

최 종
보 고 서

가다랑어골분과 한방추출물질을 이용한 골격대사기능 호전 식품첨가물 개발

Development of food additive using tuna bone powder and
oriental herb extract for improvement of bone metabolism

가다랑어골분의 제조와 Ca 이용률 및 골격대사능 평가

Manufacturing tuna bone powder and estimation of its
bioavailability in relation to bone metabolism

유어추출혼합물이 대사성 골질환에 미치는 영향

Effects of mixture of tuna bone powder and oriental herb
extract on metabolic bone disease

연구기관

동의대학교

해양수산부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “가다랑어꼴분과 한방추출물질을 이용한 골격대사기능 호전 식품첨가물 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 9 월 일

주관연구기관명 : 동의대학교

총괄연구책임자 : 김 영 만(동의대학교 식품영양학과 교수)

세부연구책임자 : 지 규 용(동의대학교 한의학과 부교수)

연 구 원 : 윤 군 애(동의대학교 식품영양학과 부교수)

연 구 원 : 황 혜 진(동의대학교 식품영양학과 조교수)

연 구 원 : 손 병 일(동의대학교 한방식품연구소 연구원)

참 여 기 업 : (주) 정필 이 강 필

요 약 문

I. 제 목

가다랑어꼴분과 한방추출물질을 이용한 골격대사기능 호전 식품첨가물 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리나라에서는 수산물의 총공급량은 612톤 이상이며, 수산가공공장에서 가공율은 약 83%를 차지하고 있다. 이와 같은 높은 가공율로 인하여 어뼈, 어피, 내장 등과 같은 수산가공잔사의 증가도 동반되고 있다. 그러나, 이들 잔사는 대부분 사료로 이용되거나 폐기되어져 자원의 효율적 활용이 제대로 이루어지지 않을 뿐만 아니라 환경오염을 유발시키고 있다. 또한 최근 광우병의 발생에 따라 우꼴분의 안전성에 문제가 제기되어 국민의 불안 심리가 고조되고 있다.

최근 Ca이 성장기, 성인기 이후의 골격질환과 순환기계질환, 대장질환 등과 밀접한 관련이 있으나 정상 식사만으로는 충분한 Ca을 얻지 못하는 실정으므로 Ca 함유식품에 대한 수요가 증가하고 있어 이에 소뼈, 난각, 굴피분말 등을 소재로 한 Ca 함유식품 등이 시판되고 있으나 가장 널리 사용되는 우꼴분은 광우병이 발생하여 안전성 문제 때문에 수입이 금지되어 새로운 Ca 소재 개발이 시급한 실정이다. 우리나라의 식생활 습관은 Ca의 부족현상을 일으키기 쉽고 현재 Ca섭취량은 권장량의 72.8% 수준이다.

또한, 고령화시대에 노인들에게 자주 발병하는 골다공증, 동맥경화, 심장질환, 대장암 등은 칼슘과 깊은 관계가 있는 질병들이며 특히, 폐경기 여성의 경우 폐경기가 되면 여성호르몬인 에스트로겐의 분비가 감소되어 칼슘의 체내흡수가 감소하기 때문에 여성이 남성에 비해 골다공증에 걸리는 비율은 약 4배가 높으며 전체 인구 중 약 13%를 차지하고 있는 것으로 조사되었다.

현재 골다공증의 치료제는 고가이면서 부작용의 수반이 우려되는 호르몬 등이 사용되고 있으므로 골격 강화 기능이 부여된 천연물질의 개발이 요구되고 있으며, 우

골분 대체 원료로써 다랑어뼈는 무기질 함량이 풍부하고 Ca : P의 비가 사람의 뼈 (2.16 : 1)와 비슷한 수준이므로 안정된 Ca 공급원으로서 충분한 가치가 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하고자 수산가공공장에서 동물사료 이외의 다른 고부가가치성 재료로 이용되지 못하고 있는 다랑어뼈를 이용하여 우골분 대체재와 한방의 방제학적 원리에 입각한 한방물질 배합에 의한 생체내 흡수율을 향상시키고 기능성을 부여한 골격질환 호전 식품첨가물을 개발하여 칼슘영양 증진 골다공증 예방에 기여하고 나아가 고기능성식품 관련 산업의 활성화에 기여하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

[제 1 과제] 다랑어골분의 제조와 Ca 이용률 및 골격대사능 평가

- ▶ 다양한 형태의 가용성 골분 제조와 안전성 평가
- ▶ Ca급원 별, 가공형태 별, 한방재료 별 Ca의 흡수율 및 가용성 평가(*in vitro*)
- ▶ 여러 영향 인자에 따른 Ca의 흡수율 평가(*in vitro*)
- ▶ 혈청, 조직, 뼈의 무기질(칼슘) 함량 및 골밀도
- ▶ Ca 급원 별, 한방재료 별 Ca 흡수율 및 보유율(*in vivo*)
- ▶ 식이변화, 식이효율, 장기무게 함량
- ▶ 골격대사(혈청, 뇨) 지표 측정

[제 2 과제] 유어추출혼합물이 대사성 골질환에 미치는 영향

- ▶ 한방물질 약리 기능 검색
- ▶ 다랑어로부터 얻은 칼슘분말과 혼합할 기능성 식이소재 recipe 구성
- ▶ Sample compound에 대해 동물실험을 통한 효능 평가
- ▶ Sample compound에 대한 소규모 임상시험 실시와 관능평가

▶식이소재의 선호도 평가 및 복용량 결정

IV. 연구개발 결과

다량어골분을 이용한 안전성 확보와 우골분 대체재로서의 가능성을 확인하고 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 생체내 Ca 흡수율을 향상시키며 또한 한방의 방제학적 원리에 입각하여 한방천연물질을 배합한 인체에 부작용 없는 고기능성 골격질환 호전 첨가물을 제조하고자 하였다.

[제 1 세부 과제 다량어골분의 제조와 Ca 이용률 및 골격대사능 평가]

1. 다량어골분을 대상으로 무기질 함량과 중금속 함량을 측정된 결과, 칼슘 36.5g/100g ash, 인 17.2g/100g ash, 나트륨, 칼륨, 마그네슘은 미량(0.1g/100g ash)으로 나타났고 중금속의 경우, 납과 수은이 0.1g/100g ash으로 조사되어 안전성에는 전혀 문제가 되지 않았다.
2. 골분 추출하기 위해 진탕처리, 고온가압처리, 회화처리 등을 행한 결과 회화처리 방법이 지질이나 어취 제거에 가장 적절한 방법이었으며, 회화처리조건은 900℃에서 30분으로 정하였다.
3. 4종(사과산, 구연산, 젖산, 초산)의 유기산을 이용하여 염의 형태에 따른 가용성과 흡수율을 알아 본 결과, 구연산의 경우가 가용성(1132mg/100ml)과 흡수율(42.6%)이 가장 높게 나타났고 최적농도(물 비)는 1:3, 교반시간은 2시간, 골분 입자의 크기는 120mesh 정하였다.
4. 칼슘급원(우골분, 난각분, 유청분, 해조분, 다량어골분)에 따른 가용화와 흡수율은 다량어골분(70.8, 15.2%)과 해조분(71.5, 15.7%)이 가장 높게 나타났고, 한방 처방에 따른 흡수율은 아동기 골다공증의 경우 16.3%, 폐경기 여성의 경우 16.6%, 노년 남성의 경우 17.1%로 조사되었다.
5. 칼슘 흡수율에 영향을 미치는 인자는 5종(CPP, glucose, xylitol, Vit-C, lysine)을 비교한 결과, CPP(casein phosphopeptide), lysine, Vit-C가 다소 높은 흡수율 상승을 보였고, 2가지를 복합한 것의 경우는 흡수율의 상승이 미미하였다.
6. 실험 종료 시 우골분을 섭취한 CB(bovine bone powder)군의 체중 증가가 유의

하게 높았으며, 구연산 처리된 다랑어골분 및 칼슘부족 식이를 급여한 CT(citrated tuna bone powder)와 LC(0.15% CaCO₃)군에서 체중증가가 가장 낮았다. 식이 섭취량도 CB에서 가장 높았으며, CT와 CL(calcium lactate)에서 유의하게 낮은 섭취량을 보였다.

7. 저칼슘식이인 LC(0.15% CaCO₃)는 변으로 배설되는 양이 다른 정상식이군에 비해 최소화되어 흡수율이 최고치를 나타냈으나 칼슘 보유량은 가장 낮았으며, 노칼슘배설량은 TB(tuna bone powder)에서 유의하게 낮았고 CL(calcium lactate)에서 높은 값을 보였지만 체내 칼슘보유량은 칼슘급원에 따른 차이를 보이지 않았고, 칼슘급원에 따른 변 칼슘 배설량과 칼슘흡수량은 차이가 없었다.
8. 칼시토닌은 LC(0.15% CaCO₃)군을 비롯한 CC(CaCO₃)와 CL(calcium lactate)에서 유의하게 낮았으며, 다랑어골분이나 우골분에서는 높은 수치를 보였다. 부갑상선 호르몬(PTH)와 오스테오칼신은 실험군 간에 차이를 보이지 않았고, DPD(deoxypyridinoline)는 LC(0.15% CaCO₃)군에서 유의하게 높았고, 정상수준의 칼슘을 섭취한 각 군에서의 차이는 차이가 없었다.
9. 대퇴골의 습윤무게는 TB(tuna bone powder)와 CT(citrated tuna bone powder)에서 유의하게 높았고, 건조 후의 무게는 LC(0.15% CaCO₃)를 제외한 정상수준의 칼슘 투여군 간에 차이가 없었으며, 대퇴골의 회분 함량은 정상수준의 칼슘식이 군들에 비해 저칼슘식이인 LC에서 유의하게 낮았다. 대퇴골 단위 무게에 함유된 회분함량 비율은 CB(bovine bone powder)와 CT에서 유의하게 높았다. 대퇴골의 칼슘함량과 건조중량 단위당 칼슘함량은 LC와 CT에서 낮았고 CB에서 뚜렷하게 증가하였다.
10. 대퇴골의 측정 결과 저칼슘식이인 LC(0.15% CaCO₃)군은 정상식이군에 비해 골밀도가 유의하게 낮았다. 동일한 정상수준의 칼슘이 공급된 실험군 사이에서는 TB(tuna bone powder)의 골밀도가 가장 높은 수치를 보였다.

[제 2 세부 과제 유어추출혼합물이 대사성 골질환에 미치는 영향]

1. 기능성 식이소재의 구성

1) 폐경기 여성 골다공증

Sample SG: 熟地黄九蒸 15g, 토사자주초 15g, 우슬주초, 백복령, 인삼, 파고지微炒, 두충거사 7.5g, 威靈仙醋浸 4g, 龜板酒炙, 砂仁 각 3.75g과 골분 2g, 黑大豆 15g(양갱제조시 원료)

2) 노년 남성 골다공증

Sample GN: 속지황(砂仁酒法製九蒸) 5돈, 당귀 3돈, 구기자 두충 去絲 각2돈, 우슬酒炒 1돈반, 육계 속단 감초炙 각1돈, 골쇄보주초3돈, 狗脊 1돈, 홍삼액 15cc, 골분 2g, 黑大豆 4g(양갱 제조시 원료)

2. 생체내 실험을 통하여 폐경후 여성에게 투여하기 위한 SG는 골다공증의 생화학적 지표인 T4(thyroxine), Osteocalcin에서 유의성있는 효과를 나타내었고 GN군은 Osteocalcin, TALP(total alkaline phosphatase), 대퇴골 강도, 요추골밀도 등에서 통계적으로 유의성있는 효과를 나타내었고, 골조직 표본에서는 GN군이 SG군보다 상대적으로 골조직의 재생과 회복을 촉진하였다.
3. 시제품은 골다공증에 수반되는 신체자각 증상에 대해 전반적으로 호전반응을 나타냈으며 신체자각증상이 없는 경우에는 특별한 변화를 나타내지 않았다. 또한 오스테오칼신에 대한 효과는 정상보다 저하된 상태에 있을 경우는 상승시키는 경향이 있지만 정상 범위에 있는 경우에는 특별한 변화를 일으키지 않았다. 남자의 경우 혈중칼슘은 정상범위 내에서 유의성있는 상승이 나타났다.
4. 식이소재는 수용액이 가장 적합하였으며 1일 150cc 총 2회 복용이 적절하였고 식이제품 용도의 칼슘복용량은 하루 1.5g, 즉 순수 칼슘량 기준 450mg 정도가 적절하였다. 시제품의 복용방법은 수용액과 칼슘 분말 모두 食間에 복용하는 것이 좋은 것으로 판단된다.

V. 연구개발결과의 활용계획

최근 사회의 고령화와 식생활 변화에 따라 칼슘부족으로 인한 골다공증에 대한 관심이 고조되고 있다. 현재 다량어뼈는 폐기되거나 사료용으로 일부 사용되어 자원의 효율적 활용이 이루어지지 않고 있으며, 광우병의 확산에 따라 우골분의 안전

성에 문제가 제기되어 국민의 불안 심리가 고조되고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 기존 칼슘제의 원료인 우골분을 대신할 대체재로써 뿐만 아니라 흡수과정에서 수반되는 부작용을 한방의 방제학적 원리에 의해 개선함으로써 한방추출물질을 이용한 Ca 소재 식품첨가물을 개발이 이루어 질 것으로 사료된다.

(주)정필과 기술실시 계약을 2003년 9월 20일 체결하였으며 세부적인 계획을 세워 예비생산을 위해 협의 중에 있다. 대량 생산에 관한 것은 식품첨가물 회사인 (주)백경과 고려식료 등과 기존 칼슘제의 단가를 비교하여 시장성을 조사하고 상품화를 위한 계획을 협의 중에 있다. 법률적 기술적 검토를 통하여 국내 특허를 출원하였으며(1건), 기존의 제약회사에서는 나오는 제품과 차별화 즉, 한방방제학 원리에 입각한 칼슘제라는 것을 부각시켜 마케팅 측면에서 (주) 조아제약과의 협약 및 면밀한 조사를 통하여 건강보조식품이나 의약품분야의 시장성을 타진한다. (주)정필에 기술을 제공하고 지속적인 기술 개발 및 품질관리 지도함과 동시에 본 동의대학교 한방식품연구소와 협의하여 품질보증을 인정받아 생산된 제품의 소비자 선호도를 높인다.

S U M M A R Y

This study investigated the bioavailability of tuna bone powder as a alternative to calf bone, which has been commonly used for Ca source. The study was composed three parts: the determination for processing condition of tuna bone powder; the bioavailability of tuna bone powder for bone metabolism in rats compared to various sources and types of Ca, and the effect of oriental herb extract supplement to tuna bone powder on the bone metabolism in ovariectomized rats; pathogenic pattern of metabolic bone disease, especially osteoporosis, and the action of mixture of tuna bone powder and oriental herb extract on bone health of menopausal women(SG) and senile men(GN).

The tuna bone powder was processed by washing, shaking, drying, calcinating, grinding, sieving, and then treated with various organic acid to enhance its absorption. The highest absorption presented in form of tuna bone powder calcinated at 900°C for 30 min and then compounded with citric acid, which was 120 mesh in particle size.

In the group of rat fed tuna bone powder compared to other Ca source, urinary Ca excretion was significantly low. The ash content per dry femur weight was high, and the highest value of bone mineral density was in tuna bone fed group. Supplementation of oriental herb extract to tuna bone powder made a tendency to decrease the fecal and urinary Ca excretion. Calcium and ash contents of rat femur did not changed by supplementing herb extract. However, bone mineral density was increased by supplementing herb extract when that value was low in tuna bone powder. These findings suggest that tuna bone powder is at least as available Ca source as calf bone powder, and supplementing herb extract would be effective for bone health.

SG manifested significant effects on the T4 and Osteocalcin level, and relieved the osteoporotic symptoms like arthralgia, bony pain, blushing, effectively. On

the other hand GN showed significant increase on the biochemical markers of osteocalcin, TALP, cytokines like IL1 and IL6 level as well as bone mineral density and intensity of femur. But there weren't any side effects relevant with these sample compounds in the middle of participants of the pilot test. From these facts, the mixture is expected to have pharmacological actions improving the sex-hormonal reduction of menopausal women and osteoporosis initiated from the disorders of Ca absorption. It seems that the improving action is through Ca supplement and the added estrogen-mimetic anti-osteoclastic activity. Mixture of 450mg Ca and 150cc of herb extract was appropriate for amount per 1 day to help bone health.

The results lead to conclusion that tuna bone is available Ca source which could be the alternative to calf bone, and the application of oriental herb as a functional material supporting bone health is deserved to take into consideration. The mixture is recommended to contain 450 mg of Ca and 150cc of oriental herb extract.

CONTENTS

Manufacturing tuna bone powder and estimation of its bioavailability in relation to bone metabolism

Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. The present domestic and foreign situations of technology development	3
Chapter 3. Research contents and Results	5
Section 1. Materials and Methods	5
1. Material.....	5
2. Tuna bone powder preparation, and measurement of solubility.....	6
3. Availability estimation of Tuna bone powder <i>in vitro</i>	6
4. Estimation of Ca bioavailability and bone metabolism in ovariectomized rats.....	7
5. Bone mineral density and bone Ca measurement.....	8
6. Biochemical analysis in the serum and urine.....	8
7. Statistical analysis.....	9
Section 2. Results and discussion	12
1. Property and safty of the tuna bone powder.....	12
2. Property of Ca powder by treatment methods.....	14
3. Solubility and absorption rate of calcium according to Ca sources and type.....	15
4. Solubility and absorption rate of calcium according to compounds with various organic acid.....	15
5. Influencing factors on absorption rate of calcium.....	20
6. Effect of Ca sources and compounds with organic acids on the bone metabolism in rats.....	24

7. Effect of tuna bone powdered and oriental herb extract supplements on the bone metabolism in ovariectomized rats.....	32
Chapter 4. Achievement and Contributions.....	42
Chapter 5. Application schedule.....	43
Chapter 6. Foreign technology information	43
Chapter 7. Reference.....	44

Effects of mixture of tuna bone powder and oriental herb
extract on metabolic bone disease

Chapter 1. Introduction	49
Chapter 2. The present domestic and foreign situations of technological development	52
Chapter 3. Research contents and Results	53
Section 1 Materials and Methods	53
1. Material.....	53
2. Drugs dosage.....	53
3. Weight measurement.....	53
4. Blood test and biochemical analysis.....	54
5. Mechanical strength in femoral neck.....	54
6. Osseous tissue specimen production and primary culture.....	54
7. Immunoprecipitation and RT-PCR.....	55
8. Statistical analysis.....	56
9. Clinical demonstration in osteoporosis patient.....	56
10. Yanggeagi and solution manufacture.....	57
Section 2. Results and discussion	59
1. Designs of dietary compounds and formulae medical considerations for making dietary compounds.....	59
2. Recipe of dietary compounds for strengthening the connective tissues.....	68
3. Estimation of physiological activity in osteoporosis rats model.....	70
4. Osseous tissue specimen and screen analysis.....	76
5. Immunoprecipitation and RT-PCR.....	76
6. Small scale pilot test about effects of dietary compounds for osteoporosis.....	79

7. Preference and dose of dietary compounds and summarizing evaluation.....	81
Chapter 4. Achievements and contributions.....	85
Chapter 5. Applications.....	85
Chapter 6. Foreign technology information.....	86
Chapter 7. References.....	87

목 차

제 1 세부과제

다량어골분의 제조와 Ca 이용율 및 골격대사능 평가

제 1 장 서 론.....	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	3
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과.....	5
제 1절 재료 및 방법.....	5
1. 재료.....	5
2. 가용성 골분 제조 및 가용화 측정.....	6
3. 제조된 골분의 이용율 평가.....	6
4. 골다공증 동물실험 모델을 이용한 Ca 소재의 생체이용율 및 골격대사능 평가.....	7
5. 골밀도 및 골 Ca 함량 측정.....	8
6. 혈액 및 뇨의 생화학적 분석.....	8
7. 통계분석.....	9
제 2절 결과 및 고찰.....	12
1. 다량어 골분의 특성과 안전성.....	12
2. 칼슘회수방법에 따른 칼슘제의 특성.....	14
3. 칼슘급원에 따른 가용화 및 Ca 흡수율.....	15
4. 염형태에 따른 가용성 및 Ca 흡수율.....	15
5. 칼슘흡수율에 영향을 미치는 인자.....	20
6. Ca 급원과 염형태에 따른 골격대사능 평가.....	24
7. Ca 급원으로써 다량어 골분과 한방추출물의 골격대사능 평가.....	32
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도.....	42

제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획.....	43
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보.....	43
제 7 장 참고 문헌.....	44

제 2 세부과제

유어추출혼합물이 대사성 골질환에 미치는 영향

제 1 장 서론	49
제 2 장 국내외 기술개발 현황	52
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	53
제 1절 재료 및 방법	53
1. 재료	53
2. 약물조제 및 투여	53
3. 체중 측정	53
4. 혈액채취 및 생화학적 분석	54
5. 대퇴골의 강도 측정	54
6. 골조직 표본 제작과 primary culture	54
7. Interleukin 1 β 의 immunoprecipitation과 western blotting 및 RT-PCR	55
8. 통계 분석	56
9. 골다공증 환자 임상실험	56
10. 양갱이와 시제품의 제조	57
제 2절 결과 및 고찰	59
1. 골다공증 식이소재 제조를 위한 의학적 고안 및 구성	59
2. 골격강화 기능성 식이소재의 recipe	68
3. 골다공증 동물실험모델을 이용한 생리활성 평가	70
4. 골조직 표본과 영상분석	76
5. Immunoprecipitation과 RT-PCR	76
6. 한방물질이 배합된 시제품의 임상실험	79
7. 시제품의 선호도와 기존제품의 다면적 평가 및 복용량 결정	81
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도	85

제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획.....	85
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보.....	86
제 7 장 참고 문헌.....	87

제 1 세부과제

가다랑어골분의 제조와 Ca 이용율 및 골격대사능 평가

**Manufacturing tuna bone powder and estimation of its
bioavailability in relation to bone metabolism**

제 1 장 서 론

한국인의 영양섭취 실태조사 결과에 의하면 아직도 칼슘 섭취는 권장량에 못 미치는 것으로 나타나고 있다. 제 6차 한국인의 영양권장량에 의하면 성인의 칼슘 권장량이 남녀 모두 700mg으로 사춘기에는 남녀 각각 900mg과 800mg으로 상향 조정되었으나 실제 칼슘의 섭취부족은 거의 모든 연령 층에서 나타나고 있는데, 칼슘 부족과 관계가 깊은 골다공증은 중년기 이후의 여성에게 심각한 문제로 대두되고 있다. 골다공증의 유발 요인은 복합적인 것으로 알려져 있다. 즉, 인종, 연령, 성별, 내분비 호르몬, 신체활동 등 유전적, 환경적 요인 뿐 아니라 단백질, 미네랄, 비타민, 섬유소 등의 영양적 요인들이 직·간접적으로 또는 상호 복합적으로 관여된다고 알려져 있다. 칼슘은 체내에서 가장 많이 존재하는 무기질로, 보통 성인 체중의 1.5~2%인 1,000~1,500g 정도를 체내에 보유하고 있다. 체내 칼슘의 99% 정도는 골격과 치아를 형성하고 있으며 나머지 1% 정도만이 근육의 수축과 이완, 규칙적인 심장 박동, 혈액의 응고, 효소의 활성화, 세포내 자극과 흥분의 전달과 같은 생리활성 조절 기능 담당하고 있다(Allen and Wood, 1994).

이와 같이 다양한 생리활성 조절기능을 가지는 칼슘은 체내에서 항상 일정한 농도로 유지되어야 하는데, 만일 장기간 칼슘섭취가 부족해지면 골다공증(osteoporosis), 구루병(rickets), 테타니와 같은 결핍증이 유발될 뿐만 아니라 골격과 관련된 질환 이외에 순환기 계통 질환, 대장 질환, 고혈압 등 각종 성인병과 관련지어져 그 중요성이 강조되고 있다.

최근 Ca이 성장기, 성인기 이후의 골격질환과 순환기계질환, 대장질환 등과 밀접한 관련이 있으나 정상 식사만으로는 충분한 Ca을 얻지 못하는 실정이므로 Ca 함유식품에 대한 수요가 증가하고 있어 이에 소뼈, 난각, 굴피분말 등을 소재로 한 Ca 함유식품 등이 시판되고 있으나 가장 널리 사용되는 우골분은 광우병이 발생하여 안전성 문제 때문에 전량 수입이 금지되어 새로운 Ca 소재 개발이 시급한 실정이다. 우리나라의 경우 식생활 습관은 많은 Ca의 부족현상을 일으켜 골격질환을 유발하는 직접적인 원인으로 Ca섭취량은 권장량의 72.8% 수준으로 성장기에 Ca의 섭취는 튼튼한 뼈와 치아를 발달·유지시킬 뿐만 아니라 혈압조절까지도 할 수 있다는

사실이 알려져 있다.

또한, 고령화시대에 노인들에게 자주 발병하는 골다공증, 동맥경화, 심장질환, 고혈압 등은 칼슘과 관계 깊은 질병들이며 계속 증가하고 있고 특히, 여성의 경우 폐경기가 되면 여성호르몬인 에스트로겐의 분비가 감소되어 칼슘의 체내흡수가 감소하기 때문에 칼슘부족이 발생하게 된다. 여성이 남성에 비해 골다공증에 걸리는 비율은 약 4배가 높으며 전체 인구 중 약 13%를 차지하고 있는 것으로 조사되었다.

