

발간등록번호

11-1541000-001500-01

보안과제( ), 일반과제( ✓ )

과제번호 110088-3

# 국내산 감태 가공부산물 유래 방사선 방호능을 가진 면역증강 소재 개발

(Development of immune boosting materials  
having radioprotective effect from  
processing by-product of *Ecklonia cava*)

아쿠아그린텍(주)

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내산 감태 가공부산물 유래 방사선 방호능을 가진 면역증강 소재 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “감태가공부산물 유래 면역증강물질의 대량생산 및 감태가공부산물 유래 면역증강물질의 분리, 특성분석 및 *in vivo* 효능평가에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2012 년 06 월 15 일

주관연구기관명 : 아쿠아그린텍(주)

주관연구책임자 : 제 종 선

세부연구책임자 : 지 영 혼

연 구 원 : 전 유 진

연 구 원 : 장 지 태

연 구 원 : 김 경 미

협동연구기관명 : 제주대학교

협동연구책임자 : 지 영 혼

# 요 약 문

## I. 제 목

국내산 감태 가공부산물 유래 방사선 방호능을 가진 면역증강 소재 개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내에 서식하고 있는 수산물 중 감태가공부산물로부터 방사선 방호효능이 인정되는 면역증강 소재를 개발하여 국민 보건에 기여하고, 국내 최초로 수산물 유래 방사선 방호 능력을 가진 면역증강 소재를 개발함으로써 새로운 기능성 영역의 개척하고자 한다. 또한 최근 각종 질환예방 및 각종 암에 대한 방사선 치료시 방사선방호 기능을 가진 건강보조식품으로서 수산물 유래 면역증강 소재를 개발하여 해조류의 가치를 증진시켜 국내 수산물 소비의 증대하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 동물실험을 통한 방사선 방호 효능을 평가하기 위하여 먼저 황산다당류(ECB-SP; *Ecklonia cava* by-product-Sulfated polysaccharide)성분에 대한 말초면역세포의 독성 및 증식능을 평가하였다. 또한 ECB-SP의 방사선 방호능 및 조혈촉진능을 평가하기 위하여 ECB-SP를 마우스에 투여하고 말초면역세포 및 골수세포에서의 방사선 보호 및 조혈 촉진 효능 평가와 함께 소장 줄기세포의 생존력 및 세포자멸사 억제 효능을 평가하였다. 이와 함께 ECB-SP에 대한 방사선 조사 후 마우스 생존율을 평가하고, 급성경구독성평가를 통하여 ECB-SP의 안전성을 평가하였다.

## IV. 연구개발결과

ECB-SP를 동물모델에 적용하여 방사선 보호효능을 검증하기 위하여 마우스에게 준치사량의 선량인 7Gy의 방사선을 조사 하여 ECB-SP의 방사선 보호효능을 확인하였다. ECB-SP를 투여한 동물에서 생존률(DRF=1.51)을 증가시켰을 뿐만 아니라 말초면역세포의 생존능 및 증식능이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 이는 방호효과가 검증되었으나 부작용이 커서 그 사용이 제한된 -SH계 화합물의 DRF가 1.4-2.0인 것에 비교하면 독성이 없이 DRF 수치가 1.51인 ECB-SP의 천연 방사선 보호제로서의 이용 가능성을 높였다고 볼 수 있다. 또한 ECB-SP의 투여는 방사선에 감수성이 높은 조혈모세포인 골수세포와 소장의 음와세포에 대한 생존능 증가, 세포자멸사 억제 등 면역조혈계의 회복촉진을 확인하였다. 안전성 평가에서는 단기급성경구투여 시험에서 독성이나 부작용을 보이지 않음을 확인하여 ECB-SP에 대한 안전성을 검증하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

감태 가공부산물 유래 황산다당류는 감태 가공후의 부산물에 포함된 다수의 탄수화물과 황산기를 효소분해법을 이용하여 식품 원료소재로서의 이용과 이를 이용한 완제품 개발이 가능하여 과제 의 결과를 이용한 제품개발을 실시하였다. 감태 가공부산물 유래 황산다당류에는 풍부한 탄수화물과 황산기가 포함되어 있어 원료 식품소재로서 AG-Fucoidan(제품명 ; 감태-후코이단)으로 식품 품목 신고한 제품을 개발하였으며 개발된 감태-후코이단을 원료로 다시 유산균을 이용하여 발효한 제품을 개발하였다. 유산균을 이용하여 발효시킨 감태 가공부산물 유래 황산다당류는 기존 해조류 특유의 비린내를 제거하기 위해 유산균을 이용하여 발효하였으며 발효중에 bio conversion 작용에 의해 탄수화물의 함량이 증가하고 해조류 특유의 해취가 감소됨으로써 음료 등에 적용이 쉬운 소재로 개발하게 되었다.

현재 이런 이점을 살려 감태 가공부산물 유래 황산다당류를 이용한 “아침에한모금”이라는 해조음료를 개발하여 시판중에 있으며 향후 감태 가공부산물 유래 황산다당류를 이용한 제품군으로 500ml 액상차 제품, 환 제품 등을 개발하여 판매코자 한다. 이들 제품군은 방사능을 치료 목적으로 이용하는 사람들 또는 업무상 필수적으로 사용하게 되는 사람들을 타겟으로 제품화하여 제품을 상시 복용가능하게 함으로써 방사능으로부터 몸을 보호할 수 있는 목적으로 이용케 하고자 한다.

# SUMMARY

## (영문요약문)

### I. Project Title

Development of immune boosting materials having radioprotective effect from processing by-product of *Ecklonia cava*

### II. Objectives and Needs

The present study aims at the investigation of the immune boosting materials having radioprotective effect from processing by-product of *Ecklonia cava* for the development of functional food.

### III. Contents and Scopes

We designed this study to determine whether ECB-SP has radioprotective effects on peripheral immune cells and hematopoietic cells of irradiated mice. In addition, we evaluated the survival rate of whole-body irradiated mice using dose reduction factor (DRF). We performed the short-term toxicity test to confirm safety of ECB-SP

### IV. Results

Irradiation was performed using a  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray, and absorbed dose was 2~7Gy. The results from the present study demonstrate that the ECB-SP dramatically enhanced the proliferation of splenocytes beyond that of untreated, irradiated controls. Mice pretreated with ECB-SP also exhibited increases in the number of bone marrow cells and endogenous spleen cell colonies at day post-irradiation. We found that ECB-SP also significantly accelerated the regeneration of intestinal crypt cells, compared to untreated control. On further observation on intestinal crypts, we discovered that ECB-SP inhibited apoptosis in intestinal stem cells by reducing the expression level and immunoreactivity of p53 and Bax and increasing those of Bcl-X<sub>L/S</sub>. In addition, we observed prolonged survivals of SP treated irradiated mice compared to irradiated but untreated controls. Our results demonstrate that ECB-SP presents radioprotective effects as shown in enhanced survivals of lethally irradiated mice, by increasing viability and proliferation on peripheral lymphocyte, possessing hematopoietic capacities on bonemarrow cells and inhibiting apoptosis of intestinal crypts. Finally, we verified the safety of ECB-SP on rapid toxicity and side effect to the mice.

## V. Proposal for Application

All the results obtained from this study could be application to the functional food industry by transfer of specified and patented technologies as enzymatic extraction process and mass production system for the development of immune boosting materials having radioprotective effect. It is also expected that general and wide application of basic data for the scientific and educational purposes.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

I. Proposal Summary	8
A. The importance of the development of natural materials and the potential value of seaweed	8
B. The importance of polysaccharides and material development	8
C. The potential value of seaweed polysaccharide as a radioprotector	9
II. Status of technical development	10
A. Production and market status	10
1. The present status of market and products in domestic and foreign	11
III. Contents and Results	12
A. Analysis general composition of byproducts <i>E. cava</i> and produce soluble extracts by the enzymatic extraction technique	12
B. Molecular characteristics and isolation of sulfated polysaccharide from byproducts <i>E. cava</i>	14
C. Isolation of sulfated polysaccharide from by product <i>E.</i> <i>cava</i> and application of membrane isolation for mass production	18
D. Product development	20
E. The radioprotective effects of by-product of <i>E. cava</i> Sulfated polysaccharide(ECB-SP) through animal experiments	22
1. The effects of ECB-SP on cytotoxicity and proliferation of splenocytes	22
2. The effects of ECB-SP on irradiated splenocytes	24
3. The effects of ECB-SP on blood profile in irradiated mice	26
4. The radioprotective effects of ECB-SP on hematopoietic stem cells in mice exposed to a lethal dose of irradiation	28
5. The radioprotective effects of ECB-SP on the intestinal stem cells in mice exposed to a lethal dose of irradiation	35
6. The effects of ECB-SP on survival rate in mice exposed to a lethal dose of irradiation	42
F. Safety assessment of ECB-SP	44
1. The acute oral toxicity test for ECB-SP	44
IV. Goal achievement and Contribution	47
V. Proposal for Application	49
VI. Technical know-how	52
VII. References	53

# 목 차

제 1장 연구개발 과제의 개요	8
제 1절 천연소재 개발의 중요성과 해조류의 잠재적 가치	8
제 2절 다당류와 원료개발의 중요성	8
제 3절 방사선 방호제로서의 해조 다당류의 잠재적 가치	9
제 2장 국내외 기술개발 현황	10
제 1절 생산 및 시장현황	10
1. 국내외 제품생산 및 시장 현황	11
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	12
제 1절 감태 가공부산물의 일반성분 분석 및 효소적 가수분해법에 따른 수용성 추출물 제조	12
제 2절 감태 가공부산물 유래 황산다당류의 분리 및 특성 규명	14
제 3절 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 분리 및 대량생산을 위한 막분리 기술 적용	18
제 4절 대량생산 구축을 통한 시제품 개발	20
제 5절 감태 가공부산물 유래 황산 다당류(ECB-SP)의 동물실험을 통한 방사선 방호 효능평가	22
1. ECB-SP에 대한 면역세포에서의 독성 및 증식능 검증	22
2. 방사선 조사로 손상된 마우스 면역세포에 대한 ECB-SP의 효과	24
3. 방사선을 조사한 마우스의 혈액 성상에 대한 ECB-SP의 효능 평가	26
4. 방사선을 조사한 마우스에서 ECB-SP의 면역조절 재생에 관한 방사선 방호 효능 평가	28
5. 방사선을 조사한 마우스에서 ECB-SP의 소장 줄기세포 재생에 관한 방사선 방호 효능 평가	35
6. ECB-SP 투여에 의한 마우스 체내에서의 약효실험 및 생존율에 대한 효능 평가	42
제 6절 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 안전성 평가	44
1. ECB-SP에 대한 단기 급성경구 독성시험	44
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	47
제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	49
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보	52
제 7장 참고문헌	53



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 천연소재 개발의 중요성과 해조류의 잠재적 가치

천연 소재의 중요성이 증대되고 있는 가운데, 생물자원은 생태계의 중요한 구성 요소로 1992년 생물 다양성 협약이 체결된 후, 생물자원에 대한 보존, 그에 따른 이용에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다. 그에 따라, 육상생물에 관한 수많은 연구가 이루어진 반면, 해양생물종들에 대한 연구는 매우 부족한 실정이며 그에 따른 기능성 소재로서의 개발 또한 부족하다. 뿐만 아니라, 최근 들어 육상생물 소재의 고갈 등으로 인한 다양한 문제점들로 인해 기능성 소재 단가가 급등하고 있고, 이러한 점을 감안할 때, 새로운 소재의 확보와 개발이 요구되어진다.

특히 최근 들어 각광받고 있는 해양 생물 종인, 해조류는 해양에서 시식하며 매년 약 200만톤 이상 양식되거나 자연적으로 수확되어지는 생물종으로, 식물성 플랑크톤과 함께 해양생태계의 생산자로서 연안역의 일차 생산을 지배하는 중요한 해양생물로 1900년대 초반까지 식용으로 사용되어져 왔다. 게다가, 해조류는 그들이 가지는 다양한 생리활성을 토대로 의약품원료, 비료공업, 사료원료, 화장품원료 등으로 다양하게 이용되고 있으며, 그에 따라 그들의 실용적 가치가 증대되고 있어 향후 예측되는 에너지 또는 식량위기에 대체될 수 있는 자원으로서 그 중요성이 새로이 인식되고 있다. 그리고, 해양생물이 가지는 육상생물 유래의 천연 물질과는 다른 신기하면서도 다채로운 화학 구조와 다양한 생물활성 발현에 따라, 지금까지 1만종에 이르는 새로운 물질이 발견되었다.

현재, 우리가 주목하고 있는 해조류 중, 갈조류는 청정해역인 제주도 연안이나 남해안 연안에서 서식하고 있고 그들의 유용성분인 폴리페놀성의 phlorotannin 성분, 알긴산, 카라기난, 한천과 같은 성분이 다양한 생리활성 (항응고, 항산화, DNA damage 억제 효과, 항암, 항바이러스, 항염증효과, 면역증강, 항균 등)이 밝혀져 왔다. 그에 반해, sulfated polysaccharide와 같은 다당류 성분의 방사선 방호 효능이 인정되는 면역활성에 대한 연구는 아직 초기 단계로서 매우 미흡한 실정이다.

## 제 2 절 다당류와 원료개발의 중요성

Polysaccharide (다당류)는 Fucoidan, Galactan 등과 같은 다양한 성분들로 나뉘 수 있으며, 이 중, fucoidan은 대표적인 해조류 유래 황산 다당류 화합물로서 원료비가 비싸고 추출방법이 까다로우며, 또한 원료에 함유되어 있는 fucoidan의 함량이 매우 적기 때문에 현재 시장에서 킬로그램 당 1백만원 정도의 높은 가격으로 판매되고 있다. 그 대표적인 원료물질로는 미역이나 다시마를 들 수 있는데, 뜨거운 물이나 산성 용액을 이용하여 다당류를 추출하고 있는데, 이들 원료들은 가격이 비쌀 뿐만 아니라 추출 수율이 매우 낮고 정제방법이 까다롭기 때문에 다당류 원료 가격을 상승시키는 요인으로 작용하고 있다. 그러나, 지금 현재 전세계 많은 사람들이 웰빙과 함께 기능성 식품에 대한 관심을 갖고 있음에 따라, 시급히 해조 다당류를 대체하기 위한 대체 원료의 개발이 이루어 져야 한다. 게다가, 그들이 가지는 뛰어난 생리활성들 (항바이러스효과, 혈액개선효과, 항암효과, 항염증효과 및 면역증강효과)이 각광받으면서 소비자들이 다당류에 주목하고 있다. 뿐만 아니라, 국제적으로 해조 다당류 시장은 아직은 초기단계에 머물고 있으나 일본은 최근 해조 다당류 시장이 약 1000억원에 접근하고 있고 급속한 소비자들

의 인지도 상승에 힘입어 각종 음료, 정제, 과립 및 캡슐제형을 중심으로 보습 기능을 겨냥한 화장품에 이르기까지 다양한 상품들의 출시가 줄을 잇고 있는 실정이다. 그에 반해, 국내의 해조 다당류 시장은 완도의 해림바이오와 해원바이오를 중심으로 제품이 출시되고 있으나, 해조 다당류 원료시장은 아직까지 초기 단계에 머물러 있는 수준이다.

해조 다당류는 위에서 언급한 대로 다양한 생리활성을 가지고 있지만 그 가격이 너무 고가이어서 아직까지 국내 시장이 형성되고 있지 않으며, 현재 국내시장 규모는 100억원 미만으로 예측되며, 대부분이 일본으로부터 수입에 의존하고 있는 실정이다.

따라서, 시급히 국내 생산의 다당류 원료를 찾아내고 그것의 생리활성을 밝힘으로서 기능성 소재를 개발하는 것이 요구된다.

### 제 3 절 면역 활성효능을 가진 방사선 방어제로서의 해조 다당류의 잠재적 가치

폐사율이 높고 막대한 경제적 손실을 이끄는 대표적인 질병인 암의 치료에 있어 수술, 화학적 요법과 동시에 방사선 치료를 동반하게 되는데, 방사선 조사는 암세포 뿐 아니라 체내의 정상세포나 면역세포들 마저도 손상을 주어 특히 말초면역기관이나 조혈기관의 손상을 이끌면서 체내 면역력을 저하시켜 치료에 있어 어려움을 주는 것으로 알려져 있다. 따라서, 미국이나 일본과 같은 선진국에서는 방사선 조사에 대해 방호기능을 가지는 물질들을 연구하고 개발하고자 노력하고 있으며 천연물질 유래의 방사선 방호효과를 갖는 약효물질 개발은 인도를 중심으로 국제적으로 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 상대적으로 국내에서는 미흡하고, 방사선 방호물질에 관한 천연물 연구 중 면역계에 초점을 맞춘 연구는 미미하다. 따라서 면역 활성효능을 가진 방사선에 대한 보호효과를 가진 물질의 개발의 필요성이 강조되고 있다.

현재 시판되고 있는 방사선 방호 물질인 Walter Reed 연구센터에서 개발한 WR-2721(amifostine; S-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothiotic acid)는 조혈장기에 방호 효과가 있다고 보고되었다. 그러나, 그들은 조직 내 집적 분포의 차이나 혈액뇌관문을 통과하지 못하는 등의 다양한 이유로 폐나 뇌 등에서는 방사선 보호효과는 저하되며, 중간 대사산물의 유해성(구토, 졸음, 그리고 저혈압 등)을 일으켜 그 사용이 제한되고 있다. 또한 interleukin-1과 같은 면역증강제, tumor necrosis factor(TNF), granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF)와 같은 조혈증강제 등의 합성물질들도 방호효능과 함께 오심, 구토, 고혈압 등의 부작용을 일으키고 고가이기 때문에 실제 임상적용이 거의 어려운 실정이다. 그리고 대표적 방사선 장애를 경감시키는 대표적인 화학 물질들로 아미노산을 함유한 -SH계 화합물과 시스테인, 아미노에틸이소티오요소로서 그들의 DRF는 최적조건에서 보통 1.4-2.0, 1.7과 1.45-2.10 정도로 높다고 알려져 있으나 이것들 또한 합성물질로서 부작용이 커서 그 사용이 제한적이다.

따라서 해조 다당류들은 항암 활성과 함께 면역세포의 증식과 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있고, 이것은 천연의 수용성 물질로서 안전성이 확보된다는 큰 장점을 가지고 있어 면역 활성을 가지는 방사선 방어 효능을 가진 물질은 그 효용성이 클 것으로 생각된다. -SH기를 다량 함유하면서 면역세포에서 면역증강 효능을 보인 sulfated polysaccharide를 갈조류로부터 효율적으로 추출 분리하여 그들의 방호 효과를 밝혀 새로운 방사선 방호효과를 가진 면역증강 소재로서 개발한다면 상당한 가치가 있을 것으로 사료된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 생산 및 시장현황

산업자원부는 생물산업의 범위를 생물화학, 생물의학, 생물환경, 바이오에너지 및 자원, 바이오식품, 생물전자, 생물공정 및 엔지니어링, 생물학적 검정 및 측정시스템 등 8개 부문으로 분류하고 있다. 전 세계적으로 우리나라는 약 1%에 해당하는 기능성 식품 시장을 가지고 있었으며, 그 이후 세계적으로 생물 산업의 발전과 함께 기능성 식품과 의약품에 대한 연구 개발이 증가하고 있다 (그림 2-1-1).

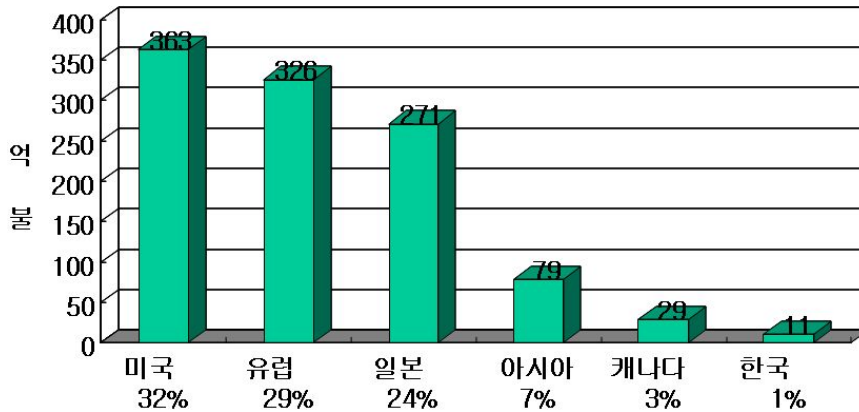


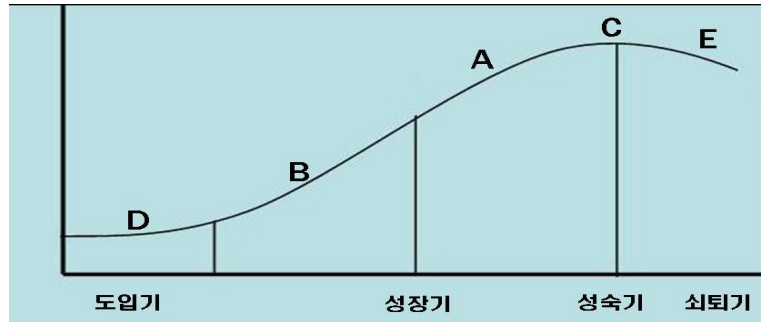
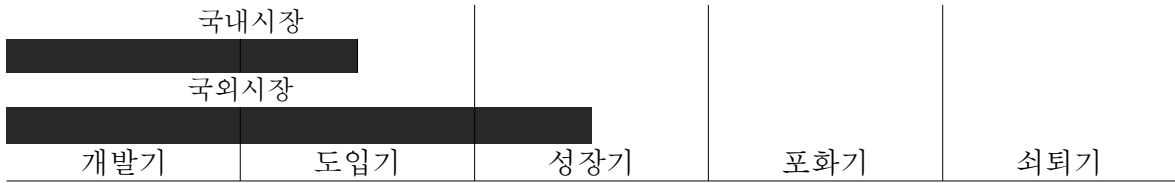
그림 2-1-1. 세계 기능성 식품의 시장 (자료: 배화여대 인터넷 창업교육센터장, 2001.)

