

117054-3

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

고부가가치식품기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003067-01

발효 기술 접목 국내 농산물을 이용한 관절건강 건강기능식품 개발

최종보고서

2020.03.30.

주관연구기관 / 에스케이 바이오랜드(주)
협동연구기관 / 경희대학교

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

이용한
관절건강
건강기능식품
개발

발효
기술
접목
국내
농산물을

최종
보고
서
2020

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

'발효기술접목 국내농산물을 이용한 관절건강 건강기능식품개발'(개발기간 : 2017. 06. 15~ 2019. 12. 31.)과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2020. 03. 25.

주관연구기관명 : 에스케이 바이오랜드(주) (대표자) 이 근 식



협동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 이 범 석



참여기관명 :

(대표자)

(인)

주관연구책임자 : 손 오 한

협동연구책임자 : 이 정 민

참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	117054-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2019.01.01~20 19.12.31	단 계 구 분	개발연구
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	발효 기술 접목 국내 농산물을 이용한 관절건강 건강기능식품 개발			
연구책임자	손요한	해당단계 참여연구원 수	총: 9 명 내부: 9 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:180,000천원 민간:180,000천원 계:360,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 13 명 내부: 9 명 외부: 4 명	총 연구개발비	정부:510,000천원 민간:510,000천원 계:1,020,000천 원
연구기관명 및 소속부서명	SK바이오랜드(주) 식품연구소			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
협 동 / 위 탁 연 구	협동연구기관명: 경희대학교 위탁연구기관명: 국민대학교			협동연구책임자: 이정민 위탁연구책임자: 이도엽	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	J Korean S o c F o o d S c i N u t r 48(11) 1179-11 85 2019	등록 번 호 계 10-2007 144호, 계 10-2044 659호	B18821 B18823 B18824 B18826 B18827 B18828 SKBL_F AJEC						KCCM 12450P		

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

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

1. **우리 고유의 농작물 및 천연물로부터 기호성이 향상된 글로벌 기능성 식품소재의 창출**
2. 발효기법을 통한 특용작물로부터 고부가가치성 생리·약리 활성 물질의 소재화 모델을 개발하고 **상용화함으로써 국내 농림수축산물의 WTO, FTA 대응을 위한 최상의 방안을 제시**
3. 발효우슬추출물의 기능성 소재 창출을 위한 관절건강 개선 유효성 평가를 통한 **학술 논문 게재 및 관련 학회 연구결과 발표**
4. 발효우슬추출물의 유효성 평가를 통한 **관절건강 및 염증 개선 조성물 특허 출원 및 제법/조성물 특허 등록 완료**
5. **발효 고기능성 신균주 발굴 및 기탁 완료**
6. **발효 전후 비교를 통한 대사체 변화 연구 및 발효 과학화의 토대 마련**
7. **조성물 독성평가 완료 및 안전성 확보**
8. **항관절염 의 항관절통 전임상 연구 완료 및 유효성/작용기전 확보**
9. **인체적용시험 완료 및 유효성/안전성 확보**
10. **식약처 개별인정 신청 완료**
11. **품목제조신고 완료 및 매출 발생**

보고서 면수

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 과제의 최종 연구목표는 국내산 천연물 소재인 우슬을 이용한 발효우슬추출복합물의 항관절염/항관절통 활성에 의한 관절건강개선 기능이 극대화된 개별인정형 건강기능식품용 소재를 개발하고 농산물의 고부가가치 제품 상용화를 하는데 있음. 이를 위해</p> <ul style="list-style-type: none"> - 관절염 증상 완화 유효활성이 극대화된 발효우슬추출복합물 소재의 개발 <ul style="list-style-type: none"> ○ 우슬 이외 항염증 활성이 검증된 국내산 천연 소재를 보완한 발효우슬추출복합물 개발 ○ 기존 발효우슬추출물의 항염증 활성 극대화를 위한 유효용량 설정 - 발효우슬추출복합물의 시험관 및 전임상 시험의 항관절염/항관절통 활성 평가를 통한 유효성 확보, 작용기전 연구 및 인체적용시험 섭취량 결정 - 발효우슬추출복합물의 관절건강 개선 기능성 인체적용시험 - 발효 대사체 기반 연구를 통한 발효 바이오컨버전 기술의 필요성 확립 발효를 통한 대사체 변화 연구 완료 - 발효 고기능성 신규주 스크리닝 및 기탁 - 발효우슬추출복합물의 독성평가를 통한 안전성 확보 - 식약처 개별인정 허가 획득 및 제품 상용화 				
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 우리 고유의 농작물 및 천연물로부터 기호성이 향상된 글로벌 기능성 식품소재의 창출 2. 발효기법을 통한 특용작물로부터 고부가가치성 생리·약리 활성 물질의 소재화 모델을 개발하고 상용화함으로써 국내 농림수축산물의 WTO, FTA 대응을 위한 최상의 방안을 제시 (품목제조신고 완료 및 매출 발생) 3. 발효우슬추출복합물의 기능성 소재 창출을 위한 관절건강 개선 유효성 평가를 통한 학술 논문 게재 및 관련 학회 연구결과 발표 4. 신규연구원 채용 (위탁연구기관 연구실 연구원 채용 1명) 5. 발효우슬추출복합물의 유효성 평가를 통한 관절건강 및 염증 개선 조성물 특허 출원 및 등록 완료 6. 발효 고기능성 신규주 발굴 및 기탁 7. 독성평가 완료 및 안전성 확보 8. 인체적용시험 완료 및 유효성/안전성 확보 9. 식약처 개별인정 신청 완료 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - SK바이오랜드는 2019년 기준 건강기능식품 원료로 약 300억원의 매출을 달성 - 건강기능식품 고시형 원료는 홍삼농축액, 대두 이소플라본, 글루코사민 등을, 개별인정형 원료는 히알루론산, 홍경천추출물 등을 인정받아 제조, 판매하고 있으며 특히 이들 중 이소플라본은 수입산 원료 이외에 국내에서 유일하게 자체생산이 가능한 기술을 보유하고 2016년 매출 25억원을 달성함. 국내산 농작물을 활용한 예로, 유산균발효마늘추출물 (간 건강에 도움을 줄 수 있음)의 2016년 개별인정형 허가를 통해 매출 창출이 기대되며 이러한 독보적인 기술력을 토대로 본 연구과제의 최종 목표인 국내산 천연물을 이용한 관절건강기능 소재의 개발을 통해 농산물의 고부가가치 제품을 상용화하는 데에 큰 기여를 할 것으로 기대됨. - 국내 관절건강 개선 기능성 원료로 수입산 원료가 시장의 주를 이루고 있는 실정에서, 국내산 농작물인 우슬 소재의 기능성 입증을 통해 발효우슬추출복합물을 개별인정형 원료로 인허가 신청 - 발효우슬추출복합물 소재 및 유효성기전에 의해 기존 고시형의 관절건강 기능성 원료와 차별성을 가지고 현대인의 관심을 받을 것으로 예상되며, 이를 이용하여 국내·외용 건강기능식품을 개발 - 발효우슬추출복합물을 이용하여 퇴행성 골관절염 개선 효능을 나타내는 기능성분 및 바이오마커를 이용한 효능검증으로 관절건강 개선 건강기능식품 신제품 개발 기대 - 발효기술 접목을 통해 고부가가치 농산 원료의 주요 기능을 증진할 수 있는 원천 기술 확보 및 신뢰성 있는 제품 출시 - 국내산 농작물인 우슬의 가치를 더욱 증진하여 농가의 지역특산물 육성 및 생산 소득 증대와 건식시장의 활성화를 기대하며, 100세 고령시대에 맞춘 세계적인 건강식품으로 발돋움하기 위하여 과학적 효능 증명과 발효를 통한 기호도 개선으로 글로벌 아이템으로 성장시킬 예정임 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	우슬	관절건강 개선	건강기능식품	발효	임상시험
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<i>Achyranthes japonica</i> (Miq.) Nakai	Joint Health Improvement	Health Functional Food	Fermentation	Clinical trial

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
가. 연구개발목적	1
나. 연구개발의 필요성	5
다. 연구개발범위	10
2. 연구수행 내용 및 결과	10
가. 제조표준화	10
나. 대사체분석	17
다. 전임상 연구 I	28
라. 전임상 연구 II	52
마. 인체적용시험	59
바. 독성평가	73
사. 연구개발성과	76
아. 연구결과	79
자. 연구고찰	81
차. 사업화 성과 및 매출실적	83
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	85
4. 연구결과의 활용 계획 등	89
붙임. 참고 문헌	90

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발 목적

관절건강 개선 기능이 입증된 우슬을 주원료로 한 국내산 천연물 소재를 통해 항염증 활성에 의한 관절염 증상 개선 효능을 극대화한 건강기능성식품 원료 개발



○ **관절염이란** 관절의 손상을 수반하는 여러 질환을 통칭하는 것으로 크게 골 관절염 (퇴행성관절염, Osteoarthritis)과 류마티스 관절염 (염증성 관절염, Rheumatoid Arthritis)으로 나눌 수 있음.

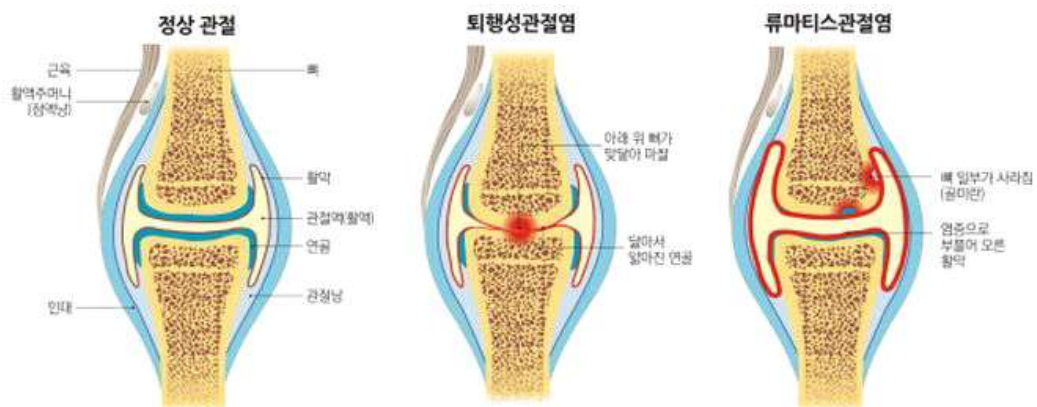
- 골 관절염 (퇴행성 관절염)은 뼈와 뼈가 직접 부딪히는 충격과 마찰을 완화하기 위해 우리 몸의 관절 안에 발달한 연골층이 손상되어 뼈와 뼈가 직접 마찰하면서 통증이 발생하고 이에 따라 움직이기 어려워지는 질환을 말함. 이러한 골관절염은 주로 무릎, 고관절, 손, 발, 척추 등 하나의 관절에서부터 발생할 수 있고, 여러 관절에서 동시에 발생할 수 있음. 류마티스 관절염은 면역체계의 이상에 의해 자신의 관절이나 몸의 일부를 공격하여 염증을 일으키는 자가 면역질환으로써 손가락, 손, 발, 손목, 발목, 무릎 등 관절이 아프고 붓는 증세가 나타나며, 근육, 피부, 폐, 눈 등 여러 다른 장기에도 이상을 초래할 수 있는 전신적인 만성 염증성 질환을 말함.
- 관절염 환자는 심한 통증을 유발하므로 반드시 항염증제 등을 복용하여야 하는데, 이러한 화학적요법 약제는 약제의 장기간 사용을 방해하는 부작용, 항염증 효과의 결핍 및 이미 발생한 관절염에 대한 효능의 부족과 같은 결점을 가지고 있어 이러한 문제에 대한 해결책으로서 효과적인 관절염 치료제의 개발에 대한 요구가 지속되고 있음.
- 현재 사용되고 있는 대부분의 관절염 치료제는 정도의 차이나 개인적인 차이가 있으나 모두 부작용을 가지고 있고, 특히 류마티스 관절염의 치료를 위해서는 약제를 장기간 복용할 필요가 있기 때문에 부작용이 적은 천연물을 사용한 관절염개선의 기능성 소재 개발은 매우 중요함.
- 골관절염의 경우, 일반적으로 노인성 질환이며 노화나 과도한 관절의 사용, 비만 등 연구로의 소실과 관절의 변형으로 나타나는 질환이며, 류마티스 관절염 (염증성 관절염)은 우리나라 인구 중 약 1%가 겪고 있는 자가면역질환의 일종으로 많은 염증성 매개체들과 사이토카인들의 방출에 의한 만성적 염증에 의해 관절이 붓고 통증을 수반하는 질환임. 우리나라에서 류마티스 관절염은 대개 20~40대에 발생하며 남성보다 여성에서 3배 정도 많이 발생함.

[골 관절염과 류마티스 관절염]

	골 관절염	류마티스 관절염
발병 연령 및 성별	주된 연령층은 50세 이상 (45세 이전: 남자>여자, 55세 이후: 남자<여자)	30세에서 50세 (여성에서 2~3배 높음)
병의 진행 과정	관절 연골의 결손, 관절 주위의 골 이상을 동반	관절이나 인대를 둘러싸고 있는 활액막에 비세균성 만성 염증반응이 장기간 지속
염증성	비염증성	염증성
발병부위	국소적 (무릎, 골반, 손끝관절)	말초관절
초기증상	없음	권태감, 피로 미열, 관절부종, 체중감소

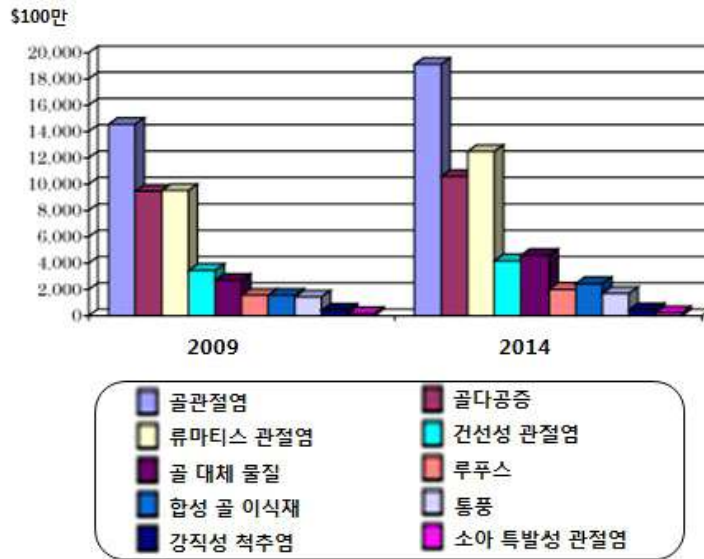
*출 처:

http://bone.knu.ac.kr/gol_13_htm, <http://plasa1.snu.ac.kr/~rheumato/arth.htm>



○ 골 관절염과 류마티스 관절염은 전체 근골격계 시장의 약 53% (2010년 기준)를 차지하고, 각각 연평균 5.6% 정도로 성장함. 골 관절염 시장은 2009년 146억 달러, 류마티스 관절염 시장은 95억 달러 규모에서 시작하여 2014년 각각 191억 달러, 125억 달러 정도로 예상됨.

[전 세계 근골격계 질환 시장 전망]



*출 처 : BCC Research, Therapeutics and Biomaterial for Musculoskeletal Disease, 2010

○ 초고령사회 축진에 의한 실버산업의 관절 건강 관심 대두

- 우리나라는 2017년에 고령사회로 진입하였고, 초고령 사회는 2026년 도달할 것으로 고 상함. 인구고령화와 베이비부머의 은퇴 등으로 실버 산업의 시장규모가 확대될 것으로 전망됨. 고령친화산업 시장규모는 2010년 33조 3천억에서 2020년 124조 9천억원으로 확 대될 전망이다(한국보건산업진흥원, 2011). 좌식생활을 주도하는 한국인과 일본인들은 노화 가 진행될수록, 무릎관절에 무리가 가고, 65세 이상의 대부분의 노인들이 퇴행성 관절염 을 경험하고 있는 실정임. 한국과 일본 사회의 고령화가 진행됨에 따라 관절 건강에 대 한 관심이 증가하고 중요성이 부각됨.
- 국내에서는 관절건강에 대한 중요성을 바탕으로 건강기능식품 원료 중 10년간 ('04~'13) 가장 많이 인정받은 기능성은 '체지방 감소(79건)'에 이어 '관절·뼈 건강(50건)'이 두 번 째로 많았음. 국내의 대표적인 관절건강 식품 소재는 고시형의 글루코사민, N-아세틸글 루코사민, MSM 등임.
- 일본의 관절시장은 국가가 주도하는 로코모티브(운동저하증후군)심드롬 대책에 힘입어 여전히 시장성장이 전망되는 분야임. 로코모티브신드롬이란 2007년에 일본 정형외과학회 가 새롭게 제창한 개념으로, [운동기의 장애]에 의한 [요간호로 되는] 기스크가 높은 상 태가 되는 것을 가리킴. 운동기의 건강을 지키고, 자리보전이나 요간호 상태를 회피하여 건강수명을 연장하는 것은 후생성도 금후의 과제로 인식하고 있고, 일본국민이 하나가 되어 대응해 갈 필요가 있는 과제로 인식함.
- 이에 따라 일본에서는 관절 케어를 소구한 제품이 큰 시장을 형성해왔고, 글루코사민과 코드로이친을 주원료로 하면서 항염증 소재나 특징이 있는 소재를 배합하는 경우가 많 음. 글루코사민 제품을 취급하는 기업이 많기 때문에 차별화하여는 움직임이 나타나며, 뼈, 관절, 근육을 종합적으로 또는 조합해서 소구하는 제품이 증가하는 추세임.

- 따라서 삶의 질 향상 및 건강에 관심이 고조되고 있는 가운데, 100세 고령화시대를 맞이하여 관절질환 증가에 따른 예방 개념으로 self-care를 위한 건강기능성식품의 수요가 지속적으로 증가함.

○ 관절염 개선 소재로서의 우슬

- 우슬(Amaranthacea)은 한약재로 한국의 전지역, 일본, 중국의 황하 이남 지역에 분포하는 비름과에 속하는 쇠무릎(*Anchyranthes japonica* Nakai)의 뿌리를 일컫는 것으로 마디가 소의 무릎과 같이 통통하게 부풀어 올라있다고 하여 붙여진 이름임.
- 우슬의 맛은 쓰고 신맛이 나며 독이 없고 간과 신장에 작용함. 동의보감에서는 '우슬은 한습으로 무릎을 굽혔다 폈다 하지 못하는 것과 남자의 음위등과 노인의 요실금을 치료하며 골수를 보충하고 음기를 장 통하게 한다'고 소개되어 있음. 특히 우슬의 약리작용으로 이노작용, 통결, 관절염 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 주요성분으로는 사포닌, 20-Hydroxyecdysone, 오레아놀릭글리코사이드, 숙신산 등으로 구성되어 있음.

○ 본사 보유 발효원천기술을 도입한 발효우슬추출물 제조 공정 개발

- 발효기술을 적용함으로써 천연물로부터 유효성분 증대 및 추출 수율 향상을 도모할 수 있으며, 발효과정 중 수행되는 가수 분해에 의해 천연물에 존재하는 전구물질들을 분해하여 생체 이용률이 증진된 유효성분들의 회수율이 높은 것으로 보고되고 있음.
- 발효는 미생물의 활동으로 특히 프로바이오틱스가 당질을 이용하여 발효 산물인 알코올, 유기산, 탄산가스 등 분해산물을 생성하는 작용으로 발효를 통해 생성되는 유기산 및 분해산물들이 건강에 좋다는 연구 결과가 발표되면서 식품, 건강기능식품, 화장품 등 바이오계통 제품화에 적극 활용되고 있으며, 주로 천연물 추출 전 단위 공정으로써 적용되고 있음.
- 본사가 보유한 발효원천기술을 접목하여 선행연구로 관절건강 개선에 효과가 기대되는 국내산 천연물 우슬로부터 발효우슬추출물을 개발함. 발효우슬추출물의 제조공정 개발을 위해 추출용매, 온도, 시간, 횟수에 따른 추출수율 표준화 절차를 확립하였으며, 대량생산을 위한 제조공정을 확립함. 당사에서 개발한 발효우슬추출물보다 활성이 증가된 유산균발효기술을 이용하여 관절염 개선 발효우슬추출복합물 기능성 소재 개발 기술의 실용화를 추진하고자 함.

○ 선행 기반 연구를 통해 연구 논문 "Effect of Fermented *Achyranthes japonica*(Miq.) Nakai Extract on Osteoarthritis" (*Korean J. Food Sci. Technol.*, vol.49(1), 2017, 1-6)에서 발효우슬추출물의 항염증 활성에 의한 관절건강 개선 효능을 입증하였음.

- 본 과제에서 발효우슬의 항염증 활성을 극대화하기 위한 추가적인 천연물 소재를 탐색하여 복합추출물 생산공정을 표준화하고, 기존의 선행연구 결과물인 발효우슬추출물의 유효 항염증 활성 재평가를 통해 관절염 건강 개선 효능을 인체적용시험으로 입증함으로써 본 개발물을 적용하여 최종 관절건강 개선 기능성을 입증하고 건강기능식품 제품 상용화를 최종 목표로 함.

나. 연구개발의 필요성

(1) 경제-산업적 측면

○ 건강기능식품 시장의 지속적인 성장

- 식품의약품안전처 (이하 식약처) 의 건강기능식품 생산실적 분석 결과, 2015년 국내 건강기능식품 시장규모는 전년대비 3.39% 증가한 1.54조 원으로, 최근 5년동안 지속적인 성장세를 유지함.
- 건강기능식품이 포함되는 영양산업의 시장 규모는 2015년 기준 전세계 약 4,347억 달러로 추정되며 최근 5년간 영양산업 시장은 연평균 7.9%의 성장률을 보임.
- 세계인들의 건강에 대한 관심이 지속되면서 영양산업 시장은 꾸준한 성장을 통해 2020년에는 6,394억 달러 규모로 예상되며, 특히 건강기능식품산업은 1,696억 달러 규모에 이를 것으로 추정됨.

[표. 연도별 세계영양산업 시장규모 (단위: 매출액 억달러, 성장률 %) 자료출처: 식약처]

분류		2009	2010	2011	2012	2013e	2014e	2015e	2020e
첨가제	매출액	803	846	902	961	1,034	1,100	1,179	1,677
	성장률	4.8	5.4	6.5	7.0	7.6	6.4	7.1	7.3
Natural food	매출액	782	838	915	1,10	1,116	1,231	1,357	2,255
	성장률	3.8	7.2	9.2	10.3	10.5	10.4	10.2	9.8
N&OPC&HH	매출액	285	310	339	374	441	452	496	767
	성장률	5.2	8.7	9.4	10.3	9.9	9.8	9.7	8.7
건강기능식품	매출액	964	1,009	1,061	1,119	1,180	1,247	1,315	1,696
	성장률	2.3	4.7	5.1	5.5	5.5	5.7	5.5	5.2
합계	매출액	2,834	3,004	3,217	3,464	3,741	4,029	4,347	6,394
	성장률	3.7	6.0	7.1	7.7	8.0	7.7	7.9	7.8

* 2013년~2020년 매출액 및 성장률은 추정치

○ 건강기능식품 수입현황

- 건강기능식품 수입은 2012년 이후 지속적으로 건수와 금액이 증가하였고 2015년 기준 약 4억4천만 달러의 시장을 가짐. 수입원료들이 해당되는 기능성 원료를 국내산 천연물 유래로 대체할 경우, 원료수입에 의존하는 기능성 원료 공급의 판도를 바꿀 수 있을 것으로 기대됨.

[표. 건강기능식품 수입현황(2010-2015년) (단위: 건, 톤, 천 달러) 자료출처:식약처]

구 분	총 계		
	건수	중량	금액
2010	6,555	6,918	225,667
2011	8,017	8,495	329,041
2012	7,423	8,603	315,033
2013	7,945	9,378	352,745
2014	8,520	8,755	418,565
2015	10,113	9,555	440,636

○ 개별인정형 원료별 생산 현황 및 관절건강 기능성 원료 시장

- 건강기능식품 산업의 개별인정형 원료별로는 당귀혼합추출물 714억(22.3%), 백수오 등 복합추출물 380억(11.9%), 황기추출물등복합물 266억(8.3%)의 순이었으며, 관절건강소재 인초록입홍합추출오일복합물이103억원으로 3.2%의 상위권(8위)을 점유하고있음.
- 2014년 대비 성장 추이를 볼 때, 미역 등 복합추출물(잔티젠) 190.5%, 과채유래유산균 96.5%, 당귀혼합추출물 80.3%에 이어 초록입홍합추출오일복합물이47.1%의 높은 성장률을보임에따라관절건강기능성원료시장의지속적인성장을간접적으로확인할수있음.

[표. 개별인정형 품목별 생산실적 현황, 자료출처: 식약처]

순위	구분	2014		2015	
		매출액(억원)	점유율	매출액(억원)	점유율
계		3,177	100	3,195	100
1	당귀혼합추출물	396	12.5	714	22.3
2	백수오 등 복합추출물	1,193	37.6	380	11.9
3	황기추출물등복합물	-	-	266	8.3
4	헛개나무과병추출분말	379	11.9	255	8.0
5	미역 등 복합추출물(잔티젠)	63	2.0	183	5.7
누계 (5품목)		2,031	63.9	1,799	56.3
6	와일드망고종자 추출물	-	-	173	5.4
7	과채유래유산균	57	1.8	112	3.5
8	초록입홍합추출오일복합물	70	2.2	103	3.2
9	홍경천추출물	78	2.4	74	2.3
10	핑거루트추출분말	81	2.6	56	1.7
누계 (10품목)		2,317	72.9	2,317	72.5
11	기타품목	859	27.1	878	27.5

[표. 개별인정형 원료별 상위 10개 품목 성장 추이, 자료출처: 식약처]

구분	2014	2015
당귀혼합추출물	396	714
전년대비 성장률(%)	26.1	80.3
백수오 등 복합추출물	1,193	380
전년대비 성장률(%)	69.5	-68.1
황기추출물등복합물	-	266
전년대비 성장률(%)	-	-
헛개나무과병추출분말	379	255
전년대비 성장률(%)	-29.9	-32.7
미역 등 복합추출물(잔티젠)	63	183
전년대비 성장률(%)	-	190.5
와일드망고종자 추출물	-	173
전년대비 성장률(%)	-	-
과채유래유산균	57	112
전년대비 성장률(%)	-	96.5
초록입홍합추출오일복합물	70	103
전년대비 성장률(%)	94.4	47.1
홍경천추출물	78	74
전년대비 성장률(%)	550	-5.1
핑거루트추출분말	81	56
전년대비 성장률(%)	-	-30.9

- 식약처에서 인정한 관절/뼈건강 기능성 원료는 총 22건(2015년 기준)이며, 이중 관절 건강에 도움이 되는 원료는 18개임. 고시형 원료인 N-아세틸글루코사민과 MSM, 글루코사민을 제외하면 15개의 개별인정형 기능성 원료가 등록되어 있음.
- 개별인정형 관절 건강 원료로는 초록입홍합과 강황추출물이 각각 개별인정형 원료 전체 상위 8위(103.1억원, 3.2%)와 20위(31.7억원, 1%)로 높은 매출을 차지하고 있음

[표. 관절/뼈건강 기능성 원료 목록, 자료출처: 식약처]

기능성		기능성 원료	건수
관절 /뼈건강	관절 건강에 도움	CMO함유FAC(Fatty acid Complex), N-아세틸글루코사민 , Dimethylsulfonylmethane(MSM), 가시오갈피 등 복합추출물, 강황추출물 , 글루코사민, 까마귀쪽나무 열매 주정추출물, 닭가슴연골분말, 로즈힙분말, 보스웰리아 추출물, 비즈왁스알코올, 전질삼추출물 등 복합물, 지방산복합물, 차조기등복합추출물, 초록입홍합추출오일 , 호프추출물, 황금추출물등 복합물, 참당귀추출분말	18
	뼈 건강에 도움	가시오가피속지황 복합추출물, 대두이소플라본, 흑효모배양액분말, 유단백추출물	4

(2) 과학기술적 필요성

○ 국내산 천연물 유래 건강기능식품 소재 개발의 취약성

- 국외 천연물 소재의 경우 과학적 연구결과를 토대로 건강 기능성 원료 과반수 이상의 비율을 차지하고 있으며, 특히 각 기능성 항목 별 원료들 중에서 국내산 천연물 소재보다 훨씬 큰 시장을 형성하고 있음. 대표적으로 체지방 개선 원료의 가르시니아 캄보지아 추출물, 간 건강 원료의 밀크씨슬 추출물, 치아건강 원료의 자일리톨 등이 있음. 특히 관절건강 소재 분야에서는 초록입홍합과 강황, 보스웰리아 등의 해외 천연물 소재가 매출의 주를 이룸.
- 이러한 과학적 연구개발 현황 속에서 지속적으로 국내산 천연생물자원을 활용한 다양한 기능성 원료개발에 집중하는 제조업체들이 증가하였고, 국내 제조원료 인정 비율이 25% 내외수준에서 2013년에 59%까지 증가함. 그러나 이후 여전히 국외 천연물 소재의 기능성 원료 인정 비율이 과반수를 차지하는 실정임.

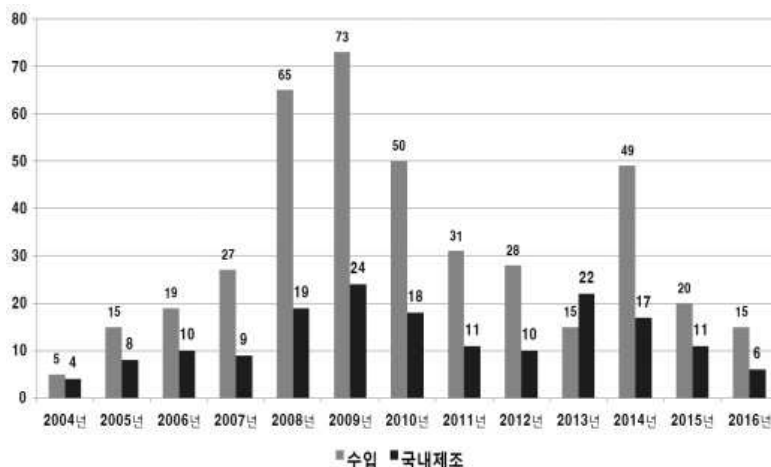


그림. 연도별 기능성 원료 수입/국내제조 현황 (자료출처: 식약처)

○ 항염증성 기전의 관절염 개선 소재 개발의 필요성

- 골관절염이란, 뼈와 뼈가 직접 부딪히는 충격과 마찰을 완화하기 위해 무리 몸의 관절 안에 발달한 연골층이 손상되어 뼈끼리 직접 마찰하면서 통증이 발생하고 이에 따라 움직이기 어려워지는 질환을 말함.
- 류마티스관절염은 면역체계의 이상에 의해 자신의 관절이나 몸의 일부를 공격하여 염증을 일으키는 자가면역질환으로써 손가락, 손, 발, 손목, 발목, 무릎 등 관절이 아프고 붓는 증세가 나타나며, 다른 장기에도 이상을 초래할 수 있는 전신적인 만성 염증성 질환을 말함.
- 관절염 환자는 심한 통증을 유발하므로 반드시 항염증제 등을 복용하여야 하는데, 이러한 화학적요법 약제는 장기간 사용을 방해하는 부작용, 항염증 효과의 결핍 및 이미 발생한 관절염에 대한 효능의 부족과 같은 결점을 가지고 있어 이러한 문제에 대한 해결책으로서 효과적인 관절염 치료제의 개발에 대한 요구가 지속되고 있음.
- 현재 사용되고 있는 대부분의 관절염 치료제는 정도의 차이나 개인차가 있으나 모두 부작용을 가지고 있고, 특히 류마티스 관절염의 치료를 위해서는 약제를 장기간 복용할 필요가 있기 때문에 부작용이 적은 천연물인 우슬을 주원료로 사용한 관절염개선의 발효우슬추출물 개발이 매우 중요함.