현재 골다공증의 치료제는 고가이면서 부작용의 수반이 우려되는 호르몬 등이 사용되고 있으므로 골격 강화 기능이 부여된 천연물질의 개발이 관심으로 대두되고 있으며, 우골분 대체 원료로써 다랑어뼈는 무기질 함량이 풍부하고 Ca : P의 비가 사람의 뼈(2.16 : 1)와 비슷한 수준으로써 안정된 Ca 공급원으로서 충분한 가치가 있을 것으로 생각된다.

따라서 참치가공 과정에서 부산물로 나오는 다랑어뼈를 이용하여 우골분 대체재와 한방의 방제학적 원리에 입각한 한방물질을 배합하여 생체내 흡수율을 향상시키고 부작용을 최소화한 골격질환 호전 식품첨가물을 개발하여 골다공증예방과 치료에 기여할 수 있는 시제품을 제조하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

체내 칼슘 농도의 항상성 유지는 식사로부터의 섭취량(intake)과 소화관으로부터의 흡수량(absorption), 뼈의 침착량(accretion)과 뼈로부터 용출량(resorption), 신장에서 재흡수량의 균형에 의해서 조절되고 나머지는 분, 뇨, 땀으로 배설된다. 체내 칼슘 농도는 주로 호르몬에 의해서 조절되는데 대표적인 호르몬으로서는 혈중 칼슘 농도가 저하될 때 부갑상선에서 분비되어 뼈로부터의 칼슘 용출을 증가시키고, 신장으로부터의 칼슘 재흡수를 증가시키는 작용을 하는 부갑상선호르몬(PTH, parathyroidgormone) 및 소장으로부터의 칼슘성 유지에 중요한 조절기능을 갖게 하는 calcitonin를 들 수 있다(Allen and Wood, 1994). 이 외에도 성장호르몬, 성호르몬(에스트로겐)이 뼈에서 칼슘 용출을 억제하는 역할을 갖는 것으로 알려져 있다. 이상의 호르몬들의 상호 긴밀한 관계속에서 이루어지는 대사조절 기능에 의해서 혈중 칼슘농도는 정상 수준으로 유지될 수 있고 골격대사도 원활하게 유지될 수 있다.

근래 세계 각국에서는 칼슘섭취 부족으로 인한 영양문제를 골격성장과 골격질환 뿐만 아니라 고혈압, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, 동맥경화 등 순환기계질환의 위험인자 및 대장질환 등 각종 성인병과 관련지어 연구자들의 관심을 집중시키고 있다(Anderson and Graner, 1996; Allen and Linder, 1991; Hamet, 1995; McCarron, 1984; National Research Council, 1989). 특히, 골다공증을 예방하기 위해서는 성인기에 도달하는 최대 골질량을 높게 유지할 필요가 강조되고 있으며, 이를 위한 가장 중요한 요인으로서 충분한 양의 칼슘섭취를 들고 있다(Heaney, 1993; Matkovic 등, 1994). 그러나, 우리나라에서의 칼슘공급원은 대부분 우골분, 난각분말(egg shell), 패각분말(shell powder), CCM(calcium citrate malate)과 같은 체내 흡수율이 낮은 불용성의 칼슘공급원 및 칼슘보충제가 수입되어 시판되고 있는 실정이다.

가장 널리 사용되는 우골분은 광우병의 발생으로 안전성에 문제가 있으므로 수입이 금지되어 새로운 Ca 소재 개발이 시급한 실정이다. 그러므로 새로운 칼슘원을 찾는 과정에서 어뼈를 이용한 칼슘원료의 타당성에 대한 검토를 한 보고가 있다. 그러나 다량어뼈를 칼슘급원으로 Ca의 생체내 이용성을 평가하는 영양학적 접근은

거의 없는 실정이다. 더욱이 한방추출물질을 보강하여 기존 칼슘제재의 부작용을 최소화한 연구는 전무하다. 본 연구가 소기의 목적을 달성하면 수산폐기물을 새로운 식재료 전환, 우골분 수입대체 효과, 기능성 식품산업의 활성화 기존 칼슘제재의 대체효과 등 많은 파급효과가 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 재료 및 방법

1. 재료

칼슘 소재로 이용하기 위해 사용한 다랑어(*thunnus thynnus*)뼈는 2001년 10월에 경남 고성소재 정필(주)로부터 원료를 구입하였다. 구입한 원료뼈는 이물질 제거를 위하여 수세 및 탈수한 후 냉동고(-40℃)에 보관하여 두고 실험에 사용하였고, 어류뼈의 수율은 fish frame(근육이 혼재하여 있는 뼈 부분의 어류 가공 잔사) 중량에 대한 어류뼈 중량의 상대비율(%)로 하였다.

1-1 일반성분의 측정

일반성분은 상법에 따라 수분은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 건식회화법으로 측정하였고, 조단백질은 semimicro Kjeldahl법으로 측정하여 질소계수 5.7을 곱하여 그 값으로 하였다.

1-2 무기질, 인 및 중금속의 정량

무기질, 인 및 중금속의 정량은 Tsutagawa et al.(1994)의 방법으로 질산을 이용하여 유기질을 습식 분해한 후 inductively coupled spectrophotometer(ICP, Atomscan 25, TJA)로 분석하였다.

1-3 회화된 무기물의 XRD 회절분석 및 백색도

X-ray diffractometer(Rigaku D/Max-2400)를 이용하여 회화하여 얻어진 시료의 상과 구조를 관측하기 위하여 아래의 조건으로 분석하였다.

Target ; CuK α (60kV, 80mA, 2 theta range ; 10~70℃)

백색도는 회화시킨 가다랑어 골분을 얻어 직시색차계(Model CR-300, MINOLTA Japan)를 이용하여 L(명도), a(적색도), b(황색도)값을 측정하였다. 가다랑어 골분은 80 mesh로 분쇄하여 측정하였으며 3회 측정하여 평균값으로 나타내었다.

2. 가용성 골분 제조 및 가용화 측정

구입한 원료의 근육과 이물질을 제거하고 고온가압처리(121℃, 60분), 진탕처리(60℃, 6시간) 및 회화처리(800℃, 20분)를 하여 가용화를 측정하였으며, 가용화는 증류수 중에 포화상태로 충분한 시간 동안 녹인 후, 여과하여 그 여과액을 ICP로 측정한 결과를 가용화 칼슘량으로 나타내었다.

고온가압처리(121℃, 60분)한 다량어골분을 전기 회화로(Dongwon scientific co.)를 이용하여 900℃에서 20분간 회화시킨 회화분 10g(0.02mol as $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)을 유기산(구연산, 젖산, 사과산, 초산) 등을 1M 100ml를 첨가하여 감압하에서 30분간 교반시키고 농축(90℃, 1시간), 건조(60℃, 24시간)시킨 후 막자사발로 분쇄한 후 80 mesh 체로 걸러 사용하였다. 분쇄된 다량어골분을 감압 하에서 각각의 유기산(구연산, 젖산, 사과산, 초산) 농도에 따라 가용성 골분을 제조하였다.

3. 제조된 골분의 이용을 평가

3-1 골분의 흡수율 측정

6M HCl 용액을 사용하여 시료의 pH를 2로 조정하고 15분간 저어준 후 시료 100 ml 당 3ml의 pepsin 용액을 첨가하여 shaking water bath 내에서 37℃에서 2시간 동안 incubation하고 소화된 시료 20ml을 취하여 0.1M NaOH pH 7로 적정하여 NaHCO_3 의 첨가량 결정한다. 결정된 NaHCO_3 에 증류수 25ml을 튜브에 넣고 비이커에 담긴 후 parafilm으로 봉하고 shaking water bath에서 37℃로 incubation 하였다. 약 30분 경과 후 pH가 5 정도가 될 때까지 incubation한 후 pancreatin- bile salts mixture를 5ml 첨가하고 2시간 동안 incubation 후 튜브를 제거하여 membrane 속의 dialysate의 무게를 측정하고 inductively coupled spectrophotometer(ICP, Atomscan 25, TJA)로 분석한 결과를 가지고 흡수율을 계산하였다.

$$\text{Ca 흡수율}(\%) = \frac{(\text{투석액의 Ca농도} \times \text{투석액량}) - (\text{공시료} - \text{투석액량})}{\text{시료의 Ca량}} \times 100$$

4. 동물실험모델을 이용한 Ca 소재의 생체 이용률 및 골격대사능 평가

4-1 실험동물 및 식이

이유한 3주령의 Sprague-Dawley 종 수컷 흰쥐에게 적응기를 거쳐 2주간의 칼슘 부족 식이(0.15%)를 급여 한 후 6군으로 나누었다(Fig 1). 한 군은 계속 칼슘 부족 식이를 4주간 급여하였고, 나머지 5군은 칼슘 급원을 달리하여 충분한 칼슘을 함유한 정상식이(0.5%)를 4주 동안 급여하였다. 식이 조성은 AIN-93G에 의거하였으며 (Table 1), 실험군은 ①저칼슘을 급여한 LC(0.15% CaCO₃, 탄산칼슘) 정상칼슘(0.5%)을 급여한 ②CC(CaCO₃; 대조군) ③ TB(tuna bone powder) ④ CT (citrated tuna bone powder) ⑤ CB(bovine bone powder) ⑥ CL(Calcium lactate, 유산칼슘)으로 구별하였다. 실험식이와 이온교환수는 자유급식하였고, 사육에 필요한 기구는 0.4% EDTA로 씻은 후 증류수로 헹구어 사용하였다. 실험기간 동안 식이섭취량과 체중은 1주일에 각기 2회와 1회 씩 정기적으로 측정하였다.

4-2 골다공증 실험동물 및 식이

이유한 6주령의 Sprague-Dawley종 암컷 흰쥐를 대상으로 적응기를 거쳐 2주간의 칼슘부족 식이(0.15% Ca; LC)를 급여 한 후 7군으로 나누었다(Fig 2). 한 군은 sham 수술을 하여 정상수준의 칼슘식이를 급여하였다. 다른 5군은 인위적으로 폐경을 유도하기 위하여 난소절제 수술 후 정상수준(0.5% Ca)의 칼슘공급과 한방시료의 추출물을 보충급여하여 5주 동안 사육하였다. 한방시료 추출물은 침수하여 추출한 후 냉동건조하여 얻은 분말을 이온교환수에 녹여 tube feeding을 통해 0.05g/100g BW의 수준으로 보충하였다. 식이조성은 AIN-93G에 의거하였으며(Table 2), 실험군은 ①Sham-Con(CaCO₃, 탄산칼슘; SCC) ②OVX-CC(CaCO₃; OVX-Control) ③OVX-CCH(CaCO₃+herb extract) ④OVX-TB(tuna bone powder) ⑤OVX-TBH (tuna bone powder+herb extract) ⑥OVX-CT(citrated tuna bone powder) ⑦OVX-CTH(citrated tuna bone powder+herb extract)으로 구별하였다. 다량어골분을 칼슘급원으로 한 식이는 모두 칼슘수준이 0.5%가 되도록 조절하였다. 실험식이와 이온교환수는 자유급식하였고, 사육에 필요한 기구는 0.4% EDTA로 씻은 후 증류수로 헹구어 사용하였다. 실험기간 동안 식이섭취량과 체중은 각기 1주일에 2회

와 1회씩 정기적으로 측정하였다.

4-3 시료수집

실험기간 총 6주 후에 희생하였고 골다공증 실험기간은 총 7주 후에 희생하였다. 실험동물은 희생 전 하룻밤 절식시킨 후 ethyl ether로 마취시킨 후 단두하여 희생하였다. 채취된 혈액을 3000rpm에서 20분 간 원심분리하여 분리된 혈청을 냉동보관하였다. 대퇴골을 적출하여 골격에 붙어 있는 근육, 인대, 지방 등을 제거하여 무게를 측정, 보관하였다. 요와 변은 실험 종료 전 대사장에서 적응시킨 후 채취하여 요는 100ml가 되도록 희석하였고, 변은 $105 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 건조시켜 분말로 만들었다.

5. 골밀도 및 골 Ca함량 측정

골밀도는 LUNAR사(Madison, WI, USA)의 양에너지 방사선 골밀도 측정기(dual energy x-ray absorptiometry, DEXA) 사용하여 측정하였다.

대퇴골은 $105 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 건조하여 건조무게를 측정 한 후 $550-600^\circ\text{C}$ 의 회화로에서 6-8시간 회화하여 총 회분을 얻었다. 회화된 회분은 1N HCl에 용해한 후 1% La_2O_3 로 희석하여 원자흡광광도계(Atomic absorption spectrometer, Perkin Elmer Co.)로 칼슘함량을 측정하였다. 변도 대퇴골과 같은 방법으로 처리하여 얻은 건조분말에서 칼슘함량을 측정하였다.

6. 혈액 및 요의 생화학적 분석

혈액과 요의 칼슘함량은 자동분석기를 이용하여 분석하였다. 혈액 중의 alkaline phosphatase의 활성은 Kang(2001)의 비색법을 토대로 한 kit를 사용하여 측정하였다. Osteocalcin은 kit(Osteocalcin-IRMA, Biosource)를 사용하였고, PTH는 I^{125} 를 이용한 RIA kit로 측정하였다.

Calcitonin은 IRMA(Immunoradiometric assay)법에 의거하여 I^{125} -Calcitonin kit(CT-U.S.-IRMA)로 분석하였다. Deoxypyridinoline(DPD)의 함량은 화학발광면역 분석법에 의한 competitive binding assay를 이용하여 측정하였다.

7. 통계 분석

실험 결과는 SAS를 이용하여 각 실험군의 평균과 SD를 계산하였다. 실험군 간의 차이는 One way ANOVA를 사용하여 비교하였으며, Duncan's multiple range test에 의해 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

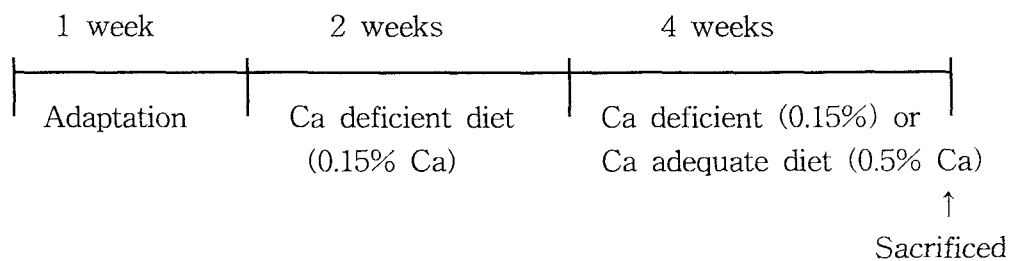


Fig. 1. Experimental design

Table 1. Composition of experimental diet (g)

	CC	TB	CT	CB	CL	LC
Calcium carbonate	12.6	-	-	-	-	3.7
Tuna bone powder	-	13.3	-	-	-	-
Citrated tuna bone powder	-	-	37.1	-	-	-
Bovine bone powder	-	-	-	13.1	-	-
Calcium lactate	-	-	-	-	37.0	-
Cornstarch	397.4	397.4	397.4	397.4	397.4	397.4
Casein	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Dextrinized cornstarch	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0
Soybean oil	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0
Fiber	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mix	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin mix	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
L-Cystine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Sucrose to	1000	1000	1000	1000	1000	1000

CC : CaCO₃ TB : tuna bone powder CT : citrated tuna bone powder CB : bovine bone powder

CL : Calcium lactate LC : 0.15% CaCO₃

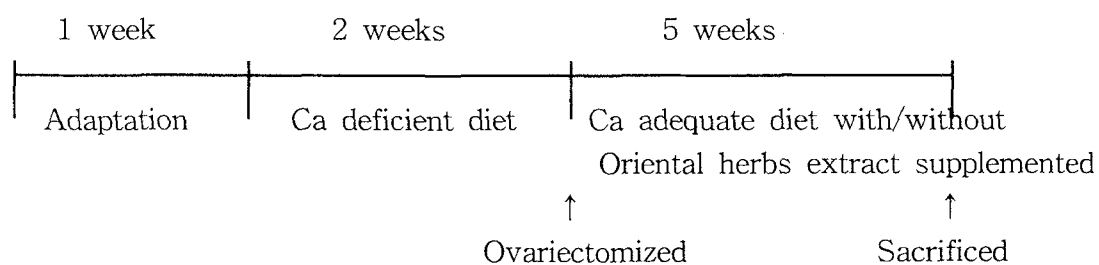


Fig. 2. Experimental design

Table 2. Composition of experimental diet (g)

	LC	Sham- CON(SCC)	OVX- CC	OVX- CCH	OVX- TB	OVX- TBH	OVX- CT	OVX- CTH
Calcium carbonate	3.8	12.6	12.6	12.6	—	—	—	—
Tuna bone powder	—	—	—	—	13.4	13.4	—	—
Citrated tuna bone powder	—	—	—	—	—	—	33.2	33.2
Cornstarch	397.5	397.5	397.5	397.5	937.5	937.5	937.5	937.5
Casein	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Dextrinized cornstarch	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Soybean oil	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0
Fiber	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mix	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin mix	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
L-Cystine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Oriental herbs extract*	—	—	—	*	—	*	—	*
Sucrose to	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

Sham-Con(CaCO₃) OVX-CC(CaCO₃; OVX-Control) OVX-CCH(CaCO₃ + herb extract) OVX-TB(tuna bone powder) OVX-TBH(tuna bone powder + herb extract) OVX-CT(citrated tuna bone powder) OVX-CTH(citrated tuna bone powder + herb extract)

* Oriental herbs extract dissolved in H₂O was supplemented by tube feeding (0.05g/100g BW).

제 2절 결과 및 고찰

1. 다랑어 골분의 특성과 안전성

원료 다랑어뼈의 일반성분은 수분 34%, 조단백질 19.2%, 조지방 7.5% 및 조회분 39.3%였다(Table 3). 그리고 뼈의 수율은 58.3%였다.

다랑어뼈를 대상으로 무기질과 인함량을 분석한 결과는 Table 4과 같다. 칼슘 36.5g/100g ash, 인 17.2g/100g ash 으로 구성이 있었고, 나트륨, 칼륨 및 마그네슘은 0.1~1.2g/100g ash, 으로 미량 함유되어 있었다. 중금속의 경우 납(0.1mg/100g ash)와 수은(0.1mg/100g ash)은 원료 안전성에 전혀 문제가 되지 않은 것으로 조사되었다. 이는 다랑어류의 경우 오염원이 다량 존재하는 연근해가 아닌 원양에 서식하는 어종이기 때문이라 판단되었다. 이상의 무기질 함량을 회분 100g 당으로 환산하면 다랑어뼈는 칼슘이 0.91몰, 인이 0.56몰로 구성되어 있었고, 이들의 대략적인 비는 10 : 6.2~6.3인 것으로 미루어 볼 때 다랑어뼈를 구성하고 있는 무기질은 대부분이 hydroxyapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ 로 구성되어 있는 것으로 판단되었고 이러한 것을 입증해 주는 결과도 얻었을 수 있었다(Fig 3). 이러한 결과로 볼 때 칼슘과 인의 비가 사람과 비슷한 골분임을 알 수 있었다.

Table 3. Proximate composition of tuna (%)

Proximate composition	tuna bones
Moisture	34
Crude protein	19.2
Crude lipid	7.5
Cruede ash	39.3

Table 4. Elements of tuna bone (g/100g ash)

Mineral	tuna bone
Crude ash	39.3
Calcium	36.5
Phosphorus	17.2
Sodium	1.2
Magnesium	0.6
Potassium	0.7
Manganese	2.1
Lead	0.1
Mercury	0.1

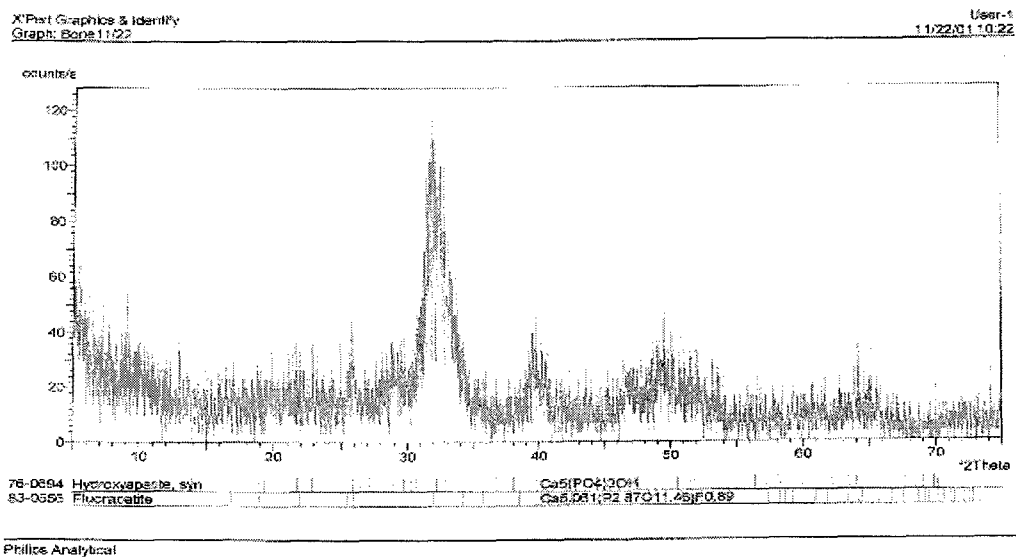


Fig. 3. X-ray diffraction patterns of calcined tuna bone.

2. 칼슘회수방법에 따른 칼슘제의 특성

2-1 처리방법에 따른 특성

진탕처리, 고온가압처리(autoclaving) 및 회화처리 등의 칼슘 회수 방법에 따른 다량어골분의 조단백질, 조회분, 조지방 함량 및 관능적 어취는 table 5와 같다. 다량어뼈 칼슘제에 있어서 진탕처리의 경우 조단백질 함량은 6.5%, 조지방과 회분함량은 3.2% 와 90.3%이고, 고온고압처리의 경우 조단백질 5.1%, 조지방 2.7%, 및 회분함량은 92.2%로 조사되었다. 고온고압처리가 진탕처리에 비하여 어취가 다소 낮게 조사되었으나 2가지 방법 모두 심한 어취가 나타나는 것으로 보아 다량어골분 제조에 적절치 않은 방법으로 사료되었다.

회화처리의 경우 조단백질과 조지방은 검출되지 않았고 거의 회분으로 조사되었고 진탕처리나 고온가압처리에 비하여 어취가 전혀 없었다.

각각의 회화온도 700℃, 800℃, 900℃에서 시간경과에 따른 백색도를 Hunter's colorimeter를 사용하여 백색도를 측정 한 결과는 Table 6와 같다. 온도가 높을수록 백색도가 높게 나타났으며 회화시간이 경과할수록 역시 백색도가 높게 조사되었다. 회화온도가 900℃의 경우 회화시간이 30분까지는 백색도가 증가하여 92.6로 회화시간 10분에 비해 뚜렷한 백색 분말상태를 보였으나 회화시간 30분 이후에는 회화시간이 경과하여도 더 이상의 백색도 증가는 큰 차이가 나타나지 않았다. 따라서, 회화시간을 고려해 볼 때 칼슘회수에 있어서 지질함량이 많은 다량어골분은 지질함량이 낮은 다른 어종와는 달리 다량어골분 제조를 위해서는 반드시 지질과 어취 제거가 필요조건으로 회분을 제외한 다른 성분들을 효과적으로 제거하기 위해서 회화처리방법이 가장 적합한 것으로 생각되며 회화처리 조건은 900℃에서 30분으로 하는 것이 최적의 제조 조건으로 사료된다.

따라서 다량어뼈에 붙어 있는 육이나 연골 및 이물질 등을 분리하기 위하여 진탕처리과정을 거치는 것이 바람직한 것으로 생각되며 칼슘제 제조공정은 Fig. 4과 같다. 위의 3가지 제조방법에 따른 가용화정도는 진탕처리(60℃, 6시간)의 경우 가용화는 10.6mg/100ml, 고온가압처리(121℃, 60분)의 경우 15.5mg/100ml 이었으며, 회화처리(900℃ 30min)된 다량어 골분의 가용화는 58.5mg/100ml으로 조사되어 회화

처리 방법이 진탕처리나 고온가압처리에 비해 가용화 되는 정도가 약 6배의 차이를 보였다.

2-2 골분 입자 크기에 따른 특성

회화처리된 다량어골분을 체를 이용하여 입자의 크기를 120, 100, 80mesh를 통과시켜 만든 다량어골분의 가용화와 흡수율의 영향을 조사하였다(Table 7).

회화처리된 다량어골분의 입자크기는 80mesh정도로 가용화는 58.5mg/100ml 흡수율은 12.2%였으며, 100mesh를 통과시킨 것은 63.2mg/100ml와 12.8%였고, 120mesh의 경우는 70.8mg/100ml와 15.2%로 나타났다. 입자의 크기가 적어질수록 가용화와 흡수율이 증가하였으며 80mesh와 100mesh의 경우는 흡수율이 별 차이가 없었으나, 120mesh의 경우에는 가용화와 흡수율에서 다소의 차이를 볼 수 있어 입자 크기가 칼슘의 흡수율에 영향을 미치는 것으로 생각되었다.

3. 칼슘 급원에 따른 가용화 및 흡수율

칼슘 급원(우골분, 난각분, 유청칼슘분, 해조칼슘분등 4종)에 따른 가용화와 흡수율을 다량어골분과 비교하였다(Table 8).

