



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월09일  
(11) 등록번호 10-1305621  
(24) 등록일자 2013년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/03 (2006.01) A61K 36/06 (2006.01)  
A61P 19/10 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-0025541  
(22) 출원일자 2011년03월22일  
심사청구일자 2011년03월22일  
(65) 공개번호 10-2012-0107800  
(43) 공개일자 2012년10월04일  
(56) 선행기술조사문헌  
JP2010090097 A\*  
KR1020090096256 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
경희대학교 산학협력단  
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)  
(72) 발명자  
이태후  
서울특별시 서초구 잠원로14길 23, 롯데캐슬아파트 202동 504호 (잠원동)  
신현섭  
경기도 수원시 영통구 영일로 8, 메가플러스 313호 (영통동)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
안소영

전체 청구항 수 : 총 10 항

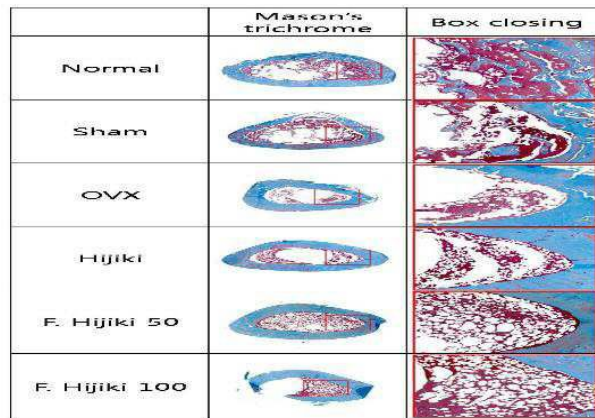
심사관 : 이정아

(54) 발명의 명칭 발효 톳 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 골 질환 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품

(57) 요약

본 발명은 발효 톳 추출물을 유효 성분으로 포함하는 대사성 골 질환 특히 골다공증의 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 발효 톳 추출물을 활성 성분으로 포함하는 대사성 골 질환 완화 또는 예방용 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 발효 톳 추출물은 천연물 유래 물질로 식품으로 이용되어 부작용이 없고, 조골세포 활성 및 골 형성에 효과가 있으며, 파골세포분화 억제에 효과가 있고, 실제 동물 모델에서의 골 함량 및 혈청에서의 골 형성 지표를 증가시키고, 골 흡수 지표를 감소시킴으로써 골다공증을 포함한 대사성 골질환 완화, 예방 또는 치료에 유용하게 사용 될 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

**박상용**

경기도 수원시 권선구 동수원로146번길 218-13,  
305호 (곡반정동)

**양정은**

경기도 의정부시 오목로 150, 주공아파트 206동  
1701호 (민락동)

**이돈길**

경기도 용인시 수지구 성복1로164번길 13, 용인성  
북힐스테이트 2차 203동 1103호 (성복동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 109203-3

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 발효 해조류를 이용한 골 관절 개선 기능성식품의 개발

주관기관 경희대학교

연구기간 2009.06.01 ~ 2012.05.31

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

Bacillus sp.균주 및 Aspergillus sp.균주 중에서 선택된 1종 이상에 의해 발효된 발효 톱 추출물을 유효 성분으로 포함하는 골다공증의 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제1항에 있어서, 추출은 물, C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알콜, 및 물과 C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알콜 혼합용매로 이루어진 균으로부터 선택된 용매를 이용한 것인 약학조성물.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 추출은 70 내지 90 (v/v)%의 에탄올 수용액인 약학조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 산제, 정제, 캡셀제, 주사제 및 액제 중에서 선택된 제형인 약학조성물.

**청구항 6**

제1항, 또는 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 골다공증이 폐경기 골다공증인 약학조성물.

**청구항 7**

Bacillus sp.균주 및 Aspergillus sp.균주 중에서 선택된 1종 이상에 의해 발효된 발효 톱 추출물을 활성성분으로 포함하는 골다공증의 완화 또는 예방용 건강기능식품.

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

제7항에 있어서, 추출은 물, C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알콜, 및 물과 C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알콜 혼합용매로 이루어진 균으로부터 선택된 용매를 이용한 것인 건강기능식품.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 추출은 70 내지 90 (v/v)%의 에탄올 수용액인 건강기능식품.

**청구항 11**

제7항, 또는 제9항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 골다공증이 폐경기 골다공증인 건강기능식품.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 산제, 정제, 캡셀제, 액제 및 유제품 중에서 선택된 제형인 건강기능식품.

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 발효 톱 추출물을 유효 성분으로 포함하는 대사성 골 질환 특히 골다공증의 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 과학과 문명의 발달로 점차 인간의 평균 수명이 연장되어 노년층 인구의 증가와 함께 중년 이후의 삶이 길어지고 있고, 실질적으로 현대 여성의 삶의 기간 중 1/3을 폐경에 의한 갱년기를 보내게 되므로 이 시기의 삶의 질을 향상시키기 위한 노력들이 이루어지고 있으며, 이의 일환으로 폐경에 의해 유발되는 여성의 골다공증 치료에 대한 많은 노력들이 이루어지고 있다.

[0003] 골다공증은 골 기질이 병적으로 희박해져 골밀도가 감소되고 골 강도가 약화되어 골절의 위험성이 증가된 상태를 말한다(DJ L. Clinical guide for management of osteoporosis. The Korean Journal of Internal Medicine 1999;57(4):801-4).

[0004] 골격의 강도는 일차적으로 골기질과 골 기질 내부의 무기질의 침착에 의해 형성되고 유지되는데 이는 임상적으로 골밀도에 반영된다. 생리적으로 뼈는 골기질을 새로운 조직으로 대체(골교체, bone turnover)하기 위한 골 개조(bone remodeling)가 꾸준히 지속되는데, 이 과정은 골 흡수(bone resorption)와 골 형성(bone formation)의 균형상태로 진행 된다(Jerome CP. Hormonal therapies and osteoporosis. ILAR J. 2004;45(2):170-8). 따라서, 건강한 골격에서는 골 흡수와 골 형성이 균형적인 골 개조에 따라 골격의 밀도와 강도가 정상상태로 유지되지만 골다공증이 유발된 뼈에서는 골 흡수가 골 형성 보다 많아져 골 개조의 불균형이 발생하고, 골질과 골량이 감소하는 골 교체가 진행됨에 따라 조직학적으로 골이 위축되며 골격의 물리적 강도가 약해져 골절발생률이 증가된다(Belchetz PE. Hormonal treatment of postmenopausal women. N Engl J Med. 1994 Apr 14;330(15):1062-71).

[0005] 임상적으로 주로 문제가 되는 것은 원발성 골다공증 중 제 1형인 폐경기 골다공증(postmanopausal osteoporosis)이며, 폐경기의 골다공증은 뼈의 통증, 골절, 기형을 유발하는 노년층의 가장 대표적인 골 대사 질환이다(Lee WS PHBD. Prevalence of Osteoporosis in Korean Women. The Journal of Korean Society of Menopause. 2003;9(4):339-46).

