

발간등록번호

11-1543000-000815-01

**골대사 조절 핵심 유전자의 발현 조절 효능을 가진 골다공증
예방 및 증상 개선 기능성 식품 개발 및 상품화**

(Development of functional foods having an effect on prevention
and improvement of osteoporosis via regulating the key gene
expression associated with bone metabolism)

(주)동우당제약

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “골대사 조절 핵심 유전자의 발현 조절 효능을 가진 골다공증 예방 및 증상 개선 기능성 식품 개발 및 상품화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 1 월 23 일

주관연구기관명 : (주)동우당제약

주관연구책임자 : 허 담

연 구 원 : 박진혁

연 구 원 : 이지원

연 구 원 : 김재성

협동연구기관명 : 아주대학교

협동연구책임자 : 정선용

요 약 문

I. 제 목

골대사 조절 핵심 유전자의 발현 조절 효능을 가진 골다공증 예방 및 증상 개선 기능성 식품 개발 및 상품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 골다공증은 폐경에 따른 급격한 호르몬의 변화에 의한 파골세포(osteoclast)의 활성화에 따른 골흡수 증가로 나타나는 폐경 후 골다공증과, 노화가 되면서 조골세포(osteoblast)의 기능이 감소하여 골형성이 감소하는 노인성 골다공증으로 분류할 수 있으며, 유전적 요인과 환경적 요인이 함께 작용하는 대표적인 만성질환임. 골다공증으로 인한 골절은 심각한 활동 제한에 이르게 되고, 고관절 골절의 경우 높은 사망률과 관련되어 있기 때문에, 골다공증성 골절이 발생하기 이전에 골다공증의 조기진단, 예방 및 치료가 매우 중요함.
- 고령화에 영향으로 국내의 골다공증 유병률이 최근 5년간 급속하게 증가되었고, 골다공증 골절에 의한 연간 사회경제적 손실이 매우 심각한 수준에 이르고 있다고 보고됨. 국내의 골다공증 유병률이 최근 5년간 급속하게 증가되었고, 골다공증 골절에 의한 연간 사회경제적 손실이 매우 심각한 수준에 이르고 있다고 보고됨. 골다공증환자는 여자에서 남자보다 약 4배 정도 더 많이 발생하며, 65세 이상 여자 10명중 약 6명이 골다공증 환자로 보고됨.
- 현재 세계적으로 가장 많이 사용되는 골다공증 치료제로는 비스포스네이트 등의 약제가 있으나, 부작용이 많아 장기 투여가 어려우며, 새로운 뼈 생성에 의한 골밀도 증가에는 큰 역할을 하지 않는다는 단점이 있음. 또한, 한국인의 골밀도 관련 유전적인 소인을 고려한 치료제의 개발이 필요함. 따라서, 부작용이 없어 장기 치료가 가능하고 우수한 효능을 보이는 천연물 유래의 골다공증 치료가 가능한 기능성 식품의 개발에 대한 필요성이 높음.
- 본 연구개발에서는 국내 천연식물(식품등록 약용작물)로부터 골다공증 증상을 개선시킬 수 있는 유용한 식품소재의 탐색과 효능 최적화를 통해 건강증진식품을 개발하고 이를 상품화하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

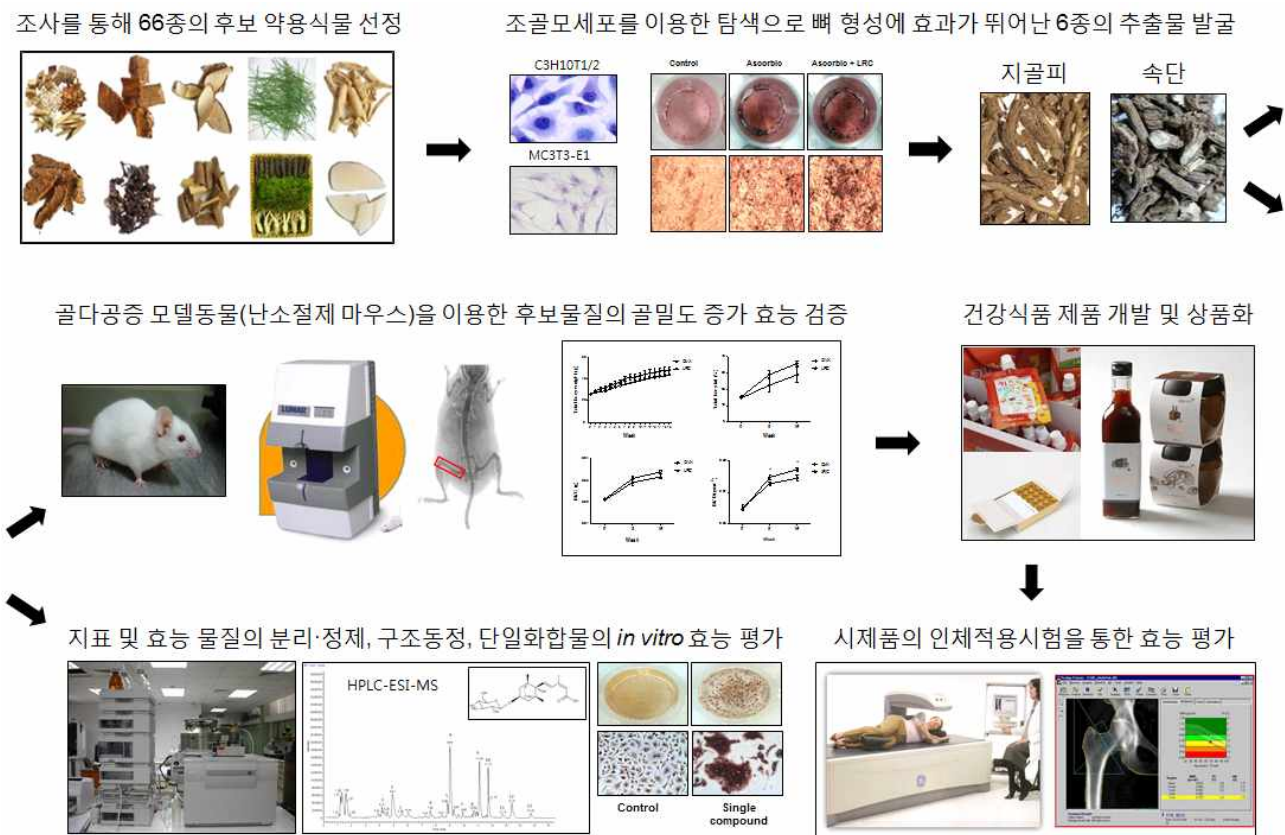
- 문헌 검색과 전문가 자문을 통해 골다공증 치료에 효과적으로 예상되는 식품등재 약용작물을 선별하여, 세포실험을 통한 탐색을 실시하여 골형성에 효능이 있는 식품소재를 후보를 선정함. 골대사 조절 마커의 변화와 선행연구에서 동정된 한국인 골밀도 연관 핵심유전자(key gene)의 발현 변화를 분석하여 효능이 뛰어난 식품소재 후보를 최종 선정함.

- 선정된 식품소재의 효능 극대화 방안(혼합 등)에 대해 연구함.
- 골다공증 마우스 동물 모델(난소절제에 의한 골다공증 유발 모델)을 이용하여 후보 물질의 효능을 평가함.
- 최종 선정된 식품소재에서 주요 효능물질을 분리하여 구조를 동정함.
- 효능물질을 이용하여 골다공증 세포 모델에서 골대사 조절 기전에 대해 연구함.
- 대량 생산을 위한 식품소재의 추출방법 및 수율 최적화 기술을 확립하고 다양한 시제품을 개발함.
- 인체적용시험(간이 임상시험)을 통한 인체에서의 시제품의 효능을 평가함.
- 관능평가, 저장성 평가 등을 통하여 완제품 생산
- 식품 원료 수급 방안 마련과 상품화

IV. 연구개발 결과

- 다양한 문헌 조사, 특허 검색, 전문가 자문을 통하여 총 66종의 식품소재(식품등록 약용자물)를 선별하여 소재 적합성 시험을 거친 후 실험에 사용할 수 있는 상태로 추출과 농축하여 실험 재료로 사용하였음. 조골모세포(osteoblast)로 분화 가능한 중간엽줄기세포주(C3H10T1/2)와 조골세포(osteocyte)로 분화하는 조골모세포주(MC3T3-E1)에 66종의 식품소재를 처리하여 alkaline phosphatase(ALP)의 활성을 측정하여 조골세포 분화 효능을 측정하고 MTT assay로 세포 독성을 측정하여 각 세포주에 효능이 있는 상위 각 3종의 총 6을 선정함. 효능 극대화를 위해서, 2종류씩 혼합하여 2종의 세포주에서 조골세포 분화 효능과 세포독성을 재분석하여 최종적으로 4종의 식품소재(지골피, 지골피+속단, 우슬+희렴, 상심자+독활)를 선정하였으며, 이들에 대해 국내특허를 출원하여 이중 3 건이 등록됨.
- 4종 식품소재에 대해 8주간 단기 투여 동물실험(난소를 적출하여 제작한 폐경성 골다공증 모델 마우스)을 통해 효능이 좋은 2종의 식품소재(지골피, 지골피+속단)을 선정하였음. 후속으로 16주간 장기 투여 동물실험을 통한 정밀분석을 통해, 지골피, 지골피+속단이 골밀도 개선 효과가 현재 판매되고 있는 골다공증 건강식품(양성대조군)보다 더 우수하다는 결과를 얻음.
- 지골피와 속단 추출물에서 주요 유효성분을 분리 추출하여 그 화학 구조를 동정하였음. 지골피 추출물에서 3종의 화합물(scopolin 유사체, scopolin, dihydrophaseic acid 3'-O-b-D-glucopyranoside)이 속단 추출물에서 1종의 화합물(loganin)이 조골세포 분화능이 있는 단일 효능물질로서 분리 동정됨.
- 지골피와 속단 추출물에서 분리 동정된 단일 화합물에 대한 골형성 및 골흡수 *in vitro* 유효성 평가를 실시하여, dihydrophaseic acid 3'-O-b-D-glucopyranoside는 조골세포 및 파골세포 분화를 모두 증대시켜 골대사율을 활성화시키는 것으로 밝혀졌으며, scopolin과 loganin은 조골세포 분화를 증대시키고 파골세포 분화를 억제시키는 것으로 밝혀짐.

- 상기의 모든 결과를 종합하여 최종 제품 개발 대상을 지골피로 결정함. 제품화를 위한 지골피의 대량 추출 공정 개발과 수율 최적화 기술을 확립하고 3종의 시제품(지골피 환, 지골피 함유 파우치, 지골피 함유 된장)을 개발함. 또한, 시제품의 레시피 개발, 관능평가, 디자인 개발, 설문 조사, 시험분석을 실시함.
- 골감소증 여성 22명에서 지골피의 유효성 및 안전성 평가를 위한 24주, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험을 실시함. 지골피 환 투여군이 위약 투여군에 비해 골밀도가 덜 감소하고 골형성 마커인 ALP, steocalcine이 증가하는 경향성은 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었음. 하지만, 골밀도와 골형성 마커에서 유효한 경향성이 나타났기 때문에 향후 더 많은 피험자를 대상으로 시험한다면 좋은 경과가 있을 것으로 기대됨.
- 3종의 골다공증 예방 및 증상 개선을 위한 건강식품(지골피 환, 튼튼된장, 키즈 밸런스 탑)의 완제품을 개발하여 상품화 함. 홍보 및 마케팅 전략을 수립하였으며, 이미 제품 판매를 통한 매출이 발생함. 완제품에 대한 시장 반응이 좋아 향후 대폭적인 매출 증대가 기대됨.
- 연구개발 결과의 그래픽 요약



V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 특허 등록 3건, SCI 논문 발표 2편, 기술실시 1건, 인력양성 2명, 신규 인력 채용 10명(일자리 창출) 등의 연구 성과를 달성함
- 3종의 골다공증 예방 및 증상 개선을 위한 건강식품(지골피 환, 튼튼 된장, 키즈 밸런스 탭)의 제품 개발 및 상품화로 현재까지 약 7,800만원의 매출 실적을 달성함.
- 개발된 지골피 추출물 함유 건강식품은 골다공증 치료제의 건강 보조 식품으로서의 활용 가치가 매우 높을 것으로 기대됨.
- 골다공증 예방에도 활용함으로써 국가적인 의료비 절감과 환자의 삶의 질 향상에 크게 기여할 것으로 기대됨.
- 국내 자생의 구기자나무의 뿌리(열매 소출 저하 시 뽑아 버려지는 농림 부산물)를 활용함으로써 재배 농가의 부가적인 수익 확대에 기여할 것으로 기대됨.
- 후속 연구에서 독성 평가 및 대규모 인체적용시험을 통해 유효성이 명확히 증명되어 식품 안전처에서 기능성 건강식품으로서 개별 인정을 받게 되면, 국내 매출 증대와 더불어 외국 수출까지 판매시장의 확대가 가능하게 될 것으로 기대됨.

SUMMARY

Osteoporosis is a common skeletal disease caused by decreased bone mass; it enhances the risk of bone fracture. This study aimed to discover novel herbal extract(s) for the treatment of osteoporosis. We screened 66 ethanol extracts of edible plants native to Korea for their ability to increase the cellular proliferation and differentiation of two osteoblastic cell lines: C3H10T1/2 and MC3T3-E1. We finally selected one herbal extract (*Lycii Radicis Cortex*) and three combinations of herbal extracts (*Lycii Radicis Cortex* + *Dipsaci Radix*, *Radix Achyranthis* + *Herba Siegesbeckiae*, and *Aralia Continentalis* + *Morus Alba L.*) as the meaningful candidates. Among them, a *Lycii Radicis Cortex* (LRC), *Lycium Chinese* root bark was demonstrated to have the best effect on osteoblastogenesis of both osteoblastic cell lines. Treatment with LRC extract showed enhanced alkaline phosphatase (ALP) activity and increased expression of bone metabolic markers *Alpl*, *Runx2*, and *Bglap* genes in both cell lines. There was no effect on the osteoclastic differentiation of primary-cultured monocytes from the mouse bone marrows. Furthermore, the study examined the effect of LRC extract *in vivo* in ovariectomized (OVX) mice for 8 weeks and 16 weeks, respectively. Bone mineral density (BMD) was significantly higher in LRC extract-administered group than in the non-LRC-administered OVX control group. The results indicated that LRC extract prevented the OVX-induced BMD loss in mice via promoting the differentiation of osteoblast lineage cells.

Next, we carried out a fractionation of the extract to identify the bioactive compound(s) responsible for the bone formation-enhancing effect of the LRC extract. Two single compounds, dihydrophaseic acid 3'-O- β -D-glucopyranoside and scopoline were isolated from the LRC extract as a candidate component enhancing the osteoblast differentiation. The bioactivity of the isolated compounds were tested in the osteoblastic MC3T3-E1 cells.

Finally, we performed the clinical trial of the LRC-containing food for investigating the effects of LRC on bone properties in human volunteers. Thirty nine postmenopausal woman participants were screened by bone mineral density (BMD) levels at lumbar spine (L1-L4), femur neck, and total hip using dual-energy X-ray absorptiometry with standard protocol at Ajou University Hospital. Total 22 participants were recruited as the study subjects. The participants ate the test food containing LRC or placebo food during six months and were examined bone properties including BMD levels and bone turnover markers in blood for two times at after 3 and 6 months. Although BMD change amount and osteoblast differentiation marker ALP and osteocalcin levels were higher in the group having test food than the group having placebo food, there was no statistical significance.

In conclusion, this is the first report demonstrating the effect of LRC extract on bone formation *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that LRC extract may be a good natural herbal medicine candidate for the treatment of osteoporosis, but with fewer side effects than traditional medications.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1	Introduction -----	1
Chapter 2	Overview of current research status of in this field -----	9
Chapter 3	Contents and results of research and development -----	12
Chapter 4	Achievement of goals and implications for related research -----	94
Chapter 5	Research and development outcomes and their application plan -----	97
Chapter 6	Scientific and technical information from abroad -----	100
Chapter 7	Facility and equipments -----	102
Chapter 8	References -----	103

목 차

제 1 장	연구개발 과제의 개요 -----	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	9
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과 -----	12
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	94
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	97
제 6 장	연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	100
제 7 장	연구시설·장비 현황 -----	102
제 8 장	참고문헌 -----	103

제 1 장. 연구개발 과제의 개요

1. 연구의 개요

□ 골다공증(osteoporosis)

- 세계보건기구(WHO)는 골다공증을 “골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환으로, 결과적으로 뼈가 약해져서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환”으로 정의함.
- National Osteoporosis Foundation에서는 “골강도의 약화로 골절의 위험성이 증가하게 되는 골격계 질환”으로 규정함(www.nof.org).
- 골강도는 골량(quantity)과 골질(quality)에 의해 결정됨.
- 골량은 주로 골밀도(bone mineral density)로 나타내고, 골질은 구조, 골교체율, 무기질화, 미세 손상 축적 등으로 구성됨.
- 정상인과 비교했을 시에 골다공증 환자에서 뚜렷한 골량의 감소와 골강도의 약화가 확인되며, 몸의 중요 부위에 골절이 쉽게 일어날 수 있음(그림 1).
- 골다공증은 폐경에 따른 급격한 호르몬의 변화에 의한 파골세포(osteoclast)의 활성화에 따른 골흡수 증가로 나타나는 폐경 후 골다공증과, 노화가 되면서 조골세포(osteoblast)의 기능이 감소하여 골형성이 감소하는 노인성 골다공증으로 분류할 수 있음.

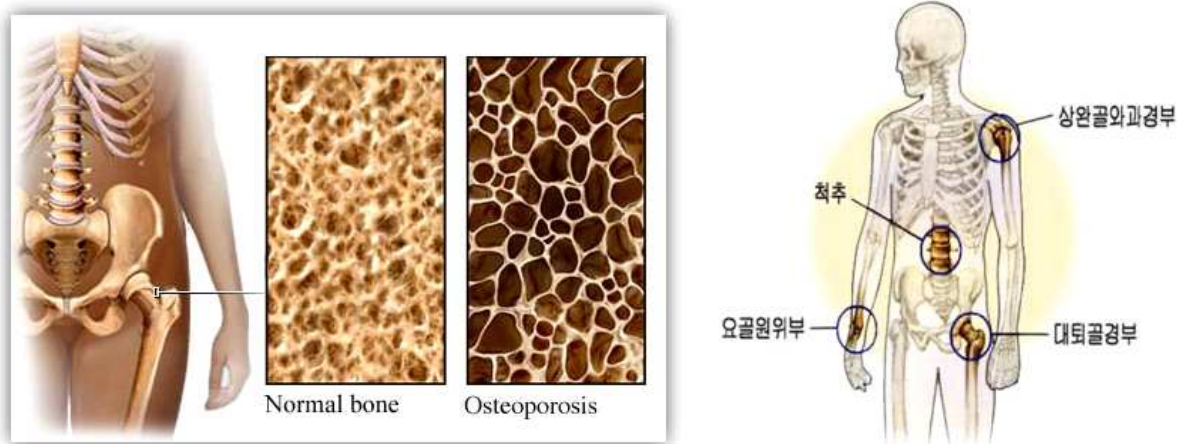


그림 1. 정상인과 골다공증 환자의 골조직 비교와 골절이 되기 쉬운 부위
(www.osteoporosis.net)

□ 골다공증 유발 위험요소

- 골다공증은 다수의 환경 및 유전 인자들의 상호 작용으로 나타나는 대표적인 ‘다인자성 복합 질환’임

- 골다공증 발생에는 많은 환경적 인자들이 영향을 미치고 있으나 그 중에서도 가족력이 매우 중요한 인자라는 사실은 골다공증 병인에서의 유전인자의 중요성을 반증함.
- 유전적 영향: 골다공증 발생의 ~50%가 유전적 소인에 영향을 받음. 골대사 기전에 관여하는 많은 유전자 다형성(polymorphism)의 차이에 기인함(WHO 2011).
- 환경적 영향: 음식, 운동, 음주, 흡연, 칼슘부족, 폐경, 비만, 노화 등이 있음.

□ 골다공증이 여성에서 많이 발생하는 이유

- 골흡수(bone resorption)와 골형성(bone formation)의 균형이 깨어질 때, 즉 골흡수가 골형성보다 많아 질 때 골다공증이 유발됨. 여성은 남성보다 체내 골량 및 칼슘량이 적고, 연령증가에 따른 체내 칼슘량 감소, 임신과 출산시의 칼슘 소실 등의 골다공증 유발 요인이 많음(그림 2).
- 여성의 경우 특히 폐경 이후 급격한 골소실이 진행되는데, 이는 여성 호르몬의 결핍으로 급격한 골흡수가 원인이며, 이후 노화로 골형성 기능이 점차 감소되어 골 소실이 지속됨.

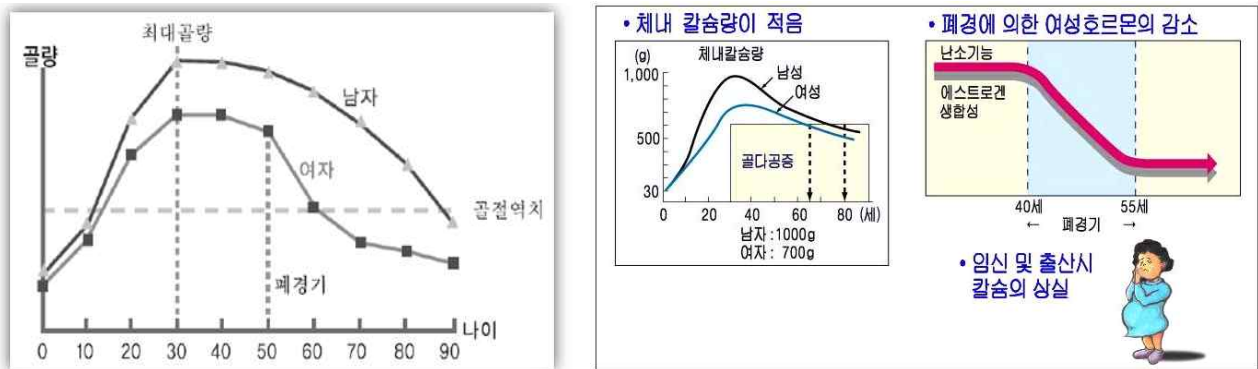


그림 2. 연령에 따른 체내 칼슘량, 최대 골량, 여성호르몬 량
(대한골대사학회, 골다공증 진단 및 치료 지침)¹⁾

□ 골량의 생애 주기 변화와 골다공증 유발인자

- 골다공증의 진단 기준이 되는 골량은 평생 동안 골 형성, 성장 및 골 재형성의 과정을 거치면서 변화함
- 최대 골량이 형성되기 전까지는 골형성이 골흡수보다 많아 전체적으로 골량이 증가되며, 이러한 골량의 증가는 특히 사춘기 이후에서 가장 왕성하고, 이십대 중반 또는 삼십대 초반의 청장년 시기에 최대 골량이 형성(그림 2).
- 최대 골량 형성 이후에는 연령 증가에 따라 점차적인 골 소실이 진행됨(그림 2).
- 30세에서 50세까지는 대체로 골량이 유지되며 단지 소량의 골량 감소만 관찰되는데, 이는 낡은 뼈를 제거하는 골흡수와 새로운 뼈를 만드는 골형성이 평형을 이루기 때문임.
- 최대 골량은 약 50~85% 정도의 강한 유전적 성향을 가진다고 알려져 있으며, 유전적 영향은 최대 골량 형성기뿐만 아니라 그 이후에도 지속됨²⁾.

□ 골재형성(bone remodeling) 기전

- 조골 및 파골세포에 의한 골재형성에 의해 골대사(bone metabolism)의 항상성이 유지됨³⁻⁵⁾ (그림 3).
 - 파골세포(osteoclast)의 활성화와 파골세포에 의한 골흡수(1단계)
 - 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)로부터 골전구세포(osteoprogenitor cell), 조골세포(osteoblast), 골세포(osteocyte)로의 분화로 골형성 시작(2단계)
 - 골조직(osteoid)의 무기질화(mineralization) 및 골세포(osteocyte)와 골표면세포(bone-lining cell)의 네트워크 연결(3단계)
- 파골세포에 의한 골흡수 관련 인자
 - RANK(Receptor Activator of Nuclear factor κ B) signaling pathway에 의해 조절됨³⁻⁵⁾(그림 4).
- 조골세포에 의한 골형성 관련 인자
 - BMP(bone morphogenic protein), TGF β , Wnt signaling pathway 관련 단백질 등 많은 인자들에 의해 조절됨³⁻⁵⁾(그림 4).

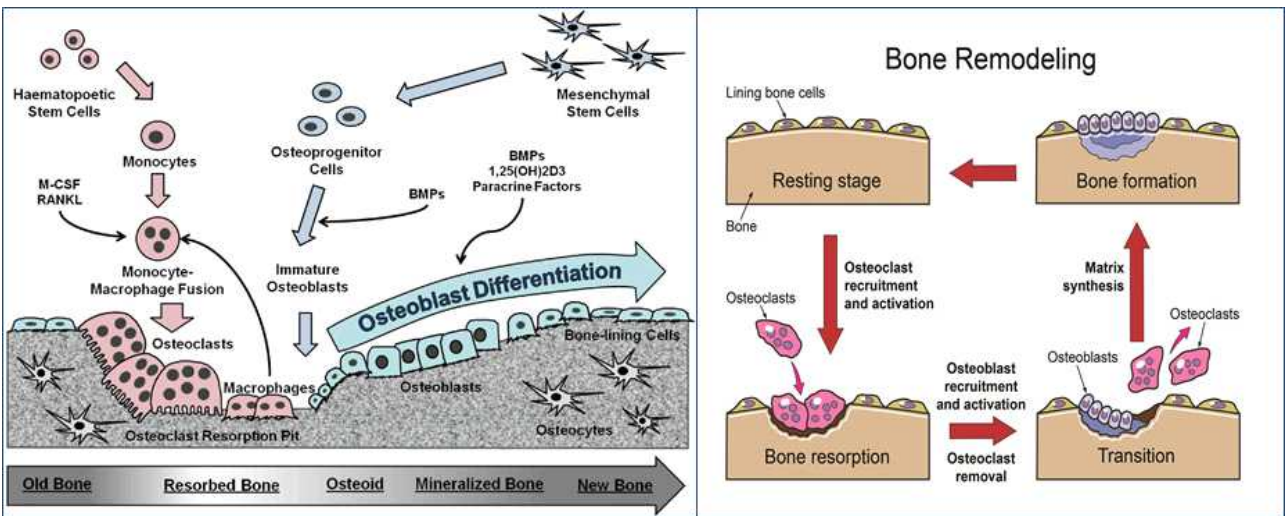


그림 3. 골재형성 과정³⁾

□ 조골세포 및 파골세포 분화와 비만

- 조골세포와 지방세포가 모두 중간엽줄기세포에서 분화되기 때문에, 골다공증과 비만과는 밀접한 상관관계가 있음⁶⁻⁸⁾(그림 4).
- 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)에서 조골세포와 지방세포(adipocyte)로 분화되며, 이 분화과정에는 DLX5, MSX1, RUNX2, CEBP, PPAR γ 등의 조절인자들이 관여함⁶⁾.
- 조혈모세포(hematopoietic stem cell)에서 파골세포로 분화됨⁶⁾.
- 비만은 만성염증과 관련이 있으며, NF- κ B(RANK)/RANK ligand(RANKL)/osteoprotegerin(OPG) pathway를 통한 파골세포 활성화로 인한 골흡수의 증가는 골다공증 유발과 관련이 많음^{7,8)}(그림 4).

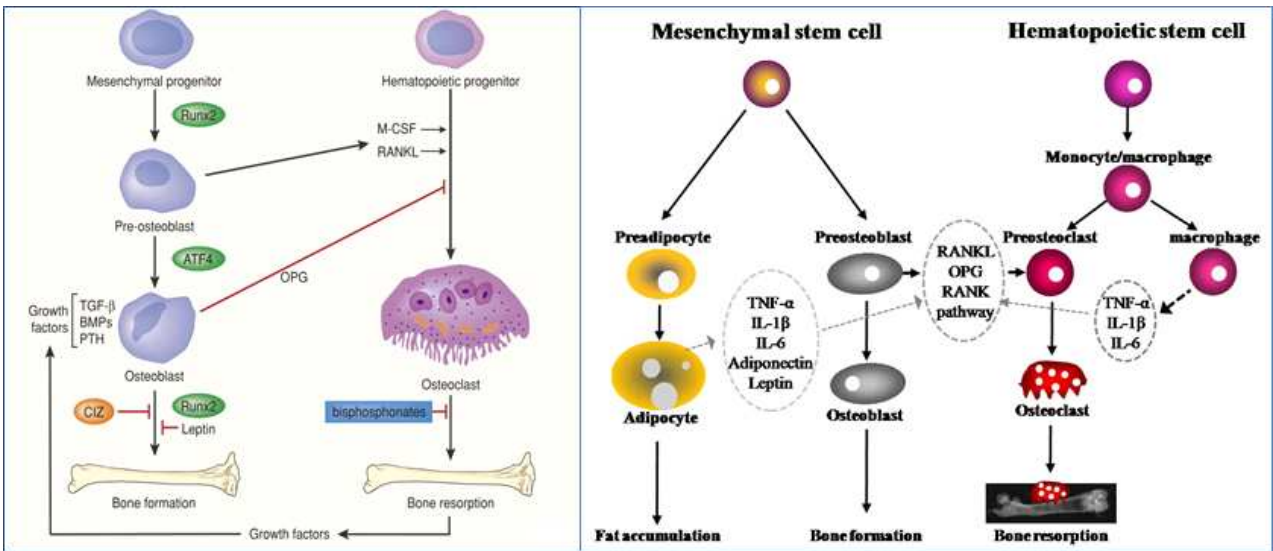


그림 4. 중간엽줄기세포 및 조혈모세포로부터의 조골세포, 파골세포, 지방세포로의 분화과정에 관여하는 인자들^{4,8)}

□ 골다공증 발병 원인

- 골재형성 과정에서 골흡수와 골형성의 불균형은 골다공증의 원인이 됨.
- 여자의 골다공증은 폐경과 노화에 의해, 남자는 노화에 의해 골흡수와 골형성의 불균형이 발생하고 결과적으로 뼈의 양적, 질적 감소에 의해 골다공증이 발병함⁵⁾(그림 5).

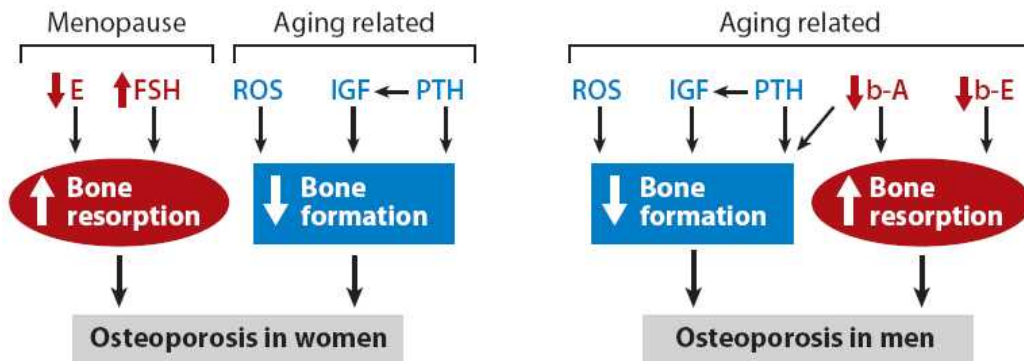


그림 5. 폐경과 노화 관련 골다공증 병인 기전⁵⁾

(A, androgen; b, bioavailable; E, estrogen; FSH, follicle- stimulating hormone; IGF, insulin-like growth factor; PTH, parathyroid hormone; ROS, reactive oxygen species)

□ 골다공증의 진단

- 골밀도 측정은 골다공증을 진단하는 가장 중요한 방법임.
- 골밀도는 골절 위험도를 판단하고 골다공증 치료 효과를 확인하는데 사용됨.
- 골밀도를 측정하는 방법으로 dual-energy X-ray absorptiometry(DEXA), quantitative computed tomography(QCT), quantitative ultrasound(QUS) 등의 방법이 있음.
- 골밀도를 측정하는 위치는 골반과 척추, 몸 전체의 골밀도를 측정하거나, 손가락, 손목, 슬개골, 정강이뼈, 발꿈치 부분을 측정함.

2. 연구의 필요성 및 중요성

□ 골다공증의 위험성

- 대표적인 만성질환인 골다공증으로 고통 받는 사람들의 수는 전 세계적으로 매우 많으며, 미국의 경우 2015년 현재 약 540만명의 골다공증 환자 또는 예비 환자가 존재하며, 질환관련으로 매년 약 20조원의 비용이 사용되고 있다고 보고됨(National Osteoporosis Foundation).
- 골다공증으로 인한 골절은 심각한 활동 제한에 이르게 되고, 고관절 골절(hip fracture)의 경우 약 15-35%의 높은 사망률과 관련되어 있기 때문에, 골다공증성 골절이 발생하기 이전에 골다공증의 조기진단, 예방 및 치료가 매우 중요함(골다공증 진단 및 치료지침 2007, 2008, 2011)¹⁾.

□ 한국인 골다공증 환자의 급속한 증가

- 국내의 골다공증 유병률이 최근 5년간 급속하게 증가되었고, 골다공증 골절에 의한 연간 사회경제적 손실이 약 1조 5000억원에 달할 정도로 심각한 수준에 이르고 있다고 보고됨(골다공증 진단 및 치료 지침 2007, 2008, 2011)¹⁾.
- 현재 국내 최신 자료인 2010년도 국민건강통계에 따르면, 50-64세와 65세 이상 한국인 전체 골다공증 유병률은 21.8%와 40.2%로 만성질환 중에서도 유병률이 매우 높은 질환임(제5기 국민건강통계-국민건강영양조사)¹⁾(표 1).
- 50-64세 여자 유병률은 남자에 비해 여자가 약 4배 정도 높았음(남자 7.8%, 여자 34.9%).
- **65세 이상 여자 유병률은 57.6%로, 10명중 약6명이 골다공증 질환자임.**
- 특히, 여자의 경우 골감소증 유병률도 매우 높아, 정상적인 골밀도를 가진 사람은 50-64세 14.8%, 65세 이상은 4%로 조사되어 **우리나라 여자의 뼈 건강 상태가 매우 심각하다는 결과를 보여줌.**
- 현재 국내 최신 자료인 2008년과 2010년의 자료에서 골다공증 유병률 추이를 보면, 2년 사이에 매우 가파른 유병률 상승을 나타내어, 고령화의 진전에 따른 골다공증 환자수의 뚜렷한 증가 현상이 나타남(그림 6).

표 1. 2010년 한국인 골다공증 유병률 및 관리현황(제5기 1차년도 국민건강영양조사 자료)¹¹⁾

구분(조사 대상자 수)		골다공증 유병률(%)	골감소증 유병률(%)	골밀도 정상인(%)
전체	50-64세 (2,773명)	21.8	48.4	29.8
	65세 이상 (1,256명)	40.2	45.4	14.4
남자	50-64세 (1,243명)	7.8	46.4	45.8
	65세 이상 (556명)	15.2	54.6	30.2
여자	50-64세 (1,530명)	34.9	50.3	14.8
	65세 이상 (700명)	57.6	38.4	4.0

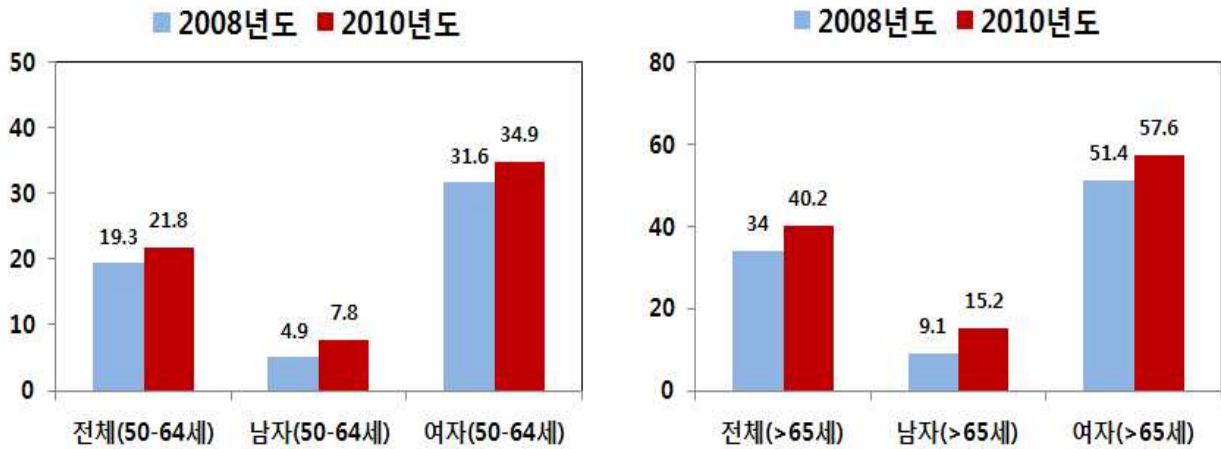


그림 6. 한국인 골다공증 유병률 변화 추이에 대한 2015년 현재의 최신 자료.

50-64세(좌), 65세 이상(우) (제4, 5기 국민건강통계-국민건강영양조사 자료)¹¹⁾

□ 골다공증 예방 및 치료제 개발을 위한 천연물 탐색 연구의 필요성

- 고령화에 의한 골다공증 증가뿐만 아니라, 다른 질병 치료에 사용되는 glucocorticoid 등의 항염증성 약물에 의한 약물성 골다공증도 최근 크게 증가되고 있음^{5,12)}.
- 골다공증의 유발에는 환경적 요인뿐만 아니라 유전적 소인이 함께 작용하고 있기 때문에 환경적인 요인에 대한 대책만으로는 예방과 증상 개선이 되지 않는 경우가 많음.
- 골다공증을 유발하기 쉬운 유전소인이 많은 사람의 경우 유전소인이 적은 사람에 비해 동일한 골다공증 유발 환경 요인의 노출에도 더 쉽게 질환에 걸리고, 더욱이 골다공증 예방 및 치료제의 개선 효과도 훨씬 낮음(그림 7). 따라서, 유전소인이 많은 경우의 골다공증 예방 및 치료에는 유전소인을 완화시켜주는 추가적인 보조제가 필요함(그림 8).
- 근본적인 유전소인의 변화는 아니지만, 골다공증 핵심유전소인의 발현을 조절함으로써 골다공증의 예방 및 기존 치료제 효과를 증진 시켜주는 부작용이 없는 천연물 유래의 예방/치료제 개발이 필요함.

- 지금까지 골다공증 예방 및 치료 효과가 있는 한약제 및 천연식품자원 유래의 추출물질 또는 활성성분에 대한 보고(논문 및 특허)는 많지만, 골대사 마커(osteocalcin 발현량, alkaline phosphatase(ALP)의 활성도)에 대한 효능만 확인 하였으며, 유전소인 완화 효과에 대한 연구는 거의 없음.
- 한국인의 골밀도 관련 유전적인 소인을 고려한 작용 효과 검증과 폐경, 비만, 노화 등의 다양한 환경적 요인을 고려한 *in vitro*, *in vivo* 실험을 거침으로써, 실질적인 효과가 기대되는 천연물 유래의 활성성분(지표물질)의 동정이 필요함.

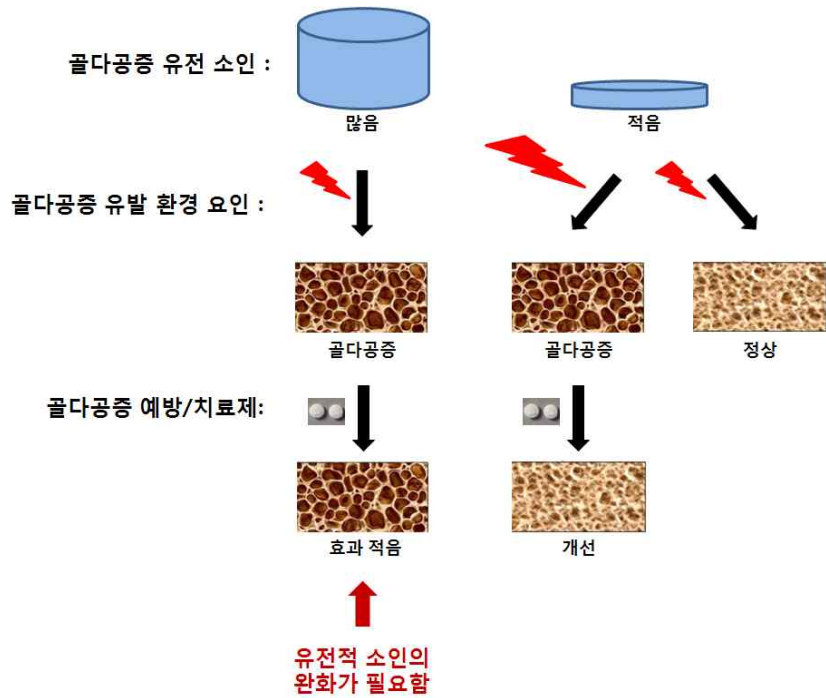


그림 7. 골다공증 핵심유전소인을 타겟으로 하는 예방/치료제 개발의 필요성

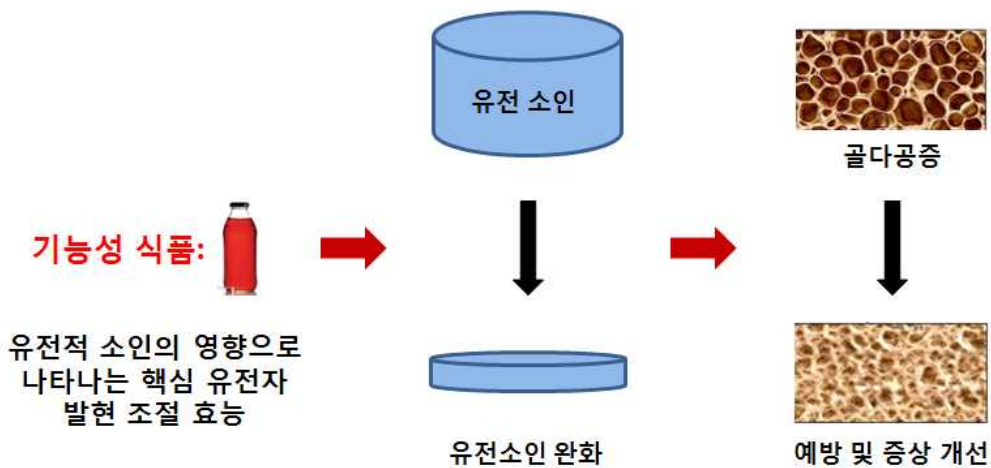


그림 8. 골다공증 유전소인에 관여하는 핵심유전자를 타겟으로 하는 건강보조제(기능성 식품) 개발의 필요성

3. 연구개발의 최종목표

□ 한국인의 골대사 조절 핵심 유전자 발현 조절을 통한 골다공증 예방 및 증상 개선 기능성 식품의 개발 및 상품화 (그림 9)

- 골다공증 예방 및 개선 효능이 있는 후보 천연물(식품등록 약용작물) 기능성 소재 선정
- 최종 선정된 식품소재의 효능 극대화 방안(소재 혼합 등) 확립
- 최종 선정된 식품소재의 골대사 기전에 미치는 역할 연구
- 최종 선정된 식품소재에서 효능물질의 분리 및 구조 동정
- 최종 선정된 식품소재의 추출방법 및 수율 최적화 기술 확립
- 골다공증 동물 모델을 이용한 기능성 식품소재의 효능 연구
- 인체적용시험을 통한 인체에서의 효과 평가
- 골다공증 예방 및 개선 기능성 식품 상품화

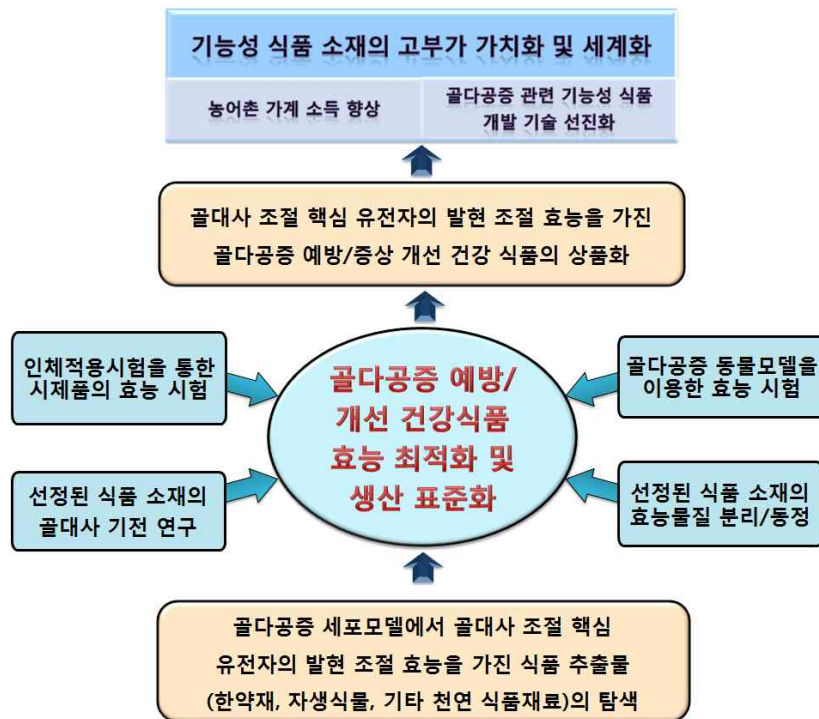


그림 9. 연구개발의 핵심 내용 및 최종 목표

지금까지 국내에서 골다공증 예방 및 개선 기능성 식품으로 특허가 등록된 다양한 한약재 및 천연식품자원 추출물질이 있으나, 제품화 단계를 거쳐 사업화가 성공한 예가 거의 없음.

