



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0033506
(43) 공개일자 2019년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/07 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/07 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0032335(분할)
(22) 출원일자 2019년03월21일
심사청구일자 2019년03월21일
(62) 원출원 특허 10-2017-0092710
원출원일자 2017년07월21일
심사청구일자 2017년07월21일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
정길생
대구광역시 수성구 들안로 300, 102동 901호 (수
성동3가, 수성 코오롱 하늘채)
(74) 대리인
특허법인태백

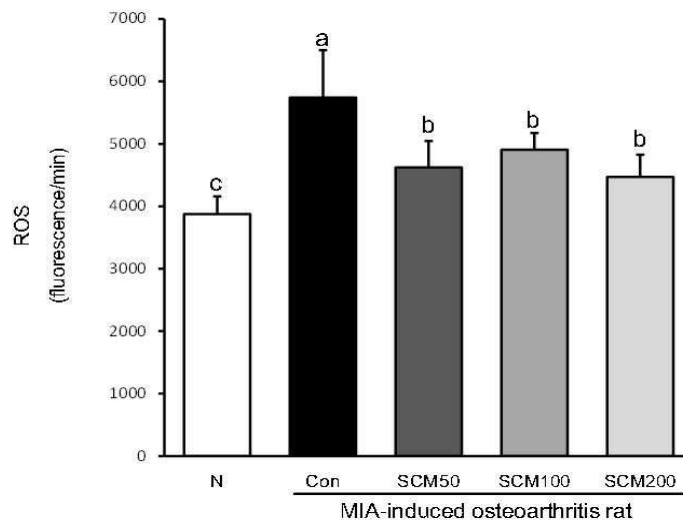
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 꽃송이버섯 추출물은 산화스트레스 인자인 활성산소종의 발생을 저해하고, 골관절염에 작용하여 염증성 사이토카인 및 매개 인자의 활성을 저해함으로써, 조골작용의 저해를 예방하고 파골작용을 억제함으로써 관절의 연골 및 조직의 파괴를 보호하고 개선시키는 효과가 확인됨에 따라, 상기 꽃송이버섯 추출물은 효과적인 골관절염 예방 또는 치료용 조성물로 제공될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

Y10S 514/825 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20160746

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품개발사업

연구과제명 꽃송이버섯을 활용한 골관절염 개선 건강기능성식품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

꽃송이버섯 추출물을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는, 관절조직 내 Nox4 (NADPH oxidase 4), p22phox (Cytochrome B-245 Alpha Chain) 및 p47phox (Neutrophil cytosol factor 1)의 발현억제 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 꽃송이버섯 추출물은 물, C1 내지 C4의 알콜 또는 이의 혼합 용매에 의해 추출되는 것을 특징으로 하는 발현억제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 류마티스 관절염과 골관절염은 관절염으로 통칭되는 대표적인 관절 질환이나, 발명 원인과 증상, 치료법에서 차이가 있기 때문에 분명한 구분이 필요하다.

[0003] 골관절염은 서서히 발병하여 초기에는 관절의 강직감을 호소하고 점차적으로 진행되어 운동 시 관절에 통증을 일으키고 휴식에 의해 완화되나, 부종과 기능저하를 발생시켜 일상생활에 장애를 일으키게 하는 질병으로, 골관절염의 치료는 관절의 강직감과 통증을 경감시키고, 가동 능력을 유지 및 개선시켜 장애가 최소화되도록 하는 것이 치료의 일차 목표이다.

[0004] 반면 류마티스 관절염은 관절의 염증과 통증을 보이는 대표적인 전신성 만성 자가면역성 질환으로 관절 내 활액 조직의 염증 및 증식을 시작으로 주변의 연골, 뼈 등의 모든 관절 구조를 손상시켜 변형과 장애를 유발한다. 관절 이외 타 장기도 침범하여 류마티스결절, 심막염, 폐섬화유, 신경염 등 관절 외 증상을 초래하는 질환으로 관절의 연골과 주위골에 퇴행 변화가 나타나 발병하는 골관절염과는 발병의 원인과 증상에 분명한 차이가 존재하므로, 류마티스 관절염과 골관절염은 서로 다른 치료방법의 개발이 필요하다.

[0005] 골관절염의 가장 큰 특징은 연골 파괴로, 연골은 항상성을 유지하는 연골세포가 변화하고 사멸되어 콜라겐(Collagen), 프로테오글리칸(Proteoglycan) 등의 세포외기질 생산이 감소하고 분해효소가 활성화되면서 연골이 파괴되는 데, 이러한 연골파괴의 과정에서 IL-1 β , TNF- α 등과 같은 사이토카인의 역할이 중요하기 때문에 세포외기질 분해효소나 세포성/염증성 사이토카인 상호작용을 직접 매개하고 또한 질병의 진행을 지연시키는 약학적 치료법을 포함한다. 비처방(over-the-counter) 약물 및 처방 약물이 증상 경감을 위해 제공되나, 이들은 많은 부작용을 야기한다. 예를 들어, 아스피린, 이부프로펜 또는 아세트아미노펜과 같은 비-스테로이드성 항염증 약물의 고용량의 장기간 사용은 위장 장애(upset stomachs), 위장관 출혈 및 간 손상으로 이어질 수 있다. 코르티코스테로이드와 같은 더 강력한 처방 약물은 취약골(brittle bones), 백내장 및 혈당 상승으로 이어질 수 있기 때문에 보다 안전하고 효과적인 골관절염 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2014-0031459호 (2014.03.13 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 안전하고 효과적으로 골관절염 예방 또는 치료제를 제공하기 위해, 천연물질인 꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, 상기 꽃송이버섯 추출물은 산화스트레스 인자인 활성산소종의 발생을 저해하고, 골관절염에 작용하여 염증성 사이토카인 및 매개 인자의 활성을 저해함으로써, 조골작용의 저해를 예방하고 파골작용을 억제함으로써 관절의 연골 및 조직의 파괴를 보호하고 개선시키는 효과가 확인됨에 따라, 상기 꽃송이버섯 추출물은 효과적인 골관절염 예방 또는 치료용 조성물로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 MIA에 의해 골관절염이 유도된 랫에서 뒷다리 체중 부하의 상대적 변화를 확인한 결과이다. N: 정상군, Con: MIA로 골관절염이 유도된 대조군, SCM50: MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 50 mg/kg가 투여된 실험군, SCM100: MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 100 mg/kg가 투여된 실험군, SCM200: MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 200 mg/kg가 투여된 실험군임.

도 2는 각 실험군의 혈청 내 산화 스트레스 바이오마커인 ROS 수준을 확인한 결과이다(n=8).

도 3은 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 SOD 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 4는 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 카탈라아제(catalase) 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 5는 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 GPx 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 6은 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 p-I κ B α 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 7은 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 NF- κ Bp65 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 8은 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 COX-2 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 9는 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 iNOS 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 10은 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 TNF- α 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 11은 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 IL-6 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 12는 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 Nox-4 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 13은 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 p22phox 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 14는 골관절염이 유도된 랫에서 꽃송이버섯 추출물(SCM)에 의한 p47phox 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 15는 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물을 투여하고 무릎 관절 조직을 사프라닌 0로 염색하여 조직학적으로 분석한 결과로($\times 40$), (A)는 정상군이며, (B)는 골관절염이 유도된 대조군이며, (C)는 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 50 mg/kg가 투여된 실험군이며, (D)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 100 mg/kg가 투여된 실험군이며, (E)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 200 mg/kg가 투여된 실험군이다.

도 16은 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물을 투여하고 무릎 관절 조직을 사프란인 0로 염색하여 조직학적으로 분석한 결과로($\times 100$), (A)는 정상군이며, (B)는 골관절염이 유도된 대조군이며, (C)는 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 50 mg/kg가 투여된 실험군이며, (D)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 100 mg/kg가 투여된 실험군이며, (E)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 200 mg/kg가 투여된 실험군이다.

도 17은 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물을 투여하고 무릎 관절 조직을 헤마톡실린&에오신(H&E)으로 염색하여 조직학적으로 분석한 결과로($\times 40$), (A)는 정상군이며, (B)는 골관절염이 유도된 대조군이며, (C)는 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 50 mg/kg가 투여된 실험군이며, (D)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 100 mg/kg가 투여된 실험군이며, (E)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 200 mg/kg가 투여된 실험군이다.

