

117082
-03

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

고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004199-01

과
제
명

두릅과
창이자를
이용한
눈건강
증진
식품
소재
발굴 및
개별
인정형
기능성
신제품
개발

두릅과 창이자를 이용한 눈 건강증진 식품소재 발굴 및 개별인정형 기능성 신제품 개발

2022. 11. 10.

2021

주관연구기관 / (주)메드빌
협동연구기관 / 서초씨알오(주)
경상대학교 산학협력단

농
림
기
술
산
기
획
평
가
원

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “두릅과 창이자를 이용한 눈 건강증진 식품소재 발굴 및 개별인정형
기능성 신제품 개발”(개발기간 : 2017. 11. 1. ~ 2021. 1. 31.)과제의 최종보고서로
제출합니다.

2022. 11. 10

주관연구기관명 : (주)메드빌 (대표자) 홍은경 (인)
협동연구기관명 : 서초씨알오(주) (대표자) 박준철 (인)
경상대학교 산학협력단 (대표자) 정종일 (인)
참여기관명 : (주)메드빌 (대표자) 홍은경 (인)
서초씨알오(주) (대표자) 박준철 (인)

주관연구책임자 : 홍은경 
협동연구책임자 : 박준철, 최완성
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117082-03	해 당 단 계 연 구 기 간	1년3개월	단 계 구 분	(3차년도)/ (3년)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	두릅과 창이자를 이용한 눈 건강증진 식품소재 발굴 및 개별인정형 기능성 신제품 개발			
연구책임자	홍은경	해당단계 참여연구원 수	총: 11 명 내부: 11 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부: 235,000천원 민간: 78,334천원 계: 313,334천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 35 명 내부: 33 명 외부: 2 명	총 연구개발 비	정부: 700,000천원 민간: 323,335천원 계: 1,023,335천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)메드빌 연구소 서초씨알오(주) 경상대학교 산학협력단			참여기업명 (주)메드빌, 서초씨알오(주)	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	5	3	1								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

- 우수한 효능을 나타내는 눈건강 개선 물질 확보
 - 두릅추출물과 창이자추출물을 대상으로 안구건조증에 대한 우수한 효능이 있음을 확인하였음.
 - 망막변성의 주요원인인 염증에서 두릅과 창이자 추출물의 항염증기전 연구
 - 항산화기능 확인과 세포사멸 조절기전에 효능 확인
 - 상처회복 기능의 확인
 - 두릅추출물에 대해서는 안구건조증에 대한 인체적용시험을 실시하였음. (중앙대학병원, 안과, 대상인원: 40명 대조군 20명, 시험군 20명)
- 기능/지표물질의 품질표준화
 - 두릅추출물과 창이자추출물을 대상으로 물질의 품질을 관리하기 위한 지표물질을 도출하고, 분석법을 확립.
- 기능성물질의 대량생산 기술 개발
 - 두릅추출물과 창이자추출물의 대량생산 공정을 확립하고 제형개발 및 디자인개발을 통해 실제 제품을 생산하여, 시장의 요구를 충족할 수 있는 요건을 확보하였음.
 - 눈 건강제품의산업화
 - 두릅추출물을 대상으로 원료 확보 및 대량생산체계를 구축하였으며 추출물을 활용하여 눈건강제품 “수리눈”을 출시하여 연구기간내 매출성과를 창출하였음.
 - 현재 미국 판매를 위한 판매회사와 접촉중이며 향후 수출 가능성이 높다고 판단됨.

195쪽

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구는 눈 건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 기능성원료를 발굴하고 그 원료를 활용한 눈건강에 도움을 줄 수 있는 제품을 개발하는 것이다. ○ 눈 건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 기능성원료 확보 (두릅추출물, 창이자추출물) ○ 기능성 소재의 후보물질인 두릅추출물, 창이자 추출물 등의 효능과 작용기전 연구 ○ 구체적인 연구 내용은 다음과 같다. <ul style="list-style-type: none"> - 사람망막세포주에서 에피제네틱 유전체 변이에 연구개발 대상물질이 미치는 영향에 관한 연구 <ul style="list-style-type: none"> 1) 당뇨망막증과 황반변성의 주요 병환대상인 망막세포주에서 후성유전학적인 변이확인하고 두릅과 창이자추출물의 효능검증 <ul style="list-style-type: none"> - O-GlcNAcylation과 OGT발현변화 확인 - Clusterin promoter의 methylation확인 2) 망막변성의 주요원인인 염증에서 두릅과 창이자 추출물의 항염증 기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> - ROS생성억제 효능 및 기전확인 - OGT와 AMPK 작용을 통하여 항염증 억제 기전 연구 3) 안구건조증에서 두릅과 창이자추출물 효능 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 렌즈세포의 세포사멸 조절기전 분석 - 항산화기능 확인 ○ 안구건조증 모델에서 연구개발 대상물질의 효능 검증 ○ 사람의 망막세포주에서 에피제네틱 유전체 변이에 연구개발 대상물질이 미치는 영향에 관한 연구 ○ 기전연구 - TonEBP와 NF-kB의 망막에서 발현여부확인 ○ 두릅과 창이자추출물의 눈건강기능식품으로서의 원료가능성 타진 ○ 관련 시장 확대 및 고부가가치 제품 개발 및 산업화 ○ 두릅추출물을 활용한 눈건강증진 건강기능식품 소재의 개별인정허가 신청을 위한 자료확보
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수한 효능을 나타내는 눈건강 개선 물질 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 두릅추출물과 창이자추출물을 대상으로 안구건조증에 대한 우수한 효능이 있음을 확인하였음. - 두릅과 창이자추출물의 분획분석을 통한 보다 효과적인 추출 및 투여 용량 분석 - 망막변성의 주요원인인 염증에서 두릅과 창이자 추출물의 항염증기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 항산화 효능 및 기전 확인 - 항산화기능 확인과 세포사멸 조절기전에 효능 확인

	<ul style="list-style-type: none"> - 상처회복 기능의 확인 - 두릅추출물에 대해서는 안구건조증에 대한 인체적용시험을 실시하였음. (중앙대학병원, 안과, 대상인원: 40명 대조군 20명, 시험군 20명) - 두릅추출물의 우수한 효능을 토대로 특허를 출원하였고, 시장진출 가능성이 높아 PCT 출원도 완료하였음. - 창이자추출물에 대해서는 전임상 효능 자료를 확보하였고, 물질의 품질을 관리하기 위한 지표물질 도출 등 대량생산을 위한 기반을 확보하였음. <ul style="list-style-type: none"> ○ 기능/지표물질의 품질표준화 <ul style="list-style-type: none"> - 두릅추출물과 창이자추출물을 대상으로 물질의 품질을 관리하기 위한 지표물질을 도출하였음 - 지표물질에 대한 분석법을 확립하고, 분석법에 대한 validation을 완료하였음. ○ 기능성물질의 대량생산 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 두릅추출물과 창이자추출물의 대량생산 공정을 확립하고 제형개발 및 디자인개발을 통해 실제 제품을 생산하여, 시장의 요구를 충족할 수 있는 요건을 확보하였음. ○ 눈 건강제품의산업화 <ul style="list-style-type: none"> - 두릅추출물을 대상으로 원료 확보 및 대량생산체계를 구축하였으며 추출물을 활용하여 눈건강제품 “수리눈”을 출시하여 연구기간내 매출 성과를 창출하였음. - 현재 미국 판매를 위한 판매회사와 접촉중이며 향후 수출 가능성이 높다고 판단됨. 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 눈건강개선 효능을 나타내는 건강기능식품의 산업화로 고령화사회의 삶의 질 개선에 기여함. ○ 스마트폰 사용의 증가와 노화에 따르는 안구건조증과 같은 눈질환이 급격히 증가하는 현실에 눈 질환 예방과 치료에 큰 도움 예상 ○ 백내장과 녹내장에서도 두릅과 창이자의 항산화 효과 확인 ○ 수입대체 효과, 수출효과 등이 기대됨 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>눈건강증진</p>	<p>두릅추출물</p>	<p>창이자추출물</p>	<p>개별인정신청</p>	<p>건강기능식품</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Improvement of the eye function</p>	<p>Aralia elata</p>	<p>Xanthium strumarium L.</p>	<p>KFDA approval</p>	<p>Health Food</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

제 1장. 연구개발과제의 개요	7
제 1절. 연구개발 목적	7
제 2절. 연구개발의 필요성	8
제 3절. 연구개발 범위	22
제 2장. 연구수행 내용 및 결과	23
제 1절. 연구개발 대상물질의 성분 및 분석법연구	26
제 2절. 연구개발 대상물질의 비임상 효능 및 기전 규명	50
제 3절. 두릅추출물의 안전성 확보	69
제 4절. 두릅추출물의 인체적용시험	147
제 5절. 두릅추출물의 기능성원료 개별인정 신청을 위한 자료 확보	179
제 6절. 두릅추출물 대량생산 및 제품 생산	180
제 7절. 두릅추출물을 이용한 건강기능식품의 사업화	192
제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	199
제 4장. 연구결과의 활용 계획 등	203
붙임. 참고 문헌	204

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 목적

1. 연구개발의 최종목표

본 과제는 눈 건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 기능성원료를 발굴하고 그 원료를 활용한 눈건강에 도움을 줄 수 있는 제품을 개발하는 것이다.

두릅과 창이자를 이용한 눈 건강증진 식품소재 발굴 및 개별인정형 기능성 신제품 개발

2. 연구개발의 세부목표

(1) 눈 건강 개선성분 함유 원료 제시 및 표준화 (두릅, 창이자추출물)

- 눈 건강 개선성분을 포함한 농산물 분석
- 기능성 성분 규명 및 기능(지표) 성분의 품질 규격 확보
- 물질 추출방법의 표준화
- 효능 평가 및 분자생물학적 유효기전 확보

(2) 안전성, 안정성 확보 및 평가시스템 구축

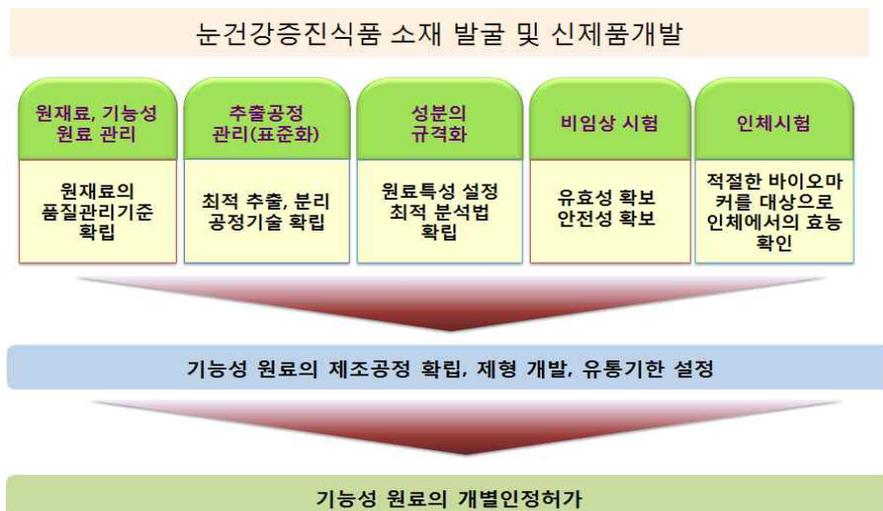
- 세포 및 동물 모델에서 눈 건강 개선능 소재의 유효성 입증 (두릅, 창이자추출물)
- 반복투여 경구독성시험, 유전독성 시험 등 (두릅추출물)

(3) 건강기능식품 기능성원료 인증 신청자료 확보 (두릅추출물)

- 전임상 및 인체 적용시험에 의한 소재 유효성 입증

(4) 기능성 제품(개별인정형) 상품화 및 산업화 (두릅추출물)

- 맞춤형 제품개발 및 사업화 전략 제시 등



제 2 절. 연구개발의 필요성

1. 연구개발 대상 물질의 특성

가. 두릅추출물



- 두릅추출물(연구개발 대상물질)의 기술적 특징
- 본 연구에 사용된 약재인 두릅나무는 갈잎떨기나무로 만주, 사할린 등 주로 동아시아에 분포하며 한국에서는 전국의 숲 가장자리에서 자람.
- 이 나무의 수피, 목재, 가지 등은 건조해 예로부터 한방약재로 사용되어져 왔으며 동의보감에서는 나무와 뿌리의 껍질을 말려 **총목피**라고 하였음.
- 두릅의 껍질에는 saponin을 포함한 여러 종류의 triterpenoids가 있는 것으로 알려져 있음 (Yoshikawa *et al.*, 1996)
- 두릅나무의 수피에는 혈당강하 효과가 있는 elatosede E(Yoshikawa *et al.*, 1993)를 포함해 elatosede F와 oleanolic acid glycosides 등 몇 가지의 glycoside가 함유되어 있으며(Sakai *et al.*, 1994, Yoshikawa *et al.*, 1996) 에탄올 흡수를 저해하는 elatoside A와 B 도 포함되어 있음(Yoshikawa *et al.*, 1993).
- Saponin의 일종인 oleanolic acid는 여러 화학물질에 의한 급성 간 손상을 막아주는 역할을 함(Liu *et al.*, 1995).
- 민간이나 한방에서는 두릅나무의 수피 등을 해수, 위암, 당뇨병 및 위장장애 등에 이용하고 있다. 두릅나무의 근피 추출물에 의한 당뇨병 치료 효과는 쥐에게 두릅나무의 잎에서 분리한 triterpenoid glycoside를 먹이고 포도당을 임의 투여시 저혈당 작용과 혈액 β -lipoprotein 수준을 감소시킴. alloxan으로 유발된 당뇨 토끼에게 두릅나무 추출물을 투여시 혈당 강하

작용이 있음이 보고됨.

- 당뇨 합병증 중 안질환의 발병에 핵심적인 역할을 하는 항산화력 감소 및 aldose reductase 활성 증가에 초점을 맞추어 in vitro에서 두릅 추출물의 기능성을 검증.
- ex vivo 렌즈 배양 시험에서도 기능성이 인정되었고 in vivo 동물실험에서도 우수한 결과를 도출하였다.
- 부작용이 적은 자생식물을 원료로 하며 두릅의 순은 고급 산채 중의 하나로 식용되고 있으며 부작용이 적은 자생식물이다.
- 특허는 한국과 미국에서 등록되었다 (한국: 제0356148호, 미국: US 6,827,950 B2호).
- 새로운 천연물 식의약소재의 부가가치를 높이기 위해 분자생화학적인 기전연구가 필연적이므로, 본 연구에서는 세포 및 동물의 조직 수준에서의 체계적인 기전연구를 추가적으로 진행 하고, 비임상시험과 인체시험을 진행하여 과학적인 근거를 확보한 천연물 신소재로 개발하고자 함.

나. 창이자(도꼬마리) 추출물 (*Xanthium strumarium* L.)



- 창이자는 국화과의 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L.) 또는 대꼬리의 열매로서 도꼬마리는 우리나라의 들판에 널리 자라는 한해살이 풀임.
- 전초의 성분은 락톤인 크산티닌, 카로티노이드, 알칼로이드, 사포닌 등이고 열매인 창이자는 크산토스트루마린(노란색의 배당체), 수지, 요드염 등이 함유되어 있으며 씨에는 수지와 40%의 기름(리놀산 63.4%, 올레인산 27%, 포화지방산 8.2%)이 함유되어 있음.
- 또한 도꼬마리는 요오드 함량이 높은 식물중 하나임. 전초는 요오드 함량이 높아 갑상선 기능이 저하되었을 때 사용하였음.
- 동의보감에서는 도꼬마리를 이뇨제, 해열제, 진경약, 감기, 두통, 비염, 축농증, 류마티스에 사용하였음.
- 민간에서는 전초를 문둥병 치료제, 진정 진경약으로 쓰거나 구내염에 사용하였음.

- 또한 열매와 전초로 살균고약, 방부고약을 만들어 습진, 바이러스 질환, 종기, 천연두, 궤양 성 피부병에 바르며 뱀이나 벌레에 물린 때 해독제로 사용하기도 하였음.
- 창이자를 약성 종양에 진통제로도 사용한다는 보고도 있고, 창이자를 물에 끓여 농축한 액체를 만성비염, 관절염, 신경통에 사용한다고 알려져 있음.
- 당사는 창이자의 눈건강에 대한 특허를 보유하고 있음.

다. 주관기관이 보유한 지식재산권현황 (선행)

구 분	지식재산권명	등록번호	권리자	비 고
특허	창이자 추출물을 이용한 백내장 예방 및 치료 조성물 및 그 제조방법	제10-0343923호	메드빌	등록
특허	두릅을 용매로 추출한 백내장에 유효한 조성물	제10-0356148호	메드빌	등록
특허	두릅과 산딸기를 용매로 추출한 항산화 효과를 가진 추출물	제10-0389132호	메드빌	등록
미국특허	Pharmaceutical composition comprising Aralia extracts	US 6,827,950 B2	메드빌	등록
상표	아랄리콤	40-2012-0072080	메드빌	등록
상표	수리논	40-2012-0072081	메드빌	등록
상표	수리안	40-2012-0072082	메드빌	등록

2. 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- 시각은 인간의 감각 중 가장 중요한 부분으로 시력의 저하는 곧 삶의 질의 저하로 연결됨.
- 이것은 신체장애를 표시하는 McBride식의 계산법에서도 알 수 있는데 시력의 장애는 전체 몸의 장애의 95%이상을 차지 (McBride식의 계산법)함.
- 최근 PC나 스마트폰 등 디지털 전자 기기를 사용하는 사람이 증가함에 따라 '노년성 백내장' 환자가 증가하고 있음.
- 최근 노령인구가 급격하게 증가하고 다양한 외부환경에 의한 수정체의 손상에 기인한 백내장에 의한 문제와 생활환경의 변화로 고혈당으로 인한 당뇨병이 심각한 실정임. 특히 당뇨병환자들의 증가는 합병증에 하나인 백내장을 동반하는데 이것은 시력저하로 나타나 장애를 동반하게 됨.

- 백내장은 노인 인구의 상당수에서 나타나는 노년기 질환일 뿐만 아니라 요즈음에는 젊은 사람들에서도 간혹 나타나는 질환이고 그 발생빈도가 점차 증가하고 있다는 점에서 매우 중요한 질환 중의 하나라고 할 수 있다. 백내장이 직접적으로 생명에 영향을 주는 질환은 아니나 삶의 질에 큰 영향을 미친다는 점에서 노년기 사회로 접어드는 선진국에서 그 중요성이 점점 커지고 있음.
- 국내 연간 백내장 환자 수는 40만 명 이상으로 매년 증가하고 있음(건강보험공단).
- 백내장은 수정체의 혼탁으로 빛이 망막에 이르는 것이 차단되어 시력장애가 일어나는 질병 (Kador *et al.*, 1979; Srivastava *et al.*, 1988)임.
- 백내장은 보통 50세 이후 발생하기 시작해 60대의 60%, 70대의 70% 이상이 백내장을 앓고 있을 정도로 흔한 질병임.
- 나이에 따른 눈건강 관리가 다름. 어린이와 청소년들의 시력관리, 장시간의 컴퓨터 사용으로 인해 안구건조증이 증가하고 있으며, 노령인구의 증가로 노인성안질환인 백내장, 당뇨와 같은 대사성 질환의 증가로 인한 2차 합병증중 안질환과 관련된 백내장, 당뇨성망막증 등이 급격히 증가하고 있음.
- 우리나라의 당뇨병 환자의 수는 500만명을 넘어선 상태이며 2차 합병으로 당뇨병성 백내장, 망막증, 신장병, 말초신경 장애, 고지혈증 등의 합병증이 나타남.
- 백내장은 주로 자외선, 열, estrogen 등 호르몬의 불균형, 흡연 등 많은 요인들이 관여한다고 보고되고 있음.
- 백내장의 발생빈도는 지역에 따라 어느 정도 차이는 있지만 60세가 지나면서 급격히 증가하고, 그 진행 및 혼탁정도가 현저히 증가함. 의학기술의 발달로 노령화 시대를 맞이하여 백내장이 접하는 비율은 해마다 증가하는 추세임. 백내장으로 인한 실명은 전체 실명의 약 35%를 차지하여(Chylack, 1984)실명의 중요한 원인이 되고 있음.
- 우리나라의 인구 분포가 노령화되고 당뇨병의 발생빈도가 근래 10년간 126% 증가를 보이고 있는 시점에서 백내장의 인구증가는 불가피하며 이에 따른 의료비용 또한 상당할 것으로 추산됨.
- 백내장이 미국에서 연간 약 200만예, 한국에서 약 15만예의 수술이 이루어지는 점만 고려해도 단일질환으로 의료비 지출이 가장 많은 질환임.
- 우리나라의 인구 분포가 노령화되고 당뇨병의 발생빈도가 근래 10년간 126% 증가를 보이고 있는 시점에서 백내장의 인구증가는 불가피하며 이에 따른 의료비용 또한 상당할 것으로 추산됨.
- 백내장은 인공 수정체를 삽입하는 수술로써 치료가 가능하나 당뇨병이 있으면 수술 후 염증 발생이 잘 되고 상처 치유 기간이 늦으며 출혈이 되는 경향이 있음. 특히 인슐린 의존성 당뇨로 인한 백내장의 경우 수술 후 좋아진 시력이 다시 나빠지는 후발 백내장이 생기는 경우가 많음.
- 당뇨 합병증 치료제로는 aldose reductase inhibitor가 개발되었으나 부작용으로 현재 사용

되고 있지 못함. 이것의 부작용을 극복하고 약효를 개선한 약물을 개발하기 위해 최근 aldose reductase inhibitors I의 구조와 활성간의 관계를 규명하는 연구가 진행 중임.

- 국내에서는 황금(*Scutellaldose reductaseia baicalensis*)뿌리에서 추출한 flavonoids 성분과 *Angelica dahurica* 뿌리에서 추출한 furanocoumarins등 여러 가지 천연 추출물에서 aldose reductase 저해 성분들이 연구됨.
- 현재 백내장 약물로서 사용되고 있는 것들은 여러 항산화 물질들, 즉 비타민 C, 비타민 E, glutathionine, catalin(일본), baineiting(중국), catachrome-OFTAN(핀란드), Vita-iodurol(프랑스), quinox(미국) 등임(Chasovnikva *et al.*, 1990).
- 현재 우리나라에서는 일본에서 개발된 catalin을 주로 사용하고 있으나 이런 약물에 의한 치료는 변성된 수정체 단백질을 원래의 투명한 상태로 만드는 것이 불가능해 확실한 가치는 인정받고 있지 못하고 있는 실정이라서 백내장을 예방하는 것이 매우 중요함.
- 따라서 백내장을 예방할 수 있는 천연물 소재의 적극적인 개발과 기초연구가 필요한 실정이다.
- 당뇨에 의한 2차 합병증중 대표적인 안질환은 당뇨병성 망막증 (Diabetic Retinopathy)으로 당뇨병환자의 주요 합병증으로 빠른 속도로 증가하고 있음.
- 당뇨병성 망막증의 한 원인 기전으로 망막 신경절 (Retina ganglion cells: RGCs)의 세포 사멸이 보고되고 있으나 이 분야에서 천연물 신소재의 효능은 보고된 바가 없음.
- 안토시아닌은 플라보노이드계 색소로 혈관에 침전물이 생기는 것을 막아 피를 맑게 하며 심장 질환과 뇌졸중 위험을 감소시키는 것으로 알려져 있음. 또한 강력한 항산화 작용과 노화방지 기능을 가져 소염작용과 심장병예방 뿐만 아니라 망막에서 빛을 감지해 뇌로 전달해 주는 로돕신 색소의 생성을 도와 눈의 피로를 완화시켜주고 시력을 보호하는 효과를 나타내는 것으로 알려져 있음.
- 망막에는 **로돕신**이란 색소가 있어 빛을 순간적으로 분해, 재합성하는 것을 반복, 뇌를 자극하고 사물을 볼 수 있게 하는데, **안토시아닌은 로돕신의 재합성을 돕는다.**
- 수정체의 초점을 맞추기 위해 작용하는 모양체 근이 약해지는 것도 방지한다. 덕분에 VDT 증후군의 여파로 생기는 눈의 피로를 완화시키는데 도움이 된다.
- 안토시아닌은 강력한 항산화 물질로 혈전 형성을 억제하여 심장 질환과 뇌졸중 위험을 감소시키기도 하여 '프렌치 패러독스(French Paradox)'의 원인물질로 알려져 있음.
- 강력한 항산화작용을 하는 안토시아닌은 블루 베리나 적포도주에 있는 것이나 동일한 작용을 하는데 아사이베리에는 적포도보다 최대 33배, 블루베리보다 최대 6배나 많은 양의 안토시아닌이 들어있는 것으로 보고되었다. 안토시아닌을 함유한 식품들에 대한 항산화 작용을 시험한 결과, 안토시아닌 색소가 진하고 많을수록 항산화력이 높은 것으로 보고됨.
- 루테인은 자연계 600종 이상 알려진 카로테노이드계 색소 중 하나로 강한 항산화 효능을 나타내는 물질이며, 눈의 망막 중심에 있는 황반의 구성 성분으로 망막의 가장 안쪽에 있어 물체를 인식보고 색을 구별하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음.

- 눈이 장시간 자외선에 노출되거나 모니터의 청색광에 노출되면 활성산소에 의해 황반의 간체와 추체를 손상시키는데, 루테인의 활성산소에 대한 라디칼 소거능 때문에 실명 위험을 감소키는 것으로 보고되고 있음.
- 아스타잔틴은 카로티노이드 계통의 색소로 역시 강력한 항산화물질로서 활성산소에 대한 라디칼 소거능으로 자외선으로부터 눈을 보호.

(2) 국내 시장현황

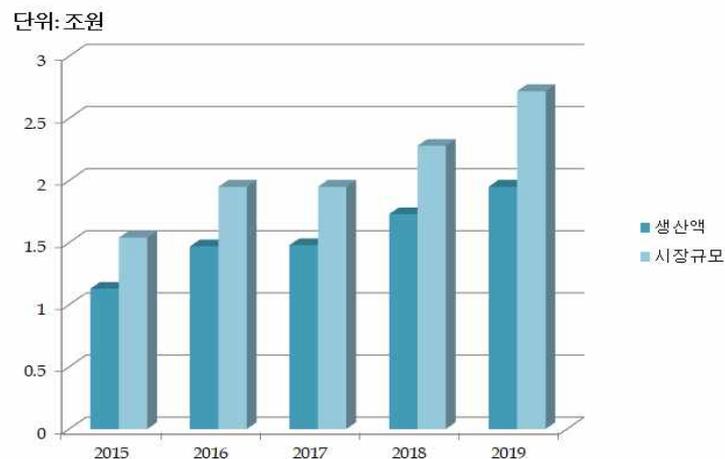
국내 산업현황

- '19년 건강기능식품 생산액은 1.95조원으로 전년대비 12.59% 증가하였고, 수출액은 0.14조원으로 전년대비 13.4% 증가하였고, 수입액은 0.92조원으로 36.35% 증가하였다.
(시장규모 2.72조원, 최근 5년 연평균 성장률 : 15.26%)

건강기능식품	생산액	수출액		수입액		시장규모
	(조원)	(조원)	(억\$)	(조원)	(억\$)	(조원)
2015	1.13	0.09	0.80	0.50	4.41	1.54
2016	1.47	0.11	0.93	0.59	5.07	1.95
2017	1.48	0.11	0.95	0.58	5.10	1.95
2018	1.73	0.13	1.14	0.67	6.11	2.28
2019	1.95	0.14	1.22	0.92	7.86	2.72
전년대비 증가율	12.59%	13.40%	7.03%	36.35%	28.69%	19.56%
연평균 성장률	14.48%	12.06%	11.22%	16.44%	15.57%	15.26%

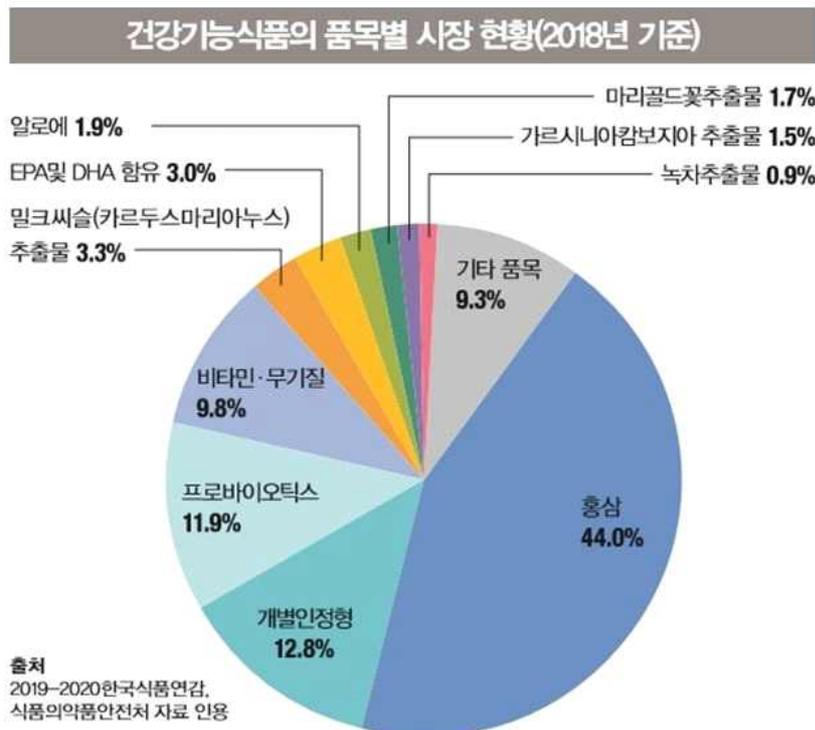
국내 시장규모

- 2019년도 건강기능식품 시장규모는 2.72조원으로 전년대비 19.56% 증가하였음.
- 최근 5년간 연평균 성장률은 15.26%



출처: 2020년도 식품의약품통계연보(식약처)

- 건강기능식품협회가 시행한 '2020 건강기능식품 시장현황 및 소비자 실태 조사' 보고서에 따르면 2020년에는 국내 건강기능식품 시장이 다양한 브랜드의 시장 진입과 코로나19 확산에 따라 건강에 대한 관심도가 높아져 시장규모가 4조 9천억 원 규모로 성장하였음 .
- 건강기능식품협회는 매년 정확한 시장규모 파악을 위해, 식품의약품안전처에서 공식적으로 발표하는 생산실적 외에 전문 리서치 업체를 통해 가구별 건강기능식품 구매지표 조사를 실시한 결과임.
- 2020년에는 건강기능식품 선물 제외(직접 구매) 시장이 크게 성장하였음. 선물 및 직접 구매 금액 비중은 각각 28.7%(-2.7%), 71.3%(+11.0%)로, 코로나19로 선물 기회가 줄고 자신 및 가족 건강에 대한 관심이 더 높아진 결과로 분석됨.
- 2020년 가장 많이 판매된 상위 기능성 원료는 홍삼, 프로바이오틱스, 비타민(종합 및 단일 비타민), EPA-DHA 함유 유지(오메가-3) 순이었고, 이들의 합산 시장 규모는 3조 2117억으로 전체 시장의 64.5%를 차지했음.
- 2017년부터 4천억 시장 규모를 형성한 프로바이오틱스가 성장주도 원료였고, 면역 기능 관련 수요가 증가하면서 비타민의 구매가 증가. 또, 체지방 감소, 눈 건강, 피부 건강 등 새로운 기능성 원료가 포함된 기타 시장도 확장되고 있음.



(3) 경쟁기관현황

- 현재 식약처의 개별인정허가를 받은 기능성원료 중 눈건강과 관련된 물질.
- 빌베리추출물(안토시아노사이드)과 헤마토코쿠스 추출물(아스타잔틴)은 눈의 피로도 개선에 도움을 주는 원료로 생리활성 2등급의 인정을 받음.
- 루테인복합물은 눈건강에 도움을 주는 원료로 생리활성 1등급의 인정을 받음. 또한 지아잔틴추출물은 눈건강에 도움을 주는 원료로 생리활성 1등급의 인정을 받았고 루테인에스테르는 생리활성 2등급의 인정을 받았음.
- 루테인과 지아잔틴추출물, 루테인에스테르 등은 과다섭취시 피부색이 일시적으로 황색으로 변하는 단점이 있으며 헤마토코쿠스 추출물은 베타카로틴의 흡수를 저해하는 단점이 나타나기도 함.
- 현재 시장에서 판매되고 있는 이들 기능성 원료들은 모두 수입된 원료를 사용하고 있어 이를 대체할 수 있는 기능성원료의 국산화가 대단히 필요한 상황이다.

(4) 유통상의 특징

치료제의 경우는 의약분업이 실시되고 있는 국가에서는 의사의 처방에 따른 약국판매가 대부분을 차지하고 있으나 건강기능식품으로 판매되는 경우에는 건강식품체인점이나 다단계 판매 그리고 대형할인점의 비율이 높은 편이고 최근 들어와 케이블TV나 인터넷쇼핑 등의 비중이 늘어나고 있는 추세임.

3. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- 미국의 National Eye Institute의 조사결과를 보면 백내장 수술을 10년간 지연시킬 수 있다면 연간 수술의 45%를 감소시키고 이것은 연간 의료비용을 십억불 이상 감소시킬 수 있는 효과를 가져온다고 보고하였음.
- 2011년 WHO는 세계 당뇨병환자를 3억4천6백만명으로 추산하고 있으며, 국제당뇨협회는 2030년 당뇨병환자를 5억5천2백만명으로 예측하고 있음.
- 세계적으로 사회적, 직업적인 치료를 필요로 하는 시각장애를 가진 인구는 현재 약 1억 6천만명에 이르고, 향후 25년간 두 배로 증가할 것으로 예측됨.
- 백내장에 의한 시각장애는 전세계적으로는 42%, 우리나라를 포함한 아시아에서는 39%에 해당함. 특히 인슐린 의존성 당뇨병인 경우엔 백내장이 20대와 30대에서도 나타남.
- 백내장이 미국에서 연간 약 200만 예, 한국에서 약 15만 예의 수술이 이루어지는 점만 고려해도 단일질환으로 의료비 지출이 가장 많은 질환임.

<표> 유통채널별 매출 현황(2013년 매출액 상위 23개 업체 기준)

(단위 : 억 달러 또는 %)

구분		2012년	2013년	증가율
		매출액(점유율)	매출액(점유율)	
매장 판매	전문매장	3,713 (10.7)	3,530 (10.1)	-4.9
	백화점	2,558 (7.3)	2,210 (6.3)	-13.6
	할인매장	2,027 (5.8)	2,095 (6.0)	3.4
	약국	310 (0.9)	541 (1.5)	74.5
	병원	40 (0.1)	64 (0.2)	60.0
	기타	208 (0.6)	162 (0.5)	-22.1
	소계	8,856 (25.4)	8,602 (24.6)	-2.9
직접 판매	다단계 판매	12,258 (35.2)	12,796 (36.6)	4.4
	방문 판매	9,396 (27.0)	8,485 (24.3)	-9.7
	소계	21,654 (62.1)	21,281 (60.8)	-1.7
전화권유 판매		120 (0.3)	195 (0.6)	62.5
홈쇼핑 또는 케이블		1,690 (4.8)	2,258 (6.5)	33.6
인터넷		734 (2.1)	1,061 (3.0)	44.6
기타		1,793 (5.1)	1,581 (4.5)	-11.8
계		34,847 (100.0)	34,978 (100.0)	0.4

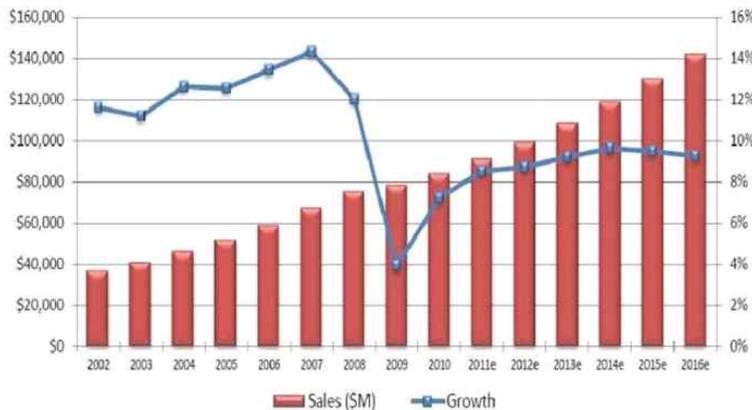
(출처 : 건강기능식품 시장현황 및 소비자 실태 조사, 한국건강기능식품협회, 2014)

(2) 시장현황

건강기능식품의 글로벌 시장규모는 아래와 같다.

세계 시장규모

Nutrition Business Journal(2012)의 자료에 따르면 2010년 건강 기능식품 세계시
장 규모는 약845억 달러로 추정된다. 세계건강기능식품 시장규모는 2009년 대비
802억달러) 5.4%의 성장을 기록하고 있음.



(단위: 백만달러)

출처: Global Supplement & Nutrition Industry Report (2012)

[그림 4] 연도별 세계 기능성식품 시장규모

- 세계 시장에서 가장 큰 규모를 차지하는 곳은 미국으로 약 404억 달러(약 45조 원, 점유율 34.3%) 규모이며, 중국 약 163억 달러(약 18조 원, 점유율 13.8%), 일본 약 109억 달러(약 12조 원, 점유율 9.2%) 순임(2015년 단일 국가 기준)
- 한국은 21억 달러 규모의 시장을 형성하고 있으며 세계 시장에서의 점유율은 1.78%를 차지하고 있음(2015년 기준)

〈표〉 국가별 건강기능식품 시장 규모 및 전망

(단위 : 억 달러 또는 %)

구분	2015년	2020년	연평균 성장률	점유율 (2015년 기준)
미국	404	568	7.1	34.3
서유럽	168	190	2.5	14.2
중국	163	267	10.4	13.8
아시아(중국, 일본 제외)	118	187	9.5	10.0
일본	109	122	2.3	9.2
남미	89	155	11.7	7.5
그 외	127	188	8.2	10.8
합계	1,179	1,677	7.3	100.0

(출처 : NBJ's global supplement & nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014)

(3) 건강기능식품 시장의 성장가능성

주요 국가별 건강기능식품산업의 동향은 표에서 보는 바와 같이 비타민과 무기질이 주요소비분야이나 시력보호분야가 유망한 성장분야로 나타나고 있음.

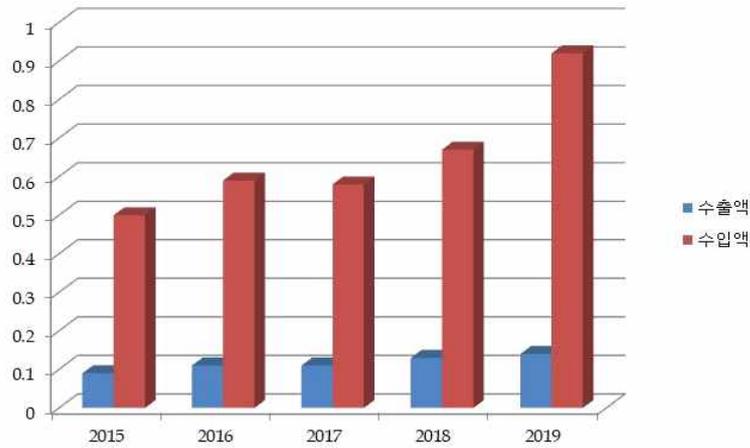
〈표〉 주요 국가별 동향

구분	미국	중국	일본
시장 규모	· 404억 달러(45조 원) · 연평균 성장률 : 7.1%	· 163억 달러(18조 원) · 연평균 성장률 : 13.8%	· 109억 달러(12조 원) · 연평균 성장률 : 2.3%
주요 소비 분야	· 멀티 비타민 · 천연물/전통 식품보충제	· 비타민 및 무기질	· 비타민 및 무기질
성장 분야	· 비타민 B, D · 프로바이오틱스	· 칼슘제	· 시력 보호 · 수면 보조
기업 동향	· 대형 기업이 시장 선점 · 대규모 유통망을 통해 판매	· 점유율 10위 기업 중 외국 기업 3개 포함 · 적소판매형식 ³⁾	· 드럭 스토어, 통신 판매 등 다양한 판매 · 자체 브랜드 제품의 성장

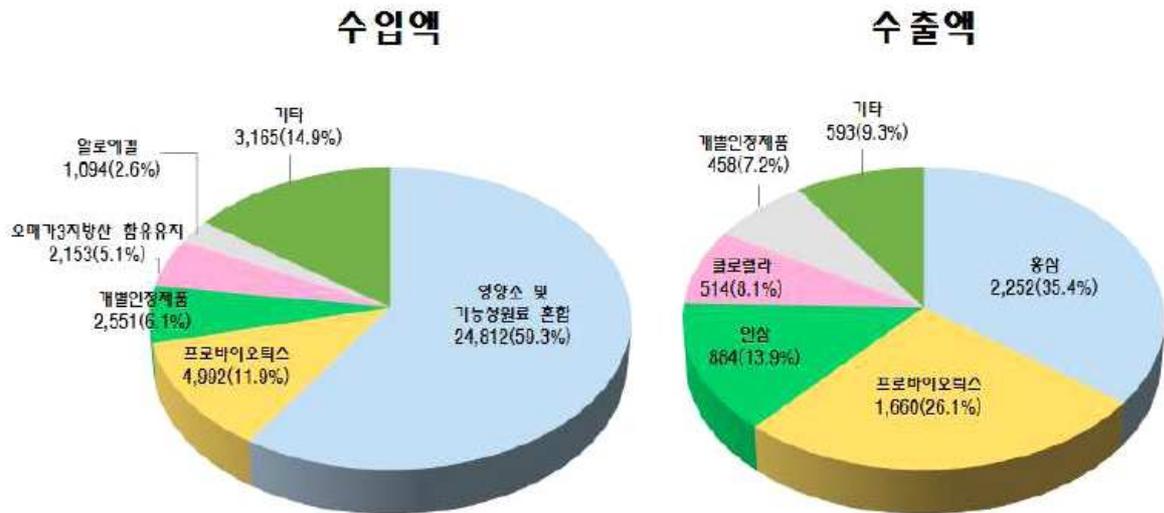
(4) 건강기능식품 원료의 수출입 상황

건강기능식품 수출입 현황

- 2019년도 건강기능식품 수출액은 0.14조원으로 전년대비 13.40% 증가하였고 수입액은 0.92조원으로 36.35% 증가하였음.
- 최근 5년간 수출액은 연평균 12.06% 증가하였고 수입액은 16.44% 증가



출처: 2020년도 식품의약품통계연보(식약처)



(출처 : 식품의약품 통계연보, 식품의약품안전처, 2015)

<그림> 건강기능식품 수입 및 수출 품목(2014년)

○ 수출액

- 식의약품 산업 분야 수출액은 26.99조원이며, 국내총수출의 4.27%를 차지함.
식품(8.80조원, 1.39%), 화장품(7.61조원, 1.20%), 의약품(6.06조원, 0.96%), 의료기기(4.33조원, 0.68%), 의약외품(0.47조원, 0.07%), 위생용품(0.17조원, 0.03%) 순.
- 국내총수출액('19)대비 : 반도체제조업(112.63조원, 17.81%), 자동차제조업(50.26조원, 7.95%), 정보통신기기(37.99조원, 6.01%), 식의약품(26.99조원, 4.27%), 선박(22.02조원, 3.48%) 순
- 식의약품 산업 분야 수출액 전년대비 성장률은 9.52% 증가로 국내 총수출 성장률(1.79%)보다 7.73%p 높음. 위생용품(38.88%), 의약품(14.57%), 화장품(10.43%), 의료기기(8.88%), 식품(9.79%), 의약외품(-3.85%) 순
- 식의약품 산업 분야 수출액 연평균 성장률('10~'19)은 11.76%로 국내 총수출 연평균성장률 1.79%보다 높음. 화장품(30.56%), 의약품(14.57%), 의료기기(11.07%), 의약외품(9.79%), 식품(5.21%) 순

○ 수입액

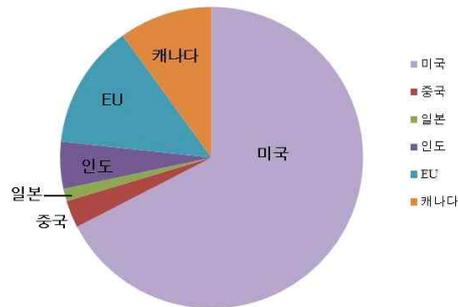
- 식의약품 산업 분야 수입액은 46.93조원이며 국내총수입의 8.00%를 차지함.
식품(32.07조원, 5.46%), 의약품(8.05조원, 1.37%), 의료기기(4.85조원, 0.83%), 화장품(1.46조원, 0.25%), 위생용품(0.28조원, 0.05%), 의약외품(0.21조원, 0.04%) 순
- 국내총수입액('19)대비 : 반도체제조업(56.81조원, 9.68%), 식의약품(46.93조원, 8.00%), 정보통신기기(31.87조원, 5.43%), 자동차제조업(13.99조원, 2.38%), 선박(1.42조원, 0.24%) 순
- 식의약품 산업 분야 수입액 전년대비 성장률은 8.05% 증가로 국내총수입성장률(-0.35%)보다 8.40%p 높음. 의료기기(13.34%), 의약품(12.57%), 식품(6.59%), 화장품(2.70%), 위생용품(2.26%), 의약외품(-0.48%) 순
- 식의약품 산업 분야 수입액 연평균 성장률('10~'19)은 6.11%로 국내총수입성장률 1.99%보다 높음. 의료기기(7.09%), 식품(6.87%), 의약외품(6.09%), 의약품(4.51%), 화장품(4.47%) 순

4. 연구개발의 중요성

(1) 눈건강제품의 산업적 특징 - 경제적 측면

- 스마트폰 사용의 증가와 노화에 따르는 눈질환의 증가, 또 당뇨병 증가에 따라 당뇨의 2차 합병증인 백내장과 망막증과 같은 질환의 급격한 증가로 인해 눈 질환 예방 제품의 필요성이 지속적으로 증가하고 있다.

건강기능식품 주요국 수입현황



- 노령화 사회로의 진행 또한 유병율과 밀접한 관계가 있다. 노인 인구가 증가됨에 따라 망막 손상에 따른 실명환자가 급격히 증가될 것으로 전망되며, 이에 따라 예방과 치료에 필요한 신약개발에 많은 노력이 집중될 전망이다. 그러나 아직까지 효과가 입증된 제제가 없는 실정이다.
- 당뇨 환자의 증가로 당뇨병 치료제에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있으나 아직까지 당뇨 합병증에 따른 전문 치료제가 존재하지 않는다.
- 잠재적인 당뇨병환자이면서 적극적으로 당뇨병 치료제를 사용하지 않은 사람은 적어도 150만 명 이상이 된다고 볼 수 있다.
- 특히 당뇨병성 망막증이나 삼출성 황반변성은 약한 미세혈관으로부터 유출된 혈액이나 삼출물이 쌓여 시력장애가 유발되는 질환으로서 레이저 치료를 통해 누출을 막는 방법이 가장 효과적인 것으로 알려져 있으나 백내장과 같은 다른 합병증과 달리 병변진행을 개선할 수 없는 특징을 보이고 있다.
- 또한 당뇨병성 망막증은 발생빈도가 높으며 시력저하와 실명의 가장 큰 원인이 되고 있다. 일단 망막증이 발생하게 되면 당 조절이 잘 되어 있는 상태라고 할지라도 망막증 자체는 계속 진행 될 수 있으며 다시 정상화시키기는 어렵다.
- 당뇨 환자는 당뇨성 망막증에 의한 시력장애와 시력상실의 위협에 지속적으로 노출되고 있다.
- 당뇨성 망막증에 효과가 있는 물질로는 블루베리 추출물로부터 분리한 생약제제와 폴리페놀계 화합물을 변형한 화학제제가 있지만 아직까지 그 효능이 미약하고 직접적으로 당뇨망막증에 미치는 작용기전이 밝혀져 있지 않은 상태로 사용되고 있다. 그 외 여러 가지 새로운 생약제제나 효능을 높이기 위한 복합제제 투여 방법 등이 연구되고 있으나 초보적인 수준이다.
- 치료제 개발의 시장성을 분석하면 잠재적인 당뇨병환자이면서 적극적으로 당뇨병 치료제를 사용하지 않은 사람은 적어도 150만 명 이상 된다고 볼 수 있다. 만일 병원과 약국을 적극적으로 이용한 환자들이 연간 평균 3회라고 가정하면 실제 본 제품을 적극적으로 구매할 수 있는 적극적인 환자는 약 40만 명 정도가 될 것이다. 이들 적극적인 당뇨병환자들이 모두 본 제품을 구입하여 1년 동안 복용할 경우 본 제품의 당뇨병 관련 잠재적 시장규모는

2001년 기준으로 약 413억원(142원/캡슐x 2캡슐/일x 365일x 40만명=413억원)에 이를 것으로 추정된다.

- 건강기능식품 시장의 확대에 따른 이익 증가가 예상됨. 청소년으로부터 노인에 이르기까지 섭취가 가능한 건강기능식품의 개발과 함께 대량의 수요를 확충하기 위한 농산물재배에 따른 농가의 소득 향상이 기대된다.

(2) 사회문화적인 측면

- 시각은 인간의 감각 중 가장 중요한 부분으로 시력의 저하는 곧 삶의 질의 저하로 연결된다.
- 이것은 신체장애를 표시하는 McBride식의 계산법에서도 알 수 있는데 시력의 장애는 전체 몸의 장애의 95%이상을 차지 (McBride식의 계산법)한다.
- 최근 노령인구가 급격하게 증가하고 다양한 외부환경에 의한 망막장애 의한 문제와 생활환경의 변화로 당뇨병의 발생이 빠른 속도로 증가하고 있다. 특히 당뇨병환자들의 증가는 합병증 중의 하나인 망막증을 동반하는 경우가 많아 시력이 저하되거나 실명의 장애를 동반하게 된다.

(3) 기술적 측면

- 천연물 원료나 자생식물을 활용한 예방 및 치료제의 경우, 민간치료나 전통의학에서 사용한 풍부한 경험과 자료가 축적되어 있고 이미 임상에 적용하였기 때문에 안전성이 입증되었음에도 불구하고 과학적인 실험 자료가 부족하고 또 자생식물의 분석 및 한약제의 품질 관리가 쉽지 않기 때문에 기능성 소재로의 경쟁력이 약하다.
- 천연물 내에 많은 성분이 복합적으로 존재하므로 인해 한 가지 뚜렷한 효능보다는 다양하고 점차적인 효능을 나타내는 경우가 많고, 전통 의약서에는 현대의 발전된 다양한 질병 및 증상의 개념보다는 음양에 의한 전반적인 개념으로 이해되고 있다.
- 지금까지의 농업 발전은 생산성 향상 위주로 품종개량 및 분자 육종 연구를 전형적으로 취하였으나 현재는 각종 성인병과 노령화사회의 문제에 직면하면서 예방 의학적 기능과 품질의 안전성을 증진시키는 농수산물 수요에 부응하는 방향으로의 변화가 일어나고 있음. 따라서 본 연구는 이에 합당한 결과를 얻으리라고 생각된다.
- 국내에는 눈건강에 도움이 될 수 있는 여러 가지 소재들이 존재하고 있으나 중소기업은 재원이 부족하여 좋은 연구결과물을 가지고도 사업화에 성공하기가 어려우므로 정부의 지원이 절대적으로 필요하다.
- 대기업들은 천연물을 이용한 기능성소재의 개발에 대해 소극적이므로 기술력을 가지고 있는 중소기업들을 적극적으로 지원하여 사업화에 성공할 수 있도록 견인하는 것이 필요하다.

제 3 절. 연구개발 범위

1. 연구개발 범위

가. 연구개발 대상물질의 성분 연구

- 1) 두릅과 창이자 추출물 제조
- 2) 두릅과 창이자의 기능/지표물질의 탐색
- 3) 두릅과 창이자의 지표물질에 대한 분석법 개발 및 분석법에 대한 Validation
- 4) 두릅과 창이자의 품질관리 기준 확보

나. 연구개발 대상물질(두릅과 창이자)의 비임상 효능 및 기전 규명

- 1) 기능성 소재의 후보물질인 두릅추출물, 창이자 추출물 등의 효능 확인
- 2) 기능성 소재의 후보물질인 두릅추출물, 창이자 추출물 등의 작용기전 연구
 - 사람 망막상피세포에서 기능성 소재의 항산화와 항염증 작용기전 연구
 - 당뇨동물모델을 이용하여 기능성 소재의 망막신경절세포의 방어기전연구
 - 기능성 소재의 에피제네틱 유전자변이에 미치는 영향분석

다. 연구개발 대상물질(두릅추출물)의 안전성 확보

- 1) 두릅과 창이자의 물질에 대한 안전성 확보 --잔류 농약, 중금속 등
- 2) 유전독성시험(복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험)
- 3) 4주DRF시험 및 13주 반복시험

라. 인체적용시험(두릅추출물)

두릅추출물을 대상으로 안구건조증에 대한 효능을 검증하기 위해 중앙대학교 병원에서 40명을 대상으로 인체 적용시험을 실시함. (대조군: 20명, 시험군: 20명)

마. 대량생산 공정 개발 및 생산(두릅추출물)

- 1) 대량생산 공정 개발
- 2) 제품디자인
- 3) 두릅추출물을 이용한 제품생산 외주가공
- 4) 두릅추출물을 활용한 눈건강제품 생산

바. 사업화 추진(두릅추출물)

- 1) 판매전략 수립 및 사업화 추진
- 2) 동물용 건강기능식품 시장 진출을 위한 제형개발

제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

연차별 연구개발의 목표 및 내용

1. 1차년도

연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2017 (주관)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구개발 대상물질의 안전성 평가 ○ 연구개발 대상물질 성분 분석 ○ 기준 및 시험법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 두릅추출물의 안전성평가 (유전, 4주DRF시험) - 두릅과 창이자의 기능/지표물질의 탐색 - 활성실험을 위한 분획 및 분리 물질 제공함 - 두릅과 창이자의 기능(지표)성분 분석 및 개발 - 두릅과 창이자의 지표물질에 대한 분석법 개발 및 분석법에 대한 Validation - 두릅과 창이자의 품질관리 기준 확보 - 두릅추출물에 대한 안전성 확보 --잔류 농약, 중금속 등
2017 (제1협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기준 규격 확립을 위한 컨설팅 	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성원료 기준 규격 확립 - 기능성근거 문헌정보 확보 - 원생약(원료물질)의 기원확립 - 제조방법 표준화 - 품질관리기준(기시) 설정
2017 (제2협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 신소재의 망막증 개선 효능 분석 ○ 기능성 신소재의 망막증 작용기전 분석 ○ 기능성 신소재의 안구건조증에 대한 효능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> - 사람망막세포주에서 에피제네틱 유전체 변이에 연구개발 대상물질이 미치는 영향에 관한 연구 1) 당뇨망막증과 황반변성의 주요 병환대상인 망막세포주에서 후성유전학적인 변이확인하고 두릅과 창이자추출물의 효능검증 - O-GlcNAcylation과 OGT발현변화 확인 - Clusterin promoter의 methylation확인 2) 망막변성의 주요원인인 염증에서 두릅과 창이자 추출물의 항염증기전 연구 - ROS생성억제 효능 및 기전확인 - OGT와 AMPK 작용을 통하여 항염증 억제 기전 연구 3) 안구건조증에서 두릅과 창이자추출물 효능 확인 - 렌즈세포의 세포사멸 조절기전 분석 - 항산화기능 확인

2. 2차년도

연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2018 (주관)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 신소재의 안전성 평가 ○ 활성분획으로부터 유효성분 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 두릅추출물에 대한 13주 반복독성시험 - 두릅추출물의 기능성분 분석 및 특성 규명 (분획 혹은 물질에 대한 규명) - 두릅추출물 활성 분획의 최적 분리조건 규명 및 대량 분리 - 두릅추출물 대량생산 공정 개발
2018 (제1협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체시험 진행 	<p>기능성입증을 위한 인체적용시험 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> - 임상요약서작성 및 MFDS사전상담 - SITE 선정 및 PI Matching - 임상Protocol 개발 - 임상수행(Monitoring, DM, SA) - 임상결과보고서(CSR)작성 및 제출
2018 (제2협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 신소재의 망막증 개선 효능 분석 ○ 기능성 신소재의 망막증 작용기전 분석 	<p>황반변성의 주된 원인세포인 인간망막세포주와 백내장의 원인세포인 렌즈세포주를 이용하여 항산화효능 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 세포주기와 세포사멸 분석을 통한 두릅과 창이자추출물의 효능 분석 - 두릅과 창이자 추출물의 분획분석을 통한 보다 효과적인 추출 및 투여용량 분석 - 추출물에서 혈중의 혈당과 지방의 양을 조절하는데 중요한 역할을 하는 OGT와 O-GlcNAcylation의 변화를 분석하여 새로운 기능의 신물질 개발

3. 3차년도

연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2019 (주관)	○ 기능성 신소재의 사업화 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 두릅추출물에 대한 제형 개발 - 외주가공 업체 발굴 및 선정 (GMP시설) - 두릅추출물 제품디자인 연구 - 두릅추출물을 이용한 시제품생산 - 원료의 수급 및 생산대책 수립
2019 (제1협동)	○ 개별인정신청을 위한 자료 확보	<p>건기식개별인정형 기능성원료 인정신청자료</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기능성원료 기원 자료 구비 - 원료의 특성 자료 구비 - 제조방법 자료 구비 - 기준및시험방법 자료 구비 - 안전성관련 자료 구비 - 기능성 관련 자료 구비 - 유해물질 관련 자료 구비 - 섭취량 관련 자료 구비 - 국내외 인정 및 사용현황 자료 구비
2019 (제2협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 신소재의 눈건강 개선 효능 분석 ○ 작용기전 분석 	<p>당뇨망막과 백내장 원인 세포주에서 두릅과 창이추출물의 투여에 따른 망막과 렌즈신경세포에서 항암과 항염증을 비롯한 새로운 효능물질 발굴</p> <ul style="list-style-type: none"> - 이 두가지 물질에서 추출한 Flavonoid와 polyphenol 등의 phytochemical을 투여하여 이들이 epigenetic change를 억제 또는 예방하는지를 확인. - OGT - antagonist를 비롯한 억제제를 이용하여 염증억제를 통한 당뇨망막증의 발병억제의 예방 및 치료가능 확인.

제 1 절. 연구개발 대상물질의 성분 및 분석법연구

1. 두릅추출물과 창이자추출물 제조

가. 원료

두릅: 경기도 가평군의 농가에서 확보한 두릅나무를 원료로 사용하였다.

창이자: 경동시장에서 국산과 중국산을 각각 구매한 것을 사용하였다.

나. 두릅추출물(MDF101) 제조

제조 공정의 각 단계별 조건을 확립하여 표준화된 제조방법은 아래와 같다. 두릅나무는 속이 스펀지처럼 되어 있는 구조라서 절단하는 것이 분쇄하는 것보다 수율이 높았다. 일반적으로는 원료를 분쇄하는 것이 절단하는 것에 비해 표면적이 넓어 추출 수율이 올라가는데 두릅의 경우에는 두릅나무의 특성 때문에 반대의 결과가 도출되었다.

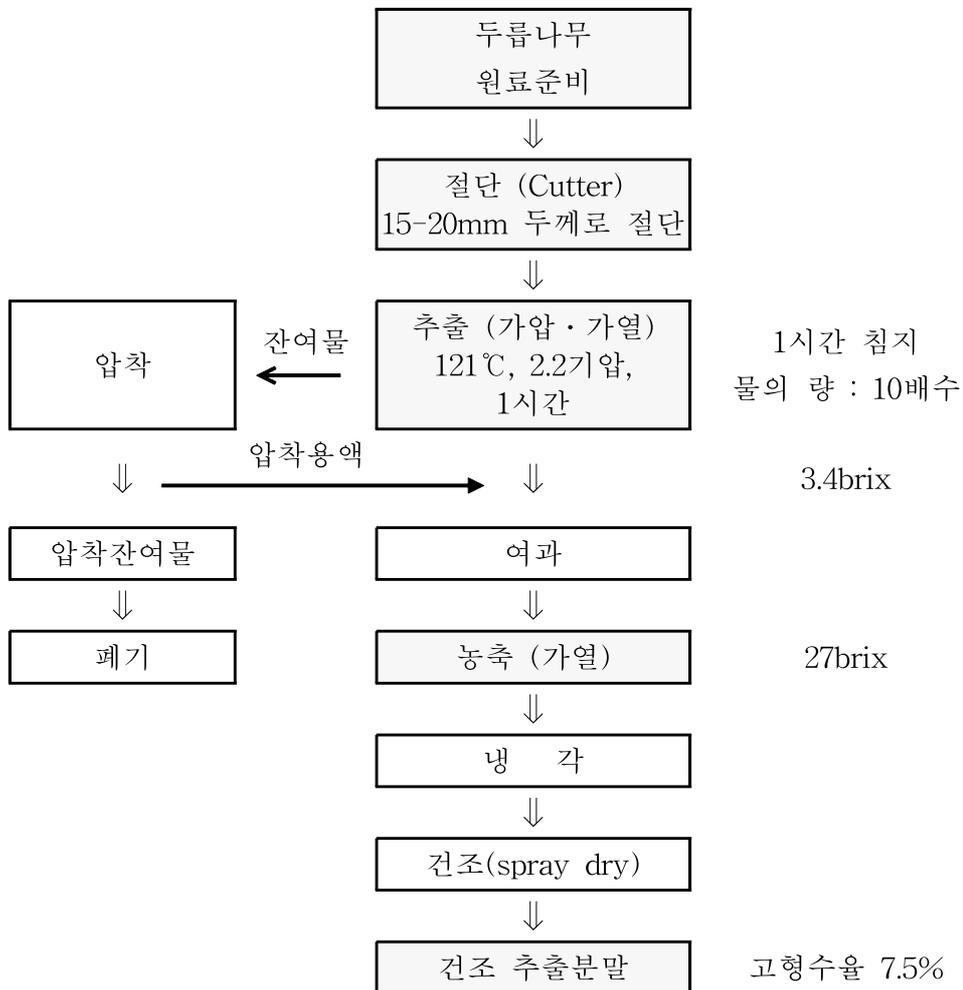


그림 1. 두릅추출분말 제조 공정.