(3) 사회문화적 필요성

○ 고령시대를 넘어선 초고령사회 예측에 의한 노인성 만성질환 연구의 필요성

- 우리나라의 고령화 속도는 세계 최고수준으로 65세 이상 고령인구 비율은 2017년 14.0%로 이미 고령시대에 진입하였으며, 2050년 37.4%로 예측됨. UN에서 전체 인구 중 65세 이상 노인(고령자)이 차지하는 비중이 7-14%인 사회를 고령화, 14-20%를 고령사회, 20% 이상을 초고령사회로 분류하는데, 통계청 예측에 의하면 2026년을 기준으로 초고령사회에 접어들게 됨. 우리나라는 평균 수명 증가와 저출산 등의 영향으로 세계에서 가장 빠른 속도로 고령화가 진행 중인 실정임.

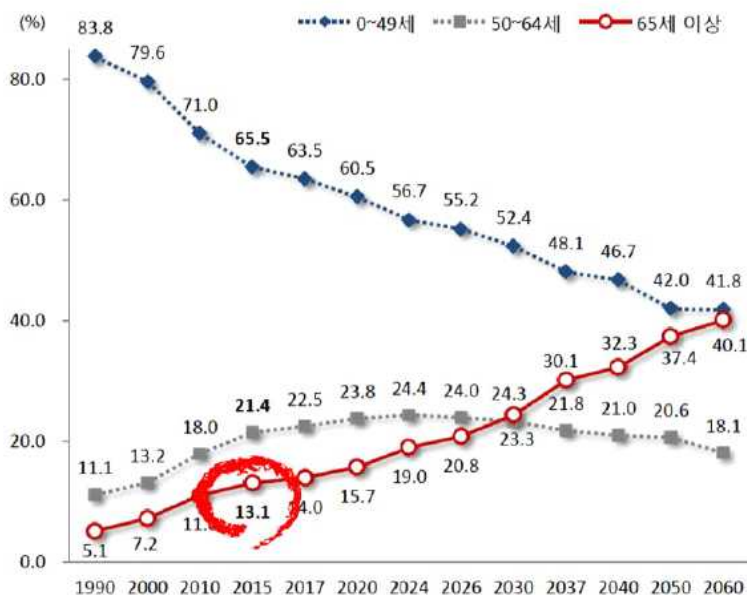


그림. 연령대별 인구 구성비 (자료출처:통계청)

- 한국보건산업진흥원의 고령친화산업 실태조사 및 산업분석 보고서에 따르면 고령친화 산업 시장 규모는 2010년 33조원에서 2020년 125조원으로 4배 이상 급성장할 것으로 전망. 고령친화산업의 각 분야별 성장을 주도할 전략품목 중 의료기기에서는 관절치료기가 포함되어 있음.
- 2014년 국내 노인 실태조사에 의하면, 65세 이상 고령자의 유병률에 따른 상위 6개 질환은 고혈압 56.7% 이후 골관절염 및 류마티스관절염 33.4%, 당뇨병 22.6%, 요통 및 좌골신경통 21.1% 고지혈증 19.6%, 골다공증 14.0% 순으로 나타남.

[표. 65세 이상 남녀 노인의 만성질환종류별 의사진단 유병률 및 치료율 (자료출처:통계청)]

종류	전체(%)		남자(%)		여자(%)	
	유병률 ¹⁾	치료율 ²⁾	유병률	치료율	유병률	치료율
고혈압	56.7	98.6	51.9	98.1	60.2	98.9
골관절염 또는 류머티즘 관절염	33.4	84.2	17.9	83.7	44.5	84.3
당뇨병	22.6	97.5	22.2	98.2	22.8	97.1
요통, 좌골신경통	21.1	82.1	12.6	78.3	27.2	83.3
고지혈증	19.6	96.1	14.6	96.2	23.2	96.0
골다공증	14.0	80.9	2.7	76.3	22.1	81.3
백내장	8.7	69.3	6.8	70.8	10.0	68.6
전립선비대증	8.2	92.9	19.7	92.9	0.0	0.0
뇌졸중 (중풍, 뇌경색)	6.9	95.6	8.0	93.6	6.0	97.5
협심증, 심근경색증	6.8	97.4	6.8	98.3	6.9	96.8

- 이 6개 질환 중에 치료율이 낮은 것은 골다공증 80.9%, 요통 및 좌골신경통 82.1%, 골관절염 및 류마티스 관절염 84.2%로 관절 및 뼈에 관련된 만성 질환에 대한 관심과 관련 소재 시장이 지속적으로 성장할 것이 예상되면서, 관절건강 개선을 위한 체계적인 연구가 매우 필요한 실정임.

○ 일본의 로코모티브신드롬 대책을 모티브로 한 고령화 사회 대비 정책의 필요성

- 일본의 경우, 2015년도 고령화 사회의 진행으로 인한 시니어 층 확대와 같은 시장환경의 큰 변화는 없었으나, 한국과 같은 좌식생활에 의해 관절건강에 대한 수요와 관심은 지속적으로 증가하고 있는 추세임.
- 운동기증후군(로코모티브신드롬) 대책 및 스포츠 뉴트리션 등 건강식품 메이커 각사가 계속해서 대응하고 있는 관절·뼈·근육 관련 건강기능성 소재 시장은 지속적으로 증가하고 있으며 2016년도 동 시장은 전년도 대비 101.1%(1,019억 1,600만 엔)으로 예측됨(출처:야노경제연구소, 2016년판 건강·기능성식품 소재시장의 실태와 전망).

다. 연구개발 범위

○ 발효우슬추출복합물의 관절건강 개선 기능성 검증을 통한 개별인정형 기능성 원료 인허가 및 상용화

골관절염 증상 완화 지표성분이 명확하고 구체적 원료 표준화가 가능한 천연소재를 대상으로 항관절염 in vitro 활성 스크리닝을 진행하여, 가장 활성을 보이는 발효 소재와 다양한 비율로 혼합하여, 골관절염 증상 완화 유력소재를 3종 선정하여 formualtion 설정 및 개발을 완료함. 더불어 복합물의 연골조직 primary culture 상 항골관절염 활성을 확인하였으며, 이를 바탕으로 전임상 동물 실험을 실시하여 항골관절염 효능을 입증하고 심도 있는 인체 임상 실험을 완료하고 관절 건강 증진 천연소재 식약처 원료 개별인정을 추진하여 최종적으로 우수하고 안전한 관절 건강 증진 건강기능식품을 제품화하고자 함.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 제조 표준화 (주관기관: 에스케이 바이오랜드(주))

(1) 발효우슬추출복합물 제조 표준화

(가) 발효우슬추출복합물 복합소재 후보군의 항관절염 활성 스크리닝

① 발효균주별 발효우슬 샘플제조

- 효모를 포함한 5종의 유산균을 각각 접종하여 발효시킨 발효우슬 샘플 제조

구분	번호	아이템	샘플명	스크리닝 결과
우슬	1	멸균전	우슬 멸균전	
	2	멸균후	우슬 멸균후	
	3	발효후	발효우슬 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	
	4		발효우슬 <i>Lactobacillus casei</i>	collagen type I 합성에 독보적 활성
	5		발효우슬 <i>Lactobacillus fermentum</i>	
	6		발효우슬 <i>Lactobacillus plantarum</i>	항관절염(항염) 활성에서 모두 두각
	7		발효우슬 Yeast	

→ 우슬 발효균주의 경우, 전반적으로 항염/항관절염 활성에서 두각을 보인 *L. plantarum* 균주로 선정

② 관절 건강 복합 소재 후보 선정 및 샘플 제조

- 복합소재 후보군 선정 및 용매 별 추출샘플 제조

구분	번호	아이템	샘플명	스크리닝 결과
복합 후보	1	가시오가피 열매	가시오가피열매열수추출분말	
	2		가시오가피열매 70%주정추출분말	
	3	당귀	당귀열수추출분말	높은 항관절염(항염) 활성

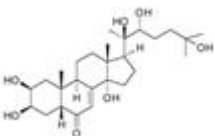
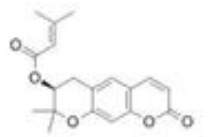
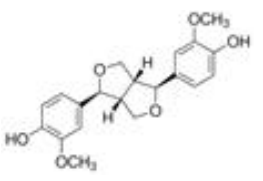
	4		당귀 70%주정추출분말	높은 항관절염(항염) 활성/ 고농도에서 콜라겐합성을 촉진
	5	두충	두충열수추출분말	높은 항관절염(항염) 활성/ 콜라겐 합성 유도 활성 높음
	6	속단	속단열수추출분말	
	7		속단 70%주정추출분말	
	8	영경귀	영경귀열수추출분말	
	9		영경귀 70%주정추출분말	높은 항관절염(항염) 활성

→ 복합소재로써, 두루 높은 활성을 나타낸 당귀, 두충의 각 열수추출분말을 선정함

(나) 발효우슬추출복합물 원료 표준화

① 공정 표준화를 위한 지표성분 결정 및 분석법 확립

㉞ 발효우슬/당귀열수/두충열수추출분말의 개별 지표성분 결정

원료	지표성분		
	성분명	구조	특징
우슬	20-Hydroxyecdysone		- Phytoecdysteroids, 강한 항염활성 - 발효우슬추출물 내 함량: 0.06% - 분석 조건 확립
당귀	Decursin		- Coumarin 유도체 - 당귀추출물 내 함량: 0.18% - 분석 조건 확립
두충	Pinoresinol diglucoside		- Lignan 계, 항고혈압 활성 - 두충추출물 내 함량: 0.4% - 분석 조건 확립

㉞ 복합 소재 개별 지표성분의 함량 분석 조건 확립

○ 우슬 (20-Hydroxyecdysone)

- 추출방법: 추출분말 1g을 정량하여 메탄올 50ml에 sonication하여 추출
- HPLC 분석 조건

항목	조건
detector	UV or PDA
과장	254 nm
컬럼	Capcell pak C18 (250mm x 4.6mm, 5µm)

시료주입량	20 μ l		
유속	1.0 ml/min		
컬럼 온도	35 $^{\circ}$ C		
이동상 조건	시간(min)	A: water	B: Acetonitrile
	0	85	15
	8	85	15
	15	70	30
	30	70	30
	35	85	15
	40	85	15

○ 당귀 (Decursin)

- 추출방법: 추출분말 0.1g을 정량하여 메탄올 50ml에 sonication하여 추출
- HPLC 분석 조건

항목	조건
detector	UV or PDA
파장	330 nm
컬럼	Capcell pak C18 (250mm x 4.6mm, 5 μ m)
시료주입량	20 μ l
유속	1.5 ml/min
컬럼 온도	35 $^{\circ}$ C
이동상 조건	Water:Acetonitrile=52:48 (30min)

○ 두충 (Pinoresinol diglucoside)

- 추출방법: 추출분말 0.5g을 정량하여 75%에탄올 50ml에 용해하여 추출
- HPLC 분석 조건

항목	조건
detector	UV or PDA
파장	230 nm
컬럼	Capcell pak C18 (250mm x 4.6mm, 5 μ m)
시료주입량	20 μ l
유속	1.0 ml/min

컬럼 온도	35℃		
이동상 조건	시간(min)	A: 0.1% Formic acid	B: Acetonitrile
	0	95	5
	20	80	20
	25	80	20
	30	95	5

㉔ 발효우슬등추출복합물 내 각 지표성분의 안정성 확인



그림. 발효우슬등추출복합물의 개별 지표성분 열안정성 확인



그림. 발효우슬등추출복합물의 개별 지표성분 pH안정성 확인

→ 우슬, 당귀, 두충의 각 지표성분들의 열/pH안정성을 측정한 결과, 당귀의 decursin 열안정성 4시간째 샘플에서 튀는 값을 보였으나, 전반적으로 80~90% 내외로 안정성을 나타냄에 따라 지표성분으로써 공정 관리에 적합하다고 판단됨

② 우슬 및 복합소재 원료 표준화

㉔ 원산지별 원료의 지표성분 분석 및 국내의 수급량 평가

○ 우슬

- 단가: \18,000/kg
- 원산지별 함량 분석 결과 및 생산량 조사

우슬 원산지	UPLC 함량(%)	2016년 기준 생산량 (ton)
중국산	0.059	-

제주도	0.089	-
전라남도	0.136	23
대구광역시	0.111	-
경상북도(복합물 원료)	0.120	63
기타 국내 원산지	-	37
국내 생산량 합계(ton)		123

- 복합물에 사용된 경북안동원료0.12%를 기준으로 전남 여수, 대구 원료의 지표성분 함량은 약 0.02% 내외 수준의 차이를 보였으나, 기존 함량 자체가 매우 낮아서 나타나는 오차로 여길 수 있음. 또한 중국산은 국내산 원료에 비해 절반인 0.059% 함량을 보였음
- 농림축산식품부(특용작물생산실적)에 따르면 2016년 기준 우슬 국내생산량은 123ton이나, 우슬 원료 거래처 유선문의 시 건조된 우슬(건우슬)은 수요량에 맞추어 공급이 가능하다고 함
- ⇒ 우슬의 수율은 약 50%이므로, 2016년 기준 생산량인 123ton 중 추출분말은 61.5ton을 수득가능함

○ 당귀

- 단가: \17,000/kg
- 원산지별 함량 분석 결과 및 생산량 조사

당귀 원산지	HPLC 함량(%)	2016년 기준 생산량 (ton)
강원도	3.125	826
경상도	2.807	506
충청도	3.791	40
기타 국내 원산지	-	25
국내 생산량 합계(ton)		1,397

- 기존에 진행된 연구에서 당귀의 decursin 함량은 평균 3.32%의 함량을 보였으며, 같은 지역의 원료에서도 함량의 차이가 다소 나타남. 이 때문에 decursin의 원재료 규격은 2012년 연구 기준 2.55~3.824%로 설정하여 사용하였으며, 매 원료마다 원재료내 함량 실험을 필요로 함
- 식품원료목록에는 ‘왜당귀(일당귀)’, ‘중국당귀’, ‘참당귀(조선당귀)’, ‘안젤리카 (서양당귀)’ 등이 등록되어 있으며, 그 중 참당귀는 *Angelica gigas Nakai*라는 학명을 가짐.
- ⇒ 당귀의 수율은 약 38%로, 2016년 기준 생산량인 1400ton 중 532ton을 수득할 수 있으므로 추출복합물 소재로서 사용하는데 공급의 어려움은 없을 것으로 판단됨

○ 두충

- 단가: \8,500/kg

- 원산지별 함량 분석 결과 및 생산량 조사

두층 원산지	UPLC 함량(%)	2016년 기준 생산량 (ton)	2010년 기준 생산량(ton)
충청도	0.62	56	-
전라도	0.61	34	-
경상도(복합물 원료)	0.40	130	-
기타 국내 원산지	-	3	-
국내 생산량 합계(ton)		223	455

- 복합물에 사용된 경상도 두층 원료에서 함량이 약 0.2% 낮게 나왔으나 해당 성분의 함량 자체가 매우 낮아 생기는 오차범위로 여겨져 국내 원산지 별 두층 원료의 지표성분 함량에 차이가 없을 것으로 예상됨
- 농림수산물식품부(특용작물생산실적)에 따르면 2010년 기준 두층 국내 생산량은 455ton이었으나, 2016년 기준 223 ton으로 생산량이 감소됨
- ⇒ 두층의 수율은 약 9%로, 2016년 기준 생산량인 223ton을 사용 시, 분말 기준 20ton을 생산할 수 있음. 발효우슬추출복합분말 140ton 생산 기준으로 두층분말 20ton이 사용

(다) 발효우슬등추출복합물 생산 공정 표준화

① 우슬 및 복합소재 추출분말 제조공정도 작성

○ 우슬

공정	수득량(kg)	수율(%)	함량(mg/g)	지표수율(%)
원재료	10	100	0.7	100%
추출	350	55	0.969	76%
여과	350	55	0.969	76%
농축	98	54.88	0.925	72.6%
멸균·배양	-	-	-	-
여과	120	48	1.344	92%
농축	23	48	1.344	92%
부형제 투입	-	-	-	-
건조	45	96	0.65	92%

- ⇒ 공정 상 수율 및 지표 수율은 우수하게 유지 됨. 멸균·배양 공정에서 함량의 변화에 대해 분석이 필요함
- ⇒ 건조 시 부형제 처방이 필요함

○ 당귀

공정	수득량(kg)	수율(%)	함량(mg/g)	지표수율(%)
----	---------	-------	----------	---------

원재료	20	100	31.25	100%
추출	300	39.96	12.38	130%
여과	330	39.7	7.25	75.6%
농축	19	39.7	9.2	74%
건조	8	39.7	9.2	74%

⇒ 추출에서 지표수율이 상승하는 것으로 나타나 재 분석이 필요함. 공정 수율은 양호하게 유지가 되며, 여과-농축-건조 단계에서 지표수율의 loss는 없는 것으로 보임

⇒ 부형제 없이 건조가 가능하며, 추출복합분말 제조 시 당귀추출물이 부형제 역할을 할 수 있음

○ 두충

공정	수득량(kg)	수율(%)	함량(mg/g)	지표수율(%)
원재료	20	100	5.63	100%
추출	280	9.9	30.91	54.3%
여과	247	9.9	30.91	54.3%
농축	4.74	8.8	28.61	48.7%
건조	1.7	8.8	-	

⇒ 추출 시 pinoresinol diglucoside의 지표수율은 54.3%였으며, 수율은 9.9%로 나타남. 목질 부분이기 때문에 추출 후 재추출 시 수득할 수 있는 부분이 없음

(2) 발효우슬추출복합물 기타가공품 품목제조신고 완료 (제품화)

-품목제조보고번호: 19970311175245

-품목제조보고일: 2018년 08월 07일

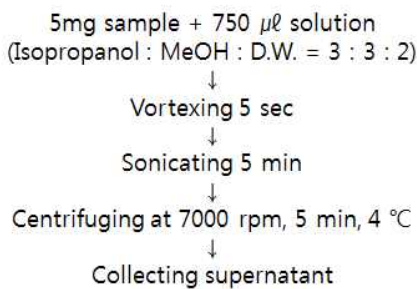
나. 대사체 분석 (위탁기관: 국민대학교)

(1) 발효산물 대사산물 고속 확보방법 (sample preparation method) 최적화

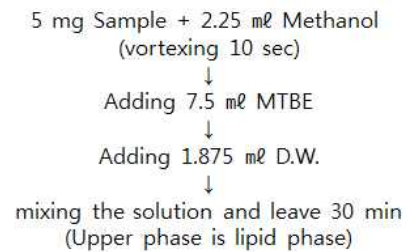
(가) 다양한 극성을 띠는 물질의 효과적인 추출을 위해서 물, 메탄올, isopropanol, acetonitrile, chloroform 등의 다중 용매 조성의 테스트를 통한 가장 효과적인 추출 용매 조성(extraction solvent system)을 검토. 결과적으로 extraction efficiency와 toxicity를 고려하여 isopropanol:MeOH:H₂O (3:3:2 v:v:v)의 삼상용매를 기본적인 extraction solvent로 최종결정함.

(나) 또한 Folch method와 MTBE를 통한 극성에 따른 fractionation 방법이 extraction efficiency에 긍정적인 영향을 미친 것으로 판단하여, LC-MS analysis를 위한 보완적 추출방법으로 확립함.

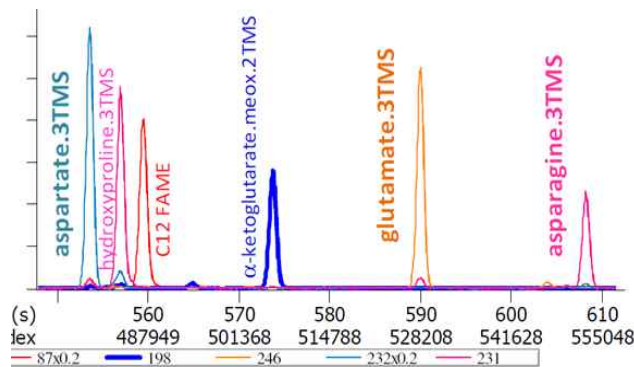
○ Isopropanol : MeOH : D.W. (3 : 3 : 2)



○ MTBE(methyl tert-butyl ether)



(2) 비표적 프로파일링을 통한 발효산물 유래 기초대사산물 데이터 획득(GC-MS)



(가) 주요 일차대사산물의 질량분석시스템의 감도 향상을 위한 유도체화 방법(derivatization method) 확립

- 추출된 화합물중 주요기초대사산물의 화합물 구조를 안정화하고 또한 분석을 위하여 사용된 gas-chromatography coupled time-of-flight MS상에서의 높은 sensitivity를 유지하기 위하여 유도체화 방법을 적용하였음. 이중 가장 다양한 화합물에 적용할 수 있는 MSTFA를 활성수소 치환기(silylation)로 사용. carbonyl group의 oxime 유도체화를 통하여 환원당의 recyclization을 방지하고, decarboxylation으로 생성된 화합물의 carbonyl group protection을 위하여 methoxiamine을 pyridine 용매에 용해시켜 사용하였음. 최적화된 reaction volume과 reaction

time 및 두 용매시스템간의 비율을 정립함 (1st derivatization: 5ul for 90 min, 2nd derivatization: 45ul for 60 min).

(나) 기체크로마토그래피 기기조건 최적화 (칼럼 선정, 인젝터 온도, 오븐 온도 프로그래밍)

- 기초대사산물의 주 분석장비로, 재현성, 감도등이 우수하며 시스템 운용의 안정성을 확보하기 용이한 기체크로마토그래피 분리방법 (gas- chromatographical separation)의 고속정밀분석의 최적화를 위하여 0.25 μ m 95% dimethyl 5% diphenyl polysiloxane film로 코팅된 30 m, 0.25 mm i.d. Rtx-5Sil MS column을 사용하였으며, 구체적인 gas chromatography의 parameter를 최적화하였음.

(다) 고성능 다중 질량분석 기기조건 정립 (스캔속도, 질량스캔시작점, collision energy최적화)

- 질량분석의 주 시스템으로 사용되고 있는 time-of-flight (TOF) 질량분석 시스템 (mass spectrometer)의 parameterization을 통하여 microalgae의 대사체 분석에 최적화를 달성했으며, 구체적인 parameter는 아래의 그림에 명시되어 있음. 예를 들어 high-throughput과 sensitivity의 최적 스캔속도는 17 scans/sec, acquisition delay는 350 sec, detector voltage 1750~1800, ion source temperature 250 C등의 주요 parameter의 최적화 작업을 마침.

(3) 발효 이차대사산물 프로파일링을 위한 LC-MS 분석방법 최적화

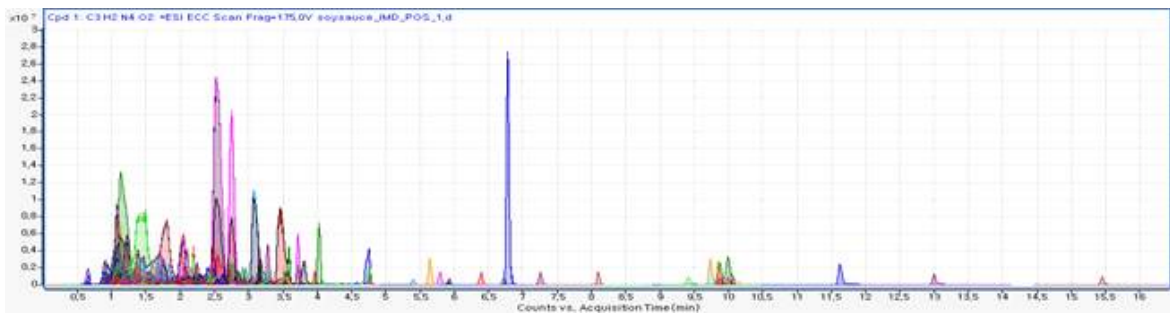
- 바이오마커 발굴을 위해 신뢰도 높은 통계분석이 진행되어야 하므로, raw data의 data process를 통한 동정상태 전의 metabolic feature 선별의 정확도가 매우 중요.
- 특히 mass spectrum을 기반으로 한 peak detection과 peak alignment process는 m/z window, RT window 및 tolerance등의 변수에 의해 다양한 결과 값을 가짐.
- 또한 peak deconvolution, missing value imputation process에 의해 각 개별적 시료에 존재하는 metabolic feature 상호비교하여 유의성을 확보.
- 이를 위해 SEIVEE를 이용한 데이터 프로세스 parameter를 확립.
- MZmine2를 이용한 데이터 프로세스를 교차검증.

(가) Raw data process를 최적화한 결과

[표] Raw data process 최적화

구분		설정
Mass scan range (m/z)		100-1,000
RT	Start (min)	2
	Stop (min)	20
Frame time width (min)		2.5
m/z width (ppm)		2,000
Maximum number of frames		m/z max, 10min 설정하여 max-min한 값
Peak intensity threshold	Negative ionization mode	4,000
	Positive ionization mode	200,000

(나) C18 column을 이용한 비극성물질의 LC-MS 분석을 실시하였으며, total ion chromatogram 및 extracted ion chromatogram을 통해 data quality와 재현성을 확인.



- Molecular feature finding 및 molecular formular matching을 통하여, 약 172개의 putative metabolic feature를 선별했으며, 반복실험을 통하여 재현성을 확인. (%CV 15%)

(4) 발효산물 기초대사물질 대사표현형 확보 및 지표물질 규명(GC TOF-MS)

(가) 다양한 극성을 띠는 물질의 효과적인 추출을 위해서 extraction efficiency와 toxicity를 고려하여 isopropanol : MeOH : H₂O (3:3:2 v:v:v)의 삼상용매를 기본적인 extraction method를 사용함.

(나) 주요 일차대사산물의 질량분석시스템 감소향상을 위한 유도체화 방법 사용
추출된 화합물중 주요기초대사산물의 화합물 구조를 안정화하고 또한 분석을 위하여 사용된 gas-chromatography coupled time-of-flight MS상에서의 높은 sensitivity를 유지하기 위하여 유도체화 방법을 사용하였음. 이중 가장 다양한 화합물에 적용할 수 있는 MSTFA를 황성수소 치환기(silylation)로 사용. carbonyl group의 oxime 유도체화를 통하여 환원당의 recyclization을 방지하고, decarboxylation으로 생성된 화합물의 carbonyl group protection을 위하여 methoxiamine을 pyridine 용매에 용해시켜 사용하였음. 최적화된 reaction volume과 reaction time 및 두 용매시스템간의 비율을 사용함. (1st derivatization: 5ul for 90 min, 2nd derivatization: 45ul for 60 min).

(다)우슬의 주요 물질 추출을 위하여 열수추출과 주정추출의 방법에 따른 metabolite 비교

추출 방법에 따라서 유의성이 있는 metabolite list. 추출방법에 따라서 primary metabolite의 차이를 확인함. (Fold change는 주정추출/열수추출 비율을 비교)

Metabolite	P-value	Fold change
ethanol phosphate	< 0.001	25.941
gluconic acid	< 0.001	14.237
malic acid	< 0.001	11.584
1-monopalmitin	< 0.001	5.098
oleic acid	0.015	4.974
isoleucine	< 0.001	3.800
alanine	0.011	2.384
glyceric acid	0.001	2.284
cellobiose	0.003	2.191
lysine	0.032	2.151
fumaric acid	0.002	2.064
valine	0.008	1.880
oxalic acid	0.002	1.872
inositol-4-monophosphate	0.005	1.803
butyrolactam	0.019	1.791
glucose	0.001	1.767
palmitic acid	0.004	1.730
oxoproline	0.012	1.715
allantoic acid (dehydrated)	0.043	1.671
galactinol	0.016	1.573
isothreonic acid	0.008	1.564
phenylalanine	0.011	1.558
tryptophan	0.015	1.535
stearic acid	0.019	1.502
tyrosine	0.003	1.480
tartaric acid	0.041	1.463
serine	0.026	1.412
aspartate	0.012	1.334
ethanolamine	0.037	1.285
6-chlorohexanol	0.019	0.913
3-hydroxypropionic acid	0.032	0.833
2-hydroxypyridine	0.028	0.803
xylulose	0.029	0.674
pyrophosphate	0.004	0.634
hydroxylamine	0.007	0.507
2,3-dihydroxypyridine	< 0.001	0.507
guanine	0.013	0.502
glycolic acid	< 0.001	0.410
erythrose	0.011	0.381
uracil	0.004	0.355
succinic acid	0.002	0.343
thymine	0.005	0.312
erythritol	< 0.001	0.230
lyxitol	< 0.001	0.063

butane-2,3-diol	0.002	0.055
2-hydroxyhexanoic acid	< 0.001	0.051
lactic acid	< 0.001	0.039
pyruvic acid	< 0.001	0.038

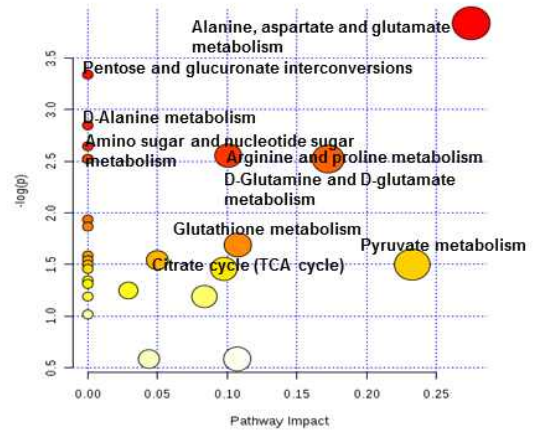
(라) 우슬추출물(열수추출방법, 주정추출방법)과 발효우슬 간의 유의적인 metabolite 발효를 통해 유의적으로 증가, 감소된 primary metabolite 확인.

Metabolite	p-value	Fold change
cellobiose	< 0.001	28.490
3-hydroxypyridine	0.001	4.656
pyruvic acid	0.041	3.284
2,3-dihydroxypyridine	0.001	2.758
fructose-6-phosphate	< 0.001	2.279
glutamate	0.011	2.251
xanthine	0.013	2.198
hydroxylamine	0.008	1.665
thymine	0.027	1.656
2-deoxytetronic acid	< 0.001	1.622
xylose	0.001	1.480
threonic acid	0.002	1.298
myo-inositol	0.026	0.812
xylitol	0.006	0.753
stearic acid	0.027	0.722
glycerol-alpha-phosphate	0.012	0.662
allantoicacid(dehydrated)	0.039	0.616
trehalose	0.011	0.611
threonine	0.007	0.598
glucose	0.019	0.576
aspartate	0.000	0.531
6-chlorohexanol	< 0.001	0.516
tryptophan	0.001	0.485
galactinol	0.001	0.450
serine	0.005	0.400
inositol-4-monophosphate	0.001	0.342
glutamine	< 0.001	0.195
ethanol phosphate	0.044	0.037

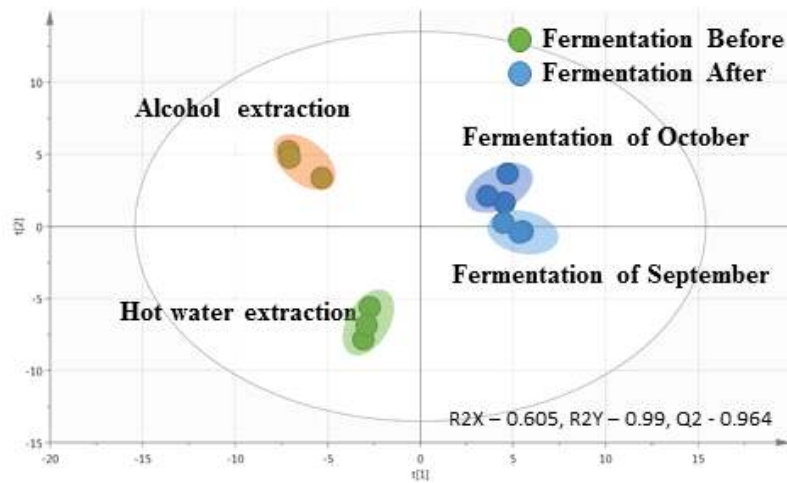
(마) 우슬추출물과 발효우슬 간의 유의적인 metabolite

GC TOF-MS 분석을 통한 우슬 추출물을 *Lactobacillus plantarum* 균주를 이용하여 Fermentation을 통해 증가 된 대사산물을 pathway analysis 이용한 분석을 통해 확인된 Alanine, aspartate and glutamate metabolism, Pentose and glucuronate interconversions, D-Glutamine and D-glutamate metabolism, Amino sugar and nucleotide sugar metabolism, Glutathione metabolism이 관찰되었음.