도 18은 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물을 투여하고 무릎 관절 조직을 헤마톡실린&에오신(H&E)으로 염색하여 조직학적으로 분석한 결과로($\times 100$), (A)는 정상군이며, (B)는 골관절염이 유도된 대조군이며, (C)는 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 50 mg/kg가 투여된 실험군이며, (D)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 100 mg/kg가 투여된 실험군이며, (E)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 200 mg/kg가 투여된 실험군이다.

도 19는 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물을 투여하고 무릎 관절 조직을 메이슨 트리크롬(Masson's Trichrome; M-T)으로 염색하여 조직학적으로 분석한 결과로($\times 40$), (A)는 정상군이며, (B)는 골관절염이 유도된 대조군이며, (C)는 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 50 mg/kg가 투여된 실험군이며, (D)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 100 mg/kg가 투여된 실험군이며, (E)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 200 mg/kg가 투여된 실험군이다.

도 20은 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물을 투여하고 무릎 관절 조직을 메이슨 트리크롬(Masson's Trichrome; M-T)으로 염색하여 조직학적으로 분석한 결과로($\times 100$), (A)는 정상군이며, (B)는 골관절염이 유도된 대조군이며, (C)는 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 50 mg/kg가 투여된 실험군이며, (D)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 100 mg/kg가 투여된 실험군이며, (E)는 MIA로 골관절염이 유도된 랫에 꽃송이버섯 추출물(SCM) 200 mg/kg가 투여된 실험군이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0013] 상기 꽃송이버섯 추출물은 물, C1 내지 C4의 알콜 또는 이의 혼합물에 의해 추출될 수 있다.
- [0014] 상기 꽃송이버섯 추출물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여, 0.1 내지 90 중량부로 포함될 수 있다.
- [0015] 상기 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 여름에서 가을까지 침엽수의 자른 그루터기나 죽은 나무의 언저리에서 자생하는 버섯으로, 면역력 강화 및 항암 효과가 확인되었으며, 최근 연구에 따르면 꽃송이버섯이 내장지방을 감소시키고 콜레스테롤 흡수를 억제하는 것으로 확인되었으나, 골관절염을 예방하거나 치료하는 효과에 대해서는 보고되어 있지 않다.
- [0016] 한편, 본 발명의 일실시예에 따르면, 랫에 모노소듐 아이도아세테이트(MIA)로 골관절염을 유도시킨 후 꽃송이버섯 추출물을 체중 당 50, 100 및 200 mg씩 투여한 후 골관절염이 유발된 슬관절 내 활막조직, 연골세포 및 섬유조직에 헤마톡실린&에오신(H&E), 메이슨 트리크롬(Masson's Trichrome; M-T) 및 사프란인-0(Safranin-O) 염색을 수행하여 조직학적으로 분석한 결과, 도 15 및 16과 같이 정상군은 관절 조직과 프로테오글리칸이 정상적으로 확인되었으나, 대조군은 골관절염 유발로 인해 정상 관절 조직과 프로테오글리칸의 파괴가 확인되었다. 반면, SCM 투여군들에서는 관절 조직과 프로테오글리칸의 파괴가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0017] 또한, 헤마톡실린&에오신 염색 결과 도 17 및 18과 같이 정상군에서는 활막 조직 및 연골 조직이 정상으로 확인되었으나, 대조군에서는 골관절염 유발로 인하여 활막 조직과 연골 조직의 심각한 손상이 나타났다. 그러나 SCM 투여군에서는 대조군과 비교하여 활막 조직과 연골 조직의 손상이 효과적으로 억제되는 것이 확인되었다.
- [0018] 마지막으로 메이슨 트리크롬(M-T) 염색 결과, 도 19 및 20과 같이 정상군에서는 활막 조직 및 연골 조직의 콜라겐 염색 수준이 정상으로 확인된 반면, 대조군에서는 골관절염 유발로 인하여 면역세포의 침투와 활막 조직 및

연골 조직의 심각한 손상이 나타났다. 반면 SCM 투여군에서는 면역세포의 침투와 활막 조직 및 연골 조직의 손상이 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

- [0019] 상기 결과들로부터 꽃송이버섯 추출물은 골관절염에 작용하여 염증성 사이토카인 및 매개 인자의 활성을 억제하며, 관절의 연골 및 조직의 파괴에 대한 보호작용이 있는 것으로 확인되었으며, 이에 따라 상기 꽃송이버섯 추출물은 효과적인 골관절염 치료제로 제공될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 구체예에서, 꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 봉해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0022] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 율활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0024] 상기 꽃송이버섯 추출물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 또한, 본 발명은 꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.
- [0027] 상기 꽃송이버섯 추출물은 물, C1 내지 C4의 알콜 또는 이의 혼합물에 의해 추출될 수 있다.
- [0028] 상기 건강식품은 상기 꽃송이버섯 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0029] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0030] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제들을 들 수 있다.

- [0032] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0034] <참고예> 시약
- [0035] 모노소듐 아이도아세테이트(monosodium iodoacetate; MIA), PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), 디티오프레이톨(dithiothreitol; DTT)는 Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. p-IκBa(Phosphorylated inhibitor of κBa), NF-κB(nuclear factor-κappa B), 수퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase; SOD), 카탈라아제(catalase), 글루타티온과산화수효소(glutathione peroxidase; GPx), iNOS(inducible nitric oxide synthase), COX-2(cyclooxygenase-2), TNF-α(tumor necrosis factor alpha), IL-6 (interleukin-6), NOX4(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate4), p22phox, p47phox, 히스톤(histone), β-액틴과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, 항 Protease inhibitor mixture, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 또한, Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little Chalfont, UK)에서 구입하였고, ECL Western Blotting Detection Reagents와 nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.
- [0037] <실시예 1> 동물실험 및 꽃송이버섯 추출물 준비
- [0038] 1. 동물
- [0039] 7주령의 수컷 Sprague-Dawley rat (200~250 g)을 대한바이오 (Gyeonggi-do, Korea)에서 공급받아 실험 당일까지 고형 사료 (Samyang corporation, Korea)와 물을 충분히 공급하고, 온도 (22±2℃), 습도 (55±5%)가 조절된 사육실에서 12시간 명-암 주기 환경을 유지하며 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.
- [0040] 또한, 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인 (승인번호: DHU2016-094)을 받았다.
- [0042] 2. 골관절염 유발
- [0043] 골관절염을 유발시키기 위해, 랫의 오른쪽 무릎 주변을 깨끗이 제모한 후 골관절염 유발물질인 모노소듐 아이도아세테이트(monosodium iodoacetate; MIA)를 0.3 mL 인슐린 주사기(BD 31G Ultra-Fine II, USA)를 사용하여 오른쪽 무릎 관절강 내에 50 μL (80 mg/mL) 씩 투여하였다. MIA 희석 시에는 0.9% 식염수를 사용하였다.
- [0045] 3. 꽃송이버섯 추출물(SCM) 준비 및 투여
- [0046] 꽃송이버섯 1kg를 메탄올 4L를 넣어 70~80℃에서 환류 냉각 추출하는 과정을 3번 반복하여 메탄올 엑스를 153g 얻었으며, 상기 방법으로 모노소듐 아이도아세테이트(MIA)로 골관절염을 유도시킨 랫에 꽃송이버섯 추출물을 체중당 50, 100 및 200 mg씩 투여하였다.
- [0048] <실시예 2> 체중 및 식이섭취량 확인
- [0049] 꽃송이버섯 추출물의 안정성을 확인하기 위해, 체중변화 및 식이 효율 변화를 확인하였다.
- [0050] 랫의 체중을 전자체중계로 2일간 하루 1회씩 동일 시간 동일 조건에서 측정하였고, 식이섭취량은 2일 동안 제공된 사료에서 2일간 섭취하고 남은 사료량을 측정한 후 각 실험군의 하루 사료섭취량을 산출하였다.
- [0051] 그 결과, 표 1과 같이 MIA 유발 전과 후 4주 동안 모든 군에서 체중이 증가하였으며 대조군과 비교하였을 때 투

여군들 간의 유의성은 없었다.

