



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0085035
(43) 공개일자 2022년06월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/82 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61P 1/02 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 36/82 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2021-0179010
(22) 출원일자 2021년12월14일
심사청구일자 2021년12월14일
- (30) 우선권주장
1020200174680 2020년12월14일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
경상남도
경상남도 창원시 의창구 중안대로 300, 경상남도
도청 (사립동)
- (72) 발명자
조수정
경남 진주시 새평거로 30, 엠코타운더프라하 113
동 1802호
김혜수
경상남도 밀양시 중앙로 234-17 대우아파트 302동
809호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인이지

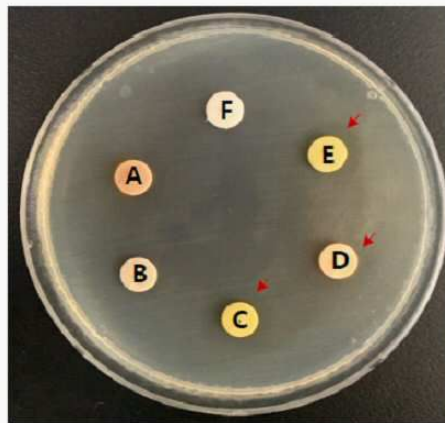
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 노각나무 추출물을 포함한 구강 건강 개선용 조성물 및 이를 포함하는 제품

(57) 요약

본 발명은 노각나무 추출물을 포함한 구강 건강 개선용 조성물 및 이를 포함하는 제품에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 노각나무의 특정 부위 추출물의 정균 활성을 이용한 노각나무 추출물을 포함하는 구강 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물, 의약품 조성물, 치과용 조성물, 구강 건강 개선용 조성물, 및 이를 포함하는 제품에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 1/02 (2018.01)

A61P 31/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/312 (2013.01)

(72) 발명자

박민정

경남 진주시 진주대로 930번길 19, 302호

박준호

경상남도 창원시 마산합포구 진동면 동촌길 185,
102-2204

김대현

부산광역시 동래구 동래아시아드대로 202, 103동
802호(운천동, e편한세상동래아시아드)

유찬열

경상남도 거창군 거창읍 강남로 266, 106-701

오성윤

부산광역시 사상구 모덕로 27, 3층 301호

명세서

청구범위

청구항 1

노각나무의 가지 및 노각나무의 잎 중 1종 이상에서 추출된, 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 의한 구강 질환을 예방 또는 치료할 수 있는, 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 노각나무 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 분획되는 분획물인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 노각나무의 가지 추출물은 상온 침지 추출물이고,

상기 노각나무의 잎 추출물은 상온 침지 추출물 또는 열수 추출물인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 노각나무 추출물은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01 내지 20 중량%의 함량으로 포함되는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 노각나무 추출물은 0.2 내지 10mg/ml의 농도로 포함되는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세균의 섬모 형성 억제, 세균의 집락, 치면세균막(dental biofilm) 형성 억제, 및 세균막의 바이오매스 형성 억제 중 1종 이상의 억제 효과를 가지는, 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 바이오필름 형성과 관련된 섬모를 암호화하는 유전자인 fimA, fimB, 및 mfal 유전자 중 1종 이상의 발현을 억제하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은, 통증 완화 효과 및 염증 억제 효과 중 1종 이상의 효과를 가지는, 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 염증 억제 효과는 kgp 유전자 및 rgpA 유전자의 발현을 억제하는 것을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 노각나무 추출물은 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대해 정균 효과를 가지는, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 구강 질환은 구강 내 치주질환, 치아우식증, 및 구취 중 1종 이상인, 약학적 조성물.

청구항 12

노각나무의 가지 및 노각나무의 잎 중 1종 이상에서 추출된, 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 의한 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 의약외품 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 의약외품은 구강 청결제 또는 치약인, 의약외품 조성물.

청구항 14

노각나무의 가지 및 노각나무의 잎 중 1종 이상에서 추출된, 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 의한 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 식품 조성물.

청구항 15

노각나무의 가지 및 노각나무의 잎 중 1종 이상에서 추출된, 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 의한 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 치과용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 노각나무 추출물을 포함한 구강 건강 개선용 조성물 및 이를 포함하는 제품에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 노각나무의 특정 부위 추출물의 정균 활성을 이용한 노각나무 추출물을 포함하는 구강 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물, 의약외품 조성물, 치과용 조성물, 구강 건강 개선용 조성물, 및 이를 포함하는 제품에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 구강 건강과 관련된 질환 중 치아우식증과 치주질환은 아동에서부터 성인, 노인에 이르기까지 다양한 연령층에서 발병되는 구강 질환으로 한 번 손상이 발생하면 영구손상으로 남는 경향이 높아 생애 전 주기에 걸쳐 삶의 질을 떨어뜨리는 원인이 되고 있다.

[0004] 치아우식증과 치주질환은 구강 내 존재하는 세균에 의해 발병되는 세균감염성 질환이며 구강 세균은 음식물 섭취를 통해 영양분을 공급받고 세균 밀도가 높아지면 치아표면에 치면세균막(dental biofilm)이라 불리는 바이오필름(biofilm)을 형성하게 된다. 치면세균막은 치아 표면에 부착된 당 단백질(glycoprotein) 성분의 얇은 막에 약 700여 종 이상의 세균들이 부착하여 형성된 점착성 세균막이다.

[0005] 구강 내 치면세균막은 물리적으로 두꺼운 층을 형성하기 때문에 외부 물질의 침투가 어렵고, 세포 간 상호작용을 통해 유전적 변이가 일어나기 때문에 부유 세균에 비해 항균 물질에 대한 저항성이 높다.

[0006] 치면세균막이 적절하게 제거되지 못하면 치면에 침착하게 되고 시간이 지나면서 치석으로 변하게 된다. 치석은 계속 방치하게 되면 치은출혈, 부종, 치조골 흡수로 인한 치아 흔들림이 발생할 수 있고 치아우식증과 치주질환

의 원인이 된다. 치아우식증과 치주질환은 아동에서부터 성인, 노인에 이르기까지 다양한 연령층에서 발병되는 구강질환으로 한 번 손상이 발생되면 영구손상으로 남는 경향이 높아 생애 전 주기에 걸쳐 삶의 질을 떨어뜨리는 원인이 되기때문에 치주질환은 치료뿐만아니라 예방과 치료 예후가 중요하게 여겨지고 있다. 특히, 치주질환은 치아 주변 조직인 치은, 치조골, 치주인대, 및 백악질에 염증이 발생하는 질환으로 치아 소실의 주요한 원인이며 동맥경화증과 같은 심혈관질환뿐만 아니라 패혈증, 유산, 조산, 폐렴 및 당뇨병과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다.

[0007] 치주질환과 관련된 세균들은 주로 치은연하 치면세균막에 존재하는 그람음성 혐기성세균으로 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis* 또는 *P. gingivalis*)가 대표적이다. 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)는 콜라겐을 분해하고 암모니아, 황화수소, 아민, 리포폴리사카라이드 등과 같은 독소를 분비하여 치주조직에 직접적인 영향을 미친다. 또한, 포르피로모나스 진지발리스(*P. gingivalis*)의 대사산물들은 생체 면역계를 자극하고 자극된 체액성 및 세포성 면역계는 여러 작용에 의해 활성 산소, 인터루킨과 같은 사이토카인을 분비하여 잇몸 염증을 유발하기도 한다.

