



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월11일
(11) 등록번호 10-1848171
(24) 등록일자 2018년04월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/90 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 31/05 (2006.01) A61K 31/375 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 36/90 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2016-0156090
(22) 출원일자 2016년11월22일
심사청구일자 2016년11월22일
- (56) 선행기술조사문헌
KR101086669 B1*
KR1020150072659 A*
KR1020150029851 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
- (72) 발명자
김철태
전라북도 익산시 망성면 금지길 25-9
- (74) 대리인
김대영

전체 청구항 수 : 총 5 항

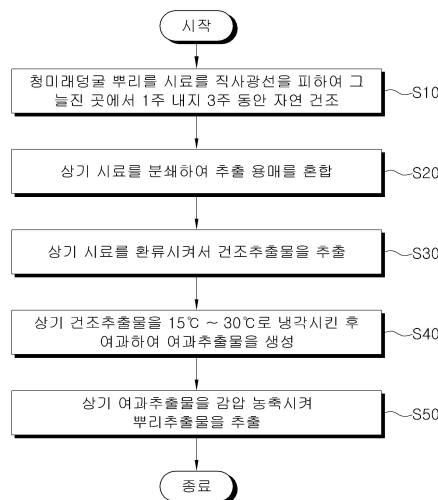
심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 청미래덩굴 뿌리조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 부작용을 최소화시키면서 파골세포 활성의 억제를 통하여 골다공증 예방 및/또는 개선 효과를 극대화 시킬 수 있는 특징이 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/05 (2013.01)

A61K 31/375 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/306 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016B0014010115

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 산학공동기술개발지원사업

연구과제명 국내산 청미래덩굴 뿌리의 골다공증 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 건양대학교산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2016.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

물 또는 에탄올수용액 중 어느 하나를 추출 용매로 하여 약학적으로 유효한 청미래덩굴 뿌리추출물로 이루어지되,

상기 청미래덩굴 뿌리추출물은 10 ~ 350 μ g/ml의 농도를 갖고,

상기 뿌리추출물의 농도는 파골세포(osteoclast)의 생존율에 영향을 주지 않으면서, Cal-R(칼시토닌 수용체)의 단백질 및 TRAP(주석산염 저항산성 인산분해효소)의 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 발현을 감소시켜 골다공증 예방 및 개선에 사용되는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 뿌리추출물 100mg에 대하여, 90 ~ 470mg GAE(gallic acid equivalent)의 페놀과, 1,100 ~ 1,800mg의 플라보노이드와, 18 ~ 35mg의 아스코르브산이 더 포함되는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물.

청구항 4

청미래덩굴 뿌리를 시료를 직사광선을 피하여 그늘진 곳에서 1주 내지 3주 동안 자연 건조하는 S10단계;

상기 시료를 분쇄하여 추출 용매를 혼합하는 S20단계;

상기 시료를 환류시켜서 건조추출물을 추출하는 S30단계;

상기 건조추출물을 15℃ ~ 30℃로 냉각시킨 후 여과하여 여과추출물을 생성하는 S40단계; 및

상기 여과추출물을 감압 농축시켜 뿌리추출물을 추출하는 S50단계;를 포함하되,

상기 S50단계는 상기 여과추출물을 40℃ ~ 60℃ 범위 내에서 감압 농축시켜 10 ~ 350 μ g/ml의 농도로 뿌리추출물을 추출하고, 상기 뿌리추출물의 농도는 파골세포(osteoclast)의 생존율에 영향을 주지 않으면서, Cal-R(칼시토닌 수용체)의 단백질 및 TRAP(주석산염 저항산성 인산분해효소)의 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 발현을 감소시켜 골다공증 예방 및 개선에 사용되는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 S20단계는

상기 추출 용매는 물 및 에탄올 농도가 60% ~ 80%인 에탄올 수용액 중에서 선택된 1종 또는 2종을 혼합한 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 제조방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 S20단계는

상기 분쇄된 시료와 추출 용매는 100g : 800 ~ 1,100ml 의 비율로 혼합되는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 제조방법.

청구항 7

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 부작용을 최소화시키면서 파골세포 활성의 억제를 통하여 골다공증 예방 및/또는 개선 효과를 극대화시킬 수 있는 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 골(bone)은 근육과 연합되어 있는 석회화된 결체조직으로서 표면은 두껍고 단단한 석회화 조직으로 신체균형을 이루는 지주역할을 하며 장기를 보호한다.

[0003] 골의 안쪽은 골수조직으로 칼슘대사의 중심이 되는 부위이다. 골은 콜라겐(collagen), 오스테오칼신(osteocalcin), 오스테오넥틴(osteonectin) 등 유기질(organic substance)과 칼슘, 인, 불소 등의 무기질(inorganic substance) 및 수분으로 구성되어 있다.

[0004] 생체 내 골 대사는 골 형성(bone formation)을 담당하는 조골세포와 골 흡수(bone resorption)를 담당하는 파골세포의 작용으로 이루어져 있으며, 이들 세포의 기능이 균형을 이루어 항상성을 유지한다.

[0005] 따라서 골 대사에서는 이들 사이의 균형이 중요하다. 골 조직은 지속적으로 재형성되는 활발한 대사조직으로 노화된 뼈를 파골세포에 의해 용해하는데, 뼈의 표면에 부착하여 산화 분해효소를 분비함으로써 뼈를 구성하는 뼈기질(matrix)을 제거한다.

[0006] 반면에 새로운 뼈의 형성은 조골세포(osteoblast)가 칼슘과 인을 분비하여 골격을 형성한다. 생체 내에서 이들 세포의 항상성 유지에 의해 일어나 골 흡수와 골 형성은 근골격계의 정상적인 구조를 유지하는 중요하다.

[0007] 골다공증(osteoporosis)은 골흡수와 골형성의 균형이 무너져 발생하는 것으로 골형성보다 과다하게 골흡수가 진행되는 기인한 질환으로, 골다공증은 골 조직의 석회가 감소 되어 골의 치밀질이 얇어지고 그로 인해 골수강(骨髓腔)이 넓어지고, 증세가 진전됨에 따라 골이 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉽다.

