

완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제()

(과제번호 : PJ010221)

인삼의 뼈건강 개선 기능성 소재 개발 연구

Development of functional food on bone health improvement using
Panax ginseng

국립원예특작과학원

연구수행기간

2014.02. ~ 2016.12.

농촌진흥청

제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “인삼의 뼈건강 개선 기능성 소재 개발에 관한 연구”(개발기간 : 2014.02.01. ~ 2016.12.31.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 인삼을 이용한 골다공증 개선 건강기능식품 개발
제2세부연구과제 : 인삼성분의 표준화연구 및 인삼 유래 성분의 골다공증 개선효과 기전연구
제3세부연구과제 : 인삼 뼈건강 개선 기능성 평가

2017. 02. 28.

제1세부 연구기관명 : 국립원예특작과학원 인삼특작부

제1세부 연구책임자 : 박춘근

참 여 연 구 원 : 김영옥, 최재훈, 이지연

제1협동 연구기관명 : 한국생명공학연구원

제1협동 연구책임자 : 성낙균



참 여 연 구 원 : 성낙균, 김보연, 김동현, 김혜민, 한호진

제2협동 연구기관명 : 전북대학교병원장

제2협동 연구책임자 : 채수완

참 여 연 구 원 : 채수완, 박수현, 최재순, 송선주, 백향임, 김혜미

주관연구책임자 : 박춘근

주관연구기관장  국립원예특작과학원 

농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서
열람에 동의합니다.

* 반드시 기관장 직인을 받아서 스캔 첨부

보고서 요약서

과제번호	PJ010221		연구기간	2014.02.01.~2016.12.31.(35개월)	
연구사업명	단위사업명	현장실용화농업기술			
	세부사업명	농축산물 부가가치 향상 기술개발			
	내역사업명	농축산물 기능성평가 및 DB구축			
연구과제명	주관과제명	인삼의 뼈 건강개선 기능성 소재 개발 연구			
	세부(협동) 과제명	(1세부) 인삼을 이용한 골다공증 개선 건강기능식품 개발 (1협동) 인삼성분의 표준화 연구 및 인삼유래 성분의 골다공증 개선효과 기전연구 (2협동) 인삼의 뼈건강 기능성 평가			
연구책임자	구분	연구기관		소속	성명
	1세부	인삼특작부		국립원예특작과학원	박춘근
	1협동	한국생명공학연구원		한국생명공학연구원	성낙균
	2 협동	전북대학교병원		전북대학교병원	채수완
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 15 명 내부: 4 명 외부: 11 명		총 연구 개발 비	정부: 799,000천원 민간: 천원 계: 799,000천원	
위탁연구기관명 및 연구책임자			참여 기업 명		
국제공동연구	상대국명:		상대국 연구기관명:		
○ 조골세포와 파골세포를 통한 인삼의 효과 구명 * 뼈를 만드는 조골세포와 밀접한 알칼라인 포스파타제, 콜라겐, 오스테오칼신 등이 유의하게 증가 ○ 시험동물에서의 인삼의 효과 * 난소절제술을 시행한 암컷 쥐에서 인삼추출물 투여군이 대퇴골 골밀도 및 골질량 개선 * 마이크로 CT를 이용한 골밀도 증가 확인 * 제브라피쉬를 대상으로 파골세포의 분화 억제 (Alizarin Red 염색) ○ 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에서 ' 15~' 16년 진행 ○ 반건강인을 대상으로 12주간 30명씩 그룹 인체적용시험을 진행 * 무작위배정, 이중눈가림, 위약비교 (1g 복용군, 3g 복용군, 위약군) ○ 오스테오칼신(골아세포의 활성)과 칼슘이 인삼복용군에서 증가 * 오스테오칼신: 인삼(3g/일) 복용군 4.5 ng/mL, 위약군 0.38 ng/mL, 12배▲ * 칼슘: 인삼(3g/일) 복용군 0.18 mg/dL, 위약군 0.05 mg/dL, 3.6배▲					보고서 면수 :103

〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	골다공증은 만성질환으로 노화와 함께 폐경기후에 많이 나타난다. 현재 흔히 사용되는 치료제들은 여러가지 부작용이 많으므로 전통의약인 인삼을 사용하여 골다공증에 대한 효능검사와 임상시험을 실시 하여 뼈건강 개선 새로운 약 또는 식품으로 개발하여 국민건강에 이바지 하고자 한다.				
연구개발성과	본 연구는 세포실험 시험 및 동물 실험으로 난소제거 후부터 인삼 물추출물을 30일간 투약한 후 혈액을 채취하여 CBC 검사(WBC, Lymphocyte, monocytes, granulocyte, RBC, HCB, HCT), 생화학적 임상검사(혈중 칼슘, alkaline phosphatase, creatinine, glucose, 무기성 phosphate, urea)를 행하고 tibia골을 분리하여 골량의 측정으로 조직검사를 통해 골밀도 검사를 하였다. 이를 임상에 적용하고자 본 연구의 인체시험을 시행하게 되었다. 접수된 총 90명의 피험자 중 30명은 플라시보그룹이고 30명은 1g 섭취군, 30명은 3g섭취군으로 피험자가 인체시험을 종료하였다. 기능성 평가 결과 1차 기능성 평가 변수인 시험물질을 투여한 후 12주째의 osteocalcin의 개선율은 placebo 군, 1g투여군, 3g투여군이 이 각각 0.39 ± 4.31 (ng/mL), 0.74 ± 4.97 , 4.52 ± 4.42 이었으며, 칼슘은 placebo 군, 1g투여군, 3g투여군이 0.06 ± 0.29 (mg/dL) - 0.03 ± 0.29 , 0.18 ± 0.32 이었다. 세 분석대상군 모두에서 세 군은 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다.				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	대한민국의 대표 농산물이면서 천연물인 인삼의 효능에 대하여 과학적 연구를 행하고 과거의 효능과 함께 현대인의 건강에 맞는 단미제와 복합 처방과의 관계를 잘 모색하여 뼈건강 기능성 식품 또는 치료약으로 개발하고자 한다.				
중심어 (5개 이내)	골다공증	뼈	인삼	임상시험	기능성식품

〈 Summary 〉

Purpose& Contents	Osteoporosis has been known as a common chronic disease in silver generation with no remedy. In this research, we tried to set up the animal models for osteoporosis and also to confirm the analytical methods for developing new preventive or thrapeutical drugs from panax ginseng. This research began to start such as Bidchemical study,ginseng study, Bone mineral density study, and thrapeutical human study.				
Results	In this study, to solve these problems by developing ginseng extract in-vitro tests and animal experiments have already pass through the inhibition of bone resorption and increases bone formation was confirmed in an effort to apply it to clinical tests performed on the body became. Restered 90 subjects were seperated three groups and administered during 12 weeks. Functional evaluation of a primary functional assessment variables after administration of test substance on 12 weeks improvement of osteocalcin and Ca were analyzed in blood test. The placebo group, 1 g group and 3 g group of osteocalcin are 0.39 ± 4.31 (ng/mL), 0.74 ± 4.97 , and 4.52 ± 4.42 . The placebo group, 1 g group and 3 g group of CA are 0.06 ± 0.29 (mg/dL), -0.03 ± 0.29 , and 0.18 ± 0.32 . The results from the placebo - treated group and the results showed statistically significant difference.				
Expected Contribution	In future, Panax ginseng should be screened through these method and hopely developed as preventive and thrapeutical foods and drugs for osteoporosis.				
Keywords	osteoporosis	bone	panax ginseng	clinical test	functional food

〈 목 차 〉

제 1 장	연구개발과제의개요	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황	12
제 3 장	연구수행 내용 및 결과	15
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	97
제 5 장	연구결과의 활용계획 등	98
제 6 장	연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	99
제 7 장	연구개발성과의 보안등급	99
제 8 장	국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황	100
제 9 장	연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	101
제 10 장	연구개발과제의 대표적 연구실적	101
제 11 장	기타사항	101
제 12 장	참고문헌	103

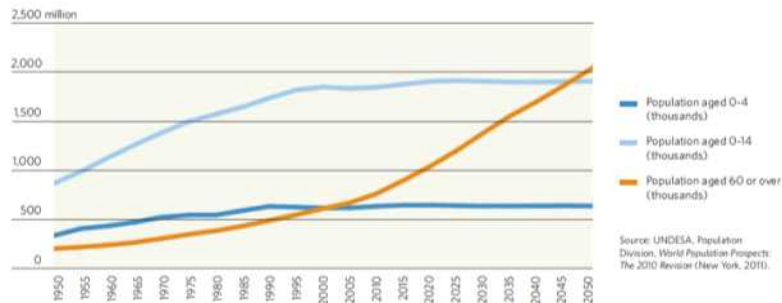
제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제1절 연구 개발 목적

에스트로겐 부족으로 인한 골다공증은 대퇴골 구조와 골밀도 등을 감소시킴으로 결국 골절이 쉽게 일어나게 된다. 골다공증에 대하여 효과가 있으면서 부작용이 없는 천연물의 중요성이 대두되고 있는 시점에서 여러 선행연구를 통해 세포, 동물 단위에서 인삼의 뼈 건강 개선 효능을 확인하였다. 그러나 표준화된 인삼추출물을 이용한 체계적인 기능성 검증 연구가 수행되지 않고 있다. 본 연구 과제에서 비임상-인체적용시험을 통해 표준화된 인삼추출물의 투여/섭취가 뼈 건강 개선에 미치는 유효성과 안전성을 확인하고자 하며, 체계적이고 과학적인 연구 결과를 통해 식약처 개별인정 원료 신청 근거를 확보하고자 연구를 진행하였다.

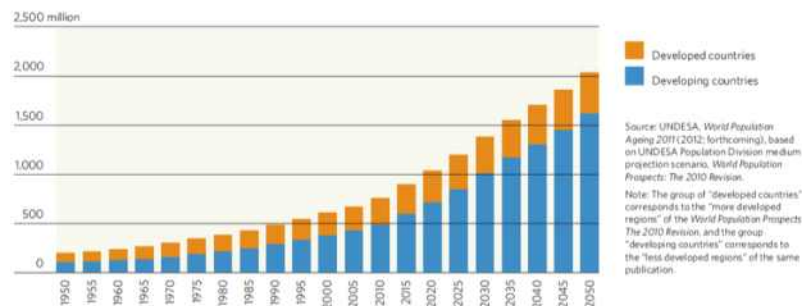
제2절 연구 개발의 필요성

우리나라의 경우 2010년 노인인구가 전체인구의 11.0%로 이미 고령화 사회에 진입하였으며 2018년에는 14.3%, 2026년에는 20.8%로 초고령화 사회에 진입할 것으로 전망되고 있다(Korea National Statistical Office, 2010).



[그림] 0-4세, 0-14세, 60세 이상 인구수

UN 세계 인구 통계에 의하면 60세 이상 인구의 비중은 2010 ~ 2050년간 12.3%에서 31.1%까지 증가할 것으로 전망됨. 특히 선진국의 노령화 외에도 개발도상국에서 급속한 노령화가 진행돼 2050년에는 세계 전체의 고령자의 80%에 이를 것으로 전망하고 있다.



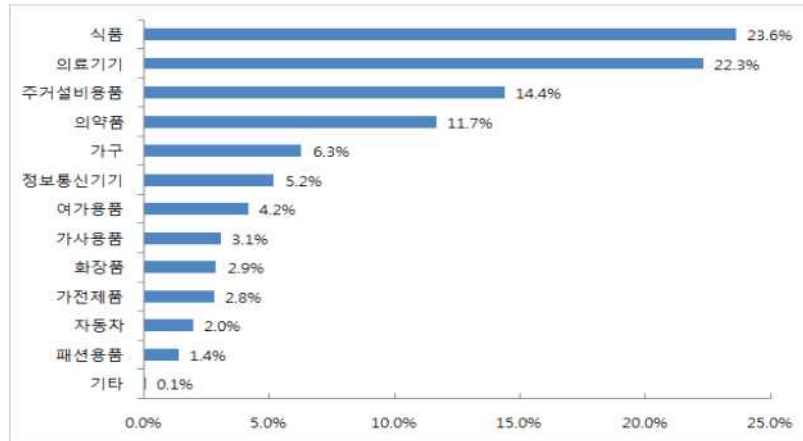
[그림] 선진국, 개발도상국의 60세 이상 인구수

사회가 고령화되면서 노인건강에 대한 관심도가 증가하고 있는 추세이며, 특히 만성질환으로 인한 노인의 삶의 질 저하가 사회적 문제로 대두되고 있다. 고령친화산업을 지원·육성하고 그 발전 기반을 조성함으로써 노인의 삶의 질 향상과 국민경제의 건전한 발전에 이바지하고자 정부에서도 2006년 “고령친화산업진흥법”을 제정하였다.

한국 전통 특화자원인 인삼을 이용한 노령화에 대한 기능식품의 개발은 고령친화분야의 새로운 건강기능식품 및 천연물의약품을 창출하는 것이며, 이는 국민보건의 향상 뿐만 아니라 농가의 소득원으로 활용할 수 있다. 해외 인지도와 수요가 높은 인삼을 활용한 새로운 기능성, 고령친화적 건강에 대한 과학적 검증 통한 건강기능식품 개발에 의한 제품화는 관련 산업분야 뿐만 아니라 연구능력 및 제품화 기술의 향상을 유도하며, 고령친화, 건강식품산업, 원료산업

등 관련 경제 활성화에 기여할 것이다.

2011년 조사에 의하면 고령친화산업의 육성에서 지원이 필요한 고령친화 제품으로는 식품, 의료기기, 주거설비용품, 의약품 순으로 나타났다.



[그림] 고령친화산업에서 지원이 필요한 분야

국내에서 최근 들어 평균수명 증가, 고령화 사회 진입 및 삶의 질에 대한 사회적 관심증가 등으로 인해서 골다공증, 관절염 및 치매와 같은 노인성 질환에 대한 시장의 수요가 한층 더 증가할 것으로 예상된다.

최근 인구의 노령화로 근골격계 질환의 발생이 증가하고 있는데, 그 중 유병률이 높은 질환 중 하나가 골다공증이다. 특히, 급격한 고령화와 필연적으로 폐경기를 거치는 여성 건강의 특성으로 인해 골다공증은 현재 뿐만 아니라 미래 사회의 심각한 여성 공중보건문제로 부각되고 있다. 60세 이상 여성의 골다공증 유병률은 50% 이상으로 추정되며, 골다공증 및 근골격계 관련 질환의 사회경제적 비용은 연 2조 2천억원 수준, 암(5조 6천억원)의 40%, 당뇨병(1조 1천억원)의 2배이다. 이미 WHO와 선진국은 국가 차원에서 골다공증에 대한 실태 조사를 오래 전부터 도입하여, 유병 수준과 그 원인을 규명하고 이에 대한 공중보건학적 대책을 강구하고 치료제 및 건강기능식품 연구개발에 노력하고 있다.

한국에서는 2009년 국민들에게 많이 발생하는 근골격계 질환 중 ‘골관절염과 골다공증 유병률’에 대한 조사를 처음으로 실시한 결과, 65세 이상 여성 2명중 1명이 골관절염을 앓고 있는 것으로 나타났으며, 65세 이상 골관절염 유병률은 전체 24.2%, 여성 50%, 남성 20.1%로 여성의 유병률이 남성보다 2배 이상 높았고, 50세 이상을 살펴보면 전체 24.2%, 여성 32.4%, 남자 14.7%가 골관절염을 앓고 있는 것으로 나타났다. 특히, 골다공증의 경우 50세이상 여성의 유병률은 38.7%인데 비해, 65세이상 여성의 유병률은 62.5%로 나타나 연령이 높아질수록 심각한 것으로 나타났다.

여성 뼈건강의 중요성은 골다공증성 골절은 뼈의 흡수와 재형성에 관여하는 여성호르몬(에스트로겐)이 폐경 후 급격히 감소하기 때문에 남성보다는 여성에게서 더 많이 나타나며, 50세 여성이 죽을 때까지 골다공증성 골절을 최소 한 번 이상 경험할 확률(전생애 위험도)은 29%로 남성보다 2.7배가량 높았다. 대한골다공증학회와 대한골대사학회가 대한정형외과학회, 한국여성건강 및 골다공증재단 등과 공동으로 2013년 8월 29일부터 2주간 50~59세 여성을 대상(서울시 거주 폐경기 여성 500명)으로 조사한 결과 현재 골감소증 또는 골다공증 치료를 받는 여성이 13.5%에 이른 것으로 밝혔다. 여성 건강을 위한 골다공증 예방의학적 건강기능식품 소재의 연구 및 개발은 국민 2세 건강과 복지를 위한 필수요소이다.

인삼 뼈건강 연구의 필요성은 국내 농업의 발전과 농가소득 향상 및 인삼을 통한 국제경쟁력 재고를 위하여서는 유효성분위주의 연구보다는 인삼자체의 연구가 보다 의미가 크다. 주로 시민들은 차나 물로 추출한 액상들의 형태로 인삼을 섭취하게 되므로 물로 추출하거나 원 인삼 그대로 분쇄하여서 쓰는 형태가 활용도가 높다. 하지만 이러한 형태의 인삼에 대하여서는 국내외 모두 연구가 미약하다. 뼈건강을 위한 인삼개발을 위하여서는 성분연구보다는 시판될 수 있는 상태로 인삼을 표준화한 후 전임상 및 인체적용시험을 수행함이 바람직하다고 할 수 있다. 인삼이 주는 임상적 효과를 재현하기 위해 사용하는 인삼의 성분에 대한 표준화가 기본적으로 요구된다. 인삼 섭취 후, 체내에서의 대사 관찰을 통해 인삼이 효과적으로 작용하였을 경우와 그렇지 못한 경우를 비교 하여 연구할 필요가 있다.

제3절 연구 개발 범위

1. 동물시험을 통한 인삼의 뼈 건강 개선 기능성 평가

난소적출 동물모델에 인삼추출물 투여 시 뼈 건강 개선 효과 및 작용 기전 연구와 동물시험 결과를 통해 인체시험을 위한 섭취용량 산출 하였다.

2. 인체적용시험을 통한 인삼의 뼈 건강 개선 기능성 및 안전성 평가

인체적용시험 디자인 설계 및 유효성 평가항목 선정 및 인체적용시험 계획서(protocol) 개발 및 인체시험윤리위원회(IRB) 승인, 인체적용시험을 통한 인삼의 뼈 건강 개선 기능성 및 안전성 평가 하였다.

3. 인삼의 뼈 건강 개선 기능성 원료 인정 자료 확보

식약처 개별인정 원료 등록 관련 연구 자료 확보 및 개별인정 등록 신청 서류 준비 및 제출을 연구범위로 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술 수준 및 시장 현황

골다공증 시장규모는 호르몬 대체제를 제외하고도 시장이 큼. 국내 골다공증 치료제 시장은 급속한 고령화에 기인하여 매년 20%의 성장률을 보이고 있다. 골다공증 치료제로는 비스포스포네이트 제제, 호르몬 대체제, 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 등 몇 가지가 이용되고 있지만, 부작용이 크기 때문에 부분적인 치료밖에 이루어지지 못하고 있다. 특히, 현재까지 사용되고 있는 약제는 뼈흡수를 억제하는 효능 위주이기 때문에, 이미 골밀도가 낮아진 환자에게는 보다 근본적인 치료제로 사용되지 못하는 한계성을 가지고 있다. 일반적인 건강기능식품(칼슘보충용, 글루코사민 제품)의 경우, 각 제품의 주요 소비자 중 다수가 겪고 있는 해당 질환을 타겟으로 하는 특화된, 유효성이 높은 건강기능식품 신제품(골밀도 저하억제기능 등)에 의해 시장에서 신속히 대체될 가능성이 높다.

인삼은 수삼 백삼 홍삼 등으로 나뉘는데 이에 대한 기능성식품으로서의 개발연구가 매우 활발하다. 특히 면역기능강화는 홍삼을 비롯한 인삼의 기능으로 자리매김하고 있으며, 다른 질환에 대하여서도 인삼을 적용하여서 연구해야한다.

인삼의 뼈건강 관련 연구 기술은 최근에 노령화된 쥐에서 인삼을 투여 시에 뼈 건강에 매우 도움이 되는 연구결과가 발표되었으며 이는 비추출된 원형의 인삼을 분말로 만들어 시행한 연구로 향후 뼈건강에 도움이 된다는 근거를 뚜렷하게 보여주고 있다. 기전 연구로 또한 pure compound인 Ginsenodie Rh2에 대한 연구가 시행되어 골다공증 기전을 제시한바 있다 (He et al., 2012).

[표] 인삼의 뼈/관절 건강 관련 국내 연구 현황

원료	기능성	in vitro	in vivo	인체
홍삼	관절염		1	1
Ginsenoside		1		

제 2 절 국외 기술 수준 및 시장 현황

미국은 폐경기 이후 여성들 중 30%는 골다공증 환자로 분류되며, 54%는 골감소증 상태에 있는 것으로 알려져 있다. 최근 발표된 세계보건기구(World Health Organization) 및 미국 국립보건원(National Institute of Health)의 보고서에 따르면, 수 년 내에 60세 이상의 고령 인구가 세계 인구의 1/4을 차지할 것으로 예측되어진다.

현재 골다공증 치료제 시장은 뼈 흡수 억제제인 비스포스포네이트(Bisphosphonate) 제제들이 국내를 비롯한 해외 시장을 석권했다. 머크(Merck)사의 포사맥스(Fosamax)가 2002년에 전세계 매출 2.2 조원을 달성하며 1위를 유지하고 있으나 2008년 특허가 만료되어 새로운 약물개발에 보다 많은 관심을 가지고 있다. 워너칠컷(Warner Chilcott)사의 악토넬(Actonel), 릴리(Eli Lilly)사의 에비스타(Evista)가 시장에서 높은 점유율을 보이고 있다.

뼈건강에 도움을 주는 식품분야는 이미 전 세계 주요산업국가에서 웰빙 관련 소비시장이 급격히 팽창하고 있으며 노화에 따른 만성질환 등에 대한 수요는 향후 지속적으로 증가할 것으로 예측된다. 특히 그 중에서도 대표적인 만성질환군으로 분류되는 골다공증을 예방, 완화할 수 있는 기능성 소재 및 관련제품사업에 대한 수요가 꾸준히 늘어날 것으로 예상됨에 따라 관련 시장의 규모는 지속적인 성장이 기대된다.

또한 최근 인삼 제품 개발은 스위스 파마톤사는 고려인삼과 중국삼에서 추출한 사포닌으로 단지 표준화한 것뿐인데 자양강장제인인 '진사나 또는 파마톤'를 만들어 매년 약 30억 달러의 매출을 올리고 있음. 인삼 추출물 G115®의 모든 1회 분은 주요 활성 물질이 동일하고 균일하다. 다른 인삼 제품의 진세노사이드 함량이 일정하지 않은데 비해(어떤 것들은 진세노사이드가 전혀 없는 것도 있다.) G115®는 항상 4%의 진세노사이드를 함유한다. 진사나는 인삼추출 성분인 G115가 100mg 들어 있는 제품으로 G115와 비타민E로 이루어진 제품이다. 파마톤은 인삼추출 성분인 G115가 40mg들어 있으며 20여 가지의 비타민과 미네랄 그리고 레시친이 함유되어 있는 종합영양제이다.

인삼이 최근 기존의 면역기능강화를 비롯한 다양한 기능 외에 뼈건강에 대한 연구가 pure compound수준에서 이루어지고 있다. 우리나라 인삼인 Panax ginseng을 이용한 골다공증 및 뼈 관련 연구는 없다.

[표] 인삼의 뼈/관절 건강 관련 국외 연구 현황

원료	기능성	in vitro	in vivo	인체
인삼	관절염	1	1	1
	골다공증	4	6	
Ginsenoside	관절염	1	1	
	골다공증	7	1	

제 3 절 연구개발의 중요성

뼈건강을 개선하는 건강기능식품의 요구가 증가하는 가운데 인삼을 활용한 뼈건강 개선 연구 노력은 국내외 거의 차이가 없이 활발하다. 하지만 대부분의 연구는 인삼의 유효성분후보 물질에 치중되어있으며 뼈건강 개선의 claim을 초점으로 하여 이루어지지 않고 있다. 즉, 주로 사포닌계열의 물질연구이며 이들의 시험관실험을 통한 기전연구, 세포생물학적 연구가 많으며 이러한 유효성분을 동물에 복강 내 주사를 통하여 기능을 평가하는 시도가 많이 이루어져왔다.

이러한 경향은 국내외 차이가 없으며 오히려 외국에서 더 많은 경향이 있다. 국내 농업의 발전과 농가소득 향상 및 인삼을 통한 국제경쟁력 재고를 위하여서는 유효성분위주의 연구보다는 인삼자체의 연구가 보다 의미가 크다. 주로 시민들은 차나 물로 추출한 액상들의 형태로 인삼을 섭취하게 되므로 물로 추출하거나 원 인삼 그대로 분쇄하여서 쓰는 형태가 활용도가 높다.

하지만 이러한 형태의 인삼에 대하여서는 국내외 모두 연구가 미약하다. 따라서 인삼이 주는 임상적 효과를 재현하고, 일정한 품질 유지를 인삼의 성분에 대한 표준화가 기본적으로 요구된다. 뼈건강을 위한 인삼개발을 위하여서는 성분연구보다는 시판될 수 있는 상태의 인삼을 표준화한 후에 전임상 및 인체적용시험을 수행함이 바람직하여 매우 필요하다고 할 수 있다.

제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

제 1 절 인삼을 이용한 골다공증 개선 건강기능식품 개발

1. 연구수행내용

<In vivo 시험 항목 및 실험 방법>

가. 골밀도 시험

현재 골밀도 측정을 위해서는 DEXA와 QCT가 가장 많이 이용된다. DEXA는 측정부위의 해면골과 치밀골을 구분하지 않고 전체 골밀도를 측정하였다. 시험물질이 골다공증을 예방 또는 치료 효능을 검증하기 위하여 골밀도 측정시험은 반드시 수행되어야 한다.

나. 조직학적 시험

경골 또는 척추골을 적출하여 고정과 탈회과정을 거친 후 paraffin section 또는 crysection을 이용하여 박편으로 후 slide glass에 고정한 후 Hematoxylin-Eosin 염색 또는 Masson's Trichrome 염색으로 염색하였다. 해면골의 골량을 비교하기 위해서는 image analyzer를 이용하여 해면골이 차지하는 면적 (BV, bone volume)을 치밀골을 제외한 전체 뼈의 면적 (TV, total volume)으로 나눈 값을 구하여 비교 하였다.

다. 혈액 및 소변의 생화학적 검사

혈액, 소변에서 나타나는 골대사의 생화학적 마커는 골밀도에서 확인할 수 없는 골형성과 골흡수 활성화에 대한 정보를 제공한다. 골형성의 생화학적 마커로는 혈액에 존재하는 열에 불안정한 (heat labile) alkaline phosphatase와 오스티오칼신 (osteocalcin)이 있다.

<In vitro 시험 항목 조골세포 및 골형성 실험>

가. Alkaline phosphatase 활성 실험

Alkaline phosphatase는 조골세포에서만 발현되지는 않지만, 조골세포가 분화하는 과정에서 발현과 활성이 증가하는 대표적인 효소로서 조골세포의 분화를 측정하는 마커로 많이 이용한다. alkaline phosphatase는 조골세포의 초기 단계에 발현이 증가하고, 효소 활성을 쉽게 측정할 수 있어서 짧은 기간 안에 조골세포의 분화 정도를 측정할 수 있는 장점이 있다.

나. 조골세포 마커의 측정

조골세포가 분화하면서 발현이 증가하는 단백질로는 type I collagen, alkaline, phosphatase, osteocalcin, osteopontin, osteonectin, bone sialoprotein을 측정하였다. 마커의 발현 정도는 RT-PCR, Northern blot, Western blot, ELISA 로 확인하였다.

다. 파골세포 및 골흡수 실험

파골세포는 생체 내에서 분화가 이루어진 후 수 일내에 사멸되므로 일차배양 세포를 얻기가 힘들다. 실험적으로는 파골세포로 분화할 수 있는 전구세포를 생쥐의 골수에서 얻어서 in vitro에서 파골세포로 분화시키거나, 파골세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있는 RAW264.7 세포주를 사용하였다. In vitro에서 파골세포의 분화를 유도하기 위해서는 골수에서 분리한 전구세포(bone marrow macrophage)에 RANKL과 M-CSF를 3 - 5일간 처리하였다. RAW264.7 세포는 RANKL만을 처리하여도 파골세포로 분화한다.

라. Tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) 활성 실험

TRAP은 파골세포에서 특이적으로 나타나는 효소로서 p-nitrophenol의 양을 흡광도를 이용하여 측정한다.

마. Tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) 양성 다핵세포 계수

하나의 세포내에 여러 개의 핵을 포함하고 있다. 이 특성을 이용하여 파골세포를 분화시킨 후 일정 면적 안에 존재하는 TRAP 양성이면서 3개 이상의 핵을 포함하는 세포를 측정함으로써, 파골세포의 분화정도를 측정한다.

<인삼성분의 표준화 및 인삼유래 뼈건강 관련 물질 연구>

인삼의 비추출 인삼 및 물추출인삼의 성분에 대한 표준화 작업은 물추출인삼의 성분 비교, 우리나라 인삼과 다른 나라 삼과의 성분 비교, 가공 처리된 인삼의 성분 비교 (인삼, 홍삼, 흑삼) 하였으며, 인삼 유래 성분의 골다공증 치유 효과의 기전 연구는 인삼 유래 성분 중 골다공증 치유능이 있는 성분 예측, 관심 성분의 타겟 유전자 발굴 및 그의 기전연구, 비드 결합 형태의 물질을 만들어 결합하는 단백질을 조사/연구 하였다.

<인삼의 뼈건강 기전연구 및 동물시험>

동물시험을 통한 인삼의 뼈건강 개선 기능성 평가는 난소절제 동물 활용한 골다공증 동물 모델을 사용 하였으며 시험설계는 정상대조군, Sham-operation군, 난소절제군, 에스트로겐 투여군, 인삼추출물 투여군으로 시험을 설계하였다. 시료투여 방법은 강제 경구 투여 하였다.

바이오마커는 골흡수(PYD, DPD, TRACP 등) 및 골형성(OSC, ALP) 지표, 칼슘 대사 및 호르몬 분비, 골절 위험(골밀도, 골강도, 골길이 등), 소장 칼슘 흡수 지표 등 다양한 바이오마커 측정 하였으며, 통계처리는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정 하였다.

시험방법은 난소적출(ovariectomy) 모델에서 골밀도, 골무기질 함량 및 총 골칼슘, Bone

Alkaline Phosphatase (BALP), Osteocalcin, Radiological evaluation을 측정 하였다.

<인체적용시험을 통한 인삼의 뼈건강 개선 기능성 평가>

시험개요는 인체적용시험 계획서(Protocol) 및 증례기록서(CRF; Case Report Form) 개발
기능성식품 인체시험윤리위원회(IRB; Institutional Review Board) 승인이며, 절차는 개발된
인체적용시험 계획서의 국제 인체적용시험 등록 사이트 등록, 인체적용시험을 통한 인삼의 뼈
건강 개선 유효성 및 안전성 평가이다

인체적용시험 모니터링은 인체적용시험의 질과 신뢰성을 보증하기 위하여 전문기관인 인체적
용시험 수탁기(CRO; Contract Research Organization)에서 인체적용시험 전반 과정에 대해 모
니터링을 실시하였다. 인체적용시험은 자료 입력 및 검증과 통계분석 및 성적서(CSR; Clinical
Study Report) 작성 하였다.

<식품의약품안전처 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청>

- ① 선행 연구 자료와 인체적용시험 결과를 바탕으로 건강기능식품 원료 개별인정을 받을 수
있도록 제출자료 준비 및 신청
- ② 건강기능식품에 관한 법률에 따라 건강기능식품 기능성 원료 및 기준 규격의 인정에 필요
한 제출자료 준비
- ③ 제출자료의 범위
 - 제출자료 전체의 총괄 요약본
 - 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
 - 제조방법에 관한 자료
 - 원료의 특성에 관한 자료
 - 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서
 - 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
 - 안전성에 관한 자료
 - 기능성 내용에 관한 자료
 - 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
 - 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

2. 연구수행결과

가. 인삼의 골다공증 개선제 효능 발굴

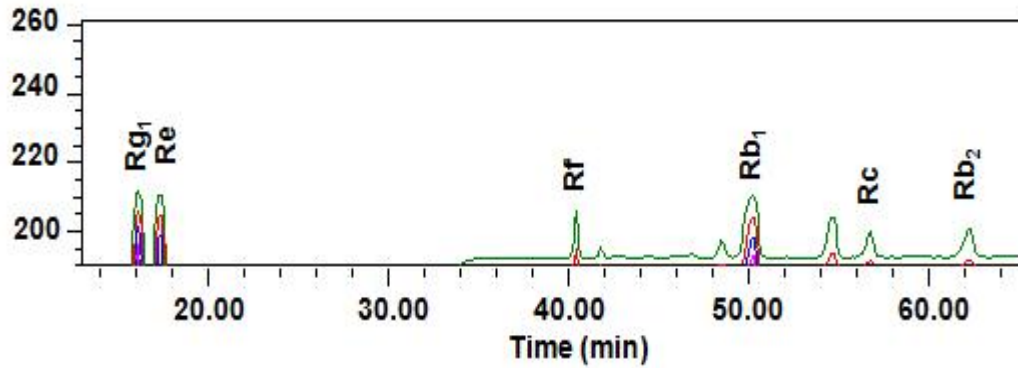


그림. Chromatogram of standard ginsenosides

인삼의 수종의 ginsenoside 함량을 HPLC를 이용하여 비교 분석하였다.

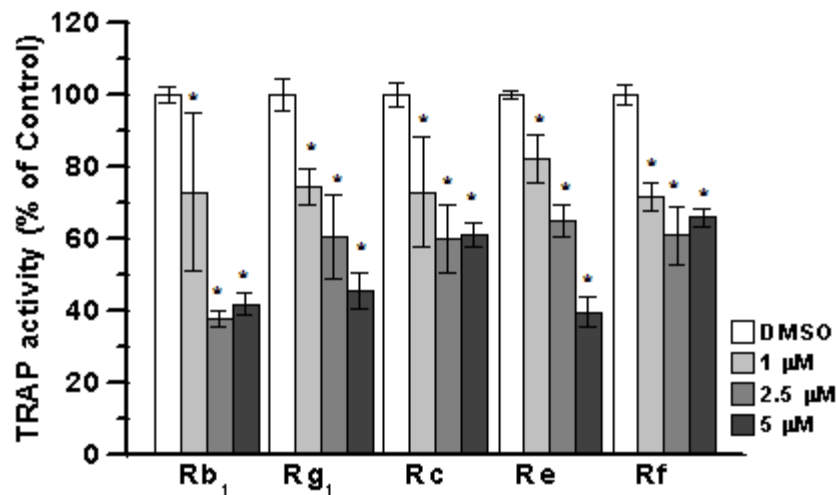


그림. 인삼성분의 파골세포 저해 효과

RANKL은 RANK와 결합한 후 신호전달 체계를 활성화 시켜 전사인자인 c-FOS와 NFATc1의 발현을 촉진하고 파골세포의 지표인 TRAP의 유전자 발현을 유도한다. 파골세포는 TRAP 양성반응을 나타내는 다핵세포이며 TRAP은 파골세포의 골 흡수 시 분비가 증가되면 다른 세포와 구별 할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지인자이다. 본 연구에서는 파골세포 전구세포를 배양하여 RANKL을 처리하여 분화를 유도하였다. 위의 결과로 모진세노사이드 Re에서는 농도 의존적으로 5μM에서 낮은 TRAP 활성이 나타났다.

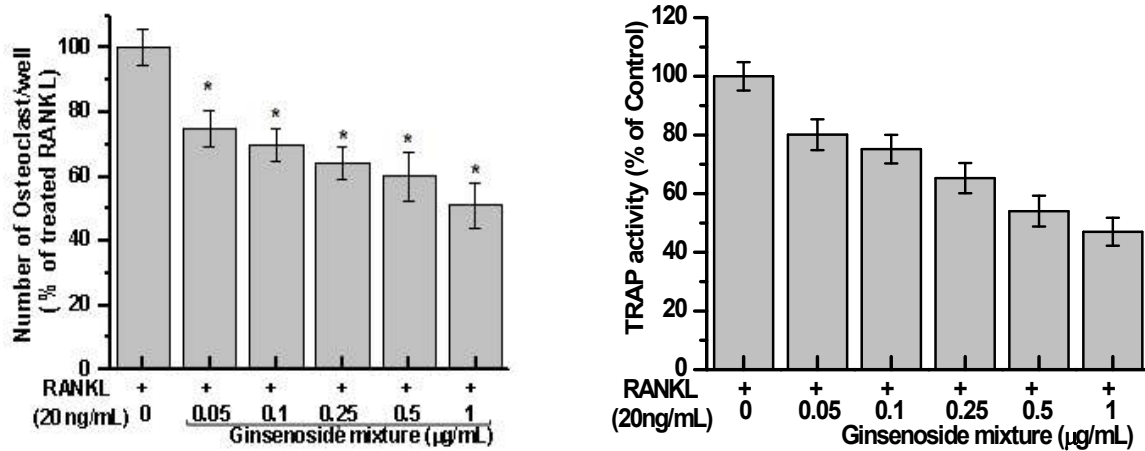


그림. 농도에 따른 인삼의 파골세포 저해 효과

인체의 뼈는 파골세포와 조골세포의 지속적인 생성이 일어난다. 파골세포는 단핵구/대식세포 계통의 세포로 뼈 조직에서 유일하게 뼈의 파괴를 담당한다. 파골세포의 전구세포인 RAW 264.7세포에서 파골세포의 생존율을 측정한 결과 진세노사이드 복합물이 농도 의존적으로 생성량을 저해하였다. 특히 진세노사이드 복합물 1μg/ml과 같이 낮은 농도에서는 파골세포 저해율이 50%에 해당하는 효과가 나타났으나 유의성 있는 결과를 나타내지는 못하였다.