[0006] 난소 적출로 인해 유발된 에스트로겐(Estrogen) 결핍에 의한 골다공증은 골절이 쉽게 일어날 수 있는 조건이 되며 이 경우의 에스트로겐 투여는 골의 무기질 성분의 증가와 함께 교원섬유의 조성에도 영향을 미쳐서 골절의 예방효과를 지닌다고 보고되어 있다(Clack A. P., J. A. Schuttinga. Targeted estrogen/proestrogen replacement therapy for osteoporosis. calculation of health care cost savings. Osteoporos Int., 2, 195-200(1992)). 에스트로겐의 기능은 다양한데, 골모 세포에 직접 작용하여 골 량을 유지시키며 새로운 골 개조 부위의 새로운 활성화를 억제하며, 또한 골모 세포를 자극하며 골내 TGF와 IGF 합성을 증가시켜 파골세포에 작용함으로써 골 흡수를 감소시키며, 인터루킨-1 (II-1) (Interleukin-1(II-1)) 과 인터루킨-1 (II-6) (Interleukin-1(II-6))을 억제함으로써 파골세포의 성숙과 출현을 감소시킨다고 보고되어 있다( Pfelschefter J., C. Chenu, A. Bird. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cell in vitro. J. Bone Miner Res., 4, 113-118(1989)). 따라서, 최근에는 골 대사질환에 여성호르몬 및 Estrogen 유사 hormone 등을 투여하여 골의 흡수를 차단하는 약물이 많이 사용되고 있다(Recker RR, Saville PD, Heaney RP. Effect of estrogens and calcium carbonate on bone loss in postmenopausal women. Ann Intern Med. 1977 Dec;87(6):649-55). 하지만, 기존의 호르몬제제에는 한계점을 가진다(SH C. Medical treatment of osteoporosis. HANYANG JOURNAL OF MEDICINE. 2002;22(1):15-7).

[0007] 해조류는 예전부터 육상생물에 비해 비타민 및 식이섬유의 함량이 높고, 마그네슘, 철, 요오드, 칼슘, 아연 등 인체 내에서 필요한 필수 미네랄 성분이 많이 함유 되어 있다고 알려져 있으며(Lee JW, Sung NJ. The Content

of Minerals in Algae. J Food Sci Nutr. 1980;9(1):51-7), 해조류에 함유된 탄수화물이 혈관 내 콜레스테롤 침착 방지 및 장관 운동을 원활히 하고, 중금속 배출을 촉진시키며 고지혈증의 개선에 유효하여(Kim HS, Kim GJ. Effects of the Feeding Hijikia fusiforme(Harvey) Okamura on Lipid Composition of Serum in Dietary Hyperlipidemic Rats. J Food Sci Nutr. 1998;27(4):718-23.) 식용 해조류로부터 생리활성 물질의 확인 및 기능성 식품의 개발에 관심이 모아지고 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 합성 화학물질에 비해 안전성이 확보된 천연 해조류인 톳을 발효하여 얻은 추출물을 포함하는 대사성 골 질환 특히 골다공증의 완화, 예방 또는 치료를 위한 조성물을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 발효 톳 추출물을 유효 성분으로 포함하는 대사성 골 질환 완화, 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명에서, 톳(*Hijikia fusiformis* = *Hizikia fusiforme*)은 평균수면에서 저조선 약 30cm 위쪽의 조간대 하부에 서식하고 유성세대만 존재하는 다년생 해조류이며, 우리나라에서는 주문진 이남에서 서해안 장산곶까지 생육하고 남해안과 제주 지역에 널리 분포하고 있다. 톳은 분류학상, Heterokontophyta (갈조식물문), Phaeophyceae (갈조식물강), Fucales (모자반목), Sargassaceae (모자반과), *Hizikia* (톳속)에 속하며, 우수한 식이섬유소의 공급원일 뿐만 아니라 혈액응고작용, 면역증강작용 등의 기능성이 있는 것으로 알려진 중성다당류인 laminaran과 함황산성 다당류인 fucoidin이 다량 함유되어있고, 그 외 항산화작용, 항균작용 등이 있으며 칼슘 등의 무기질 함량도 높아 각종 성인병 및 만성질환의 예방 및 치료에 우수한 효능을 가진 것으로 알려져 있다. 또한 혈관내 콜레스테롤 침착을 방지하고 장관운동을 원활하게 하여 중금속의 배출 등에도 효과가 높을 뿐만 아니라 항암작용이 있는 것 또한 확인되고 있다.

[0011] 본 발명에서, 발효는 된장 및 누룩에서 분리한 균주를 사용할 수 있으며, *Bacillus* sp. 균주 및 *Aspergillus* sp.균주가 바람직하며, 예를 들어 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*), 아스퍼질러스 니거(*Aspergillus niger*), 아스퍼질러스 프레버스(*Aspergillus flavus*), 아스퍼질러스 푸미가터스(*Aspergillus fumigatus*), 아스퍼질러스 오크라세우스(*Aspergillus ochraceus*), 아스퍼질러스 시도위(*Aspergillus sydowii*), 아스퍼질러스 베르시콜러(*Aspergillus versicolor*), 세파로데카 설푸리아(*Cephalotheca sulfurea*), 클라도리넴 브루네센스(*Cladorrhinum brunnescens*), 클라도스포리움 클라도스포리오데스(*Cladosporium cladosporioides*), 클라비스포라 루시타니아에(*Clavisporea lusitaniae*), 클리토피러스 패세커리아너스(*Clitopilus passeckerianus*), 라시오스페리아 오비나(*Lasio-sphaeria ovina*), 뉴로스포라 테리콜라(*Neurospora terricola*), 지오마이세스 판노룸(*Geomyces pannorum*), 시가너스 캐나리컬래터스(*Siganus canaliculatus*), 트리코모나스커스 시페리(*Trichomonascus ciferrii*), 패시로마이세스균(*Paecilomyces* sp.), 페니실리움 클란디콜라(*Penicillium glandicola*), 페니실리움 잔티넬럼(*Penicillium janthinellum*), 페니실리움 스피널로섬(*Penicillium spinulosum*), 페니오포라 인칼나타(*Peniophora incarnata*), 페스타로티오시스 크라비스포라(*Pestalotiopsis clavisporea*), 쉘모마이세스 랜기노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 및 트리코덜마 시트리노비라이드(*Trichoderma citrinoviride*)로 이루어진 균에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 것이 바람직하다. 선택된 1종 이상에 의해 발효된 것이 바람직하다. 본 발명에서, 발효를 위한 탄소원으로는 포도당(glucose), 과당(fructose), 만노스(mannose), 갈락토오스(galactose), 서당(sucrose), 말토스(maltose)등을 사용할 수 있으며, 이와 같은 성분을 포함한 물질인 밀기울, 엿기름 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수도 있다. 밀기울과 엿기름의 혼합비는 다양한 중량비(1:3, 1:7, 1:10)일 수 있으나, 1:1 중량비가 보다 바람직하다.