따라서, 본 연구개발 과제의 차별화 전략은,

- ① 탐색과정에서 골대사 마커에 대한 효능만 확인 하지 않고 한국인의 유전소인과 관련된 핵심 유전자 조절 효능까지 함께 확인함으로써 확실한 골다공증 예방 및 개선 효과가 있는 건강 보조식품 소재의 개발과,
- ② 다양한 기능성 식품 개발 노하우 바탕으로 시장경쟁력이 있는 상품으로 제품화하여 수익성 있는 사업으로 추진하는 것임.

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

1. 국내·외 연구동향

□ 골다공증 예방, 증상개선, 치료 기능성 식품 개발 및 상품화 연구 동향

- 현재 골다공증 치료제로 사용되고 있는 비스포스네이트 제제는 흡수율이 떨어지며 복용방법이 까다롭고 식도염을 유발시키며, 호르몬 제제는 장기 투여 할 경우 유방암, 자궁암, 담석 및 혈전증 등의 부작용이 나타나고, 비타민 D 제제는 고가이며 효과가 확실하지 않고, 칼시토닌 제제는 고가이며 투여방법이 어렵고, 칼슘제제는 부작용은 적지만 치료보다는 예방효과에 국한되는 단점이 있음.
- 골 관련 건강 기능성 소재로는 비타민 D와 칼슘이 주로 이용되어 왔는데, 최근 들어 prebiotic fibers와 soy isoflavones를 활용한 제품개발이 활발함. 특히 phytoestrogens은 식물성 에스트로젠으로 골다공증의 좋은 치료제로서의 가능성이 높아 많은 연구가 이루어지고 있으나 부작용의 가능성이 대두되고 있어 안정성에 대한 연구가 더 필요함.
- 지금까지 국내에서 골다공증 예방 및 개선 기능성 식품으로 특허가 등록된 한약재 및 천연식품자원 추출물질로서, 갈근, 오가피, 큰느타리버섯, 영지버섯, 복분자, 합환피, 고삼, 상두근, 괴각, 괴화, 골쇄보, 연근, 애엽, 토마토, 자두 등 매우 다양하지만, 골대사 마커에 대한 효능만 확인 하였으며, 제품화 단계를 거쳐 건강식품으로 상품화가 성공한 예로는 LG 생명과학 리튬프로-본, 아모레퍼시픽 오가든 예음보, 신도바이오 조인스틱 등이 있으나 다른 질환에 비해 매우 적음.
- 식품의약품안전처에 인증 받은 관절/뼈에 좋은 건강기능식품 개별인증 원료로는 가시오갈피 등복합추출물, 글루코사민, 로즈힙 분말, 지방산복합물, 전칠삼추출물등복합물, 차조기등복합추출물, 초록입홍합추출오일, 호프추출물, 황금추출물등복합물, N-아세틸글루코사민, Dimethylsulfone(MSM), 흑효모배양액분말, 대두이소플라본이 있으며, 고시형 원료로는 뮤코다당·단백, 비타민 D, 비타민 K, 망간, 칼슘이 등록 되어있음.

□ 골다공증 관련 해외 특허

- 1990년대 초반부터 매년 골다공증 관련 특허가 지속적으로 늘어나고 있음
- 특히 2000년대 초반부터 중반 사이에는 2배가 넘는 특허가 출원되었고, 그 이후에도 연간 300건 이상의 특허가 출원 및 등록되는 상황으로 골다공증 관련 연구개발이 활발히 진행되고 있음을 알 수 있음
- 골다공증기전, 골다공증제어, 골다공증질환 분야의 특허는 1991년부터 2000년도 초반까지 급격한 양적 증가 추이를 보이고 있으며, 2005년 이후부터는 꾸준한 양상을 나타내고 있음
- 골다공증기전 분야에는 파골세포 및 조골세포의 분화와 활성도에 관여하는 유전자에 대한 특허 개발이 활발하며, 줄기세포를 이용한 골재생 유도 및 나노입자를 이용한 골다공증 약물의 최적화에 대한 기술개발도 관찰됨
- 골다공증제어 분야는 골대사에 관여하는 다양한 호르몬, 싸이코카인, 항체, 약물전달방법 및

골재생 세포에 의한 파골세포의 억제와 조골세포의 축진을 통한 골밀도의 증진에 대한 기술 개발이 활발함

- 골다공증질환 분야에는 골다공증 관련 질환에 대한 타겟 및 신규 치료물질에 대한 특허들이 높은 비중을 차지하고 있는 것으로 관찰됨

□ 국내 특허로 살펴본 골다공증 분야 국내 연구 동향

- 골다공증 연구 및 이를 활용한 응용기술 관련 특허는 최근 20년 동안 3,000건(골다공증기전/제어/질환 세부 분야 중복 포함) 이상이 한국 특허청에 등록된 것으로 나타남
- 골다공증 관련 특허는 1990년대부터 꾸준히 증가하여 2000년대 초반 이후 빠르게 증가하는 양상을 보이며 국내에서의 기술개발과 함께 해외에서도 국내에 활발하게 진입하고 있는 것으로 판단됨
- 국내에서는 골다공증질환>골다공증기전>골다공증제어 분야의 순으로 기술분야 연구가 활발한 상태임
- 골다공증질환은 폐경기 여성 노인에게 가장 많이 나타나, 노화 및 그에 관련된 질환 및 치료제연구가 활발하며, 남성의 당질코르티코이드성 골다공증 연구가 활발함

□ 국내 골다공증 관련 제품생산 및 시장 현황

- 현재 국내 골다공증 치료제 시장은 연간 약 1,200억 원대로 추산됨(출처: "Commercial Insight: Osteoporosis"(2010)).
- 국민건강보험공단 건강보험정책연구원이 2005년부터 2009년까지 건강보험 진료비를 분석한 바에 따르면 '골다공증질환'의 건강보험 진료환자가 2005년 45만명에서 2009년 74만명으로 나타나 최근 4년 간 연평균 13%씩 증가하고 있는 것으로 나타남(출처: 국민건강보험공단 건강보험정책연구원)
- 국내 골다공증관련 신약으로 리드본정(광동제약), 마렌드정(휴온스), 아렌본정(동성제약), 약토크정(보령제약), 오스트론정(동아제약), 대웅알렌드로네이트정(대웅제약), 칸토넬정(안국약품) 등이 있으며, 유유제약이 국내와 미국특허를 취득한 국산신약 골다공증치료제 '맥스마빌'의 수출계약을 체결한 바 있음(출처: 헬스메디(<http://www.healthmedi.net>))
- 뼈 건강 음료 보해미(풀무원)는 석류, 블루베리, 크린베리, 라즈베리의 천연 농축액을 더 해 여성건강에 도움을 주는 음료로 뼈 건강 개선기능으로 식약청 인증을 받은 이소플라본과 칼슘이 함유되어 있는 음료이며, 충남 서천군에서 한산모시로 유명한 모시풀을 가공한 골다공증 예방차 '모시잎차'를 개발하였는데 모시잎은 칼슘 함량이 풍부해 골다공증 예방에 도움을 줄 것으로 기대함(출처 : <http://www.google.com>)

□ 주요 골다공증 예방 및 치료용 식품 관련 특허 현황(KIPRIS 특허정보검색서비스 검색 결과)

번호	출원번호	발명의 명칭
1	1020100131673	뽕잎 추출물을 이용한 골다공증 개선제 조성물
2	1020127011286	골다공증 치료 및 예방용 비스포스포산

3	1020100099603	장생도라지 유래의 조사포닌 분획물을 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물
4	1020110025540	모자반 추출물을 유효성분으로 함유하는 폐경기후 골다공증의 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품
5	1020100105727	권백 추출물을 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물
6	1020100130884	아보카도 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물
7	1020100105726	대계 추출물을 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물
8	1020100059589	쌍화탕 또는 이의 유산균 발효물을 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물
9	1020100059588	방풍통성산 또는 이의 유산균 발효물을 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물
10	1020100075141	감국 추출물을 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물
11	1020100061997	생약 추출물 또는 이의 유산균 발효물을 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물
12	1020100052448	섬오가피 추출물을 이용한 골다공증 개선제 조성물
13	1008325200000	매생이 추출물을 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물
14	013809040000	골다공증 개선용 기능성 김치 및 그 제조방법
15	1013774780000	골량 저하 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품
16	1002846570000	황기 추출물을 유효 성분으로 하는 골다공증 치료제
17	1004572170000	강진향 추출물의 제조방법, 그에 의해 얻어지는 강진향추출물 및 이를 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 약학조성물과 건강식품
18	1010593320000	홍화자, 숙지황 및 사인의 혼합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증질환의 예방 및 치료용 조성물
19	1011935400000	황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 포함하는 골다공증 및 골질환 예방 및 치료용 조성물
20	1003734970000	지황 추출물 및 이를 포함하는 성장기 뼈 형성 촉진 및 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물
21	1007333350000	갈근 추출물의 발효물 및 이를 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물
22	1008768670000	백강잠 추출물을 포함하는 골다공증, 골형성 장애, 또는 골절의 예방 또는 치료용 조성물
23	1014722240000	소리쟁이 뿌리 추출물을 유효성분으로 하는 골다공증의 예방 및 치료용 조성물
24	1003734980000	큰느타리버섯 추출물 및 이를 포함하는 성장기 뼈 형성 촉진 및 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물
25	1003993740000	오가피 추출물 및 이를 포함하는 성장기 뼈 형성 촉진 및 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물
26	1007031800000	혼합 생약재 추출물을 포함하는 골다공증 질환의 예방 및 치료를 위한 약학조성물
27	1009710390000	복분자 추출물을 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물
28	1003808670000	골다공증 예방 및 치료에 효과를 갖는 합환피 추출물

제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 탐색 소재 선정 및 준비

□ 식품 소재 66종의 선정 및 시험재료 준비

- 다양한 문헌 조사와 특허 탐색 등을 통하여, 천연물(식품약품안전청에 사용가능한 식품으로 등록된 약용작물) 식품 소재 66종을 선별하여 식품 소재 탐색 시험에 사용할 수 있도록 추출, 1차 농축, 필터, 2차 농축의 과정을 거쳐 총 66종의 식품 소재를 시험재료로 준비하였음 (표 1).
- 각각의 식품소재는 시험물질로 제공하기 전에 동우당제약(주)의 약제품질팀에서 대한약전에 근거한 정밀검사, 잔류이산화황 분석, 잔류 중금속 측정, 잔류 농약 분석 등을 통해 시험물질로써의 적합성을 시험하였음(시험성적서 예시: 그림 1. 숙지황에 대한 시험성적서).

표 1. 총 66종의 식품 소재 목록에 대한 상세 정보

순번	원료명	원료량 (kg)	용매 투입량 (L)	최종농축량 (g)	농축물 농도 (bx)	비고
1	숙지황	1.5	7.5 L ; 물 2.25, EtOH 5.25	435	85	
2	골쇄보	1.5	12 L ; 물 3.6, EtOH 8.4	122	82	
3	보골지	0.95	5.7 L ; 물 1.71, EtOH 3.99	38	73	
4	석창포	0.95	6.65 L ; 물 1.995 EtOH 4.655	102	66	
5	두충	0.95	6.65 L ; 물 1.995 EtOH 4.655	99	63	
6	해동피	0.95	6.65 L ; 물 1.995 EtOH 4.655	16	75	
7	독활	0.95	6.65 L ; 물 1.995 EtOH 4.655	60	60	
8	홍화자	0.95	6.65 L ; 물 1.995 EtOH 4.655	19	52	
9	우슬	0.95	6.65 L ; 물 1.995 EtOH 4.655	221	69	
10	구척	0.95	7.6 L ; 물 2.28, EtOH 5.32	128	67	
11	당삼	0.95	7.6 L ; 물 2.28, EtOH 5.32	79	66	
12	산수유	0.95	7.6 L ; 물 2.28, EtOH 5.32	193	92	
13	마가목	0.95	9.5 L ; 물 2.85, EtOH 6.65	71	58	
14	포공영	0.95	14.3 L ; 물 4.32, EtOH 9.98	178	81	
15	녹각	1.3	7.6 L ; 물 5.85, EtOH 13.7	48	32	
16	삼백초	1.0	15 L ; 물 4.5, EtOH 10.5	84	82	
17	황기	0.95	7.6 L ; 물 2.28, EtOH 5.32	125	84	
18	구관	0.95	6.65 L ; 물 1.995, EtOH 4.65	21	19	
19	백자인	0.95	5.7 L ; 물 1.7, EtOH 3.99	70	46	
20	웃	2.6	2 L		51	발효
21	유백피	1.0	8 ; 물 2.4, EtOH 5.6	67	66	
22	백강잠	1.0	6 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	124	53	
23	자근	1.0	6 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	231	74	

순번	원료명	원료량 (kg)	용매 투입량 (L)	최종농축량 (g)	농축물 농도 (bx)	비고
24	지골피	1.0	11 L ; 물 3.3, EtOH 7.7	112	76	
25	연자육	1.0	6 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	46	75	
26	작약	1.0	6 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	166	85	
27	속단	1.0	6 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	320	75	
28	금앵자	1.0	6 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	390	83	
29	대계	1.0	6 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	160	62	
30	상지	1.0	7 L ; 물 2.1, EtOH 4.9	49	60	
31	상엽	1.0	14 L ; 물 4.2, EtOH 9.8	212	63	
32	어성초	1.0	14 L ; 물 4.2, EtOH 9.8	201	81	
33	고삼	1.0	7.0 L ; 물 2.1, EtOH 4.9	157	84.4	
34	복분자	1.0	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	147.6	85.8	
35	청호	0.6	9.0 L ; 물 2.7, EtOH 6.3	126.6	75.3	
36	메밀(교맥)	1.0	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	28.4	58.5	
37	비자	0.9	5.8 L ; 물 1.7, EtOH 4.1	6.6	35.8	
38	갈근	1.0	8.0 L ; 물 2.4, EtOH 5.6	83.3	92.0	
39	에엽	1.0	12.0 L ; 물 3.6, EtOH 8.4	126.2	72.3	
40	회령	1.0	10.0 L ; 물 3.0, EtOH 7.0	56.8	74.0	
41	합환피	1.0	7.0 L ; 물 2.1, EtOH 4.9	38.2	67.1	
42	오가피	1.0	12.0 L ; 물 3.6, EtOH 8.4	84	55.1	
43	함초1	1.0	11.0 L ; 물 3.3, EtOH 7.7	15.0	70.1	농축액
44	함초2	1.0	11.0 L ; 물 3.3, EtOH 7.7	15.0	70.1	D.W
45	함초3	1.0	11.0 L ; 물 3.3, EtOH 7.7	15.0	70.1	EtOH
46	하수오	0.7	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	75.9	53.5	
47	황금	1.0	8.0 L ; 물 2.4, EtOH 5.6	341.1	75.7	
48	당귀(토)	1.0	7.0 L ; 물 2.1, EtOH 4.9	301.9	75.4	
49	울금	1.0	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	36.5	42.0	
50	지각	1.0	8.0 L ; 물 2.4, EtOH 5.6	197.8	69.2	
51	골담초(근)	1.0	7.0 L ; 물 2.1, EtOH 4.9	68.3	80.0	
52	두시	1.0	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	110.3	50.7	
53	진피	1.0	7.0 L ; 물 2.1, EtOH 4.9	327.4	81.9	
54	청피	1.0	7.0 L ; 물 2.1, EtOH 4.9	58.7	74.6	
55	연근	1.6	8.0 L ; 물 2.4, EtOH 5.6	79.3	73.2	
56	다시마	1.2	12.0 L ; 물 3.6, EtOH 8.4	546.0	48	
57	차가버섯	0.9	12.0 L ; 물 3.6, EtOH 8.4	42.7	50.0	
58	해송이	1.2	13.0 L ; 물 3.9, EtOH 9.1	340.1	73.2	
59	두릅나무	1.1	9.0 L ; 물 2.7, EtOH 6.3	133.5	68.5	
60	포도	1.0	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	188	85.8	
61	청매실	1.0	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	148.7	90	
62	헛개나무	1.0	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	123.4	72.1	
63	흑마늘	1.0	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	90.2	64.8	

순번	원료명	원료량 (kg)	용매 투입량 (L)	최종농축량 (g)	농축물 농도 (bx)	비고
64	수세미	1.0	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	172.5	52	
65	양파	1.0	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	164.0	61	
66	오디	1.0	6.0 L ; 물 1.8, EtOH 4.2	190.1	85.3	



770-862 경북 영천시 임고면 효리 1041-12번지 T 054-332-8855 F 054-332-8850
529-803 전남 장흥군 장흥읍 행원리 981번지 2층 T 061-863-1915 F 061-863-1910

담당 오영준 결재 김재성

한약, 생약분야 검사 및 연구개발

시험성적서

1. 검 체 내 용

페이지 1/1

검 체 명	속 지 황	검 체 일	2012. 03. 12	접수일자	2012. 03. 12
의 료 인	동우당 제약(주)	제조번호		시험일자	2012. 04. 11
검사항목	성상 외 8종	제 조 량		허가번호	2320-264
검체장소	동우당제약(주)	검 체 량	500g	발행번호	A12041110

2. 시 험 결 과

검 사항목	기 준	결 과	검 사항목	기 준	결 과
성 상	대한약전	적 합	간류농약축정	총BHC($\alpha, \beta, \gamma, \delta$)	총합 0.2 (mg/kg)이하 불검출
확 인 시 험	대한약전	적 합		총DDT(DDD,T,E)	총합 0.1 (mg/kg)이하 불검출
순 도 시 험	-	-		Aldrin	0.01(mg/kg) 이하 불검출
건 조 감 량	-	-		Endrin	0.01(mg/kg) 이하 불검출
회 분	6.0%이하	2.50%		Dieldrin	0.01(mg/kg) 이하 불검출
산불용성회분	2.5%이하	0.00%		기 타	-
정 유 함 량	-	-	개 별 중 금 속	납(Pb)	5 (mg/kg)이하 0.000
잔류이산화황	30ppm이하	0.00ppm		비소(As)	3 (mg/kg)이하 0.190
정 량 분 석 시 험	5-히드록시메틸-2-푸르알데히드 0.1%이상	0.28%		수은(Hg)	0.2 (mg/kg)이하 0.000
엑 스 함 량	물은에탄올엑스	-		카드뮴(Cd)	0.3 (mg/kg)이하 0.062
	물 엑 스	-	벤조피렌	5 (μ g/kg)이하 불검출	
	에 텔 엑 스	-	아플라톡신B1	-	-

판 정	적 합
검사기준 부적합 항목	

- 본 검사는 식약청고시, 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해에 의거하여 시험하였으며, 상기의 결과는 귀사에서 제시한 Sample에 한하여 실험한 결과입니다.

- 위 성적은 시험의뢰목적 이외의 상품선전 및 기타 법적 요건이나 상업용으로 사용할 수 없습니다.

2012. 4. 11

Omniherb 동우당제약(주) 약재품질 검사실장



그림 1. 숙지황에 대한 시험성적서

2. 효능 식품 소재 탐색

□ 후보 기능성 식품 소재의 탐색

- 총 66종의 식품 소재 library의 추출물을 대상으로 골다공증 세포 모델에서 MTT 분석과 ALP 활성을 확인하여 가능성 높은 후보 식품 소재에 대한 screening을 수행함.
- 마우스 세포주로서 조골세포와 지방세포로 분화되는 중간엽줄기세포(mesencymal stem cell)인 C3H10T1/2 세포주와 조골세포(osteocyte)로 분화하기 이전단계의 조골모세포(osteoblast)인 MC3T3-E1 세포주 및 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주를 대상으로 식품 소재 추출물을 처리하여 확인하였음. 66종의 식품 소재 추출물들은 각각 5 mg/ml의 stock으로 희석 한 후, 각 식품 소재 추출물을 10 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml의 3 종류의 농도군으로 구성하여 MTT와 ALP 분석을 시행하였음.
- MC3T3-E1 세포주에 대해서는 분화 유도 후의 식품 소재에 대한 효과를 분석하기 위하여 식품 소재 추출물 처리 전 3일 동안 조골세포 분화 유도제인 ascorbic acid (50 ug/ml)와 β -Glycerophosphate (10 mM)을 첨가하여 분화를 유도한 상태에서 시험을 진행하였음.
- 식품 소재의 세포 독성 (cytotoxicity) 여부를 확인하기 위하여 3,4,5-디메틸 티아졸-3,5-디페닐 테트라졸륨 브롬 (3,4,5-dimethyl thiazole-3,5-diphenyl tetrazolium bromide, 이하 "MTT"라 약칭함) 테스트를 실시하여 C3H10T1/2 세포주, MC3T3-E1 세포주와 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에 대한 독성 여부를 시험하였음. 식품 소재들의 세포독성 효과는 MTT 분석 (assay)으로 조사하는데 이 방법은 살아있는 세포는 테트라졸륨 염 (tetrazolium salt)을 분해할 수 있어 MTT의 세포내 축적을 막는데 근거함. 각 식품 소재 추출물 처리군에서의 세포 생존율을 control 100% 대비하여 범위에 따라 기호로 표시(---; 0~50%, --; 50~70%, -; 70~90%, .; 90~110%, +; 110~130%, ++; 130~150%, +++; 150~)하여 나타내었음 (표 2, 표 3).
- ALP (Alkaline phosphatase)는 유골 (osteoid) 형성과 무기질화 (mineralization)에 중요한 역할을 하는 효소임. 뼈 특이적 ALP는 골형성을 촉진하는 기능을 가지고 있으며, 조골세포 활성도의 마커로 잘 알려져 있음. 특히 조골세포의 초기 단계에 발현이 증가하고, 효소 활성을 쉽게 측정할 수 있어서 짧은 기간 안에 조골세포의 분화 정도를 측정할 수 있는 장점이 있음. 실험 대상 세포주를 일정한 밀도로 seeding 한 후 일정 시간이 경과한 후에 식품 소재 추출물을 처리하여 48시간 동안 배양한 후 세포를 detergent가 포함된 lysis buffer로 세포를 파괴하고 난 후, 염기성 pH에서 p-nitrophenylphosphate을 기질로 하여 형성된 p-nitrophenol의 양을 흡광도를 측정하여 ALP 활성을 분석함. C3H10T1/2 세포주와 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주를 대상으로 ALP 분석을 시행하였으며, ALP의 분석 결과는 control 100% 대비하여 범위에 따라 기호로 표시(---; 0~50%, --; 50~70%, -; 70~90%, .; 90~110%, +; 110~130%, ++; 130~150%, +++; 150~)하여 나타내었음 (표 2, 표 3).

표 2. 66종의 식품 소재 추출물에 대한 MTT & ALP assay in C3H10T1/2 cells

Extracts		Conc. µg/ml	C3H10T1/2		Extracts		Conc. µg/ml	C3H10T1/2		Extracts		Conc. µg/ml	C3H10T1/2	
No.	Name		MTT	ALP	No.	Name		MTT	ALP	No.	Name		MTT	ALP
1	숙지황	10	.	+	23	자근	10	+	+	45	함초 (EtOH)	10	+	.
		50	.	.			50	+	+			50	+	-
		100	+	.			100	+	+			100	+	-
2	골쇄보	10	.	.	24	지골피	10	++	++	46	하수오	10	.	.
		50	.	.			50	+	++			50	.	.
		100	-	--			100	+	-			100	-	-
3	보골지	10	.	.	25	연자육	10	.	+	47	황금	10	-	-
		50	.	-			50	.	+			50	---	---
		100	--	--			100	.	.			100	---	---
4	석창포	10	.	+	26	작약	10	+	++	48	당귀	10	.	.
		50	.	.			50	.	+			50	.	.
		100	.	.			100	.	.			100	+	.
5	두충	10	.	.	27	속단	10	.	+	49	울금	10	.	-
		50	.	.			50	.	++			50	---	-
		100	.	.			100	-	.			100	---	--
6	해동피	10	.	.	28	금앵자	10	.	+	50	지각	10	+	.
		50	+	-			50	-	.			50	+	-
		100	.	.			100	--	.			100	.	-
7	독활	10	+	.	29	대개	10	.	.	51	골담초	10	.	.
		50	.	.			50	--	--			50	.	.
		100	.	.			100	---	---			100	-	.
8	홍화자	10	.	-	30	상지	10	.	+	52	두시	10	.	.
		50	--	--			50	.	.			50	.	-
		100	---	---			100	-	.			100	--	-
9	우슬	10	+	++	31	상엽	10	.	+	53	진피	10	-	-
		50	+	.			50	+	.			50	.	.
		100	.	.			100	.	.			100	.	-
10	구척	10	+	.	32	어성초	10	-	.	54	청피	10	.	-
		50	.	-			50	.	.			50	.	-
		100	-	-			100	.	.			100	-	-
11	당삼	10	.	.	33	고삼	10	+	.	55	연근	10	.	.
		50	+	.			50	+	.			50	-	.
		100	.	-			100	+	+			100	-	-
12	산수유	10	.	.	34	복분자	10	-	-	56	다시마	10	.	.
		50	-	+			50	---	---			50	.	.
		100	-	-			100	---	---			100	.	.
13	마가목	10	.	-	35	청호	10	.	+	57	차가버섯	10	-	.
		50	--	--			50	.	-			50	-	-
		100	---	---			100	--	--			100	--	-
14	포공영	10	+	.	36	메밀 (교맥)	10	+	.	58	해송이	10	+	.
		50	.	.			50	.	.			50	+	.
		100	-	-			100	--	-			100	.	-
15	녹각	10	-	-	37	비자	10	.	.	59	두릅나무	10	.	.
		50	---	---			50	.	-			50	.	.
		100	---	---			100	--	--			100	.	.
16	삼백초	10	--	--	38	갈근	10	.	+	60	포도	10	-	-
		50	---	--			50	+	.			50	-	.
		100	---	--			100	+	.			100	.	.
17	황기	10	.	.	39	애엽	10	.	.	61	청매실	10	.	.
		50	.	.			50	.	-			50	.	+
		100	-	-			100	--	-			100	.	.
18	구판	10	.	-	40	회령	10	+	.	62	헛개나무	10	.	.
		50	--	--			50	+	-			50	-	.
		100	---	---			100	.	-			100	-	.
19	백자인	10	.	.	41	함환피	10	--	-	63	흑마늘	10	.	.
		50	.	-			50	---	---			50	.	.
		100	-	-			100	---	---			100	+	+
20	욱	10	+	+	42	오가피	10	.	.	64	수세미	10	-	-
		50	++	++			50	.	-			50	.	.
		100	++	+			100	-	-			100	.	-
21	유백피	10	+	++	43	함초 (농축)	10	.	.	65	양파	10	-	.
		50	++	++			50	+	.			50	.	.
		100	.	.			100	.	.			100	.	+
22	백강잠	10	+	+	44	함초 (D.W)	10	.	.	66	상심자	10	+	+
		50	.	+			50	+	.			50	+	.
		100	-	+			100	.	.			100	++	.

표 3. 66종의 식품 소재 추출물에 대한 MTT & ALP assay in MC3T3-E1 cells

Extracts		Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	MC3			MC3-BLAST			Extracts		Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	MC3			MC3-BLAST		
No	Name		MTT	MTT	ALP	No	Name	MTT	MTT	ALP		No	Name	MTT	MTT	ALP	
1	숙지황	10	.	.	.	23	자근	10	+	.	.	45	함초 (EtOH)	10	-	.	.
		50	-	.	---			50	.	.	.			50	.	.	-
		100	-	.	---			100	.	.	-			100	.	.	-
2	골쇄보	10	.	+	-	24	지골피	10	.	+	.	46	하수오	10	.	.	-
		50	+	.	.			50	+	.	.			50	-	.	-
		100	+	+	.			100	+	.	-			100	-	.	-
3	보골지	10	+	.	-	25	연자육	10	+	++	.	47	황금	10	-	.	.
		50	.	.	.			50	.	.	.			50	---	.	.
		100	-	+	-			100	.	.	-			100	---	-	-
4	석창포	10	+	.	-	26	작약	10	++	.	.	48	당귀	10	.	.	+
		50	.	.	-			50	+	.	-			50	-	.	.
		100	.	.	-			100	-	.	-			100	-	.	-
5	두충	10	.	.	.	27	속단	10	+	.	+	49	울금	10	.	+	.
		50	.	.	-			50	+	.	.			50	.	++	-
		100	.	+	-			100	.	.	.			100	-	+	---
6	해동피	10	.	.	.	28	금앵자	10	.	.	+	50	지각	10	.	+	.
		50	-	.	-			50	.	.	.			50	-	+	.
		100	-	.	-			100	.	.	.			100	-	.	-
7	독활	10	.	.	+	29	대계	10	+	+	.	51	골담초	10	-	+	-
		50	+	.	+			50	.	++	-			50	-	+	-
		100	+	.	-			100	-	.	---			100	-	+	-
8	홍화자	10	.	+	-	30	상지	10	+	+	.	52	두시	10	-	.	.
		50	-	+	---			50	.	+	.			50	-	+	.
		100	-	.	---			100	.	.	---			100	-	+	-
9	우슬	10	.	.	++	31	상엽	10	+	+	.	53	진피	10	.	.	.
		50	.	.	.			50	.	.	-			50	.	.	.
		100	.	.	-			100	.	.	---			100	.	+	-
10	구척	10	.	.	.	32	어성초	10	.	.	.	54	청피	10	.	+	.
		50	-	.	-			50	.	.	.			50	.	+	---
		100	-	.	---			100	.	+	.			100	-	+	---
11	당삼	10	.	.	.	33	교삼	10	+	.	+	55	연근	10	-	.	.
		50	.	-	.			50	+	.	++			50	-	+	-
		100	.	.	-			100	+	.	.			100	-	+	---
12	산수유	10	-	.	.	34	복분자	10	-	.	.	56	다시마	10	-	+	.
		50	---	.	.			50	---	-	-			50	-	.	-
		100	---	.	.			100	---	-	---			100	-	.	-
13	마가목	10	.	.	.	35	청호	10	+	.	.	57	차가 버섯	10	-	.	-
		50	---	.	-			50	.	+	.			50	-	.	---
		100	---	+	---			100	+	+	.			100	---	.	---
14	포공영	10	.	.	---	36	메밀 (교맥)	10	+	+	+	58	해송이	10	.	.	.
		50	-	+	---			50	.	+	.			50	.	.	-
		100	-	+	---			100	.	.	-			100	.	.	-
15	녹각	10	.	-	-	37	비자	10	+	+	+	59	두릅 나무	10	-	.	-
		50	-	---	---			50	+	+	.			50	-	+	-
		100	-	---	---			100	-	+	---			100	-	.	---
16	삼백초	10	.	+	---	38	갈근	10	.	.	+	60	포도	10	.	++	.
		50	-	+	---			50	+	.	+			50	.	+	.
		100	-	+	---			100	+	-	-			100	.	+	.
17	황기	10	.	+	-	39	애엽	10	.	.	.	61	청매실	10	+	+	.
		50	+	+	---			50	.	.	.			50	+	+	.
		100	+	+	---			100	.	.	.			100	.	++	+
18	구판	10	.	+	-	40	회령	10	+	+	+	62	헛개 나무	10	.	+	.
		50	.	++	---			50	.	+	+			50	+	+	.
		100	.	++	---			100	-	.	-			100	.	.	.
19	백자인	10	.	+	-	41	합환피	10	-	.	.	63	흑마늘	10	+	.	+
		50	+	++	-			50	---	-	---			50	.	.	.
		100	.	++	---			100	---	---	---			100	.	.	.
20	웃	10	.	+	.	42	오가피	10	.	++	.	64	수세미	10	-	+	.
		50	+	+	-			50	.	+	.			50	.	.	.
		100	+	+	-			100	.	.	-			100	+	.	-
21	유백피	10	.	++	.	43	함초 (농축)	10	-	.	-	65	양파	10	.	+	.
		50	.	+	-			50	-	.	.			50	+	.	.
		100	.	.	-			100	-	.	---			100	+	+	.
22	백강잠	10	+	.	.	44	함초 (D.W)	10	.	-	.	66		10	+	+	.
		50	.	+	-			50	.	.	.			50	+	+	+
		100	.	+	-			100	-	.	.			100	+	.	.

- 총 66종의 식품 소재 library의 추출물을 대상으로 C3H10T1/2 세포주와 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에서의 ALP 활성이 높은 것을 기준으로 각각 세포주별로 상위 10종을 선정하였음 (표 2와 표 3에는 진하게 표시된 식품 소재명).
- 중간엽줄기세포인 C3H10T1/2 세포주 대상 시험에서 ALP 활성이 높은 상위 10종의 식품 소재 추출물과 해당 농도는 옷 (50 ug/ml), 유백피 (50 ug/ml), 지골피 (10 ug/ml), 작약 (10 ug/ml), 자근 (10 ug/ml), 속단 (10 ug/ml), 우슬 (10 ug/ml), 백강잠 (10 ug/ml), 연자육 (10 ug/ml), 오디 (10 ug/ml)이며 이에 대한 ALP 활성과 MTT 분석에 대한 결과는 아래 그림 2와 같음.

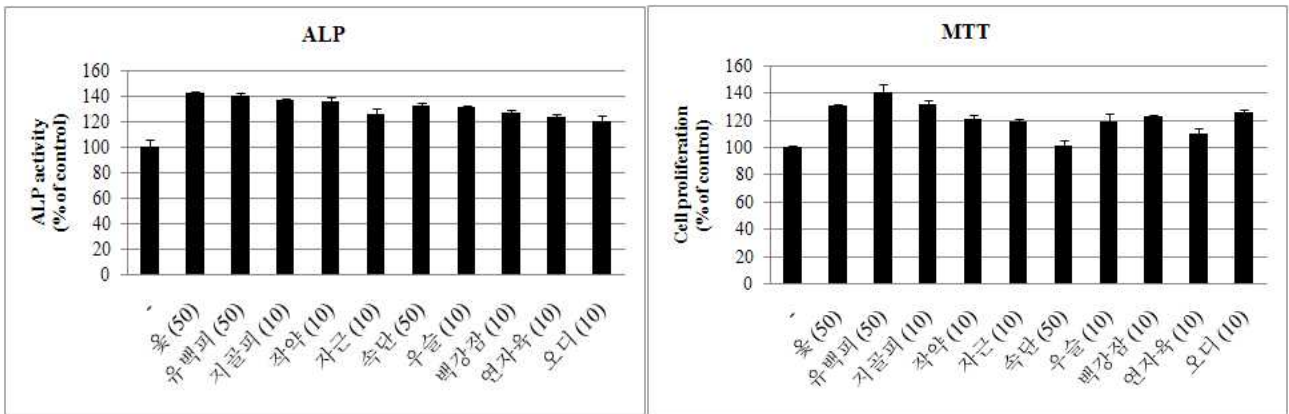


그림 2. C3H10T1/2 세포주에서 상위 10종 식품 소재 추출물의 ALP 활성과 MTT 분석 결과

- 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주를 대상 시험에서 ALP 활성이 높은 상위 10종의 식품 소재 추출물과 해당 농도는 고삼 (50 ug/ml), 회령 (10 ug/ml), 갈근 (10 ug/ml), 독활 (10 ug/ml), 우슬 (10 ug/ml), 속단 (10 ug/ml), 금앵자 (10 ug/ml), 매실 (100 ug/ml), 오디 (50 ug/ml), 메밀 (10 ug/ml)이며 이에 대한 ALP 활성과 MTT 분석에 대한 결과는 아래 그림 3과 같음.

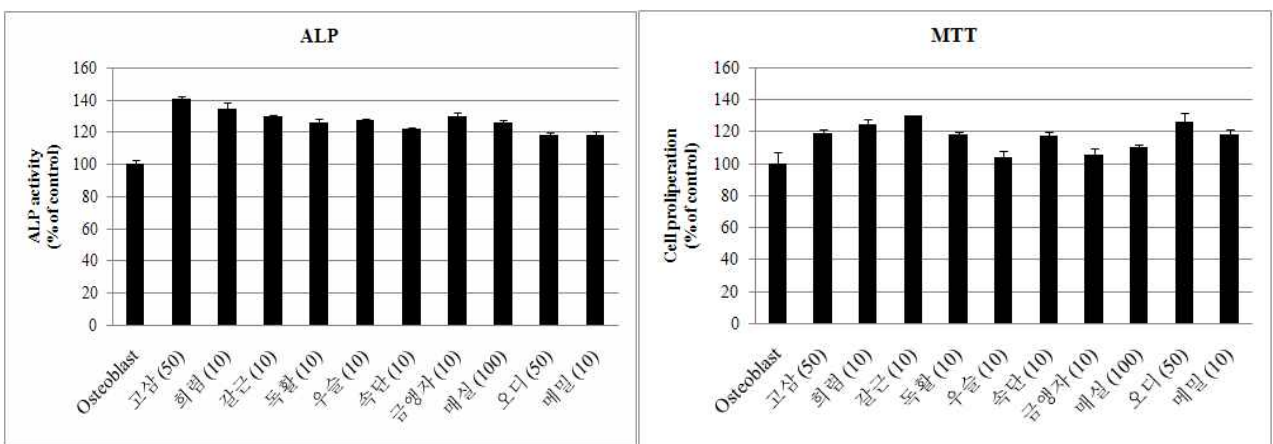


그림 3. MC3T3-E1 세포주에서 상위 10종 식품 소재 추출물의 ALP 활성과 MTT 분석 결과

3. 효능 극대화 및 최종 선정

□ 후보 기능성 식품 소재의 혼합에 의한 효능 극대화 연구

- 총 66종의 식품 소재 추출물을 대상으로 C3H10T1/2 세포주와 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에서의 ALP 활성이 높은 것을 기준으로 각각 세포주별로 선정된 상위 10종은 식품 소재 추출물 1종에 대한 결과로써, 식품 소재의 혼합을 통해 기능성 식품 소재의 효능성을 극대화하기 위하여 다양한 조합의 혼합 추출물을 대상으로 C3H10T1/2 세포주와 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에서 MTT 분석과 ALP 활성을 확인하였음.
- 혼합 추출물을 구성하기 위한 식품 소재 추출물은 각 실험 대상 세포주에서의 ALP 활성이 높은 것을 기준으로 2 세포주에 대해 3종씩을 선택하였는데, 여기에는 단독 식품 소재의 골다공증에 대한 특허가 존재하는 식품 소재(백강잠, 고삼, 갈근, 독활, 금앵자)는 제외하였음.
- ALP활성이 높은 단독 식품 소재 중 몇 종은 골다공증에 대한 기존 특허 식품소재들이 포함되었음. 이러한 결과는 본 과제 연구진의 골다공증 예방 및 증진 기능성 식품 소재 탐색에 대한 분석 방법에 신뢰성 있다는 것을 증명하는 것임.
- 결론적으로 C3H10T1/2 세포주에서 선택한 3종류의 식품 소재 추출물(적정 농도)은 옷(50 ug/ml), 유백피(50 ug/ml), 지골피(10 ug/ml)이며, MC3T3-E1 세포주에서 선택한 3종류의 식품 소재 추출물(적정 농도)은 희렴(10 ug/ml), 우슬(10 ug/ml), 속단(10 ug/ml)임. 이들 6종류의 식품 소재 추출물을 2종류씩 혼합할 경우 15가지의 혼합이 가능하여 총 15 종류의 혼합 추출물을 대상으로 C3H10T1/2 세포주와 MC3T3-E1 세포주에서의 ALP 활성과 MTT를 측정하였음.

표 4. 15종의 혼합 추출물에 대한 MTT & ALP assay in C3H10T1/2 cells

No.	Mixed extracts (Conc.($\mu\text{g/ml}$))	MTT		ALP	
		value	Level	value	Level
1	Control	100 \pm 2.4%		100 \pm 3.15%	
2	속단(50) + 지골피(10)	162.5 \pm 3.14%	+++	127.86 \pm 0.76%	+
3	지골피(10) + 우슬(10)	104.59 \pm 4.03	.	123.7705 \pm 3.8%	+
4	희렴(10) + 우슬(10)	109.55 \pm 2.43%	.	120.49 \pm 4.23%	+
5	옷(50) + 희렴 (10)	151.31 \pm 4.4%	+++	118.03 \pm 7.4%	+
6	속단(50) + 희렴(10)	154.59 \pm 2.62%	+++	116.93 \pm 1.38%	+
7	옷(50) + 지골피 (10)	166.81 \pm 8.85%	+++	110.66 \pm 3.75%	+
8	희렴(10) + 지골피(10)	108.9 \pm 0.936%	.	107.37 \pm 3.1%	.
9	옷(50) + 우슬 (10)	152.9 \pm 8.99%	+++	104.92 \pm 1.56%	.
10	유백피(50) + 우슬(10)	134.08 \pm 3.09%	++	103.27 \pm 6.73%	.
11	유백피(50) + 희렴(10)	155.52 \pm 1.69%	+++	103.27 \pm 6.84%	.
12	속단(50) + 우슬(10)	155.43 \pm 11.24%	+++	100.81 \pm 0.89%	.
13	옷(50) + 유백피 (50)	144.48 \pm 4.31%	++	100 \pm 0.01%	.
14	속단(50) + 유백피(10)	141.2 \pm 5.9%	++	97.54 \pm 5.49%	.
15	유백피(50) + 지골피(10)	141.67 \pm 6.65%	++	96.721 \pm 0.76%	.
16	옷 (50) + 속단 (50)	150.19 \pm 0.37%	+++	96.72 \pm 0.47%	.

○ 중간엽줄기세포인 C3H10T1/2 세포주 대상 시험에서 15종의 ALP 활성화와 MTT분석에 대한 결과는 표 4와 그림 4-1, 그림 4-2와 같으며, ALP 활성화 기준으로 살펴보면 속단+지골피 혼합 추출물이 가장 좋은 효과를 보여 주고 있음. 그 다음으로 지골피+우슬, 희림+우슬, 옷+희림, 속단+희림 등의 순으로 ALP 활성이 높게 나온 결과를 보여 주고 있음.