다. 창이자추출물(Xan-C: 중국산 및 Xan-K: 국산) 제조

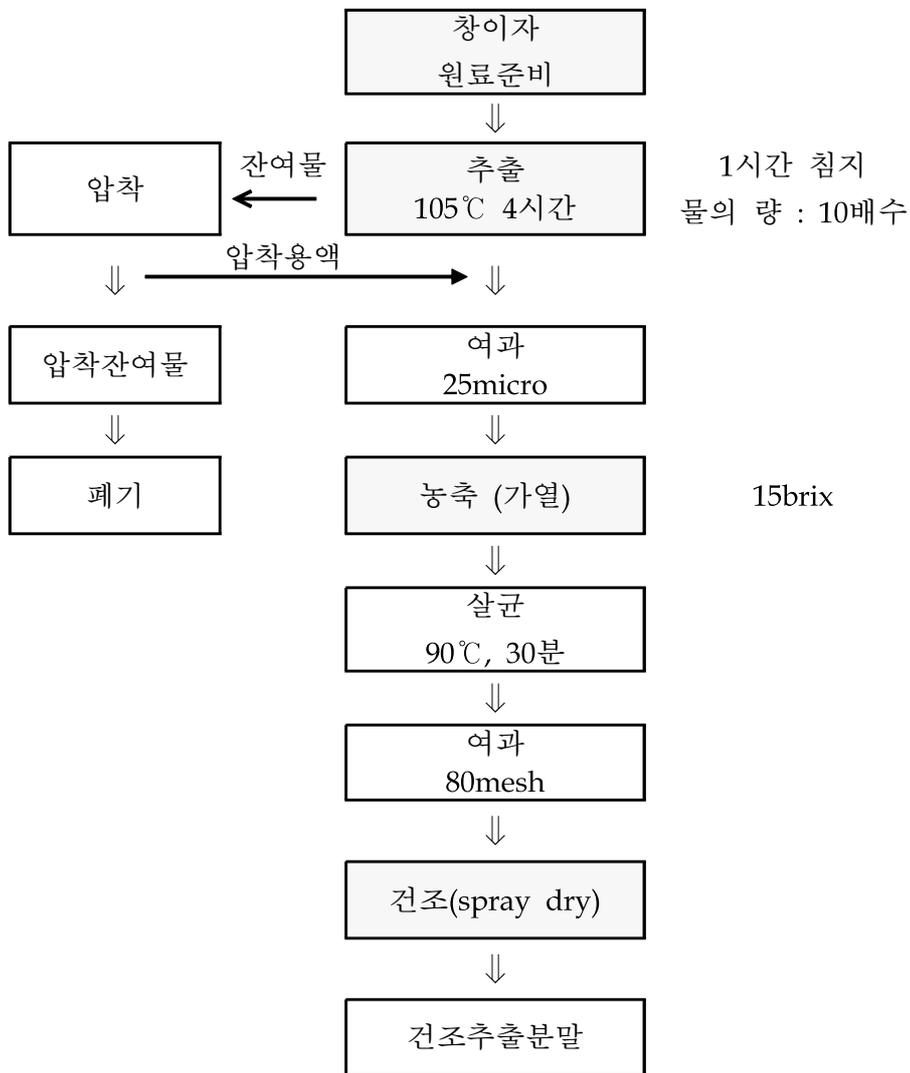


그림 2. 창이자추출분말 제조 공정.

2. 두릅추출물과 창이자 추출물의 분획 제조

가. 두릅추출물(MDF101)과 창이자 추출물을 다음의 그림 3과 같이 용매추출법에 의해 4가지 분획, 즉 Chloroform층, Ethyl acetate층, Butanol층, 물층의 4가지 분획으로 나누어 조사하였다.

나. 창이자 추출물로부터 얻어진 분획의 수율은 dichloromethane층이 1.0%, ethylacetate 층이 4.7%, butanol 층이 17.9%, 물 층이 76.4%였다.

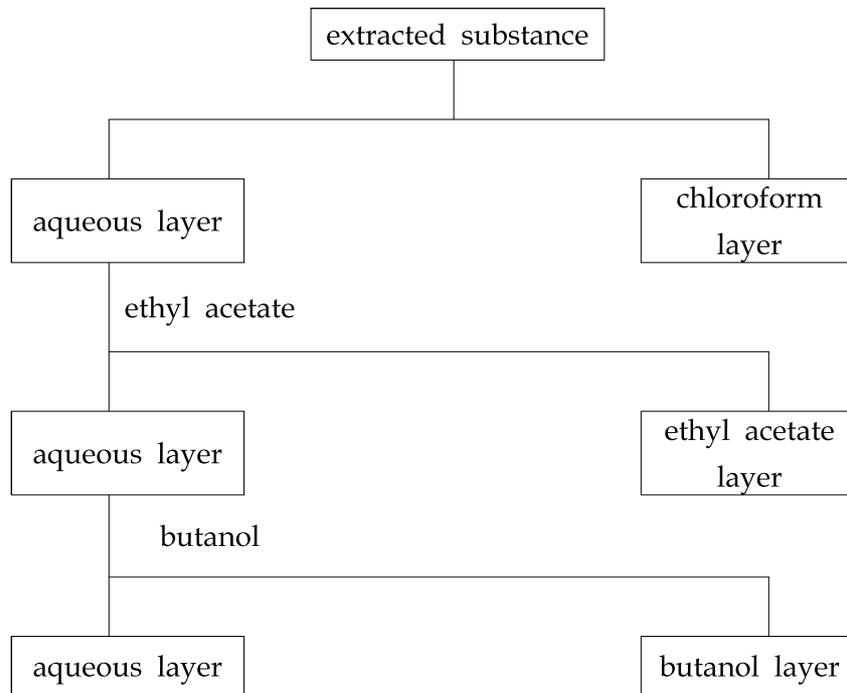


그림 3. 추출물로부터 solvent extraction method에 의한 분획제조

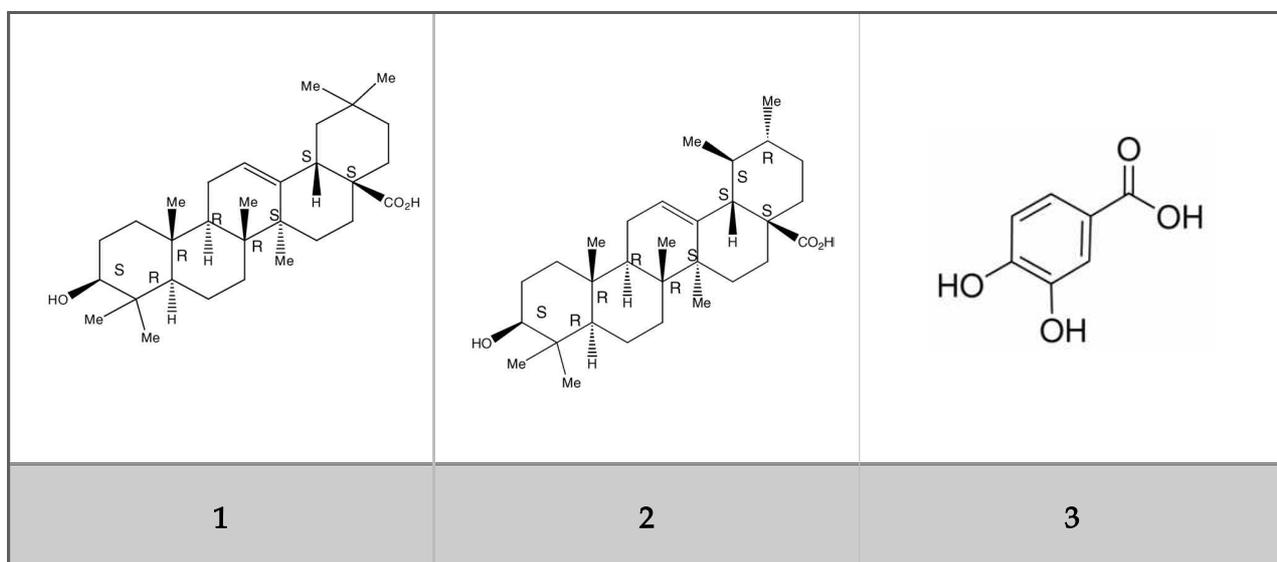
3. 두릅추출물(MDF101)의 성분 분석

- 1) 시료 : 두릅추출물(MDF101)은 냉장보관 후 실험에 사용하였다.
- 2) 시약 : Column chromatography의 packing material은 Kieselgel 60(70-230 mesh, Art. 7734, 230-400 mesh, Art. 9385, Merck, Germany)와 Sephadex LH-20(Bead size 25-100 μm , Pharmacia, Sweden)을 사용하였다.
- 3) 추출 및 농축 : 재료의 추출은 건조된 시료 10g을 70% Ethanol 수용액으로 80°C에서 1시간동안 추출하였고, 뜨거울 때 여과하여 남은 잔사를 동일한 조건에서 1회 및 2회 더 반복 추출하여 여과하였다. 여과하여 얻은 재료의 추출물은 회전식 감압농축기로 농축시켰다.
- 4) 추출물의 용매분획 : **두릅추출물(MDF101)** 6.0 kg을 70% EtOH로 추출하여 감압 농축하여 70% EtOH extract를 얻은 후, 이를 *n*-hexane, CHCl_3 , EtOAc 및 *n*-BuOH, aqueous soluble fractions으로 계통 분획하였다. 이 중 CHCl_3 및 EtOAc soluble fractions을 silica gel 및 sephadex LH-20 column chromatography를 반복 수행하여 화합물 1-9을 순수 분리한 후, 화학구조를 규명하였다.
- 5) 화합물의 분리 : 가용성 용매분획물 중 CHCl_3 (15g) 및 EtOAc soluble fraction(12g)을

MeOH에 용해시킨 후 시료 2배량의 silica gel에 현탁시킨 후, 농축, 건조시켜 곱게 갈아체에 걸러서 컬럼 분리용 시료를 제조하였다. 화합물의 분리를 위해 open column chromatography를 수행하였다. 먼저 silica gel을 충전제로 사용하여 column chromatography를 수행하였다. Column은 직경 5cm, 높이 100cm인 것을 사용하였으며 컬럼에 CHCl₃을 넣어 shaking한 silica gel을 40cm 높이로 충전하여 packing하고 파우더 형태로 만든 시료를 4cm 높이로 loading하였다. 고무망치를 이용하여 column내의 기포를 완전히 제거한 후, CHCl₃:MeOH 용매의 비율을 100:0에서부터 100:1, 98:2, 95:5, 92:8, 88:12로 순차적으로 극성을 높여주며 용출하였고, 각 분획물의 elution 속도는 200ml/hr의 속도로 균일하게 용출하였다. 용출된 분획물을 TLC plate에 전개시켜서 유사한 TLC pattern을 보인 subfraction을 re-column chromatography를 수행하였다. 이때 사용된 용출용매는 CHCl₃:MeOH(100:0~70:10)이었으며 유사한 TLC pattern을 보인 subfraction을 합하여 감압 농축한 농축물을 얻었다. 이어서 세분획물에 대해 다시 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여, TLC pattern이 동일한 fraction에서 화합물을 단리하였다.

6) 기기분석 : 분리된 화합물의 용점은 Mitamura-Riken melting point apparatus를 사용하여 측정하였으며, UV spectrophotometer는 Hitachi 3100 UV-vis spectrophotometer를 사용하였고, FT-IR은 JASCO FT-IR-5300 spectrophotometer를 사용하였다. ¹H-NMR과 ¹³C-NMR은 Bruker CXP-300 spectrophotometer를 사용하였고, 측정 시 CDCl₃ 및 DMSO-d₆에 용해시켜 측정하였으며, TMS를 internal standard로 사용하였다. FAB-MS는 JMS 700 spectrometer를 사용하였다.

7) 화합물의 화학구조 규명 : 분리된 화합물을 FT-IR, UV/Vis, MS, 1D-NMR 및 2D-NMR 분석을 통해 확보된 각각의 spectral data 및 문헌치와 비교하여 분리된 화합물의 화학구조를 Oleanolic acid(1), Ursolic acid(2), 3,4-Dihydroxy benzoic acid(3), Chlorogenic acid(4), Kaempherol(5), Quercetin(6), Hyperoside(7), Gallic acid(8), Kaulenoic acid(9)로 규명하였다.



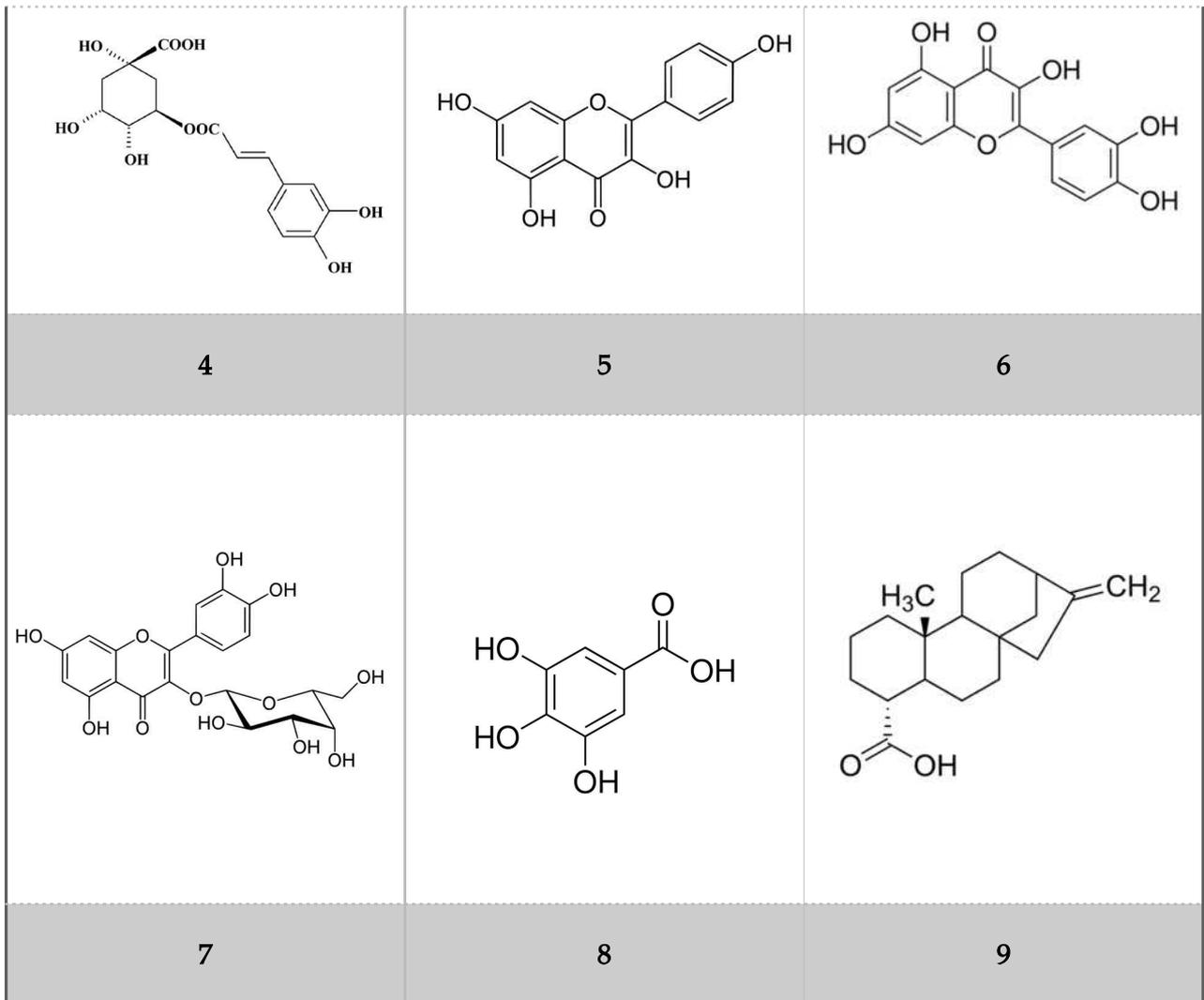


그림 4. 두릅추출물의 성분

4. 두릅추출물(MDF101)의 기능/지표물질 탐색

두릅추출물(MDF101)에 함유되어 있는 여러 가지 물질 중 문헌과 TLC 등 기초자료들을 토대로 하여 Triterpenoid계통의 물질인 Oleanolic acid(1)와 Ursolic acid(2)과 Phenol성 물질들인 3,4-Dihydroxy benzoic acid(3)와 Chlorogenic acid(4)가 기능을 나타내는데 중요한 물질인 것으로 판단하여 두가지 계통의 물질들을 지표물질로 설정하는 것이 가능한지를 확인하기 위한 분석을 실시하였다.

가. Oleanolic acid(1), Ursolic acid(2)의 분석

1) 아래와 같이 표준액과 시료를 조제하여 HPLC로 분석하였다.

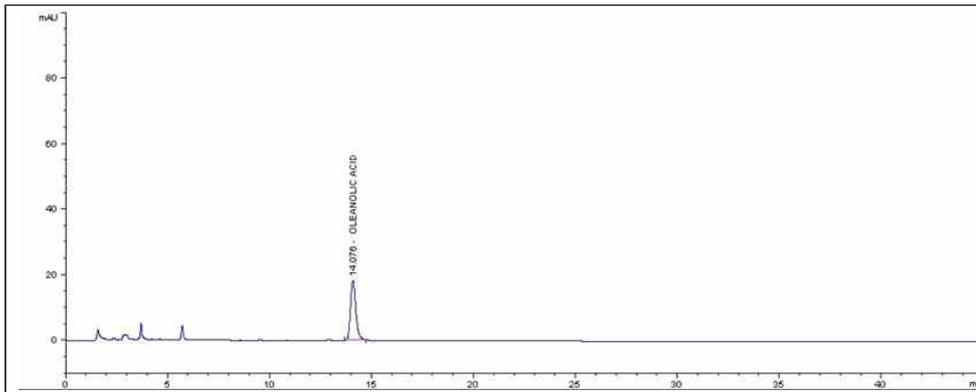
표준액	Oleanolic acid 표준품 1 mg + 메탄올 10 mL Ursolic acid 표준품 1 mg + 메탄올 10 mL
시료 조제	MDF101 열수 추출물 제조 MDF101 70% ethyl alcohol 추출물 제조(AE-73) MDF101 70% ethyl alcohol 추출물의 분획 : EtOAc 가용성 분획(AE-78)

2) 분석조건

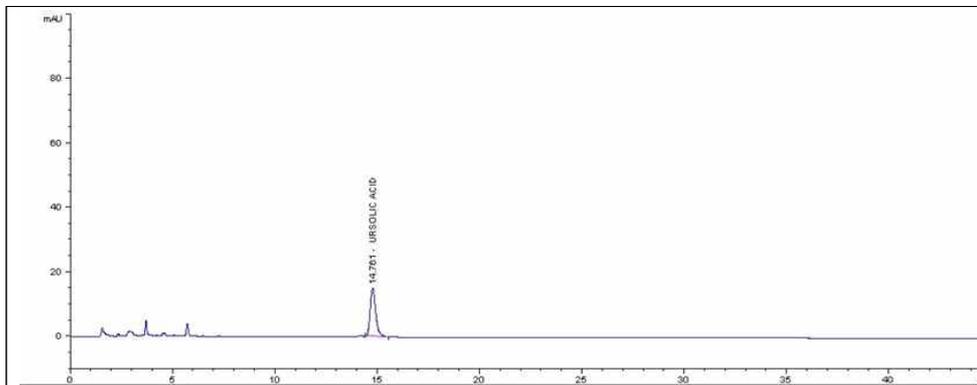
검출기	자외부 흡광광도계(측정파장 215 nm)
컬럼	SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG 120(5 μm, 4.6mmx150mm)
이동상	0.1 % 인산 · 아세트니트릴혼합액(20 : 80)
유속	1.0 mL/min

3) HPLC 분석 결과

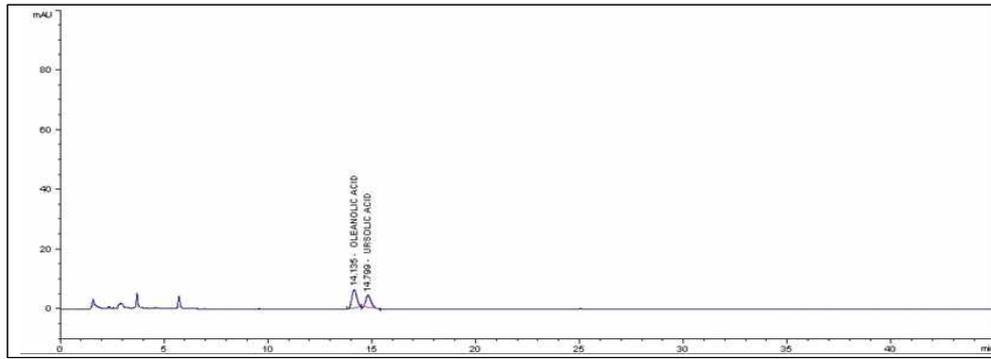
가) Oleanolic acid



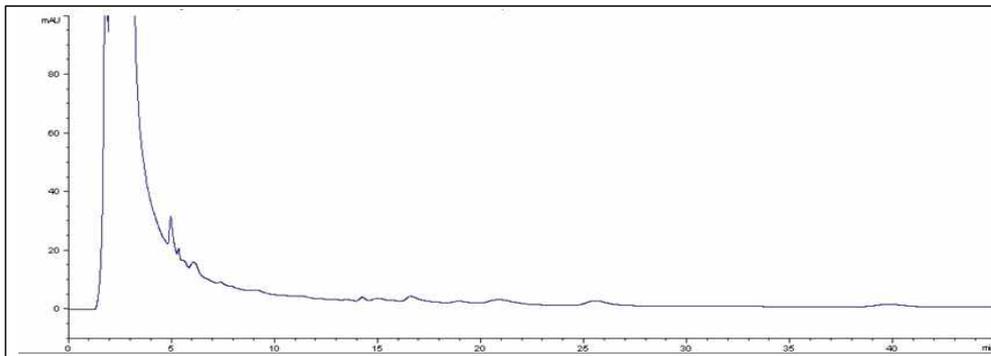
나) Ursolic acid



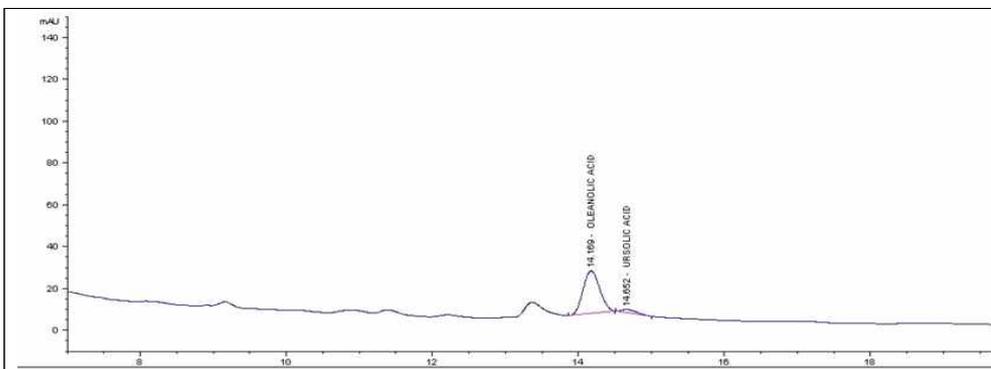
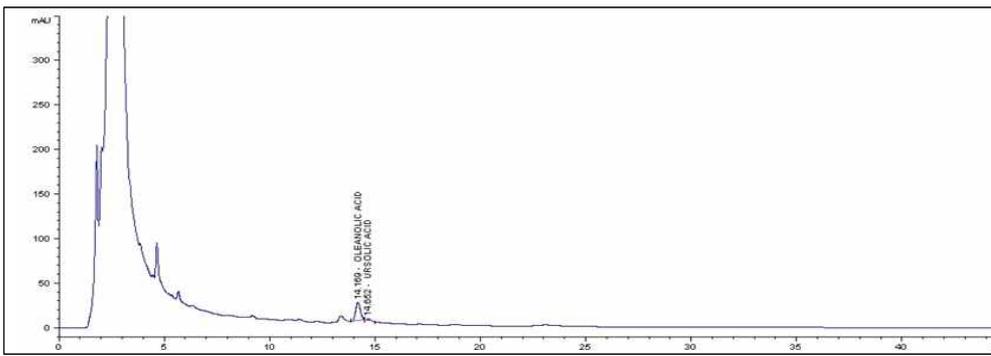
다) Standard mixture (oleanolic acid와 ursolic acid)



라) AE-73



마) AE-78



	AE-73	AE-78
Oleanolic acid	불검출	1.0396 %
Ursolic acid	불검출	0.0801 %

- HPLC 분석 결과 두릅추출물(MDF101)의 EtOAc 가용성 분획물(AE-78)에서는 oleanolic acid가 1.0396%의 포함되어있는 것으로 확인되었으며, ursolic acid는 0.0801% 존재하는 것으로 확인되었다.
- 두릅추출물(MDF101)의 70% ethyl alcohol 추출물(AE-73)에서는 oleanolic acid 및 ursolic acid가 존재하지 않는 것으로 확인되었다.
- MDF101 EtOAc 가용성 분획물에서 존재가 확인된 화합물인 oleanolic acid는 대표적인 C₃₀ triterpenoid로서 5개의 ring이 연결된 pentacyclic 형태이며, C-12에 한 개의 double bond와 C-17에 COOH가 위치하고 있다. ursolic acid는 oleanolic acid와 구조적으로 매우 유사하고 C-19, C-20의 methyl 치환만이 다르다. 이들 화합물은 구조적인 유사성으로 인해 매우 유사한 물리화학적 특징을 지니고 있다.

나. 3,4-Dihydroxy benzoic acid(3)와 Chlorogenic acid(4)의 분석

- 1) 두릅추출물(MDF101)을 HPLC로 분리하기 위하여 10 mg/ml의 농도로 물에 녹여 추출물 용액 10 μ l를 취하여 HPLC로 다음과 같은 조건하에서 분석하였다. 그 결과, phenol 성 물질 중 3,4-Dihydroxy benzoic acid(3)과 Chlorogenic acid(4)가 그림과 같이 검출되었다.

2) 분석조건

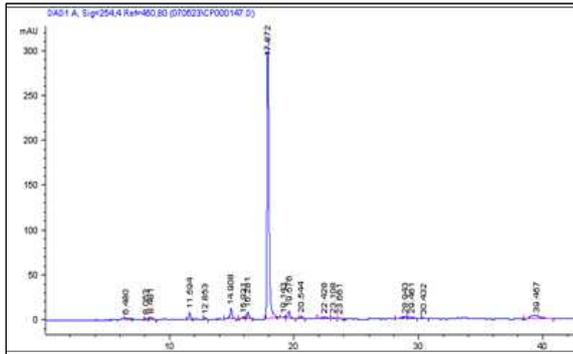
항 목	분 석 조 건
검출	photodioid array detector로 254 nm, 366 nm에서 측정
칼럼	Luna 5u C18; 4.6 mm i.d. × 250 mm L (Phenomenex)
이동상	2% 아세트산과 메탄올의 구배 시스템
유속	1 ml/min

3) HPLC 분석 결과

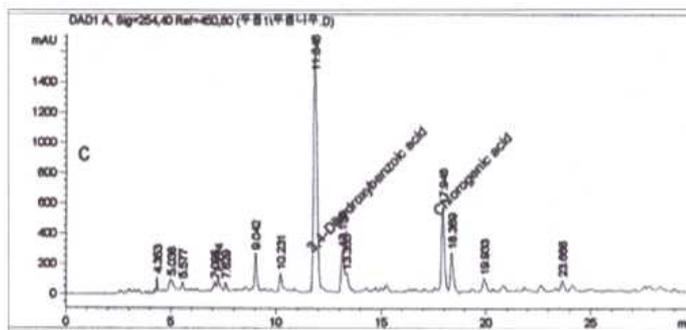
- 두릅 추출물을 분석한 결과, phenol 성 물질들이 위의 조건에서 단일 peak로 잘 분리되었다. 3,4-Dihydroxy benzoic acid는 254 nm의 파장에서 peak로 검출되었고 retention time은 12분대였으며, Chlorogenic acid도 254 nm의 파장에서 검출되었고 retention time은 17분대인 것으로 관찰되었다. 반면, 366 nm에서 CFA의 peak이 잘 분리되어 검색되었는데,

retention time은 18분대인 것으로 확인되었다.

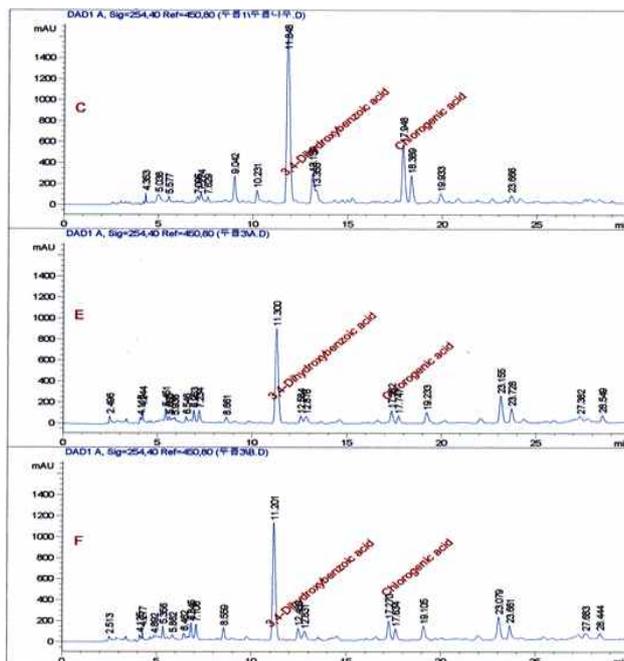
가) Phenol성 물질중 Chlorogenic acid의 표준품 크로마토그램 (Rt: 17.872min)



나) 두릅 추출물의 HPLC profile(at 254nm wave length).



- 두릅추출물에서는 아래의 HPLC profile에서 볼 수있듯이 3,4-Dihydroxy benzoic acid(3)와 Chlorogenic acid(4)가 3개의 batch로 생산된 두릅추출물 원료에서 모두 확인되어 지표물질로서 적합한 것으로 판정하였다.



다. 두릅추출물의 분획의 특성

두릅의 추출물(가지부위)을 용매 추출법에 의하여 Chloroform층, Ethyl acetate층, Butanol층, 물층의 4가지 분획으로 나누어 조사한 결과는 다음과 같다.

1) Chloroform 층

두릅의 Chloroform층을 대상으로 TLC를 실시한 결과 ferulic acid와 유사한 물질이 포함되어 있는 것으로 확인되었다. 또한 phenol 성 물질, 약간의 flavonoid 물질 그리고 소량의 sapogenin 성분이 함유되어 있음을 확인하였다.

2) Ethylacetate 층

두릅의 Ethylacetate층을 TLC로 조사한 결과 phenolic compounds가 많이 함유되어 있고 다음과 같은 조건하에서 HPLC로 분석한 결과 DHBA의 함량이 높은 것을 확인하였다 (16.44%).

가) 분석조건

항 목	분 석 조 건
검출	photodioid array detector로 254 nm, 366 nm에서 측정
칼럼	µbondapak C ₁₈ (3.9×300mm) / 40℃
이동상	ACN/H ₂ O (15:85)--->ACN/H ₂ O (80:20)(70min)
유속	1 ml/min

나) HPLC분석 결과: 두릅 추출물 ethylacetate 층의 PHLC profile

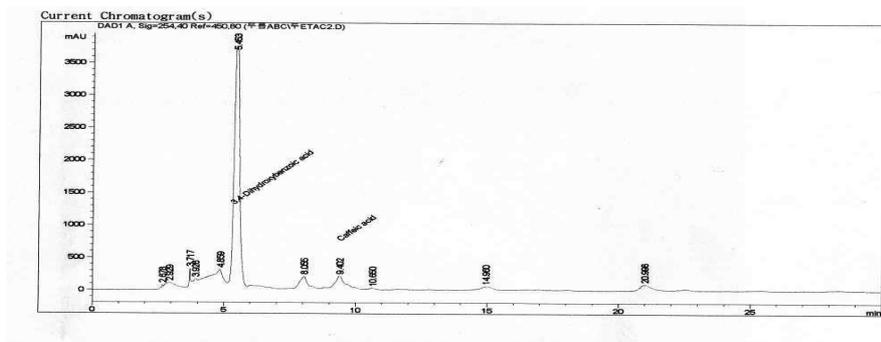


표. 두릅 추출물 ethylacetate 층의 phenol성 성분 함량

두릅 EtoAc층	3,4-DHBA		Caffeic acid	
	RT	%	RT	%
	5.453	16.44	9.402	1.21

3) 두릅의 Butanol 층 분석

TLC와 HPLC로 분석한 결과, 위의 표와 그림에 나타난 바와 같이 DHBA, CLA, gallic acid, coumarin과 같은 페놀성 물질이 검출되었다. 두릅의 Butanol층에는 chlorogenic acid가 가장 함량이 높았다 (1.78%).

가) 분석조건

항 목	분 석 조 건
검출	photodioid array detector로 254 nm, 366 nm에서 측정
칼럼	µbondapak C ₁₈ (3.9×300mm) / 40℃
이동상	2%acetic acid : MeOH = 10 : 0 ---> 2 : 8 (30min)
유속	1 ml/min

나) HPLC분석 결과: 두릅 추출물 butanol 층의 PHLC profile

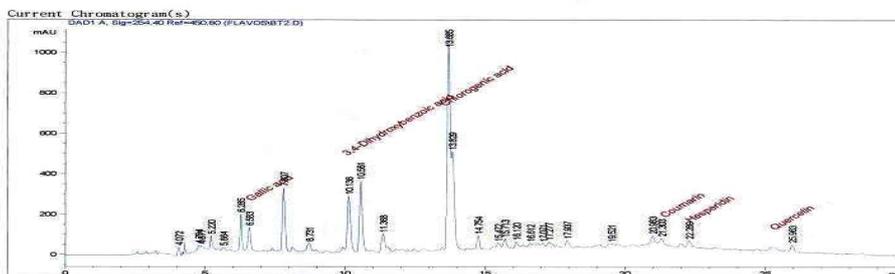


표. 두릅 추출물 butanol 층의 phenol성 성분 함량

	Gallic acid		3,4-DHBA		Chlorogenic acid		Coumarin		Hesperidin		Quercetin	
	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%
두릅 BuOH 층	6.58	0.44	10.14	0.17	13.69	1.78	21.30	0.06	22.29	0.15	25.96	0.07

다. 두릅추출물의 지표물질 설정

- Phenolic compounds외에 triterpenoids에 속하는 oleanolic acid와 Ursolic acid, saponin, esculetin, β-sitostenol 등의 물질들도 지표물질로서의 가능성을 조사하였으나 oleanolic acid와 Ursolic acid, saponin, esculetin, β-sitostenol 등의 물질들이 batch에 따라 일관성 있게 검출이 되지 않았다.
- 따라서 phenolic compounds 중 함량이 높은 Chlorogenic acid와 3,4-Dihydroxybenzoic acid (Protocatechuic acid) 두릅추출물(MDF101)의 지표물질로 선정하였다.
- 문헌조사 결과 Chlorogenic acid, 3,4-Dihydroxybenzoic acid (Protocatechuic acid)는 백내

장 유발과 관련된 효소인 aldose reductase inhibitor로서의 작용이 우수하고, 당뇨성 망막 증 모델에서 망막의 ganglion cell의 사멸을 억제하는 효능이 탁월한 것으로 확인되었다.

- 그러므로 Chlorogenic acid, 3,4-Dihydroxybenzoic acid (Protocatechuic acid)는 지표물질 이면서 동시에 기능성물질임이 확인되었다.

5. 창이자추출물(Xan)의 기능/지표물질 탐색

- 창이자추출물의 지표물질은 문헌 조사 결과를 토대로 하여 TLC와 HPLC 분석결과를 종합하여 기능/지표물질을 탐색하였다.
- 창이자 추출물도 두릅추출물과 같이 phenolic compounds가 많이 함유되어 있어서 여러 가지 성분들을 탐색하였는데 창이자 추출물에서는 Caffeic acid와 Chlorogenic acid가 함량이 높고 일관성이 있어서 지표물질로 선정되었다.
- 지표물질로 선정된 Caffeic acid와 Chlorogenic acid가 문헌조사를 통해 기능성분임을 확인하였다.

6. 두릅추출물(MDF101)의 지표물질 분석 및 분석법 validation

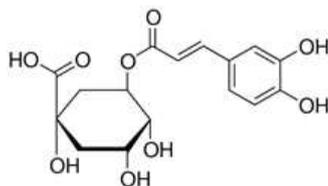
가. 개요.

- HPLC로 분석한 결과들을 토대로 하여 민감도가 더 높은 LC-MS로 분석을 실시하고 분석법 validation을 진행하였다.
- 두릅추출물(MDF101)에서 지표물질로 설정된 Chlorogenic acid와 3,4-Dihydroxybenzoic acid (Protocatechuic acid)를 분석하고 분석법 validation을 진행하였다.

나. 재료 및 방법

1) 분석표준물질

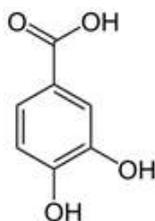
시험물질명	: Chlorogenic acid
CAS No.	: 327-97-9
Lot No.	: EBWZE
분자식	: C ₁₆ H ₁₈ O ₉
분자량	: 354.31 g/mol
구조식	:



순도 : 98.0 %
보관조건 : 실온(1 ~ 30 °C)
제조원 : TCI CO., LTD.

2) 분석표준물질

시험물질명 : 3,4-Dihydroxybenzoic acid
CAS No. : 99-50-3
Lot No. : QWKRO
분자식 : C₇H₆O₄
분자량 : 154.12 g/mol
구조식 :



순도 : 98.0 %
보관조건 : 실온(1 ~ 30 °C)
제조원 : TCI CO., LTD.

3) 재료

Methanol: Merck, HPLC grade
Water: Deionized water
Ammonium acetate: JUNSEI, Guaranteed Reagent

4) 기기

Balance: OHAUS, EX225D_AD, USA
Sonicator: HWASHIN TECH, Powersonic420, Korea
Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS): WATERS, ACQUITY TQD Tandem Quadrupole UPLC/MS/MS System, USA
Water purification system: YL INSTRUMENT, Aquamax basic 361, 372 series, Korea

5) 기기조건확립

가) 표준용액의 조제
- Chlorogenic acid

표준품 0.01020 g 을 칭량하여 10 mL 의 methanol 용액으로 용해하여 1000 mg/L 수준의 저장표준용액을 조제한 후, 기기조건 확인을 위하여 1 mg/L 의 표준용액을 조제하였다. 또한, 검량선 측정을 위하여 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L 의 표준용액을 조제하였다.

- 3,4-Dihydroxybenzoic acid

표준품 0.01020 g 을 칭량하여 10 mL 의 methanol 용액으로 용해하여 1000 mg/L 수준의 저장표준용액을 조제한 후, 기기조건 확인을 위하여 1 mg/L 의 표준용액을 조제하였다. 또한, 검량선 측정을 위하여 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L 의 표준용액을 조제하였다.

나) 기기조건

시험물질 표준용액을 이용하여 시험물질의 머무름 시간대에 간섭물질이 없는 LC-MS 기기조건을 아래와 같이 확립하였다

Instrument	: ACQUITY TQD Tandem Quadrupole UPLC/MS/MS System		
Detector	: Mass spectrometry		
Column	: Hypersil GOLD(150 mm x 2.1 mm, 1.9 μm)		
Column temp.	: Ambient		
Mobile phase	: Time	10 mM Ammonium acetate	10 mM Ammonium acetate in MeOH
	0.00	90.0	10.0
	1.00	90.0	10.0
	10.00	10.0	90.0
	11.00	90.0	10.0
	15.00	90.0	10.0
Flow rate	: 0.2 mL/min		
Ionization mode	: ES-		
MRM data(Cone Volt.)	: Chlorogenic acid - 353.09(32)		
	: 3,4-Dihydroxybenzoic acid - 152.96(34)		
Molecular ionization	: [M-H] ⁻		
Injection volume	: 5 μL		

다) 검출한계

표준품의 검출한계(LOD: Limit of detection) 확인을 위하여 10 mg/L 수준의 표준용액을 5 반복 측정하여 다음과 같은 식으로 검출한계를 계산하였다.

$$\text{검출한계} = \frac{3s(\text{RRF SD})}{\text{Response Factor}}$$

$$= \frac{3 \times 1341.66}{10627.7} = 0.379 \text{ mg/L(Chlorogenic acid)}$$

$$= \frac{3 \times 250.494}{58878.1} = 0.0128 \text{ mg/L(3,4-Dihydroxybenzoic acid)}$$

라) 정량한계

표준품의 정량한계(LOQ: Limit of quantification) 확인을 위하여 100 mg/L 수준의 표준 용액을 5 반복 측정하여 다음과 같은 식으로 정량한계를 계산하였다.

$$\text{정량한계: } \frac{10s(\text{RRF SD})}{\text{Response Factor}}$$

$$= \frac{10 \times 1341.66}{10627.7} = 1.26 \text{ mg/L(Chlorogenic acid)}$$

$$= \frac{10 \times 250.494}{58878.1} = 0.0425 \text{ mg/L(3,4-Dihydroxybenzoic acid)}$$

마) 직선성

- Chlorogenic acid

검량선 표준용액에 대한 직선성은 검량선으로부터 회귀식을 산출하여 상관계수(R)가 0.99 이상을 만족하여야 하며, Chlorogenic acid 표준용액을 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L를 사용하여 확인하였다.

- 3,4-Dihydroxybenzoic acid

검량선 표준용액에 대한 직선성은 검량선으로부터 회귀식을 산출하여 상관계수(R)가 0.99 이상을 만족하여야 하며, 3,4-Dihydroxybenzoic acid 표준용액을 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L 를 사용하여 확인하였다.

바) 특이성 확인

시험용액 분석시 시험물질 이외의 불순물에 대한 간섭여부를 대조군 시료와 비교하여 동일한 머무름 시간대에 불순물 peak의 면적이 시험물질 대비 5 % 미만을 만족하여야 하며, 해당 시험물질에 대한 추출용액(methanol)을 이용하여 0.1 mg/L 농도의 표준용액과 비교 분석하였다.

사) 함량분석

시험물질(MDF101)중 Chlorogenic acid 및 3,4-Dihydroxybenzoic acid의 함량분석을 위하여 시험물질 0.01000 g을 methanol 용액 10 mL 에 용해시킨 후 60 °C 에서 한 시간동안 증탕하였다.

시험용액을 0.2 μm 시린지필터(Labogene_Germany)를 사용하여 여과 후, 확립된 분석법에 따라 3 반복으로 정량분석을 실시하였다.

아) 결과계산

시험용액 중 지표물질(Chlorogenic acid 및 3,4-Dihydroxybenzoic acid)의 농도는 기기분석 chromatogram의 peak 면적을 기준으로 표준 검량선을 작성하여 회귀방정식 및 시료의 희석배수를 고려하여 최종적으로 산출하였다.

① 검량선식 산출

지표물질의 정량은 외부표준법에 의하여 수행하며, 검량선 작성을 위한 표준용액을 기기분석을 수행한 결과로부터 chromatogram의 peak area를 y축에 두고 주입한 지표물질의 농도(mg/L)를 x축에 두어 검량선을 작성한 후 검량선식을 산출하였다.

$$x = \frac{y - a}{b} \dots\dots\dots \text{(equation 1)}$$

- x : 기기분석시 주입한 시험용액의 농도(mg/L)
- y : Peak area
- a : 검량선의 y 절편
- b : 검량선의 기울기

② 시험물질 정량

시험용액 중 지표물질의 정량 결과는 다음 식으로부터 계산 하였다.

$$c = \frac{x}{f} \dots\dots\dots \text{(equation 2)}$$

- c : 시험용액 중 지표물질의 농도(mg/L)
- x : equation 1 에 의해 산출된 지표물질의 농도(mg/L)
- f : 시험용액 농축계수

③ 함량 계산

시험물질 중 지표물질의 함량은 분석 정량 값으로부터 다음과 같이 계산하였다.

$$P = \frac{c \times l}{a} \times 100 \dots\dots\dots \text{(equation 3)}$$

- P : 시험물질 중 지표물질의 함량(%)
- c : equation 2 에 의해 산출된 지표물질의 농도(mg/L)
- l : 샘플(시험용액) 조제용량(L)
- a : 샘플(시험물질) 양(mg)

다. 시험결과

1) 직선성 확인시험

가) Chlorogenic acid

검량선 표준용액에 대한 직선성은 Chlorogenic acid 표준용액 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L를 사용하여 확인하였으며, 분석기기로 분석한 peak area를 기준으로 표준 검량선으로부터 산출된 회귀방정식의 상관계수(r)는 0.990388로 직선성이 양호하였다.

나) 3,4-Dihydroxybenzoic acid

검량선 표준용액에 대한 직선성은 3,4-Dihydroxybenzoic acid 표준용액 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L를 사용하여 확인하였으며, 분석기기로 분석한 peak area를 기준으로 표준검량선으로부터 산출된 회귀방정식은 2차방정식으로 나타났으며, 결정계수(r^2)는 0.998857로 직선성이 양호하였다.

2) 특이성 확인

특이성은 추출용매인 control 시료(methanol)를 이용하여 각각의 0.1 mg/L 수준의 표준용액과 분석 비교하였고, 그 결과 chromatogram상의 시험물질이 확인되는 구간에서 간섭물질의 peak가 나타나지 않아 적합하였다.

3) 함량분석

시험물질(MDF101) 중 Chlorogenic acid 및 3,4-Dihydroxybenzoic acid 의 함량분석 결과 MDF101에서 Chlorogenic acid 및 3,4-Dihydroxybenzoic acid가 각각 4.64 및 3.94 mg/L 로 검출되었으며, 함량 계산식에 의하여 각각 0.464 및 0.394 % 가 함유되어 있었다.

라. 결론

시험물질(MDF101) 중 Chlorogenic acid 및 3,4-Dihydroxybenzoic acid 의 함량분석을 위하여 각각의 시험물질 0.01 g 을 methanol 용액 10 mL 을 이용하여 60 °C 에서 한 시간 동안 열탕추출 후 정량분석한 결과 Chlorogenic acid 및 3,4-Dihydroxybenzoic acid 의 함량은 다음과 같았다.

Table 1. Amount of Chlorogenic acid in test solution

Product	Replicate	Measured concentration (mg/L)	Mean ± SD ^a (mg/L)
MDF101-A	1	4.8048	4.64 ± 0.16
	2	4.6108	
	3	4.4983	

^a: Standard deviation

Table 2. Amount of 3,4-Dihydroxybenzoic acid in test solution

Product	Replicate	Measured concentration (mg/L)	Mean ± SD ^a (mg/L)
MDF101	1	4.0168	3.94 ± 0.07
	2	3.9275	
	3	3.8863	

^a: Standard deviation

시험물질	지표성분	함량(%)	함량(g/kg)
MDF101	Chlorogenic acid	0.464	4.64
	3,4-Dihydroxybenzoic acid	0.394	3.94

6. 창이자추출물(Xan)의 지표물질 분석 및 분석법 validation

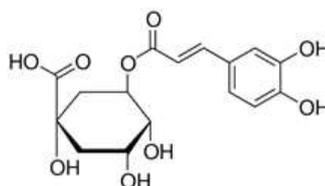
가. 개요.

- HPLC로 분석한 결과들을 토대로 하여 민감도가 더 높은 LC-MS로 분석을 실시하고 분석법 validation을 진행하였다.
- 창이자추출물(Xan)에서는 지표물질로 설정된 Chlorogenic acid와 Caffeic acid에 대한 분석을 진행하고 분석법 validation 수행하였다.

나. 재료 및 방법

1) 분석표준물질

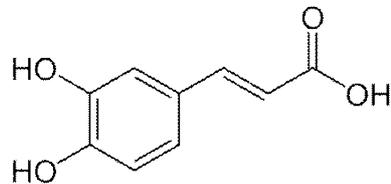
시험물질명	: Chlorogenic acid
CAS No.	: 327-97-9
Lot No.	: EBWZE
분자식	: C ₁₆ H ₁₈ O ₉
분자량	: 354.31 g/mol
구조식	:



순도 : 98.0 %
보관조건 : 실온(1 ~ 30 °C)
제조원 : TCI CO., LTD.

2) 분석표준물질

시험물질명 : Caffeic acid
CAS No. : 331-39-5
Lot No. : IXHNL
분자식 : C₉H₈O₄
분자량 : 180.16 g/mol
구조식 :



순도 : 98.0 %
보관조건 : 실온(1 ~ 30 °C)
제조원 : TCI CO., LTD.

3) 재료

Methanol: Merck, HPLC grade
Water: Deionized water
Ammonium acetate: JUNSEI, Guaranteed Reagent

4) 기기

Balance: OHAUS, EX225D_AD, USA
Sonicator: HWASHIN TECH, Powersonic420, Korea
Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (LC-MS/ MS):
WATERS,
ACQUITY TQD Tandem Quadrupole UPLC/MS/MS System, USA
Water purification system: YL INSTRUMENT, Aquamax basic 361, 372 series, Korea

5) 기기조건 확립

가) 표준용액의 조제

- Chlorogenic acid

표준품 0.01020 g을 칭량하여 10 mL의 methanol 용액으로 용해하여 1000 mg/L 수준의 저장표준용액을 조제한 후, 기기조건 확인을 위하여 1 mg/L의 표준용액을 조제하였다. 또한, 검량선 측정을 위하여 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L의 표준용액을 조제하였다.

- Caffeic acid

표준품 0.01020 g을 칭량하여 10 mL의 methanol 용액으로 용해하여 1000 mg/L 수준의 저장표준용액을 조제한 후, 기기조건 확인을 위하여 1 mg/L의 표준용액을 조제하였다. 또한, 검량선 측정을 위하여 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L의 표준용액을 조제하였다.

나) 기기조건

시험물질 표준용액을 이용하여 시험물질의 머무름 시간대에 간섭물질이 없는 LC-MS 기기조건을 아래와 같이 확립하였다

Instrument	: ACQUITY TQD Tandem Quadrupole UPLC/MS/MS System		
Detector	: Mass spectrometry		
Column	: Hypersil GOLD(150 mm x 2.1 mm, 1.9 μm)		
Column temp.	: Ambient		
Mobile phase	: Time	10 mM Ammonium acetate	10 mM Ammonium acetate in MeOH
	0.00	90.0	10.0
	1.00	90.0	10.0
	10.00	10.0	90.0
	11.00	90.0	10.0
	15.00	90.0	10.0
Flow rate	: 0.2 mL/min		
Ionization mode	: ES-		
MRM data (Cone Volt.)	: Chlorogenic acid - 353.09(32)		
	Caffeic acid - 179.00(38)		
M o l e c u l a r ionization	: [M-H] ⁻		
Injection volume	: 5 μL		

다) 검출한계

표준품의 검출한계(LOD: Limit of detection) 확인을 위하여 10 mg/L 수준의 표준 용액을 5 반복 측정하여 다음과 같은 식으로 검출한계를 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{검출한계: } & \frac{3s(\text{RRF SD})}{\text{Response Factor}} \\ & = \frac{3 \times 1161.66}{66141.7} = 0.0527 \text{ mg/L(Caffeic acid)} \\ & = \frac{3 \times 1341.66}{10627.7} = 0.379 \text{ mg/L(Chlorogenic acid)} \end{aligned}$$

라) 정량한계

표준품의 정량한계(LOQ: Limit of quantification) 확인을 위하여 100 mg/L 수준의 표준 용액을 5 반복 측정하여 다음과 같은 식으로 정량한계를 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{정량한계: } & \frac{10s(\text{RRF SD})}{\text{Response Factor}} \\ & = \frac{10 \times 1161.66}{66141.7} = 0.176 \text{ mg/L(Caffeic acid)} \\ & = \frac{10 \times 1341.66}{10627.7} = 1.26 \text{ mg/L(Chlorogenic acid)} \end{aligned}$$

마) 직선성

- Chlorogenic acid

검량선 표준용액에 대한 직선성은 검량선으로부터 회귀식을 산출하여 상관계수(R)가 0.99 이상을 만족하여야 하며, Chlorogenic acid 표준용액을 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L를 사용하여 확인하였다.

- Caffeic acid

검량선 표준용액에 대한 직선성은 검량선으로부터 회귀식을 산출하여 상관계수(R)가 0.99 이상을 만족하여야 하며, Caffeic acid 표준용액을 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L를 사용하여 확인하였다.

바) 특이성 확인

시험용액 분석시 시험물질 이외의 불순물에 대한 간섭여부를 대조군 시료와 비교하여 동일한 머무름 시간대에 불순물 peak의 면적이 시험물질 대비 5 % 미만을 만족하여야 하며, 해당 시험물질에 대한 추출용액(methanol)을 이용하여 0.1 mg/L 농도의 표준 용액과 비교 분석하였다.

사) 함량분석

시험물질(창이자추출물, Xan-C와 Xan-K)중 Chlorogenic acid 및 caffeic acid의 함량분석을 위하여 시험물질 0.01000 g을 methanol 용액 10 mL 에 용해시킨 후 60 °C 에서 한 시간동안 증탕하였다.

시험용액을 0.2 μm 시린지필터(Labogene_Germany)를 사용하여 여과 후, 확립된 분석법에 따라 3 반복으로 정량분석을 실시하였다.

아) 결과계산

시험용액 중 지표물질(Chlorogenic acid 및 caffeic acid)의 농도는 기기분석 chromatogram의 peak 면적을 기준으로 표준 검량선을 작성하여 회귀방정식 및 시료의 회석배수를 고려하여 최종적으로 산출하였다.

① 검량선식 산출

지표물질의 정량은 외부표준법에 의하여 수행하며, 검량선 작성을 위한 표준용액을 기기 분석을 수행한 결과로부터 chromatogram의 peak area를 y축에 두고 주입한 지표물질의 농도(mg/L)를 x축에 두어 검량선을 작성한 후 검량선식을 산출하였다.

$$x = \frac{y - a}{b} \dots\dots\dots \text{(equation 1)}$$

- x : 기기분석시 주입한 시험용액의 농도(mg/L)
- y : Peak area
- a : 검량선의 y 절편
- b : 검량선의 기울기

② 시험물질 정량

시험용액 중 지표물질의 정량 결과는 다음 식으로부터 계산 하였다.

$$c = \frac{x}{f} \dots\dots\dots \text{(equation 2)}$$

- c : 시험용액 중 지표물질의 농도(mg/L)
- x : equation 1 에 의해 산출된 지표물질의 농도(mg/L)
- f : 시험용액 농축계수

③ 함량 계산

시험물질 중 지표물질의 함량은 분석 정량 값으로부터 다음과 같이 계산하였다.

$$P = \frac{c \times l}{a} \times 100 \dots\dots\dots \text{(equation 3)}$$

- P : 시험물질 중 지표물질의 함량(%)
- c : equation 2 에 의해 산출된 지표물질의 농도(mg/L)
- l : 샘플(시험용액) 조제용량(L)
- a : 샘플(시험물질) 양(mg)

다. 시험결과

1) 직선성 확인시험

가) Chlorogenic acid

검량선 표준용액에 대한 직선성은 Chlorogenic acid 표준용액 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L 를 사용하여 확인하였으며, 분석기기로 분석한 peak area를 기준으로 표준검량선으로부터 산출된 회귀방정식의 상관계수(r)는 0.990388로 직선성이 양호하였다.

나) Caffeic acid

검량선 표준용액에 대한 직선성은 Caffeic acid 표준용액 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10 mg/L 를 사용하여 확인하였으며, 분석기기로 분석한 peak area를 기준으로 표준검량선으로부터 산출된 회귀방정식은 2차방정식으로 나타냈으며, 결정계수(r^2)는 0.998844 로 직선성이 양호하였다.

2) 특이성 확인

특이성은 추출용매인 control 시료(methanol)를 이용하여 각각의 0.1 mg/L 수준의 표준용액과 분석 비교하였고, 그 결과 chromatogram상의 시험물질이 확인되는 구간에서 간섭물질의 peak가 나타나지 않아 적합하였다.

3) 함량분석

시험물질(창이자추출물, Xan-K와 Xan-C) 중 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 함량분석 결과 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 는 Xan-C에서 각각 0.151 및 8.97 mg/L 로 검출되었으며 각각 0.0151 및 0.897 % 가, Xan-K 에서는 각각 0.673 및 23.6 mg/L 로 검출되었으며 각각 0.0673 및 2.36 % 가 함유되어 있었다.

국산 창이자가 중국산에 비해 Caffeic acid는 4.8배, Chlorogenic acid는 2.6배가 더 많이 포함되어있는 것으로 분석되었다.

라. 결론

2가지의 시험물질(Xan-C 및 Xan-K) 중 Caffeic acid, Chlorogenic acid 및 3,4-Dihydroxybenzoic acid 의 함량분석을 위하여 각각의 시험물질 0.01 g을 methanol 용액 10 mL 을 이용하여 60 °C 에서 한 시간동안 열탕추출 후 정량분석한 결과 Caffeic acid, Chlorogenic acid의 함량은 다음과 같았다.

Table 1. Amount of Caffeic acid in test solution

Product	Replicate	Measured concentration (mg/L)	Mean \pm SD ^a (mg/L)
Xan-C	1	0.1532	0.151 \pm 0.013
	2	0.1373	
	3	0.1639	
Xan-K	1	0.6350	0.673 \pm 0.033
	2	0.6869	
	3	0.6974	

^a: Standard deviation

Table 2. Amount of Chlorogenic acid in test solution

Product	Replicate	Measured concentration (mg/L)	Mean \pm SD ^a (mg/L)
Xan-C	1	8.8117	8.97 \pm 0.48
	2	8.5935	
	3	9.5039	
Xan-K	1	23.0592	23.6 \pm 0.7
	2	23.4602	
	3	24.4034	

^a: Standard deviation

시험물질	지표성분	함량(%)	함량(g/kg)
Xan-C	Caffeic acid	0.0151	0.151
	Chlorogenic acid	0.897	8.97
Xan-K	Caffeic acid	0.0673	0.673
	Chlorogenic acid	2.36	23.6

- 국산 창이자 추출물(Xan-K)은 중국산 창이자추출물(Xan-C)에 비해 Chlorogenic acid 함량이 2.6배 높은 것으로 나타났다. 이에 따라 효능도 큰 차이가 있을 것으로 판단된다.
- 창이자 추출물의 지표물질 chlorogenic acid의 최소함량기준 은 0.8%이상으로 정하였다.

제 2절. 연구개발 대상물질의 비임상 효능 및 기전 규명

1. 당뇨동물모델에서 두릅의 망막에 대한 효능

가. 당뇨동물모델에서 두릅추출물이 망막에 미치는 효능

1) in vivo 당뇨성 망막증 유발 동물실험

- 6주령의 Sprague Dowley 랫드를 적응시킨 후 Streptozotocin을 60 mg/ml 용량으로 1회 복강 주사하고 5일을 경과한 후 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 이때 300 mg/dl 이상의 고혈당을 일으킨 쥐만을 선택하여 3 groups을 조성하였고 각각 다음과 같이 추출물을 투여하였다. 6주 동안 두릅 추출물을 300 mg/kg와 600 mg/kg로 투여한 후 안구에서 망막을 다음과 같은 방법으로 얻어 실험하였다.

가) 망막의 추출

- 조직학 실험을 위하여 쥐의 안구를 신속히 적출하고, 각막과 렌즈를 제거한 후, 망막을 얻어내었다. 망막은 6시간동안 4%의 parapormaldehyde 용액에서 고정하였고, 30% sucrose 용액을 밤새 침투시켰다. 물기를 깨끗이 제거한 후, O.C.T compound에 조심스럽게 망막조직을 심고, isopentane과 액체 질소를 이용하여 급냉 처리한 후, 각 12 μ m로 cryosection 하여 -70°C에 보관하였다.

나) Hematoxylin & Eosine staining

- 당뇨와 약물처리에 따른 망막의 일반형태학적 변화분석을 위하여 냉동 보관된 각 그룹의 망막조직을 꺼내어 상온에서 2시간동안 air-dry 한 후, 수습분에 걸친 수세과정을 통해 망막주변의 이물질들을 제거하였다. 먼저 hematoxyline 용액에서 2분간 염색하고, 다시 약 1시간정도 수세한 후, eosine 용액에서 1분간 염색하였다. 현미경을 통하여 염색정도를 확인한 후, 알콜 탈수화, xylene 투명화 과정을 차례로 거친 후, mounting 하였고, 적절한 부위를 선택하여 사진작업을 실시하였다.

다) 결과

- STZ로 당뇨가 유발된 SD 랫드(300 mg/dl 정도의 고혈당)에서 두릅 추출물(300 mg/kg, 600 mg/kg)을 경구로 6주 동안 투여하고 망막을 적출하여 고정시킨 후 조직 슬라이드를 제작하여 H & E 염색을 실시한 결과는 다음의 그림과 같다.

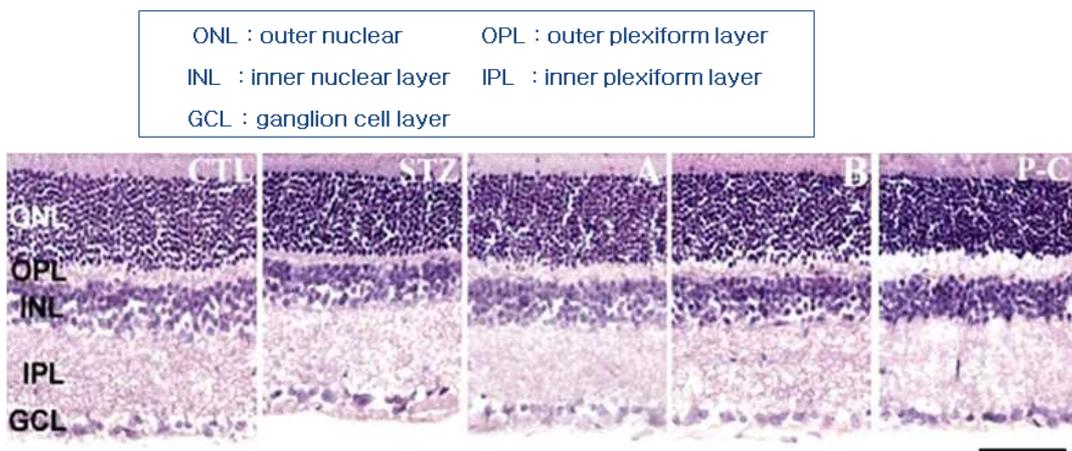
① 망막층 두께변화

- 망막층 두께는 망막의 손상정도를 파악하는데 도움을 주고 CTL에 표시한 바와 같이 ONL(outer nuclear layer), OPL(outer plexiform layer), INL(inner nuclear layer),

IPL(inner plexiform layer), GCL(ganglion cell layer)의 5부위를 집중적으로 비교분석하였다. 실험결과 CTL에 비하여 STZ 당뇨병군의 망막의 두께가 감소하였고, 나머지 A, B, P-C 군은 STZ 당뇨병군에 비해서 덜 감소된 경향으로 나타났다.

- 따라서, 물질 A(두릅 추출물 300 mg/kg), B(600 mg/kg)가 당뇨망막의 훼손을 막는데 다소 효과가 있을 것으로 생각되며 positive control(기존약물) 군 역시 약간의 효과가 있을 것으로 보인다. (Scale bar=50 μm)

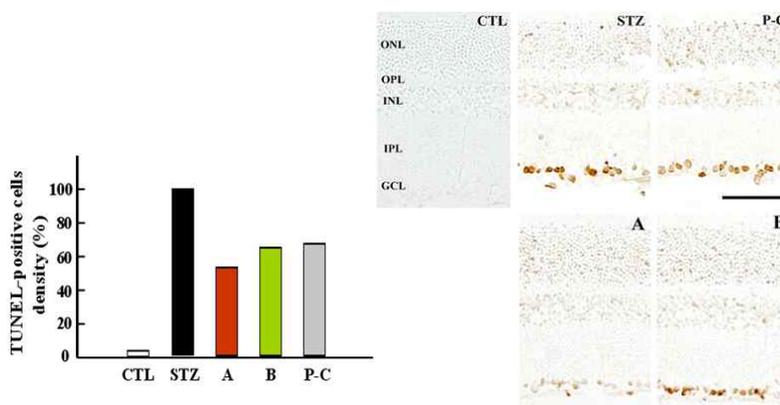
그림. in vivo STZ 유발 당뇨 랫드에서 두릅 추출물의 망막층 두께를 유지하는 효능을 나타냄.