[0012] 본 발명의 발효 톳 추출물은 통상의 해조류 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있다. 본 발명에서 발효 톳 추출물은 발효 전에 톳을 유수에서 1 내지 5회 세척한 후, 곁에 묻은 불순물 및 염분을 제거하고 24시간 내지 72시간동안 건조시킨 후 사용할 수 있다.

[0013] 본 발명에서, 추출용매는 물, C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알콜, 및 물과 C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알콜 혼합용매로 이루어진 균으로부터 선택된 용매를 이용한 것이 바람직하다. C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알콜은 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, n-프로판올, n-부탄올, 이소

부탄올, t-부탄올 등이 있으나, 에탄올이 가장 바람직하다. 또한, 추출용매는 70 내지 90 (v/v)%의 에탄올 수용액이 보다 더 바람직하다.

[0014] 본 발명에서, 추출은 상기 용매로 추출한 후 농축시키고 동결건조시켜 분말화 할 수 있으며, 경우에 따라서는 상기 용매 추출물을 이후, 핵산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 분획과정을 더욱 실시할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 1종 이상 사용할 수 있다. 추출물 제조온도는 4 내지 120 °C일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나 최소 30분에서 7일 일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다. 제조된 추출물은 이후 감압 여과하거나 동결건조하여 용매를 제거할 수 있으며, 감압 여과 및 동결건조를 모두 수행할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일예로, 상기 발효 톱 추출물은 톱의 염분 및 불순물을 제거한 후 건조하여 건조시료를 제조하고, 상기 건조시료를 발효하여 발효 물을 얻은 후, 에탄올을 첨가하여 조추출액을 얻으며, 상기 조추출액을 감압 농축하여 추출물을 제조할 수 있다. 이 때, 상기 톱의 염분 및 불순물의 제거는 유수를 이용하여 씻어내서 수행할 수 있으며, 상기 건조시료는 상기 염분 및 불순물을 제거한 톱을 건조한 후에 분쇄하여 발효에 사용할 수 있다. 상기 건조는 바람직하게는 자연건조에 의해 수행할 수 있다. 상기 조추출물의 용매로 사용되는 에탄올은 바람직하게는 50 내지 99 (v/v)% 에탄올 수용액, 더욱 바람직하게는 70 내지 90(v/v)% 에탄올 수용액, 가장 바람직하게는 70(v/v)% 에탄올 수용액일 수 있으며, 상기 조추출액의 제조는 냉침추출법, 온침추출법 또는 열 추출법 등의 통상의 추출방법으로 수행할 수 있고, 바람직하게는 열 추출법으로 수행할 수 있다. 상기 감압농축은 감압농축기를 이용할 수 있으며, 상기 추출물은 조추출물을 저온 감압 농축한 것일 수 있다.

[0016] 상기 수득한 발효 톱 추출물은 사용 시까지 급속 냉동 냉장고(deep freezer)에 보관할 수 있다.

[0017] 또한, 상기 발효 톱 추출물은 수득된 추출액을 농축 및 동결건조를 통하여 수분을 완전히 제거시킨 것일 수 있으며, 상기 수분을 완전히 제거시킨 톱 추출물은 분말형태로 사용하거나 상기 분말을 증류수 또는 통상의 용매에 녹여 사용할 수 있다.

[0018] 이에 따라, 본 발명은 1) 톱을 탄소원 존재하에 *Baillus* sp. 균주와 *Aspergillus* sp. 로 발효시키는 단계; 및 2) 1 단계의 발효물을 물, C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알콜, 및 물과 C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알콜 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 추출용매로 추출하고 추출물을 농축시키는 단계를 포함하는 발효 톱 추출물 제조방법을 제공한다. 본 발명에서, 탄소원 및 추출용매는 앞서 설명한 바와 같다.

[0019] 본 발명에서, 대사성 골질환이란, 대사장애에 의해 뼈에 변성이 생긴 것으로 골위축, 골다공증, 구루병, 골연화증, 섬유성골이영양증 등을 의미한다. 본 발명에서, 골다공증(osteoporosis)이란 동일 연령과 성별의 정상인에 비해 골량이 현저히 감소된 상태로 골의 구성성분의 양적감소를 주 병변으로 하는 대사성 골 질환을 의미한다. 본 발명에 있어서 골다공증은 폐경기성 골다공증, 노인성 골다공증 및 골 취약증을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 폐경기성 골다공증일 수 있다. 상기 골다공증은 주로, 뼈조직의 감소로 뼈에 구멍이 나거나 칼슘염의 감소로 기인하여 뼈가 얇아지고 약해지는 현상을 수반하며, 상기 골다공증이 있는 환자는 뼈의 골질이 잘 발생하게 되는 것으로 보고되어 있다.

[0020] 본 발명의 조성물은 상기한 발효 톱 추출물 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물 형태일 수 있다. 상기 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있으며, 산제, 정제, 캡슐제, 주사제 및 액제가 보다 바람직하다. 이러한 제제화는 약제학 분야에서 통상적으로 행하여지는 방법으로 수행될 수 있으며, Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0021] 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 락토즈, 텍스트로즈, 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 광물유 등을 포함한다.

[0022] 경구용 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함할 수 있다.



- [0023] 경구용 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.
- [0024] 비경구용 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함한다.
- [0025] 본 발명의 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 발효 톱 추출물을 0.01 내지 99.9중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있으며, 골다공증을 포함하는 대사성 골질환의 예방 또는 치료용 조성물의 사용 방법 및 사용목적에 따라 유효성분의 함량을 적절히 조절할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어 정맥내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용) 할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 발효 톱 추출물의 일일 투여량은 약 0.1 내지 1,000mg/kg으로 바람직하게는 200~300 mg/kg이다.
- [0027] 본 발명의 약학 조성물은 발효 톱 추출물에 추가하여 골다공증을 포함하는 대사성 골질환의 완화, 예방 또는 치료와 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 약학조성물은 골다공증을 포함하는 대사성 골질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 골다공증 완화, 예방 또는 치료를 요하는 인간을 포함하는 포유류에게 본 발명의 약학조성물을 투여함으로써 골다공증을 완화, 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명은 발효 톱 추출물을 활성성분으로 포함하는 골다공증 또는 골 질환 완화 또는 예방용 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 건강기능식품에서, 발효, 추출용매, 추출방법 등은 앞서 의약 조성물에서 설명한 바와 같다. 본 발명의 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 발효 톱 추출물을 0.01 내지 99.9중량%로 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 건강기능식품은 산제, 정제, 캡슐제, 주사제, 액제 및 유제품 중에서 선택된 제형일 수 있으며, 이들의 제제화는 의약조성물의 제조방법과 동일하거나, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 제조할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 건강기능식품은 본 발명의 발효 톱 추출물을 건강기능식품을 제조하기 위한 식품첨가제로 첨가한 식품을 포함한다.