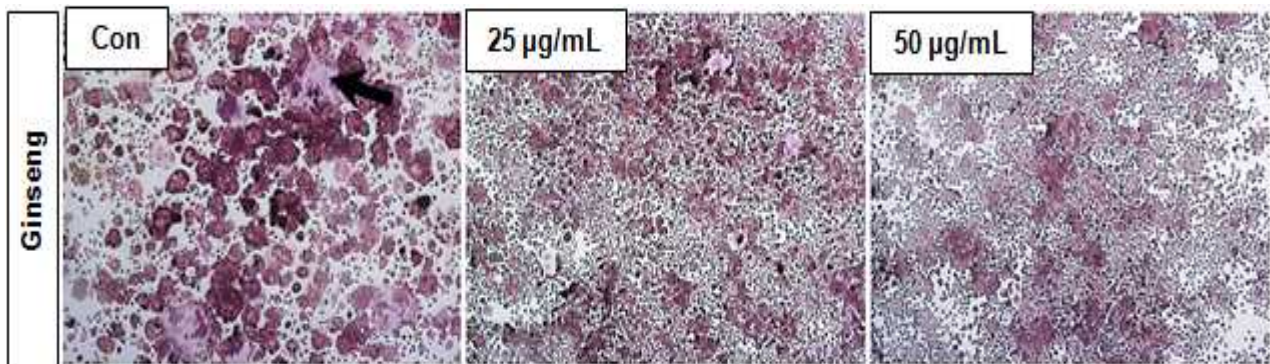


그림. 농도에 따른 인삼의 파골세포 저해 효과

파골세포 분화에 대한 인삼의 효과를 검증하기 위해 골수세포에서 유래된 대식세포에 RANKL을 처리하고 인삼을 첨가하였다. RANKL을 처리했을 때 TRAP 양성인 파골세포로 분화하였다(Control). 여기에 인삼을 25, 50μg/ml의 농도로 처리한 경우에는 파골세포가 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다.

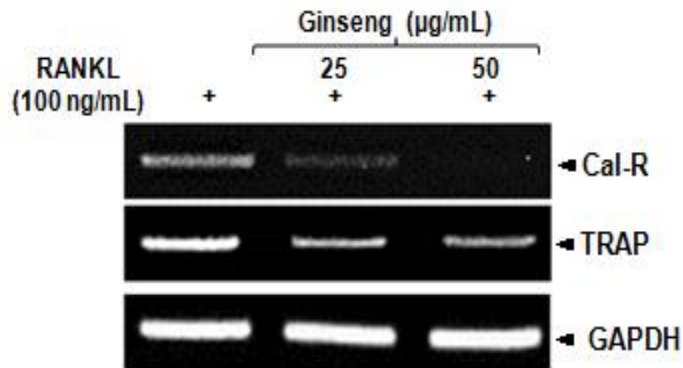


그림. 농도에 따른 인삼의 뼈파괴세포 분화인자(osteoclast differentiation factor : ODF)로 알려진 receptor activator of nuclear κ B ligand (RANKL) 저해 효과

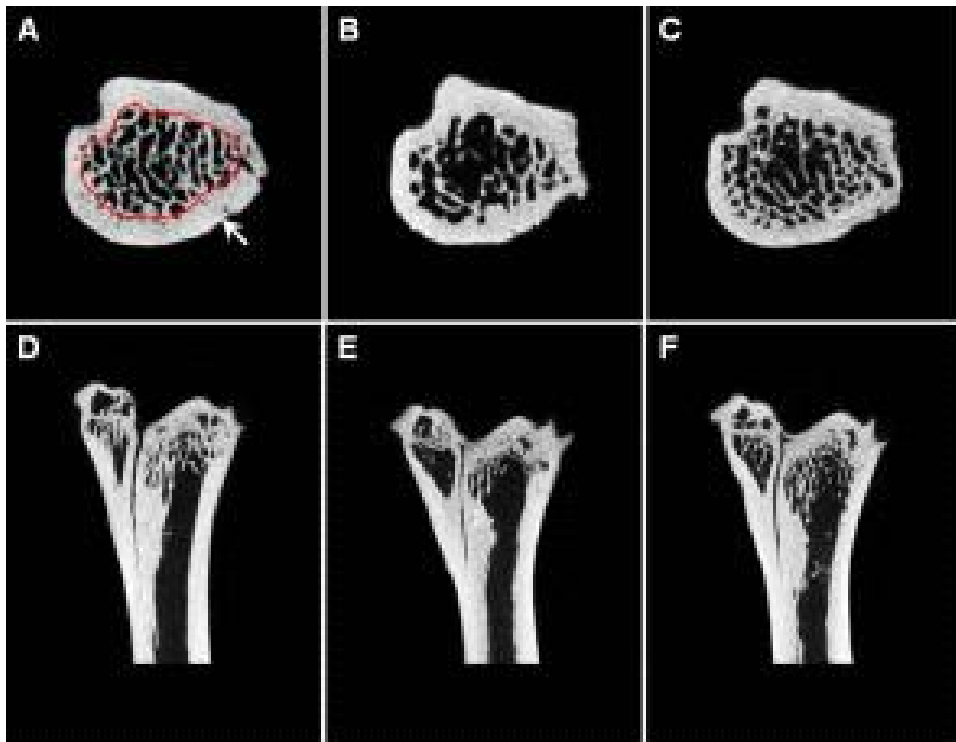


Figure. The cross sectional (upper panel; A, B and C) and transaxial (coronal section) images (lower panel; D, E and F) of tibial distal part, using Micro-CT analysis. A and D; control-young(비투여어린군), B and E; control-old(비투여고령군) C and F; ginseng-old(인삼투여고령군).

시기에 따른 골 발생과정에서의 인삼의 역할을 알기위해 생후 120주와 120주의 쥐에 8주간 인삼을 경구투여 한 쥐, 8주 흰쥐의 경골의 설정한 관심영역 내에서 3차원으로 재구성하여 그 이미지를 얻었다. 위의 그림은 각 시기에 경골의 2차원 종단면 이미지로 지주골을 3차원으로 재구성한 이미지를 보여준다. 8주령 비투여어린군에 비해 120주에 인삼을 투여한 늙은쥐의 변화가 뚜렷하게 관찰되었다. 120주의 노령쥐에 8주간 인삼을 100mg/kg 투여한 쥐의 골 모양

이 어느정도 회복함을 알 수 있다. 생체 내 골발생의 평가는 분석방법등의 다양한 요소에 의해 그 겨로가가 달라진다. microCT를 이용하여 시기에 따른 흰쥐의 경골미세구조를 분석하였다. 이는 피질골에 비해 상대적으로 세포의 성분이 많이 차지하는 지주골에서 더 큰 작용을 하는 것을 알 수 있었다.

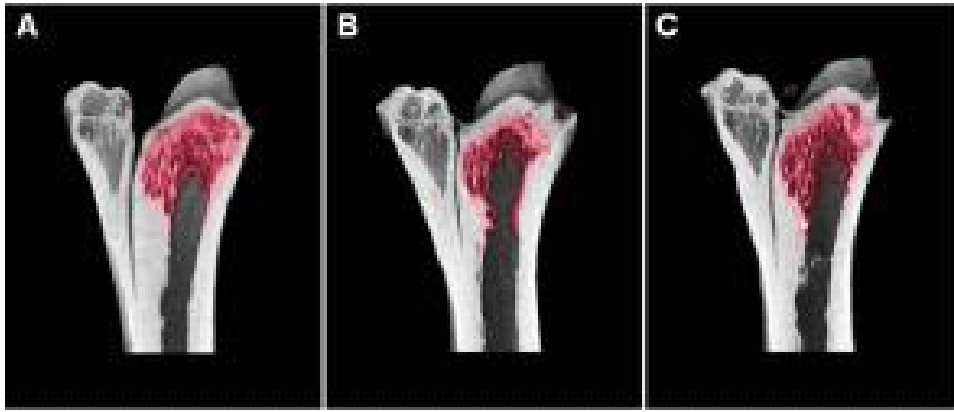


Figure 1. 3D reconstruction images of tibial distal part, using Micro-CT analysis. A; control-young(비투여어린군), B; control-old(비투여고령군), C; ginseng-old(인삼투여고령군)

설명 : 경골 말단부의 골 형성($n = 3$, randomly selected)은 micro-CT에 의해서 이미지화되었다. 경골 말단부위의 성장판 아래 0.2 mm에서부터 경골-비골 이음부까지의 치밀골(화살표)을 제외한 골소주(붉은선; 관심영역)의 가로단면과 이마단면 2차원적 영상 이미지와 3차원적 영상 이미지 모두에서 인삼 비투여 고령군의 골소주가 가장 뚜렷한 감소를 보인다. 인삼을 투여한 고령의 경골 말단부 골소주는 인삼을 투여하지 않은 어린군과 유사한 골소주의 형태를 보이고 있다. 난소절제에 의한 골다공증 동물모델에서 대퇴골의 해면골에서 골소주의 변화를 보기 위해 microCT를 측정된 결과, 난소절제한 군에 비해 인삼투여군에서 골소주의 골량과 골소주의 굵기 수가 증가하였음을 볼 수 있다.

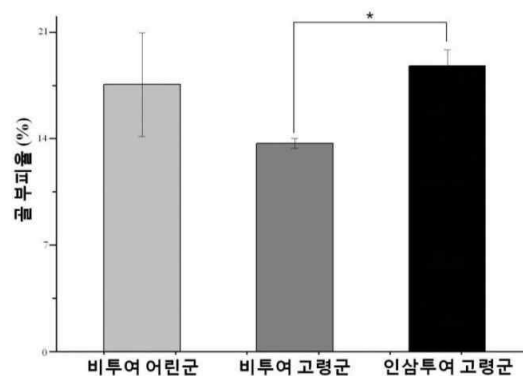


Figure 2. The volume ratio (%) of mineralized bone in the all experiment group.

Each column represents mean \pm SD ($n = 3$, respectively, $p^* < 0.05$). control-young(비투여어린군), control-old(비투여고령군), ginseng-old(인삼투여고령군).

Table. Microstructural properties of the tibial distal part by micro-CT analysis.

	Cont-Y	Cont-O	Ginseng
TV/BV (%)	17.56 ± 3.41	13.68 ± 0.33	18.78 ± 1.04 ^b
Tb.N (/mm)	0.29 ± 0.05	0.22 ± 0.03	0.33 ± 0.01 ^b
Tb.Th (mm)	0.61 ± 0.01	0.63 ± 0.06	0.59 ± 0.03
Tb.Sp (mm)	1.84 ± 0.22	2.20 ± 0.18 ^a	1.59 ± 0.02 ^b
SMI	2.83 ± 0.55	1.93 ± 0.84	2.19 ± 0.64

Values are expressed at mean ± SD (n =3, respectively). ^a $p < 0.05$ vs. Cont-Y group, ^b $p < 0.05$ vs. Cont-O, ^c $p < 0.05$ vs. Ginseng group. Cont-Y; control young, Cont-O; control old, Ginseng; ginseng old

해면골의 구조적 파라미터를 측정된 결과 TV/BV, Tb.N, Tb.Th, Tb.S BMD는 정상군에 비해 골다공증에서 모두 감소하였고 인삼추출물에서 증가하였다.

설명 : 경골 말단부 관심영역 내 전체 조직부피에 대한 골 부피율(% bone volume)은 인삼 비투여 어린군(17.56 ± 3.41)에 비해 인삼 비투여 고령군(13.68 ± 0.33)은 약 22%의 감소를 보였지만 통계적 유의성은 없었고, 인삼 투여 고령군(18.78 ± 1.04)은 약간 증가된 골부피율을 보였다. 그러나 인삼 투여 고령군은 인삼 비투여 고령군에 비하여 통계적으로 유의한 수준으로 약 37% 증가율을 보였다($P < 0.05$).

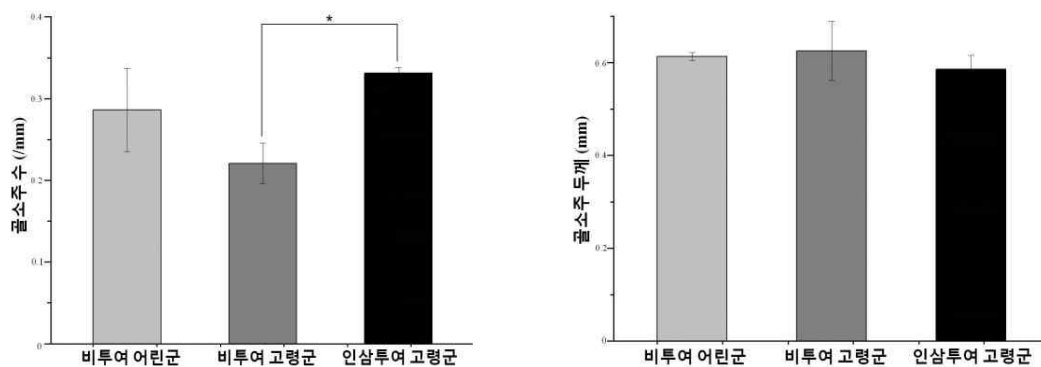


Figure . The trabecular number and thickness of mineralized bone in the all experiment group. Each column represents mean ± SD

(n = 3, respectively, $p^* < 0.05$). control-young(비투여어린군), control-old(비투여고령군), ginseng-old(인삼투여고령군).

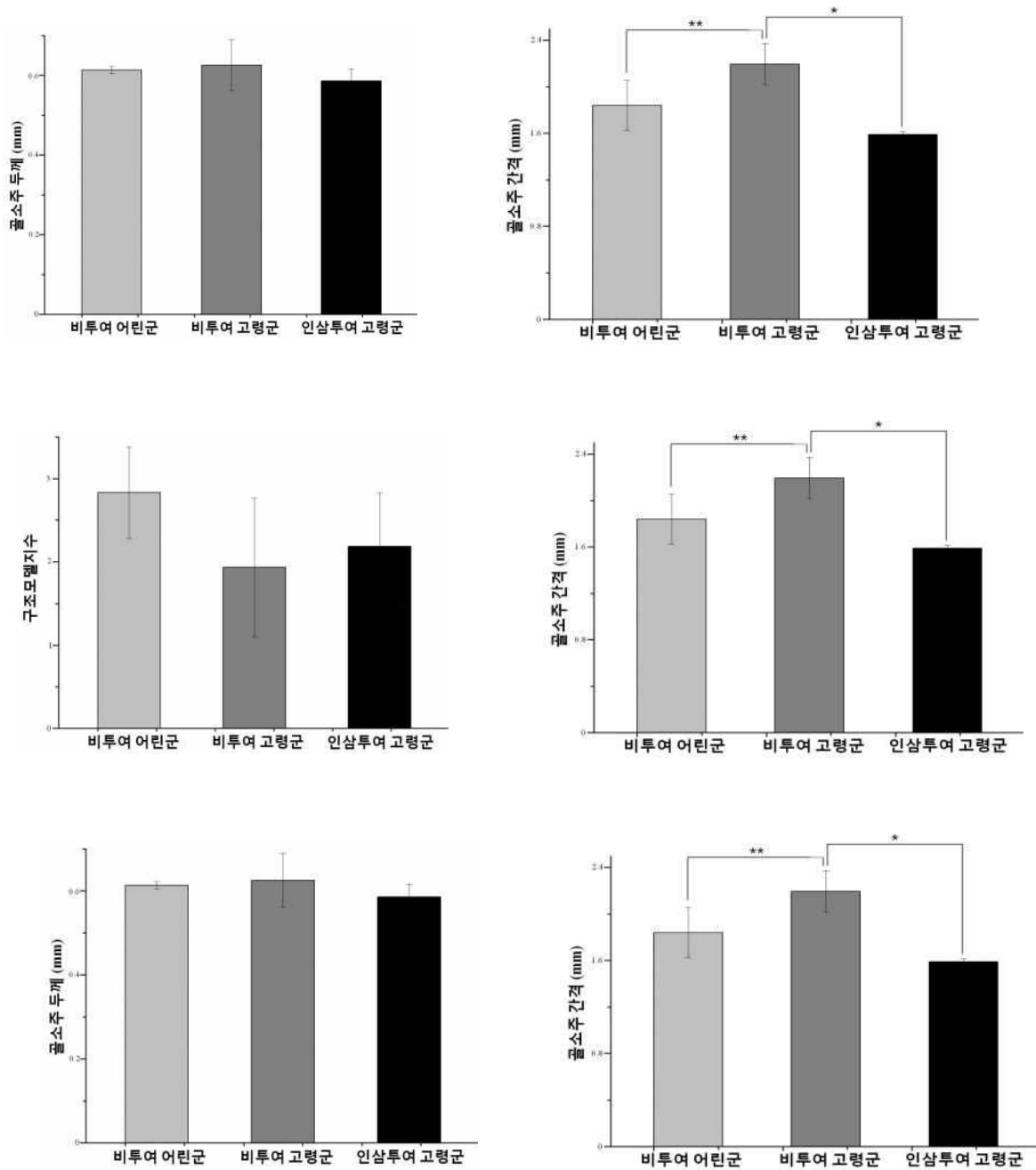


Figure . The trabecular number of mineralized bone in the all experiment group.

Each column represents mean \pm SD (n = 3, respectively, $p^* < 0.05$).

control-young(비투여어린군), control-old(비투여고령군), ginseng-old(인삼투여고령군).

경골 말단부 관심영역 내 골소주 수(trabecular number) 역시 인삼 비투여 어린군(0.29 ± 0.05)에 비해 인삼 비투여 고령군(0.22 ± 0.03)은 약 23%의 감소를 보였지만 통계적 유의성은 없었고, 인삼 투여 고령군(0.33 ± 0.01)과는 거의 유사한 비율을 보였다. 그러나 인삼 투여 고령군에서 인삼 비투여 고령군에 비하여 유의한 약 50% 증가율을 나타냈다($P < 0.05$).

경골 말단부 관심영역 내 평균 골소주 두께(trabecular thickness)는 모든 실험군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

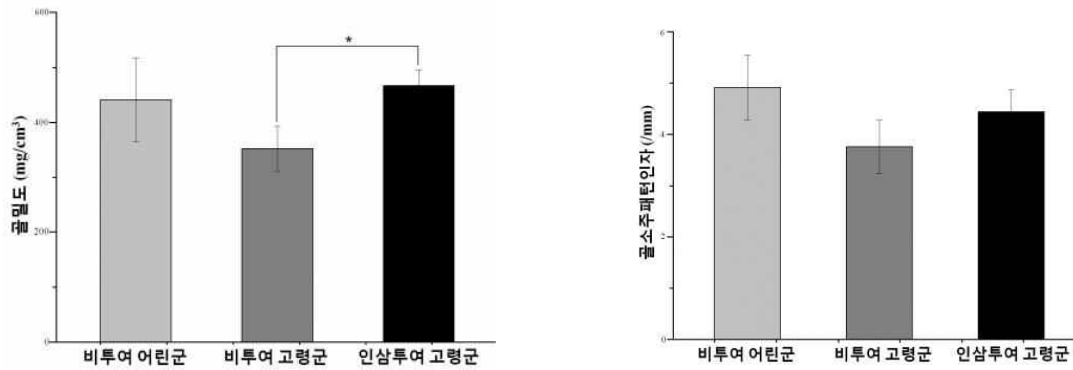


Figure. The trabecular number of mineralized bone in the all experiment group.

Each column represents mean \pm SD (n = 3, respectively, $p^* < 0.05$).

control-young(비투여어린군), control-old(비투여고령군), ginseng-old(인삼투여고령군).

소주패턴인자(trabecular fattern factor) 모든 실험군에서 유의적 수준 차이를 보이지 않았다. 경골 말단부위의 성장판 아래 0.2 mm 에서부터 경골-비골 이음부의 치밀골을 제외하여 측정된 골밀도(bone mineral density)에서 인삼 비투여 어린군(440.57 ± 76.39)에 비해 인삼 비투여 고령군(351.84 ± 40.19)은 약 21%의 감소를 보였지만 통계적 유의성은 없었고, 인삼 투여 고령군(466.31 ± 29.62)은 거의 유사하게 나타났다. 그러나, 인삼 투여 고령군에서 인삼 비투여 고령군에 비하여 유의한 약 32% 증가를 나타냈다.

Table.골소주수(trabecularnumber)

group	n	values
인삼비투여어 린군	1	0.26217
	2	0.25088
	3	0.3447
인삼비투여고 령군	1	0.23802
	2	0.19179
	3	0.23148
인삼투여고령 군	1	0.32574
	2	0.33876
	3	0.32905

소주패턴인자(trabecular fattern factor) 모든 실험군에서 유의적 수준 차이를 보이지 않았다. 경골 말단부위의 성장판 아래 0.2 mm 에서부터 경골-비골 이음부의 치밀골을 제외하여 측정된 골밀도(bone mineral density)에서 인삼 비투여 어린군(440.57 ± 76.39)에 비해 인삼 비투여 고령군(351.84 ± 40.19)은 약 21%의 감소를 보였지만 통계적 유의성은 없었고, 인삼 투여 고령군(466.31 ± 29.62)은 거의 유사하다. 그러나, 인삼 투여 고령군에서 인삼 비투여 고령군에 비하여 유의한 약 32% 증가를 나타냈다.

나. 인삼의 골밀도 개선효과

Table. Microstructural properties of the tibial distal part by micro-CT analysis.

	Cont-Y	Cont-O	Ginseng
TV/BV (%)	17.56 ± 3.41	13.68 ± 0.33	18.78 ± 1.04^b
Tb.N (/mm)	0.29 ± 0.05	0.22 ± 0.03	0.33 ± 0.01^b
Tb.Th (mm)	0.61 ± 0.01	0.63 ± 0.06	0.59 ± 0.03
Tb.Sp (mm)	1.84 ± 0.22	2.20 ± 0.18^a	1.59 ± 0.02^b
SMI	2.83 ± 0.55	1.93 ± 0.84	2.19 ± 0.64

Values are expressed at mean \pm SD (n =3, respectively). ^a $p < 0.05$ vs. Cont-Y group, ^b $p < 0.05$ vs. Cont-O, ^c $p < 0.05$ vs. Ginseng group. Cont-Y; control young, Cont-O; control old, Ginseng; ginseng old

Table. BMD of the distal tibial trabecular bone.

	Cont-Y	Cont-O	Ginseng
BMD (mg/cm ³)	440.57 ± 76.39	351.84 ± 40.19	466.31 ± 29.62^b

Values are expressed at mean \pm SD (n =3, respectively). ^a $p < 0.05$ vs. Cont-Y group, ^b $p < 0.05$ vs. Cont-O, ^c $p < 0.05$ vs. Ginseng group. Cont-Y; control young, Cont-O; control old, Ginseng; ginseng old

Table . The relative optical density of osteocalcin immunoreactivity

	Cont-O	Ginseng
OD	100.00 ± 9.86	$143.87 \pm 10.53^{**}$

Values are expressed at mean \pm SD (n =3, respectively $p^{**} < 0.01$). Cont-Y; control young, Cont-O; control Old, Ginseng; ginseng old

Table. 골부피율(% bone volume)

group	n	values
인삼비투여어린군	1	16.01535
	2	15.19894
	3	21.46791
인삼비투여고령군	1	13.66807
	2	13.35885
	3	14.01616
인삼투여고령군	1	19.88234
	2	18.67618
	3	17.79248

위의 데이터로 보아, 인삼 추출물을 노화로 인한 골다공증이 유발된 고령쥐에 투여하여 골다공증의 개선 효과를 골미세구조 및 조직형태학적 관찰과 평가를 통하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 인삼을 투여한 고령군은 인삼 비투여 어린군과 유사한 골 구조를 유지할 수 있었고, 모든군에서 골소주 두께는 차이가 없었지만 인삼 투여 고령군은 인삼 비투여 고령군에 비하여 골부피율과 골밀도 및 골소주 수 등이 증가되었고, 골소주 간격이 보다 조밀하게 형성되어 있었다. 또한, 조직형태학적 관찰 및 분석에 의하여 인삼투여 고령군은 인삼비투여 고령군에 비하여 감소된 파골세포의 분포와 골세포, 조골세포 및 골기질 등을 포함하고 있는 골소주가 현저하게 증가되었다는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 조사된 인삼 추출물은 골다공증 개선을 위한 치료제로써의 천연약재로 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

난소 절제 후 8주간 인삼(200mg/kg) 투여 후 μ -CT 분석한 결과는 그림 및 표 와 같다

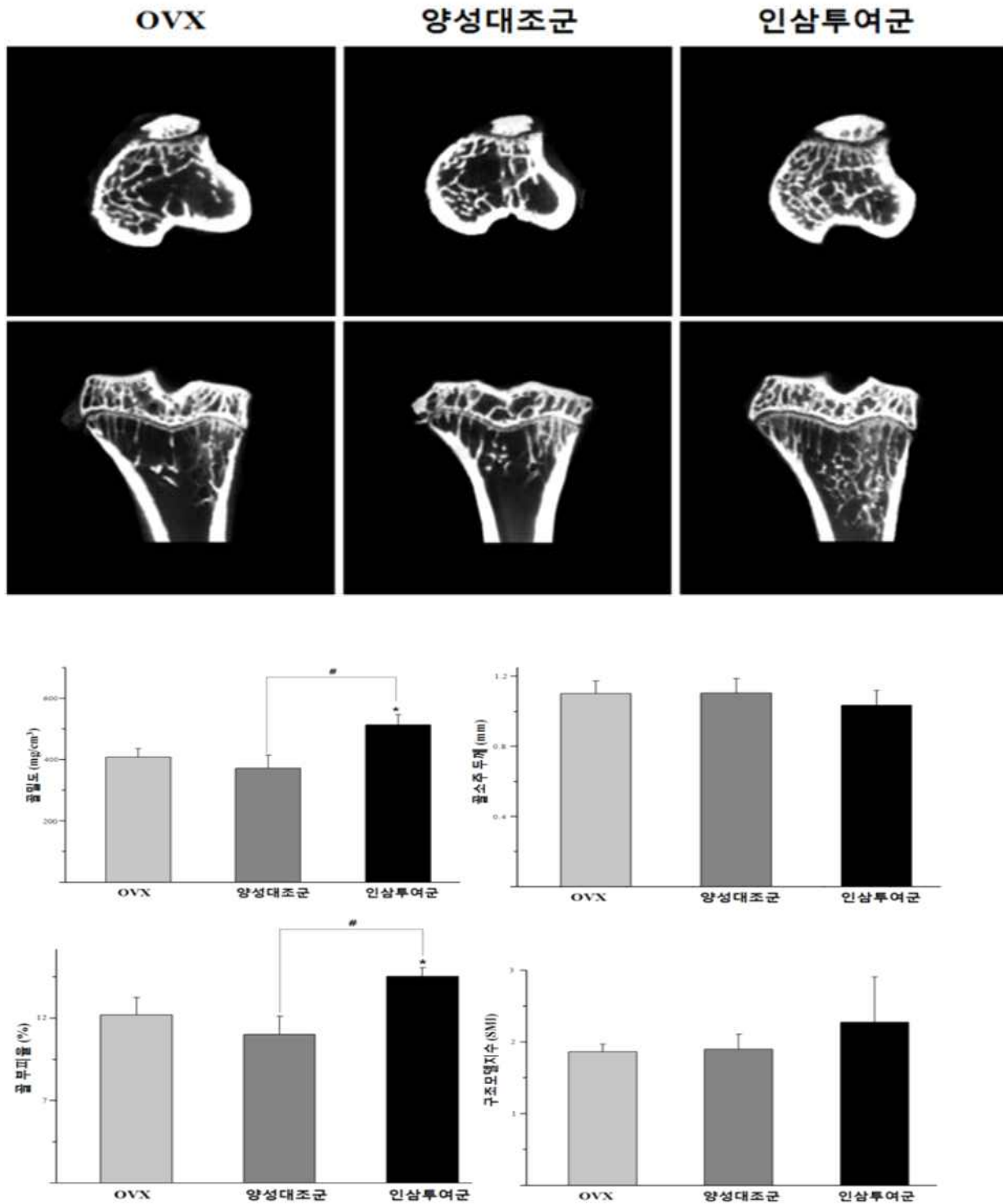


그림 12. 난소절제 흰쥐의 microCT 분석

인삼(200mg/kg) 투여 후 전체 ROI(관심영역)으로 지정한 영역에서 골이 차지하는 비율을 의미하는 'bone volume/Total volume' 이 양성대조군보다 높은 수치를 나타내었다. 이에따라 해면골의 두께를 의미하는 'trabecular thickness'에서도 인삼 투여군에서 높은 수치를 나타내었다. 이는 관절부위의 파괴를 억제하여 결과적으로 해면골 두께의 증가를 유도하여 관절염의 완화 효과가 있음을 나타내었다. 또한 'trabecular number' 분석결과에서도 인삼 투여군은 양성대조

군보다 높은 수치를 나타내어 관절부위의 파괴진행이 감소되면서 연골 마모가 감소하고 이에 따라 연골 표면적이 감소되었음을 확인하였다.

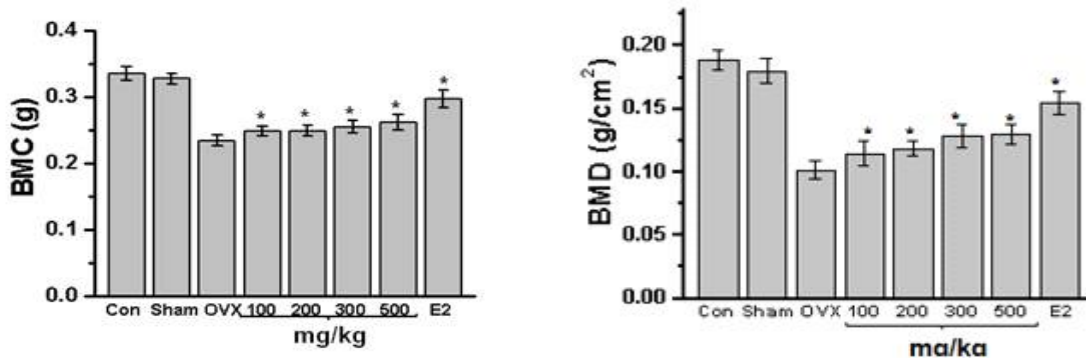


Figure. Effect of Ginseng water extract on bone mineral density

(A) Coronal images of rat medial-proximal tibia were shown by μ -CT. (B) Three D images were taken by μ -CT. Representative images were shown. BMD (C) and BMC (D) of right distal femurs were *ex vivo* measured by DEXA. * $p < 0.05$ vs OVX group. with the OVX group as determined by values are means \pm SEM (n = 16). BV/TV, bone volume fraction; Conn.D, connectivity density; SMI, structure model index, Tb.Th, trabecular thickness; Tb.N, trabecular number; Tb.Sp, trabecular separation. Rat's groups include sham-operated (Sham), OVX-control (OVX), 100, 200, 300 and 500 mg/kg treated ovariectomized groups, and E2 treated ovariectomized groups, total 8 group. (N=16/each group).

인삼이 뼈모세포 및 파골세포 활성화에 미치는 영향은 아래와 같다

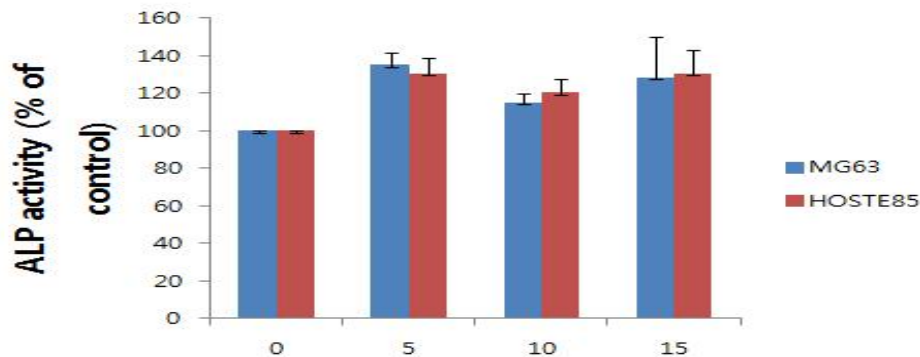


그림. 뼈모세포에서의 Alkaline phosphatase(ALP) 측정

ALP activities of osteoblast after treatment of ginseng were compared with the control at 0, 5, 10 and 15 days. ALP activity of osteoblast was markedly increased when MG-63 cells and HOSE 85.

