있어 정부 또한 뚜렷한 대안(공급 및 가격관리, 유통 및 품질관리, 소비촉진과 신규 유제품개발으로 대별)이 없음. 이는 낙농 선진국들이라 하여도 동일한 고민거리임(일본 2010.06 탈지분유 재고량: 7만5천톤, 14,751엔/25Kg, 근거: 일본 유업저널 8월호).

나. 이는 결국 국내 낙농산업의 총체적인 피해로 연결되고 있어 첨단화(고부가가치화) 연구 개발 필요성에 대하여는 전체적인 공감대가 형성되어 있으나, 시장전망에 대한 불확실성으로 극소수 연구자만의 산업화가 배제된 잉여 우유유래 원부자재에 한정되는 소재 제조와 제품생산에 치중하고 있음.

다. 현재 우유소재 및 연구개발부분으로서, 산업화(대량소비)에 치중되는 기초소재에 주안점을 둔 단편적인 연구가 학교(학회)주관으로 수행되고 있으며, 인력공급의 핵심인 낙농 관련 대학/학과 등 관련분야의 축소 및 폐지 등으로 연구인력 인프라는 점차적으로 축소되고 있음.

라. 신소재 연구개발 및 산업화에 있어서, 제조시설은 기본 분유제조공정(집유->농축(탈지)->분말]이 필요하며, 소재별 구분에 따른 제조시는 추가적으로 별도 시설 및 자금이 막대히 소요되기 때문에 영세 제조업체가 이를 산업화 하기에는 곤란하며 설사 의지가 있다 하더라도 실천이 어려움.

마. 기존의 단편적인 연구개발과정을 탈피한 첨단화 소재개발로 가격 경쟁력 확보 및 소비시장의 확대, 고부가가치 제품으로서 응용 및 용도/용법 확대 필요성에 대하여는 절실히 공감하고 있음.

바. 최근 유제품 관련 연구경향은, 우유유래 소재의 효용가치와 첨단화 개발 요구성이 매우 높음에 따라 기능성(흡수증진형 등, 면역증강형 등)연구와 제품개발도 동일한 컨셉에 맞추어지고 있으며, 이는 보다 고차원의 요구를 받게 될 것임.

- 최근 우유유래 바이오활성물질 개발과 관련한 해외연구현황으로서, 아일랜드의 Food for Health Ireland사는 아일랜드의 주요유업체 4 곳(Carbery, Dairygold, Glanbia and the

Kerry)과 대학들간의 벽을 깨고 긴밀한 협조를 통하여 우유에 들어있는 생체활성 물질을 연구하고 상업화해서 세계의 건강문제에 대한 해답을 제시하는 목표를 갖고 있다고 발표하였음(근거 : <http://www.dairyreporter.com/Formulation/Food-for-Health-Ireland-turns-in-1st-birthday-milk-mining-report.2010.10.16>).

- 최근 유단백질(치즈 유청단백질)관련 이용성연구가 급증하고 있는데, *Journal of Dairy Science*에 게재된 한 연구결과서 유청단백질(치즈유래)이 원인이 밝혀지지 않고 있으며 서구에서는 흔한 다원성 만성염증성장질환에서 염증을 일으키는 요소들의 유전자 발현을 낮추고 설사나 혈변 같은 염증성장질환의 의학적 징후를 감소시키는 등, 염증성장질환 증상을 완화시켜 준다고 밝혀졌음. 관련물질로서 유청단백질내 아미노산 트레오닌과 시스테인이 대장암에 효과적일 수 있다는 가능성을 제기한 첫 번째 연구였음(근거 : <http://www.nutraingredients.com/Research/Cheese-whey-may-protect-against-IBD-Study>, 2010.12.09)
- 네슬레사는 향후 10년간 새로이 조직되는 Nestle Health Science의 연구에 5억 스위스 프랑을 투자해서 질병예방기능을 가진 우유유래식품을 개발할 계획이라고 발표하였는데, 이는 국내외적으로 우유관련 연구는 기초수준을 넘지 못하였다는 공통적인 인식을 배경으로 기술우위확보와 시장선점을 위한 장기전략전술을 구축하겠다는 의도로 판단됨. 네슬레사가 중점을 두고 있는 분야는 비만, 당뇨, 신경학적 이상, 노화 등이나 식품의 기능에 대한 규제가 그 어느 때 보다 강한 시기에 네슬레의 이러한 도전은 쉽지 않을 것으로 보임.

사. 따라서, 상기 국내외적 연구개발 방향과 본 제안서를 비교하면, 우유의 기능성 탐구를 넘어 특수기능성 소재개발과 암환자용이라는 용도용법부분까지 확대한 본 제안서건은 국제 경쟁력 확보라는 대응차원에서도 중요한 장기프로젝트라 할 수 있음.

3. 암환자식 관련 국내외 시장성

가. 세계시장

본 과제와 관련한 항균 및 항암면역증강용 제품은 출시된 제품은 전세계적으로 현재 없음. 최근 암환자식을 목표로 출시되었던 제품으로서, 프레지니우스-카비사(독일)의 “오메가-3 지방산 함유”의 기능성을 컨셉으로 제품을 국내외에 출시한 바 있으나, 암환자 맛역치값(이미, 이취 미해결로 인해 거의 사용되지 못하고 철수한 바 있으며, 국내외적 신규시장을 대상으로 치열한 연구개발 경쟁이 진행되고 있음. 따라서, 암환자용 소재개발이 얼마나 어려운지를 쉽게 생각할 수 있음.

나. 국내시장

- 현재 국내 암환자수는 70만명(암발생 생존자 수)이며, 지속적 연간 암환자 발생수치는

161,920('07)이고, 암사망자는 68,919명(' 08)으로 조사되었는데, 매년 암환자 증가추이는 11%이상인 것으로 조사되고 있음(국립 암센터 정보센터, 2009),

- 현재 국내 공통 암환자 발생 순위는 위암, 폐암, 간암, 자궁경부암 및 대장암(직장암) 순임. 남성의 경우는 위(26%), 폐(16%), 간(14%), 대장 및 직장(8%), 식도(3%), 방광(3%) 및 조혈기관 관련 암(3%)순이고, 여성은 자궁경부(23%), 위(16%), 유방(12%), 대장 및 직장(8%), 폐(6%),갑상선(5%) 및 간(5%)의 분포를 보이며, 이중 “대장 및 직장암(남여공통 8%의 점유율 기준)” 기인 환자발생은 약 13,000명, 사망자는 약 6천명으로 추정되며, 이상의 수치가 항상 유지되는 것으로 판단됨.

다. 연구종료에 따른 환자요구성(의사처방 포함)에 충족되는 결과가 도출시, “대장 및 직장암” 만의 관련 시장만으로도 120억/년(산출기준 참고), 전체 암환자 시장으로서는 약 1조 5천억이상의 신규시장이 창출될 것으로 추정(국외시장 평가가 불가)됨.

[산출기준: 환자식 경장영양식 시장(일반환자식->암환자식 적용 가정)]

1. 암환자식 연간 소요금액(1인 기준) : 1,640천원 ~ 2,460천원 (평균: 2,050천원)
 - 일반환자 경장영양식(완전균형영양식) 섭취기준 : 200ml/제품당(200Kcal)
 - . 소비자가(200ml/제품당) : 700원 ~ 1,000원 (평균 : 900원, 1ml=1Kcal)
 - 1일 소요금액(1인 기준) : 4,500원~6,750원(평균 : 5,600원)
2. 전체 암환자 대상 암환자식 신규 런칭시장(70만명, 100%) : 1조 5천억원
 - 70만명(암발생 생존자수) x 2,050천원/년(1인 소요금액)
 - 대장암 및 직장암 환자식 신규시장(점유율 8% 기준) : 120억원

라. 본 제안서와 관련한 연구자 및 연구단은 현재까지 없으며, 진행시 관련 경쟁국은 낙농선진국인 호주와 뉴질랜드, 미국, 덴마크 및 일본 순이 될 것임[근거 : 국가과학기술정보서비스(NTIS), 범부처 국가 R&D현황, 2001~2009].

4. 암환자식 개발용 소재개발관련

가. 우유단백질 가공기술(가수분해) 연구개발관련

(1) 우유단백질이 보유한 고유 고단백질 원료가 가진 기술적 장벽들을 극복이 필요함. 즉, 유단백질 함량이 85%이상을 보장하되 모두 신선우유로 변성방지가공을 거쳐서 만들어져야 하므로 고도의 가수분해 가공기술이 필요함(근거 : <http://www.nutraingredients.com/Industry/Ingredia-launches-milk-protein-and-hydrolysate-range>, 2010.10.10.).

(2) 가수분해물의 유동성을 높여 음료 텍스처에 영향 없이 단백질수치를 증가시켜 목적제품 개발에 잘 사용할 수 있어야함.

(3) 단백질 가수분해물의 특징인 쓴 맛을 해결하여야 하는데 이 또한 고도의 가수분해물 가

공기술이 필요로 하며, 제품적용 간 가수분해 수치를 높게 사용할 수 있게 하여야 함.

(4) 영양원으로 활용을 위한 기술개발이 필요한데, 이는 가수분해된 단백질이 가수분해되지 않은 단백질보다 더 소화가 잘 되고 영양원으로서 아미노산 흡수를 보장하여야 함.

나. 유청단백질의 국내외 이용성 연구경향

가. 유럽식품안전청(EFSA)은 최근 여러 개의 유청 관련 신청건을 거부했는데 그 이유는 유청 섭취와 포만감사이의 상관관계 체중증가억제 근육조직 성장 또는 유지 에너지를 제한하면서 날씬함을 유지하게 하는 것 등의 기능에서 그 인과관계가 성립되지 않는다는 것임. 그러나, 단백질로서는 근육조직 성장 또는 유지, 건강한 뼈유지 효과에 대한 인과관계를 인정하였음(근거 : [나. 이는 유청단백질 전체에 대한 이용성에 관한 문제이며, 기능성소재 등의 이용성에 대하여는 철저히 배제된 결과라고 할 수 있음. 따라서, 본 연구에서는 유청단백질중 기능성 원료로 인정받고 있는 GMP\(Glycomacropeptide\)소재만을 선택적으로 사용하여 상기 문제점을 근본적으로 해결할 것임.](http://www.foodmanufacture.co.uk/Ingredients/Whey-protein-health-claims>Hello-article-13.5(2010.10.22)).</p></div><div data-bbox=)

다. 유단백질 함유 기능성소재(Sialic acid)개발관련

가. 당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료능(therapeutic potency) 및 치료효과(therapeutic efficacy) 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는(Stronger dosing possible) 장점이 있음. 이에 당단백질 시장은 '05년 250억 달러에서 '09년 402억 달러의 규모로 증가되었는데 이는 지속적인 전망이 가능할 것으로 판단된 반면 비당단백질 시장은 동기간 130억 달러에서 176억 달러로 비교적 소폭 상승하는 경향을 보였음.

나. 본 제안서의 핵심소재인 Sialic acid의 국제 시장가격은 1,600만원/Kg을 호가하는 초고가이고 드물게 복합기능성 소재임에 따라 이용성이 높음. 그러나, 경제성 원리와 제조방법(합성, 미생물 유전자 재조합 생산)에 의하여 사용이 특정 의약품에 한정되어 왔음. 그리고, 대부분은 중국산(JK Bioteck사)이 대부분의 시장을 장악하고 있는 실정이고, 4톤 규모(2007)가 수입되고 있는 있으나, 본 과제와 관련하여 적용사례는 현재까지는 없음.

다. 따라서, 본 제안에서 해결하고 저 하는 무독성이면서, 안전성이 보장된 우유유래 Sialic acid제제의 개발(생산가 : 100만원이하 /1Kg예정)과 이의 제품적용성까지의 연계는 전체 시장에서 중요한 변수로 작용할 수 있음.

라. 미이용 자원인 유청내 다기능성을 보유하는 소재류는 단백질류, 미네랄류, 당단백질류, 탄수화물류 및 지방류 등으로 대변 할 수 있음.

(1) 유청내 함유되어 있는 기능성 소재의 구성은 다음과 같음.

(가) 단백질류 : 16 ~82%(가공방법 차이)

. Amino Acids

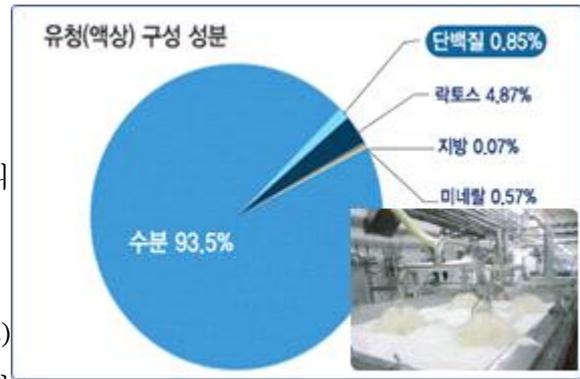
. Lactoferrin

. Immunoglobulin(면역항체, 총유청단백질의 10~15%) : IgA, IgD, IgE 및 IgM

. Beta-Lactoglobulin (“ 50%)

. Alpha-Lactalbumin(“ 20~25%)

Fig. 치즈제조후 미이용자원 유청액내 구성성분



. GMP(5% Sialic acid함유)

(나) 유지방 : 7%(99% TGA)

(다) 탄수화물(Lactose) : 50%

(라) 회분 : 10.8%(Ca: 5,000ppm, P : 4,000ppm, K:8,700ppm, Mg ; 766ppm, Fe:18ppm 등)

(2) 목표 소재별 기능성 평가

(가) 유청내 단백질류는 대부분 면역증강효과와 항균성(Lactoferrin, Sialic acid)을 보유하고 있는 기능성을 보유하고 있기 때문에, 항암관련 기능성 소재로서 개발가치가 충분함.

-현재, 유청단백질류의 기능성을 이용한 제품 적용성으로서는 일부 영 ■ 유아식품내 첨가물로 사용하는 수준이며, 의약품 수준의 소재로서 개발된 예는 없음.

(나)유지방류는 99%TGA성분으로 구성되어 있으므로 이를 이용하여 장력(전단력, HLB수치를 5이상)해체능(에스터 반응)시키는 기술을 접목하여 개발 항균소재와 병행 처리시, 위내에 존재하면서 위암 및 위염유발인자인 *H.pylori*균에 대한 제어 및 사멸이 가능한 기능성 바이오소재로서의 신규제품 개발이 가능함.

- 현재, 유지방류의 경우 버터 및 크림류로 제조되는 제품개발이외에 본 과제와 관련한 연구 및 제품화 관련 보고내용은 없음.

(다) 항암환자가 절대적으로 필요한 필수 미네랄을 유청단백질내 안정되게 유기태화 함으로서 무독성 및 고흡수능을 보장함으로서 미네랄 결핍예방용(천연물신약) 소재개발이 가능함.

- 현재, 제안건과 관련한 국내외적 기술개발 결과는 없음. 이를 위한 해결수단으로서, 유청액내 미네랄을 분리 및 농축(한외여과 시스템 적용)시킨 후, 유청에서 분리한 단백질내 킬레이팅화를 통한 PeptideOligo Saccharide TYPE형으로 제조함으로서 물리 및 이화학적 영향을 배제한 기능성 소재를 개발코 저 함.

(라) 본 과제는 항균 및 항암과 관련한 면역증강효과를 보유한 기능성 소재를 안전식품인 우유 유청내에서 분리 및 이들의 효능을 증강시키는 기술연구를 토대로 대량생산시스템을 정립함 동시에, 개발소재별 *in vitro* 및 동물시험과 인체임상 단계까지 일련의 검정을 통하여 항균 및 항암면역증강능을 보유한 기능성 바이오소재의 개발을 위함임.

(마) 최종적으로는 기능성 바이오소재를 천연물신약단계 까지 연계토록 제품화 할 것임에 따라, 식품의 영역외 천연물신약과 밀접한 효능을 갖는 기능성 소재 및 제품개발이 가능할 것임.

제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 개발소재의 기초자료조사

1. 국내외 관련 연구개발 경향 자료조사

가. 목적 : 합성 NANA시장형성(대표적 제조사 가격조사), 안전성 자료(MSDS 조사), 연구개발 현황(국내외 연구개발 및 특허자료 조사) 수집 및 비교 분석을 통하여 최종 유단백질 기원성 천연 NANA 개발 타당성 확보

나. 결과

(1) 국내외 R&D 및 시장분석

(가) 국가 농림수산물 R&D 당면과제(문제점)

- “지식기반형 일류 농림수산물육성 “으로 국가전략목표 수정

- ① 최근 10년, 과학기술혁신정책이 주요 선진국의 국정 어젠다로 부상
- ② 민간투자부분: R&D 투자가 산업경쟁력 강화의 핵심요소임에도 불구하고 농림수산물분야는 산업체의 R&D투자가 미흡
- ③ 기술 실용화부분: 기술이전 대상 민간기업 부족 등으로 개발된 기술의 실용화 및 산업화 미흡
- ④ 분산된 추진체계부분: 농림수산물 R&D의 개별적 추진체제로 인한 기관간 R&D 중복성 및 정책과의 연계성 미흡
- ⑤ R&D기획부분: 전문 R&D기획의 THINK Tank육성에 소홀
- ⑥ 연구인력양성 부분 : 농림수산물 R&D전문인력 육성체계 미흡
 - 농림수산물분야 연구인력 급진적 감소(%) : ‘85(10.4%)->’ 97(6.4%)-> ‘07(4.2%)
- ⑦ 지역 R&D 부분 : 지역박전을 위한 R&D활성화 전략 미흡
- ⑧ 국가 중점(7개분야) 기술개발 추진전략 대비 관련과제 연계분석(해당분야)

분야 (세부분야)	중점전략기술 (macro)	2008년 기술수준(%)	2013년 목표(%)	세부기술 (micro)	과제 관련성
4.유통분야 (전통식품· 한식세계화)	생물전환 및 발효기술	67	86	-생물전환기법에 의한 유용소재개발 -유용발효미생물 종균화 및 산업화 기술개발 -발효조절 및 제어기술개발	+++ +++ +++
4.유통분야 (식품가공·제 조)	저탄소 녹색식 품기술	62	83	-신 살균 가공기술 -녹색 첨단추출 및 최소가공 기술개발	+++ +++
	첨단 융복합식 품개발	59	82	-생리활성물질의 구조변형 및 가용화기술개발 -농식품 용도다양화 기술개발	+++ +++
	식품기능성 탐 색 및 발굴기 술	62	86	-식품첨가물 대체용 천연식품소재개발 -농식품자원의 영양 및 기능성 종합정보센터 및 라이브러리구축	+++ +++

	기능성 및 특 수목적 식품개 발기술	62	86	-친환경유기가공 및 식사대용초고압식품개발 -질병예방,항산화,노화방지 식품개발	+ +++
	식품신소재 개 발기술	65	84	-천연항균소재 및 천연첨가물 개발	+++
5.바이오 (식의약품 및 소재)	B T 용 합 기 술 산업화연구	64	80	-기능성 식음료 및 식품첨가 소재개발 -항생제 대체·면역증강제 및 항바이러스제개발	+++ +++
	기능성 신소재 개발	63	79	-식의약품 개발 -나노기술 응용소재 개발 -기능성 화장품 및 미용식품개발	+++ + +++
	수산(농축산)생 물 생명공학기 술	62	74	-기능성 활성물질 개발 -프로바이오틱스 개발 -어류(농축산)질병 예방백신 개발	+++ +++ +++

(참고: 제1차 농림수산식품과학기술 육성종합계획 수립을 위한 공청회자료, 농림수산식품부, 2009)

(나) 국내 유업계의 현황

- ① 선진 낙농국가의 원유 및 관련 유제품의 국내 가격경쟁력은 약 1/2~1/3수준임에 따라 농축산물 FTA와 시장개방에 속도에 따라 국내 낙농산업은 비례하여 피해(낙농분야 : 416~594억원)가 증가될 것임.
- ② 낙농제품 수출입 현황으로, '07년 무역적자는 약 2억\$[수출 :13천톤(42,241천\$), 총수입량 : 72천톤(233,951천\$)]에 달함.
- ③ 현재 국내 낙농업 현황으로서, 낙농산업 총생산액('07)은 1조 6천억원이고, 젖소사육두수는 점차 감소하고 있으나 규모화 및 젖소두당 산유량 증가로 원유와 더불어 분유류의 재고량이 동시에 급격히 증가되고 있음.
- ④ 현재 국내 낙농산업의 주요 이슈는, 총체적인 고민거리인 잉여 원유('07 기말재고량 : 141천톤)의 안정적인 소비방법을 확보하는 것인데, 생산자는 정부에 전적으로 대책을 의존하고 있으며, 정부 또한 뚜렷한 대안(공급 및 가격관리, 유통 및 품질관리, 소비촉진과 신규 유제품개발)이 없어 결국 낙농산업의 총체적인 피해로 연결되고 있음.

(다) 국내 유업관련 연구개발 현황

- ① 시장전망에 대한 불확실성으로 극소수 연구자만의 산업화가 배제된 단편적 연구 활동에 치중하고 있음. 또한, 인력공급의 핵심인, 낙농 관련 대학/학과 등 관련분야의 축소 및 폐지 등으로 연구인력 인프라는 점차적으로 축소되고 있음.
- ② 유단백질 유래 천연 NANA제제 개발관련 사례가 없으며, 이는 신소재 연구개발 및 산업화에 있어서, 제조시설은 기본 분유제조공정(집유->농축(탈지)->분말)이 필요하며, 소재별 구분에 따른 제조시는 추가적으로 별도 시설 및 자금이 막대히 소요되기 때문에

영세 제조업체가 이를 산업화 하기에는 곤란하기 때문에 설사 의지가 있다 하더라도 실천이 어려움으로 인한 것임.

- ③ 제조업체의 가격경쟁력 저하로 수입원료로 대체 등으로 전반적인 취약성이 증가일로에 있음.
- ④ 기존의 단편적인 연구개발과정을 통합연구개발시스템을 통한 첨단화 소재개발로 가격 경쟁력 확보 및 소비시장의 확대, 고부가가치 제품으로서 응용 및 용도/용법 확대에 필요성에 대하여 절실히 공감하고 있음.
- ⑤ 글라이코믹스 관련 기초 연구 및 이를 토대로 한 활용연구에 대한 중요성이 인식되면서, 전문 연구 집단 및 기업 수가 점차 증가하는 추세임, 그러나 국내 글라이코믹스 관련 연구는 선진국에 비해 단편적이고 비체계적이며, 정부의 지원 규모도 매우 미비한 실정임.
- ⑥ 현재 본 제안서와 유사한 연구는 일부 진행되고 있지만, 직접 관련된 국내외 연구 진행사항은 현재까지는 없음.

[근거 1 : 국가과학기술정보서비스(NTIS, 범부처 국가 R&D현황, 2001~2008), 근거 2 : 특허청 국내외 자료조사, 1999~2009.]

(라) 국외유업 관련 시장현황

- ① 바이오의약품 중 단백질 의약품 분야가 가장 큰 시장을 차지할 것으로 전망되며, 특히 당사슬 리모델링을 통한 효능 및 안전성을 극대화 할 수 있는 Glycomicsbased drugs 개발은 향후 세계 제약시장을 주도 할 것으로 기대함.
- ② '06년 기준 단백질 의약품의 세계 시장은 474억 달러의 규모이며, 개량형(글라이코믹스 기술을 포함) 항체 분야가 265억 달러(전체의 56%)로 가장 큰 시장을 형성하고 있음.
- ③ 2011년 단백질 의약품 시장은 557억 달러로 전망되고 있으며, 이중 개량형 항체 시장이 절반 이상을 차지하며 가장 큰 시장을 형성하며 호르몬 시장이 5.1%의 높은 성장률로 두각을 나타낼 것으로 전망됨.
- ④ 최근 5년(2001~2005) 세계 재조합 단백질 의약품의 판매액 기준 상위 10위 제품들을 살펴볼 때 대부분이 당단백질로, 당단백질의 당사슬 구조 리모델링을 통하여 효능 및 안전성 극대화와 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 글라이코믹스 기술개발은 향후 바이오제품 개발의 성패를 좌우할 것임.
- ⑤ 당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료능(therapeutic potency) 및 치료효과(therapeutic efficacy) 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는 (Stronger dosing possible) 장점이 있음. 이에 당단백질 시장은 '05년 250억 달러에서' 09년 402억 달러의 규모로 증가되었는데 이는 지속적인 전망이 가능할 것으로 판단된 반면 비당단백질 시장은 동기간 130억 달러에서 176억 달러로 비교적 소폭 상승하는 경향을 보였음.

(2) NANA의 국제시장 가격(2009.04 .09.기준)

(가) 현재 국제 시장가격은 다음과 같음.

구분	소비자 가격 (원/Kg,VAT 별도)	생산국(회사)	비고
합성NANA(10%)	2,600,000	중국(JK Bioteck사)	유기합성
합성NANA(98%)	8,000,000	중국(JK Bioteck사)	유기합성
합성NANA(99%)	10,000,000	일본(MARUKIN)	유기합성
합성NANA(98%)	4,500,000	뉴질랜드산	chitin Base합성
천연NANA(과제종료시예상가)	500,000	연구종결시	천연유단백질 분리

(나) 산업화 적용에 있어 대부분 의료용 소재로 활용(이유 : 합성제품)되고 있으며, 식품산업은 적용예가 없음(이유 : 천연제제의 개발품 부존재로 안전성 확보 필요, 경제성 부적합).

(3) 상용 합성 NANA 국제안전규격(MSDS)조사(상기 일본 및 중국 제조사 기준 작성)

M A T E R I A L S A F E T Y D A T A S H E E T

SECTION 1. CHEMICAL IDENTIFICATION

CATALOG #: A8001.

NAME: SIALIC ACID

SYNONYMS: SA, N-ACETYLNEURAMINIC ACID, NANA

5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactonulosonic acid

SECTION 2. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

CAS #: 131-48-6

MF: C11H19NO9

EC NO: 205-023-1

SECTION 3. HAZARDS IDENTIFICATION

HYGROSCOPIC. POTENTIAL HEALTH EFFECTS THE TOXICOLOGICAL PROPERTIES OF THIS MATERIAL HAVE NOT BEEN INVESTIGATED. USE APPROPRIATE PROCEDURES TO PREVENT OPPORTUNITIES FOR DIRECT CONTACT WITH THE SKIN OR EYES AND TO PREVENT INHALATION.

SECTION 4. FIRST-AID MEASURES

IN CASE OF CONTACT, IMMEDIATELY FLUSH EYES WITH COPIOUS AMOUNTS OF

WATER FOR AT LEAST 15 MINUTES. IN CASE OF CONTACT, IMMEDIATELY WASH SKIN WITH SOAP AND COPIOUS AMOUNTS OF WATER. IF INHALED, REMOVE TO FRESH AIR. IF NOT BREATHING GIVE ARTIFICIAL RESPIRATION. IF BREATHING IS DIFFICULT, GIVE OXYGEN. IF SWALLOWED, WASH OUT MOUTH WITH WATER PROVIDED PERSON IS CONSCIOUS. CALL A PHYSICIAN. WASH CONTAMINATED CLOTHING BEFORE REUSE.

SECTION 5. FIRE FIGHTING MEASURES

EXTINGUISHING MEDIA WATER SPRAY. CARBON DIOXIDE, DRY CHEMICAL POWDER OR APPROPRIATE FOAM. SPECIAL FIREFIGHTING PROCEDURES WEAR SELF-CONTAINED BREATHING APPARATUS AND PROTECTIVE CLOTHING TO PREVENT CONTACT WITH SKIN AND EYES. UNUSUAL FIRE AND EXPLOSIONS HAZARDS EMITS TOXIC FUMES UNDER FIRE CONDITIONS.

SECTION 6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

WEAR RESPIRATOR, CHEMICAL SAFETY GOGGLES, RUBBER BOOTS AND HEAVY RUBBER GLOVES. SWEEP UP, PLACE IN A BAG AND HOLD FOR WASTE DISPOSAL. AVOID RAISING DUST. VENTILATE AREA AND WASH SPILL SITE AFTER MATERIAL PICKUP IS COMPLETE.

SECTION 7. HANDLING AND STORAGE

REFER TO SECTION 8.

SECTION 8. EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

CHEMICAL SAFETY GOGGLES. COMPATIBLE CHEMICAL-RESISTANT GLOVES. NIOSH/MSHA-APPROVED RESPIRATOR. SAFETY SHOWER AND EYE BATH. MECHANICAL EXHAUST REQUIRED. AVOID INHALATION. AVOID CONTACT WITH EYES, SKIN AND CLOTHING. AVOID PROLONGED OR REPEATED EXPOSURE. WASH THOROUGHLY AFTER HANDLING. KEEP TIGHTLY CLOSED AND FREEZE.

SECTION 9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

APPEARANCE AND ODOR. WHITE TO OFF-WHITE POWDER. PHYSICAL PROPERTIES
MELTING POINT: 184 C TO 186 C (DEC).

SECTION 10. STABILITY AND REACTIVITY

CHEMICAL STABILITY: STABLE UNDER NORMAL TEMPERATURES AND PRESSURES.
CONDITIONS TO AVOID: STRONG OXIDANTS.

INCOMPATIBILITIES WITH OTHER MATERIALS: NOT AVAILABLE.

HAZARDOUS DECOMPOSITION PRODUCTS: IRRITATING AND TOXIC FUMES AND GASES.

HAZARDOUS POLYMERIZATION: HAS NOT BEEN REPORTED.

SECTION 11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

ACUTE EFFECTS

MAY BE HARMFUL BY INHALATION, INGESTION, OR SKIN ABSORPTION.

MAY CAUSE EYE IRRITATION. MAY CAUSE SKIN IRRITATION. TO THE BEST OF OUR KNOWLEDGE, THE CHEMICAL, PHYSICAL, AND TOXICOLOGICAL PROPERTIES HAVE NOT BEEN THOROUGHLY INVESTIGATED.

SECTION 12. ECOLOGICAL INFORMATION

DATA NOT YET AVAILABLE.

SECTION 13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

DISSOLVE OR MIX THE MATERIAL WITH A COMBUSTIBLE SOLVENT AND BURN IN A CHEMICAL INCINERATOR EQUIPPED WITH AN AFTERBURNER AND SCRUBBER. OBSERVE ALL FEDERAL, STATE AND LOCAL ENVIRONMENTAL REGULATIONS.

제 2절 개발소재(G-NANA 및 유기태 미네랄) 대량 생산법 개발

1. G-NANA 생산효소 생산시스템 정립

가. 기초 Neuraminidase 및 G-NANA 대량생산 시스템 정립 (실험실적 기초조건 정립)

(1) 연구목적

본 연구에서는 1) GMP에 작용하여 NANA를 생산할 수 있는 neuraminidase 생산용 선발 공시균(*A. ureafaciens*)의 활성배지 및 배양조건 평가와 2) 선발공시균으로부터 neuraminidase를 분리하여 반응특성을 연구하고, 3) 이 효소제를 이용하여 GMP로부터 NANA를 상업적으로 생산하기 위한 기초연구를 수행과 더불어 4) 생산된 효소를 이용하여 최종 NANA생산을 위한 표준제조법을 정립 하고자 하였다. 본 연구는 매일유업(주)의 기초연구결과를 이전받아 (농기평 보고 완료) 이를 본 연구간 산업화에 적합하도록 실용화 기준으로 실시하였다.

(2) 연구수행방법

(가) 선발 *A. ureafaciens* 최적 활성조건 평가

Neuraminidase를 생산하는데 필요한 균주 *Arthrobacter ureafaciens*(KCTC 3387)는 한국 생명공학연구원(KCTC)에서 분양을 받아 사용하였으며, 배양에 사용된 배지는 Luria-Bertani(LB) Broth(Difco, USA)를 사용하였다.

대조구는 LB broth 10ml만 첨가하였고 비교균은 LB broth 9ml와 OD 0.2(600nm)인 *Arthrobacter ureafaciens*(KCTC 3387) 1ml을 첨가하여 25°C 에서 호기성 배양하였으며 균 접촉 0시간, 6시간, 18시간 후에 각각 OD(600nm)값을 측정하였다.

(나) Neuraminidase 활성 측정

Neuraminidase의 활성 측정은 효소와 기질의 반응 후 생성된 NANA의 함량을 Warren의 TBA 방법을 이용해 측정하였다. Neuraminidase 1unit(U)은 1분 동안 1 μ mole의 NANA를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 0.1M sodium acetate (pH 5.0) 완충용액에 녹인 2% GMP 0.5ml 기질과 0.5ml 효소 용액을 섞은 후, 10분 동안 반응시킨 후 200 μ l TBA solution I 용액을 첨가하여 반응을 종료 시켰다. 이 용액 600 μ l를 시험관으로 옮기고 25분 반응시키고, 그 뒤의 과정은 TBA법을 이용한 분해된 NANA 함량 측정 실험 방법과 동일하였다.

(다) Neuraminidase의 분리 정제

① *A. ureafaciens*의 배양

Neuraminidase 생산을 위한 *A. ureafaciens*의 배양은 표 1의 M-9 GMP배지를 이용하여 선행시험을 거쳐 최적 활성을 보였던 25°C 에서 36시간 배양 하였고, 균체배양액을 원심분리하여 배양 상등액만을 회수하여 neuraminidase분리에 사용하였다.

② 한외여과 (Ultrafiltration, UF)

한외여과법을 이용하여 배양상등액을 농축한 후에 10mM sodium phosphate (pH 6.0) 완충용액을 이용해 완충용액을 교환을 하였다. Ion exchange chromatography 후에는 한외여과 후 50mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액을 이용하여 완충용액을 교환하였다.

③ DEAE-cellulose ion exchange chromatography

DEAE-cellulose(Sigma)를 활성화시킨 후 10mM sodium phosphate 완충용액(pH6.0)으로 평형화 시켰다. 여기에 UF로 농축한 시료를 loading 하고 동일한 완충용액으로 세척한 후 0~0.5M NaCl linear gradient를 이용해 용출하였다. 유속은 1ml/min으로 하였고, 한 분획 당 5ml씩 받았으며 모두 4℃에 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

④ Sephacryl S-300 HR gel filtration

DEAE-cellulose ion exchange chromatography에서 모은 neuraminidase활성 분획을 Sephacryl S-300 HR(GE Healthcare)를 150mM NaCl이 첨가된 50mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)을 이용하여 평형화시킨 gel을 이용해 gel filtration을 수행하였다. 유속은 1.1ml/min으로 하였고, 각 분획의 단백질함량은 280nm에서 흡광도를 측정하여 표시했다. 한 분획 당 5ml씩 총 80개의 분획을 얻었고, 모두 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

(라) 단백질 정량

단백질 농도는 Bradford 방법을 이용하여 정량하였다. Bovine serum albumin을 표준 단백질로 이용하였고, protein assay kit (Bio-Rad)를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였다.

(마) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

단백질의 SDS-PAGE는 Laemmli 방법에 따라 Mini-PROTEAN[®] 3 system(Bio-Rad)을 사용하여 수행하였다.

10% Polyacrylamide gel에서 1시간 30분 동안 100V에서 전기영동한 후 Coomassie Brilliant Blue 염색시약으로 단백질 band를 확인하였다. 단백질 크기는 Prestained Protein Ladder(Fermentas)를 이용하여 상대적 분자량을 결정하였다.

(바) Neuraminidase의 최적 pH와 최적 온도 실험

pH에 따른 효소활성을 측정하기 위해 pH 4.0~6.0범위는 100mM sodium acetate 완충용액, pH 5.0~8.0 범위는 100mM sodium phosphate 완충용액을 사용하여 측정하였다. 온도에 따른 효소활성 측정은 30℃~60℃까지 10℃ 간격으로 측정하였으며, 최대활성을 좀 더 정확히 확인하기 위해 53℃, 55℃에서도 효소활성을 측정하였다.

(사) Neuraminidase의 pH와 온도 안정성 조사

pH에 따른 효소의 안정성의 측정하기 위해 pH 3.0~6.0범위는 10mM sodium acetate 완

충용액, pH 5.0~9.0 범위는 10mM sodium phosphate 완충용액에서 효소를 4°C에서 1시간 동안 방치 후, pH 5.0에서 효소의 잔존활성을 측정하였다. 온도에 따른 효소의 안정성은 효소를 4°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C에서 1시간 방치 후 다시 4°C에서 10분 방치한 다음 잔존활성을 측정하였다.

(아) GMP에 포함된 총 NANA의 함량 측정

Svennerholm resorcinol method를 이용하여 GMP에 포함된 total NANA량을 정량하였다.

Solution I 과 II는 모두 10X stock 상태로 만들어 어둡게 -20°C에 보관해 두면서, 사용시 1X로 만들어 사용하였고, GMP는 1%가 되도록 3차 증류수에 녹여 사용하였다. 1% GMP시료 0.5ml에 Solution I을 0.1ml 넣고 ice bath에서 20분 반응 후, 1.25ml의 Solution II를 넣고 5분 동안 ice bath에 방치한 다음 100°C에서 15min간 가열하여 반응시켰다. 이 반응액을 수돗물에 넣어 식힌 다음 1.25ml의 Solution III를 넣어 37°C에서 3분간 반응시킨 후 상온에서 식힌 다음 630nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 NANA를 사용하여 0.025mM ~ 0.4mM 농도 범위에서 위와 동일한 방법으로 표준곡선을 작성 한 후, 이 표준곡선으로부터 시료의 총 NANA함량을 계산하였다.

Solution I : 0.04M periodic acid

Solution II: 0.6g resorcinol (Fisher certified) in 28% HCl 60ml을 25µmoles CuSO₄를 40ml을 증류수에 녹여, 섞은 후 사용

Solution III: 95% tert-butyl alcohol

(자) Neuraminidase를 이용한 GMP로부터 NANA 생산

GMP를 생산하기 위한 원료인 유청제조 방법 관련하여 치즈부산물부터 제조되는 공정은 그림과 같다.

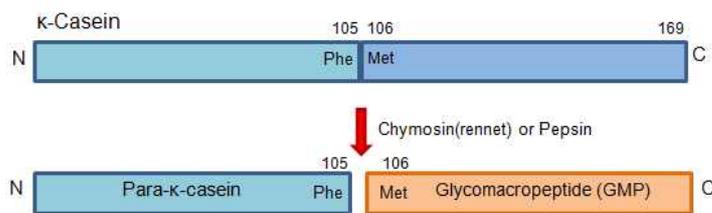


그림. Chymosin 또는 pepsin으로 잘려진 k-Casein으로부터 GMP 생산(조 등, 2011)

NANA 생산 및 Neuraminidase생산용 기질로 사용하기 위한 원료 GMP는 치즈 제조후 부산물인 유청액으로부터 제조된 것으로서 480Kg를 (주)트라이콤무역(한국)으로부터 구입하여 전체 연구간 사용하였다. 개발효소를 적용한 NANA생산공정 관련 단계별 진행내역은 다음과 같다.

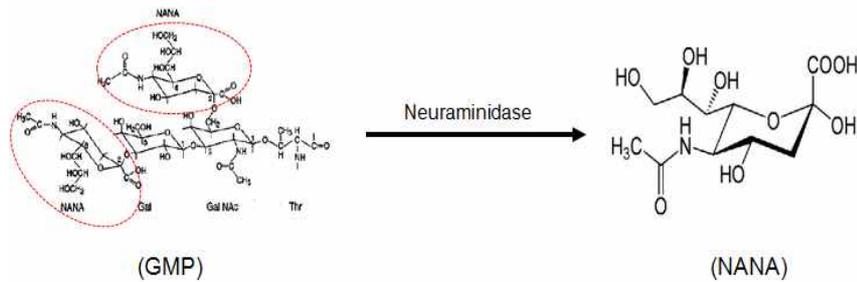


그림. Neuraminidase(효소)에 의한 GMP로부터 NANA생산(조등, 2011)

Neuraminidase를 이용한 기질 GMP로부터 NANA 생산은 정립된 G-NANA 표준제조법을 적용하여 실시하였으며, GMP로부터 G-NANA의 생산성을 증가시키기 위해 용매인 EtOH 농도조절을 통한 제조법 정립을 위하여 총 6단계 과정으로 수행하였다.

1 단계로서, GMP 70g을 분취한 후 여기에 1차 정제수를 1Kg 되게 mass-up 되게 투입 후 기질 GMP를 용해 시킨 후, Formic Acid 시약을 첨가하면서 pH를 5로 조절하였다.

2 단계로, 온도를 42°C 까지 승온 시킨 후 효소(Neuramidase)를 기질대비 1%인 0.7g을 넣고 효소반응을 5시간 진행하였다.

3 단계로는, 2단계 반응이 종결되면 30분간 57°C 에서 실활 시키고 20분간 Centrifuge (4000 RPM, 20min, 25°C)를 통해 침전물(G-NANA 이외 불용성 단백질)과 상등액(G-NANA)으로 각각 분리하였으며, 이중 상등액 분리물은 별도로 보관하였다. 이중 침전물에 대하여는 당초 투입된 기질인 GMP 대비 분획수율을 확인을 위하여 건조과정을 실시하였다.

4 단계는, 2 단계에서 분리된 침전물만을 반응기에 투입하고 80% EtOH 희석액을 반응물 대비 3배수가 되도록 첨가한 후 교반과정을 통하여 잔류하고 있는 NANA를 원심분리 과정을 통하여 세척분리 하였다.

5 단계는, 3단계 및 4단계에서 분리된 각각의 상등액을 혼합한 후, 이를 농축과정을 통하여 25%(Brix 기준)되게 농축과 분리용매인 EtOH제거를 동시에 진행하였다.

6 단계는, 5단계 반응이 종료되면 동결과정을 수행하여 최종 G-NANA제조를 완료하였다.

(차) HPLC를 이용한 NANA의 정량

분석을 위해 사용한 기기는 HPLC (high performance liquid chromatography)로 사용한 컬럼은 BIO RAD(US)사의 HPLC Organic Acid Analysis Column(300x7.8mm, 컬럼온도:40°C)을 그리고 Mobile Phase 조성액으로서는 10mM H₂SO₄을 제조 활용하였다. 생산된 표준제조법별 G-NANA 생산단계별 분취 및 건조시료(침전물, 상등액)별 NANA함유량 분석을 위한 대조시료로 합성 NANA(sigma)를 사용하였다.

(3) 연구수행결과

(가) 선발 *A. ureafaciens* 최적 활성조건 평가

*Arthrobacter ureafaciens*를 비첨가한 대조구의 증가율은 없었고, 균을 첨가한 비교균은

18시간을 기준으로 하였을 때 0시간보다 균의 생장률이 약80% 증가한 것으로 나타났다. 결론으로서, NANA생산에 필요한 효소생산 정립에서 효소를 생산하는 *Arthrobacter ureafaciens*의 활성은 25°C 호기적 조건에서 뛰어나다고 판단되었다.

표. M-9 GMP배지의 구성성분

Strain	Medium	Composition(g/ l)	
		GMP	15
<i>A.ureafaciens</i>	M-9 GMP (pH 7.0)	Di-sodium phosphate	6
		Mono-potassium phosphate	3
		Sodium chloride	0.5
		Ammonium chloride	1
		Mgnesium sulfate	0.5
		Calcium chloride	0.01

표. 25°C 호기성 조건에서 시간경과별 *Arthrobacter ureafaciens*의 활성조사

시험구		OD			증가율(%)
		0시간	6시간	18시간	
대조구(CNTL)		0.048	0.046	0.049	2.04
비교군	1	0.064	0.085	0.309	79.3
	2	0.063	0.091	0.282	77.7
	3	0.063	0.093	0.299	78.9

- 조성 : CNTL(LB broth), 비교군(LB broth + *A.ureafaciens*)
- 온도 : 25°C, 호기조건
- OD : 600nm
- 3반복으로 2번씩 측정하여 평균값으로 구함
- 증가율 : 18시간 기준

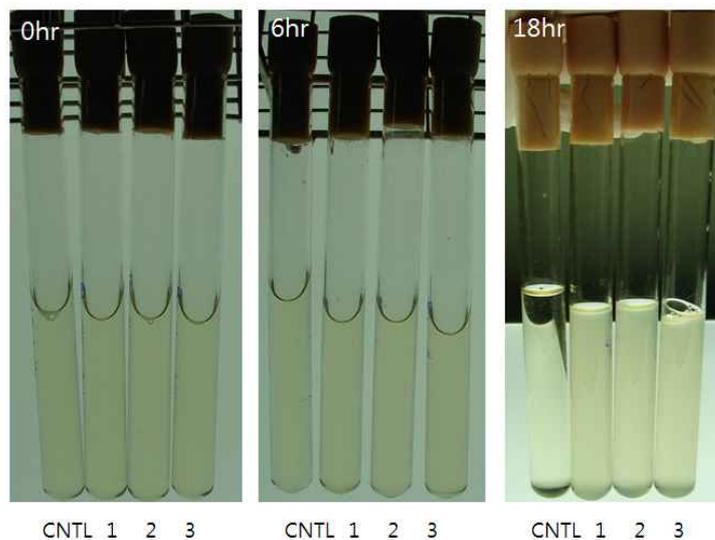


그림. 25°C 호기성 조건에서 시간경과별 *Arthrobacter ureafaciens*의 활성조사

- 조성 : CNTL(LB broth), 비교군(LB broth + *A.ureafaciens*)
- 온도 : 25°C, 호기조건
- OD : 600nm

(나) *A. ureafaciens*로부터 neuraminidase의 생산

*A. ureafaciens*에서 neuraminidase의 생산조건을 찾기 위해, M-9 minimal medium에 유일한 탄소원으로 0.5, 1, 1.5, 2%의 GMP를 첨가하거나 glucose를 2.5% 넣어 준 후 배양 시간에 따라서 배양 상등액의 효소 활성을 측정하였다. 유일한 탄소원으로 2.5% glucose만 첨가한 경우와 1% GMP와 2.5% glucose가 함유된 배지에서는 neuraminidase 활성이 전혀 측정되지 않았다. 유일한 탄소원으로 GMP를 첨가하는 경우 효소활성이 측정되었으며 모두 36시간 배양 시 최고 활성을 나타내었다. 1.5% GMP 농도에서 최대 0.19U/ml의 효소활성을 보였으며 그 이상의 GMP 농도에서는 효소활성이 더 이상 증가되지 않았다.

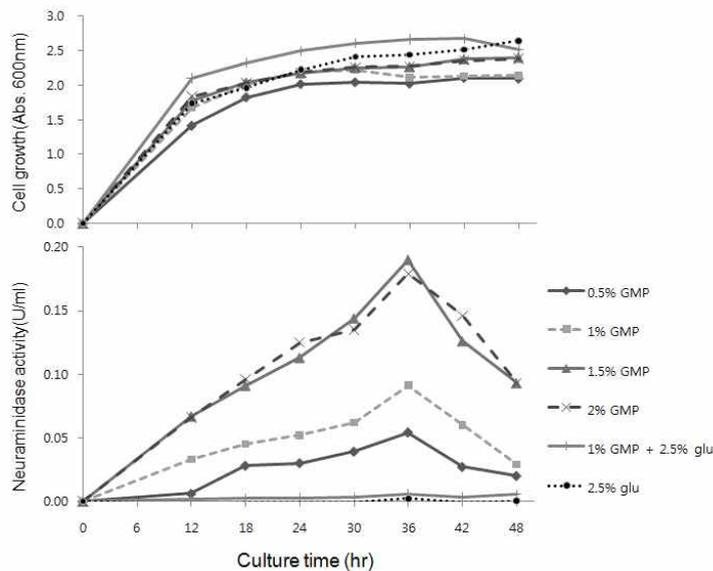


그림. GMP+glucose 또는 GMP를 포함하는 M-9 최소배지에서 *A.ureafaciens*로부터 neuraminidase의 생산

(다) Neuraminidase의 정제

Neuraminidase를 정제하기 위해서 1.5% 농도의 GMP를 첨가한 배지에서 36시간 배양한 후 원심분리하여 배양 상등액을 회수하였다. Molecular cut-off 10kDa 여과막이 장착된 UF 장치를 이용하여 배양상등액을 18.5배 농축하고 10mM sodium phosphate 완충용액(pH6.0)으로 완충용액을 교환한 후 ion exchange chromatography를 수행하였고, 활성분획을 molecular cut-off 30kDa 여과막이 장착된 UF 장치로 농축하고 50mM sodium phosphate 완충용액(pH7.0)으로 완충용액을 교환한 후 gel filtration 하는 방법으로 분리 정제하였다.

① DEAE-cellulose ion exchange chromatography

배양 상등액을 UF를 이용하여 농축하고 diafiltration한 후 ion-exchange

chromatography를 수행하였다. 일부 단백질이 loading 과정에서 빠져나왔으나 neuraminidase활성은 나타나지 않았고, 대부분의 단백질이 NaCl gradient 용출과정에서 빠져나오는 것을 확인할 수 있었다. Neuraminidase는 약 0.1M NaCl 농도에서 빠져나오는 것을 확인할 수 있었다. DEAE-cellulose ion exchange chromatography 결과 neuraminidase의 활성분획은 specific activity가 배양 상등액 0.6U/mg에서 59.3배 증가된 35.6U/mg이었고 회수율은 90.5%였다.

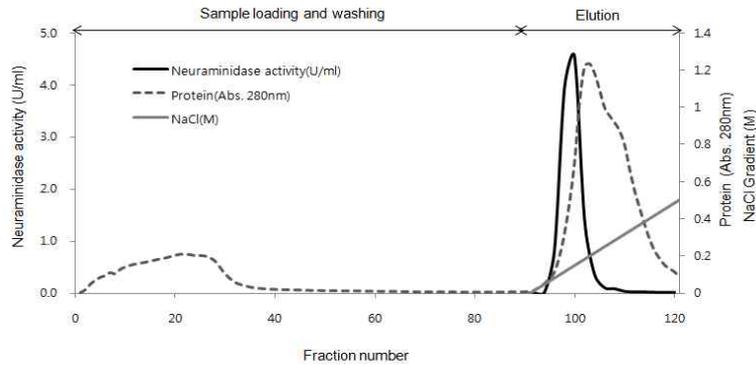


그림. DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피

배양상층액 760ml은 한외여과(molecular cut-off, 10kDa)로부터 모이고, 10mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)으로 정용여과되어 씻겨져서 모이게 된다. DEAE-cellulose column에 놓여진 농축된 효소용액은 10mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)와 평형을 유지한다. Neuraminidase는 0M~0.5M buffer와 같은 NaCl의 직선 gradient로부터 분리된다.

② Sephacryl S-300 HR gel filtration

Ion exchange chromatography에서 neuraminidase 활성을 가지는 분획을 모아 한외여과법(molecular cut-off 30kDa)으로 농축하고 50mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 완충용액을 교환한 후 gel filtration을 수행하였다. Gel filtration에서 단백질은 주로 27번~37번 분획에서 용출되었고, neuraminidase는 단백질이 빠져나오기 시작하는 27번~31번 분획에서 대부분이 용출되었다. Gel filtration에서 분리된 neuraminidase는 27번 분획에서 specific activity가 124.6U/mg으로 가장 높았으며 fraction number가 증가할수록 점점 떨어지는 경향을 보였다.

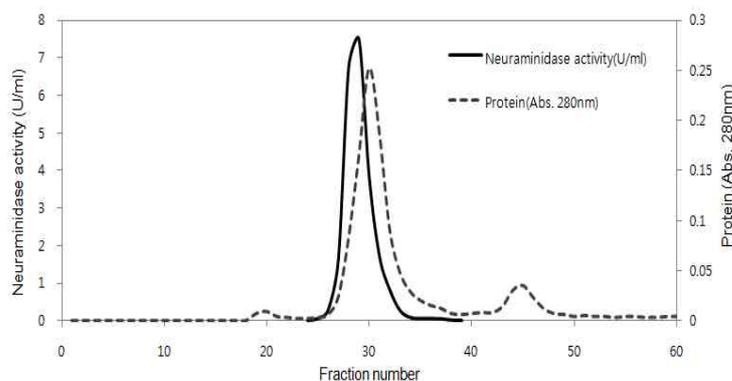


그림. Sephacryl S-300 HR gel filtration

DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피의 활성부분(fraction number 96-108)은 한외여과로부터 농축되고 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)으로 정용여과되어 씻겨져서 농축된다. 농축된 효소용액(5ml)은 Sephacryl S-300 HR gel filtration column (60cm×16mm)에 놓여지게 된다.

③ Neuraminidase 정제과정 요약 및 SDS-PAGE 분석

배양상등액의 specific activity는 0.6U/mg이었으나 분리정제과정을 거치면서 specific activity가 증가되어 gel filtration의 27번 분획에서는 124.6U/mg으로 207.7배 순도가 증가되었다. 또한 gel filtration 27번 분획은 SDS-PAGE 결과 거의 단일 밴드를 보여 분자량 88kDa의 neuraminidase가 고도로 순수분리된 것을 알 수 있었다. 또한 gel filtration 분획 28번과 29번도 각각 85.9U/mg, 86.9U/mg의 specific activity를 보여 상당히 정제된 것을 알 수 있었다. 그러나 30번 분획 이상의 것은 앞의 단계인 DEAE-cellulose ion exchange chromatography에서 정제된 시료에 비해서 오히려 순도가 떨어졌다. 이러한 분석 결과는 SDS-PAGE 분석결과와도 일치하였다.

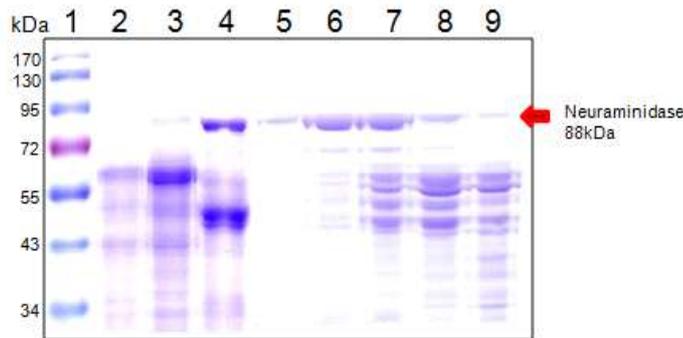


그림. 정제단계에서 Neuraminidase fraction의 SDS-PAGE

Lane 1: size marker proteins, lane 2: 배양상등액, lane 3: UF (melecular cut off, 10kDa), lane 4: DEAE-Cellulose 이온교환 크로마토그래피와 UF(melecular cut-off, 30kDa), lane 5~9 : gel 여과 부분 (각각의 fraction number 27, 28, 29, 30, 31)

표. *A.ureafaciens*로부터 neuraminidase 생산을 위한 정제단계 요약

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Sp. Activity (U/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
Culture supernatant	260	143.6	0.6	1	100
Ultrafiltration (cut-off, 10kDa)	23.1	133.6	5.8	9.7	93
DEAE-cellulose	3.7	130	35.6	59.3	90.5
Ultrafiltration (cut-off, 30kDa)	2.4	118.8	50.6	84.3	82.7
Sephacryl S-300 HR gel filtration					
GF27	0.1	8.1	124.6	207.7	5.6
GF28	0.4	33.5	85.9	143.2	23.3
GF29	0.4	37.4	86.9	144.8	26
GF30	0.8	19.2	22.8	38	13.3
GF31	0.5	8.4	16.6	27.7	5.9

(라) 정제 neuraminidase의 특성

앞에서 gel filtration으로 정제한 27번 분획을 이용하여, 효소의 pH와 온도에 따른 활성과 안정성을 조사하였다.

Neuraminidase의 최적 pH는 5.0이었으며 pH 4.0~9.0 사이에서는 80%이상의 잔존 활성을 보여 비교적 안정한 것으로 나타나 비교적 넓은 pH 안전성을 보였다. Neuraminidase의 최적 활성은 55°C에서 나타났다. 그러나 40°C 이후에는 온도 안정성이 떨어져 50°C 이상에서는 급격히 실활되는 결과를 보였다. 이러한 결과로 볼 때 neuraminidase의 온도안정성을 고려하여 반응 최적온도는 40°C가 좋은 것으로 판단되었다.

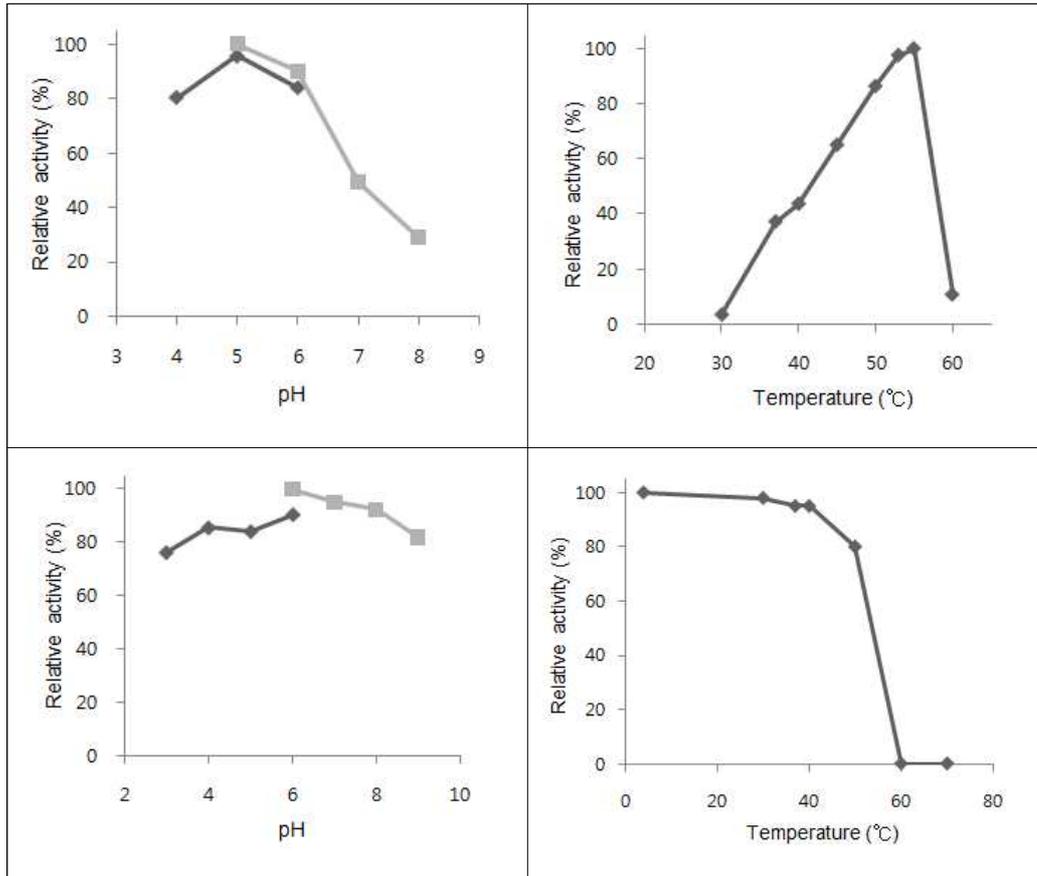


그림. *A.ureafaciens*로부터 정제된 neuraminidase의 안정성과 활성 온도와 pH의 영향

① Neuraminidase 활성pH의 영향

Neuraminidase는 100mM acetate buffer pH 4.0-6.0 (◆)와 100mM phosphate buffer pH5.0-8.0 (■)를 사용하여 10분간 배양했다.

② Neuraminidase의 활성온도의 영향

Neuraminidase는 10분동안 30, 37, 40, 45, 50, 53, 55, 60°C에서 배양하였다.

③ Neuraminidase의 안정성에서 pH의 영향

Neuraminidase는 1시간동안 4°C에서 pH 3.0-6.0 10mM acetate buffer(◆)와 pH 6.0-9.0 10mM phosphate buffer(■)에서 미리 배양하였고 그런다음 잔여효소활성을 측정하였다.

④ Neuraminidase의 열안정성

미리 배양한 neuraminidase는 4°C에서 1시간동안 각각의 온도에서 배양되었다. 그런다음 10분동

안 잔여효소활성이 측정되었다.

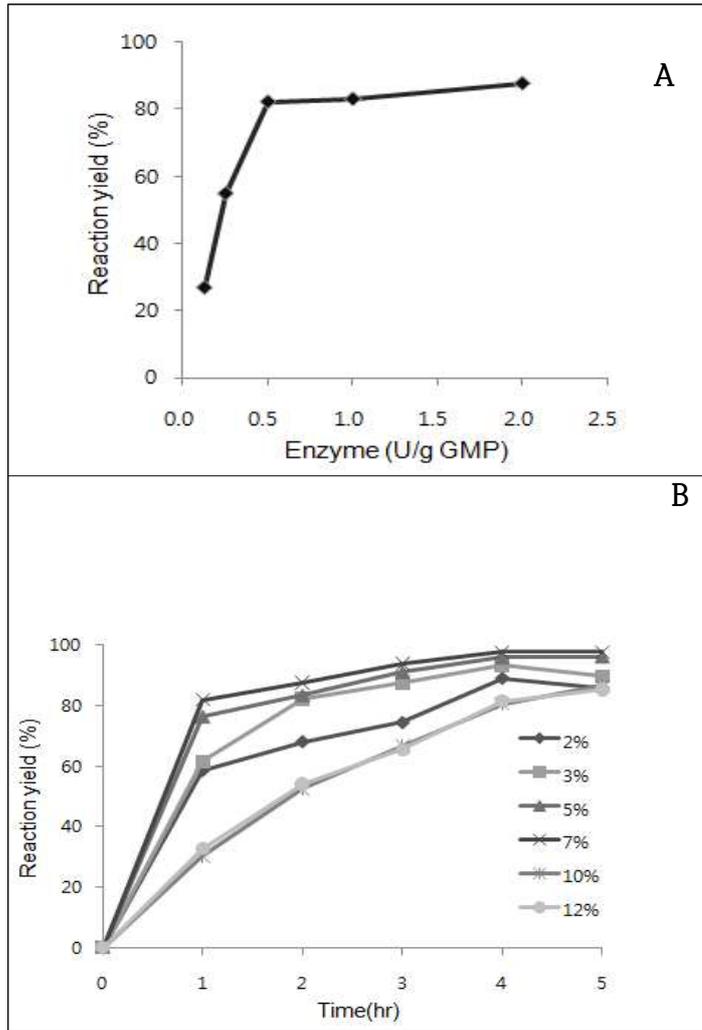


그림. 선발 공시균 *A. ureafaciens*로부터 제조한 효소(Neuraminidase)를 이용한 목표 G-NANA제도시 효소반응시간에 따른 NANA생성량 변화(pH 5.0)

A. 기질 GMP 1g당 개발 효소의 역가치[(반응조건: 기질 희석농도 5% GMP, 완충용액조건 : 100mM sodium acetate buffer(pH 5.0), 37°C, 4hr, enzyme 첨가량 : 0.125U, 0.25U, 0.5U, 1U or 2U)

B. 기질 GMP농도구배에 따른 NANA 생산효율 평가

(마) GMP로부터 NANA 제조 관련 표준제조법 정립 결과

GMP로부터 목표 G-NANA의 생산을 위하여 핵심 기술인 개발효소(Neuraminidase) 반응 후 80% EtOH 분리법을 적용한 표준제조법을 적용하여 생산된 G-NANA의 생산효율은 30%였으며, 이때 NANA함량이 29.5%로 나타났다.

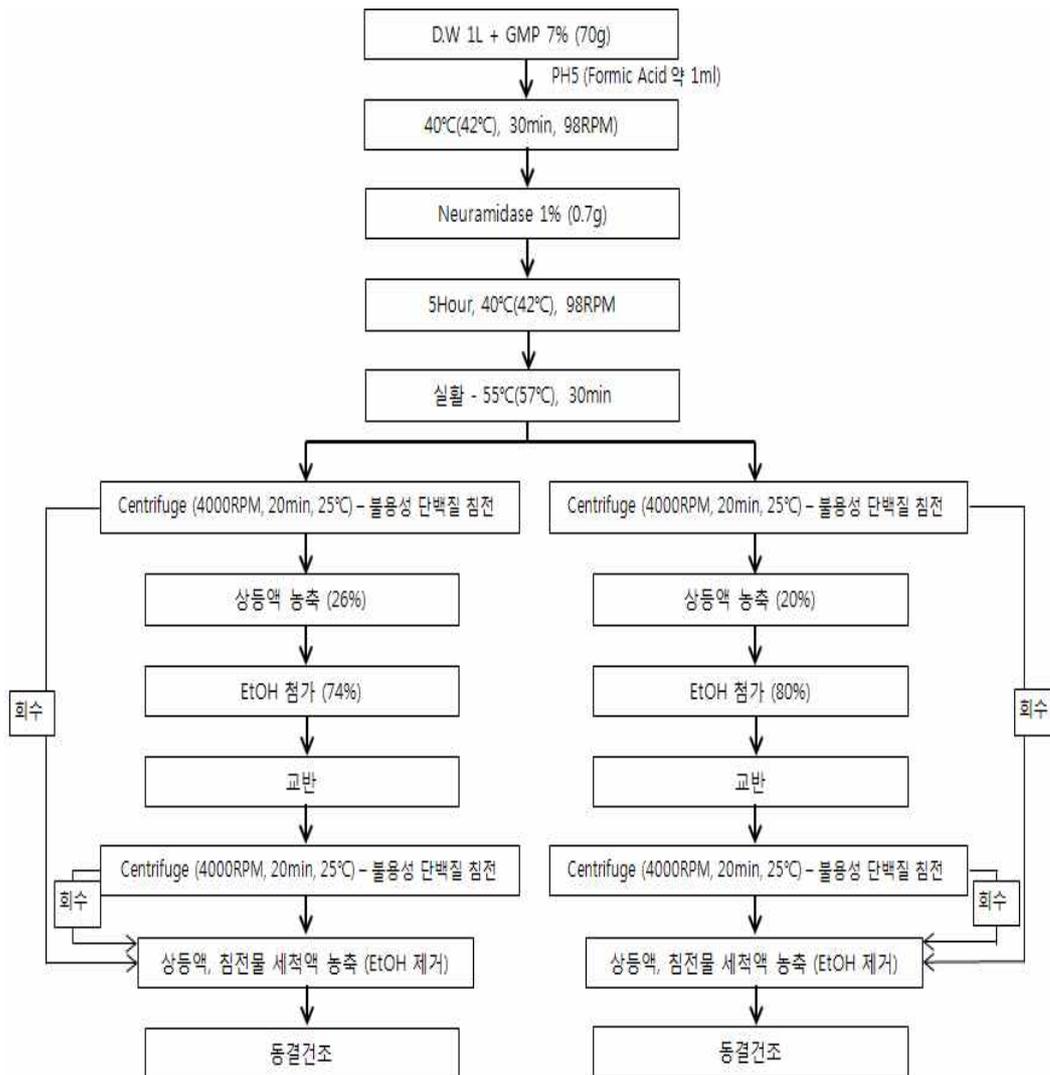


그림. 개발 효소 Neuraminidase를 적용하여 기질 GMP로부터 G-NANA의 제조를 위한 표준제조법(EtOH 처리량 80%)

(바) 생산된 NANA의 HPLC 분석

Neuraminidase를 이용하여 GMP로부터 생산한 물질이 NANA가 맞는지 확인하기 위하여 NANA시료를 정립된 HPLC분석법으로 조사한 결과, 표준 NANA 물질과 동일한 retention time에서 분리되어졌다.

EtOH 용매분획법으로 제조한 최종 G-NANA의 생산효율은 30%였으며, 이때 NANA함량이 29.5%로 나타났으며, GMP로부터 생산된 물질이 NANA가 맞다는 것을 확인할 수 있었으며, 제조된 G-NANA는 동물유효성 관련 검정에 공여를 통하여 사용예정이다.

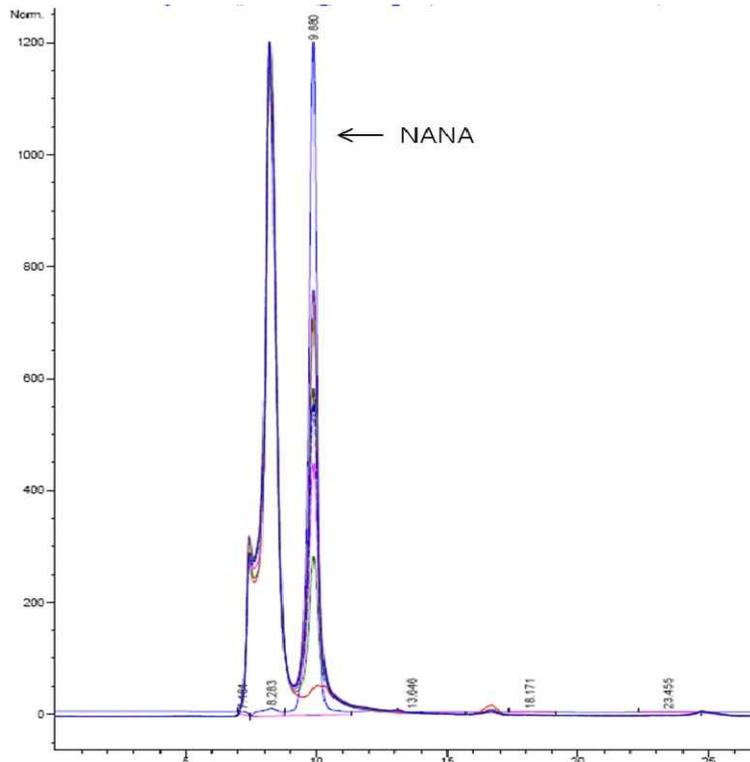


그림. GMP로부터 개발 G-NANA 표준제조법을 적용하여 제조한 NANA분석결과

(4) 결론

A. ureafaciens neuraminidase는 다른 탄소원 없이 1.5% GMP 배지 조건에서 36시간 배양하였을 때 가장 높은 활성을 가졌다. 그러나 포도당이나(GMP+포도당)이 존재하는 경우 neuraminidase가 전혀 생산되지 않은 것으로 보다 *A. ureafaciens* neuraminidase는 catabolite repression을 받는 것으로 생각된다.

*A. ureafaciens*의 배양상등액에서 분리한 neuraminidase의 최적 pH는 5.0 이며, pH 4.0~9.0 범위에서 비교적 안정하였다. 최대 효소활성은 55°C에서 나타났으나 40°C 이후에는 실활되기 때문에 이 효소의 최적 반응온도는 40°C로 생각되었다. Yoshihiro Uchida²⁵에 따르면 *A. ureafaciens* neuraminidase의 최적 pH는 5.0~5.5이고 최적온도는 53°C로 본 실험결과와 비교적 일치하며, pH 안정성은 pH 6.0~ pH 9.0 범위에서, 온도 안정성은 10분 동안 최대 50°C까지 안정하다고 보고 하여 본 연구결과와 다소 차이가 있었다. 하지만 pH 안정성에 대한 실험에서 실험 온도와 반응 시간이 서로 다르기 때문에 차이가 나는 것으로 생각된다. 온도 안정성의 경우 참고문헌과 같이 10분 동안 반응 시켰을 경우 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

1g의 GMP를 분해하는데 필요한 효소량은 0.5U 이었고, 4시간 반응 시 2~7% GMP로부터 85~95%의 수율로 NANA를 생산할 수 있었다. GMP를 neuraminidase와 반응시킨 후 에탄올 침전법으로 고분자 물질을 제거하는 경우 25%의 순도를 갖는 NANA를 생산할 수 있었다. 또 이것을 음이온 교환수지를 이용하여 정제하였을 경우 48%의 수율로 48%의 순도를 가지

는 NANA를 생산할 수 있었다.

NANA 분리정제 시 에탄올을 이용한 단백질 침전과 동결건조 등의 과정은 산업적으로 적용 시 많은 비용을 초래하므로 산업적 이용을 위해서 NANA 생산 공정의 개선이 필요할 것으로 생각된다. NANA의 정제 과정 중 에탄올 침전이나 음이온 교환 수지를 이용하여 GMP를 제거하려 했지만 GMP 혹은 GMP분해물의 일부가 물에 녹은 형태로 NANA와 함께 분리되어 높은 순도를 가지는 NANA를 생산할 수 없었다. 앞으로 NANA의 순도를 높이기 위해 GMP 혹은 GMP 분해물을 효과적으로 제거할 방법이 더 개발되어야 할 것이다.

Neuraminidase의 생산성을 증대시키기 위해서 *E. coli*에서 T7 promoter여 발현시키는 경우 gene donor인 *A. ureafaciens*의 약 3배에 해당하는 neuraminidase를 세포배양액에서 생산할 수 있었다. Neuraminidase가 대장균에서 발현되어 배지 중으로 대부분 분비되는 것은 흥미로운 결과이다. Neuraminidase가 대장균에서 분비되는 기작에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

*A. ureafaciens*가 비병원성 균주이기는 하지만 이 균주로부터 생산된 neuraminidase를 식품산업에 이용하기 위해서는 생산된 neuraminidase의 안전성 연구가 선행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 생산된 NANA의 활용도를 증가시키기 위해서 앞으로 식품이나 의료용 소재로서 활용하기 위한 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

나. Neuraminase 대량생산시스템 정립

(1) 연구목적

본 연구에 앞서 실험실 조건에서 기질인 유단백질(GMP)에서 NANA를 효소적 처리법으로 분리하기 위한 효소인 Neuraminidase는 식품첨가물로 등재되어 있는 식품미생물중 *Arthrobacter ureafaciens*를 선발하고, 이를 이용한 기질내 NANA생산에 적합하도록 최적 효소생산 조건 및 NANA생산 관련 적용기법을 정립한 바 있다.

본 연구에서는 실험실적 적립된 연구결과를 토대로 개발효소에 대한 대량생산시스템 정립을 위한 시작품 제조를 통하여 대량생산시스템 정립과 더불어 경제성 평가를 동시에 실시하였다. 시작품 제조에 따른 결과는 다음과 같다.

(2) 연구수행방법

(가) 원료 GMP준비

GMP를 생산하기 위한 원료인 유청제조 방법 관련하여 치즈부산물부터 제조되는 공정은 Fig 1과 같다. NANA 생산 및 Neuraminidase생산용 기질로 사용하기 위한 원료 GMP는 치즈 제조후 부산물인 유청액으로부터 제조된 것으로서 480Kg를 (주)트라이콤dur(한국)으로부터 구입하여 전체 연구간 사용하였다.

(나) Neuraminidase 대량생산시스템 정립

Neuraminidase생산을 위하여는 GMP내 함유되어 있는 NANA를 분리하기 종균을 배양과

이를 이용한 Neuraminidase 생산 공정으로 구분할 수 있다. 공정별 진행내용은 다음과 같다

① 뉴라미니다아제(Neuraminidase)제조용 종균배양 공정은 다음과 같다.

㉞ 1st Seed Culture : 멸균된 액상 영양배지(Lactose-broth) 300ml에 선발 종균 *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387)을 1차 접종하고 이를 30°C, 300 rpm의 조건으로 배양하되, 3.0~4.0 OD600값을 보일 때 작업을 완료 하였다.

㉟ 2ed seed Culture : 1st Seed Culture가 완료되면 3L 액상 영양배지(Lactose-broth) 로 접종하여 5L fermentation에서 7시간 30°C, 300 rpm의 조건으로 배양하며, 3.0~4.0 OD600값을 보일 때 작업을 완료 하였다.

㊸ 이를 GMP내 뉴라미니다아제(Neuraminidase)제조를 위한 효소생산을 위한 종균으로 사용하였다.

② 뉴라미니다아제 대량생산(배지조성 및 배양조건)

본 연구 단계에서는 뉴라미니다아제(Neuraminidase) 생산용 기질을 준비(용해 및 멸균) 하기 위하여 다음과 같이 실시하였다.

㉞ 재료준비

- M9{배지조성: CaCl₂(0.015g/l, pH 7.4), Na₂HPO₄ (6g/l), KH₂PO₄(3g/l), NaCl(1g/l), MgSO₄(0.5g/l), NH₄ Cl(1g/l), Glucose(2g/l) }배지 2200L 살균
- 10% GMP (GMP:25kg,R/O수 250L) 별도살균
- 5L 1M MgSO₄·7H₂O 별도살균
- 250ml 1M CaCl₂ 별도살균

㉟ 효소생산 방법은 총 10단계의 공정으로 진행하였다.

- 10톤 반응기에 M9배지 2200L를 조성하고 살균처리(121°C,15분)를 한 후 30°C로 온도를 저하시켰다(50rpm 교반조건).
- 살균된 1M MgSO₄·7H₂O(5L), 1M CaCl₂ (250ml)을 넣어 주었다.
- 살균된 준비된 기질 10% GMP (GMP:25kg,R/O수 250L)를 투입하였다.
- 종균배양된 선발 종균(*A. ureafaciens* KCTC 3387)을 접종하였다.
- 30°C, 50~100rpm, 0.3~0.6 VVM, 0.2~0.3 bar, DO=20% 이상 유지 및 pH 7.1 조건으로 배양 공정을 진행하였다.
- 효소생산 공전간, 30~40 OD600 도달점에서 반응을 종결 하였다.
- UF시스템을 이용하여 분자량 10,000이하의 물질을 제거 함과 동시에 10배로 농축하였다.
- Filter press를 이용한 최종 여과공정을 진행하였다.
- 한외여과기를 통한 분자량 30,000이하의 물질을 제거하며 농축하여 뉴라미니다아제 배양액을 분리하였다.
- 효소농축액을 동결건조시켜 최종 목표 “뉴라미니다아제” 를 생산하였다.

㊸ 효소생산 시 문제점 및 해결책

- 기질 살균시 열에 의한 단백질 엉킴현상이 나타남에 따라 살균후 균질 과정을 해결하였다.
- UF시스템과 Filter press를 이용한 여과공정중 종균에 의한 막힘 현상 나타났는데, 연속원심분리기를 이용한 1차 정제 후 정밀필터 공정으로 이를 해결하였다.
- Filter press로는 깨끗한 여과액을 얻을 수 없어서, UF 진행후 원심분리와 여과기를 사용하여 최종 55L의 맑은 효소액을 회수하였다.
- 발효 준비시 GMP를 고농도(10%)로 살균하게 되면, 단백질 엉킴현상으로 인해 발효상 효소 생산성 10~15% 감소하는 문제점 발생하였다.

(3) 연구수행결과

항균능력(경제성 확보)을 보유한 유단백질(GMP)을 원료로 기원성 천연 항균제로서 NANA를 하기 위한 핵심소재로서 Neuraminidase 대량생산시스템 정립을 완료하였다. 기질인 유단백질에서 NANA를 효소적 처리법으로 분리하기 위한 효소인 Neuraminidase는 식품첨가물로 등재되어 있는 식품미생물중 *A.ureafaciens*를 선발하고, 대량생산시스템조건에서 효소생산관련 대량생산시스템 정립을 일련의 시스템으로 완료하였다. 시작품에 대한 결과는 다음과 같다.

(가) 기질 GMP내 NANA 생산을 위해 선발된 *A. ureafaciens*를 대상으로 실험실적 반응조건 등 NANA생산조건을 정립하였다.

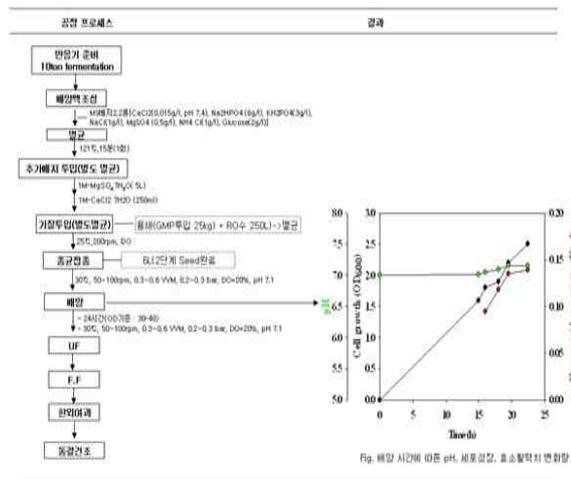


그림. 실험실적 Neuraminidase 생산법 정립을 의한 소형 Scale(30L)시제 공정도

(나) 효소와 NANA의 대량생산시스템 정립을 위하여, 효소생산(3톤 반응조) 및 이를 이용한 NANA 생산(10톤, 기질GMP 대비 효소첨가량 1% 기준)을 위한 효소생산 및 NANA생산성을 검증하였다. 결과는 다음과 같다.

- ① 시제품 제작을 통하여 도출된 효소생산시 문제점을 해결한 최종 뉴라미니다아제 대량 생산 공정도는 완료되었다.

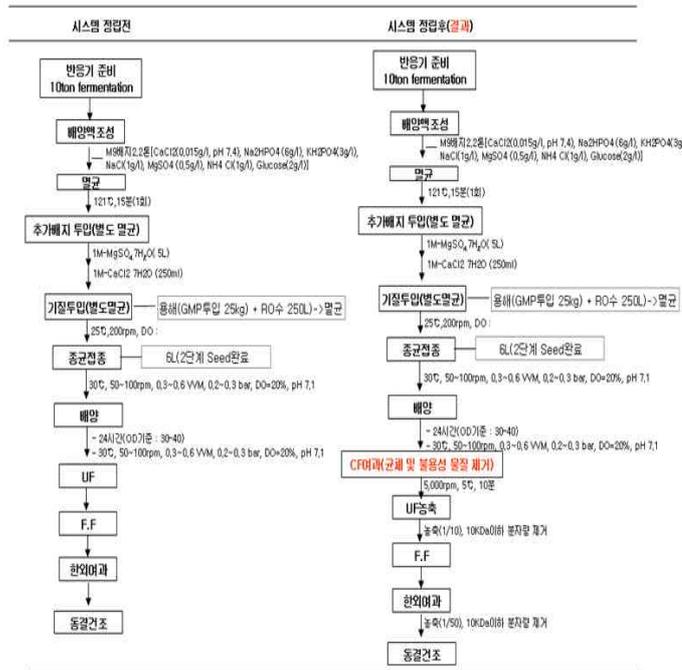


그림. 시제 결과 문제점을 보완하여 정립된 뉴라미나아제 대량생산시스템

- ② 배양액 1L기준으로 실험실적 조건에서의 효소생산성은 0.16unit/ml이었고, 이때 역가치는 74u/g이었다. 그러나, 시작품(3톤 스케일)에서는 효소생산성은 4u/ml 그리고 역가치는 116u/g으로 증가하였다. 그리고, 배양액 1L에서 생산량은33g (3.3%)이었다.
- ③ 10톤 반응조(Working Vol. 5톤)에서 총생산효소량은 1,998g(232,000U)였으며, 이때 생산수율은 71.5%였다.

표. Neuraminidase대량생산 공정 내역(10톤 반응조 조건, Working Vol. 5톤) 및 경제성 평가

공정순서	제조공정	원료	실시내역	생산수율
1	반응기 준비	1. 10톤 미생물 배양전용반응기(10톤) - Working Vol. : 5톤		
2	배양액조성	1. R/O수 :2.5톤 2. M9배지 :{배지 조성: CaCl2(0.015g/l, pH 7.4), Na2HPO4 (6g/l), KH2PO4(3g/l), NaCl(1g/l), MgSO4 (0.5g/l), NH4 Cl(1g/l), Glucose(2g/l)}	10톤 반응기에 M9배지 2200L를 조성하고 살균처리 (121°C, 15분)를 한 후 3 저하시킨다(50rpm 교반조건).	
3	멸균작업	1. 5L 1M MgSO ₄ ·7H ₂ O 별도살균 2. 250ml 1M CaCl ₂ 별도살균	1. 별도살균(121°C, 15분) 2. 추가배지 투입	
4	기질투입(멸균)	1. 10% GMP 별도살균		
5	종균접종	1. 선발 종균(<i>Arthrobacter ureafaciens</i> KCTC 3387)	1. 6L, 3.0~4.0 OD ₆₀₀ 값을 보일때 접종	
6	배양		1. 30°C, 50~100rpm, 0.3~0.6 VVM, 0.2~0.3 bar, DO=20% 이상 유지 및 pH 7.1 조건으로 배양 시킨다. 2. 30~40 OD ₆₀₀ 값을 보일때 배양종료	
7	여과	1. Centrifuge 2. Ultra Filtration Filter 3. Filter press 4. 한외여과기	1. CF여과를 통하여 균체 및 불용성 물질제거 2. UF시스템을 이용하여 분자량 10,000이하 물질을 제거함과 동시에 10배 농축한다. 3. Filter press를 통하여 재균 및 염 소거 4. 한외여과기를 통한 분자량 30,000이하의 물질을 제거하며 농축하여 뉴라미나아제 배양액을 분리한다.	
8	동결건조	1. 동결건조기		71.5%

④ 생산간 총소요경비는 7,625,000원이었으며, 이때 생산효소 1g의 생산단가는 3,816원이었으므로 경제성은 확보되었다 할 수 있다.

표. 정립 Neuraminidase대량생산시스템 공정단계별 소요경비 및 경제성 평가

공정	소모량(소모품)	사용료(원)	계(원)	작업시간	Kg당 비용
원료(GMP)	25kg		1,625,000		65,000원(부가세 별도)
발효기	10톤, 500L 발효기	150,000	450,000	3일 사용	
UF기		150,000	150,000	1일 사용	
원심분리기		200,000	200,000	1일 사용	
동결건조기		100,000	300,000	3일 사용	
발효배지	L-broth, M9배지	500,000	500,000	Pre batch	
가공비	폐수, 에너지, 소모품 등	2,400,000	2,400,000		
인건비		200,000	1,200,000	6일	
기타비용	관리비, 운임 등	800,000	800,000		
제조원가 (Neuraminidase 1g 생산기준)			7,625,000		3,816원/g (1999g, 232,000U)

(4) 결론적으로, 잉여 미이용 자원인 유청단백질에서 분리한 유단백질(GMP)로부터 NANA생산을 위한 효소(Neuraminidase)생산용 미생물(식품첨가 미생물) 확보, 이를 이용한 3~10톤 규모의 Neuraminidase 대량생산 및 생산된 Neuraminidase를 이용한 10톤 규모의 NANA대량 생산시스템을 일련되게 정립하였다.

다. 고순도 Neuraminidase 효소정제기법(SDS-PAGE 검정법 정립)

(1) 연구목표

현재 본 과제와 관련하여 헬리코박터균의 인체감염에 따른 위염 발생과 더불어 위암발생률이 연계되어 증가됨으로서 전 세계적으로 공중보건학적인 피해를 일으키고 있기 때문에 항균성 및 면역증강제로서 보고되고 있는 NANA의 다기능성에 주목하고 이를 경제성이 충족되도록 개발하고자 하였다.

본 연구에 앞서 실험실 조건에서 기질인 유단백질(GMP)에서 NANA를 효소적 처리법으로 분리하기 위한 효소인 Neuraminidase는 식품첨가물로 등재되어 있는 식품미생물 중 *Arthrobacter ureafaciens*를 선발하고, 이를 이용한 기질 내 NANA생산에 적합하도록 최적 효소생산 조건 및 NANA생산 관련 적용기법을 정립한 바 있다. 즉, NANA생산과 관련한 핵심원료인 효소를 정제하기 위해서 1.5% 농도의 GMP를 첨가한 배지에서 36시간 배양한 후 원심분리하여 배양상등액을 회수한 후 Molecular cut-off 10kDa 여과막이 장착된 UF 장치를 이용하여 배양상등액을 18.5배 농축하고, 10mM sodium phosphate 완충용액(pH6.0)으로 완충용액을 교환한 후 ion exchange chromatography를 수행 후 활성분획을 molecular cut-off

30kDa 여과막이 장착된 UF 장치로 농축하고 50mM sodium phosphate 완충용액(pH7.0)으로 완충용액을 교환한 후 gel filtration하는 방법으로 분리정제시 생산효소의 활성치는 0.5unit수준이었다. 이는 기질 GMP(이론치 NANA 함유량 6%)를 기준으로 100% 분리 시 소요량은 기질대비 1%에 해당하였음에 따라 목표 NANA 생산이 경제성이 낮다고 사료되었다.

따라서, 본 연구(2014. 상반기 완료 기준)는 기질 GMP(이론치 NANA 함유량 6%) 대비 NANA 생산과 관련한 Neuraminidase 순도를 기존 정립법 대비 10~100배 범위로 높일 수 있는데, 이는 저가의 고효능 분해능을 보유한 효소생산과 연결되므로 결국 최종 연구목표인 G-NANA의 고순도 및 생산효율 증대와 연계됨으로서 경제성 확보와 밀접하다 할 수 있다.

따라서, 이를 위한 SDS-PAGE기법을 이용한 효소생산간 분자량 검출과 통제기법 개발이라 함은, 효소가 보유한 분자량(분해능 관련)이외의 단백질원의 실험실적 및 현장 제조 시 신속한 평가기법을 정립함과 동시에 실용화 QA기법과 관련되므로 중요한 연구이다.

(2) 연구수행방법

본 연구에서는 GMP로부터 개발 G-NANA의 대량생산에 있어서, 식품미생물 *Arthrobacter ureafaciens*로부터 생산된 효소 Neuraminidase의 정제과정을 통한 specific activity를 증가시키는 정제조건을 찾기 위하여 Neuraminidase 효소 검정법 정립을 실시할 예정이며, 관련한 수행방법은 다음과 같은 방법으로 진행한다.

(가) 단백질 정량(protein assay)

SDS-PAGE를 시행하기 전, 효소의 단백질 농도는 Bradford 방법을 이용하여 정량화한다. Bovine serum albumin을 표준 단백질로 이용하고, protein assay kit를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하여 SDS-PAGE에 사용한 시료의 단백질농도를 동일화 하여 실시한다.

(나) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

단백질의 SDS-PAGE는 Laemmli 방법에 따라 Mini-PROTEAN 3 system을 사용하여 수행한다. 10% Polyacrylamide gel에서 1시간 30분 동안 100V에서 전기영동한 후 Coomassie Brilliant Blue 염색시약으로 단백질 band를 확인한다. 단백질 크기는 Prestained protein Ladder를 이용하여 상대적 분자량을 결정한다.

(3) 결과

선행연구결과에서 최종선발된 공시균인 *A. ureafaciens*를 M9배지내 혼합된 GMP를 기질로 하여 배양하면서 neuraminidase의 생산조건을 정립 후 사전 평가하여 보았더니, GMP농도는 1.5%에서 최대 0.19U/mL의 neuraminidase 효소활성을 보이는 결과를 확인한 바 있는데 이는 0.5unit에 해당되는 수치였다.

즉, NANA생산과 관련한 핵심원료인 효소를 정제하기 위해서 1.5% 농도의 GMP를 첨가한 배지에서 36시간 배양한 후 원심분리하여 배양상등액을 회수한 후 Molecular cut-off 10kDa 여과막이 장착된 UF 장치를 이용하여 배양상등액을 18.5배 농축하고, 10mM sodium phosphate 완충용액(pH6.0)으로 완충용액을 교환한 후 ion exchange chromatography를 수행 후 활성분획을 molecular cut-off 30kDa 여과막이 장착된 UF 장치로 농축하고 50mM sodium phosphate 완충용액(pH7.0)으로 완충용액을 교환한 후 gel filtration하는 방법으로 분리정제 시 생산효소의 활성치는 0.5unit 수준 이었다.

라. NANA 대량생산 수율증대 평가(SDS-PAGE)

(1) 연구목표

현재 본 과제와 관련하여 헬리코박터균의 인체감염에 따른 위염 발생과 더불어 위암발생률이 연계되어 증가됨으로서 전 세계적으로 공중보건학적인 피해를 일으키고 있기 때문에 항균성 및 면역증강제로서 보고되고 있는 NANA에 주목하고 이를 경제성이 충족되도록 개발하고 저 하였다.

그러나, 이를 위한 핵심기술인 기질에서 NANA만을 선택적으로 분리해 낼 수 있는 최적의 효소개발이 절대적으로 필요하며 유단백질인 GMP를 기질로 하여 효소를 생산하는 단계에서 효소고유의 단백질원 이외의 비효소단백질류를 제거함으로써 고순도 및 고효율의 효소를 생산함과 동시에 이를 최종 NANA생산과 연계하고 저 하였다.

이를 정립하기 위한 표준효소제조법(선행연구결과, 제 1절)에서 기질 GMP(이론치 NANA 함유량 6%)를 기준으로 100% 분리 시 효소사용량이 기질대비 1%(역가치 0.5unit)로 고품량이 사용되는 결과를 보였으며 이는 목표 NANA 생산 시 경제성이 낮은 요인으로 대두되었다.

따라서, 본 연구에서는 효소생산 시 순도(역가치)를 기존 정립법 대비 10~100배 범위로 높일 수 있도록 SDS-PAGE평가를 통하여 목표 효소고유 단백질이외의 비효소단백질류 제거효율 등을 사전평가함으로써 고순도 효소생산관련 기술의 확보와 더불어 실용화 QA기법을 완성(2014년 1/4분기 완료목표)을 목표로 본 연구를 수행하였다. 이를 위한 연구수행방법은 다음과 같다.

(2)연구수행방법

기존 NANA대량생산시스템 8단계의 공정도에 따른 최종 23.5% 순도의 NANA가 함유된 GMP 가수분해물을 확인한 바 있다. 본 연구에서는 NANA대량생산에서 고순도 NANA 정제기법 정립에 있어서 NANA의 순도를 증가시키는 정제방법 확립과 더불어 NANA 대량생산 수율증대 평가법을 정립하고자 하며, NANA의 수율증대 평가법은 다음과 같이 실시하고자 한다.

(3) 결과

1g의 GMP를 분해하는데 필요한 효소량은 0.5U이고, 4시간 반응 시 2~7% GMP로부터 85~95%의 수율로 NANA를 생산할 수 있다. GMP를 neuraminidase와 반응시킨 후 에탄올 침전법으로 고분자 물질을 제거하는 경우 25%의 순도를 갖는 NANA를 생산할 수 있다, 또 이것을 음이온 교환수지를 이용하여 정제하였을 경우 48%의 수율로 48%의 순도를 가지는 NANA를 생산할 수 있다.

NANA 분리정제 시 에탄올을 이용한 단백질 침전과 동결건조 등의 과정은 산업적으로 필요할 것으로 생각된다. NANA의 정제 과정 중 에탄올 침전이나 음이온 교환 수지를 이용한 GMP를 제거하려 했지만 GMP 혹은 GMP분해물의 일부가 물에 녹은 형태로 NANA와 함께 분리되어 높은 순도를 가지는 NANA를 생산할 수 없었다.

따라서 앞으로 NANA의 순도를 높이기 위해 GMP 혹은 GMP 분해물을 효과적으로 제거할 방법을 더 개발하여야 할 것이며, NANA의 순도를 높이기 위한 수율증대 평가기법이 정립되어야 할 것이다.

2. G-NANA 대량생산 기법 정립

가. G-NANA 생산기법 정립

(1) G-NANA 정제기법 정립

(가) 연구목적

본 연구는 유청유래 분리된 Glycomacropeptide(이하 GMP, 이론 NANA 함유량 6%)로부터 목표 NANA(이하, G-NANA)를 생산함에 있어, 추후 현장 대량생산에서 가장 중요한 항목(생산수율 및 경제성)이라 할 수 있는 정제기법 및 생산효율성을 보다 증대시킬 수 있는 표준 NANA제조법을 정립하기 위해 진행되었다.

선행연구에 의해 표준 NANA 제조법은 pH(5), 기질 GMP 대비 효소처리 농도(1%, 0.5unit) 및 반응시간(5시간)을 결정하였으며, 연계하여 효소 가수 분해물로부터 목표 NANA 정제 및 생산 수율을 위한 전체적인 조건을 확정하였다.

또한, 효소 가수 분해물로부터 NANA를 분리하기 위한 방법으로서 EtOH을 용매로 하여 농도구배별로 처리 시 NANA의 정제효율 및 생산성에 있어서 많은 차이를 보임을 알 수 있었다. 이를 세부적으로 확인함으로써 EtOH 농도구배에 따른 정제기법 확립과 생산효율 증대 관련 기초자료를 실험실적으로 정립하고자 함이 본 연구의 목적이다.

이를 해결하기 위하여, 1 단계로서는 용매인 EtOH 농도구배를 40%에서 90%까지 10% 단위를 기준으로 한 최적 농도범위에서 알아보았으며, 2 단계로서는 1 단계 실험결과에서 설정된 범위 내에서 1%단위로 구분하여 최적 첨가 농도를 평가하고자 하였다.

(나) 연구수행방법

① 시료준비

가수분해 시 기질 GMP로부터 NANA를 분리한 EtOH 농도구배별 정제 및 생산 효율성 평가를 위한 in vitro 실험 volume은 1L 반응기조건에서 수행하였다.

우선 GMP 70g을 분취한 후 반응기에 투입하였으며 다음으로 증류수를 추가하여 최종 1,000mL 되게 Mess up시켰다. 기질 GMP내 결합되어 있는 목표 NANA의 분리를 위해서 가수분해효소의 사용과 관련한 pH의 조절을 통하여 NANA의 생산효율을 증대시키는 기본 방법을 사용하였다. 이를 위하여 Formic Acid를 적절히 첨가함으로써 pH를 5로 조절하였고, 기질 GMP내 가수분해 효율을 확보하기 위한 사전평가시험 결과를 토대로 설정된 온도인 42°C로 승온시켰다.

다음 단계로서 온도가 42°C로 승온된 기점에서 30분후에 NANA생산을 위한 가수분해효소 Neuraminidase를 0.7g(기질 대비 1%)을 넣고 5시간동안 효소반응을 진행하였다. 효소반응이 종결된 기점으로 57°C로 승온하고 추가적으로 30분 동안 열처리 공정을 진행함으로써 효소실활 후 이를 평가용 최종시료로 준비하였다.

② 시험구 조성

㉓ 광역농도범위 평가(1단계, 40~90%)

시험구는 준비된 GMP 가수분해물 시료를 원료로 하여 EtOH 농도구배(세부농도)에 따른 GMP 가수분해물(G-NANA)내 NANA정제 및 생산 효율성 평가과정을 진행하였다.

이를 위한 비교구로서 효소 반응전(CNTL-GMP)을 기준으로 하였고, 시험구는 5시간 효소반응물을 기준으로 EtOH을 각각 40%(EtOH-40), 50%(EtOH-50), 60%(EtOH-60), 70%(EtOH-70), 80%(EtOH-80), 그리고 90%(EtOH-90)까지 총 7개 시험구로 설정하였다. 대조구로서는 합성NANA인 S-NANA(순도 99% 이상)를 1,000ppm농도로 조성한 후 이를 HPLC평가시 100%(기준)로 하여 비교구 및 시험구의 NANA검출량과 비교하였다.

㉔ 세부농도범위(2단계, 70~80%)

본 시험은 광역농도범위에서 설정된 농도범위 기준으로, 이를 다시 세부적으로 평가하였는데, 1%단위로 세부 평가하여 최종 최적 첨가농도를 평가하였다.

③ 분석방법

분석을 위한 시료준비는 GMP로부터 NANA분리 및 농축 등 일련의 제조과정을 거친 시료를 대상으로 EtOH을 농도구배별 처리한 Sample을 각각 원심분리(4,000rpm, 20min, 25°C)후 이를 침전물과 상층액으로 각각 구분하여 분리하였다. 이 중 상층액만을 분취하여 0.20um필터 후 정립된 HPLC 시스템 및 분석법을 적용하여 NANA함유량을 평가하였다. 침전물의 경우는 80% EtOH희석 후 역시 원심분리하여 상층액만을 분취하여 NANA함유량을 비교하였다,

이를 위한 HPLC 분석기종으로는 Aglient사의 HPLC 1260모델을 적용하였고, 분석간 사용컬럼은 BIO RAD(US)사의 HPLC Organic Acid Analysis Column(300×7.8mm, 컬럼온도 : 40°C)을 그리고 Mobile Phase 조성액으로는 10mM H₂ SO₄ 을 제조 활용하였으며, 관련 Flow Rate는 0.5ml/min 조건에서 분석을 실시하였다. G-NANA제품 내 NANA함유

량 분석을 위한 대조시료로서는 S-NANA(Sigma)를 사용하였고, 이를 필요시 적당히 농도를 변화시키면서 비교 측정하였다.

④ 결과확인

본 연구는 유청유래 분리된 GlycoMacroPeptide(이하 GMP)로 부터 목표 순도(25% 이상) 및 생산효율(20% 이상)이 확보될 수 있도록 G-NANA 생산을 위하여 GMP를 기질로 하여 1차 제조된 효소가수 분해물을 원료로 NANA 분리를 EtOH을 용매로 하여 농도구배 별로 처리시 NANA의 정제효율 및 생산성에 있어서 많은 차이를 보였음을 사전 확인한 결과를 보다 세부적으로 확인함으로서 EtOH농도구배에 따른 정제기법 확립과 더불어 생산효율 증대 관련 기초자료를 실험실적으로 정립하고자 하였다.

㉠ 광역농도범위 평가(1단계, 40~90%)

우선 준비된 GMP 가수분해물을 원료로 하여 EtOH 농도구배(세부농도)에 따른 최적 G-NANA 정제범위 및 시험구별 평가항목은 다음과 같이 설정 및 평가하였다.

이를 위한 EtOH농도구배 처리 시험구별 안전성에 미치는 평가항목으로는 분리현상, 용해성, 침전현상 및 벽면 부착성으로 총 4개 항목으로 구분하여 평가하였으며 평가항목 설정 근거는 다음과 같다.

분리현상은 EtOH 농도구배에 따라 G-NANA 가수 분해물 내 NANA와 순수가수물의 최대 분리 능력을 보유한 농도범위설정은 NANA정제와 수율향상과 관련한 주요항목임에 따라 설정하였으며, 용해성은 EtOH 농도구배에 따라 G-NANA 가수 분해물 내 G-NANA의 EtOH로부터 용해도는 중요항목임에 설정하였다.

그리고, 침전현상은 EtOH 농도구배에 따라 EtOH로부터 침전되는 G-NANA 가수 분해물의 침전물과 상등액으로 구분되는데 이중 상등액은 분리된 NANA가 용해되어 있으며 침전물의 경우는 NANA분리가 완료된 GMP단백질류의 침전물임에 따라 관련 평가는 중요항목임에 따라 설정하였으며, 또 다른 평가항목인 벽면부착성은 EtOH농도구배에 따라 벽면에 흡착되는 G-NANA가수분해물내 NANA함량의 차이와 추후 대량생산시 현장 반응기내 부착현상을 유발하므로 이에 대한 개선방법을 사전에 확보해야 하는 차원에서 분석항목으로 설정하였다.

관련하여 물리적 성상변화 평가기준으로서, 매우 심한 경우에는 +++, 심한경우는 ++, 보통인 경우는 +, 그리고 변화가 없는 경우에는 -로 표시하여 외관평가 결과를 표시하였다. 상기 평가결과를 기준으로 GMP가수분해물과 NANA의 분리와 직결되는 침전현상이 높으면서 부착현상(현장 생산문제 발생 사전차단)이 낮고, 용해성(상등액내 NANA 함유량 극대화)이 양호함과 동시에 목표 NANA의 분리효율과 검출효율이 가장 양호한 평가항목을 연계하여 NANA최대 검출량을 보이는 최적 EtOH농도 범위를 설정하였다.

㉡ 세부농도범위(2단계, 71~80%)

G-NANA의 EtOH농도에 따른 정제 및 생산수율을 비교함으로서 최종 용매 구배에 따른 최적 조건을 정립 및 선별하기 위한 결과 확인은 다음과 같이 진행 하였다.

우선 EtOH 농도구배조건별 G-NANA 가수분해물에 대한 물리적 성상평가와 HPLC 분석을 통해 시험구별 NANA 검출효율을 연계하여 최적결과를 확정하였다, 이를 위한 평가항목으로는 물리적 성상(분리현상, 용해성, 침전현상 및 벽면 부착성)와 연계하였으며 시험구별 NANA검출은 정립된 HPLC분석법을 기준으로 1단계와 동일한 방법으로 평가하였다.