전체적으로 가용화와 흡수율에 있어서 난각분과 유청칼슘분을 제외한 것에서는 큰 차이는 보이지 않았으며 다량어골분과 해조칼슘분이 가장 높게 나타났다. 가용화에 있어서는 난각분이 32.1mg/100ml, 유청칼슘분이 50.6mg/100ml, 우골분 65.2mg/100ml, 다량어골분 70.8mg/100ml 및 해조칼슘분이 71.5mg/100ml 순으로 나타났다으며, 흡수율에 있어서는 다량어골분과 해조칼슘분이 15.2%, 15.7%로 가장 높게 조사되었고 비슷한 흡수율을 보였다. 난각분은 다른 칼슘급원에 비해 흡수율이 3.9%로 가장 낮은 것으로 조사되었고 또한 우골분과 유청칼슘분은 각각 13.8%, 10.5%로 나타났다.

4. 염형태에 따른 가용성 및 Ca 흡수율

4-1 유기산의 종류

다량어골분을 회화온도 900℃에서 30분간 회화시킨 골분 $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ 에

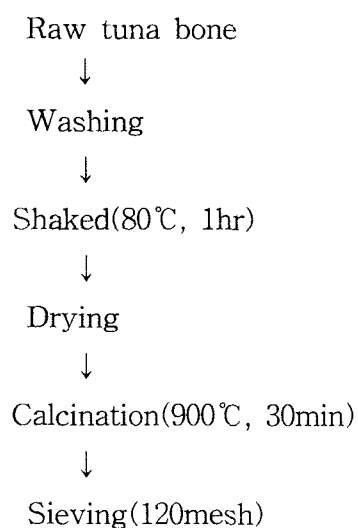


Fig. 4. Flow chart for processing calcium-based powder from tuna bone.

Table 5. Influence of treatment methods on the proximate composition, sensual odor and yields of calcium-based powders from tuna (g/100g)

Fish bones	Proximate composition	Treatment method		
		Shaked	Autoclaved	Ashed
blue fin tuna	Crude protein	6.5	5.1	ND
	Crude lipid	3.2	2.7	ND
	Crude ash	90.3	92.2	100
	Sensual odor ¹⁾	2	2	5

¹⁾ 1; very strong odor, 2 ; strong odor, 3; moderate strong odor, 3; weak odor, 5; odorless

Table 6. Effect of ashing temperatures on the whiteness of tuna powder

T(°C)	700			800			900		
Time(min)	L	a	b	L	a	b	L	a	b
10	56.8	1.41	6.51	70.1	1.85	7.62	78.2	1.96	8.91
20	68.2	1.49	6.89	76.6	1.86	7.78	86.3	2.12	9.78
30	77.1	1.59	7.56	80.9	1.86	7.89	92.6	2.39	10.19
60	86.1	1.78	8.01	87.7	1.90	8.28	92.7	2.39	10.17
120	88.2	1.95	9.56	90.1	2.26	9.78	93.7	2.38	10.16
180	90.1	2.15	9.91	92.7	2.29	10.02	93.8	2.38	10.16

Table 7. The solubilization and absorption ratio of calcium in various particle size from tuna bone powder

Particle size (mesh)	Solubilization (mg/100ml)	Absorption rate of calcium (%)
80	58.5	12.2
100	63.2	12.8
120	70.8	15.2

Table 8. The solubilization and absorption ratio of calcium in various raw materials.

Raw materials	Solubilization (mg/100ml)	Absorption rate of calcium (%)
tuna bone	70.8	15.2
cow bone	65.2	13.8
eggshell powder	32.1	3.9
skim milk powder	50.6	10.5
seaweed powder	71.5	15.7

Table 9. Preparation of various concentrations citric acid, lactic acid, malic acid and acetic acid.

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	Citric acid, Lactic acid Malic acid, Acetic acid (mol)	Ratio(mol/mol) of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$: Citric acid, Lactic acid Malic acid, Acetic acid
0.02	0.02	1 : 1
0.02	0.04	1 : 2
0.02	0.06	1 : 3
0.02	0.08	1 : 4
0.02	0.10	1 : 5

대한 유기산 4종(malic acid, citrate acid, lactic acid, acetic acid)의 농도는 물 비를 달리하여 제조하였다(Table 9). 이렇게 제조된 각 유기산의 물 비에 대한 가용화와 흡수율은 Table 10과 같다. 4종의 유기산 모두 농도가 높아짐에 따라 가용화와 흡수율의 증가폭이 컸으며 농도의 물 비가 1:3 이후로는 완만하게 증가하는 경향을 보였다.

구연산의 농도의 물 비가 1:1의 경우 흡수율이 21.7%이었고 농도가 증가할수록 흡수율이 증가하다가 물 비가 1:3이후에는 증가폭이 둔화되어 물 비가 1:4와 1:5는 흡수율이 각각 43.2% 43.8%로 가장 높게 나타났다. 이런 경향은 사과산의 경우도 같은 경향을 보였는데, 물 비가 1:1의 경우가 15.2% 1:2의 경우 21.6% 1:3의 경우 34.7%로 급격히 증가하다가 1:4이후로는 증가폭이 완만하게 나타났으며, 젖산이나 초산의 경우도 같은 경향을 볼 수 있었고, 이상과 같은 결과들을 볼 때 유기산 농도의 적정 물 비는 1:3이나 1:4가 적당한 것으로 생각되었다.

초산의 흡수율은 1:5의 경우 21.7%, 젖산 1:5의 경우 30.1%, 사과산 1:5의 경우 38.7% 구연산 1:5의 경우 43.8%로 염의 형태중에서 구연산염이 가장 높은 흡수율을 보였고, 가용화 역시 가장 높은 값을 보였다.

염형태에 따른 가용화와 흡수율을 고려할 때 유기산의 종류는 구연산으로 정하였으며 칼슘제를 복용하는 방법과 여러 가지 점을 고려하여 구연산의 농도 물 비는 1:3으로 결정하는 것이 최적의 조건으로 생각되었다.

4-2 교반 시간

다량어골분을 구연산의 물 비(1:3)의 농도로써 반응시키는 시간(0.5hr, 1hr, 2hr s, 3hrs, 6hrs, 12hrs)을 달리하여 흡수율의 변화를 조사하였다(Table 11).

교반 시간이 경과할수록 흡수율은 증가하였고 교반 시간 30분 경과한 후의 흡수율은 28.9%로 교반 시간 2시간까지는 흡수율이 급격히 증가하여 흡수율이 42.6%였고 2시간 이후로는 미미한 흡수율의 증가를 보여 다량어골분과 구연산 처리시간은 2시간으로 결정하였다.

그리고 회화처리 후 다량어골분을 ball mill로 미세하게 분쇄한 후 교반시키는 것

이 교반 후에 분쇄하는 것보다 흡수율이 높게 나타나는 것으로 보아 다량어골분과 구연산의 반응성을 높여 가용화를 촉진하는 것으로 생각되었다.

4-3 한방처방에 따른 칼슘 흡수율

아동기의 골다공증, 폐경기 여성의 골다공증 및 노년 남성의 골다공증 등 3가지 형태의 골다공증으로 구성하여 한방약제로써 처방에 따른 흡수율을 나타내었다 (table 12). 3가지 형태의 골다공증 처방에 따른 흡수율의 증가는 미미한 증가를 보였고, 이것은 단순히 *in vitro* 실험만으로 흡수율을 판단하기 곤란하며 실제 임상실험을 통해서 여러 가지 면에서 언급하는 것이 타당할 것으로 생각된다. 또한, 3가지 처방은 몸의 면역체계를 강화시키면서 인체에 흡수된 후 얼마나 칼슘을 보유하고 체외로 배출시키지 않는가라는 측면에서 접근하는 것이 한방처방에 따른 칼슘의 흡수율을 판단해야 한다.

5. 칼슘 흡수율에 영향을 미치는 인자

칼슘 흡수율에 영향을 미치는 인자들을 조사하기 위하여 CPP(Casein phosphopeptides), glucose, xylitol, vitamin-C, lysine 등을 대한 칼슘의 흡수율에 나타내었다(Table 13).

구연산 처리된 골분에 영향을 미치는 인자들을 단일 첨가와 혼합 첨가를 행한 결과, lysine, CPP, Vit-C가 대조구에 비해 2% 정도의 흡수율 증가를 보였고 glucose와 xylitol의 경우는 미미한 흡수율 증가를 알 수 있었다. 혼합 첨가의 경우 단일 첨가보다는 Ca 흡수율이 다소 증가하였으나 의미있는 차이라고 볼 수 없었다.

Miller 등은 CPP, Vit-C, lysine, Vit-C 등을 2가지나 3가지 혼합 실험한 결과 단일 첨가보다 혼합첨가의 효과는 미미하였다고 보고하였다. *in vitro*상에서의 결과를 가지고 단순히 단정하기 보다는 *in vivo* 실험과 병행하여 효과를 보는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

Table 10. The solubilization and absorption ratio of calcium in various concentration of organic acid

organic acid concentration (mol/mol)		solubilization (mg/100ml)	absorption rate of calcium (%)
Citric acid	1 : 1	528	21.7
	1 : 2	695	30.7
	1 : 3	1132	42.6
	1 : 4	1141	43.2
	1 : 5	1146	43.8
Lactic acid	1 : 1	478	14.8
	1 : 2	501	16.7
	1 : 3	538	21.8
	1 : 4	635	25.7
	1 : 5	702	30.1
Malic acid	1 : 1	506	15.2
	1 : 2	530	21.6
	1 : 3	705	34.7
	1 : 4	764	37.8
	1 : 5	801	38.7
Acetic acid	1 : 1	415	14.7
	1 : 2	462	15.8
	1 : 3	512	20.2
	1 : 4	535	21.3
	1 : 5	565	21.7

Table 11. The changes of absorption ratio of calcium by stirring time

Stirring time (hr)	Absorption rate of calcium (%)
0.5	28.9
1	36.2
2	42.6
3	42.8
6	42.9
12	43.8

Table 12. The absorption ratio of calcium in the Osteoporosis types

Osteoporosis types	Oriental herb extract	Absorption rate of calcium (%)
Osteoporosis in childhood	Gunah-dan; Angelica gigantis Radix Cistanches Herba, Achyranthis Radix Cervi pantotrichum Cornu Citriated tuna bone powder	15.2→16.3(42.2→43.7)
Postmenopausal osteoporosis in women	Shinji-won; Rehmanjae Radix, Eucommiae Cortex Dipsaci Radix, Ginseng Radix Citriated tuna bone powder	15.2→16.6(42.2→43.5)
Osteoporosis in old age men	Gagno-won; Cervi Cornus Degelatinum, Lycii Fructus Testudinis Plastrum, Cuscutae Semen Citriated tuna bone powder	15.2→17.1(42.2→44.8)

Table 13. Effect of the factors in absorption rate of calcium

Factors	Absorption rate of calcium(%)
C(citrated tuna bone)	42.8
CP(citrated tuna bone + casein phosphopeptide)	44.7
CV(citrated tuna bone + Vit C)	44.5
CS(citrated tuna bone + lysine)	45.2
CG(citrated tuna bone + glucose)	43.0
CX(citrated tuna bone + xylitol)	43.9
CPV(citrated tuna bone + casein phosphopeptide + Vit C)	45.5
CPS(citrated tuna bone + casein phosphopeptide + lysine)	46.5
CVS(citrated tuna bone + Vit C + lysine)	45.1
CSX(citrated tuna bone + lysine + xylitol)	45.3

6. Ca 급원과 염형태에 따른 골격대사능 평가

6-1 체중변화와 식이효율

실험 시작 시 실험군 간의 체중은 차이가 없었다(Table 14). 실험 종료 시에는 우골분을 섭취한 CB군의 체중 증가가 유의하게 높았으며, 구연산 처리된 다량어골분 분말 및 칼슘부족 식이를 급여한 CT와 LC군에서 체중 증가가 가장 낮았다. 식이 섭취량도 CB에서 가장 높았으며, CT와 calcium lactate를 급여한 CL에서 유의하게 낮은 섭취량을 보였다. 그러나 식이효율에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보아 CB는 다른 칼슘급원에 비해 비교적 섭취하기에 좋고 체중증가를 유발하는 반면, 구연산 처리된 다량어골분이나 calcium lactate는 섭취하기에 덜 용이한 것으로 나타났으며 이는 구연산이나 젖산에 의한 신맛 때문으로 사료된다.

Table 14. Body weight, body weight gain and FER

	Initial BW (g)	Final BW (g)	Weight gain (g/week)	Food intake (g/week)	FER
CC	119.03 ± 4.95 ^{NS}	345.18 ± 23.80 ^{ab}	37.69 ± 3.74 ^{ab}	158.10 ± 8.63 ^{ab}	0.25 ± 0.03 ^{NS}
TB	129.88 ± 35.54	338.88 ± 23.99 ^{ab}	34.83 ± 6.08 ^b	154.47 ± 8.08 ^{ab}	0.23 ± 0.05
CT	117.48 ± 10.03	331.71 ± 25.92 ^b	35.71 ± 3.66 ^b	150.64 ± 9.99 ^b	0.25 ± 0.02
CB	118.55 ± 7.25	357.94 ± 19.22 ^a	39.90 ± 3.29 ^a	161.88 ± 7.98 ^a	0.26 ± 0.02
CL	118.61 ± 6.31	336.23 ± 14.50 ^{ab}	36.27 ± 2.13 ^{ab}	150.52 ± 5.92 ^b	0.26 ± 0.01
LC	118.79 ± 5.83	331.15 ± 21.42 ^b	35.39 ± 2.66 ^b	158.71 ± 9.49 ^{ab}	0.23 ± 0.01

Values are mean ± SD. NS : not significant.

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

CC : CaCO₃ TB : tuna bone powder CT : citrated tuna bone powder CB : bovine bone powder

CL : Calcium lactate LC : 0.15% CaCO₃

6-2 장기 무게

간조직의 무게는 실험군 간에 차이가 없었으나 CB군에서 높은 경향을 보였고, 단위 체중당 간의 무게에서도 차이가 없었다. 신장의 무게도 간의 무게와 비슷한 양상으로 나타났다(Table 15).

6-3 칼슘의 섭취량과 배설량의 균형

저칼슘식이인 LC는 변으로 배설되는 양이 다른 정상식이군에 비해 최소화되어 흡수율이 최고치를 나타냈으나 칼슘 보유량은 가장 낮았다(Table 16). 칼슘급원에 따른 변 칼슘 배설량과 이에 따른 칼슘흡수량은 차이가 없었다. 뇨 칼슘배설량은 TB에서 유의하게 낮았고 CL에서 높은 값을 보였지만 체내 칼슘보유량은 칼슘급원에 따른 차이를 보이지 않았다.

6-4 혈청의 골격대사 관련 지표

뼈형성의 biomaker인 alkaline phosphatase(ALP)의 측정치는 Table 17에서와 같다. ALP의 활성은 저칼슘식이군 LC에서 유의하게 높은 반면 정상칼슘급여군에서는 낮게 나타났으며, 특히 탄산칼슘군 CC에서 현저히 낮았다. 칼시토닌은 갑상선의 특이화된 C세포라고 하는 간질세포에서 분비되어 혈액칼슘농도의 유지조절과 뼈 흡수 억제 등의 역할을 담당한다. 칼시토닌은 LC군을 비롯한 CC와 CL에서 유의하게 낮았으며, 다량어골분이나 우골분에서는 높은 수치를 보였다. 뼈의 흡수기능을 담당하는 PTH는 다량어골분을 급여한 TB와 CT군 및 LC군에서 낮은 경향을 보였으나 실험군 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 오스테오칼신은 ALP와 함께 뼈형성을 나타내는 주요 생화학지표로 사용되고 있으며, 실험군 간에 차이를 보이지 않았다. ALP는 골생성이 왕성할 때 증가되는데 성인에 비해 소아에서 정상치가 높고, 골절 후 혈중 활성도가 증가하는 것은 이와 같은 연유에서이다. PTH는 혈청칼슘이 정상 이하로 떨어질 때 골격으로부터 칼슘의 방출을 유도하며, 신장에서 25-(OH)D_{1-α}-hydroxylase를 자극하여 1,25-(OH)D₃ 합성을 증가시킴으로써 장에서 칼슘흡수와 신장에서의 재흡수를 증가시켜 혈청의 칼슘농도를 조절하는 것으로 알려져 있다. Khaw 등과 Villareal 등에 의하면 골밀도는 25-OHD와 양의 상관성이 있고,

Table 15. Liver and Kidney weight

	Liver (g)		Kidney (g)	
	Weight	Weight/100g BW	Weight	Weight/100g BW
CC	10.26±1.22 ^{NS}	2.97±0.19 ^{NS}	2.83±0.33 ^{NS}	0.82±0.05 ^{NS}
TB	10.34±1.13	3.05±0.28	2.48±0.28	0.84±0.04
CT	10.15±1.02	3.06±0.15	2.77±0.30	0.83±0.04
CB	10.75±0.94	3.00±0.19	3.03±0.18	0.85±0.06
CL	10.21±1.06	3.03±0.23	2.75±0.24	0.82±0.06
LC	10.42±1.27	3.15±0.29	2.81±0.17	0.85±0.05

Values are mean±SD. NS : not significant.

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

CC : CaCO₃ TB : tuna bone powder CT : citrated tuna bone powder CB : bovine bone powder

CL : Calcium lactate LC : 0.15% CaCO₃

Table 16. Calcium absorption and retention

	Ca intake (mg/day)	Fecal Ca excretion (mg/day)	Urinary Ca excretion (mg/day)	Ca absorption rate (%)	Ca retention (mg/day)
CC	102.96±11.17 ^a	38.89±14.87 ^a	17.20±8.75 ^{ab}	61.20±18.01 ^b	46.87±21.77 ^a
TB	105.16±8.15 ^a	40.64±20.77 ^a	14.55±5.00 ^b	61.80±17.68 ^b	49.97±18.04 ^a
CT	90.11±9.99 ^b	37.43±16.53 ^a	16.11±6.68 ^{ab}	57.86±19.70 ^b	36.57±21.20 ^a
CB	98.68±8.69 ^{ab}	42.88±15.04 ^a	16.10±2.26 ^{ab}	56.46±14.74 ^b	39.70±16.45 ^a
CL	99.43±9.95 ^{ab}	26.45±6.51 ^a	21.71±2.29 ^a	73.51±5.65 ^b	51.26±9.67 ^a
LC	29.54±4.46 ^c	1.44±0.92 ^b	1.89±2.14 ^c	94.67±4.43 ^a	26.22±6.85 ^b

Ca absorption rate(%) = (Ca intake - fecal Ca excretion)/Ca intake × 100

Ca retention(mg/day) = (Ca intake - fecal Ca excretion - urinary Ca excretion)

Values are mean±SD. NS : not significant.

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

CC : CaCO₃ TB : tuna bone powder CT : citrated tuna bone powder CB : bovine bone powder

CL : Calcium lactate LC : 0.15% CaCO₃

PTH와 음의 상관성이 있다. 문 등에 의하면 PTH와 ALP는 골밀도가 증가할수록 유의하게 감소함으로써 골격 및 칼슘대사를 조절하는 요인임을 지적하고 있다. 본 연구에서 ALP는 칼슘급원에 따른 영향은 CC에서 낮은 수치를 보이고, 칼슘함량에 따라 유의한 차이를 보여 저칼슘식이에서 높은 수치를 보였다. 이는 칼슘대사에서 식이내 칼슘의 적정량이 중요함을 의미한다고 하겠다. 뼈의 흡수기능을 담당하는 PTH는 칼슘의 함량이나 급원에 따른 차이를 보이지 않았으나 뼈의 흡수억제 기능을 담당하는 칼시토닌은 LC군을 비롯한 CC와 CL에서에서 유의하게 낮았으며, 다량어골분이나 우골분에서는 높은 수치를 보였다. 이는 동일 식이 칼슘 수준에서 비교할 때 다량어골분이나 우골분이 다른 급원과는 달리 뼈의 칼슘용출 억제 능력이 높다는 것을 시사함으로써 칼슘급원 및 칼슘의 형태에 따른 효용도에 대한 연구의 필요성을 요구한다 하겠다.

Table 17. Calcium biochemical parameters in serum

	Calcitonin (pg/ml)	PTH (pg/ml)	Osteocalcin (ng/ml)	ALP (IU/L)
CC	2.63±0.82 ^b	206.68±46.87 ^{NS}	1.10±0.21 ^{NS}	246.63±94.85 ^b
TB	4.72±1.50 ^a	185.87±49.75	1.01±0.01	302.75±71.58 ^{ab}
CT	5.50±0.87 ^a	176.16±37.43	1.00±0.00	308.63±84.30 ^{ab}
CB	4.60±1.46 ^a	202.28±27.97	1.00±0.00	319.75±39.25 ^{ab}
CL	3.37±1.29 ^b	202.42±48.96	1.14±0.23	298.38±46.67 ^{ab}
LC	2.60±0.73 ^b	187.27±71.70	1.14±0.23	360.38±92.00 ^a

Values are mean±SD. NS : not significant.

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

CC : CaCO₃ TB : tuna bone powder CT : citrated tuna bone powder CB : bovine bone powder

CL : Calcium lactate LC : 0.15% CaCO₃

6-5 요의 골격대사 관련 지표

DPD는 collagen과 cross-link하여 뼈에 존재하는 물질로서 뼈의 용출이 일어날 경우 뼈에서 유리되어 요를 통해 배설되므로 뼈의 흡수지표로 사용되고 있다. Table 18에 의하면 LC군에서 유의하게 높았으며, 정상수준의 칼슘을 섭취한 각 군에서의 차이는 차이가 없었다.

뼈의 흡수를 나타내는 지표인 뇨의 DPD는 저칼슘식이에서 유의하게 높은 결과를 보였고, 칼슘급원에 따른 차이는 나타나지 않았다. 뇨를 통한 칼슘배설량은 TB에서 가장 높고 CL에서 가장 낮았다. 이러한 DPD와 뇨 칼슘배설의 경향은 골밀도와 관련이 있는 것으로 보인다. 골밀도의 측정 결과 DPD가 높았던 저칼슘식이인 LC군에서 골밀도가 유의하게 낮았고, 뇨 칼슘배설량이 낮았던 TB의 골밀도는 유의하게 높았다. 반면 CL은 뇨 칼슘배설량이 매우 높았으나 변을 통한 배설의 감소로 인하여 골밀도에 미치는 영향이 상쇄되었다 하겠다.

Table 18. Calcium biochemical parameters in urine

	Ca (mg/dl)	Deoxypyridinoline(DPD) (nM/mM creatinine)
CC	17.20 ± 8.75 ^{ab}	271.80 ± 51.20 ^b
TB	14.55 ± 5.00 ^b	273.55 ± 55.24 ^b
CT	16.11 ± 6.68 ^{ab}	289.66 ± 36.45 ^b
CB	16.10 ± 2.26 ^{ab}	249.43 ± 41.21 ^b
CL	21.71 ± 2.29 ^a	259.52 ± 62.44 ^b
LC	1.89 ± 2.14 ^c	376.21 ± 145.12 ^a

Values are mean ± SD. NS : not significant.

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

CC : CaCO₃ TB : tuna bone powder CT : citrated tuna bone powder CB : bovine bone powder

CL : Calcium lactate LC : 0.15% CaCO₃

6-6 대퇴골의 회분과 칼슘함량 및 골밀도

대퇴골의 건조 전의 습윤무게는 LC와 CL에서 유의하게 낮은 반면 TB, CT, CC, CB에서 증가되었으며, TB와 CT에서 뚜렷하게 높았다(Table 19). 체중 100g당의 무게로 환산한 수치 또한 TB와 특히 CT에서 유의하게 증가하였으나 다른 식이군의 무게는 낮은 수치를 보였다. 건조 후의 대퇴골의 무게는 LC를 제외한 정상수준의 칼슘 투여군 간에 차이가 없으나 체중 100g당 대퇴골의 무게는 CT와 CL에서 높게 나타났다. 대퇴골의 회분 함량은 정상수준의 칼슘식이군들에 비해 저칼슘식이인 LC에서 유의하게 낮았다(Table 20). 대퇴골에 함유된 회분함량 비율은 CB와 CT에서 유의하게 높았다. 체중 100g 단위로 환산된 회분함량은 LC에서 현저히 낮았고, 정상칼슘 식이를 급여한 칼슘급원에 따른 유의한 차이는 없으나 CT에서 다소 높은 수치를 나타냈다.

대퇴골의 칼슘함량과 건조중량 단위당 칼슘함량은 LC와 CT에서 낮았고 CB에서 뚜렷하게 증가하였다(Table 21). 체중 100g 단위당 칼슘함량은 칼슘급원에 따른 차이는 없으나 저칼슘식이에 비해 높은 수치를 보였다.

대퇴골의 골밀도는 Table 22에 나타낸 바와 같다. 골밀도의 측정 결과 저칼슘식이인 LC군은 정상식이군에 비해 골밀도가 유의하게 낮았다. 동일한 정상수준의 칼슘이 공급된 실험군 사이에서는 TB의 골밀도가 가장 높은 수치를 보였으며, CT와 CB, CL은 비슷한 정도의 골밀도를 나타내고 있다.

즉 대퇴골의 무게, 회분함량 및 칼슘함량, 골밀도는 저칼슘식이에 의해 크게 영향을 받아 현저하게 낮았다. 정상수준의 칼슘이 공급된 실험군에서 칼슘급원에 따른 차이를 보면 TB 및 CT나 CB에서 대퇴골의 중량이나 회분의 함량이 높아지는 결과를 보였다. 칼슘함량은 CT에서 낮고 CB에서 유의하게 높았으며, TB에서 높은 골밀도를 나타냈다. 이상의 대퇴골의 중량이나 회분, 칼슘 및 골밀도의 결과로 보아 다량어골분은 기존에 사용되어 오던 우골분 이상으로 뼈의 건강유지면에서 긍정적인 가치를 부여할 수 있으며, 구연산 처리된 다량어골분도 CaCO_3 , calcium lactate, 우골분과 유사한 수준의 효과를 갖는 칼슘 급원으로 평가된다.

