

발간등록번호

11-1541000-001485-01

발효 해조류를 이용한
골 관절 개선 기능성식품의 개발
(Development of Functional Food Using Bio-converted
Seaweeds for Enhanced Bone Formation)

경희대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “발효 해조류를 이용한 골 관절 개선 기능성식품의 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 05 월 31 일

주관연구기관명 : 경희대학교
주관연구책임자 : 이 태 후
세부연구책임자 : 이 태 후
연 구 원 : 이 돈 길
연 구 원 : 이 은 지
연 구 원 : 양 정 은
연 구 원 : 신 지 연
협동연구기관명 : 동성제약(주)
협동연구책임자 : 이 양 구
연 구 원 : 김 범 수
연 구 원 : 김 정 우
협동연구기관명 : 경희대학교
협동연구책임자 : 백 남 인
연 구 원 : 이 대 영
연 구 원 : 서 경 화
협동연구기관명 : 이태후생명과학
협동연구책임자 : 이 정 민
연 구 원 : 박 상 용
연 구 원 : 신 현 섭

요 약 문

I. 제 목

발효 해조류를 이용한 골관절 개선 기능성식품의 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라 해조류 양식은 미역, 김, 다시마를 중심으로 발전하였는데, 2008년 우리나라의 해조류 생산량은 약 93만 톤이었다. 현재 대부분 식용으로 소비되고 있어 높은 부가가치를 창출하는 데에는 한계가 있다. 또한, 현재 우리나라의 경우 해조류를 이용한 바이오 산업화는 시작 단계라 할 수 있다. 따라서, 해조류에 대한 연구를 체계적으로 진행하여 새로운 바이오산업의 원료로 활용한다면 해조류의 양식생산은 증가할 것이고, 어가의 소득 증진에도 큰 도움을 줄 수 있을 것이다.

해조류 중 현재 한약으로 사용되고 있는 소재로서 매생이, 파래와 같은 녹조류, 다시마, 미역, 툇, 모자반류를 포함하는 갈조류, 우뚝가사리, 김을 포함하는 홍조류가 사용되고 있다. 이중, 툇은 국내에서 생산되는 해조류의 총생산량 중 약 7% 정도를 차지하며 미역, 김 다음으로 생산량이 높고 소득에 있어서도 김, 미역 다음으로 주요한 어민 소득원이다. 현재 우리나라의 툇의 생산지는 주로 제주도(7.7%)와 완도(88%)이며, 우리나라는 툇 생산량의 대부분을 1차 생산품 위주의 제품으로 90% 이상을 일본으로 수출하고 있으며 일본의 경우 툇 수입량의 76.2%를 한국에서 수입하고 있다. 또한, 일본에서의 후쿠시마 원전사태이후 특히 미역과 다시마의 국제가격이 폭등하고 있는 반면 툇은 상대적으로 가격 상승폭이 적은편이어서 장기적으로 툇의 고부가가치 제품화는 산업적으로 매우 유리하다. 또한, 툇은 식품소재 중에서도 매우 우수한 식이섬유소의 공급원일 뿐만 아니라 칼슘 등의 무기질 함량도 높아 매우 우수한 건강식품 소재이다.

의학기술 등의 발달로 평균 수명이 길어져서 각종 성인병 및 퇴행성질환에 대한 관심이 크게 증가하고 있다. 퇴행성질환 중에서도 선진국 등에 유병율이 높은 골대사 관련 질환에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

관절염에 사용되는 기존 치료제 분야에서는 최근 머크사의 바이옥스와 화이자 사의 벡스트라의 회수조치로 관절염 치료제 시장이 위축되긴 했으나 GSK 사의 GW-406381과 노바티스사의 프렉시즈 등 안전성을 강화시킨 COX-2 저해제 계열의 유망 신약 개발이 속속 진행되고 있는 상태이지만, 아세트아미노펜이나 트라마통과 같은 진통제 및 COX-2 저해제를 포함하는 NSAIDs 계 약물이 주로 사용되고 있으며 이들 대부분은 근본적인 연골재생이 불가능하고 장기간 투여시 부작용을 일으키므로 주의가 필요하다. 실제로 최근 MSD사의 관절염치료제인 바이옥스의 경우 심각한 부작용이 밝혀짐에 따라 시장에서 철수되어 진통소염제에 대한 경각심을 높이고 있다.

또한 우리나라의 경우 골관절 질환 관련 기능성식품 시장은 글루코사민을 중심으로 2009년을 기준으로 연간 1천억원에 이르는 것으로 보고되어 있다. 하지만, 2010년 한국보건의료연구원이 공개한 글루코사민과 콘드로이틴 제제 사용현황 조사와 평가 보고서에 글루코사민의 골관절염

에 대하여 효능이 없다는 보고가 있는 후에 글루코사민과 관련된 건강기능식품 시장이 위축되고 있는 실정이다.

시장에서의 이러한 문제점들을 보완하는 골관절 질환의 치료를 위해서 유발 인자를 제거하여 주는 한편 골흡수를 억제하고 골형성을 촉진하여 감소된 골량을 회복시키며 부작용이 적고, 가능성이 검증된 안전한 소재의 개발이 필요하다. 이에, 본 연구에서는 해조류인 톳을 이용한 골관절 개선 기능성 식품 개발을 통하여 내수 기반 구축 및 대외 수출 경쟁력을 확보함으로써 새로운 시장을 개척하는 기반을 만들고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제 1 장. 천연 해조류의 건강 기능성 식품 소재 및 생산 공정의 탐색

제 1 절. 해조류 소재의 확보 및 항산화, 골 관련 활성 screening

- 열수추출방법을 이용하여 63종의 해조류 시료의 추출물을 확보
- 항산화 효과 (DPPH) 및 osteoblast cell (MG63) 증식을 통한 골 형성 촉진 효능 탐색

제 2 절. 톳의 최적 생산 공정 확립 및 지표물질의 탐색

- 비소 제거를 위한 처리 방법을 설정하고 비소 및 미네랄 함량을 결정
- 효능의 극대화를 위한 톳의 가공방법 확립
- Osteoblast cell (MG63) 증식률과 산화질소 (NO) 생성 억제 활성을 이용한 활성추적분획
- 지표 물질 동정 및 설정

제 2 장. 발효 톳 시료의 골 관련 효능 검색

제 1 절. 발효 톳 추출물의 항염 활성 및 골형성 촉진 확인(*in vitro*)

- 발효 톳 추출물의 산화질소 (NO) 생성 억제 활성 확인
- 발효 톳 추출물의 RAW 264.7 세포에서 항염 지표 COX, TNF- α , IL-1 β 의 발현 확인
- 발효 톳 추출물의 조골세포 석회화 활성 확인

제 2 절. 골관절염 동물모델에서 발효 톳 추출물의 효능

- Weight Bearing Test
- Micro CT 분석, 조직학적 변화 확인
- 혈액 내 항염 지표 COX, TNF- α , IL-1 β 검사

제 3 절. 폐경기 골다공증 동물모델에서 발효 톳 추출물의 효능

- 골밀도, Micro CT 분석
- 조직학적 변화 확인
- 혈액 내 골형성 지표(Osteocalcin) 및 골흡수 지표(C-telopeptide x) 검사

제 3 장. 발효 톳 시료를 이용한 임상시험용 시제품 제작

제 1 절. 임상시험용 제형의 제조 공정 확립 및 제형 개발 연구

- 발효 톳 추출물의 표준 제조공정 확립
- 기본 물성 확인
- 제형 연구 및 안정성 확인

제 2 절. 골관절 기능 개선 기능성식품 임상시험용 제형 연구

- 약효와 제형 연관성 연구
- 임상시험용 제품의 제조공정 확립
- 임상시험용 제품의 제형 안정성 확인
- 임상시험용 제품의 영양성분 검사

제 4 장. 발효 톱 추출물의 기준 및 시험법 확립 및 안전성 평가

제 1 절. 발효 톱 추출물의 기준 및 시험방법

- 발효 톱 추출물의 기준 및 시험방법

제 2 절. 발효 톱 추출물의 안전성 평가

- 단회투여독성
- 유전독성 시험 (염색체이상시험, 복귀돌연변이, 소핵시험)

제 5 장. 건강기능성 식품 인가를 위한 인체적용시험

제 1 절. 인체적용시험

- 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조, 비교 인체적용시험
- 유효성 평가 (VAS, WOMAC 검사)
- 혈액 내 사이토카인 검사
- 안전성 평가

구분	연구목표	연구개발의 내용
1차년도 (2009)	해조류 63 종에 대하여 항산화 및 골형성 촉진 효능 효과 검증	<ol style="list-style-type: none"> 항산화 활성을 갖는 해조류 선별(page 26-27) : 바탕말, 톳, 패류, 모자반류, 감태, 서실 등을 선별함 조골세포 활성을 갖는 해조류 선별함(page 28-29) : 모자반, 톳, 감태, 서실, 다시마 등 선별함 기능성식품의 개발을 위한 소재의 선택(page 30) : 제품 개발을 위한 소재의 공급, 지적재산권의 확보, 가격의 적절성 등을 고려하여 최종적으로 톳을 선별함
	톳의 최적 추출 및 발 효 조건 확 립과 양산 조건 최적화	<ol style="list-style-type: none"> 톳의 비소제거 방법 확립(page 31-34) : 100℃로 5분간 전처리하는 것으로 비소 제거 방법을 확립함 톳의 최적 추출 가공방법 확립(page 35-42) : 발효 톳의 건조 수율(30% 증가) 및 골관절 기능 효능 증가 확인(120%) 발효 톳 추출물의 지표물질을 확립함(page 43-50) : Fucosterol 및 Fucoidan을 효소처리 톳 추출물의 지표물질로 선정함
	발효 톳을 이용한 골다 공증 개선 효능 확인	<ol style="list-style-type: none"> 발효 톳의 골다공증 개선 효능확인(page 71-85) : 골다공증 유발 동물모델(폐경기)에서의 효능 확인 완료함
2차년도 (2010)	발효 톳을 이 용한 골관절 염 기능 개 선 효능 확 인	<ol style="list-style-type: none"> 발효 톳의 골관절염 기능 개선 효능확인(page 59-70) : 골관절염 유발 동물모델에서의 효능 확인 완료함
	건강기능성 식품 인증을 위한 임상시 험용 제품의 제조공정 확 립	<ol style="list-style-type: none"> 발효 톳 추출물의 제형별 안정성을 확인함(page 86-95) : 건강기능성식품의 개발을 위한 제형을 과립제로 선정함 임상시험용 제형의 레시피 및 대량생산시스템 정립함(page 96-101)
3차년도 (2011)	건강기능성 식품 인증을 위한 제품의 안전성 확인	<ol style="list-style-type: none"> 발효 톳 추출물의 기준 및 시험법 확립(page 103-110) 발효 톳 추출물의 안전성 확인(page 111-132, 별첨 4.1-4.4) : 동물을 이용한 안전성 평가 완료 (단회투여 및 유전독성 평가 완료)
	건강기능성 식품 인증을 위한 임상 시험 진행	<ol style="list-style-type: none"> 발효 톳을 이용한 골관절염 임상시험을 완료 (page 133-148, 별첨 4.5). - 대조군 33명, 시험군 33명 투여량 : 효소처리 톳 기준 800 mg/일 투여기간 : 12주

IV. 연구개발결과

제 1 장. 천연 해조류의 건강 기능성 식품 소재 및 생산 공정의 탐색

제 1 절. 해조류 소재의 확보 및 항산화, 골 관련 활성 screening

- 해조류의 확보 : 63종의 해조류 시료의 추출물을 확보함(page 25).
- 항산화 및 골형성 효과 확인 : DPPH 및 MG63 cell proliferation을 통해 10여 종의 해조류 선택함(page 26-29).
- 연구개발 소재의 선택 : 특허 및 논문, 원료의 수급 및 제품 개발 가능성 등을 고려하여 뜻을 골관절 기능 개선 건강기능성 식품의 개발 최종 소재로 선택함(page 30).

제 2 절. 톳의 최적 생산 공정 확립 및 지표물질의 탐색

- 비소제거 방법 확립 : 100℃로 5분간 진처리를 진행하여 추출한 경우의 비소함량은 14.18 mg/kg로 안전한 것으로 확인하여 진처리 방법을 확립함(page 31-34).
- 가공방법 확립 : 미생물 발효와 효소 처리 방법 모두 일정 이상의 효능을 보였으나, 가공 시간의 단축 및 대량생산 등의 산업적 가공성을 고려하여 효소를 이용한 가공방법을 표준가공법으로 선정함(page 35-40).
- 지표물질의 선정 : 항산화 및 골형성 촉진 효과를 바탕으로 fucosterol을 지표물질로 선정함. 또한, 염증 조절효과가 있는 것으로 알려진 fucoidan도 지표물질로 설정함(page 42-50).

제 2 장. 발효 톳 시료의 골 관련 효능 검색

제 1 절. 발효 톳 추출물의 항염 활성 및 골형성 촉진 확인(*in vitro*)

- 발효 톳 추출물이 70% 이상 NO 생성을 억제하는 것을 확인함(그림 17).
- 발효 톳 추출물은 RAW 264.7 세포에서 관절염 염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β)과 COX-1, COX-2 등의 발현을 감소시키는 것을 확인함(그림 18~19).
- 발효 톳 추출물이 조골세포의 석회화를 42% 촉진하는 것을 확인함(그림 20).

제 2 절. 골관절염 동물모델에서 발효 톳 추출물의 효능

- 발효 톳 추출물 경구투여는 골 관절염 관련한 weight bearing test 결과 control 에 비해 염증을 크게 감소시킴(그림 22).
- CT 결과에서도 control의 무릎 관절 단면에 비해 톳 추출물의 무릎 관절 단면이 훨씬 매끈한 것을 확인함(그림 23).
- 조직학적 결과에서도 control 에 비해 유의적으로 무릎 관절의 연골변성정도, 이상 세포 침윤, 연골 물질량도 개선된 것을 확인함(그림 24-25).
- 혈액 TNF- α , IL-1 β 함량과 COX-1, COX-2 발현이 유의적으로 감소시킴(그림 26-28).

제 3 절. 폐경기 골다공증 동물모델에서 발효 톳 추출물의 효능(그림. 32-39)

- 동물모델에서 control에 비해 발효 톳 추출물 투여군에서 골밀도 값이 증가한 것을 확인

함

- CT 결과에서 control에 비해 발효 톳 추출물 투여군에서 해면골의 형성이 더 일어난 것을 확인
- 또한 골형성지표인 osteocalcin의 발현이 증가하고, 골흡수지표인 C-telopeptide x (CTX)가 감소한 것을 확인함.

제 3 장. 발효 톳시료를 이용한 임상시험용 시제품 제작

제 1 절. 임상시험용 제형의 제조 공정 확립 및 제형 개발 연구

- 발효 톳 추출물의 대량생산 표준 제조공정을 확립함(그림 40).
- 건조감량 및 용해성을 통해 발효 톳의 기본 물성 확인함(page 88).
- 부형제와의 compatibility 확인함(page 89).
- 제형 연구: 건강기능식품에서 가장 많이 선호되는 제형인 경질캡슐로 개발함(page 90-91).
- 제형 안정성 확인 : 건조감량 및 붕해도를 관찰하여 안정성을 확인함(page 94-95).

제 2 절. 골관절 기능 개선 기능성식품 임상시험용 제형 연구

- 약효와 제형의 연관성 연구 : 기능성분의 빠른 흡수를 위하여 캡슐제 형태의 제형을 선택 함(page 96).
- 임상 시험용 제품의 제형의 제조공정을 확립함(page 98-100).
- 임상시험용 제형의 안정성 확인 : 가속시험을 진행하여 물성변화를 2개월간에 걸쳐 관찰한 결과, 물성의 변화가 없는 것을 확인 (page 102).
- 임상시험용 제품 내에 함유된 8종의 영양성분을 분석함(그림 53).

제 4 장. 발효 톳 추출물의 기준 및 시험법 확립 및 안전성 평가

제 1 절. 발효 톳 추출물의 기준 및 시험방법

- 발효 톳 추출물의 지표물질로는 푸코스테롤, 푸코이단의 2가지를 선정하였고, 분석법은 대한약전 및 각종 논문 및 특허 자료를 참고하여 작성함(page 103-110).

제 2 절. 발효 톳 추출물의 안전성 평가

- 단회 경구 투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회(별첨 4.1)
- 5,000 mg/kg 이하의 농도에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체 이상 유발작용은 확인되지 않음(별첨 4.2).
- 5,000 mg/kg 이하의 농도에서 복귀변이 콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않아 유전자 돌연변이 유발성이 없는 것으로 확인(별첨 4.3)
- 5,000 mg/kg 이하의 농도에서 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 미치지 않는 것으로 확인(별첨 4.4)

제 5장. 건강기능성 식품 인가를 위한 임상평가

제 1 절. 골관절 기능 개선 건강기능성 식품 인가를 위한 임상시험 진행(별첨 4.5)

- 골관절 기능 개선 건강기능성 식품 인가에 필요한 임상시험을 12주에 걸쳐 진행
- 골관절염 피험자에게 발효 톳 추출물을 하루 1.8 g씩 12주간 경구 투여하고 100mm VAS, WOMAC등 골관절염 관련 증상의 평가와 객관적인 염증 및 골대사 관련 cytokine들의 분석을 통해 골관절염 증상 개선 효과에 대해 분석한 결과, 투여 후 전반적으로 골관절염 증상이 줄었고 염증지표인 ESR은 대조군에 비해 시험군에서 큰 억제효과를 보이는 등 의미 있는 결과를 보였음.
- 안전성 측면에서 발효 톳 추출물을 하루 1.8 g씩 12주간 경구 투여하여도 이상반응, 실험실 검사 결과 등에서 특별한 이상을 보여주지 않아 안전한 식품소재로 인정함.
- 통계적인 유의성을 확보하기 위하여 좀 더 많은 피험자를 대상으로 시험을 진행하고, 투여기간 및 투여용량에 관하여 적절히 고려한 추가적인 인체적용시험을 필요로 함.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구 성과

1. 논문게재 성과

- 이태후 등. *Panacagrimonas perspica* gen. nov., sp. nov., a novel member of Gammaproteobacteria isolated from soil of a ginseng field. *Journal of Microbiology*. 2010. 국내 SCIE 저널.
- 이태후 등. *Sphingomonas humi* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Journal of Microbiology*. 2011. 국내 SCIE 저널.
- 이태후 등. Solid-phase colorimetric method for the quantification of fucoidan. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012. 국외 SCI 저널.
- 이태후 등. *Hizikia fusiforme* protects against ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Med Food*. 2012. 국외 SCI 저널.
- 이태후 등. Fucosterol from *Hizikia fusiformis* and their proliferation activities on osteosarcoma-derived cell MG63. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2012. 국내 SCIE 저널.

2. 특허 성과

- 이태후 등. 베타-글루코시다아제 활성이 있는 누룩 유래 균을 이용한 해양 유래 천연물의 발효 방법 및 이에 의해 제조된 발효 식품. 2010. 국내특허출원
- 이태후 등. 모자반 추출물을 유효성분으로 함유하는 폐경기후 골다공증의 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품. 2011. 국내특허출원
- 이태후 등. 발효 톳 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 골 질환 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품. 2011. 국내특허출원
- 이태후 등. 푸코스테롤(Fucosterol)을 유효성분으로 함유하는 골관절염 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품. 2012. 국내특허출원

3. 기타 성과

- 기술이전 : 경희대학교 산학협력단 & 이태후생명과학 주식회사. 2012.
- 인력지원 : 석사 1명, 박사 1명
- 언론홍보 1건 : 전북일보. 2011.09.14

제 2 절 성과활용 계획

- 기술이전을 통한 추가 임상 연구 계획 (2013년)
- 고부가가치 상품의 개발에 적용함
 - 효소처리 톱 추출물의 제형을 과립제 이외의 제형으로 확대(2012년)
 - 골관절 기능 개선 식품의 개발(2013년)
- 국내외 판매를 통한 수익 창출(2013년)
- 기술이전을 실시하여 천연물 신약 개발을 위한 연구 진행(2013년, 대기업 OO 생활과학과 공동연구 진행 예정)
- 골다공증 예방형 기능성 식품개발

SUMMARY

I . Title

Development of functional food for bone-related diseases from seaweed

II . Objects of the research and significance

Seaweeds containing sea mustard, sea weed layer and sweet tangle laminaria japonica have been cultivated in Korea and the amount reached 930 thousand tons in 2008. Most have been used in food stuff, but it is not higher value-added business. The phase of marine biotechnology in Korea is just beginning. Therefore, marine biotechnology to make higher value-added product from seaweed will help fishing villages to make money.

Current medicines include green algae(*Fulvescens*, Parlay), brown algae(Kelp, Seaweed, Hizikia, Sargassum), red algae(*Gelidium*, Laver) has been used. Of these, Hizikia produced domestically accounted for approximately 7% of algal production. And Hizikia is an important source of income for fishermen. In Korea, Hizikia production is that Jeju Island (7.7%) and Wando (88%). After Fukushima nuclear crisis in Japan, the price of seaweed and kelp are rising. However, price gains of hizikia had not much. Therefore, the development of high value products with Hizikia was very advantageous in industry.

Advances in medicine make human live longer and then, there has been interest in metabolic and degenerative diseases. Among them, the research on bone-related diseases high-rating in developed countries has been extensively done.

In the field of conventional drugs BIOS(Merck) and Bextra(Pfizer Inc.) were used for arthritis. GSK(GW-406381) and Novartis(Prexige) had a Safety-enhanced COX-2 inhibitor drug development was going on in the series. NSAIDs had basically not regeneration of cartilage and had long-term administration side effects.

In addition, the case of Korea, joint disease-related functional food market had that glucosamine have been reported up to 1 thousand billion won in 2009 year. However, in 2010, Korea Health and Medical Research Institute reported that the no efficacy of glucosamine for osteoarthritis. After that, Health functional food market associated with glucosamine was shrinking.

In addition to eliminating the risk factors to these diseases, the balance between absorption and formation of bone is very important. Hence, needs for drugs with efficacies and without side effects has been increased. Therefore, this study aimed to develop the functional materials from seaweed to be safe and evaluated for efficacies against

bone-related diseases. This may help to expand domestic market and secure national competitiveness.

III. Scope of research

Chapter 1. Screening of function food materials and manufacturing process from seaweeds.

Section 1. Examination seaweeds for prophylaxis potentials against bone-related diseases.

- Collecting seaweeds and making their water extracts.
- In vitro tests for anti-oxidative activity with DPPH and osteoblast cell (MG63) proliferation.

Section 2. Standardization for manufacturing process and establishment of reference compounds

- Determination of conditions to eliminate As and quantification of amounts of As and other minerals.
- Determination of extraction processing methods.
- Activity-guided fractionation with osteoblast cell (MG63) proliferation and anti-inflammation through nitric oxide activated by lipopolysaccharide.
- Establishment and identification of reference compounds.

Chapter 2. Search of fermented Hizikia. extract on bone-related effects

Section 1. Anti-inflammatory effects of extracts of fermentation Hizikia(*in vitro* assays).

- Fermented Hizikia extracts confirmed the inhibition of NO production
- Fermented Hizikia extracts for anti-inflammation effect like COXs, TNF- α and IL-1 β .
- Fermented Hizikia extracts for mineralization effects on MG63 cell

Section 2. Efficacies in osteoarthritis model induced by mono-idoacetate (MIA)

- Weight bearing test
- Micro CT, Histology
- Biomarkers in serum like COXs, TNF- α , and IL-1 β .

Section 3. Efficacies in osteoporosis model induced by ovariectomy

- Bone mineral density
- Micro CT, Histology
- Biomarkers in serum like Osteocalcin & CTx.

Chapter 3. Manufacturing prototype for functional foods from seaweeds.

Section 1. Establishment of the manufacturing process

- Examination of characteristics of standardized extract
- Establishment of standard manufacturing process

Section 2. Formulation of research

- Formulation of capsule
- Stability test of capsule
- Nutrition contents

Chapter 4. Establishment of Criteria / Test Methods and Evaluation of safety test

Section 1. Establishment of Criteria / Test Methods

- Specifications
- Test methods for standardization

Section 2. Evaluation of safety test

- Single dose toxicity test
- Chromosomal aberration test
- Ames test
- Micronucleus test

Chapter 5. Human research study

- Single institution, randomized, double-blind, placebo human research
- Efficacy tests (VAS, WOMAC)
- Cytokines in serum
- Safety evaluation

IV. Results

Chapter 1. Screening of function food materials and manufacturing process from seaweeds.

Section 1. Examination seaweeds for potentials prophylaxis against bone-related diseases.

- Collected 63 kind of seaweed and made its extracts with hot water(page 25).
- Examined the activities of water extracts for anti-oxidation with DPPH(page 26-27).
- Examined the activities of water extracts for bone-related diseases via proliferation of osteoblast cell(page 28-29).
- In addition to biological activities, Hizikia fusiforme was selected with regard to

intellectual property, published papers, supply and demand of raw stuff, and possibility to develop a functional food(page 30).

Section 2. Standardization for manufacturing process and establishment of reference compounds

- Arsenic (As) is known to exist in organic compounds, arsenobetaine, but the process for removal was optimized. The treatment in boiled water for 5 min efficiently reduced the content of As in the extract lower than provisional tolerable weekly intake (PTWI)(page 31-34).
- Solid fermentation supplemented with malt and commercial enzymes promoted the growth of *Aspergillus* and increased the proliferation of osteoblast cell (MG63). With regard to industrialization, usage of enzymes was selected as standard process(page 35-41).
- For establishment of reference compounds, activity-guided fractionation was done with activities to proliferate osteoblast and reduce the amount of nitric oxide activated by lipopolysaccharide (anti-inflammation)(page 35-41).
- The compounds of phlorotannin were revealed to have proliferative effect on osteoblast cells and anti-oxidative activity. The major compound was revealed to be fucosterol, which is selected as reference compounds. Fucoidan was also selected because it has been known to have immunomodulating activity(page 42-50).

Chapter 2. Search of fermented *Hizikia* extracts on bone-related effects

Section 1. Anti-inflammatory effects and stimulating of bone formation of extracts of fermentation *Hizikia*(*in vitro*).

- Fermented *Hizikia* extracts showed the inhibition of NO production(Figure 17).
- The standardized extract from *Hizikia fusiforme* also showed the anti-inflammation effects through the reduced expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β , and pro-inflammatory enzymes such as COX-1 and COX-2(Figure 18-19).
- Fermented *Hizikia* extracts was known to stimulate bone-formation *in vitro* markers such as mineralization(Figure 20).

Section 2. Efficacies in osteoarthritis model induced by mono-idoacetate (MIA)

- The oral administration of the standardized extract improved the behavior in osteoarthritis model induced with mono-idoacetate (MIA), reflected from weight bearing test(Figure 22). The loaded burden on lesional foot induced with MIA was increased by oral administration of the Fermented *Hizikia* extracts. This means the severity of osteoarthritis was alleviated.
- Micro computerized tomography (μ CT) showed that the bone surface in part of

cartilage in rat administered with Fermented Hizikia extracts was smooth more than control. The result of μ CT said that Fermented Hizikia extract has the efficacy against osteoarthritis(Figure 23).

- Histologies with Hematoxylin and Eosin staining, toluidin blue, and safranin O showed that the oral administration of Fermented Hizikia extract exerted prophylactic influences with regard to the degree of degeneration of cartilage, abnormal phenotype of cells, and extent of cartilage substance(Figure 24-25).
- Biomarkers in serum were also affected toward positive direction. Fermented Hizikia extracts reduced the amount of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β . Also pro-inflammatory enzymes such as COX-1 and COX-2 was reduced(Figure 26-28).

Section 3. Efficacies in osteoporosis model induced by ovariectomy(Figure 32-39).

- The oral administration of Fermented Hizikia extract improved the bone mineral density and the amount of trabecular bone in osteoporosis model induced by ovariectomy. This was confirmed with Mason's trichrome staining.
- The biomarkers of bone formation (osteocalcin) and absorption (C-telopeptide, CTx) was heightened and lowered by oral administration of Fermented Hizikia extract, respectively.

Chapter 3. Manufacturing prototype for functional foods from seaweeds.

Section 1. Establishment of the manufacturing process

- The standard manufacturing process for mass production has been established(Figure 40).
- Determine the basic properties(page 88)
- Compatibility with excipients(page 89)
- Stability test of Fermented Hizikia extract(page 94-95)

Section 2. Formulation of research

- The formulation of granules was developed(page 96).
- The results of two months accelerated testing confirmed no change in physical properties(page 101).
- Nutrition contents analysis were shown in Figure 53.

Chapter 4. Establishment of Criteria / Test Methods and Evaluation of safety test

Section 1. Establishment of Criteria / Test Methods

- Specifications and test methods for standardization has been established(page 103-110).

Section 2. Evaluation of safety test

- Single dose toxicity test using rat showed that lethal dose is over 5,000 mg/kg(Appendix 4.1).
- Chromosomal aberration test using Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell was negative at concentrations less than 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Appendix 4.2).
- Ames test using auxotrophic *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* was negative at concentrations less than 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Appendix 4.3).
- Micronucleus test was negative at concentrations less than 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Appendix 4.4).

Chapter 5. Human research study(Appendix 4.5).

- Hard capsules containing 200 mg standardized extract/capsule were packed with maltodextrin, microcrystalline cellulose, caramel, stearic magnesium, and herbal flavor
- Appearance and loss on drying at 105°C for 1 h was stable for 2 months. But crumbling took longer time 2 months after storage
- Double placebo human research (66 case) was designed to take a dose of 800 mg standardized extract per day

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	19
Section 1. Objective and Significance.....	19
Section 2. Research status in domestic and aboard.....	23
Chapter 2. Screening of function food materials and manufacturing process from seaweeds	25
Section 1. Examination seaweeds for potentials prophylaxis against bone-related diseases.	25
Section 2. Standardization for manufacturing process and establishment of reference compounds.....	31
Chapter 3. Search of fermented Hizikia. extract on bone-related effects	51
Section 1. Anti-inflammatory effects and stimulating of bone formation of extracts of fermentation Hizikia	51
Section 2. Efficacies in osteoarthritis model induced by mono-idoacetate (MIA).....	59
Section 3. Efficacies in osteoporosis model induced by ovariectomy.....	71
Chapter 4. Manufacturing prototype for functional foods from seaweeds.....	86
Section 1. Establishment of the manufacturing process.....	86
Section 2. Formulation of research.....	96
Chapter 5. Establishment of Criteria / Test Methods and Evaluation of safety test.....	103
Section 1. Establishment of Criteria / Test Methods.....	103
Section 2. Evaluation of safety test.....	111
Chapter 6. Human research.....	133
Chapter 7. Contributions to Related Technologies.....	152
Chapter 8. Application of Results.....	153
Chapter 9. References.....	157

목 차

제 1 장 서론.....	19
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성.....	19
제 2 절 국내외 기술개발 현황.....	23
제 2 장 천연 해조류의 건강 기능성 식품 소재 및 생산 공정의 탐색.....	25
제 1 절 해조류 소재의 확보 및 항산화, 골 관련 활성 screening.....	25
제 2 절 확보된 소재(톡)의 최적 생산 processing 확립 및 톡의 지표물질 검색.....	31
제 3 장 발효 톡 시료의 골 관련 효능 검색.....	51
제 1 절 발효 톡 추출물의 항염 활성 및 골형성 촉진 확인(<i>in vitro</i>).....	51
제 2 절 퇴행성 골관절염 치료 기능을 확인하기 위한 <i>in vivo</i> 핵심 biomarker 분석.....	59
제 3 절 폐경기 골다공증 치료 기능을 확인하기 위한 <i>in vivo</i> 핵심 biomarker 분석.....	71
제 4 장 발효 톡 시료를 이용한 임상시험용 시제품 제작.....	86
제 1 절 임상시험용 제형의 제조 공정 확립.....	86
제 2 절 골관절 기능 개선 기능성식품 임상시험용 제형의 연구.....	96
제 5 장 발효 톡 시료의 기준/시험법 연구 및 안전성 평가.....	103
제 1 절 골관절 개선 기능성식품의 표준화를 위한 자료 및 기준 및 시험방법 연구.....	103
제 2 절 건강기능성 식품 인가를 위한 임상시험용 제품의 안전성 평가 확인 연구.....	111
제 6 장 건강기능성 식품 인가를 위한 임상평가.....	133
제 7 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	152
제 8 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	153
제 9 장 참고문헌.....	157

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

1. 기술적 측면

최근 지구온난화, 해양오염, 해양생태계 파괴 등 환경에 대한 우려가 증가하면서 학자들이 해조류의 기능과 활용방안을 발표하고 있다. 예를 들면 해조류가 이산화탄소 흡수 능력이 매우 뛰어난 것으로 조사되었고, 수중의 유기물을 흡수하고 환경을 정화시키는 기능도 갖고 있다. 아울러 해조류 서식지는 어류가 산란하거나 치어 등이 생육하는 중요한 장소이기도 하다. 또한 우리나라는 기후변화 협약을 담고 있는 교토의정서 발효 이후 온실가스 감축 의무를 부과 받을 것으로 예상되고 있어 이에 대비한 탄소 흡수원 개발도 필요하다. 그러나 좁은 국토 여건상 육상의 숲 조성을 통한 탄소 흡수는 한계가 있기 때문에 바다 숲 조성이 대안으로 주목받고 있다.

해조류 중 현재 한약으로 사용되고 있는 소재로서 매생이, 파래와 같은 녹조류, 다시마, 곶피, 부채말, 미역, 툇, 모자반류를 포함하는 갈조류, 꼬시래기, 우뭇가사리, 풀가사리, 김, 국수나물류를 포함하는 홍조류가 사용되고 있다. 전통적으로 해조류는 항마취제, 항염증제 활성을 가지며 습진, 통풍, 담석 등을 치료하기 위해 민간요법으로 사용되고 있다. 해조류는 식물성 섬유, 알긴산, 칼슘, 요오드 성분이 풍부하며, 체내의 노폐물과 독성 제거 효능이 뛰어나고 고혈압, 동맥경화 등 각종 성인병을 예방하는 효과가 있으며 항균, 항암, 항산화 등의 생리활성이 있는 것으로 알려져 있다.

고령인구의 증가로 인하여 노인성 질환이 증가하고 있는 추세이며 특히 골관절 질환은 점차로 늘어가고 있다. 이를 개선하기 위한 다양한 식품과 의약품이 개발되고 있으나 흡수장애가 있거나 부작용이 나타나고 있어서 천연물 유래의 부작용이 적고 효과가 뛰어난 골형성 촉진 소재 및 관련 제품의 개발이 시급히 필요한 실정이다.

뼈는 40대 이후 분해되는 (체내로 흡수되는) 양이 형성되는 양보다 점차로 증가하면서 골량이 감소하게 되는데 특히 여성의 경우, 폐경 이후 에스트로젠 분비가 저하되어서 처음 5~10년 사이에 골밀도가 급격히 감소되므로, 굽은 허리 (stooping), 척추후만증 (kyphosis)이 나타나고 뼈가 골절될 위험성이 남성에 비해 현저히 커짐. 남성의 경우에는 노화의 진행과 더불어 성호르몬 분비 감소가 완만하게 진행됨에 따라 골량 감소도 느린 편이다.

골다공증은 골흡수와 골형성에 균형이 깨져 나타나는 질환으로, 골격의 미세한 퇴화 현상에 따른 골량 (bone mass) 감소가 나타나다 결과적으로 뼈를 약하게 하고 골절을 초래함. 즉, 뼈의 화학적 조성에는 변화가 없고, 단위 부피 내의 골량이 감소하여 가벼운 충격에도 쉽게 골절을 일으키는 질환이다.

골다공증을 일으키는 인자로는, 칼슘 부족, 비타민 D의 부족, 과도한 동물성 단백질, Na, 카페인, 섬유질 섭취 및 음주가 있다. 골다공증의 치료를 위해서 이와 같은 유발 인자를 제거하여

주는 한편 골흡수를 억제하고 골형성을 촉진하여 감소된 골량을 회복시키는 것이 중요하다. 현재 FDA에서 공인 받은 골량 회복물질은 estrogen과 calcitonin 뿐으로 estrogen은 투여시기를 적절하게 유지하기 어려워서 유방암, 자궁암, 간질환, 고혈압, 편두통 등 부작용을 낳는다. 따라서 부작용이 적고, 기능성이 검증된 안전한 한방식품을 통해 골형성을 촉진하려는 연구가 진행되고 있는데, 이들 한방식품에는 phytoestrogen이라고 불리는 estrogen 유사 물질들 (플라보노이드, 사포닌)이 있어서 골형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

Rutin, quercetin, quercetin glycoside는 대표적인 flavonoid 성분으로 경구투여 시 항염증작용, 동맥경화 예방, 혈소판 응집억제 효과, 항암효과 등이 있는 것으로 알려져 있다. 이 물질들은 미생물에 의하여 빠르게 대사되어 aglycon인 quercetin으로 전환이 가능하고 궁극적으로는 phenolic acid로 전환된다. Quercetin의 경우, Ames 시험법에 의해 돌연변이성이 강한 것으로 알려져 있어서 문제가 되는데, 미생물에 의해 더 대사되어 돌연변이성이 소실되며 혈소판 응집억제 효과가 우수한 페놀성 화합물인 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid 등으로 전환될 수 있다.

현재까지 보고된 quercetin 전환 미생물로는 *Pediococcus*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Eubacterium* 등이 있으나, 이외에도 누룩곰팡이 (*Aspergillus oryzae*), 홍국 (*Monascus anka*), 누룩세균 (*Bacillus subtilis*), 유산균 (*Lactobacillus sp.*) 등 식품에 존재하며 안전하다고 알려진 (GRAS: Generally Recognized As Safe) 미생물들을 이용한 발효가 가능하다. 이들 미생물들은 발효 시 다른 여러 발효산물을 생산하여 식품의 활성을 향상시키는 것으로 알려져 있다.

해조류는 비소화성 다당류 때문에 식품에 적용이 용이하지 않고 제한적이었으나, 최근 육상식품에 비해 다량의 비타민 및 미네랄, 특히 마그네슘, 칼슘, 요오드, 철 등을 함유하고 있어서 해조류의 trace elements 를 이용한 골형성 대사를 촉진하려는 시도가 있고, 기술적 측면에서 해조류의 생체 내 흡수와 활성을 높이도록 개선하는 것이 시급한 현안이다.

따라서, 해조류의 비소화성 당을 당화시키고, 해조류의 phytoestrogen 성분의 활성을 향상시키면 해조류를 골형성 활성이 증진된 한방소재로 개발할 수 있다. 본 과제는, 해조류 유래 한약소재를 당화와 발효를 거쳐서 골형성 활성이 증진된 소재와 제품으로 개발하고자 한다.

뼈는 40대 이후 분해되는 (체내로 흡수되는) 양이 형성되는 양보다 점차로 증가하면서 골량이 감소하게 되는데 특히 여성의 경우, 폐경 이후 에스트로젠 분비가 저하되어서 처음 5~10년 사이에 골밀도가 급격히 감소되므로, 굽은 허리 (stooping), 척추후만증 (kyphosis)이 나타나고 뼈가 골절될 위험성이 남성에 비해 현저히 커진다. 남성의 경우에는 노화의 진행과 더불어 성호르몬 분비 감소가 완만하게 진행됨에 따라 골량 감소도 느린 편이다.

골관절 질환을 일으키는 인자로는, 칼슘 부족, 비타민 D의 부족, 과다한 동물성 단백질, Na, 카페인, 섬유질 섭취 및 음주가 있다. 이러한 골관절 질환의 치료를 위해서 이와 같은 유발 인자를 제거하여 주는 한편 골흡수를 억제하고 골형성을 촉진하여 감소된 골량을 회복시키는 것이 중요하다. 현재 FDA에서 공인 받은 골량 회복물질은 estrogen과 calcitonin 뿐으로 estrogen은 투여시기를 적절하게 유지하기 어려워서 유방암, 자궁암, 간질환, 고혈압, 편두통 등 부작용을 낳는다. 따라서 부작용이 적고, 기능성이 검증된 안전한 한방식품을 통해 골형성을 촉진하려는 연구가 진행되고 있는데, 이들 한방식품에는 phytoestrogen이라고 불리는 estrogen 유사 물질들 (플라보노이드, 사포닌)이 있어서 골형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

우리나라의 경우 약 4000여 종의 식물자원을 이용하여 전통약물에 대한 노하우 및 과학적 기반기술 및 우수한 인력인프라를 이용하여 천연물 의약 및 기능성제품에 대한 연구가 활발하게

이루어지고 있다. 하지만, 현재 국내에서 진행되고 있는 천연물소재의 골관절 질환에 대한 연구는 가시오가피, 우슬 등의 한약재를 포함하는 생약복합제제가 주류를 이루고 있다.

2. 경제·산업적 측면

우리나라 해조류 양식은 미역, 김, 다시마를 중심으로 발전하였는데, 2008년 우리나라의 해조류 생산량은 약 93만 톤이었다. 현재 해조류 총생산량 중 전복 먹이용을 제외하고는 대부분 식용으로 소비되고 있다. 그러나 식용 해조류 시장이 확대될 여지는 제한적이며, 전복양식도 공급 과잉 우려가 제기되고 있어 먹이용 수요 증가도 크게 기대하기 힘든 상황이다. 또한 이들 수요가 늘어난다고 하더라도 해조류 양식은 1차 산업으로서 높은 부가가치를 창출하는 데에는 한계가 있다.

또한, 현재 우리나라의 경우 해조류를 이용한 바이오 산업화는 시작 단계라 할 수 있다. 왜냐하면 해조류를 이용한 바이오 산업화를 이루기 위해서는 가장 기본이 되는 것이 제품의 원료와 원료를 이용하여 제품을 만들 수 있는 기술인데, 해조류 바이오산업화 관련된 기술 수준이 아직 초보단계이기 때문이다. 특히, 해조류 대량양식에 비하여 바이오에너지 및 고부가가치 물질 생산에 적합한 해조류의 종류, 전처리·당화 공정, 생산 공정에 대한 기초자료 및 연구가 현재로서는 미흡한 실정이다. 따라서 해조류에 대한 연구를 체계적으로 진행하여 새로운 바이오산업의 원료로 활용한다면 해조류의 양식생산은 증가할 것이고, 어가의 소득 증진에도 큰 도움을 줄 수 있을 것이다.

흡수가 용이하고 효능이 뛰어난 골질개선 소재는 친환경 웰빙 concept에 맞는 제품 소재로서 소비자들의 선호도가 증가할 것이며 동시에 관련제품의 수입을 대체하고 고부가가치 제품이나 소재로서 수출을 할 수 있다.

현재 우리나라의 톳의 생산지는 주로 제주도(7.7%)와 완도(88%)이며, 우리나라는 톳 생산량의 대부분을 1차 생산품위주의 제품으로 90% 이상을 일본으로 수출하고 있으며 일본의 경우 톳 수입량의 76.2%를 한국에서 수입하고 있다. 일본에서의 후쿠시마 원전사태 이후 특히 미역과 다시마의 국제가격이 폭등하고 있는 반면 톳은 상대적으로 가격 상승폭이 적은편이어서 장기적으로 톳의 고부가가치 제품화는 산업적으로 매우 유리한 편이다.

관절염에 사용되는 기존 치료제 분야에서는 최근 머크사의 바이옥스와 화이자 사의 벡스트라의 회수조치로 관절염 치료제 시장이 위축되긴 했으나 GSK 사의 GW-406381과 노바티스사의 프렉시즈 등 안전성을 강화시킨 COX-2 저해제 계열의 유망 신약 개발이 속속 진행되고 있는 상태이지만, 아세트아미노펜이나 트라마통과 같은 진통제 및 COX-2 저해제를 포함하는 NSAIDs 계 약물이 주로 사용되고 있으며 이들 대부분은 근본적인 연골재생이 불가능하고 장기 투여시 부작용을 일으키므로 주의가 필요하다. 실제로 최근 MSD사의 관절염치료제인 바이옥스의 경우 심각한 부작용이 밝혀짐에 따라 시장에서 철수되어 진통소염제에 대한 경각심을 높이고 있다.

또한 우리나라의 경우 골관절 질환 관련 기능성식품 시장은 글루코사민을 중심으로 2009년을 기준으로 연간 1천억 원에 이르는 것으로 보고되어 있다. 하지만, 2010년 한국보건의료연구원이 공개한 글루코사민과 콘드로이틴 제제 사용현황 조사와 평가 보고서에 글루코사민의 골관절염에 대하여 효능이 없다는 보고가 있는 후에 글루코사민과 관련된 건강기능식품 시장이 위축되고 있는 실정이다.

현 기능성식품 시장현황에서 국내산 천연의 해조원료를 첨가물 없이 고기능을 발현할 수 있도록 한 청정성이 강화된 제품을 이용한 건강기능성 식품을 개발한다면 소비자에게 강력한 어필과 동시에 구매 욕구를 자극시킬 수 있어서 산업적으로 성공가능성이 매우 높으며 결과적으로 관련 해양 수산산업 기반을 튼튼하게 하는 효과가 있다.

3. 사회·문화적 측면(공공성 포함)

최근 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 건강과 몸을 강조하는 “Well-Being”이 강조 되면서 소비자들의 관심이 건강기능성 식품 쪽으로 확대되고 있다. 특히, 의학기술 등의 발달로 평균 수명이 길어져서 각종 성인병 및 퇴행성질환에 대한 관심이 크게 증가하고 있다. 퇴행성질환 중에서도 선진국 등에 유병율이 높은 골대사 관련 질환에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

고령인구의 증가로 인하여 노인성 질환이 증가하고 있는 상황에서 기존의 부작용이나 흡수장애를 뛰어넘는 골질 개선 식품과 의약품의 개발이 점점 요구되고 있음. 중년이후의 삶이 길어지고 실질적으로 현대 여성의 삶 중에서 1/3을 폐경 후 갱년기로 보내게 되므로 이 시기의 삶의 질을 향상시킬 수 있다.

4. 연구개발의 필요성 종합

고령인구의 증가로 인하여 노인성 질환이 증가하고 있는 추세이며 특히 골관절 질환은 점차로 늘어가고 있다. 이를 개선하기 위한 다양한 식품과 의약품이 개발되고 있으나 흡수장애가 있거나 부작용이 나타나고 있어서 천연물 유래의 부작용이 적고 효과가 뛰어난 골형성 촉진 소재 및 관련 제품의 개발이 시급히 필요한 실정이다. 지구온난화, 해양오염, 해양생태계 파괴 등 환경에 대한 우려가 증가하고 기후변화 협약을 담고 있는 교토의정서 발효 이후 온실가스 감축 의무를 부과 받을 것으로 예상되고 있어 이에 대비한 탄소 흡수원 개발도 필요하다. 그러나 좁은 국토 여건 상 육상의 숲 조성을 통한 탄소 흡수는 한계가 있기 때문에 바다 숲 조성이 대안으로 주목받고 있다. 2008년 우리나라의 해조류 생산량은 약 93만 톤이었으며 전복 먹이 이용을 제외하고는 대부분 식용으로 소비되고 있다. 따라서, 해조류를 이용한 기능성 식품 개발을 통하여 내수 기반 구축 및 대외 수출 경쟁력을 확보함으로써 새로운 시장을 개척하는 기반을 만들 필요가 있다.

이에 따라, 본 연구에서는 국내산 해조류를 이용한 골관절 질환 개선 기능성 식품 개발 연구의 일환으로 1차년도에는 국내산 해조류 60여 종을 이용하여 골관절 질환의 효능을 탐색하여 기능성 식품으로의 개발 가능성이 있는 해조류를 선택하는 연구를 진행하였으며, 2차년도에는 1차년도에서 선택한 해조류인 톳을 이용하여 발효 등의 방법을 통하여 기능성을 증가 시키는 것을 확인하고, 발효 톳의 기능성분 및 그 추출 조건 등을 설정하였으며, 3차년도에는 발효 톳의 대량생산 공정의 확립 및 발효 톳 추출물을 이용한 골관절 기능성 식품을 제조하여 식품의약품안전청에 건강기능성 식품 인가를 받기 위하여 필요한 안전성 평가 및 임상시험 평가를 진행하였다.

제 2 절 국내외 기술개발 현황

가. 국내기술동향

제주대학교 연구진이 2004년 출원한 특허에 따르면 제주도 일대에 자생하는 홍조류인 꼬시래기 추출물을 유효성분으로 함유하여, 파골세포의 증식 및 분화를 촉진하는 사이토카인 (IL-1, TNF-a, IL-6 등)의 생성을 저해하는 것을 확인하여, 이는 골다공증을 포함한 골대사성 질환의 예방 및 치료용 의약품 또는 건강기능식품으로 이용할 수 있음을 제시하였다.

건국대학교 연구진이 2005년에 출원한 특허에 따르면 서목태와 황금 추출물을 유효성분을 포함하고, 이에 미역, 다시마 등의 갈조류를 첨가하여 조골세포의 증식 촉진 및 실험동물의 골밀도가 증가하는 것을 확인하였다.

부경대학교 연구진은 녹조류의 하나인 매생이 추출물을 이용하여 골조직의 구성성분 중 콜라겐과 콜라겐 가교물질인 피리디놀린 및 디옥시피리디놀린의 연골 중의 함량을 증가시키는 것을 확인하여 골다공증에 적용할 수 있음을 보여주었다.

나. 국외기술동향

미국, 유럽, 일본에서는 골형성 촉진 소재로서는 대두에서 추출한 이소플라본 유도체 (플라보노이드 성분의 하나임)를 대량 추출하는 방법을 이용하여 기능성 건강보조식품으로써 사용되고 있는 실정이다.

또한, 대부분의 해조류가 다량의 칼슘과 미네랄을 함유하고 있어서 골질 형성에 도움을 줄 뿐 아니라 골성장에도 많은 영향을 준다고 알려져 있어 식품으로 사용되고 있다.

다. 향후 전망

최근 비소화성 다당류가 다량 함유되어 있어 열량소로서의 큰 각광을 받지 못하여 관심을 받지 못 하던 해조류가 최근 육상식물에 비해 다량의 비타민 및 미네랄, 특히 마그네슘, 칼슘, 요오드, 철 등을 함유하고 있는 것으로 밝혀지면서 이에 대한 관심이 증가하고 있다.

이러한 관심의 증대와 함께, 독특한 구조적인 특성으로 생리활성이 강한 물질로 알려지고 있는 해조류를 구성하는 다당류에 대한 관심도 증대되어, 해조류를 통해 건강장해를 해결하려는 시도가 활발하게 진행되고 있으며 관련 시장 규모도 매년 20% 이상의 성장 추세에 있다.

이런 소재는 대부분 다량의 칼슘과 미네랄을 함유하고 있어서 골질 형성에 도움을 줄 뿐 아니라 골성장에도 많은 영향을 준다고 알려져 있어 한약으로 뿐만 아니라 식품으로 사용되고 있는 소재들이다.

현재까지 해조류를 이용한 제품개발 관련연구는 많이 되고 있는데 예를 들면 다시마의 경우는 동물실험결과 다시마 식이가 대퇴골의 칼슘함량과 강도를 높여주는 것으로 나타나 다시마가 뼈의 칼슘흡착을 도와주는 것으로 보고되었다.

그러나 해양유래 한약소재는 상대적의 보관 및 가공 그리고 제품화가 용이하지 않으며 필요한 성분의 인체 내에서 흡수도 상대적으로 쉽지 않은 경향이 많이 있어서 발효를 통하여 보다

흡수가 용이하면서도 효과가 좋은 발효를 이용한 해양유래 골관절 관련 기능 개선 기능성소재 및 제품을 개발하는 것이 필요하다.

라. 기술동향 분석 결론

본 과제 수행을 통하여 도출되는 해양유래 한약소재는 상대적의 보관 및 가공 그리고 제품화가 용이하지 않으며 필요한 성분의 인체 내에서 흡수도 상대적으로 쉽지 않은 경향이 많이 있어서 발효를 통하여 보다 흡수가 용이하면서도 효과가 좋은 발효를 이용한 해양유래 골형성 촉진 소재 및 제품을 개발하는 것이 필요하다.

제 2 장 천연 해조류의 건강 기능성 식품 소재 및 생산 공정의 탐색

제 1 절 해조류 소재의 확보 및 항산화, 골 관련 활성 screening

1. 해조류 유래 한약소재 확보

문헌자료와 선행연구를 토대로 참여기업인 (주)아쿠아그린텍의 도움을 받아 국내산 해조류의 시료를 제조 의뢰 하여 국내산 해조류 시료 63 종(녹조류 12종, 갈조류 26종, 홍조류 25종)을 확정지었다.