② 두릅추출물이 망막층의 ganglion cells에 미치는 영향

- 당뇨가 유발된 동물에서는 망막층에 존재하는 ganglion cells의 apoptosis가 가속화되는데 두릅추출물을 투여한 동물에서는 ganglion cells의 apoptosis를 억제하는 효능을 나타내었다.

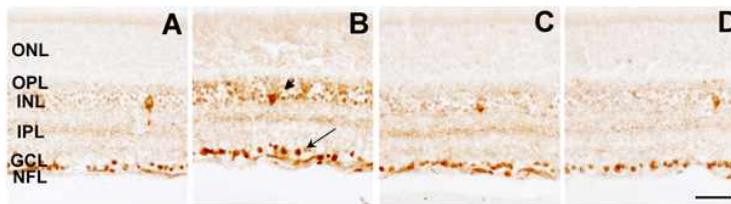
Effect of Aralia extract on apoptosis of ganglion cells in retina layers



③ 두릅추출물이 망막층의 NO 생성에 미치는 영향

- 고혈당증은 망막 세포층의 손상의 원인으로 망막 신경절 세포의 세포사멸을 증가시키고 amacrine 세포로부터 tyrosine hydroxylase의 발현과 choline acetyl transferase의 감소를 일으킨다. 또한 신경세포와 혈관세포로부터는 NOS 발현 감소를 야기하였다.
- 두릅추출물의 경구투여를 통해 신경세포와 혈관세포의 손상을 보호하는 것을 관찰 할 수 있었다. 따라서, 두릅추출물은 망막증에 효능을 나타내는 기능성 물질로서의 가능성이 매우 높은 후보물질로 판단하였다.

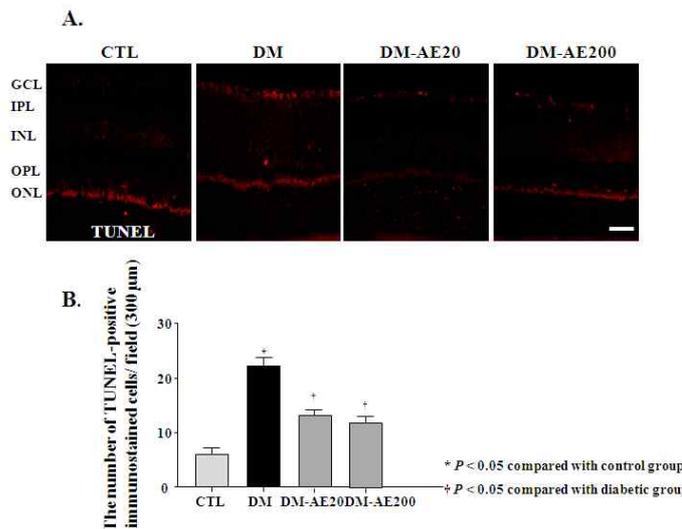
Effect of Aralia extract on the expression of nitric oxide synthase (NOS) in retina layers



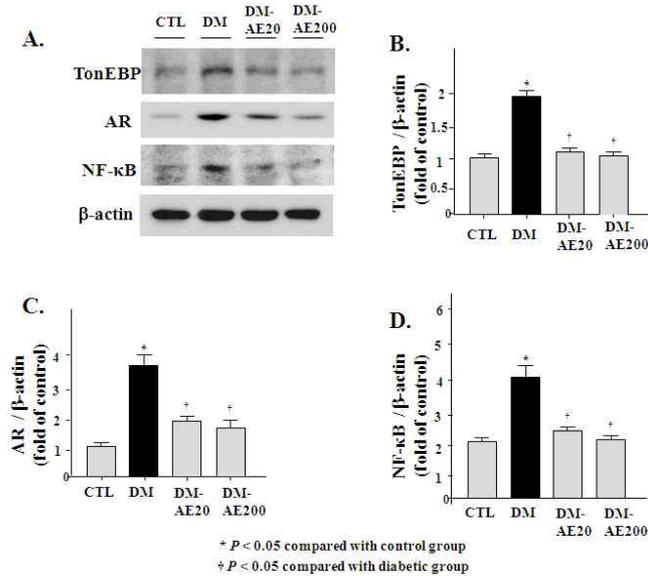
나. 당뇨망막 동물모델에서 두릅의 효능에 대한 기전 연구

1) 당뇨에서 증가하는 전사인자인 TonEBP의 조절을 통한 두릅의 효능 검증

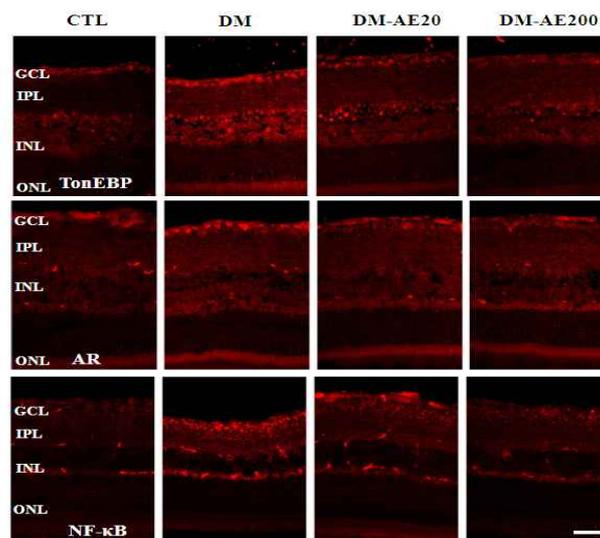
- 당뇨망막 동물모델에서 두릅의 효과를 세포내 신호전달 기전을 분석하고 밝히고자 연구를 진행하였다. 두릅추출물이 Dose-dependent하게 신경세포 사멸을 억제시키고 PKC-delta의 발현이 농도-의존적으로 억제됨을 확인하였다.(그림 1)
- 구체적인 작용기전을 비교 분석하기 위하여 당뇨쥐를 유도하고 DW와 MDF 20mg/Kg 또는 MDF 200mg/Kg를 구강으로 12주 동안에 투여한 동물모델 쥐를 제작하였다. 각 실험군에서 쥐의 망막을 분리하여 분자생물학적인 분석을 위하여 단백질을 분리하여 각종 분석을 위한 Western blotting analysis를 수행하였고, 쥐를 고정액으로 관류고정을 한후 조직절편을 제작하여 각종 단백질 염색을 위한 면역형광염색을 수행하였다.



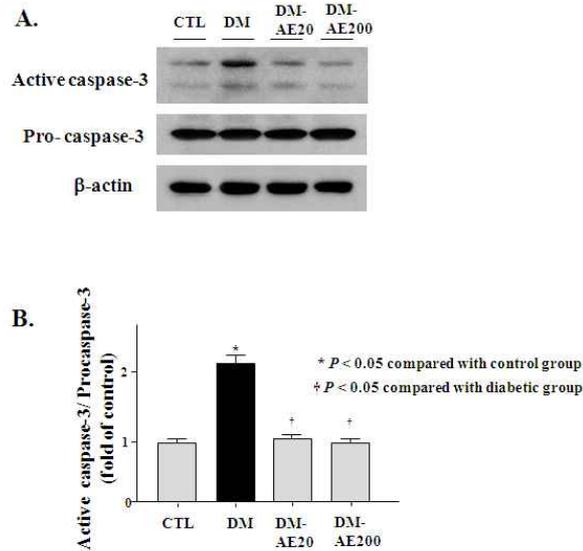
2) 신경전사인자인 NFAT5 라고도 알려진 TonEBP와 Aldose reductase(AR)과 NF-κB가 당뇨병 망막의 신경세포에서 증가되어 있고 이를 두릅추출물이 농도의존적으로 감소시킨다는 사실을 생화학적으로 규명하였다(그림 2).



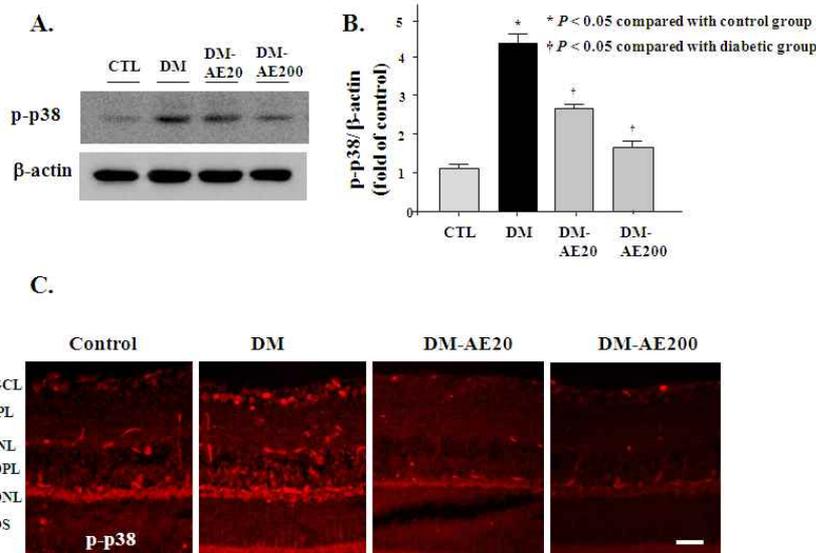
- 또한 이를 면역조직화학법으로도 규명하였다(그림 3).



3) 또한 두릅추출물이 세포사멸에 중요한 인자인 active form의 caspase3의 활성을 억제하여 세포사멸을 억제 시킨다는 사실을 단백질분석법으로 규명하였다(그림 4).



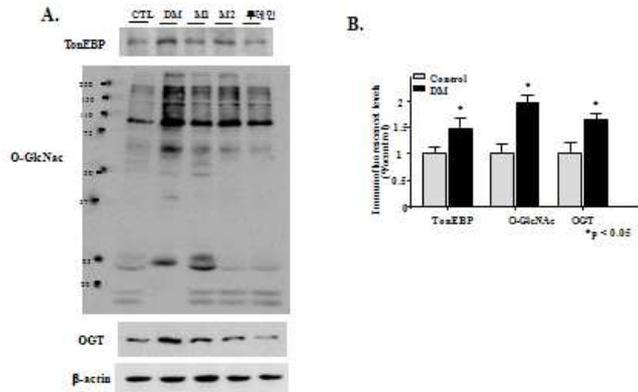
4) 두릅추출물은 MAP kinase 중에 phospho-p38 단백질의 활성을 억제 시켜 신경세포의 사멸을 억제시킨다는 사실을 밝혔다(그림 5).



5) 당뇨에서 증가하는 O-GlcNAc Transferase(OGT)의 조절을 통한 두릅의 효능 검증

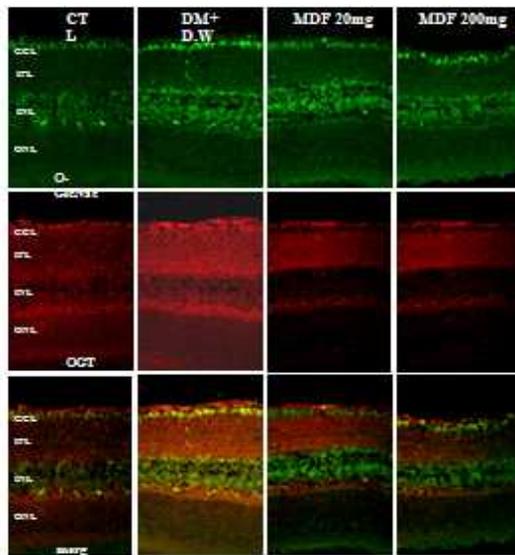
- 당뇨와 비만 등의 대사질환과 동반하여 증가하는 것으로 알려진 O-GlcNAc substrate의 증가와 이를 조절하는 OGT 발현이 당뇨망막질환의 발병에 미치는 영향을 규명하고자 당뇨망막동물모델의 제작하여 두릅추출물을 12주 동안 투여하고 구 효과를 검증하였다. 그 결과 당뇨망막증에 O-GlcNAc이 증가하고 이를 조절하는 OGT와 O-GlcNAcylation이 증가한다는 사실을 처음으로 규명하였다(그림 6,7,8). 이는 당뇨와 동시에 증가하는 Hexosamine biosynthesis pathway(HBP)를 통해서 당뇨망막의 신경세포사멸을 유도한다는 새로운 사실을 확보한 것이다.

Immunoblotting of O-GlcNAc and OGT



6) 당뇨병망막증에서 두릅추출물(MDF) 투여에 의한 O-GlcNAcylation과 OGT 억제효과 규명

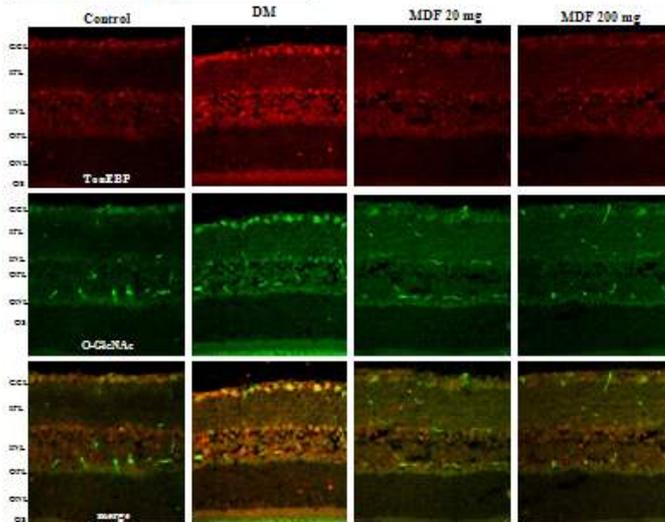
IHC for O-GlcNAc and OGT



- 면역형광염색법에 의한 두릅추출물의 O-GlcNAc과 OGT 방어효과 규명

TonEBP와 O-GlcNAc 이중염색을 통한 MDF가 당뇨병망막증에서 유발되는 신경세포사멸을 억제시켜 당뇨병망막증의 보호효과를 보여주는 그림.

IHC of TonEBP and O-GlcNAc



현재까지 당뇨병막증의 예방과 치료에 가장 많이 PKC-dealta의 antagonist 제제가 가장 많이 활용되고 있는데 두릅추출물(MDF)이 당뇨병막증의 예방과 치료에 활용될 가능성을 확보한 예비실험결과를 확보하였다고 판단됨.

다. 두릅추출물의 안구건조증에 대한 효능

1) 연구방법

가) 각막상피세포 배양과 고삼투압 노출

- 인간각막상피세포(human corneal epithelial cells, HCECs, ATCC, Manassas, VA, USA)를 이용하여 25에서 30세대 사이의 세포를 이용하였다.
- Keratinocyte-SFM(Gibco BRL, Rockville, MD, USA)에 human corneal growth supplement(Gibco BRL, Rockville, MD, USA), 100 units/mL penicillin (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 100 µg/mg streptomycin (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)을 첨가한 세포배양액을 1-2일 간격으로 교체하였다.
- 배양된 세포에 NaCl(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 다양한 농도의 삼투압(350~550 mOsm) 용액을 만들어 처리한 다음, 24시간까지 배양한 후 세포의 모양을 현미경으로 관찰하였다.

나) 농도별 두릅추출물 처리

- 두릅추출물은 Medvill Co. Ltd(Seoul, Korea)에서 제공받아 실험을 진행하였다. 우선, 각막상피세포 배양에서 두릅의 독성 농도를 확인하기 위해서 5, 10, 50, 100, 그리고 200 µg/ml의 농도의 두릅을 Dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma, St. Louis, MO, USA)에 용해시켜 처리 후 세포생존성을 확인하였다.
- 세포생존의 저하를 일으키지 않는 두 농도(5, 10 µg/ml)를 각각 동시 처리하거나 24시간 전에 전 처리한 후 배양하여 세포생존성을 확인하였다.

다) 세포생존성의 측정(Cell viability assay)

- 세포 부유액에서 세포수 측정기를 이용하여 측정한 다음, 1×10^5 /ml로 24 well 의 배양접시에 세포 부유액 500 μ l를 넣고 24시간 동안 배양하였다.
- 고삼투압 용액이나 두릅을 농도 별로 처리하고 24시간 동안 다시 배양한 뒤 시료를 제거하고 MTT 용액 200 μ l를 첨가하였다. 4시간 동안 배양 후 MTT 용액을 조심스럽게 제거하고, 200 μ l의 DMSO를 첨가하여 15-20분간 흔들어 준 뒤 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라) 창상 회복 정도 검사(Wound healing assay)

- 6 well의 배양 접시에 창상 회복 검사에 사용되는 카세트를 2개씩 붙인 다음, 각 카세트에 100 μ l의 세포부유액을 투여하고, 세포가 가득 찰 때까지 배양한다. 카세트를 제거하고 고삼투압 용액을 처리한 다음 시간 별로 현미경을 이용하여 촬영하였다.

마) 각막상피세포에서 고삼투압 노출 후 TonEBP 발현과 세포자멸사, 산화스트레스 및 염증사이토카인의 발현 변화

- 세포 부유액을 세포수 측정기를 이용하여 측정한 다음, 1×10^5 /ml로 6 well 의 배양접시에 세포 부유액 2ml을 넣고 24시간 동안 배양하였다.
- 고삼투압 용액을 처리한 다음 24시간 동안 배양하고 phosphate-buffered saline(PBS)를 이용하여 세척하였다.
- 세포를 모아 원심분리를 실시한 뒤, 세포 용해 용액을 약 20 μ l를 넣고 피펫으로 세포를 용해시킨다. 다시 원심분리를 시행한 후 세포 정량을 시행하였다.
- 정량을 한 값으로 SDS-PAGE 샘플을 준비한다. 만들어진 겔에 시료를 넣고 진행시킨 다음, nitrocellulose 종이에 옮긴 다음, 실험하고자 하는 1차 항체를 넣고 배양한 다음, 2차 항체를 붙인 후 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액을 이용하여 확인하였다.

바) 세포면역형광염색(Fluorescence Immunocytochemistry)

- 배양한 세포를 고삼투압 용액으로 처리하고 PBS로 세척한 후 4% paraformaldehyde로 고정하였다.
- PBS로 다시 세척한 후 0.1% Triton X-100/PBS 용액에서 10분 동안 배양한 다음 다시 세척을 시행하였다.
- TonEBP(mouse monoclonal, Santa Cruz, CA, USA), 1:100) 1차 항체를 이용하여 처리한 다음, 4°C에서 overnight 배양하였다. PBS를 이용하여 세척한 다음, goat-antimouse IgGs conjugated Alexa(1:1,000) 2차 항체를 처리하고 촬영하였다.

사) 통계적 분석

- 통계적 분석은 GraphPad Prism software ver. 5.02(GraphPad PRISM Software Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하여 분석하였으며, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다.

2) 연구 결과

- MTT로 측정된 세포생존의 변화에서는 500 mOsm농도에서 대조군에 비해 약 50%이하로 유의하게 감소하였으며 550 mOsm에서는 20% 이하로 감소하였다. 따라서 이 후 실험에서 고삼투압 처리 농도를 500 mOsm로 정하여 처리하였다(Fig 2A).
- 각막상피세포에 두릅을 농도 별로 처리하여 독성 농도를 확인하였다.
- 5와 10 µg의 농도에서는 각막상피세포의 생존율에는 변화가 없었지만, 50 µg에서는 세포수가 감소하기 시작했고, 100 µg에서는 15%로 급격하게 감소하는 것을 확인하였다.(Fig 2B)

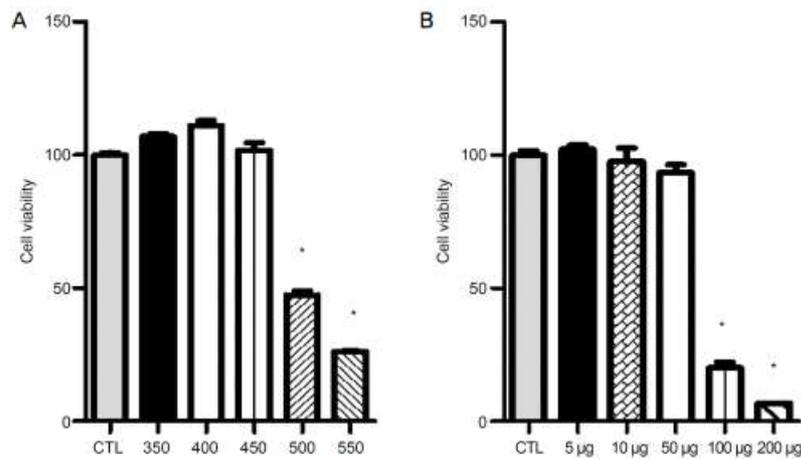


Figure 2. Changes of cell viability after exposure of hyperosmolar stress (A) and treatment of *Aralia elata* (B). CTL = control. $p < 0.001$ (vs. CTL).

- 고삼투압에 노출 후 두릅이 각막상피세포의 생존성에 미치는 효과를 확인하기 위해 5 µg 과 10 µg의 농도로 동시 처리한 군과 24시간 전에 전 처리 한 군의 세포생존성을 비교하였다.
- 그 결과 동시 처리 군에서는 세포 생존성에 미치는 효과가 없었지만, 전 처리 군에서는 5 와 10 µg농도 모두에서 통계적으로 유의하게 향상되는 것을 확인하였다(Fig 3A, 3B).

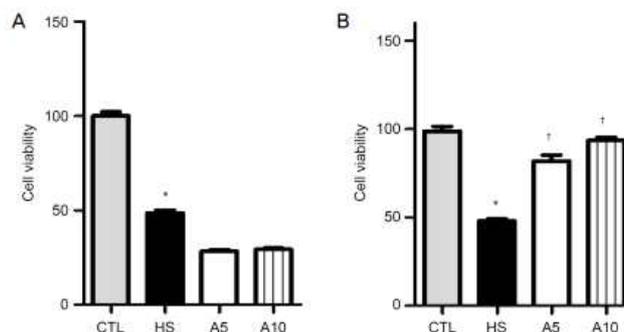


Figure 3. Comparison of differences in cell viability between simultaneous (A) and pre-(B) treatment of *Aralia elata* on human corneal epithelial cells after exposure of hyperosmolar stress (HS) (500 mOsm). CTL = control; A5 = *Aralia elata* 5 µg/mL; A10 = *Aralia elata* 10 µg/mL. $p < 0.001$ (vs. CTL); $p < 0.001$ (vs. HS).

- 고삼투압에 노출된 각막상피세포는 거의 세포이동이 없었던 반면, 5 μg 과 10 μg 의 농도의 두릅을 24시간 전에 전 처리 한 군에서 농도의존적으로 세포이동이 유의하게 증가한 것을 확인하였다(Fig. 4A, 4B).

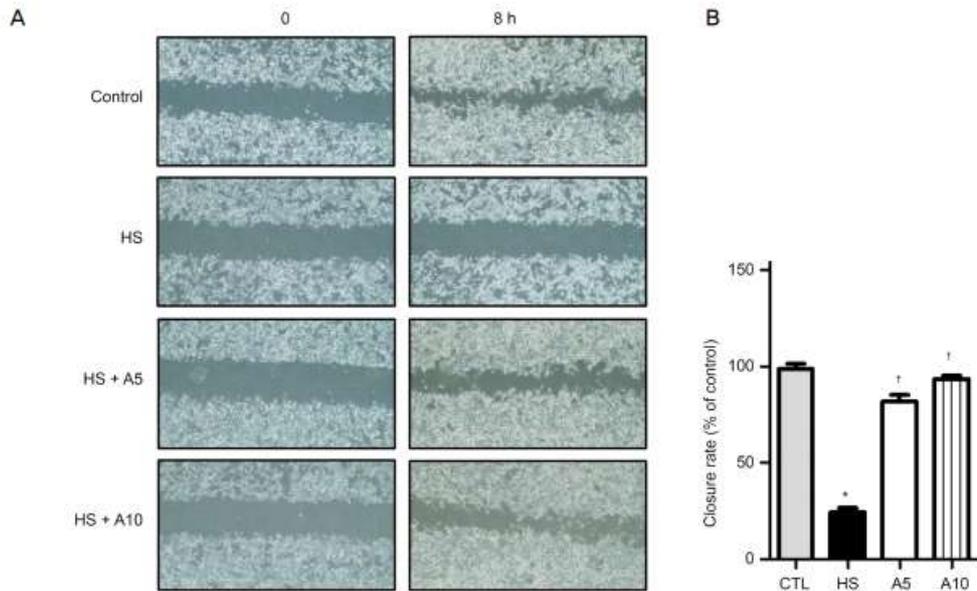


Figure 4. Differences in wound healing according to the concentrations of *Aralia elata* pretreatment. CTL = control; HS = hyperosmolar stress (500 mOsM); A5 = *Aralia elata* 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; A10 = *Aralia elata* 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. * $p < 0.001$ (vs. CTL); † $p < 0.001$ (vs. HS).

- 각막상피세포에 고삼투압 스트레스가 주어졌을 때 TonEBP의 변화를 확인한 결과, TonEBP의 발현이 증가하였으며, TonEBP의 아래 신경전달체계에 속하는 p-NF- κB p65의 발현 또한 증가하는 것을 확인하였다. 각막상피세포에 두릅을 전 처리한 경우에는 농도 의존적으로 이 두 물질의 발현이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 5A-5C).
- 각막상피세포를 고삼투압에 노출 시 Bax의 발현은 증가하고, Bcl-2와 Bcl-xl 발현은 감소함으로써 세포자멸사가 증가하는 것을 확인하였으며, 두릅을 전처리 한 군에서는 Bax의 발현이 감소하고, Bcl-2와 Bcl-xl 발현은 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 5A, 5D-5F).
- 두릅이 산화스트레스에 미치는 영향을 분석하기 위해서 산화스트레스 표지인자인 4-HNE와 항산화 효소인 GPx의 발현을 살펴본 결과, 고삼투압에 노출된 후 증가한 4-HNE는 두릅 전 처리를 한 군에서는 통계적으로 유의하게 감소한 반면, GPx는 고삼투압에서 감소하였다가 두릅을 전 처리하게 되면 회복하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A, 5G, 5H).
- 뿐만 아니라 염증 사이토카인의 일종인 IL-1 β 의 발현에서도 고삼투압 환경에 노출되면 증가하지만, 두릅을 전 처리하게 되면 그 발현 양이 감소함을 확인할 수 있었다.

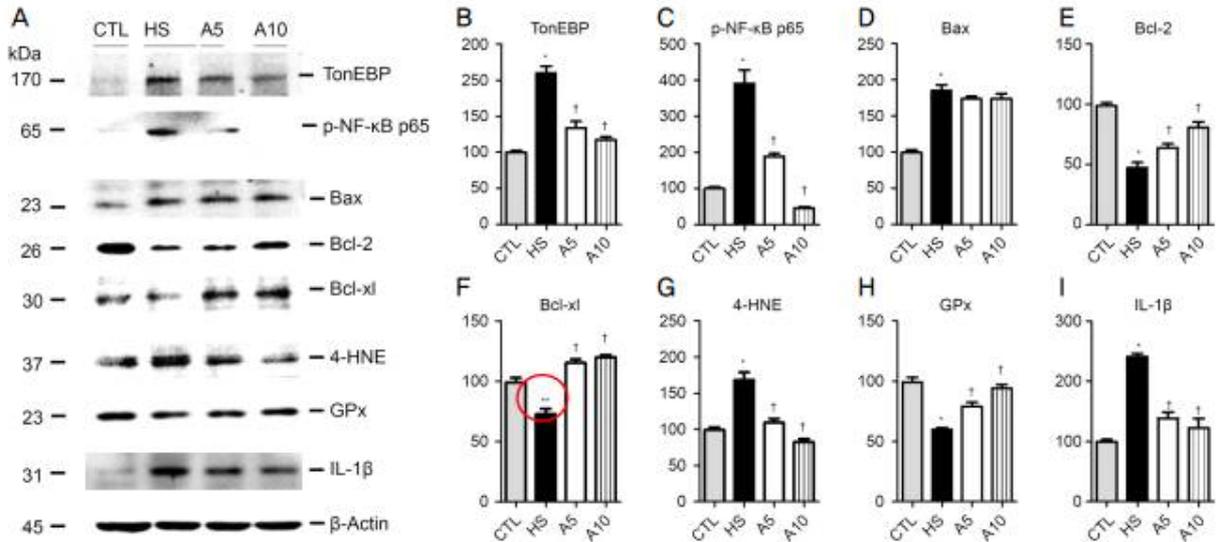


Figure 5. Western blot analysis (A) and graphs of expression changes of tonicity response enhancer-binding protein (TonEBP) (B), p-NF-κB p65 (C), apoptosis markers (Bax (D), Bcl-2 (E), and Bcl-xl (F)), oxidative stress markers (4-hydroxynonenal [4-HNE, G], glutathione peroxidase [GPx, H]), and inflammatory cytokine (interleukin [IL]-1β (I)). CTL = control; HS = hyperosmolar stress (500 mOsM); A5 = Aralia elata 5 μg/mL; A10 = Aralia elata 10 μg/mL. **p* < 0.001 (vs. CTL), **p* < 0.001 (vs. HS); 4-HNE: GPx: IL.

- TonEBP의 발현과 세포사와의 관련성을 확인하기 위해 형광세포염색을 실시하였으며, 그 결과 고삼투압에 노출되게 되면 세포질에 있던 TonEBP가 핵내로 이동이 증가하며, TUNEL과 같이 TonEBP가 염색이 일치하여, 세포사가 일어나는 과정에 TonEBP가 관여함을 확인할 수 있었으며, 이러한 변화는 두릅을 전 처리한 군에서는 감소하는 것이 확인되었다(Fig 6.)

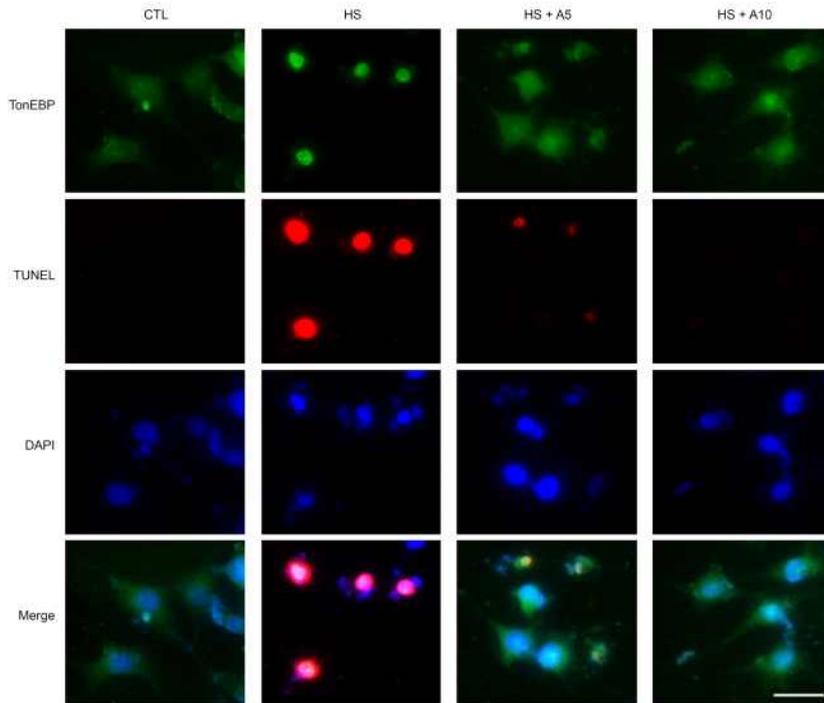


Figure 6. Fluorescence immunocytochemistry for tonicity response enhancer-binding protein (TonEBP), terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL), and DAPI in human corneal epithelial cells. Cells were treated with Aralia elata (AE; 5 μg/mL and 10 μg/mL, respectively) before exposure to hyperosmotic media (500 mOsM) for 24 hours. TonEBP and TUNEL were co-stained and pretreatment of AE ameliorates the hyperosmolarity-induced cell death and upregulation of expression and nuclear translocation of TonEBP. Scale bar length 100 μm. CTL = control; HS = hyperosmolar stress (500 mOsM); A5 = Aralia elata 5 μg/mL; A10 = Aralia elata 10 μg/mL.

- 본 연구에서 두릅은 배양된 각막상피세포가 고삼투압 환경에 노출 시 TonEBP의 발현과 핵내로의 이동을 억제하고 NF-κB의 활성화는 감소시킴으로써, 세포생존성과 이동성을 증가시킬 뿐만 아니라, 산화스트레스나 염증 인자들의 활성을 줄여주는 효과가 있음을 확인하였다.
- 최근의 TFOS DEWSII에서는 “안구건조증은 눈물층의 항상성이 손상되어 눈의 불편한 증상을 일으키는 안구 표면의 다요인성 질환으로써 눈물층의 불균형과 고삼투성 변화, 안구 표면의 염증과 손상, 그리고 각결막 신경 감각의 이상 등이 주요한 병인이다”라고 정의하였다.
- 여러 임상 연구에서는 안구건조증이 심할수록 눈물의 삼투압 절대치가 높으며, 두 눈 간이나 방문시마다 눈물의 삼투압 측정값들의 변이가 높아진다고 한다.
- 눈물의 고삼투압은 여러 신호전달체계의 활성을 통하여 각-결막 상피세포 등의 안구 표면의 세포자멸사에 관여하며, 눈물의 삼투압이 증가할수록 안구 표면의 염증이 심하다는 보고가 있다.
- 각막상피세포를 고삼투압 환경에 노출시키게 되면 extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK 1/2), p38 kinase, c-Jun N-terminal kinase 1/2(JNK 1/2) 등의 신호전달체계가 활성화되고, TNF-α, IL-1β, NF-κB, IL-6, 그리고 IL-8등의 염증 사이토카인 등이 증가한다.
- 본 연구에서도 500 mOsm의 고삼투압 환경에 각막상피세포가 노출되면, 세포생존성이 50%이하로 감소하고, Bax의 발현은 증가하면서 Bcl-2와 Bcl-xl 발현은 감소하여 세포자멸사가 증가하는 것이 확인되었다.
- 그리고 산화스트레스 표지인자인 4-HNE는 증가하고 항산화효소인 GPx의 발현은 감소하였고, 염증 사이토카인의 일종인 IL-1β의 발현은 증가하였다.
- 결국 안구건조증이 심할수록 눈물의 고삼투압이 증가하고 이것이 안구 표면의 염증을 증가시키며, 이렇게 증가한 염증이 다시 눈물의 고삼투압을 악화시키는 악순환의 고리를 형성하게 된다.
- 실험적으로 안구건조증에서 발생한 고삼투압 환경이 삼투압 변화에 민감한 TonEBP의 발현을 증가시킨다는 보고가 있으며, TonEBP가 안구 표면이나 눈물샘의 염증에 관여한다는 연구도 있다.
- 따라서 안구표면을 이루는 세포나 조직에서 고삼투압 환경에 노출 시 발현이 증가하는 TonEBP를 억제할 수 있다면, 안구표면염증을 줄이고 안구건조증 발생을 악화시키는 악순환의 고리를 끊을 수 있을 것이다.
- 본 연구에서 고삼투압에 노출된 각막상피세포에서 TonEBP의 발현이 늘어나고, 핵내로의 이동 또한 증가하는 것을 확인하였다.
- 형광세포염색에서 TonEBP의 발현이 TUNEL 양성인 세포에서 동시에 염색되는 것을 볼 때, TonEBP가 고삼투압에 의해 유래된 각막상피세포 자멸사와 관련이 있음을 간접적으로 보여준다.

- 사실 TonEBP는 약 20년 전에 신장 수질에서 고삼투압 환경에 적응하기 위한 세포들의 전사인자로서 처음 발견되었으며, 고삼투압에 노출 시 세포 생존에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.
- TonEBP의 활성화는 myo-inositol, betaine, taurine, 그리고 sorbitol과 같은 주요한 용질들의 세포내 농도를 증가시킴으로써, 고삼투압 환경에서 세포를 보호하는 역할을 하였다.
- 하지만 이러한 용질들 자체의 세포 내 증가나 이에 작용하는 aldose reductase와 같은 효소들의 증가가 오히려 세포독성을 일으킬 수 있다는 보고가 있다.
- 최근에는 TonEBP의 활성화가 고혈압이나 당뇨병성 신증과 같은 당뇨합병증의 발생이나 류마티스 관절염과 같은 자가면역질환, 그리고 간암 등의 종양 질환의 발생 기전에 관여한다는 보고들도 있다.
- 동물을 이용한 기능적인 연구에서도 TonEBP heterozygotes 쥐에서는 자가면역질환을 유도하게 되면 증상이 약하게 발현되고, 당뇨병성 신증이나 인슐린 저항성도 적게 생기며, 간암의 유병률도 낮아지는 것이 확인되었다.
- 또한 p38 MAPK의 활성화에 TonEBP가 관여함으로써, NF- κ B의 활성화에 영향을 주어 염증을 유발하거나 세포사를 일으키는 것도 잘 알려져 있다. 두릅이 이러한 TonEBP의 발현을 억제하여 NF- κ B의 활성을 낮춤으로써 당뇨망막증에서 신경보호효과가 있다는 보고가 있다.
- 따라서, 본 실험 결과와 같이 두릅이 각막상피세포가 고삼투압에 노출되었을 때 증가한 TonEBP의 발현을 억제할 수 있다면, 안구표면의 염증이나 세포사를 억제함으로써 안구건조증의 치료제로써 활용될 수 있는 근거가 될 것으로 생각이 된다.
- 두릅은 우리나라를 비롯한 중국, 일본 등 동아시아에서 당뇨 조절 효과가 있어 전통적으로 약물로 이용되기도 하였다. 실제, 실험적으로 당뇨 유발 쥐에서 혈당을 감소한다는 보고가 있으며, 당뇨망막증의 진행을 억제한다는 연구도 있다.
- 본 실험에 사용된 두릅의 경우에는 high-performance liquid chromatography에서 항산화 작용과 항염증 작용이 있는 3,4-dehydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, 그리고 caffeic acid 등을 함유하고 있어, 세포보호효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- 그리고, 두릅은 aldose reductase 등의 효소 활성을 저하시킴으로써 당뇨병성 백내장 발생을 억제할 수 있고, TNF- α 나 NF- κ B 등 염증유발 인자들의 활성을 농도의존적으로 감소시키는 효과도 보고되고 있다.
- 실험적으로 유발된 당뇨병성 망막증에서 망막신경절세포사에 두릅이 TonEBP의 발현을 줄이고 NF- κ B 등의 염증인자들을 감소시킴으로써 신경보호효과가 있다는 연구도 있다.
- 본 연구의 결과에서도 두릅은 TonEBP와 활성화된 NF- κ B인 p-NF- κ B p65의 발현을 감소시키고, Bax의 발현의 감소와 Bcl-2와 Bcl-xl 발현의 증가 등의 효과로 세포자멸사를 줄여주는 효과가 있었다.

- 그리고, 4-HNE나 IL-1 β 는 감소시키면서, GPx의 발현은 증가시키는 등의 항산화 효과와 항염증 효과가 있음을 보여주었다.
- 결국, 두릅은 안구건조증에서 고삼투압의 환경에 각막상피세포가 노출된다면 TonEBP와 NF- κ B의 발현을 감소시키고, 항산화와 항염증 효과를 보여 세포보호작용을 함으로써 안구건조증 치료 약물로 사용될 수 있을 것이다.
- 하지만, 두릅의 고삼투압에 노출된 각막상피세포의 보호 기전을 정확하게 판단하기 위해서는 두릅에 포함된 3,4-dehydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, caffeic acid 등의 단일 화합물과의 효과를 비교해 보아야 할 것이다.
- 그리고 안구건조증 동물 모델 등을 이용하여 전신적으로나 안약 점안제로 두릅을 투여하여 실제 안구건조증 완화 효과가 있는지 확인하는 실험도 필요하다.
- 결론적으로 두릅은 각막상피세포가 고삼투압 환경에 노출되었을 때, TonEBP와 NF- κ B의 발현을 감소시키고, 항염증과 항산화 효과를 보여 세포보호작용이 있으며, 추후 안구건조증 치료 약제로 사용될 수 있는 가능성이 있겠다.
- 본 연구결과는 대한안과학회지에 논문으로 발표하였다.

대한안과학회지 2021년 제 62 권 제 2 호

J Korean Ophthalmol Soc 2021;62(2):1-9

ISSN 0378-6471 (Print) · ISSN 2092-9374 (Online)

<https://doi.org/10.3341/jkos.2021.62.2.1> Original Article

고삼투압에 노출된 각막상피세포에서 TonEBP 발현과 염증인자들에 대한 두릅의 효과

Effect of Aralia Elata on the Expression of Hyperosmolarity-induced TonEBP

Protein and Inflammatory Mediators in Corneal Epithelial Cells

고삼투압에 노출된 각막상피세포에서 TonEBP 발현과 염증인자들에 대한 두릅의 효과

Effect of Aralia Elata on the Expression of Hyperosmolarity-induced TonEBP Protein and Inflammatory Mediators in Corneal Epithelial Cells

김성재^{1,2} · 박미화¹ · 유웅선^{1,2} · 홍은경³ · 최미영^{2,4} · 최원성^{2,4}

Seong-Jae Kim, MD, PhD^{1,2}, Mi Hwa Park, MD¹, Woong-Sun Yoo, MD^{1,2}, Eun-Kyung Hong³,
Mee Young Choi, MD^{2,4}, Wan Sung Choi, PhD^{2,4}

경상대학교 의과대학 경상대학교병원 안과학교실¹, 경상대학교 건강과학연구원², 주식회사 메드빌³,
경상대학교 의과대학 해부학교실 융합의과학과⁴

Department of Ophthalmology, Gyeongsang National University Hospital, Gyeongsang National University School of Medicine¹, Jinju, Korea
Gyeongsang Institute of Health Science, Gyeongsang National University², Jinju, Korea
Medvill Co., Ltd.³, Seoul, Korea

Department of Anatomy and Convergence Medical Science, Gyeongsang National University School of Medicine⁴, Jinju, Korea

Purpose: To investigate the effect of *Aralia elata* (AE) on hyperosmolar stress-induced tonicity response enhancer-binding protein (TonEBP) expression and changes in the levels of proinflammatory cytokines in immortalized human corneal epithelial cells (hCECs).

Methods: Immortalized hCECs were cultured with either 5 or 10 µg/mL AE for 24 hours, and the medium then changed to a hyperosmotic medium (500 mOsm/L). After hyperosmolar treatment, cell viability and wound-healing assays were performed, and cell proteins subjected to Western blot analysis, immunocytochemistry for TonEBP and NF-κB, and tests measuring changes in the levels of oxidative stress markers and inflammatory mediators.

Results: AE pretreatment ameliorated hyperosmolarity-induced cell death and the delay in wound-healing in a dose-dependent manner. AE inhibited TonEBP and phospho-NF-κB p65 subunit upregulation. AE significantly decreased the expression levels of Bax, 4-HNE, and IL-1β; but increased those of Bcl-2, Bcl-xl, and Gpx.

Conclusions: AE increased cell viability and wound-healing, and inhibited the hyperosmolar stress-induced upregulation of TonEBP and NF-κB. AE may be useful for treatment of patients with certain ocular surface diseases.

J Korean Ophthalmol Soc 2021;62(2):1-??

Keywords: *Aralia elata*, Human corneal epithelial cells, Hyperosmolar stress, Inflammation, Tonicity response enhancer-binding protein

Received: 2020. 8. 20. Revised: 2020. 9. 8.

Accepted: 2021. m. d.

Address reprint requests to Wan-Sung Choi, PhD
Department of Anatomy and Convergence Medical Science,
Gyeongsang National University School of Medicine, #15
Jinju-daero 816beon-gil, Jinju 52727, Korea
Tel: 82-55-772-8031, Fax: 82-55-772-8039
E-mail: chows@gnu.ac.kr

* This work was supported by National Research Foundation:
(Grant Number MAFRA [117082-03]).

* Conflicts of Interest: The authors have no conflicts to disclose.

안구건조증은 안과 의사들이 임상에서 가장 흔히 접하는 질환이며, 안구 불편감이나 시야 흐림 등으로 환자의 일상 생활에 지장을 줄 뿐만 아니라, 각막궤양이나 각막혼탁, 시력손상, 그리고 실명 등의 심각한 합병증도 유발할 수 있다.¹ 더불어, 많은 의료 비용이 지출됨으로써 환자 개인뿐만 아니라 사회경제적으로도 문제가 되는 질환이다.² 대부분의 안구건조증은 안구표면의 항상성이 파괴되고, 눈물내 삼투압이 증가하며, 그 결과 사이토카인들의 생성 증가하

© 2021 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

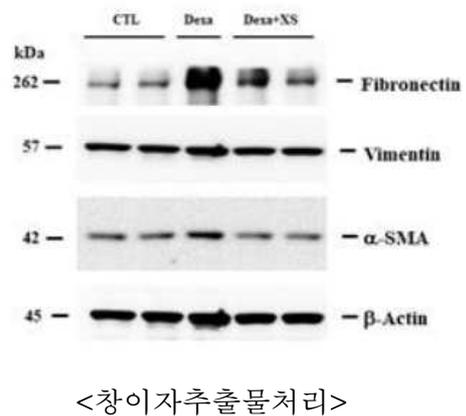
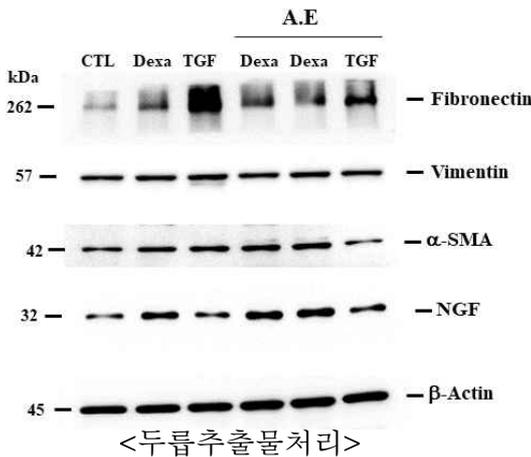
라. 백내장과 녹내장에서 두릅추출물과 창이자추출물의 항산화 효과 확인

1) 녹내장 유발모델에서 두릅추출물의 효과

두릅의 녹내장 발생 모델에서 항산화 효과를 확인한 WESTERN BLOT ASSAY 결과.

- Dexa와 TGF처리시, Fibronectin과 alpha-SMA가 증가하는데, 두릅추출물을 함께 처리시, 감소하는 경향을 나타내었다. 두릅추출물이 백내장과 녹내장의 발병에서 항산화작용을 통하여 억제하는 기능이 있음을 확인함.
- 녹내장 유발모델에서 창이자를 처리하면 세포의 분화에 관여하는 인자들을 감소시키는 영향을 주어 녹내장 예방과 치료에 도움을 될 것으로 예상된다.

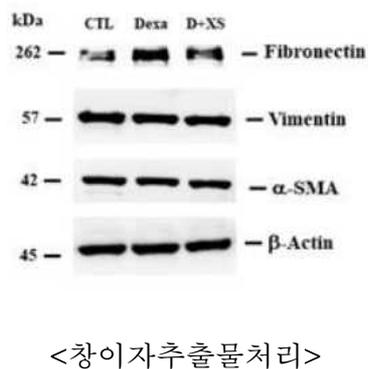
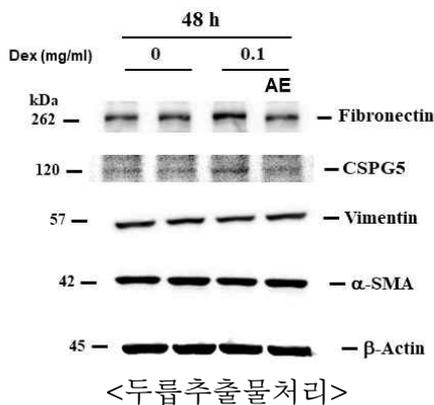
* TM cell



2) 백내장 유발 모델에서 두릅추출물의 효과

백내장 유발모델에서 항산화억제효과를 확인한 WESTERN BLOT ASSAY

B3- Lens cell 백내장 유발 모델에서 두릅을 함께 처리시 Fibronectin과 CSPG5의 발현이 감소하는 경향을 보인다.



마. 두릅추출물과 창이자추출물의 안구건조 모델에서의 효능 비교

* 당뇨망막증과 안구건조증 모델에서 각각 두릅과 창이자의 효과 분석.

1) 당뇨망막증 : * ARPE-19 (human adult retinal pigment epithelium cells)

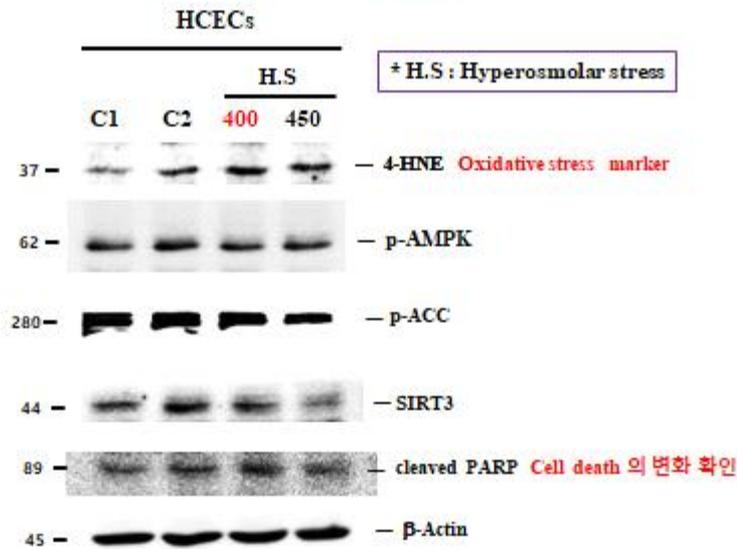
: Low glucose / High glucose 모델 적용.
ALA (Alpha Lipoic Acid) 와도 연관성 고려.

2) 안구건조증 : * HCEC (human corneal epithelial cell)

* 각막 손상 모델 (안구건조증 모델)
- Hyperosmolar stress (고삼투압성 스트레스)
: NaCl (sodium chloride) 처리

<결과>

* 안구건조증 : HCEC (human corneal epithelial cell)
- 각막 손상 모델 (안구건조증 모델)
- Hyperosmolar stress (고삼투압성 스트레스) : NaCl (sodium chloride) 처리



* Hyperosmolar stress (hyperosmotic stress)

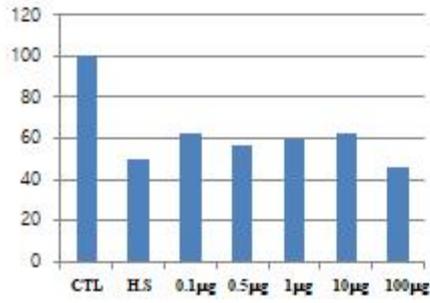
- Cell의 serum-free medium에 0, 44, 69 mM sodium chloride (NaCl)
(각각 312, 400, 450 mOsm 오스몰(삼투압)농도에 해당) 처리해서 24h
stress를 주는 방법.

○ 두릅과 창이자추출물 모두 0.5~10 μ g/ml 구간에서 농도의존적인 효과를 나타내었다.

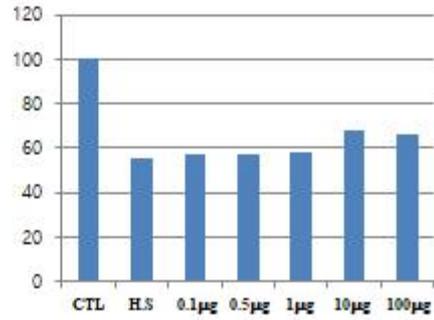
* MTT assay : 창이자와 두릅의 효과 확인 & 농도 확인

< 1 >

< 창이자 >

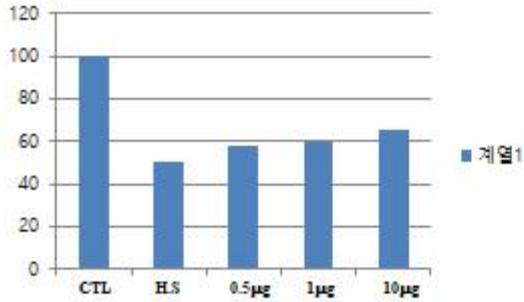


< 두릅 >



< 2 >

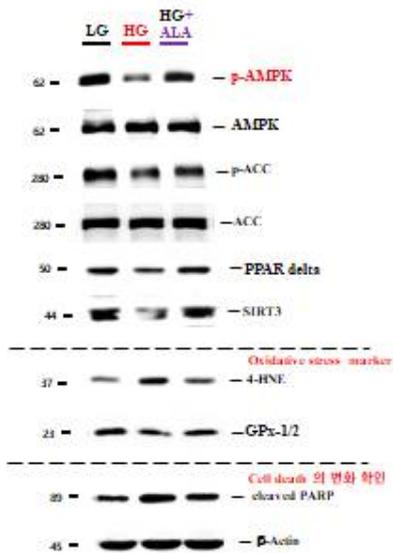
< 창이자 >



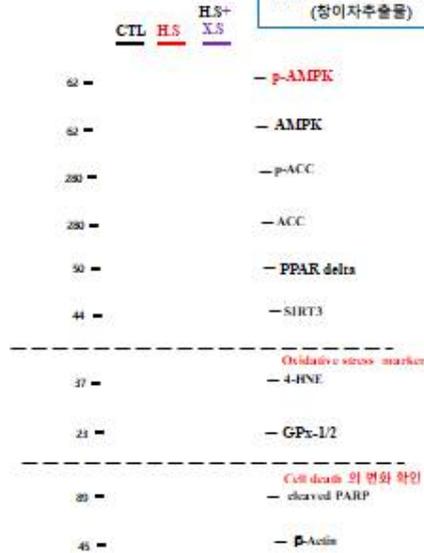
< 두릅 >



< ARPE-19 >



< HCECs >



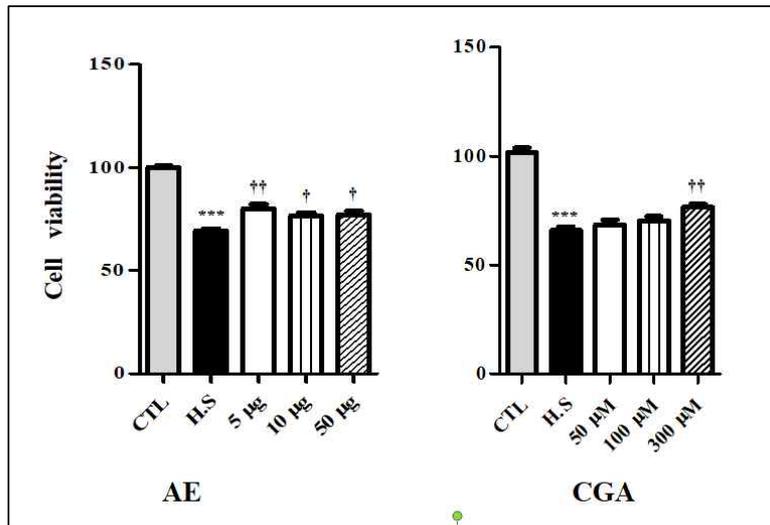
* H.S : Hyperosmolar stress
* X.S : Xanthium Strumarium L.
(창이자추출물)

○ 창이자 추출물은 안구 건조 모델에서 좋은 효능을 나타내었다.

바. 두릅추출물과 창이자추출물의 지표물질인 chlorogenic acid의 효능 비교

1) 본 실험은 AE(두릅추출물)과 CGA(chlorogenic acid: AE 효과의 주요성분)를 농도별로 전처리하고 Hyperosmolar stress 500mOsm을 주었을 때 AE(두릅추출물)과 CGA (Chlorogenic acid)의 효과를 본 결과를 비교하였다. 실험방법은 MTT assay를 사용하여 cell viability 를 확인하였다.

- 결과: AE(두릅추출물) 5 µg/ml과 CGA 300 µM를 투여했을 때 가장 좋은 효과가 나타났다.



제 3절. 두릅추출물의 안전성 확보

1. 두릅추출물의 유해물질에 대한 안전성 확보

생산된 두릅추출물에 대해 중금속과 잔류농약에 대해 시험한 결과 중금속은 기준 이하였고 잔류농약은 불검출되어서 안전한 물질임을 확인하였다.



시험성적서

접수 / 성적서 발급번호 : GHG20180705-168
문서번호 : 검사인증부-3231

검사의뢰 및 시료 정보				
제품명	두릅추출분말		제조일자	2018.07.02
의뢰대상	업체명	삼우다연	업체 대표자 / 의뢰자명	유병희
	소재지	충남 금산군 추부면 승무재로 56		
접수년월일	2018.07.05		검사완료일	2018.07.20
식품유형	-			
검사목적	참고용			

시험항목 및 결과			
시험항목	세부항목	결과	비고
중금속	타르색소	불검출	-
	납	0.34 mg/kg	
	카드뮴	0.09 mg/kg	
	비소	0.30 mg/kg	
잔류농약	수은	불검출	
	Aldrin&Dieldrin	불검출	
	Endrin	불검출	
	BHC	불검출	
	DDT	불검출	



검사자 : 선임연구원 국준영, 박영순, 박소라
책임자 : 검사인증부장 장영부

비고 : 본 검사성적서의 내용은 의뢰인이 제출한 시료에 대한 검사결과로서, 용도 이외의 광고, 전시 등의 목적으로 사용함에 따른 모든 사항에 대해, 연구소는 그 어떠한 법적 책임도 지지 않습니다.

(재)금산국제인삼약초연구소



2018.07.20

2. 두릅추출물의 동물에서의 안전성 확보

두릅추출물의 안전성 시험은 GLP기관에 의뢰하여 실시하였다.

가. 단회투여독성시험

1) 시험계 ; 특정병원균 부재 (SPF) 랫드 Sprague Dawley

Sprague-Dawley 랫드는 일반 독성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.

2) 주령 및 체중범위

- 입수시 주령: 수컷, 8주령 290.1 ~ 312.7 g / 암컷, 8주령, 174.7 ~ 202.9 g
- 입수시 동물수: 암수 각 11 마리
- 투여개시시 주령: 수컷, 9주령 319.0 ~ 341.6 g / 암컷, 9주령, 182.7 ~ 199.3 g
- 투여개시시 동물수: 암수 각 10 마리

3) 검역 및 순화

반입시 동물의 외관 검사를 실시하고 체중을 측정 한 후, 개체식별법에 따랐다. 5일의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

4) 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 순화기간 개체식별카드를 부착하였다.

관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 개체식별카드를 부착하였다.

5) 사육환경

사육상자 종류 및 크기	Polycarbonate cage, 280W × 500L × 200H (mm)
사육상자당 수용동물 수	2~3 마리
온도	20.1 ~ 22.6 °C
상대습도	48.5 ~ 62.2 %
환기횟수	10 ~ 20 회/시간
명암주기 (조명시간)	12 시간/일 (08:00 ~ 20:00)
조도	150 ~ 300 Lux

6) 사료 및 물의 급여방법

사료는 방사선조사로 멸균한 실험동물용 고형사료를, 물은 UV 멸균 및 필터를 이용하여

여과된 정제수를 자유섭취토록 하였다.

7) 시험군 구성 및 투여량 설정

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (mL/kg)	투여량 (mg/kg)
G1	male	5	1~5	10	0
	female	5	6~10	10	0
G2	male	5	11~15	10	2,000
	female	5	16~20	10	2,000

7) 군분리, 동물식별 및 잔여동물의 처분

검역 및 순화기간 종료 후, 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동물 중에서 균 평균체중의 표준편차를 계산하여 군간 균등하게 동물을 배치하였다. 암수 각각 10 마리를 선발해서 난괴법으로 2단계 (1단계: G1, 2단계: G2)로 5마리씩 (수컷; G1: 1~5, G2: 6~10, 암컷; G1: 11~15, G2: 16~20) 군분리 하였다.

군분리 후 잔여동물은 시험계로부터 제외시켰다.

8) 투여

- 투여경로 및 선택이유: 사람에게 대한 임상 예정 경로로서 경구투여를 선택하였다.
- 투여부위 및 투여법: 투여 전에 하룻밤 절식시켜 위 내용물을 비운 후, 경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여하여하며 투여 후 약 3~4시간째 사료를 재공급하였다.
- 투여액량: 투여당일에 측정된 체중을 기준으로 투여액량을 산출하였다.
- 투여 횟수 및 투여기간: 1 회/일, 단회투여

9) 관찰 및 검사항목

① 일반증상관찰

투여 당일에는 투여 후 1 시간은 지속적으로, 투여 후 4시간까지는 매시간 사망여부 및 증상을 관찰, 그 이후에는 매일 1회 이상 투여 후 14일까지 관찰하였다.

② 체중측정

모든 동물에 대하여 투여 직전, 투여 후 1, 3, 7 및 14 일째의 체중을 측정하였다.

③ 부검

투여 후 14 일째에 CO₂로 동물을 흡입마취시켜 개복한 후, 후대정맥과 복대동맥을 절단하여 방혈치사 시킨 다음, 체표 및 장기에 대한 육안적인 부검소견을 관찰하였다.

④ 통계학적 방법

부형제 및 시험물질 투여군 간의 체중 및 증체량은 ANOVA로 군간 비교하며, 통계를 위한 전산 프로그램으로는 SPSS를 이용하였다.

10) 결과

① 사망률 (Table 1)

시험기간 중 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다.

Table 1. Summary of Motality

Sex	Groups (mg/kg)	Days after dosing														Mortality (dead/used)			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14		
Male	G1 (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
	G2 (2,000)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
Female	G1 (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
	G2 (2,000)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)

② 일반증상 (Table 2)

시험기간 중 모든 시험군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

Table 2. Summary of clinical signs

Sex	Times (hrs)	Days	Signs	Groups (mg/kg)		
				G1 (0)	G2 (2,000)	
Male	0.5		No abnormality detected	5/5 ¹⁾	5/5	
	1		No abnormality detected	5/5	5/5	
	2		No abnormality detected	5/5	5/5	
	3		No abnormality detected	5/5	5/5	
	4		No abnormality detected	5/5	5/5	
		1		No abnormality detected	5/5	5/5
		2		No abnormality detected	5/5	5/5
		3		No abnormality detected	5/5	5/5
		4		No abnormality detected	5/5	5/5
		5		No abnormality detected	5/5	5/5
		6		No abnormality detected	5/5	5/5
		7		No abnormality detected	5/5	5/5
		8		No abnormality detected	5/5	5/5
		9		No abnormality detected	5/5	5/5
Female	0.5		No abnormality detected	5/5	5/5	
	1		No abnormality detected	5/5	5/5	
	2		No abnormality detected	5/5	5/5	
	3		No abnormality detected	5/5	5/5	
	4		No abnormality detected	5/5	5/5	
		1		No abnormality detected	5/5	5/5
		2		No abnormality detected	5/5	5/5
		3		No abnormality detected	5/5	5/5
		4		No abnormality detected	5/5	5/5
		5		No abnormality detected	5/5	5/5
		6		No abnormality detected	5/5	5/5
		7		No abnormality detected	5/5	5/5
		8		No abnormality detected	5/5	5/5
		9		No abnormality detected	5/5	5/5
	10		No abnormality detected	5/5	5/5	
	11		No abnormality detected	5/5	5/5	
	12		No abnormality detected	5/5	5/5	
	13		No abnormality detected	5/5	5/5	
	14		No abnormality detected	5/5	5/5	

¹⁾ Number of animals with the sign/ number of animals examined

③ 체중변화 (Table 3)

수컷의 경우 시험물질 투여군에서 투여 후 1 일차에 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였고 ($P < 0.05$), 암컷의 경우에는 투여 1 일차와 총 체중증가량에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 ($P < 0.05$). 그러나 이는 일시적인 증상으로 곧 회복되었다.