또한, 웰빙시대, 자연 건강식품과 고기능성 식품에 대한 관심과 선호도는 지속적으로 증가되고 있으며, 이러한 웰빙 소비수요에 부합하는 기능성 천연 식품(소재)의 개발을 위한 연구개발이 진행되고 있다. 이것은 천연의 육상이나 해상 생물 자원을 활용하여 기능성 식품이나 의약품 등이 시판되고 있다. 그 예로, 열대 및 아열대 지역의 육상 및 해상 자원을 활용하여 개발 (미국의 국립암연구소는 말레이시아 열대식물에서 칼라놀라이드 에이'라는 에이즈 치료용 신물질을 최근에 추출하여 임상실험, 열대지역에서 서식하는 해면으로부터 항암물질, 소염억제물질, 천식억제물질 및 항결핵 물질 등이 분리되었으며, 일부 물질은 상용화를 준비물질에 있음)질이 있다. 메디포스트 계열사 향큐로닉스사도 암세포만을 선택적으로 죽이는 독성이 없는 새로운 항암단백질(TSSP-1)을 발견, 이를 재조합단백질 항암제로 개발하기도 하였다. 국내의 경우에도 (주)코인텍 및 (주)바이오알 앤즈와 공동으로 인삼다당체(GINSAN)를 로운한 면역증강물질을 건강보조식품으로 제품화하여 판매하고 있다. 또한, 한국전통음식으로 알려진 청국장 가루, 다시마로 만든 다시마 환, 톳으로 만든 식이섬유 등 다양한 기능성 소재 식품들이 전 세계의 사람들을 타겟으로 하여 현재 판매되고 있는 중이다.

현재 제주도의 해안가 지역 등 국내 해조류 주산지에서 생산되는 해조류(다시마 등) 관련 제품은 양식에 의한 수확 후 염장 또는 건조에 의한 소분 등 단순가공에 지나지 않지만, 청정 지역에서 양식된 해조류에 대하여 진일보된 효소적 가수분해기법과 막분리시스템을 결합함으로써 안전성과 효능이 검증되어 의약품 및 건강기능식품 등으로 전 세계적으로 상용중인 해조 다당류의 생리활성을 동시에 부여하는 기능성 소재를 완성할 수 있다. 이 연구에서 해조류 유래의 새로운 해조 sulfated polysaccharide 원료를 찾게 될 경우, 이러한 신소재를 이용한 「천연 방사선 방호제」의 개발 및 조기 사업화의 추진은 양식어민(조합)과의 사전 계약에 의한 계획 재배를 통하여 확보된 원료 공급의 안전성과 경제성이 확보되어 제조업자의 경쟁력

이 강화되며, 이를 바탕으로 고부가가치 제품의 안정적인 공급과 기능성의 향상으로 1차 양식 어민의 소득 증대와 소비·유통 등 3차 산업의 상승효과를 통한 지역 경제발전을 도모할 수 있다.

1. 국내외 제품생산 및 시장 현황



가. 주시장(국가 또는 지역) : 일본 미국 유럽

구 분	현재의 시장규모	예상되는 시장규모
세계시장규모	100백만 \$	(2010년) 1000백만 \$
한국시장규모	10000백만원	(2010년) 100000백만원

나. 국내시장 : D (도입기)

국내시장의 경우 해조 다당류 성분은 이전부터 면역활성, 항암활성 등의 다양한 활성들이 연구, 평가되면서 기능성 식품으로 각광을 받고 있다. 그러나, 일본을 비롯한 미국, 유럽 국가들에서 생산 판매되고 있는 해조 다당류시장에 비하면 아직은 초기 단계라 할 수 있다. 국내에서도 물론, 해조 다당류관련 제품을 생산하여 판매하고 있으나 미역귀 등의 품귀 현상으로 인해 원자재의 가격 상승과 더불어 현재 매우 높은 가격에 판매되고 있다. 또한, 그에 따라 일본을 비롯한 국외로부터 수입하는 해조 다당류제품이 현재 판매되고 인지도가 있는 것으로 여겨진다. 따라서 국내 시장이 해조 다당류의 가치를 알고 그것에 따른 해조 다당류 제품의 수입과 판매가 늘어나는 것을 가만할 때, 새로운 해조 다당류의 원료를 확보하는 것은 성장기에 들어서 있는 국내 시장에서 국내 생산 해조 다당류의 입지를 다질 수 있을 것으로 여겨진다.

다. 국외시장 : A (성장기)

전 세계적으로 안전성과 생리효용성 등의 기능성이 여러 시험을 통하여 검증되고 인정된 국외시장의 경우 기능성 식품 및 건강기능(일본 :건강보조식품)식품은 일본을 중심으로 시장 성숙기에 진입하고 있다. 또한, 일본은 드링크, 과립, 캡셀에서 유제품, 화장품까지 최근 2, 3년간 급격하게 상품수가 증가하면서 시장규모 60억엔을 돌파했다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 감태 가공부산물의 일반성분 분석 및 효소적 가수분해법에 따른 수용성 추출물 제조

#### 가. 실험방법

##### (1) 감태 가공부산물의 원료 수집

감태 가공부산물은 아쿠아그린텍(주)에서 디에콜을 생산 후 발생하는 부산물을 동결 건조시켜 사용하였다.

##### (2) 감태 가공부산물의 일반성분 분석

감태 가공부산물에 대한 일반성분 분석은 AOAC법에 따라서 수분은 105℃ 상압건조법으로, 조회분은 550℃ 회화로에서 12시간 이상 태운 후 정량하였고, 조단백질은 킬달자동분석장치 (Kjeltec™2300, Foss Co. Ltd., Denmark)에 의해 분석하였다. 또한, 조지방은 에테르를 이용하는 Soxhlet법 (Soxhlet system 1046, TeacatorAB, Sweden)으로 분석하였다. 탄수화물은 전체 성분 함량을 100%로 하여 수분, 조회분, 조단백질 및 조지방의 함량에 대한 차이 값으로 하여 계산하였다.

##### (3) 효소적 가수분해법에 따른 수용성 추출물 제조

일반적으로 다당류 추출시 열수 추출법이나 산성 용액을 이용하여 추출하고 있는데, 이러한 추출방법은 친환경적이지 못하고 낮은 추출수율 등과 같은 단점을 가지고 있어 새로운 추출기법의 도입이 이루어지고 있다. 이에 따라, 높은 수율, 친환경적, 비독성, 수용성 등의 물질을 추출할 수 있는 효소적 가수분해법이 새롭게 각광받고 있다. 따라서 감태 가공부산물을 보다 효율적으로 수용성의 추출물을 제조하기 위해 Novozyme에서 생산되고 있는 당분해 효소인 Celluclast (Novo Nordisk, denmark)을 이용하여 효소적 가수분해를 통해 수용성 추출물을 제조하였다 (그림3-1-1). 1L 증류수에 동결건조된 감태 가공부산물 10 g을 넣고 Celluclast를 100  $\mu$ l 첨가하였다. 최적의 조건 (온도: 50℃, pH: 4.5)에서 24시간 동안 반응시킨 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 그 후, 상층액 내에 존재하는 효소의 불활성화를 위해 100℃에서 10분간 끓여주고 중성의 상태인 pH 7로 맞춰줌으로서 효소적 가수분해법에 따른 감태 가공부산물의 수용성 추출물을 제조하였다.

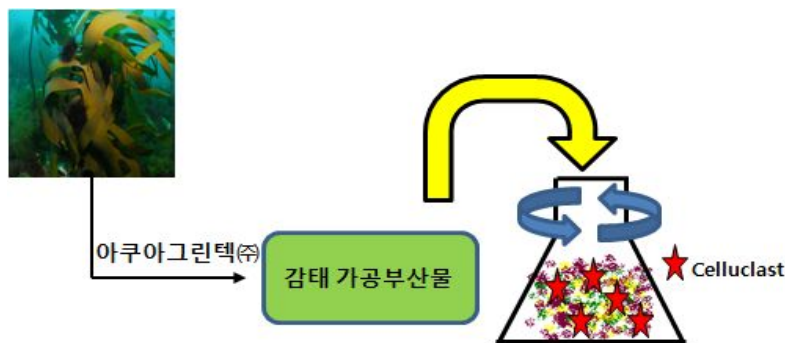


그림 3-1-1. 효소적 가수분해법 모식도

## 나. 실험결과

### (1) 감태 가공부산물의 일반성분

감태 가공부산물의 일반성분 분석결과 (표 1) 탄수화물 함량이 59%로 가장 많은 부분을 차지하는 것으로 나타났다. 원 감태의 경우 탄수화물 함량이 약 65%임을 감안할 때 감태 가공부산물은 원 감태의 탄수화물 함량을 거의 그대로 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 회분함량은 23%로 탄수화물 다음으로 높은 함량을 나타내었으며 단백질과 지방은 각각 6%와 1%로 비교적 낮은 함량을 나타내었다.

표 1. 감태 가공부산물의 일반성분 (%)

Moisture	Carbohydrate	Ash	Protein	Lipid
10.20	59.11	23.06	6.01	1.62

### (2) 효소적 가수분해법의 추출 효율

효소적 가수분해법을 이용하여 감태 가공부산물의 수용성 추출물을 제조한 결과 기존의 열수 추출법과 비교하여 더 우수한 추출 효율을 나타냄을 확인하였다 (표 2). 추출수율을 비교한 결과 효소적 가수분해법이 40%로 열수추출법 30% 보다 높은 추출수율을 나타냈으며 탄수화물과 황산기 함량에서도 효소적 가수분해법이 열수추출법 보다 높은 함량을 나타내었다. 또한 갈조류 유래 다당류의 주된 구성 단당인 fucose 함량을 비교한 결과 효소적 가수분해법이 55%로 열수추출법 45%보다 10% 높은 함량을 나타냄을 확인하였다. 또한 그림 3-1-2에서 보는 바와 같이 효소처리에 의해 우론산이 제거되는 효과를 나타냄에 따라 효소적 가수분해법은 우론산 제거 과정을 따로 수행하지 않아도 되는 장점을 가지고 있다. 따라서 이상의 결과를 종합해 볼때 감태 가공부산물의 수용성 추출물 제조에 있어서 효소적 가수분해법이 효율적인 추출방법임을 확인할 수 있었다.

표 2. 감태 가공부산물의 효소적 가수분해법과 열수추출법의 화학적 성분 비교

Component	Sample	
	Hot water extract	Enzymatic extract
Yield (%)	30.3	40.6
Total carbohydrate (%)	32.4	45.5
Sulfate content (%)	7.5	12.5
Proportion of monosaccharide (%)		
Fucose	45.2	55.8
Rhamnose	1.8	1.9
Arabinose	0.2	not determined
Galactose	18.2	21.8
Glucose	10.2	6.7
Mannose	8.1	7.3
Xylose	14.4	6.4

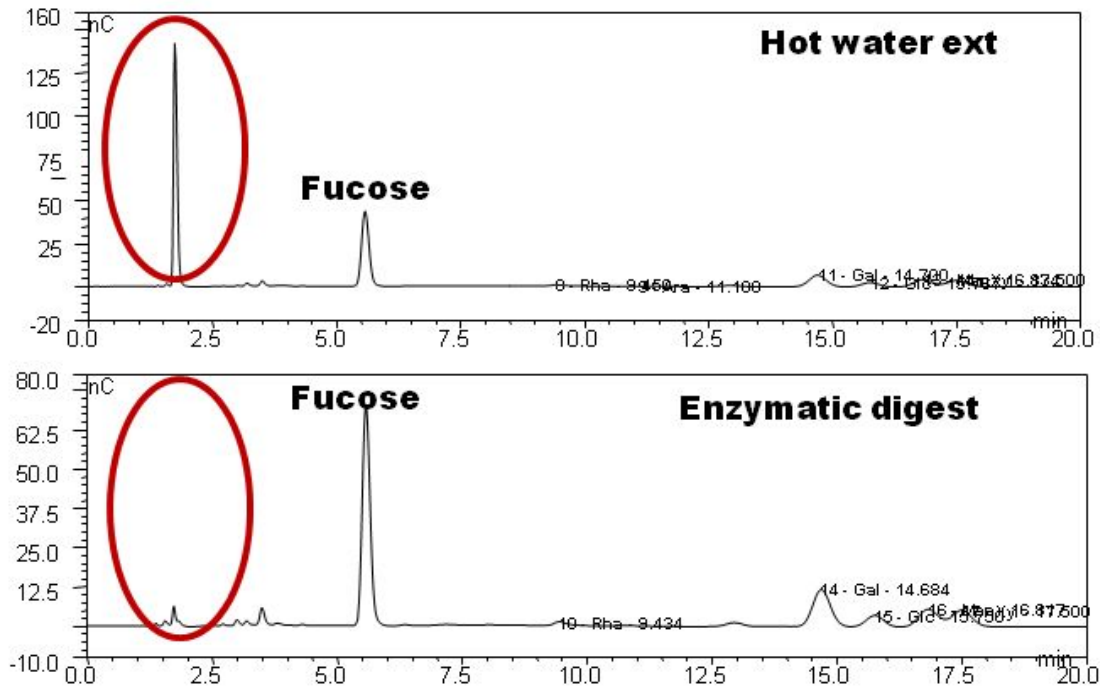


그림 3-1-2. 감태 가공부산물의 효소적 가수분해법과 열수추출법의 단당분석 크로마토그램

## 제 2 절 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 분리 및 특성규명

### 가. 실험방법

#### (1) 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 분리

감태 가공부산물로부터 효소적 가수분해법으로 제조된 수용성 추출물에 2~3배량의 에탄올을 첨가한 후 원심분리 (10,000 × g, 20 min)을 실시하였다. 원심분리 후 침전물만을 취하여 다시 증류수에 녹인 후 알긴산을 제거하기 위해 4 M CaCl<sub>2</sub>를 첨가하였다. 그 후 다시 원심분리를 통해 알긴산부분을 제거하고 얻어진 상층액을 투석막 (Mw, 10 kDa)을 이용하여 4℃에서 72시간 동안 투석한 후 동결건조 하였다. 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 분리를 위해 DEAE-cellulose을 이용하여 ion-exchange chromatography를 수행하였다. 동결건조된 sample을 DEAE-cellulose가 충전된 컬럼에 주입하고 50 mM sodium acetate (pH 5.0)으로 녹인 0.2 M NaCl과 1.2 M NaCl를 섞으면서 NaCl 농도가 순차적으로 짙어지게 하여 이동상으로 사용하였다. 이동상의 속도는 15 mL/hr로 하였으며 분리되어진 샘플들은 phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 방법을 이용하여 다당류를 측정하였다.

#### (2) 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 성분분석

감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 구성당 성분 분석은 단당류인 Fucose, Rhamnose, Galactose, Glucose, Xylose의 함량을 측정하였다. 분리된 황산 다당류를 4 M의 trifluoroacetic acid에 넣은 후 100℃에서 4시간 동안 산 가수 분해 시킨 후 진공 장치로 용매를 날린 후 증류수를 넣어 다시 진공장치로 증류수를 제거하는 과정을 2~3

회 반복하였다. 분석하는데 사용된 시스템은 HPAEC-PAD (Dionex, USA)이며 당 분석용 컬럼인 CarboPac PA1 (Dionex, USA)을 사용하였다. 이동상 용매로는 16 mM NaOH을 유속 1 mL/min으로 흘려주고 산 가수 분해된 샘플을 10  $\mu$ l을 넣어서 분석하였다. 당 성분은 분석에 이용된 당 표준물질의 머무름 시간과 상호 비교하여 분석하였다.

황산기 함량 분석은 BaCl<sub>2</sub>/gelation 방법을 이용하여 측정하였다. 4 M의 HCl을 가지고 100°C에서 2시간 동안 산 가수 분해 시킨 후 6.25% nitric acid 1 mL, 0.5% gum acacia를 포함하는 8.7 N의 아세트산 0.5 mL, Barium chloride 5 g과 10분간 상온에서 반응시켜 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 황산기 함량은 샘플의 흡광도 값을 표준물질인 ammonium sulfate를 이용하여 얻은 표준곡선에 대입하여 측정하였다.

### (3) 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 분자 특성 규명

분자량 (Mw)과 분자의 사이즈를 알 수 있는 radius of gyration (Rg) 값을 High-performance size-exclusion chromatography에 UV, multi-angle laser light scattering, refractive index detection이 장착된 HPSEC-UV-MALLS-RI system을 이용하여 측정하였으며 Mw와 Rg 값을 ASTRA 5.3 software (Wyatt Technology Corp)을 이용하여 계산하였다.

## 나. 실험결과

### (1) 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 특성

감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 특성을 규명하기 위해 DEAE-cellulose을 이용하여 ion-exchange chromatography를 수행한 결과 총 3개의 분획물을 얻을 수 있었다 (그림 3-3-1). 각각의 분획물의 화학적 성분을 분석한 결과 (표 4) 각각의 분획물별로 각기 다른 화학적 조성을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다. 3개의 분획물 모두 황산기와 fucose가 주된 구성성분으로 전형적인 황산화 다당류의 특성을 가지고 있었다. 탄수화물 함량의 경우 분획물 1 (F1: 57%), 분획물 2 (F2: 55%), 분획물 3 (F3: 47%) 순으로 나타났다. 황산기 함량의 경우 용출액의 염농도가 가장 높은 분획물 3 (F3: 39%)에서 가장 높은 함량을 나타내었으며 단백질 함량은 가장 낮은 9%로 나타났다. Fucose 함량의 경우 황산기 함량과 비슷하게 용출액의 염농도가 가장 높은 분획물 3 (F3: 77%)에서 가장 높은 함량을 나타내었으며 다음으로 분획물 2와 3은 53%와 59%로 비슷한 함량을 나타내었다. 기존의 보고에 의하면 갈조류 유래 황산 다당류를 DEAE-cellulose로 분획하므로 황산기와 fucose의 함량이 높은 분획물, 황산기와 fucose의 함량이 적은 분획물, 그리고 이들 중간 형태의 분획물로 분획 할 수 있다고 하였는데 본 결과에서도 이와 유사한 경향을 나타내었다.

감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 분자특성을 규명하기 위해 HPSEC-UV-MALLS-RI system을 이용하여 분자량 (Mw)과 분자의 사이즈를 알 수 있는 radius of gyration (Rg) 값을 측정한 결과 (표 5, 그림 3-3-2) F1은 하나의 peak로 하여 분자량을 측정하기 좀 어렵게 뚜렷하게 구분된 두 개의 peak을 가지는 물질로 구성



되어 있는 것으로 나타났다. Peak 1이 약 61%, peak 2가 39%로 구성되어 있으며 peak 1의 Mw은 359 kDa이며 peak 2는 peak 1보다 20배정도 작은 18 kDa로 측정 되었다. 분자의 사이즈를 알 수 있는 Rg 값은 두 peak가 27 nm정도로 유사하였다. 이는 두 peak 분자들의 분자량은 상당한 차이가 있지만 분자들의 사이즈는 매우 유사하다는 것을 의미한다. 그리하여 분자량과 사이즈의 관계에서 분자의 형태를 추정 할 수 있는데 peak 1분자는 다소 compact한 형태를 나타내는 반면, peak 2의 분자들은 peak 1분자들보다 약간 loose하고 linear한 형태를 취하고 있는 것으로 추정된다. F2는 F1과 마찬가지로 두 개의 서로 다른 분자량을 가지며 peak 1은 주 peak의 shoulder로 구성되어 약 18.1%의 비율로 존재하며 peak2가 주 peak로 약 81.9%로 구성되어 있다. Peak 1의 분자량은 179 kDa이며, peak 2의 분자량은 28 kDa로 측정되었다. Rg 값은 peak 1이 17.1 nm 였으며, 주 peak의 Rg는 4.5 nm로 측정되었다. F1의 peak 2와 비교 했을 때, F2의 주 peak는 상대적으로 compact한 형태를 취하고 있는 것으로 추정된다. F3은 F1과2와는 다르게 한 개의 단일 peak로 나타났으며, 단일 물질들로 구성된 것으로 보인다. 분자량은 88 kDa이었고 Rg값은 16.6 nm로 측정되었다.