확보된 해조류 시료는 건조중량의 10배 부피의 D.W.를 이용한 열수추출 후, 동결 건조하였다. 건조된 시료는 100 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹여 활성 검색에 사용하였다.

표 1 선별된 국내산 해조류 시료 리스트

No.	녹조류		B-20	Sagassum piluliferum	구슬모자반
G-1	Codium fragile	청각	B-21	Pachydictyonsp.	참가죽그물바탕말
G-2	Codium contractum	몽우리청각	B-21	Pachydictyonsp.	참가죽그물바탕말
G-3	Chaetomorpha linum	실염주말	B-22	Papenfussiella kuromo	연두털말
G-4	<i>μlva</i> conglobata	모란갈파래	B-23	Dictyopteris prolifera	갯뼈대그물말
G-5	<i>μlva</i> pertusa	구멍갈파래	B-24	Scytosiphon lomentaria	잘록이고리매
G-6	Enteromorpha compressa	납작파래	B-25	Desmarestia tabacoides	담배산말
G-7	Enteromorpha sp.	엔터로	B-26	Ecklonia cava	감태
G-8	Enteromorpha prolifera	파래	No.	홍조류	
G-9	Enteromorpha linza	임파래	R-1	Gracilaria textorii	앞꼬시래기
G-10	Enteromorpha intestinalis	창자파래	R-2	Gracilaria verrucosa	꼬시래기
G-11	Monostroma nitidum	참홀파래	R-3	Grateloupia elliptica	참도박
G-12	Caplerpa oKamurae	옥덩쿨	R-4	Grateloupia lanceolate	가는개도박
No.	갈조류		R-5	Sinkoraena lancifolia	털지누아리
B-1	Dictyota dichotoma	참그물바탕말	R-6	Bonnemaisonia hamifera	참갈고리풀
B-2	Hydroclathrus clathratus	그물바구니	R-7	Grateloupia filicina	빈참지누아리
B-3	Myelophycus simplex	바위수염	R-8	Capopeltis affinis	참까막살
B-4	Ishige okamurai	패	R-9	Laurencia okamurae	쌍발이서실
B-5	Ishige sinicola	넓패	R-10	Chondria cassicaμlis	개서실
B-6	Leathesia difformis	바위두릅	R-11	Ahnfeltiopsis flabelliformis	부챗살
B-7	Enderachne binghamiae	미역쇠	R-12	Lomentaria catenata	마디잘록이
B-8	Undaria pinnatifida	말미역(미역)	R-13	Pterocladia capillacea	큰개우미; 개우무
B-9	Hizikia fusiforme	톳	R-14	Prionitis cornea	붉은까막살
B-10	Laminaria ochotensis	다시마	R-15	Gloiopeltis furcata	불등풀가사리
B-11	Sargassum thunbergii	지층이	R-16	Chondrophycus undμlatus	흑서실
B-12	Colpomenia sinuosa	불레기말	R-17	Schizymenia dubyi	갈래잎
B-13	Sargassum fμlvellum	모자반	R-18	Gelidium amansii	우뭇가사리
B-14	Petrospongium rugosum	바위주름	R-19	Scinaia okamrae	매끈껍질
B-15	Sargassum horneri	잇바디괭생이모자반	R-20	Lithophyllum okamurai	흑돌잎
B-16	Sargassum coreanum	큰잎모자반	R-21	Chondrus crispus	주름진두발
B-17	Sargassum siliquastrum	짜배기모자반	R-22	Martensia denticμlata	비단망사
B-18	Myagropsis myagroides	외톨개모자반	R-23	Acrosorium flabellatum	부채분홍잎
B-19	Padina arborescens	부챗말	R-24	Polysiphonia japonica	왜떨기나무
			R-25	Phacelocarpus japonica	평꼬리풀속

2. 해조류 소재의 항산화 활성 검증

DPPH radical scaviging 결과, 갈조류의 바당말, 툇, 패류, 모자반류 는 약 30% 감태는 80% 이상의 높은 항산화 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었고 홍조류에서는 쌍발이 서실, 부채분홍잎 및 왜떨기나무 붉은실이 60% 이상 높은 항산화 활성을 보이는 것을 확인하였다.

2.1. 해조류 소재의 항산화 활성 검증 방법

확보된 국내산 해조류 추출물 시료 63종을 이용하여 항산화 관련 효능 검색을 위하여 DPPH assay를 실시함. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 자유 라디칼의 하나로 DPPH 라디칼이 제거되는 시험물질의 환원력을 확인함으로써 항산화 효능 검증의 방법으로 사용되고 있다.

환원된 DPPH의 양을 분광광도계(Precision microplate reader; Molecular Devices, VersaMax)를 이용하여 520nm에; 흡광도를 측정하여 시료를 가하지 않는 대조군과 활성을 비교 하였으며 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Inhibition} = [(\text{Control OD} - \text{Sample OD}) / \text{Control OD}] \times 100$$

2.2. 해조류 소재의 항산화 활성 검증 확인

본 연구진이 확보한 국내산 해조류 추출물 시료 63종을 이용하여대한 항산화 활성을 검증하였다. 항산화활성 검증 결과, 수종의 녹조류에서 약간의 활성을 검증하였으나 본과제의 목표하는 바인 제품화를 염두에 두어 생리활성은 조금 떨어지지만 기후변화로 인하여 제주의 해조류 생태계가 급격하게 녹조류로 바뀌고 있다는 현실을 감안하여 녹조류를 연구 소재로 선정하기로 하고 검토한 결과 양산이 가능한 소재인 구멍갈파래를 추가적인 생리활성 검토를 하는 후보물질로 선정하였다.(그림 1.)

그리고, 26종의 갈조류에 대한 항산화 활성 검증 결과, 툇, 다시마, 모자반, 파배기모자반, 담배산말, 감태 6종의 갈조류에서 양호한 활성을 검증하였다. 이중 본 과제가 목표로 하는 산업화에 초점을 맞추어 양산 가능한 갈조류인 툇, 다시마, 모자반, 감태 의 4종에 대하여 우수한 생리활성 가능소재로 선정하였다.(그림 1.)

또한, 25종의 홍조류에 대한 항산화 활성 검증 결과, 서실, 왜떨기나무, 부채분홍잎 3종의 홍조류에서 양호한 활성을 검증하였다.(그림 1.)

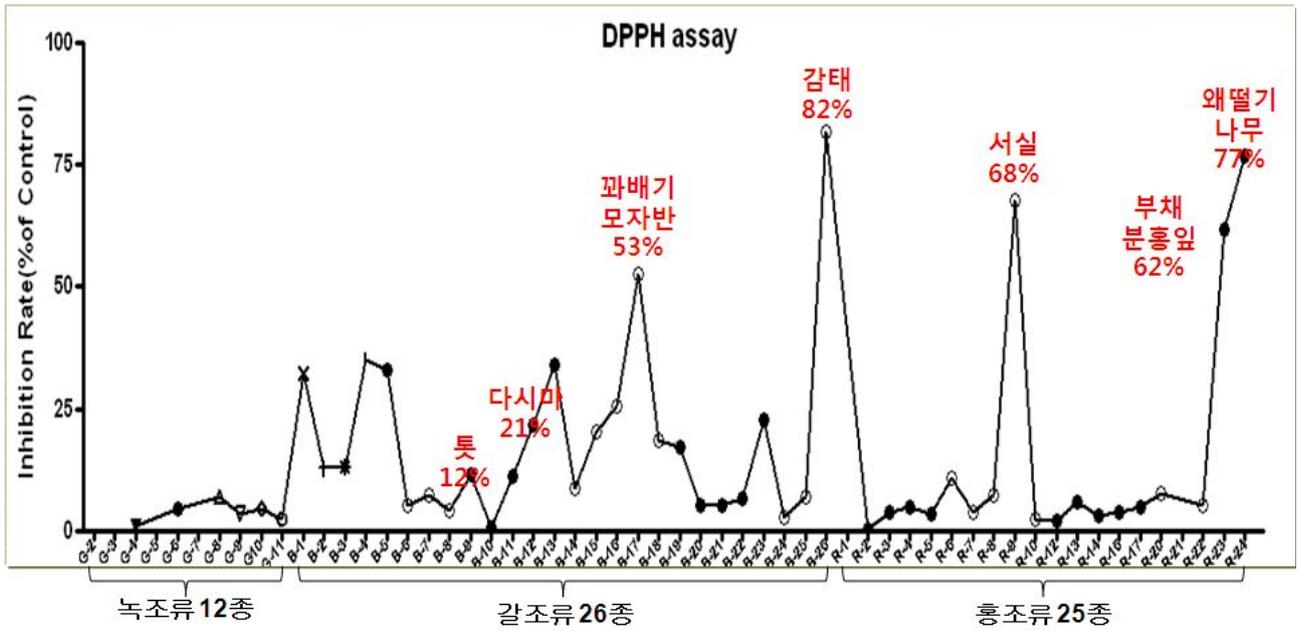


그림 1. 63종 해조류 소재의 DPPH radical 소거 활성 검증

12종의 녹조류 중 구멍갈파래, 26종의 갈조류 중 톳, 다시마, 모자반, 감태의 4종, 25종의 홍조류 중 서실, 왜떨기나무, 부채분홍잎 3종에서 DPPH radical 소거 활성이 우수한 것을 확인함

3. 해조류의 골형성 능력 생리 활성의 검증

녹조류에 비해 갈조류 및 홍조류에서 비교적 좋은 조골세포 증식 활성을 갖는 시료를 더 많이 확인할 수 있었으며 효능이 우수한 순으로 10종을 선별하였다. 이들의 조골세포 증식 효능 순서는 모자반 > 담배산말 > 외톨개모자반 = 툃 = 감태 > 참갈고리풀 > 개우무 > 흑서실 > 부채분홍잎 > 다시마의 순이나 항산화 활성 및 조골세포 증식 효능을 기반으로 하여 해조류 시료 확보의 용이성 및 경제성을 고려하여 다시마, 모자반, 툃, 구멍갈과래를 중점 시료로 선별하였다.

3.1. 해조류 소재의 골형성 능력 생리 활성 검증 방법

3.1.1. 조골세포 활성 세포의 배양 방법

Human osteoblastic cell 인 MG-63 cell 은 한국세포주은행(서울대학교 의과대학, Korea)에서 분양 받아 연구실에서 계대배양 하여 사용하였다. MG-63 human osteoblast 세포를 세포 배양 접시에 부착시키고 penicillin 및 streptomycin 이 함유된 1% antibacterial-antifungal solution (PAA, Canada)과 10% FBS (PAA, Canada)를 첨가한 DMEM (PAA, Canada)을 사용하여 배양하였다. 배양액은 2~3일에 한번 씩 교체하며, cell seeding 시 세포를 혼합한 배지와 Tryphan blue 용액을 1:1로 혼합하여 hemocytometer 를 이용하여 tryphan blue 에 의해 염색되지 않은 살아 있는 세포를 계수하였다. MG-63 cell 의 배양 시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 5% CO₂를 계속 공급하였다.¹⁾

3.1.2. 조골세포 활성 확인 방법 (MTT assay)

Osteoblast의 증식 측정은 단시간에 대량 검색이 가능한 MTT colorimetric assay 방법 (EZ-CyTox, Daeil-Lab Co., Korea)을 사용하여 측정하였다. 96-well plate(ISS, Korea) 2판에 2×10^3 cells/well 로 cell 을 분주한 다음 24시간 동안 37°C CO₂ incubator에서 배양 한 후 발효 전 후의 툃 추출물을 농도 별(0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 로 처리하여 3일간 배양하였다. 1일과 3일째 되는 날(24h, 72h) 각 well 당 MTT(10 $\mu\text{l}/\text{well}$) 시약을 첨가하고 3시간 동안 37°C에서 배양한 후 MTT가 formazan 으로 분해되는 양을 ELISA reader를 이용하여 460 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 처리 군은 3 well씩 3회 반복실험을 하였으며, 툃 발효산물의 대한 세포 증식효과는 3번 반복 실험의 평균값을 취한 후 아무것도 처리하지 않은 DMEM 용액에 배양한 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.²⁾

3.2. 해조류 소재의 골형성 능력 활성 검증 확인

본 연구진이 확보한 국내산 해조류 추출물 12종의 녹조류에 대한 골형성 촉진 생리 활성을

1) Ko H, Yang W, Park K, Kim M.. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate (MTA) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and response of rat pulp to MTA and BMP-2. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Jun;109(6):e103-8.

2) Ko H, Yang W, Park K, Kim M.. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate (MTA) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and response of rat pulp to MTA and BMP-2. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Jun;109(6):e103-8.

검증한 결과 수종의 녹조류에서 약간의 활성을 검증하였으나 본과제의 목표하는 바인 제품화를 염두에 두어 양산이 가능한 소재인 구멍갈파래를 후보물질로 선정하였다 (그림 2).

그리고 26종의 갈조류에 대한 골형성 촉진 생리활성을 검증 결과, 툃, 다시마, 모자반, 감태 4종의 갈조류에서 골 형성 활성이 있는 것을 검증하였다 (그림 2).

또한, 25종의 홍조류에 대한 골형성 능력 생리활성을 검증한 결과 참갈고리풀, 흑서실, 부채분홍잎 등 3종 시료에서 골 형성 활성이 있는 것을 확인 하였다(그림 2).

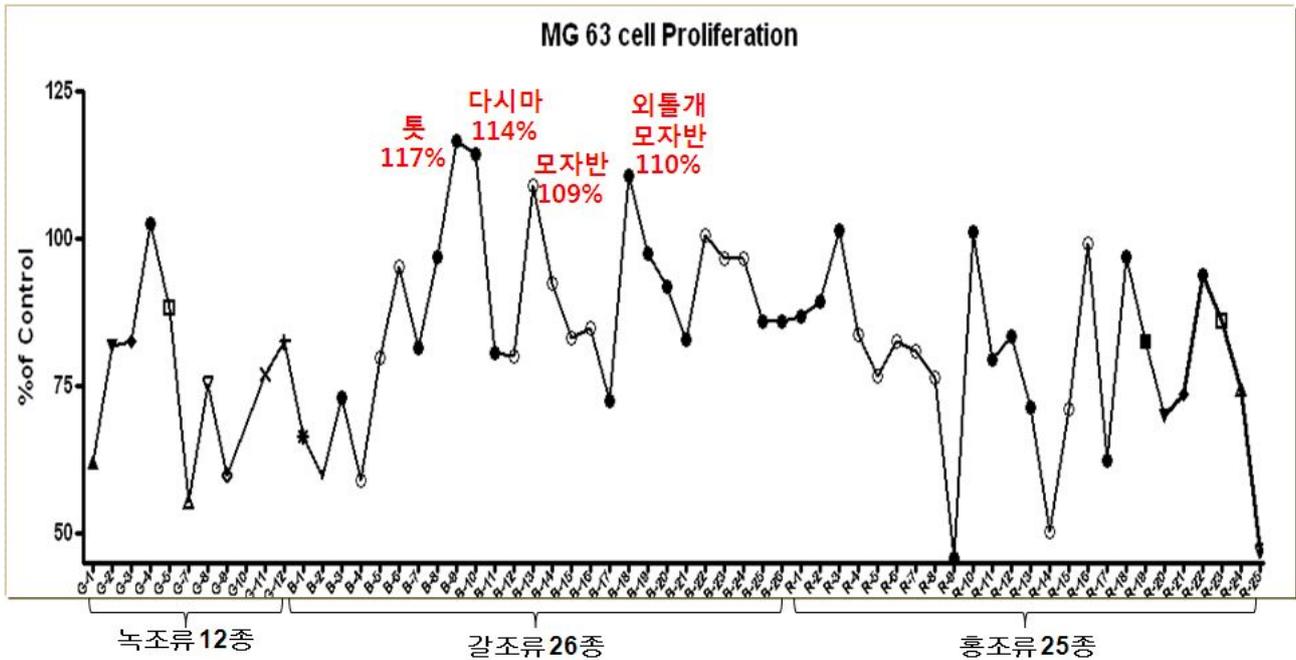


그림 2. 63종 해조류 소재의 MG63 cell의 세포증식 활성 검증
26종의 갈조류 중 툃, 다시마, 모자반, 외돌개모자반의 4종에서
MG63 cell proliferation 활성이 우수한 것을 확인함

4. 결론 및 고찰

본 과제가 목표로 하는 ‘해조류유래 골관절 기능 개선 소재의 개발 및 제품의 개발’이라는 관점에서 살펴보면 양산이 가능하고 채취가 용이하며 가격이 적절한 품목을 고려하여 고찰하여 ① 툿, ②다시마, ③ 모자반을 유력한 후보 소재로 판단하였다.(표 2.)

표 2. 해조류 발효를 이용한 제품 개발에 유력한 후보소재 및 산업화의 선택 및 배제사유

No.	식물명		선택과 배제의 사유
B-9	Hizikia fusiforme	툿	특허, 논문이 자유롭고 산업화 좋음
B-10	Laminaria ochotensis	다시마	논문, 특허 출원됨, 많이 사용됨
B-13	Sargassum flvellum	모자반	특허, 논문이 자유롭지만 산업화 힘들
B-26	Ecklonia cava	감태	특허에 출원되어 있음, 현재 식품원료 미등재
G-5	μlva pertusa	구멍갈파래	생산량은 많으나 현재 식품원료 미등재

본 연구진이 수집한 자료들을 바탕으로 툿과 다시마 모자반 등을 비교하였을 때,

① 다시마 : 이미 많은 연구 개발이 진행되어 지적재산권 등의 측면에서 자유롭지 못하고 신제품의 개발 장벽이 높은 단점을 가지고 있다.

② 모자반 : 논문 및 특허 등의 지적재산권을 확보하기 용이하다. 하지만, 원료의 수급과 관련하여, 천연 모자반의 경우는 채취시기가 한정적이고 그 양도 대량생산에는 적합하지 않다. 또한, 양식의 경우에는 아직 개발이 원활하지 않아 차후 원료의 수급에 단점을 가지고 있다.

③ 툿 : 툿의 경우 현재 연구개발이 많이 이루어져 있지 않아 논문 및 특허 등의 지적재산권을 확보하기 용이하다. 또한, 툿은 최근 생산량이 해마다 증가하고 있다. 이는 툿 양식 방법이 개발되어 안정적으로 생산이 되고 있다는 것을 의미하며, 툿을 이용한 제품 개발에 원료인 툿을 원활하게 공급할 수 있는 장점이 있다.³⁾

이에 본 연구진은 툿에 대한 심화연구를 진행함이 최종적으로 양호한 결과를 도출해 낼 가능성이 높다고 판단하여 툿에 대한 발효 최적 조건 확립 및 양산 조건 최적화하기 위하여 연구를 진행하였다.

3) 백재민, “해조류 양식 산업의 현황과 전망”, 국립수산물과학원 해조류연구센터, 2007

제 2 절 확보된 소재(툇)의 최적 생산 processing 확립 및 툇의 지표 물질 검색

1. 소재 (툇)의 비소제거 확인 실험

※ 툇은 다른 천연소재에 비하여 비소가 많이 함유되어 있다고 알려져 있다. 비소(As)는 인체 내에서 쉽게 분해되지 않고 축적되어 건강상의 위해를 끼칠 우려가 있기 때문에 건강기능성 식품을 개발하기 위해서는 가능한 비소를 제거하기 위한 연구를 진행하였다.

1. 툇의 비소 제거 확인 ; 끓는물로 전 처리한 툇(15.35mg/kg)의 비소 함량을 측정된 결과 흐르는 물에 씻어낸 경우(63.61mg/kg)보다 총 비소 함량이 최대 4배 이상 감소한 것을 확인 하였다.

2. 툇의 비소 제거방법의 확립 ; 툇의 비소 제거 방법에 대한 문헌고찰 등을 토대로 100℃로 5분간 전처리를 진행하여 추출한 경우의 비소함량은 14.18 mg/kg로 확인되었으며 이는 100℃로 30분간 전처리를 진행하였을 때 비소함량인 15.35 mg/kg와 비교하여 큰 차이가 없음을 확인 하였다. 이상의 내용을 근거로 툇의 비소제거 방법을 100℃로 5분간 전처리하여 추출하는 것으로 확립하였다.

비소(As)는 토양이나 물질 그리고 공기 중에 널리 분포하고 있는 원소이며, 식품에서도 미량의 비소가 함유되어 있다. 일반적으로 야채, 곡류, 육류에는 0.01~1.0 mg/kg의 비소가 함유되어 있으며, 해조류에서는 20~70 mg/kg 정도로 비교적 많은 농도의 비소가 존재한다고 알려져 있다⁴⁾

비소는 인간에게 이행되었을 때 자연적으로 혹은 인위적으로 쉽게 분해되거나 제거되지 않고 축적되며 식품에 유입되었을 때 간, 방광, 그리고 피부암 등의 심각한 건강상의 위해를 끼칠 우려가 있다.⁵⁾

툇을 비롯한 해조류의 평균 비소 함량이 야채나 곡류, 육류(0.1~1.0 mg/kg) 보다 훨씬 많은 것이 사실이지만, 툇 등의 해조류에서 검출되는 주요 비소들은 독성이 거의 없는 유기비소가 90% 이상을 차지하고 있어 안전하다고 알려져 있다.⁶⁾

툇에 대한 비소의 국내 또는 국제 관련 기준 규격이나 규제치는 아직까지 정해진 것은 없으나, 캐나다 영국 그리고 홍콩의 경우는 툇 섭취를 자제하도록 하고 있으며, 영국의 경우는 툇의 무기비소함량이 70 mg/kg 이상으로 확인되어 섭취 자제를 권고하고 있다.⁷⁾

하지만, 일본의 경우는 FAO/WHO의 합동 식품첨가물 전문가 회의(JECFA)에서 정한 무기비

4) Kim KS et. al. Arsenic speciation and risk assesment of Hijiki(Hijikia fusiforme) by HPLC-ICP-MS. Korean j. Food Sci. Technol. 2009 Vol. 41. No.1. 1~6

5) Martin Rose. et. al. Arsenic in seaweed—Forms, concentration and dietary exposure. Food and Chemical Toxicology 2007. Vol. 45. 1263-1267

6) Foster S, et al. Observations on the measurement of total antimony and antimony species in algae, plant and animal tissues. 2005. J Environ Monit. Dec;7(12):1214-9.

7) Martin Rose. et. al. Arsenic in seaweed—Forms, concentration and dietary exposure. Food and Chemical Toxicology 2007. Vol. 45. 1263-1267

소의 PTWI(잠정 주간 섭취 허용량)가 15 ug/kg(체중)이며 50 kg의 체중을 가진 사람의 경우 750 ug/person/week에 해당하고, 이는 생톳을 매일 4.7 g(일주일간 33 g) 이상을 지속적으로 섭취해야 하는 양으로, 일반적인 경우에는 비소 중독에 의한 건강 피해가 일어나지 않았다고 보고하였다.⁸⁾

또한 일본의 경우는 비소를 제거한 톳을 이용하기 위하여 톳의 비소제거 방법을 개발하고 실행하고 있다.⁹⁾

따라서, 해조류의 하나인 톳을 이용하여 기능성식품 등을 개발하기 위해서는 톳에 함유된 유해 성분인 비소를 제거하는 것이 바람직하다. 이에, 본 연구진은 발효를 진행하기 전에 톳에 포함되어 있는 유해 성분인 비소를 제거하기 위한 실험을 진행하였다.

1.1. 톳의 비소제거 확인 방법

1.1.1. 톳의 전처리 과정

신선한 톳 2 kg을 흐르는 물에 2~3회 세척한다. 이것을 기준으로 하여 25℃, 40℃, 60℃에서 30분씩 전 처리 한 것, 100℃끓는 물에서 30분간 전 처리 한 것, 121℃에서 15분간 감압 멸균 한 것으로 각각 300 g 씩 나누어 전 처리한 후 하루 동안 자연 건조시켜 비소 및 무기질 원소 함량을 측정하였다.

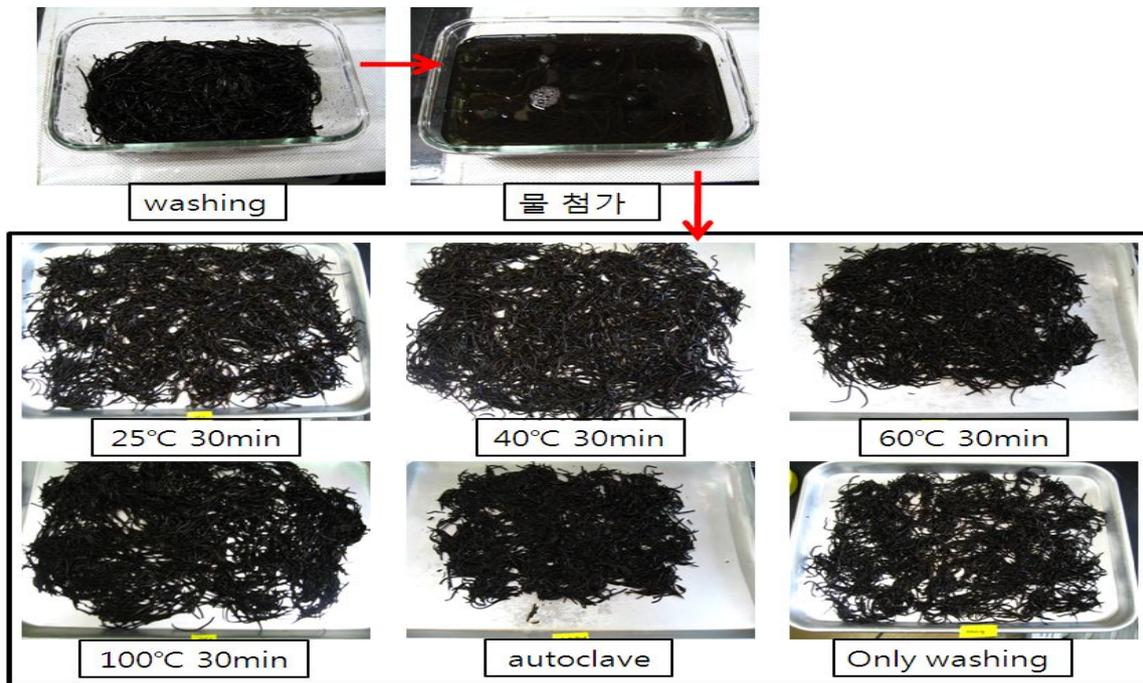


그림 3. 톳의 비소제거 전처리 과정

1.1.2. 톳에서의 비소 측정

톳에서의 총 비소 함량 및 미네랄 함량을 분석하기 위해 ArCl(m/z 75)에 의한 간섭을 제거할

8) Japan Ministry of Health, labour and Welfare. 2004

9) Hamano-Nagaoka M, et. al. Nitric acid-based partial-digestion method for selective determination of inorganic arsenic in hijiki and application to soaked hijiki. 2008. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. Apr;49(2):88-94

수 있는 DRC(Dynamic Reaction Cell) mode가 장착된 ICP-MS(ELAN 6100 DRC II, Perkin Elmer Sciex, Waltham, MA,USA)를 사용하여 분석하였다.

1.2. 톳의 총 비소 및 미네랄 함량 확인 결과

온도 조건별로 전 처리한 톳의 총 비소 및 미네랄 함량은 ICP-MS를 이용하여 분석하였다.

톳을 흐르는 물에 2~3회 세척한 경우에는 총 비소 함량이 63.61 mg/kg으로 일반적인 해조류에 존재하는 양인 20~70 mg/kg 사이에 들어간 것을 확인하였다. 그리고, 온도 조건별로 전처리한 톳의 경우에는 15.35~46.46 mg/kg의 범위로 확인 되었다. (표 9.)

이 중, 톳을 100℃로 30분간 전 처리 한 경우(15.35 mg/kg) 흐르는 물에 씻어낸 경우(63.61 mg/kg)보다 총 비소 함량이 약 4배 이상 감소한 것을 확인 하였다.

표 3. 전처리 조건에 따른 톳의 비소 및 미네랄 함량 변화. 단위 : ppm(=mg/kg)

시료명 항 목	Washing	25℃	40℃	60℃	100℃	Autocleave
Mg	4,163	3,962	4,521	4,109	3,990	3,846
Ca	9,716	15,64	16,61	16,65	16,55	16,93
K	Saturated	Saturated	Saturated	Saturated	Saturated	Saturated
Pb	0.86	1.07	1.08	0.96	0.55	1.30
As	63.61	46.46	42.51	39.49	15.35	38.21
Cd	2.73	2.63	2.50	2.36	1.83	2.22
Hg	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Fe	48.02	78.92	67.37	72.93	100.84	101.3

톳의 비소제거 방법에 관하여 보고된 타 연구에서는 비소 제거를 위하여 시간별로 boiling 및 steaming을 하였는데, boiling 의 경우 5분 이후로는 비소의 함량차이가 크게 나지 않고,¹⁰⁾ (5 min : 19.5 ppm, 30 min 16.1 ppm) 가열시간이 길어짐에 따라 성분의 손실이 있을 수 있기에 이후 연구에서는 5분간 전처리를 통하여 비소를 제거한 후 톳을 이용 하였다.

10) JG Koo, GB Kim. changes in chemical components of hijiki during heat process. Fish sci.reserch 1998:14:33~39

이후 5분간 전처리한 후 톳의 최종 추출물에서의 비소 함량 역시 측정하여 다음의 표에 나타내었다.

표 4. 최종 추출물에서의 비소 및 미네랄 함량. 단위 ppm(=mg/kg)

Elements	Water ex.	EtOH ex.
Mg	104.62	77.53
Ca	95.51	63.16
K	Saturated	Saturated
Pb	0.09	0.13
As	14.18	8.93
Cd	0.15	0.09
Hg	N.D	N.D
Fe	2.78	2.29

톳을 비롯한 해조류의 평균 비소 함량이 야채나 곡류, 육류(0.1~1.0 mg/kg) 보다 훨씬 많은 것이 사실이지만, 톳 등의 해조류에서 검출되는 주요 비소들은 독성이 거의 없는 유기비소가 90% 이상을 차지하고 있어 안전하다고 알려져 있다.¹¹⁾

우리나라의 경우, 60 kg의 체중을 갖는 성인의 잠정주간섭취허용량(PTWI)이 350 ug/person/week인 것으로 알려져 있다. 또한, 국민건강영양조사 제4기 3차년도(2009)에서 조사된 톳의 1인 1일 평균 섭취량은 0.1 g/day이었다. 본 연구진이 5분간 전 처리한 톳을 1인 1일 평균 섭취량으로 개산하였을 때 해당하는 비소의 양은 1.38 ug/person/week로 PTWI의 기준치의 3.9%에 해당하는 적은 양으로 위해성이 없이 안전함을 확인하였다¹²⁾.

11) Foster S, et al. Observations on the measurement of total antimony and antimony species in algae, plant and animal tissues. 2005. J Environ Monit. Dec:7(12):1214-9

12) 국민건강영양조사 제4기 3차년도(2009), 보건복지부

2. 발효 톳의 최적 생산 가공방법의 확립 및 조골세포 활성 검증

전통균주와 효소를 이용하여 발효 조건을 확인한 결과, 전통 균주를 이용하여 발효하였을 때와 효소를 이용하여 발효하였을 때 모두에서 약 120% 내외의 조골세포 증식효과를 나타내었다. 하지만, 전통 균주를 이용한 발효는 발효 기간이 4주 이상인 반면, 효소를 이용한 발효의 경우에는 기간이 1~3일로 짧아진 것을 확인하였다.

이에 본 연구에서는 효소처리 방법이 전통 균주를 이용한 발효에 비해 짧은 시간에 비슷한 효과를 나타내며, 대량생산 등의 산업적 가공에 유리하여, 효소를 이용하여 1일간 반응 시켜 가공하는 방법을 톳의 최적 가공방법으로 선택하였다.

본 연구팀은 비소를 제거한 톳에 함유되어있는 유효 성분의 활성이 더욱 증대될 수 있도록 생물학적 전환 기법(발효)을 이용하고자 하였으며, 연구에 이용되는 균주는 전통 발효식품인 누룩과 김치, 된장에서 순수 분리하여 사용하였고, 특히 Beta-glucosidase activity가 높은 누룩 균사체 및 된장 *Bacillus* 그리고 식품 첨가용 효소 등을 확보하여 연구에 이용하였다.

2.1. 발효 조건 및 효소처리 조건 확립

톳의 최적 활성 조건을 확인하기 위하여 발효 및 효소처리 시간 별로 최적 조건을 탐색하여 다음의 항목과 같이 톳의 발효에 첨가물 별, 발효 시간 별, 발효 방법 별 조건을 잡아 최적 활성 조건을 확립하였다.

표 5. 발효 및 효소처리 조건 표

	전통 균주	효소
발효 첨가물	보리, 엿기름, 밀기울	-
발효 기간	1주, 2주, 3주, 4주	1일, 2일, 3일
발효 방법	건조톳을 40mesh로 분쇄하여 첨가물과 1:1로 혼합 한 후 2% 누룩 균사체 배양액과 혼합하였다	건조 톳의 10배 분량의 증류수를 넣은 다음 식품 첨가 효소를 건조톳 중량의 10%로 처리하였다
기타 조건	수분량은 총 중량의 30% 유지, 37°C에서 배양	최적 효소 활성 온도인 55°C에서 배양

2.2. 최적 가공 조건 확인을 위한 조골세포 활성 측정 방법

투스 보리, 옛기름, 밀기울을 혼합하여 전통 균주인 누룩을 발효시키는 방법과 효소처리 방법 등을 이용하여 발효를 진행하는 과정에서, 발효 시간 별(발효 - 1주, 2주, 3주, 4주, 효소처리 - 1일, 2일, 3일)로 각각의 시료를 얻어 조골세포 증식 활성을 측정하였으며 실험 방법과 그 결과는 다음과 같다.

2.2.1. 조골세포 활성 세포의 배양 방법

Human osteoblastic cell 인 MG-63 cell 은 한국세포주은행(서울대학교 의과대학, Korea)에서 분양받아 연구실에서 계대배양하여 사용하였다. MG63 human osteoblast cell을 세포 배양 접시에 부착시키고 penicillin 및 streptomycin 이 함유된 1% antibacterial-antifungal solution (PAA, Canada)과 10% FBS (PAA, Canada)를 첨가한 DMEM (PAA, Canada)을 사용하여 5% CO₂ 37°C incubator에서 배양하였다. 배양액은 2~3일에 한번 씩 교체하며, cell seeding 시 세포를 혼합한 배지 와 tryphan blue 용액을 1:1로 혼합하여 hemocytometer를 이용하여 tryphan blue 에 의해 염색되지 않은 세포를 계수하였다.¹³⁾

2.2.2. 조골세포 활성 확인 방법 (MTT assay)

Osteoblast의 증식 측정은 단시간에 대량 검색이 가능한 MTT colorimetric assay 방법 (EZ-CyTox, Daeil-Lab Co., Korea)을 사용하여 측정하였다. 96-well plate(ISS, Korea) 2×10³ cells/well 로 cell 을 분주한 다음 24시간 동안 37°C CO₂ incubator에서 배양 한 후 발효 전 후의 톱 추출물을 농도 별(0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/ml) 로 처리하였다. 24 h, 72 h후 각 well 당 MTT(10 µl/well) 시약을 첨가하고 3시간 동안 37°C에서 배양한 후 MTT가 formazan 으로 분해되는 양을 ELISA reader를 이용하여 460 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 처리 군은 3 well씩 3회 반복실험을 하였으며, 톱 발효산물의 대한 세포 증식효과는 3번 반복 실험의 평균값을 취한 후 아무것도 처리하지 않은 DMEM 용액에 배양한 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.¹⁴⁾

13) Ko H, Yang W, Park K, Kim M.. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate (MTA) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and response of rat μ lp to MTA and BMP-2. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Jun;109(6):e103-8.

14) Ko H, Yang W, Park K, Kim M.. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate (MTA) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and response of rat μ lp to MTA and BMP-2. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Jun;109(6):e103-8.

2.3. 발효 톳의 최적 생산 가공 조건의 확립결과

전통 균주 발효는 보리, 엿기름, 밀기울 및 엿기름과 밀기울을 혼합한 첨가물에 누룩 균사체를 사용하여 발효한 시료를 발효 주차별로 시료를 얻어 조골세포 활성을 확인하였다. 엿기름을 보료로 사용한 시료의 경우 4주차에서 24시간 결과가 비 처리군에 비해 조골세포 증식률이 122% 이상 증가한 것을 확인하였고, 엿기름을 제외한 보료에서는 보리에서 4주차에 비 처리군에 대한 조골세포 증식률이 112% 로 나타난 것을 확인하였다.

효소 처리를 한 톳 추출물을 일별로 획득하여 조골세포 활성을 확인한 결과 Enzyme 3(cytolase ECL 5)를 처리한 추출물에서 1일차, 2일차, 3일차에 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 114%, 116%, 118% 의 활성을 확인하였다. Enzyme 1 에서는 control 과 유의적인 활성차가 나타나지 않았으며, enzyme 5번의 경우 약 108% 정도로 나와 약간의 활성이 증가되는 것을 확인하였다.

이에 본 연구에서는 전통 균주를 이용한 발효에 비해 짧은 시간에 비슷한 효과를 나타내며, 대량생산 등의 산업적 가공성을 고려하여, 효소를 이용하여 1일간 반응 시켜 가공하는 방법을 톳의 최적 가공방법으로 선택하였다.

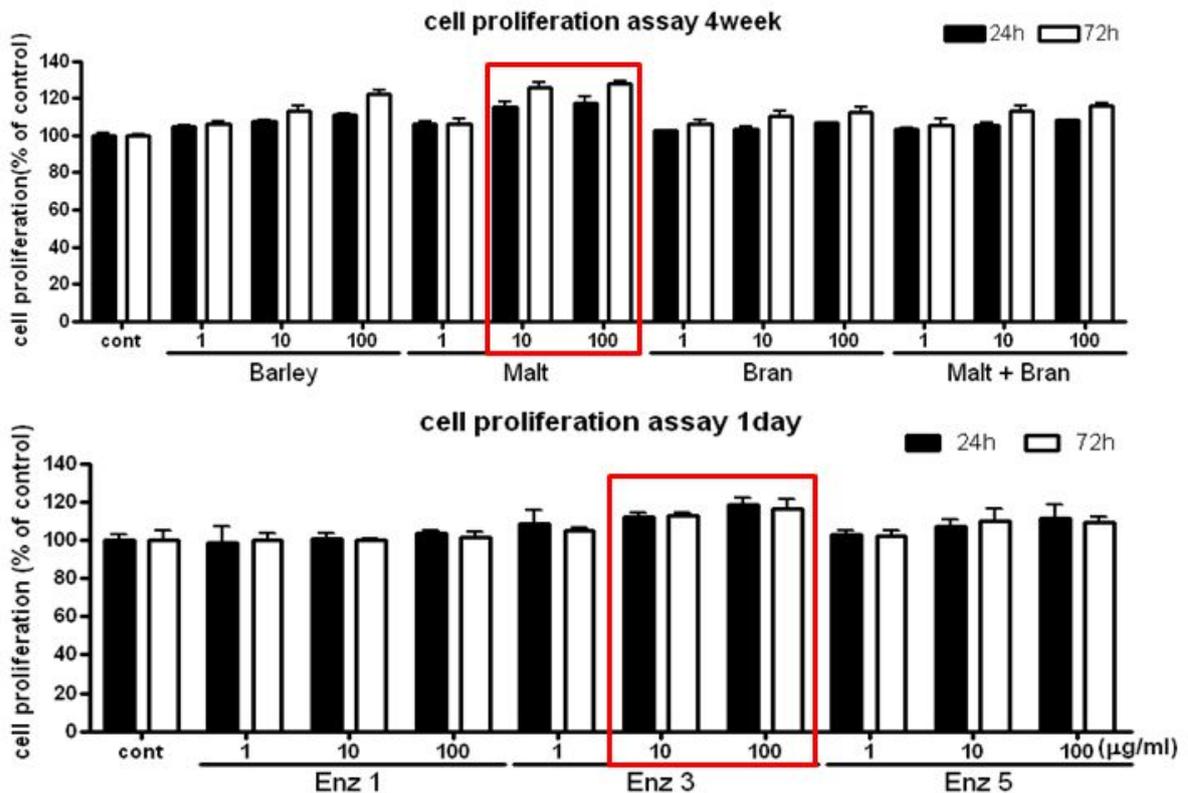


그림 4 발효 톳의 조건별 발효 유효성 결과.(위 : 전통균주발효, 아래 : 효소처리)

3. 발효 톳 추출물의 개발을 위한 최적 분획 조건 확립 및 지표물질 탐색

발효 톳을 용매 분획하여 조골세포 증식활성 및 항염활성을 확인한 결과 fucosterol을 함유하는 phlorotannin 분획층에서 활성이 가장 좋은 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 fucosterol을 함유하는 phlorotannin (PHLT) 분획층 사용하여 조골세포 분화 활성과 NO 억제 활성을 확인한 결과 조골세포 활성은 negative control에 비하여 약 28% 정도 더 좋은 효과를 보였고, NO 억제 활성은 LPS 처리군에 비해 약 70% 억제하는 것을 확인하였다.

PHLT 3 분획층은 톳의 지표물질인 fucosterol을 주성분으로 함유한 것을 확인하였고, fucosterol을 톳을 이용한 건강기능 식품 및 기능성 제품의 원료에 지표물질로 선택하였다.

본 연구진은 비소를 제거한 후 발효한 톳의 생리활성물질 및 지표물질을 탐색하기 위하여 용매 분획 등의 방법으로 분획하여 조골세포 증식 및 분화 활성, 그리고 항염 활성 등을 확인하여 발효 톳의 최적 분획 조건 및 지표물질을 확인하였다.

3.1. 각 분획별 분획 방법

비소제거 전처리한 톳을 다음의 그림에 따라 분획하여 분획물을 획득하였다.

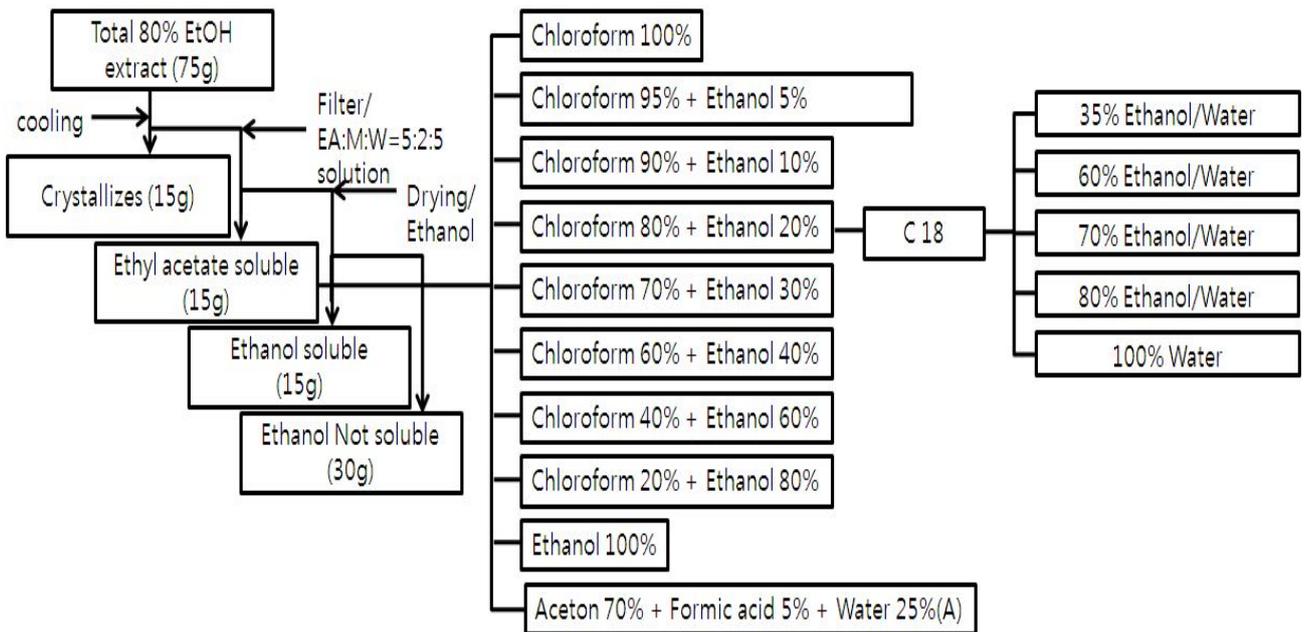


그림 5. 표준화 톳의 분획 방법

분획별로 획득한 물질을 이용하여 조골세포 증식 활성을 확인하고, 활성이 있는 분획을 다시 분획하여 지표 물질을 탐색하였다.

3.2. 최적소재 개발을 위한 분획별 조골세포 증식 활성 확인

조골세포(osteoblast)는 인체 내의 골질 내부에서 단핵구 상태로 존재하여 골 내부 골 소강에 존재하여 골기질을 합성, 분비하고, 기질에 Ca, Mg이온 등의 무기염을 침착시킴으로써 골 조직을 석회화시키는 능력을 갖고 있는 세포이다. 조골세포는 골화 등에 의해 뼈의 신생이 이루어지는 부위에서 쉽게 확인 할 수 있으며, 골 기질 중에서 유골에 인접하는 세포와 밀접하여 단층으로 발생한다. 골 형성이 진행 된 상태에서는 스스로 형성한 골 조직 속에 묻혀 골세포로 분화 되는데 이 과정에 의해 골이 성장하며 골의 경도 및 밀도가 증가하게 된다.

이러한 일련의 과정에서 발효 톱의 최적 추출 조건을 찾아 분리한 물질을 이용하여 조골세포의 성장을 촉진시켜 골의 재형성을 유도하고 골의 밀도 및 경도를 회복하여 골관절 질환의 치료에 이용 하였다.

3.2.1. 분획물을 이용한 조골세포 활성 결과

3번에 걸친 분획을 통하여 최종적으로 PHLT 3 분획($1 \mu\text{g/ml}$ - 127.73 ± 3.09 , $10 \mu\text{g/ml}$ - 128.29 ± 1.46) 을 최적 활성 물질이 함유되어 있는 분획으로 확인 하였다. 1차 분획에서는 EA($1 \mu\text{g/ml}$ - 117.41 ± 3.10) 분획을 선정하여 2차 분획을 하였고, 2차 분획 과정에서 Silicagel-23번 분획($1 \mu\text{g/ml}$ - 132.41 ± 3.48)을 선정하여 3차 분획을 하였다. 또한, PHLT 3 분획층은 톱의 지표물질인 fucosterol을 주성분으로 함유하고 있다. 따라서, PHLT 3 분획층은 톱을 이용한 건강기능 식품 및 기능성 제품의 원료에 지표물질로 선택하였다.

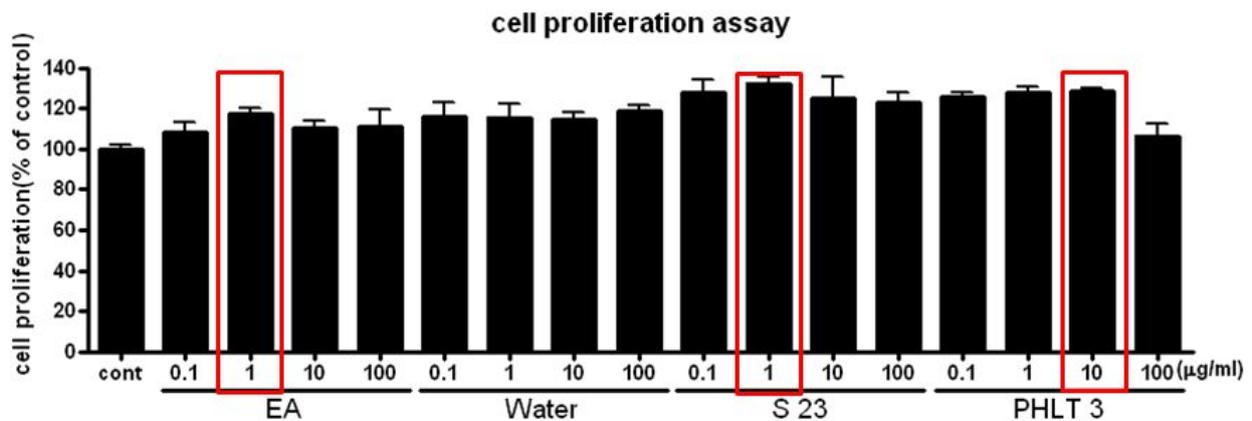


그림 6. 분획을 통한 조골세포 활성 확인. 1차 분획(EA : ethyl acetate, Water : water soluble), 2차 분획 (S 23 : silica column fraction 23), 3차 분획(PHLT 3 : Phlorotannin fraction 3)

3.3. 최적소재 개발을 위한 분획별 항염 활성 (NO assay)

염증 반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질 적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 수복재생 하려는 기전이다. 이러한 염증반응의 화학매개물 중 Prostaglandin(PGs)과 Nitric Oxide(NO)는 발암 및 염증의 진행과정에 중요한 매개물질이다. LPS는 그람음성균의 외막 구성성분이며 발열물질로 널리 알려져 있다. 또한, LPS는 Macrophage를 활성화 시키며 다양한 종류의 cytokine과 활성산소, Nitric Oxide (NO) 등을 생산한다.¹⁵⁾

NO는 정상적인 상태에서 존재하는 neuronal NOS와 endothelial NOS가 있는 반면 IFN- γ 등과 같은 cytokine에 의해 유도 발현 되는 iNOS로 구분된다. NO는 생체 내의 방어작용에 관여하지만, 과잉 생성된 NO는 순환쇼크, 발암 및 염증 반응의 원인이 된다. 또한, COX-2는 정상 세포에서는 그 농도가 매우 낮으나 염증관련세포에서 여러 자극(cytokine, endotoxin, mitogen)에 의해 유도 발현되어 통증이나 염증에 관여하는 PG류 생성에 관여한다.¹⁶⁾

따라서, 본 연구진은 발효 톱 추출물 분획물이 염증성 질환의 예방 및 치료제 개발의 기초자료로 사용될 수 있는지를 탐색하고 그 가능성을 밝히고자 순차적으로 용매 분획하여 추출물 및 분획물을 가지고 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 NO의 생성억제 효과를 조사하여 발효 톱 추출물 분획의 염증 억제 가능성을 탐색하였다.

3.3.1. 실험 방법

3.3.1.1. 세포 배양

Mouse macrophage cell 인 RAW 264.7 cell 은 한국세포주은행(서울대학교 의과 대학, Korea)에서 분양 받아 연구실에서 계대배양 하여 사용하였다. RAW 264.7 mouse macrophage 세포를 세포 배양 접시에 부착시키고 penicillin 및 streptomycin 이 함유된 1% antibacterial-antifungal solution (PAA, Canada)과 10% FBS (PAA, Canada)를 첨가한 DMEM (PAA, Canada)을 사용하여 5% CO₂, 37°Cincubator에서 배양하였다. 배양액은 2~3일에 한번 씩 교체하며, cell seeding 시 세포를 혼합한 배지 와 Tryphan blue 용액을 1:1로 혼합하여 hemocytometer 를 이용하여 tryphan blue 에 의해 염색되지 않은 세포를 계수하였다.

3.3.1.2. NO assay

RAW 264.7 세포를 48 well plate에 5×10^4 cell/well로 분주한 다음 24시간 후 발효 톱 분획 sample을 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고, 1시간 후에 LPS (0.5 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. LPS 처리 24시간 후에 세포배양 상등액 50 μl 와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 50 μl 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader 를 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 NO₂ 로 Standard curve를 작성하여 세포배양 상등액에 함유되어있는 NO 의 값을 계산하였다.

15) Zhi-Yong Xiao, et. al. Inhibitory effect of linomide on lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α production in RAW264.7 macrophages through suppression of NF- κ B, p38, and JNK activation. 2007 Immunol Lett. Dec 15;114(2):81-5.

16) Battistini L, et. al. Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. 1994. Dev Neurosci. ;16(3-4):152-61.

