(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0088715
(43) 공개일자 2011년08월04일

(51) Int. Cl.
A61K 36/82 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0008346
(22) 출원일자 2010년01월29일
심사청구일자 2010년01월29일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구 달서구 신당동 1000번지
(72) 발명자
유민
대구광역시 북구 태전동 롯데아파트 3-804호
이삼빈
대구광역시 달서구 이곡동 무지개아파트 102동 306호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인명문

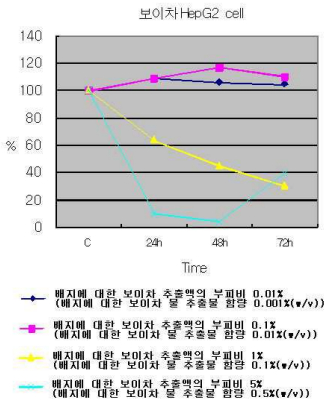
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 보이차 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 보이차 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 암세포의 세포사멸(apoptosis)를 유도하여 암의 예방 또는 치료 효과를 나타내는 항암용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

강명희

경상북도 칠곡군 가산면 학산리 335-4

최향자

대구광역시 수성구 지산동 1297-3번지 지산4단지 아파트 401동 501호

특허청구의 범위

청구항 1

보이차 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 보이차 추출물은 보이차 물 추출물인 것을 특징으로 하는 항암용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 보이차 물 추출물은 (a) 95~100℃의 물을 보이차에 첨가하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 결과물을 40~80℃ 온도로 설정된 배양기에서 30~90분 동안 진탕하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 여과하는 단계를 포함하는 추출 방법에 의해 추출되는 것을 특징으로 하는 항암용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 간암세포에 대해 독성을 갖는 것을 특징으로 하는 항암용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 항암용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 항암용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 보이차 물 추출물을 0.1%(w/v) 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 항암용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 보이차 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 보이차는 중국 운남의 대엽종 차나무(*Camellia sinensis* LINNE)로 가공한 쇄청모차를 긴압(緊壓) 또는 산차(散茶)의 상태에서 자연발효하는 흑차계열의 후발효차이다.

[0003] 중국문헌인 본초강목십유(本草綱目拾遺)에서는 보이차를 향이 독특하며, 숙취 해소와 소화를 돕고, 가래를 삭히고, 위를 깨끗이 하며, 갈증 해소와 우리 몸에 해로운 기름기를 제거하는 작용이 있다고 한다. 또한, 보이차는 장기간 복용하여도 부작용이 없으므로 일본, 프랑스, 독일, 이태리, 마카오 등에서는 미용차, 다이어트차, 장수

차 등으로 불리어지고 있다 (Son *et al.*, *Food & Nutr.* 18:219-224, 2005).

[0004] 한편, 보이차를 이용한 연구들에 의하여, ICR Mouse에 대해 알코올을 아급성 상태로 유도했을 때 보이차 추출물 섭취군의 혈중 알코올 농도는 정상대조군과 유의적으로 차이가 없고 (Park *et al.*, *J East Asian Soc dietary Life.*, 14:634-639, 2004), 녹차와 보이차의 항산화 효과에 대해 알아본 결과물에서 추출한 녹차와 보이차의 경우 총 폴리페놀의 함량과 전자공여능이 유사하다는 사실이 입증된 바 있다 (Son *et al.*, *Korea J. Food & Nutr.*, 18:219-224, 2005).

[0005] 이와 같이 보이차 추출물에 관한 연구들이 지속되고 있으나, 암에 대한 예방 또는 치료와 관련된 보이차 추출물의 효능에 관한 구체적인 연구결과는 보고된 바 없다.

발명의 내용

[0006] 따라서, 본 발명은 암세포 중 간암세포의 세포사멸을 유도하여 항암효과를 나타내는 보이차 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물을 제공하고자 한다.

[0007] 이에 본 발명은 바람직한 제1구현예로서 보이차 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물을 제공한다.