Table 3. Body weights

Sex	Groups (mg/kg)	Animal ID	Days after dosing					Final weight gain (g)
			0	1	3	7	14	
Male	G1 (0)	1	334.4	365.0	382.5	413.0	413.5	79.1
		2	333.2	362.6	370.3	407.4	411.4	78.2
		3	332.8	361.6	376.4	402.3	406.4	73.6
		4	326.6	365.6	366.3	407.4	417.5	90.9
		5	322.2	349.4	366.4	404.8	403.9	81.7
		Mean	329.8	360.8	372.4	407.0	410.5	80.7
		S.D. ¹⁾	5.24	6.61	6.99	3.98	5.46	6.41
	G2 (2,000)	6	341.6	348.3	376.0	408.4	407.2	65.6
		7	336.5	331.7	371.6	398.7	412.7	76.2
		8	327.5	335.7	361.2	381.9	374.7	47.2
		9	328.0	338.5	366.7	398.8	406.5	78.5
		10	319.0	329.9	351.7	386.9	392.4	73.4
Mean		330.5	336.8	365.4	394.9	398.7	68.2	
	S.D.	8.76	7.25	9.46	10.55	15.37	12.70	
Female	G1 (0)	11	194.2	210.5	218.5	236.3	225.9	31.7
		12	193.3	209.1	215.0	231.8	222.3	29.0
		13	191.0	205.5	215.1	227.3	218.3	27.3
		14	188.1	208.6	205.7	223.4	222.9	34.8
		15	183.1	203.7	205.4	213.6	214.4	31.3
		Mean	189.9	207.5	211.9	226.5	220.8	30.8
		S.D.	4.49	2.79	6.00	8.67	4.47	2.85
	G2 (2,000)	16	196.6	201.8	218.3	222.5	222.8	26.2
		17	199.3	207.9	223.9	232.5	224.1	24.8
		18	189.3	197.7	218.8	225.8	218.7	29.4
		19	186.6	194.4	212.6	219.3	214.9	28.3
		20	182.7	199.0	204.4	213.1	210.3	27.6
Mean		190.9	200.2	215.6	222.6	218.2	27.3	
	S.D.	6.92	5.08	7.43	7.24	5.69	1.80	

¹⁾ Standard deviation

④ 부검소견 (Table 4)

육안적인 부검소견 결과 모든 시험동물에서 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.

Table 4. Gross findings

Sex	Groups (mg/kg)	Animal ID	Gross finding	
			Organ	Observation
Male	G1 (0)	1		No organ with gross findings
		2		No organ with gross findings
		3		No organ with gross findings
		4		No organ with gross findings
		5		No organ with gross findings
	G2 (2,000)	6		No organ with gross findings
		7		No organ with gross findings
		8		No organ with gross findings
		9		No organ with gross findings
		10		No organ with gross findings
Female	G1 (0)	11		No organ with gross findings
		12		No organ with gross findings
		13		No organ with gross findings
		14		No organ with gross findings
		15		No organ with gross findings
	G2 (2,000)	16		No organ with gross findings
		17		No organ with gross findings
		18		No organ with gross findings
		19		No organ with gross findings
		20		No organ with gross findings

11) 결론

이상의 결과로 보아 두릅추출물 (MDF101)을 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 단회 경구투여 하였을 경우 사망동물이 관찰되지 않아 개략의 치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg 이상인 것으로 판단하였다.

나. 4주 DRF시험(용량결정)

1) 시험계 (예비시험)

종 및 계통 : NSam:S.D. 랫드, SPF

동물 성별	:	수컷	암컷
동물 입수시 마리 수	:	22	22
동물 투여시 마리 수	:	20	20
동물 입수 시 주령	:	5	5
동물 투여 시 주령	:	6	6
동물 입수 시 체중	:	133.2 g ~ 145.9 g	111.2 g ~ 124.4 g
동물 투여 시 체중	:	159.8 g ~ 202.2 g	134.0 g ~ 150.0 g

2) 선정사유

본 시험에 사용하는 S.D.계 랫드는 일반독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어 시험결과의 해석 및 평가에 용이하여 선택하였다.

3) 검역 및 순화

실험동물 입수 후 6 일 동안 (주)센트럴바이오 동물사육실의 환경 하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 매일 1 회 관찰하고 건강한 개체임을 확인한 후 시험에 사용하였다.

4)개체 및 사육상자 식별

개체식별은 유성펜을 이용하여 순화기간에는 빨간색, 투여 및 관찰중에는 파란색으로 각 개체번호를 꼬리에 표시하였다. 사육상자에는 개체식별카드를 부착하였다.

5) 군분리

순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 무작위 법을 이용하여 투여군 별로 군분리하였다. 군분리 시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

6) 잔여동물

잔여동물은 군분리 종료 후 CO₂가스를 사용하여 안락사 하였다.

7) 사육조건

사육환경

동물실명 : 설치류 3

사육상자정보 : 스테인레스 사육상자(420 W×270 L×180 H mm)

사육밀도 : 순화기간 : 3 마리 이하, 시험기간 : 3 마리 이하

온도 : 21.0 ~ 24.9 °C

상대습도	: 30.2 ~ 60.3 %
환기횟수	: 10 ~ 15 회/hr
조명주기	: 12 시간(오전 8 시 점등 ~ 오후 8 시 소등)
조도	: 150 ~ 300 lux
환경측정	: 시험기간 중 동물실의 온·습도는 자동 온·습도 측정기에 의하여 매 5 분마다 측정된 데이터를 1 시간 간격으로 기록하며, 조도 등의 환경조건은 SOP에 따라 정기적으로 측정하였다.
사료	: 방사선 멸균된 실험동물용 쥐 사료 1314 IRR[Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG(Im Seelenkamp 20, D-32791 Lage Postfach 11 20, D-32770 Lage_Germany)]를 자유섭취 시켰다. 오염물질 확인은 제조업체로부터 성적서를 받아 확인하였다.
음수	: 자외선 살균기 및 미세여과장치로 살균·여과한 상수도수를 300 mL 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취 시켰다. 오염물질 확인은 해당 SOP에 따른 정기적 검사를 통해 확인하였다.

8) 시험군 구성 및 투여용량 설정

① 시험군 구성

군	시험물질	투여용량 (mg/kg/day B.W.)	투여액량 (mL/kg)	성별	동물 수	동물번호
G1	멸균증류수	0	10	수컷	5	1101 ~ 1105
				암컷	5	2101 ~ 2105
G2		1,250	10	수컷	5	1201 ~ 1205
				암컷	5	2201 ~ 2205
G3	두릅추출물 (MDF101)	2,500	10	수컷	5	1301 ~ 1305
				암컷	5	2301 ~ 2305
G4		5,000	10	수컷	5	1401 ~ 1405
				암컷	5	2401 ~ 2405

② 투여량 설정

7일 경구투여 예비독성시험(시험번호: 18051ET1) 참고하여 28일 반복독성시험의 한계용량인 5,000 mg/kg을 고용량으로 선택하였으며 공비 2.0으로 2 개의 하위 용량을 구성하였다. 또한 부형제를 투여하는 대조군을 설정하였다.

③ 투여

- 투여 경로 및 선택이유

경구로 노출되었을 때에 대한 안전성을 평가하기 위하여 경구경로를 선택하였다.

- 투여횟수 및 적용기간

시험물질을 7 일/주, 1 회/일로 하여 28 일간 매일 투여하였다.

- 투여액량 산출

투여액량은 10 mL/kg B.W. 으로 하고, 개체별 투여액량은 투여 시 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 산출하였다.

- 투여방법

조제된 시험물질을 경구 투여용 주사기(존데)를 이용하여 위내에 강제 투여하였다.

9) 관찰 항목

① 일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 시험기간 중 매일 투여 전·후에 일반증상관찰을 실시하였다. 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 1 일 1 회 이상 관찰하고, 개체 별로 기록하였다.

② 사망동물의 처리

관찰기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.

③ 체중측정

체중은 입수일, 군분리일, 투여당일(투여 전), 매 주 1 회 및 부검(절식 후)시 체중을 측정하였다.

④ 사료 및 음수 섭취량

투여 첫날에 측정하였고, 그 후 매주 1 회 측정하였다. 측정방법은 사료 및 음용수를 급여한 후 당일 급여량과 익일 잔량을 측정하여 그 차이를 cage 당 마리수로 나누어 평균 섭취량(g/rat/day)을 산출하였다.

⑤ 안과학적 검사

관찰 최종 주에 모든 동물에 대하여 눈의 외관을 육안으로 관찰하였다.

10) 임상병리

① 채뇨

부검 전날에 모든 동물에 대하여 70 % 알코올로 소독한 스테인레스 실험테이블 위에서 신선뇨를 취하여 육안으로 요색조와 투명도를 관찰하였으며 요검사지 (Multistix 10 SG, Siemens, Germany)와 소변분석기 (Clinitek Status+, Siemens, Germany)를 사용하여 요검사를 실시하였다.

· 요색조_Urine color

· 투명도_Clarify

· 요당_Glucose (Glu)

· 빌리루빈_Bilirubin(Bil)

· 케톤체_Ketone body (Ket)

· 요비중_Specific gravity (SG)

· 잠혈_Blood (Blo)

· pH

· 요단백_Protein (Pro)

· 유로빌리노겐_Urobilinogen (Uro)

· 아질산염_Nitrite(Nit)

· 백혈구_Leukocyte (Leu)

② 채혈

모든 동물에 대하여 채혈 전에 약 12 시간 이상 절식시킨 실험동물을 Isoflurane를 이용하여 마취시킨 후 복대동맥으로부터 채혈하였다.

③ 혈액학적 검사

채취한 혈액 중 3 mL의 혈액은 EDTA가 함유된 CBC bottle에 취하여 혈액분석기(ADVIA 2120i, Siemens, Germany)를 이용하여 다음의 항목들을 측정하였다.

Items	Units	Analyzer
White blood cell count (WBC)	10^6 cells/ μ L	ADVIA 2120i (Siemens, Germany)
Differential leucocyte count - Neutrophils (Neut) - Lymphocytes (Lymph) - Monocytes (Mono) - Eosinophils (Eos) - Basophils (Baso)	10^3 cells/ μ L,%	
Red blood cell count (RBC)	10^6 cells/ μ L	
Hemoglobin (HGB)	g/dL	
Hematocrit (HCT)	%	
RBC indices - Mean corpuscular volume (MCV) - Mean corpuscular hemoglobin (MCH) - Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	fL pg g/dL	
Reticulocyte (Retic)	10^9 cells/L,%	
Platelet (PLT)	10^3 cells/ μ L	

④ 혈액생화학적 검사

모든 동물에 대하여 채혈한 혈액 중 혈액검사에 사용된 혈액을 제외한 나머지의 혈액을 실온에서 응고시킨 다음 원심 분리하여 혈청을 취한 후 생화학분석기 (Hitachi3100, HITACHI, Japan)와 전해질 분석기(FUJI DRI-CHEM 800, FUJIFILIM, Japan)를 이용하여 다음과 같이 측정하였다.

Items	
Aspartate aminotransferase (AST)	Total protein (TP)
Alanine aminotransferase (ALT)	Albumin (ALB)
Alkaline phosphatase (ALP)	Albumin/Globulin ratio (A/G ratio)
Total bilirubin (T-BIL)	Calcium (CA)
Gamma glutamyl-transpeptide (GGT)	Inorganic phosphorus (IP)
Creatine phosphokinase (CK)	Glucose (GLU)
Total cholesterol (T-CHO)	Sodium (Na ⁺)
Triglycerides (TG)	Potassium (K ⁺)

11) 조직병리

① 부검

관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대하여 Isoflurane 가스로 마취하에 채혈 및 안락사 시킨 다음 체표 및 모든 체공(external surface & all orifices), 두개강(cranial cavity), 흉강 및 복강의 모든 장기(thoracic and abdominal cavities & their contents)에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 투여기간 중, 사망한 동물은 관찰되지 않았다.

② 적출장기

간(liver)	신장(kidney)
부신(adrenal gland)	심장(heart)
폐(lung) 및 기관지(bronchus)	뇌(brain)
뇌하수체(pituitary gland)	비장(spleen)
정낭(seminal vesicle)	고환(testis)
난소(ovary)	부고환(epididymis)
전립선(prostate gland)	자궁(uterus)
질(vagina)	혀(tongue)
기관(trachea)	식도(esophagus)
갑상선(thyroid gland)	부갑상선(parathyroid gland)
흉선(thymus)	위(stomach)
소장/대장(small/large intestine)	방광(urinary bladder)
피부(skin) 및 유선(mammary gland)	타액선(sublingual/parotid/submandibular gland)
췌장(pancreas)	안구 및 하더리안선(eyeball)
흉골(sternum)	대퇴골(femur)
척수 (spinal cord; cervical, mid-thoracic, lumbar)	림프절 (submandibular/mesenteric lymph node)
골격근(Skeletal muscle)	좌골신경(sciatic nerve)

③ 장기중량 측정

모든 동물에 대하여 부검 시 육안 검사를 실시한 후 아래 장기에 대한 습중량을 측정하였고, 절식체중에 대한 상대장기중량비(%)를 산출하였다. 좌우가 있는 장기는 좌우를 별도로 측정하여 무게를 합산하여 산출하였다.

뇌(Brain)	비장(Spleen)	가슴샘(Thymus)
폐(Lung)	부신(Adrenal gland)	심장(Heart)
간장(Liver)	신장(Kidney)	고환(Testis)
난소(Ovary)	부고환(epididymis)	자궁(uterus)

④ 조직병리학적 검사

조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

⑤ 통계처리

통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 프로그램인 SPSS(Ver. 25)를 이용하였으며 유의수준은 $P < 0.05$ 로 설정하였다.

체중, 사료섭취량, 음수섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 장기중량의 데이터는 분산의 동질성을 비교하기 위하여 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures)의 경우에는 Levene test로 등분산성을 검정한 후, one-way ANOVA test로 유의성을 확인하였다. 사후검정시 등분산인 경우에는 Dunnett's Test, 이분산인 경우에는 Dunnett's T3-test를 이용하여 대조군과의 유의성을 검정하였다.

본 보고서에서 별도로 언급하진 않은 한 '유의한'은 대조군과 비교하였을 때 통계학적인 유의성을 나타낸다는 의미이다.

12) 결과

① 사망동물 [Table 1]

시험물질 투여기간 동안 수컷 1250 mg/kg/day 투여군 1 레에서 21 일째 사망하였다. 나머지 대조군 및 시험물질 투여군 암·수 모두에서 사망동물은 관찰되지 않았다.

② 일반증상 [Table 1]

- 실험기간 중 일반증상관찰 결과, 수컷은 5,000 mg/kg/day 투여군 2 레에서 연변(Soft stool), 설사(Diarrhea) 및 하복부, 회음부 및 항문주위의 오염(Soiled perineal region)증상이 투여 후 2 일째부터 4 일째까지 관찰되었고, 14 일째부터 부검일까지 전례에서 같은 증상이 관찰되었다.

- 2,500 mg/kg/day 투여군은 연변, 설사 및 하복부, 회음부 및 항문주위의 오염증상이 투여 후 15 일째부터 부검일까지 전례에서 관찰되었다. 1,250 mg/kg/day 투여군 1 레에서 21 일째 사망하였다. 나머지 대조군은 이상소견은 관찰되지 않았다.

- 암컷은 5,000 mg/kg/day 및 2,500 mg/kg/day 투여군에서 연변, 설사 및 하복부, 회음부 및 항문주위의 오염증상이 투여 후 14 일째부터 부검일까지 전례에서 같은 증상이 관찰되었다.

- 나머지, 대조군 및 1,250 mg/kg/day 시험물질 투여군 모두 시험물질 투여기간동안 이상소견은 관찰되지 않았다.

③ 체중변화 [Table 2 ~ 3]

체중측정 결과 수컷은 5,000 mg/kg/day 투여군에서 21일 및 28일 체중이 대조군과 비교하여 유의하게($P < 0.05$) 감소하였다. 나머지 2,500 mg/kg/day 및 1,250 mg/kg/day 투여군은 대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

암컷은 대조군과 시험물질 투여군을 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다.

④ 사료섭취량 [Table 4]

수컷 5,000 mg/kg/day 및 2,500 mg/kg/day 투여군에서 1일차 사료섭취량이 대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 감소가 관찰되었다.

암컷은 2,500 mg/kg/day 투여군에서 21일차 사료섭취량이 대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 감소가 관찰되었다. 나머지 시험물질 투여군에서의 대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

⑤ 음수섭취량 [Table 5]

모든 시험물질 투여군에서의 대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

⑥ 요검사 [Table 6 ~ 7]

모든 시험물질 투여군에서의 대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

⑦ 혈액학적 검사 [Table 8 ~ 9]

혈액학적 검사 결과, 시험물질 투여군에서의 대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

⑧ 혈액생화학적 검사 [Table 10 ~ 11]

혈액생화학적 검사 결과, 수컷은 모두 혈액학적 검사에서는 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다.

암컷은 1,250 mg/kg/day 투여군에서 CA 측정항목에서 대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 증가가 관찰되었고, 나머지 시험물질 투여군에서의 대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

⑨ 장기무게 [Table 12 ~ 13]

수컷은 모두 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다.

암컷은 1,250 mg/kg/day 투여군에서 부신(Adrenal gland)의 무게(g)가 대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 감소가 관찰되었고, 나머지 시험물질 투여군에서의 대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

⑩ 부검 [Table 14 ~ 15]

사망동물(수컷 1,250 mg/kg/day) 1례 부검소견 결과, 시험물질로 보이는 물질이 흉부에서 관찰되었다.

나머지 부검 결과, 암 수 모두 5,000 mg/kg/day 및 2,500 mg/kg/day 시험물질 투여군에서 하복부, 회음부 및 항문주위의 오염이 관찰되었고, 나머지 생존동물의 대조군 및 1,250 mg/kg/day 시험물질 투여군에서는 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 동물은 없었다.

12) 결론

- ① 시험물질인 두릅추출물(MDF101)의 암·수 S.D.계 랫드에 14 일간 반복 경구투여 시 나타나는 전신적 독성반응을 평가하고 추후 진행 할 4 주간 반복투여 독성시험의 용량 설정에 참고하고자 0 (대조군), 1,250(저용량군), 2,500 (중용량군) 및 5,000 (고용량군) mg/kg/day의 투여용량을 설정하여 S.D. Rat에 14 일간 반복 경구 투여한 결과 아래와 같이 관찰되었다.
- ② 음수섭취량, 요검사 및 혈액학적검사 에서 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- ③ 실험기간중 사망한 동물은 수컷 1250 mg/kg/day 투여군 1 례가 사망하였다. 사망동물의 부검 소견 결과 흉부에 시험물질로 의심되는 물질이 저류되어있어 시험물질 독성에 의한 사망이 아니 시험물질 투여에 의한 사망으로 판단된다.
- ④ 실험기간 중 일반증상은, 암·수 모두 5000 mg/kg/day 및 2500 mg/kg/day 투여군에서 연변, 설사 및 하복부, 회음부 및 항문주위의 오염증상이 관찰되었다. 이러한 증상 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단된다.
- ⑤ 체중측정 결과 수컷은 5000 mg/kg/day 투여군에서 21 일 및 28 일 체중이 대조군과 비교하여 유의하게($P<0.05$) 감소하였다. 나머지 2500 mg/kg/day 및 1250 mg/kg/day 투여군은 대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 체중변화는 시험물질 투여에 의한 증상으로 판단된다.
암컷은 대조군과 시험물질 투여군을 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다.
- ⑥ 사료섭취량 측정결과 암·수에서 산발적으로 대조군과 비교하여 유의한 감소가 관찰되었으나, 이러한 변화는 산발적이고 용량의존성이 확인되지 않아 시험물질에 의한 독성학적 변화가 아닌 것으로 판단하였다.
- ⑦ 혈액생화학적 검사 결과, 암컷은 1,250 mg/kg/day 투여군에서 칼슘(Calcium_CA) 측정항목에서 대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 증가가 관찰되었고, 나머지 시험물질 투여군에서의 대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 수컷은 모두 혈액학적 검사에서는 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다.
- ⑧ 장기무게 측정결과, 수컷은 모두 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다.
암컷은 1250 mg/kg/day 투여군에서 부신(Adrenal gland)의 무게(g)가 대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 감소가 관찰되었고, 나머지 시험물질 투여군에서의 대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- ⑨ 생존동물 부검결과, 암 수 모두 5000 mg/kg/day 및 2500 mg/kg/day 시험물질 투

여군에서 하복부, 회음부 및 항문주위의 오염이 관찰되었고, 나머지 생존동물의 대조군 및 1250 mg/kg/day 시험물질 투여군에서는 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 동물은 없었다. 이러한 증상은 시험물질 투여에 의한 증상으로 판단된다.

⑩ 위와 같이 시험결과를 바탕으로 추후에 실시되는 28 일 반복 경구투여 독성시험에는 장기간의 투여일정을 반영하여, 2000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 공비를 2 ~ 3 으로 하여 중용량, 저용량 투여를 추천한다.

Table 1. Mortality and Clinical signs for rats in the dose-range finding study of MDF101

Parameter	G1	G2	G3	G4
	Control	1250 mg/kg/day	2500 mg/kg/day	5000 mg/kg/day
n	5	4	5	5
Male				
Mortality ^a	0/5	1/5	0/5	0/5
No observable abnormality	5	4	5	5
Death	0	1	0	0
Soiled perineal region	0	0	5	5
Soft stool	0	0	5	5
Diarrhea	0	0	5	5
Female				
Mortality ^a	0/5	0/5	0/5	0/5
No observable abnormality	5	5	5	5
Soiled perineal region	0	0	5	5
Soft stool	0	0	5	5
Diarrhea	0	0	5	5

ⁿ : Number of animals

^a : Number of dead animals/Number of tested animals

Table 2. Final body weights for rats in the dose-range finding study of MDF101

Group	Dose (mg/kg/day)	Survival	Mean body weight (g)			Final weight relative to controls(%)
			Initial	Final	Change	
n			5/5	5/5		
Male						
G1	0	5 / 5 ^a	175.2 ± 18.6	358.1 ± 25.7	182.9 ± 19.2	100.0
G2	1250	4 / 5	184.2 ± 5.3	342.2 ± 22.9	160.1 ± 25.6	95.6
G3	2500	5 / 5	191.2 ± 8.2	341.4 ± 22.8	150.3 ± 18.5	95.4
G4	5000	5 / 5	186.2 ± 9.1	311.2 ± 41.2	125.0 ± 35.0	90.9
Female						
G1	0	5 / 5	144.7 ± 3.1	234.3 ± 7.9	89.5 ± 8.2	100.0
G2	1250	5 / 5	142.7 ± 4.2	217.3 ± 9.4	74.6 ± 7.6	92.8
G3	2500	5 / 5	143.5 ± 4.4	215.1 ± 7.3	71.6 ± 4.5	91.8
G4	5000	5 / 5	142.2 ± 5.7	223.4 ± 21.1	81.2 ± 16.3	102.8

ⁿ : Number of animals

^a : Number of dead animals/Number of tested animals

Mean ± Standard deviation

Change is body weight on Day 28 – body weight on Day 1.

Table 3. Body weight changes for rats in the dose-range finding study of MDF101

Day	G1	G2	G3	G4
	0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	2500 mg/kg/day	5000 mg/kg/day
n	5/5	5/5	5/5	5/5
Male				
1	175.2 ± 18.6	184.2 ± 5.3	191.2 ± 8.2	186.2 ± 9.1
7	246.0 ± 10.1	244.8 ± 14.5	243.0 ± 12.1	223.9 ± 16.1
14	287.7 ± 20.1	289.6 ± 14.9	290.9 ± 16.7	260.7 ± 33.9
21	332.3 ± 20.7	323.0 ± 21.0	327.1 ± 19.4	283.1 ± 33.2*
28	358.1 ± 25.7	342.2 ± 22.9	341.4 ± 22.8	311.2 ± 41.2*
Female				
1	144.7 ± 3.1	142.7 ± 4.2	143.5 ± 4.4	142.2 ± 5.7
7	177.6 ± 7.8	170.5 ± 6.5	167.4 ± 7.5	169.2 ± 8.7
14	198.6 ± 4.8	185.5 ± 11.1	187.2 ± 10.8	192.8 ± 9.1
21	219.5 ± 4.9	211.0 ± 5.8	205.5 ± 9.7	207.9 ± 14.4
28	234.3 ± 7.9	217.3 ± 9.4	215.1 ± 7.3	223.4 ± 21.1

* : Significantly different from negative control ($P < 0.05$) by Dunnett's Test

ⁿ : Number of animals

Mean ± Standard deviation

The day of first treatment was designated Day 1.

Table 4. Food consumptions for rats in the dose-range finding study of MDF101

Day	G1		G2		G3		G4	
	0 mg/kg/day		1250 mg/kg/day		2500 mg/kg/day		5000 mg/kg/day	
n	2/2		2/2		2/2		2/2	
Male								
1	23.1 ± 0.9	20.7 ± 0.4	19.0 ± 0.1*	13.8 ± 1.6*				
7	28.1 ± 0.9	26.2 ± 0.3	25.4 ± 2.3	24.9 ± 4.8				
14	28.6 ± 0.9	27.2 ± 1.4	29.7 ± 0.6	28.6 ± 2.1				
21	31.4 ± 0.6	26.2 ± 3.9	29.9 ± 0.9	29.4 ± 6.6				
28	34.7 ± 1.9	27.5 ± 7.9	31.9 ± 2.1	35.6 ± 6.3				
Female								
1	14.4 ± 1.7	14.4 ± 1.7	13.7 ± 0.6	12.4 ± 0.9				
7	20.5 ± 1.2	20.9 ± 0.6	18.6 ± 2.6	21.0 ± 1.2				
14	18.9 ± 1.2	17.4 ± 0.7	18.6 ± 0.5	21.2 ± 1.9				
21	26.1 ± 0.4	20.7 ± 1.6	20.2 ± 3.8	17.9 ± 0.1*				
28	35.8 ± 19.2	27.8 ± 13.1	25.8 ± 14.5	34.0 ± 21.8				

* : Significantly different from negative control ($P < 0.05$) by Dunnett's Test

ⁿ : Number of animals

Mean ± Standard deviation

The day of first treatment was designated Day 1.

Table 5. Water consumptions for rats in the dose-range finding study of MDF101

Day	G1		G2		G3		G4	
	0 mg/kg/day		1250 mg/kg/day		2500 mg/kg/day		5000 mg/kg/day	
n	2/2		2/2		2/2		2/2	
Male								
1	28.8 ± 0.1	27.3 ± 2.6	31.5 ± 7.7	33.1 ± 5.0				
7	20.2 ± 21.5	20.3 ± 1.7	25.4 ± 5.5	14.6 ± 5.0				
14	37.2 ± 2.0	35.8 ± 1.3	44.9 ± 7.7	52.7 ± 10.3				
21	44.2 ± 3.0	39.7 ± 0.7	49.0 ± 14.1	60.7 ± 6.4				
28	48.7 ± 0.7	46.0 ± 4.5	56.7 ± 5.4	66.1 ± 15.0				
Female								
1	26.4 ± 1.8	27.5 ± 1.1	25.0 ± 1.0	28.3 ± 1.5				
7	50.5 ± 24.1	43.0 ± 8.6	49.4 ± 5.2	67.8 ± 23.8				
14	28.4 ± 2.7	23.6 ± 0.7	30.0 ± 5.9	37.6 ± 10.2				
21	35.4 ± 2.3	34.1 ± 2.5	36.7 ± 22.1	44.7 ± 3.3				
28	46.1 ± 3.3	43.4 ± 10.3	40.4 ± 1.0	63.0 ± 41.6				

ⁿ : Number of animals

Mean ± Standard deviation

The day of first treatment was designated Day 1.

Table 6. Urinalysis results for male rats in the dose-range finding study of MDF101

Parameter	G1	G2	G3	G4
	0 mg/kg/day	1250 mg/kg/day	2500 mg/kg/day	5000 mg/kg/day
n	5/5	5/5	5/5	5/5
Male				
Color				
Yellow	5	4	5	5
Clarity				
Clear	5	4	5	5
Glucose (mg/dL)				
Negative	5	4	5	5
Bilirubin (mg/dL)				
Negative	4	4	4	4
small	1	-	1	1
Ketone body (mg/dL)				
Negative	-	-	-	2
Trace	1	-	-	-
15	4	3	2	3
40	-	1	3	-
Specific gravity				
1.010				
1.015	1	1	2	2
1.020	2	-	1	3
1.025	2	3	2	-
Blod				
Negative	5	2	4	5
Trace inact	-	2	1	-
Small	-	-	-	-
pH				
8.5	4	3	3	3
≥9.0	1	1	2	2
Protein (mg/dL)				
Negative	-	-	-	-
Trace	-	-	-	-
30	2	1	-	1
100	3	2	5	2
≥300	-	1	-	2
Urobilinogen (E.U./dL)				
0.2	3	2	1	4
1.0	2	2	4	1
Nitrite				
Negative	5	3	5	5
Positive	-	1	-	-
Leukocytes				
Negative	1	0	1	4
Trace	4	4	4	1
Small	-	-	-	-

n : Number of animals

- : Not applicable

Table 7. Urinalysis results for female rats in the dose-range finding study of MDF101

Parameter	G1		G2		G3		G4	
	n	0 mg/kg/day	1250 mg/kg/day	2500 mg/kg/day	5000 mg/kg/day	5000 mg/kg/day	5000 mg/kg/day	5000 mg/kg/day
Female								
Color	Yellow	5	5	5	5	5	5	5
Clarity	Clear	5	5	5	5	5	5	5
Glucose (mg/dL)	Negative	5	5	5	5	5	5	5
Bilirubin (mg/dL)	Negative	5	5	3	5	5	5	5
	small	-	-	2	-	-	-	-
Ketone body (mg/dL)	Negative	3	3	-	-	-	2	2
	Trace	2	1	-	-	-	2	2
	15	-	1	5	5	5	1	1
Specific gravity	1.010	-	-	1	1	1	1	1
	1.015	1	-	2	2	2	2	2
	1.020	3	2	1	1	1	1	1
	1.025	-	1	-	-	-	1	1
	≥1.030	1	2	1	1	1	-	-
Blod	Negative	2	2	2	2	2	3	3
	Tace inact	1	2	3	3	3	2	2
	Small	2	1	-	-	-	-	-
pH	Tace inact	-	-	1	1	1	-	-
	7	3	-	-	-	-	-	-
	7.5	1	1	-	-	-	-	-
	8	1	1	-	-	-	-	-
	8.5	-	3	3	3	3	4	4
	≥9.0	-	-	1	1	1	1	1
Protein (mg/dL)	Negative	-	2	-	-	-	-	-
	trace	3	-	-	-	-	1	1
	30	1	-	-	-	-	2	2
	100	1	3	-	-	-	1	1
	300	-	-	5	5	5	1	1
Urobilinogen (E.U./dL)	0.2	5	3	-	-	-	4	4
	1	-	2	-	-	-	-	-
	2	-	-	4	4	4	1	1
	4	-	-	1	1	1	-	-
Nitrite	Negative	4	5	5	5	5	4	4
	Positive	1	-	-	-	-	-	-
Leukocytes	Negative	5	4	5	5	5	5	5
	Tace inact	-	1	-	-	-	-	-

n : Number of animals, - : Not applicalbe

Table 8. Hematology data for male rats in the dose-range finding study of MDF101

Parameter	Unit	G1	G2	G3	G4
		0 mg/kg/day	1250 mg/kg/day	2500 mg/kg/day	5000 mg/kg/day
n		5/5	4/5	5/5	5/5
Male					
WBC	$\times 10^3/\mu\text{L}$	3.8 ± 2.3	6.0 ± 1.0	7.2 ± 0.9	6.8 ± 1.6
NEUT	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0.84 ± 0.59	0.84 ± 0.59	0.84 ± 0.59	0.84 ± 0.59
NEU	%	15.68 ± 4.1	15.68 ± 4.1	15.68 ± 4.1	15.68 ± 4.1
LYM	$\times 10^3/\mu\text{L}$	3.82 ± 1.65	3.82 ± 1.65	3.82 ± 1.65	3.82 ± 1.65
LYM	%	79.4 ± 4.57	79.4 ± 4.57	79.4 ± 4.57	79.4 ± 4.57
MONO	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0.14 ± 0.05	0.14 ± 0.05	0.14 ± 0.05	0.14 ± 0.05
MONO	%	2.9 ± 0.62	2.9 ± 0.62	2.9 ± 0.62	2.9 ± 0.62
EOS	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0.12 ± 0.04	0.12 ± 0.04	0.12 ± 0.04	0.12 ± 0.04
EOS	%	1.78 ± 0.36	1.78 ± 0.36	1.78 ± 0.36	1.78 ± 0.36
BASO	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
BASO	%	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
RBC	$\times 10^6/\mu\text{L}$	7.47 ± 0.6	7.47 ± 0.6	7.47 ± 0.6	7.47 ± 0.6
HGB	g/dL	15.7 ± 0.8	15.7 ± 0.8	15.7 ± 0.8	15.7 ± 0.8
HCT	%	43.2 ± 5.5	43.2 ± 5.5	43.2 ± 5.5	43.2 ± 5.5
MCV	fL	57.6 ± 3	57.6 ± 3	57.6 ± 3	57.6 ± 3
MCH	Pg	21 ± 1.1	21 ± 1.1	21 ± 1.1	21 ± 1.1
MCHC	g/dL	36.6 ± 3.6	36.6 ± 3.6	36.6 ± 3.6	36.6 ± 3.6
RETI	$10^9/\text{L}$	225.92 ± 30.56	225.92 ± 30.56	225.92 ± 30.56	225.92 ± 30.56
RETI	%	3.02 ± 0.25	3.02 ± 0.25	3.02 ± 0.25	3.02 ± 0.25
PLT	$\times 10^3/\mu\text{L}$	1064 ± 178	1064 ± 178	1064 ± 178	1064 ± 178

* : Significantly different from negative control ($P < 0.05$) by Dunnett's Test

n : Number of animals

Mean ± Standard deviation

Table 9. Hematology data for female rats in the dose-range finding study of MDF101

Parameter	Unit	G1	G2	G3	G4
		0 mg/kg/day	1250 mg/kg/day	2500 mg/kg/day	5000 mg/kg/day
n		5/5	5/5	5/5	5/5
Female					
WBC	$\times 10^3/\mu\ell$	3.0 \pm 0.7	2.6 \pm 1.8	3.9 \pm 0.7	4.9 \pm 1.6
NEUT	$\times 10^3/\mu\ell$	0.4 \pm 0.16	0.38 \pm 0.22	0.26 \pm 0.05	0.42 \pm 0.23
NEU	%	8 \pm 3.2	9 \pm 4.7	5.4 \pm 0.9	7.3 \pm 2.6
LYM	$\times 10^3/\mu\ell$	5 \pm 2.1	3.9 \pm 1.6	4 \pm 0.5	5 \pm 1.5
LYM	%	88.6 \pm 2.8	87 \pm 5.9	90.8 \pm 2	89 \pm 3.4
MONO	$\times 10^3/\mu\ell$	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0
MONO	%	1.6 \pm 0.6	1.9 \pm 1	1.9 \pm 1.1	1.4 \pm 0.4
EOS	$\times 10^3/\mu\ell$	0.1 \pm 0	0.1 \pm 0	0.1 \pm 0	0.1 \pm 0.1
EOS	%	1.4 \pm 0.2	1.7 \pm 1.1	1.6 \pm 0.9	1.8 \pm 1.4
BASO	$\times 10^3/\mu\ell$	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
BASO	%	0.1 \pm 0	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0 \pm 0.1
RBC	$\times 10^6/\mu\ell$	7 \pm 0.3	7.1 \pm 0.4	7.3 \pm 0.5	7 \pm 0.4
HGB	g/dL	14.5 \pm 0.4	14.5 \pm 0.7	15.1 \pm 0.3	14.9 \pm 0.5
HCT	%	39.4 \pm 1.8	40.1 \pm 2	40.7 \pm 2.3	40 \pm 3
MCV	fL	56.3 \pm 1.2	56.1 \pm 0.9	55.7 \pm 1.5	56.9 \pm 2
MCH	Pg	20.8 \pm 1.3	20.4 \pm 0.6	20.7 \pm 1.6	20.8 \pm 0.6
MCHC	g/dL	36.9 \pm 2.6	36.3 \pm 0.6	37.1 \pm 2.6	37.3 \pm 2.4
RETI	$10^9/L$	2.9 \pm 0.3	2.9 \pm 0.6	2.7 \pm 0.4	3 \pm 0.6
RETI	%	205.7 \pm 24.5	205.2 \pm 31.8	197.6 \pm 28.6	210.9 \pm 41.7
PLT	$\times 10^3/\mu\ell$	1191 \pm 128	1199 \pm 101	1324 \pm 110	1118 \pm 613

n : Number of animals

Mean \pm Standard deviation

Table 10. Clinical chemistry data for male rats in the dose-range finding study of MDF101

Parameter	Unit	G1	G2	G3	G4
		0 mg/kg/day	1250 mg/kg/day	2500 mg/kg/day	5000 mg/kg/day
n		5/5	4/5	5/5	5/5
Male					
AST	IU/L	158.94 ± 144.71	92.35 ± 21.96	109.76 ± 17.34	95.26 ± 14.90
ALT	IU/L	39.4 ± 7.7	39.8 ± 9.5	38.3 ± 6.5	52.3 ± 13.5
ALP	IU/L	581.6 ± 151.2	547.1 ± 11.9	452.8 ± 114.4	456.1 ± 105.7
T-BIL	mg/dL	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.0 ± 0.0
GGT	IU/L	-0.1 ± 0.4	-0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.4	0.2 ± 0.4
CK	IU/L	1423.0 ± 1547.6	618.5 ± 356.0	992.9 ± 507.7	757.4 ± 287.6
T-CHO	mg/dL	65.3 ± 5.4	61.8 ± 6.5	67.3 ± 15.3	55.6 ± 6.6
TG	mg/dL	38.7 ± 12.5	43.2 ± 12.5	47.9 ± 9.5	43.2 ± 23.8
BUN	mg/dL	14.5 ± 1.5	15 ± 2	16 ± 2	16 ± 2
CREA	mg/dL	0.21 ± 0.05	0.20 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.2 ± 0.0
TP	g/dL	5.0 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.0 ± 0.2
ALB	g/dL	2.1 ± 0.1	2.05 ± 0.06	2.06 ± 0.09	2.18 ± 0.04
CA	mg/dL	9.3 ± 0.3	9.1 ± 0.4	9.3 ± 0.2	9.3 ± 0.2
IP	mg/dL	7.7 ± 0.7	7.5 ± 0.6	7.6 ± 0.6	7.7 ± 0.5
GLU	mg/dL	118.8 ± 21.1	140.0 ± 11.0	133.9 ± 17.0	121.1 ± 6.1
Na ⁺	mmol/L	143.2 ± 1.6	142.8 ± 0.5	141.6 ± 0.5	141.8 ± 1.3
K ⁺	mmol/L	4.7 ± 0.8	3.4 ± 1.8	4.6 ± 0.6	4.6 ± 0.4
Cl ⁻	mmol/L	107.8 ± 1.5	107.0 ± 1.8	106.4 ± 3.4	103.8 ± 4.1

ⁿ : Number of animals
Mean ± Standard deviation

Table 11. Clinical chemistry data for female rats in the dose-range finding study of MDF101

Parameter	Unit	G1		G2		G3		G4	
		0 mg/kg/day		1250 mg/kg/day		2500 mg/kg/day		5000 mg/kg/day	
n		5/5		5/5		5/5		5/5	
Female									
AST	IU/L	72.6 ± 16.6	16.6	73.4 ± 11.7	11.7	81.3 ± 14.3	14.3	66.1 ± 10.2	10.2
ALT	IU/L	24.6 ± 4.0	4.0	25.1 ± 7.0	7.0	24.9 ± 2.7	2.7	25.0 ± 2.5	2.5
ALP	IU/L	370.3 ± 36.2	36.2	304.7 ± 13.5	13.5	339.1 ± 41.8	41.8	345.5 ± 57.2	57.2
T-BIL	mg/dL	0.04 ± 0.01	0.01	0.04 ± 0.01	0.01	0.04 ± 0.01	0.01	0.0 ± 0.0	0.0
GGT	IU/L	0.7 ± 0.3	0.3	0.7 ± 0.6	0.6	0.9 ± 0.5	0.5	0.3 ± 0.5	0.5
CK	IU/L	419.4 ± 283.1	283.1	426.4 ± 141.2	141.2	629.0 ± 358.6	358.6	295.9 ± 115.0	115.0
T-CHO	mg/dL	65.0 ± 9.9	9.9	69.6 ± 6.2	6.2	64.4 ± 9.9	9.9	64.7 ± 16.6	16.6
TG	mg/dL	19.6 ± 5.8	5.8	16.4 ± 2.8	2.8	17.5 ± 5.4	5.4	20.6 ± 4.0	4.0
BUN	mg/dL	18 ± 1	1	17 ± 3	3	17 ± 2	2	15 ± 3	3
CREA	mg/dL	0.22 ± 0.02	0.02	0.17 ± 0.03	0.03	0.23 ± 0.03	0.03	0.2 ± 0.0	0.0
TP	g/dL	5.0 ± 0.1	0.1	5.3 ± 0.2	0.2	5.1 ± 0.1	0.1	5.0 ± 0.1	0.1
ALB	g/dL	2.1 ± 0.1	0.1	2.3 ± 0.1	0.1	2.2 ± 0.1	0.1	2.2 ± 0.1	0.1
CA	mg/dL	9.2 ± 0.1	0.1	9.6 ± 0.2*	0.2	9.4 ± 0.3	0.3	9.42 ± 0.2	0.2
IP	mg/dL	7.1 ± 0.2	0.2	7.3 ± 0.3	0.3	7.4 ± 0.5	0.5	7.52 ± 0.45	0.45
GLU	mg/dL	122.2 ± 16.6	16.6	105.1 ± 21.4	21.4	90.7 ± 12.2	12.2	108.00 ± 17.90	17.90
Na ⁺	mmol/L	141.4 ± 0.5	0.5	141.4 ± 1.1	1.1	140.8 ± 1.5	1.5	140.0 ± 1.2	1.2
K ⁺	mmol/L	4.0 ± 0.2	0.2	4.3 ± 0.3	0.3	4.2 ± 0.4	0.4	4.2 ± 0.4	0.4
Cl ⁻	mmol/L	104.8 ± 1.8	1.8	104.8 ± 2.5	2.5	106.0 ± 1.9	1.9	105.4 ± 2.4	2.4

* : Significantly different from negative control ($P < 0.05$) by Dunnett's Testⁿ : Number of animals

Mean ± Standard deviation

Table 12. Organ weights for male rats in the dose-range finding study of MDF101

Parameter	G1		G2		G3		G4	
	0 mg/kg/day		1250 mg/kg/day		2500 mg/kg/day		5000 mg/kg/day	
Male								
Necropsy b.w. (g)	329.7	± 24.2	319.0	± 19.9	318.9	± 22.2	290.2	± 36.6
n	5		4		5		5	
Liver								
Absolute(g)	10.142	± 0.983	10.236	± 1.265	10.240	± 1.082	8.966	± 1.236
Relative(%)	3.119	± 0.082	3	± 0.210	3.208	± 0.194	3.087	± 0.113
n	5		4		5		5	
Kidney								
Absolute(g)	2.636	± 0.220	2.508	± 0.302	2.474	± 0.256	2.363	± 0.238
Relative(%)	0.775	± 0.024	0.788	± 0.100	0.776	± 0.060	0.817	± 0.030
n	5		4		5		5	
Spleen								
Absolute(g)	0.645	± 0.131	0.803	± 0.102	0.674	± 0.110	0.609	± 0.109
Relative(%)	0.230	± 0.030	0.251	± 0.018	0.211	± 0.027	0.210	± 0.023
n	5		4		5		5	
Adrenal gland								
Absolute(g)	0.049	± 0.009	0.059	± 0.011	0.068	± 0.002	0.060	± 0.009
Relative(%)	0.017	± 0.003	0.019	± 0.004	0.021	± 0.002	0.021	± 0.003
n	5		4		5		5	
Testis								
Absolute(g)	3.320	± 0.242	3.597	± 0.340	3.571	± 0.268	3.485	± 0.248
Relative(%)	1.081	± 0.082	1.131	± 0.128	1.122	± 0.074	1.218	± 0.199
n	5		4		5		5	
Brain								
Absolute(g)	2.046	± 0.062	2.013	± 0.056	2.011	± 0.068	1.999	± 0.117
Relative(%)	0.614	± 0.027	0.632	± 0.025	0.632	± 0.035	0.695	± 0.063
n	5		4		5		5	
Lung								
Absolute(g)	1.554	± 0.106	1.485	± 0.117	1.564	± 0.121	1.417	± 0.158
Relative(%)	0.461	± 0.012	0.466	± 0.028	0.491	± 0.021	0.489	± 0.019
n	5		4		5		5	
Heart								
Absolute(g)	1.341	± 0.105	1.281	± 0.143	1.326	± 0.119	1.142	± 0.135
Relative(%)	0.404	± 0.009	0.401	± 0.031	0.415	± 0.015	0.394	± 0.018
n	5		4		5		5	
Thymus								
Absolute(g)	0.371	± 0.116	0.509	± 0.099	0.550	± 0.093	0.429	± 0.059
Relative(%)	0.154	± 0.027	0.159	± 0.026	0.172	± 0.019	0.149	± 0.018
n	5		4		5		5	
Epididymis								
Absolute(g)	0.295	± 0.116	0.509	± 0.099	0.550	± 0.093	0.429	± 0.059
Relative(%)	0.154	± 0.027	0.159	± 0.026	0.172	± 0.019	0.149	± 0.018
n	5		4		5		5	

n : Number of animals

Mean ± Standard deviation

Table 13. Organ weights for female rats in the dose-range finding study of MDF101

Parameter	G1	G2	G3	G4
	0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
Female				
Necropsy b.w. (g)	213.6 ± 8.5	199.4 ± 7.7	198.5 ± 7.4	208.2 ± 21.0
n	5	5	5	5
Liver				
Absolute(g)	6.876 ± 0.386	6.037 ± 0.566	6.385 ± 0.208	6.777 ± 0.812
Relative(%)	3.219 ± 0.150	3.025 ± 0.210	3.219 ± 0.129	3.251 ± 0.120
n	5	5	5	5
Kidney				
Absolute(g)	1.709 ± 0.099	1.726 ± 0.207	1.666 ± 0.133	1.656 ± 0.155
Relative(%)	0.800 ± 0.035	0.864 ± 0.078	0.839 ± 0.062	0.796 ± 0.026
n	5	5	5	5
Spleen				
Absolute(g)	0.576 ± 0.063	0.539 ± 0.064	0.539 ± 0.054	0.579 ± 0.094
Relative(%)	0.269 ± 0.021	0.270 ± 0.023	0.271 ± 0.022	0.278 ± 0.038
n	5	5	5	5
Adrenal gland				
Absolute(g)	0.083 ± 0.004	0.069 ± 0.004*	0.078 ± 0.006	0.074 ± 0.008
Relative(%)	0.039 ± 0.003	0.035 ± 0.002	0.039 ± 0.003	0.036 ± 0.006
n	5	5	5	5
Ovaries				
Absolute(g)	0.111 ± 0.022	0.106 ± 0.019	0.115 ± 0.022	0.108 ± 0.020
Relative(%)	0.052 ± 0.011	0.053 ± 0.009	0.058 ± 0.010	0.052 ± 0.010
n	5	5	5	5
Brain				
Absolute(g)	1.904 ± 0.065	1.878 ± 0.097	1.858 ± 0.069	1.864 ± 0.099
Relative(%)	0.893 ± 0.055	0.943 ± 0.068	0.936 ± 0.029	0.898 ± 0.044
n	5	5	5	5
Lung				
Absolute(g)	1.239 ± 0.060	1.163 ± 0.095	1.211 ± 0.116	1.205 ± 0.090
Relative(%)	0.581 ± 0.030	0.583 ± 0.032	0.610 ± 0.052	0.580 ± 0.038
n	5	5	5	5
Heart				
Absolute(g)	0.937 ± 0.074	0.898 ± 0.060	0.877 ± 0.046	0.918 ± 0.089
Relative(%)	0.438 ± 0.019	0.450 ± 0.021	0.442 ± 0.019	0.441 ± 0.006
n	5	5	5	5
Thymus				
Absolute(g)	0.415 ± 0.065	0.449 ± 0.095	0.412 ± 0.115	0.433 ± 0.144
Relative(%)	0.194 ± 0.024	0.225 ± 0.044	0.207 ± 0.058	0.205 ± 0.051
n	5	5	5	5
Uterus				
Absolute(g)	0.497 ± 0.104	0.536 ± 0.056	0.449 ± 0.047	0.485 ± 0.138
Relative(%)	0.232 ± 0.042	0.269 ± 0.033	0.226 ± 0.023	0.238 ± 0.073
n	5	5	5	5

* : Significantly different from negative control ($P < 0.05$) by Dunnett's Test^a : Number of animals

Mean ± Standard deviation

Table 14. Summary incidence of necropsy findings for male rats in the dose-range finding study of MDF101

Organs	Findings	Control	1250 mg/kg/day	2500 mg/kg/day	5000 mg/kg/day	
		T	T	U	T	T
	No gross findings	5	4	1	0	0
Anogenital region	Soiled perineal region	0	0	0	5	5

T: Terminal sacrifice, U: Unscheduled death

Table 15. Summary incidence of necropsy findings for male rats in the dose-range finding study of MDF101

Organs	Findings	Control	1250 mg/kg/day	2500 mg/kg/day	5000 mg/kg/day
		T	T	T	T
All	No gross findings	5	5	0	0
Anogenital region	Soiled perineal region	0	0	5	5

T: Terminal sacrifice

다. 13주 반복 및 4주 회복시험

1) 시험계

종 및 계통	:	NSam: Sprague-Dawley 랫드, SPF (Specific Pathogen Free)			
동물 성별	:	수컷	암컷		
동물 입수 시 마리 수	:	60	60		
동물 투여 시 마리 수	:	52	52		
동물 입수 시 주령	:	5	5		
동물 투여 시 주령	:	6	6		
동물 입수 시 체중	:	126.0 g ~ 151.1 g	120.7 g ~ 160.2 g		
동물 투여 개시 체중	:	176.0 g ~ 199.5 g	152.4 g ~ 186.3 g		

2) 선정사유

본 시험에 사용하는 Sprague-Dawley 랫드는 일반독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.

3) 검역 및 순화

실험동물 입수 후 수컷은 6일, 암컷은 7일 동안 사육실의 환경 하에서 검역 및 순화시키면서

1 회/일 빈도로 일반증상을 관찰하고 건강한 개체임을 확인한 후 시험에 사용하였다.

4) 개체 및 사육상자 식별

개체식별은 유성팬을 이용하여 순화기간에는 빨간색, 시험 중에는 파란색으로 각 개체번호를 꼬리에 표시하였다. 사육상자에는 시험번호, 시험물질명, 시험항목, 성별, 동물번호, 시험책임자 및 시험담당자를 기록한 개체식별카드를 부착하였다.

5) 군분리

순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 무작위 법을 이용하여 투여군 별로 군분리 하였다. 군분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

6) 잔여동물

잔여동물은 군분리 종료 후 CO₂가스를 사용하여 안락사 시켰다.

7) 사육조건

사육환경 동물실명	:	설치류 1
사육상자정보	:	스테인레스 사육상자(420 W×270 L×180 H mm)
사육밀도	:	순화기간: 3 마리 이하, 실험기간: 3 마리 이하
온도	:	19.2 ~ 24.9 °C
상대습도	:	37.6 ~ 57.8 %
환기횟수	:	10 ~ 15 회/hr
조명주기	:	12 시간(오전 8 시 점등 ~ 오후 8 시 소등)
조도	:	150 ~ 300 lux
환경측정	:	시험기간 중 동물실의 온·습도는 자동 온·습도 측정기에 의하여 매 5 분마다 측정된 데이터를 1 시간 간격으로 기록하며, 조도 등의 환경조건은 SOP에 따라 정기적으로 측정하였다.
사료	:	방사선 멸균된 실험동물용 쥐 사료 1314 IRR[Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG(Im Seelenkamp 20, D-32791 Lage Postfach 11 20, D-32770 Lage_Germany)]를 자유섭취시켰다. 오염물질 확인은
음수	:	제조업체로부터 성적서를 받아 확인하였다. 자외선 살균기 및 미세여과장치로 살균·여과한 상수도수를 500 mL 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취시켰다. 오염물질 확인은 해당 SOP에 따른 정기적 검사를 통해 확인하였다.

8) 시험군 구성 및 투여용량 설정

가) 시험군 구성

군	시험물질	투여용량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg)	성별	구분	동물 수	동물번호
G1	멸균증류수	0	10	수컷	시험군	10	1101 ~ 1110
					회복군	6	1111 ~ 1116
				암컷	시험군	10	2101 ~ 2110
					회복군	6	2111 ~ 2116
G2	두릅추출물 (MDF101)	500	10	수컷	시험군	10	1201 ~ 1210
				암컷	시험군	10	2201 ~ 2218
G3	두릅추출물 (MDF101)	1,000	10	수컷	시험군	10	1301 ~ 1310
				암컷	시험군	10	2301 ~ 2310
G4	두릅추출물 (MDF101)	2,000	10	수컷	시험군	10	1401 ~ 1410
					회복군	6	1411 ~ 1416
				암컷	시험군	10	2401 ~ 2410
					회복군	6	2411 ~ 2416

나) 투여량 설정

- 본 시험물질을 사용하여 동일한 시험조건에서 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day로 28일 반복 경구투여 용량결정시험 (Study No. 19085ET2)을 실시한 결과는 다음과 같다.
- 실험기간 중 시험물질 투여에 의한 일반증상은 5,000 mg/kg/day 및 2,500 mg/kg/day 투여군 암·수 모두에서 연변, 설사 및 하복부, 회음부 및 항문주위의 오염증상이 관찰되었다. 체중측정 결과, 수컷 5,000 mg/kg/day 투여군 7 일, 21 일 체중 및 증체량 체중이 부형제대조군과 비교하여 유의하게($P<0.05$) 감소하였다. 또한, 28 일 체중에서는 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았으나, 부형제대조군과 비교하여 13.1 % 체중이 감소하였다. 암컷은 2,500 mg/kg/day 투여군에서 체중 증체량이 부형제대조군과 비교하여 유의하게($P<0.05$) 감소하였다.
- 모든 동물 부검결과, 암·수 모두 5,000 mg/kg/day 및 2,500 mg/kg/day 시험물질투여군에서 하복부, 회음부 및 항문주위의 오염이 관찰되었고, 나머지 생존동물의 부형제대조군 및 1,250 mg/kg/day 시험물질투여군에서는 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 동물은 없었다.
- 따라서, 두릅추출물(MDF101)을 Sprague-Dawley 랫드에 28 일간 1,250(저용량), 2,500(중용량) 및 5,000(고용량) mg/kg/day 용량으로 반복 경구투여시 무독성량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)은 수컷은 2,500 mg/kg/day 이상으로 판단되었고, 암컷은 5,000 mg/kg/day 이상으로 판단되었다. 이러한 용량결정시험 결과로 시험물질을 90 일 반복 경구투여 독성시험의 경우 투여기간을 고려하여 암·수 모두 2000 mg/kg/day를 고용량군으로 설정하고, 공비를 2 로 한 중용량, 저용량군으로 설정하였다.

다) 투여

- 투여 경로 및 선택이유

임상예정 경로인 경구로 노출되었을 때에 대한 안전성을 평가하기 위하여 경구경로를 선택하였다.

- 투여횟수 및 적용기간

시험물질을 7 일/주, 1 회/일로 하여 90일간 매일 08 ~ 15 시에 경구 투여하였다. 단, 조제물 분석일 및 상세관찰 실시일에는 17시 이내에 투여하였다.

- 투여액량 산출

투여액량은 10 mL/kg B.W.으로 하였고, 개체별 투여량은 투여 시 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 산출하였다.

- 투여방법

조제된 시험물질을 경구 투여용 주사기(존데)를 이용하여 위내에 강제 투여하였다.

라) 관찰 항목

① 일반증상 관찰

투여 및 회복기간 동안 사망동물은 2 회/1 일 빈도로 확인하였다. 일반증상의 종류 및 발현일은 1 회/1 일 이상 관찰하였고, 투여개시일에는 투여 후 30 분부터 4 시간째까지 매시간 일반증상을 관찰하였으며, 개체별로 기록하였다. 투여개시일을 Day 1로 설정하였다.

② 상세관찰

- 투여개시 전, 투여 및 회복기간 동안 매주 1 회 실시하였고, 개체별로 기록하였다. 이때, 동물을 별도의 사육상자에 수용한 후 관찰하였다. 상세관찰 항목은 다음과 같다.

- 피부(skin), 털(fur), 눈(eyes), 점막(mucous membranes)에서의 변화

- 분비물(secretions) 및 배설물(excretions)의 발생

- 자율신경의 활성화(autonomic activity); 유루(lacrimation), 입모(piloerection), 동공크기(pupil size), 비정상적인 호흡 패턴(unusual respiratory pattern)

- 걸음걸이(gait), 자세(posture), response to handling에서의 변화

- 간대성 또는 강직성 움직임(clonic or tonic movements)

- 상동행동(stereotypes); 과도한 털고르기(excessive grooming), 반복적인 돌기(repetitive circling)

- 기이한 행동(bizarre behavior); 자해(self-mutilation), 뒤로 걷기(walking backwards)

③ 안과학적 검사

모든 투여군에 대해서 투여 전 및 투여 마지막 주차에 눈의 외관을 관찰하였다. 부형제대조군 및 고용량군은 산동제를 이용하여 동공을 확장을 유도한 후, 검안경 (NUN®, Wikioptics Inc., Korea)을 이용하여 안과학적 검사를 수행하였다.

④ 감각반응 관찰

모든 동물에 대하여 아래 항목별로 부검 전 주에 실시하였다.

- Visual(시각)
- Auditory(청각)
- Touch response(촉각)
- Pain response(통각)
- Righting reflex(동물의 몸이 뒤집어졌을 때의 반응)

⑤ 기능 관찰

모든 동물에 대하여 부검 전 주에 악력(grip strength) 및 자발운동량(motor activity) 측정을 실시하였다.

- 악력측정(Grip strength)

악력계(BIO-GS3, Panlab, S.L.U., Spain)를 이용하여 앞다리 및 뒷다리에 대해 3회 측정 후 평균을 구했다.

- 자발운동량 측정(Motor activity)

운동량 측정 장치(SuperFlex Open Field, Omnitech Electronics, Inc.)를 사용하여 측정기 내에서의 이동거리를 개별적으로 측정하였고, 데이터 수집간격은 5분마다 측정하였으며, 30분의 총량을 구했다.

⑥ 사망동물의 처리

실험기간 동안 사망동물 및 빈사동물은 발생하지 않았다.

⑦ 체중측정

체중은 입수일, 군분리일, 투여당일(투여 전)에 측정하였으며, 그 이후에는 주 1회 및 부검일(절식 후 체중)에 측정하였다.

⑧ 사료 및 음수 섭취량 측정

투여 첫날에 측정하였고, 그 후에는 시험기간 및 회복기간 중 매주 1회 측정하였다. 측정방법은 사료 및 음수를 정량급여한 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하였고, 마리 당 평균섭취량(g/rat/day)을 산출하였다.

9) 임상병리

① 뇨 검사

각 군별로 부검전에 뇨시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, Germany)와 뇨측정기(Clinitex 500, Germany)를 이용하여 아래의 항목의 뇨검사를 실시하였다. 또한, 뇨판을 이용하여 3시간 동안 채뇨한 신선뇨에 대해서는 뇨 화학적 검사, 뇨침사, 뇨 색깔 검사를 실시하였고, 약 24시간 동안의 축뇨에 대해서 뇨량을 측정하였다.

	Items	Units	Analyzer
Chemistry examination	pH	-	Multistix 10 SG (Siemens, U.S.A.) Urine analyzer
	Specific gravity(SG)	-	(Clinitex status®)

	Protein(PRO)	mg/dL	
	Glucose(GLU)	mg/dL	
	Ketone body(KET)	mg/dL	
	Bilirubin(BIL)	-	Siemens, U.S.A)
	Urobilinogen(URO)	E.U./dL	
	Nitrite(NIT)	-	
	Blood(BLO)	-	
	Leukocyte(LEU)	-	
General examination	Volume	mL	Naked eye
	Urinary sediments	-	Microscope
	Color	-	Naked eye
	Clarity	-	Naked eye

② 채혈

모든 동물에 대하여 채혈 전에 12 시간 이상 절식시킨 실험동물을 isoflurane를 이용하여 마취시킨 후 복대동맥으로부터 채혈하였다.

③ 혈액학적 검사

채혈한 혈액 중 2 mL의 혈액은 EDTA가 함유된 CBC bottle에 담은 후 혈액분석기(ADVIA 2120i, Siemens, Germany)를 사용하여 CBC(complete blood count), WBC 5 differential count 및 reticulocyte 검사를 수행하였다. 2.7 mL의 혈액은 혈액응고시간의 측정을 위해 3.2 % Sodium citrate가 포함된 bottle에 취한 후 원심분리(3000 rpm, 10 분)하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 혈액응고분석기(CA660, Sysmex, USA)를 사용하여 검사하였다. 상세한 검사 항목은 아래와 같다.

Items	Units	Analyzer
White blood cell count(WBC)	10^3 cells/ μ L	
Differential leucocyte count		ADVIA 2120i
- Neutrophils(NEU)		(Siemens,
- Lymphocytes(LYM)	10^3 cells/ μ L,%	Germany)
- Monocytes(MONO)		
- Eosinophils(EOS)		

- Basophils(BASO)		
Red blood cell count(RBC)	10 ⁶ cells/ μ L	
Hemoglobin(HGB)	g/dL	
Hematocrit(HCT)	%	
RBC indices		
- Mean corpuscular volume(MCV)	fL	
- Mean corpuscular hemoglobin(MCH)	pg	
- Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	g/dL	
Reticulocyte(RETI)	10 ⁹ cells/L,%	
Platelet(PLT)	10 ³ cells/ μ L	
Prothrombin time(PT)	sec	CA660
Activated partial thromboplastin time(APTT)	sec	(Sysmex, USA)

④ 혈액생화학적 검사

나머지 혈액은 응고촉진제와 혈청분리용 겔이 포함된 혈청분리관에 넣고 실온에서 30 분 이상 응고시킨 다음 원심분리(3,000 rpm, 10 분)하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 생화학 분석기(Hitachi3100, HITACHI, Japan)와 전해질 분석기(FUJI DRI-CHEM 800, FUJIFILIM, Japan)를 사용하여 검사하였다. 상세한 검사 항목은 아래와 같다.