[0008] 골조직은 조골세포에 의해 형성되고 파골세포에 의해 파괴 흡수가 끊임없이 반복되는 동적인 조직이다. 골의 항상성은 파골 세포(osteoclast)에 의한 골 흡수(bone resorption)와 조골세포(osteoblast)에 의한 골 형성(bone formation)의 대등한 작용에 의한 리모델링 과정(bone remodeling)이 지속적으로 조절되어 유지된다.

[0009] 그러나, 파골 세포의 지나친 활성화나 조골세포 활성의 저하는 리모델링 과정의 불균형을 초래하여, 골다공증(osteoporosis)과 같은 성인 골격계 질환을 유도한다.

[0010] 이러한 불균형을 해소하기 위해서 일반적으로 파골 세포의 지나친 활성을 억제하거나, 조골세포의 활성을 촉진시키거나, 또는 파골 세포의 활성을 억제하고 조골세포의 활성을 촉진하는 방법이 사용되고 있으며, 이들은 골다공증의 치료에 대한 효과적인 치료적 접근 방법으로 인지되고 있다.

[0011] 파골세포는 조혈모세포의 단핵구로부터 유래되는 세포로서, 마우스의 RAW264.7 단핵구 세포는 RANKL(receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) ligand)에 의해 융합하여 다핵 파골세포(multinucleated osteoclasts)로 분화된다.(참조: Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and

activation. Nature. 2003 May 15;423(6937):337-42).

- [0012] 파골세포를 활성화시키는 중요한 씨토카인은 Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)로서 조골세포 또는 활성화된 면역세포에서 생성된다.
- [0013] 생성된 RANKL은 파골세포 및 전구세포에 위치한 수용체(RANK)와 결합하여 파골세포의 형성과 활성을 촉진시킨다.
- [0014] 또한 RANKL에 대한 생체 내 길항제인 Osteoprotegerin (OPG)가 존재하고 있다. 결국, RANKL과 OPG의 균형에 의하여 파골세포의 형성과 활성이 조절되는 것이다.
- [0015] 그러나, 골 흡수를 자극하는 원인(에스트로겐 결핍, 부갑상선 호르몬 항진증 등)이 발생하게 되면 OPG와 RANKL의 균형이 깨지게 되어 파골세포가 활성화되어 골 흡수가 촉진되는 것이다. 활성화된 파골세포는 골 표면에 부착하여 강한 골 용해물질을 분비한다. 골 단백 용해제 중 하나인 카텝신 (cathepsin) K가 파골세포 특이적으로 생성 분비되며, 풍부한 칼시토닌 수용체(calcitonin receptor, Cal-R)와 TRAP이 존재하며 실제적으로 골 흡수 작용을 하는 산 생성이 활발하고, acting ring을 형성하여 골 기질을 흡수한다고 알려졌다.
- [0016] 따라서 이들의 억제를 통하여 골 흡수 억제 효과를 이끌어낼 수 있을 것이다. 골 흡수를 억제하기 위해 파골 전구세포에서 파골세포로의 분화를 차단하는 분화 과정의 초기단계 저해와 분화된 파골세포의 사멸을 유도하여 골 흡수 과정을 저해하는 연구가 진행되고 있다.
- [0017] 골다공증은 그 증세 자체보다는 골의 약화에 따라 용이하게 초래되는 각종 골절, 특히 대퇴골 골절 또는 척추골절 등이 장기간 활동을 제한하여 건강한 생활을 영위할 수 없고, 결과적으로 노인층 사망의 15%에 대한 원인제공을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0018] 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받으며, 골다공증의 원인으로는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 알려져 있다.
- [0019] 한편 개인 차이는 있지만 백인보다는 흑인이 골 재흡수 수준(bone resorption level)이 낮아 골량이 더 높으며, 대개 골량은 14 ~ 18세에 가장 높고 노후에는 1 년에 약 1 %씩 감소한다. 특히 여성의 경우 30 세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다.
- [0020] 이와 같이 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가되고 있다.
- [0021] 또한, 전세계적으로 골질환 치료와 관련되어 약 1,300억 달러의 시장이 형성되어 있는 것으로 알려져 있으며 앞으로 더 증가할 것으로 예상되기 때문에, 세계적인 각 연구 기관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있고 현재 골흡수 억제제의 개발이 활발히 진행되고 있다.
- [0022] 골다공증과 관련하여 과거에는 주로 골의 무기질, 즉 칼슘과 인의 대사이상을 중심으로 그 연구가 진행되어 왔으나, 이의 발병 기전 규명에는 큰 진전을 보지 못하였다.
- [0023] 현재 골다공증 치료제로 사용되고 있는 물질로는 비스포스포네이트 제제(알렌드로네이트, 에티드로네이트), 호르몬 제제(탈록시펜), 비타민 D 제제, 칼시토닌 제제, 칼슘 제제 등이 있다.
- [0024] 그러나, 비스포스포네이트 제제는 흡수율이 떨어지며 복용방법이 까다롭고 식도염을 유발시키며, 호르몬 제제는 평생 복용하여야 하며 장기 투여할 경우 유방암, 자궁암, 담석 및 혈전증 등의 부작용이 나타나고, 비타민 D 제제는 고가이며 효과가 확실하지 않고, 칼시토닌 제제는 고가이며 투여방법이 어렵고, 칼슘제제는 부작용은 적지만 치료보다는 예방효과에 국한되는 단점이 있다.
- [0025] 골다공증은 약물의 단기 투여만으로는 치료할 수 없으며 약물의 장기 투여가 필수적이다. 따라서, 약물을 장기 투여할 때에 상기와 같은 부작용이 없고 우수한 약효를 갖는 새로운 물질의 필요성이 요구되고 있다.
- [0026] 근래에는 이러한 부작용을 최소화하기 위하여 독성이 적고, 일상생활에서 식용으로 섭취가능한 식품과 약용식물 등 천연물 소재를 이용하여 골 손실의 최소화화 더불어 골 형성을 촉진시킬 수 있는 골다공증 예방 또는 치료 물질 개발에 대한 응용 연구가 다양하게 시도되고 있다.
- [0027] 골 흡수 저하 관련 약용식물의 연구로써 두충, 노각나무, 삼백초, 작약 등이 RANKL로 유도된 파골세포 분화를 억제시켜 골흡수가 저하된다고 하였다(Kwak et al., 2008, Tsai et al., 2008).