3.3.2. 분획물을 이용한 NO 생성억제 효과

3번에 걸친 분획을 통하여 최종적으로 PHLT 3 분획($100 \mu\text{g/ml}$: 12.73 ± 0.69)을 최적 활성 물질이 함유되어 있는 분획으로 확인 하였다. 1차 분획에서는 EA($100 \mu\text{g/ml}$ - 16.7 ± 0.20) 분획을 선정하여 2차 분획을 하였고, 2차 분획 과정에서 Silicagel-23번 분획($100 \mu\text{g/ml}$ - 17.5 ± 1.25)을 선정하여 3차 분획을 하였다. 또한, PHLT 3 분획층은 톳의 지표물질인 fucosterol을 주성분으로 함유하고 있다. 따라서, PHLT 3 분획층은 톳을 이용한 건강기능 식품 및 기능성 제품의 원료에 지표물질로 선택하였다.

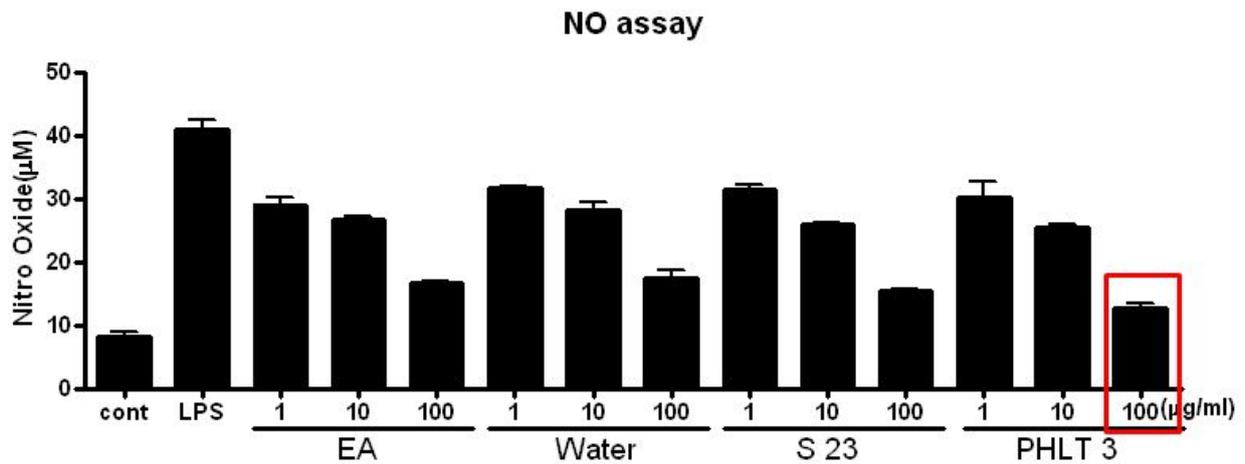


그림 7. 분획을 통한 NO 발현 억제 확인. 1차 분획(EA : ethyl acetate, Water : water soluble), 2차 분획 (S 23 : silica column fraction 23), 3차 분획(PHLT 3 : Phlorotannin fraction 3)

4. 발효 톳의 지표물질 탐색을 위한 분석 결과

4.1. 발효 톳 추출물에서 후코이단 확인을 위한 분리 정제

분리 정제한 fucoidan의 분자량은 약 30 kda-50 kda이며, 3.6%(36 mg/g)의 건조수율을 나타냈다. 황산기 함유량이 0.28 mg/mg이며, 구성당 분석결과 역시 fucose가 72% 함유되어 전형적인 fucoidan임을 확인하였다.

4.1.1 발효 톳 추출물에서 crude fucoidan의 분리 방법

발효 톳 추출물을 5배(w/v)의 물에 녹이고, 알긴산 제거를 위하여 HCl을 0.2 M이 되도록 첨가하여 상온에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 원심분리하여 그 상등액과 3배(v/v)의 acetone을 -20℃에서 2시간 동안 침전반응하였고, 그 침전물을 회수하여 acetone을 수회 처리한 후 건조하여 crude fucoidan으로 사용하였다.

4.1.2 Fucoidan의 정제 방법

상기 제조한 crude fucoidan 2 g을 200 ml의 50 mM Tris-HCl pH 7.0에 용해시킨 후, 원심분리하여 그 상등액을 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 상등액을 DEAE-Cellulose 2.5×15 cm 컬럼에 주입하고, 시료는 500 ml의 0.1 M NaCl/50 mM Tris-HCl pH 7.0, 0.4 M NaCl/50 mM Tris-HCl pH 7.0, 3 M NaCl/water로 각각 단계적으로 용출시켰다. 각 용출액은 투석 후 동결 건조하였으며, 이 중 3 M NaCl/water에서 용출된 시료만을 각종 분석 및 실험의 정제 fucoidan 소재로 사용하였다. 다음의 그림은 fucoidan의 분리 정제 방법을 도식화 한 것이다.

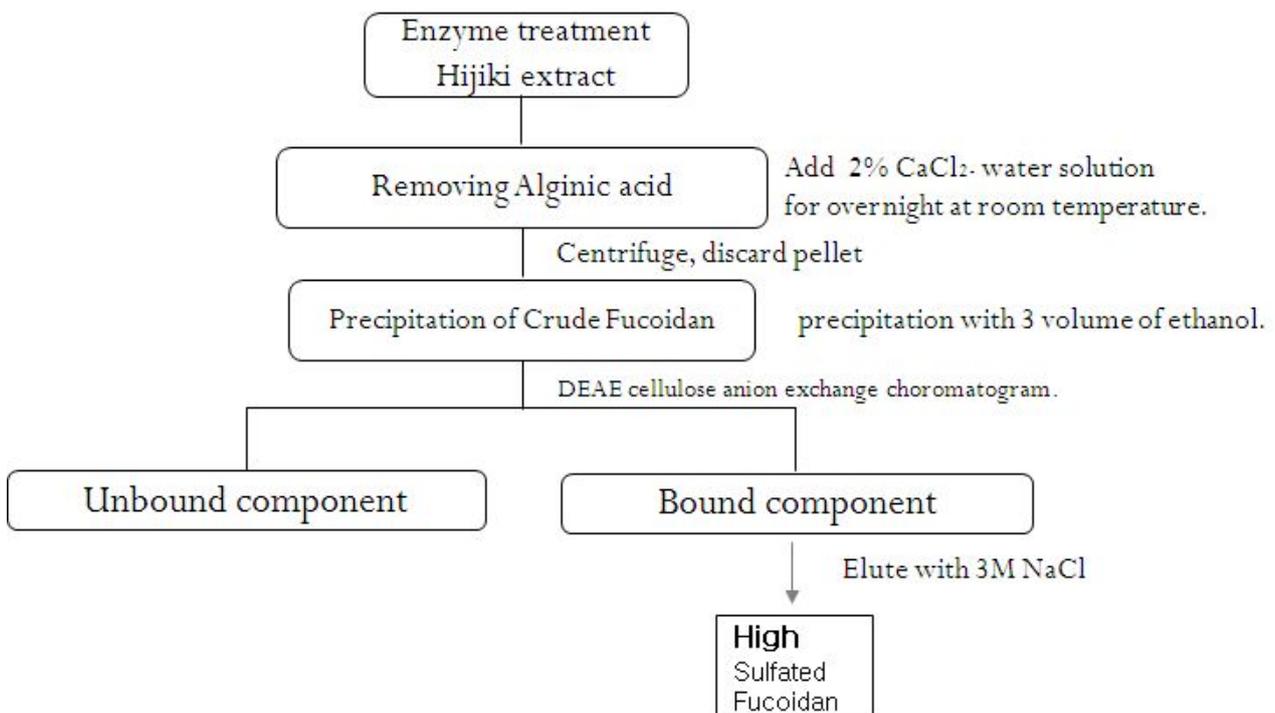


그림 8. Fucoidan 분리 공정도

4.2 발효 톳 추출물에서 fucoidan의 분석

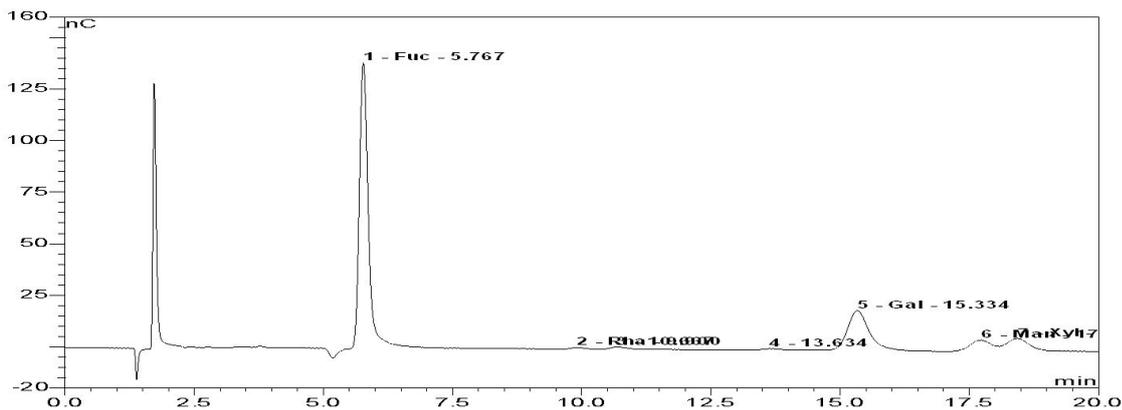
Fucoidan은 산성의 수용성 다당류로서 황산기를 가지고 있는 것이 특징이다. 이를 가수분해하면, 다량의 후코스와 소량의 글루코스, 갈락토스, 자일로스, 글루쿠론산, 황산기 등이 함유되어 있다. fucoidan의 여러 가지 생리활성은 갈조류의 종류, 화학적 조성 및 분자량에 따라 차이가 있으며, 황산기의 함량이 감소할수록 활성도 감소한다고 알려져있다. 상기 방법으로 가공한 발효 톳 유래 fucoidan의 정량 및 정성 분석을 위해 정제된 fucoidan에 대하여 다음과 같이 분석을 시행하였다.

4.2.1 발효 톳 유래 fucoidan의 성분 분석

4.2.1.1. 발효 톳 유래 fucoidan 구성당 분석 결과

fucoidan의 구조로써 기본적 구성 주성분인 후코스의 함량 분석결과는 다음과 같다. 발효 톳 으로부터 분리/정제한 fucoidan에서 후코스가 71.97% 함유되어 전형적인 fucoidan의 구성당 조성을 나타냈다.

발효 톳 추출물로부터 정제한 fucoidan은, L(-) Fucose (71.97%)외에도 소량의 단당류 L(-) Rhamnose(0.37%), D(+) Galactose(18.4%), D(+) Mannose(5.66%), D(+) Xylose(3.60%)을 포함하고 있었다.

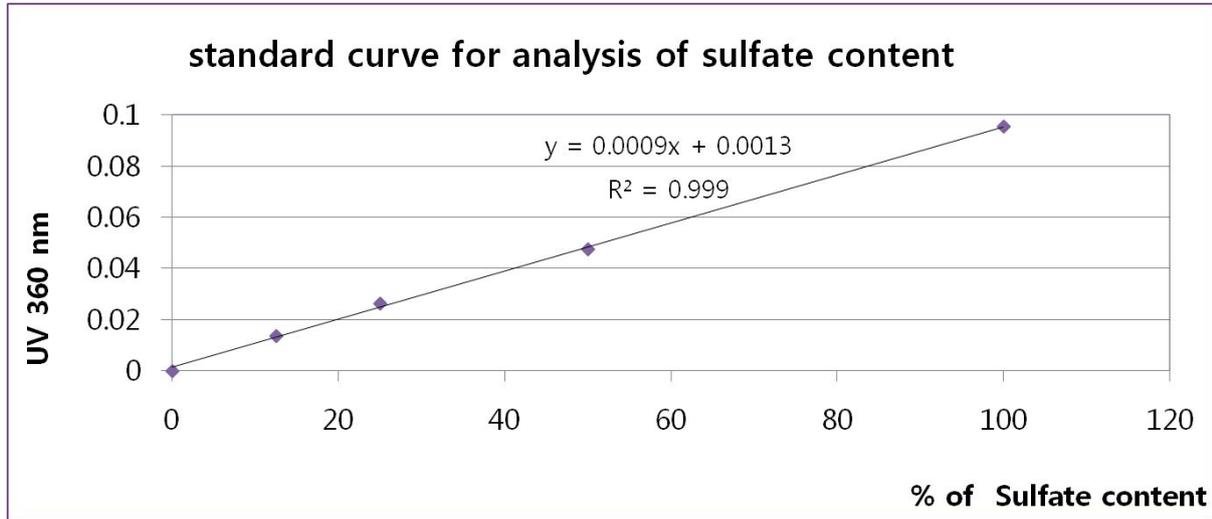


No.	Ret. Time min	Peak Name	Area nC*min	Amount pmole	Molar ratio	Concentration	
						mg/100mg	조성비(%)
1	5.77	Fuc	30.978	1576.182	4.29	10.090	71.97
2	9.90	Rha	0.112	7.218	0.02	0.051	0.37
3	10.67	n.a.	0.312	n.a.	—	—	—
4	13.63	n.a.	0.033	n.a.	—	—	—
5	15.33	Gal	9.001	367.219	1.00	2.580	18.40
6	17.73	Man	1.553	112.942	0.31	0.793	5.66
7	18.43	Xyl	1.896	86.353	0.24	0.505	3.60
Total:			43.886	2149.915		14.020	100.00

그림 9. 발효 톳 유래 fucoidan의 구성당 분석 결과

4.2.1.2. 발효 톳 유래 fucoidan의 황산기 함량 분석 결과

황산기 함량 분석 결과, 발효 톳으로부터 분리/정제한 fucoidan에서 28.21%의 황산기 함량을 나타냈다.



3M-fucoidan : 28.21 % (0.28mg/mg)

그림 10. Fucoidan 의 황산기 함량

4.2.1.3. 발효 톳 유래 fucoidan의 총 당, 단백질, 환원당 정량 분석 결과

발효 톳 추출물로부터 분리 정제한 fucoidan의 성분 분석 결과, 총 당 50%, 단백질 2%로 이루어져 있었다. 환원당의 측정 결과는 10%로 나타났다.

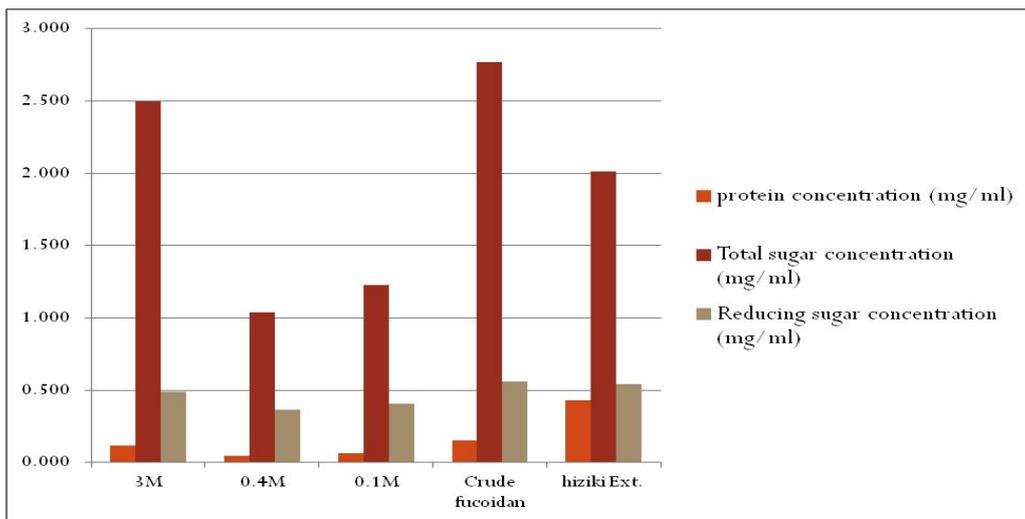


그림 11. 발효 톳 유래 fucoidan의 총 당, 단백질, 환원당 정량 분석 결과

4.2.2. 발효 톳 유래 fucoidan의 분자량 측정

2.2.2.1. Size exclusive HPLC 를 이용한 fucoidan의 분자량 분석 결과

발효 톳 추출물로부터 분리/정제한 fucoidan은 약 30 kda-50 kda의 분자량을 가진 fucoidan으로 확인하였다.

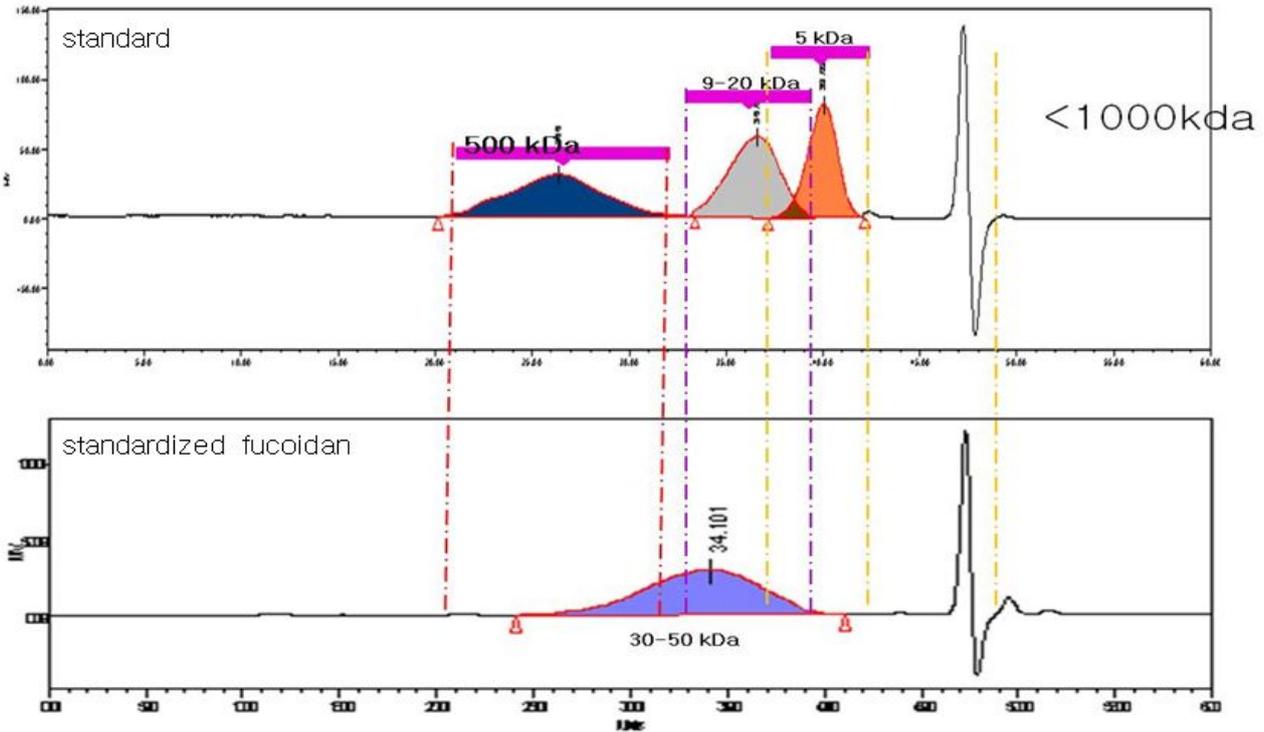


그림12. Size exclusive HPLC를 이용한 fucoidan의 분자량 측정 결과

4.3. 결론

본 연구진이 발효 톳 추출물로부터 분리/정제한 fucoidan의 분자량은 약 30 kda-50 kda이며, 3.6%(36 mg/g)의 건조수율을 나타냈다. 황산기 함유량이 0.28 mg/mg으로 28중량%로 나타났으며, 구성당 분석결과 역시 fucose가 72% 함유되어 전형적인 fucoidan임을 확인하였다.

4.2. 톳 과 발효 톳의 지표성분(Fucosterol)의 변화량 LC/MS 분석 결과

톳 과 발효 톳의 지표성분(Fucosterol)의 변화량 LC/MS 분석 결과 ; 발효 톳의 fucosterol의 함량이 약 2.2배 증량된 것을 확인할 수 있었다.

4.2.1. 재료 및 방법

4.2.1.1. 시약 및 기기

실험에 이용한 모든 시약 및 용매는 특급시약을 구입하여 사용하였다. RRLC-MS/MS는 Agilent Technologies의 Agilent 6410B(Agilent Technologies, USA, Santa Clara CA)을 이용하여 측정하였다.

4.2.1.2. 분획물 및 분석시료 조제

Powder화 한 톳 및 발효 톳 1 g 을 80% MeOH 5 ml를 가하고, 상온에서 1시간 추출(초음파 추출)하였다. 추출물을 centrifuge(8000 rpm / 상온)에 5분 동안 사용하여, 추출 잔사를 다운시킨후, 상등액을 200 μ l를 취하여, 40 $^{\circ}$ C 이하에서 회전농축기로 감압 하에서 농축하여, MeOH 추출물 톳(37.4 mg) 및 발효 톳(56.6 mg) 을 얻었다. MeOH 추출물을 10 ml vial 에 H₂O와 EtOAc를 2 ml씩을 사용하여 넣고, 30초 동안 vortexing 한 후, centrifuge(1,3000 rpm / 4 $^{\circ}$ C) 3분 동안 돌린 후 두 개의 층으로 나누어 진 상등액인 EtOAc 층을 마이크로 튜브에 500 μ l 취한 후, 40 $^{\circ}$ C 이하에서 회전농축기로 감압 농축하여 EtOAc 추출물을 얻고, 1000 ppm의 농도로 맞추어 실험에 사용하였다.

4.2.2. 분석 기기 조건

4.2.2.1. Agilent 6410 LC/MASS & Agilent 1200 RRLC condition

표 6. LC/MS 조건표(좌), RRLC 조건표(우)

Agilent 6410 LC/MASS		Agilent 1200 RRLC	
SCAN mode	100 – 800 (m/s)	Column	Epic C18, 4.6 x 250 mm, 3 μ m
Diode array	218 nm	Flow Rate(mL/min)	1
Ion Source	Positive	Injection Volumn(μ l)	10
Fragmentor	150	Mobile Phase	A: 0.1% Formic acid in Water B: 0.1% Formic acid in ACN
Gas Temp($^{\circ}$ C)	320	Column Temp.	40 $^{\circ}$ C
Gas Flow (L/min)	35		
Capillary Volt. (V)	4,000		

4.2.3. 용매 이동상 혼합비율 및 머무름 시간

표 7. 용매 이동상 조건 표

머무름 시간(분)	용매 이동상 혼합비율	
	A	B
0 ~ 3	50	50
3 ~ 9	0	100
9 ~ 12	0	100
12 ~ 14	100	0

4.2.4. 시료 분석

퇘에서 분리된 fucosterol 1.2 mg를 MeCN을 이용하여 0.005, 0.05, 0.5 mg/L의 표준 용액을 조제 한 후, 2 μ l 을 주입하여 검량선을 작성하고 시료 중 각 물질의 농도를 LC MASS/MASS로 분석하였다.

4.2.5. 시험 결과

4.2.5.1. 표준물질의 검량선

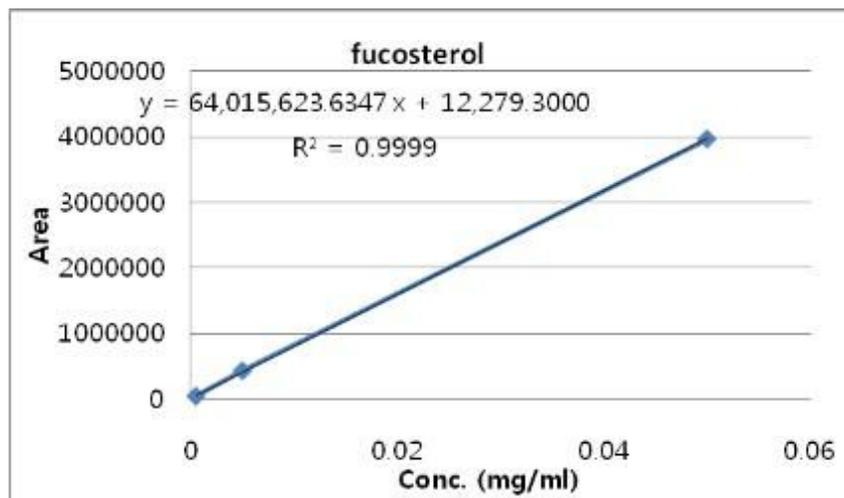


그림 13. Fucosterol standard Standard curve

fucosterol의 경우 표준시료의 농도 0.0005 에서 0.05 까지 LC/MS로 분석했을 때 농도에 따른 peak 면적은 $y = 64,015,623.6347x + 12,279.30$ 와 같은 식으로 나타났으며, 회귀계수는 0.9999 였다. 따라서 이농도 범위에서 얻어진 값은 매우 정확한 값이라고 할 수 있다.

4.2.5.2. Total Ion Chromatogram 을 이용한 퇘 및 발효 퇘의 지표물질의 변화량 비교

제품개발을 최적화하기 위하여 단일물질기준이 아닌 단일물질이 최대량 함유한 phlorotannin 분획층을 기준으로 발효전후를 비교하여 본 결과에서도 fucosterol 단일물질이 발효 전·후에 증량하는 것과 같은 결과를 얻었다.

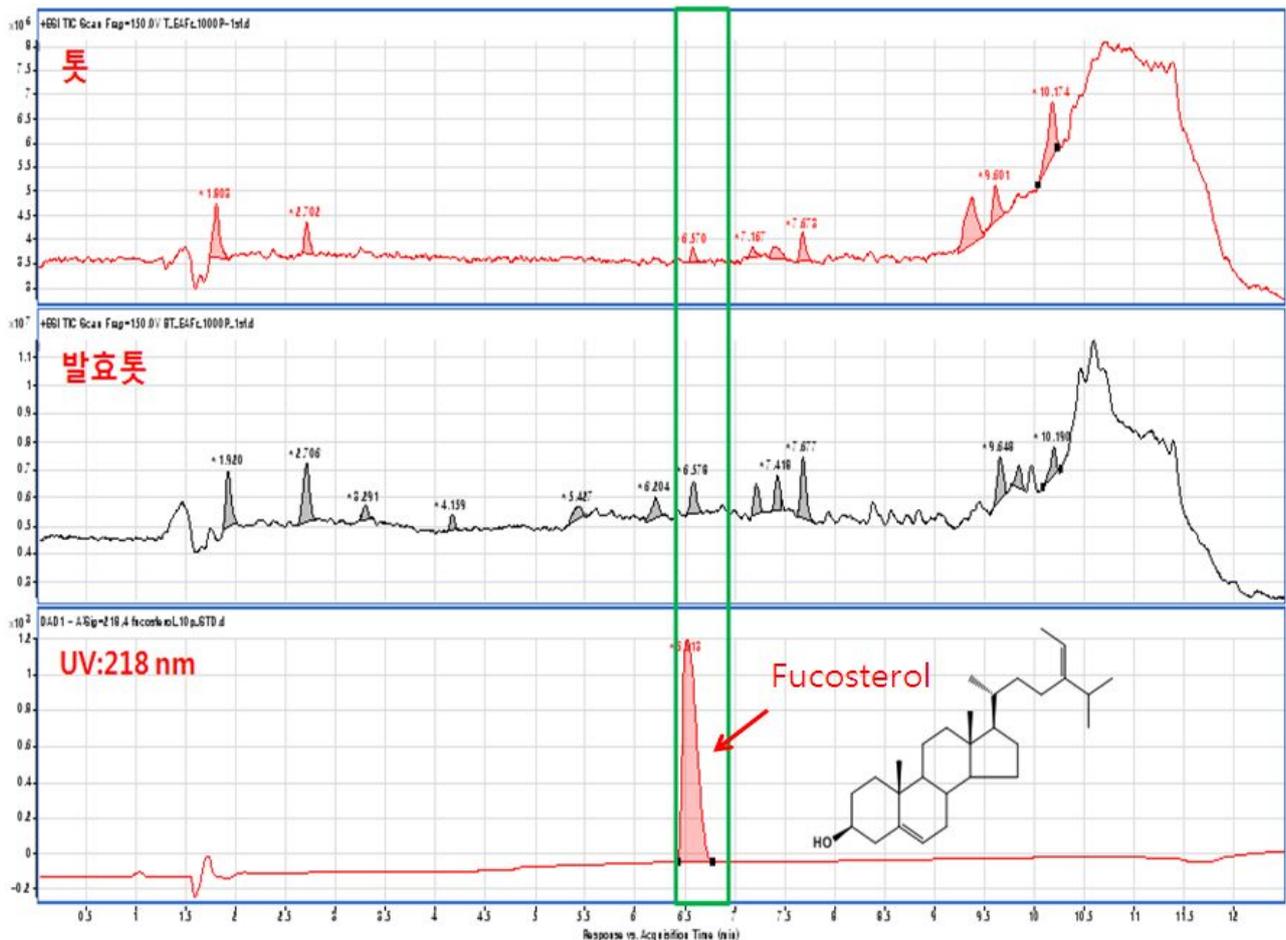


그림 14. 툃트 및 발효 툃트의 함량 확인

4.2.5.3. 분석 시료 중 분석물질 (fucosterol)의 함량 변화

툃트 및 발효 툃트의 Total Ion Chromatogram 을 통하여 본 연구팀이 지표물질 중 하나로 설정한 fucosterol의 함량이 약 2.2배 증량된 것을 확인할 수 있었다.

표 8. 툃트과 발효툃트에서의 fucosterol 함량

시료	툃트 (1000 ppm)	발효 툃트 (1000 ppm)
함량(mg/g)	0.42	0.98
Area	1086826	2412345

4.2.5.4. 분석물질 (fucosterol) 의 LC/MS data

Standard 로 사용한 fucosterol 은 12.40 분경에 peak 가 나타났으며 [M-H]⁺ 값이 413 으로 나타났다.

Phlorotannin 분획물(PHLT 3)에 포함되어있는 fucosterol 이 항산화 17)뿐만이 아닌 조골세포의 활성화에도 효과가 있는 것을 확인하였다.

17) Lee S. et. al. Anti-Oxidant Activities of Fucosterol from the Marine Algae *Pelvetia siliquosa*, 2003 Arch Pharm Res. 26, 719-722.

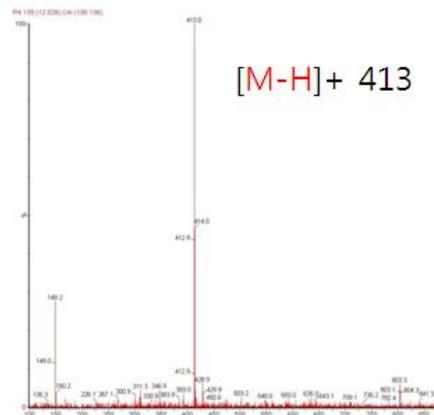
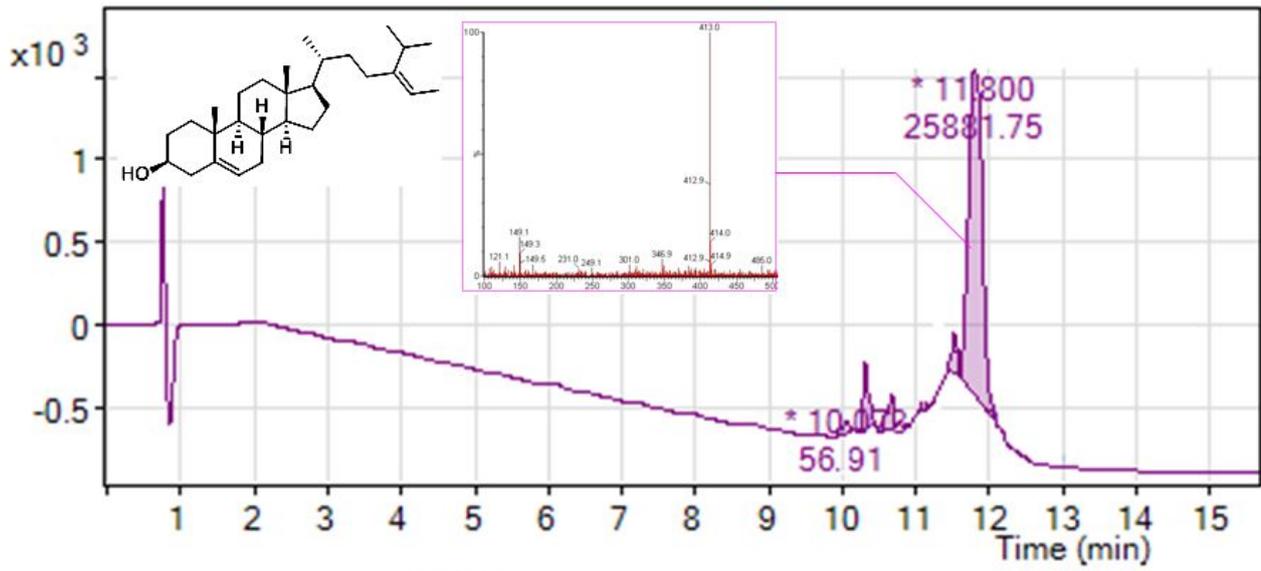


그림 15. fucosterol 의 LC/MS peak(위), peak 시간 LC/MS 값(아래)

4.2.5.5. 분석물질 (fucosterol) 의 NMR data

다음은 phlorotannin 분획물(PHLT 3) 의 구조를 동정하기 위해 H-NMR 및 C-NMR 을 한 결과이다.

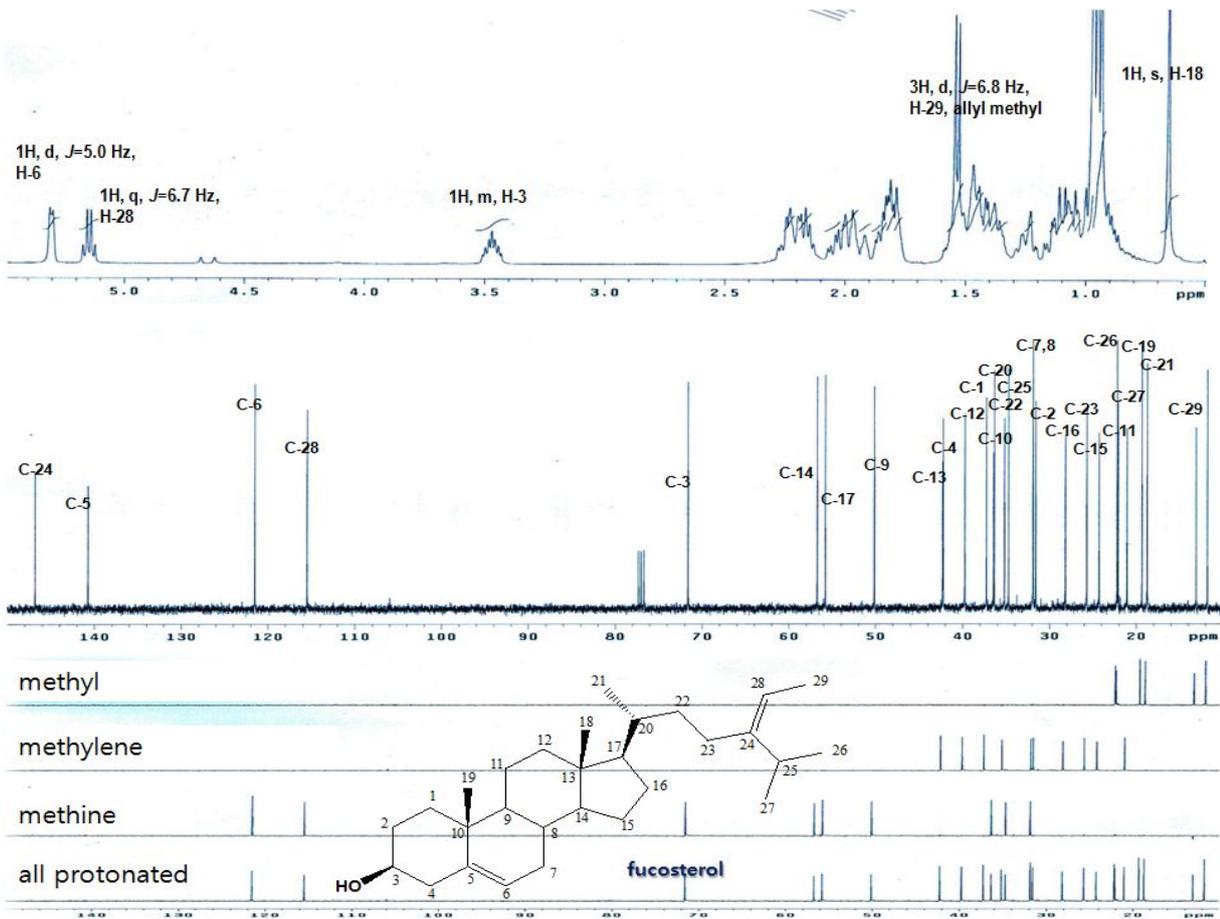


그림 16. 발효 톳의 phlorotannin 분획물의 주요 성분인 푸코스테롤의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) spectrum(위), fucosterol의 $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT(100 MHz) spectrum(아래)

발효 톳의 플로로탄닌 분획물의 주요 성분을 확인하기 위하여 NMR로 확인한 결과, fucosterol로 구조 동정이 된 것을 확인하였으며 수득률은 0.015%였다.

따라서, fucosterol 관련 선행 문헌조사 및 건강기능성식품 개발을 위한 표준물질로 사용이 가능한지 여부를 확인 하였다.

5. 결론 및 고찰

이상의 결과를 종합한 내용과 사전 문헌 조사의 내용을 바탕으로 하여 발효 톳의 건강기능성 식품으로서의 가능성을 검토한 내용은 다음과 같다.

※ 발효 톳의 지표물질중 하나로 선정된 fucosterol(푸코스테롤)은

1. 톳을 발효하기 전(0.42mg/g) 보다 발효한 후(0.98mg/g)에 그 함량이 증가한다.
2. 항산화, 항균, 당뇨, 혈액순환 및 성기능 장애 등에 효과가 있다고 보고되어 있다.
3. 간기능 개선, 심혈관 질환 개선, 성기능 개선 등에 관한 특허가 보고되어 있다.
4. Fucosterol의 골관절 질환 관련 연구 및 특허 등은 보고되어 있지 않다는 특성을 가지고 있어서 신기술 등록이 가능하며, 상품 개발 및 시장 개척이 용이한 장점을 확인하였다.

제 3 장 발효 톳 시료의 골 관련 효능 검색

제 1 절. 발효 톳 추출물의 항염 활성 골형성 촉진 확인(*in vitro*)

1. 발효 톳 시료의 경우 50 ppm의 농도에서 약 70% 정도 NO 생성을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다($p < 0.05$).
2. 발효 톳 시료의 경우 proinflammatory cytokine인 COX-1 및 COX-2 단백질의 발현량을 감소시켜 염증 반응을 억제할 것으로 판단된다.
3. 또한, 발효 톳 추출물은 proinflammatory cytokine인 TNF- α 및 IL-1 β 단백질의 발현량을 감소시켜 염증 반응을 억제할 것으로 판단된다.
4. 발효 톳 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 석회화 활성이 control에 비하여 약 42% 정도 더 좋은 효과를 보였다.

1. 발효 톳 추출물의 염증 관련 활성 확인

염증 반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질 적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 수복재생 하려는 기전 이다. 이러한 염증반응의 화학매개물 중 prostaglandin(PGs)과 nitric oxide(NO)는 발암 및 염증의 진행과정에 중요한 매개물질이다.¹⁸⁾ LPS는 그람 음성균의 외막 구성성분이며 발열물질로 널리 알려져 있다. 또한, LPS는 macrophage를 활성화 시키며 다양한 종류의 cytokine과 활성산소, nitric oxide (NO) 등을 생산한다.¹⁹⁾

NO는 정상적인 상태에서 존재하는 neuronal NOS와 endothelial NOS가 있는 반면 IFN- γ 등과 같은 cytokine에 의해 유도 발현 되는 iNOS로 구분된다. NO는 생체 내의 방어 작용에 관여하지만, 과잉 생성된 NO는 순환쇼크, 발암 및 염증 반응의 원인이 된다. 또한, COX-2는 정상세포에서는 그 농도가 매우 낮으나 염증관련세포에서 여러 자극(cytokine, endotoxin, mitogen)에 의해 유도 발현되어 통증이나 염증에 관여하는 PG류 생성에 관여한다.²⁰⁾

따라서, 본 연구진은 발효 톳 추출물 분획물이 염증성 질환의 예방 및 치료제 개발의 기초자료로 사용될 수 있는지를 탐색하고 그 가능성을 밝히기 위하여 순차적으로 용매 분획하여 추출물 및 분획물을 가지고 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 NO의 생성억제 효과를 조사하여 발효 톳 추출물 분획의 염증 억제 가능성을 확인하였다.

1.1. 실험 방법

18) Roy Pettipher et. al. A dominant role for chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper type 2 (Th2) cells (CRTH2) in mediating chemotaxis of CRTH2+ CD4+ Th2 lymphocytes in response to mast cell supernatants. 2006. Immunology Vol. 119-3, 362-368

19) Zhi-Yong Xiao. et. al. Inhibitory effect of linomide on lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α production in RAW264.7 macrophages through suppression of NF- κ B, p38, and JNK activation. 2007 Immunol Lett. Dec 15;114(2):81-5.

20) Battistini L, et. al. Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. 1994. Dev Neurosci. ;16(3-4):152-61.

1.1.1. 세포배양

Mouse macrophage cell 인 RAW 264.7 cell 은 한국세포주은행(서울대학교 의과대학, Korea)에서 분양 받아 연구실에서 계대배양 하여 사용하였다. RAW 264.7 mouse macrophage 세포를 세포 배양 접시에 부착시키고 penicillin 및 streptomycin 이 함유된 1% antibacterial-antifungal solution (PAA, Canada)과 10% FBS (PAA, Canada)를 첨가한 DMEM (PAA, Canada)을 사용하여 배양하였다. 배양액은 2~3일에 한 번씩 교체하며, cell seeding시 세포를 혼합한 배지와 tryphan blue용액을 1:1로 혼합하여 hemocytometer를 이용하여 tryphan blue에 의해 염색되지 않은 살아 있는 세포를 계수하였다. RAW 264.7 cell 의 배양 시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 5% CO₂를 계속 공급하였다.

1.1.2. NO assay

RAW 264.7 세포를 48 well plate에 2.5×10^5 cells/ml(5×10^4 cell/well)로 분주한 다음 24시간 후에 serum을 포함하지 않는 배지로 교환하여 24시간 동안 배양하였다. 발효 톳 분획 sample 을 1, 10, 50 μ g/ml의 농도로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS (0.5 μ g/ml)를 처리하고 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. LPS 처리 후 24시간에 배지를 수거하여 세포배양 상등액 50 μ l와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 50 μ l를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader 를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

1.2. 발효 톳 추출물의 농도별 항염 활성 결과

LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 생성된 nitrite의 양을 Griess 시약을 사용하여 표준화 된 발효 톳 추출물의 NO 생성 억제를 조사한 결과는 다음과 같이 나타났다.

LPS를 처리하지 않은 control 군의 NO 생성량은 $10.23 \pm 1.01 \mu\text{M}$ 로 나타났으며, LPS를 처리하여 염증을 유발한 군의 경우 $50.98 \pm 1.23 \mu\text{M}$ 로 나타나 LPS를 처리하지 않았을 때 보다 5배 까지 증가한 것을 확인 할 수 있었다.

반면, LPS를 처리하여 염증을 유발한 후 표준화 된 발효 톳 추출물을 처리하였을 때, PHLT3 분획층의 경우 $1 \mu\text{g/ml}(28.38 \pm 2.13 \mu\text{M})$, $10 \mu\text{g/ml}(20.25 \pm 2.49 \mu\text{M})$, $50 \mu\text{g/ml}(15.48 \pm 0.51 \mu\text{M})$ 로 나타났다.

이러한 결과는 LPS 만을 단독으로 처리하여 염증을 유발한 군의 경우보다 톳의 골세포 활성의 지표물질인 Fucosterol 이 다량 함유된 PHLT 3 경우 50 ppm의 농도에서 약 70% 정도 NO 생성을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 모든 실험 농도에서는 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았다.

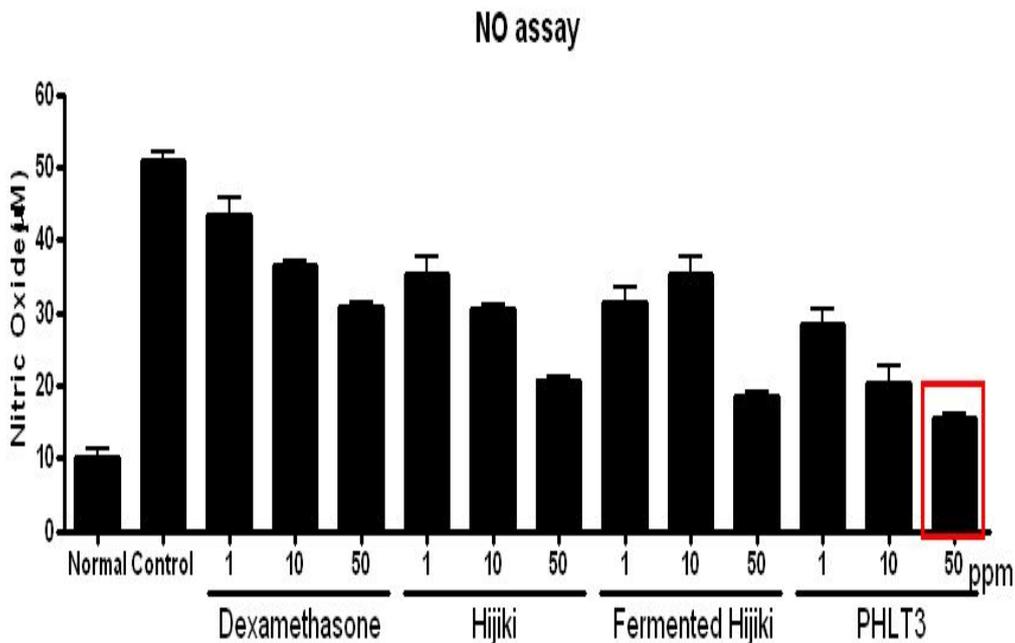


그림 17. 발효 톳의 항염 활성 확인 결과

2. 발효 톳 추출물의 핵심 항염증 지표의 분석

염증 반응은 영향을 받은 세포나 조직에서 관련 효소들의 작용하여 일어난다. 이 때 작용하는 효소들을 proinflammatory enzyme이라고 하며, inducible form of nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), TNF- α 등이 있으며, 이러한 proinflammatory enzyme 들에 의하여 NO 및 프로스타글란딘을 생성한다.

이중에서, COX-2는 통증 유발물질인 프로스타글란딘의 합성을 유도하는 효소로서, NO를 비롯한 기타 자극에 의해 합성이 촉진되기 때문에 COX-2의 발현을 억제하거나 활성을 억제하는 것은 골관절염 치료에 중요한 마커다.

특히, TNF- α 는 면역과 염증반응에서 가장 중요한 역할을 하는 proinflammatory cytokine으로 잘 알려져 있어 TNF- α 의 발현을 확인하여 조절하는 것 역시 골관절염 치료의 중요한 마커로서 작용한다.

따라서, 본 연구에서는 macrophage cell line인 RAW264.7 cell에서 표준화된 발효 톳을 대상으로 pro-inflammatory cytokine의 생성에 미치는 영향을 확인하여 발효 톳의 연골 보호 효과를 확인하였다.

2.1. RAW 264.7 cell에서 COX-1, COX-2, TNF- α 등의 발현 확인 방법

LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포를 이용하여 pro-inflammatory cytokine인 COX-1, COX-2, TNF- α , IL-1 β 의 생성에 미치는 발효 톳의 지표물질의 활성을 측정하였다. 10% FBS가 함유된 DMEM에서 배양한 RAW 264.7 세포를 24well에 1×10^6 cell/ml의 농도로 접종한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 조건에서 24시간 배양하였다. LPS(500 ng/ml)와 발효 톳의 지표물질을 첨가하여 시간별로 배양하여 각각의 세포에서 protein을 분리한 후, western blot의 방법을 이용하여 COX-1, COX-2, TNF- α , IL-1 β 의 발현량을 확인하였고, 대조 약물로는 시판중인 dexamethasone 등을 사용하였다.

2.2. RAW264.7 cell에서 COX-1 및 COX-2의 발현 확인 결과

발효 톱 추출물을 이용하여 NO 및 프로스타글란딘의 생성을 촉진하는 인자인 COX-1과 COX-2 단백질의 발현량을 westren blot로 확인한 결과 발효 톱 추출물은 LPS로 유도된 pro-inflammatory cytokine인 COX-1 및 COX-2 단백질의 발현량을 감소시킴을 확인하였다.

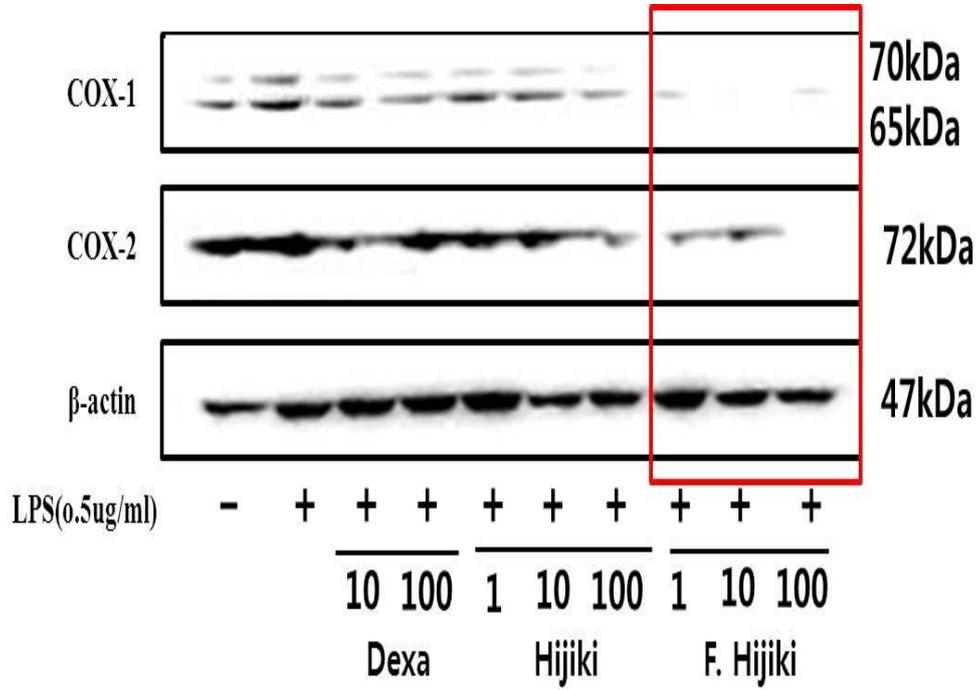


그림 18. RAW 264.7 cell에서 COX-1 및 COX-2의 발현 확인 결과

2.3. Raw264.7 cell 에서 TNF- α 및 IL-1 β 의 발현 확인 결과

발효 톱 추출물을 이용하여 염증반응을 촉진하는 인자인 TNF- α 및 IL-1 β 단백질의 발현 량을 westren blot로 확인한 결과 발효 톱 추출물 추출물이 LPS로 유도된 TNF- α 및 IL-1 β 단백질의 발현량을 농도 의존적으로 감소시킴을 확인하였다.