[0008] 따라서 치주질환을 예방하고 치료하는 데 있어 치면세균막을 제거하는 것은 필수적이다. 치면세균막을 제거하는 가장 좋은 방법은 올바른 잇솔질이지만 잇솔질로는 치아 교합면에 존재하는 세균막이나 치아 인접면에 있는 세균막까지는 제거하기 어렵다.

[0009] 이러한 단점을 보완하기 위해 최근에 치실이나 항균제가 첨가된 구강케어제품의 사용이 증가하고 있다. 현재 구강용 항균제로는 비스비구아니드(bisbiguanides) 제제인 클로르헥시딘(chlorhexidine)과 4급 암모늄 제제인 세틸피리디움(cetylpyridium), 염화벤잘코늄(benzalkonium chloride) 및 페놀화합물인 트리클로산(triclosan)이 있으나 이들 화합물 유래 항균제는 장기간 사용 시 치아나 연조직에 착색이 유발되고 미각변화 가능성 등이 보고되고 있어서 이를 대체할 수 있는 천연물 유래 구강건강 소재 개발에 관한 연구가 주목을 받고 있다. 특히, 살균작용을 하는 항균 물질의 경우, 인체 세포에도 영향을 미칠 수 있고, 항균 물질에 대한 저항성 세균의 발생 등 부작용이 있을 수 있다.

[0010] 또한, 치주질환을 비롯한 구강질환을 유발하는 원인균을 억제 또는 제거하기 위해서 사용하는 항생제는 인체에 균교대 현상과 내성균 형성 등 부작용을 유발할 수 있기 때문에 최근에는 부작용이 적다고 알려진 천연물유래 구강건강 소재에 관한 연구들이 많은 관심을 받고 있다.

[0011] 최근 들어 오배자 추출물, 편백, 몰약, 라타니아, 카모밀레, 인도감나무 줄기 추출물, 오리나무 추출물 등이 포르피로모나스 진지발리스(*P. gingivalis*)에 대해 항균작용이 있음이 보고되면서 천연물로부터 인체에 무해하고 구강 병원미생물에 대해서는 항균 활성이 우수한 구강 건강 개선 소재 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0012] 한편, 본 발명의 배경기술로 대한민국 등록특허 제10-2001074호에 충치 억제 활성을 갖는 유산균 조성물이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 인체에 무해하고 구강 미생물에 대한 항균 활성 및 정균 활성이 우수한 노각나무 가지 또는 잎의 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 인체에 무해하고 구강 미생물에 대한 항균 활성 및 정균 활성이 우수한 노각나무의 가지 또는 잎의 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 인체에 무해하고 구강 미생물에 대한 항균 활성 및 정균 활성이 우수한 노각나무의 가지 또는 잎의 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 인체에 무해하고 구강 미생물에 대한 항균 활성 및 정균 활성이 우수한 노각나무의 가지 또는 잎의 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 치과용 조성물을 제공

하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 본원의 구강 건강 개선용 조성물을 포함하는 구강 건강 개선용 제품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 일 측면에 따르면, 노각나무의 가지 및 노각나무의 잎 중 1종 이상에서 추출된, 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 의한 구강 질환을 예방 또는 치료할 수 있는, 약학적 조성물이 제공된다.

[0021] 일 실시예에 따르면, 상기 노각나무 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 분획되는 분획물일 수 있다.

[0022] 일 실시예에 따르면, 상기 노각나무의 가지 추출물은 상온 침지 추출물이고, 상기 노각나무의 잎 추출물은 상온 침지 추출물 또는 열수 추출물일 수 있다.

[0023] 일 실시예에 따르면, 상기 노각나무 추출물은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01 내지 20 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.

[0024] 일 실시예에 따르면, 상기 노각나무 추출물은 0.2 내지 10mg/ml 농도로 포함될 수 있다.

[0025] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 세균의 섬모 형성 억제, 세균의 집락, 치면세균막(dental biofilm) 형성 억제, 및 세균막의 바이오매스 형성 억제 중 1종 이상의 억제 효과를 가질 수 있다.

[0026] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 바이오필름 형성과 관련된 섬모를 암호화하는 유전자인 *fimA*, *fimB*, 및 *mfa1* 유전자 중 1종 이상의 발현을 억제할 수 있다.

[0027] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은, 통증 완화 효과 및 염증 억제 효과 중 1종 이상의 효과를 가질 수 있다.

[0028] 일 실시예에 따르면, 상기 염증 억제 효과는 *kgp* 유전자 및 *rgpA* 유전자의 발현을 억제할 수 있다.

[0029] 일 실시예에 따르면, 상기 노각나무 추출물은 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대해 정균 효과를 가질 수 있다.

[0030] 일 실시예에 따르면, 상기 구강 질환은 치주질환, 치아우식증, 및 구취 중 1종 이상일 수 있다.

[0032] 다른 측면에 따르면, 노각나무의 가지 및 노각나무의 잎 중 1종 이상에서 추출된, 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 의한 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 의약품 조성물이 제공된다.

[0033] 일 실시예에 따르면, 상기 의약품은 구강 청결제 또는 치약일 수 있다.

[0035] 또 다른 측면에 따르면, 노각나무의 가지 및 노각나무의 잎 중 1종 이상에서 추출된, 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 의한 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 식품 조성물이 제공된다.

[0037] 또 다른 측면에 따르면, 노각나무의 가지 및 노각나무의 잎 중 1종 이상에서 추출된, 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 의한 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 치과용 조성물이 제공된다.

발명의 효과

[0039] 일 실시예에 의하면, 천연물에서 유래되어 인체에 무해하면서도, 구강 질환 유발균인 포르피로모나스 진지발리

스(*Porphyromonas gingivalis*) 등의 활성 또는 생육을 현저하게 억제할 수 있고, 정균작용을 통해, 입속 세균이 남아 있더라도 점막 형성과 집락을 형성을 억제하여 치주염을 예방 및 통증 완화 효과를 가진, 구강 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0040] 일 실시예에 의하면, 천연물에서 유래되어 인체에 무해하면서도, 구강 질환 유발균인 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 등의 활성 또는 생육을 현저하게 억제할 수 있고, 정균작용을 통해, 입속 세균이 남아 있더라도 점막 형성과 집락을 형성을 억제하여 치주염을 예방 및 통증 완화 효과를 가져, 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 의약품 조성물을 제공할 수 있다.

[0041] 일 실시예에 의하면, 천연물에서 유래되어 인체에 무해하면서도, 구강 질환 유발균인 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 등의 활성 또는 생육을 현저하게 억제할 수 있고, 정균작용을 통해, 입속 세균이 남아 있더라도 점막 형성과 집락을 형성을 억제하여 치주염을 예방 및 통증 완화 효과를 가져, 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 식품 조성물을 제공할 수 있다.

[0042] 일 실시예에 의하면, 천연물에서 유래되어 인체에 무해하면서도, 구강 질환 유발균인 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 등의 활성 또는 생육을 현저하게 억제할 수 있고, 정균작용을 통해, 입속 세균이 남아 있더라도 점막 형성과 집락을 형성을 억제하여 치주염을 예방 및 통증 완화 효과를 가져, 구강 질환을 예방 또는 개선할 수 있는, 치과용 조성물을 제공할 수 있다.

