



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0095765
(43) 공개일자 2011년08월25일

(51) Int. Cl.

A61K 36/80 (2006.01) *A61P 27/14* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0015414

(22) 출원일자 2010년02월19일

심사청구일자 2010년02월19일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

(주)에스.앤.디

충청남도 연기군 남면 월산리 6-12블럭

(72) 발명자

김진경

경기도 가평군 가평읍 대곡리 175-5

김윤희

강원도 춘천시 교동 11-28

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 천지

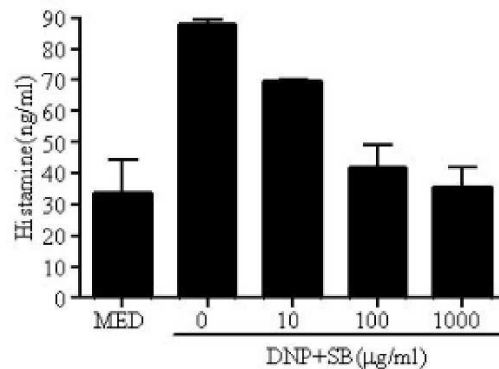
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 현삼 추출물을 포함하는 항알레르기 조성물

(57) 요약

본 발명은 현삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 항알레르기 조성물에 관한 것이다. 상기 현삼 추출물은 알레르기성 질환세포를 이용하여 측정한 항알레르기효과 즉, 알레르기성 질환세포에 대한 세포사멸 효과가 있고, 알레르기성 질환전이 저해 효과가 우수한 것으로 확인되었을 뿐만 아니라, 천연물 추출물이므로 부작용과 안전성 관련 문제가 거의 없고 실험결과 세포 독성도 없으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 상기 약학 조성물은 알레르기성 질환을 치료, 예방 또는 개선하기 위하여 사용될 수 있다.

대표도 - 도2b



(72) 발명자

신현경

서울 성북구 안암동 1가 361번지 래미안 안암아파트 104동 602호

임순성

강원도 춘천시 퇴계동 916-3 그린타운아파트 102동 401호

여경목

충청남도 연기군 조치원읍 신흥리 393 신흥주공아파트 202동 1504호

권상오

강원도 춘천시 우두동 1080번지 롯데인벤스아파트 104동 1004호

김복남

강원도 춘천시 석사동 대우아파트 103동 1203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

부처명 지식경제부

연구관리전문기관

연구사업명 지역혁신센터(RIC)사업

연구과제명 고추 활성다당펙틴의 항알러지 평가 및 항알러지성 천연소재 탐색

기여율

주관기관 한림대학교

연구기간 2009년 03월 01일 ~ 2010년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

현삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 항알레르기 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 현삼 추출물은 현삼 뿌리를 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 추출한 것인 항알레르기 조성물.

청구항 3

제1항의 항알레르기 조성물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 알레르기성 질환은 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 알레르기성 비염, 알레르기성 천식 및 알레르기성 피부염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상인 알레르기성 질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 5

제1항의 항알레르기 조성물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

청구항 6

제1항의 항알레르기 조성물을 유효성분으로 포함하는 외용제.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 항알레르기 효과가 있는 식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 알레르기란 어떤 외래성 물질과 접한 생체가 그 물질에 대하여 정상과는 다른 반응을 나타내는 현상 또는 과민 반응을 의미하고 알러지 또는 앨러지라고도 한다. 또한, 생물체가 어떤 외래성 물질과 접하게 되면 항원항체반응에 의하여 생체 내에 급격한 반응 능력의 변화가 생기는 것을 의미하기도 한다.

[0003] 생체는 이종물질에 대해서는 그 항원에 특이적으로 반응하는 항체와 림프구를 생산하고 재차 항원과 접하면 여러 가지 면역반응을 일으킨다. 상기 면역반응은 생체의 자기 보존을 위한 중요한 방어메커니즘의 하나인데, 보통 생체에 대해 보호적으로 작용하지만 때로는 이 메커니즘이 생체에 불리하게 작용하여 장애를 일으키는 경우가 있다.

[0004] 상기 알레르기 반응을 유발하는 항원은 알레르겐(allergen)이라고 하며, 전형적인 알레르겐은 꽃가루, 약물, 식물성 섬유, 세균, 음식물, 염색약, 화학물질 등이 있다. 면역계에는 항원에 대항하여 신체를 지키기 위한 몇 가지 방어 메커니즘이 있다. 이들 중 가장 많은 종류는 림프구로, 특정 항원에 반응하기 위해 특이화되어 있으며, B세포(B-cell)와 T세포(T-cell)가 이에 해당한다. 알레르기 반응은 즉시형 알레르기 또는 지연형 알레르기로 나타나는데, 항원이 B세포나 T세포 중 어느 세포와 반응하는지에 따라 결정된다.

[0005] 상기 알레르기로 인한 질환 즉, 알레르기성 질환은 광범위하고 복잡한 병리적 현상의 총화로 면역반응에 근거한 생체의 전신적 또는 국소적인 장애이다. 일 예로, 알레르기로 인한 질환에는 자가면역질환, 교원병, 아토피성 질환, 알레르기성비염, 화분증, 기관지천식, 두드러기, 습진 또는 알레르기성 접촉성 피부염 등이 있다.