Table 19. Weight of femur

	Wet weight		Dry weight	
	g	g/100g BW	g	g/100g BW
CC	0.802±0.05 ^{ab}	0.233±0.01 ^{bc}	0.546±0.03 ^a	0.159±0.01 ^{ab}
TB	0.836±0.06 ^a	0.247±0.02 ^{ab}	0.532±0.03 ^a	0.157±0.01 ^{ab}
CT	0.863±0.06 ^a	0.261±0.02 ^a	0.537±0.02 ^a	0.163±0.01 ^a
CB	0.804±0.05 ^{ab}	0.225±0.01 ^c	0.539±0.02 ^a	0.151±0.01 ^b
CL	0.765±0.08 ^b	0.227±0.02 ^c	0.545±0.04 ^a	0.162±0.01 ^a
LC	0.641±0.04 ^c	0.193±0.02 ^d	0.437±0.03 ^a	0.131±0.01 ^c

Values are mean±SD. NS : not significant.

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

CC : CaCO₃ TB : tuna bone powder CT : citrated tuna bone powder CB : bovine bone powder

CL : Calcium lactate LC : 0.15% CaCO₃

Table 20. Ash content of femur

	Ash(mg)	Ash/dry weight(%)	Ash/BW(mg/100g)
CC	330.20±21.99 ^a	60.4±1.3 ^b	95.76±4.41 ^a
TB	323.96±26.88 ^a	60.8±3.0 ^b	95.82±7.79 ^a
CT	331.08±14.23 ^a	61.6±1.6 ^{ab}	100.17±6.25 ^a
CB	340.40±12.74 ^a	63.1±9.1 ^a	95.30±5.42 ^a
CL	329.65±21.82 ^a	60.5±11.2 ^b	98.06±5.13 ^a
LC	240.79±7.78 ^b	55.1±1.9 ^c	72.45±2.62 ^b

Values are mean±SD. NS : not significant.

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

CC : CaCO₃ TB : tuna bone powder CT : citrated tuna bone powder CB : bovine bone powder

CL : Calcium lactate LC : 0.15% CaCO₃

Table 21. Calcium content of femur

	Ca(mg)	Ca/dry weight(%)	Ca/ash(%)	Ca/BW(mg/100g)
CC	128.83±9.27 ^{ab}	23.6±1.2 ^{ab}	39.0±1.7 ^a	37.38±2.28 ^a
TB	123.85±16.97 ^{ab}	23.2±1.9 ^{ab}	38.1±2.6 ^{ab}	36.54±4.04 ^a
CT	117.43±16.93 ^b	21.8±3.0 ^b	35.4±4.5 ^b	35.58±5.90 ^a
CB	134.32±9.23 ^a	24.9±1.8 ^a	39.5±3.0 ^a	37.63±3.40 ^a
CL	127.68±13.29 ^{ab}	23.4±1.9 ^{ab}	38.7±3.1 ^a	37.93±3.08 ^a
LC	95.28±4.99 ^c	21.8±1.4 ^b	39.5±1.8 ^a	28.69±2.02 ^b

Values are mean±SD. NS : not significant.

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

CC : CaCO₃ TB : tuna bone powder CT : citrated tuna bone powder CB : bovine bone powder

CL : Calcium lactate LC : 0.15% CaCO₃

Table 22. Bone mineral density of femur

	BMD(g/cm ²)	BMD/100g BW(g/cm ²)
CC	0.172±0.007 ^{ab}	0.050±0.002 ^{ab}
TB	0.240±0.191 ^a	0.070±0.052 ^a
CT	0.173±0.004 ^{ab}	0.052±0.005 ^{ab}
CB	0.175±0.005 ^{ab}	0.049±0.004 ^{ab}
CL	0.177±0.006 ^{ab}	0.053±0.002 ^{ab}
LC	0.132±0.003 ^b	0.040±0.003 ^b

Values are mean±SD. NS : not significant.

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

CC : CaCO₃ TB : tuna bone powder CT : citrated tuna bone powder CB : bovine bone powder

CL : Calcium lactate LC : 0.15% CaCO₃

7. Ca 급원으로써 가다랑어골분과 한방추출물의 골격대사능 평가

7-1 체중 변화와 식이효율

Sham시술 및 난소절제한 모든 실험군의 초기 체중은 차이가 없으나 실험 종료 시기의 최종체중은 sham에 비해 모든 OVX군에서 현저히 증가하였다(Table 23). 체중증가량도 난소절제군에서 유의하게 증가하였는데 이는 난소절제로 인한 체중증가현상이 나타난 결과이며 체중이 부하된 활동을 증대시키고 에스트로젠 생성이 가능한 체지방을 증가시키려는 기전으로 생각된다. 또한, 노령화에 따라 골격형성에 비해 골격흡수가 급속히 증가되어 골격손실이 가속화되며 이는 폐경 이후 여성호르몬의 분비감소가 주요 요인으로 작용하기 때문이다. 주당 식이섭취량은 Sham군에서 다소 낮으나 유의한 차이는 아니었다. 그러나 식이효율은 체중증가량과 같은 양상으로 sham군에 비해 난소절제군이 뚜렷이 높았다. 체중변화나 식이효율에서 칼슘 급원이나 한약재 추출물에 따른 차이는 나타나지 않았다.

7-2 장기 무게

간의 무게는 Sham-con에서 가장 낮았고, OVX-TB에서 가장 높았으나 단위 체중당으로 나타낸 간의 무게는 실험군 간에 차이를 보이지 않았다(Table 24). 신장 무게는 Sham에 비해 OVX 군들에서 유의하게 높게 나타났다. 그러나 단위 체중당 표시된 신장의 무게는 Sham군이 유의하게 높았으며, OVX군 간에 칼슘급원 및 한약재 보충에 따른 차이가 없었다.

Heaney(2000)가 설명하는 골손실 기전에 따르면, 폐경에 이르면 비타민 대사와 관련된 소장과 신장의 민감도에 영향없이 PTH에 대한 골격의 민감도가 증가된다. 따라서 칼슘의 항상성에 필요한 칼슘원으로 뼈가 우선적으로 쉽게 이용되는데 반해, 신장과 소장으로부터의 칼슘은 덜 이용되기 때문으로 보고하고 있다.

7-3 칼슘의 섭취량과 배설량의 균형

변을 통한 칼슘배설량은 난소절제에 의한 차이는 없으나 OVX-CC에서 높고, OVX-CTH에서 가장 낮았다(Table 25). 뇨의 칼슘배설량은 전반적으로 sham에 비해 난소절제군에서 유의하게 높았다. 또한 OVX-TB에서 뇨 칼슘배설량이 뚜렷하게

Table 23. Body weight, body weight gain and FER

	Initial BW (g)	Final BW (g)	Weight gain (g/week)	Food intake (g/week)	FER
Sham(SCC)	164.40±6.84 ^{NS}	257.84±12.52 ^b	13.35±1.48 ^b	117.71±8.69 ^{NS}	0.11±0.01 ^b
OVX-CC	165.24±6.29	321.30±32.78 ^a	21.01±4.67 ^a	123.63±7.54	0.17±0.03 ^a
OVX-CCH	162.48±4.24	320.10±13.01 ^a	22.52±1.47 ^a	126.48±9.13	0.18±0.01 ^a
OVX-TB	164.74±7.71	322.74±16.30 ^a	22.57±1.97 ^a	124.29±10.61	0.18±0.02 ^a
OVX-TBH	162.79±6.34	324.54±10.23 ^a	23.11±1.54 ^a	126.64±7.93	0.18±0.02 ^a
OVX-CT	161.66±2.62	313.91±15.03 ^a	21.75±1.93 ^a	127.60±6.44	0.17±0.01 ^a
OVX-CTH	166.86±4.61	310.63±14.05 ^a	20.54±1.63 ^a	123.07±9.04	0.17±0.01 ^a

Values are mean±SD. NS : not significant

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

Sham-Con(CaCO₃) OVX-CC(CaCO₃; OVX-Control) OVX-CCH(CaCO₃ + herb extract) OVX-TB(tuna bone powder) OVX-TBH(tuna bone powder + herb extract) OVX-CT(citrated tuna bone powder) OVX-CTH(citrated tuna bone powder + herb extract)

Table 24. Liver and Kidney weight

	Liver(g)		Kidney(g)	
	Weight	Weight/100g BW	Weight	Weight/100g BW
Sham(SCC)	9.15±1.23 ^c	3.55±0.46 ^{NS}	1.82±0.16 ^b	0.71±0.06 ^a
OVX-CC	11.04±1.60 ^{ab}	3.53±0.36	2.02±0.14 ^a	0.65±0.06 ^b
OVX-CCH	11.28±0.46 ^{ab}	3.53±0.18	2.02±0.13 ^a	0.63±0.02 ^b
OVX-TB	11.81±1.54 ^a	3.65±0.30	2.04±0.13 ^a	0.63±0.04 ^b
OVX-TBH	11.48±0.72 ^{ab}	3.54±0.15	2.05±0.12 ^a	0.63±0.03 ^b
OVX-CT	10.72±1.26 ^{ab}	3.41±0.25	1.98±0.17 ^a	0.63±0.02 ^b
OVX-CTH	10.41±1.13 ^b	3.35±0.26	1.95±0.15 ^{ab}	0.63±0.03 ^b

Values are mean±SD. NS : not significant

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

Sham-Con(CaCO₃) OVX-CC(CaCO₃; OVX-Control) OVX-CCH(CaCO₃ + herb extract) OVX-TB(tuna bone powder) OVX-TBH(tuna bone powder + herb extract) OVX-CT(citrated tuna bone powder) OVX-CTH(citrated tuna bone powder + herb extract)

높고, OVX-CTH에서 낮았다. 따라서 칼슘흡수율은 OVX-CC에서 낮고 OVX-CTH에서 높은 경향으로 나타났으며, 칼슘보유량은 OVX-CC와 OVX-TB에서 낮아지는 반면 OVX-CTH에서 상승되는 경향을 보였다.

한방 추출물을 보충한 군에 비해 보충하지 않은 군에서 변과 뇨를 통한 칼슘배설이 작은 변화이지만 전반적으로 감소하는 양상이었다. 이를 백분율로 나타내면 변배설량의 경우 CC는 8.8%, TB는 18.9%, CT는 17.4%씩 각기 저하하였고, 뇨배설량은 CC, TB, CT에서 각기 2.6%, 29.4%, 32.6%씩 낮아졌다. 한방재료 추출물을 보충한 경우는 Sham군과 비슷한 수준의 칼슘배설량을 기록하였다. 특히 OVX-TB에 비해 TB에 구연산처리와 한방추출물이 첨가된 OVX-CTH는 변(33.6%)과 뇨(45.8%)를 통한 칼슘배설이 크게 감소하였다. 이러한 효과는 칼슘 흡수율과 보유량에서도 나타나 흡수율은 59.9에서 71.2로 19% 증가하였고, 보유량은 42.6 ± 8.1 에서 52.6 ± 16.7 mg/day로 22.5% 상승하였다.

이상의 결과로 보아 다량어골분은 구연산으로 처리하여 한방추출물을 첨가할 경우 칼슘배설량을 저하시킴으로써 칼슘의 흡수와 보유율 증가를 유도할 수 있음을 시사한다.

7-4 혈청의 칼슘대사 관련 지표

Sham은 난소절제군에 비해 에스트로젠의 수치가 가장 높아 본 연구에서 의도한 인위적인 골다공증 모델의 유발에 부합되는 현상이었다. 한방추출물의 첨가에 의한 차이는 없으나 구연산처리된 다량어골분이 CaCO_3 급원군 보다 다소 높은 농도의 호르몬 함량을 유지하였다(Table 26).

혈중 칼시토닌은 Sham이 OVX군에 비해 다소 높은 경향을 보이며, OVX내 칼슘급원에 의한 차이는 뚜렷한 차이를 볼 수 없으나 구연산처리된 다량어골분 급원군에서 다소 낮은 양상을 보였다. PTH는 Sham과 OVX 사이 및 칼슘급원간에 차이가 없었다. 한약재의 효과도 나타나지 않았다.

오스테오칼신은 Sham과 OVX-CC에서 유의하게 낮았고 OVX-TB, OVX-TBH, OVX-CT, OVX-CTH에서 높은 값은 보였으며, 구연산 처리된 식이군이 다른 칼슘급원 식이군에 비해 높은 경향이었다. ALP는 차이가 현저하지는 않으나 난소절제

Table 25. Calcium absorption and retention

	Ca Intake (mg/day)	Fecal Ca excretion (mg/day)	Urinary Ca excretion (mg/day)	Ca absorption rate (%)	Ca retention (mg/day)
Sham(SCC)	73.92±14.18 ^{NS}	26.60±8.22 ^{ab}	2.83±1.90 ^b	61.56±16.99 ^{NS}	44.49±21.09 ^{NS}
OVX-CC	78.24±7.35	32.42±15.66 ^a	3.98±1.18 ^{ab}	58.30±20.09	41.83±17.79
OVX-CCH	81.17±6.63	29.55±6.67 ^{ab}	3.88±1.68 ^{ab}	63.50±8.45	47.75±9.51
OVX-TB	79.25±9.45	31.82±7.63 ^{ab}	4.80±1.05 ^a	59.88±8.28	42.63±8.13
OVX-TBH	80.61±6.39	25.80±9.60 ^{ab}	3.39±0.99 ^{ab}	67.61±12.91	51.42±12.79
OVX-CT	78.96±7.18	25.59±6.82 ^{ab}	3.86±1.25 ^{ab}	67.36±9.24	49.51±10.76
OVX-CTH	75.96±7.44	21.14±11.02 ^b	2.60±0.83 ^b	71.23±16.37	52.22±16.67

Ca absorption rate(%) = (Ca intake - fecal Ca excretion)/Ca intake ×100

Ca retention(mg/day) = (Ca intake - fecal Ca excretion - urinary Ca excretion)

Values are mean±SD. NS : not significant

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

Sham-Con(CaCO₃) OVX-CC(CaCO₃; OVX-Control) OVX-CCH(CaCO₃ + herb extract) OVX-TB(tuna bone powder) OVX-TBH(tuna bone powder + herb extract) OVX-CT(citrated tuna bone powder) OVX-CTH(citrated tuna bone powder + herb extract)

Table 26. Calcium biochemical parameters in serum

	Calcitonin (pg/ml)	PTH (pg/ml)	Osteocalcin (ng/ml)	ALP (IU/L)	Estrogen (pg/ml)
Sham(SCC)	7.04±2.23 ^{NS}	203.61±39.43 ^{NS}	1.38±0.26 ^{bc}	215.00±193.21 ^{NS}	91.63±14.88 ^a
OVX-CC	6.17±0.60	199.72±30.29	1.26±0.33 ^c	342.57±242.74	76.86±11.29 ^b
OVX-CCH	6.32±2.52	208.44±47.52	1.53±0.32 ^{abc}	254.63±233.08	75.50±8.71 ^b
OVX-TB	6.32±1.72	195.24±53.32	1.61±0.24 ^{ab}	439.43±262.87	78.25±12.18 ^{ab}
OVX-TBH	5.66±1.16	202.31±50.72	1.58±0.31 ^{ab}	406.00±319.62	73.29±7.30 ^b
OVX-CT	5.65±2.27	193.46±24.47	1.75±0.20 ^a	380.43±296.01	78.86±12.55 ^{ab}
OVX-CTH	5.58±1.64	202.63±107.13	1.67±0.25 ^{ab}	276.86±263.93	79.00±7.75 ^{ab}

Values are mean±SD. NS : not significant

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

Sham-Con(CaCO₃) OVX-CC(CaCO₃; OVX-Control) OVX-CCH(CaCO₃ + herb extract) OVX-TB(tuna bone powder) OVX-TBH(tuna bone powder + herb extract) OVX-CT(citrated tuna bone powder) OVX-CTH(citrated tuna bone powder + herb extract)

군에 비해 Sham군에서 낮음을 알 수 있다.

7-5 뇨의 칼슘대사 관련 지표

뇨 칼슘은 난소절제에 시술에 따른 차이는 없으나 대체로 한방재료 추출물을 보충한 군에 비해 보충하지 않은 군에서 뇨를 통한 칼슘 배설이 증가하는 경향이였다 (Table 27). 한방재료 추출물을 보충한 경우는 Sham군과 비슷한 수준의 칼슘배설량을 기록하였다. DPD는 collagen과 cross-link하여 뼈에 존재하는 물질로서 뼈의 용출이 일어날 경우 뼈에서 유리되어 요를 통해 배설되므로 뼈의 흡수지표로 사용되고 있다. DPD는 난소절제 시술에 의해 유의적인 변화를 보이는데 Sham에 비해 모든 OVX 실험군에서 DPD가 현저히 높은 수치를 나타냈다. 칼슘급원이나 한방추출물 보충에 따른 차이는 없으나 구연산 처리된 다량어골분의 경우는 한방추출물질의 투여에 의해 DPD가 12.8% 저하되었다.

Table 27. Calcium biochemical parameters in urine

	Ca (mg/dl)	Deoxypyridinoline(DPD) (nM/mM creatinine)
Sham(SCC)	2.83±1.90 ^{bc}	114.59±36.90 ^b
OVX-CC	3.98±1.18 ^{ab}	168.71±39.66 ^a
OVX-CCH	3.88±1.68 ^{abc}	176.27±33.71 ^a
OVX-TB	4.80±1.05 ^a	175.29±33.99 ^a
OVX-TBH	3.39±0.99 ^{abc}	168.75±23.13 ^a
OVX-CT	3.86±1.25 ^{abc}	195.05±25.34 ^a
OVX-CTH	2.60±0.83 ^c	170.45±38.11 ^a

Values are mean±SD. NS : not significant

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

Sham-Con(CaCO₃) OVX-CC(CaCO₃; OVX-Control) OVX-CCH(CaCO₃ + herb extract) OVX-TB(tuna bone powder) OVX-TBH(tuna bone powder + herb extract) OVX-CT(citrated tuna bone powder) OVX-CTH(citrated tuna bone powder + herb extract)

7-6 대퇴골의 회분과 칼슘함량 및 골밀도

대퇴골의 젖은 무게와 건조 후의 무게는 난소 절제 및 식이군 과 한방추출물 보충 등에 따른 차이가 없었다(Table 28). 이들의 무게를 체중100g 단위로 환산한 결과, 젖은 무게는 SCC에서 높았으나 식이에 따른 차이는 없었다. 건조 중량은 SCC와 OVX-CC에서 가장 높고 OVX-TB에서 낮았으며, 한방추출물에 의한 차이는 없었다. Shiraki 등에 의하면 골밀도는 뼈에 대한 체중비율과, 칼시토닌, 안드로젠 등의 혈청 호르몬 수준과 양의 상관관계를 보이는 반면, PTH, 비타민 D3, 에스트로겐의 수준과는 상관성이 없는 것으로 보고된 바 있다.

대퇴골의 회분함량은 절대 중량이나 건조 뼈무게 단위로 환산된 수치 모두 각 군 사이에 차이가 없었다(Table 29). 체중 100g 단위 별로 볼 때 SCC의 회분함량이 최대치를 보였고 OVX-TB는 가장 낮은 값을 나타냈다. 그러나 대퇴골의 체중당 건조중량이나 회분함량은 OVX-TB에서 가장 낮았으나 한방추출물은 첨가한 OVX-TBH에서 상승 경향을 볼 수 있으며, 구연산 처리와 동시에 한방추출물이 첨가된 OVX-CTH는 OVX-TB에 비해 유의하게 회분함량이 증가되어 9.5% 상승된 수치를 보였다. 대퇴골의 칼슘함량은 칼슘급원이나 한방추출물 보충 등의 그룹 간에 차이가 없는 것으로 나타났고, SCC에서 Ca/100g BW 수치가 높았다(Table 30). Kalu 등은 난소절제 후 7개월 동안 정상의 칼슘식이를 공급하였을 때 대퇴골의 칼슘함량이 감소됨으로써 난소절제로 인한 에스트로겐의 감소가 뼈에 미치는 영향을 보고하였다. 그러나 Arjmandi 등에 의하면 표준식으로 적응시킨 후 난소절제 30일 이후에 대퇴골의 칼슘함량에 차이가 없었으며, Donahue 등에 의하면 0.02%, 1%의 칼슘을 공급했을 때 후자의 식이군에서 대퇴골의 칼슘함량이 증가하였다. 즉 칼슘함량은 난소절제와 무관하게 칼슘섭취량에 따라 영향을 받을 수 있음을 의미한다.

대퇴골의 골밀도는 Sham군에 비해 OVX군에서 저하되지 않았으나 체중 단위로 표시한 골밀도는 OVX군에서 뚜렷하게 낮은 값을 보였다. OVX 내에서 골밀도는 TB군에서 가장 낮았으나 이는 한방추출물을 첨가한 TBH군에서는 상승되었고, TB를 구연산 처리하여 제공된 CT와 CTH에서도 골밀도가 유의하게 증가하였다(Table 31). 이러한 경향은 체중 100g 단위로 표시한 골밀도에서도 같은 증가현상

을 나타냈다.

이상의 결과는 다량어골분을 가공처리하여 공급하거나 한방추출물을 보충함으로써 난소 절제된 흰쥐의 골격대사 보강에 효과가 있음을 시사한다.

Table 28. Weight of femur

	Wet weight		Dry weight	
	g	g/100g BW	g	g/100g BW
Sham(SCC)	0.678±0.05 ^{NS}	0.264±0.03 ^a	0.505±0.02 ^{NS}	0.196±0.01 ^a
OVX-CC	0.733±0.04	0.236±0.02 ^b	0.519±0.01	0.168±0.02 ^b
OVX-CCH	0.730±0.05	0.228±0.01 ^b	0.518±0.03	0.162±0.01 ^{bc}
OVX-TB	0.705±0.11	0.218±0.03 ^b	0.495±0.06	0.153±0.02 ^c
OVX-TBH	0.740±0.04	0.228±0.01 ^b	0.526±0.03	0.162±0.01 ^{bc}
OVX-CT	0.682±0.06	0.217±0.01 ^b	0.497±0.02	0.158±0.01 ^{bc}
OVX-CTH	0.673±0.10	0.217±0.03 ^b	0.510±0.04	0.164±0.01 ^{bc}

Values are mean±SD. NS : not significant

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

Sham-Con(CaCO₃) OVX-CC(CaCO₃; OVX-Control) OVX-CCH(CaCO₃ + herb extract) OVX-TB(tuna bone powder) OVX-TBH(tuna bone powder + herb extract) OVX-CT(citrated tuna bone powder) OVX-CTH(citrated tuna bone powder + herb extract)

Table 29. Ash content of femur

	Ash(mg)	Ash/dry weight(%)	Ash/BW(mg/100g)
Sham(SCC)	299.98±15.70 ^{NS}	59.4±1.2 ^{NS}	116.69±9.81 ^a
OVX-CC	313.51±9.96	60.4±3.8	101.25±9.94 ^b
OVX-CCH	314.71±18.69	60.7±8.9	98.27±2.77 ^{bc}
OVX-TB	295.74±35.47	59.8±1.2	91.58±9.35 ^c
OVX-TBH	319.14±16.60	60.7±6.8	98.32±3.70 ^{bc}
OVX-CT	299.09±22.32	60.2±3.7	95.22±4.37 ^{bc}
OVX-CTH	311.87±24.79	61.2±0.8	100.30±4.55 ^b

Values are mean±SD. NS : not significant

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

Sham-Con(CaCO₃) OVX-CC(CaCO₃; OVX-Control) OVX-CCH(CaCO₃ + herb extract) OVX-TB(tuna bone powder) OVX-TBH(tuna bone powder + herb extract) OVX-CT(citrated tuna bone powder) OVX-CTH(citrated tuna bone powder + herb extract)

Table 30. Calcium content of femur

	Ca(mg)	Ca/dry weight(%)	Ca/ash(%)	Ca/BW(mg/100g)
Sham(SCC)	115.16±11.52 ^{NS}	22.8±2.3 ^{NS}	38.4±3.6 ^{NS}	44.79±5.33 ^a
OVX-CC	124.16±12.20	23.9±2.4	39.6±4.0	39.96±3.98 ^b
OVX-CCH	126.60± 8.35	24.4±1.6	40.3±2.9	39.59±2.85 ^b
OVX-TB	111.46±10.49	23.3±1.9	38.9±2.9	35.48±2.86 ^b
OVX-TBH	118.67± 9.68	22.6±1.6	37.2±2.7	36.59±3.09 ^b
OVX-CT	118.38±16.17	23.8±3.2	39.5±4.4	37.72±5.03 ^b
OVX-CTH	119.78±14.81	23.6±2.8	38.5±4.7	38.64±5.08 ^b

Values are mean±SD. NS : not significant

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

Sham-Con(CaCO₃) OVX-CC(CaCO₃; OVX-Control) OVX-CCH(CaCO₃ + herb extract) OVX-TB(tuna bone powder) OVX-TBH(tuna bone powder + herb extract) OVX-CT(citrated tuna bone powder) OVX-CTH(citrated tuna bone powder + herb extract)

Table 31. Bone mineral density of femur

	BMD(g/cm ²)	BMD/100g BW (g/cm ²)
Sham(SCC)	0.176±0.008 ^a	0.069±0.006 ^a
OVX-CC	0.173±0.004 ^a	0.056±0.006 ^b
OVX-CCH	0.177±0.006 ^a	0.055±0.002 ^b
OVX-TB	0.162±0.007 ^b	0.050±0.002 ^c
OVX-TBH	0.176±0.008 ^a	0.054±0.002 ^b
OVX-CT	0.175±0.003 ^a	0.056±0.003 ^b
OVX-CTH	0.172±0.011 ^a	0.055±0.002 ^b

Values are mean±SD. NS : not significant

Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

Sham-Con(CaCO₃) OVX-CC(CaCO₃; OVX-Control) OVX-CCH(CaCO₃ + herb extract) OVX-TB(tuna bone powder) OVX-TBH(tuna bone powder + herb extract) OVX-CT(citrated tuna bone powder) OVX-CTH(citrated tuna bone powder + herb extract)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

최근 사회의 고령화와 식생활의 개선에 따라 칼슘섭취와 관련된 질환으로서 골다공증에 대한 관심이 고조되고 있다. 또한, 근래 세계 각국에서는 칼슘 섭취부족으로 인한 영양 문제를 골격질환 뿐만 아니라 고혈압, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, 동맥경화 등 순환계질환의 위험인자 및 대장질환 등 각종 성인병과 관련이 있는 것으로 파악되어 칼슘에 대한 관심은 점점 더 높아지고 있다.