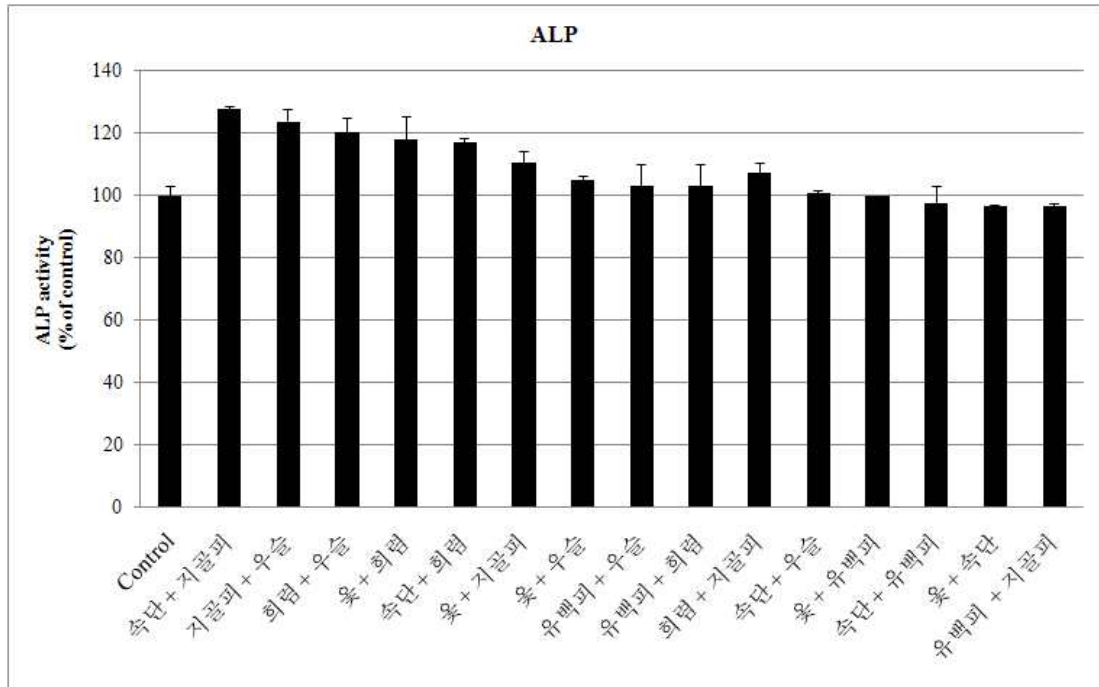


그림 4-1. C3H10T1/2 세포주에서 15종의 혼합 추출물에 대한 ALP 활성화 결과

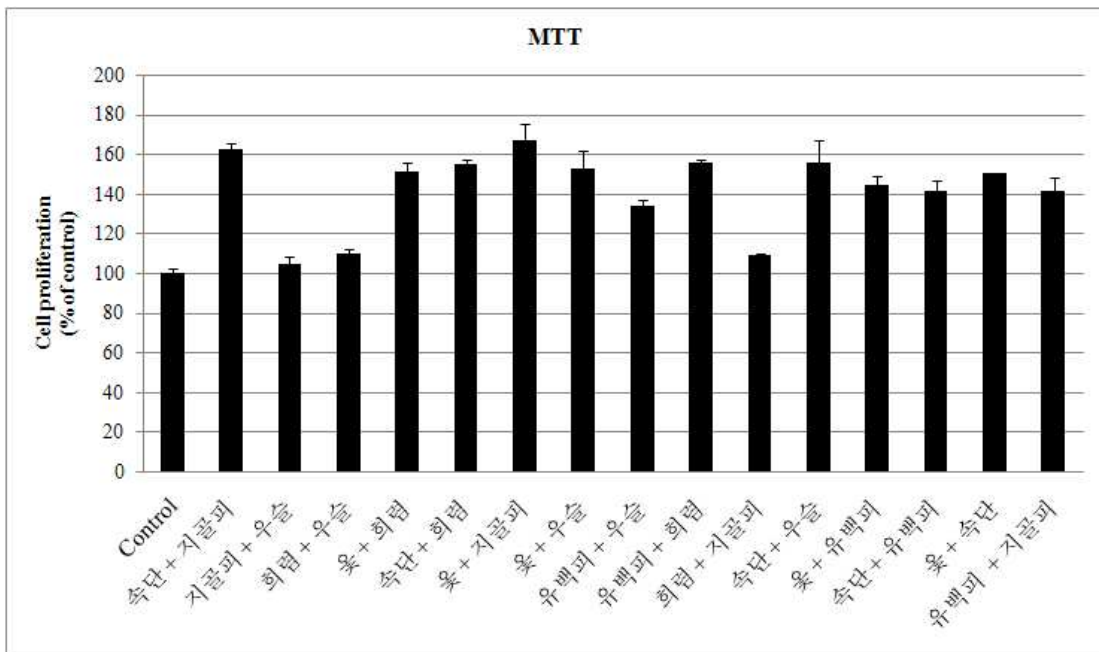


그림 4-2. C3H10T1/2 세포주에서 15종의 혼합 추출물에 대한 MTT 분석 결과

○ 조골모세포인 MC3T3-E1 세포주를 대상 시험에서 15종의 ALP 활성과 MTT분석에 대한 결과는 표 5와 그림 5-1, 그림 5-2와 같으며, ALP 활성 기준으로 옷+지골피 혼합 추출물이 가장 좋은 효과를 나타 내었음. 그 다음으로 지골피+우슬, 희렴+지골피, 희렴+우슬, 옷+우슬 등의 순으로 ALP 활성이 높게 나타났음.

표 5. 15종의 혼합 추출물에 대한 MTT & ALP assay in MC3TC-E1 cells

No.	Mixed extracts (Conc.($\mu\text{g/ml}$))	MTT		ALP	
		value	Level	value	Level
1	Control	100 \pm 3.13%		100 \pm 5.79%	
2	옷(50) + 지골피(10)	102.01 \pm 0.41%	.	125.56 \pm 3.6%	+
3	지골피(10) + 우슬(10)	91.13 \pm 0.68%	.	118.49 \pm 1.5%	+
4	희렴(10) + 지골피(10)	88.10 \pm 1.36%	-	116.69 \pm 0.73%	+
5	희렴(10) + 우슬(10)	90.58 \pm 3.4%	.	116.24 \pm 3.31%	+
6	옷(50) + 우슬(10)	100.23 \pm 2.36%	.	116.24 \pm 3.31%	+
7	속단(50) + 지골피(10)	97.80 \pm 1.22%	.	111.57 \pm 3.31%	+
8	속단(10) + 우슬(10)	106.68 \pm 0.36%	.	110.97 \pm 1.65%	+
9	옷(50) + 속단(50)	95.13 \pm 0.68%	.	109.02 \pm 5.5%	.
10	유백피(50) + 지골피(10)	89.15 \pm 3.35%	-	102.10 \pm 3.01%	.
11	유백피(50) + 우슬(10)	94.29 \pm 1.27%	.	101.95 \pm 3.87%	.
12	속단(50) + 희렴(10)	94.53 \pm 2.26%	.	98.345 \pm 6.61%	.
13	옷(50) + 희렴(10)	98.03 \pm 0.95%	.	88.72 \pm 9.17%	-
14	유백피(50) + 희렴(10)	84.33 \pm 0.45%	-	87.66 \pm 2.26%	-
15	속단(50) + 유백피(50)	85.60 \pm 0.86%	-	87.06 \pm 2.26%	-
16	옷(50) + 유백피(50)	96.86 \pm 1.04%	.	83.90 \pm 7.82%	-

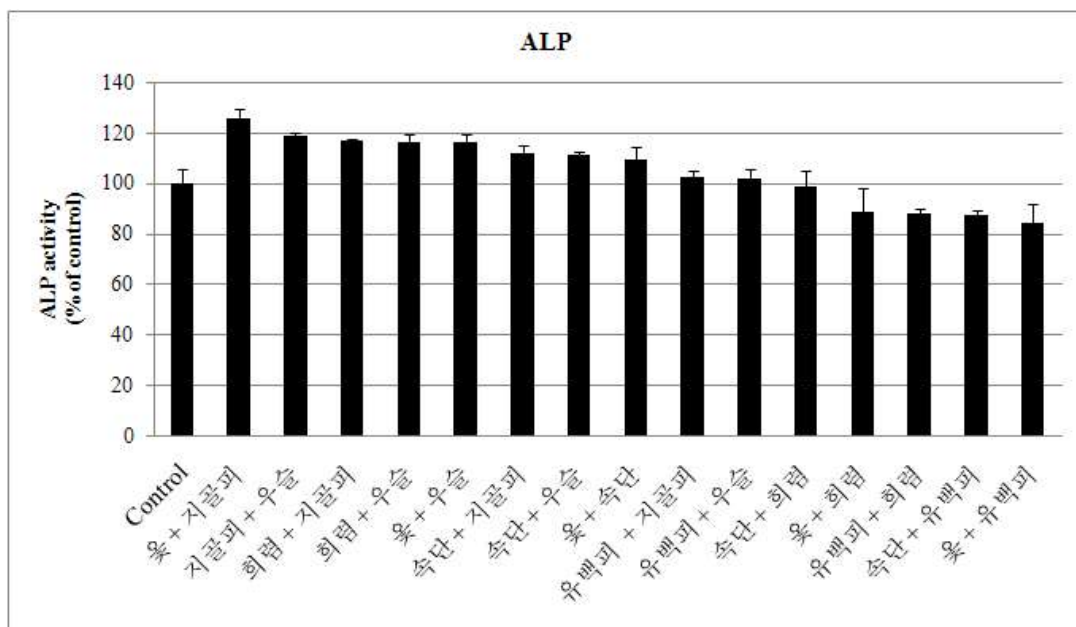


그림 5-1. MC3T3-E1 세포주에서 15종의 혼합 추출물에 대한 ALP 활성 결과

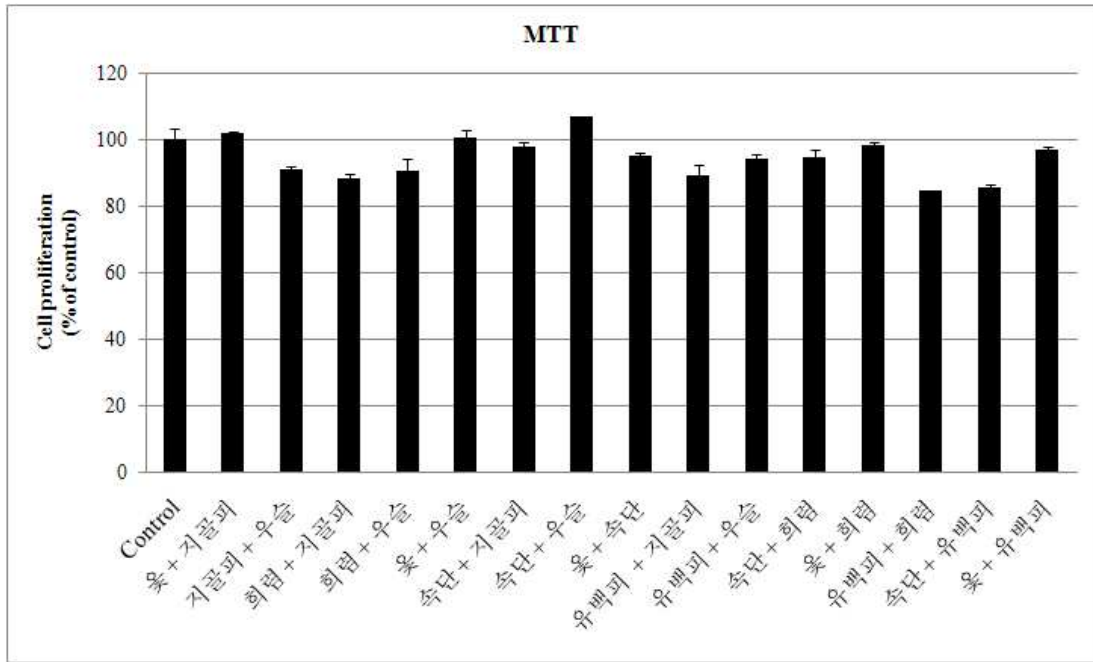


그림 5-2. MC3T3-E1 세포주에서 15종의 혼합 추출물에 대한 MTT 분석 결과

- 골다공증 관련 유전자 마커의 변화 확인을 통한 효능 극대화 확인을 하기 위하여 기존의 골다공증과 관련되어 검증된 조골세포의 유전자 마커인 ALP, RUNX2, BGLAP (Osteocalcin, OCN), SPP1 (Osteopontin, OPN), SP7 (Osterix, OTX)의 5종과 본 과제 연구진의 검증을 거쳐 선정한 5종의 유전자 (ANXA6, COL5A1, ENO1, MYOF, SCARA5)의 발현 변화를 분석하였음.
- 본 과제 연구진이 선행연구에서 새로운 조골세포 마커로서 5종의 유전자를 선정하게 된 과정은 연구과제 신청 시 상세히 기술하였으나, 간단히 서술하면, 골다공증 세포 모델에서 10종의 DEG (differentially expressed gene)을 발굴 하여, 세포 모델과 골다공증 마우스 모델에서 검증을 통과한 7종의 유전자에 대해 한국인 여성 코호트 1,813명을 대상으로 상관분석을 시행한 결과, 최종 5종의 유전자가 골다공증 연관 유전자 마커로 선정됨. 이들 5종의 유전자는 연구의 전 과정에서 의미 있는 발현량 차이를 보이거나, 골밀도/골다공증과 유의한 상관관계를 보여주었음. 이결과는, 선행연구에서 밝혀진 5종 유전자(ANXA6, COL5A1, ENO1, MYOF, SCARA5)가 골다공증 관련 유전적 요인일 가능성이 높음. 따라서, 이러한 유전자의 발현을 조절함으로써 골다공증 예방 및 개선 효과가 있는 기능성 식품 소재를 탐색하는 기술에 활용하는 것에 대한 가능성이 매우 높음을 알 수 있음(표 6).
- 표 6의 결과를 살펴 보면, 골다공증군에서 정상군에 비해 4종의 유전자(ANXA6, COL5A1, MYOF, SCARA5)의 발현량은 증가하고 있고, ENO1 유전자의 발현량은 감소하고 있음. 따라서, 골다공증 예방 및 개선 건강식품 소재 탐색에 있어서 4종의 유전자의 발현량은 감소시키고, ENO1 유전자의 발현량은 증가시키는 변화의 양상을 보여주는 식품 소재를 찾고자 하였으며 이러한 분석 결과를 바탕으로 유전자 차원에서의 식품소재의 효능을 확인하였음.
- C3H10T1/2 세포주와 MC3T3-E1 세포주에서 식품 소재 추출물 (단독 또는 혼합)의 골다공증 관련 유전자 마커 변화를 확인하기 위해 총 10 종의 유전자(기존 5종, 개발된 5종)의 mRNA 발현은 real-time RT PCR로 분석하였음. 사용하는 real-time RT PCR용 프라이머

는 표 7에 기재되어 있으며, real-time RT PCR은 95℃에서 10분 동안 1회, 95℃에서 20초, 62℃에서 20초, 72℃에서 40초로 이어지는 반응을 45회, 그리고 마지막으로 melting curve를 작성하기 위해 95℃에서 60℃까지 0.2℃씩 온도를 내리는 조건으로 수행하였음.

표 6. 골다공증 연관 후보 유전자 발굴 및 골밀도/골다공증 상관분석 결과의 요약

Mouse Gene symbol	DD		qRT-PCR				Human Gene symbol	SNP No.	Number of significant SNPs (lowest p value)		
	Cell line		Cell line		Mouse				>50s Women		
	Con	Dex	Con	Dex	Sham	OVX			BD-RT	BD-TT	Osteoporosis
<i>AnaxA6</i>	+	++	1.0	2.8	1.0	1.5	<i>ANXA6</i>	18	1 (0.039)	3 (0.024)	N/D
<i>Cnn3</i>	+	++	1.0	1.3	1.0	1.1	<i>CNN3</i>	-	-	-	-
<i>Col5a1</i>	+	++	1.0	2.1	1.0	1.9	<i>COL5A1</i>	29	3 (0.0055)	4 (0.027)	5 (0.008)
<i>Col6A2</i>	++	+++	1.0	2.8	1.0	2.2	<i>COL6A2</i>	3	0	0	0
<i>Eno1</i>	+++	++	1.0	0.8	1.0	0.7	<i>ENO1</i>	3	2 (0.027)	2 (0.009)	2 (0.015)
<i>Kitl</i>	+	++	1.0	2.6	1.0	1.9	<i>KITL</i>	9	0	0	0
<i>Myof</i>	+	+++	1.0	3.2	1.0	2.3	<i>MYOF</i>	29	3 (0.0053)	2 (0.034)	7 (0.006)
<i>Nfib</i>	+	++	1.0	2.6	1.0	1.1	<i>NFIB</i>	-	-	-	-
<i>Scara5</i>	+	+++	1.0	3.0	1.0	2.2	<i>SCARA5</i>	25	1 (0.01)	1 (0.045)	2 (0.017)
<i>S100a10</i>	+++	++	1.0	2.4	1.0	1.2	<i>S100A10</i>	-	-	-	-

Abbreviations: DD, differential display; BD-RT, bone density estimated by T-score at distal radius; BD-TT, bone density estimated by T-score at midshaft tibia; N/D, not detect.

표 7. 골다공증 관련 유전자 마커의 발현량 확인을 위한 프라이머 서열 정보

종류	유전자	서열이름	서열 정보 (5'→3')
Relative Control	<i>Gapdh</i>	Gapdh-F	TGA CCA CAG TCC ATG CCA TC
		Gapdh-R	GAC GGA CAC ATT GGG GGT AG
기존의 유전자 마커	<i>Alp</i>	Alp-F	TCC CAC GTT TTC ACA TTC GG
		Alp-R	CCC GTT ACC ATA TAG GAT GGC C
	<i>Runx2</i>	Runx2-F	TAA AGT GAC AGT GGA CGG TCC C
		Runx2-R	TGC GCC CTA AAT CAC TGA GG
	<i>Bglap</i> (Osteocalcin)	Bglap-F	TAG TGA ACA GAC TCC GGC GCT A
		Bglap-R	TGT AGG CGG TCT TCA AGC CAT
	<i>Spp1</i> (Osteopontin)	Spp1-F	AGC AAG AAA CTC TTC CAA GCA A
		Spp1-R	GTG AGA TTC GTC AGA TTC ATC CG
<i>Sp7</i> (Osterix)	Sp7-F	ATG GCG TCC TCT CTG CTT G	
	Sp7-R	TGA AAG GTC AGC GTA TG GCT T	
개발된 유전자 마커	<i>Anxa6</i>	Anxa6-F	CAC AGG GTG CCA TGT ACC G
		Anxa6-R	GAG GTC CTT GCC ATA CAG GG
	<i>Col5a1</i>	Col5a1-F	CAA TTT GCC CTC AGG GGT AAC
		Col5a1-R	TCC TCG GGA AAA CCA GAC TCA
	<i>Eno1</i>	Eno1-F	GCT GCC TCC GAG TTC TAC AG
		Eno1-R	GCA GGG ATT CGG TCA CAG AG
	<i>Myof</i>	Myof-F	TGA TCG AGG GCC GTC AGT TAT
		Myof-R	CTG TCA CTC ACC TTA AAT TCC CC
<i>Scara5</i>	Scara5-F	ACC GGA CAG CTC GTT TTG G	
	Scara5-R	AGG GGA CAG TAC AAG TCA CCC	

○ C3H10T1/2 세포주에서의 골다공증 관련 유전자 마커의 변화 검증을 통한 효능 극대화 확인을 하기 위한 식품 소재 추출물은 상기 C3H10T1/2 세포주를 대상으로 시행된 ALP 활성과 MTT 분석 결과를 토대로 하여 단독 식품 소재 추출물 3종류 (옥, 유백피, 지골피), 혼합 식품 소재 추출물 3종류 (속단+지골피, 옥+희랍, 우슬+지골피)로 각각 10 종의 유전자 마커 변화를 확인 하였으며, 그 결과는 **그림 6-1, 그림 6-2(유전자 마커별 결과)와 그림 7-1, 그림 7-2 (유전자군별 종합결과)에** 도식화하였음.

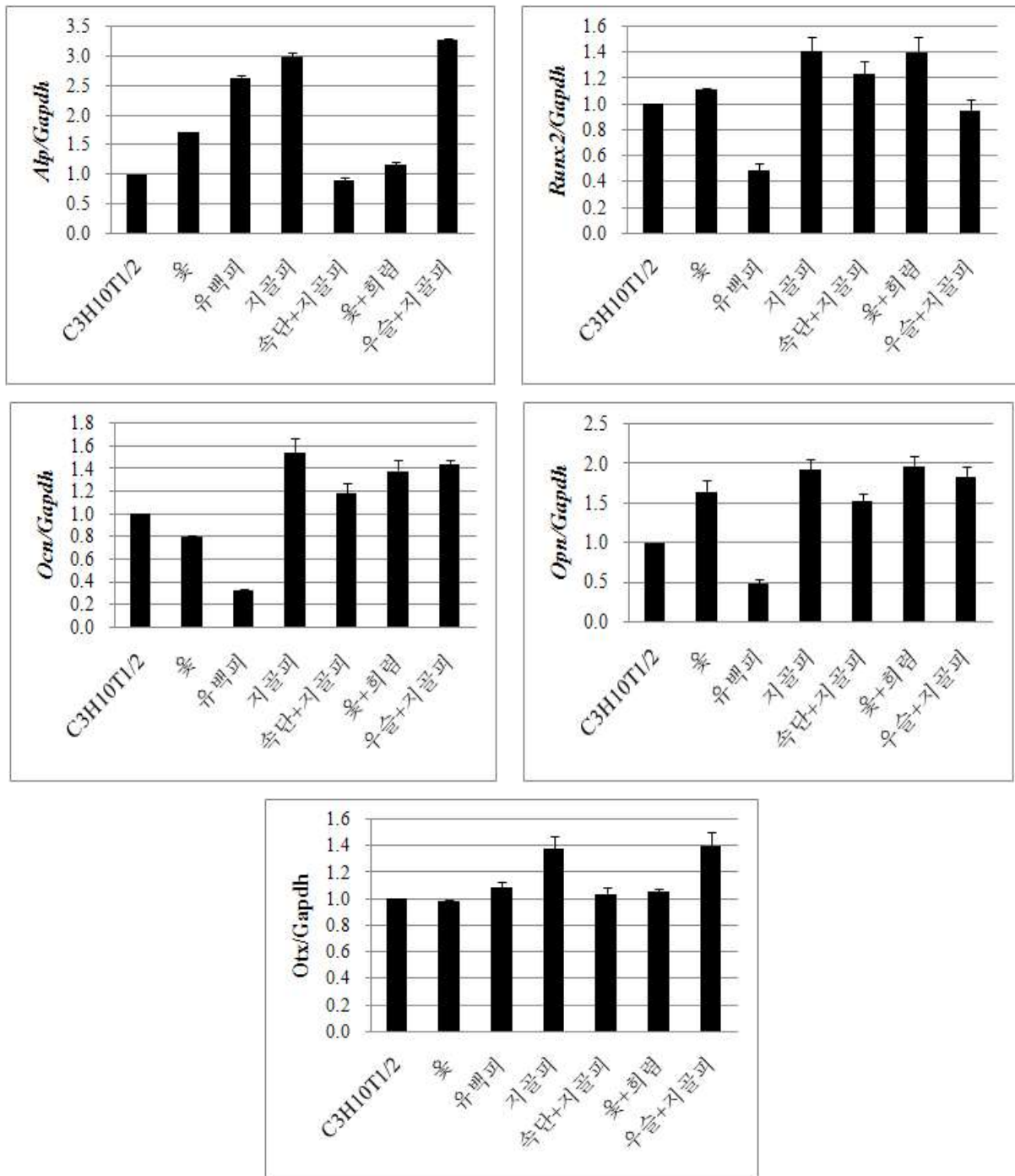


그림 6-1. C3H10T1/2 세포주에 식품 소재 단독 및 혼합 추출물이 기존 유전자 마커 5종의 mRNA 발현량에 미치는 변화 확인

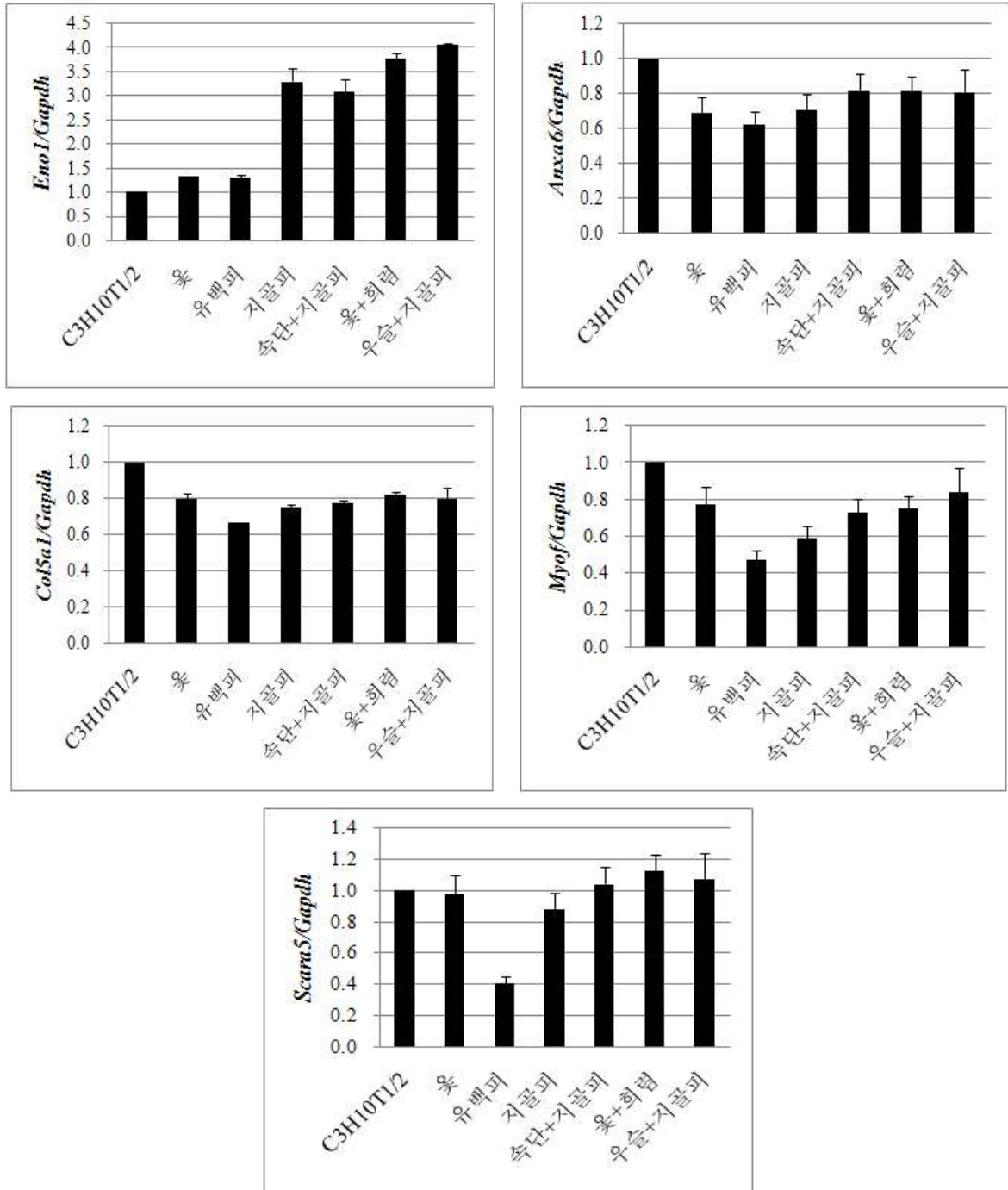


그림 6-2. C3H10T1/2 세포주에 식품 소재 단독 및 혼합 추출물이 개발된 유전자 마커 5종의 mRNA 발현량에 미치는 변화 확인

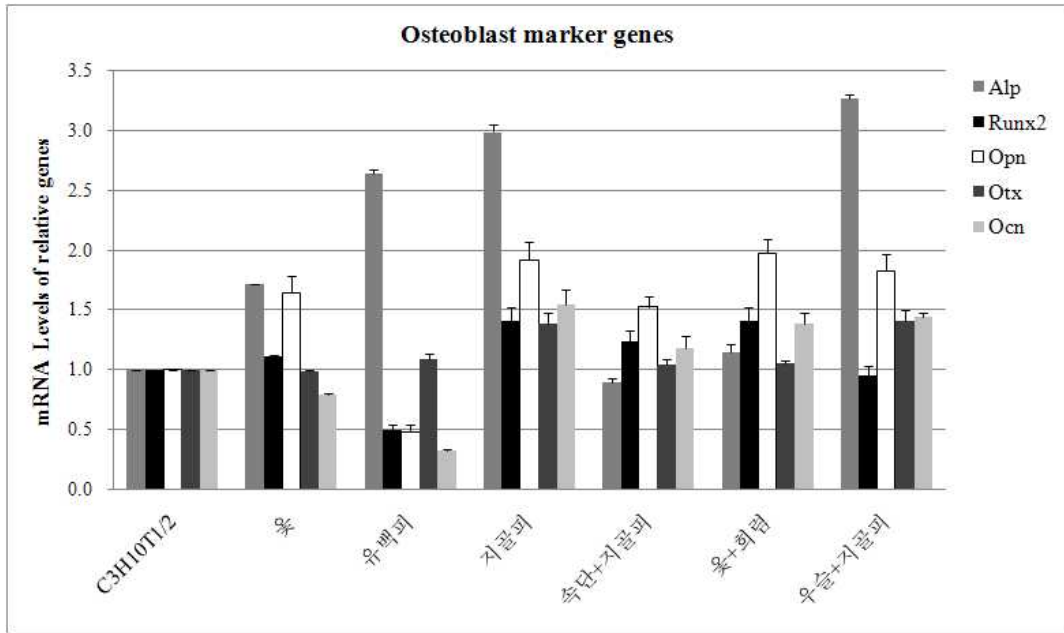


그림 7-1. C3H10T1/2 세포주에 식품 소재 단독 및 혼합 추출물이 기존 유전자 마커 5종의 mRNA 발현량에 미치는 변화 종합 확인

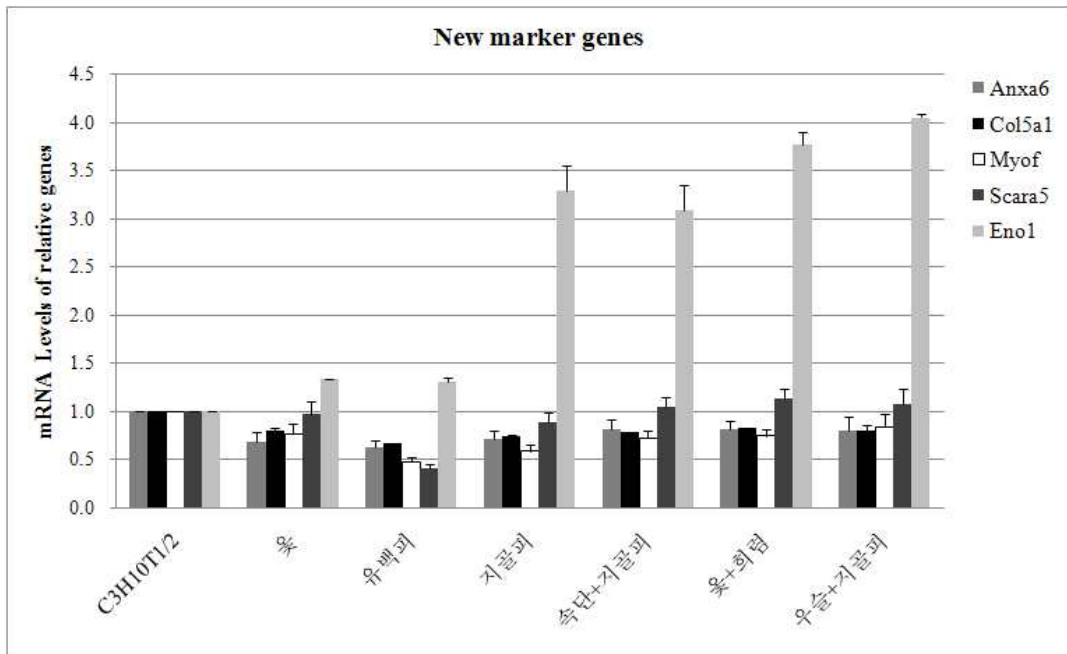


그림 7-2. C3H10T1/2 세포주에 식품 소재 단독 및 혼합 추출물이 개발된 유전자 마커 5종의 mRNA 발현량에 미치는 변화 종합 확인

○ C3H10T1/2 세포주에서의 골다공증 관련 유전자 마커의 변화 양상을 살펴 보면, 지골피 단독으로 처리한 군에서 기존의 조골세포 분화 마커들은 증가 시키고, 개발된 유전자 마커들 중 Eno1은 증가시키고, 나머지 다른 4종의 유전자의 발현량은 감소시키는 가장 이상적인 결과를 보여 주고 있음. 혼합 식품 소재 추출물에서도 지골피가 혼합된 2 종류의 군 (속단+지골피, 우슬+지골피)에서의 유전자 마커 발현량 양상이 양호한 결과를 보여 주고 있음. 이

러한 C3H10T1/2 세포주에서의 결과에 따라 단독 식품 소재 추출물로는 지골피를 선정하였고, 복합 식품 소재 추출물로는 지골피가 혼합되어 있지 않으면서 효과가 좋은 것으로 판정된 옷+희림의 혼합을 우선 선정하였음.

- 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에서의 골다공증 관련 유전자 마커의 변화 검증을 통한 효능 극대화 확인을 하기 위한 식품 소재 추출물은 상기 MC3T3-E1 세포주를 대상으로 시행된 ALP 활성과 MTT 분석 결과를 토대로 하여 단독 식품 소재 추출물 3종류 (속단, 희림, 우슬), 혼합 식품 소재 추출물 3종류 (옷+지골피, 우슬+지골피, 우슬+희림)로 각각 10 종의 유전자 마커 변화를 확인 하였으며, 그 결과는 그림 8-1, 8-2 (유전자 마커별 결과)와 그림 9-1, 그림 9-2 (유전자군별 종합결과)에 도식화하였음.

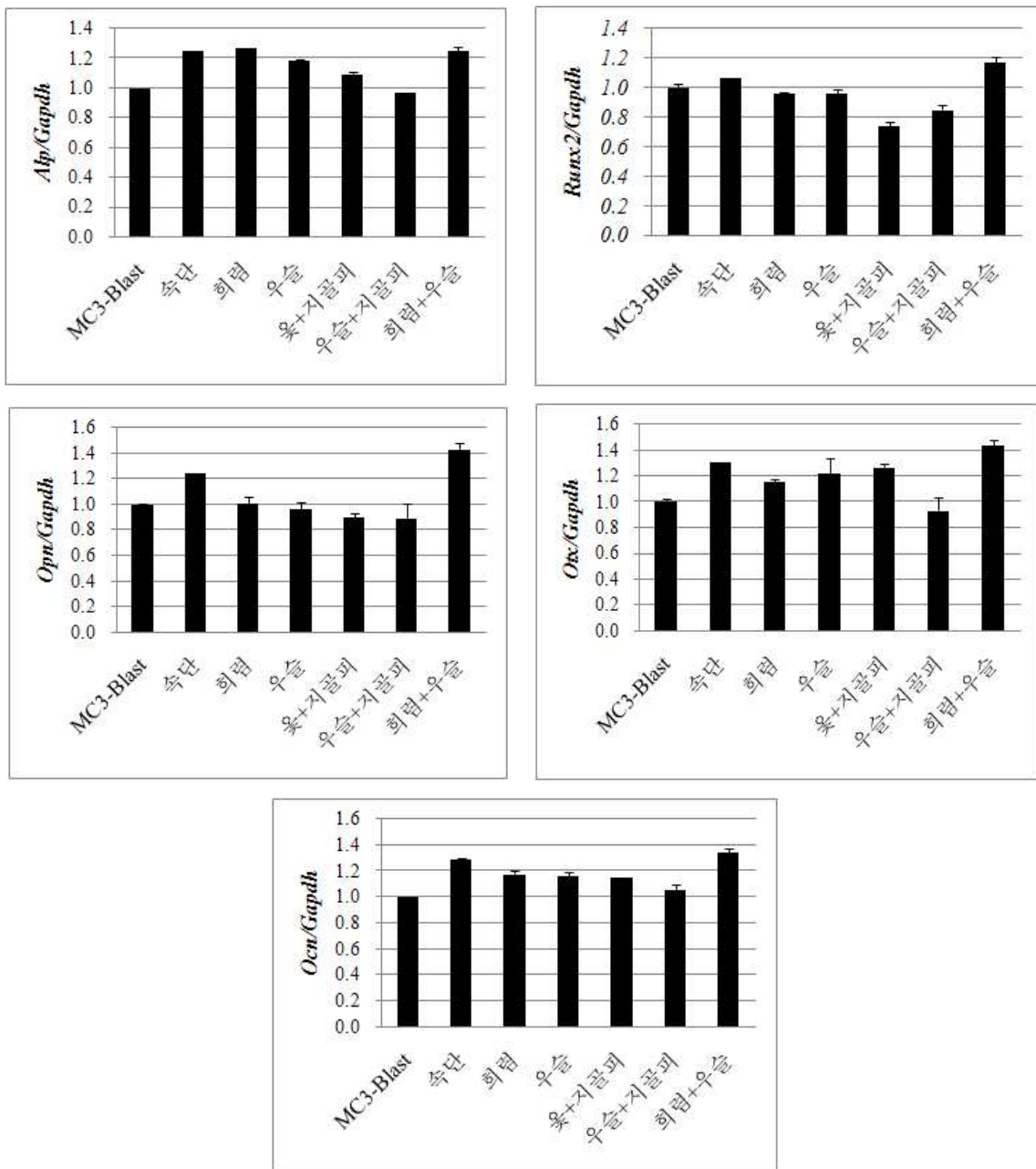


그림 8-1. 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에 식품 소재 단독 및 혼합 추출물이 기존 유전자 마커 5종의 mRNA 발현량에 미치는 변화 확인

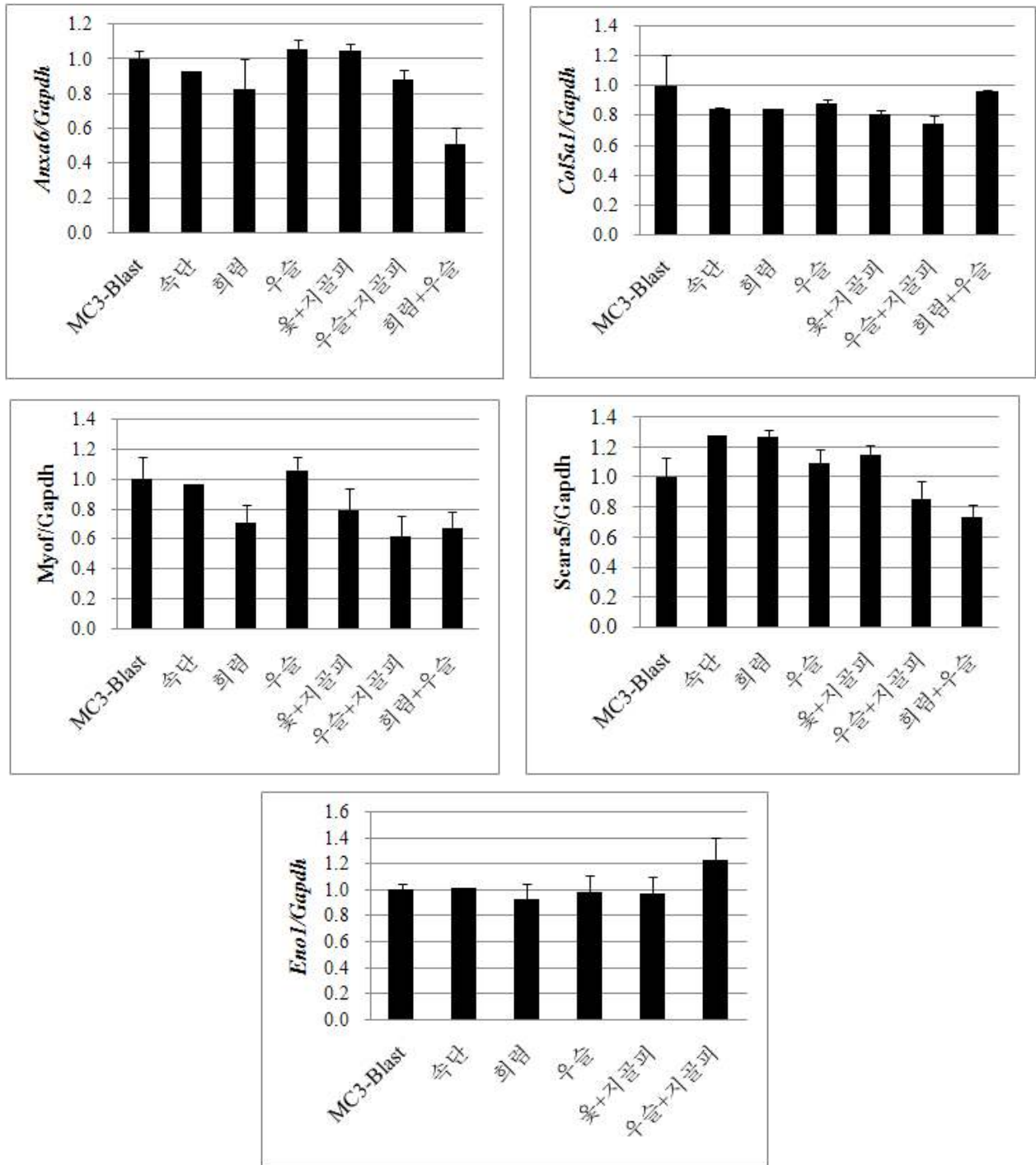


그림 8-2. 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에 식품 소재 단독 및 혼합 추출물이 개발된 유전자 마커 5종의 mRNA 발현량에 미치는 변화 확인

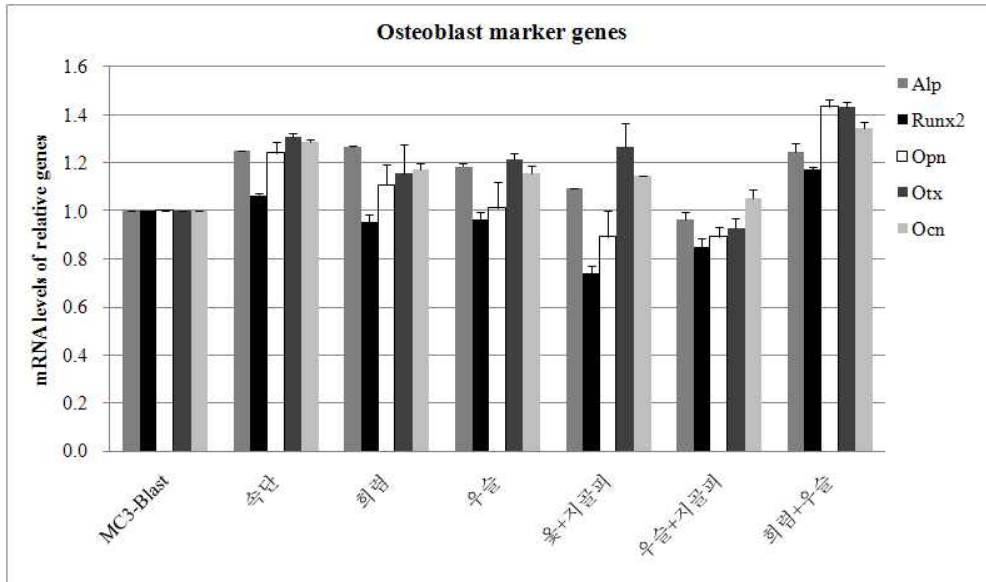


그림 9-1. 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에 식품 소재 단독 및 혼합 추출물이 기존 유전자 마커 5종의 mRNA 발현량에 미치는 변화 종합 확인

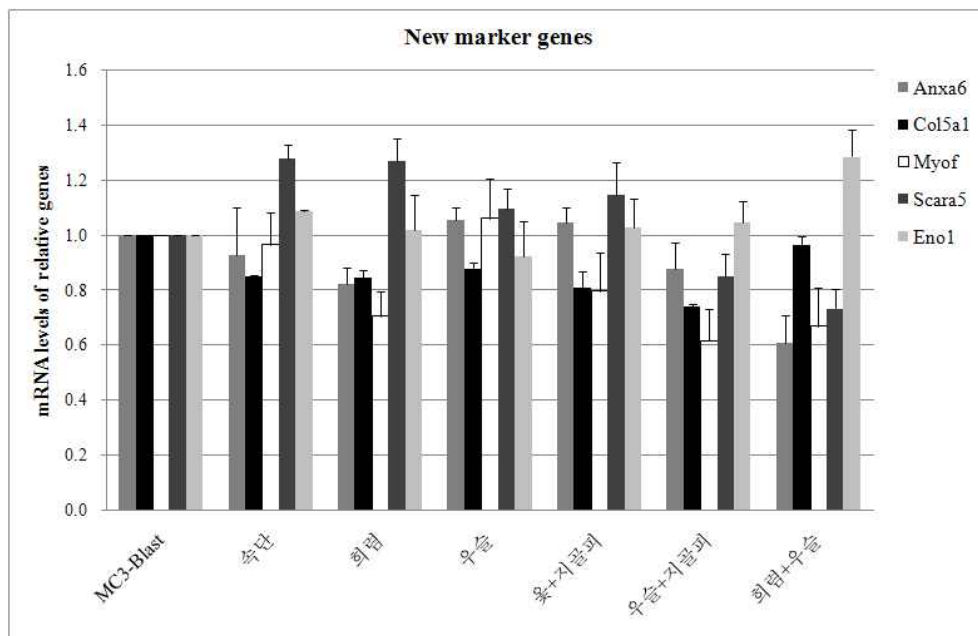


그림 9-2. 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에 식품 소재 단독 및 혼합 추출물이 개발된 유전자 마커 5종의 mRNA 발현량에 미치는 변화 종합 확인

- 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에서의 골다공증 관련 유전자 마커의 변화 양상을 살펴보면, 회령+우슬로 구성된 혼합 추출물을 처리한 군에서 기존의 조골세포 분화 마커들은 증가시키고, 개발된 유전자 마커들 중 Eno1은 증가시키고, 나머지 다른 4종의 유전자의 발현량은 감소시키는 가장 이상적인 결과를 보여 주고 있음. 이러한 MC3T3-E1 세포주에서의 결과에 따라 복합 식품 소재 추출물로는 우슬+회령의 혼합을 우선 선정하였고, 단독 식품 소재 추출물로는 복합 식품 소재 추출물에 구성되지 않으면서, 효과가 좋은 것으로 판정된 속단을 우선 선정하였음.