[0008] 상기 구현예에 의한 보이차 추출물은 보이차 물 추출물인 것일 수 있다.

[0009] 상기 구현예에 의한 보이차 물 추출물은 (a) 95~100℃의 물을 보이차에 첨가하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 결과물을 40~80℃ 온도로 설정된 배양기에서 30~90분 동안 진탕하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 여과하는 단계를 포함하는 추출 방법에 의해 추출되는 것일 수 있다.

[0010] 상기 구현예에 의한 조성물은 간암세포에 대해 독성을 갖는 것일 수 있다.

[0011] 상기 구현예에 의한 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다.

[0012] 상기 구현예에 의한 조성물은 식품 조성물일 수 있다.

[0013] 상기 구현예에 의한 조성물은 보이차 물 추출물을 0.1%(w/v) 이상 포함하는것일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 보이차 추출액(10%(w/v) 보이차 물 추출물) 함량에 따른 HepG2 세포 활성을 시간에 따라 측정한 MTS assay 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 보이차 추출액(10%(w/v) 보이차 물 추출물) 함량에 따른 HepG2 세포주기를 측정한 FACS 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 보이차 추출액(10%(w/v) 보이차 물 추출물) 함량에 따른 HepG2 세포활성 정도를 관찰한 현미경 사진이다.

도 4는 보이차 추출액(10%(w/v) 보이차 물 추출물) 함량이 배지에 대해 부피비로 5%일 때 시간에 따른 HepG2 세포의 변화를 관찰한 현미경 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명은 바람직한 일구현예로서 보이차 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물을 제공한다. 본 발명은 보이차 추출물이 암세포에 대하여 세포 독성을 나타내어 세포사멸을 유도함으로써 암의 예방, 치료 또는 개선에 효과적이라는 점을 기반으로 한다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 보이차 추출물은 보이차 물 추출물인 것이 인체에 무해하고 부작용이 없다는 측면에서 바람직하다.

[0018] 본 발명에 의한 보이차 물 추출물은 (a) 95~100℃의 물을 보이차에 첨가하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 결과물을 40~80℃ 온도로 설정된 배양기에서 30~90분 동안 진탕하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 여과하는

단계를 포함하는 추출 방법에 의해 추출되는 것일 수 있다.

[0019] 여기서, 상기 (a) 단계의 물의 온도는 시음하기에 적합한 점을 고려하여, 상기 범위 내에서 조절될 수 있다. 다음으로, 이와 같은 (a) 단계의 결과물을 배양하는데, 이때 배양기 온도는 40~80℃ 정도로 설정하는 것이 세포사멸에 의한 항암효과를 최적화하기 위한 측면에서 바람직하고, 역시 항암효과의 최적화를 고려하여 정치시간은 30~90분인 것이 바람직하다.

[0020] 본 발명의 조성물은 간암세포에 대해 독성을 갖는 것일 수 있다. 구체적으로는 간암세포인 HepG2의 세포사멸을 유도하여 항암 효과를 나타낼 수 있다.

[0021] 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.

[0022] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0023] 본 발명의 약제학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 경구 또는 비경구 등의 다양한 경로로 투여할 수 있으며, 예컨대 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여할 수 있다. 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다.

[0024] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은, 경구형 제형인 경우 성인 기준으로 0.1-100 ㎎/㎏ 의 양을 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 다만, 상기 투여량은 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 산제, 과립제, 정제, 캅셀제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 등을 비롯하여 약제학적 제제에 적합한 어떠한 형태로든 사용할 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 조성물은 식품 조성물로 제조될 수 있다.

[0027] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 보이차 물 추출물뿐만 아니라, 식품 제조시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0028] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 보이차 물 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 약제학적 조성물 또는 식품 조성물에 있어서, 보이차 물 추출물의 유효함량은 암세포에 대한 세포독성이 나타난다는 측면에서 0.1%(w/v) 이상인 것이 바람직하고, 암세포에 대한 세포독성이 더욱 우수하게 나타난다는 측면에서 0.1%(w/v) ~ 0.5%(w/v)인 것이 더욱 바람직하다.