[0028] 최근, Quercetin과 Kaempferol의 파골세포의 골 흡수 억제 효과나 대두를 이용한 조골세포 골 형성 활성 검색, 두종의 골다공증 효과에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 산화스트레스 증가와 골밀도 간 유의한 음의 상관 관계가 있는 것으로 보고된 바(Basu et al., 2001), 산화스트레스가 파골세포에 직접적으로 작용하여 분화와 활성을 증가시킴으로써 골 흡수가 촉진된다고 알려졌고(Yang et al., 1998), 항산화능을 갖는 폴리페놀이나 플라보노이드가 많이 함유된 천연물 유래 약용 식물, 인삼의 사포닌과 같은 특정 성분이 파골세포 분화 및 기능을 억제하여 골흡수 억제제로서 기능을 하는 것으로 보고되었다. 특히, 골다공증 여성의 경우 혈중 항산화제의 농도가 감소되고, 항산화 비타민 섭취로 인하여 골밀도를 증가시켰다고 보고하였다.

[0029] 따라서, 항산화 성분을 가진 유효 약용식물의 안전한 천연물 소재를 이용하여 골 손실의 최소화시켜 골밀도 증가를 통한 골다공증을 예방할 수 있는 천연 치료 물질 발굴이 절실하게 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0030] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록번호 제1096574호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0031] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 제 1목적은, 파골세포의 분화 및 기능저하를 통한 골 흡수 억제 기능을 밝혀냄으로써 골다공증 예방 및 개선제로써 이용 가능한 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0033] 본 발명의 제 2목적은, 청미래덩굴 뿌리추출물에 페놀, 플라보노이드 및 아스코르브산을 포함시켜 항산화 효과가 우수한 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0034] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위한 특징에 따르면, 제 1발명은, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물에 관한 것으로, 물 또는 에탄올수용액 중 어느 하나를 추출 용매로 하여 약학적으로 유효한 청미래덩굴 뿌리추출물로 이루어지되, 상기 청미래덩굴 뿌리추출물은 10 ~ 350 μ g/ml의 농도를 갖고, 상기 뿌리추출물의 농도는 파골세포(osteoclast)의 생존율에 영향을 주지 않으면서, Cal-R(칼시토닌 수용체)의 단백질 및 TRAP(주석산염 저항산성 인산분해효소)의 단백질로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 발현을 감소시켜 골다공증 예방 및 개선에 사용되는 것을 특징으로 한다.

[0035] 삭제

[0036] 삭제

[0038] 제 3발명은, 제 1발명에서, 상기 뿌리추출물 100mg에 대하여, 90 ~ 470mg GAE(gallic acid equivalent)의 페놀과, 1,100 ~ 1,800mg의 플라보노이드와, 18 ~ 35mg의 아스코르브산이 더 포함되는 것을 특징으로 한다.

[0040] 제 4발명은, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 제조방법에 관한 것으로, 이를 위해 청미래덩굴 뿌리를 시료를 직사광선을 피하여 그늘진 곳에서 1주 내지 3주 동안 자연 건조하는 S10단계;와, 상기 시료를 분쇄하여 추출 용매를 혼합하는 S20단계;와, 상기 시료를 환류시켜서 건조추출물을 추출하는 S30단계;와, 상기 건조추출물을 15℃ ~ 30℃로 냉각시킨 후 여과하여 여과추출물을 생성하는 S40단계; 및 상기 여과추출물을 감압 농축시켜 뿌리추출물을 추출하는 S50단계;를 포함하되, 상기 S50단계는 상기 여과추출물을 40℃ ~ 60℃ 범위 내에서 감압 농축시켜 10 ~ 350 μ g/ml의 농도로 뿌리추출물을 추출하고, 상기 뿌리추출물의 농도는 파골세포(osteoclast)의 생존율에 영향을 주지 않으면서, Cal-R(칼시토닌 수용체)의 단백질 및 TRAP(주석산염 저항산성 인산분해효소)의 단백질로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 발현을 감소시켜 골다공증 예방 및 개선에

사용되는 것을 특징으로 한다.

[0042] 제 5발명은, 제 4발명에서, 상기 S20단계는, 상기 추출 용매는 물 및 에탄올 농도가 60% ~ 80%인 에탄올 수용액 중에서 선택된 1종 또는 2종을 혼합한 것을 특징으로 한다.

[0044] 제 6발명은, 제 4발명에서, 상기 S20단계는, 상기 분쇄된 시료와 추출 용매는 100g : 800 ~ 1,100ml의 비율로 혼합되는 것을 특징으로 한다.

[0046] 삭제

발명의 효과

[0047] 본 발명의 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물 및 이의 제조방법에 따르면, 부작용을 최소화시키면서 파골세포 활성의 억제를 통하여 골다공증 예방 및/또는 개선 효과를 극대화시킬 수 있는 효과가 있다.

[0048] 또한 청미래덩굴 뿌리추출물에 페놀, 플라보노이드 및 아스코르브산을 포함시켜 항산화 성분을 일상생활에서 식용으로 섭취할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 본 발명에 따른 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 제조방법에 따른 순서도,
 도 2는 본 발명에 따른 청미래덩굴 뿌리조성물의 MTT assay를 통한 세포 독성 평가를 나타낸 그래프,
 도 3은 본 발명에 따른 청미래덩굴 뿌리조성물의 TRAP 활성 평가를 나타낸 그래프,
 도 4는 본 발명에 따른 청미래덩굴 뿌리조성물의 RANKL에 의해 유도되는 파골세포의 TRAP 및 Cal-R 단백질 발현 양 이미지와 평가를 나타낸 그래프,
 도 5는 청미래덩굴 뿌리추출물 처리에 따른 TRAP 염색에 의한 파골세포 양성세포 광학현미경 이미지 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하의 본 발명의 목적들, 다른 목적들, 특징들 및 이점들은 첨부된 도면과 관련된 이하의 바람직한 실시예들을 통해서 쉽게 이해될 것이다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다.

[0051] 오히려, 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0052] 여기에 설명되고 예시되는 실시예들은 그것의 상보적인 실시예들도 포함한다.