우리나라의 경우 가장 결핍되기 쉬운 영양소로 칼슘을 지정하고 칼슘의 1일 권장량을 지정하여 홍보하고 있으나, 권장량에 70% 정도만을 섭취하고 있는 수준이다. 따라서 칼슘섭취량의 절대부족과 체내이용성이 낮은 식품으로부터의 칼슘섭취는 매우 심각한 국민영양문제로 제기되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 어류 가공 중의 부산물을 이용한 기술을 개발함으로써 수산폐기물의 부가가치를 높이고, 식재료의 이용율을 최대화하는 최적의 가공형태를 개발·확립하여 효용성 증대에 이바지할 것으로 사료된다. 또한, 한방 방제학 원리에 입각한 약효가 입증된 천연 한방재료를 첨가한 기능성 보조식품을 개발함으로써 한방원리 응용의 견인차 역할을 유도할 것으로 생각된다. 경제적인 측면에서 보면 현재 우골분의 경우 7,000원/kg, 해조분 12,000원/kg, 유청칼슘분 11,000kg 등으로 이를 Ca소재로 하여 개발된 Ca 보조식품의 가격은 성인 1인 기준 월 5만원 전후로 가계에 부담이 되고 있어 보다 가계의 부담 경감 및 수입대체 효과(50억원/년)가 예상된다. 최근 골다공증환자는 200만 명으로 추산되며 골다공증성 골절환자의 수가 매년 5만~10만에 이르고 이러한 추세는 노인의 인구 증가와 더불어 골격질환이 범국가적인 문제로 부각됨으로써 이에 Ca 보충제재의 요구가 증대되면서 99년 Ca 함유식품의 시장규모는 1350억원 대로 급증하기에 이르러 매년 20% 이상 증가할 것으로 예상되고 있으며 식품산업 발전과 어민 소득 증대에도 기여할 것으로 예상된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

연구 결과를 바탕으로 Ca 소재로서의 다량어류를 이용한 가공기술과 한방원리가 부가된 기능성 보조식품의 조제 기술에 대한 국내외 법률적 기술적 검토를 통하여 국내·외 특허를 준비 중에 있으며, 특허출원에 따른 해외 대체의학 시장에 진입과 판로개척을 위하여 기존의 제약회사에서는 나오는 제품과 차별화 즉, 한방방제학 원리에 입각한 칼슘제라는 것을 부각시켜 생산·연구 및 마케팅측면에서 (주)정필, (주)조아제약, (주)명신화성 등과의 연구 협약, 생산 설비와 면밀한 시장조사를 통하여 국내·외 시장성을 확보한다.

제조회사 (주)정필에 기술을 제공하고 지속적인 기술 개발 및 품질관리 지도함과 동시에 본 동의대학교 한방식품연구소와 협의하여 품질보증을 인정받아 생산된 제품의 소비자 선호도를 높인다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

해당 사항 없음

제 7 장 참고문헌

- 정혜경, 장남수, 이현숙, 장영은, 칼슘 급원의 종류가 체내 칼슘 및 골격대사에 미치는 영향, 한국영양학회지, 29(5): 480-488, 1996.
- 문주환, 이연숙, 난소절제된 골다공증 모델 흰 쥐에서 체내 칼슘 이용성 저하에 대한 칼슘 섭취 수준의 효과, 한국영양학회지 26(3): 277-285. 1993.
- 이연숙, 김은미, 성장기동안 저칼슘식이를 섭취한 흰쥐에서 난소 절제 및 칼슘 섭취가 골격대사에 미치는 영향, 한국영양학회지 31(3): 279-288, 1998.
- Allen L. H. and Wood R. J. Calcium and phosphorus. Modern nutrition in health and disease, 8th ed. 144-163, 1994.
- Hamet, p., The evaluation of the scientific evidence for a relationship between calcium and hypertension, J. Nutr. 125, 311s-400s, 1995.
- McCarron, D. A., Dietary calcium as an antihypertension agent, Nutr. Rev. 42(6), 223-225, 1984.
- Heaney R. P., Smith K. T. and Recker R. R., Meal effects on calcium absorption, Am. J. Clin. Nutr. 49, 372-376.
- Matkovic V. and Wardlaw G. Timing of peak bone mass in caucasia females and its implication for the prevention of osteoporosis Inference from a cross-sectional model, J. Clin. Invest. 93, 799-808, 1994.
- National Research Council, In; Diet and health, Natl. Acad. Press, 1989.
- Tsutagawa Y. and H. Kawai, Comparison of mineral and phosphorus contents of muscle and bone in the wild and cultured horse mackerel, J. Food Hyg. Soc. Japan, 34, 315-318, 1994.
- Miller JZ., Amith D. and Flora L, Calcium absorption from calcium carbonate and a new form of calcium in healthy male and female adolescents, Am. J. Clin. Nutr., 48: 1291-1294, 1988.
- Shizuki O., Fish bone, New Food Industry 23: 66-72, 1981.
- Jean Wilson, Eugene Braunwald et al, Harrison's Principles of Internal Medicine 12th, McGraw Hill, 1922, 1981.
- Stein GS, Lian JB, Stein JL, Wijnen AJ, Frenkel B, Montecino M: Mechanisms

- regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian JP and Raisz LG(eds). Principles of Bone Biology, Academic Press, San Diego, CA, 69-86, 1996.
- Chestnut CH: Theoretical overview: bone development, peak bone loss, and fracture risk, *Am J Med* 91(suppl 5B): 25, 1991.
- Jean Wilson et al, *Ibid*, 1922-1923.
- Suleiman S, Nelson M, Li F, Buxton-Thomas M, Moriz C. Effect of calcium intake and physical activity level on bone mass and turnover in healthy, white, postmenopausal women, *Am. J. Clin. Nutr.*, 66: 937-943, 1997.
- Specker BL. Evidence for an interaction between calcium intake and physical activity on changes in bone mineral density. *J Bone Miner Res* 11: 1539-1544, 1996.
- Thompson JL, Gylfadottir UK, Moynihan S, Jensen CD, Butterfield GE. Effect of diet and exercise on energy expenditure in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 66: 867-873, 1997.
- Krall EA, Dawson-Hughes B. Walking is related to bone density and rates of bone loss. *Am J Med* 96: 20-26, 1994.
- Mizuhima S, Tsuchida K, Yamori Y, Preventive nutritional factors in epidemiology:interaction between sodium and calcium, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 26: 573-575, 1999.
- Jones G, Beard T, Parameswaran V, Greenaway T, von Witt R. A population-based study of the relationship between salt intake, bone resorption and bone mass. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51(8): 561-566, 1997.
- Roca CA, Schmidt PJ, Daly RC, Rubinow DR. Estrogen-progestin replacement and risk of breast cancer. *JAMA* 284(6): 693-694, 2000.
- Kang SY, Lee KY, Sung SH, Park MJ, Kim YC. Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.*, 64(5): 683-685, 2001.
- Kim SY, Choi YH, Huh H, Kim J, Kim YC, Lee HS. New antihepatotoxic cerebroside from *Lycium chinense* fruits. *J. Nat. Prod.* 60(3): 274-276,

1997.

- Ishimi Y, Yoshida M, Wakimoto S, Wu J, Chiba H, Wang X, Takeda K, Miyaura C. Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice. *Bone* 31(1): 180-185, 2002.
- Kritz-Silverstein D, Goodman-Gruen DL. Usual dietary isoflavone intake, bone mineral density, and bone metabolism in postmenopausal women. *J. Womens Health Gend Based Med* 11(1): 69-78, 2002.
- Takeda T. Senescence-accelerated mouse(SAM): with special reference to age-associated pathologies and their modulation. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 51(2): 569-578, 1996.
- Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.*, 15(3): 175-191, 1991.
- Heaney RP. Nutritional factors in osteoporosis. *Ann Rev Nutr* 13: 287-316, 1993.
- Heaney RP. Calcium, dairy products and osteoporosis. *Am. J. College Nutr.* 19:833-839, 2000.
- Tenathinsp M, Bolscher M, Netelenobs J, Coen R, Barto R, van Buuren L, Vanathihsp W, Derathinsp W and Vijigh W. Estrogen regulation of intestinal calcium absorption in the intact and ovariectomized adult rat. *J. Bone Miner. Res.* 14: 1197-1202, 1999.
- Shiraki M, Ito H, Fujimaki H, Higuchi T. Relation between body size and bone mineral density with special reference to sex hormones and calcium regulating hormone in elderly females. *Endocrinology Jpn.* 38: 343-349, 1991.
- Avioli LV, Mcdonald JE, Lee SW. The influence of age on the intestinal absorption of ^{47}Ca in women and its relation to ^{47}Ca absorption in postmenopausal osteoporosis. *J. Clin. Invest* 44: 1960-1967, 1965.
- Kalu DN, Hardin RR, Cockerhan aR. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. *Endocrinology* 115: 507-512, 1984.
- Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Sapuntzakis MS, Guo P and

- Kukreja SC., Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J. Nutr.* 126: 161-167, 1996.
- Donahue HJ, Mazzeo RS, Horvath SM. Endurance training and bone loss in calcium deficient and ovariectomized rats. *Metabolism* 37: 741-744, 1988.
- Morris HA, Porter SJ, Durbridge TC, Moore RJ, Need AG, Nordin BEC. Effect of ovariectomy on biochemical and bone variables in the rats. *Bone Miner.* 18:133-142, 1992.
- Ballamore JR, Gallagher JC. Effect of age on Ca absorption. *Lancet* 12: 549-551, 1970.
- Villareal DT, Civitelli R, Chines A, Avioli LV. Subclinical vitamin D deficiency in postmenopausal women with low vertebral bone mass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 72: 628-634, 1991.
- Khaw KT, Sney MJ, Compston J. Bone density and 25-hydroxy-vitamin D concentration in middle aged women. *Br. J. Med.* 305: 273-277, 1992.
- Wronski L . Response of femoral neck to estrogen depletion and parathyroid hormone in aged rats. *Bone* 16: 551-557, 1995.
- Recker RR, Saville PD, Heaney RP. Effect of estrogen and calcium carbonate on bone loss in postmenopausal women. *Ann. Int. Med.* 87: 649-655, 1977.
- Shina R, Smith JC and Soares JH. The effect of dietary calcium on bone metabolism in young and aged female rats using a short term in vivo model. *J. Nutr.*, 118: 1217-1222, 1988.
- Delmas PD, Christensen C, Mann KG, Price PA. Bone Gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *J. Bone Miner. Res.* 5: 5, 1990.

유어추출혼합물이 대사성 골질환에 미치는 영향

Effects of mixture of tuna bone powder and oriental herb extract on metabolic bone disease

제 1 장 서 론

대사성 골질환이란 골기질의 형성과 무기질 침착(mineralization)의 異常 또는 골형성(bone formation)과 골흡수(resorption)간의 불균형, 즉 골재형성과정(bone remodelling activity)의 불균형으로 인해 발생하는 골질환을 가리킨다. 따라서 병리학적으로는 이들 각 요인들의 변화 정도에 따라 다음과 같은 여러 질병들이 대사성 골질환에 포함된다. 첫째 무기질 침착의 장애 또는 감소에 의한 골연화증(osteomalacia)과 구루병(rickets), 둘째 골흡수율이 골형성률보다 큰 경우로서 부갑상선 기능항진증과 골다공증(osteoporosis), 셋째 골형성률이 골흡수율보다 큰 경우로써 부갑상선 기능저하증과 골화석증(osteopetrosis) 등이 있다(대한병리학회, 1995).

이들 중에서 임상적으로 가장 흔하고 문제시되는 질환은 골다공증이다. 통계청의 사망원인 별 사망자 수를 보면 2000년도의 전체 근골격계 사망자(2130명) 중 골밀도 및 구조장애(785명) 비율이 약 36.8%를 차지하는데 골밀도 및 구조장애 중에서도 골다공증(459명)이 전체의 58.5%를 차지할 만큼 골질환의 주요한 사망원인이다(통계청, 2002).

骨多孔症은 骨粗鬆症이라고도 하는데 단위용적당 골량(bone mass per volume)의 감소를 일으키는 여러 원인에 의한 질병으로 정의하며 감소 정도는 젊은 성인의 골밀도 평균값을 100으로 했을 때 30% 이상인 경우를 말한다. 이러한 골량의 감소는 특히 老人이나 閉經期가 지난 女性들에게서 다발하는데 노령인구가 급속히 증가하면서 노인성 골다공증에 의한 골절이 사회적인 의료 문제로 부각되고 있다. 1999년 현재 보건사회연구원 통계에 의하면 평균 기대수명이 남성은 약 71세, 여성은 약 78세이며 이로 인해 골다공증의 유병률이 현저하게 증가하여 골다공증 위험군이 1995년에는 18%이지만 2010년에는 27%, 2020년에는 약 35%에 달할 것으로 예측된다고 한다(김기수, 2000). 이렇게 보면 여성의 경우 1995년 기준으로 인생의 약 38% 정도, 그 이후는 50%에 육박하는 기간을 폐경 후 상태로 살아가게 된다.

골량은 곧 骨密度(bone mineral density, BMD)를 의미하는데 연령과 성별에 따른 골밀도변화를 관찰해 보면 30대 후반을 정점으로 점차 감소하고 여성의 경우에

는 폐경을 전후하여 급격히 감소한다(한인권 등, 1998). 따라서 골다공증은 노화와 매우 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.

骨多孔症의 初期症狀은 특이성이 없고 단지 뼈가 弱해지면서 骨折의 위험이 높아지고 腰背酸痛, 椎體의 變形, 身長의 減少 등이 비정형적으로 일어나는 것일 뿐이어서 골절이 실제로 발생하기 전에는 조기진단에 의한 예방이 어렵다. 가장 흔하게 수반되는 症狀으로 특별한 異常이 없으면서 등과 허리가 빠근하게 아프고, 전신 각부의 산발적인 동통이 생기고 쉽게 疲倦해진다. 이러한 점 때문에 일반인들은 정확한 의학적 진단이 없이 '사람이 늙으면 호르몬대사와 機能이 減退되고 運動量도 적어지기 때문에 당연히 생기는 것'이라고 속단하여 치료를 지연하기 쉽다. 그렇지만 이러한 일반적 原因 외에도 골형성부전(osteogenesis imperfecta)이나 마르판 증후군(Marfan's syndrome) 같은 선천적인 질환, 糖尿病, 위장관 疾患으로 칼슘 攝取가 안되거나 혹은 영양장애, 간질(epilepsy), 류마티스 關節炎, 알콜中毒, 만성폐쇄성 폐질환(COPD) 혹은 심한 吸煙, 고단백 산성식품의 과잉섭취, 항응고제나 스테로이드 藥物을 過用하는 경우에도 잘 발생한다(Jean W.,1991). 또한, 의학적으로 노인성 골다공증은 생리적 노화현상과 함께 이러한 여러가지 인자들이 결합되면서 발생하는 것이므로 단순한 뼈의 노화 이상으로 다각도에서 다루어야 한다. 그리고 골다공증성 골절이 생겼거나 의학적인 진단과정을 통하여 골다공증을 알았을 경우 정확한 생리·병리·생화학적인 기전들을 찾아서 치료하는 것도 중요하지만 무엇보다 시급한 것은 특이적인 前驅症狀이 없이 골다공증이 심화되는 초기단계에서의 예방이다. 동시에 의학적으로 병리본질이 분명히 밝혀지지 않았다 하더라도 적절한 섭생지침을 제시할 수 있으며 특히 식품영양생리학적인 관점에서의 식이요법을 통하여 양호한 결과를 얻을 수도 있을 것으로 생각한다. 이러한 측면에서 이 등의 칼슘급원에 관한 연구가 있었고 본 과제에서도 보다 효율적인 칼슘급원으로써 다량어를 선정하여 연구를 진행하였다. 그렇지만 실제 인체에서 발생하는 골량감소의 주요 병리는 칼슘공급의 부족보다는 골흡수의 증가에 기인하기 때문에 더 세부적인 치료기능적 recipe가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 특히 한약리화학적 관점에서 골다공증의 주요한 병리패턴

을 분석하고 그에 맞는 기본방제를 구성한 다음 여기에 다량어골분을 배합함으로써 고기능성 치료용 식이소재를 제조하고 그 효능을 검증하였고, 또한 골대사학에 관한 기본이론과 골다공증의 병리학적·역학적 분석 및 생화학적·진단적 지표, 기타 골다공증 치료에 중요한 일반 수칙들을 모두 검토하여 가장 적합한 형태의 한약리학적 기본 처방을 구성하였으며 이러한 sample compound를 가지고 동물실험과 소규모의 pilot study를 진행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

한약재를 응용하여 골다공증을 치료하는 방안에 대한 실험적인 연구는 1990년대 들어 활발하게 이루어졌다. 1993년에 김근모는 녹용과 육미지황탕으로 실험한 바 있고(녹용 및 육미지황탕가녹용의 운동역제성 골다공증에 미치는 영향, 경산대 대학원), 냉죽평은 우슬(우슬이 흰쥐의 난소적출로 유발한 골다공증에 미치는 영향, 1995), 박종철은 좌귀음과 우귀음(좌귀음과 우귀음이 난소적출백서의 성호르몬과 지질 및 골대사에 미치는 영향, 경산대 대학원, 1995), 오하식은 두충(두충과 두충엽이 흰쥐의 난소적출로 유발한 골다공증에 미치는 영향, 경희대 대학원, 1995), 최연수는 속단(속단이 흰쥐의 난소적출로 유발한 골다공증에 미치는 영향, 경희대 대학원, 1995) 등 이후에도 여러 처방을 가지고 골다공증에 대한 효능을 연구한 바 있다. 또한 중국에서도 이와 비슷한 시기에 葉雪淸(1993), 羅潤明(1995), 宋獻文(1996) 등이 중약처방에 의한 골다공증 치료연구를 진행하였다. 그렇지만 이들 연구는 대개 한의학 또는 중의학에서 전문적인 치료제로 사용되는 것들이거나 단미제인 경우 다른 주처방과 사용되는 것을 전제로 한 것이기 때문에 불특정 다수를 대상으로 하는 식이소재로 개발하기는 어렵다. 즉 식이소재로 사용되기 위해서는 골다공증을 가진 사람이면 누구나 부작용이 나타나지 않을 만큼 완화된 약성을 가져야 하며 그러면서도 기능성은 유지할 수 있어야 하기 때문에 효능의 안정성이 매우 중요하다. 또한 본 식이소재는 칼슘분말과 함께 복용하기 때문에 칼슘제에 의한 일반적인 부작용인 胃痛, 소화불량, 변비 등을 적절히 보완할 수 있어야 한다. 골다공증 치료를 위해 한약재를 사용하여 식이소재를 만들고 직접 임상시험을 실시한 경우는 아직 없다. 비록 소규모 pilot test이긴 하지만 본 과제에서 처음 시도되는 것이며 결과 여하에 따라 시험규모를 확대시킬 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 동물은 대한바이오링크에서 공급받은 8주령 180g 전후의 female Sprague Dawley계 흰쥐이다. 실험에 사용하기 위하여는 일정한 노화단계에 이르도록 할 필요가 있기 때문에 총 6개월간을 실험실 환경($22\pm 1^{\circ}\text{C}$, $50\pm 5\%$)에서 사육하였다. 수술은 체중이 $294\pm 16.9\text{g}$ 정도에 이른 흰쥐에 ketamine과 xylazine을 1:1로 혼합한 다음 30mg/kg의 용량을 복강주사하여 전신마취 한 다음, 除毛와 消毒(povidone)을 실시하고 양측 난소를 적출하였으며 수술후 kanamycin을 복강 내에 주사하여 감염을 예방하였다.

실험군은 칼슘흡수 촉진성을 평가하기 위해 정상군(칼슘+비수술)과 위장 수술군(칼슘+개복수술), 대조군(칼슘+개복수술+난소제거), 골다공증 1군(칼슘+개복수술+난소제거+투약), 골다공증 2군(칼슘+개복수술+난소제거+투약)의 총 5군으로 나누었다.

2. 약물 조제 및 투여

실험에는 성인 남녀를 목적으로 처방된 두 종류의 약물이 사용되었다. 소아용 약물은 동물 모델과 맞지 않고 인체 대상 시험도 매우 어렵기 때문에 제외하였다.

신지원(SG) 5첩 분량과 却老元(GN) 6첩 분량을 각각 3000cc 용적의 환저 플라스크에 증류수 1500cc와 함께 넣어 3시간 동안 가열하고 濾液을 여과지로 여과한 다음 다시 3000rpm에서 10분간 원심분리하고 감압농축기로 농축한 후 동결건조를 거쳐 건조엑기스 98g과 108.8g을 얻었다.

동물에 투여시에는 SG와 GN은 각각 50mg/100g, calcium은 7mg/100g을 증류수에 녹여 feeding zonde를 사용하여 경구투여를 하였다. 투여기간은 8주로 하고 실험 동물의 스트레스를 줄이기 위하여 주 6회, 매일 오전 10시경에 투여하였다.

3. 체중 측정

난소를 제거한 후에 식이샘플을 2개월간 투여한 다음 심장에서 혈액을 채취하기 직전에 체중을 측정하였다. 체중은 소수점 첫째자리에서 반올림하여 정수로 하였고 평균은 소수 첫째 자리까지 구하였다.

4. 혈액 채취 및 생화학적 분석

흰쥐를 에테르로 마취한 후 심장천자하여 전혈을 약 10ml 채혈한 후 상온에서 약 30분간 방치하였다. 혈액이 응고된 뒤 2500rpm에서 15분간 원심분리하여 상층부의 혈청을 피펫으로 분리하고 검체로 사용하였다.

5. 대퇴골의 강도 및 요추의 골밀도 측정

대퇴골 시료를 추출한 다음 연조직을 제거하고 -20℃ 온도환경에서 냉동 보관하였다. 시료의 건조도를 맞추기 위해 5일을 경과한 후 대퇴골의 강도를 만능강도시험기(Universal testing machine, Instron 1011, USA)로 측정하였다(Table 1). Head의 직경은 13mm, 높이는 13mm인 원기둥을 사용하였으며, 최대하중이 가해질 때 시료의 변형률은 2mm/min로 하였고, 최대 응력은 단위 면적당 가해지는 최대하중을 측정하였으며 단위는 MPa(1MPa=1N/mm²)로 하였다.

혈액채취를 마친 흰쥐를 희생시킨 후 척추 전체를 채취하고 연부조직을 외과용 칼과 가위로 제거한 후 DEXA(dual energy X-ray absorptiometry, Lunar Piximus #51039)를 이용하여 골무기질 농도(bone mineral density, BMD)를 측정하였다. 측정 부위를 선택할 때는 1번 요추체 상단부터 6번 요추체 중간선까지를 선택하였으며 측정 결과는 자동 계산된 수치이다.

6. 골조직표본 제작과 primary culture

흰쥐의 대퇴부에서 대퇴골을 분리한 다음 10% Formalin buffer에 넣어 24시간 동안 고정한 다음 각 조직을 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)를 이용하여 2주 동안 탈회시켰다. 탈회된 조직은 xylene과 ethanol을 이용하여 탈수한 후 paraffin block을 만들었다. 그리고 paraffin 포매된 조직을 microtome을 이용하여 6 μm의 두께로 박리한 다음 슬라이드에 부착시킨 후 H&E 염색과정을 거쳐 현미경으로 관찰, 판정하였다.

Table 1. Conditions of measurement on the mechanical strength of the femoral neck

Head	Condition
Testing instrument machine	Instron model 1011
Cross head speed	10mm/min
Weight of load cell	500kg
Chart speed	50mm/min
Cross Head diameter	13mm

골세포의 primary culture는 collagenase를 이용하여 37°C에서 3시간 동안 반응시키고 여과하여 대퇴골로부터 골세포를 분리하였다. 세포는 DMEM에 10% FBS, 그리고 1×Antimycotic antibacterium을 포함한 배지에서 2주간 배양하였다.

7. Interleukin 1 β 의 immunoprecipitation과 western blotting 및 RT-PCR

먼저 동물의 대퇴골조직으로부터 primary culture한 cell을 회수하고 4°C에서 14,000rpm으로 원심분리하여 cell을 모은 다음, 상층액을 버린 후 모은 cell은 freezing and thawing으로 깨어서 total protein을 Bradford method로 정량한다.