[0030] 한편, 본 발명의 유효성분인 보이차 물 추출물은 차(茶)류로 음용되고 있는 인체에 무해한 천연 물질로서 독성 및 부작용이 거의 없으므로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있으며, 특히 상기한 바와 같은 약제학적

및 식품 조성물에 안전하게 적용할 수 있다.

[0031] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0032] 실시예 1: 보이차 추출물 제조

[0033] 50㎖ tube에 보이차시료(보이청차, 다부문화예술원) 2 g을 넣고 용매 20 ㎖를 넣었다. 용매는 정수된 물로 hot plate 위에서 100℃까지 가열한 것을 사용하였다. Shaking incubator에서 tube를 기울여서 80rpm으로 60℃에서 1시간 동안 섞어주면서 시료를 추출하여, 10%(w/v) 보이차 물 추출물을 제조하였다.

[0034] 상기 10%(w/v) 보이차 물 추출물을 거름종이(Whatman No.2)로 1차 여과하고 이를 다시 0.45 ㎛ 주사기 필터(syringe filter)로 2차 여과하였다. 여과된 10%(w/v) 보이차 물 추출물(이하, 보이차 추출액이라 함)을 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, (주)웰진, 한국) 배지에 희석하여 사용하였다.

[0035] 실험예 1: 세포독성 측정 - MTS assay

[0036] 간암세포주인 HepG2(HB-8065)를 ATCC(American Type Culture Collection)에서 입수하였다.

[0037] HepG2를 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, (주)웰진, 한국) 배지를 이용하여 5% CO_2, 37℃ incubator에서 배양하였다.

[0038] 상기와 같이 배양된 HepG2 세포를 트립신 처리한 후 떼어내어 10ml의 배지에 모았다. 배지 90 ㎕에 3×10^3 개의 세포를 96 well plate에 분주하였다. 18시간 후, 실시예 1에서 여과되어 얻어진 보이차 추출액이 희석되어 있는 배지 10㎕를 상기 96 well plate의 각 well에 첨가하여 배양하였다. 이때 배지에 대하여 보이차 추출액의 첨가량은 배지에 대하여 부피비로 각각 0.01%, 0.1%, 1% 및 5%의 경우를 각각 적용하여 배양하였다 (이 경우, 배지에 대한 보이차 물 추출물의 함량은 각각 0.001%(w/v), 0.01%(w/v), 0.1%(w/v) 및 0.5%(w/v)임). 배양 후, MTS 시약 20㎕을 각 well에 첨가하여 5% CO_2, 37℃ incubator에서 1시간 동안 incubation 하여, 세포 생존율을 측정하였다.

[0039] 이때, 세포 생존율은 Cell Titer 96 aqueous one solution cell proliferation assay (Promega, Madison, Wisconsin)를 이용하여 측정하였다. Formazan 생성물은 흡광도 490nm에서 측정하여 확인하였다. 퍼센트 GI(% growth inhibition)는 수식(I)을 이용하여 계산하였다.

[0040] $GI(\%) = 100\times(T-T_0)/(C-T_0)$ ---------- (I)

[0041] 여기서, T는 보이차 추출액과 각 측정시간별로 반응 후 측정한 흡광도 값이며, T_0는 시간별 반응 전의 흡광도 값이며, C는 대조군의 흡광도 값이다.