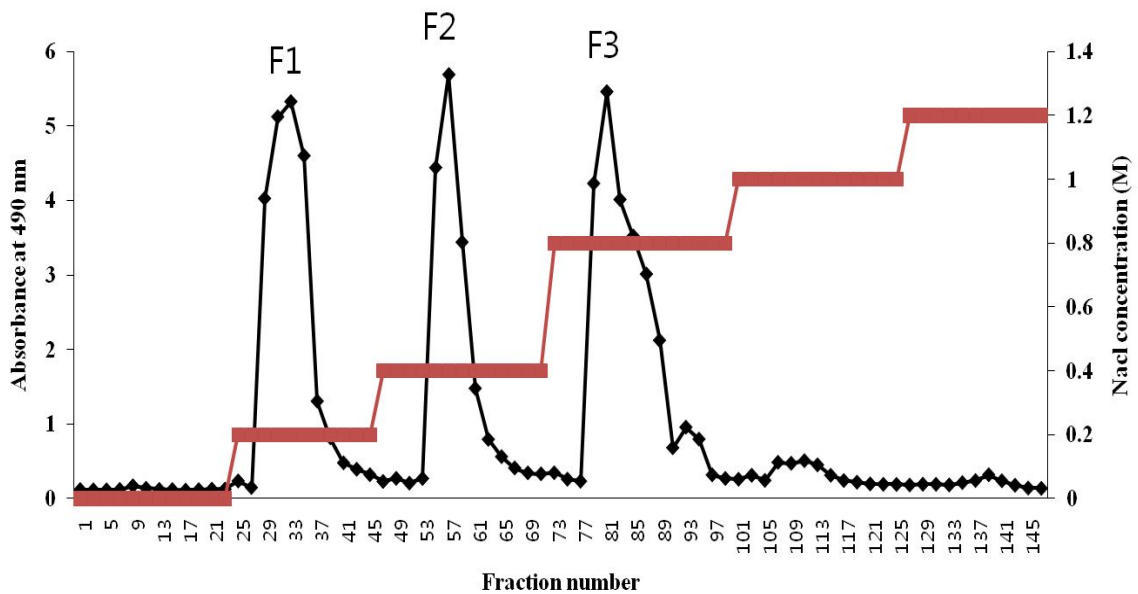


그림 3-2-1. 감태 가공부산물 유래 황산 다당류로부터 분리된 분획물의 크로마토그램

표 4. 감태 가공부산물 유래 황산 다당류로부터 분리된 분획물의 화학적 성분

Component	F1	F2	F3
Total carbohydrate (%)	57.1	55.7	47.1
Sulfate content (%)	20.0	16.5	39.1
Protein (%)	7.2	5.3	1.3
Proportion of monosaccharide (%)			
Fucose	53.1	59.7	77.9
Rhamnose	4.1	4.5	2.3
Galactose	32.8	30.9	10.1
Glucose	1.8	0.91	2.2
Xylose	8.2	4.0	7.5

표 5. 감태 가공부산물 유래 황산 다당류로부터 분리된 분획물의 분자량 (Mw)과 분자사이즈 (Rg)

Sample	Peak 1			Peak 2		
	Mw×10 <sup>3</sup> (g/mol)	Rg (nm)	Ratio (%)	Mw×10 <sup>3</sup> (g/mol)	Rg (nm)	Ratio (%)
F1	359.6±13.8	27.6±0.1	61.2±3.1	18.0±0.5	27.7±0.2	38.9±3.0
F2	178.7±2.2	17.1±0.9	18.1±0.2	27.7±1.1	4.5±0.1	81.9±0.2
F3	88.3±3.6	16.6±0.2				

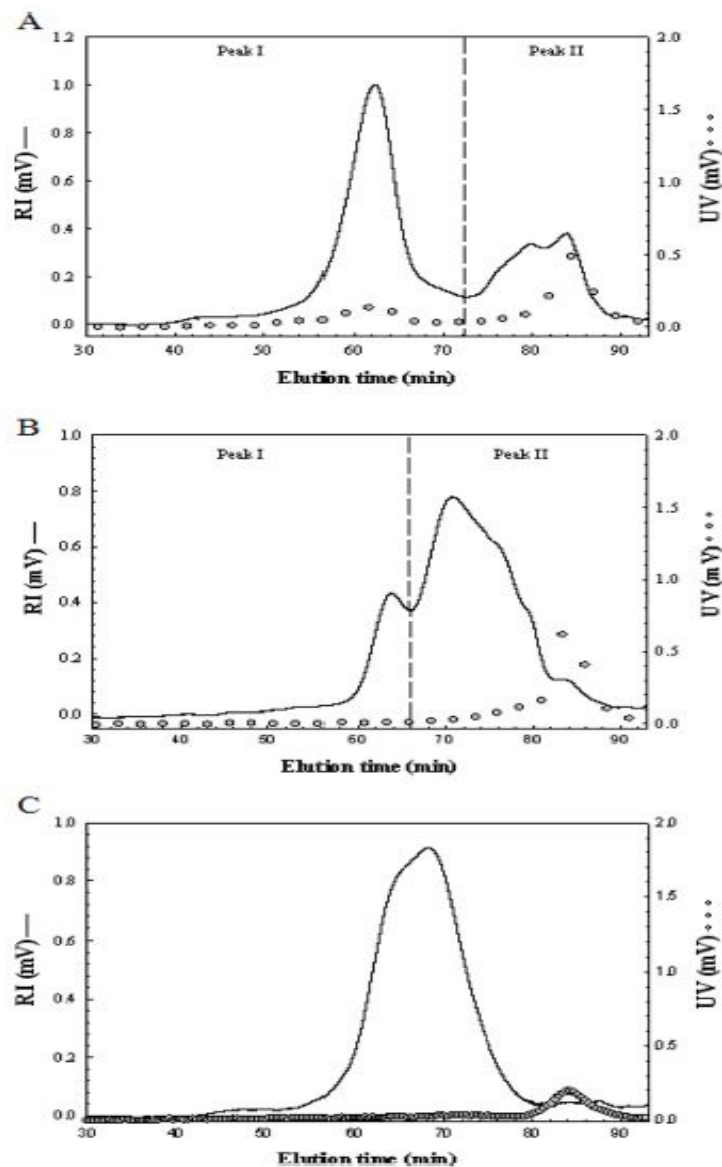


그림 3-2-2. 감태 가공부산물 유래 황산 다당류로부터 분리된 분획물의 크로마토그램  
A: F1, B: F2, C: F3

### 제 3 절 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 분리 및 대량생산을 위한 막분리 기술 적용

#### (1) 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 분자량별 분획물 제조

효소적 가수분해법에 의해 제조된 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 분자량별 분획물 제조는 한외여과막을 이용한 막분리기법을 통해 분자량별로 각각의 분획물로 각각 분리하였다 (그림3-3-1). 기존의 선행연구에서 생리활성을 갖는 감태 유래의 황산 다당류는 30 kDa 이상의 분획물에 주로 많이 함유되어 있고 감태 유래 황산 다당류의 주요 성분인 fucose와 황산기 또한 대부분 30 kDa 이상의 분획물에 포함되어 있는 것으로 나타났다. 따라서 30 kDa 이상의 분획물을 가지고 대량생산공정을 실시하였다.

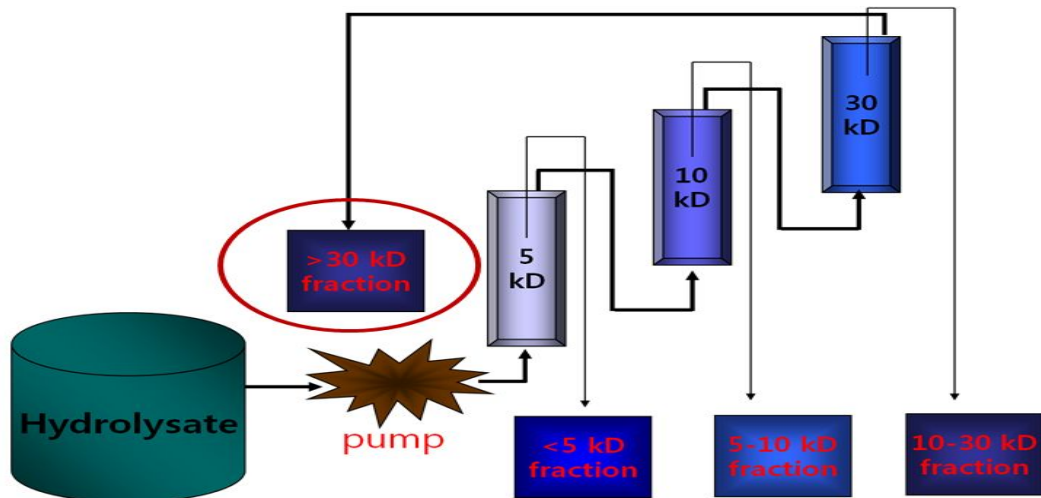


그림 3-3-1. 한외여과막을 이용한 분자량별 분획물 제조 모식도

#### (2) 대량생산공정구축

Pilot plant에서 30 kDa 분획물을 대량생산하기 위해 감태 가공부산물을 효소적 가수분해시킨 후 대량으로 수용성 추출물을 제조하였다. 이렇게 제조된 수용성 추출물을 산업용으로 이용할 수 있게 제작된 pilot plant 한외여과막 장치를 통해 30 kDa 이상의 분획물을 대량생산 할 수 있는 공정을 실시하였으나 황산 다당류의 점성으로 인해 한외여과막 장치로 대량생산이 어렵다는 결과를 얻을 수 있었다 (그림3-3-2).

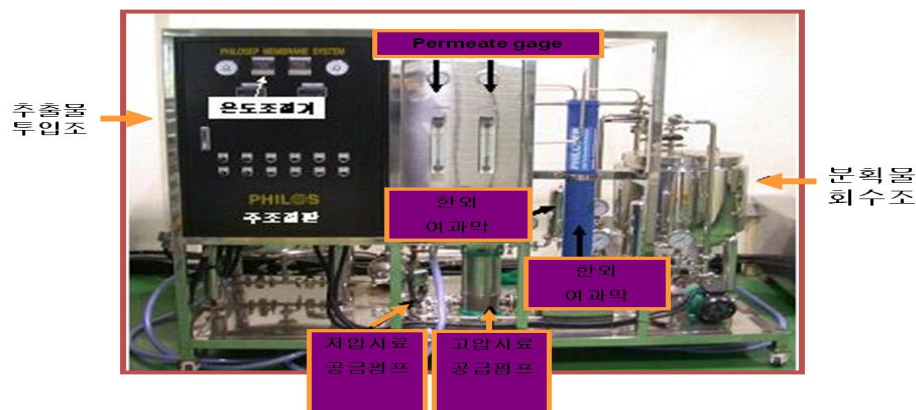


그림 3-3-2. 대량생산공정구축을 위한 pilot plant 한외여과막 장치

(1) 에탄올 침전법을 통한 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 대량 분리 및 성분분석

위에서 언급한 바와 같이 막분리 장치를 통해 대량생산이 어려워서 다른 대안으로 에탄올 침전법을 통한 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 대량 분리를 실시하였다 (그림 3-3-3). 그 결과 감태 가공부산물에서 황산 다당류를 대량으로 분리할 수 있었으며 화학적 성분을 측정된 결과 (표 3) 탄수화물 함량이 51%로 효소적 가수분해법에 의한 수용성 추출물과 비교하여 6% 증가하였고 황산기와 fucose 함량 또한 효소적 가수분해법에 의한 수용성 추출물보다 증가하여 20%와 61%로 각각 나타났다. 이러한 결과로 보아 감태 가공부산물에서 분리된 다당류는 높은 황산기와 fucose 함량을 나타내어 전형적인 갈조류에서 나타나는 황산화 다당류임을 확인할 수 있었다.

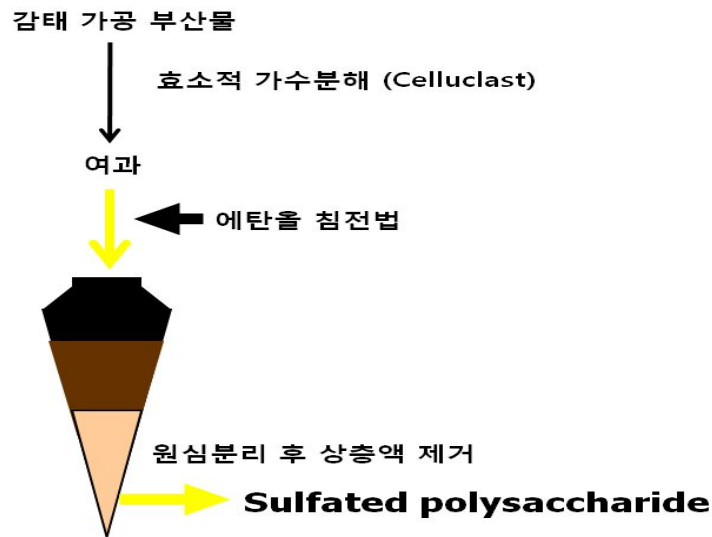


그림 3-3-3. 에탄올 침전법을 통한 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 대량 분리

표 3. 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 화학적 성분

Component	sulfate polysaccharide
Total carbohydrate (%)	51.8
Sulfate content (%)	20.1
Protein (%)	8.7
Proportion of monosaccharide (%)	
Fucose	61.1
Rhamnose	3.9
Galactose	27.2
Glucose	0.8
Xylose	7.0

## 제 4 절 대량생산시스템 구축을 통한 시제품 개발

### 가. 시제품 개발-국내산 감태 가공부산물 유래 방사선 방호능을 가진 면역증강제 (ECB-SP)

제주에 풍부하게 자생하고 있는 감태로부터 얻어진 가공부산물의 sulfated polysaccharide는 방사선 방호능을 가진 면역증강 천연 소재로서 가치를 확인하였다. 따라서 아쿠아그린텍(주)로부터 감태 가공부산물을 대량 확보하여 대량생산시스템 구축을 통해 방사선 방호능을 가진 면역증강제로 시제품을 개발하였다.

### 나. 대량생산시스템 구축 과정

1. 감태 가공부산물 대량 확보 후 동결건조
2. 감태 가공부산물로부터 Celluclast효소를 이용하여 효소적 가수분해법으로 대용량 추출기를 통해 수용성 추출물 제조
3. 제조된 수용성 추출물을 filter press를 이용하여 여과 후 농축
4. 주정 에탄올 침전법으로 sulfated polysaccharide의 대량 분리
5. 동결건조 및 분말화
6. 시제품 제작

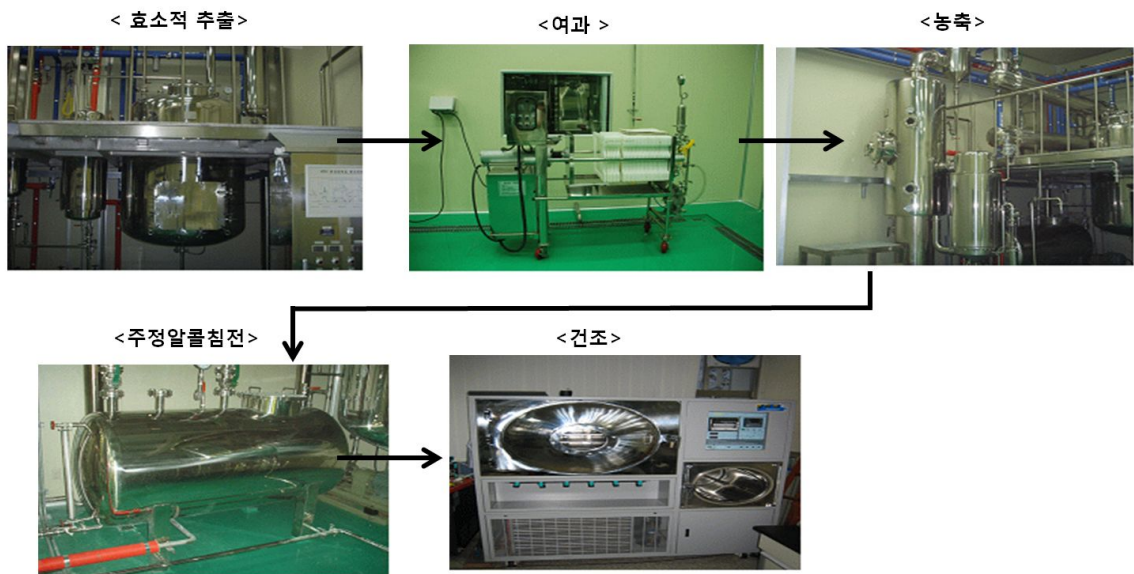


그림 3-4-1. 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 대량생산시스템 구축 과정

### 다. 결과

방사선 방호능을 가진 면역증강제로서 감태 가공부산물 유래 황산 다당류를 제작하기 위해 대량생산시스템 구축을 통해 sulfated polysaccharide (ECB-SP)의 시제품을 제작하였다. 제작된 시제품의 화학적 성분을 분석한 결과 lab scale에서 분리한 황산 다당류와 비슷한 fucose와 황산기 함량을 나타내어 대량생산 시스템을 성공적으로 구축하였다. 이러한 모든 결과를 종합해 볼 때 효소가수분해법에 의해 추출된 황산다당류는 국외에서

수입되는 fucoidan 보다 더 낮은 가격으로 시판이 가능하고, 유기용매나 화학약품에 의한 추출이 아닌 새로운 생물학적 기법인 효소적 가수분해법이 적용되어 보다 안전한 식품 소재의 제조라는 측면에서 소비자들이 원하는 “보다 더 안전하고 믿음이 가는 기능성 소재”로서의 가치를 가진다. 더 나아가 바이오산업이 점차 발전하고 있고, 그 가운데 기능성 천연 소재의 식품이 대세를 이루고 있는 사회적 문화 속에서 감태 가공부산물 유래 방사선 방호능을 가진 면역증강제는 산업적, 경제적, 사회적으로 무한한 가치를 가진다고 할 수 있다.



그림 3-4-2. 시제품 사진

## 제 5 절 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 동물실험을 통한 방사선 방호 효능평가

### 1. 황산다당류(by-product of *Ecklonia cava* Sulfated polysaccharide, ECB-SP)에 대한 면역세포에서의 독성 및 증식능 검증

#### 가. 실험목적

감태 가공부산물 유래 황산다당류(ECB-SP)가 독성 및 증식능을 가지는지 확인하기 위하여 마우스의 대표적인 면역세포인 비장세포에 ECB-SP를 처리하여 세포의 생존율과 증식능을 측정하였다.

#### 나. 실험방법

##### (1) 마우스 비장세포의 부유액 준비

6-10주령 ICR 마우스 (SLC, Japan)의 비장을 적출하여 세포 여과기를 통해 단일세포 부유액을 얻었다. 이렇게 얻은 세포는 ACK (ammonium chloride-potassium)용액과 함께 10분간 실온에서 배양하여 적혈구를 lysis시킨 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Gibco BRL, UK)로 세척하고, 10% 소태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL)과 1% 항생제 (100U/ml penicillin-streptomycin, Gibco BRL)가 포함된 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL)에 부유시켰다.

##### (2) MTT assay를 이용한 세포독성 측정

정상 마우스 비장세포의 생존율에 대한 ECB-SP의 효능을 관찰하기 위하여 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) assay를 수행하였다. 비장에서 얻은 세포를 96 well plate의 각 well에 10% FBS와 1% streptomycin과 penicillin이 포함되어 있는 RPMI 배지 100  $\mu$ l와 함께 well당  $1 \times 10^5$ 개로 분주하고 각 0, 75, 150, 300  $\mu$ g/ml의 농도로 ECB-SP를 첨가하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 포화습도가 있는 배양기에서 24시간 배양 후, 15  $\mu$ l의 MTT (5 mg/ml)을 각 well에 첨가하고 4시간 반응시켰다. 이후 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)와 50% dimethylformamide (DMSO)가 함유된 solubilization buffer 100  $\mu$ l를 첨가하여 570 nm와 630 nm에서 ELISA plate reader로 흡광도를 측정하였다.

##### (3) <sup>3</sup>H-thymidine incorporation법을 이용한 세포 증식능 검사

정상 마우스 비장세포의 증식에 대한 ECB-SP의 효능을 관찰하기 위하여 <sup>3</sup>H-thymidine incorporation assay를 수행하였다. 비장에서 얻은 세포를 96well plate의 각 well에 10% FBS와 1% streptomycin과 penicillin이 포함되어 있는 RPMI 배지 200  $\mu$ l에 well당  $4 \times 10^5$  개로 세포를 3배수로 분주하고 36.5°C, 5% CO<sub>2</sub>, 포화습도가 있는 incubator에서 24시간 배양 후, <sup>3</sup>H-thymidine (42 Ci/mmol; Amersham, USA)를 1 $\mu$ Ci/well를 첨가하여 배양하였다. 18시간 후에 유리섬유 여지에 포획하고 건조시킨 후 방사선 측정기 (TriLux, USA)를 이용하여 방사선 동위원소 양을 측정하였다.

##### (4) 통계처리

각 실험결과는 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었고 student *t*-test를 이용하였고 통계처

리한 후 \*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*;  $p < 0.005$  수준에서 유의성을 검정하였다.