○ 복합 식품 소재 추출물로는 1차적으로 옷+희렴, 우슬+희렴으로 구성된 4종류의 식품 소재 추출물을 선정하였으나, 현재 옷은 식품으로 등록되어 있지 않았기 때문에 차년도 연구대상에서 제외하였음. 추가 식품소재 연구에서 상심자+독활이 옷+희렴보다 더 좋은 효능을 보였음(그림 10).

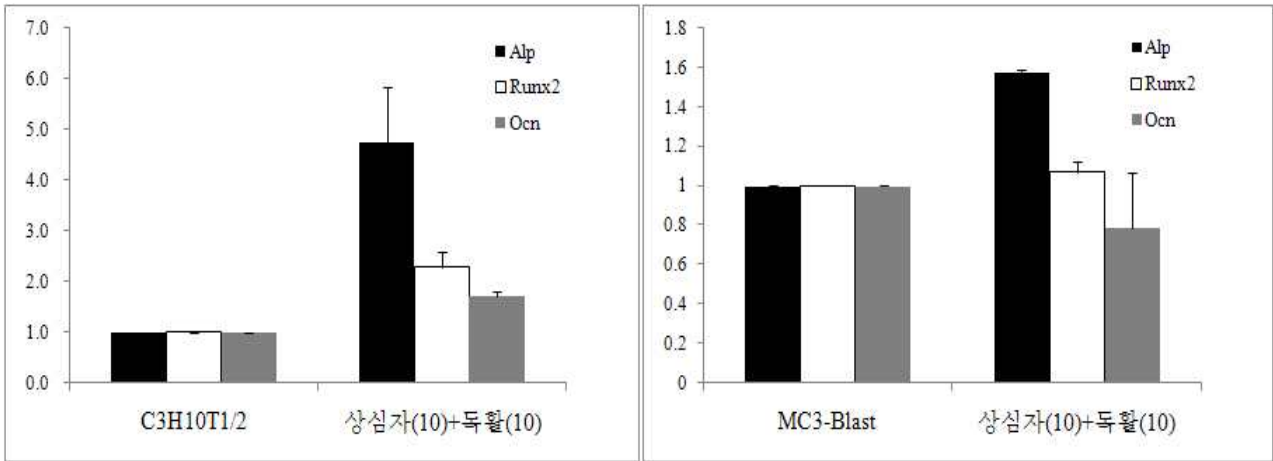


그림 10. C3H10T1/2 세포주와 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에서 상심자+독활 복합물의 조골세포분화 마커 mRNA 발현량에 미치는 변화 분석

□ 최종 식품 소재의 선정

○ 2 종류의 세포주 (C3H10T1/2 세포주, 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주) 대상으로 골다공증 예방 및 증진 기능성 식품 소재 추출물 탐색의 과정에 대한 상기의 결과들을 종합하여, 다음의 4가지를 최종적으로 선정하였음.

- ① 지골피
- ② 지골피+속단
- ③ 우슬+희렴
- ④ 상심자+독활

□ 특허 중복성에 대한 검토

○ 후보 식품 소재를 발명의 명칭으로 하여 등록되어 있는 특허 정보 현황(KIPRIS 특허정보검색서비스 검색 결과)

식품 소재	번호	출원번호	발명의 명칭
지골피	1	1020090046648	지골피, 동충하초, 가시오가피의 추출물을 함유하는 항당뇨 조성물
	2	1020130052491	상심 또는 지골피 추출물, 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 치매 또는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물
	3	1010027970000	연잎, 지부자, 지골피의 추출물과 피탄트리올을 함유하는 여드름 개선용 화장품 조성물

속단	1	1020120070146	인슐린 유사 성장인자 분비 및 뼈 골격 성장 촉진용 백하수추출물과 속단 추출물 및 그 제조방법
	2	1020100034335	속단 추출물을 유효성분으로 포함하는 지질 관련 심혈관 질환 또는 비만의 예방 및 치료용 조성물
	3	1020130009419	다발성 경화증의 예방 또는 치료용 조성물
	4	1020120153825	세복수초 추출물 또는 그 유효물질을 이용한 항암제 조성물
희림	1	1020060050066	백출, 천마, 진피, 복령, 산사 및 희림을 포함하는 한약제제 혼합물의 동맥경화 및 관련 질환의 예방 및 치료용 추출물 및, 이를 유효성분으로 함유하는 동맥경화 및 관련 질환의 예방 및 치료용 건강식품 조성물
	3	1020060010603	반하, 백출, 천마, 진피, 복령, 산사, 희림 및 황련의 추출물을 유효성분으로 포함하는 고혈압 치료 또는 예방용 약제학적 조성물
	4	1020050070953	희림 추출물을 유효성분으로 하는 항암, 항산화 및 혈압강하의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물
우슬	1	1020000081211	오적골, 우슬, 두충, 오가피, 고비 및 구관을 주성분으로 함유하는 의약조성물 및 이를 주성분으로 함유한 약학적 제제
	2	1020000071375	우슬, 오공, 두충, 오가피, 방풍을 주성분으로 함유하는 의약 조성물 및 이를 주성분으로 함유하는 약학적 제제
상심자	1	1005266310000	모노아민산화효소 저해활성을 갖는 상심자 추출물을 함유한 조성물
	2	1008390960000	상심자 추출물을 함유하는 면역증강용 조성물
	3	1005697880000	상심자, 상업 또는 상백피를 포함하는 염모제용 조성물
독활	1	1008015110000	독활 추출물을 주요 성분으로 함유하는 동맥경화 예방 및 치료용 조성물
	2	1008290450000	독활 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 치주질환의 예방 또는 치료용 조성물
	3	1008303530000	독활의 에탄올 추출물을 함유하는 뇌혈관질환 예방 또는 치료제
	4	1009003430000	세포 독성 개선 및 간손상 억제 활성을 갖는 독활 추출물을 함유하는 간질환의 예방 및 치료용 조성물
	5	1007603850000	독활 추출물을 포함하는 관절 연골 손상 및 관절염의 예방 및 치료용 조성물

- 골관절염에 대한 특허와의 중복성 문제: 골관절염과 골다공증은 서로 다른 질환임. 골다공증은 뼈 자체의 골밀도에 이상이 생긴 질환이고, 골관절염은 뼈와 뼈마디 사이의 운동을 돕는 관절에 염증이 생기는 질환으로 뼈마디가 아프고, 특히 무릎이나 손목, 발목 등 관절부위에 통증이 나타난다는 점에 있어서 두 질환이 다름. 골관절염에 대한 특허는 ‘연골세포’의 성장/분화/활성 촉진에 대한 효능을 보는 것이며, 골다공증은 ‘조골세포’의 성장/분화/활성 촉진과 파골세포의 성장/분화/활성 억제에 대한 효능을 보는 것이기 때문에 기존의 특허와 중복성이 없다고 사료됨.
- 결론적으로, 지골피, 지고피+속단, 우슬+희림, 상심자+독활이 골다공증에 효능이 있다는 본 과제 **의 특허는 중복성이 없다고 판단됨**. 또한, 특허 출원 시에 변리사를 통하여 중복성이 없음을 이미 확인하였음.

4. 동물실험을 통한 효능 평가

□ 골다공증 동물 모델 제작 및 검증

- 골다공증의 in vivo 시험에서는 골다공증 유도 모델로 난소 절제술을 이용한다. 난소를 제거하면 사람에서의 폐경기와 같이 estrogen의 결핍으로 골형성은 감소하고 골흡수가 증가하여 2개월 후면 골다공증이 유도됨.
- 골다공증 동물 모델 제작 및 검증을 위한 준비 단계로 동물실험계획서를 아주대학교 의료원 동물실험윤리위원회에 제출하여 동물실험승인번호(AMC-133)를 이미 부여 받았음.
- 난소 절제술을 시행한 8주령의 암컷 ddY 마우스와 복강 절제 후 난소는 제거하지 않은 sham-operated 마우스를 구입하였음.
- 온-습도가 유지되는 청정 동물실에서 8주간 두 그룹을 동일한 조건에서 사육한 후, PIXI-mus bone densitometer로 골밀도를 측정(그림 11)하여 골다공증 마우스 그룹에서 골밀도 감소와 체지방률 증가를 확인하여 골다공증 동물 모델을 검증하였음(그림 12).

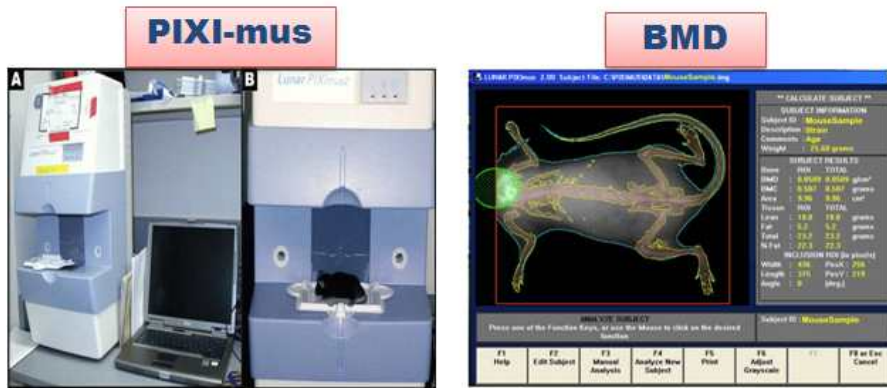


그림 11. 마우스 골밀도 측정기와 골밀도 분석 프로그램

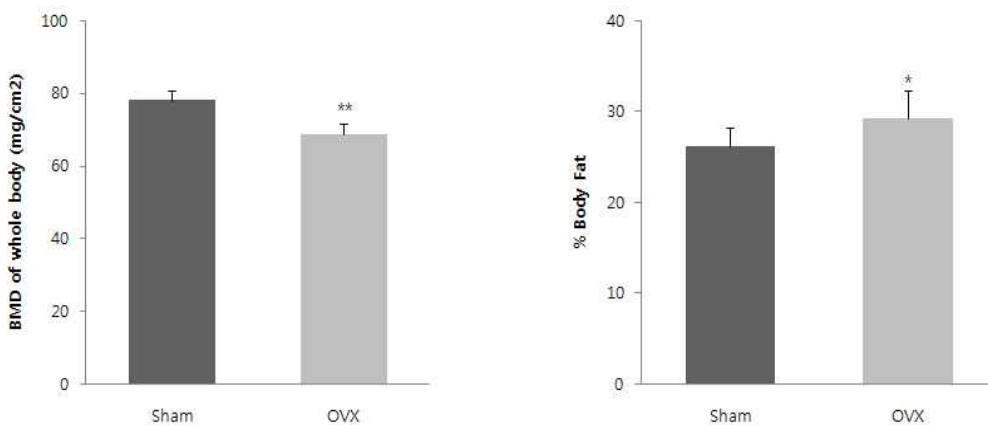


그림 12. 골밀도와 체지방률 측정을 통한 골다공증 마우스 모델의 검증. Sham-operated 마우스 군(Sham)과의 비교에서 난소 절제술을 시행한 마우스 군(OVX)에서 골밀도는 통계적으로 유의하게 11.8% 감소하였고, 체지방율은 유의하게 12.3% 증가하였음.

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Sham mice group)

□ 골다공증 동물 모델에 식품 소재 추출물 단기 투여 후 최종 2중 선정

- *In vitro* 실험에서 선정된 4종의 식품 소재(지골피, 지골피+속단, 우슬+희렴, 상심자+독활) 추출물에 대해 골다공증 모델 마우스를 대상으로 아래와 같이 8주간의 단기 투여를 통해 골밀도 개선 효과를 비교·분석하였음.
- 중앙실험동물(주)를 통해 5주령의 sham-operated ddY 암컷 마우스 4마리와 난소절제 ddY 암컷 마우스 52마리를 구입함. 아주대학교 실험동물센터 검역실에서 1주간의 순화기간을 거친 후 clean 동물사육구역으로 이동하여 실험함.
- 마우스 개체별 체중을 측정하여 그룹간의 통계적으로 유의한 체중 차이가 나지 않도록 아래와 같이 군 분리를 시행함(그림 13).

Sham			난소절제군		
1	33.8		1	G5	27.3
2	31.2		2	G3	30.0
3	30.6		3	J1	30.0
4	28.4		4	C3	33.4
평균	31.0		평균		30.2
SD	2.22		SD		2.50

지골피(저용량)			지골피(중용량)			지골피(고용량)		
1	K3	27.3	1	D3	27.9	1	E1	28.0
2	B3	29.9	2	G2	29.8	2	J3	29.7
3	C2	30.1	3	B2	30.3	3	K6	30.3
4	H4	33.3	4	E2	33.3	4	K2	33.2
평균		30.2	평균		30.3	평균		30.3
SD		2.46	SD		2.24	SD		2.165

지골피+속단(저용량)			지골피+속단(중용량)			지골피+속단(고용량)		
1	B5	28.1	1	K1	28.1	1	D2	28.3
2	I4	29.6	2	E3	29.6	2	C1	29.6
3	F5	30.4	3	C4	30.6	3	D4	30.7
4	K4	32.7	4	H5	32.6	4	A3	32.1
평균		30.2	평균		30.2	평균		30.2
SD		1.92	SD		1.89	SD		1.615

우슬+희렴(저용량)			우슬+희렴(중용량)			우슬+희렴(고용량)		
1	J2	28.3	1	G4	28.6	1	H1	28.6
2	J6	29.3	2	A4	29.3	2	I3	29.1
3	G1	30.9	3	I1	30.9	3	A2	31.1
4	D5	32.0	4	K5	31.9	4	B4	31.9
평균		30.1	평균		30.2	평균		30.2
SD		1.65	SD		1.50	SD		1.578

상심자+독활(저용량)			상심자+독활(중용량)			상심자+독활(고용량)		
1	A1	28.7	1	C5	28.7	1	F2	28.7
2	F1	29.1	2	I5	28.9	2	I2	28.9
3	D1	31.4	3	E5	31.5	3	H2	31.5
4	A5	31.8	4	J4	31.7	4	B1	31.7
평균		30.3	평균		30.2	평균		30.2
SD		1.58	SD		1.62	SD		1.621

그림 13. 식품소재 단기 투여 동물 실험 군 분리 결과 및 구성

- 실험에 사용할 식품 소재 추출물인 지골피, 속단, 우슬, 희렴, 상심자, 독활 추출물 각각은 100 mg/ml의 농도로 stock solution을 만들었으며, 실험동물센터의 반입을 위해 방사선 조사 전문업체인 소야그린텍(주)에 의뢰하여 감마선 조사를 통해 멸균 작업을 시행하였음.
- 식품 소재 추출물 투여 전에 PIXImus bone densitometer로 초기 골밀도를 측정하였음. 골밀도를 측정하기 전에 졸레틸과 럼푼 혼합 마취제(Zoletil과 Rompun 1:2 혼합액을 생리식염수와 2:3 비율로 희석함) 50 ul를 주사마취 한 후, 골밀도 측정 틀에 고정시키고 골밀도(BMD, Bone Mineral Density), 골량(BMC, Bone Mineral Content), 체지방율(%Fat)을 측정하였음(그림 14). 골밀도 측정이 종료 된 마우스는 원래의 동물케이지에 다시 위치시키고 마취가 깨어나 정상적으로 활동하는지를 확인하였음(이상 반응을 보이는 마우스는 없었음).

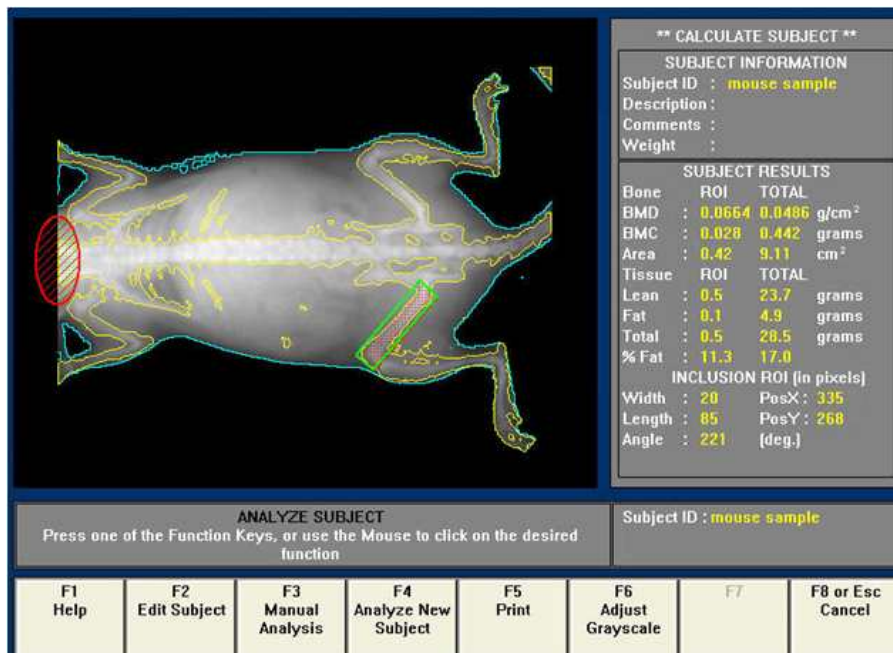


그림 14. 오른쪽 대퇴골(right femur) 부위를 지정한 골밀도 측정

- 골밀도 측정 후 다음날부터 4종의 식품 소재 추출물을 음수에 혼합하여 자유식이 시키기 시작하였음. 지골피 추출물은 단독으로, 지골피:속단의 1:5 혼합 추출물, 우슬:희렴의 1:1 혼합 추출물, 상심자:독활의 1:1 혼합 추출물을 각각 저용량 투여군은 50 mg/kg, 중용량 투여군은 150 mg/kg, 고용량 투여군은 300 mg/kg의 섭취량이 되도록 음수에 혼합하여 자유 식이를 하였음. 음수와 추출물의 혼합은 마우스 1마리당 1일 음수섭취량을 4 ml(식품 소재 추출물의 음용 여부에 대한 예비 실험에서 기 확인하였음)과 마우스 체중을 고려하여 혼합하였음.
- 추출물이 혼합된 음수병은 3일 간격으로 교체를 해 주었고, 주1회 체중을 측정하였으며, 주 1회 케이지를 교체 해 주었음.
- 식품 소재 추출물 투여 후 8주 후에 최종 체중을 측정하고, 주사 마취 후 골밀도(BMD, Bone Mineral Density), 골량(BMC, Bone Mineral Content), 체지방율(%Fat)을 동시에 측정하였음.

- 식품 소재 추출물 투여 전 초기 체중 측정값은 그룹간의 차이가 없도록 군분리를 시행하였기 때문에 난소절제군과 각 실험군의 Student's t-test를 통한 비교에서 통계적으로 유의한 차이가 없었음. 식품 소재 추출물 투여 8주 후의 최종 체중 측정값도 난소절제군과 각 실험군의 비교에서 통계적으로 유의한 차이가 없었음(표 8).
- 체중변화에 있어서는 난소절제군과 지골피 고용량군(p=0.033), 상심자+독활 고용량군(p=0.034)에서 통계적으로 유의한 차이가 있었으며, 2 군 모두가 체중변화량이 난소절제군에 비해 많은 것으로 나타남. 우슬+희렴 고용량군의 경우 난소절제군, Sham군에 비해 특이적으로 최종 체중이 적게 나왔으나, 통계적 유의성은 존재하지 않았음(표 8).

표 8. 골다공증 동물 모델의 4종의 식품 소재 단기 투여 시험의 체중 측정 결과

군과 용량군	초기 측정값	8주 후		체중변화	p value	
		체중	p value			
난소절제군	30.2 ±2.50	39.8 ±3.48		9.7 ±1.83		
Sham	31.0 ±2.22	38.6 ±3.69	0.640	7.6 ±4.82	0.451	
지골피	저용량	30.2 ±2.46	41.3 ±1.56	0.468	11.2 ±2.65	0.384
	중용량	30.3 ±2.24	42.1 ±4.92	0.479	11.8 ±4.17	0.387
	고용량	30.3 ±2.16	43.1 ±3.05	0.210	12.8 ±1.35	0.033
지골피+속단	저용량	30.2 ±1.92	42.4 ±6.57	0.518	12.2 ±5.13	0.390
	중용량	30.2 ±1.89	40.9 ±6.67	0.794	10.6 ±5.73	0.757
	고용량	30.2 ±1.62	43.5 ±5.93	0.326	13.3 ±4.53	0.183
우슬+희렴	저용량	30.1 ±1.65	40.8 ±3.39	0.695	10.7 ±2.19	0.490
	중용량	30.2 ±1.50	40.5 ±2.79	0.772	10.3 ±1.53	0.592
	고용량	30.2 ±1.58	36.9 ±3.11	0.261	6.8 ±1.67	0.057
상심자+독활	저용량	30.3 ±1.58	41.5 ±3.82	0.552	11.2 ±3.38	0.451
	중용량	30.2 ±1.62	41.3 ±3.44	0.575	11.1 ±3.38	0.487
	고용량	30.2 ±1.62	42.5 ±1.18	0.192	12.3 ±0.68	0.034

- 골량(BMC)와 체지방율(%Fat)은 마우스 머리 부분을 제외한 전체 영역을 대상으로 최종 측정값 만을 정리하였음. 골량(BMC)의 경우 Sham군이 난소절제군 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있으며, 높은 수치인 골량을 나타내고 있음. 체지방율(%Fat)은 난소절제군과 Sham군은 유의한 차이가 존재하지 않았으며, 지골피+속단 고용량군에서 유의하게 난소절제군에 비해 체지방율(%Fat)이 높은 것으로 나타남(표 9).
- 골밀도(BMD)는 대퇴부(Thigh) 부위의 측정값을 기준으로 하여 식품 소재 추출물 투여 전 초기 BMD, 최종 BMD, BMD 변화량 값을 산출하였음. 난소절제군과 Sham군의 비교에 있어서, 초기 BMD, 최종 BMD, BMD 변화량 값이 모두 통계적으로 유의한 차이가 존재하였으며, 모든 BMD 값에서 난소절제군이 낮은 수치를 보이고 있음. 특히, BMD 변화량에 있어서는 난소절제군과 Sham군의 골밀도가 모두 증가하였으나, Sham군의 증가량이 난소절제군에 비해 약 2.3배의 골밀도 증가가 관찰됨(표 9).

표 9. 골다공증 동물 모델의 4종의 식품 소재 단기 투여 시험의 골밀도(BMD), 골량(BMC), 체지방율(% Fat) 측정 결과

군과 용량군	8주 후 (Total body)				BMD (Right femur)						
	BMC	p value	%Fat	p value	초기 BMD	p value	8주 후 BMD	p value	BMD 변화량	p value	
난소절제군	0.49 ±0.039		28.78 ±3.43		0.072 ±0.002		0.082 ±0.002		0.010 ±0.002		
Sham	0.62 ±0.064	0.014	23.45 ±5.73	0.162	0.081 ±0.005	0.016	0.104 ±0.005	0.00015	0.023 ±0.002	0.00023	
지골피	50 mg/kg	0.45 ±0.033	0.168	32.23 ±5.24	0.313	0.074 ±0.004	0.404	0.088 ±0.003	0.018	0.014 ±0.003	0.103
	150 mg/kg	0.48 ±0.053	0.659	31.23 ±2.86	0.314	0.070 ±0.003	0.338	0.094 ±0.004	0.003	0.022 ±0.006	0.012
	300 mg/kg	0.48 ±0.028	0.620	34.20 ±3.25	0.061	0.073 ±0.002	0.514	0.092 ±0.005	0.009	0.020 ±0.004	0.010
지골피+숙단	50 mg/kg	0.49 ±0.064	0.995	32.30 ±8.60	0.475	0.074 ±0.006	0.434	0.091 ±0.003	0.006	0.015 ±0.002	0.046
	150 mg/kg	0.49 ±0.010	0.840	30.18 ±8.13	0.762	0.074 ±0.009	0.618	0.093 ±0.008	0.045	0.020 ±0.005	0.025
	300 mg/kg	0.47 ±0.028	0.485	35.20 ±3.93	0.049	0.075 ±0.002	0.084	0.090 ±0.004	0.013	0.014 ±0.003	0.092
상심자+독활	50 mg/kg	0.50 ±0.048	0.829	30.53 ±4.27	0.546	0.074 ±0.005	0.428	0.088 ±0.004	0.049	0.014 ±0.002	0.097
	150 mg/kg	0.52 ±0.075	0.588	30.93 ±5.12	0.511	0.075 ±0.005	0.349	0.089 ±0.003	0.019	0.014 ±0.001	0.055
	300 mg/kg	0.51 ±0.034	0.627	33.63 ±3.76	0.105	0.072 ±0.005	0.916	0.086 ±0.004	0.115	0.012 ±0.007	0.578
우슬+희림	50 mg/kg	0.48 ±0.048	0.728	29.58 ±3.28	0.748	0.073 ±0.004	0.713	0.087 ±0.005	0.144	0.014 ±0.003	0.085
	150 mg/kg	0.44 ±0.033	0.108	33.25 ±2.91	0.094	0.071 ±0.005	0.790	0.084 ±0.001	0.171	0.013 ±0.004	0.268
	300 mg/kg	0.54 ±0.057	0.258	25.35 ±2.20	0.144	0.071 ±0.005	0.918	0.087 ±0.009	0.250	0.016 ±0.006	0.123

- 실험군의 BMD 값 중 난소절제군과 비교하여 3종의 식품 소재 추출물(지골피, 지골피+숙단, 상심자+독활)이 유의한 차이가 있으며, 난소절제군에 비해 골밀도가 높은 것을 보여 주고 있음. 그러나, 지골피 투여군과 지골피+숙단 투여군에서는 모든 용량군에서 골밀도가 개선되는 효과를 보여 주고 있으나, 상심자+독활 투여군에서는 저용량군과 중용량군에서만 유의한 차이를 보이고 있음. 또한, BMD 변화량에서 지골피 중용량군, 고용량군과 지골피+숙단 저용량군과 중용량군에서 유의한 차이가 있었으나, 상심자+독활 혼합 추출물에서는 BMD 변화량의 유의한 차이가 존재하지 않았음. 따라서, 2종의 식품 소재 추출물 선정에 있어서는 지골피와 지골피+숙단 혼합 추출물을 선택하였음.
- 지골피 투여군 중 고용량군은 체중 변화와 체지방율에 있어서 비만을 유도할 가능성이 존재하고 있으며, 지골피 중용량 군이 골밀도 개선 효과가 가장 좋은 것으로 나타남. 지골피+숙단 고용량군 역시 체지방율을 유의하게 높이는 효과가 있는 것으로 나타나, 골밀도 개선 효과가 좋은 지골피+숙단 중용량군을 고려하였음.

□ 장기 투여 동물실험에 사용할 식품소재 최종 선정

- 상기의 결과를 종합하여, 2차 장기간의 동물실험에 사용할 식품 소재 추출물로는 다음의 2가지를 최종 선정하였음.
 - ① 지골피 중용량
 - ② 지골피+숙단 중용량

□ 선정된 2종의 식품소재에 대한 장기 투여 마우스 효능 검증

- 1차 단기 투여 동물 실험을 통해 선정된 2종의 식품소재(지골피, 지골피+숙단)를 아래와 같이 16주간 장기 투여 후의 골밀도 변화를 중심으로 정밀 평가하였으며, 1차 동물 실험에서

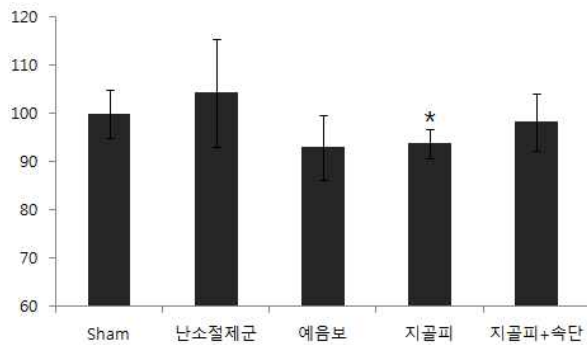
사용하지 않았던 양성 대조군[골다공증 건강기능식품 예음보(대두이소플라본 제품)]을 추가로 구성하여 비교·검증하였음.

- 전체 군 구성은 Sham 군(수술만 하고 난소 절제하지 않은 대조군), 난소절제군(골다공증 모델군), 예음보 투여군, 지골피 투여군, 지골피+속단 투여군의 5군으로 구성하였음. Sham 군, 난소절제군, 예음보 투여군은 각각 5마리씩 구성하였고, 식품 소재 투여군은 10마리씩 구성하였음.
- 1차 실험과 마찬가지로 동물 반입 후 1주간의 순화 과정 후 각 개체별 체중을 측정하여 군 간의 유의한 차이가 없도록 군분리를 시행하였음. 군분리 다음날 PIXImus bone densitometer로 초기 골밀도를 측정하였음. 골밀도를 측정하기 전에 졸레틸과 럽푼 혼합 마취제(Zoletil과 Rompun 1:2 혼합액을 생리식염수와 2:3 비율로 희석함) 50 ul를 주사마취 한 후, 골밀도 측정 틀에 고정시키고 골밀도(BMD, Bone Mineral Density), 골량(BMC, Bone Mineral Content), 체지방율(%Fat)을 측정하였음. 골밀도 측정이 종료 된 마우스는 원래의 동물케이지에 다시 위치시키고 마취가 깨어나 정상적으로 활동하는지를 확인하였음 (이상 반응을 보이는 마우스는 없었음).
- 골밀도 측정 후 다음날부터 예음보, 지골피, 지골피+속단 추출물을 음수에 혼합하여 자유식이 시키기 시작하였음. 예음보는 성인 여성 1일 1회 섭취량 20 ml을 기준을 마우스 체중에 맞게 보정한 양이 투여 되도록 음수에 혼합하여 자유 식이를 하였고, 지골피 추출물은 단독으로, 지골피:속단의 1:5 혼합 추출물을 중용량(150 mg/kg) 섭취량이 되도록 음수에 혼합하여 자유 식이를 하였음. 음수와 추출물의 혼합은 마우스 1마리당 1일 음수섭취량을 4 ml과 마우스 체중을 고려하여 혼합하였음.
- 예음보와 추출물이 혼합된 음수병은 3일 간격으로 교체를 해 주었고, 주1회 체중을 측정하였으며, 주1회 케이지를 교체 해 주었음. 각 군의 초기 측정 체중, 4주 간격 체중 및 16주 동안의 체중변화량은 아래 표 10과 같음. 4주 간격의 체중과 16주 체중변화는 난소절제군과 각각의 군에 대해 Student's t-test로 통계적으로 유의한 차이가 존재하는지를 확인하였음.
- 난소절제군과 Sham군의 비교에서는 4주의 체중만 제외하고, 8주, 12주, 16주 동안 체중변화량에 있어서 통계적 유의성이 있거나 의미 있는 경향성을 보여 주고 있음(표 10). 난소절제군이 각 시기별 체중이 가장 높았고, 16주 동안 체중변화량도 가장 많은 것을 확인할 수 있었음. 양성대조군인 예음보 투여군은 각 시기별 체중의 통계적 유의성은 존재하지 않았으나, 16주 동안 체중변화량에서는 난소절제군과 비교하여 현격하게 낮은 체중 증가를 보여 주고 있으며, 통계적으로도 유의성이 존재하였음.
- 실험군 중 지골피 투여군에서는 4주, 8주에서 유의한 통계적 차이($p < 0.05$)가 존재하였는데, 난소절제군과 비교하여 체중이 가벼운 것을 확인할 수 있었음. 또한, 지골피 투여군은 12주와 16주 동안 체중변화량에 있어서도 유의수준을 만족하지는 못하였으나, 의미 있는 경향성을 보여 주고 있음.
- 실험군 중 지골피+속단 투여군에서는 8주, 12주, 16주에서 유의수준을 만족하지는 못하였으나, 의미 있는 경향성을 보여 주고 있음. 표 10의 내용을 시각적으로 표현하고자 Sham군을 100으로 환산하여 다른 군들을 나타내었음(그림 15).

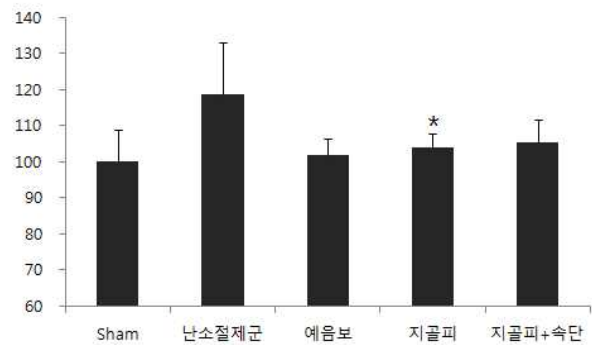
표 10. 장기 투여 기간 동안의 각 군별 체중 측정 결과

군	초기 측정값	4주 후		8주 후		12주 후		16주 후		16주 체중변화	p value
		체중	p value	체중	p value	체중	p value	체중	p value		
난소절제군	26.2 ±1.44	34.3 ±3.69		41.9 ±5.05		45.5 ±6.62		48.0 ±7.10		21.4 ±6.05	
Sham	27.3 ±0.88	32.9 ±1.66	0.456	35.3 ±3.15	0.070	36.5 ±3.58	0.054	37.9 ±5.03	0.059	10.5 ±4.60	0.028
예음보	26.0 ±1.04	30.6 ±2.23	0.172	36.0 ±1.59	0.114	38.7 ±0.95	0.145	40.8 ±2.27	0.158	11.1 ±7.47	0.016
지골피	25.9 ±0.97	30.8 ±0.98	0.037	36.7 ±1.45	0.027	40.9 ±1.16	0.098	43.8 ±1.95	0.161	17.9 ±2.51	0.080
지골피+숙단	26.0 ±1.17	32.3 ±1.94	0.255	37.2 ±2.28	0.059	39.3 ±3.12	0.059	41.5 ±4.40	0.088	15.5 ±3.54	0.113

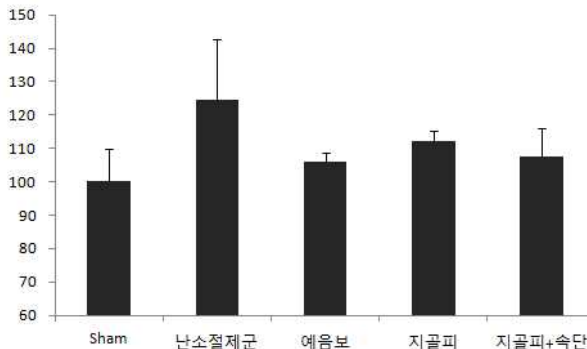
<4주 후 체중의 각 군별 비교>



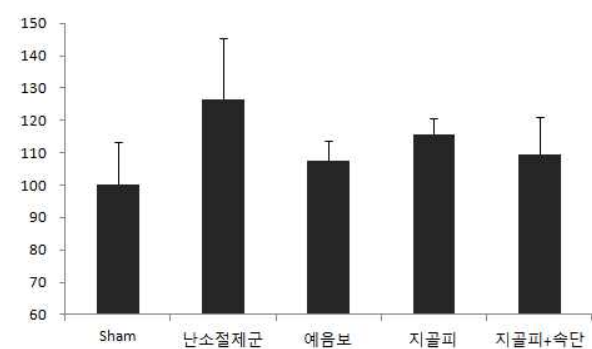
<8주 후 체중의 각 군별 비교>



<12주 후 체중의 각 군별 비교>



<16주 후 체중의 각 군별 비교>



<16주 동안 체중변화량의 각 군별 비교>

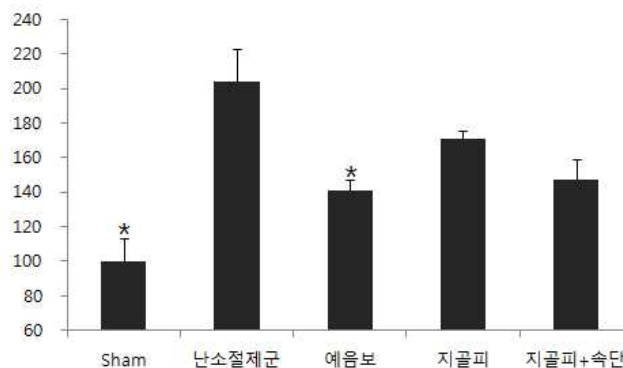


그림 15. 식품 소재 추출물 투여 기간 동안의 Sham군에 대한 보정 체중 비교 (*p < 0.05 vs. 난소절제군)

- 그림 15에서 보여 주는 바와 같이, 난소절제군은 Sham군과 비교하여 체중이 많이 나가고 변화량도 많은 것을 확인할 수 있음. 특히, 16주 동안 체중변화량의 경우에는 2배의 많은 체중증가량을 보여 주고 있음. 양성대조군인 예음보 투여군과 실험군인 지골피, 지골피+속단 투여군의 경우에는 4주 체중을 제외하고는 모두 Sham군 보다는 체중이 많이 나가고, 난소절제군 보다는 적은 경향을 일정하게 보여주고 있음.
- 식품 소재 추출물 투여 후 8주와 16주에 주사 마취 후 골밀도(BMD, Bone Mineral Density), 골량(BMC, Bone Mineral Content), 체지방율(%Fat)을 측정하였음.
- 체지방율(%Fat)에 대한 실험결과(표 11)를 먼저 살펴 보면, Sham군의 경우 초기 측정값을 제외한 모든 측정치와 변화량 계산수치에서 난소절제군과 통계적으로 유의한 차이가 있음을 보여 주고 있음. 예음보와 실험군에서는 어느 시기에든 난소절제군과 비교하여 유의한 차이가 없었으나, 투여 후 모든 시기와 변화량에서 난소절제군의 체지방율 보다 낮은 수치를 일정하게 나타내고 있음.

표 11. 장기 투여 기간 동안의 각 군별 체지방율과 변화량 측정 결과

군	초기 측정값		8주		16주		초기 8주 변화량		전체 16주 변화량	
	체지방율	p value	체지방율	p value	체지방율	p value	체지방율	p value	체지방율	p value
난소절제군	15.64 ±2.02		29.13 ±4.26		35.85 ±3.32		13.28 ±2.69		20.00 ±1.57	
Sham	14.14 ±0.82	0.163	19.96 ±4.13	0.014	23.76 ±6.60	0.013	5.82 ±3.59	0.011	9.62 ±6.16	0.014
예음보	16.08 ±2.53	0.769	26.17 ±2.56	0.340	36.37 ±4.90	0.873	11.13 ±0.29	0.237	18.17 ±1.85	0.214
지골피	14.74 ±1.04	0.267	26.32 ±2.63	0.229	33.83 ±1.70	0.234	12.05 ±2.45	0.477	19.70 ±1.60	0.774
지골피+속단	15.16 ±1.25	0.576	28.46 ±3.85	0.791	32.11 ±4.66	0.187	13.61 ±2.96	0.852	17.26 ±4.64	0.287

- 골량(BMC)의 경우에는 측정치에 100을 곱한 값을 정리하였는데 실험결과(표 12)를 살펴 보면, Sham군의 경우 모든 측정치와 변화량 계산수치에서 난소절제군과 통계적으로 유의한 차이가 있음을 보여 주고 있는데, 골량 측정치가 높은 것을 보여 주고 있음. 예음보는 각 시기별 측정값은 난소절제군과 비교하여 유의한 차이가 없었으나, 전체 16주 변화량에서는 유의하게 골량이 증가가 많은 것을 보여 주고 있음. 실험군에서는 어느 시기에든 난소절제군과 비교하여 유의한 차이가 없었으나, 모든 시기와 변화량에서 난소절제군의 골량 보다 높은 수치를 일정하게 나타내고 있음.

표 12. 장기 투여 기간 동안의 각 군별 골량과 변화량 측정 결과

군	초기 측정값		8주		16주		초기 8주 변화량		전체 16주 변화량	
	골량	p value	골량	p value	골량	p value	골량	p value	골량	p value
난소절제군	2.10 ±0.10		2.93 ±0.29		3.18 ±0.13		0.83 ±0.24		1.08 ±0.19	
Sham	2.60 ±0.28	0.006	3.98 ±0.43	0.004	4.16 ±0.38	0.002	1.38 ±0.29	0.019	1.56 ±0.28	0.021
예음보	2.06 ±0.21	0.708	3.00 ±0.16	0.666	3.90 ±0.60	0.056	0.95 ±0.26	0.507	2.07 ±0.55	0.019
지골피	2.16 ±0.12	0.347	3.10 ±0.22	0.287	3.40 ±0.19	0.067	0.90 ±0.20	0.588	1.20 ±0.12	0.200
지골피+속단	2.22 ±0.15	0.128	3.21 ±0.34	0.170	3.36 ±0.37	0.373	0.97 ±0.24	0.352	1.13 ±0.29	0.764

○ 골밀도(BMD)의 경우에도 측정치에 100을 곱한 값을 정리하였는데 실험결과(표 13)를 살펴 보면, Sham군의 경우 모든 측정치와 변화량 계산수치에서 난소절제군과 통계적으로 유의한 차이가 있음을 보여 주고 있는데, 골밀도가 높은 것을 보여 주고 있음. 예음보는 각 시기별 측정값은 난소절제군과 비교하여 유의한 차이가 없었음. 지골피 투여군에서는 초기 8주 변화량에서 난소절제군과 비교하여 유의하게 골밀도 증가량이 많은 것으로 나타났고, 전체 16주 변화량에서도 유의수준을 만족하지는 못하였으나 골밀도 증가량이 많은 경향을 보여주고 있음. 지골피+속단 투여군에서는 8주, 초기 8주 변화량, 전체 16주 변화량에서 난소절제군과 비교하여 유의하게 골밀도가 높거나 증가량이 많은 결과를 보여주고 있음.

표 13. 장기 투여 기간 동안의 각 군별 골밀도와 변화량 측정 결과

군	초기 측정값		8주		16주		초기 8주 변화량		전체 16주 변화량	
	골밀도	p value	골밀도	p value	골밀도	p value	골밀도	p value	골밀도	p value
난소절제군	6.05 ±0.31		7.54 ±0.20		7.97 ±0.49		1.46 ±0.17		1.91 ±0.32	
Sham	6.68 ±0.24	0.007	9.07 ±0.53	0.001	9.66 ±0.48	0.001	2.39 ±0.37	0.002	2.98 ±0.36	0.002
예음보	6.06 ±0.19	0.915	7.57 ±0.04	0.767	8.13 ±0.33	0.648	1.50 ±0.13	0.742	2.01 ±0.39	0.715
지골피	5.93 ±0.34	0.516	7.81 ±0.30	0.141	8.22 ±0.30	0.283	1.86 ±0.29	0.033	2.31 ±0.29	0.063
지골피+속단	6.05 ±0.33	1.000	8.09 ±0.36	0.019	8.22 ±0.34	0.317	2.09 ±0.35	0.007	2.29 ±0.22	0.045

○ 장기 투여 기간 동안의 각 군별 골밀도 변화량을 난소절제군을 기준으로 하여 비교해 보았음(그림 16). 난소절제군은 Sham군과 비교하여 골밀도 변화량이 많은 것을 확인할 수 있음. 초기 8주에서는 실험군인 지골피, 지골피+속단 투여군의 골밀도 증가량이 난소절제군의 골밀도 증가량에 비해 통계적으로 유의하게 많았고, 16주에서는 실험군인 지골피+속단 투여군의 골밀도 증가량이 난소절제군에 비해 통계적으로 유의하게 많았음.

<초기 8주 동안 골밀도 변화량 비교>

<16주 동안 골밀도 변화량비교>

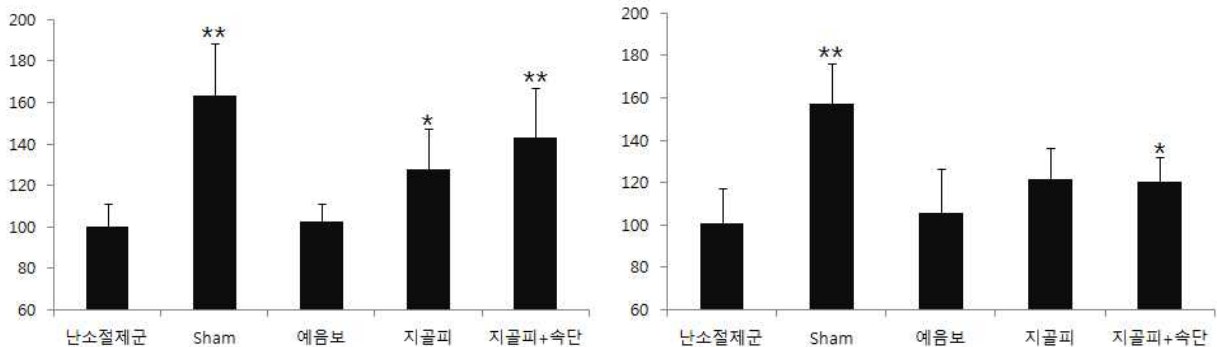


그림 16. 장기 투여 기간 동안의 골밀도 변화량 비교

(*p< 0.05, **p< 0.01 vs. 난소절제군)

○ 식품 소재 추출물의 장기 투여 효과를 확인하기 위해 골대사 바이오마커(Bone metabolism biomarker)를 추가로 측정하였음. 총 6종의 골대사 바이오마커[IL-6, Osteoprotegerin(OPG),

Osteocalcin(OC), Insulin, Leptin, TNF α]에 대해 Multiplex immunoassay kit를 사용하였음.