조골세포인 MG-63을 이용하여 인삼추출물이 ALP 활성을 측정한 결과가 5, 10, 15 ug/ml 처리ALP 활성이 증가함 인삼추출물 처리시 ALP 활성이 증가한 것은 세포 활성이 감소함을 추측 할 수 있었다

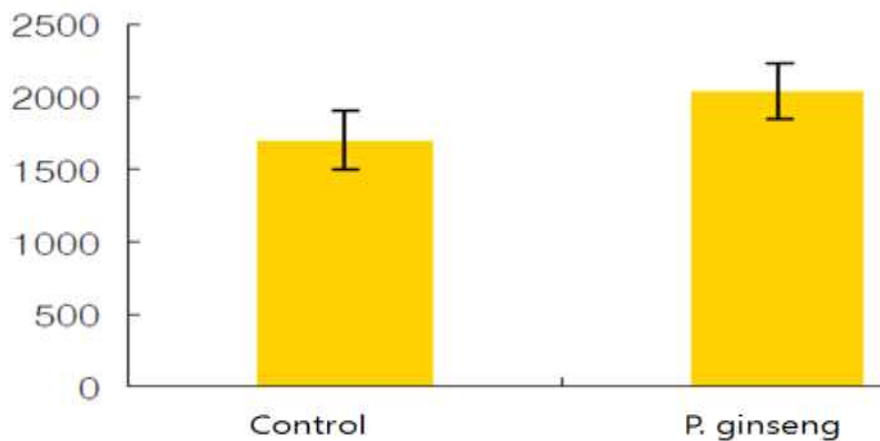


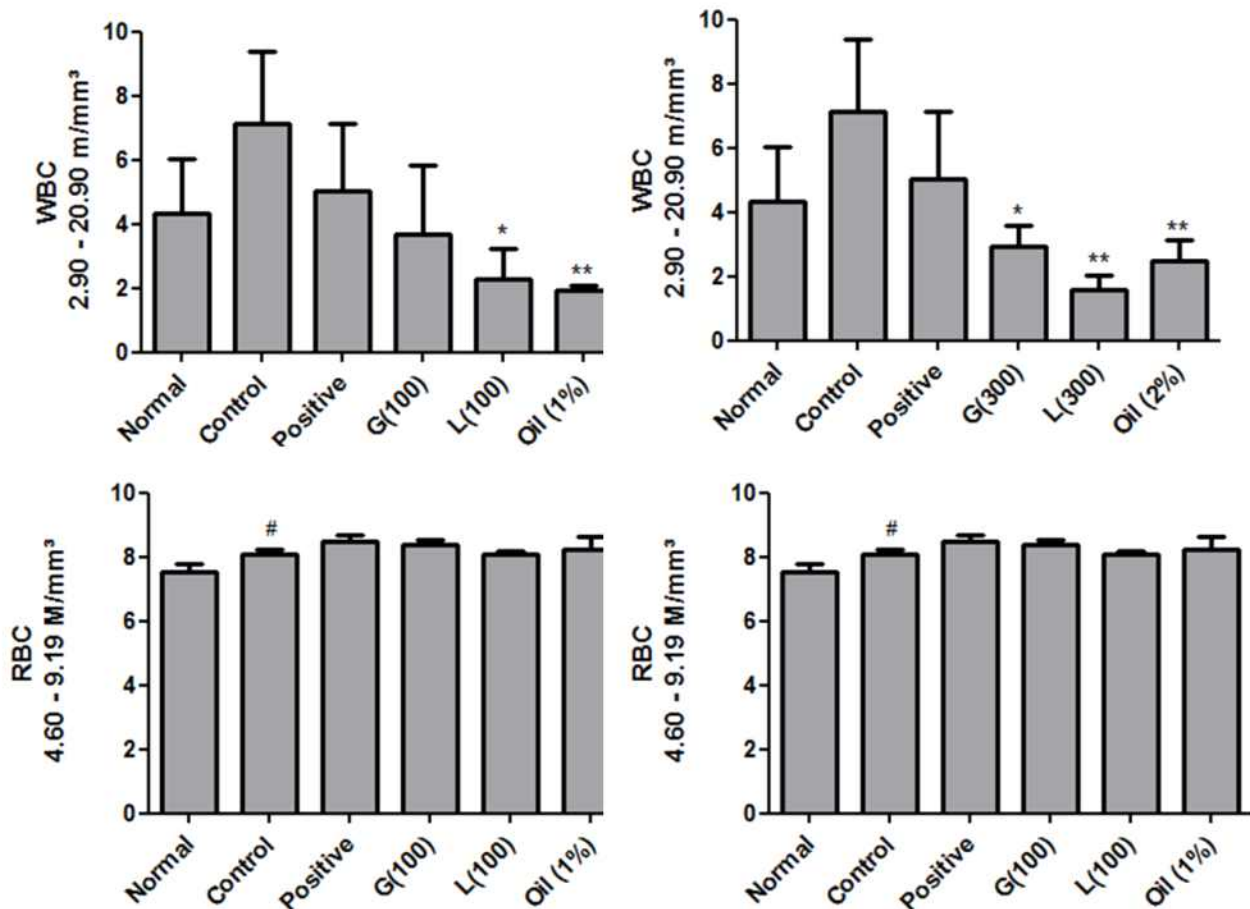
그림. 인삼이 뼈모세포의 석회화 결절에 미치는 영향

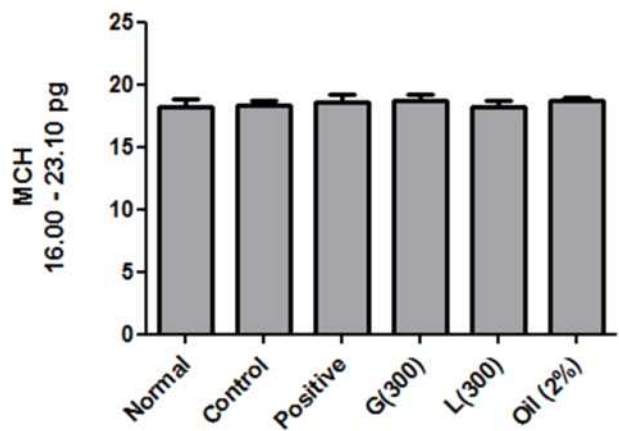
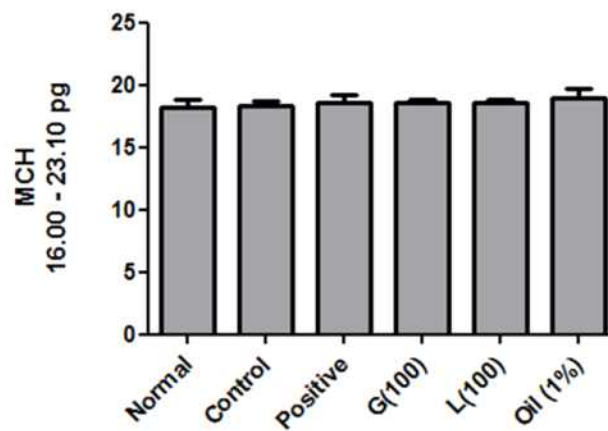
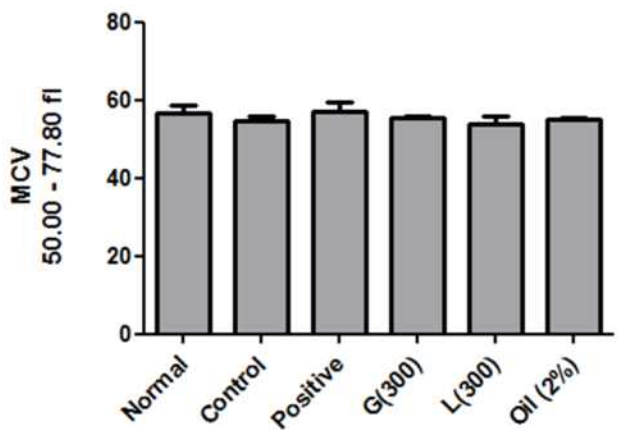
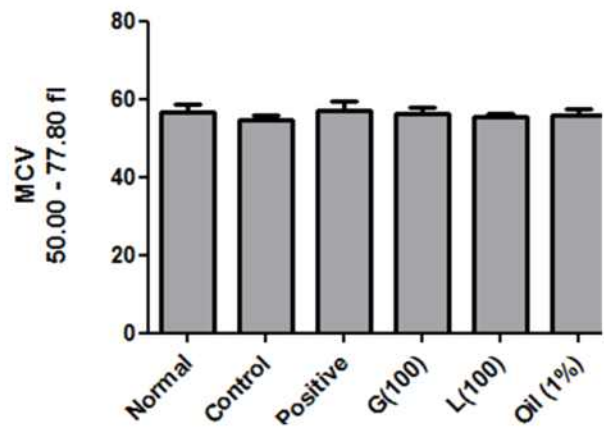
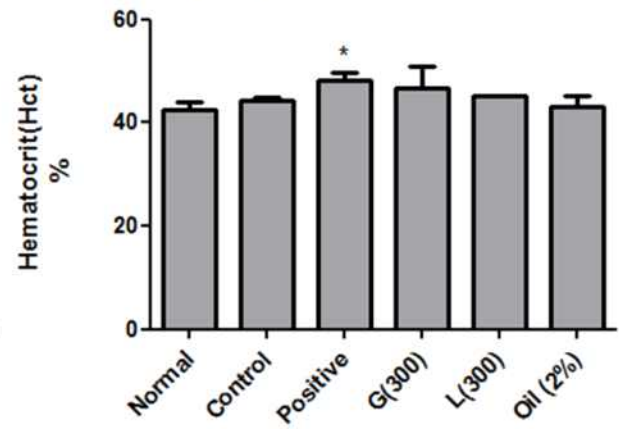
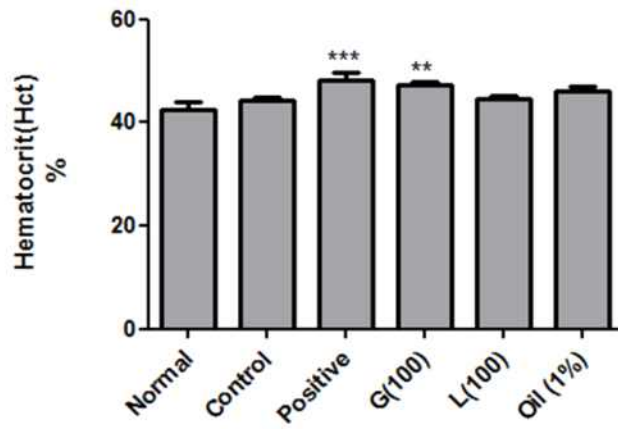
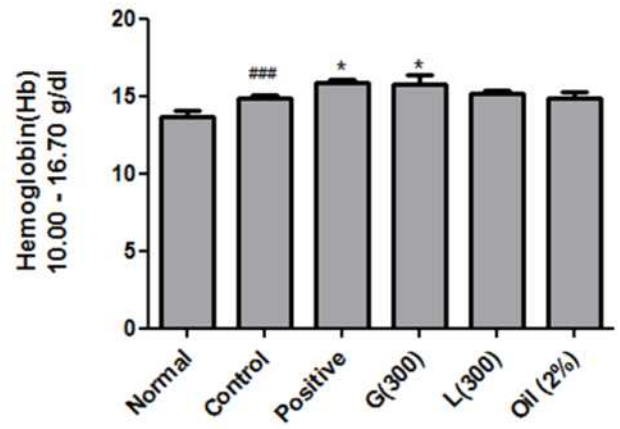
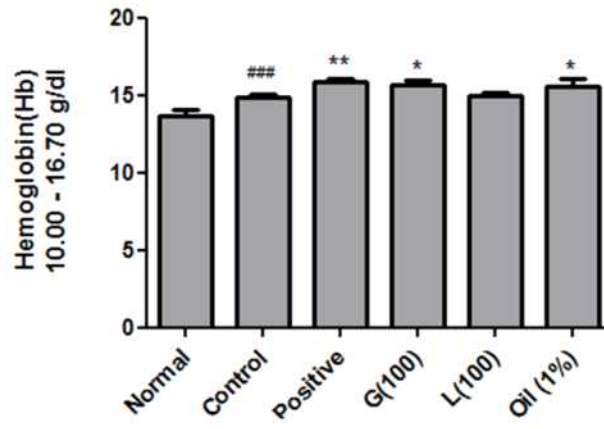
21일간 무기질화를 칼슘만 특이적으로 염색하는 arizarin red S에 의해 인삼을 넣은 배지가 대조군보다 높이 나타났다. 뼈는 몸에 형태를 부여하고 지지해주는 조직으로써 개체의 평생에 걸쳐 가해지는 다양한 물리적인 자극을 견디어 내야 한다. 따라서 뼈 조직 내에서는 낡은 뼈를

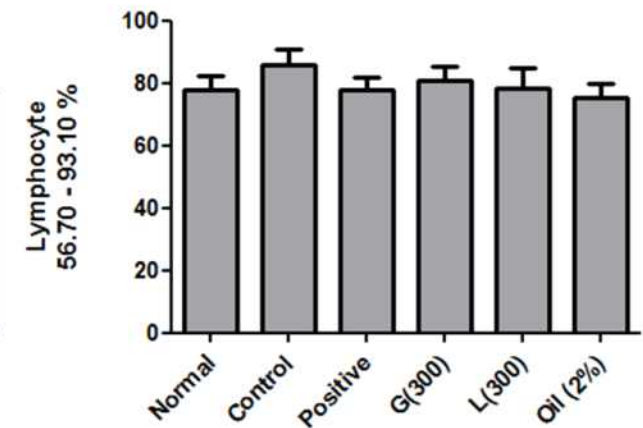
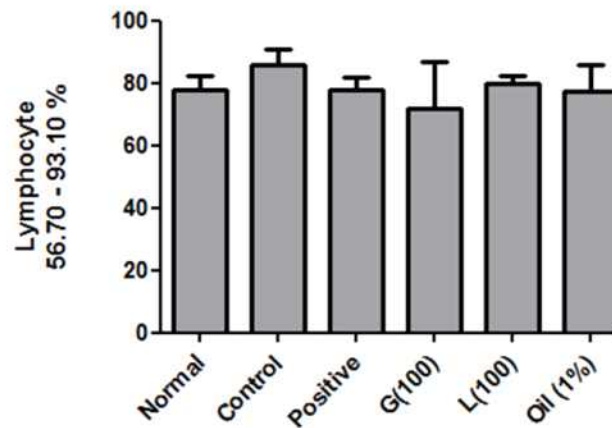
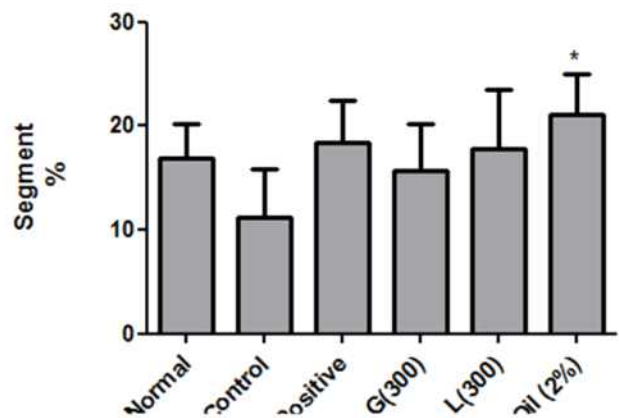
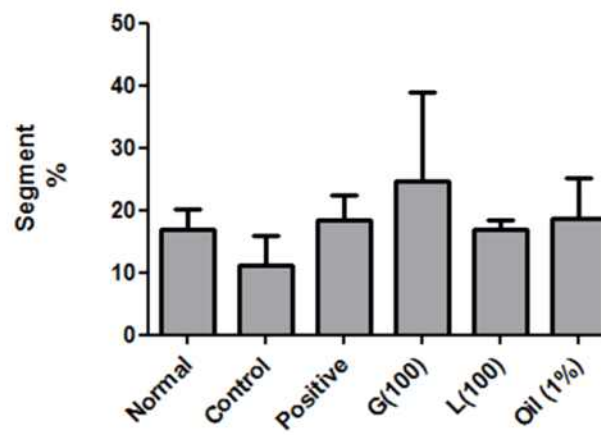
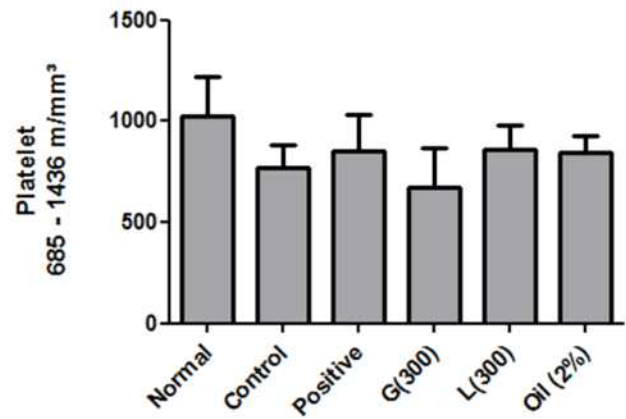
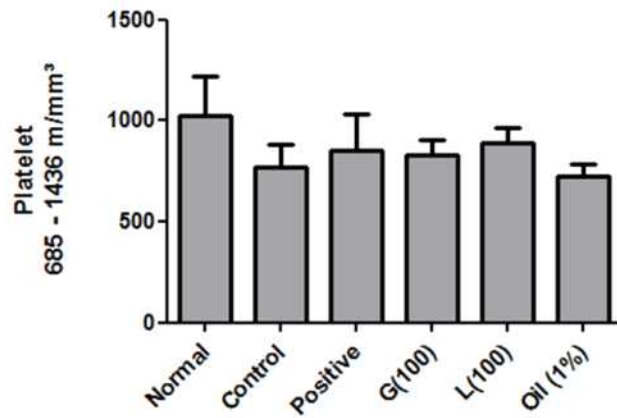
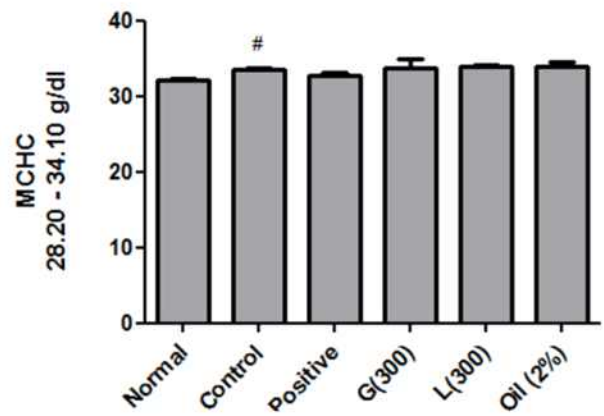
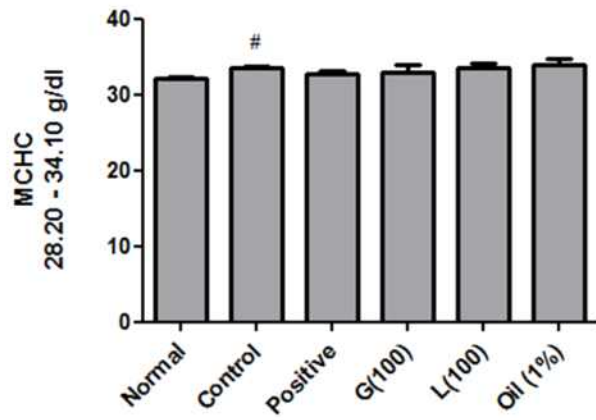
제거하고 새로운 뼈를 만들어내는 과정이 끊임없이 반복되는데 이를 뼈의 재형성 과정(bone remodeling)이라 부른다. 뼈의 재형성 과정은 조골세포와 파골세포라는 두 세포의 상호작용에 의해 일어난다. 파골세포가 낡은 뼈를 흡수(bone absorption)하고 나면 조골세포가 새로운 뼈를 만들어 (bone formation) 그 빈자를 채운다. 두 세포는 다양한 세포외 인자와 세포 내 신호전달계가 관여하는 복잡한 상호작용을 통해 정교하게 서로를 제어하며 이를 통해 뼈 조직의 항상성이 유지된다.

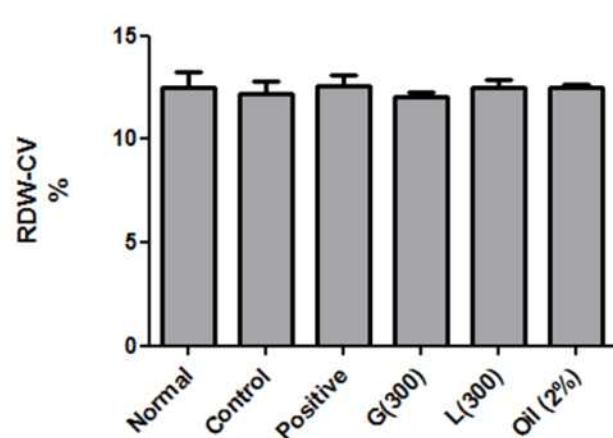
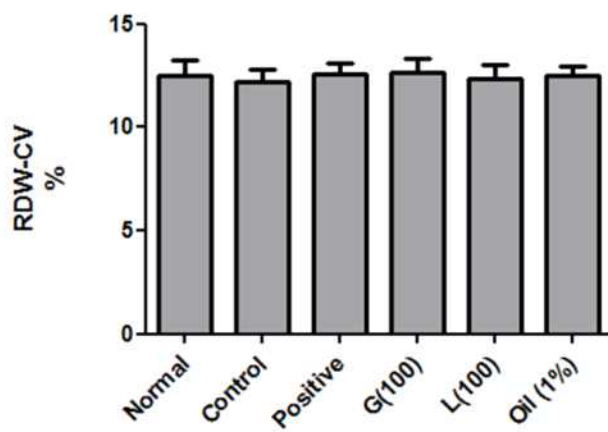
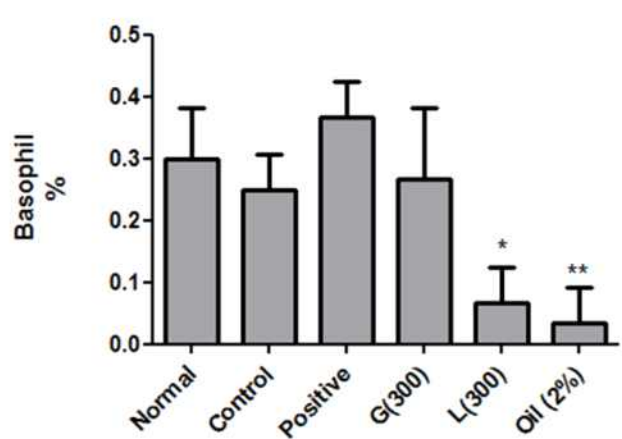
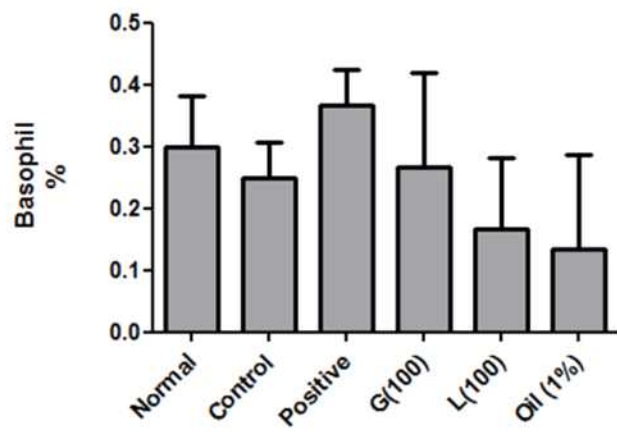
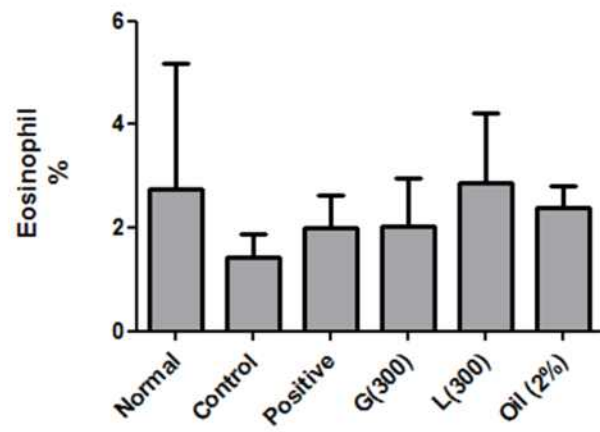
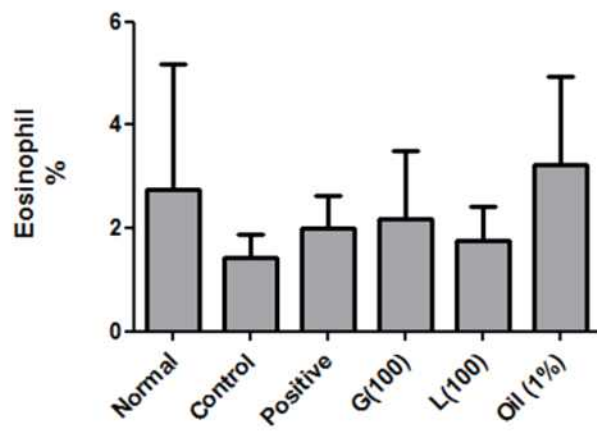
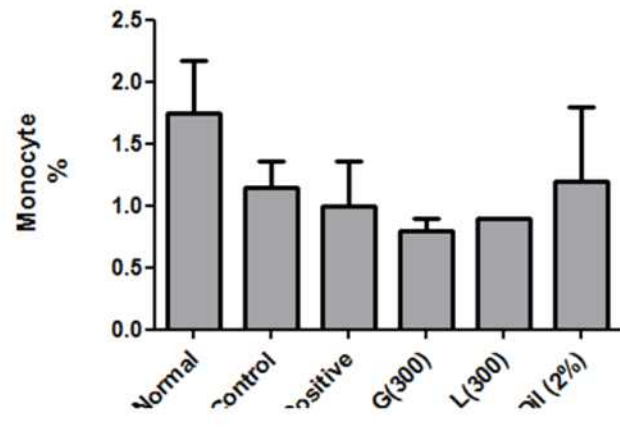
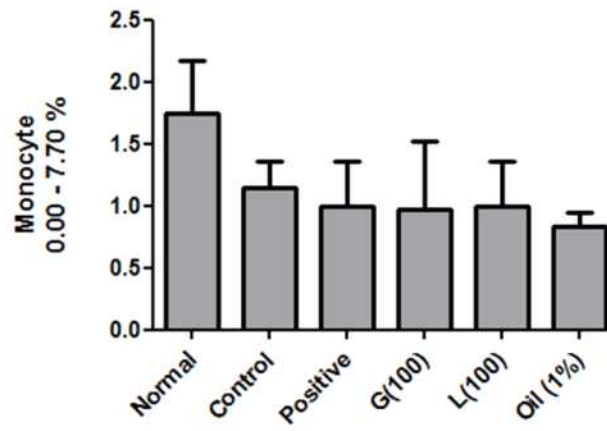
다. 인삼의 골다공증 개선 혈액분석

white blood cell (WBC), red blood cell (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular hemoglobin(MCH), mean corpuscular volume (MCV), platelet (PLT), lymphocyte (LY), monocyte (MO), granulocyte (GR), Mean distribution width(PDW)









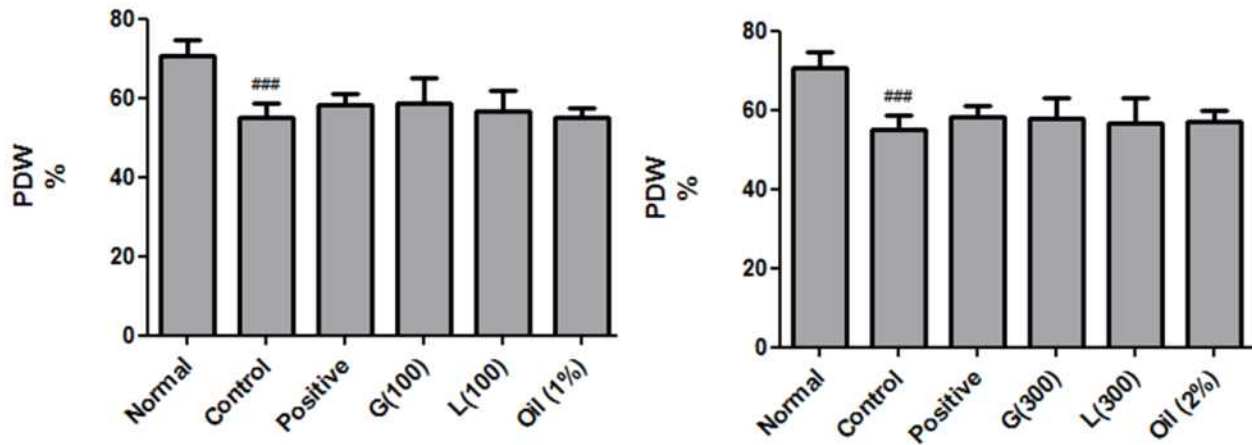


그림. Hematological parameters of experimental groups

혈액분석결과 혈중 헤모글로빈 농도도 골다공증을 유도한 경우 인삼투여군이 모든 군에서 유의한 회복효과를 나타내었다. 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구 혈색소(MCH), 평균적혈구혈색소 농도(MCHC), 도 인삼투여군에서 유의한 회복효과를 나타내었다. 빈혈을 판정할 때, 헤모글로빈이나 헤마토크리트의 검사 결과 철분부족이 심하지 않은 경우, 정상범위로 나타나는 경우도 있고 헤모글로빈의 농도는 철분 특이성이 낮아 엽산이나 비타민B12 결핍시 저하되므로 철분영양상태를알아보는 빈혈의 판정에 민감한 지표는 아닌 것을 보고 된다. 인삼투여군에서 헤마토크리트, 적혈구수, 혈색소 농도등의 항목에서 유의한 회복효과가 있었다.

라. 인삼과 우슬의 골다공증 개선제 효능 발굴

인삼과 우슬 혼합 복합물질의 골세포 즉, 파골세포와 조골세포의 영향을 평가하여 뼈 건강 개선 물질로서의 가능성을 평가하였다.

우슬과 인삼의 동량 혼합 복합물의 파골세포 분화 활성 억제는 그림 에서 보는바와 같이 인삼의 일부 고동도 처리에서 나타나는 세포 독성은 우슬과 혼합 처리함으로서 감소시키며, 인삼이 농도 의존적으로 파골세포의 분화 억제를 보이고 있다.

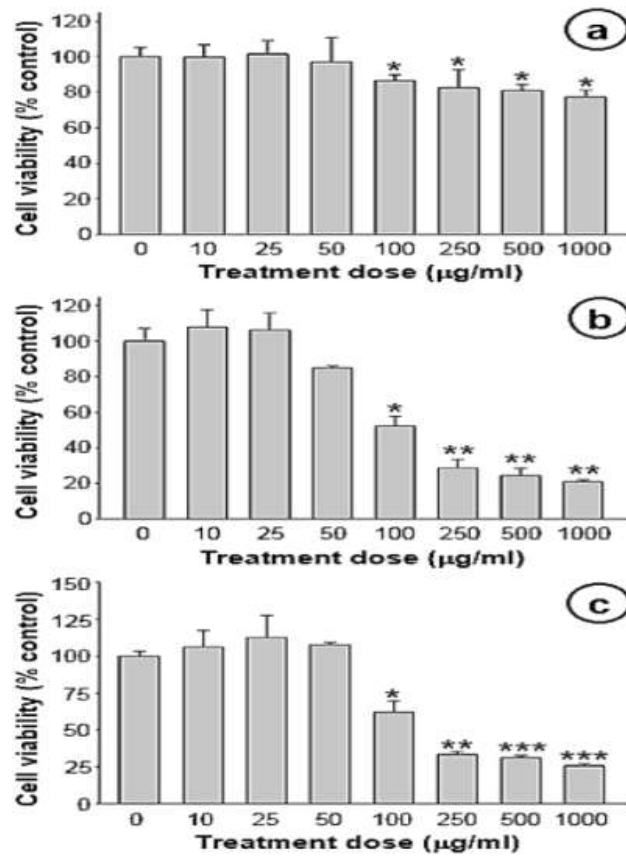


그림. MTT assay를 통한 세포 독성 평가. Each column represents mean \pm SD (n=3, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001) vs Control. Control: only RANKL treatment, a: *Achyranthes bidentata*, b: *Panax ginseng*, c: *Achyranthes bidentata* and *Panax ginseng* complex

인삼과 우슬 모두 100 ug/ml의 농도에서 세포 독성을 보였다. 그러나, 인삼과 우슬의 동량의 혼합물 50 ug/ml에서 인삼 단독처리보다 높은 생존률을 보인다.

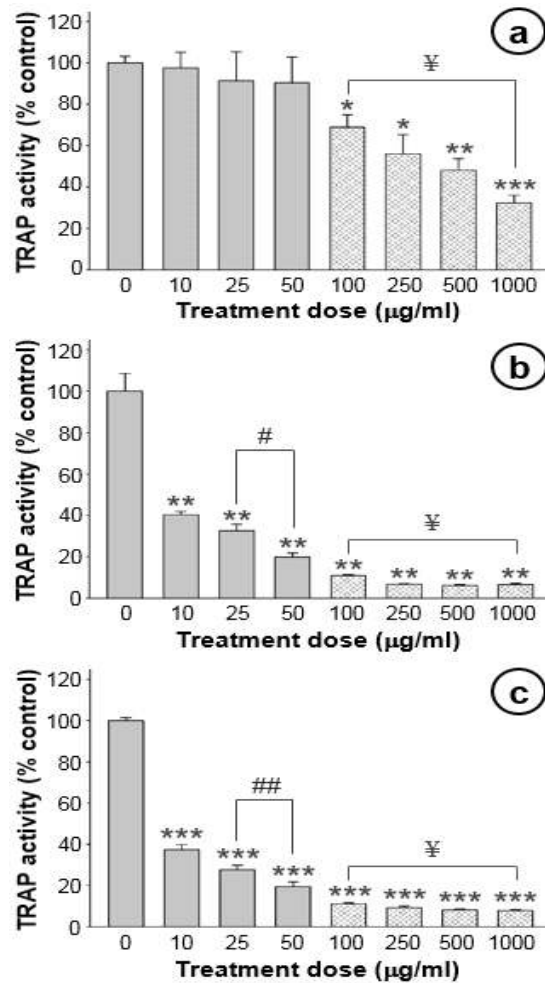


그림. 우슬과 인삼 처리에 따른 TRAP 활성 평가. Each column represents mean \pm SD (n=3, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001) vs Control. # P < 0.05 and ## P < 0.01 as compared to the 25 mg/ml treatment. ¥ indicates concentration with a cytotoxicity. Control: only RANKL treatment, a: *Achyranthes bidentata*, b: *Panax ginseng*, c: *Achyranthes bidentata* and *Panax ginseng* complex.

세포독성을 보이는 인삼과 우슬 모두 100 ug/ml의 농도를 제외하고 인삼과 우슬의 동량의 혼합물 50 ug/ml에서는 인삼 단독처리보다 현저하게 낮은 파골세포 활성을 나타냈다. 우슬에서는 파골세포의 활성 억제가 보이지 않는 반면 인삼 처리군에서는 파골세포의 활성이 억제되었다.

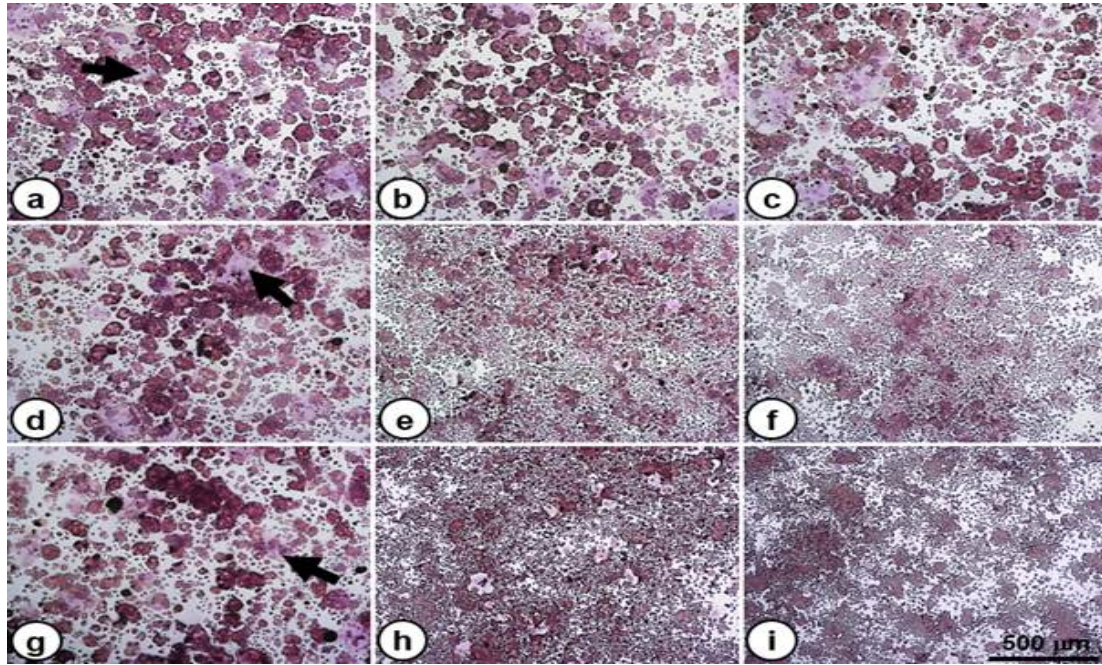


그림. RANKL에 의해 유도되는 파골세포의 우슬과 인삼 처리에 따른 TRAP 양성세포 관찰. Arrow indicates that ROC formation is obvious, and rarely was formed in the PG contained groups. (a-c): AB (*Achyranthes bidentata*), (d-f): PG (*Panax ginseng*), (g-i): AB and PG complex, (a, d and g): only RANKL treatment, (b, e and h): 25 mg/ml, (c, f and i): 50 mg/ml, 40X.

RANKL로 분화유도한 그룹에선 파골세포로 분화가 많이 발생하였고 인삼우슬 투여 시 분화가 억제된 것을 관찰하였다.

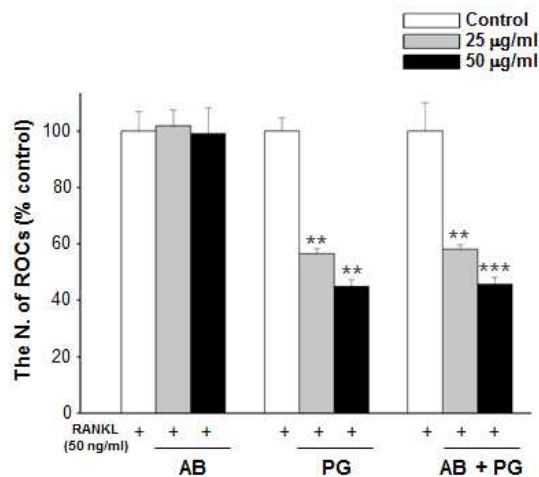


그림. 둥근 모양 형태 파골세포(ROC) 수. Each column represents mean \pm SD ($n=3$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) vs Control. Control: only RANKL treatment, AB: *Achyranthes bidentata*, PG: *Panax ginseng*, AB+PG: *Achyranthes bidentata* and *Panax ginseng* complex.

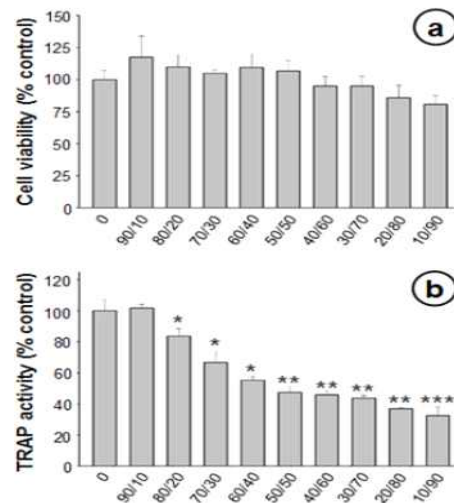


그림. 우슬과 인삼의 다양한 비율 혼합 농도에 따른 세포 생존율과 TRAP 활성 평가. Each column represents mean \pm SD ($n=3$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$) vs Control. Control: only RANKL treatment, AB (*Achyranthes bidentata*) / PG (*Panax ginseng*).