#### 다. 실험결과

##### (1) 마우스 면역세포에서 ECB-SP의 세포독성 효과

마우스 면역세포에 대한 ECB-SP의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. 비장 세포의 생존율에 대한 ECB-SP의 효능을 확인한 결과, 아무것도 처리하지 않은 세포군에 비해 ECB-SP를 처리한 경우, 면역세포의 생존률이 증가하였다는 것을 확인하였다 (그림 3-4-1). 0, 75, 150, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 ECB-SP를 처리하여 24시간 배양 시 말초면역세포인 비장세포가 모든 농도에서 세포 독성을 보이지 않았으며 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하였다는 것을 확인할 수 있었다. (\*\*\*) $p < 0.005$ )

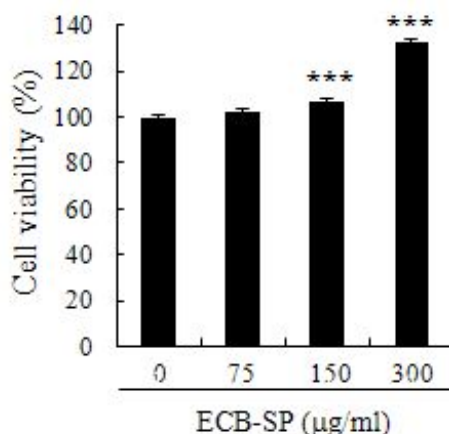


그림 3-4-1. 마우스 면역세포의 생존율에 대한 ECB-SP의 효과

##### (2) 마우스 면역세포에서 ECB-SP의 증식촉진 효과

일반적으로,  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation은 세포가 이러한 방사능동위원소를 얼마나 포함하느냐에 따라 그 세포의 성장여부를 판단할 수 있는 방법으로, DNA replication의 세포분열 S phase에서 A-T, G-C끼리 결합이 일어나 thymidine이 필요하게 되는데, 방사능을 띤  $^3\text{H}$ -thymidine을 넣어주게 되면 증식하는 세포들이 이것을 많이 포함하게 되는 원리를 이용한 것이다. 게다가, 면역세포의 증식에 의한 면역 세포수의 회복은 방사선 조사 후 회복에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기에, 먼저 정상 마우스의 말초면역세포의 증식능력에 미치는 영향을 확인하기 위하여 비장세포의 증식능을 검사하였다. 그림 3-4-2에서 보는 같이, 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해, 비장 세포의 증식이 유의적으로 증가했다는 것을 확인하였다. 특히, 75, 150, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 ECB-SP를 세포에 처리하여 배양하였을 때 말초 면역세포인 비장세포가 농도 의존적으로 유의성 있게 높은 세포 증식 활성을 보이는 것을 확인하였다. 이것으로부터, ECB-SP가 면역 세포에 대해 독성을 가지지 않으며 세포의 증식을 이끌었다는 것을 확인할 수 있었다. (\*\*\*) $p < 0.005$ )



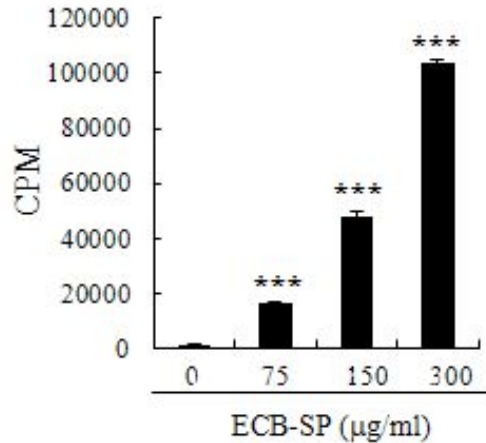


그림 3-4-2. 마우스 면역세포의 증식능에 대한 ECB-SP의 효과

## 2. 방사선 조사로 손상된 마우스 면역세포에 대한 ECB-SP의 효과

### 가. 실험목적

방사선을 조사하게 되면, 세포나 생체 내 존재하는 물 분자와 반응하게 되고, 이로 인해 발생하는 활성 산소들로 인해 세포의 DNA나 단백질 등의 변성과 손상을 초래하게 되면서, 세포의 생존과 증식이 감소하게 된다. 이번 연구에서는 방사선 조사가 감소시킨 면역세포인 비장 세포의 생존율과 증식률에 대한 ECB-SP의 효능을 검증하였다.

### 나. 실험방법

#### (1) 마우스 비장세포의 부유액 준비 및 $^{60}\text{Co}$ 감마선 조사

6-10주령 ICR 마우스 (SLC, Japan)의 비장을 적출하여 세포 여과기를 통해 단일세포 부유액을 얻었다. 이렇게 얻은 세포는 ACK (ammonium chloride-potassium) 용액과 함께 10분간 실온에서 배양하여 적혈구를 lysis시킨 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Gibco BRL, UK)로 세척하고, 10% 소태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL)과 1% 항생제 (100U/ml penicillin-streptomycin, Gibco BRL)가 포함된 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL)에 부유시켰다. 면역세포 기능의 억제를 위해 마우스 비장의 단일세포 부유액에 저선량의  $^{60}\text{Co}$  감마선 (Theratron-780 teletherapy unit, 방사선응용과학연구소, 제주대학교) 2Gy를 1회 조사하였다.

#### (2) MTT assay를 이용한 세포독성 측정

방사선이 조사된 비장 세포의 생존율에 대한 ECB-SP의 효능을 관찰하기 위하여 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) assay를 수행하였다. 비장에서 얻은 세포를 96 well plate의 각 well에 10% FBS와 1% streptomycin과 penicillin이 포함되어 있는 RPMI 배지 100 µl와 함께 well당  $1 \times 10^5$ 개로 분주하고 각 0, 75, 150, 300 µg/ml의 농도로 ECB-SP를 첨가하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 포화습도가 있는 배양기에서 24시간 배양 후, 15 µl의 MTT (5 mg/ml)을 각 well에 첨가하고 4시간 반응시켰다. 이후 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)와 50% dimethylformamide (DMSO)가 함유된 solubilization buffer 100 µl를 첨가하여 570 nm와 630 nm에서 ELISA plate reader로 흡광도를 측정하였다.

### (3) $^3\text{H}$ -thymidine incorporation법을 이용한 세포 증식능 검사

방사선이 조사된 비장 세포의 증식에 대한 ECB-SP의 효능을 관찰하기 위하여  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay를 수행하였다. 비장에서 얻은 세포를 96well plate의 각 well에 10% FBS와 1% streptomycin과 penicillin이 포함되어 있는 RPMI 배지 200  $\mu\text{l}$ 에 well당  $4 \times 10^5$  개로 세포를 3배수로 분주하고 36.5°C, 5%  $\text{CO}_2$ , 포화습도가 있는 incubator에서 24시간 배양 후,  $^3\text{H}$ -thymidine (42 Ci/mmol; Amersham, USA)를 1 $\mu\text{Ci}$ /well를 첨가하여 배양하였다. 18시간 후에 유리섬유 여지에 포획하고 건조시킨 후 방사선 측정기 (TriLux, USA)를 이용하여 방사선 동위원소 양을 측정하였다.

### (4) 통계처리

각 실험결과는 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었고 student *t*-test를 이용하였고 통계처리한 후  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검정하였다.

## 다. 실험결과

### (1) 방사선 조사가 감소시킨 마우스 면역세포의 생존율에 대한 ECB-SP의 효과

앞의 결과에서 면역 세포의 증식을 이끌었던 ECB-SP가 방사선 조사에 의해 감소된 비장 세포의 생존율을 증가시킬 수 있는지를 확인하기 위해, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) assay를 수행하였다. 그림 3-4-3에서 제시된 것처럼, 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 방사선을 조사한 세포의 생존율이 감소하였다는 것을 확인하였다. ECB-SP를 처리하였을 때, 방사선 조사에 의해 감소된 세포의 생존율이 약 120%까지 상당히 증가했다는 것을 확인하였다. (b;  $P < 0.05$ )

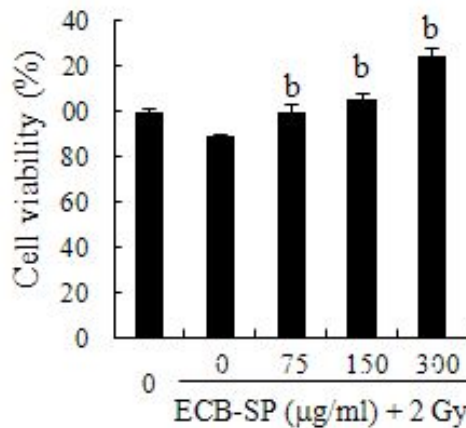


그림 3-4-3. 방사선 조사가 감소시킨 마우스 면역세포의 생존율에 대한 ECB-SP의 효과

### (2) 방사선 조사가 감소시킨 마우스 면역세포의 증식률에 대한 ECB-SP의 효과

ECB-SP가 방사선 조사로 감소된 마우스의 생존율을 증가시킬 뿐만 아니라 증식능에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여,  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay를 수행하였다. 그림 3-4-4에서처럼 방사선 조사에 의해 감소된 비장 세포의 증식이 75, 150, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 ECB-SP를 세포에 처리하여 배양하였을 때 말초면역세포인 비장 세포가 농도 의존적으로 유의성 있게 높은 세포 증식 활성을 보이는 것을 확인하였다. 이것으로부터

ECB-SP가 방사선 조사가 감소시킨 비장 세포의 생존률 뿐만 아니라 세포의 증식능을 향상시킴으로서 방사선 방호 효과를 이끈다는 것을 알 수 있었다. (b; P<0.05)

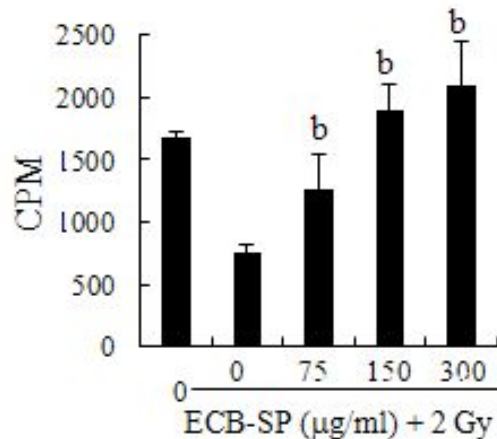


그림 3-4-4. 방사선 조사가 감소시킨 마우스 면역세포의 생존율에 대한 ECB-SP의 효과

### 3. 방사선을 조사한 마우스의 혈액 성상에 대한 ECB-SP의 효능 평가

#### 가. 실험목적

방사선을 조사하게 되면, 혈액을 생성하는 골수 내 조혈세포의 손상으로 인하여 말초 혈액 내 혈구의 수적 감소가 일어나 면역력 감소, 빈혈 등의 여러 가지 부작용으로 나타나게 된다. 본 연구에서는, 방사선 조사에 의해 변화된 혈액 성상에 대한 ECB-SP의 영향을 관찰하였다.

#### 나. 실험방법

##### (1) 동물 처치

본 실험에 이용된 동물은 바이오제노믹스에서 구입한 15주령, 24-30g의 C57BL/6 마우스 (Jackson사, USA)를 사용하였다. 사육 조건은 온도  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , 습도  $50\% \pm 5\%$ 를 맞추어 주었으며, 마우스 전용사료와 음수를 자유급식 하였다. ECB-SP를 생리식염수에 대해서는 방사선 조사 12시간 전과 2시간 전에 10 mg/kg를 각각 경구 투여하고, 방사선 조사 대조군은 동량의 PBS를 투여하였다.

##### (2) 방사선 조사

실험에 공시된 mouse는 perspex box ( $3 \times 3 \times 11$  cm)에 넣어  $^{60}\text{Co}$  감마선 (Theratron-780 teletherapy unit, 방사선응용과학연구소, 제주대학교)을 7 Gy를 마우스 전신에 조사하였다.

##### (3) 혈액 분석

실험군은 각 군당 3 마리씩 정상 대조군과 방사선 조사 대조군, ECB-SP 병행 투여군으로 구분하였다. 준치사량인 7 Gy의 방사선을 조사한 후 1, 10일에 각 실험군의 마우스를 희생시켜 혈액을 얻었다. 얻은 혈액을 가지고, 혈액분석기를 이용하여 혈액 성분 변화 (WBC (white blood cells)와 PLT (platelet), MCV (mean corpuscular volume), MCH

(mean corpuscular hemoglobin), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration))를 확인하였다.

#### 다. 실험결과

##### (1) 방사선 조사 후 1일째 마우스 혈액성상 변화에 대한 ECB-SP의 효과

일반적으로, 방사선을 조사하게 되면 조혈기능의 감소로 인하여 혈액 내 혈구세포의 수적 감소가 일어나게 된다. 본 이번 연구에서는 방사선 조사로 인한 혈액 성분변화에 대해 ECB-SP가 영향을 미치는지 확인하였다. 그 결과 ECB-SP를 처리한 경우, WBC, MCV, MCH, MCHC치에 대해서는 별다른 차이를 보이지 않았다. 한편 PLT는 ECB-SP에 의해 유의적인 차이를 보이지 않았지만 다소 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(그림 3-4-5). 이상에서 방사선 조사 1일째에는 혈액성상에서는 별다른 영향을 미치지 못하는 것을 알 수 있었다.

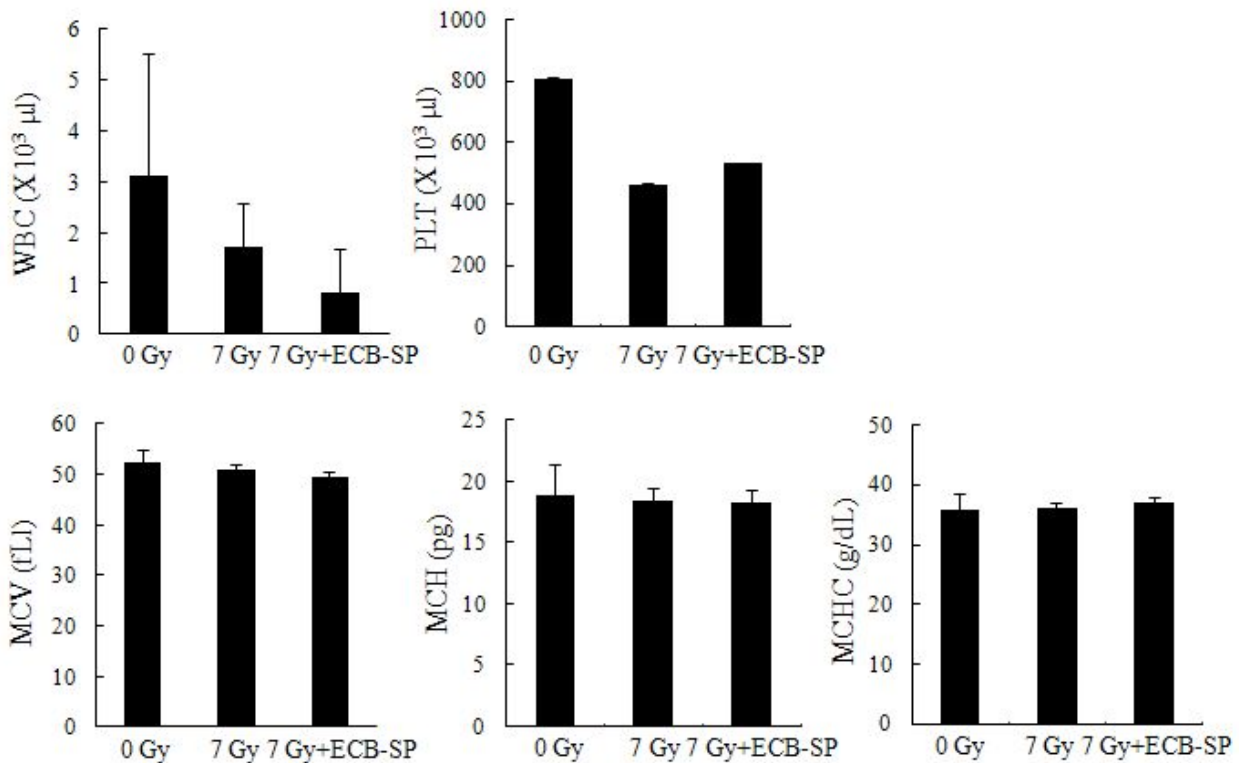


그림 3-4-5. 방사선 조사된 후 1일째 마우스의 혈액 성상에 대한 ECB-SP의 효과

##### (2) 방사선 조사 후 10일째 마우스 혈액성상 변화에 대한 ECB-SP의 효과

한편, 방사선을 조사한 후 10일째, 혈액 성상에 대한 ECB-SP의 효능을 확인한 결과, WBC, MCV치에는 별다른 변화가 나타나지 않았다. 그러나, MCH, MCHC치는 유의적 차이를 보이지는 않았지만 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다. 또한 흥미롭게도 ECB-SP의 처리는 방사선 조사 후 1일째와 유사하게 PLT의 수를 다소 증가시키는 경향을 보였다(그림 3-4-6).

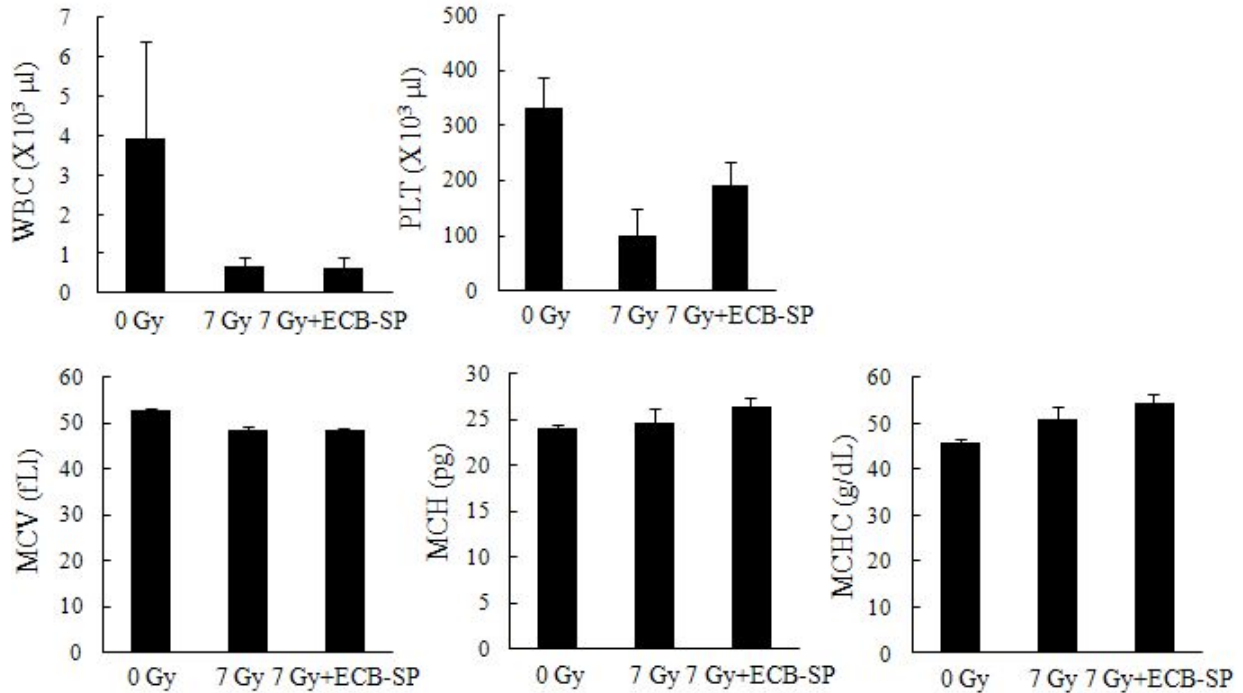


그림 3-4-6. 방사선 조사된 후 10일 째 마우스의 혈액 성상에 대한 ECB-SP의 효과

#### 4. 방사선을 조사한 마우스에서 ECB-SP의 면역조혈 재생에 관한 방사선 방호 효능 평가

##### 가. 실험목적

조혈 조직은 인체의 많은 조직 중 방사선 감수성이 높은 조직이다. 핵사고를 인한 대선량이 인체에 피폭되거나 방사선 물질이 대량으로 체내에 섭취되면 골수는 황폐해지고 조혈 능력을 잃는다. 특히 골단 연골부위의 골수 감수성이 높아 위축성 변화가 초래되며 골수의 형태학적 변화로는 출혈, 적아구 파괴등과 같은 현상을 보인다. 전구증상으로는 오심, 구토, 설사 이후에 무증상의 잠복기가 생기고, 잠복기 동안에 골수 내 골수모세포가 죽기 때문에 이미 생성된 혈구의 수명이 끝나면 더 이상의 혈구 생산이 되지 않기 때문에 말초 혈액에 적혈구, 백혈구 및 혈소판 수의 감소가 관찰된다. 임상적으로는 피로감, 피하출혈, 점막궤양, 탈모 등이 수반되며 출혈, 빈혈 및 감염으로 사망하게 된다. 이를 조혈계 증후군 (hematopoietic syndrome) 이라고 하며, 따라서 방사선 생체 손상의 방호 및 회복을 위해서는 일차적인 조직의 방호뿐만 아니라 이차적인 면역조혈계의 회복촉진이 더욱 중요하다. 본 연구에서는 방사선 감수성이 높은 조혈모세포의 방호 및 재생능에 대하여 ECB-SP가 가지는 효능을 검증하였다.

##### 나. 실험방법

###### (1) 동물 처치와 방사선 조사

본 실험에 이용된 동물은 바이오제노믹스에서 구입한 15주령, 24-30g의 C57BL/6 마우스 (Jackson사, USA)를 사용하였다. 사육 조건은 온도 23 ± 3°C, 습도 50% ± 5%를 맞추어 주었으며, 마우스 전용사료와 음수를 자유급식 하였다. ECB-SP를 생리식염수에 대해서는 방사선 조사 12시간 전과 2시간 전에 10 mg/kg를 각각 경구 투여하고, 방사선

조사 대조군은 동량의 PBS를 투여하였다. 실험에 공시된 mouse는 perspex box (3 × 3 × 11 cm)에 넣어 <sup>60</sup>Co 감마선(Theratron-780 teletherapy unit, 방사선응용과학연구소, 제주대학교)을 7 Gy를 마우스 전신에 조사하였다.

## (2) 비장의 회복과 조혈 촉진능력 평가

실험군은 정상대조군과 방사선 조사 대조군과 ECB-SP 병행 투여군으로 구분하였고, 방사선 조사 후 10일 째에 마우스 각각의 체중과 비장의 무게를 재서 체중에 대한 비장 무게의 비율(SW/BW)을 구하고, 비장표면에 형성된 조혈 집락을 육안으로 관찰하여 그 수를 세었다.

## (3) 마우스 비장 세포 및 골수 세포에 대한 ECB-SP의 세포 증식 효과 평가

C57BL/6 마우스 (Female, 3 마리)에 ECB-SP를 적정농도 (10 mg/kg)로 방사선 조사 전 12시간과 2시간 전에 투여하고, 방사선 (7 Gy)을 조사하였다. 방사선이 조사된 마우스 면역세포의 회복증진효과 측정을 위해 비장세포 증식능력 검사를 실시하였다. 실험군은 각 군당 마우스를 3마리로 정상 대조군과 방사선조사 대조군과 ECB-SP 병행 투여군으로 구분하였고 방사선 조사 후 1, 10일에 얻은 비장에서 얻은 세포를 96 well plate의 각 well에 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% streptomycin과 penicillin이 포함되어 있는 RPMI 배지 200  $\mu$ l에 well당  $4 \times 10^5$  개로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 포화습도가 있는 incubator에서 72시간 배양 후, <sup>3</sup>H-thymidine (42 Ci/mmol; Amersham, USA)를 1  $\mu$  Ci/well를 첨가하여 배양하였다. 18시간 후에 유리섬유 여지에 포획하고 건조시킨 후 방사선 측정기 (TriLux, USA)를 이용하여 방사선 동위원소 양을 측정하였다.