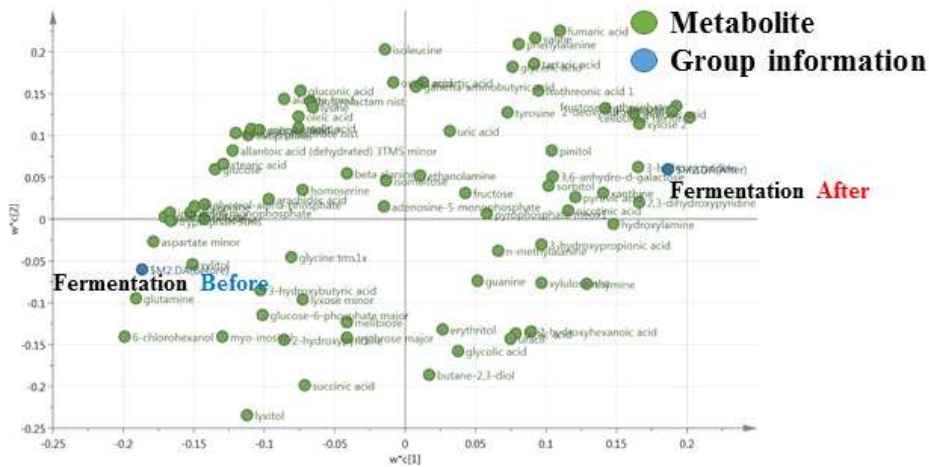
Metabolite list	p-value	fold change
Cellobiose	< 0.001	28.490
3-hydroxypyridine	0.001	4.656
pyruvic acid	0.041	3.284
2,3-dihydroxypyridine	0.001	2.758
fructose-6-phosphate	< 0.001	2.279
Glutamate	0.011	2.251
Xanthine	0.013	2.198
Hydroxylamine	0.008	1.665
Thymine	0.027	1.656
2-deoxytetronic acid	< 0.001	1.622
Xylose	0.001	1.480
threonic acid	0.002	1.298



일차대사산물 유동성 분석을 통한 다변량 모델 PLS-DA (PLS Discriminant Analysis) 표현형을 통해 우슬 추출방법(hot water, alcohol)에 따른 일차대사산물의 차이를 확인할 수 있었으며, fermentation 전, 후의 primary metabolite의 차이가 거의 없는 것을 model 표현형을 통하여 확인 함.



PLS-DA (PLS Discriminant Analysis) model 표현형을 Loading scatter plot의 metabolite를 확인하였으며, discriminant model에 기여하는 cellobiose, 6-chlorohexanol, fructose-6-phosphate, glutamine, 2-deoxytetronic acid, aspartate 등으로 구분 짓는 model 표현형을 확인함.



Variable Importance in Projection (VIP) analysis 통해 discriminant model 구성요소에 기여하는 primary metabolite TOP10 List를 확인.

Metabolite	VIP score
Cellobiose	1.749
6-chlorohexanol	1.729
fructose-6-phosphate	1.670
Glutamine	1.650
2-deoxytetronic acid	1.644
Aspartate	1.539
Galactinol	1.474
Xylose	1.442
inositol-4-monophosphate	1.442
Tryptophan	1.433

(5) 비표적 프로파일링을 통한 발효산물 유래 이차대사산물 분석(LC-MS)

(가) 발효 대사 산물 추출을 위한 최적화된 방법을 사용

우슬 및 발효 우슬대사 산물의 LC-MS 분석을 위해서 발효 산물에 포함되어 있는 metabolite와 20-hydroxyecdysone의 추출을 위해서 메탄올을 첨가 후 stainless steal ball의 높은 밀도와 high frequency homogenization을 이용한 추출방법을 검토하여 대사체 추출효율과 속도를 높인 방법을 사용함.

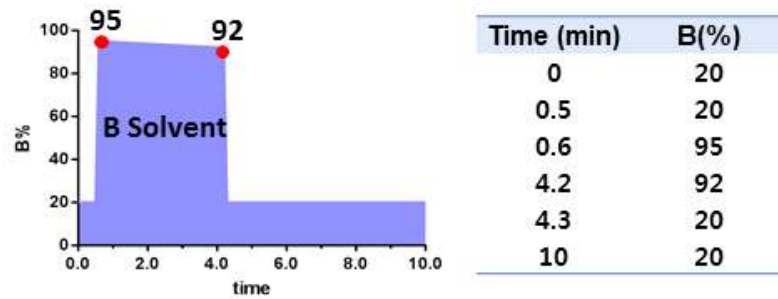
- Extraction Method

MeOH 100%,

Sonication 10min with temperature 30℃,

Reconstitution solvent, 70% Acetonitrile

(나) 발효 이차대사산물 LC-MS 프로파일링을 최적화된 방법을 통한 분석



- LC-MS analysis condition

Column : CSH C18

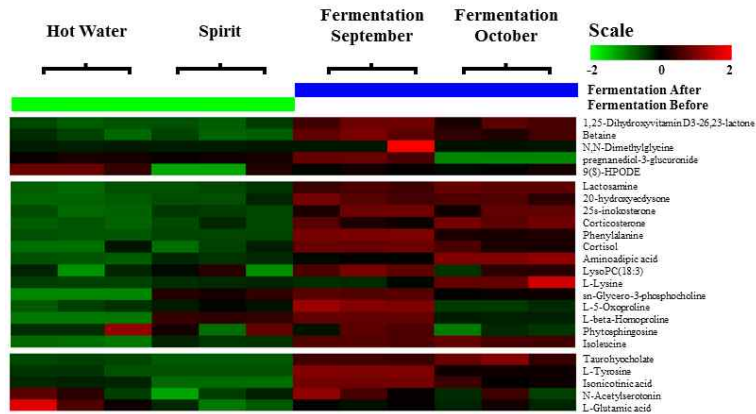
A solvent : 0.1% formic acid in water

B solvent : 0.1% formic acid in Acetonitrile

(다) 우슬 추출물과 발효우슬 간의 유의적으로 증가된 metabolite

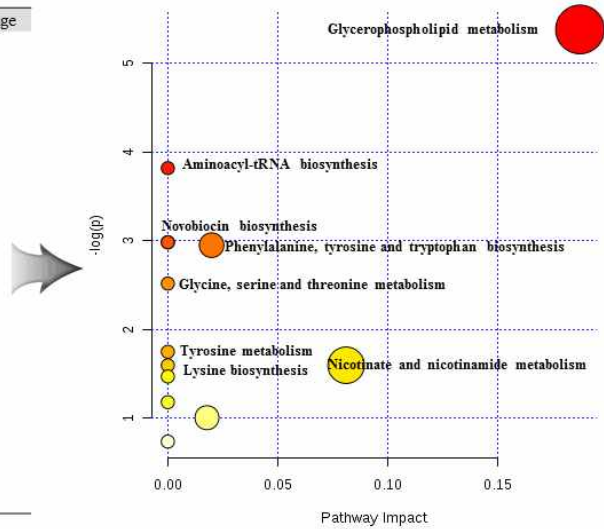
Metabolite	p-value	Fold change
Taurohyocholate	< 0.001	16.200
L-Tyrosine	< 0.001	15.580
Cortisol	< 0.001	4.938
Lactosamine	< 0.001	3.296
L-Lysine	0.030	3.227
L-prolyl-L-proline	0.017	2.845
LysoPC(18:3)	0.019	2.166
Phenylglyoxylic acid	< 0.001	2.112
sn-Glycero-3-phosphocholine	0.039	2.081
Phenylalanine	< 0.001	1.986
Isonicotinic acid	< 0.001	1.935
Isoleucine	< 0.001	1.750
Amino adipic acid	0.002	1.711
1,25-Dihydroxyvitamin D3-26,23-lactone	< 0.001	1.558
20-hydroxycdysone	< 0.001	1.330
25s-inokosterone	< 0.001	1.291
Corticosterone	< 0.001	1.278
Glycine-Betaine	< 0.001	1.128
Choline	0.046	1.061

Self Organizing Tree Algorithm을 통해 fermentation 전, 후의 이차 대사산물 변화를 확인 할 수 있었으며, 추출방법에 따라서 metabolite의 차이가 거의 없는 것을 확인함.



우슬 추출물의 Fermentation 전,후 비교를 통해 가장 significant 하며 impact가 뚜렷한 Glycerophospholipid metabolism 와 Aminoacyl-tRNA biosynthesis가 관찰되었으며, Novobiocin biosynthesis, Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, 그리고 Glycine, serine and threonine metabolism pathway의 유동성이 추가로 확인되었음.

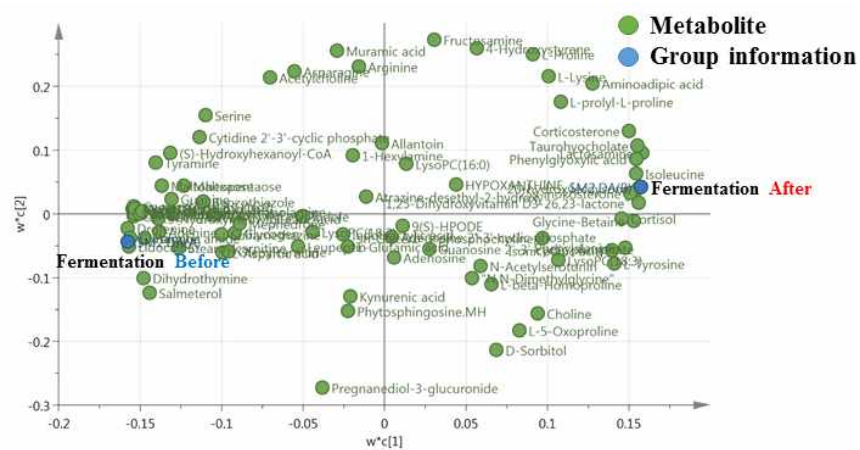
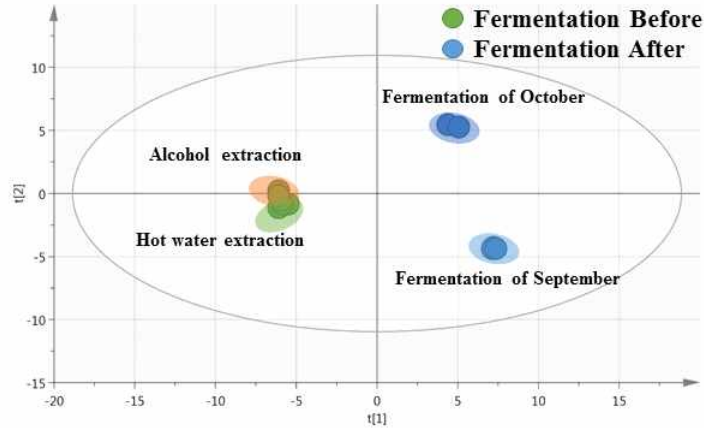
Metabolite	p-value	Fold change
Taurohyocholate	5.056E-07	16.200
L-Tyrosine	2.022E-04	15.580
Cortisol	6.319E-05	4.938
Lactosamine	2.363E-08	3.296
L-Lysine	3.014E-02	3.227
L-prolyl-L-proline	1.727E-02	2.845
LysoPC(18:3)	1.903E-02	2.166
Phenylglyoxylic acid	1.221E-06	2.112
sn-Glycero-3-phosphocholine	3.942E-02	2.081
Phenylalanine	3.098E-05	1.986
Isonicotinic acid	3.106E-04	1.935
Isoleucine	1.244E-06	1.750
Amino adipic acid	2.277E-03	1.711
1,25-Dihydroxyvitamin D3-26,23-lactone	3.236E-07	1.558
20-hydroxyecdysone	3.879E-07	1.330
25s-inokosterone	1.060E-05	1.291
Corticosterone	1.164E-05	1.278
Glycine-Betaine	2.528E-06	1.128
Choline	4.625E-02	1.061



(6) 발효산물 유래 신규 기능성 물질 선정

이차대사산물 유동성 분석을 통한 다변량 모델 PLS-DA (PLS Discriminant Analysis) 표현형을 통해 우슬 추출방법(hot water, spirit)에 따른 차이는 거의 없는 것을 확인할 수 있었으며, fermentation 전, 후의 metabolite의 차이를 통해 다음과 같은 model 표현형을 확인할 수 있었음.

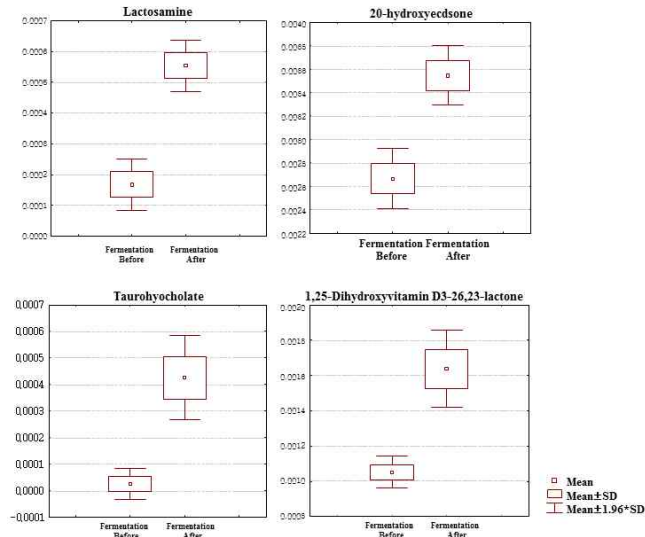
PLS-DA (PLS Discriminant Analysis) model 표현형을 Loading scatter plot의 metabolite를 확인하였으며, discriminant model에 기여하는 fermentation 전 metabolite (Drofenine, Lidocaine, Glutamine, Alpha.CEHC, N,N-Dimethylaniline 등), fermentation 후 metabolite (20-hydroxyecdysone, Phenylglyoxylic acid, Isoleucine, 25s-inokosterone 등) 구분 짓는 model 표현형을 확인함.



Variable Importance in Projection (VIP) analysis 통해 discriminant model 구성요소에 기여하는 secondary metabolite TOP10 List를 확인.

Metabolite TOP10	VIP score
Lactosamine	1.403
Drofenine	1.391
Lidocaine	1.390
Taurohyocholate	1.380
1,25-Dihydroxyvitamin D3-26,23-lactone	1.378
Glutamine	1.378
20-hydroxyecdysone	1.377
Alpha CEHC	1.369
Phenylglyoxylic acid	1.367
Isoleucine	1.365

Variable Importance in Projection (VIP) analysis를 통해서 선정된 10개 metabolite 중 우슬 추출물의 fermentation 후 증가된 metabolite(Lactosamine, 20-hydroxyecdysone, Taurohyocholate, 1,25-Dihydroxyvitamin D3-26,23-lactone)를 Box & whisker plot을 통해 확인함.



발효전후 비교를 통한 LC-MS 분석 자료 중 유효성분과 관련된 대사체 추가 분석을 실시함. LC-MS 분석의 경우 발효우슬의 지표 및 유효성분인 20-hydroxyecdysone 외에, 25s-inokosterone의 물질 동정 및 분석조건 확립에 초점을 맞추어 분석이 진행되었으며, 추가분석시 확인된 대사체는 총 16개로 나타남. 변화량에 대한 P-Value 값이 0.05 이하인 대사체는 21개로 나타났으며, 이 중 증가된(up-regulation) 대사체는 20개, 감소된(down-regulation) 대사체는 1개임을 확인. Amino acid(55%), carboxylic acid(25%), another(25%)로 확인함.

Metabolite name	P -Value	Fold change
D-Arginine	< 0.001	9.23
D-Glucosamine	< 0.001	5.17
D-Proline	< 0.001	4.55
L-Phenylalanine	< 0.001	4.24
Acetophenone	< 0.001	3.59
Asparagine	< 0.001	3.35
Corticosterone	< 0.001	2.88
20-hydroxyecdysone	< 0.001	2.58
Muramic acid	< 0.001	2.57
25s-inokosterone	< 0.001	2.52
Phloroglucinol	< 0.001	2.48
Nicotinic acid	< 0.001	2.44
L-Pyroglutamic acid	< 0.001	2.17
Betaine	< 0.001	2.12
Leucine	< 0.001	2.03
9-octadecadienoic acid	< 0.001	1.99
Choline	< 0.001	1.90
D-Serine	< 0.001	1.87
L-Glutamic acid	0.002	1.71
α-Cyclodextrin	< 0.001	1.48
Hexadecanamide	0.021	0.80

분석결과를 바탕으로, 관절염 개선 가능성이 있는 유효성분의 특징을 정리함.

Metabolite name	특징
Corticosterone	생체 내에서 나트륨 및 칼륨 수준의 주요 항상성 조절제 중 하나 인 mineralocorticoid aldosterone의 전구체, 스트레스와 관련된 호르몬 성분
D-Glucosamine	골관절염 치료와 관절 기능에 대해서 유효한 보충제 성분
Pyroglutamic acid	건성 피부 및 모발제품에 사용되며 독성이 낮고 피부 자극이 없는 성분
Nicotinic acid	비타민 B3로 불리는 수용성 비티민

대사체 분석시 독성전구체 또는 독성성분은 검출이 안되었으나, 추후에 독성성분 library를 이용한 심도있는 독성성분 대사체변화 연구가 필요할 것으로 판단됨.

다. 전임상 연구 I (제1협동기관: 경희대학교)

퇴행성골관절염(osteoarthritis, OA)은 퇴행적으로 관절 부위에 염증이 발생되어 골조직 및 관절 연골이 손실되고 극심한 만성 통증을 유발하여 고령층의 삶의 질에 심각한 영향을 미치는 장애 중 하나이다. 현재 퇴행성골관절염에 대한 적절한 치료법은 없는 상황이며, 환자는 치료를 받더라도 정상 상태로 회복되지 않는다. 비스테로이드 항염증제(NSAIDs)가 지난 몇 년 동안 사용되어왔지만, 치료 효과는 아직 완벽하지 못하다(Schnitzer 등, 2004). 비스테로이드 항염증제의 장기간 섭취는 심각한 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있어서, 골관절염 장기 치료에 안전하게 사용될 수 있고 연골 보호 및 재생 효능이 있는 천연물에 기인한 신규 기능성 소재 개발이 절실하다. 천연물 기능성 원료 제품은 골관절염 증상 완화 및 예방에 많이 적용되어왔으며, 잠재적인 관절염 치료제 또는 건강기능식품으로써 가능성을 보여 왔다. 특히 전통 한의학에서 골관절염 환자에게 사용되어온 우슬(*Achyranthes japonica* Nakai)은 비스테로이드 항염증제의 대안으로 보고되었다(Han 등, 2005). 한국에서는 우슬이 통증 조절 및 골관절염 환자의 기능 장애 개선에 널리 사용되고 있는 것으로 보고되었다(Hong 등, 2016). 우슬은 inokosterone, ecdysone, oleanolic acid, bisdesmoside 및 saponin류 등, 염증 및 골관절염에 대한 강력한 억제활성을 갖는 것으로 알려진 유효성분을 다량 함유하고 있다(Lee 등, 2012).

당귀(*Angelica gigas*)는 염증 및 압과 같은 다양한 질병에 효과적이라고 보고되어 왔다(Son 등, 2009; Son 등, 2011). 당귀는 coumarin류(Lee 등, 2002), essential oil류(Chi와 Kim, 1988), polyacetylene류(Choi 등, 2000)와 같은 다양한 화합물을 함유하고 있으며, coumarin 중 decursin 및 decursinol angelate와 같은 pyranocoumarin류는 약리학적 특성 때문에 상당한 주목을 받았다(Lee 등, 2003). 특히, decursin의 항염증 및 항암활성은 광범위하게 연구 보고되어왔다(Kim 등, 2006; Ma 등, 2009).

두충(*Eucommia ulmoides*)은 lignan, iridoid, phenol, steroid, flavonoid 및 기타 화합물과 같은 다양한 종류의 화학 성분을 함유하는 천연물이다. 두충은 항산화, 항염증, 항알레르기,

항균, 항암 등과 같은 여러 가지 약리학적 성질이 보고되어 왔으며, 염증 질환을 치료하기 위해 단독으로 또는 다른 천연물과 혼합처방되어 광범위하게 사용되어 왔다(Hussain 등, 2016).

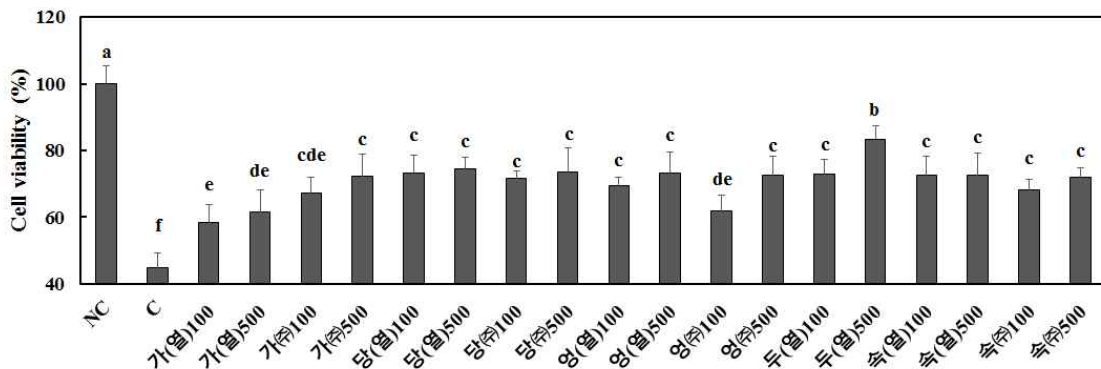
선행 연구를 통하여, 발효된 우슬 추출물이 RAW264.7 세포주 실험에서 LPS로 유도된 NO 발생을 효과적으로 소거하는 것을 확인하였다. 또한, Sprague Dawley(SD) rat을 이용한 골관절염 유발 동물모델에서 TNF- α , IL-1 β 의 농도를 감소시키며, 연골조직내 collagen matrix를 손상시켜 퇴행성관절염을 악화시키는 것으로 알려진 matrix metalloproteinases(MMPs)의 발현을 감소시킴으로 항염 및 항골관절염 효과를 보였다(Kang 등, 2017). 추가적으로, 복합 소재 후보군의 항염 활성 스크리닝을 통하여 높은 활성을 나타낸 당귀와 두충을 발효우슬과 복합물로 구성하여 연구를 진행하게 되었다.

(1) 발효우슬 및 복합물 제조 원료 screening

(가) 관절강내 세포 회복(재생) 실험

① 발효우슬이 관절강내 세포 손상 억제효능

- MH7A세포에 H₂O₂ 300 uM 2시간 처리한 후 세포 손상에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 통하여 세포생존률을 확인. 골관절염 실험에 대한 in vitro 모델은 LPS 또는 H₂O₂로 염증을 유발하는 것이 일반적으로 알려짐. 골관절염의 경우 연골세포의 사멸 억제와 세포 재생에 초점이 맞추어져 있으며, 단순 염증유발의 경우 LPS로 충분하지만 세포사멸을 유도하기 위해서는 H₂O₂처리 후 실험을 진행하는 것이 적절할 것으로 판단되어, H₂O₂에서 2시간 처리한 MH7A세포에서 발효우슬이 미치는 영향을 관찰.
- 그 결과, H₂O₂처리에 의해 감소된 세포생존률이 발효우슬추출물 처리에 의해 유의적으로 증가되었음을 확인. 그 중 두충 열수 추출물이 500 ug/mL을 처리한 군이 유의적으로 가장 높은 세포생존률을 보임(p<0.05).



[H₂O₂처리한 MH7A세포에서 발효우슬추출물이 세포 손상 억제에 미치는 영향]

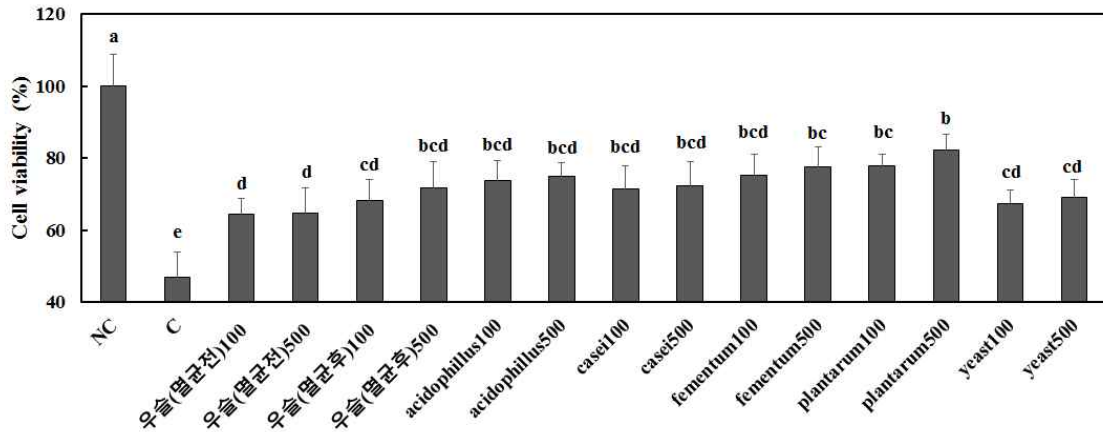
② 복합물 제조 원료가 관절강내 세포 손상 억제효능

- 본 연구에서 복합물 제조에 들어갈 후보원료 추출물인 가시오가피 열수 추출물(가(열)), 가시오가피 주정 추출물(가(주)), 당귀 열수 추출물(당(열)), 당귀 주정 추출물(당(주)), 영경귀열수 추출물(영(열)), 영경귀 주정 추출물(영(주)), 두충 열수 추출물(두(열)), 속단 열수 추출물(속(열)), 속단 주정 추출물(속(주))이 H₂O₂처리한

MH7A세포에서 세포손상 억제에 미치는 영향을 확인.

- 그 결과, 모든 원료 추출물의 처리가 세포생존률을 유의적으로 증가시켰음을 확인.

그 중 Plantarum 500 ug/mL을 처리한 군이 가장 높은 생존률을 보임($p < 0.05$).



[H₂O₂처리한 MH7A세포에서 복합물 제조 원료가 세포 손상 억제에 미치는 영향]

(나) 염증 cytokine 측정

① 발효우슬이 TNF-alpha발현에 미치는 영향

- Cytokine은 세포에서 분비되는 수용성 단백질로 특정신호물질에 의해 발현되며 효소와는 구별되게 주변 세포에 의해 영향을 받으며 반감기가 매우 짧아 그 작용하는 범위도 cytokine이 분비되는 인접한 세포들로 국한되는 특징을 가짐.

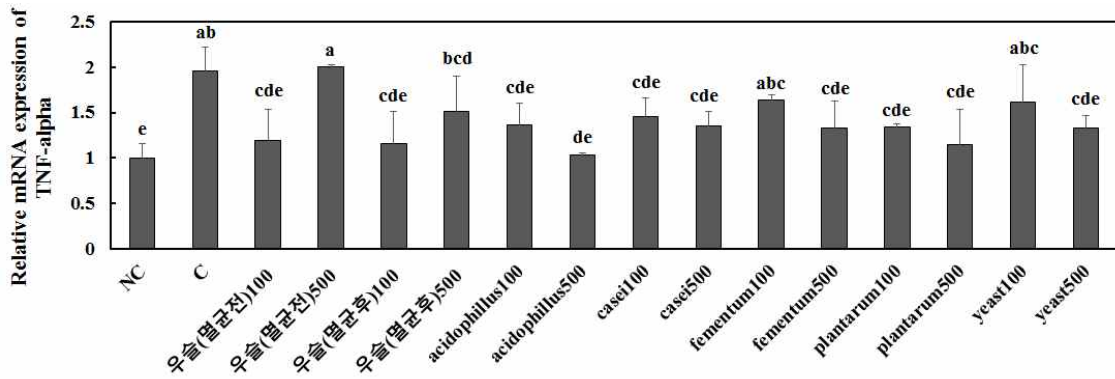
관절염에 있어서 항염증(Pro-inflammatory) cytokine으로 알려져 있는 IL-1 β , IL-6, TNF-alpha는 연골세포조직의 이화작용에 영향을 주는 cytokine으로 알려짐.

IL-1 β 은 연골세포조직의 이화작용에서 MMPs(금속단백분해효소)의 발현을 유도하고 TGF- β 가 연골세포를 증식시키도록 하는 것을 방해. 퇴행성관절염에서는

연골세포가 IL-1 β 수용체를 2배 이상 발현하고 연골생성에 관련된 유전 인자의 합성을 저해한다고 보고됨. TNF-alpha는 연골세포에서 IL-1 β 과 비슷한 역할을 하며,

골관절염이 진행되면서 TNF-alpha수용체가 연골세포와 관절강 조직세포에서 발현되는 것으로 알려짐. 또한 이러한 TNF-alpha는 연골세포, 파골세포 등을 자극하여 IL-6 같은 염증성 사이토카인의 생성을 촉진, 골관절염에서 연골파괴의 주요 인자로 알려짐.

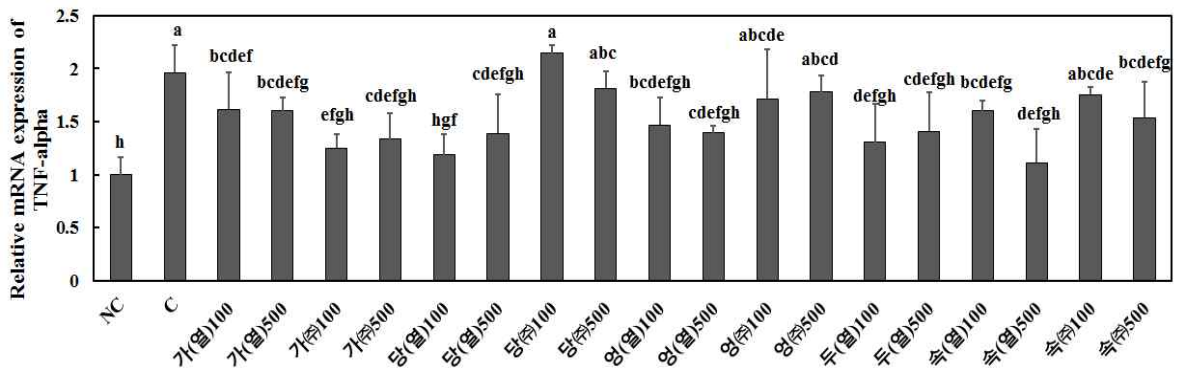
- 본 연구에서 MH7A세포에 H₂O₂처리하였을 때(C, control) TNF-alpha mRNA 발현이 증가되었음을 확인. 하지만 우슬(멸균전) 500 ug/mL을 처리한 군과 yeast발효 우슬 100 ug/mL을 처리한 군을 제외한 모든 군에서 control군과 비교하여 유의적으로 TNF-a발현이 감소되었음을 확인. 또한 H₂O₂처리와 함께 우슬(멸균전) 100 ug/mL, 우슬(멸균후) 100 ug/mL, Acidophilus 100 ug/mL와 500 ug/mL, Caseic 100 ug/mL와 500 ug/mL, Fermentum 500 ug/mL, Plantarum 100 ug/mL와 500 ug/mL, Yeast 500 ug/mL을 처리한 군에서는 정상군(NC, normal control)과 비교하여 유의적인 차이가 없음($p < 0.05$).