(다) 결과

효소 가수 분해물로부터 NANA를 분리하기 위한 방법으로 EtOH을 용매로 하여 농도구배별로 처리 시 NANA의 정제효율 및 생산성에 있어서 많은 차이를 보임을 알 수 있었다.

따라서 이를 세부적으로 확인하여 EtOH농도구배에 따른 정제기법 확립과 생산효율 증대 관련 기초자료를 실험실적으로 정립하고 저 함이 본 연구의 목적이다. 이를 해결하기 위하여, 총 2단계로 구분하여 진행하였는데, 그중 1 단계는 EtOH 농도구배를 40%에서 90%까지 10% 단위로 평가하므로써 최적 범위를 설정하였으며, 2 단계에서는 다시 1%단위로 구분하여 최적 첨가농도를 평가하였다. EtOH 농도구배에 따른 단계별 평가결과는 다음과 같다.

① 광역농도범위 평가(1단계, 40~90%)

EtOH농도구배에 따른 GMP 효소가수물(G-NANA)의 총체적 물리적 안전성 평가결과를 육안으로 관찰해보면, 최적 EtOH 처리농도는 70~80% 범위였으며 다음순서로는 80~90%, 60~70% 그리고 40~60% 범위 순이었다.

이를 세부적으로 평가하면, 분리성에 대해서는 EtOH농도 90~80%, 용해성에 대해서는 EtOH농도 90~80%가, 침전성에 대해서는 EtOH농도 90~70%가, 부착성에 대해서는 EtOH농도 80~40%에서 높게 확인되었다. 따라서, 물리적 안전성 평가결과를 최적의 조건인 부착효과가 낮은 조건에서 분리, 용해성 및 침전효능이 높은 조건을 수용하는 최적범위는 70~80%범위임이 확인 되었다.

물리적 안전성 결과를 토대로 또 다른 설정조건인 NANA함유량이 높게 검출되는 결과를 시험구별 확인하여 보았더니 EtOH 농도가 높을수록 NANA의 검출량은 높게 나타났는데 반하여 EtOH농도가 낮은 경우에는 NANA검출량은 낮게 나타났다. 즉, EtOH-90 시험구의 경우는 13.5%로 가장 높게 나타났는데 EtOH-80은 9.19%, EtOH-70과 EtOH-60, EtOH-50 그리고 EtOH-40의 경우는 7.22%, 6.34%, 6.12% 및 6.77%로 나타나 EtOH의 농도가 낮을수록 NANA검출량 역시 감소하는 경향이 보였다.

이는 본 시험의 평가조건인 물리적 안전성 조건인 부착효과가 낮은 조건에서 분리, 용해성 및 침전효능이 높은 조건을 수용하는 최적범위인 70~80%범위와 관련한 최대 NANA검출량을 비교하였을 때 70~80%범위임을 볼 때 전체목표에 합당한 EtOH범위는 70~80%였음이 확인되었다.

표. GMP로부터 효소(Neuraminidase) 처리후 분리된 NANA의 EtOH 농도구배별 분리효율 증대성 평가(HPLC, 육안 분석)

시험구	시험조성내역		EtOH농도구배별 안전성 평가결과				NANA 검출량 (%)
	GMP가수분해물 (열풍건조시료)	EtOH농도구배 (시료: EtOH)	분리	용해성	침전	부착	
CNTL-GMP	GMP 0.10g	10 : 0	+++	++	+++	+	ND
CNTL-NANA	S-NANA 0.11g	0 : 10	+++	-	+++	-	100
EtOH-90	G-NANA 0.100g	1 : 9	+++	++	+++	++	13.5
EtOH-80	G-NANA 0.105g	2 : 8	++	++	+++	+	9.19
EtOH-70	G-NANA 0.105g	3 : 7	+	-	+++	-	7.22
EtOH-60	G-NANA 0.104g	4 : 6	-	-	++	-	6.34
EtOH-50	G-NANA 0.100g	5 : 5	-	-	+	-	6.12
EtOH-40	G-NANA 0.102g	6 : 4	-	-	+	-	6.77

- EtOH 40~90 : 3rd ddH₂O 대비 EtOH 첨가농도 비율
- GMP : 유청분리 유단백질 Glycomacropeptide(이론치 NANA 함유량 : 6%)
- NANA : Sialic acid
- 분석결과 유의성 : 6% NANA 함유량 측정결과±10%

② 세부농도범위(2단계, 71~80%)

1 단계 실험결과를 기준으로 선별된 농도범위인 70~80%를 다시 1%단위씩 세분하여 역시 물리적 안전성(분리성, 부착성, 침전성 및 용해성)과 HPLC 분석과정을 진행을 통해 역시 검출효율과 동일한 결과를 확인하였다.

2 단계 평가는 1단계와 마찬가지로 EtOH 농도별 처리에 의해 일어난 물성변화를 매우 심한 경우에는 +++, 심한 경우는 ++, 보통인 경우는 +, 그리고 변화가 없는 경우에는 -로 표시하여 결과를 제시하였다. 관련된 NANA함유량 분석결과를 연계하여 EtOH농도구배별 단계별 평가결과는 다음과 같다.

즉, EtOH농도별 처리에 대한 물리적 안정성을 세부적으로 평가한 결과, 침전성에 대해서는 EtOH농도 77~80%가, 부유성에 대해서는 EtOH농도 70~74%가, 부착성에 대해서는 EtOH농도 70~75%가, 응고성에 대해서는 EtOH농도 70~77%에서 높게 확인되었으며, 종합적으로는 74%의 농도가 최적 EtOH 처리농도였고, 다음으로 75%와 76% 범위였다.

표. GMP로부터 효소처리후 분리된 NANA의 EtOH 농도구배별 분리효율 증대성 평가(HPLC, 육안 분석)

시험구	시험조성내역 EtOH농도구배 (시료 : EtOH)	EtOH농도구배별 안전성 평가결과				NANA 검출효율 (%)	분리효율 (%)	비고
		침전	부유	부착	응고			
EtOH- 100	0 : 100							NANA 불포함
EtOH - 80	20 : 80	+++	+++	+++	++	6.0	99.3	
EtOH - 79	21 : 79	+++	+++	++	++	5.9	98.2	
EtOH - 78	22 : 78	++	+++	++	+	5.8	96.8	
EtOH - 77	23 : 77	++	+++	++	-	6.1	101.1	
EtOH - 76	24 : 76	+	++	++	-	6.9	115.5	표준 NANA 제 조법 적용 최적 농도설정
EtOH - 75	25 : 75	+	++	+	-	6.0	99.7	
EtOH - 74	26 : 74	-	+	+	-	6.2	104.1	
EtOH - 73	27 : 73	-	+	-	-	5.9	99.0	
EtOH - 72	28 : 72	-	+	-	-	6.1	102.2	
EtOH - 71	29 : 71	-	-	-	-	5.7	96.0	
EtOH - 70	30 : 70	-	-	-	-	5.8	96.2	

- EtOH 70~100 : 3rd ddH₂O 대비 EtOH 첨가농도 비율
- GMP : 유청분리 유단백질 Glycomacropeptide(NANA 함유량 : 6%)
- NANA : Sialic acid
- 분석결과 유의성 : 6% NANA 함유량 측정결과±10%

물리적 안전성 결과를 토대로 또 다른 설정조건인 NANA함유량이 높게 검출되는 결과를 시험구별 확인하여 보았더니 1 단계에서와 달리 EtOH의 농도 변화에 따라 NANA함량의 변화가 크게 달라지지 않았음을 알 수 있었다.

즉, EtOH-76 시험구의 경우는 6.9%로 가장 높게 나타났으며 그 다음으로는 EtOH-74가 6.2%, EtOH-80과 EtOH-79, EtOH-78, EtOH-77, EtOH-75. EtOH-73, EtOH-72, EtOH-71 그리고 EtOH-70의 경우는 각각 6.0%, 5.9%, 5.8%. 6.1%, 6.0%, 5.9%, 6.1%, 5.7% 그리고 5.8%로 확인되었다.

이는 본 시험의 평가조건인 물리적 안전성 조건인 부착효과가 낮은 조건에서 침전, 부유, 부착 그리고 응고조건을 수용하는 최적범위인 74~76%범위와 관련한 최대 NANA검출량이 74~76%범위임을 볼 때 전체목표에 합당한 EtOH범위는 74~76%였음이 확인되었다.

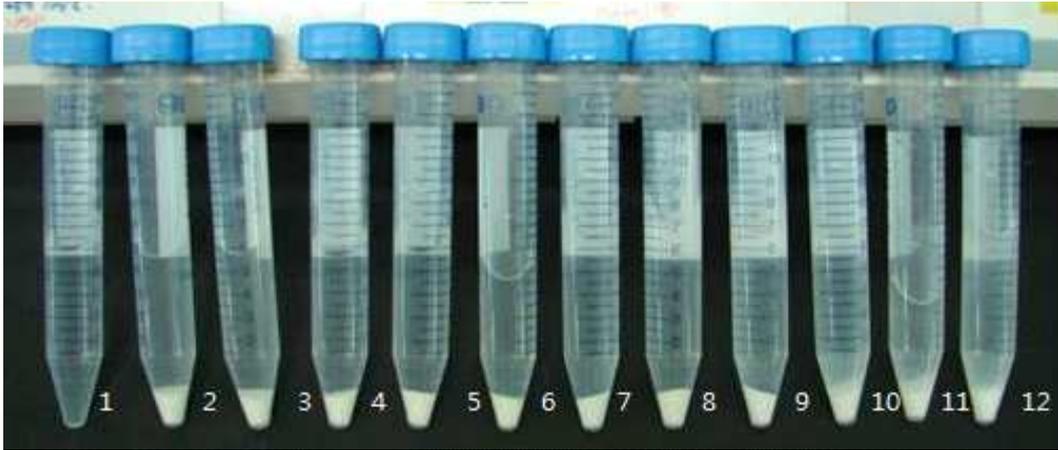


그림 . EtOH농도구별 G-NANA의 물리적 안정성 평가(원심분리 후)

1 : EtOH 100%, 2 : EtOH 70%(DW 30%), 3 : EtOH 71%(DW 29%), 4 : EtOH 72%(DW 28%), 5 : EtOH 73% (DW 27%). 6 : EtOH 74% (DW 26%). 7 : EtOH 75% (DW 25%), 8 : EtOH 76% (DW 24%). 9 : EtOH 77% (DW 23%). 10 : EtOH 78% 9DW 22%), 11 : EtOH 79% (DW 21%), 12 : EtOH 80% (DW 20%)., 원심분리조건 : 4,000rpm, 20분, 25°C, 1회

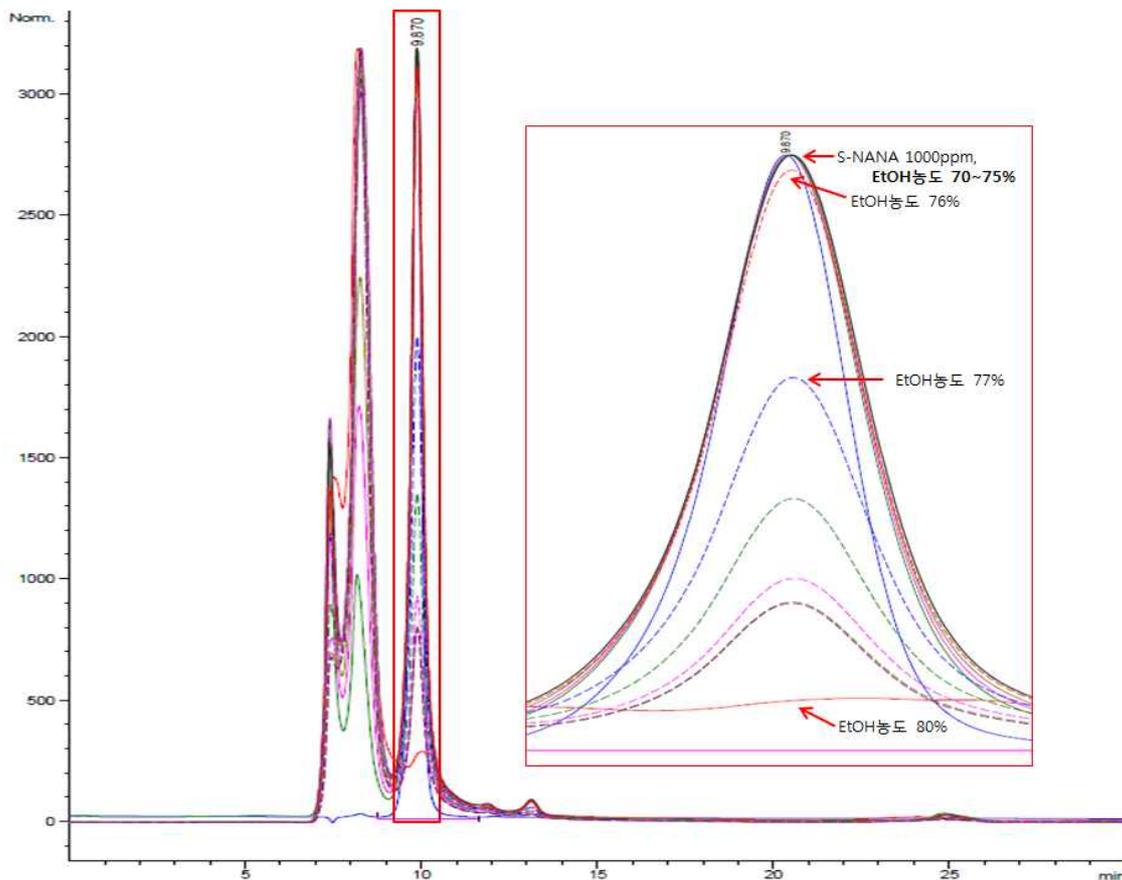


그림. EtOH 농도구별 NANA함량 HPLC 분석

결론적으로, 물리적 안전성과 HPLC 분석결과를 NANA함유량이 높은 조건을 동시에 수용하는 EtOH의 농도는 74%임을 확인하였다.

(라) 결론

최종 결론으로서, G-NANA의 대량생산 목적으로는 EtOH이 적은 양을 사용함(경제성 확보)과 동시에 생산간 물리적 안전성(침전, 부착, 부유 및 응고성)과 더불어 목표 NANA의 분리효율이 가장 높은 74%농도의 EtOH를 첨가하는 조건에서 G-NANA의 표준생산법을 적용 예정이다. 따라서, 본 연구에 의해 GMP로부터 G-NANA를 분리할 때에는 EtOH의 농도를 74~80% 범위에서 처리하는 것이 가장 적절함을 확인하였다.

나. G-NANA 표준제조법 정립

(1) 용매 농도구배법에 G-NANA 표준제조법 정립

(가) 연구목적

전체 연구과제의 목표(면역 증강형 암식이 및 헬리코박터균 제어 제제 개발) 대비 성과를 성공적으로 완료하기 위하여, 유청 유래 분리 단백질 (GMP; Glycomacropeptide)을 기질로 하여 효소분해 공정을 거쳐 G-NANA를 생산하는데 있어, 단백질과 분리 NANA가 공존하고 있는데 이를 시료로 하여 G-NANA의 생산수율과 NANA의 순도 조절을 위한 최적의 표준제조법이 필요하다.

본 연구에서는 GMP로부터 G-NANA를 생산함에 있어 생산수율과 NANA함량이 높은 순도증강법을 확보함과 동시에 불필요 공정제거 또는 개선을 통해 효율적인 G-NANA 생산 시스템관련 표준제조법을 정립하고자 하였다.

본 연구를 진행 전, GMP 대비 반응 후 GMP 가수분해물을 원료로 단계별 EtOH농도를 40~90%범위에서 물리적 안전성 조건인 부착효과가 낮은 조건에서 침전, 부유, 부착 그리고 응고조건을 수용하는 최적범위인 74~76%범위에서 최대 NANA 검출량이 74~76%범위임을 볼 때 전체목표에 합당한 EtOH범위는 74~76%였다.

따라서, 본 연구에서는 이를 기초로 EtOH 농도구배를 74%, 75% 및 80%로 차이를 두고 G-NANA 생산수율과 G-NANA내 NANA 함유량이 높은 최종 표준제조법을 선별하기 위하여 이중 최적 표준제조법을 정립하고자 하였다.

(나) 연구수행방법

① 재료준비

본 연구를 진행하기 위해 사용한 GMP는 (주)트라이콤무역(한국)에서 구매하여 사용하였으며, G-NANA 제조를 위해 핵심적으로 필요로 하는 효소인 Neuraminidase(역가치 0.5unit)는 (주)생명의나무에서 자체 제조하여 사용하였다.

pH조절을 위한 formic acid(Kanto, Japan)는 구입하여 사용하였고, 기질 용해용 정제수는 2차 증류수를 제조하여 사용하였다. 그리고 GMP가수분해물내 목표 핵심 지표성분인 NANA분리를 위한 용매로서 사용한 EtOH은 Fisher사의 HPLC급을 구입하여 시험 간 사용하였다.

② 고순도 및 고수율 G-NANA 표준제조법 정립

㉞ 기질배지 pH조절에 따른 G-NANA제조법 평가

- 산성배지(pH 5)조건 기준 G-NANA제조법 평가

GMP로부터 G-NANA의 생산성을 증가시키기 위해 용매인 EtOH 농도조절을 통한 제조법 정립을 위하여 총 6단계 과정으로 수행하였다.

1 단계로서, GMP 70g을 분취하여 여기에 1차 정제수를 1Kg 되게 mass-up하였으며, 기질 GMP를 용해시키고 Formic Acid를 첨가하면서 pH를 5로 조절하였다.

2 단계로, 온도를 42℃ 까지 승온 시킨 후 효소(Neuramidase)를 기질대비 1%인 0.7g을 넣고 효소반응을 5시간 진행하였다.

3 단계로는, 2단계 반응종결후 30분간 57℃ 에서 실활 시키고 20분간 Centrifuge (4000RPM, 20min, 25℃)를 통해 침전물(G-NANA의 불용성 단백질)과 상등액(목표 G-NANA)으로 각각 분리하였으며, 이중 상등액 분리물은 별도로 보관하였다. 이중 침전물에 대하여는 당초 투입된 기질인 GMP 대비 분획수율을 확인을 위하여 건조과정을 실시하였다.

4 단계는, 2 단계에서 분리된 침전물만을 반응기에 투입하고 80% EtOH 희석액을 반응물 대비 3~4배수가 되도록 첨가한 후 교반과정을 통하여 잔류하고 있는 NANA를 원심분리 과정을 통하여 세척분리 하였다.

5 단계는, 3단계 및 4단계에서 분리된 각각의 상등액을 혼합한 후, 농축과정을 통하여 25%(Brix 기준)까지의 농축과 동시에 분리용매인 EtOH제거를 진행하였다.

6 단계는, 5단계 반응 종료 후 동결과정을 수행함으로써 최종 G-NANA제조를 완료하였다.

- 중성배지(pH 6.8)조건 기준 G-NANA제조법 평가

GMP로부터 G-NANA의 생산성을 증가시키기 위해 pH를 산성 및 중성조건으로 차이를 두고 역시 동일한 G-NANA 제조법(EtOH 농도구배 80% 적용)을 적용하되, 본 실험에서는 pH를 6~7범위로 기질용액을 제조 후 최종 G-NANA의 생산수율과 역시 NANA함량을 연계하여 산성조건과의 차이를 확인하였다.

즉, 1 단계로서, D.W 1L에 GMP 70g을 첨가 후 이를 용해시키고 이어서 pH를 6.8로 정밀하게 조절하였으며, 나머지 공정은 “산성배지(pH 5)조건 기준 G-NANA제조법 평가” 방법과 동일하게 진행하였다.

㉟ GMP가수분해물 대비 용매구배에 따른 G-NANA제조법 평가

- G-NANA 표준제조 시험법 1 (EtOH-80)

“산성배지(pH 5)조건 기준 G-NANA제조법 ” 과 동일하게 실시하였다.

- G-NANA 표준제조 시험법 2 (EtOH-75)

시험구 EtOH-75는 EtOH-80에서와 동일한 방법으로 진행하였지만, 다만 효소반응 후 제조된 GMP가수분해물 원료 대비 EtOH 사용량을 75%로 대체하는 이외의 공정은 동

일하게 처리하였다.

- G-NANA 표준제조 시험법 3 (EtOH-74)

시험구 EtOH-74는 표준제조법 관련 EtOH-80 및 EtOH-75와 역시 동일한 방법으로 진행하였지만, 다만 효소반응 후 제조된 GMP가수분해물 원료 대비 EtOH 사용량을 74%로 대체하는 이외의 공정은 역시 동일하게 처리하였다.

㉔ G-NANA내 NANA 함유량 분석(HPLC 분석)

분석을 위해 사용한 기기는 HPLC (high performance liquid chromatography)로 사용한 컬럼은 BIO RAD(US)사의 HPLC Organic Acid Analysis Column(300x7.8mm, 컬럼온도:40°C)을 사용하였으며, Mobile Phase 조성액으로서는 10mM H₂SO₄을 제조 활용하였다.

생산된 표준제조법별 G-NANA 생산단계별 분취 및 건조시료(침전물, 상등액)별 NANA 함유량 분석을 위한 대조시료로 합성 NANA(sigma)를 사용하였다.

- 분석시료 준비

표준제조법별 채취된 시료들에 대하여 NANA함유량 검정을 위한 분석시료제조는 표준제조법별 효소반응 시작 전 및 효소반응 시작 후 시간별 일정시료를 채취하여 NANA함유량의 생성패턴과 최종 제조완료 후 침전물과 상등액을 각각 분리한 후 이들을 각각 동결건조한 뒤 생산수율을 확인하였다.

이들의 결과를 연계하여 표준제조법별 G-NANA의 최대 생산효율을 방법을 선별함과 동시에 목표 기능성분인 NANA함유량이 최대로 나타나는 제조법을 최종 표준제조법으로 선별하였다.

(다) 결과확인

본 연구는 GMP에서 G-NANA를 생산함에 있어 높은 생산수율과 NANA함량이 높은 순도 증강법을 확보함과 동시에 불필요한 공정제거 또는 개선을 통해 효율적인 G-NANA 생산 시스템관련 표준제조법을 정립하기 위해 진행되었다. 선행 연구 결과 기질 배지의 pH와 GMP 가수분해물 대비 용매구배에 따라 생산된 G-NANA의 수율 및 순도의 차이가 있다는 것을 확인함으로써 보다 효율적인 G-NANA 생산시스템을 정립하고 저 하였다.

① 기질배지 pH조절에 따른 G-NANA제조법 평가

기질배지 pH조절에 따른 G-NANA 순도 및 함유량을 비교하기 위해 G-NANA 제조시 효소 반응 시작 전 및 효소반응 후의 시간별로 시료를 채취하였고 평가항목은 다음과 같이 설정 및 평가하였다.

효소 반응시 G-NANA의 시간별 분리율을 기준으로 순도 및 함유량을 평가하였으며 평가항목은 기질배지 온도를 42°C까지 승온 후 효소(Neuraminidase)를 넣기 전인 0Hour, 효소 투입 후 1시간 경과 후인 1Hour, 2시간 경과 후인 2Hour, 3시간 경과 후인 3Hour, 4시간 경과 후인 4Hour, 5시간 경과 후인 5Hour과 효소의 반응을 중단시키기 위해 기질배지 온도를 30분간 57°C까지 승온 시킨 실험 총 7개 실험군을 비교하였다.

② GMP가수분해물 대비 용매구배에 따른 G-NANA제조법 평가

GMP가수분해물 대비 용매구배에 따른 G-NANA 순도 및 함유량 비교를 위해 평가항목은 준비된 표준제조법을 거친 G-NANA 최종시료의 양을 통해 생산 수율과 HPLC 분석을 통해 최종시료 내 G-NANA의 순도로 2개의 항목으로 평가하였다.

그리고, EtOH-74와 EtOH-75의 경우는 표준제조법 중 불용성 단백질의 세척과정이 다르게 되었음을 확인하기 위하여 세척이 끝난 1차 침전물을 한번 더 세척한 세척액과, 이미 2번의 세척을 거친 2차 침전물을 한번 더 세척한 세척액을 HPLC로서 추가로 평가하였다.

(라) 연구결과

GMP로부터 G-NANA 생산시 기질배지의 pH차이와 G-NANA의 순도를 높이기 위한 방법으로 EtOH을 용매구배에 따라 처리 시 최종 G-NANA 시료의 수율 및 순도에 많이 차이를 보임을 알 수 있었다.

이에 따라 표준제조법에서의 PH, 용매구배에 따른 차이를 비교하여 표준제조법의 정립과 생산효율 증대를 가져오는 것이 본 연구의 목적이다.

이를 해결하기 위해 기질배지 pH조절에 따른 G-NANA제조법 평가와 GMP가수분해물 대비 용매구배에 따른 G-NANA제조법 평가로 실험을 진행하였는데 평가결과는 다음과 같다.

① 기질배지 pH조절에 따른 G-NANA제조법 평가

GMP(이론치 NANA 함유량 7%)기질 배지를 조성 후 pH의 차이(pH 5 및 6.8)를 부여한 기질조건 대비 최종 효소반응 시간경과별 및 종료시점에서 시험구별 NANA 분리율을 비교해 보았다.

효소첨가 후 1시간이 경과하는 산성배지 조건에서는 기질내 이론치 NANA 함유량(7%) 대비 61.4%였는데 이때 중성조건에서는 65.7%로 중성배지 조건에서 약 4.3%정도의 분리효율이 높은 것으로 나타났으며, 전체 시험구에서 동일하게 효소반응 시간이 경과하면 할수록 역시 NANA분리효율역시 증가하는 패턴을 보였다.

시험구별 반응 최적시간을 비교하여 보았더니 산성조건에서 3시간이 경과하면 분리율은 100% 도달하였지만 중성조건에서는 약 87%로 낮은 경향을 보였으며, 최종 반응시간이 종료되는 5시간이 경과시 두 시험구 모두 NANA분리율이 100%에 도달하는 경향을 보였다.

이러한 이유는 GMP용해액을 조성 후 pH를 산성조건으로 조절시, GMP에서 NANA가 분리된 GMP단백질이 불용성으로 전환되면서 침전되는데 이로 인하여 효소의 반응이 중성조건보다는 더 활성을 보이는 이유로 판단되었다.

그러나, 전체 연구과제의 목표가 NANA함유량이 높으면서 생산효율이 높은 G-NANA 제조법을 정립한 결과를 기초로 추후 연구진행내역으로서 NANA의 고순도 정제법 개발 연구(Column 및 한외여과법 동시적용 연구)를 진행예정임에 따라 산성조건에서 진행되

는 제조법을 선별하는 것이 타당하다고 판단되었다.

표. 표준제조법 정립을 위한 pH조건차이(산성배지, 중성배지)를 부여한 기질용액 조건에서 효소 반응 시간 경과에 따른 NANA(이론치 함유량 7%) 분리효율 비교평가결과

시험구별 효소반응시간	산성배지 (pH5)		중성배지 (pH6.8)	
	NANA함량 (ppm)	NANA분리율 (%)	NANA함량 (ppm)	NANA분리율 (%)
S NANA(1000ppm)	1,000	100	1,000	100
0 Hour	ND	ND	ND	ND
1 Hour	43,896	73.2	46,087	76.8
2 Hour	61,703	102	57,775	96.3
3 Hour	74,491	124	61,205	102
4 Hour	80,003	133	64,511	107
5 Hour	77,162	128	67,140	111
실활처리	77,797	129	69,629	116

- S NANA :표준체 NANA (1,000ppm)
- 0~5 Hour : 효소(Neuraminidase) 투입 후 반응시간

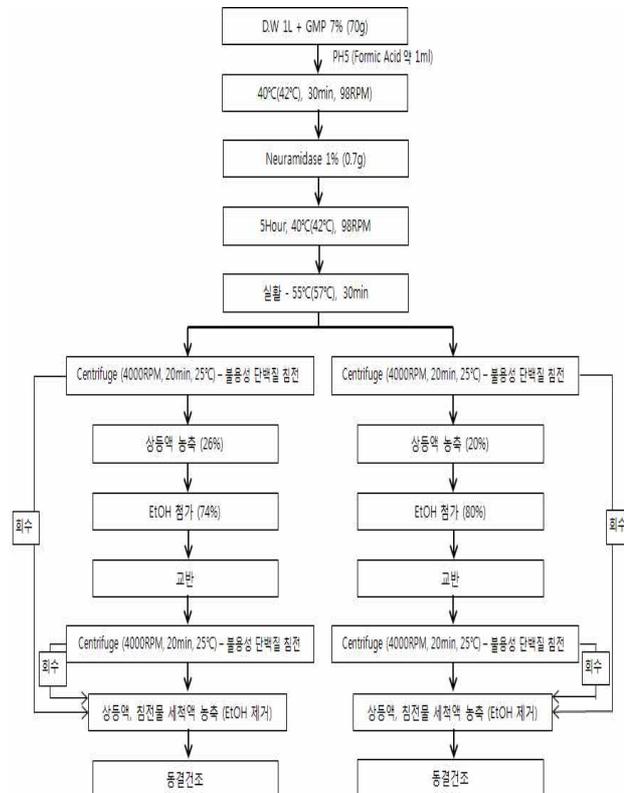


그림. 개발 G-NANA의 수율과 순도의 증가를 위한 용매 농도 구배별 (EtOH 처리량 74%, 80%) 표준제조법 정립

② GMP가수분해물 대비 용매구배에 따른 G-NANA제조법 평가

기질 GMP를 대상으로 효소(Neuraminidase) 반응종료 후 제조된 가수분해물을 대상으로 EtOH의 농도차이(EtOH 74%, 75% 및 80%)에 따른 G-NANA의 생산효율과 고함량 NANA 생산과 관련한 최적 제조법을 선별하기 위한 평가를 실시하여 보았다. EtOH의 농도차이에 따른 GMP 가수물 내 G-NANA생산효율과 관련한 NANA함유량(분리효율) 검정결과는 다음과 같다.

우선 시험구 EtOH 74%로 처리하는 시험구 EtOH-74의 경우를 살펴보았더니, GMP 1kg 대비 G-NANA 생산량이 450g으로 G-NANA 생산수율은 45%로 나타났는데 선행예비 제조법과 비교시 9.9%가 상승했지만 핵심성분인 NANA의 순도는 16.8%로 나타나 기존 순도 25.2%보다 8.4%나 떨어지는 결과를 보였다.

또한 EtOH-74와 동일 제조방법으로 제조하되 EtOH 사용량만을 75%와 80%를 변형하여 사용하였던 시험구 EtOH-75와 EtOH-80에서는 생산수율은 16.2%, 20%로 기존 실험결과보다 6~10% 상승하였고, NANA 순도역시 29.6%, 29.5%로 4%정도 상승하는 결과를 보였는데, 시험구 모두 기존 실험결과보다 높은결과가 나왔지만 실험군 EtOH-80의 생산수율이 EtOH-75의 수율보다 4%정도 높은 결과가 나왔다.

따라서, 본 연구를 통하여 G-NANA의 생산을 위한 표준제조법으로서는 EtOH-80 시험구의 제조법을 최종 표준제조법으로 확정하였다.

선정된 G-NANA 표준 정립법(EtOH-80)은 전체 연구과제의 목표가 NANA의 순도가 높으면서 생산효율이 높은 G-NANA 제조법을 정립한 결과를 기초로 추후 연구진행내역인 NANA의 고순도 정제법 개발연구를 진행예정임에 따라 G-NANA 제조시 용매처리 농도는 EtOH 80%가 타당하다고 판단되었다.

표. 기질 GMP를 대상으로 효소(Neuraminidase) 반응종료 후 제조된 가수분해물을 대상으로 EtOH의 농도차이(EtOH 74%, 75% 및 80%)에 따른 G-NANA의 생산효율과 NANA 함유량 비교평가결과

	GMP 1kg 대비 생산량		G-NANA내 NANA함유량 (%)
	G-NANA생산량 (g)	생산수율(%)	
기존실험 (선행제조)	99	10	25.1
EtOH-74	450	45	16.8
EtOH-75	160	16	29.6
EtOH-80	200	20	29.5

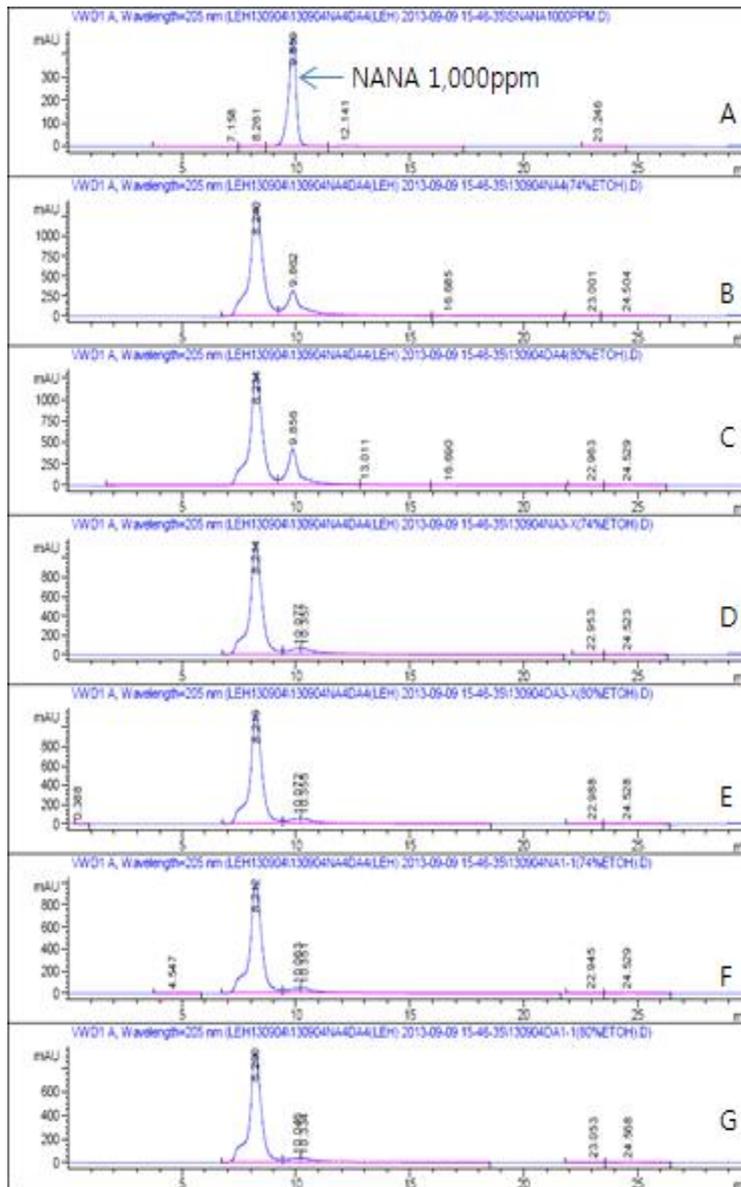


그림. 기질 GMP를 대상으로 효소(Neuraminidase) 반응종료(pH 5, 반응시간: 5시간, 반응 온도 : 42°C)후 상등액(B, C)와 침전물 세척액(D~G)내 NANA함유량 분석을 통한 G-NANA 표준제조법 정립성 평가

- A : 표준체 NANA 1,000ppm
- B : 표준제조법 최종 동결건조 분말 (EtOH-74)
- C : 표준제조법 최종 동결건조 분말 (EtOH-80)
- D : 세척후 EtOH 침전물 (불용성 단백질, EtOH-74)
- E : 세척후 EtOH 침전물 (불용성 단백질, EtOH-80)
- F : 세척후 침전물 (불용성 단백질, EtOH-74)
- G : 세척후 침전물 (불용성 단백질, EtOH-80)

다. G-NANA 대량생산 기법 정립

(1) 당류에 의한 NANA생산수율 저해요인 평가(Lactose, Glucose대상)

(가) 연구목적

본 연구는 당류가 제거되지 않은 유청 유래 분리 단백질 GlycoMacroPeptide(이하 GMP)에 의해 목표 NANA(이하 G-NANA)를 생산함에 있어 당류가 미치는 NANA 생산수율 저해능력을 평가하기 위해 진행되었다.

G-NANA 생산을 위한 표준제조법 정립 결과에서, 당류가 첨가된 GMP로부터 G-NANA를 생산함에 있어 당류가 미치는 생산수율 저해능력을 평가하기 위하여 기존 당류를 제거한 GMP(이론치 NANA함유량 6% 기준)를 기질로 G-NANA를 제조한 경우에서 G-NANA의 생산효율은 약 30%였으며 이때 NANA함유량은 29.5%였음이 확인되었다. 그러나 NANA생산간 당류는 효소의 기질 반응 시 간섭효과를 유발하는 경향을 보임이 선행시험에 의해 확인되었기 때문에 본 연구에서는 당류가 다량 함유된 GMP(Lactose 45% 이상)로부터 G-NANA 생산능력을 확인하였다.

따라서 본 연구의 목적은 당류가 존재하지 않는 GMP로부터 G-NANA를 생산했을 때의 생산수율로부터 당류가 존재하는 GMP로부터 G-NANA생산시의 생산수율을 비교, 분석하여 결국 당류가 G-NANA의 생산에 미치는 영향을 분석하고자 함에 있다.

이를 분석하기 위하여, 당류가 첨가된 GMP로부터 G-NANA를 생산하기 위한 생산공정을 간략하게 진행하였으며, 분리율을 확인하기 위한 연구 수행 방법은 다음과 같다.

(나) 연구수행방법

당류가 존재하는 GMP로부터 G-NANA생산 시, 생산수율을 규명하기 위하여 비교 검증할 데이터로써 선행 연구 결과를 인용하였다.

선행 연구결과, 당류가 포함되어 있는 GMP로부터 G-NANA 생산 분리율(DW 1L + GMP 70g기준)은 약 6~7%로 확인되었다. 따라서, Lactose가 G-NANA생산에 얼마만큼 영향을 미치는지 확인해 볼 필요성이 판단되어 본 연구를 진행하였다.

① 시료준비

기질 GMP로부터 G-NANA를 분리하기 위한 in vitro 실험은 선행연구와 마찬가지로 실시하였다. 우선 GMP 7g(정제수 대비 7%)을 분취한 후 반응기에 투입하였으며 1차 증류수를 사용하여 최종 100mL이 되게 Mess up시켰다. 기질 GMP내 결합되어 있는 목표 NANA의 분리를 위하여 가수분해효소의 사용과 관련한 pH의 조절(Adjust pH 5 ; Formic Acid)을 통하여 G-NANA의 생산효율을 증대시키는 방법을 사용하였으며, 효소 첨가 후 가수분해의 효율을 높이기 위해 선행연구 분석방법에 의해 설정되어진 42°C로 승온시켜 매 시간별 시료를 분취하고, 5시간 효소활성이 끝난 후 30분 동안 57°C에서 효소활성을 실행 시켰으며 역시 분취하여 시료로 사용하였다.

② 시험구 조성

당류가 포함되어있는 유청 유래 분리 단백질 시료를 원료로 하여 5시간동안의 효소활성과정과 G-NANA분리 증가율 평가과정을 진행하였다.

이를 위한 비교구로서는 효소 반응전(SNANA 1000ppm)을 기준으로 하였고, 시험구는 효소 첨가 전(130912가0H)부터 각각 효소 첨가 1시간 후(130912가1H), 2시간 후(130912가2H), 3시간 후(130912가3H), 4시간 후(130912가4H), 5시간 후(130912가5H), 실험 후(130912가5XH)로 하여 총 7개 시험구로 설정하였다.

대조구로서는 합성 NANA인 S-NANA(Sigma, 순도 99%이상)을 1,000ppm농도로 조성한 후 이를 HPLC평가 시 100%로 하여 비교구 및 시험구의 NANA 검출량과 비교하였다.

③ 분석방법

본 연구는 당류가 제거되지 않은 GMP에 의해 목표 NANA(이하 G-NANA)를 생산함에 있어 당류가 미치는 생산수율 저해능력을 평가하였다. 실험방법은 제 1장 필수분석법 정립에 의해 실험하였다.

분석은 당류가 제거되지 않은 GMP로부터 NANA분리 및 농축 등의 일련의 제조과정 후의 시료를 대상으로 진행하였다. 효소첨가 후 매 시간별 분취하여 80% EtOH 희석액으로 제조하고 원심분리하여 상층액만을 대상으로 0.20um필터 후 HPLC 시스템 및 분석법을 적용하여 NANA함유량을 평가하였다.

G-NANA의 함유량 분석은 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 사용하였으며, 대조구로서는 합성 (이하 S-NANA)를 필요시 농도를 변화시키면서 비교 측정하였다.

이를 위한 HPLC 분석기종으로는 Agilent사의 HPLC 1260모델을 적용하였고, 분석간 사용컬럼은 BIO RAD(US)사의 HPLC Organic Acid Analysis Column(300×7.8mm, 컬럼온도 : 40℃)을 그리고 Mobile Phase 조성액으로서 10mM H₂ SO₄ 을 제조 활용하였으며, 관련 Flow Rate는 0.5ml/min 조건에서 분석을 실시하였다. 개발 G-NANA제품내 함유량 측정간 대조구로서는 합성NANA(이하 S-NANA)를 필요시 농도를 변화시키면서 비교 측정하였다.

(다) 결과확인

NANA생산간 당류는 효소의 기질 반응시 간섭효과를 유발한다는 선행연구 결과를 바탕으로 본 연구에서는 당류가 다량 함유된 GMP(Lactose 45% 이상)로부터 표준제조법 대비 G-NANA생산능력을 확인한 결과는 다음과 같다.

① 당류 함유 GMP 기질화 단계별 효소반응에 의한 G-NANA 분리율 평가

당류가 첨가된 GMP로부터 G-NANA생산수율 저해능력에 관한 평가로서, 시간별 G-NANA의 생산능력은 효소를 첨가한 후 1시간 경과시에는 검출되지 않았는데 2시간이 경과하면 1.3%의 NANA가 검출되었으며 3시간을 정점으로 최종 5시간이 경과하면 1.6%로 최대 분리효능과 생산효율은 26%였다. 이후 최종 반응시간인 5시간이 경과하더라도 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다.

또한, 7% GMP 대비 G-NANA생산능력을 환산해서 계산해보면 역시 시간별 G-NANA의

생산능력은 효소 첨가 후 3시간을 정점으로 최후 최대 NANA 분리율은 1.7%임이 확인되었다.

또한, G-NANA내 목표 기능성분인 NANA의 분리율은 2%(100% 기준) 미만이고 생산효율은 약 30%였는데, 기존 G-NANA표준제조법에서는 G-NANA의 생산효율은 30% 그리고 NANA함유량인 29.5%였음을 감안하면 당류가 함유된 경우 NANA생산과 관련된 생산수율을 동일하였지만 NANA분리효율은 93.2%가 감소한 것으로 확인되었다.

표. 당류가 첨가된 GMP로부터 (이론치 NANA함유량 7%)의 생산수율 저해능력 평가

시험구	RT	Area	Height	ppm	분리율	G-NANA 분리 효율 (%)
SNANA1000ppm	9.838	10941	471.7	1000.0		
I.C.G-0Hour			ND		0.0	
I.C.G-1Hour	9.861	7788.4	88.5	187.6	1.3	22.3
I.C.G-2Hour	9.845	5276.9	106.3	225.4	1.6	26.8
I.C.G-3Hour	9.843	5382.8	108.2	229.4	1.6	27.3
I.C.G-4Hour	9.843	5240.5	106.1	224.9	1.6	26.8
I.C.G-5Hour	9.84	5824	110.5	234.3	1.7	27.9
I.C.G-5Hour-X	9.837	5420.8	109.5	232.1	1.7	27.6

- I.C.G : Included Carbohydrate Glycomacropeptide

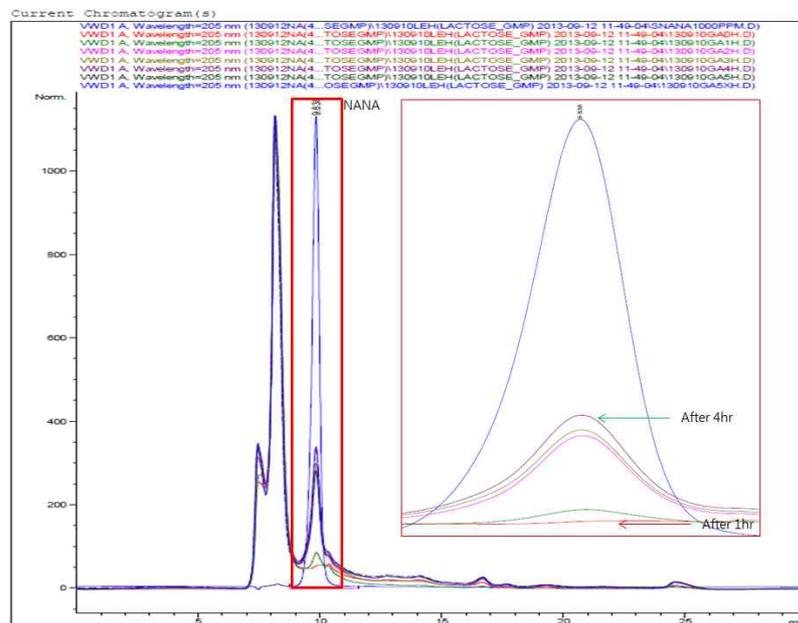


그림. 당류가 첨가된 GMP로부터 생산된 NANA의 생산수율 저해능력 평가 (HPLC)

② 당류 비함유 GMP 기질화 단계별 효소반응에 의한 G-NANA 분리율 평가 (선행 연구결과 인용)

당류 비함유 GMP로부터 G-NANA생산능력에 관한 평가로서, 시간별 G-NANA생산능력

은 효소 첨가 후 1시간이 경과하면 2.4%의 NANA가 분리되고, 이후 시간의 경과에 따라 분리율이 증가하는 경향을 보였으며 최종 6.9%까지 상승하였다(Table 2).

즉, 당류 비함유 GMP로부터 G-NANA 생산시 NANA 분리율은 7%이며 이론치 GMP내 NANA함유량이 6~7%였음을 감안하면 분리 관련 생산효율은 100%이상으로 확인 되었는데, 당류함유된 GMP를 기질로 제조된 G-NANA의 생산수율과 비교할 때 분리율은 3배 이상 낮은 것으로 확인 되었다.

이는 당류가 첨가된 GMP로부터 G-NANA를 생산함에 있어 당류가 G-NANA의 생산능력을 저해하는 것을 확인할 수 있다.

표. 당류가 첨가되지 않은 GMP로부터 G-NANA(이론치 NANA함유량 7%)의 생산수율 저해능력 평가

시험구	RT	Area	Height	ppm	분리율	G-NANA 분리 효율 (%)
SNANA1000ppm	9.886	11098.2	516.2	1000		
GMP 1000ppm			ND			
N.I.C.G-0Hour	9.870	12161.6	170.2	1648.6	2.4	39.2%
N.I.C.G-1Hour	9.873	12865.4	333.2	3277.4	4.6	76.8%
N.I.C.G-2Hour	9.873	14699.9	417.7	4045.9	5.8	96.3%
N.I.C.G-3Hour	9.876	15105.4	442.5	4286.1	6.1	102%
N.I.C.G-4Hour	9.879	15068.1	466.4	4517.6	6.5	107%
N.I.C.G-5Hour	9.890	14654.8	485.4	4701.7	6.7	111%
N.I.C.G-5Hour-X	9.893	14651.9	503.4	4876.0	6.9	116%

- N.I.C.G : Not Included Carbohydrate Glycomacropeptide

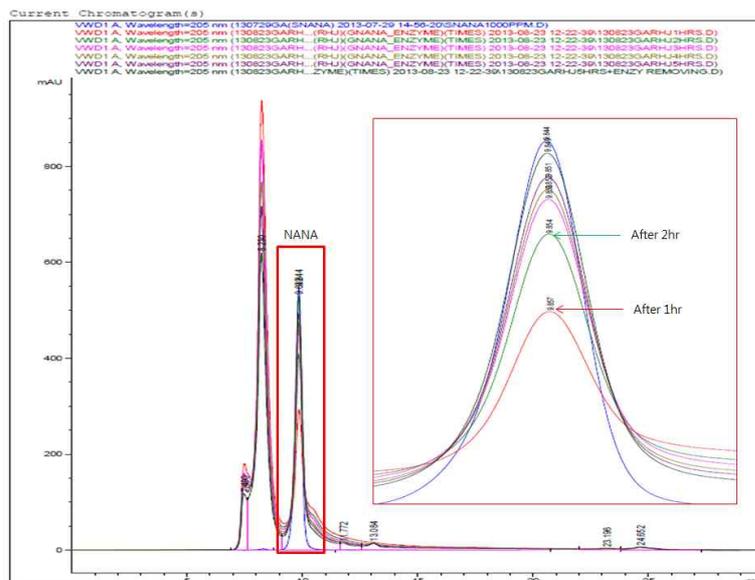


그림. 당류가 첨가되지 않은 GMP로부터 생산된 NANA의 생산수율 저해능력 평가 (HPLC)

(라) 결과

효소 가수 분해물로부터 NANA를 순도 높게 분리하기 위한 방법으로 당류가 G-NANA를 생산 시 생산능력을 저해함이 확인되었다. 기존 당류를 제거하지 않은 GMP로부터 G-NANA를 생산하는 것에 비해 당류가 포함되어있는 GMP로부터 G-NANA 생산 시 수율은 현저히 떨어짐을 알 수 있었다.

따라서 이를 구체적으로 확인하여 당류의 포함여부에 따른 생산능력 평가를 실험실적으로 정립하고 저 함이 본 연구의 목적이다.

이를 해결하기 위하여 이미 선행연구에 의해 정립되어있는 G-NANA생산기법에 의거 당류가 포함되어 있는 GMP로부터 실험공정을 진행하였으며, 최종적으로 높은 수율을 얻기 위해서는 GMP속 당류를 제거해야 함이 판단되었다.

(마) 결론

G-NANA의 생산효율을 극대화하기 위해서는 사전 유청 유래 분리 단백질로부터 유당 등 당류를 제거하는 것이 차후 생산단가 절감과 동시에 생산율이 증가함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에 의해 GMP로부터 G-NANA생산 시 유당 또는 당류를 분석한 후 이를 제거하는 공정이 필요함을 확인하였다.

라. 개발 G-NANA 제품 안전성(오염균 제균) 확립

(1) 연구목적

본 연구의 전체 연구개발 목표 중 최종은 개발제품인 G-NANA를 개발하고 이를 소재로 하여 암식이 및 항균(헬리코박터) 제어제로 사용함과 동시에 추후 용도·용법 및 응용성을 신규창출함으로써 다각적인 산업화에 목적이 있다.

따라서, 개발 G-NANA의 제품화 방향은 반제품으로 사용되는 경우와 최종사용자의 제품에 기능성 및 고부가 창출을 위한 첨가물로 사용하는 경우, 그리고 G-NANA자체를 완제품으로 활용하는 부분으로 구분할 수 있다.

그러나, 본 과제와 직접적인 관련되는 부분으로서 개발 G-NANA는 목표 암식이 제품화 시는 첨가물로서 활용 그리고 Helicobacter pylori 제어제로 사용하는 경우는 완제품으로 활용하는 경우에 해당되는데 이중 반제품으로 사용되는 경우에는 최종사용자의 제품의 제균시스템을 경유하므로 오염균에 대한 법적 규제사항을 준수하면 되지만, 완제품으로 직접제품화 하는 경우는 인체에 대한 공중보건학적 피해를 유발 할 수 있는 우려가 잠재되고 있다 할 수 있다.

또한, 본 과제의 개발목표 제품인 암식이 제품의 경우, 최종 G-NANA내 오염균이 감염되는 경우, 이들 오염균으로부터 LPS(Lipopolysaccharide)가 발생하는데, 이는 암식이 제품의 기능성을 면역증강에 목표를 두는 기준에서 LPS는 관련 면역을 감소시키는 역효과를 발생 할 수 있다고 예상된다.

따라서, 개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 열풍건조 단계에서 예상되는 오염균에 대한 제어를 할 수 있다면 상기에서 언급한 오염균으로부터 유발되는 문제점을 사전에 차단 할 수 있을 것으로 판단되어 본 연구를 실시하였다.

(2) 연구수행방법

(가) 다중 특성 보유 기질물질에 대한 제균성 평가

본 연구에서는 최종 G-NANA제품화 과정 중 원료 등으로부터 감염성에 기준을 두고 이에 대한 사전 제균성을 파악하기 위하여, 기질로서 TSB(Difco사)와 표준제조법으로 제조한 G-NANA(생명의나무, 한국)를 대상으로 공시균을 감염시킨 후, 이를 제거하기 위해 Spray Dry(BUCHI사, Mini Spray Dryer B-290, 스위스)를 이용하여 온도조건을 다른 조건에서 각각의 제균성을 확인하고 저 하였다. 이를 위한 기질별 시험방법을 다음과 같다.

① 시료준비 및 열처리 조건

준비된 기질별로 희석 및 멸균 처리후에 공시균을 오염시킨 조건을 조성 후 이들에 대한 제균성 평가를 위한 시험구 조성은 다음과 같이 준비하였다.

제균성 평가를 위한 공시균으로서는 그람음성균 *Enterobacter sakazakii* 및 그람양성균 *Bacillus cereus*을 사용하였고, 배지는 Tryptic Soy Broth(Difco™, Becton, Dickinson and company, USA)을 사용하였다.

우선 TSB시험구는 13%(w/v) TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*(1.0×10^9 cfu/ml), *B.cereus*(2.2×10^7 cfu/ml)을 혼합하여 이를 온도별 SD처리간 시료로 하였으며, 이때 대조구는 *E.sakazakii*, *B.cereus* 혼합균을 TSB에 첨가하여 동결건조 한 것으로 평가하였고, 실험구는 혼합균을 온도별 열처리한 구로 평가하였으며, 대조구는 *E.sakazakii*, *B.cereus* 혼합균을 TSB시험구에 첨가하여 동결건조 한 것으로 평가하였다.

G-NANA시험구 조성에 있어서는 G-NANA자체가 항균성을 보유하고 있음에 따라 정제수에 5%(w/v)되게 G-NANA를 희석 및 멸균처리를 실시한 후 이를 대상으로 TSB와 동일한 방법으로 진행하였다.

② 기질별 감염공시균에 대한 열처리 조건

준비된 기질별로 희석 및 멸균처리후에 공시균을 오염시킨 조건하에서 SD처리시 제균성 평가를 위한 온도조건은 시험군별로 다음과 같다.

TSB시험구의 SD 처리온도는 180℃, 170℃, 160℃, 150℃, 140℃, 130℃와 120℃ 8개의 온도처리군으로 하였으며, G-NANA 시험구는 120℃, 110℃, 100℃, 90℃, 85℃, 80℃ 및 70℃ 범위로 7개 온도처리군으로 하여 총 2개시험군, 총 15개 시험구로 조성하였다.

③ 기질별 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과 확인

준비된 시험구별로 설정온도범위에서 제균효과 평가를 위하여, 각각을 50ml씩 분취 후 온도조건별 SD를 처리하였으며, 처리한 SD분말별 10%(w/v)되게 TSB에 녹여 이를 미리 준비된 TSA 배지에 50μl씩 도말하여 37℃에서 18시간 호기성 조건에서 배양하여 균수

를 확인하였다.

(3) 결과확인

본 연구는 개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 열풍건조 단계에서 암식이 제품의 기능성을 면역증강에 목표를 두는 기준에서 오염균으로부터 발생하는 LPS (Lipopolysaccharide)가 관련 면역 감소시키는 역효과를 발생시키지 않도록 그 발생원인인 오염균을 제어하고자 한다.

이를 위해 우선적으로 TSB 시험구를 통하여 SD 열처리 조건에 따른 성장변화 및 제균효과 등의 기초자료를 정립하고 저 하였다.

① TSB 시험구의 열처리 조건에 따른 성장변화 평가

TSB 시험구의 SD 열처리 조건에 따른 제균효과 평가에 있어 SD처리시 온도변화에 따라 Spray Cylinder 내부의 TSB 시험구 성상을 부착과 탄화현상으로 구분하여 외형변화를 관찰하여 이를 결과치로 하였으며, 이때 +++는 매우심함, ++는 심함, + 초기발생 그리고 -의 경우는 변화없음으로 구분하여 이를 최종결과로 제시하였다.

② TSB 시험구의 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과 평가

13%(w/v) TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*(1.0×10^9 cfu/ml), *B.cereus*(2.2×10^7 cfu/ml)을 혼합하여 온도별 SD처리를 한 시료로 TSB에 녹여 TSA 배지에 50 μ l 씩 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 호기성 조건에서 배양하여 균수를 확인하였다. 균수를 확인한 후 균의 사멸률(%)로 평가하였다.

(4) 연구 결과

개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 열풍건조 단계에서 예상되는 오염균에 대한 제어를 목적으로 TSB 시험구 Spray dry 처리시 최종분말의 성장변화의 결과를 정립하고 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과를 확인 및 정립하여 이를 G-NANA 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과실험에 적용 및 활용하고자 하였다.

이를 해결하기 위해 TSB 시험구의 열처리 조건에 따른 성장변화 평가와 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과 평가 2가지를 진행하였는데 평가결과는 다음과 같다.

① TSB 시험구의 열처리 조건에 따른 성장변화 평가

TSB 시험구(13% TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*, *B.cereus* 혼합)를 대상으로 온도 다양성 조건(180, 170, 160, 150, 140, 130 및 120 $^{\circ}$ C)에서의 SD처리시 Spray cylinder 내부의 부착 및 탄화현상을 비교한 평가결과는 다음과 같다.

열처리 조건이 Spray cylinder 내부에 부착 및 탄화현상이 발생하는 온도범위를 살펴보니 열처리 온도 150 $^{\circ}$ C 이상에서부터 타는 현상 초기(+) 발생하기 시작하였고 온도가 상승할수록 더 심해지는 것을 알 수 있었다.

표. TSB시험구(13% TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*, *B.cereus* 혼합)의 온도다양성 조건에서의 Spray dry 처리시 최종분말의 성장변화 비교평가 결과

시험구	열처리 (°C)		ASPIRATOR (%)	PUMP (%)	Q-Flow (m3/h)	Nozzle (mm)	성장변화 (열변성#)	결과 (SD조건 정립)	비고
	Inlet	Outlet							
SD-180	180	114	90	9	40	0.7	+	비적합	덱스트린 비함유
SD-170	170	108	90	9	40	0.7	+	비적합	덱스트린 비함유
SD-160	160	102	90	9	40	0.7	+	비적합	덱스트린 비함유
SD-150	150	104	90	9	40	0.7	+	비적합	덱스트린 비함유
SD-140	140	90	90	9	40	0.7	-	적합	덱스트린 비함유
SD-130	130	87	90	9	40	0.7	-	적합	덱스트린 비함유
SD-120	120	82	90	9	40	0.7	-	적합	덱스트린 비함유

성장변화 : +++ (타는 현상 매우 심함), ++ (타는 현상 심함), + (타는 현상 초기발생), - (변화 없음)

: Spray cylinder 내 부착 및 탄화현상 발생여부

따라서, 본 연구의 목표는 개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 열풍건조 단계에서 예상되는 오염균을 제어하기 위한 SD조건을 사전에 정립하기 위함이므로 우선 온도조건별 성장변화(TSB 시험구 부착 및 탄화현상)에 있어 안전성을 확인하였으므로, G-NANA의 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과실험의 기초자료로 활용예정이다.

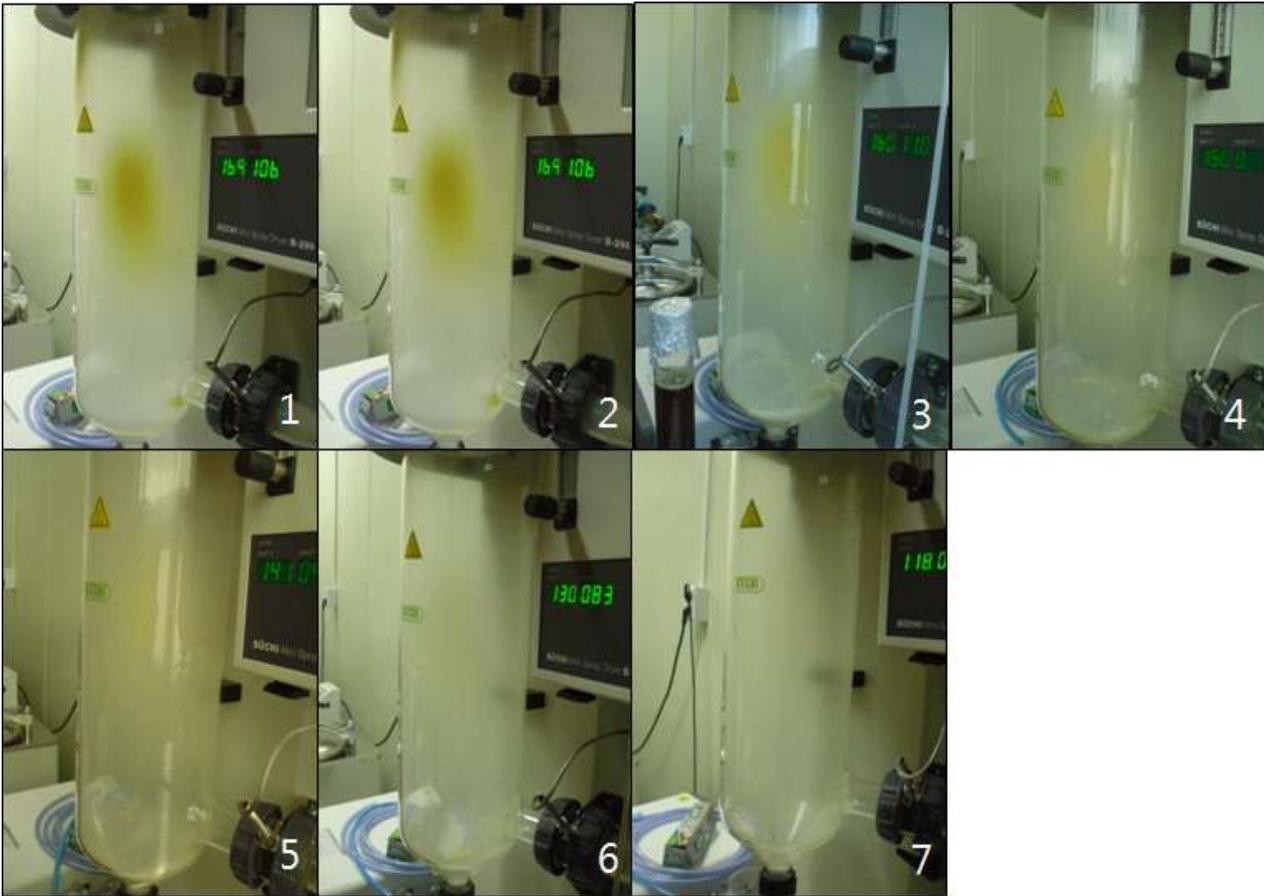


그림. TSB 시험구(13% TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*, *B.cereus* 혼합)의 SD 온도조건별 제균효과 평가

(평가방법 : Spray Dryer내 Cylinder내 부착과 탄화현상)

- 1 : SD열처리 조건(180℃, 시험구 SD-180), 2 : SD열처리 조건(170℃, 시험구 SD-170)
 3 : SD열처리 조건(160℃, 시험구 SD-160), 4 : SD열처리 조건(150℃, 시험구 SD-150)
 5 : SD열처리 조건(140℃, 시험구 SD-140), 6 : SD열처리 조건(130℃, (시험구 SD-130)
 7 : SD열처리 조건(120℃, 시험구 SD-120)

② TSB 시험구의 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과 평가

개발 우유 유래 NANA(이하 G-NANA)의 암식이 개발 및 헬리코박터 제어제품은 Spray dry 및 동결건조 제품으로 만들어지게 되는데 제품화 되었을 때 Spray dry 제품에 대한 제균 및 온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가가 필요하다.

따라서 공시균(그람음성, 양성균)에 대하여 SD 온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가에 대한 결과는 다음과 같다.

13%(w/v) TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*(1.0×10^9 cfu/ml), *B.cereus*(2.2×10^7 cfu/ml)을 혼합하여 온도처리 한 Spray dry내에서 *B.cereus*는 120℃ 및 130℃에서 사멸률 100%이었고, *E.sakazakii*는 180℃에서 100% 사멸률을 보였다. *B.cereus*는 170℃ 및 180℃에서 사멸률이 0%인 것을 확인하였고, *E.sakazakii*는 120℃ 및 130℃에서 사멸률이

0%였다. 즉, *B.cereus*는 내열성을 보유하고, *E.sakazakii*는 비내열성 균임을 확인하였다.

결론적으로, 공시균별 내열성 및 비내열성 온도범위를 확인했고, 그람양성균 및 그람음성균 동시사멸 온도조건은 140°C(사멸률 95%이상)이고 그람 양성균 제어온도조건은 120~160°C, 그람 음성균 제어온도조건은 140~180°C임을 확인할 수 있었다.

표. 혼합 공시균(그람음성, 그람양성균)에 대하여, SD온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가

혼합공시균		SD온도조건별 사멸패턴 조사(cfu/g)							
		대조 (동결)	180°C	170°C	160°C	150°C	140°C	130°C	120°C
<i>B.cereus</i>	생존 균수	4.0x10 ³	9.6x10 ⁴	7.6x10 ³	5.1x10 ²	5.5x10 ²	90	ND	ND
	사멸률 (%)	0 (기준)	0	0	87.25	86.25	97.75	100	100
<i>E.sakazakii</i>	생존 균수	3.1x10 ⁶	ND	300	140	2.8x10 ³	2.1x10 ⁴	2.0x10 ⁸	7.52x10 ⁸
	사멸률 (%)	0 (기준)	100	99.99	99.99	99.91	99.32	0	0

-ND : Not detect

-SD조건 : 13%(w/v) TSB 용액 멸균처리 후 *E.sakazakii*(1.0x10⁹cfu/ml), *B.cereus*(2.2x10⁷cfu/ml) 혼합

- 온도별 SD처리(8개구) : 대조(동결건조), 180°C, 170°C, 160°C, 150°C, 140°C, 130°C, 120°C



그림. 혼합 공시균(그람음성, 양성균)에 대하여, SD온도조건별 사멸패턴 및 내열성 평가

- SD조건 : 13%(w/v) TSB 용액 멸균처리후 *E.sakazakii*(1.0x10⁹cfu/ml), *B.cereus*(2.2x10⁷cfu/ml) 혼합

- 온도별 SD처리(8개구) : 대조(동결건조), 180°C, 170°C, 160°C, 150°C, 140°C, 130°C, 120°C

공시균(그람양성균, 그람음성균)에 대하여 TSB Spray dry 온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가에 대한 기초결과를 통해 공시균(그람양성균, 그람음성균)을 G-NANA에 감염시켰을 때 공시균에 대하여 TSB Spray dry 온도조건에 따른 사멸패턴과 비슷한 결과를 확인할 수 있는지 내열성, 비내열성 온도범위 확인 및 균 제어온도조건을 확인하여 개발 G-NANA의 제품화에 있어 제균조건의 기초결과로 사용할 예정이다.

마. 제균온도처리(SD)에 따른 G-NANA내 NANA물성 및 성상변화 평가

(1) 연구목적

본 연구의 연구개발 목표 중 최종은 개발제품인 G-NANA를 개발하고 이를 소재로 하여 암식이 및 항균(*Helicobacter pylori*) 제어제로 사용함과 동시에 추후 용도·용법 및 응용성을 신규 창출함으로써 다각적인 산업화에 목적이 있다.

개발 G-NANA의 제품화 방향은 반제품으로 사용되는 경우와 최종사용자의 제품에 기능성 및 고부가 창출을 위한 첨가물로 사용하는 경우, 그리고 G-NANA 자체를 완제품으로 하여 신규의 제품화에 활용하는 부분으로 구분할 수 있다.

그러나, 본 과제와 직접적인 관련되는 부분으로서 개발 G-NANA는 목표 암식이 제품화시는 첨가물로서 활용 그리고 *H.pylori* 제어제로 사용하는 경우는 완제품으로 활용하는 경우 등 다양성을 가지는 적용성 관련 요구에 부딪히는데, 이중 반제품으로 사용되는 경우에는 최종사용자의 목표제품은 제균시스템(열처리 조건)을 경유하여 최종 제품화 되는 단계를 밟게 된다.

이 경우 개발 G-NANA의 기능성분인 NANA가 다종의 열처리 조건에서 안전(정)하리라는 보장이 없기 때문에 실제적으로 개발G-NANA를 제품화 현장에 런칭함에 있어 반드시 관련 연구자는 열처리 등의 물리/이화학적 처리조건에 대한 안전성을 요구한다 할 수 있다.

따라서, 개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 현장조건을 수용하는 조건에서 다양한 Spray Dryer시스템내 온도범위에서 개발 G-NANA내 NANA성분의 변화가 유발되는지 혹은 G-NANA의 성상(부착 및 탄화현상 등)이 변화되는지 혹은 생산수율의증감등을 평가할 필요가 제기됨에 따라 실험실적 보유한 Spray Dry시스템을 이용하여 열처리 온도조건을 더 포괄적인 범위에서 상기 조건을 충족하는 최종 열풍건조 조건의 정립을 위하여 본 연구를 실시하였다.

(2) 연구수행방법

(가) 시료준비

본 연구를 진행 하기 위해 사용한 GMP는 (주)트라이콤무역(한국)에서 구매하여 사용하였으며, G-NANA 제조를 위해 핵심적으로 필요로 하는 효소인 Neuraminidase(역가치 0.5unit)는 (주)생명의나무에서 자체 제조하여 사용하였다.

기질 GMP(이론치 NANA함유량 7%)를 대상으로 효소반응 5시간이 경과시에 반응을 중

료하여 제조한 G-NANA는 사전정립된 EtOH(80%)용매분획 표준제조법에 준하여 제조하였는데, 본 실험에서는 이중 효소반응이 종료단계(NANA분리효율 100%)에서 이를 온도 다양성 조건별 SD처리가 기능성분 NANA함유량 변화와 G-NANA의 성상 변화 등에 미치는 영향이 있는지를 평가하기 위한 시료로 사용하였다.

(나) 온도다양성에 따른 G-NANA의 Spray Dryer처리조건

온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 성상변화 평가의 주요항목으로서는 테스트 시스템인 Spray Dryer기종에 시료를 분말화 공정을 진행시, 현장시스템 중 실린더 내 부착현상과 온도에 따른 탄화현상이 유발되는 경우 현장적용성은 어렵다고 할 수 있다.

이를 위하여, 액상상태의 GMP 가수분해물(기질 대비 이론치 NANA함유량 7%)를 대상으로 온도 다양성 조건별 SD처리가 기능성분 NANA함유량 변화와 G-NANA의 성상 변화 등에 미치는 영향이 있는지를 평가를 위하여, 준비된 시료(Stock Solution)를 다시 50ml씩 분취하여 이를 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110 및 100℃로 9개 온도처리구에 대하여 설정 온도 하에서 SD를 실시하였다. 대조구로서는 역시 동일 Stock solution에서 50ml를 분취한 후 이를 열처리 전 단계를 분석하여 이를 결과로 하였다.

(3) 결과확인

본 연구는 개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 현장조건을 수용하는 조건에서 다양한 Spray Dryer 시스템 내 온도범위에서 개발 G-NANA내 NANA성분의 변화가 유발되는 지 혹은 G-NANA의 성상(부착 및 탄화현상 등)이 변화되는지 혹은 생산수율의 증감 등을 평가할 필요가 제기됨에 따라 실험실적 보유한 Spray Dry시스템을 이용하여 열처리 온도조건을 더 포괄적인 범위에서 상기 조건을 충족하는 최종 열풍건조 조건의 정립하고자 하였다.

(가) 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 성상변화 평가

G-NANA를 제품화함에 있어 기능성분인 NANA의 함량변화가 SD처리시 온도변화에 따라 G-NANA성상을 부착과 탄화현상으로 구분하여 외형변화를 관찰하여 이를 결과치로 하였으며, 이때 +++는 매우심함, ++는 심함, + 초기발생 그리고 -의 경우는 변화없음으로 구분하여 이를 최종결과로 제시하였다.

(나) 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 생산수율 변화 평가

GMP로부터 G-NANA 제품화함에 있어 Spray Dry는 G-NANA의 생산수율과 연관되어 온도별 SD처리시 50ml의 같은 양을 분취하여 최종 분말의 양의 무게를 통해 온도별 수율을 비교 및 평가하였다.

(다) 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA내 NANA함유량 평가

SD처리가 기능성분 NANA함유량 변화와 G-NANA의 성상 변화 등에 영향을 미치는지

는 평가하기 위해 온도별 SD처리를 거친 최종 분말을 HPLC 분석을 통해 G-NANA내 NANA함유량을 온도별로 비교 및 평가하였다.

(4) 연구결과

Spray Dryer 시스템내 온도범위에서 개발 G-NANA내 NANA성분의 변화가 유발되는지 혹은 G-NANA의 성상(부착 및 탄화현상 등)이 변화되는지 혹은 생산수율의 증감 등을 평가하여 G-NANA 생산시 NANA의 성분 및 성상이 변하지 않는 조건에서 수율을 확보하는 것이 이번 연구의 목적이다.

이를 해결하기 위해 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 성상변화와 평가생산수율 변화, G-NANA내 NANA함유량 평가 3가지로 진행하였는데 평가결과는 다음과 같다.

① 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 성상변화 평가

액상상태의 GMP 가수분해물(기질 대비 이론치 NANA함유량 7%)를 대상으로 온도다양성 조건(180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110 및 100℃)에서의 SD처리시 G-NANA를 부착, 탄화현상 및 외형변화의 비교를 평가하여 보았다.

표. GMP 가수분해물(기질 대비 이론치 NANA함유량 7%)의 온도다양성 조건에서의 Spray dry 처리시 G-NANA 생산수율 및 성상변화 비교평가 결과

시험구	열처리 (℃)		ASPIRATOR PUMP (%)	Q-Flow (m3/h)	Nozzle (mm)	수율 (%)	성상변화 (열변성#)	결과 (SD조건 비교 정립)	
	Inlet	Outlet							
SD-180	180	101	90	20	40	0.7	85.9	+	적합
SD-170	170	96	90	20	40	0.7	82.3	+	적합
SD-160	160	91	90	20	40	0.7	75.9	+	비적합
SD-150	150	81	90	20	40	0.7	85.3	+	적합
SD-140	140	74	90	20	40	0.7	92.1	+	적합
SD-130	130	71	90	20	40	0.7	75.3	+	비적합
SD-120	120	63	90	20	40	0.7	83.4	-	적합
SD-110	110	59	90	20	40	0.7	81.9	-	적합
SD-100	100	51	90	20	40	0.7	69	-	비적합

성상변화 : +++ (타는 현상 매우 심함), ++ (타는 현상 심함), + (타는 현상 초기발생), - (변화 없음)

: Spray cylinder 내 부착 및 탄화현상 발생여부

결과로서, 열처리 조건이 Spray cylinder 내부에서 부착현상과 탄화현상이 유발되는 온도범위를 살펴보았더니, 130℃ 이상에서 내부 부착 및 탄화현상이 초기(+) 발생하였는데

이는 온도가 증가하면 할수록 이들의 현상은 심하게 나타나는 것으로 확인되었다. 이는 G-NANA의 구성물인 단백질과 NANA가 주요 성분임을 고려하면, 단백질 변성을 유발하는 온도범위가 120℃ 이하 조건에서는 안전성을 보유하는 것으로 확인된 결과였다. 따라서, 본 연구의 목표는 추후 개발 G-NANA의 현장 대량생산에 있어 최종제품을 분말화 하므로써, 장기보관성 및 핵심성분(NANA)보존성을 확보하기 위함과 경제성 있는 분말 제품화 획득 방안을 확보하기 위한 실험실조건을 사전에 정립하기 위함이므로 우선 온도조건별 정상변화(G-NANA의 부착 및 탄화현상)에 있어 안전성을 확인하였으므로, G-NANA의 현장생산과정(OEM)에서 협의관련 기초자료로 귀중하게 활용예정이다.

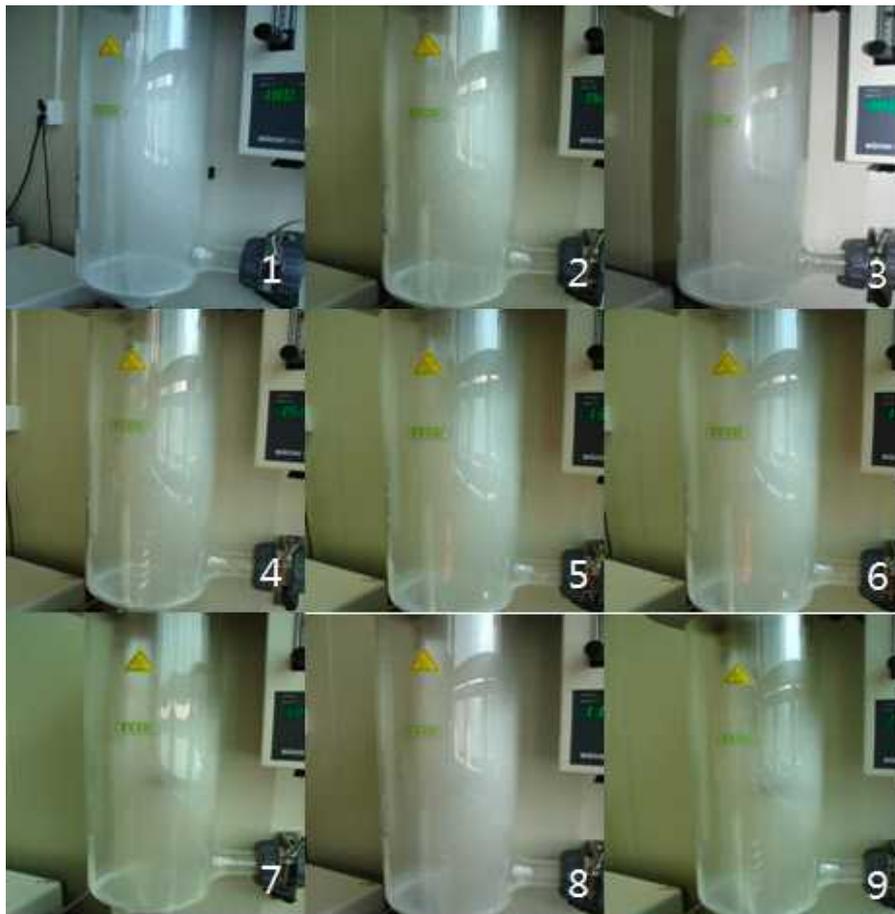


그림. 개발 G-NANA의 분말제품화 기법 정립을 위한 온도조건별 안전성 평가결과
(평가방법 : Spray Dryer내 Cylinder내 부착과 탄화현상)

- 1 : SD열처리 조건(180℃, 시험구 SD-180), 2 : SD열처리 조건(170℃, 시험구 SD-170)
- 3 : SD열처리 조건(160℃, 시험구 SD-160), 4 : SD열처리 조건(150℃, 시험구 SD-150)
- 5 : SD열처리 조건(140℃, 시험구 SD-140), 6 : SD열처리 조건(130℃, (시험구 SD-130)
- 7 : SD열처리 조건(120℃, 시험구 SD-120), 8 : SD열처리 조건(110℃,(시험구 SD-110)
- 9 : SD열처리 조건(100℃, 시험구 SD-100)

② 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 생산수율 변화 평가

G-NANA 생산시 Spray Dry는 G-NANA의 생산수율과 연관되어있기 때문에 온도별 SD 처리시 같은 양을 분취하여 온도별 최종시료의 수율을 비교해보았다.

SD 열처리 온도조건별 전체적인 생산수율을 살펴보았더니, 최초(SD전 G-NANA희석액 내 순수고형분 함유량 대비) 대비 최저 69%에서 최대 약 92%의 생산수율을 보였다. 이중 69% 생산수율을 보였던 SD-100시험구는 SD처리시 온도범위가 100℃로 낮았음에 따라 열풍건조 효율 또한 낮은 것으로 판단되었는데, 110℃ 이상의 온도처리구에서는 약 82% 이상의 생산수율을 보였다.

온도별 SD공정후 생산수율을 살펴보면 다음과 같다. 즉, 온도범위를 140℃로 설정한 시험구 SD-140의 경우 G-NANA가수분해물 대비 최종시료의 무게로 봤을 때 수율이 92.1%로 모든 시험구에서 가장 높게 측정되었다.

시험구 SD-160, -130 및 -100을 제외한 나머지 시험구 -180, -170, -150, -120 및 -110에서도 수율 80%이상으로 비교적 높은 수율이 측정되었는데, 시험구 SD-160, -130 및 -100의 경우는 오히려 수율이 80% 이하로 10~20% 정도차이로 낮아졌는데, 이러한 이유는 당초 분취시료의 SD공정중 공급량의 부족과 시험 간 오차범위로 인한 것으로 판단되었다.

③ 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA내 NANA함유량 평가

효소반응이 종료된 시점에서 GMP 가수분해물을 동량으로 분리후 이를 100~180℃ 범위 내에서 각각 SD처리후 최종 획득된 분말시료 내 NANA함량 변화를 검정(정립 HPLC분석시스템)함으로서 열조건에 따른 G-NANA 내 기능성분인 NANA의 함유량의 변화를 비교함으로서 G-NANA의 최종 제품화시 안전성에 영향을 미치는지를 확인하여 보았다.

표. GMP 가수분해물 온도별 SD처리를 거친 최종 분말의 HPLC 분석을 통한 G-NANA 내 NANA 함유량 평가결과

시험구	G-NANA 내 NANA 함량(ppm)
CNTL	1,963
SD-180	1,973
SD-170	1,936
SD-160	1,986
SD-150	1,958
SD-140	1,919
SD-130	1,997
SD-120	1,984
SD-110	1,937
SD-100	1,841

CNTL : GMP 가수분해물(5시간 효소반응 완료시료)의 분취시 함유된 NANA양(SD처리전)

SD-100~180 : GMP 가수분해물(5시간 효소반응 완료시료)의 50ml 분취 후 100~180℃ 온도조건에서의 Spray dry 과정실시

결과로서, 대조로서 기질 GMP 대비 효소반응이 종료된 시점에서 G-NANA내 NANA함 유량은 1,963ppm(기준)의 수치를 보였는데, 이를 기준으로 전체 열처리 조건별 설정시 험구의 NANA측정량을 살펴보았더니 최저 1,841ppm에서 최대 1,997ppm의 검출결과를 보였다.

이러한 결과는 SD처리시 열처리 조건을 저온의 경우는 100℃ 그리고 10℃ 단위로 증가 시키면서 최대 180℃ 범위 조건으로 설정한 후 SD처리공정을 진행하더라도 G-NANA내 핵심성분이 NANA의 구조 및 물성변화에 미치는 영향은 없는 것으로 평가된 결과였다.

따라서, 본 연구의 목표는 추후 개발 G-NANA의 현장 대량생산에 있어 최종제품을 분말화 하므로써, 장기보관성 및 핵심성분보존성을 확보하기 위함과 경제성 있는 분말 제 품화 획득 방안을 확보하기 위한 실험실조건을 사전에 정립하기 위함이다.

이는 현장 Spray Dryer시스템의 적용에 있어 관련된 주요한 기초자료를 확보하였다 할 수 있으며, 이는 추후 G-NANA의 대량현장 생산시 기초협의 자료로 활용예정이다.

(5) 결론

본 연구의 목표는 추후 개발 G-NANA의 현장 대량생산에 있어 최종제품을 분말화 하므로써, 장기보관성 및 핵심성분보존성을 확보하기 위함과 경제성 있는 분말 제품화 획득 방안을 확보하기 위한 실험실조건을 사전에 정립하였다.

결론으로서, 개발 G-NANA를 SD처리공정을 활용하여 분말제품화하려면 110~120℃의 온도조건이라면 핵심기능성분인 NANA의 성분변화에 미치는 영향이 없으면서 또한 생산수율도 83% 이상으로 나타나 적절하였으며 동시에 G-NANA 현장생산관련 가장 난점인 부착 및 탄화 현상 발생문제를 동시에 해결 할 수 있다는 결과를 본 연구를 통하여 확보하였다.

이는 현장 Spray Dryer시스템의 적용에 있어 관련된 주요한 기초자료를 확보하였다 할 수 있으며, 이는 추후 G-NANA의 대량현장 생산시 기초협의 자료로 활용예정이다.

3. 시제품 생산을 위한 G-NANA 생산기법 정립

가. G-NANA 시제 생산 및 분석

(1) 목적

임상 실험을 위한 G-NANA 시제 생산

(2) 재료 및 방법

(가) 종균준비

① 1차 seed culture

㉠ stock된 *A.ureafaciens* 16ml을 멸균된 LB broth 160ml에 접종

㉡ 30℃에서 150rpm으로 18시간 배양

② 2차 seed culture

- ㉞ 1차 seed culture된 배양액을 16L 영양배지(LB broth)에 접종
- ㉟ 30°C 에서 150rpm의 조건으로 5시간 반 동안 OD₆₀₀값이 0.3~0.35가 될 때까지 배양

(나) 효소배양

① 재료

- ㉞ M9배지 350L 멸균[M9 배지조성 : CaCl₂(0.015g/l), Na₂HPO₄(6g/l), KH₂PO₄(3g/l), NaCl(1g/l), MgSO₄(0.5g/l), NH₄Cl(1g/l)]
- ㉟ 10% GMP(GMP 3.976kg + R/O 39.76L) 별도멸균
- ㊱ 7.94.5ml 1M MgSO₄ 별도멸균
- ㊲ 39.77 1M CaCl₂ 별도 멸균

② 효소생산

- ㉞ 800L 반응기에 M9배지 350L를 조성하고 멸균처리(121°C, 15분)를 한 후 30~35°C로 온도를 저하시킴
- ㉟ 멸균된 1M MgSO₄(794.52ml), 1M CaCl₂(39.77ml) 첨가
- ㊱ 멸균된 준비된 기질 10% GMP (GMP 3.97kg+R/O수 39.76L) 투입
- ㊲ 종균배양 된 선발 종균(A.ureafaciens KCTC 3387)을 16L(본 배양액의 4%) 접종
- ㊳ 150rpm, 0.5vv/m, 0.5kgf/m², 30°C 조건으로 배양
- ㊴ 16시간 배양 후 반응 종결
- ㊵ 종결 후 filter press로 균 filter
- ㊶ 여과액 UF(20KDa, 2배농축)
- ㊷ 동결건조

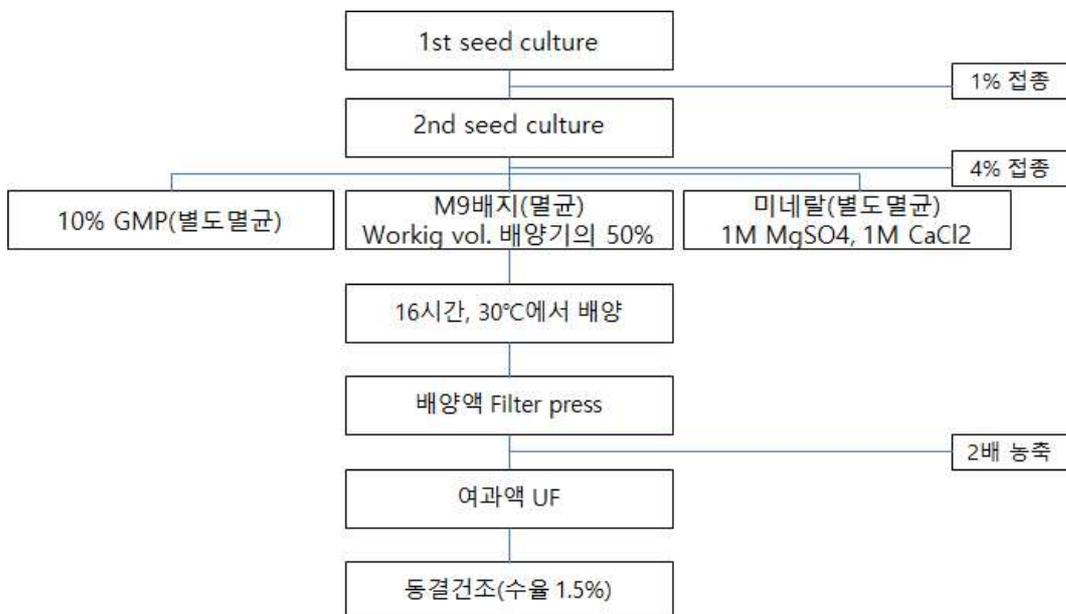


그림. 효소대량생산 process

(다) 7% NANA 생산(대량 양산)

- ① 반응기에 사전 준비된 효소 420g과 물 200kg을 충전
- ② 150rpm 교반
- ③ GMP를 14kg 투입(교반 150rpm유지)
- ④ 55℃로 승온(교반 150rpm유지)
- ⑤ 승온시점부터 5시간 동안 교반(55℃, 150rpm)
- ⑥ 95℃에서부터 30분간 효소실활
- ⑦ 여과 보조제를 첨가하여 여과
- ⑧ 여과액 농축
- ⑨ 2차 여과
- ⑩ 여과액 Spray dry 후 체별



그림. 7% NANA 대량생산 process

(라) NANA 분석

- ① 재료 : S-NANA 98%(Standard), G-NANA 7%, 1차 증류수
- ② 실험방법
 - ㉠ 대조구 : S-NANA
 - S-NANA 0.1g을 취하여 물 10ml에 용해(1%, 10000ppm)
 - Vortex 후 sonication 30분
 - syringe filter(0.2µm, 13HP)로 여과하여 HPLC 분석
 - ㉡ 시험구 : 7% G-NANA(SD)
 - G-NANA 0.5g을 취하여 물 5ml에 용해(10%, 100000ppm)
 - Vortex 후 sonication 60분

- sonication 후 4배 dilution
- syringe filter(0.2 μ m, 13HP)로 여과하여 HPLC 분석

㉔ HPLC 분석조건

Detector	UV detector
Wavelength.	205nm
Column	Aminex® HPX-87H Ion Exclusion Column (300 × 7.8 mm, 9 μ m)
Mobile Phase	A-10mM H ₂ SO ₄ in water(Isocratic mode)
Running time	20min
Flow rate	0.5mL/min
Injection volume	10 μ l
Temperature	40°C

(3) 결과

- (가) 효소배양에서 *Arthrobacter ureafaciens*의 균수는 6.94×10^9 CFU/ml
- (나) 배양된 효소를 20KDa로 2배 UF 했을 때 NANA의 분해능은 8.12%
- (다) 동결건조 된 효소의 수율: 1.5%
- (라) 7% GNANA(SD)의 NANA 함량 : 6.58%, 수율 : 70%
- (마) 7% GNANA(SD)의 체별 포장 후 총균수 및 대장균군
 - 총균수 : 170 CFU/ml, 대장균군 : 음성

표 . 대량생산 효소시제 NANA 분리능 평가(반응조건 : 55°C, 150rpm)

시험구	분취 효소액의 시간별 NANA분해능 평가결과(%)				비고
	1hr	3hr	5hr	22hr	
대조(매일,효소)	4.66	7.56	6.67	7.03	
M9배지(균접종전)	ND	ND	ND	ND	
Crude(16시간 배양 효소)	6.91	9.68	8.38	6.89	A.ureafaciens 6.94×10^9 CFU/ml
20KDa UF(20KDa 이상)	5.89	8.16	8.12	6.6	2.3 brix (수율 1.5%)
20KDa 이하 폐액-초기	0.56	1.12	1.34	3.03	1.7 brix
20KDa 이하 폐액-중기	0.55	1.04	1.28	1.72	1.8 brix
20KDa 이하 폐액-말기	0.82	1.54	1.84	3.93	1.96 brix

표. G-NANA 대량생산 시제(액상) pH, 수율 및 생존균수 확인(CFU/ml)

시험구	효소 반응후	효소실활 후 (95°C, 30분)	GNANA 여과 (1차여과)	GNANA 농축 후	GNANA 농축 재여과 (2차여과)	GNANA 제균 여과 후	
액상	pH	6.63	6.66	6.71	6.55	6.53	6.59
	Brix	8	7.7	6.8	23.7	20.1	20.1
	총 균수(cfu/ml)	60	960	4.36×10^3	2.38×10^3	5.48×10^4	180
	대장균군(cfu/ml)	0	0	3.8×10^2	0	3.2×10^4	0

표. G-NANA 대량생산 시제 생존균수 및 G-NANA 함량확인

시험구		GNANA 생산시제를 통한 수율, 균수 확인 및 NANA 함량 평가(%)			
		GNANA SD 체별 전		GNANA SD 포장 후 (9.8kg)	
		1	2		
Spray Dry	총균수(cfu/ml)	10	70	170	
	대장균군(cfu/ml)	0	0	0	
	NANA 함량(%)	NT	NT	6.58% (수분함량 : 4.2%)	
	수율(%)	NT	NT	70%	

4. 유기태화 미네랄류 소재 표준제조법 정립

가. 연구목표

- (1) 암 환자 식이 개발을 위한 소재 개발
- (2) 유기태화 미네랄 소재류 표준제조법 정립

나. 연구내용

- (1) 최적 유기태화 기질 WPS 선발
- (2) 각 미네랄류 별 유기태화 소재 세척 횟수 결정
- (3) 각 미네랄류 별 생산수율 증대기법 확보

다. 재료 및 방법

(1) 재료

- (가) 미네랄 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, SeO_2)
- (나) 1st dd H_2O
- (다) 농축 유청 단백질 분말 (이하 WPS)

(2) 방법

(가) 최적 유기태화 소재 및 농도조건 설정

- ① WPS의 최대 포화농도 확인
 - 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 10%
- ② WPS의 최대 분리 온도조건 확인
 - 60°C, 70°C, 80°C, 90°C
- ③ WPS의 최대 분리 온도조건에서의 시간별 분리능 확인
 - 30min, 1hr, 2hr, 3hr

라. 결과

(1) WPS의 최대 포화농도 확인

- 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 10% → 40%에서 최대포화

(2) WPS의 최대 분리 온도조건 확인

- 60°C, 70°C, 80°C, 90°C → 80°C에서 최대 분리

(3) WPS의 최대 분리 온도조건에서의 시간별 분리능 확인

- 30min, 1hr, 2hr, 3hr → 30min에서 분리능이 제일 좋음

(4) 수율 및 ICP Data

종류	조성			수율				미네랄 량 (ppm)							
	WPS (g)	Mineral (g)	H ₂ O (mL)	반응 후			수율 (%)	일반 미네랄					P/S	기타	이후 침강속
				건조 전 (g)	건조 후 (g)	수분 함량 (%)		Ca	Fe	Cu	Zn	Se			
Ca-WPS	2202.14	894.98	4400	913.4	306.28	33.53	13.91	38,800	25	0.44	3.55	ND	13,740 / 2,589	4,970	1.65
Fe-WPS	2204.94	967.47	4400	975.414	287.37	29.46	13.03	10,990	19,120	10	7.43	11	12,950 / 5,358	3,948	25.73
Cu-WPS	2002	800.56	4400	954.238	271.9	28.49	13.58	5,757	35	49,890	21	2.48	13,190 / 11,320	4,374	0.95
Zn-WPS	2402.48	965.54	4800	832.475	240.61	28.90	10.01	12,560	12	5.53	15,190	ND	17,080 / 6,300	3,680	0.33
Se-WPS	3207.84	131.52	6400	852.717	204.09	23.93	6.36	1,275	6.79	1.04	ND	5,202	1,706 / 5,229	1,145	0.79

(5) 유기태화 소재 표준제조법

- (가) WPS : Mineral : 1st dd H₂O = 10 : 4 : 20를 잘 섞는다(단, SeO₂ 는 10 : 0.4 : 20).
- (나) 80°C, 30min, 150RPM으로 반응시킨다.
- (다) Centrifuge (4,000rpm, 20min, 25°C)로 최초 원심분리한다.
- (라) 이후 같은 조건으로 7회 원심분리하여 세척한다. (단, SeO₂ 는 10회)
- (마) 최종 침전물을 동결 건조시킨다.

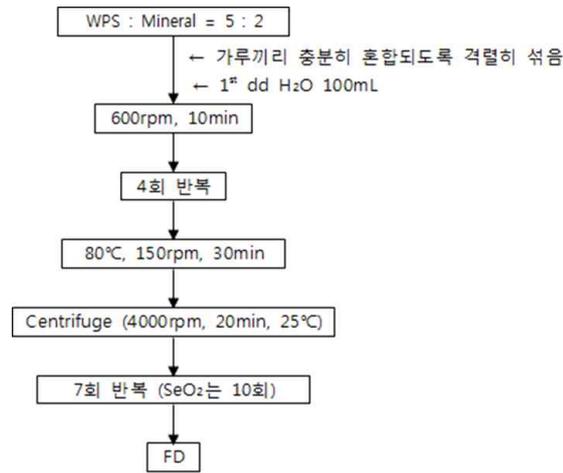


그림. 유기태화 미네랄 소재류 표준제조법

5. 유기태화 미네랄류 소재 수율 증대 및 대량생산조건 확립

가. 연구목표

- (1) 최적 유기태화 기질 WPS 선발
- (2) 각 미네랄류 별 유기태화 소재 세척 횟수 결정
- (3) 각 미네랄류 별 생산수율 증대기법 확보

나. 실험방법

- (1) 유청분말 단백질과 결합하는 미네랄의 최적 농도조건 설정
 - 각 미네랄 종류별 농도구배 변화시 함량확인 (5:2, 5:1.5, 5:1, 5:0.5)

(가) 실험내용

- ① WPS : Mineral : 1st dd H₂O = 5 : 2(1.5 / 1 / 0.5) : 10를 잘 섞는다. (단, SeO₂ 는 5:0.2 / 0.15 / 0.1 / 0.05 : 10)
- ② 80°C, 30min, 150RPM으로 반응시킨다.
- ③ Centrifuge (4,000rpm, 20min, 25°C)로 최초 원심분리한다.
- ④ 이후 같은 조건으로 7회 원심분리하여 세척한다. (단, SeO₂ 는 10회)
- ⑤ 최종 침전물을 동결 건조시킨다.

- (2) 지방의 함량이 적은 WPS로 미네랄과 결합 확인

- 4% Fat WPS + FeSO₄ : 수율확인, 함량확인

(가) 실험내용

- ① WPS를 DW에 1:2의 비율로 녹인다. (WPS2)
- ② 80°C 에서 30min간 처리한다.
- ③ 실온에서 냉각 후 원심분리하여 상등액을 취한다..
- ④ 여기에 DW의 1/10의 Mineral(CuSO₄)을 넣고 잘 섞는다.

- ⑤ 원심분리하여 침전물을 수득하고 침전물은 FD, 상등액은 SD한다.
(침전물이 생기지 않으면 모두 Spray Dry)
- ⑥ 얻은 상등액과 침전물을 각각 가수분해 전처리 한다.
- ⑦ ICP-OES를 통해 미네랄을 분석한다.
- ⑧ 각기 다른 3개의 유청분말을 가지고 실험한다.

(3) 유기태화 미네랄의 제조시 주정첨가에 따른 미네랄의 함량변화

(가) 실험내용

- ① WPS + Mineral + DW를 각각 2.5g , 0.5g , 25mL을 넣고 섞는다.
(단, DW는 5mL씩 5회에 걸쳐 투입)
- ② 80℃에서 30분간 150RPM으로 반응시킨다.
- ③ Sample을 Centrifuge처리군, EtOH 처리군으로 나누고, 각각의 실험군을 다시 EtOH비첨가, EtOH 10%첨가, EtOH 20% 첨가군으로 나눈다.
- ④ EtOH비첨가군과 EtOH 10%첨가군은 1Hour~5Hour관찰하고, EtOH 20%첨가군은 1, 2 Hour관찰.

다. 결과

(1) 유청분말 단백질과 결합하는 미네랄의 최적 농도조건 설정

미네랄별 WPS와의 최대결합 농도구배 조건은 Ca-WPS-5:2, Fe-WPS-5:1, Cu-WPS-5:0.5, Zn-WPS-5:0.5, Se-WPS-5:2 로 나타나 최종적으로 5:1로 배합하기로 하였다.

		WPS무게 (g)	FD후무게 (g)	수율(%)
WPS		12.5	0.231	1.85
5;2	Calcium	12.5	1.628	13.02
5;1.5		12.503	1.328	10.62
5;1		12.495	1.207	9.66
5;0.5		12.5	1.151	9.21
5;2	Iron	12.49	0.915	7.33
5;1.5		12.496	0.615	4.92
5;1		12.494	1.003	8.03
5;0.5		12.49	0.716	5.73
5;2	Copper	12.5	0.895	7.16
5;1.5		12.5	1.255	10.04
5;1		12.5	1.648	13.18
5;0.5		12.5	2.208	17.66
5;2	Zinc	12.506	1.378	11.02
5;1.5		12.496	1.469	11.76
5;1		12.49	1.588	12.71
5;0.5		12.497	1.704	13.64
5;2	Selenium (Selenium Dioxide)	12.49	0.881	7.05
5;1.5		12.496	0.19	1.52
5;1		12.51	0.149	1.19
5;0.5		12.505	0.202	1.62
5;2	Selenium (Sodium Selenite)	12.496	0.182	1.46
5;1.5		12.502	0.162	1.29
5;1		12.503	0.133	1.06
5;0.5		12.498	0.123	0.98

(2) 지방의 함량이 적은 WPS로 미네랄과 결합

4% Fat Fe-WPS & Fe-WPS를 비교한 결과 Fe-WPS는 수율이 8.03% (WPS : FeSO₄ = 5 : 1, 7회세척)이고, 4% Fat Fe-WPS의 수율은 48.1% (4%Fat WPS : FeSO₄ = 5 : 1, 3회세척)으로 나왔으나 미네랄 함량이 적어 수율의 증대 효과는 나타나지 않았다. 또한 유청분말 종류에 따른 함량의 변화도 나타나지 않았다.

#	Sample Name	시험결과(μg/g)
1-1	Calcium	1,062
1-2	Iron	8,981
1-3	Copper	54,690
1-4	Zinc	30,53
1-5	Selenium	1,675
2-1	WPS 1	52,260
2-2	WPS 2 (매일유업)	45,730
2-3	WPS 3 (4% Fat)	55,470

(3) 유기태화 미네랄의 제조시 주정첨가에 따른 미네랄의 함량변화

유기태화 미네랄의 수율을 높이기 위해 주정을 첨가하였으나 0~20%에서는 큰 변화가 일어나지 않았다.

		Mineral Contents (ug/g)		
Not Centrifuge	EtOH 0%	1Hr	1,466	
		2Hr	1,686	
		3Hr	1,574	
		4Hr	1,721	
		5Hr	1,844	
	EtOH 10%	1Hr	1,269	
		2Hr	1,751	
		3Hr	1,610	
		4Hr	1,632	
		5Hr	1,889	
	EtOH 20%	1Hr	1,235	
		2Hr	1,554	
		EtOH 0%	1Hr	36,890
			2Hr	37,960
3Hr	37,650			
4Hr	37,940			
5Hr	37,110			
Centrifuge	EtOH 0%	1Hr	37,820	
		2Hr	38,030	
		3Hr	38,040	
		4Hr	38,470	
		5Hr	37,760	
	EtOH 10%	1Hr	37,030	
		2Hr	38,910	

라. 결론

(1) 유기태화 미네랄 양산 공정

유기태화 미네랄의 대량 생산을 위한 양산 공정을 2가지로 압축하여 OEM회사와 진행 중에 있으며, 2가지 공정은 아래와 같다.