[0052] 또한, 식이섭취량은 정상군 25.1 ± 1.5 g, 대조군 23.9 ± 2.7 g, SCM50군 24.4 ± 2.4 g, SCM100군 24.4 ± 2.1 g 및 SCM200군은 23.3 ± 2.4 g으로 나타났으며, 각 군 간의 유의성은 없었다.

표 1

[0053]

그룹	몸무게(g)					섭취량 (g/day)
	-2 주	-1 주	0 주	1 주	2 주	
N	296.5 ± 10.8^a	349.4 ± 7.3^a	376.4 ± 11.8^{ab}	394.6 ± 19.7^a	419.9 ± 11.2^a	25.1 ± 1.5^a
Con	296.1 ± 15.1^a	352.1 ± 16.8^a	377.8 ± 16.9^a	393.4 ± 19^a	406.6 ± 21.3^{ab}	23.9 ± 2.7^a
SCM 50	296.1 ± 11.2^a	341.4 ± 14.1^a	364.6 ± 14.7^{ab}	382.4 ± 19.1^a	395.6 ± 21.2^b	24.4 ± 2.4^a
SCM 100	296 ± 9.2^a	352.8 ± 14.6^a	373.4 ± 18.5^{ab}	393.3 ± 19.4^a	407.9 ± 21.8^{ab}	24.4 ± 2.1^a
SCM 200	297.5 ± 8.2^a	340.3 ± 20.1^a	358.6 ± 24.8^b	377.8 ± 25.6^a	392.3 ± 28.5^b	23.3 ± 2.4^a

[0055] <실시예 3> 뒷다리 체중 부하 확인

[0056] 꽃송이버섯 추출물(SCM)을 오전에 투여하고 오후에 부하 측정을 수행하였다.

[0057] 부하 측정은 MIA 주사 전날, 주사 후 7일, 14일에 각각 수행하였으며, Incapacitance tester (Ser No. 01/45/25, Linton instrument Co., UK)를 이용하여 오른쪽, 왼쪽 발 무게를 각각 측정하였다.

[0058] MIA에 의해 골관절염이 유발될 경우, 랫은 MIA를 투여하지 않은 발에 의지하여 테스트의 홀더 안에 서게 하였다. 랫의 배가 기기 센서에 닿지 않은 상태에서 왼쪽, 오른쪽 각각의 발무게(g)를 측정하고, 그 결과값을 하기 계산식과 같이 관절염이 유발된 오른쪽 뒷다리의 체중 부하량에 대한 정상인 왼쪽 뒷다리의 체중 부하량을 계산하여 체중 부하 비율을 계산하고, 정상군의 체중 부하 비율에 각 군의 체중 부하 비율을 계산하여 평균±표준편차로 표시하였다.

[0059] [계산식]

$$I \text{ 체중부하비율} = \frac{\text{정상뒷다리의 체중 부하량}}{\text{관절염이 유발된 뒷다리의 체중 부하량}}$$

$$II \text{ 상대적 체중 부하} = \frac{\text{각 군의 체중 부하 비율}}{\text{정상군의 평균 체중 부하 비율}} \times 100$$

[0060]

[0062] 정상군의 뒷다리 체중부하 비율을 100으로 하였을 때, 각 군의 상대적 뒷다리 체중 부하의 변화를 측정한 결과, 도 1과 같이 MIA 투여 1주일 후에는 대조군 191.44 ± 95.15 로 나타나 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈으며, SCM50군 199.11 ± 87.28 , SCM100군 158.47 ± 44.84 , SCM200군은 195.05 ± 35.75 로 대조군과 비슷한 수치를 나타냈다. MIA 투여 2주일 후에는 대조군 142.74 ± 44.71 , SCM50 145.57 ± 32.61 , SCM100군 141.12 ± 38.49 , SCM200군 165.10 ± 26.62 로 나타났다.

[0063] 상기 결과로부터 꽃송이버섯 추출물은 골관절염이 유발된 랫의 뒷다리 통증을 효과적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0065] <실시예 4> 혈청 내 산화적 스트레스 바이오마커 확인

[0066] 산화적 스트레스 바이오마커인 활성산소종(Reactive Oxygen Species; ROS)은 연골조직을 파괴하는 물질 중 하나로 알려짐에 따라, 골관절염이 유도된 동물모델에서 ROS에 꽃송이버섯 추출물에 미치는 영향을 확인하였다.

[0067] 복대정맥에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청을 수집하였으며, 관절조직은 1mM EDTA - 50mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.4)를 이용하여 분쇄한 후 활성산소종(Reactive Oxygen Species; ROS)을 측정하기 위하여 25 mM DCF-DA를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 5분씩 530 nm 방출파장과 485nm 여기 파장을 이용하여 30분간 측정하고 산출 값을 계산하였다.

[0068] 혈청에서 ROS를 보고되어진 방법(Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radic Biol Med. 1994;16(2):149-56.)으로 측정하였다.

[0069] 그 결과, 도 2와 같이 대조군의 ROS(5741.1 ± 758.7 fluorescence/ml)는 정상군(3875.6 ± 283.8 fluorescence/ml)과 비교하여 유의성 있게 증가한 반면, SCM50 군(4622.2 ± 424.2 fluorescence/ml), SCM100 군(4906.7 ± 266.2 fluorescence/ml) 및 SCM200 군(4470 ± 358.1 fluorescence/ml)은 대조군과 비교하여 유의하게 감소된 것이 확인되었다.

[0071] <실시예 5> 혈청 내 항-타입 II 콜라겐 항체 확인

[0072] 혈청 내 항-타입 II 콜라겐 항체의 수치는 페옥시니트리트(peroxynitrite; ONOO-)와 산화적 스트레스를 형성하는데 관련이 있는 것으로 알려짐에 따라, rat anti-type II collagen IgG ELISA kit (Chondrex Inc., Redmond, USA)를 이용하여 혈청 내 항-타입 II 콜라겐 항체 측정하였다.

[0073] 그 결과, 표 2와 같이 대조군은 정상군보다 유의성 있는 증가를 나타낸 반면, SCM100 및 200군에서는 유의한 감소가 확인되었다.

표 2

Group	Collagen-II IgG antibody (Unit/mL)
N	1.78 ± 0.68^b
Con	2.95 ± 1.93^a
SCM50	3.19 ± 0.44^a
SCM100	0.21 ± 0.75^c
SCM200	0.22 ± 0.35^c

[0076] <실시예 6> 산화적 스트레스 바이오마커 ROS에 대한 꽃송이버섯 추출물의 효과 확인

[0077] 1. 웨스턴 블롯 분석

[0078] 관절조직의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 1.5 M 수크로스, 0.1 M DTT 및 단백질분해효소 억제제 칵테일을 첨가한 버퍼 A를 넣고 tissue grinder (Bio Spec Product, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다.

[0079] 핵을 얻기 위해, 10% NP-40을 첨가한 버퍼 A로 두 번 세척하고 100μl의 버퍼 C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF and 10% glycerol)를 첨가해 재 부유시킨 후, 10분마다 vortex 을 3번 수행하였다.

[0080] 그 후 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80℃에서 각각 냉동 보관하였다. 관절조직의 세포질의 p-IκBα, COX2, iNOS, TNF-α, IL-6, SOD-1, Catalase, GPx, NOX4, p22phox, p47phox, β-actin 및 핵의 NF-κBp65, Histone 단백질의 발현을 측정하기 위해 10μg의 단백질을 8~15% SDS-폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기연동 후, 아크릴아마이드 겔을 니트로셀룰로스 막으로 이동시켰다. 준비된 막에 각각의 1차 항체를 처리하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 반응

시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다.

[0081] 그 후, ECL(enhanced chemiluminescence) 용액을 GE Healthcare에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc에 감광시켜 단백질 발현을 확인하고, 해당 밴드를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)프로그래를 사용하여 정량하였다.

[0083] 2. 관절조직 내 항산화 단백질 분석

[0084] ROS 소거와 관련된 항산화 활성은 항산화 효소 단백질로 알려진 SOD, CAT 및 GPx에 의해서 조절되는 데, 상기 단백질들은 스트레스에 의해 유발된 ROS의 축적에 의한 세포 손상을 억제함에 따라, 꽃송이버섯 추출물이 상기 단백질 발현에 미치는 영향을 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다.