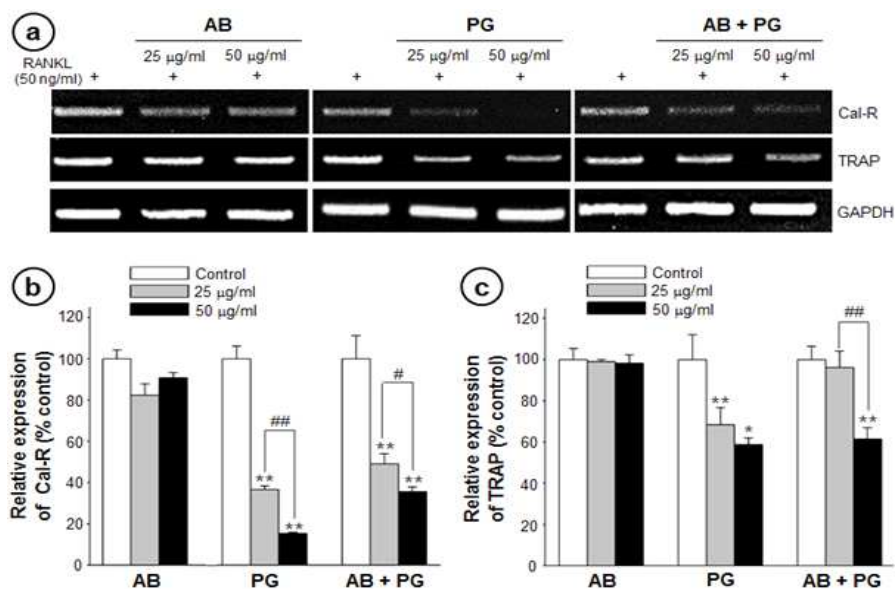


그림. RANKL에 의해 유도되는 파골세포의 우슬과 인삼 처리에 따른 파골세포의 흡수단계에서의 유전인자 평가. (a) RT-PCR was performed to detect the expression of the indicated genes, and performed with 25 cycles. (b) Cal-R and (c) TRAP expression was lower 50mg/ml than 25mg/ml treatment in the PG contained groups. Each column represents mean \pm SD ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$) vs Control. $\#P < 0.05$ and $\##P < 0.01$ as compared to the 25 mg/ml treatment. Control: only RANKL treatment, Cal-R: calcitonin receptor, AB: *Achyranthes bidentata*, PG: *Panax ginseng*, AB+PG: *Achyranthes bidentata* and *Panax ginseng* complex.

우슬과 인삼의 동량 혼합 복합물의 파골세포 분화 활성 억제 효과는 그림과 같다.

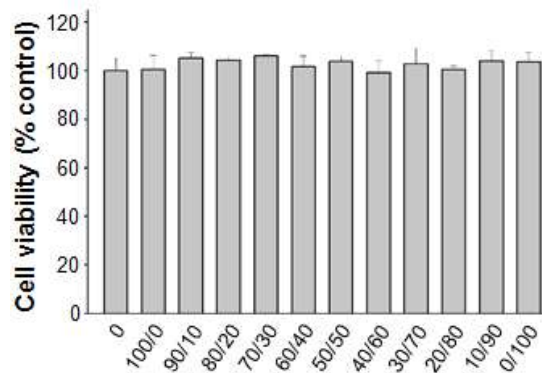


그림. 우슬과 인삼의 다양한 농도별 혼합에 따른 조골세포주 생존을 평가. Each column represents mean \pm SD (n=3) vs Control. Control: only osteogenic induction reagents (OS) treatment, AB (*Achyranthes bidentata*) / PG (*Panax ginseng*).

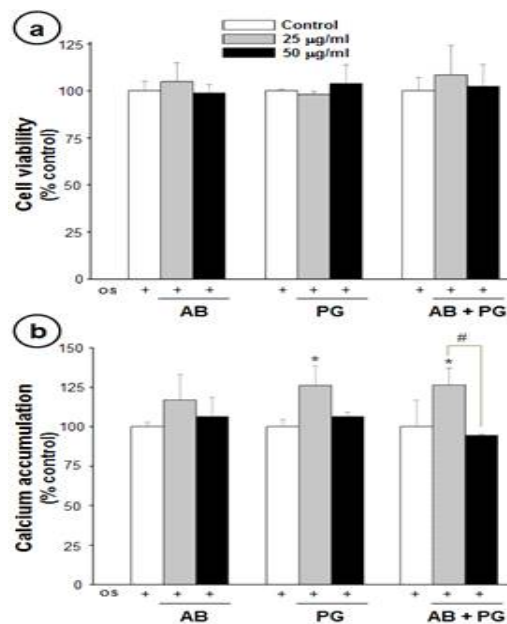


그림. MC3T3-E1 세포로부터 우슬과 인삼 처리에 따른 조골세포의 세포 생존율과 석회화 결절 형성 관찰. (A) Osteoblastic cell viability was treated in media with osteogenic induction reagents (OS) and different concentration of Gin and AB for 24 hours. (B) Calcium accumulation was assessed after 21 days of culturing. Each column represents mean \pm SD (n=3, * P < 0.05) vs Control. # P < 0.05 as compared to the 25 mg/ml treatment. Control: only OS treatment. AB: *Achyranthes bidentata*, PG: *Panax ginseng*, AB+PG: *Achyranthes bidentata* and *Panax ginseng* complex.

이상의 연구 결과는 골 흡수와 골 형성의 불균형에 의해 골밀도 감소를 초래하는 대사성 골

질환인 골다공증 개선제로서 우슬과 인삼 추출물 혼합물의 가능성을 보인다.

인삼의 일부 고동도 처리에서 나타나는 세포 독성은 우슬과 혼합 처리함으로써 감소되는 것을 볼 때 인삼의 농도 의존적에 따른 파골세포의 분화 억제와 조골세포 분화 활성이 촉진되어 골 항상성 유지에 관여하고 있음을 확인하였다.

골다공증 치료제 분야의 세계시장은 작년 83억6000만 달러 규모를 형성한데 이어 향후 10년 동안 탄탄한 성장을 지속할 것으로 전망된다(‘골다공증 치료 및 예방: 2014~2024년 세계시장 전망 및 주요 관련 제약기업들의 미래 조망’, 비전계인社. 영국, 런던). 보고서는 전 세계 골다공증 환자 수가 2억 명을 상회하며, 이들 중 38%가 미국, 유럽 및 일본에 거주한다고 말한다. 또한 고령화로 2050년이면 골다공증의 유병률은 현재의 4배 정도까지 증가할 것이라고 예측한다. 이러한 예측을 기반으로 보고서는 골다공증 치료제 시장이 2014~2024년 동안 전 세계적으로 확대를 지속할 것이라고 전망했다.

이상의 결과를 살펴보면 인삼은 난소적출하여 골다공증을 유발하거나 고령으로 늙어 골다공증이 발생한 경우 흰쥐에게 장기간 투여하여도 파골세포의 활성을 억제하여서 골소주 두께와 면적의 감소를 억제하므로 골다공증에 개선효과가 있다고 사료된다.

골다공증은 폐경기에 발생하는 여러 질환 중 가장 흔한 대사성 골질환의 하나로, 의학의 발달로 인간의 수명이 증가함에 따라 폐경이 이후의 여성인구도 급격히 증가하였고, 그에 따른 골다공증의 빈도 또한 증가하고 있다. 이번 연구는 人蔘이 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증 모델에 미치는 효과를 알아보기 위해 수행하였다. 방법: 24마리의 암컷 흰쥐의 난소를 적출한 후 Sham군, 대조군, 人蔘군으로 나누는 후(n=8) 8주 동안 Sham군과 대조군에는 D.W. (Distilled Water)를 구강투여하였고, 人蔘군에는 人蔘 (209mg/100g)을 구강 투여하였다. 8주 후 쥐를 희생시켜 몸무게, alkaline phosphatase (ALP), 대퇴골 무게, 경골의 회분함량, 골소주의 면적과 두께, osteoblast의 면적, osteoclast의 개수를 측정하였다. 체중대비 대퇴골의 무게와 체중대비 경골의 회분함량도 대조군과 人蔘투여군 사이에 큰 차이가 있었다. 골소주의 면적과 두께는 또한 대조군에 비해 人蔘군이 유의하게 증가하였다. Osteoblast의 면적과 osteoclast의 개수는 대조군에 비해 人蔘군이 유의하게 감소하였다. 이상의 결과를 통해 人蔘은 혈중 calcium, phosphorus, estrogen의 감소를 억제하고 osteoclast의 활성을 억제하여서 골소주의 두께와 면적의 감소를 억제하므로 여성의 폐경 후 발생하는 골다공증의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 생각된다.

마. 기능성 원료 신청을 위한 인삼 논문 리뷰 자료

논문1

학술지정보	Immunopharmacology and Immunotoxicology					
	Vol	30	게재연도	2008	시작페이지	333
논문제목	Effect of Ginseng Mixture on Osteoporosis in Ovariectomized Rats					
연구목적	OVX 동물모델에서 인삼복합물의 골다공증에 미치는 영향을 평가하고자 함					
연구유형	동물시험					
Species	rat			Age	thirty	
Strain	Sprague-Dawley			Sex	<input type="checkbox"/> male <input checked="" type="checkbox"/> female	
시험물질	인삼복합물 (HER-S: red ginseng, Angelicae gigantis Radix, Phyllostachys folium, and soybean extracts)					
투입형태	<input type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input checked="" type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타					
시험디자인	Group1 (CTR)		control (n=10)			
	Group2 (Sham)		sham control (n=10)			
	Group3 (OVX)		OVX (n=10)			
	Group4 (300mg/kg)		OVX+HER-S 300mg/kg 투여 (n=10)			
	Group5 (500mg/kg)		OVX+HER-S 500mg/kg 투여 (n=10)			
	Group6 (1000mg/kg)		OVX+HER-S 1000mg/kg 투여 (n=10)			
	Group7 (Estrogen)		OVX+17β-estradiol 투여 (n=10)			
	디자인	7군으로 나눠 진행, 양성 대조군 17β-estradiol으로 진행				섭취량
					섭취기간	7주
바이오마커	weight 혈액: calcium, phosphate, alkaline phosphatase, free thyroxine (T4), free triiodothyronine (T3), estrogen femoral trabecular bone surface femoral trabecular bone area, number, thickness bone mineral content (BMC), bone mineral density (BMD) osteoblast(ALPase) differentiation and osteoclast(TRAP staining) formation					
시험결과	1. femoral trabecular bone surface: OVX의해 다공질/침식되었으나, HER-S의해 개선 2. femoral trabecular bone area and number: OVX의해 감소되었으나, HER-S(300mg/kg)의해 유의적으로 개선 (양성대조군과 유사한 수준으로 개선됨) 3. 혈중 estrogen: OVX의해 감소되었으나, HER-S(300mg/kg)의해 유의적으로 개선 (양성대조군과 유사한 수준으로 개선됨) 4. Lumbar, femoral head BMC: OVX의해 감소되었으나, HER-S(300mg/kg)의해 유의적으로 개선 (양성대조군과 유사한 수준으로 개선됨) 5. osteoclast(TRAP staining) formation: HER-S 처리시 osteoclast number가 유의적 감소					

논문2

학술지정보	J Nat Med						
	Vol	64	게재연도	2010	시작페이지	336	
논문제목	Alleviation of ovariectomy-induced osteoporosis in rats by Panax notoginseng saponins						
연구목적	OVX 동물모델에서 삼칠삼(Panax notoginseng saponin)이 골다공증에 미치는 영향을 평가하고자 함						
연구유형	동물시험						
Species	Rats		Age	6개월			
Strain	Sprague.Dawley (SD) rats		Sex	<input type="checkbox"/> male <input checked="" type="checkbox"/> female			
시험물질	삼칠삼(PNS: Panax notoginseng saponin)						
투입형태	<input type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input checked="" type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타						
시험디자인	Group1 (sham)		sham-operated group (n = 12)				
	Group2 (OVX)		OVX group(n = 12)				
	Group3 (PNS75)		OVX + low dose PNS (75 mg/kg/day, p.o., n = 12)				
	Group4 (PNS150)		medium dose PNS (150 mg/kg/day, p.o., n = 12)				
	Group5 (PNS300)		high dose PNS (300 mg/kg/day, p.o., n = 12)				
	Group6 (nilestriol)		nilestriol (1 mg/kg/week, p.o., n = 12)				
	디자인	OVX 후 7일간의 적응기 가짐			섭취량	75, 150, 300mg/kg/day	
					섭취기간	13주	
식이조절	-						
바이오마커	체중 및 자궁무게 bone mineral density (BMD): lumbar vertebrae and total femur bone mineral content (BMC) 혈액: serum calcium (S-Ca), serum inorganic phosphorus (S-P), and serum alkaline phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC), Urinary deoxypyridinoline (DPD) Microcomputed tomography analysis(uCT): trabecular bone volume over bone total volume (BV/TV), trabecular number (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp), trabecular thickness (Tb.Th), connectivity density (Conn.D), and structure model index (SMI)						
시험결과	1. BMD of lumbar vertebrae and total femur: OVX의해 감소되었으나, PNS의해 유의적으로 개선 (양성대조군과 유사한 수준으로 개선됨) 2. BMC of lumbar vertebrae: OVX의해 감소되었으나, PNS(300mg/kg)의해 유의적으로 개선 (양성대조군과 유사한 수준으로 개선됨) 3. Microcomputed tomography analysis(uCT): PNS(300mg/kg)의해 유의적으로 개선 (양성대조군과 유사한 수준으로 개선됨) 4. ALP, DPD: PNS(300mg/kg)의해 유의적으로 개선 (양성대조군과 유사한 수준으로 개선됨)						

논문3

학술지정보	Journal of Asian Natural Products Research					
	Vol	8	게재연도	2006	시작페이지	649
논문제목	Effect of 17b-oestradiol and ginsenoside on osteoporosis in ovariectomised rats					
연구목적	OVX 동물모델에서 ginsenoside(TR)과 E2가 골다공증에 미치는 효과를 평가하고자 함					
연구유형	동물시험					
Species	rat			Age	1.2-day-old (200~240g)	
Strain	Wistar rats			Sex	<input type="checkbox"/> male <input checked="" type="checkbox"/> female	
시험물질	ginsenoside(TR)					
투입형태	<input type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input checked="" type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타					
시험디자인	Group1 (CONTROL)		sham control			
	Group3 (OVX)		OVX			
	Group4 (E2)		OVX+E2 400mg/kg/week			
	Group5 (10mg/kg)		OVX+inflammation+TR 10 mg/kg			
	Group6 (20mg/kg)		OVX+inflammation+ TR 20 mg/kg			
	Group7 (40mg/kg)		OVX+TR 40 mg/kg			
	디자인	OVX 이후 회복기를 가짐				섭취량
					섭취기간	6개월
바이오마커	bone density: DEXA- bone mineral densities (BMD) of lumbar vertebra and tibia bone tissue: tibia histological morphological data Cell culture of osteoblasts: activity & number activity of alkaline phosphatase (ALP), cAMP					
시험결과	1. BMD(lumbar vertebra and tibia): OVX의해 감소되었으나, E2와 TR의해 유의적으로 개선 2. number of osteoblasts: E2와 TR의해 유의적으로 증가 3. activity of alkaline phosphatase (ALP), cAMP:E2와 TR의해 유의적으로 증가					

제 2 절 인삼성분의 표준화연구 및 인삼 유래 성분의 골다공증 개선효과 기전연구

1. 연구수행내용

1) 인삼의 성분 중 식약처 고시를 위해 필수 성분인 Rb1, Rg1에 대한 함량비를 확인

- ① 각 fraction에 포함된 Rb1과 Rg1의 함량확인 하였다.
- ② Rb1과 Rg1 외의 기타 물질에 대한 존재 유무 확인과 함량을 측정 하였다.

2) 인삼유래 성분 중 골다공증 저해 효과 물질 탐색

- ① Rb1과 Rg1 물질이외에 인삼(백삼)의 성분 중 뼈건강에 영향을 주는지 여부를 확인 하였다.
- ② 파골세포에 대한 영향 확인: TRAP Assay를 통하여 확인하고, 각각의 물질에 대한 효능을 비교 하였다.
- ③ 조골세포에 대한 영향 확인: Alizarin Red S Assay를 기초로 사용하여 그 효능을 측정 하였으며, Alkaline phosphatase (ALP) activity 측정을 병행 실시 하였다. (Rb2, Rb3, Rg2, Rg3, Rc, Rd, Re, Rf, Com.K, Fraction11, Rh2)를 대상으로 실험 하였다.
- ④ 실험을 수행하기 위해 앞서 독성 검사를 통해 약물을 처리해야 하는 농도를 예측 하였다.
- ⑤ 세포독성 검사는 마우스 BMM세포를 이용하여 측정:MTT측정법을 이용하여 검사 하였다.

3) 인삼의 성분 Re의 뼈건강 관련성 검증 및 기전 연구

- ① 파골세포의 분화 억제 효능 검증 하였다.
- ② 조골세포의 분화 촉진 효능 검증 하였다.
- ③ 연골세포 성장/분화 관련성 확인 하였다.

2. 연구수행결과

가. 실험재료 및 방법

1) 시험재료

본 연구의 시험재료인 인삼의 열수 추출물은 농촌진흥청 인삼특작부로부터 제공 받았다. 지표로 사용된 진세노사이드는 시그마알드리치로부터 정제된 것을 사용하였다. 또한, 조골세포 분화를 유도하는 중요한 조골 인자 인 L-ascorbic acid와 β -glycerophosphate는 sigma Aldrich에서 구입하였다.

- ① 두 물질을 필수 표준화 물질로 지정(식약처 기준) 하고, 순도가 98% 이상인 물질을 확보하여 지표물질 사용하였다.
- ② HPLC-PDA로 fraction 분리 후, 성분 분석 및 정량

각 fraction에 포함된 Rb1과 Rg1의 존재를 확인하기 위하여 HPLC-PDA를 통해 해당 peak의 retention time과 UV absorbance pattern을 지표물질의 데이터와 비교하였다. 해당 peak의 identification을 위해 LC/MS를 통해 분자량을 확인하였다. 시료 내에 존재하는 Rb1과 Rg1의 양을 확인하기 위해 HPLC-PDA를 통하여 확인되는 정량곡선에 대한 적분법으로 환산 (210nm에서 의 흡광을 이용하여 진행함)법을 적용하였다. Rb1과 Rg1 외의 기타 물질에 대한 존재 유무 확인과 함량 확인도 위의 방법에 따라 진행하였고, 대상물질에 대한 비교실험과 정량곡선 확인으로 존재 여부와 함량을 확인하였다.

③ 마우스 골수 대식 세포 및 파골 세포 분화와 조골세포의 배양 및 분화

골수 대 식세포 (BMM)를 6 주령의 ICR 생쥐의 대퇴골 및 경골로부터 수득하고, 10 % 태아 소 혈청 및 100 U / mL 페니실린을 함유하는 α 최소 필수 배지 완전 배지에서 100 mM 배양 접시에서 배양 하였다. 3 일 동안 M-CSF (30 ng / mL)의 존재. 비 부착 성 세포를 제거한 후에 남아있는 접착 세포를 BMM으로 사용 하였다. 파골 세포를 생성하기 위해, 48- 웰 (1 mL / well) 조직 배양 접시에서 MCSF (30 ng / mL) 및 RANKL (25 ng / mL)을 사용하여 BMM (4 x 10⁴ 세포 / 웰)을 4 일간 배양 하였다. 진 세노 시드 추출물 및 진 세노 시드 Re 전처리. 3 일째에, 세포를 10 % 포르말린으로 10 분 동안 고정시키고, 0.1 % Triton X-100으로 투과성으로 만든 다음, Leukocyte Acid Phosphatase Assay Kit (Sigma-Aldrich)를 사용하여 TRAP로 염색 하였다.

마우스 조골 세포 전구 세포주 인 MC3T3-E1 세포를 10 % 소 태아 혈청 (FBS, Hyclone, CA, USA)을 첨가 한 Eagle 's minimum essential medium (α -MEM, Gibco, Grand Island, NY, USA) , 및 1 % 페니실린 - 스트렙토 마이신을 포함한다. 골아 세포 분화를 유도하기 위해 MC3T3-E1 세포 (5 x 10³ 세포 / 웰)를 96- 웰 플레이트에 접종하고, 골 형성 인자로서 L- 아스코르브 산 100 μ g / mL 및 β - 글리세로 포스페이트 10 mM을 함유하는 골 형성 배지와 배양 하였다.

④ 제브라피쉬 관리 및 실험적 처리 방법

Zebra fish는 이전에 설명한 바와 같이 10:14 h의 명암주기를 지닌 통제 된 환경에서 한국 청주 생명 공학 연구소의 Zebra fish 시설에서 28 °C에서 자란다 (Westerfield M, 편집자 1995. 제브라 피쉬 북 (Zebra fish book) : 제브라 피쉬의 실험실 사용 가이드 (Danio Rerio), 제 3 판). 체중 350mg 이상의 Zebrafish를 선택하여 7 일 동안 적응시킨 다음, 실험을 시작하기 전에 7 일간의 기준 기간 동안 유지했다. 각 그룹의 10 마리의 제브라 피쉬를 표준 케이스에 개별적으로 수용하고 물에서 50 % 라이브 아르테 미아 5mL를 공급했다. 24 시간마다, 수성 인삼 추출물 또는 진 세노 사이드 Re를 함유하는 담수로 물의 50 %를 교환 하였다. 통제를 위해, 가짜 집단의 물은 오직 담수로 교환되었다. 물고기 비늘에서 골 손실을 유도하기 위해 우

리는 제한된 수유 일정, 즉 하루에 한 번만 먹이면서 정상 수유 (피드 제한 Zebrafish 모델)의 30 %를 사용했다.

⑤ 세포 생존율 분석

세포 독성 분석은 이전에 설명한대로 수행 하였다 (He, Lee et al., 2012) 수용 인삼 추출물 또는 진 세노 시드 Re를 포함하거나 포함하지 않은 배양액을 다양한 농도 (0-100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 또는 0-10 μM) 48 시간 동안. CCK-8 처리 (10 μL)의 1 시간 후, 플레이트를 96- 웰 플레이트 레코더를 사용하여 450 nm (650 nm 기준)에서 판독 하였다.

⑥ TRAP 염색 및 활성 분석

다핵 파골 세포를 10 % 포르말린에 10 분, 에탄올 / 아세톤 (1 : 1)에 1 분간 고정시킨 후 Leukocyte Acid Phosphatase Kit 387-A (Sigma)로 염색 하였다. TRAP- 양성 다핵 세포의 이미지를 DP 제어기 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 현미경으로 촬영 하였다. TRAP 활성을 측정하기 위해 다핵 파골 세포를 10 % 포르말린과 10 분 동안 95 % 에탄올로 1 분간 고정시킨 후 10 mM sodium tartrate와 5 mM p-nitrophenylphosphate가 포함된 100 μL 의 구연산 완충액 (50 mM, pH 4.6) (시그마). 1 시간 동안 배양 한 후, 반응 혼합물을 동량의 0.1N NaOH를 함유하는 새로운 플레이트로 옮겼다. 흡광도는 410 nm에서 측정되었고 TRAP 활성은 대조군의 % (%)로 표시하였다.

⑦ Alizarin Red 염색

비늘은 처리 된 제브라 피쉬에서 수확했다. PBS 완충액으로 두 번 세척 한 후, 스케일을 4 % 파라 포름 알데히드에서 24 시간에서 48 시간 동안 고정시킨 다음, 알리자린 레드로 염색하고 이전에 기술 된 절차에 따라 제거 하였다 (Sire, Allizard et al., 1997)

⑧ RNA 준비 및 역전사 - 중합 효소 연쇄 반응 분석

RNeasy Mini 키트 (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 총 RNA를 준비하고 3 μg 의 total RNA (Superscript II Preamplification System, Invitrogen)에서 cDNA를 합성했다. 실시간 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)은 SYBR FAST KAPA iCycler qPCR 키트가 장착 된 CFX96 TM 실시간 시스템을 사용하여 다음 PCR 조건에서 수행되었다 : 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 변성 (40 초) 및 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 증폭 (1 분). 모든 반응은 3 배로 실행되었고 데이터는 하우스 키핑 유전자 β - 액틴으로 보정되었다. PCR 결과의 상대적인 차이는 비교주기 임계 방법을 사용하여 평가되었다. 다음 프라이머 세트를 사용 하였다 : mouse NFATc1, 5' -CCGTTGCTTCCAGAAAATAACA-3' (forward), 5' -TGTGGGATGTGAACT-CGGAA-3' (reverse); and mouse β -actin, 5' -TCTGCTGGAAGGTGGACAGT-3' (forward), 5' -CCTCTATGCCAACACAGTC-3' (reverse); mouse TRAP 5'

-CTGGAGTGCACGATG-CCAGCG-ACA-3' (forward), 5'
 -TCCGTGCTCGGCGATGGACCAGA-3' (reverse); zebrafish cathepsin K, 5'
 -CTATTAAAGAGATTCCTCAGGGTAAGCA-3' (forward), 5'-
 ACACGGGTCCCACATTGG-3' (reverse); zebrafish TRAP, 5'-
 CGTCCACTGACCA-CAGGAAGA-3' (forward), 5'-
 AAGGA-TCCTGACGTCTGATTGA-3' (reverse); zebrafish matrix metalloproteinase
 (MMP)-9, 5'-AAATCTGTGTTCTGTGACGTT-TCCT-3' (forward), 5'-
 -GCCGTAACGCTT-CAGATACTCAT-3' (reverse); zebrafish MMP2, 5'-
 -TTGCTTCCCTGCAAACCTTTTG-3' (forward), 5'-
 -GAGCCACTTCTTTGTCTGTGTGA-3' (reverse); zebrafish alkaline phosphatase, 5'-
 -CAGTGGGAATCGTCACAACAA-3' (forward), 5'-CCACACAGTGGGCATAAGCA-3'
 (reverse); zebrafish osterix, 5'-AAGAAACCTGTCCACAGCTG-3' (forward), 5'-
 GAGGCTT-TACCGTACACCTT-3' (reverse), and zebrafish beta actin, 5'-
 CAACAGGGAAAAGATG-ACACAGAT-3' (forward), 5'-CAGCCTGGATGGCAACGT-
 3' (reverse).

⑨ 뼈와 비늘의 칼슘(Ca) 측정

뼈와 스케일의 칼슘 농도는 원자 흡수 분광법으로 측정 하였다. 샘플의 칼슘 / 인 (Ca / P) 비
 율은 유도 결합 플라즈마 질량 분석법 (VG PlasmaQuad, Fisons Instruments, UK)에 의해 측
 정되었다. 모든 값은 허용 된 자연 비율로 표준 칼슘 용액으로부터의 사소한 편차에 대해 조정
 되었다. 모든 시료는 이중으로 측정되었다 (van den Heuvel, Schoterman et al., 2000)

⑩ mineralization 분석

mineralization 분석 MC3T3-E1 세포를 96 웰 플레이트에 5 x 10³ 세포 / 웰에 접종하고 3 일
 마다 매질을 교체하여 ginsenoside Re의 존재 또는 부재하에 21 일 동안 배양했다. 세포를
 PBS로 세척하고 10 % 포르말린으로 30 분간 고정시킨 후 세포를 40 mM alizarin red 용액으
 로 1 시간 동안 염색 하였다.

⑪ 통계분석

값은 평균 ± S.D로 나타낸다. 3 회 이상의 실험에서 얻은 값. 데이터는 두 가지 평균값 사이의
 비교를 위해 Student's t 검정 또는 일방적 인 분산 분석을 사용하여 분석되었다. P < 0.05의
 값은 유의 한 것으로 간주되었다.

나. 주요결과

1) 인삼의 성분 중 Rb1, Rg1와 기타 성분의 함량 확인

식약처 고지 물질에 대한 함량을 표에서 보는 바와 같이 측정하였으면, 추가적으로 미량으로 검출된 물질 두 종이 검출 되었다. 기전연구에서는 뼈와 관련된 연구의 축적도가 낮지만, 사용된 인삼시료상에 비교적 높은 수준으로 포함된 Re 성분에 대한 연구가 진행되었다.

인삼성분표준화를 위한 지표 물질의 종류와 구조

종류	함량비 (%)	비고
Rb1	1.19	식약처 고지 필수 성분
Rg1	0.57	식약처 고지 필수 성분
Rb2	0.12	
Rc	0.07	미량 검출
Re	0.64	추가 연구 진행됨.
Rf	0.04	미량 검출

2) 인삼유래 성분 중 골다공증 저해 가능 물질 확인

인삼 추출물이 파골 세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 수성 인삼 추출물의 존재 또는 부재 하에 MCSF-1 (30 ng / mL) 및 RANKL (25 ng / mL)으로 처리 한 후 TRAP- 양성 다핵 세포를 계수 하였다. 수성 인삼 추출물은 농도 의존적으로 파골 세포 분화를 감소 시켰고 (그림 1a 및 1b), 농도 100 μ g / mL에서도 세포 독성은 없었다 (그림 1b). 또한 여러 가지 농도의 14 가지 진 세노 사이드를 동일한 방법으로 분석 하였다. 2.5 μ M 농도에서 ginsenosides Rd, Re, Rf, 화합물 K 및 분획 11은 파골 세포 분화를 ~ 60 % 저해 하였다. 그러나 ginsenoside Rd는 독성을 나타냈다 (그림 1d). 단일 진 세노 사이드 중 ginsenoside Re는 파골 세포 분화에 대해 가장 강력한 억제 효과를 보였다 (그림 1c)

대략 30 일 후, 우리는 제브라 피쉬 모델에서 사료를 제한하는 효과를 조사하였다. 먼저, 제브라 피쉬 백본을 μ -CT에 의해 생체 내에서 검사 하였다. μ -CT에 의해 얻어진 백본 이미지는 우리의 실험 방법이 백본에 유의미한 영향을 미치지 않음을 보여 주었다 (그림 2a). 또한, Ca / P 비율은 대조군 골격 시료 및 수성 인삼 추출물로 처리 한 시료에서 정상 범위였다. 그러나 어류 골격의 일부인 비늘 시료에서 Ca / P 비는 1.78 : 1로 현저하게 감소했다. 수용성 인삼 추출물로 처리 한 시료에서 Ca / P 비는 비슷했지만 약간 높았다 (2.06 : 1, 그림 2b). 우리는 파골 세포 표지 유전자 TRAP, MMP9, MMP2의 유전자 발현 수준을 평가 하였다. 유전자 마커 발현 수준은 감소했다. 특히, 수성 인삼 추출물 처리 샘플에서 TRAP 발현 수준이 현저하게 낮았다 (도 2c). 이러한 결과를 확인하기 위해 우리는 파골 세포 분화에 대한 억제 효과를 조사하기 위해 TRAP 및 Alizarin Red 염색으로 zebrafish 비늘을 시각화했다. 이러한 결과를

바탕으로 수성 인삼 추출물 처리는 파골 세포 분화능을 감소시켰다. 대조군과 비교하여 TRAP 신호 강도는 수성 인삼 추출물 처리 시료에서 약화되었다 (그림 2d).

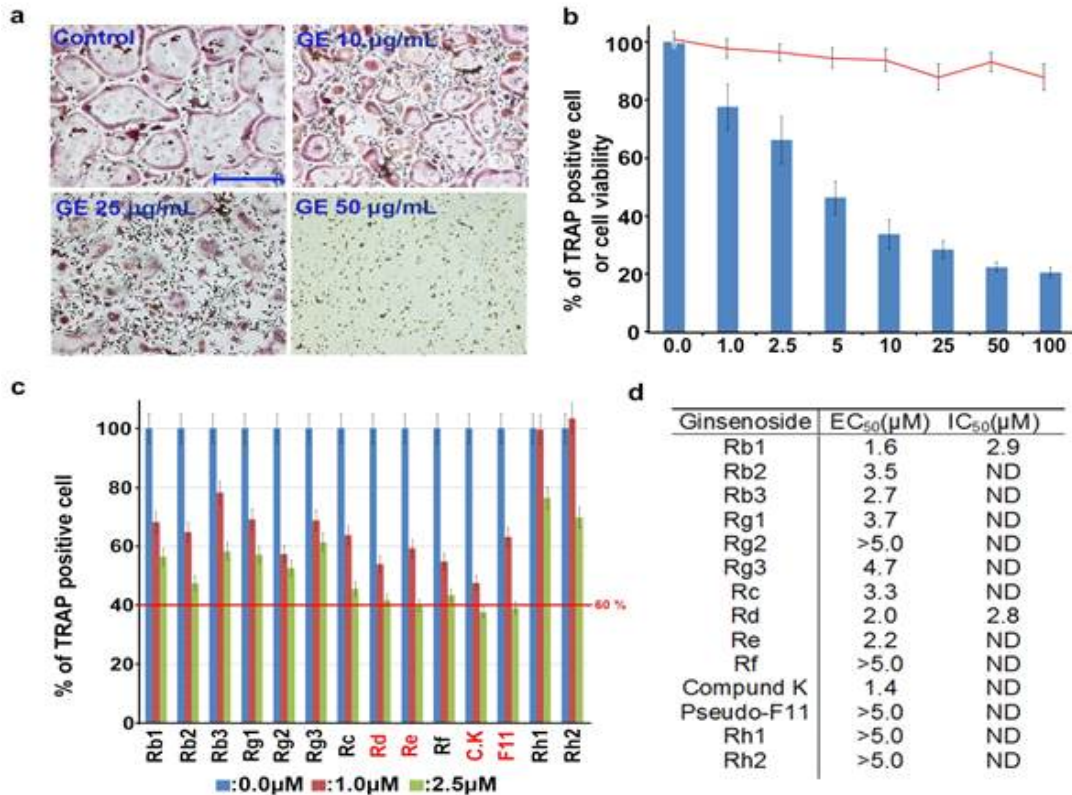
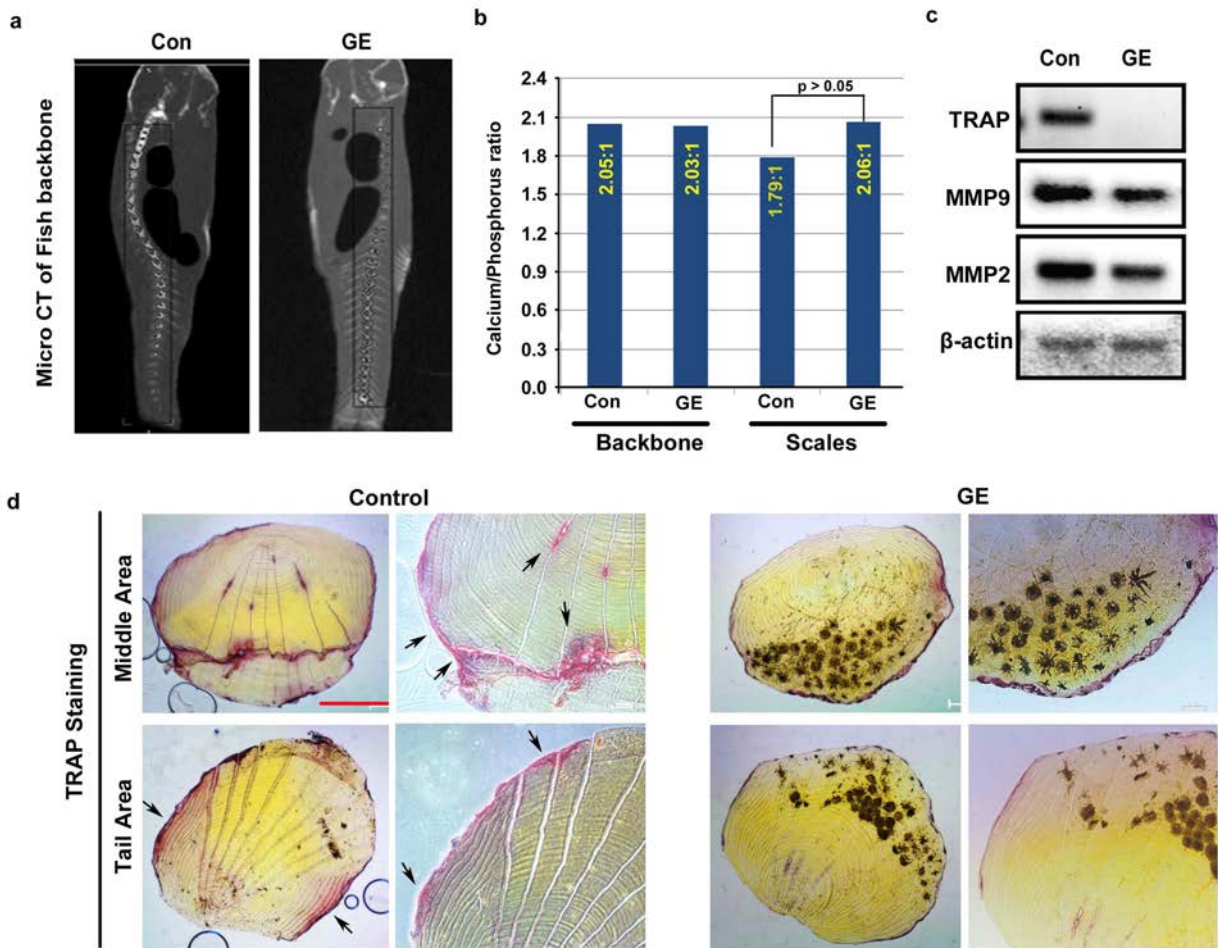


그림 1. 파골 세포 분화의 수 인삼 추출물 억제 및 14 종의 진 세노 사이드가 파골 세포 분화에 미치는 영향

(a) 마우스 BMM을 수확하고 다양한 농도의 인삼 활성 화합물을 함유하거나 포함하지 않은 RANKL (25 ng / mL) 및 M-CSF (10 ng / mL)에 3 일 동안 노출시켰다. TRAP 염색을 수행 한 후 (b) TRAP 활성을 $\lambda = 405$ nm에서 측정 하였다. 데이터는 청색 컬럼에 의한 미처리 세포 (평균 \pm SEM, $n = 3$)의 TRAP 활성의 백분율로 나타내었고, 동일한 농도에서 MTT 분석 (적색 라인)에 의해 세포 생존력을 시험 하였다. (c) RANKL 유도 BMM은 14 ginsenosides로 처리하였고 파골 세포 분화는 TRAP로 평가 하였다. TRAP 활성은 $\lambda = 405$ nm에서 측정되었다. 데이터는 치료되지 않은 세포의 TRAP 활성의 백분율 (평균 \pm SEM, $n = 3$)로 표현된다. 붉은 선은 2.5µM 농도에서 60 % 억제를 나타낸다. 보다 효과적인 진 세노 사이드는 적색으로 표시됩니다. (d) 14 ginsenosides의 파골 세포 - 분화 억제 효율 및 MTT 분석에 의한 세포 생존력의 요약. EC₅₀은 최대 유효 농도의 절반을 나타냅니다. IC₅₀은 최대 성장 억제 농도의 절반을 나타낸다. Scalebar, 100µm를 의미한다.