[0053] 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 '포함한다(comprise)' 및/또는 '포함하는(comprising)'은 언급된 구성요소는 하나 이상의 다른 구성요소의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.

[0054] 이하, 도면을 참조하여 본 발명을 상세히 설명하도록 한다. 아래의 특정 실시예들을 기술하는데 있어서, 여러가지의 특정적인 내용들은 발명을 더 구체적으로 설명하고 이해를 돕기 위해 작성되었다. 하지만 본 발명을 이해할 수 있을 정도로 이 분야의 지식을 갖고 있는 독자는 이러한 여러 가지의 특정적인 내용들이 없어도 사용될수 있다는 것을 인지할 수 있다. 어떤 경우에는, 발명을 기술하는 데 있어서 흔히 알려졌으면서 발명과 크게 관련 없는 부분들은 본 발명을 설명하는 데 있어 혼돈을 막기 위해 기술하지 않음을 미리 언급해 둔다.

[0056] 이하에서는 본 발명에 따른 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물에 관하여 설명하기로 한다.

[0057] 본 발명은 물 또는 에탄올수용액 중 어느 하나를 추출 용매로 하여 약학적으로 유효한 청미래덩굴 뿌리추출물로 이루어지되, 상기 청미래덩굴 뿌리추출물은 10 ~ 350 μ g/ml의 농도를 갖는 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물에 관한 것이다.

[0058] 여기서 상기 뿌리추출물의 농도는 파골세포(osteoclast)의 생존율에 영향을 주지 않으면서, Cal-R(칼시토닌 수용체)의 단백질 및 TRAP(주석산염 저장산성 인산분해효소)의 단백질로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상

의 발현을 감소시켜 골다공증 예방 및 개선에 사용될 수 있다.

- [0059] 본 발명의 일실시예로서, 청미래덩굴 뿌리조성물은 뿌리추출물이 25 μ g/ml 농도일 때, TRAP(주석산염 저항산성 인산분해효소)의 단백질 활성이 20% ~ 40%일 수 있다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 일실시예로서, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 뿌리추출물은 물을 추출 용매로 추출한 경우, 100 μ g/ml 농도일 때, TRAP(주석산염 저항산성 인산분해효소)의 단백질 활성이 50.0% ~ 59.0%이고, 250 μ g/ml 농도일 때, TRAP(주석산염 저항산성 인산분해효소)의 단백질 활성이 20% ~ 28%일 수 있다.
- [0061] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 뿌리추출물은 에탄올을 추출 용매로 추출한 경우, 100 μ g/ml 농도일 때, TRAP의 단백질 활성이 40.0% ~ 49.0%이고, 250 μ g/ml 농도일 때, TRAP 효소 활성이 32% ~ 40%일 수 있다.
- [0062] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 뿌리추출물이 250 μ g/ml 농도일 때, TRAP의 단백질 활성 발현을 55% ~ 80% 억제시킬 수 있다.
- [0063] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 청골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 뿌리추출물은 물을 추출 용매로 추출한 경우, 250 μ g/ml 농도일 때, TRAP의 단백질 활성 발현을 70.0% ~ 80.0% 억제시킬 수 있다.
- [0064] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물은 에탄올을 추출 용매로 추출한 경우, 250 μ g/ml 농도일 때, TRAP의 단백질 활성 발현을 55.0% ~ 65.0% 억제시킬 수 있다.
- 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 뿌리추출물은 250 μ g/ml 농도일 때, Cal-R(칼시토닌 수용체)의 단백질 발현을 16% ~ 40% 억제시킬 수 있다.
- [0065] 삭제
- [0066] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 뿌리추출물은 물을 추출 용매로 추출한 경우, 250 μ g/ml 농도일 때, Cal-R(칼시토닌 수용체)의 단백질 발현을 18.0% ~ 30.0% 억제시킬 수 있다.
- [0067] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 뿌리추출물은 에탄올을 추출 용매로 추출한 경우, 250 μ g/ml 농도일 때, Cal-R(칼시토닌 수용체)의 단백질 발현을 16.0% ~ 40.0% 억제시킬 수 있다.
- [0068] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 뿌리추출물은 마우스 대식 세포주 RAW246.7세포를 이용하여 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)에 의해 유도된 파골세포 생존을 측정시, 250 μ g/ml 농도일 때, 파골세포 생존율이 92.0% ~ 128%일 수 있다.
- [0069] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 뿌리추출물은 물을 추출 용매로 추출한 경우, 250 μ g/ml 농도일 때, 파골세포 생존율이 92% ~ 106%일 수 있다.
- [0070] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 뿌리추출물은 에탄올을 추출용매로 추출한 경우, 250 μ g/ml 농도일 때, 파골세포 생존율이 102% ~ 128%일 수 있다.
- [0071] 또한 본원발명의 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물은 상기 뿌리추출물 100mg에 대하여, 90 ~ 470mg GAE(gallic acid equivalent)의 페놀과, 1,100 ~ 1,800mg의 플라보노이드와, 18 ~ 35mg의 아스코르브산이 더 포함되어 항산화 효과를 갖도록 구성될 수 있다.
- [0072] 좀 더 구체적으로는 상기 뿌리추출물이 물을 추출 용매로 추출한 경우, 뿌리추출물의 100mg에 대하여, 페놀 함량이 458 ~ 462 mg GAE(gallic acid equivalent)이고, 플라보노이드 함량이 1,103 ~ 1,116 mg이며, 아스코르브산 함량이 19 ~ 21 mg을 포함할 수 있다.
- [0073] 그리고 상기 뿌리추출물이 에탄올을 추출 용매로 추출한 경우, 뿌리추출물의 100mg에 대하여, 페놀 함량이 90 ~ 92 mg GAE(gallic acid equivalent)이고, 총 플라보노이드 함량이 1,743 ~ 1,753 mg이며, 아스코르브산 함량이 28 ~ 30 mg을 포함할 수 있다.
- [0074] 이와 같이, 본 발명의 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물은 페놀, 플라보노이드 및 아스코르브산을 고함량으로 포함하는 바, 항산화 효과가 우수하면서도 TRAP 효소의 활성 즉, 파골세포 분화 활성 억제를 통

한 골다공증 예방, 개선 효과가 우수하다.