[0085] 관절 조직에서 SOD 단백질을 분석한 결과, 도 3과 같이 정상군 1.00 ± 0.05 , 대조군 0.75 ± 0.02 , SCM50군 0.72 ± 0.04 , SCM100군 0.75 ± 0.01 , SCM200군 0.89 ± 0.04 으로 확인되었으며, 특히 SCM200군에서 대조군과 비교하여 유의한 증가를 나타냈다.

[0086] 또한, 관절 조직에서 catalase 단백질을 분석한 결과, 도 4와 같이 정상군 1.00 ± 0.06 , 대조군 0.86 ± 0.05 , SCM50군 0.78 ± 0.04 , SCM100군 0.83 ± 0.05 , SCM200군 0.97 ± 0.04 로 나타났으며, 특히, SCM200군에서 대조군에 비해 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0087] 마지막으로 관절 조직에서 GPx 단백질을 분석한 결과, 도 5와 같이 정상군 1.00 ± 0.08 , 대조군 0.83 ± 0.03 , SCM50군 0.64 ± 0.03 , SCM100군 0.97 ± 0.1 , SCM200군 0.99 ± 0.08 으로 발현이 나타났으며, 대조군과 비교하여 SCM100 및 200군에서 발현 증가가 확인되었다.

[0088] 상기 결과로부터 골관절염 유발 동물의 조직 내 항산화 효소는 정상군과 비교하여 유의성있게 감소되는 반면, 꽃송이버섯 추출물은 항산화 효소 단백질로 알려진 SOD, CAT 및 GPx의 발현을 증가시켜 ROS에 의한 조직 손상을 효과적으로 억제할 수 있음이 확인되었다.

[0090] 3. 관절조직 내 염증 사이토카인 및 매개 인자 분석

[0091] 골관절염이 유도된 동물모델에서 꽃송이버섯 추출물이 관절조직 내 염증성 사이토카인 및 매개 인자의 발현 수준에 미치는 영향을 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

[0092] 관절 조직에서 p-I κ B α 발현 수준을 분석한 결과, 도 6과 같이 정상군 1.00 ± 0.13 , 대조군 1.43 ± 0.1 , SCM50군 1.07 ± 0.11 , SCM100군 1.18 ± 0.14 및 SCM200군 1.07 ± 0.1 으로 발현이 나타났으며, 특히 SCM200군은 대조군과 비교하여 유의한 감소를 나타내었다.

[0093] 관절 조직에서 NF- κ Bp65 발현 수준을 분석한 결과, 도 7과 같이 정상군 1.00 ± 0.05 , 대조군 1.44 ± 0.12 , SCM50군 1.21 ± 0.08 , SCM100군 1.20 ± 0.11 , SCM200군 1.10 ± 0.05 수준으로 발현이 나타났으며, SCM200군에서 대조군과 비교하여 유의한 감소를 나타내었다.

[0094] 관절 조직에서 COX-2 발현을 확인한 결과, 도 8과 같이 정상군 1.00 ± 0.05 , 대조군 1.18 ± 0.10 , SCM50군 1.04 ± 0.05 , SCM100군 1.08 ± 0.07 , SCM200군 1.03 ± 0.06 수준으로 나타났으며, 정상군과 비교하여 대조군에서는 발현 증가가 확인된 반면, SCM 투여군에서는 대조군보다 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0095] 관절 조직에서 iNOS 발현을 확인한 결과, 도 9와 같이 정상군 1.00 ± 0.04 , 대조군 1.26 ± 0.05 , SCM50군 1.09 ± 0.04 , SCM100군 1.08 ± 0.05 , SCM200군 1.09 ± 0.05 수준으로 발현이 나타났으며, 대조군에서는 정상군과 비교하여 유의성 있게 증가된 반면, SCM 투여군 모두 대조군과 비교하여 유의한 감소를 나타내었다.

[0096] 관절 조직에서 TNF- α 발현 수준을 확인한 결과, 도 10과 같이 정상군 1.00 ± 0.05 , 대조군 1.18 ± 0.03 , SCM50군 1.01 ± 0.07 , SCM100군 1.09 ± 0.11 및 SCM200군 1.04 ± 0.09 수준으로 발현이 확인되었다. 정상군과 비교하여 대조군에서는 발현이 증가하는 경향을 나타낸 반면, SCM 투여군에서는 발현 감소가 나타났다.

[0097] 관절 조직에서 IL-6 발현 수준을 확인한 결과, 도 11과 같이 정상군 1.00 ± 0.10 , 대조군 1.31 ± 0.07 , SCM50군 1.21 ± 0.09 , SCM100군 1.22 ± 0.04 및 SCM200군 1.26 ± 0.06 수준으로 발현이 나타났다. 정상군과 비교하여 대조군에서는 유의한 발현 증가가 확인된 반면, SCM 투여군에서는 대조군과 비교하여 발현이 감소되는

것을 확인할 수 있었다.

[0098] 상기 결과로부터 꽃송이버섯 추출물은 NFkB, COX2, iNOS 발현을 효과적으로 감소시키고 골관절염 진행에 따라 발현이 증가되는 염증성 사이토카인 IL-6의 수준을 유의적으로 감소시키는 것이 확인됨에 따라, 꽃송이버섯 추출물은 골관절염에 효과적으로 사용될 수 있다.

[0100] 4. 관절조직 내 ROS 생성 관련 인자 분석

[0101] Nox4, p22phox 및 p47phox가 ROS 생성 관련 인자로 알려짐에 따라, 상기 인자들에 대한 꽃송이버섯 추출물의 영향을 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

[0102] 관절 조직에서 Nox4 발현 수준을 확인한 결과, 도 12와 같이 정상군 1.00 ± 0.06 , 대조군 0.92 ± 0.06 , SCM50군 1.04 ± 0.10 , SCM100군 1.13 ± 0.13 및 SCM200군 0.63 ± 0.07 수준으로 발현이 나타났다. 정상군과 비교하여 대조군에서는 발현 감소가 확인된 반면, SCM50군 및 SCM100군에서는 대조군보다 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0103] 또한, 관절 조직에서 p22phox 발현 수준을 확인한 결과, 도 13과 같이 정상군 1.00 ± 0.03 , 대조군 1.04 ± 0.13 , SCM50군 1.69 ± 0.26 , SCM100군 2.02 ± 0.14 및 SCM200군 1.57 ± 0.15 수준으로 발현이 나타났다. 대조군은 정상군과 비교하여 유사한 수준으로 확인된 반면, SCM 투여군에서는 대조군과 비교하여 유의하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0104] 마지막으로 관절 조직에서 p47phox 발현 수준을 확인한 결과, 도 14와 같이 정상군 1.00 ± 0.33 , 대조군 0.79 ± 0.06 , SCM50군 0.73 ± 0.13 , SCM100군 0.84 ± 0.08 및 SCM200군 0.59 ± 0.05 수준으로 발현이 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 감소를 보였으나 정상군과 유의성은 보이지 않았다. 또한, 약물 투여군의 p47phox 단백질 발현량은 대조군에 비해 유의성은 보이지 않았으나, SCM200 고농도 투여군에서 가장 크게 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0105] 상기 결과로부터 꽃송이버섯 추출물은 관절 조직 내 산화적 스트레스 인자인 Nox4 및 p22phox를 억제하여 골관절염에 효과를 나타낼 수 있다.

[0107] <실시예 7> 조직학적 분석

[0108] 골관절염이 유발된 슬관절 내 활막조직, 연골세포 및 섬유조직의 병리조직학적 분석을 위하여 헤마톡실린&에오신(H&E)과 메이슨 트리크롬(Masson's Trichrome; M-T) 및 사프란닌-O(Safranin-O) 염색을 수행하였다.