- 최종 골밀도 측정후 마우스 혈액을 채취하여 EDTA 항응고제가 첨가된 채혈 용기로 수집을 하였음. 그 후, 원심분리를 통해 혈장 부분만 분리하여 6종의 골대사 바이오마커를 측정하는데 사용하였음. 각 6종의 골대사 바이오마커에 대한 각각의 표준 곡선은 그림 17과 같이 작성되었으며, 붉은색 사각형은 실제 시료의 분포 범위를 나타내고 있음.

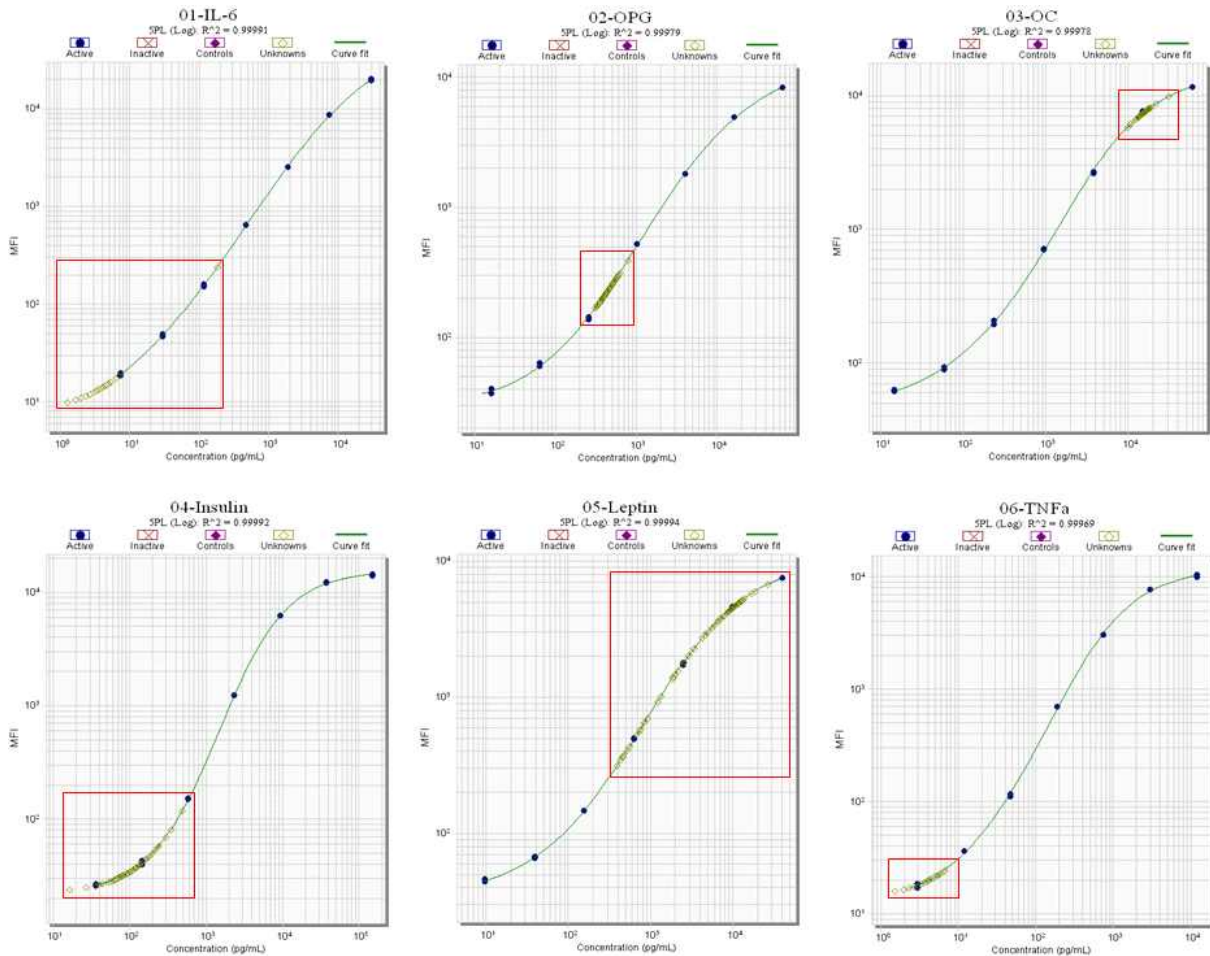


그림 17. 6종의 골대사 바이오마커 표준 곡선과 시료 측정치의 분포

- 6종의 골대사 바이오마커의 측정치를 확인한 결과(표 14), Sham군과 난소절제군의 비교에서 Osteoprotegerin(OPG)의 측정치가 Sham군에서 유의하게 높음을 확인할 수 있었고, IL-6 측정치 비교에서는 Sham군에서 유의수준에 근접한 높은 경향을 보여 주고 있음. 그러나, 나머지 4종의 골대사 바이오마커에서는 유의한 차이가 존재하지 않았음. 지골피 투여군의 경우에는 IL-6와 OPG의 측정치가 난소절제군 보다 높은 경향성을 보여 주고 있으나, 다른 4종의 골대사 바이오마커는 유의한 차이가 없었음. 지골피+숙단 투여군의 경우에도 단지 IL-6 측정치에서 높은 경향성을 보여 줄 뿐, 나머지 5종의 바이오마커에서는 통계적으로 유의한 차이가 존재하지 않았음.

표 14. 식품소재 투여 16주 후의 6종 골대사 바이오마커의 측정 결과

군	IL-6 (pg/ml)		OPG (ng/ml)		OC (ng/ml)		Insulin (pg/ml)		Leptin (ng/ml)		TNF α (pg/ml)	
	측정치	p value	측정치	p value	측정치	p value	측정치	p value	측정치	p value	측정치	p value
난소절제군	7.0 \pm 1.70		1.67 \pm 0.21		61.1 \pm 7.39		442 \pm 218		27.8 \pm 9.15		17.9 \pm 6.85	
Sham	11.9 \pm 1.84	0.054	2.33 \pm 0.23	0.010	52.4 \pm 2.16	0.122	293 \pm 120	0.359	15.2 \pm 12.58	0.205	17.1 \pm 1.15	0.824
지골피	10.9 \pm 2.67	0.056	2.03 \pm 0.24	0.089	58.4 \pm 5.75	0.644	423 \pm 225	0.837	26.2 \pm 12.87	0.881	16.7 \pm 4.87	0.730
지골피+속단	13.7 \pm 6.14	0.094	1.83 \pm 0.27	0.402	62.5 \pm 0.92	0.823	350 \pm 154	0.410	37.6 \pm 10.32	0.342	19.0 \pm 6.16	0.787

○ 상기의 골다공증 동물모델을 이용한 *in vivo* 결과를 종합하면, 현재 시판중인 뼈 건강기능성 식품인 “에음보(대두이소플라본제품)” 제품보다 지골피 단독과 지골피+속단 혼합 추출물의 골밀도 개선 효과가 더 우수한 것으로 나타났음.

5. 활성물질 분리 및 동정

□ 주요 활성물질의 분리 및 성분 분석

○ 2차에 걸친 동물 실험을 통해 선정된 식품 소재인 지골피와 속단 추출물을 대상으로 유효 성분을 분리하기 위해 각각의 추출물을 분리하여 골세포주에서 *in vitro* 활성 검증실험을 통해 유효성분이 존재하는 1차 분획층(지골피: Buthanol extract; 속단: Buthanol extract)을 선별한 후, 각각의 2차 분획층을 분리(지골피: 35% MeOH; 속단: 20% MeOH)하였으며, 성분 분석을 시행하였음.

□ 지골피 추출물에서 활성물질의 분리 및 성분 분석

○ 지골피의 경우에는 추출물 254g을 증류수에 현탁시킨 후 디크로로메탄 에틸아세테이트, 부탄올로 용매분획 하였음. 각각의 분획층을 감압상태에서 증발시켜 용매별 추출물을 얻었고 각 추출물을 활성검정을 실시하였음. 활성검정결과 부탄올층에서 활성이 나타나 부탄올층을 Daion HP-20을 이용하여 open column chromatography를 실시하였음. 실험결과 H₂O, 35%, 70%, 100% MeOH로 분취한 총 4개의 소분획물을 얻었고 활성검정을 실시하여 35% MeOH에서 활성이 높다는 것을 확인하였음. 그 후 35%의 MeOH에서 분취한 7개의 소분획물을 대상으로 활성검정을 실시하여 1, 3, 5번의 분획에서 활성을 확인함(그림 18).

○ 활성이 있는 3번 5번 분획을 분리정제 하여 **Compound 1**, **Compound 2**, **Compound 3**의 3가지 단일화합물을 분리정제 함. 분리정제된 화합물은 700 MHz NMR(cryo probe)을 이용하여 분석한 1D 와 2D NMR data, LC-MS data등의 분석결과 및 기존 문헌과 비교 하여 구조를 동정하였음(그림 19-1,2, 그림 20-1,2, 그림 21-1,2).

U



그림 18. 지골피 추출물의 유효성분 분리 정제 과정 및 결과

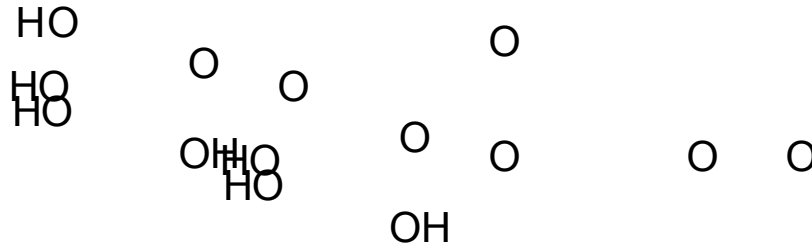


그림 19-1. Compound 1(scopolin 유사체)의 구조

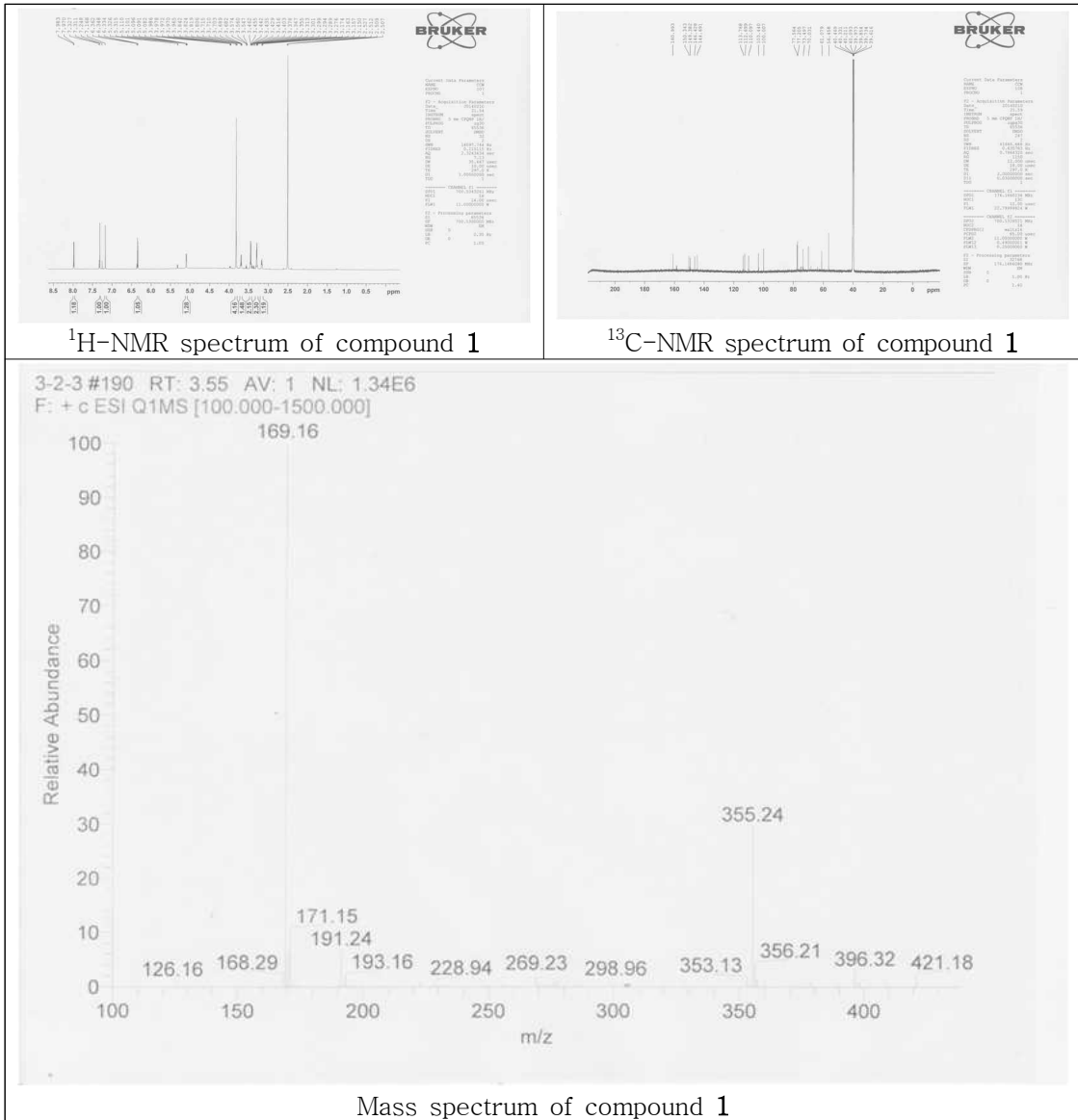


그림 19-2. Compound 1(scopolin 유사체)의 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, Mass spectrum 결과

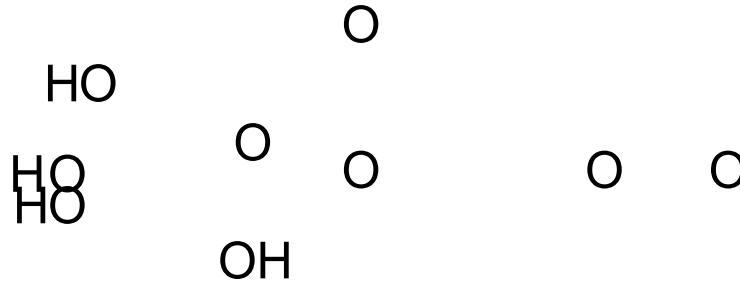


그림 20-1. Compound 2(scopolin)의 구조

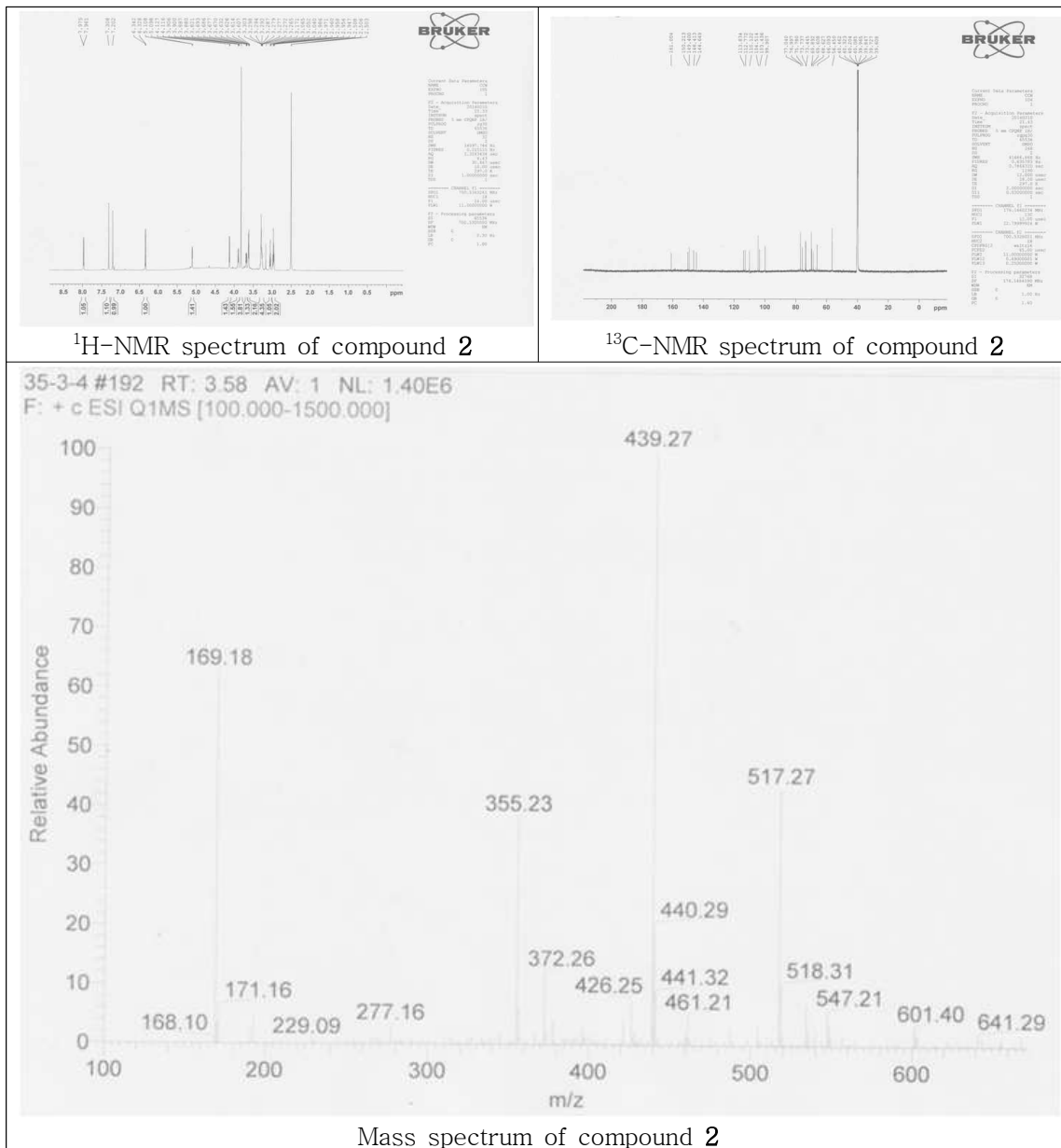


그림 20-2. Compound 2(scopolin)의 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, Mass spectrum 결과

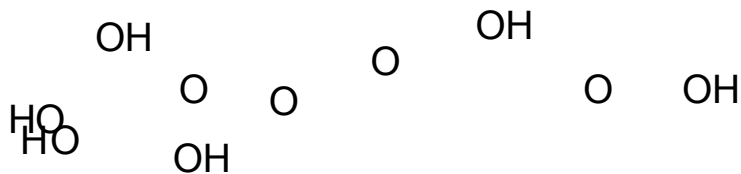


그림 21-1. Compound 3(dihydrophaseic acid 3'-O-β-D-glucopyranoside)의 구조

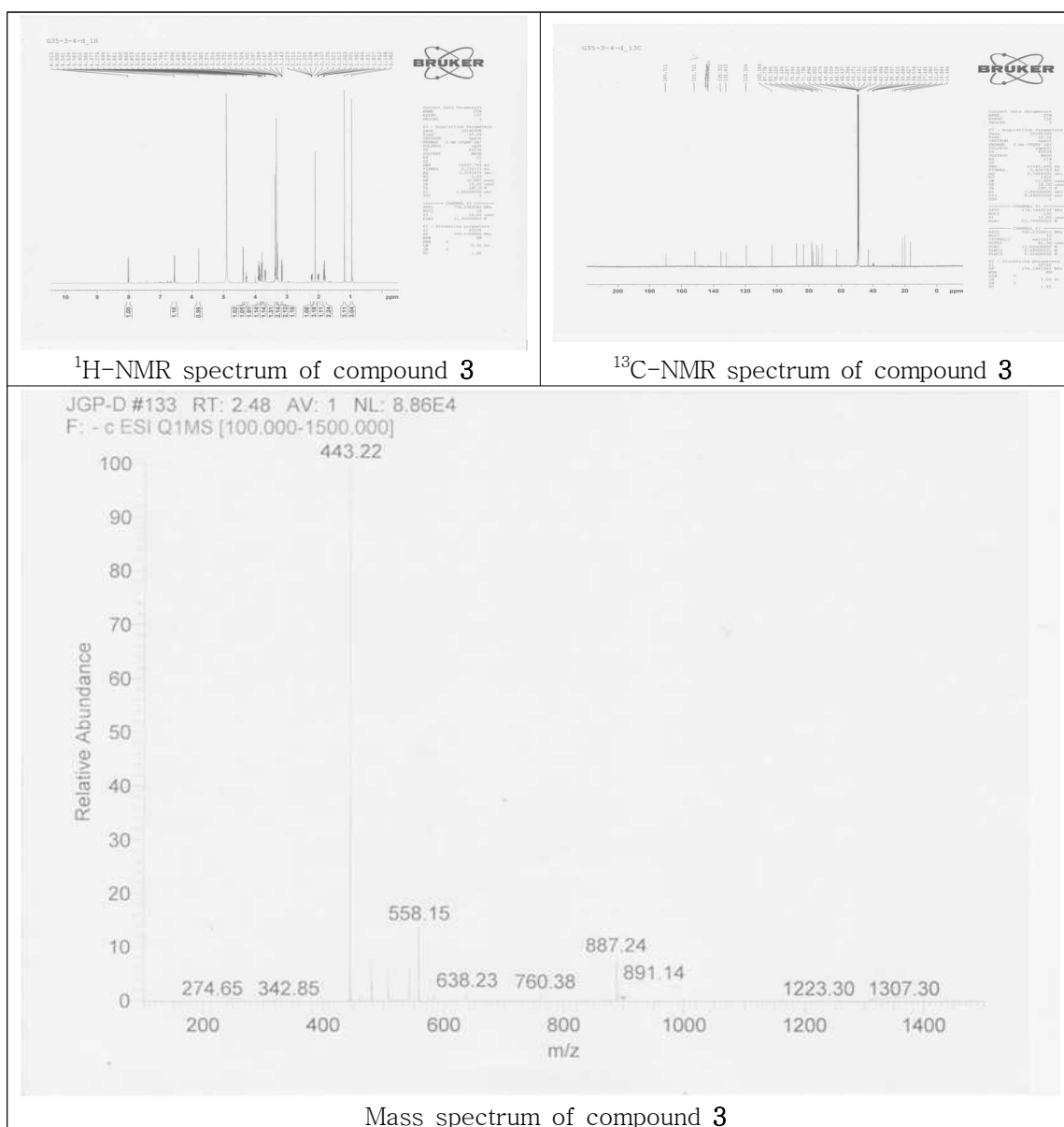


그림 21-2. Compound 3(dihydrophaseic acid 3'-O-β-D-glucopyranoside)의 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, Mass spectrum 결과

□ 속단 추출물에서 활성물질의 분리 및 성분 분석

- 속단의 경우에는 추출물 282g을 증류수에 현탁시킨 후 디크로로메탄 에틸아세테이트, 부탄올로 용매분획 하였음. 각각의 분획층을 감압상태에서 증발시켜 용매별 추출물을 얻었고 각 추출물을 활성검정을 실시하였음. 활성검정결과 부탄올층에서 활성이 나타나 부탄올층을 Daion HP-20을 이용하여 open column chromatography를 실시하였음. 실험결과 H₂O, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% MeOH로 분취한 총 6개의 소분획물을 얻었고 활성검정을 실시하였음. 이 중 20% MeOH 분획물에서 활성이 나타나 20% MeOH 분획물을 prep HPLC를 실시하여 단일 화합물을 분리정제 하였음(그림 22).
- 분리정제된 화합물(Compound)은 700 MHz NMR (cryo probe)을 이용하여 분석한 NMR data와 기존 문헌과 비교 확인 결과 **loganin**으로 밝혀짐(그림 23-1,2).

**Extract
(282g)**

Hexane ext. Aqua layer
(383mg)

Dichloromethane ext. Aqua layer
(1.9g)

Ethyl acetate ext. Aqua layer
(5.2g)

active fraction **Buthanol ext. (40g)** Aqua layer

Diaion HP-20 C.C.
MeOH : H₂O condition

H₂O **20% MeOH** 40% MeOH 60% MeOH 80% MeOH 100% MeOH

active fraction Prep HPLC
MeCN : H₂O condition

compound (8mg)

그림 22. 속단 추출물의 유효성분 탐색 결과

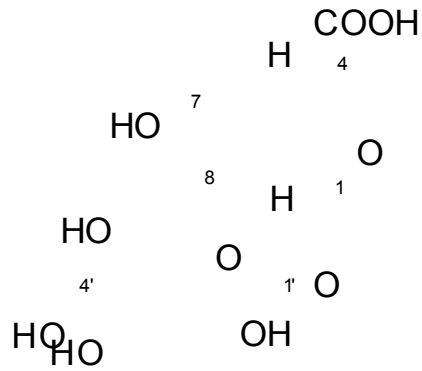


그림 23-1. 분리된 Compound(loganin)의 화학적 구조

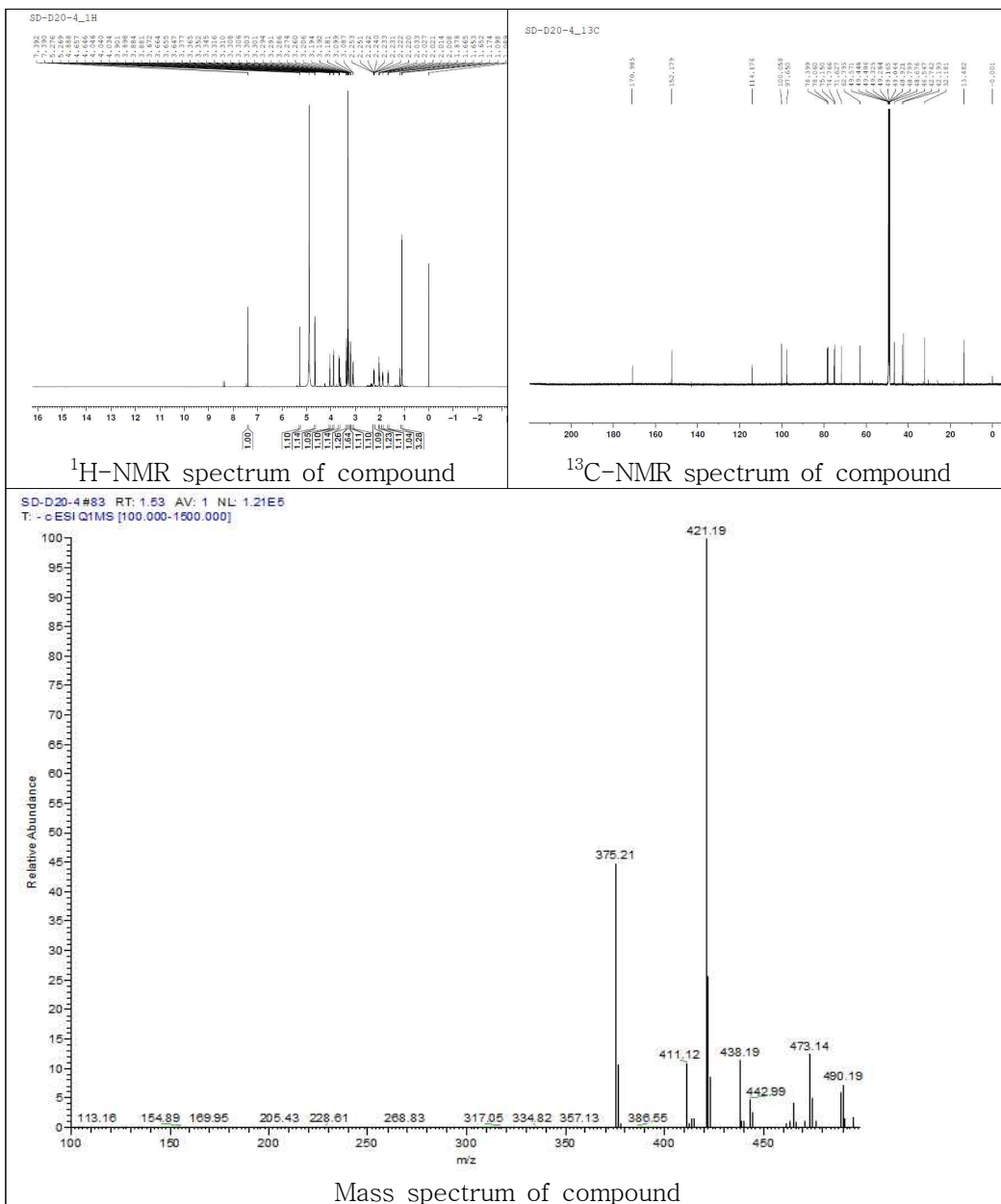


그림 23-2. Compound(loganin)의 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, Mass spectrum 결과

□ 유효 분획물의 중간엽줄기세포주의 세포 증식 및 ALP 활성 분석

- 유효성분을 탐색하기 위한 과정으로써, 조골모세포(osteoblast)로 분화 가능한 중간엽줄기세포주(C3H10T1/2)에 각각의 분획층들을 처리하여 세포 증식에 대한 영향과 alkaline phosphatase(ALP)의 활성(조골세포로의 분화 효능)을 측정하여 유효성분이 존재하는 분획층을 확인하였음.
- 중간엽줄기세포주(C3H10T1/2)에 대한 지골피 1차 분획층에 대한 세포 증식 실험 결과는 **그림 24**에 나타냈으며, 지골피 2차 분획층에 대한 세포 증식 실험 결과는 **그림 25**와 같이 측정되었음.

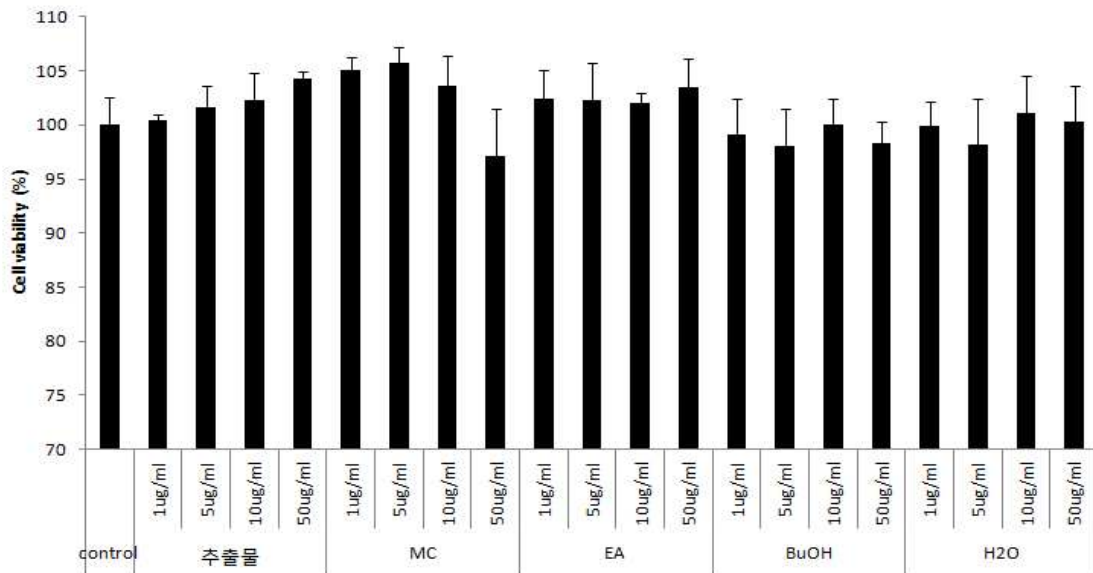


그림 24. 지골피 추출물의 1차 분획층에 대한 C3H10T1/2 세포의 증식 효과 확인

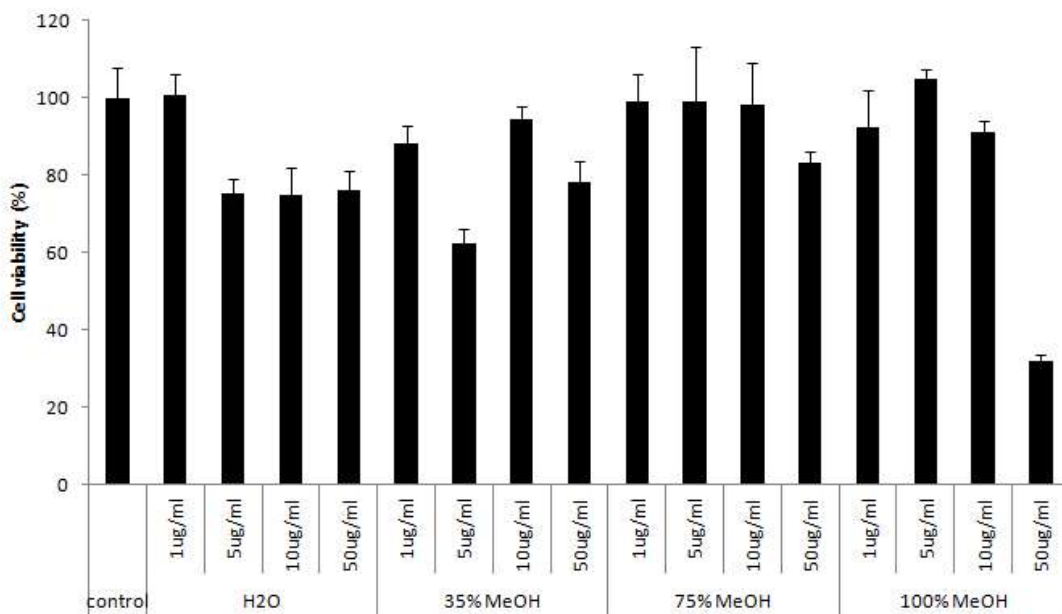


그림 25. 지골피 추출물의 2차 분획층에 대한 C3H10T1/2 세포의 증식 효과 확인

○ 중간엽줄기세포주(C3H10T1/2)에 대한 지골피 1차 분획층에 대한 ALP 활성화에 대한 실험 결과는 그림 26에 나타냈으며, 지골피 2차 분획층에 대한 ALP 활성화 실험 결과는 그림 27과 같이 측정되었음.

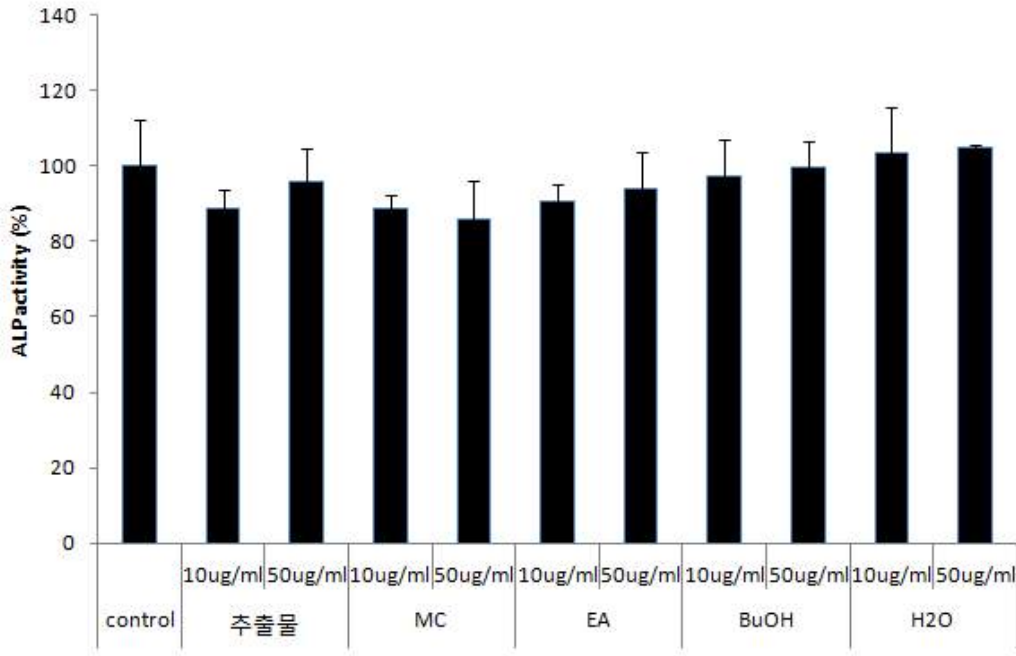


그림 26. 지골피 추출물의 1차 분획층에 대한 C3H10T1/2 세포의 ALP 활성화 확인

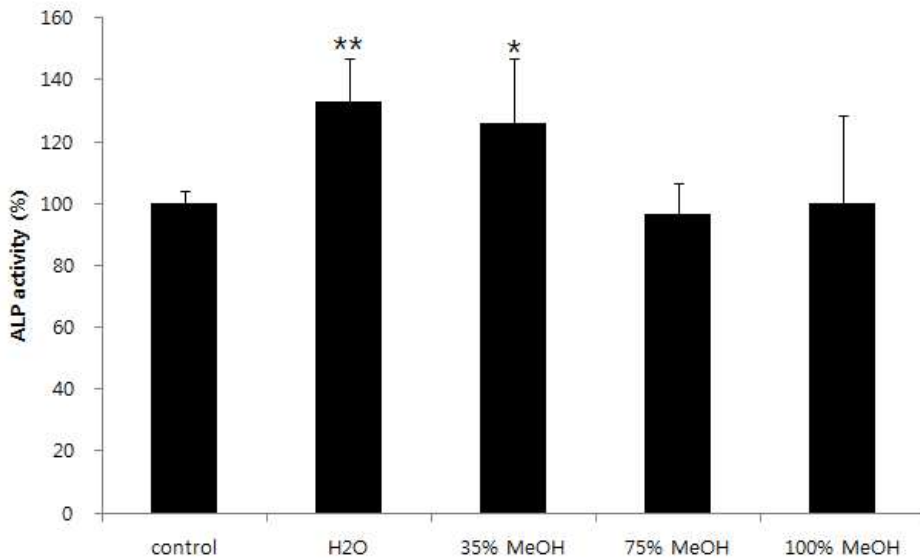


그림 27. 지골피 추출물의 2차 분획층에 대한 C3H10T1/2 세포의 ALP 활성화 확인

○ 중간엽줄기세포주(C3H10T1/2)에 대한 속단 1차 분획층에 대한 세포 증식 실험 결과는 **그림 28**에 나타냈으며, 속단 2차 분획층에 대한 세포 증식 실험 결과는 **그림 29**와 같이 측정되었음.

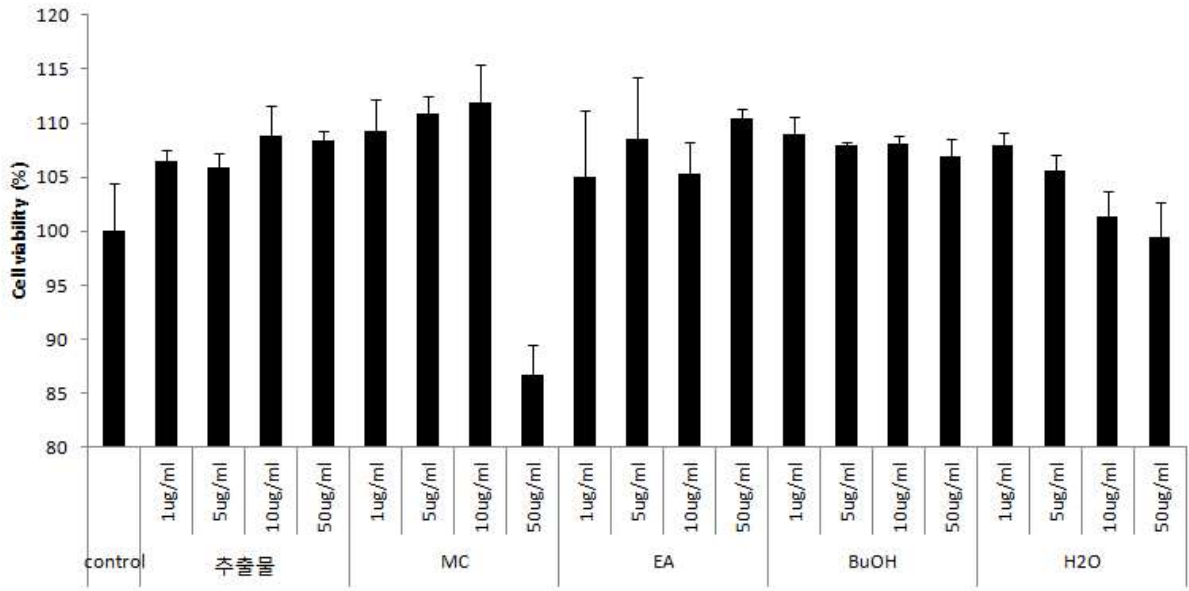


그림 28. 속단 추출물의 1차 분획층에 대한 C3H10T1/2 세포의 증식 효과 확인

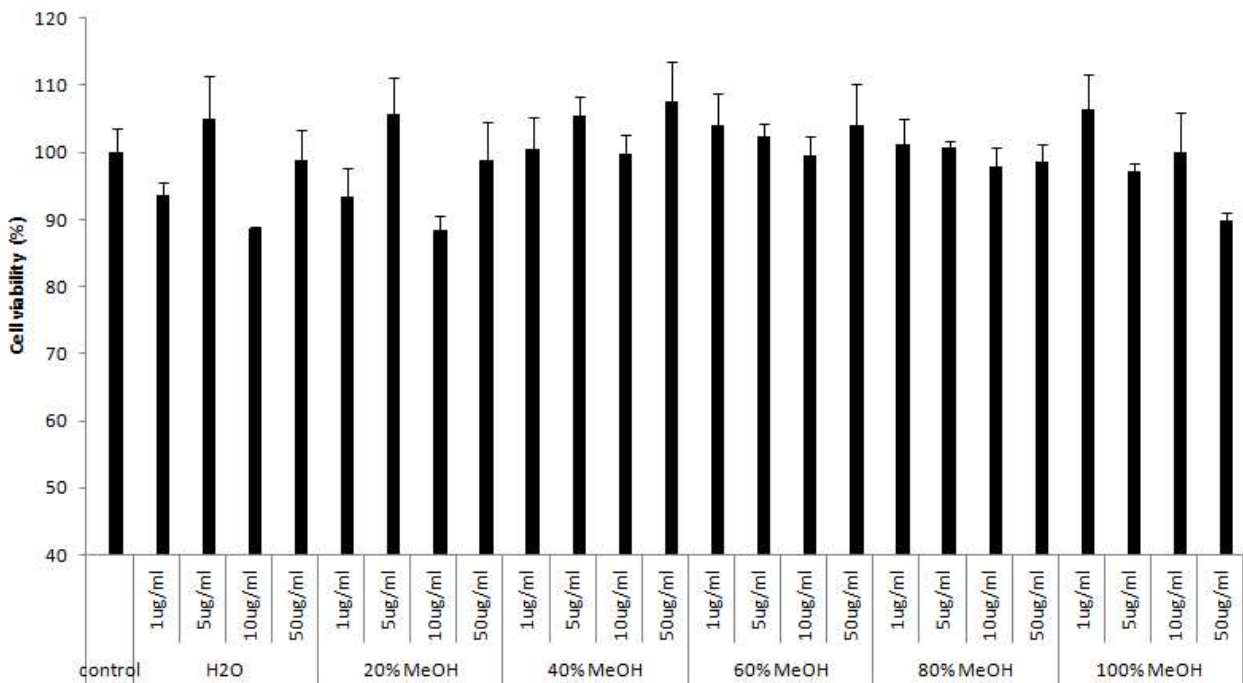


그림 29. 속단 추출물의 2차 분획층에 대한 C3H10T1/2 세포의 증식 효과 확인

○ 중간엽줄기세포주(C3H10T1/2)에 대한 속단 1차 분획층에 대한 ALP 활성화에 대한 실험 결과는 그림 30에 나타냈으며, 속단 2차 분획층에 대한 ALP 활성화 실험 결과는 그림 31과 같이 측정되었음.