- [0076] 이하에서는 본 발명에 따른 골다공증 예방 및 개선용 청미래덩굴 뿌리조성물의 제조방법에 관하여 첨부되어진 도면과 함께 더불어 상세히 설명하기로 한다.
- [0077] 도 1과 같이, 먼저 S10단계에서는 청미래덩굴 뿌리를 시료를 직사광선을 피하여 그늘진 곳에서 1주 내지 3주 동안 자연 건조한다.
- [0078] S20단계에서는 상기 시료를 분쇄하여 추출 용매를 혼합한다.
- [0079] 이 때 S20단계에서 추출 용매는 물 및 에탄올 수용액 중에서 선택된 1종 또는 2종을 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0080] 바람직하게는 추출 용매로서 에탄올 수용액을 사용하되, 에탄올 농도가 60% ~ 80%이 되도록 사용하는 것이 추출 효과 면에서 유리하기 때문이다.
- [0081] 또한 S20단계에서 시료와 추출 용매는 100g : 800 ~ 1,100ml 의 비율로 혼합되는 것이 바람직하다.
- [0082] 여기서 추출 용매가 800ml 미만이면 시료와 추출 용매의 혼합이 불완전하게 되어 유효성분의 추출이 충분하지 않을 수 있고, 1,200ml 를 초과하면 일정 온도를 유지하며 뿌리추출물을 추출하는 방법에 문제가 있을 수 있기 때문에 바람직하지 않다.
- [0083] 아울러 S30단계에서는 시료를 환류시켜서 건조추출물을 추출한다.
- [0084] 여기서 환류는 80℃ ~ 95℃ 하에서, 바람직하게는 82℃ ~ 88℃ 하에서, 2.5 ~ 3.5시간씩 3번 ~ 5번 수행할 수 있다.
- [0085] S40단계에서는 상기 건조추출물을 15℃ ~ 30℃로 냉각시킨 후 여과하여 여과추출물을 생성한다.
- [0086] S50단계에서는 상기 여과추출물을 감압 농축시켜 뿌리추출물을 추출하여 완성한다.
- [0087] 이 때 S50단계에서 여과추출물을 40℃ ~ 60℃ 범위 내에서 감압 농축시켜 10 ~ 350 μ g/ml의 농도로 뿌리추출물을 추출할 수 있다.
- [0088] 여기서 40℃ 미만에서 감압농축을 수행하면 농축의 시간이 장시간이 될 수 있는 문제가 있을 수 있고, 60℃를 초과하면 유효 성분의 변성이 있을 수 있는 문제가 있을 수 있기 때문에 바람직하지 않다.
- [0089] 또한 뿌리추출물의 농도가 10 μ g/ml 미만이면 파골세포효소 활성 저하 효과가 미비하여 골다공증 효과를 볼 수 없을 수 있고, 350 μ g/ml의 농도를 초과하면 독성에 의한 세포 생존율을 저하시키는 문제가 있을 수 있으므로 상기 범위 내의 농도로 뿌리추출물을 포함하는 것이 좋다.
- 여기서 상기 뿌리추출물의 농도는 파골세포(osteoclast)의 생존율에 영향을 주지 않으면서, Cal-R(칼시토닌 수용체)의 단백질 및 TRAP(주석산염 저장산성 인산분해효소)의 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 발현을 감소시켜 골다공증 예방 및 개선에 사용될 수 있다.
- [0091] 실시예1: 물을 추출 용매로 하여 감압 농축하여 청미래덩굴 뿌리조성물을 제조하였다.
- [0092] 실시예2: 70% 농도의 에탄올 수용액을 추출 용매로 하여 청미래덩굴 뿌리조성물을 제조하였다.
- [0093] [실험예 1] 폴리페놀, 플라보노이드 및 아스코르빈산 함량 측정
- [0094] 실시예1 및 실시예2의 냉동고에 보관된 청미래덩굴 뿌리조성물 100g에 함유된 폴리페놀, 플라보노이드 및 아스코르빈산의 함량을 각각 측정하였다.
- [0095] 이 때, 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정을 위한 폴리-시오칼토 시약(FolinCiocalteau reagent), 갈산(gallic acid), 아질산 나트륨(sodium nitrite), 카테킨(catechin), 트라이클로로아세트산(trichloroacetic acid), 아스코르빈산(ascorbic acid)을 사용하였다.
- [0096] 그리고 폴리페놀은 갈산으로 정량하여 건조함량 당 100g 기준으로 측정하였고, 플라보노이드 함량은 카테킨으로 정량하여 건조함량 당 100g 기준으로 측정하였으며, 아스코르빈산 함량은 아스코르빈산으로 정량하여 건조함량 당 100g 기준으로 측정하였다. 측정값은 mg 단위로 표기하였다.

표 1

구분	총 페놀 함량 (mg GAE ¹⁾ /100g of dry mass)	총 플라보노이드 함 량 (mg CE ²⁾ /100g of dry mass)	아스코르빈산 함량 (mg/100g of dry mass)	수율 (%)
실시예1 (SC-W)	460.25±1.37	1109.86±5.49	20.01±0.62	12.36
실시예2 (SC-E)	91.65±0.34	1748.09±5.20	29.65±0.78	11.71
1) GAE(gallic acid equivalent), 2) CE(catechin reagent)				

상기 [표 1]의 측정 결과를 살펴보면, 실시예1 및 실시예2를 각각 서로 비교해 보면, 페놀 함량은 에탄올 추출 용매보다 물 추출 용매가 상대적으로 높았고, 플라보노이드 및 아스코르빈산 함량은 물 추출 용매 보다 에탄올 추출 용매가 상대적으로 높은 결과를 보였다.

[실험예 2] 파골세포 생존율 측정 실험

실시예1 및 실시예2의 청미래덩굴 뿌리조성물 각각을 PBS (Dulbecco's, phosphate buffered saline)에 하기 [표 2]와 같은 농도로 희석하여 골다공증 예방 및 개선용 조성물을 각각 제조한 후, 하기와 같은 방법으로 파골 세포의 생존율을 측정하였다.