- [0006] 상기 다양한 알레르기성 질환은 면역 기전에 따른 크게 4가지 유형, 즉, I형, II형, III형 및 IV형으로 분류된다. 상기 알레르기성 질환 중에 가장 대표적인 질환은 I형 알레르기 또는 제1형 알레르기이다.
- [0007] 상기 제1형 알레르기는 일정한 항원에 대하여 이미 감작된 개체에 부착되어 있는 항체에 항원이 결합한 후 수분 내에 일어나는 즉시형 반응으로, 상기 제1형 알레르기성 질환은 알레르기성 비염, 아토피성 피부염 및 기관지 천식 등이 포함된다. 상기 제1형 알레르기는 비만세포(Mast cell)의 활성화에 의해 일어나며, 비만세포의 과립에 다량 포함되어 있는 염증의 매개체인 히스타민(Histamine)이 방출되는 경우 제1형 알레르기성 질환을 포함한 즉시형 알레르기 반응이 유도되는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 보다 구체적으로, 비만세포 표면에 발현하고 있는 고친화성 IgE수용체인 FcεRI이 IgE 및 특이적 알레르겐과 결합함으로써, 세포질 내 칼슘 농도가 상승하고 탈과립이 일어나 염증 매개인자, 구체적으로 히스타민이나 헤파린, 가수분해효소 그리고 면역반응의 조절인자로 알려진 interleukin-4(IL-4), interleukin-6(IL-6), interleukin-13(IL-13) 및 TNF-α와 같은 여러 가지 사이토카인이 분비되게 되며, 상기 분비된 염증 매개인자들은 혈관을 이완시키고, 혈관투과도를 증가시키며, 기관지를 수축시키게 된다.
- [0009] 상기 비만세포의 활성화는 이러한 알레르겐과 IgE를 통한 면역학적 자극 이외에 비면역학적 자극 물질인 compound 48/80, protein kinase C(PKC) activator인 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), calcium ionophore(A23187) 등에 의해서도 야기되는 것으로 보고되어 있다.
- [0010] 상기와 같은 이론에 근거하여, 막의 표면에 수십만 개의 IgE 수용체를 포함하고, IgE로 감작된 후에 항체에 반응하여 히스타민을 유리하는 Rat 유래의 RBL-2H3 세포는 항알레르기 효능검색을 위한 모델세포주로 많이 이용되고 있다.
- [0011] 한편, 현대의 환경오염, 식생활의 변화와 유전적 영향 등의 복합적인 영향으로 급증하고 있으며, 우리나라를 포함한 전세계의 알레르기 질환 환자의 수가 꾸준히 증가하고 있는 실정이다. 일 예로, 알레르기성 천식 환자는 세계인구의 약 10%를 차지하는 것으로 알려져 있으며(1995년 기준 약 27,500만 명), 미국에만 1,700만 명이 천식으로 고생하고 있고, 이 중 약 500만 명이 청소년인 것으로 보고되어 있다. 또한, 2000년도에 알레르기성 천식 치료제의 미국 시장 규모는 약 64억 달러이었으며, 한국 시장도 약 10억 달러로 전체 한국 의약품 시장의 약 20% 정도를 차지한다는 보고도 있었다.
- [0012] 상기 알레르기성 질환을 치료하기 위하여, 항히스타민 약물과 같은 항알레르기제가 투여되고 있다. 그러나, 면역학적 또는 비면역학적 과민반응은 항히스타민 약물에 의해 증상이 일시적으로 경감되지만 완전히 치료되지는 않는다. 따라서 알레르기 매개물질인 히스타민이 방출되는 것을 예방하는 소재의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 세포 실험 결과 알레르기 반응의 주요 원인인 히스타민의 분비나 탈과립을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라, 동물 실험 결과 실제로 알레르기 반응의 진행을 억제하고, 알레르기 반응을 유도하는 사이토카인의 분비를 효과적으로 억제할 수 있으면서도, 부작용이 문제되지 않는 천연물 유래 항알레르기 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 천연물 즉, 식물 유래 유효성분을 포함하는 항알레르기 조성물을 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명은 현삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 항알레르기 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 발명자들은 상기 현삼 추출물은 제1형 알레르기 반응과 관련된 모델 세포주인 Rat 유래의 RBL-2H3 세포를 통하여 미세관찰 및 분자생물학적인 실험을 통하여 확인한 결과 탈과립의 지표물질인 β-hexosaminidase 및 알레르기 반응의 원인물질인 히스타민(Histamine)의 유리가 효과적으로 저해되고, 알레르기 반응을 심화시키는 사이토카인의 생성이 억제되었으며, 동물실험을 통하여 확인한 결과 실질적으로 과민 반응 즉, 부종, 표피과대증식 또는 염증 세포의 침윤과 같은 알레르기 반응이 억제될 뿐만 아니라, 실험동물의 실험 조직 내에서 사이토카인의 생성이 억제된다는 것이 확인되었을 뿐만 아니라, 천연물로부터 유래된 것으로 부작용이 문제될 가능성도 낮고, MTT 분석 결과 세포 독성도 없다는 것을 확인하여, 이를 토대로 본 발명을 완성하였다.

- [0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0017] 본 발명은 현삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 항알레르기 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 상기 현삼(*Scrophularia buergeriana*)은 현삼과의 다년초로 중대, 현대 또는 축마라고도 한다. 주로, 산지에서 자란다. 줄기는 모가 지고, 잎은 좁고 길게 생겼으며, 꽃은 연한 황록색으로 8월에서 9월에 피며, 뿌리는 덩어리로 백색이나 자르면 바로 검게 변한다. 현삼은 겨울동안 땅위의 줄기는 말라 죽고, 뿌리만 살았다가 이듬해 봄 다시 새싹을 돋아내는 숙근약초이다. 현삼은 기후가 온화하면서 습기가 많은 곳을 좋아하고, 추위에 강하다. 민간요법에서 주로 열을 내리고 심장기능을 강화하며 염증을 방지하는 용도로 사용되어왔다. 상기 현삼의 근연종에는 울릉도에서 자라는 섬현삼(*S. takesimensis*), 산지에서 자라는 큰개현삼(*S. kakudensis*) 및 토현삼(*S. koraiensis*) 등이 있다.
- [0019] 상기 현삼 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 일 예로 현삼의 꽃, 잎, 가지, 뿌리, 열매 또는 껍질이나 이의 분쇄물, 바람직하게는 현삼의 뿌리에 추출용매를 가함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 조추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조된 것일 수 있다.
- [0020] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 상기 알코올 희석수 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 알코올 희석수는 알코올을 50 내지 99.9%(v/v)로 물에 희석한 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 현삼 추출물의 추출용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 희석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 75 내지 99% 에탄올 수용액 또는 주정일 수 있다. 상기 추출과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 70℃ 내지 85℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간, 바람직하게는 1시간 내지 6시간일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 현삼 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 냉침추출법, 온침추출법, 열 추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 분획과정을 더욱 실시할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다. 또한, 상기 분획과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 70℃ 내지 85℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0024] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일 예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 현삼 뿌리 에탄올 추출물은 제1형 알레르기 반응과 관련된 모델 세포주인 Rat 유래의 RBL-2H3 세포에 대한 MTT 분석결과 24시간이 경과한 시점에서 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 경우에도 안전한 것으로 확인되었고, 알레르기성 질환세포를 이용하여 항알레르기 효과를 확인한 결과, 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 경우에도 세포 탈과립의 지표물질인 β -hexosaminidase 및 알레르기 반응의 원인물질인 히스타민(Histamine)의 유리가 효과적으로 저해되고, 알레르기 반응을 심화시키는 사이토카인의 생성과 관련하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 경우에도 TNF- α 의 분비가 억제되고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 경우에도 IL-4의 분비가 억제되었으며, 동물실험을 통하여 확인한 결과 실질적으로 과민 반응 즉, 부종, 표피과대증식 또는 염증 세포의 침윤과 같은 알레르기 반응이 억제될 뿐만 아니라, 실험동물의 실험 조직 내에서 사이토카인의 생성이 억제된다는 것이 확인되었다. 한편, 현삼 뿌리 에탄올 추출물은 MTT 분석결과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 처리한 경우에도 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다.
- [0026] 상기 항알레르기 조성물의 유효성분인 현삼 추출물은 항알레르기 활성이 우수할 뿐만 아니라, 식용으로 사용될 수 있는 천연식물을 이용하여 제조한 것이므로 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수하므로, 상기 항