[H₂O₂처리한 MH7A세포에서 발효우슬추출물이 TNF-alpha mRNA 발현에 미치는 영향]

② 복합물 제조 원료가 TNF-alpha 발현에 미치는 영향

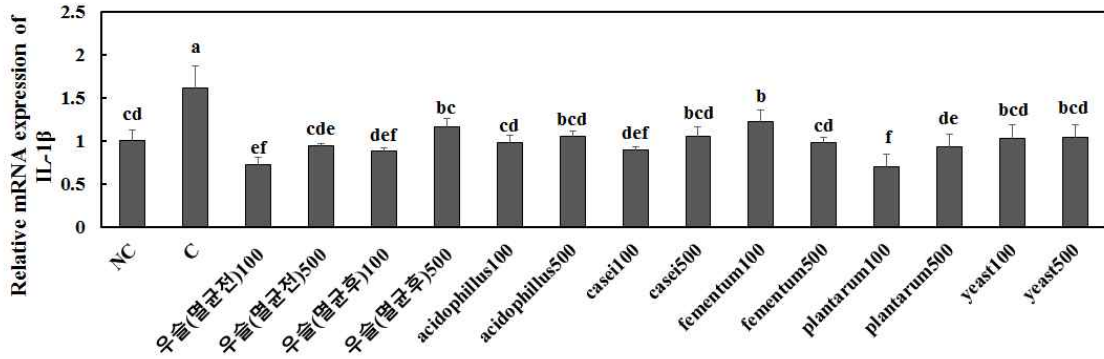
- 복합물 제조에 들어갈 원료 추출물인 가시오가피 열수 추출물 (가(열)), 가시오가피 주정추출물(가(주)), 당귀 열수 추출물(당(열)), 두충 열수 추출물(두(열)), 엉겅퀴 열수 추출물(엉(열)) 속단 열수 추출물(속(열)), 속단 주정 추출물(속(주))이 H₂O₂처리한 MH7A세포에 TNF-alpha mRNA 발현에 미치는 영향을 확인. 가시오가피 주정 추출물 100 ug/mL과 500 ug/mL, 당귀 열수 추출물 100 ug/mL과 500 ug/mL, 속단 열수 추출물 100 ug/mL과 500 ug/mL, 엉겅퀴 열수 추출물 500 ug/mL, 엉겅퀴 주정 추출물 500 ug/mL을 처리한 군에서 H₂O₂처리한 MH7A세포에서 증가된 TNF-alpha 발현을 유의적으로 감소시켰음을 확인(p<0.05).



[H₂O₂처리한 MH7A세포에서 복합물 제조 원료가 TNF-alpha mRNA 발현에 미치는 영향]

③ 발효우슬이 IL-1β 발현에 미치는 영향

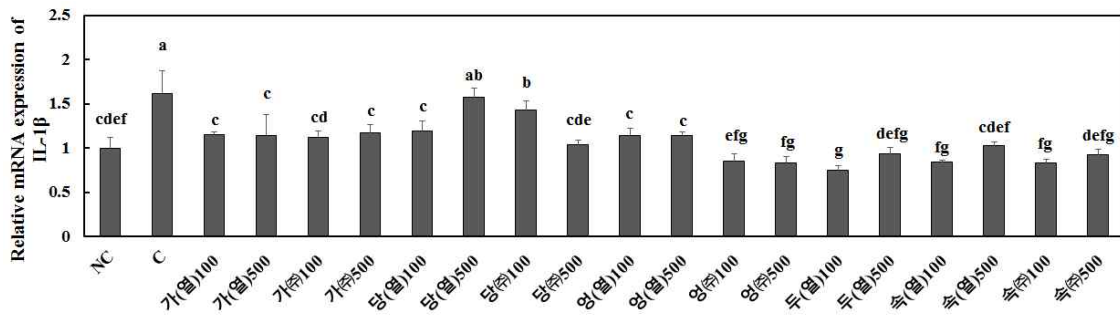
- MH7A세포에 H₂O₂처리하였을 때(C, control) 증가된 IL-1β mRNA 발현이 모든 발효우슬추출물의 처리에 의해 유의적으로 감소되었음을 확인. 그 중 *L. plantarum*으로 발효한 우슬은 저농도 처리임(*L. plantarum* 100)에도 불구하고 유의적으로 가장 IL-1β 발현이 낮아졌음을 확인(p<0.05).



[H₂O₂처리한 MH7A세포에서 발효우슬추출물이 IL-1β mRNA 발현에 미치는 영향]

④ 복합물 제조 원료가 IL-1β발현에 미치는 영향

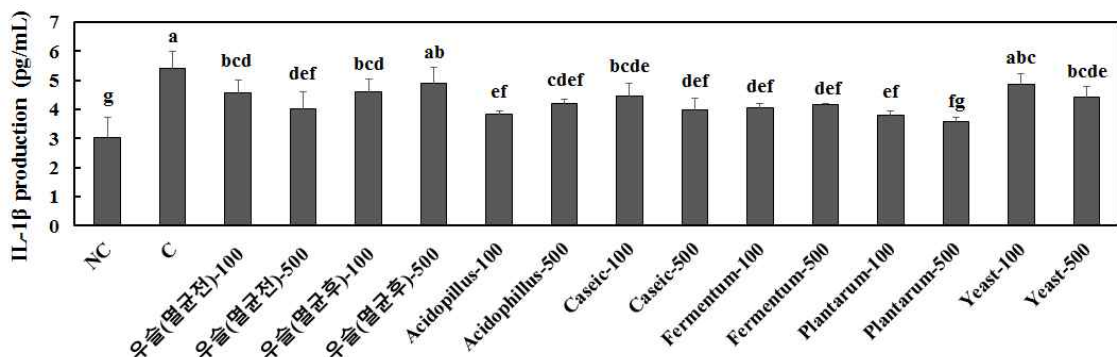
- MH7A세포에 H₂O₂처리하였을 때(C, control) 증가된 IL-1β mRNA 발현이 당귀 열수 추출물500 ug/mL 처리를 한 군을 제외한 모든 처리군에서 유의적으로 감소되었음을 확인(p<0.05).



[H₂O₂처리한 MH7A세포에서 복합물 제조 원료가 IL-1β mRNA 발현에 미치는 영향]

⑤ 발효우슬이 IL-1β분비에 미치는 영향

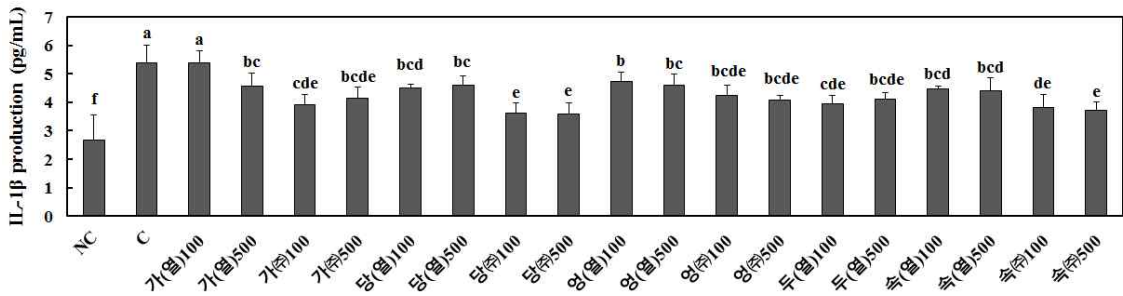
- MH7A세포에 H₂O₂처리하였을 때(C, control) 증가된 IL-1β분비가 우슬(멸균후) 500 ug/mL과 Yeast 100 ug/mL을 제외한 모든 처리군에서 유의적으로 감소되었음을 확인. 그 중 *L. plantarum*으로 발효한 우슬 500 ug/mL 처리한 군은 정상군(NC, Normal control)과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 IL-1β분비를 가장 크게 감소(p<0.05).



[H₂O₂처리한 MH7A세포에서 발효우슬추출물이 IL-1β분비에 미치는 영향]

⑥ 복합물 제조 원료가 IL-1β분비에 미치는 영향

- MH7A세포에 H₂O₂처리하였을 때(C, control) 증가된 IL-1β분비가 가시오가피 열수 추출물 100 ug/mL 처리를 한 군을 제외한 모든 처리군에서 유의적으로 감소되었음을 확인. 그 중 당귀 주정 추출물(당(주))과 속단 주정 추출물(속(주))을 처리한 군이 유의적으로 가장 낮은 IL-1β분비를 나타냈음을 확인(p<0.05).

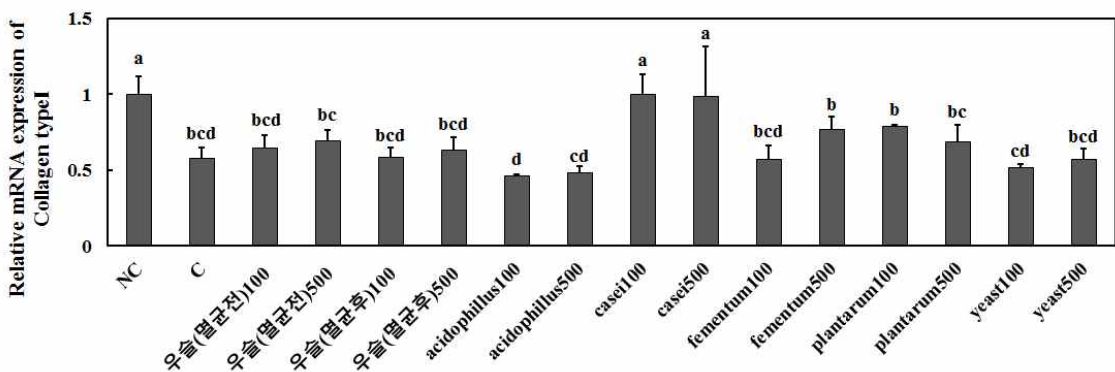


[H₂O₂처리한 MH7A세포에서 복합물 제조 원료가 IL-1β분비에 미치는 영향]

(다) 연골인자의 측정

① 발효우슬이 collagen type I 발현에 미치는 영향

- 완충 역할을 통해 관절을 보호하는 연골의 대표 구성 성분인 collagen mRNA 발현을 측정함으로써 추출물들이 관절염 억제에 미치는 영향을 확인. MH7A세포에 H₂O₂처리 하였을때(C, control) 감소된 collagen type I mRNA 발현이 *L. casei* 발효 우슬 100ug/mL과 500ug/mL을 처리한 군에서 유의적으로 증가되었음을 확인 (p<0.05).

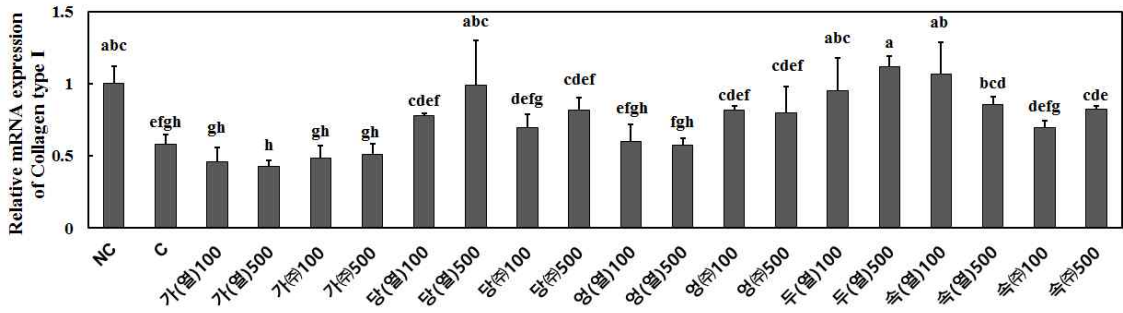


[H₂O₂처리한 MH7A세포에서 발효우슬추출물이 collagen type I mRNA 발현에 미치는 영향]

② 복합물 제조 원료가 collagen type I 발현에 미치는 영향

- MH7A세포에 H₂O₂처리하였을 때(C, control) 감소된 collagen type I mRNA 발현이 당귀열수 추출물 500 ug/mL, 두충 열수 추출물 100 ug/mL과 500 ug/mL, 속단 열수 추출물 100 ug/mL과 500 ug/mL을 처리한 군에서 유의적으로 증가되었음을 확인

(p<0.05).



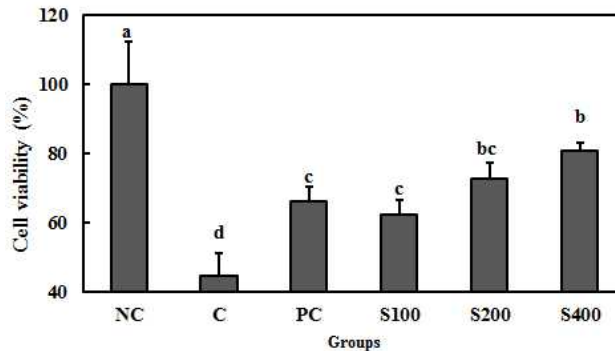
[H₂O₂처리한 MH7A세포에서 복합물 제조 원료가 collagen type I mRNA 발현에 미치는 영향]

(2) 발효우슬복합추출물 *in vitro* 효능 평가

(가) Chondrocytes의 세포 회복(재생) 실험

① 발효우슬이 관절강내 세포 손상 억제효능

- 본 연구에서는 Rat연골에서 Primary culture를 통해 얻은 chondrocytes를 이용하여 발효우슬복합물이 H₂O₂처리에 의한 세포 손상을 억제하는 효능이 있는지 확인. 그 결과 H₂O₂ 처리에 의해 유의적으로 감소된 세포생존률이 발효우슬복합물 처리에 의하여 농도의존적으로 증가되었음을 확인(p<0.05).



[H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 발효우슬복합물이 세포 손상 억제에 미치는 영향]

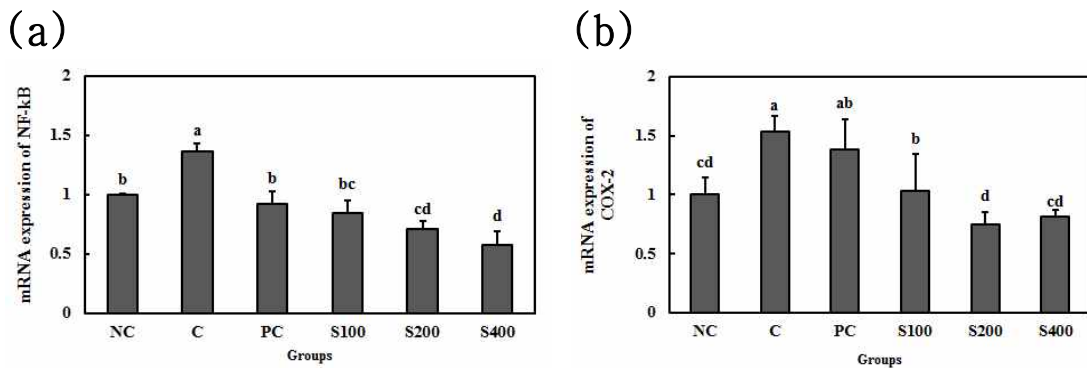
(나) 염증 cytokine 측정

① 발효우슬복합물이 NF-κB와 COX-2 발현에 미치는 영향

- NF-κB는 면역과 염증 반응 관련 여러 인자의 transcription factor로, 염증 관련 cytokine과 염증 효소 등의 전사를 조절하는 인자로 알려짐. 대부분의 염증반응은 COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 염증유발 사이토카인이 관련된 것으로 알려

집. 활성화된 NF-κB는 핵으로 이전하여 TNF-α를 생성시키는데 이렇게 생성된 TNF-α는 다시 NF-κB를 재활성화 시키는데 이용되어 COX-2를 유전적으로 합성하여 염증반응을 가속화시키는 것으로 알려짐. 따라서 TNF-α의 적절한 생성 조절은 염증반응을 조절하는 중요한 인자로 인식. 또한 골관절염의 경우 관절강 내에서 대식세포 등에 의한 일련의 염증반응으로 TNF-α와 COX-2 등이 과다 생성되는 것으로도 알려짐.

- 본 연구에서는 Rat연골에서 Primary culture를 통해 얻은 chondrocytes를 이용하여 발효우슬추출복합물이 NF-κB와 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰. 그 결과 H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 유의적으로 증가된 NF-κB와 COX-2 발현이 발효우슬추출복합물의 처리에 의해 유의적으로 감소되었음을 확인 하였으며, 높은 농도를 처리하였을 때 가장 유의적으로 낮은 NF-κB와 COX-2 발현을 보였음을 확인.
- 이러한 감소는 양성대조군(PC, positive control)보다 유의적으로 낮아 발효우슬추출복합물이 염증인자를 감소시키는 효능이 있음을 확인(p<0.05).

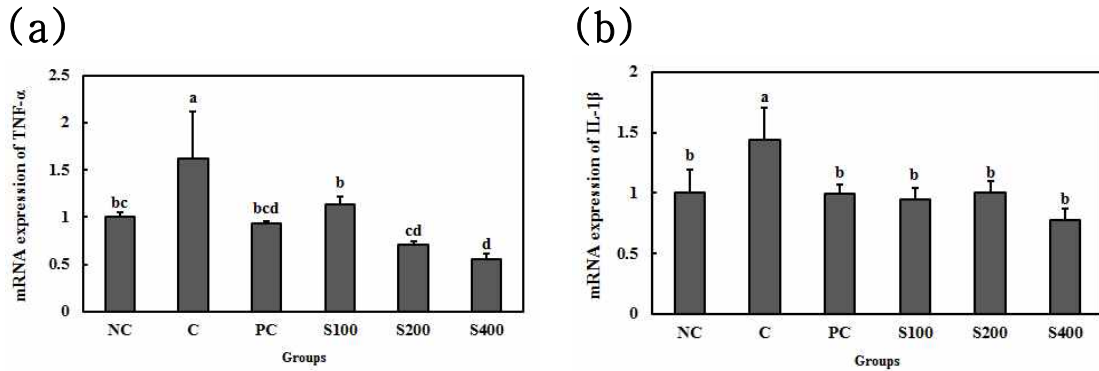


[H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 발효우슬추출복합물이 NF-κB와 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향]

② 발효우슬추출복합물이 염증성 cytokine(TNF-α와 IL-1β)발현에 미치는 영향

- H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 유의적으로 증가된 TNF-α와 IL-1β mRNA 발현이 발효우슬추출복합물의 처리에 의해 유의적으로 감소되었음을 확인. TNF-α의 mRNA 발현에서는 발효우슬추출복합물 농도의존적으로 발현이 감소되었음을 확인.

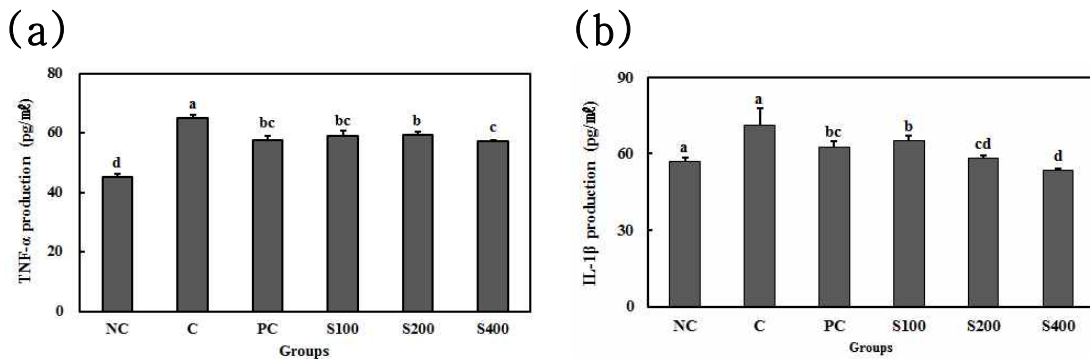
IL-1β mRNA 발현에서는 발효우슬추출복합물의 감소 효능이 양성대조군 (PC, positive control) 효능과 유의적인 차이를 보이지 않았음을 확인(p<0.05).



[H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 발효우슬추출복합물이 염증성 cytokines mRNA 발현에 미치는 영향]

③ 발효우슬추출복합물이 염증성 cytokine(TNF-alpha와 IL-1β)분비에 미치는 영향

- TNF-alpha와 IL-1β mRNA 발현 결과와 마찬가지로 H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 유의적으로 증가된 TNF-alpha와 IL-1β 분비가 발효우슬추출복합물의 처리에 의해 유의적으로 감소되었음을 확인. TNF-alpha와 IL-1β 분비 모두 발효우슬추출복합물의 고농도에서 가장 유의적으로 낮아졌음을 확인(p<0.05). 따라서 H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 염증인자 분비를 감소시킨 발효우슬추출복합물은 관절염발생을 억제시킬 수 있을 것으로 기대.



[H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 발효우슬추출복합물이 염증성 cytokines 분비에 미치는 영향]

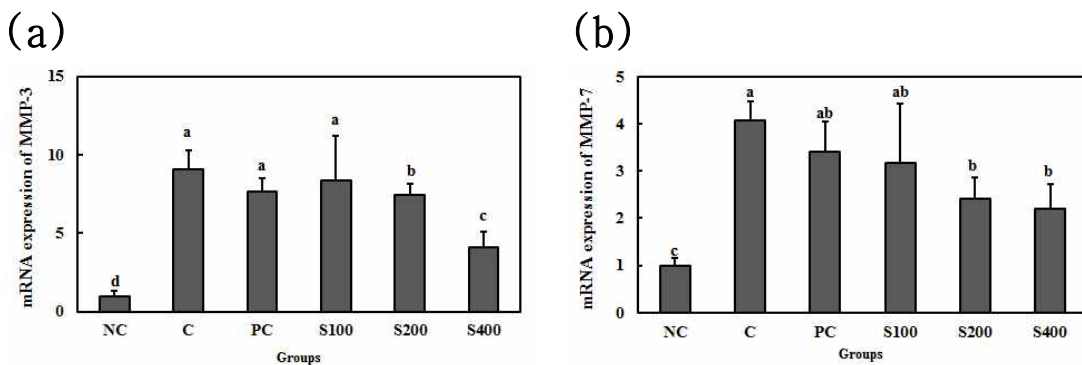
(다) 연골인자의 측정

① 발효우슬추출복합물이 MMPs(MMP-3와 MMP-7) 발현에 미치는 영향

- 관절염의 발생에 있어서 단백질 가수분해 효소(proteolytic enzymes)는 연골질의 퇴화에 가장 핵심적인 역할을 하며 그 중 가장 대표적인 것이 matrix

metalloproteinases(MMPs, 금속단백분해효소). MMP-3(Stromelysin)는 proteoglycan의 퇴화에 결정적인 역할을 하는 금속단백분해효소이며 관절강 내 MMP-3 level의 증가는 심각한 연골손상과도 연관 지을 수 있음. 금속단백분해효소의 활성화는 촉진제(activator)와 억제제(inhibitor)에 의해 조절되는데, 금속단백분해효소의 억제에 관여하는 것이 TIMPs(tissue inhibitors of metalloproteinases)로 TIMPs는 관절의 연골세포인 chondrocytes에서 분비가 됨. 정상적인 기능의 chondrocytes는 MMPs와 inhibitor인 TIMPs가 균형을 이루게 하는 기능을 하게 되는데 염증이 일어나는 세포에서는 MMPs가 불균형적으로 증가하게 되어 골 및 연골의 기질 구성요소를 파괴하게 됨.

- 본 연구에서는 Rat연골에서 Primary culture를 통해 얻은 chondrocytes를 이용하여 발효우슬복합물이 MMP-3와 MMP-7 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰. 그 결과 H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 유의적으로 증가된 MMP-3와 MMP-7 mRNA 발현을 관찰. 양성대조군(PC, positive control)에서는 H₂O₂처리한 군(C, control)과 유의적은 차이가 없었지만, 발효우슬추출복합물을 처리한 군에서는 MMP-3와 MMP-7 mRNA 발현을 감소시켰음을 확인. MMP-3발현에서는 발효우슬추출복합물이 농도의존적으로 발현을 감소시켰으며, MMP-7 발현에서는 발효우슬추출복합물 200ug/mL과 400ug/mL처리한 군에서 유의적으로 감소(p<0.05).



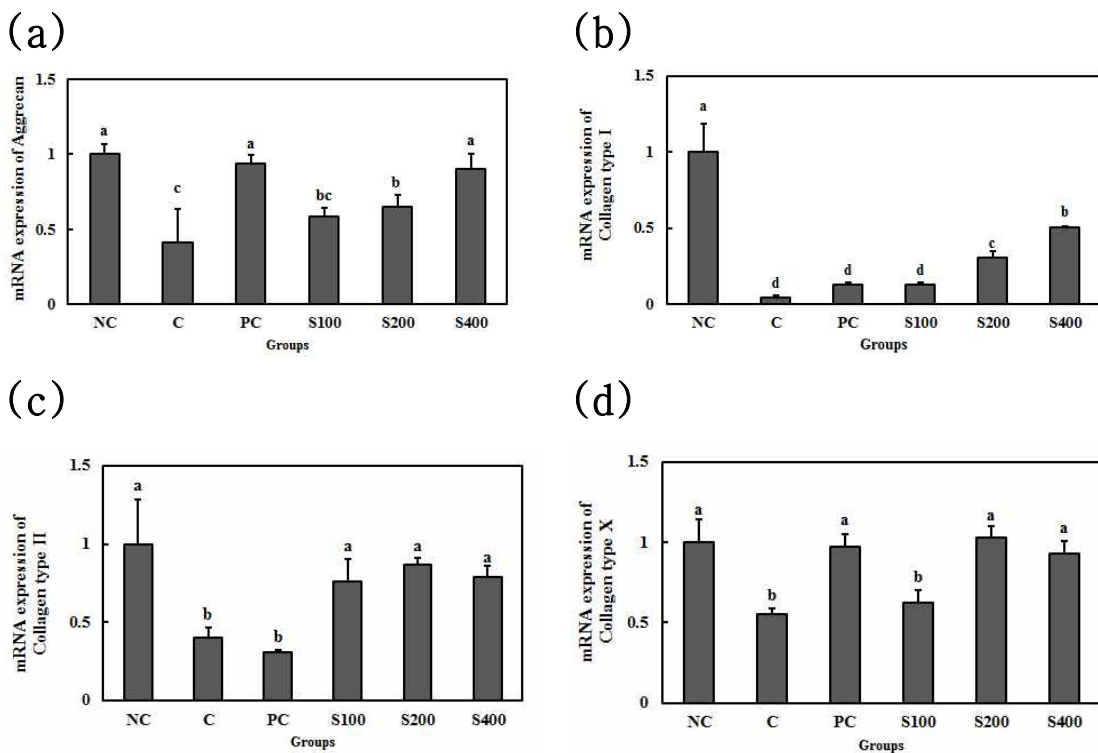
[H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 발효우슬추출복합물이 MMPs mRNA 발현에 미치는 영향]

② 발효우슬추출복합물이 aggrecan과 collagen mRNA 발현에 미치는 영향

- 연골세포 조직의 생리학·물리학 작용을 유지시키는 것은 조직의 동화작용(anabolism)과 이화작용(catabolism)의 균형에 의한 것으로 인식. 동화작용에 관여하는 것으로는 collagens, 금속단백분해효소 조직 억제(tissue inhibitors of metalloprotenases, TIMPs), aggrecan을 포함하는 proteoglycan 등이 해당되는 반면 이화작용에는 금속단백분해효소(metalloproteinase; MMP), nitric oxide(NO), TNF-alpha, collagenase, aggrecanase 등이 해당. Collagen type I 은 연골세포뿐만

아니라 일반적으로 인체세포에서 가장 많이 분포하고 있으며, collagen type II는 연골조직 단백질의 50%를 차지하고 연골에 분포하고 있는 collagen 종류중 약 85~90%를 차지하고 있는 주요 단백질임. 따라서 collagen type I 과 II의 형성은 연골조직의 상태를 결정하는 중요한 인자임.

- 본 실험에서 동화작용 인자로서 aggrecan과 collagen type I, II, X의 mRNA발현을 H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 관찰. 그 결과 H₂O₂처리한 primary chondrocyte aggrecan과 collagen type I, II, X의 모든 mRNA발현이 유의적으로 감소되었음을 확인. 하지만 발효우슬추출복합물의 처리가 감소된 aggrecan과 collagen type I의 발현을 농도 의존적으로 증가시켜주었으며, collagen type II 발현은 발효우슬추출복합물 모든 농도에서 유의적으로 증가되었음을 확인. Collagen type X의 발현은 발효우슬추출복합물 200ug/mL에서 유의적으로 증가(p<0.05).



[H₂O₂처리한 primary chondrocyte에서 발효우슬추출복합물이 aggrecan과 collagen mRNA 발현에 미치는 영향]

(2) 관절염 동물모델을 이용한 항관절염 연구
(가) 동물처리

관절염 유발에 사용된 동물은 (주)새론바이오에서 250 g 내외의 생후 5주 된 male SD rat을 공급받았음. 명암은 12시간(light/dark cycle), 온도는 23±2°C, 상대습도는 50±5%인 조건에서 1주 동안 적응기를 거쳐 실험에 이용하였음. 적응기간 동안 AIN-93G 식이

와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 체중을 측정하여 평균체중에 가까운 개체를 무작위 법으로 8마리씩 5군으로 분리하였음. 본 연구는 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였음. (KHUASP(SE)-17-041)

Table 1. Experimental design animals (n=8/group)

Groups	Induced arthritis	Dietary administration	Orally administration
Normal	-	AIN 93G diet	
Control	+	AIN 93G diet	
PC	+	AIN 93G diet	MSM 300 mg/kg
S100	+	AIN 93G diet	발효우슬추출복합물 100 mg/kg
S300	+	AIN 93G diet	발효우슬추출복합물 300 mg/kg

(나) 식이제작 및 사료투여

발효우슬추출복합물 제공에 따른 관절염 예방 및 연골보호 효과를 관찰하기 위해 관절염 유발 1주일전부터 발효우슬추출복합물을 관절염 유발 1주일 전부터 100 mg/kg b.w.과 300 mg/kg b.w.을 진행하였음. 양성대조군(Positive control, PC)으로 MSM은 300 mg/kg b.w. 농도로 비교 실험 하였음. 정상대조군(Normal control NC) 및 MIA로 관절염을 유도한 유도군(Control)은 AIN93G를 제공하였음.

(다) MIA 주사를 통한 관절염 모델

6주령의 male SD Rat을 이용하며 이소플루란을 가지고 호흡기기를 이용하여 마취시켰음. 마취시킨 Rat의 무릎 주변을 제모하고 골관절염 유발물질인 MIA (Sigma-aldrich, St Louis, MO, USA)를 1mL 주사기로 양쪽 무릎 관절강 내에 50ul (60mg/ml)씩 주사하였음. MIA 희석시에는 saline 용액을 사용하고 약물 주사 7일 후에 관절부위 부종 정도와 실험동물의 걷는 상태를 관찰하여 관절염 유발 확인 후 실험을 진행하였음.

(라) 채혈 및 장기적출

실험 동물은 12시간 절식 시킨 후 마취시켜 회복하여 복대동맥을 통해 채혈하였음. 채혈 전 주사기와 tube에 10% EDTA solution을 충분히 적셔 혈액응고를 방지하였음. 장기(간, 신장, 비장)를 적출한 다음 중량을 측정하였음.

(마) PGE₂ 및 cytokine 분비량 측정

관절염 유발 실험동물을 희생 후 얻은 혈액을 원심분리하여 serum을 얻어 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)의 Prostaglandin E2 Assay kit를 이용하여 R&D Systems의 protocol을 따라서 실험을 하였으며, ELISA reader(Bio-rad, California, USA)를 이용하여 655 nm에서 흡광도를 측정하였음.

(바) 골관절염 형태학적 평가

관절염 유발 4주 후에 희생시킨 SD rat의 뒷다리의 슬관절 부위를 10% formalin (sigma, USA)에 1일 동안 고정시킨 후, 이것을 Calci-Clear Rapid (National diagnostics, Georgia, USA)에 24시간 동안 탈회한 후 다시 10% formalin에 2일간 고정하여 파라핀에 포매한 다음 미세절단기를 이용하여 박절함. 파라핀에 고정한 슬관절 조직을 7 μ m의 크기로 잘라 슬라이드를 제작하였고, Hematoxyline & Eosin (H&E) 염색을 통해 염증반응 발생 유무 나 활막세포의 증식, 염증세포의 조직침윤 여부를 확인하였음. 염색 된 슬라이드는 조직절편을 Olympus IX71 (Olympus, Japan) 광학현미경으로 관찰하고 Olympus 6LH100HG (Olympus, Japan) 디지털 카메라로 촬영하였음.

(사) Real-Time Polymerase Chain Reaction에 의한 유전자 발현 측정

관절염 유발 실험동물 희생 후, 동물에서 분리한 연골세포를 1 mL Trizol (QIAZEN)에 보관하여 200 μ L Chloroform을 넣어 상층액을 수거하여 RNA 추출 및 cDNA 합성 과정을 거쳐 유전자 발현을 측정하였음. 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 hot start 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 15초간, 55 $^{\circ}$ C에서 15초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 40 cycling 으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 95 $^{\circ}$ C 15초간 polishing step을 거쳐 PCR 분석을 시행하였음. 반응에 사용한 Primer는 Table 3에 제시하였음.