**발명의 효과**

- [0033] 본 발명의 발효 톱 추출물은 에스트로겐 분비가 감소된 경우에도 골형성 biomarker인 Osteocalcin의 발현을 증가시키고 골흡수 biomarker인 CTx의 발현을 감소시키는 효과가 있을 뿐만 아니라 난소적출로 유발된 마우스 골다공증 쥐 모델에서 골밀도를 향상시킴으로써 골다공증을 포함하는 골 질환의 완화, 예방 또는 치료에 우수한 효과를 나타낸다. 더욱이, 발효 톱 추출물은 천연물이므로 기존의 골다공증 치료제가 가지고 있는 부작용에 대한 문제도 없을 것으로 예상되므로, 골다공증을 포함한 대사성 골질환의 예방 또는 치료제 또는 건강기능식품으로서 사용가능하다.

**도면의 간단한 설명**

- [0034] 도 1은 발효 톱 추출물이 골 형성 Biomarker인 Osteocalcin의 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 발효 톱 추출물이 골 흡수 Biomarker인 CTx(C-Telepeptide)의 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 발효 톱 추출물이 골 밀도(bone density)에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 발효 톱 추출물이 골 조직형성에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.
- 도 5는 발효 톱 추출물이 Alkaline phosphatase의 활성에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 발효 톱 추출물이 Minerailization의 활성에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 발효 톱 추출물이 파골세포 분화 억제에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0035] 이하에서는, 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다. 또한, 하기에서 기재된 실험 결과에 따른 대조군, 비교군 및 실험군들 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후,  $\alpha=0.05$  수준에서 Scheffe 법, Bonferroni 법으로 다중 비교하였다.

[0036] <실시예 1> 톳 추출물의 제조

[0037] 자연 건조한 톳(전북나라, 대한민국, *Hijikia fusiformis*은 *Hizikia fusiforme*와 동의어이다.) 1 kg을 유수에서 3회 채로 씻어 내어 길에 묻은 불순물 및 염분을 제거한 후 48시간 동안 자연건조하고 분쇄하여 건조 시료를 제조하였다.

[0038] 상기 건조 시료 500g을 100℃의 물로 열수추출하였고, 2시간 동안 추출한 후 여과하는 방법으로 조 추출액을 얻은 후, 감압농축기(Rotary evaporator N-1000, EYELA, Japan)를 이용하여 55℃에서 감압 농축 한 후 동결건조하여 분말형태로 표제의 톳 추출물을 제조하였다.

[0039] <실시예 2> 발효 톳 추출물의 제조

[0040] 자연 건조한 톳(전북나라, 대한민국, *Hijikia fusiformis*은 *Hizikia fusiforme*와 동일한 학명이다) 1 kg을 유수에서 3회 채로 씻어 내어 길에 묻은 불순물 및 염분을 제거한 후 48시간 동안 자연건조하고 분쇄하여 건조 시료를 제조하였다. 분쇄한 건조 톳에 균주 성장에 도움이 되는 탄소원으로 밀기울과 엿기름의 혼합물(밀기울 : 엿기름 = 1 : 1(중량비))을 이용하였으며, 톳과 탄소원을 각 500g 씩 혼합한 후 된장과 누룩에서 분리한 *Bacillus subtilis*와 *Aspergillus oryzae* 균주를 톳과 탄소원의 혼합물의 전체 용량의 4%로 접종하여 3주간 37℃ 배양기에서 발효를 진행하였다. 발효의 종료 시점은 1주일 간격으로 일정량을 따 추출한 다음 농축하여 cell proliferation assay 결과를 통하여 결정하였다. 상기 발효 시료 500g을 70%(v/v) 에탄올 수용액을 이용하여 24시간 추출하였고, 추출한 후 여과하는 방법으로 조 추출액을 얻은 후, 감압농축기(Rotary evaporator N-1000, EYELA, Japan)를 이용하여 55℃에서 감압 농축 한 후 동결건조하여 분말형태로 제조하였다.

[0041] <실험예 1 > 실험동물의 사육 조건 및 체중변화 측정

[0042] 1-1. 실험동물의 사육조건

[0043] 상기 실시예 1 및 2의 발효 톳 추출물의 골 형성 촉진효능을 측정하기 위하여, 평균체중이 160g인 6주령의 Sparaque-dawley계 암컷 흰쥐(대한바이오링크, 대한민국) 48마리를 22℃ 내지 24℃의 온도 및 55% 내지 60%의 상대습도의 조건에서 사육하였다. 실험동물의 사료는 고품사료(대한바이오링크, 대한민국)를 사용하였고, 사료와 물은 상시로 섭취할 수 있게 하였다.

[0044] 실험동물은 대조군인 비난소절제군(Sham) 8마리, 비교군인 난소제거군(OVX) 8마리, 난소를 제거한 후, 톳 추출물 100mg/kg(체중), 발효 톳 추출물 25, 50, 100mg/kg(체중)을 투여한 실험군 8마리씩으로 나누어 실험하였으며, 이를 [표 1]에 나타내었다. 상기 실험군에서 사용한 톳 추출물 및 발효 톳 추출물은 실시예 1 및 2에서 제조한 것을 사용하였다. 상기의 난소의 제거는 1주일 동안 주위환경에 적응시켜 난피법에 의해 균을 나누어 난소 절제 수술을 실시함으로써 수행하였다. 난소절제 수술은 Ketamin 과 Rumpun 을 4:1의 부피비로 혼합하여 g 당 0.002ml를 주사하여 실험동물을 마취한 후, 심마취기에 이르면 등의 척추좌우 콩팥 부위를 절개하여 난소를 제거하고 절개부를 봉합하는 방법으로 수행하였다.

[0045] 상기 실험군은 상기 실험동물 중 발효 톳 추출물의 효과를 측정하기 위해 발효 톳 추출물을 투여한 것을 제외하고는 다른 실험동물과 동일한 조건에서 사육하였다. 상기 발효 톳 추출물의 투여는 실시예 1의 분말을 상기의 투여량으로 증류수 1ml에 용해하여 제조한 실험시료를 상기의 난소 절제 수술 15주 후부터 매일 경구투여하는 방법으로 수행하였다. 상기 대조군 및 비교군은 실험군과 동일 용량의 0.5(v/v)% CMC(Carboxy methyl Cellulose)를 투여하였다.



[0046] [표 1]

Group (마리수)	처리(Treatment)
대조군(Sham (8))	난소를 제거하지 않고 마취 후 피부 및 근육 절개만 함
비교군(OVX (8))	난소를 제거함
실험군(Hijiki (8))	난소를 제거하고 톳 추출물을 100mg/kg bw/day 투여함.
실험군(F. Hijiki 25(8))	난소를 제거하고 발효 톳 추출물을 25mg/kg bw/day 투여함.
실험군(F. Hijiki 50 (8))	난소를 제거하고 발효 톳 추출물을 50mg/kg bw/day 투여함.
실험군(f. Hijiki 100 (8))	난소를 제거하고 발효 톳 추출물을 100mg/kg bw/day 투여함.