Park, et al., Figure 2 a-d

그림 2. 제브라 피쉬 실험 모형에서 수 인삼 추출물이 골다공증에 미치는 영향

(a) 인삼 추출물 (GE, 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$)으로 35 일 동안 처리 한 후, zebrafish를 μ -CT로 스캔하여 백본 밀도를 시각화 하였다. (b) 제브라 피쉬 샘플로부터 백본 및 비늘을 수집 한 후, 유도 결합 플라즈마 질량 분석법에 의해 칼슘 / 인의 비율을 측정 하였다. (c) 파골 세포 표지자 (TRAP, MMP9 및 MMP2) 유전자 및 β -액틴의 mRNA 발현 수준을 결정하기 위해 qPCR을 수행 하였다. (d) Zebrafish 비늘은 트랩으로 얼룩 져 있었다. 스케일 바, 100 μm 를 의미한다.

3) 인삼의 성분 Re의 뼈건강 관련성 검증 및 기전 연구

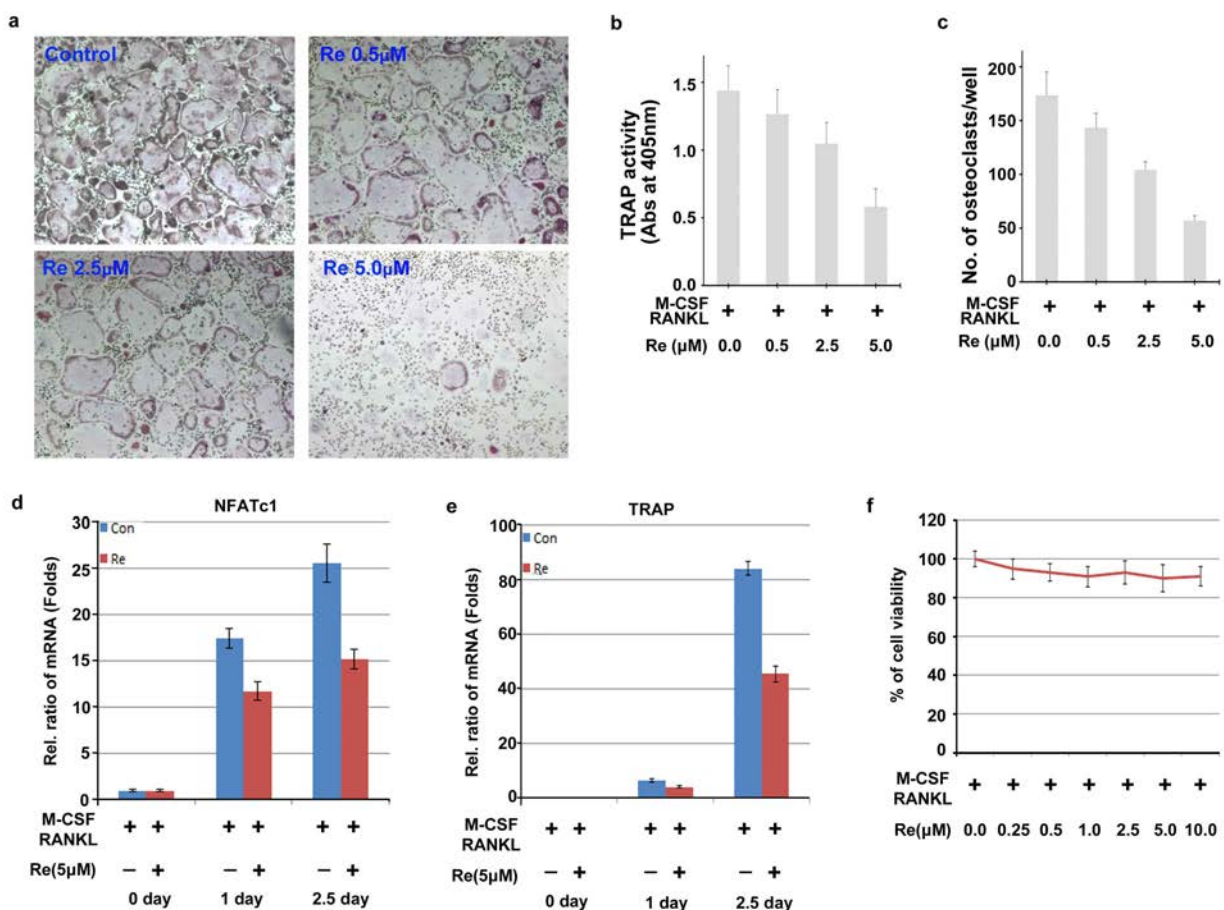
① 파골세포의 분화 억제 효능 검증 하였다.

Ginsenoside Re는 신호 조절 Kinase 및 NF- κ B 억제를 통해 파골 세포 분화를 억제

Ginsenoside Re가 파골 세포 분화를 억제하는 기전을 탐색하기 위해, ginsenoside Re가 RANKL로 자극 된 BMM에서 전사 인자 NFATc1 및 c-Fos의 단백질 발현 수준을 감소시키는 지 여부를 관찰 하였다 (도 4a). RANKL에 의한 파골 세포의 분화는 mitogen activated

protein kinase를 매개로하는 세포 신호 전달의 증폭과 NF- κ B와 NFATc1과 같은 하류 전사인자의 활성화를 포함한다 (Wei, Wang et al., 2002).

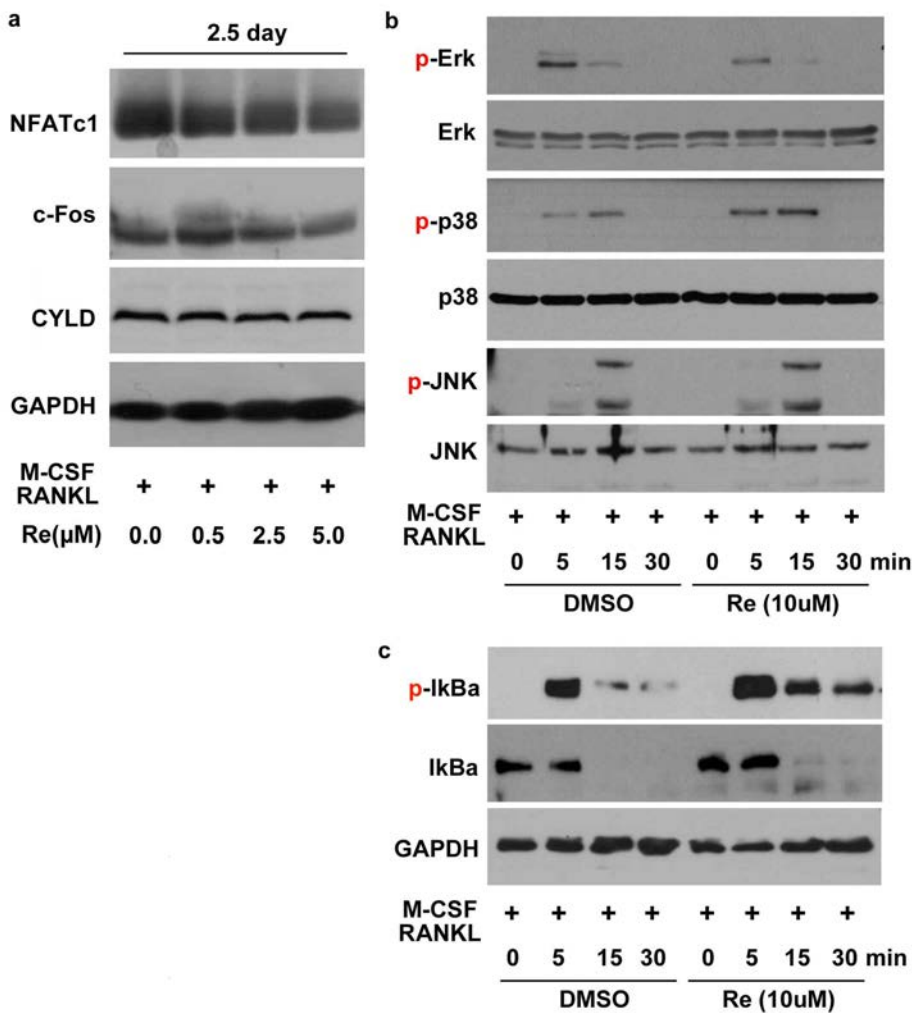
우리는 다음에 RANKL 유도 BMM에서 세포 내 신호 전달 경로에 대한 ginsenoside Re의 효과를 조사했다. 5 분 동안 BMM의 RANKL 치료는 세포 의존 신호 조절 키나아제 (ERK)의 인산화를 증가 시켰는데, 이는 시간 의존적으로 ginsenoside Re로 처리 하였지만 p38 mitogen activated protein kinase와 C-Jun N의 인산화는 억제하지 않았다 (그림 4b). NF- κ B 전사 인자는 파골 세포 분화에 중요한 역할을한다. NF- κ B의 음성 피드백 조절 인자 인 I κ B α 의 인산화 의존성 분해는 NF- κ B 활성화의 증거 인 RANKL 유도 파골 세포 분화의 중요한 사건이다. 인삼 사포닌 재 처리 BMM은 RANKL에 의한 I κ B α 의 인산화를 약화시켰다 (그림 4c). 따라서, 파골 세포 생성에 대한 ginsenoside Re의 억제 효과는 부분적으로 ERK 및 NF- κ B 신호 전달을 차단하는 효과에 의해 매개된다.



Park et al., Figure 3 a-f

그림 3. 파골 세포 분화에 미치는 ginsenoside Re의 영향

(a) 서로 다른 농도의 ginsenoside Re로 처리 한 BMM에서의 파골 세포 형성을 유도하고, 배양 3 일 후에 TRAP 염색을 수행하여 TRAP + 다핵 세포를 관찰하였다 (40x). (b) TRAP 활성은 $\lambda = 405$ nm에서 측정 하였다. 데이터는 처리되지 않은 세포의 TRAP 활성의 백분율로 표시하였다. (평균 \pm SEM, $n = 3$). (c) TRAP 양성 세포를 동일한 조건 하에서 측정하였다. (d 및 e) qPCR을 수행하여 NFATc1 및 TRAP 유전자의 mRNA 발현 수준을 확인 하였다. (f) 지시 된 농도의 진 세포 사이드 Re에서의 세포 생존력을 MTT 분석에 의해 시험 하였다.



Park et al., Figure 4 a-c

그림 4. BMMs에서 ginsenoside Re에 의한 ERK와 NF-κB 경로의 억제

(a) BMM은 M-CSF (30 ng / ml) 및 RANKL (25 ng / ml)의 존재 하에 2.5 시간 동안 ginsenoside Re (0-5 μM)로 처리 하였다. 전체 세포 용 해물을 추출하여 NFATc1, c-Fos 및 CYLD에 대한 항체로 IB 분석 하였다. (b 및 c) BMM은 표시된 시간 동안 ginsenoside (10μM) 또는 대조 (DMSO)로 치료되었다. 전체 세포 용 해물을 추출하여 p-ERK, ERK, p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-IκBα 및 IκBα에 대한 항체로 웨스턴 블 랫팅 분석 하였다. GAPDH는 량에 대한 대조단백질로 사용되었다.

Ginsenoside Re의 파골 세포 분화를 억제할 통한 뼈의 건강을 개선효능 확인

우리는 ginsenoside Re가 수성 인삼 추출물의 주요 성분으로 작용하는 효과를 밝혀 내기를 목표로 삼았다 (그림 2). MTT 분석 (그림 3f)을 사용하는 독성 시험에 기초하여, 우리는 제브라 피시 스케일 모델에 대한 최적 농도 인 5 μM 농도를 선택했다. 제브라 피쉬 모델에서 5μM 농도의 진 세노 사이드 Re가 치료에 적절하다는 것을 확인하기 위해 생선 배아를 0-10μM

ginsenoside Re로 3 일간 처리 하였다. 제브라 피쉬 배아의 독성 시험에서 가장 높은 농도 (10 μ M)는 배아 사망이나 비정상적인 형태와 같은 독성이 거의 없었다. 우리는 35 일 동안 진 세노 사이드 Re로 처리 한 어류 및 대조군에서 파골 세포 분화 억제 효율을 평가하기 위해 TRAP 분석을 사용했다. 대조 비늘에서 TRAP 염색은 중앙 및 외측 영역 모두에 널리 분포되었지만 ginsenoside 재 처리 비늘에서 TRAP 염색의 분포는 훨씬 작았다 (그림 5a). 또한, ginsenoside 재 처리 샘플의 TRAP 강도는 대조군의 0.37 배였으며 (그림 5b), ginsenoside Re는 제브라 피쉬 스케일에서 파골 세포 생성을 억제 함을 나타냅니다. 이러한 관찰은 TRAP 및 카 텡신 K와 같은 파골 세포 표지 유전자의 발현 감소에 의해 확인되었다. 유전자 발현 수준은 ginsenoside 재 처리 샘플에서 약 0.7-0.8 배 감소 하였다 (도 5c 및 5d). 조골 세포 표지 유전자 인 ALP와 osterix의 발현은 대조군과 진 세노 사이드 Re 시료에서 동일하게 유지되었다 (그림 5e와 5f).

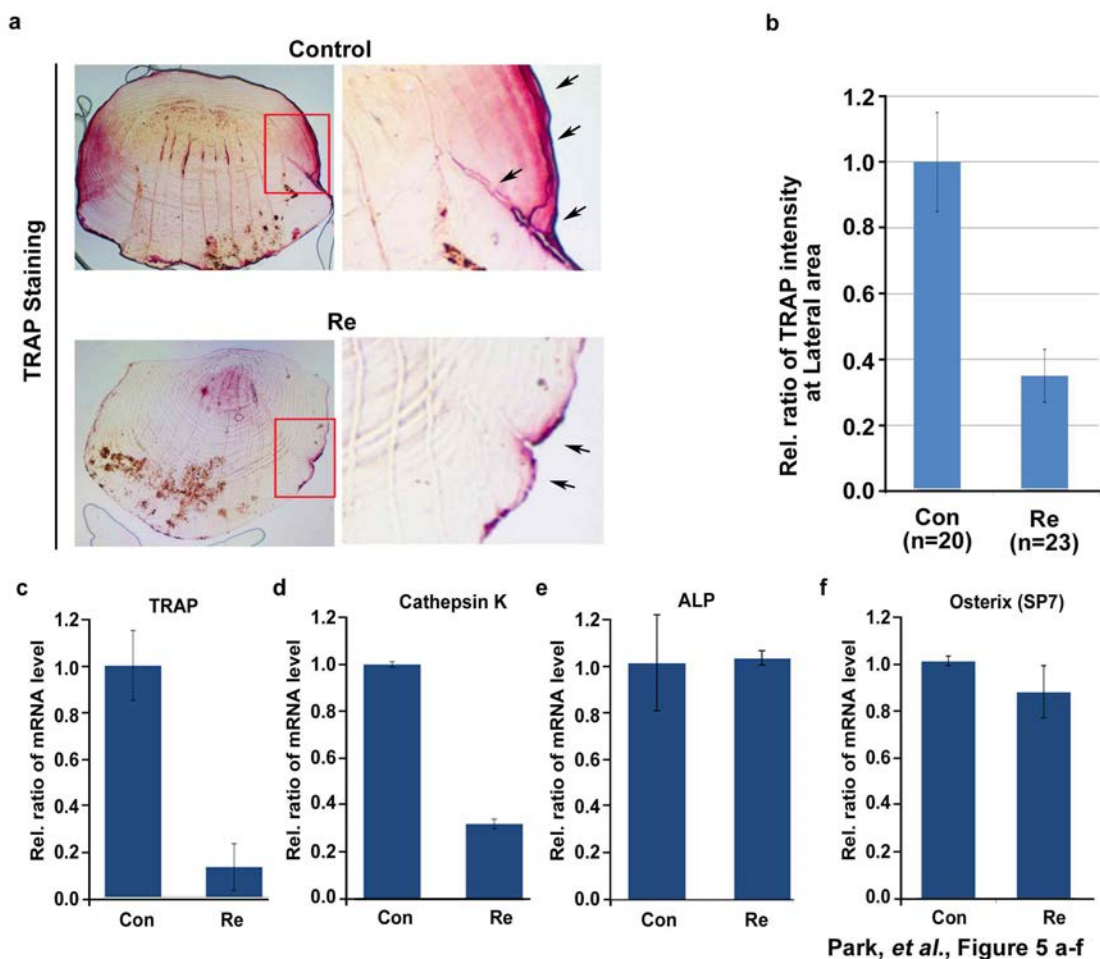


그림 5. Zebrafish 비늘 모델을 통한 파골 세포에 대한 ginsenoside Re의 효과확인

(a) Ginsenoside 재처리 된 Zebrafish 비늘은 TRAP으로 염색되었고, 빨간색 상자 영역은 X200으로 확대되었으며, 화살표는 TRAP 양성 신호 (b)를 나타내고 TRAP 신호 강도는 측부 영역에서 측정되었다. 무작위로 선택된 5 개의 점을 각 치료 척도에서 측정하였다. (c 및 d) qPCR은 파골 세포 (TRAP 및 카 텡신 K) 및 (e 및 f) 골아 세포 (ALP 및 오스테릭스)에 대한 마커의 mRNA 수준을 측정하기 위해 수행되었다.

② 조골세포의 분화 촉진 효능 검증

마우스 조골 세포 전구체 MC3T3-E1 세포에서 ginsenoside Re가 세포 생존력에 미치는 영향

골 형성과 파골 세포의 균형은 뼈의 재 형성에 중요하며, 골 항상성의 기능 상실은 골절, 골 다공증과 같은 뼈 질환을 유발한다. [Feng, 2011 and Rasz, 1999]. 인삼은 뼈 질환 치료제 인 ginsenoside Rg5 : Rk1, Rh1, Rh2 (s)가 골아 세포 분화를 촉진시키는 것으로 알려져있다. ginsenoside Re가 골아 세포 분화에 미치는 영향을 밝히기 위해 MC3T3-E1 세포에서 세포 생존력을 조사했다. 진 세노 사이드 Re (5, 10, 25, 50, 100 μ M)의 존재하에 MC3T3-E1 세포를 배양 하였다. 36 시간 후, MTT 분석을 사용하여 세포 독성을 측정 하였다. 우리는 MC3T3-E1 세포의 증식이 100 μ M의 ginsenoside Re (그림 6 (b))의 처리조차 감소하지 않는다는 것을 관찰했다. 따라서, ginsenoside Re는 MC3T3-E1 세포에서 세포 독성이 없었다.

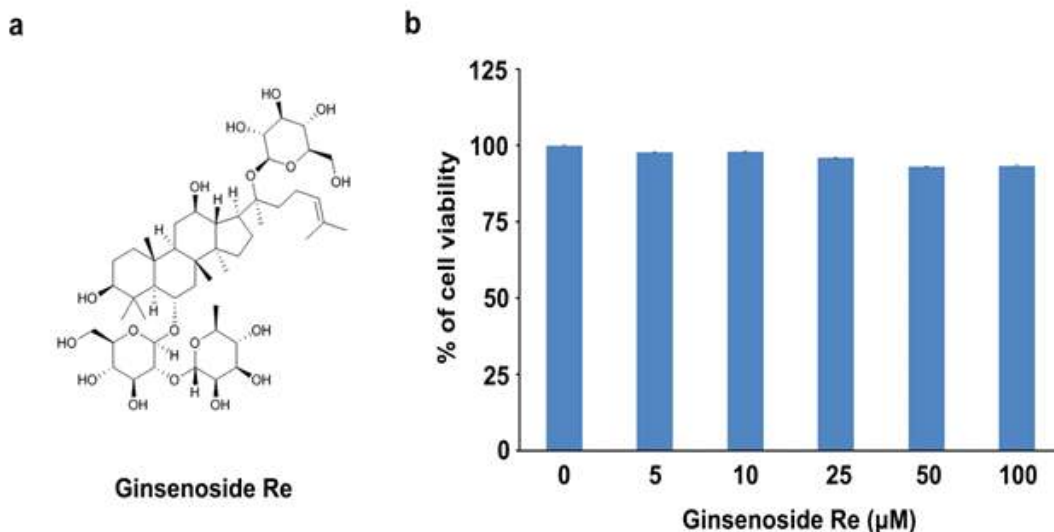


그림 6. Re의 화학구조 (A)와 MC3T3-E1에서 조골세포 분화효능(B) MC3T3-E1 세포에 ginsenoside Re (5, 10, 25, 50, 100 μ M)를 처리한 후, 24 시간 동안 배양하고 세포 생존력을 MTT 분석을 통해 측정 하였다.

마우스 MC3T3-E1 세포에서 Ginsenoside Re가 ALP 활성에 미치는 영향

Alphaline phosphatase (ALP)는 골아 세포의 분화와 성숙을위한 가장 중요한 생화학 적 마커로 생각되어 왔으며 ALP의 활동과 국소화는 골 형성과 분화에 필수적이다 [Miao, D., 2002 and Sabokbar, A., 1994]. 따라서 우리는 MC3T3-E1 세포에서 진 세노 사이드 Re가 ALP 활성에 미치는 영향을 평가했다. 세포를 ginsenoside Re를 첨가 한 골 형성 배지에서 14 일 동안 배양하고 ALP 활성을 효소 활성으로 측정하였고 pNPP를 기질로 사용 하였다. 결과는

ginsenoside Re로 처리 한 세포가 ginsenoside Re가없는 경우와 비교하여 용량 의존적으로 ALP 양성 염색을 촉진한다는 것을 보여 준다 (그림 7 (a)). 또한 ALP 활성은 ginsenoside Re의 처리에서 50 μ M에서 자극을 받았다 (그림 7 (b)).

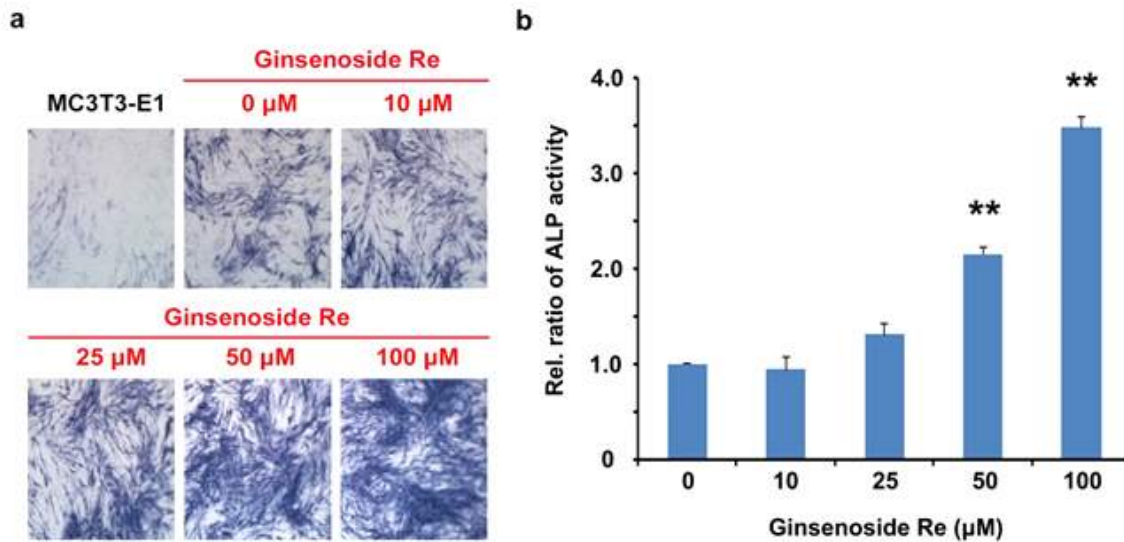


그림 7. Alkaline phosphatase (ALP) (A) 염색에 대한 ginsenoside Re의 영향 및 MC3T3-E1 세포에서의 활성 (B). MC3T3-E1 세포를 골 형성 배지에서 14 일 동안 배양하고; 염색 및 ALP의 활성은 기질로서 BCIP / NBT 및 pNPP를 사용하여 수행 하였다. 모든 연대 측정은 3 배로 수행되었다. ** 대조군에 비해 $P < 0.01$ 로 측정되어 유의함을 의미한다.

ginsenoside Re를 처리한 MC3T3-E1 세포에서 조골 세포 분화관련 유전자의 mRNA 발현 수준에 미치는 영향

우리는 정량적 RT-PCR (qRT-PCR)에 의한 골아 세포 분화 마커 유전자의 mRNA 발현에 대한 ginsenoside Re의 효과를 조사 하였다. ginsenoside Re의 존재하에 골 형성 배지와 함께 7 일 동안 배양 한 MC3T3-E1 세포와 qRT-PCR을 위해 총 RNA를 추출 하였다. 결과적으로, 골 모세포 분화에서 주요 전사 인자로 알려진 Runx2의 mRNA 수준은 50 μ M의 ginsenoside Re (그림 8 (a))에서 증가하였고, ginsenoside Re 처리는 COL1A1, ALP 및 OCN의 mRNA 수준을 ginsenoside Re가없는 경우와 비교하여 MC3T3-E1 세포에서 골 모세포 마커를 보였다 (그림 8 (b), (c) 및 (d)). 이러한 결과는 ginsenoside Re가 Runx2를 통한 골아 세포 분화를 촉진하고 하류 골 모세포 마커 유전자를 자극한다는 것을 시사한다.

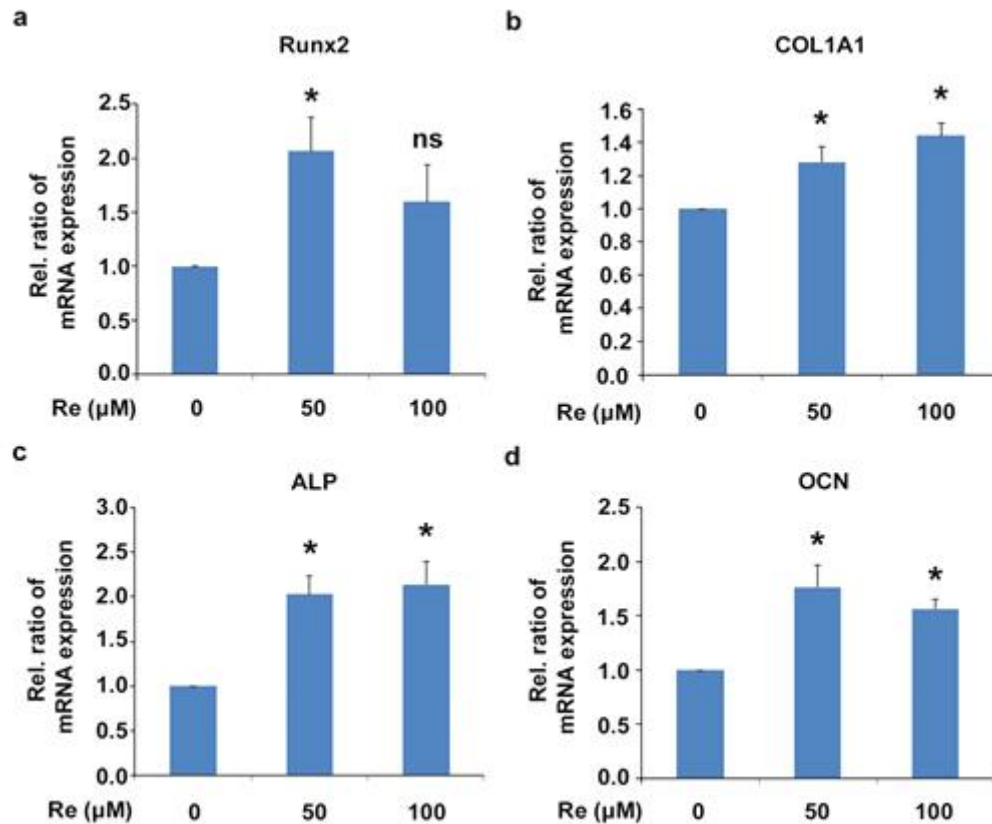


그림 8. MC3T3-E1 세포에서 조골 세포 표지 유전자의 mRNA 발현 수준에 미치는 ginsenoside Re의 영향

MC3T3-E1세포를 진 세노 사이드 Re의 존재 또는 부재 하에 7 일 동안 배양 하였다. 그런 다음 MC3T3-E1 세포에서 (A) Runx2, (B) Type 1 콜라겐, (C) ALP 및 (D) Osteocalcin mRNA 발현의 정량적 RT-PCR 분석을 수행 하였다. 결과는 GAPDH의 mRNA 수준에 의해 보정 되었다. 모든 측정은 3 배로 수행되었다. * 대조군에 비해 $P < 0.05$ 로 측정되어 유의함을 의미한다.

MC3T3-E1 세포 및 제브라 피쉬 비늘에서 mineralization에 대한 ginsenoside Re의 효과

뼈는 가장 관련성이 높은 mineralized 조직이며, mineralization는 종종 조골 세포의 분화를 특성화하기 위한 마커로 사용된다 (Sila-Asna, M., 2007). 우리는 MC3T3-E1 세포에서 mineralization에 대한 ginsenoside Re의 효과를 조사하였다. 세포를 골 형성 배지에서 ginsenoside Re와 함께 21 일 동안 배양하고 Alizarin Red S 염색법을 사용하여 광화학 분석을 수행 하였다. 칼슘 침적 수준은 대조군과 비교하여 MC3T3-E1 세포에서 ginsenoside Re의 50 μM 농도에서 증가했다 (그림 9 (a)와 (b)). 또한 생체 내에서 ginsenoside Re가 조골 세포의 광물 화에 미치는 영향을 확인하기 위해 zebrafish 모델을 사용하였다. Zebrafish는 35 일 동안 50 μM의 ginsenoside Re를 함유 한 물에서 자랐고, 비늘은 Alizarin Red S 용액으로 염

색되었다. ginsenoside Re로 처리 한 Zebrafish 비늘은 칼슘 농도의 증가 된 침전물이었고, Alizarin Red S 신호의 상대적 강도는 대조군보다 2.4 배 더 강했다 (그림 9 (c)와 (d)). 우리는 ginsenoside Re가 체외와 생체 내에서 조골 세포의 mineralization을 촉진할 것으로 기대된다.

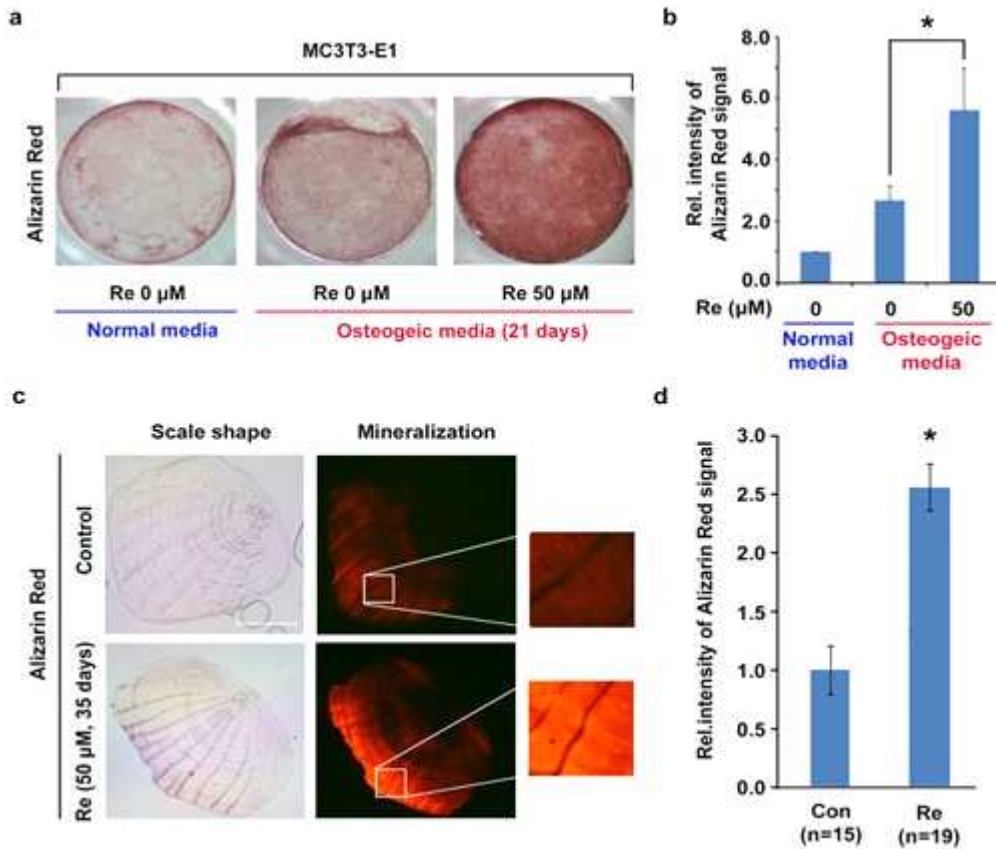


그림 9. MC3T3-E1 세포와 제브라 피쉬 비늘의 mineralization에 ginsenoside Re의 영향

(A) MC3T3-E1 세포를 진 세노 사이드 Re로 21 일 동안 처리하고 Alizarin red S로 염색하여 칼슘 침착을 가시화시켰다. (B) 그림 9a 의 강도의 측정 및 정상적인 미디어 처리 샘플 강도에 의해 정상화. 모든 연대 측정은 3 배로 수행되었고, 강도는 Image j 프로그램으로 측정되었다. 정상적인 미디어의 샘플을 대조군으로 사용했다. (C) 제브라 피쉬는 35 일 동안 ginsenoside Re로 처리하였고 칼슘 침착을 가시화하기 위해 Alizarin red S로 염색 하였다. (D) 그림 4c의 강도의 측정 및 컨트롤 샘플 강도에 의해 표준화. 강도는 image J 도구로 측정했다. * 대조군에 비해 $P < 0.05$ 로 측정되어 유의함을 의미한다.

③ 제브라피쉬(GFP::Col10a1)모델을 이용한 ginsenoside Re의 연골형성 향상효과 확인

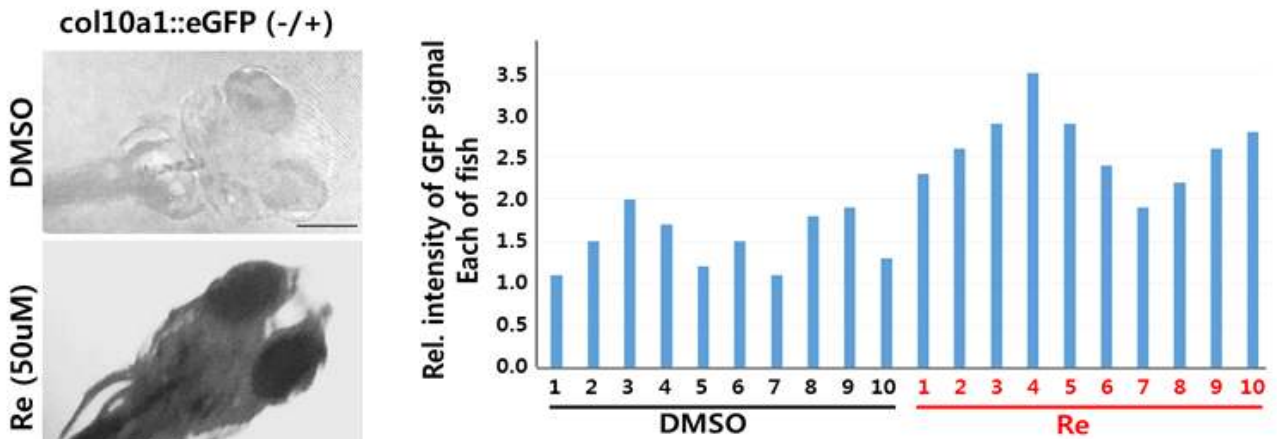


그림 10. 형질전환된 제브라피쉬(col10a1::eGFP (+/-))15일 (DOB)에 ginsenoside Re를 50uM 농도로 처리하여 형광단백질로 표지된 연골세포 분화 표지 단백질의 발현정도를 측정 (left panel)

제브라 피쉬 중 대표적인 개체에 대한 형광의 발현 여부를 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. (right panel) 각 그룹당 10마리에 대한 형광 발현 여부를 측정하고 일반적인 개체가 보이는 형광발현정도를 기준 (1.0)으로 상대적인 형광 발현정도를 나타냈다.