7-1 Immunoprecipitation(IP)

각 total protein을 200 μ g 씩 E-tube에 넣고 IL-1 β Ab를 20 μ l를 넣고 4°C에서 약 1시간 이상 반응시킨다. 1시간이 지난 후에 protein A/G plus agarose를 20 μ l 씩 넣고 또 다시 4°C에서 rocker 에 올려 1시간 이상 반응시킨다. 반응이 끝난 후 4°C에서 1000×G로 30초간 원심분리한 후 상층액은 버리고 PBS로 세척한다. 이 때 pellet을 2~4번 PBS로 세척한다. 마지막 세척 후 40 μ l의 sample buffer를 넣고 2~3분간 100°C에서 끓인다. Sample을 20 μ l 씩 loading하여 전기영동한다. 전기영동이 끝난 후 western blotting을 한다.

7-2 Western blotting

Transfer한 NC membrane을 5% skim milk를 넣어 blacking한 후 IL-1 β Ab를 1:500으로 넣어 반응시킨다. 1시간 이상 반응시킨 후 TBST로 약 10분간 3번 세척한다. 세척 후 2차 Ab를 넣어 1시간 이상 반응시킨 후 다시 TBST로 약 10분간 3번 세척하고 ECL solution으로 발광시킨 후 X-ray film에 감광시킨다.

역전사반응(reverse transcription polymerase chain reaction)은 primary culture하여 얻은 세포로부터 RNA를 분리한 다음 시행하였다. RNA는 Tri-zol을 이용하여 chloroform으로 불순물을 제거하였고, isopropanol로 RNA를 응축시켜 추출하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였고, primer sequenc는 다음과 같다.

IL-1 β 는 GATTCTCGACAAG, GATGGCTCAT TCTAATGC

IL-6은 GCTTTCAAGATGAGTTGGATGGT, CCCAACTTCCCAATGCTC
CCTA

TNF- α 는 CTCCTCTCCGCCATCAAGAG, TGGGCTCATACCAGGGCTT

GAPDH는 GAACATCATCCCTGCATCCA, CCAGTGAGCTTCCCGTTCA이다.

RT반응은 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 denaturation하고, 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응하였고, PCR 반응은 95 $^{\circ}$ C 5분, 56 $^{\circ}$ C에서 10분, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다.

8. 통계 분석

얻어진 자료에 대한 통계 분석은 Microsoft Excel 2000을 사용하였다. 정상군과 위장수술군, 대조군 및 실험군간에 표현되는 특성차이의 유의성에 대한 분석은 Student's t-test를 사용하였고 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

9. 골다공증 환자 임상 실험

임상시험을 진행하기 위해 일간신문 건강면에 임상시험 공고를 내고 지원자를 15일간 모집하였다. 여기에 지원한 남녀 중 시험 종료기간까지 참여한 남자 5명, 여자 6명의 임상 자료를 획득하였다. 이와 같은 수적 제한으로 placebo 효과를 판정하기 위해 대조군에 위약을 투여하는 방법은 시행할 수 없었다. 연령은 45세부터

63세까지의 골다공증 관련 진단을 받은 적이 있고 현재 병원에서 골절치료를 받고 있지는 않는 개체, 즉 골다공증에 의한 임상증상이 병원의 집중치료 대상이 아니거나, 경미하거나 혹은 DEXA 검사에서만 확인되었을 뿐 임상증상으로는 나타나지 않은 개체를 선정하였다.

시험진행 중에는 본 골다공증용 기능성제품 외에는 어떤 약물이나 녹즙을 포함한 건강음료, 혹은 녹차나 커피, 주류, 흡연 등도 금지토록 하였으며 만 2일 이상을 연속해서 복용하지 못하는 경우도 시험대상에서 제외하였다. 혈액검사는 검사 당일 오전까지 시제품을 복용하고 오후 2시 30분~3시 30분 사이에 실시하였다. 또한 시제품의 오관감각을 파악하기 위하여 설문조사를 실시하였으며 검사결과를 해석할 때 이를 함께 분석하였다. 결과에 대한 통계는 Microsoft 2000 Excel을 이용하여 Student's T test를 실시하였다.

10. 양갱 시제품 제조

우선 JG와 GN의 원재료를 120℃, 2기압의 조건에서 각각 3시간 水煎하고 원료액을 각 500cc 씩 收得하였다. 이를 다시 농축하여 200cc 정도로 만들어 준비하였다. 한천액 2,400g에 말티톨 400g을 넣고 끓인 다음 赤小豆 앙금 1,000g을 넣어 고루 혼합시킨다. 여기에 농축물 250g 정도 넣고 설탕 대신 물엿을 적당량 첨가하였으며 일정 시간 가열하여 농축하고 성형시켰다. 한 원료당 1회에 복용해야 할 용량을 원료액량을 기준으로 계산한 결과 25cm×20cm×1.5cm의 크기에 해당하였으며 이를 시제품으로 사용하였다.

SG 196g과 GN 172g을 각각 3,000cc round flask에 넣고 증류수 2,000cc에 넣은 다음 3시간 동안 가열추출하여 대기압과 일치시켰다. 그리고 침전물을 3회 필터링한 다음 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압농축하여 1일 2회 복용하기에 적당하도록 220cc로 조절하였다. 실제 피험자용 수용액을 제조하는 과정에서는 이 과정을 최대한 따르도록 탕제원에서 제조조건을 맞추었으며 용액을 파우치에 담아서 朝夕으로 공복시에 복용토록 하였다.

또한 1세부 과제에서 제조한 염형태의 유어칼슘분말을 1 캡슐에 0.5g 씩 수작업

으로 미량저울을 이용하여 포장하였다. 칼슘투여량은 성인 1인당 하루 700mg을 맞추기 위하여 칼슘 분말 시제품의 30% 정도가 순수칼슘이므로 하루 복용량을 4캡슐 (1일 2회, 1회 2캡슐)로 통일하였다.

제 2 절 결과 및 고찰

1. 골다공증 식이소재 제조를 위한 의학적 고안 및 구성

● 골다공증의 역학적 분석

이 연구과제의 객관적 타당성 확인과 최종제품의 주요 타겟을 설정하기 위하여 통계자료(대한병리학회편, 1995)를 검토하고 처방을 구성하기 위한 기초자료를 탐색해 보면 다음과 같다.

Table 2. Disease rate of osteoporosis (%)

sex \ age	50' s	60' s	70' s
male	1.8	11.6	11.7
female	26.9	55.4	77.2

Table 2에서와 같이 남성에 비해 여성이 5-7배 정도 많은 비율로 골다공증이 발생한다는 것을 알 수 있다. 이러한 점은 대퇴골 골절의 유병률에서도 그대로 반영되는데 1995년 의료보험 분석자료에 의하면 여성 1000명당 0.94명, 남성은 1000명당 0.3명으로 나타났다(조 등, 1995). 또한 여성에 있어서 골밀도와 상관관계를 갖는 여러 인자들을 분석한 자료를 보면 음의 상관관계를 갖는 것으로는 연령, 초경연령, 폐경후 기간, 출산 수, 총콜레스테롤(mg/dl), 중성 지방(mg/dl), LDL콜레스테롤(mg/dl), 난포자극호르몬의 농도(mIU/ml) 등이 있고 양(+)의 상관관계를 갖는 것으로는 체질량지수(kg/m²), 교육수준, 운동 등이 있다(National Osteoporosis Foundation, 1996). 한편 미국의 한 역학조사보고서에 의하면(Mary et al, 1996) 연간 2800만의 환자가 골다공증에 노출된다고 하며 매년 평균수명의 증가와 함께 더욱 늘어나는 추세이다. 또 다른 자료(Mary et al, 1996)에 의하면 12,000,000회/년의 빈도로 골절이 발생하는데 골반골절이 약 147,000회에서 250,000회를 차지하고, 그중 80%가 가벼운 외상에 의하며 여성의 약 40%가 80세에 이를 때까지 적어도 한번의 척추골절을 경험하게 되고, 80대 후반이 되면 여성의 3분의 1과 남성의 6분의 1이 골반골절을 경험하게 된다고 한다. 인구비율로 환산한 자료를 보면 1992년 기준으로 미국의 50세 이상 백인여성의 40%와 남성의 13%가 적어도 한 번 씩은 골절약화로 인한

골절을 경험하였다고 하며 돈으로 환산하면 1995년 미국의 골다공증 치료비용이 약 138억 달러였다고 한다(Joel S., 2001). 따라서 사회경제적으로 가장 시급하게 문제 되는 다발질환은 골다공증이며 여성들의 加齡과 함께 증가되는 경우이다.

체질량지수와 관련하여 체중이 5% 이상 줄어든 여성은 1.7%의 골밀도 감소가 있는 반면, 체중 변화가 없는 여성은 0.8%의 골밀도 감소가 있었고 체중이 증가된 경우에는 0.1%의 골밀도 증가를 나타내어 체중이 골밀도 보호효과가 있는 것으로 나타났다.

충분한 Ca 섭취와 정기적인 운동이 최대골량을 유지하기 위해 가장 중요하다는 사실은 이미 수많은 논문(Suleiman S. et al., 1997; Specker B. L., 1996; Tompson J., 1997)에서 증명된 바 있는데 2,30대 여성(20-39세) 91명에 대한 횡단연구(cross-sectional study)에 의하면(Hara S. et al., 2001)야구, 농구, 테니스 같은 고강도 운동(high impact activity)을 시행한 경우가 탁구, 수영, 소프트볼 같은 저강도 운동(low impact)을 시행한 경우보다 유의하게 골밀도(whole-body BMD & lumbar BMD)가 높았다고 하여 운동의 실시 여부 뿐만 아니라 종류에 따라서도 골밀도에 미치는 영향이 다른 것을 알 수 있다. 적절한 칼슘섭취량에 대해서는 일반적으로 하루에 1000mg에서부터 특별히 사용할 필요가 있는 경우, 예컨대 임산부, 수유기, 폐경 후 칼슘 투여시에는 1500mg까지의 사이에서 조절하는 것이 적당하다고 할 수 있으나 폐경 후 노령의 여성 1419명에 대한 대규모 코호트조사에서는 칼슘섭취의 부족이 곧 골절발생을 증가시키지 않는다는 보고도 있다(Wickham C. et al., 1989).

염분섭취와 관련된 일본의 역학조사에서 Mizushima는 칼슘 섭취량이 적은 여성(600mg/day)과 칼슘 섭취는 많아도 염분을 많이 섭취한 여성들은 낮은 골밀도를 보인 것으로 나타났으며 호주의 중규모(154명) 역학조사에서도 Jones는 salt intake가 bone resorption의 marker로 쓰인다거나 골다공증의 risk factor가 될 수 있다(Jones G., 1996)는 결론을 내렸다. 따라서 이러한 자료들로부터 다음과 같은 결론을 이끌어낼 수 있다.

첫째 아동기부터 청소년기에 걸쳐 골조직이 성장하는 동안 최대골량이 충분히 생성될 수 있도록 하고 장년기에 가능한 한 오래 최대골량을 유지할 수 있도록 하는

것이다. 이 과정이 골다공증의 발생을 최소화하여 국민 건강수준을 향상시키기 위한 최선의 방법이며 바로 이 점에서 한방소아과학에서의 골병치료학에 근거한 한약리학적 처방의 필요성이 인정된다.

둘째 위 Table 2에서 보듯이 장년기 이후에는 남성보다 여성의 골다공증 발생률이 현저하게 높기 때문에 남녀의 생리학적 차이에 근거하여 골격강화치료법을 특화할 필요가 있다. 이 점에 대해서는 한방부인과학에서 근골병을 치료하기 위해 사용했던 방법을 원용할 수 있다.

셋째 그렇지만 남성의 경우에도 老化가 진행되면서 점차 골소실이 일어나고 골다공증성 골절이 늘어나는데 특히 70세 이후에 급격히 증가한다. 따라서 남성노령자들을 위해 적합한 형태의 식이제품도 특화시켜 제조하는 것이 마땅하다. 이에 대해서는 한방신계내과학의 임상지식을 원용할 수 있다.

이상의 역학적 분석을 바탕으로 기본적인 예방지침을 정리하면 다음과 같다. 첫째는 식습관을 개선하되 발달단계에 맞게 권장되는 충분한 양의 칼슘 및 비타민 D와 칼륨, 마그네슘 등을 섭취하고 알콜이나 염분, 카페인 등의 섭취량을 많이 해서는 안된다. 둘째는 생활습관을 개선하되 청소년기에는 농구, 배구, 테니스 같이 강한 강도높은 운동을 하고 장년기 이후에는 걷기, 뛰기, 역기들기, 체조, 배드민턴 같은 체중부하운동이나 부담이 적은 운동을 규칙적으로 실시한다. 또한 흡연이나 상습적인 호르몬과 마약의 사용을 금지하여야 한다.

● 골다공증의 임상적 분류

이상에서 살펴본 바와 같이 성장기와 장년기 이후의 남녀 성별에 따라서 골다공증의 형성과 관련된 기전들이 조금씩 다르다는 것을 알 수 있다. 이 때문에 의학적 진단에서도 원발성 골다공증을 3가지로 분류하고 있다.

첫째는 성장기의 아동이나 청소년과 관계된 juvenile idiopathic osteoporosis이고 둘째는 51세에서 75세 사이의 폐경후 여성과 관련된 Type I osteoporosis인데 이는 치밀골(cortical)보다 해면골(trabecular bone)에 잘 발생하며 추체(vertebral body)와 下膊(distal forearm)에 호발하는 특징이 있으며 代償적으로 부갑상선 호르몬이 감

소하는 경향을 보인다. 셋째는 70세 이상의 남녀에게 모두 흔한 Type II osteoporosis인데 치밀골과 해면골에 고루 발생하며 대퇴골(femoral neck), 상완골과 정강이뼈(proximal humerus and tibia), 골반뼈(pelvis) 등이 가장 호발부위인데 여기서는 부갑상선호르몬의 혈청치가 정상보다 상대적으로 높은 경향이 있다. 그렇지만 I II형 모두 활성형 비타민 D의 수치는 감소된다(Jean W., 1991). 그러므로 본 과제에서도 골격강화기능을 갖는 기능성 보조제를 이들 세 그룹에 각기 적합하도록 특화시켜 방제를 구성하는 것이 타당하다고 생각한다. 나머지는 모두 속발성 골다공증으로서 반드시 원인질환을 가지고 있기 때문에 본 과제에는 해당되지 않으며 따라서 여기서는 상세한 설명을 피하고 내과학 교재에 정리된 항목을 바탕으로 골다공증성 골절의 위험인자를 정리하면 다음과 같다(Ross, 1996; Rebecca R., 1996).

- 일반적 인자 : 마른 체형, 短身小骨, 코카시아인이나 아시아인종, 여성, 폐경(폐경 후 20년 이내), 비출산(nulliparity), 난소적출 유경험자, 가족력, 장관 절제수술, 부갑상선 기능항진
 - 약물요법 : Glucocorticoids, Loop계 이뇨제, GnRH-효능제, Heparin, 장기적인 항경련제
 - 식이 : 만성적 저칼슘 식이, 만성적 고인산 식이
 - 개인적 습관 : 담배, Caffeine의 과다 섭취, Alcohol의 과다 복용, 운동부족
- 이상의 요인들을 가지고 있는 경우에는 유력한 골다공증 후보군이 되므로 본 기능성 식이제품의 예방효용에 대한 평가시 중요한 인자가 될 수 있다.

● 골다공증 식이소재의 약리학적 고려사항

골다공증의 치료기전은 약리학적으로 크게 두가지가 가능하다. 하나는 골흡수를 억제하는 방법이고(antiresorptive agents) 둘째는 골형성을 촉진시키는 방법이다. 그렇지만 현재 임상적으로는 골흡수를 억제(antiresorptive drug)하는 Estrogen, SERM(selective estrogen receptor modulator), Calcium, Calcitonin, Calcitriol 등을 사용하는 경우가 많으며 가장 폭넓게 연구되고 다양한 합성약물이 있는 Bisphosphonates 제제가 사용된다.

Estrogen은 수용체 친화성이 높아 골세포에 직접적으로 작용하므로 폐경 직후 estrogen 투여를 시작하면 골소실의 초기단계 및 골절을 예방할 수 있는 가장 효과적인 치료방법이다. Estrogen과 progesterone의 병용투여로 자궁내막암 및 유방암 발생의 위험성을 감소시킬 수 있다. 그렇지만 출혈이나 혈전색전성 질환, 유방암 등이 있으면 사용할 수 없고 또 일부의 경우에는 출혈을 유발하기도 한다.

Calcium은 골다공증 치료의 필수요소이긴 하지만 단독으로는 급격한 골소실을 지연시키지 못하며 estrogen 투여와 병행하여야 한다. 인체가 뼈로부터 칼슘을 소모하는 것을 막기 위한 1일 칼슘권장량은 약 1000-1500 mg이다. 특히 노인의 경우엔 비타민 D의 감소와 칼슘 흡수의 저하가 있으므로 모두 골절예방을 위해 필요하다. 다행히 칼슘의 과량섭취로 인한 고칼슘혈증이나 칼슘궤양의 증상은 거의 보고되지 않으며 변비의 부작용이 나타난다(Rebecca R., 1996).

Calcitonin은 식이나 혈청칼슘증가에 반응하여 갑상선에서 분비되는 내인성 호르몬이며 폐경후 여성에 있어서 척추의 골량을 증가시키므로 폐경이나 난소적출경험이 있는 여성인 경우 골소실 방지 효과가 매우 크다고 한다. 그러므로 Calcitonin은 estrogen 금기환자나 glucocorticoid에 의한 골다공증 등에 적용되며 부작용으로는 초기에 안면홍조나 피부염 혹은 구토, 위장장애 등이 나타날 수 있다.

Harris는 그의 Osteoporosis clinic에서 폐경 후의 골다공증 환자에 대한 대규모 임상시험에서 etidronate나 alendronate와 같은 Bisphosphonates 제제를 장기간 투여하여 일관되고 현저하게 골밀도가 상승하는 효과를 거두었다는 보고가 있다. SERM에 속하는 약제로는 Raloxifene, Tamoxifene 등이 있는데 여기에 대해서도 심혈관질환이나 유방암 등 병발질환과의 약리학적 상관성을 고려한 많은 임상보고와 실험보고가 있다(Pols et al., 2001; Taranta et al., 2002; Park et al., 2002).

골형성 촉진제로는 Vit. D나 PTH등이 사용되는데 Vit. D는 조골세포의 기능을 촉진시켜 척추와 고관절 골질의 발병률을 감소시키며 부갑상선 호르몬은 cancellous bone mass를 현저히 증가시켜 폐경후 여성골다공증과 남성골다공증의 치료제로 응용된다. 하지만 피질골에는 영향이 거의 없거나 시간이 경과되면서 약간 감소되는 것으로 나타났다(Hock et al., 1998; Goltzman et al., 1999). 결국 보조식이소재가

estrogen-mimetic이면서 동시에 calcitonin을 증가시키고 칼슘의 체내 이용율을 증가시킬 수 있다면 소기의 목적을 충분히 달성할 수 있을 것이다.

● 한의학에서의 근 골격 기능 강화 방안

① 아동 및 청소년

한방소아과학에서는 小兒期를 다음과 같이 분류한다. 新生兒期(neonatal period)는 출생부터 1개월까지이고 嬰兒期(infancy)는 생후 1개월부터 1년까지이며 幼兒期(early childhood)는 생후 1년부터 6년까지이고 學童期(late childhood)는 7년부터 12년까지이며 思春期(puberty)는 2차 성징이 나타나는 13-15세까지이다.

과제에서 成長期라 할 때는 유아기 이후 사춘기를 거쳐 최고골량에 도달하는 17-20세까지를 포괄하므로 아동 및 청소년기라 칭하였으며 청소년이란 보통 10代 남녀를 지칭한다<국어사전>. 아동심리학에서는 특히 청소년기(adolescence)를 13-18세로 보고 사춘기의 육체적·성적 발달 외에 인지능력과 사회성, 개인적 정체성(personal identity) 등이 발달하는 심리적·사회적 발달기로 보기도 한다. 한의학에서 볼 때 小兒의 생리적인 특징은 臟腑組織과 정신심리기능이 연약하고 성장과정에 있어 항상 滋養分이 부족한 상태에 있다는 점이다. 따라서 단순히 성인의 축소판이라고 생각할 수 없는데 이를 宋代 소아과 의사인 錢乙은 “五臟六腑 成而未全 全而未壯 易虛易實易寒易熱”<小兒藥證直訣>하다 하였고 錢乙을 비롯한 여러 醫家들은 小兒를 “純陽” 혹은 “稚陽”이라서 “陰氣未全”하다고 설명하였다. 그런데 이러한 陰氣의 근본은 腎에 있으며 이를 眞陰, 元陰 또는 腎陰이라 한다. 또한 腎陰은 腎精과 腎中의 津液을 포괄한다.

宋代의 소아과 전문서인 <幼幼新書>에는 “小兒臟腑嬌嫩 血氣懦弱 肌體不密 精神未備 故稱不易醫”라 하였는데 이처럼 소아들은 생리적으로는 臟腑가 嬌嫩하고 形氣가 未充하지만 生氣가 왕성하고 발육이 신속한 반면 바로 이 점 때문에 병리적으로 發病이 용이하고 傳變도 신속하게 된다. 따라서 성장과정에 평균적인 발달의 정도 및 病證의 虛實寒熱을 비교하여 부족한 부분을 보충하면 장부조직의 성숙이나 질병의 회복도 빠르게 진행된다(정규만편, 1985).

이런 이유들로 인해 아동기 및 청소년기에는 골다공증이나 골절이 의학적으로 확인되기 이전이라도 家系上 혹은 유전적으로 골다공증성 소인을 갖고 있거나 아니면 서기, 걷기, 뛰기, 신체동작 등 근골격계통의 발달이 상대적으로 늦은 경우에는 예방적으로 골격강화를 위한 식이요법을 실시하거나 보조약제를 투여하는 것이 발병 이후에 치료하는 것보다 훨씬 효과적이다. 즉 최고골량을 유지하기 위해서는 기능성 식이제품의 섭취와 함께 성장기에 적당한 칼슘과 Vit D 및 단백질 섭취, 충분한 근력운동과 유산소운동, 적당한 신장 대비 체중유지와 함께 여성호르몬 분비수준의 적절한 유지 등이 장년기 이후의 골다공증 예방을 위해 반드시 필요하다.

한의학에서 뼈는 인체의 기둥(“干”<靈樞·經脈>)으로써 인체에서 가장 단단한 조직이며 견고하게 主螫封藏하는 기관으로 腎에 속한다는 原義에 부합한다. 또 <素問·解精微論>에 “髓는 뼈를 채우는 것(骨之充)”이라 하고 이를 뒤집어 <脈要精微論>에서는 “뼈는 髓를 저장하는 창고다(髓之府)”라 하여 뼈와 髓의 관계를 설명하였다.

腎과 뼈 및 髓의 관계에 대해서는 <內經>의 여러 편에서 기술하고 있다. “腎主骨”<素問·宣明五氣>, “腎生骨髓”<素問·陰陽應象大論>, “腎主身之骨髓”<素問·痿論>, “少陰者冬脈也 伏行而濡骨髓者也”<靈樞·經脈> 등이 그것인데 거의 대부분 腎과 骨髓를 함께 舉論하는 것을 볼 수 있다. 그만큼 뼈와 髓는 腎과 밀접한 관계를 갖는다. 그러므로 腎精이 旺盛하면 骨髓도 充足하게 만들어져 骨骼이 강하게 되며 이로써 保護 運動 作強의 기능을 담당할 수 있고 五軟과 五遲등의 근골격 및 기관발육장애가 생기지 않게 된다. 뿐만 아니라 腦髓도 충족해지고 따라서 腦도 滋養이 풍부하여 精神과 五官이 明敏해지며 愚痴나 韓啞가 생기지 않는다.

그런데 뼈와 髓의 盛衰를 살필 때는 診部가 약간 다르다. 뼈의 근본은 顛骨<靈樞·五變>이므로 顛骨(광대뼈)을 診察하고 髓의 總主는 腦이므로<素問·奇病論> 腦를 살핀다. 왜냐 하면 髓는 뼈 속에 있는 것인데 가장 큰 뼈기둥은 脊이고 내부용량이 가장 큰 뼈는 머리골(腦)이기 때문에 髓는 腦脊이 중요하고, 뼈자체의 발달 정도를 관찰하기 쉽게 잘 표현하는 부위는 광대뼈이기 때문이다.

따라서 만일 아동기에 골수의 形成이 부족하여 골다공증이 되었다면 이는 곧 腎

精의 부족이 주요한 원인이며 이는 다시 腎陰의 不足으로 總攝된다. 그러므로 아동 및 청소년기의 골다공증 위험군이나 骨格素弱者에게는 腎精과 腎陰을 보하는 처방이 필요하다.

② 폐경후 노년 여성

폐경(menopause)이란 월경이 완전히 끝난 것을 말하며 폐경이 되는 시기는 대개 49세 전후이다. 폐경은 자궁이나 난소등이 인위적으로 제거되어도 나타나며 이와 비슷한 개념인 갱년기(climacteric)라 함은 성기능 및 생식기능이 감퇴하여 폐경기에 이르는 과도기로서 대개 44~48세의 사이이다. 난소로부터 30년 이상 규칙적으로 월경시마다 일정한 수의 난모세포가 배출되는데 이는 estrogen과 inhibin의 감소를 초래하고 이로 인해 무배란과 무월경이 오게 된다. 그렇지만 폐경 자체가 항상 특정한 질환을 일으키는 것은 아니며 폐경 부인의 75%는 증상이 없다. 나머지 약 25%의 경우에서 초기에는 홍조, 작열감, 불면증, 冷汗 등의 혈관운동계 증상이 주로 나타나다가 점차 동맥경화증, 성교통, 재발성 요도염, 골다공증, 비뇨생식기 위축 등이 나타나고 자율신경 계통의 불균형으로 인한 情志症狀, 예컨대 피로감, 의기소침, 현기증, 홍조, 불면, 성욕감퇴, 짜증, 불쾌감, 집중력 감퇴, 호흡곤란감, 정서불안, 긴장감 등이 함께 나타난다.