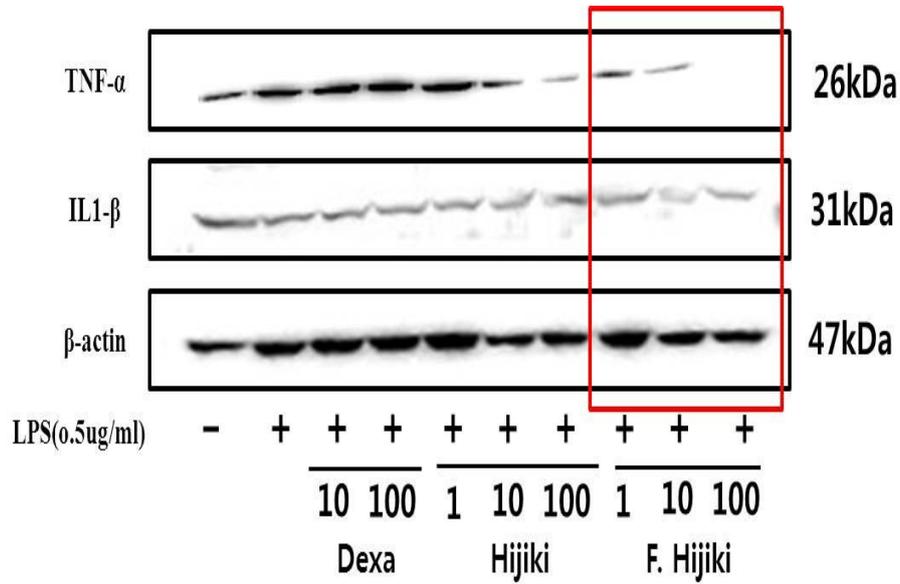


그림 19. RAW 264.7 cell에서 TNF- α 및 IL-1 β 단백질의 발현량 확인 결과

3. 발효 톳 추출물의 조골세포 석회화 활성화

MC3T3-E1 세포는 신생 C57B/6 mouse 의 두개골에서 추출한 것으로 in vitro 상에서 생체 내의 조골전구세포와 유사한 양상을 보여 조건에 따라 조골세포로 분화 하고, 골 조직상에서 콜라겐 합성 및 생성된 세포 외 기질에 Calcium Phosphate 결정을 침착하는 능력을 가져 체내의 골 생성을 연구하는데 적합하다고 알려져 있다.²¹⁾

또한, MC3T3-E1 cell 의 분화를 촉진하기 위해 골세포에서 Collagen Type 1 gene의 발현을 자극하지는 않지만 세포 외 기질에서 교원질 침착에 반드시 필요한 첨가 물질로 성숙세포에서 ALP의 활성을 유도하는 것으로 알려진 Ascorbic acid 와 골세포에 Ascorbic acid 가 존재하는 경우 Ascorbic acid 의 효과를 상승시키고 골세포의 분화를 촉진 시키고 세포 외 기질의 교원질 축적이나 ALP 활성을 더욱 증가시키는 것으로 알려진 β -glycerophosphate 를 α -MEM 배지에 첨가하여 MC3T3-E1 cell의 석회화를 촉진하였다.²²⁾

석회화의 정도 확인은 Alizarin red S staining을 이용하여 확인 하였는데 Alizarin red S 이 가지는 칼슘염에 대한 특이적 결합의 성질을 이용하여 cell에서 세포가 분화되어 calcium phosphate결정을 형성하는 것을 확인하였다.

3.1. 실험방법

3.1.1. 세포 배양

Mouse osteoblastic cell인 MC3T3-E1 은 한국세포주은행(서울대학교 의과대학, Korea)에서 분양 받아 연구실에서 계대배양하여 사용하였다. MC3T3-E1 조골전구세포는 polystyrene 세포 배양접시에 부착시키고 penicillin 및 streptomycin이 함유된 1% antibacterial-antifungal solution (PAA,canada)와 10% FBS(PAA,canada)를 첨가한 α -MEM (PAA,canada) 을 사용하여 5% CO₂와 95% 습도가 유지되는 37°C incubator 에서 기본 배양하였다. MC3T3-E1 세포의 골세포로의 분화는 세포를 혼합 한 배지와 trypan blue 시약을 1:1 로 섞은 것을 hemocytometer 을 이용하여 cell 을 counting 한 다음 24well plate 에 3×10^4 cell/well로 처리하여 이들 세포가 단층을 형성한 후 50 μ g/ml Vit. C(ascorbic acid) 와 10 mM β -glycerophosphate(β -GP)를 혼합한 differential media(DM media) 를 처리하여 골 세포의 무기질 화를 유도하였다.

3.1.2. Mineralization assay (Alizarin red staining)

세포를 처리 한 후 하루 간 배양 시킨 24well Plate에 MC3T3-E1 cell을 골 무기질화 시키는 Vit C와 β -GP 를 이용하여 톳 발효 산물의 mineralization 정도를 측정하였다. Vit C와 β -GP 를 처리한 cell plate에 발효 전 후의 톳을 1, 10, 100 μ g/ml 로 처리 하고 Positive Control 로 dexamethason을 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M 으로 처리하여 3주간 37°C CO₂ incubator 에서 배양 한 후 Mineralization 이 된 24well Plate 에서 배지를 제거한 후 PBS를 이용하여 Plate를 세척한 후 10% formalin solution 으로 4°C에서 12시간 동안 고정시켰다. Alizarin red solution(ARS, Sigma, USA)는 cell 을 고정시키는 동안 40 mM의 농도로 제작하여 pH를 4.2로 조정하였다.

21) HIROKO SUDO. et. al. In Vitro Differentiation and Calcification in a New ClonalOsteogenic Cell Line Derived from Newborn Mouse Calvaria. 1983. J Cell Biol. Jan;96(1):191-8.

22) Quarles LD. Prednisone-induced osteopenia in beagles: variable effects mediated by differential suppression of bone formation. 1992 Am J Physiol. J μ l;263:136-41.

고정시킨 cell에 ARS 로 5분간 염색 한 후 DW를 이용해 잔여 염색약을 washing 한 다음 PBS를 이용하여 염색된 부분이 마르지 않도록 한 후 현미경을 이용해 nodule형성을 확인한 다음 10% cetylpyridinium chloride(Sigma, USA)를 처리하여 15분간 반응시킨 후 용액을 96well Plate 에 옮겨 담아 562 nm 에서 흡광도를 확인하였다. 골 무기질화 정도의 비교는 negative control 및 positive control 로 사용한 dexamethasone을 이용하여 톳과 발효 톳의 골 형성 정도를 확인하였다.

3.2. 발효 톳 추출물위 골세포의 석회화 활성 실험 결과

21일간 cell 을 treat 한 결과 중 Alizarin red를 이용하여 염색 한 결과는 아래 사진에서 보이는 것과 같이 negative control (DM media) 와 dexamethasone에 비해 붉은색의 nodule이 증가한 모습을 눈으로 확인 할 수 있었으며 이를 10% cetylpyridinium chloride로 녹여 ELISA reader 로 흡광도를 확인하였다.

그림에 보이는 결과와 같이 발효 톳에서 positive control 로 사용한 dexamethasone 에 비해 calcium nodule 이 붉은 색으로 염색이 더욱 잘 된 것을 확인 할 수 있다.

발효 톳 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 negative control에 비하여 약 42% 정도 더 좋은 효과를 보였으며, (100 $\mu\text{g/ml}$ - 142.89 ± 2.48) PHLT 100 $\mu\text{g/ml}$ 역시 negative control 에 비해 약 46% 정도 더 좋은 효과를 보였다 (100 $\mu\text{g/ml}$ - 146.76 ± 1.54).

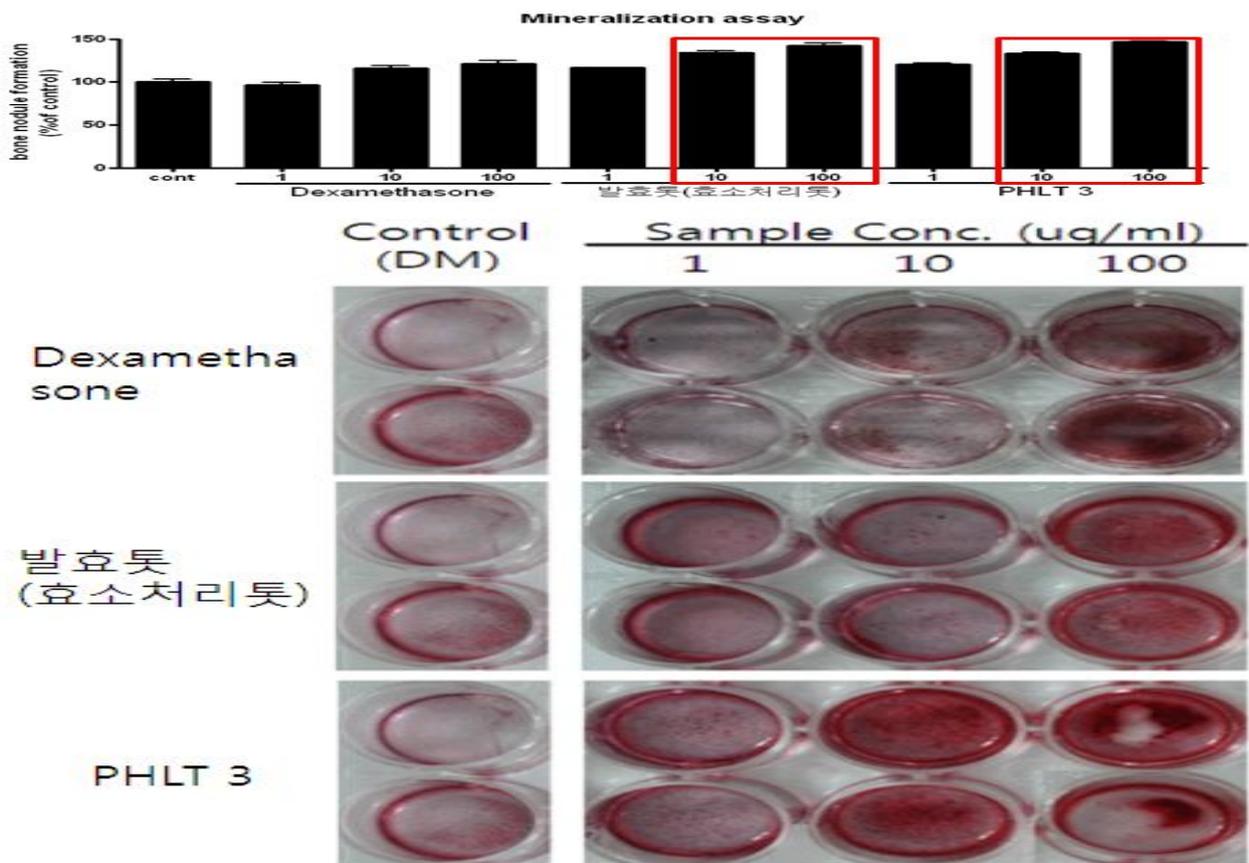


그림 20. 분획별 톳의 골세포 석회화 결과(위) Alizarin Red S 염색결과(아래)

제 2 절 퇴행성 골관절염 치료 기능을 확인하기 위한 in vivo 핵심 biomarker 분석

골관절 대상기능	연구 내용
골관절염 (퇴행성 골관절염)	<ul style="list-style-type: none"> - MIA를 이용한 골관절염 유발 Rat에서의 골관절염 기능 개선 효능 확인 - Rat에서의 COX-1, COX-2, TNF-α, IL-1, PGE등의 발현 확인

상기 연구내용에 따라 표준화 된 톡의 골관절염 동물모델에서의 효과를 검색한 결과 ;
발효 톡이 골 관절염 동물모델의 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

관련 특허 출원

1. 푸코스테롤(Fucosterol)을 유효성분으로 함유하는 골관절염 완화, 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품 (출원 예정)

※ 발효 톡 의 골관절염 동물모델을 이용한 효능 연구

발효 톡 의 퇴행성 골관절염 효능을 재확인하기 위하여 MIA를 주입하여 골관절염을 유도한 SD-Rat을 이용하여 퇴행성 골관절염 예방 및 억제 효과를 분석하였다.

골관절염은 일반적으로 퇴행성관절염으로 잘 알려져 있다. 이는 관절을 보호하고 있는 연골이 손상 또는 퇴화하고 뼈가 돌기처럼 성장하여 주변조직에 염증과 통증이 생기는 질환을 말한다.

골관절염은 관절부위의 외상, 관절의 과다 사용, 어긋난 모양으로 잘못된 연결된 관절, 또는 과체중으로 관절과 연골에 과도한 부담이 있을 때 잘 생긴다고 알려져 있다.

관절에서 연골은 뼈의 말단을 덮고 있는 견고하고 탄력성이 있는 조직으로 관절 운동 시에 윤활유의 역할과 뼈의 충격을 흡수하는 역할을 한다. 골관절염으로 연골 조직이 손상되는데, 나이가 들면서 연골은 노화 현상이 일어나 탄력성이 감소하게 된다.

연골의 탄력성이 감소하면 외상이나 과도한 운동에 의해 쉽게 부서지며 이로 인해 관절을 싸고 있는 활막에 염증이 생기고 이 염증으로 인해 분비되는 효소나 생화학 물질에 의해 연골 손상이 더 심해진다.

골관절염에 사용되는 비약물적요법은 침, 바이오피드백(biofeedback), 인지 행동 요법(CBT, Cognitive Behavioral Therapy), 운동, 마사지, 냉온 요법, 인위적 최면(hypnosis), 작업 요법(occupational therapy), 보조기구에 의한 기능회복 훈련(orthotics), 환자 교육, 물리 요법, 요가, 명상, 외과 수술, 경피신경 자극 치료(TENS), 체중 관리 등이 있다.

통증과 그 밖의 증상을 완화시키고자 약물요법을 실시하는데 이때 중요한 것은 부작용을 최소화시키며 안전하고 경제적으로 치료하는 것이다. 아세트아미노펜(acetaminophen)은 오직 진통효과만을 기대할 수 있으며 650mg을 1일 4회 투여한다. 최대 4g/day를 초과하지 않는다.

NSAIDs 계열의 약물보다 안전하여 가장 흔하게 사용된다.

가장 많이 사용되는 NSAIDs인 아스피린의 작용기전은 아라키도닉산경로(arachidonic acid pathway)에서 COX(CycloOxygenase)를 아세틸화시켜 세포 외막 프로스타글란딘의 증식을 비

가역적으로 차단하는 것으로 알려져 있다.

1. 실험재료 및 방법

1.1. 실험동물

체중 200g 내외의 수컷 Sprague-Dawley Rat을 구입하여 1주일간 적응시킨 후 사용하였다.

1.2. 골 관절염 유발

MIA 을 생리식염수로 3 g/ml의 농도로 용해한 후, Rat을 마취시키고 슬관절의 전면을 소독한 후, 관절강내로 MIA 용액 0.05 ml을 2주간 투여 한 Rat 에게 주사하여 골관절염을 유발 하였다.

1.3. 실험군의 분류

Normal 군은 MIA용액을 주사하지 않은 정상군으로 유발하기 전 15일 동안 증류수 1 ml을 경구투여 하였다.

대조군은 MIA용액을 주사하며 유발을 하기 전 15일 동안 증류수 1 ml을 경구투여 하였다

양성대조군은 MIA용액을 주사하며 유발을 하기 전 15일 동안 리프린놀 100 mg/kg 농도로 각 개체별로 1 ml씩 경구투여 하였다.

시험군은 MIA용액을 주사하며 유발을 하기 전 15일 동안 톡 (100 mg/kg)및 발효 톡(50, 100, 200 mg/kg)농도로 각 개체별로 1 ml씩 경구투여 하였다.

1.4. Weight Bearing Test

시험물질의 투여 전후 또는 전체 투여기간에 걸쳐 골 관절염 유발 동물의 행동 패턴을 확인한 후 측정일은 시험물질을 경구투여 한 후 4, 7, 11, 14 제 되는 날에 각각 시행하였다.

MIA에 의해 골관절염이 유발되면 Rat은 MIA를 투여하지 않은 발에 의지하여 tester의 holder안에 서게된다. Rat의 배가 기기의 센서에 닿지 않은 상태에서 왼쪽, 오른쪽 각각의 발 무게(g)를 측정하여 나타내었다.

실험결과는 양쪽 발의 무게에 대한 오른쪽 발의 무게 비율을 계산하여 평균(%) ± 표준오차로 표시하였다.

$$\text{계산식} = [\text{weight on right leg}/(\text{weight on the left leg} + \text{weight on the right leg})] \times 100$$

1.5. Bone Micro CT 촬영 방법

골 관절염의 변화를 확인하기 위하여 4주간 시료를 투여한 Rat 을 희생하여 적출한 무릎관절을 Micro CT(Inveon™, Simens Medical Solutions USA,Inc.)를 이용해 톱 발효 대사물이 골 대사에 미치는 영향을 확인하였다.

CT 촬영은 한국기초과학지원연구원 오창분원에 비치되어 있는 Micro CT 를 이용하여 대퇴골의 CT를 촬영하였다.

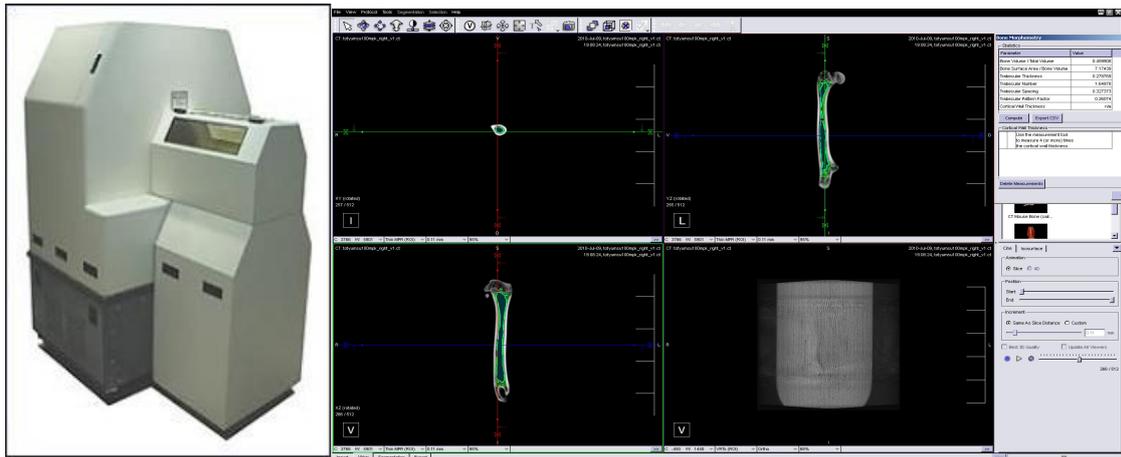


그림 21. Micro CT 장비와 측정 시 확인 할 수 있는 사진 예시.

1.6. Histology 분석

Histology 분석은 한국 실험 병리(서울) 에 조직을 의뢰하여 분석을 진행하였다.

조직 slide 제작 및 slide 사진 촬영 후 data 분석은 본 연구원이 참관한 상황에서 scoring 및 discussion 하였다.

골 관절면의 형태 관찰과 변화를 알아보기 위하여 H&E 염색법, Toluidin Blue 염색법 및 Safranin O 염색법을 시행 하였다.

염색한 조직은 현미경을 이용하여 촬영 한 다음 image analysis program(Leica application suite, Leica, Germany)을 이용하여 조직의 intensity를 측정하여 대조군 과 비교하였다.

1.7. 골관절염 Rat 모델에서의 염증성 사이토카인의 측정

투여 후 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후, 염증성 지표로서 COX-1, COX-2 및 IL-1 β , TNF- α , PGE₂ 등의 사이토카인을 측정하였다.

염증성 지표인 COX-1과 COX-2의 경우는 분리한 혈청을 사용하여 Western Blot의 방법으로 COX-1과 COX-2의 발현 량을 확인하였다.

IL-1 β , TNF- α , PGE₂ 등의 발현 양을 측정하기 위해 Rat-MIDTM IL-1 β , TNF- α ELA(Nordic bio Sci., USA)를 구입하여 발효 톱을 투여한 Rat의 혈청을 이용해 혈청 내 IL-1 β , TNF- α 의 함량을 확인 하였다.

먼저, Biotinylated Osteocalcin 을 100 μ l 씩 96 well plate 에 넣어준 다음 sealing 하여 30분 간 RT, 300rpm microtitre plate mixing apparatus 에서 반응 하여 Plate에 Osteocalcin이 흡착 되게 한다.

그 다음, 300 μl washing solution 으로 5번 washing 하였다. Washing 한 plate에 primary antibody 와 primary incubation buffer를 1 : 100의 비율로 섞어 각각의 well에 150 μl 넣은 다음 standard 와 control, sample을 20 μl 씩 antibody mixture 가 들어있는 plate 에 넣고 60분간 RT, 300 rpm microtitre plate mixing apparatus 에서 반응 하였다.

그 후 plate를 다시 300 μl washing solution 으로 5번 washing 하였다. Washing 한 plate에 100 μl secondary antibody 를 각각의 well 에 넣고 60분간 RT, 300 rpm microtitre plate mixing apparatus 에서 반응 하였다.

1.8. 통계분석

실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하고 실험 데이터는 repeated ANOVA를 사용하여 분석하며 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

2. 결과 및 고찰

2.1. Weight Bearing Test 결과

Rat 의 통증 정도에 따른 좌우 밸런스의 차이를 측정하여 관절염의 정도를 측정하는 weight bearing test 결과 유발 이후 day 별로 좌 우 밸런스의 차이가 생긴다,

그중 MIA 에 의해 유발만 한 (-) control 군은 초기 측정값에 비해 약 10~17% 좌우 발의 무게 차가 생기는 것을 확인하였다.

Weight Bearing Test 확인 결과를 각각의 실험군을 정상군, 음성대조군과 비교하여 그림 33 에 나타내었다.

그에 비하여 positive control 로 이용한 Liprinol 은 골 관절염 유발전에 비해 크게 밸런스 차이가 나타나지 않았으며, sinbaro capsule 의 경우는 day 4일에서 밸런스의 차이가 발생하였다가 control 에 비해 급격히 밸런스가 회복되는 것을 확인하였다.

또한, 표준화 톱 추출물의 경우 Liprinol과 비슷한 밸런스 회복을 보이는 것을 확인 할 수 있었다.

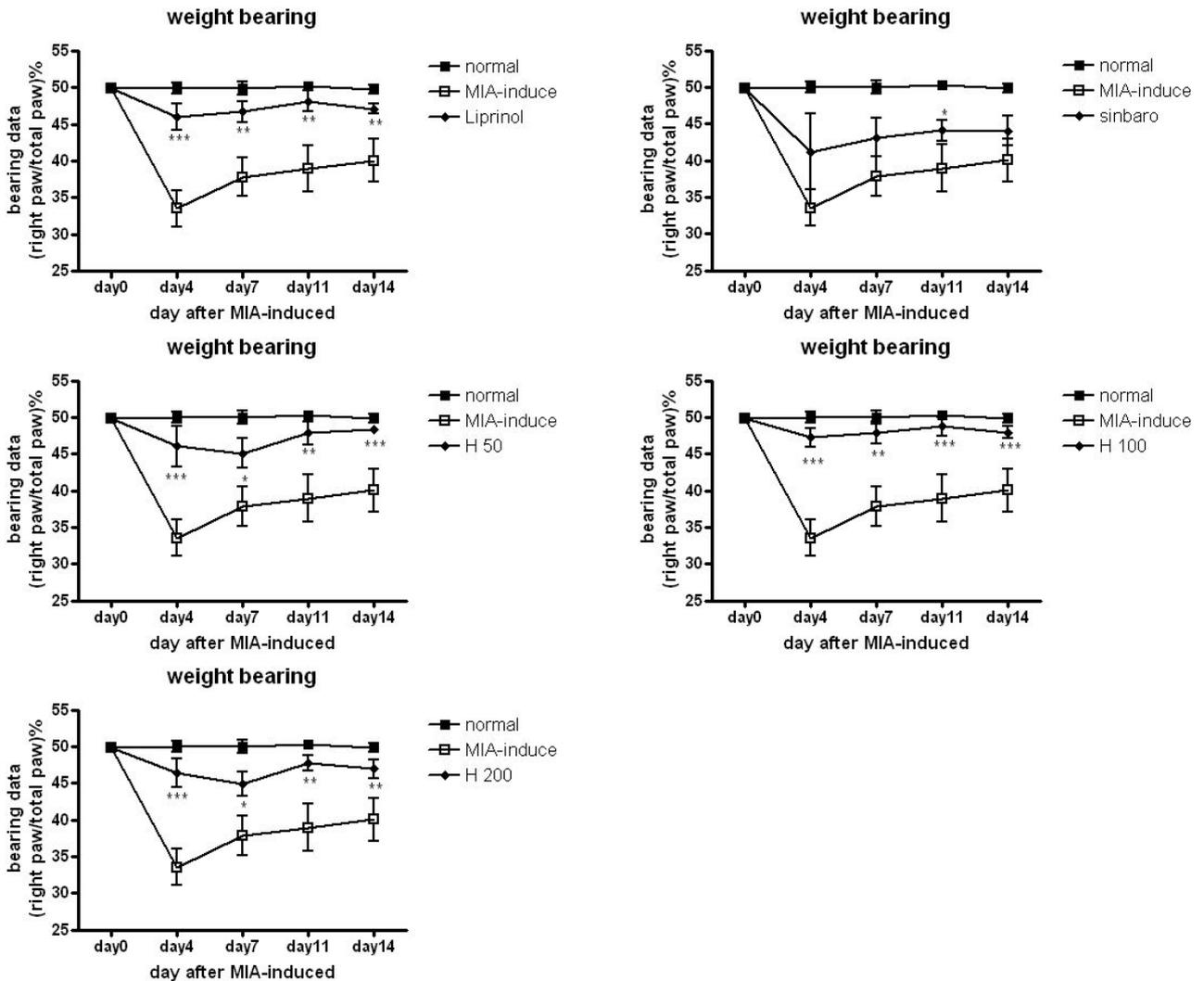


그림 22. Weight Bearing Test 확인 결과

2-2. Bone Micro CT 분석 결과

MIA를 이용하여 무릎 관절 연골에 관절염을 유발한 rat 에서의 관절 표면 및 슬개골의 형태 변화를 확인하기 위하여 Micro CT를 이용하여 무릎 관절 부분을 촬영한 결과를 그림 38.에 나타내었다.

MIA 에 의해 유발만 한 (-) control 군의 관절 연골이 파괴된 것과 슬개골의 형태가 변화한 것과, 반월상 연골의 위치가 정상 위치에서 벗어나 있는 것을 확인하였다. positive control 로 사용한 sinbaro 와 liprinol 에서는 표면 일부의 연골이 손상이 나타났으며, liprinol 의 경우 반월상 연골의 손상이 심하게 나타난 것을 확인하였다.

실험 시료인 발효 톳 추출물의 경우 100 mg/kg 그룹에서 관절 표면의 손상이 거의 없는 것을 확인하였고, 50 mg/kg 와 200 mg/kg 그룹에서는 100 mg/kg 그룹에 비해 무릎 연골의 손상이 심하게 나타난 것을 확인 할 수 있었다.

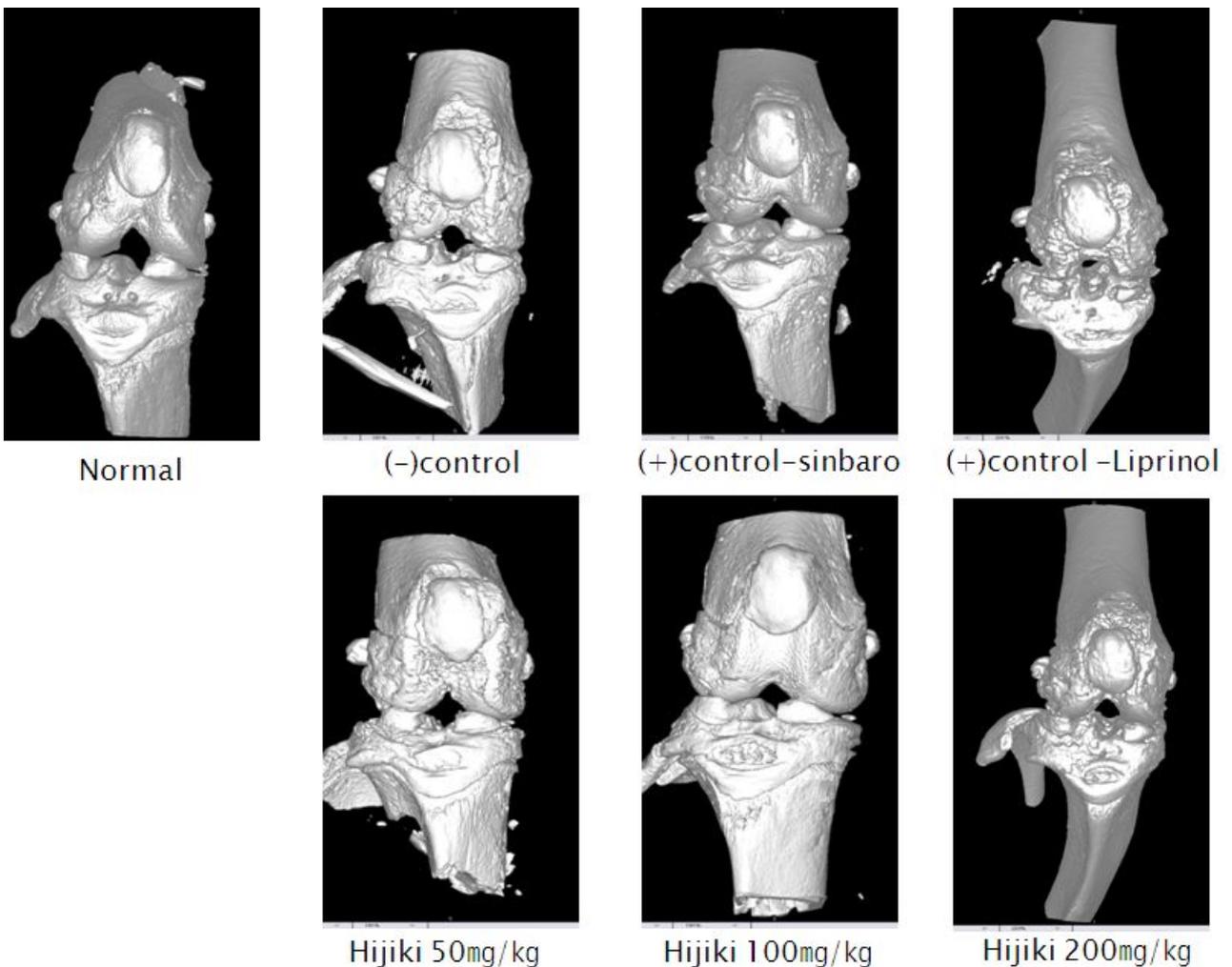


그림 23. Micro CT 확인 결과

Normal; 정상군, N.C; Negative Control 군, Sin; Sinbaro Capsule 투여군, Lip.; Liprinol 투여군, H 50 ; 발효 톳 50 mg/kg 투여군, H 100; 발효 톳 100 mg/kg 투여군, H 200; 발효 톳 200 mg/kg 투여군,

2.3. Histology 분석 결과

Rat의 무릎 관절에서 H&E, T.B. 및 S.O. 염색 슬라이드를 이용한 조직병리학적 관독을 통하여 정상군, MIA에 의한 관절염 유도군 및 유도 후 실험물질 처치 군 간에 관절 연골의 변성 정도, 세포의 이상 양상 및 기질의 염색 정도에 따라 각각 0점~6점, 0점~3점, 0점~4점으로 점수화 하였다.

MIA를 처치하지 않은 정상군인 [Normal]군에서는 모든 샘플에서 어떠한 유의적인 병변도 관찰되지 않았다.

MIA를 통하여 관절염을 유발시킨 뒤 실험물질을 처치하지 않은 대조군인 [Control]군에서는 다섯 개체 중 세 개체에서 관절연골의 표층이 소실되고 구조변형(disorganization)이 일어나면서 세포수의 감소를 동반하였고, 세포 주변 기질에서만 염색상이 나타나는 소견을 보였다.

MIA를 통하여 관절염을 유발시킨 뒤 실험물질을 처치한 [50]군에서는 다섯 개체 중 두 개체에서 관절연골이 심하게 구조 변형된 것이 관찰되었으며, [50-9]를 제외한 나머지 개체에서는 세포수의 감소가 나타나면서 염색상이 감소되거나 전체적으로 소실되는 소견을 보였다.

MIA를 통하여 관절염을 유발시킨 뒤 실험물질을 처치한 [100]군에서는 다섯 개체 중 두 개체에서 관절연골의 표층이 소실되는 미란이 관찰되었으며, 이러한 소견이 관찰된 두 개체를 포함하여 — 세 개체에서는 세포수의 감소가 나타나면서 염색상이 영역사이 기질 또는 세포 주변 기질에서만 나타나는 소견을 보였다.

MIA를 통하여 관절염을 유발시킨 뒤 실험물질을 처치한 [200]군에서는 다섯 개체 중 [200-10]을 제외한 네 개체에서 관절연골이 심하게 구조변형 되면서 염색상이 전체적으로 소실된 것이 관찰되었으며, 모든 개체에서 세포수의 감소가 나타났다.

MIA를 통하여 관절염을 유발시킨 뒤 실험물질을 처치한 [S]군에서는 다섯 개체 중 [S-4]를 제외한 네 개체에서 관절연골의 표층이 소실되는 미란이 관찰되거나, 경미하거나 심한 구조변형 소견이 나타났다. [S]군 내 모든 개체에서 세포수의 감소가 관찰되었으며 염색상이 감소되거나 전체적으로 소실되는 소견을 보였다.

MIA를 통하여 관절염을 유발시킨 뒤 실험물질을 처치한 [Li]군에서는 다섯 개체 중 [LI-2, 4] 두 개체는 어떠한 유의적인 병변도 관찰되지 않았으며, [Li-8, 9] 두 개체에서는 세포수의 증가 소견만 나타났다. [Li-6] 개체에서는 관절연골의 표면이 불규칙적인 소견을 보였으며, 세포수의 감소 및 감소된 염색상이 나타났다.

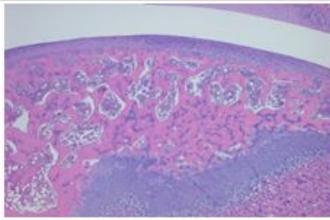
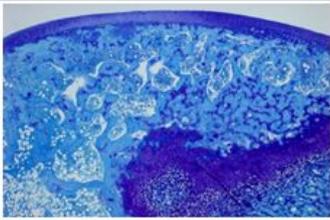
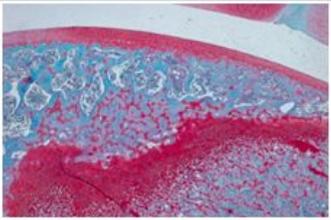
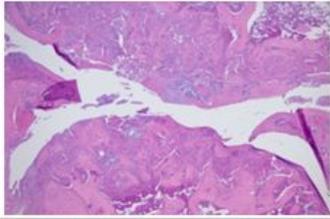
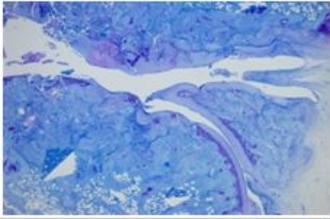
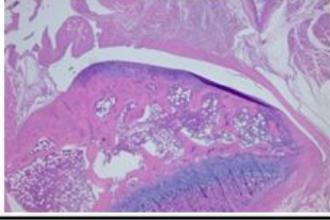
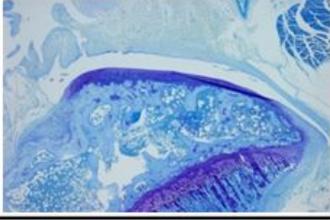
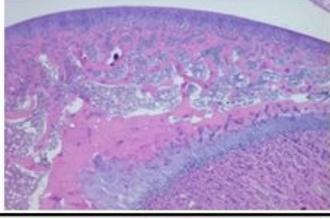
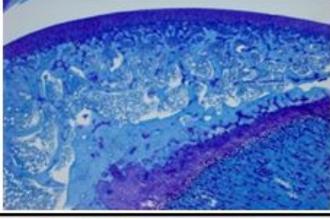
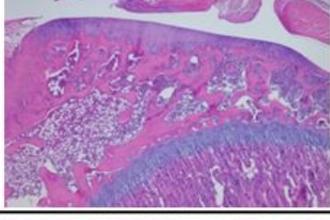
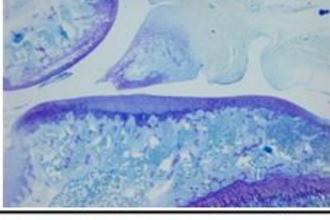
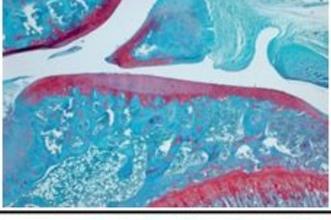
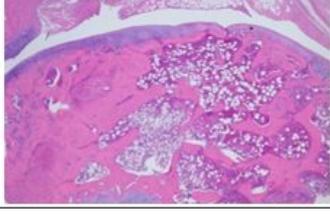
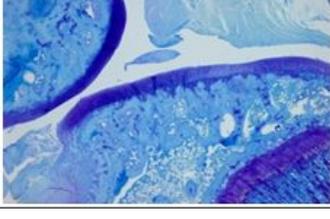
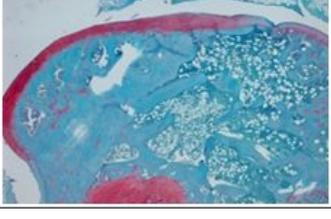
	H & E	Toluidin blue	Safranin O
Normal			
Control			
H 50			
H 100			
Sinbaro			
Liprinol			

그림 24. Histology staining 결과 Hematoxylin & Eosin(좌), Toluidin blue(중), Safranin O(우)
 Normal;정상군, Control : MIA 유발군, Sinbaro; Sinbaro Capsule 투여군, Liprinol; Liprinol 투여군,
 H 50; 발효 톳 50mg/kg 투여군, H 100; 발효 톳 100mg/kg 투여군,

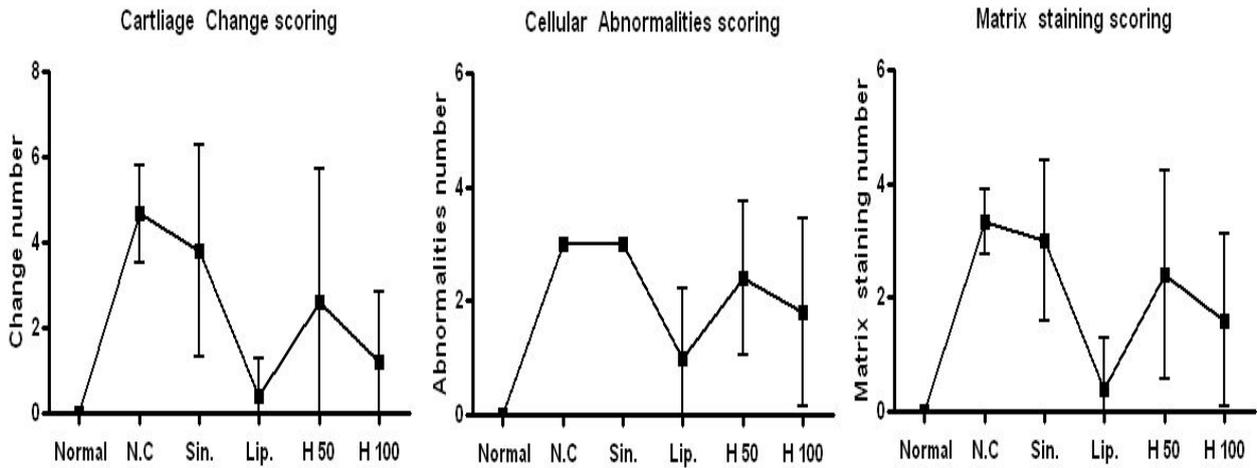


그림 25. 조직 분석 scoring 결과

Normal; 정상군, N.C; Negative Control 군, Sin; Sinbaro Capsule 투여군, Lip.; Lipronol 투여군, H 50; 발효 톱 50 mg/kg 투여군, H 100; 발효 톱 100 mg/kg 투여군,

Scoring 기준 : Cartilage change (0 = normal, 1 = irregular surface, including fissures into the radial layer, 2 = pannus, 3 = absence of superficial cartilage layers (≥ 6), 4 = slight disorganization (an absent cellular row and some small superficial clusters), 5 = fissures into the calcified cartilage layer, 6 = disorganization (chaotic structure, clusters and osteoclastic activity)), Cellular abnormalities (0 = normal, 1 = hypercellularity, including small superficial clusters, 2 = clusters, 3 = hypocellularity), Matrix staining (0 = normal/slight reduction of staining, 1 = staining reduced in the radial layer, 2 = staining reduced in the interterritorial matrix, 3 = staining present only in the pericellular matrix, 4 = staining absent)

2.4. Rat 혈청에서의 COX-1 및 COX-2의 발현 확인 결과

발효 톱 추출물을 이용하여 NO 및 프로스타글란딘의 생성을 촉진하는 인자인 COX-1과 COX-2 단백질의 발현량을 westren blot로 확인한 결과 표준화 된 톱 추출물이 골관절염을 유발한 Rat의 혈청에서 COX-1, COX-2 단백질의 발현 량을 감소시킴을 확인 하였다.

혈청 중에 존재하는 COX-1 및 COX-2의 발현 량을 western blot 방법으로 확인한 결과 골관절염을 유발한 Control 군의 경우, 관절염을 유발하지 않은 Normal 군과 비교하였을 때 COX-2의 발현 량이 현저하게 증가된 것을 확인 할 수 있었다.

그리고, Positive Cotrol로 사용한 기능성식품인 Lyprinol 군의 경우, 관절염을 유발한 Control 과 비교하여 COX-2의 발현 량이 큰 차이를 나타내지 않았다.

하지만, 발효 톱 추출물의 경우, 골관절염을 유발하였음에도 불구하고, Control 군과 비교하였을 때 COX-2의 발현 량을 현저하게 감소시켰으며, 기능성식품인 Lyprinol 보다 크게 감소함을 확인하였다.

이러한 결과는 리프린놀이 염증 유발을 유발하는 LOX(Lipoxygenase)의 작용을 조절하는 것과는 다르게 발효 톱 추출물이 COX(cyclooxygenase) 작용에 관여하여 염증을 조절한다는 것을 의미한다. 따라서, 발효 톱은 골관절 기능 개선 기능성식품의 개발을 위한 소재로 매우 의미가 있다.

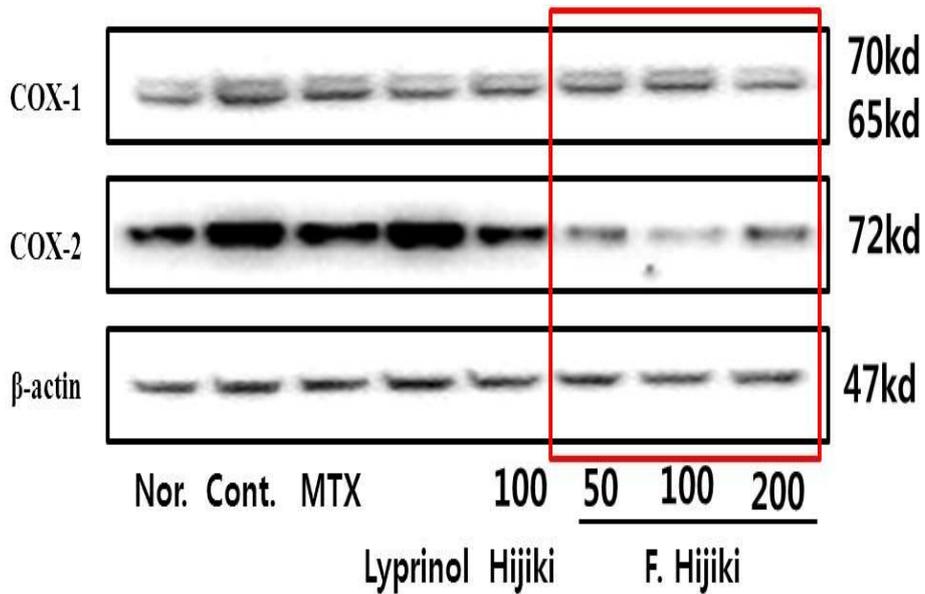


그림 26. 골 관절염을 유발한 Rat 혈청에서의 COX-1 및 COX-2의 발현 확인결과

2.5. Rat 혈청에서의 TNF- α 및 IL-1 β 의 발현 확인 결과

발효 톳을 이용하여 Rat의 혈청 중에 존재하는 TNF- α 함량을 ELISA Kit를 사용하여 확인한 결과 TNF- α 의 함량은 골관절염을 유발한 Control 군의 경우, 관절염을 유발하지 않은 Normal 군과 비교하였을 때 약 2정도(203.10 ± 6.82 %) 증가한 것을 확인하였다.

그리고, Positive Cotrol로 사용한 Lyprinol 군의 경우, 관절염을 유발한 Control과 비교하여 TNF- α 의 함량을 약 20% 정도 감소시켰다.

하지만, 발효 톳 추출물의 경우, 골관절염을 유발하였음에도 불구하고, Control 군과 비교하였을 때 TNF- α 의 함량을 50 mg/kg의 경우 22%, 100 mg/kg의 경우 30%, 200 mg/kg의 경우에는 42%(58.33 ± 2.17 %) 가량을 감소시킨 것을 확인 하였다.

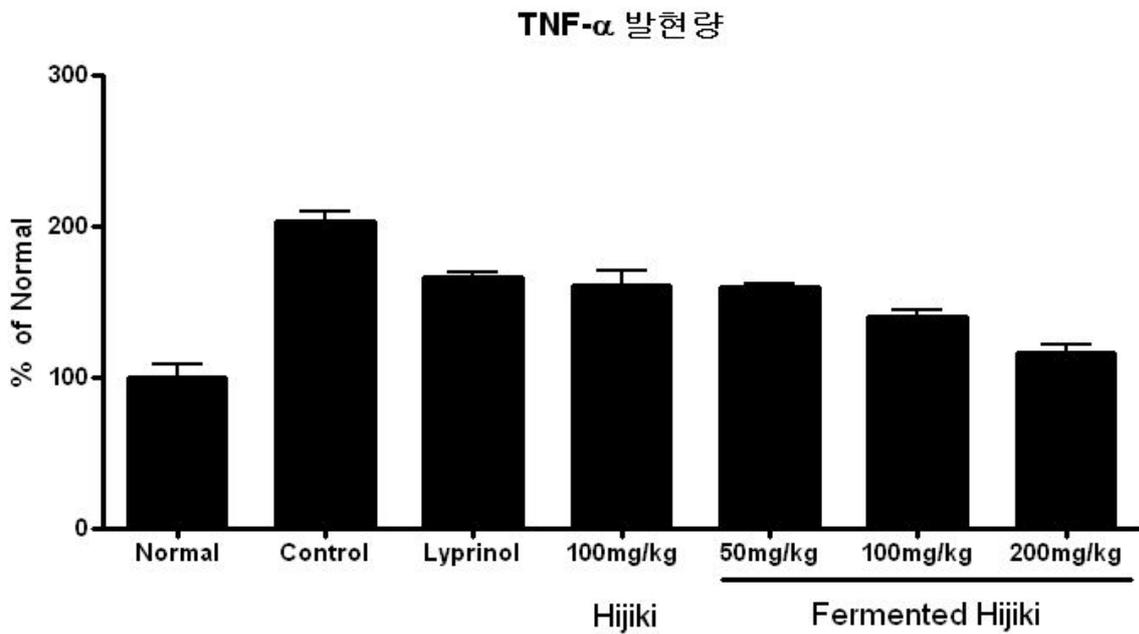


그림 27. 골 관절염 치료모델에서의 TNF- α 발현량 결과

또한, 혈청 중에 존재하는 IL-1 β 의 함량을 ELISA Kit를 사용하여 확인한 결과 골관절염을 유발한 control 군의 경우, 관절염을 유발하지 않은 Normal 군과 비교하였을 때 약 2.2배 정도 (218.10 \pm 1.32 %) 증가한 것을 확인하였다.

그리고, positive cotrol로 사용한 Lyprinol 군의 경우, 관절염을 유발한 control과 비교하여 TNF- α 의 함량을 약 30% 정도 감소시켰다.

하지만, 발효 톳 추출물의 경우, 골관절염을 유발하였음에도 불구하고, Control 군과 비교하였을 때 IL-1 β 의 함량을 50 mg/kg의 경우 37%, 100 mg/kg의 경우 48%, 200 mg/kg의 경우에는 52%(48.20 \pm 1.61%) 가량을 감소시킨 것을 확인 하였다.

이러한 결과는 리프린놀이 염증 유발 인자 중 prostaglandin의 작용을 조절하는 것과는 다른 기전으로 발효 톳 추출물이 염증을 조절한다는 것을 의미한다. 따라서, 발효 톳은 골관절 기능 개선 기능성식품의 개발을 위한 소재로 매우 의미가 있다.

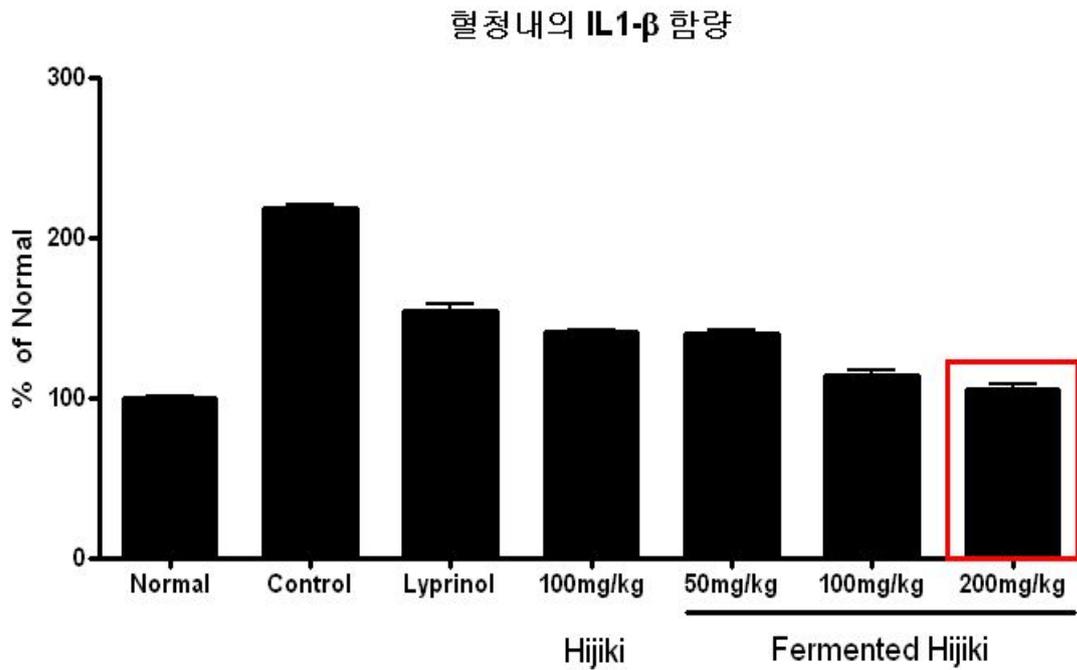


그림 28. 골 관절염 치료모델에서의 IL-1 β 발현량 결과

제 2 절 폐경기 골다공증 치료 기능을 확인하기 위한 in vivo 핵심 biomarker 분석

골관절 대상기능	연구 내용
골다공증	- 난소절제로 골다공증을 유발한 Rat에서의 골다공증 개선 효능 확인 - Rat에서의 Osteocalcin, CTx 등의 발현 확인

상기 연구내용에 따라 발효 톱의 난소적출 골다공증 동물모델에서 효과를 검색한 결과 ; 발효 톱이 난소적출로 유발된 골다공증의 개선에 효능이 있음을 확인하였다.

23)

관련 논문 개제

JOURNAL OF MEDICINAL FOOD
J Med Food 15 (4) 2012, 384-390
 © Mary Ann Liebert, Inc., and Korean Society of Food Science and Nutrition
 DOI: 10.1089/jmf.2011.1827

***Hijikia fusiforme* Protects Against Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rats**

Sang-Yong Park,^{1,*} Jung Min Lee,^{1,*} Don-Gil Lee,¹ Heon-Sub Shin,¹ Jung Eun Yang,¹
 Eun Ji Yi,¹ Jae Hee Park,¹ Yu Jin Jeon,² Da-Eun Nam,³ and Tae-Hoo Yi¹

관련 특허 출원

출원 번호 통지서

출원 일자 2011.03.22
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(01)
 출원 번호 10-2011-0025540 (접수번호 1-1-2011-0210550-87)
 출원인 명칭 경희대학교 산학협력단(2-2004-007362-3)
 대리인 성명 안소영(9-2000-000155-5)
 발명자 성명 이태후 신현섭 박상용 양정은 이든길
 발명의 명칭 모자반 추출물을 유효성분으로 함유하는 폐경기후 골다공증의 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품

출원 번호 통지서

출원 일자 2011.03.22
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(02)
 출원 번호 10-2011-0025541 (접수번호 1-1-2011-0210551-22)
 출원인 명칭 경희대학교 산학협력단(2-2004-007362-3)
 대리인 성명 안소영(9-2000-000155-5)
 발명자 성명 이태후 신현섭 박상용 양정은 이든길
 발명의 명칭 발효 톱 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 골 질환 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품

23) 본 연구의 결과는 1차년도 과제인 “발효를 이용한 해조류 유래 한약 소재의 골형성 촉진 소재 및 관련 제품의 개발”의 결과임.