Table 2. Primer set sequence used for Real-Time PCR

Sequence Name	Forward Sequence	Reverse Sequence
GAPDH	TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C	CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT
Aggrecan	GAA GTG GCG TCC AAA CCA A	CGT TCC ATT CAC CCC TCT CA
Collagen Type I	GAG CGG AGA GTA CTG GAT CGA	CTG ACC TGT CTC CAT GTT GCA
Collagen Type II	GCA ACA GCA GGT TCA CGT ACA	TCG GTA CTC GAT GAT GGT CTT G
MMP-3	GAG TGT GGA TTC TGC CAT TGA G	TTA TGT CAG CCT CTC CTT CAG AGA
MMP-7	ACT CTA GGC CAT GCC TTT GC	CCA TCC GTC CAG TAC TCA TCC T
NF-kB	GCA CCA AGA CCG AAG CAA TT	GAA ACC CCA CAT CCT CTT CCT T
IL-1β	GGC TTC GAG ATG AAC AAC AAA AA	GTC CAT TGA GGT GGA GAG CTT T
TNF-α	ACA AGG CTG CCC CGA CTA T	CTC CTG GTA TGA AGT GGC AAA TC
COX2	AGA GAA AGA AAT GGC TGC AGA GTT	AGC AGG GCG GGA TAC AGT

(아) 통계처리

실험 결과는 SPSS 22.0 software(IBM, cambridge, MA, USA)를 이용하여 분석하였으며, 모든 측정 항목의 결과는 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였음. 실험군간 평균 차이를 one-way ANOVA로 확인한 후 그룹간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test를 이용하여 검증 하였으며 5% 이내에서 통계적 유의성을 부여하였음(p<0.05).

(3) 결과

(가) 실험동물의 체중변화, 식이효율 및 장기무게에 미치는 영향

실험기간 동안 사료를 투여한 후 동물의 체중변화, 식이효율 및 장기무게에 미치는 영향을 측

정한 결과는 Table 3에 나타내었음.

MIA를 투여한 control (C)군이 정상대조군(normal control, NC)에 비해 weight gain이 유의적으로 감소하였고, MSM을 투여한 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군(S100, S300)은 C군에 비해 증가하는 경향은 있으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 식이섭취량, 식이효율 및 장기무게는 실험 군간의 유의적인 차이가 나타나지 않았음을 확인하였음.

Table 3. Body weight gain, food efficiency ratio, and organ weight of experimental animals for 4 weeks

Measurements	NC	Induced Arthritis			
		C	PC	S100	S300
Weight gain (g)	278.40±44.08 ^a	239.36±16.12 ^b	264.16±15.55 ^{ab}	252.29±20.14 ^{ab}	272.19±37.12 ^{ab}
Food consumption (g/day)	22.67±3.08 ^{ns}	20.11±4.23	22.59±3.45	21.54±3.80	22.66±3.04
FER	34.02±5.39 ^{ns}	32.84 ± 2.21	32.38 ± 1.91	32.39 ± 2.58	33.27 ± 4.54
Liver (g)	2.75±0.30 ^{ns}	2.59 ± 0.13	2.67 ± 0.06	2.62 ± 0.16	2.57 ± 0.10
Kidney (g)	0.65±0.06 ^{ns}	0.67 ± 0.04	0.65 ± 0.03	0.66 ± 0.04	0.63 ± 0.05
Spleen (g)	0.17±0.03 ^{ns}	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.03

Values are presented as means ± SD. Different letters show a significantly difference at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

¹⁾ NC : AIN93M, C : AIN93M + MIA injection group, PC : AIN93M + MIA injected group supplemented MSM 300 mg/kg b.w., S100 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 100 mg/kg b.w., S300 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 300 mg/kg b.w.,

²⁾Weight gain (g/8weeks) = final body weight (g) -initial body weight (g)

³⁾FER (Food efficiency rate) = {weight (g) / food intake (g)} * 100

(나) 혈청 PGE₂ 분비량 측정

PGE₂는 염증반응에서 TNF-α 등에 의해 영향을 받아 생산되고 골관절염 발병 시 관절연골 degradation에 관여하는 인자임. 또한 osteophyte을 형성하여 비정상적인 골 성장 및 통증을 나타내며 이러한 증상은 퇴행성관절염에서 흔히 발생하는 것으로 알려져 있음.

실험기간 동안 사료를 투여한 후 혈청 PGE₂에 미치는 영향을 측정된 결과는 Fig.1에 나타내었음. C군의 혈청 PGE₂ 수준은 정상대조군에 비해 318.49% 유의적으로 증가하여 염증이 발생되었음을 확인하였고, MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군 섭취군인 S100, S300군의 혈청 PGE₂ 수준은 C군에 비해 46.51%, 23.13%, 42.19% 감소하였음. 특히, PC군과 S300군은 C군과 유의적인 차이가 있었음.

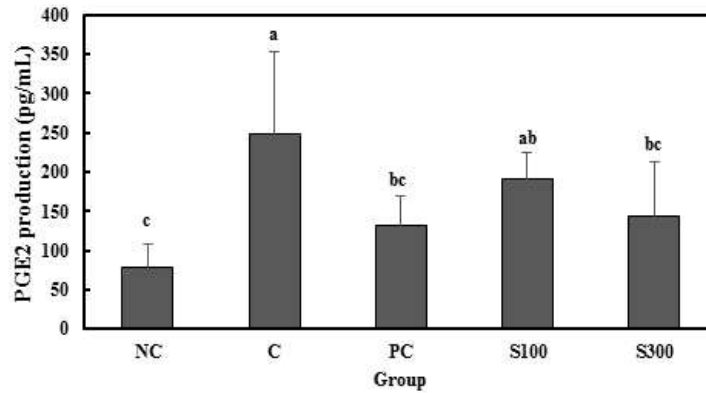


Fig.1. Inhibitory effects of 발효우슬추출복합물 on serum PGE2 levels.

Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

NC : AIN93M, C : AIN93M + MIA injection group, PC : AIN93M + MIA injected group supplemented MSM 300 mg/kg b.w., S100 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 100 mg/kg b.w., S300 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 300 mg/kg b.w..

(다) 혈청 pro-inflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 측정

Cytokines은 세포들에서 분비되는 수용성 단백질로 특정 신호물질에 의해 발현되며 cytokines은 효소와는 구별되게 주변 세포에 의해 영향을 받고, cytokines은 그 반감기가 매우 짧아 그 작용하는 범위도 cytokines이 분비되는 인접한 세포들로 국한됨. Interleukin(IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor(TNF)- α 은 chondrocytes의 이화작용에 영향을 주는 cytokines임. IL-1 β 연골생성에 관련된 collagen II와 proteoglycan의 합성을 저해하고 퇴행성관절염인 chondrocytes에서는 IL-1 β 이 정상 chondrocytes보다 2배의 IL-1 β receptor가 존재하며 TNF- α 는 chondrocyte에 IL-1 β 과 비슷한 역할을 함.

실험기간 동안 사료를 투여한 후 혈청 cytokines(IL-1 β , IL-6, TNF- α)에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig.2에 나타내었음. 관절염 유발군(C)의 혈청 IL-1 β 수준은 정상대조군(NC)에 비해 213.66% 유의적으로 증가하였고, MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군의 혈청 IL-1 β 수준은 C군에 비해 각각 9.46%, 22.19%, 23.79% 감소하였고, 특히 S300군은 C군과 유의적인 차이가 나타남을 확인하였음. 관절염 유발군(C)의 혈청 IL-6 수준은 정상대조군(NC)에 비해 252.83% 유의적으로 증가하였고, MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군의 혈청 IL-6 수준은 C군에 비해 각각 73.39%, 27.10%, 43.43% 유의적으로 감소하였음. 관절염 유발군(C)의 혈청 TNF- α 수준은 NC군에 비해 153.83% 유의적으로 증가하였고, MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군의 혈청 TNF- α 수준은 C군에 비해 각각 25.96%, 17.79%, 32.04% 유의적으로 감소하였고, 특히 PC군과 S300군은 NC군과 비슷한 수준으로 감소하였음을 확인하였음. 이러한 결과로 미루어 볼 때 발효우슬추출복합물의 섭취가 관절염으로 인해 증가된 혈청 pro-inflammatory cytokines(IL-1 β , IL-6, TNF- α)을 감소시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었음.

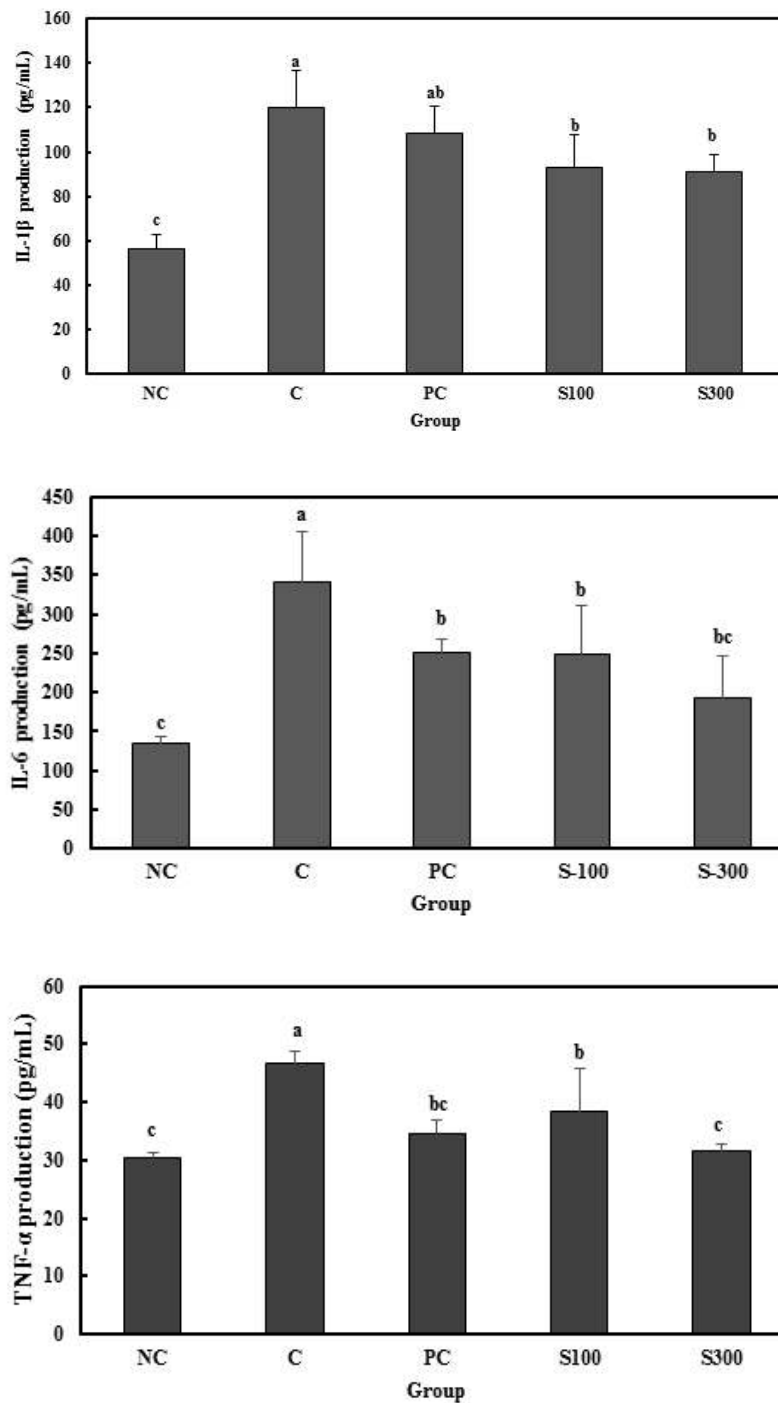
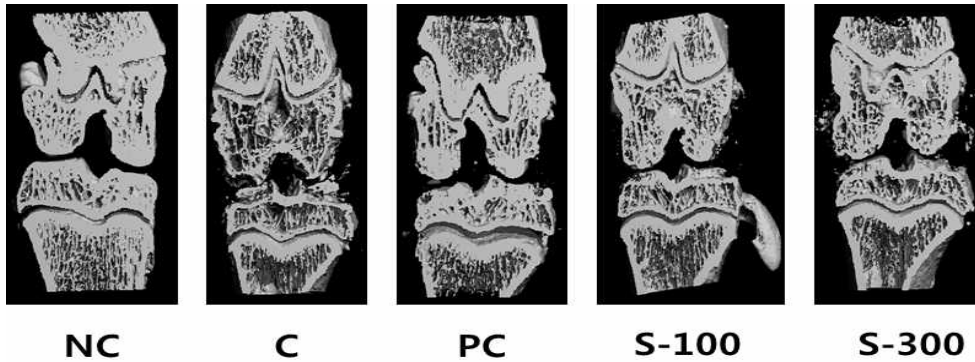


Fig.2. Inhibitory effects of 발효우슬추출복합물 on serum cytokines(IL-1 β , IL-6, TNF- α) levels. Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. NC : AIN93M, C : AIN93M + MIA injection group, PC : AIN93M + MIA injected group supplemented MSM 300 mg/kg b.w., S100 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 100 mg/kg b.w., S300 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 300 mg/kg b.w.,

(라) Micro CT 분석

경골(Tibia)과 대퇴골(Femur)의 연결 부위의 종단면의 정면부분을 관찰한 결과는 Fig.3에 나타내었음. MIA로 관절염을 유도한 C군에서 아무것도 처리하지 않은 정상대조군(NC)에 비해 관절면이 뚜렷한 면을 형성하지 못하고 뼈의 침식이 일어나 손상이 나타나는 것을 확인하였음. MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군에서 C군에 비해 뚜렷한 표면이 나타나는 것을 확인하였음. 관절 내의 염증반응으로 연골이 손상을 입음으로써 경골과 대퇴골의 잦은 충돌로 인해 통증을 느껴진다고 알려져 있음.

(A)



(B)

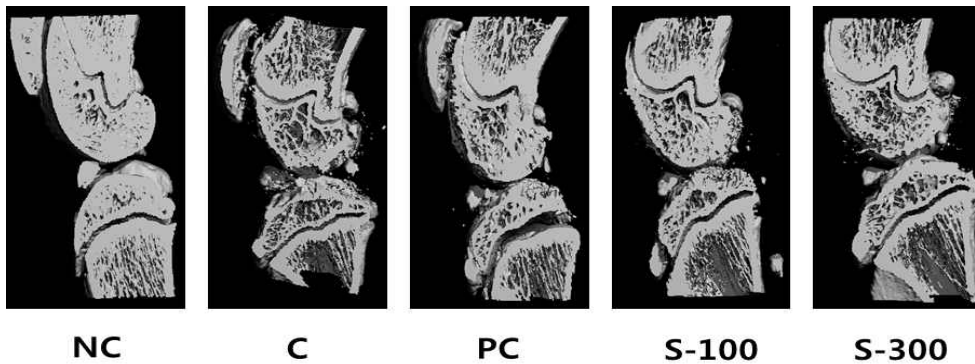


Fig.3. Coronal and sagittal micro-CT image of hind knee joint in rats treated with or without MIA. (A) coronal images, (B) sagittal images.

NC : AIN93M, C : AIN93M + MIA injection group, PC : AIN93M + MIA injected group supplemented MSM 300 mg/kg b.w., S100 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 100 mg/kg b.w., S300 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 300 mg/kg b.w.,

관절염에 의한 연골 손상 정도를 파악하기 위해 골밀도(BMD), 골부피(Bone volume)와 총 부피(Total volume)의 비율(BV/TV) trabecular bone의 수, trabecular 두께(thickness), 간격(separation)을 측정하였음. Micro CT분석결과는 Fig.4에 나타내었음.

관절염에 의해 연골손상으로 골밀도가 감소한다고 알려져 있는데, 정상대조군에 비해 MIA 주사군인 C군에서 유의적으로 골밀도가 감소하였으며 C군에 비해 MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 섭취군인 S100, S300군에서 각각 유의적으로 증가하였음을 확

인하였음.

골부피(Bone volume; BV)와 총부피(Total volume; TV)의 비율 측정결과, 정상대조군(NC)에 비해 C군에서 유의적으로 감소하였으며 C군에 비해 발효우슬추출복합물 투여군(S100, S300)에서 유의적으로 BV/TV의 비율이 각각 유의적으로 증가하였음을 확인함.

Trabecular number는 ROI 범위안의 voxel 수로써 수치가 높을수록 빈공간의 voxel 숫자가 많고 촘촘함. 정상대조군(NC)에 비해 C군에서 유의적으로 감소한 것을 보아 골 밀도가 감소한 결과와 일치함을 확인하였음. C군에 비해 발효우슬추출복합물 투여군(S100, S300)에서 유의적으로 증가하였음.

Trabecular separation은 trabecular thickness인 골 두께와는 반대되는 개념으로 골 그물 구조사이의 거리를 나타내고, 수치가 높을수록 골 소실이 심한 것을 확인할 수 있음. Trabecular separation의 결과, 정상대조군(NC)에 비해 C군에서 유의적으로 증가하였으므로 골 그물 구조사이의 거리가 멀어졌음을 확인함. C군에 비해 MSM 투여군인 PC 군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군에서 유의적으로 감소하였음을 확인하였음.

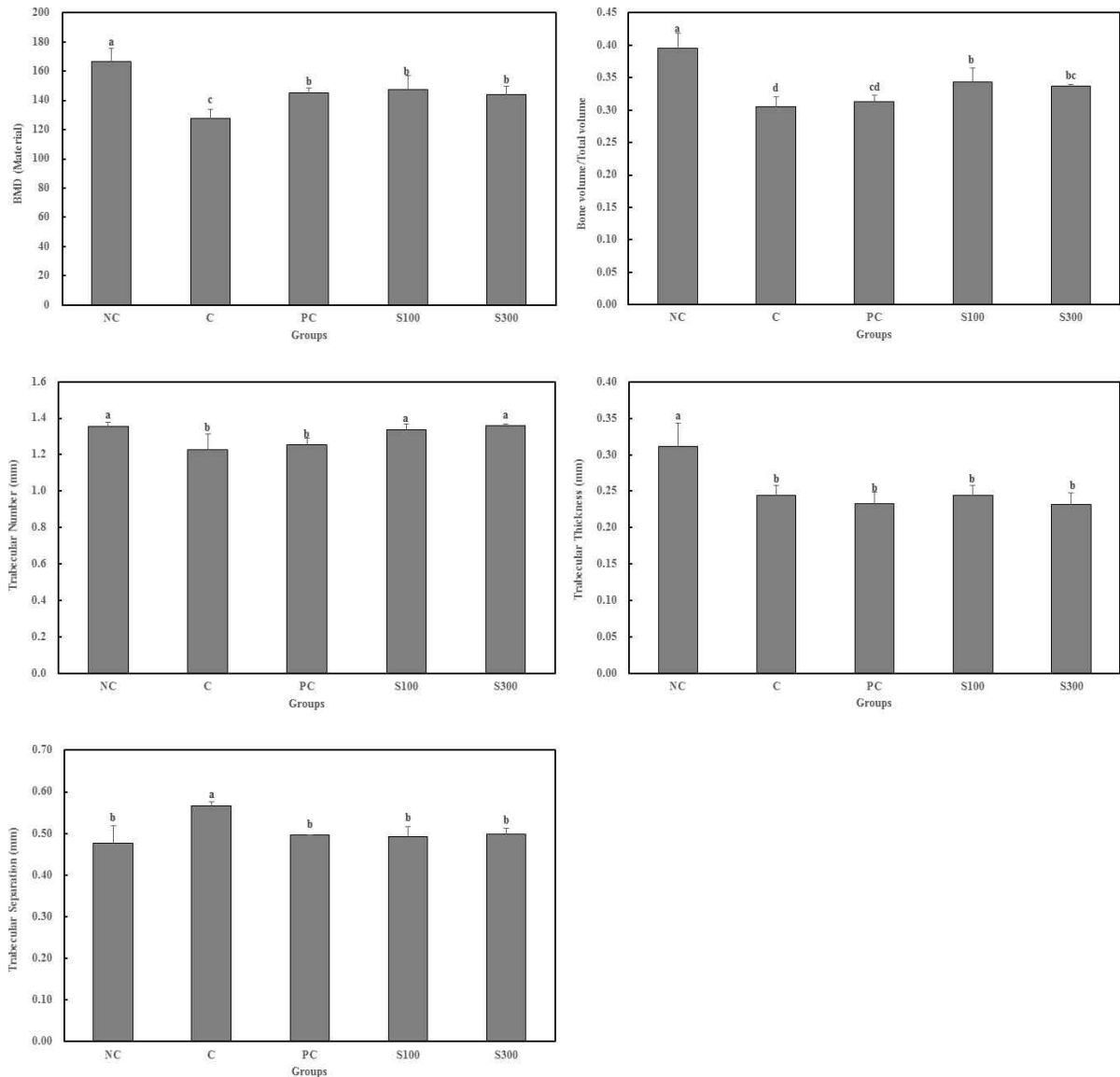


Fig4. Values of architectural and mineralization parameters in Tibia bone in oosteoarthritis rats.

Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

NC : AIN93M, C : AIN93M + MIA injection group, PC : AIN93M + MIA injected group supplemented MSM 300 mg/kg b.w., S100 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 100 mg/kg b.w., S300 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 300 mg/kg b.w.,

(마) 골관절염 유발에 따른 골구조의 형태학적 변화

MIA 주사에 의한 골관절염 유발모델에서 chondrocyte의 metabolism 저해로 인해 연골세포가 사멸되어 활액의 증식과 염증세포의 침투로 연골표면의 모양이 비정상적으로 변화함. 이러한 조직학적인 변화를 관찰하기 위하여 동물의 연골조직을 H&E 염색을 하여 연골세포와 활액주변 변화를 관찰하였음. 일반적으로 정상적인 관절강에서는 세포의 형태가 둥글게 나타나는 반면 염증이 유발되어 chondrocyte가 사멸하는 경우 세포가 작게 밀집하거나 형태를 확인하기 어려울 정도로 침투하기도 함. H&E의 염색결과는 Fig. 5에 나타내었음. 정상대조군(NC)의 연골은 둥근형태가 나타나고 두께가 일정하며 조직의 분배가 균등하나 관절염 유발군(C)은 정상대조군에 비해 연골조직의 두께가 균등하지 못하고 연골세포의 배분이 불규칙하게 배열되었음을 확인하였음. 발효우슬추출복합물 S300군은 C군에 비해서 연골조직의 두께가 균등해짐을 확인하였음.

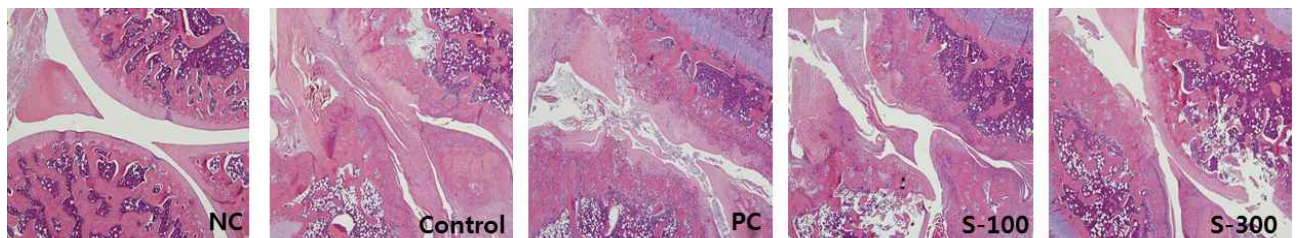


Fig5. Histological investigations in knee joints of normal rats and MIA rats.

NC : AIN93M, C : AIN93M + MIA injection group, PC : AIN93M + MIA injected group supplemented MSM 300 mg/kg b.w., S100 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 100 mg/kg b.w., S300 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 300 mg/kg b.w.,

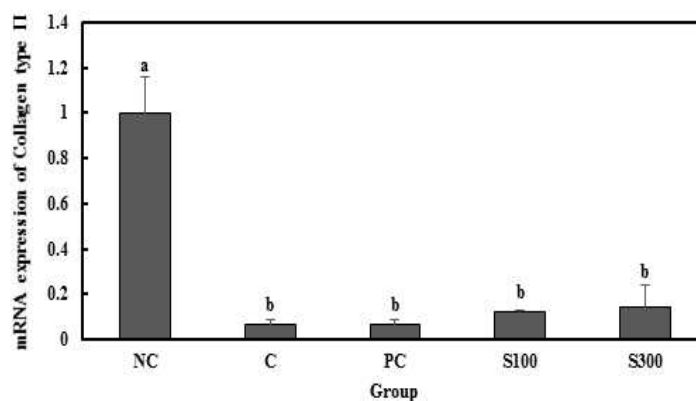
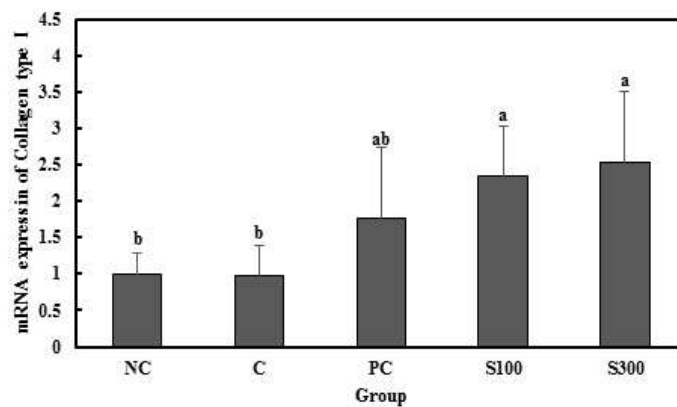
(바) 관절염 관련 유전자 발현 측정

연골세포 조직의 물리학적 생물학적 작용을 유지시키는 것은 조직의 동화작용(anabolism)과 이화작용(catabolism)의 균형에 의한 것으로 알려져 있음. 동화작용에 관여하는 것으로는 collagens, aggrecan을 포함하는 proteoglycan 등이 해당되고 이화작용에는 금속단백분해효소(metalloproteinase; MMP), nitric oxide(NO), TNF-a, collagenase,

aggrecanase 등이 해당됨.

Collagen type I은 연골세포 뿐만 아니라 일반적으로 인체 세포에서 가장 많이 분포하고 있는 형태이며 collagen type II는 연골조직 단백질의 50%를 차지하고 있으며 연골에 분포하고 있는 collagen 종류 중 약 85-90%를 차지하고 있는 단백질로 collagen type I과 II의 형성과 함께 Aggrecan은 연골조직의 상태를 결정하는 중요한 인자임. Aggrecan은 대표적으로 연골조직은 합성하는 proteoglycan coreprotein의 하나로서 aggregation, hyaluronan binding, cell adhesion과 chondrocyte apoptosis에 관여하는 구상단백질인 G1, G2 그리고 G3로 구성되어 있으며 주로 관절에서 외부의 압력(compressive load)으로부터 저항성을 나타내어 관절을 유지시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있음.

실험기간 동안 사료를 투여한 후 Collagen type I & II, Aggrecan 유전자 발현을 측정한 결과는 Fig.6에 나타내었음. Collagen type II과 Aggrecan의 유전자 발현을 측정한 결과, 관절염 유발군(C)이 정상대조군에 비해 유의적으로 감소하였음을 확인하였음. 그러나 MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군에서 Collagen type II과 Aggrecan의 유전자 발현이 관절염 유발군(C)과 유의적인 차이가 나타나지 않았음.



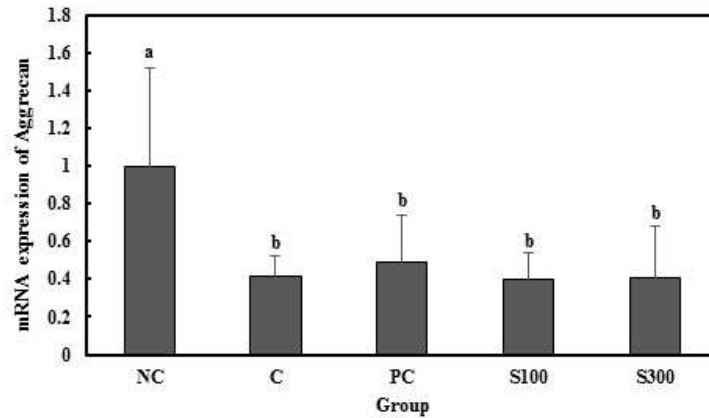


Fig.6. mRNA expression of Collagen type I & II, and Aggrecan from osteoarthritis rats.

Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

NC : AIN93M, C : AIN93M + MIA injection group, PC : AIN93M + MIA injected group supplemented MSM 300 mg/kg b.w., S100 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 100 mg/kg b.w., S300 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 300 mg/kg b.w.,

MMP-3(Stromelysin)은 proteoglycan의 퇴화에 아주 중요한 역할을 하는 금속단백분해 효소로 관절강 내 MMP-3의 증가는 심각한 연골손상과도 연관지어 지는 것으로 알려져 있다. 또한, MMP-7은 류마티스 관절염에 비하여 골관절염에서 특히 발현이 증가하는 인자로 알려져 있다. 실험기간 동안 사료를 투여한 후 MMP-3, MMP-7 유전자 발현을 측정 한 결과는 Fig.7에 나타내었음. 관절염 유발군(C)의 MMP3 유전자 발현이 정상대조군 (NC)에 비해 유의적으로 증가하였고, MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군의 MMP3 유전자 발현이 관절염 유발군(C)에 비해 각각 29.54%, 38.01%, 42.87% 감소하였음. 특히 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군은 관절염 유발군(C)과 유의적인 차이가 나타났음. MMP7 유전자 발현을 측정한 결과, 관절염 유발군(C)이 정상대조군(NC)에 비해 유의적으로 증가하였고, MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군의 MMP7 유전자 발현이 관절염 유발군(C)에 비해 각각 36.28%, 14.00%, 78.33% 감소하였음. 특히, PC군과 S300군은 관절염 유발군(C)와 유의적인 차이가 나타났음. 따라서 발효우슬추출복합물의 섭취가 관절염 유발로 인해 증가한 MMP3와 MMP7을 감소시킴을 확인할 수 있었음.

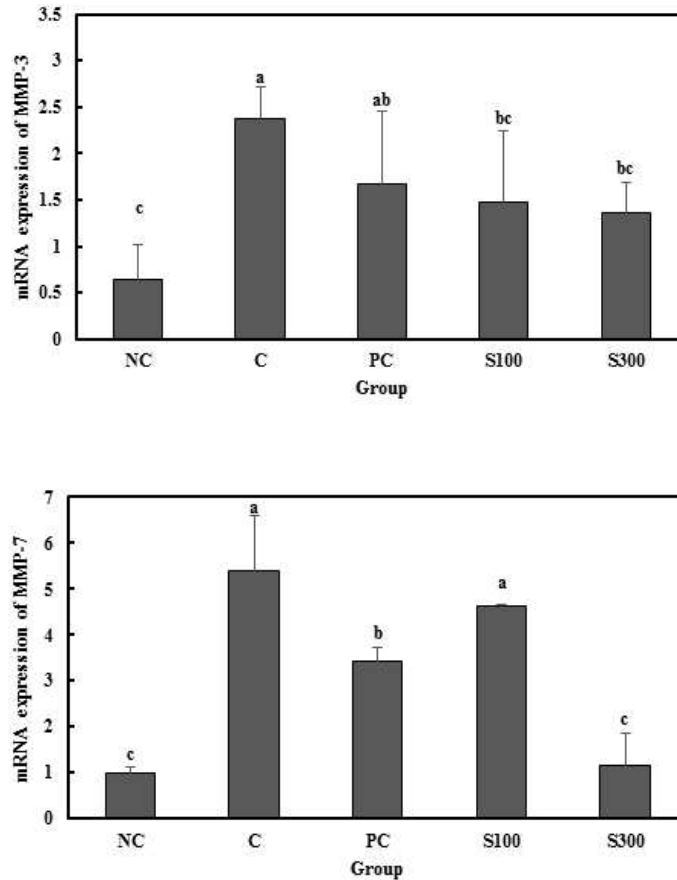


Fig.7. mRNA expression of MMP-3 and MMP-7 from osteoarthritis rats.

Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

NC : AIN93M, C : AIN93M + MIA injection group, PC : AIN93M + MIA injected group supplemented MSM 300 mg/kg b.w., S100 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 100 mg/kg b.w., S300 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 300 mg/kg b.w.,

Nuclear transcription factor κ B(NF- κ B)는 면역과 염증 반응에 관여하는 여러 유전자들의 transcription factor로, TNF- α 와 IL-6등의 염증 관련 cytokine의 전사를 조절하는 인자로 알려져 있음. 대부분의 염증반응은 COX-2, IL-6, TNF- α 등의 염증 유발 cytokine이 관련되므로 알려져 있음. 활성화된 NF- κ B는 핵으로 이전하여 TNF- α 를 생성시키는데 이렇게 생성된 TNF- α 는 다시 NF- κ B를 재활성화 시키는데 이용되어 Cox-2를 유전적으로 합성하여 염증반응을 가속화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 TNF- α 의 적절한 생성조절은 염증반응을 조절하는 중요한 인자임.

실험기간 동안 사료를 투여한 후 NF- κ B, IL-1 β , TNF- α , COX-2 유전자 발현을 측정된 결과는 Fig.8에 나타내었음.

관절염 유발군(C)의 NF- κ B 유전자 발현은 정상대조군에 비해 158.28% 증가하였으나 유의적인

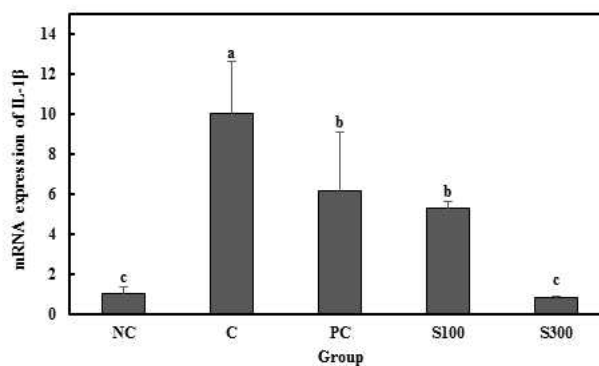
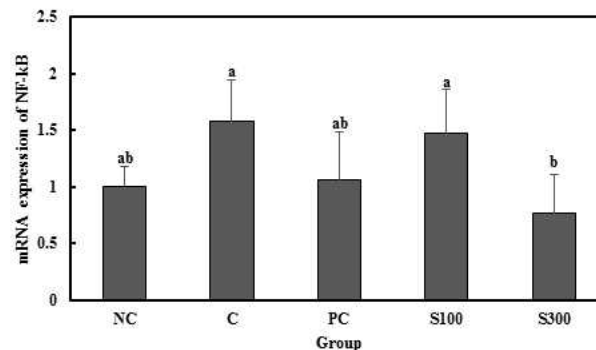
차이는 나타나지 않았음. MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군의 NF- κ B 유전자 발현은 관절염 유발군(C)에 비해 각각 33.13%, 7.03%, 51.41% 감소하였고, 특히 S300군은 C군과 유의적인 차이가 있었음.

IL-1 β 유전자 발현을 측정한 결과, 관절염 유발군(C)의 유전자 발현은 정상대조군(NC)에 비해 1003.53% 유의적으로 증가하였고, MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군은 관절염 유발군(C)에 비해 각각 38.65%, 47.52%, 91.86% 유의적으로 감소하였음. 특히, S300군은 정상대조군 수준으로 감소하였음을 확인하였음.

관절염 유발군(C)의 TNF- α 유전자 발현은 정상대조군(NC)에 비해 288.49% 유의적으로 증가하였고, MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군은 관절염 유발군(C)에 비해 각각 57.71%, 0.45%, 67.60% 감소하였음. PC군과 S300군은 관절염 유발군(C)과 유의적인 차이가 있었음.

COX-2 유전자 발현을 측정한 결과, 관절염 유발군(C)의 유전자 발현은 정상대조군(NC)에 비해 398.13% 유의적으로 증가하였고, MSM 투여군인 PC군과 발효우슬추출복합물 투여군인 S100, S300군은 관절염 유발군(C)에 비해 각각 48.79%, 20.75%, 72.52% 감소하였음. 특히 PC군과 S300군은 관절염 유발군(C)과 유의적인 차이가 나타났으며 정상대조군(NC) 수준으로 감소함을 확인하였음.

따라서, MSM와 발효우슬추출복합물 섭취 시 관절염 유발로 인한 염증 biomarker의 수준이 정상대조군 수준으로 감소하는 것으로 확인되었음.



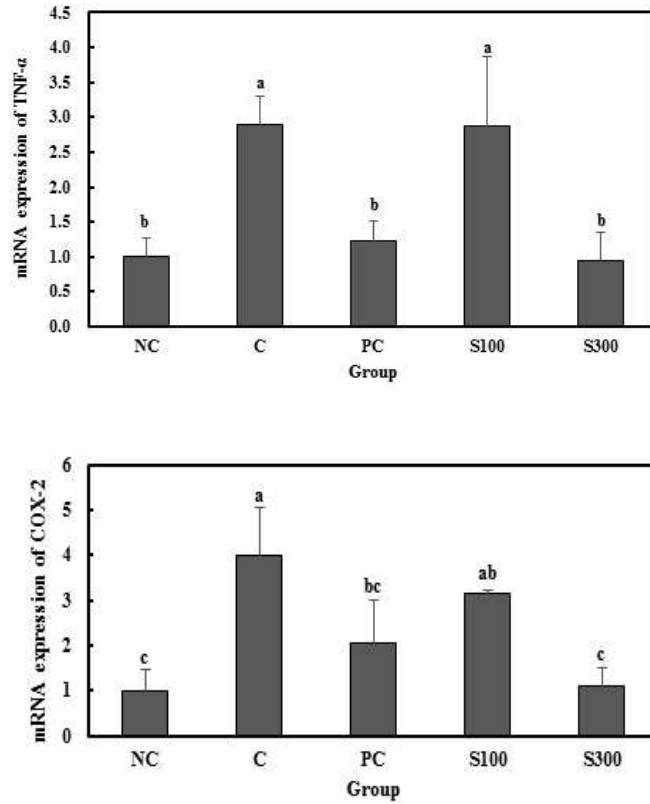


Fig.8. mRNA expression of NF- κ B, COX-2, TNF- α , and IL-1 β from osteoarthritis rats.

Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

NC : AIN93M, C : AIN93M + MIA injection group, PC : AIN93M + MIA injected group supplemented MSM 300 mg/kg b.w., S100 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 100 mg/kg b.w., S300 : AIN93M + MIA injected group supplemented 발효우슬추출복합물 300 mg/kg b.w.,

라. 전임상 연구 II (주관기관: 에스케이 바이오랜드(주), 위탁기관: (주)이비오)

본 연구에서는, SD rat를 이용하여 monosodium iodoacetate(MIA)으로 유도한 골관절염에 대한 발효우슬, 당귀 및 두충 추출복합물(발효우슬추출복합물)의 통증 및 염증 개선 효과를 실험적으로 검증하였다. 관절염 동물 모델을 이용한 통증 개선 효능 평가는 염증 및 조직학적 실험을 바탕으로한 기존의 연구 접근 방법과 비교하여 새로운 시도라 볼 수 있다. 다각도의 골관절염 개선 효과를 위한 체중 부하 지수(Weight Bearing Index) 측정을 포함하여, 혈액 내 염증성 사이토카인 발현 검사 및 조직병리학적 관찰을 통하여 발효우슬추출복합물의 섭취를 통한 관절통증 개선 및 항관절염 효능을 검증하였다.

(1) 실험 방법

본 연구는 동물보호법(제정 1991년 5월 31일 법률 제4379호, 일부개정 2015년 1월 20일 법률 제13023호)에 근거한 (주)이비오(Cheongju, Korea)의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호: EBOA-2018-01).

(가) 골관절염 모델

정상대조군의 6마리를 제외한 18마리 동물에 대하여 관절염을 유발하였다. 필요량의 MIA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 칭량하여 조제병에 넣었고 생리식염주사액을 일부 가한 후 vortex mixer로 용해시켰으며, 다시 첨가하여 규정농도(60 mg/mL)로 조제하였다. 음성대조군 및 시험물질투여군에 대하여 일회용주사기를 이용하여 MIA 용액을 0.05 mL/head씩 동물의 오른쪽 뒷다리의 관절강에 단회투여하였다. 정상대조군에 대하여 MIA의 용매인 생리식염주사액을 오른쪽 뒷다리의 관절강에 0.05 mL/head씩 투여하였다.

(나) 체중 부하 지수(Weight Bearing Index, WBI) 측정

체중 부하 지수 측정은 시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일째 실시하였다. MIA 주입과 시험물질 투여개시일이 동일한 관계로 0일째 WBI 측정은 제외하였다(정상군과 동일). 측정기기로 정적 체중 부하 테스트 장치(Static Weight Bearing test device, SWB-TOUCH-R, Bioseb, Boulonge, France)를 사용하였다. 동물을 경사진 acrylic chamber에 넣고 뒷다리를 분리된 압력 센서에 각각 올려 놓고, 각 뒷다리에 실리는 힘을 5초간 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였다. 아래 식에 의해 왼쪽 다리에 실리는 무게를 계산하여 비율로 나타내었다.

$$\text{Weight bearing by ipsilateral limb (\%)} = \left[\frac{\text{Weight bearing by ipsilateral limb}}{\text{Weight bearing by ipsilateral limb} + \text{Weight bearing by contralateral limb}} \right] \times 100$$

(다) 혈액 중 염증성 사이토카인 측정

염증성 사이토카인 측정을 위해 혈액을 시험물질 발효우슬추출복합물 투여 3일째 및 14일째 경정맥에서 채취하였다. 투여 마지막 날 절식하고 다음날 배대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 원심분리기(Combi-514R, Hanil Science Industrial Co., Ltd.,

Seoul, Korea)로 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 TNF- α 및 IL-1 β 를 측정하는데 사용하였다. 채취된 혈청은 측정 시까지 -20°C 이하의 냉동고에 보관하였다. TNF- α 와 IL-1 β 의 단백질 정량은 ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)의 메뉴얼에 따라 실시하였다.

(라) 조직병리학적 분석

영상학적 분석 후 조직병리학적 검사를 실시하였다. 조직은 70% 에탄올에 세척 후 5% formic acid 용액에서 7일간 탈회하였다. 70% 에탄올에 세척 및 수세 후 파라핀 포매하여 4~5 μ m 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켰다. Safranin-O fast Green 및 hematoxylin & eosin(H&E) staining 후 permount(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)으로 봉입하여 현미경(CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하고 사진 촬영을 실시하였다.

H&E staining을 마친 조직으로 Table 1의 기준으로 조직병리학적 분석을 실시하였다.

Table 1. Macroscopic scoring chart for histopathological analysis

	Synovial hyperplasia	Pannus formation	Cartilage destruction	Bone erosion
Normal	0	0	0	0
Mild	1	1	1	1
Moderate	2	2	2	2
Severe	3	3	3	3
Very severe	4	4	4	4

(마) 통계 분석

실험에서 얻어진 체중, WBI, 염증성 cytokine 및 Histologic score 측정 결과는 SPSS(Version 20.0, IBM Corporation, Armonk, NY, USA)를 사용하여 검정하였다. 정상대조군과 음성대조군은 student's t-test를 실시하였다. Levene의 등분산 검정 결과로 등분산성을 확인하고(유의수준: 양측 0.05), 등분산성 검정 결과에 따라 평균의 동일성에 대한 t-검정 결과를 선택하였다(유의수준: 단측 0.05). 음성대조군에 대한 각 시험군 간의 유의성 확인을 위하여 One-way analysis of variance(ANOVA)를 실시(유의수준: 0.05)하여 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다(유의수준: 단측 0.05).

(2) 결과 및 고찰

(가) 발효우슬추출복합물이 체중 부하 지수 (Weight Bearing Index)에 미치는 영향

골관절염은 관절을 보호하고 있는 연골의 손상이나 퇴행성 변화로 인해 관절을 이루는 뼈와 인대 등에 손상이 생겨 염증과 통증이 발생하는 질환이다. 관절염에서 유발된 염증반응은 면역세포 및 주위의 조직에서 발현된 염증성 매개물질들이 통증 수용체(nociceptor)를 자극, 활성화시켜 통증 반응을 유발시키는 것으로 알려져 있다 (Lang과 Hope, 1994; Millian, 1999)

본 시험에서는 MIA를 시험동물의 오른쪽 뒷다리 관절강에 단회 투여하여 염증을 유발하고 시험물질 발효우슬추출복합물을 반복 경구 투여하여, 체중 부하 지수(Weight

Bearing Index, WBI) 분석으로 관절염 개선에 대한 발효우슬추출복합물의 효능을 평가하였다. 동물의 한쪽 뒷다리 관절에 염증을 유발하게 되면 통증으로 인하여 각각의 다리에 실리는 무게가 차이가 난다. 본 시험에서는 양다리에 실리는 무게의 차이를 측정하기 위하여 정적 체중 부하 테스트기 (Static Weight Bearing test device)를 사용하였다. 이 기기는 시험동물의 뒷다리를 분리된 압력 센서에 각각 올려 놓고, 각 뒷다리에 실리는 힘을 측정하는 시험으로, 통증이 심할수록 다리를 덜 디디게 되어 무게가 적게 실리게 된다.

관절염을 유발한 날부터 시험물질을 투여하였고, 시험물질 투여 3, 7, 14, 21 및 28일째 WBI를 측정하여 통증 개선 효과를 평가하였다.

정상대조군의 weight bearing은 시험물질 투여 3일부터 28일까지 평균 49.9~50.6%의 변동을 나타내었고, 모든 측정 시점에서 양 발에 실리는 무게가 동일한 것을 확인하였다. 음성대조군의 weight bearing은 시험물질 투여 3일부터 28일까지 평균 22.8~39.9%의 변동을 나타내고, 정상대조군과 비교하여 모든 측정시점에서 통계학적으로 유의 ($P<0.01$)하게 감소되어 MIA투여에 의하여 통증이 유발된 것을 확인할 수 있었다. 특히, MIA 단회 주입으로 유발된 골관절염이 3일째 통증이 가장 심한 것으로 확인되었으며, 시간이 지남에 따라 자연적 회복에 의해 통증이 개선됨을 확인할 수 있었다. 150 mg/kg 용량의 발효우슬추출복합물 시험물질투여군의 weight bearing은 시험물질 투여 3일부터 28일까지 평균 38.4~44.9%의 변동을 나타내고, 음성대조군과 비교하여 일부 측정 시점에서 통계학적으로 유의 ($P<0.05$: 발효우슬추출복합물 시험물질 투여 7, 28일째, $P<0.01$: 발효우슬추출복합물 시험물질 투여 3, 14일째)하게 증가되었다. 300 mg/kg 용량의 발효우슬추출복합물 시험물질투여군의 weight bearing은 시험물질 투여 3일부터 28일까지 평균 36.8~46.7%의 변동을 나타내고, 음성대조군과 비교하여 모든 측정 시점에서 통계학적으로 유의 ($P<0.01$)하게 증가되었다. 결론적으로, 관절염으로 유발된 통증을 발효우슬추출복합물 섭취를 통하여 통증 개선 효과가 나타났음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

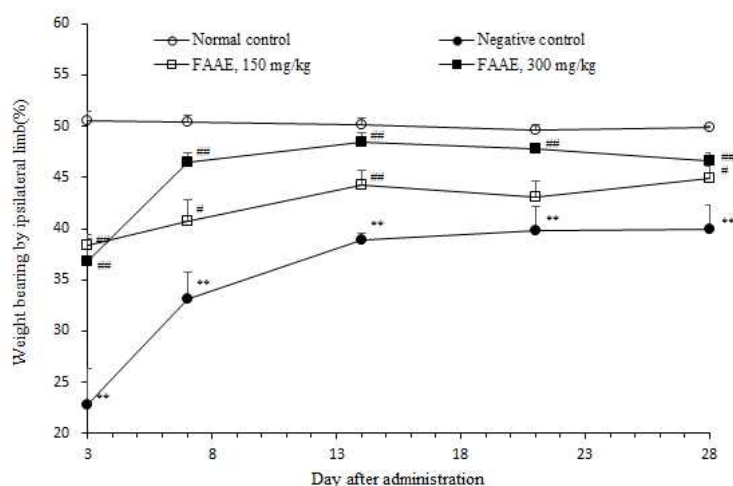


Fig. 1. Hind-limb weight bearing index of rats on monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis. The values are mean + S.E. ** $P<0.01$, significant difference from the normal control group by student's t-test. # $P<0.05$, significant difference from the negative control group by Dunnett's t-test.

##P<0.01, significant difference from the negative control group by Dunnett's t-test. FAAE: 발효우슬추출복합물.

(나) 발효우슬추출복합물이 혈청 IL-1 β 과 TNF- α 발현에 미치는 영향

염증성 면역 세포들에서 생성되는 IL-1 β 와 TNF- α 가 관절염의 염증 반응에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 골관절염이 진행되면 관절내로 모여든 monocyte는 macrophage로 분화한 뒤 활성화되어 IL-1 β 및 TNF- α 의 생성이 주로 증가한다. IL-1 β 및 TNF- α 는 활액 섬유아세포에서 IL-6, IL-8, 연골과 골조직 파괴를 진행하는 collagenase, matrix metalloproteinases(MMPs) 등 염증인자와 관절연골 분해효소의 분비를 촉진하게 되므로 뼈 조직의 분해는 물론 파골세포의 활성을 촉진시켜 뼈의 흡수나 파괴를 유발한다(Takanori 등, 1998). 더욱이 인접하고 있는 뼈뿐만 아니라 관절연골의 손상과 관절강을 싸고 있는 활막을 손상시킴으로서 심한 통증을 일으킨다(Scott 등, 1998). IL-1 β 는 연골세포에서 MMPs의 발현을 유도하여 직접적인 연골 기질파괴를 증가시키고, 프로스타글란딘 E2의 생성을 촉진하여 프로테오글리칸을 소실시키고 재합성을 억제한다(McDonnell, 1992). 또 TNF- α 는 면역반응 초기에 발현 분비되어 초기염증과 더불어 파골세포의 분화와 활성화를 이끌고, 관절 연골기질의 프로테오글리칸 감소 촉진 및 재합성을 억제하여 골관절염을 진행시킨다(Beutler, 1995).

본 시험에서는, 시험물질 투여 3, 14 및 28일째 (관절염 유발 3, 14 및 28일째) 혈액에서 염증성 cytokine IL-1 β 및 TNF- α 를 측정하여 시험물질이 염증 반응을 억제하는 효과를 평가하였다.

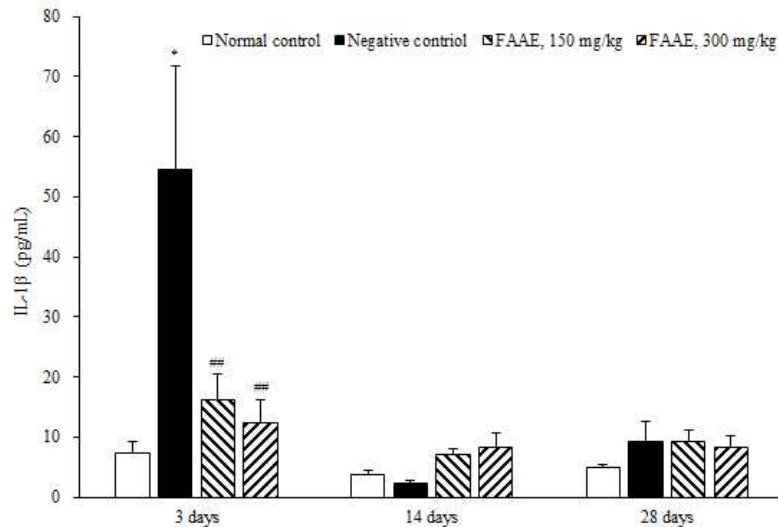
시험물질 투여 3일째, 정상대조군의 혈액 내 IL-1 β 의 농도는 7.3 pg/mL로 나타났다. 음성대조군의 혈액 내 IL-1 β 의 농도는 평균 54.48 pg/mL로 정상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의($P<0.05$)하게 증가되어 MIA 투여로 인하여 염증성 사이토카인 발현이 증가된 것을 확인하였다. 발효우슬추출복합물 시험물질투여군인 경우, 혈액 내 IL-1 β 의 농도는 16.22 pg/mL (150 mg/kg 발효우슬추출복합물 섭취군), 12.46 pg/mL (300 mg/kg 발효우슬추출복합물 섭취군)로 통계학적으로 유의($P<0.01$)하게 감소되었다. 시험물질 투여 14, 28일째, 정상대조군의 혈액 내 IL-1 β 의 농도는 각각 평균 3.75 및 4.95 pg/mL로 나타났으며, 음성대조군의 혈액 내 IL-1 β 의 농도는 각각 평균 2.27 및 9.31 pg/mL로 정상대조군과 비교하여 통계학적인 유의성이 나타나지 않았다. 이는 MIA주입으로 인한 염증성 사이토카인 IL-1 β 발현이 시간이 지남에 따라 negative feedback 또는 자연적 회복에 의한 발현량 감소가 나타난 것으로 판단된다. 발효우슬추출복합물 시험물질투여군도 마찬가지로, 혈액 내 IL-1 β 의 농도는 각각 평균 7.17 및 9.17 pg/mL (150 mg/kg 발효우슬추출복합물 섭취군), 8.43 및 8.27 pg/mL (300 mg/kg 발효우슬추출복합물 섭취군)로 통계학적인 유의성이 나타나지 않았다(Fig. 2 (A)).

혈중 TNF- α 수준과 관련하여, 시험물질 투여 3일째, 정상대조군의 혈액 내 TNF- α 의 농도는 3.05 pg/mL로 나타났다. 음성대조군의 혈액 내 TNF- α 의 농도는 평균 5.97 pg/mL로 정상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의($P<0.05$)하게 증가되어 MIA 투여로 인하여 염증이 유발된 것을 확인하였다. 150 mg/kg 용량의 발효우슬추출복합물 시험물질투여군의 혈액 내 TNF- α 의 농도는 3.63 pg/mL로 음성대조군과 비교하여 통계

학적으로 유의($P<0.05$)하게 감소되었다. 300 mg/kg 용량의 발효우슬추출복합물 시험물질투여군의 혈액 내 TNF- α 의 농도는 2.51 pg/mL로 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의($P<0.01$)하게 감소되었다. 정상대조군의 시험물질 투여 14, 28일째 혈액 내 TNF- α 의 농도는 각각 평균 3.81 및 3.78 pg/mL로 나타났다. 음성대조군의 시험물질 투여 14, 28일째

혈액 내 TNF- α 의 농도는 각각 평균 6.13 및 6.04 pg/mL로 정상대조군과 비교하여 증가되는 경향을 나타내었으며, 시험물질 투여 28일째 통계학적으로 유의($P<0.01$)하게 증가되었다. 150 mg/kg 용량의 발효우슬추출복합물 시험물질투여군의 시험물질 투여 14, 28일째 혈액 내 TNF- α 의 농도는 각각 평균 6.2 및 5.54 pg/mL로 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성이 나타나지 않았다. 300 mg/kg 용량의 발효우슬추출복합물 시험물질투여군의 시험물질 투여 14, 28일째 혈액 내 TNF- α 의 농도는 각각 평균 3.99 및 4.52 pg/mL로 음성대조군과 비교하여 감소하는 경향을 나타내었으나 통계학적인 유의성이 나타나지 않았다(Fig. 2 (B)).

(A)



(B)

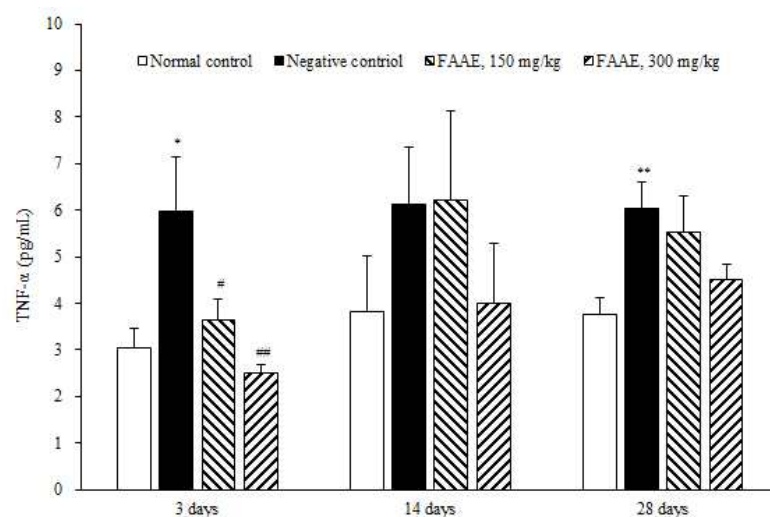


Fig. 2. Effects of FAAE(발효우슬추출복합물) on the level of serum IL-1 β and TNF- α in MIA-induced osteoarthritic rats. A: IL-1 β , B: TNF- α . The values are mean + S.E. * P <0.05, significant difference from the normal control group by student's t-test. ** P <0.01, significant difference from the normal control group by student's t-test. # P <0.05, significant difference from the negative control group by Dunnett's t-test. ## P <0.01, significant difference from the negative control group by Dunnett's t-test.

(다) 생체 내 MIA 유발 골관절염의 조직 병리학 적 분석에 발효우슬추출복합물이 미치는 영향

투여 후 29일에, 대퇴골과 경골이 연결된 상태로 조직을 분리하여 조직병리학적 분석을 실시하였다. H&E staining으로 활막과형성(synovial hyperplasia), 결합조직 증가(Pannus formation), 연골 파괴(Cartilage destruction) 및 뼈 부식(Bone erosion) 정도를 평가하고, safranin-O fast green staining으로 연골의 파괴 정도를 관찰하고 점수화하였다(Fig. 3).

정상대조군의 활막과형성 점수는 평균 0.00으로 이상이 발견되지 않았다. 음성대조군의 활막과형성 점수는 평균 3.83으로 정상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의(P <0.01)하게 증가되어 활막이 증가된 것을 확인하였다.

150 mg/kg 용량의 발효우슬추출복합물 시험물질투여군의 활막과형성 점수는 평균 3.00으로 음성대조군과 비교하여 감소하였으나 통계학적인 유의성이 나타나지 않았다. 300 mg/kg 용량의 발효우슬추출복합물 시험물질투여군의 활막과형성 점수는 평균 1.67으로 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의(P <0.01)하게 감소되었다(Fig. 3 (A), (C)).

정상대조군의 결합조직 형성 점수는 평균 0.00으로 이상이 발견되지 않았다. 음성대조군의 결합조직 형성 점수는 평균 3.67으로 정상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의(P <0.01)하게 증가되었다. 150 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 결합조직 형성 점수는 평균 3.17으로 음성대조군과 비교하여 통계학적인 차이를 나타내지 않았다. 300 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 결합조직 형성 점수는 평균 1.83으로 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의(P <0.01)하게 감소되었다 (Fig. 3 (A), (C)).

정상대조군의 연골 파괴 점수는 평균 0.00으로 이상이 발견되지 않았다. 음성대조군의 연골 파괴 점수는 평균 3.33으로 정상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의(P <0.01)하게 증가되었다. 150 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 연골 파괴 점수는 평균 3.08으로 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다. 300 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 연골 파괴 점수는 평균 2.67으로 음성대조군과 비교하여 감소하였으나 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 3 (A), (C)).

정상대조군의 뼈 부식 점수는 평균 0.00으로 이상이 발견되지 않았다. 음성대조군의 뼈 부식 점수는 평균 3.33으로 정상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의(P <0.01)하게 증가되었다. 150 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 뼈 부식 점수는 평균 3.33으로 음성대조군과 비교하여 차이가 나타나지 않았다. 300 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 뼈

부식 점수는 평균 2.67으로 음성대조군과 비교하여 감소하였으나 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 3 (A), (C)).

Safranin-O & Fast green staining을 통하여 연골의 부식 정도를 확인하였다. 정상대조군의 연골조직은 Safranin-O에 의하여 붉게 염색되었다. 음성대조군에서는 연골조직이 파괴되어 Safranin-O에 의한 연골조직의 염색을 확인할 수 없었다. 시험물질투여군에서 음성대조군과 비교하여 염색 정도가 진해지고 층이 두껍게 증가된 것이 관찰되었다(Fig. 3. (B)).

조직병리학적 평가를 위해 H&E 염색법과 Safranin-O fast green 염색법을 시행한 결과, MIA 투여로 인한 골관절염 유발군에서 염증 세포 침윤, 퇴행 및 연골 손상이 확인되었지만, 발효우슬추출복합물 투여군에서는 투여된 시료의 농도가 증가함에 따라 연골 상태가 상당히 회복됨을 확인할 수 있었다. 특히, 발효우슬추출복합물 투여군에서는 골관절염 유발군에 비해 활막과형성 및 결합조직형성 비교평가에서 통계적으로 유의적으로 개선됨을 확인하였으며, 연골파괴 및 뼈부식 비교평가에서는 뚜렷한 개선 경향성을 보였다. 즉, 발효우슬추출복합물을 섭취하였을시 정상군의 상태로 개선 또는 회복됨을 보였다. 또한, 연골 조직 변성의 정도를 확인하기 위해 프로테오글리칸층에 대한 Safranin-O로 염색 결과, 골관절염 유발 군에서 연골층 및 프로테오글리칸의 손실이 심했던 반면, 발효우슬추출복합물을 투여한 군에서 프로테오글리칸층의 회복이 관찰되었다.

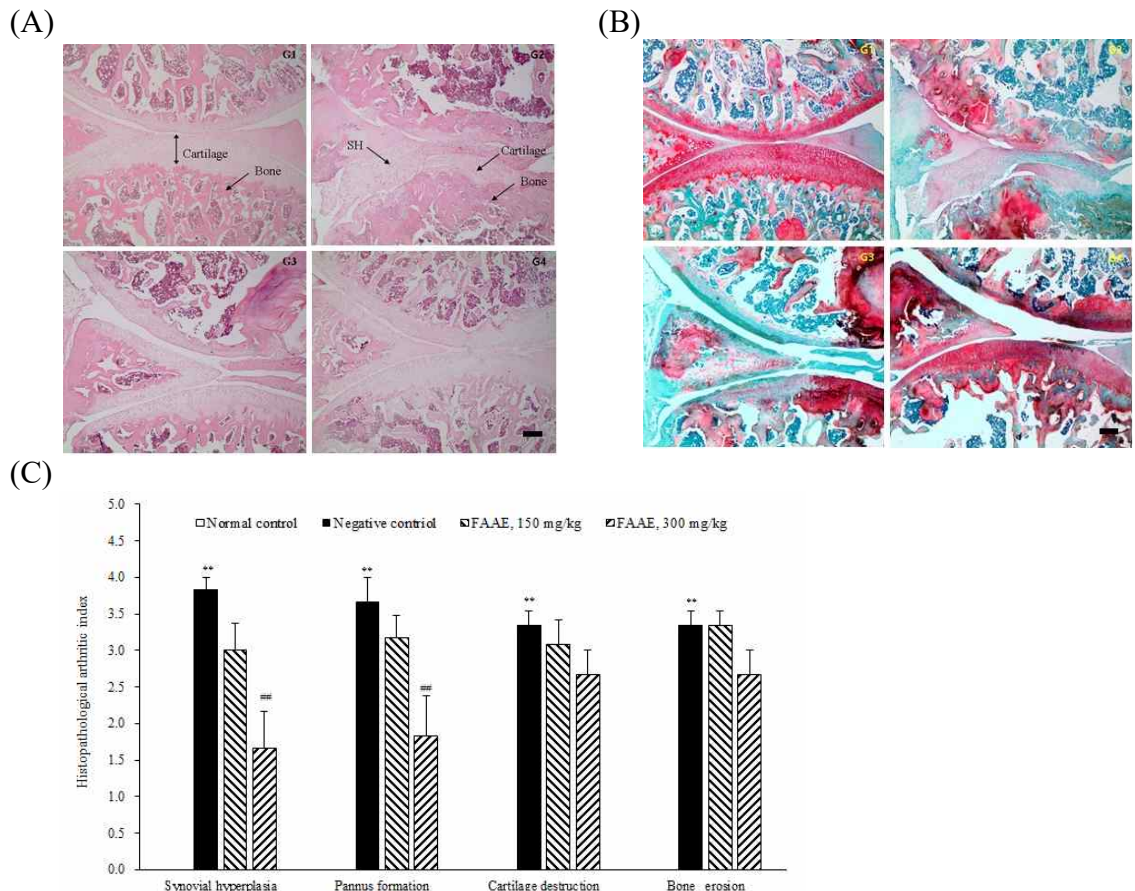


Fig. 3. Histological examination of the effect of FFAE(발효우슬추출복합물) on joints in MIA-induced arthritis of rats. (A) Cartilage H&E staining. (B) Cartilage

Safranin-O & Fast green staining. G1: Normal control (upper left), G2: Negative control (upper right), G3: FAAE 150 mg/kg (lower left), G4: FAAE(발효우슬추출복합물) 300 mg/kg (lower right). SH: Synovial hyperplasia. Magnification: ×40. Scale bar: 200 μm. (C) Histopathological arthritic index. The values are mean + S.E. *P<0.01, significant difference from the normal control group by student's t-test. #P<0.05, significant difference from the negative control group by Dunnett's t-test. ##P<0.01, significant difference from the negative control group by Dunnett's t-test.