(가) UF농축/수세 공정

- ① 유청단백질 + 상수 1 : 2 혼합하여 용해한다.
- ② 80°C 에서 30분 교반하며 용해
- ③ F/P여과하여 불용성 성분제거
- ④ WPS의 수용성 단백질 20%에 CuSO_4 첨가 후 용해한다.
- ⑤ F/P여과하여 불용성 성분제거
- ⑥ UF농축한다. (MwCO 20,000Da) 농축액에 상수 가하여 저분자 물질 수세제거 한다.
- ⑦ 농축후 수세액을 회수, 농축한다.
- ⑧ 농축액을 건조한다.

(나) 주정침전공정

- ① 유청단백질 + 상수 1 : 2 혼합하여 용해한다.
- ② 80°C 에서 30분 교반하며 용해
- ③ F/P여과하여 불용성 성분제거
- ④ WPS의 수용성 단백질 20%에 CuSO_4 첨가 후 용해한다.
- ⑤ F/P여과하여 불용성 성분제거
- ⑥ 1:3비율의 주정을 첨가하여 침전 및 수세(1~4회)
- ⑦ 침전물을 회수한다. 진공 건조한다.

제 3절. 개발소재(Sialic acid(G-NANA) 및 유기태 미네랄)의 분석법 정립

1. 목적 : 유단백질 원료 대비 GMP(NANA제조 원료) 분리 정제 및 NANA 연구개발 단계간 필수분석법[영양성분 변화, 분자량 변화, 유기산류(NANA포함) 확인, 당류(5종) 검정, 지방산 및 항균성 검정방법(미생물 검사)]정립

2. 필수분석 정립항목 별 내역(기준: 식품공전, 분석방법)

가. 영양성분 분석법 정립부분 : NANA 개발간 순도 및 영양성분 변화 조사

(1) 조단백질 함량분석 : 킬달분석법 적용

(가) 적용분석법 : 식품첨가물공전(2008), 제10 일반시험법, 1)일반성분시험법, 3)질소화합물, (1)총질소 및 조단백질

(2) 조지방 함량 분석 : 거버법 적용

(가) 적용분석법 : 수의과학검역원(2007), 축산물의 가공기준 및 성분규격, IV 원유.식육.원료알의 시험법, (2)시험법, (나) 지방측정법

(3) 당류(5종)분석 : HPLC 분석법 적용

(가) 목적 : 유단백질(GMP)에서 NANA분리 후 순도 확인 시, 순도관련 탄수화물 함유량 조사 실시를 위함.

(나) 재료 및 방법

① 적용 분석법 : 식품공전(2008), 제10 일반시험법, 1)일반성분분석법, 5)탄수화물

② 분석대상 당류(우유 유래 탄수화물) : Lactose, Galactose, Glucose, Fructose, Sucrose

③ 검정방법

㉠ 최저검출한계 검정 : 1%(w/v) 당류(5종, Lactose, Galactose, Glucose, Fructose, Sucrose) 용액

㉡ 조성-> 당류별 5,000ppm, 1,000ppm, 100ppm, 10ppm, 1ppm, 0.1ppm희석시료-> 검출효율 검정

㉢ 검출효율 검정

- 대조 : (멸균유 4.5ml + ddH₂O 0.5ml) + ACN 5ml -> 교반 -> 30분 Sonication -> 0.2 μm필터 -> HPLC분석

- Spiking Test(100ppm) : [멸균유 4.5ml(4ml) + 1% 당류별 표준체 조성액 0.5ml(1ml) + ACN 5ml -> 교반 -> 30분 Sonication -> 0.2μm필터 -> HPLC분석

(다) 분석시스템 구성 및 분석조건

<p>1. 분석시스템 구성(Agilent HPLC)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Degasser : Model G1322A - QuatPump : Model G1311A - Autosampler : Model G1313A - ColCom : Model G1316A - Detector(RI) : Model G1365B 	<p>2. 분석조건</p> <ul style="list-style-type: none"> - Column : Carbohydrate(5um)(4.6 x 150mm) - Mobile Phase :ACN(75):ddH2O(25) - Flow Rate : 1.0ml/min. - Column Temp. : 35°C - Injection Vol. : 20ul
--	--

(라) 당류별 HPLC 검출한계 및 검출효율 검정결과

- 당류분석방법 정립완료(검출한계 : 10ppm이상, 검출효율 : 92~108%)

표준체별 조성내역 (당류 : 5 종)	최저검출한계(ppm)	검출효율(%)
Lactose 0.1~5,000ppm	10	108
Galactose 0.1~5,000ppm	10	97.9
Glucose 0.1~5,000ppm	10	92.5
Fructose 0.1~5,000ppm	10	105
Sucrose 0.1~5,000ppm	10	92.2

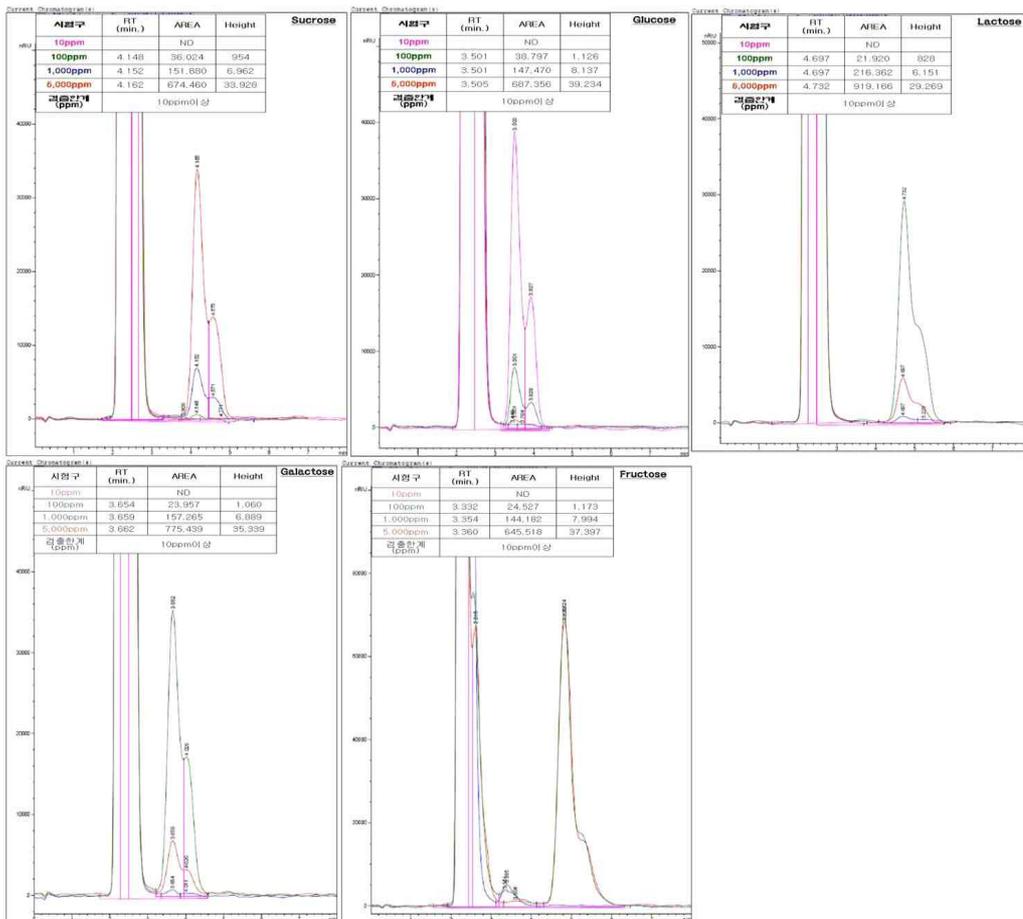


그림 . 농도별 조성된 당류별 표준액의 최저검출한계 검정(HPLC Peak analysis)

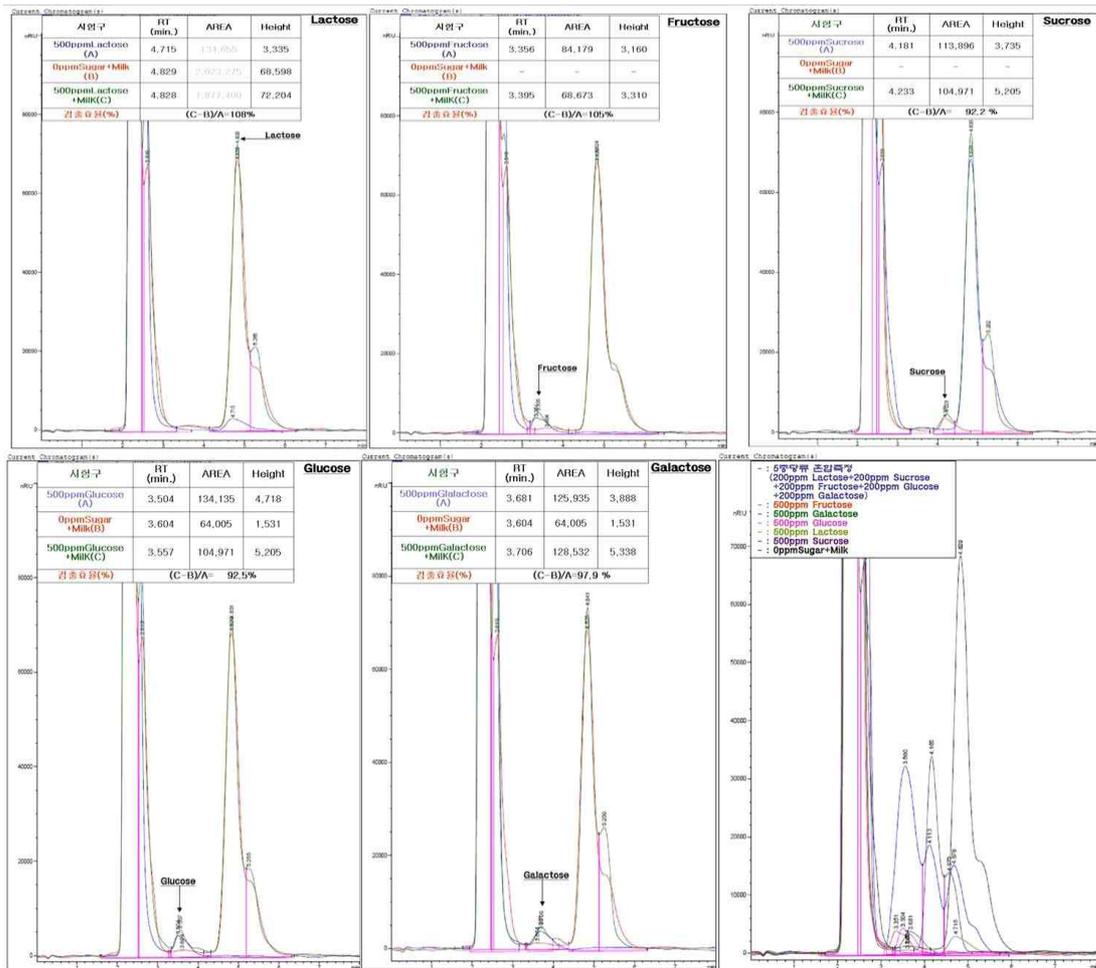


그림 . 시유내 첨가 후 당류별 HPLC 검출효율 검정 Peak analysis

(4) 지방산 분석법 : GC(FID) 분석법 적용

(가) 목적 : 유단백질(GMP)내 NANA개발간 지방산 검정을 위한 분석법 정립

(나) 적용분석법:식품공전(2008),제10 일반시험법, 1일반성분분석법, 5)지질,(4) 지방산<제1법>

(다) 결과 : 분석법 정립완료

(5) 미네랄 함유량 분석 : ICP 분석법 적용

(가) 목적 : 유단백질(GMP)내 NANA개발간 미네랄 검정을 위한 분석법 정립

(나) 재료 및 방법

① 분석방법 및 기종 : ICP-OES시스템(모델 : Optima 5300DV, Perkin Elmer사, USA)

- 전처리 : 마이크로웨이브 시스템 병행적용

② 전처리 및 분석방법 : 스텝 1 : 분석샘플 분취(0.5g) -> 스텝 2 : 가수분해용액 첨가 (70% HNO₃ 7ml+H₂O₂ 1ml) -> 스텝 3 : 유기물제거(마이크로웨이브시스템, 190℃ 20분) -> 스텝 4 : Mass-Up(2% HNO₃ 용액 첨가 최종 50ml로 조절) -> 스텝 5 : ICP샘플 별 3반복 측정 -> 스텝 6 : 결과도출(평균±표준편차)

③ 분석항목(10 항목) : Ca, P, Cu, Fe, Mg, Mn, K, Na, Zn, S

(다) 결과 : 검출효율(99%이상), 최저검출한계(100ppb이상)

나. 분자량 변화분석법 정립 부분 : FPLC 분석

(1) 목적

(가) NANA안전(정)성 변화(분자량) 평가

(나) 장단기/, 비/열처리시 NANA 및 단백질 분자량 이동 패턴 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 운용시스템 : FPLC(UPC900+D920+CU950)

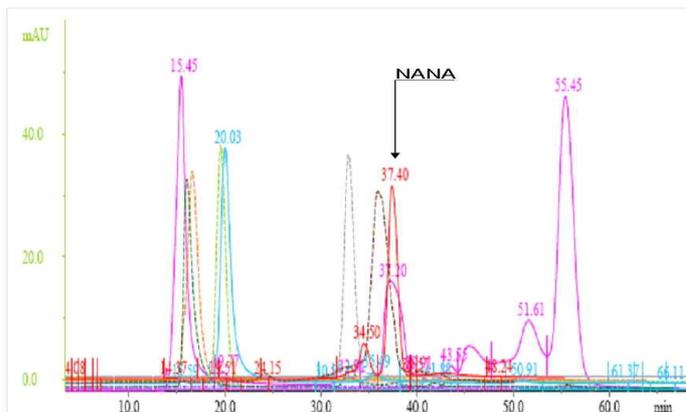
(나) 분석조건

- column(Temp.) : Sephadex Peptide 10/300GL(35' C), Suprose 12 10/300GL
- Mobile Phase : Phosphate buffer(50mM Na₂HPO₄+10mM NaCl+ddH₂O 1L)
- Flow rate : 0.5ml/min.
- Press : 0.84PSI
- injection volumn: 100ul
- 표준체 내역

표준체명	분자량	비고
NANA	309.3	Murukin사(일본)
Vitamine B12	1,355	Sigma
Aprotinin	6,500	FPLC Calibration kit(USA)
Chtochromec	12,384	
Ribonuclease-A	13,700	
Ovalbumin	43,000	
Conalbumin	75,000	
Aldolase	158,000	
Myosin	212,000	

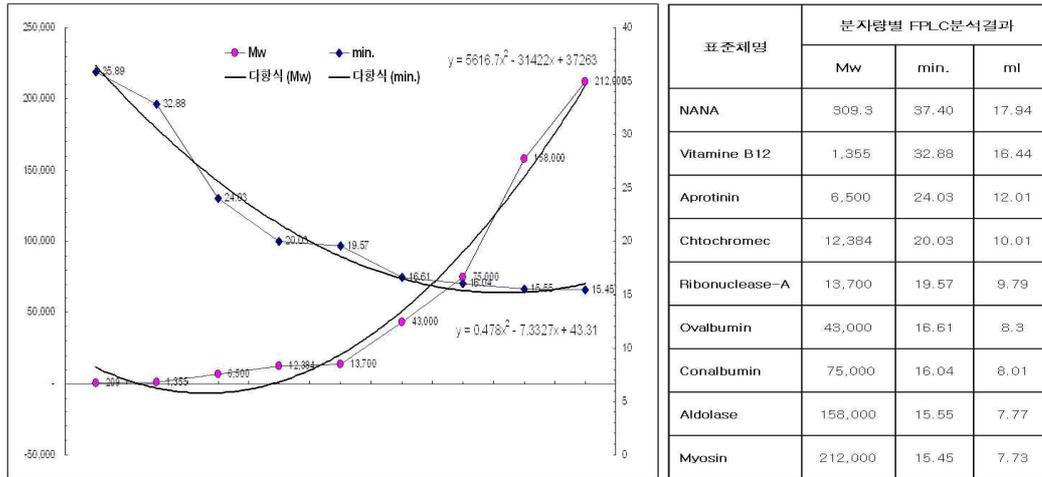
(3) 결과 : 분자량 분석법 정립 및 검량곡선 작성

(가) 표준체를 대상으로 한 FPLC 검정결과 : 측정효율(97%)



표준체명	FPLC분석결과		
	Mw	min.	ml
NANA	309.3	37.40	17.94
Vitamine B12	1,355	32.88	16.44
Aprotinin	6,500	24.03	12.01
Chtochromec	12,384	20.03	10.01
Ribonuclease-A	13,700	19.57	9.79
Ovalbumin	43,000	16.61	8.3
Conalbumin	75,000	16.04	8.01
Aldolase	158,000	15.55	7.77
Myosin	212,000	15.45	7.73

(나) 표준체를 대상으로 한 FPLC 검정결과를 활용한 검량선 작성결과



다. NANA 및 관련 유기산 검정

(1) 목적 : 개발 NANA에 대한 순수 검정법을 확립하고, 이를 NANA 자체, 유제품 첨가 시 검출 한계와 회수율 확인 및 장/단기 보관 시, 열처리 전/후에 있어 안전(성) 확인에 적용코져 함.

(2) 재료 및 방법

(가) HPLC 분석시스템 구성 및 분석조건

<p>1. 분석시스템 구성(Agilent HPLC)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Degasser : Model G1322A - QuatPump : Model G1311A - Autosampler : Model G1313A - ColCom : Model G1316A - Detector(UV) : Model G1365B 	<p>2. 분석조건</p> <ul style="list-style-type: none"> - Column : AMINEX HPX-87(300mm x 7.8mm) - Mobile Phase : 10mM H2SO4 - Flow Rate : 1.0ml/min. - Column Temp. : 40°C - Injection Vol. : 10ul - Detection(UV): 205nm
--	--

(나) NANA 검출효율 검정을 위한 실험조성표 및 결과(시유 첨가실험)

시험군	실험조성 내역	검출효율(%)
대조-1 (NANA 500ppm)	(3rd ddH ₂ O 9ml+NANA 1,000ppm첨가)->교반(30분) ->5ml 분취->5ml ACN첨가 ->Sonicating(30분) ->0.2um Filtering->HPLC측정	96.3
처리구-1 (우유+NANA 500ppm)	(우유 9ml+NANA 1,000ppm첨가)->교반(30분) ->5ml 분취->5mlACN첨가->Sonicating(30분) ->0.2um Filtering->HPLC측정	
대조-2 (NANA 1,000ppm)	(3rd ddH ₂ O 9ml+NANA 1,000ppm첨가)->교반(30분) ->5ml 분취->5mlACN첨가 ->Sonicating(30분) ->0.2um Filtering->HPLC측정	98.3
처리구-2 (우유+NANA 1,000ppm)	(우유 9ml+NANA 1,000ppm첨가)->교반(30분) ->5ml 분취->5mlACN첨가->Sonicating(30분) ->0.2um Filtering->HPLC측정	

(다) NANA 검출한계 검정을 위한 실험조성표 및 결과

표준제조성(함유량)	실험조성내역	검출한계(%)
NANA 0.1ppm	3rd ddH ₂ O + NANA 0.1ppm 조성	ND
NANA 1ppm	3rd ddH ₂ O + NANA 1ppm 조성	108.4%
NANA 10ppm	3rd ddH ₂ O + NANA 10ppm 조성	90.7%
NANA 100ppm	3rd ddH ₂ O + NANA 100ppm 조성	93.0%
NANA 500ppm	3rd ddH ₂ O + NANA 500ppm 조성	100%(기준)
NANA 1,000ppm	3rd ddH ₂ O + NANA 1,000ppm 조성	114%

(3) 결과 : NANA 분석방법 정립

- 검출효율(96%이상), 검출한계(1ppm 이상)

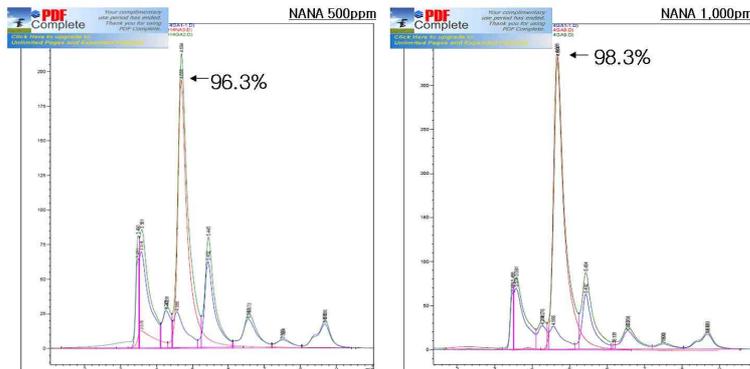


그림. 시유내 농도별첨가 NANA에 대한 검출효율 검정(HPLC분석)결과

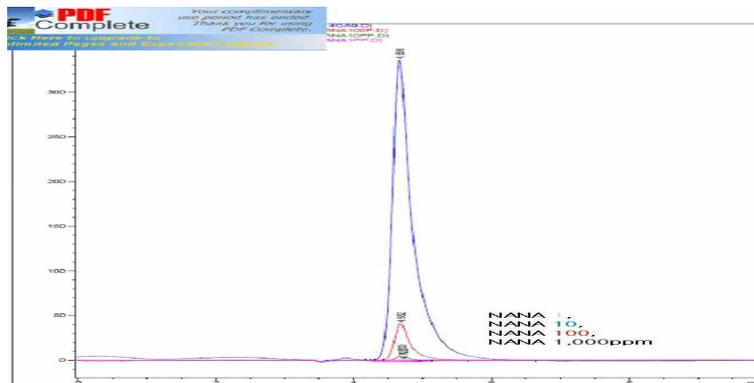


그림. 농도별 표준 NANA시료에 대한 최저검출한계 측정결과

라. 항균성(미생물) 검사법(식품공전기준) 정립

(1) 목적 : G-NANA제제 개발 시 예측되는 감염균 확인 및 항균성 검정을 위한 미생물 분석 방법 정립

(2) 재료 및 방법

(가) 총균수 정성시험

- 식품공전(2008), 제10일반시험법, 8 미생물시험법, 2) 세균수(일반세균수)

(나) 대장균군 정성시험

- 식품공전(2008), 제10일반시험법, 8 미생물시험법, 5)~6)대장균(군)

(다) 진균수 정성시험

- 식품공전(2008), 제10일반시험법, 8 미생물시험법, 9) 진균수(효모 및 사상균수)

(라) 유산균 정성시험

- 식품공전(2008), 제10일반시험법, 8 미생물시험법, 8)유산균수

(마) 유해세균 정성시험(*E.sakazakii*, *E.coli* O157:H7, *B.cereus*등)

- 수의과학검역원(2007), 축산물의 가공기준 및 성분규격, 9 미생물 시험법
- 식품공전(2008), 제 10 일반시험법, 제 11 시약·시액표준용액 등

(3) 결과 : 정립완료

마. 개발 NANA 및 유기태화 미네랄류 성장(물성) 분석 : 순도 및 간섭효과 평가

(1) FT-IR분석

- (가) 목적 : 개발 NANA 순도분석 및 간섭효과 평가(분석법 정립 : 내열성 보유 유단백질인 유청분말(아산공장, 유효기간 : 2010.02.03)를 기준으로 미네랄 킬레이팅 도입량별 기능기 확인]

(나) 재료 및 방법

- ① 분석시료 준비 : 대조(유청분말), 비교-1(칼슘-킬레이팅 유청분말, 칼슘-함유량 30,000ppm), 비교-2(칼슘-킬레이팅 유청분말, 칼슘 함유량 :100,000ppm)
- ② 분석샘플준비(KBr-Pellet Disc법) : 시료(1) : KBr(1,000)비율로 혼합 -> 0.1g 분취 -> Hand Press (8,000Kg)/3분 -> Pellet -> FT-IR측정
- ③ 분석기종 및 측정범위 : Bruker Optics IFS66/S기종, 4,000~600Cm-1/Resol : 4Cm-1
- ④ 기능기 분석 : Peak analysis방법 적용(분석기종 Data Base비교)

(다) 결과 : 분석법 정립완료

시험구	관련기능기 변화 평가 결과		비고
	칼슘함유량(ppm)	킬레이팅 관련기능기	
유청분말(대조)	9,936	-	
칼슘-유청분말(비교-1) (Ca함유량:30,000ppm)	36,450	- NH2 - COOH	기능기 도출
칼슘-유청분말(비교-2) (C a 함 유 량:100,000ppm)	104,600	- NH2, - COOH - SH -P	-기능기 차이 극대화 -칼슘 치환 가능 기능기 : -NH2, -COOH,-SH, -P임

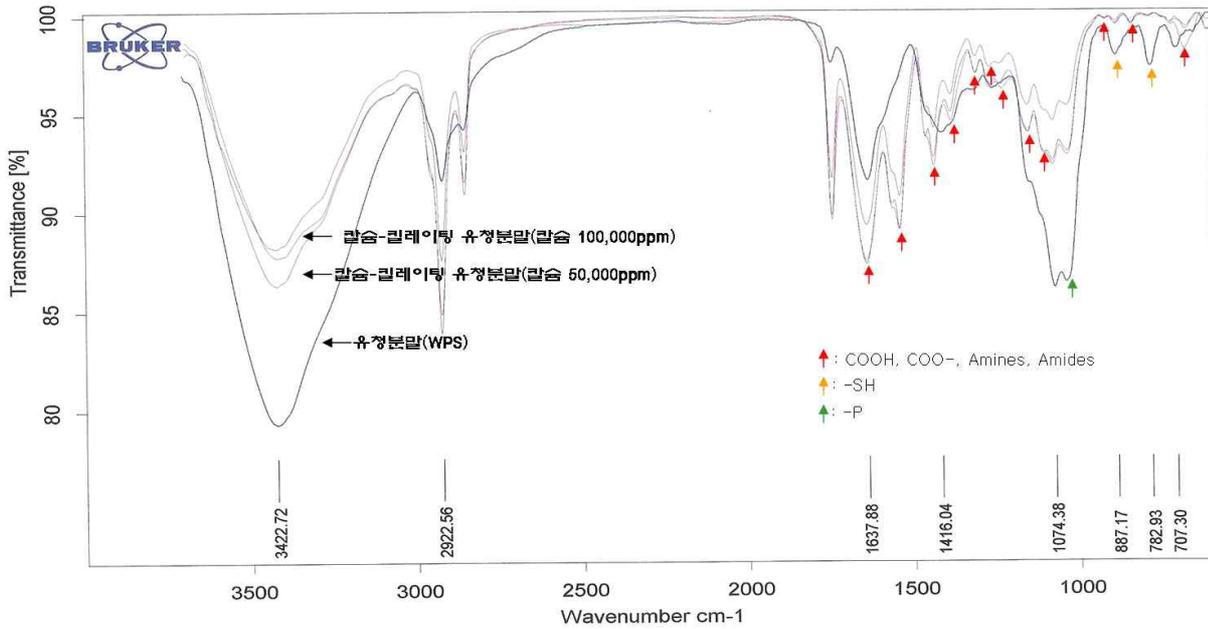


그림 . 동일 유청분말 대비 칼슘이 농도별 킬레이팅 시킨 시료별 관련 기능기 분석결과

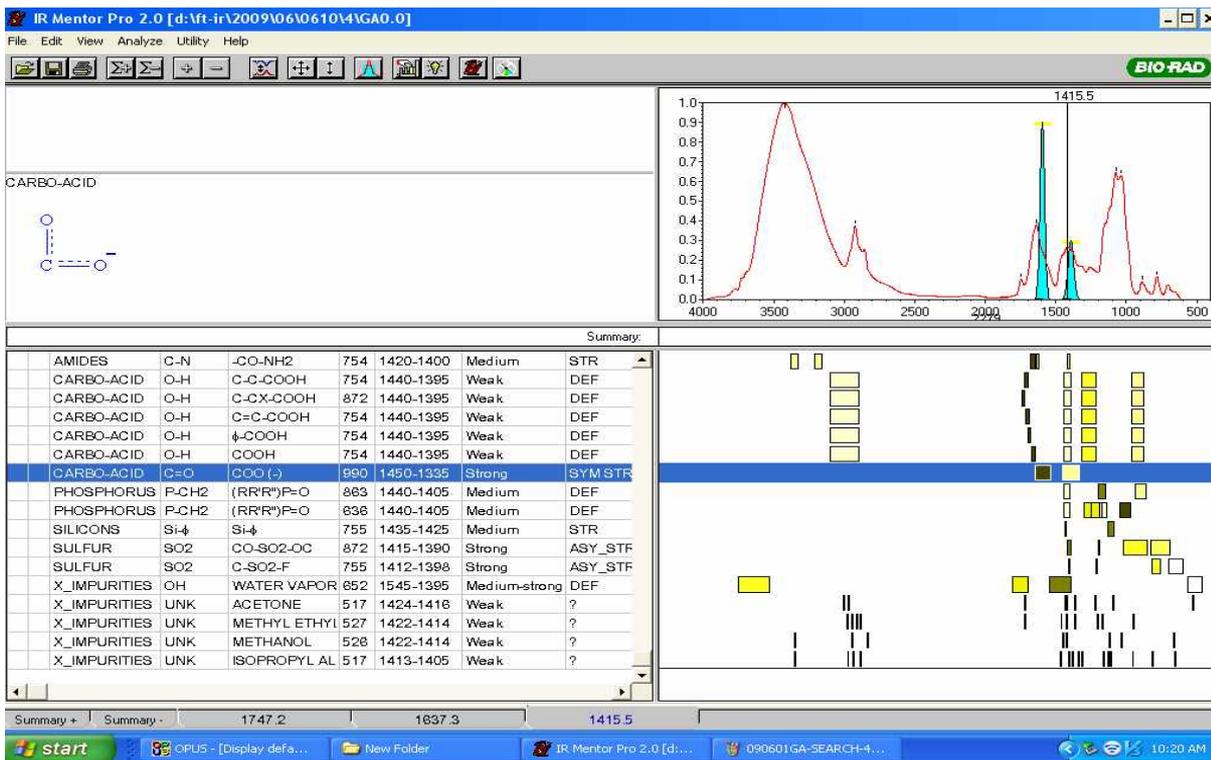


그림 . 기능기 변화 결과 비교를 위한 Peak analysis

(2) XRD분석

(가) 목적 : 개발NANA 및 유가태화 미네랄류 순도조사 및 킬레이팅 유발 관련구조분석

(나) 재료 및 방법

- ① 분석기종 : PDR XRD(Model D8-FOCUS, 독일 Bruker사)
- ② 적용분석 프로그램 : DIFFRACplus XRDWIZARD 2.9버전
- ③ 표준체(시료) : 대조(유청분말), 비교구[Ca-WPS(칼슘-유청분말), 칼슘 함유량 :100,000ppm]
- ④ 분석방법 :
 - ㉞ Type: 2Th/Th locked - Start: 5.000° - End: 59.993° -Step: 0.020° -Step time: 17.5s
 - ㉟ Temp.: 25°C(Room) -Time Started: 17s - 2-Theta: 5.000° -Theta:2.500° -Chi: 0.00

(다) 결과

- ① 결과 1 : 칼슘은 유청분말내 킬레이팅시 6종류의 Formular형태를 보임.
- ② 결과 2 : 표준체 NANA 대비 개발 NANA분석간 적용분석법 정립 완료

XRD결과	XRD 확인 Compound Name(Formular)	Y-Scale	dxby	Wavelength	System
01-086-1221 (C)	Calcium Potassium Phosphate Hydrate [Ca ₂ K ₂ (P ₆ O ₁₈).6H ₂ O]	43.56	1	1.5406	Monoclinic
00-026-1056 (*)	Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ .6H ₂ O]	119.95	1	1.5406	Triclinic
00-034-0148 (I)	Anapaite[Ca ₂ Fe+2(PO ₄) ₂ H ₂ O]	49.53	1	1.5406	Triclinic
00-034-1239 (C)	Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [CaK ₃ H(PO ₄) ₂]	38.57	1	1.5406	Monoclinic
00-009-0077 (*)	Brushite.syn[CaPO ₃ (OH).H ₂ O]	40.58	1	1.5406	Monoclinic
00-038-0263 (*)	Calcium Sulfide Phosphate [Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ S]	44.59	1	1.5406	Hexagonal

XRD결과	a	b	c	alpha	beta	gamma	Bravais L.	Space Group
01-086-1221 (C)	7.266	11.833	12.3	90	103.17	90	Primitive	P21/n (14)
00-026-1056 (*)	9.529	18.994	6.855	92.33	90.13	79.93		
00-034-0148 (I)	6.4508	6.8187	5.9017	101.65	104.26	70.76	Primitive	P-1 (2)
00-034-1239 (C)	9.88	5.733	7.432	90	94.1	90	Base-centered	C2/m (12)
00-009-0077 (*)	6.363	15.19	5.815	90	118.5	90	Base-centered	Cc (9)
00-038-0263 (*)	9.4554	9.4554	6.8405	90	90	120	Primitive	P63 (173)

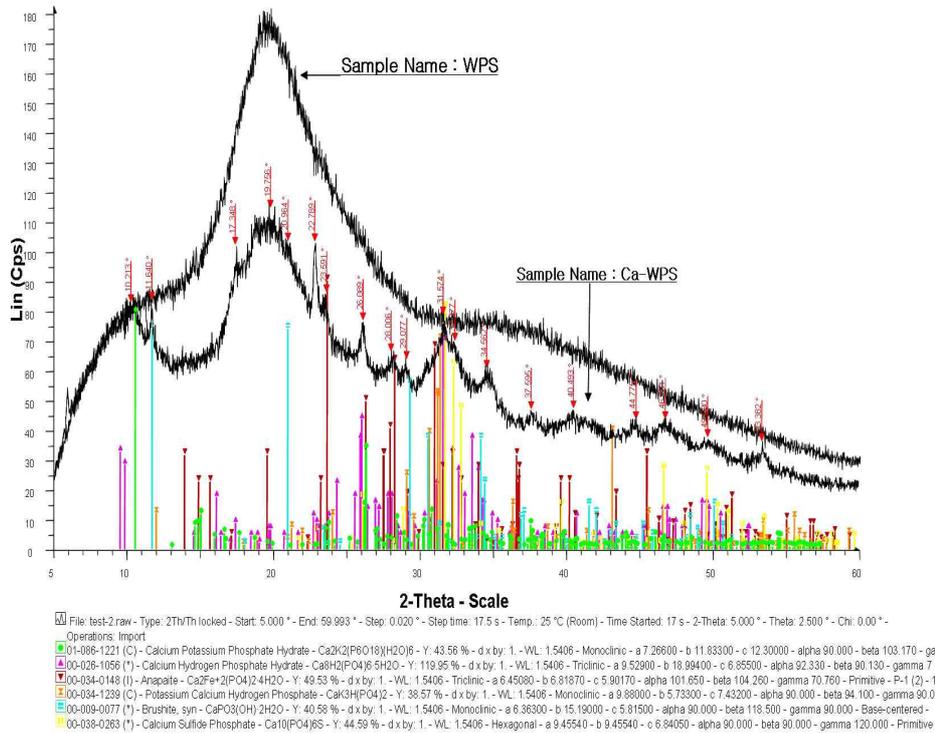


그림. 개발NANA 순도조사 및 구조분석법 정립을 위한 XRD분석결과 - WPS: 표준체
유청분말, Ca-WPS : 표준체 칼슘-유청분말

(3) SEM분석

(가) 목적 : 유단백질(GMP)내 NANA(합성NANA대비)분리과정 연구과정에서 형태(성상)비교분석을 통한 순도 조사를 실시하였으며, 분석법은 성상 차이를 확인하기 위한 차원에서 NANA분리용 원료인 유청분말(WPS)와 칼슘이 킬레이팅된 동일 유청분말을 사용하여 비교검정 하였음.

(나) 재료 및 방법

- ① 분석기종 : FE-SAM(Model JEOL-JSM 7000F, 독일 JEOL사)
- ② 표준체(시료) : 대조(유청분말), 비교구-1[Ca-WPS(칼슘-유청분말), 칼슘 함유량 :36,450ppm], 비교구-2[Ca-WPS(칼슘-유청분말), 칼슘 함유량 : 104,600ppm]
- ③ 분석방법 : 해당기기 분석운용 시스템 운용권장사항 준수

(다) 결과 : 분석법 정립완료

시험구	시료별 칼슘함유량(ppm)	SAM검정결과
대조(유청분말)	9,936	몽침형태 보유
비교구-1	36,450	분리형태
비교구-2	104,600	구형형태

제 4 절. G-NANA 제품 안전성(제품QA) 평가기법 정립

1. 연구목표

NANA의 경우 식품첨가물(식약처, 기능성원료 및 식품 기준)로서 허가되어 있다 하더라도 안전성 평가는 필수항목이다. 선행연구(건양대 결과)에 따르면 개발 우유유래 NANA의 보관과정 내 오염균의 감염에 따른 LPS 보유가 평가되어 오염균에 의한 제품QA를 위한 평가기법의 정립이 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 대량생산된 GMP에서 분리한 개발 우유유래 NANA(이하 G-NANA) 대비 합성 NANA(S-NANA)를 통하여, 사전에 표준세포주를 사용하여 세포주에 대해 제품 안전성을 기초자료로 확보하고, 차후 암식이 개발과 헬리코박터 제어 제품화 QA 평가기법을 *in vitro*조건에서 정립하고자 한다.

이를 위하여, 대조시약 대비 합성 NANA(이하 S-NANA), 개발 우유 유래로서 오염균 감염에 따른 LPS 보유 NANA(이하 OG-NANA) 그리고 개발 우유유래로 무균상태에서 오염균 감염없이 제조한 NANA(이하 NG-NANA)를 시료로 하여 표준세포주를 이용한 염증관련 및 세포독성 평가 등의 연계를 통한 NANA의 제품 안전성 평가를 한다.

최종적으로, 추후 NANA의 암식이 개발과 헬리코박터 제어 제품 안전성 평가하기 위한 기초자료로 활용코져 본 연구를 수행하였다.

2. 연구수행방법

가. NG-NANA 제조(시료준비)

기존의 개발 우유유래 NANA 생산기법으로 제조된 G-NANA의 경우는 오염균 감염에 따른 LPS 보유 가능성이 예측(건양대 결과)된 NANA(이하 OG-NANA)였는지가 의심되어 오염균 감염여부를 확인 결과 역시 오염으로 인한 세균이 검출되었는데, 이들은 감염 후 생존간 부산물로 LPS를 균별로 다르게 생성 할 수 있다는 결과가 예측되었다.

균종별 생성된 LPS류는 생체에 흡수되어 면역(본 과제목표 면역증강형 암식이 개발 해당) 등을 감소시킴이 기보고 되어 있으므로 인하여 이에 대한 비교 평가가 절대적 필요성이 대두되었다.

이를 위하여 본 연구에서는 무균상태에서 오염균 감염없이 제조한 NANA는 새로운 제조공정으로 GMP로부터 개발 우유유래 NANA(이하 NG-NANA)를 검정시료로 사용하였으며, 대조시약은 합성 NANA(이하 S-NANA)를 사용하였다. NG-NANA의 생산기법은 다음과 같이 서술하였다.

따라서, 본 연구에서는 기존 정립되어 있는 G-NANA의 생산공정을 적용하되 계균조건에서 오염균이 없는 시료를 제조하기 하기 위하여, EtOH 농도조절을 통한 제조법 정립을 위하여 총 6단계 과정으로 수행하였다.

1 단계로서, GMP 70g을 분취한 후 여기에 1차 정제수를 1Kg 되게 mass-up 되게 투입후

기질 GMP를 용해 시킨 후, Formic Acid 시약을 첨가하면서 pH를 5로 조절하였다.

2 단계로, 온도를 40°C 까지 승온 시킨 후 효소(Neuramidase)를 기질대비 1%인 0.7g을 넣고 효소반응을 5시간 진행하였다.

3 단계로는, 2단계 반응이 종결되면 30분간 55°C 에서 실활 시키고 20분간 Centrifuge (4000RPM, 20min, 25°C)를 통해 침전물(G-NANA 이외 불용성 단백질)과 상등액(목표 G-NANA)으로 각각 분리하였으며, 이중 상등액 분리물은 별도로 보관하였다. 이중 침전물에 대하여는 당초 투입된 기질인 GMP 대비 분획수율을 확인을 위하여 건조과정을 실시하였다.

4 단계는, 2 단계에서 분리된 침전물만을 반응기에 투입하고 80% EtOH 희석액을 반응물 대비 3배수가 되도록 첨가한 후 교반과정을 통하여 잔류하고 있는 NANA를 원심분리 과정을 통하여 세척분리 하였다.

5 단계는, 3단계 및 4단계에서 분리된 각각의 상등액(pH 6으로 조절)을 혼합한 후, 25%(Brix 기준) 농축 및 분리용매인 EtOH제거를 동시에 진행하였다.

6 단계는, 5단계 반응이 종료되면 동결과정을 수행하므로써 NG-NANA제조를 완료하였다.

나. 제품 안전성(제품QA) 평가용 NG-NANA 준비

G-NANA의 생산공정 내 제균조건 및 제품 안전성 평가를 위하여 오염균이 없는 시료를 제조하기 위하여 GMP로부터 G-NANA의 생산과정을 멸균조건에서 수행하였다.

우선 GMP 70g을 분취한 후 증류수를 1L가 되도록 Mess Up 하고 교반기를 통하여 교반하였고, 다음 단계로 반응기의 온도를 GMP의 가수분해 효율 사전평가시험 결과를 토대로 42°C 까지 승온 시킨 후 효소(Neuramidase)를 기질대비 1%인 0.7g을 넣고 효소반응을 2시간 진행하였다. 이후 반응기의 온도를 57°C 까지 승온 시켜 30분간 실활시키고 G-NANA의 순도를 증가시키기 위하여 20분간 Centrifuge(4000RPM, 20min, 4°C)를 통해 불용성 단백질을 침전 시켰다. 상등액 200ml를 채취해 EtOH 80% 용액이 되도록 EtOH 800ml를 투입하고 다시 한번 Centrifuge(4000RPM, 20min, 25°C)를 통해 불용성 단백질을 침전 시켰다.

마지막 G-NANA 생산공정 내 여과단계를 거치기 전, pH농도를 조절하기 위하여 NaOH를 투입하여 PH를 7.0~7.2로 조절하고 syringe filter(0.45µl)를 사용하여 여과함으로써 제균 하였다. 이 후 상등액을 80%정도 농축을 하여 EtOH을 제거하고 동결건조를 통해 무균상태로 오염균의 감염없이 제조된 우유유래 개발NANA(이하 NG-NANA)를 생산하였다.

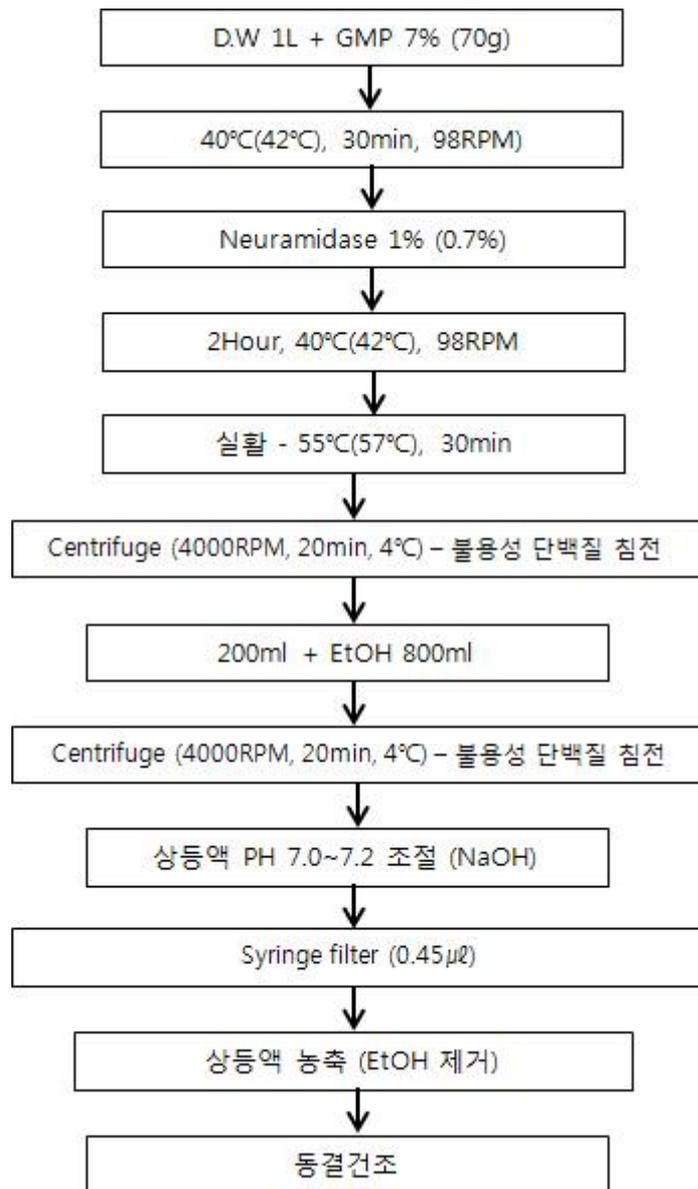


그림. 무균상태에서 오염균 감염없이 제조한 개발NANA의 제조과정

다. 개발 NG-NANA의 오염균 확인

G-NANA에 생산에 사용되는 GMP 내 균 확인 및 GMP로부터 개발 G-NANA를 생산하기 위해 효소처리 단계에서 무균상태임을 확인함으로써 최종적으로 생산된 G-NANA가 무균상태임을 확인하고자 실시하였다. 배지는 Tryptic Soy Agar(TSA) 배지(Difco, USA)를 사용하였으며, 121°C에서 15분간 고압멸균하였다. 7% GMP(FD)와 G-NANA(FD)를 TSB에 0.1g씩 녹인 후 TSA 배지에 50ul씩 도말하였다.

배양조건은 37°C에서 호기적 조건으로 18시간동안 배양하여 Neuraminidase 효소 처리 전 7% GMP와 GMP에 효소(neuraminidase)를 처리한 후 효소실활을 거친 G-NANA 및 불용성 단백질을 침전시킨 후 상등액을 여과하여 만들어진 오염균 감염없이 제조한 NANA(이하 NG-NANA)의 생존균수를 확인하였다. 대조구로서는 사전 오염균 평가를 완료한 OG-NANA

를 시료로 비교평가하였다.

라. 개발 G-NANA의 안전성 평가

본 연구에서는 우유유래 개발 G-NANA의 제품화에 있어, G-NANA의 제조과정 내 오염균의 혼입유무를 평가하여 제품 안전성을 사전에 확보하고 기초확인 결과를 확인하므로서 추후 제품 QA 검정에 있어서 활용가능한 평가기법을 정립하고자 실시하였으며, 관련한 수행방법은 다음과 같다.

(1) IL-6 분비량 평가

RAW 264.7 대식세포로부터 IL-6분비가 되는지 확인하기 위하여 24well-plate에 RAW 264.7 대식세포를 well당 5×10^5 개씩 분주하고, 24시간 동안 부착시켜 24시간 후 5개의 NANA 농도 (NANA 0%(대조군), 0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75%)(w/v)로 처리하여 24시간 동안 배양기에서 배양하였다. 배양액을 수득하여 IL-6 ELISA Kit(R&D bio, CA, USA)의 manufacturer's instruction에 따라 측정하였다.

(2) NO 생성량 평가

NO는 염증 반응이 유발될 경우 분비되는 대표적인 염증 물질로 IL-6 분비량 평가법과 동일한 농도수준과 방법으로 S-NANA, G-NANA를 RAW 264.7 대식세포에 처리하고 24시간 배양 후 각 시료에 의해 생성된 NO의 양은 세포배양액에 존재하는 NO_2^- 의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양액과 Griess reagent를 1:1로 혼합하여 37°C에서 10분 안 상온에서 반응시킨 후 microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도 값을 측정하였으며, NO_2^- 의 농도는 NaNO_2 로 검량선을 그려 μM 값으로 환산하여 값을 나타냈다.

(3) 세포 생존율 확인

RAW 264.7 대식세포를 24well-plate에 5×10^5 cells/well이 되도록 분주한 다음, IL-6 분비량 평가법과 동일한 농도수준과 방법으로 S-NANA 및 G-NANA를 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO_2 에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 세포에 0.5mg/mL의 MTT용액(Sigma, St. Louis, Mo, USA)을 100 μL 를 처리하고 4시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 microplate reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 NANA 0%(대조군)를 기준으로 대조군 대비 %로 표기하였다.

3. 결과

본 연구에서는 기존 정립되어 있는 G-NANA의 생산공정을 적용하되 제균조건에서 오염균이 없는 시료를 제조하기 하기 위하여, EtOH 농도조절을 통한 제조법 정립을 위하여 총 6단계 과

정으로 수행 후 최종 제조된 NG-NANA내 기능성분을 HPLC 분석법을 통하여 분석한 결과, NANA함유량은 29.5% 그리고 생산수율은 30%였다.

가. NG-NANA제품내 오염균 확인 결과

무균상태로 오염없이 G-NANA를 제조하기 위한 제조법을 정립하고 최종적으로 생산된 G-NANA가 무균상태임을 확인하기 위해 7% GMP와 GMP에 Neuraminidase효소를 처리한 후 효소실활을 거친 G-NANA 및 불용성 단백질을 침전시킨 후 상등액을 여과하여 오염균 감염 없이 제조한 NANA를 TSA배지에 도말하여 관찰한 결과는 다음과 같다.



(1) 7% GMP (2) *Neuraminidase* 실활 후 (3) NG-NANA

그림. GMP로부터 G-NANA 생산공정 내 단계별 오염균 확인 결과

- 시료(1) : Neuraminidase효소 처리 전 7% GMP(w/v), 시료(2) : Neuraminidase 실활 후 2시간 거치,
시료(3) : GMP로부터 무균상태로 오염없이 제조된 개발 G-NANA(NG-NANA)
- 배양조건 : 37°C, 24시간 배양(호기성)

GMP를 37°C에서 24시간 동안 배양한 결과 GMP 내 균은 확인되지 않은 반면, Neuraminidase 효소 실활 후에서 균이 관찰되었으며 GMP로부터 효소 반응 후 남아 있는 불용성 단백질을 에탄올로 침전시킨 후 여과한 상등액에서도 역시 생존균이 확인되지 않았다. 따라서 GMP로부터 개발G-NANA의 생산공정 중 GMP에 Neuraminidase효소처리 후 실활과정 내 외부로부터 오염된 균으로 예상되며 GMP로부터 무균상태로 오염없이 제조된 개발 G-NANA(이하 NG-NANA)는 여과과정으로 오염균이 제어되었다.

나. NG-NANA의 안전성 평가 결과

본 실험에서는 G-NANA 제품 안전성에 미치는 영향을 in vitro조건에서 검정하였는데, 이를 위하여 대조시약 대비 합성 NANA(이하 S-NANA)와 오염균 감염에 따른 LPS 보유 NANA(이하 OG-NANA) 및 오염균 감염없이 제조한 NANA(이하 NG-NANA)가 표준세포주에 대하여 농도별 처리에 따른 염증성 인자(IL-6, NO)와 세포독성을 평가하였고, 결과는 다음과 같다.

(1) IL-6 분비량 평가

S-NANA와 OG-NANA 및 NG-NANA의 농도별 결과에 따른 표준세포주에 있어 염증유발을 관찰하였을 때 OG-NANA는 0.1%(w/v)이상에서 IL-6분비를 증가시켰으며 대조시약 S-NANA와 NG-NANA의 경우 0.75%(w/v)농도까지 IL-6의 분비를 유도하지 않았다. 이는 OG-NANA는 표준세포주에 있어 0.1%이상의 농도에서 염증성 인자 IL-6를 유도시키는 것으로 관찰되었다.

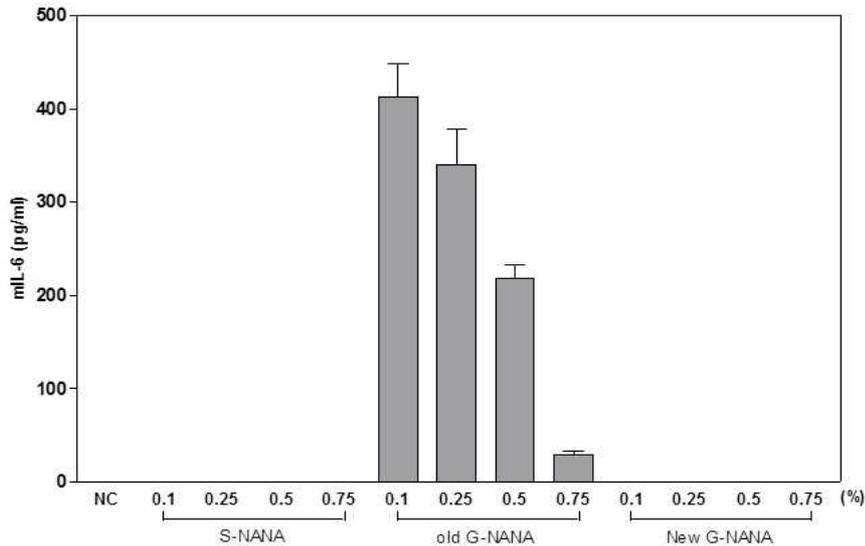


그림. 대조시약 대비 S-NANA와 G-NANA소재별 농도에 따른 RAW 264.7 대식세포의 IL-6분비 조절능 평가결과.

NANA: N-acetylneuraminic acid, S-NANA; synthetic N-acetylneuraminic acid, OG-NANA; old sample of N-acetylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, NG-NANA; new sample of N-acetylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, LPS; lipopolysaccharide, mL-6; mouse interleukin-6.

본 연구의 목적이 S-NANA와 비교시 OG-NANA와 NG-NANA의 제품 안전성 평가를 함으로서 안전성을 평가하는 것이 주요 평가목표임에 따라 대조시료인 S-NANA와 OG-NANA 및 NG-NANA의 염증성 인자 IL-6의 발현을 세세히 살펴보았더니, S-NANA는 표준세포주에 24시간 처리 시 0.75%(w/v)내에서 IL-6 분비가 관찰되지 않았다.

이와 비교 시 OG-NANA와 NG-NANA의 경우 각각 OG-NANA는 0.1%(w/v)이상에서 IL-6 분비가 확인되었고 NG-NANA는 0.75%(w/v)이내에서 IL-6유도가 관찰되지 않았다. 따라서 대조시료인 S-NANA와 비교시 OG-NANA는 S-NANA에 비하여 0.1%이상에서 염증성 사이토카인 IL-6의 유도가 나타났으며 OG-NANA는 오염균 감염으로 인한 염증유발 효과가 있는 것으로 평가되었다.

(2) NO 생성량 평가

NO 생성량 평가는 IL-6 분비량 평가방법과 동일한 방법으로 수행하였으며 S-NANA와 OG-NANA 및 NG-NANA의 농도별 결과에 따른 표준세포주에 있어 염증유발을 관찰하였을

때 OG-NANA는 0.1%(w/v)이상에서 NO 생성을 증가시켰으며 NG-NANA는 0.5%(w/v)이상에서 NO생성량이 관찰되었다. 반면 S-NANA의 경우 0.75%이내 농도에서 NO 생성을 유도하지 않았다. 이는 OG-NANA는 표준세포주에 있어 0.1%이상 농도에서 NO 생성을 유도시키는 것으로 관찰되었다.

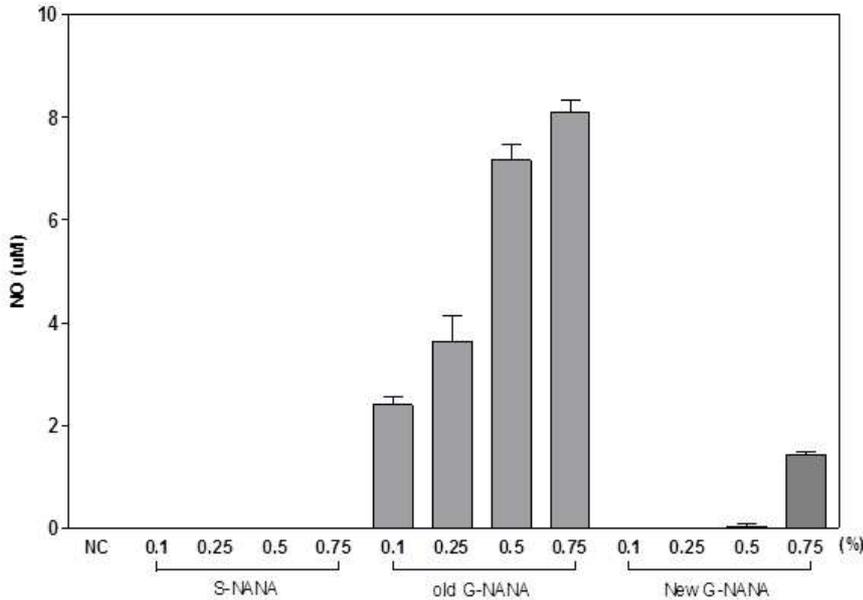


그림 . 대조시약 대신 S-NANA와 G-NANA소재별 농도에 따른 RAW 264.7 대식세포의 NO분비 조절능 평가 결과.

NANA: N-acylneuraminic acid, S-NANA: synthetic N-acylneuraminic acid, OG-NANA: old sample of N-acylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, NG-NANA: new sample of N-acylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, LPS: lipopolysaccharide.

본 연구의 목적이 S-NANA와 비교 시 OG-NANA와 NG-NANA의 제품 안전성 평가를 함으로서 안전성을 평가하는 목적이 주요 평가목표임에 따라 대조시료인 S-NANA와 OG-NANA 및 NG-NANA와의 NO 생성량을 세세히 들여다 보았더니, S-NANA는 표준세포주에 24시간 처리 시 0.75%내에서 NO의 분비를 유도하지 않았고, OG-NANA는 0.1%이상에서 NO생성 관찰되었다.

이와 비교 시 오염균 감염없이 제조한 NG-NANA의 경우 0.75% 농도에서 NO생성을 유도하였다. 이는 대조시약인 S-NANA와 비교 시 OG-NANA는 0.1%이상의 농도에서 오염균 감염에 따른 염증성 인자 NO의 생성이 유도되며, 오염균 감염을 제어하여 무균상태로 균없이 제조한 NG-NANA의 경우 0.75%이상에서 NO생성을 확인하였다. 따라서 OG-NANA는 오염균 감염으로 인한 LPS 효과로 염증유발에 관여하는 것으로 평가된다.

(3) 세포 생존율 평가(MTT)

본 실험에서는 우유유래 개발 G-NANA 제품화 안전성을 평가하기 위해 표준세포주에 대

하여 안전성에 미치는 효능을 in vitro조건에서 검정하였는데, 이를 위하여 대조시약 대비 합성 S-NANA(S-NANA)와 오염균 감염에 따른 LPS 보유 개발NANA(이하 OG-NANA) 및 무균 상태에서 오염균 없이 제조한 개발 NANA(이하 NG-NANA)가 표준세포주에 대하여 농도별 처리에 따른 세포독성(MTT) 평가결과는 다음과 같다.

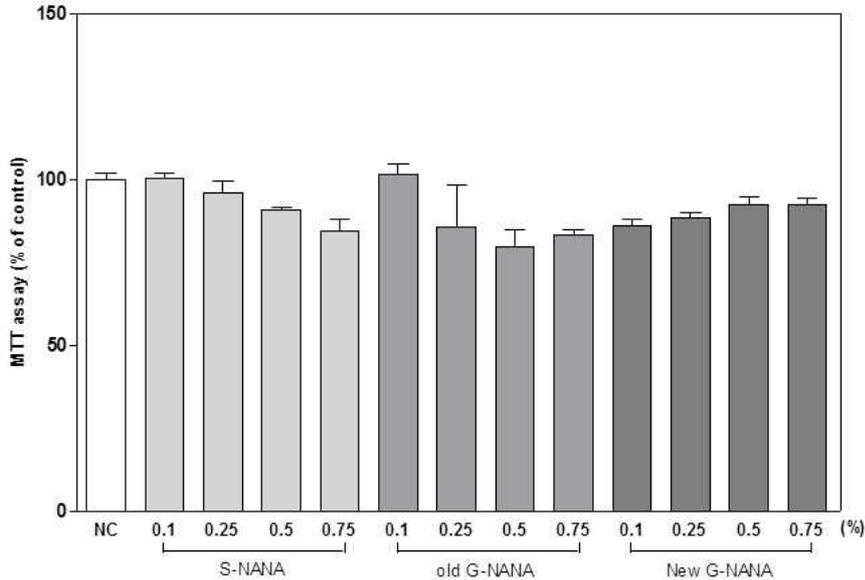


그림 .대조시약 대비 S-NANA와 G-NANA소재별 시료로 하여 따른 표준세포주(RAW 264.7 대식세포)를 이용한 세포독성(MTT) 평가결과.

NANA; N-acylneuraminic acid, S-NANA; synthetic N-acylneuraminic acid, OG-NANA; old sample of N-acylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, NG-NANA; new ample of N-acylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, LPS; lipopolysaccharide.

결과는 S-NANA 대조시약 대비 OG-NANA 및 NG-NANA의 농도별 결과에 따른 표준세포주에 있어 독성이 관찰되는 농도범위는 24시간 접촉시 S-NANA와 OG-NANA는 0.5%이상에서 독성이 관찰되었고 NG-NANA는 0.75%이내에서 독성이 발현되지 않았다.

4. 결론

표준세포주를 기준으로 평가시 NANA의 안전성에 있어 최대 안전성에 관여하는 농도가 0.5% 임을 감안하고 염증성 인자의 발현을 연계하여 평가할 때 오염균 감염에 따른 LPS 보유 개발 NANA인 OG-NANA는 염증성 인자인 IL-6 및 NO의 발현을 유도하는 반면 무균상태에서 오염균의 감염을 제어하여 제조한 개발 NANA(NG-NANA)의 결과를 비교시 OG-NANA의 오염에 따른 G-NANA 제품화에 문제가 있음을 제시한다.

따라서 무균상태에서 오염균의 감염없이 제어하여 제조된 개발 NANA의 경우 안전성 농도 0.5%로 확정함과 동시에 추후 G-NANA 제품화에 있어서 G-NANA의 제품 안전성 평가 등의 검정시 다음과 같은 기법이 활용될 것이다.

5. 내열성, 비내열성균에 대한 제균 생산 조건 정립

가. 연구목표

식약청 허용기준균수는 영유아 식품기준으로 일반세균 10,000군이하/g, 대장균군 음성/g, *B.cereus* 100군이하/g, 진균50.군/g, *E.sakazakii* 불검출/g 에 따라야한다.

개발 우유유래NANA(이하 G-NANA)의 암식이 개발 및 헬리코박터 제어제품은 Spray dry 및 동결건조 제품으로 만들어지게 되는데 제품화 되었을 때 Spray dry 제품에 대한 제균 및 온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가가 필요하다.

따라서 본 실험에서는 공시균(그람음성, 양성균)에 대하여 SD 온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가 정립을 위한 기초결과로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

나. 연구수행방법

공시균은 그람음성균 *Enterobacter sakazakii* 및 그람양성균 *Bacillus cereus*을 사용하였고, 배지는 Tryptic Soy Broth(Difco™, Becton, Dickinson and company, USA)을 사용하였다. 대조구는 *E.sakazakii*, *B.cereus* 혼합균을 TSB에 첨가하여 동결건조 한 것으로 평가하였고, 실험구는 혼합균을 온도별 열처리한 구로 평가하였다.

13%(w/v) TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*(1.0×10^9 cfu/ml), *B.cereus*(2.2×10^7 cfu/ml)을 혼합하여 온도별 SD처리를 하였다. SD 처리온도는 180°C, 170°C, 160°C, 150°C, 140°C, 130°C, 120°C 8개의 온도로 처리하였으며 균혼합 stock solution 50ml씩 분취 후 온도조건별 SD를 처리하였다. 처리한 SD를 TSB에 녹여 TSA 배지에 50µl 씩 도말하여 37°C에서 18시간 호기성 조건에서 배양하여 균수를 확인하였다.

다. 결과

개발 우유유래NANA(이하 G-NANA)의 암식이 개발 및 헬리코박터 제어제품은 Spray dry 및 동결건조 제품으로 만들어지게 되는데 제품화 되었을 때 Spray dry 제품에 대한 제균 및 온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가가 필요하다.

따라서 공시균(그람음성, 양성균)에 대하여 SD 온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가에 대한 결과는 다음과 같다.

*B.cereus*는 120°C 및 130°C에서 사멸률 100%이었고, *E.sakazakii*는 180°C에서 100% 사멸률을 보였다. *B.cereus*는 170°C 및 180°C에서 사멸률이 0%인 것을 확인하였고, *E.sakazakii*는 120°C 및 130°C에서 사멸률이 0%였다. 즉, *B.cereus*는 내열성을 보유하고, *E.sakazakii*는 비내열성 균임을 확인하였다.

표 . TSB 열처리 및 PUMP, Q-Flow 조건에 따른 최적 SD 조건정립

시험구	열처리 (°C)		ASPIRATOR (%)	PUMP (%)	Q-Flow (m3/h)	Nozzle (mm)	수율 (%)	성상변화 (열변성#)	결과 (SD조건 정립)	비고
	Inlet	Outlet								
1	180	114	90	9	40	0.7		+	비적합	덱스트린 비함유
2	170	108	90	9	40	0.7		+	비적합	덱스트린 비함유
3	160	102	90	9	40	0.7	84.6	+	비적합	덱스트린 비함유
4	150	104	90	9	40	0.7	76.9	+	비적합	덱스트린 비함유
5	140	90	90	9	40	0.7	84.6	-	적합	덱스트린 비함유
6	130	87	90	9	40	0.7	76.9	-	적합	덱스트린 비함유
7	120	82	90	9	40	0.7	76.9	-	적합	덱스트린 비함유

성상변화 : +++ (타는 현상 매우 심함), ++ (타는 현상 심함), + (타는 현상 발생), - (변화 없음)

: Spray cylinder 내 부착 및 탄화현상 발생여부

표. 혼합 공시균(그람음성, 그람양성균)에 대하여, SD온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가

혼합공시균		SD온도조건별 사멸패턴 조사(cfu/g)							
		대조 (동결)	180°C	170°C	160°C	150°C	140°C	130°C	120°C
<i>B.cereus</i>	생존 균수	4.0x10 ³	9.6x10 ⁴	7.6x10 ³	5.1x10 ²	5.5x10 ²	90	ND	ND
	사멸률 (%)	0 (기준)	0	0	87.25	86.25	97.75	100	100
<i>E.sakazakii</i>	생존 균수	3.1x10 ⁶	ND	300	140	2.8x10 ³	2.1x10 ⁴	2.0x10 ⁸	7.52x10 ⁸
	사멸률 (%)	0 (기준)	100	99.99	99.99	99.91	99.32	0	0

- ND : Not detect

- SD조건 : 13%(w/v) TSB 용액 멸균처리후 *E.sakazakii*(1.0x10⁹cfu/ml), *B.cereus*(2.2x10⁷cfu/ml) 혼합

- 온도별 SD처리(8개구) : 대조(동결건조), 180°C, 170°C, 160°C, 150°C, 140°C, 130°C, 120°C

결론적으로, 공시균별 내열성 및 비내열성 온도범위를 확인했고, 그람양성균 및 그람음성균 동시사멸 온도조건은 140°C(사멸률 95%이상)이고 그람 양성균 제어온도조건은 120~160°C,

그람 음성균 제어온도조건은 140~180℃ 임을 확인할 수 있었다.

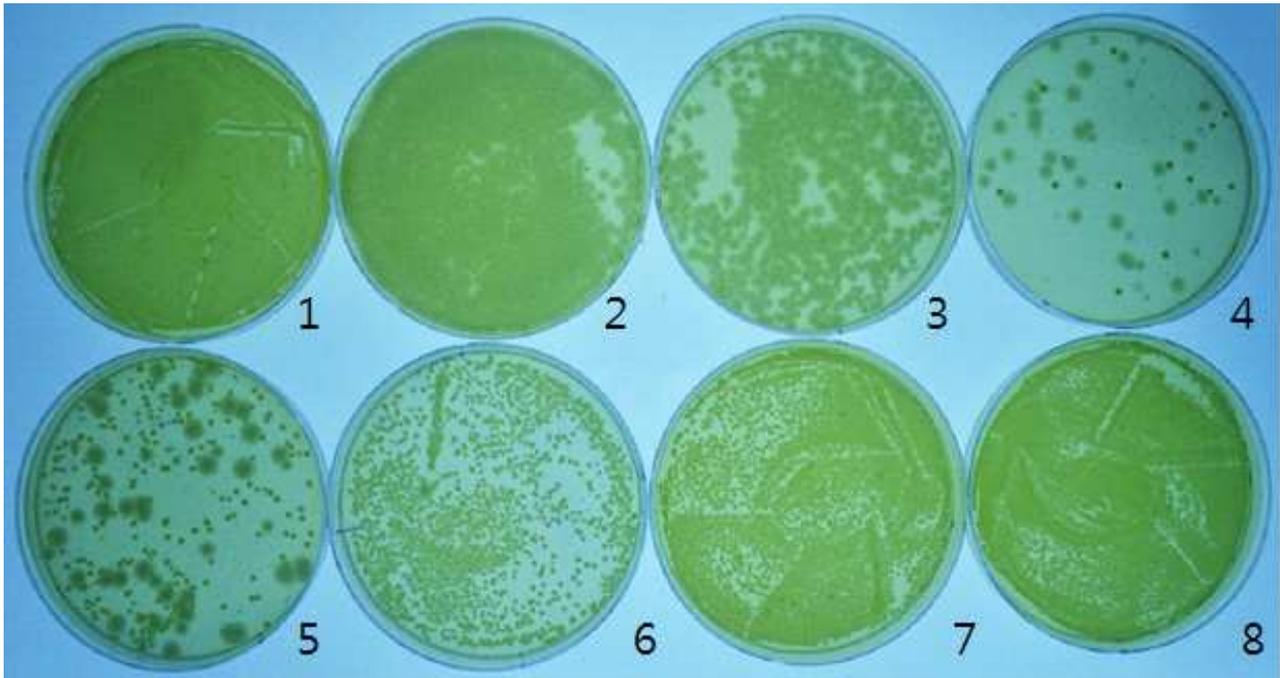


그림. 혼합 공시균(그람음성, 양성균)에 대하여, SD 온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가
- SD조건 : 13%(w/v) TSB 용액 멸균처리후 *E.sakazaki*(1.0×10^9 cfu/ml), *B.cereus*(2.2×10^7 cfu/ml) 혼합
- 온도별 SD처리(8개구) : 대조(동결건조), 180℃, 170℃, 160℃, 150℃, 140℃, 130℃, 120℃

제 5 절 개발 G-NANA의 동물안전성(GLP 기준) 평가

1. 개발 G-NANA의 동물안전성(설치류) 평가

(G-NANA의 랫드를 이용한 28일 반복 경구투여 DRF독성시험)

가. 요약 (Study summary)

본 시험은 우유내 유청으로부터 제조한 NANA의 반복투여에 따른 안전성을 평가하고자, 6주령 (투여개시시) 암수 Sprague-Dawley계 랫드에 시험물질을 0, 500, 2,500 및 5,000 mg/kg/day의 용량으로 암수 각 군당 5 마리씩 사용하여 28일간 경구 투여하였다.

일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 뇨검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 전해질검사, 부검시 장기의 중량측정 및 육안적 검사가 수행되었다.

- 암수 시험물질투여군에서 사망례 및 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.
- 체중 및 사료섭취량의 변화, 안과학적 검사, 혈액학적, 혈액생화학적 검사 및 부검 결과, 암수 시험물질투여군에서 시험물질 투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다.
- 요검사에서 수컷 KET 수치가 중용량 및 고용량군에서 경미한 용량의존적 변화로 증가하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단된다.

본 시험을 통해 수컷의 경우 요검사에서 시험물질-유래 경미한 변화가 확인되었으며, 암컷은 시험물질에 의한 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 독성판단 설정기준에 따라 4주 반복 경구투여독성시험을 통해 수컷의 경우 NOAEL(최대무독성용량)이 5,000 mg/kg/day로 추정되며, 암컷은 NOEL(최대무영향용량)이 5,000 mg/kg/day로 추정된다.

나. 시험물질 및 부형제

(1) 시험물질

- (가) 명 칭 : NANA(Sialic acid)
- (나) 기 원 : 우류(유청내 GMP)
- (다) Lot번호 : 130103-1
- (라) 순 도 : 6.4 %
- (마) 분자량 : 309.28
- (바) 입수량 : 8088.42 g
- (사) 입수일 : 2013.01.07
- (아) 외관 및 색상 : 연노랑색 분말
- (자) 보관조건 : 냉장보관
- (차) 친화성 : Hydrophilic
- (카) 취급시 주의사항 : 조제 후 냉장보관
- (타) 제공자 : (주)생명의 나무 김희경

- (과) 잔여시험물질의 처리 : 시험종료 후 폐기
- (하) certificate of analysis : 시험의뢰자 제공(첨부자료)

(2) 매체대조물질(부형제)

- (가) 명칭 : 멸균증류수
- (나) 제조(로트)번호 : KAI2013(중외제약),52LBP60(대한약품)
- (다) 입수일 : 2013년 3월 26일(중외제약) , 2013년 2월 27일(대한약품)
- (라) 보관조건 : 실온
- (마) 제조원 : (주)중외제약, (주)대한약품
- (바) 선정이유 : 독성이 없고, 시험물질이 잘 현탁됨

다. 재료 및 방법

(1) 시험계

- (가) 종 및 계통: 특정병원균 부재(SPF) Sprague Dawley[®]TM SD[®]TM 랫드
- (나) 공급원: (주) 대한바이오파마
- (다) 시험계의 선택이유

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

- (라) 입수시 성별, 주령, 동물수 및 체중범위

수컷 5주령, 23마리 122.7~137.7 g

암컷 5주령, 24마리 111.1~126.2 g

- (마) 투여개시시 성별, 주령, 동물수 및 체중범위

수컷 6주령, 20마리 182.2~199.7 g

암컷 6주령, 20마리 146.0~170.0 g

- (바) 검역 및 순화(Annex 2)

동물 입수시 입수동물에 대한 검수검역을 실시하였으며, 동물의 순화는 입수 후 5일간 시험을 실시하는 동물실내에서 실시하였다. 동물공급업체에서 제공한 시험계의 병원체검사 성적서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었다. 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 투여전일 및 투여일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

(2) 사육환경

- (가) 동물실 번호 : GLP센터 SPF실험동물실내 사육실 3

- (나) 온습도 범위 : 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$
- (다) 명 암 cycle : 형광등조명 12hr (08:00 점등~20:00 소등)
- (라) 조 도 : 150 ~ 300 Lux
- (마) 환 기 횟 수 : 10~20 회/시간
- (바) 소 음 : 60dB 이하
- (사) 암모니아농도 : 20ppm 이하
- (아) 사육상자의 종류(크기) : 순화, 투여 및 관찰기간 중 Polysulfone 사육상자 (260W×420L×150H mm)에 수용하였다.
- (자) 사육상자 당 동물수 : 검역·순화기간 2~3마리 / 관찰기간 1마리
- (차) 사육기자재 교환
 - 사육상자 및 급수병은 주 1회 교환하였으며, 모든 사육기자재는 고압증기멸균기(121°C 20분)로 멸균하여 사용하였다.

(3) 사료

- (가) 종 류 : 실험동물용 고품사료
- (나) 공급원 : Zeigler Bros., Inc. (USA)
- (다) 급여법 : 방사선 멸균사료를 급이기에 넣어 자유섭취 시켰다.
- (라) 사료의 분석 및 확인
 - 사료의 분석은 Zeigler Bros., Inc.에서 제공하는 성적서(첨부자료)를 확인하여 사용하였으며, GLP센터의 사료 및 물의 관리에 관한 SOP에 따라서 실시하였다.

(4) 물

- (가) 종 류 : 음용 수도수
- (나) 급수방법
 - 본 센터의 수도물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 사용하였다. 동물에게 공급은 급수병을 통해 자유섭취 시켰다.
- (다) 오염물질의 분석
 - GLP센터의 사료 및 물 중의 오염물질 검사에 관한 SOP에 따라서 경상북도보건환경연구원에서 검사한 자료를 참조하였다.

(5) 시험군 구성 및 투여량 설정

(가) 시험군의 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량 (ml/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)
대조군(G1) ^{a)}	M / F	5 / 5	1101~1105 / 2101~2105	10	0
저용량(G2)	M / F	5 / 5	1201~1205 / 2201~2205	10	1,250
중용량(G3)	M / F	5 / 5	1301~1305 / 2301~2305	10	2,500
고용량(G4)	M / F	5 / 5	1401~1405 / 2401~2405	10	5,000

a) G1: Vehicle control

(나) 투여량 설정

본 시험물질은 암환자의 기능성식품으로 개발·등록하고자 개발되었으며 의뢰자의 자체 시험결과에 의하면 독성이 크게 없을 것으로 추정되었다. 또한 본 센터에서 실시한 단회경 구투여독성시험(13-SDOT-001)에서 5,000 mg/kg 농도로 시험한 결과 사망을 비롯한 체중변화, 일반증상 및 부검소견 등에서 어떠한 독성적 소견도 관찰되지 않아 개략치사량이 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 나타났다. 따라서 위 결과를 고려할 때 본 시험물질은 독성이 미약하고, 건강기능성물질의 특성상 임상예정용량이 높을 것으로 예상되어 5,000mg/kg/day를 고용량군으로 설정하였다. 그리고 공비 2를 두어 중용량군 및 저용량군을 각각 2,500mg/kg/day, 1,250mg/kg/day으로 설정하였다.

(다) 군분리 잔여동물의 처리

입수한 모든 동물 중 군분리일에 측정한 평균체중에 가장 가까운 암수 각 20마리를 선택하였다. 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 4군, 군당 5마리로 군분리 하였다.

(라) 개체식별

개체식별은 꼬리마킹법을 사용하였다. 사육상자에는 용량별로 다른 색상의 개체식별카드를 부착하였으며, 사육상자대에는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 시험번호, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험담당자명, 비상연락처 등을 기재한 ‘SPF실험동물실 사용기록지’를 부착하였다.

(마) 잔여동물 처리

잔여동물은 군분리 후 안락사 시켰다.

(6) 시험물질의 조제

본 시험물질의 조제는 순도 및 비중에 대한 보정없이 시험물질을 중량 그대로 측정하여 조제하였다. 고용량군은 부형제(멸균증류수)를 이용하여 5,000mg/10ml(50%) 로 조제하고 중용량군 및 저용량군은 동일한 부형제로 각각 2,500mg/10ml(25%), 1,250mg/10ml(12.5%) 방법으로 조제하였다. 시험물질 조제는 시험물질 정보에 따라 1주일에 1회 조제하며, 조제 후 반드시 냉장보관하고 사용시 침전물이 없도록 충분히 섞어 사용하였다.

(7) 투여

- (가) 투여경로 및 선택이유: 사람에게 대한 임상 예정 경로로서 경구투여를 선택하였다.
- (나) 투여부위 및 투여법 : 경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여하였다.
- (다) 투여액량: 최근 체중측정일의 체중을 기준으로 투여액량을 10ml/kg으로 산출하였다.
- (라) 투여횟수 및 기간
1 회/일, 7 일/주, 4 주간 투여하였으며, 투여는 11:30 이전에 완료하였다.

(8) 관찰 및 검사항목

(가) 일반증상관찰

모든 동물에 대해서 1 일 1 회 일반증상의 종류, 발현 일 및 증상의 정도를 관찰하였으며, 1일 2회 사망 및 빈사동물을 관찰하였다. 관찰은 투여 0일부터 28일간 실시하였다.

(나) 체중측정

모든 동물의 체중을 투여개시일에 측정하고, 이후에는 주 1 회, 부검전일 및 부검일에 측정하였다. 부검일 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하고 부검전일 체중을 평가하였다.

(다) 사료섭취량 산정

투여개시 전의 사료섭취량은 군분리일 부터 투여개시일까지 1일간의 섭취량을 측정하였다. 투여기간에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다. 투여 4주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

(라) 요검사

각 군당 5마리에 대하여 투여 마지막 주에 요검사를 실시하였다. 동물을 대사 케이지에 수용하여 3~4 시간동안 채뇨한 신선뇨 중 약 1 ml의 취하여 요검사용 시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, USA)에 묻힌 후, 요자동분석기(CliniTek Advantus™ , SIEMENS, USA)를 이용하여 다음 항목을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
GLU(glucose)	g/dL	CliniTek Advantus™, SIEMENS, USA 요자동분석기
BIL(bilirubin)	mg/dL	
KET(ketone body)	mg/dL	
LEU(leukocyte)	Leu/ul	
OB(occult blood)	Ery/ul	
PRO(protein)	mg/dL	
URO(urobilinogen)	umol/L	
NIT(nitrite)	-	
SG(specific gravity)	-	
pH	-	
Color	-	

(마) 부검

부검 전날 절식한 계획부검 동물에 대하여 부검 당일에 Isoflurane 으로 흡입마취하여, 마취가 확인되면 개복하여 복대동맥에서 임상병리 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 그 후 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사시킨 다음, 모든 장기에 대해 부검소견을 관찰한 후 기록지에 기록하였다.

(바) 혈액학적 검사

부검시 채혈한 혈액 일부를 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle (Vacutainer 3 ml, SEKISUI, JAPAN)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)로 다음 항목을 측정하였다.

① 일반혈액학적 검사

항목	단위	측정방법
㉠ WBC (White blood cell count)	10 ³ /μL	Flowcytometry
㉡ RBC (Red blood cell count)	10 ⁶ /μL	Flowcytometry, Isovolumetry
㉢ HGB (Hemoglobin conc.)	g/dL	Modified CN met-Hb method
㉣ HCT (Hematocrit)	%	(RBC×MCV)÷10
㉤ MCV (Mean corpuscular volume)	fL	Histogram
㉥ MCH (Mean corpuscular hemoglobin)	pg	(HGB÷RBC)×10
㉦ MCHC (Mean corpuscular Hb conc.)	g/dL	(HGB÷HCT)×100
㉧ RDW (Red cell distribution width)	%	Histogram
㉨ HDW (Hb conc. distribution width)	g/dL	Histogram
㉩ PLT (Platelet)	10 ³ /μL	Flowcytometry
㉪ MPV (Mean platelet volume)	fL	Histogram

② 백혈구감별계수

항 목	단 위	측 정 방 법
① NEU (Neutrophil)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
NEU (Neutrophil)	10 ³ /μL	Flowcytometry, Peroxidase staining
② LYM (Lymphocyte)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
LYM (Lymphocyte)	10 ³ /μL	Flowcytometry, Peroxidase staining
③ MONO (Monocyte)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
④ EOS (Eosinophil)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
⑤ BASO (Basophil)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
⑥ LUC (Large unstained cells)	%	Noise-Lymph Histogram

(사) 혈액생화학적 검사

혈액 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube (SEKISUI, JAPAN) Germany)에 주입하고 15~20 분간 상온에 방치하여 응고시킨 후, 3,000 rpm (1,630 RCF)으로 10 분간 원심분리(MF80, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(KONELAB 20XT, Thermo)를 활용하여 아래 항목에 대하여 측정하였으며, 전해질은 전해질 분석기(744 Na⁺/K⁺/Cl⁻ Analyzer, SIEMENS, USA)로 측정하였다.

항 목	단 위	방 법
① AST (Aspartate aminotransferase)	U/L	IFCC법
② ALT (Alanine aminotransferase)	U/L	IFCC법
③ ALP (Alkaline phosphatase)	U/L	P-NPP법
④ BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dL	Urease-UV법
⑤ CRE (Creatinine)	mg/dL	Jaffe법
⑥ GLU (Glucose)	mg/dL	UV법
⑦ CHO (Total cholesterol)	mg/dL	Enzyme법
⑧ PRO (Total protein)	g/dL	Biuret법
⑨ CPK (Creatine phosphokinase)	U/L	UV-Rate 법
⑩ ALB (Albumin)	g/dL	BCG 법
⑪ BIL (Total bilirubin)	mg/dL	Evelyn-Malloy법
⑫ TG (Triglyceride)	mg/dL	Enzyme법
⑬ IP (Inorganic phosphorus)	mg/dL	Enzyme법
⑭ A/G ratio (Albumin/Globulin ratio)	ratio	PRO, ALB로 산출
⑮ Ca ²⁺ (Calciumion)	mg/dL	ArsenazoIII
⑯ Na ⁺ (Sodiumion)	mmol/L	전극법
⑰ K ⁺ (Potassiumion)	mmol/L	전극법
⑱ Cl ⁻ (Chlorideion)	mmol/L	전극법

①-⑮: 혈액생화학분석기를 이용하여 측정.

⑯-⑱ : 전해질자동분석기로 측정.

(아) 장기중량 측정

부검시 다음의 장기를 적출한 후 전자저울(CP63, Sartorius, Germany)을 이용하여 중량을 측정하였다. 양측성 장기는 양측 장기를 각각 측정하며, 중량측정 장기에 대하여는 부검시 체중에 대한 상대중량을 산출하였다.

중량측정장기명

난소(ovary), 부신(adrenal gland), 뇌하수체(pituitary), 가슴샘(thymus), 전립샘(prostate), 고환(testis), 부고환(epididymis), 비장(spleen), 신장(kidney), 심장(heart), 폐(lung), 뇌(brain) 및 간(liver)

(자) 기관 및 조직의 보존

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기를 적출하여 10 % 중성완충 포르말린용액에 고정하였으며, 고환과 부고환은 Bouin 용액에 고정하였다.

고정장기명

고환, 부고환, 정낭, 전립샘, 난소, 자궁, 질, 방광, 비장, 위, 췌장, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 장간막림프절, 부신, 신장, 간, 턱밑림프절, 침샘, 가슴샘, 심장, 폐, 기관, 식도, 갑상샘, 뇌, 뇌하수체, 피부(젖샘)

(9) 통계학적 방법

대조군과 투여군 간의 평균비교에는 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하였으며, 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 14.0을 이용하였다.

(가) 연속적인 자료의 분석

체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량에 대하여 one-way ANOVA test로 평균치에 대한 유의성 검정하였다. 유의성이 있으면 Levene test로 등분산성을 검정하여 등분산일 경우에는 Duncan multiple range test, 이분산일 경우에는 Dunnett's T-test를 이용하였다.

(나) 불연속인 자료의 분석

요검사 결과에 대해 아래 표와 같이 척도변환을 통해 중증도(severity)로 나타내어 통계 분석이 이루어졌다.

Severity	0	1	2	3	4	5
GLU	-	+/-	1+	2+	3+	4+
BIL	-	+/-	1+	2+	3+	
KET	-	+/-	1+	2+	3+	4+
SG (Specific gravity)	1.005	1.010	1.015	1.020	1.025	1.030
PRO	-	+/-	1+	2+	3+	4+
pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	>=9.0
URO (EU/dL)	0.2	1	2	4	>=8	
NIT	-	+				
OB (μ mol/L)	-	+/-	1+	2+	3+	
LEU	-	+/-	1+	2+	3+	

Kruskal-Wallis' H-test를 실시한 후, 유의성이 있으면 Mann-Whitney U-test를 적용하여 대조군과의 유의성을 확인하였다. 요색조는 Fisher' s exact test를 적용하였다.

(10) 독성의 판단기준 - NOEL, NOAEL 그리고 LOAEL의 설정 기준

- 본 시험의 목적은 시험물질 독성의 특징을 나타내는 지표인 NOEL(no-observed-effect-level), NOAEL(no-observed-adverse-effect level) LOAEL(Lowest-observed-adverse-effect level)을 얻는 것이다. 각 지표의 정의는 다음과 같으며 참고문헌에 따라 이들 지표를 확인한다.

지표	정의
NOEL	시험물질에 의한 독성학적 및 약리학적 변화를 유발하지 않는 최대무영향용량
NOAEL	시험물질에 의한 adverse effect를 유발하지 않거나 명확한 질환과 연계되지 않는 nonadverse effect를 유발하는 최대무독성용량
LOAEL	시험물질에 의해 adverse effect를 유발하는 최소독성용량

지표	정의
Adverse effect	<ul style="list-style-type: none"> - 독성(toxicity)과 동일한 의미를 가지며 시험물질의 독성양상(toxicity profile)을 공식적으로 표명할 수 있을 정도의 수준 - 시험계의 정신적 안녕과 정상적인 성장, 발달 그리고 수명에 영향을 주는 생화학적, 형태학적, 생리학적 변화를 유발하는 생물학적 영향 - Adverse effect 유발에 관여하는 여러 변화의 일부 - 비록 경미한 변화일지라도 시험물질의 알려진 표적독성 유발과 관련된 변화

- NOEL, NOAEL, LOAEL의 정의에서처럼 이들 지표를 구분하는 핵심적인 요소는 시험물

질에 의한 adverse effect와 non-adverse effect이며 다음과 같이 규정한다.

Non-adverse effect	<ul style="list-style-type: none"> - 시험물질의 독성양상으로 규정하기에는 부족하지만 시험물질에 의한 경미한 변화 - 더 높은 시험물질 용량에서 adverse effect 유발할 가능성 있는 낮은 용량의 변화 - 시험물질에 의한 약리학적 변화
--------------------	---

○ 시험물질에 의한 adverse effect와 non-adverse effect는 수정될 수 없는 절대적 개념을 갖는다. 그러나 실제 실험을 통해 얻어지는 finding(결과물)은 시험책임자의 판단에 따라 차이가 있을 수 있는 상대적 특징이 있다. 따라서 생물학적 및 통계학적 유의성을 가지는 findings(결과물)에 대해 판단을 수정을 가능한 분류체계가 필요하다.

○ Findings(결과물)에 대해 판단을 수정을 가능한 분류체계는 finding의 경중에 따라 구분하는 Weight-based Classification(결과-경중에 따른 분류)을 응용한다. Weight-based Classification은 아래와 같이 3가지인 시험물질-유래 중요한 변화(important compound-related changes), 시험물질-유래 경미한 변화(minor compound-related changes)와 비시험물질-유래 변화(noncompound-related changes)로 분류된다. 이들의 분류는 임상병리학적 지표와 조직병리학적 지표에서 생물학적 및 통계학적 유의성을 기초로 한다. 또한 유의성에서 용량-의존성(dose-dependent)의 유무 그리고 시험물질의 중단을 통한 변화의 가역성 역시 분류에 중요한 판단 기준이 된다. Finding에 대한 유의성의 경중에 따라 변화의 분류는 아래와 같다.

변화의 종류	분류의 기준
시험물질-유래 중요한 변화	<ul style="list-style-type: none"> - 기본적으로 정상개체에서는 나타나지 않지만 모든 용량 또는 투여 고용량에서 통계적, 생물학적 유의성을 지닌 용량의존성 변화 - 어떤 용량에서도 조직병리적 변화를 동반하고 이와 관련된 임상병리 지표에서 통계적, 생물학적 유의성을 가진 변화 - 조직병리적 변화에서 용량비의존성이라도 통계적 및 생물학적 유의성을 가진 변화
시험물질-유래 경미한 변화	<ul style="list-style-type: none"> - 어떤 용량에서도 조직병리적 변화를 동반하지 않거나 정상개체에서 확인되는 임상병리 지표에서 통계적, 생물학적 유의성을 가진 용량비의존성 변화 - 시험물질의 약리작용으로 고려되는 통계적, 생물학적 유의성을 지닌 용량의존성 또는 용량비의존성변화
비시험물질-유래 변화	<ul style="list-style-type: none"> - 정상개체의 임상병리적 및 조직병리적 지표에서 벗어나는 adverse와 nonadverse effect를 의미하며 용량의존성 및 historical data와 일치하지 않는 경우 - 실험과정에서 발생에서는 실수로 발생하는 변화와 자연발생적 변화(spurious changes)를 포함한다.

○ 이와 같은 절차를 통해 실제 실험에 얻어지는 finding을 생물학적 및 통계적 유의성의 강도에 따라 Weight-based Classification로 분류하여 아래와 같이 시험물질의 독성 지표를 판단한다.

Findings의 분류	Adverse vs non-adverse effect	시험물질의 독성지표
시험물질-유래 중요한 변화일 경우	Adverse effect로 분류하여	LOAEL로 판정
시험물질-유래 경미한 변화일 경우에	Nonadverse effect로 분류하여	NOAEL로 판정
비시험물질-유래 변화일 경우에	No effect로 간주하여	NOEL로 판정

○ NOEL, NOAEL 그리고 LOAEL 설정에 있어서 고려 사항: 모든 투여군에서 시험물질-유래 중요한 변화가 없이 시험물질-유래 경미한 변화가 확인 될 경우에는 최고 투여용량을 NOAEL로 설정한다. 독성시험의 최종보고서에서 NOEL, NOAEL과 LOAEL 중 어떤 결론을 내려도 문제는 없다. 그러나 NOEL 설정할 경우 저용량 설정으로 유효용량이 NOEL 범위를 상회할 우려가 있고 LOAEL 설정할 경우 고용량을 통해 독성의 우려가 있다. 따라서 반복투여독성시험에서 NOAEL을 설정하는 것이 바람직하다.

라. 결과 (Result)

(1) 일반증상 및 사망동물

4주간의 투여 및 관찰기간에 특이증상이나 사망이 관찰되지 않았다.

(2) 체중

체중변화(body weight changes) 및 증체량(weight gains)에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

(3) 사료섭취량

사료섭취량에서 시험물질에 의한 변화는 없었다.

(4) 안검사

도입 시의 검사와 투여 마지막 주에 검사결과, 모든 시험군에서 시험물질에 의한 영향은 없었다.

(5) 요검사

요검사를 통해 수컷 KET 중증도가 중용량 및 고용량 투여군에서 증가되었다. 이는 약한 용량의존성이 있어서 시험물질-유래 경미한 변화로 판단된다.

(6) 혈액학적 검사

혈액학적 검사에서 암컷 NEU 수치가 중용량군에서 감소하였지만 용량의존성이 없었으며 Historical data의 정상범위내 변화로써 비시험물질-유래 변화로 판단된다.

(7) 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사에서 수컷 Cl⁻ 수치가 저용량군 및 고용량군에서 감소하였지만 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단된다. 수컷 Na⁺ 수치는 고용량군에서 감소하였다. 이는 경미한 용량의존성이 있어지만 정상범위내의 변화이므로 비시험물질-유래 변화로 판단된다.

(8) 장기중량

장기중량 측정결과 시험물질의 영향에 의한 변화는 없었다.

(9) 부검소견

부검결과 어떠한 이상도 관찰되지 않았다.

마. 결과의 요약 (Summary of results)

본 시험에서는 우유내 유청으로부터 제조한 NANA의 반복경구투여에 따른 독성 반응 및 안전성을 평가하기 위하여 결과-경중에 따른 분류(Weight-based Classification)로 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 암수 시험물질투여군에서 사망례 및 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.
- 체중 및 사료섭취량의 변화, 안과학적 검사, 혈액학적, 혈액생화학적 검사 및 부검 결과, 암수 시험물질투여군에서 시험물질 투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다.
- 뇨검사에서 수컷 KET 수치가 중용량 및 고용량군에서 경미한 용량의존적 변화로 증가하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단된다.

본 시험을 통해 수컷의 경우 뇨검사에서 시험물질-유래 경미한 변화가 확인되었으며, 암컷은 시험물질에 의한 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 독성판단 설정기준에 따라 수컷의 경우 NOEL(최대무독성용량)이 고용량군(5,000 mg/kg/day)으로 추정되며, 암컷은 NOEL(최대영향용량)이 고용량군(5,000 mg/kg/day)로 추정된다. 본 시험은 13주 반복투여독성시험을 위한 용량결정시험이기 때문에 본 시험을 통해 확인된 결과를 고려할 때 13주 반복투여독성시험을 통한 본 시험물질의 NOEL을 얻기 위해서는 암수 모두에서 5,000 mg/kg/day이 포함하는 용

량설정이 바람직할 것으로 사료된다.

2. 개발 G-NANA의 동물안전성(설치류) 평가

(G-NANA(Sialic acid)의 랫드를 이용한 단회경구투여 독성 시험)

가. 요약

본 시험은 우유내 유청으로부터 제조한 NANA의 단회경구투여에 의한 독성을 조사하고자, 8주령(투여개시시) 암수 Sprague-Dawley 계 랫드에 시험물질을 대조군 및 시험군 각각 10마리씩 0, 5,000 mg/kg 의 용량으로 경구 투여하여 14일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 그 시험결과는 다음과 같다.

- (1) 시험 전 기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았다.
- (2) 시험 전 기간 동안 일반증상에서는 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다.
- (3) 시험기간 동안 체중변화를 확인한 결과, 암수 모두에서 시험군과 대조군의 군간 유의적 차이는 없었다.
- (4) 부검 결과 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다.

본 시험에 있어서 시험물질에 의한 동물의 사망, 체중변화, 이상증상 그리고 이상병변이 발견되거나 확인되지 않았다. 따라서 단회경구투여독성시험에서 본 시험물질에 대한 랫드에서의 개략치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 한계량인 2,000 mg/kg보다 높은 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 추정된다.

나. 시험물질 및 대조물질

(1) 시험물질 (첨부자료 1)

- (가) 명칭 : NANA(Sialic acid)
- (나) 기원 : 우류(유청내 GMP)
- (다) Lot 번호 : 130103-1
- (라) 순도 : 6.4 %
- (마) 입수량 : 8088.42 kg
- (바) 입수일 : 2013. 01. 07
- (사) 외관 및 성상 : 연노랑색 분말
- (아) 보관조건 : 냉장보관

(2) 대조물질

- (가) 명칭 : 멸균증류수
- (나) 제조(로트)번호 : KAI2013
- (다) 입수일 : 2012. 3. 26

- (라) 입수량 : 1L
- (마) 외관 및 성상 : 무색 액체
- (바) 등급 : 일반의약품
- (사) 보관조건 : 실온
- (아) 제조원 : (주)중외제약

다. 재료 및 방법

(1) 시험계

(가) 종 및 계통

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

(나) 공급원

(주) 대한바이오링크

주소 : 충청북도 음성군 삼성면 대야리 113번지

(다) 시험계의 선택이유

본 시험에 사용하는 랫드는 크기가 작고, 다루기가 쉬우며, 계절변동이 적은 장점이 있는 동시에 스트레스에 덜 민감하면서 병에 대한 저항력이 강하다. 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 있다.

(라) 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

(바) 검역 및 순화 (첨부자료)

동물 입수시 입수동물에 대한 검수검역을 실시하였으며, 동물의 순화는 입수 후 7일간 시험을 실시하는 동물실내(사육실 5)에서 실시하였다. 동물공급업체에서 제공한 시험계의 병원체검사 성적서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었다. 순화기간 중 매일

1회 일반증상을 관찰하고, 투여일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

(2) 사육환경

- (가) 동물실 번호 : GLP센터 SPF실험동물실내 사육실 5
- (나) 온습도 범위 : 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$
- (다) 명 암 cycle : 형광등조명 12hr (08:00 점등~20:00 소등)
- (라) 조 도 : 150 ~ 300 Lux
- (마) 환 기 횟 수 : 10~20 회/시간
- (바) 소 음 : 60dB 이하
- (사) 암모니아농도 : 20ppm 이하
- (아) 사육상자의 종류(크기)

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

- (자) 사육상자 당 동물수 : 검역 · 순화 및 관찰기간 2~3마리
- (차) 사육기자재 교환

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

(3) 사료

- (가) 종 류 : 실험동물용 고형사료(방사선 멸균사료)
- (나) 제품명 : 로텐트 NIH-31
- (다) 공급원 : Zeigler Bros., Inc. (USA)
- (라) 급여법 : 급이기에 넣어 자유섭취 시켰다.
- (마) 사료의 분석 및 확인

사료의 분석은 Zeigler Bros., Inc.에서 제공하는 성적서(첨부자료 4)를 확인하여 사용하였으며, GLP센터의 사료 및 물의 관리에 관한 SOP에 따라서 실시하였다.

(4) 물

- (가) 종 류 : 음용 수도수
- (나) 급수방법

본 센터의 수도물을 자외선유수살균기로 여과 후 사용하였다. 동물에게 공급은 급수병을 통해 자유섭취 시켰다.

- (다) 오염물질의 분석

GLP센터의 사료 및 물의 관리(CU-ANI-009) SOP에 따라서 경상북도보건환경연구원에서 검사한 자료(첨부자료 5)를 참조하였다.

(5) 시험군의 구성과 투여량

(가) 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	5,000
	Female	5	2201~2205	10	5,000

G1: Vehicle control, G2: 5,000 mg/kg

(나) 투여량 설정

본 시험물질은 건강기능성식품 등록을 목적으로 개발되었으며, 의뢰자의 정보에 의하면 독성이 크게 없을 것으로 추정된다. 또한 건강기능성물질의 특성상 높은 임상예정용량이 예상되어 5,000 mg/kg을 최고 용량으로 설정하였다. 이에 본 경구투여독성시험에서는 한계 용량인 2,000 mg/kg 보다 높은 5,000 mg/kg을 암수 각 1마리에 투여한 한계용량시험 결과, 사망 및 증상관찰에서 특이 증상이 관찰되지 않았다. 따라서 본시험에서는 투여 최고용량인 5,000 mg/kg을 시험물질 투여군으로 하고 멸균증류수를 투여하는 음성대조군을 두었으며, 투여 횟수는 1회/1일로 하였다.

(6) 군분리 방법

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

(7) 개체식별

개체식별은 꼬리마킹법을 사용하였다. 사육상자에는 용량별로 다른 색상의 개체식별카드를 부착하였으며, 사육상자대에는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 시험번호, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험담당자명, 비상연락처 등을 기재한 'SPF실험동물실 사용기록지'를 부착하였다.

(8) 잔여동물 처리

잔여동물은 군분리 후 안락사 시켰다.

(9) 시험물질의 조제

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

(10) 투여 시간 및 방법

투여일 오전 11:00 이전에 투여가 이루어졌으며, 경배부 피부를 고정하고 금속제 경구투여용 존대를 이용하여 강제 경구투여 하였다.

(11) 관찰 및 검사항목

(가) 일반증상관찰

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

(나) 체중측정

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

(다) 부검조건

시험물질 투여 후 14일째 되는 날 전체 동물에 대해 체중을 측정하고 Isoflurane 마취하에 개복하여 복대동맥 및 정맥을 절단하여 방혈치사 시킨 후 부검을 실시하였다. 육안적으로 모든 내부장기의 이상 유무를 관찰하여 그 소견을 기록하였다.

(12) 통계학적 방법

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

라. 결 과

(1) 사망동물 및 최소치사량

전 시험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 랫드의 최소치사량은 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 관찰되었다.

(2) 일반증상

전 시험기간 동안 모든 군에서 아무런 증상이 관찰되지 않았다.

(3) 체중

시험 전체 기간을 통해 체중변화(body weight changes) 및 증체량(weight gains)을 관찰한 결과 수컷 대조군과 시험군은 각각 103.5 ± 4.32 g과 97.5 ± 17.34 g의 증체량을 보였으며, 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다. ($p > 0.05$). 그리고 암컷 대조군과 시험군은 각각

41.6±9.58 g 및 45.2±6.49 g 으로 군간 증체량에 있어서 유의한 차이가 없었다(p > 0.05).

(4) 부검소견 (Table 7~8, Appendix 1~2)

관찰기관 동안 살아남은 동물에 대한 계획부검 시 이상소견은 관찰되지 않았다.