※ 골다공증 동물모델 실험

발효 톱의 골다공증 효능을 확인하기 위하여 골다공증을 유도한 SD-Rat을 이용하여 골다공증 치료 및 개선 효과를 분석하였다.

골다공증 동물 모델은 골 소실이 가속화되는 모델과, 골 형성이 감소되는 모델로 나눌 수 있다. 골 소실이 가속화되는 모델로는, 정소절제 흰쥐 모델, 난소절제 흰쥐 모델, 난소절제 원숭이 모델 등이 있다. 골 형성이 감소되는 모델로는, 고령의 흰쥐 또는 생쥐 모델, 글루코코르티코이드 처리한 흰쥐 모델, 고령의 개 또는 원숭이 모델, 글루코코르티코이드 처리한 돼지 모델 등이 있다.

대부분의 골다공증 환자들은 여성에서 폐경에 의해 나타나는 에스트로겐 감소와 관련되어 있으므로, 골다공증 치료제 개발을 위한 동물 모델로서는 난소절제 동물모델이 가장 적합한 것으로 알려져 있다. 따라서, 사람에게서 골다공증 치료효과를 예측하기 위한 동물모델로서는 난소절제 동물 모델이 가장유용하며, 현실적으로 난소절제 흰쥐 모델이 가장 바람직하다.

Rat은 골다공증의 연구에 가장 널리 사용되는 실험동물로서 사용빈도가 지속적으로 증가하고 있다. Rat은 구입, 유지에 비용이 저렴하고 성장이 빠르며 상대적으로 life span이 짧고 skeleton이 잘 알려져 있으므로 널리 사용되고 있으며 골다공증에 대해 가장공통적인 몇 가지 위험인자에 대해 우수한 모델로서 입증되어 본 실험에서는 SD rat 을 이용한 난소적출 골다공증 모델을 이용 하여 발효 톱의 골다공증 치료 효과를 확인 하였다.²⁴⁾

1. 실험재료 및 방법

1.1. 실험동물의 골다공증 유발

6주령 female SD rat (Dae-han Bio., Korea) 72마리를 각 그룹 당 9마리씩 8그룹으로 분류하여 사육 하였다. 사육실은 경기 바이오 센터 지하에 있는 동물 사육실을 이용 하였으며 사육 환경은 온도 23±1℃ 습도 55±5% 명암은 12시간 주기로 (light 8:00 ~ 20:00) 조절하여 Rat cage 에 3마리씩 사육하였고 사료와 물은 일반 식이를 사용하였다. 또한, 실험동물은 매주 1회 무게를 측정하여 체중의 증가를 확인하였다.

1주일간 적응기간을 거친 Rat 을 Ketarmin hydrochloride(Ketara, Yuhan Co.,Korea) 과 2% Xylazine Hydrochloride(Rumpun, Bayel Co., Korea) 을 4 :1 비율로 혼합한 주사액을 10 ml/kg 로 복강 주사 하여 전신마취 하였다.

마취 후 등 부위의 털을 제거하고 좌 우 난소위치의 피부, 근육, 복막을 절개한 후 5호 실크 봉합사로 난소를 결찰 한 후 난소를 적출한다.

난소 적출 후 복막과 근육, 피부를 각각 5호 실크 봉합사로 봉합한 후 15주간 골다공증을 유발 시켰다.

수술 후 5일 간 겐타마이신(SK chem., Korea) 1ml/kg을 투여하여 2차 감염을 방지하였고, 수술 첫 주 매일 포비돈을 이용하여 수술 부위를 소독하고, 이후3주간 주 1회 포비돈을 이용하여 소독하였다.

골다공증 유발의 확인은 각 군별로 1마리를 희생하여 골밀도를 측정하여 골량의 감소를 확인 하였다.

24) 생약(한약)제제의 효력 시험 지침. 2008. 식약청



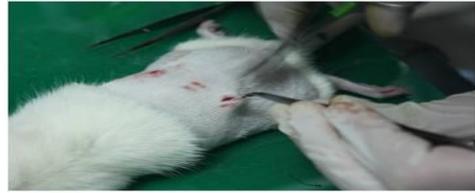
마취



털 제거



등 피부 절개



복막 절개



난소 결찰 및 절개



복막 및 피부 봉합



수술부위 소독(포비돈)

그림 29. 골다공증 유발 수술 방법

1.2. 실험군의 분리 및 시료의 투여

발효 톳의 골다공증 치료 효능을 확인하기 위하여 난소적출 수술을 한 후 15주간 유발 시킨 Rat 72마리를

- ① 수술을 하지 않은 군 (normal)
- ② 난소를 적출하지 않고 절개만 한 후 Vehicle 을 투여한 군 (sham)
- ③ 난소 적출 후 Vehicle 만 투여한 군 (ovariectomized, 이하 OVX)
- ④ 난소 적출 후 톳 열수 추출물을 투여한 군(Hijiki)
- ⑤ 난소 적출 후 발효 톳 추출물을 투여한 군(F.Hijiki 25, 50, 100 mg/Kg)

으로 각 그룹당 9마리씩 8그룹으로 나누어 매일 일정시간에 각 시료 별로 분류한 군에 마리당 1 ml씩 투여할 수 있게 준비한 시료를 Rat용 존데를 이용하여 6주간 위내 경구투여 하였다. Sham, OVX-control, normal 군은 시료를 대신하여 시료를 녹일 때 사용한 vehicle (0.5% CMC수용액)을 투여하였다.

1-3. 실험 기간 동안의 체중변화 측정

난소 적출을 시행 한 후 매주 1회 Rat 의 체중을 체중계를 사용하여 측정 하였다.

1-4. 혈액학적 변화 측정

투여 기간 종료 후 실험 동물을 희생 할 때 시험동물로부터 혈액을 채취하여 혈액 내에 있는 Biomarker 를 측정하였다.

현재까지 골다공증과 관련된 골형성 biomarker는 혈액에서 확인하는 Osteocalcin이 있고, 골 흡수 marker는 소변에서 측정하는 pyridinoline이나 혈액에서 측정하는 CTx, NTx 가 알려져 있다.

아래 표는 식약청에서 가이드라인으로 제시한 골대사 조절 주요 biomaker들과 이들의 역할을 나타낸 것이다.

표 9. 식약청 기준 골 대사 biomarker

	골 대사 조절	주요 Biomarker
생화학적 검사 (골 활성 검사)	골 형성 지표	(heat labile) alkaline phosphatase (혈청)
		Osteocalcin (혈청)
	골 흡수 지표	Hydroxyproline (뇨)
		Pyridinoline (뇨)
		Hydroxy pyridinoline (뇨)
		CTx (혈청)
		NTx (혈청)

이번 연구에서는, 이 biomaker들 중 Osteocalcin 과 CTx를 측정하였다.

1.4.1. 골 형성 biomarker(Osteocalcin) 측정 방법

Serum내의 골 형성 biomarker인 Osteocalcin의 발현양을 측정하기 위해 Rat-MID™ Osteocalcin ELA(Nordic bio Sci., USA)를 구입하여 발효 톳을 투여한 Rat의 혈청을 이용해 혈청내 Osteocalcin 발현양을 확인하였다.

먼저, Biotinylated Osteocalcin 을 100 μ l 씩 96 well plate 에 넣어준 다음 sealing 하여 30분 간 RT, 300rpm microtitre plate mixing apparatus 에서 반응 하여 Plate에 Osteocalcin이 흡착 되게 한다.

그 다음, 300 μ l washing solution 으로 5번 washing 하였다. Washing 한 plate에 primary antibody 와 primary incubation buffer를 1 : 100의 비율로 섞어 각각의 well에 150 μ l 넣은 다음 standard 와 control, sample을 20 μ l씩 antibody mixture 가 들어있는 plate 에 넣고 60 분간 RT, 300 rpm microtitre plate mixing apparatus 에서 반응 하였다.

그 후 plate를 다시 300 μ l washing solution 으로 5번 washing 하였다. Washing 한 plate에 100 μ l secondary antibody 를 각각의 well 에 넣고 60분간 RT, 300 rpm microtitre plate mixing apparatus 에서 반응 하였다.

그런 다음 plate를 다시 300 μ l washing solution 으로 5번 washing 하였다. Washing 한 plate에 100 μ l substrate solution 을 각각의 well 에 넣고 15분간 RT, 300 rpm microtitre plate mixing apparatus 에서 빛을 차단시킨 다음 반응 하였다.

반응시킨 plate에 100 μ l씩 stopping solution 을 각각의 well 에 넣어준 뒤 2시간 후 450 nm 의 흡광도에서 확인하였다.

1.4.2. C-terminal telopeptide (CTX) 양 측정 방법

Serum 골 흡수 biomarker인 C-telopeptide(CTX) 의 발현 양을 측정하기 위해 Rat-Laps™ ELA(Nordic bio Sci., USA)를 구입하여 발효 킷을 투여한 Rat의 혈청을 이용해 혈청내 CTx 발현 양을 확인 하였다.

먼저, Biotinylated Rat-Laps antigen을 100 μ l 씩 96 well plate 에 넣어준 다음 sealing 하여 30분간 RT, 300 rpm microtitre plate mixing apparatus 에서 반응 하여 Plate에 CTx 가 흡착 되게 하였다.

그 다음, 300 μ l washing solution 으로 5번 washing 하였다. Washing 한 plate 에 standard 와 control, sample 을 20 μ l씩 넣고 primary antibody를 100 μ l씩 넣어준 다음 2-8°C incubator 에서 overnight(18±3 hours) 하였다.

Overnight한 plate를 다시 300 μ l washing solution 으로 5번 washing 하였다. Washing 한 plate 에 100 μ l peroxidase conjugated Goat anti-Rabbit IgG antibody 를 각각의 well 에 넣고 60분간 RT 에서 반응 하였다.

그런 다음 plate를 다시 300 μ l washing solution 으로 5번 washing 하였다. 그런 다음 100 μ l substrate solution 을 각각의 well 에 넣고 15분간 RT 에서 빛을 차단시킨 다음 반응 하였다.

그 후 100 μ l씩 stopping solution 을 각각의 well 에 넣어준 뒤 2시간 후 450 nm 의 흡광도에서 확인하였다.

1.5. X-ray를 이용한 골밀도 측정 방법

골 대사 량의 변화를 확인하기 위하여 6주간 시료를 투여한 Rat 을 희생하여 적출한 대퇴골 을 골밀도측정기를 이용해 킷 발효 대사물이 골 대사에 미치는 영향을 확인하였다.

6주간 시료를 투여한 Rat 을 희생한 후 femur bone 을 적출한 후 그 골을 한림대학교의 골 밀도측정기 (PIXImus, Lunar, USA)를 이용하여 각각의 골밀도 (bone mineral density, BMD) 를 측정하였다.

아래 그림은 골밀도를 측정하기 위한 골밀도 측정기 및 측정 시에 확인 할 수 있는 사진이다.

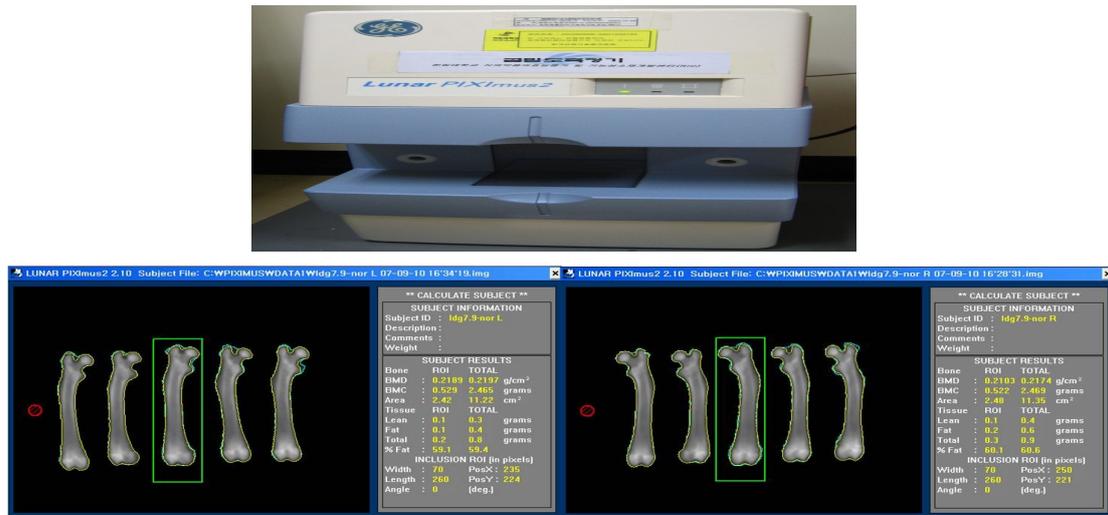


그림 30. 골밀도 측정기(위) 골 밀도 결과 data(아래)

1.6. Bone Micro CT 촬영 방법

골 대사량의 변화를 확인하기 위하여 6주간 시료를 투여한 Rat 을 희생하여 적출한 대퇴골을 Micro CT(Skyscan model 1076, Skyscan, Kontich, Belgium)를 이용해 톱 발효 대사물이 골 대사에 미치는 영향을 확인하였다.

CT 촬영은 경기 바이오 센터 아주대 세포치료센터에 비치되어 있는 Micro CT 를 이용하여 대퇴골의 CT를 촬영하였다.

1.7. 골질 변화량 조직학적 검사

조직을 paraffin block으로 만들어 section & stain을 통하여 조직학적 변화를 확인하였다.

골 조직을 얇은 박편으로 만들어 해면골의 골량을 확인하고 control 이나 normal 군과 대조하여 시료의 골다공증 치료 효과를 확인하였다.

1.7.1. Histology 분석

적출한 골 조직을 10 % Buffered neutral formalin에 일주일간 고정시킨 후, 10 % 염산 과 200mM EDTA용액에 3일간 침전하여 골 조직을 탈회(decalcification) 하였다.

탈회한 조직은 수세한 후 mess 를 이용하여 0.5 cm길이로 절단 한 후 골 조직을 60 % ethanol에서 1 시간, 70 % ethanol에서 1 시간, 80 % ethanol에서 1 시간, 90 % ethanol에서 1 시간, 95 % ethanol에서 1 시간 100 % ethanol에서 1 시간 동안 탈수과정을 시행한 후, xylene 에서 1 시간씩 2 회의 투명과정을 시행하였다.

투명과정 후 조직은 paraffin으로 포매 한 후 Microtome(Leica, Japan)을 사용하여 6 μ m 의 두께로 박절하여 조직리본을 채취하여 슬라이드에 붙인 다음 건조하여 보관하였다.

신생골과 섬유조직의 형태 관찰과 변화를 알아보기 위하여 Mason's trichrome 염색법을 시행하였다.

염색한 조직은 현미경을 이용하여 촬영 한 다음 image analysis program(Leica application

suite, Leica, Germany)을 이용하여 조직의 intensity 를 측정하여 대조군 과 비교하였다.

다음 그림은 조직학적 관찰을 하기위하여 랫드에서 대퇴골을 적출하는 수술 방법을 나타낸 것이다.



마취



EtOH 소독



복부 절개



혈액 채취



적출 부위 확인
(대퇴골)



무릎 인대 절개



대퇴골 적출



적출완료 (대퇴골)



잔여 이물질 제거

그림 31. 골다공증 유발 모델에서의 대퇴골 적출 방법

2. 결과 및 고찰

2.1. 실험 기간 동안의 체중변화 측정

난소 적출을 시행 한 후 매주 1회 Rat 의 체중을 체중계를 사용하여 측정 하였다. 그 중 0, 3, 6, 9, 12, 15주의 rat 체중변화를 아래 그림으로 나타내었다.

난소 적출 수술을 한 그룹(OVX control, OVX sample) 에서 난소 적출을 하지 않은 그룹(normal, sham)에 비해 유의하게 증가하는 모습($p < 0.05$) 을 보였고 15주차의 OVX control($381.56 \pm 27.01g$), OVX sample($381.67 \pm 24.21g$) 에 비해 normal ($331.92 \pm 24.63g$) 과 sham($309.49 \pm 23.99g$)의 체중이 99.9%신뢰도로 난소를 제거한 쥐의 체중은 증가하며 여성 호르몬 대체 투여를 통해 체중 증가가 억제된다는 보고²⁵⁾와 같이 난소 적출에 의해 수술 쥐와 비수술 쥐의 체중이 유의하게 차이가 나는 모습을 보이는 것을 확인하였다($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **).

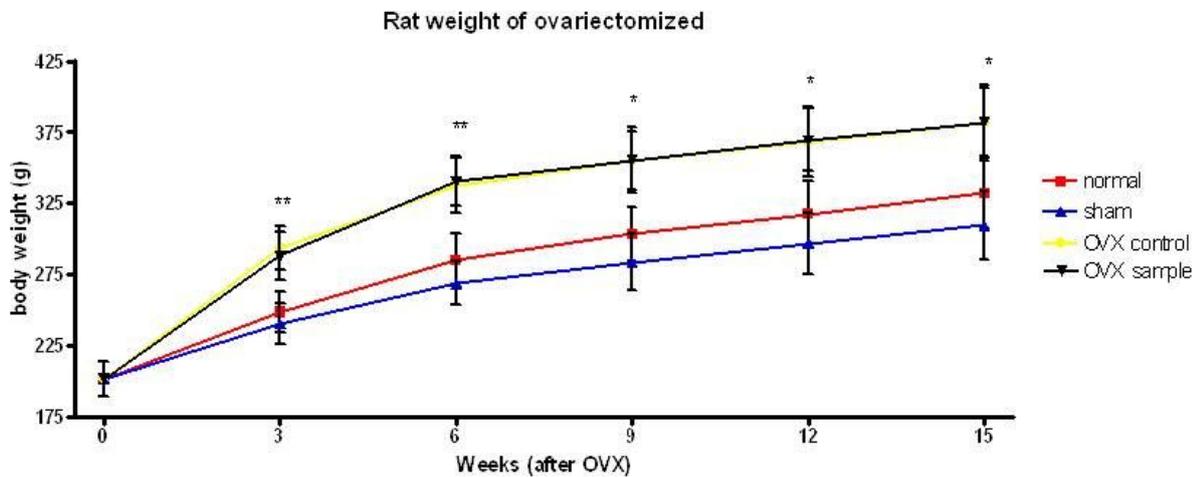


그림 32. 골다공증 유발 기간 중 체중의 변화

표 10. 골다공증 유발 Rat 의 체중 변화량

B o d y Weight	Normal	Sham	OVX	Hijiki	F. 25	Hijiki 50	F. 100	Hijiki
	Intial(g)	201±12.4	201±12.4	201±12.4	201±12.4	201±12.4	201±12.4	201±12.4
Final(g)	331±24.6*	309±24.0	389±33.6**	382±35.8**	382±23.5**	381±17.9**	381±19.3**	

25) Wronski T.J. et. al. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. 1988. Endocrinology. Aug;123(2):681-6.

2.2. 골 형성 biomarker(Osteocalcin & CTx) 측정 결과

Rat 의 혈청중 Osteocalcin(OC) 농도를 측정한 결과를 아래의 그림으로 나타내었다.

Osteocalcin은 골 형성 지표로 골다공증의 치유될 때 골의 형성이 일어나면서 분비되어 혈중 농도가 증가하는 특성을 가진다.

혈중 Osteocalcin의 농도는 OVX control 군이 314.19 ± 143.2 ng/ml, normal 군이 476.04 ± 70.9 ng/ml, Sham 군이 565.60 ± 90.5 ng/ml, 발효전 톳 군이 367.47 ± 105.5 ng/ml, 발효 톳 25 mg/kg 군이 601.55 ± 110.4 ng/ml, 발효 톳 50 mg/kg 군이 557.81 ± 171.1 ng/ml, 발효 톳 100 mg/kg 군이 822.61 ± 137.8 ng/ml로 나와 발효 톳 100 mg/kg 군에서 Sham 군 대비 145% 더 발현 되는 모습을 보였으며 OVX control 에 비해서는 262% 의 발현을 보여 발효 톳이 골 형성에 관여하는 biomarker인 Osteocalcin 의 발현을 우수하게 증가시키는 것을 확인 하였다.

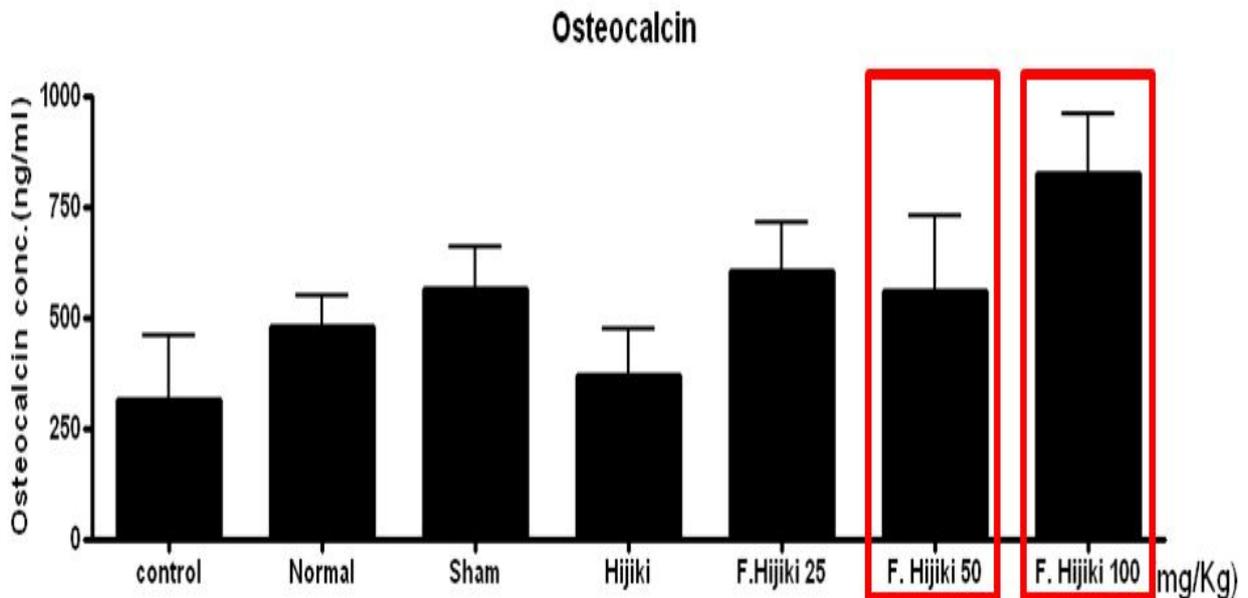


그림 33. 혈청 내 Osteocalcin 발현 결과

또한, Rat의 혈청 중C-telopeptide(CTx) 농도를 측정한 결과를 아래의 그림으로 나타내었다. CTx는 골 흡수 지표로서 골다공증이 발생하여 골의 흡수가 일어나 골이 파괴될 때 분비되어 혈중 농도가 증가하는 특성을 가진다.

혈중 CTx 의 농도는 OVX control 군이 118.88 ± 21.5 ng/ml, normal 군이 78.48 ± 47.4 ng/ml, Sham 군이 58.22 ± 39.6 ng/ml, 발효 전 톳 군이 85.48 ± 40.9 ng/ml, 발효 톳 25 mg/kg 군이 61.48 ± 30.6 ng/ml, 발효 톳 50 mg/kg 군이 57.91 ± 3.7 ng/ml, 발효 톳 100 mg/kg 군이 47.26 ± 6.5 ng/ml로 확인되었다.

발효 톳 100 mg/kg에서 CTx의 발현이 sham 군에 비해 81%, OVX control 에 비해 40%의 발현을 보여 발효 톳이 골 흡수에 관여하는 biomarker인 CTx의 발현을 감소 시켜 골의 흡수를 저해하는 것을 확인 하였다.

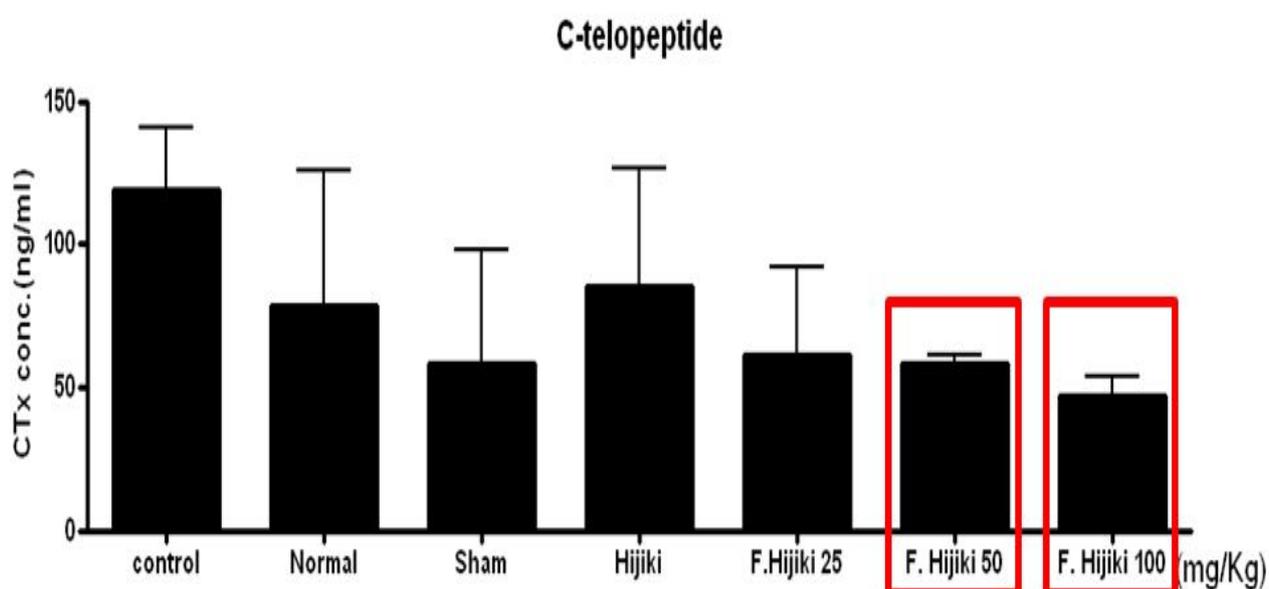


그림 34. 혈청내 CTx 발현 결과

2.3. X-ray를 이용한 골밀도 결과

골밀도는 대퇴골의 BMD 값을 측정하였고, 좌·우측의 골을 각각 측정하여 평균을 내었다.

Normal 군은 $217.1 \pm 4.92 \text{ mg/cm}^2$, Sham 군이 $207.6 \pm 12.82 \text{ mg/cm}^2$ 로 나타났으며, OVX control군은 $187.6 \pm 2.14 \text{ mg/cm}^2$ 로 나타났는데, 이것은 Sham 군에 비해 90.36% 정도의 골밀도 량이다.

또한, 발효 전 톳 100 mg/kg군은 $193.1 \pm 6.03 \text{ mg/cm}^2$ 로 이것은 Sham 군에 비하여 93.01%의 골밀도 량을 나타내었다. 발효 톳의 경우, Sham 군과 비교하여 25 mg/kg 군 ($196.5 \pm 9.28 \text{ mg/cm}^2$)은 94.65%, 50 mg/kg 군 ($202.5 \pm 5.76 \text{ mg/cm}^2$)은 97.54%, 100 mg/kg 군 ($205.6 \pm 1.95 \text{ mg/cm}^2$)은 99.04%의 골밀도 량을 보여 발효 톳 대사산물 100 mg/kg 군의 경우 난소적출을 하지 않은 일반 Rat과 유사할 정도로 골조직이 재생되는 것을 확인 할 수 있었다.

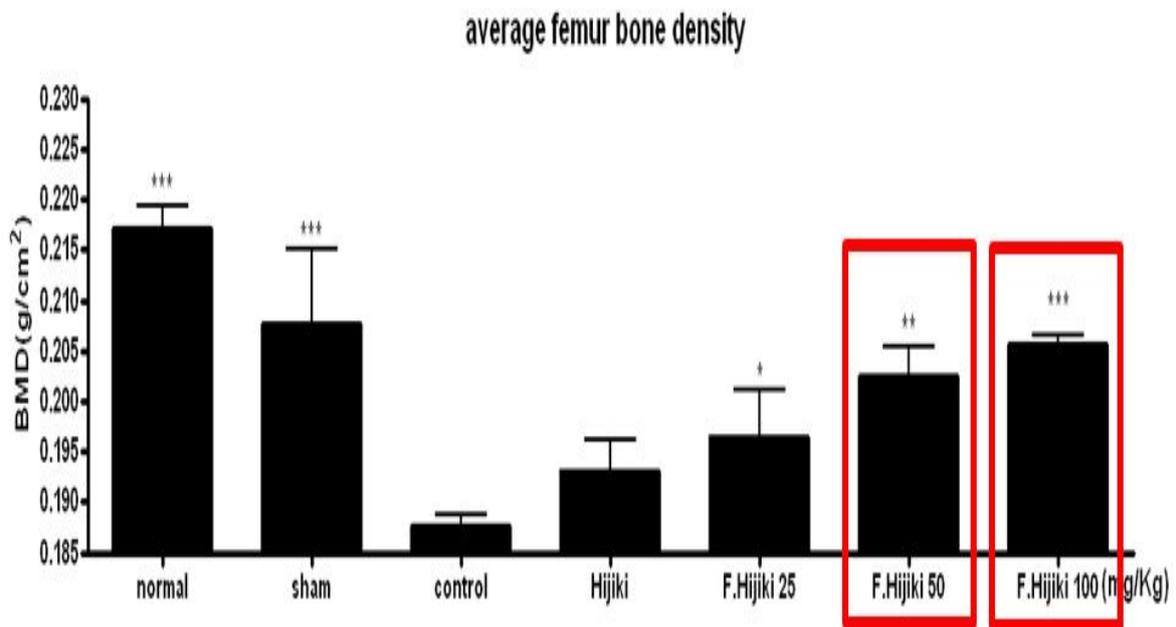


그림 35. 골밀도 측정 결과

2.4. Bone Micro CT 촬영 결과

Bone micro CT를 이용하여 희생한 동물에서 적출한 대퇴골을 촬영한 결과, 화살표로 나타난 부분의 trabecular bone부분이 control 에 비해 발효 톳의 골 내 골기질 부분이 회복되어 하얀 색의 골이 증가한 것을 CT (2D) 상에서 확인 하였고, 3D 상에서도 Control 에 비해 발효 톳의 결과에서 골질이 증가한 것을 확인하였다.

따라서 발효 한 톳이 난소적출을 시행하여 골다공증을 유발한 동물모델의 골질량 회복에 효과가 있는 것을 Total volume/Trabecular volume ratio를 측정하여 확인하였다.(그림. 36)

Positive control 로 사용한 17-β Estrogen 과 비교 하였을 때 발효 톳 100mg/kg에서 Positive control 에 비해 110% 정도의 효과를 나타내어 톳이 17-β Estrogen 에 비해 유효한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

Micro CT 측정의 결과는 아래의 그림으로 나타내었다(그림. 37).

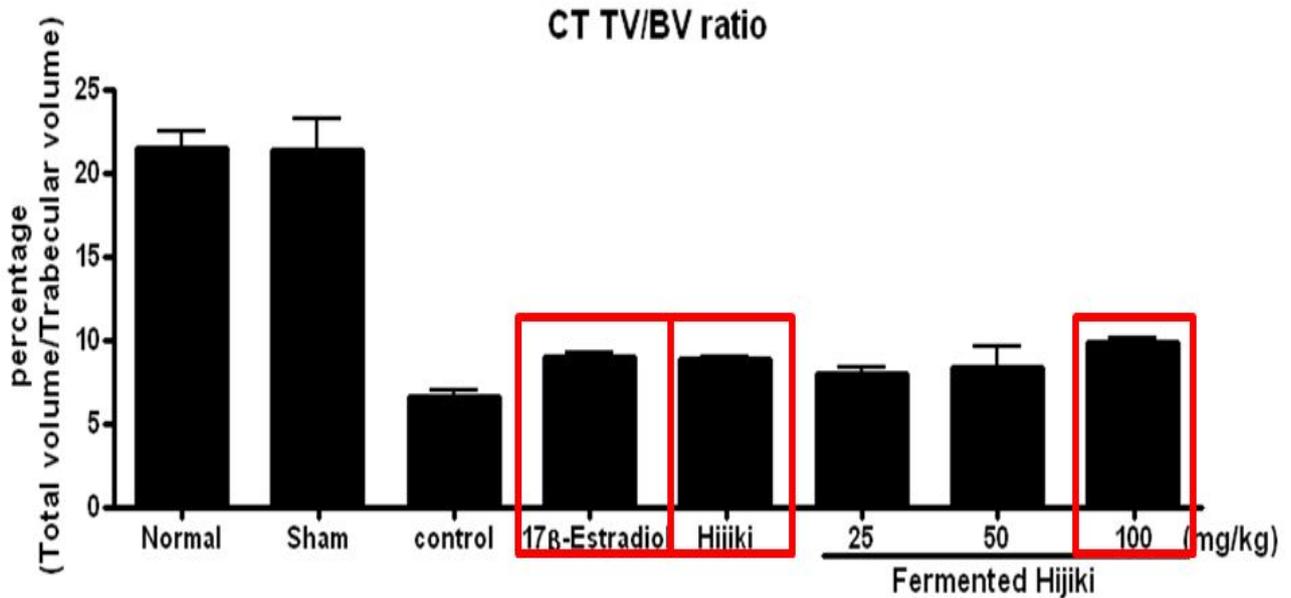


그림 36. Rat femur bone의 Trabecular volume/Total volume 결과

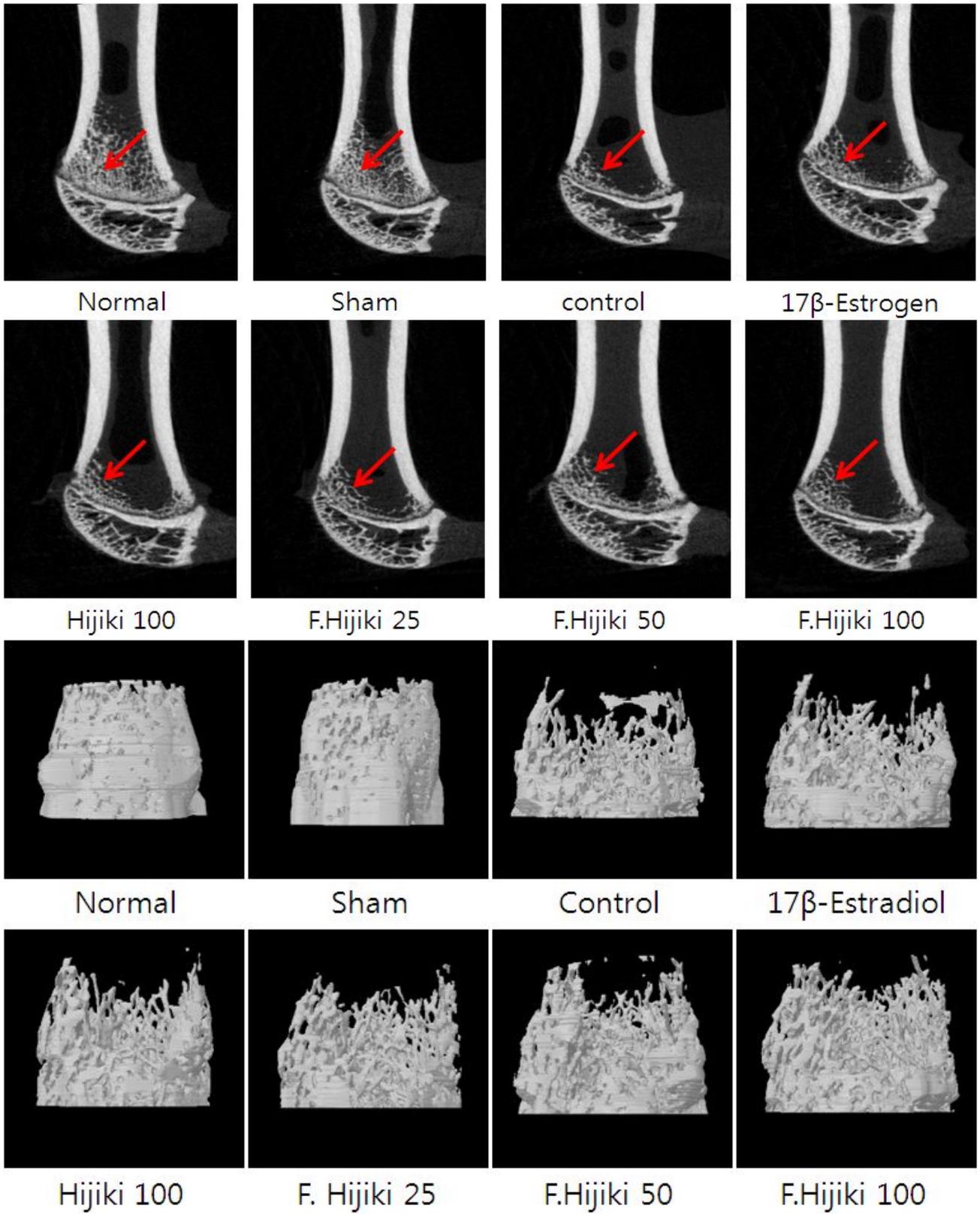


그림 37. Rat femur bone CT 사진(위 : 2D, 아래 : 3D)

2.5. 골질 변화량 조직학적 검사 결과

2.5.1. Bone length and bone weight

6주간 시료를 투여한 rat 의 femur bone을 적출하여 각각의 무게와 길이를 측정 한 결과 대퇴골의 길이는 F. hijiki 25 mg/Kg에서 95% 유의성을 보였으며, 대퇴골의 무게에서는 OVX에 비해 발효를 한 F. Hijiki 100 mg/Kg에서 control 인 OVX 에 비해 99.9% 신뢰도로 골의 무게가 11% 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

대퇴골의 길이가 길어지지 않은 것에 비해 골의 무게가 증가한다는 것은 난소 적출 동물 모델에서 발효 톱을 투여한 군의 골 조직의 치밀도가 대조군에 비해 증가한 것으로 생각된다.

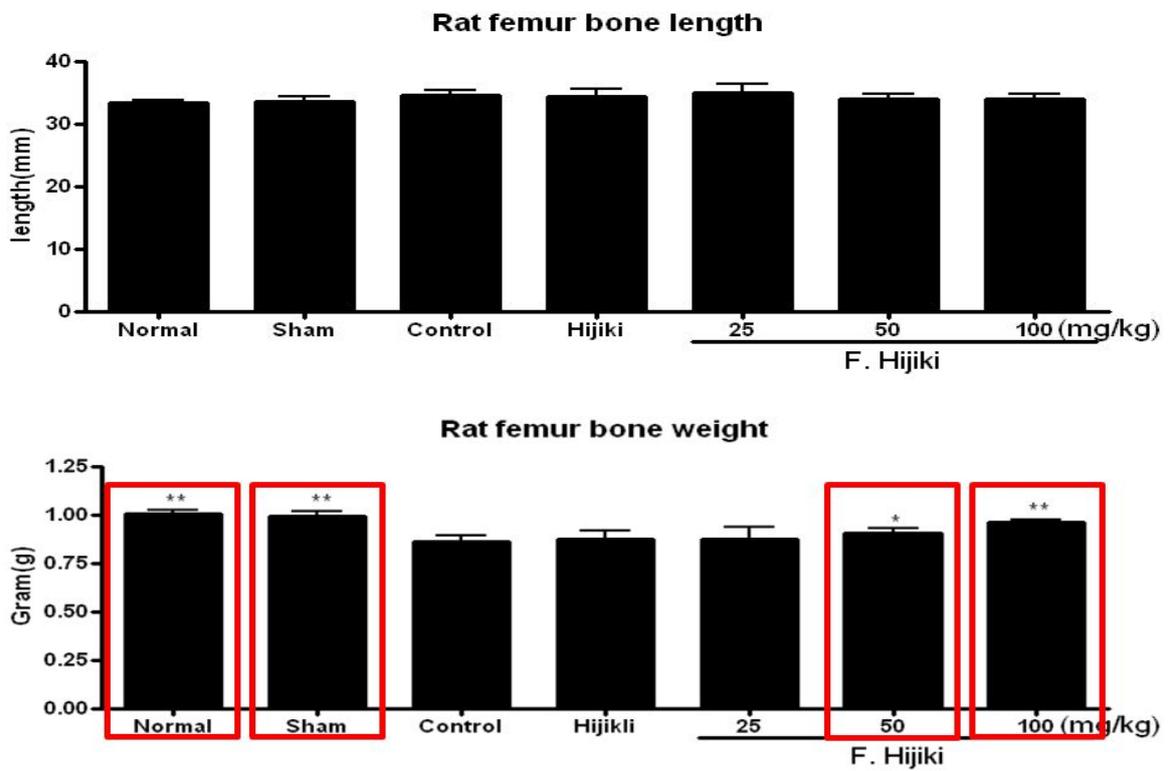


그림 38. Rat Femur bone length 및 Weight 결과

2.5.2. 골조직의 조직학적 관찰 결과

6주간 시료 투여 후 적출한 Rat femur bone 을 10% formalin 에 고정 한 조직을 10% Hydrochloric acid 와 200 mM EDTA 를 혼합한 용액에 3일간 침전 한 후 절단하여 포매 (Embedding) 한 후 블록을 만든 다음 6 μ m 두께로 박절하여 슬라이드를 제작한 다음 Mason trichrome를 시행하였다.

염색 결과 발효 톳 추출물을 투여하였던 군의 골조직이 Mason's trichrome 염색에서 해면골 부분의 양이 control 에 비해 많이 회복 된 것을 확인 할 수 있었고, BV/TV 결과 normal의 105%, Sham 의 101% 정도의 회복을 한 것을 확인 할 수 있었다.

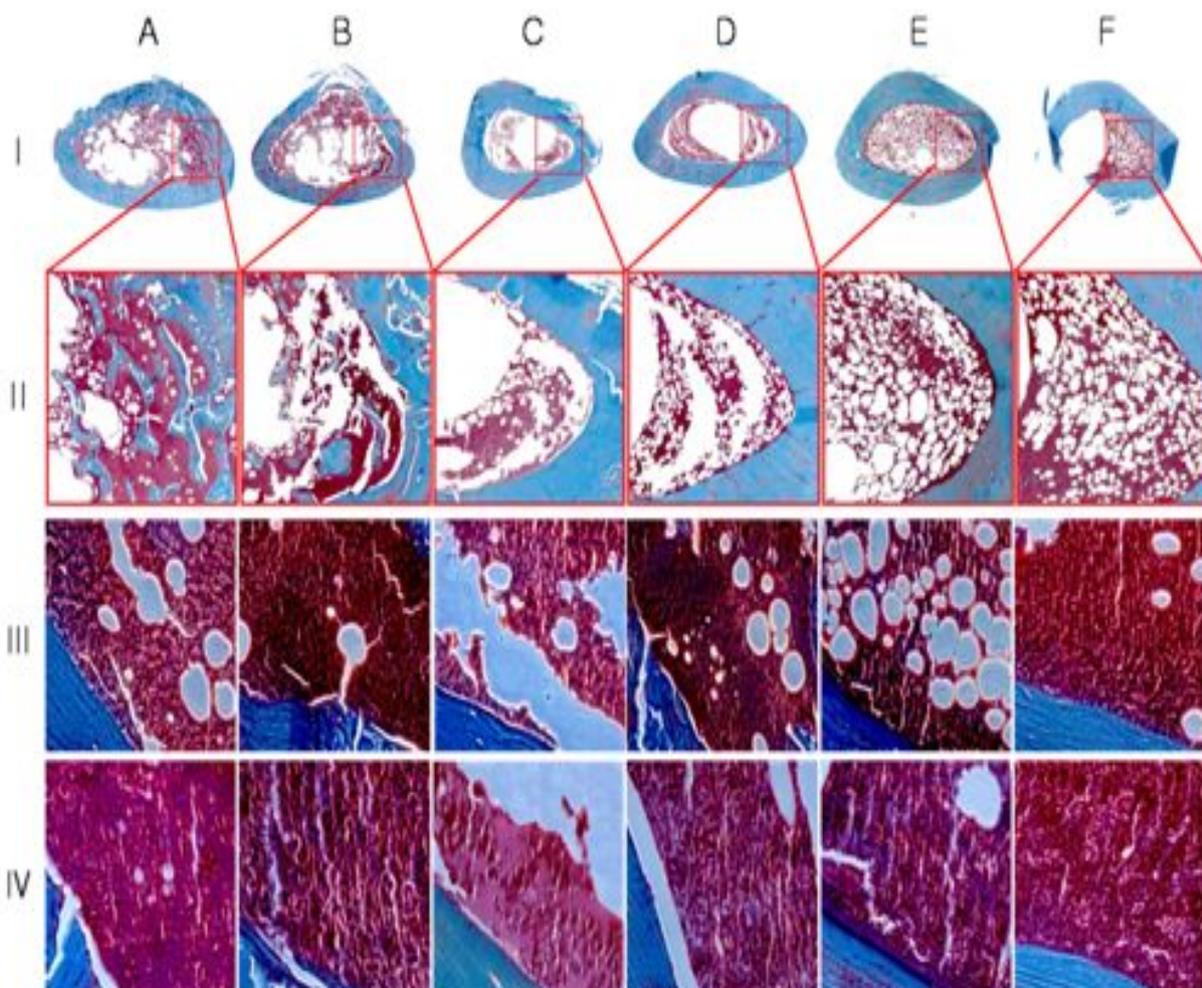


그림 39. Rat femur bone 의 Mason trichrome 염색 사진 (A : normal, B : sham, C : control, D : Hijiki, E : F. Hijiki 50mg/kg, F : F. Hijiki 100mg/kg I. 50x, II 200x, III 400x, IV 1000x magnification)

제 4 장 발효 톳 시료를 이용한 임상시험용 시제품 제작

제 1 절. 임상시험용 제형의 제조 공정 확립

1. 임상 시험용 제품 제작을 위한 원료 제조 공정

상업용 효소를 이용하여 60°C에서 하루 간 반응 시켜 효소처리를 완료한 시료를 대량추출기를 이용하여 추출한 후 decanter를 이용하여 여과하고, 추출 후 잔류물은 95% Ethanol을 이용하여 2차 추출한 후 decanter를 이용해 여과한 추출액을 획득하여, 앞서 물로 추출한 추출액과 Ethanol로 추출한 추출액을 대량 농축기를 이용하여 60°C이하에서 농축 한 후, 추출액을 동결 건조하여 추출물을 획득하는 방법으로 4 회 실시한 후 Batch 별 TLC를 확인하여 동등성 확인 하였다.

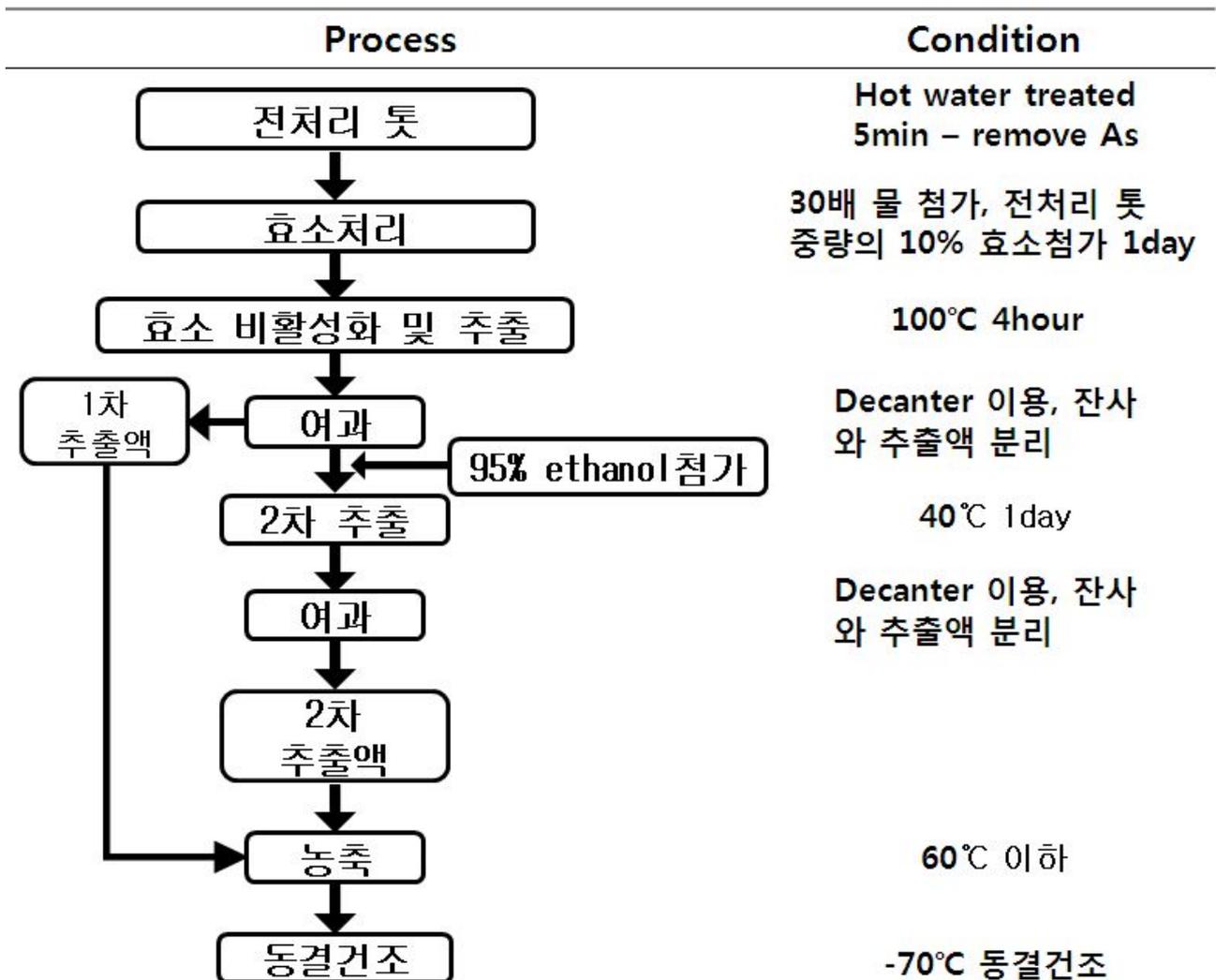


그림 40. 발효 톳의 대량생산 공정도

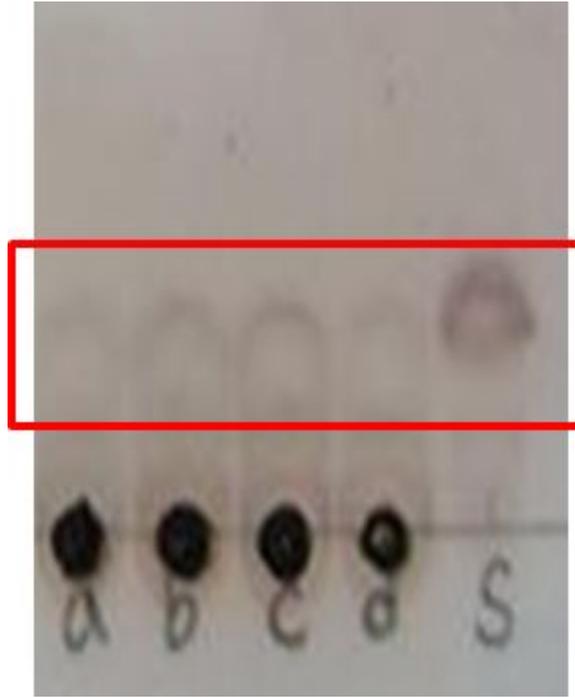


그림 41. Pilot test의 Batch별 추출물의 TLC 전개
S: PHLT3 분획층, a: 발효톳 Batch 1(1/21), b: 발효톳 Batch 2(2/11),
c: 발효톳 Batch 3(2/25), d: 발효톳 Batch 4(3/11)

Batch 별 TLC를 확인하여 동등성 확인한 결과 Batch 별 발효 톳의 경우 Standard로 사용한 PHLT3 분획층과 유사한 TLC pattern을 보이는 것을 확인하였다. 또한 각 Batch 별로 동일한 TLC pattern을 나타내어 batch 별로 동일하게 추출된 것을 확인하였다.