Items	Units	Analyzer
Total protein(TP)	g/dL	
Albumin(ALB)	g/dL	
Albumin/Globulin(A/G)	ratio	
Total bilirubin(T-BIL)	mg/dL	
Alkaline phosphatase(ALP)	IU/L	
Aspartate aminotransferase(AST)	IU/L	
Alanine aminotransferase(ALT)	IU/L	Hitachi3100 (HITACHI, Japan)
Gamma glutamyl-transpeptidase(GGT)	IU/L	
Creatinine(CRE)	mg/dL	
Blood urea nitrogen(BUN)	mg/dL	
Total cholesterol(T-CHO)	mg/dL	
High density lipoprotein cholesterol(HDL)	mg/dL	
Low density lipoprotein cholesterol(LDL)	mg/dL	

Triglycerides(TG)	mg/dL	
Glucose(GLU)	mg/dL	
Calcium(CA)	mg/dL	
Inorganic phosphorus(IP)	mg/dL	
Creatine phosphokinase(CK)	IU/L	
Bile acid(BA)	μmol/L	
Cholinesterase(CH-E)	IU/L	
Sodium(Na ⁺)	mmol/L	
Potassium(K ⁺)	mmol/L	FUJI DRI-CHE 800 (FUJIFILM, Japan)
Chloride(Cl ⁻)	mmol/L	

⑤ Heinz Body 및 Methemoglobin 검사

Heinz Body 검사는 전혈 일부를 초생체염색(supervital stain)법으로 염색하여 현미경(BX51, Olympus)으로 관찰하였으며, Methemoglobin(Met-Hb) 검사는 Elabscience사의 Methemoglobin (MetHb) assay kit을 사용하였다. 혈액 약 0.2 mL를 용혈시킨 후 10 분간 원심분리시켜 얻은 상층액을 검체로 하여 spectrophotometer(Multiskan™ GO, Thermo Fisher Scientific Inc, USA)를 이용하여 검사하였다.

⑥ 성주기 검사

부검 전 성주기를 확인하여 에스트로젠 민감 장기(oestrogen-sensitive organs)에 대한 조직병리학적 평가에 반영하였다. 암컷에 대하여 부검 전 30 분 이내에 생리식염수와 면봉을 사용하여 검체를 채취한 후 슬라이드에 도말하였다. 도말 표본은 Diff Quik Stain(Sysmex Corporation, Japan)을 실시한 후 광학현미경(BX51, Olympus)을 사용하여 관찰하면서 성주기를 판정하였다.

10) 조직병리

①부검

관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대하여 Isoflurane으로 마취하에 채혈 및 안락사 시킨 다음 체표 및 모든 체공(external surface & all orifices), 두개강(cranial cavity), 흉강 및 복강의 모든 장기(thoracic and abdominal cavities & their contents)에 대하여 육안적 검사를 실시한 후 다음의 장기를 적출하였다.

갑상샘(Thyroid gland)	기관지(Bronchus)	뇌하수체(Pituitary gland)
식도(Esophagus)	간(Liver)	가슴샘(Thymus)
안구 + 하더리안선 (Eyeball + Harderian gland)	부신(Adrenal gland)	위(Stomach)

신장(Kidney)	폐+기관(Lung+ trachea)	췌장(Pancreas)
심장 + 동맥(Heart + aorta)	질(Vagina)	비장(Spleen)
자궁경구(Uterus, including cervix)	전립샘(Prostate gland)	난소(Ovaries)
부고환(Epididymides)	방광(Urinary bladder)	고환(Testes)
피부 + 유선(Skin + mammary gland)	좌골신경(Sciatic nerve)	골격근(Skeletal muscle)
뼈 + 골수(Bone, with bone marrow)		
소장/대장 + Peyer's patches (Small/large intestine, including Peyer's patches)		
응고선 + 정낭 (Coagulating glands seminal vesicle)		
뇌(Brain; cerebrum, cerebellum, medulla/pons)		
척수(Spinal cord; cervical, mid-thoracic and lumbar)		
림프절(Submandibular/mesenteric lymph node)		

② 장기중량 측정

부검 시 적출된 장기 중 아래의 장기에 대하여 중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기 중량(%)를 산출하였다. 좌우가 있는 장기는 좌우를 별도로 측정한 후 양측의 무게를 합산하여 장기 중량을 산출하였다.

뇌(Brain)	비장(Spleen)	가슴샘(Thymus)
폐(Lung)	부신(Adrenal gland)	심장(Heart)
간(Liver)	신장(Kidney)	고환(Testes)
난소(Ovaries)	부고환(Epididymides)	뇌하수체(Pituitary gland)
갑상샘(Thyroid gland)	자궁 / 자궁경부(Uterus, including cervix)	
전립샘 + 응고선을 포함한 정낭(Prostate + seminal vesicles with coagulating glands)		

③ 조직병리학적 검사

- 고정

적출된 장기는 10 % neutral buffered formalin에 고정하였으며 그 중, 고환, 부고환,

안구(하더리안선)는 modified Davidson's 액에 고정하였다.

- 슬라이드 제작 범위 및 방법

고정된 장기에 대하여 시험군에서는 부형제대조군 및 고용량군의 모든 동물에 대하여 각 장기별로 적절한 방법을 선택하여 삭정한 후 탈수·파라핀침투, 조직의 파라핀 포매, 박절 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 검체슬라이드를 제작하였다. 제작된 슬라이드는 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하였으며 뼈가 포함된 조직은 산탈회법으로 탈회한 후 동일한 방법으로 검체슬라이드 제작 및 염색을 실시하였다. 검체 제작 후, 잔여 장기 및 조직은 10 % neutral buffered formalin에 보존하였다. 회복군에서는 모든 동물에 대하여 본시험군의 일반증상 관찰, 상세 관찰, 기능 관찰 및 임상병리학적 검사 결과를 바탕으로 독성 변화가 있을 것으로 예상되는 간, 신장, 뇌, 뼈 및 척수 조직에 대하여 조직병리학적 검사를 실시하였으며 슬라이드 제작 및 잔여 장기 및 조직의 보관은 시험군 검체와 동일하게 실시하였다.

사) 통계처리 및 결과의 제시

상세관찰(노, 분변), 기능관찰(악력, 자발운동량), 체중, 사료섭취량, 물섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 24 시간 뇨량 및 장기중량 측정 결과는 통계 분석을 실시하였다. 분산의 동질성을 비교하기 위하여 SPSS 통계프로그램(ver. 25)을 이용하여 모수적인 다중비교의 경우에는 Levene's test로 등분산성을 검정한 후, one-way ANOVA test로 유의성을 확인하였다. 사후검정시 등분산인 경우에는 Dunnett's Test, 이분산인 경우에는 Dunnett's T3-test를 이용하여 부형제대조군과의 유의성을 검정하였으며 회복군의 경우 Student's t-test를 실시하였다. $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

일반증상, 상세관찰(관찰항목), 기능관찰(감각반응), 안과학적 검사, 뇨 검사(노화학 및 노침사 검사) 및 조직병리학적 검사 결과는 통계적 분석을 실시하지 않고 관찰된 사례를 제시하였다. 성주기 검사 결과는 별도로 해석하지 않고 appendix에 첨부하며 조직병리학적 검사의 보충 자료로 사용하였다. 모든 관찰 및 측정 결과는 appendix에 제시하며 table에는 평균과 표준편차 또는 발생 빈도를 제시하였다.

11)결과

가) 사망동물[Table 1]

시험기간동안 모든 투여군에서 시험물질 투여에 의한 빈사 및 사망동물은 관찰되지 않았다.

나) 일반증상[Table 1]

① 시험기간

- 수컷은 2,000 mg/kg/day 투여군 13례에서 연변(Soft stool)이 산발적으로 관찰되었고, 연변이 관찰된 동물 중에 9례는 하복부, 회음부 및 항문주의 오염(Soiled perineal region)이 추가로 관찰되었으며, 그 중 1례는 설사(Diarrhea)까지 관찰되었다.
- 1,000 mg/kg/day 투여군의 동물 1례에서 우측 안면부에 경도에 해당하는 창상이 투여

74일부터 78일까지 관찰되었고, 이후 회복되었다.

- 암컷은 2,000 mg/kg/day 투여군의 암컷 9 레에서 연변, 하복부, 회음부 및 항문주의 오염이 투여기간 동안 산발적으로 관찰되었다.
- 1,000 mg/kg/day 투여군의 암컷 1레에서 72일부터 85일까지 안면부의 탈모(Lossof fur)가 관찰되었고, 이후 회복되었다. 나머지 시험물질투여군에서는 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 500 mg/kg/day 투여군 및 0 mg/kg/day 투여군의 암·수 모두 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.

② 회복기간

모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

다) 상세관찰[Table 2]

① 시험기간

암·수컷 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

② 회복기간

암·수컷 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

라) 기능관찰[Table 3]

① 시험기간

암·수컷 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 악력(Grip strength) 및 자발운동량(Motor activity)을 측정한 결과 또한, 부형제대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

② 회복기간

암·수컷 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 악력(Grip strength) 및 자발운동량(Motor activity)을 측정한 결과 또한, 부형제대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

마) 안과학적 검사[Table 4]

① 시험기간

암·수컷 모든 투여군에서 투여 전 및 부검 전에 눈의 외관을 관찰한 결과 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.

② 회복기간

암·수컷 모든 투여군에서 투여 전 및 부검 전에 눈의 외관을 관찰한 결과 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.

바) 체중측정[Table 5]

① 시험기간

암·수컷 모든 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

② 회복기간

암·수컷 모든 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

사) 사료섭취량[Table 6, Appendix 6-1 ~ 6-4]

① 시험기간

수컷은 2,000 mg/kg/day 투여군에서 1주, 2주, 3주 및 8 주차에 사료섭취량이 부형제대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 감소가 관찰되었다.

암컷은 모든 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

② 회복기간

암·수컷 모든 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

아) 음수섭취량[Table 7]

① 시험기간

수컷은 2,000 mg/kg/day 투여군의 5 주차 음수섭취량 및 총 음수량 합계에서 부형제대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 증가가 관찰되었다. 1,000 mg/kg/day 투여군의 2주차 음수섭취량이 부형제대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 증가가 관찰되었다. 나머지 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

암컷은 2,000 mg/kg/day 투여군의 8 주차 음수섭취량이 부형제대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 증가가 관찰되었다. 1,000 mg/kg/day 투여군의 11 주차 음수섭취량이 부형제대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 감소가 관찰되었다. 500 mg/kg/day 투여군의 14 주차 음수섭취량이 부형제대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 감소가 관찰되었다.

② 회복기간

암·수컷 모든 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

자) 뇨검사[Table 8, 9]

① 시험기간

암·수컷 모든 투여군에서 시험물질 투여와 연관된 변화는 관찰되지 않았다.

② 회복기간

암·수컷 모든 투여군에서 시험물질 투여와 연관된 변화는 관찰되지 않았다.

차) 혈액학적 검사[Table 10]

① 시험기간

수컷은 2,000 mg/kg/day 투여군의 적혈구(total erythrocyte count, RBC)수치 및

헤마토크리트치(Hematocrit, HCT)가 유의하게 증가($P<0.05$)하였다.

1,000 mg/kg/day 투여군 백혈구(White blood cell count, WBC) 및 림프구(Lymphocytes, LYM)의 절대적 수치가 유의하게 증가($P<0.05$)하였다.

나머지 투여군은 부형제대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

암컷은 모든 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

② 회복기간

수컷은 백혈구(White blood cell count, WBC)수치, 중성호성백혈구(Neutrophils, NEU)절대 및 상대 수치 및 적혈구(Total erythrocyte count, RBC)의 수치가 유의하게 감소($P<0.05$)하였고, 림프구(Lymphocytes, LYM)의 상대적 수치, 평균적혈구혈색소량(Mean corpuscular hemoglobin, MCH) 및 평균적혈구혈색소농도(Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)의 수치가 유의하게 증가($P<0.05$)하였다.

암컷은 2,000 mg/kg/day 투여군의 부분활성트롬보플라스틴시간(Activated partial thromboplastin time, APTT) 시간이 유의하게 감소($P<0.05$)하였다. 나머지 투여군은 부형제대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

카) 혈액생화학적 검사[Table 11]

① 시험기간

수컷은 모든 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

암컷은 1,000 mg/kg/day 투여군의 중성지방(Triglycerides, TG)이 유의하게 감소($P<0.05$)하였다.

② 회복기간

수컷은 2,000 mg/kg/day 투여군의 나트륨(Sodium, Na⁺)및 염소(Chloride, Cl⁻)의 수치가 유의하게 증가($P<0.05$)하였다.

암컷은 2,000 mg/kg/day 투여군의 혈액요소질소(Blood urea nitrogen, BUN) 유의하게 증가($P<0.05$)하였다.

타) 장기중량[Table 12]

① 시험기간

수컷의 1,000 mg/kg/day 투여군에서 전립샘(Prostate seminal vesicles with coagulating glands)의 절대중량이 유의하게 증가($P<0.05$)하였다. 500 mg/kg/day 투여군의 부신양측(Adrenal gland) 및 전립샘의 절대중량이 유의하게 증가($P<0.05$)하였다.

암컷은 2,000 mg/kg/day 투여군의 양측 신장(Kidney) 및 왼쪽의 부신(Adrenal gland left)의 상대중량이 유의하게 증가($P<0.05$)하였다. 1,000 mg/kg/day 투여군의 가슴샘(Thymus)의 상대중량이 유의하게 증가($P<0.05$)하였다.

② 회복기간

수컷의 2,000 mg/kg/day 투여군의 부신 양측 및 왼쪽 갑상샘(Thyroid gland Left)의 절대중량이 유의하게 감소($P<0.05$)하였다.

암컷은 2,000 mg/kg/day 투여군의 양측 갑상샘(Thyroid gland sum)의 상대중량이 유의하게 감소($P < 0.05$)하였다.

과) 부검[Table 13]

① 시험기간

2,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 1례에서 간과 횡경막의 유착이 관찰되었다. 나머지 암·수컷 모든 투여군은 시험물질투여와 관련된 이상소견이 관찰되지 않았다.

② 회복기간

암·수컷 모든 투여군은 시험물질투여와 관련된 이상소견이 관찰되지 않았다.

하) 조직병리학적 검사[Table 14]

① 시험기간

수컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 간과 횡경막 유착 1례가 관찰되었으며, 조직병리학적 검사 결과 이상 소견은 관찰되지 않았다. 조직병리학적 검사결과, 암·수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 용량의존성이 인정되는 소견 및 특이 소견은 관찰되지 않았다.

② 회복기간

수컷과 암컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 회복기간 동안 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다. 조직병리학적 검사결과, 암·수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 용량의존성이 인정되는 소견 및 특이 소견은 관찰되지 않았다.

12) 고찰 및 결론

본 시험은 암·수 Sprague-Dawley 랫드에 시험물질 두릅추출물(MDF101)을 90일 동안 반복 경구투여한 후 전신적 독성반응을 평가하고, 무독성량 및 표적장기를 확인하고자 수행하였다.

- 시험군은 두릅추출물(MDF101)을 500(저용량군), 1,000(중용량군) 및 2,000(고용량군) mg/kg/day로 1회/1일 투여하는 투여군과 용매로서 멸균증류수를 투여하는 부형제대조군으로 구성하였으며 투여액량은 10 mL/kg으로 하였다. 시험군으로 군당 암·수 각 10 마리의 동물을 배치하였으며 회복군으로는 부형제대조군과 고농도투여군에 암·수 각 6 마리를 사용하였다.
- 관찰기간동안 일반증상 관찰, 상세관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 음수섭취량 측정, 기능검사 및 뇨검사를 진행하였고 관찰기간 종료 후 부검하여 혈액생화학적 검사, 혈액학적 검사, 장기중량 측정, 부검 시 육안 검사 및 조직병리학적 검사를 실시하였다. 암컷은 부검 전 성주기 검사를 진행하였다.
- 시험기간 동안 모든 시험군에서 시험물질 투여로 인한 빈사 및 사망동물은 관찰되지 않았다.

- 상세관찰, 기능관찰, 체중측정 결과, 노검사 및 안과학적 검사에서는 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 일반증상관찰 결과, 시험군 암·수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 연변과 설사 하복부, 회음부 및 항문주의 오염은 아래 용량군에서는 관찰되지 않아 시험물질 투여에 의한 변화로 사료되나, 연변은 부검소견에서 위장관계의 이상소견이 동반되지 않은 변화였고, 설사 또한 1 레에서만 관찰되었기 때문에 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다. 1,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 동물 1레에서 우측 안면부에 경도에 해당하는 창상이 투여 74 일부터 78 일까지 관찰되었고, 1레에서만 관찰되었기 때문에 우발적인 증상으로 판단하였다. 암컷 1,000 mg/kg/day 투여군의 동물 1레에서 72일부터 85일까지 안면부의 탈모(Loss of fur)가 관찰되었지만 이 역시 용량의존성이 결여되었고, 시험물질 투여와 무관한 증상으로 판단하였다.
- 사료섭취량측정 결과, 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 투여기간 동안 관찰된 일평균 사료섭취량의 유의한 감소는 고용량군에서 관찰되어 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단되나, 발생 횟수가 4 회로 제한적이며, 산발적으로 발생하였고 체중변화를 비교한 결과 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다.
음수섭취량 측정결과, 시험기간 동안 발생한 수컷 및 암컷에서 발생한 음수섭취량의 유의한 증감은 용량의존적이지 않으며, 산발적으로 발생하였으며, 체중변화와 비교한 결과 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다.
- 혈액학적 검사 결과, 시험군 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군의 적혈구(RBC)수치 및 헤마토크리트치(HCT)가 유의하게 증가($P<0.05$)하여, 시험물질의 투여에 의한 변화로 사료되나 간장의 중량이 유의한 변화가 관찰되지 않았고, 조직병리학적 검사에서 연관된 변화가 관찰되지 않아 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다.
- 1,000 mg/kg/day 투여군에서 백혈구(WBC) 및 림프구(Lymphocytes, LYM)의 절대적 수치가 유의하게 증가($P<0.05$)하였으나 용량 의존적이지 않고 중용량군에서만 관찰되어 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다.
- 회복군 수컷은 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 중성호성백혈구(NEU) 절대 및 상대 수치가 유의하게 증가($P<0.05$)하였고, 림프구(Lymphocytes, LYM)의 상대적 수치, 평균적혈구혈색소량(MCH) 및 평균적혈구혈색소농도(MCHC)의 수치가 유의하게 감소($P<0.05$)하여, 시험물질에 의한 영향으로 판단되나, 시험군에서는 관찰되지 않았고, 회복군에서만 관찰되어 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다. 암컷은 2,000 mg/kg/day 투여군의 부분활성트롬보플라스틴시간(APTT)이 유의하게 증가($P<0.05$)하였으나, 시험군에서는 관찰되지 않았기 때문에 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다.
- 나머지 투여군은 부형제대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다.
- 혈액생화학적 검사 결과, 수컷은 모든 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 암컷은 1,000 mg/kg/day 투여군의 중성지방(TG)이

- 유의하게 감소($P<0.05$)하였으나, 용량 의존적이지 않고, 고용량 투여군에서도 관찰되지 않아 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다.
- 회복군 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 나트륨(Na^+) 및 염소(Cl^-)의 수치가 유의한 증가($P<0.05$)와 암컷 2,000 mg/kg/day 투여군의 혈액요소질소(BUN)의 유의한 증가($P<0.05$)는 시험군에서의 유의한 변화가 관찰되지 않아 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다.
 - 장기중량측정 결과, 수컷의 1,000 mg/kg/day 투여군에서 전립샘(Prostate seminal vesicles with coagulating glands)의 중량이 유의하게 증가($P<0.05$)하였고, 500 mg/kg/day 투여군의 부신 양측(Adrenal gland) 및 전립샘의 절대중량이 유의하게 증가하였으나, 조직병리학적 검사에서 연관된 변화가 관찰되지 않았고, 용량의존성이 결여되어 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다. 또한 회복군 2,000 mg/kg/day 투여군의 수컷에서 양측부신(Adrenal gland) 및 좌측 갑상샘 절대중량이 유의하게 증가($P<0.05$)하였으나, 시험군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았기 때문에 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다.
 - 암컷은 2,000 mg/kg/day 투여군의 양측 신장(Kidney) 및 왼쪽의 부신(Adrenal gland left)의 상대중량이 유의하게 증가($P<0.05$)한 것은 고용량군에서 관찰되어 시험물질 투여에 의한 변화로 판단되나, 조직병리학적 검사에서 연관된 변화가 관찰되지 않았기 때문에 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다. 1,000 mg/kg/day 투여군의 가슴샘(Thymus)의 상대중량이 유의하게 증가($P<0.05$)하였으나, 용량의존성이 결여되어 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다.
 - 암컷 회복군 2,000 mg/kg/day 투여군의 양측 갑상샘(Thyroid gland sum)의 상대중량이 유의하게 감소($P<0.05$)하였으나, 시험군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았기 때문에 독성학적 의미가 없는 변화로 판단된다.
 - 부검 시 관찰된, 2,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 1례에서 간과 횡경막의 유착은 시험물질 투여와 무관하게 관찰된 증상으로 판단되었다.
 - 조직병리학적 검사 결과, 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 간과 횡경막 유착 1례가 관찰되었으며 조직병리학적 검사 결과 이상 소견은 관찰되지 않았다. 조직병리학적 검사결과, 암·수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 용량의존성이 인정되는 소견 및 특이 소견은 관찰되지 않았다.
 - 따라서, 본 시험조건 하에서 두릅추출물(MDF101)을 Sprague-Dawley 랫드에 90 일간 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 용량으로 반복 경구투여 하였을 때의 무독성량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)은 암·수 모두에서 2,000 mg/kg/day를 상회하고, 독성학적인 표적장기는 관찰되지 않았다.

Table 1. Clinical signs

Parameter	G1	G2	G3	G4
	0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
Male				
1 - 14 week	16 ^a	10	10	16
Normal	16	10	9	2
Soft stool	0	0	0	13
Soiled perineal region	0	0	0	9
Diarrhea	0	0	0	1
Wound	0	0	1	0
15 – 18 week	6 ^b	-	-	6
Normal	6	-	-	6
Female				
1 - 14 week	16 ^a	10	10	16
Normal	16	10	9	7
Soft stool	0	0	0	9
Soiled perineal region	0	0	0	7
Loss of fur	0	0	1	0
15 – 18 week	6 ^b	-	-	6
Normal	6	-	-	6

a: Number of animals

b: Number of animals for recovery group

-: Not applicable

Table 2. Detailed clinical signs

Parameter	G1	G2	G3	G4
	0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
Male				
1 - 14 week	16 ^a	10	10	16
Normal	16	10	10	16
15 – 18 week	6 ^b	-	-	6
Normal	6	-	-	6
Female				
1 - 14 week	16 ^a	10	10	16
Normal	16	10	10	16
15 – 18 week	6 ^b	-	-	6
Normal	6	-	-	6

a: Number of animals

b: Number of animals for recovery group

-: Not applicable

Table 2. Detailed clinical signs (Defecation and urination)

Group	Week	Group	Dose (mg/kg/day)	N	Male		Female	
					Defecation	Urination	Defecation	Urination
Main group	1 week	G1	0	16	4.3 ± 2.4	1.3 ± 0.9	1.3 ± 2.9	0.6 ± 0.8
		G2	500	10	3.0 ± 2.3	0.7 ± 0.5	0.9 ± 1.5	0.5 ± 0.8
		G3	1,000	10	4.1 ± 3.3	0.8 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.7
		G4	2,000	16	4.3 ± 3.2	0.6 ± 0.5	1.3 ± 1.8	0.7 ± 0.6
	2 week	G1	0	16	4.1 ± 1.7	1.6 ± 1.0	1.1 ± 0.9	1.5 ± 1.0
		G2	500	10	4.8 ± 3.2	1.5 ± 1.0	3.0 ± 2.9	1.7 ± 0.8
		G3	1,000	10	4.5 ± 2.7	1.0 ± 0.8	2.5 ± 1.1	0.8 ± 0.6
		G4	2,000	16	6.1 ± 2.8	1.3 ± 0.9	2.3 ± 1.6	2.0 ± 1.4
	3 week	G1	0	16	4.6 ± 1.7	1.6 ± 0.9	2.3 ± 1.1	1.8 ± 1.8
		G2	500	10	4.2 ± 2.9	1.1 ± 1.2	2.4 ± 3.0	1.5 ± 0.5
		G3	1,000	10	4.8 ± 2.4	1.7 ± 1.1	3.0 ± 1.9	1.6 ± 1.0
		G4	2,000	16	4.2 ± 2.1	1.5 ± 0.8	3.1 ± 2.8	1.4 ± 0.9
	4 week	G1	0	16	2.7 ± 2.7	0.9 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.7
		G2	500	10	2.0 ± 2.9	1.5 ± 0.7	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.7
		G3	1,000	10	2.2 ± 2.0	1.4 ± 1.3	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.5
		G4	2,000	16	2.4 ± 2.5	1.3 ± 1.1	0.3 ± 0.6	1.2 ± 1.7
	5 week	G1	0	16	1.8 ± 2.0	0.8 ± 0.9	0.3 ± 1.0	0.3 ± 0.4
		G2	500	10	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.8
		G3	1,000	10	2.2 ± 2.7	0.9 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.3
		G4	2,000	16	2.8 ± 3.4	0.9 ± 1.6	0.1 ± 0.5	0.4 ± 0.6
	6 week	G1	0	16	0.9 ± 1.6	1.3 ± 0.5	0.2 ± 0.8	0.2 ± 0.4
		G2	500	10	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.8	0.5 ± 1.6	0.1 ± 0.3
		G3	1,000	10	1.0 ± 1.5	1.2 ± 0.4	0.2 ± 0.6	0.2 ± 0.6
		G4	2,000	16	0.9 ± 1.6	0.9 ± 0.9	0.1 ± 0.3	0.6 ± 0.7
	7 week	G1	0	16	0.8 ± 1.3	0.7 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		G2	500	10	0.1 ± 0.3	1.2 ± 1.8	0.2 ± 0.6	0.4 ± 0.7
		G3	1,000	10	1.4 ± 1.4	1.7 ± 1.8	0.0 ± 0.0	0.6 ± 1.0
		G4	2,000	16	1.1 ± 2.3	0.6 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.7 ± 1.0

Mean ± Standard deviation

N: Number of animals

Table 2. Detailed clinical signs(Defecation and urination)(Continued)

Group	Week	Group	Dose (mg/kg/day)	N	Male		Female	
					Defecation	Urination	Defecation	Urination
Main group	8 week	G1	0	16	3.5 ± 1.5	1.4 ± 0.7	0.3 ± 1.3	0.6 ± 1.0
		G2	500	10	1.3 ± 1.3	1.5 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.5
		G3	1,000	10	1.6 ± 1.2	0.9 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.7
		G4	2,000	16	1.4 ± 1.3	0.9 ± 0.9	0.0 ± 0.0	1.0 ± 1.6
	9 week	G1	0	16	1.6 ± 1.5	1.1 ± 0.7	0.3 ± 0.6	0.7 ± 0.8
		G2	500	10	1.5 ± 0.8	1.0 ± 0.7	0.3 ± 0.5	0.6 ± 0.7
		G3	1,000	10	1.1 ± 1.4	0.6 ± 0.7	0.3 ± 0.5	0.6 ± 0.7
		G4	2,000	16	1.4 ± 1.2	0.9 ± 0.8	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.4
	10 week	G1	0	16	1.8 ± 1.4	1.0 ± 0.7	0.2 ± 0.8	0.4 ± 0.8
		G2	500	10	1.5 ± 1.4	1.1 ± 0.7	0.0 ± 0.0	1.4 ± 2.5
		G3	1,000	10	1.8 ± 1.5	0.8 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.7
		G4	2,000	16	1.4 ± 1.1	1.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.1
	11 week	G1	0	16	1.3 ± 2.2	1.0 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.6 ± 1.1
		G2	500	10	0.2 ± 0.6	0.9 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.7 ± 1.2
		G3	1,000	10	1.1 ± 2.0	1.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.8
		G4	2,000	16	0.9 ± 1.9	0.7 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.8
	12 week	G1	0	16	0.4 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9
		G2	500	10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.6	0.5 ± 1.1
		G3	1,000	10	1.1 ± 1.0	0.3 ± 0.7	0.2 ± 0.6	0.3 ± 0.9
		G4	2,000	16	0.6 ± 1.0	0.1 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.1
	13 week	G1	0	16	0.7 ± 1.3	2.1 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 1.1
		G2	500	10	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.5
		G3	1,000	10	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.6 ± 1.1
		G4	2,000	16	0.4 ± 1.2	1.1 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.5 ± 1.0
	14 week	G1	0	16	0.5 ± 1.1	2.1 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 1.1
		G2	500	10	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.5
		G3	1,000	10	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.6 ± 1.1
		G4	2,000	16	0.4 ± 1.2	0.9 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.5 ± 1.0

Mean ± Standard deviation

N: Number of animals

Table 2. Detailed clinical signs(Defecation and urination)(End)

Group	Week	Group	Dose (mg/kg/day)	N	Male		Female	
					Defecation	Urination	Defecation	Urination
Recovery group	15 week	G1	0	6	1.0 ± 1.5	1.2 ± 0.4	0.3 ± 0.8	0.7 ± 0.8
		G4	2,000	6	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.5
	16 week	G1	0	6	0.8 ± 0.8	1.0 ± 0.6	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.8
		G4	2,000	6	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.5
	17 week	G1	0	6	0.7 ± 0.5	0.8 ± 0.8	0.5 ± 1.2	0.7 ± 1.2
		G4	2,000	6	0.3 ± 0.5	0.7 ± 0.5	0.0 ± 0.0	1.0 ± 1.3
	18 week	G1	0	6	0.5 ± 0.5	1.0 ± 0.6	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4
		G4	2,000	6	0.8 ± 0.8	0.8 ± 0.8	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.5

Mean ± Standard deviation

N: Number of animals

Table 3. Functional examination

Group	Parameter	G1	G2	G3	G4
		0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
Male					
	Grasp response	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Visual	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Auditory	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Touch response	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Pain response	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Finger approach	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Righting reflex	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Pupil reflex	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Blink reflex	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Grip strength(Fore paw)	1190.2±193.9	1213.7±142.4	1162.6±171.6	1276.3±162.6
	Grip strength(Hind paw)	755.2±83.2	776.8±99.1	759.0±95.6	828.3±80.9
	Motor activity	319.4±269.2	410.4±277.5	349.6±268.9	383.0±253.1
Main group	Female				
	Grasp response	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Visual	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Auditory	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Touch response	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Pain response	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Finger approach	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Righting reflex	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Pupil reflex	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Blink reflex	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Grip strength(Fore paw)	1026.7±142.8	991.2±97.0	971.3±144.1	983.5±117.0
	Grip strength(Hind paw)	661.0±84.9	676.5±65.0	684.0±81.0	726.4±102.5
	Motor activity	715.3±321.2	652.9±254.8	535.1±274.3	478.8±285.3

Number of animals with normal/Number of tested animals

Mean±Standard deviation

Table 3. Functional examination (End)

Group	Parameter	Male		Female	
		G1	G4	G1	G4
		0 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day	0 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
Recovery group	Grap response	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	Visual	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	Auditory	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	Touch response	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	Pain response	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	Finger approach	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	Righting reflex	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	Pupil reflex	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	Blink reflex	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	Grip strength (Fore paw)	1291.5 ± 150.3	1298.6 ± 220.7	1073.7 ± 128.6	1044.2 ± 148.4
	Grip strength (Hind paw)	837.5 ± 68.0	872.8 ± 71.0	786.9 ± 85.8	741.1 ± 54.2
	Motor activity	205.9 ± 207.7	432.0 ± 288.8	482.4 ± 450.3	448.7 ± 274.8

Number of animals with normal/Number of tested animals

Mean ± Standard deviation

Table 5. Body weights

Week	G1	G2	G3	G4
	0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
Male				
Main group				
1	188.8±5.6	188.4±6.8	189.3±5.6	189.9±5.9
2	233.9±7.8	235.0±9.2	233.9±9.4	231.0±7.9
3	278.1±12.7	278.0±12.8	278.5±14.5	267.8±16.4
4	321.0±17.2	317.5±17.3	317.7±19.0	310.2±19.7
5	344.4±20.0	340.8±19.8	343.8±21.2	333.5±24.2
6	361.7±22.9	359.9±20.2	359.2±27.1	347.2±27.3
7	388.9±25.3	384.0±24.3	385.1±28.5	372.7±30.2
8	401.9±27.5	398.9±27.1	398.3±31.4	383.5±30.9
9	413.7±26.9	415.6±30.8	415.7±33.4	397.0±34.3
10	431.3±28.4	431.6±32.6	440.0±30.4	412.2±37.9
11	449.3±31.8	450.2±33.0	448.9±37.6	430.4±42.5
12	453.7±30.7	455.3±34.8	455.8±39.0	435.8±44.1
13	466.2±33.6	466.7±37.3	468.3±39.2	447.5±45.2
14	471.1±34.4	470.1±35.3	461.1±43.0	446.3±46.6
Gain	282.3±31.4	281.9±31.9	271.8±39.3	256.3±45.3
N	16	10	10	16
Recovery group				
15	500.0±46.2	-	-	470.4±57.0
16	507.5±46.7	-	-	477.3±56.3
17	522.3±48.9	-	-	489.4±62.5
18	529.5±49.6	-	-	491.8±63.3
Gain	341.6±45.8	-	-	302.8±62.4
N	6	-	-	6

N: Number of animals

Mean±Standard deviation

The day of first treatment was designated Day 1.

Gain: Main group is body weight on Day 90 – body weight on Day 1

Recovery group is body weight on Day 118 – body weight on Day 1

Table 5. Body weight(End)

Week	G1	G2	G3	G4
	0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
Female				
Main group				
1	169.2±6.2	166.8±6.4	166.6±8.2	167.6±6.4
2	182.7±8.1	184.0±5.6	184.2±9.9	184.4±8.4
3	203.1±7.7	201.1±13.9	201.8±11.1	203.1±9.7
4	220.9±9.3	225.2±14.3	218.6±12.3	219.9±10.1
5	231.4±10.5	239.5±17.6	231.8±14.9	231.4±13.9
6	241.0±10.0	247.5±16.7	238.5±15.7	236.1±12.9
7	248.6±13.7	261.0±14.5	248.2±12.8	245.9±12.3
8	258.7±16.2	266.3±20.4	255.1±14.8	255.6±15.3
9	262.0±13.9	272.3±22.0	259.8±13.5	258.0±14.3
10	268.1±14.3	280.2±23.5	264.1±15.8	263.4±14.7
11	278.8±12.7	291.4±21.5	275.3±15.3	271.3±16.0
12	280.7±15.9	292.9±23.7	276.7±14.9	275.8±15.4
13	286.2±17.3	294.6±26.0	283.2±15.3	280.2±14.2
14	292.9±13.6	297.5±21.5	282.8±16.0	285.9±16.7
Gain	123.7±13.1	130.7±18.8	116.1±13.1	118.3±15.7
N	16	10	10	16
Recovery group				
15	282.4±7.1	-	-	281.1±15.9
16	286.3±6.6	-	-	283.5±14.4
17	286.6±9.2	-	-	285.1±12.6
18	289.2±3.5	-	-	287.3±18.6
Gain	120.2±10.0	-	-	123.8±14.1
N	6	-	-	6

N: Number of animals

Mean±Standard deviation

The day of first treatment was designated Day 1.

Gain: Main group is body weight on Day 90–body weight on Day 1

Recovery group is body weight on Day 119–body weight on Day 1

Table 4. Ophthalmological examination

Parameter	G1			G2		G3		G4		
		0 mg/kg/day		500 mg/kg/day		1,000 mg/kg/day		2,000 mg/kg/day		
Week	1 ^a	14	18	1	14	1	14	1	14	18
N	16	16	6	10	10	10	10	16	16	6
Male										
Left eye										
Normal	16	16	6	10	10	10	10	16	16	6
Right eye										
Normal	16	16	6	10	10	10	10	16	16	6
Female										
Left eye										
Normal	16	16	6	10	10	10	10	16	16	6
Right eye										
Normal	16	16	6	10	10	10	10	16	16	6

a: The day of first treatment was designated Day 0.

N: Number of animals.

Table 8. Urinalysis results (Continued)

Main group		Female			
Parameter	Result	G1	G2	G3	G4
		0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
	N	10/10 ^a	10/10	10/10	10/10
Color	Yellow	10	10	10	10
Clarity	Clear	10	10	10	10
Glucose(mg/dL)	Negative	10	10	10	9
	100	0	0	0	1
Bilirubin(mg/dL)	Negative	10	10	10	9
	Small	0	0	0	1
Ketone body (mg/dL)	Negative	9	5	3	1
	Trace	1	4	4	6
	15	0	1	3	3
Specific gravity	1.010	0	1	0	4
	1.015	5	7	8	5
	1.020	4	1	1	1
	1.025	1	1	1	0
Occult blood	Negative	5	10	10	10
	Trace	5	0	0	0
pH	7.5	0	0	1	0
	8.0	1	0	0	0
	8.5	2	2	2	1
	≥9.0	7	8	7	9
Protein(mg/dL)	Negative	3	0	0	0
	Trace	1	0	1	0
	30	4	5	4	2
	100	2	5	5	6
	≥300	0	0	0	2
Urobilinogen (E.U./dL)	0.2	10	8	8	6
	1.0	0	2	2	4
Nitrite	Negative	9	10	10	10
	Positive	1	0	0	0
Leukocytes	Negative	7	8	10	7
	Trace	3	2	0	2
	Small	0	0	0	1
Urine volume	mL	9.9 ± 2.2	9.5 ± 2.2	9.8 ± 1.8	10.0 ± 2.4

N: Number of animals

a: Number of live animals/Number of tested animals

Table 8. Urinalysis results(End)

Recovery group	Parameter	Result	Male		Female	
			G1	G4	G1	G4
			0 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day	0 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
		N	6/6 ^a	6/6	6/6	6/6
	Color	Yellow	6	6	6	6
	Clarity	Clear	6	6	6	6
	Glucose(mg/dL)	Negative	6	6	6	5
		100	0	0	0	1
	Bilirubin(mg/dL)	Negative	6	6	6	4
		Small	0	0	0	2
	Ketone body (mg/dL)	Negative	0	0	3	4
		Trace	0	0	3	1
		15	1	2	0	1
		40	5	4	0	0
		≥80	0	0	0	0
	Specific gravity	1.010	3	1	1	1
		1.015	2	5	4	3
		1.020	1	0	1	0
		1.025	0	0	0	1
		≥1.030	0	0	0	1
	Occult blood	Negative	6	6	5	4
		Trace	0	0	1	2
	pH	6.0	0	0	0	1
		7.0	0	0	0	1
		8.5	0	1	1	1
		≥9.0	6	5	5	3
	Protein(mg/dL)	Negative	0	0	0	2
		30	0	0	2	0
		100	2	3	3	3
		≥300	4	3	1	1
	Urobilinogen (E.U./dL)	0.1	0	0	0	3
		0.2	3	4	4	3
		1.0	3	2	2	0
	Nitrite	Negative	6	6	6	4
		Positive	0	0	0	2
	Leukocytes	Negative	0	0	3	5
		Trace	2	5	3	1
		Small	1	0	0	0
		Large	3	1	0	0
	Urine volume	mL	16.1 ± 2.1	17.7 ± 2.6	8.5 ± 1.5	10.1 ± 1.9

N: Number of animals

a: Number of live animals/Number of tested animals

Table 9. Urinary sediments

Group	Item	Grade	G1	G2	G3	G4
			0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 g/kg/day	2,000 g/kg/day
Main group						
	N		10	10	10	10
Male	RBC	-	0	0	0	0
	WBC	-	0	0	0	0
	Epithelial cell	1-4	1	1	1	1
		5-9	0	0	0	1
	Cast	-	0	0	0	0
	Crystal	-	0	0	0	0
Female	RBC	-	0	0	0	0
	WBC	-	0	0	0	0
	Epithelial cell	1-4	2	0	1	2
		5-9	0	1	1	1
	Cast	-	0	0	0	0
	Crystal	-	0	0	0	0
Recovery group						
	N		6	-	-	6
Male	RBC	-	0	-	-	0
	WBC	-	0	-	-	0
	Epithelial cell	1-4	1	-	-	2
		5-9	1	-	-	0
	Cast	-	0	-	-	0
	Crystal	-	0	-	-	0
Female	RBC	0	0	-	-	0
	WBC	0	0	-	-	0
	Epithelial cell	1-4	2	-	-	1
		Cast	0	0	-	-
	Crystal	0	0	-	-	0

N: Number of animals

-: Not applicable

Table 8. Urinalysis results

Main group		Male			
Parameter	Result	G1	G2	G3	G4
		0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
N		10/10 ^a	10/10	10/10	10/10
Color	Yellow	10	10	10	10
Clarity	Clear	10	10	10	10
Glucose(mg/dL)	Negative	10	8	9	10
	100	0	2	1	0
Bilirubin(mg/dL)	Negative	10	10	8	8
	Small	0	0	2	2
Ketone body (mg/dL)	Negative	0	1	0	0
	Trace	2	0	0	1
	15	5	7	3	4
	40	3	2	6	5
	≥80	0	0	1	0
Specific gravity	1.010	0	1	4	1
	1.015	1	5	6	7
	1.020	3	3	0	1
	1.025	1	1	0	0
	1.030	1	0	0	0
Occult blood	Negative	8	6	6	6
	Trace	2	4	4	3
	Small	0	0	0	0
	Moderate	0	0	0	1
pH	7.5	1	0	0	0
	8.0	0	0	0	0
	8.5	2	1	0	0
	≥9.0	7	9	10	10
Protein(mg/dL)	30	2	1	0	3
	100	7	4	4	5
	≥300	1	5	6	2
Urobilinogen (E.U./dL)	0.2	8	8	4	5
	1.0	2	2	6	5
Nitrite	Negative	10	10	10	10
Leukocytes	Negative	1	0	0	3
	Trace	7	5	6	3
	Small	2	4	4	4
	Moderate	0	0	0	0
	Large	0	1	0	0
Urine volume	mL	16.7 ± 3.4	17.0 ± 3.4	17.1 ± 3.8	17.0 ± 4.5

N: Number of animals

a : Number of live animals/Number of tested animals

Table 10. Hematological data (Continued)

Main group		Female			
Parameter	Unit	G1	G2	G3	G4
		0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
N		10/10 ^a	10/10	10/10	10/10
Female					
WBC	×10 ³ /μL	2.21 ± 0.63	2.97 ± 0.91	2.72 ± 1.14	2.60 ± 0.61
NEU	×10 ³ /μL	0.24 ± 0.07	0.27 ± 0.14	0.28 ± 0.25	0.25 ± 0.12
LYM	×10 ³ /μL	1.82 ± 0.55	2.55 ± 0.90	2.27 ± 0.97	2.20 ± 0.57
MONO	×10 ³ /μL	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.04	0.07 ± 0.05	0.06 ± 0.04
EOS	×10 ³ /μL	0.08 ± 0.05	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.05
BASO	×10 ³ /μL	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
NEU	%	11.37 ± 2.95	10.34 ± 6.41	11.08 ± 6.91	9.73 ± 4.22
LYM	%	82.17 ± 4.04	84.57 ± 7.44	83.17 ± 6.87	84.53 ± 5.16
MONO	%	2.40 ± 0.69	2.30 ± 1.27	2.46 ± 0.92	2.25 ± 1.23
EOS	%	3.64 ± 1.88	2.23 ± 0.89	2.89 ± 1.16	2.92 ± 2.15
BASO	%	0.05 ± 0.05	0.07 ± 0.08	0.07 ± 0.11	0.07 ± 0.07
RBC	×10 ⁶ /μL	7.74 ± 0.28	7.72 ± 0.34	7.71 ± 0.45	7.73 ± 0.44
HGB	g/dL	14.40 ± 0.46	14.38 ± 0.45	14.22 ± 0.55	14.34 ± 0.46
HCT	%	40.41 ± 1.35	40.40 ± 1.48	40.08 ± 1.73	40.44 ± 1.23
MCV	fL	52.25 ± 1.28	52.36 ± 1.29	52.08 ± 1.57	52.39 ± 1.71
MCH	pg	18.61 ± 0.47	18.65 ± 0.57	18.47 ± 0.61	18.57 ± 0.68
MCHC	g/dL	35.60 ± 0.48	35.62 ± 0.34	35.47 ± 0.45	35.47 ± 0.65
RETI	%	2.34 ± 0.59	2.45 ± 0.56	1.96 ± 0.36	2.41 ± 0.55
RETI	×10 ⁹ /μL	180.53 ± 44.50	188.91 ± 44.18	150.04 ± 22.21	186.57 ± 43.99
PLT	×10 ³ /μL	1058.10 ± 80.81	1100.30 ± 73.97	1099.20 ± 37.09	1106.10 ± 150.55
PT	sec	8.49 ± 0.17	8.75 ± 0.22*	8.57 ± 0.26	8.68 ± 0.32
APTT	sec	16.16 ± 0.97	15.69 ± 1.24	15.29 ± 1.28	16.01 ± 1.94
Heinz body	count	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Mct-Hb	%	23.37 ± 0.62	23.57 ± 0.91	23.48 ± 0.61	23.70 ± 0.82

* : Significant differences from control group by Dunnett's t-test($p < 0.05$)

N: Number of animals

a: Number of dead animals/Number of tested animals

Mean±Standard deviation

Table 10. Hematological data(End)

Recovery group		Male		Female	
Parameter	Unit	G1	G4	G1	G4
		0 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day	0 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
N		6/6 ^a	6/6	6/6	6/6
WBC	$\times 10^3/\mu\text{L}$	3.16 \pm 0.58	1.92 \pm 0.59*	1.84 \pm 0.07	1.90 \pm 0.62
NEU	$\times 10^3/\mu\text{L}$	1.01 \pm 0.62	0.23 \pm 0.04*	0.27 \pm 0.13	0.23 \pm 0.04
LYM	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2.00 \pm 0.38	1.59 \pm 0.53	1.44 \pm 0.15	1.57 \pm 0.56
MONO	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0.08 \pm 0.06	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01
EOS	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0.07 \pm 0.03	0.05 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02
BASO	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
NEU	%	30.55 \pm 13.36	12.83 \pm 2.51*	14.55 \pm 7.22	12.60 \pm 2.51
LYM	%	64.48 \pm 13.44	82.12 \pm 3.16*	78.22 \pm 7.20	82.12 \pm 3.05
MONO	%	2.28 \pm 1.32	1.98 \pm 0.48	2.55 \pm 0.92	1.98 \pm 0.59
EOS	%	2.17 \pm 0.88	2.55 \pm 0.34	3.95 \pm 1.20	2.97 \pm 0.55
BASO	%	0.07 \pm 0.08	0.13 \pm 0.10	0.10 \pm 0.09	0.07 \pm 0.08
RBC	$\times 10^6/\mu\text{L}$	8.22 \pm 0.51	7.69 \pm 0.17*	7.64 \pm 0.45	7.68 \pm 0.19
HGB	g/dL	14.40 \pm 0.83	14.30 \pm 0.46	13.98 \pm 0.66	14.32 \pm 0.43
HCT	%	40.72 \pm 2.46	39.17 \pm 1.17	38.65 \pm 2.26	39.02 \pm 1.24
MCV	fL	49.52 \pm 0.97	50.97 \pm 1.44	50.55 \pm 0.53	50.77 \pm 1.47
MCH	pg	17.52 \pm 0.13	18.62 \pm 0.44*	18.32 \pm 0.26	18.62 \pm 0.48
MCHC	g/dL	35.37 \pm 0.47	36.52 \pm 0.39*	36.22 \pm 0.56	36.70 \pm 0.18
RETI	%	1.95 \pm 0.23	2.02 \pm 0.35	2.26 \pm 1.42	1.99 \pm 0.37
RETI	$\times 10^9/\mu\text{L}$	160.07 \pm 20.65	155.03 \pm 29.11	167.75 \pm 91.92	152.72 \pm 29.99
PLT	$\times 10^3/\mu\text{L}$	1096.17 \pm 66.53	1089.67 \pm 163.16	1076.00 \pm 211.41	1059.33 \pm 99.33
PT	sec	9.78 \pm 0.25	9.82 \pm 0.33	10.07 \pm 2.81	8.57 \pm 0.31
APTT	sec	19.05 \pm 1.17	19.48 \pm 0.66	16.20 \pm 2.17	13.90 \pm 1.04*
Heinz body	count	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Met-Hb	%	24.69 \pm 1.20	24.39 \pm 0.44	24.54 \pm 1.03	24.46 \pm 0.63

*: Significant differences from control group by T-test($p < 0.05$)

N: Number of animals

a: Number of live animals/Number of tested animals

Mean \pm Standard deviation

Table 10. Hematological data

Main group		Male			
Parameter	Unit	G1	G2	G3	G4
		0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
N		10/10 ^a	10/10	10/10	10/10
Male					
WBC	×10 ³ /μL	4.12 ± 0.73	4.96 ± 1.16	6.29 ± 1.51*	4.61 ± 1.25
NEU	×10 ³ /μL	0.97 ± 0.36	0.96 ± 0.30	1.38 ± 0.45	0.94 ± 0.53
LYM	×10 ³ /μL	2.88 ± 0.68	3.72 ± 1.07	4.58 ± 1.20*	3.39 ± 0.83
MONO	×10 ³ /μL	0.16 ± 0.06	0.15 ± 0.05	0.18 ± 0.07	0.15 ± 0.06
EOS	×10 ³ /μL	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.04
BASO	×10 ³ /μL	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01
NEU	%	23.83 ± 8.75	20.16 ± 6.90	22.17 ± 5.55	19.72 ± 6.30
LYM	%	69.56 ± 9.91	74.25 ± 7.18	72.61 ± 6.31	74.32 ± 6.59
MONO	%	3.81 ± 1.24	3.10 ± 0.53	2.85 ± 0.86	3.20 ± 0.83
EOS	%	2.10 ± 0.44	1.87 ± 0.55	1.80 ± 0.43	2.17 ± 0.71
BASO	%	0.07 ± 0.05	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.05	0.12 ± 0.15
RBC	×10 ⁶ /μL	8.13 ± 0.39	8.08 ± 0.19	8.36 ± 0.26	8.53 ± 0.35*
HGB	g/dL	14.21 ± 0.60	13.12 ± 4.44	14.81 ± 0.47	14.99 ± 0.73
HCT	%	40.25 ± 1.85	40.66 ± 0.90	41.84 ± 1.79	42.47 ± 2.18*
MCV	fL	49.53 ± 1.87	50.34 ± 0.96	50.06 ± 1.77	49.80 ± 2.35
MCH	pg	17.50 ± 0.72	16.21 ± 5.46	17.69 ± 0.47	17.57 ± 0.78
MCHC	g/dL	35.33 ± 0.62	32.07 ± 10.78	35.40 ± 0.57	35.27 ± 0.58
RET1	%	1.87 ± 0.33	1.83 ± 0.33	1.92 ± 0.37	2.00 ± 0.32
RET1	×10 ⁹ /μL	151.64 ± 24.96	147.46 ± 25.29	160.61 ± 31.23	170.30 ± 27.54
PLT	×10 ³ /μL	1000.90 ± 132.57	993.60 ± 92.40	997.00 ± 86.87	1030.70 ± 134.13
PT	sec	10.50 ± 1.23	9.94 ± 0.30	9.93 ± 0.38	9.92 ± 0.35
APTT	sec	16.96 ± 1.28	16.54 ± 2.10	17.93 ± 1.58	17.41 ± 2.19
Heinz body	count	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Met-Hb	%	29.64 ± 1.57	29.72 ± 2.37	29.09 ± 2.19	27.78 ± 1.45

*: Significant differences from control group by Dunnett's t-test($p < 0.05$)

N: Number of animals

a: Number of live animals/Number of tested animals

Mean±Standard deviation

Table 11. Clinical chemistry (Continued)

Main group		Female			
Parameter	Unit	G1	G2	G3	G4
		0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
N		10/10 ^a	10/10	10/10	10/10
TP	g/dL	5.33 ± 0.24	4.69 ± 1.62	4.65 ± 1.66	4.96 ± 0.24
ALB	g/dL	2.23 ± 0.08	1.98 ± 0.71	2.00 ± 0.72	2.14 ± 0.13
A/G	ratio	0.72 ± 0.05	0.66 ± 0.24	0.68 ± 0.26	0.77 ± 0.13
T-BIL	mg/dL	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.03
ALP	IU/L	227.16 ± 48.56	244.13 ± 82.96	193.70 ± 91.60	207.65 ± 53.97
ALT	IU/L	32.08 ± 6.64	30.06 ± 5.49	29.74 ± 10.87	34.06 ± 18.91
AST	IU/L	89.01 ± 19.40	102.33 ± 22.67	89.41 ± 27.46	80.50 ± 21.12
GGT	IU/L	0.80 ± 0.35	1.27 ± 0.92	1.20 ± 0.44	0.92 ± 0.65
CRE	mg/dL	0.34 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.31 ± 0.06	0.29 ± 0.05
BUN	mg/dL	16.53 ± 2.96	15.86 ± 2.05	16.95 ± 4.60	15.87 ± 10.29
T-CHO	mg/dL	69.69 ± 6.95	66.93 ± 6.54	70.52 ± 10.98	74.30 ± 19.13
HDL	mg/dL	25.30 ± 2.53	22.60 ± 3.91	25.27 ± 2.87	26.62 ± 6.66
LDL	mg/dL	7.94 ± 2.03	7.72 ± 3.12	7.23 ± 2.99	9.77 ± 2.23
TG	mg/dL	23.09 ± 6.44	15.13 ± 2.23*	20.25 ± 6.16	22.22 ± 6.41
GLU	mg/dL	162.38 ± 31.83	138.25 ± 18.09	143.11 ± 21.83	165.72 ± 25.52
CA	mg/dL	9.19 ± 0.43	9.16 ± 0.41	8.91 ± 0.34	9.09 ± 0.27
IP	mg/dL	6.29 ± 0.71	6.24 ± 0.46	6.24 ± 0.59	6.36 ± 0.75
CK	IU/L	589.28 ± 256.35	754.41 ± 339.21	506.89 ± 300.66	458.82 ± 245.78
BA	μmol/L	11.51 ± 7.85	23.05 ± 22.78	18.38 ± 19.61	10.46 ± 7.29
CH-E	IU/L	5.64 ± 1.28	6.12 ± 2.42	5.28 ± 1.93	5.03 ± 2.29
Na ⁺	mmol/L	140.50 ± 1.18	141.00 ± 1.89*	140.50 ± 1.08	140.40 ± 1.65
K ⁺	mmol/L	4.25 ± 0.36	4.41 ± 0.32	4.40 ± 0.43	4.40 ± 0.24
Cl ⁻	mmol/L	103.30 ± 1.49	105.00 ± 3.65*	103.70 ± 2.45	102.90 ± 2.51

*: Significant differences from control group by Dunnett's t-test ($p < 0.05$)

N: Number of animals

a: Number of live animals/Number of tested animals

Mean ± Standard deviation

Table 11. Clinical chemistry

Main group		Male			
Parameter	Unit	G1	G2	G3	G4
		0 mg/kg/day	500 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
N		10/10 ^a	10/10	10/10	10/10
TP	g/dL	5.56 ± 0.21	5.56 ± 0.21	5.49 ± 0.18	5.44 ± 0.18
ALB	g/dL	2.20 ± 0.08	2.21 ± 0.12	2.17 ± 0.09	2.20 ± 0.07
A/G	ratio	0.66 ± 0.04	0.66 ± 0.06	0.65 ± 0.02	0.68 ± 0.06
T-BIL	mg/dL	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.03
ALP	IU/L	385.17 ± 52.72	390.29 ± 95.90	396.72 ± 49.49	387.04 ± 65.91
ALT	IU/L	39.88 ± 12.49	39.25 ± 5.53	36.70 ± 4.23	37.50 ± 7.26
AST	IU/L	106.75 ± 35.68	114.43 ± 18.63	99.84 ± 24.66	98.30 ± 20.60
GGT	IU/L	0.43 ± 0.30	0.63 ± 0.39	0.53 ± 0.39	0.90 ± 0.68
CRE	mg/dL	0.28 ± 0.06	0.28 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.05
BUN	mg/dL	18.14 ± 4.43	15.75 ± 1.62	16.56 ± 2.04	16.91 ± 4.28
T-CHO	mg/dL	66.97 ± 8.72	77.84 ± 11.98	71.57 ± 12.47	68.70 ± 8.93
HDL	mg/dL	22.45 ± 1.95	24.67 ± 3.09	24.16 ± 3.24	23.62 ± 3.73
LDL	mg/dL	8.09 ± 1.33	12.22 ± 2.83	9.58 ± 3.54	10.79 ± 2.72
TG	mg/dL	52.14 ± 9.95	50.46 ± 21.76	44.49 ± 10.09	37.86 ± 13.27
GLU	mg/dL	209.39 ± 48.03	189.44 ± 84.57	218.98 ± 37.73	209.96 ± 40.78
CA	mg/dL	9.64 ± 0.47	9.71 ± 0.39	9.50 ± 0.48	9.58 ± 0.24
IP	mg/dL	6.76 ± 0.60	6.89 ± 0.54	6.92 ± 0.38	7.11 ± 0.68
CK	IU/L	762.00 ± 544.55	872.63 ± 282.77	611.63 ± 408.56	635.58 ± 323.62
BAICD	μmol/L	32.97 ± 19.70	30.17 ± 7.11	32.60 ± 8.94	36.85 ± 12.97
CH-E	IU/L	4.16 ± 2.35	3.79 ± 1.98	4.09 ± 2.03	2.92 ± 1.73
Na+	mmol/L	140.80 ± 1.32	141.70 ± 1.06	140.70 ± 0.82	141.10 ± 1.10
K+	mmol/L	4.77 ± 0.22	4.60 ± 0.19	4.63 ± 0.36	4.75 ± 0.39
Cl-	mmol/L	102.40 ± 2.12	103.60 ± 2.88	101.70 ± 1.06	102.60 ± 1.84

N: Number of animals

a: Number of live animals/Number of tested animals

Mean±Standard deviation

Table 11. Clinical chemistry (End)

Recovery group		Male		Female	
Parameter	Unit	G1	G4	G1	G4
		0 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day	0 mg/kg/day	2,000 mg/kg/day
N		6/6 ^a	6/6	6/6	6/6
TP	g/dL	5.68 ± 0.24	5.65 ± 3.13	5.95 ± 0.46	5.57 ± 1.76
ALB	g/dL	2.15 ± 0.18	2.23 ± 1.16	2.50 ± 0.14	2.40 ± 0.63
A/G	ratio	0.61 ± 0.06	0.66 ± 0.33	0.42 ± 0.02	0.45 ± 0.06
T-BIL	mg/dL	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
ALP	IU/L	484.58 ± 104.89	394.58 ± 198.41	196.78 ± 30.55	215.17 ± 108.37
ALT	IU/L	38.53 ± 7.34	38.62 ± 18.03	23.88 ± 4.87	24.08 ± 6.22
AST	IU/L	118.53 ± 21.12	119.07 ± 56.39	86.48 ± 16.33	80.50 ± 11.93
GGT	IU/L	0.82 ± 0.29	1.05 ± 0.39	1.78 ± 0.44	2.27 ± 0.46
CRE	mg/dL	0.33 ± 0.06	0.33 ± 0.15	0.43 ± 0.02	0.45 ± 0.07
BUN	mg/dL	17.05 ± 2.21	19.33 ± 9.30	18.48 ± 1.64	21.42 ± 1.75
T-CHO	mg/dL	78.80 ± 10.71	84.37 ± 41.01	109.55 ± 49.27	97.95 ± 15.17
HDL	mg/dL	24.12 ± 2.87	24.23 ± 12.30	26.35 ± 3.56	28.50 ± 3.38
LDL	mg/dL	8.95 ± 1.26	12.35 ± 5.68	4.08 ± 0.99	4.02 ± 0.71
TG	mg/dL	55.85 ± 12.51	48.58 ± 23.21	21.18 ± 3.02	17.12 ± 10.60
GLU	mg/dL	164.53 ± 19.46	149.80 ± 79.84	142.92 ± 17.78	160.23 ± 14.20
CA	mg/dL	9.32 ± 0.20	9.15 ± 5.21	9.70 ± 0.47	10.07 ± 0.68
IP	mg/dL	5.60 ± 0.53	5.42 ± 2.88	5.33 ± 0.45	5.75 ± 0.69
CK	IU/L	995.43 ± 177.64	1013.80 ± 477.54	362.50 ± 116.02	270.60 ± 105.26
BA	μmol/L	30.65 ± 3.77	29.30 ± 15.14	8.17 ± 5.62	6.12 ± 8.81
CH-E	IU/L	5.48 ± 0.72	4.90 ± 2.60	6.50 ± 2.02	7.75 ± 2.12
Na ⁺	mmol/L	142.33 ± 0.52	144.00 ± 82.36	142.33 ± 2.25	142.67 ± 2.42
K ⁺	mmol/L	4.60 ± 0.13	4.50 ± 2.55	4.48 ± 0.33	4.32 ± 0.25
Cl ⁻	mmol/L	102.83 ± 1.17	104.83 ± 59.28	103.83 ± 3.06	105.00 ± 1.79

*: Significant differences from control group by T-test($p < 0.05$)

N: Number of animals

a: Number of live animals/Number of tested animals

Mean ± Standard deviation

라. 복귀돌연변이시험

1) 시험목적

시험물질 두릅추출물 (MDF101)을 히스티딘 요구성 시험균주 (*Salmonella typhimurium*)과 트립토판요구성 시험균주 (*Escherichia coli*)을 이용하여 유전독성을 평가하였다.

2) 재료 및 방법

가) 시험계

- Salmonella typhimurium* TA98
- Salmonella typhimurium* TA100
- Salmonella typhimurium* TA1535
- Salmonella typhimurium* TA1537
- Escherichia coli* WP2uvrA (pKM101)

나) 시험방법

① 균주접종

- 초저온냉동고 에 보관하고 동결 보존 균주를 10 mL의 1.6% nutrient broth 에 10 μ L를 접종하여 37°C진탕배양기에서 200 rpm 약12~14시간 배양하였다.
- 시험물질액 0.1 mL, 균배양액 0.1mL, S9혼합물 또는 인산완충액 (sodium phosphate buffer) 0.5 mL을 혼합한 후 L-Histidine/D-Biotin 또는 L-Tryptophan이 첨가된 연한천배지를 2mL씩 분주하고 vortex mixer로 혼합하여 Vogel-Bonner 최소 Glucose 한천평판배지에 고르게 부어 굳혔다.
- 연한천배지가 굳은 후 Vogel-Bonner 최소 glucose 한천평판배지를 뒤집어 37°C 배양기에서 약48시간 배양하였다.
- 시험물질 및 S9 혼합물의 오염여부를 조사하기 위하여 시험물질 최고농도 용액 0.1 mL 및 S9 혼합물 0.5 mL을 각각 2 mL의 top agar에 혼합하여 Vogel-Bonner 최소 Glucose 한천평판배지에 고르게 부어 미생물의 오염에 의한 콜로니 형성 유무를 확인하였다.