마. 고찰 및 결론

본 시험물질인 우유내 유청으로부터 제조한 NANA의 독성을 조사하기 위해 Sprague-Dawley 계 랫드 암수 각각에 0 및 5,000 mg/kg 용량으로 단회경구투여한 후 독성지표인 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 관찰기간동안 사망동물은 없었다. 일반증상에서 관찰기간동안 이상증상은 관찰되지 않았다. 관찰기간 동안 체중변화(body weight changes) 및 증체량(weight gains)을 관찰한 결과 대조군과 비교하여 군간 증체량에 있어서 유의한 차이가 없었다. 사망 동물도 없었으며, 증상관찰 및 부검소견 또한 특이증상이 관찰되지 않았으므로, 본 단회경구투여독성시험에서 시험물질의 랫드에 대한 개략치사량(ALD)은 한계량인 2,000 mg/kg 보다 높은 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 추정된다.

바. 시험의 신뢰성에 영향을 줄 수 있는 사항

시험의 신뢰성에 영향을 줄 수 있는 사항은 없었다.

3. 개발 G-NANA의 안전성(미생물복귀돌연변이시험) 평가

가. 요약

시험물질인 우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid의 미생물에 대한 돌연변이 유발성 유무를 검색하기 위해 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537과 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2uvrA를 이용하여 복귀돌연변이시험을 실시하였다.

시험물질은 멸균증류수에 용해하여 처리하였다. 농도결정시험은 5000 µg/plate를 최고농도로 하여 공비 2로 5단계 농도군(0, 312, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate)으로 시행한 결과 대조군과 비교하여 모든 농도에서 생육저해가 확인되지 않았다. 따라서 농도결정시험에 설정한 시험군의 농도를 본시험에 적용하였다.

본 시험결과, 대사활성계 존재 유무와 관계없이 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA의 5 균주 모두에서 시험물질의 각 농도들에 의한 복귀돌연변이 유발원 양성기준인 콜로니 생성 수치가 재현성있는 증가를 나타내지 않았으며, 또한 용량의존성도 확인되지 않았다.

이상의 결과를 볼 때 본시험에서 시험물질인 우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid는 상기의 5개 균주에 대하여 복귀돌연변이를 유발하지 않는 음성으로 판단된다. 본 시험조건에 대한 적합성 여부를 판단하기 위해 실시된 각 균별 양성물질에 의한 양성대조군의 복귀돌연

변이 콜로니 발생빈도가 대사활성계 존재 유무와 관계없이 음성대조군보다 약 2-10배 정도 높은 유의성이 확인되었기에 본 시험의 조건과 결론은 적절한 것으로 사료된다.

나. 시험물질 및 부형제

(1) 시험물질

- (가) 명칭 : G-NANA(Sialic acid)
- (나) 기원 : 우류 (유청내 GMP)
- (다) Lot번호 : 130103-1
- (라) 입수일 : 2013. 1. 7
- (마) 입수량 : 8088.42 g
- (바) 외관 및 성상 : 연노랑색 분말
- (사) 순도 : 6.4 %
- (아) 보관조건 : 냉장
- (자) 제공자 : (주)생명의 나무

(2) 부형제

- (가) 명칭 : 멸균증류수
- (나) 제조(로트)번호 : 31LBP60
- (다) 입수일 : 2013. 4. 24
- (라) 입수량 : 1L
- (마) 외관 및 성상 : 무색무취 액체
- (바) 보관조건 : 상온
- (사) 제조원 : (주)대한약품공업주식회사

(3) 용매선정이유

의뢰자가 제공한 시험물질성적서에 따르면 시험물질이 물용해도가 높은 것으로 확인되어 용매로 선정하였다.

(4) 보관 및 취급

시험 중 시험물질은 시험물질보관실 냉장보관고에 보관하였으며, 시험 종료 후 시험에 사용하고 난 여분의 양은 반복투여독성시험으로 이관하여 사용하였다. 시험물질은 혼합금지 물질과 분리하고 현행법규 및 규정에 의하여 저장 및 취급하였다.

다. 양성대조물질

(1) 양성대조물질과 용매

	물 질 명	제 조 원	Lot No.	순도 (%)
양성 대조 물질	Sodium azide (NaN ₃)	Wako	SDE2303	98.0
	9-aminoacridine (9-AA)	Sigma	11126KD	98.0
	4-Nitroquinoline-N-Oxide (4-NQO)	Sigma	095K1125	98.0
	2-aminoanthracene (2-AA)	Wako	EWL 1809	96.0
용매	Dimethyl sulfoxide	Sigma	26696MJ	99.5

(2) 사용한 양성대조물질 명칭 및 농도

균주명	구분	직접법에 의한 경우		대사활성화법에 의한 경우	
		양성대조물질	농도(µg/plate)	양성대조물질	농도(µg/plate)
TA98		4-NQO	0.5	2-AA	0.5
TA100		NaN ₃	1.5	2-AA	1.0
TA1535		NaN ₃	1.5	2-AA	2.0
TA1537		9-AA	80	2-AA	2.0
WP2uvrA		4-NQO	0.5	2-AA	10

라. 시험에 사용한 균주

(1) 균주선택이유

미생물 복귀돌연변이시험에서 일반적으로 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)을 이용하는데 살모넬라균은 히스티딘 요구성의 변이를, 대장균은 트립토판 요구성의 변이를 지표로 한다. 이들 균주는 유전독성유발물질에 대해 높은 감수성을 나타내는 유전적형질을 가지고 있어 유전독성시험에 널리 이용되고 있다. 따라서 본 시험에는 *Salmonella typhimurium*의 돌연변이 균주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537, *Escherichia coli*의 돌연변이 균주인 WP2uvrA 등 5균주를 이용하였다.

(2) 입수방법

균 주 명	공 급 처	입 수 처	입 수 년 월 일
TA98	MOLTOX™	(주) 우정 BSC	2012. 6. 19
TA100	MOLTOX™	(주) 우정 BSC	2012. 6. 19
TA1535	MOLTOX™	(주) 우정 BSC	2012. 6. 19
TA1537	MOLTOX™	(주) 우정 BSC	2012. 6. 19
WP2uvrA	MOLTOX™	(주) 우정 BSC	2012. 6. 19

(3) 보존방법

보 존 방 법	분 주 동 결	
보 존 온 도	-70°C	
조 성	균현탁액 : 10 ml	DMSO : 0.875 ml
	균현탁액과 DMSO를 혼합하여 0.2 ml씩 분주하여 보존하였다.	

(4) 균주의 유전적 성질 및 양성대조물질의 감수성 검사

균 주 명	시험에 사용한 보존 균주의 특성검사일
TA98	2013. 5. 1
TA100	2013. 5. 1
TA1535	2013. 5. 1
TA1537	2013. 5. 1
WP2uvrA	2013. 5. 1

마. 대사활성계 (S9 Mix)

(1) S9 정보 및 보존방법 등

제조사(Lot번호)	MOLTOX™ (2993)	제조원	MOLTOX™
유 도 물 질	Aroclor 1254		
유 도 방 법	Sprague dawley male rat에 유도물질을 도살 5일전 단회 복강 투여 후 간조직 균질화		
유 효 기 간	2014 년 9 월 7 일		
보 관 방 법	- 20°C		
근 거 서 류	Post Mitochondrial supernatant (S-9) Quality control statement		

(2) S9 Mix의 조성

S-9	1		2	
S-9(ml)	2.1	2.0	4.2	4.0
20mM HEPES (ml)	6.0		12.0	
50mM MgCl ₂ (ml)	3.0		6.0	
330mM KCl (ml)	3.0	18.0	6.0	36.0
50mM G-6-P (ml)	3.0		6.0	
40mM NADP · Na (ml)	3.0		6.0	
증류수 (ml)	3.0		6.0	
총합 (ml)	20.0		40.0	

바. 시험물질용액의 조제

	명 칭	제 조 원	Lot No.	등 급	순도(%)
사 용 용 매	멸균증류수	(주)대한약품	31LBP60	-	100
시험물질의 안정성	안정				
용매선택의 이유	의뢰자가 제공한 시험물질성적서에 따르면 시험물질이 물용해도가 높은 것으로 확인되어 용매로 선택				
제조방법	최고농도의 시험물질을 조제한 후 공비 2로 단계희석				
순도환산의 유무	순도환산은 하지 않음				

사. 전배양의 조건

Nutrient Broth	명 칭	제 조 원	Lot No.
	No. 2 배지	Oxoid	959530
전배양시간	10 시간 (정지기 초기에 배양을 멈춘다)		
진탕배양장치의 모델 및 제조원	모 델: VS-84805F 제조원: VISION SCIENTIFIC CO., LTD		
진 탕 방 법	진탕형식: 선회 선회수: 180회/분		
배 양 용 기	종류: 삼각플라스크 용량: 50 ml		
배 양 액 량	15 ml	접종균량	30 µl

아. 사용배지

(1) Top Agar

명칭	제조원	로트번호
Agar	BD	2067049
NaCl	Sigma	BCBC3152

(2) Vogel-Bonner 최소 Glucose 한천평판배지

명칭	제조원	로트번호	자체조제일
Vogel-Bonner E× 50	-	-	2013. 1. 22 2013. 5. 7
40% Glucose	-	-	2013. 4. 30 2013. 5. 28
Agar	BD	2067049	-

자. 시험의 조건

(1) Plate 법

조 성	균현탁액	0.1 ml
	시험물질용액	0.05 ml
	Phosphate buffered saline (대사활성계 미처리시)	0.5 ml
	S9 mix (대사활성계 처리시)	0.5 ml
	Top agar	2.0 ml
Incubation	온 도	37°C
	시 간	48시간

(2) 시험구성

(1) 농도결정시험

구 분	사용 플레이트 수	농도단계	양성대조, 용매대조 사용 플레이트 수
대사활성계 미처리	3매	5단계 (0, 312, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate)	3매
대사활성계 처리	3매	5단계 (0, 312, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate)	3매

(2) 본시험

구 분	사용 플레이트 수	농도단계	양성대조, 용매대조 사용 플레이트 수
대사활성계 미처리	3매	5 단계 (0, 312, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate)	3매
대사활성계 처리	3매	5 단계 (0, 312, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate)	3매

(3) 농도설정이유

복귀돌연변이시험에 일반적으로 고려되고 있는 최고투여용량인 5000 µg/plate 를 최고농도로 공비 2로 하여, 5농도 단계로 농도결정시험을 실시하였다. 농도결정시험 결과 대조군과 비교하여 모든 농도에서 생육저해가 확인되지 않았다. 따라서 농도결정시험에서 설정한 시험군의 농도를 본시험에 적용하였다.

차. 관찰, 측정, 검사 및 분석방법

(1) Colony 수의 측정

90 mm 직경의 플레이트 (내경 86 mm)에 생성된 콜로니를 콜로니카운터(SUNTEX Model 570) 를 사용하여 계수하였다.

(2) 생육저해유무의 확인방법

육안으로 모든 플레이트를 관찰하여 확인하였다.

(3) 균농도의 측정방법

본 센터 표준작업수순서의 단계희석법에 의한 생균수 측정방법에 의하여 균 농도를 측정하였다.

(4) 무균시험

S9 Mix 및 시험물질용액을 0.1 ml씩 최소글루코즈 한천배지에 top agar를 중층시켜 37°C에서 48시간 배양 후 균이 자라지 않았으므로, 무균적으로 시험이 수행되었음을 확인하였다.

카. 결과 해석과 통계학적 수법

결과의 판정은 대사활성계 존재 유무에 관계없이 최소 1개 균주에서 플레이트 당 복귀된 집락수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정한다.

타. 시험결과

본 시험을 위해 5000 µg/plate를 최고농도로 하여 0, 312, 625, 1250, 2500 µg/plate의 농도

를 포함하여 5단계의 농도결정시험을 하였다. Table 1에서처럼 5종의 모든 균주에서 투여된 시험물질의 모든 농도에서 유의한 생육저해가 없었다. 따라서 미생물복귀돌연변이시험에서 일반적으로 적용되는 5000 µg/plate를 최고농도로 하여 공비 2의 5단계 농도를 설정하여 본시험을 실시하였다.

이와 같이 농도결정시험을 통해 설정된 농도를 본시험에 적용하였으며 그 결과는 다음과 같다. 본시험의 대사활성계 미처리의 경우 음성대조군 및 5단계의 농도 0, 312, 625, 1250, 2500 µg/plate 그리고 5000 µg/plate 에서 TA100 균주는 125.7 ± 6.03 , 131.3 ± 5.03 , 119.0 ± 13.53 , 135.7 ± 11.85 , 135.0 ± 7.00 그리고 142.3 ± 10.02 colonies/plate, TA1535 균주는 37.0 ± 1.00 , 36.3 ± 2.08 , 36.3 ± 3.06 , 33.7 ± 4.16 , 32.0 ± 4.58 그리고 31.3 ± 3.51 colonies/plate, WP2uvrA 균주는 31.0 ± 1.00 , 36.7 ± 0.58 , 35.7 ± 2.52 , 32.7 ± 2.31 , 31.7 ± 0.58 그리고 34.7 ± 3.21 colonies/plate, TA98 균주는 46.0 ± 4.00 , 42.0 ± 10.39 , 46.7 ± 1.15 , 49.3 ± 2.31 , 52.7 ± 3.51 그리고 52.7 ± 4.93 colonies/plate, TA1537 균주는 16.7 ± 2.52 , 16.7 ± 1.53 , 17.3 ± 1.53 , 14.3 ± 3.51 , 17.0 ± 1.73 그리고 16.0 ± 2.00 colonies/plate 이었다. 대사활성화계 처리의 경우 음성대조군 및 동일한 5단계의 농도에서 TA100 균주는 114.3 ± 9.29 , 112.0 ± 9.54 , 119.7 ± 2.08 , 131.0 ± 7.21 , 129.7 ± 11.85 그리고 122.7 ± 5.51 colonies/plate, TA1535 균주는 34.3 ± 3.21 , 32.7 ± 3.06 , 34.7 ± 1.15 , 32.7 ± 6.03 , 33.3 ± 1.15 그리고 33.3 ± 1.53 colonies/plate, WP2uvrA 균주는 32.0 ± 4.00 , 34.0 ± 4.00 , 31.7 ± 2.52 , 33.3 ± 2.31 , 34.0 ± 2.00 그리고 30.7 ± 1.15 colonies/plate, TA98 균주는 52.3 ± 4.04 , 52.3 ± 5.86 , 51.0 ± 4.58 , 49.0 ± 7.00 , 51.3 ± 9.29 그리고 53.0 ± 4.36 colonies/plate, TA1537 균주는 13.0 ± 1.73 , 13.3 ± 2.89 , 14.7 ± 2.31 , 14.7 ± 4.04 , 18.0 ± 1.73 그리고 14.3 ± 4.04 colonies/plate 이었다 (Table 2, Figure 1).

균주별 양성대조군의 콜로니수는 대사활성계 처리의 경우 TA100, TA1535, WP2uvrA, TA98 및 TA1537 균주는 각각 393.3 ± 19.73 , 240.0 ± 34.70 , 248.0 ± 26.23 , 355.0 ± 33.60 그리고 143.3 ± 25.32 colonies/plate 이었다. 대사활성계 미처리의 경우 각 균주별로 381.3 ± 44.60 , 185.3 ± 5.03 , 292.0 ± 23.07 , 256.0 ± 32.00 그리고 267.3 ± 24.95 colonies/plate 이었다

과. 결론 및 고찰

우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid에 대한 발암성 유발 유·무 판단에 기초자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 미생물복귀돌연변이시험을 실시하였다. 시험에는 *Salmonella typhimurium* 의 돌연변이 균주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537, *Escherichia coli*의 돌연변이 균주인 WP2uvrA의 5 균주를 이용하였다. 본시험의 농도 결정을 위해 5000 µg/plate를 최고농도로 하여 0, 312, 625, 1250, 2500 µg/plate의 농도를 포함하여 5단계의 농도결정시험을 하였다. 농도결정시험 결과 모든 농도에서 대조군과 비교하여 모든 균주의 생육저해는 확인되지 않았으며, 이를 본시험의 농도에 사용하였다.

본 시험에서 대사활성계 존재 유무에 관계없이 모든 균주의 모든 농도에서 재현성 있는 증가를 나타내지 않았으며, 또한 용량의존성도 확인되지 않았다. 따라서 본 시험물질인 우유

내 유청으로부터 제조한 Sialic acid는 본 시험 조건하에서 복귀돌연변이 유발원이 아닌 것으로 판정된다. 본 시험조건에 대한 적합성 여부를 판단하기 위해 실시된 각 군별 양성물질에 의한 양성대조군의 복귀돌연변이 콜로니 발생빈도가 대사활성계 존재 유무에 관계없이 음성대조군보다 약 2-10배 정도 높은 유의성이 확인되었기에 본 시험의 조건과 결론은 적절한 것으로 사료된다.

하. 시험의 신뢰성에 영향을 줄 수 있는 사항

본 시험은 시험의 신뢰성에 영향을 줄만한 시험계획서로부터의 이탈사항은 없었다.

4. 개발 G-NANA의 안전성(마우스 골수세포를 이용한 소핵시험) 평가

가. 요약문

본 시험물질인 우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid에 대해 발암성 유발 유·무 판단의 기초자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 군구성은 시험물질 2,000 mg/kg을 투여 최고농도로 하여 공비 2의 3단계 투여농도군, 음성대조군, 양성대조군으로 이루어졌다. 또한 시험물질의 체내 흡수 후 48시간까지의 소핵출현빈도를 관찰하기 위하여 시험물질을 2일간 투여하였다.

본 시험결과, 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율 비교에 있어서 음성대조군과 시험물질 투여군간 평균차이의 유의성이 없었다($p>0.05$). 또한 동물개체별로 2,000 개의 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵출현 적혈구의 평균빈도 비교에 있어서 음성대조군과 시험물질 투여군간 유의성이 없었으며($p>0.05$), 시험물질 투여농도에 따른 용량의존성 반응이 없었다.

이상의 결과를 볼 때 본 시험물질인 우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid는 당 시험조건에서는 마우스 골수세포에 대해 소핵의 유발성이 없는 것으로 판단된다. 본 시험에 있어서 양성대조군은 음성대조군의 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵출현 적혈구의 평균빈도보다 유의하게 높은 것으로 관찰되어 시험물질의 소핵출현 빈도 확인을 위한 시험조건이 적절한 것으로 사료된다.

나. 시험물질, 부형제 및 양성대조물질

(1) 시험물질

(가) 명칭 : G-NANA(Sialic acid)

(나) 기원 : 우류 (유청내 GMP)

(다) Lot번호 : 130103-1

(라) 입수일 : 2013. 01. 07

(마) 입수량 : 8088.42 g

(바) 외관 및 색상 : 연노랑색 분말

(사) 순도 : 6.4 %

- (아) 보관조건 : 냉장
- (자) 제공자 : (주)생명의 나무 김희경

(2) 부형제

- (가) 명칭 : 멸균증류수
- (나) 제조(로트)번호 : 31LBP60
- (다) 입수일 : 2013년 4월 24일
- (라) 입수량 : 1L
- (마) 외관 및 성상 : 무색무취 액체
- (바) 보관조건 : 상온
- (사) 제조원 : (주)대한약품공업주식회사

(3) 양성대조물질

- (가) 명칭 : Mitomycin C
- (나) 제조(로트)번호 : SLBB7481V
- (다) 입수일 : 2012년 7월 18일
- (라) 입수량 : 2 mg
- (마) 외관 및 성상 : 암청색 분말
- (바) 보관조건 : 냉장
- (사) 제조원 : Sigma-Aldrich

(4) 보관 및 취급

시험 중 시험물질은 시험물질보관실 냉장보관고에 보관하였으며, 시험 종료 후 시험에 사용하고 난 여분의 양은 반복투여독성시험으로 이관하여 사용하였다. 시험물질은 혼합금지 물질과 분리하고 현행법규 및 규정에 의하여 저장 및 취급하였다.

다. 시험계

- (1) 종 및 계통 : ICR 계통의 특정병원균 부재 (SPF) 수컷 마우스
- (2) 공급원 : (주) 샘타코
- (3) 시험계의 선택이유

본 시험에 사용하는 마우스는 독성시험에 적당한 실험동물로서 소핵시험에 널리 사용되고 있다. 또한 본 계통의 마우스는 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어서, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있다.

- (4) 입수일 : 2013년 5월 14일
- (5) 입수 시 동물 수 : 32마리

(6) 입수 시 주령 및 체중 : 7 주령, 30.2 ~ 33.0 g

(7) 검역 및 순화기간

입수 후 7일간 (순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용)

(8) 투여개시 시 주령 및 체중 : 생후 8주령, 29.4 ~ 37.2 g

(9) 사용 동물 수 : 본시험 25마리

(10) 균분리법

투여개시 전에 체중을 측정하고 순위화한 체중을 이용하여 균분리를 실시하였다.

(11) 식별법

개체식별은 꼬리마킹법 및 사육상자별 개체식별카드표시법을 이용한다. 사용 동물실의 입구에는 시험번호, 시험제목, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험자명을 기재한 동물실사용기록지를 첨부한다.

(12) 체중측정방법

체중측정은 도입시, 군구성 및 희생 당일에 측정하되 표준분동으로 정도관리 된 전자저울을 이용하여 동물식별번호에 따라 한 마리씩 측정하였다.

(13) 사육환경

(가) 동물실 : SPF 실험동물실 사육실 I

(나) 온습도 범위 : 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$

(다) 명암 cycle : 형광등조명 12 hr. (08:00 점등~20:00 소등)

(라) 조도 : 150~300 Lux

(마) 사육상자의 종류 (크기)

Polysulfone 사육상자 (260W x 420L x 150H mm) 에 수용하였다.

(바) 사육상자 당 동물수

순화, 검역기간을 비롯하여 투여, 관찰기간 모두 5마리로 하였다.

(14) 사 료

(가) 종류 : 실험동물용 고형사료

(나) 공급원: Zeigler Bros., Inc. (USA)

(다) 급여법 : 방사선 멸균사료를 자유섭취 시켰다.

(라) 오염물질 확인 : GLP센터의 사료 및 물 중의 오염물질 검사에 관한 SOP에 따라서 실시하였다.

(15) 물

(가) 종류 : 음용 소독수

(나) 급수방법 : 자외선 소독 된 지하수를 급수병을 통해 자유섭취 시켰다.

(다) 오염물질의 분석 : GLP센터의 사료 및 물 중의 오염물질 검사에 관한 SOP에 따라서

경상북도 보건환경연구원에서 검사한 자료를 참조하였다.

라. 동물실험법

(1) 투여방법

(가) 투여경로 : 경구

(나) 선택이유 : 사람에게 대한 임상 예정 경로로써 경구투여를 선택하였다.

(다) 투여부위 및 투여법

경배부 피부를 고정하고 금속제 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였다.

(라) 투여시각 : 오후 1시경에 투여하였다.

(마) 시험 물질의 조제 및 투여량

의뢰자가 제공한 시험물질성적서에 따르면 시험물질이 물용해도가 높은 것으로 확인되어 시험물질의 용매로 멸균증류수를 사용하였으며, 최고농도의 조제농도에 맞춰 시험물질 적량을 용매에 희석한 후 동일한 용매로 단계 희석하여 사용하였다. 조제된 시험물질의 투여액량은 체중 측정일에 측정한 체중을 기준으로 10 ml/kg으로 투여액량을 계산하였다.

(바) 투여횟수 : 1일 1회로 하여 2일간 투여하였다.

(2) 시험군의 구성

본 시험에서 시험군을 음성(용매)대조군 1군, 투여군 3군 (500 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg 투여군), 양성대조군 (Mitomycin C (MMC) 2 mg/kg)으로 구성하여 총 5군을 구성하였다. 각 군당 5마리씩 총 25마리의 마우스를 사용하였다.

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg)
G1 (V.C)	Male	5	1101 ~ 1105	10	0
G2	Male	5	1201 ~ 1205	10	500
G3	Male	5	1301 ~ 1305	10	1,000
G4	Male	5	1401 ~ 1405	10	2,000
G5 (P.C)	Male	5	1501 ~ 1505	10	2

G1 : Vehicle Control, G5 : Positive Control, G2~G4 : 시험물질 투여군

(3) 투여량 및 투여횟수 설정이유

본 시험물질은 건강기능식품 등록을 목적으로 개발되었으며 의뢰자가 제공한 정보에 의하면 독성이 크게 없을 것으로 추정되며, 본 센터에서 실시한 5,000 mg/kg을 투여한 단회경구투여독성시험 결과 시험물질에 의한 독성이 나타나지 않았다. 따라서 본 시험물질에 독성이 없을 것으로 판단되어, 예비시험을 생략하고 마우스 2마리에 2,000 mg/kg을 투여하는 한계용량시험(limit dose test)를 실시하였다. 그 결과 2마리 모두 생존하였기에 본시험에서는

2,000 mg/kg 최고용량으로 하여 1,000 mg/kg, 500 mg/kg 투여량을 설정하였다. 또한 본 시험물질이 체내에서 대사되는 시간을 고려하여 시험물질을 2일간 투여하였다.

마. 단계별 시험방법

(1) 골수세포의 회수 및 검체 제작

문헌조사로 투여농도를 결정하여 2일간 시험물질을 투여하고 24시간 후에 희생시킨 후 Fetal bovine serum (FBS)을 사용하여 대퇴골에서 골수세포를 회수한다. 골수세포의 도말표본을 만들어 고정한 후 광학현미경을 사용하여 도말상태, 세포밀도를 확인한다. 좋은 도말표본을 선정하여 염색한 후 형광현미경을 사용하여 전체 적혈구와 다염성 적혈구 중의 소핵출현적혈구를 계수한다. 계수가 끝난 후 다염성 적혈구 중의 소핵출현빈도 및 전체 적혈구 중의 다염성 적혈구의 비율을 구한다.

(2) 표본의 염색

메탄올로 고정시킨 표본에 acridine orange (40 µg/ml)로 점적하여 커버글라스를 덮어 염색한 후 골수세포증식과 다염성 적혈구에 생성된 소핵을 관찰하였다.

(3) 표본의 관찰

(가) 관찰방법

표본의 관찰은 맹검법 (blind method)에 의해 실시하였으며, FITC filter가 장착된 형광현미경을 사용하여 관찰하였다.

(나) 관찰기준

골수세포의 증식현상을 관찰하기 위해서 세포의 도말상태가 좋은 곳을 선택 하여 전체 적혈구 (다염성 적혈구 및 정염성 적혈구) 약 200 개를 관찰하여 그중 다염성 적혈구의 비율을 측정하였다. 소핵빈도를 관찰하기 위해서는 다염성 적혈구 (Polychromatic erythrocytes, PCE) 약 2,000 개에서 소핵을 갖는 세포를 계수하였다. 염색한 표본에서는 관찰시야에서 핵이 없이 적색 형광빛을 나타내는 것을 다염성 적혈구로 하였으며, 정염성 적혈구는 형광빛을 나타내지 않고 음영으로만 구분되는 것으로 하였다.

본 소핵시험에서 소핵관찰시 소핵의 판정기준은 다음과 같다.

크기 : 제일 큰 것은 적혈구 직경의 1/2 크기의 것으로, 제일 작은 것은 식별이 가능한 것까지로 하였다.

형태 : 주로 원형이나 기타 도너츠형, 반원형 등의 형태의 것을 포함시켰다.

색깔 : Acridine 염색 표본에서 근접한 유핵세포의 핵과 동일하게 녹색 형광빛을 띠는 것으로 하였다.

바. 시험결과의 판정 및 통계처리

본 소핵시험의 결과 음성(용매)대조군에 대한 시험물질 투여군의 소핵출현빈도와 전체적혈구당 다염성적혈구 비율에 대한 유의성 검정은 5%의 유의수준 ($p = 0.05$)에서 one-way ANOVA, multiple comparison 분석을 통해 SPSS 19.0K 통계 프로그램을 이용하여 실시하였으며, 양성 판정의 기준은 아래와 같다.

- ① 소핵을 가진 다염성적혈구의 수가 통계학적으로 용량의존적으로 증가하는 경우
- ② 하나이상의 용량 단계에서 재현성있게 양성반응을 나타낸 경우

사. 시험결과

(1) 실험동물의 사망, 일반증상 및 체중

시험기간 동안 모든 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 그리고 일반증상 관찰 결과 이상증상이 관찰되지 않았다. 투여에 의한 군간 체중변화를 관찰한 결과 모두 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

(2) 적혈구 증식억제 및 소핵출현빈도

- 본시험에서 양성대조군은 음성대조군과의 적혈구증식억제율과 비교에서는 유의한 차이가 없었지만 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵출현 적혈구의 평균빈도에서는 유의하게 높아 시험물질의 소핵출현 빈도 확인을 위한 시험조건으로 적절한 것으로 판단된다.
- 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 평균 비율은 음성대조군에서 $40.7 \pm 1.35\%$, 500 mg/kg 투여군에서 $40.2 \pm 1.44\%$, 1,000 mg/kg 투여군에서 $39.7 \pm 1.15\%$, 2,000 mg/kg 투여군에서는 $39.9 \pm 1.34\%$ 로 관찰되었다. 통계적 검정결과 모든 투여군의 평균비율이 음성대조군과 비교하여 유의성이 없었다($p>0.05$). 또한 시험물질 투여군들에 있어서 시험물질에 의한 용량의존성 반응이 없었다.
- 동물개체별로 약 2,000 여개의 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵출현 적혈구의 평균빈도는 음성대조군에서 $0.13 \pm 0.027\%$, 500 mg/kg 투여군에서 $0.15 \pm 0.035\%$, 1,000 mg/kg 투여군에서 $0.14 \pm 0.022\%$, 2,000 mg/kg 투여군에서는 $0.13 \pm 0.045\%$ 로 관찰되었다. 통계적 검정결과 소핵출현 적혈구의 평균빈도는 음성대조군과 비교하여 유의성이 없었다($p>0.05$). 또한 시험물질 투여군들에 있어서 시험물질에 의한 용량의존성 반응이 없었다.

아. 결론 및 고찰

본 시험물질인 우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid에 대해 발암성 유발 유·무 판단의 기초자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 시험물질 2,000 mg/kg을 투여 최고 농도로 하여 공비 2의 3단계 투여농도군, 음성대조군, 양성대조군을 설정하였다. 또한 시험물질의 체내 흡수 후 48시간까지의 소핵출현빈도를 관찰하기 위하여 시험물질을 2일간 투여하였다.

본 시험결과, 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율 비교에 있어서 음성대조군과 시험물질 투여군간 평균차이의 유의성이 없었다($p>0.05$). 또한 동물개체별로 2,000 개의 다염성 적혈구

에서 관찰한 소핵출현 적혈구의 평균빈도 비교에 있어서 음성대조군과 시험물질 투여군간 유의성이 없었으며($p>0.05$), 시험물질 투여농도에 따른 용량의존성 반응이 없었다.

이상의 결과를 볼 때 본 시험물질인 우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid는 당 시험조건에서는 마우스 골수세포에 대해 소핵의 유발성이 없는 것으로 판단된다. 본 시험에 있어서 양성대조군은 음성대조군의 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵출현 적혈구의 평균빈도보다 유의하게 높은 것으로 관찰되어 시험물질의 소핵출현 빈도 확인을 위한 시험조건이 적절한 것으로 사료된다.

자. 시험의 신뢰성에 영향을 줄 수 있는 사항

본 시험은 시험의 신뢰성에 영향을 줄만한 시험계획서로부터의 이탈사항은 없었다.

5. 개발 G-NANA의 안전성(포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험) 평가

가. 요약문

우유내 유청으로부터 제조한 NANA의 유전독성을 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 난소유아세포(CHO-K1 cell)를 이용하여 염색체이상시험을 실시하였다. 시험물질은 멸균증류수에 용해하여 조제하였으며 결과의 요약은 다음과 같다.

- 세포증식억제시험 결과 대사활성계 적용 6시간 처리군, 대사활성계 비적용 6시간 처리군 및 대사활성계 비적용 24시간 처리군의 최고농도인 5 mg/ml을 포함한 모든 농도에서 세포증식억제가 나타나지 않았다. 따라서 S9 Mix 첨가 6시간 처리군, S9 Mix 비첨가 6시간 처리군 및 S9 Mix 비첨가 24시간 처리군 모두 5 mg/ml을 최고농도로 하여 1.25, 0.08 mg/ml 등 3 단계 투여농도를 본시험에 적용하였다.
- S9 Mix 첨가 6시간 처리군의 경우 투여된 3 단계 농도에서 염색체의 수적 및 구조적 이상 빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다($p>0.01$). S9 Mix 비첨가 6시간 처리군 경우에서도 투여된 3 단계 농도에서 염색체의 수적 및 구조적 이상 빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다($p>0.01$). 또한 S9 Mix 비첨가 24시간 처리군 경우에서도 투여된 3 단계 농도에서 염색체의 수적 및 구조적 이상 빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다($p>0.01$).
- 따라서 시험물질인 우유내 유청으로부터 제조한 NANA는 본 시험조건에서 수적 및 구조적 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 추정된다. 양성대조물질에 의한 염색체이상 발생 빈도가 모든 처리군에서 음성대조군과의 비교하여 유의성($p<0.01$)이 확인되었기에 본 시험의 조건과 결론은 적절한 것으로 사료된다.

나. 시험물질 및 부형제

(1) 시험물질

(가) 명칭 : G-NANA (Sialic acid)

- (나) 기원 : 우류 (유청내 GMP)
- (다) Lot번호 : 130103-1
- (라) 입수일 : 2013. 1. 7
- (마) 입수량 : 8088.42 g
- (바) 외관 및 성상 : 연노랑색 분말
- (사) 순도 : 6.4 %
- (아) 보관조건 : 냉장
- (자) 제공자 : (주)생명의 나무 김희경

(2) 부형제

- (가) 명칭 : 멸균증류수
- (나) 제조(로트)번호 : 31LBP60
- (다) 입수일 : 2013. 4. 24
- (라) 입수량 : 1L
- (마) 외관 및 성상 : 무색무취 액체
- (사) 보관조건 : 상온
- (아) 제조원 : (주)대한약품공업주식회사

(3) 용매선정이유

의뢰자가 제공한 시험물질성적서에 따르면 시험물질이 물용해도가 높은 것으로 확인되어 용매로 선정하였다.

(4) 보관 및 취급

시험 중 시험물질은 시험물질보관실 냉장보관고에 보관하였으며, 시험 종료 후 시험에 사용하고 난 여분의 양은 반복투여독성시험으로 이관하여 사용하였다. 시험물질은 혼합금지 물질과 분리하고 현행법규 및 규정에 의하여 저장 및 취급하였다.

다. 양성대조물질

(1) 양성대조물질 명칭

Chemical Name		Manufacturer	Lot. No.	Grade	Solvent
Positive control	Mitomycin C (MMC)	Sigma chemical Co.	SLBB7481V	Biochemical grade	Distilled water
	Cyclophosphamide (CPA)	Sigma chemical Co.	079K1569	Biochemical grade	Distilled water

(2) 사용한 양성대조물질의 농도

	Chemical name	Concentration of Solution	Concentration of treatment
Without S9 mix	Mitomycin C (MMC)	0.2 mg/ml	0.15 µg/ml
			0.5 µg/ml
With S9 mix	Cyclophosphamide (CPA)	100 mg/ml	15 µg/ml

(3) 양성대조물질의 선정이유

MMC와 CPA는 염색체이상시험에 많이 사용되는 양성대조물질이며, 본 시험에도 양성대조물질로 사용하였다.

라. 사용세포

(1) 시험에 사용한 세포

시험에 사용한 세포는 CHO-K1(Chinese hamster ovary fibroblast) 유래의 배양세포를 이용하였다. 사용한 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 2012년 7월 3일 입수하여 사용하였다.

(2) 선정이유

이 세포는 염색체이상시험에 있어서 화학물질에 대한 감수성이 높은 것으로 알려져 있으며 자료가 풍부하기 때문에 선택하였다.

(3) 세포의 특징

(가) 배양조건

배양액 : 10% Fetal Bovine Serum을 포함한 Minimum Essential Medium Eagle

조 건 : 5% CO₂ , 37°C 에서 배양하여 3~4일마다 계대하였다.

(나) 배가시간 : 약 15시간

(다) 염색체 수 (mode) : 22개

(라) 보관 : 10% dimethyl-sulfoxide (DMSO)를 혼합한 배양액에 현탁시킨 세포를 냉동용 바이알에 넣어 액체질소에 보관하였다.

마. 대사활성계 (S9 Mix)

(1) S9 정보 및 보존방법 등

제조사(Lot번호)	MOLTOX™ (3003)	제조원	MOLTOX™
유도물질	Aroclor 1254		
유도방법	Sprague dawley male rat에 유도물질을 도살 5일전 단회 복강 투여 후 간조직 균질화		
유효기간	2014년 9월 20일		
보관방법	- 20℃		
근거서류	Post Mitochondrial supernatant (S-9) Quality control statement		

(2) S9 Mix의 조성

S9	1	2	3	4
S9 (ml)	2.1	4.2	6.3	8.4
20mM HEPES (ml)	1.4	2.8	4.2	5.6
50mM MgCl ₂ (ml)	0.7	1.4	2.1	2.8
330mM KCl (ml)	0.7	1.4	2.1	2.8
50mM G-6-P (ml)	0.7	1.4	2.1	2.8
40mM NADP · Na (ml)	0.7	1.4	2.1	2.8
증류수 (ml)	0.7	1.4	2.1	2.8
총합 (ml)	7.0	14.0	21.0	28.0

바. 시험의 실시

(1) 시험물질의 조제

시험물질의 용매로는 멸균증류수를 사용하였으며, 최고농도의 조제농도에 맞추어 시험물질 적량을 용매에 용해한 것을 동일한 용매로 단계 희석하여 사용하였다. 조제된 시험물질의 투여량은 배지 부피의 1%가 되도록 하였다.

(2) 본시험의 농도결정을 위한 세포증식억제시험

본시험에 적용할 시험물질의 투여농도를 결정하기 위해 세포증식억제시험을 실시하였으며, 시험물질은 7개의 농도단계 (0.08, 0.16, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5 mg/ml)를 적용하였다. 세포증식억제는 농도에 따른 세포수 계측을 통해 관찰하였으며, 세포증식억제율의 산출은 RICC(Relative Increase in Cell Count)를 통해 확인하였다.

(3) 염색체이상시험

염색체이상 예비시험과 본시험은 세포증식억제시험에 의해 설정한 농도단계에 따라 실시하였다.

(가) 시험물질 6시간 처리군

25T Culture flask에 2×10^5 개의 세포를 5 ml씩 분주하여 약 3일간 배양하였다. 시험물질 처리 시 대사활성계 적용군은 기존 배양액을 제거하고 신선한 배양액 (37°C)을 4.45 ml씩 분주한 후 시험물질용액 (0.05 ml) 및 S9 Mix (0.5 ml)를 분주하여 5 ml이 되도록 하고, 대사활성계 비적용군은 기존 배양액을 제거하고 신선한 배양액 (37°C)을 4.95 ml씩 분주한 후 시험물질용액 (0.05 ml)을 분주하여 5 ml이 되도록 처리하였다. 6시간 후 배양액을 제거하고 신선한 배양액 (37°C)으로 세포층을 1회 세척한 후 제거하고 다시 배양액을 5 ml씩 분주하여 18시간동안 추가 배양 하였다.

(나) 시험물질 24시간 처리군

25T Culture flask에 2×10^5 개의 세포를 분주하여 약 3일간 배양하였다. 시험물질을 처리 시 기존 배양액을 제거하고 신선한 배양액 (37°C)을 4.95 ml씩 각 flask에 분주한 후 농도별 시험물질용액 (0.05 ml)을 분주하여 5 ml이 되도록 처리하였다. 배양조건에 따라 처리 후 24시간 배양하였다.

(다) 염색체표본슬라이드 작성

시험군에 따라 모든 flask에 대해 시험물질 처리 개시로부터 약 24시간 후에 Colcemid를 0.2 mg/ml(100 μ l/5 ml) 농도로 각각의 flask에 처리하여 2시간 경과 후 세포를 수거하였다. 원심분리 후 상등액을 제거한 후 37°C의 75mM KCl 저장액을 첨가하여 15분간 incubation하였다. 세포들은 Carnoy's 고정액 (acetic acid : methanol = 1 : 3) 에 3회 고정한 후 염색체 표본을 제작하고 3% Giemsa액으로 5분간 염색한 후 염색체이상을 계수하였다. 표본은 각 flask당 2매씩 제작하였다.

(4) 염색체이상의 관찰 및 평가

(가) 관찰방법

각 flask 당 200개의 분열중기세포를 관찰하여 다음의 종류별로 분류하였다. 이상의 유발율은 염색체에 이상을 갖는 세포의 출현율을 나타낸다. 관찰은 코드화한 표본을 이용한 BLIND방법으로 행하였으며 염색체이상의 형태는 다음과 같이 분류하였다.

	이상관찰	표현형
구조적이상	gap(염색분체형, 염색체형)	g
	절단 (염색분체형)	ctb
	교환 (염색분체형)	cte
	절단 (염색체형)	csb
	교환 (염색체형)	cse
	기타	etc
수적이상		pol

(나) 관찰기준

① gap

염색되지 않은 부분이 염색분체의 종축위에 있어 그 폭이 염색분체의 두께 정도로 그 구분이 명확한 것.

② 절단

절단은 염색분체의 종축으로부터 떨어져 있는 것. 동일선상에 있어도 그 폭이 염색분체의 두께의 2배를 넘는 것.

염색체형의 절단은 동원체를 갖지 않는 염색체가 있기 때문에 명확하게 판정할 수 있는 것만을 헤아렸다.

③ 교환

1개 또는 여러 개의 염색체의 2부위 사이에서 생긴 절단이 서로 결합한 것.

염색체형에 관하여는 환상, 이동원체 등 명확하게 판정할 수 있는 것만을 헤아렸다.

④ 기타

fragmentation : 교환형을 갖지 않고, 많은 염색체에 gap, 절단 등이 있는 것.

⑤ 수적이상

CHO-K1과 같은 세포주 세포에서는 어느 정도 염색체에 변이가 있으므로 이수성 (aneuploidy)의 검색은 하지 않고 배수성 (polyploidy)만 검색하였다. CHO-K1 세포에서의 mode는 22개이며 4배수체인 경우 44개가 되나 3배수체를 포함하는 36개 이상을 배수체로 간주하였다. 또한 핵내 배가 (endoreduplication)를 나타내는 것은 배수체로 분류되나 다수 관찰되는 경우는 그 점을 명시해 두었다.

(다) 시험결과의 판정

시험군과 음성대조군과의 비교는 0.01 유의수준에서 Chi-square test 및 Fisher's exact test를 실시하며 유의성이 있는 경우 Cochran-Armitage trend test를 염색체 이상의 발생 빈도에 대한 용량의존성을 확인한다. 시험의 판정은 본 센터의 SOP에 의거하여 시험에 이

용되는 CHO-K1 세포의 염색체이상 발생빈도는 기본적 수준(background level)에 따라 다음과 같이 판정한다. 단, 염색체 구조적 이상에 있어서 gap은 빈도만 기록하고 판정에 있어서는 포함하지 않는다.

- ① 유의수준 $p = 0.01$ 에서 용량-반응 관계(Dose-response relationship)를 보이며 유의하게 염색체 이상을 가진 세포가 증가하는 경우 양성으로 판정한다. (단, 용량-반응 관계는 historical control data에서 음성대조군의 평균 염색체이상 출현율 보다 높은 경우로 제한한다.)
- ② 유의수준 $p = 0.01$ 에서 하나 이상의 용량단계의 양성반응을 보일 경우 재시험을 통해 재현성이 확인될 경우에는 양성으로 판정한다.
- ③ 용매대조군에서 염색체이상출현율이 historical control data와 비교하여 이상적으로 높은 경우에는 재시험을 실시한다.
- ④ 본시험만으로 평가가 불가능한 경우는 재시험을 실시한다.

(라) 통계처리

통계프로그램은 SPSS 19.0k를 이용하였고 시험군과 음성대조군과의 비교는 0.01의 유의수준에서 Chi-square test 및 Fisher's exact test를 실시하였다. 유의성이 있는 경우 Cochran-Armitage trend test를 통해 염색체 이상의 발생 빈도에 대한 용량의존성을 확인하였다.

사. 시험의 결과

(1) 세포증식억제의 농도결정시험

본시험의 투여농도를 결정하기 위해 세포증식억제시험을 실시하여 시험물질의 농도별 세포수를 관찰하였다. 최고농도를 5 mg/ml로 하여 대사활성계 적용 6시간 처리군의 경우에는 투여농도 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5 와 5 mg/ml에서 음성대조군 대비 0%, 2%, 6%, 4%, 12%, 22% 그리고 20%의 증식억제율이 확인되었으며, 대사활성계 비적용 6시간 처리군은 4%, 9%, 9%, 9%, 4% 0% 그리고 4%의 증식억제율이 확인되었다. 대사활성계 비적용 24시간 처리군 역시 같은 농도단계에서 5%, 0%, 5%, 5%, 14%, 19% 그리고 19%의 증식억제율이 확인되었다. 따라서 대사활성계 적용 6시간 처리군, 대사활성계 비적용 6시간 처리군 및 대사활성계 비적용 24시간 처리군 모든 농도에서 세포증식억제가 나타나지 않아 5 mg/ml을 최고농도로 하여 1.25, 0.08 mg/ml 등 3 단계 투여농도를 본시험에 적용하였다.

(2) 본시험

(가) 세포증식억제시험

대사활성계 적용 6시간 처리군은 5, 1.25 및 0.08 mg/ml의 농도에서 9%, 8% 그리고 4%의 증식억제율이 확인되었다. 대사활성계 비적용 6시간 처리군은 같은 농도에서 14%, 12%

그리고 4%의 증식억제율이 확인되었다. 대사활성계 비적용 24시간 처리군역시 같은 농도에서 7%, 4% 그리고 0%의 증식율이 확인되었다.

(나) 대사활성계 적용 6시간 처리군

염색체수적이상인 배수체의 발생빈도는 0.08, 1.25 및 5 mg/ml 농도에서 각각 $2.0 \pm 0.00\%$, $1.0 \pm 0.00\%$ 와 $1.0 \pm 1.41\%$ 이었으며 음성대조군은 $1.5 \pm 0.71\%$ 였으나, 시험물질 투여군과 음성대조군의 염색체이상 발생빈도 비교에서 유의한 차이가 확인되지 않았다 ($p > 0.01$). 염색체구조적이상 발생빈도는 gap을 포함하여 0.08, 1.25 및 5 mg/ml 농도에서 각각 $1.0 \pm 0.00\%$, $1.5 \pm 0.71\%$ 와 $2.0 \pm 4.41\%$ 이었으며 음성대조군은 $2.0 \pm 0.00\%$ 이었다. 염색체이상의 유무에 대한 판정 기준이 되는 gap을 포함하지 않은 염색체이상 발생빈도는 각각 $0.0 \pm 0.00\%$, $1.0 \pm 0.00\%$ 와 $0.5 \pm 0.71\%$ 이었으며 음성대조군은 $1.0 \pm 0.00\%$ 이었다. 시험물질 투여군과 음성대조군의 염색체이상 발생빈도 비교에서 유의한 차이가 확인되지 않았다 ($p > 0.01$).

(다) 대사활성계 비적용 6시간 처리군

염색체수적이상인 배수체는 음성대조군을 포함하여 모든 농도에서 관찰되지 않았다. 염색체구조적이상 발생빈도는 gap을 포함하여 0.08, 1.25 및 5 mg/ml 농도에서 각각 $3.0 \pm 1.41\%$, $1.5 \pm 0.71\%$ 와 $1.5 \pm 0.71\%$ 이었으며 음성대조군은 $2.0 \pm 1.41\%$ 이었다. 염색체이상의 유무에 대한 판정 기준이 되는 gap을 포함하지 않은 염색체이상 발생빈도는 각각 $1.5 \pm 0.71\%$, $0.0 \pm 0.00\%$ 와 $0.0 \pm 0.00\%$ 이었으며 음성대조군은 $0.5 \pm 0.71\%$ 이었다. 시험물질 투여군과 음성대조군의 염색체이상 발생빈도 비교에서 유의한 차이가 확인되지 않았다 ($p > 0.01$).

(라) 대사활성계 비적용 24시간 처리군

염색체수적이상인 배수체의 발생빈도는 5 mg/ml 농도에서 $0.5 \pm 0.71\%$ 였으나, 시험물질 투여군과 음성대조군의 염색체이상 발생빈도 비교에서 유의한 차이가 확인되지 않았다 ($p > 0.01$). 염색체구조적이상 발생빈도는 gap을 포함하여 0.08, 1.25 및 5 mg/ml 농도에서 각각 $2.5 \pm 0.71\%$, $1.5 \pm 0.71\%$ 와 $3.0 \pm 1.41\%$ 이었으며 음성대조군은 $1.5 \pm 0.71\%$ 이었다. 염색체이상의 유무에 대한 판정 기준이 되는 gap을 포함하지 않은 염색체이상 발생빈도는 각각 $0.5 \pm 0.71\%$, $0.5 \pm 0.71\%$ 와 $1.5 \pm 0.71\%$ 이었으며 음성대조군은 $0.5 \pm 0.71\%$ 이었다. 시험물질 투여군과 음성대조군의 염색체이상 발생빈도 비교에서 유의한 차이가 확인되지 않았다 ($p > 0.01$).

(마) 양성대조물질에 의한 염색체이상 빈도

양성대조물질인 Cyclophosphamide 15 $\mu\text{g/ml}$, Mitomycin C 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 및 Mitomycin C

0.15 µg/ml 및을 처리한 결과, gap을 포함하지 않은 염색체이상 발생빈도는 각각 $25.0 \pm 2.83\%$, $30.0 \pm 1.41\%$ 그리고 $24.5 \pm 0.71\%$ 으로 음성대조군과의 비교에서 높은 유의성이 확인되었다 ($p < 0.01$).

아. 결론 및 고찰

시험물질인 우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid에 대한 발암성 유발의 유·무 판단을 위한 기초자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험을 실시하였다. CHO-K1 세포를 이용하여 실시한 직접법 및 대사활성법 등을 통해 염색체 수적 및 구조적 이상에 있어서 발생빈도 및 용량의존성을 분석하여 시험물질의 염색체이상 유발 유무를 확인하였다.

본시험의 투여농도를 결정하기 위해 실시된 용량결정시험을 통해 시험물질에 의한 세포 증식억제율을 확인하였다. OECD guideline에 따라 50% 이상의 세포증식억제를 보이는 시험물질의 농도를 최고농도로 설정하며 대사활성계 적용 6시간 처리군, 대사활성계 비적용 6시간 처리군 및 대사활성계 비적용 24시간 처리군의 최고농도인 5 mg/ml을 포함한 모든 농도에서 세포증식억제가 나타나지 않았다. 따라서 대사활성계 적용 6시간 처리군, 대사활성계 비적용 6시간 처리군 및 대사활성계 비적용 24시간 처리군 모두 5 mg/ml을 최고농도로 하여 1.25, 0.08 mg/ml 등 3 단계 투여농도를 본시험에 적용하였다.

대사활성계 적용 6시간 처리군의 경우 투여된 3 단계 농도에서 염색체의 수적 및 구조적 이상 빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다($p > 0.01$). 대사활성계 비적용 6시간 처리군 경우에서도 투여된 3 단계 농도에서 염색체의 수적 및 구조적 이상 빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다($p > 0.01$). 또한 대사활성계 비적용 24시간 처리군 경우에서도 투여된 3 단계 농도에서 염색체의 수적 및 구조적 이상 빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다($p > 0.01$).

따라서 시험물질인 우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid는 본 시험조건에서 수적 및 구조적 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 추정된다. 양성대조물질에 의한 염색체이상 발생빈도가 모든 처리군에서 음성대조군과의 비교하여 유의성($p < 0.01$)이 확인되었기에 본 시험의 조건과 결론은 적절한 것으로 사료된다.

자. 시험의 신뢰성에 영향을 줄 수 있는 사항

본 시험은 시험의 신뢰성에 영향을 줄만한 시험계획서로부터의 이탈사항은 없었다.

6. 개발 G-NANA의 동물안전성(설치류) 평가

(Sialic acid의 랫드를 이용한 90일 반복경구투여 독성시험)

가. 요약

본 시험은 Sialic acid의 반복투여에 따른 독성을 평가하기 위하여 6주령 Sprague-Dawley계

랫드에 시험물질을 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg의 용량으로 군당 암수 각 10 마리에 13주간 경구투여하였다. 독성지표를 위해 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안검사, 요검사, 전해질, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검시 장기의 중량측정, 육안적 검사 및 조직병리학적 검사 등이 수행되었다. 시험물질에 대한 영향 및 이에 대한 판단은 본 시험의 판단기준에 따라 다음과 같이 확인되었다.

- 투여기간 중 사망동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상관찰 소견에서도 시험물질에 영향으로 보이는 특이증상은 없었다.
- 관찰기간동안 체중변화(body weight changes), 증체량(weight gains) 및 사료섭취량에서 암컷 고용량군의 증체량(weight gains) 및 사료섭취량이 감소하였지만 시험물질의 독성보다는 과용량의 투여로 인한 사료섭취량의 감소로 판단된다.
- 요검사 결과, 수컷에서 SG 및 PRO 중증도가 저, 중, 고용량군 및 저용량군에서 증가되었지만 비시험물질-유래 변화로 판단되며, 암컷에서는 PRO 및 LEU 중증도가 증가되었지만 비시험물질-유래 변화로 판단되었다.
- 혈액생화학적 검사결과, 수컷의 ALB 및 AST 수치가 중용량군에서 감소하였고, 암컷은 ALB 및 BIL 수치가 고용량군에서 감소하였다. 이는 용량의존성이 없고 감소폭이 미약하여 조직병리 검사를 동반하지 않으면 비시험물질-유래 변화로 판단된다. 전해질 검사결과, 고용량군에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만 감소폭이 적고 관련 지표가 동반되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단되었다.
- 혈액학적 검사결과, 수컷 RBC 수치가 저용량군에서 감소하였고, 암컷 HDW가 중용량군에서 증가하였지만 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단되었다.
- 장기중량 측정결과, 수컷의 우측 고환의 무게가 저용량군에서 증가하였지만 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단하였고, 신장무게가 고용량군에서 증가하였지만 조직병리 검사결과와 같이 비교하여 판단하고자 한다.

나. 시험물질 및 부형제

(1) 시험물질

- (가) 명칭 : Sialic acid
- (나) 기 원 : 우류(유청내 GMP)
- (다) Lot번호 : 130103-1
- (라) 순 도 : 6.4 %
- (마) 분자량 : 309.28
- (바) 입수량 : 8088.42 g
- (사) 입수일 : 2013.01.07
- (아) 외관 및 성상 : 연노랑색 분말

- (자) 보관조건 : 냉장보관
- (차) 제공자 : ㈜생명의 나무 김희경

(2) 부형제

- (가) 명칭 : 멸균증류수
- (나) 제조(로트)번호 : KAI2013
- (다) 입수일 : 2012. 3. 26
- (라) 보관조건 : 실온
- (마) 제조원 : (주)중외제약
- (바) 선정이유 : 독성이 없고, 시험물질이 잘 현탁됨

다. 재료 및 방법

(1) 시험계

- (가) 종 및 계통: 특정병원균 부재(SPF) Sprague Dawley®TM 랫드
- (나) 생산자 및 공급처 : (주) 대한바이오링크
- (다) 시험계의 선택이유

본 시험에 사용하는 랫드는 크기가 작고, 다루기가 쉬우며, 계절변동이 적은 장점이 있는 동시에 스트레스에 덜 민감하면서 병에 대한 저항력이 강하다. 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 있다.

- (라) 입수시 성별, 주령, 동물수 및 체중범위

수컷 5주령, 48마리 116.3~140.6 g

암컷 5주령, 48마리 110.1~125.4 g

- (마) 투여개시시 성별, 주령, 동물수 및 체중범위

수컷 6주령, 40마리 186.7~213.4 g

암컷 6주령, 40마리 150.5~171.8 g

- (바) 검역 및 순화

동물 입수시 입수동물에 대한 검수 및 검역을 실시하였으며, 동물의 순화는 입수 후 7일간 해당 동물실내에서 실시하였다. 동물공급업체에서 제공한 시험계의 병원체검사 성적서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄 요인은 없었다. 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 투여전일 및 투여일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

(2) 사육환경

- (가) 동물실 번호 : GLP센터 SPF실험동물실내 사육실 3
- (나) 온습도 범위 : 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 50 ± 20 %
- (다) 명 암 cycle : 형광등조명 12 hr (08:00 점등~20:00 소등)
- (라) 조 도 : 150~300 Lux
- (마) 환 기 횟 수 : 10~20 회/시간
- (바) 소 음 : 60 dB 이하
- (사) 암모니아농도 : 20 ppm 이하
- (아) 사육상자의 종류(크기) : 순화, 투여 및 관찰기간 중 Polysulfone 사육상자 (260 W × 420 L × 150 H mm)에 수용하였다.
- (자) 사육상자 당 동물수 : 검역 · 순화기간 2~3마리 / 관찰기간 2마리
- (차) 사육기자재 교환
 - 사육상자 및 급수병은 주 1회 교환하였으며, 모든 사육기자재는 고압증기멸균기(121°C 20 min)로 멸균하여 사용하였다.

(3) 사료

- (가) 종 류 : 실험동물용 고품사료
- (나) 공급원 : Zeigler Bros., Inc. (USA)
- (다) 급여법 : 방사선 멸균사료를 급이기에 넣어 자유섭취 시켰다.
- (라) 사료의 분석 및 확인
 - 사료의 분석은 Zeigler Bros., Inc.에서 제공하는 성적서(첨부자료 4)를 확인하여 사용하였으며, GLP센터의 사료 및 물의 관리에 관한 SOP에 따라서 실시하였다.

(4) 물

- (가) 종 류 : 음용 수도수
- (나) 급수방법
 - 본 센터의 수도물을 자외선 유수살균기로 여과 후 사용하였다. 동물에게 공급은 급수병을 통해 자유섭취 시켰다.
- (다) 오염물질의 분석
 - GLP센터의 사료 및 물 중의 오염물질 검사에 관한 SOP에 따라서 경상북도보건환경연구원에서 검사한 자료를 참조하였다.

(5) 시험군 구성 및 투여량 설정

- (가) 시험군의 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량 (mL/kg/day)	투여용량 (mg/kg/day)
대조군(G1) ^{a)}	M / F	10 / 10	1101~1110 / 2101~2110	10	0
저용량군(G2)	M / F	10 / 10	1201~1210 / 2201~2210	10	1,250
중용량군(G3)	M / F	10 / 10	1301~1310 / 2301~2310	10	2,500
고용량군(G4)	M / F	10 / 10	1401~1410 / 2401~2410	10	5,000

a) G1: Vehicle control

(2) 투여량 설정

본 시험물질은 암환자의 기능성식품으로 개발·등록하고자 개발되었으며, 본 센터에서 실시한 28일 용량설정(DRF)시험결과(13-NREO-001), 암수 모두에서 NOEL(최대무영향용량)이 5,000 mg/kg/day으로 추정되었다. 일반적으로 13주 반복경구투여독성시험에서의 용량설정은 NOEL(최대무영향용량), NOAEL(최대무독성용량), LOAEL(최소독성용량)이 나타나 것이 바람직하나 본 시험물질로 이러한 독성단계를 나타내기 위해서는 5,000 mg/kg/day이상의 용량설정이 필요하다. 그러나 이미 반복투여독성시험의 한계용량인 1,000mg/kg/day를 5배 초과한 농도로 용량설정시험을 하였고 이보다 높은 용량은 과용량에 의한 물리적 및 생리적 부작용이 우려되어 다소 무리가 있다. 따라서 본시험은 28일 용량설정시험과 동일하게 5,000 mg/kg/day를 최고농도로하여 공비2를 두어 2,500, 1,250 mg/kg/day로 투여량을 설정한다.

(3) 군분리

입수한 모든 동물 중 군분리일에 측정된 평균체중에 가장 가까운 암수 각 40마리를 선택하였다. 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 4군, 군당 10마리로 군분리 하였다.

(4) 개체식별

개체식별은 꼬리마킹법을 사용하였다. 사육상자에는 용량별로 다른 색상의 개체식별카드를 부착하였으며, 사육상자대에는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 시험번호, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험담당자명, 비상연락처 등을 기재한 'SPF실험동물실 사용기록지'를 부착하였다.

(5) 잔여동물 처리

잔여동물은 군분리 후 안락사 시켰다.

(6) 시험물질의 조제

본 시험물질의 조제는 순도 및 비중에 대한 보정없이 시험물질을 중량 그대로 측정하여 조제하였다. 고용량군은 부형제(멸균증류수)를 이용하여 5,000mg/10ml(50%)로 조제하고 중용량군 및 저용량군은 동일한 부형제로 각각 2,500mg/10ml(25%), 1,250mg/10ml(12.5%) 방법으로 조제하였다. 시험물질 조제는 시험물질 정보에 따라 1주일에 1회 조제하며, 조제 후 반드시 냉장보관하고 사용시 침전물이 없도록 충분히 섞어 사용하였다.

(7) 투여

(가) 투여경로 및 선택이유

사람에 대한 임상 예정 경로로서 경구투여를 선택하였다.

(나) 투여부위 및 투여법

경구투여용 존대를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여하였다.

(다) 투여액량

최근 체중측정일의 체중을 기준으로 투여액량을 10 ml/kg으로 산출하였다.

(라) 투여횟수 및 기간

1 회/일, 7 일/주, 13 주간 투여하였으며, 투여는 오전 11:00 이전에 완료하였다.

(8) 관찰 및 검사항목

(가) 일반증상관찰

모든 동물에 대해서 1 일 1 회 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 관찰하였으며, 1 일 2 회 사망 및 빈사동물을 관찰하였다. 관찰은 투여 0일부터 90일까지 13주간 실시하였다.

(나) 체중측정

모든 동물의 체중을 투여개시일에 측정하고, 이후에는 주 1 회, 부검전일 및 부검일에 측정하였다. 부검일 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하고 부검전일 체중을 평가하였다.

(다) 사료섭취량 산정

투여개시 전의 사료섭취량은 군분리일 부터 투여개시일까지 1 일간의 섭취량을 측정하였다. 투여기간에는 7 일간의 섭취량을 측정하여 1 일의 평균섭취량을 산출하였다. 투여 13 주째에는 6 일간의 섭취량을 측정하여 1 일의 평균섭취량을 산출하였다.

(라) 안검사

동물 도입 시 모든 동물에 대하여 육안으로 눈의 외관을 관찰하였다. 투여 마지막 주에는 모든 동물을 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후, 각 군당 5마리에 대해서는 안구에 산동제(Ocrotropic ophthalmic drops, 로트번호: 021838, Samil pharma. Co., Ltd.)를 점적하여 안저사진기(Genesis, Gowa Co. Ltd., Japan)로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰하였다.

(마) 요검사

각 군당 5마리에 대하여 투여 13주에 요검사를 실시하였다. 동물을 대사 케이지에 수용하여 3~4 시간동안 채뇨한 신선뇨 중 약 1 ml의 취하여 다음 항목을 검사하였으며, 24 시간동안 계속 채집한 요로 요총량을 측정하였다.

① 일반검사

약 0.3ml의 요를 요검사용 시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, USA)에 묻힌 후, 요자동분석기(CliniTek Advantus™, SIEMENS, USA)를 이용하여 다음 항목을 측정하였다.

항 목	단 위
GLU(glucose)	g/dL
BIL(bilirubin)	mg/dL
KET(ketone body)	mg/dL
LEU(leukocyte)	Leu/ul
OB(occult blood)	Ery/ul
PRO(protein)	mg/dL
URO(urobilinogen)	umol/L
NIT(nitrite)	-
SG(specific gravity)	-
pH	-
Color	-

② 요침사 검사

일반검사 후 남은 요를 1,500 rpm 으로 5 분간 원심분리(MF80, Hanil, Korea)한 후, 그 침전물을 S.M (Sternheimer-Malbin)법으로 염색하여 RBC(red blood cell), WBC(white blood cell), Epithelial cell 및 Casts를 관찰하였다.

(바) 부검 및 채혈

부검 전날 절식(17 시간)한 계획부검 동물에 대하여 부검 당일에 Isoflurane 으로 흡입 마취하여 복대동맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 이 후 복대동맥 및 복대정맥을 절단하여 방혈/치사시킨 다음, 모든 장기에 대해 부검소견을 관찰한 후 기록지에 기록하였다.

(사) 혈액학적 검사

부검시 채혈한 혈액일부를 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle (Vacutainer 3 ml, SEKISUI, JAPAN)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)로 다음 항목을 측정하였다.

① 일반혈액학적 검사

항 목	단 위	측 정 방 법
㉑ WBC (White blood cell count)	10 ³ /μL	Flowcytometry
㉒ RBC (Red blood cell count)	10 ⁶ /μL	Flowcytometry, Isovolumetry
㉓ HGB (Hemoglobin conc.)	g/dL	Modified CN met-Hb method
㉔ HCT (Hematocrit)	%	(RBC×MCV)÷10
㉕ MCV (Mean corpuscular volume)	fL	Histogram
㉖ MCH (Mean corpuscular hemoglobin)	pg	(HGB÷RBC)×10
㉗ MCHC (Mean corpuscular Hb conc.)	g/dL	[HGB÷(RBC×MCV)]×1000
㉘ RDW (Red cell distribution width)	%	Histogram
㉙ HDW (Hb conc. distribution width)	g/dL	Histogram
㉚ PLT (Platelet)	10 ³ /μL	Flowcytometry
㉛ MPV (Mean platelet volume)	fL	Histogram
㉜ RET (Reticulocyte)	%	Flowcytometry, Isovolumetry

② 백혈구감별계수

항 목	단위	측 정 방 법
㉑ NEU (Neutrophil)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
NEU (Neutrophil)	10 ³ /μL	Flowcytometry, Peroxidase staining
㉒ LYM (Lymphocyte)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
LYM (Lymphocyte)	10 ³ /μL	Flowcytometry, Peroxidase staining
㉓ MONO(Monocyte)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
㉔ EOS (Eosinophil)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
㉕ BASO(Basophil)	%	Flowcytometry, Peroxidase staining
㉖ LUC (Large unstained cells)	%	Noise-Lymph Histogram

(아) 혈액생화학적 검사

혈액 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube(SEKISUI, JAPAN) Germany)에 주입하고 15~20 분간 상온에 방치하여 응고시켰다. 이 후, 3,000 rpm 으로 10 분간 원심분리(MF80, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(KONELAB 20XT, Thermo, USA)를 사용하여 아래 항목을 측정하였다. 전해질은 전해질 분석기(744 Na⁺/K⁺/Cl⁻ Analyzer, SIEMENS, USA)로 측정하였다.

항 목	단 위	방 법
Ⓐ AST (Aspartate aminotransferase)	U/L	IFCC법
Ⓑ ALT (Alanine aminotransferase)	U/L	IFCC법
Ⓒ ALP (Alkaline phosphatase)	U/L	P-NPP법
Ⓓ BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dL	Urease-UV법
Ⓔ CRE (Creatinine)	mg/dL	Jaffe법
Ⓕ GLU (Glucose)	mg/dL	UV법
Ⓖ CHO (Total cholesterol)	mg/dL	Enzyme법
Ⓗ PRO (Total protein)	g/dL	Biuret법
Ⓙ CPK (Creatine phosphokinase)	U/L	UV-Rate 법
Ⓚ ALB (Albumin)	g/dL	BCG 법
Ⓛ BIL (Total bilirubin)	mg/dL	Evelyn-Malloy법
① TG (Triglyceride)	mg/dL	Enzyme법
Ⓜ IP (Inorganic phosphorus)	mg/dL	Enzyme법
Ⓝ A/G ratio (Albumin/Globulin ratio)	ratio	PRO, ALB로 산출
Ⓞ Ca ²⁺ (Calciumion)	mg/dL	ArsenazoIII
Ⓟ Na ⁺ (Sodiumion)	mmol/L	전극법
Ⓠ K ⁺ (Potassiumion)	mmol/L	전극법
Ⓡ Cl ⁻ (Chlorideion)	mmol/L	전극법

Ⓐ-Ⓞ: 혈액생화학분석기를 이용하여 측정.

Ⓟ-Ⓡ : 전해질자동분석기로 측정.

(자) 혈액응고시간 검사

부검시 채혈한 혈액 중 1.8 ml을 3.2 % sodium citrate 0.2 ml이 들어있는 Microtube(SEKISUI, JAPAN)에 주입한 후, 3,000 rpm 으로 10 분간 원심분리(MF80, Hanil, Korea)하여 얻은 혈장으로 PT(prothrombin time), APTT (activated partial thromboplastin time)를 측정하였다. 혈액응고시간검사기(ACL 7000 Instrumentation Laboratory, USA.)를 사용하여 Nephelometric Analysis 방법으로 초(sec) 단위로 측정하였다.

(차) 장기중량 측정

부검시 다음의 장기를 적출한 후 전자저울을 이용하여 중량을 측정하였다. 양측성 장기는 양측 장기를 각각 측정하였다. 중량측정 장기에 대하여는 부검시 체중에 대한 상대중량을 산출하였다.

중량측정장기명

난소(ovary), 부신(adrenal gland), 뇌하수체(pituitary), 가슴샘(thymus), 전립샘(prostate), 고환(testis), 부고환(epididymis), 비장(spleen), 신장(kidney), 심장(heart), 폐(lung), 뇌(brain) 및 간(liver)

(카) 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기를 적출하여 10 % 중성완충포르말린용액에 고정하였으며 안구는 Davidson 용액에, 고환과 부고환은 Bouin 용액에 고정하였다.

고정장기명

고환, 부고환, 정낭, 전립샘, 난소, 자궁, 질, 방광, 비장, 위, 췌장, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 장간막림프절, 부신, 신장, 간, 대퇴골, 턱밑림프절, 침샘, 흉골, 가슴샘, 심장, 폐, 대동맥, 흉척수, 혀, 기관, 식도, 갑상샘, 안구, 하더샘, 뇌, 뇌하수체, 피부(젖샘)

고정한 장기·조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하였다. 이후 박절하여 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 잔여 장기·조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존하였다. 조직병리학적 검사는 대조군과 고용량군의 모든 고정 장기·조직에 대하여 검경하였다.

(9) 통계학적 방법

대조군과 투여군 간의 평균비교에는 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하였으며, 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 14.0을 이용하였다.

(가) 연속적인 자료의 분석

체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량에 대하여 one-way ANOVA test로 평균치에 대한 유의성 검정하였다. 유의성이 있으면 Levene test로 등분산성을 검정하여 등분산일 경우에는 Duncan multiple range test, 이분산일 경우에는 Dunnett's T-test를 이용하였다.

(나) 불연속인 자료의 분석

요검사 결과에 대해 아래 표와 같이 척도변환을 통해 중증도(severity)로 나타내어 통계 분석이 이루어졌다.

Kruskal-Wallis' H-test를 실시한 후, 유의성이 있으면 Mann-Whitney U-test를 적용하여 대조군과의 유의성을 확인하였다. 요색조는 Fisher's exact test를 적용하였다.

Severity	0	1	2	3	4	5
GLU	-	+/-	1+	2+	3+	4+
BIL	-	+/-	1+	2+	3+	
KET	-	+/-	1+	2+	3+	4+
SG (Specific gravity)	1.005	1.010	1.015	1.020	1.025	1.030
PRO	-	+/-	1+	2+	3+	4+
pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	>=9.0
URO (EU/dL)	0.2	1	2	4	>=8	
NIT	-	+				
OB (µmol/L)	-	+/-	1+	2+	3+	
LEU	-	+/-	1+	2+	3+	
RBC	0	+/-	1+	2+	3+	
WBC	0	+/-	1+	2+	3+	
Epithelial cell	0	+/-	1+	2+	3+	
Cast	0	+/-	1+	2+	3+	

라. 독성판정기준

(1) NOEL, NOAEL 그리고 LOAEL의 정의

본 시험의 목적은 시험물질 독성지표를 나타내는 NOEL, NOAEL, LOAEL을 얻는 것이며, 정의는 다음과 같다.

독성지표	정 의
NOEL (No Observed Effect Level)	시험물질에 의한 독성학적 및 약리학적 변화를 유발하지 않는 최대무영향용량
NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)	시험물질에 의한 Adverse effect를 유발하지 않거나 명확한 질환과 연계되지 않는 Non-adverse effect를 유발하는 최대무독성용량
LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level)	시험물질에 의해 Adverse effect를 유발하는 최소독성용량

(2) Adverse effect와 Non-adverse effect 판정기준

(가) NOEL, NOAEL, LOAEL을 구분하는 핵심적인 판정기준은 시험물질에 의한 Adverse effect와 Non-adverse effect이다. 판정기준은 다음과 같이 규정한다.

판정기준	정 의
Adverse effect	<ul style="list-style-type: none"> - 독성(toxicity)과 동일한 의미이다. - 시험물질에 의해 생화학적·형태학적·생리학적 변화를 유발하는 생물학적 영향을 포함하며, 임상병리학적 또는 조직병리학적 지표를 통해 확인된다. - 표적기관독성을 유발할 수 있는 잠재적 변화를 포함한다.
Non-adverse effect	<ul style="list-style-type: none"> - 가역성이 추정되며 경미한 변화를 의미한다. - 임상병리학적 지표의 종합적인 판단을 통해 시험에서 투여된 최고용량보다 더 높은 용량의 노출에서 Adverse effect 유발이 예상되는 변화를 포함한다. - 시험물질에 의한 약리학적 변화를 포함한다.

(나) 시험물질에 의한 finding(결과물)을 Adverse effect와 Non-adverse effect로 판정하여 독성지표를 얻기에는 포괄적이며 또한 추상적인 측면이 있다. 따라서 생물학적 및 통계적 유의성, historical data와 용량의존성 강도의 기준을 바탕으로 시험의 결과를 구분할수 있는 분류체계가 필요하다.

(다) 분류체계는 위의 기준에 따라 시험을 통해 얻은 finding(결과물)을 Weight-based Classification(결과-경중에 따른 분류)에 적용한다.

(3) Weight-based Classification 분류

Weight-based Classification은 참고문헌(Park et al., Lewis et al., Ness. D.)을 참고하여 시험물질-유래 중요한 변화(Important compound-related changes), 시험물질-유래 경미한 변화(Minor compound-related changes) 및 비시험물질-유래 변화(Noncompound-related changes)로 아래와 같이 분류한다.

변화의 종류	분류의 기준
시험물질-유래 중요한 변화	- 모든 투여용량에서 용량-의존성을 가진 통계적 및 생물학적 유의성 있는 임상병리적 및 조직병리적변화 - 용량-의존성이 없지만 대조군에서 발생하지 않고 통계적 유의성을 가진 조 직병리학적 변화
시험물질-유래 경미한 변화	- 일부 용량에서 경미한 용량의존성 또는 용량-의존성이 없는 특정 투여용량 에서의 임상병리학적 변화 - 시험물질의 약리작용으로 고려되는 통계적, 생물학적 유의성을 지닌 용량의 존성 또는 용량비의존성변화
비시험물질-유래 변화	- Historical data 벗어나는 대조군의 결과와의 비교를 통해 얻은 통계적 유 의성을 가진 변화 - 실험과정에서 실수로 발생하는 변화와 자연발생적 변화(spurious changes)를 포함

Historical data : 시험을 통해 얻어진 대조군의 범위(Mean±SD).

생물학적 유의성 : 시험계의 정상범위(Historical data)를 벗어나는 대조군과 시험군간의 통계적 유의성.

(4) 독성지표의 판정

(가) 시험의 목적인 독성지표를 판정하기 위해 finding(결과물)은 아래와 같이 적용한다.

Weight-based Classification의 분류	독성판정기준	독성지표
시험물질-유래 중요한 변화	Adverse effect	LOAEL
시험물질-유래 경미한 변화	Non-adverse effect	NOAEL
비시험물질-유래 변화	No effect	NOEL

(나) NOEL, NOAEL 그리고 LOAEL 설정에 있어서 고려 사항

- ① 모든 투여군에서 시험물질-유래 중요한 변화가 없이 시험물질-유래 경미한 변화가 확
인될 경우에는 최고 투여용량을 NOAEL로 설정한다.
- ② 독성시험의 최종보고서에서 NOEL, NOAEL과 LOAEL 중 어떤 결론을 내려도 상관없
다. 그러나 NOEL을 설정할 경우, 임상시험에서 저용량 설정에 기인하여 약리적 유효용
량이 NOEL 범위를 상회할 우려가 있으며, LOAEL을 설정할 경우에는 높은 용량 설정
으로 인하여 독성이 나타날 가능성이 있다. 따라서 반복투여독성시험에서 NOAEL을 설
정하는 것이 바람직하다.

마. 결 과 (Result)

(1) 일반증상 및 사망동물

실험기간 중 대조군을 포함한 모든 시험군에서 사망동물은 없었으며, 투여 기간 중 일반
증상 관찰 결과 이상 소견은 없었다.

(2) 체중

암컷 증체량(weight gains)이 고용량군에서 감소하였지만 시험물질의 독성보다는 과용량의 투여로 인한 것으로 비시험물질-유래 변화로 판단되었다.

(3) 사료섭취량

암컷 사료섭취량이 고용량군에서 감소하였지만 시험물질의 독성보다는 과용량의 투여로 인한 사료섭취량의 감소로 비시험물질-유래 변화로 판단되었다.

(4) 안검사

군분리시 외안검사와 투여 마지막 주에 수행된 안저검사 결과에서 특이한 소견은 관찰되지 않았다.

(5) 요검사

수컷에서 SG 및 PRO 중증도가 저, 중, 고용량군 및 저용량군에서 증가되었지만 비시험물질-유래 변화로 판단되며, 암컷에서는 PRO 및 LEU 중증도가 증가되었지만 비시험물질-유래 변화로 판단되었다.($p < 0.05$)

(6) 혈액학적 검사

수컷 RBC 수치가 저용량군에서 감소하였고, 암컷 HDW가 중용량군에서 증가하였지만 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단되었다.($p < 0.05$)

(7) 혈액생화학적 검사

수컷의 ALB 및 AST 수치가 중용량군에서 감소하였고, 암컷은 ALB 및 BIL 수치가 고용량군에서 감소하였다. 이는 용량의존성이 없고 감소폭이 미약하여 조직병리 검사를 동반하지 않으면 비시험물질-유래 변화로 판단된다.($p < 0.05$)

(8) 혈액응고 검사

혈액응고 검사결과, 수컷 PT수치가 저용량군에서 감소하였지만 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단된다.($p < 0.05$)

(9) 장기중량

장기중량의 측정결과, 수컷의 우측 고환의 무게가 저용량군에서 증가하였지만 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단하였고, 신장무게가 고용량군에서 증가하였지만 조직병리 검사결과와 같이 비교하여 판단하고자 한다.

(10) 부검소견

부검결과에서 수컷에서 가슴샘의 발적(redress), 암컷에서 자궁내 맑은 액체 저류(retention of clear fluid)가 관찰되었다. 수컷 가슴샘의 발적은 대조군과 저용량군에서 각각 1례씩 관찰되었고, 암컷의 경우 고용량군에서 2례 자궁내 맑은 액체 저류(retention of clear fluid) 관찰되었다.

(11) 조직병리학적 검사

- 조직병리학적 검사는 결과의 중증도에 따라 minimal(미약한), slight(약한), moderate(보통), severe(심한) 등의 4단계로 구분하여 나타냈다.
- 암컷 뇌하수체(pituitary gland) 대조군 1례(2106)에서 뇌하수체 원위부(pars distalis) 내 낭포(cyst)가 약하게(slight) 확인되었다. 수컷 고용량군 1례(1410)에서 고환의 위축(atropy)과 변성(degeneration)이 severe 양상으로 확인되었다. 최소한 군당 2례 이상이 확인되어야 시험물질의 영향으로 판단되어 1례의 고환에서 조직병리학적 변화는 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 전립선(prostate) 고용량군 1례(1407)에서 전립선 내 염증세포 침윤(Inflammatory cells infiltration)이 minimal하게 나타났으나 대조군 2례(1108, 1107)에서도 각각 minimal 및 slight로 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 수컷 신장(kidney) 고용량군 2례(1401, 1402)에서 protein cast가 minimal하게 나타나고 4례(1405, 1406, 1409, 1410)에서는 slight로 나타났다. 또한 중용량군에서도 3례(1303, 1305, 1308)가 minimal로 나타나고 1례(1304)에서 slight로 나타나는 것이 확인되었다. 저용량군에서도 2례(1205, 1208)에서 minimal로 나타났다. 그러나 대조군에서도 5례(1102, 1107, 1108, 1109, 1110)에서 minimal로 나타난 것이 확인되었다. 따라서 protein cast가 대조군과 비교해 시험물질 투여군에서 발생빈도 및 중증도가 증가되었지만 대조군에도 발생하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.
- 암컷 신장(kidney)에서 protein cast가 고용량군의 1례(2408)에서 minimal로, 1례(2404)에서 slight로 나타난 것이 확인되었다. 중용량군에서는 2례(2302, 2310)에서 minimal로 나타났으며, 저용량군에서는 2례(2208, 2210)에서 slight로 나타났다. 하지만 대조군에서도 3례(2102, 2104, 2109)가 minimal로 나타나고 1례(2106)에서는 slight로 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 암컷 신장(kidney)에서 mineralization이 암컷 고용량군 1례(2401)에서 minimal로 나타났다. 중용량군의 3례에서 minimal로 나타나고 1례(2306)에서 moderate, 2례(2301, 2305)에서 severe, 저용량군의 6례에서 minimal, 1례에서 slight로 나타났다. 그러나 대조군에서도 1례가 minimal로 나타나고 용량비의존성이 확인하여 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 암컷 간장(liver)에서 공포변성(vacuolation)이 고용량군의 1례(2410)에서 minimal 정도의 나타났지만, 암컷 대조군 1례(2110)에서도 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 수컷 대조군 1례(1104)에서 Bile duct hyperplasia가 minimal 정도로 나타나 비시험물질-

유래 변화로 판단하였다.

- 수컷 폐장(lung)에서 골화생(Osseous metaplasia)이 고용량군의 1레(1410)에서 minimal로 나타났지만 특정군에서 1레로 확인되어 자연발생적인 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 심장(heart)을 관찰한 결과, 수컷 고용량군의 1레(1403)에서 심근염(myocarditis)이 minimal 정도로 나타났지만 대조군 2레(1103, 1109)에서도 minima로 확인되어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.
- 수컷 위장(stomach)에서 선위 궤양(ulcer of the glandular stomach)이 대조군 1레(1108)에서 나타났지만 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

바. 결론(결과요약과 독성판정:Result summary and Toxicity evaluation)

(1) 결과 요약

(가) 수컷의 시험물질-유래 변화

결과의 경중-따른 분류	측정지표	투여용량(mg/kg/day)
시험물질-유래 중요한 변화	없음	
시험물질-유래 경미한 변화	요(SG)	1250, 2500, 5000
	장기절대중량(양쪽 신장)	5000
	장기상대중량(양쪽 신장)	5000
	조직병리 (신장:Protein casts)	0(5/10), 5000(6/10)
비시험물질-유래 변화	요(PRO)	1250
	혈액학(RBC)	1250
	생화학(ALB)	1250
	생화학(AST)	2500
	혈액응고(PT)	1250
	장기절대중량(고환)	1250
	장기상대중량(좌측 부고환)	2500
	부검소견(가슴샘 발적)	0, 1250
	부검소견(우측고환 왜소)	5000
	조직병리(고환)	5000
	조직병리(전립선)	0, 5000
	조직병리(간장:Bile duct hyperplasia)	0(1/10)
	조직병리(폐장:Osseous metaplasia)	5000(1/10)
	조직병리(심장:myocarditis)	0(2/10), 5000(1/10)
조직병리(위장:ulcer of the glandular stomach)	0(1/10)	

(나) 암컷의 시험물질-유래 변화

결과의 경중-따른 분류	측정지표	투여용량(mg/kg/day)
시험물질-유래 중요한 변화	없음	
시험물질-유래 경미한 변화	장기상대중량(양측신장)	5000
	체중	5000
	사료섭취량	5000
비시험물질-유래 변화	요(PRO, LEU)	5000
	혈액학(HDW)	2500
	생화학(ALB)	5000
	부검소견(우측부신 왜소)	5000
	부검소견(자궁)	5000
	조직병리 (신장:protein casts)	0(4/10), 1250(2/10), 2500(2/10), 5000(2/10)
	조직병리 (신장:mineralization)	0(1/10), 1250(7/10), 2500(6/10), 5000(1/10)
	조직병리 (간장:vacuolation)	0(1/10), 5000(1/10)

(2) 독성판정

- 수컷에서 시험물질-유래 중요한 변화없이 시험물질-유래 경미한 변화가 1250, 2500, 5000 mg/kg/day에서 확인되었다. 이를 근거로 본 시험의 독성판정 기준에 따라 수컷 랫드에 있어서 Sialic acid의 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대무독성용량)은 5000 mg/kg/day로 판단되었다.
- 암컷에서 시험물질-유래 중요한 변화가 없었으며 시험물질-유래 경미한 변화가 5000 mg/kg/day으로 확인되었다. 이를 근거로 성판정 기준에 따라 암컷 랫드에 있어서 Sialic acid의 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대무독성용량)은 5000 mg/kg/day로 판단되었다.

따라서 랫드의 암수 모두에 대한 Sialic acid의 NOAEL은 5000 mg/kg/day로 추정된다.

사. 고찰

본 시험은 Sialic acid를 Sprague-Dawley 랫드에 90일 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성 정도를 알아보기 위해 수행되었다. 용량설정은 용량범위설정(dose-range finding, DRF) 시험(13-NREO-001)을 바탕으로 설정되었다. 결과는 수컷의 경우 NOAEL (최대무독성용량)이

5000 mg/kg/day으로 추정되며, 암컷은 NOEL(최대무영향용량)이 5000 mg/kg/day로 추정되었다. 따라서 본 시험물질의 NOAEL을 얻기 위해서 암수 모두에서 5000 mg/kg/day를 최고용량으로 하여 중간농도로 2500 mg/kg/day와 저농도 1250 mg/kg/day 등의 3단계 농도가 설정되었다. 이러한 용량의 설정은 건강기능식품의 특성상 임상예정용량이 높을 것이라 예상되어 시험물질의 고용량 투여를 통해 시험이 이루어졌다.

시험결과, 시험물질 투여 및 관찰기간(90일)동안 사망동물, 일반증상소견에서 시험물질의 영향으로 보이는 특이소견이 관찰되지 않았다. 암컷 증체량(weight gains) 및 사료섭취량에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 감소가 확인되었다. 그러나 시험물질에 기인하기보다는 과용량(5000 mg/kg/day)의 투여로 인한 스트레스 및 사료섭취량의 감소, 약리적 변화에 기인한 것으로 판단되어 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 체중변화(body weight changes)에서 암컷의 일시적인 체중감소가 산발적으로 나타났다 그러나 1~2주 후 체중이 회복되는 것이 관찰되어 시험물질의 영향은 아닌 것으로 판단되었다. 또한 투여 마지막 주에 암수 모두에서 체중감소가 대조군을 포함하여 시험물질 투여군에서 부분적으로 나타난 것은 요점사 및 안점사로 인한 스트레스에 기인하는 것으로 판단된다.

임상병리적 지표에서 혈액학적 검사결과, 수컷 RBC 수치가 저용량군에서 감소하고, 암컷 HDW 수치가 중용량군에서 증가하였지만 변화폭이 미약하고 정상범위(historical data)내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 혈액생화학적 검사결과, 수컷의 ALB 수치가 대조군과 비교하여 중용량군에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만 용량의존성이 없는 정상범위내의 변화로 판단하여 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷의 ALB 수치가 대조군과 비교하여 고용량군에서 유의하게 감소하였지만 정상범위내의 변화로 확인되어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

부검 후 장기중량 측정결과, 수컷 신장무게(좌, 우)가 절대중량, 상대중량 모두 고용량군에서 유의하게 증가하였다. 그러나 용량의존성이 없고 상대중량의 저용량 및 중용량군에서는 유의성이 없어 시험물질 유래-경미한 변화로 판단하였다. 또한 암컷 신장도 상대중량에서 고용량군에서만 유의성있게 증가하였지만 시험물질 유래-경미한 변화로 판단하였다. 이와 같이 암컷 모두에서 시험물질에 의한 신장의 무게 증가는 고용량에서만 확인되어 시험물질 유래-경미한 변화로 판단되었지만 더 높은 용량을 투여하면 본 시험물질에 의한 독성 표적기관이 될 수 있는 가능성이 있다고 판단된다.

부검소견 결과, 암컷 고용량군(2410)의 우측부신이 기형적으로 작은 것이 관찰되었다. 부신에 대한 독성판단을 위해 병리표본을 제작을 하였으나 우측부신은 크기가 작아 불가능하였으며, 좌측부신은 관찰 결과 이상소견이 없었다. 동일군의 시험계에서 부신에 대한 다른 증상이 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 수컷 고용량군(1410)의 우측고환이 좌측과 비교해 왜소한 것이 관찰되었고 조직병리 검사결과 위축(atropy)과 변성(degeneration)이

심하게(severe) 나타났으나 좌측고환 및 동일군의 시험계에서 다른 증상이 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단되었다.

조직병리 검사결과, 대조군에서 암컷 뇌하수체(pituitary gland), 원위부(pars distalis)와 내낭포(cyst)가 약하게(slight) 확인되었다. 수컷 신장(kidney)에서 Protein casts가 저, 중, 고용량군에서 각각 2레, 4레, 6레씩 미약하게(minimal) 또는 약하게(slight) 관찰되었지만 대조군에서도 미약하게(minimal) 5레가 관찰되었다. 암컷에서도 protein cast가 대조군에서 미약하게(minimal) 3레, 약하게(slight) 1레, 고용량군에서 미약하게(minimal) 및 약하게(slight) 각 1레씩, 중용량군에서는 미약하게(minimal) 2레, 저용량군에서는 약하게(slight) 2레가 확인되었다. 본 시험에서 나타난 신장의 protein cast는 F344 랫드에서는 5개월 정도가 되면 자연발생적으로 나타나는 증상으로 암컷보다는 수컷에서 자연발생적으로 많이 나타난다(Gary A. Boorman *et al.*, 1990). 본 시험에서도 암컷에서는 시험동물 40레 중 10레에서 나타났으나 수컷에서는 40레 중 17레에서 나타났다. 그러나 본 시험에서는 수컷 대조군에서 5레에서 미약하게 나타났으나 수컷에서는 저농도군 2레, 중농도군 4레 고농도군 6레 등 시험물질 용량의존적으로 발생 빈도수가 증가하고 대조군에 비하여 증상의 정도도 심하게 나타나 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 암컷에서는 저농도군 4레, 중농도군 2레 고농도군 2레에서 나타났으나 용량의존성이 없었으며 대조군 4레에서도 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

암컷 신장(kidney)에서 mineralization이 대조군에서 1레, 고용량군에서 1레, 중용량군에서 5레, 저용량군에서 7레 나타났다. 이는 랫드 신장에서 자연발생적으로 나타나는 증상으로(Gary A. Boorman *et al.*, 1990) 본 시험에서는 수컷에서는 나타나지 않고 암컷에서만 나타났다. 또한 대조군에서도 관찰되었고 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 간장(liver) 암컷 고용량군이 1레에서 미약한(minimal) 공포변성(vacuolation)이 나타났지만, 대조군에서도 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 수컷 고용량군에서 1레에서 심근염(myocarditis)이 미약하게(minimal) 나타났지만, 대조군의 2레에서도 미약하게(minimal) 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단되었다.

암수 모두에서 시험물질-유래 경미한 변화가 5000 mg/kg/day로 확인되었다. 따라서 시험의 독성 판정기준에 따라 암수 모두에 대한 Sialic acid의 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대무독성용량)은 5000 mg/kg/day로 판단되었다.

아. 시험의 신뢰성에 영향을 줄 수 있는 사항

시험에 영향을 주는 변경 및 이탈은 없었다.

7. 개발 G-NANA의 비설치류(비글견) 단회 안전성 평가

(Sialic acid의 Beagle dog에 DE(dose escalation)법을 이용한 경구투여 독성시험)

가. 요약

본 시험은 시험물질 Sialic acid를 Beagle dog에 DE (dose escalation) 투여법을 이용하여 단회 경구투여 하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 조사하기 위하여 수행하였다.

시험물질을 625 및 1250 mg/kg으로 투여하는 시험물질 투여군을 설정하여 군당 암수 각 1 마리에 단회 경구투여(1 차)하였고, 1 차 투여 후 6 일간 관찰한 뒤 2500 및 5000 mg/kg으로 2 차 투여하였다. 2 차 투여 후 8 일간 관찰한 뒤 5000 mg/kg으로 암수 각 2 마리에 3 차 투여하였다. 시험물질을 3 차 투여한 후 2 주간 사망을 포함한 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였고, 그 결과는 다음과 같다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 본 시험조건하에서 Sialic acid를 Beagle dog에 DE (dose escalation) 투여법을 이용하여 단회 경구투여 하였을 때, 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중변화 및 부검소견에서 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 시험물질의 고유특성에 의해 일반증상에서 5000 mg/kg 투여군 암수에서 시험물질 구토가 관찰되었고, 이로 인하여 정확한 독성평가 및 전신적 노출의 정도는 판단하기 어려웠다. 따라서, 본 시험조건하에서 시험물질 Sialic acid의 독성작용에 의한 이상이 관찰되지 않는 최대내성용량(MTD, Maximum tolerance dose)은 암수 모두 2500 mg/kg으로 판단하였다. 단, 구토를 고려하지 않았을 때, 시험물질 구토가 관찰되지 않은 5000 mg/kg 투여군 암컷 1 레에서 시험물질 투여와 관련된 어떤 증상도 관찰되지 않았으므로, 독성작용에 의한 이상이 관찰되지 않는 최대내성용량은 암수 모두 5000 mg/kg으로 판단하였다.

검정결과를 요약하면 다음과 같다.

- 가. 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 나. 일반증상 관찰결과, 시험물질 구토가 5000 mg/kg 투여군 수컷(2 및 3 차 투여) 및 암컷(3 차투여)에서 투여 후 전반적으로 1-3 시간 이내에 관찰되었다.
- 다. 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 라. 부검소견 관찰 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

나. 재료 및 방법

(1) 시험물질 조제 및 분석

(가) 투여시험물질 조제방법(APPENDIX 3. CERTIFICATE OF ANALYSIS)

시험물질은 지표성분에 대한 보정 없이 중량 그대로를 사용하였으며 별도의 조제 없이 동물 체중에 맞게 각각의 시험물질을 칭량한 후 경구투여용 젤라틴 캡슐에 충전하였다. 캡슐에 시험물질을 충전하는 작업은 투여 당일 투여 직전에 수행하였다.

(나) 투여시험물질의 분석 : 투여시험물질의 분석은 실시하지 않았다.

(2) 시험계 및 사육환경

(가) 시험계

① 동물정보

종 및 계통	Beagle dog	
생산자	Beijing Marshall Biotechnology Co., Ltd. (Wayao village, Liucun town, Chang Ping District, Beijing, 102204, China)	
공급원	(주)우정 BSC (경기도 수원시 영통구 의의동 864-1 차세대융합기술연구원 B 동 3 층)	
선정사유	본 시험에 사용한 Beagle dog은 독성시험에 적당한 실험동물로서 일반독성시험에 널리 사용되고 있다. 또한 본 계통의 Beagle dog은 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어서, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있기 때문에 선택하였다.	
성별	수컷	암컷
동물 수	입수시	3
	첫 투여시	2
주령	입수시	약 5-6
	첫 투여시	약 5.5-6.5
입수시 체중범위	5.10-6.18 kg	5.38-5.60 kg
첫 투여시 체중범위	5.68-6.06 kg	5.58-5.86 kg
잔여동물의 처리	다른 시험[(주)캠온 시험번호: 13-DA-015 및 13-DA-070]의 예비투여에 사용하였다.	

② 검역 및 순화

입수시 및 순화기간(1 회) 중 체중을 측정하였다. 입수 시 동물의 외관을 관찰하고 체중을 측정한 후 21 일간 본 시험을 실시하는 동물실내에서 사육하면서 매일 일반증상을 관찰하였다. 동물 공급처에서 제공한 예방접종 및 검역증명서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었다. 또한, 캡슐투여에 대한 적응을 위하여 투여개시 일주일 전부터 모든 투여동물에 빈 캡슐을 투여하였다.

③ 식별

검역 및 순화기간 중에는 귓바퀴에 새겨진 문신 번호로 식별하였고, 투여 및 관찰기간에는 귓바퀴에 유성 매직펜으로 기재한 동물번호 및 문신 번호로 식별하였으며, 사육상자에는 용량별로 다른 색상의 개체식별카드를 부착하여 구분하였다. 그리고 사용동물실의 입구에는 동물실 사용기록지를 부착하였다.

④ 실험동물윤리규정

본 시험은 (주)캠온 비임상연구소의 실험동물운영위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 13-D108).

(나) 사육환경

① 환경조건 및 측정

- 동물은 온도 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 설정한 (주)캠온 비임상연구소 제1동물사육구역 5 호실에서 사육하였다.

- 온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하였고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정하였다.
- 사육기간 동안 동물실의 온도 및 상대습도는 일평균 21.3-23.0 °C 및 49.5-60.8 %이었고, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

② 사료, 물 및 오염물질 검사

- 사료는 (주)카길 에그리 퓨리나에서 생산하는 실험동물용 개사료를 공급받아 매일 약 300 g씩 제한급여를 하였다. 사료 공급처에서 제공한 사료성분 분석 성적서를 검토한 결과, 사료조성 및 오염물질 등에서 시험에 악영향을 줄만한 요인 없었다.
- 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후, 자동급수장치를 이용하여 자유섭취 하도록 하였다.
- 수질검사는 시험에 앞서 경기도보건환경연구원(경기도 수원시 장안구 파장동 324-1)에서 수행하였고, 먹는물수질기준에 적합하였다.

③ 사육상자 및 사육밀도

스테인레스제 망사육상자(W 895 x L 795 x H 765 mm)에서 1 마리/사육상자로 사육하였다.

다. 시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

(1) 시험군 구성

(가) 1 차 투여

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여량 (mg/kg)
G1	M / F	1 / 1	1 / 3	625
G2	M / F	1 / 1	2 / 4	1250

(나) 2 차 투여

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여량 (mg/kg)
G1	M / F	1 / 1	1 / 3	2500
G2	M / F	1 / 1	2 / 4	5000

(다) 3 차 투여

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여량 (mg/kg)
G1	M / F	2 / 2	1-2 / 3-4	5000

(2) 투여량의 설정

본 시험물질을 2500 및 5000 mg/kg으로 투여 전 절식을 실시한 Beagle dog 암수 각 1 마리에 단회 경구투여 하였을 때, 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 및 체중변화의 이상은 관찰되지 않았다.

따라서, 상기의 결과 및 시험의뢰자의 요구를 반영하여 1 차 투여의 투여량을 625 및 1250 mg/kg, 2 차 투여의 투여량을 2500 및 5000 mg/kg으로 설정하였다. 2 차 투여 시 5000 mg/kg 투여군 수컷 1 례에서 시험물질 구토가 관찰되어, 구토 발생 여부 및 독성 작용을 알아보기 위하여 3 차 투여의 투여량을 5000 mg/kg으로 설정하였다.

(3) 군분리

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화 하고, 평균에 가까운 동물 암수 각 2 마리를 선택하여 ‘시험군 구성’ 표와 같이 무작위 분배하였다.

(4) 투여

투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용하였다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 7 또는 9 일 간격으로 총 3 회 투여하였고, 10:54 이전에 투여하였다.
투여량 산출	각각의 동물들은 투여당일에 측정된 체중을 기준으로 투여량을 산출하였다.
투여방법	투여 전에 하룻밤을 절식시켜 위 내용물을 비우게 하였다. 동물을 사육상자 내에서 자연스럽게 위치한 상태에서 입을 벌린 후 캡슐을 혀의 안쪽에 넣고 입을 다물게 한 다음, 인후두부를 부드럽게 쓰다듬어 삼키도록 하였다. 사료는 투여 후 약 4 시간째 급여하였다.

라. 관찰 및 검사

(1) 일반증상

매일 1 회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 1 시간까지 지속적으로, 투여 후 6 시간까지 매 시간마다 관찰하였고, 각 투여일을 Day 1로 설정하여 1 차 투여 후의 증상은 Day 7까지, 2 차 투여 후의 증상은 Day 9까지, 3 차 투여 후의 증상은 Day 15 까지 관찰하였다.

(2) 체중

1 차 투여 시에는 Day 1(투여 전), 3 및 6에, 2 차 투여 시에는 Day 1(투여 전), 2, 6 및 9 에, 3 차 투여 시에는 Day 1(투여 전), 2, 4, 8 및 15에 체중을 측정하였다.

(3) 부검

3 차 투여일을 기준으로 Day 15에 모든 생존동물을 펜토바비탈(엔토발, 한림제약)을 정맥 내투여하여 마취시킨 후 액와정동맥(Axillary vein & artery)을 절단하는 방법으로 방혈하여 안락사시킨 후 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 모든 시험군의 계획 도살한 동물에서 육안적 이상장기가 관찰되지 않아 고정 및 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

마. 임상병리

(1) 채혈

순화 기간 중 실험동물의 건강상태를 확인하기 위하여 요측피정맥에서 혈액검사를 위한 채혈을 실시하였다. 동물은 채혈 전에 하룻밤 동안(16-24 시간) 절식(물은 제공)하였다. 단, 혈액검사 관련자료는 군분리시 동물의 건강을 판단하기 위한 참고자료로 활용하였고, 최종 보고서에는 반영하지 않았다.

(2) 혈액학적 검사

혈액 약 1 mL를 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle (3 mL Vacutainer, BD, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 이용하여 검사하였다.

백혈구(WBC)	평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)	림프구(LYM)
적혈구(RBC)	적혈구분포폭(RDW)	단핵구(MONO)
혈색소량(HGB)	헤모글로빈분포폭(HDW)	호산구(EOS)
헤마토크리트치(HCT)	혈소판수(PLT)	호염기구(BASO)
평균적혈구용적(MCV)	평균혈소판용적(MPV)	대형비염색성세포(LUC)
평균적혈구헤모글로빈량(MCH)	호중구(NEU)	

(3) 혈액생화학적 검사

혈액 약 2 mL를 clot activator가 들어 있는 5 mL vacutainer tube (INSEPACK,)에 주입하고 15-20 분간 실온에 방치하여 응고시킨 후 10 분간 원심분리(3000 rpm, 1902 RCF, Combi-514R, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(AU680, BECKMAN COULTER, USA)를 이용하여 아래 항목을 검사하였다.

아스파테이트 아미노기전이효소(AST)	총콜레스테롤(TCHO)	크레아티닌(CRE)
알라닌 아미노기전이효소(ALT)	중성지방(TG)	무기인(IP)
알칼라인 포스파타제(ALP)	총단백(TP)	칼슘(Ca ²⁺)
크레아틴인산활성효소(CPK)	알부민(ALB)	나트륨(Na ⁺)
총빌리루빈(TBIL)	알부민/글로불린 비(A/G)	칼륨(K ⁺)
당(GLU)	혈액요소질소(BUN)	염소(Cl ⁻)

바. 통계학적 방법

군별 암수 각 1 마리로 통계 분석을 위한 동물수가 충분하지 않기 때문에 통계처리는 실시하지 않았다.

사. 결 과

(1) 사망동물

사망동물은 관찰되지 않았다.

(2) 일반증상

시험물질 투여에 의한 주요한 변화는 시험물질 구토(vomiting)였고, 그 외, 사료남김 (remaining of food) 및 사료 구토가 용량-반응 상관성 없이 산발적으로 관찰되었고, 이는 비글견을 이용한 실험에서 자연스럽게 관찰될 수 있는 정도였다.