2. 제품의 제형에 대한 연구

발효 톳을 이용하여 소비자가 쉽게 선택하여 섭취할 수 있는 제형을 찾고 이 제형을 만들기 위한 Formulation을 탐색하고, 안정성이 확보된 제품이 개발 되도록 함에 있다. 일반적으로 건강기능식품으로서 소비자가 가장 쉽게 접하는 제형은 고형제로는 경질캡슐, 연질캡슐, 정제가 있고 드링크제 등으로 구분 할 수 있으며, 발효 톳의 활성 성분이 안정적으로 제형이 만들어 지도록 하는데 있다.

2.1. 발효 톳의 기본 물성

발효 톳을 가지고 고형제를 개발하기 위한 기본 물성인 색상, 건조감량과 용해성을 측정한 결과 색상은 흑색의 점조성 물질이고 건조감량과 용해성은 표 11. 과 같다

표 11. 발효 톳 기본물성 실험결과

구 분	건조감량 105°C,1시간	용해성 (물)	용해성 (50%에탄올)	용해성 (95%에탄올)
에탄올95%추출물	8.2%	불용	불용	용해



그림 42. 발효 톳 추출물의 용해성

2.2. 부형제와 compatibility 연구

발효 톱과 식품공전 및 식품첨가물공전에서 허용하는 부형제와 배합 가능여부를 알아보기 위해서 일반적으로 고품제에서 가장 많이 사용되는 부형제인 결정셀룰로오스, 유당, 결합과 붕해제로 사용되는 옥수수전분, 활택제로 사용되는 스테아린산 마그네슘을 사용하여 부합하는지에 대해서 발효 톱과 1:1비율로 섞은 다음 25℃인 상온에서 24시간 개봉방치 후 정상 및 방치 전, 후의 건조감량을 측정하였다. 실험 결과 정상 변화가 없고, 건조감량 변화가 없어 부형제로 사용하는 데 적합하다는 것을 확인 하였다.

표 12. 배합 변화

구 분	성 상		건조감량 (105°C,1시간)	
	전	후	전	후
결정셀룰로오스	얇은 흑색의 분말	얇은 흑색의 분말	6.3%	6.5%
유당	얇은 흑색의 분말	얇은 흑색의 분말	4.1%	4.5%
옥수수전분	얇은 흑색의 분말	얇은 흑색의 분말	11.3%	12.1%
스테아린산마그네슘	얇은 흑색의 분말	얇은 흑색의 분말	3.6%	3.6%

3. 발효 톳 추출물의 제형 및 안정성 실험 연구

3.1. 발효 톳 추출물의 제형 연구

일반적으로 건강기능식품에서 가장 많이 선호되는 제형인 경질캡슐과 내용액제를 가지고 배합 비를 표 13. 와 같이 제조 하였고, 그림 43. 은 그에 따른 제조공정도이며, 기본적인 물성을 실험한 결과는 다음의 표 14. 와 같이 나타내었다.

표 13. 경질캡슐 배합 비

구 분	1 캡슐중 (mg)		
	DS111	DS112	DS113
발효톳	250.0mg	250.0mg	250.0mg
결정셀룰로오스	146.0mg	-	-
유당	-	146.0mg	-
옥수수전분	-	-	146.0mg
스테아린산마그네슘	4.0mg	4.0mg	4.0mg
합 계	400.0mg	400.0mg	400.0mg
캡슐	0호 캡슐 충전		

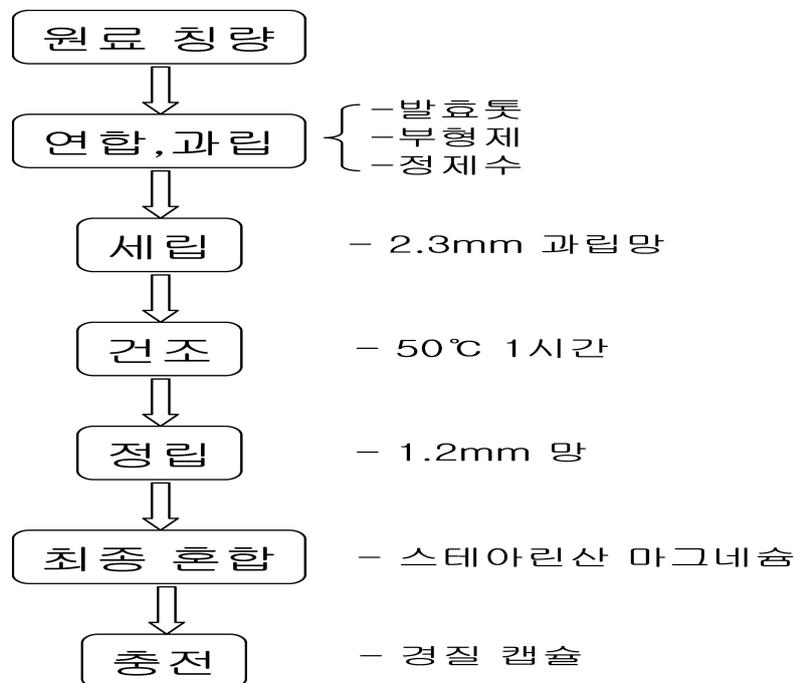


그림 43. 경질캡슐 제조공정도

표 14. 경질캡슐의 기본물성 실험결과

구 분	성 상	건조감량 (105°C,1시간)	붕해
DSC 111	얇은 흑색의 분말	6.2%	5분30초
DSC 112	얇은 흑색의 분말	6.5%	6분15초
DSC 113	얇은 흑색의 분말	6.3%	9분50초



그림 44. 경질캡슐 Pilot

발효 톱으로서 1일 1.0g을 섭취할 수 있도록 Formulation을 하였으며, 1회 2캡슐 1일 2회 섭취하면 1.0g을 섭취할 수 있다. 경질캡슐 Pilot 을 제조할 때 DSC 113의 경우 과립 공정 시 과립형성이 너무 강하여 제립이 어렵기 때문에 현장 적용에 어려우며, 붕해도 시험 결과에서도 가장 늦었다. DSC 112의 경우에는 결합력이 떨어져 분말이 많이 발생하여 충전이 어려웠다. DSC 111은 과립공정 쉽게 과립이 형성되며, 붕해도 시험에서도 가장 좋은 것을 확인하였다.

표 15. 내용액제 배합비

구 분	100ml중 (g)		
	DS114	DS115	DS116
발효톳	0.5g	1.0g	1.5g
고과당	15.0g	15.0g	15.0g
구연산	0.2g	0.2g	0.2g
구연산나트륨	0.2g	0.2g	0.2g
자몽종자추출물	0.05g	0.05g	0.05g
정제수	적량	적량	적량
합계	100ml	100ml	100ml

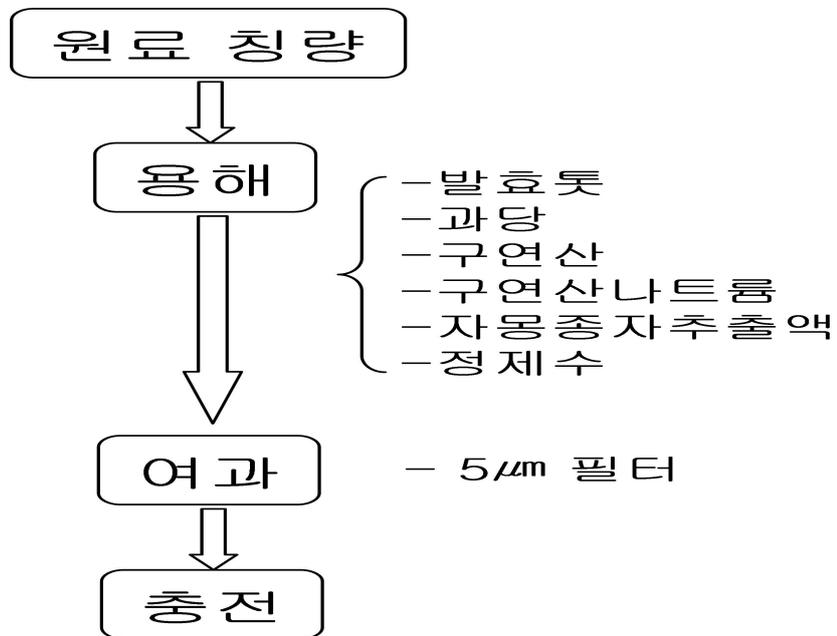


그림 45. 내용액제 제조공정도

표 16. 내용액제의 기본물성 실험결과

구 분	성 상	향 취	pH
DSC 114	갈색의 액	해조류의 비린향	3.97
DSC 115	갈색의 액	해조류의 비린향	4.05
DSC 116	갈색의 액	해조류의 비린향	4.14

경질캡슐과 마찬가지로 발효 톳으로 1일 1 g을 섭취할 수 있도록 배합 비를 구성하였고, 좀 더 고용량을 섭취하기도 하므로 추가적으로 투입하여 Pilot 제조하였다. 발효 톳의 양이 증가할수록 필터에 잔류량이 많이 발생하였고 여과하는데 시간이 많이 소요되는 경향도 보였다. 또한 해조류 특유의 비린향은 차후 Pilot 제조 시 착향제를 이용하여 마스킹을 하여 제조하였다.

3.2. 제형별 안정성 실험

Pilot 제조에서 선정된 경질캡슐의 DSC 111와 내용액제의 DSC 115의 기본적인 안정성을 보기 위하여 제조한 샘플을 항온항습기를 사용하여 40℃, 상대습도 75%에서 보관하여 물성변화를 관찰하였다. 안정성을 2개월간에 걸쳐 실험한 결과 경질캡슐의 경우 정상, 건조감량은 변화가 없었으나, 봉해의 경우는 지연되는 것을 확인하였고 이는, 차후 사용기간을 설정하는데 중요한 물리적인 지표로 사용할 수 있음을 확인하였다. 내용액제의 정상, 향취, pH는 변화가 없었으며, 2개월까지 천연물을 사용했을 경우 육안으로 보이는 침전물이 확인되지 않았다. 이후 25℃, 35℃, 40℃의 항온기를 사용 안정성실험을 진행하고 발효 톱의 지표성분인 fucosterol 보관온도별 함량 변화를 HPLC법으로 분석하여 제품의 유통기한을 식약청고시 “식품 등의 유통기한 설정기준”에 준하여 설정할 수 있도록 하였다.

표 17. 경질캡슐 안정성 실험 결과

DSC 111	성 상	건조감량 (105℃,1시간)	봉해 (기준 20분 이내)
초기	엷은 흑색의 분말	6.2%	5분30초
1 month	엷은 흑색의 분말	6.5%	6분10초
2 month	엷은 흑색의 분말	6.6%	6분30초

표 18. 내용액제 안정성 실험 결과

DSC 115	성 상	향 취	pH
초기	갈색의 액	해조류의 비린향	3.97
1 month	갈색의 액	해조류의 비린향	3.85
2 month	갈색의 액	해조류의 비린향	3.95



그림 46. 경질캡슐 안정성실험 검체

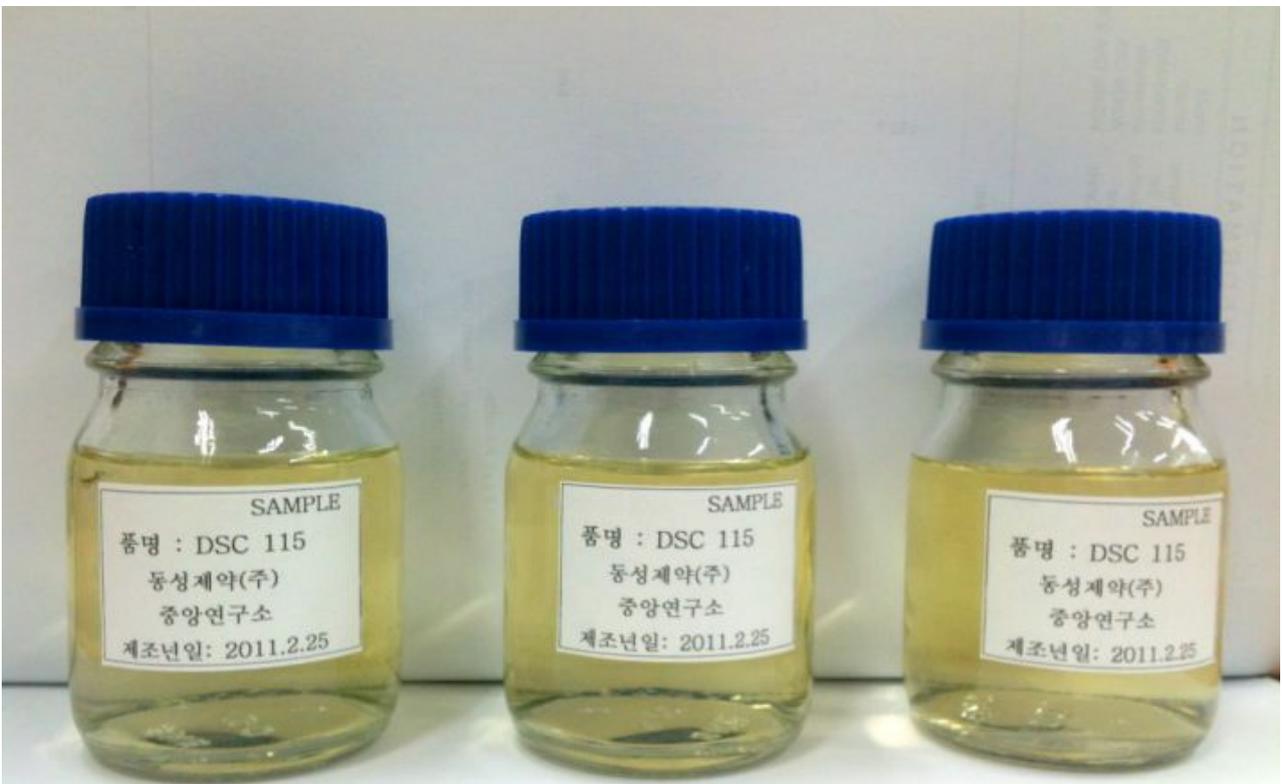


그림 47. 내용액제 안정성실험 검체

제 2 절 골관절 기능 개선 기능성식품 임상시험용 제형의 연구

발효 톳을 이용하여 소비자가 쉽게 선택하여 섭취할 수 있는 제형을 찾고 이 제형을 만들기 위한 Formulation을 탐색하고, 안정성이 확보된 제품이 개발 되도록 함에 있다. 일반적으로 건강기능식품으로서 소비자가 가장 쉽게 접하는 제형은 고형제로는 경질캡슐, 연질캡슐, 정제가 있고 드링크제 등으로 구분 할 수 있으며, 발효 톳의 활성 성분이 안정적으로 제형이 만들어 지도록 하는데 있다.

1. 발효 톳 추출물의 약효와 제형의 연관성

발효 톳 추출물을 골관절 질환에 적용하기 위한 기능성식품 제형을 선정하기 위하여, 발효 톳 추출물 복용 시의 문제점을 개선하고 발효 톳 추출물의 기능성분의 빠른 흡수를 위하여 캡슐제 형태의 제형을 우선적으로 선정하여 실험을 진행하였다. 발효 톳과 식품공진 및 식품첨가물 공전에서 허용하는 부형제와 배합 가능여부를 알아보기 위해서 일반적으로 고형제 에서 가장 많이 사용되는 부형제인 결정셀룰로오스, 유당, 결합과 붕해제로 사용되는 옥수수전분, 활택제로 사용되는 스테아린산 마그네슘을 사용하여 부합하는지에 대해서 발효 톳과 1:1비율로 섞은 다음 25℃인 상온에서 24시간 개봉방치 후 성상 및 방치 전, 후의 건조감량을 측정하여 보았다. 실험 결과 성상 변화가 없고, 건조감량 변화가 없어 부형제로 사용하는데 적합하다는 것을 확인 하였다.

표 19. 배합 변화

제형	특징	판단기준	비고
과립제	캡슐제 및 그 자체로써 사용이 가능함	안정성 잔류용매 수분 침투성 추출물 자체의 점성	복용의 편의성 및 안정성 확보에 유리할 것으로 판단되어져 우선적으로 선정함. → 경질 캡슐제로 개발 예정
정제	일반적인 형태의 제형	안정성 잔류용매 수분침투성	
액제	액상으로 존재하므로 자체의 이용 및 시럽 등으로 제형화 가능	미생물한도 안정성 잔류용매 유효기간	
산제	추출물 자체를 이용 가능	안정성 잔류용매 수분 침투성 추출물 자체의 점성	
엑스제	자체를 이용하거나 캡슐제의 형태 등으로 제형화 가능	안정성 유연물질 잔류용매 유효기간	

2. 임상시험용 제형 및 안정성 실험 연구

2.1. 임상 시험용 제품의 제형에 대한 연구

발효 톱을 이용한 임상시험용 제품을 경질캡슐로 개발하기로 결정하고 경질캡슐과 내용제를 가지고 실험군의 제형을 표 20. 과 같이 제조 하였고, 제조공정도를 그림 48. 에 나타내었다.

표 20. 실험군의 임상시험용 경질캡슐 구성성분

	1캡슐중(mg)	함유율(%)
톱추출물	200.0	55.01
말토덱스트린	100.0	27.50
미결정셀룰로오스(#102)	40.0	11.00
카라멜색소	16.0	4.40
스테아르산마그네슘	4.0	1.10
허브향	3.6	0.99
내용물합계	363.6	100.00
상하캡슐(0호)	97.0	
합계	460.6	

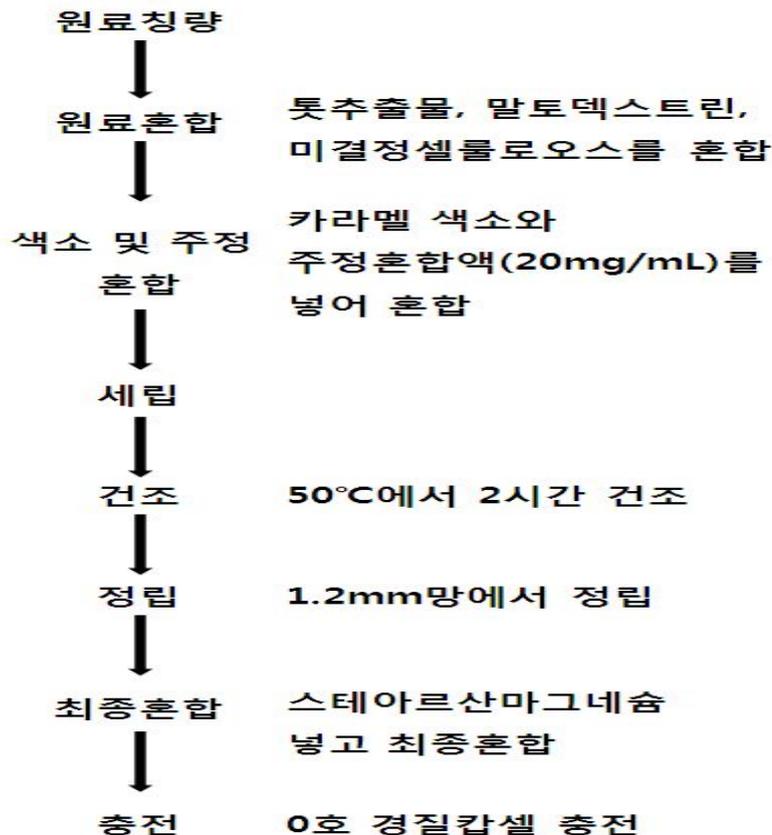


그림 48. 임상시험용 실험군 제품의 제조공정도

또한, 임상시험에 사용할 대조군의 제형을 표 21. 와 같이 제조 하였고, 제조공정도를 그림 49.에 나타내었다.

표 21. 대조군의 임상시험용 경질캡슐 구성성분

	1캡슐중(mg)	함유율(%)
말토덱스트린	300.0	82.51
미결정셀룰로오스(#102)	40.0	11.00
카라멜색소	16.0	4.40
스테아르산마그네슘	4.0	1.10
허브향	3.6	0.99
내용물합계	363.6	100.00
상하캡슐(0호)	97.0	
합계	460.6	

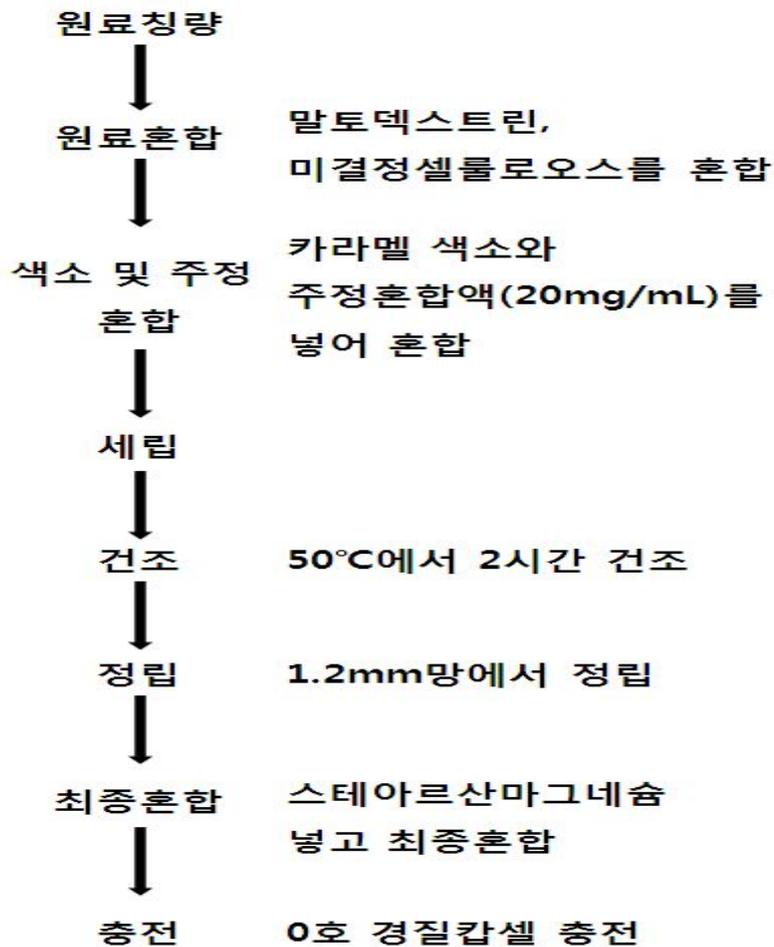


그림 49. 임상시험용 대조군 제품의 제조공정도



그림 50. 시험군의 경질캡슐(좌) 및 내용물(우)



그림 51. 대조군의 경질캡슐(좌) 및 내용물(우)

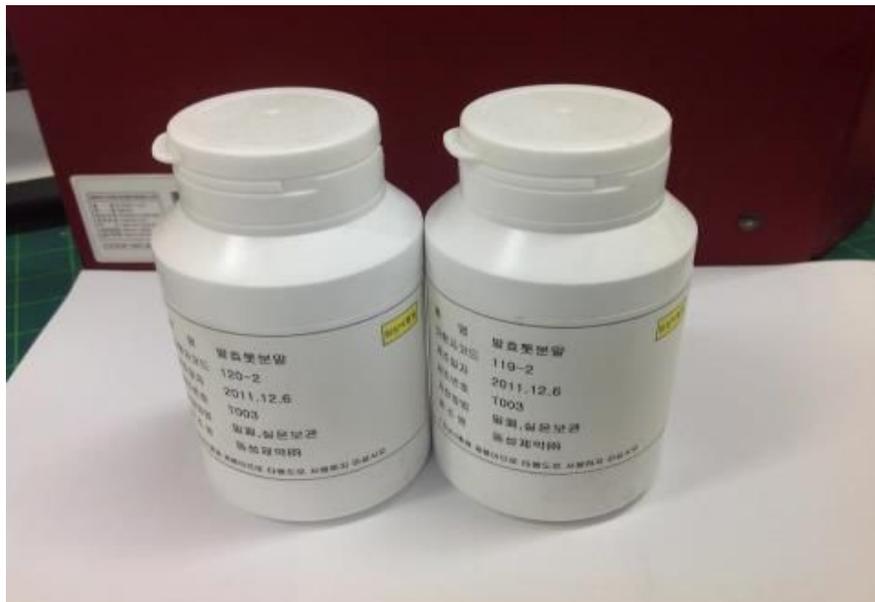


그림 52. 시험군 & 대조군 포장 용기 및 label

발효 톱으로서 1일 800 mg을 섭취할 수 있도록 formulation을 하였으며, 1회 2캡슐 1일 2회 섭취하면 800 mg을 섭취할 수 있다. 또한, 시험군의 경질캡슐과 마찬가지로 1일 800 mg을 섭취할 수 있도록 성분을 구성하였다.

2.2. 임상시험용 제형의 안정성 실험

임상시험용으로 제작된 제품의 기본적인 안정성을 보기 위하여 제조한 샘플을 항온항습기를 사용하여 가속시험을 40℃, 상대습도 75%의 조건에서 진행하여 물성변화를 관찰하였다.

표 22. 임상시험용 대조군의 안정성 실험 결과

대조군 경질캡슐	성 상	건조감량 (105°C,1시간)	붕해 (기준 20분 이내)
초기	얇은 흑갈색의 분말	5.2%	5분10초
1 month	얇은 흑갈색의 분말	5.5%	5분40초
2 month	얇은 흑갈색의 분말	5.4%	6분00초

표 23. 임상시험용 실험군의 안정성 실험 결과

대조군 경질캡슐	성 상	건조감량 (105°C,1시간)	붕해 (기준 20분 이내)
초기	얇은 흑갈색의 분말	5.4%	5분30초
1 month	얇은 흑갈색의 분말	5.3%	6분00초
2 month	얇은 흑갈색의 분말	5.5%	6분20초

안정성을 2개월간에 걸쳐 실험한 결과 임상시험용 제형의 경우 정상, 건조감량은 변화가 없었으나, 붕해 시간은 지연되는 것을 알 수 있었다. 차후 사용기간을 설정하는데 중요한 물리적인 지표로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

3. 임상 시험용 제형의 영양 성분 검사

임상시험용으로 제작된 제품의 영양 성분조성을 확인하기 위하여 제조한 샘플을 수원여자대학 식품분석연구센터에 의뢰하여 열량 외 8종의 항목에 대하여 분석하였다.

100g 당 영양 성분의 함량은 다음의 그림과 같다.

<http://farc.swc.ac.kr>



수원여자대학
식품분석연구센터

[445-895] 경기도 화성시 봉담읍 상기리 336-27
수원여자대학 식품분석연구센터 309호
Tel. 031-290-8217 Fax. 031-290-8220

식품시험(검사)성적서

접수번호	A3-120214-015-03	접수일자	2012년 02월 14일
검사용도	영양성분검사	검사항목	열량 외 8종
제품명	발효뮌추출물	식품유형	영양성분분석
제조일자		유통기한	
업체명	경희대학교산학협력단	대표자	김영진
업체주소	경기 용인시 기흥구 서현동 1 경희대학교국제캠퍼스내		

귀하께서 의뢰하신 검체에 대하여 다음과 같이 시험성적서를 교부합니다.

시험결과

시험항목	결과	100g(=)당	표시량	% 영양소 기준치
열량(kcal/100g)	287.11	287.11	287.11	
탄수화물(g/100g)	65.02	65.02	65.02	20%
당류(%(g/100g))	8.70	8.70	8.70	
단백질(g/100g)	5.16	5.16	5.16	9%
지방(g/100g)	0.71	0.71	0.7	1%
포화지방(g/100g)	0.19	0.19	0	1%
트랜스지방(g/100g)	0.00	0.00	0	
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	불검출	-	-
나트륨(mg/100g)	2,602.62	2,602.62	2,602.62	130%

비교: 1. 상기 판정은 의뢰된 검사항목에 한함
 2. 이 검사성적서는 의뢰자가 제시한 제품 및 제품명으로 검사한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지 않습니다.
 3. 이 검사성적서는 당 센터의 사전 서면 동의 없이 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.

2012년 02월 28일



수원여자대학 식품분석연구센터

Suwon Women's College Food Analysis Research Center

[국가공인 식품위생검사기관, 축산물위생검사기관]



그림 53. 식품영양성분 분석결과

제 5 장 발효 톳 시료의 기준/시험법 연구 및 안전성 평가

제 1 절 골관절 개선 기능성식품의 표준화를 위한 자료 및 기준 및 시험방법 연구

1. 연구 배경 및 필요성

한약제제를 이용한 기능성식품 및 화장품 등의 시장의 다양화 및 관련 시장의 확대로 인하여 한약제제를 이용한 기능성식품의 개발이 활발하게 이루어지고 있지만, 한약제제의 잘못된 사용, 한약제제에 등에 함유된 중금속 또는 잔류농약 등 유해물질에 대한 정확한 기준이 정해져 있지 않은 것들이 대부분이다. 또한, 현재 식약청 고시 “대한약전외 의약품등 기준(KPC)” 수재 한약제제의 품질관리 시에 사용되는 시험 방법 및 함량기준이 개별시험으로 설정이 되어 있어 비용과 시간이 많이 드는 단점이 있다. 이러한 문제들을 개선하기 위하여 현재 많은 연구들이 진행되고 있다. 본 연구에서는 골관절 개선 기능성식품 원료의 표준화를 위하여 발효 톳 추출물의 지표성분을 설정하고 그 지표성분을 확인하는 시험법을 설정하여 향후 개발되는 기능성 식품의 품질관리의 일관성을 확보하고자 하였다.

2. 연구 개발 수행 내용 및 결과

발효 톳 추출물의 분석에 적합한 시험방법을 작성하고, 추출물의 품질을 관리하기 위하여 기준 및 시험방법을 확립하였다. 발효 톳 추출물의 지표물질로는 푸코스테롤, 푸코이단의 2가지를 선정하였고, 분석법에는 대한약전 및 각종 논문 및 특허 자료를 참고하여 작성하였다.

표 32. 발효 톳 추출물 임상시험용 제품의 분석 요약

원료명	발효 톳 추출물	Lot No.	KH20110930	제조사	경희대학교
제조수량	2kg	작업일자	2011. 11. 01	접수일자	2011. 11. 01
검체 채취 장소	동성제약 연구소	채취량	300g	채취일자	2011. 11. 01

항목	기준(동성제약)	내용
성상	흙갈색의 건조한 결정형 가루	동결건조 추출물의 경우 흙갈색을 띠는 것을 육안으로 확인함.
순도시험	중금속(비소) :	식약청의 기능성식품 중금속 함량 기준을 바탕으로 작성함
수분함량	5% 이하	대한약전의 자료를 바탕으로 확인함
지표성분 함량	푸코스테롤 : 1% 이상	공급자인 경희대학교의 시험성적서 및 분석결과를 바탕으로 작성함
	후코이단 : 5% 이상	공급자인 경희대학교의 시험성적서 및 분석결과를 바탕으로 작성함
잔류용매	5000ppm 이하	식약청의 "의약품잔류용매기준지침"을 바탕으로 확인함.

표 24. 발효 톳 추출물의 분석 및 시험방법 작성의 참고자료

원료명	지표물질	참고문헌	비고
발효 톳 추출물	푸코스테롤	<ul style="list-style-type: none"> - Kalsait RP. Isolation of phytosterols and antihyperlipidemic activity of Lagenaria siceraria.. Arch Pharm Res. Oct;34(10):1599-604. (2011). - Permeh P. Sterols from Sargassum oligocystum, a brown algae from the Persian Gulf, and their bioactivity. Nat Prod Res. 2012;26(8):774-7. (2011). - Song FH. Studies on chemical constituents of the brown alga Dictyopteris divaricata. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. Jan;31(2):125-8. (2006) 	
	후코이단	<ul style="list-style-type: none"> - 해조류를 이용한 후코이단의 생산 KSBB Journal 2010. 25: 223-229 - Patankar M.S., Oehninger S., Barnet T., Williams R.L., Clark G.F. A revised structure of fucoidan may explain some of its biological activities. The J.Biol.Chem. 268,29, 21770-21776 (1993). - Li B. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, Hizikia fusiforme. Carbohydr Res. 2006 	

2.1. 기준 및 시험 방법

본 연구에서 진행한 발효 톳 추출물은 자연산 톳을 구입하여 비소를 제거하고 건조하여 분쇄한 후 효소를 이용하여 발효하는 과정을 거친 다음, 정제수를 이용하여 추출하고, 나머지 잔사를 에탄올을 이용하여 추출하고 동결 건조한 흑갈색의 결정형 가루로서, 발효 톳 추출물을 정량할 때는 fucoidan 5% 이상, fucosterol을 1% 이상을 함유한다.

2.1.1. 성상

발효 톳 추출물은 흑갈색의 건조한 결정형 가루이다. 이 발효 톳 추출물은 정제수에 잘 녹으며 에탄올에는 조금 녹으며 헥산 등의 유기용매에는 녹기 어렵다.

2.1.2. 함량 확인 시험

2.1.2.1. Fucosterol

Powder화 한 발효 톳 1 g 을 80% MeOH 5 ml를 가하고, 상온에서 1시간 추출(초음파추출)하였다. 추출물을 centrifuge(8000 rpm / 상온)에 5분 동안 사용하여, 추출 잔사를 다운시킨 후, 상등액을 200 μ l를 취하여, 40 $^{\circ}$ C 이하에서 회전농축기로 감압 하에서 농축하여, MeOH 추출물 발효 톳을 얻는다. MeOH 추출물을 10 ml vial 에 H₂O와 EtOAc를 2 ml씩을 사용하여 넣고, 30초 동안 vortexing 한 후, centrifuge(1,3000 rpm / 4 $^{\circ}$ C) 3분 동안 돌린 후 두 개의 층으로 나누어진 상등액인 EtOAc 층을 마이크로 튜브에 500 μ l 취한 후, 40 $^{\circ}$ C 이하에서 회전농축기로 감압 농축하여 EtOAc 추출물을 얻고, 1000 ppm의 농도로 맞추어 분석에 사용하였다. 톳에서 분리된 fucosterol 1.2 mg를 MeCN을 이용하여 0.005, 0.05, 0.5 mg/L의 표준 용액을 조제하여 사용하였다.

분석 기기 조건 : Agilent 6410 LC/MASS & Agilent 1200 RRLC condition

표 25. LC/MS 조건표(좌), RRLC 조건표(우)

Agilent 6410 LC/MASS		Agilent 1200 RRLC	
SCAN mode Diode array	100 – 800 (m/s) 218 nm	Column	Epic C18, 4.6 x 250 mm, 3um
Ion Source	Positive	Flow Rate(mL/min)	1
Fragmentor	150	Injection Volumn($\mu\ell$)	10
Gas Temp($^{\circ}\text{C}$)	320	Mobile Phase	A: 0.1% Formic acid in Water B: 0.1% Formic acid in ACN
Gas Flow (L/min)	35	Column Temp.	40 $^{\circ}\text{C}$
Capillary Volt.(V)	4,000		

용매 이동상 혼합비율 및 머무름 시간

표 26. 용매 이동상 조건 표

머무름 시간(분)	용매 이동상 혼합비율	
	A	B
0 ~ 3	50	50
3 ~ 9	0	100
9 ~ 12	0	100
12 ~ 14	100	0

2.1.2.2. Fucoïdan

2.1.2.2.1. Fucoïdan의 정량분석

Fucoïdan은 함유하고 있는 시료를 2 μl 씩 크로마토그램 종이위에 점적하여 말리고, 이를 0.1% Methylene blue, 50 mM HCl MeOH:acetone:water 혼합용액으로 염색시켰다. 5% acetic acid, 6% MeOH, 4% acetone으로 탈염 후, 염색된 fucoïdan을 2% SDS를 포함한 70% MeOH 0.5 ml에 넣고 50°C에서 추출하였다. 0.2 ml씩 96well plate에 분주하고 microplate reader기를 이용하여 663 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

2.1.2.2.2. HPLC를 이용한 fucoïdan의 분자량 측정

Gel permeation chromatography (GPC)를 이용하여 fucoïdan의 분자량을 측정하였다. 컬럼의 종류는 ultrahydrogel[1000-500-250]이며, 0.2 M KNO_3 를 이동상으로 하여 상온에서 유속 0.7 ml/min로 흘렸으며, 정제된 fucoïdan 시료 100 μl (5 mg/ml)을 주입하였다. Standard로써 Dextran sulfate(sigma) 5, 9-20, 500 kda를 사용하였다.

2.1.2.2.3. 황산기 함량 측정

황산기 함량을 측정하기 위해 정제된 fucoïdan 3 mg을 60% formic acid 1.0 ml에 녹이고, 100°C에서 8시간동안 산가수분해 시켰다. 반응 종료 후 가수분해물 0.2 mg에 3.8ml의 4% TCA와 1 ml의 BaCl-gelatine을 첨가하고 Elisa Leader를 이용하여 360 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.1.2.2.4. Fucoïdan의 구성당 분석

1-2mg의 정제된 fucoïdan 시료를 6.0 M의 HCl에 넣고 110°C에서 24시간 동안 산 가수 분해 시키고 건조 후, 1-2 ml의 증류수로 용해한 뒤 이를 구성당 분석의 시료로서 이용하였다. 분석 시스템은 HPAEC-PAD, ED50이며 컬럼의 종류는 CarboPac PA1 Analytical (4×250 mm), PA1 Guard(4×50 mm)이다. 30°C에서 18 mM NaOH를 이동상으로 하여 유속 1.0 ml/min로 흘렸으며, 가수분해 된 시료의 주입량은 15 μl 이다. 구성당은 7가지(Fuc, Rham, Arb, Gal, Glu, Man, Xyl) 를 기본으로 분석하였다.

2.1.3. 순도 및 수분함량 시험

2.1.3.1. 중금속

발효 톳 추출물을 이용하여 식품의약품안전청고시 “생약의 중금속허용 기준 및 시험방법”에 따라 시험할 때 적합하다.

2.1.3.2. 수분함량

대한약전의 수분측정법에 따라 시험할 때 5.0% 이하의 수분함량을 확인하였다.

2.1.4. 잔류용매 확인 :

발효 톳 추출물을 제조할 때 사용한 에탄올은 식약청의 “의약품잔류용매기준지침”에 저독성 용매로 분류되어 있다. 잔류 용매의 양이 1일 50 mg 이하 (방법 1에서 5,000 ppm이나 0.5%에

해당량)인 경우 타당성을 입증하는 자료 없이도 인정될 수 있다. 이보다 높은 잔류량에 대하여도 제조업자의 제조능력이나 우수 의약품 제조 및 품질관리기준(GMP)과 관련하여 현실적인 것으로 인정되는 경우 허용될 수 있다. 또한, 원료 의약품 제조시 마지막 제조공정 이전에 사용된 분류 2 또는 분류 3의 용매의 경우는 최종 원료에서 용매가 잔류하지 않음을 입증하는 자료를 제출할 경우, 원료 의약품에 잔류용매 기준을 설정하지 않을 수 있다.

2.2. 발효 톳 추출물의 분석

발효 톳 추출물의 실제적인 분석을 통하여 지표물질에 대한 성적서를 작성하여 이를 기준으로 삼아 제품 개발을 진행하도록 한다. 골관절 개선 기능성식품의 지표물질로써 fucoidan, fucosterol을 발효 톳을 이용하여 HPLC 및 LC/MS 분석을 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻어, 각 지표물질이 추출물 내에 존재함을 확인 하였다.

2.2.1. 발효 톳 추출물 내의 푸코스테롤의 확인

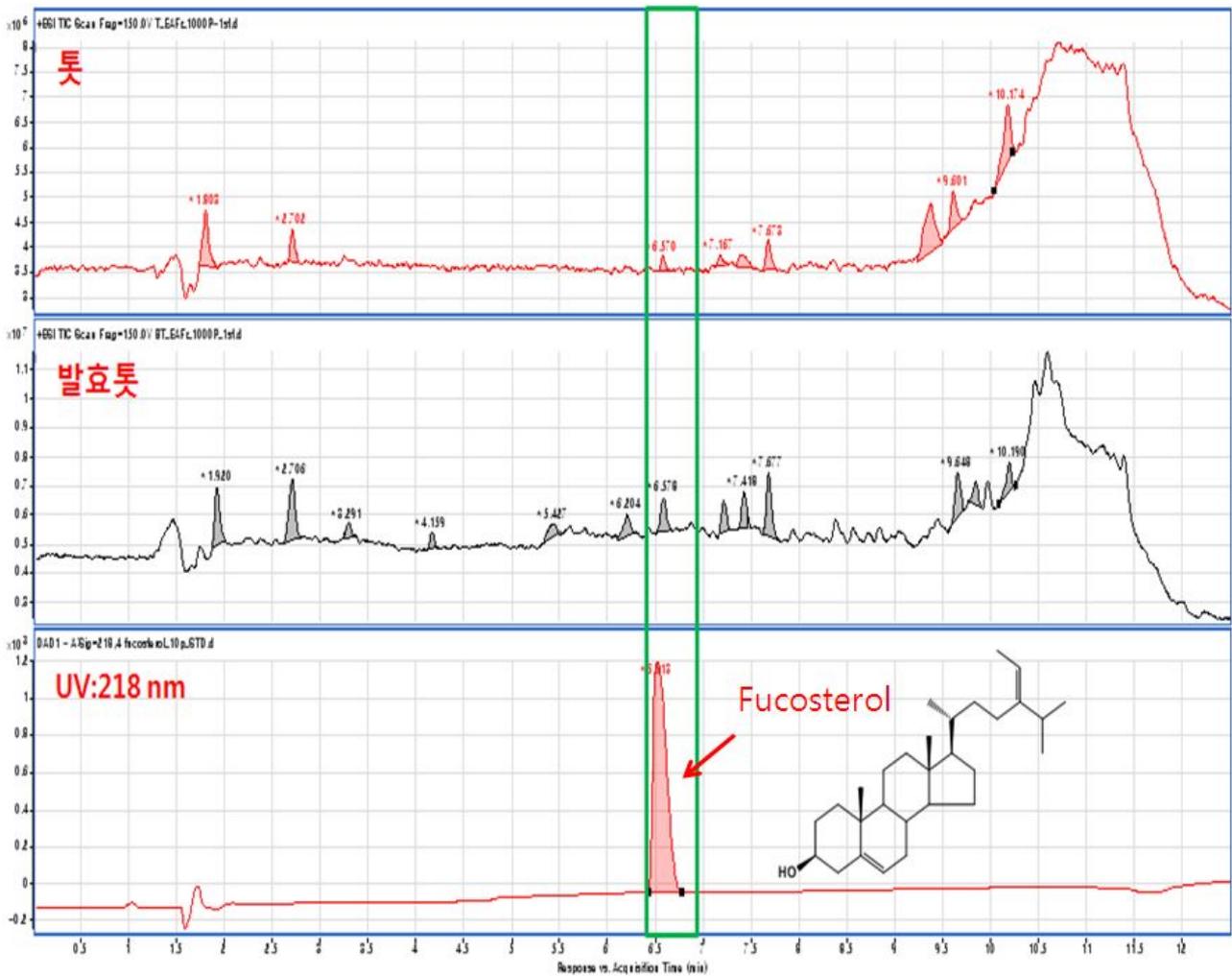


그림 54. 톳 및 발효 톳의 함량 확인

2.2.2. 발효 톱 추출물 내의 fucoidan의 확인

2.2.2.1. Fucoidan의 정량분석

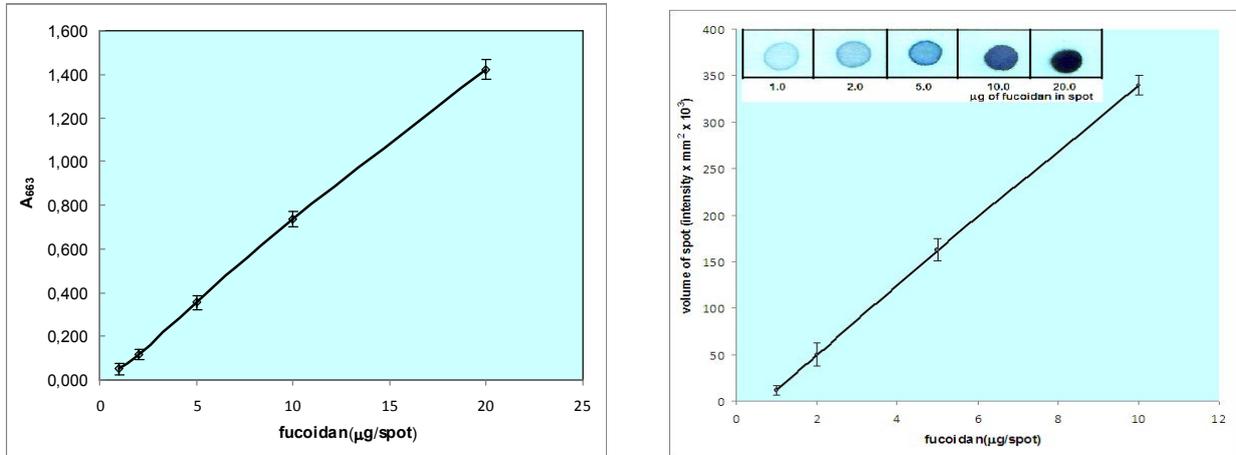


그림 55. Fucoidan의 정량분석 calibration curve(좌), fucoidan 정량 분석 결과

2.2.2.2. HPLC를 이용한 fucoidan의 분자량 측정

분석 결과, 정제된 fucoidan은 약 30-50 kDa의 크기를 나타냈다.

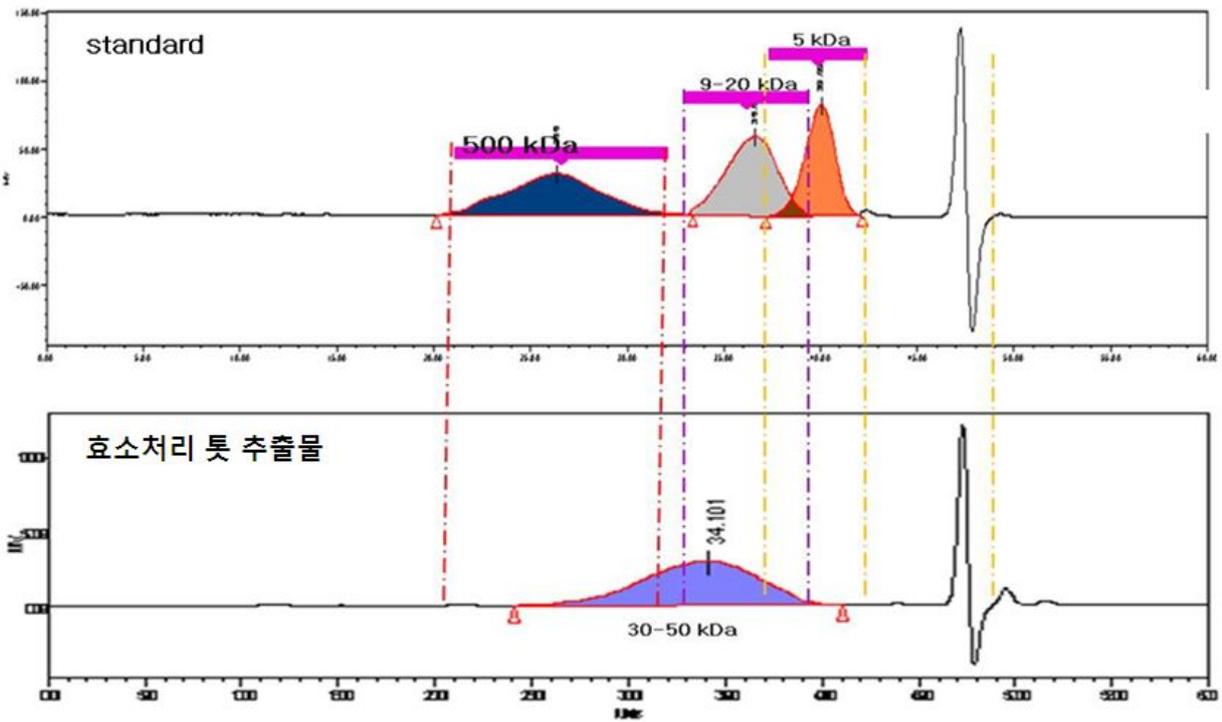


그림 56. HPLC를 이용한 fucoidan의 분자량 측정 결과

2.2.2.3. 황산기 함량 측정

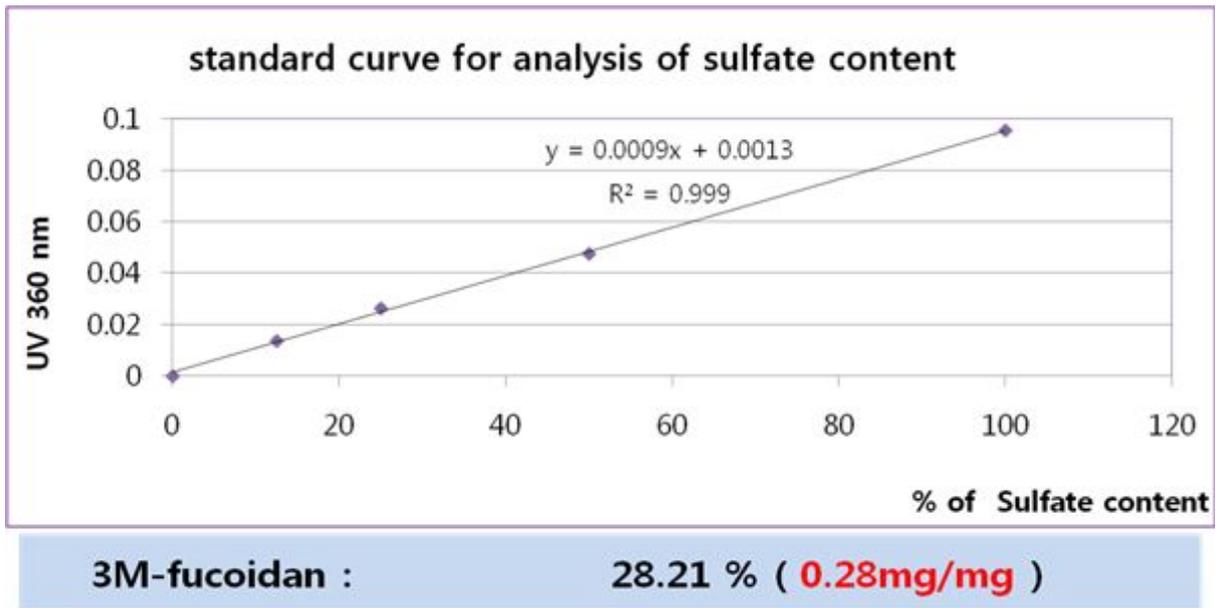


그림 57. Fucoidan의 황산기 함량 측정 결과

2.2.2.4. Fucoidan의 구성당 분석

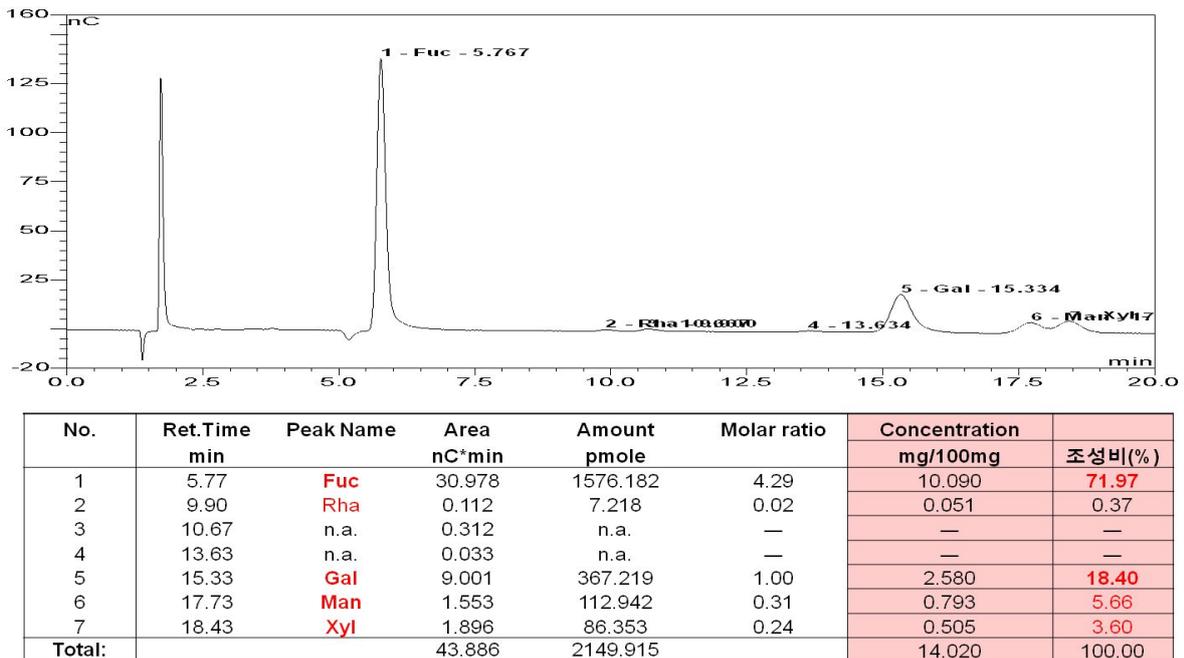


그림 58. Fucoidan의 구성당 분석 결과

분석 결과, 본 연구진이 발효 킷으로부터 분리 정제한 fucoidan의 분자량은 약 30kda-50kda이며, 3.6%(36mg/g)의 건조수율을 나타냈다. 황산기 함유량이 0.28mg/mg으로 28중량%로 나타났다. 구성당 분석결과 역시 후코스가 72% 함유되어 전형적인 fucoidan임을 확인하였다.