따라서 폐경기 후의 골다공증은 폐경이라는 물리적 현상과 직접적인 관계를 갖고 있으므로 폐경기 여성의 골다공증 치료에 접근하기 위해서는 老化라는 거시적 관점에서 접근해야 한다.

그러므로 의학적인 치료에 있어서는 특별한 금기증상, 예컨대 estrogen 의존성 종양, 유방암, 원인 불명의 자궁출혈, 자궁암, 뇌졸중(CVA), 동맥경화증, 혈전 색전성 질환 등이 없다면 estrogen을 우선적으로 처방하는 것도 이와 같은 이유이다. 골다공증의 발생빈도를 보더라도 에스트로젠을 투여하지 않은 40대 이후의 부인들은 1,000명중 75명 꼴이었으나 estrogen 투여후에는 25명 정도로 감소한다.

폐경으로 인한 골다공증의 직접적인 발생기전은 위에 살펴본 1 α -hydroxylase와 관련된다. 이 효소는 prolactin에 의해 영향을 받는데 prolactin은 estrogen농도와 비

레하여 변동한다. 따라서 폐경으로 인해 estrogen이 감소하면 prolactin의 감소와 함께 1 α -hydroxylase가 감소되고 이는 vitamin D의 활성화를 저해하여 Ca 흡수를 더욱 감소시키게 되는 것이다. 물론 이 외에도 부갑상선 호르몬의 감소나 운동량 감소, 흡연, 음주 등 여러 요인이 관여하고 있지만 가장 중요한 것은 estrogen이다.

그렇지만 estrogen 치료에는 금기가 있는만큼 위험성이 내포되어 있다. estrogen의 발암성이 그것인데 수년 전에는 프로세스틴 병용요법이 권장되기도 하였지만 최근에는 오히려 유방암을 심화시킨다는 보고가 많다(Schairer et al., 2000; Stephens, 2000; Roca et al., 2000).

따라서 한방부인과학교재(2001)에서는 골다공증을 만성 갱년기 장애의 한 유형으로 보고 폐경기 질환의 범주에서 다루고 있다. 따라서 폐경의 전반적인 신체변화를 중심으로 腎陰虛(肝腎不足)에는 六味地黃湯을, 腎陽虛에는 右歸丸을 가미하여 활용한다.

③ 노년 남성

노인들은 다음과 같은 여러 가지 특징을 갖는다. 칼슘(Ca)의 흡수가 적고 인(P)이 많은 음식을 즐기며 젊은이에 비해 햇볕 노출시간이 적어 vitamin D의 흡수가 적고 운동량이 적어 근육괴(muscle mass)가 위축된다거나 골밀도가 저하되어 있는 등이다. 전형적인 노화의 양상으로 나타나므로 키가 작아지고, 척추전굴증과 함께 골절 관절통이 특징이다. 만일 키가 매년 4.5cm 이상 감소한다면 일단 골다공증을 의심한다. 만일 자연적인 노화에 의한 골다공증이라면 매년 0.5cm 정도의 신장감소가 있다.

검사는 요추 및 흉추 X-선 검사, hydroxy proline/creatinine 검사, 혈중 P, Ca 농도 검사, Ca/creatinine比 검사, 혈중 alkaline phosphatase 등의 항목이 있는데 반드시 추가적으로 당뇨병, 갑상선 기능 항진증, 부갑상선 기능 항진증, 골연화증, 골형성부전증, 부신피질 기능 항진증, 대사성 악성종양, 다발성 골수증 등과 감별하는 것이 중요하다.

골다공증이 가장 심화되는 시기는 앞에서 지적한 것처럼 통계적으로 70세 이후이

다. 그렇지만 <內經·上古天真論>을 보면 "七八, 肝氣衰, 筋不能動, 天癸竭, 精少, 腎藏衰, 形體皆極"이라 한 것처럼 한의학에서는 50대 후반에 이미 남자도 腎臟의 精血이 衰하면서 骨骼도 약해지는 것으로 본다. 구체적으로 한방내과학에서는 골다공증의 원인을 腎陽不足과 腎陰不足으로 보고 六味地黃丸, 四物湯, 八味丸, 五苓散 등을 응용한다고 하였으며(두오경편저, 1986) 再活科 임상에서는 腎陰不足, 腎陽不足, 氣血兩虛, 風邪偏勝 등으로 분류하였는데 이 중 氣血兩虛는 영양장애와 유관하고 風邪偏勝은 유주성 관절통과 유관하다고 하여 임상특징을 구별하였다.

이처럼 골다공증의 공통적인 치료점은 신음부족과 신양부족임을 알 수 있으며 골다공증 관련 연구논문의 방제선택 경향도 역시 그러하다(김 등, 1993; 박 등, 1995; 조 등, 1999).

골다공증에 대한 치료는 특별한 수반질환이 없는 상태에서 예방적인 단계로 시행할 수도 있고 대퇴골절과 같은 특정질환이 생겨서 의학적인 치료를 시행하는 경우가 있다. 그렇지만 본 과제에서는 물론 무증상인 골다공증을 완화하고 개선하는 것이 목적이므로 신음부족과 신양부족을 補充할 수 있는 한약리학적 접근과 함께 다음과 같은 여러 보조적인 치료방법들을 병행하면서 본 제품을 사용하도록 고안해야 한다.

노년기의 증가된 골흡수와 감소된 골형성간 균형을 줄이기 위해 충분한 영양과 Ca의 섭취, 운동, 금연을 실천하도록 하는데, 충분한 calcium의 섭취를 위해서는 600~1,000mg 정도를 복용시키며 vitamin D를 5만 unit/month를 2회씩 4개월 복용토록 한다. 골형성을 촉진하기 위해 개인별 역량에 맞는 체중부하운동을 시행하고 골흡수를 방지하기 위해 금연을 유도한다. 또한 가능하면 결합 estrogen 0.3mg/day를 복용하는 것도 좋다.

2. 골격강화 기능성 식이소재의 recipe

이상에서 논의한 내용을 바탕으로 다음과 같은 한약재를 주종으로 하여 골격강화를 보조하기 위한 기능성을 증강시켰다. 이상과 같이 sample compound를 조성하였는데 종합하면 아래와 같다.

(1) 男性의 식이소제 recipe

- 처방명: GN
- 조성: 熟地黄九蒸 15g, 토사자주초 15g, 우슬주초, 백복령, 인삼, 파고지微炒, 두충거사 7.5g, 威靈仙醋浸 4g, 龜板酒炙, 砂仁 각 3.75g과 골분 2g, 黑大豆 15g(양갱제조시 원료)
- 요점: 熟地黄과 羌活子를 합하여 腎精과 腎氣를 보익하고 우슬과 두충을 합하여 筋骨을 강건하게 하며 인삼과 녹용과 파고지를 합하여 腎氣가 쇠약하여 陽痿가 되는 것을 막고 백복령은 健脾養心하고 利水滲濕하여 補에 치우치지 않게 하며 威靈仙은 風濕痺痛을 除하고 骨硬을 다스리는 공효가 있으며 龜板은 신음부족을 보하여 健骨의 효과가 있다. 또한 이들은 합하여 쓰면 骨質을 연화하여 소화와 흡수가 이루어지기 쉽게 하는 작용이 있다.

(2) 女性의 식이소제 recipe

- 처방명: SG
- 조성: 숙지황(砂仁酒法製九蒸) 5돈, 당귀 3돈, 구기자 두충 去絲 각2돈, 우슬酒炒 1돈반, 육계 속단 감초炙 각1돈, 골쇄보주초3돈, 狗脊 1돈, 홍삼액15cc + 골분 2g, 黑大豆 4g(양갱 제조시 원료)
- 요점: 이 조성은 한방임상에서 널리 사용되는 大營煎을 기본으로 가미한 것이다. 大營煎은 <景岳全書·新方八陣·固略>에 나오는 처방으로 “治眞陰精血虧損, 及婦人經遲血少, 腰膝筋骨疼痛, 或氣血虛寒, 心腹疼痛等證”이라 하여 폐경기 증상과 함께 근골격기능 퇴화를 치료하기 위한 목적으로 만들어진 것이다. 원방의 조성은 “當歸 二·三錢, 或五錢 熟地 三·五·七錢 枸杞 二錢 炙甘草 一·二錢 杜仲 二錢 牛膝 一錢半 肉桂 一·二錢 水二鍾, 煎七分 食遠溫服”이라 하였는데 여기에 藥對로 흔히 함께 쓰이는 續斷과 狗脊을 합하고 다시 骨折과 止痛에 응용되는 骨碎補를 가미한 것이다.

3. 골다공증 동물실험모델을 이용한 생리활성 평가

3-1 체중 변화

체중은 난소절제가 유의성 있게 이루어졌는지를 판단하기 위한 목적으로 측정하였다. 측정결과는 다음과 같다(Table 3).

Sham군과 control군 사이에는 유의성있는 체중증가가 있었으나 GN군과 SG군은 control군과 비교하여 감소하는 경향은 있으나 유의성은 인정되지 않았다.

Table 3. Body weight of each group.

	Normal	Sham	Control	GN	SG
No. of Animal	8	8	8	8	8
Initiation	282.1±10.78*	280.6±10.41	284.3±11.23	283.4±9.78	284.9±10.14
completion	294.3±11.09	295.6±11.19	314.5±10.13**	309.7±10.89	302.1±10.37

* Mean±SD(standard deviation)

** : p<0.025

3-2 혈청중 thyroxine 변화

혈청중에 들어있는 Thyroxine(T₄)의 측정치는 정상군이 3.72±0.515이고 위장수술군이 4.06±0.403이며 대조군이 4.23±0.322, GN군이 3.79±0.580, SG군이 3.78±0.299로 나타나 정상군과 대조군 사이에는 유의성있는 차이가 있었으나(p<0.05) 위장수술군과 대조군 사이에는 유의성있는 차이가 없었다. 대조군과 GN군과의 사이에는 유의성있는 차이가 없었으나 SG군과는 유의성있는 차이(p<0.025)가 인정되었다(Fig. 1).

3-3 Osteocalcin 함량 변화

혈청 중에 들어있는 osteocalcin의 함량은 정상군이 1.37±0.237이고 위장수술군이 1.62±0.108이며 대조군이 1.13±0.097, SG군이 1.41±0.243, GN군이 1.36±0.211로 나타났다. 정상군과 대조군 사이에도 유의성있는 차이가 있었을 뿐만 아니라 (p<0.05)

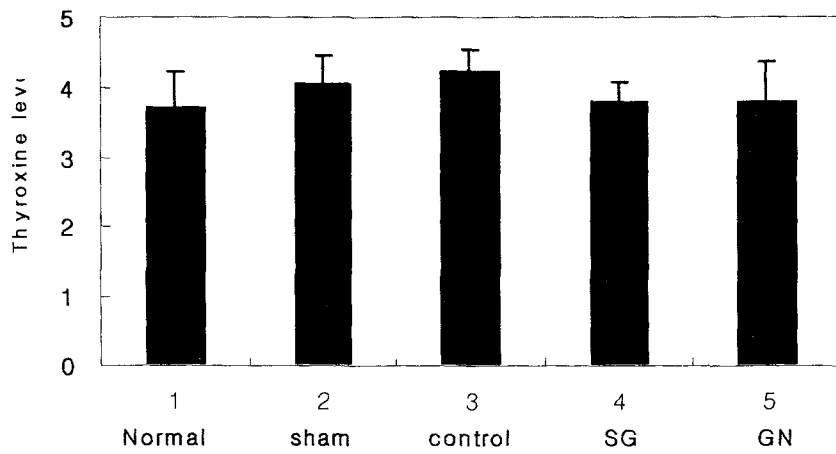


Fig. 1. Effect on the T4 level of each group

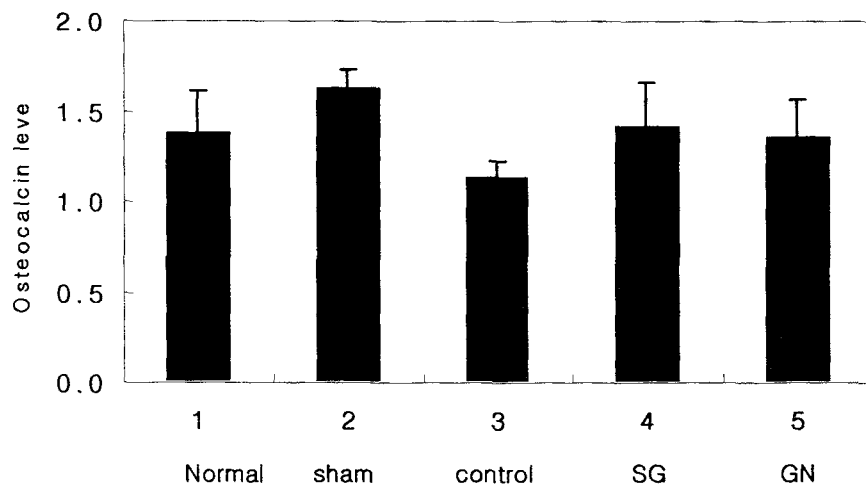


Fig. 2. Effects on the osteocalcin level of each group.

위장수술군과 대조군 사이에는 매우 고도의 유의성있는 차이($p < 0.001$)가 있었다. 대조군과 GN군과의 사이에도 유의성있는 차이($p < 0.025$)가 있었고 SG군과는 유의성있는 차이($p < 0.01$)가 인정되었다(Fig 2).

Osteocalcin은 뼈에 있는 비콜라젠 단백질의 20%를 차지하고 석회화의 조절이나 골흡수를 위한 대식세포 조절에 관여하며, 새로 합성되는 osteocalcin의 70%는 골기질에 결합되고 30%가 혈액에 유리되는데 이를 이용하여 측정한다. osteocalcin은 체형 시간이나 나이, 성호르몬 상태에 따라 변동이 있으며 폐경후에 약간 증가되었다가 골흡수억제제를 투여하여 치료하면 다시 감소된다(Karaenzlin, 1996). 그렇지만 골형성이 부족한 경우이거나 성장호르몬이 부족하면 osteocalcin의 수치는 정상보다 낮아지는데 본 결과에서 정상군이나 위장수술군보다 대조군에서 현저하게 낮아진 것은 역시 수술 후에 골형성이 안되기 때문에 비롯된 것이며 SG와 GN을 투여한 군에서는 다시 유의성있게 회복되는 것으로 보아 골형성을 증가시키는데 기여했음을 알 수 있다.

3-4 Alkaline phosphatase 함량 변화

혈청 중에 들어있는 alkaline phosphatase의 함량은 정상군이 350.0 ± 137.46 이고 위장수술군이 543.8 ± 90.89 이며 대조군이 580.7 ± 161.12 , SG군이 554.8 ± 150.57 , GN군이 427.1 ± 161.03 으로 나타났다. 정상군과 대조군 사이에는 유의성있는 차이($p < 0.05$)가 있었으나 위장수술군과 대조군 사이에는 유의성있는 차이가 없었다. 대조군과 GN군과의 사이에는 유의성있는 차이($p < 0.05$)가 있었으나 SG군과는 유의성있는 차이가 없었다(Fig 3).

조골세포는 total alkaline phosphatase(TALP)를 생성하여 조골세포막의 소포에 저장하며 이 중 일부가 혈액으로 유리되므로 ALP는 일반적인 골형성지표로 사용된다. TALP activity의 55%는 간으로부터 오고 40%가 조골세포에서 오며 나머지 5%는 장에서, 임신했을 경우는 태반에서도 유리되기 때문에 골질환에서의 특이성은 별로 높지 않다. 그렇지만 TALP는 폐경 후에 올라가고 골다공증이 있으면 더 올라가며 칼슘제나 골흡수억제제를 사용하면 감소된다(Karaenzlin, 1996). 정상군과 대조군 사이에 유의성 있는 차이가 나타나 대조군에서 폐경이나 골다공증에 의한 영향

이 있었던 것으로 추정할 수 있다. 또한 대조군과 GN군 사이에는 유의성있는 차이를 나타내면서 수치를 감소시켰으므로 GN은 칼슘제 혹은 골흡수억제제로서의 역할을 한 것으로 생각된다.

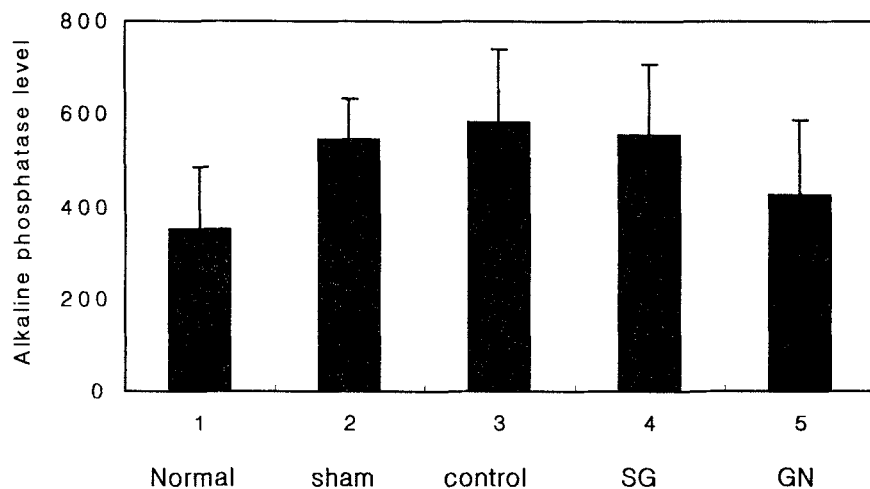


Fig. 3. Effects on the alkline phosphatase.

3-5 혈중칼슘 함량의 변화

혈청 중에 들어있는 Ca^{++} 의 함량은 정상군이 9.30 ± 0.208 이고 위장수술군이 9.31 ± 0.253 이며 대조군이 9.31 ± 0.241 , SG군이 9.25 ± 0.192 , GN군이 9.32 ± 0.225 로 나타났다. 따라서 모든 군 사이에는 유의성있는 차이가 전혀 없었다(Fig 4).

혈중 칼슘 측정치의 표준편차가 매우 크고 각 군간에 차이가 거의 없어서 유의성있는 차이를 발견할 수 없었는데 이는 역으로 골다공증에서 칼슘의 단독적인 의의가 별로 없음을 반증하며 그 수치는 모두 정상범위 내에 있었다.

혈중 칼슘은 체내에 약 1kg 정도가 존재하지만 그 중의 약 99.9%는 골격내에 있고 나머지 0.1%가 세포외액에 분포하는데 폐경이나 난소를 적출하여 성호르몬이 중단되면 칼슘이 혈액 속으로 유출되는 양이 더 늘어나게 된다. 따라서 성장기 뿐만 아니라 폐경 후에 칼슘을 섭취하면 골소실을 감소시킨다고 하여 1950년대 초부터 치료에 이용되었지만 임상시험 결과는 다른 약물치료보다 골소실 진행도도 높고 골

절 빈도도 높아 칼슘 단독치료가 바람직하지 않은 것으로 되어 있다(김 등, 1998; Karaenzlin, 1996).

3-6 대퇴골 강도 측정

대퇴골 경부에서 측정된 Instron 강도는 정상군이 6.08 ± 0.376 이고 위장수술군이 4.80 ± 0.294 이며 대조군은 4.10 ± 0.339 이고 SG군은 4.30 ± 0.607 이며 GN군은 4.70 ± 0.531 이었다. 정상군 및 위장수술군과 대조군 사이에는 고도의 유의성있는 차이($p < 0.01$)가 있었으나 대조군과 SG군 사이에는 유의성을 나타내지 못하였고 대조군과 GN군 사이에는 유의성있는 차이($p < 0.05$)가 인정되었다(Fig 5). 정상군 및 위장수술군과 대조군 사이에는 고도의 유의성있는 차이($p < 0.01$)가 있었으나 대조군과 SG군 사이에는 유의성을 나타내지 못하였고 대조군과 GN군 사이에는 유의성있는 차이($p < 0.05$)가 인정되었다. 이는 GN이 생화학적인 검사 성적과 일치하게 물리적 강도의 개선에도 유효한 효과를 나타냈음을 보여준다.

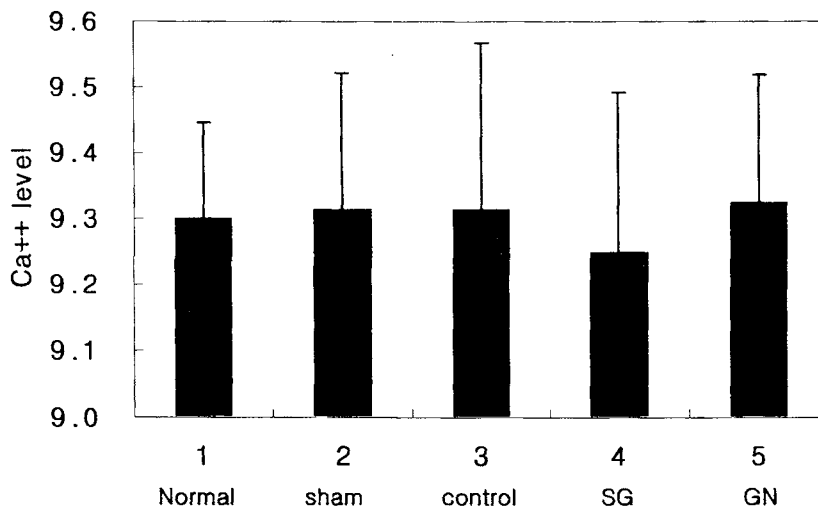


Fig. 4. Effects on Ca⁺⁺ level of ovariectomized osteoporosis model rat

3-7 요추의 골밀도 측정

요추의 평균골밀도는 정상군에서는 0.203 ± 0.0148 이고 위장수술군은 0.199 ± 0.0097 이었으며 대조군에서는 0.171 ± 0.0029 이고 JG군에서는 0.176 ± 0.0086 , GN군에서는 0.176 ± 0.0045 였다(Fig. 6). T-test에서는 정상군과 비교하여 대조군에서 현저한 유의성이 있는 것으로($p < 0.002$) 나타나 골조송증이 매우 성공적으로 일어났음을 알 수 있다. 또한 대조군과 비교하였을 때 SG군에서는 유의성이 나타나지 않았지만 GN군과 비교하면 유의성이 인정되었다($p < 0.02$).

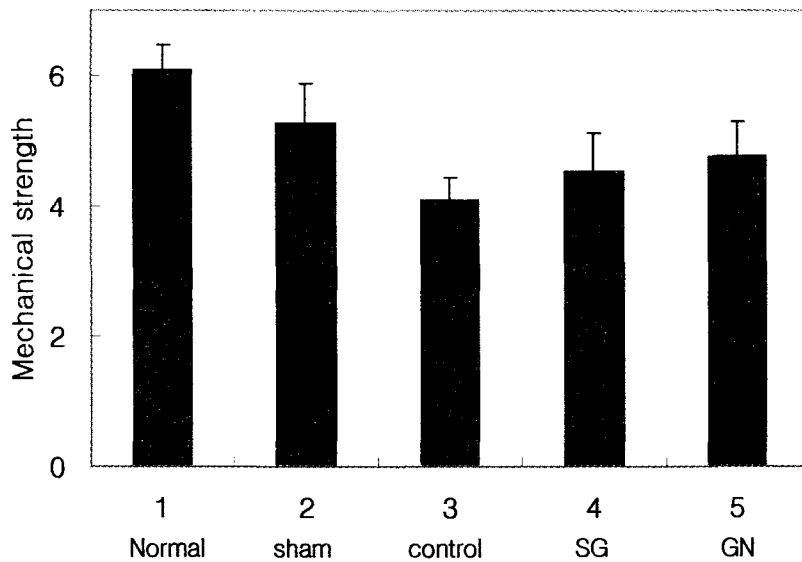


Fig. 5. Effects on the mechanical strength of the femoral neck.