[0042] MTS assay를 이용하여 배양시간에 따른(24시간, 48시간 및 72시간) 세포 생존율을 측정한 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 24시간일 때 0.01% 및 0.1%인 보이차 추출액에서 세포 생존율은 109%로 동일하게 증가하였으나, 1% 및 5%인 보이차 추출액에서의 세포 생존율은 각각 64% 및 10%로 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 48시간일 때 0.01% 및 0.1%인 보이차 추출액에서 세포 생존율은 각각 106% 및 117%로 증가하였으나, 1% 및 5%인 보이차 추출액에서의 세포 생존율은 각각 44% 및 4%로 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 72시간일 때 0.01% 및 0.1%인 보이차 추출액에서 세포 생존율은 각각 105% 및 110%로 증가하였으나, 1% 및 5%인 보이차 추출액에서의 세포 생존율은 각각 30% 및 39%로 감소하는 것으로 나타났다.

[0043] 결국, MTS assay에 의한 세포 생존율 실험 결과로부터, 간암세포인 HepG2에 보이차 추출액을 적어도 1% 첨가하고 배양하는 경우 세포독성이 강하며, 특히 보이차 추출액을 5% 첨가하고 48시간 동안 배양하였을 때 세포독성

이 가장 강한 것을 확인할 수 있었다.

[0044] 실험예 2: 세포주기 분석 - FACS

[0045] HepG2 세포를 20×10^4 cells/dish로 분주하고 18시간 배양 후, 배지에 대하여 부피비로 1%, 2% 및 5%의 보이차 추출액으로 각각 처리한 뒤 24시간 배양하였다 (이 경우 배지에 대한 보이차 물 추출물의 함량은 각각 0.1%(w/v), 0.2%(w/v) 및 0.5%(w/v)임). 배양액을 시험관에 모으고 세포들을 PBS로 씻어 상층액을 시험관에 모았다. 세포는 trypsin 처리로 떼어내어 시험관에 모았다. 2,000rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. PBS를 이용하여 세포를 풀어 1.5 ㎖ tube로 모은 뒤, 2,000rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. PBS 300㎕를 넣고 세포를 풀어준 뒤 cold absolute EtOH 700㎕를 넣고 4℃에서 30분 이상 세포를 고정시켰다. 2,000rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거한 후 PBS로 2번 씻어주었다. PI(Propium) solution(50 ㎍/㎕ PI, 0.1 ㎎/㎖ RNase A, 0.1% NP-40, 0.1% trisodium citrate)을 500㎕씩 첨가 후 충분히 섞어주고 4℃에서 1시간 둔 후 FACS 분석기(Becton-Dickinson Co., Franklin, New Jersey)를 이용하여 분석하였다.

[0046] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 세포사멸이 일어나는 세포주기인 Sub G1기에 있어서, 특히 부피비로 5%의 보이차 추출액 처리군에서 사멸한 세포수는 대조군에 비해 증가하였다. 여기서, 대조군은 보이차 추출액으로 처리하지 않은 HepG2 세포 배양군이다.

[0047] 보이차 추출액 함량에 따른 Sub G1기의 사멸한 세포수를 비교한 결과로부터, 보이차 추출액 함량이 증가할수록 HepG2의 세포사멸 유도 효과가 증대되어 항암효능이 우수하다는 것을 알 수 있었다.

[0048] 실험예 3: 보이차 추출액 함량에 따른 세포관찰

[0049] HepG2 세포를 20×10^4 cells/dish로 분주하고 18시간 배양 후, 대조군으로서 보이차 추출액으로 처리하지 않은 HepG2 세포와 배지에 대하여 부피비로 각각 1%, 2% 및 5%(이 경우, 배지에 대한 보이차 물 추출물의 함량은 각각 0.1%(w/v), 0.2%(w/v) 및 0.5%(w/v)임)의 보이차 추출액으로 처리한 HepG2 세포를 배양한 후, 광학 현미경을 사용하여 보이차 추출액 함량에 따른 생존 HepG2 세포의 수 및 형태를 관찰하였다.

[0050] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, HepG2 세포에 처리된 보이차 추출액의 함량이 증가할수록 생존한 HepG2 세포의 수는 감소한 반면, 형태가 변형된 HepG2 세포의 수는 증가한 것을 확인하였다.