[0047]

[0048] 1-2. 실험동물의 체중변화 확인

[0049] 상기 실험동물은 시료를 투여한 기간을 포함한 총 21주 사육기간 중에서 첫 1주일의 경과한 후, 매주 일정 시간에 실험동물의 체중을 측정하였고, 그 결과를 [표 2]에 작성하였다.

[0050] [표 2]

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

[0051] (상기 표에서, \*는 p-value<0.05을 나타내며, \*\*는 p-value<0.01을 나타낸다.)

[0052] 난소 제거에 의해 에스트로겐의 분비가 감소되면 체중 증가를 가져온다는 기존의 보고와 마찬가지로, 본 실험에서도 난소를 제거한 비교군(OVX)은 난소를 제거하지 않은 대조군(Sham)에 비하여 체중이 증가하였다.

[0053] 한편, 난소를 제거한 실험군도 대조군과 비교해서 높은 체중 증가량이 나타나므로 톳 추출물은 체중감소에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

[0054] <실험예 2>: 발효 톳 추출물의 골 형성 및 골 흡수 biomarker 발현 측정

[0055] 2-1. 혈액 채취

[0056] 상기 실험동물의 혈액 채취를 위하여, 상기 실험예 1-1.의 실험동물은 해부하기 24시간 전부터 절식시켰다. 상기 24시간동안 절식시킨 실험동물을 에테르를 이용하여 마취하고 회복한 후 복대정맥에서 혈액을 채취하였다.

[0057] 2-2. 골 형성 및 골 흡수 biomarker 발현 측정

[0058] 상기에서 채취한 혈액은 효소활성 및 지질 농도를 측정하기 위하여 실온에서 30분 동안 방치한 후, 4℃에서 3,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상기 원심분리를 통하여 분리된 혈액에서 혈청을 분리하였다. 상기 분리된 혈청은 해파린 처리된 튜브에 담은 후에 Rat-MID™ Osteocalcin ELA(Nordic bio Sci., USA)와 Rat-Laps™ ELA(Nordic bio Sci., USA)를 이용하여 골 형성 및 골 흡수 biomarker인 Osteocalcin(뼈에 칼슘을 붙잡아주는 역할을 해 조골세포호르몬이라 불림)과 C-telopeptide(CTX, 골과괴가 많이 일어날 수록 많이 생성됨)를 측정하였고 그 결과를 [도 1]과 [도 2]에 나타내었다([도 1 ]및 [도 2]에서, \*는 p-value<0.05을 나타내며, \*\*는 p-value<0.01을, \*\*\*는 p-value<0.001을 나타낸다).

[0059] [도 1]과 [도 2]에 나타난 바와 같이, 비교군(OVX)의 Osteocalcin (314.19±143.2ng/ml) 과 CTx(118.88±21.5 ng/ml)의 결과는 대조군(Sham)의 Osteocalcin (565.60±90.5 ng/ml) 과 CTx(58.22±39.6 ng/ml)의 결과에 비해

Osteocalcin 은 적고 CTx는 많이 발현된 경향을 나타내었다. 반면에, 난소 절제 후 톳 및 발효 톳 추출물을 투여한 실험군의 경우에서는 Osteocalcin은 톳 100mg/kg(367.47±105.5 ng/ml), 발효 톳 25mg/kg 이 (601.55±110.4 ng/ml) 발효 톳 50mg/kg 이(557.81±171.1 ng/ml) 발효 톳 100mg/kg 이 (822.61±137.8 ng/ml) 로 나와 발효 톳 100 mg/kg에서 Sham 군 대비 145% 더 발현되는 모습을 보였으며 OVX control 에 비해서는 262% 의 발현을 보여 발효 톳이 골 형성에 관여하는 biomarker인 Osteocalcin의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 또한 CTx의 경우 톳 100mg/kg(85.48±40.9 ng/ml), 발효 톳 25mg/kg 이(61.48±30.6 ng/ml), 발효 톳 50mg/kg 이 (57.91±3.7 ng/ml), 발효 톳 100mg/kg 이 (47.26±6.5 ng/ml) 로 나와 발효 톳 100mg/kg에서 CTx의 발현이 sham 군에 비해 81%, OVX control 에 비해 40% 의 발현을 보여 발효 톳이 골 흡수에 관여하는 biomarker인 CTx의 발현을 감소시켜 골의 흡수를 저해하는 것을 확인하였다.

[0060] 상기한 바와 같이, 본 발명의 조성물은 비교군(ovx)에 비해 Osteocalcin 은 증가시키고 CTx은 감소시키므로 실험군은 폐경 후 골 대사에 유의한 효과 즉, 골다공증 치료효과가 있는 것으로 기대된다.

[0061] <실험예 3> 발효 톳 추출물의 골밀도에 대해 미치는 영향의 측정

[0062] 골 밀도는 가장 널리 사용되고 있는 골다공증의 지표로 식약청 골다공증 가이드라인 (2008)에 따르면 골다공증을 확인하는 가장 중요한 지표로 이용되고 있다. 즉 골밀도가 비교군에 비해 증가한다면 골다공증의 치료 효과가 있다고 생각 할 수 있다. 따라서 본 출원인은 발효 톳 추출물의 골다공증 치료 또는 예방 효과를 알아보기 위하여 발효 톳 추출물이 골밀도에 미치는 영향을 실험하였다.

[0063] 3-1. 장기 적출

[0064] 상기 실험동물의 장기 적출 및 보관은 실험예 2-1.에서 혈액을 채취한 실험동물의 좌우 대퇴골을 적출하여 골 조직을 제외한 근조직 및 인대를 모두 제거 한 후 실험 시 까지 -70℃에서 보관하였다.

[0065] 3-2. 골밀도 측정

[0066] 골밀도의 측정은 한림대학교에 있는 골밀도측정기(PIXImus, Lunar, USA)를 이용하여 측정하였고, 그 결과에 대한 값은 [도 3] 및 [표 3]과 같다([도 3 ]및 [표 3]에서, \*는 p-value<0.05을 나타내며, \*\*는 p-value<0.01을, \*\*\*는 p-value<0.001을 나타낸다).

[0067] [표 3]

Groups	Normal	Sham	OVX	Hijiki	F.Hijiki 25mg/kg	F.Hijiki 50mg/kg	F.Hijiki 100mg/kg
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	217.1± 4.92***	207.6 ±12.82***	187.6 ±2.14	193.1 ±6.03	196.5 ±9.28*	202.5 ±5.76**	205.6 ±1.95***

[0068]

[0069] <실험예 4> 발효 톳 추출물의 골 조직변화에 미치는 영향

[0070] 상기 실험동물의 골 밀도를 확인 한 다음 이를 조직학적으로 확인하기 위하여 파라핀 포매를 한 다음, 조직을 박절하여 슬라이드를 제작한 다음 염색약을 이용하여 골의 형성을 확인 하였고, 그 결과는 [도 4]에 작성하였다.