[0043] 일 실시예에 의하면, 천연물에서 유래되어 인체에 무해하면서도, 살균활성의 부작용이 최소화되고, 정균작용을 통해 구강 질환의 예방 또는 개선에 유용하게 사용될 수 있는 구강 건강 개선용 제품을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무 추출물을 포함하는 구강 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 다양한 균주에 대한 항균 활성을 확인하기 위하여, 이용한 한천 내 확산법(Agar diffusion)을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) ATCC33277에 대한 노각나무 잎의 에탄올 추출물의 항균 활성 분석 결과를 나타낸 것이다. a: 음성대조군인 DMSO, b: 음성대조군인 에탄올, c: 양성대조군인 소듐라우릴설페이트(sodium lauryl sulfate, 1 mg/disc), d: 양성대조군인 클로르헥시딘(chlorhexidine, 1 mg/disc), e: 양성대조군인 트리클로산(triclosan, 1 mg/disc), f: 노각나무 잎의 에탄올 추출물 (1 mg/disc).

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 다양한 노각나무의 추출물(노각나무의 가지 및 잎의 열수 추출물 또는 노각나무의 가지 및 잎의 상온 침지 추출물)의 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 항균 활성 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무의 잎의 열수 추출물 중 다양한 유기용매의 극성에 따른 분획물의 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 항균 활성 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무의 잎의 열수 추출물 중 부탄올 분획물(Buthanol Fr.)의 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 최소성장억제 농도(MIC) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무의 잎의 열수 추출물을 포함하는 구강 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 세균막 형성에 미치는 영향을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무의 추출물을 포함하는 구강 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 처리한 후, 주사전자현미경(SEM)을 통해 상기 세균의 세균막(biofilm)을 확인한 결과를 무처리구와 대비하여 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무 추출물을 포함하는 구강 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 조성물을 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 처리한 후, 투과전자현미경(TEM)을 통해 상기 세균의 세균막(biofilm)을 확인한 결과를 무처리구와 대비하여 나타낸 것이다. A 및 C: 노각나무 추출물 무처리구, B 및 D: 노각나무 잎의 열수 추출물 처리구.

도 9는 노각나무 잎의 에탄올 추출물(0.2-2.0 mg/ml)로 처리된 tryptic soy hemin menadione broth 내의 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) KCTC5352의 생장 및 바이오필름 형성 분석 결과를 나타낸 그래프를 나타낸 것이다. *P. gingivalis* KCTC5352의 생장 및 바이오필름 형성은 혐기성 조건 하에서 측정되었다. 모든 분석은 3회 반복 수행되었고, 평균값 및 표준오차가 나타나 있다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무 추출물을 포함하는 구강 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 구강 미생물의 세균막 바이오매스(biomass)에 미치는 영향을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 노각나무의 추출물(노각나무의 가지 및 잎의 열수 추출물 또는 노각나무의 가지 및 잎의 상온 침지 추출물)의 세균막의 바이오매스 형성 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)가 잇몸 상피 세포(gingival epithelial cell)에 부착되어 세균막을 형성하는 메커니즘 및 관련 유전자를 개략적으로 나타낸 것이다.

도 13은 qRT-PCR 분석에 의한 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) KCTC5352의 *fimA* 및 *fimB* mRNA 발현에 대한 노각나무 잎의 에탄올 추출물의 효과를 나타내는 그래프를 나타낸 것이다. mRNA 발현은 대조 유전자로 사용된 16S rRNA 유전자에 의해 정규화되었다. 결과는 5회 반복의 $\pm$ SD로 대조군과 비교해서 나타내어진다. * $p < 0.05$

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 농도의 노각나무의 추출물(노각나무의 가지의 상온 침지 추출물 및 노각나무의 잎의 열수 추출물)의 섬모 관련 유전자인 *fimA* 유전자의 억제 정도를 qRT-PCR을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 농도의 노각나무의 추출물(노각나무의 가지의 상온 침지 추출물 및 노각나무의 잎의 열수 추출물)의 섬모 관련 유전자인 *mfa1* 유전자의 억제 정도를 qRT-PCR을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에서 염증반응 유도과 관련한 유전자의 발현 메커니즘을 개략적으로 나타내는 도면이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 농도의 노각나무의 추출물(노각나무의 가지의 상온 침지 추출물 및 노각나무의 잎의 열수 추출물)의 염증 반응 유도 관련 유전자인 *kgp* gene의 억제 정도를 qRT-PCR을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 농도의 노각나무의 추출물(노각나무의 가지의 상온 침지 추출물 및 노각나무의 잎의 열수 추출물)의 염증 반응 유도 관련 유전자인 *rgpA* gene의 억제 정도를 qRT-PCR을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 19는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에서 염증 매개 인자의 발현 메커니즘을 개략적으로 나타내는 도면이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 농도의 노각나무의 추출물(노각나무의 가지의 상온 침지 추출물 및 노각나무의 잎의 열수 추출물)의 염증 매개 인자인 IL-6 gene의 억제 정도를 qRT-PCR을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 농도의 노각나무의 추출물(노각나무의 가지의 상온 침지 추출물 및 노각나무의 잎의 열수 추출물)의 염증 매개 인자인 IL-8 gene의 억제 정도를 qRT-PCR을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 22는 본 발명의 일 실시예에 따라, 노각나무의 잎의 열수 추출물을 이용하여 제조된 구강청결제를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046]