알레르기 조성물은 알레르기성 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물, 알레르기성 질환의 개선 또는 예방을 위한 식품 조성물 또는 알레르기성 질환의 개선 또는 예방을 위한 외용 조성물 또는 외용제로 사용될 수 있다.

- [0027] 본 발명의 항알레르기 조성물 또는 본 발명의 현삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환 치료 또는 예방용 조성물은 유효성분으로 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 알레르기성 질환은 알레르기 반응으로 인한 질환을 의미하며, 알레르기로 인한 질환에는 아토피성 피부염을 포함한 아토피성 질환, 알레르기성 접촉성 피부염을 포함한 접촉성 피부염, 알레르기성 비염, 알레르기성 천식, 알레르기성 피부염, 화분증, 두드러기, 습진, 자가면역질환 또는 교원병 등이 모두 포함되고, 일 예로 이미 감작된 개체에 부착되어 있는 항체에 항원이 결합한 후 수분 내에 일어나는 즉시형 반응으로 일어나는 제1형 알레르기에 의한 질환일 수 있다.
- [0029] 상기 알레르기성 질환은 바람직하게는 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 알레르기성 비염, 알레르기성 천식 및 알레르기성 피부염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0030] 상기 알레르기성 피부염은 증세의 악화 및 호전을 반복하는 가려움증이 있는 습진을 주 증상으로 하는 알레르기 질환이고, 그 환자 수는 세계적으로 증가하는 경향에 있다. 상기 알레르기성 피부염은 완치가 어렵기 때문에, 증상이 생기는 것이 억제된 상태를 유지하거나 알레르기 반응을 저감시키기 위한 의약, 기능성 식품 또는 외용제 등의 개발이 진행되고 있다.
- [0031] 상기 아토피성 피부염(Atopic dermatitis)은 주로 유아기 또는 소아기에 시작되는 만성적이고 재발성의 염증성 피부질환으로, 가려움증, 피부건조증 및 특징적인 습진을 동반한다. 아토피성 피부염은 세계적으로 증가하는 추세이고, 유병률이 인구의 약 20%라는 보고되 있다. 현재, 아토피성 피부염의 약제 요법으로는 스테로이드를 이용한 외용 요법이 중심이나, 스테로이드의 장기 투여가 요구되는 한편, 상기 스테로이드의 투여는 부작용을 유발할 수 있다는 문제점이 제기되고 있다.
- [0032] 상기 천식(asthma)이란 여러 가지 자극에 대한 기도의 과민성을 그 특징으로 하는 질환으로 기도의 광범위한 협착에 의해 발생하는 천명, 호흡곤란, 기침 등의 임상 증세들을 수반한다. 상기 천식은 그 원인에 따라 외인성 천식과 내인성 천식으로 나누어질 수 있다. 상기 외인성 천식은 원인 항원에 노출되었을 때 증상이 나타나는 천식을 말하고, 발병 연령이 젊은 것이 보통이다. 상기 원인 항원으로는 집 먼지, 진드기 등이 있으며, 그밖에 꽃가루, 동물의 상피, 곰팡이 등이 원인 항원으로 작용한다. 상기 내인성 천식의 경우에는 상기도 감염, 운동, 정서불안, 한랭 기후 및 습도의 변화 등이 천식을 유발하거나 악화시키는 경우인데, 성인형 천식에서 흔히 볼 수 있다.
- [0033] 상기 가장 문제가 되는 외인성 천식의 경우 피부시험으로 원인 항원을 찾아낼 수 있으며, 외인성 천식 환자의 경우 혈청 중의 총 IgE가 증가하며 항원 특이적 IgE가 검출되는 특징이 있다. 상기로부터 외인성 천식의 경우 일반적으로 알레르기성 천식인 것으로 보고되어 있다.
- [0034] 상기 알레르기성 천식은 만성 기도염증(chronic airway inflammation)과 기도 과민반응성(bronchial hyperresponsiveness)이라는 특징을 갖는다. 상기 알레르기성 천식 환자는 세계인구의 약 10%를 차지하는 것으로 알려져 있으며, 2000년도에 알레르기성 천식 치료제의 미국 시장 규모가 약 64억 달러이었으며, 한국 시장도 약 10억 달러로 전체 한국 의약품 시장의 20%정도를 차지한다고 보고되었다.
- [0035] 상기 알레르기성 질환 치료 또는 예방용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0036] 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물은 상기 알레르기성 질환 치료 또는 예방용 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물은 통상적인 방법에 따라 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.
- [0037] 이 경우 상기 조성물 내 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물의 함량은 0.001 중량 % 내지 99.9 중량

%, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 20 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물의 함량은 약학적으로 유효한 양 또는 바람직한 양으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.

- [0038] 상기 ‘약학적으로 허용되는’이란 생리학적으로 허용되고 동물, 바람직하게는 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 의미한다. 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [0039] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 또한, 상기 알레르기성 질환 치료 또는 예방용 조성물은 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 봉해제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 항알레르기제로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 알레르기성 질환 치료 또는 예방용 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0042] 또한, 상기 알레르기성 질환 치료 또는 예방용 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캡셀제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSPENSIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0043] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제(INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.
- [0044] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 제형화될 수 있다.
- [0045] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0046] 또한, 본 발명은 본 발명의 항알레르기 조성물 또는 현삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다. 상기 본 발명의 항알레르기 조성물 또는 현삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 현삼 추출물은 현삼 뿌리 에탄올 추출물일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 식품 조성물의 예로는 식품, 식품첨가제, 음료 또는 음료첨가제를 들 수 있다.