Ginsenoside Re에 의한 연골 분화 향상 관찰

제브라 피쉬에 연골 분화의 마커인 col10a1 유전자의 발현을 eGFP 발현으로 확인할 수 있는 형질 전환물고기를 만들어, 해당 라인으로부터 알을 수집한 후, ginsenoside Re를 처리하여 연골 세포의 발현을 표현할 수 있는 col10a1의 발현을 녹색형광단백질의 발현여부로 확인한 결과 녹색형광 단백질의 발현이 Ginsenoside Re의 처리로 인해 증가함을 확인하였다.

본 결과를 토대로 후속 연구를 통한 검증이 된다면, 인삼성분에 의한 연골 형성 향상효과를 통한 추가 기능 연구가 가능할 것으로 기대할 수 있다.

3) 인삼성분과 Ginsenoside Re의 뼈건강 개선 효능에 대한 고찰

뼈의 건강은 뼈 형성 (osteoblasts)과 골 흡수 (osteoclast) 사이의 균형에 달려 있다. 본 연구에서는 열수 추출 인삼과 그 성분의 파골 세포 형성 억제 활성을 억제하여 항 골다공증에 대한 시험관 내 및 생체 내 증거를 제공한다는 것을 입증했다. 수성 인삼 추출물은 파골 세포 분화를 효과적으로 억제하고 제브라 피쉬 비늘에서 골량 감소를 막았다. 다양한 ginsenoside 중에서 ginsenoside Re는 파골 세포 분화에 억제 작용을 나타내는 주요 화합물이다. 인삼 추출물은 BMM에 대해 독성 없이 파골 세포 분화를 억제 하였다. 이러한 결과는 파골 세포 생성에

대한 인삼 추출물의 억제 효과가 파골 세포 분화 없이 파골 세포의 분화를 억제함으로 인한 것임을 시사하였다. Ginsenosides는 항산화, 항암, 항 당뇨병, 항 지방 세포, 항 골다공증 및 성 증진 활동을 하는 것으로 보고되고 있다 (Shin and Bea et al., 2006). 우리 그룹은 이전에 다른 사람들과 함께 홍삼 (Kim, Cui et al., 2008). 본 연구에서는 파골 세포의 분화를 억제하여 뼈의 손실을 예방하는 한 가지 인삼 치료의 효과를 더 보고 하였다.

제한된 먹이 zebrafish scale 모델에서 수성 인삼 추출물을 이용한 처리는 세포 독성 없이 백본 밀도의 감소를 예방했다. 이러한 결과는 zebrafish scale 모델이 파골 세포 분화에 대한 인삼 추출물 또는 ginsenoside Re의 영향을 결정하기에 충분하다는 것을 증명했다. Zebrafish 저수지의 인삼 추출물 처리는 제한된 사료 섭취로 인한 골밀도의 급격한 감소와 비늘의 Ca / P 비율을 크게 감소시켰다. 우리는 수성 ginsenoside 추출물이 파골 세포에 미치는 영향을 통해 뼈의 건강에 영향을 미치며 파골 세포보다 조골 세포에 더 큰 효과가 있음을 확인했다. Osteoclast marker 유전자는 인삼 추출물을 처리 한 시료에서 유의하게 감소하였다. 또한 ginsenoside Re 처리는 골아 세포 표지 유전자 ALP와 osterix의 발현에 현저한 영향을 미치지 않는 않았지만 TRAP와 카 토텍신 K의 발현 수준을 감소시켰다. 인삼 추출물을 처리 한 어류 비늘에서 Ca / P 비를 유지 하였다. 특히, ginsenoside Re는 파골 세포 분화의 메커니즘으로 잘 알려진 ERK 또는 NF- κ b의 세포 신호 전달을 차단했다. 따라서 인삼 추출물과 주요 ginsenoside Re는 뼈의 건강에 유익한 효과가있는 것으로 보인다.

또한, 본 연구는 뼈의 세포 분화와 mineralization에 대한 ginsenoside Re의 자극 효과를 조사한 최초의 연구이다.. Ginsenoside Re는 ALP 활성을 증가 시켰을뿐만 아니라 Runx2, COL1A1, ALP 및 OCN의 mRNA 발현 수준을 세포 독성이 없는 조골 세포 표지자로 자극했다. 또한, 진 세노 사이드 Re는 마우스 조골 세포 전구체 MC3T3-E1 세포 및 제브라 피쉬 비늘에서 조골 세포의 광물 화에 영향을 미친다. 따라서 본 연구 결과는 ginsenoside Re가 뼈의 건강을 향상시키기 위해 조골 세포 분화를 촉진한다는 것을 시사한다. 또한 이전의 연구에서 ginsenoside Re는 뼈의 건강을 향상시키는 주요 효과 중 하나 인 저농도에서 파골 세포의 분화를 억제한다는 것을 보여 주었다. 그래서 우리는 본 연구를 통하여 ginsenoside Re가 뼈 건강 개선을 위한 중요한 성분이라는 것을 제안 할 수 있다. 인삼 섭취는 뼈 건강을 향상시키는 간단한 방법입니다. 건강식품이나 약물에 함유 된 ginsenoside Re의 주요 구성 성분은 뼈를 촉진하는데 유용 할 수 있다.

제 3 절 인삼의 뼈건강 개선 기능성 평가

1. 연구수행내용

가. 동물시험을 통한 인삼의 뼈건강 개선 기능성 평가

1) 시험방법

본 시험은 난소 적출 동물모델(rat)을 이용하여 인삼추출물의 뼈건강 개선 기능성을 평가하였다. 시험군은 총 8군으로 정상대조군, Sham-operation 군, 난소절제군(OVX), OVX + 에스트로젠 투여군(0.4 mg/rat/10 day 복강 내 주입; 에스트라디올-데포, 제이텍바이오젠, 서울), OVX + 인삼추출물 투여군(인삼추출물 100, 200, 300, 500 mg/kg)이었다.

인삼추출물은 8주 간 강제 경구투여 하였다. 유효성 평가를 위해 DEXA를 이용하여 대퇴골 골밀도(bone mineral density, BMD) 및 골무기질량(bone mineral content, BMC)를 측정하였고, μ -CT를 이용하여 대퇴골 microstructural parameters를 측정하였다. 그 외 칼슘 대사(Ca, P) 및 호르몬(estradiol) 지표를 측정하였다.

2. 연구수행결과

가. 8주 동안 rat 몸무게 변화

8주 동안의 연구기간 동안 난소를 절제한 OVX group에서는 몸무게가 현저히 증가하였다. 인삼을 투여한 쥐에서는 OVX group보다 몸무게는 감소하지만 난소를 절제하지 않은 control군, sham group과 에스트로젠을 투여한 군에서 몸무게의 변화가 더 적음을 확인하였다.

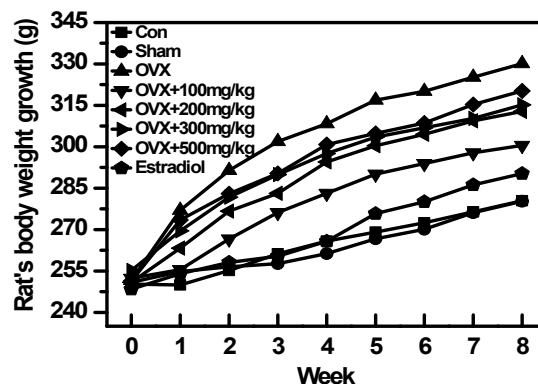


그림 3. 8주 동안 몸무게의 변화

나. 대퇴골 골밀도 (bone mineral density, BMD)과 골무기질량 (bone mineral content, BMC) 측정

인삼추출물 투여 8주 후 대퇴골 골밀도와 골무기질량 측정 시 OVX 군이 Con 군과 Sham 군에 비해 유의적으로 낮았으며, OVX 군, 인삼을 섭취한 군과 에스트로젠을 투여한 군에서 골밀도와 골무기질량을 비교해 볼 때, OVX 군보다 인삼을 섭취한 군과 에스트로젠을 투여한 군에서 골밀도와 골무기질량이 증가하는 것을 확인하였다.

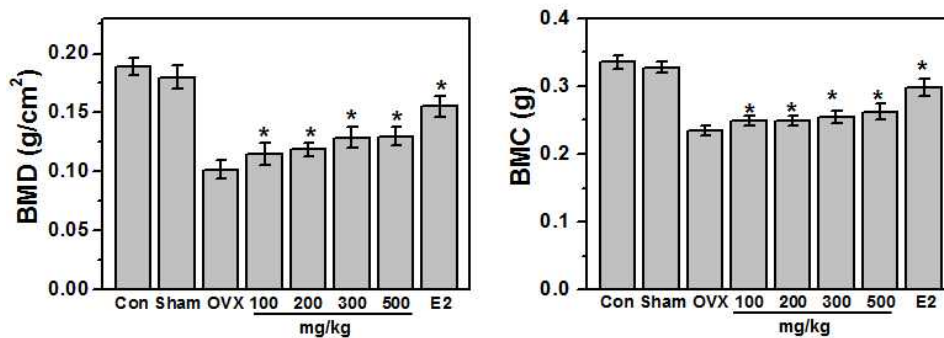


그림 4. 골밀도와 골무기질량의 변화

다. Micro-CT 측정

인삼추출물 투여 8주 후 마이크로 CT 분석 결과, tibial metaphysis의 대퇴골 microstructural parameters에서 각 투여군 간 상당한 차이가 있었다. Sham 군과 비교해 볼 때, OVX 군은 bone volume fraction (BV/TV)이 66.3% ($P<.05$), Conn.D (1/mm³)이 56.4%, trabecular number (Tb.N)이 50% ($P<.05$)로 감소하였고, SMI (1)이 209.6%, ($P<.05$), trabecular separation (Tb.Sp)이 108.4% ($P<.05$)로 증가하였다. 인삼투여군과 에스트로젠 투여군을 OVX 군과 비교해 보았을 때, bone volume fraction (BV/TV), Conn.D (1/mm³), trabecular number (Tb.N)는 유의적으로 증가하였고 SMI (1), trabecular separation (Tb.Sp)는 유의적으로 감소하였다.

표 3. micro-CT를 이용한 경골 골간단(tibial metaphysis)과 대퇴골피질(cortical)의 기하학적 특성의 섬유주 미세조직 분석

	Con	Sham	OVX	OVX 100 mg/kg	OVX 200 mg/kg	OVX 300 mg/kg	OVX 500 mg/kg	OVX E2
BV/TV	83.21	80.70	53.14	59.96	61.93	70.63	73.58	77.09
(%)	±1.76	±2.64	±6.57 ^a	±15.29	±6.16 ^b	±5.48 ^b	±4.00 ^b	±3.77 ^b
Conn.D	72.50	72.89	34.34	41.12	43.56	47.02	52.02	65.02
(1/mm ³)	±2.31	±3.01	±3.23 ^a	±3.02 ^b	±2.56 ^b	±3.66 ^b	±1.57 ^b	±3.32 ^b
SMI (1)	1.32	1.36	2.85	2.58	2.54	2.41	2.43	2.32

	±0.32	±0.27	±0.19 ^a	±0.15	±0.29	±0.14	±0.14	±0.26 ^b
Tb.Th	90.37	89.33	61.71	74.42	75.31	79.63	76.37	83.55
(mm)	±6.00	±11.11	±4.50 ^a	±2.36 ^b	±9.01 ^b	±2.39 ^b	±3.12 ^b	±6.24 ^b
Tb.N	0.03	0.032	0.016	0.028	0.02	0.022	0.02	0.03
(1/mm)	±0.01	±0.01	±0.01 ^a	±0.002 ^b	±0.002 ^b	±0.01 ^b	±0.01 ^b	±0.00 ^b
Tb.Sp	0.23	0.83	0.90	0.97	0.760	0.72	0.71	0.50
(mm)	±0.03	±0.05	±0.06 ^a	±0.05 ^b	±0.06 ^b	±0.05 ^b	±0.06 ^b	±0.17 ^b

Note: ^a $P < 0.05$ vs. sham group, ^b $P < 0.05$ vs. OVX group. BV/TV, percent bone volume; Conn.D, connectivity density; SMI, structure model index; Tb.Th, trabecular thickness; Tb.N, trabecular number; Tb.Sp, trabecular separation. Rat's groups include con-operated (con), sham-operated (Sham), OVX-control (OVX), 100, 200, 300 and 500 mg/kg ginseng treated ovariectomized groups, estradiol valerate (200 µg/kg, Estradiol Depot 10 mg, Jenapharm, Germany) treated ovariectomized groups, total 8 group. (N=16/each group).

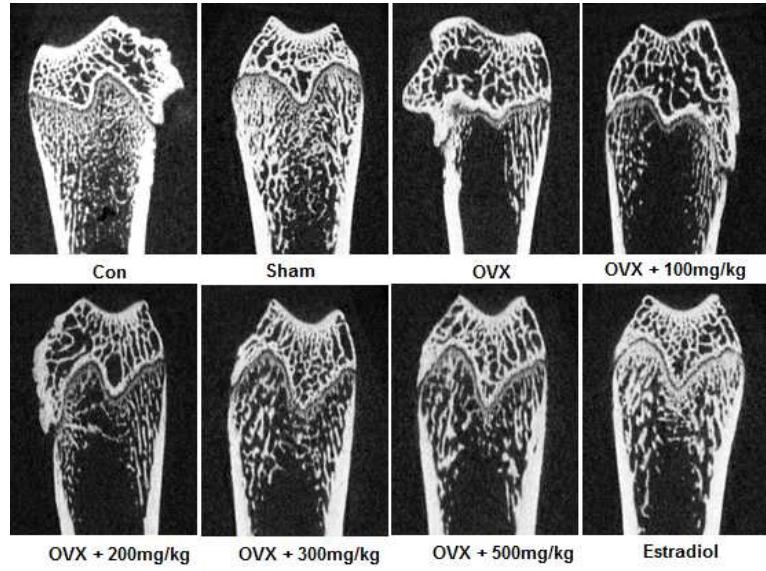


그림 5. 마이크로-CT를 이용한 내측-근위 경골의 관상 이미지

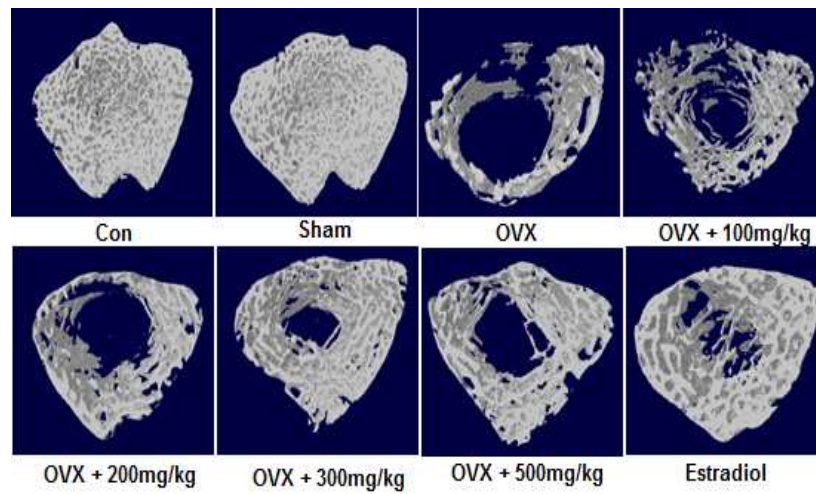


그림 6. 마이크로-CT를 이용한 내측-근위 경골의 3D 이미지

라. serum과 urine내 biochemical parameters 측정

인삼추출물 8주 투여 후 OVX 군과 비교할 때, 인삼을 투여한 군에서는 혈액 내 osteocalcin과 ALP 수치가 감소하였으며 뇨 내의 DPD/Cr 의 비율이 감소하였다. 또한 OVX 군과 비교하였을 때, 인삼을 투여한 군에서는 뇨 내 칼슘과 인의 배출이 감소하였다.

표 4. serum과 urine 내 biochemical parameters 분석

	Con	Sham	OVX	OVX 100 mg/kg	OVX 200 mg/kg	OVX 300 mg/kg	OVX 500 mg/kg	OVX E2
S-Ca (mmol/L)	9.80 ±0.32	9.95 ±0.39	9.65 ±0.19	9.75 ±0.26	9.63 ±0.15	10.05 ±0.13	9.93 ±0.26	10.63 ±0.31
S-P (mmol/L)	5.10 ±1.46	5.18 ±0.33	4.53 ±0.77	4.60 ±0.76	5.48 ±0.10	4.65 ±0.57	5.18 ±0.80	5.78 ±0.62
ALP (U/L)	47.00 ±11.43	49.75 ±6.29	68.25 ±13.67 ^a	59.75 ±9.94	56.75 ±3.77	54.5 ±12.79 ^b	54.75 ±9.18 ^b	43.5 ±3.70 ^b
Osteocalcin (ng/mL)	10.32 ±7.17	9.86 ±0.56	12.93 ±2.71 ^a	11.81 ±0.96	11.25 ±3.61	10.97 ±4.62 ^b	10.65 ±1.62 ^b	9.72 ±0.91 ^b
Estradiol (pg/mL)	5.18 ±2.03	4.17 ±1.54	2.79 ±0.35 ^a	4.74 ±0.54 ^b	4.03 ±0.66 ^b	3.94 ±0.54 ^b	4.70 ±2.02 ^b	4.21 ±1.77 ^b
DPD/Cr (nmol/m mol)	11.61 ±5.17	11.94 ±4.13	35.91 ±3.18 ^a	29.61 ±6.89	19.79 ±11.79 ^b	15.81 ±10.98 ^b	14.46 ±9.07 ^b	12.21 ±10.05 ^b
U-Ca/Cr (mmol/m mol)	1.88 ±1.23	1.75 ±3.99	2.63 ±0.19 ^a	2.50 ±1.97	2.43 ±3.93	2.18 ±2.04 ^b	1.98 ±0.21 ^b	1.88 ±1.98 ^b

Note: Values are means±SEM (n=16). S-Ca, serum calcium; S-P, serum inorganic phosphorus; ALP, alkaline phosphatase; DPD/Cr, urinary deoxypyridinoline/creatinine; U-Ca/Cr, urine calcium/creatinine. ^a*P*<.05 compared with the sham group. ^b*P*<.05 compared with the OVX group.

마. H&E와 trap staining을 이용한 이미지 분석

H&E staining을 통한 파골세포 (osteoclast) number를 분석한 결과, 파골세포의 수가 OVX 군이 Con 군과 Sham 군에 비해 유의적으로 높았으며, 에스트로겐과 인삼을 섭취한 군에서는 OVX보다 인삼을 섭취한 군에서 파골세포의 수가 감소하는 것을 확인하였다.

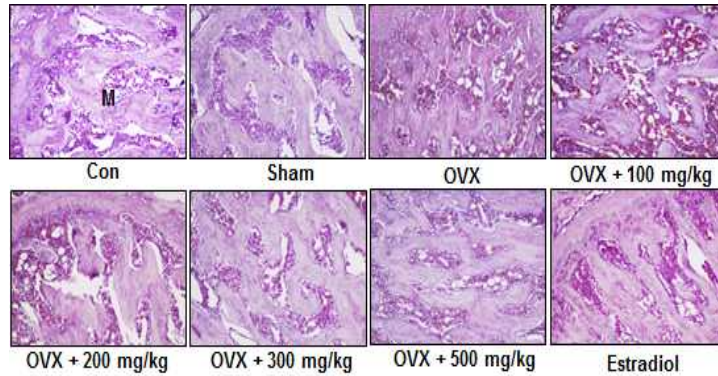


그림 7. H&E staining 이미지 분석

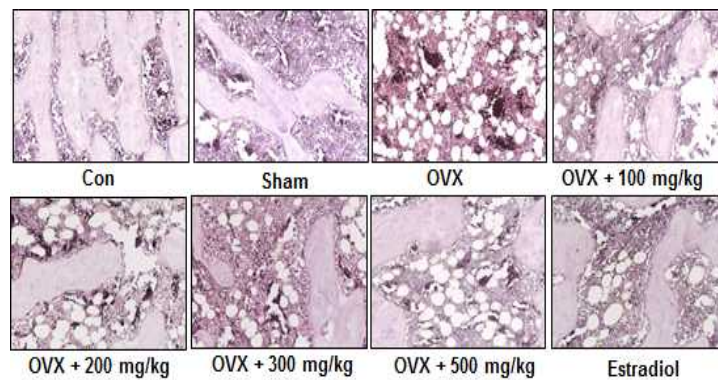


그림 8. Trap staining 이미지 분석그림

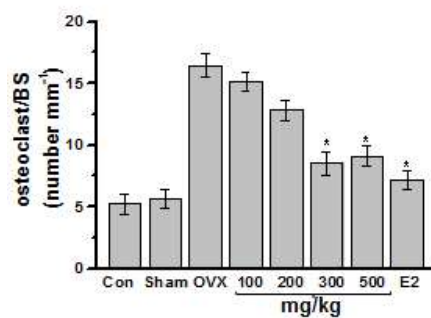


그림 9. 파골세포 (Osteoclast) number 분석

바. 결론

대퇴골 골밀도 및 골질량 등 관련 지표 평가 결과, 인삼추출물을 투여한 모든 군에서 난소적출군 대비 유의한 뼈 건강 개선 효능을 확인할 수 있었다.

※ 별첨 1. 동물실험 논문

1. 인체적용시험을 통한 인삼의 뼈건강 개선 기능성 평가

가. 시험방법

(1) 섭취 용량 산출

인삼은 오랫동안 안전하게 섭취하여 온 식품이며, 심각한 독성이 보고된 바가 없으며, 식품 공전 상 식품원재료 분류에 근채류로 분류(뿌리)되어 있으며, 식용 가능 원료로 등록(<http://fse.foodnara.go.kr/origin/>)되어 있다. 또한 인삼은 면역력 증진 및 피로회복으로 기능성이 인정되어, 현재 식품의약품안전처 기능성원료로 고시되어 있으며, 건강기능식품으로 판매되고 있다(일일섭취량 인삼 분말로서 0.5~5 g, 진세노사이드 Rg1 과 Rb1 의 합계로서 3~80 mg).

난소절제술로 골다공증을 유도한 동물모델을 이용하여 인삼추출물을 경구투여한 결과, 대퇴골 골밀도 및 골질량을 비롯한 뼈 건강 관련 지표가 인삼추출물 300 mg/kg과 500 mg/kg 를 투여한 쥐에서 난소 적출군에 비하여 유의하게 개선되었으며, 100 mg/kg 에서도 개선되는 경향을 보였다(인체환산 시 약 1, 3, 5 g/day).

따라서 선행연구 결과, 식품의약품안전청고시 건강기능식품의 기준 및 규격, 섭취경험, 원료 생산성 등을 고려하여 인체적용시험에서의 인삼추출물 일일섭취량을 1, 3 g 으로 설정하였다.

(2) 인체적용시험 디자인 설계 및 평가항목 선정

(가) 연구디자인

인삼추출물의 최적 섭취용량을 산출하기 위하여 섭취군은 총 3군으로 선정하였다(인삼추출물 1 g 군 30명, 인삼추출물 3 g 군 30명, 플라세보군 30명). 시험디자인은 인체적용시험 디자인의 gold standard 인 “무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 시험(RCT; Randomized Controlled Trial)”으로 설계하였다.

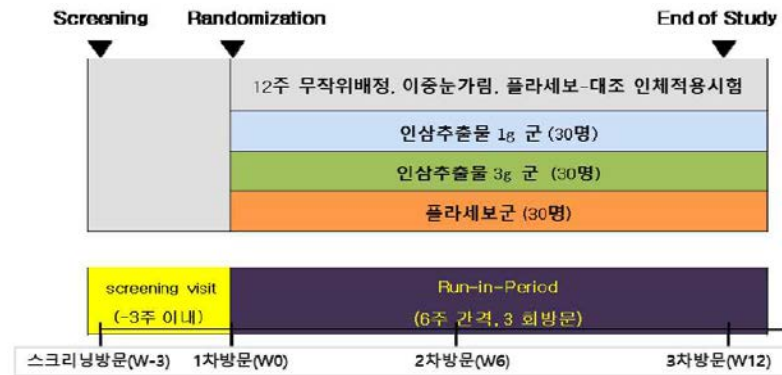


그림 10. 연구디자인

(나) 연구대상자

모든 연구대상자는 다음 기준을 만족하여 인체적용시험에 참여하였다.

- 만 40 세 이상의 여성으로서, 무월경 후 6 개월이 경과된 자
- 골밀도측정(DEXA) 결과 T-score 가 -1.0 이하 인 자
- 골형성 지표인 오스테오칼신(OC; osteocalcin) 농도가 8 ng/mL 이상이면서 골흡수 지표인 테옥시피리디놀린(DPD; deoxypyridinoline) 농도가 5.2 nM DPD/mM creatinine 이상인 자

연구대상자들이 다음 기준 중 하나라도 해당될 경우 인체적용시험의 참여에서 배제되었다.

- 이차성 골감소증 또는 골다공증을 진단 받은 자
- 스크리닝 검사 전 6 개월 이내에 골다공증 치료를 위해 여성호르몬 대체요법(hormone replacement therapy), calcitonin, strontium renelate 과 bisphosphonate(alendronate, risedronate, ibandronate, zoledronate 등) 등을 투약한 자
- 스크리닝 검사 전 4 주 이내에 vitamin D 와 K, Ca 보충제를 복용하고 있는 자
- 스크리닝 검사 전 2 개월 이내에 베타-아드레날린성 수용체 억제제를 복용하고 있는 자
- 스크리닝 검사 전 2 개월 이내에 고지혈증이나 내분비계질환 치료제, 호르몬제제, 뼈건강 개선 등에 관련한 건강기능식품을 비롯한 본 연구의 결과 해석에 영향을 줄 수 있는 약물 및 건강기능식품을 지속적으로 복용한 자
- 유방암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 방광암 등의 암환자
- 골대사에 영향을 미치는 질환을 앓고 있는 자(갑상선질환, 당뇨병, 간질환, 신장질환 등)
- 골다공증성 골절, 퇴행성 척추질환, 대퇴골질환, 고관절질환 등을 앓거나 과거력이 있는 자
- 체질량지수(BMI)가 18.5 kg/m² 미만 또는 30 kg/m² 이상인 자
- 연구책임자의 판단 하에 인지능력 저하가 의심되는 자

- 약물 및 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자(단, 시험책임자의 판단에 따라 연구대상자의 상태를 고려하여 본 연구에 참여할 수 있다.)
- 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예; 크론씨병)이나 위장관계수술(단, 단순맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자
- 스크리닝 검사 전 2 개월 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 자
- 약물 또는 알코올 남용 병력이 있는 자
- 진단검사의학검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자
 - ☞ AST, ALT > 참고범위 상한치의 2 배
 - ☞ Serum Creatinine > 2.0 mg/dl
- 스크리닝 검사 전 2 개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자
- 진단검사의학 검사 결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자

(다) 평가항목

인삼추출물의 뼈건강 개선 유효성 평가를 측정하기 위해 1차 유효성 평가항목으로 혈중 OC (Osteocalcin), 뇨중 DPD (Deoxypyridinoline), DPD/OC ratio를 측정하였고, 2차 유효성 평가항목으로 혈중 CTX (Cross-linked C-telopeptide of type-1 collagen), NTX (Cross-linked N-telopeptide of type-1 collagen), Ca, Phosphorus, BSALP (Bone specific-alkaline phosphatase), P1NP (Procollagen type 1 N-terminal propeptide) 와 설문조사를 이용한 WOMAC index (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis: 무릎관절염증상)을 측정하였다.

안전성 평가를 위해 자·타각증상 등 이상반응 모니터링과 활력징후, 신체검진, 심전도, 진단검사의학검사 등을 시행하였다.

(3) 인체적용시험계획서(Protocol) 개발 및 인체시험윤리위원회(Institutional Review Board; IRB) 승인

(가) 인체적용시험 프로토콜, 증례기록서 및 인체적용시험자 자료집 개발

인체적용시험 프로토콜 개발을 위해 선행연구 자료조사 및 연구자 회의 개최 등을 통해 인체적용시험 디자인 설계 및 biomarker 결정하였고, 인체적용시험 유효성평가 분석을 위한 통계적 접근 방법을 모색하였다. 이에 따라 목표로 하는 기능성에 관한 연구디자인 및 연구대상자 선정/제외기준을 확립하여 인체적용시험계획서(protocol), 증례기록서(CRF), 인체적용시험시험자 자료집(IB)를 개발하였다.

- 인체적용시험 계획서(protocol): 해당 인체적용시험의 배경이나 근거를 제공하기 위해 인체적용시험의 목적·연구방법론·통계학적 측면·관련 조직 등이 기술된 문서

- 증례기록서(CRF): 개개 연구대상자로 계획서에서 규정한 정보를 기록하여 의뢰자에게 전달될 수 있도록 고안한 인쇄되거나 전자 문서화된 서식
- 인체적용시험자 자료집(IB): 인체적용시험용제품과 관련된 임상 정보 및 비임상 정보를 정리하여 시험자에게 제공하는 자료집

※ 별첨 2. 인체적용시험 계획서

※ 별첨 3. 증례기록서

※ 별첨 4. 인체적용시험자 자료집

(나) 인체시험윤리위원회(Institutional Review Board; IRB) 심의 및 승인

인체적용시험심사위원회는 계획서 또는 변경계획서를 검토하고, 연구대상자의 서면동의를 얻기 위해 사용하는 방법이나 제공되는 정보를 검토하고 지속적으로 이를 확인함으로써 인체적용시험에 참여하는 연구대상자의 권리·안전·복지를 보호하기 위해 시험기관 내에 독립적으로 설치한 상설위원회이다. 따라서 인체적용시험의 윤리적·과학적 수행을 위해서 상설위원회에 관련 심의 서류인 계획서, 증례기록서, 인체적용시험자 자료집 등을 제출하여 심의를 받았다. 심의 결과, 본 인체적용시험 계획서(version 1.1)는 연구대상자의 안전을 충분히 고려하여 작성되었으며, 전북대학교병원의 기능성식품인체시험윤리위원회(IRB)가 심의하여 인체적용시험 수행을 결정하였다(승인 일자: 2015. 6. 3, 승인 번호: 2015-02-006).

※ 별첨 5. IRB 심사결과 통지서(version 1.1)

(다) 인체적용시험 등록

인삼추출물의 우수성을 규명하기 위한 프로토콜을 국제 인체적용시험 등록 사이트(<http://clinicaltrials.gov>)에 등록함으로써 인삼추출물의 기능성 규명 인체적용시험의 과학적 타당성을 사전에 확보하였다(국내외 연구진에 의해 인삼발효분말 인체적용시험 수행에 있어 기초 활용자료 제공, 국제적으로 객관적 의사결정을 위한 근거자료의 공유, 인체적용시험의 윤리적 수행).

※ 별첨 6. ClinicalTrials.gov 등재 현황 및 내용

(4) 인체적용시험 수행

(가) 인체적용시험 개시미팅 진행

개시미팅은 인체적용시험에 참여하는 시험자로 하여금 연구 계획과 흐름에 대한 전반적인 이해를 가지는 모임으로 2015년 5월 12일에 의뢰자(Sponsor), 시험 책임자(Principal Investigator, PI), 시험 담당자(Sub-Investigator), 모니터요원(Clinical

Research Associate, CRA)등 참석 하에 진행 완료하였다.

(나) 인체적용시험 수행

인삼의 뼈 건강 개선 인체적용시험 수행을 위해 선정/제외기준에 적합한 연구대상자 모집 및 등록하였고, 등록된 연구대상자를 대상으로 유효성 및 안전성 평가항목을 측정하였다.



그림 11. 인체적용시험 수행 과정

(5) 인체적용시험 모니터링

인체적용시험의 결과 신뢰성을 보증하기 위하여 전문기관인 인체적용시험 수탁기관(CRO; Contact Research Organization)에서 인체적용시험 전반 과정에 대해 모니터링을 실시하였다. 모니터 요원은 인체적용시험 기간 동안 ① 시험자가 인체적용시험을 안전하고 적절하게 수행할 수 있는 자격이 있고, 시설 및 연구자원에 변경사항이 있는지, ② 인체적용시험에 사용되는 시험용제품에 관해 유효기간, 저장조건, 수분 및 반납 기록, 계획서에 준수한 용량 사용 등 확인, ③ 시험자의 시험계획서 준수 여부, ④ 연구대상자로부터의 동의취득 과정의 적절성, ⑤ 최신의 인체적용시험자자료집 및 기타 인체적용시험 관련물품의 시기적절한 수령 여부, ⑥ 시험자가 시험계획서 및 의뢰자의 시험자/실시기관과의 서면합의대로 업무를 수행하고 자격이 없는 사람에게 업무를 위임했는지 여부, ⑦ 선정기준에 적합한 연구대상자만을 등록시키는지의 여부, ⑧ 연구대상자 등록 상황 보고, ⑨ 근거문서 및 인체적용시험 관련 기록이 정확하고 완전하며 최신 것이며 제대로 반영되어 유지되는지 여부, ⑩ 시험자가 요구되는 보고서, 통지서, 신청서 등을 제공하며 이들이 정확하고, 완전하고, 시기적절하며, 날짜가 기록되고 본 인체적용시험을 확인할 수 있는지 여부, ⑪ 증례기록서의 기재가 근거문서와 일치되게 기록되어있는지, 근거문서에 있는 내용이 증례기록서에 누락되어 있지 않은지, 계획서를 준수하지 못한 사항이 적절히 기록되어 있는지 등 시험 관련 기록의 정확성과 안전성 여부 확인, ⑫ 중대한 유해사태가 관련 규정, 계획서에 따라 IRB, 의뢰자에게 명시된 기간 내에 적절하게 보고되었는지 여부, 시험자가 기본문서를 보존하고 있는지 여부 등에 대해 모니터링하였다.

※ 별첨 7. 모니터링 보고서

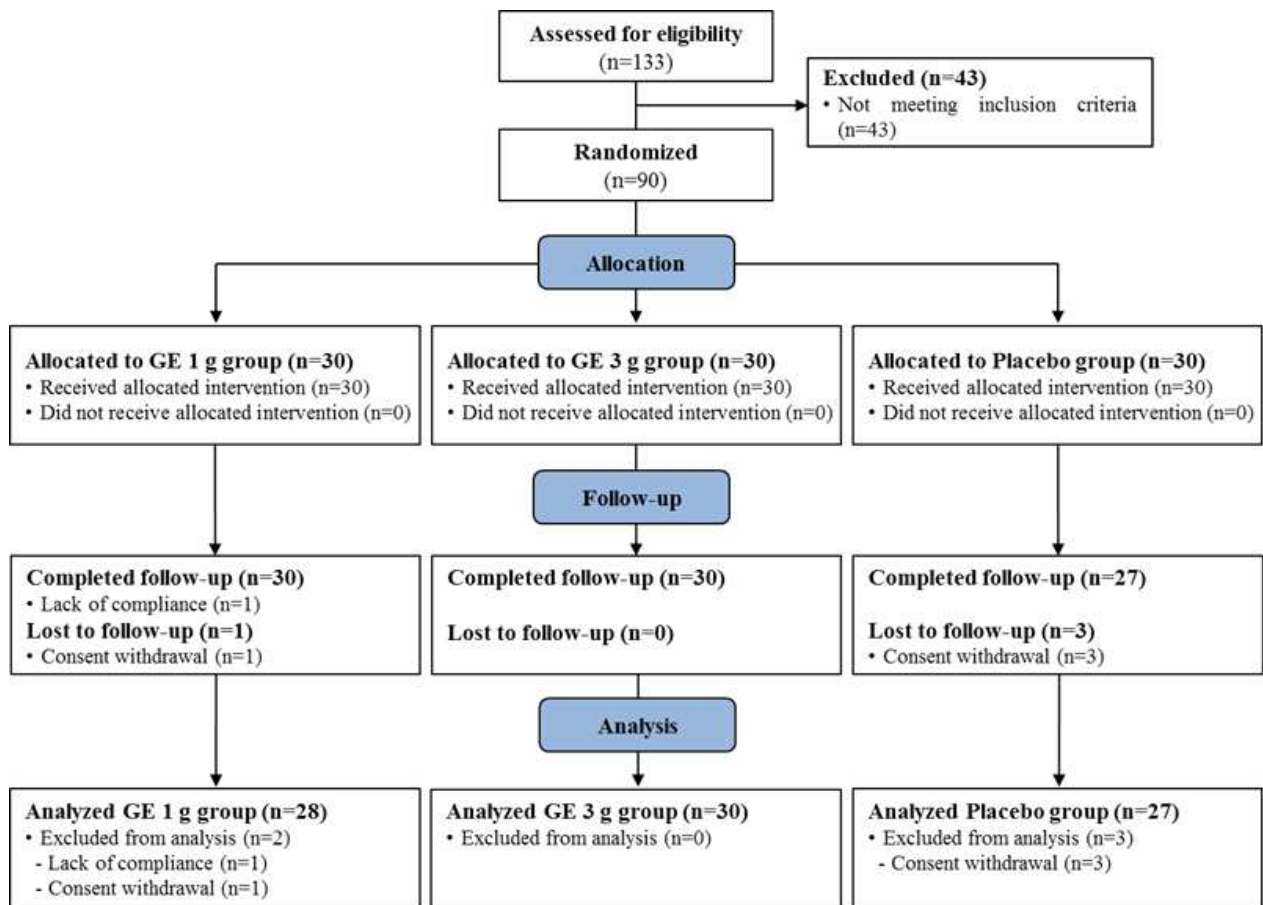
나. 시험결과

(1) 연구대상자 참여 실태

총 133명의 자원자가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자 적합성 평가를 통해 90명이 연구대상자로 선정되었다. 연구대상자는 무작위 배정, 이중눈가림 방법을 통해 인체적용시험에 참여(인삼추출물 1 g 군 30명, 인삼추출물 3 g 군 30명, 플라세보군 30명)하였다. 인체적용시험 참여 중 동의철회 4명(인삼추출물 1 g 군 1명, 플라세보군 3명), 시험용제품 순응도 미달 1명(인삼추출물 1 g 군) 발생함에 따라 총 85명(인삼추출물 1 g 군 28명, 인삼추출물 3 g 군 30명, 플라세보군 27명)이 인체적용시험계획서에 명시된 모든 절차를 수행 완료하였다.