본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우

그 상세한 설명을 생략한다. 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

- [0047] 본 발명을 더 쉽게 이해하기 위해 편의상 특정 용어를 본원에 정의한다. 본원에서 달리 정의하지 않는 한, 본 발명에 사용된 과학 용어 및 기술 용어들은 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 문맥상 특별히 지정하지 않는 한, 단수 형태의 용어는 그것의 복수 형태도 포함하는 것이며, 복수 형태의 용어는 그것의 단수 형태도 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0049] 일 측면에 따르면, 본원은 노각나무의 가지 및 노각나무의 잎 중 1종 이상에서 추출된, 노각나무 추출물을 유효 성분으로 포함하는, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 의한 구강 질환을 예방 또는 치료할 수 있는, 약학적 조성물을 제공한다.
- [0050] 노각나무(*Stewartia koreana* Nakai)는 차나무과 (Theaceae)의 낙엽교목으로 우리나라 전라남·북도, 경상남·북도에 분포하며, 주로 지리산 지역에 자생하고 있는 우리나라 고유 수종이다. 노각나무는 높이 7~15 m이며 수피는 얇은 조각으로 떨어져 적갈, 회백, 회갈색의 무늬가 생겨 얼룩얼룩하고, 꽃은 양성으로서 6~7월에 백색으로 피며, 새 가지의 기부에서 액생하고 과실은 삭과로 5각난형이다. 본 식물은 이명인 *Stewartia pseudocamellia* Maxim. var. *koreana* (Nakai) Kim 이라 하여 꽃이 컵 모양이고 가지가 곧고 둥글다고 특산종으로 보는 견해도 있으나 현재 일본 등에도 분포하는 *Stewartia pseudocamellia* Maxim.로 주로 기록하고 있고, 또 다른 이명으로는 *Stewartia ptero-petiolata* Cheng var. *koreana* (Rehd.) Sealy가 기록되어 있다. 노각나무는 꽃이 크고 화려하여 관상용으로 재배되어왔으며, 목재는 단단하고 무늬가 아름다워 가구재, 장식재 등으로 사용되고 있고 숯은 연마재로 사용되고 있다. 한방에서는 노각나무 수피와 근피를 모란(帽蘭)이라 하여 서근활혈(舒筋活血)의 효능이 있어 타박상으로 어혈, 근육 이완, 풍습성으로 인한 사지 마비와 동통 등이 있을 때 유효한 것으로 기록하고 있다. 또한, 민간에서 껍탄, 이뇨약으로 노각나무 열매를 사용하였다. 이상에서 살펴본 바와 같이 그 효능적 중요성이 인정되는 사지마비와 동통이 있을 때 유효한 것으로 기록하고 있다. 또한, 노각나무 추출물의 항산화, 항염증, 미백활성이 보고된 바가 있다.
- [0051] 그러나 현재까지 노각나무 추출물에 의한 구강 질환의 예방, 치료, 또는 구강 건강 개선에 대해 알려진 바는 없다.
- [0053] 상기 노각나무 추출물은 상기 노각나무의 천연, 잡종 또는 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어 노각나무의 종자(씨앗), 뿌리, 지상부, 가지, 잎, 꽃, 열매의 몸통, 열매의 껍질뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터도 추출이 가능하다. 이에 한정되는 것은 아니나, 이 중 노각나무의 가지 추출물 및 노각나무 잎 추출물 중 1종 이상일 수 있고, 노각나무 잎의 열수 추출물 및 노각나무 가지의 상온 침지 가지 추출물이 항균 내지 정균 활성 면에서 구강용 조성물로 가장 적합할 수 있다.
- [0054] 본원에서 용어, "추출물"은 상기 노각나무를 추출 처리한 것을 의미하는 것이고, 이에 제한되지는 않으나, 추출 처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 조정제물, 정제물 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 노각나무 추출물은 당업계에 공지된 일반적인 추출방법, 분리 및 정제방법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 추출방법으로는, 이에 한정되지는 않으나, 침지추출, 열수추출, 냉침추출, 환류냉각추출, 또는 초음파추출 등의 방법을 이용할 수 있다.
- [0056] 본원의 약학적 조성물은, 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있는데, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리락틱산(Poly Lactic Acid), 폴리-L-락틱산(poly-L-lactic acid), 광물유 등을 들 수 있다.
- [0057] 상기 약학적 조성물은 구강 건강을 유지하고 개선하기 위한 통상의 방법에 따라 환제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여

사용될 수 있으며, 특히 본원의 약학적 조성물이 구강 질환 예방 또는 치료용일 경우, 구체적으로 구강용 스프레이, 구강용 연고제, 또는 구강용 바니쉬의 제형을 가질 수 있다. 담체의 형태로는 각종 부정형의 담체, 마이크로 스피어, 나노파이버, 로진 등을 포함할 수 있다.

- [0058] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0059] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [0060] 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당 되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0061] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0062] 본원의 조성물은 포르피로모나스(*Porphyromonas*) 속 세균에 대해 항균 효과를 가지는 것을 특징으로 하며, 보다 상세하게 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 항균 효과가 우수하여 구강 질환의 예방, 개선, 또는 치료에 효과를 가질 수 있다.
- [0063] 본원에서 상기 조성물은 구강 질환의 예방 또는 치료용일 수 있다.
- [0064] 본원에서 사용된 용어 "치료"는 유익하거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 접근법으로서, 본 발명의 목적을 위해 유익하거나 바람직한 임상적 결과를 감지가능하거나 가능하지 않거나를 불문하고, 또한 부분적이든 전체적이든 상관없이 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화(즉, 더 나빠지지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 속도감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서, 치료는 치료법적 치료 및 예방적인 차원의 것들 모두를 가리키며, 치료할 필요가 있는 것들은 이미 질환을 가지고 있는 상태뿐만 아니라 질환이 예방되어야 할 상태를 포함한다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하여 구강 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0065] 본원에서 사용된 용어 "예방"은 상기 조성물을 이용하여 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 상기 조성물은 약학적 조성물, 구강 위생용 조성물의 형태로 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 노각나무 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 분획 되는 분획물일 수 있다. 추출하는 유기용매에 따라 유효성분의 추출 정도와 손실 정도가 차이가 날 수 있으므로, 적절한 유기용매를 선택하여 사용할 수 있다. 구체적으로 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출할 수 있다. 보다 구체적으로 에탄올을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0068] 본원에서 용어, "분획물"은 여러 다양한 구성성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.
- [0069] 본원에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 구강 질환의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 다양한 용매를 처리하여 수행하는 용매 분획법, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 수행하는 한외 여과 분획법, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 수행하는 크로마토그래피 분획법, 및 이의 조합 등이 될 수 있다.
- [0070] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데에 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 증류수, 알코올 등의 극성 용매; 핵산, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄 등의 비극성 용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 분획 용매 중 알코올을 사용하는 경우에는 바람직하게

는 C1 내지 C4의 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올)을 사용할 수 있다. 상기 노각나무 추출물은 에탄올 추출물의 부탄올 분획물이 구강 질환 예방, 개선, 또는 치료에 더 적합할 수 있다.

[0071] 또한, 상기 추출물 또는 분획물은 추출 후 건조 분말 형태로 제조되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0073] 일 실시예에 따르면, 상기 노각나무의 가지 추출물은 상온 침지 추출물이고, 상기 노각나무의 잎 추출물은 상온 침지 추출물 또는 열수 추출물일 수 있다.

[0074] 도 2 및 표 2에는 노각나무의 가지와 잎을 열수 추출하거나, 상온에서 침지하여 추출한 후, 각각의 추출물에 대해 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 항균 활성 결과가 나타나 있다. 이를 참조하면, 열수 추출한 가지 추출물의 경우, 노각나무 추출물 임에도, 상기 균주에 대한 항균 활성을 가지지 않아, 가열 및 상온의 여부는 매우 중요한 것으로 나타났다.

[0076] 본원은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 구강 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다. 이에 한정하는 것은 아니나, 상기 노각나무 추출물은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01 내지 20 중량%의 함량으로 포함될 수 있다. 본원의 약학적 조성물에 포함된 노각나무 추출물 또는 이의 분획물의 함량은 이에 한정되지 않으나, 최종 조성물 총 중량을 기준으로 0.01 내지 100 중량%, 0.01 내지 50 중량%, 보다 구체적으로 0.01 내지 20 중량%, 더욱더 구체적으로는 0.1 내지 10 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.

[0077] 본원의 약학적 조성물은 구강 질환의 예방 또는 치료 효과를 나타내므로, 이를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 본원의 방법은 구강 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

[0078] 본원에서 용어, "개체"는 구강 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물, 예를 들어, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소, 조류, 어류 등을 의미하고, 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0079] 본원에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 상기 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 구체적으로, 본원의 약학적 조성물은 경구, 정맥 내, 피하, 피 내, 비강 내, 복강 내, 근육 내, 경피 등으로 투여될 수 있고, 국부적 치료를 위해 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법 및 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0080] 본원의 치료방법으로 노각나무 추출물을 포함하는 약학적 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[0081] 본원에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본원의 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본원의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본원의 약학적 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 구강 질환 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

[0082] 또한, 상기 약학적 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효 성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본원의 약학적 조성물은 성인 1인당 1mg/kg 내지 200mg/kg, 구체적으로 1mg/kg 내지 100mg/kg, 더욱 구체적으로 20 내지 40mg/kg로 투여할 수 있고, 본원의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본원의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0084] 일 실시예에 따르면, 상기 노각나무 추출물은 0.2 초과 내지 10mg/ml 이하의 농도로 포함될 수 있다. 본원의 약학적 조성물에 포함된 노각나무 추출물 또는 이의 분획물의 함량은 이에 한정되지 않으나, 최종 조성물 총 중량을 기준으로 0.2 내지 10 mg/ml, 0.01 내지 7 mg/ml, 보다 구체적으로 0.01 내지 5 mg/ml의 함량으로 포함될 수 있다.