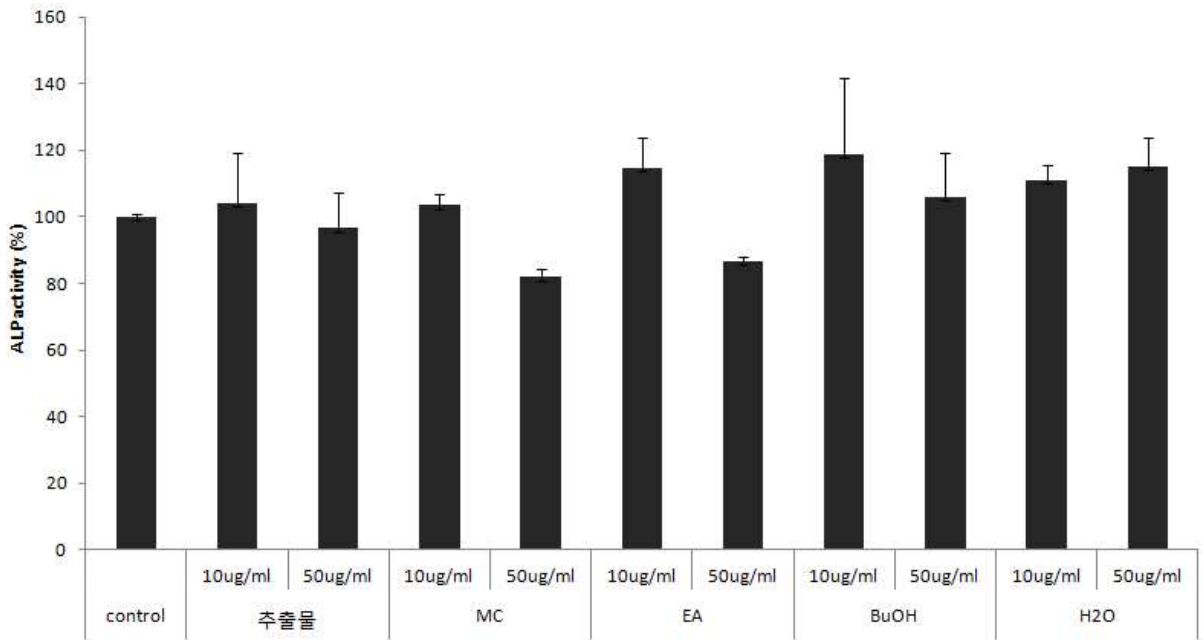


그림 30. 속단 추출물의 1차 분획층에 대한 C3H10T1/2 세포의 ALP 활성화 확인

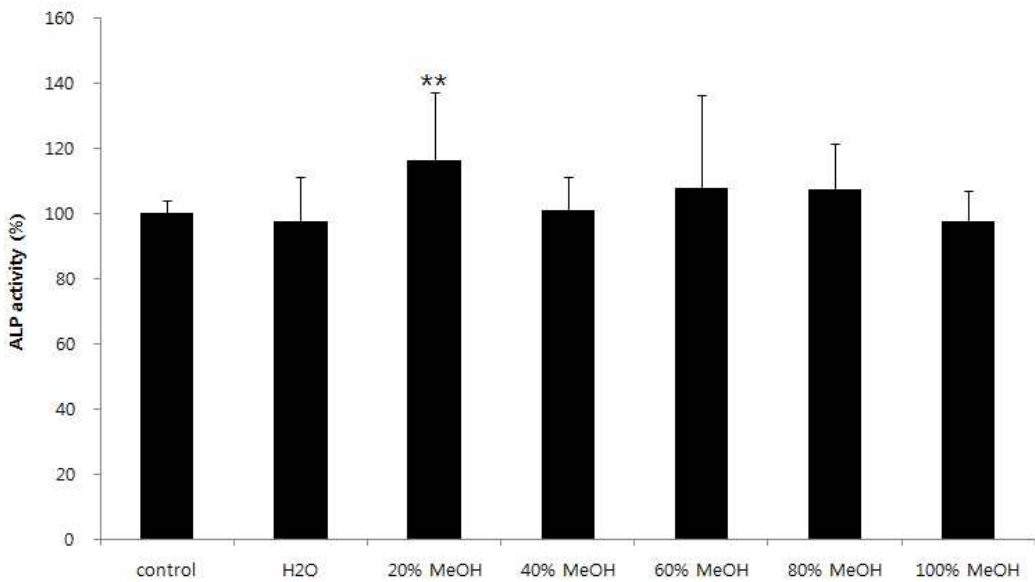


그림 31. 속단 추출물의 2차 분획층에 대한 C3H10T1/2 세포의 ALP 활성화 확인

□ 유효 분획물의 조골모세포주에서 세포 증식 및 ALP 활성, 분화 촉진 분석

- 유효성분을 탐색하기 위한 과정으로써, 조골세포(osteocyte)로 분화하는 조골모세포주(MC3T3-E1)에 각각의 분획층들을 처리하여 세포 증식에 대한 영향과 alkaline phosphatase(ALP)의 활성 및 ALP 염색 정도를 확인하여 조골세포 분화 효능을 측정하여 유효성분이 존재하는 분획층을 확인하였음.
- 조골모세포주(MC3T3-E1)에 대한 지골피 1차 분획층에 대한 세포 증식 실험 결과는 **그림 32**에 나타냈으며, 지골피 2차 분획층에 대한 세포 증식 실험 결과는 **그림 33**과 같이 측정되었음.

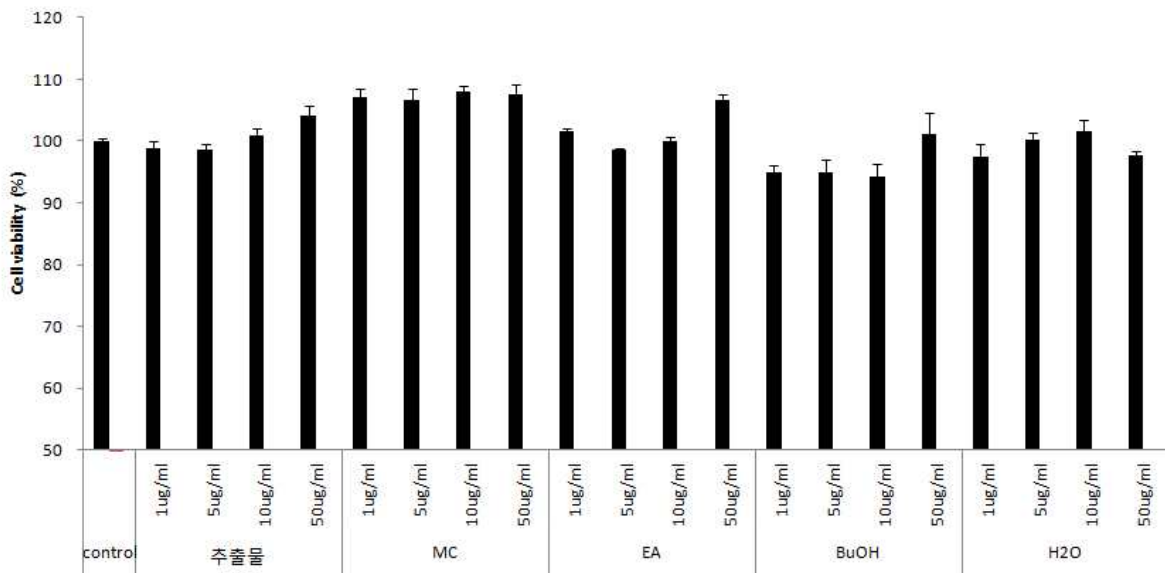


그림 32. 지골피 추출물의 1차 분획층에 대한 MC3T3-E1 세포의 증식 효과 확인

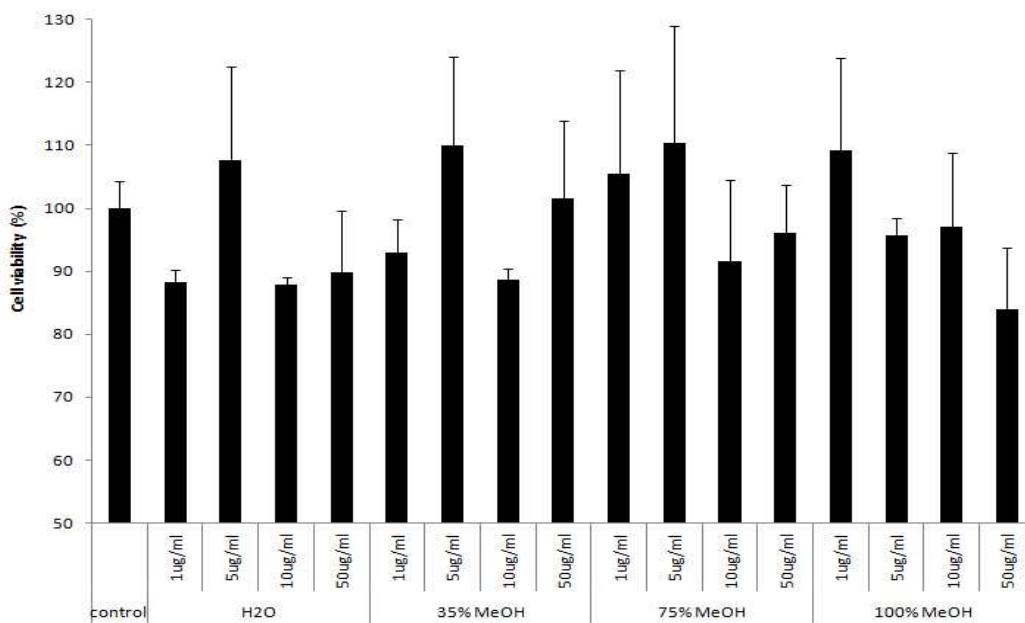


그림 33. 지골피 추출물의 2차 분획층에 대한 MC3T3-E1 세포의 증식 효과 확인

○ 조골모세포주(MC3T3-E1)를 분화 유도 시킨 후, 지골피 1차 분획층에 대한 ALP 활성에 대한 실험 결과는 그림 34에 나타냈으며, 지골피 2차 분획층에 대한 ALP 활성 실험 결과는 그림 35와 같이 측정되었음.

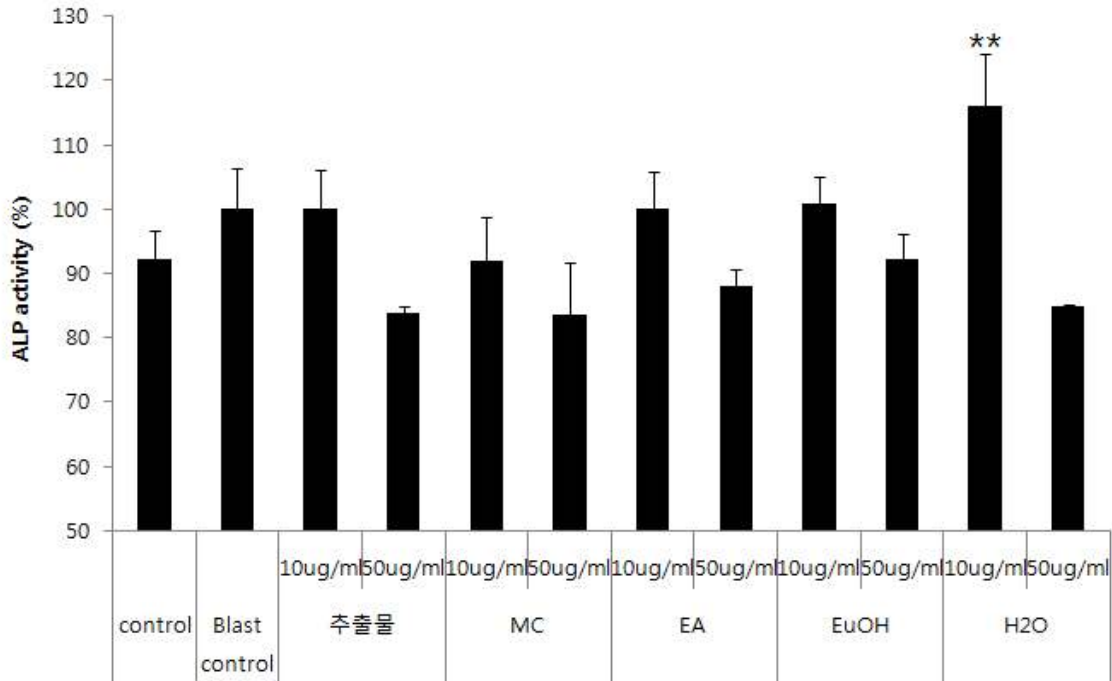


그림 34. 지골피 추출물의 1차 분획층에 대한 MC3T3-E1 분화유도 세포의 ALP 활성 확인

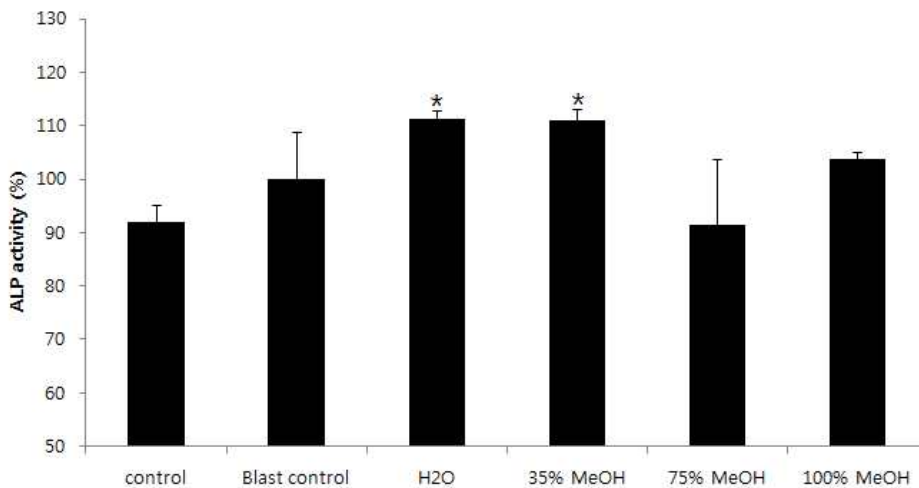


그림 35. 지골피 추출물의 2차 분획층에 대한 MC3T3-E1 분화유도 세포의 ALP 활성 확인

○ 조골모세포주(MC3T3-E1)에 대한 속단 1차 분획층에 대한 세포 증식 실험 결과는 **그림 36**에 나타냈으며, 속단 2차 분획층에 대한 세포 증식 실험 결과는 **그림 37**과 같이 측정되었음.

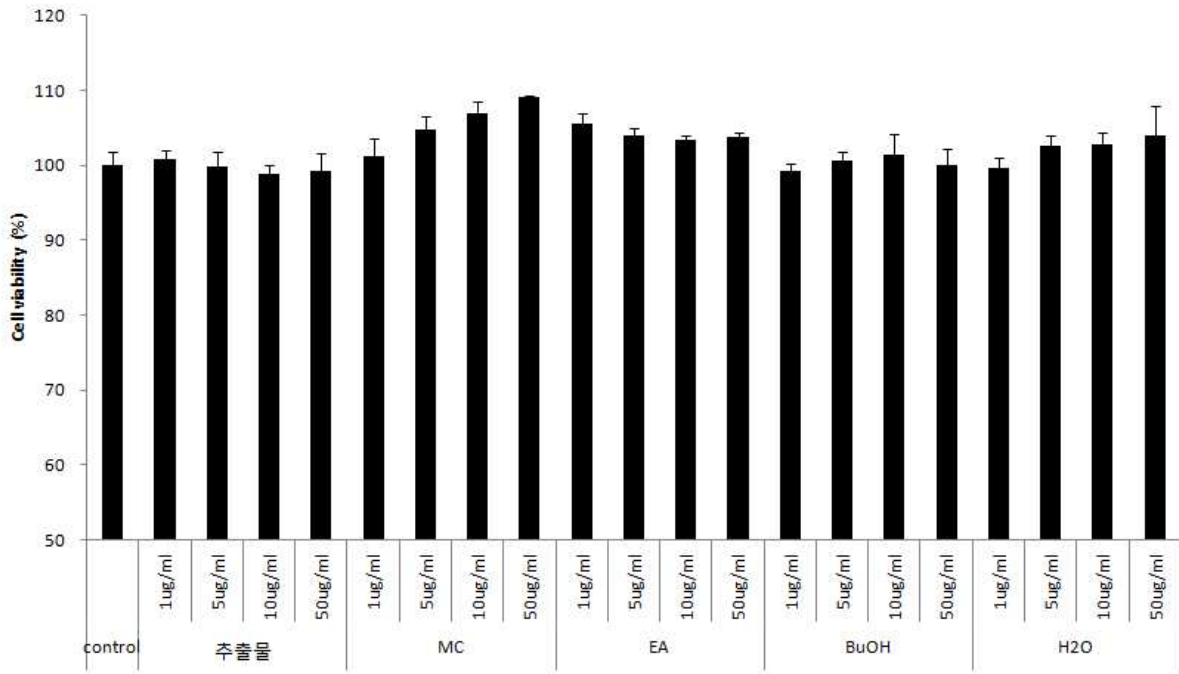


그림 36. 속단 추출물의 1차 분획층에 대한 MC3T3-E1 세포의 증식 효과 확인

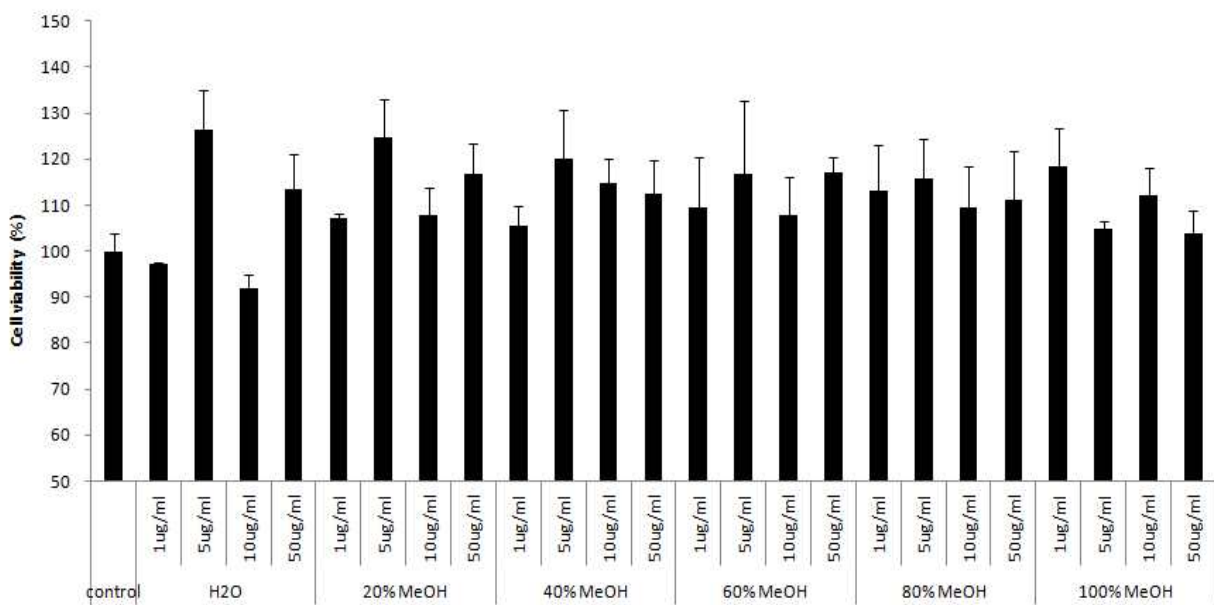


그림 37. 속단 추출물의 2차 분획층에 대한 MC3T3-E1 세포의 증식 효과 확인

○ 조골모세포주(MC3T3-E1)를 분화 유도 시킨 후, 속단 1차 분획층에 대한 ALP 활성에 대한 실험 결과는 **그림 38**에 나타냈으며, 속단 2차 분획층에 대한 ALP 활성 실험 결과는 **그림 39**와 같이 측정되었음.

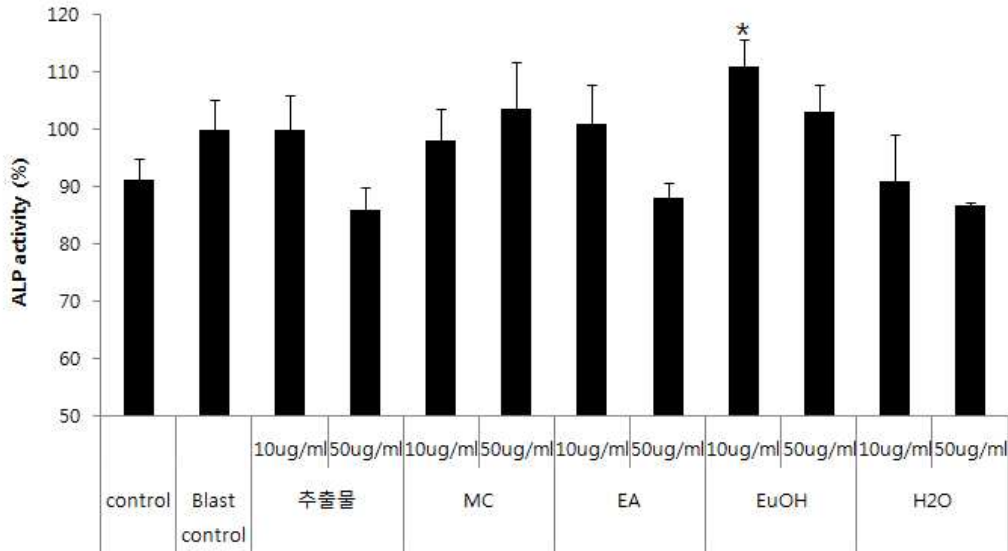


그림 38. 속단 추출물의 1차 분획층에 대한 MC3T3-E1 분화유도 세포의 ALP 활성 확인

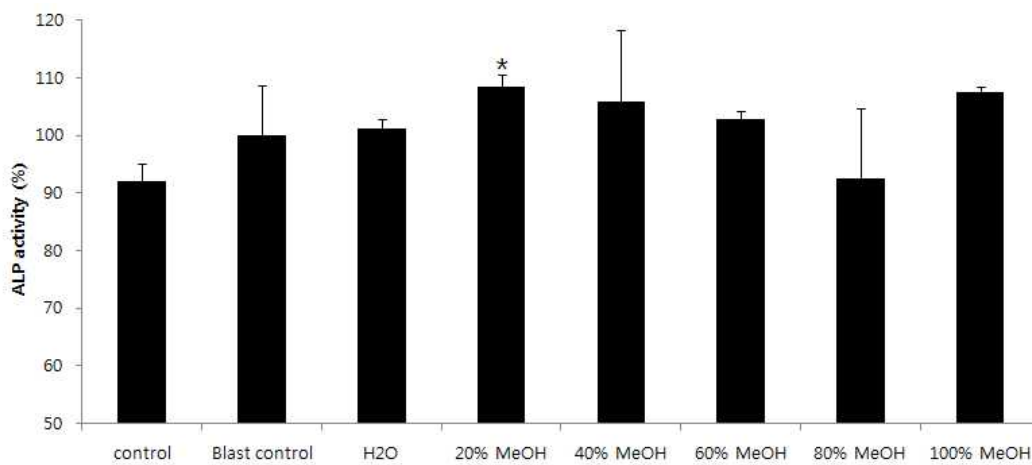


그림 39. 속단 추출물의 2차 분획층에 대한 MC3T3-E1 분화유도 세포의 ALP 활성 확인

- 지골피와 속단의 각 2차 분획층 단독 및 지골피와 속단 2차 분획층의 혼합에 대한 ALP 염색을 시행하여, 각 유효 성분이 포함된 분획층에 대한 조골세포로의 분화능을 확인하였음 (그림 40). MC3T3-E1 세포(Control)에 비해 분화를 유도(50 µg/mL ascorbic acid, 10 mM β-glycerophosphate)한 MC3T3-E1 세포(Blast control)에서의 ALP 염색정도가 높았으며, 지골피 추출물 2차 분획층, 속단추출물 2차 분획층, 지골피 추출물 2차 분획층 + 속단추출물 2차 분획층을 함께 처리하였을 경우에 Blast control보다 염색정도가 더 높았음.

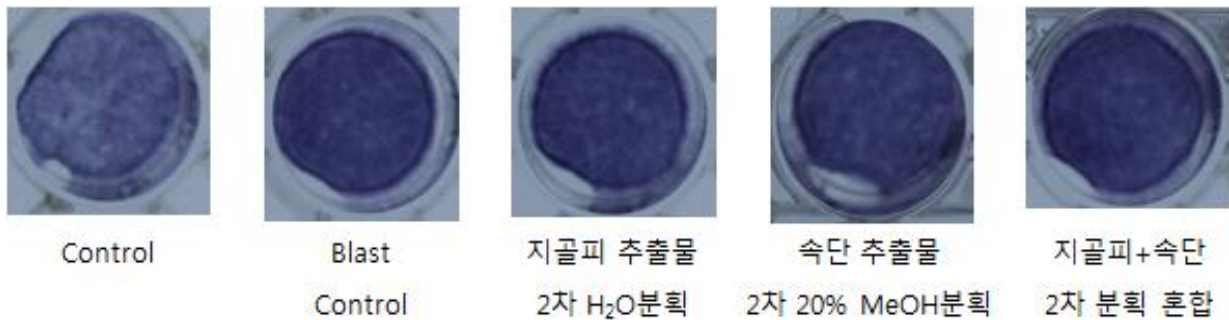


그림 40. 지골피와 속단 추출물의 2차 분획층에 대한 MC3T3-E1 분화유도 세포의 ALP 염색

- 상기의 효능 물질 분리결과를 종합하면, 지골피와 속단에서 활성이 있는 2차 분획층(지골피: 35% MeOH; 속단: 20% MeOH)을 분리하였으며, 최종적으로, 지골피 추출물에서 3종의 화합물(scopolin 유사체, scopolin, dihydrophaseic acid 3'-O-b-D-glucopyranoside)이 속단 추출물에서 1종의 화합물(loganin)이 조골세포 분화능이 있는 단일 효능물질로서 분리 동정되었음.

6. 동정된 효능물질의 골형성 및 골흡수 *in vitro* 유효성 평가

□ 지골피 및 속단 추출물에서 동정된 3 가지 효능물질의 골형성 및 골흡수 효과 평가

- 지골피에서 동정된 3가지 화합물(Compound 1: scopolin 유사체, Compound 2: scopolin, Compound 3: dihydrophaseic acid 3'-O-b-D-glucopyranoside) 중에서 Compound 1과 Compound 2에서 공통되는 scopolin과 dihydrophaseic acid 3'-O-b-D-glucopyranoside(D3G)에 대해 *in vitro* 유효성 평가 실험을 진행하였음.
- 속단에서 동정된 화합물 loganin에 대해서도 *in vitro* 유효성 평가 실험을 진행하였음.
- 지골피의 유효성분인 D3G는 뼈 관련으로 논문이나 특허로 아직 보고되지 않았음.
- 지골피의 유효성분인 scopolin 이전의 *in vitro* 실험 결과의 보고에서 골흡수에 작용하는 관련된 파골세포의 분화 억제에 관여하는 것으로 보고되었으며²³⁾, 속단의 유효성분인 loganin은 골형성에 관여하는 조골세포의 분화 증가와 파골세포의 분화 억제에 효과가 있다고 보고됨²⁴⁾.

□ D3G의 골형성 및 골흡수 *in vitro* 유효성 평가

- 지골피에서 동정된 D3G는 구매할 수 없기 때문에, D3G가 포함된 분획층을 이용하여 골형성 및 골흡수 *in vitro* 유효성 평가실험을 진행하였음.
- D3G 분획층의 농도별 처리 시에 중간엽줄기세포인 C3H10T1/2 세포와 조골모세포인 MC3T3-E1 세포의 증식이 다양한 농도에서 증가 하였으며(그림 41-A), 최적 농도인 5 μ g/mL의 D3G 처리 시에 조골세포 분화 마커인 ALP 활성과 무기질화(mineralization)가 유의하게 증가하였음(그림 41-B, C).

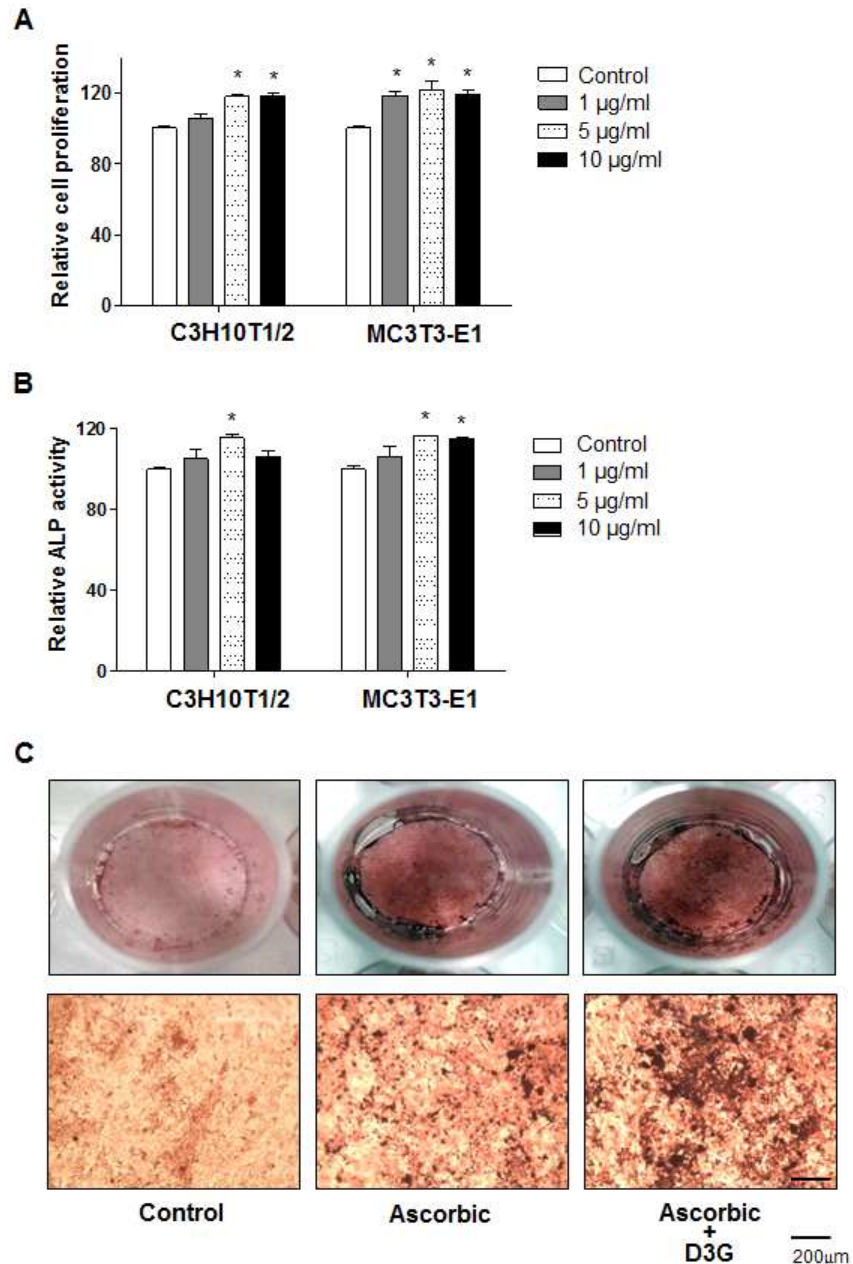


그림 41. 지골피 추출물 D3G 분획층에 대한 골형성 증가 유효성 평가. (A) 세포 증식 실험. D3G 처리 3일 후에 측정함. (B) 조골세포로의 분화 마커인 ALP 활성측정. D3G 처리 3일 후에 측정. (C) 무기질화 평가. D3G(5 μ g/mL)와 50 μ g/mL ascorbic acid와 10 mM β -glycerophosphate를 함께 처리하여 21일 후에 40 mM Alizarin red S로 염색.

○ 마우스 골수로 부터의 파골세포의 근원세포인 primary 단핵세포(primary monocyte)를 분리 배양함(그림 42-A). D3G 분획층(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 처리 시에 단핵세포의 파골세포로의 분화 마커인 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 활성과 TRAP 염색 정도에 유의한 변화가 없었음(그림 42-B, C)

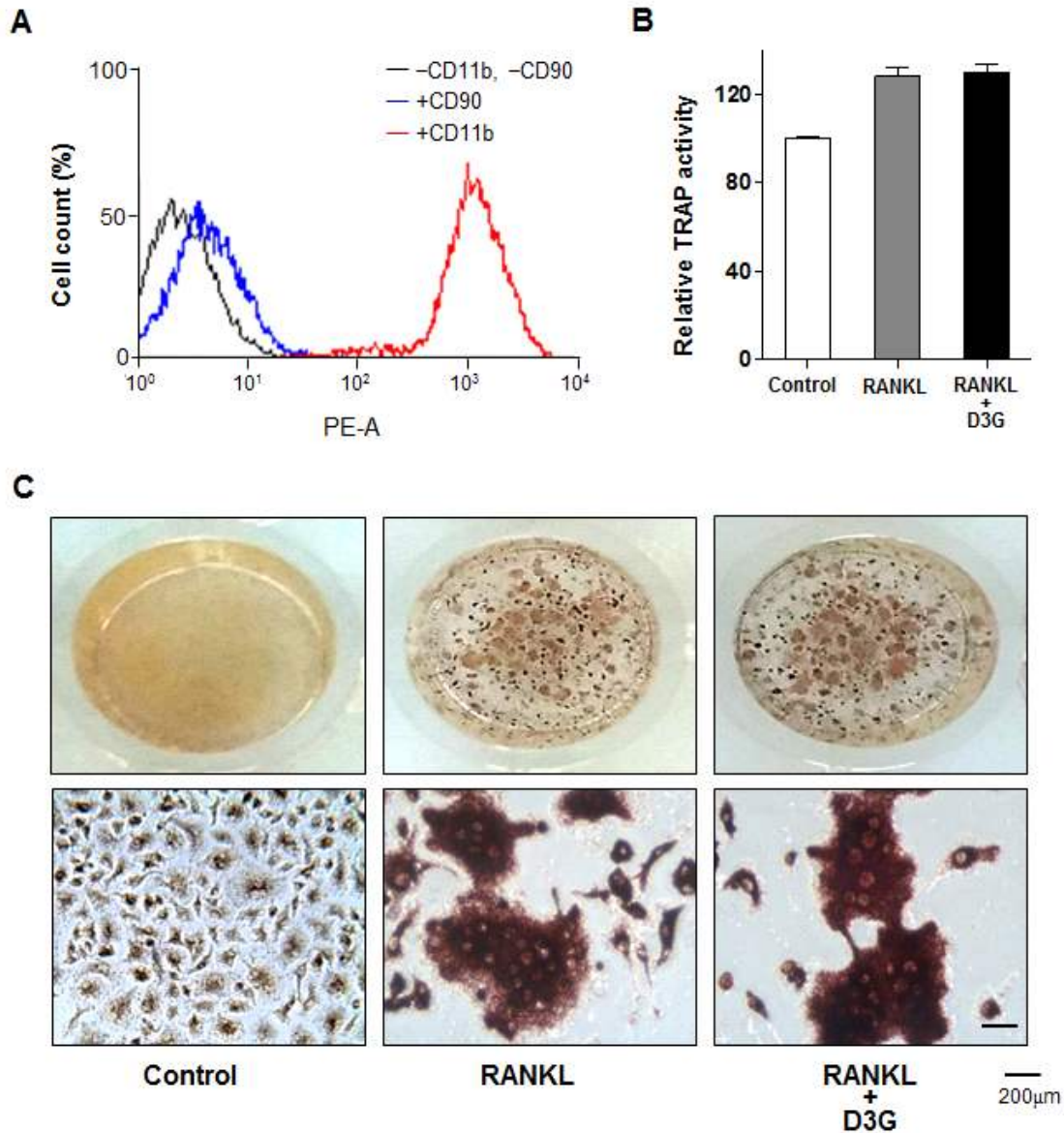


그림 42. 지골피 추출물 D3G 분획층에 대한 골흡수 억제 유효성 평가. (A) FACS를 통한 마우스 골수로 부터의 분리 단핵세포(primary monocyte) 확인(단핵세포 positive 마커 항체: CD11b). (B) 단핵세포에 30 ng/mL M-CSF와 50 ng/mL RANKL를 함께 처리하여 5일간 배양 후 파골세포 분화 마커인 TRAP 활성 측정. (C) 파골세포분화 마커인 TRAP 염색.

○ 다음으로, 보다 더 *in vivo* 조건에 가까운 상태에서 D3G의 효과를 관찰하기 위하여, 조골모세포인 MC3T3-E1 세포와 파골모세포인 primary 단핵세포의 혼합 배양(co-culture)을 시행함. 혼합배양액에 D3G 분획층(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리한 후 조골세포 분화 마커인 ALP 활성과 파골세포 분화 마커인 TRAP 활성을 측정하였음. 혼합배양에서 조골세포 분화와 파골세포 분화 양쪽 모두 현저한 증가를 나타내었음(그림 43-A, B). 이러한 결과는 D3G가 *in vivo* 상태에서 뼈의 교체율(turn over) 즉 골대사를 증가 시키는 것이 시사됨.

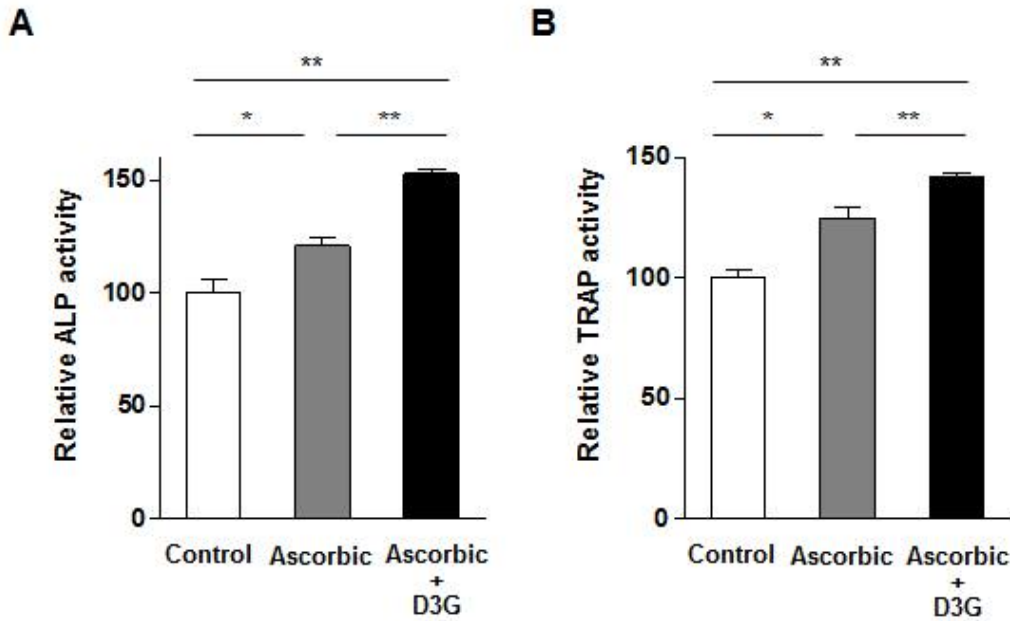


그림 43. 혼합배양(조골모세포와 파골모세포)에서의 지골피 추출물 D3G 분획층에 대한 골대사 증가 유효성 평가. D3G(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid와 10 mM β -glycerophosphate를 함께 처리하여 5일 후 측정. (A) 조골세포 분화 마커인 ALP 활성 측정. (B) 파골세포 분화 마커인 TRAP 활성 측정.

○ 조골모세포인 MC3T3-E1 세포와 파골모세포인 primary 단핵세포의 혼합배양액에 D3G 분획층(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리한 후 조골세포 분화 유전자 마커인 *Alp*, *Runx2*, *Bglap*(Osteocalcine)와 파골세포 분화 유전자 마커인 *Tnfsf11*(RANKL)의 mRNA의 발현량 변화를 정량적 역전사-PCR(quantitative Reverse transcription-PCR)을 이용하여 관찰함. 결과적으로, *Alp*, *Runx2*, *Bglap*, *Tnfsf11* 유전자 모두 발현이 유의하게 증가하였음(그림 44-A, B).

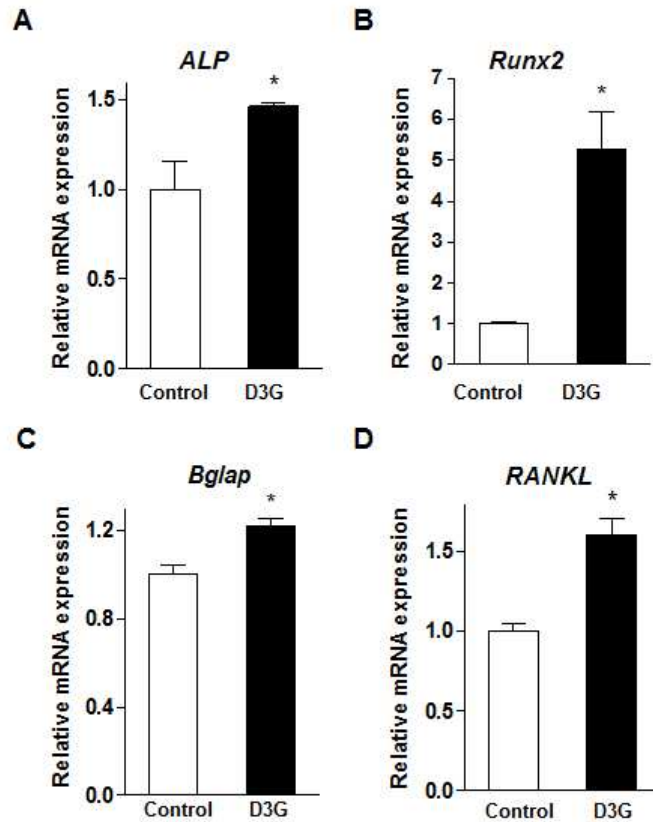


그림 44. 혼합배양(조골모세포와 파골모세포)에서의 지골피 추출물 D3G 분획층에 대한 골 대사 증가 유전자 마커의 발현량 변화 평가. D3G(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid와 10 mM β -glycerophosphate를 함께 처리하여 5일 후 mRNA 량을 정량적으로 측정함.

□ Scopoin과 loganin의 골형성 및 골흡수 *in vitro* 유효성 평가

- 지골피에서 동정된 효능 성분인 scopoin과 속단에서 동정된 효능 성분인 loganin 화합물을 구매하여 골형성 및 골흡수 *in vitro* 유효성 평가실험을 진행함.
- Scopoin과 loganin의 농도별 처리 시에 조골세포인 MC3T3-E1 세포의 조골세포로의 분화를 관찰함. Scopoin은 50 ng/mL의 농도에서, loganin은 1 ng/mL의 농도에서 최고의 ALP 활성을 나타내었음(그림 45-A, B). 최적 농도에서 scopoin과 loganin 모두에서 ALP 염색(조골세포 분화)과 Alizarin red S 염색(무기질화)가 유의하게 증가하였음(그림 45-C).

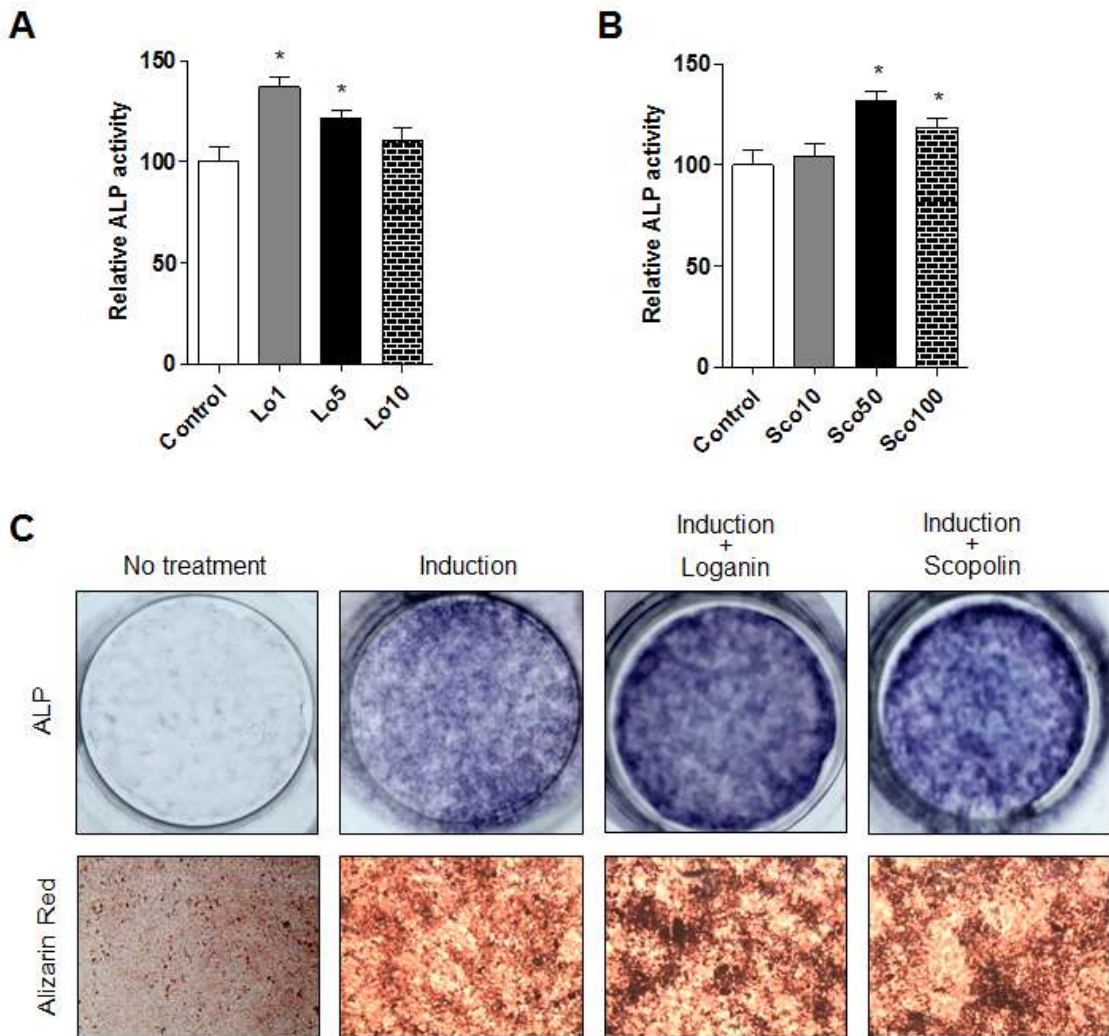


그림 45. Scopoin과 loganin에 대한 골형성 증가 유효성 평가. (A, B) 조골세포로의 분화 마커인 ALP 활성측정. 화합물 처리 3일 후에 측정. (C) 화합물 처리 3일 후에 ALP 염색. 무기질화 평가는 50 µg/mL ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate를 함께 처리하여 21일 후에 40 mM Alizarin red S로 염색.