표 5. 탈락 및 계획서 위반 현황/사유

그룹	사유	N(명)
인삼추출물 1 g 군	동의철회	1
	순응도 미달	1
인삼추출물 3 g 군	-	-
플라세보군	동의철회	3
Total	동의철회	4
	순응도 미달	1



*GE: Ginseng Extract

그림 12. 연구대상자 참여실태

(2) 연구대상자의 인구학적 정보

인구학적 정보 분석에 포함되는 연구대상자는 총 90명(safety군)으로 인삼추출물 1 g 군(30명), 인삼추출물 3 g 군(30명), 플라세보군(30명)으로 나뉘었다. 인구학적 정보 분석 결과, 골밀도 T-score, osteocalcin, DPD가 모두 선정기준 범위에 해당되었고, 모든 항목에서 세 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이를 통해 연구대상자 선정이 적절하게 이루어졌고, 연구대상자의 무작위배정이 잘 이루어졌다고 판단하였다.

표 6. 인구학적 정보

	GE 1 g 군 (n=30)	GE 3 g 군 (n=30)	플라세보군 (n=30)	전체 (n=90)	<i>p</i> -value ¹⁾
나이(세)	55.40±3.17	53.93±2.82	54.63±3.02	54.66±3.03	0.174
폐경연령(세)	50.27±3.94	48.57±4.04	49.43±4.01	49.42±4.01	0.263
폐경기간(개월)	61.87±40.05	64.00±55.78	62.40±50.76	62.76±48.75	0.985
출산횟수(회)	2.07±0.58	2.20±0.81	2.23±0.86	2.17±0.75	0.668
신장(cm)	156.57±4.25	155.20±6.22	155.37±5.50	155.71±5.36	0.565
체중(kg)	58.45±7.80	59.52±9.31	57.21±7.97	58.39±8.35	0.569
BMI (kg/m ²)	23.85±3.01	24.65±3.03	23.66±2.69	24.05±2.91	0.379
음주여부(Y/N)	10/20	9/21	12/18	31/59	0.709 ²⁾
음주량(unit)	1.14±1.18	1.10±1.79	2.31±2.68	1.58±2.06	0.305
흡연여부(Y/N)	0/30	0/30	0/30	0/30	—
척추부골밀도 (T-score)	-2.25±0.75	-1.99±0.64	-1.96±0.71	-2.07±0.71	0.207
대퇴부골밀도 (T-score)	-1.40±0.88	-1.15±0.67	-1.22±0.77	-1.26±0.78	0.433
Osteocalcin (ng/mL)	21.13±5.60	18.93±3.72	21.25±6.43	20.44±5.42	0.174
DPD (nM DPD/mM crea)	7.35±1.33	7.33±1.52	8.24±4.51	7.64±2.85	0.368

Values are presented as mean±SD. ¹⁾Analyzed by one-way ANOVA, ²⁾Analyzed by Fisher's exact test.

(3) 순응도 평가

시험용제품에 대한 순응도는 인삼추출물 1 g 군 94.00±5.84%, 인삼추출물 3 g 군 95.23±5.02%, 플라세보군 90.07±8.88%로 세 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.043$). 사후검정 결과, 인삼추출물 3 g군이 플라세보군에 비해 순응도가 유의하게 높았다. 연구기간 중 인삼추출물 1 g 군에서 1명의 연구대상자가 순응도 미달이었으며, 유효성 평가를 위한 주분석군이 계획서대로 분석 대상군(per protocol; PP 분석군)임에 따라 유효성 분석에서 제외되었다.

표 7. 순응도

	GE 1 g 군 (n=28)	GE 3 g 군 (n=30)	플라세보군 (n=27)	전체 (n=85)	p -value ¹⁾
순응도 (%)	94.00 ±5.84 ^{ab}	95.23 ±5.02 ^a	90.07 ±8.88 ^b	93.19 ±6.99	0.014*

Compliance was calculated by total intakes by prescriptions. Values are presented as mean±SD. ¹⁾Analyzed by one-way ANOVA. Different letters indicate statistically significant differences between groups. * $p<0.05$.

(4) 식이섭취량 및 신체활동량 평가

(가) 식이섭취량 변화

인체적용시험 참여기간 동안 연구대상자가 섭취한 음식물 및 영양소 섭취 상태를 평가하기 위하여 시험용제품 섭취 전과 섭취 8주 후에 식이기록지를 이용하여 식이섭취조사를 실시하였으며, CAN Pro 4.0®을 이용하여 분석하였다. 유효성 평가 대상인 PP 군으로 식이섭취량 변화를 분석한 결과, 시험용제품 섭취 전·후, 각 시험군 내 및 시험군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

표 8. 식이섭취량 변화

	GE 1 g 군(n=28)				GE 3 g 군(n=30)				플라세보군(n=27)				
	0 w	12 w	Diff	P -value ¹⁾	0 w	12 w	Diff	P -value ¹⁾	0 w	12 w	Diff	P -value ¹⁾	P -value ²⁾
Calorie	1681.30	1609.45	-71.85	0.461	1522.94	1557.56	34.62	0.708	1584.74	1478.53	-106.21	0.196	0.510
(kcal)	±434.63	±464.11	±508.34		±495.53	±354.22	±502.06		±426.59	±409.78	±416.01		
CHO	267.60	267.70	0.10	0.995	244.00	250.91	6.90	0.643	257.09	246.56	-10.54	0.417	0.712
(g)	±78.58	±78.98	±90.58		±73.47	±62.14	±80.63		±64.63	±57.16	±66.31		
Lipid	40.34	34.78	-5.56	0.131	36.26	38.64	2.38	0.649	39.90	33.58	-6.31	0.207	0.333
(g)	±20.35	±16.60	±18.90		±20.88	±20.24	±28.35		±23.55	±18.65	±25.34		
Protein	67.21	63.08	-4.13	0.412	61.62	60.28	-1.34	0.774	54.70	55.33	0.63	0.886	0.774
(g)	±21.18	±23.21	±26.26		±27.87	±21.67	±25.26		±20.10	±20.06	±22.62		
Fiber	23.13	24.94	1.81	0.421	22.26	23.14	0.89	0.634	21.89	21.17	-0.72	0.616	0.635
(g)	±7.98	±8.54	±11.71		±11.93	±9.14	±10.08		±7.00	±5.86	±7.4-		

Values are presented as mean±SD. ¹⁾Analyzed by paired *t*-test, ²⁾Analyzed by linear mixed model

(나) 신체활동량 변화

인체적용시험 참여 기간 동안 연구대상자의 신체활동량을 평가하기 위하여 시험용제품 섭취 전·섭취 8주 후에 세계신체활동설문지(Global physical activity questionnaire, GPAQ)를 사용하여 신체활동 정도 조사를 실시하였다. 평가항목으로 사용되는 신체활동량(Metabolic equivalent task, MET)은 물리적인 활동이나 GPAQ의 데이터의 분석에 사용되는 것으로, 사람의 휴식대사율에 대한 작업대사율의 상대적인 비율을 나타낸다. 유효성 평가 대상인 PP 군으로 신체활동량을 분석한 결과 플라세보군 내에서 시험용제품 섭취 전에 비해 섭취 8주 후 신체활동량이 유의하게 증가하였으나, 세 시험군 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

표 9. 신체활동량 변화

	인삼추출물 1 g 군(n=28)				인삼추출물 3 g 군(n=30)				플라세보군(n=27)				<i>p</i> -value ²⁾
	0 w	12 w	Diff	<i>p</i> -value ¹⁾	0 w	12 w	Diff	<i>p</i> -value ¹⁾	0 w	12 w	Diff	<i>p</i> -value ¹⁾	
MET -min/ week	2490.00 ±2122.15	3002.14 ±3423.55	512.14 ±3697.90	0.470	3002.67 ±3203.45	4350.00 ±4649.10	1347.33 ±4114.29	0.083	1822.67 ±1418.57	4309.63 ±5266.72	2486.96 ±5241.23	0.021*	0.251

Values are presented as mean±SD. ¹⁾Analyzed by paired *t*-test, ²⁾Analyzed by linear mixed model, **p*<.05

(5) 유효성 평가

유효성 평가는 인체적용시험계획서에 정해진 바에 따라 인체적용시험을 완료한 연구대상자(PP; per protocol 분석군)의 데이터를 이용하여 분석하였다. 시험용제품에 대한 순응도가 세 섭취군 간 동질하지 않았고, 신체활동 정도가 골대사에 영향을 미치는 것으로 알려져 있어 유효성 평가항목을 순응도와 신체활동 정도(MET value)로 보정하여 추가 분석하였다.

(가) 1차 유효성 평가

1차 유효성 평가 항목으로 골형성 지표인 osteocalcin (OC)와 골흡수 지표인 deoxypyridinoline (DPD)를 측정하였다. 분석 결과, OC 와 DPD/OC에서 세 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었으며($p=0.001$, $p=0.046$), 순응도와 신체활동 정도 보정 후 분석 시에도 OC 와 DPD/OC 비율에서 세 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p<.001$, $p=0.027$). 사후검정 결과, 인삼추출물 3 g 군의 OC 증가 정도가 인삼추출물 1 g 군과 플라세보군의 OC 증가 정도보다 크고, 인삼추출물 3 g 군의 DPD/OC 감소 정도가 플라세보군의 DPD/OC 감소 정도보다 커서 섭취군 간 유의한 차이가 있었다.

표 10. 1차 유효성 평가항목 변화

	GE 1 g 군(n=28)				GE 3 g 군(n=30)				플라세보군(n=27)					
	0 w	12 w	Diff	p -value ¹⁾	0 w	12 w	Diff	p -value ¹⁾	0 w	12 w	Diff	p -value ¹⁾	p -value ²⁾	p -value ³⁾
Osteocalcin (ng/mL)	21.30 ±5.72	22.05 ±5.77	0.74 ±4.97 ^{ab}	0.436	18.93 ±3.72	23.45 ±5.81	4.52 ±4.42 ^a	<.0001* **	21.11 ±6.34	21.50 ±8.16	0.39 ±4.31 ^a	0.643	0.001**	<.001***
DPD (nM)	7.43	6.86	-0.58	0.061	7.33	7.23	-0.11	0.722	8.29	7.85	-0.44	0.166	0.510	0.564
DPD/mM crea)	±1.33	±1.42	±1.57		±1.52	±2.04	±1.61		±4.74	±5.53	±1.59			
DPD/OC ratio	0.37 ±0.10	0.33 ±0.12	-0.04 ±0.10 ^{ab}	0.057	0.40 ±0.09	0.32 ±0.08	-0.08 ±0.05 ^a	<.0001* **	0.42 ±0.26	0.41 ±0.37	-0.01 ±0.15 ^b	0.772	0.046*	0.027*

Values are presented as mean±SD, 1)Analyzed by paired t -test, 2)Analyzed by linear mixed model, 3)Analyzed by RM-ANCOVA after adjustment for the effects of compliance and MET value, Different letters indicate statistically significant differences between groups. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

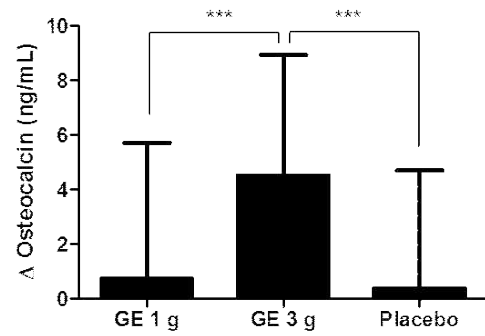


그림 13. 섭취 전 · 12주 후 OC 변화

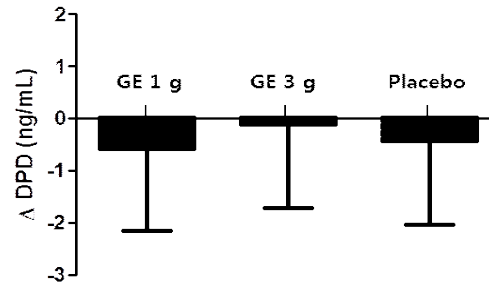


그림 14. 섭취 전 · 12주 후 DPD 변화

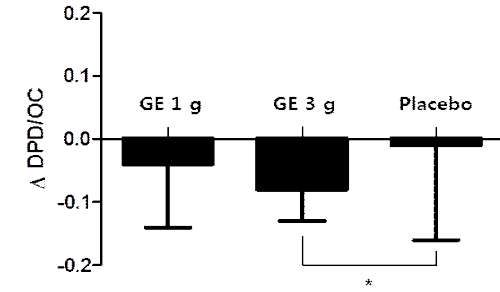


그림 15. 섭취 전 · 12주 후 DPD/OC 변화

GE 1 g: 인삼추출물 1 g 군, GE 3 g: 인삼추출물 3 g, * $p<.05$, *** $p<.001$

(나) 2차 유효성 평가

2차 유효성 평가 항목으로 골흡수 지표인 CTX와 NTX, 골형성 지표인 BSALP와 P1NP, 뼈 구성 성분인 혈중 Ca과 P을 측정하였고, 관절 통증 정도를 확인하기 위하여 설문조사를 통해 무릎관절염증상지표인 WOMAC index를 조사하였다. 분석 결과, 혈중 Ca, WOMAC index 중 통증 3(밤에 잠을 잘 때, 수면을 방해하는 무릎 통증), 뻣뻣함 2(오후에 앉거나, 눕거나, 쉬고 난 후 관절의 뻣뻣함) 항목에서 세 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.034$, $p=0.037$, $p=0.016$). 순응도와 신체활동 정도 보정 후 분석 시에는 혈중 Ca, WOMAC index 중 뻣뻣함 2 항목에서 세 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.017$, $p=0.011$). 사후검정 결과, Ca 은 인삼추출물 1 g 군에서 감소, 인삼추출물 3 g 군에서 증가함. WOMAC index 중 통증 3 항목은 인삼추출물 3 g 군이 플라세보군에 개선되었고, 뻣뻣함 2 항목은 인삼추출물 3 g 군이 1 g 군에 비해 개선되어 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다.

표 11. 2차 유효성 평가항목 변화

	GE 1 g 군(n=28)				GE 3 g 군(n=30)				플라세보군(n=27)					
	0 w	12 w	Diff	P -value ¹⁾	0 w	12 w	Diff	P -value ¹⁾	0 w	12 w	Diff	P -value ¹⁾	P -value ²⁾	P -value ³⁾
CTX	0.48	0.48	0.00	0.802	0.49	0.49	0.00	0.961	0.45	0.47	0.02	0.411	0.683	0.918
(ng/mL)	±0.11	±0.12	±0.08		±0.16	±0.14	±0.10		±0.16	±0.17	±0.11			
NTX	15.58	15.40	-0.17	0.580	15.95	15.39	-0.56	0.170	15.93	15.83	-0.09	0.837	0.664	0.757
(ng/mL)	±2.88	±2.58	±1.63		±4.05	±3.74	±2.17		±4.03	±4.42	±2.37			
Ca	9.45	9.42	-0.03	0.679	9.35	9.53	0.18	<.001** *	9.33	9.38	0.06	0.335	0.034*	0.017*
(mg/dL)	±0.36	±0.28	±0.36 ^a		±0.27	±0.32	±0.24 ^b		±0.25	±0.25	±0.29 ^{ab}			
P	3.67	3.68	0.00	0.964	3.81	3.72	-0.08	0.221	3.72	3.81	0.09	0.274	0.263	0.173
(mg/dL)	±0.35	±0.37	±0.41		±0.33	±0.39	±0.36		±0.49	±0.51	±0.43			
BSALP	16.59	16.31	-0.28	0.719	15.91	15.07	-0.84	0.071	17.23	17.07	-0.16	0.771	0.689	0.720
(µg/L)	±5.06	±3.67	±4.05		±3.56	±3.63	±2.46		±5.93	±5.84	±2.87			
P1NP	61.23	58.46	-2.77	0.036*	59.10	59.01	-0.09	0.947	58.18	61.29	3.11	0.256	0.087	0.170

(pg/mL)	±13.69	±12.98	±6.63 ^a		±14.97	±16.15	±7.31 ^{ab}		±15.98	±21.89	±13.91				
WOMAC index															
통증	Q1	0.36	0.57	0.21	0.136	0.50	0.40	-0.10	0.448	0.22	0.26	0.04	0.713	0.205	0.184
		±0.68	±0.96	±0.74		±0.68	±0.56	±0.71		±0.42	±0.53	±0.52			
	Q2	0.50	0.68	0.18	0.170	0.87	0.77	-0.10	0.558	0.48	0.63	0.15	0.256	0.319	0.248
		±0.69	±0.77	±0.67		±1.01	±0.73	±0.92		±0.51	±0.63	±0.66			
	Q3	0.18	0.21	0.04	0.746	0.57	0.30	-0.27	0.147	0.11	0.33	0.22	0.011*	0.037*	0.122
		±0.39	±0.57	±0.58 ^{ab}		±0.97	±0.65	±0.98 ^a		±0.42	±0.62	±0.42 ^b			
	Q4	0.18	0.36	0.18	0.096	0.33	0.30	-0.03	0.832	0.30	0.37	0.07	0.537	0.507	0.459
		±0.39	±0.62	±0.55		±0.76	±0.47	±0.85		±0.61	±0.69	±0.62			
	Q5	0.18	0.29	0.11	0.264	0.33	0.40	0.07	0.625	0.19	0.37	0.19	0.202	0.796	0.740
		±0.39	±0.60	±0.50		±0.66	±0.62	±0.74		±0.48	±0.69	±0.74			
관절의 땀땀함	Q1	0.46	0.64	0.18	0.134	0.73	0.60	-0.13	0.475	0.33	0.44	0.11	0.376	0.283	0.249
		±0.74	±0.78	±0.61		±0.78	±0.81	±1.01		±0.55	±0.75	±0.64			
	Q2	0.46	0.64	0.18	0.259	1.03	0.63	-0.40	0.008**	0.48	0.52	0.04	0.802	0.016*	0.011*
		±0.69	±0.91	±0.82 ^a		±0.81	±0.72	±0.77 ^b		±0.70	±0.70	±0.76 ^a			
신체적 기능	Q1	0.64	0.75	0.11	0.477	0.67	0.73	0.07	0.690	0.59	0.52	-0.07	0.537	0.669	0.892
		±0.91	±0.93	±0.79		±0.88	±0.87	±0.91		±0.64	±0.58	±0.62			
	Q2	0.68	0.68	0.00	>.999	0.77	0.63	-0.13	0.293	0.52	0.59	0.07	0.537	0.482	0.296
		±0.82	±0.82	±0.67		±0.86	±0.76	±0.68		±0.58	±0.64	±0.62			
	Q3	0.39	0.61	0.21	0.161	0.77	0.67	-0.10	0.610	0.33	0.63	0.30	0.058	0.209	0.320
		±0.79	±0.83	±0.79		±0.86	±0.80	±1.06		±0.55	±0.79	±0.78			
	Q4	0.46	0.50	0.04	0.746	0.57	0.53	-0.03	0.865	0.37	0.41	0.04	0.802	0.934	0.801
		±0.74	±0.69	±0.58		±0.73	±0.86	±1.07		±0.56	±0.75	±0.76			

Q5	0.54 ±0.74	0.46 ±0.58	-0.07 ±0.81	0.646	0.63 ±0.85	0.53 ±0.68	-0.10 ±0.99	0.586	0.30 ±0.67	0.37 ±0.79	0.07 ±0.92	0.678	0.749	0.687
Q6	0.43 ±0.74	0.50 ±0.75	0.07 ±0.72	0.602	0.67 ±0.88	0.47 ±0.73	-0.20 ±1.06	0.312	0.30 ±0.47	0.44 ±0.70	0.15 ±0.66	0.256	0.261	0.127
Q7	0.50 ±0.75	0.50 ±0.75	0.00 ±0.47	>.999	0.53 ±0.73	0.60 ±0.77	0.07 ±0.87	0.677	0.33 ±0.55	0.52 ±0.75	0.19 ±0.62	0.134	0.596	0.715
Q8	0.32 ±0.72	0.54 ±0.84	0.21 ±0.63	0.083	0.50 ±0.82	0.6 ±0.81	0.10 ±0.84	0.522	0.26 ±0.45	0.26 ±0.53	0.00 ±0.55	>.999	0.521	0.602
Q9	0.32 ±0.61	0.39 ±0.79	0.07 ±0.54	0.490	0.33 ±0.55	0.33 ±0.55	0.00 ±0.69	>.999	0.19 ±0.40	0.37 ±0.69	0.19 ±0.56	0.096	0.512	0.437
Q10	0.61 ±0.79	0.46 ±0.74	-0.14 ±0.65	0.255	0.63 ±0.76	0.53 ±0.57	-0.10 ±0.80	0.501	0.22 ±0.51	0.48 ±0.85	0.26 ±0.66	0.050	0.076	0.106
Q11	0.25 ±0.59	0.43 ±0.79	0.18 ±0.55	0.096	0.33 ±0.55	0.37 ±0.61	0.03 ±0.72	0.801	0.19 ±0.40	0.41 ±0.8	0.22 ±0.64	0.083	0.506	0.541
Q12	0.29 ±0.71	0.39 ±0.74	0.11 ±0.57	0.326	0.50 ±0.68	0.43 ±0.57	-0.07 ±0.78	0.645	0.15 ±0.36	0.37 ±0.79	0.22 ±0.64	0.083	0.269	0.212
Q13	0.29 ±0.60	0.39 ±0.69	0.11 ±0.50	0.264	0.43 ±0.77	0.43 ±0.73	0.00 ±0.98	>.999	0.30 ±0.47	0.41 ±0.75	0.11 ±0.58	0.327	0.804	0.751
Q14	0.32 ±0.55	0.43 ±0.79	0.11 ±0.69	0.415	0.53 ±0.86	0.57 ±0.86	0.03 ±0.93	0.845	0.22 ±0.51	0.44 ±0.64	0.22 ±0.58	0.056	0.637	0.699
Q15	0.32 ±0.61	0.36 ±0.68	0.04 ±0.64	0.769	0.27 ±0.52	0.33 ±0.76	0.07 ±0.87	0.677	0.26 ±0.53	0.48 ±0.75	0.22 ±0.80	0.161	0.636	0.810
Q16	1.04 ±0.92	1.04 ±0.96	0.00 ±0.82	>.999	1.23 ±0.94	1.20 ±0.76	-0.03 ±1.03	0.861	0.70 ±0.91	0.96 ±0.94	0.26 ±0.81	0.110	0.418	0.567
Q17	0.82 ±0.82	0.68 ±0.67	-0.14 ±0.97	0.443	0.97 ±0.89	0.77 ±0.86	-0.20 ±0.76	0.161	0.67 ±0.83	0.63 ±0.74	-0.04 ±0.85	0.824	0.773	0.730

총 점	10.54	12.50	1.96	0.202	14.70	13.13	-1.57	0.505	8.00	11.22	3.22	0.102	0.202	0.162
	±12.75	±13.91	±7.96		±12.63	±12.14	±12.71		±9.12	±13.69	±9.88			

Values are presented as mean±SD, ¹⁾Analyzed by paired *t*-test, ²⁾Analyzed by linear mixed model, ³⁾Analyzed by linear mixed model after adjustment for the effects of compliance and MET value, Different letters indicate statistically significant differences between groups.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

▶ WOMAC Index

• 무릎관절 통증

- Q1 계단을 내려갈 때
- Q2 계단을 오르내릴 때
- Q3 밤에 잠을 잘 때, 수면을 방해하는 통증
- Q4 (의자에) 앉아있을 때 혹은 누워있을 때
- Q5 똑바로 서 있을 때

• 관절의 뻣뻣함

- Q1 아침에 막 잠에서 깼을 때
- Q2 오후에 (의자에) 앉거나, 눕거나, 쉬고 난 후에

• 신체적 기능

- Q1 계단을 내려갈 때
- Q2 계단을 올라갈 때
- Q3 (의자에) 앉아있다가 일어설 때
- Q4 서 있을 때
- Q5 바닥으로 몸을 구부릴 때
- Q6 평지를 걸을 때
- Q7 승용차나 버스를 타거나 내릴 때
- Q8 시장을 보러 갈 때
- Q9 양말이나 스타킹을 벗을 때
- Q10 이부자리에 누울 때
- Q11 양말이나 스타킹을 벗을 때
- Q12 이부자리에 누울 때
- Q13 욕조에 들어가고 나올 때
- Q14 (의자에) 앉아 있을 때
- Q15 양변기에 앉거나 일어설 때
- Q16 힘든 집안 일을 할 때
- Q17 가벼운 집안 일을 할 때

(6) 안전성 평가

안전성 평가는 인체적용시험에 참여하여 최소한 1회 이상 인체적용시험용제품을 섭취한 연구대상자(Safety 분석군)의 데이터를 이용하여 분석하였다.

(가) 이상반응 발생

인체적용시험용제품을 섭취한 90명의 연구대상자 중 시험기간 동안 14명의 연구대상자에서 총 15건의 경도 또는 중등도의 이상반응이 발생하였으며, 중대한 이상반응은 없었다. 발생한 이상반응은 두드러기 1건, 두통 1건, 소화불량 1건, 피부발진 1건, 감기 8건, 복부불편감 1건, 현기증 1건, 소화불량 1건이었다. 분석 결과, 세 섭취군 간 이상반응 발생에 유의한 차이가 없었으며, 이상반응과 인체적용시험용제품의 섭취 사이에 인과관계가 없다고 판단하였다.

표 12. 이상반응 발생

	GE 1 g 군(n=30)	GE 3 g 군(n=30)	플라세보군(n=30)	p-value ¹⁾
이상반응 발생(y/n)	4/26	3/27	7/23	0.439

¹⁾Analyzed by Fisher's exact test

(나) 진단검사의학검사 결과

분석 결과, 모든 항목에서 세 섭취군 간 통계적·임상적으로 유의한 차이 또는 변화가 없었다.

표 13. 진단검사의학검사 결과

	GE 1 g 군(n=30)				GE 3 g 군(n=30)				플라세보군(n=30)				
	0 w	12 w	Diff	P -value ¹⁾	0 w	12 w	Diff	P -value ¹⁾	0 w	12 w	Diff	P -value ¹⁾	P -value ²⁾
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	5.30 ± 1.72	5.08 ± 1.42	-0.22 ± 1.28	0.368	5.07 ± 1.12	4.83 ± 1.04	-0.24 ± 0.74	0.091	4.94 ± 1.03	4.70 ± 0.83	-0.32 ± 0.63	0.021*	0.951
RBC ($\times 100^3/\mu\text{l}$)	4.35 ± 0.32	4.32 ± 0.34	-0.02 ± 0.19	0.555	4.41 ± 0.30	4.42 ± 0.29	0.01 ± 0.14	0.782	4.40 ± 0.33	4.41 ± 0.27	-0.01 ± 0.19	0.921	0.825
Hb (g/dL)	13.24 ± 0.89	13.09 ± 0.82	-0.12 ± 0.55	0.218	13.31 ± 0.76	13.30 ± 0.81	-0.01 ± 0.40	0.893	13.34 ± 0.86	13.38 ± 0.78	0.00 ± 0.52	0.964	0.539
Hct (%)	39.08 ± 2.37	39.52 ± 2.26	0.48 ± 1.71	0.149	39.37 ± 1.98	39.96 ± 2.11	0.60 ± 1.23	0.013*	39.59 ± 2.42	40.27 ± 2.13	0.54 ± 1.81	0.101	0.947
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	262.47 ± 46.60	266.03 ± 44.10	2.93 ± 26.10	0.535	255.57 ± 51.49	263.27 ± 55.09	7.70 ± 29.98	0.170	249.43 ± 54.92	255.81 ± 61.72	4.85 ± 24.36	0.295	0.800
ALP (IU/L)	79.73 ± 14.95	81.24 ± 16.22	1.07 ± 6.63	0.375	75.33 ± 16.45	78.43 ± 16.67	3.10 ± 10.06	0.102	86.63 ± 21.45	86.19 ± 19.53	-0.52 ± 9.28	0.776	0.302
GGT (IU/L)	18.90 ± 10.91	20.24 ± 13.37	1.28 ± 6.74	0.312	18.23 ± 10.96	17.53 ± 10.92	-0.70 ± 6.45	0.557	19.47 ± 9.99	19.07 ± 11.80	-0.81 ± 5.40	0.468	0.372
AST (IU/L)	23.77 ± 4.97	23.34 ± 5.72	-0.62 ± 6.25	0.678	24.00 ± 4.90	22.67 ± 3.30	-1.33 ± 4.30	0.100	24.07 ± 4.98	24.85 ± 5.16	1.56 ± 5.63	0.378	0.258
ALT (IU/L)	24.50 ± 10.46	23.45 ± 12.41	-1.10 ± 10.24	0.571	23.97 ± 10.10	21.60 ± 4.87	-2.37 ± 8.40	0.134	23.40 ± 8.14	23.70 ± 7.52	1.19 ± 7.37	0.591	0.400

Total cholesterol (mg/dL)	205.87 ±25.38	211.21 ±25.09	4.76 ±20.39	0.200	199.97 ±33.52	210.53 ±37.41	10.57 ±27.41	0.044*	209.97 ±34.30	211.70 ±38.29	-0.74 ±17.75	0.898	0.198
Triglyceride (mg/dL)	121.40 ±36.57	137.69 ±77.78	15.72 ±65.16	0.191	129.97 ±73.85	110.93 ±45.23	-19.03 ±58.01	0.083	122.47 ±79.64	119.67 ±70.16	-6.81 ±45.55	0.492	0.065
HDL-C (mg/dL)	55.70 ±13.38	56.86 ±14.95	0.79 ±6.85	0.516	52.27 ±11.40	54.00 ±11.10	1.73 ±7.52	0.217	58.90 ±15.70	58.41 ±15.01	-1.19 ±6.69	0.391	0.309
LDL-C (mg/dL)	125.89 ±25.56	126.81 ±25.02	0.82 ±21.69	0.832	121.71 ±30.86	134.35 ±33.30	12.64 ±23.22	0.006**	126.57 ±27.86	129.36 ±30.71	1.81 ±13.30	0.460	0.050
Glucose (mg/dL)	85.43 ±6.94	85.69 ±8.50	0.48 ±8.32	0.820	84.80 ±6.39	85.50 ±7.44	0.70 ±7.23	0.600	87.00 ±7.94	85.22 ±7.56	-2.19 ±7.67	0.180	0.370
Total bilirubin (mg/dL)	0.81 ±0.25	0.77 ±0.17	-0.04 ±0.18	0.227	0.74 ±0.17	0.71 ±0.15	-0.03 ±0.12	0.177	0.82 ±0.28	0.80 ±0.16	-0.05 ±0.25	0.457	0.973
Total protein (g/dL)	7.26 ±0.3	7.38 ±0.28	0.12 ±0.30	0.034*	7.30 ±0.22	7.51 ±0.26	0.21 ±0.22	<.0001 ***	7.22 ±0.34	7.33 ±0.39	0.11 ±0.30	0.069	0.324
Albumin (g/dL)	4.29 ±0.18	4.29 ±0.14	0.00 ±0.18	0.912	4.36 ±0.18	4.36 ±0.18	0.00 ±0.16	0.908	4.32 ±0.18	4.31 ±0.17	-0.01 ±0.16	0.701	0.977
BUN (mg/dL)	13.87 ±2.71	14.90 ±3.95	1.00 ±3.58	0.133	14.07 ±2.92	14.33 ±3.02	0.27 ±3.27	0.658	13.83 ±3.96	13.70 ±2.76	-0.19 ±2.97	0.772	0.394
Creatinine (mg/dL)	0.60 ±0.09	0.58 ±0.08	-0.02 ±0.07	0.193	0.56 ±0.10	0.55 ±0.09	-0.01 ±0.07	0.500	0.56 ±0.08	0.55 ±0.09	-0.01 ±0.08	0.378	0.918
CK (IU/L)	86.07 ±29.90	103.59 ±58.95	16.45 ±44.37	0.048*	96.23 ±49.60	102.70 ±50.97	6.47 ±36.70	0.342	91.70 ±37.95	128.00 ±91.64	35.93 ±99.69	0.056	0.217
LDH (IU/L)	9.79 ±23.86	6.66 ±6.34	-3.30 ±25.24	0.003**	6.18 ±2.92	5.64 ±1.85	-0.54 ±2.32	0.132	8.11 ±12.18	13.65 ±32.07	5.28 ±35.36	0.080	0.838

Estradiol	83.46	78.55	-5.07	0.503	79.99	76.63	-3.35	0.212	83.67	79.61	-4.37	0.396	0.386
(pg/mL)	±32.65	±23.98	±20.80		±27.59	±26.90	±9.83		±29.94	±32.26	±19.75		
FSH	374.50	395.03	20.41	0.202	391.10	406.97	15.87	0.072	392.03	403.26	14.85	0.263	0.932
(mIU/mL)	±45.77	±50.78	±33.54		±51.84	±69.75	±55.99		±48.68	±52.03	±39.48		
SG	1.02	1.02	0.00	0.981	1.02	1.02	0.00	0.789	1.02	1.02	0.00	0.964	0.974
	±0.00	±0.01	±0.01		±0.00	±0.01	±0.01		±0.01	±0.01	±0.01		
pH	5.85	6.16	0.34	0.020*	5.93	5.97	0.03	0.839	6.27	6.33	0.07	0.702	0.369
	±0.80	±0.85	±0.72		±0.96	±0.92	±0.89		±0.80	±0.93	±0.95		

Values are presented as mean±SD, 1) Analyzed by paired *t*-test, 2) Analyzed by linear mixed model, Different letters indicate statistically significant differences between groups. **p*<0.05, ***p*<0.01

(다) 활력징후 측정 결과

분석 결과, 모든 항목에서 세 섭취군 간 통계적·임상적으로 유의한 차이 또는 변화가 없었다.

표 14. 활력징후(방문 별)

	인삼추출물 1 g 군(n=30)				인삼추출물 3 g 군(n=30)				플라세보군(n=30)				<i>P</i> -value ¹⁾
	0 w	6 w	12 w	<i>P</i> -value ¹⁾	0 w	6 w	12 w	<i>P</i> -value ¹⁾	0 w	6 w	12 w	<i>P</i> -value ¹⁾	
SBP (mmHg)	118.50 ±13.15	119.34 ±12.32	117.24 ±12.86	0.497	120.53 ±13.67	118.87 ±11.78	120.50 ±12.75	0.568	119.80 ±10.89	121.59 ±11.27	119.15 ±10.89	0.379	0.462
DBP (mmHg)	75.60 ±9.33	77.72 ±10.36	76.38 ±10.39	0.300	77.70 ±7.42	77.13 ±8.80	77.83 ±8.82	0.797	75.47 ±7.84	77.15 ±8.06	77.41 ±9.33	0.217	0.451
Pulse (BPM)	69.60 ±5.58	73.17 ±7.61	70.31 ±6.44	0.011*	72.03 ±6.73	73.20 ±9.80	70.23 ±7.96	0.179	70.40 ±9.51	72.63 ±8.99	69.52 ±8.60	0.144	0.717

Values are presented as mean±SD, ¹⁾Analyzed by linear mixed model

다. 결론

본 인체적용시험을 통해 골감소증이 있는 여성이 인삼추출물 3 g/일 섭취 시 OC 와 같은 골형성 지표, DPD/OC 수치와 일부 무릎 관절염 증상이 의미 있게 개선됨을 관찰하여 인삼추출물 3 g 섭취가 골대사 개선에 효과적이었음을 확인할 수 있었다. 또한 본 시험이 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 인삼추출물 섭취가 인체에 안전하다고 판단하였다.

※ 별첨 8. 인체적용시험 결과보고서

2. 인삼의 뼈 건강 개선 기능성 원료 인정 자료 확보

가. 건강기능식품 개발 기술컨설팅

건강기능식품 개발 연구의 원활한 진행을 위해 외부 위탁 기관(CRO; (주)헬스케어크레임스)에서 건강기능식품 개발 기술컨설팅을 진행하였다. 연구진에게 식약처 기능성 원료 및 기준 규격 인정에 관한 규정을 안내하였고, 연구 단계 별로 연구자 협의 등을 통해 진행 현황 파악 및 진행시 문제점을 파악한 후 대책 방안 논의하였다. 또한 기능성 소재에 대한 연구결과 활용도를 높이고, 개발품목에 대한 성공 가능성을 높이기 위해 기술컨설팅 진행하고 컨설팅 결과 반영하여 연구 계획에 대한 의견을 제시하였다.