(3) 체중변화

시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

(4) 부검소견

시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

아. 고찰 및 결론

본 시험은 시험물질 Sialic acid를 Beagle dog에 DE (dose escalation) 투여법을 이용하여 단회 경구투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 조사하기 위하여 수행하였다.

본 시험에서 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중변화 및 부검소견에서도 시험물질의 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

일반증상에서 관찰된 시험물질 구토는 암컷 1 레를 제외한 5000 mg/kg 투여군 암수 모두에서 관찰되어, 시험물질 투여에 의한 변화로 판단하였다. 단, 일반적으로 개에서 구토는 구토중추의 발달로 인하여 독성작용 없이 경미한 위장관의 자극에 의해서 유발하기도 하고^{1, 2)}, 본 시험에서는 전신적인 이상증상, 그리고 체중변화 및 부검소견에서의 이상이 동반되지 않았기에 독성작용에 의한 것이 아닌 시험물질 고유의 맛, 냄새 등의 물리적 특성에 의한 변화로 사료된다. 따라서, 시험물질 구토로 인하여 5000 mg/kg 투여군에 대한 정확한 독성평가 및 전신적 노출의 정도는 판단하기 어려웠다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 본 시험조건하에서 Sialic acid를 Beagle dog에 DE (dose escalation) 투여법을 이용하여 단회 경구투여 하였을 때, 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중변화 및 부검소견에서 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 시험물질의 고유특성에 의해 일반증상에서 5000 mg/kg 투여군 암수에서 시험물질 구토가 관찰되었고, 이로 인하여 정확한 독성평가 및 전신적 노출의 정도는 판단하기 어려웠다. 따라서, 본 시험조건하에서 시험물질 Sialic acid의 독성작용에 의한 이상이 관찰되지 않는 최대내성용량 (MTD, Maximum tolerance dose)은 암수 모두 2500 mg/kg으로 판단하였다. 단, 구토를 고려하지 않았을 때, 시험물질 구토가 관찰되지 않은 5000 mg/kg 투여군 암컷 1 레에서 시험물질 투여와 관련된 어떤 증상도 관찰되지 않았으므로, 독성작용에 의한 이상이 관찰되지 않는 최대내성용량은 암수 모두 5000 mg/kg으로 판단하였다.

제 6절 G-NANA의 항균효능 평가

1. 선발 surfactant의 항균모델 및 효능평가

가. 연구목표

헬리코박터균은 인간의 위장 내에 서식하여 위궤양과 위염은 물론 위암까지도 일으킬 수 있는 세균을 말한다. 헬리코박터는 위장점막의 표면이나 위장의 점액에서 발견되며 헬리코박터균에 도달하기 위해서는 위장점막으로 침투 확산이 되어야 한다. 따라서 위장점막에 침투 확산을 하기 위해서 복합처리 할 수 있는 surfactant가 필요하다. 결론적으로, 본 실험에서는 25종의 surfactant에서 침투 확산이 뛰어나면서 항균성까지 있는 surfactant를 선발하여 헬리코박터 제어 제품을 개발하기 위해서 개발 G-NANA와 surfactant를 단일 처리 및 복합처리 했을 때 항균스펙트럼을 보고자 본 실험을 진행하였다.

나. 연구수행방법

배지는 Tryptic Soy Agar(Difco™, Becton, Dickinson and company, USA)를 121℃에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. 공시균은 그람양성균 *Bacillus cereus* 및 그람음성균 *Enterobacter sakazakii*를 사용하였고, 배양조건은 37℃에서 18시간 호기성 배양하였다.

*Bacillus cereus*는 균수를 고, 중, 소로 나누어 각각 8.0×10^8 (cfu/ml), 8.0×10^5 (cfu/ml), 8.0×10^3 (cfu/ml)로 배지에 50μl씩 도말하였고, *Enterobacter sakazakii*는 1.8×10^{10} (cfu/ml), 1.8×10^7 (cfu/ml), 1.8×10^5 (cfu/ml)로 배지에 각각 50μl씩 도말하였다. 균 도말 배지 위에 농도별(2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05%) surfactant를 30μl씩 점적한 후 37℃에서 18시간 호기성 배양하였다.

다. 결과

공시균은 그람양성균 *Bacillus cereus*, 그람음성균 *Enterobacter sakazakii*를 사용하였고, surfactant의 농도별 점적을 통해 항균성과 효능을 평가하였다.

그 결과, 전단력 평가에서 매우우수(+++), 우수(++), 보통(+), 효능없음(-) 4가지로 구분하였을 때 침투·확산이 뛰어난 surfactant는 700과 707이었고, 매우우수(+++)로 판단하였다.

두 개의 surfactant 중 700(surfactant name)이 *E.sakazakii*(그람음성균), *B.cereus*(그람양성균)에 대한 MIC(최소저해농도)가 더 낮았고, *E.sakazakii*(그람음성균) 고농도에서 MIC는 0.5%, *B.cereus*(그람양성균) 고농도에서 MIC는 0.25%이었다.

표. 수용성계 surfactant 항균모델 및 효능평가

구분		전단력평가		농도별 균수 대비 농도별 Surfactant의 항균성 평가(MIC)					
				그람음성균(<i>E.sakazakii</i>)			그람양성균(<i>B.cereus</i>)		
		침투	확산	고농도	중농도	저농도	고농도	중농도	저농도
MODEL 1	700	+++	+++	0.5%	0.25%	0.25%	0.25%	0.1%	0.05%
MODEL 2	Q-14S	+++	++	1%	0.1%	0.05%	0.25%	0.1%	0.05%
MODEL 3	870	+++	+	1%	0.5%	0.1%	0.25%	0.1%	0.05%
MODEL 4	P-1570	+++	++	0.5%	0.5%	0.25%	0.1%	0.05%	0.05%
MODEL 5	F-160	+++	+	0.25%	0.1%	0.1%	0.25%	0.1%	0.05%
MODEL 6	F-110	+++	-	0.5%	0.25%	0.1%	1%	0.1%	0.05%
MODEL 7	707	+++	+++	1%	0.5%	0.5%	0.5%	0.25%	0.05%
MODEL 8	750	+++	++	0.5%	0.5%	0.25%	0.1%	0.05%	0.05%
MODEL 9	760	+++	++	-	-	2%	0.25%	0.1%	0.05%
MODEL 10	Q-12S	+++	+	-	-	-	0.5%	0.25%	0.25%
MODEL 11	P-1670	+++	+	-	-	-	2%	0.1%	0.05%
비고		+++ : 매우우수 ++ : 우수 + : 보통 - : 효능없음		MIC 선정 기준 : 성장저지환 형성(항균성 50% 이상)					

- *E.sakazakii*(그람음성균) : 고농도 - 1.8×10^{10} (cfu/ml) 중농도 - 1.8×10^7 (cfu/ml) 저농도 - 1.8×10^5 (Cfu/ml)
- *B.cereus*(그람양성균) : 고농도 - 8.0×10^8 (Cfu/ml) 중농도 - 8.0×10^5 (Cfu/ml) 저농도 - 8.0×10^3 (Cfu/ml)

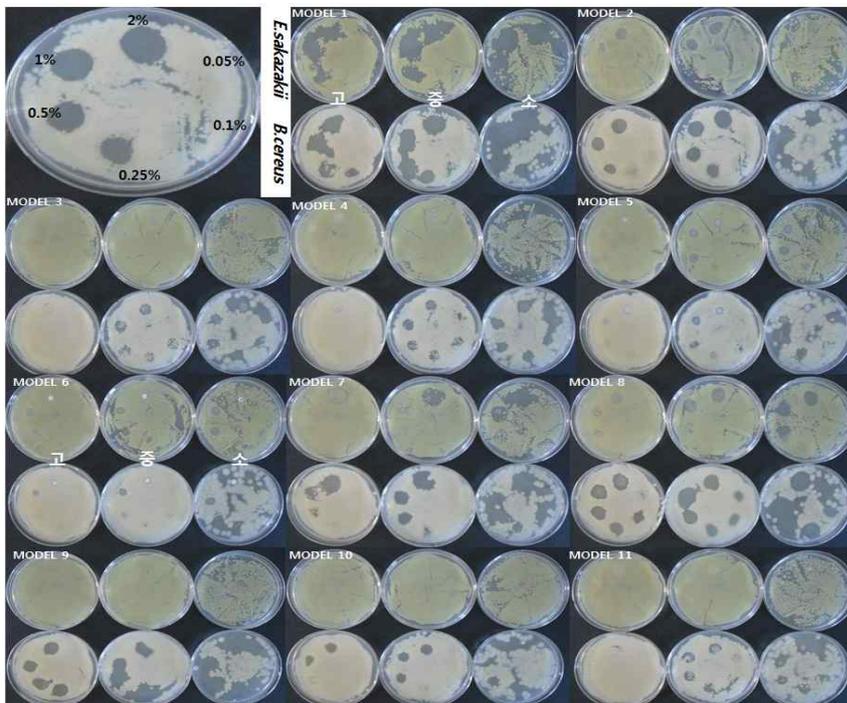


그림. 선발된 11종의 surfactant의 농도별 항균 및 효능평가 결과

- MODEL 1(700), MODEL 2(Q-14S), MEDEL 3(870), MODEL 4(P-15700), MODEL 5(F-160), MODEL 6(F-110), MODEL 7(707), MODEL 8(750), MODEL 9(760), MODEL 10(Q-12S), MODEL 11(P-1670)

- *E.sakazakii*(그람음성균) : 고농도 - 1.8×10^{10} (cfu/ml) 중농도 - 1.8×10^7 (cfu/ml) 저농도 - 1.8×10^5 (cfu/ml)
- *B.cereus*(그람양성균) : 고농도 - 8.0×10^8 (cfu/ml) 중농도 - 8.0×10^5 (cfu/ml) 저농도 - 8.0×10^3 (cfu/ml)

2. 개발 G-NANA의 항균스펙트럼 평가

가. 연구목표

G-NANA는 다기능성(면역, 염증, 항균, 항바이러스 등)을 보유하고 있다고 보고가 되고 있음에 따라, 본 실험에서는 이중 NANA가 보유한 기능성중 항균성에 주목하고 이를 암식이 개발 및 헬리코박터 제어 제품화에 있어서 필요한 사항을 충족하기 위해서 식품에서 대표적인 식품 위해균과 구강세균 그리고 헬리코박터에 대한 항균성을 평가하고자 하였다.

이를 위하여, 개발 우유유래 NANA(이하 G-NANA)와 선발 된 surfactant(700)를 시료로 하여 공시균주를 이용한 항균성을 평가하였다. 그리고 G-NANA 생산시에 나타날 수 있는 감염균 제어를 위해 분리 및 동정기법 및 제품 G-NANA 제균조건 정립을 수행하였다.

최종적으로, 식품위해균 및 구강세균 그리고 헬리코박터에 대한 G-NANA의 항균 스펙트럼 평가와 제품 G-NANA 제균조건 정립은 추후 암식이 개발과 헬리코박터 제어효능을 평가하기 위한 기초결과로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

나. 연구수행방법

(1) 광역 항균스펙트럼 평가

개발 우유유래 NANA(G-NANA)의 항균효과를 검정하기 위하여, 공시균은 *Helicobacter pylori* wild type인 SS1, P1을 사용하였다.

실험 균주 배양에 사용한 배지는 Brucella broth(Difco™, Becton, Dickinson and company, USA)이며, 121°C에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. *Helicobacter pylori*는 37°C, 10% CO₂ 조건에서 24시간 혐기적으로 배양하였다.

Helicobacter pylori wild type SS1, P1의 항균성 평가는 6well에 농도별로 G-NANA와 surfactant(700)를 각각 2ml씩 분주 후 OD(600nm) 0.6의 SS1와 P1을 50μl씩 첨가하여 37°C, 10% CO₂ 조건에서 혐기적으로 배양하면서 0시간, 12시간, 24시간 후에 OD(600nm)을 측정하였다.

G-NANA와 surfactant(700)의 시너지 효과는 적용되는 농도의 2배씩 stock 농도를 만든 후 G-NANA 1ml, surfactant(700) 1ml을 분주하였다. 그 후 OD(600nm) 0.6의 P1을 50μl씩 첨가한 후 37°C, 10% CO₂ 조건에서 혐기적으로 배양하면서 접촉 후 0시간, 12시간, 24시간 후에 OD(600nm)값을 측정하였다.

(2) 제품 G-NANA 감염균 분리 및 동정기법 정립(QA기법 관련)

공시균은 ABT-4(CHR HANSEN, Probiotic culture-Probio-Tec® contains BB-12®, Freezed-dried Lactic culture for Direct Vat Set(DVS))를 사용하였으며, 배지는 BCP

Agar(E-MB31, EIKEN CHEMICAL Co., LTD., Japan) 배지를 121℃에서 15분 동안 고압멸균하여 사용하였다. 배양조건은 37℃에서 48~72시간 호기적 조건으로 배양하였다. 배양한 ABT-4 균의 동정은 API 50CHL kit(BIOMERIEUX)를 사용하였으며, apiweb.biomerieux.com에서 균 동정을 확인하였다.

(3) 제품 G-NANA 제균조건 정립

배지는 Tryptic Soy Broth(Difco™, Becton, Dickinson and company, USA), Tryptic Soy Agar(Difco, USA)를 121℃에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. G-NANA 감염균 4종을 TSB에 각각 균을 현탁시키고, 100ml 삼각플라스크에 TSB 50ml을 넣은 후 현탁균 1ml씩 첨가하여 70℃, 80℃, 90℃는 30분 동안 shaking incubation, 121℃는 15분 동안 autoclave 하였다. 온도별 열처리 후 24시간동안 실온에서 거치시킨 후 TSA에 50µl씩 도말하여 균수(cfu/ml)를 확인하였다. 무처리구는 균을 비첨가한 TSB만 첨가하였고, 대조구는 TSB에 현탁균을 첨가하였으며 실험구는 온도별 열처리를 한 구로 평가하였다.

다. 결과

(1) 광역 항균스펙트럼 평가

NANA가 보유한 기능성중 항균성을 평가하기 위하여, 공시균을 선발한 후 이를 대상으로 개발 G-NANA(순도 23.5%)를 농도별 처리 후 시간결과에 따른 항균성을 처리전과 비교함으로써 항균스펙트럼에 미치는 NANA의 항균성을 평가하여 본 결과는 다음과 같다.

처리전과 비교시 개발 G-NANA는 *Helicobacter pylori* wild type에 대하여 최소저해농도(MIC) 0.5%로 나타났으며, surfactant(700)는 0.05%로 나타났다. *Helicobacter pylori* wild type P1에 대해서 개발 G-NANA와 surfactant(700) 복합처리시 최소저해농도(MIC)는 G-NANA 0.05%, surfactant 0.05%로 G-NANA의 농도는 10배 감소되었다.

표. 야생분류 *H. pylori* P1WT에 대한 개발 G-NANA 및 surfactant의 단일 및 복합처리에 따른 시간경과별 항균스펙트럼 평가 결과

시험구	농도별 G-NANA 및 Surfactant 처리 후 시간 경과별 항균성 평가 결과						
	무처리구	G-NANA		700		GNANA+700	
		12hr	24hr	12hr	24hr	12hr	24hr
CNTL	0	0.049	0.12	NT	NT	0.038	0.066
Group 1	0	0.034	0.12	0.022	0.103	0.053	0.094
Group 2	0	0.032	0.12	0.061	0.073	0.056	0.073
Group 3	0	0.018	0.004	ND	0.054	0.07	0.037
Group 4	0	0.006	0.006	ND	ND	ND	ND
Group 5	0	0.005	0.003	ND	ND	ND	ND

- ND : Not Detect, NT : Not Test

- Group 1~5 : Brucella Broth내 시료첨가농도(w/v, G-NANA→ 1: 0.05%, 2: 0.1%, 3: 0.5%, 4: 1%, 5: 2%, 700→ 1: 0.001%, 2:0.005%, 3:0.01%, 4: 0.05%, 5: 0.1%)
- G-NANA : 유청분말에서 분리한 GMP를 기질로 하여 제조한 NANA함유 GMP가수분해물(NANA 함유량 : 23.5%)
- 700(Surfactant name) : Capric acid ester
- P1WT : *H. pylori* wild type
- 12 hr and 24hr : 개발 G-NANA 및 Surfactant 첨가후 항균성 평가 시간, OD:600nm
- Incubation Condition : Brucella Broth(37°C, 10% CO2 incubation)

표. 야생분류 *H. pylori* P1WT에 대한 개발 G-NANA 및 surfactant의 복합처리에 따른 시간경과별 항균스펙트럼 평가 결과

시험구	농도별 G-NANA 및 Surfactant 처리후 시간 경과별 항균성 평가 결과	
	12hr	24hr
CNTL	0.038	0.066
2%N + 0.1% 700	ND	ND
2%N + 0.05% 700	ND	ND
2%N + 0.01% 700	0.007	ND
2%N + 0.005% 700	0.008	ND
2%N + 0.001% 700	0.008	ND
1%N + 0.1% 700	ND	ND
1%N + 0.05% 700	ND	ND
1%N + 0.01% 700	0.025	ND
1%N + 0.005% 700	0.024	0.016
1%N + 0.001% 700	0.026	0.014
0.5%N + 0.1% 700	ND	ND
0.5%N + 0.05% 700	0.001	ND
0.5%N + 0.01% 700	0.07	0.037
0.5%N + 0.005% 700	0.045	0.071
0.5%N + 0.001% 700	0.047	0.056
0.1%N + 0.1% 700	ND	ND
0.1%N + 0.05% 700	0.005	ND
0.1%N + 0.01% 700	0.047	0.072
0.1%N + 0.005% 700	0.056	0.073
0.1%N + 0.001% 700	0.062	0.094
0.05%N + 0.1% 700	ND	ND
0.05%N + 0.05% 700	0.006	ND
0.05%N + 0.01% 700	0.044	0.074
0.05%N + 0.005% 700	0.058	0.071
0.05%N + 0.001% 700	0.053	0.094

- ND : Not Detect
- G-NANA : 유청분말에서 분리한 GMP를 기질로 하여 제조한 NANA함유 GMP가수분해물(NANA 함유

량 : 23.5%)

- 700(Surfactant name) : Capric acid ester
- PIWT : *H. pylori* wild type
- 12 hr and 24hr : 개발 G-NANA 및 Surfactant 첨가후 항균성 평가 시간, OD:600nm
- Incubation Condition : Brucella Broth(37°C, 10% CO2 incubation)

Helicobacter pylori wild type SS1에 대해서 개발 G-NANA와 surfactant(700)의 최소저해농도(MIC)는 각각 2%, 0.05%이었다.

표. 야생분류 *H. pylori* SS1WT에 대한 개발 G-NANA 및 surfactant의 단일처리에 따른 시간 경과별 항균스펙트럼 평가 결과

시험구	농도별 G-NANA 및 Surfactant 처리후 시간 경과별 항균성 평가 결과					
	G-NANA			700		
	0hr	12hr	24hr	0hr	12hr	24hr
CNTL	0.0162	0.051	0.114	0.0162	0.051	0.114
Group 1	0.01735	0.0365	0.216	0.01605	0.0455	0.255
Group 2	0.01745	0.0415	0.2	0.0153	0.029	0.14
Group 3	0.0136	0.032	0.058	0.01575	0.0295	0.0475
Group 4	0.01815	0.0275	0.052	0.01655	0.0055	0.006
Group 5	0.0153	0.0125	0.0025	0.0078	0.008	0.0045

- Group 1~5 : Brucella Broth내 시료첨가농도(w/v, G-NANA→ 1: 0.05%, 2: 0.1%, 3: 0.5%, 4: 1%, 5: 2%, 700→ 1: 0.001%, 2:0.005%, 3:0.01%, 4: 0.05%, 5: 0.1%)
- G-NANA : 유청분말에서 분리한 GMP를 기질로 하여 제조한 NANA함유 GMP가수분해물(NANA 함유량 : 23.5%)
- 700(Surfactant name) : Capric acid ester
- SS1 WT : *H. pylori* wild type
- 12 hr and 24hr : 개발 G-NANA 및 Surfactant 첨가후 항균성 평가 시간, OD:600nm
- Incubation Condition : Brucella Broth(37°C, 10% CO2 incubation)

(2) 제품 G-NANA 감염균 분리 및 동정기법 정립(QA기법 관련)

G-NANA 생산시에 나타날 수 있는 감염균 제어를 위한 미생물 분리 및 동정기법 정립에 필요한 기초결과로 사용될 수 있는 유산균의 동정 결과는 다음과 같다.

ABT-4 균 동정결과 *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 4로 나왔으며 ID(%)는 99.9%이었다. 결론적으로 ABT-4는 *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 4인 유산균임을 확인하였다.

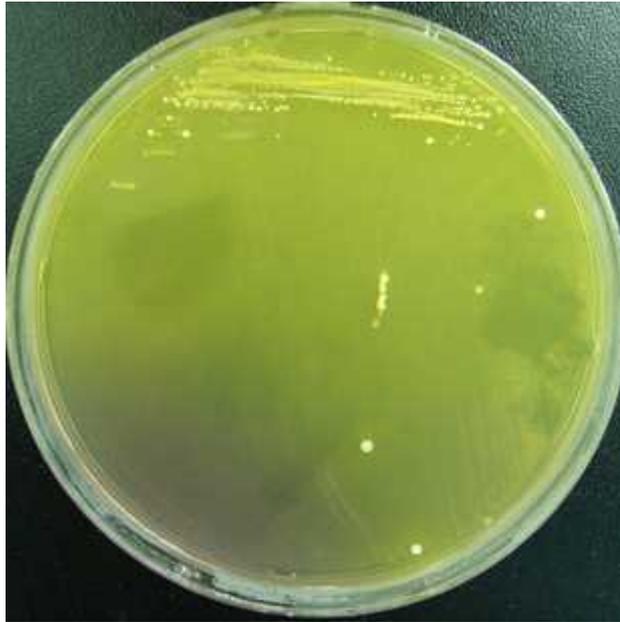


그림. BCP Agar에서 유산균 ABT-4 배양
 - 배지 : BCP Agar(유산균 선택배지)
 - 배양조건 : 37℃, 호기성, 48시간 배양

표. 선발유산균 동정결과

선발유산균	동정결과	% ID	당이용성
ABT-4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 4	99.9	RIB+, ADO+, D-GAL+, D-GLU+, D-FRU+, D-MNE+, L-SBE+, MAN+, SOR+, N-AG+, AMY+, ARB+, Esculin+, SAL+, CEL+, MAL+, LAC+, Sucrose+, TRE+, GEN+, D TUR+, D TAG+, GNT+

(3) 제품 G-NANA 제균조건 정립

G-NANA 생산시에 나타날 수 있는 감염균 제어에 필요한 기초결과서 G-NANA 제균조건 결과는 다음과 같다.

대조구에 비교해 보았을 때 90℃에서 30분 온도처리를 한 구와 121℃에서 15분 autoclave 했을 때 생존균수가 없었다. 따라서 G-NANA에 균을 감염시켰을 때 90℃ 이상에서 100% 사멸률을 보였다. 결론적으로, 제품 G-NANA의 제균 온도는 90℃ 이상으로 판단되었다.

표. 온도별 처리에 따른 제균효과 평가

처리온도 (°C)	온도별 처리에 따른 제균효과(OD, 600nm)				생존콜로니수(cfu/ml)				사멸률(%)			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
무처리구	0.064 (100% 기준)				0	0	0	0	-	-	-	-
대조구	NT				1.98×10 ⁸	8.0×10 ⁷	4.4×10 ⁵	4.0×10 ⁵	-	-	-	-
70	0.067 (95.5%)	0.296 (21.6%)	0.287 (22.3%)	0.354 (18.1%)	0	2.08×10 ⁶	1.92×10 ⁶	2.28×10 ⁶	100	97.4	0	0
80	0.064 (100%)	0.108 (59.3%)	0.101 (63.4%)	0.142 (45.1%)	0	2.88×10 ⁶	2.4×10 ⁶	1.56×10 ⁶	100	96.4	0	0
90	0.066 (97%)	0.064 (100%)	0.068 (94.1%)	0.065 (98.5%)	0	0	0	0	100	100	100	100
121	0.079 (81%)	0.08 (80%)	0.079 (81%)	0.08 (80%)	0	0	0	0	100	100	100	100

- NT : Not test
- 온도처리 : 70°C, 80°C, 90°C (30min shaking incubation), 121°C (15min autoclave)
- 배양조건 : 37°C, 호기성, 18시간
- OD : 600nm
- 온도별 열처리 후 24hr 경과 후에 생존콜로니수 확인
- 1~4 : G-NANA제품 감염균(동정예정)
- OD값은 무처리구를 100% 기준으로 온도처리별 사멸률을 나타낸 것이고 생존콜로니 수는 대조구를 기준으로 사멸률을 나타냄

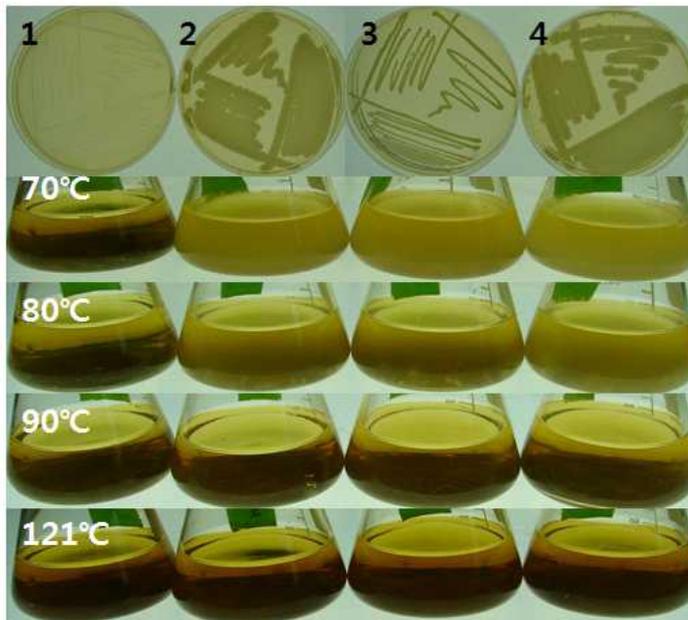


그림. 온도별 처리에 따른 제균효과 평가

- 온도별 30min 열처리 후 24hr 경과
- 1~4 : G-NANA제품 감염균

제 7절 *Helicobacter pylori*에 대한 G-NANA의 항균 및 항염효력 평가

1. 연구목표 : 사람에서 위염, 위궤양 및 위암을 일으키는 원인균인 *Helicobacter pylori*에 대한 (주) 생명의 나무의 개발소재인 sialic acid (NANA)의 항균 및 항염효과를 규명

2. 연구내용

가. ANA의 *H. pylori*에 대한 항균 효과 규명

- (1) 흡광도 및 CFU 측정법을 통한 *in vitro* 항균 효과 규명
- (2) 마우스 감염 모델을 이용하여 *H. pylori*에 대한 NANA의 생체 내 항균 효과 규명

나. NANA의 *H. pylori*에 대한 항염 효과 규명

- (1) 위상피세포 및 골수유래 대식세포에서 *H. pylori*에 의해 유도되는 염증 인자 (cytokines 및 nitric oxide) 생성에 미치는 NANA의 효과 규명
- (2) *In vivo* 모델에서 *Helicobacter*에 의해 유도되는 염증에 미치는 NANA의 항염 효과 규명

3. 재료 및 방법

가. *H. pylori* 배양

- (1) *H. pylori* P1WT, SS1은 Brucella broth (Brucella broth를 autoclave하고 60°C 이하로 식힌 후 항생제 vancomycin 10 μ g/ml, trimethoprim 5 μ g/ml, nystatin 1 μ g/ml와 10% FBS첨가) petry dish에 broth를 8ml 넣고 배양된 균을 1ml 넣어 37°C, 10% Co₂ incubator에서 24 hr 배양함.
- (2) *H. felis*는 Brucella broth에 10% FBS첨가. filter가 있는 75T flask에 broth 30ml을 넣고 균 1ml를 넣어주고 anaerobic jar에 Co₂ gaspak을 넣은 후 37°C, 150rpm shaking incubator에서 48hr 배양함.

나. 물질 만들기

GMP, G-NANA, S-NANA를 *in vitro*실험 시 broth(Brucella)로 물질을 녹이고, *in vivo*실험 시 PBS로 농도에 맞게 녹임. 그 다음 p.H를 7로 맞춘 후 사용.

다. OD 측정

배양한 균을 3000rpm, 20min, 4°C 원심분리 후 상층액 broth를 제거하고 PBS로 *H. pylori* pellet을 풀어준 후 96well plate에 100 μ l 넣어 분광광도계를 이용하여 OD_{600nm}에서 0.6을 맞추는 후 사용.

라. CFU 측정

각각의 물질을 농도별로 희석하여 6well plate에 2ml씩 넣고 OD_{600nm}를 0.6으로 맞추는 *H. pylori*를 50 μ l씩 넣고 37°C, 10% Co₂ incubator에서 24hr 배양함. 24hr 후 OD_{600nm}에서 흡광

도를 측정 한 후 Brucella Agar에 50 μ l씩 넣어 plating 한 후 37 $^{\circ}$ C, 10% CO₂ incubator에서 4~5일간 배양 후 colony를 counting 함.

마. mouse in vivo

C57BL/6 마우스를 일주일에 이틀 간격으로 5x10⁸/ml의 *H. felis*를 200 μ l씩 경구투여 한 후 마지막 균을 투여한 다음날 각각 농도의 물질을 투여함. 물질을 10일과 20일 까지 투여를 하고 부검함. 부검시 위 조직을 떼어 절반은 histology를 확인하고 나머지 절반은 DNA를 추출. DNA용 위 조직을 DNA kit를 사용하여 DNA를 뽑은 후 95 $^{\circ}$ C 10min, 95 $^{\circ}$ C 15sec, 60 $^{\circ}$ C, 1min 으로 45cycle real-time PCR 돌림.

4. 연구수행 결과

가. *H. pylori* 에 대한 NANA와 700의 항균효과

(1) *H. pylori* P1WT, SS1 그리고 *H. felis* 세 가지 균주를 농도별로 처리된 NANA 에 함께 배양 후 시간별로 배양액의 흡광도를 측정하여 항균 능력을 평가하였다. G-NANA, S-NANA, 700 모두 농도 의존적으로 세 가지 균주에 대한 항균효과를 나타냈다. G-NANA 가 합성한 S-NANA 보다 항균효과 능력이 뛰어났으며 700 만으로도 항균효과를 내는 것을 확인할 수 있었다.

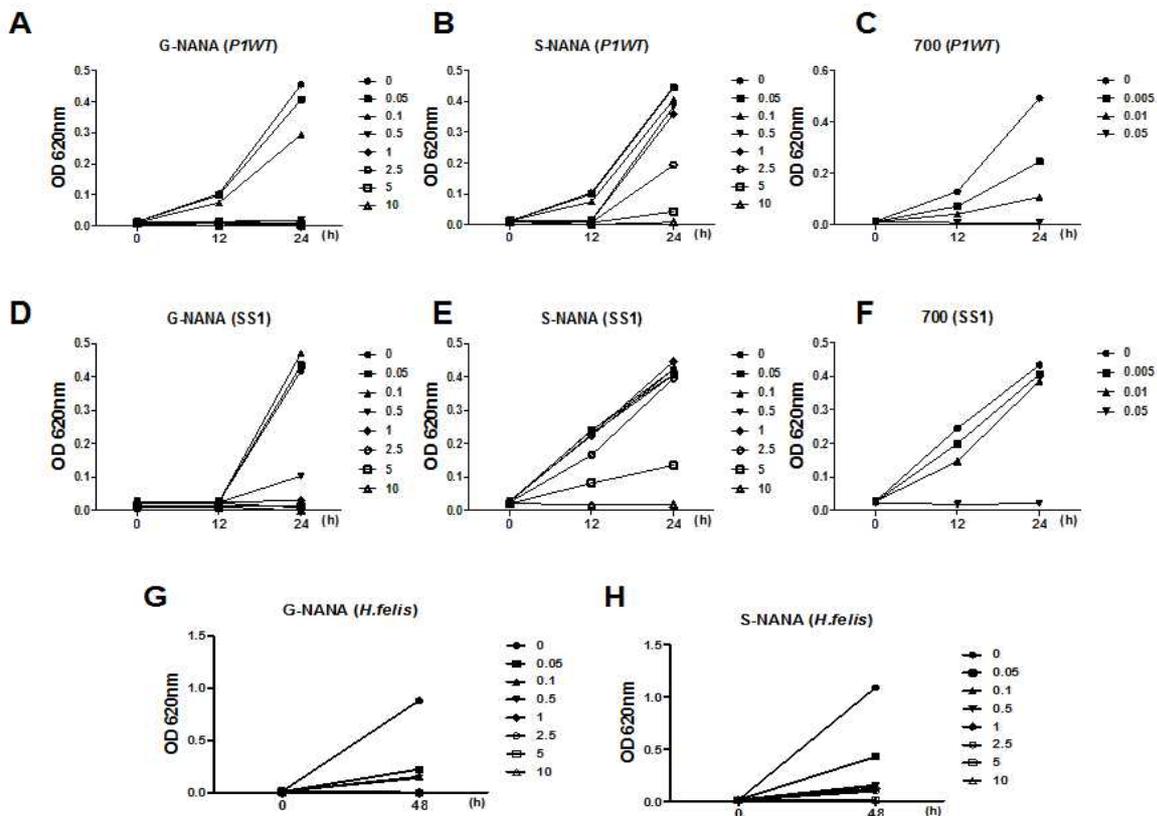


그림. NANA와 700을 각각 *H. pylori* strain P1WT (A-C), strain SS1 (D-F), 그리고 *H. felis* (G and H)와 함께 처리 후 표시된 시간에 따라 흡광도를 측정함

나. *H. pylori* 에 대한 NANA와 700의 항균효과 (CFU)

(1) *H. pylori* PIWT 과 SS1 두 가지 균주를 농도별로 처리된 NANA와 함께 24 시간 배양한 후 고형 배지에 다양한 희석배율로 접종하고 콜로니를 확인하여 CFU를 측정하였다. 앞서 확인하였던 NANA의 항균효과가 실질적으로 균을 사멸하여 효과를 나타낸 것인지 아니면 *H. pylori*의 증식을 억제한 것인지 알아보기 위해 CFU를 측정한 것이다.

그 결과 G-NANA, S-NANA 그리고 700 세 가지 물질 모두 적정 농도에서 *H. pylori* 균을 사멸시킴으로써 항균효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

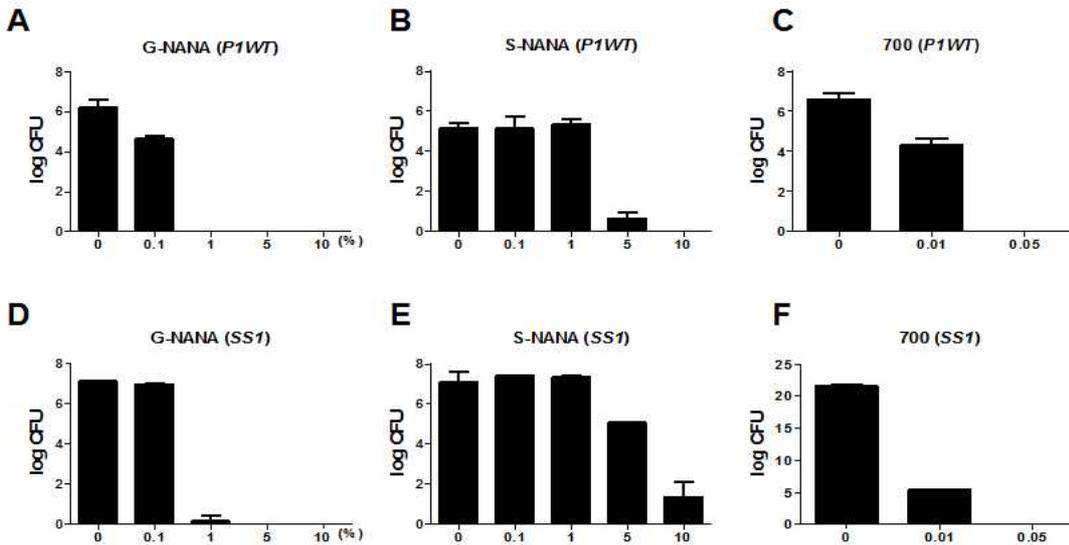


그림. NANA와 700을 각각 *H. pylori* PIWT과 함께 처리 한 후 CFU 측정(A-C), SS1을 함께 처리 후 CFU 측정 (D-F)

다. *H. pylori* 에 대한 NANA와 700의 항균 시너지 효과

(1) G-NANA 와 700 물질을 함께 처리하였을 때 항균효과의 synergy effect를 확인하기 위해 각각의 물질을 농도별로 혼합한 후 *H. pylori*와 함께 배양하여 24 시간 뒤 흡광도를 측정하였다. G-NANA와 700을 단독으로 처리하였을 때도 *H. pylori*에 대한 항균효과가 나타나지만 G-NANA와 700을 함께 혼합한 후 배양하면 그 효과가 훨씬 더 크게 나타나 항균효과의 synergy effect를 확인할 수 있었다.

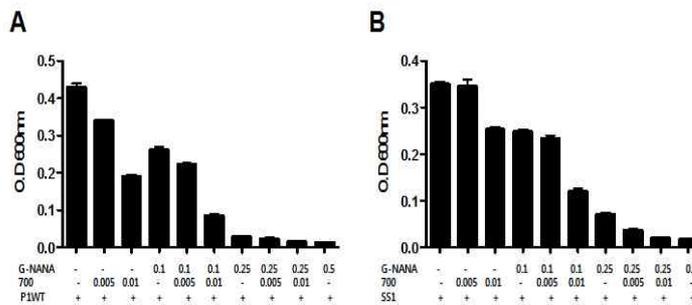


그림. G-NANA와 700을 혼합 한 후 PIWT에 대한 항균 시너지 효과(A), G-NANA와 700을 혼합한 후 SS1에 대한 항균 시너지 효과(B)

라. 위 상피세포 (AGS 세포)에서 *H. pylori* PIWT에 대한 NANA와 700의 항염효과

(1) AGS 세포에 G-NANA와 *H. pylori* PIWT를 처리 한 후 배양액에서 chemokines인 IL-8을 측정하여 항염효과를 평가하였다. 위 상피세포에 *H. pylori*를 감염시키면 cytokine IL-8이 생성되는 것은 기존 연구에 알려져 있다. 본 실험에서는 *H. pylori*에 의해 생성된 IL-8이 NANA와 700에 의해 항염효과를 나타내는지 확인해보았다. 그 결과 *H. pylori*에 의해 생성된 IL-8은 G-NANA에 의해 훨씬 더 많이 생성되었고, S-NANA나 700은 염증효과에는 관련이 없는 것을 알 수 있다.

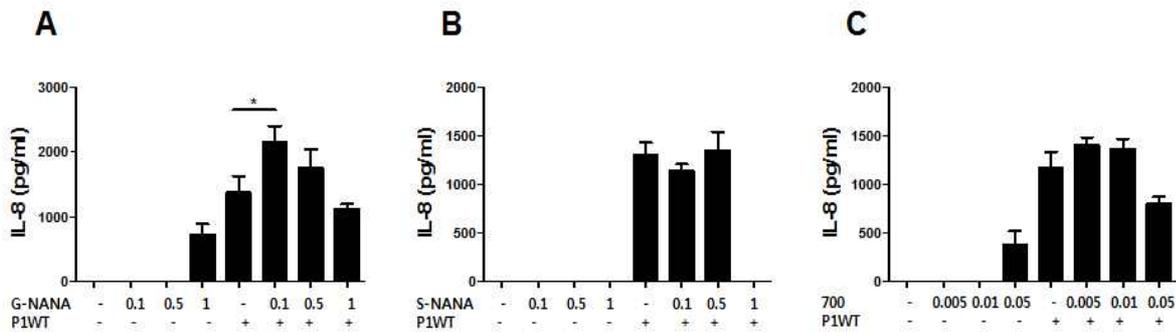


그림. 위 상피세포 AGS에 NANA와 700을 PIWT와 함께 처리 후 IL-8 생성

마. 골수 유래 대식세포에 대한 NANA의 cytokine 생성

(1) 골수 유래 대식세포를 배양하여 NANA를 처리 한 후 배양액에서 cytokine(IL-6)를 측정하였다. NANA를 처리하여 물질 자체만으로 염증을 유도하는 능력이 있는지를 확인해본 결과 G-NANA는 적정 농도에서 단독으로 cytokine을 생성하였고, S-NANA는 염증반응을 유도하지 않았다.

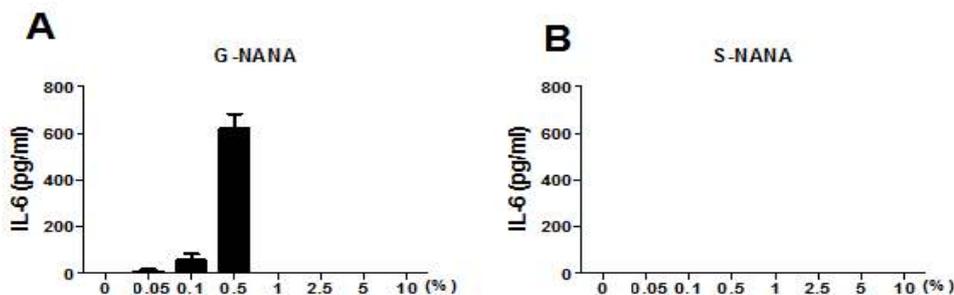


그림. 대식세포에서 G-NANA에 의한 IL-6 생성 (A), S-NANA에 의한 IL-6 생성(B)

바. 골수 유래 대식세포의 *Helicobacter pylori* PIWT에 대한 NANA의 cytokine 생성 시너지 효과

(1) 골수 유래 대식세포를 배양하여 NANA와 *H. pylori*를 함께 처리 한 후 생성되는 cytokien의 synergy effect를 확인하였다. 골수 유래 대식세포에 G-NANA와 *H. pylori*를 함께 처리하면 단독으로 생성했던 cytokine보다 훨씬 더 많은 cytokine을 생성하여 synergy effect를 나타내었고, S-NANA는 cytokine생성에는 관련이 없다.

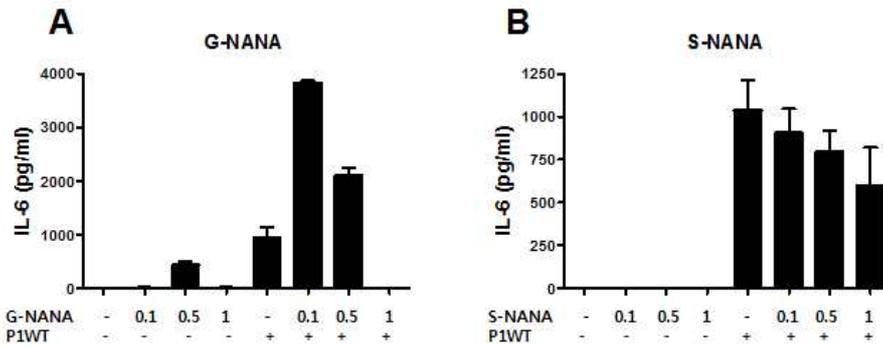


그림. 대식세포에서 G-NANA (A) 또는 S-NANA (B)와 *H. pylori* P1WT을 함께 처리 한 후 IL-6의 생성을 ELISA법으로 측정함

사. G-NANA의 LPS 오염 여부 확인

(1) 골수 유래 수지상 세포를 배양하여 NANA를 처리한 후 LPS contamination 여부를 확인하였다. 앞의 실험에서 G-NANA 자체로도 cytokine을 생성하는 것이 확인되어, 본 실험에서는 LPS와 binding 하여 LPS의 활성을 막는 Polymix B를 G-NANA와 S-NANA에 함께 처리 하여 물질의 LPS contamination 여부를 확인하였다. 그 결과 G-NANA는 PMB를 처리 하자 cytokine생성이 줄었고, S-NANA는 cytokine 생성에 아무런 영향이 없었다.

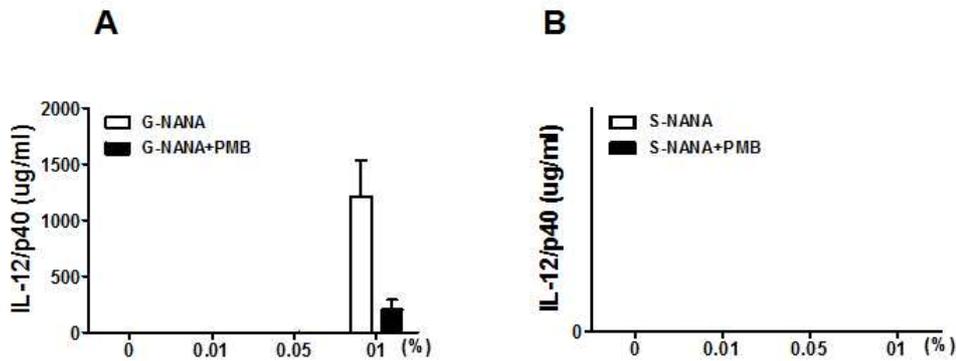


그림. 골수 유래 수지상세포에 NANA와 Polymix B를 함께 처리 후 IL-12/p40 생성 측정

아. *Helicobacter pylori felis* 감염 마우스 모델에서 NANA와 700에 의한 항균효과

(1) 마우스에 *H. felis* 와 NANA를 경구감염 시킨 후 마우스 위 조직에서 *H. felis*의 DNA를 획득하여 Real-time PCR로 *H. felis*를 정량화하였다. 감염 후 예방 차원에서 *H. felis* 와 G-ANNA 그리고 *H. felis*와 700을 함께 혼합하여 경구감염 시킨 후 1주일 후 마우스 위 조직에 남아있는 *H. felis*를 측정해 보았다. 그 결과 G-NANA 단독으로도 마우스 모델에서 항균효과를 나타내는 것을 볼 수 있다.

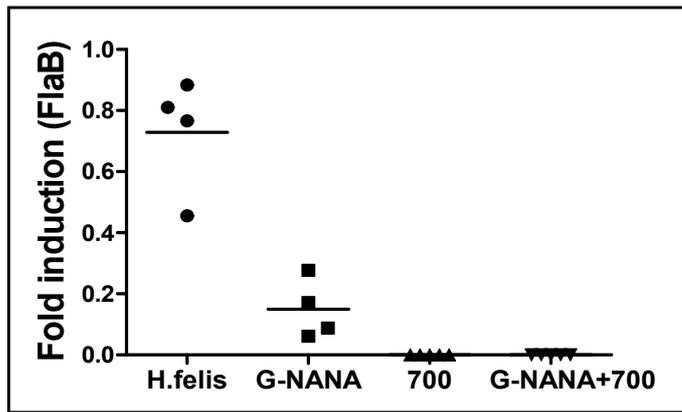


그림. *H. felis* 경구 감염시킨 마우스 모델 위 조직에서 잔존하는 *H. felis* 측정

자. *H. pylori*에 대한 GMP와 G-NANA의 항균효과

(1) *H. pylori* P1WT균주를 농도별로 처리된 GMP (분리되지 않은 NANA 7%) 및 G-NANA(순도 23.5%)와 함께 24 시간 배양한 후 고형 배지에 다양한 희석배율로 접종하고 콜로니를 확인하여 CFU를 측정하였다. NANA의 항균효과가 실질적으로 균을 사멸하여 효과를 나타낸 것인지 아니면 *H. pylori*의 증식을 억제한 것인지 알아보기 위해 CFU를 측정하였다. 그 결과 GMP는 G-NANA와 단백질 함량을 동일하게 하였을 때 *H. pylori* P1WT균을 사멸하는 효과가 없었으며, G-NANA와 동일한 NANA함량을 사용하였을 시 8%를 첨가한 것에서 미약하게 항균효과를 나타내었으나, G-NANA의 경우 0.1% 농도에서 부터 *H. pylori* 균을 사멸시킴으로써 탁월한 항균효과를 나타내는 것을 확인하였다.

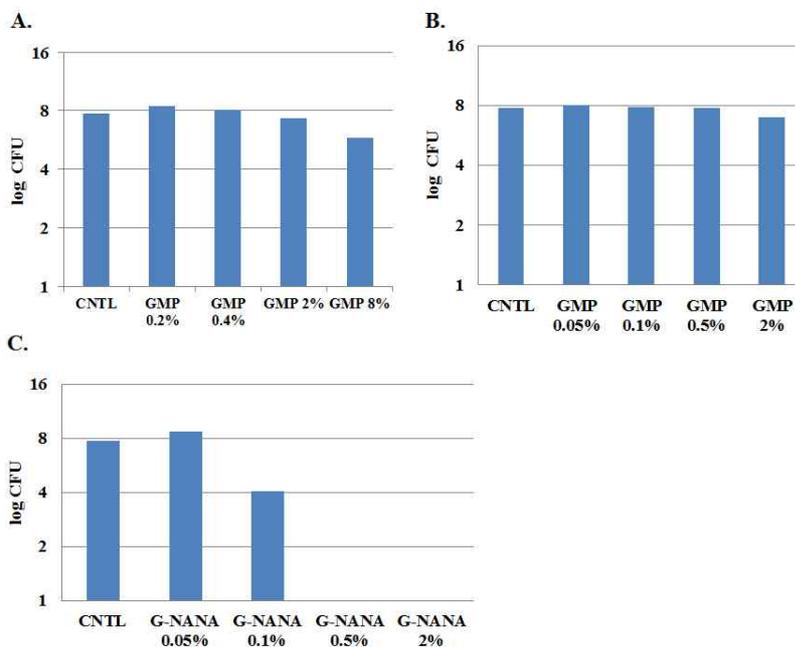


그림. GMP와 G-NANA(순도 23.5%)의 항균활성 비교. A)G-NANA와 효소에 의해 분리되지 않은 GMP 내 NANA 함량 동일화한 GMP 농도별, B)G-NANA와 동일한 단백질 함량의 GMP 농도별, C)농도별 G-NANA

차. *H. pylori* 에 대한 G-NANA와 합성된 S-NANA의 항균효과

(1) *H. pylori* P1WT, SS1 그리고 *H. felis* 세 가지 균주를 농도별로 처리된 NANA 에 함께 배양 후 시간별로 배양액의 흡광도를 측정하여 항균 능력을 평가하였다. G-NANA(순도 23.5%), S-NANA(순도 98%) 모두 농도 의존적으로 세 가지 균주에 대한 항균효과를 나타냈다. G-NANA(순도 23.5%)가 합성한 S-NANA(순도 98%) 보다 탁월한 항균능력을 보였다.

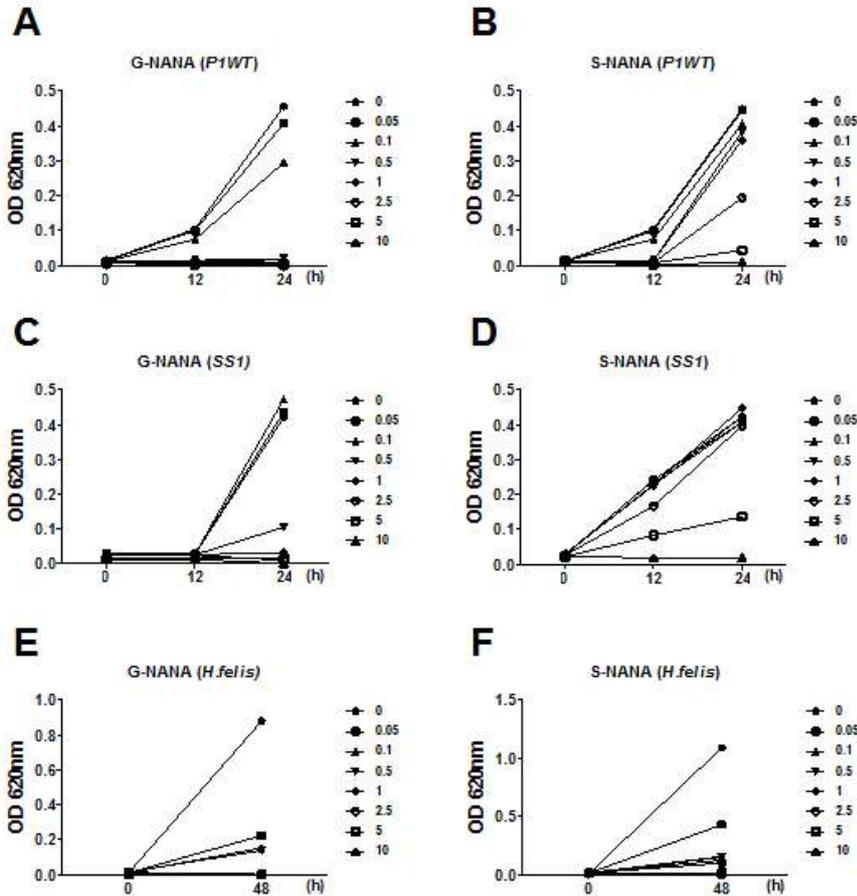


그림 . NANA를 각각 *H. pylori* strain P1WT (A & B), strain SS1 (C & D), 그리고 *H. felis* (E & F)와 함께 처리 후 표시된 시간 따른 항균 효과

타. *H. pylori felis* 감염 마우스 모델에서 NANA의 항균 예방 효과

(1) C57/BL6 마우스에 1일부터 7일까지 G-NANA(순도 23.5%)를 계속 먹이고 1, 3, 5일째 G-NANA와 felis를 함께 먹인 후 마지막으로 먹인 7일부터 1주일 후 부검하여 위조직에서 DNA를 분리하여 real-time PCR로 felis 잔존 여부를 수치적으로 정량화한 것으로 대조군에 비해서 G-NANA(순도 23.5%)를 먹인 군에서 항균 예방 효과가 탁월하다는 것을 보였다.

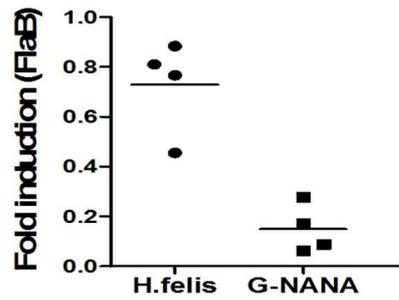


그림. *H. felis* 경구감염에 따른 G-NANA(순도 23.5%)에 의한 예방효과

파. *Helicobacter pylori felis* 감염 마우스 모델에서 NANA에 의한 치료적 항균효과

(1) 마우스에 *H. felis*를 경구감염 시킨 후 감염 후 치료효과를 확인해 보기 위해 G-NANA를 10일과 20일 동안 단독 투여하였다. 그 뒤 마우스 위 조직에서 *H. felis*의 DNA를 획득하여 Real-time PCR로 *H. felis*를 정량화하였다. 10일과 20일 동안 G-NANA(순도 23.5%)를 투여한 결과 G-NANA 농도 의존적으로 위조직에 잔존하는 *H. felis*의 양이 줄어들어 *H. felis*에 감염된 후 투여된 G-NANA는 위에 잔존하고 있는 *H.felis*를 사멸하는 항균효과를 나타냄을 확인함.

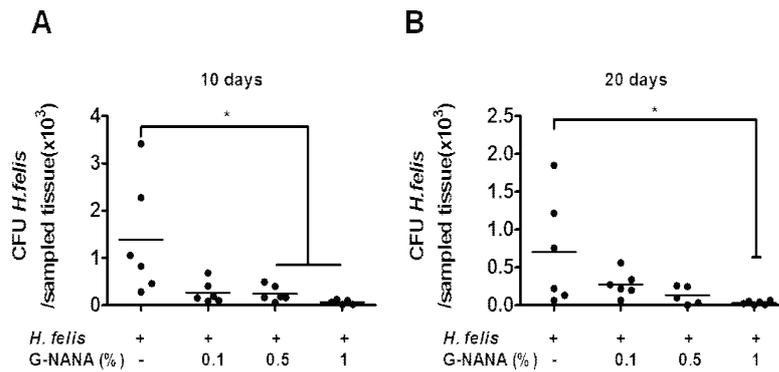


그림. *H. felis* 경구 감염 후 G-NANA에 의한 치료효과

5. 양산시제 G-NANA(7%)의 헬리코박터에 대한 항균성 평가

가. 목적

*Helicobacter pylori*의 시간별 항균성 평가

*Helicobacter pylori*의 사멸률 확인

나. 재료 및 방법

(1) Brucella agar, broth 및 Sialic acid을 만들기 위한 시료 준비

(가) 재료 : Brucella agar, Brucella broth용액(Brucella agar-BD 211086, Brucella broth-BD 211088), 증류수, G-NANA

(나) Brucella agar, broth 조성액 Scheme

① 1L bottle에 DW 810ml에 Brucella agar 38.43g, DW 270ml에 Brucella broth 7.56 넣고 용해

② Autoclave로 121℃ 에서 15분간 멸균

③ 온도가 내려간 후 FBS 10% , 항생제 3종(vancomycin, trimethoprim, nystatin) 0.1% 첨가

④ Brucella agar는 10ml petri dish에 분주, brucella broth는 식혀서 사용

⑤ S-NANA, G-NANA는 brucella broth에 농도별로 용해

(다) 액체배양 한 균 준비

(라) 농도별 S-NANA, G-NANA에 *Helicobacter pylori* (P12WT) 분주

① broth에 녹인 S-NANA, G-NANA는 2ml씩 분주, *Helicobacter pylori*는 50μl씩 분주

② 균을 넣지 않고 broth에 녹인 S-NANA, G-NANA도 농도별로 각각 분주

(마) OD값 측정(0hr, 24hr)

① 600nm에서 3반복으로 ELISA를 이용하여 측정

② S-NANA 및 G-NANA에 각각 균이 들어간 OD값에서 S-NANA, G-NANA만 들어간 OD값을 빼서 data정리

(사) 도말

① 균의 사멸률을 확인하기 위해 brucella agar에 0hr, 24hr 모두 50μl씩 도말하여 균 수 확인

다. 결과

(1) S-NANA는 0.5% 부터 항균성 나타남

(2) 양산 시제 G-NANA(6.58%)는 0.5% 이상에서부터 항균성 나타남

표. 실험실제조 G-NANA(28.9%) 및 양산시제 G-NANA(6.58%)에 대한 시간별 *H.pylori*(P12WT)의 OD측정

시험구		OD(600nm)	
		0시간	24시간
CNTL		0.012	0.139
대조구	SNANA 0.05%	0.015	0.157
	SNANA 0.1%	0.010	0.146
	SNANA 0.5%	0.010	0.013
	SNANA 2%	0.022	0.019
실험실제조 공정 (G-NANA : 28.9%)	G-NANA 0.05%	0.012	0.349
	G-NANA 0.1%	0.011	0.353
	G-NANA 0.5%	0.011	0.140
	G-NANA 2%	0.012	0.008
대량양산시제 (G-NANA : 6.58%)	G-NANA 0.05%	0.013	0.254
	G-NANA 0.1%	0.015	0.272
	G-NANA 0.5%	0.017	0.099
	G-NANA 2%	0.012	0.007

표. 실험실제조 G-NANA(28.9%) 및 양산시제 G-NANA(6.58%)에 대한 시간별 *H.pylori*(P12 WT)의 균수 확인(CFU/ml)

시험구		생존균수(CFU/ml)	
		0시간	24시간
CNTL		2.64×10^7	2.14×10^8
대조구	SNANA 0.05%	2.64×10^7	1.32×10^8
	SNANA 0.1%	2.64×10^7	1.44×10^8
	SNANA 0.5%	2.64×10^7	1.8×10^4
	SNANA 2%	2.64×10^7	0
실험실제조 공정 (G-NANA : 28.9%)	G-NANA 0.05%	2.64×10^7	8.5×10^8
	G-NANA 0.1%	2.64×10^7	6.24×10^8
	G-NANA 0.5%	2.64×10^7	8.52×10^7
	G-NANA 2%	2.64×10^7	5.86×10^4
대량양산시제 (G-NANA : 6.58%)	G-NANA 0.05%	2.64×10^7	2.98×10^8
	G-NANA 0.1%	2.64×10^7	3.14×10^8
	G-NANA 0.5%	2.64×10^7	6.34×10^7
	G-NANA 2%	2.64×10^7	4.0×10^3

표. 실험실제조 G-NANA(28.9%) 및 양산시제 G-NANA(6.58%)에 대한 시간별 *H.pylori*(KCCM 40449)의 OD측정

시험구		OD(600nm)	
		0시간	24시간
CNTL		0.007	0.073
대조구	SNANA 0.05%	0.006	0.076
	SNANA 0.1%	0.004	0.067
	SNANA 0.5%	0.004	0.009
	SNANA 2%	0.016	0.006
실험실제조 공정 (G-NANA : 28.9%)	G-NANA 0.05%	0.004	0.120
	G-NANA 0.1%	0.004	0.126
	G-NANA 0.5%	0.005	0.060
	G-NANA 2%	0.006	0.003
대량양산시제 (G-NANA : 6.58%)	G-NANA 0.05%	0.003	0.078
	G-NANA 0.1%	0.006	0.097
	G-NANA 0.5%	0.009	0.036
	G-NANA 2%	0.004	0.003

표. 실험실제조 G-NANA(28.9%) 및 양산시제 G-NANA(6.58%)에 대한 시간별 *H.pylori*(KCCM 40449)의 군수 확인(CFU/ml)

시험구		생존군수(CFU/ml)	
		0시간	24시간
CNTL		3.8×10^7	1.04×10^8
대조구	SNANA 0.05%	3.8×10^7	3.08×10^8
	SNANA 0.1%	3.8×10^7	1.66×10^8
	SNANA 0.5%	3.8×10^7	1.42×10^5
	SNANA 2%	3.8×10^7	0
실험실제조 공정 (G-NANA : 28.9%)	G-NANA 0.05%	3.8×10^7	1.56×10^8
	G-NANA 0.1%	3.8×10^7	4.04×10^7
	G-NANA 0.5%	3.8×10^7	1.92×10^7
	G-NANA 2%	3.8×10^7	4.78×10^4
대량양산시제 (G-NANA : 6.58%)	G-NANA 0.05%	3.8×10^7	1.66×10^8
	G-NANA 0.1%	3.8×10^7	2.12×10^8
	G-NANA 0.5%	3.8×10^7	4.28×10^7
	G-NANA 2%	3.8×10^7	0

라. 결론

- 실험실제조 G-NANA(28.9%) 및 양산시제 G-NANA(6.58%)는 NANA의 함량을 동일하게 했을 때 같은 농도에서 항균성을 나타냄

제 8절 개발 G-NANA 및 유기태화 미네랄의 면역증강효과 평가

1. G-NANA의 세포독성 평가

가. 연구목표

NANA는 우리 몸 속의 수용기의 인지, 신경 신호전달 등에 역할을 하며, 뇌의 ganglioside의 구조와 기능에 역할을 하는 구성 물질이고, 뇌의 발달과 인지능력에 중요한 역할을 하는 등 다기능성을 보유하고 있다고 보고가 되고 있음에 따라, 본 실험에서는 면역에 미치는 효능을 in vitro조건에서 검정하였다.

이를 위하여, 대조시약 대비 합성 NANA(이하 S-NANA)와 개발 우유유래 NANA(이하 G-NANA)를 시료로 하여 표준세포주를 이용한 세포독성(MTT평가) 및 염증관련 평가를 통한 독성평가와 염증저하와 세포활성 등의 연계를 통한 G-NANA의 효능을 평가하였다.

최종적으로, G-NANA의 실험실적 효능은 추후 암식이 개발과 헬리코박터 제어효능을 평가하기 위한 기초결과로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

나. 연구수행방법

본 연구에서는 개발 G-NANA의 추후 암식이 개발과 헬리코박터 제어 제품개발에 관련하여 기초 결과를 확보하기 위해, 세포 독성평가를 실시하였으며 관련된 수행방법은 다음과 같다.

(1) 세포배양 및 NANA처리

표준세포주는 mouse RAW 264.7 macrophage(이하 대식세포)를 사용하였으며 세포배양은 10% fetal bovine serum(이하 FBS)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(10mL penicillin-streptomycin, 2mg/L gentamicin)을 사용하여 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 배양하였다.

NANA의 처리농도는 6개 농도(NANA 0%(대조군), 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0%, 1.25%)로 나누어 평가하였으며 측정시간은 24 및 48시간 경과 시 각각 측정하였다.

(2) 세포독성 평가(MTT평가)

세포독성 평가는 tetrazolium-based colorimetric (MTT) 검색법을 사용하였으며 분석방법은 배양중인 세포(5×10^5 cells/mL)에 NANA를 각 농도별로 처리한 후 37°C에서 24시간과 48시간 경과 시, plate의 배지를 제거하고 PBS로 씻어낸 뒤, MTT solution(0.5ug/mL)을 100ul씩 세포에 처리해준 후 배양기에서 4시간 배양하였다. 배지를 모두 제거 후 DMSO를 동량 넣어 반응시킨 후, microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 결과 값은 NANA 0%(대조군)를 기준으로 대조군 대비 %로 표기하였다.

다. 결과

(1) 세포독성 평가(MTT평가)

본 실험에서는 현장실험(동물 및 인체유효성)전 세포독성에 미치는 효능을 in vitro조건에서 검정하였는데, 대조시약 대비 합성 S-NANA와 개발 우유유래 G-NANA가 표준세포주에 대하여 농도별 처리에 따른 세포독성(MTT) 평가결과는 다음과 같다.

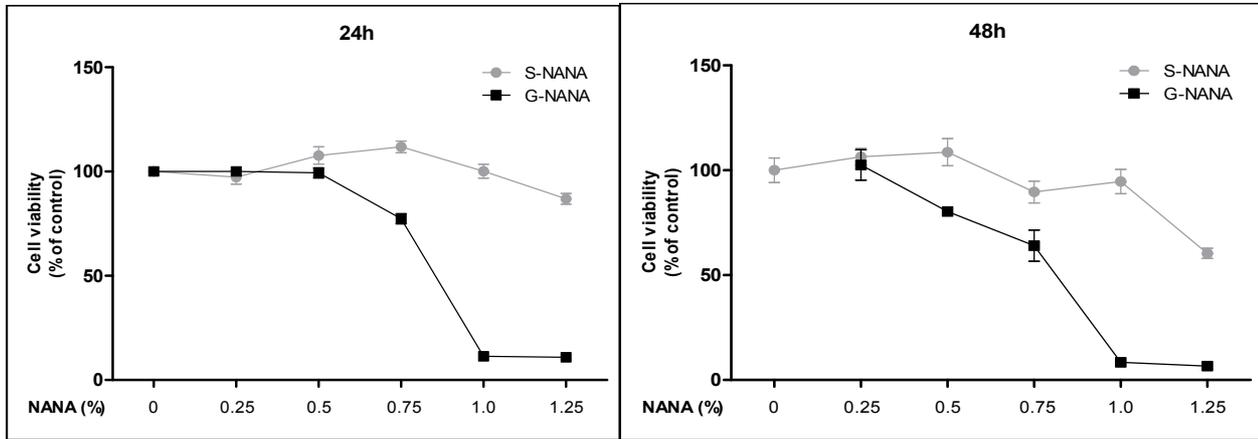


그림 . 대조시약 대비 S-NANA와 G-NANA를 시료로 하여 표준세포주(RAW 264.7 macrophage) 이용한 소재별 농도 및 시간별 세포독성(MTT) 평가결과.

NANA; N-acylneuraminic acid, S-NANA; synthetic N-acylneuraminic acid, G-NANA; N-acylneuraminic acid isolates from glycomacropeptide.

결과로서, S-NANA 및 G-NANA의 농도별 및 시간 결과에 따른 표준세포주에 있어 독성이 관찰되는 농도범위는 24시간 접촉 시 0.75%(w/v)이상에서 그리고 48시간이 경과 시는 0.5%(w/v)이상의 농도에서 독성이 관찰되었는데, 이는 G-NANA가 표준세포주에 있어 0.5%이상의 농도에서 독성발현을 유도하는 것으로 관찰되었다.

본 연구의 목적이 S-NANA와 비교 시 G-NANA가 세포독성에 미치는 효과를 평가함으로써 안전성을 평가하는 목적이 주요 평가목표임에 따라 대조시료인 S-NANA와 G-NANA와의 독성평가를 세세히 살펴보았더니, S-NANA는 24시간 접촉 시 0.75%(w/v)내에서 세포독성이 관찰되지 않았고, 48시간 경과 시에는 1.25%이상에서 세포 독성이 관찰되었다. 이와 비교 시 G-NANA의 경우는 24시간째에 0.25%(w/v) 그리고 48시간이 경과 시는 0.5%(w/v) 농도이상에서 독성이 발현되었다. 결과적으로 대조시료인 S-NANA와 비교 시 G-NANA는 S-NANA에 비하여 0.5%(24시간 기준)에서 0.75%(48시간) 범위에서 독성이 나타났으며 최대 20%의 독성이 있는 것으로 평가되었다.

이러한 결과는 표준세포주를 기준으로 평가 시 G-NANA의 안전성에 있어 최대 안전성에 관여하는 농도가 0.5%임을 감안할 때, 추후 연계되는 항균성(*Helicobacter pylori* 등), 동물 및 인체유효성 평가 등의 in vivo 검정 시 적용과 관련한 기본첨가 농도를 0.5%로 확정함과 동시에 관련 협동연구기관의 연구개시를 기초결과로 공여하였다.

2. G-NANA의 면역활성 평가

가. 연구목표

NANA는 다기능성(면역, 염증, 항균, 항바이러스 등)을 보유하고 있다고 보고가 되고 있음에 따라, 본 실험에서는 현장실험(동물 및 인체유효성)전 면역에 미치는 효능을 in vitro조건에서 검정코자 하였다.

이를 위하여, 대조시약 대비 합성 NANA(이하 S-NANA)와 개발 우유유래 NANA(이하 G-NANA)를 시료로 하여 표준세포주를 이용한 세포독성(MTT평가) 및 염증관련 평가를 통한 독성평가와 염증저하와 세포활성 등의 연계를 통한 G-NANA의 안전성 등의 효능을 평가하였다.

최종적으로, G-NANA의 실험실적 효능은 추후 암식이 개발과 헬리코박터 제어효능을 평가하기 위한 기초결과로 활용코 저 본 연구를 수행하였다.

나. 연구수행방법

본 연구에서는 개발 G-NANA의 제품화에 있어, 사전 면역활성과 관련하여 기초예비 결과를 확인하므로서, 추후 in vivo검정에 있어 사전효능평가를 실시하였으며, 관련한 수행방법은 다음과 같다.

(1) 시료준비

기존의 개발 우유유래 NANA 생산기법으로 제도된 G-NANA로서, 오염균 감염에 따른 LPS 보유 가능성이 평가(건양대 결과)된 NANA(이하 OG-NANAN)와 무균상태에서 오염균 감염없이 제조한 NANA는 새로운 제조공정(3장 Fig. 5.)으로 GMP로부터 개발 우유유래 NANA(이하 NG-NANA)를 검정시료로 사용하였으며, 대조시약은 합성 NANA(이하 S-NANA)를 사용하였다.

(2) IL-6 분비량 평가

IL-6(interleukin 6, 이하 IL-6)를 측정하기 위하여 24well-plate에 RAW 264.7 대식세포를 5×10^5 cells/mL로 분주하고, 100ng/mL LPS(Lipopolysaccharide)와 함께 농도별 NANA를 동시에 처리한 다음, 24시간 동안 배양기에서 배양하였고, 배양액을 수거하여 -20°C 에서 보관하였다. IL-6는 ELISA Kit(R&D bio, CA, USA)의 manufacturer's instruction에 따라 측정하였다.

(3) Nitric Oxide 생성량 평가

LPS에 의해 생성되는 NO의 양은 세포배양액에 존재하는 NO_2^- 의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 대식세포를 5×10^5 cells/mL이 되도록 24well-plate에 분주한 다음 LPS (100ng/mL)와 함께 NANA를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포배양액과 Griess reagent를 1:1로 혼합하여 37°C 에서 10분간 상온에서 반응시킨 후 microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도

값을 측정하였으며, NO₂⁻의 농도는 NaNO₂로 검량선을 그려 uM값으로 환산하여 나타냈다.

(4) 세포 생존율 평가(MTT)

RAW 264.7 대식세포를 24well-plate에 5×10⁵cells/well이 되도록 분주한 다음, NANA를 농도 별로 처리하여 37℃, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 세포에 0.5mg/mL의 MTT용액(Sigma, St, Louis, Mo, USA)을 100uL를 처리하고 4시간 동안 배양한 후, 배지를 제거 하고 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 microplate reader를 이용하여 570nm에서 흡광 도를 측정하였다. 결과 값은 NANA 0%(대조군)를 기준으로 대조군 대비 %로 표기하였다.

다. 결과

본 연구에서는 개발 G-NANA의 제품화에 있어, 사전 면역활성과 관련하여 기초예비 결과를 확인함으로써, 추후 in vivo검정에 있어 사전효능평가를 실시하였으며, 관련한 결과는 다음과 같다.

(1) IL-6 분비량 평가

IL-6는 염증 유발 시 생성되는 여러 세포들을 자극하는 염증성 사이토카인을 분비시키는 대표적인 염증성 물질이며, T림프구와 대식세포에서 분비되는 활성인자로, B림프구를 자극 하여 활성화시키는 역할을 함과 동시에 여러 염증반응을 촉진한다. 염증유발 물질 (대표적 인 LPS)은 IL-6 과잉 생산을 유발하고 이러한 과잉생산을 여러 가지 면역이상증과 염증성 질환 같은 반응을 유발시킨다고 알려져 있다. 이를 위하여 대조시약 대비 합성 S-NANA와 개발 우유유래 NANA가 염증유발 인자(LPS)에 의한 농도별 처리에 따른 IL-6 분비 평가결과는 다음과 같다.

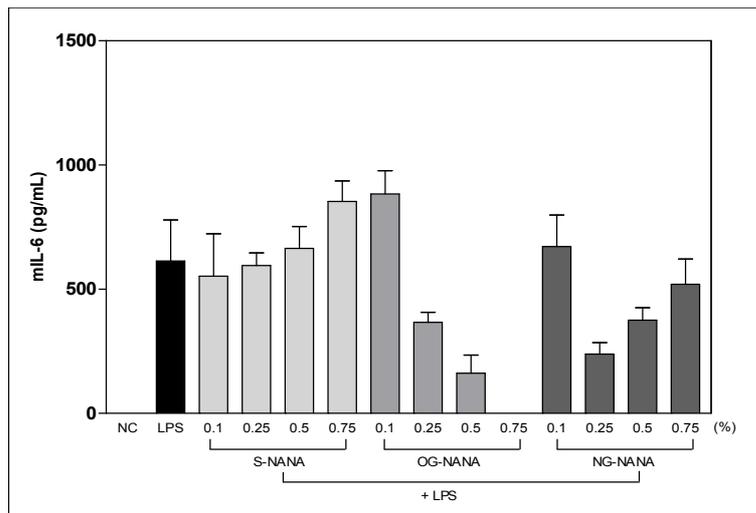


그림. NANA의 소재별 및 농도별 LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 IL-6 생성 억제능 평가결과.

NANA; N-acylneuraminic acid, S-NANA; synthetic N-acylneuraminic acid, OG-NANA; old sample of N-acylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, NG-NANA; new sample of

N-acetylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, LPS; lipopolysaccharide, mL-6; mouse interleukin-6.

본 연구의 목적이 대조시약 S-NANA와 비교 시 G-NANA의 염증(LPS)으로 유도된 염증성 사이토카인인 IL-6의 분비능을 평가함으로서 G-NANA의 면역활성을 평가하는 목적이 주요 목적임에 따라 소재별 NANA에 LPS와 함께 처리하여 배양액으로부터 IL-6의 분비량을 측정하여 IL-6의 평가를 살펴보았더니, S-NANA는 0.5%(w/v)내에서 IL-6분비량의 변화가 관찰되지 않았다. 이와 비교 시 개발 우유유래 NANA를 관찰하였을 때, OG-NANA는 0.25%이상 0.5%이내의 농도범위에서 IL-6의 분비량 저감효과가 나타났는데, 0.75%에서는 IL-6의 저감효과는 세포독성에 의한 결과일 것으로 추정한다. 또한 NG-NANA에서는 OG-NANA와 같은 0.25%이상 0.5%이내에서 IL-6생성 저감효과가 있는 것으로 평가되었으나 농도의존적인 경향은 관찰되지 않았다.

이러한 결과는 대식세포에서 염증유발로 증가된 IL-6를 제어하는 G-NANA의 농도설정에 있어 최적 농도가 0.25%이며, 이는 G-NANA의 안전성에 있어 최대 안전성에 관여하는 농도가 0.5%임을 감안할 때, 세포 독성이 관여하지 않는 범위이며 염증성 물질로 인한 과잉 IL-6의 분비를 제어할 수 있는 농도로 확인하였다. 이는 추후 연계되는 동물유효성 평가 검증 시 면역활성을 보이는 농도를 0.25%로 확정할 수 있는 기초결과로 제공한다.

(2) Nitric Oxide 생성량 평가

Nitric oxide (이하, NO)는 염증 반응이 유발될 경우 분비되는 대표적인 염증 물질이다. 실험에 사용된 LPS는 대표적인 염증 유발 물질로서 NO생성을 유발시킨다. 본 실험에서는 대조시약 대비 합성 S-NANA와 개발 우유유래 NANA가 염증유발 인자(LPS)에 의한 농도별 처리에 따른 NO 분비 평가결과를 IL-6분비평가 방법과 동일한 과정으로 확인하였으며, 실험결과는 다음과 같다.

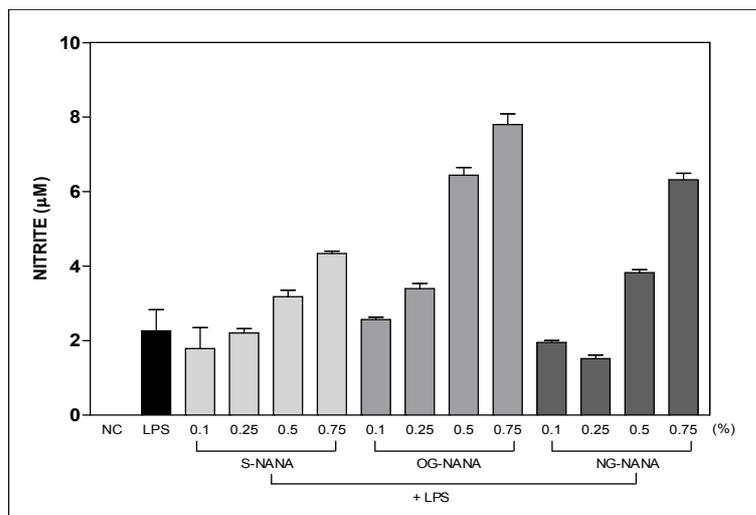


Fig. 2. NANA의 소재별 및 농도별 LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 NO 생성 억제능 평가결과.

NANA; N-acylneuraminic acid, S-NANA; synthetic N-acylneuraminic acid, OG-NANA; old sample of N-acylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, NG-NANA; new sample of N-acylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, LPS; lipopolysaccharide.

본 연구는 표준세포주에서 염증유발로 인한 염증성 인자의 분비에 대하여 G-NANA의 면역활성을 평가함을 목적으로 대조시약 S-NANA와 비교하여 평가하기 위해, 소재별 NANA에 염증유발물질 LPS와 함께 처리하여 배양액으로부터 NO의 생성량을 측정하였다.

이러한 결과는 대식세포에서 LPS로 유도된 NO생성을 제어하는 G-NANA의 농도설정에 있어 최적 농도가 0.25%이며, 이는 G-NANA의 안전성에 있어 최대 안전성에 관여하는 농도가 0.5%임을 감안할 때, 세포 독성이 관여하지 않는 범위이며 염증성 물질로 인한 과잉의 NO생성을 제어할 수 있는 농도로 확인하였다.

(3) 세포 생존을 평가(MTT평가)

본 실험에서는 in vitro 수준 내에서 염증유발 인자로 인한 G-NANA의 면역활성을 in vitro 조건에서 검정하는데, 세포 안전성 평가를 위하여 대조시약 대비 합성 S-NANA와 개발 우유유래 G-NANA가 대식세포에 대하여 농도별 처리에 따른 세포독성 평가 결과는 다음과 같다.

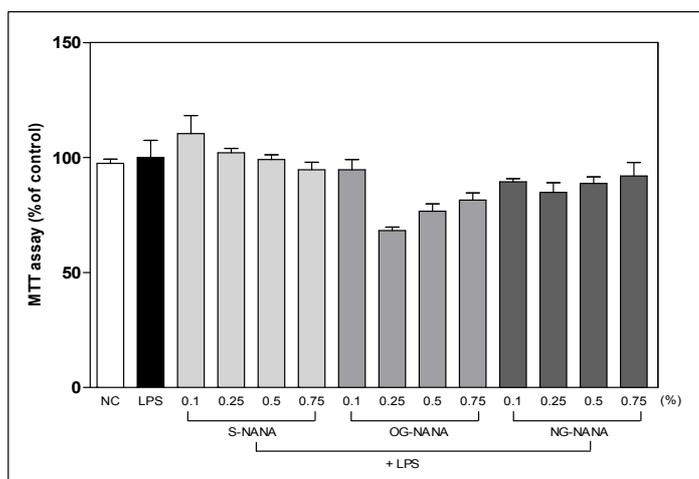


그림. NANA의 소재별 및 농도별 LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 세포독성(MTT) 평가결과.

NANA; N-acylneuraminic acid, S-NANA; synthetic N-acylneuraminic acid, OG-NANA; old sample of N-acylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, NG-NANA; new sample of N-acylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide, LPS; lipopolysaccharide, MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide.

결과로서, S-NANA 및 G-NANA의 농도에 따른 대식세포에 있어 독성이 관찰되는 농도범위는 OG-NANA는 0.25%이상에서 관찰되었다. 반면, NG-NANA는 최대 0.75%에서 세포독성을 나타내지 않았다. 이와 비교하여 비교대조 S-NANA는 LPS로 유발된 환경조건에서도 최

대 0.75%에서 세포독성을 나타내지 않았다. 이는 OG-NANA의 경우, 이전 생산경로 및 보관상태에서 다른 세균의 혼입으로 인한 세포독성이 관찰되는 것으로 예상된다.

3. 항암면역강화형 개발소재에 대한 동물시험평가

가. G-NANA의 면역기능향상을 위한 최적농도 결정

(1) 동물모델에서 면역 기능이 향상되는 기능성 바이오소재 최적의 농도 산출

(가) G-NANA, S-NANA의 최적 농도 산출

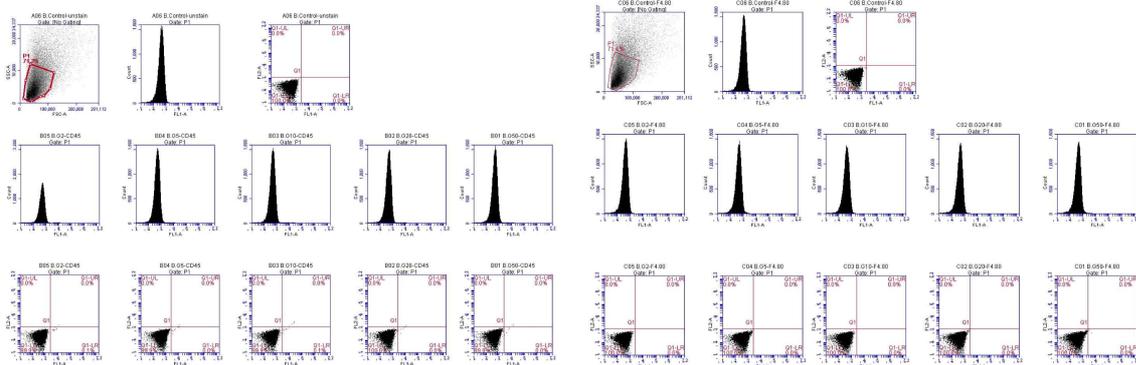
① 연구방법: 동물모델에서 G-NANA를 mouse(20g)당 2, 5, 10, 20, 50 mg 농도로 대조군과 같이 한 그룹당 마우스 3마리를 대상으로 약 6주간 경구 투여를 하였다. 시료는 물에 녹여 1회 투여 시 200ul/mouse 정도를 투여하였으며 음성대조군은 물만 투여하였고, 양성대조군으로 S-NANA를 G-NANA와 동일량으로 투여하였다. (이때 S-NANA의 투여량은 G-NANA에 포함된 NANA함량에 비해 약 4.5배 정도 과도한 양이었다.)

6주후에 각각의 마우스에서 혈액과 lymph node를 적출하여 면역과 관련된 leukocyte, Macrophage, T-cell, Neutrophil의 증가를 FACS 방법으로 분석하였다.

이 때 사용한 마커로는 CD45, F4/80, CD8, Ly6G와 같은 마커를 사용하였다.

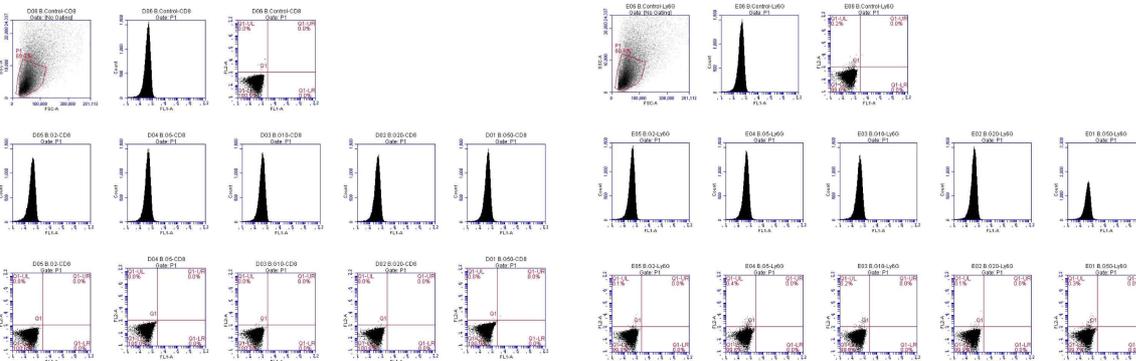
◎ In circulating blood

-G-NANA



G-NANA blood CD45 (Leukocyte)

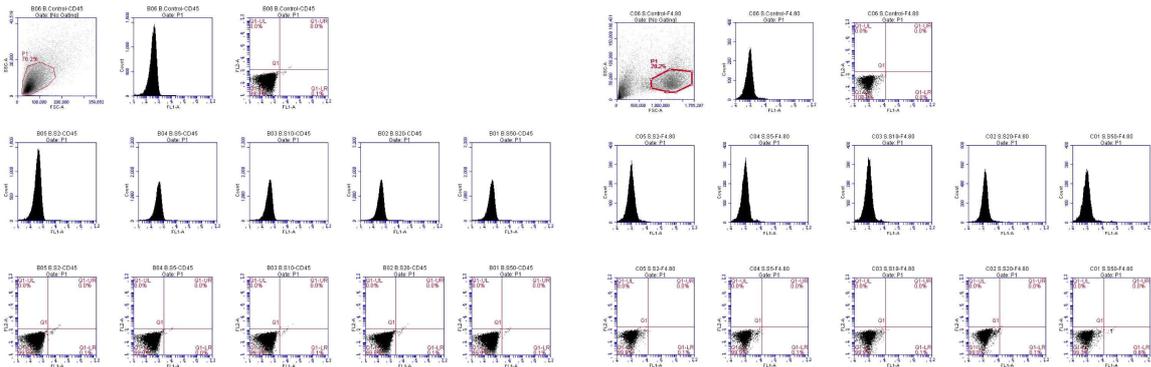
G-NANA blood F4/80 (Macrophage)



G-NANA blood CD8 (T-cells)

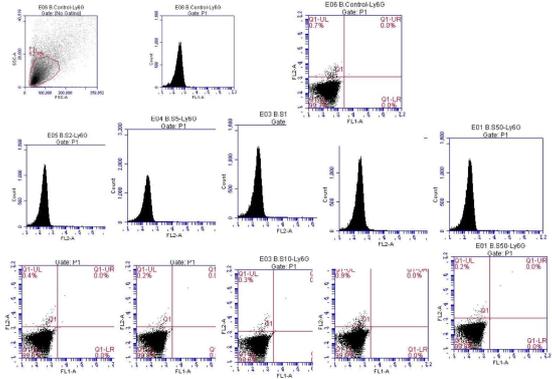
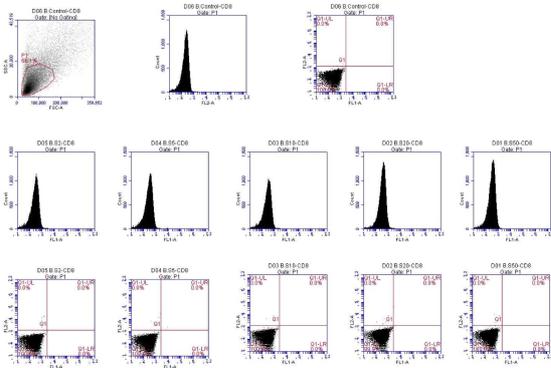
G-NANA blood Ly6G (Neutrophil)

-S-NANA



S-NANA blood CD45 (Leukocyte)

S-NANA blood F4/80 (Macrophage)



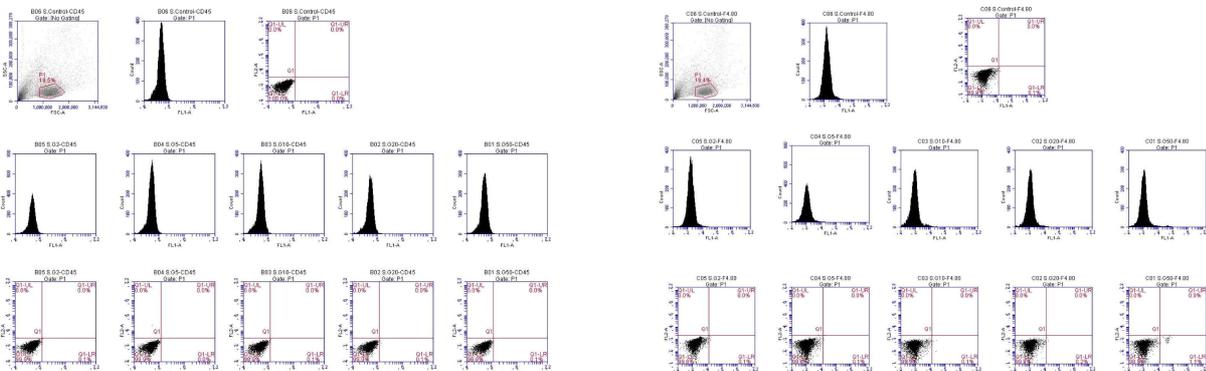
S-NANA blood CD8 (T-cell)

S-NANA blood Ly6G (Neutrophil)

- 연구결과: 양성대조군인 S-NANA와 시험물질인 G-NANA의 경우, 동일하게 circulating blood에서는 면역세포의 수적인 증가가 발견되지 않았다.

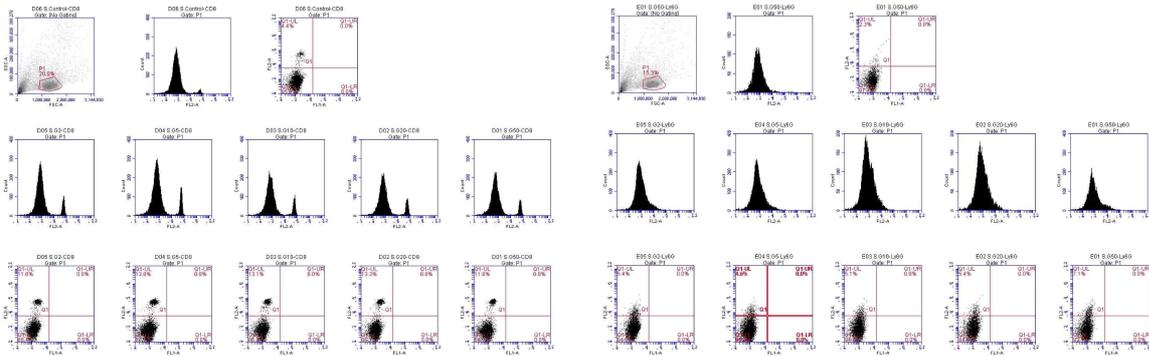
◎ In lymph node

-G-NANA



G-NANA lymph node CD45 (Leukocyte)

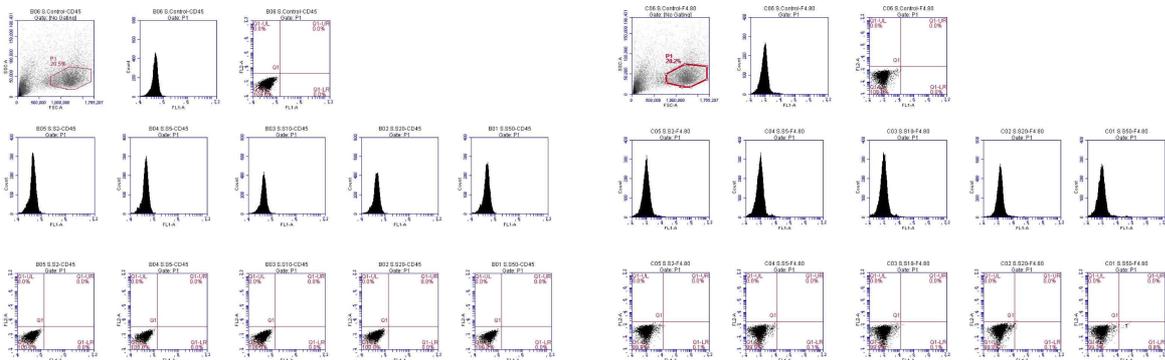
G-NANA lymph node F4/80 (Macrophage)



G-NANA Lymph node CD8 (T-cells)

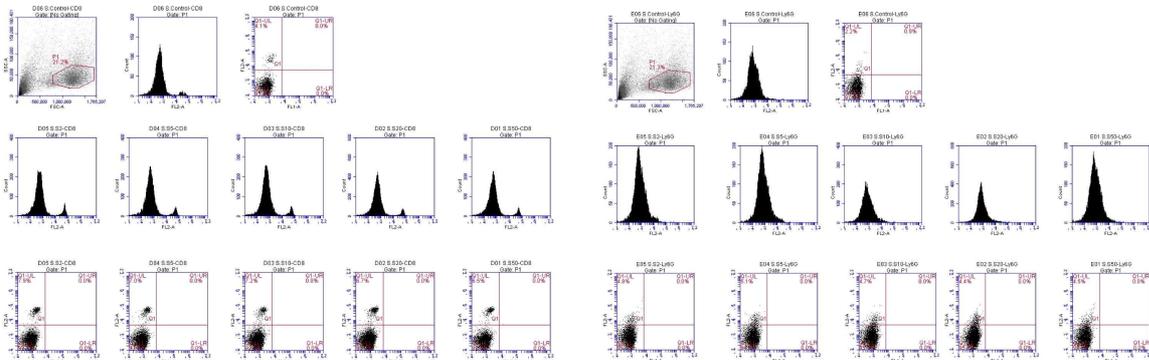
G-NANA lymph node Ly6G (Neutrophil)

-S-NANA



S-NANA Lymph node CD45 (Leukocyte)

S-NANA Lymph node F4/80 (Macrophage)



S-NANA Lymph node CD8 (T-cell)

S-NANA Lymph node Ly6G (Neutrophil)

- 연구결과: 양성대조군인 S-NANA를 투여한 군에서 음성대조군에 비해 CD8 T cell과 neutrophil의 population이 증가하였으나, leukocyte와 macrophage의 증가는 유도하지 못하였다. 또한, 시험물질인 G-NANA를 투여한 군에서 음성대조군에 비해 CD8 T cell과 neutrophil population이 증가하였으나, leukocyte와 macrophage의 증가는 유도하지 못하였음. 흥미롭게도, G-NANA를 투여한 군에서 양성대조군인 S-NANA를 투여한 군보다 CD8 T cell 및 neutrophil

population이 더 증가하였다.

(나) 결론 : mouse(20g)당 2, 5, 10, 20, 50mg을 투여한 군이 모두 음성대조군에 비해 CD8 T cell 및 neutrophil population의 증가되었으며, 투여량별로는 현저한 차이를 나타내지 않았으므로 2mg/mouse(20g)의 투여량의 최적의 농도로 결정되었다.

나. 미네랄 기능성 바이오소재의 최적 농도 결정

(1) 연구방법: 다음과 같은 WPS에 미네랄이 함유되어있는 기능성 바이오 소재를 이용하여 한 그룹당 마우스 3마리를 대상으로 약 6주간 경구투여를 하였다.

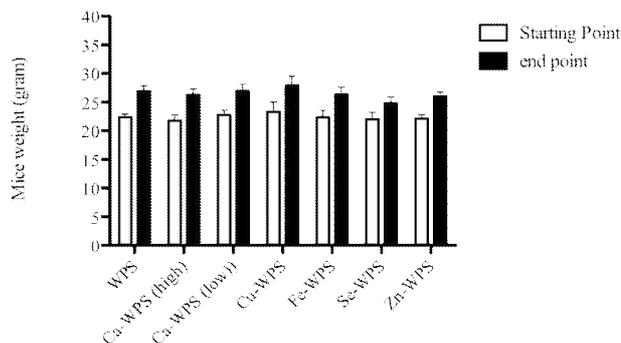
WPS	Ca-WPS	Cu-WPS	Se-WPS	Ca-WPS	Fe-WPS	Zn-WPS
260 ug	260 ug	2.32 ug	45 ng	1.5 ug	5 ug	4 ug
70 ug	168 ug	1.2 ug	25 ng	0.9 ug	3.1 ug	2.4 ug
	70 ug	0.8 ug	5.5 ng	0.32 ug	1.2 ug	0.85 ug

시료는 물에 녹여 1회 투여 시 200ul/mouse 정도를 투여하였으며 대조군은 WPS를 시료 투여량과 동일한 량으로 투여하였다.

6주후에 각각의 마우스에서 혈액과 lymph node을 적출하여 면역과 관련된 Macrophage. Neutrophil. cytotoxic T-cell. T helper cells. NK cells의 증가를 FACS 방법으로 분석하였다.

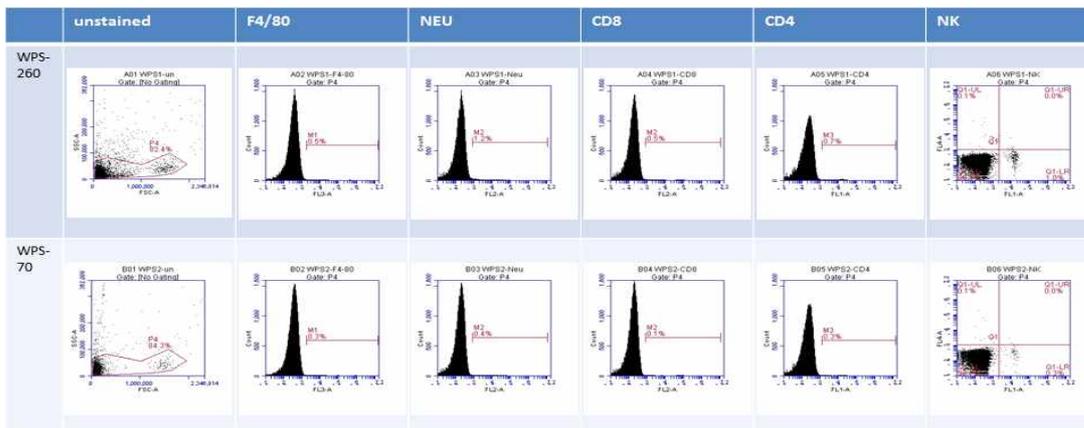
이 때 사용한 마커로는 F4/80, Ly6G, CD8a, CD4, CD122, CD3와 같은 마커를 사용하였다.

6주후에 기능성 바이오소재를 먹이기 전과 후의 무게를 비교해보니 다음과 같았음. 약 6주후에 무게가 정상 쥐만큼 증가한 것으로 보아 영양학적으로는 문제가 없어 보인다.