[0109] 실험 종료 후 슬관절 부위를 절단하고 10% EDTA가 포함된 10% 포르말린(formalin) 용액에 넣어 관절을 탈회(decalcification)시켰다. 방사선 촬영기법으로 탈회 유무를 확인한 후 파라핀 왁스에 관절을 넣고 고정된 후 coronal section을 수행하였다. 탈회 과정을 거쳐 파라핀으로 고정된 조직을 7 μ m의 크기로 자른 뒤, 헤마톡실린&에오신(H&E)과 메이슨 트리크롬(Masson's Trichrome; M-T) 및 사프란닌-O(Safranin-O) 염색을 수행하여 조직의 상태를 확인하였다.

[0110] 염증 반응 발생 유무, 활막 세포의 증식 및 염증 세포의 조직 침윤 여부는 H&E과 M-T 염색 결과에서 확인할 수 있으며, 연골 조직의 손상 여부는 프로테오글리칸 층을 염색하는 사프란닌-O 염색 결과로 확인하였다.

[0111] 사프란닌-O 염색 결과, 도 15 및 16과 같이 정상군은 관절 조직과 프로테오글리칸이 정상적으로 확인되었으나, 대조군은 골관절염 유발로 인해 정상 관절 조직과 프로테오글리칸의 파괴가 확인되었다. 반면, SCM 투여군들에서는 관절 조직과 프로테오글리칸의 파괴가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0112] 또한, 헤마톡실린&에오신 염색 결과, 도 17 및 18과 같이 정상군에서는 활막 조직 및 연골 조직이 정상으로 확인되었으나, 대조군에서는 골관절염 유발로 인하여 활막 조직과 연골 조직의 심각한 손상이 나타났다. 그러나 SCM 투여군에서는 대조군과 비교하여 활막 조직과 연골 조직의 손상이 효과적으로 억제되는 것이 확인되었다.

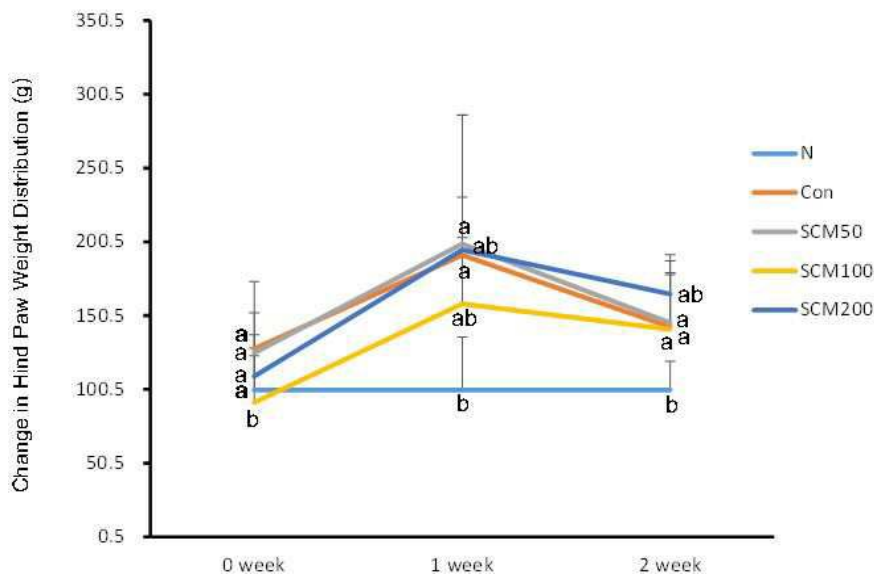
[0113] 마지막으로 메이슨 트리크롬(M-T) 염색 결과, 도 19 및 20과 같이 정상군에서는 활막 조직 및 연골 조직의 콜라겐 염색 수준이 정상으로 확인된 반면, 대조군에서는 골관절염 유발로 인하여 면역세포의 침투와 활막 조직 및 연골 조직의 심각한 손상이 나타났다. 반면 SCM 투여군에서는 면역세포의 침투와 활막 조직 및 연골 조직의 손상이 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0114] 상기 결과들로부터 꽃송이버섯 추출물은 골관절염에 작용하여 염증성 사이토카인 및 매개인자의 활성을 억제하며, 조골작용의 저해를 예방하고 파골작용을 억제함에 따라, 관절의 연골 및 조직의 파괴에 대한 보호작용이 있는 것이 확인되므로 효과적인 골관절염 치료제로 제공될 수 있다.

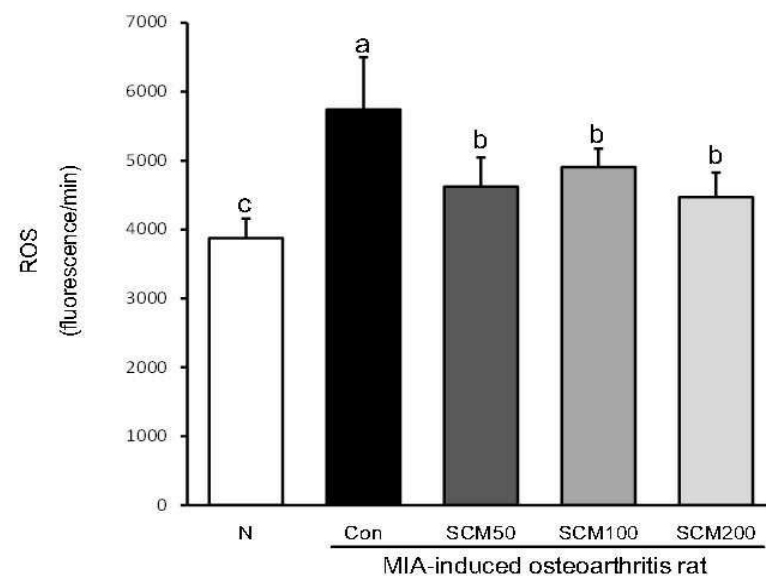
[0116] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