(1) 파골세포 배양

파골세포 분화 유도를 위한 마우스 대식 세포주 RAW264.7 세포는 ATCC(American Type Culture Collection; Rockville, MD, USA)로부터 구입하였으며, RAW264.7 세포는 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco-BRL사)와 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin, 100 U/ml, 100 µg/ml, Gibco-BRL사)이 포함된 DMEM 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% FBS와 1% 페니실린-스트렙토마이신을 첨가하여 5% CO₂, 37℃ 배양 기(incubator)에서 계대 배양하였다.

(2) 파골세포 생존율 측정

하기 [표 2]의 농도를 갖는 추출물 각각의 RAW264.7 세포에 대한 생존 및 간접적 독성평가를 위하여 MTT assay 를 시행하였다. 96-well plate에 1×10⁴ cells/well 농도로 분주하여 DMEM에 10% FBS와 1% 페니실린-스트렙토마이신의 조건으로 24시간 동안 안정화시켰다.

다음으로, 파골세포 분화 유도를 위하여 10% FBS와 1% 페니실린-스트렙토마이신이 함유된 α-MEM에 RANKL(100 ng/ml)을 첨가한 뒤, 하기 [표 2]의 농도를 갖도록 실시예1 및 실시예2의 청미래덩굴 뿌리조성물로 배양 처리하였다. 그리고, 각 뿌리조성물을 처리하지 않은 군을 대조군으로 설정하였다.

배양 3일 후 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)용액 2mg을 첨가하여 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 생성된 포마잔 결정(formazan crystals)을 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 용해하였다.

그리고 이를 ELISA reader(BIO-RAD 450, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 확인하였고, 그 결과를 하기 [표 2] 및 도 2에 나타내었다.

표 2

구분		0	50	100	250	500
실시예1 (SC-W)	파골 세포 생존율(%)	100±12.18	105.10±02.09	104.57 ±13.42	100.92±4.06	56.84±1.68
실시예2 (SC-E)	파골 세포 생존율(%)	100±12.18	98.65±3.12	110±7.35	117.11 ±10.39	53.49±4.19

상기 [표 2] 및 도 2의 그래프를 살펴보면, 마우스 대식 세포주 RAW264.7 세포를 이용하여 RANKL에 의해 유도된

과골세포 생존율이 청미래당굴 뿌리조성물의 0 ~ 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에 이르기까지 각 뿌리조성물의 농도가 증가할수록, 물 추출물(SC-W) 보다 에탄올 추출물(SC-E)의 과골세포의 생존율이 상대적으로 높은 경향을 보였다.

[0111] 그러나, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도는 물 추출 용매는 56.84%, 에탄올 추출 용매는 53.49%의 세포 생존율을 보임으로써 세포 독성을 가지는 것으로 판단된다.

[0113] [실험예 3] TRAP 효소 활성 측정 실험

[0114] 골세포 특이 지표인 TRAP 효소의 활성을 측정하기 위하여 TRAP solution assay를 Tintut 등 (2002)의 방법으로 수행하였다. TRAP 효소는 ATP와 니트로페닐 포스페이트(nitrophenyl phosphate)가 존재할 때 높은 활성을 가지고, 골 흡수작용시 분비가 증가되기 때문에 그 활성도 측정하여 과골세포 분화정도를 확인하는 데 이용할 수 있다.

[0115] 하기 [표 3]의 농도를 갖도록 실시예1 및 실시예2의 청미래당굴 뿌리조성물로 처리한 3일된 세포와 분화제를 PBS로 수세 후 차가운 라이시스 버퍼(cold lysis buffer, 90mM 구연산염, pH4.8, 타르타르산나트륨 80mM 함유한 0.1% Triton X-100)를 80 μl 씩 분주하여 10분간 처리하고, 20mM p-니트로페닐 포스페이트(p-nitrophenyl phosphate, substrate solution)을 80 μl 씩 첨가하여 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 배양기에서 20분간 반응시켰다.

[0116] 다음으로, 40 μl 의 0.5 N NaOH로 반응을 중지시킨 다음, ELISA reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 확인하였고, 그 결과를 하기 [표 3] 및 도 3에 나타내었다.

표 3

구분	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	50	100	250	500
실시예1 (SC-W)	TRAP 활성(%)	100 $\pm$ 0.71	56.92 $\pm$ 3.65	54.07 $\pm$ 1.10	22.14 $\pm$ 1.10	7.51 $\pm$ 0.21
실시예2 (SC-E)	TRAP 활성(%)	100 $\pm$ 0.71	59.21 $\pm$ 10.29	45.06 $\pm$ 1.21	37.18 $\pm$ 1.01	5.19 $\pm$ 0.07

[0118] 상기 [표 3] 도 3를 살펴보면, 실시예1,2의 TRAP 활성도는 농도 의존적으로 RANKL 만을 처리한 대조군에 비하여 현저하게 낮은 활성도를 보이는 경향이 있었다. 세포 치사 활성이 없는 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 물 추출(SC-W, 22.14%) 및 에탄올 추출(SC-E, 37.18%)로서 대조군에 비해 현저하게 감소된 과골세포 분화 활성을 보였다. 특히, 실시예1의 물 추출 용매(SC-W)의 경우, 실시예2의 에탄올 추출 용매(SC-E) 보다 현저하게 낮은 TRAP 활성을 보여서, 가장 우수한 과골세포활성의 억제능을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0120] [실험예 4] TRAP 효소 및 Cal-R (칼시토닌 수용체) 단백질 발현 측정 실험

[0121] 과골세포는 다양한 사이토카인, 호르몬 및 유전인자 조절 등으로 시작, 분화, 다핵화 그리고 성숙화 등 복잡한 과정에 의해 형성되는데, Cal-R(calcitonin receptor)와 TRAP이 존재하며 실제로 골 흡수작용을 하는 산 생성이 활발하고, acting ring을 형성하여 골 기질을 흡수한다고 알려져 있다. 이에 성숙 과골세포의 골기질 흡수 단계에 관여하는 TRAP 및 Cal-R(calcitonin receptor)단백질의 발현을 관찰하기 위하여 웨스턴블랏(western blot) 방법으로 수행하였다.