[0051] 결국, 보이차 추출액의 함량이 증가할수록 HepG2 세포에 대한 독성이 증가하는 것을 알 수 있었다.

[0052] 실험예 4: 세포 배양 시간에 따른 세포관찰

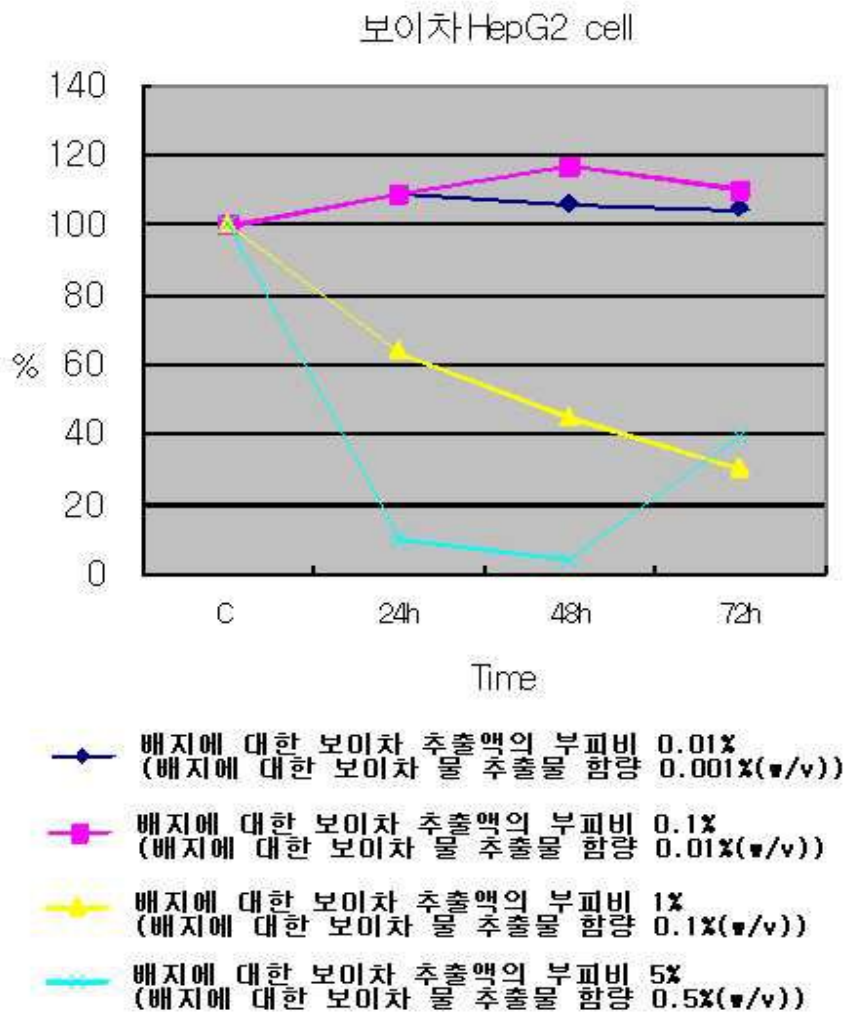
[0053] HepG2 세포를 20×10^4 cells/dish로 분주하고 18시간 배양 후, 대조군으로서 보이차 추출액으로 처리하지 않은 HepG2 세포와 배지에 대해 부피비로 5%의 보이차 추출액으로 처리한 HepG2 세포를 배양 후 24시간, 48시간 및 72시간일 때 광학 현미경을 사용하여 배양 시간에 따른 HepG2 세포를 관찰하였다.

[0054] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 배양 시간이 증가할수록 HepG2 세포의 수가 감소하는 것을 확인하였다.

[0055] 결국, 배양 시간이 증가할수록 HepG2에 대한 보이차 추출액의 세포독성은 증가하며, 사멸된 세포는 배양 시간이 증가하여도 사멸된 상태로 있음을 알 수 있었다.