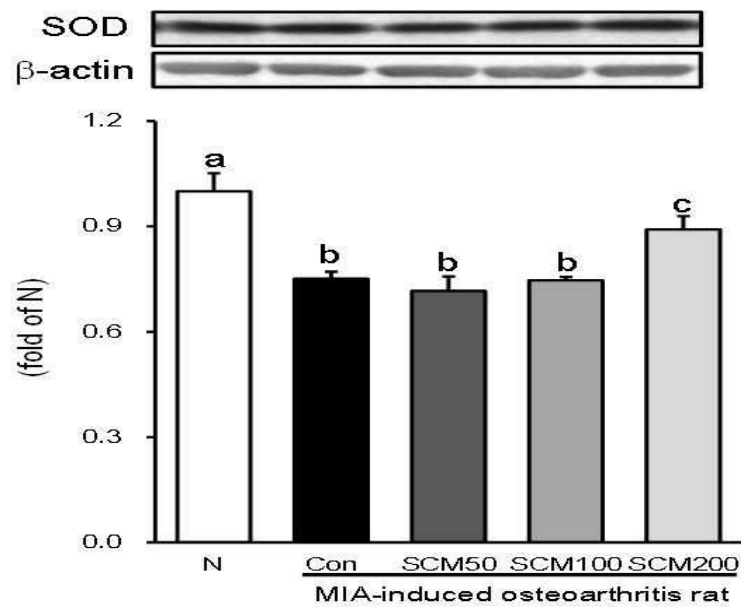
도면1



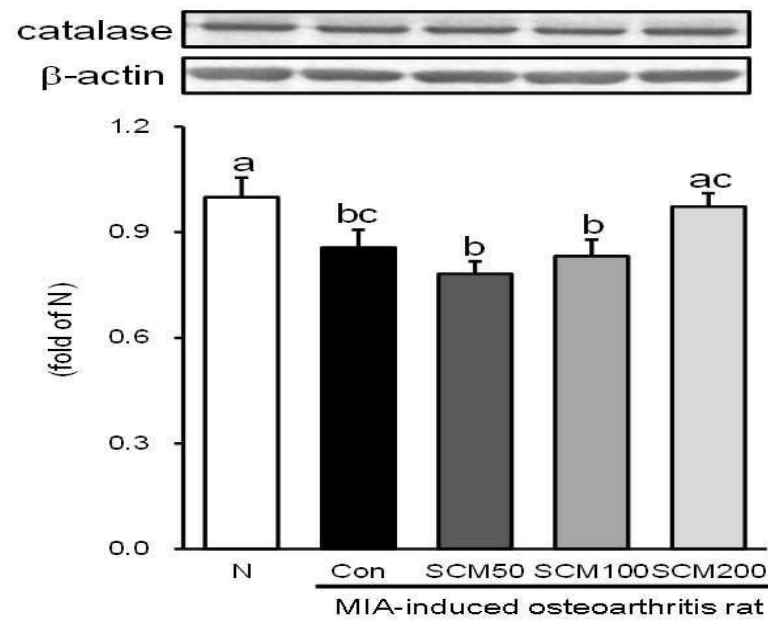
도면2



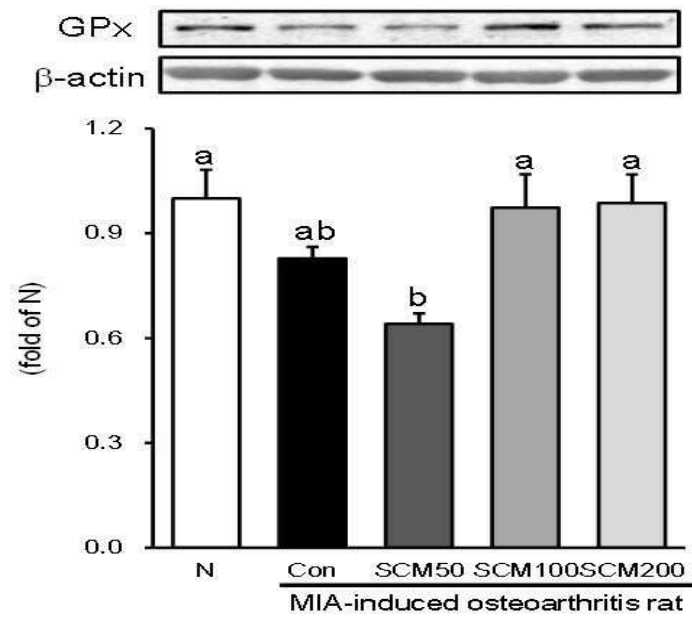
도면3



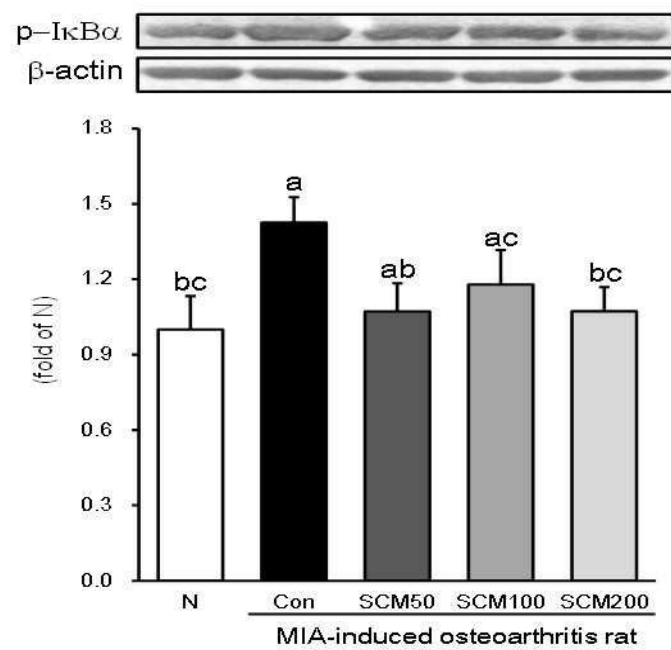
도면4



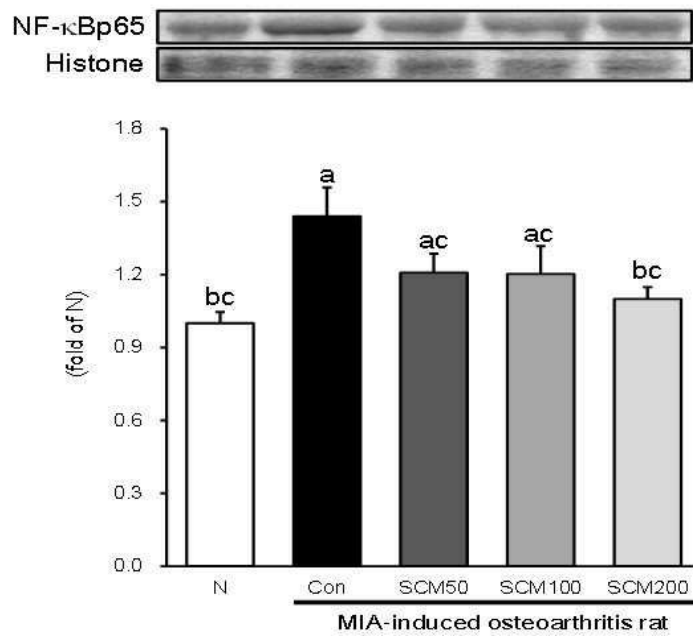
도면5



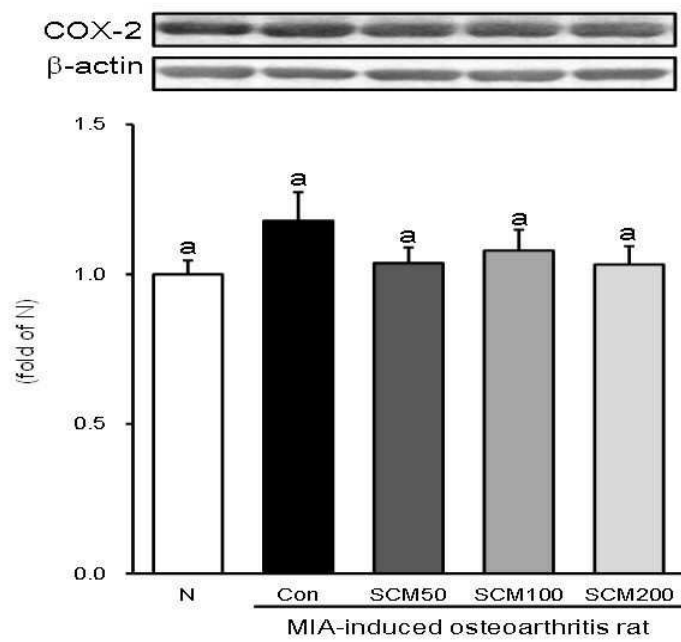