또 다른 세포 증식 측정법으로 CCK-8 assay를 시행하였다. 방사선 조사 후 10일에 얻은 골수세포를 96 well plate의 각 well에 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% streptomycin과 penicillin이 포함되어 있는 RPMI 배지 100  $\mu$ l에 well당  $1 \times 10^5$  개로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 포화습도가 있는 incubator에서 72시간 배양 후, CCK-8 solution(Dojindo, Japan)을 10  $\mu$ l 첨가하여 3시간 동안 배양하였다. 그 후 450 nm에서 ELISA plate reader로 흡광도를 측정하였다.

## (4) 증식된 비장세포에 대한 ECB-SP의 표현형 타입에 미치는 영향 평가 (Flow cytometry)

C57BL/6 마우스 (Female, 3 마리)에 ECB-SP를 적정농도 (10 mg/kg)로 방사선 조사 전 12시간과 2시간 전에 투여하고, 방사선 (7 Gy)을 조사하였다. 방사선이 조사된 마우스 면역세포를 면역학적으로 분류하기 위해 flow cytometry를 수행하였다. 실험군은 각 군당 3 마리 마우스를 정상 대조군과 방사선조사 대조군과 ECB-SP 병행 투여군으로 구분하였고, 방사선 조사 후 1, 10일에 얻은 비장에서 얻은 면역 세포 ( $1 \times 10^6$ )를 anti-mouse IgG와 함께 4°C에서 15분간 반응시켰다. 그 다음 helper T lymphocytes 마커인 CD4와 cytolytic-FITC, T lymphocytes의 마커인 CD8a-PE, pan B lymphocytes 마커인 CD45RB220-FITC, monocytes 마커인 CD11b-FITC, 및 granulocyte 마커인 Gr-1-PE 형광 항체를 각각 4°C에서 15분간 반응시킨 후, DPBS로 세척하였다. 그 후 1% paraformaldehyde로 세포를 고정한 후, 각 마우스마다 20,000개의 세포를 가지고 BD

FACSCalibur™ 와 CellQuest 소프트웨어를 이용하여 세포의 표현형을 분석하였다.

(5) 방사선을 조사한 마우스 골수에서 감소된 골수 세포 수에 대한 ECB-SP의 효과 검사  
실험군은 각 군당 3 마리씩 정상 대조군과 방사선 조사 대조군, ECB-SP 병행 투여군으로 구분하였고 방사선 조사로 억제된 조혈기능에 대한 ECB-SP의 효능을 알아보기 위해 준치사량인 7 Gy의 방사선을 조사한 후 1, 10일에 각 실험군의 마우스를 희생시켜 대퇴골을 얻고 대퇴골의 양 끝단을 자른 후 골수세포를 1% Fetal bovine serum (FBS)이 들어있는 PBS로 씻어 낸다. 10% FBS가 들어있는 RPMI 배지에 부유시킨 후 trypan Blue 염색을 하여 살아있는 골수세포의 수를 측정하였다.

(6) 조혈세포의 수용체인 c-kit의 발현양에 대한 ECB-SP의 효과 검사

실험군은 각 군당 3 마리씩 정상 대조군과 방사선 조사 대조군, ECB-SP 병행 투여군으로 구분하였고 방사선 조사로 억제된 조혈기능에 대한 ECB-SP의 효능을 알아보기 위해 준치사량인 7 Gy의 방사선을 조사한 후 1, 10일에 각 실험군의 마우스를 희생시켜 대퇴골을 얻고 대퇴골의 양 끝단을 자른 후 골수세포를 1% Fetal bovine serum (FBS)이 들어있는 PBS로 씻어 낸다. 10% FBS가 들어있는 RPMI 배지에 부유시켜 실험에 사용하였다. 조혈세포의 수용체인 c-kit의 발현양에 대한 감태 유래 후코이단의 효능을 확인하기 위해, Flow cytometry를 수행하였다. 비장에서 얻은 세포( $1 \times 10^6$ )를 anti-mouse IgG를 4°C, 15분 처리한 다음 c-kit-FITC 형광항체와 4°C, 15분 반응시킨 후 DPBS로 씻었다. 그 후 각 마우스마다 10,000 세포를 BD FACSCalibur™ 을 이용하여 분석하였다.

(7) 통계처리

각 실험결과는 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었고 student *t*-test를 이용하였고 통계처리한 후 \*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*;  $p < 0.005$  수준에서 유의성을 검정하였다.

## 다. 실험결과

(1) ECB-SP에 의한 비장의 조혈 촉진 능력 평가

일반적으로, 방사선이 조사된 생체에서 말초 혈액 및 림프기관 내의 면역 세포수가 급격히 감소되며, 그렇게 감소된 면역세포의 재생성으로 인해 골수내의 조혈모세포가 말초 림프기관으로 이동하여 증식한다고 알려져 있다. 이때 비장 내에서는 조혈모세포의 증식에 의한 집락이 형성되는데, 이것으로 인해 방사선 조사 후 비장에서 형성된 집락의 수는 조혈모세포의 방호 및 재생성 능력의 지표로 사용되고 있다. 이번 실험에서 ECB-SP가 내재성 비장집락 형성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 실험군은 정상대조군과 방사선 조사 대조군과 ECB-SP 병행 투여군으로 구분하였고, ECB-SP를 10 mg/kg 용량으로 방사선 조사 전 12시간과 2시간 전에 투여하였다. 방사선 조사 10일 후 비장을 채취하여 표면에 형성된 조혈 집락을 시각적으로 관찰하여 그 수를 센 결과는 그림 3-4-7에 제시되었다. 0 Gy의 정상 대조군에서는 이러한 비장 집락을 관찰할 수 없었으나, 방사선 조사 대조군의 비장에서 형성된 집락의 수는  $1.7 \pm 0.3$ 개를 보였다. 그리고 ECB-SP 병행 투여군은  $4.0 \pm 1.2$ 개로 방사선 조사 대조군보다 유의성 있게 증가하였다 ( $p < 0.062$ ). 이러한 결과로부터 ECB-SP의 투여는 조혈계의 보호 및 회복을 촉진시킴으로

써, 방사선 조사 후 생체에서 10-15일에 유도되는 급성조혈계 증후군을 예방하는 데 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

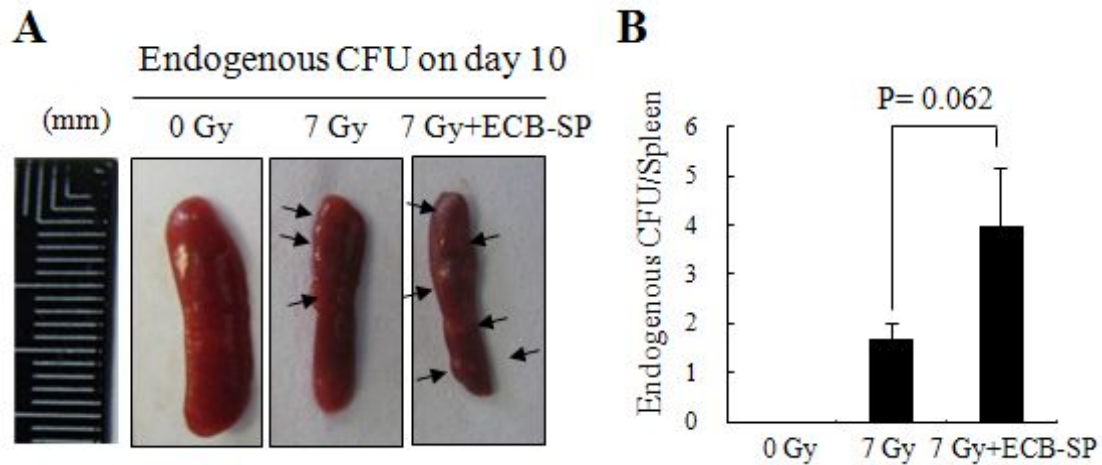


그림 3-4-7. 방사선 조사 후 10일째, ECB-SP가 마우스의 내재성 비장 집락 형성에 미치는 영향. A: 정상대조군, 방사선 조사 대조군과 ECB-SP (10 mg/kg) 병행 투여군의 비장 사진, B: ECB-SP가 투여 시 나타나는 비장집락 수를 나타낸 그래프 (means ± SEM).

## (2) 방사선을 조사한 마우스 비장 세포에 대한 ECB-SP의 세포 증식 효과 평가 ( $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay)

방사선 조사 후 생체에서는 방사선에 민감한 면역세포 및 조혈세포수가 크게 감소되며, 면역세포의 재생성에 의한 면역세포수의 회복은 방사선 조사 후 회복에 중요한 역할을 한다. 방사선이 생체에 조사되었을 때, 말초 면역 기관으로 알려진 비장 내 존재하는 면역 세포들의 증식에 ECB-SP가 미치는 영향을 확인하기 위해,  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation 방법을 수행하였다. 그림 3-4-8에서 보는 바와 같이, 방사선 (7 Gy) 조사 1일째, 마우스로부터 얻어진 마우스 비장 유래 면역세포는 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군에 비해 방사선 조사군의 증식이 감소되었으나, ECB-SP를 병행 처리한 경우, 비장 세포의 증식이 유의성 있게 증가되었다는 것을 확인하였다 (\*\*\*) $p < 0.005$ ). 또한 방사선 조사 10일째에도 ECB-SP 병행 처리군에서 방사선 조사 대조군에 비해 증식이 유의성 있게 증가되었음을 확인하였다. 따라서 ECB-SP가 방사선 조사에 의해 억제된 면역 세포의 증식을 자극시킴으로써, 방호 효과를 유도한다는 것을 알 수 있었다.



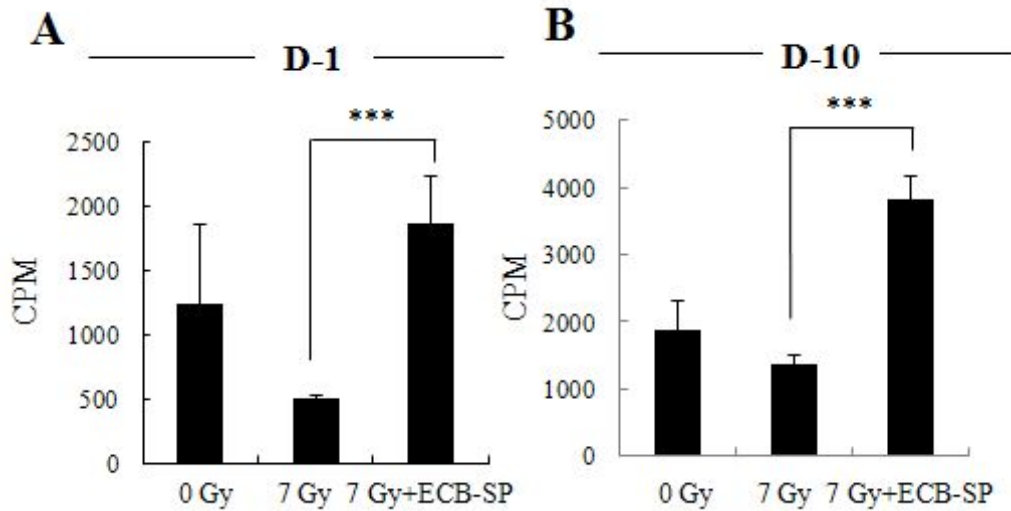


그림 3-4-8. 방사선 조사된 마우스의 비장 세포 증식에 대한 ECB-SP의 효능 (means  $\pm$  SE, \*\*\* $p < 0.005$ ).

### (3) 증식된 비장세포의 표현형 검사

이렇게 증식된 비장세포를 면역학적으로 분류하기 위해 flow cytometry를 통해 분류, 확인하였다. 실험군은 각각 정상 대조군과 방사선조사 대조군과 ECB-SP 병행 투여군으로 구분하였고 방사선 조사 후 10일에 얻은 비장에서 얻은 세포 (20000/mouse) 세포를 BD FACSCalibur™ 을 이용하여 세포의 표현형을 분석하였다. 방사선 조사 10일 째 (그림 3-4-9), ECB-SP의 병행 처리군은 방사선 (7 Gy) 조사군에 비해 helper T lymphocytes의 집단 %를 다소 증가시켰으나, 유의적 차이를 보이지 않았으며, 다른 cytolytic T lymphocytes와 pan B lymphocytes의에 대해서는 별다른 영향을 미치지 못했다. 그러나 monocyte와 granulocytes 집단 %에 대해서 약간의 증가 경향을 보였다. 방사선 조사 후 10일 째 비장 내 세포는 방사선으로 인해 손상된 면역세포들의 기능 및 수적 감소를 회복하기 위해 골수모세포가 성장, 분화하여 말초면역세포의 population 변화에 영향을 받는 것으로 생각된다. 이것으로 미루어 보아 준치사량의 선량인 7 Gy의 방사선 조사 후 10일 째에는 말초면역세포 중 특히 helper T lymphocytes, monocytes, granulocytes의 population을 증가시키는 것으로 보아 골수모세포의 말초면역세포로의 분화에까지 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 따라서 ECB-SP는 방사선 조사 시 면역세포의 특정 집단의 회복 및 성장을 촉진함으로써 방사선에 의해 손상 받은 면역계의 보호를 할 수 있을 것으로 생각된다.

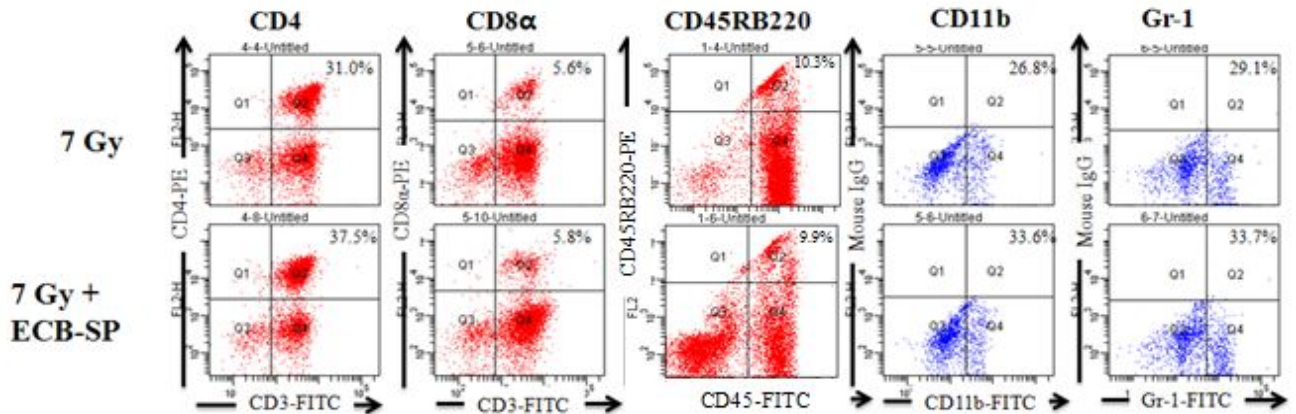


그림 3-4-9. ECB-SP가 미치는 방사선이 조사 후 10일째 마우스의 비장 세포 내 면역세포 집단에 미치는 영향

**(4) 방사선을 조사한 마우스 골수에서 감소된 골수 세포 수에 대한 ECB-SP의 효과 평가**

골수의 조혈세포는 방사선에 예민하기 때문에 방사선이 조사된 생체에서는 위축성 변화가 초래되며 골수의 형태학적 변화로는 출혈, 적아구 파괴등과 같은 현상을 보인다. 전구증상으로는 오심, 구토, 설사 이후에 무증상의 잠복기가 생기고, 잠복기 동안에 골수 내 골수모세포가 죽기 때문에 이미 생성된 혈구의 수명이 끝나면 더 이상의 혈구 생산이 되지 않기 때문에 말초 혈액에 적혈구, 백혈구 및 혈소판 수의 감소가 관찰된다. 임상적으로는 피로감, 피하 출혈, 점막궤양, 탈모 등이 수반되며 출혈, 빈혈 및 감염으로 사망하게 된다. 이를 조혈계증후군 (hematopoietic syndrome) 이라고 하며, 이런 이유로, 방사선 생체 손상의 방호 및 회복을 위해, 면역조혈계의 회복촉진을 확인하는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다.

따라서, 본 실험에서 ECB-SP가 방사선 조사 후 1일과 10일에 골수를 채취하여 골수세포의 수를 측정하였다. 그림 3-4-10A에 제시된 것처럼, 방사선 조사 1 일째, 방사선 조사가 정상 마우스의 골수세포 수를  $10.3 \pm 1.7 (\times 10^6)$  개에서  $4.2 \pm 0.4 (\times 10^6)$ 로 감소시켰으며 ECB-SP의 병행 처리는  $3.0 \pm 0.7 (\times 10^6)$ 개의 세포수를 보여 별다른 효능을 보이지 않았다. 그러나 방사선 조사 10일째, 방사선 조사 대조군의 마우스는 정상 마우스에서의  $11.60 \pm 0.36 (\times 10^6)$ 개 세포 수에 비하여  $0.13 \pm 0.02 (\times 10^6)$ 개의 세포수를 나타낸 반면 ECB-SP를 투여한 경우 각각  $1.10 \pm 0.57 (\times 10^6)$ 개의 골수 세포로서 방사선 조사 대조군에 비해 유의성 있게 증가된 경향을 보였다 (그림 3-4-10B, \* $p < 0.05$ ). 방사선 조사 후 1일째에는 ECB-SP로 인한 골수세포의 수적 변화가 없었던 반면, 10일째에 ECB-SP에 의한 골수세포의 유의적 증가는 방사선 조사로 인해 손상된 골수세포의 회복과 증식 기간을 고려해 보았을 때 ECB-SP가 방사선 조사로 인한 손상된 골수세포의 회복과 증식을 촉진시킨다는 것을 알 수 있다.

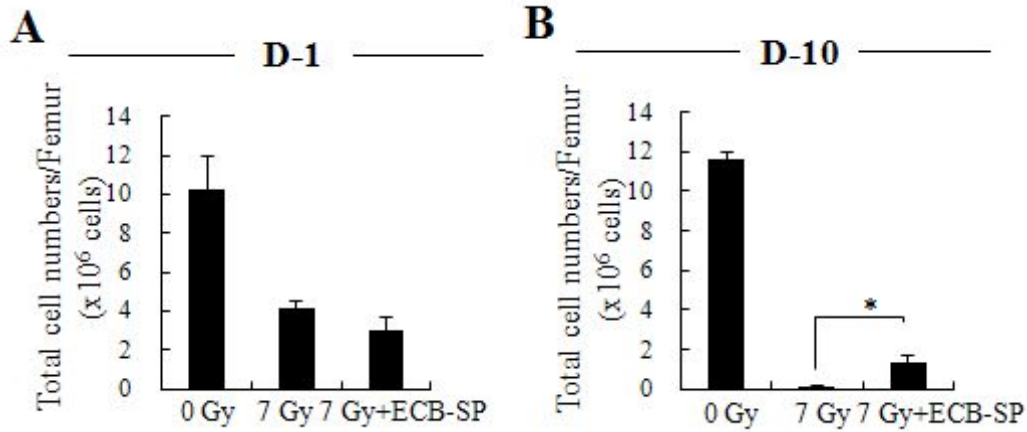


그림 3-4-10. 방사선 조사된 마우스의 골수 세포 수에 대한 ECB-SP의 효능 (means  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ ).

#### (5) 방사선을 조사한 마우스 골수에서 감소된 골수 세포 증식에 대한 ECB-SP의 효과 평가

ECB-SP가 방사선 조사 후 1일과 10일에 마우스 골수세포 증식에 미치는 효능을 확인하였다. 방사선 조사 후 1일째, 절취한 골수에서 얻은 골수 세포의 증식능 시험에서 방사선 조사 대조군이  $563 \pm 91$  cpm으로 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군의  $7283 \pm 288$  cpm에 비해 상당히 감소되었다는 것을 확인하였다 (그림 3-4-11A). 그에 반해, ECB-SP 병행 투여군은  $946 \pm 294$  cpm으로 방사선 대조군에 비해 다소 증가하였으나 유의적 차이는 없다는 것을 확인하였다. 또한, 방사선 조사 후, 10일 째 절취한 골수에서 얻은 골수 세포의 CCK-8 assay를 통한 증식능 시험에서는 방사선 조사로 인해  $69.1 \pm 1.2$  %로 감소된 골수세포의 증식능이 ECB-SP 병행 투여군에서  $86.5 \pm 3.1$  %로 유의성 있게 증가함을 확인하였다(그림 3-4-11B). 이 결과로부터, ECB-SP가 방사선 조사에 의해 감소된 골수 세포의 수와 증식을 향상시켜 방사선 방호효과를 가지는 것을 알 수 있다.