○ 마우스 골수로 부터의 파골세포의 근원세포인 primary 단핵세포(primary monocyte)에서 scopoin과 loganin의 농도별 처리 시에 파골모세포인 primary 단핵세포의 파골세포로의 분화를 관찰함. Scopoin과 loganin의 사용한 모든 농도에서 파골세포 분화 마커인 TRAP활성이 유의하게 감소하였으며(그림 46-A, B), Scopoin 50 ng/mL, loganin 1 ng/mL의 처리 시에 TRAP 염색 정도가 다소 감소하였음(그림 46-C).

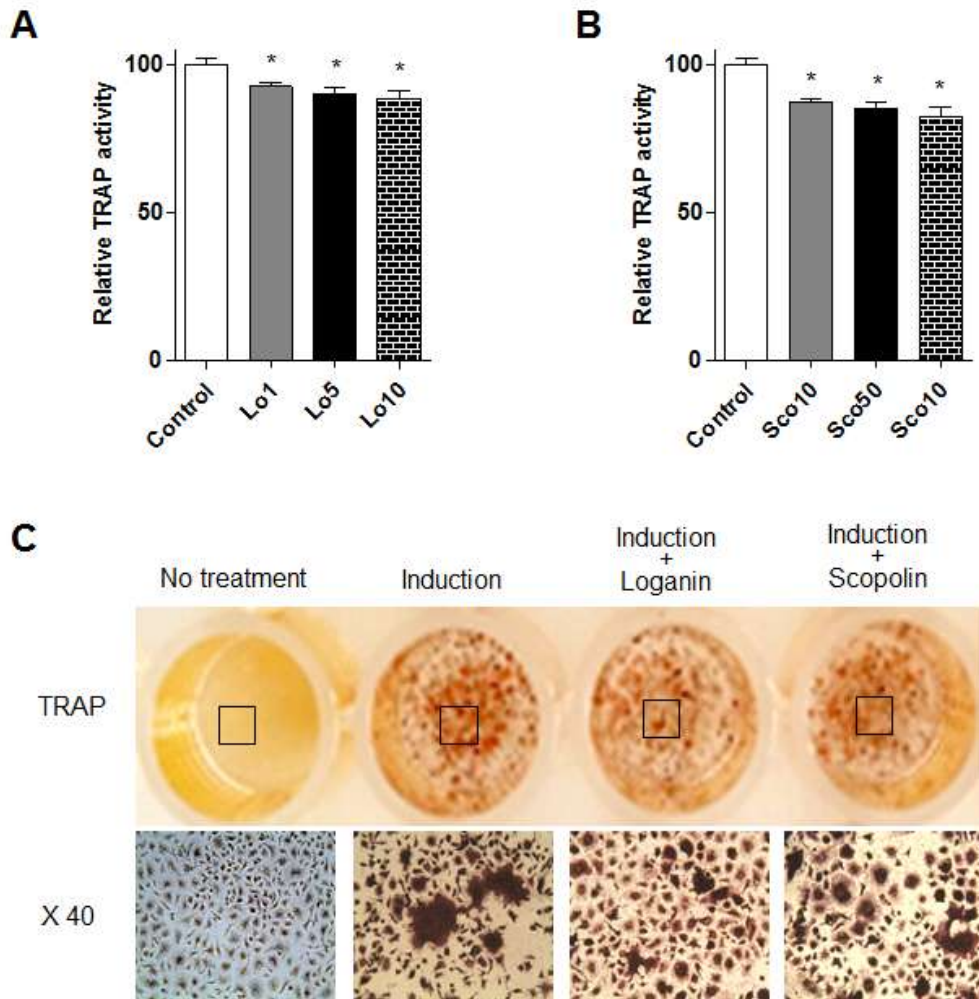


그림 46. Scopoin과 loganin에 대한 골흡수 억제 유효성 평가. (A, B) 단핵세포에 30 ng/mL M-CSF와 50 ng/mL RANKL를 함께 처리하여 5일간 배양 후 파골세포 분화 마커인 TRAP 활성 측정. (C) 파골세포분화 마커인 TRAP 염색.

○ 다음으로, 조골모세포인 MC3T3-E1 세포와 파골모세포인 primary 단핵세포의 혼합 배양 (co-culture)에서 scopoin과 loganin의 영향을 평가 함. Scopoin 50 ng/mL, loganin 1 ng/mL의 처리 후에 시간별로 조골세포 분화 마커인 ALP 활성과 파골세포 분화 마커인 TRAP 활성을 측정하였음. 혼합배양에서 scopoin은 24시간에 loganin은 48시간에 유의한 ALP 증가를 나타내었음(그림 47-A, B). 또한, scopoin과 loganin 모두 72시간 이후부터 TRAP 활성이 유의하게 감소하였음(72시간 이후부터 Control은 유의하게 증가) (그림 47-C). 이러한 결과는, scopoin과 loganin 모두 *in vivo* 상태에서 골형성은 촉진 시키며 골흡수는 억제 시키는 것이 시사됨.

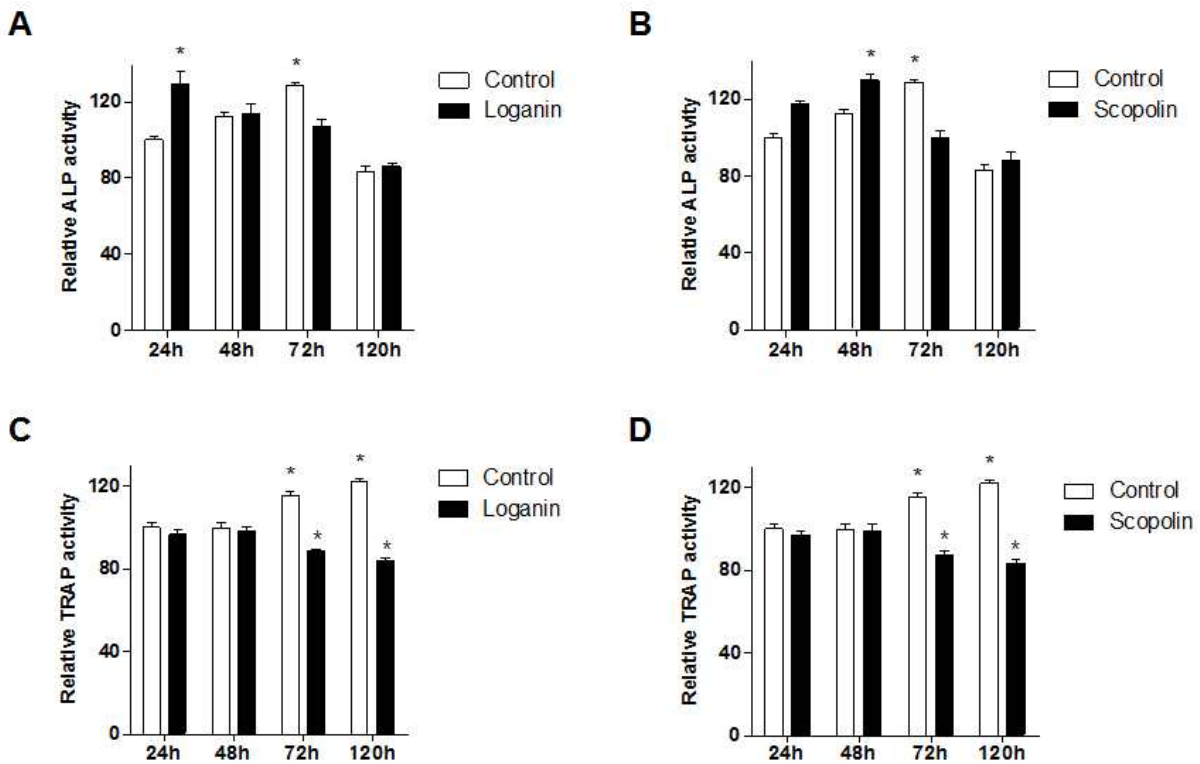


그림 47. 혼합배양(조골모세포와 파골모세포)에서의 scopoin과 loganin에 대한 골형성 증가 및 골흡수 감소 유효성 평가. Scopoin 50 ng/mL, loganin 1 ng/mL와 50 µg/mL ascorbic acid와 10 mM β-glycero-phosphate를 함께 처리하여 5일 후 측정. (A, B) 조골세포 분화 마커인 ALP 활성 측정. (C, D) 파골세포 분화 마커인 TRAP 활성 측정.

7. 대량 생산을 위한 최적화

□ 대량생산을 위한 식품소재 추출 효율 극대화

- 최종 제품 개발을 위한 대량생산을 목적으로 **최종 선정 식품소재(지골피)**의 추출 효율 극대화를 위한 연구를 진행하였음. 추출온도, 추출시간을 변화시켜 한방소재를 추출하였고 추출물의 당도(brix), 고형물 함량을 측정하여 추출최적화방법을 설정하였음.
- 추출물의 당도는 당도계(saccharimeter)로 그 용액의 당도를 측정하였고, 고형물 함량은 수분시험법으로 고형분 함량을 측정하였음. 굴절당도계를 이용하여 농도를 측정한 후 고형분 함량 계산식에 값을 대입하여 계산하여 산출하였음.
- 디지털 굴절당도계를 이용하여 고형분 함량을 측정한 방법은 다음과 같음. 먼저 검경면에 물을 한 방울 적가하고 영점을 조정하고 굴절당도계 검경면의 물을 제거하고 한방소재 액상추출물 한 방울을 적가 한 다음 당도(°Brix) 값을 측정함. 수분시험법(105℃ 건조법)으로 측정한 고형분 함량과 굴절당도계로 측정한 당도(°Brix)를 이용하여 검량선을 작성하고 얻어진 Factor(R2값)가 0.95~1.0 이내일 경우 검량선으로부터 얻어진 다음 식에 의거하여 측정된 당도(°Brix)를 수분함량 측정 없이 고형분 함량(%)으로 산출하여 적용함.

※ 액상 추출물의 고형분 함량(%) = [X절편 × 당도(Brix)] ± Y 절편

- 한약재의 종류에 따라 최적의 추출조건이 다르지만 대체로 한방소재의 물 추출의 경우 70℃~100℃의 온도조건에서 1~3시간의 조건으로 추출하는 경우가 대부분이므로 이 조건을 변화시켜 추출 최적화조건을 설정하였음(표 15).

표 15. 지골피의 추출온도와 시간에 따른 당도(Brix) 변화

온도 \ 시간	70℃	80℃	90℃	100℃
1시간	1.0	1.0	1.5	1.6
2시간	1.4	1.6	2.0	2.3
3시간	1.9	2.3	2.5	2.8

- 한방소재종류에 따라 그 특성이 다르기 때문에 당도 및 고형분 함량에 차이는 있으나 같은 용매로 추출할 경우 최적의 추출조건은 거의 유사할 것으로 판단되며, 지골피를 이용해서 최적의 추출조건을 연구한 결과 추출온도 100℃, 추출시간 3시간에서 추출할 때 최적의 추출효율을 나타내는 것으로 확인하였음(표 16).

표 16. 지골피의 추출온도와 시간에 따른 고형분 함량(%) 변화

온도 시간	70℃	80℃	90℃	100℃
1시간	0.9%	0.9%	1.3%	1.6%
2시간	1.0%	1.5%	2%	2.2%
3시간	1.5%	2%	2%	3%

8. 건강식품 시제품 개발

□ 소비자 기호도 및 시장성 조사를 위한 설문조사

- 연구결과 뼈 형성 및 골다공증 예방에 좋은 효능을 나타낸 **지골피**를 이용하여 골다공증 예방 및 개선을 위한 제품을 생산하기 위해 잠재적인 소비자를 대상으로 생산될 제품의 기호도 및 시장성 조사를 위한 설문조사를 실시하였음(그림 48).
- 동우당제약(주)의 온라인 쇼핑몰 ‘허브인라이프(herbinlife)’에 회원가입이 되어있는 회원을 대상으로 설문조사를 실시하였고, 대상은 뼈 건강에 가장 관심이 많을 것으로 보이는 40대 이상 여성 100명으로 설정하였음.
- 설문조사 결과, 평소 뼈가 약하거나 골다공증을 앓고 있습니까? 라는 질문에 73%가 그렇다고 대답했으며, 27%가 그렇지 않다고 대답하였음. 40대 이상의 여성들에게서 뼈가 약하거나 골다공증을 앓고 있는 비율이 73%로 높은 수치를 나타냈음. 평소 뼈 건강을 위해 어떤 노력을 하십니까? 라는 질문에 운동 5%, 물리치료 5%, 약 처방 20%, 건강기능식품섭취 40%, 없다 10%, 기타 20%로 가장 많은 비율의 응답자가 건강기능식품을 섭취하는 것으로 나타났음. 평소 뼈 건강을 위해 한달 얼마 정도의 비용이 발생합니까? 라는 질문에 10,000원이 하가 5%, 10,000원~30,000원이 30%, 30,000원~50,000원이 45%, 50,000이상이 5%, ‘없다’라고 답한 응답자가 10%, 기타를 선택한 응답자가 5%로 나타났으며, 뼈 건강을 위해 30,000~50,000원을 소비하는 응답자가 45%로 가장 많은 비율을 나타냈음. 골다공증 치료 및 개선을 위한 제품이 판매된다면 구매할 의사가 있습니까? 라는 질문에 구매할 의사가 있다고 답한 응답자가 80%, 구매할 의사가 없다고 답한 응답자가 20%를 나타내어 대다수의 응답자가 골다공증 치료 및 개선을 위한 제품의 생산 및 구매에 긍정적인 반응을 나타냈음. 골다공증 치료 및 증상개선을 위한 제품이 판매된다면 어떠한 형태가 가장 좋습니까? 라는 질문에 한방차 티백형태 15%, 패트병 음료형태 5%, 물에 타서 마시는 고형차 형태 10%, 환 혹은 고 형태 35%, 기타 35%로 환 혹은 고 형태를 선호하는 응답자가 35%로 가장 많았으며 기타의견 또한 35%로 가장 많았는데 음식으로 섭취할 수 있는 형태를 언급하였음(그림 49).

설문조사

▷ 골다공증 예방 및 개선을 위한 식품 고객 Needs조사 ◁

안녕하십니까? 생활한방기업 동우당 제약㈜입니다. 본 동우당 제약㈜에서는 골다공증 예방 및 개선을 위한 식품개발을 진행하고 있으며 제품화 하기 전에 여러분의 의견을 바탕으로 제품개발에 도움을 얻고자 합니다. 바쁘시더라도 5분만 시간을 내시어 협조해주시면 감사하겠습니다.

2014. 03.

- 각 항의 해당사항에 표시를 해 주시기 바랍니다.
- 해당하는 번호가 없는 경우 해당사항을 기타란에 직접 기재해 주시기 바랍니다.
- 작성 중 궁금하신 사항은 아래 설문조사 담당자에게 문의하여 주시기 바랍니다.

1. 응답자 인적 사항 성별 : 나이 :
2. 평소 뼈가 약하거나 골다공증을 앓고 있습니까? 예 / 아니오
3. 평소 뼈 건강을 위해 어떤 노력을 하십니까?
1) 운동 2) 물리치료 3) 약 처방 4) 건강기능식품섭취 5) 없다 6) 기타
4. 평소 뼈 건강을 위해 한달 얼마 정도의 비용이 발생합니까?
1) 10,000원 이하 2) 10,000원~30,000원 3) 30,000원~50,000원 4) 50,000원 이상 5) 없다 6) 기타
5. 골다공증 치료 및 증상 개선을 위한 제품이 판매된다면 구매할 의사가 있습니까?
예 / 아니오
6. 골다공증 치료 및 증상 개선을 위한 건강 음료가 판매된다면 어떠한 형태가 가장 좋습니까?
1) 한방차 티백 형태 2) 패트병 음료형태 3) 물에 타서 마시는 고형차 형태 4) 환 혹은 고 형태
5) 기타

Omniherb 동우당제약(주)

그림 48. 시제품 개발을 위한 설문지

Q1. 평소 뼈가 약하거나, 골다공증을 앓고 있습니까?



Q2. 평소 뼈 건강을 위해 어떤 노력을 하십니까?



Q3. 평소 뼈 건강을 위해 한달 얼마 정도의 비용이 발생합니까?



Q4. 골다공증 치료 및 증상개선을 위한 제품이 판매된다면 구매할 의사가 있습니까?



Q5. 골다공증 치료 및 증상개선을 위한 제품이 판매된다면 어떠한 형태가 가장 좋습니까?



그림 49. 제품개발을 위한 소비자 기호도 및 시장성조사를 위한 설문조사 결과

□ 시제품 레시피 개발 및 시제품 생산

- 위의 설문조사 결과를 분석하여 시제품을 개발하였음. 설문조사에서 골다공증 치료 및 증상개선을 위한 제품의 형태로 환 혹은 고의 형태가 35%를 나타내어 가장 높은 비율을 차지하였고 제품의 특성상 중장년층 이상이 주요 소비층이 될 것으로 예상되어 제품의 유형을 환으로 하는 건강개선식품을 개발하였음. 가격은 20,000원~50,000원정도로 예상하여 시제품을 개발하였음.
- 지골피 추출물을 30brix정도로 농축한 지골피 농축물과 부형제 역할을 하는 현미가루를 섞어 잘 반죽하고 제환을 한 후 50℃이상의 건조기에서 건조하여 환 시제품을 제작, 생산하였음(지골피 환).
- 선호하는 제품의 유형에 대한 설문조사에서 기타의 의견으로 음식으로 섭취할 수 있는 유형에 대한 요구가 있었고 이를 반영하여 두 번째 시제품은 지골피를 함유한 장류제품인 된장을 개발하였음. 된장찌개 혹은 양념장으로 폭넓게 음식에 응용하여 먹음으로써 뼈 건강을 지킬 수 있을 것으로 판단하였음. 된장의 가격은 용량 950g에 15,000원~20,000원정도로 예상하고 시제품을 생산하였음. 된장 시제품의 생산의 경우 알메주를 이용하여 된장을 제조하는 과정에서 지골피 농축액과 주정, 쌀을 혼합하여 시제품을 생산하였음(지골피 함유 된장).

○ 뼈 건강은 골다공증이 염려되거나 앓고 있는 중장년층 이상의 연령층에게서도 중요하지만 한창 성장하는 어린이에게도 중요하다고 판단하여 뼈 형성에 좋은 작용을 나타낸 지골피 및 기타 한방원료를 혼합하여 성장기 어린이 음료를 시제품으로 개발하였음. 파우치(pouch) 형태의 제품으로 세트 구성하여 약 40,000원~60,000원으로 예상하는 시제품을 개발하였음. 어린이 성장에 도움을 줄 수 있는 지골피를 포함한 몇 가지 한약재를 혼합하여 추출하였고, 이에 아이들의 기호를 맞추기 위해 프락토올리고당, 포도농축액과 비타민을 추가로 혼합하여 음료 시제품을 개발하였음(지골피 함유 파우치).

□ 시제품 디자인 및 제품명 개발

○ 지골피를 함유한 건강식품인 환 제품은 제품명을 ‘지골피 환’으로 명명하였고, (주)동우당제약의 디자인팀에서 다음과 같이 시제품 디자인을 개발하였음(그림 50).



그림 50. 시제품 ‘지골피 환’ 외곽 케이스 디자인개발

- 두 번째 시제품인 지골피를 함유한 된장은 제품명을 ‘튼튼된장’으로 명명하였고, 다음과 같이 시제품 디자인을 개발하였음(그림 51).

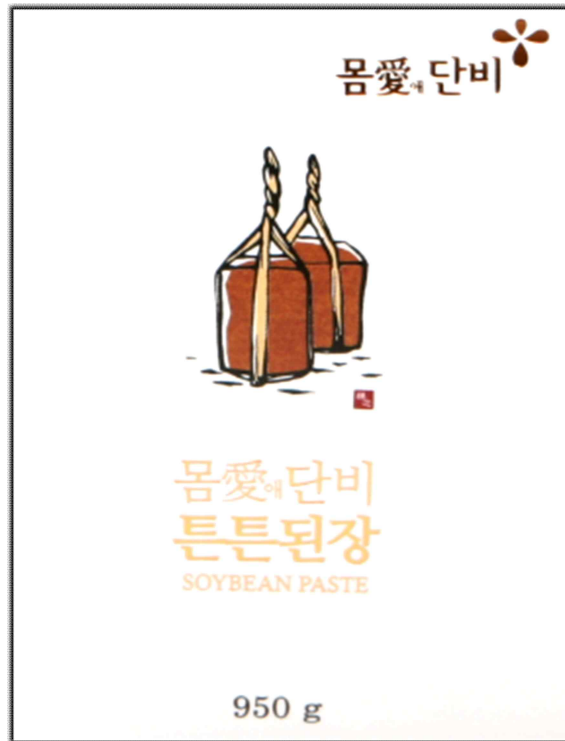


그림 51. 시제품 ‘튼튼된장’ 디자인개발

- 세 번째 시제품으로는 뼈 형성을 도와 성장에 도움을 주는 성장기 어린이 음료세트를 개발하였고, 이 제품은 ‘키즈 밸런스 탑(Kids Balance Top)’ 이라고 명명하고 파우치, 중박스, 아웃박스에 대한 디자인을 개발하였음(그림 52).





그림 52. 시제품 '키즈 밸런스 탭(Kids Balance Top)' 디자인개발(파우치, 중박스, 외곽박스)

□ 시제품의 관능평가

- 지골피를 이용하여 연구개발한 시제품 3종에 대해서 관능평가를 실시하였음. 시제품 3종과 이들과 유사한 시중 판매되고 있는 제품을 통해 관능평가를 하였고, 본 실험에 흥미가 있고 차이식별능력이 있는 동우당제약(주) 직원 20명을 관능검사 요원으로 선정하였음. 이들에게 색, 맛, 향, 전반적인 기호도 및 선호도에 대한 평가요령을 훈련시킨 뒤 9점 채점법(9점: 가장 좋다, 7점: 좋다, 5점: 보통이다, 3점: 싫다, 1점: 가장 싫다)에 따라 관능평가를 실시하였음.
- 첫 번째 시제품 ‘지골피 환’의 경우, 현재 판매 중인 지골피로 만든 환 제품이 없는 관계로 Y사의 구기자 환을 구입하여 관능평가를 실시하였고, 색상을 제외한 맛, 향, 전반적인 기호도, 선호도에서 동우당제약(주)의 ‘지골피 환’이 비교 제품에 비해 더 좋은 결과를 나타내었음.
- 두 번째 시제품인 ‘튼튼 된장’의 경우, ‘튼튼 된장’과 이와 유사한 S사의 재래식 된장을 통해 관능평가를 실시하였음. 색상, 맛, 향, 전반적인 기호도, 선호도의 다섯 항목에서 모두 동우당제약(주)의 ‘튼튼된장’이 비교 제품에 비해서 더 좋은 결과를 나타내었음.
- 마지막 시제품인 성장기 어린이 음료 ‘키즈 밸런스 탑(Kids Balance Top)’의 경우 이와 유사한 제품인 J사의 제품을 구입하여 관능평가를 실시하였고 맛, 전반적인 기호도, 선호도에서 동우당제약(주)의 ‘키즈 밸런스 탑(Kids Balance Top)’이 비교 제품에 비해서 더 좋은 결과를 나타내었음(표 17).

표 17. 시제품의 분석을 위한 관능평가 결과

Sensory quality	Mean sensory score					
	지골피 환	Y사 구기자 환	튼튼된장	S사 재래식된장	키즈 밸런스 탑	J사 어린이음료
Color	4.8 ^a	6.8 ^b	7.2 ^a	5.8 ^b	6.0 ^a	6.4 ^b
Taste	7.0 ^a	4.2 ^b	6.8 ^a	4.0 ^b	7.8 ^a	6.8 ^b
Flavor	6.6 ^a	4.6 ^b	7.0 ^a	6.8 ^b	6.4 ^a	7.0 ^b
Overall	6.4 ^a	4.2 ^b	6.4 ^a	5.8 ^b	6.8 ^a	6.2 ^b
Preference	7.0 ^a	4.0 ^b	7.0 ^a	5.2 ^b	7.0 ^a	6.6 ^b

Sensory evaluation was conducted by ten members of panel using scoring difference test and sensory scores were 9, excellent; 7, very good; 5, good; 3, poor; 1, very poor.

abMean scores within a row followed by the same superscript are not significantly different at 5 % level using Duncan’s multiple range test.

□ 시제품 시험분석

- 연구개발한 시제품에 대해서 국가에서 인증 받은 식품평가기관에 의뢰해서 9대 영양성분분석 및 자가 품질검사를 진행하였음(그림 53).

제 14-2-05205 호

발급번호 : 제 10-07-954 호

시험 성적서

검 체 명	지골피환		
제 품 유 형	일반성분검사		
의뢰인 주소 및 성명	(주)옴니허브	대 표 자	허담
	경북 영천시 임고면 호리 1041-11		
시 험 의 릐 목 적	참고용	접 수 년 월 일	2014년 09월 24일

귀하가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰된 시험항목에 한하며 다음과 같습니다.

결과 :

시 험 항 목	규 격 기 준	결 과
열량	-	370Kcal/100g
탄수화물	-	69g/100g (21%, %영양소 기준치)
당류	-	1g/100g
단백질	-	10g/100g (17%, %영양소 기준치)
지방	-	6g/100g (12%, %영양소 기준치)
포화지방	-	0.7g/100g (5%, %영양소 기준치)
트랜스지방	-	0g/100g
콜레스테롤	-	0mg/100g (0%, %영양소 기준치)
나트륨	-	70 mg/100g (4%, %영양소 기준치)

식품위생검사기관지정기준 제4호의 2 규정에 의하여 위와같이 검사성적서를 발급합니다.

2014년 10월 02일

계명대학교 전통미생물자원연구센터 소장

식품의약품안전청 식품위생검사기관 제32호
국립수의과학검역원 축산물위생검사기관 제 16호



이 검사결과는 제출된 검체에 한하며 의뢰목적 이외의 상업적인 광고 및
법적인 해결수단으로 사용할 수 없습니다.

검사성적서

발급번호 : R20141202-0046

접수번호 : 2014110020230-0001

발급번호	2014110020230	접수번호	2014110020230		
제품명	튼튼된장	제조일자		유통기한	2015-11-15
의뢰인	동우당제약(주)	성명	히담	소재지	경상북도 청도군 풍각면 안국길 63
접수년월일	2014-11-19	검사완료일	2014-12-02		
식품유형/재질	된장				

시험 항목 및 결과

시험항목	기준	결과	항목판정
보존료			적합
그외보존료	불검출(g/kg)	불검출	적합
소르빈산으로서	1.0이하(g/kg)	불검출	적합
타르색소	불검출	불검출	적합

판정 : 적합

검사자 : 박정민, 엄영빈

책임자 : 엄영빈, 조민석

비고 : 자가품질위탁검사용

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

<식품,의약품분야 시험,검사 등에 관한 법률>

제 11조 제2항 및 같은법 시행규칙 제12조 제4항에 따라 위와 같이 시험검사성적서를 발급합니다.

2014년 12월 02일

(재)경북테크노파크 대구한의대학교특화센터 식품위생검사소

검사 책임자	정 조 민 석 부 업 영 빈
전화번호	053-819-1497



(재)경북테크노파크 대구한의대특화센터
식품위생검사소
 경북 경산시 유곡동 290번지 http://techno.dhu.ac.kr
 Tel : (053)819-1495,1497 Fax : (053)819-1496

검 사 성 적 서

발급번호 참고 2014-1728

접수번호 1728

제품명	키즈 밸런스 탑		제조일자나 유통기한 또는 제조번호	2016. 01. 20.
의뢰인	업소명	동우당 제약(주)	성 명	허 답
	소재지	경북 영천시 임고면 운주로 267-14		
접수년월일	2014. 07. 24.	검사완료일	2014. 08. 06.	
식품유형(재질)	액상차	검사목적	참고용	
시험항목 및 결과				
시험항목	기준	결과(단위)	%영양소기준치	항목판정
열량	-	80(kcal/100ml)	-	확인
탄수화물	-	19(g/100ml)	6%	확인
당류	-	14(g/100ml)	-	확인
단백질	-	0(g/100ml)	0%	확인
지방	-	0(g/100ml)	0%	확인
포화지방	-	0(g/100ml)	0%	확인
트랜스지방	-	0(g/100ml)	-	확인
콜레스테롤	-	0(mg/100ml)	0%	확인
나트륨	-	0(mg/100ml)	0%	확인
판정 : 확인				
비고 : 상기 판정은 의뢰된 시험항목에 한함.				
위와 같이 검사성적서를 발급합니다.				
2014년 08월 06일				
(재)경북테크노파크 대구한의대특화센터 식품위생검사소 장				



검사성적서

발급번호 : R20140806-0015

접수번호 : 2014070020289-0001

발급번호	2014070020289	접수번호	2014070020289		
제품명	키즈밸런스탑	제조일자		유통기한	2016-01-20
의뢰인	동우당제약(주)	성명	허담	소재지	경북 영천시 임고면 운주로 267-14
접수년월일	2014-07-24	검사완료일	2014-08-06		
식품유형/재질	액상차	비고			

시험항목 및 결과

시험항목	기준	결과	항목판정
납	0.30이하(mg/kg)	0.0	적합
타르색소	불검출	불검출	적합
대장균군	음성	음성	적합
세균수	100이하(mL당)	0	적합

판정 : 적합

검사자 : 이유진, 박정민, 한태경

책임자 : 배명인, 조민석

비고 : 자가품질위탁검사용

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

식품위생검사기관지정기준 제4조의2 규정에 의하여 위와 같이 검사성적서를 발급합니다.

2014년 08월 06일

(재)경북테크노파크 대구한의대학교특화센터 식품위생검사소



그림 53. 시제품에 대한 영양성분분석성적서 및 자가품질시험성적서

9. 인체적용시험

□ 지골피 환의 인체적용시험을 통한 효능 평가

○ 골감소증 여성에서 지골피의 유효성 및 안전성 평가를 위한 24주, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험을 실시함.

인체적용시험 개요

임상시험 제목	골감소증 여성에서 지골피의 유효성 및 안전성 평가를 위한 24주, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
임상시험 의뢰자	농림수산식품기술기획평가원
임상시험 책임자	정선용 교수(아주의대 의학유전학과)
	조두연 교수(아주의대 가정의학과)
임상시험 실시기관	아주대학교병원: 경기도 수원시 영통구 월드컵로 164
임상시험 기간	임상시험 승인일로부터 12개월
임상시험 대상	골감소증 여성
임상시험 목적	골감소증 여성에서 지골피를 투여했을 때 대조식품 (placebo)과 비교하여 골감소증 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위함이다.
단계 및 디자인	단 계: 기타(건강식품, 환) 디자인: 24주, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조
시험식품	지골피가 포함된 환
대조식품	진피(굴 껍질)가 포함된 환
시험군 섭취방법	1일 2회, 1회 1포(5g)씩 (지골피 4g/day)
대조군 섭취방법	1일 2회, 1회 1포(5g)씩 (진피 4g/day)
섭취기간	24주
피험자 수	총 30명 예정, 지골피:위약 = 1:1
선정기준	(1) 만 40세 이상의 폐경 후 여성: 폐경이란 다음 네 가지 조건 중 하나 이상을 만족시키는 경우로 한다. - 12개월간 자발적인 무월경 상태인 경우 - 마지막 월경이 6개월에서 1년 미만으로 혈중 FSH >40mIU/mL인 경우

	<ul style="list-style-type: none"> - 양측 난소절제술 후 6주 이상이 경과한 경우 - 자궁절제술 후 혈중 FSH > 40mIU/mL인 경우 (2) DXA (Dual energy X-ray absorptiometry)로 척추(AP) 골감소증 진단을 받은 자: 골감소증이란 요추 (lumbar spine L1~L4의 평균)에서 측정된 BMD T-score가 -1.0 ~ -2.5 SD인 경우로 한다. (3) 본 임상시험에 대해 충분한 설명을 듣고 자발적으로 동의서에 서명한 자
제외기준	<ul style="list-style-type: none"> (1) 스크리닝 이전 3개월 이내에 Calcium 제제, Bisphosphonate 제제, 호르몬 대체요법 또는 1일 200 IU를 초과하여 vitamin D 제제를 복용한 자. (2) 임상실험실적 검사상 신장 및 간 기능 저하가 의심되는 자 <ul style="list-style-type: none"> ① 신장 기능: serum creatinine $\geq 2 \times$ UNL ② 간 기능: AST, ALT $\geq 2 \times$ UNL (3) 갑상선 기능의 이상이 의심되는 자 <ul style="list-style-type: none"> ① TSH (갑상선 자극 호르몬) 수치가 정상범위를 벗어난 자 ② 갑상선암이나 갑상선기능항진증을 앓고 있거나 병력을 가지고 있는 자 (단, 갑상선기능저하증이 있는 자로써 갑상선호르몬을 보충으로 복용하고 있을 경우에는 혈중 TSH의 농도가 정상범위에 해당하면 임상시험에 참여할 수 있음) (4) 악성 종양의 병력을 가지고 있는 자 (5) 식도배출을 지연시키는 식도 질환을 가지고 있는 자 (예: 식도 협착 또는 이완 불능증) (6) 만성 위장관 질환 및 위절제술 이력 등 흡수 장애를 가지고 있는 자 (7) 교정되지 않은 고칼슘혈증/저칼슘혈증을 가지고 있는 자 (예: 8.7mg/dL \leq 혈청 calcium 농도 \leq10.3mg/dL 를 벗어난 자는 제외. 단, 연구자 판단 시 고칼슘혈증/저칼슘혈증으로 판단되지 않는 경우에는 시험에 참여할 수 있음) (8) 골대사에 영향을 줄 수 있는 조절되지 않는 만성질환을 가지고 있는 자 (예: 만성간질환, 알코올중독, 일차성 부갑상선기능항진증) (9) 골감소증 외의 대사성 골질환인 자 (10) 골 또는 칼슘대사에 영향을 주는 약물치료 중인 환자 (예: 스테로이드(경구, 주사제제) 및 다량의 이뇨제 등) (11) 임상적으로 유의한 알러지성 질환 (투약을 필요로 하지 않는 경미한 알러지성 비염 제외) 및 임상시험용식품 성분에 대한 과민증을 가진 자 (12) 다른 임상시험에 참여중인자 (13) 임상시험책임자의 소견으로 볼 때 임상시험에 순응할 수 없거나 임상시험 참여 여부가 부적절 하다고 판단되는 자
유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 1차 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - DEXA로 측정된 골밀도(척추)AP 변화 • 2차 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 골대사 지표 (ALP, Osteocalcin, Calcium, urine-NTX, urine Ca/Creatinine ratio)
안전성 평가	이상반응 확인

인체적용시험 일정요약

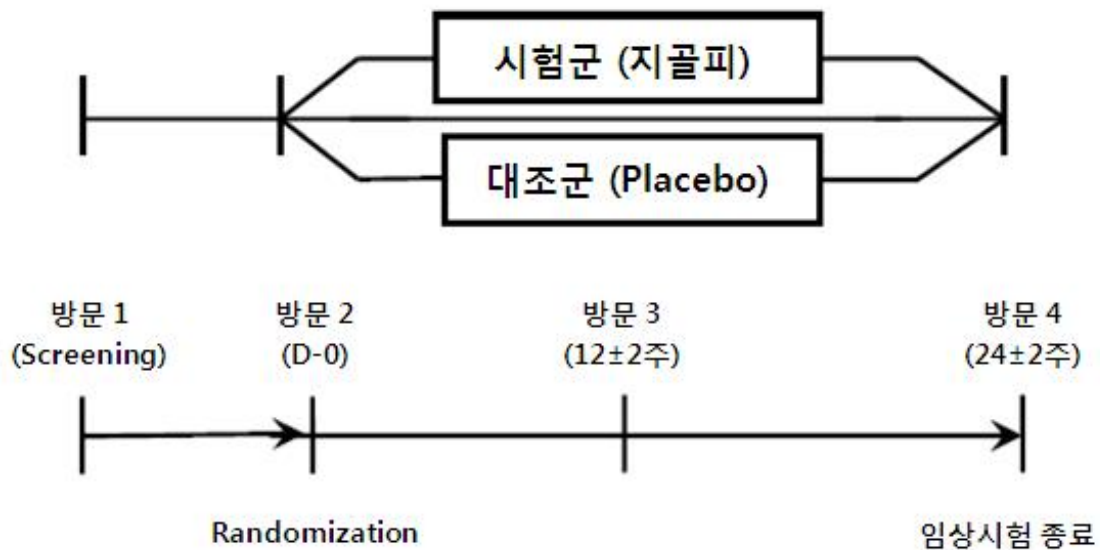
Period		Screening	Active	Treatment	
Visit		1	2	3	4
Week		-2	0	12	24
Window period	(week)			±2	±2
서면동의서		P			
인구학적 조사		P			
병력 및 약물투여력		P	P		
신체검사		P	P	P	P
신체계측	신장	P			
	체중	P	P	P	P
활력징후 (혈압, 맥박)		P	P	P	P
임상실험실검사 ¹⁾		P			
유효성 평가	골밀도(척추)AP ²⁾	P			P
	ALP, Calcium, urine ratio ³⁾ Osteocalcin, urine-NTX, Ca/Creatinine	P		P	P
피험자 적합성 평가		P			
무작위배정			P		
시험식품 및 대조식품 처방			P	P	
이상반응 확인				P	P
순응도 확인				P	P
병용약물 및 병용요법 변화 확인				P	P

(1) 대상자는 채혈하기 전날 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다. 방문1 이전 4주(28일) 이내의 검사결과가 있다면 적용 가능하며, 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 재검사를 시행할 수 있다.

- 혈액학적 검사: RBC, Hb, Hct, WBC, Platelet, Seg. Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, MCV
- 혈액화학적 검사: AST(GOT), ALT(GPT), Protein, Albumin, Total bilirubin, Total Cholesterol, BUN, Creatinine, Glucose, Inorganic phosphorus
- 소변검사: SG, pH, WBC(Leukocyte), Nitrite, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Erythrocyte
 - 갑상선호르몬검사: TSH/ft4

- (2) 방문1 이전 4주(28일) 이내의 검사결과가 있다면 적용 가능하다.
- (3) 방문1 이전 4주(28일) 이내의 검사결과가 있다면 적용 가능하다.

* 대상자 교통비: 방문2, 3, 4 각 3만원 지급 (방문1 Screening은 제외)
 * 임상실험실검사, 골밀도(척추)AP, 유효성 평가 중 ALP 자료가 있는 검진 수검자 중 대상자 모집예정. 따라서 스크리닝 검사 비용으로 Calcium, Osteocalcin, urine-NTX, urine Ca, urine Creatinine 만 산정.



계획서에 들어가야 할 시험/대조식품에 대한 사항

1. 시험/대조식품

1.1. 시험/대조식품의 개요

1.1.1. 시험식품

- 주성분명: 지골피
- 성상 및 제형: 환
- 제품의 중량: 5g/포
- 섭취량 및 섭취방법: 1일 2회, 1회 1포(5g)씩 물과 함께 먹는다
- 보관방법: 실온보관
- 제품의 조성 및 그 분량: 5g/포 중

1.1.2. 대조식품 (Placebo)

- 성상 및 제형: 환
- 제품의 중량: 5g/포
- 섭취량 및 섭취방법: 1일 2회, 1회 1포(5g)씩 물과 함께 먹는다
- 보관방법: 실온보관
- 제품의 조성 및 그 분량: 5g/포 중

1.2. 시험/대조식품의 생산/포장 및 라벨링

- 시험식품 및 대조식품은 시험의뢰자가 제조 후, 포장하여 임상시험 연구자에게 공급한다.
- 시험식품 및 대조식품으로 생산되는 제품은 각 약물의 외형 및 성상이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않아야 하며, 중량 차이도 크지 않아야 한다. 또한 시험식품과 대조식품은 동일한 라벨을 부착함으로써 임상시험 대상자 및 연구자에 대하여 맹검 (Blind)이 유지되도록 한다.
- 시험/대조식품 라벨은 의약품 등의 안전에 관한 규칙 (2013.03.23) 제69조 제6항에 따라, 아래의 사항을 기재한다.

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. "임상시험용" 이라는 표시2. 제품의 코드명 또는 주성분의 일반명3. 대상자번호4. 제조번호 및 사용 (유효)기한 또는 재검사일자5. 저장방법6. 임상시험계획 승인을 받은 자의 상호와 주소7. "임상시험 외의 목적으로 사용할 수 없음"이라는 표시 |
|--|

지골피 환의 인체적용시험 결과

임 상 시 험 결 과 보 고 요 약

골감소증 여성에서 지골피의 유효성 및 안전성 평가를 위한 24주, 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조 인체적용시험

A 24-Week, Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Study to Investigate the Efficacy and Safety of Lycium Root Bark in Osteopenic Women

1. 대상자의 임상시험 참여 상태

총 39명의 지원자를 대상으로 스크리닝을 실시하였으며, 이중 선정/제외기준에 적합한 대상자를 선정하여 임상시험 절차를 진행하였다. 스크리닝 탈락한 대상자는 총 17명으로, 선정/제외 기준 불만족이 16명, 동의 철회가 1명이었다.

본 임상시험 참여에 적합한 22명의 대상자에 대해 무작위 배정을 실시하였고, 무작위 배정된 22명의 대상자 모두 임상시험용의약품을 투여 받았다. 이중 20명이 계획된 임상시험을 완료하였으며, 2명에 대한 연구가 진행 중이며 2015년 1월 27일 종료된다. 탈락한 대상자는 없었다 (Figure 1).