②시험적합성의 판정

복귀돌연변이시험은 다음의 판정기준을 만족시킬 경우 그 결과가 적합하다고 판정하였다.

음성대조군

Strain	S9 mix (-)	S9 mix (+)
TA 98	15 ~ 60	20 ~ 80
TA100	50 ~ 180	60 ~ 200
TA1535	10 ~ 40	10 ~ 40
TA1537	5 ~ 20	5 ~ 60
WP2uvrA(pKM101)	10 ~ 60	20 ~ 120

양성대조군

	Strain	양성대조물질	처리농도 (μ g/plate)	판정콜로니수
S9 mix (-)	TA 98	2-NF	1.0	150 ~ 70
	TA100	SA	1.0	300 ~ 1000

	TA1535	SA	1.0	100 ~ 1000
	TA1537	9-AA	80.0	80 ~ 700
	WP2uvrA(pKM101)	AF2	0.01	100 ~ 200
S9 mix (+)	TA 98	2-AA	0.5	150 ~ 1000
	TA100	2-AA	1.0	300 ~ 2000
	TA1535	2-AA	2.0	100 ~ 500
	TA1537	2-AA	2.0	100 ~ 500
	WP2uvrA(pKM101)	2-AA	20.0	250 ~ 1500

③ 시험결과의 판정

결과는 각 농도당 계수된 복귀돌연변이 콜로니수의 평균과 표준편차로 표시하였다.

아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

최소 1개 이상의 균주 및 1 용량 이상에서 복귀돌연변이 콜로니수가 음성대조군에 비해 농도 의존적으로 증가하거나, TA98, TA100, WP2uvrA균주는 2배 이상 TA1535, TA1537균주는 3배 이상 증가하고 재현성 있는 증가를 보일 경우 양성으로 판정하였다.

4) 결과

① 용량설정시험

두릅추출물 (MDF101)의 박테리아 균주를 이용한 유전독성시험 용량설정시험은 사전에 실시된 두릅추출물의 박테리아 균주를 이용한 유전독성시험의 결과를 참고로 하여 본시험의 최고 농도는 5,000 µg/plate로 정하였다.

② 본시험

Salmonella typhimurium strains TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 *Escherichia coli* strain WP2uvrA에 대하여 복귀돌연변이 시험 결과에 따른 평균 및 표준편차를 각각 Table 1에 제시하였고, 개별 콜로니 수는 appendix 1에 제시하였다. 콜로니 수의 평균값을 사용하여 fig. 1~2의 그래프에 결과를 도식화하였다.

시험물질은 본시험 최고농도인 5,000 µg/plate를 포함하여 공비 2의 5단계농도 (156.3~5,000 µg/plate)로 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA 에 처리하였다. 그 결과 대사활성계 및 비대사활성계 조건에서 모든 균주에 대해 복귀돌연변이를 나타내는 콜로니의 수는 농도 의존적인 증가는 관찰되지 않았다.

본 실험실의 음성대조물질과 양성대조물질 자료 history profile을 appendix 4에 제시하였다.

음성대조물질에 대한 박테리아의 복귀돌연변이 콜로니 수는 시험방법에 제시한 시험적합성 판정기준의 정상 범위내로 관찰되었다. 또한 양성대조물질에 대한 복귀돌연변이 콜로니 수는 음성대조군과 비교하여 콜로니의 수가 급격히 증가하였다.

5) 결론

시험의 결과에 따라 시험물질 두릅추출물 (MDF101)은 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀돌연변이를 유발시키지 않는 물질로 평가되었다.

Figure 1. Dose-response curve of revertant colonies of differential bacterial strains in the absence of metabolic activation

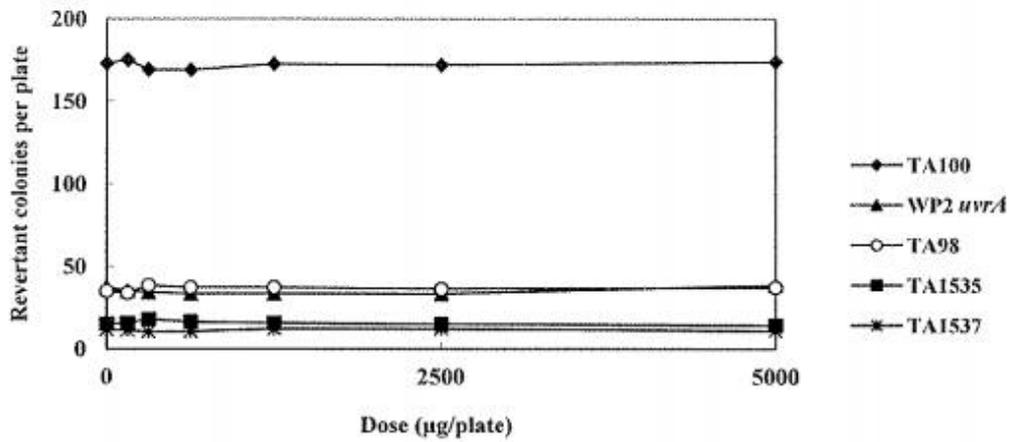


Figure 2. Dose-response curve of revertant colonies by differential bacterial strains in the presence of metabolic activation

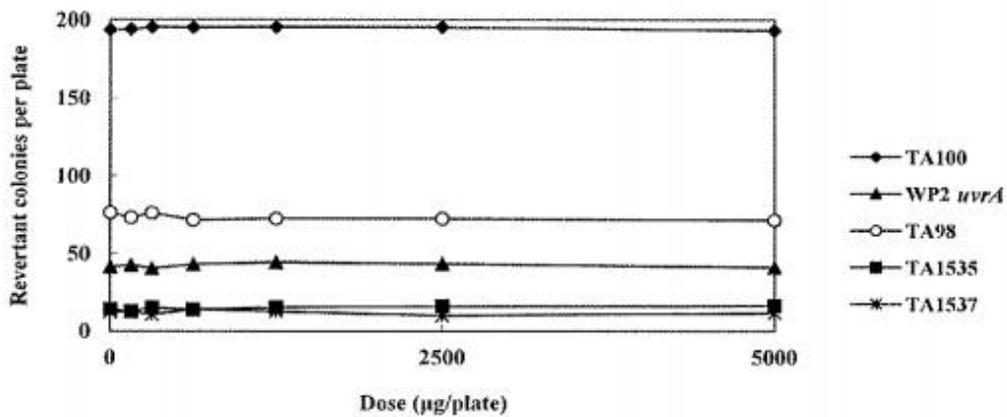


Table 1. Summary of revertant colony numbers obtained per plate with/without S9 mix

S9 mix	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate				
		base replacement type			frame shift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
-	NC	173 \pm 4	15 \pm 2	37 \pm 1	35 \pm 5	12 \pm 3
	156.3	175 \pm 4	16 \pm 1	35 \pm 2	34 \pm 4	11 \pm 3
	312.5	169 \pm 5	18 \pm 1	34 \pm 2	39 \pm 3	10 \pm 2
	625	169 \pm 3	16 \pm 2	33 \pm 3	37 \pm 1	11 \pm 3
	1,250	173 \pm 4	16 \pm 2	34 \pm 3	37 \pm 3	12 \pm 3
	2,500	172 \pm 5	15 \pm 2	33 \pm 2	36 \pm 2	12 \pm 3
	5,000	174 \pm 4	14 \pm 3	39 \pm 5	37 \pm 3	11 \pm 3
	PC	613 \pm 32	744 \pm 111	167 \pm 5	332 \pm 35	353 \pm 51

S9 mix	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate				
		base replacement type			frame shift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
+	NC	194 \pm 3	14 \pm 3	41 \pm 2	76 \pm 5	12 \pm 1
	156.3	194 \pm 4	13 \pm 1	43 \pm 5	73 \pm 2	13 \pm 2
	312.5	195 \pm 4	15 \pm 4	40 \pm 3	76 \pm 4	11 \pm 1
	625	195 \pm 2	14 \pm 1	43 \pm 3	72 \pm 2	14 \pm 1
	1,250	195 \pm 5	15 \pm 3	44 \pm 2	72 \pm 1	13 \pm 2
	2,500	195 \pm 4	16 \pm 1	43 \pm 5	72 \pm 2	10 \pm 1
	5,000	193 \pm 4	16 \pm 1	41 \pm 3	71 \pm 1	12 \pm 1
	PC	772 \pm 84	152 \pm 15	539 \pm 86	515 \pm 58	196 \pm 19

Data are presented as mean \pm SD (N=3)

NC : Negative Control (Distilled Water , 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

PC : Positive Control (100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

마. 염색체이상시험

1) 시험목적

시험물질인 두릅추출물(MDF101)을 포유동물 세포주 (Chinese Hamster Lung cell)에 노출시켜 염색체이상 빈도를 측정함으로써 시험물질의 유전독성을 평가한다.

2) 시험기준

시험의 모든 과정은 “비임상시험관리기준”의 Good Laboratory Practices규정을 준수하였다. 시험의 모든 규정은 “의약품등의독성시험기준”을 준수하여 실시하였다.

3) 재료 및 방법

① 세포주: Chinese hamster lung (CHL/IU) cells

② 농도 결정 시험

- 시험농도는 세포독성실험을 통하여 시험물질의 세포주 CHL 노출 농도를 설정하였다.
- 세포독성시험을 통해 두릅추출물(MDF101)의 최고농도를 1000 µg/mL 로 정하였다.
- 배양세포의 50% 성장억제농도(IC₅₀, 50% Inhibitory concentration)를 구하고자 세포를 분주하고 24시간 배양한 후, 단시간처리군(S9 혼합물 처리군, 비처리군), 연속처리군으로 나누어 시험물질을 포함한 배양액으로 교체하였다.
- 음성대조군은 용매인 증류수를 이용하여 10% 농도로 처리하였다.
- 시험물질은 1000 µg/mL 농도가 되도록 증류수에 고르게 용해시켜 공비 2의 7단계 (15.6~1000 µg/mL) 농도로 조제하였다.
- S9 혼합물 존재하와 부재하의 단시간처리군은 시험물질을 6시간 처리하고 새 배양액으로 교체하여, 총 24시간 배양 하였다. S9 혼합물 부재하에서 연속처리군은 시험 물질을 24시간 처리하였다. IC₅₀은 trypan blue assay (relative cell count)값으로 수행하였다.
- IC₅₀값을 고려하여 염색체이상시험의 최고농도로 하였다.

③ 시험군의 구성

위의 실험에서 결정된 최고농도는 최고농도를 포함하여 공비 2의 3단계 농도로 시험물질 처리군과 음성 및 양성대조군으로 본시험을 구성하였다. 증류수를 음성대조물 질로 사용하였고, 양성대조물질은 이미 염색체이상을 유발하는 것으로 밝혀진 CP (Cyclo phosphamide monohydrate) 와 MMC (Mitomycin C)를 S9 혼합물을 첨가한 시험계와 S9 혼합물을 첨가하지 않은 시험계에 처리하였다.

시험군	단시간처리		연속처리
	S9 mix (+)	S9 mix (-)	S9 mix (-)
음성대조군	증류수	증류수	증류수
저농도군	143.3 µg/mL	211.3 µg/mL	182.5 µg/mL
중간농도군	286.5 µg/mL	422.5 µg/mL	365 µg/mL
고농도군	573 µg/mL	845 µg/mL	730 µg/mL
양성대조군	CP (5 µg/mL)	MMC (0.1µg/mL)	MMC (0.1µg/mL)

④ 시험방법

- 단시간처리법

CHL 세포(2×10⁴cells/mL)를 60 mm의 petri-dish에 duplicate로 72시간 동안 배양하며, S9

혼합물 처리군과 비처리군의 음성대조물질, 시험물질, 양성대조물질을 세포에 6시간 처리 후 신선한 배지로 교환하여 18시간 배양하였다. 그리고 petri-dish에 세포를 수거하기 2시간 전에 0.25 µg/mL Colcemid(Invitrogen)를 처리한 다음 세포를 수거하여 검체를 제작하였다.

- 연속처리법

CHL 세포(2×10^4 cells/mL)를 60 mm의 petri-dish에 duplicate로 72시간 동안 배양하며, 각 음성대조물질, 시험물질 또는 양성대조물질이 포함된 배양액으로 24시간 계속 배양하였다. 세포를 수거하기 2시간 전에 0.25 µg/mL 의 colcemid (Invitrogen)를 처리한 다음 세포를 수거하여 검체를 제작하였다.

- 슬라이드 제작

검체는 처리 종료 시각에 각 petri-dish로부터 배양액을 제거하고 PBS (Phosphate buffered saline, Invitrogen)로 3회 세척한 후 0.05% Trypsin-EDTA로 세포를 수거하여 1000rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 하였다. 수거한 세포를 저장액 (0.075 mol/L, KCl) 현탁 시켜 37°C에서 30분간 처리하였고, 냉각고정액(Methyl alcohol: Glacial acetic acid = 3 : 1)을 1 mL 혼합하여 10분간 고정한 후 원심분리 (2500rpm, 4°C, 5min)하고, 상층액은 제거하고 다시 냉각 고정액 5 mL로 3회 고정 하였다. 세포 현탁액은 슬라이드위에 한 두방울 떨어 뜨려 공기건조법으로 검체를 제작하였다. 그 슬라이드는 5% Giemsa 염색액으로 30분간 염색하였다.

- 관찰

각 슬라이드는 현미경의 1000배 배율로 관찰하였다. 각 검체 당 100 개 의 세포분열 중기상 세포 (농도당 200개 분열중기세포)를 관찰하였다. 염색체 구조이상 (Structural aberration)과 수적이상(Numerical aberration) 유무를 관찰하였다. 구조이상은 염색분체형 (Chromatid type)과 염색체형 (Chromosome type)으로 구분하여 계수하였다. 구조이상의 종류는 염색분체형 gap (ctg), 염색분체형 절단 (ctb), 염색분체형 교환 (cte), 염색체형 gap (csg), 염색체형 절단 (csb), 염색체형 교환(cse)이 있다. 그리고 여러 가지 gap 또는 잘라진 분열중기세포는 fragment (frg)로 기록하였다. 수적이상과 하나 또는 그보다 많은 염색체이상은 하나의 염색체이상세포로 기록하였다.

구조이상	수적이상
Chromatid gap (ctg)	Polyploid Endoreduplication
Chromatid break (ctb)	
Chromatid exchange (cte)	
Chromosome gap (csg)	
Chromosome break (csb)	
Chromosome exchange (cse)	
Fragment (frg)	

- 시험적합성의 판정

염색체이상시험은 다음의 판정기준을 만족시킬 경우 그 결과가 적합하다고 판정하였다. 음성대조군인 용매 처리군에서 염색체이상세포수가 다음의 historical data 범위 내에 있어야 한다.

S9 혼합물을 첨가하지 않는 경우: 200개의 중기상당세포 중에 min=0, max=6 (mean=1.5, SD=0.8), gap을 포함하지 않음.

S9 혼합물을 첨가하는 경우: 200개의 중기상당세포 중에 min=0, max=3 (mean=0.8, SD=0.4), gap을 포함하지 않음.

양성대조 물질을 처리한 군에서 염색체이상세포의 수가 음성대조군에 비해 통계학적 유의하게 증가하거나, 농도 시간 또는 농도의존적으로 증가하였다 (Fisher's exact test, $p < 0.05$).

- 시험결과 및 평가

각 농도군당 200 개의 중기상세포에서 염색체이상의 수를 표시하였다.

구조이상은 크게 염색체형 절단 및 교환과 염색분체형 절단 및 교환으로 구별해 계수하고, gap을 염색분체의 폭보다 좁은 결손으로 분류하고 계수하되 염색체이상에 포함시키지 않았다.

수적이상은 4 배수체 이상인 polyploid 및 endoreduplication 만을 평가하였다..

구조이상의 종류를 1 개 이상 갖는 세포를 양성세포 1 개로 계수하고 퍼센트 값을 구하고 퍼센트 값을 염색체이상빈도로 하였다. 또한, 염색체이상의 종류를 각 기록하였다.

- 통계처리

이 시험에서는 평균 값에 대한 통계 분석을 하지 않았다. 평균과 표준편차는 본 시험의 측정값과 관련하여 계산되었다.

염색체이상빈도에 대한 통계처리는 OECD guideline 등에 따라 gap을 포함하지 않는 숫자를 대상으로 실시하였다.

각 군의 200 개의 중기상세포 중에서 염색체이상 세포 수와 정상세포수를 표시하였다.

용량 의존적인 증가나 반복적인 증가를 보일 때 양성으로 판정하였다.

Fisher's exact test (Altman, 1993)를 통하여 음성대조군과 시험물질 처리군의 유의성 검증을 위한 통계처리를 실시하였다. p -value에 따라 $p < 0.05$ 일 때 양성 여부를 판정하였다.

⑤ 결과 및 고찰

- 세포독성시험

Chinese hamster lung 세포를 이용한 염색체이상시험에 대한 두릅추출물 (MDF101)의 처리 농도를 결정하기 위하여 세포독성시험을 실시하였다. 세포독성시험에 따라, 대사활성계 처리 농도는 573 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 최고농도로 설정하였고, 비대사활성계의 단시간처리군은 845 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 최고농도로 설정하였다. 그리고 연속처리군은 730 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 설정하였다. 본시험은 음성 대조와 양성대조와 함께 최고농도를 포함하여 공비 2의 3 단계농도로 회석하였다.

시험물질은 7 단계농도로 처리하였고, S9 혼합물 (렛트 간의 균질액)의 대사활성 존재하와 부재하로 나누어 실시하였다. S9 혼합물을 첨가한 단시간처리군은 15.6~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 77.1%의 cell viability를 보였고, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 모든 세포가 사멸하였으며, IC₅₀(50%억제 농도) 값은 573.6264 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다. 따라서 S9 혼합물 첨가한 단시간처리군의 염색체이상 본 시험의 최고농도는 573 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 정하였다. S9 혼합물을 첨가하지 않은 단시간 처리군은 15.6 ~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 97.0% 이상의 cell viability를

보였고, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 25.8%로 IC_{50} (50% 억제 농도) 값은 845.9459 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다. 따라서 S9 혼합물을 첨가하지 않는 단시간 처리군의 염색체이상 분시험의 최고농도는 845 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 정하였다. 연속처리군은 15.6 ~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 70.4% 이상의 cell viability 를 보였고, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 18.0%를 보여, IC_{50} (50% 억제 농도) 값은 730.2632 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다. 따라서 S9 혼합물을 첨가하지 않는 연속처리군의 염색체이상 분시험의 최고농도는 730 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 정하였다.

- 염색체이상시험

위의 결과에 따라 염색체이상시험에서 사용한 시험물질의 최고 농도를 분시험의 최고농도로 정하며 공비 2 의 3 단계로 정하였다.

- 단시간처리법

S9 혼합물 첨가하는 조건: 143.3, 286.5, 573 $\mu\text{g}/\text{mL}$

S9 혼합물 첨가하지 않는 조건: 211.3, 422.5 , 845 $\mu\text{g}/\text{mL}$

S9 혼합물과 함께 시험물질 143.3, 286.5, 573 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 6시간 동안 처리한 경우, 200개의 증기상세포 중 염색체의 구조적 이상 빈도는 각각 0.0, 0.5, 0.5% 로 통계적 (Fisher's exact test)으로 유의한 증가가 유발되지 않았다 ($P>0.05$).

S9 혼합물을 첨가하지 않고 시험물질 211.3, 422.5, 845 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 6시간 동안 처리한 경우, 200개의 증기상세포 중 염색체의 구조적 이상 빈도는 각각 1.0, 0.5, 0.0% 로 통계적 (Fisher's exact test)으로 유의한 증가가 유발되지 않았다 ($P>0.05$).

S9 혼합물과 함께 처리한 양성대조물질 (CP)은 31.0%, S9 혼합물을 첨가하지 않는 양성대조물질 (MMC)도 21.5% 로서 현저한 염색체이상을 유발하였다 ($P<0.001$) (Table 1).

실험 조건에 따른 염색체이상의 종류는 Table 2 에 기록하였다.

- 연속처리법

S9 혼합물 첨가하지 않는 조건: 182.5, 365 , 730 $\mu\text{g}/\text{mL}$

염색체이상 빈도는 Table 1 과 Table 2 에 gap 을 포함하지 않은 경우와 gap 을 포함하는 경우를 각각 기록하였고, 다음의 결과 기술 및 염색이상 유무의 판정은 시험방법에서 제시한 바와 같이 gap 을 포함하지 않는 경우를 기준으로 하였다.

S9 혼합물을 첨가하지 않고 시험물질을 24시간 동안 연속 처리한 경우 182.5, 365, 730 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 염색체이상의 구조적 이상빈도가 0.0, 0.0, 0.5% 로 통계적 (Fisher's exact test)으로 유의한 증가가 유발되지 않았다 ($P>0.05$). 그러나 양성대조물질 MMC 를 처리한 군은 39.5% 로서 현저한 염색체이상이 관찰되었다 ($P<0.001$)(Table 1). 실험 조건에 따른 염색체이상의 종류는 Table 2에 기록하였다.

위의 결과에서 양성대조물질인 cyclophosphamide monohydrate 와 mitomycin C는 각 실험의 조건하에서 현저한 염색체이상을 유발하였다. 따라서 S9 혼합물의 유효성과 본 시험 시스

템의 민감성이 입증되었다. 이 시험에서 음성대조군은 염색체이상의 세포수는 정상범위안에 있는 것으로 평가되었다.

④ 결론

시험물질 두릅추출물(MDF101) 를 처리하였을 때, 시간 또는 농도 증가에 따른 염색체 이상 유발 빈도의 증가가 나타나지 않았다. 따라서 염색체이상을 일으키지 않는 물질로 판단된다.

Table 1. Summary of results obtained from chromosome aberration test of 두릅추출물(MDF101)

S9 Mix	Exposure period (hours)	Dose (µg/mL)	No. of counted cells	Cells with Chromosome aberration		
				Aberration cells excluding gaps (%)	Aberration cells including gaps (%)	No. of normal cells
+	6	NC	200	0.0	0.0	200
		143.3	200	0.0	0.5	199
		286.5	200	0.5	1.0	198
		573	200	0.5	1.0	198
		PC (CP)	200	31.0	38.0	125
-	6	NC	200	0.0	1.0	198
		211.3	200	1.0	1.0	198
		422.5	200	0.5	1.0	198
		845	200	0.0	0.0	200
		PC (MMC)	200	21.5	24.0	152
-	24	NC	200	0.5	0.5	199
		182.5	200	0.0	1.0	198
		365	200	0.0	0.5	199
		730	200	0.5	2.5	195
		PC (MMC)	200	39.5	43.5	113

*: $P < 0.001$, significant differences between control and treatment group by Fisher's exact test

otherwise: $P > 0.05$

NC: Distilled Water

CP: Cyclophosphamide monohydrate (5 µg/mL)

MMC: Mitomycin C (0.1 µg/mL)

Table 2. Metaphase analysis data

S9 mix	Exposure period (hours)	Dose (µg/mL)	esb	cse	ctb	cte	Frg	Aberration excluding gap (%)	csg	ctg	poly	endo	Aberration including gap (%)	Normal cells (No.)		
+	6	NC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
		143.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
			0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	99	
		286.5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	99	
			0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	99	
		573	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	99	
			0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	99	
		PC(CP)	1	0	13	16	0	0	29	2	3	0	0	34	67	
			2	1	16	15	0	0	33	3	8	0	0	42	58	
		-	6	NC	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	99
					0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
211.3	1			0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	2	98	
	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
422.5	0			0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	99	
	1			0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	99	
845	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
PC (MMC)	1			1	9	11	0	0	22	1	2	0	0	25	75	
	2			0	12	7	0	0	21	1	1	0	0	23	77	
-	24			NC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
					1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
		182.5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	99	
			0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	99	
		365	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	99	
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
		730	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	98	
			0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	3	97	
		PC (MMC)	0	0	12	29	0	0	37	0	6	0	0	42	58	
			0	0	17	30	0	0	42	0	3	0	0	45	55	

ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break,

cse: chromosome exchange, ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap,

poly: polyploid, endo: endoreduplication, frg: fragment

NC: Distilled Water

CP: Cyclophosphamide monohydrate (5 µg/mL), MMC: Mitomycin C (0.1 µg/mL)

바. 소핵시험

1) 시험목적

ICR 마우스 골수세포를 이용하여 시험물질 두릅추출물 (MDF101)의 소핵유발 유무를 평가하였다.

2) 시험목적

시험의 모든 과정은 “비임상시험관리기준”의 Good Laboratory Practice를 준수하였다.
시험의 모든 규정은 “의약품등의 독성시험기준”을 근거로 실시하였다.

3) 시험방법

① 시험계

- 종 및 계통: 마우스, CrliOri:CD1(ICR), SPF
- 선택 이유: ICR 마우스는 설치류로 소핵시험을 비롯한 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있으며 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.
- 입수시 성별, 동물수, 체중 및 주령: 수컷, 30마리, 25.2 ~28.3 g, 7주령,
투여시 성별, 동물수, 체중 및 주령: 수컷, 25마리, 31.3 ~ 34.9 g, 8주령

② 검역 및 순화

반입시 동물의 외관 검사를 실시하고 체중 측정 후, 개체식별법에 따랐다. 5일의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

③ 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 순화기간 개체식별카드를 부착하였다.

관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 개체식별카드를 부착하였다.

④ 군분리

검역 및 순화기간 종료 후, 체중 증가량 및 일반증상에 건강한 동물을 선별하여 사용하였다. 군 평균체중의 표준편차를 계산하여 구간 균등하게 동물을 배치하였다.

⑤ 잔여동물의 처리

잔여동물은 군분리 종료 후 시험계에서 제외하였다.

⑥ 사육환경조건

- | | |
|----------------|---|
| - 동물실 번호 | 동물실 II |
| - 사육상자 종류 및 크기 | Polycarbonate cage, 270W × 220D × 130H (mm) |
| - 사육상자당 수용동물 수 | 5마리 |

- 온도 19.2 ~ 21.0 °C
- 상대습도 48.7 ~ 58.3 %
- 환기횟수 10 ~ 20 회 / 시간
- 명암주기 (조명시간) 12 시간 / 일 (08:00 ~ 20:00)
- 조도 150 ~ 300 Lux

⑦ 사료

- 종류: 실험동물용 고형사료
- 급여방법: 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취 시켰다.
- 사료의 분석 및 확인: 공급원에서 제공한 자료를 이용하였다.

⑧ 음수

- 종류 및 급수방법
UV 멸균 및 필터를 이용하여 여과된 정제수를 Polycarbonate 음수병 (250mL)에 넣어 자유섭취 시켰다.

⑨ 투여

- 투여경로
음성대조군 및 시험물질군은 위내 경구투여하고, 양성대조군은 복강 내 투여하였다.
- 투여경로의 선택이유
사람에 대한 노출 경로 중의 하나로서 경구투여를 선택하였다.
- 투여방법
경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (1 mL)를 이용하여 위 내 강제 경구하였다.
- 투여액량
투여 당일 측정된 체중을 기준으로 투여액량을 계산하였다.
- 투여횟수 및 투여기간
각 군당 1일 1회 1일간 투여를 실시하였다.

⑩ 일반증상 관찰 및 체중측정

- 일반증상 관찰
모든 동물에 대하여 매일 1회 이상 일반 상태의 변화, 운동성, 외관등의 일반 증상 및 사망동물 유무를 관찰하였다.
- 체중측정
모든 동물에 대하여 투여 직전, 골수세포 채취 당일까지 체중을 측정한다.

⑪ 시험군 구성

본시험의 최고용량은 시험물질 정보를 참고하여 2000 mg/kg로 설정하였다. 소핵유발빈도 시험에서 소핵 채취 시간에 있어서 차이가 나타나지 않았다. 따라서 소핵 본시험의 최고용량은 2000 mg/kg으로 설정하였으며, 최고용량을 포함한 공비 2의 3단계용량으로 시험물질 군과 음성대조군, 양성대조군으로 구성하였다. 또한 소핵유발빈도 시험의 결과에

따라 골수 세포 채취시간은 최종투여 후 24시간으로 설정하였다.

군	성별	동물수	동물번호	투여용량 (mL/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여경로	투여횟수
음성대조 (증류수)	수컷	5	1M 01~05	0	10	경구	1
두릅추출물 (MDF101)	수컷	5	2M 06~10	500	10	경구	1
	수컷	5	3M 11~15	1000	10	경구	1
	수컷	5	4M 16~20	2000	10	경구	1
양성대조 (MMC)	수컷	5	5M 21~25	1	10	복강내	1

⑫ 골수세포의 채취 및 검체 제작

시험물질의 최종투여 후, 경추탈골로 마우스를 안락사 시키고 대퇴골을 적출하여 근육질을 제거 한 후, 대퇴골 상부 머리부근 가까이에서 절단하였고 난 다음 슬개골을 절단하였다. 0.2 mL의 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, Invitrogen, U.S.A.)을 대퇴골에 관류시켜 골수세포를 채취하였다. 골수세포부유액은 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 소량을 슬라이드 글라스에 떨어뜨려 도말하였다. 개체당 2매의 골수도말검체를 제작하였다. 공기중에 충분히 건조 시킨 후, 메탄올로 고정하였다. 5% Giemsa 염색액으로 20분간 염색하였다.

⑬ 검체의 판독

동물개체별로 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte)와 정염성적혈구 (NCE, Normochromatic, erythrocyte)의 합이 200개가 되도록 계수하여 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비 $[PCE / (PCE+NCE)]$ 를 구하였다. 이어서 다염성적혈구가 2000개가 되도록 계수하여 다염성적혈구 중 소핵을 가지고있는 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 비 $(MNPCE / 2000PCE)$ 를 구하였다.

⑭ 결과의 판정

시험물질 투여군에서 소핵의 빈도가 용량의존적으로 증가하거나, 한 용량 이상에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타날 때 양성으로 판정하였다. 그러나 통계학적 유의성을 양성판정의 유일한 근거로 삼지 않으며, 생물학적 연관성 또한 고려하였다.

⑮ 자료의 통계처리

소핵의 유발빈도에 대하여 SAS 9.1 프로그램을 이용하여 Fisher's exact test 법을 이용하여 5% 유의수준에서 검증하였다. 다염성적혈구의 출현빈도와 체중의 변화는 SAS 9.1 프로그램으로 ANOVA test법을 이용하여 5% 유의수준에서 통계적으로 유의성을 검증하였다.

4) 결과 및 고찰

① 일반증상 및 사망동물 관찰 (Table 1)

모든 용량군에서 빈사상태 및 사망동물과 일반증상은 관찰되지 않았다.

② 체중변화 (Table 1)

각 군간의 체중을 음성대조군과 비교한 결과 모든 용량에서 유의성 있는 체중변화가 관찰되지 않았다 ($p>0.05$, ANOVA test).

③ 소핵다염성 적혈구 및 다염성 적혈구의 출현 빈도 (Table 2)

음성대조군, 시험물질의 500, 1,000, 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 용량군에서 다염성적혈구 중 소핵다염성 적혈구의 출현 빈도의 평균은 각 1.2, 1.6, 0.8, 1.2로, 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다 ($p>0.05$, Fisher's exact test). 또한 양성대조군의 소핵다염성 적혈구의 출현빈도의 평균은 25.6으로 음성대조군에 비해 현저하게 증가 하였다 ($p<0.05$, ANOVA test).

총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현 빈도는 모든 용량군에서 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p>0.05$, ANOVA test).

5) 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 두릅추출물 (MDF101)은 마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

Table 1. Results of main study (Body weights and Clinical signs)

Test article	Route	Dose mg/kg	Sex	Clinical signs	Animal ID	Body weight (g)	
						0hr	24hr
중류수	P.O.	0	Male	NAD	1M 01	34.9	35.2
				NAD	1M 02	32.5	32.0
				NAD	1M 03	32.5	32.5
				NAD	1M 04	31.6	32.7
				NAD	1M 05	31.5	29.8
				-	Mean	32.6	32.4
				-	S.D.	1.4	1.9
두릅추출물	P.O.	500	Male	NAD	2M 01	34.9	35.8
				NAD	2M 02	32.7	33.8
				NAD	2M 03	32.4	31.8
				NAD	2M 04	31.6	31.0
				NAD	2M 05	31.4	32.0
				-	Mean	32.6	32.9
				-	S.D.	1.4	1.9
두릅추출물 (MDF101)	P.O.	1,000	Male	NAD	3M 01	34.2	35.2
				NAD	3M 02	32.8	31.2
				NAD	3M 03	32.2	30.9
				NAD	3M 04	31.8	31.8
				NAD	3M 05	31.4	31.2
				-	Mean	32.5	32.1
				-	S.D.	1.1	1.8
	P.O.	2,000	Male	NAD	4M 01	34.1	34.4
				NAD	4M 02	33.0	33.2
				NAD	4M 03	32.1	31.4
				NAD	4M 04	31.8	36.0
				NAD	4M 05	31.3	30.7
				-	Mean	32.5	33.1
				-	S.D.	1.1	2.2
MMC	I.P.	1	Male	NAD	5M 01	33.5	33.6
				NAD	5M 02	33.0	31.9
				NAD	5M 03	31.9	31.7
				NAD	5M 04	31.8	32.1
				NAD	5M 05	31.3	32.4
				-	Mean	32.3	32.3
				-	S.D.	0.9	0.8

P.O.: Per Os

I.P.: Intraperitoneal

S.D.: Standard Deviation

NAD: No Abnormalities Detected

Table 2. Results of main study

Test article	Route	Dose mg/kg	Sex	Hour after administration	Animal ID	PCE:NCE	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/2000PCE					
중금속	P.O.	0	Male	24	1M 01	116:84	0.580	0					
					1M 02	94:106	0.470	0					
					1M 03	93:107	0.465	4					
					1M 04	97:103	0.485	2					
					1M 05	96:104	0.480	0					
					Total	-	-	6					
					Mean	-	0.496	1.20					
					S.D.	-	0.048	1.79					
					두릅추출물 (MDF101)	P.O.	500	Male	24	2M 01	88:112	0.440	4
										2M 02	124:76	0.620	0
2M 03	121:79	0.605	2										
2M 04	87:113	0.435	2										
2M 05	102:98	0.510	0										
Total	-	-	8										
Mean	-	0.522	1.60										
S.D.	-	0.088	1.67										
두릅추출물 (MDF101)	P.O.	1,000	Male	24						3M 01	114:86	0.570	0
										3M 02	107:93	0.535	2
					3M 03	95:105	0.475	0					
					3M 04	96:104	0.480	0					
					3M 05	113:87	0.565	2					
					Total	-	-	4					
					Mean	-	0.525	0.80					
					S.D.	-	0.045	1.10					
					MMC	P.O.	2,000	Male	24	4M 01	120:80	0.600	4
										4M 02	106:94	0.530	0
4M 03	104:96	0.520	0										
4M 04	97:103	0.485	0										
4M 05	110:90	0.550	2										
Total	-	-	6										
Mean	-	0.537	1.20										
S.D.	-	0.042	1.79										
MMC	I.P.	1	Male	24						5M 01	125:75	0.625	32
										5M 02	120:80	0.600	20
					5M 03	96:104	0.480	24					
					5M 04	98:102	0.490	30					
					5M 05	107:93	0.535	22					
					Total	-	-	128					
					Mean	-	0.546	25.60*					
					S.D.	-	0.065	5.18					

P.O.: Per Os

I.P.: Intraperitoneal

S.D.: Standard Deviation

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

MMC: Mitomycin C

*: Significantly different from mice treated with vehicle ($p < 0.05$, Fisher's exact test)

제 4절. 두릅추출물의 인체적용시험

1. 인체적용시험 계획

연구 제목	(국문)두릅 추출물섭취를 통한 안구건조증상(건성안) 개선에 대한 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 2중눈가림, 평행설계 인체적용시험
	(영문)Sponsor initiated trial designed randomization, double blind and parallel to evaluate functionality and safety of xerophthalmia(dry eye) improvement for Intake of aralia elater extract.
책임연구자	중앙대학교병원 안과 이정규 교수
연구비 지원기관	(주)메드빌
연구 목적	두릅 추출물(시험식품)섭취를 통한 안구건조증상(건성안) 개선에 대한 기능성 및 안전성을 평가하기 위함
연구 설계	두릅 추출물섭취를 통한 안구건조증상(건성안) 개선에 대한 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 2중눈가림, Placebo대조 평행설계, 단일기관 인체적용시험
연구 기간	IRB 승인일 ~ 16개월 예상 (19.08부터 20.11.30까지 예상)
연구 대상	시험식품: 두릅 추출물을 기능성 원료로 한 건강기능식품 대조식품: (Placebo 식품) 결정셀룰로오스(51.67%), 옥수수 전분(39.66%), 카르복시메틸셀룰로오스칼슘(2.33%), 카라멜 색소(2%) 등
연구 대상자 수	본원 40명(시험군과 대조군 각 20명)
취약한 연구대상자	<p>본 연구는 안구 건조 증상(건성안)으로 불편함을 느끼는 건강한 사람을 대상으로 하는 건강기능식품의 인체적용시험이므로, 선정/제외기준에 따라 중앙대학교병원을 방문하는 환자를 시험대상자로 등록하기에는 어려움이 많아서 목표 대상자 수 중 약 30%는 취약한 환경에 있는 대상자를 등록할 수 있다.</p> <p>본 연구에 참여할 수 있는 취약한 환경에 있는 대상자는 본원과 관련된 기관에 소속된 직원 중 선정/제외기준에 위반되지 않는 건강한 사람으로, 대상자 모집공고문을 보고 자발적인 참여 의사를 밝힌 경우에만 서면동의서를 작성한 후 참여할 수 있다. 취약한 환경에 있는 대상자도 일반 대상자와 동일하게 연구 참여 중 언제라도 참여를 취소할 수 있으며, 이러한 사실이 상사에게 알려져 부당한 영향이나 강제성을 받지 않도록 보호하기 위해 중앙대학교병원 안과 직원은 본 연구에 참여할 수 없다.</p> <p>본 연구와 관련된 모든 내용은 연구에 참여하는 중앙대학교 안과 의료진에게만 공개되며, 그 외 허가받지 않은 자에게 제공하지 않는다.</p>

	<p>본 연구에 참여하는 모든 연구자는 취약한 환경에 있는 대상자에 대해서는 특히 사생활과 기밀 유지에 신경을 써야 한다. 연구 참여를 위한 서면동의 취득 과정에는 본 연구에 참여하는 중앙대학교 안과 의사만 참여할 수 있으며, 모든 내용은 임상시험 관련 규정에 따라 비밀로 보호되어야 한다.</p>
연구방법	<p>시험대상자선별검사(Screening)를 통해 적합 판정받은 사람을 대상으로 무작위배정으로 시험/대조군에 등록한 후 시험/대조식품을 12주간 섭취하도록 한다. 기능성과 안전성 평가를 위해 TBUT(1차), Schirmer test, OSDI 설문조사, 각막염색검사지수(2차)를 평가변수로 설정하여 임상 결과를 통계적으로 분석한다.</p>
유효성 평가	<p>시험군(두릅 추출물섭취군)/대조군(Placebo 식품섭취군)에 대한 섭취 前(Baseline, V2)과 12주 섭취 後(V4)의 기능성 1차 평가변수(TBUT)를 각각 측정하여 섭취 前・後 간의 군간 평균 변화량의 차이를 유의수준 0.025(단측), Power=80%에서 95% 양측 신뢰구간의 하한이 우월성 마진(Superiority Margin)(=0)보다 크면 우월성이 입증된 것으로 평가한다.</p> <p>2차평가변수(Schirmer test 값, OSDI 설문조사, 각막염색검사점수)의 평가는 시험군/대조군 군간 섭취 前・後 간의 각각의 변수 평균 변화량의 차이를 Independent t - test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 분석한다. 통계검정의 유의수준은 $\alpha=0.05$(양측)로 한다. 이때, 평균 변화량의 정규성 검정은 Shapiro-Wilk Normal Test를 실시하며, p값이 유의수준 0.05 이상일 경우 정규성을 따른다고 판단한다.</p>
안전성 평가	<p>활력징후는 시험식품/대조식품 섭취 전/후 변화량에 대해 기술통계량을 제시하고 변화량의 차이는 정규성 가정을 만족하는 경우 Paired t-test를, 정규성 가정을 만족하지 않는 경우는 Wilcoxon's signed rank test로 검정한다.</p> <p>추가적으로, 실험실적 검사 결과는 시험식품/대조식품 섭취 전・후 정상(임상적으로 의미 없는 비정상 포함)/임상적으로 의미 있는 비정상 변화에 대한 분할표를 제시하고 각 군 내 변화는 기대빈도 셀의 비율 또는 정규성 가정과 무관하게 McNemar's test로 검정한다.</p> <p>인체적용시험용 건강기능식품을 복용한 이후 발생한 이상사례에 대해서는 Primary SOC, PPTerm에 대해 도표화 한 후 그 발현율을 구하고, 각 군간 이상사례 발생한 시험대상자의 비율을 계산하고 Chi-square test 또는 Fisher' exact test를 이용하여 분석한다.</p>
기대효과 및 예상결과	<p>안구건조증의 기존 치료로서 인공눈물, 스테로이드제, 수술 등의 방부제의 부작용, 낮은 효능, 높은 재발을 등의 문제점이 있으나 본 연구는 눈물증발을 막아주고 눈물 생성을 도와주는 안구표면환경을 개선할 수 있는 천연물 기능성 원료로서 타 치료제에 비해 안전성 및 기능성 면에서 상대적으로 우월한 이익 수혜가 예상된다.</p>

2. 윤리위원회 심의결과 통보서



중앙대학교병원 생명윤리위원회

중앙대학교병원 생명윤리위원회	
Tel 02-6299-2738, 2739, 2740	FAX 02-6299-2860
e-Mail irb@caumc.or.kr	e-IRB 시스템 https://eirb.cauhs.or.kr/
주소 서울특별시 동작구 흑석로 102 (흑석동 224-1) (우) 06973	

심의 결과 통보서

IRB No.	1952-004-371		제출경로	중앙대학교병원		
수신	책임연구자	이정규	소속	학과	직위	교수
	의뢰기관	(주)에드빌				
연구과제명	두릅추출물 섭취를 통한 안구건조증상(건성안) 개선에 대한 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 2중눈가림, 평행설계 인체적용시험					
Protocol No.	Med-01		Version No.	1.0_sb2		
생명 윤리법에 따른 분류	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물연구 <input type="checkbox"/> 배아줄기세포주이용연구 <input type="checkbox"/> 배아연구 <input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구 <input type="checkbox"/> 단성생식배아연구 <input type="checkbox"/> 배아생성의료기관 <input type="checkbox"/> 인체유래물은행					
연구종류	임상 <input type="checkbox"/> 시험외 연구	<input type="checkbox"/> 증례보고 <input type="checkbox"/> 생태학적 연구 <input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 조사, 설문, 인터뷰 연구 <input type="checkbox"/> 환자군 연구 <input type="checkbox"/> 환자-대조군연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물저장소 연구 <input type="checkbox"/> 등록(레지스트리) 연구 <input type="checkbox"/> 시판후사용성적조사 <input type="checkbox"/> 전향적 코호트 연구 <input type="checkbox"/> 후향적 코호트연구 <input type="checkbox"/> 기타				
	임상 시험	연구 대상	<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 생물학적제제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 의료기기 <input type="checkbox"/> 기타			
	Phase	일반명	두릅추출물			
	식약처 승인 대상 여부	상품명				
	임상시험 목적	<input type="checkbox"/> 제1상 <input type="checkbox"/> 제1/2상 <input type="checkbox"/> 제2상 <input type="checkbox"/> 제2/3상 <input type="checkbox"/> 제3상 <input type="checkbox"/> 제4상 <input type="checkbox"/> 생물학적동등성 <input type="checkbox"/> 기타				
식약처 승인 대상 여부	<input type="checkbox"/> 식약처승인대상 <input checked="" type="checkbox"/> 승인 제외 대상					
임상시험 목적	<input type="checkbox"/> 학술용 <input checked="" type="checkbox"/> 국내(MFDS)허가용 <input type="checkbox"/> 해외 허가용					
승인유효 만료일	2020년 09월 15일	정기보고주기	12개월	심의대상	경토의견에 대한 답변서(연구계획변경)	
심의종류	신속심의			심의일자	2020년 02월 17일	
접수일자	2020년 02월 06일			심의결과통보일	2020년 02월 18일	
심의내용 및 목록	1. 경토의견에 대한 답변서(연구계획변경)					
심의결과	승인					
연구의 위험도	Level 1 (최소위험)					
심의의견	연구계획 변경 심의건을 재경토 한 결과 '승인' 되었음을 알려드립니다. 1. 연구계획서 부분					

중앙대학교병원 생명윤리위원회

	<p>1) 승인된 연구는 최종 승인된 계획서 및 연구자 준수사항에 따라 연구를 진행하여야 합니다.</p> <p>2) 연구가 1년을 초과 시 승인 유효기간 내에 지속성을 받아야 합니다.</p> <p>2. 동의서 부분</p> <p>1) 승인된 동의서 및 설명문은 e-IRB 해당과제에서 다운 받아 사용하시기 바랍니다. 구체적인 방법은 e-IRB 공지사항(No.5142)을 참고하시기 바랍니다.</p> <p>3. 기타 부분</p> <p>1) 연구계획서는 "CRIS(영상연구정보서비스, https://cris.nih.go.kr)"에 등록하시길 권장합니다.</p> <p>2) 시험(연구) 대상자 보호를 위한 보험 가입을 권장합니다.</p> <p>3) 연구자주도 임상연구(IIT)는 요양급여 적용을 위해 사전에 심평원 요양급여 적용 결정 신청 승인을 받은 후 연구를 진행하시기 바랍니다. (단 관찰연구와 같은 비종재적 임상연구는 제외)</p> <p>4) 식약처 승인 대상 연구는 식약처 승인을 득하신 후 연구를 진행하시기 바랍니다.</p> <p>5) IRB에서 승인된 연구계획서와 동일한 내용의 인체유래물연구동의서를 대상자로부터 획득하시기 바랍니다. 연구계획서에 기술된 사항 이외의 항목을 기재하여 동의를 받은 경우 유효하지 않은 동의서로 간주됩니다. (유래물 보존 기간, 종류 및 수량, 2차적 사용에 대한 사용 여부, 2차적 사용을 위한 제공 시 개인식별정보 등)</p>
--	--

생명윤리위원회 위원



	<p>본 통보서에 기재된 사항은 IRB의 기록된 내용과 일치함을 증명합니다.</p> <p>본 기관 IRB는 생명윤리 및 안전에 관한 법률, 약사법, 의료기기법 및 ICH-GCP 등 관련 법규를 준수합니다.</p> <p>본 연구와 이해관계(Conflict of Interest)가 있는 위원이 있을 경우 연구의 심의에서 배제하였습니다.</p>
--	--

3. 인체적용시험용 식품

1) 시험식품(시험군)

- 주성분 : 두릅추출물(MDF101)
- 성상 : 녹색의 정제(고팅정)
- 지표성분 : Chlorogenic acid(CGA), 3,4-Dihydroxybenzoic acid(DHBA)
- 두릅추출분말 중 CGA 함량 - 4.64±0.16g/Kg
- 두릅추출분말 중 DHBA 함량 - 3.94±0.222g/Kg
- 식품의 제형 : 정제
- 식품의 중량 : 400mg/정
- 1일 섭취량 : 두릅추출물(건조엑스)로 1일 총 800mg 섭취/성인(60kg)
(1일 2정, 1정당 주성분 400mg)
- 섭취량 및 섭취방법 - 1정(400mg)/1회, 2회(2정)/1일/성인(60kg)를 아침, 저녁에 섭취한다. 이 섭취량은 13.3mg/kg/day으로서 본 두릅추출물의 NOAEL값(무독성 한계량:2,000mg 이상)보다 매우 작다.
- 저장방법 : 직사광선을 피하여 15℃ 이하의 서늘한 곳에 보관한다.

< 원료로부터 추출물 제조과정 >

□ 제조방법 : 원료 구입 ⇒ 열수추출(1차 및 2차) ⇒ 여과 ⇒ 농축 ⇒ 살균 ⇒ 분무건조 ⇒ 검사 ⇒ 포장

- 원재료 구입 : 중국산 두릅 품종으로서 재배지는 경기도 가평군 일대이다.
- 열수추출(1차 및 2차) : 원료의 8배 이상의 정수를 넣어 95℃에서 8시간 동안 가온하여 1차 및 2차 추출.
- 여과 : 1차 추출 및 2차 추출한 추출액을 25micro체에서 여과한다.
- 농축 : 여과한 액을 60℃에서 감압 가온하여 고형분 함량이 23%(23 Brix)가 되도록 농축한다.
- 살균 : 농축한 농축액을 85℃에서 20분간 가열 살균한다.
- 분무건조 : 살균한 농축액을 수분 함량이 10% 이하가 되도록 분무건조하여 60mesh로 선별하여 분말로 한다
- 검사: 검사규격(기준 및 시험방법)에 따라 검사한다
- 기준 및 시험방법: 성상, 이물, 중금속, 잔류농약, 대장균군, 타르색소, 수분 등의 기준규격 시험
- 포장: 검사에서 규격적합품을 포장한다. 유통기한, 저장방법 등 표시사항을 표시한다.

< 정제 생산 공정 >

- 원료의 배합

배합목적	원료명	배합비(%)	분량(mg)	비고
주성분	두릅추출물(건조액스)	50.0	400	
부형제	결정셀룰로오스	29.946	239.57	
부형제	케이엠유-2(KMU-2)	9.779	78.23	
붕해제	카르복시메틸셀룰로오스칼슘	3.5	28.0	
활택제	이산화규소	1.625	13.0	
활택제	스테아린산마그네슘	1.25	10.0	
코팅제	히드록시프로필메틸셀룰로오스	3.125	25.0	
코팅제	글리세린지방산에스테르	0.338	2.7	
코팅제	이산화티타늄	0.188	1.5	
코팅제	치자그린색소	0.25	2.0	
		100.0%	800mg	

□ 제조공정 : 원료 칭량 ⇒ 혼합 ⇒ 타정 ⇒ 코팅 ⇒ 선별 ⇒ 포장

1. 원료 칭량

- 주성분 : 두릅추출물
- 부형제 : 결정셀룰로오스, 케이엠유-2(KMU-2)
- 붕해제 : 카르복시메틸셀룰로오스칼슘
- 활택제 : 이산화규소, 스테아린산마그네슘
- 코팅제 : 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 글리세린지방산에스테르, 이산화티타늄, 치자그린색소
- 용제 : 에탄올(KP), 정제수(KP)

2. 혼합 : 공정 1의 주성분, 부형제, 붕해제

3. 후혼합 : 공정 1의 활택제, 공정 2의 혼합물

4. 타정 : 공정 3의 혼합물

5. 코팅액 조제

- 코팅제 : 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 글리세린지방산에스테르, 이산화티타늄, 치자그린색소
- 용제 : 에탄올(KP) 268mg/정, 정제수(KP) 67mg/정

- 6. 코팅 : 공정 4의 반제품, 공정 5의 코팅액
- 7. 선별 : 공정 6의 반제품
- 8. 포장(병포장) : 공정 7의 반제품 [직접 용기,포장의 재질: PE, PVDC]

2) 대조식품(대조군)

• 원료의 배합

배합목적	원료명	배합비(%)	분량(mg)	비고
부형제	결정셀룰로오스	39.875	319.0	
부형제	말토덱스트린	28.556	228.45	
부형제	케이엠유-2(KMU-2)	19.156	153.25	
부형제	카르복시메틸셀룰로오스칼슘	4.375	35.0	
부형제	카라멜색소	1.875	15.0	
활택제	이산화규소	1.5	12.0	
활택제	스테아린산마그네슘	1.0	8.0	
코팅제	히드록시프로필메틸셀룰로오스	2.875	23.0	
코팅제	글리세린지방산에스테르	0.288	2.3	
코팅제	이산화티타늄	0.25	2.0	
코팅제	치자그린색소	0.25	2.0	
		100.0%	800mg	

- 성상 : 시험식품과 동일
- 식품의 제형 : 시험식품과 동일
- 식품의 중량 : 시험식품과 동일
- 1일 섭취량 : 시험식품과 동일
- 저장방법 : 시험식품과 동일

□ 제조공정 : 원료 칭량 ⇨ 혼합 ⇨ 타정 ⇨ 코팅 ⇨ 선별 ⇨ 포장

1. 원료 칭량

- 부형제 : 결정셀룰로오스, 말토덱스트린, 케이엠유-2(KMU-2), 카라멜색소
- 봉해제 : 카르복시메틸셀룰로오스칼슘
- 활택제 : 이산화규소, 스테아린산마그네슘
- 코팅제 : 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 글리세린지방산에스테르, 이산화티타늄, 치자그린색소
- 용제 : 에탄올(KP), 정제수(KP)

2. 혼합 : 공정 1의 부형제, 봉해제

3. 후혼합 : 공정 1의 활택제, 공정 2의 혼합물

4. 타정 : 공정 3의 혼합물

5. 코팅액 조제

- 코팅제 : 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 글리세린지방산에스테르, 이산화티타늄, 치자그린색소
- 용제 : 에탄올(KP) 268mg/정, 정제수(KP) 62mg/정

6. 코팅 : 공정 4의 반제품, 공정 5의 코팅액

7. 선별 : 공정 6의 반제품

8. 포장(병포장) : 공정 7의 반제품 [직접 용기,포장의 재질: PE, PVDC]

4. 연구대상자의 선정기준, 제외기준, 목표한 대상자 수 및 산출 근거

1) 선정기준

- (1) 19세≤만 나이<65세의 눈이 건조하고 침침하여 불편한 남녀
- (2) 양안(兩眼) 중 1안의 눈물막파열시간(TBUT) 3회 시험 평균 시간이 6~10초인 자
- (3) 주관적 의사 표현이 가능하고 본 인체적용시험에 참여할 것을 자발적으로 서면 동의한 자

2) 제외기준

- (1) Screening 3개월 이내 안과 관련 수술(백내장, 라식/라섹, 눈꺼풀 수술 등)을 받은 자
- (2) 최근 1개월 이내 다음의 약물 사용 이력이 있는 자
 - 안구표면 윤활제인 인공눈물(히알루론산나트륨 제제, 카복시메틸셀룰로스나트륨 제제 등) 외 건성안의 점안 치료제 사용 및 경구 약제를 복용한 경우
 - 건성안 치료 이외의 목적으로 안약을 점안한 경우
 - 항히스타민제, 베타차단제, 삼환계항우울제, 경구호르몬제제(에스트로젠 요법 등)를 복용한 경우
- (3) 중증의 안구 감염이 있는 자
- (4) Screening 3주 이내 두릅 추출물을 섭취한 자
- (5) Screening 방문 12시간 내 콘택트렌즈 착용하였거나, 연구 참여 기간 중 콘택트렌즈 착용이 필요한 자
- (6) 최근 3개월 이내에 안구건조증의 원인이 되는 류마티스성 관절염, 쇼그렌증후군, 루프스, 공피증, 당뇨 병, 비타민A 결핍증, 녹내장, 결막염, 갑상선 질환을 진단받은 자
- (7) Screening 시 Creatine 수치가 정상 범위 상한치보다 2배 이상인 신장 기능 장애가 있는 자
- (8) AST, ALT 수치가 정상 범위 상한치보다 2배 이상인 간 기능 장애가 있는 자
- (9) Screening 방문 전 48시간 내 알코올을 복용한 자
- (10) 임신하였거나 수유 중인 여성
- (11) 폐경 상태(월경이 12개월 이상 멈춘 상태)인 여성
- (12) 상기 사항들 외 시험책임자의 판단으로 본 인체적용시험의 여가 적합하지 않다고 판단되는 자

3) 목표한 대상자 수 및 산출 근거

- 본 인체적용시험의 목적은 시험식품(두릅 추출물)의 시험군내에서 섭취 전(前) 대비 12주 섭취 후(後)의 안구건조증상 개선이 대조군(Placebo)의 그것보다 통계적으로 유의한 차이가 있는지를 평가하는 것이다. 따라서 본 인체적용시험은 시험군(두릅 추출물)의 섭취 전(前) 대비 12주 섭취 후(後)의 안구건조증상 개선평균 변화량이 대조군(Placebo 식품)의 평균 변

화량과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이도록 검정한다.

- V2의 섭취 前(Baseline)을 기준으로 V4의 12주 섭취 後 변수값 평균의 측정 및 산출과 검정방법은 다음과 같다.
- 평가변수 측정 및 산출
 - 1) 평가변수: 눈물막 파열시간(TBUT)
 - 2) V2의 섭취 前(Baseline)과 V4의 12주 섭취 後 시험군(시험식품: 두릅 추출물)/대조군(Placebo 식품) 각각에 대한 평가변수 값을 측정한다.
 - 3) V2의 섭취 前과 12주 섭취 後의 시험군/대조군 평가변수 평균 변화량을 구하여 μ_a , μ_o 라 한다.
- 통계적 검정 방법론에서 일반적으로 대조군이 위약(placebo), 무처치(no treatment) 또는 용량-반응(dose-response)군이 되는 임상연구 등의 검정방법은, 시험군은 이 3가지 대조군(placebo, no treatment or a lower dose of test drug)보다 우월함을 보여야 하는 우월성 설계를 한다. 따라서, Placebo 식품섭취군을 대조군으로 하는 본 인체적용시험의 통계적 검정은 시험군(두릅추출물 섭취군)이 대조군(Placebo 식품섭취군)보다 우월성을 입증해 보여야 한다.
- 유의수준 0.025(단측), Power=80%에서 95% 양측 신뢰구간의 하한이 우월성 마진(Superiority Margin)(=0)보다 큼을 보이면 이 우월성이 입증된 것으로 본다.

독립 2표본의 평행설계(평균비교) 우월성 검정

가설검정 - 귀무가설 $H_0 : d(\mu_a - \mu_o) \leq 0$

대립가설 $H_A : d(\mu_a - \mu_o) > 0$

시험군/대조군에 대한 섭취前·後의 평가변수 평균 변화량(μ_a / μ_o)의 차($\mu_a - \mu_o$) = d , α (유의수준): 0.025(단측), β (제2종오류): 0.2로 하여 검정력:(1- β)100%=80%로 검정

시험군/대조군에 대한 섭취 前·後의 평가변수 평균변화량의 차($\mu_a - \mu_o$) = d , α (유의수준): 0.025(단측), β (제2종오류): 0.2로 하여 검정력:(1- β)100%=80%로 시험대상자 수를 산출하면 다음과 같다.

유사 안구건조증 선행연구 자료 : "Effect of Oral Re-esterified Omega-3 Nutritional Supplementation on Dry Eyes" 검토를 통해 다음과 같이 시험대상자 수가 계산될 수 있다.

Ref1. Effect of Oral Re-esterified Omega-3 Nutritional Supplementation on Dry Eyes

Mean Diff ¹ betw. Treatment vs. Const. of '12Wk Change from Baseline'	Treatment			Contrast		
	n	mean	sd	n	mean	sd
	54	3.5	0.5	51	1.2	0.5

모분산 같지 않을 경우 (가정)

결합표준편차	0.5
z_alpha=z_0.025	1.96
z_beta=z_0.2	0.842
n1=n2	

=>우월성임상시험이므로

n2(분자)=	3.925602
n2(분모)=	5.29

n2=n2(분자)/n2(분모)	0.74208
------------------	---------

$$\text{결합표준편차} = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$n = \frac{(z_\alpha + z_\beta)^2 \sigma^2 (1+1/k)}{d^2} = 0.74208 \approx 1 \text{명}$$

Ref 2. A randomized controlled trial of omega-3 fatty acids in dry eye syndrome

Mean Diff ¹ betw. Treatment vs. Const. of '12Wk Change from Baseline'	Treatment			Contrast		
	n	mean	sd	n	mean	sd
	132	2.54	2.34	127	0.13	0.16

모분산 같지 않을 경우 (가정)

결합표준편차	1.6744
z_alpha=z_0.025	1.96
z_beta=z_0.2	0.842
n1=n2	

=>우월성임상시험이므로

n2(분자)	44.02352
n2(분모)	5.8081

n2=n2(분자)/n2(분모)	7.5791
------------------	--------

$$n = \frac{(z_\alpha + z_\beta)^2 \sigma^2 (1+1/k)}{d^2} = 7.5791 \approx 8 \text{명}$$

여기서 중도탈락율(θ:0.2)을 고려하면 시험대상자 수는 다음과 같다.

유사 안구건조증 선행연구 자료 1(Ref1) 인용

$$N = \frac{n}{(1-\theta)} = \frac{1}{(1-0.2)} = 1.25 \approx 2 \text{명으로 통계적 산출되고}$$

유사 안구건조증 선행연구 자료 2(Ref2) 인용

$$N = \frac{n}{(1-\theta)} = \frac{8}{(1-0.2)} = 10 \text{명으로 통계적 산출되나,}$$

본 인체적용시험에서는 시험군 : 20명, 대조군 : 20명 합계 40명을 모집하여 두 집단의 특정분산(정규분포), 정규성 등을 충족할 최소한의 표본수를 확보하여 보수적으로 시험하도록 한다.

5. 연구대상자 모집계획

연구대상자 모집은 임상시험 관련 규정에 따라 제작된 대상자 모집 광고문을 IRB 최종 승인을 받아 원내 게시판과 홈페이지 등에 게시하고, 원내 모집 광고 후에도 대상자 등록율이 저조하다면, 원외 건강한 연구대상자 모집을 위한 사이트(메디 25: www.medi25.com) 내 추가 게재하여 연구대상자를 모집하도록 한다.

본 연구는 안구건조증상(건성안)으로 불편함을 느끼는 건강한 사람을 대상으로 하는 건강기능식품의 인체적용시험이므로, 선정/제외기준에 따라 중앙대학교병원을 방문하는 환자를 시험대상자로 등록하기에는 어려움이 많기 때문에 목표 대상자 수 중 약 30%는 취약한 환경에 있는 대상자를 등록할 수 있다.

<인체적용시험 대상자 모집 공고문>

Version 1.1

인체적용시험 대상자 모집 공고문

두릅추출물 섭취를 통한 안구건조증상(건성안) 개선에 대한 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 2중눈가림, 평행설계 인체적용시험

인체적용시험의 목적

본 연구는 두릅 추출물 섭취를 통한 안구건조증상(건성안) 개선에 대한 기능성 및 안전성을 평가하기 위해 실시합니다.

인체적용시험방법

- 시험군(두릅 추출물)과 대조군(Placebo 식품)에 1:1로 무작위 배정됩니다.
- 대상자로 최종 등록된 이후 약 3개월(최대 4개월) 동안 총 4회 방문하게 됩니다.
- 방문 시 활력징후, 신체검사, 심전도 검사, 임상실험실적 검사(혈액, 소변 등)와 안구건조증상(건성안) 관련 안과 검사와 설문조사를 수행하게 됩니다.