마. 인체적용시험 (주관기관: 에스케이 바이오랜드(주))

(1) 임상시료용 원료 시생산 및 임상시료 제작

(가) 발효우슬추출복합물의 항관절염활성 기반 인체적용시험 섭취량 결정

- 특정 성분에 대한 섭취량을 평가하기 위해서는 특정 성분을 함유하고 있는 식품의 섭취량 및 그 식품 가격에서의 특정성분 함량에 대한 과학적인 정보가 필요함.
- 특정 성분의 섭취량을 평가하는 방법은 1) 이를 평가해 놓은 과학적이고 객관적인 문헌이 있을 경우 이를 인용하는 방법과 2) 식품에서 특정성분을 분석한 다양한 논문들을 검색하고 국민건강영양조사 등의 식품섭취량에 관한 정보를 줄 수 있는 자료들을 조합하여 직접 계산하는 방법임.

표. 섭취량평가자료 탐색 문헌, DB

근 거 자 료

1. 국민건강영양조사 식품섭취량 평가 자료
2. 식품첨가물데이터베이스 섭취량 산출 DB
3. 연가소비량, 한국농촌경제연구원 (식품수급표)
4. 발표된 학술논문
5. 전통적 사용이 기록되어 있는 과학적 자료 또는 역사적 사용기록
6. 그 외 객관적으로 입증 가능한 통계 자료 등

-전임상동물 실험 데이터를 바탕으로한 유효섭취량 추측

(섭취량 설정 : 체표면적 대비 환산)

Human equivalent doses (HED) 를 결정하기 위해 Mouse의 km value와 Human의 km value을 적용하여, 성인 평균 몸무게 60 kg 대비 환산 섭취량을 설정할 예정임.

$$HED = \text{Animal dose (mg/kg)} \times \frac{\text{Animal } k_m}{\text{Human } k_m}$$

(나) 발효우슬추출복합물 제조공정 확립

① 제조방법

㉠ 추출:

우슬) 1차: 우슬 투입 후 원재료 대비 15배수의 상수 투입하여 추출(95℃, 4hr)

2차: 1차 추출 잔여물에 15배수의 상수 투입하여 추출(95℃, 2hr)

당귀) 당귀 투입 후 원재료 대비 15배수의 상수 투입하여 추출(95℃, 6hr)

두충) 두충 투입 후 원재료 대비 15배수의 상수 투입하여 추출(95℃, 6hr)

㉡ 여과: 여과보조제 투입 후 filter press 여과

㉢ 농축: 우슬) 10 brix가 되게 농축

㉣ 멸균: 우슬) 121℃, 30분 멸균

㉤ 냉각: 우슬) 37℃까지 냉각

㉥ 배양: 우슬) *Lactobacillus plantarum*을 농축액 대비 5% 접종하여 37℃, 24hr 배양
(40 rpm, air없음)

㉦ 살균: 우슬) 100℃, 1hr 가열하여 살균

㉧ 여과/농축: 우슬) 여과보조제 투입 후 filter press 여과하고 농축

㉨ 혼합: 고품분 비율 기준 [우슬:두충:당귀:β-CD(부형제)=30:15:22:33] 으로 고품분
total 100%로 계산하여 혼합

㉩ 건조: 80℃ 분무 건조

표1. 발효우슬추출복합물 제조공정표

제조공정	내용	지표성분 함량(%)	수율(%)
원재료 투입 및 혼합	우슬) 상수를 15 배수 투입 당귀) 상수를 15 배수 투입 두충) 상수를 15 배수 투입	H 0.07 D 3.12 P 0.56	100
추출	우슬) 95℃, 4hr(1 차), 2hr(2 차) 추출 당귀) 95℃, 6hr 추출 두충) 95℃, 6hr 추출	H 0.097 D 1.238 P 3.091	우슬 55 당귀 39.96 두충 9.9
여과	여과보조제 투입하여 filter press	H 0.097 D 0.725 P 3.091	우슬 55 당귀 39.7 두충 9.9
농축	농축	H 0.092 D 0.092 P 2.861	우슬 54.88 당귀 39.7 두충 8.8
멸균/냉각	우슬) 121℃, 30 분 멸균, 37℃까지 냉각	-	-

배양	<i>L. plantarum</i> 5% 접종, 37°C, 24 hr 배양	-	-
살균	100°C, 1hr 가열하여 살균	-	-
여과/농축	여과보조제 투입하여 filter press 후 농축	H 0.134	우슬 48
혼합	고형분 비율 기준 혼합 [우슬:두충:당귀:β-CD=30:15:22:33]	-	-
건조	분무 건조	H 0.065 D 0.182 P 0.408	우슬 40 당귀 39.7 두충 8.8

* H, 20-Hydroxyecdysone; D, Decursin; P, Pinoresinol diglucoside

(다) 발효우슬추출복합물 기준규격 확립 및 성분분석

① 기준규격 및 분석 결과

표2. 발효우슬추출복합물의 기준규격 분석 결과

Analytical Tests	Specifications	Results
1) 성 상	황갈색 분말	Pass
2) 함 량	20-Hydroxyecdysone 0.056~0.084%	H 0.065%
	Decursin 0.16%~0.24%	D 0.182%
	Pinoresinol diglucoside 0.30~0.46%	P 0.408%
3) 납	1.0 ppm 이하	Pass
4) 총 비소	1.0 ppm 이하	Pass
5) 카드뮴	1.0 ppm 이하	Pass
6) 총 수은	1.0 ppm 이하	Pass
7) 수분	10% 이하	Pass
8) 대장균군	음 성	음 성

* H, 20-Hydroxyecdysone; D, Decursin; P, Pinoresinol diglucoside

② 영양성분분석결과

표3. 발효우슬추출복합물의 영양성분

성분	함량	성분	함량
열량(kcal/100g)	357.28	수분(%)	5.51
탄수화물(%)	82.33	회분(%)	5.62
조단백질(%)	6.18	나트륨(mg/100g)	118.76
조지방(%)	0.36		

[분석기관 : 기능식품연구원]

(라) 발효우슬추출복합물 시생산

- 약 45 kg의 발효우슬추출복합물 시생산 완료
- 우슬 추출

공정	수득량 (kg)	brix(%)	고형분(%)
원재료	35		100
1차 추출	450	3.6	-
2차 추출	300	1.0	-
혼합 및 농축	200	9.6	-
멸균, 배양	-	-	-
살균, 배양액	210	9.2	9.0

- ① 1차 추출조건: 95℃, 4시간
- ② 2차 추출조건: 95℃, 2시간
- ③ 배양 조건: *L. plantarum*, 37℃, 16시간

- 당귀 추출

공정	수득량 (kg)	brix(%)	고형분(%)
원재료	17		100
추출	290	3.3	2.9

- ① 1차 추출조건: 95℃, 4시간
- ② 2차 추출조건: 95℃, 2시간

- 두충 추출

공정	수득량 (kg)	brix(%)	고형분(%)
원재료	55		100
1차 추출	450	1.3	1.1
2차 추출	250	1.1	1.1

- ① 1차 추출조건: 95℃, 4시간
- ② 2차 추출조건: 95℃, 2시간

- 혼합 및 농축

공정	수득량 (kg)	brix(%)	고형분(%)
혼합	1122	2.6	2.5

농축	200	14.2	
----	-----	------	--

① 15 kg의 b-cyclodextrin을 농축액에 혼합, 열을 가하여 용해함

- 분무건조를 통해 총 45 kg의 분말을 수득함
- 지표물질 분석

지표물질	함량(mg/g)
20-hydroxyecdysone	0.384
Decursin	0.079
Pinoresinol diglucoside	2.443

(마) 임상시료 제작

- ① 인체적용시험 섭취량 결정
- ② 섭취량 평가 자료

표4. 섭취량 평가표

신청원료 제안 섭취량	신청원료(발효우슬추출복합물)로써 1,000 mg/일		
	발효우슬추출물	당귀추출물	두충열수추출물
구성성분			
신청원료로써 섭취량	300 mg	220 mg	150 mg
수율(평균)	40 %	39.7 %	8.8 %
원물로 환산한 섭취량	0.75g	0.554 g	1.70 g
유통판매 섭취량	17.2 g/day	2.15 g/day	29.61 g/day
원물 섭취량 기준 평가	적합	적합	적합

④ 임상시료 제작 및 포장

1) 임상시료 조성 및 함량

가) 시험식품

- 주성분명: 발효우슬추출복합물 (FAJEC)
- 성상 및 제형: 옅은 황갈색의 캡슐
- 함량: 800 mg
- 보관방법: 직사광선을 피한 서늘한 곳에 보관
- 용법 및 용량: 1일 1회, 1회 2캡슐 식후 물과 함께 섭취
(발효우슬추출복합물 (FAJEC) 로써 1g/day)
- 원재료 및 배합비율: 800 mg/캡슐 중

나) 대조식품

- 주성분: 유당 및 결정형 셀룰로오스

- 정상 및 제형: 옅은 황갈색의 캡슐
- 함량: 800 mg
- 보관방법: 직사광선을 피한 서늘한 곳에 보관
- 용법 및 용량: 1일 1회, 1회 2캡슐 식후 물과 함께 섭취
- 원재료 및 배합비율: 800 mg/캡슐 중

표5. 임상시험 조성표

원료명	시험식품		대조식품	
	배합비율(%)	함량(mg)	배합비율(%)	함량(mg)
발효우슬추출복합물	55.5600	250.002	-	-
유당	38.4400	172.9800	83.9000	377.5500
결정형셀룰로오스	3.0000	13.5000	12.0000	54.0000
이산화규소	2.0000	9.0000	2.0000	9.0000
스테아린산마그네슘	1.0000	4.5000	1.0000	4.5000
카카오 색소(JS-200)			0.6000	2.7000
치자황색600(#M4015)			0.500	2.250
합계	100.0000	800.0000	100.0000	800.0000



그림1. 임상식품 캡슐 및 포장사진

(2) 인체적용시험 프로토콜 (위탁용역-네오뉴트라)

- 경증의 퇴행성 골관절염 증상을 가진 사람을 대상으로 FAJEC가 관절건강에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
- 인체적용시험 실시기관: 한림대학교 성심병원 정형외과, 서울대학교병원 정형외과
- 인체적용시험 기간: 임상시험심사위원회의 인체적용시험 승인일로부터 12개월
- 인체적용시험 대상: 경증의 퇴행성 골관절염 증상을 가진 사람
- 인체적용시험 목적: 본 인체적용시험은 경증의 퇴행성 골관절염 증상을 가진

사람을 대상으로 FAJEC를 섭취하였을 때 퇴행성 골관절염 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획됨

- 인체적용시험용 식품 섭취방법: 1일 1회, 1회 2캡슐 식후 물과 함께 섭취
- 섭취기간: 12주
- 인체적용시험 방법: 시험대상자는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정한다. 배정된 시험대상자는 12주간 인체적용시험용 식품(시험식품 또는 대조식품)을 섭취한다.
- 최종 평가 인체적용시험 시험대상자수: 시험군 38, 대조군 38

시험물질	시험 디자인	대상자	섭취량	바이오마커	예상결과	비고
발효우슬추출복합물 (FAJEC)	12주, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조	경증의 퇴행성 골관절염 증상을 가진 사람 (n=96)	2g/day (초안)	1) VAS 2)K-WOMAC의 total score와 각 항목의 점수 3) KKS의 total score와 각 항목의 점수 4) KSF-36 5)피험자 및 담당의사의 개선도 평가 6)혈중 염증 지표(CRP, ESR)	경증의 퇴행성 골관절염 증상을 가진 사람에게 발효우슬추출물을 섭취하여 섭취전 후 유효성 지표의 개선정도를 대조식품과 비교하여 유의한 차이를 확인 (P<0.05)	(주)네오뉴트라 위탁진행

시험명: 경증의 퇴행성 골관절염 증상을 가진 사람을 대상으로 FAJEC가 관절건강에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

(가) 인체적용시험 계획서

인체적용시험 번호	SKBL_FAJEC
인체적용시험용 식품	발효우슬추출복합물(FAJEC)
인체적용시험 제목	경증의 퇴행성 골관절염 증상을 가진 사람을 대상으로 FAJEC가 관절건강에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조 인체적용시험

인체적용시험 단계	기타(건강기능식품)
인체적용시험 시험책임자	권봉철 교수(한림대학교 성심병원 정형외과) 한혁수 교수(서울대학교병원 정형외과)
인체적용시험 실시기관	한림대학교 성심병원(경기도 안양시 동안구 관평로 170번길 22) 서울대학교병원(서울시 종로구 대학로 101)
인체적용시험 의뢰자	SK바이오랜드㈜ 대표이사 이근식 충청남도 천안시 동남구 병천면 송정리 2길 59
Confidential	© SK Bioland Co., Ltd. This protocol is the property of SK Bioland Co., Ltd. and may not in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise use without the express permission of SK Bioland Co., Ltd.

인체적용시험 제목	경증의 퇴행성 골관절염 증상을 가진 사람을 대상으로 FAJEC가 관절건강에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 의뢰자	SK바이오랜드㈜ 대표이사 이근식 충청남도 천안시 동남구 병천면 송정리 2길 59
인체적용시험 시험책임자	권봉철 교수(한림대학교 성심병원 정형외과) 한혁수 교수(서울대학교병원 정형외과)
인체적용시험 실시기관	한림대학교 성심병원 (경기도 안양시 동안구 관평로 170번길 22) 서울대학교병원(서울시 종로구 대학로 101)
인체적용시험 기간	임상시험심사위원회(IRB)의 인체적용시험 승인일로부터 12개월
인체적용시험 대상	경증의 퇴행성 골관절염 증상을 가진 사람
인체적용시험 목적	본 인체적용시험은 경증의 퇴행성 골관절염 증상을 가진 사람을 대상으로 FAJEC를 섭취하였을 때 퇴행성 골관절염 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.
인체적용시험 단계 및 디자인	단계: 기타(건강기능식품) 디자인: 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
인체적용시험용 식품	시험식품: 발효우슬추출복합물(FAJEC)
	대조식품: Placebo
인체적용시험용 식품 섭취방법	시험식품: 1일 1회, 1회 2캡슐 식후 물과 함께 섭취 (발효우슬추출복합물로써 1g/day)
	대조식품: 시험식품과 동일한 방법으로 섭취

인체적용시험용 식품섭취기간	12주
-------------------	-----

인체적용시험 방법	<p>시험대상자(또는 법정대리인)는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정한다. 배정된 시험대상자는 12주간 인체적용시험용 식품(시험식품 또는 대조식품)을 섭취한다.</p>
-----------	--

인체적용시험 대상자 수		시험군	대조군	총 시험대상자 수
	최종 평가 레수(PP)	38	38	76
	Drop-out(20%) 고려레수	48	48	96

선정기준	<ul style="list-style-type: none"> (1) 만 40세 이상 ~ 만 75세 이하의 남·녀 (2) VAS(Visual Analogue Scale) 30mm 이상에 해당되는 자 (3) X-ray 상에서 슬관절 또는 고관절 등의 Kellgren & Lawrence grading scale이 grade I, II 에 해당되는 자 (4) 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent form)에 서명한 자
------	---

제외기준	<ul style="list-style-type: none"> (1) 시험자 판단으로 퇴행성 이외의 특정요인에 의한 관절염에 해당하는 자 (2) 관절 간격이 2mm 이하인 자 (3) 관절 주위의 골극 현상, 불규칙한 관절면, 관절의 연골하 골낭종 등이 동반되어 있으며 중등도의 관절염으로 판단되는 자 (4) 현재 관절통 이외에 임상적으로 유의한 심혈관계, 면역계, 감염성, 종양성 질환을 가진 자 (5) 위염, 위궤양 치료 중인 자 (6) 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100mmHg 이상, 10분 안정 후 측정기준) (7) 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180mg/dl 이상) (8) TSH 0.1 μIU/ml 이하이거나, 10 μIU/ml 이상인 자 (9) AST(GOT)와 ALT(GPT)가 수행기관 정상범위의 3배 이상인 자 (10) Creatinine이 수행기관 정상범위의 2배 이상인 자 (11) 임신 중이거나 수유 중 또는 3개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자 (12) 스크리닝 기준 2주 이내에 관절염 관련 의약품 또는 관절건강을 목적으로 하는 건강기능식품을 섭취한 자 (13) 정신분열증, 우울증, 약물중독 등의 정신질환자 (14) 스크리닝 기준 2주 이내에 퇴행성 관절염 치료를 위한 물리치료 또는 한방치료(침, 부항, 뜸 등)를 받은 자 (15) 인체적용시험 시작 2개월 이내에 다른 임상시험에 참여했거나 본 인체적용시험 기간 동안에 다른 임상시험에 참여할 계획이 있는 자 (16) 인체적용시험용 식품 관련 식품에 민감하거나 알레르기가 있는 자 (17) 시험자가 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단되는 자
유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> (1) VAS (2) K-WOMAC의 total score와 각 항목의 점수 (3) KSF-36 (4) 시험자의 개선도 평가 (5) 시험대상자의 개선도 평가 (6) 혈중 염증 지표 (CRP, ESR)
안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> (1) 이상반응 (2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사) (3) 활력징후(맥박, 혈압), 신체계측(체중) (4) 심전도검사

통계분석	<p>1. 유효성 VAS, K-WOMAC, KSF-36, 혈중 염증 지표(CRP, ESR)의 섭취 전후 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 이용하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 시험대상자 및 연구자에 의한 개선도 평가는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 이용하여 분석한다.</p> <p>2. 안전성</p> <p>1) 이상반응 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 이상반응(treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA에 따라 Coding 하며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화 한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각군간 이상반응이 발생한 시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석한다.</p> <p>2) 임상병리검사 혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료는 군내 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하고, 군간 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 이용하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 분석한다. 뇨검사는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교한다.</p>
	<p>3) 활력징후(맥박·혈압), 신체계측(체중) 활력징후(맥박·혈압), 체중 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내비교는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하고, 군간 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 이용하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 분석한다.</p> <p>4) 심전도검사 심전도검사결과는 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 분류하여 표로 제시하며, 군내 비교는 McNemar검정을 이용하여 분석한다.</p>

(나) 인체적용시험 진행 일정표

Period		Screening	Active Treatment		
Visit		1	2	3	4
Week ¹⁾		-2 ~ 0	0	6	12
Window period (day) ²⁾				±6	±6
서면동의서		✓			
인구학적조사 ³⁾		✓			
병력 및 약물투여력 조사 ⁴⁾		✓	✓		
이학적검사		✓		✓	✓
활력징후(맥박, 혈압)		✓		✓	✓
심전도검사 ⁵⁾		✓			✓
신체계측 ⁶⁾			✓	✓	✓
방사선촬영(X-ray) ⁷⁾		✓			
식사지도 및 식이조사 ⁸⁾			✓	✓	✓
임상병리검사 ⁹⁾		✓			✓
임신반응검사 ⁹⁾		✓			
유효성 평가	VAS	✓		✓	✓
	K-WOMAC (Total score 및 각항목의 점수)		✓	✓	✓
	KSF-36		✓	✓	✓
	시험자의 개선도 평가			✓	✓
	시험대상자의 개선도평가			✓	✓
	혈중 염증 지표(CRP, ESR)	✓			✓
시험대상자 적합성 평가		✓	✓		
무작위배정			✓		
인체적용시험용 식품의 처방			✓	✓	
이상반응 확인				✓	✓
순응도 확인 ¹⁰⁾				✓	✓
병용약물 및 병용요법 변화 확인				✓	✓

(다) 인체적용시험 결과

① 유효성평가결과

인체적용시험의 1차유효성평가는 섭취 12주 후 VAS(Visual Analogue Scale) 변화량으로써 시험군과 대조군의 개선정도를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. 2차유효성평가는 섭취 6주 후 VAS(Visual Analogue Scale), K-WOMAC의 total score와 각 항목의 점수, KSF-36, 혈중염증지표(CRP, ESR)의 변화량과 시험대상자 및 시험자 개선도평가점수로서 시험군과 대조군의 개선정도를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

㉞ VAS (Visual Analogue Scale)

VAS 변화량 분석에서 섭취 6주 후 시험군은 $4.73 \pm 9.24\text{mm}$ 감소하였고($p=0.0010$), 대조군은 $4.52 \pm 8.15\text{mm}$ 감소하였으나($p=0.0003$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 12주 후 VAS 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 시험군은 $11.91 \pm 11.01\text{mm}$ 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 $9.90 \pm 11.89\text{mm}$ 감소하였으나($p<0.0001$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. FA Set분석에서도 PP Set분석과 유사한 결과를 보였다.

㉟ K-WOMAC

K-WOMAC의 total score 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 16.41 ± 13.82 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 9.33 ± 14.34 점 감소하여($p=0.0001$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0222$).

K-WOMAC의 통증 점수변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 3.16 ± 3.34 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 1.52 ± 3.12 점 감소하여($p=0.0031$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0232$).

K-WOMAC의 뻣뻣함 점수변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.57 ± 1.44 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.79 ± 1.51 점 감소하여($p=0.0011$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0141$).

K-WOMAC의 □신체적 기능점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 11.68 ± 10.02 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 7.02 ± 10.48 점 감소하여($p<0.0001$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0381$).

K-WOMAC의 total score 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 15.78 ± 13.84 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 8.89 ± 14.61 점 감소하여($p=0.0001$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0218$).

K-WOMAC의 □통증 점수변화량을 □FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 3.00 ± 3.35 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 1.57 ± 3.28 점 감소하여($p=0.0022$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0393$).

K-WOMAC의 뻣뻣함 점수변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.52 ± 1.43 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.77 ± 1.48 점

감소하여($p=0.0005$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0122$, $p=0.0469$).

K-WOMAC의 신체적 기능 점수변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취12주 후 시험군은 11.26 ± 10.01 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 6.55 ± 10.70 점 감소하여($p=0.0001$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0310$).

㉔ KSF-36

KSF-36의 기능 수준 영역 점수변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 12.50 ± 13.87 점 증가하였고($p<0.0001$), 대조군은 5.40 ± 15.74 점 증가하여($p=0.0318$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0078$).

KSF-36의 신체적 기능 점수변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 13.07 ± 11.22 점 증가하였고($p<0.0001$), 대조군은 6.55 ± 17.72 점 증가하여($p=0.0213$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0174$).

KSF-36의 신체적 역할 제한 점수변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 14.06 ± 19.45 점 증가하였고($p<0.0001$), 대조군은 3.27 ± 18.53 점 증가하여($p=0.2589$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0016$).

KSF-36의 건강상태 변화점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 9.09 ± 17.96 점 증가하였고($p=0.0027$), 대조군은 1.19 ± 17.42 점 증가하여($p=0.7999$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0486$).

이외 사회적기능, 감정적 역할제한, 안녕수준영역, 정신건강, 활력, 통증, 전반적인 건강평가영역, 일반건강 점수변화량분석에서는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다.

KSF-36의 기능수준 영역점수변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 12.07 ± 13.75 점 증가하였고($p<0.0001$), 대조군은 5.59 ± 16.13 점 증가하여($p=0.0218$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0106$).

KSF-36의 신체적 기능점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 12.39 ± 11.73 점 증가하였고($p<0.0001$), 대조군은 5.96 ± 19.21 점 증가하여($p=0.0389$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0214$).

KSF-36의 신체적 역할제한 점수변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 13.59 ± 19.15 점 증가하였고($p<0.0001$), 대조군은 4.12 ± 18.81 점 증가하여($p=0.1398$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0055$).

이외 사회적 기능, 감정적 역할제한, 안녕수준영역, 정신건강, 활력, 통증, 전반적인 건강평가영역, 일반건강, 건강상태 변화점수 변화량분석에서는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다.

시험자의 개선도평가 결과를 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 2.27 ± 0.50 점, 대조군은 2.67 ± 0.53 점으로 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0009$).

시험자의 개선도 평가결과를 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 2.28 ± 0.50 점, 대조군은 2.64 ± 0.57 점으로 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0016$).

혈중염증지표인 CRP(C-Reactive Protein, C반응단백질)와 ESR(Erythrocyte Sedimentation Rate, 적혈구침강속도) 분석을 통하여 염증 개선 정도를 보고자하였다.

CRP는 감염이나 염증 시작 후에 수 시간내에 간에서 만들어지고 혈류로 분비되는 급성기 반응물질이다.

CRP의 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.34 ± 2.07 mg/dl 증가하였고($p=0.0151$), 대조군은 1.15 ± 7.24 mg/dl 증가하였으나($p=0.0011$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 시험군의 CRP변화량이 대조군과 비교하여 감소경향성을 나타내었다.

ESR의 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.68 ± 6.71 mm/hr 증가하였고($p=0.6890$), 대조군은 0.31 ± 7.18 mm/hr 증가하였으나($p=0.7353$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. CRP, ESR 변화량의 FA Set분석에서도 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

바. 독성 평가 (주관기관: 에스케이 바이오랜드(주), 위탁기관: (주)바이오톡스텍)

(1) Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주 반복 경구투여 용량결정시험 (Non-GLP)

본 시험은 시험물질인 발효우슬추출복합분말을 Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))계 암수 랫드에 2 주간 반복 경구 투여하여, 13 주 반복투여 독성시험 시 용량설정 근거로 사용하고자 실시하였다.

군구성은 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 의 각 3 개 용량과 대조군 (주사용수)을 설정하여 암수 각 군당 5 마리에 2 주간 경구 투여하였다.

관찰기간 동안, 일반증상관찰, 체중측정 및 사료섭취량 측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정 및 부검 시 육안적 검사를 수행하였다.

투여기간 동안, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질색 변이 관찰되었고, 수컷 5,000mg/kg/day 투여군에서 유연이 투여 후에 관찰되었다.

암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 알라닌 아미노기전이효소 (ALT)의 증가가 관찰되었고, 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 상대중량이 증가하였다.

체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사 및 부검 결과, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

이상으로, 발효우슬추출복합분말을 암수 랫드에 2 주간 반복 경구 투여한 결과, 13 주 반복투여 독성시험의 고용량은 5,000 mg/kg/day 로 설정해야 될 것으로 판단된다.

(2) 유전독성평가 (GLP)

(가) 복귀돌연변이시험 (Ames Test)

시험물질 발효우슬추출복합분말의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주)과 트립토판 요구성인 대장균 (WP2 $uvrA$ (pKM101) 균주)을 이용하여 대사활성화비존재하 및 존재하의 경우에 대하여 각각 검토하였다.

본시험의 용량을 설정하기 위하여, 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비4를 적용하여, 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 로 용량설정시험을 실시한 결과, 시험물질에 의한 생육저해 및 침전은 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조균 및 양성대조균을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량($\mu\text{g}/\text{plate}$)
TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 $uvrA$ (pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

본시험의 결과, 시험물질균에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수는 음성대조균의 2배를 초과하지 않았다.

각 균주에 대한 양성대조균의 복귀변이콜로니수는 음성대조균과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 발효우슬추출복합분말의 유전자돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단된다.

(나) 염색체이상시험

시험물질인 발효우슬추출복합분말의 염색체이상유발성을 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 이용하여 검토하였다.

본 시험의 용량을 설정하기 위하여, 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 최고용량으로 하고,

이하용량은 공비2를 적용하여, 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1

및 19.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 용량설정시험을 실시한 결과, 단시간처리법의 대사활성화 비존재하

및 존재하에서는 세포독성이 관찰되지 않았으나, 연속처리법의 대사활성화

비존재하에서는 세포독성이 관찰되었다. 따라서, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의

세포증식을 50% 이상(약55%) 억제하는 용량을 산출한 결과, 2,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였다.

시험물질에 의한 침전은 모든 계열에서 313 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 용량에서 관찰되었다.

용량설정시험의 결과에 따라서, 본 시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한,

음성대조균 및 양성대조균을 설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량($\mu\text{g}/\text{plate}$)
단시간처리법	-/+	313, 156, 78.1, 39.1
연속처리법	-	313, 156, 78.1, 39.1

본시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다.

각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질인 발효우슬추출복합분말은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

(다) 소핵시험

시험물질 발효우슬추출복합분말의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발유무를 평가하기 위하여 ICR 마우스를 이용하여 24시간 간격으로 2회 경구투여하여 검토하였다.

본 시험의 용량을 설정하기 위하여, 5,000mg/kg을 최고 용량으로하고, 이하 용량은 공비2를 적용하여, 2,500, 1,250 및 625mg/kg으로 용량설정시험을 실시한 결과, 암수 모두 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상의 이상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.

따라서, 본 시험의 최고용량은 5,000 mg/kg으로 하고, 이하용량은 공비2를 적용하여, 2,500 및 1,250mg/kg의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 용량설정시험에서 암수 모두 사망동물이 관찰되지 않았기 때문에, 본 시험은 소핵유발에 감수성이 좋다고 알려져 있는 수컷을 사용하였다.

본 시험의 결과, 시험물질군의 다염성적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE)

중소핵다염성적혈구(Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. 또한,

총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다.

양성대조군에서는 다염성적 혈구중소핵 다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었다. 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질 발효우슬추출복합분말의 마우스골수세포에 대한 소핵유발성이 없는 것으로 판단된다.

(3) Spague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험 (GLP)

본 시험은 시험물질인 발효우슬추출복합분말을 Sprague-Dawley 계 암수 6 주령 랫드에 단회경구투여시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다. 군구성은 5,000 mg/kg 단일시험물질 투여군 및 대조군 (주사용수)의 2 군으로 하고, 암수 각각 5 마리씩 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14 일 동안, 일반증상의 관찰 및

체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였다.

암수 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 일반증상에서는 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1 일에 점액변 및 시험물질색변이 관찰되었으나, 투여 후 2 일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

본 시험의 조건 하에서 발효우슬추출복합분말을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

(4) Spague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험 (GLP)

본 시험은 발효우슬추출복합분말을 Sprague-Dawley계 암수 랫드에 13주간 반복경구 투여시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고자 실시하였다.

군구성은 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000mg/kg/day 투여군의 3개의 용량과

대조군(주사용수)을 설정하여 군당 암수 각 10마리에 13주 동안 경구 투여하였다.

관찰기간동안, 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량측정, 안과학적 검사 및 뇨검사를

실시하였고, 관찰 기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량측정, 부검 및 조직병리학적 검사를 실시하였다.

본 시험에서 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중, 사료섭취량, 안과학적검사, 뇨검사, 혈액학적검사, 혈액생화학적검사, 장기중량 및 조직병리학적 검사에서 시험물질투여에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

암수 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 색변이 관찰되었고, 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 전 또는 후에 유연이 관찰되었다.

부검결과, 수컷 2,500 mg/kg/day 투여군 및 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 변색이 관찰되었으며, 암수 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 신장의 변색이 관찰되었다.

본 시험조건하에서 시험물질 발효우슬추출복합분말을 랫드에 13주 반복경구투여한 결과, 무독성량(NOEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day를 상회하는 것으로 판단된다.

사. 연구개발성과

- 논문게재성과

1. 한국식품영양과학회지 (*J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 48(11), 1179~1185, 2019) KCI

논문명: “MIA로 유도된 골관절염 동물모델을 이용한 발효우슬, 당귀, 두충을 포함한 추출복합물의 항골관절염 및 항관절통 효과 연구(Anti-osteoarthritis and anti-arthrodynia effects of a mixture of fermented *Achyranthes japonica* Nakai, *Angelica gigas* Nakai, and *Eucommia ulmoides* Oliver extracts on monosodium iodoacetate-induced arthritis in rats)”

저자: 최동환, 이성진, 정현철, 김경민, 권민영, 이승훈, 손요한 (주관책임자)

주요내용: MIA로 유도된 관절염동물모델을 이용하여 발효우슬등추출복합물 섭취를 통한 관절통 개선, 염증사이토카인의 감소, 조직병리학적 개선 등을 확인하였음.