제 2 절 건강기능성 식품 인가를 위한 임상시험용 제품의 안전성 평가 확인 연구

1. 건강기능성 식품 인가를 위한 설치류의 단회투여 독성시험 실시.

본 시험은 시험물질인 발효 톳 추출물을 Sprague-Dawley계 암수 6주령 rat에 단회 경구투여시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

군구성은 시험물질 5,000 mg/kg의 용량 및 대조군 (주사용수)의 2군으로 하고, 암수 각 5 마리씩 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였다.

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

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

별첨 4.1번의 단회투여 독성시험 결과보고서 참조

1.1. 시험목적

암수 Sprague-Dawley rat을 이용하여 시험물질인 발효 톳 추출물을 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

1.2. 시험재료 및 방법

1.2.1. 시험물질 : 발효 톳 추출물 (Fermented Hiziki Extracts)

1.2.2. 시험계

1.2.2.1. 종 및 계통

Rat, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF

1.2.2.2. 생산자 및 구입처

ORIENTBIO INC., Korea

1.2.2.3. 종 및 계통의 선택이유

Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택한다.

1.2.2.4. 입수 시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 12 마리, 5 주령, 124.3 ~ 135.8 g / 암컷, 12 마리, 5 주령, 100.7 ~ 113.1 g

1.2.2.5. 투여 시 주령 및 동물 수

수컷, 10 마리, 6 주령, 166.5 ~ 178.3 g / 암컷, 10 마리, 6 주령, 117.8 ~ 129.8 g

1.2.2.6. 검역..순화

반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울 (CP3202S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7 일간의 순화기간 중에 매일 1 회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물입수 시 검역실에서 3 일간 일반증상을 관찰 후 동물실로 이동하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화 (Table 5)를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

1.2.2.7. 군분리

군분리는 모든 동물에 대하여 순화종료일 (군분리일)에 실시하였다. 군분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 10 마리를 선발하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2 군, 군당 5 마리로 군분리하였다.

1.2.3. 투여 (SOP/SGE/260)

1.2.3.1. 투여경로

경구투여

1.2.3.2. 투여경로의 선택이유

시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택한다.

1.2.3.3. 투여방법 및 투여횟수

투여액량은 10 mL/kg 으로 하고, 개체별 투여액량은 절식 후 (투여당일)의 체중을 기준으로 산출한다. 경구투여용 존대를 부착한 일회용 주사기 (3 mL)를 이용하여 위내에 단회 강제투여한다. 모든 동물은 투여 전에 약 16 시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4 시간에 사료를 급여한다.

1.2.4. 군 구성 및 투여용량

1.2.4.1. 군 구성

표 27. 단회투여 독성 실험 군 구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	5 (1101 ~ 1105)	5 (2101 ~ 2105)
G2 시험물질투여군	5,000	10	5 (1201 ~ 1205)	5 (2201 ~ 2205)

1.2.4.2. 투여용량설정

시험물질의 임상적용예정용량은 약 800 mg/human/day (성인 60 kg 기준시 13.3mg/kg)이다. 본시험의 예비시험 (Biototech Study No.: B12152P)으로 5,000 mg/10 mL/kg 을 암수 각 1 마리에 단회 경구투여한 결과 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서, 본시험의 투여용량은 5,000 mg/kg 의 단일 시험물질투여군을 설정한다. 대조군에는 시험물질투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여한다.

1.2.5. 관찰 및 검사

1.2.5.1. 일반증상 관찰 (SOP/SGE/160)

투여당일 (0 일)에 투여 후 30 분까지는 적어도 1 회 이상, 1, 2, 4 및 6 시간째에 일반상태 (독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰한다. 투여 후 1 일부터 14 일까지는 매일 1 회 일반증상을 관찰한다.

1.2.5.2. 사망동물의 처리 (SOP/SGE/240)

관찰기간 중 사망동물은 발견 시 체중을 측정 후 부검을 실시하는 것을 원칙으로 하고, 즉시 부검이 불가능할 경우 냉장보관 후 24 시간 이내에 부검한다.

1.2.5.3. 체중측정 (SOP/SGE/300)

체중은 투여당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7 일 및 14 일 (부검일)에 측정한다.

1.2.5.4. 부검 (SOP/PAT/115, 130)

관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대해서 CO₂ 가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검한다.

1.2.5.5. 조직병리학적 검사 (SOP/PAT/190, 230, 250, 280, 300, 320)

부검 시 육안소견이 관찰된 장기·조직에 대해서 필요하다고 판단된 경우, 조직병리학적 검사를 실시한다.

1.2.6. 자료의 통계처리 (SOP/DSC/002) : 실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS (version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정한다. Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정한다 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우 Student t-test 를, 등분산이 기각되면 Aspin-Welch t-test 를 실시하여 유의성을 확인한다. (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

1.3. 시험 결과

다음의 시험 결과표는 별첨 4.1 에 첨부 하였다

1.3.1. 사망유무 (별첨 4.1의 Table 1)

관찰기간 동안, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 없었다.

1.3.2. 일반증상 (별첨 4.1의 Tables 2, 6)

5,000 mg/kg 투여군의 암수 전례에서 투여 후 1 일에 약물혼입변 (compound-colored stool)이 관찰되었으나, 투여 후 2 일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 이러한 증상은 시험물질 투여에 기인한 일시적인 변화로 판단된다.

1.3.3. 체중변화 (별첨 4.1의 Figures 1, 2, Tables 3, 7)

관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.

1.3.4. 육안적 부검소견 (별첨 4.1의 Tables 4, 8)

부검시, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다.

1.4. 결론

본 시험의 조건 하에서 발효 톱 추출물을 랫드에 단회 경구투여 한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단된다.

2. 건강기능성 식품 인가를 위한 유전독성시험

2.1. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

시험물질 발효 톳 추출물의 염색체 이상 유발성을 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 사용하여 검토하였다.

본시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 모든 처리계열에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이도 관찰되지 않았다.

각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가되었다.

이상의 결과로부터 본 시험조건하에서 시험물질인 발효 톳 추출물은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

별첨 4.2 번의 염색체 이상 시험 결과보고서 참조

2.1.1. 시험목적

시험물질 발효 톳 추출물에 대해 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU)cell line)를 사용하여 염색체이상 유발성의 유무를 검토하였다.

2.1.2. 시험재료 및 방법

2.1.2.1. 시험물질

발효 톳 추출물 (Fermented Hiziki Extracts)

2.1.2.2. 세포주

2.1.2.2.1. 명칭

Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포

2.1.2.2.2. 선택이유

검출감도가 높아 염색체이상시험에 많이 사용되고 있으며 가이드라인에서도 추천하는 Chinese Hamster Lung (CHL/ IU) 세포주를 선택하였다.

2.1.2.2.3. 입수 및 보관

CHL/IU 세포주 (Lot No.: 3375917, U.S.A.)는 2006년 10월 25일에 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여, 10% Fetal bovine serum (FBS)를 포함한 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)이 들어있는 75 cm² 플라스크 (Nunc, Denmark)에 넣고, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. Hoechst Stain Kit (MPBIOMEDICALS, Japan)

를 사용하여 세포의 마이크로 플라즈마의 오염유무에 대해 확인하고, 배양된 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 가하여 플라스크 바닥으로부터 세포가 분리된 것을 확인하였다. 세포 현탁액을 tube에 옮겨 담고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 1×10^6 cells/mL이 되도록 FBS를 첨가한 후, DMSO (Merck, Germany)의 최종농도가 10% 가 되도록 하여 동결보존용 튜브에 분주하고, 초저온냉동고(-80 ~ -60°C)에서 하루동안 방치한 후, 액체 질소탱크에 사용 시 까지 보관하였다.

2.1.2.2.4. 계대배양

동결된 세포를 37°C로 설정된 항온수조에서 녹인 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지가 들어있는 50 mL 플라스틱 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm² 플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포가 배양플라스크 바닥면적에 70~80% 이상 생육할 때 세포형태를 관찰하고, 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리하였다. 세포현탁액을 50 mL 플라스틱 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁 시켰다. 세포현탁액을 75 cm² 플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

2.1.2.2.5. 전배양

염색체이상시험에는 세포 계대수가 14 이내인 세포를 사용하였다. 대수증식기의 세포에 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리한 후, 50 mL 플라스틱 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시킨 후, 혈구계수관을 이용하여 세포수를 계수하여 5×10^4 cells/mL 세포 현탁액을 만든 후, 세포증식억제시험용은 96 well plate (200 µL/well; Nunc, Denmark), 분시험용은 60 mm dish (5 mL/dish, BD, U.S.A.)에 분주하여 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 1일간 배양하였다.

2.1.2.3. 배지

시험에 사용할 배지를 조제하기 위하여, EMEM에 비활성화된 FBS를 최종농도 10%가 되도록 첨가한 후, 10,000 units/mL의 Penicillin G sodium과 10,000 µg/mL의 streptomycin sulfate를 포함한 혼합액 (Invitrogen, U.S.A.)을 100 : 1의 비율로 첨가하였다. 조제 후 사용시까지 냉장 (2 ~ 8°C) 보관하였다.

2.1.3.4. 세포증식억제시험

분시험의 용량을 설정하기 위해 비GLP로 실시하였다.

2.1.3.4.1. 용량

가이드라인에서 추천한 5,000 µg/mL을 최고용량으로 하고, 이하 2,500, 1,000, 500, 250, 100, 50, 10 및 5 µg/mL의 8용량을 설정하였다. 또한, 음성대조군을 설정하였다.

2.1.3.4.2. 처리방법

계대배양한 세포현탁액의 세포수를 혈구계수관을 이용하여 계수한 후 5×10^4 cells/mL이 되도록 10% FBS를 포함한 EMEM으로 희석하여 96 well plate (Nunc, Denmark)에 200 μ L씩 분주하고, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 1일간 배양하였다. 배양종료 후, 각 plate는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 합 3계열로 분리하였다. 한 용량당 4 well을 사용하고, 시험번호 및 각 계열을 기입해서 well plate를 구별하였다. 계열별로 아래의 표와 같이 조제하여 처리하였다.

표 28. 세포증식억제 예비시험 시료 처리량

계열	S9 mix	처리군	조제량 (mL)			분주량 (μ L/well)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성대조물질 또는 시험물질액	
단시간처리법	-	음성대조	0.90	-	0.1	200
		시험물질	0.90		0.1	200
	+	음성대조	0.73	0.17	0.1	200
		시험물질	0.73	0.17	0.1	200
연속처리법	-	음성대조	0.90	-	0.1	200
		시험물질	0.90		0.1	200

처리후, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하에는 6시간 배양한 후 well내를 *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (D-PBS)로 세정하고, 신선한 배양액 200 μ L를 가해 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 경우에는 24시간 연속 배양하였다. 시험물질의 침전은 시험물질액 처리시와 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다.

2.1.3.4.3. 흡광도 측정

배양종료 후 모든 well에 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL D-PBS)를 50 μ L씩 첨가하여 4시간 더 배양한 후에 배양액을 버리고 건조시켰다. 여기에 DMSO를 150 μ L씩 첨가하여 침전물을 용해시켰다. ELISA reader (ELx808IU, BioTek, U.S.A.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.1.3.4.4. 본시험의 용량설정의 이유

2.1.3.4.4.1. 세포증식억제시험의 결과 : 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포증식을 명확하게 50% 이상 억제하는 용량은 관찰되지 않았다. 단시간처리법의 대사활성화존재하에서는 세포독성이 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 2,500 μ g/mL 이상에서 관찰되었다.

2.1.3.4.4.2. 본시험의 용량

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하의 최고용량인 5,000 μ g/mL에서 약 30% 이상의 세포독성이 관찰되었기 때문에, 본시험의 최고용량은 단시간처리법

의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하 모두 5,000 µg/mL으로 하고, 이하 공비 2로 3용량의 시험물질균을 설정하였다. 또한, 각각의 처리계열에 대해 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

2.1.3.5. 본시험

2.1.3.5.1. 처리방법

계대배양한 세포현탁액의 세포수를 혈구계수관을 이용하여 계수한 후 5×10^4 cells/mL이 되도록 10% FBS를 포함한 EMEM로 희석하여 60 mm plate (BD, U.S.A.)에 5 mL씩 분주하여 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 1일간 배양하였다. 배양종료 후, 각 plate는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 합 3계열로 분리하였다. 한 용량당 2개의 plate를 사용하고, 각각의 plate에 유성펜으로 코드화한 용량, 음성대조물질, 양성대조물질 및 대사활성화 존재유무를 기입하여 식별하였다. 계열별로 아래와 같이 조제하여 처리하였다.

표 29. 세포증식억제 본시험 시료 처리량

계열	S9 mix	처리군	조제량 (mL)			분주량 (mL/plate)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성(양성)대조물질 또는 시험물질액	
단시간처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5
	+	음성대조	9.53	2.17	1.3	5
		시험물질	9.53		1.3	5
		양성대조	10.7		0.13	5
연속처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5

처리 후, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 6시간 배양한 후 plate내를 D-PBS로 세정하고, 신선한 배양액 5 mL로 교환하고 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 경우에는 24시간 연속 배양하였다. 시험물질의 침전은 시험물질액의 처리시와 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다.

2.1.3.5.2. 검체제작

배양종료 2시간 전에 Colcemid 용액 (Invitrogen, U.S.A.)을 최종농도가 0.2 µg/mL되게 첨가하였다. 배양종료 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 plate 바닥으로부터 세포를 떼어냈다. 떨어진 세포를 1,000 rpm (FLETA 5, 한일과학)에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 버리고 37°C에서 보온한 0.075 mol/L KCl 수용액을 5 mL 첨가하여 vortex mixer로 교반한 후 37°C에서 20분간 방치하였다. 20분 후, 1 mL의 냉각한 고정액 (methanol : acetic acid = 3 : 1)을 넣고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 세포를 반고정하였다. 이후,

5 mL의 냉각한 고정액을 첨가한 후 vortex mixer로 교반하여 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 1회 반복하여 세포를 고정하였다. 얻어진 세포부유액을 슬라이드 글라스 2군데에 1 ~ 2 방울 떨어뜨려 슬라이드 표본을 제작하고 코드화하였다. 건조 후, 3% Giemsa 염색액으로 20분간 염색하였다.

2.1.3.6. 관찰

슬라이드 표본관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시하였다. 염색체 관찰의 대상 용량은 각 처리법 모두 용량당 200개의 분열중기세포가 관찰 가능한 3용량을 설정하였다. 각 슬라이드당 100개, 1개 용량 당 최소 200개의 분열중기세포를 현미경 (BX51, Olympus, Japan, 400배, 600배 배율)으로 관찰하였다. 구조이상으로서 염색분체절단 (chromatid break; ctb), 염색분체교환 (chromatid exchange; cte), 염색체절단 (chromosome break; csb), 염색체교환 (chromosome exchange; cse), 갭 (gap: 염색분체의 폭 보다도 좁은 비염색성 부위) 및 기타 (other; o)로 분류하였다. 기타로서 1개의 분열중기세포에 다수의 gap 및 절단 등이 있는 경우에는 단편화 (fragmentation; frg)로 기록하였다. Gap에 대해서는 결과 기록시 구조이상에 포함하지 않고, 종합판정에서도 gap을 포함하지 않는 결과로 평가하였다. 또한 수적 이상으로서 배수체 (polyploid; pol) 및 핵내배화 (endoreduplication; end)를 기록하였다. 이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 퍼센트 값을 구하고, 퍼센트 값을 염색체이상빈도로 하였다. 또한, 염색체이상의 종류를 각각 기록하였다.

2.1.3.7. 시험의 성립조건

다음의 조건을 모두 만족하는 경우 성립으로 하였다.

- 1) 염색체이상출현빈도가 음성대조군에서는 5% 미만, 양성대조군은 10% 이상일 것.
- 2) 시험물질군에서 분열중기상 세포를 200개 관찰한 용량이 3용량 이상일 것.
- 3) 세포의 오염이 없을 것.

2.1.3.8. 결과의 판정

염색체이상을 가진 세포 (gap은 제외)의 출현빈도에 대해 Toshio Sofuni 등의 판정기준에 따라 이상세포의 평균 출현율에 따라 다음과 같이 판정하였다.

- 1) 5% 미만 - 음성(-)
- 2) 5% 이상, 10% 미만 - 의양성(±)
- 3) 10% 이상 - 양성(+)

본 실험에서는 양성으로 판정되지 않았기 때문에 D20 및 TR값은 구하지 않았다.

- D20: 20%의 세포에 구조이상이 출현할 수 있는 농도 (mg/mL)

- TR값: 단위용량 (mg/mL)당의 염색분체형교환 (cte) 출현빈도의 비교치

2.1.3.9. 자료의 통계처리

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도는 SAS (version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)을 사용하여 통계해석을 실시하였다. 음성으로 판정될 경우에는 염색체이상을 가지는 세포의 출현빈

도에 대해서 Fisher's exact test에 의해 음성대조군과 시험물질처리군 간 및 음성대조군과 양성대조군간의 유의차 (유의수준: 0.05) 검증을 실시하였다.

2.1.4. 시험 결과

시험 결과 표는 별첨 4.2 에 첨부 하였다.

2.1.4.1. 세포증식억제시험

시험방법에 따라, 세포증식억제시험을 실시한 결과, 본시험의 최고용량은 5,000 µg/mL으로 하고, 이하 공비 2로 2용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

2.1.4.2. 본시험 (별첨 4.2의 Table 2)

2.1.4.2.1. 염색체이상출현빈도

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이도 관찰되지 않았다 (Fisher's exact test, $p \geq 0.05$). 각 처리계열에 대한 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 10% 이상이며, 음성조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가하였다 (Fisher's exact test, $p < 0.05$).

2.1.4.2.2. 시험물질의 침전

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 2,500 µg/mL 이상에서 관찰되었다.

2.1.4.2.3. Historical Control Data (별첨 4.2의 Table 3)

음성대조군 및 양성대조군의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 historical control data의 범위내에 있었다.

2.1.4.2.4. 시험의 성립

음성대조군 및 양성대조군의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 historical control data의 범위내에 속하였으며, 양성대조군에서 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 10% 이상으로 음성대조군과 비교해서 유의한 증가가 확인되었고, 시험물질군의 3용량에서 200개의 분열중기상세포가 관찰 가능하였다. 또한, 세포의 오염도 없었기 때문에 해당시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것이 확인되었다.

2.1.5. 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질 발효 톳 추출물의 염색체이상 유발성은 음성으로 판정되었다.

2.2. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험물질 발효 톳 추출물의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성 살모넬라균 (TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주) 및 트립토판 요구성 대장균 (WP2*uvrA*(pKM101) 균주)을 이용하여 대사활성화비존재하 및 존재하의 경우에 대해 각각 검토하였다

본시험의 결과, 시험물질균에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀돌연변이수는 음성대조균의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다.

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

이상의 결과로부터, 본 시험조건에서 시험물질 발효 톳 추출물은 유전자 돌연변이 유발성이 없는 것으로 판단되었다.

별첨 4.3 번의 복귀 돌연변이시험 결과보고서 참조

2.2.1. 시험목적

시험물질 발효 톳 추출물의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*)과 트립토판 요구성인 대장균 (*Escherichia coli*)을 이용하여 검토하였다.

2.2.2. 시험재료 및 방법

2.2.2.1. 시험물질 : 발효 톳 추출물 (Fermented Hiziki Extracts)

2.2.2.2. 양성대조물질

표 30. 양성 대조 물질의 목록

명칭	Lot No.	보관조건	제조사
Sodium azide (SA)	STBB9452V	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-Nitrofluorene (2-NF)	S43858V	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-Aminoanthracene (2-AA)	STBB1901V	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
9-Aminoacridine (9-AA)	07620TDV	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide(AF2)	STQ3987	실온	Wako, Japan

2.2.2.3. 시험물질의 조제

시험물질의 조제는 시험물질 처리일에 실시하였다. 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (CP323S, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 교반하여 현탁

시킨 후 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계회석하여 조제하였다.

2.2.2.4. 양성물질의 조제

각 균주에 대한 양성대조물질을 조제하기 위하여, SA는 주사용수 (Lot No.: GBA1009, Choongwae Pharma Corp., Korea)를 그 외의 물질은 DMSO (Lot Nos.: K41607131, K42088831 Merck, Germany)를 부형제로 사용하였다. 각각의 양성대조물질을 칭량한 후, 조제 용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 교반하였다. 각 양성대조물질은 아래와 같이 규정된 최종용량이 되도록 부형제로 정량하여 조제하였다. 조제된 각각의 양성대조물질은 튜브에 분주하여 초저온냉동고 (OPR-DFU-657CEV, Operon, -80 ~ -60°C)에 동결보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.

표 31. 각 균주에 대한 양성대조물질의 종류와 용량

S9 mix	균주명	명칭	용량 (µg/plate)
-	TA98	2-NF	5.0
	TA100	SA	1.5
	TA1535	SA	1.5
	TA1537	9-AA	80.0
	WP2uvrA(pKM101)	AF2	0.005
+	TA98	2-AA	1.0
	TA100	2-AA	2.0
	TA1535	2-AA	3.0
	TA1537	2-AA	3.0
	WP2uvrA(pKM101)	2-AA	2.0

2.2.2.5. 균주

2.2.2.5.1. 종 및 균주명 :

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

2.2.2.5.2. 선택이유

변이원성물질에 대한 감수성이 높고, 미생물을 사용한 변이원성시험에 가장 일반적으로 사용되고 있으며, 가이드라인에서 추천되고 있는 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA(pKM101) 균주를 사용하였다.

2.2.2.5.3. 입수 및 보관

균주는 2011년 10월 28일에 Molecular Toxicology, Inc. (MOLTOXTM)에서 구입하였다. 입수된 각 균주를 nutrient broth 배지에 접종하여 8시간 동안 진탕배양 (37°C, 130 rpm)하였다.

배양 종료 후 각 균주의 유전자형 (genotype)을 확인하였다. 균주의 특성이 확인된 각 균주 현탁액과 DMSO를 1:0.09의 비율로 혼합하여 동결보존용 튜브에 분주하고 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하였다.

표 32. 각 균주의 유전자형

종	균주명	유전자형	
Salmonella typhimurium	TA98	hisD3052	rfaΔuvrB (pKM101)
	TA100	hisG46	rfaΔuvrB (pKM101)
	TA1535	hisG46	rfaΔuvrB
	TA1537	hisC3076	rfaΔuvrB
Escherichia coli	WP2uvrA(pKM101)	trpE	uvrA (pKM101)

2.2.2.5.4. 전배양

동결보관된 각 균주를 해동하여 nutrient broth 배지에 접종하고 진탕배양 (37°C, 130 rpm)하였다. 배양 종료 후, 각 균주를 2 mL씩 cuvette에 넣고 UV/VIS spectrophotometer (측정파장 660 nm, V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하고, 균수가 1×10^9 cells/mL 이상 되는 것을 확인한 후 시험에 사용하였다.

2.2.2.6. 배지

2.2.2.6.1. Nutrient broth 배지

Nutrient broth No.2 (Oxoid, UK)를 칭량한 후 조제용기에 넣고 소량의 초순수를 첨가하여 stirrer로 교반하여 용해시켰다. 최종농도가 2.5%가 되도록 초순수를 첨가하였다. 조제 후 고압증기 멸균하였다.

2.2.2.6.2. 최소 glucose 한천평판배지

초순수에 bacto agar (BD, U.S.A.)를 넣고 고압증기 멸균하였다. 멸균후 VB (Vogel-Bonner) salts 10배 농축액과 20% glucose (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)를 각각 첨가하고 페트리 디쉬에 분주하여 상온 방치하였다.

2.2.2.6.3. Top agar

염화나트륨 및 bacto agar (BD, U.S.A.)의 농도가 각각 0.5 및 0.6%인 top agar를 조제하기 위하여 각각의 물질을 칭량한 후 초순수를 가하여 고압증기 멸균하였다. 조제된 용액에 살모넬라 균주용 top agar는 0.5 mM L-Histidine/DBiotin 혼합액 (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하고, 대장균용 top agar는 0.5 mM L-Tryptophan (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하여 조제하였다.

2.2.2.7. S9 mix의 조제

2.2.2.7.1. 입수 및 보관

S9과 Cofactor A를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온냉동고 (-80 ~

-60°C)에 보관하고, 유효기간 내에 사용하였다.

표 33. S9의 특성

사용동물	Sprague-Dawley rat [Cr1:CD(SD)]
성별, 주령	수컷, 7주령
장기	간장
유도물질	Phenobarbital (PB) 및 5,6-benzoflavone (BF)
투여량 및 투여횟수	PB: 30 mg/kg 1회 (1일째) 60 mg/kg 3회 (2 ~ 4일째) BF: 80 mg/kg 1회 (3일째)
투여경로	복강내투여

2.2.2.7.2. S9 mix 조성 및 조제방법

S9 mix는 아래의 표와 같은 조성으로 필요량을 사용시에 조제하였다. 동결보관된 S9 (Lot No.: 11122210)과 Cofactor A (Lot No.: A11121910)를 해동하여 1 : 9의 비율로 혼합하였다.

표 34. S9 mix의 조성

성 분		각 성분의 함유량	
S9		0.1	mL
Cofactor A	0.4 mol/L MgCl ₂	0.02	mL (8 µmol)
	1.65 mol/L KCl	0.02	mL (33 µmol)
	1.0 mol/L Glucose-6-phosphate	0.005	mL (5 µmol)
	0.1 mol/L NADPH	0.04	mL (4 µmol)
	0.1 mol/L NADH	0.04	mL (4 µmol)
	0.2 mol/L Sodium phosphate buffer, pH 7.4	0.5	mL (100 µmol)
	정제수	0.275	mL
총 액량		1	mL

2.2.2.8. 용량설정시험

본시험의 용량을 결정하기 위하여 용량설정시험을 실시하였다.

2.2.2.8.1. 용량

가이드라인에서 추천하는 5,000 µg/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 4로 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 µg/plate의 5용량을 설정하였다. 또한 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

2.2.2.8.2. 시험방법

용량설정시험은 본시험과 동일한 방법 및 조건으로 실시하였다. 단 용량설정시험에서는 각 용량당 2매의 페트리디쉬를 사용하였다.

2.2.2.8.3. 본시험의 용량설정

용량설정시험의 결과, 시험물질에 의한 생육저해는 대사활성화 유무에 관계없이 모든 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전은 대사활성화 비존재하 및 존재하의 1,250 μ g/plate 이상에서 관찰되었지만, 복귀변이 콜로니수의 계측에는 영향이 없었다. 따라서, 본시험의 최고용량은 5,000 μ g/plate으로 하고, 이하 공비 2로 4용량 (2,500, 1,250, 625 및 313 μ g/plate)의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

2.2.2.9. 본시험

2.2.2.9.1. 시험방법

본시험은 프리인큐베이션법으로 실시하였다. 또한, 대사활성화비존재하 및 존재하의 2계열로 하였다. 본시험에서는 각 용량당 3매의 페트리디쉬를 사용하였다. 각각의 페트리디쉬에 코드화한 균주명, 용량, 음성대조물질, 양성대조물질 및 대사활성화 존재 유무를 기입하여 식별하였다.

2.2.2.9.2. 처리방법

대사활성화비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질을 각각 100 μ L씩 마이크로피펫으로 취하여 건열멸균한 유리시험관에 넣고, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 μ L 및 각 균주 현탁액 100 μ L를 첨가해서 37°C에서 20분간 진탕하였다. 진탕 종료 후, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP2uvrA(pKM101) 균주에는 대장균용 top agar를 각각 2mL씩 첨가하여 vortexing 하였다. 그 후, 현탁액을 최소 glucose 한천평판배지에 중층하여 실온에서 방치하였다. 대사활성화존재하에서는 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 μ L 대신에 S9 mix 500 μ L를 첨가하였다. 그 외의 처리는 동일하게 실시하였다.

2.2.2.9.3. 배양법 및 배양시간

Top agar가 굳은 후 페트리디쉬를 뒤집어서 37°C 배양기 (DK-LI020-P, Daikiscientific Co., LT, Korea)에서 48시간 배양하였다.

2.2.2.9.4. 무균검사

잡균에 의한 오염유무를 확인하기 위해 최고용량의 시험물질액, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 및 S9 mix를 건열멸균한 유리시험관에 넣고, 37°C 배양기에서 20분간 진탕하였다. 진탕 종료 후, top agar를 가해서 vortexing 한 후, nutrient broth 한천평판배지에 중층하여 실온에 방치하였다. Top agar가 굳은 후 페트리디쉬를 뒤집어서 37°C 배양기에서 48시간 배양한 후, 미생물의 오염으로 인한 콜로니 형성 유무를 확인하였다.

2.2.2.9.5. 확인시험

용량설정시험과 본시험의 결과에서 재현성이 확보되지 않은 경우와 생육저해가 확인되지 않은 용량이 4용량 이상이 확보되지 않은 경우의 조건에 해당되지 않았기 때문에 확인시험을 실시하지 않았다.

2.2.2.10. 관찰 및 계측

2.2.2.10.1. 시험물질의 침전의 관찰

시험물질의 처리시 및 콜로니 수 계측시에 시험물질의 침전에 대해 육안으로 관찰하고 기록하였다.

2.2.2.10.2. 콜로니수의 계측

배양 종료 후, 복귀변이콜로니수를 콜로니카운터 (ProtoCOL, SYNBIOISIS, UK)로 자동계측하였다. 시험물질의 침전 등으로 자동계측이 정확하지 않은 경우에는 육안계수를 실시하였다.

2.2.2.10.3. Background lawn의 관찰

계측과 동시에 background lawn으로부터 시험물질에 대한 균주의 생육저해의 유무를 관찰하였다. 생육저해의 판정기준은 background lawn이 음성대조군과 비교시 엷어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다.

2.2.2.11. 시험의 성립조건

- 1) 음성 및 양성대조군에서의 평균복귀변이콜로니수가 Historical control data의 범위내 또는 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배 이상일 것.
 - 2) 4용량 이상에서 생육저해가 관찰되지 않을 것.
 - 3) 오염이 없을 것
- 의 조건을 모두 만족하는 경우 성립으로 하였다.

2.2.2.12. 결과의 판정

적어도 1개 균주에서 복귀변이콜로니수가 1용량 이상에서 음성대조군에 비해 2배 이상 증가하고, 증가에 따른 용량의존성이 있거나, 재현성이 있을 것의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

2.2.2.13. 자료의 통계처리

복귀변이콜로니수의 측정치에 관해서는 실측치를 표기하고, 평균치 및 표준편차를 구하며 통계학적 방법은 사용하지 않았다.

2.2.3. 시험 결과

시험의 결과 표는 별첨 4.3 에 첨부하였다

2.2.3.1. 용량설정시험

2.2.2.8.의 시험방법에 따라, 용량설정시험을 실시한 결과, 본시험의 최고용량은 5000 μ g/plate로 하였고, 공비를 2 로 5 농도로 하여 설정하였다.. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

2.2.3.2. 본시험

2.2.3.2.1. 복귀변이콜로니수의 계측

시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다. 양성대조군에서는 각 균주의 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

2.2.3.2.2. 시험물질에 의한 생육저해 및 침전

시험물질에 의한 생육저해는 대사활성화 유무에 관계없이 모든 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전은 대사활성화 비존재하 및 존재하의 625 µg/plate 이상에서 관찰되었지만, 복귀변이콜로니수의 측정에는 영향이 없었다.

이상의 결과로부터, 용량설정시험과 본시험의 재현성이 확인되었기 때문에, 본시험은 음성으로 판정하였다.

2.2.3.3. Historical Control Data

대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이 콜로니수의 평균치는 historical control data의 범위내에 속하였다.

2.2.3.4. 시험의 성립

해당시험은 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치가 historical control data 범위내에 속하였고, 각 균주에 있어서의 양성대조군의 복귀변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실한 증가가 확인되었다. 또한, 생육저해가 인정되지 않는 용량이 4용량 이상이었으며, 잡균에 의한 오염도 확인되지 않았기 때문에 해당시험은 적절하게 실시되었다고 판단하였다.

2.2.4. 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건에서 시험물질 발효 및 추출물의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판정되었다.

2.3. 마우스를 이용한 소핵시험

시험물질 발효 톱 추출물의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발유무를 평가하기 위하여 수컷 ICR 마우스를 이용하여 단회 경구투여하여 검토하였다.

본시험의 최고용량을 설정하기 위해 5,000, 2,500, 1,000, 500 및 250 mg/kg의 용량으로 용량설정시험을 실시한 결과, 투여 후 1일에 1,000 mg/kg 이상에서 약물혼입변이 관찰되었지만, 모든 용량에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서, 5,000 mg/kg을 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 2용량 (2,500 및 1,250 mg/kg)의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군에는 주사용수를, 양성대조군에는 Mitomycin C를 설정하였다.

검체제작설정시험에서는 용량설정시험에서 설정된 최고용량인 5,000 mg/kg을 투여하고, 투여 후 24, 48 및 72시간에 골수를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰한 결과, 모든 관찰 시간대에서 소핵유발빈도는 증가되지 않았다. 따라서 일반적으로 사용되는 투여 후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 설정하였다.

시험물질군에서는 다염성적혈구 (Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 증가는 관찰되지 않았다. 또한, 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 없었다. 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군에 비해 유의하게 증가하였다.

이상의 결과로부터, 시험물질 발효 톱 추출물은 본시험 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

별첨 4.4 번의 소핵 시험 결과보고서 참조

2.3.1. 시험목적

마우스 골수세포를 이용하여 시험물질 발효 톱 추출물의 소핵유발 유무를 평가하였다.

2.3.2. 시험재료 및 방법

2.3.2.1. 시험물질

발효 톱 추출물 (Fermented Hiziki Extracts)

2.3.2.2. 양성대조물질

실험에 사용한 양성대조물질은 Sigma-Aldrich사(U.S.A.)에서 구입한Mitomycin C (MMC)를 냉장 보관하여 사용하였다.

2.3.2.3. 시험물질의 조제

시험물질의 조제는 투여 일에 실시하였다. 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (CP323S, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 교반하여 현탁한 후 부형제를 가하여 규정용량으로 조제하였다.

2.3.2.4. 양성물질의 조제

Mitomycin C (MMC) 2 mg에 주사용수 (Lot No.: GBA1009, Choongwae Pharma Corp., Korea) 4 mL를 첨가하여 용해한 후 생리식염주사액 (Lot No.: GAJ1036, Choongwae Pharma Corp., Korea) 을 더하여 0.2 mg/mL으로 조제하여 초저온 냉동고 (-80 ~ -60°C) 내에 보관하고, 사용시 해동하여 시험에 사용하였다.

2.3.2.5. 시험계

2.3.2.5.1. 종 및 계통

마우스, CrljOri:CD1(ICR), SPF (ORIENTBIO INC., Korea)

2.3.2.5.2. 선택이유

ICR 마우스는 설치류로서 소핵시험을 비롯한 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있으며 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.

2.3.2.5.3. 군 분리

군 분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동물을 이용하여 순화종료일 (군 분리일)에 실시하였다. 군 분리 일에 평균체중에 가까운 동물에 대해 용량설정시험용 15마리, 검체제작시간 설정시험용 9마리 및 본시험용 25마리를 선별하였다. 선별한 동물은 각 군 평균체중이 균등하도록 군을 분리하였다.

2.3.2.6. 용량설정시험

본시험의 용량을 결정하기 위하여 용량설정시험을 실시하였다.

2.3.2.6.1. 투여용량

가이드라인에서 추천하는 용량은 2,000 mg/kg 이지만, 시험물질이 식품인 것을 고려하여, 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하고 이하 2,500, 1,000, 500 및 250 mg/kg의 4용량을 설정하였다.

2.3.2.6.2. 투여방법 및 일반증상과 사망동물의 관찰

용량 당 3 마리로 하였다. 테프론제 존데를 장착한 주사기를 사용하여 강제경구 투여하였다. 투여액량은 10 mL/kg로 하고, 군 분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다. 또한, 투여직후 (투여 0일), 투여 후 2시간, 투여 후 1, 2 및 3일에 일반증상 및 각 용량별 사망동물을 관찰하였다.

2.3.2.6.3. 본시험의 용량설정

투여 후 1일에 1,000 mg/kg 이상에서 약물혼입변이 관찰되었지만, 모든 용량에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서, 5,000 mg/kg을 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 2용량 (2,500 및 1,250 mg/kg)의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

2.3.2.7. 검체제작시간 설정시험

본시험의 검체제작시간을 설정하기 위해 실험을 실시하였다.

2.3.2.7.1. 투여방법

용량설정시험에서 설정한 최고용량을 1회 경구투여하고, 투여 후 24, 48 및 72시간째에 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰하였다. 각 시간당 동물은 3마리로 하였다. 투여액량은 10 mL/kg로 하고, 군분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

2.3.2.7.2. 일반증상 및 사망동물 관찰

시험물질 투여직후 (투여 0일), 투여 후 2시간, 투여 후 1, 2 및 3일에 일반증상 및 사망동물을 관찰하였다.

2.3.2.7.3. 검체제작시간의 설정

투여 후, 24, 48 및 72시간에 소핵유발을 확인한 결과, 모든 관찰 시간대에서 소핵유발은 증가되지 않았기 때문에 일반적으로 사용되는 투여 후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 하였다.

2.3.2.8. 본시험

2.3.2.8.1. 군 구성

각 군에 5마리의 동물을 사용하여 5군으로 설정하였다.

표 35. 설치류의 소핵 유발 시험 군 구성표

군		투여용량(mg/kg)	투여액량(mL/kg)	투여경로	마리수(개체번호)
G1	음성대조	0	10	경구	5 (1101-1105)
G2	저용량	1,250	10	경구	5 (1201-1205)
G3	중용량	2,500	10	경구	5 (1301-1305)
G4	고용량	5,000	10	경구	5 (1401-1405)
G5	양성대조	2	10	복강내	5 (1501-1505)

2.3.2.8.2. 투여

시험물질은 테프론제 손대를 장착한 주사기를 사용하여 1회 강제경구 투여하였다. 음성대조군은 시험물질과 동일한 방법으로 부형제를 1회 강제경구 투여하였다. 양성대조물질 MMC는 일반적으로 많이 사용되고 있는 복강에 1mL (26G) 주사기를 이용하여 1회 투여하였다. 투여액량은 10 mL/kg로 하여, 군분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

2.3.2.8.3. 관찰 및 평가

일반증상 관찰은 투여직후 (투여 0일), 투여 후 2시간 및 검체제작일 까지 24시간 간격으로 실시하며, 각 용량의 사망동물을 관찰하였다. 그리고, 체중은 투여일 (투여 0일) 및 골수채취직전에 측정하였다 (BP410S, Sartorius, Germany). 또한, 골수세포의 증식억제의 지표로서, 검체 1장당 총적혈구 250개를 관찰하여, 1개체 당 500개의 총적혈구에 대한 다염성 적혈구의 비를 구하였다.

2.3.2.9. 시험의 성립조건

음성대조군 및 양성대조군에 있어 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 범위내에 있는 조건인 경우 시험 성립으로 하였다.

2.3.2.10. 결과의 판정

결과가 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum and Bowman의 추정학적 통계 방법을 사용하여 검증하고, 통계학적으로 유의하게 증가하는 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

2.3.2.11 자료의 통계처리

소핵 다염성 적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum & Bowman의 추정학적 통계방법을 이용하여 검증하였다. 다염성 적혈구의 출현빈도 및 체중의 변화는 통계처리 프로그램 (version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)을 사용하여 통계해석을 실시하였다. Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우, Oneway analysis of variance (ANOVA)를 실시하였다 (유의수준: 0.05).

2.3.3. 시험 결과

시험의 결과는 별첨 4.4 에 작성하였다.

2.3.3.1. 용량설정시험 및 검체제작시간 설정시험

용량설정시험의 결과, 투여 후 1일에 1,000 mg/kg 이상에서 약물혼입변이 관찰되었지만, 모든 용량에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서, 5,000 mg/kg을 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 2용량 (2,500 및 1,250 mg/kg)의 시험물질군을 설정하였다. 또한 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 검체제작시간 설정시험의 결과, 모든 관찰 시간대에서 소핵유발빈도는 증가되지 않았기 때문에 일반적으로 사용하는 투여 후 24시간을 본시험의 검체제작시간으로 설정하였다.

2.3.3.2. 본시험 (별첨 4.4의 Tables 4~6)

2.3.3.2.1. 일반증상 및 사망동물의 관찰 (별첨 4.3의 Table 4)

시험물질군의 모든 용량에서 투여 후 1일에 약물혼입변 (Compound-colored stool)이 관찰되었지만, 사망동물은 관찰되지 않았다.

2.3.3.2.2. 체중변화 (별첨 4.4의 Table 5)

각 군 모든 동물에서 음성대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, ANOVA).

2.3.3.2.3. 소핵유발 출현빈도 (별첨 4.4의 Table 6)

시험물질군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 비율이 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, Kastenbaum & Bowman). 또한, 총적혈구 중 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, ANOVA). 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$, Kastenbaum & Bowman). 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, ANOVA).

2.3.3.3. 시험의 성립

음성대조군 및 양성대조군의 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 historical control data의 범위 내에 있었기 때문에 해당시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것으로 판단하였다.

2.3.4. 결론

이상의 결과로부터, 본시험 조건하에서 시험물질 발효 톱 추출물의 마우스 골수세포의 소핵유발성은 음성으로 판정하였다.

제 6 장 건강기능성 식품 인가를 위한 임상평가

제 1 절. 건강기능성 식품 인가를 위한 골관절염 임상시험 평가

본 임상시험의 결과에서 골관절염 피험자에게 발효 톳 추출물을 하루 1.8그램씩 12주간 경구 투여하고 100mm VAS, WOMAC등 골관절염 관련 증상의 평가와 객관적인 염증 및 골대사 관련 cytokine들의 분석을 통해 골관절염 증상 개선 효과에 대해 분석한 결과, 투여 후 전반적으로 골관절염 증상이 줄었고 염증지표인 ESR은 대조군에 비해 시험군에서 큰 억제효과를 보이는 등 의미 있는 결과를 보였다. 하지만, 통계적인 유의성을 확보하기 위하여 좀 더 많은 피험자를 대상으로 시험을 진행하고, 투여기간 및 투여용량에 관하여 적절히 고려한 추가적인 인체적용시험을 적용한다면 퇴행성 골관절염 증상개선에 의미 있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 한편, 안전성 측면에서 발효 톳 추출물을 하루 1.8그램씩 12주간 경구 투여하여도 이상반응, 실험실 검사 결과 등에서 특별한 이상을 보여주지 않아 안전한 식품소재로 판단하였다.

별첨 4.5 인체적용시험 결과보고서 참조

1. 서론

톳(*Hizikia fusiforme*)은 갈조식물(Phaeophyta)인 모자반과의 바닷말로서, 우리나라에서는 주문진 이남에서 서해안과 남해안 및 제주도에 걸쳐 서식하는 천연자원 식물이다. 이 식물은 항암, 항균, 항응고 활성, 지방대사, 항고지혈증, 항고콜레스테롤 및 항산화, 면역기능강화 등의 기능을 갖는 것으로 보고되어 있다. (국립수산진흥원, 수산시험연구결과 활용자료집, 1997.) 하지만 대부분의 연구들은 톳으로부터 유기용매를 활용한 추출을 기반으로 용매조건별 활성 혹은 기능 평가와 특히 식이섬유인 후코이단과 일부 폴리페놀 등의 물질을 분리하여 다양한 질환별로 효과를 검증하고 분석하는 것에 집중되어 있다.

푸코스테롤 (fucosterol)은 톳의 지표성분 중 하나로 강한 항산화 효과를 지니고 있고, 생리적으로는 혈관 수축작용을 일으켜 성기능 장애를 일으키는 것으로 알려진 ACE (angiotensin converting enzyme)의 활성을 조절해줌이 보고되었다. 선행연구로서 발효공정을 이용한 톳에서의 푸코스테롤의 생산성 향상의 결과를 확보함에 따라 이를 활용한 새로운 기능성 식품의 개발은 용이하게 수행될 것으로 기대하며 개발하게 되었다.

본 인체적용시험의 목적은 퇴행성 관절염 환자에서 “발효 톳 추출물(LTH-01)”를 하루 복용량 약 1.8 g/4 캡셀/일(발효 톳 분말로 800mg/일)을 경구 투여하였을 때의 WOMAC score, VAS scale 평가로 퇴행성 관절염지수 개선효과 등의 기능성을 평가하며 추가적으로 발효 톳 추출물의안전성에 대한 자료를 얻었다. 본 인체적용 시험의 계획서는 대한민국 식품의약품안전청(KFDA)의 임상시험관리기준(KGCP)에 따라 작성되었다.

2. 인체적용시험의 목적

본 인체적용시험의 목적은 퇴행성 관절염 환자에서 “발효 톱 추출물(LTH-01)”를 하루 복용량 약 1.8 g/4캡셀/일(발효 톱 분말로 800mg/일)을 경구 투여하였을 때의 WOMAC score, VAS scale 평가로 퇴행성 관절염지수 개선효과 등의 기능성을 평가하려는 것이었다.

3. 인체적용시험의 계획

3.1. 종합적인 시험의 고안 및 계획

본 연구는 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조, 비교 인체적용시험으로 퇴행성 관절염 환자에서 발효 톱 추출물(LTH-01)을 하루 복용량 약 1.8 g/4캡셀/일(발효 톱 분말로 800mg/일)을 경구 투여하였을 때의 WOMAC score, VAS scale 평가로 퇴행성 관절염지수 개선효과 등의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험으로 설계되었다. 본 인체적용시험은 유효성에 대한 파악이 주목적이며 이러한 목적을 달성하기 위하여 군당 29명 [시험군(발효톱추출물)과 대조군(위약, 진분)], 총 58명(중도탈락률 10% 포함)의 효과를 평가할 수 있는 피험자를 대상으로 12주간의 복용기간을 거친 후에 효과를 평가하는 인체적용시험이었다.

3.2. 시험대상 피험자(STUDY PATIENTS)

3.2.1. 선정기준

- 1) 만 45세 이상, 75세 이하의 성인 남녀
- 2) 퇴행성 관절염 환자로 아래의 기준에 적합한 피험자
 - 가) 무릎 관절통이 있거나(있고) 조조강직이 30분 이하이거나(이하이며), 염발음이 있는 환자
 - 나) 슬관절에 방사선사진상 골돌기(osteophyte)가 있거나 퇴행성 관절염 소견을 보이는 환자
 - 다) 100 mm VAS에서 관절부위의 통증이 35 mm 이상인 환자
- 3) 인체적용시험동의서에 서면 동의하고 연구과정에 필요한 방문과 관련검사 등에 협조할 수 있는 피험자

3.2.2. 제외기준

- 1) 해조류에 알레르기 등 이상반응을 경험한 피험자
- 2) 심한 신 기능장애나 간 기능장애가 있는 피험자 (serum creatinine > 2.0 mg/dl, ALT, AST alkaline phosphatase > 정상 상한치 x 2.5)
- 3) 임신 또는 수유 중이거나 임신 가능성이 있는 여성
- 4) 유사질환에 의한 관절통 환자 (류마티스 관절염, 활액낭염 등)
- 5) 사고 등의 외상 후 2차적으로 유발된 퇴행성 관절염 환자
- 6) 교통사고나 산업재해 관련 환자 및 양쪽 슬관절에 모두 인공치환술을 받은 환자 또는 연구기간 중에 퇴행성 관절염이 있는 슬부에 수술 또는 수술에 준하는 치료를 받기로 예정된 환자
- 7) 시험제품 투여 개시 2달 전 이내에 관절 구조 및 기능을 개선하기 위한 스테로이드나 약제를 투여 받은 환자(예: hyaluronic acid, chondroitin sulphate)
- 8) 치매, 정신 질환 등 연구참여를 위하여 필요한 정도의 의사 전달이 불가능하거나 3개월 이내에 호르몬 대체요법을 시행했거나 시행중인 피험자
- 9) 시험기간에 항응고제 또는 만성적인 진통제 또는 시험제품 이외의 NSAIDs 또는 다른 질환으로 부신 피질제제를 필요로 하는 환자

- 10) 소화성 궤양 또는 위장관 출혈이 있거나 의심되며 염증성 장질환 (크론병 또는 궤양성 장염)을 가진 환자
- 11) 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 협우각 녹내장(narrow angle glaucoma), 조절되지 않는 고혈압(> SBP 145mmHg, > BBP 90mmhg) 및 폐질환이 있는 피험자
- 12) 6개월 내 외과적 수술을 받았던 피험자
- 13) 침, 뜸, 한약, 물리치료 등 무릎을 위한 치료를 받고 있는 자
- 14) 건강기능식품 (콘드로이친, 글루코사민, 홍화 추출물, 오가피 추출물 등)을 복용하는 자
- 15) 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 피험자

3.2.3. 중지, 탈락기준

다음의 항목에 해당되는 경우는 그 대상피험자의 시험을 중지하고, 시험담당자는 시험 중지 일, 이유, 처치 및 임상증상에 대한 소견을 증례기록서에 기록하였다.

3.2.3.1. 시험자에 의해 중지, 탈락되는 경우

- 1) 갑작스런 사고로 인하여 시험을 계속할 수 없는 경우
- 2) 대상피험자의 안전성에 문제를 일으킬 수 있다고 담당의사가 판단한 경우
- 3) 과도한 예측 이상반응 증상, 사망을 포함한 중대한 이상반응의 경우
- 4) 인체적용시험에 사용되는 식품에 대한 복용순응도가 2회 연속 80% 미만일 경우
- 5) 방문 계획 등에 대한 순응도: 계획된 방문일에 방문하지 않아 안전성 및 유효성 평가를 하지 못하는 경우
- 6) 병용 금지된 약물의 투약 등 시험계획서 위반의 경우
- 7) 퇴행성관절염 증상에 영향을 미칠 수 있는 약물이나 건강기능식품을 3일 이상 복용한 경우
- 8) 피험자의 증상 악화로 더 이상 인체적용시험을 진행할 수 없다고 판단될 경우
- 9) 추적조사(follow-up)에 실패한 피험자
- 10) 피험자 선정기준 위반인 경우
- 11) 기타 시험을 계속하는데 지장을 주는 경우

3.2.3.2. 피험자가 조기 종료를 요구하는 경우:

- 1) 대상피험자나 그 가족이 시험 중지를 요청한 경우
- 2) 이상반응 발현으로 인한 중도탈락
- 3) 투여거부, 비협조, 동의 철회 등의 기타 이유로 인한 중도탈락

3.2.3.3. 의뢰자의 행정상의 사유

의뢰자인 농림수산식품부 및 경희대학교 산학협력단은 행정상 사유로 인해 인체적용시험을 조기 종료할 수 있었다.