대상자 선정/제외기준

- 만 19세 이상 65세 미만의 눈이 건조하고 침침하여 불편한 남녀
- 최근 3개월 이내 안과 관련 수술을 받지 않은 자
- 최근(Screening) 3주 이내 두릅 추출물을 섭취하지 않은 자
- 연구 참여 기간 중 콘택트렌즈 착용을 하지 않을 자

예측가능한 부작용

인체적용시험용 건강기능식품의 과량 섭취 시 복부팽만, 경미한 소화불량, 메스꺼움 등이 발생할 수 있고, 이 중 일부를 경험할 수도 있으며, 전혀 경험하지 않을 수도 있습니다. 또한, 본 건강기능식품은 아직 연구 단계이므로 예측하지 못한 부작용도 새롭게 발생할 수 있습니다.

참여문의

본 연구에 대한 자세한 내용을 알고 싶거나, 참여를 희망하는 경우에는 중앙대학교병원 안과 이정규 교수님(02-6299-1666) 혹은 담당 연구원(02-6299-1665)에게 문의 바랍니다.

중앙대학교병원 안과 서울특별시 동작구 흑석로 102
의뢰처: ㈜메드빌(서울특별시 금천구 디지털로9길 68, 대풍포스트 5차 1606호, ☎070-4006-1800)

6. 연구방법

1) 구체적인 연구방법

- ① **평행설계** : 인체적용시험 참여를 동의한 시험대상자는 동의서 취득순서에 따라 SN-001부터 차례대로 시험대상자식별번호를 부여받는다. 스크리닝을 통과하여 적합판정을 받은 시험대상자는 RN-01부터 차례대로 시험대상자등록번호를 부여받게 되는데 이때 무작위배정을 통해 시험군과 대조군에 배정된다. 인체적용시험에 참여하는 시험대상자는 인체적용시험 종료까지 처음 배정된 군으로 시험군과 대조군이 평행설계로 유지된다.
- ② **2중눈가림** : 본 인체적용시험은 시험대상자와 시험자가 시험군과 대조군을 인지할 수 없도록 눈가림 방법(암맹, Blinding)을 적용하여 실시한다. 각 군별로 고유코드의 할당 내역은 시험자가 봉인상태로 관리하고 중대한 이상사례 발생 등의 부득이한 해당 코드 열람이 필요한 경우를 제외하고는 시험 종료시까지 암맹해제를 하지 않는다.
- ③ **임상실험실적 검사**를 실시하여 시험대상자의 전신적인 건강상태를 평가한다.

④ 방문별 시험방법

임상수행항목	Screening		Intake(Treatments) & Measurements	
Visit	Visit 1	V 2	V 3	V 4
Day/Week/Month	-14~0 (Days)	0 (Day)	6Weeks±7Days	12Weeks±7Days

- **Visit 1 (Screening 방문)** : 인체적용시험에 대해 설명한 후 시험대상자에게 인체적용시험 참여에 대한 서면동의를 받는다. 시험대상자의 Demographics(인구학적 정보), 문진(問診) 통한 기왕력(Medication history, Medical history 등), 활력 징후(Vital sign), 신체검사, 임상실험실적 검사, 세극등검사, 눈물막파열시간(TBUT) 측정, 선정/제외기준을 확인한다.
- **임상실험실적 검사**는 혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 혈액응고검사, 소변검사, 임신반응 검사, 심전도검사를 말하며, Visit 1 방문 당시 검사 결과를 확인할 수 없는 경우에는 Visit 2 방문 전 검사 결과를 확인하고, 선정/제외기준에 따른 대상자 적합판정을 한다.
- **Visit 2 (Enrollment 방문)** : Screening(시험대상자 선별검사) 당시 선정/제외기준에 따라 적합판정을 받은 자만 시험기관을 방문하여 시험대상자로 등록하고, 등록번호(RN-00X)를 부여한다. 등록된 시험대상자는 무작위배정을 통해 시험군(두릅 추출물섭취군) 혹은 대조군(Placebo 식품섭취군)으로 배정되며, 이에 따라 시험/대조식품을 제공한다. 세극등검사, 섭취 전(Baseline) 기능성 평가변수(눈물막파열시간(TBUT), Schirmer test, OSDI 설문조사, 각막염색검사점수)를 측정한 후 식사/영양 및 생활 조사, 식사/영양 및 생활 지침 교육을 한 뒤, Visit 2 방문 이후부터 안내에 따라 시험/대조식품을 복용한다.

- 시험/대조식품 섭취량, 섭취방법은 1정(400mg)/1회, 2회(2정)/1일/성인(60kg)를 아침, 저녁에 충분한 물과 함께 섭취한다.
- Visit 3 (중간 방문) : 시험군은 두릅 추출물, 대조군은 Placebo 식품을 6주 동안 섭취한 후 중간방문하여세극등검사, 기능성 평가변수의 개선 추이를 보기 위해 눈물막과열시간(TBUT), Schirmer test, OSDI 설문조사, 각막염색검사점수를 측정한다. 식사/영양 및 생활조사, 식사/영양 및 생활 지침 교육을 하고 시험/대조식품 섭취를 계속한다. 그리고 이상사례 조사를 한다.
- Visit 4 (종료 방문) : 시험식품, 대조식품을 각각 12주 동안 섭취한 후 시험기관 종료 방문하여 세극등검사, 기능성 평가변수(눈물막과열시간(TBUT), Schirmer test, OSDI 설문조사, 각막염색검사점수)에 대한 12주 후 검사를 하고 또한, 안전성 관련 항목(실험실적 검사항목, 활력징후, 신체검사, 식사/영양 및 생활 조사, 이상사례 조사 등)에 대한 12주 후 검사도 한다.

2) 비교군 설정 및 무작위 배정 방법

- 시험군(두릅추출물 섭취군)에 대한 대조군으로 Placebo 식품군을 설정
- 무작위배정 : 인체적용시험에 자발적으로 참여할 것을 동의하고, 동의서에 서명한 시험대상자 중 선정 및 제외기준에 적합한 자 등 시험대상자 선별검사(Screening)에 적합판정을 받은 자를 대상으로 무작위 배정한다. 인체적용시험을 진행하는 연구자의 임의 판단으로 생기는 Bias를 최소화하기 위하여 시험군과 대조군으로 나누어 1:1로 무작위 배정한다. 무작위배정방법은 블록 무작위 배정방법(Block Randomization method)을 이용하며, SAS의 Proc Plan Procedure를 이용하여 무작위배정표를 생성한 후, EDC의 IWRS System을 통해 무작위배정 될 수 있도록 한다. 무작위배정시험식품 포장 시 무작위배정표와 그에 따른 IP No.에 따라 시험식품에 라벨을 붙인다.
- 블록 무작위 배정방법(Block Randomization method)은 단순 무작위배정 시 발생할 수 있는 군간 시험대상자수의 불균형을 막기 위해 사용되고 하나의 블록이 끝날 때마다 정확히 균형이 맞추어지고 1:1로 무작위 배정된다.

3) 인체적용시험용 식품 복용 방법, 대조식품 사용 시 그 선택 사유

- 시험/대조식품 섭취량, 섭취방법은 1포(400mg)/1회, 2회(2포)/1일/성인(60kg)를 아침, 저녁에 충분한 물과 함께 섭취한다. 이 섭취량은 13.3mg/kg/day으로서 NOAEL값(무독성한계량: 2,000mg이상)보다 매우 작아서 고용량 섭취로 인한 독성, 부작용 발생 등이 적은 식품이라 할 수 있다.

4) 관찰항 목, 임상검사항목 및 관찰검사방법

(1) 관찰항목

눈물막파열시간(TBUT)	V1-Screening, V2-시험식품 섭취 전, V3-섭취 6주 후, V4-섭취 12주 후
Schirmer test	V2-시험식품 섭취 전, V3-섭취 6주 후, V4-섭취 12주 후
OSDI 설문조사	V2-시험식품 섭취 전, V3-섭취 6주 후, V4-섭취 12주 후
각막염색검사점수	V2-시험식품 섭취 전, V3-섭취 6주 후, V4-섭취 12주 후

임상실험실적 검사(Lab tests)

- 혈액학적 검사 : RBC, WBC, Hb, Hct, RDW
- 혈액화학적 검사 :
 - 1) 신장기능 및 전해질검사 : Creatinine, Na, K, Cl, Ca
 - 2) 혈중지질 검사 : Total Cholesterol, HDL/LDL-cholesterol, TG(Triglyceride)
 - 3) 간 기능 검사 : ALP, AST(GOT), ALT(GPT), γ -GTP, Total protein, Albumin, Total bilirubin
 - 4) 당뇨 검사 : Glucose
 - 5) 신장 기능 검사 : BUN, Uric acid
 - 6) 심장 기능 검사 : CK, LDH
 - 7) 갑상선자극호르몬(TSH) 검사 : 갑상선 자극 호르몬은 뇌하수체에서 분비되며 갑상선을 자극하여 갑상선호르몬을 생성하고 방출하게 하는 역할을 하고 정상 참고치는 0.4~4.0uU/mL이다.
 - 8) 종양표지자(AFP) 검사 : AFP(α -fetoprotein)는 태아간(胎兒肝)과 종양과의 공통 단백질로서 원발성간암(原發性肝癌) 환자 90%에서 혈중에서 검출되고 위암의 일부에서도 만들어지며, 간염, 간경변환자에서도 혈중에서 높은 수치를 나타낸다.
 - 9) 간염바이러스(HBs-Ag, Ab / anti-HCV) 검사 : B형 간염바이러스(Hepatitis B Virus; HBV)와 C형 간염바이러스(Hepatitis C Virus; HCV)에 대한 항체 검사
- 혈액응고검사 : PT, aPTT
- 소변검사 : 요당(Glucose), 요단백(Protein), 요잠혈(RBC), 요산도(pH)
- 임신반응 검사(HCG; human chorionic gonadotropin) : 융모성(絨毛性), 태반성(胎盤性) 호르몬으로 태반의 Syncytium 세포에서 생산되어 모체 측에 분비되는 당단백(糖蛋白) 호르몬이다. 본 검사는 가임기 여성에게만 시행한다.
- 심전도(心電圖, ECG; Electrocardiogram) : 심전도검사는 3개월 이내 자료 있을 시 대체할 수 있다.
- 임상실험실적 검사방법은 시험기관의 담당 부서(예, 진단실 혹은 채혈실 등) 내규에 따라 진행하며, 증례기록서 내 임상적 유의성 평가는 임상실험실적 검사 결과가 '비정상'일 경우, '임상적으로 의미 있는 비정상'인 경우에만 '예'로 기록한다.

(2) 관찰검사방법

가) Visit 1 (Screening 방문) : 서면동의, Demographics(인구학적 정보), 문진(問診) 통한 기왕력(Medication history, Medical history 등), 활력 징후(Vital sign), 신체검사, 임상실험실적 검사{Lab tests: 혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 혈액응고검사, 소변검사, 임신반응 검사(HCG; human chorionic gonadotropin), 심전도(心電圖, ECG; Electrocardiogram)}, 세극등검사, 눈물막파열시간(TBUT) 측정, 선정/제외기준을 확인한다.

○ 세극등검사는 세극등현미경(Slit Lamp Microscopy)을 통해 대상자의 안구건조증 외 안과적 질환의 존재여부, 안의 상태(condition)에 대해서 조사한다.

○ 눈물막 파열시간의 측정은 안구 결막 안쪽에 2% Fluorescein 용액을 점안한 후 효과적으로 각막에 퍼지게 하려면 눈을 깜박이도록 한다. 그리고 Slit Lamp 앞자리에 앉아 앞을 바라보도록 한다. 그다음에 Cobalt blue light로 tear film을 스캔한다. 마지막 깜박임으로부터 처음으로 Dry spot이 나오는 때까지의 시간을 Stop watch로 Visit 당 3회 연속 측정하여 그 평균값으로 한다. 여기서 측정자는 한 시험대상자의 스크리닝 시 측정자가 모든 Visit에서도 측정하도록 한다. Screening에서 적합 판정받은 사람을 시험대상자로 선정하며 양안 중, 1안을 선택하여 시험을 시행한다. 1안 선택 방법은, 각 양안에 대한 눈물막 파열시간(TBUT)을 각각 3회 측정하여 평균값(소수점 셋째 자리에서 반올림)을 계산하고 3회 측정 평균값이 낮은안을 선택한다. 다만, 3회 평균값이 동일한 경우 연구자에 의해서 좌/우안 중 1안을 선택하여 시험을 시행한다.

나) Visit 2 (Enrollment 방문) : 선정/제외기준에 따라 적합판정을 받은 자만 시험기관을 방문하여 시험대상자로 등록하고, 등록번호(RN-00X)를 부여한다. 등록된 시험대상자는 무작위 배정, 세극등검사, 시험/대조식품섭취 전(Baseline) 기능성 평가변수(눈물막파열시간(TBUT), Schirmer test, OSDI 설문조사, 각막염색검사점수)를 측정하고, 식사/영양 및 생활 조사, 식사/영양 및 생활 지침 교육을 한 뒤, Visit 2 방문 이후부터안내에 따라 시험/대조식품을 복용한다.

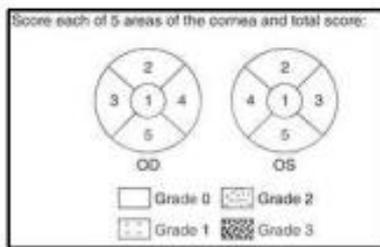
○ 세극등검사와 눈물막파열시간은 Visit 1과 동일한 방법으로 수행한다.

○ Schirmer test는 눈물 생성시험으로 여과지를 아래 눈꺼풀의 결막낭 위에 삽입하고 여과지의 끝을 바깥쪽 아래로 드리운다. 5분간 접촉한 다음 정상 습윤의 정도는 아래로 매달려 있는 종잇조각의 습윤영역으로부터 밀리미터 단위로 1회 측정하여 기록한다.

○ OSDI (Ocular Surface Disease Index) 설문조사는 안구건조증 주관적 증상을 경도(13~22), 중등도(23~32), 중증(33 이상)으로 지난 1주일 사이에 12가지 평가항목을 조사하는 방법이다. 12가지 항목은 다음과 같다.

◆ 지난 1주 사이에 느낀 증상					
1) Eyes that are sensitive to light (불빛에 민감한지?)	0	1	2	3	4
2) Eyes that feel gritty (모래 들어간 느낌이 있는지)	0	1	2	3	4
3) Painful or sore eyes(통증이 있는지)	0	1	2	3	4
4) Blurred vision(희미하게 보이는지)	0	1	2	3	4
5) Poor vision(시력이 감소했는지)	0	1	2	3	4
◆ 지난 1주 사이에 증상이 언제 발생하였는지					
6) Reading(독서할 때)	0	1	2	3	4
7) Driving at night(야간 운전할 때)	0	1	2	3	4
8) Working with a computer (컴퓨터 할 때)	0	1	2	3	4
9) Watching TV(TV시청할 때)	0	1	2	3	4
◆ 지난 1주 사이에 언제 불편하였는지					
10) Windy conditions(바람불 때)	0	1	2	3	4
11) Places or areas with low humidity (습도가 낮을 때)	0	1	2	3	4
12) Areas that are air conditioned (에어컨이 있을 때)	0	1	2	3	4

○ 상기 12개 각 항목의 점수를 0~4점까지 부여한 후 합산하여 매긴다. 각막염색검사점수는 각막을 5등분하여 염색이 되지 않는 0점부터 표면결손이 심하여 염색구역이 치밀할수록 3점으로 점수를 부여하여 총 15점으로 표면결손의 중증도를 평가한다.



○ 인체적용시험용 시험/대조식품은 Visit 2 당시 대상자로 최종 등록된 대상자에게 1명 당 6주분(90정)씩, 총2명[(1), (2)]이 제공된다. 섭취방법은 IP No.(1), (2) 순서대로 개봉하여 1정(400mg)/1회, 2회(2정)/1일/성인(60kg)을 12주간 섭취한다.

○ 시험기관의 IP 관리자는 Visit 3과 Visit 4 당시 대상자의 인체적용시험용 시험/대조식품

의 실제 복용 여부 확인을 위해 제공된 2병을 동시에 개봉하여 복용하지 않도록 당부해야 한다.

○ 식사/영양 및 생활 조사는 아래 교육 항목에 대해서 대상자 임상시험 참여 전 패턴에 대해서 조사하며, 아래 교육 내용에 따라서 식사/영양 및 생활 지침 교육을 한다.

<식사/영양 및 생활 지침 내용>

1) 인공누액 사용

- 본 인체적용시험에서는 인공누액 사용을 수용한다. 단, 인체적용시험 참여 전 사용해 왔던 대상자는 필요 시 연구 참여 전과 동일한 제품을, 동일한 습관과 패턴, 사용량을 따라 사용되어야 하며, 사용 가능한 인공누액은 안구표면 유행제로써 히알루론산나트륨 제제, 카복시메틸셀룰로스 나트륨 제제 등으로제한한다. 인체적용시험 참여 전 사용하지 않았던 대상자는 필요 시 시험책임자의 확인 후 지시에 따라 진행한다. 각 Visit 별 검사를 위한 방문 전에는 검사하기 4시간 전에 인공누액 사용이 제한되어야 한다.

2) 콘택트렌즈 사용

- 인체적용시험 참여 후 콘택트렌즈 사용은 하지 않는다. 콘택트렌즈를 착용하였을 시 중도탈락 처리되도록 한다.

3) 컴퓨터 및 스마트 폰 사용

- 컴퓨터 및 스마트 폰 사용에 대한 제제는 없다. 다만, 인체적용시험 참여 전 사용 패턴에서 벗어난 과한 사용은 자제한다.

4) CGA가 많이 함유된 음식 섭취

- Chlorogenic acid(CGА)이 많이 함유된 음식 섭취를 자제한다. 이를 위해 두릅은 물론 구아바, 근대, 계피, 푸룬(말린 서양 자두) 등의 섭취를 자제한다.

5) 병용금지약물

- 아래 병용 금지약물 리스트 내 포함된 약물 복용 시, 중도탈락 처리되도록 한다. - 건성안 치료제 : 눈물 촉진제(3% 디쿠아포솔나트륨 등), 스테로이드제(사이클로스포린(ciclosporin), 프레드니솔론(prednisolon), 플루오로메톨론(fluorometholone), 로테프레드놀에타보네이트(loteprednol etabonate) 등)
- 건성안 보조 치료제 : 오메가3 30일 기간 장기복용
- 베타차단제
- 삼환계항우울제
- 경구호르몬제제(에스트로젠 요법 등)
- 이 외 기능성 및 안전성에 영향을 미칠 것이라고 예상되는 약물

다) Visit 3 (중간 방문) : 세극등검사, 기능성 평가변수의 개선 추이를 보기 위해 눈물막파열 시간(TBUT), Schirmer test, OSDI 설문조사, 각막염색검사점수를 측정하고, 식사/영양 및 생활 조사, 식사/영양 및 생활 지침 교육, 시험/대조식품 투여, 이상사례 조사를 한다. 세극등검사와 눈물막파열시간은 Visit 1과 동일한 방법으로 수행한다. Schirmer test, OSDI 설문조사, 각막염색검사점수는 Visit 2와 동일한 방법으로 수행한다.

○ 시험자는 대상자 질문을 통해 대상자의 식사/영양 및 생활 조사를 한다. 그리고 시험자는 조사한 내용을 바탕으로 Visit 2 <식사/영양 및 생활 지침 내용>에 대해서 재교육한다. 순응도 평가를 위한 실제 복용량 조사를 위해 대상자는 Visit 2 당시 제공된 인체적용시험용 식품(총 2병[(1),(2)])을 가지고 시험기관을 방문한다.

○ 시험기관의 담당자는 대상자와 함께 IP No.(1)[Visit 2 다음 날부터 개봉하여 복용 중인 IP]의 남은 수량, 분실 및 파손 수량 등을 직접 확인하여 기록 후 회수하고, IP No.(2)[Visit 2 이후 보관 중인 IP]은 아직 개봉되지 않았음을 확인하고, Visit 3 이후 개봉하여 복용할 수 있도록 안내한다.

라) Visit 4 (종료 방문) : 시험식품 12주 섭취 후 활력징후(Vital sign), 신체검사, 세극등검사, 눈물막파열시간(TBUT), 임상실험실적 검사(혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 혈액응고검사, 소변검사, 심전도), Schirmer test, OSDI 설문조사, 각막염색검사점수를 조사하고 식사/영양 및 생활 조사, 이상사례조사를 한다. 임상실험실적 검사와 세극등검사, 눈물막파열시간은 Visit 1과 동일한 방법으로 수행한다. Schirmer test, OSDI 설문조사, 각막염색검사점수는 Visit 2와 동일한 방법으로 수행한다.

○ 시험자는 대상자 질문을 통해 대상자의 식사/영양 및 생활 조사를 한다. 순응도 평가를 위한 실제 복용량 조사는 Visit 3와 동일한 방법으로 수행한다.

5) 효과 평가 기준, 평가 방법

1차 기능성 평가변수

눈물막 파열시간(TBUT : Tear Break Up Time)

○ 1차 기능성 평가변수 측정방법

눈물막파열시간(TBUT)은 안구 결막 안쪽에 2% Fluorescein 용액을 점안한 후 효과적으로 각막에 퍼지게 하려면 눈을 깜박이도록 한다. 그리고 Slit Lamp 앞자리에 앉아 앞을 바라보도록 한다. 그다음에 Cobalt blue light로 tear film을 스캔한다. 마지막 깜박임으로부터 처음으로 Dry spot이 나오는 때까지의 시간을 Stop watch로 Visit 당 3회 연속 측정하여 그 평균값으로 한다.

여기서 측정자는 한 시험대상자의 스크리닝 시 측정자가 모든 Visit에서도 측정하도록 한

다.

○ 1차 기능성 평가변수 평가 방법

인구통계학적 기저상태 측정, 병용 시술에 대한 처리, 하위집단에 대한 분석 등은 빈도, % 등(범주형 자료), 평균, 표준편차 등(연속형 자료)의 기술 통계량 값을 기능성, 안전성 분석 전에 분석한다. 시험군(두릅 추출물섭취군)/대조군(Placebo 식품섭취군)에 대한 섭취 前 (Baseline, V2)과 12주 섭취 後(V4)의 기능성 평가변수(눈물막과열시간:TBUT)를 각각 측정하여 섭취 前•後 간의 군간 평균 변화량의 차이를 아래와 같이 통계분석 한다.

○ 통계적 검정 방법론에서 일반적으로 대조군이 위약(placebo), 무처리(no treatment) 또는 용량-반응 (dose-response) 군이 되는 임상연구 등의 검정방법은, 시험군은 이 3가지 대조군(placebo, no treatment or a lower dose of test drug)보다 우월함을 보여야 하는 우월성 설계를 한다. 따라서, Placebo 식품섭취군을 대조군으로 하는 본 인체적용시험의 통계적 검정은 시험군(두릅 추출물섭취군)이 대조군(Placebo 식품섭취군)보다 우월성을 입증해 보여야 한다.

○ 유의수준 0.025(단측), Power=80%에서 95% 양측 신뢰구간의 하한이 우월성 마진 (Superiority Margin)(=0)보다 큼을 보이면 이 우월성이 입증된 것으로 평가한다.

○ 독립 2표본의 평행설계(평균비교) 우월성검정

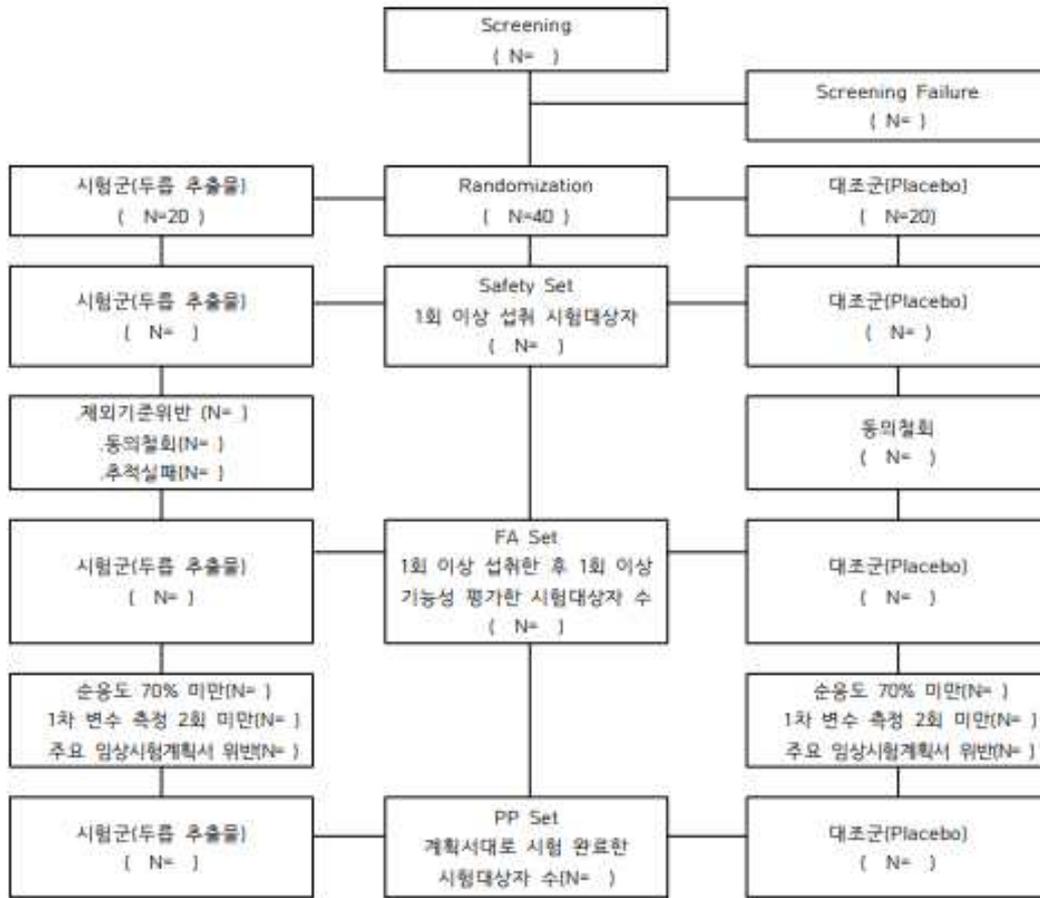
가설검정 - 귀무가설 $H_0 : d (\mu_a - \mu_o) \leq 0$

대립가설 $H_A : d (\mu_a - \mu_o) > 0$

○ 시험군/대조군에 대한 섭취 前•後의 평가변수 평균 변화량(μ_a / μ_o) 의 차($\mu_a - \mu_o$) = d, α (유의수준): 0.025(단측), β (제2종오류): 0.2로 하여 검정력:(1- β)100%=80%로 검정

분석대상군

분석대상군 개요



Full Analysis Set

○ 인체시험용 건강기능식품을 단 한 번이라도 투여/적용받았고 baseline 이후 한 번이라도 평가가 이루어진 대상자로 하고, 아래의 기준에 해당하는 경우에는 Bias를 발생시키지 않고 FAS 분석군에서 제외할 수 있다.

- ① 선정/제외기준 위반인 경우
- ② 무작위배정 이후 자료가 전무한 경우
- ③ 한 번도 건강기능식품을 복용하지 않은 경우

○ FAS 분석군을 주분석 대상자로 한다. FAS 분석군 내 대상자의 treatment arm(치료군/대조군)을 결정 시 'Intention to Treat' 기준을 적용한다. 이는 배정 군과 실제 적용 군이 상이하더라도 배정 군에 따라 분석을 실시한다.

그리고 아래의 조건에 해당하는 대상자를 포함하는 분석군을 PP 분석군으로 정의하며, 부분분석군 대상자로 한다. PP분석군 분석시에는 배정 군과 실제 적용 군이 상이할 경우 실제 적용 군에 따라 분석을 실시한다.

- ① 인체적용식품 복용에 대한 순응도가 70% 이상
(순응도 = ((최종 실제 복용량) / (84일(12Wks) X 2회)) * 100%)

- ② Baseline 이후 일차 변수 관련 검사 측정이 2회 이상
- ③ 아래 임상시험 계획서 내용을 위반하지 않는 경우
 - 선정/제외기준
 - 임상시험 실시 기간 중 콘택트렌즈를 사용한 경우
 - 임상시험 실시 기간 중 제외기준 내에 기재된 약물을 복용하였을 경우

결측치 처리기준

분석에서 제외할 수 있는 정당한 사유가 있을 때로 결측치 처리기준에 따라 처리한다. FAS 분석군에서 결측치 처리방법으로는 결측자료분석법 중 단일 대체법(Single Imputation) 중 하나인 마지막 관측값 선행대체 법(LOCFA:Last Observation Carried Forward Analysis)을 적용한다.

2차 기능성 평가변수

- 1) Schirmer test 값
- 2) OSDI(Ocular Surface Disease Index) 설문조사 점수
- 3) 각막염색검사 점수

2차 기능성 평가변수 측정방법

- 1) Schirmer test 값 - 눈물 생성시험으로 여과지를 아래 눈꺼풀의 결막낭(結膜囊) 위에 삽입하고 여과지의 끝을 바깥쪽 아래로 드리운다. 5분간 접촉한 다음 정상 습윤의 정도는 아래로 매달려 있는 종잇조각의 습윤영역으로부터 밀리미터 단위로 1회 측정하여 기록한다.
- 2) OSDI(Ocular Surface Disease Index) 설문조사 점수는 안구건조증 주관적 증상을 정도(13~22), 중등도(23~32), 중증(33 이상)으로 지난 1주일 사이에 12가지 평가항목을 조사하는 방법으로서 12가지 항목은 다음과 같다.

◆ 지난 1주 사이에 느낀 증상					
1) Eyes that are sensitive to light (불빛에 민감한지?)	0	1	2	3	4
2) Eyes that feel gritty (모래 들어간 느낌이 있는지)	0	1	2	3	4
3) Painful or sore eyes(통증이 있는지)	0	1	2	3	4
4) Blurred vision(희미하게 보이는지)	0	1	2	3	4
5) Poor vision(시력이 감소했는지)	0	1	2	3	4
◆ 지난 1주 사이에 증상이 언제 발생하였는지					
6) Reading(독서할 때)	0	1	2	3	4
7) Driving at night(야간 운전할 때)	0	1	2	3	4
8) Working with a computer (컴퓨터 할 때)	0	1	2	3	4

9) Watching TV(TV시청할 때)	0	1	2	3	4
◆ 지난 1주 사이에 언제 불편하였는지					
10) Windy conditions(바람불 때)	0	1	2	3	4
11) Places or areas with low humidity (습도가 낮을 때)	0	1	2	3	4
12) Areas that are air conditioned (에어컨이 있을 때)	0	1	2	3	4

상기 12개 각 항목의 점수를 0~4점까지 부여한 후 합산하여 증상점수를 산출한다.

3) 각막염색검사 점수- 각막을 5등분하여 염색이 되지 않는 0점부터 표면결손이 심하여 염색구역이 치밀할수록 3점으로 점수를 부여하여 총 15점으로 표면결손의 중증도를 평가한다.

2차 기능성 평가변수 평가 방법

1. Schirmer test 값

시험군/대조군 군간 섭취 前・後 간의 각각의 변수 평균 변화량의 차이를 Independent t - test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 분석한다. 통계검정의 유의수준은 $\alpha = 0.05$ (양측)로 한다. 이때, 평균 변화량의 정규성검정은 Shapiro-Wilk Normal Test를 실시하며, p값이 유의수준 0.05 이상일 경우 정규성을 따른다고 판단한다.

2. OSDI 설문조사 점수

시험군/대조군 군간 섭취 前・後 간의 각각의 변수 평균 변화량의 차이를 Independent t - test 또는 Wilcoxon signed rank test로 분석한다. 12개 각 항목의 점수를 0~4점까지 부여한 후 합산하여 증상점수를 산출한 후 평균 변화량을 산출한다. 통계검정의 유의수준은 $\alpha = 0.05$ (양측)로 한다. 이때, 평균 변화량의 정규성 검정은 Shapiro-Wilk Normal Test를 실시하며, p값이 유의수준 0.05 이상일 경우 정규성을 따른다고 판단한다.

3. 각막염색검사점수

시험군/대조군 군간 섭취 前・後 간의 각각의 변수 평균 변화량의 차이를 Independent t - test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 분석한다. 통계검정의 유의수준은 $\alpha = 0.05$ (양측)로 한다. 이때, 평균 변화량의 정규성 검정은 Shapiro-Wilk Normal Test를 실시하며, p값이 유의수준 0.05 이상일 경우 정규성을 따른다고 판단한다.

6) 기존 치료 및 연구와의 차별점

○ 국내 안구건조증 치료방법으로는 90%가 "인공눈물"을 투여하는 방법이고 나머지는 누점 폐쇄술이나 기타 방법들이 있는데 환자들의 치료 효과의 만족도가 낮고 대부분 환자에서

재발하고 있다. 안구건조증의 효과적인 치료는 염증 치료와 눈물증발을 막아주고 눈물생성을 도와주는 안구표면환경을 개선해야 한다.

- 이처럼 안구건조증의 치료로서 인공눈물, 스테로이드제, 수술 등을 적용하고 있으나 방부제의 부작용, 낮은 효능, 높은 재발을 등의 기존 치료법의 문제점이 대두되고 있다.
- 안구건조증의 효과적인 치료는 염증 치료와 눈물증발을 막아주고 눈물생성을 도와주는 안구표면환경을 개선해야 하는데 이의 대안으로 두릅 추출물을 안구건조증 개선의 새로운 1가지 방법으로 제시하고자 한다.
- (주)메드빌에서 개발한 두릅 추출물의 안구건조증 개선에 대한 안전성, 유효성을 눈물막 파열시간(TBUT:Tear Break-Up Time)과 Schirmer test, 안구건조증 OSDI(Ocular surface disease index)조사, 각막염색검사점수 측정을 통해 검증하여 기존 치료와 차별화하여 염증 치료와 눈물증발을 막아주고 눈물생성을 도와주는 안구표면환경을 개선하는 치료방법으로 개발하고자 한다.

7) 자료분석 및 통계분석방법

1차 기능성 평가변수 분석

- 인구통계학적, 기저상태에 대한 분석 등은 빈도, % 등(범주형 자료), 평균, 표준편차 등(연속형 자료)의 기술 통계량 값을 기능성, 안전성 분석 전에 분석한다. 시험군(두릅 추출물 섭취군)/대조군(Placebo 식품섭취군)에 대한 섭취 前(Baseline, V2)과 12주 섭취 後(V4)의 기능성 평가변수(눈물막파열시간:TBUT)를 각각 측정하여 섭취 前・後 간의 군간 평균 변화량의 차이를 아래와 같이 통계분석 한다.
- 통계적 검정 방법론에서 일반적으로 대조군이 위약(placebo), 무처치(no treatment) 또는 용량-반응(dose-response)군이 되는 임상연구 등의 검정방법은 시험군은 이 3가지 대조군(placebo, no treatment or a lower dose of test drug)보다 우월함을 보여야 하는 우월성 설계를 한다. 따라서, Placebo 식품섭취군을 대조군으로 하는 본 인체적용시험의 통계적 검정은 시험군(두릅 추출물섭취군)이 대조군(Placebo 식품섭취군)보다 우월성을 입증해 보여야 한다.
- 유의수준 0.025(단측), Power=80%에서 95% 양측 신뢰구간의 하한이 우월성 마진(Superiority Margin)(=0)보다 크을 보이면 이 우월성이 입증된 것으로 평가한다.

독립 2표본의 평행설계(평균비교) 우월성검정

가설검정 - 귀무가설 $H_0 : d (\mu_a - \mu_o) \leq 0$

대립가설 $H_A : d (\mu_a - \mu_o) > 0$

시험군/대조군에 대한 섭취前・後의 평가변수 평균 변화량(μ_a / μ_o)의 차($\mu_a - \mu_o$) = d,
 α (유의수준): 0.025(단측), β (제2종오류): 0.2로 하여 검정력:(1- β)100%=80%로 검정

2차 기능성 평가변수 분석

1. Schirmer test 값

- 시험군/대조군 군간 섭취 前・後 간의 각각의 변수 평균 변화량의 차이를 Independent t - test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 분석한다.
- 통계검정의 유의수준은 $\alpha=0.05$ (양측)로 한다. 이때, 평균 변화량의 정규성 검정은 Shapiro-Wilk Normal Test를 실시하며, p값이 유의수준 0.05 이상일 경우 정규성을 따른다고 판단한다.

2. OSDI 설문조사 점수

- 시험군/대조군 군간 섭취 前・後 간의 각각의 변수 평균 변화량의 차이를 Independent t - test 또는 Wilcoxon's signed rank test로 분석한다.
- 12개 각 항목의 점수를 0~4점까지 부여한 후 합산하여 증상점수를 산출한 후 평균 변화량을 산출한다. 통계검정의 유의수준은 $\alpha=0.05$ (양측)로 한다. 이때, 평균 변화량의 정규성 검정은 Shapiro-Wilk Normal Test를 실시하며, p값이 유의수준 0.05 이상일 경우 정규성을 따른다고 판단한다.

3. 각막염색검사 점수

- 시험군/대조군 군간 섭취 前・後 간의 각각의 변수 평균 변화량의 차이를 Independent t - test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 분석한다.
- 통계검정의 유의수준은 $\alpha=0.05$ (양측)로 한다. 이때, 평균 변화량의 정규성 검정은 Shapiro-Wilk Normal Test를 실시하며, p값이 유의수준 0.05 이상일 경우 정규성을 따른다고 판단한다.

8) 연구수행일정표

임상수행항목	Screening		Intake(Treatments) &Measurements	
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4
	Day/Week	-14~0 Days	0 Day	6 Weeks±7 Days
서면동의(식별번호(SN) 부여)	■			
인구학적 정보	■			
기왕력	■			
활력징후	■			■
신체검사	■			■
혈액학적 검사 (*1)	■			■
혈액화학적 검사 (*2)	■			■
혈액응고검사 (*3)	■			■
소변검사 (*4)	■			■
임신반응 검사(HCG) (*5)	■			
심전도 (*6)	■			■
눈물막파열시간(TBUT) 측정(*7)	■	■	■	■
세극등검사(*8)	■	■	■	■
선정/제외기준	■			
대상자등록(등록번호(RN) 부여)		■		
무작위배정		■		
시험/대조식품 제공		■		
Schirmer test		■	■	■
OSDI 설문조사		■	■	■
각막염색검사점수		■	■	■
식사/영양 및 생활 조사 (*9)		■	■	■
식사/영양 및 생활 지침 교육 (*9)		■	■	
시험/대조식품 투여 (*10)		■	■	■
순응도 조사			■	■
이상사례 조사			■	■
선행/병용약물	■	■	■	■
인체 적용시험 종료(Disposition)				■
시험책임자 최종 서명				■

(•1) 혈액학적 검사 : RBC, WBC, Hb, Hct, RDW

(•2) 혈액화학적 검사 :

(1) 신장기능 및 전해질검사 : Creatinine, Na, K, Cl, Ca

(1) 혈중지질 검사 : Total Cholesterol, HDL/LDL-cholesterol, TG(Triglyceride)

(2) 간 기능 검사 : ALP, AST(GOT), ALT(GPT), γ -GTP, Total protein, Albumin, Total bilirubin

(3) 당뇨 검사 : Glucose

(4) 신장 기능 검사 : BUN, Uric acid

(5) 심장 기능 검사 : CK, LDH

(6) 갑상선자극호르몬(TSH) 검사 : 갑상선 자극 호르몬은 뇌하수체에서 분비되며 갑상선을 자극하여 갑상선호르몬을 생성하고 방출하게 하는 역할을 하고 정상 참고치는 0.4-4.0uI/mL이다.

(7) 종양표지자(AFP) 검사 : AFP(α -fetoprotein)는 태아간(胎兒肝)과 종양과의 공통 단백질로서 원발성 간암(原發性肝癌) 환자 90%에서 혈중에서 검출되고 위암의 일부에서도 만들어지며, 간염, 간경변환자에서도 혈중에서 높은 수치를 나타낸다.

(8) 간염바이러스(HBs-Ag, Ab / anti-HCV) 검사 : B형 간염바이러스(Hepatitis B Virus: HBV)와 C형 간염바이러스(Hepatitis C Virus: HCV)에 대한 항체 검사

(•3) 혈액응고검사 : PT, aPTT

(•4) 소변검사 : 요당(Glucose), 요단백(Protein), 요칼혈(RBC), 요산도(pH)

(•5) 임신반응 검사(HCG: human chorionic gonadotropin) : 융모성(絨毛性), 태반성(胎盤性) 호르몬으로, 태반의 Syncytium 세포에서 생산되어 모체 속에 분비되는 당단백(糖蛋白) 호르몬이다. 본 검사는 가임기 여성에게만 시행한다.

(•6) 심전도(心電圖, ECG: Electrocardiogram) : 심전도검사는 3개월 이내 자료 있을 시 대체 할 수 있다.

(•7) 눈물막파열시간(TBUT) 관찰검사 : V1 - 시험/대조식품 섭취 前, V3 - 섭취 6주 후, V4 - 섭취 12주 후

(•8) 세극등검사 : 세극등현미경(Slit Lamp Microscopy)을 통해 대상자의 안구건조증 외 안과적 질환의 존재 여부, 안의 상태(condition)에 대해서 조사한다.

(•9) 식사/영양 및 생활 조사/지침 교육 :

(1) 인공누역 사용 - 본 인체적용시험에서는 인공누역 사용을 수용한다. 단, 인체적용시험 참여 전 사용해 왔던 대상자는 필요 시 연구 참여 전과 동일한 제품을, 동일한 습관과 패턴, 사용량을 따라 사용되어야 하며, 사용 가능한 인공누역은 안구표면 윤활제로써 히알루론산나트륨 제제, 카복시메틸셀룰로스 나트륨 제제 등으로 제한한다. 인체적용시험 참여 전 사용하지 않았던 대상자는 필요 시 시험책임자의 확인 후 지시에 따라 진행한다. 각 Visit 별 검사를 위한 방문 전에는 검사하기 4시간 전에 인공누역 사용이 제한되어야 한다.

(2) 콘택트렌즈 사용 - 인체적용시험 참여 후 콘택트렌즈 사용을 하지 않는다. 콘택트렌즈를 착용하였을 시 중도탈락 처리되도록 한다.

(3) 컴퓨터 및 스마트폰 사용 - 컴퓨터 및 스마트 폰 사용에 대한 제제는 없다. 다만, 인체적용시험 참여 전 사용 패턴에서 벗어난 과한 사용은 자제한다.

(4) CGA가 많이 함유된 음식 섭취 - Chlorogenic acid(CGA)이 많이 함유된 음식 섭취를 자제한다. 이를 위해 두릅은 물론 구아바, 근대, 계피, 푸룬(말린 시양 자두) 등의 섭취를 자제한다.

(5) 병용금지약물 - 아래 병용 금지약물 리스트 내 포함된 약물 복용 시, 중도탈락 처리되도록 한다.

- 건성안 치료제 : 눈물 촉진제(3% 디쿠아모솔나트륨 등), 스테로이드제(사이클로스포린(ciclosporin), 프레드니솔론(prednisolon), 플루오르메톨론(fluorometholone), 로테프레드놀에타보네이트(loteprednol etabonate) 등)

- 건성안 보조 치료제 : 오메가3 30일 기간 장기복용

- 베타차단제

- 삼환계항우울제

- 경구호르몬제제(에스트로겐 요법 등)

- 미 외 기능성 및 안전성에 영향을 미칠 것이라고 예상되는 약물

(•10) 시험/대조 식품투여 : V2(0 Day) - V4(24 Weeks) : 1정(400mg)/1회, 2회(2정)/1일, 12주간 섭취

7. 인체적용시험 결과

가. Primary Efficacy Analysis(FAS)

- 1차 기능성 평가변수는 눈물막 파열시간(TBUT; Tear Break Up Time)이다. 시험식품(두릅추출물)과 대조식품(Placebo) 간 섭취 전(Baseline, V2) • 후(V4) 간의 TBUT 평균 변화량의 차이를 통계 분석 실시하였다. 주 분석군은 FAS 분석군이다.
- FAS 분석군에서 Treatment 군의 TBUT 평균 변화량은 0.73, Placebo 군의 TBUT 평균 변화량은 0.75이었다. 그리고 그 차이에 대한 Independent (Pooled) t-test 결과 95% 신뢰구간의 하한은 -1.68, 신뢰구간 상한은 1.65이었다. 따라서 95% 신뢰구간의 하한이 우월성 마진 0보다 크지 않으므로 시험식품이 대조식품보다 TBUT 개선에 대한 효과가 있다고 판단할 수 없었다.

TBUT*	Treatment(N=20) mean (SD) med (min, max)	Placebo(N=20) mean (SD) med (min, max)	Total(N=40) mean (SD) med (min, max)	95% two-sided CI	
Baseline	6.45 (1.18) 6.00 (4.67, 9.33)	6.90 (1.70) 6.33 (4.33, 11.00)	6.67 (1.46) 6.00 (4.33, 11.00)		
Post-Treatment	7.18 (2.40) 6.67 (4.33, 12.33)	7.65 (2.31) 7.50 (4.00, 11.33)	7.42 (2.33) 7.00 (4.00, 12.33)		
Difference (Baseline - Post-Treatment)	0.73 (2.67) -0.17 (-3.00, 6.33)	0.75 (2.52) 0.50 (-5.00, 5.33)	0.74 (2.56) 0.00 (-5.00, 6.33)	-1.68	1.65

*Primary End Point ; 눈물막 파열 시간(TBUT:Tear Break Up Time)
 **FAS분석군
 ***Independent t-test(Pooled)

표 800. Primary Efficacy Analysis(FAS)

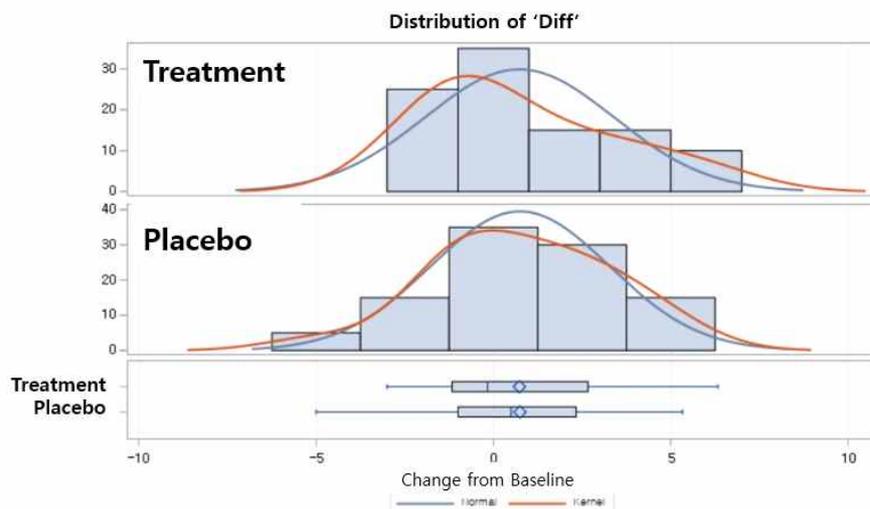


Figure 3. Primary Efficacy Analysis (FAS)

나. Primary Efficacy Analysis(PP)

- 1차 기능성 평가변수는 눈물막 파열시간(TBUT; Tear Break Up Time)이다. 시험식품(두릅추출물)과 대조식품(Placebo) 간 섭취 전(Baseline, V2) • 후(V4) 간의 TBUT 평균 변화량의 차이를 통계 분석 실시하였다. 부 분석군은 PP 분석군이다.
- PP 분석군에서, Treatment 군의 TBUT 평균 변화량은 0.86, Placebo 군의 TBUT 평균 변화량은 0.96이었다. 그리고 그 차이에 대한 Independent (Pooled) t-test 결과 95% 신뢰구간의 하한은 -1.86 신뢰구간 상한은 1.65였다. 따라서 95% 신뢰구간의 하한이 우월성 마진 0보다 크지 않으므로 시험식품이 대조식품보다 TBUT 개선에 대한 효과가 있다고 판단할 수 없다.

TBUT*	Treatment(N=19) mean (SD) med (min, max)	Placebo(N=18) mean (SD) med (min, max)	Total(N=37) mean (SD) med (min, max)	95% two-sided CI	
Baseline	6.39 (1.18) 6.00 (4.67, 9.33)	6.96 (1.78) 6.33 (4.33, 11.00)	6.67 (1.51) 6.00 (4.33, 11.00)		
Post-Treatment	7.25 (2.45) 7.00 (4.33, 12.33)	7.93 (2.26) 8.00 (4.00, 11.33)	7.58 (2.35) 8.00 (4.00, 12.33)		
Difference (Baseline - Post-Treatment)	0.86 (2.68) 0.00 (-3.00, 6.33)	0.96 (2.57) 1.33 (-5.00, 5.33)	0.91 (2.59) 0.00 (-5.00, 6.33)	-1.86	1.65

*Primary End Point ; 눈물막 파열 시간(TBUT:Tear Break Up Time)
 **PP분석군
 ***Independent t-test(Pooled)

표 11. Primary Efficacy Analysis(PP)

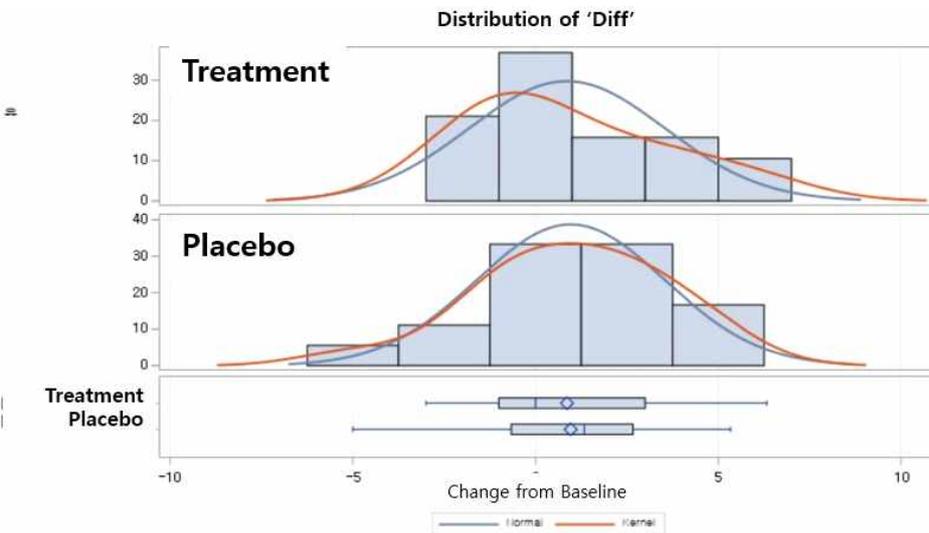


Figure 4. Primary Efficacy Analysis(PP)

다. 안전성 평가(Safety Analysis)

1) 이상사례(Adverse Event)

- Treatment 군에서 이상반응이 발생한 대상자는 총 7명(35%)이고, Placebo 군에서 이상반응이 발생한 대상자는 총 4명(20%)이다.
- 이상반응이 발생한 대상자 비율에 따른 Chisq 검정 결과 p-value가 0.2881로 유의수준 0.05보다 작지 않으므로, Treatment 군과 Placebo 군간 이상반응 발생한 대상자 비율에는 차이가 있다고 할 수 없다.
- IP와 관련된 이상반응은 발생하지 않았다. 중대한 이상반응은 발생하지 않았다. 중대하고 IP와 관련된 이상반응은 발생하지 않았다.

SOC	Number (%) of subjects with adverse event				Number (%) of subjects with adverse event related to IP				Number (%) of subjects with Serious Adverse Event related to IP			
	Treatment (N=20) n(%)	Placebo (N=20) n(%)	p-value	Total (N=40) n(%)	Treatment (N=20) n(%)	Placebo (N=20) n(%)	p-value	Total (N=40) n(%)	Treatment (N= 20) n(%)	Placebo (N=20) n(%)	p-value	Total (N=40) n(%)
	Number of subjects with AE											
	7(35.00)	4(20.00)	0.2881	11(27.50)			.				.	
	Eye disorders											
Blepharitis	1(14.29)	.(.)	.	1(8.33)			.				.	
	Gastrointestinal disorders											
Dyspepsia	1(14.29)	.(.)	.	1(8.33)			.				.	
Tooth impacted	1(14.29)	.(.)	.	1(8.33)			.				.	

SOC PT	Number (%) of subjects with adverse event				Number (%) of subjects with adverse event related to IP				Number (%) of subjects with Serious Adverse Event related to IP			
	Treatment (N=20) n(%)	Placebo (N=20) n(%)	p-value	Total (N=40) n(%)	Treatment (N=20) n(%)	Placebo (N=20) n(%)	p-value	Total (N=40) n(%)	Treatment (N= 20) n(%)	Placebo (N=20) n(%)	p-value	Total (N=40) n(%)
Infections and infestations												
Gastroenteritis	1(14.29)	.(.)	.	1(8.33)			.				.	
Herpes zoster	.(.)	1(20)	.	1(8.33)			.				.	
Hordeolum	.(.)	1(20)	.	1(8.33)			.				.	
Nasopharyngitis	1(14.29)	.(.)	.	1(8.33)			.				.	
Vaginal infection	1(14.29)	.(.)	.	1(8.33)			.				.	
Injury, poisoning and procedural complications												
Road traffic accident	.(.)	1(20)	.	1(8.33)			.				.	
Investigations												
Blood thyroid stimulating hormone abnormal	1(14.29)	.(.)	.	1(8.33)			.				.	
Skin and subcutaneous tissue disorders												
Urticaria	.(.)	2(40)	.	2(16.67)			.				.	
All	7(100)	5(100)	.	12(100)			.				.	
*Safety Analysis Set												
**Chi-square test												

⌘ 14. Adverse Event

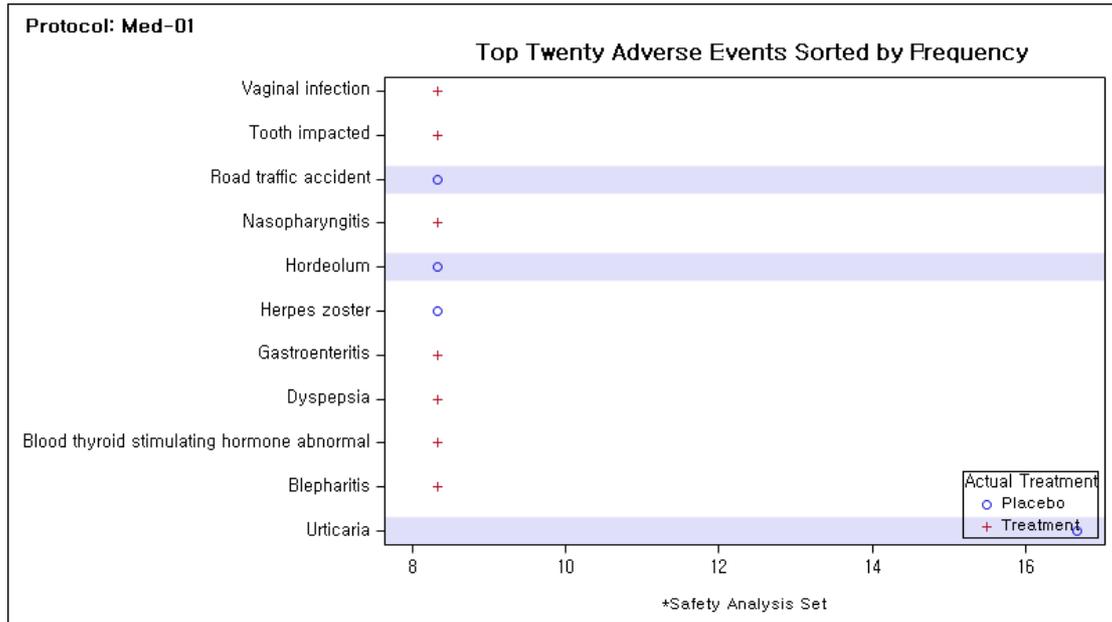


Figure 5. Top Twenty Adverse Events

2) Pregnancies

인체적용시험 참여 중 임신 건은 발생하지 않았다.

3) Clinical Laboratory Evaluations

- 실험실적 검사치에 대한 임상적으로 유의한 변화, 즉 Baseline(V1) 시 실험실적 검사 항목별 검사 결과 '정상' 이었으나 V4 '임상적으로 유의한 비정상' 으로의 변화, 또는 V1 '임상적으로 유의한 비정상' 이었으나 V4 '임상적으로 유의하지 않은 비정상' 또는 '정상' 으로의 변화를 경험한 대상자가 Treatment 군에서는 16명(80%), Placebo 군에서는 13명(65%)이었다.
- 임상적으로 유의한 변화를 경험한 대상자 비율에 대하여 Treatment 군과 Placebo 군 간의 차이에 대하여 Chisq 검정을 실시하였고 p-value가 0.2881이었다. 따라서 유의 수준 0.05보다 작지 않으므로, 실험실적 검사치에 대한 임상적으로 유의한 변화를 겪은 대상자 비율에 Treatment 군과 Placebo 군간 임상적으로 차이가 있다고 할 수 없다.

	Treatment(N=20) n(%)	Placebo(N=20) n(%)	p-value
Number of subjects with clinical changes	16(80.00)	13(65.00)	0.2881
Number of subjects without clinical changes	4(20.00)	7(35.00)	.

*Safety Analysis Set

**Chi-square test

표 15. Clinical Laboratory Evaluation

4) Vital Sign

- Safety 분석군에서 Treatment 군과 Placebo 군의 V1 섭취 전과 12주 섭취 후의 'Temperature' 평균 변화량은 각각 0.04, 0.05였다. 그리고 그 차이에 대한 Independent (Pooled) t-test 결과 95% 신뢰구간의 하한은 -0.23, 신뢰구간 상한은 0.22였다. 따라서 95% 신뢰구간이 0을 포함하고 있으므로, Treatment군과 Placebo 군 간 Temperature 평균 변화량에 대한 차이가 있다고 할 수 없다.
- Safety 분석군에서 Treatment 군과 Placebo 군의 V1 섭취 전과 12주 섭취 후의 'Pulse' 평균 변화량은 각각 -0.10, 1.30였다. 그리고 그 차이에 대한 Independent (Pooled) t-test 결과 95% 신뢰구간의 하한은 -8.79, 신뢰구간 상한은 5.99였다. 따라서 95% 신뢰구간이 0을 포함하고 있으므로, Treatment군과 Placebo 군 간 Pulse의 평균 변화량에 대한 차이가 있다고 할 수 없다.
- Safety 분석군에서 Treatment 군과 Placebo 군의 V1 섭취 전과 12주 섭취 후의 'Systolic pressure' 평균 변화량은 각각 -1.10, 0.20였다. 그리고 그 차이에 대한 Independent (Pooled) t-test 결과 95% 신뢰구간의 하한은 -6.22, 신뢰구간 상한은 3.62였다. 따라서 95% 신뢰구간이 0을 포함하고 있으므로, Treatment군과 Placebo 군 간 Systolic pressure의 평균 변화량에 대한 차이가 있다고 할 수 없다.
- Safety 분석군에서 Treatment 군과 Placebo 군의 V1 섭취 전과 12주 섭취 후의 'Diastolic blood pressure' 평균 변화량은 각각 0.05, -0.15였다. 그리고 그 차이에 대한 Independent (Pooled) t-test 결과 95% 신뢰구간의 하한은 -5.61, 신뢰구간 상한은 6.01였다. 따라서 95% 신뢰구간이 0을 포함하고 있으므로, Treatment군과 Placebo 군 간 Diastolic blood pressure의 평균 변화량에 대한 차이가 있다고 할 수 없다.

	Treatment(N=20) mean (SD) med (min, max)	Placebo(N=20) mean (SD) med (min, max)	Total(N=40) mean (SD) med (min, max)	95% two-sided CI	
Temperature					
Baseline	36.54 (0.32) 36.55 (36.00, 37.10)	36.58 (0.29) 36.50 (36.10, 37.30)	36.56 (0.31) 36.50 (36.00, 37.30)		
Post-Treatment	36.58 (0.25) 36.50 (36.10, 37.00)	36.63 (0.23) 36.55 (36.30, 37.20)	36.61 (0.24) 36.50 (36.10, 37.20)		
Difference (Baseline - Post -Treatment)	0.04 (0.37) 0.00 (-0.80, 0.70)	0.05 (0.32) 0.00 (-0.60, 0.80)	0.05 (0.34) 0.00 (-0.80, 0.80)	-0.23	0.22
Pulse					
Baseline	81.60 (11.11) 82.00 (57.00, 102.00)	79.50 (9.57) 80.50 (60.00, 97.00)	80.55 (10.29) 81.00 (57.00, 102.00)		
Post-Treatment	81.50 (11.53) 81.00 (66.00, 107.00)	80.80 (11.38) 79.00 (66.00, 107.00)	81.15 (11.31) 80.50 (66.00, 107.00)		

	Treatment(N=20) mean (SD) med (min, max)	Placebo(N=20) mean (SD) med (min, max)	Total(N=40) mean (SD) med (min, max)	95% two-sided CI	
Difference (Baseline - Post -Treatment)	-0.10 (13.69) 0.50 (-30.00, 24.00)	1.30 (8.88) 0.00 (-15.00, 22.00)	0.60 (11.41) 0.00 (-30.00, 24.00)	-8.79	5.99
Systolic pressure					
Baseline	114.00 (7.20) 115.50 (96.00, 125.00)	114.15 (8.88) 114.00 (98.00, 132.00)	114.08 (7.98) 114.50 (96.00, 132.00)		
Post-Treatment	112.90 (9.60) 111.50 (98.00, 131.00)	114.35 (9.67) 113.50 (98.00, 132.00)	113.63 (9.54) 112.50 (98.00, 132.00)		
Difference (Baseline - Post -Treatment)	-1.10 (8.63) -4.00 (-18.00, 14.00)	0.20 (6.61) -0.50 (-12.00, 18.00)	-0.45 (7.62) -1.00 (-18.00, 18.00)	-6.22	3.62
Diastolic blood pressure					
Baseline	67.35 (10.09) 66.00 (56.00, 96.00)	69.10 (9.83) 69.50 (51.00, 86.00)	68.23 (9.87) 68.00 (51.00, 96.00)		
Post-Treatment	67.40 (7.44) 66.00 (58.00, 83.00)	68.95 (9.40) 68.00 (51.00, 87.00)	68.18 (8.40) 66.50 (51.00, 87.00)		
Difference (Baseline - Post -Treatment)	0.05 (7.86) 0.00 (-15.00, 12.00)	-0.15 (10.14) -1.00 (-23.00, 20.00)	-0.05 (8.95) 0.00 (-23.00, 20.00)	-5.61	6.01
<i>*Safety Analysis Set</i>					
<i>** Independent t-test(Pooled)</i>					

표 16. Vital Sign

라. Conclusion

- 유효성 평가 결과 - 1차 유효성 평가변수인 눈물막 파열시간(TBUT; Tear Break Up Time)에 대해 시험식품(두릅추출물)과 대조식품(Placebo) 간 섭취 전 (Baseline, V2) • 후(V4) 간의 TBUT 평균 변화량의 차이에 대하여, Independent (Pooled) t-test(정규성 검정, 등분산성 검정 결과, 정규성, 등분산성 가정을 충족)를 실시하였다.
- FAS 분석군에서의 95% 신뢰구간은 (-1.68, 1.65), PP 분석군에서의 95% 신뢰구간은 (-1.86, 1.65)이다. 모두 95% 신뢰구간의 하한이 우월성 마진 0보다 크지 않으므로 시험식품이 대조식품보다 TBUT 개선에 대한 효과가 있다고 판단할 수 없다.
- 안전성 평가 결과 - 이상반응은 시험식품 복용 한 7명(35%) 대상자에게서 7건, 대조식품 복용 한 4명(20%) 대상자에게서 5건 발생하였고 두 군간 이상반응 발생 대상자 비율에 대한 차이는 p-value 0.2881로써 두 군간 차이가 있다고 할 수 없다. IP(시험식품)와 관련된 이상반응 및 중대한 이상반응은 발생하지 않았다.