[0122] 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도를 갖도록 실시예1 및 실시예2의 조성물로 처리한 3일된 세포와 분화제를 PBS로 수세 후 차가운 라이시스 버퍼(cold lysis buffer, Pro-PREPTM, iNtRON)를 4000 μl 을 첨가하여 30분간 냉동(-20 $^{\circ}\text{C}$)처리하고, 원심 분리(4 $^{\circ}\text{C}$, 13,000rpm, 10min)하여 상층액을 취하여 BCA 법으로 단백질을 정량하였다.

[0123] 단백질 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 sample buffer(60 mM Tris-Cl; pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptaethanol, 0.1% bromphenol blue)를 혼합하여 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 끓인 후 급속 냉각하였으며, 각 lane 별 120V에서 전기 영동하였다. PVDF막으로 단백질을 부착하였고, 5% bovine serum albumin로 blocking 하였으며, 1차 항체로 TRAP 와 Cal-R을 각각 반응시킨 후, 2차 항체로 HRP-conjugated anti-rabbit으로 처리하였다.

[0124] 목적단백질을 동정하기 위하여 기질로 ECL(enhanced chemiluminescence)을 사용한 후, membrane을 X-ray film 에 노출시켜 LAS3,000 image analyzer를 사용하여 밴드를 현상하여 정량화하였다. 그 결과를 하기 표 4 및 도 4에 나타내었다.

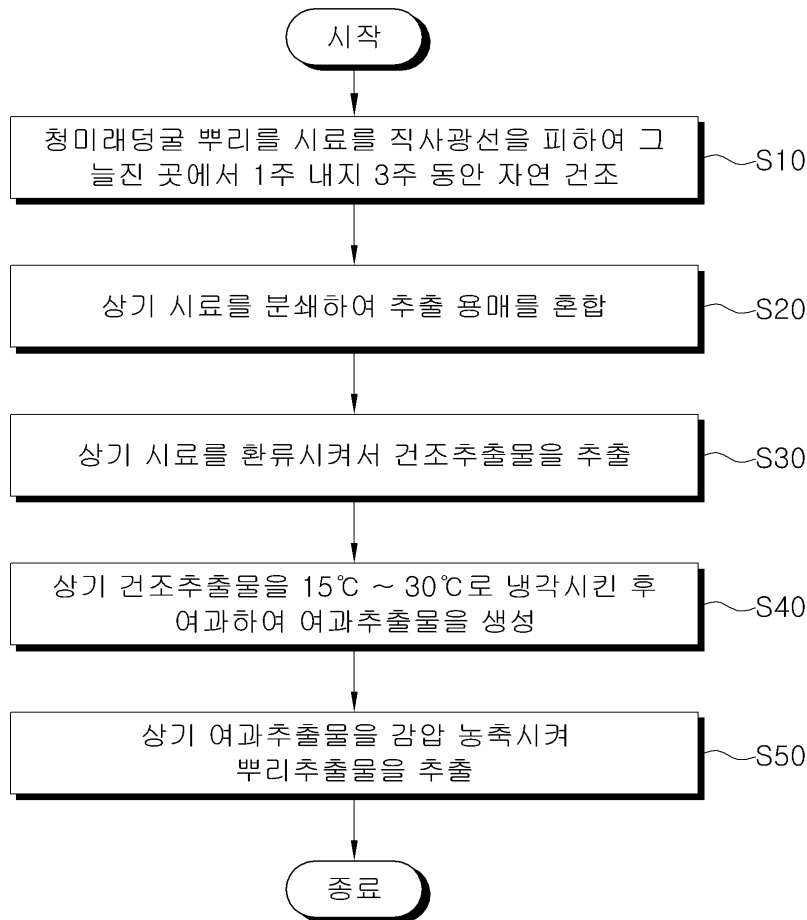
표 4

구분	농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	TRAP	Cal-R
	0	100 ± 12.14	100 ± 10.53
실시예1(SC-W)	250	25.67 ± 1.80	75.14 ± 5.88
실시예2(SC-E)	250	39.19 ± 5.75	71.95 ± 12.14