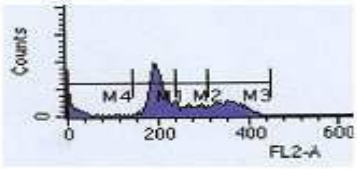
도면

도면1


보이차 HepG2 cell
140
120
100
80
% 60
40
20
0
C
24h
48h
72h
Time
배지에 대한 보이차 추출액의 부피비 0.01%
(배지에 대한 보이차 물 추출물 함량 0.001%(w/v))
배지에 대한 보이차 추출액의 부피비 0.1%
(배지에 대한 보이차 물 추출물 함량 0.01%(w/v))
배지에 대한 보이차 추출액의 부피비 1%
(배지에 대한 보이차 물 추출물 함량 0.1%(w/v))
배지에 대한 보이차 추출액의 부피비 5%
(배지에 대한 보이차 물 추출물 함량 0.5%(w/v))

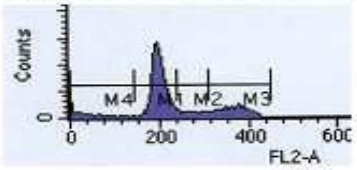
도면2

(a) Control



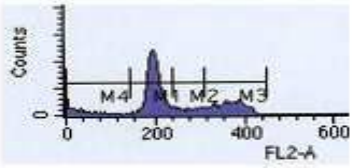
세포주기	세포 사멸 수
G1 (M1)	53.37
S (M2)	23.49
G2/M (M3)	14.85
Sub G1 (M4)	8.18

(b) 배지에 대한 보이차 추출액의 부피비 1%
(배지에 대한 보이차 물 추출물 함량 0.1%(w/v))



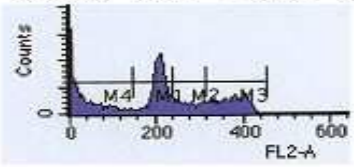
세포주기	세포 사멸 수
G1 (M1)	68.67
S (M2)	17.43
G2/M (M3)	8.62
Sub G1 (M4)	5.69

(c) 배지에 대한 보이차 추출액의 부피비 2%
(배지에 대한 보이차 물 추출물 함량 0.2%(w/v))



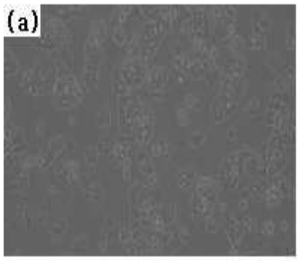
세포주기	세포 사멸 수
G1 (M1)	59.65
S (M2)	23.49
G2/M (M3)	8.95
Sub G1 (M4)	7.97

(d) 배지에 대한 보이차 추출액의 부피비 5%
(배지에 대한 보이차 물 추출물 함량 0.5%(w/v))

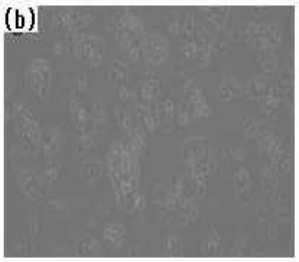


세포주기	세포 사멸 수
G1 (M1)	38.44
S (M2)	20.05
G2/M (M3)	11.07
Sub G1 (M4)	30.83

도면3



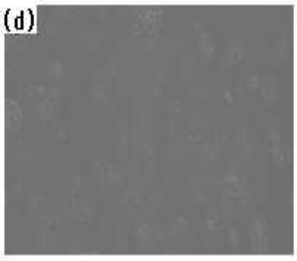
Control



배지에 대한 보이차 추출액의 부피비 1%
(배지에 대한 보이차 물 추출물 함량 0.1%(w/v))



배지에 대한 보이차 추출액의 부피비 2%
(배지에 대한 보이차 물 추출물 함량 0.2%(w/v))



배지에 대한 보이차 추출액의 부피비 5%
(배지에 대한 보이차 물 추출물 함량 0.5%(w/v))

도면4