[0071] [도 4]를 이용하여 image analysis를 통한 전체 골에 대한 신생골의 양을 확인하였고(BV/TV) 그 결과를 [표 4]에 작성하였다.

[0072] [표 4]

Groups	Normal	Sham	OVX	Hijiki	F.Hijiki 50mg/kg	F.Hijiki 100mg/kg
BV/TV(%)	21.72	25.80	12.58	18.07	14.65	20.79

[0073]

[0074] <실험예 5> 발효 톳 추출물의 in vitro 상에서 조골세포 및 파골세포의 활성화에 미치는 영향

[0075] 5-1. Alkaline phosphatase activity 확인

[0076] 조골세포는 세포막에 alkaline phosphatase (ALP)를 함유하고 있고, ALP는 칼슘과 인 대사에 관여하는

효소로서, 세포 외막과 석회화 조직의 기질세포에서 높은 농도로 발견되며 염기성 pH 8-10에서 최적의 활성을 나타내며 ALP가 Organic phosphate를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온 농도를 증가시키고 세포의 기질에 인산칼슘을 침착 시키는 석회화를 유도 하는 역할을 하기 때문에 발효 톳 추출물을 이용한 ALP activity 를 확인하였다. ALP 활성도 검사는 p-nitrophenyl phosphate(pNPP, Sigma, St. Louis, MO, USA)의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 것을 이용하여, 가수분해 반응의 산물인 p-nitrophenol의 양을 측정함으로써 ALP의 농도를 간접적으로 산출하는 것이다. 배양한 MC3T3-E1 cell 을  $1 \times 10^4$  cell/well 로 조정하여 96well plate 에 분주하고 24시간 후 분화유도배지(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Vit. C(ascorbic acid) 와 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate( $\beta$ -GP)이 포함된  $\alpha$ -MEM 배지)로 교환한 후 24시간 배양하여 시료처리를 하였다. 톳, 발효 톳 추출물 및 텍사메트론(시료)을 각각  $\alpha$ -MEM 배지에 녹여 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  으로 처리하였고, 대조군(control)은 시료를 뺀 well 당 200 $\mu\text{l}$ 씩  $\alpha$ -MEM 배지만 처리한 후, 3일 뒤 PBS 를 이용하여 washing 한 다음 0.1% Triton X-100을 20 $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 lysis 하였다. 그런 다음 20 $\mu\text{l}$  0.1M glycine-NaOH buffer(pH 10.4) 와 20 $\mu\text{l}$ 의 p-nitrophenyl phosphate(p-NPP)를 첨가한 후 다시 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 100 $\mu\text{l}$  의 0.1N NaOH로 반응을 중지하고 405nm 에서 흡광도를 측정하였다. ALP activity 는 p-NPP로부터 생성된 p-nitrophenol (p-NP)를 측정하여 p-NP에 대한 standard curve를 작성한 후 활성도를 대조군과 상대비교를 통해 도출하였다. 그 결과를 [도 5] 및 [표 5]에 작성하였다. 실험군의 비교는 골 형성 효능을 갖는 Dexamethasone 을 Positive control 로 사용하였다([도 5]및 [표 5]에서, \*는 p-value<0.05을 나타내며, \*\*는 p-value<0.01을, \*\*\*는 p-value<0.001을 나타낸다).

[0077] [표 5]

Groups	Hijiki(mg/kg)			F.Hijiki (mg/kg)			Dexamethasone(mg/kg)		
	1	10	100	1	10	100	1	10	100
alkaline phosphatase (%)	100.7 ±1.7	140.6 ±0.1 **	151.8 ±0.8 ***	116.1 ±7.0 **	140.0 ±1.0 **	179.4 ±1.0 **	98.8 ±0.8	117.8 ±0.2 **	139.1 ±0.5 **

[0078]

[0079] **5-2.Mineralization activity 확인**

[0080] 발효 톳 추출물에 의해 조골세포가 분화하여 골질을 형성하는지를 확인하기 위하여 Mineralization activity 를 확인하였다. MC3T3-E1 조골전구세포는 polystyrene 세포배양접시에 부착시키고 penicillin 및 streptomycin이 함유된 1% antibacterial-antifungal solution (PAA)와 10% FBS(PAA)를 첨가한  $\alpha$ -MEM (PAA) 을 사용하여 5% CO<sub>2</sub>와 95% 습도가 유지되는 37 $^{\circ}\text{C}$  incubator 에서 기본 배양하였다.

[0081] MC3T3-E1 세포의 골세포로의 분화는 24well plate 에  $3 \times 10^4$  cell/well로 처리하여 이들 세포가 단층을 형성한 후 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Vit. C(ascorbic acid) 와 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate( $\beta$ -GP)처리에 의해 유도하였다. 하루 간 배양 후 24well Plate에 MC3T3-E1 cell을 골 무기질화 시키는 Vit C와  $\beta$ -GP 를 이용하여 발효 톳 추출물의 Mineralization 정도를 측정하였다. Vit C와  $\beta$ -GP 를 처리한 cell plate에 톳 및 발효톳 추출물과 Positive Control인 Dexamethason을  $\alpha$ -MEM 배지에 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  로 녹이고, Sample을 제외한  $\alpha$ -MEM 배지만을 처리한 것을 대조군(control)으로 하여, 각 well에 1ml 씩 처리하여 3주간 37 $^{\circ}\text{C}$  CO<sub>2</sub> incubator 에서 배양 한 후 Mineralization 이 된 24well Plate 에서 배지를 제거한 후 PBS를 이용하여 Plate를 세척한 후 10% formalin solution 으로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 고정시켰다.

[0082] Alizarin red solution(ARS, Sigma, USA)는 cell 을 고정시키는 동안 40mM의 농도로 제작하여 pH를 4.2로 조정하였다. 고정시킨 cell에 ARS 로 5분간 염색 한 후 DW(증류수)를 이용해 잔여 염색약을 washing 한 다음 PBS를 이용하여 염색된 부분이 마르지 않도록 한 후 현미경을 이용해 nodule 형성을 확인한 다음 10% cetylpyridinium chloride(Sigma, USA) 를 처리하여 15분간 반응시킨 후 용액을 96well Plate 에 옮겨 담아 562nm 에서 흡광도를 확인하였다. 그 결과는 [도 6] 및 [표 6]에 작성하였다. 상기 실험에서도 역시 Dexamethasone 을 Positive control 로 사용하였다([도 6]및 [표 6]에서, \*는 p-value<0.05을 나타내며, \*\*는 p-value<0.01을 나타낸다).