도면6



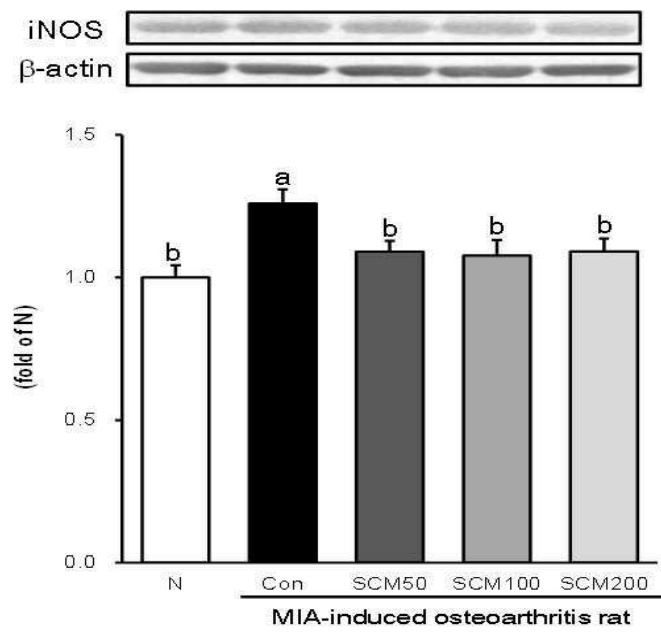
도면7



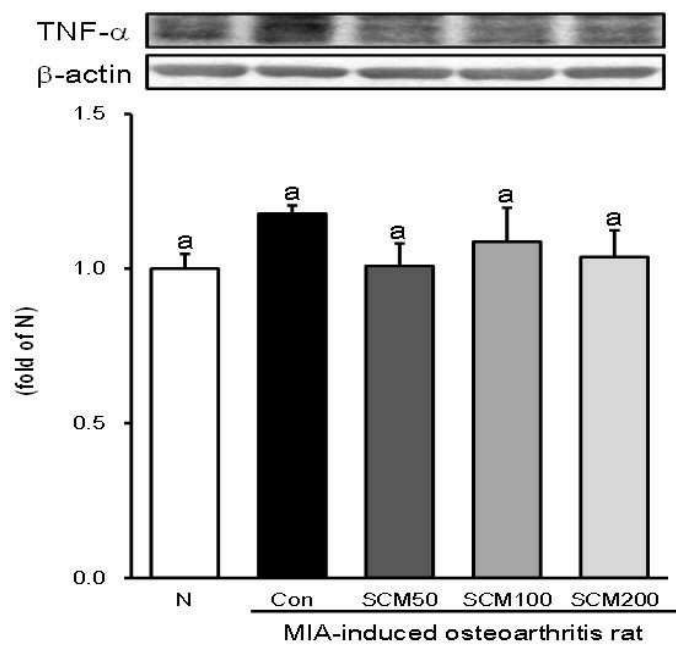
도면8



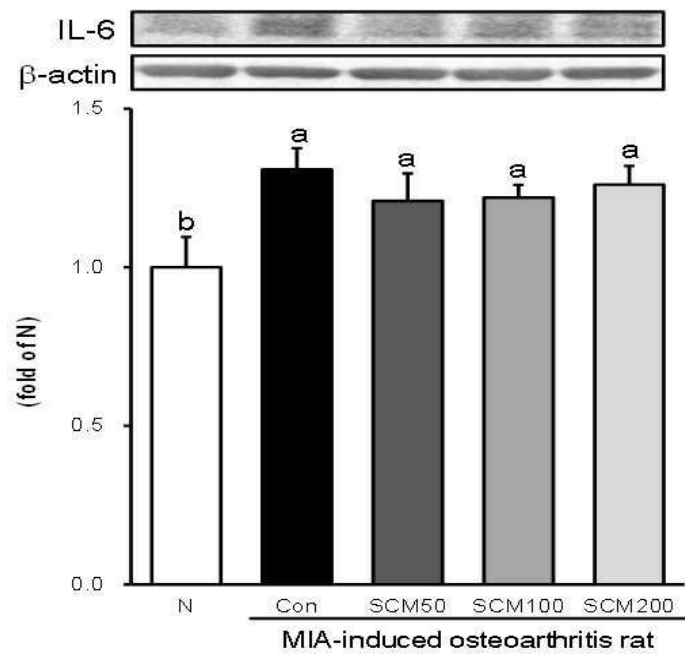
도면9



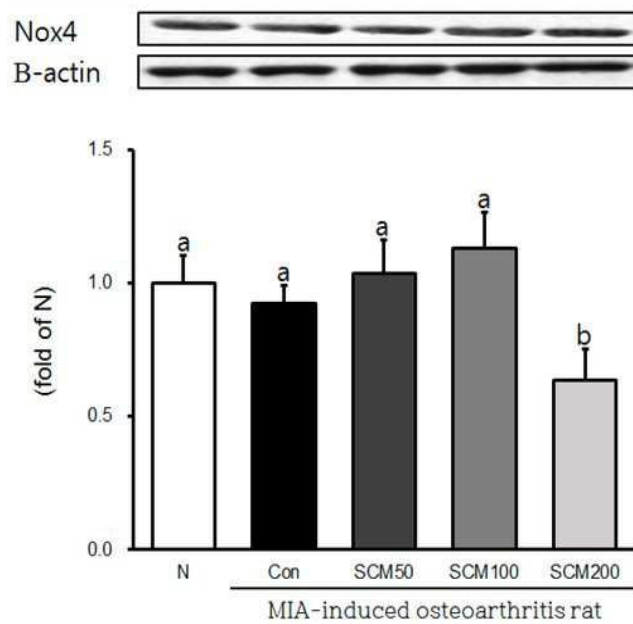
도면10



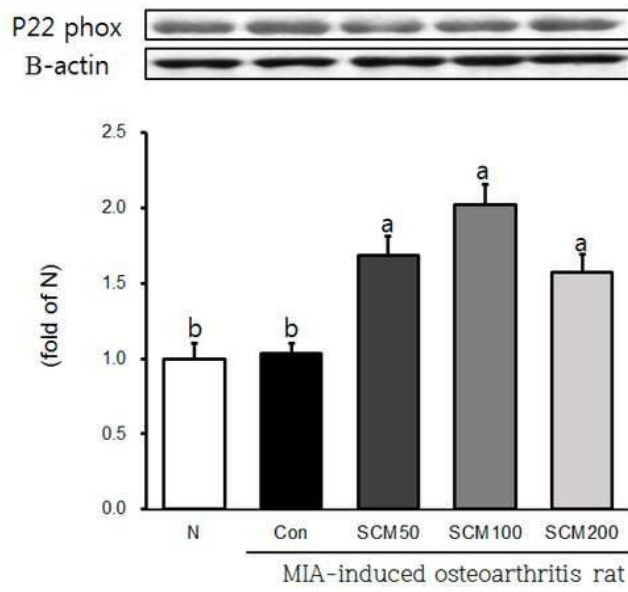
도면11



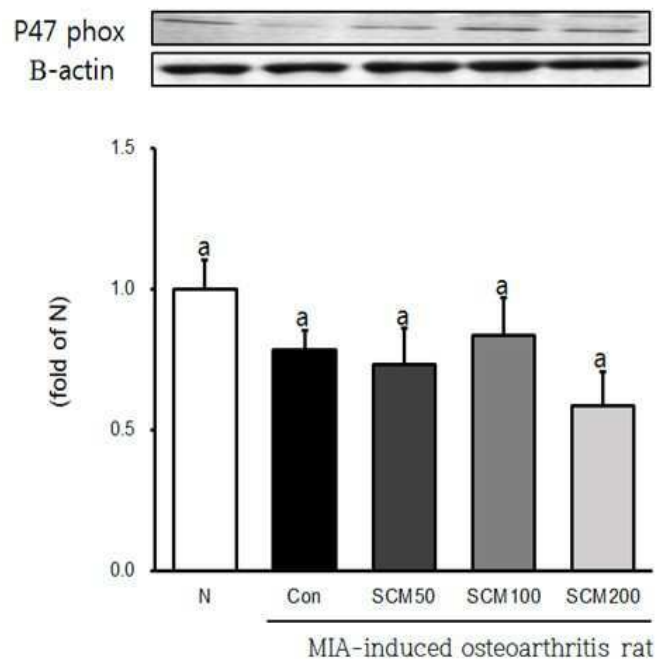