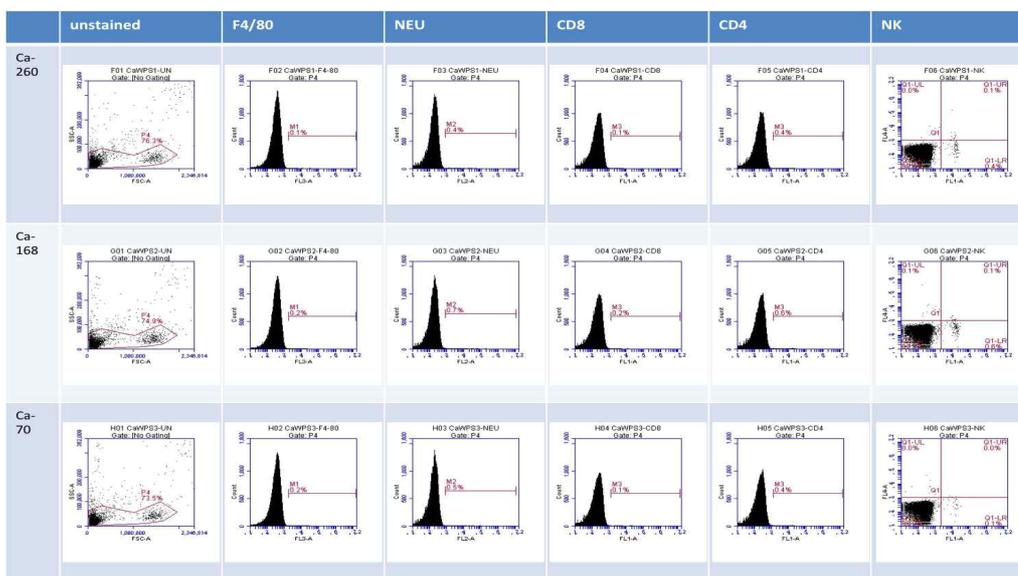


◎In circulating blood

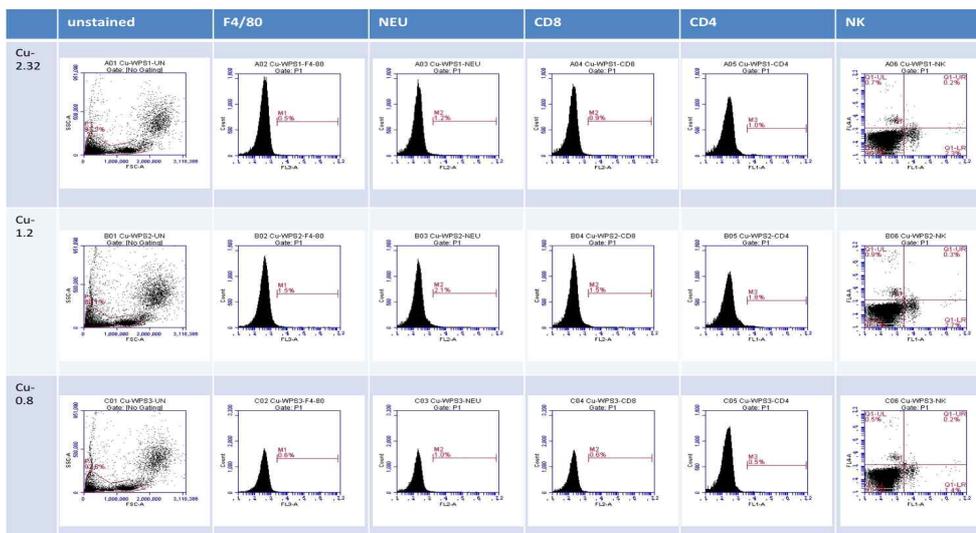
- WPS-blood



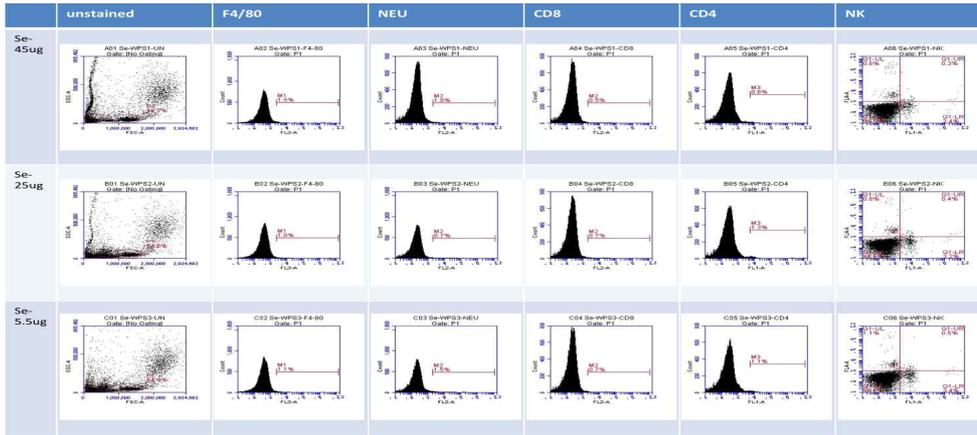
- Ca-WPS-blood



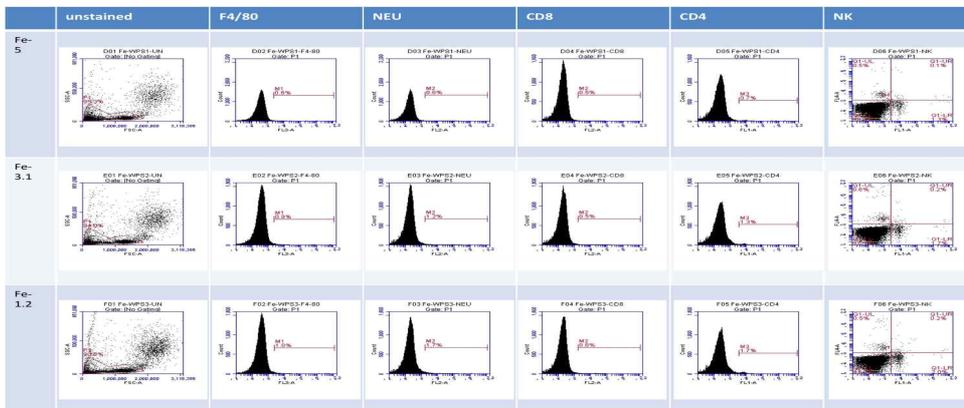
-Cu-WPS-blood



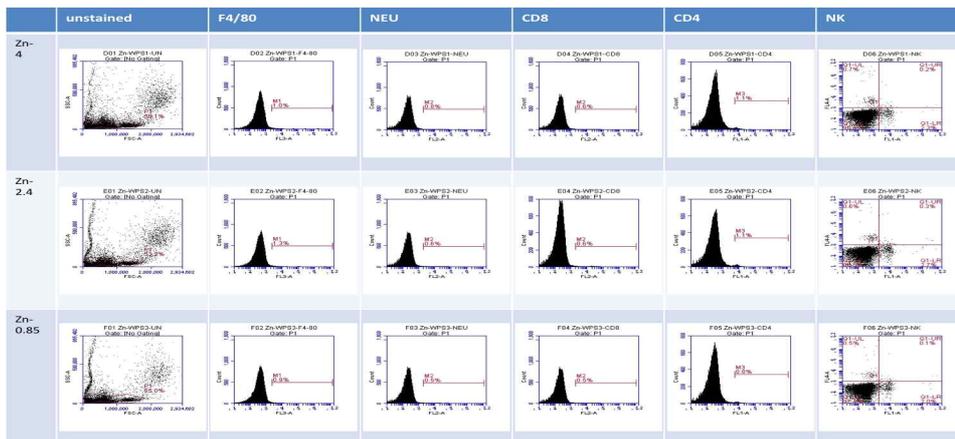
-Se-WPS-blood



-Fe-WPS-blood

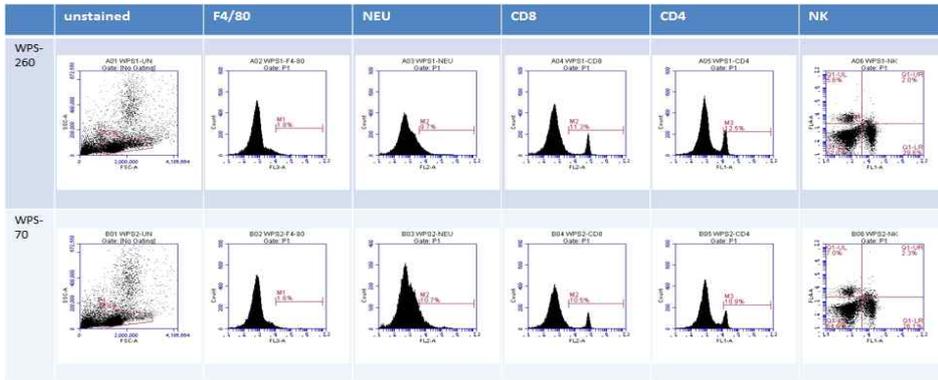


-Zn-WPS-blood

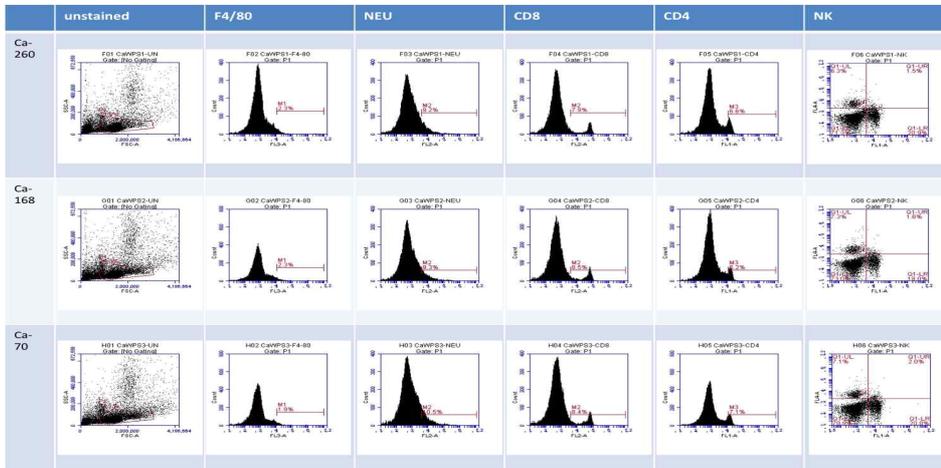


(2) 연구결과: 유기태 미네랄을 투여한 군에서 macrophage, neutrophil, CD8, CD4 population 은 유기태 종류에 따라 서로 다른 양상을 보였으나 작은 량의 population으로, 이들의 유효성 여부는 향후 더 심도있는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되며, NK, NKT, CD3+ population은 WPS만을 투여한 대조군에 비해 유기태 미네랄을 투여한 군에서 현저히 증가함을 확인하였다.

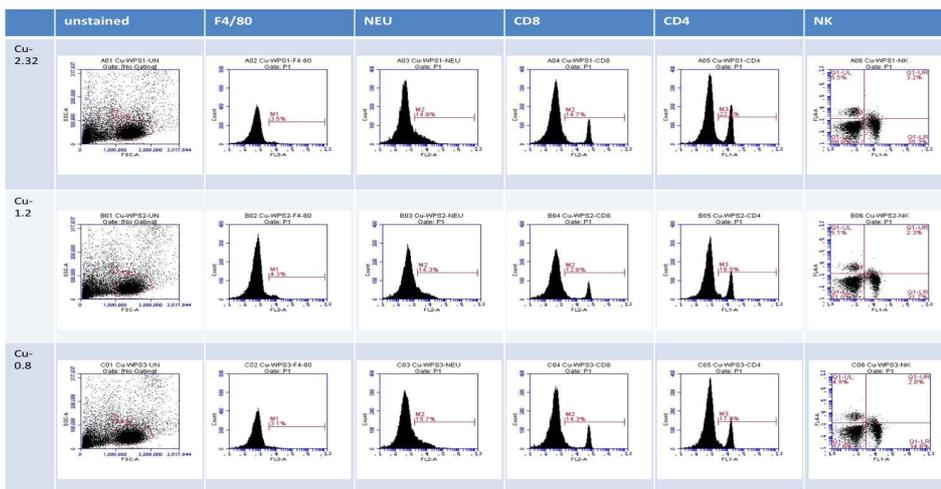
⊙ In lymph node
 - WPS-lymph node



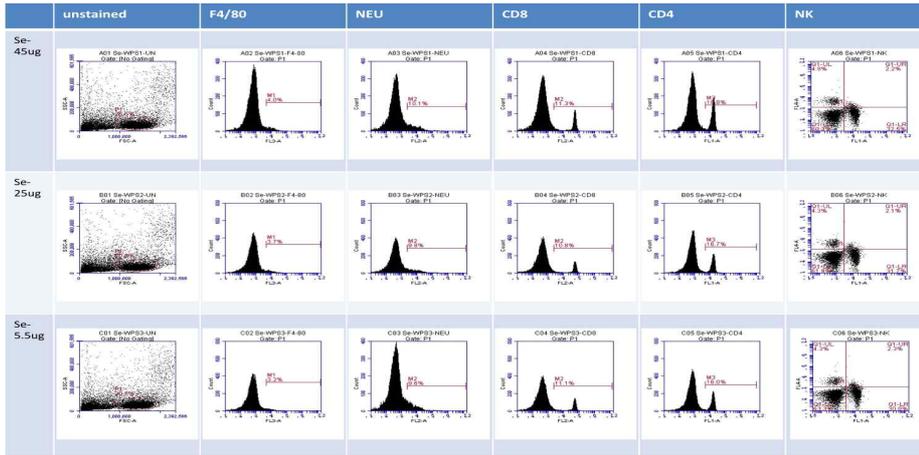
- Ca-WPS-lymph node



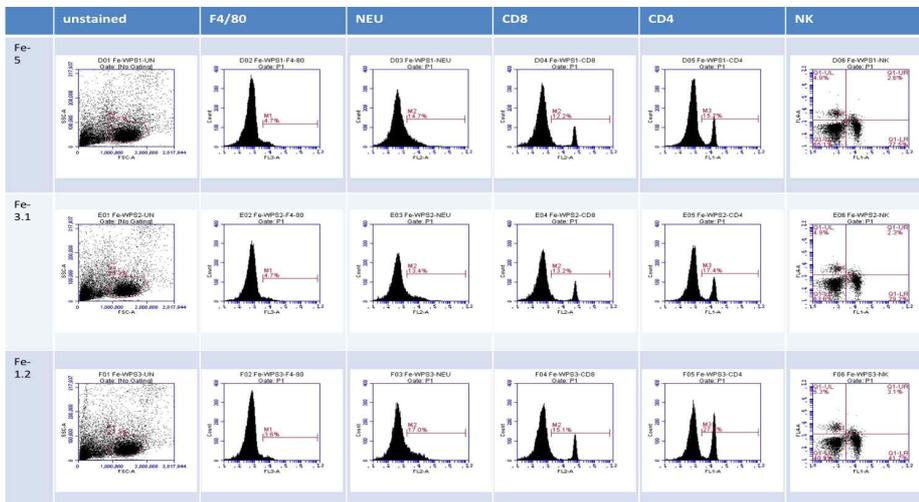
- Cu-WPS-lymph node



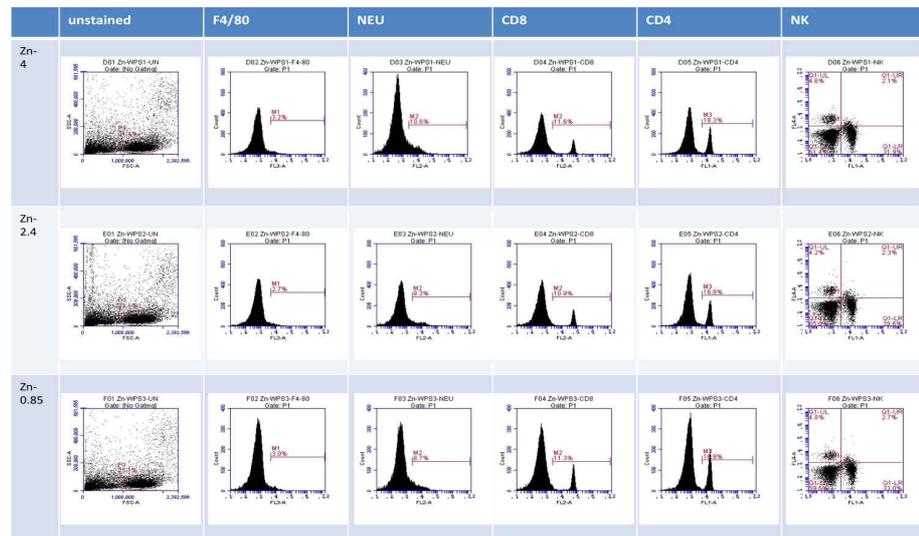
- Se-WPS-lymph node



- Fe-WPS-lymph node



- Zn-WPS-lymph node



- (3) 연구결과: 유기태 미네랄의 종류에 따라 면역세포에 미치는 영향이 다르게 나타나는 것으로 보였다. Fe-WPS의 경우 WPS 대조군에 비해 최저 농도에서 macrophage, neutrophil 과 CD4 population이 현저히 증가하였으며, Cu-WPS, Se-WPS, Zn-WPS의 경우 macrophage population에서 현저히 증가하였다. 이들에 특정 세포에 대한 유효성은 더 심도있는 연구가 요구되며, 유기태 농도별 면역세포에 미치는 효능은 유기태별로 현저한 차이를 보이지 않았다.
- (4) 결론: 유기태 연구시 대조군으로 사용한 WPS 자체의 면역물질들에 의한 면역활성으로 인해 유기태 미네랄의 면역활성이 현저히 두드러지지 않은 것으로 사료되나, 그럼에도 불구하고 유기태별로 특정 면역세포에 미치는 영향이 차이가 있었다. 유기태미네랄의 최적농도는 어느 농도를 사용해도 무방한 것으로 판단되며, 그러므로 최저 농도를 사용하는 것이 적합할 것으로 사료된다.

다. 항암 종양동물모델 확립

- (1) 실험방법: 대장암 세포주 CT26을 DMEM media에서 배양한 후 harvest을 실시함. 이때 세포 부유물안에 FBS을 완전히 제거하기 위해서 3번의 DPBS로 세척한다.
hematocytometer로 세포의 개수를 측정한 다음 마우스 한 마리당 1×10^6 개의 암 세포주를 마우스의 대퇴부에 주사함.

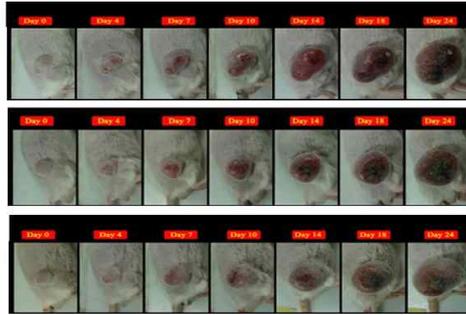


약 2주 정도 후에 마우스에 종양의 부피가 약 100mm^3 (가로 \times 세로 \times 높이 $\times 0.5$)로 형성되었으며 이를 실험에 이용할 예정임.

라. 종양동물모델에서의 기능성 바이오 소재 면역반응 검증

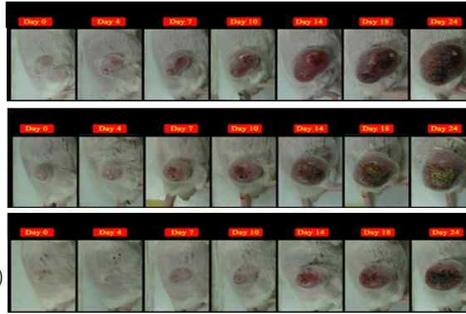
- (1) 최적의 농도를 바탕으로하여 종양동물모델에서 항암효과를 일으키는 면역반응 검증
지금 현재 종양동물모델을 제작하여 위에서 확립된 기능성 바이오 소재 G-NANA와 미네랄 기능성 바이오소재 Se 또는 Zn를 대상으로 최적의 농도로 경구투여중 임.
그리하여 앞으로 liver, spleen, lymph node의 morphology을 확인하고 싸이토카인의 양을 측정할 예정임
- (2) 현재 25일간의 각 그룹 군별 종양크기변화
(가) 유기태 미네랄 면역반응 효과

- 음성대조군
- 대조군: WPS (112ng)
- 실험군: Se-WPS (45ng)

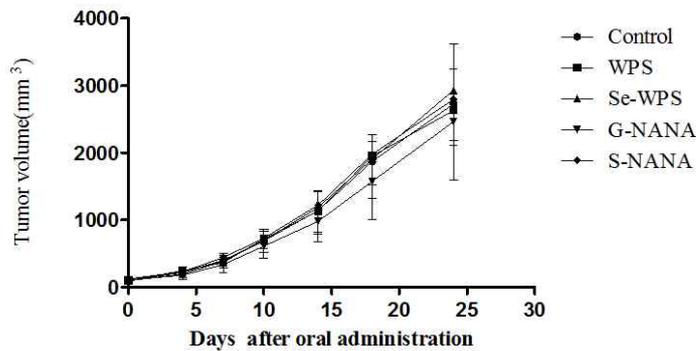


(나) G-NANA 면역반응 효과

- 음성대조군
- 대조군: S-NANA(10mg)
- 실험군: G-NANA(50mg)



(다) 각 그룹 군별 종양크기



4. 우유내 유청으로부터 제조한 G-NANA의 마우스를 이용한 28일 항암 효과 시험

가. 항암 종양동물모델 확립

(1) 실험방법: 간암 세포주 HepG2를 EMEM media에서 배양한 후 harvest을 실시함. 이때 세포 부유물안에 FBS을 완전히 제거하기 위해서 3번의DPBS로 세척한다.

hematocytometer로 세포의 개수를 측정한 다음 마우스 한 마리당 4×10^6 개의 암 세포주를 마우스의 대퇴부에 주사한다.

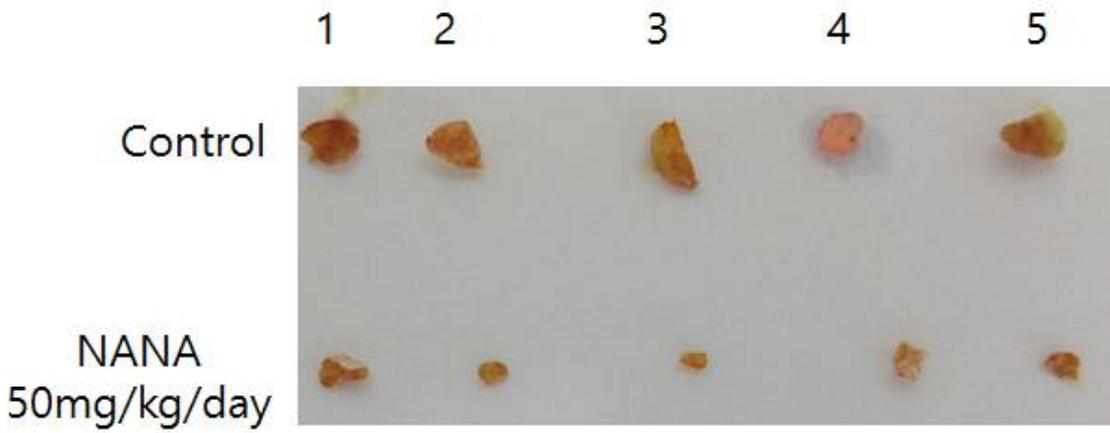
(2) 암세포 주입 2주 전부터 NANA를 경구투여하여 예비면역을 준 후 암세포를 주입하여 키웠다.

나. 종양동물모델에서의 기능성 바이오 소재 항암 효과 검증

(1) NANA의 농도를 50mg/kg/day로 고정하였다. 세포 주입 후 4주가량 암세포의 크기 관찰하였다.

(2) 마우스의 체중과 암세포의 크기를 관찰하며 측정하였다.

(3) 암세포 주입 후 30일째 되는날 마우스를 희생하여 피부 가죽 안쪽에 형성되어 있는 암세포의 크기를 측정하였다.



다. 결과

(1) 물만 먹인 control그룹에 비해 NANA를 경구투여 한 그룹은 암세포의 크기가 확연하게 작은 것을 확인할 수 있음.

제 9절 개발 G-NANA 제품적용성 평가

1. 개발 G-NANA 현장제품적용성 평가

가. 연구목적

암식이와 헬리코박터 제어제품의 소재로 개발하려는 G-NANA의 제품화에 있어, 표준화 규격 확립을 위한 G-NANA의 정확한 분석과 다중 제품의 적용성에 대한 사전고려요소(반응성, 침전성, 부착성, pH 반응성 등)에 따른 G-NANA의 안정성 평가(NANA 기능성 보존)가 필요하다. 이는 제품화에 있어 G-NANA의 함량을 정할 수 있고 품질관리에도 유용하게 이용될 것이다.

이를 위하여, 대조시료로서 S-NANA와 검정시료로서 개발 G-NANA를 기준으로 하여 그 함량을 HPLC로 분석함에 있어 최적 검정방법을 정립하고, 정립된 분석법을 통해 개발 G-NANA의 첨가 및 혼합 등을 통한 최종 제품화시 주요한 평가 항목인 pH별 단기안정성과 현장제품 적용성에 주목하고 관련하여 기초 예비결과를 확인함으로써 추후 제품화에 있어 안정성을 확보하는데 목적이 있다.

나. 연구수행방법

(1) G-NANA의 분석법 정립

본 연구에서는 G-NANA의 제품화에 있어, 그 함량을 HPLC로 분석함에 있어 최적 검정 방법을 정립하는데 목적이 있으며, 관련한 수행방법은 다음과 같다.

(가) 분석시료 준비

분석을 위한 표준용액으로는 S-NANA(Sigma, 99%)를 구입하여 이를 시료로 100mg을 정밀하게 취하여 이를 10mL 용량플라스크에 넣고 증류수로 녹인 후, 측정 간 적당히 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

분석시료로서는 개발 G-NANA(순도 23.5%)를 준비하여 사용하였고, 시료 100mg을 정밀하게 분취하여 증류수 10mL에 용해 후 이를 초음파 분쇄기에서 1시간 추출하였다. 추출된 시료용액을 0.2 μ m 여과필터(13HP, Advantec MFS, Inc., Japan)를 사용하여 여과 후 이를 최종 HPLC분석용 시료로 준비하였다.

(나) 분석 시스템 및 분석조건 정립

시료내 NANA함유량 분석을 위해 사용된 HPLC system은 Quaternary pump(G1311C)와 UV detector(G1314F)로 구성된 Agilent사 1260 Infinity series(U.S.A)이며 분석조건은 다음과 같다(Table 1).

즉, 준비된 시료 10 μ l를 분석용 컬럼인 Aminex[®] HPX-87H Ion Exclusion(300 \times 7.8mm I.d., 9 μ m)에 주입하고 이동상인 10mM H₂SO₄을 함유한 증류수(HPLC급)를 분당 0.5mL로 흘

려 205nm(40°C, 20분)에서 검출하였다.

(다) 결과도출

대조시료인 S-NANA를 기준으로 검정시료인 G-NANA의 검출시간, 최저검출농도 및 검출효율을 살펴보았다. 또한 대조시료를 기준으로 시험시료인 G-NANA내 NANA함유량을 조사한 후 여기에 표준시료를 10ppm, 100ppm 및 500ppm 농도구배별로 첨가한 경우의 추가 검출량을 기준으로 검출신뢰성을 평가하였으며, 이 때 신뢰범위는 $\pm 20\%$ 의 범위로 부여하였다.

즉, 개발 G-NANA의 최종 분석법의 정립은 표준시료 대비 검출시간, 최저검출농도 및 검출효율을 기준으로 검정시료 내 NANA를 농도별 첨가 후 검정 시 추가 검출량을 종합적으로 평가하여 이를 분석법 정립 완료여부로 결정하였다.

(2) G-NANA의 pH에 따른 안정성 평가

본 연구에서 개발 G-NANA를 반제품으로 사용되는 경우와 이를 원료로 사용하여 최종 목표제품으로 개발 시 다중 제품의 적용성에 대한 사전고려요소(반응성, 침전성, 부착성 및 pH 반응성 등)의 다각적인 검토가 필요하다 할 수 있다.

고려 항목 중 pH는 개발 G-NANA를 목적 제품 내 첨가 및 혼합시 pH(산, 중성 및 알카리) 조건별 기능성분인 NANA의 성분변화 유발로 인한 목표기능이 상실 또는 저하될 수 있음에 주목하고, 관련 기초 예비결과를 확인함으로써 추후 제품화에 있어 안정성을 확보하는데 목적이 있으며 관련한 수행방법은 다음과 같다.

(가) pH용액 조성

실험에 사용된 용매의 pH범위는 G-NANA의 제품화와 체내 소화흡수(위산)를 고려하여 pH범위를 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 1단위씩 설정하였다.

pH의 구배조건별 시험용액 조성을 위하여, 산성용액으로서는 HCl(Junsei, Japan)을 증류수에 1차로 1N가 되도록, 알카리용액은 NaOH(Junsei, Japan)를 시료로 사용하여 역시 증류수에 1%(w/v)가 되도록 제조한 후 이를 Stock Solution으로 하여 필요에 따라 희석 및 첨가 과정을 통하여 적절히 사용하였다.

(나) 평가용 G-NANA시료 준비

G-NANA 시료 20mg을 취하여 pH의 구배조건별 시험용액 2mL에 녹인 후 초음파 분쇄기에서 30분 추출한 후 0.2 μ m 여과필터(13HP, Advantec MFS, Inc., Japan)로 여과하여 냉장(4°C) 보관하였으며, 정립된 HPLC 분석법에 준하여 시간에 따라 3시간, 1일, 2일, 3일 그리고 4일 후 분석하였다. 표준품인 S-NANA 대비 시료 G-NANA내 NANA함량을 분석하였고, 대조구는 증류수로 동일 실험방법을 적용하였다.

(다) 결과도출

증류수로 처리한 대조구를 기준으로 pH의 구배조건별 시험용액으로 처리한 G-NANA내 NANA 함량을 정립된 HPLC 분석조건으로 분석하였고, 이를 기초로 하여 3시간과 4일을 비교하여 살펴보았다. 이 때 신뢰범위는 $\pm 20\%$ 의 범위로 부여하였고 이를 기준으로 pH에 따른 안정성 유무를 결정하였다.

(3) G-NANA의 현장 제품적용성 평가

본 연구에서 개발 G-NANA를 원료로 사용하여 최종 목표제품으로 개발 시, 다중 제품의 적용성에 대한 사전고려요소(반응성, 침전성 및 부착성 등)의 다각적인 검토가 필요하다 할 수 있다.

예비 실험을 통한 순수 pH조건별 예비실험 결과(중성조건 기준)에서 NANA의 성분변화는 없었음을 기초로 하여, 본 연구에서는 우선 개발 G-NANA를 우유 내에 농도별로 첨가한 후 역시 첨가전후에 NANA 함유량 변화를 확인함으로써 추후 제품화에 있어 결합성 유무 등을 사전 확인하는데 목적이 있으며 관련한 수행방법은 다음과 같다.

(가) 제품적용성 평가용 시료준비(우유 내 G-NANA 농도별 첨가시료)

개발 G-NANA를 우유(멸균우유, 매일유업) 내에 농도별로 첨가전후에 NANA 함유량 변화를 확인하기 위하여 정립된 HPLC분석법을 적용하였는데, 분석조건은 다음과 같다.

우선 G-NANA를 우유 내 농도별로 첨가를 위한 Stock solution(23,500ppm, NANA 함유량 기준)을 준비하였다. 즉, 시료준비로서 G-NANA 시료 1g(NANA 함유량 : 235mg)을 취하여 증류수 10mL에 녹인 후 초음파 분쇄기에서 30분간 추출한 후 이를 우유 내 첨가 시료로 사용하였다.

준비된 G-NANA Stock Solution을 사용한 우유 내 첨가시험구 조성은 다음과 같다.

대조구로서는 우유 대신 정제수를 사용하였으며 이때 단일농도의 G-NANA를 NANA함유량 기준으로 250ppm(CNTL) 되게 첨가하는 조건으로 하였다.

시험구로서는 G-NANA Stock Solution을 우유에 최종 NANA함유량이 0.1175ppm(Milk-1), 1.175ppm(Milk-2), 11.75ppm(Milk-3) 및 117.5ppm(Milk-4)으로 첨가한 후 1 시간 경과시 이를 대상으로 총 4개군을 설정하였다.

농도구배조건별로 첨가된 시험구별 NANA함유량의 변화를 확인하기 위하여, 시료조성에 완료된 시점에서 1 시간 경과시 이를 대상으로 대조구 대비 시험구내 NANA함유량을 비교하였다. 즉, 각 시험구별 용액을 200 μ l를 분취한 후 이를 80% EtOH(v/v) 800 μ l에 희석하고, 이어서 원심분리(4 $^{\circ}$ C, 4000rpm, 20분)하여 상층액을 0.2 μ m 여과필터(13HP, Advantec MFS, Inc., Japan)로 여과하여 이를 HPLC분석용 시료로 사용하였다.

(나) 결과도출

증류수로 처리한 대조구를 기준으로 농도구배조건별 시험용액으로 처리한 G-NANA내 NANA 함량을 정립된 HPLC 분석조건으로 분석하였고, 이를 기초로 하여 대조구 대비 검출 효율을 살펴보았다. 이 때 신뢰범위는 ±20%의 범위로 부여하였고 이를 기준으로 G-NANA 와 우유를 기준으로 한 현장제품간의 결합성 유무를 결정하였다.

다. 결과

본 연구에서는 개발 G-NANA의 제품화에 있어 1단계는 NANA분석법 정립, 2단계는 정제수를 기준으로 하는 pH조건별 그리고 3단계는 우유를 대상으로 한 G-NANA(NANA 함유량 23.5%) 첨가시 물리/이화학적 변화를 사전 확인함으로써, 추후 제품화에 있어 주요 경계항목에 대한 사전안정성평가를 실시하였으며 관련한 결과는 다음과 같다.

(1) G-NANA의 분석법정립 결과

개발 G-NANA의 제품화에 있어 목표 기능성분인 NANA의 함유량 확인을 위한 분석조건 정립은 개발제품인 G-NANA의 제조 및 품질관리 등에도 주요한 핵심기술이라 할 수 있다. 핵심소재 NANA의 표준분석법 정립을 위한 주요 항목은 핵심성분인 NANA의 검출시간, 최저검출농도 및 검출효율로 구분하여 정립하였는데 결과는 다음과 같다.

표. 암식이 개발을 위한 핵심소재 NANA의 표준분석법 정립을 위한 HPLC 기종 및 분석조건 정립결과

Instrument	HPLC
Column	Aminex ® HPX-87H Ion Exclusion (300×7.8mm, 9µm)
Flow rate	0.5mL/min.
Wave length	205nm
Mobile phase	10mM H ₂ SO ₄ in D.W
Injection volume	10µl
Temperature	40°C

우선 NANA의 검출시간을 확인하여 보았더니, 개발 G-NANA는 대조시료인 S-NANA 모두 NANA의 검출시간은 9.8분이었는데 주변 peak와 완전 분리되어 정량하는데 문제점이 없음을 확인할 수 있었으며. 최저검출농도는 1ppm 이상 그리고 검출효율은 사전 설정 범위인 90±10%에 충족되는 것으로 확인되었다.

본 연구에서 확보된 HPLC조건(검출시간, 최저검출농도 및 검출효율) 확립결과는 추후 대조시료를 기준으로 G-NANA 개발 그리고 본 과제의 최종 목표인 암식이 및 헬리코박터균 제어형 제품군 개발과 관련한 평가 등에 활용 예정이다.

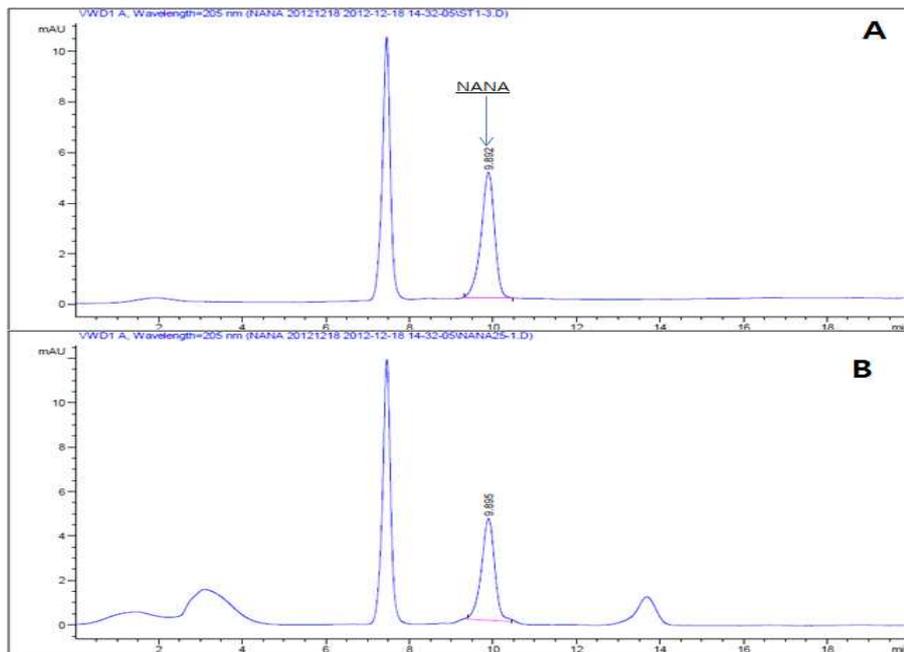


그림. 압식이 개발을 위한 핵심소재 NANA의 표준분석법 정립결과(HPLC)

A: 대조 S-NANA, B: 가발 G-NANA(NANA 함유량 :23.5%~29.5%)

(2) G-NANA의 pH에 따른 안정성 평가

개발 G-NANA는 반제품으로 사용되는 경우와 이를 원료로 사용하여 최종 목표제품으로 개발 시 다중 제품의 적용성에 대한 사전고려요소(반응성, 침전성, 부착성 및 pH 반응성 등)의 다각적인 검토가 필요하다 할 수 있다.

본 연구에서 상기 항목 중 pH에 따른 개발 G-NANA내 기능성분인 NANA 함유량변화에 미치는 영향을 일정별로 검정한 결과, 대조 대비 최종 검정기간인 4일이 경과시에도 NANA함유량의 변화는 없는 것으로 확인되었다.

표. pH조성차이를 부여한 개발 G-NANA내 NANA성분의 시간경과에 따른 함유량변화를 기준으로 한 안전성 평가 결과

시험구	3시간	pH조성별 NANA함유량(%) 변화			
		1일	2일	3일	4일
대조구	25.0	25.2	26.8	26.4	26.8
pH 1	25.8	25.2	27.3	27.3	27.0
pH 2	26.4	25.6	27.4	27.8	27.3
pH 3	25.2	26.1	27.8	28.0	27.5
pH 4	26.0	26.1	27.8	28.0	27.5
pH 5	25.6	25.8	27.5	27.5	27.1
pH 6	26.0	26.2	27.9	28.0	27.5
pH 7	25.4	25.5	27.2	27.3	26.9
pH 8	25.5	25.5	27.2	27.4	27.0
pH 9	22.4	22.4	23.9	24.1	23.8
pH 10	25.2	25.2	26.9	27.2	26.8

즉, 대조 대비 pH 조성별 개발 G-NANA는 4일 경과 시를 기준으로 최저 4.7%에서 최대 9.1% 범위에서 변화폭을 보였는데, 최종제품화시 규제기관인 식약처의 허용범위이내였다.

관련하여 pH에 따른 시간경과별(3시간, 1일, 2일, 3일 및 4일) NANA 함유량 변화를 대조 대비 세부적으로 비교하여 보았다. 대조구의 경우 3시간 내 분석 시 25.0%의 NANA 함유량을 보였고, 4일 후 분석 시 26.8%로 NANA함량이 약 7.2% 증가하였는데, pH 조성별 시험구는 대조구와 비교하여 4일이 경과 후 4.7~9.1%의 증가를 보였다. 이는 식약처 허용 오차범위인 $\pm 20\%$ 내로 pH에 따른 G-NANA의 함량은 4일까지 안정함을 확인하였다.

이러한 결과는 결국 G-NANA내 기능성분인 NANA가 인체섭이시 위산(pH 1)조건에서 그리고 제품 내 첨가시 유기산(pH 2~4) 및 특정 알칼리(pH 8~10) 조건에서 안정성을 보일 것으로 확인되었다.

본 연구의 단기안정성평가 결과는 추후 장기안정성 평가(30일 기준) 및 대표적 제품을 선발(우유, 발효유제품 및 과실음료 등)과 여기에 G-NANA첨가 후 기능성분인 NANA의 변화검정을 통하여 본 과제외 최종 동물 및 인체유효성 평가와 관련한 제품안전성 평가에 있어 비교자료로 활용예정이며 관련 시험을 역시 진행할 예정이다.

다. G-NANA의 현장 제품적용성 평가

개발 G-NANA를 원료로 사용하여 최종 목표제품으로 개발 시 다중 제품의 적용성에 대한 사전고려요소(반응성, 침전성 및 부착성 등)의 검토가 필요하다 할 수 있다.

본 연구는 개발 G-NANA의 첨가 및 혼합 등을 통한 최종 제품화시 주요한 평가 항목인 현장 제품적용성에 주목하고 이와 관련하여 우선 우유를 기준으로 하여 평가하였다. 이는 우유내에 분자량 및 구조 등이 다양한 단백질류, 지방류, Lactose, 미네랄류 및 효소 등이 다중 함유되어 있음으로 인하여 NANA의 반응성 평가에 적합하다고 판단되어 이를 시료로 우선 선별하여 적용하였는데, 관련한 평가 결과는 다음과 같다.

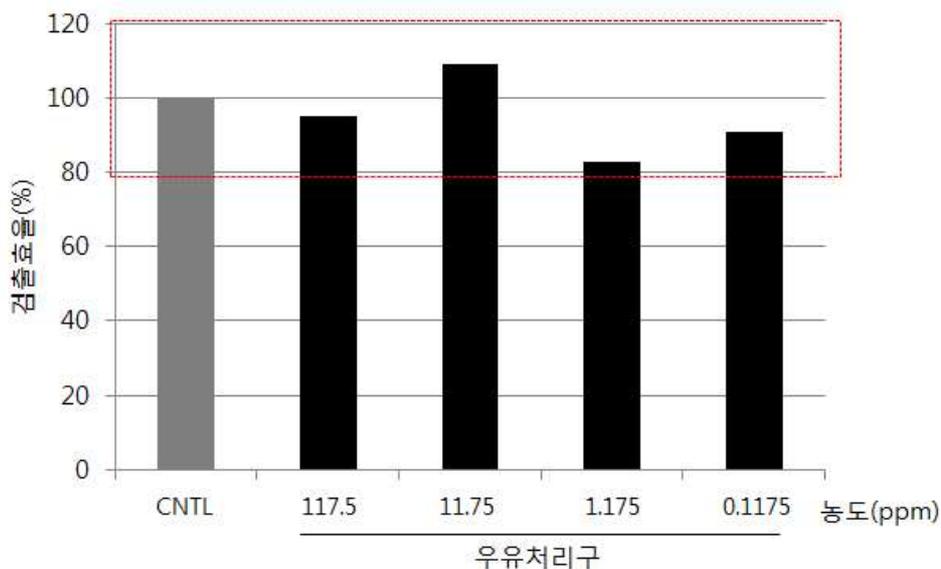


그림. G-NANA 농도별 첨가에 따른 NANA성분의 검출효율

본 연구에서 상기 항목 중 우유를 기준으로 한 현장제품에 농도별로 적용하여 이에 따른 개발 G-NANA내 기능성분인 NANA의 함량변화에 미치는 영향을 검정한 결과, 대조 대비 NANA함유량의 변화는 없는 것으로 확인되었다.

즉, 대조 대비 농도별 G-NANA를 첨가한 우유 내 NANA의 검출효율은 대조구 대비(100%) 최저 83%에서 최대 109% 범위에서 변화폭을 보였는데 이는 최종제품화시 규제기관인 식약처의 허용범위이내였으며, 이러한 결과는 G-NANA내 기능성분인 NANA가 제품 내 첨가시 제품과 결합(반응성)하지 않으며 첨가 및 혼합 등을 통한 최종제품화에 적용할 수 있을 것으로 확인하였다.

본 연구의 우유를 기준으로 한 현장 제품적용성 평가 결과는 추후 장기안정성 평가(30일 기준) 및 대표적 제품을 선발(우유, 발효유제품, 과실음료 등)과 여기에 G-NANA 첨가 후 기능성분인 NANA의 변화검정을 통하여 본 과제 의 최종 동물 및 인체유효성 평가와 관련한 제품안전 평가에 있어 비교자료로 활용예정이며 관련 시험 역시 진행할 예정이다.

제 10 절 기능성 원료(G-NANA) 중 N-acetylneraminic acid 기준·규격 설정 연구

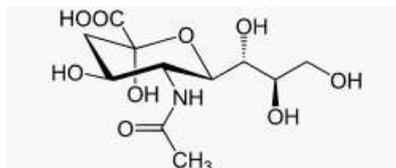
1. 개요

본 연구는 기능성 원료(G-NANA)를 표준화하기 위하여 기능/지표 물질인 N-acetylneraminic acid 를 분석할 수 있는 시험법을 검토하고 해당 시험법에 대한 검증을 통하여 적절한지를 확인한다. 또한 확인된 시험법을 이용하여 N-acetylneraminic acid 기준규격을 설정하고 원료의 안전성을 확인하기 위하여 수입식품 등 검사지침에 따라 잔류농약 58종 항목을 측정하고자 한다.

가. 분석시료 (5Lot)

- (1) 시료명 : G-NANA
- (2) 제조일자
 - ① 2014. 07.02
 - ② 2014. 11.17
 - ③ 2015. 05.28
 - ④ 2015. 07.29
 - ⑤ GMP

나. 기능/지표물질



- (1) 성분명: N-acetylneraminic acid
- (2) CAS Number : [131-48-6]
- (3) Chemical name :
5-(acetylamino)-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosonic acid
- (4) Molecular formula : $C_{11}H_{19}NO_9$
- (5) Molecular weight : 309.273g/mol

2. 기능/지표성분 시험법 설정

가. 기능성 원료 중 N-acetylneraminic acid 시험법 설정

기능성 원료 N-acetylneraminic acid 함량 분석을 위하여, 문헌 조사를 통하여 분석법을 검토하여 최종 분석법을 설정하였다.

Reference: *Determination of Sialic Acids Using UHPLC with fluorescence Detection, DIONEX, Application Note 266, 2011*

문헌조사에 따르면 N-acetylneuraminic acid는 산 가수분해 과정을 거쳐 형광물질을 유도체화 시켜 형광검출기를 통해 피크검출이 된다는 점을 바탕으로 하여 실험을 진행하였고 해당 성분의 함량을 측정하기 적절한 시험법인지를 검토하였다.

(1) 장비

HPLC System Agilent 1200 Infinity, USA
G1311B 1260 Quat Pump, G1329B 1260 ALS
G1316A 1260 TCC, G1321B 1260 FLD Spectra

(2) 시약 및 시액

- (가) N-acetylneuraminic acid 표준품 : Sigma, SLBC5231V, 99%
- (나) 2-Mercaptoethanol : Sigma, M6250
- (다) Sodium hydrosulfite : Sigma, 71699
- (라) 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene dihydrochloride : Sigma, D4784
- (마) Acetic acid : J.T.Baker, K15A07
- (바) Acetonitrile : Duksan, HPLC grade
- (사) Formic acid: Sigma, 695076
- (아) 3차 증류수

(3) 표준용액 제조

- (가) 표준품(N-Acetylneuraminic acid) 약 5mg을 취하여 증류수 100mL로 정용한다(50ppm).
- (나) 위 용액 중 1mL을 5mL로 정용한 후 희석하여 검량선 작성용 표준용액으로 한다(1, 2, 5, 8, 10 ppm).

(4) 시험용액 조제

- (가) 시료채취 : 시료 약 50mg을 50mL 정용 플라스크에 취한 후 증류수로 정용한다.
- (나) 30분간 sonication하여 시료 추출한 후 10~100배 희석하여 시험용액으로 사용한다.

(5) 실험방법 유도체화

- (가) 분석법 1
 - ① 표준용액/시험용액 300ul + 300ul DMB시약
 - ② Heating mental block (50°C, 150min)
 - ③ 얼음에서 식히기(또는 냉동 10min)

④ 기기분석

(나) 분석법 2

- ① 표준용액/시험용액 300ul + 2M formic acid 300ul
- ② Heating mental block (80°C, 60min)
- ③ 얼음에서 식히기(또는 냉동 10min)
- ④ 원심분리(13,000rpm, 10min)
- ⑤ 위의 상층액 300ul + 300ul DMB시약
- ⑥ Heating mental block (50°C, 150min)
- ⑦ 얼음에서 식히기(또는 냉동 10min)
- ⑧ 기기분석

(6) 기기분석조건

Instrument	HPLC system			
Detector	FLD detector			
Column	Agilent XDB C18 (4.6mm × 150mm, 5um)			
wavelength	Ex=373nm Em=448nm			
	A - DW			
	B - Acetonitrile			
Mobile Phase	Time(min)	A(%)	B(%)	Flow(mL/min)
	0	95	5	1.0
	5	95	5	1.0
	11	80	20	1.0
	13	60	40	1.0
	18	40	60	1.0
	21	95	5	1.0
	25	95	5	1.0
Run time	25min			
Oven Temp.	45°C			

(7) 계산

$$\text{N-acetylnueraminic acid (mg/g)} = \frac{\text{시험용액 농도(ug/mL)} \times \text{희석용량(mL)} \times \text{표준용액순도}}{\text{시료량(mg)}}$$

나. 분석방법 요약

분석방법을 설정하기 위해서 문헌조사를 진행하였으며 지표물질인 N-acetylnueraminic acid 가 증류수로 추출 후 UV 및 DAD에서 검출이 되지 않고 형광물질을 유도체화 시켜 형광검출기에서 검출된다는 것을 문헌조사를 통해 알 수 있었다. 문헌내용을 응용하여 유도체화 조건 및 기기분석 조건을 변경하여 두 가지 분석방법을 설정할 수 있었으며, 그 방법은 아래의 표와 같다.

표. 분석방법 중 문헌방법 및 분석법 I, II 요약

실험방법	컬럼 종류	산 가수분해 유무	Flow rate
문헌방법	Acclaim RSLC 120 C18 (2.1mm × 100mm, 2.2μm)	2M Formic acid	0.42mL/min
분석법 (I)	Agilent XDB C18 (4.6X 150mm, 5um)	×	1.0mL/min
분석법 (II)	Agilent XDB C18 (4.6X 150mm, 5um)	2M Formic acid	1.0mL/min

*문헌방법: Determination of Sialic Acids Using UHPLC with fluorescence Detection, DIONEX, Application Note 266, 2011

*분석법 (I): 문헌방법 응용(산 가수분해 없이 실험진행)

*분석법 (II): 문헌방법 응용(2M Formic acid를 사용하여 산 가수분해를 하여 실험진행)

다. 분석 결과

(1) 1차 실험(2015-07-27, 분석법 1)

1차 실험은 업체에서 제공받은 시료 중 제조번호 2014.11.17일자에 해당하는 시료로 실험을 진행하였다. 시료를 증류수로 추출한 후 100배 희석한 후 DMB 시약으로 유도체화 시켜 Heating mental block (50°C, 150min) 으로 반응을 진행하였다. 컬럼은 Agilent XDB C18, 4.6 mm×150 mm, 5 μm로 실험을 하였다.

표준용액 분석 결과 N-acetylnueraminic acid peak가 약 11분대에 나타났으며 최저 농도에서만 표준물질 Peak가 검출되었고 그 이상의 농도에서는 Overlaped 된 현상이 나타났다. 시험용액은 표준물질과 동일한 시간에 Peak가 검출되었다. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램 아래와 같다.

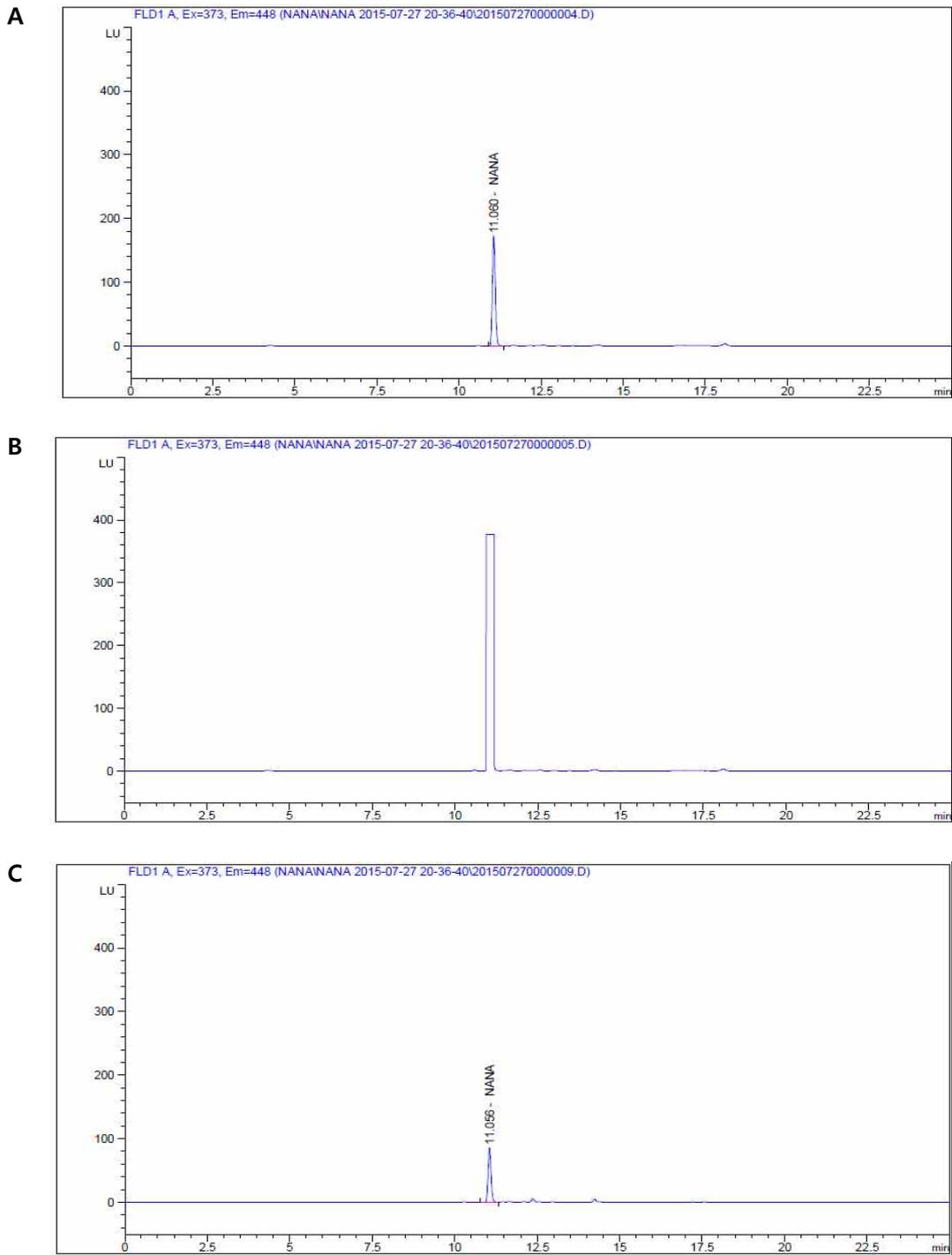


그림. 기능성 원료 N-acetylneuraminic acid 중 N-acetylneuraminic acid chromatogram.
 (A: 최저농도, B: 최저농도 이상, C: 시험용액)

표준용액은 약 5 mg/ 50 ml(100 ppm)로 조제 후 이를 적절히 희석하여 기기분석 하였으나 최저 농도에서만 Peak가 검출되어 표준용액의 검량선 작성이 불가능 하였다. 위 결과, 유도체화가 가능한 최적의 농도 및 본 연구원의 FLD Cell 크기 및 감도 조건에 따른 영향으로 약10~11 ppm이하로 표준용액 Stock solution을 제조 할 예정이다.

표 . 1차 표준용액 분석결과

STD level	농도(ug/ml)	area
1	7.113	1048.75781
2	14.225	Overlaid
3	28.450	Overlaid
4	56.900	Overlaid
5	113.800	Overlaid

시료 약 750~800mg을 취해 40mL 증류수로 추출하여 100배 희석하여 전처리를 진행하였으며 위 용액 중 300ul을 DMB 시약과 반응시켜 Heating mental block 50℃ 에서 150min 동안 유도체화 시켰다. 3 반복 분석한 결과, 재현성 있는 결과를 얻을 수 없었으며 시료량 및 희석배수에 대한 조건변경이 필요하다고 판단되었다.

표 . 기능성 원료 N-acetylnueraminic acid 함량

	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	NaNa 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
#1	3.56174	791.3	40	0.99	17.8245	
#2	3.58663	815.5	40	0.99	17.4164	25.291± 13.29
#3	7.89992	769.9	40	0.99	40.6334	

(2) 2차 실험(2015-08-05, 분석법 1)

1차 실험을 통해 문제점을 확인하였으며 표준품 농도 및 시료량을 변경하여 정밀성 및 Lot별 함량 실험을 진행하였다.

표. 1차 실험과 2차 실험 변경사항 요약

변경사항	표준품 최고농도	시료량	시료 희석배수
1차 실험	약 100ppm	700~800mg	100배 희석
2차 실험	약 11ppm	50~60mg	10배 희석

표준용액 분석 결과 N-acetylnueraminic acid peak가 약 11분대에 나타났으며, 시험용액에서도 동일한 시간대에 peak가 나타났다. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램은 아래와 같다.

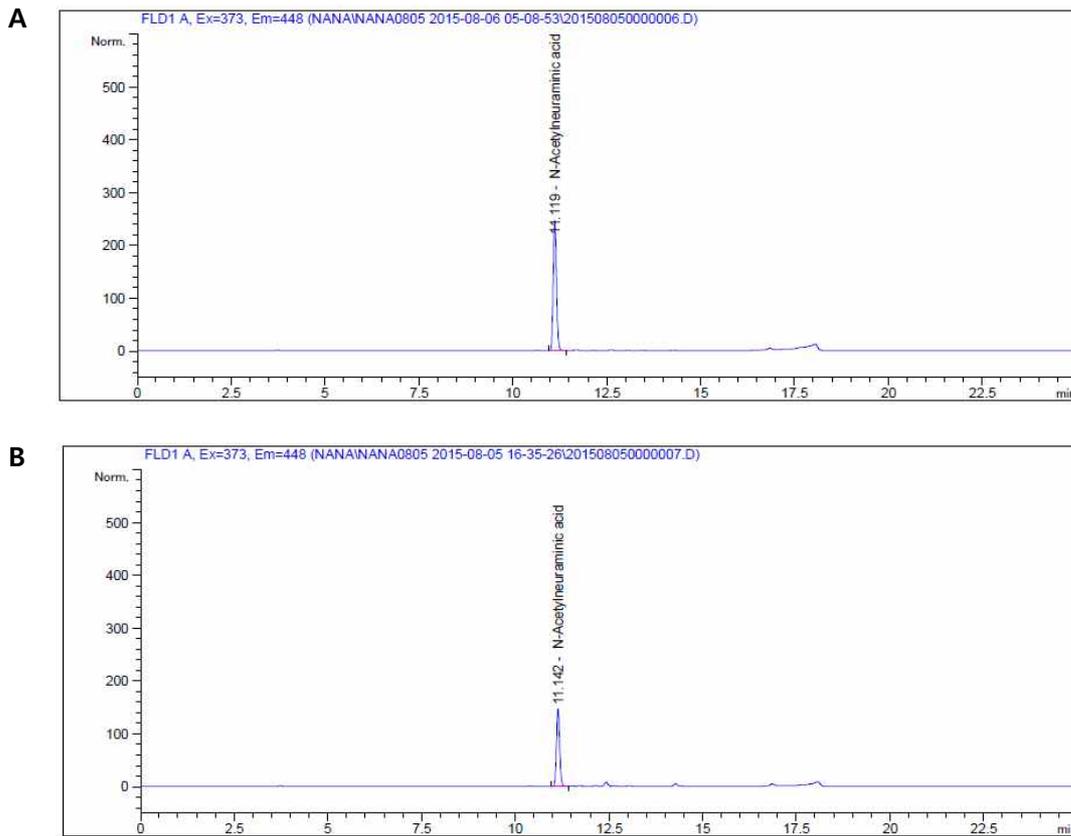


그림 . 기능성 원료 N-acetylneuraminic acid 중 N-acetylneuraminic acid chromatogram.

(A: 표준용액, B: 시험용액)

표준물질 4.44 mg/100 ml(44.4 ppm)로 조제 후 이를 적절히 희석하여 기기분석 하였다. 그 결과 N-acetylneuraminic acid는 1.388~11.100 ppm에서 직선성이 나타남이 확인되었다 ($R^2=0.9995$). 표준용액의 검량선 결과는 아래와 같다.

표. 2차 표준용액 분석결과

STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	1.388	194.89098	
2	2.775	384.45663	
3	5.550	730.58252	
4	8.325	1090.52698	
5	11.100	1482.64844	

Lot간 함량을 알아보기 위해 업체에서 제공해준 시료 5 Lot를 3반복으로 진행하였다. 제조번호 2014.07.02, 제조번호 2015.05.28 원료는 50mg을 50mL 증류수로 녹인 후 100배 희석

하여 실험을 진행하였고, 나머지 원료는 50mg을 50mL 증류수로 녹인 후 10배 희석하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 제조번호 2014.11.17일자 원료의 함량은 47.738 ± 1.08 mg/g, 제조일자 2014.07.02일자 원료의 함량은 217.914 ± 4.23 mg/g, 제조일자 2015.05.28일자 원료의 함량은 232.705 ± 21.76 mg/g, 제조일자 2015.07.29일자 원료의 함량은 12.078 mg/g, GMP 시료는 10.136 mg/g 으로 나타났다. 반복 실험 간의 편차가 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

표. 기능성 원료 N-acetylneraminic acid 함량(Lot간 함량편차)

제조번호	반복수	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채 취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	희석 배수	NaNa 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
2014. 11.17	#1	6.60157	67.5	50	0.99	10	48.4115	47.738± 1.08
	#2	5.88007	62.6	50	0.99	10	46.4958	
	#3	6.03098	61.8	50	0.99	10	48.3064	
2014. 07.02	#1	2.22890	50.1	50	0.99	100	220.2207	217.914± 4.23
	#2	2.42721	56.4	50	0.99	100	213.0264	
	#3	2.35194	52.8	50	0.99	100	220.4944	
2015. 05.28	#1	2.66161	59.0	50	0.99	100	223.3046	232.705± 21.76
	#2	2.33459	53.2	50	0.99	100	217.2222	
	#3	2.63313	50.6	50	0.99	100	257.5888	
GMP	#1	1.72802	53.7	50	0.99	10	15.9287	-
2015. 07.29	#1	1.75541	50.8	50	0.99	10	17.1049	-

(3) 3차 실험(2015-08-10, 분석법 1)

표준용액과 시험용액을 분석한 결과 N-acetylneraminic acid peak가 약 11분대에 나타났으며 Peak 분리도에는 문제가 없는 것으로 나타났다. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램은 아래와 같다.

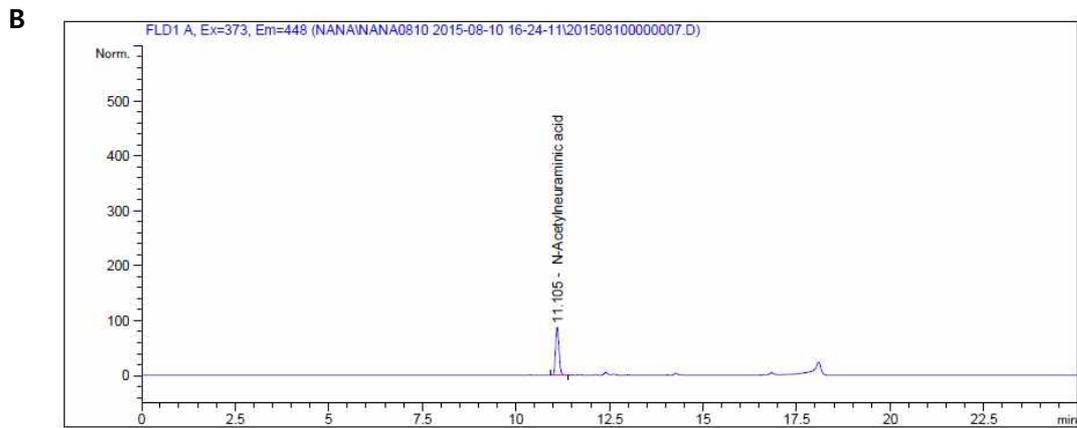
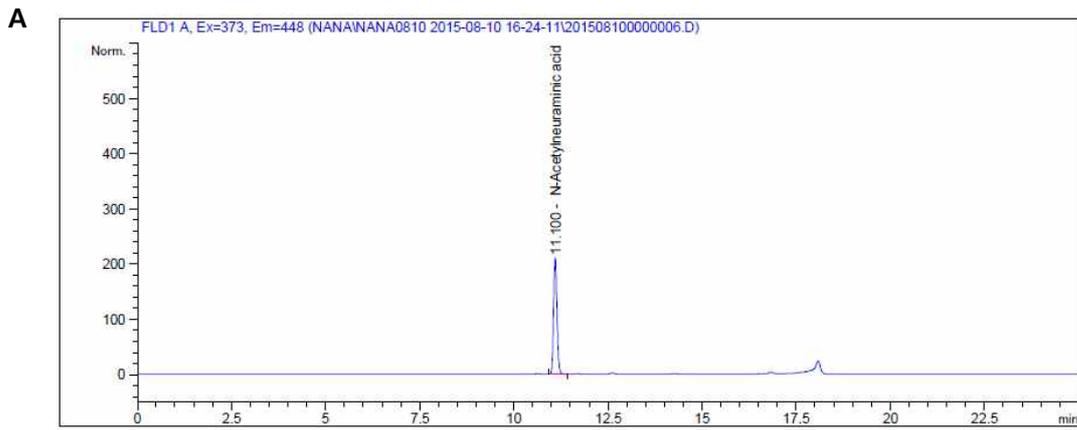


그림 . 기능성 원료 N-acetylneuraminic acid 중 N-acetylneuraminic acid chromatogram.
(A: 표준용액, B: 시험용액)

표준물질 5.72 mg/50 ml(114.4 ppm)로 조제 후 이를 적절히 희석하여 기기분석 하였다. 그 결과 N-acetylneuraminic acid는 1.430~11.440 ppm에서 직선성이 나타남이 확인되었다 ($R^2=0.9999$). 표준용액의 검량선 결과는 아래와 같다.

표. 3차 표준용액 분석결과

STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	1.430	175.08212	
2	2.860	343.06616	
3	5.720	680.79102	
4	8.580	1003.44434	
5	11.44	1328.52100	

2차 실험과 동일한 방법으로 실험을 진행하였다. 제조번호 2014.07.02, 제조번호 2015.05.28 원료는 50mg을 50mL 증류수로 녹인 후 100배 희석하여 실험을 진행하였고, 나머지 원료는 50mg을 50mL 증류수로 녹인 후 10배 희석하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 제조번호 2014.11.17일자 원료의 함량은 43.249 ± 0.36 mg/g, 제조일자 2014.07.02일자 원료의 함량은 193.745 ± 1.90 mg/g, 제조일자 2015.05.28일자 원료의 함량은 192.184 ± 1.22 mg/g, 제조일자 2015.07.29일자 원료의 함량은 12.078 mg/g, GMP 시료는 10.136 mg/g 으로 나타났다.

2차 실험 결과와 유사한 함량으로 나타났으며 함량 편차는 개선되었지만 시료 중 GMP, 제조번호 2015.07.29는 제조공정에 따른 이론 함량과 차이가 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

표. 기능성 원료 N-acetylnueraminic acid 함량(Lot간 함량)

제조번호	반복수	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채 취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	희석 배수	NaNa 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
2014. 11.17	#1	4.69072	53.3	50	0.99	10	43.5630	43.249± 0.36
	#2	5.95756	68.8	50	0.99	10	42.8633	
	#3	3.86812	44.2	50	0.99	10	43.3194	
2014. 07.02	#1	2.09766	53.8	50	0.99	100	193.0003	193.745± 1.90
	#2	2.30405	59.3	50	0.99	100	192.3280	
	#3	2.08175	52.6	50	0.99	100	195.9061	
2015. 05.28	#1	2.02229	51.8	50	0.99	100	193.2497	192.184± 1.22
	#2	1.77284	45.6	50	0.99	100	192.4464	
	#3	2.23245	57.9	50	0.99	100	190.8571	
GMP	#1	1.02584	50.1	50	0.99	10	10.1355	-
2015. 07.29	#1	1.37128	56.2	50	0.99	10	12.0780	-

(4) 4차 실험(2015-08-12, 분석법 2)

기존 실험에 대한 함량편차 및 재현성에 문제점이 발견되어 지표물질에 대한 문헌조사를 한 결과, 위 물질은 산 가수분해 가정을 거치지 않으면 유도체화 효율이 떨어진다고 나타났다.

으며 동량의 유도체화 시약으로 표준품과 시료를 반응 시켜야 정확한 함량을 얻을 수 있다고 나타났다.

위 조사 결과를 바탕으로 시료를 증류수에 녹인 후 2M formic acid로 Heating mental block 80°C, 60min 산 가수분해 반응을 진행하였다.

표준용액과 시험용액을 분석한 결과 N-acetylneuraminic acid peak가 약 11분대에 나타났으며 Peak 분리도에는 문제가 없는 것으로 나타났다. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램은 아래와 같다.

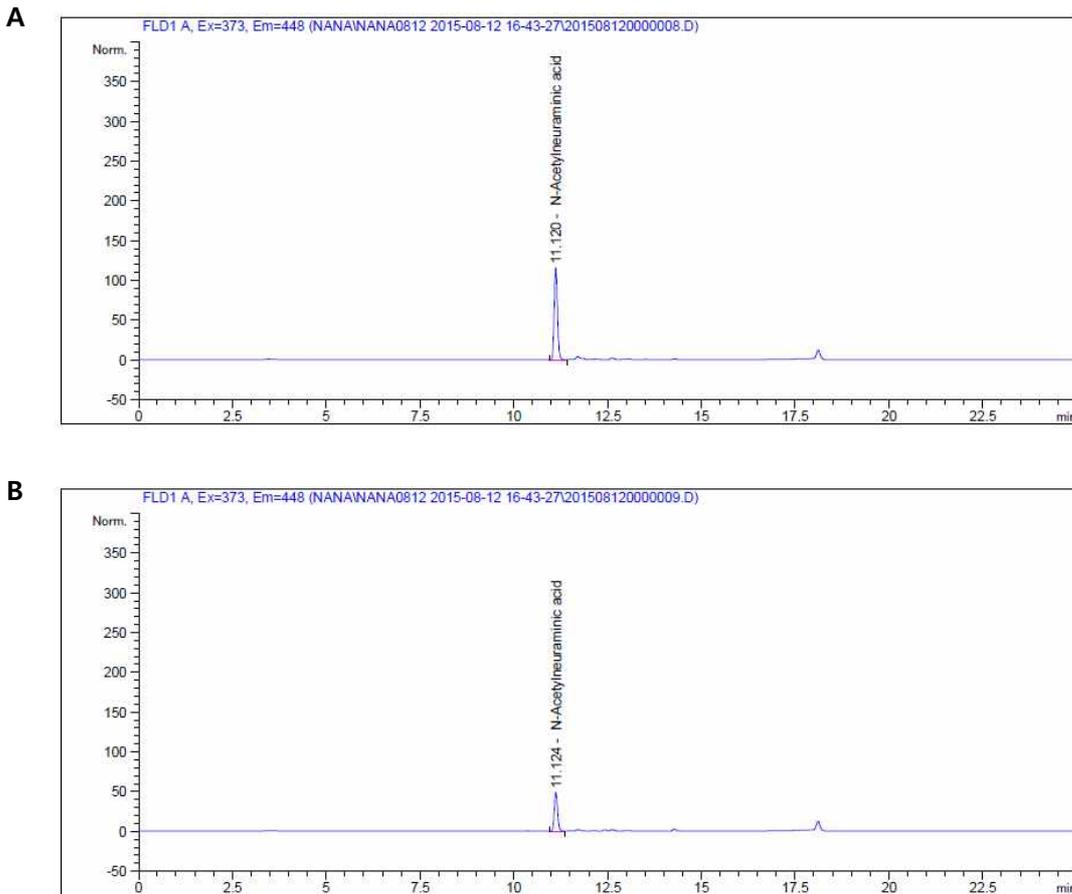


그림 . 기능성 원료 N-acetylneuraminic acid 중 N-acetylneuraminic acid chromatogram.

(A: 표준용액, B: 시험용액)

표준물질 5.70 mg/50 ml(114.0 ppm)로 조제 후 이를 적절히 희석하여 기기분석 하였다. 그 결과 N-acetylneuraminic acid는 1.425~11.400 ppm에서 직선성이 나타남이 확인되었다 ($R^2=1.0000$). 표준용액의 검량선 결과는 아래와 같다.

표. 4차 표준용액 분석결과

STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	1.425	87.33143	
2	2.850	175.91167	
3	5.700	351.06723	
4	8.550	526.90356	
5	11.400	698.76215	

제조번호 2014.07.02, 제조번호 2015.05.28 원료는 50mg을 50mL 증류수로 녹인 후 100배 희석하여 2M formic acid로 산 가수분해하였고, 나머지 원료는 50mg을 50mL 증류수로 녹인 후 10배 희석하여 2M formic acid로 산 가수분해하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 제조번호 2014.11.17일자 원료의 함량은 43.249 ± 0.36 mg/g, 제조일자 2014.07.02일자 원료의 함량은 193.745 ± 1.90 mg/g, 제조일자 2015.05.28일자 원료의 함량은 192.184 ± 1.22 mg/g, 제조일자 2015.07.29일자 원료의 함량은 12.078 mg/g, GMP 시료는 10.136 mg/g 으로 나타났다.

기준규격 및 함량 확인은 제조번호 2015.07.29 원료를 기준으로 실험을 진행하여 위 두 Lot의 함량을 비교하였을 때 제조공정에 따른 이론 함량과 유사한 값을 얻을 수 있었다.

표. 기능성 원료 N-acetylnueraminic acid 함량(Lot간 함량)

제조번호	반복수	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채 취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	희석 배수	NaNa 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
2014.11.17	#1	4.77273	52.2	50	0.99	10	45.2586	43.249±0.36
	#2	5.10132	56.3	50	0.99	10	44.8517	
	#3	4.88204	55.3	50	0.99	10	43.7000	
2014.07.02	#1	2.43348	59.2	50	0.99	100	203.4751	193.745±1.90
	#2	2.76743	65.1	50	0.99	100	210.4267	
	#3	2.15435	51.4	50	0.99	100	207.4714	
2015.05.28	#1	2.43936	57.5	50	0.99	100	209.9971	192.184±1.22
	#2	2.24929	52.5	50	0.99	100	212.0759	
	#3	2.50172	59.7	50	0.99	100	207.4290	
GMP	#1	6.78485	52.1	50	0.99	10	64.4626	-
2015.07.29	#1	7.40770	53.7	50	0.99	10	68.2833	-

(5) 5차 실험(2015-10-09, 분석법 2)

5차 실험에서는 4차 실험과 동일한 방법으로 실험을 진행하였다. 표준용액을 분석한 결과 약 10.4분에 N-acetylneuraminic acid peak가 검출되었으며 시험용액 에서도 동일한 시간대에 단일물질로 N-acetylneuraminic acid peak가 나타났다. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램은 아래와 같다.

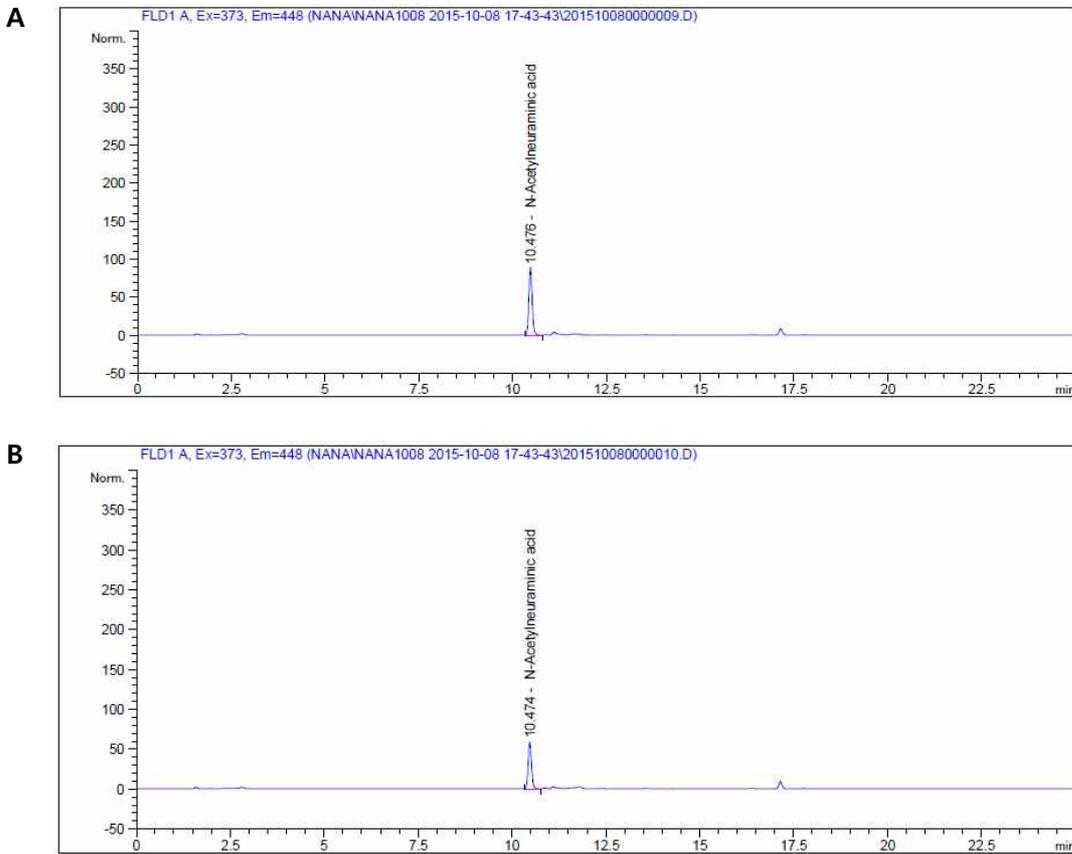


그림 . 기능성 원료 N-acetylneuraminic acid 중 N-acetylneuraminic acid chromatogram.

(A: 표준용액, B: 시험용액)

표준물질 5.31 mg/100 ml(53.1 ppm)로 조제 후 이를 적절히 희석하여 기기분석 하였다. 그 결과 N-acetylneuraminic acid는 1.323~10.62 ppm에서 직선성이 나타남이 확인되었다 ($R^2=0.9999$). 표준용액의 검량선 결과는 아래와 같다.

표. 5차 표준용액 분석결과

STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	1.323	69.10750	
2	2.655	136.78000	
3	5.310	278.62399	
4	7.965	413.54364	
5	10.620	551.32623	

시료 약 50mg을 취해 50mL 증류수로 추출하여 10배 희석하여 전처리를 하였고 2M Formic acid를 사용하여 산 가수분해 반응을 하였다. 동일한 양의 표준용액/시험용액과 DMB 시약을 사용하여 Heating mental block 50℃ 에서 150min 동안 유도체화 시켰다. 6 반복 분석한 결과, 61.775 ± 0.54 mg/g 으로 재현성 있는 함량을 얻을 수 있었다.

표. 기능성 원료 N-acetylnueraminic acid 함량

반복수	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	희석 배수	NaNa 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
#1	6.98861	56.1	50	0.99	10	61.6642	61.775± 0.54
#2	6.65830	53.3	50	0.99	10	61.8360	
#3	6.36490	51.8	50	0.99	10	60.8229	
#4	7.02294	56.2	50	0.99	10	61.8569	
#5	6.42801	51.3	50	0.99	10	62.0247	
#6	6.61023	52.4	50	0.99	10	62.4440	

라. 최종 설정된 시험법

(1) 실험방법

(가) 장비

HPLC System Agilent 1200 Infinity, USA
 G1311B 1260 Quat Pump, G1329B 1260 ALS
 G1316A 1260 TCC, G1321B 1260 FLD Spectra

(나) 시약 및 시액

- ① N-acetylnueraminic acid 표준품 : Sigma, SLBC5231V, 99%
- ② 2-Mercaptoethanol : Sigma, M6250
- ③ Sodium hydrosulfite : Sigma, 71699
- ④ 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene dihydrochloride : Sigma, D4784
- ⑤ Acetic acid : J.T.Baker, K15A07
- ⑥ Acetonitrile : Duksan, HPLC grade
- ⑦ Formic acid: Sigma, 695076
- ⑧ 3차 증류수

(다) 표준용액 제조

표준품(N-Acetylneuraminic acid) 약 5mg을 취하여 증류수 100mL로 정용한 후 위 용액 중 1mL을 5mL로 정용한 다음 적절한 농도로 희석하여 검량선 작성용 표준용액으로 한다.

(라) 시험용액 조제

시료 약 50mg을 정용플라스크 50mL에 취한 후 증류수로 녹인 후 30min 초음파 추출한다. 위 용액을 실온에서 방냉 한 후 10배 희석하여 시험용액으로 사용한다.

(마) 실험방법

- ① 표준용액/시험용액 300ul + 2M formic acid 300ul
- ② Heating mental block (80°C, 60min)
- ③ 얼음에서 식히기(또는 냉동 10min)
- ④ 원심분리(13,000rpm, 10min)
- ⑤ 위의 상층액 300ul + 300ul DMB시약
- ⑥ Heating mental block (50°C, 150min)
- ⑦ 얼음에서 식히기(또는 냉동 10min)
- ⑧ 기기분석

(바) 기기분석조건

Instrument	HPLC system			
Detector	FLD detector			
Column	Agilent XDB C18 (4.6mm × 150mm, 5um)			
wavelength	Ex=373nm	Em=448nm		
	A - DW			
	B - Acetonitrile			
Mobile Phase	Time(min)	A(%)	B(%)	Flow(mL/min)
	0	95	5	1.0
	5	95	5	1.0
	11	80	20	1.0
	13	60	40	1.0
	18	40	60	1.0
	21	95	5	1.0
	25	95	5	1.0
Run time	25min			
Oven Temp.	45°C			

(사) 계산

$$\text{N-acetylneuraminic acid (mg/g)} = \frac{\text{시험용액 농도(ug/mL)} \times \text{희석용량(mL)} \times \text{표준용액순도}}{\text{시료량(mg)}}$$

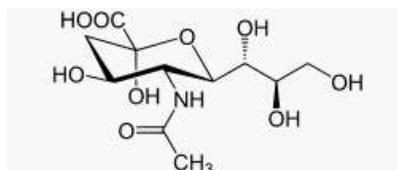
3. 시험법검증

기능성 원료 중 N-acetylneuraminic acid 함량을 확인하기 위하여 설정된 분석법의 유효성을 검증하였다. 설정된 방법으로 분석법의 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 범위(Range) 등의 항목을 검토하였다.

표 . 기능성 원료 중 N-acetylneuraminic acid 분석법의 유효성 검증(요약)

항 목	평가 방법	설 정 값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 검출시간(Retention time)	o 검출시간 : 약 10.4~10.5분
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 5개 농도에서 직선성 확인	o 목적농도의 20~200%에서 확인 1.323~11.380 mg/L o R ² : 1.000
	시료에 대한 6개 농도에서 직선성 확인	o 시료채취량의 50~140%에서 확인 o R ² : 0.999
정확성 (Accuracy)	시료 중 3개 농도로 표준 물질 첨가하여 회수율 검토	o 검출된 표준물질농도 - 13.45~26.90 ug/ml 회수율 - 97.435~101.077% RSD(%) - 1.27~1.72%
정밀성 (Precision)	3일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가	o 실험실내 정밀성 함량 - 60.6509~62.9893 mg/g RSD(%) - 1.634%
		o 반복정밀성 함량 - 60.0521~62.5949 mg/g RSD(%) - 0.868~1.205%
범위 (Range)	직선성, 정확도, 정밀도 고려 후 설정	o 1.323~11.380 mg/L

가. 분석물질



- (1) 성분명: N-acetylneuraminic acid
- (2) CAS Number : [131-48-6]
- (3) Chemical name :
5-(acetylamino)-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosonic acid
- (4) Molecular formula : C₁₁H₁₉NO₉
- (5) Molecular weight : 309.273g/mol

나. 분석시료

G-NANA

다. 분석방법

(1) 고속액체크로마토그래피법

(가) 장비

HPLC System Agilent 1200 Infinity, USA
 G1311B 1260 Quat Pump, G1329B 1260 ALS
 G1316A 1260 TCC, G1321B 1260 FLD Spectra

(나) 시약 및 시액

- ① N-acetylneuraminic acid 표준품 : Sigma, SLBC5231V, 99%
- ② 2-Mercaptoethanol : Sigma, M6250
- ③ Sodium hydrosulfite : Sigma, 71699
- ④ 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene dihydrochloride : Sigma, D4784
- ⑤ Acetic acid : J.T.Baker, K15A07
- ⑥ Acetonitrile : Duksan, HPLC grade
- ⑦ Formic acid: Sigma, 695076
- ⑧ 3차 증류수

(다) 표준용액 제조

표준품(N-Acetylneuraminic acid) 약 5mg을 취하여 증류수 100mL로 정용한 후 위 용액 중 1mL을 5mL로 정용한 다음 적절한 농도로 희석하여 검량선 작성용 표준용액으로 한다.

(라) 시험용액 조제

시료 약 50mg을 정용플라스크 50mL에 취한 후 증류수로 녹인 후 30min 초음파 추출한다. 위 용액을 실온에서 방냉 한 후 10배 희석하여 시험용액으로 사용한다.

(마) 실험방법

- ① 표준용액/시험용액 300ul + 2M formic acid 300ul
- ② Heating mental block (80°C, 60min)
- ③ 얼음에서 식히기(또는 냉동 10min)

- ④ 원심분리(13,000rpm, 10min)
- ⑤ 위의 상층액 300ul + 300ul DMB시약
- ⑥ Heating mental block (50°C, 150min)
- ⑦ 얼음에서 식히기(또는 냉동 10min)
- ⑧ 기기분석

(바) 기기분석조건

Instrument	HPLC system			
Detector	FLD detector			
Column	Agilent XDB C18 (4.6mm × 150mm, 5um)			
wavelength	Ex=373nm	Em=448nm		
	A - DW			
	B - Acetonitrile			
Mobile Phase	Time(min)	A(%)	B(%)	Flow(mL/min)
	0	95	5	1.0
	5	95	5	1.0
	11	80	20	1.0
	13	60	40	1.0
	18	40	60	1.0
	21	95	5	1.0
	25	95	5	1.0
Run time	25min			
Oven Temp.	45°C			

(사) 계산

$$\text{N-acetylnueraminic acid (mg/g)} = \frac{\text{시험용액 농도(ug/mL)} \times \text{희석용량(mL)} \times \text{표준용액순도}}{\text{시료량(mg)}}$$

라. 시험법 검증(Method Validation) 결과

(1) 특이성(Specificity)

(가) 기능성 원료 중 N-acetylnueraminic acid 의 retention time과 peak 분리도 확인

N-acetylnueraminic acid 표준물질과 시료를 동일한 분석법으로 분석하여 검출된 peak 를 확인하였다. 표준용액과 시료에서 약 10.5분대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인하였다. 시험용액에서 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인할 수 있었다

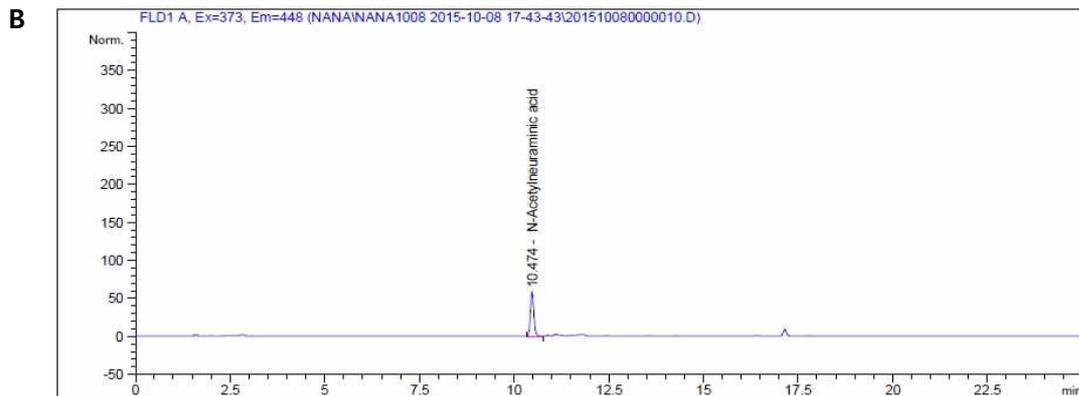
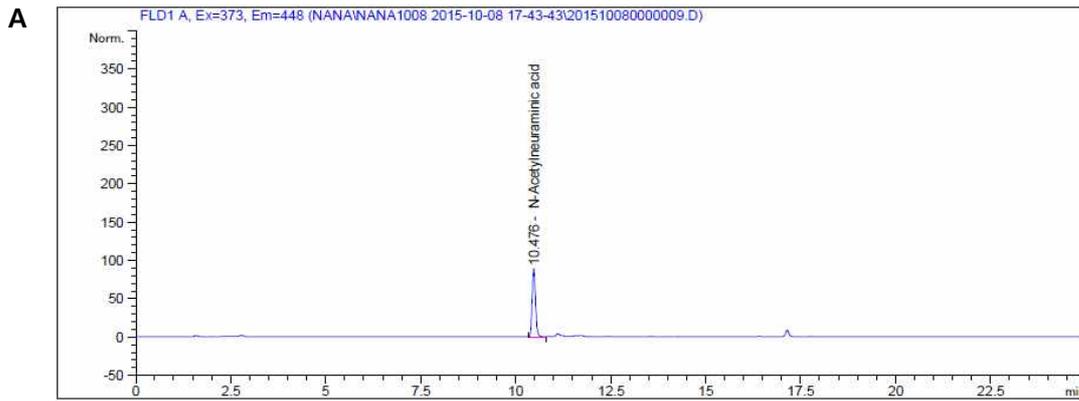


그림. 표준용액과 시험용액 중 N-acetylneuraminic acid의 크로마토그램.

(A: 표준용액, B: 시험용액)

(2) 직선성(Linearity)

(가) 표준물질에 대한 직선성(Linearity)

표준물질을 농도별로 희석하여 분석한 결과로 직선성을 평가하였다. N-acetylneuraminic acid의 검출농도 약 5~7 ug/ml를 목적농도 100%로 설정하여 20~200% 범위에서 3반복 평가하였다. 분석결과 농도별로 직선성이 확인되었으며, 기울기 값은 46.176~54.357, R^2 는 0.9999~1.000로 나타났다.

표. N-acetylneuraminic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

농도(%)	검출농도 (ug/ml)	면적 (area)	검량선
20	1.323	69.10750	
50	2.655	136.78000	
100	5.310	278.62399	
150	7.965	413.54364	
200	10.620	551.32623	
기울기	51.924		
y 절편	0.4193		
R^2	0.9999		

표. N-acetylneraminic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

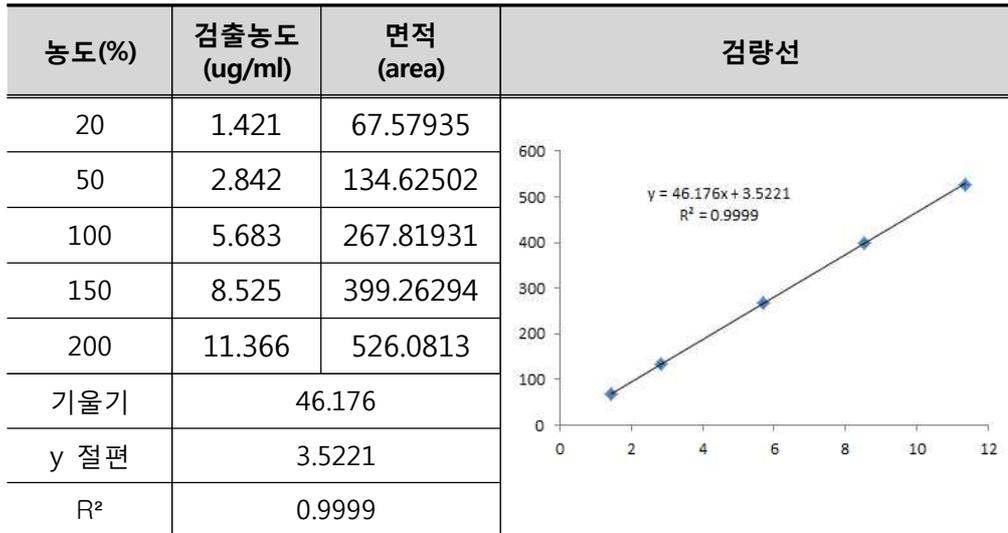
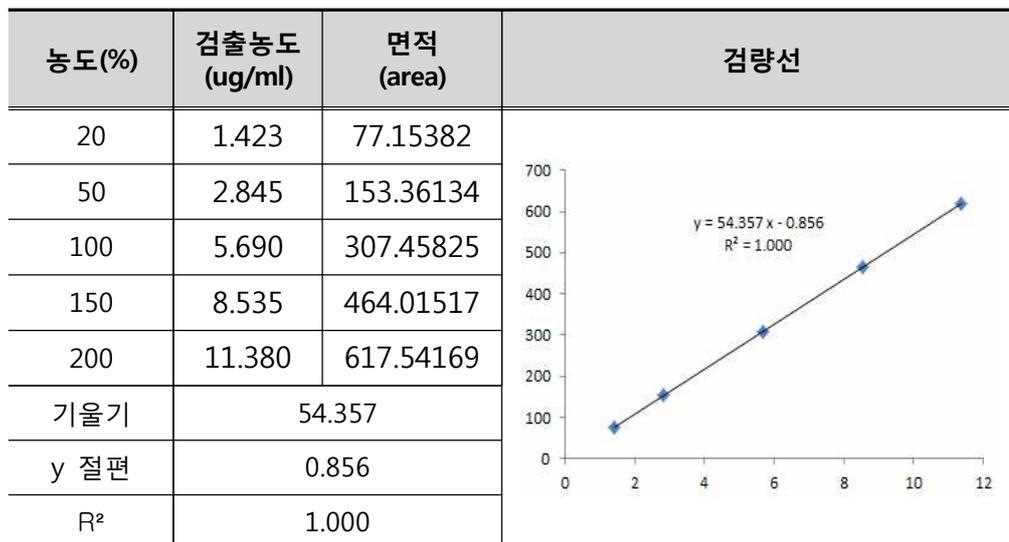


표. N-acetylneraminic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성 (3회 실험)



(나) 시료에 대한 직선성(Linearity)

시료를 중량별로 측정하여 전처리 분석한 결과로 직선성을 평가하였다. 시료 50 mg 을 취해 증류수 50mL을 가한 후 10배 희석하여 검출된 농도 6 ug/mL을 목적농도 100%로 설정하여 50~200% 범위에서 평가한 결과 농도별로 직선성을 확인할 수 있었다. 기울기 값은 6.0244~6.7789 R²는 0.9990~0.9998 으로 나타났다.

표. 시료를 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

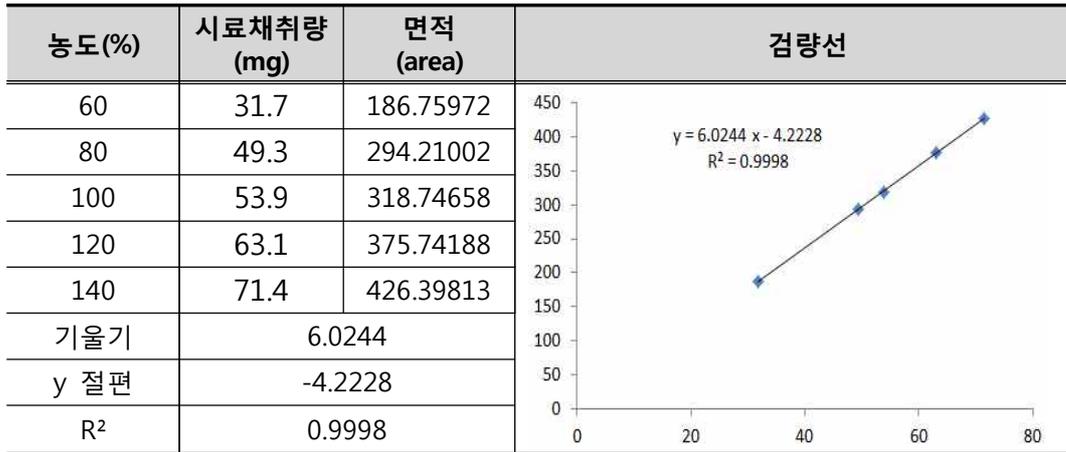


표. 시료를 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

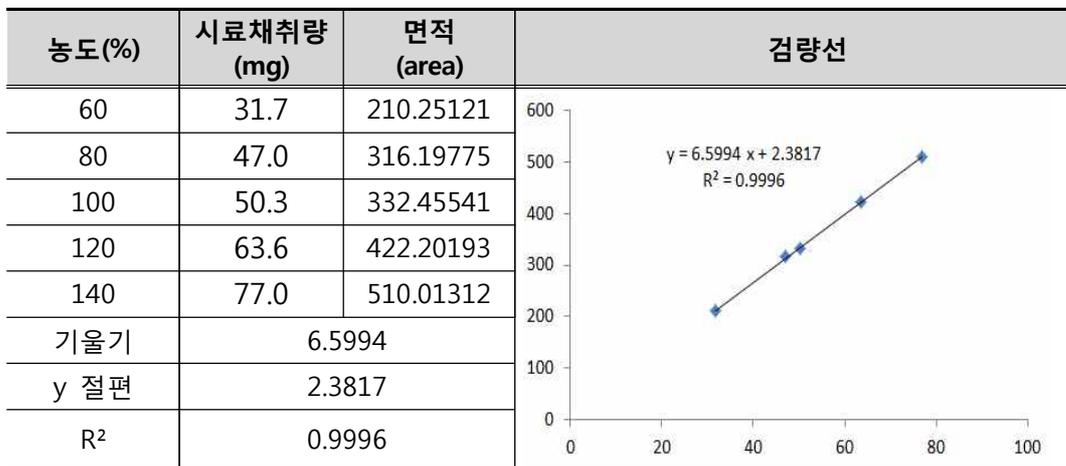
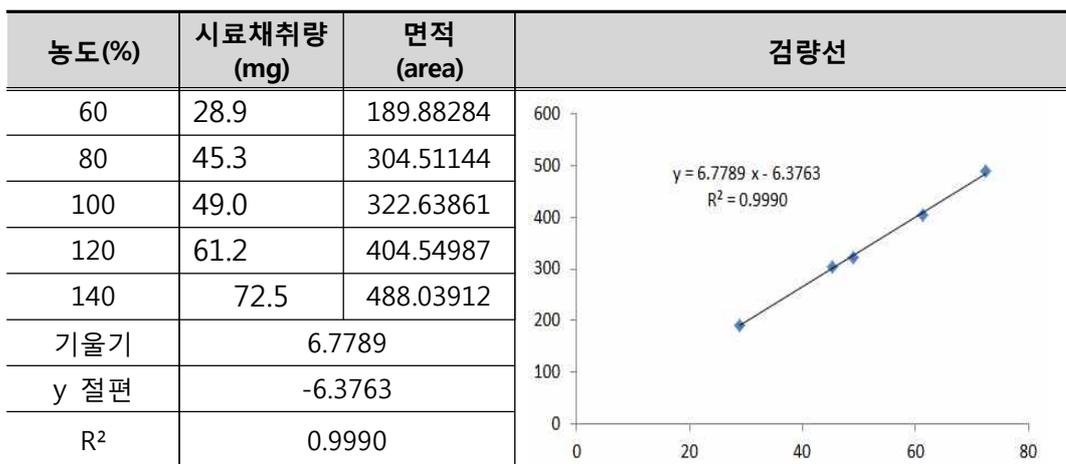


표. 시료를 이용한 검량선 작성 (3회 실험)



(3) 정확성(Accuracy), 회수율(Recovery)

기능성 원료 중 *N-acetylnueraminic acid (NaNa)의 정확성을 측정하기 위해 시료에 이미

농도를 알고 있는 표준용액을 넣어 회수율을 구함으로써 정확성을 확인하였다. 검출농도를 고려하여 시료 약 50 mg을 취한 후 표준용액을 검출 농도로 1.31~3.93 mg/L 넣은 후 동일한 전처리 방법으로 분석하였다. 농도별로 3반복씩 진행한 결과 회수율 97.435~101.077%, 표준편차(SD) 1.261~1.703%, 상대 표준편차(RSD)는 1.27~1.72%로 나타났다. 전체적으로 97% 이상의 회수율을 보이므로 분석방법에 문제는 없다고 사료된다.

표. 시료 중 표준용액 농도별 회수율 확인

sample (mg/L)	원료(mg) + 추가표준용액 농도(ug/mL)	이론함량 (mg/L)	검출된 Area	검출함량 (ug/mL)	*NaNa 함량 (mg/g)	회수율 (%)	평균 (%)	RSD (%)
G-NaNa 원료	-		299.98029	6.51332	6.2241	-	6.108	-
	-		299.46091	6.50202	6.0159	-		
	-		337.37326	7.32674	6.0851	-		
1.31	53.0(mg) + 1.31	7.84809	356.13403	7.73485	7.2241	98.557	98.9	1.72
	53.5(mg) + 1.31	7.90977	354.84952	7.70691	7.1307	97.435		
	62.5(mg) + 1.31	9.02001	418.45447	9.09053	7.1997	100.782		
2.62	50.0(mg) + 2.62	8.78800	395.05911	8.58160	8.4958	97.651	99.1	1.27
	55.4(mg) + 2.62	9.45415	434.58182	9.44135	8.4359	99.865		
	51.8(mg) + 2.62	9.01005	413.94473	8.99243	8.5932	99.804		
3.93	52.3(mg) + 3.93	10.38173	482.95233	10.49357	9.9318	101.077	99.4	1.50
	50.2(mg) + 3.93	10.12268	459.20264	9.97694	9.8378	98.560		
	51.8(mg) + 3.93	10.32005	467.53732	10.15825	9.7072	98.432		

(4) 정밀도(Precision)

(가) 실험실내 정밀성(Intermediate precision)

기능성 원료 중 N-acetylnueraminic acid 함량의 분석 재현성 시험을 위해 분석 장비, 분석자와 분석일자를 달리하여 분석을 진행하였다. 결과는 시료를 3회 반복 전처리 한 후 실험하여 측정치를 비교하였고, 사용한 실험 장비는 두 가지(Agilent HPLC 1200 infinity와 Agilent HPLC 1260 infinity)였고, 4일간, 두 명의 시험자가 분석하였다. 분석 결과 N-acetylnueraminic acid 함량은 평균 61.6450 mg/g, 표준편차(SD) 1.007 mg/g, 상대표준편차

(RSD)는 1.634 %로 나타났다.

표. 분석일자, 분석자, 분석기간 N-acetylnueraminic acid 함량

	일자	분석자	기기	G-NaNa 함량(mg/g)	평균(mg/g)	SD(mg/g)	RSD(%)
1	2015-10-09	A	Agilent 1260	61.7748	61.6450	1.007	1.634
2	2015-10-12	B	Agilent 1260	62.9893			
3	2015-10-27	A	Agilent 1260	61.1650			
4	2015-10-29	A	Agilent 1200	60.6509			

(나) 반복 정밀성 (Repeatability, Intra-assay precision)

기능성 원료 중 N-acetylnueraminic acid 함량 분석의 반복 정밀성을 확인하기 위해 한 번 진행시 각각 6번의 전처리를 하여 분석을 진행하였다. 일자를 달리하여 측정된 결과 72.730~77.265 mg/g 범위로 검출되었고, 각 일자에서의 함량은 평균 60.6509~62.9893 mg/g, 표준편차(SD) 0.459~0.759 mg/g, 상대표준편차(RSD) 0.750~1.205%로 분석되었다.

표. 분석일 10월 09일, 분석자 A, Agilent HPLC 1260 Infinity

	Area	시험용액 농도(ug/ml)	시료채취량 (mg)	G-NaNa 함량(mg/g)	Average (mg/g)	SD(mg/g)	RSD(%)
1	363.28247	6.98861	56.1	61.6642	61.7748	0.536	0.868
2	346.12357	6.65830	53.3	61.8360			
3	330.88202	6.36490	51.8	60.8229			
4	365.06552	7.02294	56.2	61.8569			
5	334.16058	6.42801	51.3	62.0247			
6	343.62665	6.61023	52.4	62.4440			

표. 분석일 10월 12일, 분석자 A, Agilent HPLC 1260 Infinity

	Area	시험용액 농도(ug/ml)	시료채취량 (mg)	G-NaNa 함량(mg/g)	Average (mg/g)	SD(mg/g)	RSD(%)
1	299.20789	6.41046	50.3	63.0850	62.9893	0.759	1.205
2	308.88300	6.61916	53.1	61.7040			
3	306.50946	6.56796	51.2	63.4988			
4	312.13177	6.68924	52.4	63.1903			
5	334.41751	7.16996	56.7	62.5949			
6	329.18729	7.05714	54.7	63.8626			

표. 분석일 10월 27일, 분석자 A, Agilent HPLC 1260 Infinity

	Area	시험용액 농도(ug/ml)	시료채취량 (mg)	G-NaNa 함량(mg/g)	Average (mg/g)	SD(mg/g)	RSD(%)
1	337.55219	6.22404	50.9	60.5285	61.1650	0.459	0.750
2	370.26535	6.82635	55.0	61.4372			
3	337.33276	6.22000	50.5	60.9683			
4	345.53860	6.37108	51.8	60.8819			
5	367.81723	6.78127	54.7	61.3662			
6	388.78009	7.16724	57.4	61.8081			

표. 분석일 10월 29일, 분석자 A, Agilent HPLC 1200 Infinity

	Area	시험용액 농도(ug/ml)	시료채취량 (mg)	G-NaNa 함량(mg/g)	Average (mg/g)	SD(mg/g)	RSD(%)
1	224.70532	6.27484	51.2	60.6650	60.6509	0.640	1.055
2	232.77174	6.50395	53.3	60.4025			
3	194.22444	5.40909	43.9	60.9909			
4	206.70926	5.76369	47.5	60.0637			
5	232.29761	6.49048	53.5	60.0521			
6	216.73366	6.04842	48.5	61.7313			

(5) 범위(Range)

기능성 원료 중 N-acetylneraminic acid 함량을 정량하기 위한 분석법의 정량 범위는 직 선성과 정확도, 정밀도를 고려하여 기능성 원료 중 N-acetylneraminic acid은 1.323~11.380 mg/L의 범위로 설정하였다.