2. Journal of Microbiology and Biotechnology (SCIE)

논문명: "Metabolomic investigation on fermentation products of *Achyranthes japonica* Nakai by *Lactobacillus plantarum*"

저자: 이창완 (위탁공동연구기관 이도엽 교수님 석사졸업 후 SK바이오랜드에 입사)
이도엽 (위탁공동연구책임자)

주요내용: 우슬 발효 전후비교를 통해 대사산물의 변화를 확인함. 특히 유효성분인 20-hydroxyecdysone, 25S-inokosterone의 증가를 확인함. 대사산물 중 58%가 발효의 영향을 받는 것을 확인. Cellobiose와 같은 경우, 56배 증가됨을 확인함. 발효를 통한 대사산물 변화를 깊이있게 다룬 연구.

- 특허성과 : 특허 등록 2건 완료 (제법 및 조성물 특허 등록 완료)

1. 특허명: 관절염의 개선 효능이 있는 락토바실러스 플랜타럼 SKB1234 신규 균주, 이의 발효 우슬 추출물, 당귀 추출물 및 두충 추출물의 혼합물의 제조방법

특허등록번호: 제10-2007144호

출원번호: 제10-2019-0049002호

출원일: 2019년 04월 26일

등록일: 2019년 07월 29일

특허권자: 에스케이바이오랜드(주)

발명자: 정현철, 이성진, 최동환, 권민영, 손요한, 이승훈

2. 특허명: 발효우슬추출복합물을 함유하는 관절염의 예방 또는 치료용 조성물

특허등록번호: 제10-2044659호

출원번호: 제10-2019-0049005호

출원일: 2019년 04월 26일

등록일: 2019년 11월 07일

특허권자: 에스케이바이오랜드(주)

발명자: 정현철, 이성진, 최동환, 김경민, 손요한, 이승훈



위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록됨을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록됨을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



-생명정보 (생명자원과 생명정보)

1. 생물자원 기탁(국제특허 기탁)

균주명: *Lactobacillus plantarum* SKB1234

기탁년도: 2019년

기탁일: 2019.03.05


기탁번호: KCCM12450P

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To: SK Bioland
152, Manhae-ro, Danwon,
Ansan, Gyeonggi 15407,
Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Lactobacillus plantarum</i> SKB1234	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12450P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on March. 05. 2019 (date of the original deposit). ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B-D 45, Hongjeonae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 03641 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s). Date: March. 05. 2019. 

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international Depository Authority was acquired.

아. 연구결과

- 우슬 및 국내산 천연물의 용도개발을 위한 유산균발효기법 도입으로 국내산 기능성 원료 시장의 한계를 극복

·국내 발효연구 중 전통발효에 관한 연구는 김치류, 장류, 젓가류, 주류 분야의 연구가 대부분으로 천연물을 이용한 발효는 미비함. 현재 상품화 되어 있는 천연물 발효제품은 발효홍삼이 대표적임.

·특히 우리 고유의 농림산물과 천연물을 대상으로 발효를 이용하여 생물전환된 유도체나 신물질을 창출하고, 이들의 생리·약리 활성을 탐색하는 개발전략은 국외의 기존 특허와 마찰을 피하고, 천연물 유래의 신규선도물질을 개발할 수 있는 최상의 대안임.

·또한 천연물 생물전환기술의 과학화는 천연물의약, 기능성식품, 천연물화장품 산업에 있어 원료다양성의 한계와 원료의 균일한 QC 문제를 극복할 수 있는 최상의 대안임.

- 우슬 소재 및 유효 기능성 기작의 차별성

·주 경쟁업체인 정관장 등에서 초록입홍합오일, 강황, 보스웰리아 등 개별인정형으로 등록된 수입산 원료를 주원료로 하여 다기능성의 홍삼을 복합하거나, MSM이나 상어연골 등과 같은 연골 보강 원료를 혼합한 제품을 개발하는 경우가 대부분임.

·국외 시장에서 우슬은 관절건강 소재로서 사용된 제품이 없고, 기존 고시형 원료들의 연골 보강 기능성과 다르게 항염증 활성에 의한 관절염 개선 기능성을 추구한다는 점에서 소재 선택에 창의성이 있다고 판단됨.

-기대성과

·인체적용시험을 통한 발효우슬추출물의 효능평가를 수행 결과, 관절건강에 도움을 주는 기능성원료의 인정을 통해 국내 개별인정형 건강기능식품 시장에 활력을 줄 수 있을 것으로 기대

·국내산 농작물의 활용을 통한 국내 지역특화농작물 생산 및 생산 농가 수익증대 효과 기대

-파급효과

[기술적 측면]

⇒ 소재의 차별성에 의한 관절건강 개선 효능평가 기술 확보

기존의 관절건강 소재인 글루코사민, N-아세틸글루코사민은 관절 연골의 구성성분으로, 무릎의 연골 성분을 보충, 보강해주는 개념인 반면, 우슬 소재는 관절에 생긴 염증 때문에 발행하는 퇴행성관절염의 통증을 완화시키는 것으로 소재 기작의 차별성이 있음. 이에 따라 퇴행성관절염으로 고통받는 만성통증 반건강인에게 효과가 있을 것으로 판단.

· 항관절염 및 항관절통 활성에 관련된 in vitro, in vivo 평가자료의 축적으로 추후 다른 소재를 이용한 관절건강 관련 기능성 소재 개발 시 효능평가 assay법 활용

⇒ 천연물/지역특화농림산물 이용 발효 기술의 과학화

· 발효에 의한 생물전환의 과학화로 향후 발효 천연물/지역특화농림산물로부터 생리

활성물질의 개발에 기여

- 생물전환 기법을 활용한 관절건강 개선 우슬복합 소재 제조 기술 확립
- 기능성과 안전성이 확보된 천연물/지역특화농림산물로부터 가공식품 제조 기술 확보

[경제적-산업적 측면]

- ⇒ 생약재인 우슬 등 천연물로부터 고부가가치기능성 소재의 창출을 통한 지역특산물의 육성과 생산농가의 소득 증대에 직접적으로 기여
 - 수요증가에 따라 재배량 증가로 생산농가의 소득 증대
 - 고부가가치성 기능성 원료 개발로 우슬 및 국내산 천연물의 판매가격 상승
 - 현지 가공공장의 설립으로 지역민의 고용 창출 기대
- ⇒ 국가 경제의 향상에 기여
 - 수입산 원료로 치중된 관절건강 기능성 원료 시장의 국내산 원료 대체효과
 - 효능이 뛰어난 기능성 원료의 개발로 수출에 의한 무역수지 개선에 기여
 - 천연물/지역특화농림산물 발효 및 생물전환의 과학화로 FTA 이후 어려움이 예상되는 제약산업의 활로 개척에 기여
 - 특히, 천연물/지역특화농림산물 생물전환기술의 과학화는 천연물의약, 기능성식품, 천연물화장품 산업에 있어 원료 다양성의 한계와 완료의 균일한 QC문제 극복에 도움을 줄 것으로 예상됨.
- ⇒ 시장의 실버산업 제품의 수요증가에 따른 공급 추진
 - 65세 이상의 고령인구 비율 증가추세에 따라 고령친화산업 제품의 수요증가에 따른 공급 추진
 - 좌식생활의 공통점이 있는 일본 역시 고령화가 진행됨에 따라 관절 건강에 대한 관심이 증가하여 중요성이 부각됨. 세계 최고수준의 건강기능성식품 기술 및 시장을 가진 일본으로의 제품 수출 효과가 기대됨.

[사회적 측면]

- ⇒ 발효우슬추출복합물의 개별인정형 등록 및 국내산 농작물 유래 건강소재의 홍보를 통한 초고령사회 가속화에 대한 관심 및 경각심 부여
 - 본 과제의 결과물인 발효우슬추출복합물의 제품화를 통해 관절건강 소재 시장에 활력을 불어넣음으로써 국내 소비자들의 고령인구의 만성질환에 대한 관심 및 관리의 필요성을 강조
 - 결과적으로는 일본의 로코모티브신드롬 대책과 같이 국가 주도의 관절 건강을 위한 붐을 유도하고 건강한 노후를 위한 인식개선이 촉진될 수 있을 것으로 기대됨.
- ⇒ 해당 개발 내용은 발효우슬추출복합물의 관절염 개선 기능성 평가를 통해 소비자들의 관심을 확대하여 국민의 건강을 증진시키고 국내 농작물 및 천연물 생산농가를 활성화시키는 **사회적 가치(Social Value)**를 극대화하고자 함.

[제품 및 시장분석 측면]

⇒ 관절 건강 소재로서 우슬의 차별성을 강조

- 우슬 관련 국내 시장을 분석한 결과 우슬을 원료로써 사용한 제품들이 두루 있으나, 건강기능식품으로써 인정받은 제품은 종근당 건강(주) 등에서 글루코사민 등의 고시형 원료를 주원료로 하여 우슬추출분말을 혼합한 제품 형태가 대부분임.
- 또한 국외 시장에서 우슬은 관절건강 소재로서 사용된 제품이 없고, 발효를 접목한 소재의 개발이 흔치 않기 때문에 이에 소재 선택과 추출물 개발 공정에 혁신성이 있다고 판단됨.

⇒ 건강기능성식품의 주 수출시장인 일본 공략

- 일본의 경우, 국가 자체적으로 로코모티브신드롬 대책을 주도하며 관절 건강 소재에 대한 관심을 높이고 있으며, 실제 관절 건강 시장규모가 지속적으로 증가하는 추이를 나타냄.
- 관절건강식품인 글루코사민이 주 매출을 이루고 있으나, 본 과제의 결과물로 항염증 활성 기전에 의한 관절염 및 관절통 개선 효능의 차별성을 내세워 일본 관절시장에 진출하고자 함.

⇒ 최종적으로 자사는 우슬 소재의 항염증 활성에 의한 관절염 개선 효능과 더불어 원료의 차별성을 부각하여 건강기능성 원료로 상용화하여 매출을 극대화하고자 함.

자. 연구고찰

본 연구에서는 여러 균주를 가지고 발효를 진행한 우슬 시료 7개와 열수 및 주정 추출물 9개 시료를 가지고 관절강내 세포에서 세포사멸억제실험, 염증성 cytokine 분비량 및 연골인자(Collagen type I) 실험을 진행하였다.

세포사멸억제실험에서 발효우슬 원료 중 *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* 순서로 복합물 제조 원료 중 두충 열수 추출물(두(열)), 당귀 열수 추출물(당(열)), 당귀 주정 추출물(당(주)) 순서로 세포생존률이 유의적으로 증가되었음을 확인하였다.

염증성 cytokine 분비량 실험에서 TNF- α 분비량에서 발효우슬 원료는 *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* 순서로, 복합물 제조 원료에서 두충 열수 추출물(두(열)), 당귀 열수 추출물(당(열)), 속단 열수 추출물(속(열)) 순서로 유의적으로 감소되었음을 확인하였다. IL-1 β 분비량 및 유전자 발현량 결과, 발효우슬 원료는 *L. plantarum*, 두충 열수 추출물(두(열))에서 공통적으로 유의적으로 감소하였음을 확인하였다.

관절을 보호하는 대표 Collagen 중 가장 많은 비중을 차지하는 Collagen type I의 유전자 발현량 결과, 발효우슬 원료 중 *L. casei*, *L. plantarum* 순서로 유의적으로 증가하였으며 복합물 제조 원료에서 두충 열수 추출물(두(열)), 당귀 열수 추출물(당(열)), 속단 열수 추출물(속(열)) 순서로 유의적으로 증가하였다.

따라서, 종합적인 실험결과를 통해 발효우슬 원료 중 *L. plantarum*, 복합물 제조 원료는 두충 열수 추출물(두(열)), 당귀 열수 추출물(당(열))을 최종 발효우슬추출복합물로 선정하였다. 직접 연골세포를 primary culture하여 발효우슬추출복합물의 관절 건강 효능 평가를 진행하였다.

결과적으로, 발효우슬추출복합물의 처리가 primary chondrocyte에서 염증발생 억제와 관절연골 보호 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 발효우슬추출복합물 섭취 시 관절염 증상을 완화시키고 연골 보호 및 예방효능을 지니는 기능성 소재로서 활용가치 및 실용가능성이 있을 것으로 기대할 수 있다. 또한 추후 연구를 통해 골관절염이 유발된 동물에서 발효우슬추출복합물 섭취 시 관절연골의 형태학적인 변화 및 골상태의 분석과 더불어 관절염 유발 동물의 관절연골 및 혈액학적 분석을 진행하여 동물실험에서 기전적 측면을 보완하고 효능에 대한 추가적인 검증을 완료하였다.

추가로, 발효우슬추출복합물의 관절염 통증 개선 효과를 보기 위해 진행된 WBI 측정 결과, 음성대조군은 정상대조군과 비교하여 모든 측정일에서 통계유의적으로 감소하였으며, MIA로 유도된 관절염으로 인해 음성대조군에서 통증이 발생했음을 확인하였다. 시험물질투여군은 모든 측정일에서 음성대조군과 비교하여 WBI가 증가되어 통증 개선에 효과가 있는 것으로 나타났다.

염증성 사이토카인 IL-1 β 및 TNF- α 모두 시험물질 투여 3일째 음성대조군과 비교하여 통계유의적으로 감소되었다. 음성대조군의 IL-1 β 는 염증유발 초기에 혈액에서 증가되었다가 14일 이후 감소되어 정상대조군과 차이를 보이지 않아, 14일 이후 시험물질이 IL-1 β 에 미치는 영향을 확인할 수 없었다. 음성대조군의 TNF- α 는 염증유발 후 증가되었으며, 시험물질투여군에서 감소하는 경향을 나타냈지만 통계학적인 유의성이 나타나지 않았다.

연골의 조직병리학적 분석 결과, 활막과형성 및 결합조직 형성 정도가 300 mg/kg 용량의 시험물질투여군에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소되었으며, 음성대조군에서 파괴된 연골 조직이 모든 용량의 시험물질투여군에서 증가되는 경향을 나타냈다.

결론적으로, MIA로 유도된 관절염 동물모델에서 시험물질인 발효우슬추출복합물의 섭취는 염증을 억제하여 통증을 감소시키고, 연골 파괴를 억제하여 관절염을 개선하는데 효과가 있는 것으로 판단된다.

인체적용시험 결과, VAS 변화량 분석에서 섭취군에서 대조군 대비 감소 경향성을 보였으며, 가장 중요한 바이오마커인 K-WOMAC의 total score, 통증, 뻣뻣함, 신체적 기능 점수 변화량에서 FA Set 및 PP Set 모두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(P<0.05). 결론적으로, 발효우슬추출복합물 섭취시 인체대상 관절염 개선 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

차. 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.497억원	
			향후 3년간 매출	30억원	
		관련제품	개발후 현재까지	5억원	
			향후 3년간 매출	100억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.1 % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 20 % 국외 : 10 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 1 % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 30 % 국외 : 20 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			10위 내 진입목표

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2017.06.15~2019.12.31		
	소요예산(백만원)		1,020		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년 후	5년 후
			0.497	30	100
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	0.1	20	40
		국외		10	20
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		건강기능식품, dietary supplement, 천연물의약품			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년 후	5년 후
	수입대체(내수)		0.497	30	100
	수 출			10	50

[사업화 계획]

1) 소재의 차별성 부각

기존의 관절건강에서 가장 널리 판매되고 있는 소재인 글루코사민, N-아세틸글루코사민은 관절 연골의 구성성분으로, 무릎 연골의 성분을 보충, 보강해주는 개념인 반면, 우슬 소재는 관절에 생긴 염증 때문에 발생하는 퇴행성관절염의 통증을 완화시키는 것으로, 소재 기작의 차별성이 있음. 생물전환기술 적용을 통한 유효성분 고도화를 실현하였으며, 특히, 두충 및 당귀와의 혼합을 통해 우슬의 기능을 보완한 완벽한 관절건강기능식품 원료로 충분히 경쟁력이 있다고 판단됨. 퇴행성관절염으로 고통을 받고 있는 만성통

중 반건강인(노인, 운동선수 등)에게 소재의 효능에 관한 차별성을 강조하여 제품을 판매할 전략임.

2) 건강기능성식품 원료 생산 및 판매 1위의 산업적 기반을 이용한 제품의 사업화

SK바이오랜드(주)는 2019년 기준 건강기능식품 원료로 약 300억원의 매출을 달성하였음. 건강기능식품 고시형 원료는 홍삼농축액, 대두 이소플라본, 녹차추출물, 키토올리고당, 상어연골뮤코다당, 글루코사민 등을 제조, 판매하고 있으며, 개별인정형 원료는 히알루론산, 헛개나무과병추출분말, 바나바주정추출물, 홍경천추출물, 당귀등추출복합물(위탁제조) 등을 개별인정형 원료로 인정받아 제조, 판매하고 있음. 이들 중 헛개나무과병추출분말의 경우 '알코올성 간손상으로부터의 보호효과' 기능성으로 2010년 53억원을 제조, 판매하였음. 2011년 까지 지속적인 매출 신장을 기록하였으나, 건강기능성식품 시장의 위축으로 인한 매출의 증대는 미비한 현황임. 현재 시장에서는 시장의 한계를 극복할 수 있는 소재의 필요성이 대두되고 있는 상황이며, 이에, SK바이오랜드(주)의 발효우슬추출복합물은 기존의 관절건강 소재와는 차별화된 소재로 건강기능성식품을 섭취하였을 때 느끼는 소비자들의 효능에 관한 기대감을 충족시켜 줄 수 있는 소재가 될 수 있을 것으로 예상됨. 또한 SK바이오랜드(주)는 국내 최대의 생산 규모와 판매를 수행하고 있어 소재의 대중화 및 산업적 보편화는 어렵지 않을 것으로 판단됨. 본 과제를 통하여 발효우슬추출복합물의 관절건강 기능성을 인정받을 경우, 1차적으로 현재 주 건강기능식품 제조업 거래처인 KGC인삼공사, 아모레퍼시픽, LG생활건강 등의 업체를 대상으로 B2B형태로 판매할 수 있을 것임. ODM 사업부 확장으로 매출 증대 기대 확대. "HyaluronAZ(히알루론산 함유 피부건강증진 건강기능식품 완제품)"와 같은 홈쇼핑 건강기능식품 B2C제품 상용화 경험을 바탕으로 홈쇼핑 사업 또한 확대해 나갈 계획임.

3) 국외 Distributor를 활용한 Global 마케팅 추진

SK바이오랜드(주)는 해외사업부에 현재 11명의 영업인원이 고용되어 있으며, 이들은 국외의 Distributor를 활용한 영업을 하고 있음. 대표적인 Distributor로 Toa Kasei Co. Ltd., Safic-Alcan 등이 있으며, 가까운 일본, 중국뿐만 아니라, 미국, 유럽 등에도 다양한 Distributor를 활용한 Global 마케팅을 추진하고 있는 현황임. 대표적인 Global 마케팅 제품으로는 히알루론산(HA)이 있으며, 그 외에도 식품, 건강기능성식품(각 국의 제도에 따름), 화장품 원료를 판매하여 연 100만불 이상의 해외수출매출을 기록하고 있음. 이를 토대로 발효우슬추출복합물을 세계로 런칭할 예정임.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

○ 발효우슬추출복합물의 관절건강 개선 기능성 검증을 통한 개별인정형 기능성 원료 인허가 및 상용화

골관절염 증상 완화 지표성분이 명확하고 구체적 원료 표준화가 가능한 천연소재를 대상으로 항관절염 in vitro 활성 스크리닝을 진행하여, 가장 활성을 보이는 발효 소재와 다양한 비율로 혼합하여, 골관절염 증상 완화 유력소재를 3종 선정하여 formualtion 설정 및 개발을 완료함. 더불어 복합물의 연골조직 primary culture 상 항골관절염 활성을 확인하였으며, 이를 바탕으로 전임상 동물 실험을 실시하여 항골관절염 효능을 입증하고 심도 있는 인체 임상 실험을 완료하고 관절 건강 증진 천연소재 식약처 원료 개별인정을 추진하여 최종적으로 우수하고 안전한 관절 건강 증진 건강기능식품을 제품화하고자 함.

3-2. 목표 달성여부

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
----	----	----------	----------	-----

1차년도	2017	<p>제 1세부(주관) : 에스케이 바이오랜드(주)</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 발효우슬 및 발효우슬추출복합물 조성 및 시료 제작 표준화 ■ 인체적용시험용 시료 제작 및 생산 ■ 섭취량 확립 	<p>1) 발효우슬 및 추가 국내산 천연물의 추출복합물 생산공정 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 관절건강 개선 기능성 소재 개발을 위한 추가 국내산 천연물의 항염증 활성 스크리닝 - 발효우슬 및 추가 국내산천연물의 추출복합물 생산공정 개발 - 공정 표준화를 위한 지표성분 결정 및 분석법 확립 <p>2) 발효우슬 또는 발효우슬추출복합물의 항염증 활성을 기반으로 한 인체적용시험 섭취량 결정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 발효우슬추출복합물의 항염증 활성 유효용량 결정 - 섭취량 확정 - 인체적용 시험 시료 제작 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 발효우슬 및 발효우슬추출복합물 조성 및 시료 제작 표준화 (100%) ■ 인체적용시험용 시료 제작 및 생산(100%) ■ 섭취량 확립(100%)
		<p>제 1협동 : 경희대학교</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ <i>in vitro</i> 실험을 통한 발효우슬추출물 및 발효우슬추출복합물의 관절염 억제 효능 screening 	<p>1) Human 관절강내 세포주인 MH7A cell을 이용한 세포 회복(재생) 실험</p> <p>2) ELISA 방법에 의한 염증 cytokine 측정</p> <ul style="list-style-type: none"> - TNF-α, IL-1β <p>3) Real-Time PCR 분석을 통한 연골생성과 파괴인자의 측정</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aggrecan, collagen type (I, II, X), TIMPs - MMP-3, MMP-7 - NF-kB, COX-2 	<ul style="list-style-type: none"> ■ <i>in vitro</i> 실험을 통한 발효우슬추출물 및 발효우슬추출복합물의 관절염 억제 효능 screening (100%)
		<p>위탁 : 국민대학교</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 관절건강 개선 기능성의 유효성 기작 물질 탐색 	<p>1) 관절건강 개선 기능성의 유효성 기작 물질 탐색</p> <ul style="list-style-type: none"> - 관절건강 개선 기능성의 유효성 기작 물질 탐색 및 연구 - 발효에 의한 우슬의 제한적 물질 특성 감하 스크리닝 - 정제물질의 물리화학적 성질 검토 - 발효 전후 비교를 통한 대사체 변화 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 관절건강 개선 기능성의 유효성 기작 물질 탐색(100%)

2차년도	2018	<p>제 1세부(주관) : 에스케이 바이오랜드(주)</p> <p>■ 인체적용시험을 통한 관절염 개선 기능성 평가(위탁 진행)</p>	<p>1) 인체적용시험 진행을 통한 유효성 평가</p> <p>- 임상시료 제작 및 시생산</p>	<p>■ 임상시료 제작 및 시생산 (100%)</p> <p>■ 인체적용시험 개시(100%)</p>
		<p>제 1협동 : 경희대학교</p> <p>■ MIA로 유도한 퇴행성 관절염 동물모델(<i>in vivo</i> 실험)을 이용한 발효우슬 추출복합물의 관절염 억제 효능 및 기작 연구</p>	<p>1) Micro-CT 촬영을 통한 골 상태 측정</p> <p>2) 세포 염색법을 이용한 연골조직 및 세포의 형상 확인</p> <p>3) 염증 조절물질의 측정</p> <p>- PGE₂</p> <p>4) Real-time PCR 분석을 통한 연골 생성과 파괴인자의 측정</p> <p>- Aggrecan, collagen type (I, II, X), TIMPs</p> <p>- MMP-3, MMP-7</p> <p>- NF-kB, COX-2</p>	<p>■ MIA로 유도한 퇴행성 관절염 동물모델(<i>in vivo</i> 실험)을 이용한 발효우슬추출복합물의 관절염 억제 효능 및 기작 연구 (100%)</p>
		<p>위탁 : 국민대학교</p> <p>■ 관절건강 개선 기능성의 면역작용 관련 유효성 기작 물질 탐색 및 동정</p>	<p>1) 미생물 발효에 따른 일·이차대사반응 총괄적으로 분석하고, 대사체 네트워크 시스템 분석을 통한 생리활성물질 발굴</p> <p>2) 기초 및 에너지 필수 대사체 정보분석을 위한 초고속 정밀 질량분석 시스템의 최적화와 활용</p> <p>3) High-resolution 질량분석 시스템 적용을 통한 생리활성 물질 규명</p>	<p>■ 관절건강 개선 기능성의 면역작용 관련 유효성 기작 물질 탐색 및 동정 (100%)</p>

3차년도	2019	<p>제 1세부(주관) : 에스케이 바이오랜드(주)</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 인체적용시험 완료 ■ 대량생산 공정 확립 ■ 독성평가 완료 및 안전성 확보 ■ 개별인정 신청 	<p>1) 인체적용시험 완료</p> <p>2) 대량생산 공정 및 제품의 기준 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유효추출물성분의 대량수급 경로 확보 - 생산 공정의 문서화 <p>3) 발효우슬추출복합물의 식약처 건강기능식품 개별인정 인허가 추진</p> <ul style="list-style-type: none"> - 마케팅적 제품개발 방향 파악 - 식용가능성 검토 - 해외 공인성 검토 - 문헌적 임상자료 검토 - 원료의 확보 경로 및 기준화와 공인성 검토 - 국내개발 경위 등 원료의 사용 현황 검토 - 제조방법 및 그에 관한 자료 작성 - 원료성분 및 특성이 관한 자료작성 - 기능성분 혹은 지표성분에 대한 기준 확보 - 원료의 유해물질에 대한 기준 확보 - 안전성에 관한 자료 확보 (독성평가 포함) - 기능성에 관한 자료 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 인체적용시험 완료(100%) ■ 대량생산 공정 확립(100%) ■ 독성평가 완료 및 안전성 확보 (100%) ■ 개별인정 신청(100%)
------	------	---	--	---

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

본 과제 목표는 100% 달성하였으나, 개별인정 획득을 위해 식약처 보완사항 있을시 적극적으로 대응할 계획임.

4. 연구결과의 활용 계획

- 국내 건강기능식품 개별인정형 원료
 - 본 과제를 통하여 인체적용시험까지 완료됨으로써 관절건강 개선 건강기능식품 원료 개발이 완료됨.
 - 국내 건강기능식품 개별인정형 원료로 식품의약품안전처에 인허가 획득
- 국내·외용 완제형 건강기능식품
 - 인정된 건강기능식품 원료를 사용하여 국내·외용 완제형 건강기능식품을 개발함.
- 국내·외용 소재의 제품화
 - 추출한 활성 획득분의 활성과 수율이 높은 경우 국내·외용 extract 또는 powder의 형태로 소재화함.
 - 상기 소재를 주성분으로 한 조성물을 국내·외용 granule, tablet, capsule, tea bag, jelly, gummy, soft gel, shot, drink제의 형태로 제품화함.
- 소재의 용도개발: 추가연구
 - 하기 표와 같이 시료추출물의 형태에 따라 소재를 구분하고, 각각의 용도를 개발함.

추출물의 형태	용 도	비고
단순 시료 추출물	건강기능식품	
1급 시료 부분정제물	건강기능식품, 일반의약(드링크, 타블렛 등)	
특급 시료 부분정제물	전문의약	

- 다용도 복합소재의 실용화
 - 활성의 다양화를 위한 복합소재의 실용화
 - 제품의 다양화 및 상품의 마케팅을 위한 복합소재의 실용화
- 지적재산권 확보
 - 본 과제의 개발물인 발효우슬추출복합물로 물질 및 제법 특허 등록 2건 활용
- 농공상 성공 모델로 활용
 - 지역특화작물로부터 발효 및 가공 기술개발을 통한 고부가가치 소재, 제품의 창출은 농공상 성공모델로 활용할 수 있음.

붙임. 참고문헌

BCC Research, Therapeutics and Biomaterial for Musculoskeletal Disease, 2010

Beutler B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. J Invest Med. 1995. 43:227-235.

Chi HJ, Kim HS. Studies on essential oils of plants of *Angelica* genus in Korea (I) essential oils of *Angelica gigantis* radix. Korean J Pharmacol. 1988. 19:239.

Choi YE, Ahn H, Ryu JH. Polyacetylenes from *Angelica gigas* and their inhibitory activity on nitric oxide synthesis in activated macrophages. Biol Pharm Bull. 2000. 23:884-886.

Han CY, Liu CY, Niu ZX. Component changes of Chinese herb before and after fermentation and the effect on some immune indices and growth performance of broiler chickens. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica. 2005. 36:1223-1227.

Hong IH, Choi JY, Kim AY, Lee EM, Kim JH, Park JH, et al. Anti-rheumatoid arthritic effect of fermented Adlay and *Achyranthes japonica* Nakai on collagen-induced arthritis in mice. Food Agric Immunol. 2016. 28:14-26.

Hussain T, Tan B, Liu G, Oladele OA, Rahu N, Tossou MC, et al. Health-promoting properties of *Eucommia ulmoides*: A Review. Evid Based Complement Alternat Med. 2016. Article ID: 5202908.

Kang HS, Lee HS, Yu HJ, Jang SH, Seo Y, Cho HY, et al. Effect of fermented *Achyranthes japonica* (Miq.) Nakai extract on osteoarthritis. 2017. 49:1-6.

Kim JH, Jeong JH, Jeon ST, Kim H, Ock J, Suk K, et al. Decursin inhibits induction

of inflammatory mediators by blocking nuclear factor-kB activation in macrophages. *Mol Pharmacol*. 2006. 69:1783-1790.

Lang CW, Hope PJ. Evidence for localized release of substance P within rat spinal cord evoked by physiological and electrical stimuli. *Neuropeptide*. 1994. 26:413-419.

Lee S, Lee YS, Jung SH, Shin KH, Kim BK, Kang SS. Anti-tumor activities of decursinol angelate and decursin from *Angelica gigas*. *Arch Pharm Res*. 2003. 26:727-730.

Lee SG, Lee EJ, Park WD, Kim JB, Kim EO, Choi SW. Anti-inflammatory and anti-osteoarthritis effects of fermented *Achyranthes japonica* Nakai. *J Ethnopharmacol*. 2012. 142:634-641.

Lee SH, Kang SS, Shin KH. Coumarins and a pyrimidine from *Angelica gigas* roots. *Nat Prod Sci*. 2002. 8:58-61.

Ma Y, Jung JY, Jung YJ, Choi JH, Jeong WS, Song YS, et al. Anti-inflammatory activities of coumarins isolated from *Angelica gigas* Nakai on LPS-stimulated RAW264.7 cells. *J Food Sci Nutr*. 2009. 14:179-187.

McDonnell J, Hoerrner LA, Lark MW, Harper C, Dey T, Lobner J, et al. Recombinant human interleukin-1 β -induced increase in levels of proteoglycans, stromelysin, and leukocytes in rabbit synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 1992. 35:799-805.

Millian MJ. The introduction of pain: An integrative review. *Pro Neurobiol*. 1999. 57:157-164.

Schnitzer TJ, Burmester GR, Mysler E, Hochberg MC, Doherty M, Ehram E, et al.

Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the therapeutic arthritis research and gastrointestinal event trial(TARGET), reduction in ulcer complications: Randomised controlled trial. *Lancet*. 2004. 364:665-674.

Scott DL, Shipley M, Dawson A, Edwards S, Symmons DP, Woolf AD. The clinical management of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: strategies for improving clinical effectiveness. *Br J Rheumatol*. 1998. 37:546-554.

Son CY, Baek IH, Song GY, Kang JS, Kwon KI. Pharmacological effect of decursin and decursinol angelate from *Angelica gigas* Nakai. *Yakhak Hoeji*. 2009. 53:303-313.

Son SH, Park KK, Park SK, Kim YC, Kim YS, Lee SK, Chung WY. Decursin and decursinol from *Angelica gigas* inhibit the lung metastasis of murine colon carcinoma. *Phytother Res*. 2011. 25:959-964.

Takanori K, Tomohiro S, Toshijiro Y, Intraarticular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998. 6:177-186.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.