도면12



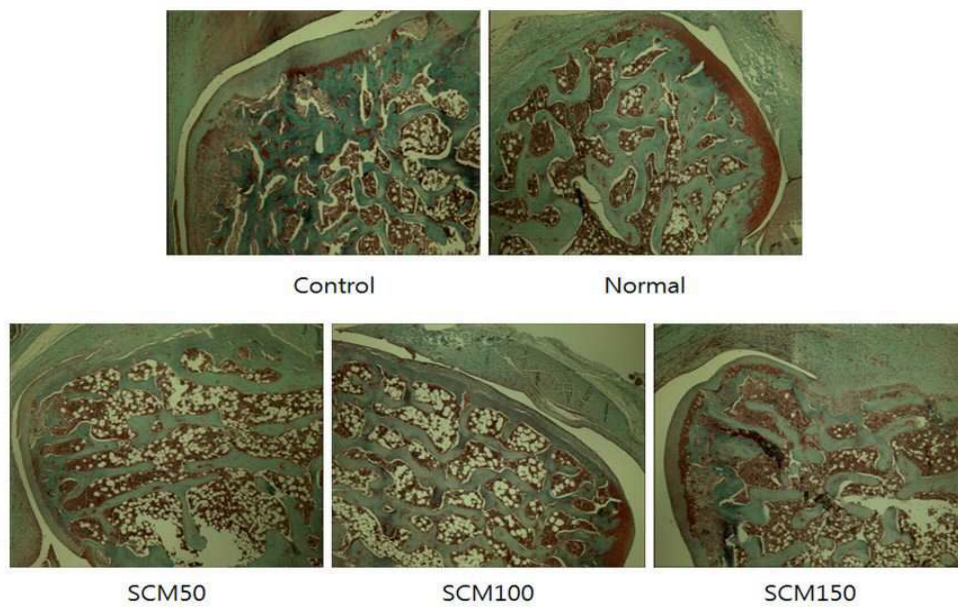
도면13



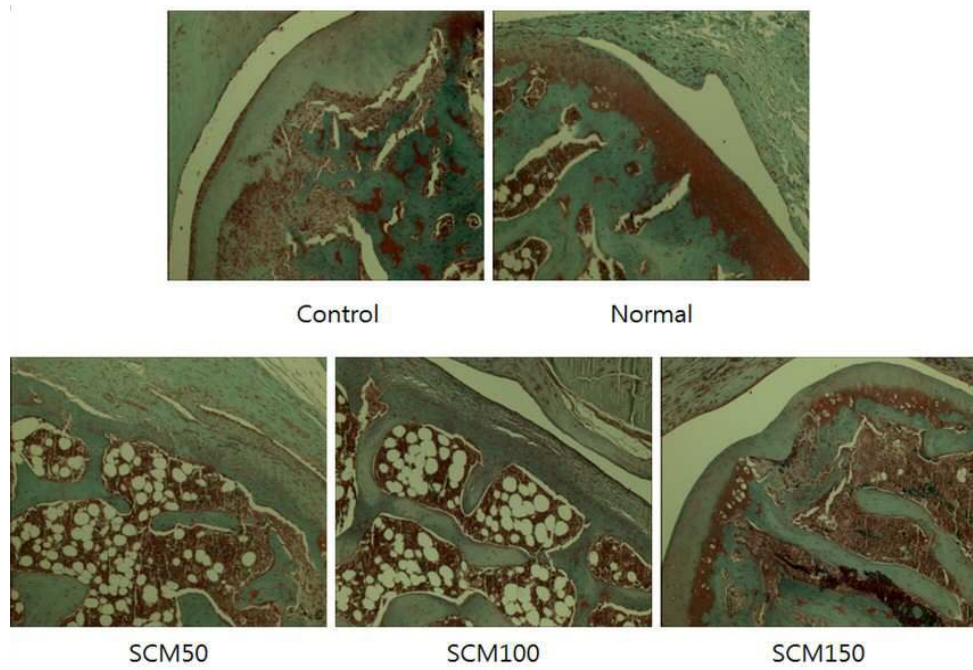
도면14



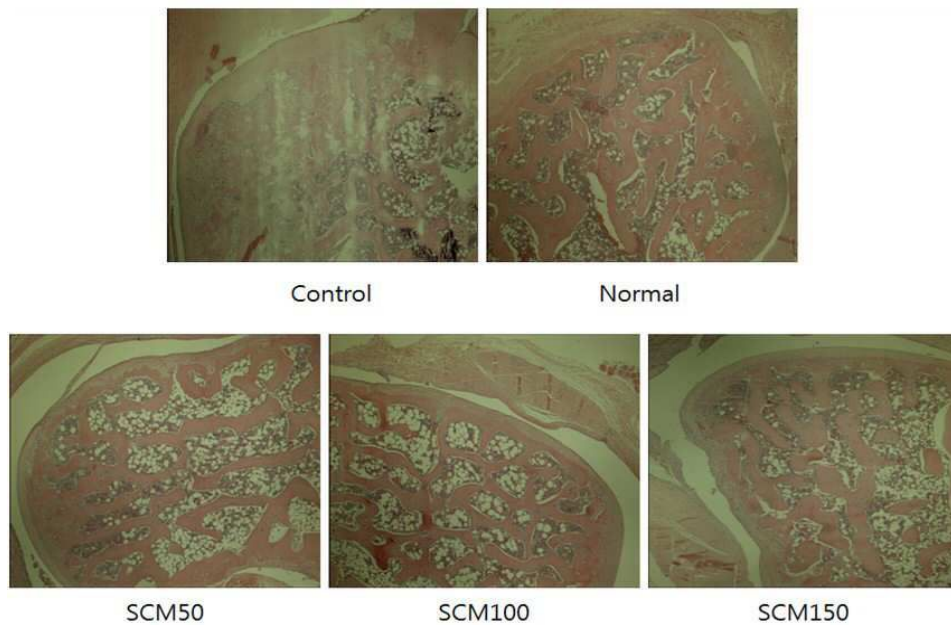
도면15



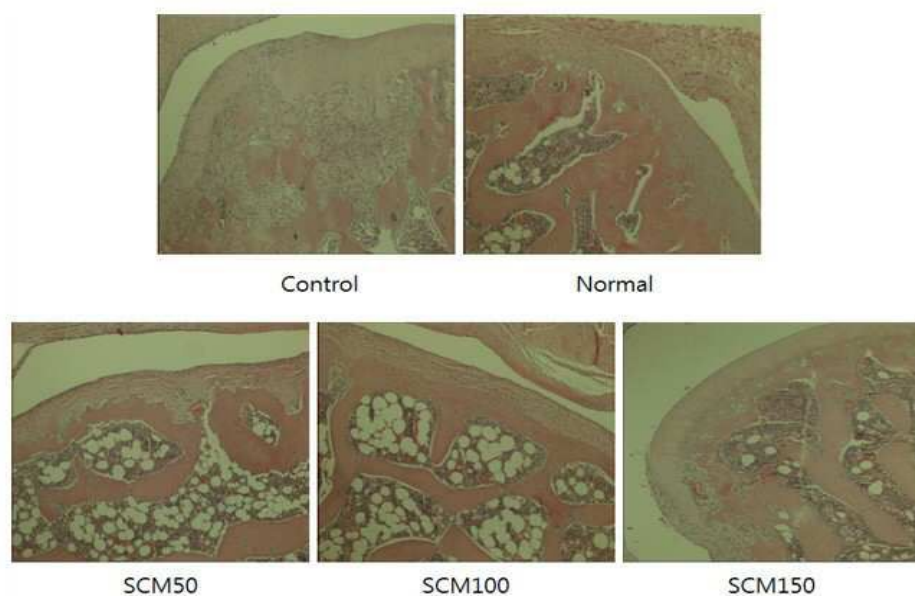
도면16



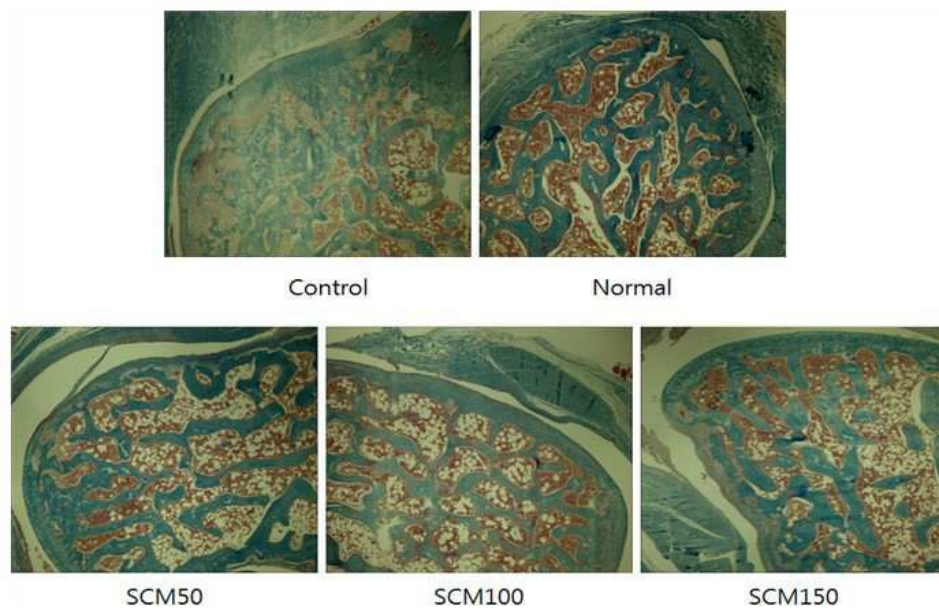
도면17



도면18



도면19



도면20