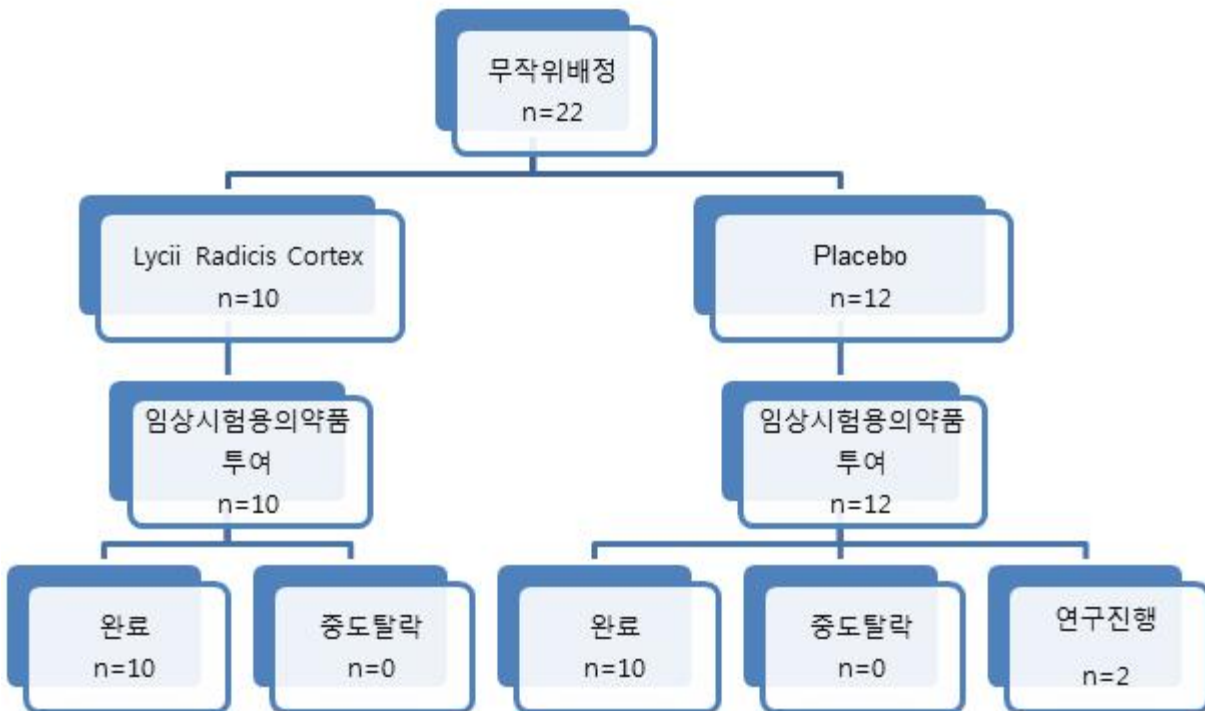


Figure 1. 대상자 분포도

2. 대상자의 인구학적 자료

대상자의 인구학적 특성은 Table 1과 같다. 지골피 또는 위약 투여군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

Table 1. Baseline characteristics of the study subjects

Variables	Unit	Lycii Radicis Cortex			Placebo			P value
		(n=20)			(n = 22)			
Age	Year	58.5	±	6.4	59.2	±	6.2	0.665
Height	cm	154.9	±	3.4	152.9	±	3.7	0.221
Weight	kg	58.1	±	7.4	52.4	±	5.7	0.070
WBC	×10 ³ /μL	5.5	±	1.2	6.4	±	2.1	0.276
Hemoglobin	g/dL	13.3	±	0.8	13.3	±	0.6	0.880
Hematocrit	%	39.1	±	2.5	39.3	±	1.7	0.879
Platelet	X10 ³ /μL	231	±	66	238	±	40	0.742
Total protein	g/dL	7.1	±	0.4	7.1	±	0.4	0.873
Albumin	g/dL	4.5	±	0.2	4.5	±	0.2	0.986
Total cholesterol	mg/dL	183	±	32	200	±	25	0.183
Fasting glucose	mg/dL	105	±	23	95	±	6	0.530
ALT	U/L	23	±	7	20	±	6	0.331
AST	U/L	27	±	5	24	±	4	0.168
BUN	mg/dL	15.6	±	4.0	17.5	±	4.9	0.330
Creatinine	mg/dL	0.9	±	0.1	0.9	±	0.1	0.870
Phosphorus	mg/dL	3.7	±	0.3	3.7	±	0.5	0.445
TSH	uIU/mL	2.36	±	0.96	1.52	±	0.52	0.017
ALP	U/L	74.2	±	17.2	76.8	±	15.0	0.715
Calcium	mg/dL	9.6	±	0.3	9.4	±	0.3	0.218
Osteocalcin	ng/mL	23.1	±	8.4	25.9	±	7.5	0.408
urine-NTX	nmol BCE/mmol Cr	50.2	±	16.8	67.6	±	14.7	0.018
urine Ca/ creatinine ratio	mg/g	148.4	±	85.2	110.4	±	54.0	0.391
Spine BMD		-1.73	±	0.56	-1.48	±	0.29	0.230
Anti-hypertensive medication	%	10			17			-
Anti-diabetic medication	%	10			-			-

Data are shown as means ± SD or percentage

3. 유효성 평가

DEXA로 측정된 골밀도(척추)AP 변화는 table2에 기술하였고, baseline으로부터의 변화량 (% change)는 Figure 2에 나타내었다. 6개월 투여 후 Baseline 골밀도로부터의 차나 변화량에서 지골피 투여군이 위약 투여군에 비해 골밀도가 덜 감소하는 경향성은 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

Table 2. Mean (\pm SD) baseline and after 6 month of spine BMD in Lycii Radicis Cortex treated and control group.

Variables	Lycii Radicis Cortex (n=10)		Placebo (n = 10)		P value
Baseline	-1.73	\pm 0.56	-1.48	\pm 0.29	0.230
After 6 month	-1.80	\pm 0.54	-1.58	\pm 0.99	0.287
Mean difference from baseline	-0.07	\pm 0.24	-0.10	\pm 0.17	0.751
% change from baseline	-5.99	\pm 15.88	-7.00	\pm 12.37	0.875

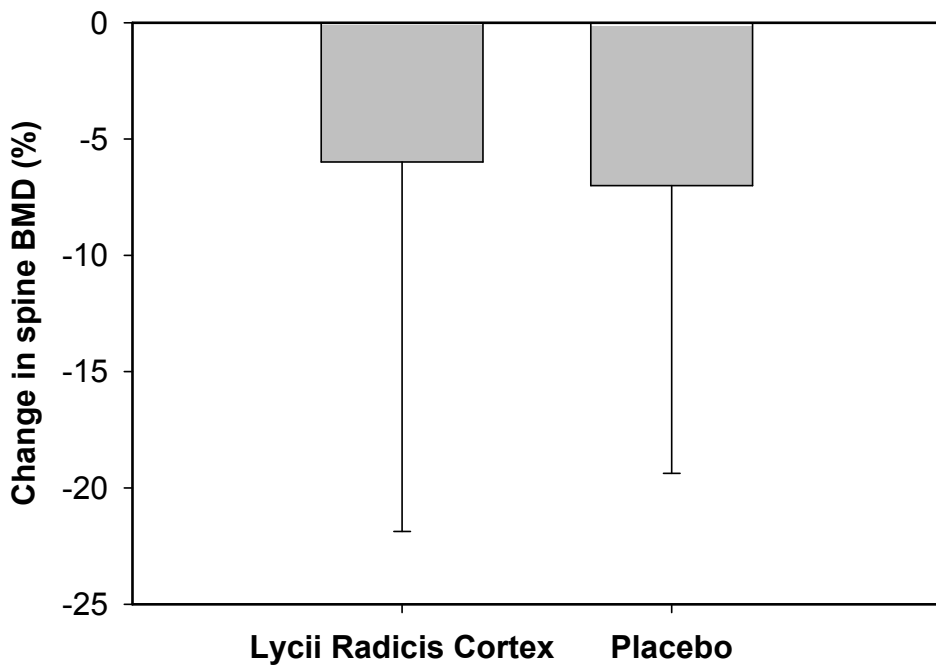


Figure 2. % change in spine BMD in Lycii Radicis Cortex treated and control group after 6 month

골대사 지표 (ALP, Osteocalcin, Calcium, urine-NTX, urine Ca/Creatinine ratio)의 변화는 Table 3, Table 4, Table 5에 기술하였고, 측정시간에 따른 변화와 baseline으로부터의 변화량 (% change)는 각각 Figure 3, Figure 4에 나타내었다. 3개월 투여 후 Osteocalcin, 6개월 투여 후 ALP 변화량에서 지골피 투여군이 위약 투여군에 비해 증가하는 경향성은 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

Table 3. Mean (\pm SD) baseline and after 3, 6 month of bone turnover markers in Lycii Radicis Cortex treated and control group.

Variables	Lycii Radicis Cortex (n=10)	Placebo (n = 10)	P value
Baseline			
ALP	74.2 \pm 17.2	76.8 \pm 15.0	0.715
Calcium	9.6 \pm 0.3	9.4 \pm 0.3	0.218
Osteocalcin	23.1 \pm 8.4	25.9 \pm 7.5	0.408
urine-NTX	50.2 \pm 16.8	67.6 \pm 14.7	0.018
urine Ca/Creatinine ratio	148.4 \pm 85.2	110.4 \pm 54.0	0.391
After 3 month			
ALP	72.9 \pm 11.9	80.8 \pm 19.9	0.487
Calcium	9.6 \pm 0.3	9.4 \pm 0.3	0.108
Osteocalcin	22.8 \pm 6.5	25.7 \pm 6.0	0.291
urine-NTX	53.3 \pm 14.7	54.0 \pm 16.5	0.918
urine Ca/Creatinine ratio	197.7 \pm 89.6	164.0 \pm 83.1	0.370
After 6 month			
ALP	78.8 \pm 15.8	82.2 \pm 18.6	0.664
Calcium	9.7 \pm 0.4	9.6 \pm 0.3	0.599
Osteocalcin	24.0 \pm 7.9	28.7 \pm 7.8	0.193
urine-NTX	39.9 \pm 9.3	50.8 \pm 16.2	0.086
urine Ca/Creatinine ratio	149.3 \pm 70.7	163.2 \pm 77.8	0.681

Table 4. Mean (\pm SD) difference from baseline of bone turnover markers in Lycii Radicis Cortex treated and control group.

Variables	Lycii Radicis Cortex (n=10)	Placebo (n = 10)	P value
After 3 month			
ALP	-1.3 \pm 8.4	4.1 \pm 11.5	0.233
Calcium	0.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.4	0.568
Osteocalcin	-0.3 \pm 5.4	-0.3 \pm 5.1	0.989
urine-NTX	3.1 \pm 23.7	-13.6 \pm 25.6	0.132
urine Ca/Creatinine ratio	49.3 \pm 83.2	53.5 \pm 61.8	0.893
After 6 month			
ALP	4.6 \pm 6.8	3.5 \pm 11.0	0.791
Calcium	0.1 \pm 0.3	0.2 \pm 0.4	0.489
Osteocalcin	0.9 \pm 5.8	1.8 \pm 6.3	0.750
urine-NTX	-10.3 \pm 17.3	-14.3 \pm 21.5	0.652
urine Ca/Creatinine ratio	0.8 \pm 90.0	53.4 \pm 56.4	0.135

Table 5. Mean (\pm SD) % change from baseline of bone turnover markers in Lycii Radicis Cortex treated and control group.

Variables	Lycii Radicis Cortex (n=10)	Placebo (n = 10)	P value
After 3 month			
ALP	0.11 \pm 10.39	2.89 \pm 13.44	0.612
Calcium	0.53 \pm 2.09	0.37 \pm 4.18	0.914
Osteocalcin	7.88 \pm 33.67	2.33 \pm 23.10	0.672
urine-NTX	21.23 \pm 64.58	-5.21 \pm 57.75	0.151
urine Ca/Creatinine ratio	60.59 \pm 102.46	44.12 \pm 65.47	0.880
After 6 month			
ALP	7.37 \pm 9.69	4.68 \pm 12.88	0.603
Calcium	1.04 \pm 2.91	2.18 \pm 3.78	0.458
Osteocalcin	11.19 \pm 34.77	10.82 \pm 25.76	0.979
urine-NTX	-12.71 \pm 32.11	-16.92 \pm 36.90	0.788
urine Ca/Creatinine ratio	26.60 \pm 88.44	57.52 \pm 55.89	0.082

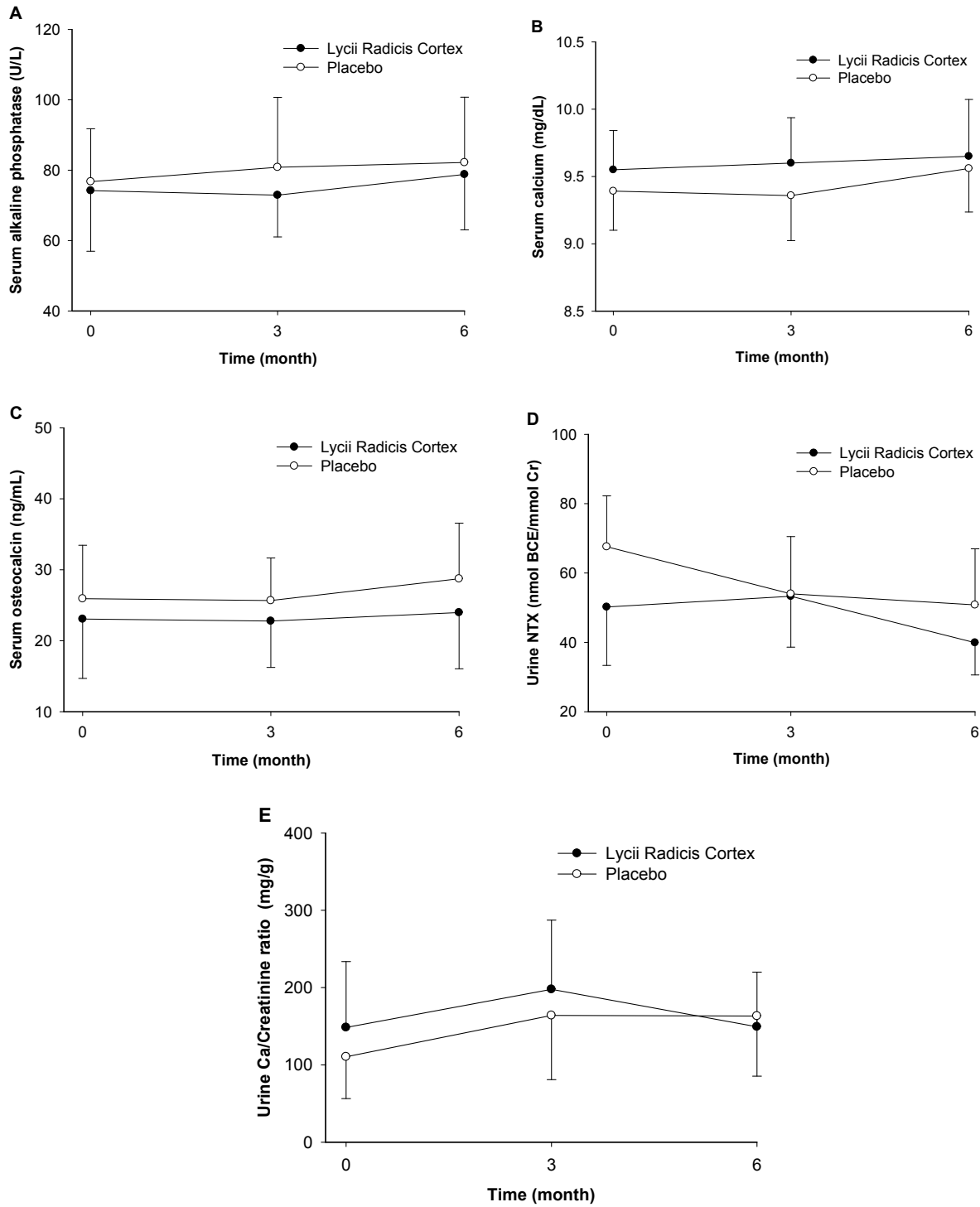


Figure 3. Baseline and after 3, 6 month of bone turnover markers in Lycii Radicis Cortex treated and control group

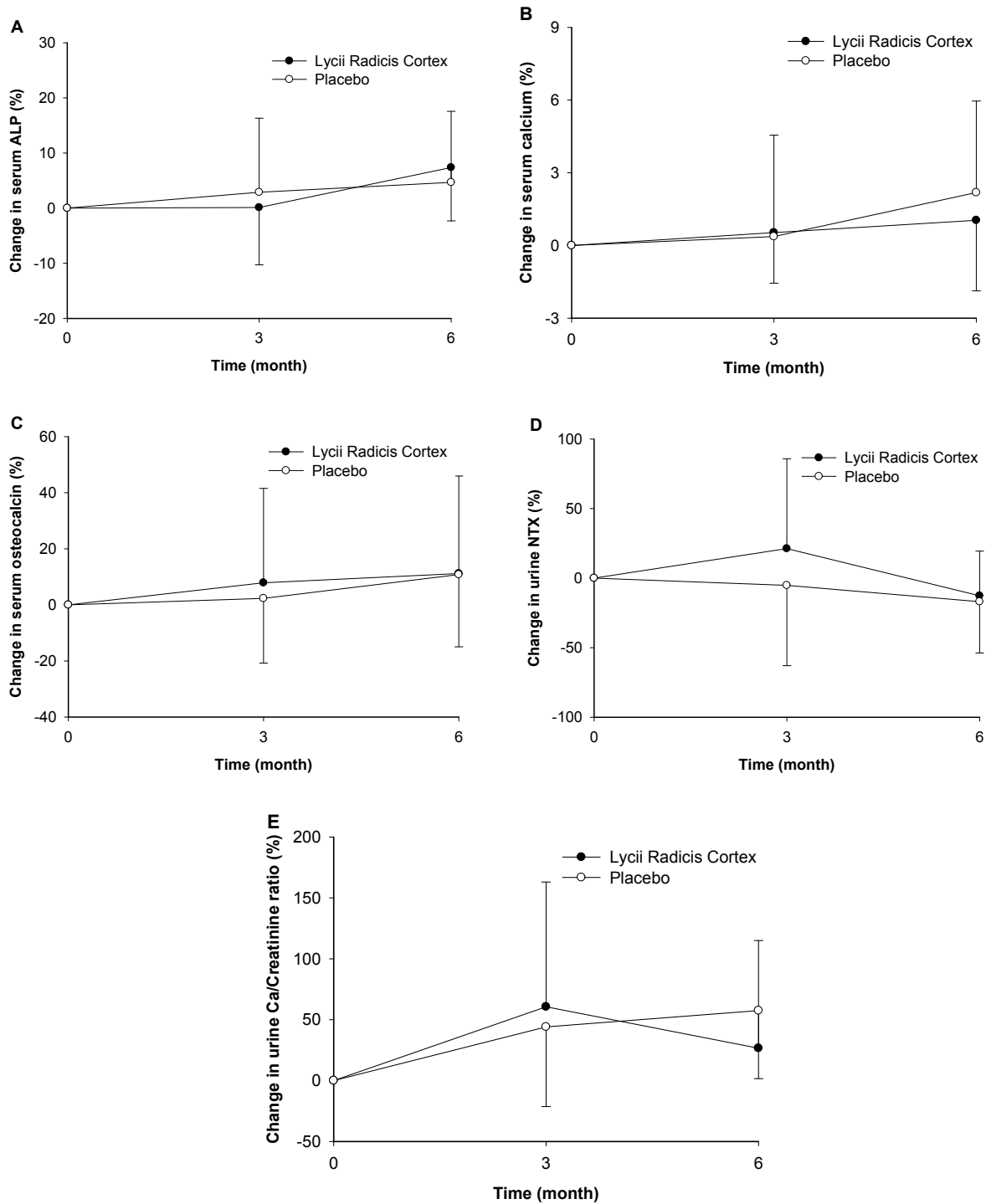


Figure 4. Change from baseline of bone turnover markers in Lycii Radicis Cortex treated and control group.

□ 인체적용시험 결론

- 6개월간의 인체시험 결과를 종합하면, 지골피 환 투여군이 위약 투여군에 비해 골밀도가 덜 감소하고 골형성 마커인 ALP, steocalcine이 증가하는 경향성은 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었음.
- 사람의 경우 골다공증 개선 효과가 확실히 나타 나기 위해서는 1년 이상의 장기간 임상시험이 필요하다고 사료됨.
- 본 인체적용시험에서 통계적 유의 수준은 없었으나, 골밀도와 골형성 마커에서 경향성이 나타났기 때문에 향후 더 많은 피험자를 대상으로 시험한다면 좋은 경과가 있을 것으로 기대됨.

10. 상품화

□ 골다공증 예방 및 증상 개선을 위한 건강식품의 완제품 개발

- 시제품 개발한 지골피 환, 튼튼 된장, 키즈 밸런스 탑 3종에 대해서 완제품을 개발하였음. 지골피 환의 경우 1구에 약 3.75g 정도가 되는 크기로 하고 30구를 1케이스에 포장하여 완제품을 생산하였음.
- 튼튼된장의 경우 1단지에 약 950g씩 담아서 날개 포장하여 완제품 생산하였고, 된장 2개와 간장 1개를 세트로 포장하여 장류꾸러미를 별도로 생산하였음.
- 어린이 성장음료인 키즈 밸런스 탑(Kids Balance Top)의 경우 80ml씩 파우치(pouch)포장하여 10개씩 소포장하고, 이를 3개씩 넣어 총 30개 파우치를 1box로 포장하여 완제품을 생산하였음(그림 54).

□ 홍보, 마케팅 활동

- 국내 박람회에 참석하여 발효 총명탕 고행차 시제품을 전시하여 홍보마케팅 활동을 진행하였다. 2014년 12월 4일부터 6일까지 3일간 서울 KINTEX에서 열린 WORLD FOOD EXPO KOREA 2014에 참석하였고 여러 가지 동우당제약(주)의 제품과 더불어 연구개발한 신제품을 전시하여 홍보, 마케팅활동을 진행하였음(그림 55).



그림 54. 지골피를 응용한 3종의 완제품 생산



그림 55. 홍보활동(WORLD FOOD EXPO KOREA 2014)

11. 골다공증 예방 및 개선을 위한 건강식품의 상품화 전략 수립

건강식품의 원료수급 방안 마련과 대량 추출, 농축물의 최적 제조 기술 개발을 통한 제품화 방안 마련

- 제품화를 위하여 우선적으로 원활한 식품소재의 원료수급 방안을 마련할 필요가 있음. 동우당제약(주)의 자회사인 (주)옵니허브에서는 기존에 확립된 원료수급 시스템을 활용하여 안정적이고 균일한 원료의 공급이 이루어 질 수 있도록 할 수 있기 때문에 원료수급의 어려움은 없을 것으로 판단됨.
- 시제품 개발을 통해 확립된 원료의 대량 추출과 농축물의 최적 제조기술 개발로 대량생산 공정을 확립하였음. 최적의 대량생산 공정을 확립함으로써 생산원가를 줄이고 생산 효율을 증가시켰음.

홍보 및 마케팅 전략 수립

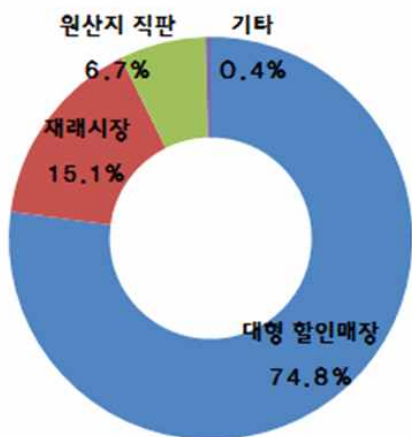
- 개발된 시제품은 한방, 한약축제 및 박람회, 식품박람회, 해외 박람회 참석을 통해 소개, 홍보마케팅 활동을 진행할 계획이며 기존 회사홍보를 위해 활용하였던 TV, 라디오 광고를 통해 신제품 홍보활동을 진행할 계획임.
- 기존 동우당제약(주)의 거래처인 백화점, 대형유통마트, 친환경마트 등의 유통업체 및 건강식품 판매처를 통해 홍보, 영업활동을 통해 판매할 계획임.
- 주관기관인 동우당제약(주)과 자회사인 (주)옵니허브는 건강식품을 전문적으로 생산하고 판매하는 기업이기 때문에, 본 연구과제의 최대 목표인 제품의 상업화가 원만히 수행 될 수 있을 것으로 판단함.
- 본 과제를 통한 연구결과를 논문, 특허 등의 결과물로 창출함으로써 뉴스 보도자료 및 홍보자료로 활용할 수 있고 식품소재에 대한 차별화된 효과를 제시하는 과학적 근거를 바탕으로 영업, 사업화 할 계획임. 과학적 근거자료들은 신뢰성을 확보할 수 있고 제품의 우수성을 나타내기 때문에 판매증진에 크게 기여할 것으로 기대함.
- 한약재의 효능을 나타내는 특정한 성분에 대한 골다공증 예방, 치료효과가 검증되면 이 결과를 토대로 제약업체와 협력하여 향후의 후속 연구를 통하여 제약분야 사업화도 가능할 것으로 판단함.
- 최근 동우당제약(주)에서 설립한 미국 LA법인을 중심으로 한 미국진출 제품으로 골다공증 예방 액상차 및 고형차를 홍보, 판매할 전략임. 또한 제품의 미국 FDA승인 절차를 받아 검증된 제품으로 발전시킬 계획임.

판매 전략 수립

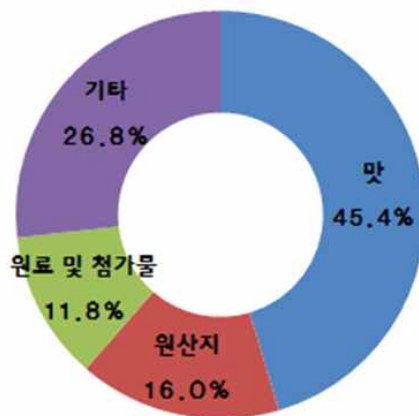
- 2010년 한국조리학회지 논문에 실린 “주부들의 식생활 라이프스타일이 된장 소비행동에 미치는 영향”을 확인한 결과 시중된장의 구입 장소로 74.8%가 대형 할인매장으로 나타났음. 이러한 결과를 바탕으로 대형 할인매장에서의 판매를 목표로 영업을 할 계획임. 대형 할인

매장은 입점하기 어려운 점도 있지만, 입점한다 하더라도 경쟁제품들이 넘쳐나서 큰 판매를 이루지 못할 수도 있기 때문에 뉴스 지면광고나 웹페이지 광고 등을 통해 홍보활동을 진행해 인지도를 높여야 할 것으로 판단됨. 또한 대형할인마트 내 시식행사나 할인행사 등을 통해 제품을 알리는데 주력해야 할 것으로 생각함.

〈시중된장 구입장소〉



〈시중된장을 구매 시, 고려사항〉



출처 : 주부들의 식생활 라이프스타일이 된장 소비행동에 미치는 영향(한국조리학회지, 2010)

- 국내 뿐 아니라 해외에서도 전통발효식품에 대한 관심이 커지고 있으며 한류문화와 더불어 외국인들 사이에서도 한국 음식은 인기를 얻어가고 있음. 이에 동우당제약(주)의 자회사인 (주)옵니허브에서 공동법인 설립한 LA법인을 통한 LA매장에서 미국 내 거주하고 있는 한인과 외국인을 대상으로 된장을 판매할 계획임.
- 튼튼된장은 시중에 흔히 판매되고 있는 개량식 된장이 아닌 재래식 된장으로 건강을 생각하는 사람들에게 좋은 반응을 나타낼 수 있으며, 특히 뼈 형성 및 골다공증 예방 개선에 좋은 작용을 하는 지골피가 함유된 건강식 된장이기 때문에 한의원에서 판매한다면 충분히 소비를 유도할 수 있을 것으로 판단됨. 동우당제약(주)의 자회사인 (주)옵니허브는 전국의 3,000개 이상의 한의원을 한방원료 및 한방식품 판매의 영업망으로 보유하고 있기 때문에 이들 거래처 한의원을 통한 된장판매가 가능할 것으로 판단하고 적극적으로 영업활동을 진행하고 있음. **현재까지의 판매 실적은 판매 개수 698 세트에 매출 18,779,584원임.**
- 성장기 어린이를 위한 성장과 발육에 도움을 주는 키즈 밸런스 탑(Kids Balance Top)의 경우 현재 풀무원 친환경 식품 전문 브랜드인 '올가'와의 협력을 통해 올가 매장에서 판매되고 있음. 또한 오프라인 매장 및 동우당제약의 온라인 쇼핑몰(herbinlife)를 통해 판매가 진행되고 있음. **현재까지의 판매 실적은 판매 개수 1,914개에 매출 59,576,670원임.**
- 지골피 환의 경우 기능성을 나타내는 건강식품으로 올가의 건강제품코너에 입점하여 판매할 수 있을 것으로 판단되어 현재 관련 영업을 진행 중임. 또한 환 제품을 많이 판매하고 있는 한의원이나 약국을 통한 판매가 적합할 것으로 판단하여 관련 영업을 준비하고 있음.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	천연물(식품등록 약용작물)중 식품 물질 library 선별 및 제공	식품 물질 library 선별 (계획 59종)	112	다양한 문헌 조사와 특허 검색을 통하여 총 66종의 식품 소재 선별
		식품 물질 제공(계획 59종)	112	총 66종의 식품 소재에 대한 적합성 시험 후, 소재 추출 및 농축하여 효능 탐색 연구용으로 제공
	후보 기능성 식품 소재 탐색	조골세포 모델에서 식품 소재 효능 분석(계획 59종)	112	2 종류의 뼈 형성 관련 세포주(C3H10T1/2, MC3T3-E1)에서 총 66종의 식품 물질을 대상으로 조골세포 활성 마커인 ALP activity assay를 이용한 효능 분석, 분화능 분석, 세포독성 분석을 통한 식품 소재 탐색
		식품 소재의 유전자 조절 효과 확인을 통한 효능 검증	100	골대사 마커 5종의 유전자 변화와 조골세포 조절 핵심 유전자 5종의 변화 분석
	후보 기능성 식품 소재의 효능성 극대화	식품 소재 혼합을 통한 효능 극대화	100	기존 특허 소재와의 혼합 및 본 연구에서 탐색된 소재의 혼합에 의한 조골세포 활성 마커인 ALP activity assay 효능 분석, 분화능 분석, 세포독성 분석
		식품 소재 혼합 시의 유전자 조절 효과 확인을 통한 효능 극대화 검증	100	본 연구에서 탐색된 소재 (기존 특허 소재 포함)의 혼합에 의한 골대사 마커 5종의 유전자 변화와 조골세포 조절 핵심 유전자 5종의 변화 분석을 통한 유전자 차원에서의 식품 소재 효능 분석
	골다공증 동물 모델 제작 및 검증	골다공증 동물 모델 제작	100	암컷 ddY 마우스에 난소 절제술을 시행하여 골다공증 동물 모델 제작

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
		골다공증 동물 모델 검증	100	마우스의 골밀도, 체지방율을 측정하여 골다공증 동물 모델 검증
2차 년도 (2013)	골다공증 동물 모델에서 기능성 식품물질의 효능 시험	3-4종의 후보 식품소재 물질로 골다공증 동물모델에서 최상의 효능 물질 2종 선정	100	4종의 식품 소재를 골다공증 마우스에 8주간 단기 투여 후 골밀도 변화를 확인하여 효능이 좋은 식품소재 2종 선정
		선정된 식품소재 물질을 대상으로 대조군과 실험군으로 나누어 골밀도, 체중, 및 골대사 표지자의 변화 분석	100	선정된 2종의 식품 소재를 대상으로 16주간 장기 투여 후 골밀도, 체중 및 골대사 표지자의 변화 확인을 통한 효능 검증
	기능성 식품물질 후보에서 주요활성 물질(지표물질) 추출 및 동정	선정된 후보 식품소재의 주요 활성물질(지표물질) 추출	100	주요 활성물질의 추출
		주요 활성물질의 성분 분석 및 동정	100	성분 분석과 동정
		대량생산을 위한 추출 최적화 방법 개발	100	제품 생산을 위한 추출 최적화 및 효능 소실 최소화 연구
	골다공증 세포 모델에서 기능성 식품물질의 세포내 기전 연구	활성물질에 대한 골수 유래 중간엽줄기세포를 대상으로 골대사 영향 연구	100	추출/동정된 물질의 중간엽줄기세포에서 조골모세포로의 세포독성 및 분화 촉진 효능 확인
활성물질에 대한 조골모세포주를 대상으로 골대사 영향 연구		100	추출/동정된 물질의 조골모세포주에서 조골세포로의 세포 독성 및분화 촉진 효능 확인	
3차 년도 (2014)	식품소재에서 분리 동정된 단일 효능물질의 in vitro 기전 연구	단일 효능물질의 골세포 내 기전 분석	100	조골세포와 파골세포에서 단일 지표물질이 영향을 미치는 세포내 기전 분석
		효능물질의 조골세포-파골세포 혼합배양에서의 영향 평가	100	뼈에서 실제로 존재하는 환경(조골모세포와 파골세포의 혼재)에서의 단일 효능물질의 조골세포 분화와 파골세포 분화 평가
	골다공증 예방 및 개선을 위한 건강식품의 시제품 개발	식품소재 추출 효율 극대화	100	식품소재의 제품화할 단계로의 추출 효율 극대화
		시제품 대량 생산, 소비자 기호도 조사 및	100	시제품 대량 생산과 제품개발을 목적으로 한 시제품 컨셉을

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
		시장성 조사		설정하기 위해 고객 설문조사 실시
		시제품 디자인 개발	100	타겟 고객층의 취향에 맞는 제품을 생산하기 위한 시제품 디자인 개발
		시제품 레시피 개발, 시험분석, 평가	100	제품의 기능성과 더불어 기호도를 향상시키기 위한 시제품 레시피(recipe) 개발, 시험 분석 및 평가
	인체적용시험(간이 임상시험)을 통한 시제품의 효과 검증	인체적용시험을 통한 시제품의 효능 조사 및 평가	100	골밀도 검사상 골감소증으로 진단된 폐경 후 여성 22명을 모집하여 시제품 1종(지골피환)에 대한 골밀도 개선 효과를 평가
	골다공증 예방 및 개선을 위한 건강식품의 상품화 전략 수립	건강식품의 원료수급 방안 마련과 대량 추출, 농축물의 최적 제조 기술 개발을 통한 제품화 방안 마련	100	원료수급, 추출, 농축, 분무건조 및 혼합 등의 제품 대량생산 최적 조건 확립
		건강식품의 포장방법과 저장성 실험을 통한 유통기한 설정	100	제품의 안전성과 안정성 확보를 위한 포장 방법, 보관방법 및 유통기한 설정
		골다공증 예방 및 개선을 위한 기능성 식품의 제품명 개발, 특허 출원, 상품화 및 경제성 제고 방안 마련	100	제품의 특허 출원 및 경제성평가
박람회, 광고 등을 통한 홍보, 마케팅 활동 및 상품화 전략 수립		100	국내 한방, 식품 박람회, 축제 및 해외 박람회참석과 TV, 라디오 광고를 통한 홍보, 마케팅활동	

제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위: 건수)

구분	특허		신제품				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품명 명칭	중 등 등록	품 종 수	생 산 판 매 신 고		품종보호		
								출원	등록	
1차 년도	목표	1							1	
	달성	0							1	
2차 년도	목표	1							2	
	달성	4							0	
3차 년도	목표		1						1	
	달성		3						1	
계	목표	2	1						4	
	달성	4	3						2	

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	1		2	5
	달성	1	3		2	1

2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Association between the <i>SPRY1</i> gene polymorphism and obesity-related traits and osteoporosis in Korean women	진현석	정선용 정윤석	허담, 김보영, 김정현	MOL GENET METAB	108(1): 95-101	국외	SCI (IF:3.193)
2012	Association between the <i>SPRY1</i> gene polymorphism and obesity-related traits and osteoporosis in Korean women	진현석	정선용 정윤석	허담, 김보영, 김정현	MOL GENET METAB	108(1): 95-101	국외	SCI (IF:3.193)

3. 특허 성과

특허 출원				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2013	지골피와 속단의 혼합 추출물을 함유하는 골대사 질환 예방 및 골 기능 개선을 위한 조성물	동우당제약 주식회사, 아주대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0092479
2013	우슬과 희렴의 혼합 추출물을 함유하는 골대사 질환 예방 및 골 기능 개선을 위한 조성물	동우당제약 주식회사, 아주대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0092481
2013	상심자와 독활의 혼합 추출물을 함유하는 골대사 질환 예방 및 골 기능 개선을 위한 조성물	동우당제약 주식회사, 아주대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0092483
2013	지골피 추출물을 함유하는 골대사 질환 예방 및 골 기능 개선을 위한 조성물	동우당제약 주식회사, 아주대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0092484

특허 등록				
등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2014	지골피와 속단의 혼합 추출물을 함유하는 골대사 질환 예방 및 골 기능 개선을 위한 조성물	동우당제약 주식회사, 아주대학교 산학협력단	대한민국	10-1451754
2014	우슬과 희렴의 혼합 추출물을 함유하는 골대사 질환 예방 및 골 기능 개선을 위한 조성물	동우당제약 주식회사, 아주대학교 산학협력단	대한민국	10-1444760
2014	상심자와 독활의 혼합 추출물을 함유하는 골다공증 예방 또는 개선을 위한 조성물	동우당제약 주식회사, 아주대학교 산학협력단	대한민국	10-1451755

4. 기술료 징수 현황

기 징수액	향후 징수액	합계
5,740,000		5,740,000

5. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	기관매 갯수	기매출액 합계
키즈 밸런스 탑(Kids Balance Top)	지골피와 한약제 함유 파우치(pouch) 30개 들어 box 상품	1,914	59,576,670원
튼튼된장	된장 2개와 간장 1개를 세트로 포장하여 장류꾸러미 상품	698	18,779,584

6. 인력양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
2	1	1				2	2		

7. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				신규 고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
					10	10

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

□ 미국

- 영양소 강화 식품: 미국 소비자의 81%가 건강 유지나 증진에 도움을 주는 식품을, 75%는 영양소가 강화된 식품을 구입하고 있음
- 기능성 식용식물 및 phytochemicals의 소재화: 식품으로 사용되고 있는 식용식물의 추출물 또는 해당 식물의 주 생리 활성 phytochemicals의 소재화가 각광을 받고 있음
- 허브: 대체의학 요법과 함께 허브들의 생리·약리 활성에 관한 연구 개발이 국가연구 사업으로 자리 잡고 있음
- 의약품 대체 기능성식품의 개발: 미국인의 약 50%가 기능성식품이 의약품을 대체할 수 있다고 믿고 있으며 이들은 천연 재료를 사용함으로써 부작용 및 위험을 완화시킬 수 있고 친숙한 식품 형태를 취하고 있는 점에서 선호함
- 소비자 맞춤형 제품: 남성과 여성으로 분리한 제품들 특히 갱년기 여성을 위한 phytoestrogen이 함유된 케이크, 다이어트 중 부족하기 쉬운 영양소를 공급해 주는 바, 야외 활동이나 운동 시 온도 변화를 완화시키는 에너지바 등 맞춤형 제품의 개발에 중점을 두고 있음

□ 유럽

- 기존에 있는 특정 성분을 더욱 보강, 새로운 성분을 첨가한 식품을 개발하는 것이 최근 추세이며 비타민, 미네랄, 미량 성분 등을 첨가한 에너지드링크, 스포츠식품 등이 개발되고 있음
- 기능성분을 첨가하는 기존 개발 방식에서 벗어나 특정영양분이 미리 함유된 새로운 작물을 개발하고 이를 활용하여 기능성 식품을 개발하는 것이 가능하게 될 전망 스위스연구팀에 의해 개발된 비타민 A와 철분이 풍부한 황금쌀 (golden rice)이 이와 같은 새로운 개발 방식의 적절한 예
- 유럽 각국의 식품연구기관에서 수행하고 있는 기능성 식품 관련 연구에는 주로 심혈관 질환 예방, 면역 조절, 장건강, 체중조절 등에 연구가 집중되고 있음
- 주요 소재로는 Phytochemical 류의 연구 빈도가 가장 높았으며 또한 장 건강과 면역 증진과 관련하여 probiotics 연구도 활발하게 진행되고 있음
- 유럽의 식품 연구소에서는 기능성 소재의 세부 작용기작에 대한 연구와 ‘omics’ 기술을 접목 한 첨단 연구를 진행하고 있음
- 이 외에도 가공, 저장 중 기능성 성분의 변화와 생산 분야 연구, 생체 내 이용율 증진에 대한 연구도 병행되고 있어 생산-가공-섭취-체내 전달-효능에 이르는 일련의 연구단계에 대해 고르게 연구가 진행되고 있음
- 네덜란드의 TNO의 식품영양 연구그룹은 영양 유전체학 뿐만 아니라 post-genomics 기술 (transcriptomics, proteomics, metabolomics 등) 및 생물정보학기술을 통합적으로 접목시켜 학계의 기초연구와 산업계의 응용연구 간의 갭을 연결하는 역할을 수행함으로써 맞춤형식품의 실용화를 위해 나아가고 있음

□ 일본

- 정부의 건강장수 계층 탐색연구를 중심으로 유전체기술의 기반확대 및 SNP 발굴, 유전체 활용기술개발사업이 대대적으로 수행되고 있고 nutrigenomics 데이터베이스 등의 연구가 진행되고 있음
- 일본은 주로 미생물 및 해양식물 유래의 활성 천연물에 집중하고 있음

□ 국외 제품 생산 및 시장 현황

- 2005 ~ 2009년 현황
 - '07년 주요 7개 국가(미국, 일본, 5EU)의 골다공증 시장규모는 76억 달러로 최고에 이르렀으며, '09년에는 69억 달러 매출규모를 달성함
 - '05~'09년 사이 연평균성장률(CAGR)은 2%로 나타남
 - 미국과 유럽에서 가장 보편적인 골다공증 의약품인 alendronate 제네릭 출시로 '08년 매출 규모가 8.7% 감소함
- 2010 ~ 2011년 현황
 - '10년을 시작으로 골다공증 시장은 특히 미국과 유럽에서 계속 성장하였음
 - 단일클론항체 Prolia(denosumab, Amgen/GlaxoSmithKline)의 출시로 '12년에는 75억달러로 성장할 것임
- 2012 ~ 2014년 전망
 - '12년부터 제네릭의 출시로 골다공증 시장 규모가 감소할 것임
 - '14년의 매출규모는 70억 달러로 성장할 것으로 전망되나 '11년의 매출규모(76억 달러)에 비해서는 6.3% 감소한 규모임
- 2015 ~ 2019년 전망
 - '15년에는 몇몇의 anabolic 치료제가 새로운 시장을 열어 '19년까지 성장세를 지속할 것으로 예상됨
 - anabolic 치료제로 인해 '19년 골다공증 시장의 매출규모는 85억 달러에 도달할 것으로 전망됨(출처: "Commercial Insight : Osteoporosis"(2010))

※상기 내용은 생명공학정책연구센터 BT 기술동향 보고서 '건강기능식품 연구 및 기술개발'과 '골다공증 연구 및 활용기술'의 내용을 참고하였음.

제 7 장. 연구시설·장비 현황

연구시설·장비명	구매금액 (원)	구매일자	연구시설·장비 활용용도	설치장소	국가과학기술지식정보 시스템 등록번호

※ 구매금액이 3천만원 이상인 연구시설·장비 구매현황

제 8 장. 참고문헌

- (1) 골다공증 진단 및 치료 지침 2007, 2008, 2011. **대한골대사학회**
- (2) Ralston SH (2010) Genetics of osteoporosis. **Ann N Y Acad Sci** 1192:181-9.
- (3) Raggatt LJ and Partridge NC (2010) Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **J Biol Chem** 285:25103-8.
- (4) Krane SM (2005) Identifying genes that regulate bone remodeling as potential therapeutic targets. **J Exp Med** 201:841-3.
- (5) Feng X and McDonald JM (2011) Disorders of bone remodeling. **Annu Rev Pathol** 6:121-45.
- (6) Katagiri T and Takahashi N (2002) Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Diseases** 8:147 - 59.
- (7) Rosen CJ and Bouxsein ML (2006) Mechanisms of Disease: is osteoporosis the obesity of bone? **Nat Clin Pract Rheumatol** 2:35-43.
- (8) Cao JJ (2011) Effects of Obesity on Bone Metabolism. **J Orthop Surg Res** 6:30.
- (9) Ralston SH and Uitterlinden AG (2010) Genetics of osteoporosis. **Endocr Rev** 31:629-662.
- (10) Cho YS, et al. (2009) A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits. **Nat Genet** 41:527-34.
- (11) 제4기(2007-2009년), 제5기(2010-2012) 국민건강통계-국민건강영양조사.
보건복지부-질병관리본부
- (12) Rachner TD, et al. (2011) Osteoporosis: now and the future. **Lancet** 377:1276-87.
- (13) Carlson CS, et al. (2004) **Nature** 429:446-52.
- (14) Kim TH et al. (2009) Polymorphisms in the Annexin gene family and the risk of osteonecrosis of the femoral head in the Korean population. **Bone** 45:125-31.
- (15) Enrich C et al. (2011) Annexin A6-Linking Ca(2+) signaling with cholesterol transport. **Biochim Biophys Acta** 1813:935-47.
- (16) Ruy SY et al. (2012) Enolase 1 and calreticulin regulate the differentiation and function of mouse mast cells. **Cell Signal** 24:60-70.
- (17) Rowe GC, et al. (2009) Increased energy expenditure and insulin sensitivity in the high bone mass DeltaFosB transgenic mice. **Endocrinology** 150:135-43.
- (18) Kim JH and Dang CV (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. **Trends Biochem Sci** 30:142-50.
- (19) Kung AW, et al. (2010) Association of JAG1 with bone mineral density and osteoporotic fractures: a genome-wide association study and follow-up replication studies. **Am J Hum Genet** 86:229 - 39.
- (20) Yun HY, et al. (2011) Poncirin promotes osteoblast differentiation but inhibits adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. **Eur J Pharmacol** 664:54-9.

- (21) Laue K et al. (2008) The multidomain protein Brpf1 binds histones and is required for Hox gene expression and segmental identity. **Development** 135:1935–46.
- (22) Phillips JB and Westerfield M (2014) Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. **Dis Model Mech** 7:739–743.
- (23) Lee SH et al. (2013) Scopoletin and scopolin isolated from *Artemisia iwayomogi* suppress differentiation of osteoclastic macrophage RAW 264.7 cells by scavenging reactive oxygen species. **J Nat Prod** 76:615–620.
- (24) Li M et al. (2010) The pharmacological effects of morroniside and loganin isolated from Liuweidihuang Wan, on MC3T3–E1 cells. **Molecules** 15:7403–7414.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.