3.3.1. 인체적용시험에 사용되는 식품

3.3.1.1. 시험제품

시험제품 : 발효 톱 추출물 : 이 식품 1 정(460.6 mg) 중

표 36. 시험제품내 성분 함량

	1캡슐중(mg)	함유율(%)
톱추출물	200.0	55.01
말토덱스트린	100.0	27.50
미결정셀룰로오스(#102)	40.0	11.00
카라멜색소	16.0	4.40
스테아르산마그네슘	4.0	1.10
허브향	3.6	0.99
내용물합계	363.6	100.00
상하캡슐(0호)	97.0	
합계	460.6	

3.3.1.2. 대조제품

대조제품 : 대조식품 : 이 식품 1 정(464.6 mg) 중

표 37. 대조제품 내 성분 함량

	1캡슐중(mg)	함유율(%)
말토덱스트린	300.0	82.51
미결정셀룰로오스(#102)	40.0	11.00
카라멜색소	16.0	4.40
스테아르산마그네슘	4.0	1.10
허브향	3.6	0.99
내용물합계	363.6	100.00
상하캡슐(0호)	97.0	
합계	460.6	

3.3.2. 무작위배정

선정된 피험자는 시험식품 또는 대조식품군에 1:1 의 비율로 무작위 배정하였다. 무작위 배정 코드는 통계학자에 의해 제공되었다.

- ① 연구대상으로 선정한 환자를 확률에 의거한 무작위배정 방법으로 각 군에 배정하였다.
- ② 무작위 배정표 SPSS 프로그램의 난수(random number)를 발생시키는 함수를 이용하여 작성하였다.
- ③ 두군 중의 한 군에 방문일(Day 0) 순서대로 낮은 번호부터 할당된다. 즉, 인체적용시험에 참여하는 순서대로 무작위 배정표에 따라 배정번호(Allocation Number: AN)를 부여하여 시험군 혹은 대조군에 배정되도록 하였다.
- ④ 무작위배정계획에 의해 피험자에게 사용할 약품은 관리약사가 대상환자에게 부여한 코드대로 인체적용시험제품을 제공하여 처방하였다.

3.3.3. 맹검

시험진행 중에는 연구자와 피험자 모두 각 피험자가 어느 군에 배정되어 있는지 알지 못하며, 의학적 긴급상황이 발생하기 전까지는 맹검을 해제하지 않았으며, 배정된 군의 비밀을 유지하였다. 이상반응 등으로 맹검을 해제한 경우는 발생하지 않았다.

3.3.4. 순응도

시험제품의 복용순응도는 각 방문 시마다 남은 약물의 용량 또는 개수를 세는 것으로 측정하는데, 만일 복용순응도가 2회 연속 80% 미만인 경우에 피험자는 순응도가 나쁜 (non-compliant) 경우로 간주하여 인체적용시험에서 탈락시켰다

3.4. 시험절차

3.4.1. 인체적용시험 흐름도

- 1) 기초조사: 생년월일, 성별, 신장(신을 벗고 cm 단위로 측정한다), 체중 등을 조사한다.
- 2) 활력징후: 혈압, 맥박수, 체온 - 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 측정한다.
- 3) 실험실적 검사: 피험자는 채혈하기 전 최소 8시간 이상 금식한 상태로 내원해야 한다.
혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets ESR
혈액생화학적 검사: BUN, Creatinine, Uric acid, ALT, AST, r-GT, Alkaline phosphatase, glucose Triglyceride, Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol. C-reactive Protein
소변검사: Occult blood, pH
- 4) 임신 검사: 불임수술을 받지 않고, 효과적인 피임법을 실시하지 않은 가임기 여성에 한하여 소변검사로 실시한다.
- 5) Cytokines 측정: TGF-beta, TNF-alpha, IL-3, osteocalcin
- 6) 선정/제외기준 판정: 각각의 스크리닝 검사가 끝난 후 실시한다. 단, 수술이나 약물복용 등 질병이 없는 건강한 정상인의 경우 14일 이내의 실험실적 검사자료를 사용할 수 있다.
- 7) 이상반응으로 인한 탈락된 경우 또는 재검 등 필요 시 실시한다.

3.4.2. 시험기간 전, 중, 후의 평가

3.4.2.1. 시험전(스크리닝)평가

- 1) 피험자 동의서 취득
- 2) 기초조사: 성별, 생년월일(주민등록상), 신장(신을 벗고 cm단위로 측정), 몸무게
- 3) 활력징후(Vital sign): 혈압(mmHg), 맥박수(회/분) 및 체온 모두 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 측정.
- 4) 선행/병용 약물 조사: 4주 내에 피험자가 복용한 약물 및 기능식품 등을 기록.
- 5) 병력 및 동반질환 조사: 일차성 진단, 질병의 지속기간, 약물복용기록, 현재상태와 가족력을 기록한다. 또한 과거 수술 기록 및 최근 3개월간 모든 약물복용과 치료를 모두 기록.
- 6) 생활습관 조사(흡연/음주/식이/운동습관)
- 7) 실험실적 검사 (표 38.) 및 임신여부 검사(가임여성):
혈액을 채취하여 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사를 실시. 단, 스크리닝 시 실시한 검사결과 특별한 이상이 없는 경우 스크리닝 검사 결과를 방문 2에 사용함.
불임수술을 받지 않고, 효과적인 피임법을 실시하지 않은 가임기 여성에 한하여 소변으로 임신검사를 실시하여 양성과 음성 판독을 함.
- 8) VAS, WOMAC 검사: 퇴행성 관절염의 주증상인 통증에 대한 척도를 평가하기 위해 피험자에게 설문.
- 9) 선정/제외 기준 판정: 각각의 스크리닝 검사가 끝난 후 실시.

3.4.2.2. 시험중의 평가

- 1) 투여직전 (0주, Baseline)
 - i) 활력징후

ii) VAS, WOMAC 검사:

iii) 병용 약물 조사

iv) 실험실적 검사 및 임신여부 검사(가임여성)

단, 수술이나 약물복용 등 질병이 없는 건강한 정상인의 경우 14일 이내의 실험실적 검사자료를 사용.

v) Cytokines 측정

vi) 무작위 배정/ 시험식품 또는 대조식품 처방 및 교부

2) 시험 진행 중의 측정(6주)

i) 활력징후

ii) 병용 약물 조사

iii) 이상반응

iv) 실험실적 검사 및 임신여부 검사(가임여성)

v) VAS, WOMAC 검사

vi) 복약 순응도 평가: (실제 복용 식품 수/복용해야 하는 식품 수) × 100

vii) 시험식품 또는 대조식품 처방 및 교부

3.4.2.3. 시험후의 평가

시험 종료 시 측정 (12주±3일)

12주 투약을 종료하거나 중간에 탈락 한 후에 다음의 항목을 측정.

i) 활력징후

ii) 생활습관 조사

iii) 이상반응

iv) 실험실적 검사 및 임신여부 검사(가임여성)

v) Cytokines 측정

vi) 병용약물 조사

vii) VAS, WOMAC 검사

viii) 복약 순응도 평가

3.5. 유효성 및 안전성 평가변수 및 분석방법

3.5.1. 유효성 평가변수 및 분석방법

3.5.1.1. 유효성 평가대상

선정기준에 적합한 피험자

시험제품인 발효 톱 추출물(LTH-01)을 최소 1회 이상 복용하고 최소 1회 이상 방문, 유효성 평가를 받은 사람을 Intention-to-treat 분석에 포함하였다.

3.5.1.2. 유효성 평가

0주와 6주, 12주째 100mm VAS 검사와 WOMAC 검사를 실시하였고, 채혈하여 염증지표(CRP, cytokines)를 측정하였다.

1) 1차 유효성 평가로서 baseline과 12주 후 시험군과 대조군의 100mm VAS 수치의 개선율을

비교 평가하였다.

2) 2차 유효성 평가로서 baseline과 12주 후 시험군과 대조군의 WOMAC 검사 개선율과 개선치, 100mm VAS 수치의 개선치를 비교 평가하며, 염증지표인 CRP, cytokines의 개선 수치를 비교 평가하였다.

3.5.1.3. 통계분석 방법

전체 대상들의 질병력, 약물 복용력 등에 관해서는 Fisher's exact test 또는 Chi-square 검정법을 시행하여 그 차이를 파악하였다. 발효 뜻 추출물 복용군과 대조군간의 VAS의 감소율을 비교하기 위하여 이 표본 t-검정 (twosample t-test)을 실시한다. 또한, 복용전과 복용 후의 측정치의 변화를 검정하기 위하여 각 군별로 쌍체 t-검정(paired t-test)을 시행하였다. 또한, 복용 전의 평가항목이 양 군 간에 유의한 차이를 보이는 경우는 이에 대한 두 군의 차이를 보정해 주기 위하여 ANOVA 검정을 시행하였다. 2 차유효성 평가항목에 관해서도 동일한 통계분석을 실시하였다.

3.5.2. 안전성 평가변수 및 분석방법

3.5.2.1. 평가기준

안전성에 대한 분석은 실험실 검사항목을 근거로 이상반응이 있는 피험자의 수를 군별로 파악하여 Fisher's exact test 또는 Chi-square 검정법을 시행하였다.

3.5.2.2. 안전성 평가

이상반응, 실험실검사, 활력징후 등

3.5.2.3. 평가 방법

시험기간 동안 보고된 모든 이상반응은 CRF에 기록하고 도표화한 후 이상반응 비율을 구한다. 12주간의 시험군과 대조군의 이상반응 증상 및 발생율을 구하여 두 군이 유의한 차이가 있는지 분석하였다.

4. 인체적용시험의 결과

4.1. 피험자 정보

4.1.1. 피험자의 인체적용시험 참여 상태

본 인체적용시험에 참가하기로 동의한 피험자 79명 중 스크리닝 검사 결과, 선정/제외기준 위반 13명이 스크리닝 탈락되어 총 66명이 무작위 배정을 받았다. 무작위 배정을 받은 피험자 66명 중 2명이 한 번의 유효성 검사도 시행하지 않아 ITT군에서 제외되었고 64명의 ITT 피험자 중 1명이 동의철회로 제외되어 최종 63명이 프로토콜에 따라 인체적용시험을 완벽하게 종료하였다

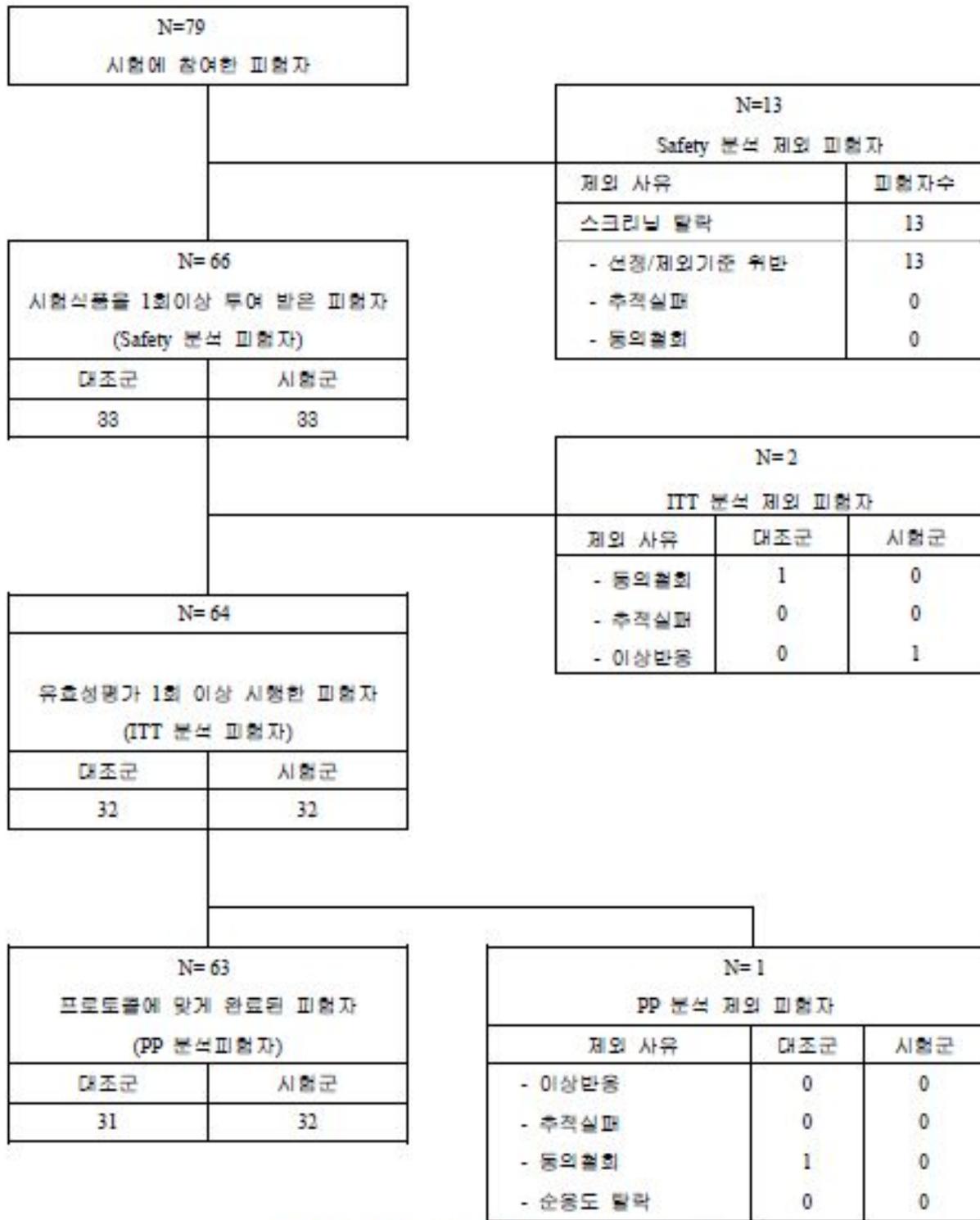


그림 59. 피험자의 인체적용시험 참여 상태

4.2. 분석에 포함할 피험자군의 선정

본 인체적용시험에 등록되어 시험식품 또는 대조식품을 투여 받은 66명의 피험자가 Safety 분석에 포함되었고 이 중 1회 이상 1차 유효성 평가가 실시된 64명을 ITT 분석 대상 자료로 사용하였다. 총 64명의 ITT 분석 피험자 가운데 인체적용시험계획서에 맞게 시험을 완료한 63명을 PP 분석 대상 자료로 사용하였다. 인구학적 특성을 포함하는 배경인자 분석은 Safety 군에 대해 실시하였으며, 안전성 분석은 ITT군에 대하여, 그리고 유효성 평가는 ITT군을 주 분석으로 하되, PP군에 대해 유효성에 관한 추가 분석을 실시하였다.

4.3. 피험자의 인구학적 정보 및 기타 투여전 특성에 대한 비교

4.3.1. 피험자 인구학적 기초자료

투여 제품 효과에 영향을 줄 가능성이 있는 다양한 인구학적 기초정보에 대하여 양군간에 차이를 비교한 결과 통계적인 유의성을 보인 변수는 하나도 없어서 투여 전의 양군의 상태는 차이가 없었음을 알 수 있었다.

4.3.2. 피험자 과거병력 및 약물복용력

피험자들 중 과거 질병력이 있었던 사람은 대조군의 경우 15명으로 전체의 45.5%를 차지했으며 시험군의 경우는 13명으로 39.4%를 차지하였다. 이러한 빈도가 양군 간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다($p=0.803$). 과거질환의 치유여부도 양군 간에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(표 42). 또한, 과거 약물복용력에 대한 조사에서도 대조군이 15명으로 45.5%, 시험군이 12명으로 36.4%를 나타내 양군간에 유의한 차이는 없는 것으로 조사되었다($p=0.617$)

5. 유효성 분석

5.1. 유효성 분석 (ITT 분석)

처음에 무작위 배정을 받은 피험자 중 유효성 검사를 한번이라도 시행한 사람을 대상으로 (ITTset) 시행한 유효성 분석 결과는 아래와 같다.

5.1.1. 1차 유효성 평가변수 <100 mm VAS 수치의 변화>

피험자들의 100 mm VAS 값에 대한 기저치(baseline)는 대조군이 59.39, 시험군이 57.73으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p=0.576$). 복용 6주 후의 100 mm VAS 값은 대조군이 49.00, 시험군은 45.63으로 나타나 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며 ($p=0.445$), 복용 12주 후에도 대조군은 43.83, 시험군은 40.47을 나타내 양군간에 차이가 관찰되지 않았다. 복용 12주 간의 100 mm VAS 값의 변화도 대조군은 평균 15.56의 감소를 보인 반면, 시험군은 17.27의 감소를 나타내 시험군의 경우가 대조군에 비해 다소 큰 감소를 보였으나 통계적인 유의성은 확보하지 못하였다($p=0.692$). Paired t-test를 이용하여 12주 간의 변화를 군별로 분석한 결과에서는 대조군과 시험군 모두 12주간의 복용기간 동안 100 mm VAS 값이 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났다($p=0.000$). 교차분석을 이용하여 12주 후의 100 mm VAS 값이 기저치에 비해 감소한 사람과 감소하지 않은 사람의 비율을 각 군별로 비교하였다. 그 결과 감소자의 비율이 대조군에서는 87.5%, 시험군에서는 78.1%를 각각

나타냈으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다.

<표 6> 100 mm VAS 변화에 대한 평균치 검정

	대조군 (32명)	시험군 (32명)	p-값 ^a
	평균±표준편차		
Baseline	59.39±12.24	57.73±11.31	0.576
After (6 Week)	49.00±17.16	45.63±17.93	0.445
After (12 Week)	43.83±18.88	40.47±18.82	0.479
Difference ^b	-15.56±16.62	-17.27±17.60	0.692
p-값 ^c	0.000	0.000	

a: 양 군에서의 Student's t-test 실시 결과

b: After (12 Week) - baseline

c: 각 투여군 별 baseline 대비 after (12 Week) 검사치의 paired t-test 실시 결과

그림 60. 100mm VAS 변화 평균치 검정

5.1.2. 2차 유효성 평가변수 <WOMAC 수치의 변화>

피험자들의 WOMAC 값에 대한 기저치(baseline)는 대조군이 46.50, 시험군이 47.19로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.826). 복용 6주 후의 WOMAC 값도 대조군이 41.25, 시험군이 39.56을 보여 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며 (p=0.648), 복용 12주 후에도 대조군은 37.72, 시험군은 34.31을 나타내 양군간에 차이가 관찰되지 않았다(p=0.419). 복용 12주 간의 WOMAC 값의 변화는 대조군이 평균 8.78의 감소를 보인 반면, 시험군은 12.88의 감소를 나타내 시험군의 경우가 대조군에 비해 다소 큰 감소를 보였으나 통계적인 유의성은 확보하지 못하였다(p=0.297). Paired t-test를 이용하여 12주간의 변화를 군별로 분석한 결과에서는 대조군과 시험군 모두 12주간의 복용기간 동안 WOMAC 값이 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났다(p=0.003 vs. p=0.000). 교차분석을 이용하여 12주 후의 WOMAC 값이 기저치에 비해 감소한 사람과 감소하지 않은 사람의 비율을 각 군별로 비교하였다. 그 결과 감소자의 비율이 대조군에서는 71.9%, 시험군에서는 81.3%를 각각 나타내 시험군에서의 감소자 비율이 다소 높았으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다(p=0.555)

<표 8> WOMAC 수치 변화에 대한 평균치 검정

	대조군 (32명)	시험군 (32명)	p-값 ^a
	평균±표준편차		
Baseline	46.50±13.95	47.19±10.72	0.826
After (6 Week)	41.25±15.34	39.56±14.10	0.648
After (12 Week)	37.72±18.42	34.31±14.86	0.419
Difference ^b	-8.78±15.66	-12.88±15.51	0.297
p-값 ^c	0.003	0.000	

a: 양 군에서의 Student's t-test 실시 결과

b: After (12 Week) - baseline

c: 각 투여군 별 baseline 대비 after (12 Week) 검사치의 paired t-test 실시 결과

그림 61. WOMAC 수치 변화에 대한 평균치 검정

5.1.3. 2차 유효성 평가변수 <IL-3 발현의 변화>

피험자들의 IL-3 발현량에 대한 기저치(baseline)는 대조군이 1.32, 시험군이 3.43으로 시험군의 경우가 상대적으로 높았으나 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p=0.449). 복용 12주 후에는 대조군이 3.10, 시험군은 1.89의 평균을 나타냈으나 역시 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다(p=0.311). 복용 12주 간의 IL-3 발현량의 변화에서 대조군의 경우, 평균 1.78의 증가를 보인 반면, 시험군은 1.54의 감소를 나타내 두 군 사이에 변화량의 차이가 관찰되었으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다(p=0.291). Paired t-test를 이용하여 12주간의 변화를 군별로 분석한 결과, 대조군과 시험군 모두에서 12주 동안의 변화량이 통계적으로 유의하지는 않은 것으로 나타났다(p=0.166 vs. p=0.594). 교차분석을 이용하여 12주 후의 IL-3 발현량이 기저치에 비해 증가한 사람과 증가하지 않은 사람의 비율을 각 군별로 비교하였다. 그 결과 증가자의 비율이 대조군에서는 28.1%, 시험군에서는 18.8%를 각각 나타내 대조군에서의 증가자 비율이 다소 높았으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다(p=0.555)

<표 10> IL-3 변화에 대한 평균치 검정

	대조군 (32명)	시험군 (32명)	p-값 ^a
	평균±표준편차(pg/ml)		
Baseline	1.32±3.65	3.43±15.18	0.449
After (12 Week)	3.10±5.37	1.89±4.05	0.311
Difference ^b	1.78±7.12	-1.54±16.13	0.291
p-값 ^c	0.166	0.594	

a: 양 군에서의 Student's t-test 실시 결과

b: After (12 Week) - baseline

c: 각 투여군 별 baseline 대비 after (12 Week) 검사치의 paired t-test 실시 결과

그림 62. IL-3 변화에 대한 평균치 검정

5.1.4. 2차 유효성 평가변수 <TGF-beta 발현의 변화>

피험자들의 TGF-beta 발현량에 대한 기저치(baseline)는 대조군이 19045, 시험군이 20119로 시험군의 경우가 다소 높았으나 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p=0.398). 복용 12주 후에는 대조군이 18931, 시험군은 19986의 평균을 나타내 역시 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다(p=0.378). 복용 12주 간의 TGF-beta 발현량의 변화에서 대조군의 경우, 평균 114의 감소를 보인 반면, 시험군은 133의 감소를 나타내 양군 사이에 변화량의 차이가 관찰되지 않았다(p=0.985). Paired t-test를 이용하여 12주간의 변화를 군별로 분석한 결과에서도 대조군과 시험군 모두 12주 동안의 변화량이 통계적으로 유의하지는 않은 것으로 나타났다(p=0.871 vs. p=0.869). 교차분석을 이용하여 12주 후의 TGF-beta 발현량이 기저치에 비해 증가한 사람과 증가하지 않은 사람의 비율을 각 군별로 비교하였다. 그 결과 증가자의 비율이 대조군에서는 46.9%, 시험군에서는 53.1%를 각각 나타내 양군에서의 증가자 비율에 거의 차이가 없는 것으로 관찰되었다(p=0.803)

<표 12> TGF-beta 변화에 대한 평균치 검정

	대조군	시험군	p-값 ^a
	(32명)	(32명)	
평균±표준편차(pg/ml)			
Baseline	19045±4249	20119±5736	0.398
After (12 Week)	18931±4841	19986±4653	0.378
Difference ^b	-114±3903	-133±4496	0.985
p-값 ^c	0.871	0.869	

a: 양 군에서의 Student's t-test 실시 결과

b: After (12 Week) - baseline

c: 각 투여군 별 baseline 대비 after (12 Week) 검사치의 paired t-test 실시 결과

그림 63. TGF-β 변화에 대한 평균치 검정

5.1.5. 2차 유효성 평가변수 <Osteocalcin 수치 변화>

피험자들의 osteocalcin 발현량에 대한 기저치(baseline)는 대조군이 0.43, 시험군이 0.56으로 시험군의 경우가 다소 높았으나 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p=0.617). 복용 12주 후에는 대조군이 0.45, 시험군은 0.34의 평균을 각각 나타내 역시 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다(p=0.639). 복용 12주 간의 osteocalcin 발현량의 변화에서 대조군의 경우, 평균 0.02의 증가를 보인 반면, 시험군은 0.22의 감소를 나타냈으나 양 군 모두에서 통계적으로 유의한 변화량의 차이가 관찰되지 않았다(p=0.336). Paired t-test를 이용하여 12주간의 변화를 군별로 분석한 결과에서도 양 군 모두에서 12주 동안의 변화량이 통계적인 유의성을 나타내지 않았다(p=0.913 vs. p=0.145). 교차분석을 이용하여 12주 후의 osteocalcin 발현량이 기저치에 비해 증가한 사람과 증가하지 않은 사람의 비율을 각 군별로 비교하였다. 그 결과 증가자의 비율이 대조군에서는 12.5%, 시험군에서는 6.3%를 각각 나타내 양군에서의 증가자 비율은 통계적으로

차이가 없는 것으로 관찰되었다(p=0.672).

<표 14> Osteocalcin 변화에 대한 평균치 검정

	대조군	시험군	p-값 ^a
	(32명)	(32명)	
평균±표준편차(ng/ml)			
Baseline	0.43±1.04	0.56±1.08	0.617
After (12 Week)	0.45±1.11	0.34±0.79	0.639
Difference ^b	0.02±1.17	-0.22±0.85	0.336
p-값 ^c	0.913	0.145	

a: 양 군에서의 Student's t-test 실시 결과

b: After (12 Week) - baseline

c: 각 투여군 별 baseline 대비 after (12 Week) 검사치의 paired t-test 실시 결과

그림 64. Osteocalcin 변화에 대한 평균치 검정

5.2.6. 2차 유효성 평가변수 <ESR 수치의 변화>

염증관련 지표중 하나인 ESR(Erythrocyte Sedimentation Rate)의 경우 기저치(baseline)는 대조군이 18.53, 시험군이 18.56으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고(p=0.991) 복용 12주 후에 대조군은 19.78, 시험군은 17.03을 나타내 양군간에 차이가 관찰되지 않았다(p=0.270). 그러나 복용 12주 간의 ESR 값의 변화는 대조군이 평균 1.25의 증가를 보인 반면, 시험군은 1.53의 감소를 나타내 시험군의 경우가 대조군에 비해 상대적으로 큰 감소를 보였으나 통계적인 유의성은 확보하지 못하였다(p=0.156). Paired t-test를 이용하여 12주간의 변화를 군별로 분석한 결과, 대조군과 시험군 모두 12주간의 복용기간 동안 ESR 값이 통계적으로 유의한 변화는 보여주지 못하였다(p=0.335 vs. p=0.301). 염증관련 지표인 ESR이 감소하는 것은 100mm VAS, WOMAC과 다른 양상을 보여주어 고무적인 결과라 할만 하나 통계적인 유의성은 보여주지 못하였다.

<표 16> ESR 변화에 대한 평균치 검정

	대조군	시험군	p-값 ^a
	(32명)	(32명)	
	평균±표준편차(mm/hr)		
Baseline	18.53±10.78	18.56±11.13	0.991
After (6 Week)	15.47±10.41	16.13±9.43	0.792
After (12 Week)	19.78±10.22	17.03±9.55	0.270
Difference ^b	1.25±7.22	-1.53±8.24	0.156
p-값 ^c	0.335	0.301	

a: 양 군에서의 Student's t-test 실시 결과

b: After (12 Week) - baseline

c: 각 투여군 별 baseline 대비 after (12 Week) 검사치의 paired t-test 실시 결과

그림 65. ESR 변화에 대한 평균치 검정

6. 안전성분석결과

안전성 분석에서 이상반응은 safety set을 대상으로 평가하였고, 실험실 검사 및 그 외의 항목에 대하여는 ITT 분석군을 이용하였다.

6.1 이상반응 발현상황

총 12주간의 약물 복용 기간 동안 이상반응을 보인 경우는 대조군에서 4명, 시험군에서 3명으로 나타났으며 이는 각각의 집단군에서 12.1%와 9.1%를 차지하는 것으로 양군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p=1.000). 한편, 중대한 이상반응을 보인 피험자는 양군 모두에서 한 명도 관찰 되지 않았다. 피험자별 이상반응 증상으로는 변비, 복부 불편감, 설사, 가려움증, 두드러기, 안구충혈 등이었으며 시험군과 대조군에서 모두 나타났으나 가려움증을 제외하고 시험제품과의 인과 관계가 명확한 증상은 보이지 않았다.

6.2 기초생체지표의 변화

기초생체지표의 변화는 약품을 복용하기 전에 대한 복용 12주 후의 변화량을 paired t-test의 방법으로 평가하였으며 Student's t-test를 이용하여 각 시점에서의 군간 비교를 시행한 후 통계적인 차이가 있는 경우는 별도로 표시하였다(본 결과에서는 해당 사항 없음). 그 결과, 이완기 혈압이 양군 모두에서 12주간의 복용 기간 동안 통계적으로 유의한 변화가 있는 것으로 나타났으며 (p=0.010 vs. p=0.000), 그 밖에 체온과 수축기 혈압, 맥박의 경우는 양군 모두에서 통계적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 따라서, 시험제품 복용에 따른 피험자들의 기초생체지표의 변화는 없음을 알 수 있었다(표 66).

6.3 실험실 검사 결과

실험실 검사 결과는 ITT 분석군을 대상으로 분석하였다. 검사항목의 투여 전(Week 0)과 투

여 후(Week 12)의 변화를 보기 위하여 paired t-test를 실시하고 Student's t-test에서 군 간 차이를 보인 경우는 별도로 표기하였다. 그 결과, 백혈구(WBC), 혈색소(Hematocrit), 혈소판(platelets), AST, ALT, r-GTP, BUN, Creatinine, 요산(Uric acid), 공복혈당(glucose), 총콜레스테롤(Total cholesterol), 저밀도지질(LDL), 중성지방(Triglyceride)의 경우 양군 모두에서 통계적으로 유의한 변화가 나타나지 않았다. 적혈구(RBC)의 경우는 양군 모두에서 12주간의 복용 후 유의한 감소를 나타내었으며($p=0.004$ vs. 0.034) 헤모글로빈(Hemoglobin)은 대조군에서만, 그리고 고밀도지질(HDL)은 시험군에서만 유의한 감소가 관찰되었다. 한편, Student's t-test를 이용한 군간 비교에서 통계적인 차이를 보인 경우는 나타나지 않았다.

7. 피험자 순응도

피험자의 복용 순응도는 시험군 및 대조군의 %로 나타내었다. 대조군은 대조식품을 복용한 순응도를, 시험군은 발효 톳 분말을 복용한 순응도를 %로 나타내었다. 2회 연속 순응도 미달로 탈락한 피험자는 없었다.

8. 고찰 및 결론

골관절염은 일반적으로 퇴행성관절염으로 잘 알려져 있다. 이는 관절을 보호하고 있는 연골이 손상 또는 퇴화하고 뼈가 돌기처럼 성장하여 주변조직에 염증과 통증이 생기는 질환을 말한다. 골관절염은 관절부위의 외상, 관절의 과다 사용, 어긋난 모양으로 잘못된 연결된 관절, 또는 과체중으로 관절과 연골에 과도한 부담이 있을 때 잘 생기며 관절의 염증성 질환 중에서 가장 많이 나타나는 질환으로 55세 이상인 경우에는 약 80%, 75세인 경우에는 거의 전인구가 이 질환을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

이러한 퇴행성 관절염 환자에서 “발효 톳 추출물(LTH-01)”를 하루 복용량 약 1.8g/4캡셀/일(발효 톳 분말로 800mg/일)을 경구 투여하였을 때 WOMAC score, VAS scale 을 평가하여 발효 톳 추출물이 퇴행성 관절염지수 개선효과가 있는지 탐색하고 이상반응 등 안전성에 대한 자료를 얻고자 실시한 시험이었다. 피험자 79명을 스크리닝 하였고 시험에 적합한 66명을 등록하였고 한 번의 유효성 검사도 시행하지 않은 2명과 동의철회 한 1명이 ITT군에서 제외되어 최종 63명이 계획서에 따라 인체적용시험을 종료하였다.

골관절염의 주증상인 통증에 대한 척도로 visual analogue scale(VAS)를 사용하였고, 100mm VAS를 이용한 환자의 골관절염 통증에 대한 평가를 일차 유효성 평가 변수로 하였다. 환자들은 매 방문 때마다 슬부의 골관절염으로 인해 어느 정도의 통증이 있는지를 index joint를 기준으로 0mm(통증 없음)에서 100mm(참을수 없는 최대의 통증)사이의 VAS를 표시하였다. 또한 기능 장애의 정도는 문헌을 통해 이미 그 타당성을 인정받은 WOMAC score Korean validation version을 사용하였다.

유효성 검사를 한번이라도 시행한 63명을 대상으로 ITT 분석한 결과, 100 mm VAS 값에 대한 기저치(baseline)는 대조군이 59.39, 시험군이 57.73으로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으며($p=0.576$) 복용 6주 후의 100 mm VAS 값은 대조군이 49.00, 시험군은 45.63으로 나타나 두 군 모두 통계적으로 유의하게 감소하는 양상을 보였으나 양군 간에 통계적 차이가 관찰되지 않았다. 복용 12주간의 100 mm VAS 값의 변화도 대조군은 평균 15.56의 감소를 보인 반면, 시험군은 17.27의 감소를 나타내 시험군의 경우가 대조군에 비해 다소 큰 감소를 보였으나 통계적인 유의성은 확보하지 못하였다($p=0.692$). Paired t-test를 이용하여 12주간의 변

화를 군별로 분석한 결과에서는 대조군과 시험군 모두 12주간의 복용기간 동안 100 mm VAS 값이 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났다($p=0.000$)(표 6). PP분석 결과도 같은 양상을 보여 주었다. WOMAC수치의 ITT 분석 결과, 기저치(baseline)는 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고 복용 6주 후의 값과 12주 후에도 두 군 간에 차이가 관찰되지 않았다. 복용 12주 간의 WOMAC 값의 변화는 대조군이 평균 8.78의 감소를 보인 반면, 시험군은 12.88의 감소를 나타내 시험군의 경우가 대조군에 비해 다소 큰 감소를 보였으나 통계적인 유의성은 확보하지 못하였다($p=0.297$). Paired t-test를 이용하여 12주간의 변화를 군별로 분석한 결과에서는 대조군과 시험군 모두 12주간의 복용기간 동안 WOMAC 값이 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났다($p=0.003$ vs. $p=0.000$)(표 8). PP분석 결과도 같은 양상을 보여 주었다.

골형성에 중요한 역할을 하는 TGF-beta 발현량에 대한 기저치(baseline)는 대조군이 19045, 시험군이 20119로 시험군의 경우가 다소 높았으나 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었고($p=0.398$) 복용 12주 후에는 대조군이 18931, 시험군은 19986의 평균을 나타내 역시 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다($p=0.378$). 복용 12주 간의 TGF-beta 발현량의 변화에서 대조군의 경우, 평균 114의 감소를 보인 반면, 시험군은 133의 감소를 나타내 양군 사이에 변화량의 차이가 관찰 되지 않았다($p=0.985$). Paired t-test를 이용하여 12주간의 변화를 군별로 분석한 결과에서도 대조군과 시험군 모두 12주 동안의 변화량이 통계적으로 유의하지는 않은 것으로 나타났다($p=0.871$ vs. $p=0.869$).

골형성을 촉진하는 Osteocalcin 발현량에 대한 기저치(baseline)는 대조군이 0.43, 시험군이 0.56으로 시험군의 경우가 다소 높았으나 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었으며($p=0.617$) 복용 12주 후에는 대조군이 0.45, 시험군은 0.34의 평균을 각각 나타내 역시 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다($p=0.639$). 복용 12주 간의 osteocalcin 발현량의 변화에서 대조군의 경우, 평균 0.02의 증가를 보인 반면, 시험군은 0.22의 감소를 나타냈으나 양 군 모두에서 통계적으로 유의한 변화량의 차이가 관찰되지 않았다($p=0.336$). Paired t-test를 이용하여 12주간의 변화를 군별로 분석한 결과에서도 양 군 모두에서 12주 동안의 변화량이 통계적인 유의성을 나타내지 않았다($p=0.913$ vs. $p=0.145$).

염증관련 지표중 하나인 ESR(Erythrocyte Sedimentation Rate)의 경우 기저치(baseline)는 대조군이 18.53, 시험군이 18.56으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고($p=0.991$) 복용 12주 후에 대조군은 19.78, 시험군은 17.03을 나타내 양군간에 차이가 관찰되지 않았다($p=0.270$). 그러나 복용 12주 간의 ESR 값의 변화는 대조군이 평균 1.25의 증가를 보인 반면, 시험군은 1.53의 감소를 나타내 시험군의 경우가 대조군에 비해 상대적으로 큰 감소를 보였으나 통계적인 유의성은 확보하지 못하였다($p=0.156$). Paired t-test를 이용하여 12주간의 변화를 군별로 분석한 결과, 대조군과 시험군 모두 12주간의 복용기간 동안 ESR 값이 통계적으로 유의한 변화는 보여주지 못 하였다($p=0.335$ vs. $p=0.301$). 염증관련 지표인 ESR이 감소하는 것은 100mm VAS, WOMAC과 다른 양상을 보여주어 고무적인 결과라 할만 하나 통계적인 유의성은 보여주지 못하였다.

Safety set을 대상으로 이상반응을 평가하였고 실험실 검사 및 그 외의 항목에 대하여는 ITT 분석군을 이용한 안전성 분석에서, 총 12주간의 약물 복용 기간 동안 이상반응을 보인 경우는 대조군에서 4명, 시험군에서 3명으로 나타났으며 이는 각각의 집단군에서 12.1%와 9.1%를 차지하는 것으로 양군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p=1.000$). 한편, 중대한 이상반

응을 보인 피험자는 양군 모두에서 한 명도 관찰되지 않았다. 피험자별 이상반응 증상으로는 변비, 복부 불편감, 설사, 가려움증, 두드러기, 안구충혈 등이었으며 시험군과 대조군에서 모두 나타났으나 가려움증을 제외하고 시험제품과의 인과 관계가 명확한 증상은 보이지 않았다. 또한 기초생체지표의 변화를 복용 전과 12주 복용후의 변화량을 paired t-test의 방법으로 평가하고 Student's t-test를 이용하여 각 시점에서의 군간 비교를 시행한 결과, 이완기 혈압이 양군 모두에서 12주간의 복용 기간 동안 통계적으로 유의한 변화가 있는 것으로 나타났으며 ($p=0.010$ vs. $p=0.000$), 그 밖에 체온과 수축기 혈압, 맥박의 경우는 양군 모두에서 통계적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 따라서, 시험제품 복용에 따른 피험자들의 임상적으로 의미 있는 기초생체지표의 변화는 없음을 알수 있었다. ITT 분석군을 대상으로 한 실험실 검사 결과에서는 백혈구(WBC), 혈색소(Hematocrit), 혈소판(platelets), AST, ALT, r-GTP, BUN, Creatinine, 요산(Uric acid), 공복혈당(glucose), 총콜레스테롤(Total cholesterol), 저밀도지질(LDL), 중성지방(Triglyceride)의 경우 양군 모두에서 통계적으로 유의한 변화가 나타나지 않았다. 그러나 적혈구(RBC)의 경우는 양군 모두에서 12주간의 복용 후 유의한 감소를 나타내었으며($p=0.004$ vs. 0.034) 헤모글로빈(Hemoglobin)은 대조군에서만, 그리고 고밀도지질(HDL)은 시험군에서만 유의한 감소가 관찰되었다. 한편, Student's t-test를 이용한 군간 비교에서 통계적인 차이를 보인 경우는 하나도 없었다.

이상의 결과를 바탕으로 골관절염 피험자에게 발효 톱 추출물을 하루 1.8그램씩 12주간 경구 투여하고 100mm VAS, WOMAC등 골관절염 관련 증상의 평가와 객관적인 염증 및 골대사 관련 cytokine들의 분석을 통해 골관절염 증상 개선 효과에 대해 분석한 결과, 투여 후 전반적으로 골관절염 증상이 줄었고 염증지표인 ESR은 대조군에 비해 시험군에서 큰 억제효과를 보이는 등 의미 있는 결과를 보였다. 하지만, 통계적인 유의성을 확보하기 위하여 좀 더 많은 피험자를 대상으로 시험을 진행하고, 투여기간 및 투여용량에 관하여 적절히 고려한 추가적인 인체적용시험을 적용한다면 퇴행성 골관절염 증상개선에 의미 있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 한편, 안전성 측면에서 발효 톱 추출물을 하루 1.8그램씩 12주간 경구 투여하여도 이상반응, 실험실 검사 결과 등에서 특별한 이상을 보여주지 않아 안전한 식품소재로 판단된다.

제 7 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	기술발전 기여도
1차 연도 (2009)	해조류 유래 한약 기능성 신소재의 효능/효과 분석	해조류 63 종에 대하여 항산화 및 골형성촉진 효능 효과 검증	100%	각종 해조류의 항산화 활성 및 골형성 촉진 효능을 검증하여 해조류를 이용한 연구의 분야를 다양화 하는 데에 기여함.
	해조류 유래 한약 소재를 이용한 골형성 촉진 고기능성 가공제품 및 관련 가공 기술의 개발	골형성 촉진 효를 갖는 해조류의 선택 및 최적 추출 및 발효 조건 확립과 양산 조건 최적화		골관절 기능 관련 효능이 있는 해조류를 선별하고, 유효성분을 잘 추출하기 위하여 발효 등의 방법을 이용하여 선택된 해조류의 최적 추출방법 및 양산 조건을 확립함으로써 원료의 개발과 기능성 제품의 생산 효율에 기여함.
2차 연도 (2010)	발효 톳의 제품 개발에 필요한 원료의 표준화, 규격화 및 제형의 안정성 확인	발효 톳 추출물의 지표물질 검색과 표준화 확립	100%	발효 톳 추출물의 지표물질을 확립하고 표준화 하여 기능성식품 개발에 기여함
	발효 톳을 이용한 골관절 기능 개선 효능/효과 확인	발효 톳 추출물의 제형 안정성 확인		발효 톳 추출물의 제형별 안정성을 확인하여 건강기능성식품 개발에 기여함.
		발효 톳을 이용한 골관절염 기능 개선 효능 확인		발효 톳의 골관절염 기능 개선 효능을 In vitro 및 In vivo 상에서 확인하여 골관절염 개선 물질의 개발에 기여함.
		발효 톳을 이용한 골다공증 개선 효능 확인		발효 톳의 골다공증 개선 효능을 In vitro 및 In vivo 상에서 확인하여 골다공증 개선 물질의 개발에 기여함.
3차 연도 (2010)	발효 톳을 이용한 골관절 개선 기능성식품의 개발	건강기능성식품 인증을 위한 임상시험용 제품의 제조공정 확립	100%	발효 톳을 이용한 제품을 개발하고 이의 제조공정을 확립하여 건강기능성식품 개발에 기여함.
		건강기능성식품 인증을 위한 제품의 안정성 및 안전성 확인		발효 톳을 이용한 제품의 제형 안정성을 확인하였으며, 또한 독성 평가를 실시하여 발효 톳 추출물의 안전성을 확인하여 임상시험 및 기능성식품 개발에 기여함.
		건강기능성식품 인증을 위한 자료의 확보 및 임상시험 진행		발효 톳을 이용한 골관절염 임상시험을 진행하여 차후 골관절 기능개선 건강기능성식품의 개발에 기여함.

제 8 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	1					1	1		
	달성	1					1	1		1**
2차년도	목표	1					1	1		
	달성	2					2	1		
3차년도	목표	1	1				1	2		
	달성	1	(1)					1	1	
4차년도	목표									
	달성									
5차년도	목표									
	달성									
계	목표	3	1				3	4		
	달성	4	(1)				3	4	1	1**

** 기타는 국제 학술대회 발표 건임

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1	1	1	1
	달성	1	1	0	1	1

나. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신 저자	공동저자				
2010.	Panacagrimonas perspica gen. nov., sp. nov., a novel member of Gammaproteobacteria isolated from soil of a ginseng field	임완택	이태후	류청매 Leonid N. Ten 김세영	Journal of Microbiology	48 (2)	국내	SCIE
2011.	Sphingomonas humi sp. nov., isolated from soil of a ginseng field	이태후	김명겸	Sathiyaraj Srinivasan 이강진	Journal of Microbiology		국내	SCIE
2012	Solid-phase colorimetric method for the quantification of fucoidan	Gafur J.	이태후	신지유	Applied Biochemistry and Biotechnology		국외	SCI
2012	Hijikia fusiforme protects against ovariectomy-induced bone loss in rats.	이정민 박상용	이태후	이돈길, 신현섭	J Med Food.	15(4)	국외	SCI
2012	Fucosterol from Hizikia fusiformis and their proliferation activities on osteosarcoma-derived cell MG63	허규원	이태후, 백남인	이돈길, 이대영,	Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry		국내	SCIE

다. 특허 성과

출원 연도	출원된 특허의 경우				등록된 특허의 경우				
	특허명	출원인	출원 국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2010. 5	베타-글루코시다아제 활성이 있는 누룩 유래 균을 이용한 해양 유래 천연물의 발효 방법 및 이에 의해 제조된 발효 식품	경희대학교 산학협력단	KR	10-2010-0051259					
2011. 3	모자반 추출물을 유효성분으로 함유하는 폐경기후 골다공증의 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품	경희대학교 산학협력단	KR	10-2011-0025540					
2011. 3	발효 톳 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 골 질환 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품	경희대학교 산학협력단	KR	10-2011-0025541					
2012	푸코스테롤(Fucosterol)을 유효성분으로 함유하는 골관절염 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품	경희대학교 산학협력단	KR						

라. 기술료 징수 현황

- 연구개발과제명 : 발효 해조류를 이용한 골 관절 개선 기능성식품의 개발
- 총 연구개발비 : 695,000,000원
(정부출연금액 : 200,000,000원, 참여기업부담금액 : 원)
- 기술료 징수액 : 40,000,000 원 (정부출연금액의 20 %)
- 기술사용기간 : 8 년 (2012 년 ~ 2019 년)
- 계약당사자
(갑) 주관연구기관 : 경희대학교 산학협력단
(을) 실시기업(참여기업) : 이태후생명과학 주식회사

마. 사업화 현황

해당 사항 없음.

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

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

(2) 장·단기 연수지원 성과

해당사항 없음

(3) 산업기술인력 양성 성과

- ◆ 생명과학 분야 기업으로의 박사 연구원 취업 1명을 지원하였다.

사. 경제사회 파급효과

- ◆ 언론홍보 1건, 2011년 09월 14일자 전북일보에 기사를 통하여 본 연구 과제를 홍보하였다.

5. 구매금액이 3천만원 이상인 기자재 구매현황

해당사항 없음

6. 연구 성과 활용 계획

- 기술이전을 통한 추가 임상 연구 계획 (2013년)
- 고부가가치 상품의 개발에 적용함
 - 효소처리 톱 추출물의 제형을 과립제 이외의 제형으로 확대(2012년)
 - 골관절 기능 개선 식품의 개발(2013년)
- 국내외 판매를 통한 수익 창출(2013년)
- 기술이전을 실시하여 천연물 신약 개발을 위한 연구 진행(2013년, 대기업 OO 생활과학과 공동연구 진행 예정)
- 골다공증 예방형 기능성 식품개발

제 9 장 참고문헌

- 1) Ko H, Yang W, Park K, Kim M.. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate (MTA) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and response of rat pulp to MTA and BMP-2. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Jun;109(6):e103-8.
- 2) Ko H, Yang W, Park K, Kim M.. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate (MTA) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and response of rat pulp to MTA and BMP-2. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Jun;109(6):e103-8.
- 3) 국민건강영양조사 제4기 3차년도(2009), 보건복지부
- 4) Kim KS et. al. Arsenic speciation and risk assesment of Hijiki(Hijikia fusiforme) by HPLC-ICP-MS. Korean j. Food Sci. Technol. 2009 Vol. 41. No.1. 1~6
- 5) Martin Rose. et. al. Arsenic in seaweed—Forms, concentration and dietary exposure. Food and Chemical Toxicology 2007. Vol. 45. 1263-1267
- 6) Foster S, et al. Observations on the measurement of total antimony and antimony species in algae, plant and animal tissues. 2005. J Environ Monit. Dec;7(12):1214-9.
- 7) Japan Ministry of Health, labour and Welfare. 2004
- 8) Hamano-Nagaoka M, et. al. Nitric acid-based partial-digestion method for selective determination of inorganic arsenic in hijiki and application to soaked hijiki. 2008. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. Apr;49(2):88-94
- 9) Foster S, et al. Observations on the measurement of total antimony and antimony species in algae, plant and animal tissues. 2005. J Environ Monit. Dec;7(12):1214-9
- 10) Zhi-Yong Xiao. et. al. Inhibitory effect of linomide on lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α production in RAW264.7 macrophages through suppression of NF- κ B, p38, and JNK activation. 2007 Immunol Lett. Dec 15;114(2):81-5.
- 11) Battistini L, et. al. Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. 1994. Dev Neurosci. ;16(3-4):152-61.
- 12) HIROKO SUDO. et. al. In Vitro Differentiation and Calcification in a New ClonalOsteogenic Cell Line Derived from Newborn Mouse Calvaria. 1983. J Cell Biol. Jan;96(1):191-8.
- 13) Quarles LD. Prednisone-induced osteopenia in beagles: variable effects mediated by differential suppression of bone formation. 1992 Am J Physiol. J μ ;263:136-41.
- 14) Lee S. et. al. Anti-Oxidant Activities of Fucosterol from the Marine Algae *Pelvetia siliquosa*, 2003 Arch Pharm Res. 26, 719-722.
- 15) Roy Pettipher et. al. A dominant role for chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper type 2 (Th2) cells (CRTH2) in mediating chemotaxis of CRTH2+ CD4+ Th2 lymphocytes in response to mast cell supernatants. 2006. Immunology Vol. 119-3, 362-368
- 16) Zhi-Yong Xiao. et. al. Inhibitory effect of linomide on lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α production in RAW264.7 macrophages through suppression of NF- κ B, p38, and JNK activation. 2007 Immunol Lett. Dec 15;114(2):81-5.
- 17) Battistini L, et. al. Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. 1994. Dev Neurosci. ;16(3-4):152-61.
- 18) 생약(한약)제제의 효력 시험 지침. 2008. 식약청

- 19) Wronski TJ. et. al. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. 1988. *Endocrinology*. Aug;123(2):681-6.
- 20) Kopera H. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Klin Wochenschr* 1989;67:557--558.
- 21) Lawrence G, Raisz MD. Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;2:5--12.
- 22) Tyagia AM, Gautam AK, Kumar A, et al. Medicarpin inhibits osteoclastogenesis and has nonestrogenic bone conserving effect in ovariectomized mice. *Mol Cell Endocrinol* 2010;325:101--109.
- 23) Lacativa PG, Farias ML. Osteoporosis and inflammation. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010;54:123--132.
- 24) Maruotti N, Grano M, Colucci S, d'Onofrio F, Cantatore FP. Osteoclastogenesis and arthritis. *Clin Exp Med* 2011;11:137--145.
- 25) Lasco A, Morabito N, Gaudio A, et al. Effects of hormonal replacement therapy on bone metabolism in young adults with beta-thalassemia major. *Osteoporos Int* 2001;12:570--575.
- 26) Changotade SI, Korb G, Bassil J, et al. Potential effects of a lowmolecular-weight fucoidan extracted from brown algae on bone biomaterial osteoconductive properties. *J Biomed Mater Res A* 2008;87:666--675.
- 27) Byon YY, Kim MH, Yoo ES, et al. Radioprotective effects of fucoidan on bone marrow cells: improvement of the cell survival and immunoreactivity. *J Vet Sci* 2008;9:359--365.
- 28) Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 2008;58:424--430.
- 29) Park KE, Jang MS, Lim CW, et al.: Antioxidant activity on ethanol extract from boiled-water of *Hizikia fusiformis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2005;48:435--439.
- 30) Barve RA, Minnerly JC, et al. Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:1190-8
- 31) Beyreuther B, Callizot N, et al. Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R14
- 32) Bove SE, Calcaterra SL, et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:821-30
- 33) Dumond H, Presle N, et al. Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:284-95
- 34) Guzman RE, Evans MG, et al. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 2003;31:619-24

주 의

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