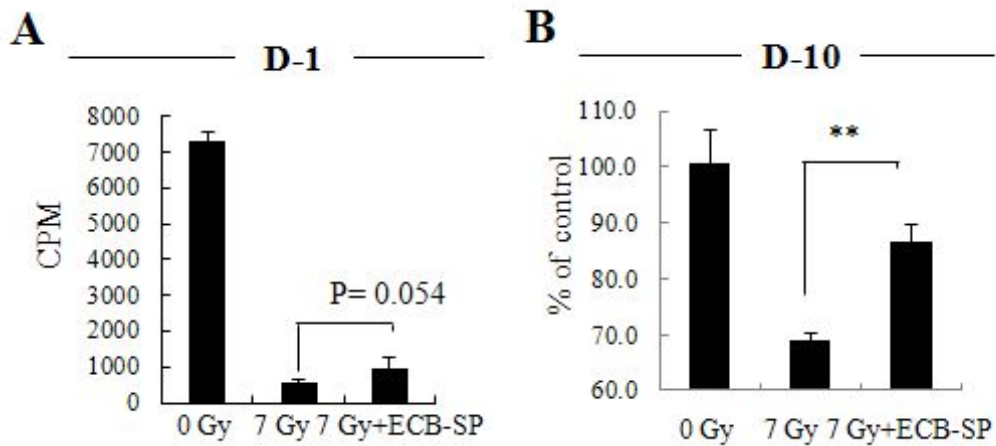


그림 3-4-11. 방사선 조사된 마우스의 골수 세포 증식에 대한 ECB-SP의 효능 (means  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ )

(6) 방사선을 조사한 마우스 골수에서 감소된 조혈세포의 수용체인 c-kit의 발현양에 대한 ECB-SP의 효과 평가

방사선 조사 후 1일째, 조혈세포에 특징적으로 있는 c-kit 수용체를 발현하는 세포의 양을 살펴본 결과, 방사선 조사에 의해 감소된 c-kit 수용체를 발현하는 세포의 수에 대해 ECB-SP가 별다른 효능을 보이진 않았다 (data not shown). 그러나 방사선 조사 후 10일째, 조혈세포에 특징적으로 있는 c-kit 수용체를 발현하는 세포의 수를 살펴본 결과, 정상 대조군은 c-kit 수용체를 발현하는 세포의 수가  $17.1 \pm 3.2\%$ 였으나, 방사선 조사 대조군은  $9.2 \pm 0.6\%$ 를 나타내어 방사선 조사가 c-kit 수용체의 발현을 상당히 감소시켰다는 것을 알 수 있었다 (그림 3-4-12). 그러나 ECB-SP를 투여한 마우스 군에서는  $31.3 \pm 4.0\%$ 으로 ckit 수용체를 발현하는 세포가 유의성 있게 증가하였다는 것을 알 수 있었다. 따라서 ECB-SP 투여를 통한 조혈세포의 receptor를 가진 세포의 증가는 곧 조혈세포의 증가를 의미하고, 이는 ECB-SP이 골수내의 조혈작용을 촉진하는 것을 의미한다. 이 결과는 방사선 조사에 의해 감소된 골수세포에서 ECB-SP의 투여가 방사선 조사 후, 1일째에는 골수세포의 수나 증식, c-kit발현에 대해 미비한 효능을 보였으나, 10일째에는 조혈 세포의 수와 증식, c-kit의 발현을 증가시켜 잠재적으로 조혈계의 보호 및 회복을 촉진시켜 동물에서 방사선 조사 후 10-15일에 생기는 급성 조혈계 증후군을 막을 수 있는 능력을 가지고 있는 것으로 확인하였다. (\* $p < 0.05$ )

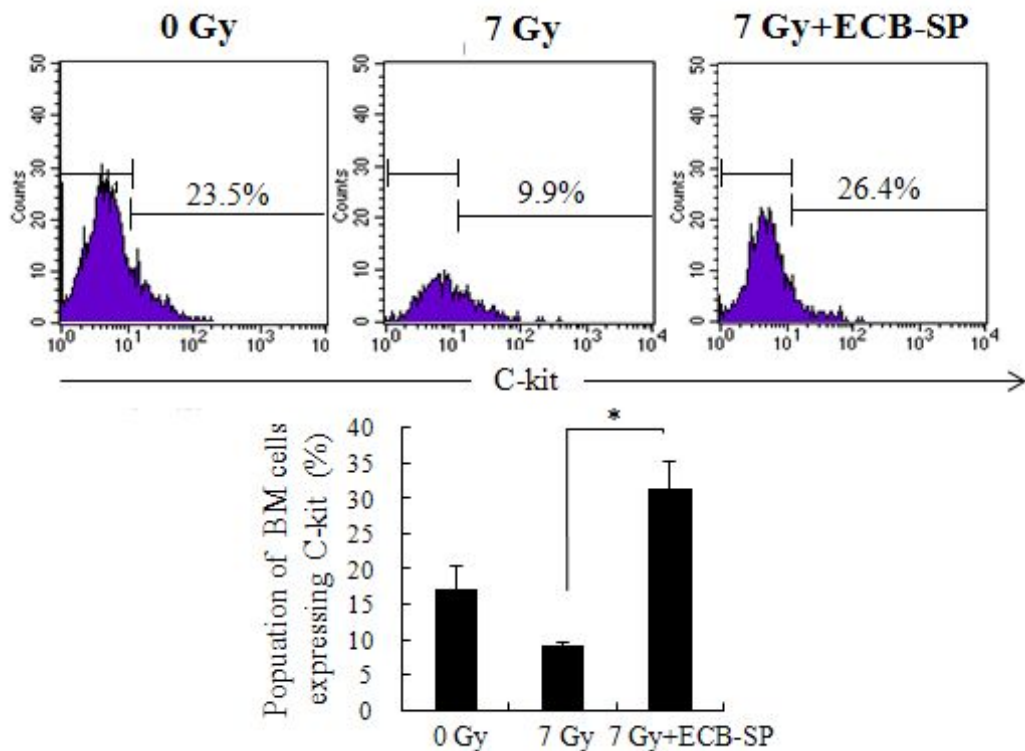


그림 3-4-12. 방사선 조사된 마우스의 c-kit을 발현하는 골수 세포에 대한 ECB-SP의 효능 (means  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ ).

5. 방사선을 조사한 마우스에서 ECB-SP의 소장 줄기세포 재생에 관한 방사선 방호 효능 평가

가. 실험목적

소장염은 방사선에 민감한 재생 조직으로서, 전신피폭 시 위장관계 상피세포들의 손상에 의해 사망에 이르는 위장관계증후군을 일으키기도 한다. 위장관계증후군은 방사선 피폭 수일 후에서 시작되어 초기증상은 배멀미와 유사하고 식욕상실과 무기력하고 의기소침 상태에 이어 구역질과 구토증이 특징적으로 나타난다. 이들 증상은 곧 사라졌다가 1-2일이 지나면 다시 위장관 증상이 급격히 나타나서 장폐색증을 비롯 권태감, 식욕부진, 구역질, 구토, 높은 열, 반복되는 설사와 혈변, 복부팽창 등의 증상을 나타낸다. 말기에는 심한 탈수와 혈액농축, 순환성 쇼크가 일어나고 손수상태에 이어서 죽음에 이르게 된다. 위장관계증후군의 주요 요인은 장, 특히 선와에서의 세포 수 감소나 세포가 선와로부터 용모의 끝부분으로 이행하는 속도가 저하되고, 소장점막 상피세포가 탈락하기 때문이다. 정상적인 위장관의 상피는 조혈계처럼 세포재생이 빠른 조직으로 음와부에는 형태학적으로 분화도가 낮은 줄기세포가 있으며 그곳에서 분열하여 최후의 세포분열을 끝낸 세포는 상피세포로 분화하여 용모부의 장 상피조직에 들어가고 상피세포로서 영양을 흡수하는 기능을 수행한다. 반면 방사선에 노출되면 소장염은 장해를 받아서 세포분열능력이 상실되든가 분열지연을 일으킨다. 또한 용모상피세포는 정상으로 이행하나, 용모상피세포가 음와에서 보급되지 않기 때문에 부분적 혹은 전체적으로 상피세포는 없어지고 엷은 피막으로 된다. 결과적으로 체액은 붕괴도니 장상피로부터 장 내강으로 유출되고 심한 혈변이나 설사가 일어나므로 체내에서 곧 탈수증상을 일으켜 개체는 사망하게 된다. 따라서 소장염은 방사선에 의한 산화적 생체손상을 측정하는 대표적인 지표로 이용되어지고 있으며, 방사선에 대한 생체방호에 있어서 소장염 등의 소화기관 재생조직 손상의 억제 및 회복이 중요한 요건의 하나로 받아들여지고 있다. 따라서 이번 연구에서는 방사선 조사 시 유도되는 소장염 수와 세포자멸사(apoptosis)에 대하여 ECB-SP가 가지는 효능을 검증하고 그 기전을 연구하였다.

## 나. 실험방법

### (1) 동물 처치와 방사선 조사

본 실험에 이용된 동물은 바이오제노믹스사에서 구입한 15주령, 24-30g의 C57BL/6 마우스 (Jackson사, USA)를 사용하였다. 사육 조건은 온도  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 습도  $50\% \pm 5\%$ 를 맞추어 주었으며, 마우스 전용사료와 음수를 자유급식 하였다. ECB-SP를 생리식염수에 대해서는 방사선 조사 12시간 전과 2시간 전에 10 mg/kg를 각각 경구 투여하고, 방사선 조사 대조군은 동량의 PBS를 투여하였다. 실험에 공시된 mouse는 perspex box ( $3 \times 3 \times 11$  cm)에 넣어  $^{60}\text{Co}$  감마선(Theratron-780 teletherapy unit, 방사선응용과학연구소, 제주대학교)을 2 또는 7 Gy를 마우스 전신에 조사하였다.

### (2) 소장에서의 소장염 재생 시험

방사선을 마우스의 전신 조사에 의한 소장염 생존에 ECB-SP이 미치는 영향을 알아보기 위해, 실험군은 각 군당 3마리씩 정상 대조군과 방사선 조사 대조군, ECB-SP 병행 투여군(10 mg/kg)으로 구분하였고, 방사선조사 후 1, 10일에 소장을 채취하고 20% 중성 포르말린에 1일 이상 고정시킨 뒤 각 마우스 당 5-6개의 소장편을 통상적인 방법에 따라 조직검사 처리과정을 거쳐 파라핀 포매를 한 후 5 $\mu\text{m}$  두께의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 하였다. 가로절편된 소장표본의 가장자리에 위치하는 소장염

의 수를 광학현미경으로 관찰하여 그 수를 세었다. 각각의 실험은 3회 이상 반복 실시하였다.

### (3) 소장에서의 apoptotic fragment 빈도 검사법

실험군은 C57BL/6 마우스를 정상 대조군과 방사선 조사 대조군, ECB-SP 병행 투여군으로 구분하였고, 방사선 조사 후 1, 10일에 소장을 채취하여 20% 중성포르말린에 1일 이상 고정시킨 뒤 각 마우스 당 5-6개의 소장편을 통상적인 방법에 따라 조직검사 처리 과정을 거쳤다. 이후 파라핀 포매를 한 후 5 $\mu$ m 두께의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 한 뒤, 염색 상에서 핵염색질과 세포질의 농축 및 산호성 세포질의 특성을 나타내는 apoptotic fragments를 광학현미경으로 관찰하였다.

### (4) 소장에서의 apoptosis 관련 단백질 발현 양상 확인

실험군은 C57BL/6 마우스를 정상 대조군과 방사선 조사 대조군, ECB-SP 병행 투여군으로 구분하였고, 방사선 조사 후 1일 째에 소장을 채취하여 20% 중성포르말린에 1일 이상 고정시킨 뒤 각 마우스 당 5-6개의 소장편을 통상적인 방법에 따라 조직검사 처리 과정을 거쳤다. 이후 파라핀 포매를 한 후 5 $\mu$ m 두께의 절편을 만들어 탈파라핀화 및 합수시킨 후, 0.3% 과산화수소에서 20분간 침적하여 내인성 과산화효소를 제거하고, 비특이적 면역반응을 방지하기 위해 blocking goat serum을 30분간 반응시켰다. 이후 1차 항체로서 P53 (1:500; Calbiochem), Bcl-X<sub>L/S</sub> (1:500; Santa Cruz Biotechnology), Bax (1:50; Santa Cruz Biotechnology)을 사용하여 1시간 실온에서 반응시켰다. 이후 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector, Birlingham, CA)로 실온에서 45분 동안 반응시킨 후, Avidin-Biotin Complex(ABC) reagents(Vector Laboratories, Birlingham, CA)로 45분간 실온에서 반응시켰다. 면역 반응이 끝난 조직은 3, 3'-diaminobenzidine(DAB; Vector, Birlingham, CA) 용액에서 발색시키고 양성반응을 나타낸 조직을 헤마톡실린(hematoxylin)(Sigma-Aldrich) 용액으로 대조염색했다. 염색이 끝난 파라핀 슬라이드는 에탄올(ethanol)과 크실렌(xylene)으로 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

### (5) 통계처리

각 실험결과는 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었고 student *t*-test를 이용하였고 통계처리한 후 \*\*:p<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다.

## 다. 실험결과

### (1) ECB-SP의 소장염 재생에 대한 효과

방사선 조사 후 1일 째, 정상대조군의 소장단면에서의 소장염 수는 평균 72.0  $\pm$  1.5개로 방사선 단독 조사군에서는 56.3  $\pm$  2.9개로 약간 감소하였다. 그리고 ECB-SP을 병행 투여한 마우스의 평균 소장염 수는 64.5  $\pm$  1.0개로 방사선 조사 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 방사선 조사 후 10일 째 역시 방사선 조사 대조군의

평균 소장염 수는  $49.0 \pm 4.7$ 개에 비하여 ECB-SP 병행 투여군의 소장염은  $71.8 \pm 4.0$ 개로 유의적으로 그 수가 증가하였다(그림 3-4-13,  $**P < 0.01$ ). 따라서 방사선 조사로 인한 소화기관의 손상의 억제 및 회복의 지표로 사용되는 소장염의 수적 증가로 보아 ECB-SP가 방사선에 의한 중요 부작용 중 하나인 위장관계증후군에 효과적으로 작용할 것이라고 예상된다.

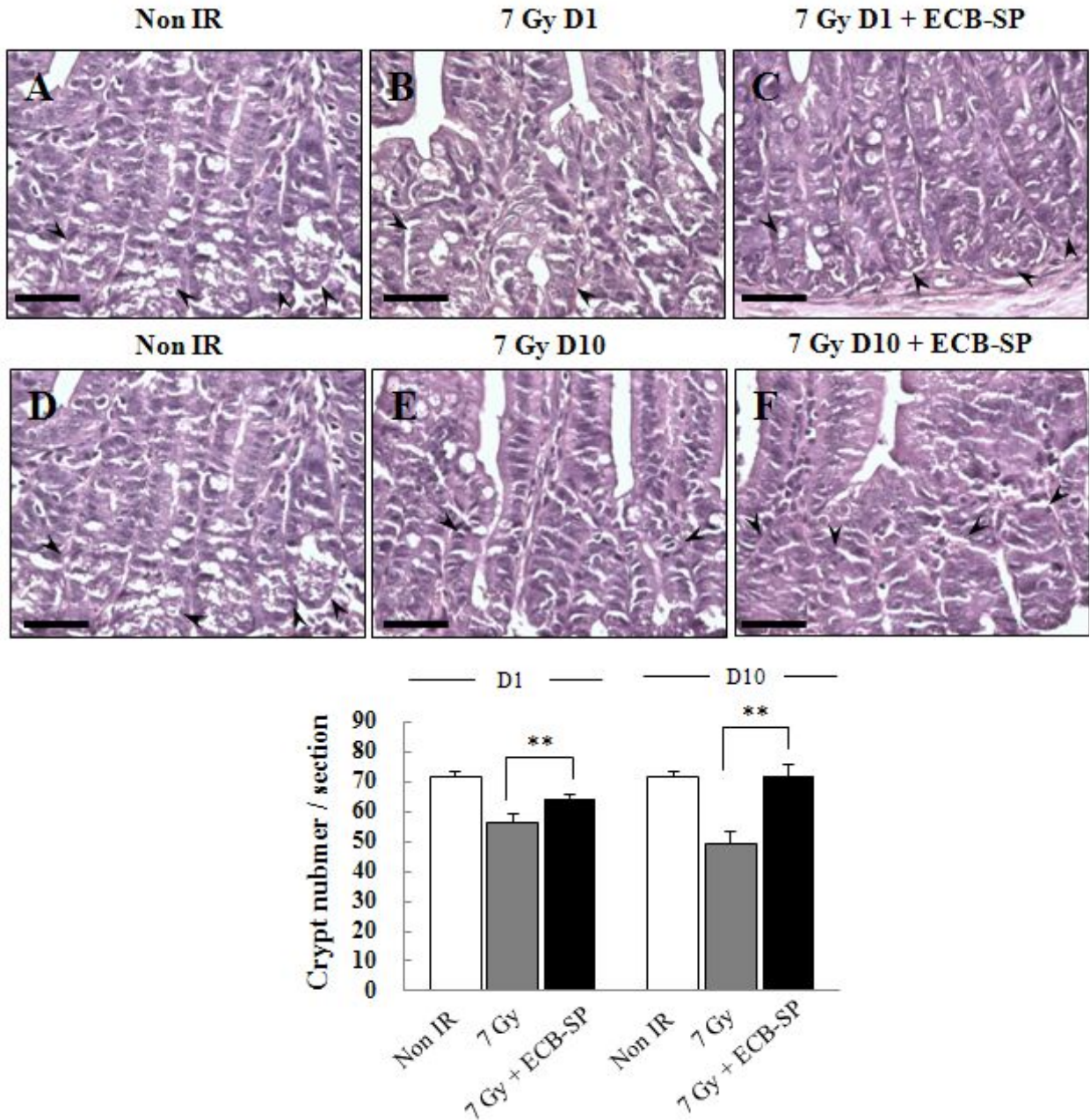


그림 3-4-13. 방사선 조사된 마우스의 소장염에 ECB-SP가 미치는 영향 평가 (means  $\pm$  SE,  $**p < 0.01$ ).

## (2) ECB-SP의 소장염 apoptosis 억제능 평가

소장염은 방사선에 민감한 재생 조직으로서, 방사선에 의한 산화적 생체손상을 측

정하는 대표적인 지표로 이용되어지고 있으며, 방사선에 대한 생체방호에 있어서 소장암 등의 소화기관 재생조직 손상의 억제 및 회복이 중요한 요건의 하나로 받아들여지고 있다. Apoptosis는 괴사와 구별이 되며 형태학적으로 세포벽의 공포화, 세포질과 핵의 농축 및 apoptotic body가 관찰된다. 방사선 조사 후 1, 10일에 얻은 소장에서 apoptotic cell은 소장의 기저부에 주로 형성되었으며, H&E 염색상에서 핵염색질과 세포질의 농축 및 세포성 분질의 특성을 나타내었다. 반면 ECB-SP 병행 투여군의 소장에서 각 소장의 apoptotic fragments의 수는 방사선 조사 대조군에서의 수에 비해 감소하여 소장의 apoptosis 억제 효과를 나타내었다(그림 3-4-14). 이로써 ECB-SP는 소장에서 재생력이 있는 stem cell에 해당하는 소장암 세포의 apoptosis를 억제시켜 방사선 장해에 대한 방호 효과를 나타낼 수 있었다. 이는 방사선에 의한 장 장해나 괴사 후 7-10에 생기는 위장관계증후군에 효과를 나타낼 것으로 생각되고 apoptosis와 관련된 질병의 예방과 치료에 적용할 수 있을 것으로 보인다.

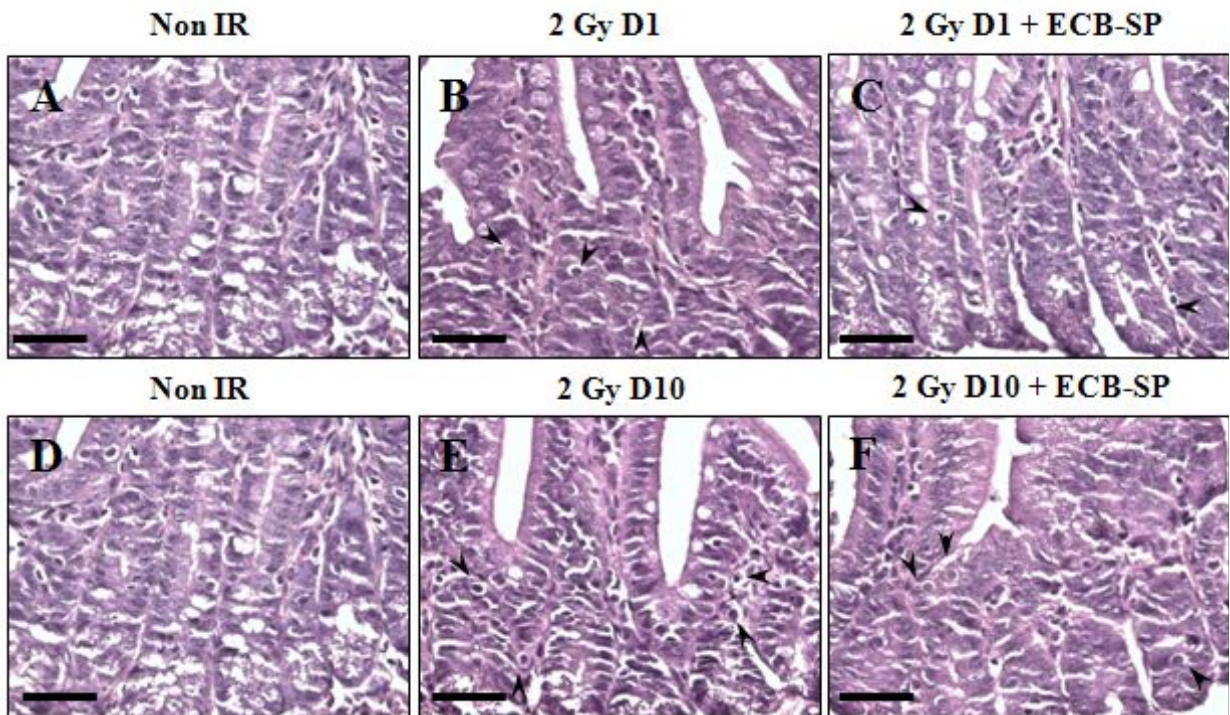


그림 3-4-14. ECB-SP가 방사선 조사된 마우스의 소장의 apoptosis에 미치는 영향 평가

### (3) ECB-SP의 소장암의 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향 평가

ECB-SP 투여 시 소장의 crypt cell의 apoptosis 빈도가 줄어드는 것의 메카니즘 연구로 apoptosis 관련 단백질 (p53, Bax, Bcl-X<sub>L/S</sub>)의 발현양을 확인하기 위하여 면역조직화학염색(immunohistochemistry)을 실행하였다. 실험군은 C57BL/6 마우스를 정상 대조군과 방사선 조사 대조군, ECB-SP 병행 투여군으로 구분하였고, 방사선 조사 후 1일 째에 소장을 채취하였다. 방사선 조사는 p53과 Bax 같은 apoptosis 유도 단백질의 발현양을 증가시키는 반면, Bcl-X<sub>L/S</sub>같은 apoptosis 억제 단백질의 발현양을 정상대조군



에 비해 감소시켰다 (그림 3-4-15, 16, 17). 그러나 ECB-SP은 방사선에 의해 감소된 Bcl-X<sub>L/S</sub> 발현양을 증가시킴과 동시에 증가된 p53과 Bax 발현양을 억제시켰다. 이런 p53과 Bax의 발현 감소와 Bcl-X<sub>L/S</sub> 발현 유도 그리고 그 상관관계(상대적 비율)는 apoptosis과 DNA 회복에 주요 인자로, 앞의 결과를 볼 때, ECB-SP의 방사선에 대한 소장의 방어 메카니즘은 이런 apoptosis 관련 단백질의 발현을 조절함으로써 이루어지는 것으로 보인다. 소장염 세포의 apoptosis를 억제하는 방사선에 의한 장 장애나 피폭 후 7-10에 생기는 위장관계증후군에 효과를 나타내어 마우스의 생존율을 증가시키는 것으로 보인다. 뿐만 아니라 이러한 ECB-SP의 효과는 apoptosis와 관련된 질병의 예방과 치료에 적용할 수 있을 것으로 보인다.