- [0086] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 세균의 섬모 형성 억제, 세균의 집락, 치면세균막(dental biofilm) 형성 억제, 및 세균막의 바이오매스 형성 억제 중 1종 이상의 억제 효과를 가질 수 있다.
- [0087] 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)가 구강 내에 서식하여, 치아표면에 부착하고, 집락을 형성하면, 세균막이 형성되고, 이는 치주 질환을 일으키게 된다. 또한, 상기 균주의 일부가 분산되어, 다시 치아 표면에 집락을 형성하는 단계를 반복적으로 거치며, 치주질환은 점차 악화된다.
- [0088] 그러나, 본 발명의 일 실시예에 따른 약학적 조성물을 이용하면, 섬모 형성을 억제하여, 세균의 집락을 억제하고, 이로 인해, 세균막 및 세균막의 바이오매스를 억제하는 효과가 있다. 더욱 상세한 내용은 실시예에 나타나 있다.
- [0089] 본원의 조성물은 이에 한정하는 것은 아니나, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 섬모 형성, 세균의 집락 형성, 치면세균막의 형성 및 세균막의 바이오매스 형성과 관련된 섬모를 암호화하는 유전자인 *fimA*, *fimB*, 및 *mfal* 유전자 중 1종 이상의 발현을 억제할 수 있다.
- [0091] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은, 통증 완화 효과 및 염증 억제 효과 중 1종 이상의 효과를 가질 수 있다. 구체적으로, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에서 생성하는 독성 효소이며, 염증반응을 유도하는 단백질 분해효소 진지페인(Gingipain)에 의해 통증과 관련된 염증반응을 유도하는 유전자인, *IL-6* 및 *IL-8* 유전자뿐 아니라, 염증반응 유도 관련 유전자인, *kgp* 유전자 및 *rgpA* 유전자의 발현을 억제할 수 있다.
- [0093] 일 실시예에 따르면, 상기 노각나무 추출물은 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대해 정균 효과를 가질 수 있다. 보다 상세하게 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 항균 효과가 우수하며, 항균 효과 이외의 정균 효과도 구비하고 있어, 구강 건강의 예방 또는 치료뿐 아니라, 구강 건강의 유지 또는 개선에 효과를 가질 수 있다. 현재, 시판되고 있는 구강 건강 케어의 제품들의 항균제들은 살균 작용을 나타내고 있으며, 살균작용을 하는 항균 물질은 실제 부작용이 심한 것으로 나타났다. 반면, 본 발명의 정균 효과 및 항균 효과를 가지는 본 발명의 일 실시예들은 그에 비하여, 부작용이 적은 이점이 있다.
- [0095] 일 실시예에 따르면, 상기 구강 질환은 치주질환, 치아우식증, 및 구취 중 1종 이상일 수 있다.
- [0096] 본원에서 상기 "구강 질환"은 구강영역에서 발생하는 여러 가지 질환을 말하며, 상기 구강영역은 앞쪽 입술부터 뒤쪽 구협에서 인두와 연결되는 입 안의 공간을 의미한다. 본원에서 상기 구강 질환은 구강에 발생하는 질환이라면 그 병중에 관계없이 모두 포함하는 개념이며, 상기 구강 질환의 비제한적인 예로는 치아우식증, 치주질환(치주염 또는 치은염), 치통, 시린이, 구취, 치면세균막(dental biofilm)의 형성, 및 구강 내 점막 궤양을 포함하는 포괄적 개념이며, 보다 바람직하게는 포르피로모나스 진지발리스(*P. gingivalis*)로 인하여 유발되는 치주염, 치은염, 또는 치아우식증일 수 있다.
- [0097] 본원의 용어, "치주질환"은 흔히 풍치라고도 하는데, 병의 정도에 따라 치은염(gingivitis)과 치주염(periodontitis)으로 나뉜다. 비교적 가볍고 회복이 빠른 형태의 구강 질환으로 잇몸 즉, 연조직에만 국한된 형태를 치은염이라고 하고, 이러한 염증이 치은(gingiva)과 치조골(alveolar bone) 주변까지 진행된 경우를 치주염이라고 한다. 치은(잇몸)과 치아 사이에는 V자 모양의 틈이 있는데, 이 치은 열구(gingival sulcus)의 치은 아랫부분을 박테리아가 공격하여 치주인대와 인접조직을 손상시키는 것이 치주질환이다. 염증이 진행되어 더 많은 조직이 손상되면서 홈이 치주낭(periodontal pocket)으로 발전하게 되며, 치주염이 심할수록 치주낭의 깊이가 깊어지게 된다. 치주낭이 깊어지면서 치주인대에 염증이 생기게 되고, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 의해 분비되는 리포다당류(lipopolysaccharide; LPS)에 의해 파골세포 분화가 촉진되어 치조골 소실이 일어나게 되는 것이 치주질환이다.
- [0098] 본원에서 용어, "구취"는 구강 및 인접기관으로부터 유래되는 냄새로 구취의 85 ~ 90%가 구강에서 유래하며, 특히, 혀의 뒷쪽에서 유래하고 있다. 구취의 주요 성분은 휘발성 황화합물인데, 휘발성 황화합물의 전체량 중 90%가 시스테인으로부터 만들어지는 황화수소(hydrogen sulfide)와 메티오닌으로부터 만들어지는 메틸머캡탄(methyl mercaptan) 및 디메틸설파이드(dimethyl sulfide)이다. 이러한 성분들은 주로 혐기성 세균이 분비하는

단백질 효소에 의해서 생성되며, 혀의 뒤쪽이 가장 중요한 서식지가 된다. 이 부위는 타액에 의해 세정작용이 잘되지 않고, 많은 작은 함몰이 있어 세균이 지속적으로 살아가는 장소가 된다. 혐기성 세균에 의한 휘발성 황 화합물 생성이 구취의 원인으로 가장 중요하지만, 그 외 치아우식증, 치주염, 구강 건조증 등과 같은 구강 질환에 의해서도 발생한다. 구취를 발생시키는데 많은 종류의 혐기성 세균이 관여하며, 구취 발생 원인균의 비제균적인 예로 많은 종류와 많은 양의 효소를 분비하는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)를 들 수 있다.