[0083] [표 6]

Groups	Hijiki(mg/kg)			F.Hijiki (mg/kg)			Dexamethasone(mg/kg)		
	1	10	100	1	10	100	1	10	100
Mineralization(%)	110.9 ±2.0*	120.5 ±4.1**	132.7 ±5.6**	122.1 ±3.2**	129.7 ±2.6**	137.8 ±3.7**	104.6 ±2.2	115.7 ±2.0**	123.5 ±2.3**

[0084]

[0085] 5-3. 파골세포분화 억제 확인

[0086] RankL에 의해 파골세포로 분화되는 Raw 264.7 cell 을 발효 톳 추출물이 분화를 억제하는지를 확인하기 위하여 TRAP 염색을 실시하였다. Raw 264.7 파골전구세포는 polystyrene 세포배양접시에 부착시키고 penicillin 및 streptomycin이 함유된 1% antibacterial-antifungal solution (PAA)과 10(v/v)% FBS(PAA)를 첨가한 α-MEM (PAA) 을 사용하여 5% CO<sub>2</sub>와 95% 습도가 유지되는 37℃ incubator 에서 기본 배양하였다. Osteoclast의 분화 정도를 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP, sigma, USA) 염색으로 확인하였다. RAW264.7 파골 전구 세포를 1×10<sup>4</sup> cell/well로 24well plate에 처리하고 50 ng/mL recombinant murine RANKL 및 톳, 발효톳 추출물과 Positive Control인 Dexamethason을 α-MEM 배지에 1, 10, 100 μg/ml 로 녹이고, Sample을 제외한 α-MEM 배지만을 처리한 것을 대조군(control)으로 하여, 각 well에 1ml 씩 처리하여 3일간 배양하였다. 이후, 배지를 제거하고 1X PBS 로 washing 한 다음 fixative solution(25ml citrate solution, 65ml acetone, 8ml 37% formaldehyde)를 well 당 0.5ml 씩 넣어 고정한 다음 DW를 이용하여 세척하고 staining solution(45ml DW-prewarmed to 37℃, 0.5ml Fast Garnet GBC base solution, 0.5ml Sodium Nitrate solution, 0.5ml Naphthol AS-BI phosphate solution, 2ml acetate, 1ml Tartrate solution)을 well 당 300μl씩 처리해 주었다. 빛을 차단한 상태에서 37℃ incubator에서 1시간동안 반응시킨 다음 DW로 washing하고 H&E solution으로 2분간 counterstaining 하였고, 잔여 염색액은 DW를 이용하여 washing한 다음 건조하여 현미경으로 mature Osteoclast의 수를 확인하였다. 확인한 Osteoclast 는 image analysis program(Leica application suite, Leica, Germany)을 이용하여 intensity 를 측정하여 대조군과 비교하였다. 그 결과를 [도 7] 및 [표 7]에 작성하였다. 상기 실험 역시 Dexamethasone 을 Positive control 로 사용하였다. ([도 7]및 [표 7]에서,\*\*는 p-value<0.01을, \*\*\*는 p-value<0.001을 나타낸다).

[0087] [표 7]

Groups	normal	Hijiki(mg/kg)			F.Hijiki (mg/kg)			Dexamethasone(mg/kg)		
		1	10	100	1	10	100	1	10	100
TRAP Staining cell(%)	14.0 ±0.7 ***	76.3 ±2.6 ***	53.2 ±0.7 ***	56.1 ±1.5 ***	52.4 ±6.5 ***	48.4 ±8.3 ***	36.6 ±4.1 ***	77.8 ±2.7 **	74.5 ±0.4 ***	72.9 ±0.8 ***

[0088]

[0089] <제조예> 발효 톳 추출물을 함유하는 우유 제조

[0090] [표 8]에 나타난 성분 및 그의 중량%를 함유하는 우유를 통상의 우유제조공정에 따라 제조할 수 있다.

[0091] [표 8]

성분	함량 (중량%)
발효 톳 추출물	2.50
원유	70.00
액상과당	1.00
정제수	26.00
타우린	0.025
카르니틴	0.025
수크랄로스	0.45
합계	100

[0092]

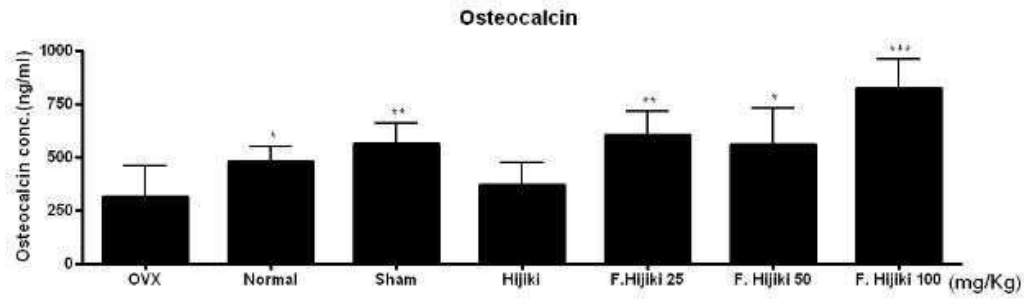
- [0093] <제조방법>
- [0094] 본 발명에 대한 발효 톳 추출물을 함유한 우유의 제조 방법은 간략하게 다음과 같은 통상적인 방법으로 제조할 수 있다. 세균수 기준 1등급 원유와 상기 표8에 기재된 우유 이외의 성분을 혼합하여 용해단계, 균질단계, 본 살균단계, 저장 등의 단계로 구성되는 과정을 거쳐 제조할 수 있다.
- [0095] <제조에 2> 발효 톳 추출물을 포함하는 약학 조성물의 제조
- [0096] A. 산제의 제조
- [0097] 발효 톳 추출물 200 mg
- [0098] 유당 100 mg
- [0099] 탈크 10 mg
- [0100] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0101] B. 정제의 제조
- [0102] 발효 톳 추출물 200 mg
- [0103] 옥수수전분 100 mg
- [0104] 유당 100 mg
- [0105] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0106] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0107] C. 캡셀제의 제조
- [0108] 발효 톳 추출물 200 mg
- [0109] 결정성 셀룰로오스 3 mg
- [0110] 락토오스 14.8 mg
- [0111] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg
- [0112] 통상의 캡셀제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡셀제를 제조한다.
- [0113] D. 주사제의 제조
- [0114] 발효 톳 추출물 200 mg
- [0115] 만니톨 180 mg
- [0116] 주사용 멸균 증류수 2974 mg
- [0117]  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  26 mg
- [0118] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.
- [0119] E. 액제의 제조
- [0120] 발효 톳 추출물 200 mg
- [0121] 이성화당 10 g
- [0122] 만니톨 5 g
- [0123] 레몬향 적량
- [0124] 정제수 적량
- [0125] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성

분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색 병에 충전하여 멸균 시켜 액제를 제조한다.