제 5 절. 두릅추출물의 기능성원료 개별인정 신청을 위한 자료 확보

1. 기능성원료 기원 자료 구비

학명(식물種까지기재) - 두릅(*Aralia elata*)

수확시기 - 가을(9~11월, 추채)

사용부위 - 두릅의 가지(2년이상)

원산지 - 국내 중북부 (1.강원도 평창, 2.경기도 가평), 3.중국산

2. 원료의 특성자료 구비

<특성자료1>

Artichoke leaf extract, as AKR1B1 inhibitor, decreases sorbitol level in the rat eye lenses under high glucose conditions ex vivo.

<특성자료2>

당뇨망막증과 안구건조증 모델에서 각각 두릅 과 창이자의 효과 분석.

안구건조증 : * HCEC (human corneal epithelial cell)

각막손상(안구건조증)모델)- Hyperosmolar stress (고삼투압성 스트레스): NaCl (sodium chloride) 처리

3. 제조방법 자료 구비

기능(지표)성분 함량-원료식품(기능성원료) 대비 지표물질(DHBA, CLA) 함량명시

필수제조공정-절단 - 추출 - 여과-농축(가열)-냉각-건조(분무건조)

공정별 제조조건

중요공정(추출,농축) 수율변화표시

4. 기준 및 시험자료 구비

확인시험,함량시험,유해물질시험,중금속시험에 대한 기준및시험방법을 설정

5. 안전성 관련 자료 구비

○ 두릅추출물을 Sprague- Dawley 계통의 암·수 랫드에 13주간 반복경구투여 실시 - 시험물질과 관련이 있는 것으로 추정되는 독성변화는 관찰되지 않았음 : 시험물질의 무독성량 (NOAEL : No Observed Adverse Effect Level)은 암·수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 안전성이 확보됨

○ 두릅추출물의 용량관련 안전성 - 1정(400mg)/1회, 2회(2정)/1일/성인(60kg)를 아침, 저녁에 섭취한다.

- 이 섭취량은 13.3mg/kg/day으로서 본 두릅추출물의 NOAEL값(무독성 한계 량:2,000mg 이상)보다 매우작아서 용량관련 안전성이 확보됨
- 두릅추출물의 잔류농약, 중금속 검사 - 안전성이 확인됨

6. 기능성 관련 자료 구비

- 두릅추출물의 지표물질인 Chlorogenic acid와 3,4-Dihydroxybenzoic acid (Protocatechuic acid) - 백내장 유발과 관련 효소인 aldose reductase inhibitor로서의 작용이 우수, 당뇨성 망막증 모델에서 망막의 ganglion cell의 사멸을 억제하는 효능이 탁월한 것으로 확인되었음.

7. 유해물질 관련 자료 구비

- 두릅추출물을 검사한 결과 - 유해물질은 없는 것으로 확인됨

8. 섭취량 관련 자료 구비

- 섭취량 및 섭취방법 : 1정(400mg)/1회, 2회(2정)/1일/성인(60kg)를 아침, 저녁에 섭취한다. 이 섭취량은 두릅추출물 13.3mg/kg/day에 해당하는 것임

9. 국내외 인정 및 사용현황관련 자료

- 문헌조사결과 현재까지는 개별 인정 제품은 없는 것으로 조사됨

제 6 절. 두릅추출물 대량생산 및 제품 생산

1. 대량생산 공정 개발 연구: 산업적 추출 조건 확립

두릅나무의 원료는 경기도 가평군의 농가에서 구입하여 사용하였으며 아래와 같이 추출하였다. 추출조건은 pilot scale의 조건을 토대로 하여 현장 상황에 맞는 대량생산 조건을 확립하였다.

가. pilot scale 시료 전처리

- Pilot scale에서 Cutter 분쇄와 Hammer mill분쇄를 비교한 결과는 다음과 같다.
- Cutter와 Hammer mill (8mm hole screen과 디스크에 핀을 이용한 분쇄, 7.5마력, 1750rpm, 분쇄시간: 100 kg/h)로 원료를 처리하여 추출 후 수율을 비교한 결과 Cutting시 수율이 높은

것을 확인하였다.

- 일반적으로 Hammer mill분쇄가 수율이 높은 것으로 알려져 있으나 본 연구에 사용된 두릅나무 원료의 보습성이 강해 수율이 Cutting에 비해 낮았다. 따라서 Cutting이 바람직한 것으로 판단됨.
- 두릅나무 내부의 스펀지 조직처럼 되어 있는 부분이 절반 가까이 되므로 분쇄하여 가루로 만들 경우 수분이 흡수되어 오히려 수율이 감소하는 현상이 나타났다. 따라서 두릅나무를 분쇄하기 보다는 적당한 크기로 잘라서 사용하는 것이 오히려 수율이 높게 나타났다.
- 두릅나무는 일반적인 나무원료와 특성에 차이가 있어 생산에서 중요하게 다루어져야 한다고 판단하였다.

나. pilot scale 추출공정

- 레토르트 방식 (121℃, 2.2기압에서 30분간 추출, 고온고압)과 이중솔 방식 (95℃, 0.4~1.4kfg/cm²에서 1~2h 추출, steam 방식)을 비교한 결과 레토르트 방식이 유리함을 확인.
- 추출공정에서 레토르트 방식이 이중솔 방식보다 수율이 높게 나타난 결과는 고온, 고압의 환경 하에서 추출시간을 단축할 수 있음을 보여줌.
- 추출시 물의 비율을 달리하여 (10배, 5배, 4배) 수율을 비교해 본 결과 4배수와 5배수는 별로 차이가 없고 10배수가 가장 유리하였다.
- 대량생산시에는 현장의 상황을 감안하여 8배수 이상으로 조정하였다.

다. pilot scale 농축공정

- 이중솔 방식 (농축조건 : 95℃, 0.4~1.4kfg/cm²으로 2~4h 농축, steam 가열 방식으로 농축, 농축brix : 10brix, 여과 : 100mesh)을 사용하였다.

라. pilot scale 건조공정

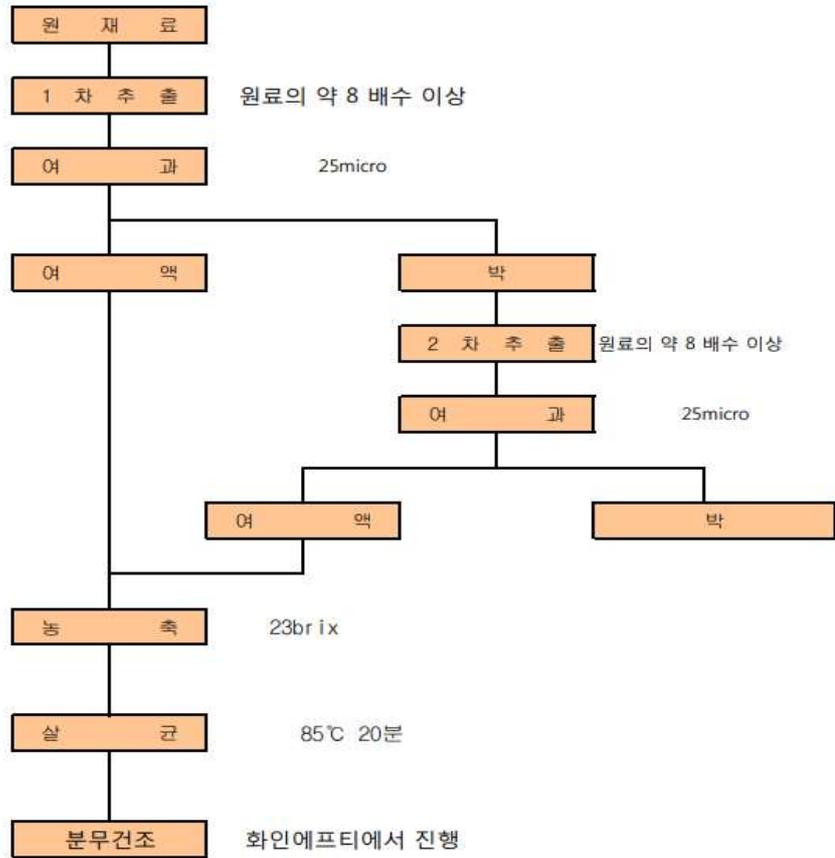
- pilot scale 열풍건조와 동결건조가 모두 가능하나 성분의 변화에 영향이 미치지 않는 것으로 알려진 동결건조가 유리한 것으로 판단되어 동결건조 하였음. 동결건조공정을 거친 추출물은 색상이나 분말의 크기 모두 제품화에 적당하였다. 대량생산 현장에서는 spray dry방법을 적용하여 생산하였다.

마. 고찰

- 최종 제품의 수분함유율은 6.9%로 밀가루의 14.5%보다 적었다. 이러한 사실은 제품의 저장성과 수송비의 절감을 통한 재가공 조작성의 용이성을 보여주었다.
- 원료 1.6톤을 확보하여 확립된 대량생산 공정을 통해 두릅추출물을 건조분말로 약 124 kg을 생산하였다. 생산수율은 약 7.75%로서 다른 천연물 원료에 비해 낮은 편이라고 판단된다.
- 그 이유는 두릅나무가 속이 스펀지처럼 공기구멍이 있는 부드러운 조직이어서 활용도가 낮은 부분이라고 판단된다. 한방에서는 안쪽을 제거하고 껍질 부분만을 사용한다. 두릅나무의 겉쪽은 단단한 재질이어서 이 부분에 유용한 성분들이 함유되어 있는 것으로 보인다. 안쪽의 스펀지같은 부분에서 나오는 물질이 별로 없어 수율이 낮은 것으로 판단된다.

<대량 생산 공정도>

두릅 추출 농축액제조공정도



<대량생산 실제>

두릅 추출 농축액 제조 작업일지(5ton 추출기)										작업자	확인	
										송재혁	이진우	
작업내용		두릅추출농축 1bt			두릅추출농축 2bt			두릅추출농축 3bt				
원료명		두릅			두릅			두릅				
원료 성상		이물	이취	기타	이물	이취	기타	이물	이취	기타		
		양호	양호		양호	양호		양호	양호			
1차 추출	작업일자	2018.05.03			2018.05.03			2018.05.07				
	원료투입량	300kg			300kg			300kg				
	정수	3500ℓ			3500ℓ			3500ℓ				
	온도	95°C			95°C			95°C				
2차추출	작업일자	2018.05.04			2018.05.04			2018.05.08				
	정수	3500ℓ			3500ℓ			3500ℓ				
	온도	95°C			95°C			95°C				
농축	작업일자	2018.05.04~05			2018.05.04~05			2018.05.08~09				
	온도	60±3°C			60±3°C			60±3°C				
	생산량	135kg			133kg			131kg				
	brix	23			23			23				
	고형수율(%)	10.35%			10.20%			10.04%				
특이사항 실험용 추출시 원물의 8배수의 정수로 원물이 잠기지 않아 추가로 정수 투입하였음												

2. 두릅추출분말에 대한 품목제조보고서

식품(식품첨가물)품목제조보고서																
보고인	성명	류병희	주민등록번호	790902 - 1068816												
	주소	충남 금산군 추부면 신평리 25번지														
영업소	명칭(상호)	(주)삼우다연														
	소재지	충남 금산군 추부면 신평리 25번지														
식품의유형		기타가공품	영업허가(신고)	제 3 - 245 호												
제품명		두릅추출분말	유통기한	제조일로부터 24 월												
원재료명 또는 성분명 및 배합비율		별첨														
용도용법		별첨														
포장방법 및 포장단위		별첨														
성상		별첨														
기타																
<p>「식품위생법」 제22조제6항 및 동법시행규칙 제25조의 규정에 따라 식품(식품첨가물)품목제조 사명출보본입니다. 조제</p> <table border="1" style="float: left; margin-right: 20px;"> <tr> <td colspan="3">2009년 7월 13일</td> </tr> <tr> <td colspan="3">대조책임자</td> </tr> <tr> <td>직명</td> <td>성명</td> <td>인</td> </tr> <tr> <td>보조</td> <td>김관수</td> <td></td> </tr> </table> <p style="text-align: right;">2009년 07월 13일</p> <p style="text-align: right;">보고인 류병희 </p> <p style="text-align: left;">금산군수 귀하</p>					2009년 7월 13일			대조책임자			직명	성명	인	보조	김관수	
2009년 7월 13일																
대조책임자																
직명	성명	인														
보조	김관수															
<p>※ 구비서류</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사기관이 발급한 식품 등의 한시적 기준 및 규격 검토서 1부(화학적 합성품이 아닌 식품첨가물과 식품 및 식품첨가물에 사용되는 기구 또는 용기, 포장에 한합니다.) 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정사유서 1부 																
<p>※ 유의사항</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다. 2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분에 한한다. 																

제 조 방 법 설 명 서

1. 제 품 명 : 두릅추출분말

2. 식품의 유형 : 기타가공품

3. 원료 또는 성분의 함량

두릅 100%

4. 제조방법

1) 원료구입 : 원료는 식품의 원료로서 적합한 양질의 원료만을 선별 구입 한다.

2) 추출 농축

① 정선한 원료를 계량하여 추출기에 넣고 정수로 세척한 후 약 8배의 정수를 가하여 $98\pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서 8시간 가온 추출하여 여과한다.

② 여과할 여액을 $55\pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 감압 가온 농축하여 고형분 함량이 30%이상이 되도록 농축한다.

3) 살균

농축한 농축액을 85°C 에서 20분간 가열 살균한다.

4) 분무건조

① 살균한 농축액을 수분함량이 10% 이하가 되도록 분무건조 한다.

② 분무 건조한 분말을 60mesh의 사별기로 선별한다.

5) 검사

선별한 분말을 내부규격검사를 한다.

6) 포장

검사결과 적합한 제품에 한하여 규격용기에 충전하고 유통기한 등 표시사항을 표시하여 포장한다.

5. 성상 : 고유의 색택과 향미를 지닌 갈색의 분말 임

6. 포장방법 및 포장단위 : 자사규격에 준 한다.

7. 보존 및 유통기준 : 직사광선을 피하여 서늘한 장소 보관한다.

8. 용도 및 용법 : 식품의 원료로서 적당량 사용한다.

9. 유통기한 : 제조일로부터 24개월

3. 생산된 두릅추출분말에 대한 시험성적서



시험성적서

접수 / 성적서 발급번호 : GHG20180705-168

문서번호 : 검사인증부-3231

검사의뢰 및 시료 정보				
제품명	두릅추출분말		제조일자	2018.07.02
의뢰대상	업체명	삼우다연	업체 대표자 / 의뢰자명	유병희
	소재지	충남 금산군 추부면 승우재로 58		
접수년월일	2018.07.05		검사완료일	2018.07.20
식물유형	-			
검사목적	참고용			

시험항목 및 결과				
시험항목	세부항목	결과	비고	
중금속	타르색소		불검출	-
	납	0.34 mg/kg		
	카드뮴	0.09 mg/kg		
	비소	0.30 mg/kg		
잔류농약	수은	불검출		
	Aldrin&Dieldrin		불검출	
	Endrin		불검출	
	BHC		불검출	
	DDT		불검출	



검사자 : 선임연구원 국준영, 박영순, 박소라

책임자 : 검사인증부장 장영부

비고 : 본 검사성적서의 내용은 의뢰인이 제출한 시료에 대한 검사결과로서, 용도 이외의 광고, 전시 등의 목적으로 사용함에 따른 모든 사항에 대해, 연구소는 그 어떠한 법적 책임도 지지 않습니다.

(재)금산국제인삼약초연구소



2018.07.20

4. 두릅추출물을 이용한 건강기능식품 생산

가. 두릅추출물을 활용하여 눈건강제품 (상표명: 수리눈) 생산

- 수리눈 제품의 디자인 확립하였다.
- GMP시설을 갖춘 OEM업체인 한미양행과 계약을 맺고 한미양행을 통해 식약처에 품목제조 신고를 완료하였다.
- 제품의 단상자와 속지의 표시내용을 건강기능식품 협회에 보내 광고심의를 통과하였다.
- “수리눈”이라는 제품명으로 눈건강제품을 생산하였다 (2,700개).

나. 건강기능식품 품목제조신고증 (수리눈)

발급번호 : 1200-4442-BYQV-CN2V-JBGB

제 200400150831137 호

건강기능식품 품목제조신고증

○ 영업허가(번호) : 제 20040015083 호

○ 업 소 명 : 주식회사한미양행

○ 소 재 지 : 경기도 파주시 문산읍 통일로1888번길 44-20

○ 영업의 종류 : 건강기능식품전문제조업

○ 제 품 명 : 수리눈 (유형: 비타민A, 비타민E, 비타민 C, 셀레늄(또는 셀렌))

제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (뒤쪽 작성)
「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고를 수리합니다.

2019년 04월 23일

서울지방식품의약품안전청장



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 1200-MHD2-8YQV-CN2V-JB08



제품명	수리본
섭취방법	1일 2회, 1회 2정을 충분한 물과 함께 섭취
섭취 시 주의사항	알레르기 체질인 경우 성분을 확인 한 후 섭취하시기 바랍니다.
포장방법	병포장 또는 PTP포장
포장단위	660 mg × 30 정(19.8 g), 660 mg × 60 정(39.6 g), 660 mg × 90 정(59.4 g), 660 mg × 120 정(79.2 g), 660 mg × 160 정(105.6 g), 660 mg × 200 정(132 g), 660 mg × 240 정(158.4 g), 660 mg × 280 정(184.8 g) 등.
포장재질	폴리에틸렌(PE), 폴리스틸렌(PS), 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET), 폴리프로필렌(PP) 등.
성상	이미, 어둡가 없으며 고유의 향미를 지닌 분홍색 정방형 제피정제.
기능성내용	①어두운 곳에서 시각 적응을 위해 필요②피부와 정맥을 형성하고 기능을 유지하는데 필요③상피 세포의 성장과 발달에 필요 ①유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요 ①결합조직 형성과 기능유지에 필요②혈의 흡수에 필요③유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요 ①유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요
제조방법	① 원료 : 자체규격검사를 거쳐 적합함에 한하여 원료로 사용. ② 칭량 : 위 공정을 배합비율에 따라 전자저울로 칭량. ③ 사별 : 칭량한 원료를 메서말을 이용 수동으로 사별. ④ 혼합 : 혼합기를 이용하여 혼합을 실시. ⑤ 타정 및 알분 : 혼합된 원료를 타정기를 이용하여 660mg 정방형으로 타정, 알분기를 이용하여 나정을 알분. ⑥ 코팅 : 다량된 정제를 히드록시프로필메틸셀룰로스, 락토스, 글리세린지방산에스테르로 적갈색 코팅한다. ⑦ 중간검사 : 정제를 중간검사를 실시. (성상, 중량) ⑧ 포장 : 중간검사결과 적합한 제품을 포장기를 이용하여 포장한 후 외포장에 유통기한 등을 표시. ⑨ 최종검사 : 포장이 완료된 제품을 건강기능식품 규격에 의한 검사를 실시. ⑩ 보관출하 : 검사결과 적합한 제품에 한하여 보관출하.

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 1200-MHD2-8YQV-CN2V-JB08



제품의 형태	정
기준과 규격	(1) 성상 : 이미, 어둡가 없으며 고유의 향미를 지닌 분홍색 정방형 제피정제. (2) 비타민A : 표시량(700.8 ugRE/2,640 mg)의 80%이상 150%이하 (3) 비타민E : 표시량(10.2 mgα-TE/2,640 mg)의 80%이상 150%이하 (4) 비타민C : 표시량(111.6 mg/2,640 mg)의 80%이상 150%이하 (5) 셀레늄 : 표시량(55.2 ug/2,640 mg)의 80%이상 150%이하 (6) 대장균군 : 음성 (7) 병해시멸 : 적합
보존 및 유통기준	고온다습한 곳이나 직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관.
유통기한	30개월
기타	

다. 제품에 대한 시험의뢰서

시험의뢰서 (TEST REQUEST)

- 원료 부차재 제제개선
 완제품 환입품 기타
 공정중 신제품

고유번호(Code No.)		의뢰번호(Requested No.) 190219-03	
품명(Material) 수리눈		의뢰일(Date, Test requested) 2019.02.19	
제조원(Origin)/판매원(Agency)		포장단위(Packaging unit)	
제조/구입번호		포장수량(No. of package)	
제조/구입일자 2019.02.19		포장물질(Packaging material)	
의뢰처 (Requested By) 개발팀		총수량(Total amount)	
첨부의견(Additional Information) 기준규격검사		의뢰결재(Signature) 	
접수일(Date received) 2019.02.19		시험번호(Analytical No.) 190219-03	
시료채취일(Date sampled) 4		포장상태(Condition of package)	
시료채취장소(Place, sampled)		라벨상태(Condition of label)	
시료채취자(Sampled By)		저장상태(Condition of storage)	
시료채취량(Amount of sample) 50g		첨부의견(Additional Information)	
시료채취자의견(Coment of sampler)			
시험자(Tested by) 안은지	확인자(Checked by) 강지희	승인자(Approved by) 	판정(Judgement) 12
시험·검사 항목 및 결과			
시험·검사 항목	시험·검사 기준	결과	비고
성상	이물, 이취가 없으며 고유의 향미를 지닌 적갈색 장방형 세피정제.	이물, 이취가 없으며 고유의 향미를 지닌 적갈색 장방형 세피정제	
비타민C	표시량(111.6 mg/2,640 mg)의 80-150%	129%	149.7mg/2640mg
비타민E	표시량(10.2 mg-e-TE/ 2,640mg)의 80-150%	40%	9.94mg-e-TE/2640mg
셀레늄	표시량(55.2 ug/ 2,640mg)의 80-150%	83%	46.11ug/2640mg
비타민A	표시량(700.8 ugRE/ 2,640mg)의 80-150%	107%	746.76ugRE/2640mg
대장균군	음성	음성	
분해시험	60분 이내	40분 이내	

(주) 한미양행

시험·검사 확인란			

라. 제품에 대한 시험성적서 (기능성분 분석결과)

1/1

<h1>시험성적서</h1>		권	자	성	검	도	승	인
		제	안은지	강지희	김성태			
제 품 명	수리눈	시험의뢰일	2019. 02. 19					
L O T 번호	190219-03	시 험 자	강 지 희, 안 은 지, 이 미 래, 김 형 욱					
의 피 처(업체/제조사)	개발팀	의 피 목 적	제조·수입품목허가(신고)용 검사					

시 험 항 목	시 험 기 준	시험결과	판정	시험일자	시험자
성 상	이미, 이취가 없으며 고유의 향미를 지닌 적갈색 장방형 제피정제.	이미, 이취가 없으며 고유의 향미를 지닌 적갈색 장방형 제피정제.	적합	2019. 02. 19	안 은 지
비타민C	표시량(111.6 mg/2,640 mg)의 80 ~ 150%	129% (143.7 mg/2,640 mg)	적합	2019. 02. 27	김 형 욱
비타민E	표시량(10.2 mg-TE/2,640 mg)의 80 ~ 150%	97% (9.94 mg-TE/2,640 mg)	적합	2019. 03. 06	강 지 희
셀레늄	표시량(5.2 µg/2,640 mg)의 80 ~ 150%	83% (46.01 µg/2,640 mg)	적합	2019. 03. 05	강 지 희
비타민A	표시량(700.8 µgRE/2,640 mg)의 80 ~ 150%	107% (746.96 µgRE/2,640 mg)	적합	2019. 03. 08	김 형 욱
대장균군	음성이어야 한다.	음 성	적합	2019. 02. 19	이 미 래
붕 해 도	37 ± 2℃, 60분 이내	40분 00초	적합	2019. 02. 19	안 은 지

종합판정	적합	판정자	김성태	판정일자	2019. 03. 08
비 고					

(주) 한 미 양 행

마. 수리눈제품의 영양성분 분석성적서



DI LAB 주식회사 다이아분석센터

문서확인번호 : EM7E-YSZB-RPE9-PKOS

시험 · 검사성적서

발행번호	R20190307-0003		접수번호	190100461-003
검사원요일	2019-03-07		접수연월일	2019-02-19
제품명	수리눈			
(품목)제조번호		품목제조신고번호		
유형 · 재질 · 품목명	기타기준규격외			
제조(수입)일		유통(품질유지)기한		
의뢰자	성명	정명수	업체명	(주)한미양행
	소재지	(10808)경기도 파주시 문산읍 통일로1888번길 44-20 전화번호: 031 - 952 - 9555 팩스번호: 031 - 952 - 9556 전자우편:		
제조원	업체명		제조국	
	소재지			
시험 · 검사목적	식품 기타(참고용)			

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
열량(Kcal/100g)	기준없음	358.15	상기실험확인함	
탄수화물(g/100g)	기준없음	76.99	상기실험확인함	
단백질(g/100g)	기준없음	12.12	상기실험확인함	
지방(g/100g)	기준없음	0.19	상기실험확인함	
나트륨(mg/100g)	기준없음	109.84	상기실험확인함	

종합판정 : 상기실험확인함

시험검사원 : 박은정, 이유리, 장우철, 정진영

시험검사책임자 : 김영환, 정진영

비고 :

- ※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- ※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.
- ※ 검사결과를 광고하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

2019년03월07일

주식회사 다이아분석센터



11675 경기도 의정부시 가남로 9 2,3,4 층(가남동 수신빌딩)

T:031-836-5123

F:031-836-5124

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다. 또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너를 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다. <http://lms.mfds.go.kr> Page 1 of 1

바. 제품사진



제 7 절. 두릅추출물을 이용한 건강기능식품의 사업화

1. 판매전략 수립 배경

- 고령화 및 컴퓨터 및 스마트폰 사용이 증가하는 사회에서 수요가 많은 눈건강 증진 건강기능식품이 요구된다.
- 두릅 소재에 대한 친근함, 건강함 및 자연소재에 대한 관심이 판매망을 잘 확보하면 시장진입이 용이할 것으로 판단됨.
- 이제까지의 연구결과 및 출시한 제품으로 Test Marketing한 결과 두릅추출물은 획기적인 기전을 가진 고기능성 물질임이 확인되었음.

2. 경쟁제품 현황

- 현재 식약처의 개별인정허가를 받은 기능성원료 중 눈건강과 관련된 물질은 빌베리추출물(안토시아노사이드)과 헤마토코쿠스 추출물(아스타잔틴)은 눈의 피로도 개선에 도움을 주

는 원료로 생리활성 2등급의 인정을 받았다.

- 루테인복합물은 눈건강에 도움을 주는 원료로 생리활성 1등급의 인정을 받았고 지아잔틴 추출물은 눈건강에 도움을 주는 원료로 생리활성 1등급의 인정을 받았고 루테인에스테르는 생리활성 2등급의 인정을 받았다.
- 루테인과 지아잔틴추출물, 루테인에스테르 등은 과다섭취시 피부색이 일시적으로 황색으로 변하는 단점이 있으며 헤마토코쿠스 추출물은 베타카로틴의 흡수를 저해하는 단점이 나타나기도 한다.
- 현재 시장에서 판매되고 있는 이들 기능성 원료들은 모두 수입된 원료를 사용하고 있어 이들 대체할 수 있는 기능성원료의 국산화가 대단히 필요한 상황이다.
- 현재 출시된 제품 목록

번호	제조사	판매사	제품명	성분	원료
1	(주)안국약품	(주)안국약품	토비콜 골드	레티놀아세테이트(비타민A4,000IU)(USP)8.0mg, 아스코르브산97%과립(아스코르브산으로서200mg)(별규)206.2mg, 벤포티아민(티아민염산염으로서21.7mg)(KP)30.0mg, 리보플라빈부티레이트(KP)12.0mg, 니코틴산아미드(KP)50.0mg, 판토텐산칼슘(KP)40.0mg, 피리독신염산염(KP)50.0mg, 비오틴(USP)0.045mg, 폴산(KP)0.4mg, 시아노코발라민1000배산(시아노코발라민으로서50ug)(KP)100.0mg, 셀레늄함유건조효모(셀레늄으로서59.8ug)(KP)46.0mg, 산화아연(아연으로서10mg)(USP)12.45mg, 산화마그네슘(마그네슘으로서30mg)(USP)50.0mg	
2	(주)유한양행	(주)유한양행	루테인 에이스플러스	루테인(20mg), 비타민A(560ug), 비타민C(70mg), 비타민E(11mg)	마리골드씨앗
3	코스맥스바이오(주)	코스맥스바이오(주)	베터브라이트 투모로우	[(EPA와DHA함유유지, 투레인, 비타민A)1250mg, (헤마토코쿠스추출물, 비타민E)625mg] EPA와DHA의함600mg, 루테인20mg, 아스타잔틴4mg, 비타민A210ugRE(30%), 비타민E3.7mgα-TE(34%)	마리골드씨앗 해바라기씨유
4	(주)서흥	사노피-아벤티스	세노비스 루테인+오메가-3	루테인(20mg) 오메가3(600mg)	정제어유[노르웨이/(정제어유, D-토코페롤 혼합형), 대두레시틴/참치, 멸치, 고등어, 정어리/EPA+DHA 600mg/g.] 루테인(미국/루테인, 올리브유), 밀납, 대두유, 대두레시틴
5	극동에치팜(주)	(주)티지알앤	아이조아 루테인8플러스	루테인추출물(Lutein20%/루테인, 해바라기유, 미국), D-α-토코페롤유지(비타민E67%, 대두), 산화아연(아연80%), 아셀렌산나트륨(셀렌1%), 비타민A유지(비타민A30%, 양공), 비타민B6염산염(비타민B682%), 비타민B1염산염(비타민B178%), 비타민, 대두유(수입산), 밀납, 대두레시틴, 결명자엑기스분말(국산), 세븐베리농축분말, 푸른과즙분말, 셀레늄함유건조효모, 코엔자임Q10	
6	(주)한미양행	(주)녹십자HS	루테인9플러스	루테인(캐나다산/마리골드꽃추출물, 해바라기유), 레티닐팔미트산염혼합제(레티닐팔미트산염, 땅콩오일, DL-알파-토코페롤), D-α-토코페롤, 비타민B2, 니코틴산아미드, 비타민B6염산염, 산화아연, 식용건조효모분말(셀레늄), 황산망간, 황화아연(독일산), 정제어유(정제어유, 토코페롤혼합형), 정제팜유, 밀납, 대두레시틴, 빌베리추출물분말, 헤마토코쿠스추출물, 과일채소혼합분말, 베리혼합분말, 당면이나두열매농축액분말, 구기자추출물분말, 결명자추출물분말, 식물혼합추출물분말	
7	코스맥스바이오(주)	안국건강(주)	안국눈에 좋은 루테인플러스	루테인20mg, 베타카로틴1mg, 비타민E3.3mg α-TE(30%), 아연2.55mg(30%), 셀렌16.5ug(30%)	건조효모(아연5%이상), 루테인(루테인40%, 올리브유, 마리골드추출물, D-α-토코페롤), 건조효모(셀렌 0.1%이상), D-α-토코페롤(비타민E 67%), 카로틴(베타카로틴 30%, 올리브유, 카로틴), 포도씨유, 밀납, 대두레시틴, 건조효모(구리 1%이상), 아세로라추출분말, 식물혼합추출분말, 베리혼합추출분말, 헤마토코쿠스추출물 [캡슐기제] 히드록시프로필전분 분말, 글리세린, 카라기난, 폴리글리시딜시럽, 카카오색소, 차차청색소, 락색소혼합제(락색소, 카라멜색소, 차차황색소) 대두(대두레시틴)함유
8	(주)한국씨엔에스팜	(주)종근당건강	눈사랑 루테인 에이스	루테인20mg, 비타민A700ugRE, 비타민C31.5mg, 비타민E3.3mgα-TE, 아연7.2mg	루테인(마리골드꽃추출물, 해바라기씨유), 비타민C, 산화아연, D-α-토코페롤, 유성비타민A지방산에스테르(비타민A유지,

					망공기름, DL- α -토코페롤), 대두유(대두유, 토코페롤, 규소수지), 밀납, 대두레시틴, 결명자추출물분말, 블루베리농축액분말
9	네이처퓨어 코리아(주)	비타민하 우스	밝은 눈 파워루테인 20mg	루테인 20mg, 비타민 C 35mg(35%), 아연 3.6mg(42%), 비타민 E 3.3mg α -TE(30%), 비타민 A 700 μ g RE(100%)	루테인[(루테인 20%, 해바라기유), 미국산], 비타민 C(L-Ascorbic acid), 글루콘산아연, D- α -토코페롤(대두), 비타민 A유지(땅콩), 대두유(대두/수입산), 밀납(네덜란드), 대두레시틴(대두), 구기자추출물분말, 헤마토코쿠스추출물, 결명차추출물분말, 베리혼합추출물분말(빌베리, 월귤, 아로니아, 블루베리), 당근추출물분말, 정제어유(EPA, DHA 함유), 동글레추출물분말, 빌베리엑기스분말
10	극동에치팜 (주)	(주)대웅생명과학	아이오메가3	EPA와DHA의 합 600mg	정제어유[EPA와DHA의합55%(정제어유 99.9%, D-토코페롤 혼합형0.1%), 노르웨이산] 100%
11	(주)뉴트리바이오텍	(주)LG생활건강	루비오-3	EPA+DHA 합 500mg, 루테인 20mg, 비타민A 910 μ g RE, 비타민B1 2mg, 비타민B2 2.4mg, 나이아신 7.8mg NE, 판토텐산 5mg, 비타민B6 3.075mg, 비타민B12 2 μ g, 비타민C 35mg, 비타민D 3 μ g, 비타민E 5mg α -TE, 비타민K 27.5 μ g, 철 5.25mg, 아연 6mg, 비오틴 45 μ g, 엽산 250 μ g, 요오드 30 μ g, 구리 0.54 μ g, 망간 1mg, 몰리브덴 9 μ g, 셀렌 25 μ g, 크롬 17.5 μ g	정제어유[정제어유(노르웨이), D-토코페롤(혼합형)], 루테인유지(해바라기유, 마리골드추출물), 비타민C, 건조효모(셀렌), 피로인산제이철, 건조효모(크롬), 니코틴아미드, D-알파-토코페롤혼합제제(대두), 산화아연, 판토텐산칼슘, 건조효모(몰리브덴), 비타민B6엽산염, 글루콘산동, 황산망간, 레티닐팔미트산염혼합제제(땅콩), 비타민B1, 엽산염, 비타민B2, 비타민K1, 혼합제제, 엽산, 비타민B12혼합제제, 비타민D3혼합제제, 비오틴, 요오드칼륨, 밀납, 대두레시틴, 해조분말, 산화마그네슘, 영화칼슘, 홍삼농축액분말, 과일채소혼합분말, 초유단백분말(우유), 아미노산혼합분말, 밀크씨슬추출물분말, 뽕나무잎추출물분말, 베타카로틴혼합, 옥타코사놀함유유지, 생선콜라겐분말, 마카추출물분말, 아스타틴추출물, 베리혼합분말, HK 표고버섯균사체분말, 보라지종자유지, 아마씨유, 하프물범유지, 콜로렐라분말, 유산균혼합분말, 곡류혼합효소분말
12	한국씨엔에스팜	메디포스트	오큐메가3	루테인 20mg, EPA와DHA의 합 600mg, 비타민A 350 μ g RE(50%), 비타민D 25 μ g(500%), 비타민E 11mg α -TE(100%)	EPA 및 DHA 함유 유지[정제어유, D-토코페롤(혼합형)/미국산], 루테인(마리골드꽃추출물, 해바라기유/인도산), D- α -토코페롤, 비타민D3유지(비타민D3, 가공유지, DL- α -토코페롤), 유성비타민A지방산에스테르(비타민A유지, 망공기름, DL- α -토코페롤, 밀납, 헤마토코쿠스추출물

3. 경쟁구조

○ 현재의 시장상황은 같은 원료를 이용하여 Formulation만 다르게 한 제품들이 주를 이루고 있어 원료의 차별성이 적고 비슷한 제품들이 경쟁하고 있는 구조이다.

○ 시장진입 장벽

효능이 우수한 신원료의 발굴이 어렵고, 식약처의 인허가 요건이 까다로워 시장진입 장벽이 높다.

4. 사업화 방안

가. 주요 고객군

- 컴퓨터를 장시간 사용하는 학생, 회사원 등 - 안구건조 예방
- 스마트폰을 장시간 사용하여 눈이 피곤한 사람 - 안구건조 예방
- 갱년기에 접어든 사람들 - 백내장, 망막증 예방
- 당뇨병환자 - 2차합병 예방, 백내장, 망막증 예방

나. 사업화 전략

● 사업화 방안

<p>-Target시장</p> <ul style="list-style-type: none"> • 눈질환 예방을 위한 • 과학적근거를 확보한 건강기능식품 • 기능성 천연물질 • 삶의 질향상에 기여하는 건강식품군 	<p>-판로</p> <ul style="list-style-type: none"> • 천연물 제조업체, 제약사 • 실수요처(질병군, 연령별) • 홈쇼핑 • 약국 • 인터넷 쇼핑몰
<p>-제품홍보</p> <ul style="list-style-type: none"> • 맞춤형 기능제품의 요구성 증가 • 약물남용과 독성에 대한 두려움 • 소비자의 안전한 먹거리 선호 • 유기농 친환경 농산물 선호 	<p>-판매전략</p> <ul style="list-style-type: none"> • 무독성의 건식제품으로 매출극대화 • 질병예방가능 • 고품질의 친환경제품의 매출증대
<p>-수입대체효과</p> <ul style="list-style-type: none"> • 전체 수입건식 수입액의 50% 이상 수입대체가능 • 약물남용과 무독성에 대한 두려움해소 	<p>-수출증대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> • 중국, 미주,일본 등 한류인기에 대한 수출기회 획득으로 매출신장

다. 눈건강제품의 사업화 내용 및 일정

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> o 상용화 형태 : 건강기능식품 o 수요처 : 건강기능식품 제조 판매업체, 홈쇼핑, 인터넷판매업체, 방문 판매업체 등 o 예상 단가 : 1개월분 2만원 (B to B) - 수리는 제품을 판매전문회사에 샘플로 공급하여 판매 타진하고 있다. 판매 회사(TP글로벌 및 주식회사 유베이 등)와 안과(밝은세상 안과) 등지에 두릅추출물을 함유한 건강기능식품 (수리눈)제품을 공급하고 판매를 타진하였다. 조기 매출 달성을 위해 안과, 약국, on line 판매 조직 등과도 협의하고 있다. - 판매촉진을 위해 응모자를 대상으로 시험사용을 진행하여 복용 결과를 사용후기를 모니터링하여 PMS보고서를 작성하였다. - PMS보고서는 임상시험 윤리위원회에 인체적용시험심의를 위해 제출 하였다. - on line 판매를 위한 상세페이지를 제작하여 쿠팡에 입점하였음.

상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> ○ (주)메드빌은 건강기능식품 개발에 성공한 경험을 가지고 있음. ○ 적고구마를 이용한 다이어트식품 개발 성공 경험 보유
상용화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2019.11 ~ 2021.1: 임상시험 (중앙대학교 병원 안과) 코로나로 인한 기간 연장 ○ 2021년 상반기: 식약처 개별인정허가 신청 ○ 2021년 하반기: 식약처 개별인정심사 및 보완 ○ 2021년 말 ~ 2022년 초: 식약처 개별인정허가 획득 예정 ○ 2022년: 개별인정허가 획득 후 홈쇼핑 등 판매채널에 대한 사업권 계약 예정("A" 제약) ○ 2022년: 미국 수출 ○ 2022년: 약국 판매망 보유 회사와 계약 예정 ○ 2022년: 안과 병원용 제품 개발 및 판매 (안과 판매채널 보유 회사와 계약 예정) ○ 수출방안마련 VITA FOOD 등 전시회를 이용한 시장개척 중국: Agency를 통해 중국의 위생허가 신청을 거쳐 진입 시도

5. 판매 확대를 위한 새로운 시장 확보 방안 모색

본 과제 연구결과물을 활용하여 반려 동물을 위한 제품 개발이 가능하며, 반려 동물용 제품의 잠재적인 시장이 형성되어있는 것으로 판단된다.

본 과제에서는 반려견을 위한 제형개발을 추가적으로 진행하여 반려견이 잘 먹을 수 있는 추어블 정제로 개발하였다.

1) 동물용 식이제형 추어블 정제의 조성

성분명	배합량	처방목적
MDF101	50mg	주성분
스테아린산 마그네슘	15mg	활택제
미결정 셀룰로오스	120mg	부형제
포도당	70mg	감미제
사카린 나트륨	0.5mg	감미제
감초추출물	0.5mg	감미제
치즈혼합 분말	5mg	기호성 증진
건조효모	30mg	기호성 증진
가금부산물 건조분	105mg	기호성 증진
이산화규소	4mg	고결 방지제
합계	400mg	

2) 성상

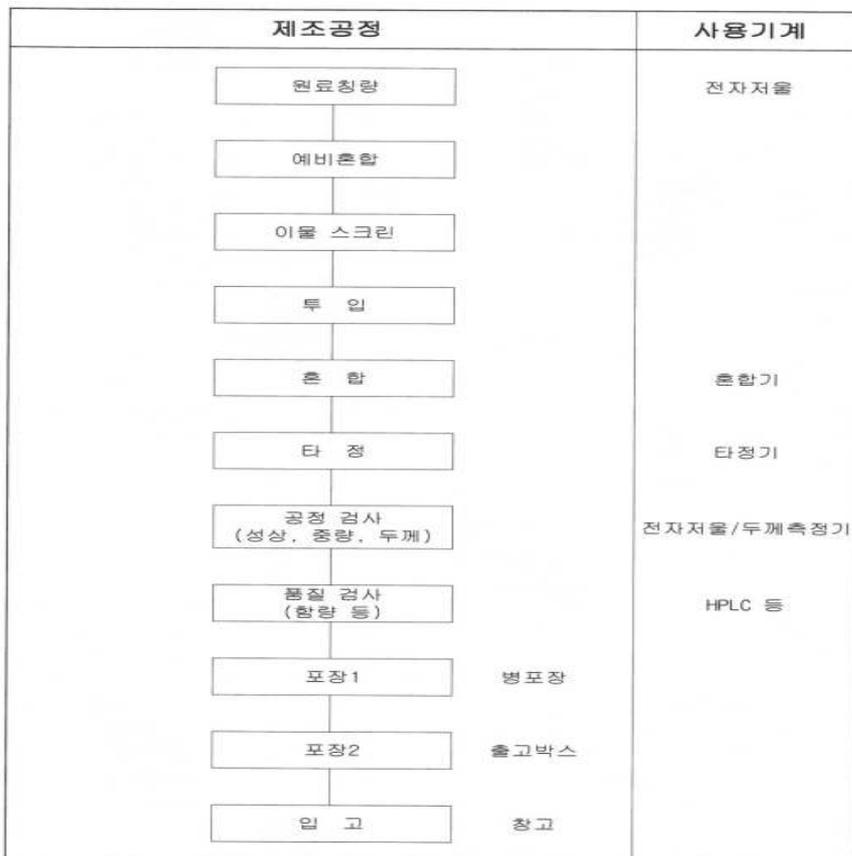
- 1) 크 기 : $\phi 10.5$
- 2) 모 양 : 원 형
- 3) 두 께 : $4.65 \pm 2.5\text{mm}$



3) 시제품 생산

- 1) 제조번호/제조일자 : MDF101-201125/ 2020.11.25.
- 2) 혼합량 : 1,200정(480g)
- 3) 생산량 : 1,000정(100정 × 10병)

4) 제조 공정도



6. 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.31억원
			향후 3년간 매출	억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	사업화 완료			
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.31억원			
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내			
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	반려동물을 위한 건강기능식품 개발 완료			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

구분	연도	연구개발의 목표
1차 년도	2017 (주관)	○ 연구개발 대상물질의 안전성 평가
		○ 연구개발 대상물질 성분 분석
		○ 기준 및 시험법 확립
	2017 (제1협동)	○ 기준 규격 확립을 위한 컨설팅
	2017 (제2협동)	○ 기능성 신소재의 망막증 개선 효능 분석
		○ 기능성 신소재의 망막증 작용기전 분석
○ 기능성 신소재의 안구건조증에 대한 효능 검증		
2차 년도	2018 (주관)	○ 기능성 신소재의 안전성 평가
		○ 활성분획으로부터 유효성분 분석
	2018 (제1협동)	○ 인체시험 진행
	2018 (제2협동)	○ 기능성 신소재의 망막증 개선 효능 분석
		○ 기능성 신소재의 망막증 작용기전 분석
	3차 년도	2019 (주관)
2019 (제1협동)		○ 개별인정신청을 위한 자료 확보
2019 (제2협동)		○ 기능성 신소재의 눈건강 개선 효능 분석
		○ 작용기전 분석

3-2. 목표 달성여부

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
1차 년도	2017 (주관)	○ 연구개발 대상 물질의 안전성 평가 ○ 연구개발 대상 물질 성분 분석 ○ 기준 및 시험법 확립	- 두릅추출물의 안전성평가 (유전, 4주DRF시험) - 두릅과 창이자의 기능/지표물질의 탐색 - 활성실험을 위한 분획 및 분리 물질 제공함 - 두릅과 창이자의 기능(지표)성분 분석 및 개발 - 두릅과 창이자의 지표물질에 대한 분석법 개발 및 분석법에 대한 Validation - 두릅과 창이자의 품질관리 기준 확보 - 두릅과 창이자의 물질에 대한 안전성 확보 -- 잔류 농약, 중금속 등	100%
	2017 (제1협동)	○ 기준 규격을 위한 컨설팅	기능성원료 기준 규격 확립 -기능성근거 문헌정보 확보 -원생약(원료물질)의 기원확립 -제조방법 표준화 -품질관리기준(기시) 설정	100%

	2017 (제2협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 신소재의 망막증 개선 효능 분석 ○ 기능성 신소재의 망막증 작용기전 분석 ○ 기능성 신소재의 안구건조증에 대한 효능 검증 	<p>-사람망막세포주에서 에피제네틱 유전체 변이에 연구개발 대상물질이 미치는 영향에 관한 연구</p> <p>1) 당뇨망막증과 황반변성의 주요 병환대상인 망막세포주에서 후성유전학적인 변이확인하고 두릅과 창이자추출물의 효능검증</p> <ul style="list-style-type: none"> - O-GlcNAcylation과 OGT발현변화 확인 - Clusterin promoter의 methylation확인 <p>2) 망막변성의 주요원인인 염증에서 두릅과 창이자 추출물의 항염증기전 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - ROS생성억제 효능 및 기전확인 - OGT와 AMPK 작용을 통하여 항염증 억제 기전 연구 <p>3) 안구건조증에서 두릅과 창이자추출물 효능 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> - 렌즈세포의 세포사멸 조절기전 분석 - 항산화기능 확인 	100%
2차 년도	2018 (주관)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 신소재의 안전성 평가 ○ 활성분획으로부터 유효성분 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 두릅추출물에 대한 13주 반복독성시험 - 두릅추출물의 기능성분 분석 및 특성 규명 (분획 혹은 물질에 대한 규명) - 두릅추출물 활성 분획의 최적 분리조건 규명 및 대량 분리 - 두릅추출물 대량생산 공정 개발 	100%
	2018 (제1협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체시험 진행 	<p>기능성 입증위한 인체적용시험 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> -임상요약서작성 및 MFDS사전상담 -SITE 선정 및 PI Matching -임상Protocol 개발 -임상수행(Monitoring, DM, SA) -임상결과보고서(CSR)작성 및 제출 	100%
	2018 (제2협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 신소재의 망막증 개선 효능 분석 ○ 기능성 신소재의 망막증 작용기전 분석 	<p>황반변성의 주된 원인세포인 인간망막세포주와 백내장의 원인세포인 렌즈세포주를 이용하여 항산화효능 분석</p> <p>1) 세포주기와 세포사멸 분석을 통한 두릅과 창이추출물의 효능 분석</p> <p>2) 두릅과 창이추출물의 분획분석을 통한 보다 효과적인 추출 및 투여용량 분석</p> <p>3) 추출물에서 혈중의 혈당과 지방의 양을 조절하는데 중요한 역할을 하는 OGT와 O-GlcNAcylation의 변화를 분석하여 새로운 기능의 신물질 개발</p>	100%
3차 년도	2019 (주관)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 신소재의 사업화 연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 두릅추출물에 대한 제형 개발 - 외주가공 업체 발굴 및 선정 (GMP시설) 	100%

			<ul style="list-style-type: none"> - 두릅추출물 제품디자인 연구 - 두릅추출물을 이용한 시제품생산 - 원료의 수급 및 생산대책 수립 	
2019 (제1협 동)	○ 개별인정신청을 위한 자료 확 보	<p>건기식개별인정형 기능성원료 인정신청</p> <ul style="list-style-type: none"> -기능성원료 기원 자료 구비 -원료의 특성 자료 구비 -제조방법 자료 구비 -기준및시험방법 자료 구비 -안전성관련 자료 구비 -기능성 관련 자료 구비 -유해물질 관련 자료 구비 -섭취량 관련 자료 구비 -국내외 인정 및 사용현황 자료 구비 	100%	
2019 (제2협 동)	○ 기능성 신소재 의 눈건강 개선 효 능 분석 ○ 작용기전 분석	<p>당뇨망막과 백내장 원인 세포주에서 두릅과 창 이추출물의 투여에 따른 망막과 렌즈신경세포에 서 항암과 항염증을 비롯한 새로운 효능물질 발 굴</p> <p>1) 이 두가지 물질에서 추출한 Flavoniod와 polyphenol 등의 phytochemical을 투여하여 이 들이 epigenetic change를 억제 또는 예방하는지 를 확인.</p> <p>2) OGT - antagonist를 비롯한 억제제를 이용하 여 염증억제를 통한 당뇨망막증의 발병억제의 예방 및 치료가능 확인.</p>	100%	

성과 목표											연구기반지표100%								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍 보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	10				10	20	20	10					5	5	5		5	
최종목 표	2	1				1	20		2					2	1	2		2	1
1차년도																			
2차년도	1								1										
3차년도	1	1				1	20	10	1					2	1	2		2	1
4차년도																			
5차년도																			
합 계	2	1				1			2					2	1	2		2	1
달성	2	1				1	31.45	0	2					2	1	2		0	1
달성도 (%)	100 %	100 %				100 %	100 %	0 %	100 %					100 %	100 %	100 %		0 %	100 %

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

- 3차년도에 홍보, 전시 2건과 수출액 10백만원 목표였으나 코로나로 인해 해외전시회 참석과 해외바이어 미팅이 모두 무산되어 목표를 달성하지 못하였다.
- 판로 확대를 위해 반려동물을 위한 건강기능식품으로도 판매를 추진하고 있어 이를 위해 1차적으로 정제로 제형개발을 하였다.
- 판매망과 소비자에 따라 적절한 제형을 개발하기 위한 추가적인 연구개발이 필요하다고 판단됨.
- 현재까지 두릅추출물을 활용하여 건강기능식품으로 개발을 진행하였지만 두릅추출물이 탁월한 효능을 나타내는 당뇨병 망막증 분야에서는 추출물을 좀더 정제하여 의약품으로 개발하는 것이 필요하다고 판단된다.
- 당뇨 환자의 증가로 당뇨병 치료제에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있으나 아직까지 당뇨 합병증에 따른 전문 치료제가 존재하지 않으므로 두릅추출물을 활용한 당뇨병 망막증 치료제의 개발은 시장성이 좋고 유망한 분야라고 할 수 있다.

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

1. 기술적 측면

- 본 과제를 수행하는 과정에서 확보된 자료들은 우수한 눈건강제품 개발을 위한 기초자료로 활용되는 동시에 향후 개별인정을 받아 원료로 판매하거나 완제품을 판매하는데 필요한 마케팅 자료로 활용할 예정이다.
 - 본 과제에서 개발된 두릅 추출물은 눈건강제품의 원료로 사용되어 사업화되었으며 매출이 발생하였다. 개별인정허가가 완료되면 원료와 제품으로 판매하는데 유리할 것으로 판단된다.
 - 본 과제를 수행하는 과정에서 확보된 원천기술들은 앞으로 두릅추출물을 활용한 당뇨성 망막증을 위한 신약개발의 기초자료로 활용할 예정이다.
- 당뇨병성 망막증의 경우 선진국의 노동 인구에서 가장 흔하게 발생하는 실명원인이며, 제2형 당뇨의 20%가 당뇨병성 망막증으로 진단받는 것으로 알려져 있다.
 - 현재 당뇨병성망막증에 사용되는 물질로는 블루베리 추출물로부터 분리한 생약제제와 폴리페놀계 화합물을 변형한 화학제제가 있지만 아직까지 그 효능이 미약하고 직접적으로 당뇨망막증에 미치는 작용기전이 밝혀져 있지 않은 상태로 사용되고 있다. 여러 가지 새로운 생약제제나 효능을 높이기 위한 복합제제 투여 방법 등이 연구되고 있으나 초보적인 수준이다.
 - 당뇨병성 황반부종은 당뇨병성 황반부종은 당뇨병 환자들에게 가장 흔하게 발병하는 눈 합병증인 당뇨병성 망막병증의 주요 증상 중의 하나다. 당뇨병성 황반부종은 중대한 시력의 손상으로 이어질 수 있다.
 - 당뇨병성 황반부종으로 인한 시력 장애는 당뇨병 환자의 약 1~3%에서 나타나며 이는 선진국의 경제활동 연령층 시력상실의 주된 원인이 되고 있다. 황반부종은 시력소실을 가져오는 주된 원인으로 환자 수가 급증하고 있는 것에 비해 적합한 치료제가 거의 없는 실정이다.
 - 현재 루센티스 정도가 당뇨병성 황반부종으로 인해 시력이 손상된 환자들의 시력을 개선시키는 것은 물론 환자의 삶의 질 향상에 유의한 효과를 보인 최초의 허가받은 당뇨병성 황반부종 일차치료제가 된 정도이다.
 - 황반부종은 시력소실을 가져오는 주된 원인으로 환자 수가 급증하고 있는 것에 비해 적합한 치료제가 거의 없는 실정이다. 루센티스는 제넨테크사와 노바티스가 공동개발했으며, 전 세계 85개국 이상에서 습성 연령관련 황반변성 치료제로 사용되고 있다.
 - 해외에서 당뇨병성 망막증 치료제에 대한 여러 연구가 진행되고 있으나, 천연물 신소재를 활용한 제품에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서, 시장성에서 볼 때 천연물 신소재를 이용한 당뇨병성 망막증 치료제의 개발은 국제적으로도 획기적인 연구가 될 수 있다.
 - 본 과제에서 개발하고자 하는 두릅추출물은 이제까지의 효능 결과를 볼 때 당뇨병성 안질환에 대해 효과적으로 대응할 수 있는 가능성이 높다고 판단된다.

○ 두릅과 창이자 추출물로부터 O-GlcNAcylation 조절을 확인하여 후성유전학에 바탕을 둔 망막질환의 연구는 매우 독창적이다.

- 당뇨와 비만에서 대사불균형으로 유도되는 O-GlcNAc modification이 여러 가지 질병의 원인이 된다는 사실이 밝혀짐으로서 새로운 연구분야로 대두되었다.
- 당뇨망막증의 연구에 epigenetic modification을 확인하여 당뇨망막증의 발병기전 및 예방과 치료기전 사이의 연관관계를 규명하는 연구는 획기적인 연구여서 본 과제에서 수행한 연구 결과를 논문으로 발표하였다.
- 본 연구를 통하여 당뇨에 의해 유발되는 합병증의 발병기전 규명에 기여하였으며, 항산화 Phytochemicals들의 효능을 확인함으로써 새로운 예방과 치료제 개발에 기여할 것으로 기대된다.
- 본 연구에서 새로운 눈건강 기능성원료로 타진된 창이자 추출물은 추가적인 연구개발을 통해 두릅추출물에 이어서 우수한 효능을 가진 원료가 될 것으로 기대된다.
- 기능성원료인 두릅추출물의 지표성분 설정 등 제조, 품질관련 표준화를 이룩하였고 인체적용 시험을 통한 기능성원료의 기능성(안구건조증 개선) 입증에 한계가 있었지만 향후 당뇨합병증 눈질환 예방, 당뇨병성 백내장 발생 억제 등으로 기능성 확장연구가 필요할 것으로 사료된다.

붙임. 참고문헌

1. 약초의 성분과 이용, 최옥자 (펴낸이), 과학·백과사전 출판사주음, 일월서각, p634-635, 1994.
2. 한국 본초도감, 안덕균저, (주)교학사, p19, 1998.
3. 한국의 약용식물, 배기환저, (주)교학사, p514, 1999.
4. “비임상시험관리기준” 식품의약품안전처 고시 제 2018 - 93 호(2018 년 11 월 21 일)
5. “OECD Principles of Good Laboratory Practice” Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM (98)17(as revised in 1997)
6. “건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정” 식품의약품안전처 고시 제 2018-73 호(2018 년 10 월 12 일)
7. “의약품등의 독성시험기준” 식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호(2017 년 08 월 30 일)
8. “OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, TG 408 (25 June 2018) ‘Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents’
9. ATSDR-Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2008). Toxicological profile for cresols. U.S. Public Health Service in collaboration with U.S. Environmental Protection Agency (EPA).
10. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 9(11), 633.
11. CentralBio-Historical Control Data-Repeated Dose Toxicity, 2020.01.30.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 두릅과 창이자를 이용한 눈 건강증진 식품소재 발굴 및 개별인정형 기능성 신제품 개발						
	(영문) Discovery of new health food materials for eye protection using Aralia and Xanthium, and development of new products						
주관연구기관	(주)메드빌		주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주)메드빌			
참 여 기 업	(주)메드빌, 서초씨알오(주)			(성명) 홍은경			
총연구개발비 (1,023,335천원)	계	1,023,335천원	총 연 구 기 간	2017.11.01.~2021.01.31.(3년 3월)			
	정부출연 연구개발비	700,000천원		총 인 원	35명		
	기업부담금	323,335천원		총 참 여 수 연 구 원 수	내부인원	33명	
	연구기관부담금				외부인원	2명	

○ 연구개발 목표 및 성과

- 두릅과 창이자를 이용한 눈 건강증진 식품소재 발굴 및 개별인정형 기능성 신제품 개발
- 본 연구는 눈 건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 기능성원료를 발굴하고 그 원료를 활용한 눈건강에 도움을 줄 수 있는 제품을 개발하는 것이다.
- 눈 건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 기능성원료 확보 (두릅추출물, 창이자추출물)
- 기능성 소재의 후보물질인 두릅추출물, 창이자 추출물 등의 효능과 작용기전 연구
- 두릅과 창이자추출물의 눈건강기능식품 원료화
- 두릅추출물을 활용한 눈건강증진 건강기능식품 개발 및 산업화

○ 연구내용 및 결과

- ① 우수한 효능을 나타내는 눈건강 개선 물질 확보
 - 두릅추출물과 창이자추출물을 대상으로 안구건조증에 대한 우수한 효능이 있음을 확인하였음.
 - 두릅과 창이자추출물의 분획분석을 통한 보다 효과적인 추출 및 투여용량 분석
- ② 기능/지표물질의 확립 및 품질표준화
 - 두릅추출물과 창이자추출물을 대상으로 물질의 품질을 관리하기 위한 지표물질을 도출하였음
 - 지표물질에 대한 분석법을 확립하고, 분석법에 대한 validation을 완료하였음.
- ③ 두릅과 창이자추출물의 눈건강기능식품 원료화
 - 두릅과 창이자추출물의 품질관리방안 확립
 - 두릅추출물의 대량생산체계 확립
 - 두릅추출물과 창이자추출물의 대량생산 공정을 확립하고 제형개발 및 디자인개발을 통해 실제 제품을 생산하여, 시장의 요구를 충족할 수 있는 요건을 확보하였음.

④ 두릅과 창이자추출물의 효능 검증 및 기전 연구

㉠ 당뇨망막증과 황반변성의 주요 병환대상인 망막세포주에서 후성유전학적인 변이확인하고 두릅과 창이자추출물의 효능검증 - 사람망막세포주에서 에피제네틱 유전체 변이에 연구개발 대상물질이 미치는 영향에 관한 연구

- O-GlcNAcylation과 OGT발현변화 확인
- Clusterin promoter의 methylation확인

㉡ 망막변성의 주요원인인 염증에서 두릅과 창이자 추출물의 항염증기전 연구

- ROS생성억제 효능 및 기전확인
- OGT와 AMPK 작용을 통하여 항염증 억제 기전 연구

㉢ 안구건조증에서 두릅과 창이자추출물 효능 확인

- 안구건조증 모델에서 연구개발 대상물질의 효능 검증
- 각막상피세포가 고삼투압의 환경에 노출되게 되면 세포사가 증가하면서 세포생존성이 감소하고, 산화스트레스 및 염증 인자들이 활성화되는 것을 확인하였다.

㉣ 기전연구 - TonEBP와 NF-kB의 망막에서 발현여부확인

- TonEBP의 발현과 세포핵내로의 이동이 증가하고 그에 따라 NF-kB의 활성화도 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, TonEBP의 발현이 세포사와 관련이 있다는 것을 알 수 있었다.
- 두릅추출물을 전처리한 각막상피세포에서는 이러한 대조군에 비해 세포생존성이나 이동성이 증가하였으며, 산화스트레스나 염증 인자들의 활성화는 줄어들었으며, TonEBP 활성화나 핵내 이동은 감소시켜 세포사멸사를 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다.

⑤ 두릅추출물을 이용한 건강기능식품 개발 및 사업화

- 두릅추출물을 대상으로 안구건조증에 대한 인체적용시험 수행
- 중앙대학병원, 안과, 대상인원: 40명 대조군 20명, 시험군 20명

⑥ 창이자추출물에 대해서는 전임상 효능 자료를 확보하였고, 물질의 품질을 관리하기 위한 지표물질 도출 등 대량생산을 위한 기반을 확보하였음.

⑦ 두릅추출물을 이용한 건강기능식품 생산 및 판매

○ 연구성과 활용실적 및 계획

① 두릅추출물의 우수한 효능을 토대로 특허를 출원하였고, 해외 시장진출 가능성이 높아 PCT 출원도 완료하였음.

② 눈 건강제품의산업화

- 두릅추출물을 대상으로 원료 확보 및 대량생산체계를 구축하였으며 추출물을 활용하여 눈건강제품 “수리눈”을 출시하여 연구기간내 매출성과를 창출하였음.
- 현재 미국 판매를 위한 판매회사와 접촉중이며 향후 수출 가능성이 높다고 판단됨.
- 스마트폰 사용의 증가와 노화에 따르는 안구건조증과 같은 눈질환이 급격히 증가하는 현실에 눈질환 예방과 치료에 큰 도움 예상
- 삶의 질 향상
- 백내장과 녹내장에서도 두릅과 창이자의 항산화 효과 확인

주 의

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