- [0100] 또 다른 측면에 따르면, 본원은 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강 질환의 예방 또는 개선용 의약 외품 조성물을 제공한다.
- [0101] 본원에서 용어, "개선"은 노각나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 예방 또는 치료되는 구강 질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0102] 구체적으로, 본원의 구강 질환 예방 또는 개선용 의약외품 조성물은 노각나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함할 수 있다.
- [0103] 본원에서 용어, "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 아니하며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염형 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미한다. 또한, 상기 의약외품은 피부외용제 또는 개인위생용품을 포함할 수 있다.
- [0104] 상기 피부외용제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 연고제, 로션제, 스프레이제, 패치제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제, 또는 겔의 형태로 제조되어 사용될 수 있으며, 상기 개인위생용품에는 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 치약, 에어프레쉬너 겔, 또는 세정겔일 수 있다. 또한, 본원의 의약외품의 또 다른 예로 구강청결제, 구강 양치용액, 구강용 스프레이, 연고제, 또는 필터충진제가 있다.
- [0105] 본원의 노각나무 추출물 또는 이의 분획물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물 또는 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있으며 유효성분 혼합량은 사용목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0107] 다른 측면에 따르면, 본원은 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0108] 본원에서 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강기능식품 등의 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함하며, 본원의 노각나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함할 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다. 또한, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 또는 액제 등의 형태를 포함할 수 있다.
- [0109] 본원에서 용어, "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제16295호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공을 포함한다)한 식품을 의미하며, '기능성'은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 한편, 건강식품은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품은 건강 보조 목적의 식품을 의미하는데, 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다. 본원의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하다. 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고 휴대성이 뛰어나다.
- [0110] 상기 식품 조성물 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용 가

능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

- [0112] 또 다른 측면에 따르면, 본원은 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강 질환의 예방 또는 개선용 치과용 조성물을 제공한다.
- [0113] 구체적으로, 본원의 구강 질환 예방 또는 개선용 치과용 조성물을 노각나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함할 수 있다.
- [0114] 본원에서 용어, "치과용"은 치아와 그 지지조직 및 구강 내 질병이나 손상을 예방하거나 치료하기 위한 용도를 의미할 수 있다.
- [0115] 상기 치과용 조성물은 불소바니쉬에 첨가하여 항균성 불소바니쉬와 같은 치과용 제품으로 응용이 가능하며, 구강 양치용액, 치과용 지각파민치치제, 항균성 치과용 접착제, 치과용 충전재, 치과용 수복재, 치과용 근관충진재, 치과용 근관 실러(sealer), 소와열구봉쇄제, 치과용 코팅제 및 치과용 시멘트 등과 같은 치과용 재료에 응용되어 사용될 수 있다.
- [0116] 또한, 상기 치과용 조성물은 구강의 건강을 위하여 사용되는 모든 물품에 사용될 수 있다. 상기 물품의 예로는 치실, 칫솔, 치간칫솔, 전동칫솔, 혀클리너, 구강세정기, 칫솔살균기 등과 같은 구강용품, 교정기, 임플란트 등과 같은 치과용 장치, 또는 치과 진료에 사용되는 모든 치과용 도구 및 기기를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0117] 구체적으로, 상기 물품을 상기 치과용 조성물에 침지시키거나, 상기 치과용 조성물을 상기 물품의 표면에 도포 또는 분무하거나, 상기 치과용 조성물로 상기 물품의 표면을 수회 세척하거나, 상기 치과용 조성물이 스며든 타올 등으로 상기 물품의 표면을 닦는 등의 방법으로 물품에 사용할 수 있으며, 상기 물품과 상기 치과용 조성물이 소정의 시간 동안 접촉할 수 있는 방법이라면 특별히 제한되지 않는다. 또한, 상기 방법을 수행하는 시간도 상기 치과용 조성물이 상기 물품의 표면과 충분히 반응할 수 있는 시간이면 제한되지 않으며, 당업자가 이를 적절하게 선택할 수 있다.
- [0119] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0121] 실시예

[0122] <실시예> 노각나무 추출물의 제조

[0123] 지리산 자생 식물인 노각나무의 잎과 가지는 (주) 농업회사법인 모리(경상남도 거창군 소재)에서 제공받아 사용하였다. 노각나무 잎 및 가지는 수집한 다음 건조하여 70% 에탄올에 1:8의 비율로 침지하여 상온 침지 추출(24 시간) 또는 열수 추출(1시간)을 하였다. 추출물은 45℃에서 회전 증발기(rotary evaporator; N-1000SWD; EYELA)로 농축하여 용매를 완전히 제거한 다음 DMSO(100 mg/ml)에 용해하여 보관하면서 회석하여 사용하였다.

[0124] 이후, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1), 노각나무의 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2), 노각나무 잎의 상온 침지 추출물(실시예 3) 및 노각나무 가지의 열수 추출물(실시예 4)을 이용하여, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 항균 활성을 확인하였다.

[0126] 실험예

[0127] <실험예 1> 구강미생물에 대한 노각나무 추출물의 항균 활성 분석

[0128] 노각나무 추출물의 항균 활성을 분석하기 위하여, 구강미생물에 대한 항균 활성을 측정하였다. 도 1에는 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무 추출물을 포함하는 구강 건강 개선용 조성물의 다양한 균주에 대한 항균 활성을 확인하기 위하여, 이용한 한천 내 확산(Agar diffusion)법이 개략적으로 나타나 있다. 구체적으로, 상기 한천 확산 방법은 나노 입자 샘플을 제조하는 제1 단계, 대장균(*E.coli*) 배지를 제조하는 제2 단계, 대장균 배지

상에 나노입자를 증착하는 제3 단계, 및 억제 영역의 두께를 측정하는 제4단계로 구성된다. 특히, 제4 단계에서, 디스크 주변에 나타난 투명환은 클리어 존(clear zone)으로 불리며, 이는 항균 활성을 나타낸다.

[0130] 구강미생물에 대한 노각나무 추출물의 항균활성은 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)와 농업유전자원센터 씨앗은행(KACC)에서 분양받은 그람음성균인 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)와 그람양성균인 스트렙토코쿠스 에피더미디스 (*S. epidemidis*) KACC13234, 스트렙토코쿠스 안지노수스(*S. anginosus*) KCTC33397, 스트렙토코쿠스 크리세티(*S. criceti*) KCTC19642, 스트렙토코쿠스 다운네이(*S. downei*) KCTC3634, 스트렙토코쿠스 고르도니(*S. gordonii*) KCTC3286, 스트렙토코쿠스 무탄스(*S. mutans*) KCTC3065, 스트렙토코쿠스 상퀴니스(*S. sanguinis*) KCTC3284, 스트렙토코쿠스 소브리누스(*S. sobrinus*) KCTC3308 등의 균주를 대상으로 확인하였다.

[0131] 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)는 tryptic soy agar hemin menadione (TSAHM) 배지에 계대한 다음 37℃에서 혐기 배양하였고 스트렙토코쿠스 상퀴니스(*S. sanguinis*)는 tryptic soy agar (TSA; BD, Franklin Lakes, USA)에 계대한 다음 37℃에서 혐기 배양하였다. 스트렙토코쿠스 무탄스(*S. mutans*)와 스트렙토코쿠스 소브리누스(*S. sobrinus*)는 brain-heart infusion agar (BHIA; BD, Franklin Lakes, USA)에 계대한 다음 37℃에서 혐기 배양하였고 스트렙토코쿠스 크리세티(*S. criceti*), 스트렙토코쿠스 다운네이(*S. downei*), 스트렙토코쿠스 고르도니(*S. gordonii*), 스트렙토코쿠스 상퀴니스(*S. sanguinis*)는 tryptic soy yeast extract medium에 계대한 다음 37℃에서 혐기배양하였다. 스트렙토코쿠스 에피더미디스 (*S. epidemidis*)는 polypeptone phosphate medium (PP-medium) 배지에 계대한 다음 30℃에서 배양하였다.