- [0049] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.
- [0050] 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물이 포함될 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영아식 또는 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료, 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g일 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.
- [0053] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 첨가제는 본 발명의 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부, 바람직하게는 0.00001 내지 15 중량부 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명에서 기능성 음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.
- [0055] 상기 기능성 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 중량부 내지 20 중량부, 바람직하게는 1 중량부 내지 18 중량부, 더욱 바람직하게는 5 중량부 내지 12 중량부 포함될 수 있다.
- [0056] 또한, 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물에 있어서, 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물의 경우 식품 전체의 부피 100 ml를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0057] 또한, 본 발명은 본 발명의 항알레르기 조성물 또는 본 발명의 현삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 개선 및 예방용 외용제를 제공한다.
- [0058] 본 발명에서 외용제란 일반적으로 외용에 사용하는 조성물 전반을 포괄하는 개념이고, 예를 들어, 기초 화장료, 메이크업 화장료, 모발용 화장료 등 각종 화장료를 포함하는 화장료 조성물이나 연고제 등의 다양한 의약품 내지 의약외품 등으로 폭넓게 적용 가능한 것을 말한다.
- [0059] 상기 외용제에는 유효성분 외에 사용용도 및 외용제 조성물의 성질에 따라 통상 외용제에 배합되고 있는 성분, 일예로 보습제, 자외선 흡수제, 비타민류, 동식물 추출성분, 소화제, 미백제, 혈관확장제, 수렴제, 청량제, 호르몬제 등을 추가로 배합한 것일 수 있다.
- [0060] 상기 외용제의 제형은 사용용도 및 외용제 조성물의 성질에 따라 적절한 형태를 취할 수 있으며, 일예로 수용액제, 가용화제, 유화제, 유액제, 겔제, 페이스트제, 연고제, 에어줄제, 물-기름 2층제, 물-기름-분말 3층제일 수 있으며, 상기 제형에 의해 본 발명의 외용제의 제형 및 형태가 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 또한, 상기 외용제는 유효성분을 피부조직으로 침투 또는 이행시키기 위해서 필요한 기제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 유효성분은 알레르기성 질환의 개선 및 예방용 외용제 총 중량을 기준으로 0.01 내지 30 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.05 내지 20 중량%일 수 있으나, 함량은 제형 또는 외용제에 함유되는 유효성분 외의 성분의 함량에 따라 적절히 조절할 수 있다.
- [0063] 상기 본 발명의 외용제의 일 예인, 상기 항알레르기 조성물 또는 상기 현삼 추출물을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환의 개선 및 예방용 화장료 조성물은 상기 유효성분 이외에, 통상의 화장품에 사용가능한 모든 종류의 성분, 예컨대 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 부형제, 희석제, 무기염류 및 합성 고분자 물질 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0064] 상기 화장료 조성물은, 기초화장품, 메이크업 화장품, 바디 화장품, 두발용 화장품, 두피용 화장품, 면도용 화장품 또는 구강용 화장품의 용도로 제공될 수 있다. 상기 기초화장품의 예로는 크림, 화장수, 팩, 마사지 크림, 유액 등이 있으며, 상기 메이크업 화장품으로는 파운데이션, 메이크업 베이스, 립스틱, 아이섀도, 아이라이너, 마스크라, 아이브로우 펜슬 등이 있으며, 바디 화장품으로는, 비누, 액체 세정제, 입욕제, 선스크린 크림, 선 오일 등이 있으며, 두발용 화장품으로는 샴푸, 린스, 헤어 트리트먼트, 헤어 무쓰, 헤어 리퀴드, 포마드, 헤어 칼라제, 헤어 블릿치제, 칼라 린스가 있으며, 두피용 화장품으로는 헤어 토닉, 스칼프 트리트먼트가 있으며, 면도용 화장품으로는 애프터셰이브로션, 셰이빙 크림 등이 있으며, 구강용 화장품으로는 치약, 마우스 워셔 등이 있다.
- [0065] 본 발명의 조성물은 알레르기 반응의 핵심현상인 비만세포의 탈과립현상과 관련하여, 탈과립의 지표물질인 β -hexosaminidase의 유리를 억제하고, 알레르기 반응의 원인물질인 히스타민(Histamine)의 유리를 효과적으로 저해할 뿐만 아니라, 알레르기 반응을 심화시키는 사이토카인의 생성을 억제하고, 동물실험을 통하여 확인한 결과 실제로 과민 반응 즉, 부종, 표피과대증식 또는 염증 세포의 침윤과 같은 알레르기 반응을 억제할 수 있고, 천연물로부터 유래된 것으로 부작용이 문제될 가능성도 낮을 뿐만 아니라 MTT 분석결과 본 발명의 효과를 유의적으로 얻을 수 있는 함량의 약 10배인 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 현삼 추출물을 투여한 경우에도 세포독성이 없으므로, 알레르기성 질환 특히, 알레르기성 천식이나 알레르기성 비염 뿐만 아니라 최근 문제가 아토피와 알레르기성 접촉성 피부염의 치료, 개선 또는 예방하기 위하여 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 특히, 본 발명의 현삼 추출물은 이러한 우수한 효과와 안전성의 확보로 인하여, 외용 조성물 일 예로, 기능성 화장품이나 알레르기성 피부염 또는 접촉성 피부염을 포함한 다양한 피부 관련 질환의 치료, 개선 또는 예방을 위한 약품 또는 의약외품에 첨가될 수 있으며, 이러한 기능성 화장품이나 약품 또는 의약외품의 종류는 특별히 한정되지 않는다.