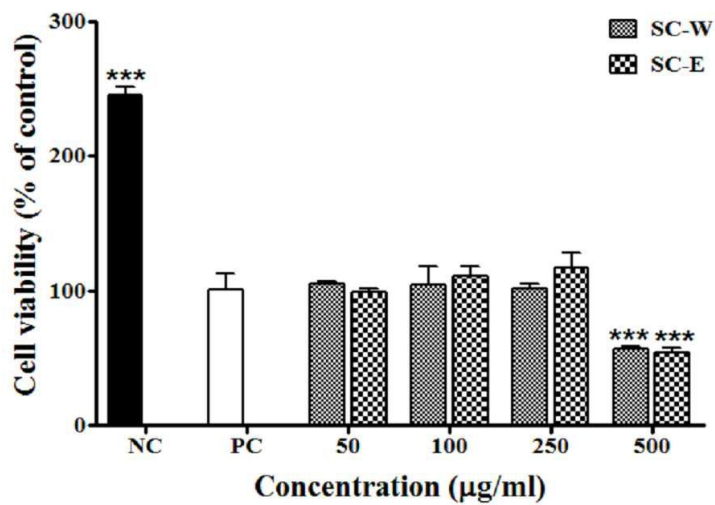
- [0125]
- [0126] [표 4] 및 도 4를 살펴보면, 청미래덩굴 뿌리조성물의 TRAP 단백질 발현은 대조군에 비하여 현저한 낮은 발현량을 보이는 경향이였다. 특히, 실시예1의 물 추출 용매(SC-W)의 경우, 실시예2의 에탄올 추출 용매(SC-E) 보다 현저하게 낮은 TRAP 단백질 발현을 보여서, 가장 우수한 파골세포활성의 억제능을 갖는 것을 확인할 수 있었다.
- [0127] 또한, 청미래덩굴 뿌리조성물에서 Cal-R 단백질 발현은 대조군에 비하여 현저한 낮은 발현량을 보이는 경향이였고, 실시예1과 실시예2는 차이는 보이지 않았다.
- [0128] 따라서 RANKL에 의한 TRAP 효소활성의 억제와 마찬가지로 Cal-R와 TRAP의 단백질 발현 역시 청미래덩굴 뿌리조성물에 의해서 유의하게 억제된다는 것을 알 수 있었다.
- [0129] 이는 청미래덩굴 뿌리조성물을 포함하는 유효성분이 NF-kB과 MAPKs 경로조절을 하고, NF-kB, NFATc1 그리고 c-Fos등을 조절하여 파골세포분화를 억제하는 것으로 판단될 수 있다.
- [0130] 그러므로 청미래덩굴 뿌리조성물은 파골세포분화 전사인자인 NFATc1을 억제하여 Cal-R와 TRAP를 감소시켰을 것으로 예상되고, 이로 인해 최종적으로 골기질 흡수가 억제될 것으로 판단될 수 있다.
- [0132] [실험예 5] TRAP 염색을 통한 양성파골세포 분화 관찰
- [0133] RAW264.7 세포로부터 유도 분화된 파골세포에서 시그마 TRAP 염색(tartate resistant acid phosphate)을 통하여 성숙 파골세포의 형태를 광학현미경으로 관찰하고, 디지털 영상카메라로 이미지를 영상화하여 둥근 모양 형태의 파골세포(round-shaped osteoclast, ROC) 수를 관찰하였다.
- [0134] 실시예1 및 실시예2의 [표 1]에서 실시한 청미래덩굴 뿌리추출물 세포 치사 활성을 나타내지 않는 0 ~ 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도를 갖는 조성물로 각각 처리하여 3일간 배양한 후 TRAP 염색을 시행하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0135] 도 5를 살펴보면, 대조군(control)에서 둥근 모양 형태 파골세포(ROC) 즉, 세포가 융합되면서 다핵의 성숙 파골세포가 형성되어 골 표면에 부착하여 골 흡수 작용을 하는 TRAP 양성 다핵형 파골세포가 뚜렷하게 관찰되었다.
- [0136] 그리고, 대조군과 비교할 때, 모든 청미래덩굴 뿌리조성물의 처리군에서 현저하게 감소된 ROC와 융합되지 않은 단핵의 전파골세포와 불규칙 모양 형태 파골세포 (irregular shaped osteoclast, IOC)가 풍부하게 관찰되었다.
- [0137] 도 5의 양성파골세포 분화 관찰을 통해서 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화과정 중에 청미래덩굴 뿌리조성물의 농도에 의존적으로 파골세포 분화 억제에 직접적으로 관여한다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0139] 상기 [실험예1 ~ 5]를 통하여, 본 발명이 제시하는 방법으로 추출한 청미래덩굴 뿌리추출물이 파골세포 활성의 억제를 통해서 골다공증 예방 및/또는 개선 효과를 갖을 수 있음을 확인할 수 있었으며, 이러한 청미래덩굴 뿌리추출물을 이용하여 골다공증 예방 및/또는 개선용 의약품, 건강기능식품을 제공할 수 있음을 확인하였다.
- [0141] 상기 [실험예 1 ~ 5]의 모든 실험군은 3개 이상 수행하였으며 정량적 결과는 본 연구에 대한 실험결과는 통계분석 SAS 8.2를 이용하여 ANOVA (Analysis of variation) 검정을 실시한 후 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)의 다중범위검정과 two-tailed Student's t-test로 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였고, 대조군에 대한 백분율로 평균 $\pm$ 표준편차로 나타냈다.
- [0143] 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

도면

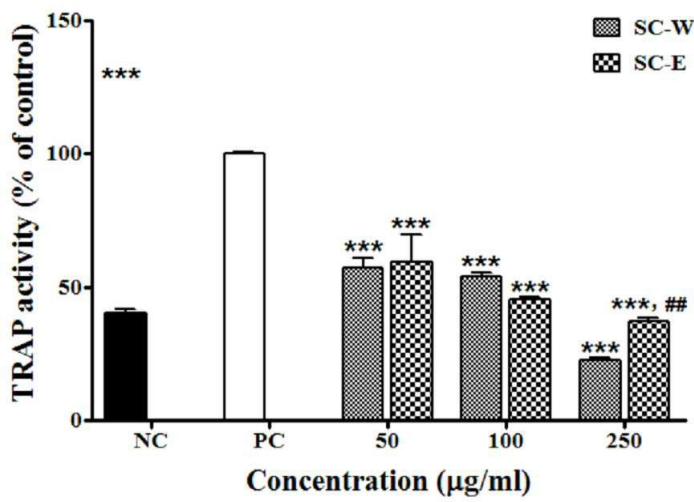
도면1



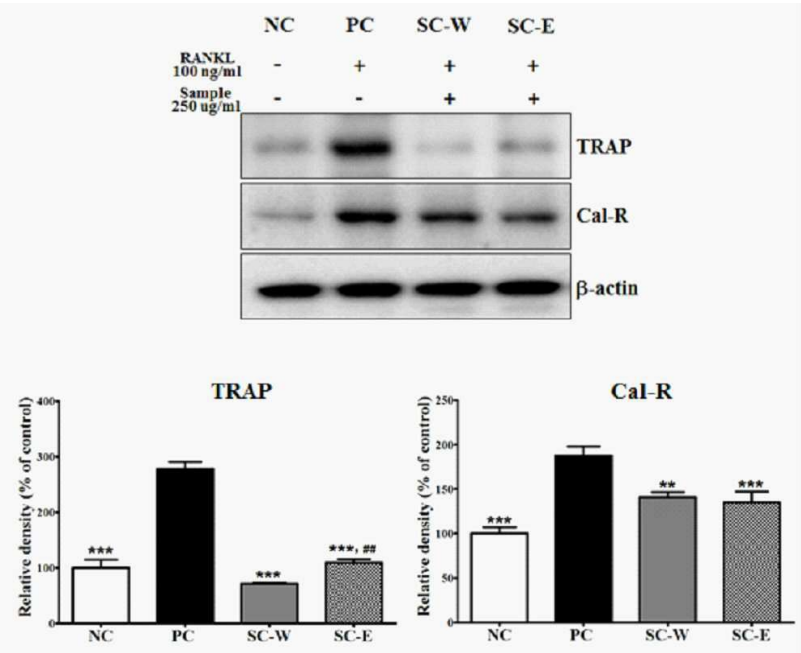
도면2



도면3



도면4



도면5