[0132] 추출물의 구강 미생물에 대한 항균활성은 한천내확산법(agar diffusion method)에 따라 고체배지에 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 스트렙토코쿠스 에피더미디스 (*S. epidemidis*), 스트렙토코쿠스 안지노수스(*S. anginosus*), 스트렙토코쿠스 크리세티(*S. criceti*), 스트렙토코쿠스 다운네이(*S. downei*), 스트렙토코쿠스 고르도니(*S. gordonii*), 스트렙토코쿠스 무탄스(*S. mutans*), 스트렙토코쿠스 상퀴니스(*S. sanguinis*), 및 스트렙토코쿠스 소브리누스(*S. sobrinus*)를 각각 도말한 다음 추출물의 농도가 1 mg/disc인 페이퍼 디스크(8 mm diameter, ADVANTEC, Tokyo, Japan)를 얹어 배양한 후 페이퍼 디스크 주위에 나타난 클리어 존(clear zone)의 크기를 측정하여 조사하였다. 또한, 노각나무 추출물과 시판되고 있는 구강 케어 제품에 사용되고 있는 항균제의 항균 활성을 비교하기 위해 클로르헥시딘(chlorhexidine (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)), 소듐라우릴설페이트(sodium lauryl sulfate (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)), 트리클로산(triclosan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)) 등을 양성 대조구로 사용하여 한천내확산법에 따라 항균활성을 측정하였다. 음성 대조구로는 용매인 에탄올 및 DMSO를 사용하였다.

[0134] 국내 자생 식물인 노각나무 등의 잎과 가지를 추출한 에탄올 추출물의 구강미생물에 대한 항균활성을 측정한 결과를 표 1 및 도 2에 나타내었다.

[0135] 표 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 노각나무 가지 추출물은 구강미생물 중 치주질환, 치면세균막, 또는 구치 등의 원인균인 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대해서만 항균활성을 나타내었다. 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 노각나무 가지 추출물의 항균활성을 구강케어제품에 사용되고 있는 클로르헥시딘(chlorhexidine (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)), 소듐라우릴설페이트(sodium lauryl sulfate (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)), 트리클로산(triclosan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA))과 비교한 결과는 도 2와 같다. 시판되고 있는 구강케어제품에서 클로르헥시딘(chlorhexidine (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)), 소듐라우릴설페이트(sodium lauryl sulfate (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)), 트리클로산(triclosan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA))은 각각 0.1%, 0.2%, 0.3%의 농도로 사용되고 있으며 본 실험에서는 노각나무 잎 추출물과 클로르헥시딘(chlorhexidine (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)), 소듐라우릴설페이트(sodium lauryl sulfate (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)), 트리클로산(triclosan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA))의 항균활성을 1 mg/disc의 농도에서 비교하였다. 그 결과, 노각나무 잎 추출물은 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대해 트리클로산(triclosan)과 유사한 항균활성을 나타내었다. 양이온성 항균 물질인 트리클로산(triclosan)은 구강 내에 존재하는 세균들을 광범위하게 사멸시킬 수 있는 대표적인 항균제이지만 장기간 사용 시 치아나 연조직에 착색이 유발되고 미각변화 가능성이 보고되고 있기 때문에 이를 대체할 항균제의 개발이 필요한 실정이다. 따라서 노각나무 잎 추출물은 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대해 항균활성이 있는 천연물 유래 구강 건강 소재로써 유용하다고 판

단된다.

표 1

Oral bacteria	Conditions	Ethanol extracts from <i>S. koreana</i> (1 mg/ml)	
		leaves	branch
<i>P. gingivalis</i> KCTC5352		++	+
<i>S. anginosus</i> KCTC33397		-	-
<i>S. criceti</i> KCTC19642		-	-
<i>S. downei</i> KCTC3634		-	-
<i>S. epidermidis</i> KACC13234		-	-
<i>S. gordonii</i> KCTC3286		-	-
<i>S. mutans</i> KCTC3065		-	-
<i>S. sanguinis</i> KCTC3284		-	-
<i>S. sobrinus</i> KCTC3308		-	-

*Growth inhibition size of clear zone: -, not detected; +, less than 5 mm; ++, more than 5 mm.

[0137]

[0139] 또한, 국내 자생 식물인 노각나무 등의 잎과 가지를 열수 추출 및 상온 침지한 추출물의 구강 미생물에 대한 항균활성을 측정한 결과를 표 2 및 도 3에 나타내었다.

[0140] 표 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 실시예 1 내지 실시예 4 및 대조구로써, 용매인 에탄올 및 DMSO에 대한 항균 활성 결과가 나타나 있다. 구체적으로, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1), 노각나무의 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2), 노각나무 잎의 상온 침지 추출물(실시예 3) 및 노각나무 가지의 열수 추출물(실시예 4)을 이용하여, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 항균 활성을 확인한 결과, 노각나무의 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1)이 항균 활성이 가장 우수하였으며, 같은 노각나무의 추출물임에도, 열수 침지한 가지(실시예 4)에서는 항균 활성이 나타나지 않았다.

표 2

시료 (농도: 2mg/disc)						
시료	A	B	C	D	E	F
	Methanol	가열가지	가열 잎	상온가지	상온 잎	DMSO
항균활성	-*	-*	+	+	+	-*

*+ : 있음, - : 항균활성 없음

[0141]

[0143] <실험예 2> 추출 용매에 따른 노각나무 추출물의 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 항균 활성 분석

[0144] 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1)을 에탄올, 헥산(hexane), 클로르포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol)의 분획물을 얻었다. 대조구로는 DMSO를 사용하였다. 포르피로모나스 진지발리스(*P. gingivalis*)에 대한 분획물의 항균활성은 디스크 확산법(disc diffusion method)에 따라 분획물 농도가 2 mg/disc인 페이퍼 디스크(8 mm diameter, ADVANTEC, Tokyo, Japan)를 균주가 도말된 고체배지에 얹어 배양한

다음 디스크 주위에 생성된 클리어 존의 크기를 측정하여 확인하였다.

그 결과를 표 3 및 도 4에 나타내었다.

표 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 포르피로모나스 진지발리스(*P. gingivalis*)에 대해 노각나무의 에탄올 추출물, 노각나무의 에탄올 분획물, 헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 및 부탄올 분획물 모두 항균 활성이 확인되었다. 특히 부탄올 분획물의 항균 활성이 가장 우수하였고, 에탄올 분획물의 항균 활성이 가장 낮은 것으로 나타났다.