4. 기준규격설정

본 연구 결과 기능성 원료 중 N-acetylneraminic acid 의 기준·규격은 다음과 같다.

가. 기능성 원료 중 N-acetylneraminic acid의 기준·규격

(1) 제조기준

(가) 원재료 : GMP

(2) 기준·규격

(가) 정상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 백색의 분말

(나) N-acetylnueraminic acid 함량 (mg/g) : 65 mg/g 의 80~150 %

(3) 시험법

(가) 정상

식품공전 제 10. 일반시험법 19. 정상시험법(관능시험법)

한국표준색이름(산업자원부 기술표준원) 참조

(나) N-acetylnueraminic acid 시험법(고속액체크로마토그래피법)

① 장비

HPLC System Agilent 1260 series, Agilent, USA
Quat Pump G1311B, Autosampler G1329B, DAD G1321B,
Column Oven G1316A, Degasser G1322A

Agilent 1200 series, Agilent, USA
Quat Pump G1311A, Autosampler G1329, DAD G1315D,
Column Oven G1316A, Degasser G1322A

Analytical Column Agilent XDB C18 (4.6X 150mm, 5um)

② 시약

- N-acetylnueraminic acid 표준품 : Sigma, SLBC5231V, 99%
- 2-Mercaptoethanol : Sigma, M6250
- Sodium hydrosulfite : Sigma, 71699
- 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene dihydrochloride : Sigma, D4784
- Acetic acid : J.T.Baker, K15A07
- Acetonitrle : Duksan, HPLC grade
- Formic acid: Sigma, 695076
- 3차 증류수

③ 표준용액 조제

표준물질 N-acetylnueraminic acid 약 5mg을 정밀하게 100mL의 증류수에 녹인 후 위 용액 1mL을 5mL 정용플라스크에 녹여 표준용액으로 사용한다. 이를 증류수를 이용하여 농도별로 적절하게 희석하여 working Solution으로 사용한다.

④ 시험용액 조제

시료 약 50mg을 정용플라스크 50mL에 취한 후 증류수로 녹인 후 30min 초음파 추출한다. 위 용액을 실온에서 방냉 한 후 10배 희석하여 시험용액으로 사용한다.

⑤ 실험방법

- 표준용액/시험용액 300ul + 2M formic acid 300ul
- Heating mental block (80°C, 60min)
- 얼음에서 식히기(또는 냉동 10min)
- 원심분리(13,000rpm, 10min)
- 위의 상층액 300ul + 300ul DMB시약
- Heating mental block (50°C, 150min)
- 얼음에서 식히기(또는 냉동 10min)
- 기기분석

⑥ 분석조건

Instrument	HPLC system			
Detector	FLD detector			
Column	Agilent XDB C18 (4.6mm × 150mm, 5um)			
wavelength	Ex=373nm	Em=448nm		
	A - DW			
	B - Acetonitrile			
Mobile Phase	Time(min)	A(%)	B(%)	Flow(mL/min)
	0	95	5	1.0
	5	95	5	1.0
	11	80	20	1.0
	13	60	40	1.0
	18	40	60	1.0
	21	95	5	1.0
	25	95	5	1.0
Run time	25min			
Oven Temp.	45°C			

⑦ 계산

$$\text{N-acetylneraminic acid 함량(mg/g)} = \frac{\text{시험용액 농도(ug/mL)} \times \text{희석용량(mL)} \times \text{표준용액순도}}{\text{시료량(mg)}}$$

(4) 기준 · 규격 설정근거

(가) 기능/지표성분 규격 설정에 관한 자료

기능/지표성분의 규격은 분석오차를 고려하여 표시하고자 하는 값에 대한 하한치와 상한치를 백분율로 설정한다. 일반적으로 추출물의 경우는 표시량의 80~120%를 원칙으로 하나 천연물의 경우 원료 Lot 별 기능/지표물질의 함량 편차가 커서 여러 Lot의 분석 데이터를 근거로 규격 함량을 달리 설정할 수 있다. 기능성 원료 중 N-acetylneraminic acid 함량은 설정한 시험방법으로 분석하여 측정하였으며, 분석 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science 15.0) One-way ANOVA을 이용하여 각 Lot 간의 평균값(mean), 표준편차(SD, standard deviation), 표준오차(SE, standard Error), 최소값, 최대값, 95% 신뢰구간에서의 상한

치(Upper Bound)와 하한치(Lower Bound)를 구하여 모두 포함할 수 있는 규격을 설정하였다.

① 기능성 원료 중 N-acetylneraminic acid 함량

기능성 원료 중 N-acetylneraminic acid의 기준규격을 설정하기 위하여 3 Lot를 각각 3반복 분석한 결과를 토대로 N-acetylneraminic acid의 함량 범위를 구하였다. 전체 평균±SD, 평균의 80~120%, 각 Lot별 하한치~상한치, 각 Lot 별 95% 신뢰구간에서의 하한치~상한치를 분석하여 분석오차 및 Lot 별 함량을 모두 포함할 수 있는 기준규격으로 65.0 mg/g의 80%~120%인 52.0~78.0 mg/g 으로 설정하였다. 천연물의 경우 기준규격 범위는 평균의 80%~120%로 설정하는 것이 일반적이지만, 65 mg/g 이상으로 원료를 관리 하여 평균값인 69.2 mg/g 보다 낮은 65.0 mg/g 으로 기준규격을 제안하였다.

표. Lot 별 N-acetylneraminic acid의 함량 분석결과

	Lot No.	LT315001P	LT315002P	LT315003P	평균
	반복수				
N-acetylneraminic acid 함량(mg/g)	1	70.5326	67.9725	68.2692	69.2115
	2	69.0222	69.2930	69.5016	
	3	69.7534	69.7099	68.8487	
	평균	69.7694	68.9918	68.8732	

표. Lot 별 N-acetylneraminic acid의 함량 범위 결과

Lot No.	표준편차 (SD)	표준오차 (SE)	최소값	최대값	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
LT315001P	0.755	0.436	69.0222	70.5326	68.91467	70.62413
LT315002P	0.907	0.524	67.9725	69.7099	67.96541	70.01819
LT315003P	0.617	0.356	68.2692	69.5016	68.17546	69.57087
전체	0.760	0.439	68.2692	70.5326	68.352	70.071

표. N-acetylneraminic acid 함량 범위(요약)

N-acetylneraminic acid(mg/g) 함량 범위	
전체 평균±SD	69.21±0.76
평균의 80~120%	55.4~83.1
기준규격 제안 범위	52.0~78.0
각 Lot 별 최소값~최대값	67.97~70.53

(나) 유해물질 규격 설정에 관한 자료

G-NANA의 유해물질 규격은 원재료 또는 제조과정 중 유해물질의 오염 또는 잔류가능성을 막고 안전성을 확보할 수 있도록 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정 중 유해물질규격설정항목(제13조제7호 가목 관련) [별표 2]에 준하여 설정하였다.

G-NANA의 경우 추출하여 분말화 하였으므로 중금속 4종(납, 총비소, 카드뮴, 총수은)과 미생물 중 대장균군만 유해물질규격으로 설정하였다.

표. 유해물질규격설정항목(식품의약품안전청고시 제 2011-34호 제13조 제7호 가목 관련)

원료	항목		규격	비고
모든 원료	중금속	납	< 10.8µg/일	
		총비소	< 150µg/일	
		카드뮴	< 3.0µg/일	
		총수은	< 2.1µg/일	
	미생물	대장균군	음성	
		세균수	≤ 100/g (액상제품에 한함)	
용매를 사용한 원료	잔류용매	헥산	< 0.005g/kg	
		이소프로필알콜	≤ 0.05g/kg	
		초산에틸		
		메틸알콜	≤ 0.03g/kg	
		아세톤		
해당 기준이 「식품의 기준 및 규격」에 설정되어 있는 원료	동물용 의약품		「식품의 기준 및 규격」에 따름	
	곰팡이 독소	아플라톡신		
		파롤린		
		오크라톡신		
		기타곰팡이독소		
	방사능 오염	¹³¹ I	≤ 300Bq/Kg, l	
¹³⁴ Cs+ ¹³⁷ Cs		≤ 370Bq/Kg, l		

① 중금속

G-NANA의 중금속 실험을 진행한 결과, 납 최대 0.0063 mg/kg, 카드뮴 최대 0.0040 mg/kg, 총비소 최대 0.0012 mg/kg로 검출되었고 총수은은 최대 0.003 mg/kg으로 검출되었다. 원료에서 발생할 수 있는 오차, 원료의 1일 최대섭취량, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에서 제안하고 있는 중금속 기준(상한값)을 고려하여 안전성에 문제가 없도록 설정하고자 하였으며, 그 결과 카드뮴, 총수은 1.0 mg/kg 이하로 설정하였고, 납은 1.0 mg/kg, 총비소는 1.0 mg/kg으로 설정하였다.

표. 중금속 분석결과

시 험 항 목	LT315001P	LT315002P	LT315003P	
중금속	납(mg/kg)	0.0046	0.0062	0.0063
	카드뮴(mg/kg)	0.0027	0.0040	0.0038
	총비소(mg/kg)	0.0005	0.0010	0.0012
	총수은(mg/kg)	0.003	0.002	0.002

표. G-NANA 중금속 규격 상한값

시 험 항 목		규격	상한값(이하)*
중금속	납(mg/kg)	< 10.8 μ g/일	10.8 μ g/500mg
	카드뮴(mg/kg)	< 3.0 μ g/일	3.0 μ g/500mg
	총비소(mg/kg)	< 150 μ g/일	150 μ g/500mg
	총수은(mg/kg)	< 2.1 μ g/일	2.1 μ g/500mg

* G-NANA 의 최대섭취량을 1g/일로 계산

표. 중금속 제안규격

시 험 항 목		제안규격(mg/kg)
중금속	납(mg/kg)	1.0 ^{a)}
	카드뮴(mg/kg)	1.0 ^{b)}
	총비소(mg/kg)	1.0 ^{c)}
	총수은(mg/kg)	1.0 ^{d)}

- a) 납 : 기능성 원료 중 N-acetylnueraminic acid의 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0 μ g/일의 납을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 10.8 μ g/일 보다 낮은 섭취 기준임.
- b) 카드뮴 : 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0 μ g/일의 카드뮴을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 3.0 μ g/일 보다 낮은 섭취 기준임.
- c) 총비소 : 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0 μ g/일의 총비소를 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 150 μ g/일 보다 낮은 섭취 기준임.
- d) 총수은 : 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0 μ g/일의 총수은을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 2.1 μ g/일 보다 낮은 섭취 기준임.

② 대장균군

대장균군은 실험결과 모든 원료에서 음성임이 확인되었고, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 따라 대장균군의 규격을 음성으로 설정하였다.

표. 대장균군 분석결과

시 험 항 목		LT315001P	LT315002P	LT315003P
미생물	대장균군	음성	음성	음성

표. 대장균군 제안규격

시 험 항 목		제안규격
미생물	대장균군	음성

(다) 유해물질 규격 미설정에 관한 자료

① 잔류농약

잔류농약은 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 의거하여 규격으로 설정하지는 않지만 시험결과를 제출하여야 하는 항목으로 「식품의 기준 및 규격」에 원재료에 대한 농약의 잔류허용기준이 있는 경우에는 「수입식품등검사지침」(제 2012-132호) 별표 3.1. 동시 다 분석 검사대상: 58종에 대하여 분석하여야 한다. 또한 식품으로 섭취 이력이 있거나 잔류농약이 오염될 수 있다고 판단되면 원재료에 대한 잔류허용기준이 없다 하여도 정밀검사항목 58종을 분석하여야 한다. 분석결과 정밀검사항목(58종)이 모두 불검출로 확인되었다.

표. 잔류농약 시험항목 및 시험방법

시 험 항 목	시 험 방 법
Atrazine, BHC, Bifenthrin, Captan, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Cyhalothrin, Cypermethrin, Cyprodinil, DDT, Diazinon, Dichlorvos, Dicolof, Endosulfan, Ethion, Fenarimol, Fenitrothion, Fenpropathrin, Fenvalerate, Fludioxonil, Imazilil, Iprodione, Iprovalicarb, Isoprothiolane, Malathion, Methidathion, Paclobutrazol, Parathion, Parathion-methyl, Permethrin, Phenthoate, Phosmet, Pirimicarb, Pirimiphos-methyl, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Quintozene, Tolclofos-methyl, Triadimefon, Triazophos, Triflumizole, Triflumuron	식품공전 제9.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1 식품일반 4.1.2 다중농약다성분분석법 4.1.2.2 다중농약 다성분 시험법.
Acetamidipid, Azoxystrobin, Boscalid, Carbaryl, Carbofuran, Fenhexamid, Flufenoxuron, Hexaflmuron, Methomyl, Methoxyfenozide, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Thiamethoxam, Flubendiamide	식품공전 제9.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1 식품일반 4.1.2 다중농약다성분분석법 4.1.2.2 다중농약 다성분 시험법.

표. 잔류농약(59종) 분석 결과

시 험 항 목	Lot 1 분석결과
BHC	불검출
Bifenthrin	불검출
Cabofuran	불검출
Chlorfenapyr	불검출

시 험 항 목	Lot 1 분석결과
Chlorothalonil	불검출
Chlorpyrifos	불검출
Chlorpyrifos-methyl	불검출
Cyhalothrin	불검출
Cypermethrin	불검출
Cyprodinil	불검출
DDT	불검출
Diazinon	불검출
Dichlorvos	불검출
Dicofol	불검출
Endosulfan	불검출
Fenarimol	불검출
Fenitrothion	불검출
Fenpropathrin	불검출
Fenvalerate	불검출
Fludioxonil	불검출
Imazalil	불검출
Iprodione	불검출
Isoprothiolane	불검출
Malathion	불검출
Methomyl	불검출
Methidathion	불검출
Paclobutrazol	불검출
Parathion	불검출
Parathion-methyl	불검출
Permethrin	불검출
Phenthoate	불검출
Phosmet	불검출
Pirimicarb	불검출
Procymidone	불검출
Quintozene	불검출
Triadimefon	불검출
Triflumizole	불검출
Triazophos	불검출
Prochloraz	불검출
Methoxyfenozone	불검출
Boscalid	불검출
Acetamiprid	불검출
Azoxystrobin	불검출
Atrazine	불검출
Ethion	불검출
Iprovalicarb	불검출
Carbaryl	불검출

시 험 항 목	Lot 1 분석결과
Captan	불검출
Tolclofos-methyl	불검출
Triflumuron	불검출
Thiamethoxam	불검출
Fenhexamid	불검출
Profenofos	불검출
Flubendiamide	불검출
Flufenoxuron	불검출
Pyraclostrobin	불검출
Pyrimethanil	불검출
Pirimiphos-methyl	불검출
Hexaflmuron	불검출

5. 영양성분분석

기능성 원료 중 N-acetylneraminic acid에 대한 영양성분분석은 아래와 같다.

표. 영양성분 시험방법 및 결과

시험항목	시 험 방 법	결 과
열량 (Kcal/100g)	식품공전 제10.일반시험법 1.일반성분시험법 6)열량의 계산	368.76
탄수화물(%)	식품공전 제10.일반시험법 1.일반성분시험법 5)탄수화물	12.13
조단백질(%)	AOAC OFFICIAL METHOD 991.20	79.52
조지방(%)	식품공전 제10.일반시험법 1.일반성분시험법 4)지질 (1) 조지방	0.24
수분(%)	식품공전 제10.일반시험법 1.일반성분시험법 1)수분	3.44
회분(%)	식품공전 제10.일반시험법 1.일반성분시험법 2)회분	4.67
나트륨 (mg/100g)	식품공전 제10.일반시험법 11.미량영양성분시험법 1)무 기성분	417.87
요오드 (μ g/g)	식품공전 제10.일반시험법 11.미량영양성분시험법 1)무 기성분	56.15

제11절 G-NANA의 헬리코박터 저해 인체적용시험

제 목	Sialic acid의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 9주, 무작위배정, 이중 눈가림, 평행, 위약대조, 용량결정 인체적용시험		
시험약물명	Sialic acid		
인체적용시험 시작일/종료일	시작일 : 2014년 09월 23일 (First patient enrolled) 종료일 : 2015년 01월 13일 (Last patient completed)		
인체적용시험책임자 및 공동연구자, 기관명	구분	성명	기관명
	책임자	내분비내과 장학철 교수	분당 서울대학교병원
	공동연구자	내분비내과 임수 부교수, 내분비내과 최성희 부교수, 소화기내과 신철민 조교수	
인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (인체적용시험 수탁기관 : 크로벤CRO)		
보고서 제출일	2015년 03월 27일		

2015. 03. 27.

임상시험 책임연구자 :

장학철

(서명: )

1. 요약(Synopsis)

인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (임상시험 수탁기관 : 크로벤CRO)	Volume : 11
인체적용시험 제품명	Sialic acid 250, Sialic acid 500	pages
		Page : 1 of 11
인체적용시험 명칭	Sialic acid의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 9주, 무작위배정, 이중 눈가림, 평행, 위약대조, 용량결정 인체적용시험	
인체적용시험의 목적	<p>▶ 1차 목적</p> <p>시험식품 투여군과 대조식품 투여군에 대해서 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지 요소호기 검사(Urea Breath Test, 이하 UBT)의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교하여 Sialic acid의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선을 평가하고, 개선시키는 적합한 용량을 찾아내고자 한다.</p> <p>▶ 2차 목적</p> <p>① 최종 평가시점(endpoint)의 대변 항원검사(stool antigen test)를 통해 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교한다.</p> <p>② 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사, 이상반응 등을 통하여 식품의 안전성을 평가한다.</p>	
실시기관 및 주소, 연구자	<p>▶ 실 시 기 관 : 분당 서울대학교병원</p> <p>▶ 주 소 : 경기도 성남시 분당구 구미로 173번길 82</p> <p>▶ 시험책임자 : 내분비내과 장학철 교수</p> <p>▶ 공동연구자 : 내분비내과 임수 부교수, 내분비내과 최성희 부교수, 소화기내과 신철민 조교수</p>	
인체적용시험 기간	인체적용시험 승인일로부터 12개월	
주요 선정기준	<p>1) 만 20세 이상의 성인 남성 또는 여성</p> <p>2) 요소호기 검사(UBT)에서 양성(UBT \geq 2.0 per mil)으로 진단받은 자</p> <p>3) 본 인체적용시험의 개요를 설명 받고 동의서에 서명한 자</p>	
주요 선정 제외기준	<p>1) 본 인체적용시험 전 Helicobacter pylori 제균 치료를 받은 자</p> <p>2) 위장관련 질환(위 소화, 위장 운동, 위 손상, 제산능, 장내 균총, 장 손상, 배변 활동 등)의 병력이 있는 자</p> <p>3) 시험 전 4주 이내에 비스테로이드성 소염진통제(NSAIDs), 스테로이드 제제, 항혈전제를 복용한 자</p> <p>4) 시험 전 4주 이내에 Helicobacter pylori 평가에 영향을 줄 수 있는 양성자 펌프 억제제(proton pump inhibitor) 또는 해당 일반 의약품, bismuth 제제, 항생제(antibiotics)를 복용한 자</p> <p>5) 상부위장관 수술 · 협착 · 출혈, 식도 확장술, 위점막절제술 등의 과거력이 있는 자</p> <p>6) ALT, AST, Total bilirubin, Alkaline Phosphatase 검사치가 정상 상한치의 2.5배 이상 높은 간기능 장애자</p> <p>7) 신부전 병력이 있거나 혈청 Creatinine 검사치가 정상 상한치의 30% 이상 높은 신기능 장애자</p> <p>8) Hepatitis B test 양성 반응을 보이는 자</p>	

인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (임상시험 수탁기관 : 크로벤CRO)	Volume : 11
인체적용시험 제품명	Sialic acid 250, Sialic acid 500	pages Page : 2 of 11
주요 선정 제외기준	<p>9) BMI 45(kg/m²) 이상의 비만증인 자</p> <p>10) 알코올 중독 또는 약물 남용의 병력이 있는 자</p> <p>11) 암(cancer)의 병력이 있는 자</p> <p>12) 임신 또는 수유 중인 여성</p> <p>13) 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>14) 시험제품에 대한 과민 반응력이 있는 자</p> <p>15) 병용약물로 인해 심각한 약물 상호작용의 위험성이 있는 자</p> <p>16) 의학적, 정신적으로 연구약물 복용의 금기 사항을 가지는 자</p> <p>17) 법적으로 인체적용시험에 참가가 불가능한 자</p> <p>18) 현재 본 인체적용시험 이외에 연구개발 중인 다른 시험에 참가하고 있거나, 시험 전 4주 이내에 타 인체적용(임상)시험에 참여하였던 자</p> <p>19) 본 인체적용시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 연구자가 판단하여 인체적용시험을 진행할 수 없다고 판단되는 자</p>	
인체적용시험 대상자 수	총 84 례 [시험식품군 A 28명, 시험식품군 B 28명, 대조식품군 C 28명 (탈락을 10%씩 고려)] (취약한 연구대상자 수 : 해당사항 없음)	
인체적용시험용 건강기능식품	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 시험식품군 A : Sialic acid 250 ▶ 시험식품군 B : Sialic acid 500 ▶ 대조식품군 C : Sialic acid 위캡슐(덱스트린) 	
인체적용시험 설계	무작위배정, 이중 눈가림, 평행, 위약대조, 용량결정	
용법 및 용량	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 시험식품군 A : 1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구투여, 9주간 복용 [(Sialic acid 62.5mg + Sialic acid 위캡슐 62.5mg) * 4캡슐 = 500mg/day] ▶ 시험식품군 B : 1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구투여, 9주간 복용 (Sialic acid 125mg * 4캡슐 = 500mg/day) ▶ 대조식품군 C : 1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구투여, 9주간 복용 (Sialic acid 위캡슐 125mg * 4캡슐 = 500mg/day) 	

인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (임상시험 수탁기관 : 크로벤CRO)	Volume : 11
인체적용시험 제품명	Sialic acid 250, Sialic acid 500	pages Page : 3 of 11
인체적용시험 방법	<p>피험자는 총 84명 [시험식품군 A 28명, 시험식품군 B 28명, 대조식품군 C 28명]으로 이루어져 있으며, 본 연구에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 피험자를 선정하고 필요한 임상검사를 실시한다. Visit 2에 선정 및 제외기준에 적합한 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 시험식품군과 대조식품군으로 배정하여 총 9주간의 Treatment period를 진행한다.</p>	
검사/방문 일정	방문일	검사 항목
	방문 1 -7일 (-1주)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 인구학적, 병력 및 치료력 조사 ▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사(두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등), 신체 계측(키, 체중) ▶ 임상실험실 검사 1 (일반혈액검사, 혈청생화학검사, 뇨검사) ▶ 임상실험실 검사 2 (B형간염 검사) ▶ 임신여부 검사(임신이 가능한 여성의 경우), 심전도(ECG) 검사 ▶ 요소호기 검사(UBT)
	방문 2 1일 (0주+7, 방문1 기준)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사, 신체 계측 ▶ 임상실험실 검사 1 ▶ 임신 여부 검사(임신이 가능한 여성의 경우) ▶ 요소호기 검사(UBT), 대변 항원검사(stool antigen test)
	방문 3 21일 (3주±7, 방문2 기준)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사, 신체 계측 ▶ 임상실험실 검사 1 ▶ 임신 여부 검사(임신이 가능한 여성의 경우) ▶ 요소호기 검사(UBT)
	방문 4 42일 (6주±7, 방문2 기준)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사, 신체 계측 ▶ 임상실험실 검사 1 ▶ 임신 여부 검사(임신이 가능한 여성의 경우) ▶ 요소호기 검사(UBT)
	방문 5 63일 (9주±7, 방문2 기준)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 혈압 측정, 맥박 측정, 체온 측정, 신체검사, 신체 계측 ▶ 임상실험실 검사 1 ▶ 임신여부 검사(임신이 가능한 여성의 경우), 심전도(ECG) 검사 ▶ 요소호기 검사(UBT), 대변 항원검사(stool antigen test)
유효성 평가	<p>유효성에 대한 자료는 FAS(Full Analysis Set) 분석법과 PP(per protocol) 분석법을 실시하며, 유효성 평가변수에 대한 최종판정은 FAS 분석법으로 한다. 즉 인체적용시험에 등재되어 무작위 배정 받은 후 1회 이상 인체적용시험용 건강기능식품을 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.</p>	

인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (임상시험 수탁기관 : 크로벤CRO)	Volume : 11
인체적용시험 제품명	Sialic acid 250, Sialic acid 500	pages Page : 4 of 11
유효성 평가	<p>▶ 1차 유효성 평가</p> <p>기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지의 요소호기 검사(UBT)를 통해 <i>Helicobacter pylori</i> 활성 억제 개선율을 비교하여 시험식품을 투여한 군이 대조식품 투여군에 비해 <i>Helicobacter pylori</i> 활성 억제 개선의 우월함을 증명하고, 개선시키는 적합한 용량을 찾아낸다.</p> <p>▶ 2차 유효성 평가</p> <p>최종 평가시점(endpoint)의 대변 항원검사(stool antigen test)를 통해 <i>Helicobacter pylori</i> 활성 억제 개선율을 비교한다.</p>	
안전성 평가	<p>인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위배정을 받고 인체적용시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자를 대상으로 활력징후 및 신체계측, 신체검사, 임상실험실 검사, 임상적 이상반응 발현상황, 약물 복용력 등을 평가한다.</p>	
통계적 분석방법	<p>▶ 인구학적 정보 및 건강 상태</p> <p>인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자를 대상으로 인구학적 정보(성별, 연령, 신장, 체중 등) 및 건강 상태에 대하여 연속형 변수에 대해서는 분산분석(ANOVA)을 실시하고, 범주형 변수에 대해서는 카이제곱검정(chi-square test)을 실시한다.</p> <p>▶ 유효성 자료의 분석</p> <p><u>1차 유효성 평가</u></p> <p>요소호기 검사(UBT)를 통한 <i>Helicobacter pylori</i> 활성 억제 개선율에 대해 치료 후 군간 비교는 카이제곱검정(chi-square test) 또는 fisher's exact test 및 Pearson-Clopper coincidence interval로 평가하고, 이를 통하여 대조식품군과 시험식품군을 용량별로 순차적으로 비교하여 <i>Helicobacter pylori</i> 활성 억제 개선의 차이가 통계적으로 유의한 최저용량을 찾아낸다.</p> <p><u>2차 유효성 평가</u></p> <p>대변 항원검사(stool antigen test)를 통한 <i>Helicobacter pylori</i> 활성 억제 개선율에 대해 치료 후 군간 비교는 카이제곱검정(chi-square test) 또는 fisher's exact test 및 Pearson-Clopper coincidence interval로 평가한다.</p> <p>▶ 안전성 자료의 분석</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 활력징후 및 신체계측, 임상실험실 결과는 각 방문 시점별 평균 및 표준편차 등의 기술통계량으로 기술하고, 각 치료군 간의 비교는 분산분석(ANOVA)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다. 2) 신체검사 결과는 각 방문별로 증례수를 계산하여 카이제곱검정(chi-square test)으로 평가한다. 3) 인체적용시험 전반에 걸쳐 발생한 이상반응에 대하여는 증례수를 계산하여 카이제곱검정(chi-square test)으로 평가한다. 	

인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (임상시험 수탁기관 : 크로벤CRO)	Volume : 11
인체적용시험 제품명	Sialic acid 250, Sialic acid 500	pages
		Page : 5 of 11
통계적 분석방법	<p>▶ 안전성 자료의 분석</p> <p>4) 약물 복용력은 인체적용시험 기간 동안 인체적용시험용 건강기능식품 이외에 피험자가 복용한 모든 약물을 기록하고, 기록된 약물은 계열별로 분류하여 평가한다.</p>	
<p>● 통계분석 결과</p> <p>1. 피험자의 인체적용시험 참여 상태</p> <p>인체적용시험 실시기관인 분당 서울대학교병원 생명윤리심의위원회로부터 2014년 8월 20일 최종승인을 받은 후, 2014년 9월 23일부터 피험자가 등록되었다.</p> <p>방문 1에 본 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 선별검사(screening)를 실시한 피험자 수는 총 99명이었으며, 그 중에 총 15명은 “요소호기 검사(UBT)에서 음성으로 판정되어 선정/제외기준 부적합”의 이유로 무작위 배정되기 전에 탈락하였다.</p> <p>방문 2에 선정 및 제외기준에 적합한 총 84명의 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 대조식품군(Sialic acid 위캡슐)과 시험식품군(Sialic acid 250, Sialic acid 500)으로 배정하였다. 무작위 배정된 피험자는 대조식품 또는 시험식품을 1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 총 3주간 복용하였다.</p> <p>방문 3에서 인체적용시험용 건강기능식품을 회수하였고, 중도탈락한 피험자는 없었다. 84명의 피험자는 방문 2에 배정된 시험식품 또는 대조식품을 재처방 받아 1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 총 3주간 복용하였다.</p> <p>방문 4에서 인체적용시험용 건강기능식품을 회수하였고, 중도탈락한 피험자는 없었다. 84명의 피험자는 방문 2에 배정된 시험식품 또는 대조식품을 재처방 받아 1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 총 3주간 복용하였다.</p> <p>방문 5에서 인체적용시험용 건강기능식품을 회수하였으며, 총 9주간의 Treatment period 동안 중도탈락 피험자는 발생하지 않았다. 2015년 1월 13일에 총 84명의 피험자가 인체적용시험을 완료(피험자 최종방문 완료)하였다.</p> <p>2. 피험자의 인구학적 정보 및 건강 상태</p> <p>본 인체적용시험에 등재한 피험자 중 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용하였으며, 인체적용시험용 건강기능식품 복용 후 전화 또는 방문에 의하여 시험자가 안전성 관련 데이터를 최소한 1회 이상 확인한 피험자 84명[Sialic acid 위캡슐군 28명, Sialic acid 250군 28명, Sialic acid 500군 28명]에 대해 분석을 실시하였다.</p> <p>① 성별 분포를 살펴보면 남자 피험자는 40명(47.6%), 여자 피험자는 44명(52.4%)으로 남자보다 여자의 비율이 높게 나타났으나 성별에 따른 구간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($p=0.538$). 평균 연령의 경우 Sialic acid 위캡슐군(만 55.9±10.44세)이 Sialic acid 250군(만 55.3±14.08세)과 Sialic acid 500군(만 50.4±13.48세) 보다 약간 높게 나타났으며, 선정기준에 해당되었다. 키($p=0.141$)와 체중($p=0.503$), BMI($p=0.317$)의 경우 모두 유의한 차이를 보이지 않아 최초 무작위 배정에 의한 대상자간의 편견이 없는 것으로 확인되었다.</p>		

인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (임상시험 수탁기관 : 크로벤CRO)	Volume : 11
인체적용시험 제품명	Sialic acid 250, Sialic acid 500	pages
		Page : 6 of 11

● 통계분석 결과

② 인체적용시험 선별 당시 병력(수술력 포함) 및 치료력을 조사한 결과, Sialic acid 500군에서만 2명(7.1%)이 병력 및 치료력이 있는 것으로 조사되었다. 병력 및 치료력이 있는 피험자들 중 본 인체적용시험용 건강기능식품과 병용 투여할 수 있는 약물인지를 평가하기 위하여 병용약물 여부를 조사한 결과, Sialic acid 500군에서 1명(50.0%)의 경우에만 현재 병력을 치료하기 위해 병용약물을 투여하는 것으로 조사되었으나 피험자의 복지를 위해 필요하고 또 인체적용시험용 건강기능식품에 영향을 주지 않는다는 시험 책임자의 판단에 따라 병용 투여할 수 있도록 결정되어 인체적용시험 진행에는 문제가 없음을 확인하였다.

3. 안전성 평가

본 인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용하였으며, 인체적용시험용 건강기능식품 복용 후 전화 또는 방문에 의하여 시험자가 안전성 관련 데이터를 최소한 1회 이상 확인한 피험자 84명[Sialic acid 위캡슐군 28명, Sialic acid 250군 28명, Sialic acid 500군 28명]을 대상으로 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사 결과, 임상적 이상반응 발현상황, 약물 복용력 등을 종합하여 평가하였다.

① 활력 징후

수축기 혈압의 경우 Sialic acid 위캡슐군($p=0.160$), Sialic acid 250군($p=0.480$), Sialic acid 500군($p=0.221$) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

이완기 혈압에서는 Sialic acid 250군($p<0.001$)에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 변화는 아니었으며, 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

맥박의 경우 Sialic acid 위캡슐군($p=0.018$)과 Sialic acid 250군($p=0.036$)에서 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 차이는 아니었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

체온에서는 각 치료군별 방문시기 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

② 신체 계측

키와 체중에서는 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

BMI 지수의 경우 Sialic acid 위캡슐군($p=0.028$)에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 변화는 아니었으며, 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (임상시험 수탁기관 : 크로벤CRO)	Volume : 11
인체적용시험 제품명	Sialic acid 250, Sialic acid 500	pages
		Page : 7 of 11

● 통계분석 결과

③ 신체검사

각 방문시마다 피험자들에게 두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등의 신체검사를 실시하여 비교한 결과, Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 비정상인 경우가 전혀 없었다.

④ 임상실험실 검사

일반혈액검사 수치를 비교한 결과, Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 방문시기에 따라 Hemoglobin, Hematocrit, WBC, RBC, Platelet, MCV, MCH, MCHC, Segment, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다. 또한 각 방문시기별 치료군 간의 검사치를 비교한 결과에서도 일반혈액검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

혈청생화학검사 수치를 비교한 결과, Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 방문시기에 따라 Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Fasting plasma glucose, Total Bilirubin, AST, ALT, Alkaline phosphatase, Total cholesterol, Triglyceride, Sodium(Na), Potassium(K), Chloride(Cl) 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다. 또한 각 방문시기별 치료군 간의 검사치를 비교한 결과에서도 혈청생화학검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

뇨검사(1) 수치를 비교한 결과, Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 방문시기에 따라 pH, S.G 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

뇨검사(2) 수치를 비교한 결과, Nitrate, Bilirubin, Urobilinogen 검사 수치는 모두 정상으로 조사되었다. Protein 검사 수치가 비정상인 나온 피험자는 Sialic acid 250군에서 0주차 1명(3.6%), 3주차 2명(7.1%), 9주차 1명(3.6%)으로 조사되었으나 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었으며 임상적으로 큰 의미는 없었다. Glucose 수치의 경우 Sialic acid 500군에서 0주차 1명(3.6%)이 비정상인 조사되었으나 군간에 유의하지 않았으며 임상적으로 큰 의미는 없었다. 그 밖에 Ketone, Blood, Leukocyte esterase 검사 수치에서도 비정상인 나온 경우가 있었으나 모든 방문시기에서 치료군 간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 임상적으로 큰 의미는 없었다.

⑤ 임상적 이상반응 발현상황

대조식품군(Sialic acid 위캡슐)과 시험식품군(Sialic acid 250, Sialic acid 500)에서 인체적용시험 제 품과의 인과관계와 상관없이 발현된 모든 이상반응 현황을 살펴보면, Sialic acid 위캡슐군에서 발현된 이상반응(AE)은 3건(10.7%), Sialic acid 250군은 1건(3.6%), Sialic acid 500군은 1건(3.6%) 발현되었다. 이상약물반응(ADR) 발현은 1건도 없었다. 또한 중대한 이상반응(Serious AE)과 중대한 이상약물반응(Serious ADR) 발현은 1건도 발생하지 않았다.

인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (임상시험 수탁기관 : 크로벤CRO)	Volume : 11
인체적용시험 제품명	Sialic acid 250, Sialic acid 500	pages
		Page : 8 of 11

● 통계분석 결과

피험자들의 이상반응 발현 현황을 자세히 살펴보면, Sialic acid 위캡슐군에서 발현된 ‘어지러움’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 적음(Unlikely)’으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증(Mild)’, 결과는 ‘후유증 없이 회복(Recovered without sequelae)’ 평가되었고, 시험제품과의 인과관계와 상관성이 적어 계속 시험을 진행하여 완료하였다. ‘설사’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 적음(Unlikely)’으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증(Mild)’, 결과는 ‘후유증 없이 회복(Recovered without sequelae)’으로 평가되었고, 시험제품과의 인과관계와 상관성이 적어 계속 시험을 진행하여 완료하였다. ‘소화불량’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 적음(Unlikely)’으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증(Mild)’, 결과는 ‘후유증 없이 회복(Recovered without sequelae)’으로 평가되었고, 시험제품과의 인과관계와 상관성이 적어 계속 시험을 진행하여 완료하였다.

Sialic acid 250군에서 발현된 ‘설사’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 적음(Unlikely)’으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증(Mild)’, 결과는 ‘후유증 없이 회복(Recovered without sequelae)’으로 평가되었고, 시험제품과의 인과관계와 상관성이 적어 계속 시험을 진행하여 완료하였다.

Sialic acid 500군에서 발현된 ‘소화불량’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 적음(Unlikely)’으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증(Mild)’, 결과는 ‘후유증 없이 회복(Recovered without sequelae)’으로 평가되었고, 시험제품과의 인과관계와 상관성이 적어 계속 시험을 진행하여 완료하였다.

⑥ 약물 복용력

인체적용시험 선별 당시 병용약물이 있는 것으로 확인되었으며, 피험자의 복지를 위해 필요하고 또 인체적용시험용 건강기능식품에 영향을 주지 않는다는 시험 책임자의 판단에 따라 병용 투여할 수 있도록 결정되어 인체적용시험 진행에는 문제가 없음을 확인하였다. 또한 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 건강기능식품을 1회 이상 복용한 이후의 병용약물도 전혀 변화 없음을 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 건강기능식품 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 건강기능식품을 복용하고, 최소한 1회 이상 유효성 평가가 실시된 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 따라서 피험자 84명[Sialic acid 위캡슐군 28명, Sialic acid 250군 28명, Sialic acid 500군 28명]을 대상으로 평가하였다.

인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (임상시험 수탁기관 : 크로벤CRO)	Volume : 11
인체적용시험 제품명	Sialic acid 250, Sialic acid 500	pages
		Page : 9 of 11

● 통계분석 결과

① 1차 유효성 평가

요소호기 검사(UBT)의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교한 결과, Baseline(0주차)과 식품 투여 후 3주차에서는 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 음성으로 확인된 피험자는 없었다. 식품 투여 후 6주차에서는 Sialic acid 250군에서 1명(3.6%), Sialic acid 500군에서 1명(3.6%)의 피험자가 음성으로 확인되었다. 식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군에서 1명(3.6%), Sialic acid 250군에서 7명(25.0%), Sialic acid 500군에서 15명(53.6%)이 음성으로 확인되었다. Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군($p=0.022$), Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군($p<0.001$) 간에 통계적으로 유의한 변화가 있었으며 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

요소호기 검사(UBT)의 검사치를 비교한 결과, Baseline(0주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군(15.08 ± 6.44 per mil)과 Sialic acid 250군(17.86 ± 8.37 per mil), Sialic acid 위캡슐군(15.08 ± 6.44 per mil)과 Sialic acid 500군(18.44 ± 8.45 per mil) 간에 통계학적으로 유의한 차이($p=0.168$, $p=0.100$)는 없었다. 식품 투여 후 3주차에서도 Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군($p=0.685$), Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군($p=0.277$) 간에 통계학적으로 유의한 변화는 없었다. 식품 투여 후 6주차에서는 Sialic acid 위캡슐군과 비교하였을 때 Sialic acid 500군에서만 통계적으로 유의하게 감소($p=0.002$)하는 것으로 나타났다. 식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군(13.51 ± 7.21 per mil)과 Sialic acid 250군(7.02 ± 5.42 per mil), Sialic acid 위캡슐군(13.51 ± 7.21 per mil)과 Sialic acid 500군(3.93 ± 4.06 per mil) 간에 통계학적으로 유의하게 감소($p<0.001$, $p<0.001$)하여 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 나타났다. 또한 방문시기별 변화는 Sialic acid 250군($p<0.001$)과 Sialic acid 500군($p<0.001$)에서 유의하게 감소하는 것으로 나타나 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

요소호기 검사(UBT) 검사치의 변화량을 비교한 결과, Baseline의 검사치와 비교하였을 때 Sialic acid 위캡슐군에서는 평균 1.57 per mil 감소($p=0.068$)한 반면 Sialic acid 250군에서는 평균 10.84 per mil 유의하게 감소하는 효과($p<0.001$)가 있는 것으로 평가되었다. Sialic acid 500군에서도 평균 14.51 per mil 감소하여 Sialic acid 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선효과($p<0.001$)를 보였다.

② 2차 유효성 평가

대변 항원검사(stool antigen test)의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교한 결과, Baseline(0주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 음성으로 확인된 피험자는 없었다. 식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군에서 3명(10.7%), Sialic acid 250군에서 8명(28.6%), Sialic acid 500군에서 16명(57.1%)의 피험자가 음성으로 확인되었다. Sialic acid 위캡슐군과 비교했을 때 Sialic acid 500군에서만 통계적으로 유의한 변화($p<0.001$)가 있는 것으로 나타나 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (임상시험 수탁기관 : 크로벤CRO)	Volume : 11
인체적용시험 제품명	Sialic acid 250, Sialic acid 500	pages
		Page : 10 of 11

● 결론

1. 안전성 평가

1) Sialic acid는 안전한 것으로 평가되었음.

㉠ 활력 징후 검사치를 비교한 결과, 수축기 혈압과 체온의 경우 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이는 없었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 변화는 없었다. 이완기 혈압에서는 Sialic acid 250군($p < 0.001$)에서, 맥박의 경우 Sialic acid 위캡슐군($p = 0.018$)과 Sialic acid 250군($p = 0.036$)에서 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 변화는 아니었으며, 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

㉡ 신체 계측 검사치를 비교한 결과, 키와 체중의 경우 각 치료군별 방문시기 간에 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. BMI 지수의 경우 Sialic acid 위캡슐군($p = 0.028$)에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 변화는 아니었으며, 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

㉢ 각 방문시마다 피험자들에게 두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등의 신체검사를 실시하여 비교한 결과, Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 비정상인 경우가 전혀 없었다.

㉣ 일반혈액검사 수치를 비교한 결과, 각 치료군별 방문시기 간에 Hemoglobin, Hematocrit, WBC, RBC, Platelet, MCV, MCH, MCHC, Segment, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다. 또한 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서도 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

㉤ 혈청생화학검사 수치를 비교한 결과, 각 치료군별 방문시기 간에 Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Fasting plasma glucose, Total Bilirubin, AST, ALT, Alkaline phosphatase, Total cholesterol, Triglyceride, Sodium(Na), Potassium(K), Chloride(Cl) 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다. 또한 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서도 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

㉥ 뇨검사 수치를 비교한 결과, 각 치료군별 방문시기 간에 pH, S.G 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 변화는 없었다. Nitrate, Bilirubin, Urobilinogen 검사 수치는 모두 정상으로 조사되었다. 그 밖에 Protein, Glucose, Ketone, Blood, Leukocyte esterase 검사 수치에서 비정상인 경우로 나온 경우가 있었으나 각 방문시기별 치료군 간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 임상적으로 큰 의미는 없었다.

㉦ 대조식품군(Sialic acid 위캡슐)과 시험식품군(Sialic acid 250, Sialic acid 500)에서 인체적용시험 제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 모든 이상반응 현황을 살펴보면, Sialic acid 위캡슐군에서 발현된 이상반응(AE)은 3건(10.7%), Sialic acid 250군은 1건(3.6%), Sialic acid 500군은 1건(3.6%) 발현되었다. 이상약물반응(ADR) 발현은 1건도 없었다. 또한 중대한 이상반응(Serious AE)과 중대한 이상약물반응(Serious ADR) 발현은 1건도 발생하지 않았다.

인체적용시험 의뢰자	(주) 생명의 나무 (임상시험 수탁기관 : 크로벤티CRO)	Volume : 11
인체적용시험 제품명	Sialic acid 250, Sialic acid 500	pages
		Page : 11 of 11

● 결론

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) Sialic acid는 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 평가됨.
- 3) 1차 유효성 평가 및 2차 유효성 평가를 종합한 결과, Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 적합한 용량은 Sialic acid 500 시험식품군(Sialic acid 125mg * 4캡슐 = 1일 총 500mg 복용)으로 결정됨.

① 1차 유효성 평가

㉞ 요소호기 검사(UBT)의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교한 결과, Baseline(0주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 음성으로 확인된 피험자는 없었다. 식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군에서 1명(3.6%), Sialic acid 250군에서 7명(25.0%), Sialic acid 500군에서 15명(53.6%)이 음성으로 확인되었다. Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군($p=0.022$), Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군($p<0.001$) 간에 통계적으로 유의한 변화가 있었으며 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

㉟ 요소호기 검사(UBT)의 검사치를 비교한 결과, Baseline(0주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군($p=0.168$), Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군($p=0.100$) 간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군($p<0.001$), Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군($p<0.001$) 간에 통계학적으로 유의하게 감소하여 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 나타났다. 또한 방문시기별 변화는 Sialic acid 250군($p<0.001$)과 Sialic acid 500군($p<0.001$)에서 유의하게 감소하는 것으로 나타나 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

㊱ 요소호기 검사(UBT)의 검사치 변화량을 비교한 결과, Baseline(0주차)의 검사치와 비교하였을 때 Sialic acid 위캡슐군(평균 1.57per mil 감소, $p=0.068$)에 비해 Sialic acid 250군(평균 10.84per mil 감소, $p<0.001$)에서, Sialic acid 위캡슐군보다 Sialic acid 500군(평균 14.51per mil 감소, $p<0.001$)에서 유의한 개선효과가 나타나 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

② 2차 유효성 평가

㉞ 대변 항원검사(stool antigen test)의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교한 결과, Baseline(0주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 음성으로 확인된 피험자는 없었다. 식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군에서 3명(10.7%), Sialic acid 250군에서 8명(28.6%), Sialic acid 500군에서 16명(57.1%)의 피험자가 음성으로 확인되었다. Sialic acid 위캡슐군과 비교했을 때 Sialic acid 500군에서만 통계적으로 유의한 변화($p<0.001$)가 있는 것으로 나타나 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

2. 약어 및 용어 정의

시험식품군 A : [(Sialic acid 62.5mg + Sialic acid 위캡슐 62.5mg) * 4캡슐 = 500mg/day]] 복용한 피험자

시험식품군 B : (Sialic acid 125mg * 4캡슐 = 500mg/day) 복용한 피험자

대조식품군 C : (Sialic acid 위캡슐 125mg * 4캡슐 = 500mg/day) 복용한 피험자

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

GCP : Good Clinical Practice, 인체적용시험 관리기준

HBsAg : Hepatitis B virus surface antigen, B형 간염 바이러스 표면항원

FAS : Full Analysis Set, 배정된 대로 분석

MCH : Mean corpuscular hemoglobin, 적혈구의 평균 혈색소량

MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration, 적혈구의 혈색소 평균 농도

MCV : Mean Corpuscular Volume, 적혈구의 평균 용적

NSAIDs : Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, 비스테로이드성 소염진통제

PP : Per Protocol, 계획서순응

PPI : proton pump inhibitor, 양성자 펌프 억제제

RBC : Red Blood Cell, 적혈구

SCr : Serum Creatinine, 혈청 크레아티닌

SG : specific gravity, 비중

UBT : Urea Breath Test, 요소호기 검사

WBC : White Blood Cell, 백혈구

3. 윤리적 고려

3.1 인체적용시험관리기준(GCP)과 헬싱키 선언

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

시험책임자 및 시험 담당자는 인체적용시험에 참여하는 피험자에게 ‘피험자 동의를 위한 설명서’의 내용에 대해 쉽게 이해할 수 있도록 설명한 후 자필로 날짜와 이름을 적고 서면으로 참가 동의를 하도록 하였다. ‘피험자 동의를 위한 설명서’는 서면 및 구두로 할 수 있으며 피험자 및 보호자가 요구할 경우 법적 대리인에게도 인체적용시험의 상세한 내용에 대해 문의할 충분한 기회를 제공해 줄 수 있도록 하였다.

3.3 비밀유지

모든 피험자명은 비밀로 유지되었고, 인체적용시험 진행 중 부여한 번호에 의해 기록 및 평가 시 피험자를 확인하도록 하였다. 피험자에게 모든 인체적용시험 자료가 컴퓨터에 저장되고 엄격히 비밀사항으로 다루어진다는 것을 알려주었다. 서명을 받은 ‘인체적용시험 참여 동의서’는 인체적용시험이 종료된 후에는 인체적용시험 실시기관의 보관책임자가 보관하도록 하였다. 본 계획서에 서명함으로써 시험책임자는 인체적용시험에 참가하는 피험자로부터 올바르게 ‘인체적용시험 참여 동의서’를 획득하기로 동의한 것이며, 요청이 있는 경우 실태조사를 받는 데에도 동의한 것임을 확인하였다.

3.4 인체적용시험계획의 승인

인체적용시험 실시기관인 분당 서울대학교병원 생명윤리심의위원회로부터 2014년 8월 5일 정규심의를 실시하여 조건부 승인을 받았다. 인체적용시험계획서, 피험자 동의를 위한 설명서 및 인체적용시험 참여 동의서 등을 수정·보완하여 2014년 8월 20일 최종 승인을 받았다.

4. 시험자와 연구지원 조직

4.1 인체적용시험 실시기관명 및 주소

- 1) 실시 기관명 : 분당 서울대학교병원
- 2) 주소 : 경기도 성남시 분당구 구미로 173번길 82

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, 소화기내과 신철민 조교수

4.2.3 인체적용시험 담당자

분당서울대학교 병원 김수미 CRC, 이윤희 CRC

4.3 인체적용시험용 건강기능식품 관리

분당서울대학교 병원 인체적용시험 담당자 김수미 CRC, 이윤희 CRC

4.4 인체적용시험 의뢰자

- 1) 의뢰자명 : (주)생명의 나무
- 2) 주 소 : 경기도 수원시 권선구 매송고색로 634-21

4.5 인체적용시험 수탁기관 및 중앙검사실

- 1) 인체적용시험 수탁기관명 : 크로벤CRO
- 2) 인체적용시험모니터요원 : 크로벤CRO 김종배 CRA
- 3) 중앙검사실 : (재)서울의과학연구소(SCL)

5. 서론

5.1 목적

1차 목적 : 시험식품 투여군과 대조식품 투여군에 대해서 기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지 요소호기 검사(Urea Breath Test, 이하 UBT)의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교하여 Sialic acid의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 평가하고, 개선시키는 적합한 용량을 찾아내고자 한다.

2차 목적 : ① 최종 평가시점(endpoint)의 대변 항원검사(stool antigen test)를 통해 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교한다.

② 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사, 이상반응 등을 통하여 식품의 안전성을 평가한다.

5.2 배경

헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori)는 인간의 위 점막에 기생하는 그람 음성 나선균이다. 간단히 헬리코박터균 또는 파일로리균이라고 부르기도 한다. Helicobacter pylori에서 helico

는 나선형, bacter는 세균(bacteria), pylori는 유문(幽門)이라는 뜻으로, 위의 유문부에 사는 나선형 세균을 가리킨다.

1983년 오스트레일리아의 로빈 워렌(J. Robin Warren)과 배리 마셜(Barry J. Marshall)에 의해 발견되었다. 종래에는 위액에 포함된 염산으로 인해 위의 내부가 강산성이기 때문에 세균이 살 수 없는 환경이라고 생각하여 왔다. Helicobacter pylori는 요소분해효소(urease)를 생성하고, 이 효소로 위점액 중의 요소(urea)를 암모니아와 이산화탄소로 분해하는데, 이때 생긴 암모니아로 국소적으로 위산을 중화하면서 위에서 정착(감염)하여 살고 있다. 이 균이 발견됨으로써 동물의 위에 적응하여 사는 세균이 있다는 것이 밝혀졌다.[1]

Helicobacter pylori 감염은 만성 위염, 위궤양이나 십이지장 궤양 뿐만 아니라, 위암이나 MALT 임파종 등의 발생으로도 이어지는 것으로 보고되고 있다. 그 외에 특발성 혈소판 감소성 자반병, 소아의 철 결핍성 빈혈, 만성 두드러기 등의 위외성 질환의 원인이 되는 것도 밝혀지고 있다.[2-6] 세균들 중에서 악성 종양의 원인이 될 수 있는 것이 밝혀지고 있는 유일한 병원체로서 1994년 세계보건기구(WHO)에서는 1등급 발암 물질로 규정하였다.[7]

우리나라 Helicobacter pylori의 감염 유병률 연구가 1998년과 2005년에 진행되었다. 1998년도의 16세 이상 헬리코박터 감염률은 66.9%를 보인 반면에 2005년도에는 59.6%의 감염 유병률을 보여 의미 있는 감소가 있었다. 또한 16-19세의 경우 12.5%, 20-29세의 경우 26.3%로 낮은 감염률을 보이지만, 40대 이상의 경우 60% 이상의 감염률을 보이고 있다. 이는 1998년도에 비해 현저히 낮아진 수치이지만 아직도 40대 이상에게 있어서는 높은 감염률을 보였다.[8-9]

Helicobacter pylori 제균 치료를 위해 국내의 경우 1차 치료는 삼제요법, 1차 치료가 실패할 경우 2차 치료는 사제요법을 추천하고 있다.[10-12] 그러나 삼제요법 도입 초기에는 90%의 제균율을 보였으나 최근에는 75%까지 떨어지고 있다. 그 원인으로는 항생제에 대한 내성 균주의 증가, 약물 부작용 등으로 인한 환자의 낮은 순응도가 일차적으로 거론되며, 치료기간, 제균 치료의 대상질환, 환자의 위산 농도, 나이, 흡연 여부, Helicobacter pylori 밀도나 만성 염증의 정도 등이 제균율의 차이를 일으킬 수 있다.[12-14]

따라서 이러한 항생제의 내성을 줄이고 치료의 효과를 높이는 방법으로 한약과 양약을 동시에 활용하는 치료법[14]이나, 젖산균(Lactobacillus)이 함유된 발효유,[15-16] 포도주,[17] 면역물질 IgY 항체가 함유된 계란,[18] cranberry juice,[19] 감초[20] 등 여러 가지 식용물질에 대해서도 Helicobacter pylori 제균 치료법에 대한 새로운 연구가 계속 시도되고 있다.

이에 (주)생명의 나무에서는 우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid가 다양한 병원성 미생물에 대하여 항균활성을 나타내는 것을 연구하여 헬리코박터균에 적용시켜본 결과 항균활성이 뛰어나 헬리코박터균 억제 및 제균 기능성식품으로 개발하려 한다.

Sialic acid는 각종 올리고당 및 당단백질과 연관된 것으로 나타나는 인간 모유의 한 자연 발생적 성분이다. 인간 모유는 상당량의 Sialic acid를 함유하나, 대부분의 조제분유는 초유에서 발견되는 Sialic acid의 25% 미만을 함유한다.

Sialic acid는 세포막의 세포 표면에 있는 당단백질 또는 당지질의 구성 성분으로 말단에 위

치함으로써 다양한 생물학적인 기능을 발휘하는데, 최근의 활발한 연구로 인하여 여러 가지 생리적 기능이 해명되고 있다. 예를 들면, Sialic acid는 포유동물의 생체 내에서 fructose-6-phosphate로부터 N-acetylamannoseamine을 경유하여 합성되어 강글리오시드의 한 주요성분으로 사용되며, 신생아 뇌의 발달 및 기능에 있어 중요하다고 보고되고 있으며, 다양한 병원성 미생물에 대하여 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 현재 Sialic acid는 조제 분유에 50~60mg(1일) 정도 사용되어 지고 있으며, 인플루엔자 바이러스의 용혈작용을 저지하는 역할을 하여 인플루엔자 바이러스 치료제의 첨가물로 소량 쓰이고 있다.

Sialic acid의 설치류 단회투여 독성시험, 설치류 90일 반복투여 독성시험, 비설치류 단회투여 독성시험, 미생물 복귀돌연변이 시험, 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험, 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험을 통하여 그 안전성을 검증한 결과 안전하게 섭취할 수 있는 것으로 판명되었다.

따라서 Sialic acid의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하고, 개선시키는 적합한 용량을 찾아내고자 한다.

6. 인체적용시험용 건강기능식품

6.1 인체적용시험용 건강기능식품의 일반명, 코드명, 원료약품 및 분량, 성상 및 제형 등

	시험식품군 A	시험식품군 B	대조식품군 C
일반명	Sialic acid	Sialic acid	위캡슐(placebo)
제품명(코드명)	Sialic acid 250	Sialic acid 500	Sialic acid 위캡슐
원료약품 및 분량	1캡슐 중 Sialic acid 62.5mg + Sialic acid 위캡슐 62.5mg 함유	1캡슐 중 Sialic acid 125mg 함유	1캡슐 중 Sialic acid 위캡슐 125mg 함유(덱스트린)
성상 및 제형	흰색의 분말이 들어 있는 타원형 캡슐	흰색의 분말이 들어 있는 타원형 캡슐	흰색의 분말이 들어 있는 타원형 캡슐
저장방법	실온보관(1~30℃), 기밀용기	실온보관(1~30℃), 기밀용기	실온보관(1~30℃), 기밀용기

6.2 인체적용시험용 건강기능식품의 생산, 포장, labeling 및 저장

인체적용시험용 건강기능식품은 인체적용시험 의뢰자인 (주)생명의 나무에서 제조 후 아래 예시(약사법 시행규칙 제 69조 6항에 준함)와 같은 라벨을 부착하고 포장하여 인체적용시험 실시기관의 시험 담당자에게 공급한다. 또한 (주)생명의 나무는 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: Sialic acid 250 또는 Sialic acid 500 또는 Sialic acid 위캡슐
2. 제 조 번 호:
3. 사용(유효)기한 또는 재검사일자: 년 월 일
4. 저 장 방 법:
5. 제 조 업 자: (주)생명의 나무
6. 인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없습니다.

6.3 인체적용시험용 건강기능식품의 관리 및 기록

시험 담당자는 인체적용시험용 건강기능식품의 인수·보관·조제·관리 및 반납에 대한 책임을 갖는다. 또한 인체적용시험용 건강기능식품의 수령사실 및 수량을 서면으로 확인하고 서명해야 하며, 안전한 장소인 분당 서울대병원 임상연구실 내의 잠금장치가 있는 약품보관함에 취급·보관하여야 한다. 시험 담당자는 (주)생명의 나무로부터 공급 받은 인체적용시험용 건강기능식품의 수량, 피험자에게 사용된 수량, 인체적용시험 종료 후 사용되지 않고 남아 있는 수량 등에 대한 정확한 기록을 보관하는 것을 원칙으로 한다. 또한 인체적용시험 종료 시 모든 미사용 인체적용시험용 건강기능식품, 사용/미사용 용기, 라벨 및 인체적용시험용 건강기능식품 관리 기록의 복사본을 인체적용시험모니터요원에게 제출한다.

7. 인체적용시험 계획

7.1 인체적용시험의 기간

인체적용시험 승인일로부터 12개월

7.2 대상 질환

헬리코박터균 감염(Helicobacter pylori infection)

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 20세 이상의 성인 남성 또는 여성
- 2) 요소호기 검사(UBT)에서 양성(UBT \geq 2.0 per mil)으로 진단받은 자
- 3) 본 인체적용시험의 개요를 설명 받고 동의서에 서명한 자

7.3.2 제외기준

- 1) 본 인체적용시험 전 Helicobacter pylori 제균 치료를 받은 자
- 2) 위장관련 질환(위 소화, 위장 운동, 위 손상, 제산능, 장내 균총, 장 손상, 배변 활동 등)의 병력이 있는 자
- 3) 시험 전 4주 이내에 비스테로이드성 소염진통제(NSAIDs), 스테로이드 제제, 항혈전제를 복용한 자
- 4) 시험 전 4주 이내에 Helicobacter pylori 평가에 영향을 줄 수 있는 양성자 펌프 억제제(proton pump inhibitor) 또는 해당 일반 의약품, bismuth 제제, 항생제(antibiotics)를 복용한 자
- 5) 상부위장관 수술 · 협착 · 출혈, 식도 확장술, 위점막절제술 등의 과거력이 있는 자
- 6) ALT, AST, Total bilirubin, Alkaline Phosphatase 검사치가 정상 상한치의 2.5배 이상 높은 간기능 장애자
- 7) 신부전 병력이 있거나 혈청 Creatinine 검사치가 정상 상한치의 30% 이상 높은 신기능 장애자
- 8) Hepatitis B test 양성 반응을 보이는 자
- 9) BMI 45(kg/m²) 이상의 비만증인 자
- 10) 알코올 중독 또는 약물 남용의 병력이 있는 자
- 11) 암(cancer)의 병력이 있는 자
- 12) 임신 또는 수유 중인 여성
- 13) 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.

- 14) 시험제품에 대한 과민 반응력이 있는 자
- 15) 병용약물로 인해 심각한 약물 상호작용의 위험성이 있는 자
- 16) 의학적, 정신적으로 연구약물 복용의 금기 사항을 가지는 자
- 17) 법적으로 인체적용시험에 참가가 불가능한 자
- 18) 현재 본 인체적용시험 이외에 연구개발 중인 다른 시험에 참가하고 있거나, 시험 전 4주 이내에 타 인체적용(임상)시험에 참여하였던 자
- 19) 본 인체적용시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 연구자가 판단하여 인체적용시험을 진행할 수 없다고 판단되는 자

7.3.3 목표한 피험자 수 및 그 근거

시험식품 투여군이 대조식품 투여군에 비해 *Helicobacter pylori* 활성 억제 개선의 우월함을 증명하고 효과적으로 개선시키는 용량을 찾아내기 위해, 총 84명 [시험식품군 A 28명, 시험식품군 B 28명, 대조식품군 C 28명]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>

Probiotic Multistrain Treatment May Eradicate *Helicobacter pylori* from the Stomach of Dyspeptics: A Placebo-Controlled Pilot Study에서 요소호기 검사(UBT)를 통한 *Helicobacter pylori* 제거율은 placebo group 0.0%, probiotic group 32.5%로 확인되었다.

$$H_0 = P_t \leq P_c \text{ vs } H_1 = P_t > P_c$$

P_t = 시험군의 개선율

P_c = 대조군의 개선율

$\alpha = 0.05, Z_{1-\alpha/2} = 1.960$

$\beta = 0.10, Z_{1-\beta} = 1.282$

$$\bar{P} = \frac{(n_t \times P_t) + (n_c \times P_c)}{n_t + n_c} = \frac{(40 \times 0.325) + (40 \times 0.0)}{40 + 40} = 0.1625$$

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2} \sqrt{2\bar{P}(1-\bar{P})} + Z_{1-\beta} \sqrt{P_t(1-P_t) + P_c(1-P_c)}}{(P_c - P_t)^2}$$

$$= \frac{1.96 \sqrt{2 \times 0.1625 \times (1 - 0.1625)} + 1.282 \sqrt{0.325 \times (1 - 0.325) + 0.0 \times (1 - 0.0)}}{(0.325 - 0.0)^2} = 24.94$$

<참고문헌>^[21]

Rosania R, Minenna MF, Giorgio F, Facciorusso A, De Francesco V, Hassan C, Panella C, Ierardi E. Probiotic Multistrain Treatment May Eradicate *Helicobacter pylori* from the Stomach of Dyspeptics: A Placebo-Controlled Pilot Study. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012;11(3):244-249.

따라서 최종 표본 산정은 그룹별 25명 정도가 적당할 것으로 산정되었으나, 예상 탈락률을 10%로 고려하여 25/(1-0.1)로서 그룹별 28명[시험식품군 A 28명, 시험식품군 B 28명, 대조식품군 C 28명]으로 총 84명의 샘플이 적당할 것으로 사료된다.

7.4 인체적용시험의 방법

7.4.1 전반적인 인체적용시험의 방법에 대한 기술

본 인체적용시험은 무작위배정, 이중 눈가림, 평행, 위약대조, 용량결정 연구로 시행한다. 피험자는 총 84명 [시험식품군 A 28명, 시험식품군 B 28명, 대조식품군 C 28명]으로 이루어져 있으며, 본 연구에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 피험자를 선정하고 필요한 임상검사를

실시한다. Visit 2에 선정 및 제외기준에 적합한 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 시험 식품군과 대조식품군으로 배정하여 총 9주간의 Treatment period를 진행한다.

Visit 1 -7d (-1wk)	Double-Blind treatment period			
	Visit 2 1d (0wk+7)	Visit 3 21d (3wk±7)	Visit 4 42d (6wk±7)	Visit 5 63d (9wk±7)
선별검사	무작위배정, 건강기능식품 배포	건강기능식품 반납 및 재배포	건강기능식품 반납 및 재배포	건강기능식품 복용 종료

7.4.2 투여량, 투여방법, 투여기간

1) 시험식품군 A

1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구투여, 9주간 복용한다.
[(Sialic acid 62.5mg + Sialic acid 위캡슐 62.5mg) * 4캡슐 = 500mg/day]

2) 시험식품군 B

1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구투여, 9주간 복용한다.
(Sialic acid 125mg * 4캡슐 = 500mg/day)

3) 대조식품군 C

1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 식후 30분 내에 물과 함께 경구투여, 9주간 복용한다.
(Sialic acid 위캡슐 125mg * 4캡슐 = 500mg/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 수탁기관인 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 피험자 별로 9주간 인체적용시험용 건강기능식품 투여 후 종료될 때까지는 봉합된 상태로 유지되어야 하고, 인체적용시험이 종료되면 크로벤CRO 측에 다시 반납하여야 한다.

7.4.4 눈가림/눈가림 해제

눈가림(Blind)은 인체적용시험을 완전하게 실시하는데 있어 중요하다. 피험자 및 시험 책임자는 9주간 인체적용시험용 건강기능식품 투여 후 종료될 때까지 무작위배정에 대하여 눈가림 상태(Double-Blind)로 유지하여야 한다. 그러나 어떤 피험자에게 중대한 이상반응이 발생한 경우나 의학적으로 위급한 상황 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)생명 의 나무와 상의하고, 눈가림이 해제된 피험자는 중도 탈락으로 더 이상의 인체적용시험용 건강 기능식품을 투여해서는 안 된다.

7.4.5 순응도 평가

인체적용시험에 참여하여 무작위 배정된 각 피험자들이 인체적용시험 기간 동안 복용한 인체적용시험용 건강기능식품의 개수를 복용해야 하는 인체적용시험용 건강기능식품의 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 인체적용시험 건강기능식품에 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 병용 금지할 수 있다.

- 1) 비스테로이드성 소염진통제(NSAIDs)
- 2) 스테로이드 제제
- 3) 항혈전제
- 4) 항생제
- 5) 양성자 펌프 억제제(PPI) 또는 해당 일반 의약품
- 6) bismuth 제제
- 7) 위장관 관련 건강기능식품

7.5 관찰항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법

7.5.1 인체적용시험 진행 일정표*

관찰항목	Screening ¹⁾	Double-Blind treatment period			
	Visit 1 -7d (-1wk)	Visit 2 1d (0wk+7)	Visit 3 21d (3wk±7)	Visit 4 42d (6wk±7)	Visit 5 63d (9wk±7)
피험자 방문 ²⁾	✓	✓	✓	✓	✓
서면동의 및 Baseline Number 부여	✓				
인구학적, 병력 및 치료력 조사	✓				
임신 여부 검사(가임 여성) ³⁾	✓	✓	✓	✓	✓
활력 징후, 신체검사 및 계측 ⁴⁾	✓	✓	✓	✓	✓
임상실험실 검사 ⁵⁾	✓	✓	✓	✓	✓
심전도(ECG)	✓				✓
요소호기 검사(UBT) ^{6),7)}	✓	✓	✓	✓	✓
대변 항원검사(stool antigen test) ⁷⁾		✓			✓
선정/제외 기준 판정 ⁸⁾	✓				
Randomization Number 부여 및 무작위배 정		✓			
인체적용시험용 건강기능식품 처방 ⁹⁾		✓	✓	✓	
반납약 회수 및 순응도 평가 ¹⁰⁾			✓	✓	✓
병용약물 확인	✓	✓	✓	✓	✓
이상반응 평가		✓	✓	✓	✓
식사 및 운동요법 교육 ¹¹⁾	✓	✓	✓	✓	✓

[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.

1) Screening 방문 절차는 여러 방문에 걸쳐 시행할 수 있다.

2) 피험자는 가급적 공복 상태여야 하고, 오전 방문을 권장한다.

방문일 오차범위 : V2는 +7일(V1 기준), V3~V5는 ±7일(V2 기준)

또한, 여러 가지 사유로 인체적용시험 기간을 완료하지 않은 피험자는 인체적용시험 중단 시점에 Visit 5(종료방문)의 모든 절차를 시행해야 하며, 마지막 방문(Visit 5) 페이지 및 인체적용시험 종료 페이지의 기록이 완료되어야 한다.

3) 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.

4) 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 등

③ 신체 계측 : 키, 체중, 체질량지수

5) 임상실험실 검사는 아래와 같으며, 중앙검사실(SCL)에 의뢰하여 분석한다.

- ① 일반혈액검사 : Hematocrit, Hemoglobin, RBC, WBC, Platelet count, MCV, MCH, MCHC, Differential count(Segment, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil)
 - ② 혈청생화학검사 : Fasting plasma glucose, AST, ALT, Total Bilirubin, Creatinine, BUN, Alkaline Phosphatase, Albumin, Total protein, Total cholesterol, Triglyceride, Potassium(K), Sodium(Na), Chloride(Cl)
 - ③ 뇨검사 : PH, SG, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Nitrite, Blood, Leukocyte esterase
 - ④ 혈청검사 : Hepatitis B test (Visit 1에서만 실시)
- 6) 선별검사는 다음과 같으며, 중앙검사실(SCL)에 의뢰하여 분석한다.
- ① 요소호기 검사(UBT) : Helicobacter pylori 감염의 진단 및 선별검사로서 요소호기 검사(UBT)를 통해 평가한다. 요소호기 검사(UBT) ≥ 2.0 per mil 의 경우 양성으로 판정한다. Visit 1 기준 2주 이전까지 실시한 요소호기 검사(UBT) 평가 결과도 사용 가능하다.
- 7) 유효성 평가변수는 아래와 같으며, 중앙검사실(SCL)에 의뢰하여 분석한다.
- ① 요소호기 검사(UBT) 평가
 - ② 대변 항원검사(stool antigen test) 평가 : Helicobacter pylori의 성장과 증식 과정에서 생긴 항원 단백질을 대변에서 직접 검출하는 정성적 검사이다.
- 8) 피험자의 선정/제외 기준 판정은 Screening 검사 후 최종 결과로 판단한다.
- 9) 선별검사를 통과한 모든 피험자에게 Visit 2부터 무작위배정 받은 인체적용시험용 건강기능식품을 처방한다.
- 10) 반납약 회수 시에는 모든 미사용 인체적용시험용 건강기능식품, 사용/미사용 용기도 같이 반납을 받고, 복약 순응도는 아래와 같이 계산한다. 소수점 둘째 자리에서 반올림하여 소수점 첫째 자리까지 기록한다.

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

- 11) 식사 및 운동요법 교육을 매 방문시마다 시행한다(별첨 : 식사의요법 및 운동요법 지침 참조).

7.5.2 관찰항목 및 임상검사 항목

임상실험실 검사와 유효성 평가변수 측정을 위해 8ml(Visit 1~Visit 5)의 채혈과 10ml(Visit 1~Visit 5)의 소변검사를 실시하게 되고, 0.5g~1g(Visit 2, Visit 5)의 대변검사를 진행합니다.

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 성별 및 연령을 확인한다. 또한 과거 및 현재 병력(수술력 포함)과 그에 따른 치료력을 조사한다. 병용하고 있는 약물이 있다면 이에 대한 정확한 정보를 증례 기록서에 작성하고 해당 약물이 본 인체적용시험용 건강기능식품과 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 등
- ③ 신체 계측 : 키, 체중, 체질량지수(BMI) 계산

(6) 임상실험실 검사

다음 항목의 일반혈액검사, 혈청생화학검사, 뇨검사, 혈청검사를 실시(중앙검사실 이용)한다.

- ① 일반혈액검사 : Hematocrit, Hemoglobin, RBC, WBC, Platelet count, MCV, MCH, MCHC, Differential count(Segment, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil)
 - ② 혈청생화학검사 : Fasting plasma glucose, AST, ALT, Total Bilirubin, Creatinine, BUN, Alkaline Phosphatase, Albumin, Total protein, Total cholesterol, Triglyceride, Potassium(K), Sodium(Na), Chloride(Cl)
 - ③ 뇨검사 : PH, SG, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Nitrite, Blood, Leukocyte esterase
 - ④ 혈청검사(Hepatitis B) : HBsAg (Visit 1에서만 실시)
- (7) 심전도(ECG) 검사
- 피험자는 선별 검사 시 심전도를 측정한다.

(8) 요소호기 검사(UBT)

Helicobacter pylori 감염의 진단 및 선별검사로서 요소호기 검사(UBT)를 통해 평가한다(중앙검사실 이용). 요소호기 검사(UBT) ≥ 2.0 per mil 의 경우 양성으로 판정한다. Visit 1 기준 2주 이전까지 실시한 요소호기 검사(UBT) 평가 결과도 사용 가능하다.

[Helicobacter pylori 감염의 진단][22-25]

안정동위원소를 이용해서 비교적 간단하게 헬리코박터의 감염 유무를 판별하는 방법이다.

헬리코박터는 위산으로 덮여있는 위에서 살고 있다. 따라서 헬리코박터는 이런 열악한 환경으로부터 자신을 보호하기 위한 보호막을 가지고 있는데, 이 보호막은 요소를 분해하면서 생성

되는 암모니아로 이루어져 있다. 알칼리성의 암모니아가 위산을 중화시켜 줌으로써 위산으로부터 헬리코박터를 보호해 주는 것이다. 아래의 식은 헬리코박터가 자신을 보호하기 위해서 끊임 없이 요소를 분해하여, 암모니아와 이산화탄소를 만들어 내고 있는 모습을 보여준다. 이 반응에서 나타나는 원리가 바로 안정동위원소를 이용해서 헬리코박터의 유무를 판별하게 해주는 근거이기도 하다.



탄소에는 원자량이 12와 13인 두 개의 안정동위원소가 존재하는데, 자연상태에서 질량이 13인 탄소는 1.1% 밖에 되지 않고 질량이 12인 탄소가 대부분을 차지한다. 그러므로 대부분의 탄소화합물은 질량이 12인 탄소의 비율이 질량이 13인 탄소의 비율에 비해 상대적으로 월등히 우세하다. 하지만 분자내의 탄소를 인위적으로 모두 질량이 13인 원자로 만들 수 있는데, 이렇게 만들어진 분자를 13C-lable 되었다고 말한다.

안정동위원소로 헬리코박터의 감염여부를 판별하는 방법은 이와 같이 분자 내에 탄소가 질량이 13인 탄소로만 이루어진, 다시말해 13C-lable된 요소를 이용한다. 위 속에 투입된 13C-lable된 요소는 위속에 헬리코박터가 살고 있는 경우라면, 헬리코박터에 의해서 분해되어 암모니아와 질량이 13인 탄소가 이루어진 이산화탄소($^{13}\text{CO}_2$)를 만들어 낼 것이고, 이 ^{13}C 로 이루어진 이산화탄소는 호흡기를 통해서 몸밖으로 배출될 것이다. 다시 말하면, 헬리코박터가 위속에 존재하지 않는다면, 13C-lable된 요소는 위에서 분해되지 않을 것이고, 헬리코박터가 존재하는 경우에만 13C-lable된 요소가 분해되어 동위원소 적으로 무거운 $^{13}\text{CO}_2$ 가 허파를 통해서 몸밖으로 배출될 것이다. 그러므로 환자는 13C-lable된 요소를 투입하기 전, 평상시 호흡으로 몸밖으로 배출되는 이산화탄소의 탄소동위원소비를 측정 한 후에 요소를 투입한 후, 호흡으로 배출되는 이산화탄소의 탄소동위원소비를 다시 측정하여 이산화탄소의 ^{13}C 의 비율이 현저하게 높아졌으면 헬리코박터에 감염되었다고 진단할 수 있다.

(9) 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.

(10) 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.

(11) 식사 및 운동요법 교육

별첨된 자료(별첨 1, 2)를 활용하여 식사 및 운동요법을 교육한다.

2) Visit 2 : 1d (0wk+7, Visit 1 기준)

Visit 2 시점에 검사한 활력 징후, 신체검사, 임상실험실 검사, 유효성 평가변수 측정 결과

등은 인체적용시험용 건강기능식품 투여 후 검사에 대한 기저치(Baseline)로 이용된다.

(1) Randomization Number(이하 RN) 부여

시험 책임자는 선별 검사를 통과한 모든 피험자에게 무작위배정표에 따라 인체적용시험용 건강기능식품을 처방하는 순서대로 배정번호(RN)를 부여한다. RN은 공통으로 R이 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)로 써 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(중앙검사실 이용)

① 요소호기 검사(UBT)

② 대변 항원검사(stool antigen test) : Helicobacter pylori의 성장과 증식 과정에서 생긴 항원 단백질을 대변에서 직접 검출하는 정성적 검사이다.

(6) 인체적용시험용 건강기능식품 처방

해당 피험자의 배정번호(RN)에 따라 시험 책임자는 다음 방문 시기까지 인체적용시험용 건강기능식품을 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 : 21d (3wk±7, Visit 2 기준)

(1) 임신 여부 검사(가임 여성)

(2) 활력 징후, 신체검사 및 계측

(3) 임상실험실 검사

(4) 유효성 평가변수 측정(중앙검사실 이용)

① 요소호기 검사(UBT)

(5) 인체적용시험용 건강기능식품 처방

(6) 반납약 회수 및 순응도 평가

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

(7) 병용약물 확인

(8) 이상반응 평가

(9) 식사 및 운동요법 교육

4) Visit 4 : 42d (6wk±7, Visit 2 기준)

- (1) 임신 여부 검사(가임 여성)
- (2) 활력 징후, 신체검사 및 계측
- (3) 임상실험실 검사
- (4) 유효성 평가변수 측정(중앙검사실 이용)
 - ① 요소호기 검사(UBT)
- (5) 인체적용시험용 건강기능식품 처방
- (6) 반납약 회수 및 순응도 평가
- (7) 병용약물 확인
- (8) 이상반응 평가
- (9) 식사 및 운동요법 교육

5) Visit 5 : 63d (9wk±7, Visit 2 기준)

Visit 5 시점에 검사한 활력 징후, 신체검사, 임상실험실 검사, 유효성 평가변수 측정 결과 등은 인체적용시험용 건강기능식품 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(중앙검사실 이용)
 - ① 요소호기 검사(UBT)
 - ② 대변 항원검사(stool antigen test)
- (6) 반납약 회수 및 순응도 평가
- (7) 병용약물 확인
- (8) 이상반응 평가
- (9) 식사 및 운동요법 교육

6) 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 활력 징후, 신체검사 및 계측, 임상실험실 검사, 심전도(ECG) 검사, 임신 여부 검사(가임 여성), 요소호기 검사(UBT), 대변 항원검사(stool antigen test), 병용약물 확인, 이상반응 평가 등 필요하다고 판단되는 검사를 시행할 수 있고,

해당 내용을 증례기록서에 기록한다.

7.5.3 관찰검사 방법

유효성과 안전성 평가변수는 결과 분석의 객관성 유지를 위하여 인체적용시험 의뢰자인 (주)생명의 나무와 중앙검사실인 서울의과학연구소(SCL)에서 혈압계, 맥박계, 체온계, 신장계, 체중계, 심전도(ECG)계, 검체 채취관련 물품 등을 인체적용시험 실시기관에 제공한다.

1) 유효성 평가

결과 분석의 객관성 유지를 위하여 중앙검사실에 의뢰하여 측정한다. 단, 오전 방문(공복상태)을 권장하여 가급적 비슷한 시간대에 검체를 채취하고, 되도록 빨리 수거를 하도록 한다.

(1) 1차 유효성 평가변수 측정 : 요소호기 검사(UBT) (검체 검사방법 : 요소호기 검사법)

[요소호기 검사(UBT) 방법 및 검체 취급시의 유의사항][26]

- ① 투여 전 4시간 이상 금식해야 한다. 검사 실시전 4주 이내 Helicobacter pylori를 억제하는 것으로 알려져 있는 항생제, 프로톤 펌프저해제, bismuth 제제를 복용한 이력이 없어야 한다.
- ② 동봉된 백색라벨의 튜브에 약 4초간 정상시의 호흡으로 날숨을 불어넣고 즉시 마개를 한다.
- ③ 동봉된 13C-요소 함유 캡슐제를 물 50ml와 함께 복용한다.
- ④ 캡슐제를 복용한 후 정확히 20분 후에 청색라벨의 튜브에 약 4초간 정상시의 호흡으로 날숨을 불어넣고 즉시 마개를 한다.
- ⑤ 검체 채취 후 마개가 단단히 닫혀있는지 확인한 후, 튜브에 labeling을 한 후 검사실로 운반한다.
- ⑥ 채취한 검체를 질량분석기로 측정한다.
- ⑦ 보관 : 실온

(2) 2차 유효성 평가변수 측정 : 대변 항원검사(stool antigen test) (검체 검사방법 : ELISA)

[대변 항원검사(stool antigen test) 방법][26]

- ① 0.5-1g을 대변 용기에 채취한다.
- ② 검체 채취 후 마개가 단단히 닫혀있는지 확인한 후, 튜브에 labeling을 한 후 검사실로 운반한다.
- ③ 보관 : 냉장

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

㉔ 신체검사 : 두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등을 확인한다.

㉕ 신체 계측 : 키, 체중, 체질량지수를 계측하여 소수점 둘째자리에서 반올림하여 첫째 자리까지 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)²)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)

단회경구투여에 의한 동물실험에서는 과량투여 시 시험물질에 의한 동물의 사망, 일반증상 및 부검 결과의 이상소견, 체중변화가 관찰되지 않았다.

반복경구투여에 의한 동물실험에서는 과량투여 시 동물의 사망, 일반증상 및 안검사의 이상소견은 관찰되지 않았다. 체중변화 및 사료섭취량, 요검사, 일반혈액 및 혈청생화학적 검사, 혈액응고 검사, 장기중량에 있어서 일부 수치의 감소 또는 증가가 관찰되었으나 용량의존적인 결과를 보이지 않았다.

유전독성시험에서는 복귀돌연변이를 유발할 가능성이 없었으며, 골수세포의 소핵 형성에도 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다.

인체를 대상으로 한 과량복용시의 증상에 대해서는 알려진바 없다.

7.6.2 일반적 주의사항

- 1) 간기능 이상은 시험 책임자에게서 확인되어야 하며, 투약기간 중 효소수치를 정기적으로 관찰하고 만일 수치가 높아진 경우에는 투여를 중지한다.
- 2) 시험 책임자에게서 확인되어진 병용요법을 실시하는 경우, 각 사용약품의 설명서를 숙지한다.
- 3) 정해진 용량 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 건강기능식품을 원래 용기에서 꺼내어 다른 용기에 보관하는 것은 인체적용시험용 건강기능식품 오용(잘못 사용)에 의한 사고 발생이나 인체적용시험용 건강기능식품 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 5)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 건강기능식품을 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 인체적용시험 의뢰자인 (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, 통계분석

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 건강기능식품을 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 건강기능식품을 단 한번이라도 투여 받지 않은 피험자
- ▶ 무작위 배정 이후 자료가 전무한 피험자

PP 분석법은 무작위 배정된 피험자군 중에서 인체적용시험계획서에 순응한 피험자들만이 분석대상이 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 건강기능식품 순응도가 80% 이하인 피험자
- ▶ 인체적용시험계획서를 중대하게 위반하였다고 판단되는 피험자

7.8.2 유효성 평가방법

7.8.2.1 일차 유효성 평가변수

기초상태(baseline)에서 최종 평가시점(endpoint)까지 요소호기 검사(UBT)를 통해 *Helicobacter pylori* 활성 억제 개선율을 비교하여 시험식품을 투여한 군이 대조식품 투여군에 비해 *Helicobacter pylori* 활성 억제 개선의 우월함을 증명하고, 개선시키는 적합한 용량을 찾아낸다.

7.8.2.2 이차 유효성 평가변수

최종 평가시점(endpoint)의 대변 항원검사(stool antigen test)를 통해 *Helicobacter pylori* 활성 억제 개선율을 비교

7.8.3 통계분석방법

7.8.3.1 인구학적 정보 및 건강 상태

인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자를 대상으로 인구학적 정보(성별, 연령, 신장, 체중 등) 및 건강 상태에 대하여 연속형 변수에 대해서는 분산분석(ANOVA)을 실시하고, 범주형 변수에 대해서는 카이제곱검정(chi-square test)을 실시한다.

7.8.3.2 유효성 자료의 분석(Statistical Analysis of Efficacy Data)

7.8.3.2.1 일차 유효성 평가변수의 분석

요소호기 검사(UBT)를 통한 *Helicobacter pylori* 활성 억제 개선율에 대해 치료 후 구간 비교는 카이제곱검정(chi-square test) 또는 fisher's exact test 및 Pearson-Clopper coincidence interval로 평가하고, 이를 통하여 대조식품군과 시험식품군을 용량별로 순차적으로 비교하여 *Helicobacter pylori* 활성 억제 개선의 차이가 통계적으로 유의한 적합한 용량을 찾아낸다.

7.8.3.2.2 이차 유효성 평가변수의 분석

대변 항원검사(stool antigen test)를 통한 *Helicobacter pylori* 활성 억제 개선율에 대해 치료 후 구간 비교는 카이제곱검정(chi-square test) 또는 fisher's exact test 및 Pearson-Clopper coincidence interval로 평가한다.

7.9 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법

7.9.1 안전성 평가기준

인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위배정을 받고 인체적용시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용한 모든 피험자를 대상으로 활력징후 및 신체 계측, 신체검사, 임상실험실 검사, 임상적 이상반응 발현상황, 약물 복용력 등을 평가한다.

7.9.2 안전성 평가방법

- 1) 활력징후 및 신체계측, 임상실험실 결과는 각 방문 시점별 평균 및 표준편차 등의 기술통계량으로 기술하고, 각 치료군 간의 비교는 분산분석(ANOVA)을 실시하며, 치료 전후 비교는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으로 평가한다.
- 2) 신체검사 결과는 각 방문별로 증례수를 계산하여 카이제곱검정(chi-square test)으로 평가한다.
- 3) 인체적용시험 전반에 걸쳐 발생한 이상반응에 대하여는 증례수를 계산하여 카이제곱검정(chi-square test)으로 평가한다.
- 4) 약물 복용력은 인체적용시험 기간 동안 인체적용시험용 건강기능식품 이외에 피험자가 복용한 모든 약물을 기록하고, 기록된 약물은 계열별로 분류하여 평가한다.

7.9.3 안전성 보고 방법

7.9.3.1 정의

1) “이상반응(Adverse Event, 이하 AE)“이라 함은 인체적용시험용 건강기능식품을 투여 받은 피험자에서 발생한, 바람직하지 않고 의도되지 않은 증후(sign, 예; 실험실적 검사치의 이상), 증상(symptom), 질병을 말하며, 해당 인체적용시험용 건강기능식품과 반드시 인과관계를 가져야 하는 것은 아니다.

2) “이상약물반응(Adverse Drug Reaction, 이하 ADR)” 이라 함은 인체적용시험용 건강기능식품의 임의의 용량에서 발생한, 모든 유해하고 의도되지 않은 반응으로서, 인체적용시험용 건강기능식품과의 인과관계를 배제할 수 없는 경우를 말한다.

3) “중대한 이상반응/이상약물반응(Serious AE/ADR)” 이라 함은 인체적용시험에 사용되는 건강기능식품의 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 건강기능식품 관련 정보(예를 들어 임상시험자 자료집 또는 건강기능식품의 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) 경증(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) 중증(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.

임상시험 중 중대한 이상반응 발생시 각 담당자의 의무는 다음과 같다.

1) 시험 책임자

중대한 이상반응이 임상시험 기간 도중에 발생하는 경우, 인체적용시험용 건강기능식품과의 상관유무와 관계없이 발생 후 24시간이내, 혹은 늦어도 다음 근무일까지 임상시험 의뢰자 또는 임상시험모니터요원에게 보고해야 한다.

2) 시험 담당자

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

3) 인체적용시험 의뢰자

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

① 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우에는 의뢰자가 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 의뢰자가 이 사실을 보고 받거나 알게 된 날로부터 15일 이내

8. 피험자

8.1 피험자의 인체적용시험 참여 상태

인체적용시험 실시기관인 분당 서울대학교병원 생명윤리심의위원회로부터 2014년 8월 20일 최종승인을 받은 후, 2014년 9월 23일부터 피험자가 등록되었다.

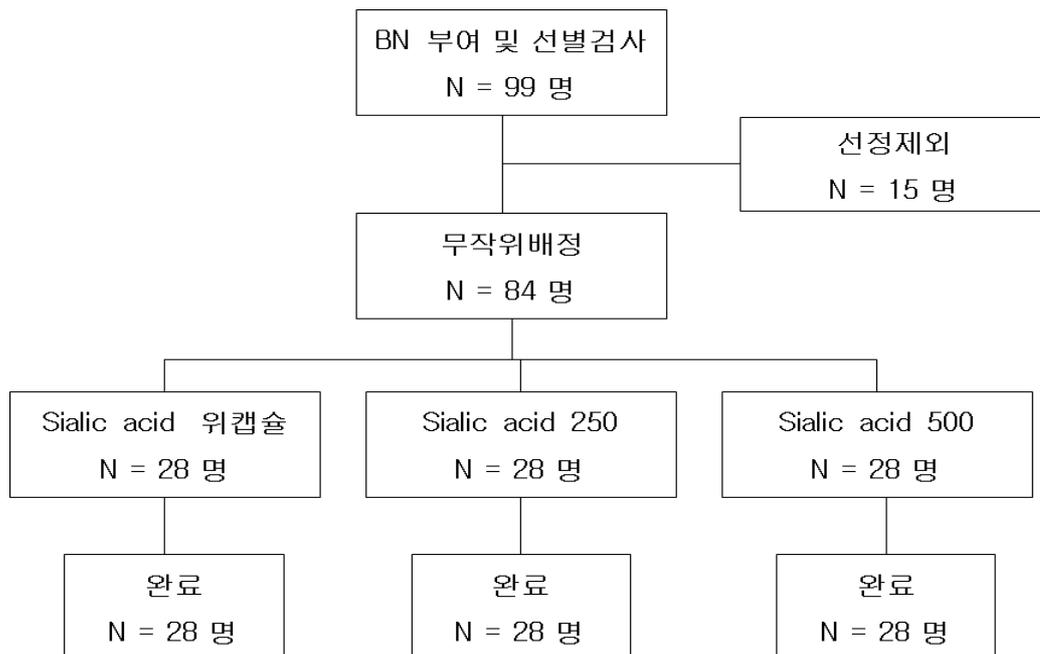
방문 1에 본 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 선별검사(screening)를 실시한 피험자 수는 총 99명이었으며, 그 중에 총 15명은 “요소호기 검사(UBT)에서 음성으로 판정되어 선정/제외기준 부적합”의 이유로 무작위 배정되기 전에 탈락하였다.

방문 2에 선정 및 제외기준에 적합한 총 84명의 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 대조식품군(Sialic acid 위캡슐)과 시험식품군(Sialic acid 250, Sialic acid 500)으로 배정하였다. 무작위 배정된 피험자는 대조식품 또는 시험식품을 1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 총 3주간 복용하였다.

방문 3에서 인체적용시험용 건강기능식품을 회수하였고, 중도탈락한 피험자는 없었다. 84명의 피험자는 방문 2에 배정된 시험식품 또는 대조식품을 재처방 받아 1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 총 3주간 복용하였다.

방문 4에서 인체적용시험용 건강기능식품을 회수하였고, 중도탈락한 피험자는 없었다. 84명의 피험자는 방문 2에 배정된 시험식품 또는 대조식품을 재처방 받아 1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐, 총 3주간 복용하였다.

방문 5에서 인체적용시험용 건강기능식품을 회수하였으며, 총 9주간의 Treatment period 동안 중도탈락 피험자는 발생하지 않았다. 2015년 1월 13일에 총 84명의 피험자가 인체적용시험을 완료(피험자 최종방문 완료)하였다.



< 그림 . 피험자의 인체적용시험 참여 상태 >

9. 인체적용시험의 결과

9.1 피험자의 인구학적 정보 및 건강 상태

본 인체적용시험에 등재한 피험자 중 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용하였으며, 인체적용시험용 건강기능식품 복용 후 전화 또는 방문에 의하여

시험자가 안전성 관련 데이터를 최소한 1회 이상 확인한 피험자 84명[Sialic acid 위캡슐군 28명, Sialic acid 250군 28명, Sialic acid 500군 28명]에 대해 분석을 실시하였다.

9.1.1 피험자의 인구학적 정보

< 표 . 인구학적 정보 >

단위: 명(%), 평균±표준편차(최소값-최대값)

항목	Sialic acid 위캡슐 (N=28)	Sialic acid 250 (N=28)	Sialic acid 500 (N=28)	p
성별	남자	15(53.6%)	11(39.3%)	0.538
	여자	13(46.4%)	17(60.7%)	
연령 (만)	55.9±10.44 (24-76)	55.3±14.08 (22-82)	50.4±13.48 (26-72)	0.216
키 (cm)	161.6±9.46 (138.9-179.1)	159.1±8.48 (140.1-174.6)	163.8±8.81 (148.7-181.7)	0.141
체중 (kg)	60.9±9.80 (42.7-84.8)	62.2 ±8.80 (45.7-80.3)	64.5±15.72 (48.0-115.0)	0.503
BMI (kg/m ²)	23.2±2.73 (19.1-29.3)	24.5±2.47 (17.7-28.1)	23.9±4.07 (18.8-35.1)	0.317

인체적용시험에 참여한 피험자의 성별 분포를 살펴보면 남자 피험자는 40명(47.6%), 여자 피험자는 44명(52.4%)으로 남자보다 여자의 비율이 높게 나타났으나 성별에 따른 군간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다(p=0.538). 평균 연령의 경우 Sialic acid 위캡슐군(만 55.9±10.44세)이 Sialic acid 250군(만 55.3±14.08세)과 Sialic acid 500군(만 50.4±13.48세) 보다 약간 높게 나타났으며, 선정기준에 해당되었다. 키(p=0.141)와 체중(p=0.503), BMI(p=0.317)의 경우 모두 유의한 차이를 보이지 않아 최초 무작위 배정에 의한 대상자간의 편견이 없는 것으로 확인되었다.

9.1.2 병력 및 치료력, 병용약물 여부

피험자들의 인체적용시험 선별 당시 병력(수술력 포함) 및 치료력을 조사한 결과, Sialic acid 500군에서만 2명(7.1%)이 병력 및 치료력이 있는 것으로 조사되었다.

병력 및 치료력이 있는 피험자들 중 본 인체적용시험용 건강기능식품과 병용 투여할 수 있는 약물인지를 평가하기 위하여 병용약물 여부를 조사한 결과, Sialic acid 500군에서 1명(50.0%)의 경우에만 현재 병력을 치료하기 위해 병용약물을 투여하는 것으로 조사되었으나 피험자의 복지를 위해 필요하고 또 인체적용시험용 건강기능식품에 영향을 주지 않는다는 시험 책임자의 판단에 따라 병용 투여할 수 있도록 결정되어 인체적용시험 진행에는 문제가 없음을 확인하였다.

< 표 158. 병력 및 치료력, 병용약물 여부 >

단위 : 명(%)

항목	Sialic acid 위캡슐 (N=28)	Sialic acid 250 (N=28)	Sialic acid 500 (N=28)	Total (N=84)	p*
<u>병력 및 치료력</u>					
없음	28(100.0)	28(100.0)	26(92.9)	82(97.6)	0.325
있음	0(0.0)	0(0.0)	2(7.1)	2(2.4)	
<u>병력 및 치료력이 있는 경우 병용약물 여부</u>					
없음	0(0.0)	0(0.0)	1(50.0)	1(50.0)	-
있음	0(0.0)	0(0.0)	1(50.0)	1(50.0)	

p* : Fisher's exact test

9.2 안전성 평가

본 인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중, 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 건강기능식품을 수령 후 1회 이상 복용하였으며, 인체적용시험용 건강기능식품 복용 후 전화 또는 방문에 의하여 시험자가 안전성 관련 데이터를 최소한 1회 이상 확인한 피험자 84명[Sialic acid 위캡슐군 28명, Sialic acid 250군 28명, Sialic acid 500군 28명]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 Sialic acid 위캡슐군(p=0.160), Sialic acid 250군(p=0.480), Sialic acid 500군(p=0.221) 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

이완기 혈압에서는 Sialic acid 250군(p<0.001)에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 변화는 아니었으며, 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

맥박의 경우 Sialic acid 위캡슐군(p=0.018)과 Sialic acid 250군(p=0.036)에서 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 차이는 아니었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

체온에서는 각 치료군별 방문시기 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

< 표 . 활력 징후 비교 >

Variables	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
수축기혈압 (mmHg)	0주	116.29±10.62 (98-134)	0.160	117.5±10.92 (94-130)	0.480	115.54±10.96 (88-130)	0.221	0.792
	3주	117.04±9.43 (101-130)		117.07±9.67 (96-130)		115.79±9.67 (92-128)		0.850
	6주	118.14±9.84 (94-134)		117.29±9.06 (98-130)		117.21±8.15 (96-128)		0.913
	9주	115.86±9.84 (88-130)		115.86±11.13 (90-130)		117.50±8.30 (98-128)		0.771
이완기혈압 (mmHg)	0주	75.5±6.17 (60-84)	0.191	77.07±6.12 (56-88)	<0.001	75.39±6.18 (60-82)	0.699	0.524
	3주	74.61±6.43 (60-84)		77.64±5.33 (64-84)		75.71±4.80 (66-84)		0.125
	6주	75.93±6.59 (60-86)		76.43±6.98 (56-86)		76.36±5.63 (66-88)		0.952
	9주	73.64±6.06 (56-84)		73.21±6.31 (60-84)		75.29±5.08 (64-88)		0.379
맥박 (회)	0주	65.96±6.21 (52-80)	0.018	65.07±4.67 (52-72)	0.036	66.71±4.66 (58-76)	0.369	0.503
	3주	66.29±5.13 (56-80)		66.07±4.44 (56-76)		67.29±4.04 (60-78)		0.570
	6주	68.21±5.34 (60-80)		66.36±6.33 (52-80)		68.21±3.94 (60-76)		0.322
	9주	67.93±4.13 (60-80)		67.86±4.62 (60-80)		67.71±2.71 (60-72)		0.978
체온 (°C)	0주	36.07±0.24 (35.4-36.5)	0.320	36.13±0.22 (35.8-36.5)	0.923	36.05±0.24 (35.5-36.4)	0.666	0.420
	3주	36.03±0.17 (35.7-36.3)		36.12±0.20 (35.8-36.5)		36.05±0.22 (35.6-36.5)		0.203
	6주	36.10±0.15 (35.8-36.3)		36.10±0.16 (35.8-36.4)		36.05±0.18 (35.6-36.4)		0.442
	9주	36.05±0.11 (35.8-36.3)		36.11±0.14 (35.8-36.5)		36.1±0.16 (35.6-36.3)		0.198

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : ANOVA (치료군별)

9.2.2 신체 계측

피험자들의 신체 계측 검사치를 비교하였다. 키와 체중에서는 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

BMI 지수의 경우 Sialic acid 위캡슐군(p=0.028)에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 변화는 아니었으며, 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

< 표 160. 신체 계측 비교 >

Variables	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
키 (cm)	0주	161.66±9.51 (138.8-179.2)	0.512	159.06±8.41 (140.7-174.4)	0.306	163.83±8.80 (148.9-181.5)	0.897	0.141
	3주	161.62±9.56 (138.8-179)		159.11±8.45 (140.8-174.7)		163.82±8.82 (148.9-181.5)		0.151
	6주	161.61±9.64 (138.6-179.1)		159.12±8.52 (140.5-174.6)		163.81±8.84 (148.8-181.4)		0.157
	9주	161.67±9.53 (138.9-179)		159.13±8.47 (140.7-174.6)		163.83±8.82 (148.7-181.5)		0.151
체중 (kg)	0주	60.73±9.70 (42.5-84.1)	0.056	62.44±8.75 (45.9-82.1)	0.848	64.82±15.69 (48.4-115)	0.226	0.430
	3주	60.80±9.67 (42.8-84.4)		62.42±8.76 (45.8-82.4)		64.83±15.65 (48-114.8)		0.439
	6주	60.87±9.71 (42.9-84.9)		62.41±8.73 (45.9-82.1)		64.97±15.59 (48.2-114.5)		0.423
	9주	60.88±9.64 (43.1-84.4)		62.39±8.72 (45.7-82)		64.96±15.55 (48.4-114.8)		0.423
BMI (kg/m ²)	0주	23.17±2.61 (19.3-29.4)	0.028	24.63±2.44 (17.8-28.5)	0.842	23.97±4.07 (18.8-35.1)	0.130	0.221
	3주	23.20±2.60 (19.4-29.3)		24.61±2.49 (17.8-28.9)		23.96±4.05 (18.8-35)		0.246
	6주	23.24±2.59 (19.3-29.3)		24.61±2.46 (17.9-28.7)		24.03±4.02 (19-34.9)		0.257
	9주	23.23±2.60 (19.2-29.2)		24.61±2.45 (17.8-28.6)		24.03±4.01 (18.9-35)		0.254

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : ANOVA (치료군별)

9.2.3 신체검사

각 방문시마다 피험자들에게 두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등의 신체검사를 실시하여 비교한 결과, Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 비정상인 경우가 전혀 없었다.