발명의 효과

- [0066] 본 발명의 현삼 추출물은 알레르기 반응과 관련된 모델 세포주인 Rat 유래의 RBL-2H3 세포를 통하여 미세관찰 및 분자생물학적인 실험을 통하여 확인한 결과, 알레르기 반응의 핵심현상인 비만세포의 탈과립현상과 관련하여, 탈과립의 지표물질인 β -hexosaminidase의 유리를 억제하고, 알레르기 반응의 원인물질인 히스타민(Histamine)의 유리를 효과적으로 저해할 뿐만 아니라, 알레르기 반응을 심화시키는 사이토카인의 생성을 억제하고, 동물실험을 통하여 확인한 결과 실질적으로 과민 반응 즉, 부종, 표피과대증식 또는 염증 세포의 침윤과 같은 알레르기 반응을 억제할 뿐만 아니라, 실험동물의 실험 조직 내에서 사이토카인의 생성을 억제할 수 있고,

천연물로부터 유래된 것으로 부작용이 문제될 가능성도 낮을 뿐만 아니라 MTT 분석결과 본 발명의 효과를 유익적으로 얻을 수 있는 함량의 약 10배인 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 현삼 추출물을 투여한 경우에도 세포독성이 없으므로, 알레르기성 질환 특히, 알레르기성 천식이나 알레르기성 비염 뿐만 아니라 최근 문제가 아토피와 알레르기성 접촉성 피부염의 치료, 개선 또는 예방에 효과적일 것이므로, 다양한 알레르기성 질환의 치료, 개선 및 예방을 위한 치료제, 기능성 식품 및 화장품과 세정제를 포함한 외용 조성물 등 여러 방법으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, RBL-2H3 세포주를 이용하여, 현삼 추출물의 세포독성을 MTT assay법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 각 그래프에서 가로축의 수치는 현삼 추출물의 투여량($\mu\text{g}/\text{mL}$)량을 나타내는 수치이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, RBL-2H3 세포주를 이용하여, 현삼 추출물의 항알레르기 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 도 2a는 β -hexosaminidase의 분비정도를 확인한 그래프이고, 도 2b는 히스타민의 유리 정도를 확인한 그래프이며, 상기 각 그래프에서 가로축의 수치는 현삼 추출물의 투여량($\mu\text{g}/\text{mL}$)량을 나타내고, 상기 밑줄은 알레르기 반응 유발물질인 dinitrophenyl-bovine serum albumin(DNP-BSA)를 첨가한 것을 의미하며, MED는 DNP-BSA를 첨가하지 않은 대조군을 의미한다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, RBL-2H3 세포주를 이용하여, 현삼 추출물의 항알레르기 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 도 3a는 TNF- α 의 생성정도를 확인한 그래프이고, 도 3b는 IL-4의 생성정도를 확인한 그래프이며, 상기 각 그래프에서 가로축의 수치는 현삼 추출물의 투여량($\mu\text{g}/\text{mL}$)량을 나타내고, 상기 밑줄은 알레르기 반응 유발물질인 DNP-BSA를 첨가한 것을 의미하며, MED는 DNP-BSA를 첨가하지 않은 대조군을 의미한다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene(DNFB)에 의한 접촉성 과민반응 모델을 이용한 실험 경과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 실험동물을 이용하여, 현삼 추출물의 항알레르기 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 도 5a는 DNFB에 의해 유도된 알레르기 반응에 따른 실험동물의 귀 두께 변화를 나타낸 그래프이고, 도 5b는 DNFB에 의해 유도된 알레르기 반응에 따른 실험동물의 귀 무게 변화를 나타낸 그래프이며, Vehicle은 알레르기 유발 물질과 항알레르기 물질 모두를 첨가하지 않은 대조군을 의미한다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 실험동물을 이용하여, 현삼 추출물의 항알레르기 효과를 확인한 결과를 나타낸 사진으로, 보다 구체적으로, DNFB에 의한 생쥐 귀 조직변화 정도를 반응시간 및 현삼 추출물 투여량 별로 구분하여 촬영한 사진으로, Vehicle은 알레르기 유발 물질과 항알레르기 물질 모두를 첨가하지 않은 대조군을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐으로 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으므로, 이는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0069] <실시예 1> 현삼추출물의 제조

[0070] 현삼(*Scrophularia buergeriana*)을 뿌리의 건조물 200g을 곱게 마쇄한 후, 70% 식음용 주정 에탄올 2L에 침지한 후, 온침 추출법으로 추출하였다.

[0071] 보다 구체적으로, 상기 현삼 뿌리 200g에 70% 에탄올 2L를 가하여 상기 현삼 뿌리를 추출용매에 완전히 침지시킨 후, 80℃에서 3시간 동안 환류시키면서 추출하였다. 상기 추출을 통해 제조된 현삼 추출액을 진공회전증발기를 이용하여 추출 용매인 에탄올 수용액을 완전히 제거하고 농축한 뒤, -20℃에서 동결건조하여, 추출물을 수득하였다.

[0072] 상기 수득한 추출물은 실험에 사용하기 전까지 냉동보관하였다.

[0073] <실시예 2> 세포 실험

[0074] 실시예 2-1. 세포 및 배양

[0075] 상기 실시예 1에서 제조된 현삼 추출물의 세포 독성 및 항알레르기활성을 확인하기 위하여, 흰쥐의 호염기성 세포인 RBL-2H3(rat basophilic leukemia) 세포를 한국세포주은행에서 수득하였다. 상기 세포는 항생제 및 항균제로서 100 U/ml의 페니실린 G 및 100 U/ml의 스트렙토마이신이 포함된 10% 열처리 FBS(fetal bovine serum)을 첨가한 MEM(minimum essential medium) 배지에서 5% CO₂ 및 37℃의 조건으로 배양하였고, 2일에 한번 씩 계대배양하였다.

[0076] 실시예 2-2. 세포독성실험

[0077] 상기 실시예 1에서 얻은 현삼 추출물의 세포 독성효과를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0078] 상기 실시예 1의 현삼 추출물은 DMSO 용매에 용해시켜, 배지에 0, 10, 100, 1000, 5000 µg/ml로 희석하여 준비하였다. 하기 모든 시험에서 DMSO의 농도는 0.01%를 초과하지 않도록 조절하였다. 참고예 1에서 배양한 세포현탁액(5×10^4 세포) 200 ml를 96 웰 플레이트에 분주하여 24시간 경과 후, 상기에서 준비한 희석 시료로 배지를 교체하였다. 24시간 추가 배양 후, 세포증식 분석 키트(CellTiter Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit, Promega, USA)를 사용하여 세포독성을 측정하였다. 구체적으로는 키트에 포함되어 있는 하나의 용액(테트라졸리움 화합물(tetrazolium compound) : [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt ; MTS 및 phenazine ethosulfate ; PES의 복합체)을 각 웰 당 20 ml 첨가하여 차광한 상태로 2시간 배양 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0079] 상기 도 1에 나타난 바와 같이, 실험결과 현삼 주정추출물 5000 mg/ml의 농도에서 RBL-2H3 세포에 대한 세포의 생존 및 증식이 억제되는 것으로 나타나, 이후 실험에서 5000 mg/ml 농도를 제외하였다