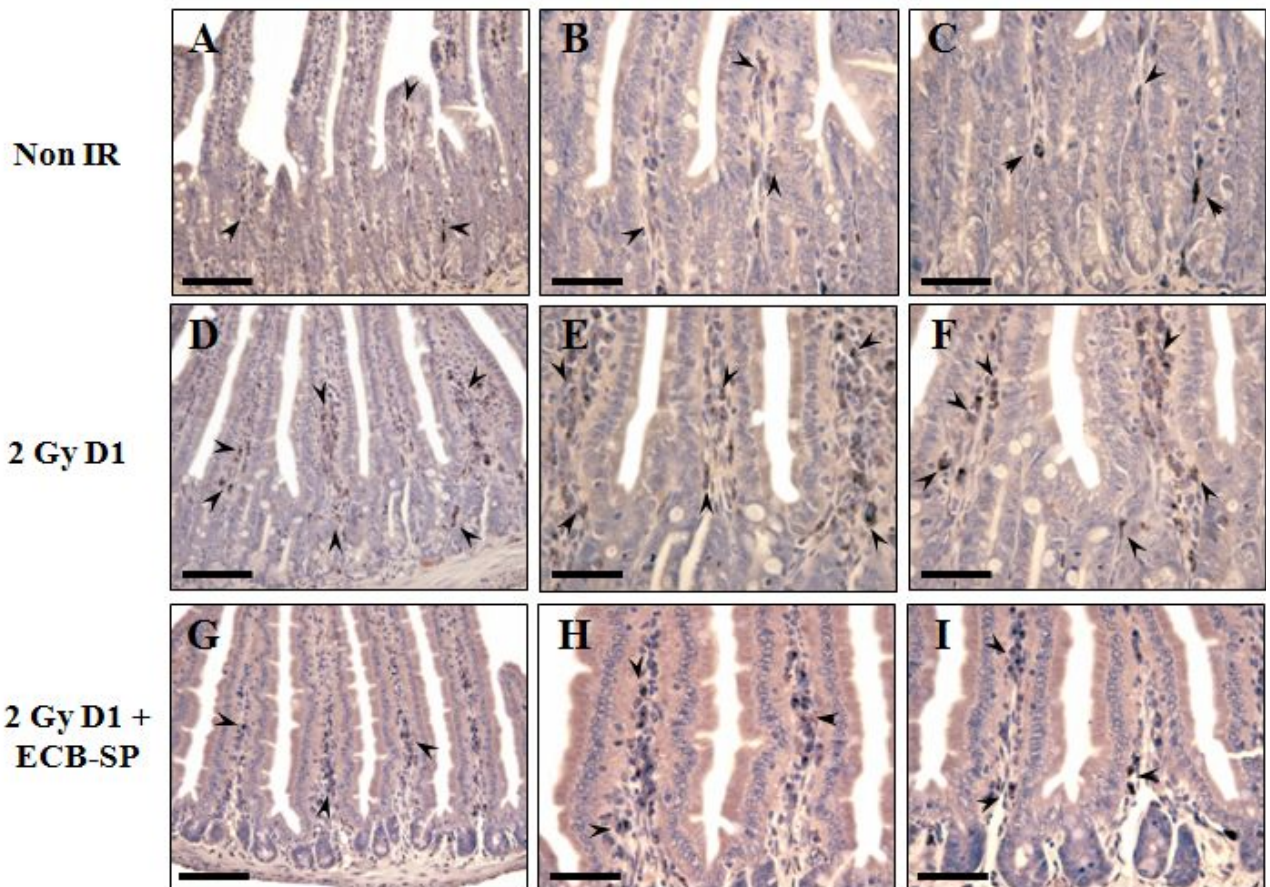


그림 3-4-15. ECB-SP가 방사선 조사된 마우스의 소장염의 p53 단백질 발현에 미치는 영향 평가

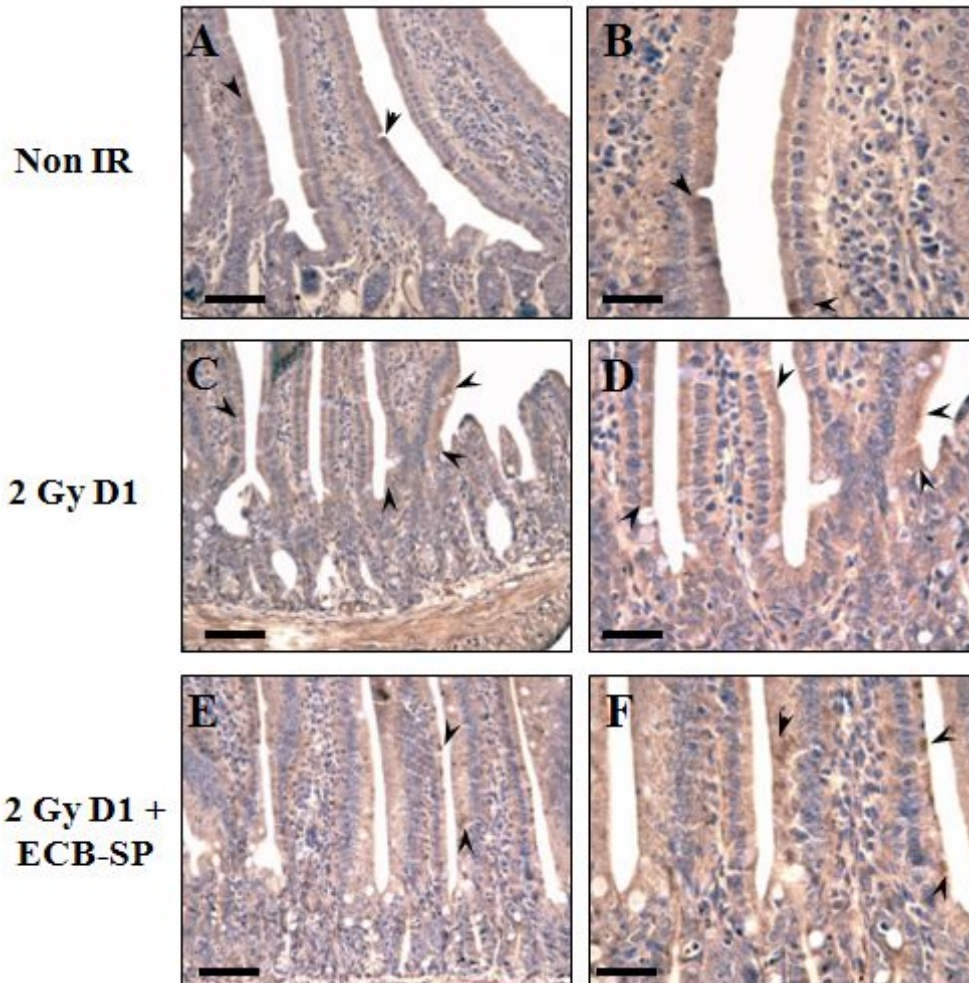


그림 3-4-16. ECB-SP가 방사선 조사된 마우스의 소장움의 Bax 단백 발현에 미치는 영향 평가

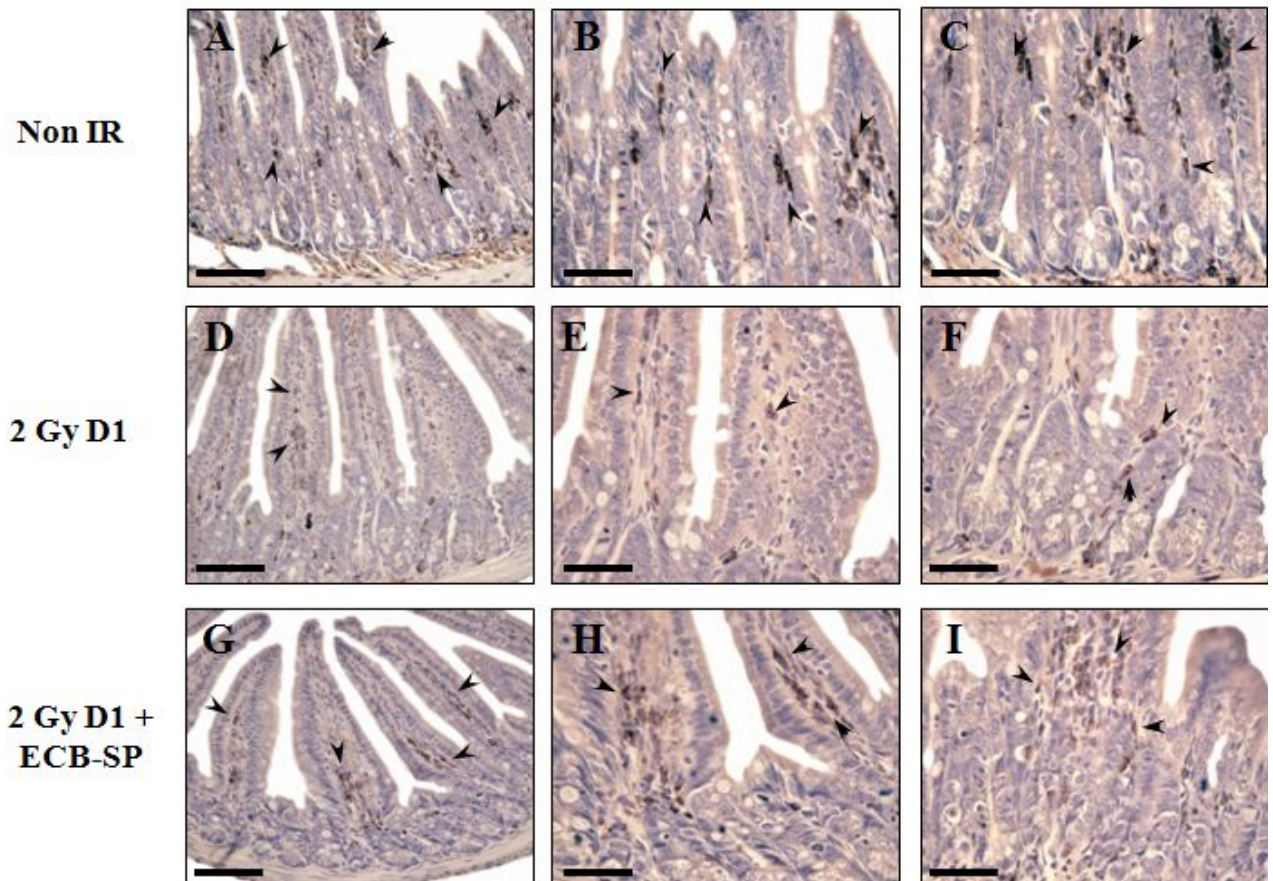


그림 3-4-17. ECB-SP가 방사선 조사된 마우스의 소장육의 Bcl-X<sub>L/S</sub> 단백 발현에 미치는 영향 평가

## 6. ECB-SP 투여에 의한 마우스 체내에서의 약효실험 및 생존율에 대한 효능 평가

### 가. 실험목적

앞선 실험에서 ECB-SP가 마우스 면역세포에 대한 방사선 보호 및 조절 촉진효과가 있음을 확인하였고 우리는 이번 실험에서 ECB-SP가 방사선 전신조사를 한 마우스의 생존율을 확인하여 ECB-SP의 생체에 대한 방사선 보호효과를 갖는지 평가하였다.

### 나. 실험방법

#### (1) 동물 처치와 방사선 조사

본 실험에 이용된 동물은 바이오제노믹스사에서 구입한 15주령, 24-30g의 C57BL/6 마우스 (Jackson사, USA)를 사용하였다. 사육 조건은 온도 23 ± 3°C, 습도 50% ± 5%를 맞추어 주었으며, 마우스 전용사료와 음수를 자유급식 하였다. ECB-SP를 생리식염수에 대해서는 방사선 조사 12시간 전과 2시간 전에 10 mg/kg를 각각 경구 투여하고, 방사선 조사 대조군은 동량의 PBS를 투여하였다. 실험에 공시된 mouse는 perspex box (3 × 3 × 11 cm)에 넣어 <sup>60</sup>Co 감마선(Theratron-780 teletherapy unit, 방사선응용과학연구소, 제주대학교)을 8, 9, 10 Gy를 마우스 전신에 조사하였다.

## (2) DRF(Dose reduction factor) 측정

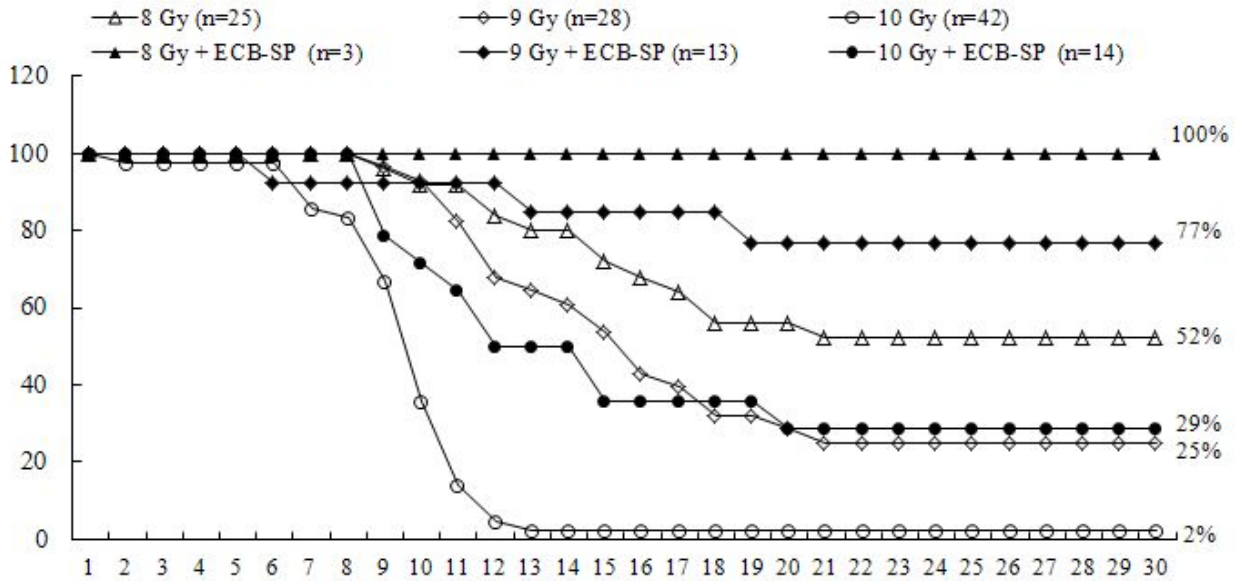
방사선 보호효과는 방사선 선량 감소 효율 (Dose reduction factor) 로 나타낼 수 있다. ECB-SP을 투여한 마우스와 비투여 마우스에 8, 9 또는 10 Gy로 방사선 조사 후 30일간 생존율을 측정하였다. 동물에서 방사선에 대한 감수성을 나타내는 지표로써 반치사선량 LD<sub>50</sub> (50% lethal dose)이 사용되는데 이는 50% 개체를 사망케 하는데 필요한 선량이며 특별한 지정이 없는 경우 피폭 후 30일 이내의 사망을 의미하고 LD<sub>50/30</sub>로 나타낸다. 생존율을 통해 반수치사선량을 구하고 선량감소효율 측정은 다음 공식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{선량감소효율 (dose reduction factor; DRF)} = \frac{\text{추출물 투여로 효과를 나타내는 데 필요한 선량}}{\text{추출물 비투여로 동일한 효과를 나타내는데 필요한 선량}}$$

### 다. 실험결과

#### (1) ECB-SP의 DRF 측정

PBS를 단독 투여한 후 8, 9, 그리고 10 Gy의 방사선 조사를 한 마우스의 30일째 생존율은 각각 52%, 25% 그리고 2%였다. 이에 반하여 방사선 조사 전 ECB-SP을 10 mg/kg을 투여한 경우의 생존율은 100%, 77% 그리고 29%였다. 생존율을 이용하여 10% 치사량을 측정한 결과 PBS를 투여한 경우는 5.80, ECB-SP을 전처리한 경우는 8.77이었다. 이를 이용하여 계산한 결과 선량감소효율 DRF = 1.51 이었다(그림 3-4-18). 이 수치는 방사선 보호효과는 있으나 오심, 구토, 고혈압 등의 부작용과 고가로 인해 임상적용이 제한된 면역증강제, 조혈증강제, -SH계 화합물 등의 DRF와 비슷하였고, 현재 유일하게 FDA에 승인된 amifostine의 DRF = 1.79 보다는 낮으나 다른 부작용이나 독성이 없는 점을 고려해 보았을 때 ECB-SP는 상당한 가치가 있다고 본다.



Group	Intercept ( <i>b</i> )	Slope ( <i>m</i> )	LD <sub>10</sub>	DRF
IR	210.99	-20.87	5.80	1
IR + ECB-SP	526.19	-49.76	8.77	1.51

그림 3-4-18. ECB-SP 전 처리군과 비처리군의 8, 9 그리고 10 Gy 방사선 조사 후 생존율

## 제 6 절 감태 가공부산물 유래 황산 다당류의 안전성평가

### 1. ECB-SP에 대한 단기 급성경구 독성시험

#### 가. 실험목적

ECB-SP의 안전성을 평가하기 위하여 마우스를 이용한 단기 경구독성시험을 식품의약품 등의 독성시험기준 (2009년 식품의약품 안전본부 고시 2009-39호)에 따라 실시하였다.

#### 나. 실험방법

##### (1) 실험동물

실험에 이용된 동물은 바이오제노믹스사에서 구입한 15주령, 24-30g의 C57BL/6 마우스 (Jackson사, USA)를 사용하였다. 사육 조건은 온도 23 ± 3°C, 습도 50% ± 5%를 맞추어 주었으며, 마우스 전용사료와 음수를 자유급식 하였다.

##### (2) 투여용량

식품의약품안전청의 의약품의 독성시험기준(2009)에 의하면 시험물질의 독성이 극히 약하여 치사량을 구하기 곤란한 경우 기술적으로 투여할 수 있는 한계량의 투여를 상한선으로 하는 것을 권장하고 있다. 따라서 본 연구에서 투여 용량은 미국 환경보호청(US environmental protection agency)에서 무해 물질 분류 기준인 5,000mg/kg을 최고용량으

로 설정하였으며, OECD의 급성독성시험 허용 한계용량은 2,000mg/kg(OECD 2000) 투여군과 부형제 투여군을 추가하였다. 시험물질은 임상적용을 고려하여 경구투여용 존데를 이용하여 1회 강제경구 투여를 하였다.

## (2) 시험군 분류

시험군의 구성은 표 3-6-1 과 같이 분류하였다.

표 3-6-1. 단기 급성경구 독성시험을 위한 시험군 분류

Reagent	Group	Sex	population	Dosage (mg/kg B.W.)	Oral Ad. Vol. (ml/kg B.W.)
PBS	control	M	3	0	10
	control	F	3	0	10
By-product of <i>E.cava</i>	SP2000	M	5	2000	10
	SP2000	F	5	2000	10
	SP5000	M	5	5000	10
	SP5000	F	5	5000	10

M : male, F : female, B.W. : body weight, Ad. : administration

## (3) 일반증상 관찰

**일반 증상 및 폐사의 관찰.** 투여 당일은 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간 마다, 투여 익일부터 14일까지 매일 1회 일반 증상의 변화, 독성 증상 및 사망 동물의 유무를 관찰하였다.