< 표 . 신체검사 비교 >

단위 : 명(%)

항목	Sialic acid 위캡슐 (N=28)	Sialic acid 250 (N=28)	Sialic acid 500 (N=28)	Total (N=84)	p*
정상	28(100.0)	28(100.0)	28(100.0)	84(100.0)	
비정상(NCS)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
비정상(CS)	0(0.0)	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. Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 방문시기에 따라 Hemoglobin, Hematocrit, WBC, RBC, Platelet, MCV, MCH, MCHC, Segment, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

또한 각 방문시기별 치료군 간의 검사치를 비교한 결과에서도 일반혈액검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

< 표 . 일반혈액검사 비교 >

Variables	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
Hemoglobin (g/dL)	0주	14.26±1.07 (12-16.5)	0.368	13.94±1.34 (11.4-16.3)	0.099	14.02±1.26 (11-16)	0.372	0.590
	3주	14.38±1.12 (11.4-16.6)		14.04±1.37 (12-17.5)		14.17±1.33 (11.3-16.9)		0.593
	6주	14.39±1.11 (12.1-16.5)		14.13±1.39 (12-16.7)		14.10±1.35 (10.9-17.1)		0.660
	9주	14.28±1.11 (12.1-17)		14.12±1.41 (12.1-17.2)		14.14±1.48 (11-16.8)		0.893
Hematocrit (%)	0주	43.48±3.42 (36.9-51.2)	0.062	42.80±3.77 (36.5-49.8)	0.181	43.06±3.98 (35.5-51.5)	0.191	0.790
	3주	44.25±3.67 (35.4-52.8)		43.16±3.81 (37-52.4)		43.50±3.65 (36.9-51.2)		0.534
	6주	44.19±3.43 (37.7-52.2)		43.24±3.97 (35.9-50.9)		43.42±3.77 (37-51.5)		0.599
	9주	44.09±3.58 (39.3-53.3)		43.38±3.86 (36.3-52)		43.67±4.14 (36.2-51.2)		0.788
WBC (Thous/uL)	0주	5.64±1.60 (2.5-8.9)	0.184	5.98±1.53 (3.1-9.5)	0.115	5.94±1.46 (3.3-8.7)	0.490	0.666
	3주	5.92±1.75 (2.7-10.3)		6.12±1.64 (2.9-9.3)		6.20±1.38 (3.9-8.6)		0.793
	6주	5.99±1.72 (3.2-9.2)		6.31±1.81 (3.2-11.6)		6.21±1.98 (3.8-13.8)		0.794
	9주	5.89±1.67 (2.5-9.4)		6.45±1.42 (3.7-9.5)		6.34±1.37 (4.2-8.9)		0.330
RBC (Mil/uL)	0주	4.70±0.44 (3.68-5.49)	0.077	4.66±0.51 (3.89-5.61)	0.097	4.54±0.34 (3.99-5.29)	0.163	0.348
	3주	4.70±0.46 (3.48-5.63)		4.64±0.46 (3.82-5.44)		4.58±0.38 (4.03-5.44)		0.561
	6주	4.72±0.46 (3.79-5.68)		4.71±0.49 (3.79-5.5)		4.58±0.38 (3.99-5.43)		0.408
	9주	4.76±0.47 (3.87-5.74)		4.72±0.43 (4-5.58)		4.60±0.41 (3.91-5.42)		0.375
Platelet (Thous/uL)	0주	241.96±51.35 (166-359)	0.329	249.21±66.52 (123-369)	0.191	245.79±47.47 (152-339)	0.578	0.888
	3주	252.29±66.39 (156-494)		260.39±60.34 (156-367)		249.25±54.68 (153-440)		0.777
	6주	251.36±58.41 (135-374)		256.25±60.94 (145-361)		253.25±60.26 (152-451)		0.954
	9주	250.32±50.15 (151-358)		257.75±63.42 (136-364)		254.43±59.67 (115-396)		0.891

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : ANOVA (치료군별)

< 표 . 일반혈액검사 비교 (계속) >

Variables	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
MCV (fL)	0주	94.03±3.57 (85.8-101.4)	0.104	93.14±3.71 (83.7-98.8)	0.211	95.22±4.39 (84.9-103)	0.538	0.141
	3주	94.25±4.53 (85.9-105.1)		93.01±3.77 (83.1-99.1)		95.20±4.57 (84.5-105.2)		0.169
	6주	93.70±4.30 (84.4-103.9)		92.61±4.17 (82.9-98.8)		94.93±4.61 (82.9-106.4)		0.145
	9주	93.43±4.51 (84.5-104.9)		92.58±4.20 (81.3-99.7)		94.77±5.15 (80.4-104.4)		0.211
MCH (pg)	0주	30.87±1.17 (28.5-33.5)	0.056	30.57±1.42 (26.5-32.7)	0.084	31.09±1.64 (26.2-33.9)	0.342	0.387
	3주	30.65±1.43 (27.3-33.1)		30.21±1.51 (26.6-32.5)		30.99±1.73 (25.9-33.5)		0.178
	6주	30.44±1.35 (27.1-33.1)		30.06±1.63 (26.3-32.8)		30.86±1.54 (26.5-34.2)		0.147
	9주	30.40±1.53 (26.5-33.2)		30.11±2.07 (25.4-34)		30.88±1.56 (26.4-33.5)		0.254
MCHC (%)	0주	32.73±0.89 (30.2-34.8)	0.258	32.76±0.75 (31.2-34.1)	0.064	32.75±0.79 (30.9-34.3)	0.318	0.991
	3주	32.51±0.80 (31-34.7)		32.38±0.83 (31-34.2)		32.55±0.81 (30.7-34.1)		0.690
	6주	32.48±0.97 (30.4-34.7)		32.53±0.82 (31.2-34.1)		32.50±0.84 (29.5-33.9)		0.983
	9주	32.48±0.93 (30.7-34.7)		32.36±0.97 (30.4-34.1)		32.54±0.84 (30.3-33.8)		0.753
Segment (%)	0주	53.60±7.72 (35.3-65.3)	0.768	57.68±8.06 (41.8-74.2)	0.336	56.89±7.98 (37.4-69.4)	0.936	0.130
	3주	54.65±9.09 (35.2-67.5)		57.18±7.40 (45-79.3)		56.19±8.58 (35.4-72.3)		0.525
	6주	54.21±8.87 (35.2-70.3)		56.63±6.03 (46.2-72.7)		56.05±9.14 (38.1-75.7)		0.512
	9주	54.45±7.88 (35.2-69.4)		59.47±9.72 (40.3-82.9)		56.19±7.31 (41.9-68.5)		0.080
Lymphocyte (%)	0주	37.36±6.46 (23.9-51.8)	0.589	33.58±7.42 (17.7-45.2)	0.432	33.88±6.70 (22.6-49.8)	0.984	0.079
	3주	36.17±7.44 (24.8-56.9)		34.23±6.70 (16.5-45.8)		33.98±7.51 (20.4-50.4)		0.466
	6주	36.53±7.42 (23.6-56.8)		34.50±6.21 (17.2-45.5)		33.76±7.65 (15.5-49.7)		0.326
	9주	36.09±6.85 (22.6-51.9)		32.23±9.37 (11.8-50.7)		34.23±6.98 (23.8-47.1)		0.189
Monocyte (%)	0주	5.53±1.72 (3.6-9.8)	0.806	5.60±1.10 (3.5-7.8)	0.284	5.54±1.08 (3.3-7.5)	0.533	0.978
	3주	5.54±1.86 (3.1-11.5)		5.55±1.26 (2.8-7.9)		5.80±1.19 (3.9-8.5)		0.758
	6주	5.67±1.85 (3.6-11.5)		5.84±1.18 (3.9-7.8)		5.45±1.46 (3.2-9.7)		0.632
	9주	5.56±1.84 (3.5-11.5)		5.46±1.01 (3.5-7.6)		5.62±0.92 (4.3-7.5)		0.896

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : ANOVA (치료군별)

< 표 . 일반혈액검사 비교 (계속) >

Variables	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
Eosinophil (%)	0주	2.86±1.80 (1-8.3)	0.844	2.68±1.39 (1.4-6.5)	0.550	3.24±2.28 (0.5-8.7)	0.250	0.518
	3주	2.96±2.28 (0.7-9.8)		2.48±0.98 (0.8-5.9)		3.50±2.27 (0.6-9.2)		0.150
	6주	2.86±1.80 (0.8-8.2)		2.55±1.06 (1.2-5.9)		3.73±2.42 (0.8-10.3)		0.051
	9주	3.05±1.74 (1-7.9)		2.42±1.07 (1.2-5.7)		3.35±1.69 (0.5-7.9)		0.073
Basophil (%)	0주	0.76±0.52 (0.2-2.1)	0.064	0.54±0.38 (0.1-1.7)	0.147	0.50±0.35 (0.1-1.6)	0.080	0.061
	3주	0.68±0.56 (0.1-2.5)		0.56±0.23 (0.1-1.1)		0.53±0.22 (0.2-1.1)		0.272
	6주	0.77±0.53 (0.2-2.5)		0.64±0.26 (0.2-1.1)		0.73±0.59 (0.2-3.4)		0.582
	9주	0.81±0.52 (0.2-2.5)		0.65±0.27 (0.1-1.2)		0.68±0.31 (0.2-1.3)		0.234

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : ANOVA (치료군별)

임상실험실 검사 중 혈청생화학검사 결과를 비교하였다. Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 방문시기에 따라 Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Fasting plasma glucose, Total Bilirubin, AST, ALT, Alkaline phosphatase, Total cholesterol, Triglyceride, Sodium(Na), Potassium(K), Chloride(Cl) 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다.

또한 각 방문시기별 치료군 간의 검사치를 비교한 결과에서도 혈청생화학검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

< 표 . 혈청생화학검사 비교 >

Variables	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
Total protein (g/dL)	0주	7.20±0.40 (6.3-8)	0.810	7.14±0.45 (6.1-7.9)	0.125	7.20±0.33 (6.7-8)	0.116	0.792
	3주	7.24±0.47 (6.1-8)		7.18±0.40 (6.4-8.1)		7.26±0.36 (6.5-7.9)		0.760
	6주	7.23±0.46 (6.3-8.1)		7.23±0.35 (6.4-7.9)		7.31±0.34 (6.5-8)		0.679
	9주	7.25±0.37 (6.4-7.8)		7.27±0.39 (6.5-8.1)		7.35±0.29 (6.7-7.9)		0.512
Albumin (g/dL)	0주	4.33±0.17 (4-4.6)	0.801	4.31±0.24 (3.8-4.8)	0.147	4.33±0.21 (3.9-4.7)	0.306	0.945
	3주	4.34±0.20 (3.9-4.6)		4.35±0.20 (4-4.7)		4.39±0.24 (3.9-4.8)		0.630
	6주	4.36±0.19 (4-4.7)		4.39±0.20 (4.1-4.8)		4.38±0.21 (4-4.7)		0.898
	9주	4.33±0.20 (3.9-4.7)		4.34±0.20 (4-4.7)		4.35±0.22 (3.9-4.6)		0.922

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : ANOVA (치료군별)

< 표 . 혈청생화학검사 비교 (계속) >

Variables	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
BUN (mg/dL)	0주	14.12±3.25 (9.5-20.7)	0.560	14.38±3.51 (6.8-20.1)	0.063	15.34±3.65 (8-21.3)	0.231	0.389
	3주	13.35±4.07 (7.1-22.3)		13.30±3.39 (7.8-19.7)		14.35±2.66 (9.5-19.8)		0.435
	6주	13.66±3.53 (8.2-21.7)		13.05±3.26 (6.8-20.7)		13.95±3.84 (7.9-22.5)		0.624
	9주	13.35±3.56 (7.6-21.8)		14.33±3.60 (6.8-23)		14.66±3.03 (9.8-22.3)		0.332
Creatinine (mg/dL)	0주	0.86±0.14 (0.64-1.13)	0.082	0.86±0.12 (0.6-1.11)	0.425	0.88±0.18 (0.64-1.2)	0.270	0.779
	3주	0.88±0.15 (0.65-1.25)		0.86±0.13 (0.62-1.14)		0.89±0.17 (0.66-1.25)		0.788
	6주	0.88±0.14 (0.65-1.18)		0.87±0.12 (0.63-1.13)		0.90±0.17 (0.66-1.19)		0.730
	9주	0.87±0.13 (0.68-1.1)		0.87±0.14 (0.62-1.18)		0.90±0.18 (0.65-1.19)		0.683
Fasting plasma glucose (mg/dL)	0주	93.18±7.00 (79-105)	0.661	90.89±7.51 (78-110)	0.114	91.82±10.26 (76-110)	0.182	0.593
	3주	92.71±7.81 (74-104)		93.50±7.51 (78-110)		93.21±9.50 (76-115)		0.938
	6주	93.54±7.34 (77-107)		92.39±8.65 (78-112)		94.61±8.97 (77-110)		0.613
	9주	92.43±7.28 (74-103)		93.61±7.58 (82-112)		93.50±8.45 (77-111)		0.822
Total Bilirubin (mg/dL)	0주	0.76±0.24 (0.24-1.19)	0.754	0.69±0.23 (0.27-1.16)	0.623	0.63±0.22 (0.29-1.15)	0.418	0.097
	3주	0.78±0.20 (0.41-1.15)		0.65±0.23 (0.3-1.16)		0.67±0.19 (0.22-1.05)		0.059
	6주	0.74±0.25 (0.24-1.17)		0.68±0.21 (0.27-1.15)		0.65±0.22 (0.25-1.19)		0.322
	9주	0.75±0.24 (0.32-1.16)		0.69±0.22 (0.33-1.16)		0.68±0.25 (0.24-1.12)		0.461
AST (U/L)	0주	24.14±4.12 (17-31)	0.502	21.82±3.71 (16-30)	0.858	23.07±4.09 (16-29)	0.498	0.098
	3주	23.54±3.93 (17-29)		22.04±3.83 (14-30)		23.36±3.19 (17-29)		0.253
	6주	23.14±4.31 (15-31)		22.29±3.03 (17-28)		22.57±3.01 (18-28)		0.649
	9주	23.54±4.25 (15-30)		22.32±3.84 (16-30)		23.50±4.21 (15-31)		0.456
ALT (U/L)	0주	22.18±7.10 (13-38)	0.061	20.00±5.52 (10-32)	0.746	21.00±7.94 (11-39)	0.114	0.503
	3주	23.32±8.11 (12-38)		20.32±6.01 (10-36)		20.86±8.11 (11-44)		0.283
	6주	22.14±7.59 (12-42)		19.86±5.05 (11-31)		19.14±6.75 (10-35)		0.208
	9주	20.75±5.61 (10-37)		19.25±6.32 (11-40)		21.11±7.15 (10-37)		0.517

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : ANOVA (치료군별)

< 표 . 혈청생화학검사 비교 (계속) >

Variables	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
Alkaline phosphatase (U/L)	0주	70.32±19.20 (42-114)	0.387	69.96±22.14 (45-159)	0.216	68.18±23.83 (31-136)	0.805	0.925
	3주	73.29±22.91 (41-133)		71.25±21.01 (46-150)		67.61±22.34 (34-134)		0.624
	6주	72.54±21.47 (40-122)		72.86±19.74 (48-147)		66.82±21.69 (32-131)		0.484
	9주	71.14±20.93 (42-131)		71.36±20.42 (46-147)		67.54±21.85 (31-122)		0.749
Total cholesterol (mg/dL)	0주	179.86±27.16 (111-210)	0.679	177.75±29.43 (111-218)	0.568	176.79±25.48 (123-212)	0.677	0.912
	3주	182.79±22.95 (128-220)		175.21±24.72 (133-219)		179.32±22.95 (126-212)		0.488
	6주	182.93±19.64 (133-216)		173.93±27.36 (116-219)		178.82±24.96 (109-208)		0.383
	9주	183.50±17.01 (134-210)		176.68±23.58 (123-205)		180.07±25.65 (96-208)		0.525
Triglyceride (mg/dL)	0주	123.54±46.32 (43-223)	0.577	119.25±44.89 (49-203)	0.554	129.93±54.81 (47-239)	0.171	0.714
	3주	121.93±37.94 (61-193)		127.61±45.83 (58-220)		125.04±44.04 (52-209)		0.884
	6주	116.96±36.80 (47-200)		127.14±39.56 (46-189)		113.46±46.98 (49-197)		0.441
	9주	124.64±40.73 (65-208)		123.96±45.81 (58-200)		124.00±52.22 (32-233)		0.998
Sodium(Na) (mmol/L)	0주	142.54±1.50 (140-146)	0.272	142.75±1.90 (139-146)	0.159	141.89±1.77 (138-146)	0.847	0.163
	3주	142.36±1.57 (139-145)		142.50±1.60 (140-146)		141.89±1.59 (139-146)		0.331
	6주	142.21±1.47 (139-146)		142.32±1.70 (140-146)		141.71±1.76 (139-145)		0.344
	9주	142.68±1.44 (140-145)		142.79±1.40 (140-145)		141.96±1.50 (140-146)		0.076
Potassium(K) (mmol/L)	0주	4.43±0.31 (3.8-5)	0.088	4.39±0.41 (3.8-5.9)	0.132	4.41±0.35 (3.7-5.1)	0.084	0.918
	3주	4.58±0.38 (3.9-5.5)		4.48±0.41 (3.6-5.3)		4.49±0.31 (3.9-5)		0.564
	6주	4.41±0.36 (3.8-5.4)		4.50±0.33 (3.8-5.1)		4.44±0.34 (3.8-5)		0.652
	9주	4.56±0.41 (3.8-5.7)		4.60±0.39 (3.8-5.3)		4.58±0.36 (3.7-5.3)		0.930
Chloride(Cl) (mmol/L)	0주	104.96±1.90 (101-109)	0.111	104.89±1.69 (102-109)	0.099	104.11±2.33 (99-108)	0.175	0.208
	3주	104.54±2.03 (100-108)		105.43±1.99 (101-109)		104.32±2.39 (99-109)		0.129
	6주	105.07±1.96 (101-109)		105.29±2.00 (101-109)		104.79±2.28 (100-109)		0.668
	9주	105.50±1.88 (101-109)		105.64±1.95 (101-109)		104.79±2.70 (99-109)		0.303

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : ANOVA (치료군별)

< 표 . 뇨검사(1) >

Variables	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*
		평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	평균±표준편차 (최소값-최대값)	p	
pH	0주	5.68±0.70 (5-7.5)	0.296	5.59±0.68 (5-7.5)	0.990	5.54±0.79 (5-8)	0.109	0.759
	3주	5.89±0.84 (5-8)		5.64±0.81 (5-8)		5.68±0.81 (5-8)		0.472
	6주	5.73±0.79 (5-8)		5.61±0.76 (5-8)		5.80±1.03 (5-8)		0.694
	9주	5.70±0.81 (5-8)		5.59±0.76 (5-7.5)		5.38±0.60 (5-7.5)		0.249
S.G	0주	1.021±0.007 (1.005-1.03)	0.554	1.021±0.007 (1.01-1.03)	0.230	1.022±0.005 (1.015-1.03)	0.306	0.754
	3주	1.022±0.006 (1.01-1.03)		1.024±0.006 (1.015-1.03)		1.021±0.007 (1.009-1.03)		0.148
	6주	1.021±0.005 (1.014-1.03)		1.022±0.006 (1.008-1.03)		1.021±0.006 (1.01-1.03)		0.547
	9주	1.020±0.006 (1.01-1.03)		1.023±0.007 (1.01-1.032)		1.024±0.007 (1.01-1.037)		0.082

p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : ANOVA (치료군별)

임상실험실 검사 중 뇨검사(1) 결과를 비교하였다. Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 방문시기에 따라 pH, S.G 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

< 표 169. 뇨검사(2) >

Variables	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*
		정상	비정상	정상	비정상	정상	비정상	
Nitrate	0주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	3주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	6주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	9주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
Protein	0주	28(100.0%)	0(0.0%)	27(96.4%)	1(3.6%)	28(100.0%)	0(0.0%)	1.000
	3주	28(100.0%)	0(0.0%)	26(92.9%)	2(7.1%)	28(100.0%)	0(0.0%)	0.325
	6주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	9주	28(100.0%)	0(0.0%)	27(96.4%)	1(3.6%)	28(100.0%)	0(0.0%)	1.000
Glucose	0주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	27(96.4%)	1(3.6%)	1.000
	3주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	6주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	9주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
Ketone	0주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	27(96.4%)	1(3.6%)	1.000
	3주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	6주	28(100.0%)	0(0.0%)	27(96.4%)	1(3.6%)	28(100.0%)	0(0.0%)	1.000
	9주	28(100.0%)	0(0.0%)	27(96.4%)	1(3.6%)	28(100.0%)	0(0.0%)	1.000
Bilirubin	0주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	3주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	6주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	9주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-

p* : Fisher's exact test

< 표 170. 뇨검사(2) (계속) >

Variables	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*
		정상	비정상	정상	비정상	정상	비정상	
Blood	0주	28(100.0%)	0(0.0%)	27(96.4%)	1(3.6%)	27(96.4%)	1(3.6%)	1.000
	3주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	6주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	9주	27(96.4%)	1(3.6%)	27(96.4%)	1(3.6%)	25(89.3%)	3(10.7%)	0.611
Urobilinogen	0주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	3주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	6주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
	9주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	-
Leukocyte esterase	0주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	27(96.4%)	1(3.6%)	1.000
	3주	28(100.0%)	0(0.0%)	28(100.0%)	0(0.0%)	26(92.9%)	2(7.1%)	0.325
	6주	27(96.4%)	1(3.6%)	28(100.0%)	0(0.0%)	27(96.4%)	1(3.6%)	1.000
	9주	27(96.4%)	1(3.6%)	24(85.7%)	4(14.3%)	28(100.0%)	0(0.0%)	0.121

p* : Fisher's exact test

임상실험실 검사 중 뇨검사(2) 결과를 비교하였다. Nitrate, Bilirubin, Urobilinogen 검사 수치는 모두 정상으로 조사되었다.

Protein 검사 수치가 비정상적으로 나온 피험자는 Sialic acid 250군에서 0주차 1명(3.6%), 3주차 2명(7.1%), 9주차 1명(3.6%)으로 조사되었으나 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 확인되었으며 임상적으로 큰 의미는 없었다.

Glucose 수치의 경우 Sialic acid 500군에서 0주차 1명(3.6%)이 비정상적으로 조사되었으나 군간에 유의하지 않았으며 임상적으로 큰 의미는 없었다.

그 밖에 Ketone, Blood, Leukocyte esterase 검사 수치에서도 비정상적으로 나온 경우가 있었으나 모든 방문시기에서 치료군 간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 임상적으로 큰 의미는 없었다.

9.2.5 임상적 이상반응 발현상황

< 표 . 이상반응 발현상황 비교 >

단위 : 명(%)

항목	Sialic acid 위캡슐 (N=28)	Sialic acid 250 (N=28)	Sialic acid 500 (N=28)	Total (N=84)	p*
없다	25(89.3)	27(96.4)	27(96.4)	79(94.0)	0.611
있다	3(10.7)	1(3.6)	1(3.6)	5(6.0)	

p* : Fisher's exact test

피험자들의 대조식품군(Sialic acid 위캡슐)과 시험식품군(Sialic acid 250, Sialic acid 500)에서 인체적용시험 제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 모든 이상반응 현황을 살펴보면, Sialic acid 위캡슐군에서 발현된 이상반응(AE)은 3건(10.7%), Sialic acid 250군은 1건(3.6%), Sialic acid

500군은 1건(3.6%) 발현되었다.

이상약물반응(ADR) 발현은 1건도 없었다. 또한 중대한 이상반응(Serious AE)과 중대한 이상약물반응(Serious ADR) 발현은 1건도 발생하지 않았다.

< 표 . 이상반응 발현 현황 >

	이상반응 종류	발현 건수	경과	중증도	본제와의 관련여부	조치	결과
Sialic acid 위캡슐	어지러움	1건	1회	경증	관련성이 적음	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복
	설사	1건	1회	경증	관련성이 적음	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복
	소화불량	1건	1회	경증	관련성이 적음	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복
Sialic acid 250	설사	1건	1회	경증	관련성이 적음	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복
Sialic acid 500	소화불량	1건	1회	경증	관련성이 적음	취해진 조치 없음	후유증 없이 회복

피험자들의 이상반응 발현 현황을 자세히 살펴보면, Sialic acid 위캡슐군에서 발현된 ‘어지러움’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 적음(Unlikely)’ 으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증(Mild)’, 결과는 ‘후유증 없이 회복(Recovered without sequelae)’ 평가되었고, 시험제품과의 인과관계와 상관성이 적어 계속 시험을 진행하여 완료하였다. ‘설사’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 적음(Unlikely)’ 으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증(Mild)’, 결과는 ‘후유증 없이 회복(Recovered without sequelae)’ 으로 평가되었고, 시험제품과의 인과관계와 상관성이 적어 계속 시험을 진행하여 완료하였다. ‘소화불량’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 적음(Unlikely)’ 으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증(Mild)’, 결과는 ‘후유증 없이 회복(Recovered without sequelae)’ 으로 평가되었고, 시험제품과의 인과관계와 상관성이 적어 계속 시험을 진행하여 완료하였다.

Sialic acid 250군에서 발현된 ‘설사’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 적음(Unlikely)’ 으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증(Mild)’, 결과는 ‘후유증 없이 회복(Recovered without sequelae)’ 으로 평가되었고, 시험제품과의 인과관계와 상관성이 적어 계속 시험을 진행하여 완료하였다.

Sialic acid 500군에서 발현된 ‘소화불량’ 1건의 이상반응은 ‘관련성이 적음(Unlikely)’ 으로 평가되었다. 중증도는 ‘경증(Mild)’, 결과는 ‘후유증 없이 회복(Recovered without sequelae)’ 으로 평가되었고, 시험제품과의 인과관계와 상관성이 적어 계속 시험을 진행하여 완료하였다(표 16).

9.2.6 약물 복용력

피험자들의 인체적용시험 선별 당시 병용약물이 있는 것으로 확인되었으며, 피험자의 복지를 위해 필요하고 또 인체적용시험용 건강기능식품에 영향을 주지 않는다는 시험 책임자의 판단

에 따라 병용 투여할 수 있도록 결정되어 인체적용시험 진행에는 문제가 없음을 확인하였다. 또한 무작위 배정을 받고 인체적용시험용 건강기능식품을 1회 이상 복용한 이후의 병용약물도 전혀 변화 없음을 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 건강기능식품 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 건강기능식품을 복용하고, 최소한 1회 이상 유효성 평가가 실시된 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 따라서 피험자 84명[Sialic acid 위캡슐군 28명, Sialic acid 250군 28명, Sialic acid 500군 28명]을 대상으로 평가하였다.

9.3.1.1 1차 유효성 평가변수

< 표 . 요소호기 검사(UBT) 개선을 비교 >

항목	방문		Sialic acid 위캡슐 (N=28)	Sialic acid 250 (N=28)	Sialic acid 500 (N=28)	p*	p**
UBT (per mil)	visit 2 (0주)	Positive Negativ e	28(100.0%) 0(0.0%)	28(100.0%) 0(0.0%)	28(100.0%) 0(0.0%)	-	-
	visit 3 (3주)	Positive Negativ e	28(100.0%) 0(0.0%)	28(100.0%) 0(0.0%)	28(100.0%) 0(0.0%)	-	-
	visit 4 (6주)	Positive Negativ e	28(100.0%) 0(0.0%)	27(96.4%) 1(3.6%)	27(96.4%) 1(3.6%)	0.313	0.313
	visit 5 (9주)	Positive Negativ e	27(96.4%) 1(3.6%)	21(75.0%) 7(25.0%)	13(46.4%) 15(53.6%)	0.022	<0.001

p*:chi-square test(Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군), p**:chi-square test(Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군)

요소호기 검사(UBT)의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교한 결과, Baseline(0주차)과 식품 투여 후 3주차에서는 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 음성으로 확인된 피험자는 없었다. 식품 투여 후 6주차에서는 Sialic acid 250군에서 1명(3.6%), Sialic acid 500군에서 1명(3.6%)의 피험자가 음성으로 확인되었다.

식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군에서 1명(3.6%), Sialic acid 250군에서 7명(25.0%), Sialic acid 500군에서 15명(53.6%)이 음성으로 확인되었다. Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군(p=0.022), Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군(p<0.001) 간에 통계적으로 유의한 변화가 있었으며 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

< 표 . 요소호기 검사(UBT) 비교 >

항목	방문	Sialic acid 위캡슐 (N=28)			Sialic acid 250 (N=28)			Sialic acid 500 (N=28)			p*	p**
		평균±표준편차	p**	p	평균±표준편차	p**	p	평균±표준편차	p**	p		
UBT (per mil)	0주	15.08±6.44			17.86±8.37			18.44±8.45			0.168	0.100
	3주	13.65±6.87	0.053	0.079	14.40±6.97	<0.001	<0.001	11.68±6.49	<0.001	<0.001	0.685	0.277
	6주	13.71±6.21	0.071		11.78±7.59	<0.001	1	8.23±6.39	<0.001	1	0.302	0.002
	9주	13.51±7.21	0.068		7.02±5.42	<0.001		3.93±4.06	<0.001	1	<0.001	<0.001

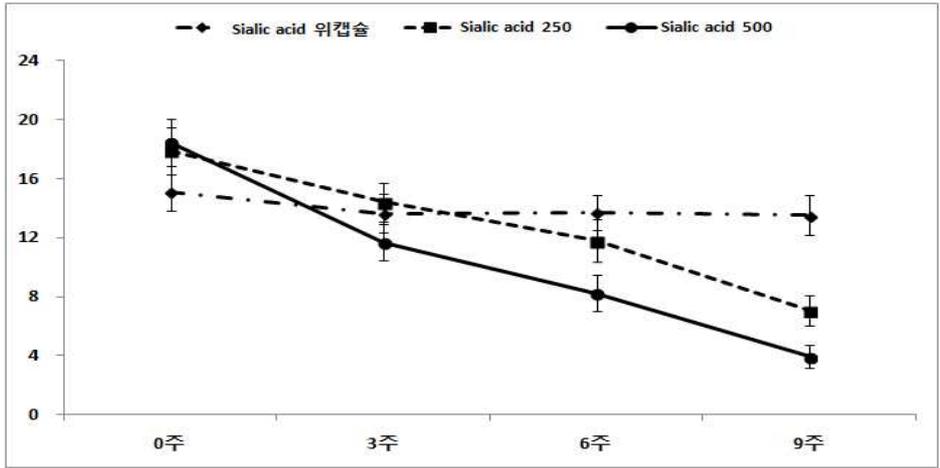
p : Repeated measure ANOVA (방문시기별), p* : independence samples t-test(Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군)

p** : independence samples t-test(Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군)

p*** : paired samples t-test(치료군별 0주차와 비교)

요소호기 검사(UBT)의 검사치를 비교하였다. Baseline(0주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군(15.08±6.44per mil)과 Sialic acid 250군(17.86±8.37per mil), Sialic acid 위캡슐군(15.08±6.44per mil)과 Sialic acid 500군(18.44±8.45per mil) 간에 통계학적으로 유의한 차이(p=0.168, p=0.100)는 없었다. 식품 투여 후 3주차에서도 Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군(p=0.685), Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군(p=0.277) 간에 통계학적으로 유의한 변화는 없었다. 식품 투여 후 6주차에서는 Sialic acid 위캡슐군과 비교하였을 때 Sialic acid 500군에서만 통계적으로 유의하게 감소(p=0.002)하는 것으로 나타났다. 식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군(13.51±7.21per mil)과 Sialic acid 250군(7.02±5.42per mil), Sialic acid 위캡슐군(13.51±7.21per mil)과 Sialic acid 500군(3.93±4.06per mil) 간에 통계학적으로 유의하게 감소(p<0.001, p<0.001)하여 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 나타났다.

또한 방문시기별 변화는 Sialic acid 250군(p<0.001)과 Sialic acid 500군(p<0.001)에서 유의하게 감소하는 것으로 나타나 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.



< 그림 . 요소호기 검사(UBT) 비교 >

< 표 . 요소호기 검사(UBT) 변화량 비교 >

항목	Sialic acid 위캡슐 (N=28)		Sialic acid 250 (N=28)		Sialic acid 500 (N=28)		p*	p**
	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p	평균±표준편차	p		
UBT (per mil)	-1.57±4.37	0.068	-10.84±5.66	<0.001	-14.51±8.12	<0.001	<0.001	<0.001

p : paired samples t-test (방문시기별), p* : independence samples t-test(Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군)

p** : independence samples t-test(Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군)

피험자들의 요소호기 검사(UBT) 검사치의 변화량을 비교한 결과, Baseline의 검사치와 비교하였을 때 Sialic acid 위캡슐군에서는 평균 1.57per mil 감소(p=0.068)한 반면 Sialic acid 250군에서는 평균 10.84per mil 유의하게 감소하는 효과(p<0.001)가 있는 것으로 평가되었다. Sialic acid 500군에서도 평균 14.51per mil 감소하여 Sialic acid 위캡슐군에 비해 통계적으로 유의한 개선효과(p<0.001)를 보였다.

9.3.1.2 2차 유효성 평가변수

< 표 . 대변 항원검사(stool antigen test) 개선을 비교 >

		Sialic acid 위캡슐 (N=28)	Sialic acid 250 (N=28)	Sialic acid 500 (N=28)	p*	p**
visit 2 (0주)	Positive	28(100.0%)	28(100.0%)	28(100.0%)	-	-
	Negative	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)		
visit 5 (9주)	Positive	22(89.3%)	20(71.4%)	12(42.9%)	0.093	<0.001
	Negative	3(10.7%)	8(28.6%)	16(57.1%)		

p*:chi-square test(Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군), p**:chi-square test(Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군)

대변 항원검사(stool antigen test)의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교한 결과, Baseline(0주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 음성으로 확인된 피험자는 없었다.

식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군에서 3명(10.7%), Sialic acid 250군에서 8명(28.6%), Sialic acid 500군에서 16명(57.1%)의 피험자가 음성으로 확인되었다. Sialic acid 위캡슐군과 비교했을 때 Sialic acid 500군에서만 통계적으로 유의한 변화($p < 0.001$)가 있는 것으로 나타나 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

10. 결론

10.1 안전성 평가

1) Sialic acid는 안전한 것으로 평가되었음.

활력 징후 검사치를 비교한 결과, 수축기 혈압과 체온의 경우 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이는 없었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 변화는 없었다. 이완기 혈압에서는 Sialic acid 250군($p < 0.001$)에서, 맥박의 경우 Sialic acid 위캡슐군($p = 0.018$)과 Sialic acid 250군($p = 0.036$)에서 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 변화는 아니었으며, 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

신체 계측 검사치를 비교한 결과, 키와 체중의 경우 각 치료군별 방문시기 간에 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. BMI 지수의 경우 Sialic acid 위캡슐군($p = 0.028$)에서만 방문시기에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 임상적으로 큰 의미를 가질 만큼의 변화는 아니었으며, 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

각 방문시마다 피험자들에게 두부 및 경부, 심장 및 폐, 복부 및 간, 피부, 사지 등의 신체검사를 실시하여 비교한 결과, Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 비정상 의 경우가 전혀 없었다.

일반혈액검사 수치를 비교한 결과, 각 치료군별 방문시기 간에 Hemoglobin, Hematocrit, WBC, RBC, Platelet, MCV, MCH, MCHC, Segment, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다. 또한 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서도 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

혈청생화학검사 수치를 비교한 결과, 각 치료군별 방문시기 간에 Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Fasting plasma glucose, Total Bilirubin, AST, ALT, Alkaline phosphatase, Total cholesterol, Triglyceride, Sodium(Na), Potassium(K), Chloride(Cl) 검사 수치 모두 통계적으

로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다. 또한 각 방문시기별 치료군 간의 비교에서도 모두 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

뇨검사 수치를 비교한 결과, 각 치료군별 방문시기 간에 pH, S.G 검사 수치 모두 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 각 방문시기별 치료군 간에서도 통계적으로 유의한 변화는 없었다. Nitrate, Bilirubin, Urobilinogen 검사 수치는 모두 정상으로 조사되었다. 그 밖에 Protein, Glucose, Ketone, Blood, Leukocyte esterase 검사 수치에서 비정상적으로 나온 경우가 있었으나 각 방문시기별 치료군 간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 임상적으로 큰 의미는 없었다.

대조식품군(Sialic acid 위캡슐)과 시험식품군(Sialic acid 250, Sialic acid 500)에서 인체적용시험 제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 모든 이상반응 현황을 살펴보면, Sialic acid 위캡슐군에서 발현된 이상반응(AE)은 3건(10.7%), Sialic acid 250군은 1건(3.6%), Sialic acid 500군은 1건(3.6%) 발현되었다. 이상약물반응(ADR) 발현은 1건도 없었다. 또한 중대한 이상반응(Serious AE)과 중대한 이상약물반응(Serious ADR) 발현은 1건도 발생하지 않았다.

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) Sialic acid는 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 평가됨.

3) 1차 유효성 평가 및 2차 유효성 평가를 종합한 결과, Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 적합한 용량은 Sialic acid 500 시험식품군(Sialic acid 125mg * 4캡슐 = 1일 총 500mg 복용)으로 결정됨.

① 1차 유효성 평가

요소호기 검사(UBT)의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교한 결과, Baseline(0주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 음성으로 확인된 피험자는 없었다. 식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군에서 1명(3.6%), Sialic acid 250군에서 7명(25.0%), Sialic acid 500군에서 15명(53.6%)이 음성으로 확인되었다. Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군($p=0.022$), Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군($p<0.001$) 간에 통계적으로 유의한 변화가 있었으며 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

요소호기 검사(UBT)의 검사치를 비교한 결과, Baseline(0주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군($p=0.168$), Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군($p=0.100$) 간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 250군($p<0.001$), Sialic acid 위캡슐군과 Sialic acid 500군($p<0.001$) 간에 통계학적으로 유의하게 감소하여 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 나타났다. 또한 방문시기별

변화는 Sialic acid 250군($p < 0.001$)과 Sialic acid 500군($p < 0.001$)에서 유의하게 감소하는 것으로 나타나 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

요소호기 검사(UBT)의 검사치 변화량을 비교한 결과, Baseline(0주차)의 검사치와 비교하였을 때 Sialic acid 위캡슐군(평균 1.57per mil 감소, $p = 0.068$)에 비해 Sialic acid 250군(평균 10.84per mil 감소, $p < 0.001$)에서, Sialic acid 위캡슐군보다 Sialic acid 500군(평균 14.51per mil 감소, $p < 0.001$)에서 유의한 개선효과가 나타나 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

② 2차 유효성 평가

대변 항원검사(stool antigen test)의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선율을 비교한 결과, Baseline(0주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군, Sialic acid 250군, Sialic acid 500군 모두 음성으로 확인된 피험자는 없었다. 식품 투여 후 endpoint(9주차)에서는 Sialic acid 위캡슐군에서 3명(10.7%), Sialic acid 250군에서 8명(28.6%), Sialic acid 500군에서 16명(57.1%)의 피험자가 음성으로 확인되었다. Sialic acid 위캡슐군과 비교했을 때 Sialic acid 500군에서만 통계적으로 유의한 변화($p < 0.001$)가 있는 것으로 나타나 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

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, 고혈압성 질환, 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]



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
오므라이스	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
양파링	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

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 이로인 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. 준비

운동은 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 운동을 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
걸기(5.6km/시간)	240~300	자전거 타기(16km/시간)	360~420
골프	240~300	수상 스키	420~480
볼링	240~300	빠르게 걸기(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

제 3 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 연구개발 수행내용 및 목표달성도

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013 ,주관)	NANA소재개발 기초자료조사	100	1. 국내외적 관련 연구개발 경향 및 시장가격 조사 2. 상용NANA 국제규격 MSDS조사
	과제 수행간 필수분석법 정립	100	1. 영양성분(당류, 지방, 조단백질) 분석법 정립 2. 분자량 변화분석법 정립 3. 유기산 분석법정립 4. 미생물 검사법 정립 등
	기초 Neuraminidase 생산기법 정립	100	1. 선발 균주의 최적 활성조건 평가 : 완료 가. 효소제조용 공시균 선발 나. 효소생산형 배지조성 및 배양조건 정립 2. 선발 공시균 적용 최적Neuraminidase생산기법 정립 및 시제효소 생산 : 완료 가. Neuraminidase의 최적 pH와 온도설정 3. 선발 공시균 적용 효소(Neuraminidase) 제조법 정립 : 완료 가. Neuraminidase의 분리정제 : 나. 시제 생산 효소의 고유 분자량 검정 - 효소 고유 단백질 정량 및 QA기법 정립 - QA기법 : SDS-PAGE분석법 응용 정립 나. Neuraminidase 활성평가 : 0.5unit - 1차년도 후반기 연계 2차년도 상반기 역가 증대를 위한 효소정제기법 정립예정 4. 개발효소 적용 NANA생산성 평가 : 완료 가. NANA 표준제조법 정립간 시제효소 적용 나. 적용기질 : GMP 다. 개발 효소 적용량 : - 1차년도 후반기 연계 2차년도 상반기 역가증대 기법 적용후 고순도 효소개발과 연계, 효소사용량 저감형 NANA표준제조법 재수정후 공여예정 라. GMP기내 총 NANA의 분리율 측정 - 생산효율 : 30% - NANA함유량 : 29.5% 마. HPLC를 이용한 NANA의 정량 -신규 NANA분석법 정립법 연계확인 : HPLC
	Neuramininase대량 생산시스템 정립	100	1.효소 대량생산시스템 정립(10톤 규모, Working Volume : 5톤) : 완료

			<p>가. 효소생산관련 작업 지시서 작성 : 완료</p> <p>나. 생산량 : 생산량 1,998g(232,000U), 생산수율 71.5%</p> <p>다. 경제성 평가 : 4,000원/1g 효소</p>
고순도 Neuraminidase 효소 정제기법 (SDS-PAGE 검정법 정립)	100		<p>1. NANA생산과 관련된 효소고유 단백질이외의 단백질류 제거 기법의 실험실적 정립 : 완료 (기존 정립법 대비)</p> <p>- 결과 : GMP농도 1.5%에서 최대 0.19U/mL의 neuraminidase 효소활성 보임</p> <p>2. 고순도 Neuraminidase 효소정제기법 정립 : 완료 (2012. 12. 20기준)</p> <p>- 결과 : 순도(역가치) 10~100배 증대 (기존 정립법 대비)</p>
NANA 대량생산 수율증대 평가 (SDS-PAGE)	100		<p>Neuraminidase를 이용하여 GMP로부터 NANA를 절단하여 내는 최적조건을 확립 기법 정립</p> <p>- 결과 : NANA 순도 10~100배 증대 (기존 정립법 대비)</p>
G-NANA 정제 기법 정립	100		G-NANA 정제 기법 정립
G-NANA 표준 제조법 정립	100		<p>1. G-NANA 표준제조법 정립을 위한 기질배지의 최적 pH 및 GMP 가수분해물 대비 용매농도 설정 완료</p> <p>- NANA 함량 평가 방법 : 정립된 HPLC 분석법 적용 해결</p>
G-NANA 생산수율 저해요인 평가 (Lactose)	100		<p>1. G-NANA 생산수율 저해요인 평가 완료</p> <p>- G-NANA 분석법 : 유당의 간섭효과 확인</p>
개발 G-NANA 제품 안전성 (오염균 제균) 확립	100		<p>1. 개발 G-NANA 제품 안전성 확립을 위한 Spray dry 오염균 제균 조건 정립 : 완료</p> <p>2. 제균 효과 평가 방법 : 균의 배양을 통한 사멸률(%) 평가 해결</p>
제균온도처리(SD)에 따른 G-NANA내 NANA 물성 및 성장변화	100		<p>1. Spray Dry 제균 온도처리에 따른 G-NANA 내 NANA 물성 및 선상 변화 평가 : 완료</p> <p>2. G-NANA 변성 여부 평가 방법 : 정립된 HPLC 분석법 적용 해결</p>
G-NANA 분석법 정립	100		<p>1. 개발 G-NANA 내 기능성분인 NANA의 분석법 정립 완료</p> <p>가. 분석시스템 : HPLC (UV)</p> <p>나. 검출시간 : 9.8분대</p> <p>다. 최저검출농도 : 1ppm 이상</p> <p>라. 검출효율 : 90±10%</p>
G-NANA의 pH에 따른 안정성 평가	100		<p>1. G-NANA 내 기능성분인 NANA의 pH에 따른 안정성 평가 완료</p> <p>가. G-NANA 분석법 기준</p> <p>나. pH 구배조건 : pH 1~10 (1단위)</p> <p>다. 일정별 분석 : 3시간, 1~4일</p> <p>라. NANA 함량 변화 확인</p> <p>- 3시간 대비 4일 후 G-NANA 내 NANA 함</p>

			<p>량변화 없음</p> <ul style="list-style-type: none"> - 산성 및 알칼리 조건내에서 NANA 성분은 안전성 보유 확인
G-NANA의 현장 제품적용성 평가	100		<p>1. G-NANA 내 기능성분인 NANA의 현장제품 적용성 평가 완료</p> <p>가. G-NANA 분석법 기준</p> <p>나. 적용 제품 : 우유</p> <p>다. 농도별 G-NANA 첨가 : 0.1175~117.5ppm</p> <p>라. NANA 함량 변화 확인 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 핵심기능성분 NANA는 우유내 다중 성분류와 비반응성을 보임으로서 안전성 확인 - G-NANA내 NANA 함량은 대조구 대비 83~109% 범위에서 변화폭을 보임, 측정오차 범위기준내 안전성 확인
G-NANA의 안전성 평가 (제품QA)	100		<p>1. 제품 안전성(제품QA) 평가용 NG-NANA 준비</p> <ul style="list-style-type: none"> -무균상태로 오염균 감염없이 G-NANA생산 (완료) <p>2. 개발 NG-NANA의 오염균 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> -무균상태 생산된 G-NANA 내 비오염 확인 (완료) <p>3. 개발 G-NANA의 안전성 평가</p> <p>가. IL-6 분비량 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 적용 표준세포주 : RAW 264.7 Macrophage - 최적농도 : 0.1%(w/v)이내 (OG-NANA기준) 0.75%(w/v)이내 (NG-NANA기준) <p>나. NO 생성량 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 적용 표준세포주 : RAW 264.7 Macrophage - 평가농도 : 0.1%(w/v)이내 (OG-NANA기준) 0.5%(w/v)이내 (NG-NANA기준) <p>다. 세포 생존율 평가(MTT)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 적용 표준세포주 : RAW 264.7 Macrophage - 독성보유농도 : 0.5%(w/v)이상 (OG-NANA기준) 0.75%(w/v)이상 (NG-NANA기준) <p>라. 결과(G-NANA 안전성 평가)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 예상 농도 : 0.5%(w/v)이내
선발 surfactant의 항균모델 및 효능평가	100		<p>1. 선발 surfactant의 항균모델 및 효능평가 완료</p> <p>가. surfactant 선발</p> <p>나. surfactant의 항균성 및 효능평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 침투확산능력 : 매우 좋음(+++) - MIC(최소저해농도) 확인
개발 G-NANA의 항균스펙트럼 평가	80		<p>1. 광역 항균스펙트럼 평가 완료</p> <p>가. 공시균 : Helicobacter pylori wild type SS1, P1</p> <p>나. MIC(최소저해농도)</p> <ul style="list-style-type: none"> - G-NANA : 0.5% - 선발 Surfactant(700) : 0,05% - G-NANA+surfactant : 0.05%+0,05% <p>2. 제품 G-NANA 감염균 분리 및 동정기법 정립(QA기법 관련) : 목표대비 50%</p>

			3. 제품 G-NANA 제균조건 정립 완료 가. 제균온도
내열성, 비내열성균에 대한 항균성 평가	100		1. 내열성, 비내열성균에 대한 항균성 평가 완료 가. 그람양성균 및 음성균 동시사멸 온도조건 : 150~160℃ 나. 그람양성균(<i>B.cereus</i>) - 내열성 보유, 140℃ 이상 다. 그람음성균(<i>E.sakazakii</i>) - 비내열성 보유, 170℃ 이하
개발 G-NANA의 장단기 안전성 평가	100		1. 개발 G-NANA의 장단기 안전성 평가 완료 가. 온도별 - 121℃: 열처리전 대비 NANA함량 20% 감소 - 나머지(70~90℃) : 변화없음 나. 일정별 - NANA 함유량 변화없음(30일) 다. 보관상태별 - 냉장보관 : 문제없음 - 상온보관 : 문제있음 라. 영양육즙배지와 반응성: 없음(안전성 보유)
NANA의 안전성(세포독성 평가)	100		1. 표준세포주(RAW 264.7 macrophage) 활용 in vitro 독성 사전평가 : 완료 가. 평가 방법 : MTT assay 나. 세포독성(MTT)평가 - 적용 표준세포주: RAW 264.7 macrophage - 독성보유농도 : 0.75%(w/v)이상 (24시간 기준), 0.5%(w/v)이상 (48시간 기준) 2. 결과(세포독성평가) - 독성보유농도 : 0.5%(w/v)이상
NANA의 면역활성 평가	100		1. 최종목표 제품화(암식이 및 헬리코박터균 제어)목표대비 면역활성 효능 사전평가: 완료 가. 염증성 사이토카인 활성화 (IL-6 분비량 평가) - 적용 표준세포주 : RAW 264.7 macrophage - 최적농도 : 0.25%(w/v) 나. 항염증(NO)평가 - 적용 표준세포주 : RAW 264.7 macrophage - 평가농도 : 0.25%(w/v) 다. 세포독성(MTT)평가 - 적용 표준세포주 : RAW 264.7 macrophage - 독성보유농도 : 0.25%(w/v)이하 2. 결과(면역활성농도평가) - 예상 농도: 0.25%(w/v)
우유내 유청으로부터 제조한 NANA의 랫드를 이용한 28일 반복 경구투여 DRF독성시험	100		1. 시제 NANA(순도 23.5%)에 대한 설치류(랫드) 대상 DRF독성(28일)평가 : 완료 2. 연구목적 : 개발NANA를 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 4주간 반복경구투여를 통해 나타나는 독성의 특성을 바탕으로 추후 실시될 13주 반복투여독성시험의 용량을 설정하기 위해 실시

			2. 결과 : 개발NANA를 농도별 (500~5000mg/Kg)NOAEL(최대무독성용량)이 5,000 mg/kg/day로 추정되며, 암컷은 NOEL(최대무영향용량)이 5,000 mg/kg/day로 추정되었음.
우유내 유청으로부터 제조한 NANA(Sialic acid)의 랫드를 이용한 단회경구투여 독성시험	100		1. 시제 NANA에 대한 설치류(랫드) 대상 농도별 단회독성(14일)평가 : 완료 2. 연구목적 : 개발 NANA를 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 단회경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 개략의 치사량(ALD: Approximate Lethal Dose)을 조사하기 위하여 실시함(90일 장기 안전성 평가 연계). 3. 연구방법 : 본 시험은 우유내 유청으로부터 제조한 NANA(순도 : 23.5%)의 단회경구투여에 의한 독성을 조사하고자, 8주령(투여개시시) 암수 Sprague-Dawley 계 랫드에 시험물질을 대조군 및 시험군 각각 10마리씩 0, 5,000 mg/kg 의 용량으로 경구 투여하여 14일간의 사망률,일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 4. 결과 : 전체농도에서 안전성 확인
우유내 유청으로부터 제조한 NANA(Sialic acid)의 미생물 복귀돌연변이시험	100		1. 시제 NANA(순도 23.5%)의 미생물에 대한 돌연변이 유발성 유무평가 : 완료 2. 연구목적 및 방법 :히스티딘 요구성 균주인 <i>Salmonella typhimurum</i> TA98,TA100,TA1535 및 TA1537과 트립토판 요구성 균주인 <i>E.coli</i> WP2uvrA를 이용, 복귀돌연변이를 시제 NANA를 32~5,000ug/plate농도로 평가 3. 결과 : 음성
우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid의 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험	100		1. 유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid의 유전독성을 평가 : 완료 2. 연구방법 : 난소유아세포(CHO-K1 cell)를 이용하여, 세포증식억제(대사활성계 적용 및 비적용) 농도별 세포증식억제효과 평가함. 3.평가결과 : 안전성 확인
우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid의 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험	100		1. 제조된 G-NANA(Sialic acid, 순도 23.5%)에 대해 발암성 유발 유·무 판단의 기초자료 확보를 위하여, 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시 : 완료 2. 연구방법 : 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율 과 동물개체별로 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵출현 적혈구의 평균빈도 비교를 통하여 결과를 확인함. 3. 결과 : 우유내 유청으로부터 제조한 Sialic acid는 마우스 골수세포에 대해 미소핵 유발성이 없는 것으로 판단.
NANA(Sialic acid)의 랫드를 이용한 90일 반복경구투여	100		1. 시제 NANA에 대한 설치류(랫드) 대상 농도별, 장기안전성(90일)평가 : 완료

	독성시험		<p>2. 연구목적 : NANA(순도 23.5%)의 반복투여에 따른 독성을 평가하기 위하여, 6주령 Sprague-Dawley계 랫드에 시험물질을 1,250~5,000mg/kg 범위의 용량으로 군당 암수 각 10 마리에 13주간 경구투여 후 독성평가 지표에 따른 안전성 평가 실시</p> <p>3. 연구방법 : 독성지표를 위해 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안검사, 요검사, 전해질, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검시 장기의 중량측정, 육안적 검사 및 조직병리학적 검사 등을 수행하였음.</p> <p>4. 결과 : 전체농도에서 안전성 확인</p>
	Sialic acid의 Beagle dog에 DE (dose escalation)법을 이용한 경구투여 독성시험	100	<p>1. 시제 NANA에 대한 비설치류(비글견) 대상 농도별 단회독성평가 : 완료</p> <p>2. 연구목적 : 개발 NANA(순도 23.5%)를 비글견에 농도별 단회경구투여 하였을 때 나타나는 독성유발 여부 확인을 위하여 실시함.</p> <p>3. 연구방법</p> <p>가. 공시동물 : Beagle dog</p> <p>나. 투여방법 : DE(dose escalation) 투여법, 단회 경구투여</p> <p>다. 투여농도 : 625~5,000 mg/kg</p> <p>라. 평가항목 : 사망여부, 일반증상, 체중변화 및 부검소견</p> <p>4. 결과 : 안전성 확인</p>
(위탁 : 건양대)	NANA의 <i>in vitro</i> 항균 효력 규명	100	1. 흡광도 및 CFU 측정을 통한 <i>in vitro</i> 항균효과 시험
	NANA의 <i>in vivo</i> 항균 효력 규명	100	2. <i>Helicobacter</i> 의 마우스 감염 실험을 통한 NANA의 생체 내 항균효과 시험
	NANA의 <i>in vitro</i> 항염 효과 규명	100	3. 위상피세포와 골수유래 마크로파지를 이용하여 <i>H. pylori</i> 에 대한 NANA 항염 효과 시험
	NANA의 <i>in vivo</i> 항염 효과 규명	100	4. <i>H. felis</i> 의 마우스 감염 실험을 통한 NANA의 생체 내 항염효과 시험
2차 년도 (2014)	G-NANA 시제 생산 및 분석	100	<p>1) 효소배양에서 <i>A. ureafaciens</i>의 균수는 6.94×10^9 CFU/ml</p> <p>2) 배양된 효소를 20KDa로 2배 UF 했을 때 NANA의 분해능은 8.12%</p> <p>3) 동결건조 된 효소의 수율: 1.5%</p> <p>4) 7% GNANA(SD)의 NANA 함량 : 6.58%, 수율 : 70%</p> <p>5) 7% GNANA(SD)의 체별 포장 후 총균수 및 대장균군</p> <p>- 총균수 : 170 CFU/ml, 대장균군 : 음성</p>
	양산시제 G-NANA의 헬리코	100	1) S-NANA는 0.5% 부터 항균성 나타남

박테어에 대한 항균성 평가		2) 양산 시제 G-NANA(6.58%)는 0.5% 이상에서부터 항균성 나타남
유기태화 미네랄류 소재 표준제조법 정립	100	1) WPS : Mineral : 1 st dd H ₂ O = 10 : 4 : 20를 잘 섞음(단, SeO ₂ 는 10 : 0.4 : 20). 2) 80°C, 30min, 150RPM으로 반응시킴. 3) Centrifuge(4,000rpm, 20min, 25°C)로 최초 원심 분리함. 4) 이후 같은 조건으로 7회 원심분리하여 세척함(단, SeO ₂ 는 10회). 5) 최종 침전물을 동결 건조시킴.
유기태화 미네랄류 소재 수율 증대 및 대량생산조건 확립	80	- 유청분말 단백질과 결합하는 미네랄의 최적 농도 조건을 5:1조건으로 설정 - 지방의 함량이 적은 WPS로 미네랄과 결합시켰으나 수율 증대에는 영향이 없음. 또한 유청분말의 종류에도 영향이 없음. - 주정첨가도 20%까지는 수율변화에 영향이 없음. - 세척횟수를 7회에서 3회로 줄여도 충분한 세척이 이루어져 효율을 높일 수 있음.
유기태화 미네랄 양산 공정	50	- 현재 UF농축/수세 공정 및 주정침전공정으로 수율 및 양산효율을 높이기 위하여 양산 단계 제조를 진행 중에 있음.
개발 Sialic acid를 적용한 <i>H. pylori</i> 균 감염환자에 대한 인체임상 효능평가 (Sialic acid의 Helicobacter pylori 활성 억제 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 9주, 무작위배정, 이중 눈가림, 평행, 위약대조, 용량결정 인체적용시험)	50	가. 인체적용시험 심사관련 사항 - 연구계획서의 의뢰서 제출일 : 2014.07.18. 심의일 : 2014.08.20. 심의결과 : 승인 나. 피험자 2014년 9월 23일 피험자 등재를 시작(2014년 10월 17일 기준) 1) BN부여 54명, 선정 48명, BN 제외 =6명(사유 : 요소호기 검사 ‘음성’) 2) 현재 진행사항 Visit 2 25명, Visit 3 23명 3) 계획 ① 2014년 10월 31일까지 Visit 1 모집 완료 예정임. ② 인체적용시험 완료는 2015년 1월 9일 예정임.
항암 종양동물모델 확립	100	- 대장암 세포주 CT26을 이용하여 동물에서 xenograft model을 확립하고 종양동물 모델에

			서 기능성 바이오소재의 면역반응 검증에 이용함.
	G-NANA, S-NANA의 최적 농도 산출	100	- 유청 농도를 달리하여 동물모델에 6주이상을 투여한 후 최적의 농도를 산출하였음. mouse(20g)당 2, 5, 10, 20, 50mg을 투여한 군이 모두 음성대조군에 비해 CD8 T cell 및 neutrophil population의 증가되었으며, 투여량 별로는 현저한 차이를 나타내지 않았으므로 2mg/mouse(20g)의 투여량의 최적의 농도로 결정됨
	미네랄 기능성 바이오소재의 최적 농도 산출	100	- 총 6가지의 미네랄 농도를 달리하여 동물모델에 6주이상을 투여한 후 최적의 농도를 산출하였음. 유기태 연구시 대조군으로 사용한 WPS 자체의 면역물질들에 의한 면역활성으로 인해 유기태 미네랄의 면역활성이 현저히 두드러지지 않은 것으로 사료되나, 그럼에도 불구하고 유기태별로 특정 면역세포에 미치는 영향이 차이가 있었음. 유기태 미네랄의 최적농도는 어느 농도를 사용해도 무방한 것으로 판단되며, 그러므로 최저 농도를 사용하는 것이 적합할 것으로 사료됨
	최적의 농도를 바탕으로 하여 중앙동물모델에서 항암 효과를 일으키는 면역반응 검증	50	- 위에 산출된 최적의 농도를 기초로 하여 중앙동물모델에서 항암효과에 도움을 주는 면역반응을 검증하고 있는 중임.
	기능성 바이오 소재 투여시 증가하는 면역반응 중 항암 효과와 특이적 관계가 있는 T-cell, NK-cell의 population과 싸이토카인의 증가 혹은 감소를 비교 분석	50	- T-cell, NK cell의 population, polarization, cytotoxic assay을 통하여 면역반응 검증 - 싸이토카인과 immunoglobulin을 혈액에서 비교 분석 중
3차 년도 (2015)	NANA내의 Sialic acid 분석법 확립과 분석법의 타당성 증명	100	- 기능식품협회에 의뢰하여 NANA 내의 Sialic acid 분석법 확립 - 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 범위의 모든 타당성 검사에서 적합 판정.
	항암면역강화형 개발소재에 대한 동물시험평가(Xenograft model 적용)	100	- G-NANA를 이용한 Xenograft model 항암면역실험에서 NANA를 투여 한 그룹에서 NANA를 투여하지 않은 군에 비하여 암의 크기가 작은 것을 확인.

			- NANA 50mg/kg/day의 조건에서 충분히 효과를 나타냄
<i>Helicobacter pylori</i> 제어형 Sialic acid의 항균스펙트럼 항염 효력 인체적용시험	100		- 헬리코박터 감염 환자를 대상으로 NANA를 투여한 결과 저농도에서 80%이상 제균, 고농도에서 100% 제균됨을 확인 함.
G-NANA의 항암면역강화 인체임상평가	50		<p>가. 실시기관 : 분당 서울대학교병원</p> <p>나. 시험책임자 : 내분비내과 장학철 교수(공동 연구자: 내분비내과 최성희 교수)</p> <p>다. 대상 질환 : 면역기능 저하</p> <p>라. 대상 피험자 : 대상 피험자 선정/제외 기준은 선별기간 시점임.</p> <p>마. 피험자수:총 72 례 [대조군, 처리군, 탈락율 15%씩 고려]</p> <p>바. 시험군 : 임상시험용 건강기능식품, 시험식품군:개발제제(Silaiic acid) 캡슐.,대조식품군 : 위캡슐</p> <p>사. 임상시험 설계 : 무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조</p> <p>아. 임상시험기간 : 임상시험 승인일로부터 20개월</p> <p>자. 투여 방법 및 기간: 시험식품군 : 제조 캡슐을 1일 3회(아침, 점심,저녁), 1회 1캡슐, 8주간 복용., . 대조식품군 : 위 캡슐을 1일 3회(아침, 점심,저녁), 1회 1캡슐, 8주간 복용</p> <p>차. 시험 방법</p> <ul style="list-style-type: none"> - 피시험자는 총 72명[시험식품군 36명, 대조식품군 36명]으로 이루어져 있음. - 본 연구에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 피험자를 선정하고 필요한 임상검사 및 설문조사. - Visit 2에 선정 및 제외기준에 적합한 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 시험식품군과 대조식품군으로 배정하여 총 8주간의 Treatment period를 진행 <p>카. 과제 종료 시점에 인체적용시험 계약 후 진행중.</p>
고부가제품 사업화	0		<p>가. 개발소재별 개별인정 신청(식약청)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Product-1: <i>H.pylori</i>활성저하 및 사멸형제품 - Product-2 : 항암면역기능강화제품 <p>나. 용도 ■ 용법 확대</p>

			<ul style="list-style-type: none"> - 천연물신약 및 의약품(식약청 인허가 신청예정) 다. 제품화 방향설정 - 의약품(암환자용) - 기능성 식품(암식이, 고령친화식, 일반환자식)
--	--	--	--

제 4 장 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명칭 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	1							2	
	달성	1								
2차 년도	목표	1					1	2		
	달성	4								
3차 년도	목표	2	2				3	2		
	달성									
계	목표	4	2				4	6		
	달성	4								

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구계획에 따라 도출된 것으로 예시와 같이 작성

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	1	2			3	
목표						
달성						

나. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				

* 회사방침에 따라 특허출원 완료기점에서 논문게재예정임(선준비후 게재)

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2014	글라이코매크 로펩타이드 효소분해물을 유효성분으로 하는 헬리코박터 파이로리 감염 예방 또는 치료용 조성물	(주)생명 의나무	대한 민국	10- 2014- 0060258					
2014	유기태화 구리 또는 철 강화 유단백질을 유효성분으로 하는 면역 증강용 조성물 및 그 제조방법	(주)생명 의나무	대한 민국	10- 2014- 0165340					
2014	유기태화 셀레늄 강화 유단백질을 유효성분으로 하는 면역 증강용 조성물 및 그 제조방법	(주)생명 의나무	대한 민국	10- 2014- 0165385					
2014	유기태화 아연 또는 칼슘 강화 유단백질을 유효성분으로 하 는 면역 증강용 조성물 및 그 제조방법	(주)생명 의나무	대한 민국	10-2014-0 165390					

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역

(2) 장단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

사. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계

2. 성과활용계획

본 연구사업단에서는 본 연구 사업을 완료하고 현재 미이용자원인 GMP를 이용한 건강기능식품의 개발로 2차산업으로의 전환을 통한 고부가가치 산업으로 육성하기 위하여 핵심과제들의 성공적인 수행을 위한 기반 조성 및 지원책을 통해 NANA의 기능성 연구, 연구인력 양성을 도모하며, 지자체와의 유기적인 협력등 다각적인 사업들을 진행하여 NANA 건강기능식품 개발에 주도적인 역할을 수행한다. 이를 위하여

가. NANA의 기능성 원료 인정

- 헬리코박터의 제균 기능이 있는 NANA를 기능성 원료로 식약처에 인허가를 받아 건강기능식품으로 개발.
- 면역력을 높여 암세포까지도 억제 할 수 있는 건강기능식품, 복합제형의 건강기능식품 등 다양한 제품 개발.

나. 천연물신약 개발

- NANA 추출물에서 단일물질을 분리하여 면역 및 항암에 관련된 단일컴파운드를 찾아 천연물 신약 개발

다. NANA의 기능성 관련 워크샵/설명회 등을 개최 사업단의 성과 등을 홍보.

- NANA 연구 및 건강기능식품 관련 다양한 정보 및 동향에 대한 워크샵을 개최하여 과제의 성과 홍보 및 동향에 대한 정보를 수집함.

라. 교육연수 프로그램, 단기 강좌 등을 개최하여 맞춤형 인재를 양성할 수 있도록 지원

마. 판매관련 전문기업과 MOU체결을 통한 사업화 방안 계획 수립

본 기업에서는 위의 역할을 충실히 수행하여 건강기능식품, 천연물신약 등 천연물을 이용한 산업을 고부가가치 산업으로 발전시켜 이를 이용한 국민건강증진 및 삶의 질 향상을 도모하려 함.

또한, 본 사업단에서는 연구기간 안에 개별인정형 건강기능식품 인허가를 획득하여 사업화할 수 있도록 최선을 다하여 운영하도록 하겠음.

NANA를 이용한 바이오산업은 미이용자원을 이용한 새로운 소득원으로 자리를 잡게 될 것이며, 이러한 소득원의 증가는 미이용자원의 가치를 다시금 생각하여 더 넓은 건강기능식품 시장에 진출하도록 노력하겠음.

3. 연구개발 기대효과

- 우유에서 분리된 단백질인 GMP는 비피더스균의 증식을 돕는 성분으로써 비피더스 균은 장

내부의 pH를 산성화하고 연동운동 및 장의 면역을 활성화하는 역할을 한다. GMP에서 NANA를 분리, 정제하여 헬리코박터의 제균시험을 한 결과 효능이 있음을 발견 하였으며 건강기능식품으로써 시장에 내보냈을 시 국민건강증진에 기여할 수 있음을 확인함.

- 미이용 자원으로써 버려지는 자원인 GMP를 이용하여 제품을 개발함으로써 더 많은 부가가치를 얻을 수 있는 연구로 생각됨.
- NANA의 기능성에 대한 산업재산권 획득으로 기술수출이 가능함
- 기술제공 및 기술지원을 통해 건강기능식품 및 신약후보물질 개발의 기회를 확산하고 이를 통하여 헬리코박터 및 항암 관련 신약개발 성공률을 높일 수 있음.
- NANA의 기능성 자료들이 충분히 확보될 경우 국내외 선진 제약기업들과도 전략적 제휴가 가능할 것임.
- 본 과제의 주관 기관인 (주)생명의나무에서는 헛개나무과병추출분말을 이용하여 ‘알코올성 손상에서 간 보호’ 라는 기능성을 인정받아 건강기능식품으로 개발하여 연간 150억원 정도의 매출을 올리고 있음.
- 본 연구사업단에서 (주)생명의나무의 건강기능식품의 개발 경험을 살려 NANA를 이용한 건강기능식품으로 개발한다면 현재 지속적으로 성장하고 있는 건강기능식품 시장에 새로운 성장 동력이 되어 발전할 수 있을 것이 기대됨.

4. 성과 활용 방안

- 헬리코박터의 제균과 관련한 국내 및 국제특허 출원
- NANA의 기능성 관련 논문발표
- NANA를 이용한 헬리코박터 개선 개별인정형 건강기능식품 개발 및 인허가
- NANA를 이용한 기능성 제품의 (주)생명의나무 기술실시
- 신약후보물질 개발로 인한 제약업체와의 기술제휴

5. 연구과제 보유(활용)기술의 산업화 계획 및 기대효과

가. 산업화-제품화 계획(제품의 특징, 대상 등)

- 대한민국 국민의 60% 정도가 헬리코박터에 감염이 되어있으며 오랜시간 접촉하면 전염도 될 수 있는 질병으로써 위궤양, 위암, 만성위염등 많은 질병으로 이어질수 있어 제균은 필수임.
- 헬리코박터의 제균시에는 항생제를 주로 사용하는데 이는 부작용이 유발 될 수있지만 GMP에서 정제, 분리한 NANA에서는 부작용이 발견되지 않았으며 헬리코박터의 제균에도 효과적인 것을 발견하였으며 항생제에 비해 섭취 방법도 간단함.

(1) 산업화 계획

NANA는 미이용자원인 GMP를 분리, 정제하여 개발 한 것으로써 면역 관련 탁월한 효능을

보이며 특히 헬리코박터의 제균과 항암관련 작용에서 두드러지게 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있음.

1단계: GMP에서 NANA의 기초자료 조사와 소재의 분리, 정제 공정 확립 및 효능 관찰

2단계: NANA의 효능 확립과 안전성 및 인체적용시험 진행

3단계: 건강 기능 식품 개발

4단계: 신약 후보 물질 개발

1단계 - 3단계에서 건강 기능식품의 산업화가 완성되어 개별인정형 획득으로 용·복합형 또는 단독형 기능성 식품군으로 발전.

(2) 대상

대한민국 국민의 60%가 헬리코박터균을 가지고있다함. 또 암세포의 증식을 억제하는 작용이 있어 암환자들 또한 NANA의 잠정고객이 될 수 있음.

(3) 제품화 계획

개발을 통해 기능성식품은 우선 융합, 복합 제품으로 출시할 것을 검토함.

특히 효용이 뛰어난 결과를 예견 했을 때 수출 수요는 매우 크리라고 예상함

제 5 장 연구시설·장비 현황

1. 주요 사용 연구장비

연구시설·장비명	구매금액(원)	구매일자	연구시설·장비 활용용도	설치장소	국가과학기술지 식정보시스템 등록번호
제조용 액체크로마 토그래피(Prep-LC)	85,000,000	2012.06.12	천연물 분리 정제	(주)생명의나무	NFEC-2013-11 -184126

제 6 장 참고문헌

- 1) Organization for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines 408 for the testing of chemicals: Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. 2008
- 2) I.Kaneko, L.Han, T.Liu, J.LI, Y.Zhao, C.Li, Y.YI, A.Liang, K.Hayamizu, A 13-week subchronic oral toxicity syudy of L-serine in rats, Food and Chem. Tox. 47(2009)2356-2360.
- 3) Han, z.z., Xu, H.D., Kim, K.H., Ahn, T.H., Bae, J.S., Lee, J.Y., Gil, K.H., Lee, J.Y., Woo, S.J., Yoo, H.J., Lee, H.K., Kim, K.H., Park, C.K., Zhang, H.S., and Song, S.W.. Reference Data of the Main Physiological Parameters in Control Sprague-Dawley Rats from Pre-clinical Toxicity Studies. Lab. Anim. Res. 2010: 26(2), 153-164
- 4) U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. 2005.
- 5) Keenan, C., Elmore, S., Francke-Carroll, S., Kemp, R., Kerlin, R., Peddada, S., Pletcher, J., Best Practices for Use of Historical Control Data of Proliferative Rodent Lesions. Toxicol Pathol 2009;37:679-693.
- 6) Y.C. Pack, M. H. Cho. A New Way in Deciding NOAEL Based on the Findings from GLP-Toxicity Test. Toxicol. Res. 2011, Vol. 27, No. 3, pp. 133-135
- 7) Lewis, R.W.,Billington, R., Debryune, E., Gamer, A., Lang, B. and Carpanini, F. Recognition of adverse and nonadverse effects in toxicity studies. Toxicol. Pathol., 2002. 30, 66-74.
- 8) Ness, D. Writing the nonclinical study final report: A focus on compliance, accuracy, and scientific soundness. 2006 issue of APO, 7, 36-41.
- 9) US FDA. (2005). Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Pharmacology and Toxicology, 2005.
- 10) Determination of Sialic Acids Using UHPLC with fluorescence Detection, DIONEX, Application Note 266, 2011
Determination of Sialic Acids Using UHPLC with fluorescence Detection, DIONEX, pplication Note 266, 2011
- 11) Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet. 1983;1(8336):1273-1275.
- 12) NIH Consensus Conference. Helicobacter pylori in peptic ulcer disease. NIH Consensus

- Development Panel on Helicobacter pylori in Peptic Ulcer Disease. JAMA. 1994;272(1):65-69.
- 13) Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med 2002;347:1175-1186.
- 14) 요코이 센즈, 코바야카와 마사오 등. 임상 강좌 11: 헬리코박터 파일로리 감염증. PharmaTribune. 2009;1(11):26-35.
- 15) 난치병 의학 연구 재단 난치병 정보 센터. 특발성 혈소판 감소성 자반병. 2008. 7. 2.
- 16) 후지오카 토시오. 헬리코박터 감염증의 연구: 현상과 장래 전망. e-CLINICIAN. 2007;54(556):152-155.
- 17) WHO. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1994;61:177-177.
- 18) Kim JH, Kim HY, Kim NY, Kim SW, Kim JG, Kim JJ, Roe IH, Seo JK, Sim JG, Ahn H, Yoon BC, Lee SW, Lee YC, Chung IS, Jung HY, Hong WS, Choi KW. Seroepidemiological study of Helicobacter pylori infection in asymptomatic people in South Korea. J Gastroenterol Hepatol 2001;16:969-975.
- 19) Yim JY, Kim N, Choi SH, Kim YS, Cho KR, Kim SS, Seo GS, Kim HU, Baik GH, Sin CS, Cho SH, Oh BH. Seroprevalence of Helicobacter pylori in South Korea. Helicobacter 2007;12:333-340.
- 20) 대한 Helicobacter pylori 연구회. 한국인에서의 Helicobacter pylori 감염의 진단 및 치료. 대한소화기학회지. 1998;32(3):275-289.
- 21) 김나영, 김재준, 최연호, 김현수, 김진일, 정인식. 헬리코박터 파일로리 감염의 진단 및 치료 가이드라인. 대한소화기학회지. 2009;54(5):269-278.
- 22) 김상균, 정혜경, 이항락, 장재영, 이혁, 김찬규, 신운건, 신인순, 이용찬, 대한상부위장관·헬리코박터학회. 한국인 헬리코박터 파일로리 감염의 진단과 치료 임상 진료지침 개정안 2013. Korean J Gastroenterol 2013;62(1):3-26.
- 23) Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ; European Helicobacter Study Group. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut 2012;61(5):646-664.
- 24) 배수현, 박선영, 진명호, 박상은, 홍상훈. 헬리코박터 파일로리 감염의 한·양약 병용치료 효과 및 안전성에 관한 증례 보고. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2012;26(3):381-385.
- 25) Aiba Y, Suzuki N, Kabir AM, Takagi A, Koga Y. Lactic Acid-Mediated Suppression of Helicobacter pylori by the Oral Administration of Lactobacillus salivarius as a Probiotic in a Gnotobiotic Murine Model. Am J Gastroenterol. 1998;93(11):2097-2101.
- 26) Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic Activity against Helicobacter Infection In Vitro and In Vivo by the Human Lactobacillus acidophilus Strain LB. Appl Environ

Microbiol. 1998;64(11):4573-4580.

27) 김도형, 노임환, 허재형, 박상현, 남승우, 임창영, 송일환, 김정원, 명나혜, 신지현. Helicobacter pylori에 대한 포도주(wine)의 항세균 효과. 대한소화기학회 춘계학술대회. 2002:204-204.

28) 서정일, 배만중, 김병기. IgY 함유 계란의 항헬리코박터 치료효과에 관한 연구. J. Life Resources & Industry. 2002;6:1-19.

29) Zhang L, Ma J, Pan K, Go VL, Chen J, You WC. Efficacy of cranberryjuice on Helicobacter pyloriinfection: a double-blind, randomized placebo-controlled trial. Helicobacter. 2005;10(2):139-145.

30) Puram S, Suh HC, Kim SU, Bethapudi B, Joseph JA, Agarwal A, Kudiganti V. Effect of GutGard in the Management of Helicobacter pylori: A Randomized Double Blind Placebo Controlled Study. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013;2013:Article ID 263805, 8pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/263805>.

31) Rosania R, Minenna MF, Giorgio F, Facciorusso A, De Francesco V, Hassan C, Panella C, Ierardi E. Probiotic Multistrain Treatment May Eradicate Helicobacter pylori from the Stomach of Dyspeptics: A Placebo-Controlled Pilot Study. Inflamm Allergy Drug Targets. 2012;11(3):244-249.

32) 김상태. 헬리코박터 감염 진단, 동위원소에게 맡겨 줘. 동아사이언스. 2002. 9. 3. Available from : <http://www.dongascience.com/news/view/-51836/bef>

33) 황인경, 지근익. 위장관 관련 기능성 시험. 건강기능식품 시험법 가이드 II. 식품의약품안전처. 2004.

34) Ricci C, Holton J, Vaira D. Diagnosis of Helicobacter pylori: invasive and non-invasive tests. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2007;21:299-313.

35) 대한상부위장관 헬리코박터학회. Available from : <http://www.hpylori.or.kr>

36) (재)서울의과학연구소. Available from : <http://www.scllab.co.kr>

37) Rosania R, Minenna MF, Giorgio F, Facciorusso A, De Francesco V, Hassan C, Panella C, Ierardi E. Probiotic Multistrain Treatment May Eradicate Helicobacter pylori from the Stomach of Dyspeptics: A Placebo-Controlled Pilot Study. Inflamm Allergy Drug Targets. 2012;11(3):244-249.

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
1. 유청유래 항균·항암 그리고 면역증진효과를 보유하는 기능성 바이오소재 생산기법 정립(4부류 14종)(주관)	한국	10	90	100	
2. <i>Helicobacter pylori</i> 제어형 Sialic acid의 항균·항염 효력평가(in vitro 및 in vivo) 동물시험 평가(위탁:건양대)	없음	10	90	100	기술선도형
3. 핵심소재 Sialic acid(당단백질)의 표준세포주 및 동물시험을 통한 사전 안전성 및 기초효능평가(시험,분석의뢰: 대구대GLP센터)(주관)	없음	0%	90%	100%	기술선도형
4. 개발 Sialic acid를 적용한 <i>H. pylori</i> 균 감염환자에 대한 인체임상 효능평가(위탁 :크로벤CRO)	없음	0%	50%	100%	기술선도형
5. 항암면역강화형 개발소재에 대한 동물시험평가(Mouse Tumor Model적용) -협동: 전남의대 화순암병원	한국	10%	50%	100%	기술선도형
6. 항암면역강화형 소재 적용 신규레시피 2종 정립 및 인체임상평가(위탁:크로벤CRO)	한국	10%	50%	100%	기술선도형
맛역치 해결형 가수분해 유단백질 개발	한국	10%	50%	100%	기술선도형

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	WIPS
검색기간	최근 5년간
검색범위	방사선방호식품*암*NANA*락토페린*유기태화*맛역치

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

(1)개발기술명		항균활성 및 항암면역강화를 유효성분으로 하는 유청유래 기능성 바이오소재의 제품화
Keyword		락토페린*항균성*의약품
검색건수		102
유효특허건수		없음
핵심특허 및 관련성	특허명	항균성을 갖는 한국산 흑염소 유래의 락토페린 및 이의 유전자
	보유국	한국
	등록년도	등록 ;10-0229418-0000 (1999.08.16)
	관련성(%)	10%
	유사점	항균성 락토페린
차이점	항균성을 갖는 한국산 흑염소 락토페린 및 이의 유전자에 관한 것으로, 한국산 흑염소의 유선으로부터 정제된 락토페린은 염소 락토페린과는 달리 항균력을 가지므로 항균제, 사료첨가제, 안약, 식품 및 화장품의 방부제 등으로 유용하게 이용	

(2)개발기술명		항균활성 및 항암면역강화를 유효성분으로 하는 유청유래 기능성 바이오소재의 제품화
핵심특허 및 관련성	특허명	락토페린의 신규한 용도
	보유국	한국
	등록년도	출원 : 10-2000-0037772 (2000.07.03)
	관련성(%)	0%
	유사점	염증저감형 락토페린 이용성
차이점	락토페린(lactoferrin)을 2% 함유함을 특징으로 하는 급성 간염예방 및 치료용 조성물.	

(3)개발기술명		항균활성 및 항암면역강화를 유효성분으로 하는 유청유래 기능성 바이오소재의 제품화
핵심특허 및 관련성	특허명	대장균에 대해 항균활성을 갖는 한국산 흑염소 락토페린 유래 가수분해물 및 펩타이드
	보유국	일본
	등록년도	1008193980000 (2008.03.28)
	관련성(%)	10%
	유사점	항균성 락토페린
차이점	한국재래산 흑염소(Korean native goat) 유래의 락토페린(lactoferrin)을 펩신 가수분해하여 얻어지는 대장균에 대해 항균활성을 갖는 펩신 가수분해물(pepsin hydrolysate), 펩타이드 및 그 아미노산 서열에 관한 것으로, 본 발명에 따른 펩신 가수분해물 및 펩타이드는 항균제,사료첨가제,안약, 식품, 화장품, 방부제 등에 유용하게 이용	

(1) 발명의 명칭	회복기 암환자의 영양관리를 위한 특수영양식품 개발
출원인	건국대학교 산학협력단
발명자	백현동외 4인
특허출원번호	10-2007-0022265
특허출원일	2007.03.07.

(2) 발명의 명칭	시알산을 함유하는 장내 조제유용 조성물 및 제제화 방법
출원인	브리스톨-마이어스스퀴브컴파니
발명자	맥마흔, 로버트, 제이외 4인
특허출원번호	10-2005-7019430 (2005.10.13)
특허출원일	2005.10.13.

(3) 발명의 명칭	DE-N-아세틸 시알산 항원, 이에 대한 항체, 및 암치료에서 사용하는 방법
출원인	칠드런즈 하스피탈 앤드 리써치 센터 옛 오클랜드
발명자	모, 그레고리, 알.외 1인
특허출원번호	10-2008-7017934
특허출원일	2008.07.22.

(4) 발명의 명칭	시알산 함량이 높은 재조합 당단백질의 제조방법
출원인	씨제이 주식회사
발명자	백형준외 6인
특허출원번호	등록 ;10-0475417-0000
특허출원일	2005.02.25.

(1)개발기술명	항균활성 및 항암면역강화를 유효성분으로 하는 유청유래 기능성 바이오소재의 제품화	
Keyword	시알산*Sialic acid*효소*제조	
검색건수	102	
유효특허건수	없음	
핵심특허 및 관련성	특허명	시알산 함량이 높은 재조합 당단백질의 제조방법
	보유국	한국
	등록년도	등록 ;10-0475417-0000(2005.02.35.
	관련성 (%)	0%
	유사점	효소를 이용한 시알산 제조방법
차이점	목적하는 시알산 함유 당단백질에 대한 시알리다아제의 작용을 경쟁적으로 저해하는 또다른 시알산 함유 당단백질이 첨가된 배지에서, 목적하는 시알산 함유 당단백질의 유전자로 형질전환된 포유동물세포를 배양하는 것을 특징으로 하여, 시알산 함량이 높은 재조합 당단백질을 제조하는 방법.	

(2)개발기술명	항균활성 및 항암면역강화를 유효성분으로 하는 유청유래 기능성 바이오소재의 제품화	
Keyword	시알산*Sialic acid*효소*제조	
검색건수	102	
유효특허건수	없음	
핵심특허 및 관련성	특허명	시알산 함유 올리고당의 제조방법
	보유국	한국
	등록년도	10-0386424-0000 (2003.05.22)
	관련성 (%)	0%
	유사점	단백질 고유가 가지고 있는 성분활용
차이점	난황에 함유되어 있는 시알산 함유 올리고당을 추출, 정제하는 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 난황으로부터 용매를 사용하여 난황유를 추출, 제거한 후 얻어진 탈지난황에 에탄올, 물 및 산을 사용하여 시알산 함유 올리고당이 10~20중량% 함유된 제품을 경제적으로 생산하는 방법을 제공	

(3)개발기술명		단백질 기원성 NANA분리형 효소개발
Keyword		시알산*Sialic acid*효소*제조
검색건수		102
유효특허건수		없음
핵심특허 및 관련성	특허명	N-아세틸뉴라민산의 제조법
	보유국	일본
	등록년도	1008193980000 (2008.03.28)
	관련성 (%)	10%
	유사점	미생물을 활용한 NANA제조법
차이점	피루브산, 포스포에놀피루브산 등의 고가의 원료를 첨가하지 않고, 저렴하게 N-아세틸뉴라민산을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명은 수성매체 중에, ① N-아세틸뉴라민산 알돌라아제 활성 또는 N-아세틸뉴라민산 신세타아제 활성을 갖는 미생물의 배양액 또는 그 배양액의 처리물, ② 피루브산의 생성능력을 갖는 미생물의 배양액 또는 그 배양액의 처리물, 또는 포스포에놀피루브산의 생성능력을 갖는 미생물의 배양액 또는 그 배양액의 처리물, ③ N-아세틸만노사민, 및 ④ 피루브산 또는 포스포에놀피루브산의 생성에 필요한 에너지를 존재시키고, 그 수성매체 중으로부터 N-아세틸뉴라민산을 생성 축적시키고, 그 수성매체 중으로부터 N-아세틸뉴라민산을 채취하는 것을 특징으로 하는 N-아세틸뉴라민산의 제조법	

(5)개발기술명		우유유래 항균성 극대화 소재를 이용한 섭취가능형 무독성 및 무알콜 천연가그린(중치예방)제품 개발(NANA 및 N-MBcin소재 개발 및 제품화)
Keyword		시알산*Sialic acid*항균성*분유
검색건수		102
유효특허건수		없음
핵심특허 및 관련성	특허명	유단백질 펩타이드를 이용한 질환치료제 조성물
	보유국	이스라엘
	등록년도	출원 : 10-2006-7020558 (2006.10.02)
	관련성 (%)	0%
	유사점	유단백질 고유펩타이드 고유성분활용
차이점	생물학적으로 활성이 있는 펩타이드들은 젖 카제인의 알파S1-, 알파S2-, 베타- 또는 카파-카제인 단편들의 서열들로부터 파생되었거나 또는 그것에 유사함. 이 펩타이드들은, 그것에 국한되지는 않으나, 면역반응을 자극하고 증진시키는 것, 바이러스성 감염에 대한 보호, 혈청 콜레스테롤 수준들의 정상화, 그리고 조절작용을 자극하는 것을 포함하여, 면역 조절(IMMUNE MODULATION)과 그외 다른 작용들이 가능하다. 카제인-유도 펩타이드들은 무독성이고 면역적 병리들, 당뇨병, 고콜레스테롤혈증, 조절작용의 장애들 그리고 바이러스에 관련된 질환들을 치료하고 예방하기 위해 사용	

(6)개발기술명		우유유래 항균성 극대화 소재를 이용한 섭취가능형 무독성 및 무알콜 천연가그린(중치예방)제품 개발(NANA 및 N-MBcin소재 개발 및 제품화)
Keyword		시알산*Sialic acid*항균성*분유
검색건수		102
유효특허건수		있음
핵심특허 및 관련성	특허명	유청 단백질 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암용식품조성물
	보유국	한국
	등록년도	출원 : 10-2007-0022265
	관련성 (%)	10%
	유사점	유단백질 고유펩타이드 고유성분활용
차이점	유청 단백질 농축물(WPC)에 알칼리제를 pH 6.5, 45℃에서 5~6시간 반응시켜 얻은 유청 단백질 농축물의 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 유방암 또는 폐암 예방용 식품 조성물	

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

제 목	Effect of Bovine Whole Lactoferrin and Hydrolysated Lactoferrin on MA-104 Cell Infected with Jeju Island Bovine Rotavirus(JBR)
제 목 (영문)	Effect of Bovine Whole Lactoferrin and Hydrolysated Lactoferrin on MA-104 Cell Infected with Jeju Island Bovine Rotavirus(JBR)
저 자	주지선
발행 년도	1997
발행 기관	건국대학교 대학원
발행 정보	낙농학과 석사논문
주제키워드	유유 , 락토페린 , 송아지 , 로타바이러스 , 세포감염
국문 초록	<p>우유중에 함유되어있는 살균성분이며 생리활성물질로 알려져 있는 LF(whole LF과 Hydrolysated LF)과 송아지 로타바이러스를 MA-104 세포에 동시 감염시켰을 때 LF의 영향 여부를 탐색코저 수행하였으며 얻어진 결과는 다음과 같음.. JBR 로타바이러스는 MA-104 세포에 감염시켜 세포변성효과(CPE)를 확인하였음.</p> <p>2. 10% polyacrylamide gels을 사용하여 PAGE에 의해 얻어진 (dsRNA genotype은 분석 결과 4: 2: 3: 2 pattern으로 나타났다.</p> <p>3. Plaquing 후에 얻어진 titer는 JBR이 2×10^6 PFU, NCDV 1×10^7 PFU, UK $1 \sim 3 \times 10^7$ PFU, N-5 3×10^5 PFU이었다.</p> <p>4. Serotype은 ELISA에 의해 JBR과 NCDV, UK, N-5, Kawatbi 모두 group A에 속하며 subgroup I의 G6 이었다.</p> <p>5. Whole LF과 hydrolysated LF은 JBR과 다른 표준로타바이러스(N-5, NCDV, UK, RRV)의 세포감염에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었다.</p>

제 목	시알산 함유 올리고당의 생촉매를 이용한 합성법
제 목 (영문)	Biocatalytic Synthesis of Sialic acid-containing Oligosaccharides
저 자	유은순
발행 년도	2004
발행 기관	호남대학교 석사논문
발행 정보	호남대학교 학술논문집, Vol.25 No.2 [2004]
주제키워드	시알산*효소*분유*항균선
국문 초록	<p>화학적 합성법은 복잡한 coupling과 uncoupling과정을 내포하므로 올리고당의 생촉매인 효소를 이용한 합성은 화학적 합성의 대안으로 고려. 연구의 목적은 시급하게 요구되고 있는 생리적 활성을 지니는 시알산 함유 올리고당의 빠른 합성법 및 올리고당의 구조분석을 위한 분석기술의 발전에 대한 해결책으로 연구. 구조이성질체 올리고당의 합성법으로 시알산전이효소 및 갈당전이효소를 이용한 합성법을 제시하였으며 이 합성법은 주목받고 있는 생체활성기능을 지닌 올리고당의 연구임. 합성된 올리고당의 입체구조는 ESI MS 및 MS/MS방법을 도입하여 증명되었으며 본 연구는 특히 합성삼당류의 연결부위 연구에 초점을 맞추었음.</p>

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		항균활성 및 항암면역강화를 유효성분으로 하는 유청유래 기능성 바이오소재의 제품화
Keyword		락토페린*항균성*가그린
검색건수		42
유효논문건수		2
핵심논문 및 관련성	논문명	한우락토페린의 항균성에 관한 연구
	학술지명	한국유가공학회지.18(1):31~40.
	저자	진현석외 3
	게재년도	1996
	관련성(%)	30%
	유사점	락토페린의 항균성에 관한 연구
차이점	<ul style="list-style-type: none"> - 초록 : 한우 우유에서 추출한 락토페린(apo type: 철제거, Sat type : 철포화)을 유산균 및 유방염 유발세균에 대하여 항균성을 검정하였음. 결과로서 MIC는 2~4mg/ml의 범위로 나타내었으며, Sat type의 경우가 4mg/ml로 항균성이 높은 것으로 조사되었음. - 차이점 : 본 과제에서는 일반락토페린(TYPE 무상관)의 나노화를 통하여 항균성을 극대화 한 후 이를 항균소재로 활용함으로 진일보한 연구과제임. 전체적인 논문분석결과, 락토페린 그자체의 항균성과 관련한보고 사례는 있으나, 본과제와 관련하여 항균성 극대화 및 가그린에 적용한 사례는 발표된 바 없음. 	

개발기술명		항균활성 및 항암면역강화를 유효성분으로 하는 유청유래 기능성 바이오소재의 제품화
Keyword		시알산*Sialic acid*항균성*분유
검색건수		347
유효논문건수		시알산 : 5
핵심논문 및 관련성	논문명	시알산 함유 올리고당의 생촉매를 이용한 합성법
	학술지명	호남대학교 석사논문
	저자	유은순
	게재년도	2004
	관련성(%)	10%
	유사점	생촉매를 이용한 시알산올리고당 제조
차이점	구조이성질체 올리고당의 합성법으로 시알산전이효소 및 갈당전이효소를 이용한 합성법을 제시하였으며, 본 과제와 연관된 시알산의 분리 및 용도용법(항균성)은 제시 못함.	

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황(암환자식 관련 국내외 시장성)

1) 세계시장

본 과제와 관련하여 출시된 제품은 전세계적으로 현재 없음. 최근 암환자식을 목표로 출시되었던 제품으로서, 프레지니우스-카비사(독일)의 “오메가-3 지방산 함유”의 기능성을 컨셉으로 제품을 국내외에 출시한 바 있으나, 암환자 맛역치값(이미, 이취 미해결로 인해 거의 사용되지 못하고 철수한 바 있으며, 국내외적 신규시장을 대상으로 치열한 연구개발 경쟁이 진행되고 있음.

2) 국내시장

- 현재 국내 암환자수는 70만명(암발생 생존자 수)이며, 지속적 연간 암환자 발생수치는 161,920('07)이고, 암사망자는 68,919명('08)으로 조사되었는데, 매년 암환자 증가추이는 11%이상인 것으로 조사되고 있음(국립 암센터 정보센터, 2009),

- 현재 국내 공통 암환자 발생 순위는 위암, 폐암, 간암, 자궁경부암 및 대장암(직장암) 순임. 남성의 경우는 위(26%), 폐(16%), 간(14%), 대장 및 직장(8%), 식도(3%), 방광(3%) 및 조혈기관 관련 암(3%)순이고, 여성은 자궁경부(23%), 위(16%), 유방(12%), 대장 및 직장(8%), 폐(6%), 갑상선(5%) 및 간(5%)의 분포를 보이며, 이중 “대장 및 직장암(남여공통 8%의 점유율 기준)” 기인 환자발생은 약 13,000명, 사망자는 약 6천명으로 추정되며, 이상의 수치가 항상 유지되는 것으로 판단됨.

3) 연구종료에 따른 환자요구성(의사처방 포함)에 충족되는 결과가 도출시, “대장 및 직장암”만의 관련 시장만으로도 120억/년(산출기준 참고), 전체 암환자 시장으로서는 약 1조 5천억 이상의 신규시장이 창출될 것으로 추정(국외시장 평가가 불가)됨.

4) 본 과제와 관련한 시장은 항헬리코박터균 시장(시장성 :1800억, 헬리코박터 유제품 기준)과 면역제, 암환자, 일반환자용 시장 및 고령친화 시장으로 대별되는데 이 경우 국내시장만으로도 3,079억 신규런칭이 가능한 것으로 판단되었음.

Table . 개발 소재류 및 제품의 국내신규 시장성 평가

구분	시장성 평가내역				비고	
가.면역제 시장 (국내:179억)	품목	제품	생산액(억원)	비중(%)	200%이상증가	식품의약품안전청, 2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과
	1	간건강	532	37.5		
	2	면역기능	179	12.6		
	3	관절, 뼈건강	153	10.8		
	4	피부건강	100	7.0		
	5	갱년기 여성건강	64	4.5		
	6	콜레스테롤 개선	52	3.7		
	7	눈 건강	51	3.6		
	8	전립선 건강	50	3.5		
	9	기억력 개선	47	3.3		
	10	항산화	45	3.2		
	11	혈당조절	44	3.1		
	12	피로개선	14	1.0		
나.암환자 시장 (국내:1,500억)	가. 국외: 평가불가 나. 국내: 1조 5천억(10% 점유시: 1,500억) 1) 일반환자식년간 소요금액(1인 기준): 1,640천원~2,460천원 (평균:2,050천원) - 일반환자 경장영양식(완전균형영양식) 소비자(200ml/제품당, 1ml=1Kcal): 700원~1,000원(평균: 900원) - 1일 소요금액(1인 기준): 4,500원~6,750원(평균: 5,600원) 2) 암환자식 신규 런칭시장(70만명, 100%):1조 5천억원 - 70만명(암발생 생존자수)x2,050천원/년=1조 5천억원				년 11% 이상 증가예상(항암제 시장성장률 기준)	-매일유업 분석자료(2011)
다.일반환자용 시장 (국내: 420억)	국내 시장: 350억('08년)->420억('09년)				년 19%이상성장 -경장영양식기준	
라.고령친화용 시장 (국내:980억)	1. 전체규모: 33조(2010)->125조(2020) 2. 국내시장(식품부분): 4조8,990원(2010)->9조원(2015) ->17조원(2020) - 신규런칭 시장: 4조 8,990원 x 점유율 2%=980억원 3. 전략품목: 특수의료용도식품, 건강기능식품, 두부류 및 목류, 전통발효식품 등				- 전체시장: 년 13%이상 성장 -특수용도식품: 34.5%이상	한국보건산업진흥원(2012), 고령친화산업 실태조사 및 산업분석 보고

5) 본 제안서와 관련한 연구자 및 연구단은 현재까지 없으며, 진행시 관련 경쟁국은 낙농선진국인 호주와 뉴질랜드, 미국, 덴마크 및 일본 순이 될 것임[근거 : 국가과학기술정보서비스(NTIS), 범부처 국가 R&D현황, 2001~2009].

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

가) 현재 항암(생)제 개발관련 시장은 합성제품이 주종을 이루고 있으나, 이들의 지속적 사용에 따른 내성형성 및 독성 등의 문제해결을 위한 방안을 다각도로 모색중임.

나) 국제적인 기술개발 및 시장전망으로서, 생물전환제제(단백질 성분을 대체할 수 있는 식물지방산 소재를 의약품등 산업적 전환제제) 및 단백질의약품(당단백질 의약품이 단백질 시장의 60%점유)등 분야가 향후 연구개발 및 세계시장을 향후 주도할 것으로 예상됨.

다) 본 제안서와 관련한 현재 시장성은 항암제 시장과 단백질의약품 시장으로 구분할 수 있는데, 세계 항암제 시장은 853억\$('10기준), 단백질 의약품시장은 557억\$('11년기준)으로 총 1,410억\$ 시장을 형성하고 있으며, 이중 단백질의약품분야의 비약적 증가가 예측됨.

국내도 중요성을 인식하고 2005년부터 “Glycomics를 이용한 차세대의약품 개발사업(총 사업비 :100.5억원)” 이 시작되었으나, 기초단계로 진행되고 있음

라) 본 제안서는 우유가 보유한 단백질류 및 지방산류 내에 미이용 기능성소재(당, 당-단백질, 지방산류)의 의약(외)품으로의 전환기술개발과 이를 적용한 제품개발이라는 차원은 국내외적 “Glycomics 및 탄수화물 의약품 연구개발” 과정과 동일선상의 연구개발이라 할 수 있으며, 국제기술 우점화 관련 통합적 대안을 제시하는 연구개발이라 할 수 있음.

마) 세계 항암제 시장의 꾸준한 증가경향과 이에 따른 국내항암제 시장(수입판매 기인성 근거)을 살펴볼 때, 암환자의 꾸준한 요구성은 결국 필연적으로 선발 연구주자 그룹의 형성이라는 결과로 나타날 것임. 만일, 다국적 제약사 등에 의하여 시장이 선점 될 경우, 국내 1조 시장의 종속화가 필연적일 것으로 예측됨.

바) 본 제안서와 관련하여 국내외 연구개발 결과의 제품화까지 연결된 사례는 없기 때문에, 선행연구와 연계하여 진행될 소재 및 제품(암환자식) 개발 KNOW-HOW는 국제적 기술우위성과 선도성을 갖게 될 것이고, 관련산업 및 시장을 주도할 수 있을 것으로 전망됨.

사) 본 제안은 기존 우유 등(소재)의 단순 식품영역에서 의약(외)품으로 신규 및 진보성을 갖는 관련 식품산업의 기술개발 방향성을 제시하게 될 것이며, 모방불가 및 유일무이한 고부가가치 소재와 이를 이용한 용도용법 창출이 무한한 제품개발이 될 것임.

궁극적으로는 낙농산업 발전의 고민거리인 잉여 원유의 수급불균형 해소와, 결국 가격경쟁력 강화와 산업전반의 기반보호 및 육성이라는 대안과 관련된 것임.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과		-	0	1000	5000	5000	11,000
경제적 파급효과		-	0	0	1000	1000	2,000
부가가치 창출액		-	0	1000	5000	5000	11,000
합계		0	0	2,000	11,000	11,000	24,000

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

가) 기존 특허는 락토페린의 경우, 제조 혹은 고유물질의 이용성에 기준을 두고 개발된 측면이 강하고, 이를 혼합하는 조성물분야에 치중하고 있으며, 과제관련 NANA소재 자체의 연구 및 특허출원 내역은 없음(대상국가 : 한국, 일본, 미국, 기준 : 2012.02.07)

나) 본 연구과제에서는 유단백질내에 존재하는 기능성 소재를 분리하고 이를 재투입함으로써 소비자 기피성을 조기에 차단되게 제조하되, 동물 및 임상 안전성 부분과 체내대사까지도 점정한 신규한 소재 개발을 완료함.

다) 이들을 천연항균제로서 사용하는 방향으로 연구를 추진하여 국내 및 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임

2) 논문분석 측면

가) 기존 논문은 단순히 유단백질들의 특정 구성물과 이들에 대한 단일 효과를 탐구하는 임상.분야에 치중되어 있음.

나) 본 과제에서는 임상을 기본으로 하되 첨단 제조방법의 정립과 이들의 안전성과 다기능성 등을 종합하여 효과적인 방향으로 연구를 추진하여 의약분야의 학술지 등에 게재할 계획임.

3) 제품 및 시장분석 측면

가) 국내 및 국외시장은 불화나트륨등 화학합성물을 단순히 첨가한 수준의 제품 등의 제조 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 쇠퇴기에 접어들었음.

나) 본 연구과제에서는 이들의 문제점(단점)을 장점화(천연 유단백질 기원성 무독성 다기능성 소재 개발)로 해결하는 방향으로 연구를 추진 하므로써, 국제기호성에 충족되는 첨단소재 및 제품군을 본 과제 수행간 간 습득된 기술을 접목 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

나. 개발에 필요한 요건, 특이점

1) 개발 기능성 소재/제품의 식품공전 등재(식품첨가물 기준 충족 기준) 및 제품화 판매허가(관련법규) 확보 방안 필요

- 암환자에 있어서 식이조절을 통한 우유기능성 소재를 이용하여 조절하는 새로운 시도임에 따름.

2) 기존 암환자용 기능성 바이오 소재에 비해 차별성을 확보하기 위한 추가적인 방안 필요

- 전/임상연구를 위해 암전문 병원과의 연계로서 해결

3) 대상 임상시험등 의약품에 준하는 연구시설, 장비 및 인플라 필요

- 기존 구축된 인프라(병원) 적극적 연계 연구실시로 해결

4) 개발제품 기술구현에 필요한 시설과 장비 대규모 필요

- 기존 구축된 산업화 시설 및 장비 적극활용 해결

5) GMP 및 G-NANA 생산의 국내화 및 자체적인 생산능력 필요

<별첨3>

(주)생명의나무 GMP 자체 생산 계획서

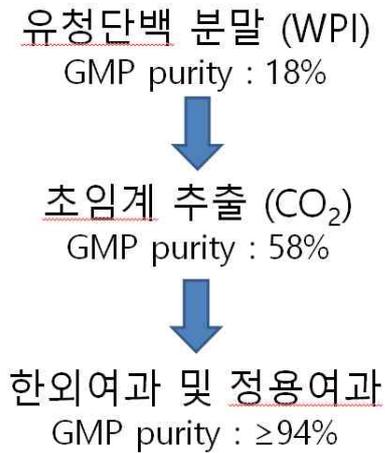
1. GMP 자체 생산의 필요성

- 현재 국내에는 GMP를 생산하는 공장이 존재하지 않으며 유청의 확보도 쉽지 않으므로 자체 개발을 하는 것이 국내 기술력 증진에 중요한 역할을 할 수 있을것으로 생각됨.

2. GMP 자체 생산의 세부 계획

가. 유청생산공장과의 협력관계 조성

- 1) 유청에서 G-NANA까지의 공정을 단축하여 중간 단계 없이 G-NANA로의 직접적인 생산.



Reference : Enrichment and Purification of Casein Glycomacropeptide from Whey Protein Isolate Using Supercritical Carbon Dioxide Processing and Membrane Ultrafiltration. *Foods* 2014, 3, 94-109;

나. 독자적인 GMP 생산 공장 설립

- 1) 전라남도 신안군과 의견을 나눈 바 있으며 실행가능시 바로 진행 할 계획을 가지고있음.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.