[0080] 실시예 2-3. β-hexosaminidase 유리량 측정

[0081] 현삼 추출물의 항알레르기 효과를 측정하기 위해 세포 탈과립의 지표로써 항원(DNP-BSA)에 의해 유리된 β-hexosaminidase의 활성을 측정하였다. 상기 실시예2-1에서 배양한 세포현탁액(2×10^5 세포)을 24-웰 플레이트의 웰 당 300 ml씩 1시간 동안 부착시켰다. 1시간 동안 안정화 시킨 세포에 dinitrophenyl-immunoglobulin E(DNP-IgE, 50 ng/ml)로 24시간 동안 감작시킨 후, 세포들을 Siraganian buffer(119mM NaCl, 5mM KCl, 5.6mM glucose, 0.4mM MgCl₂, 25mM PIPES, 40mM NaOH, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 7.2)로 세척한 다음 각 웰 당 Siraganian buffer 160 ml로 37℃에서 10분간 반응시키고, 20 ml의 현삼 주정추출물(0~1000 µg/ml)을 첨가 후, 30분간 추가 배양시켰다. 이후 세포에 20 ml의 항원(DNP-BSA, 25 ng/ml)을 10분 동안 처리하여 세포의 탈과립을 유도하였으며, 반응 종결 후 상층액을 취해 300×g의 조건에서 10분 동안 원심분리한 뒤 상층액 50 ml를 96-웰 플레이트에 옮겼다. 기질(1mM p-nitrophenyl-N-acetyl-D-glucosaminide) 50 ml를 상층액이 옮겨진 96-웰 플레이트에 넣고, 37℃에서 1시간 동안 배양시킨 다음 각 웰 당 100 ml의 stop solution(0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃)를 넣어 반응을 종결시키고 405nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 2a에 나타내었다.

[0082] 상기 도 2a에 나타난 바와 같이, 항원 (DNP-BSA)에 의해 유도된 세포 탈과립에 의한 β-hexosaminidase의 유리가 현삼 추출물에 의해 현저하게 감소되었음을 관찰할 수 있었다. 특히, 상기 현삼 추출물의 첨가량이 100 µg/ml를 첨가한 실시예부터 뚜렷한 탈과립 억제 효과가 확인되었다.

[0083] 실시예 2-4. Histamine 유리량 측정

[0084] 현삼 주정추출물의 항알레르기 효과를 측정하기 위해 세포 탈과립의 지표로써 항원 (DNP-BSA)에 의해 유리된 히스타민 양을 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 통해 측정하였다. 상기 실시예 2-1에서 배양한 세포현탁액(2×10^5 세포)을 24-웰 플레이트의 웰 당 300 ml씩 1시간 동안 부착시켰다. 1시간 동안 안정화 시킨 세포에 DNP-IgE(50 ng/ml)로 24시간 동안 감작시킨 후, 세포들을 Siraganian buffer(119mM

NaCl, 5mM KCl, 5.6mM glucose, 0.4mM MgCl₂, 25mM PIPES, 40mM NaOH, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 7.2)로 세척한 다음 각 웰 당 Siraganian buffer 160 ml로 37℃에서 10분간 반응시키고, 20 ml의 현삼 추출물(0~1000 µg/ml)을 첨가 후 30분간 추가 배양시켰다. 이후 세포에 20 ml의 항원(DNP-BSA, 25 ng/ml)를 10분 동안 처리하여 세포의 탈 과립을 유도하였으며, 반응 종결 후 상층액을 300×g의 조건에서 10분 동안 원심분리를 한 후 상층액을 취하여 세포로부터 유리된 히스타민의 양을 Oxford사 (Oxford Biomedical Research, OXFORD, MI)로부터 구입한 키트 및 키트의 사용자 매뉴얼에 기재된 방법으로 히스타민의 양을 측정하였고, 그 결과를 도 2b에 나타내었다.

[0085] 상기 도 2b에 나타난 바와 같이, 실험결과 현삼 주정추출물은 항원 (DNP-BSA)에 의해 유도된 세포 탈 과립에 의한 히스타민의 유리를 현저하게 저해하였다. 특히, 100µg/ml를 첨가한 경우에는 대조군과 거의 유사한 정도의 히스타민 유리량이 확인되었으며, 1,000µg/ml를 첨가한 경우와 비교하여 거의 유사한 정도의 히스타민 유리 억제능이 있는 것으로 확인되었다.

[0086] 실시예 2-5. 사이토카인 생성량 측정

[0087] 현삼 추출물의 항알레르기 효과를 측정하기 위해 항원(DNP-BSA)에 의해 생성된 tumor necrosis factor(TNF)-α와 interleukin(IL)-4의 양을 효소면역측정법 (enzyme-linked immuno absorbent assay, ELISA)을 통해 측정하였다. 상기 실시예2-1에서 배양한 세포현탁액(2×10⁵ 세포)을 24-웰 플레이트의 웰 당 300 ml씩 1시간 동안 부착시켰다. 1시간 동안 안정화 시킨 세포에 DNP-IgE(50 ng/ml)로 24시간 동안 감작시킨 후 세포들을 Siraganian buffer로 세척한 다음 현삼 추출물(0~1000 100µg/ml)을 항원 (DNP-BSA, 25 ng/ml)과 동시에 세포에 처리한 다음 4시간 동안 배양하였다. 세포를 배양한 후 세포 상층액을 취하여 세포로부터 분리된 TNF-α와 IL-4의 양을 Panomics사 (Panomics, Inc., CA, USA)로부터 구입한 키트 및 키트의 사용자 매뉴얼에 기재된 방법으로 사이토카인의 양을 측정하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0088] 상기 도 3에 나타난 바와 같이, 실험결과 현삼 주정추출물은 항원(DNP-BSA)에 의해 유도된 TNF-α 및 IL-4 생성을 현저하게 저해하는 것이 확인되었다. 특히, TNF-α의 경우, 10 µg/ml를 첨가한 군에서부터 생성 억제능이 확인되었고, IL-4의 경우 100 µg/ml를 첨가한 군에서부터 생성 억제능이 확인되었다. 생 및 IL-4 생였다.