**체중변화.** 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여 개시 전과 투여 후 1, 3, 7, 14, 21 및 28일에 체중을 측정하였다.

**부검.** 28일의 시험기간이 끝난 후 생존한 모든 마우스를 ether로 마취시킨 후 치사시켜 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안으로 관찰하였다.

## 나. 실험결과

### (1) 시험기간 동안의 마우스 체중변화

ECB-SP를 C57BL/6에 경구 투여한 결과, 최고 투여용량인 5,000mg/kg의 시험구간에서도 마우스의 사망예가 관찰되지 않아 LD<sub>50</sub>의 값의 산정은 불가능하였으며 시료 투여 후 마우스의 운동상태, 외관변화 등도 ECB-SP에 의한 것으로 여겨지는 특별한 소견이 관찰되지 않았다. 마우스의 체중은 시험기간인 28일 동안 수컷은 약 3.67g, 암컷은 약 3.40g 씩 증가하였고, 대조군에 비하여 ECB-SP 투여군에서 유의성 있는 체중변화의 소견은 보이지 않았다(그림 3-6-1).

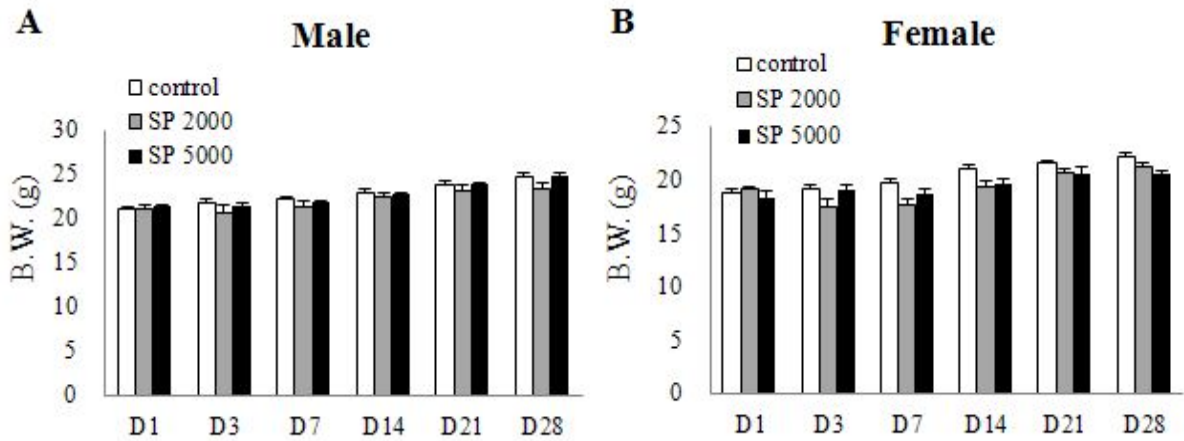


그림 3-6-1. ECB-SP 투여에 따른 마우스의 체중변화

실험완료 후 마우스를 부검하여 뇌, 신장, 심장, 폐, 간, 위, 장, 정소, 난소 등의 장기를 관찰한 결과 유의할만한 병변이나 ECB-SP의 투여에 기인한다고 사료되는 소견이 관찰되지 않았다(표 3-6-2). 이러한 결과로 보아 본 실험에 사용된 ECB-SP는 마우스에서 단기 급성경구시험에 대한 독성이나 부작용을 유발하지 않는 소재로 평가되었다.

표 3-6-2. ECB-SP 투여에 따른 마우스의 육안적 부검조건

organ		Groups					
		control (M)	control (F)	SP2000 (M)	SP2000 (F)	SP5000 (M)	SP5000 (F)
Brain	No. of observation	3	3	5	4	5	5
	Gross findings	0	0	0	0	0	0
Kidney	No. of observation	3	3	5	4	5	5
	Gross findings	0	0	0	0	0	0
Heart	No. of observation	3	3	5	4	5	5
	Gross findings	0	0	0	0	0	0
Lung	No. of observation	3	3	5	4	5	5
	Gross findings	0	0	0	0	0	0
Liver	No. of observation	3	3	5	4	5	5
	Gross findings	0	0	0	0	0	0
Stomach	No. of observation	3	3	5	4	5	5
	Gross findings	0	0	0	0	0	0
intestine	No. of observation	3	3	5	4	5	5
	Gross findings	0	0	0	0	0	0
Testis	No. of observation	3	3	5	4	5	5
	Gross findings	0	0	0	0	0	0
Ovary	No. of observation	3	3	5	4	5	5
	Gross findings	0	0	0	0	0	0

M : male, F : female

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

세부연구목표	주요 연구개발 실적	가중치 (%)	연구목표 달성도 (%)	평가착안점
감태로부터 폴리페놀 잔사를 얻은 후, 그것의 가공부산물로부터 바이오기법을 이용하여 수용성 물질의 추출 효율 증대	○ 높은 수율, 친환경적, 비독성, 수용성 등의 물질을 추출할 수 있는 효소적 가수분해법을 이용하여 감태 가공부산물의 수용성 추출물을 제조한 결과 기존의 열수추출법보다 수율, 황산 다당류의 주요 성분이 증가와 같이 추출효율이 증대됨을 입증하였다.	20	100	○ 기존의 다당류 추출시 사용하는 열수추출법보다 효소적 가수분해법이 효율적인 추출방법임을 확인하였음
감태 가공부산물 유래 수용성 추출물로부터 면역증강 효과가 기대되는 sulfated polysaccharide를 막분리기술을 활용한 분자량별 대량분획 및 활성물질 분리	○ 감태 가공 부산물 유래 sulfated polysaccharide를 막분리 기술을 이용하여 분자량별로 분획하였으며 대부분의 유효성분이 30 kDa 이상의 분획물에 존재함을 확인하였다. 따라서 대량생산하기 위해 산업용으로 이용할 수 있게 제작된 pilot plant 한외여과막 장치를 구축하여 30 kDa 이상의 분획물 분리를 시도하였으나 강한 점성으로 인해 실패하였다. 따라서 다른 대안으로 에탄올 침전법을 실시하였으며 그 결과 황산 다당류 대량생산에 성공하였다.	20	100	○ 감태 가공부산물 유래 sulfated polysaccharide의 대량생산공정은 점성으로 인해 막분리기술로는 어렵다고 판단 다른 대안인 에탄올 침전법을 이용하여 성공적으로 대량생산을 할 수 있었음
감태 가공부산물 유래 면역증강 물질의 분리 및 당성분, 분자량 특성 분석	○ Ion-exchange chromatography를 이용하여 면역증강 물질을 분리하였으며 분리된 각각의 물질에 대한 화학적 조성 및 분자량 특성을 규명하였다.	20	100	○ 면역증강 물질의 분리 및 분자량 특성에 관한 결과는 Carbohydrate Polymers에 게재하였음



<p>분리된 sulfated polysaccharide의 동물실험을 통한 면역증강 효과를 중심으로 한 방사선 방호능 평가 (<i>in vivo</i>)</p>	<p>○ 말초면역세포인 비장세포에서 MTT와 <sup>3</sup>H-thymidine incorporation 분석법을 주로 이용하여 ECB-SP가 비장세포의 생존률과 증식능을 증가시키고, 방사선에 의하여 손상된 비장세포에서도 생존률과 증식능을 향상시킨다는 것을 입증하였다.</p> <p>○ 방사선 조사시 변화되는 혈액성상에 대하여 ECB-SP는 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다.</p> <p>○ 감소된 면역세포의 재생성시 골수내의 조혈모세포가 말초 림프기관으로 이동하여 그 증식능을 상승시키는 결과로서 나타나는 비장 내 집락의 수적 증가의 확인 등 면역조혈계의 회복촉진을 확인하였다. 그리고 방사선 조사로 인해 줄어든 골수세포의 수와 증식능을 ECB-SP가 향상시키고, 조혈기능의 지표로 알려진 C-kit 양성인 골수세포의 수적 증가 역시 입증하였다.</p> <p>○ ECB-SP가 소장암 세포에서 apoptosis 억제효과 및 기전과 소장암의 재생촉진효과를 확인하였다.</p> <p>○ 마우스에서 감마선 조사에 의한 장해 발생의 경감에 효과를 알아보기 위해 ECB-SP의 구체적으로 생존률 증가에 관한 연구를 진행하여 마우스 생존률 검사에 있어 방어제의 효과가 어느 정도인가를 판정하는 대표적인 지표로 사용되는 선량감소효율(DRF)을 구하였다(1.51).</p> <p>○ 급성경구독성시험을 통하여 ECB-SP는 마우스에서 단기 급성경구독성이나 부작용을 유발하지 않는다는 것을 입증하였다.</p>	20	100	<p>○ ECB-SP에 대한 면역 활성과 그 기전에 대한 연구결과는 Biochimica et Biophysica Acta (BBA)지에 투고하였음 (Under review)</p> <p>○ ECB-SP의 면역세포에서 방사선 보호효과에 관한 연구결과는 Food and Chemical toxicology 지에 투고하였음 (Under review)</p> <p>○ ECB-SP에 대한 면역활성, 방사선 보호 및 조혈에 관한 결과를 국내 학술대회(4건) 및 국외 학술대회(1건)에서 발표하였음</p>
<p>감태 가공부산물로부터 방사선 방호 효능을 가진 면역증강 소재의 대량 생산 시스템 구축</p>	<p>○ Pilot plant에서 대용량 추출기를 이용하여 감태 가공부산물을 효소적 가수분해시킨후 산업용 원심분리기와 filter press를 이용하여 대량으로 수용성 추출물을 제조하였다. 이렇게 제조된 수용성 추출물은 에탄올 침전법을 통해 황산 다당류를 대량생산 할 수 있는 시스템을 구축하였다.</p>	20	100	<p>○ 대량생산시스템을 구축하여 시제품을 개발하였음</p>

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 기술적 측면

1. 감태 가공부산물로부터 sulfated polysaccharide 추출한다. 이 때, 당기수분해효소를 이용한 바이오기법으로 감태 가공부산물 유래 수용성 추출물의 효율성과 수율을 증대시켜 다당류 추출 기법의 새로운 모티브를 제공한다.
2. 지금까지 감태 가공부산물로부터 방사선 방호능을 가지 면역증강 소재를 개발한 연구가 없으므로 국내 수산물의 기능을 새롭게 조명할 수 있는 새로운 기술 분야를 개척한다.
3. 방사선 방호효과를 가진 면역증강 소재를 국내산 감태 가공부산물로부터 개발은 현재 유일한 방사선 방호제인 Amifostine의 심각한 부작용에 대한 대안으로서 수산 기능성 식품이나 의약품 관련분야에서 새로운 학술적인 토대 마련한다.

### 제 2 절 경제·산업적 측면

1. 외국 수입에 의존하는 국내 방사선 방호제 시장에서 보조적 건강기능성 식품으로서 수입대체 효과를 이끌고 천연소재로서 국민보건에 기여한다.
2. 해조 sulfated polysaccharide가 방사선 방호능이 있는 면역증강 소재로 인정될 경우, 국내 수산물을 이용한 천연 방사선 방호제 시장을 개척함으로써 바이오산업 발전, 수산 기능성 식품산업의 경제와 부 창출에 기여한다.
3. 아쿠아그린텍(주)의 기능성 sulfated polysaccharide 제품 생산은 수산 관련 기업 발전과 수산 분야의 발전에 기여함에 따라 국가 경쟁력 증대, 발전에 도움이 될 것이다.

### 제 3 절 사회·문화적 측면

1. 감태 가공부산물 유래 sulfated polysaccharide의 효능을 널리 알리는 학문적, 경제적, 산업적 기회가 될 것이다.
2. 아쿠아그린텍(주)의 제품개발과 특허 출원 후 개발된 제품은 향후 기능성 식품과 의약품 개발에 있어 모티브가 될 것이다.
3. 수산 관련 중소기업의 발전과 산학연 협력연구로 제주산 감태 가공부산물로부터 sulfated polysaccharide를 분리하고 그들의 생리활성을 평가하여 수산 관련 기업과 수산 기능성 식품 관련 발전에 기여한다.

### 제 4 절 상품화 및 사업화 방법

1. 우리나라에서 현재 시판되고 있지 않은 해조 다당류의 방사선 방호 효과를 검증함으로써 수산 기능성 식품으로서 생산하거나 기능성 소재로서 원재료의 판매를 유도할 수 있다.
2. 제주 연안의 해조류 산업의 발전에 기여할 수 있도록 해조 다당류의 원재료 물질을 찾고 그것을 상품화하여 국내 및 국외에 판매함으로써 경제적인 부를 창출할 수 있다.
3. 아직 미흡한 감태 가공부산물 유래 다당류인 sulfated polysaccharide의 더 다양한 생리활성 검증을 위해 sulfated polysaccharide 샘플 자체로서 다른 연구기관의 샘플을 판매하는 것이 가능하다.
4. 방사선 방호능이 있는 면역증강 소재로서 sulfated polysaccharide를 액상과 파우더의 형태로 제품을 판매할 수 있어 수산 기능성 식품 분야 발전에 기여한다.

5. 현재 대부분 수입에 의존한 다당류의 원료 대체효과를 가질 수 있기에 지역경제와 국가 경제 발전에 공헌할 수 있다.
6. 아쿠아그린텍(주)에서 감태 가공부산물 유래 후코이단 음료인 “아침애한모금”을 개발하여 상품화하였다. 현재 관련기업과의 상호 협력체계를 구축하여 판매네트워크 구축과 홍보 및 마케팅을 강화하고 있다.
7. 향후 면역증강 기능성 식품을 상품화하여 기능성 식품에 대한 새로운 시장 개척하고 기능성 식품 완제품 기업과 협력하여 사업화 할 계획이다.

### 제 5 절 연구개발에 있어서의 애로사항

당초 총 연구기간이 3년으로 본 연구개발사업이 선정되었으나 연구기간이 2년으로 단축되면서 시간적, 경제적 제약이 발생함에 따라 당초 계획했던 개별인정형 건강기능식품개발을 위한 안전성 및 안정성시험과 임상시험을 수행하지 못하였다. 하지만 감태 가공부산물로부터 경제성이 있는 후코이단 제조에 성공하였고 방사선 방호능이 있는 우수한 면역증강 소재임을 확인하였다. 따라서 이러한 연구결과를 토대로 안전성 및 안정성시험과 임상시험 등과 같은 추가적으로 지속적인 연구가 이루어지면 개별인정형 건강기능식품으로 산업적 가치가 있다고 판단된다.

### 제 6 절 연구성과

#### 1.특허

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2011	감태추출물 유래의 후코이단을 함유하는 방사선 방호능을 가진 면역증강용 조성물	전유진, 지영훈, 제종선, 안긴내	대한민국	10-2011-00736 12

#### 2. 논문실적

게재 연도	논문명	저자		학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자				
2012	Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from <i>Ecklonia cava</i>	이승홍	전유진	Carbohydrate Polymers	89:599-606	국외	SCI
2012	The JNK/NFpathway is required for activation of murine lymphocytes induced by a sulfated polysaccharide isolated from <i>Ecklonia cava</i>	안긴내	지영훈	*BBA-biochimica et Biophysica Acta	under review	국외	SCI
2012	Radioprotective role of a sulfated polysaccharide of <i>Ecklonia cava</i> against ionizing radiation-caused splenocytes' damages	안긴내	지영훈	**Food and Chemical Toxicology	under review	국외	SCI

\*BBA에 2012년 6월에 투고함

\*\*Food and Chemical Toxicology 2012년 6월에 투고함

3. 학술발표실적

발표 년도	학회명	지자	논문제목	국내/외	개최국
2011	한국수의해부학회	Ginnae Ahn, So Jin Bing, Insun Hwang, Haejin Joo, You-Jin Jeon	Protective effects of a sulfated polysaccharide isolated from <i>Ecklonia Cava</i> against immune suppression caused by gamma ray irradiation in mice	국내	한국
2011	8th International conference on Innate Immunity	Ginnae Ahn, Insun Hwang, Danbee Ha, So Jin Bing, Hae jin Joo, You-Jin Jeon, and Youngheun Jee	A SULFATED POLYSACCHARIDE ISOLATED FROM <i>ECKLONIA CAVA</i> BY-PRODUCT ENHANCES IMMUNOSTIMULATORY AND HEMOPOIETIC CAPACITIES INHIBITED BY GAMMA RAY IRRADIATION IN MICE	국외	그리스
2011	대한면역학회 추계학술대회	Danbee Ha, Subin An, So-Jin Bing, Ginnae Ahn, Youngheun Jee	A sulfated Polysaccharide Isolated from <i>Ecklonia cava</i> Benefits the Protection of Hematopoietic Stem Cells against Gamma Ray Irradiation in Mice	국내	한국
2012	한국수의해부학회	Jinhee Cho, Ginnae Ahn, Danbee Ha, So Jin Bing, You-Jin Jeon, Youngheun Jee	Sulfated polysaccharide isolated from <i>Ecklonia cava</i> protects irradiated mice from apoptosis	국내	한국
2012	한국수의해부학회	Danbee Ha, Subun An, So Jin Bing, Ginnae Ahn, Youngheun Jee	A sulfated polysaccharide isolated from <i>Ecklonia cava</i> by-product improved the differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells against gamma ray irradiation in mice	국내	한국

4. 제품화 실적

감태 후코이단 음료 “아침애한모금” 출시



5. 전시회 등 참여

- 완도 장보고축제(2012.05.04.(금)~05.06(일)/3일간)
- 음료제품(아침愛한모금) 및 감태추출물 전시 홍보



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 해조 다당류는 미역귀를 비롯한 다시마, 미역, 큰실말 등 다양한 갈조류로부터 추출 분리되고 있다. 미역귀로부터 상당량의 해조 다당류를 분리하여 제품 판매하였으나, 최근 들어 미역귀의 품귀현상이 유도되고 있다. 따라서, 일본이나 미국은 미역귀가 아닌 큰실말이나 다시마 등의 다른 해조류로부터 해조 다당류를 분리하여 기능성을 평가해 판매 중에 있으며, 우리나라는 그 원료의 상당한 양을 일본으로부터 수입하고 있는 실정이다. 즉, 국내 해조 다당류 제품은 수요에 비해 국내 생산량이 적으므로 상당한 양이 수입에 의존하고 있다.

○ **일본 및 미국** : 푸코이단의 주원료로 사용되는 오끼나와 모즈크 또는 통가산 모즈크 (큰실말) 등은 해조 특유의 끈적끈적한 성분이 없어 추출하기가 쉽고, 또한 양도 다시마나 미역보다 4~5배나 많이 추출되나 다시마나 미역포자엽을 주원료로 하여 추출된 fucoidan보다 그 유효성과 기능성이 현저히 낮은 것으로 취급되고 있다. 그러나 일본은 드링크, 과립, 캡셀에서 유제품, 화장품까지 최근 2, 3년간 급격하게 상품수가 증가하면서 시장규모 60억엔을 돌파했다. 건강차 및 청즙으로도 제품화가 진행되고 있으며, 비식품분야에서도 보습크림이나 화장수, 샴푸, 트리트먼트, 비누에 이르기까지 다양한 분야에서 그 용도를 개척하고 있다. 대표적적적 생산회사로는 다카라바이오(주)가 있으며 3가지 type의 fucoidan을 개발하여 '암세포의 자살유도작용' '간세포증식인자의 산생유도' '면역균형 조정작용' 등을 확인했다. 현재 항종양작용 이외에도, 항알레르기, 항비만, 관절염 대응소재로서의 연구를 진행하는 기업도 많아 앞으로는 다기능에 주목한 복합제품도 증가할 것으로 예상된다.

## 제 7 장 참고문헌

- Weiss, JF., (1997), "Pharmacologic approaches to protection against radiation-induced lethality and other damage. Environ", *Health Perspect.* Vol. 105, pp 1473-1478.
- Mashiba, H., Yoshinaga, H., Matsunaga, K., Gojobori, M., Furusawa, M., (1979), "Effect of immunochemotherapy on lymphocyte response of patients with gastrointestinal cancer" *J. Surg. Oncol.* Vol. 12, pp 275-279
- Satoh, S., Suzuki, A., Okamura, H., Nishimura, T., (1982), "Case of malignant melanoma of the external genitalis responding satisfactorily to a combination of local injection of OK-432 and chemotherapy" *Gan To Kagaku. Ryoho.* Vol. 9, 140-145.
- Till, JE., McCulloch, EA., (1961), "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells" *Radiat. Res.* Vol. 14, pp 213-222.
- Jee, YH., Jeong, WI., Kim, TH., Hwang, IS., Ahn, MJ., Joo, HG., Hong, SH., Jeong, KS., (2005), "p53 and cell-cycle-regulated protein expression in small intestinal cells after fast-neutron irradiation in mice" *Mol. Cell. Biochem.* Vol. 270, pp 21-28.
- Choi, EM., Kim, AJ., Kim, YO., Hwang, JK.. (2005), "Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan in vitro" *J. Med. Food.* Vol. 8, pp 446-453.
- Damron, TA., Spadaro, JA., Tamurian, RM., Margulies, B., Damron, LA.. (2000B), "Dose response of amifostine in protection of growth plate function from irradiation effects", *Int. J. Cancer. (Radiation Oncology Invest).* Vol. 90, pp 73-79.

## 보완요구사항에 대한 조치

보완 사항	보완 내용
<p>○ 연구 개발에 있어서의 애로사항에 대한 해결안 또한 제시되었으면 함</p>	<p>○ 당초 총 연구기간이 3년에서 2년으로 단축되면서 시간적, 경제적 제약이 발생함에 따라 당초 계획했던 개별인정형 건강기능식품 개발을 위한 연구내용을 수행하지 못함에 따라 추가적으로 지속적인 연구가 이루어져야 한다고 판단된다. (보고서 50쪽에 제시함)</p>



## 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.