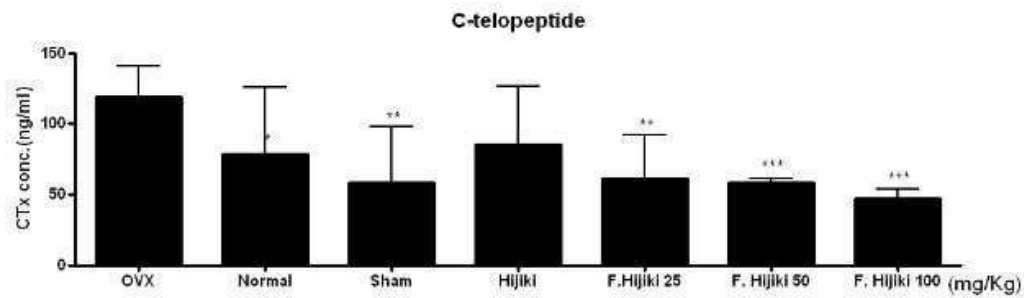
[0126] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면

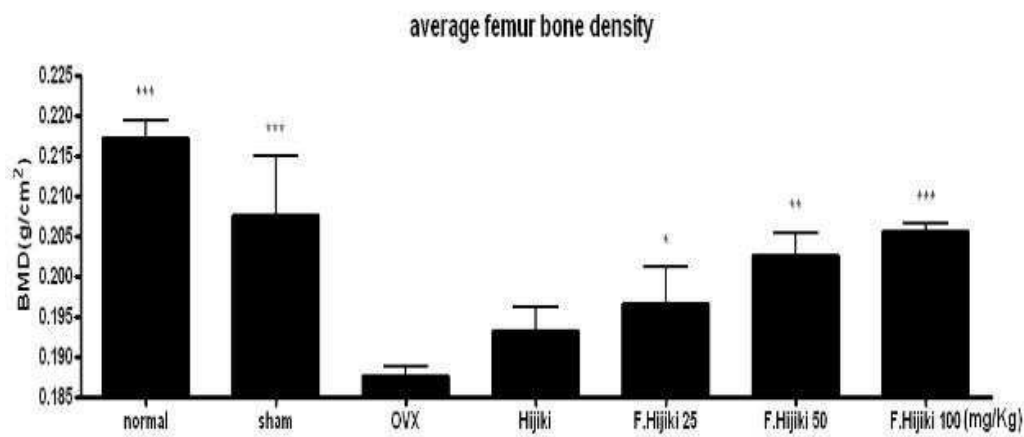
도면1



도면2

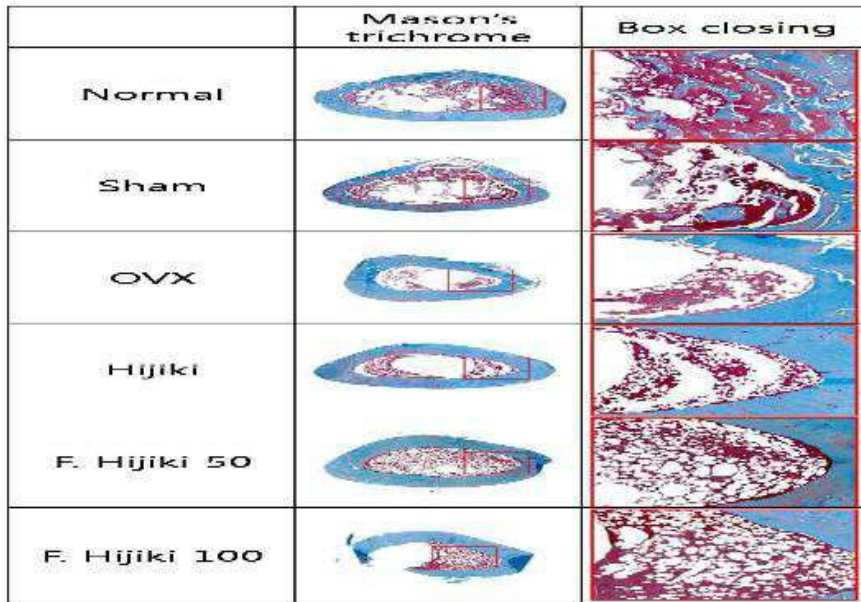


도면3

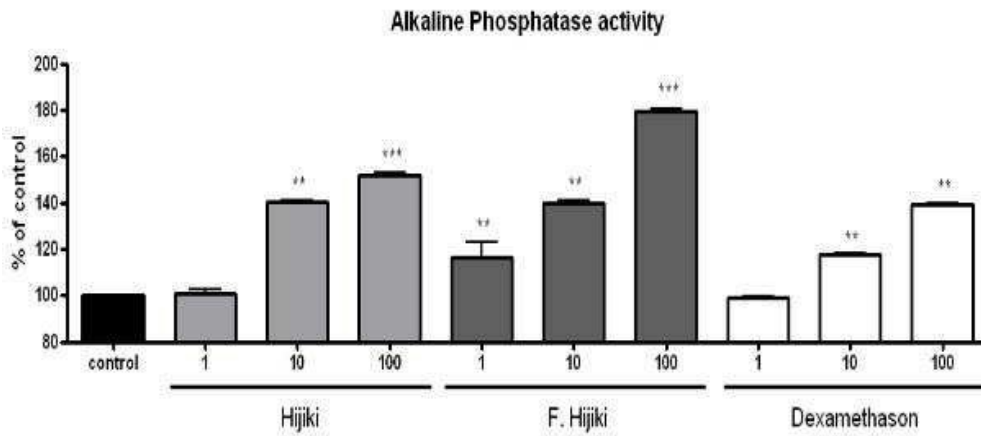




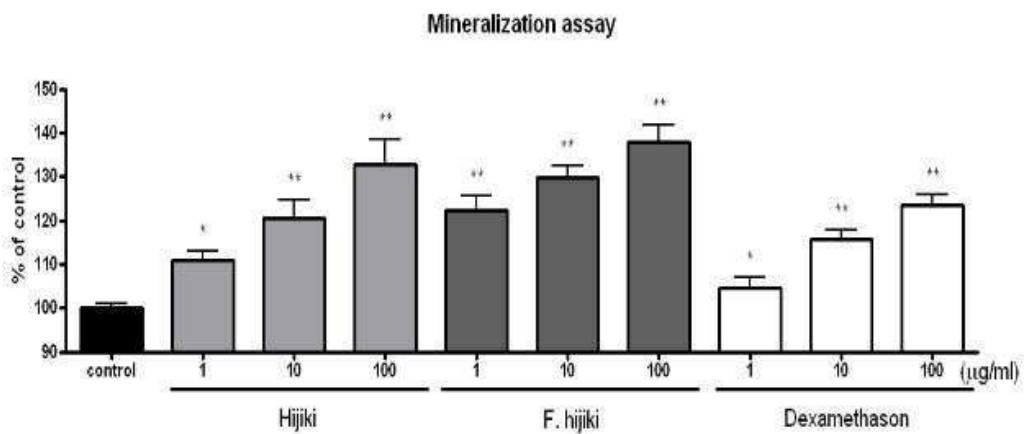
도면4



도면5



도면6



도면7