그림 16. 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정



그림 17. 기능성평가 가이드라인

〈뼈 건강 기능성 확인을 위한 바이오마커〉				
기전	바이오마커	측정가능 한 연구유형		
		In vitro	In vivo	Human
골흡수	Urinary deoxypyridinoline, pyridinoline		○	○
	Serum tartrate-resistant acid phosphatase		○	○
	Urinary type 1 collagen cross-linked telopeptide (NTX, CTX)		○	○
	Urinary pyridinium cross-links		○	○
	Urinary hydroxyproline		○	○
	Urinary hydroxylysine glycosides		○	○
골형성	Serum osteocalcin		○	○
	Serum total alkaline phosphatase		○	○
	Serum Bone alkaline phosphatase	○	○	○
	Serum Type 1 procollagen peptide		○	○

그림 18. 기전별 바이오마커

나. 기능성소재 관련 자료 수집/정리

인삼추출물의 개별인정 등록 서류 준비를 위해 소재 관련 자료를 수집 및 정리하였다. 선행연구 조사를 통해 기능성 및 안전성자료를 확보하였고 인삼 소재의 관련 논문자료 및 섭취근거 자료를 수집하였으며, 인삼 지표성분의 기능성 및 안전성 자료를 수집하고 인삼 및 표준화 자료를 검토 및 수정하였다.

표 15. 원재료 기원에 관한 정보

원재료명	인삼	비고(참고)
학명	Panax ginseng C.A Meyer PanaxschinsengNees(이명)	http://www.foodsafetykorea.go.kr/
이명	Ginseng, 백삼, 홍삼, 야산삼, 별직삼, 귀개, 토정, 신초, 혈삼, 장뇌삼, 산양삼 등	
생약명	인삼(人參, Ginseng Radix Alba)	
원재료분류	식물	
식품원료 사용가능부위	잎/뿌리/조식배양삼/열매/씨	

표 16. 유사원료의 인정 및 허가 현황

구분	원료명	기능성내용	일일섭취량	기능(지표)성분	인정번호	업체명
인삼	고시형	인삼	면역력 증진·피로 개선에 도움을 줄 수 있음	진세노사이드Rg1과 Rb1의 합계로서 3~80 mg	진세노사이드Rg1과 Rb1을 합하여 0.8~34 mg/g	-
	개별 인정형	인삼가수분해농축액	혈당 조절에 도움을 줄 수 있음(기타기능II)	인삼가수분해농축액으로서 960 mg/일	Ginsenoside Rg1	제2011-2호 ("11.10.11) (주)일화
		인삼다당체추출물	면역기능 증진에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	인삼다당체추출물로서 6 g/일	-	제2015-11호 (2015.4.6) (주)헬스바 이오메드
		인삼가시오갈피등 혼합추출물	기억력 개선에 도움을 줄 수 있으나 인체시험을 통한 확인이 필요함(기타기능 III)	인삼가시오갈피등 혼합추출물로서 5.2 g/day	① Ligustilide ② Eleutheroside E ③ Ginsenoside Rg1과 Rb1의 합 ④ Baicalin	제2009-79호 ("09.10.15) (주)뉴메드
홍삼	고시형	홍삼	면역력 증진, 피로 개선, 혈소판 응집 억제 등을 통한 혈액 흐름, 기억력 개선, 항산화에 도움을 줄 수 있음	(가) 면역력 증진, 피로 개선에 도움을 줄 수 있음: 진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합계로서 3~80 mg (나) 혈소판 응집 억제 등을 통한 혈액 흐름, 기억력 개선, 항산화에 도움을 줄 수 있음: 진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합계로서 2.4~80 mg	진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합	-
	개별 인정형	홍삼	갱년기여성의 건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합계로서 25~80 mg/일	-	제2014-15호 (2014.4.23) (주)한국인삼공사
		홍삼, 사상자, 산수유 복합추출물	햇볕 또는 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강을 유지하는데 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	복합추출물로서 3 g/일	-	제2008-67호 (2008.11.04) (주)한국인삼공사

표 17. 뼈 건강 관련 인정 현황

원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
대두 이소플라본 (고시된 원료로 전환)	제2008-20호	생리활성 기능 2등급	Daidzin, Genistin, Glycitin의 합	이소플라본 비배당체로 서 24~25.5 mg/일	① 섭취대상자는 폐경기 여성 ② 임신부, 수유여성, 영 유아, 어린이 섭취 삼가
	제2008-25호		Daidzein, Genistein의 합	이소플라본 비배당체로 서 25 mg/일	③ 대두이소플라본에 민 감한 사람 섭취 삼가 ④ 갑상선, 유방암, 자궁 내막 암, 방광암 환자 등은 섭취를 삼가
	제2008-27호		Daidzin, Genistin, Glycitin의 합	이소플라본 비배당체로 서 25~27 mg/일	① 섭취대상자는 폐경기 여성임
	제2008-28호		Daidzein, Genistein의 합		② 임신부, 수유여성, 영 유아, 어린이 섭취 삼 가
	제2008-29호		Daidzin, Genistin, Glycitin의 합	이소플라본 비배당체로 서 25~26 mg/일	③ 대두이소플라본에 민 감한 사람 섭취 삼가 ④ 갑상선, 유방암, 자궁 내막 암, 방광암 환자 등은 섭취를 삼가
	제2008-72호		Daidzin, Genistin, Glycitin의 합		
	제2008-73호		Daidzin, Genistin, Glycitin의 합	이소플라본 배당체로서 5~27 mg/일	① 섭취대상자는 폐경기 여성 ② 영유아, 어린이, 임신 부, 수유여성은 섭취 주의 ③ 대두 알러지가 있는 분 섭취 주의 ④ 갑상선, 유방암, 자궁 내막 암, 방광암 환자 등은 전문가 상담 필요
	제2008-77호				① 섭취대상자는 폐경기 여성
	제2008-80호	생리활성 기능 2등급	Daidzin, Genistin, Glycitin의 합	이소플라본 비배당체 로서 25 mg/일	② 임신부와 수유여성은 섭취를 삼가 ③ 영유아, 어린이는 섭 취를 삼가

	제2009-11호			이소플라본 비배당체 로서 25~27 mg/일	④ 대두이소플라본에 민감한 사람 섭취 삼가 ⑤ 갑상선, 유방암, 자궁내막 암, 방광암 환자 등은 섭취를 삼가
	제2009-13호				
	제2009-26호				
	제2009-27호				
	제2009-44호			이소플라본 비배당체 로서 25 mg/일	
흑효모배양 액분말	제2011-2호	생리활성 기능 3등급	β -Glucan	흑효모배양 액분말로서 150 mg/일	-
가시오가피 숙지황 복합추출물	제2013-14호	생리활성 기능 2등급	① 가시오갈피 : Eleutheroside E ② 숙지황 : tachyose	가시오가피 숙지황복합 추출물로서 800 mg/일	① 영 · 유아, 임산부, 수유부 섭취 주의 ② 알레르기 체질이거나 특정질환자 섭취 주의

다. 식약처 개별인정형 원료 등록 서류 신청

선행 연구 자료와 인체적용시험 결과를 바탕으로 건강기능식품 원료 개별인정을 받을 수 있도록 제출자료를 준비하였다. 제출자료는 건강기능식품에 관한 법률에 따라 건강기능식품 기능성 원료 및 기준 규격의 인정에 필요한 제출자료 목록에 맞추어 준비하였다.

표 18. 제출 자료의 범위

1. 제출자료 전체의 총괄 요약본	
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료	
2.1	기원
2.2	개발경위
2.3	국내·외 인정·허가 현황
2.4	국내·외 사용 현황
3. 제조방법 및 그에 관한 자료	
3.1	제조공정표
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화
3.5	주요공정별 수율 변화
4. 원료의 특성에 관한 자료	
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거

4.3	영양성분정보자료								
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료									
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거 ※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서								
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도,구조동정,유효기간 등 정보 추가)								
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법 자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)								
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료									
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거 ※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함								
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료								
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등) ※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함								
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법								
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 :)									
7.1	섭취근거 정보								
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보								
7.3	섭취량 평가 정보								
7.4	영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보								
7.5	<table border="1"> <tr> <td>독성시험</td><td>단회투여독성시험</td></tr> <tr> <td>* GLP기관</td><td>3개월 반복투여독성시험</td></tr> <tr> <td>확인 여부</td><td>유전독성시험</td></tr> <tr> <td></td><td>특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)</td></tr> </table>	독성시험	단회투여독성시험	* GLP기관	3개월 반복투여독성시험	확인 여부	유전독성시험		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)
독성시험	단회투여독성시험								
* GLP기관	3개월 반복투여독성시험								
확인 여부	유전독성시험								
	특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)								
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료									
8.1	<table border="1"> <tr> <td>시험관시험</td><td><input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :</td></tr> <tr> <td></td><td><input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)</td></tr> </table>	시험관시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)				
시험관시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :								
	<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)								
8.2	<table border="1"> <tr> <td>동물시험</td><td><input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :</td></tr> <tr> <td></td><td><input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)</td></tr> </table>	동물시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)				
동물시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :								
	<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)								
8.3	<table border="1"> <tr> <td>인체적용시험</td><td><input type="checkbox"/> 신청원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편) *인체적용시험기관 :</td></tr> <tr> <td></td><td><input type="checkbox"/> 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)</td></tr> </table>	인체적용시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편) *인체적용시험기관 :		<input type="checkbox"/> 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)				
인체적용시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편) *인체적용시험기관 :								
	<input type="checkbox"/> 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)								
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료									
9.1	섭취량 및 근거								
9.2	섭취방법 및 근거								
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거								
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료									
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부								
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부								

표 19. 제출자료의 총괄 요약본

항 목	주요 내용
1. 원료명	인삼추출물
2. 원재료	인삼 (학명: Panac ginseng C.A.Meyer, 이명 : 수삼(水蔘), 백삼(白蔘), 홍삼(紅蔘), 흑삼, 야산삼(野山蔘), 별직삼(別直蔘), Ginseng, Korean ginseng, 사용부위 : 뿌리)
3.기능 (지표)성분	지표성분: 진세노사이드 Rg1과 Rb1(Ginsenoside Rg1과 Rb1)

4. 제조 공정	원재료 → 열수추출 → 진공농축 → 열수추출 → 진공농축 → 열수추출 → 진공농축 → 동결건조 → 분쇄 → 신청 원료	
5. 규격 및 시험방법	1) 성상 : 열은 갈색의 분말 2) 지표성분 : 진세노사이드 Rg1과 Rb1(Ginsenoside Rg1과 Rb1): 9.58 mg/g 3) 납(mg/kg) : 1.0 이하 4) 총비소(mg/kg) : 1.0 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 0.5 이하 6) 총수은(mg/kg) : 0.5 이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능(지표)성분 시험법	◦ 진세노사이드 분석법 공인시험방법
	규격외 (잔류농약)	◦ 「식품의 기준 및 규격」에 따라 58종의 잔류농약에 대하여 국내 식품위생검사기관인 한국기능식품연구원에서 시험분석
6. 안전성	의사결정도	◦ 섭취경험이 있는 인삼을 물을 이용한 단순추출에 의해 얻어진 것이므로 의사결정도 ‘다’에 해당
	섭취 근거	<인정현황> ◦ 국내: 식품공전상 식품에 사용할 수 있는 원료의 목록에 등재(뿌리, 잎, 열매, 씨앗), 식품원재료 DB검색결과 ‘인삼’으로 식용 가능한 것으로 등재, 유사원료 건강기능식품 기능성원료 인정 ◦ 국외 : 식품 원료로 널리 사용됨 <사용현황> ◦ 국내: 함유 식품 유통 ◦ 국외: 함유 식품 유통
	안전성 정보	◦ 안전성 정보 DB : 독성에 관한 정보 없음 ◦ 섭취시 주의사항: 인삼의 섭취로 두통, 불면, 가슴 두근거림, 혈압 상승의 부작용이 나타날 수 있으며 땀이 나지 않고 배변이 불편하고 열이 많은 사람이나, 염증 등으로 인한 고열이 있을 때에는 일반적으로 인삼을 기피하도록 하고 있습니다. 또한, 수축기 혈압 180 mmHg 이상의 고혈압이 있는 경우 인삼의 섭취를 금하는 것을 권장
	섭취량 평가	◦ 신청원료의 섭취량: 신청원료로서 3 g/일 ◦ 인삼은 예로부터 한방에서 널리 사용되어온 식물로 약용, 식용 등으로 널리 이용되고 있으며, 식품 공전의 원재료로 등재되어 있고, 심각한 독성은 보고되지 않았다. 또한 면역력 증진 • 피로개선 등의 기능성이 인정되어 있다(Rg1과 Rb1 합계로서 3~80 mg). 또한 해당 원료인 인삼추출물 등 다양한 형태로 제품이 유통 • 판매되고 있으며, 특징적인 부작용이 발생하지 않을 것으로 생각되어 진다. ◦ ‘대한약전’에는 정확한 복용량 기준이 명기되어 있지 않지만 생약 규격집 해설에 따르면 하루 인삼 1.5~10 g, 많을 경우 30 g까지 복용한다고 되어 있음 ◦ ‘동의보감’, ‘방약합편’, ‘의문보감’, ‘제중신론’ 등 조선시대 한방의

		<p>서에 수록된 인삼 함유 처방 가운데 인삼의 평균 배합량 분포는 1첩 기준 9~11분(푼, 分)으로 3~4 g이므로 하루에 두 첩을 복용할 경우 인삼 복용량은 6~8 g, 또한 ‘동의보감’에서는 원기가 약해 기력이 없는 경우 인삼 달인 물을 하루에 5~6숟가락씩 복용한다고 되어 있는데, 한 숟가락을 4 g으로 하면 하루 양은 20~24 g에 해당</p> <p>◦ 인삼은 식약처의 기능성 원료 고시형으로 등재되어 있으며(일일 섭취량: 진세노사이드 Rg1 과 Rb1의 합계로서 3~80 mg, 지표성분: 진세노사이드 Rg1과 Rb1을 합하여 0.8~34 mg, 기능성내용: 면역력 증진 • 피로 개선에 도움을 줄 수 있음), 개별인정형 제품은 인삼가수 분해농축액 섭취량 960 mg/day(혈당 조절에 도움을 줄 수 있음, 생리활성기능 2등급), 인삼다당체추출물 섭취량 6 g/day(면역기능 증진에 도움을 줄 수 있음, 생리활성기능 2등급), 인삼, 가시오갈피 등 혼합추출물 섭취량 5.2 g/day(기억력 개선에 도움을 줄 수 있으나 인체적용시험을 통한 확인이 필요함, 생리활성기능 3등급)으로 인정</p> <p>◦ 당해원료로 수행한 비임상시험에서, ovariectomy 시술하여 골다공증 유도한 동물모델을 이용하여 인삼추출물을 8주, 12주 경구투여한 결과 대퇴골 골밀도 및 골질량을 비롯한 뼈 관련 바이오마커가 인삼추출물 300 mg/kg과 500 mg/kg를 투여한 쥐에서 난소 적출군에 비하여 유의하게 개선되는 경향을 보였으며, 100 mg/kg에서도 개선되는 경향을 보였다(인체환산시 약 1, 3 g/day).</p> <p>⇒ 인삼은 오래전부터 한방 및 민간에서 이용되어 왔으며 인삼은 식품공전상 식품에 사용할 수 있는 원료의 목록에 등재(뿌리, 잎, 열매, 씨앗)되어 있음. 현재 다양한 제품이 유통, 판매되고 있으며, 이에 관한 부작용은 보고되지 않아 특징적인 부작용이 발생하지 않을 것으로 예측됨. 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고(또는 3배 이내이고), 최대 안전섭취량, 일일허용 섭취량 이내임</p>							
	인체적용시험	◦ 특징적 부작용 확인되지 않음 (3 g/일 섭취 기준)							
	독성 시험	-							
	기타 사항	-							
	섭취시 주의사항	◦ 인삼의 섭취로 두통, 불면, 가슴 두근거림, 혈압상승의 부작용이 나타날 수 있으며 땀이 나지 않고 배변이 불편하고 열이 많은 사람이나, 염증 등으로 인한 고열이 있을 때에는 일반적으로 인삼을 기피하도록 하고 있습니다. 또한, 수축기 혈압 180 mmHg 이상의 고혈압이 있는 경우 인삼의 섭취를 금하는 것을 권장							
7. 기능성	신청 기능성	◦ 뼈 건강 개선							
	신청 일일섭취량	◦ 인삼추출물로서 3 g/일							
	시험관시험	<table><tr><th>시험물질</th><th>시험계</th><th>시험결과</th><th>비고</th></tr><tr><td>ginsenoside Rb1</td><td>Raw 264.7 cells</td><td>- Rb1은 세포독성 없이 RANKL 유래 osteoclast differentiation을 저해함. - Rb1은 RANKL 유래 TNFα mRNA</td><td>Food and Chemical Toxicology.</td></tr></table>	시험물질	시험계	시험결과	비고	ginsenoside Rb1	Raw 264.7 cells	- Rb1은 세포독성 없이 RANKL 유래 osteoclast differentiation을 저해함. - Rb1은 RANKL 유래 TNFα mRNA
시험물질	시험계	시험결과	비고						
ginsenoside Rb1	Raw 264.7 cells	- Rb1은 세포독성 없이 RANKL 유래 osteoclast differentiation을 저해함. - Rb1은 RANKL 유래 TNFα mRNA	Food and Chemical Toxicology.						

				<p>expression을 저해함.</p> <ul style="list-style-type: none">- Rb1은 RANKL 유래 c-Fos, NRATc1의 유전자 발현을 저해함.- Rb1은 RANKL 유래 nucleus translocation과 NF-KB를 저해함.- Rb1은 RANKL 유래 JNK, p38 phosphorylation을 저해함.	50, 1610-1615, 2012 (참고문헌 1)
	ginsenoside Rh2	Mouse bone marrow cell(obtained from femurs and tibiae of a 6-wk-old ICR mouse)		<ul style="list-style-type: none">- Rh2는 transcription factors, c-Fos, NFATc1의 발현 및 TRAP, OSCAR를 저해함.- Rh2는 p38과 JMK에 영향 없이 NF-KB activation과 ERK phosphorylation을 저해함.- Ph2는 BMD 회복 및 osteoclast differentiation 관련 marker를 회복시킴으로써 osteoporosis를 차단하는 것을 in vivo 시험을 통해 확인함.	Bone. 50, 1207-1213, 2012 (참고문헌 2)
	Panax notoginseng (PN)	Healthy human periodontal ligament tissue, Raw264.7 cells		<ul style="list-style-type: none">- PN의 butanol추출물(bPN)은 PDLFs의 cell proliferation을 증가시키고, MMP-2의 mRNA expression을 감소시킴.- bPN은 LPS-stimulated TRAP(+) multinucleated cells의 formatin을 저해함.- bPN은 JNK와 ERK signaling의 LPS-stimulated activation을 저해함.- bPN은 RAW264.7 cells의 IKB의 LPS-stimulated degradation을 저해함.- bPN은 MMP-9와 iNOS의 mRNA expression을 감소시킴.- iNOS의 저해로 인해 NO production 또한 감소.	Archives of Oral Biology. 56, 1319-1327, 2011 (참고문헌 3)
	Panax notoginseng Saponins (PNS)	Bone marrow stromal Cells		<ul style="list-style-type: none">- Cell proliferation, ALP activity, Alizarin red S staining, ALP의 mRNA level, Cbfa1, OC, BSP 유의하게 증가- Osterogenic induction동안 PPARγ2의 mRNA level과 protein expression 감소- PNS treatment의 효과는 용량의존적임.	J Ethnopharmacol. 134, 268-274, 2011 (참고문헌 4)
	Acidic Panax ginseng (APG)	bone marrow cell (BMs)		<ul style="list-style-type: none">- APG는 BM cell viability를 증가시킴.- APG 처리한 BM은 IL-12 생성을 증가시킴(not No).- Flow cytometric 분석 결과 APG 처리 후 BM은 형태가 변화함.- APG-treated BM은 CD4+T cell 분화를 증가시킴.- APG 처리 BM은 in vivo에서 radiation으로부터 protection 기능이 있음.	J. Vet. Sci. 8(1), 39-44, 2007 (참고문헌 5)

동물시험	시험물질	시험 동물	섭취량	바이오마커	결과	비고
	인삼 추출물	Ovariectomy 시술 하 여 골다공 증을 유 도 한 rat	100, 200, 300, 500 mg/kg	<ul style="list-style-type: none">- 대퇴골 골밀도 (Bone mineral density, BMD)- 골무기질량(bone mineral content, BMC)- 대퇴골 μ-CT 분석	<ul style="list-style-type: none">- 대퇴골 골밀도 및 골질량을 비롯한 뼈 관련 바이오마커가 인삼추출물 300 mg/kg 과 500 mg/kg를 투여한 쥐에서 난소 적출군에 비하여 유의하게 개선되는 경향을 보임.	자체수행결과
	인삼 복합물	OVX 동물모델 (SD rat)	300, 500, 1000 mg/kg/day	<ul style="list-style-type: none">- weight- Ca, P, alkaline phosphatase, T4, T3, estrogen, femoral trabecular bone surface, area, number, thickness, BMC, BMD, ALPase, TRAP staining, formation	<ul style="list-style-type: none">- femoral trabecular bone surface: OVX의해 다공질 / 침식 되었 으 나 , HER-S의해 개선- femoral trabecular bone area and number, 혈중 estrogen, Lumbar, femoral head BMC: OVX의해 감소 되었으나, HER-S (300 mg/kg)의해 유의적으로 개선(양성대조군과 유사한 수준으로 개선됨)	Immunopharmacology and Immunotoxicology. 30, 333-345, 2008 (참고문헌 6)

					- osteoclast (TRAP staining) formation: HER-S 처리 시 osteoclast number가 유의적으로 감소	
	삼칠삼 (PNS: Panax notoginseng saponin)	OVX 동물 모델 (SD rat)	75, 150, 300 mg/kg/day	- 체중 및 자궁무게 - BMD - BMC - S-Ca, S-P, ALP, OC, DPD - uCT: BV/TV, Tb.N, Tb.Sp, Tb.Th, Conn.D, SMI	- BMD of lumbar vertebrae and total femur: OVX의해 감소되었으나, PNS에 의해 유의적으로 개선(양성대조군과 유사한 수준으로 개선됨) - BMC of lumbar vertebrae, Microcomputed tomography analysis, ALP, DPD: PNS (300mg/kg)의해 유의적으로 개선(양성대조군과 유사한 수준으로 개선됨)	J Nat Med. 64, 336-345, 2010 (참고문헌 7)
	gensenoside(TR)	OVX 동물 모델 (Wistar rat)	10, 20, 40 mg/kg/day	- bone density: BMD of lumbar vertebra and tibia - bone tissue: tibia histological morphological data - Cell culture of osteoblasts: activity & number - ALP, cAMP	- BMD(lumbar vertebra and tibia):OVX의해 감소되었으나, E2와 TR의해 유의적으로 개선 - number of osteoblasts, ALP: E2와 TR의해 유의적으로 증가	Journal of Asian Natural Products Research. 8, 649-656, 2006 (참고문헌 8)
	인삼(PG)	OVX 동물 모델 (rat)	100, 200 mg/kg/day	BMD, OC, OP, TNF- α , IL-1 β , IL-6	- BMD: 인삼 200mg/kg 투여 시 정상수준으로 회복됨 - OC, OP: OVXinf+PG1, OVXinf+PG2 그룹에서 감소	Cell Mol Biol. 2, 1835, 2013 (참고문헌 9)
	liquid extract from Siberian ginseng(LESG)	Wistar rat	1 ml/kg/day	- 소변: Ca, P, hydroxyproline - 혈액: Ca, P, Breaking strength of the femur, vertebrae	- 소변 Ca, hydroxyproline (10일), 소변 Ca, P (20일), 혈액 Ca, P (20일): 골다공증군에서 감소되었으나, LESG와 ipriflavone의해 유의적으로 개선(대조군과 유사한 수준으로 개선됨) - Breaking strength of the femur, vertebrae: LESG의해 유의적으로 개선	PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGY. 133, 252-254, 2002 (참고문헌 10)
인체적용 시험	◦ 반건강인(n=90), 1,3 g/일, 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 비교 인체적용시험 - Osteocalcin: 시험군에서 유의적으로 증가하여 군간 유의적 차이 - DPD/OC ratio: 시험군에서 유의적으로 감소하여 군간 유의적 차이 - Ca: 시험군에서 유의적으로 증가하여 군간 유의적 차이 - WOMAC index: 관절의 뻣뻣함 항목에서 시험군이 유의적으로 감소하여, 군간 유의적 차이 ※ 시험물질: 인삼추출물 3 g/g ※인체적용시험기관 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터					
기타 사항						

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제1절 : 목표대비 달성도

당초 목표	가중치 (%)	개발 내용	달성도 (%)
인삼을 이용한 골다공증 개선 건강기능식품 개발	40	1) 조골세포 및 골형성 시험 2)인삼의 뼈건강 관련 기능성에 대한 기전연구 3) 기능성식품 인체시험윤리위원회(IRB) 승인	100
인삼성분의 표준화연구 및 인삼 유래 성분의 골다공증 개선효과 기전연구	30	1)인삼 성분의 표준화 2)인삼 유래성분 중 골다공증 저해효과 물질탐색 및 기전연구 3)제브라피쉬 모델을 이용한 뼈 건강(연골) 연구	100
인삼의 뼈 건강 개선 기능성 평가	30	1)동물시험을 통한 인삼의 뼈 건강 개선 기능성 평가 2)인체적용시험 디자인 설계 및 바이오마커 개발 3)인삼의 뼈건강 개선 기능성 원료 인정을 위한 기능성 검증 및 과학적 근거 확보	100

제2절 : 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)

성과지표명 \ 연도		당초 목표 (전체)	실적	달성도 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI	6	4	66	30
	비SCI	3	2	67	20
산업재산권	출원	4	2	25	20
	등록	1	0	0	20
학술발표	국제	2	2	100	0
	국내	2	6	300	10
영농기술·정보 기관제출		2	4	100	0
홍보성과		1	1	100	0
영농활용		2	4	200	0
계		23	25	71	

제 5 장 연구 결과의 활용 계획

가. 연구개발결과의 활용방안

- 사업팀의 건강기능식품 전문 네트워크(인프라 및 기술)를 활용한 인삼의 고부가가치 기능성 규명 후, 기업 기술이전 통한 건강기능식품 원료 허가 및 제품 사업화에 도움을 준다.
- 건강기능식품 개별인정을 통한 인삼 소재 생산, 가공 및 식의약 기업의 사업화 적용 기회 제공한다.

나. 기대성과

1) 기술적 측면

- 인삼의 기능성분을 확인함으로써 목적에 맞는 인삼의 성분에 대한 건강기능성 제품 적용을 가능하게 한다.
- 마우스의 primary cell 시스템을 이용하여 확인된 결과를 제브라 시스템을 이용하여 동물 개체에 대한 물질의 효능을 쉽게 확인이 가능하였다.
- 인삼성분뿐만 아니라 다른 물질 소스에 대한 효능확인에 쉽게 이용 가능한 것을 확인하였다.

2) 건강기능성식품 원료 인정 확보 측면

- 개별인정 신청자격 완화에 대해 법률 개정 추진 중이며, 현재 법제처 심사 중에 있어 지연되고 있으나 개별인정 신청자격 추가에 대해 법률이 공포되면, 개별인정 신청 예정이다.
- 인삼의 뼈건강 개선 식약처 기능성원료 개별인정 신청을 통한 건강기능식품 개발 및 산업화 기대되며, 농가소득 증대에 기여할 것으로 기대하고 있다.
- 가공공정이 홍삼에 비해 단순하여 인삼 원가 및 생산단가가 낮아짐으로서 제품경쟁력이 높아지고, 식약처 인정고시 기능성을 2종에서 3종으로 확대함으로써 인삼이 홍삼에 비해 기능성이 약하다는 소비자들의 인식을 개선함으로써 인삼제품 시장 확대를 도모할 수 있다.
- 최종적으로 인삼추출물을 고시형 건강기능식품으로 등록하여 특정 기업이 아닌 많은 기업들이 인삼시장에 진입할 수 있는 계기를 만들어 줄 수 있으리라 기대된다.
- 이를 통해 인삼시장 구조의 불투명성 및 유통구조 개선에 기여할 수 있고, 전칠삼과 화기삼에 비해 월등히 뛰어난 고려인삼의 우수성을 과학적 근거 및 효능으로서 중국 전칠삼과 북미 화기삼과의 각축전에서 인삼중주국으로서의 우위를 차지하는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

○ 해외과학기술 정보에 대한 수집은 참고문헌으로 정리하였다.

제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

○ 일반 사항

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구 시설/ 연구 장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천 원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치장소)	NTIS장비 등록 번호
생공연	공초점 레이저 형광 현미경	LSM510 meta	1	2003.12.24	373,679	Carl Zeiss	오창 공동기 기실 지하	NFEC-200 7-12-0516 07
생공연	고효율 스크리닝 시스템	ArrayScan VTI	1	2008.10.02	492,034	Thermo Fisher	오창 공동 기기실 2층	NFEC-200 8-11-0766 45
생공연	디지털 도립 형광 현미경	AMG-AMF 4300	1	2014.04.30	46,890	Life Technologies 02-2023-0600	오창 공동 기기실 2층	NFEC-201 5-09-2046 41
생공연	전자동 위상차 고해상도 형	Axio Observer Z1	1	2015.09.01	113,097	Carl Zeiss	오창 공동기 기실 지하	NFEC-201 5-09-2046 41
생공연	유세포분리기	FACSCalibur	1	2009.12.11	89,546	Becton Dickinson	오창 공동기 기실 지하	NFEC-200 9-12-0812 28
생공연	NMR 300	M:UNITY-300	1	1993.01.01	205,840	VERIAN	오창 공동기 기실 지하	NFEC-200 7-12-0503 17
생공연	NMR 500	M:UNITY-520	1	1993.01.01	480,836	VERIAN	오창 공동기 기실 지하	NFEC-200 7-12-0503 61

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

- 국가 연구실 안전 및 보완 규칙에 맞게 운영할 계획이며 연구원 차제에서 안전 및 보안 관련 행동 지침이 정해져 있어 이 규율에 맞게 연구실을 운영할 계획이다.
- 각 참여기관에서는 신규 연구자의 경우 안전교육 이수 후 출입증이 발급되며, 모든 연구자에 대한 정기적 안전수칙을 시행 중에 있으며, 사이버 보안 및 안전을 위해서도 온라인 교육, 실험실 자체교육 등 다양한 교육과 함께 주 단위의 진단시스템이 가동되고 있다.
- 또한 수시로 야간에 안전점검을 실시하여 실험실 및 연구장비의 상황을 점검하여 그 결과의 통보를 통해 안전조치 이행을 확인하고 있어 연구자들의 연구에 있어 위험요소를 미연에 방지하고 있음. 또한 성희롱 방지 등을 위해서도 주기적으로 동영상 교육을 실시하고 있다.
- 연구원 차원에서 연구자 안전에 대한 검토를 계속 하고 있으며 안전점검을 통해 안전미비 연구실의 안전조치 이행을 계속 모니터링 하고 있다.
- 또한 실험실 단위로 자체 안전점검 일지가 있어 매일 퇴근 시 안전사항 준수에 관한 기록을 하고 있다.

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/기 타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Aqueous ginseng extract has a preventive role in RANKL-induced osteoclast differentiation and estrogen deficiency-induced osteoporosis	전북대학교	세부	Journal of Functional FoodS	3.973	2014.12.22	단독사사	SCIE
2	논문	Ginsenoside Re inhibits osteoclast differentiation in mouse bone marrow-derived macrophages and zebrafish scale model	한국생명공학연구원	교신	Molecules and Cells	2.6	2016.12.	단독사사	SCI
3	논문	The effects of panax ginseng extracts on bone microarchitecture of ovariectomized-induced osteoporosis rats	인삼특작부	교신	Molecules	2.645	revision중	단독사사	SCI
3	특허	미량진세노사이드 복합물을 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물	인삼특작부	제1발명자	국내		2017. 3. 출원중		특허출원

제 11 장 기타사항

해당사항 없음

제 12 장 참고문헌

- (1) Becker, D.J., Kilgore, M.L., Morrissey, M.A. The societal burden of osteoporosis. *Curr. Rheumatol.*12: 186-191, 2010.
- (2) 고려인삼이 골다공증의 개선 효과, 농촌진흥청 국립원예특작과학원 보도자료, 2013.
- (3) 김남현, 이환모, 최종혁, 임승길. 홍삼의 골다공증에 대한 임상적 효능 연구. *J. Ginseng Res.* 22(2): 114-121.1998.
- (4) Rodan, G.A., Martin, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289(5484):1508-1514, 2000.
- (5) 광이성, 위재준·황석연, 경종수, 김시관. 난소절제 흰쥐의 생리적 장애에 미치는 고려홍삼조사포닌 분획의 영향. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29(2): 288-293, 2000.
- (6) Lin, B.Y., Jee, W.S., Chen, M.M., Ma, Y.F., Ke, H.Z. and Li, X.J. Mechanical loading modifies ovariectomy induced cancellous bone loss. *Bone Miner.*, 25: 199-210, 1994.
- (7). Jung, N.P. and Jin, S.H. : Studies on the physiological and biochemical effects of Korean ginseng. *Korean J.Ginseng Sci.*, 20: 431-471, 1996.
- (8) Kaneko, H., Nakanishi, K., Murakami, A., Aidoh, H. and Kuwashima, K. The acute effects of massive dose of red ginseng on healthy adults under the condition of cold stress. *Proc. of '96 Korea-Japan Ginseng Symp.* 22-30, 1996.
- (9) Ogita, S. Clinical effectiveness of Korean ginseng climacteric disturbances and its possible mechanism of action. *Korean J. Ginseng Sci.*, 14: 162-166, 1990.
- (10) Yi-Seong Kwak, Jae-Joon Wee, Seok-Yeon Hwang, Jong-Soo Kyung and Si-Kwan Kim. Effect of crude saponin fraction from Korean red ginseng on physiological events of ovariectomized rat. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29(2): 288-293, 2000.
- (11) Lee KY et al: Altered Purkinje cell responses and calmodulin expression in the spontaneously ataxic mouse, Pogo. *Eur J Neurosci.* Apr;33(8):1493-503, 2011.
- (12) Becker, D.J., Kilgore, M.L., Morrissey, M.A. The societal burden of osteoporosis. *Curr. Rheumatol.* 12: 186-191, 2010.
- (13) Rodan, G.A., Martin, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*, 289: 1508-1514, 2000.
- (14) Riggs, B.L. and Melton, L.J. Involutional osteoporosis. *N. Eng. J. Med.* 314: 1676-1686, 1986.
- (15) Kamezawa, K. Inhibitory effects of combined treatment with vitamin K and D on bone loss of ovariectomized rats : a microdiagraphic study. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 90: 71-78,1990.
- (16) 광이성, 경종수, 송용범, 위재준, 박종대, 김시관, 황미선, 김석창, 박채규, 도재호. TCDD

- (2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin)로 급성독성을 유도한 자성 기니픽의 대퇴골 무게감소에 대한 홍삼사포닌의 방어효과 J. Ginseng Res. 30(3): 112-116, 2006.
- (17) Chen H, Wu M, Kubo KY. Combined treatment with a traditional Chinese medicine, Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan) and alendronate improves bone microstructure in ovariectomized rats. J Ethnopharmacol. Jun 26;142(1):80-5, 2012.
- (18) Nishikawa, M., Akatsu, T., Katayama, Y., Yasutomo, Y., Kado, S., Kugal, N., amamoto, M., Nagata, N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. Bone 18: 9-14, 1996.
- (19) Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., Dempster, D.W., Ebeling, P.R. Felsenberg, D., Gagel, R.F., Gilsanz, V., Guise, T., Koka, S., McCauley, L.K., McGowan, J., McKee, M.D., Mohla, S., Pendrys, D.G., Raisz, L.G., Ruggiero, S.L., Shafer, D.M., Shum, L., Silverman, S.L., Van Poznak, C.H., Watts, N., Woo, S.B., Shane, E. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. J. Bone Miner. Res. 22: 1479-1491, 2007.
- (20) Kwak, H.B., Kim, J.H., Kim, D.J., Kwon, Y.M., Oh, J.M., Kim, Y.K. Effect of water extract of deer antler in osteoclast differentiation. Korean J Oriental Physiology & pathology 22: 891-895, 2008.
- (21) Lee, Y., Lee, H.S., Jang, S.J., Song, J.H. Effect of Water Extract of Schisandra Chinensis on Osteoclast Differentiation. Korean J Oriental Physiology & pathology 24, 2010.
- (22) 박성태, 이명수, 전병훈, 박기인, 오재민. 백출의 파골세포 분화에 미치는 영향. Korean J. Oriental Physiology & Pathology 25(1):109~114, 2011
- (23) Yeong-Cheol Cho. Expression of osteocalcin and callus reaction during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenic protein-1 injection. J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 32: 317-326. 2006.

주 의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「농축산물 부가가치 향상 기술개발」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「농축산물 부가가치 향상 기술개발」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

* 예산사업명은 과제 종료년도에 지원한 세부사업을 기재함