[0089] <실시예 3> 동물실험

[0090] 3-1. 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene(DNFB)에 의한 접촉성 과민반응 모델

[0091] 6주령 암컷 생쥐를 코아텍(대한민국)에서 구입하여, 12시간을 주기로 빛과 어두운 환경에 적응시켰다. 상기 6주령의 암컷 생쥐는 각 군당 6마리씩 하기 표 1과 같이 구분하여 실험에 사용하였다. 하기 표 1은 DNFB에 의한 접촉성 과민반응 모델로 사용된 모델군을 구분하여 나타낸 것이다.

표 1

군	항원	시험물질(70% 주정용액)
Vehicle	올리브오일+아세톤 용액	주정
0 mg/ear SB	DNFB	주정
10 mg/ear SB	DNFB	10 mg/ear SB
100 mg/ear SB	DNFB	100 mg/ear SB
1000 mg/ear SB	DNFB	1000 mg/ear SB
Dexametasone	DNFB	0.05 mg/ear Dexamatasone

[0093] 상기 과민반응 모델 실험은 도 4에 나타난 과정으로 수행하였다.

[0094] 보다 구체적으로, 접촉성 과민반응은 생쥐 배 부분의 털을 제거하고, 이틀 후 감작항원으로 올리브오일과 아세톤을 4:1로 혼합한 용매에 DNFB를 0.5% 농도로 용해시킨 DNFB 용액 25 ml을 실험 0일과 1일에 생쥐 배에 도포하여 생쥐를 감작시켰다. 감작 후 실험 5일째에 0.2% DNFB 용액 20 ml을 생쥐의 귀에 도포하여 DNFB에 의한 과민 반응을 유도하였다. 현삼 추출물은 0.2% DNFB 처리 2시간 전과 0.2% DNFB 처리 후 2시간 24시간 및 48시간 켜에 0 µg/ear, 100 µg/ear 및 1000 µg/ear 농도로 생쥐의 귀에 도포하였다. 0.2% DNFB 처리 후, 24시간, 48시간 및 72시간 켜 생쥐를 희생시키고 귀 조직을 얻어 분석에 사용하였다.

[0095]

4-2. 귀 두께 및 무게 측정

[0096]

0.2% DNFB 항원 처리 후 과민반응은 0.2% DNFB 항원 처리 전과 처리 후 6시간, 24시간, 48시간 및 72시간에 귀의 두께를 캘리퍼(Mitutoyo, 일본)를 사용하여 측정하였다. 또한, 상기한 바와 같이, 0.2% DNFB 항원 처리 후 24시간, 48시간 및 72시간 췌 생쥐를 희생시키고, 귀 조직을 5mm 펀치를 이용하여 같은 크기로 잘라낸 후, 미세 저울로 각각의 무게를 측정하였고 그 결과를 도 5a 및 도 5b에 나타내었다.

[0097]

상기 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이, 현삼 추출물을 처리한 경우에 귀의 두께 및 무게가 유의적으로 감소하는 것으로 확인되어, 상기 현삼 추출물은 DNFB에 의한 과민반응을 억제할 수 있는 것으로 관찰되었다.

[0098]

4-3. 조직 변화 관찰

[0099]

0.2% DNFB 항원 처리 후 24시간, 48시간 및 72시간 췌 생쥐를 희생시키고 귀 조직을 O.C.T. compound(Sakura Finetechnical Co., LTD., 일본)로 포매시켜 동결 시킨 후, cryostat(Thermo SCIENTIFIC, Waldorf, 독일)를 이용하여 6 mm 두께로 조직절편을 자르고 hematoxylin & eosin 염색을 통해 DNFB에 의해 유도된 과민 반응에 의한 조직학적인 변화를 촬영하여, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0100]

상기 도 6에 나타난 바와 같이, 실험결과 현삼 추출물은 DNFB에 의한 피부의 부종, 표피과대증식 및 염증 세포의 침윤을 효과적으로 억제시킬 수 있는 것으로 확인되었다.

[0101]

4-4. DNFB에 의한 TNF- α 와 IL-4의 생성 억제

[0102]

귀 조직 내, TNF- α 와 IL-4 함량은 Murakawa 등의 방법(Murakawa M *et al.*, Biochem. Pharmacol., 28, pp1331-1336(2006))에 의해 측정하였다.

[0103]

보다 구체적으로, 0.2% DNFB 처리 후 24시간, 48시간 및 72시간 후에 귀 조직을 얻고, 귀 조직 무게의 3배에 해당하는 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5, 1mM EDTA, 0.1% Triton X-100)로 균질화 시켰다. 4℃ 및 10,000×g의 조건으로 10분 동안 원심분리 후 상층액을 얻어 상층액에 함유된 TNF- α 와 IL-4의 양을 Panomics사(Panomics, Inc., USA)로부터 구입한 키트 및 키트의 사용자 매뉴얼에 기재된 방법으로 측정하였다. TNF- α 와 IL-4의 양은 단백질 정량 키트(Bio-Rad, USA)를 이용하여 정량한 단백질 양으로 보정하여 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0104]

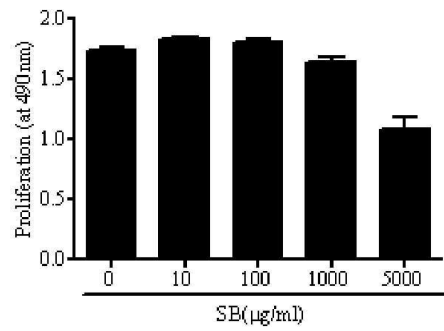
Group	TNF- α (pg/mg protein)			IL-4(pg/mg protein)		
	after DNFB treatment (h)			after DNFB treatment (h)		
	24	48	72	24	48	72
Vehicle	1.37	1.37	1.37	6.56	6.56	6.56
0 mg/ear SB	2.15	1.59	0.99	12.90	8.17	7.88
100 mg/ear SB	2.64	2.31	1.79	8.91	8.27	8.09
1000 mg/ear SB	2.15	1.59	1.27	7.86	6.82	6.05
Dexametasone	0.93	1.40	0.81	6.17	7.24	4.38

[0105]

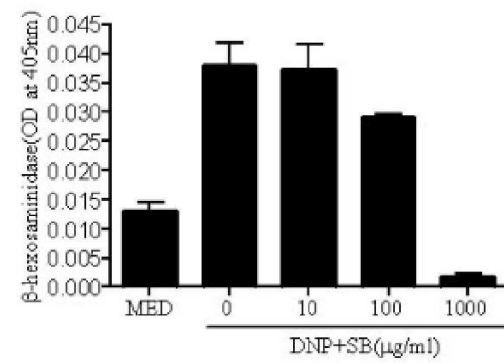
상기 표 2에 나타난 바와 같이, 실험결과 현삼 추출물이 항원(DNFB)에 의해 유도된 TNF- α 및 IL-4 생성을 저해할 수 있는 것으로 확인되었다.