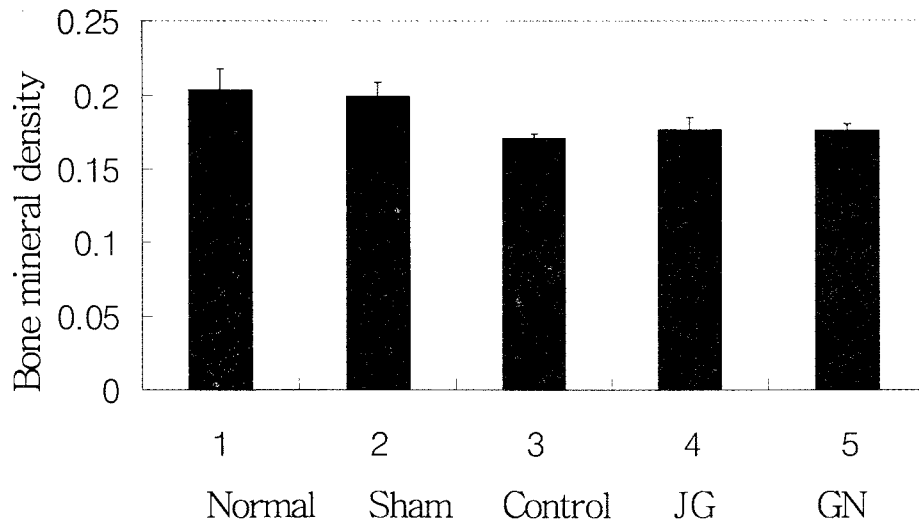


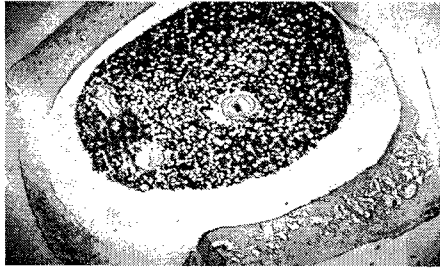
Fig. 6. Effects on BMD of each backbone

4. 골조직 표본과 영상분석

골조직 표본의 슬라이드 사진(Fig. 7)을 보면 정상군과 위장수술군에서는 내부에 유골조직이 많이 포함되어 있고 脂肪球의 분포도 적은데 반해 대조군에서는 유골조직의 수도 적고 지방구가 매우 많이 충전되어 있음을 볼 수 있다. 그리고 SG군에서는 지방구의 수효가 많이 줄어들지는 않았지만 유골조직의 수효가 상대적으로 늘어나 있고 GN군에서는 지방구의 수효도 변연부에서 줄어들고 동시에 유골조직도 늘어나 있음을 볼 수 있다. 따라서 GN군이 상대적으로 좋은 효과를 보였음을 알 수 있다.

5. Immunoprecipitation과 RT-PCR

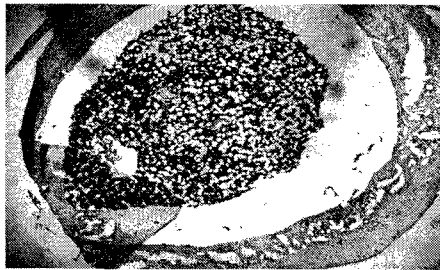
IL-1 β 는 골다공증의 형성에 영향을 미치는 cytokine으로 골절이 다발하는 가계의 유전성을 관찰해 보면 interleukin-1과 함께 collagen I- α 1, estrogen receptor, transforming growth factor beta(TGF- β), interleukin-6, calcitonin, parathyroid hormone, and apolipoprotein E, IL-4, IGF 등의 유전자들이 골밀도 형성과 관련되어 있는 것으로 조사되었다(Fig. 8., Fig. 9). 예를 들어 IL-1이나 TNF를 설치류에



Normal



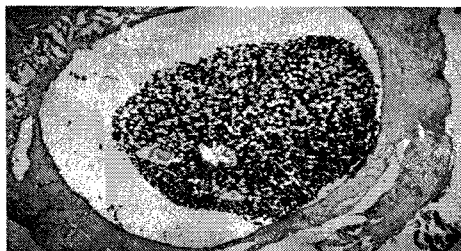
Sham



Control



SG



Cross section of the distal neck of femur in GN group($\times 50$)

Fig. 7. Slide images of each group.

N- N+ S C S- G



Fig. 8. Detection of IL-1 β by IP

N- : Normal group and diet without calcium

N+ : Normal group and normal diet with calcium

S : Sham operation group

C : Control group ovariectomized S- : SG group G : GN group

N- N+ S C S- G

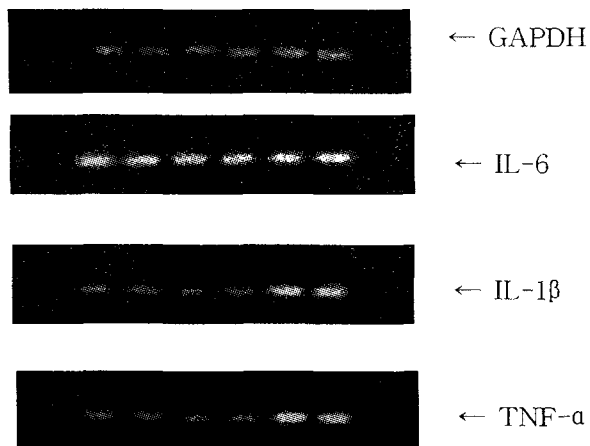


Fig. 9. Expression of each cytokine, IL-6, IL-1 β , TNF- α in RT-PCR

N- : Normal group and diet without calcium

N+ : Normal group and normal diet with calcium

S : Sham operation group

C : Control group ovariectomized S- : SG group G : GN group

투여하면 골재형성이 증가하며 생체외에서는 파골세포의 형성을 촉진한다. 그렇지만 이들 작용은 직접적인 것이 아니고 다른 조골세포나 기질세포를 매개하여 일어난다. 그러므로 IL-1 β 의 단독적인 영향보다는 복합적인 생체내 환경하에서 이루어져야만 하는데 primary culture를 통하여 detection한 결과 정상군과 대조군에서 유의성있는 양적 차이를 발견하지 못하였다. 이러한 원인은 여러 가지 추론이 가능하지만 가장 크게는 실험의 오류 가능성과 워낙 적은 양이 파골세포 형성과 관련하여 분비되기 때문에 골다공증이 아닌 다른 생리적 기전이 혼재하여 관련되었을 가능성이 있다. 또한 IL-6는 조혈과정의 초기단계를 촉진하고 파골세포 형성에도 중요한 역할을 하며 분비되는 양도 상대적으로 많다. 특히 병적인 상태에서 파골세포 형성에 관여하는데, 즉 에스트로젠이 정상적으로 분비되면 조골세포로부터의 IL-6 생성이 억제되지만 폐경이 되면 에스트로젠량이 감소하면서 IL-6의 생성이 촉진되기 때문에 파골세포의 활동이 증가되고 골다공증이 발생하는 것이며 따라서 cytokine 중에서도 특히 중요하게 다루어진다. 그런데 RT-PCR 결과를 보면 IL-6 mRNA의 발현량이 각 군별로 별 차이를 나타내지 않고 있는데 이는 반복 시험을 해도 같은 결과를 보였다. 이 결과는 Brooks-Asplund(2002)등이 폐경후 여성들의 IL-6와 TNF- α receptor를 측정 한 임상시험에서도 estrogen 단독 투여시 IL-6 receptor의 양에 아무런 변화가 생기지 않았던 관찰사실과 일치하며 적어도 IL-6의 분비량이 증가되지 않고 일정한 수준을 유지하였다는 사실만은 분명히 보여준다. 또한 IL-6의 골다공증에 대한 아직 밝혀지지 않은 관여기전도 현재로서는 배제할 수 없다. 반대로 IL-1과 TNF의 RT-PCR 결과는 정상군이나 위장수술군보다 대조군에서 비교적 적게 발현되고 SG군과 GN군에서 다시 발현량이 증가되었는데 파골세포에 의한 골조직 잔편의 흡수과정이 촉진되고 있음을 알 수 있었다.

6. 한방물질이 배합된 시제품의 임상실험

성인(45세~63세) 남성 15명을 대상으로 osteocalcin의 수치를 측정하였다. 박○만씨의 경우는 수치가 비정상 수준까지 떨어진 것으로 나와 있으나 주관감각에 대한 설문지를 보면 시제품 복용 전에 비해 매우 호전된 것으로 평가하고 있어서 측정 수치에 문제가 있음을 짐작케 한다.

여자의 경우는 약간의 예외는 있지만 비교적 고르게 상승하고 있어서 완만한 효과가 있었음을 보여준다. 실제로 주관감각에 대한 설문조사에서도 골다공증성 신체 증상을 가지고 있던 피험자는 대개 증상이 호전되었다고 평가하고 있다. 다만 평소 골다공증에 관련된 신체자각증상이 없었던 정○숙씨는 시제품 복용 후에도 여전히 특별한 변화를 자각하지 못하였다.

시험개체수가 적고 개인차가 커서 T Test는 전혀 의미가 없었는데 평균 3.00의 상승이 있었지만 역시 생리적인 변동범위이기 때문에 임상적인 의의를 지니지는 못한다. 다만 오스테오칼신의 상승 경향성은 인정할 수 있었다(Table 4).

혈중칼슘 수치는 남녀 시험 전후 모두 정상 수준이었고 시제품 복용에 의해서도 특별한 의의있는 변화는 없었다. 이것은 혈중칼슘 수치 자체는 골다공증을 진단함에 있어 별 유의성이 없다는 것을 알 수 있었다(Table 5).

시제품 복용 후 주관감각을 기술한 설문지 결과를 보면 남자의 경우 비록 X-ray 상으로는 골다공증 진단을 받았지만 임상적으로 자각증상이 나타나지 않았던 경우에는 약 복용 후에도 별다른 효과나 부작용을 느끼지 못하는 것으로 나타났다. 그러므로 이런 경우에 효과를 확인할 수 있는 유일한 검증방법은 DEXA 측정법 뿐이다. 그렇지만 이것은 본 실험에서 사용하기 부적절하므로 현재로서는 궁극적인 효능성을 판정하기 어렵다.

하지만 박○만씨의 경우에는 평소 당뇨가 있고 골다공증에 의한 膝痛이 있었으나 복용 1개월부터 약간 씩 호전되었고 2개월 후에는 무릎통증을 거의 못 느끼고 있다고 진술하여 시제품 복용 후 많이 호전되었음을 알 수 있다. 박○중씨의 경우에도 무릎 관절, 어깨, 왼쪽 팔꿈치, 척추 등에 불편을 느낀다고 하였는데 이 증상 역시 점차 호전되는 것을 자각한다고 진술하였다. 반면에 여자의 경우는 전반적으로 호전반응을 보였으나 이○란씨는 골다공증에 의한 관절통증보다는 紅潮증상이 나아졌다고 기술하였다. 그런데 紅潮는 갱년기에 여성 호르몬의 생산이 감소하면서 수반되는 증상으로 골다공증과 밀접한 관련이 있으며 이는 아마도 골다공증 진단시기가 4년 이상을 경과한 만큼 통증개선 속도보다 여성호르몬 분비수준조절에 더 빨리 작용하였던 것으로 짐작된다. 한편 정○숙씨는 평소 자각증상이 없었던 관계로 특

별한 변화를 기술하지 않았다. 이상의 시험결과를 통하여 본 시제품의 특성과 효과에 대해 다음과 같이 판정할 수 있다.

첫째 골다공증에 관련된 특정 증상, 예컨대 관절통이나 骨痛 혹은 紅潮 등이 있을 경우 해당 증상에 대한 개선효과가 있었다.

둘째 시제품 복용시 전체 대상자에서 특별한 부작용은 보고되지 않았다. 또한 자각증상이 없어서 치료효과를 자각하지 못하였던 경우에도 부작용은 전혀 발생하지 않았다.

셋째 여성의 골다공증에 대한 시험에서 본 시제품은 오스테오칼신의 분비수준을 상승시키는 경향성을 관찰할 수 있었다.

넷째 남성의 골다공증에서 정상범위에 있는 오스테오칼신은 유의있는 변화를 보이지 않았다.

다섯째 혈중칼슘의 양은 남녀 모두 정상범위에 있었으며 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다.

7. 시제품의 선호도와 기존제품과의 다면적 평가 및 복용량 결정

수용액은 탕전 한약과 같은 형태이기 때문에 피험자들도 음식으로 간주하지 않았고 기능성 약제로 평가하였기 때문에 복용량과 복용방법을 평가하는데 중점을 두었다.

복용량은 수용액 시제품과 캡슐을 동시 복용하는 과정에서胃痛을 호소하는 경우가 남성에서 1명 있었고 여성에서는 5명중 1명이 있었다. 이들 모두 캡슐과 관련이 있음을 호소하여 하루 3회, 1캡슐씩 복용하도록 바꾼 뒤에는 모두 위통증상이 사라졌다. 또한 칼슘제제에 의한 일반적인 부작용으로 변비, 오심 혹은 요로결석 등이 지적되고 있는데 본 pilot study에서도 2개월 정도 지난 뒤 변비를 호소하는 경우가 여성(박○연) 중에 1명 있었다. 따라서 식이제품으로 사용하기 위해서는 칼슘 시제품의 기준 복용량은 하루 1.5g, 즉 순수칼슘량을 기준으로 하면 450mg 정도가 적당할 것으로 판단된다. 한편 수용액은 복용시 특별한 부작용이나 호소사례가 없어서 복용량이 적절한 것으로 판단된다.

복용방법의 경우, 수용액은 흡수율을 높이기 위해서 식간(공복)에 복용하는 것이

Table 4. Changes of osteocalcin level of men and women

Specimen	Trial test		
	First	Second	Third
Men			
김○희	17.26	13.66	
노○근	23.06	20.44	
박○종	21.55	19.04	
박○만	14.48	8.22	
최○호	15.20	16.12	
Average	18.31	15.50	
Women			
박○영	5.02	5.72	6.48
박○연	16.53	14.33	21.22
전○자	8.26	11.52	13.96
김○숙	25.64	26.46	31.16
정○숙	11.31	13.26	12.13
이○란	11.72	12.09	11.56
Average	13.08	13.89	16.08

Table 5. Changes of blood calcium level of men and women

Specimen	Trial test		
	First	Second	Third
Men			
김○희	8.6	9.1	
노○근	9.3	9.3	
박○중	8.9	9.4	
박○만	8.5	9.2	
최○호	8.7	9.3	
Average	8.8	9.26	
Women			
박○영	8.5	8.9	8.7
박○연	8.8	8.6	9.1
전○자	9.0	9.2	9.7
김○숙	8.9	8.5	9.2
정○숙	8.8	8.6	8.8
이○란	8.7	8.7	9.0
Average	8.78	8.75	9.08

타당하며 칼슘제제도 위장관의 산도가 높을수록 용해도가 높아지므로 흡수가 용이해진다. 따라서 두 형태의 제제 모두 食間에 복용하는 것이 좋은 것으로 판단된다.

그리고 기존제품과 시제품의 여러 가지 측면에서 비교해보면 다음과 같다.

첫째 효능적 측면에서 보자면 기존제품인 칼슘우골분은 칼슘급원으로서의 단순기능을 담당하는데 그친다면 본 시제품은 칼슘의 체외배설 감소를 유도하여 장내 흡수율을 향상시키고, 한약재를 배합함으로써 변비 등 칼슘제 고유의 probable side effect를 감소시킬 수 있으며, 한약재의 성분을 변화시킴으로써 대사효능촉진 및 적응대상 다양화가 가능해지는 이점이 있다.

또한 경제적 측면에서 보자면 우골분은 절대량의 부족으로 수입 의존도가 높은 반면 본 시제품은 국내에서 폐기되는 다량어골분을 활용하므로 가격절감(50%) 및 수입대체 효과가 있고, 아울러 한약재 생산 농가의 수익성이 향상될 수 있으며, 제품 다양화 및 대중화를 통해 국외수출도 가능한 만큼 경제성이 뛰어나다.

부가가치적인 측면에서 보더라도 우골분은 附價性이 낮은 반면 본 시제품은 기능성 성분을 함유한 고부가 제품화가 가능하며, 특수질환 목적용 기능성 제품도 추가 개발이 가능하다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

이 연구에서 폐경 후 여성과 노년기 남성에게 나타나는 골다공증을 대상으로 하여 다량어골분을 한약추출물과 혼합하여 기능성 식이소재를 만들고 실험적인 검증을 실시하였던 바 *in vivo* 실험 및 *in vitro* 실험에서 모두 유의있는 효능을 나타냈으며 소규모 임상시험에서도 역시 증후를 수반하는 골다공증 顯症에 대해서는 자각증상의 감소와 함께 osteocalcin 혹은 blood calcium의 증가를 보여 유효하게 기능성을 발휘할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 처음에 계획하고 신청하였던 연구목표는 모두 달성하였다고 사료된다.

다만 과제외의 시간적인 한계와 연구규모의 제한성으로 인해 임상시험이 폭넓게 이루어지지 못한 것은 아쉽으나 식이제품의 기능성 정도를 알아보기 위한 정도로서는 가능하다고 판단된다.

우선 이 식이 소재 제조기술은 다량어를 수입하는 원양업자나 무역업자들에게 생산성을 증대시킬 것이며 관련한약재를 생산하는 농가에게도 수익성을 제고시킬 수 있을 것이다. 또한 제빵이나 양갱, 음료, 두류식품 등 앞으로 제품고안형태에 따라서 다양한 산업분야에 응용될 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 과제에서는 사용되는 한약재의 수요가 많지 않아서 표준화된 제품을 구입할 수 있었으나 추후 본격적인 제품 생산단계에서는 대량의 한약재를 필요로 하기 때문에 한약재 원료의 同定이나 건조보존상태 및 잔류농약 검사 등이 철저히 이루어져야 한다. 산업화를 위해서는 이 점이 전제되어야 한다.

본 식이소재의 제조방법은 본 실험결과와 함께 현재 특허출원을 준비하고 있다. 이 기술이 실용화되려면 안정적인 원료공급을 위해 참여업체인 (주)정필과 함께 한약재 생산농가를 별도로 선정하여 안정적인 제품생산을 유도할 계획이다.

따라서 식이소재의 제조형태가 다양화되고 그에 따른 공정표준이 갖추어지면 점

차 산업화를 이룰 수 있을 것이며 요리학원과 연계하여 제조법을 일반에도 전파할 계획이다. 이렇게 하면 평소 예방적인 섭식을 통하여 대사성 골질환의 발생을 늦추거나 방지할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 그 동안 폐기되었던 다량의 참다랑어 뼈를 활용하여 생산성을 획기적으로 증대시킬 수 있으며 한약재 관련농가에도 도움이 될 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

해당사항 없음

제 7 장 참고문헌

- 대한병리학회편, 병리학 제2판, 고문사, 1141, 1995.
- 통계청 홈페이지 http://www.nso.go.kr/cgi-bin/sws_999.cgi.
- 김기수 주편, 골다공증, 대한골대사학회, 1-3, 2000.
- 한인권, 박경옥, 김효민, 조남한: 중년여성의 갱년기증상과 그 인지도에 관한 연구, 대한폐경학회지 4:3-15, 1998.
- Jean Wilson, Eugene Braunwald et al, Harrison's Principles of Internal Medicine 12th, McGraw Hill, 1922, 1991.
- National Osteoporosis Foundation. 1996 and 2015 osteoporosis prevalence figures; stated by state prevalence report. Washington DC: National Osteoporosis Foundation, 1997.
- Mary Beth O'Connell, Steven F. Bauwens. Osteoporosis and Osteomalacia. In: Dipiro JT eds. Pharmacotherapy. A pathophysiologic approach. 3rd ed. Appleton & Lange, PO Box 120041, Samford, CT 06912-0041. 1689-1716, 1996.
- Karen Walker, Elaine Dennison, Cyrus Cooper: Epidemiology of Osteoporosis, Rheumatic Diseases Clinics of North America 27(1) 1-18, 2001.
- Joel Steelman, Philip Zeitler: Osteoporosis in Pediatrics, Pediatrics in Review 22(2): 56-64, 2001.
- Suleiman S, Nelson M, Li F, Buxton-Thomas M, Moriz C. Effect of calcium intake and physical activity level on bone mass and turnover in healthy, white, postmenopausal women. Am J Clin Nutr 66: 937-943, 1997.
- Specker BL. Evidence for an interaction between calcium intake and physical activity on changes in bone mineral density. J Bone Miner Res 11: 1539-1544, 1996.
- Thompson JL, Gylfadottir UK, Moynihan S, Jensen CD, Butterfield GE. Effect of diet and exercise on energy expenditure in postmenopausal women. Am. J. Clin. Nutr., 66: 867-873, 1997.
- Krall EA, Dawson-Hughes B. Walking is related to bone density and rates of

- bone loss. *Am. J. Med.*, 96: 20-26, 1994.
- Hara S, Yanagi H, Amagai H, Endoh K, Tsuchiya S, Tomura S. Effect of physical activity during teenage years, based on type of sport and duration of exercise, on bone mineral density of young, premenopausal Japanese women. *Calcif. Tissue Int.*, 68(1): 23-30, 2001.
- Storm D, Eslin R, Porter ES, Musgrave K, Vereault D, Patton C, Kessenich C, Mohan S, Chen T, Holick MF, Rosen CJ. *J Clin Endocrinol Metab* 83(11): 3817-3825, 1998.
- Wickham CA, Walsh K, Cooper C, Barker DJ, Margettis BM, Morris J, Bruce SA. Dietary calcium, physical activity, and risk of hip fracture: a prospective study. *BMJ* 299: 889-892, 1989.
- Mizushima S, Tsuchida K, Yamori Y, Preventive nutritional factors in epidemiology: interaction between sodium and calcium, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 26: 573-5, 1999.
- Jones G, Beard T, Parameswaran V, Greenaway T, von Witt R. A population-based study of the relationship between salt intake, bone resorption and bone mass. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51(8): 561-5, 1997.
- Jean Wilson et al, *Ibid*, 1922-1923.
- Ross PD. Osteoporosis. Frequency, consequences, and risk factors, *Arch. Intern. Med.* 8:156(13):1399-411, 1996.
- Rebecca Rogers. Osteoporosis and Osteomalacia. In: Eric T. Herfindal, Dick R. Gourley, eds. *Textbook of Therapeutics: Drug and Disease Management*. 6th ed. Williams & Wilkins, Maryland : 639-650, 1996.
- 노인의학, 전게서, 261~262.
- Rebecca Rogers, Osteoporosis and Osteomalacia. In: Eric T. Herfindal, Dick R. Gourley, *Textbook of Therapeutics: Drug and Disease Management*. 6th ed., Williams & Wilkins, Maryland 639-650, 1996.
- Harris ST., Bisphosphonates for the treatment of postmenopausal osteoporosis: clinical studies of etidronate and alendronate, *Osteoporos Int.* 2001(12) Suppl. 3, S11-6.

- Watts N. B. Risedronate for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: results from recent clinical trials, *Osteoporos Int.* Dec;12 Suppl. 3: S17-22, 2001.
- McGrath H Jr. Alendronate in postmenopausal osteoporosis, *N. Engl. J. Med.* Mar. 14; 334(11): 734, 1996.
- Pols H, Eastell R, Delmas P, et al, Early onset and sustained efficacy of raloxifene on incident vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis, Program and abstracts of The 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the European Calcified Tissue Society; June 5-10, Madrid, Spain. *Bone.* 2001;28(suppl): S85, 2001.
- Taranta A, Brama M, Teti A, De luca V, Scandurra R, Spera G, Agnusdei D, Termine JD, Migliaccio S.; The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro, *Bone*, 30(2): 368-376, 1996.
- Park WC, Jordan VC.; Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention, *Trends Mol Med* Feb; 8(2): 82-8, 2002.
- Hock JM, Gera I, Fonesca J, Raisz LG. human PTH increases rat bone mass in ovariectomized and orchidectomized rats. *Endocrinology.* 122: 2899-2904, 1998.
- Goltzman D. Interactions of PTH and PTHrp with the PTH/PTHrp receptor and downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules. *J. Bone Miner Res.* 14:173-177, 1999.
- 정규만編, 동의학소아과학, 행림출판, 31-35, 1985.
- Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* 283(4): 485-491, 2000.
- Stephens MB. Estrogen-progestin increases breast cancer risk. *J Fam Pract* 49(4):301-302, 2000.
- Roca CA, Schmidt PJ, Daly RC, Rubinow DR. Estrogen-progestin replacement

- and risk of breast cancer. *JAMA* 284(6):693-694, 2000.
- 한방부인과학교재편찬위원회, *韓方婦人科學*, 정담, 218-237, 2001
- 두호경편저, *동의신계내과학*, 동양의학연구원, 583-584, 1986.
- 전국한의과대학재활의학과학교실편, *동의재활의학과학*, 서원당, 184-185, 1995.
- 김근모, 녹용 및 육미지황탕가녹용이 백서의 운동억제성 골다공증에 미치는 영향, *경산대학교 대학원*, 1993.
- 박종철, 좌귀음과 우귀음이 난소적출백서의 성호르몬과 지질 및 골대사에 미치는 영향, *경산대학교 대학원*, 1995.
- 조한백, 박병렬, 대보원전이 난소적출로 골다공증이 유발된 백서에 미치는 영향, *대한한방부인과학회지*, 12(1): 343-363, 1999.
- 오하식, 김호철, 이상인, 안덕균. 두충의 수피와 잎이 난소적출로 유발한 골다공증에 미치는 영향, *대한본초학회지* 10(1): 59-68, 1995.
- Hsu HY, Yang JJ, Ho YH, Lin CC. Difference in the effects of radioprotection between aerial and root parts of *Lycium chinense*, *J. Ethnopharmacol.* 64(2): 101-108, 1999.
- 전국한의과대학 *本草學敎室共編*, 본초학, 영림사, 1998, 549, 601, 531.
- 전계서, 562~563, 2000.
- 윤수진, 이균상, 문호성. 골다공증의 관련요인, *가정의학회지* 17(12): 1450-1461, 1996.
- Garneo P. Delmas PD.: New developments in biochemical markers for osteoporosis, *Calcif Tissue Int.*, 54(Suppl 1): S2-9, 1996.
- Garneo P., Sornay-Rendu E., Chapuy MC., Delmas PD.: Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis, *J. Bone Miner. Res.* 11(3): 337-349, 1996.
- 최상순, 임주오, 김송백, 유심근: 육린주가 난소적출 백서의 골다공증에 미치는 영향, *동의생리병리학회지* 16(4): 794, 2002.
- Yamazaki I., Yamaguchi H.: Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model, *J Bone Miner Res*, 4(1): 13-22, 1989.