도면

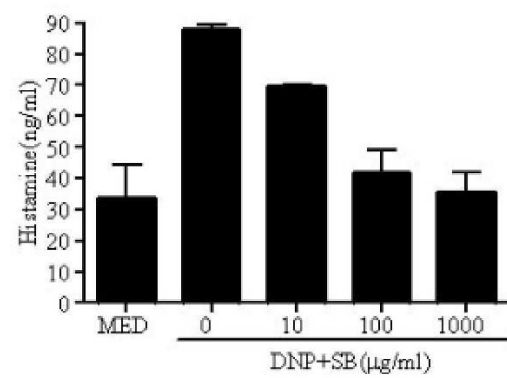
도면1



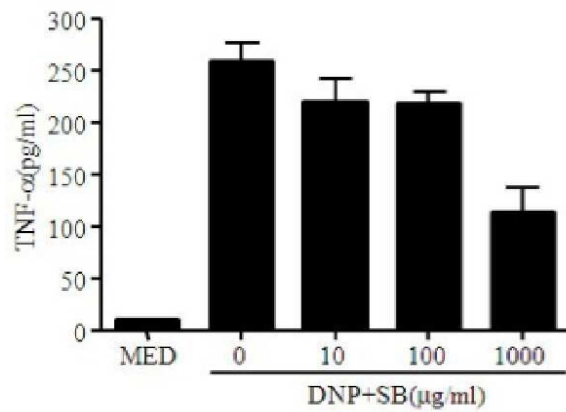
도면2a



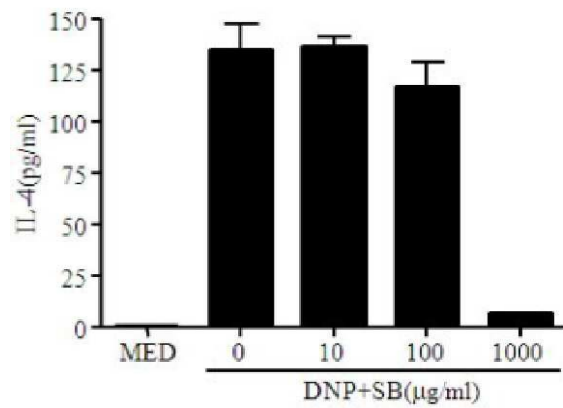
도면2b



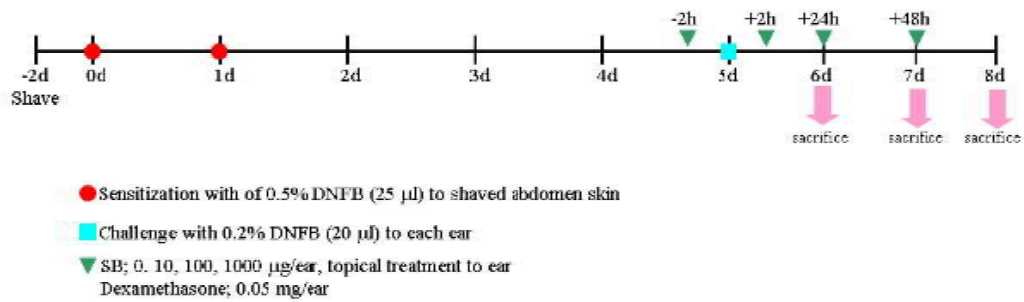
도면3a



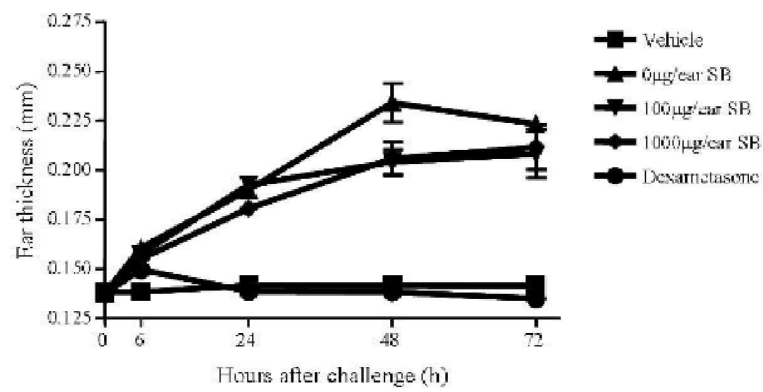
도면3b



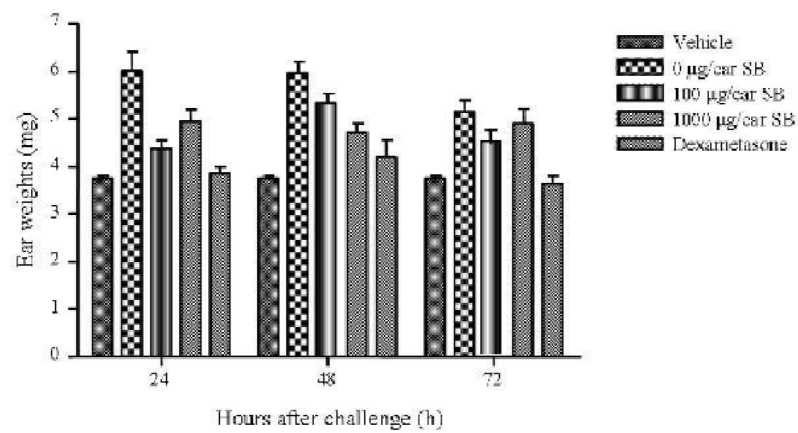
도면4



도면5a



도면5b



도면6