표 3

시료 No.	1	2	3	4	5	6
시료 (1 mg/ml)	DMSO (대조구)	Ethanol Ex.	Hexane Fr.	Chloroform Fr.	Ethylacetate Fr.	Butanol Fr.
<i>P. gingivalis</i>	-*	+	+++	+++	+++	++++

* -: 항균활성 없음 (++++: clear zone 4 mm 이상 / +++: 2-4 mm / ++: 1-2mm / +: 1 mm 이하) / -: 항균활성 없음

또한, 본 발명에 따른 실시예 1의 부탄올 분획물의 농도별 항균 활성의 결과를 살펴보면, 표 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 노각나무 추출물은 포르피로모나스 진지발리스(*P. gingivalis*)에 대해 0.4mg/disc의 농도에서부터 항균 활성을 나타내고, 0.4 내지 2mg/disc에서 농도 의존적으로 항균 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

표 4

시료 No.	1	2	3	4	5	6	7
시료 (1 mg/ml)	DMSO (대조구)	0.2 mg	0.4 mg	0.6 mg	0.8 mg	1.0 mg.	2.0 mg.
<i>P. gingivalis</i>	-*	-	+	+	++	++	++++

* -: 항균활성 없음 (++++: clear zone 4 mm 이상 / +++: 2-4 mm / ++: 1-2mm / +: 1 mm 이하) / -: 항균활성 없음

<실험예 3> 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 노각나무 잎 추출물의 최소성장억제 농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC) 분석

노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1)의 최소성장억제 농도(minimal inhibitory concentration, MIC)는 액체배지 희석법을 이용하여 조사하였다. 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)는 37℃에서 48시간 동안 혐기 배양한 다음 배양액을 액체배지에 희석하였다(O.D₆₀₀=0.4-0.6). 희석된 배양액에 추출물을 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mg/ml 농도로 처리한 다음 37℃에서 48시간 동안 혐기 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 증식이 나타나지 않는 최소 농도를 최소성장억제 농도로 정하였다. 추출물의 최소살균농도(minimal bactericidal concentration, MBC)는 최소성장억제 농도로 확인된 추출물 농도로부터 그 이상의 농도에 해당하는 배양액을 고체배지에 도말하여 37℃에서 48시간 동안 혐기배양한 다음 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 균수가 99.9% 사멸된 추출물의 농도로 정하였다.

그 결과를 표 5에 나타내었다.

표 5에 나타난 바와 같이, 노각나무 잎 추출물은 구강미생물 중 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas*

gingivalis)에 대해 우수한 항균활성을 나타내었으며 노각나무 잎 추출물 처리에 따른 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 최소성장억제농도(MIC)는 0.4 mg/ml였으며 0.4-2mg/ml의 추출물 처리농도에 서 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 노각나무 잎 추출물의 항균활성은 농도의존 적으로 증가하였다. 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 최소살균농도(MBC)를 확인한 결과, 최소성장억제 농도를 확인한 후 최소성장억제농도인 0.4 mg/ml 및 그 이상의 농도에 해당하는 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*) 배양액을 고체배지에 도말 한 후 배양하였을 때 0.4 mg/ml 및 그 이상의 농도에서 colony가 관찰되었기 때문에 노각나무 추출물은 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)에 대해 정균작용을 하는 것으로 판단된다.

[0157] 황기 추출물의 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*) 억제효과에 관한 Choi 등[Choi, Y. R., Choi, M. S., Kwun, H. S. and Nam, S. H. 2019. The inhibitory effect of *Porphyromonas gingivalis* (P. *gingivalis*) on *Astragali radis* extract. J. Kor. Soc. Oral Health. 7, 46-50.]의 연구에서 황기추출물은 5 mg/ml 이상의 농도에서 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)에 대해 유의적인 성장억제 효과를 나타내었고 10 mg/ml, 20 mg/ml에서 사멸효과를 나타내었다. 따라서 노각나무 추출물은 황기 추출물에 비해 낮은 농도에서 항균활성을 나타내기 때문에 노각나무 추출물을 천연물 유래 구강 건강 소재로써 사용할 경우 경제성이 있다고 판단된다.

표 5

■ MIC (최소성장억제농도)

Strains	<i>D. malabarica</i> extracts (mg/ml)							MIC (mg/ml)
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	2.0	
<i>P. gingivalis</i> ATCC33277	+	+	-	-	-	-	-	0.4

*+ : growth / - : no growth

■ MBC (최소살균농도)

Strains	<i>D. malabarica</i> extracts (mg/ml)							MBC (mg/ml)
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	2.0	
<i>P. gingivalis</i> ATCC33277	+	+	+	+	+	+	+	정균작용

*+ : growth / - : no growth

[0158]

[0160] <실험예 4> 포르피로모나스 진지발리스(*P. gingivalis*)에 대한 노각나무 추출물의 바이오필름(biofilm)에 미치는 영향 분석

[0161] 노각나무의 잎의 열수 추출물(실시에 1)이 포르피로모나스 진지발리스(*P. gingivalis*)의 바이오필름에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 처리하지 않은 무처리구(비교예 1) 및 노각나무 잎의 열수 추출물(실시에 1)을 0.4mg/ml 상기 균주에 처리한 후, 주사전자현미경(SEM) 및 투과전자현미경(TEM) 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다. 도 7을 참조하면, 노각나무의 잎의 열수 추출물(실시에 1)은 포르피로모나스 진지발리스(*P. gingivalis*)의 집락 형성을 억제하는 것으로 나타났다.

[0162] 또한, 도 8에는 무처리구(도 8의 A 및 C) 및 노각나무 열수 잎 추출물(도 8의 B 및 D) 0.4mg/ml를 처리한 결과가 나타나 있다. 구체적으로, 무처리구인 도 8의 A에는 세포와 세포들이 모여있는 것이 관찰되었으며, 이 중 일부를 확대한 도 8의 C에서 세포와 세포가 섬모로 연결되어 있는 것을 확인할 수 있다. 반면, 도 8의 B에는 세포와 세포가 흩어져 있으며, 이 중 일부를 확대한 도 8의 D를 참조하면, 세포의 가장자리에 섬모가 있으나, 세포와 세포가 서로 연결되어 있지 않은 것을 명확하게 확인할 수 있다.

[0163] 도 6에는 본 발명의 일 실시예에 따른 약학 조성물이 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 세균막 형성에 미치는 영향이 개략적으로 나타나 있으며, 구체적으로, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)가 구강 내에 서식하여, 치아표면에 부착하고, 집락을 형성하면, 세균막이 형성되고, 이는 치주 질환을 일으키게 된다. 또한, 상기 균주의 일부가 분산되어, 다시 치아표면에 집락을 형성

하는 단계를 반복적으로 거치며, 치주질환은 점차 악화된다.

- [0164] 그러나, 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무의 잎의 열수 추출물(실시예 1)을 처리하면, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)는 잇몸에 서식하고 있어도, 섬모의 형성이 억제되어, 집락을 형성할 수 없고, 이에 따라, 치주 질환을 유발할 수 없어, 구강 건강의 유지 및 개선에 탁월한 효과가 있는 것으로 나타났다.
- [0166] <실험예 5> 노각나무 잎 추출물에 의한 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 바이오필름 바이오매스(biofilm biomass) 형성 억제 분석
- [0167] 노각나무 잎 추출물이 구강미생물의 바이오필름 형성에 미치는 영향은 Zhou 등[Zhou, L., Ding, Y., Chen, W., Zhang, P., Chen, Y. and Lv, X. 2013. The in vitro study of ursolic acid and oleanolic acid inhibiting cariogenic microorganisms as well as biofilm. Oral Dis. 19, 494-500.]의 방법을 이용하여 조사하였다. 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)는 고체배지에 도말하여 48시간 동안 혐기배양한 다음 액체배지에 현탁하여(O.D₆₀₀=0.4-0.6) 96-well plate에 분주하였다. 0.2-2.0 mg/ml 농도의 추출물을 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)가 분주된 96-well plate에 처리한 다음 37℃에서 혐기배양하면서 바이오필름 바이오매스 형성을 유도하였다. 96-well plate에 형성된 바이오필름 바이오매스는 멸균 종류수로 2회 세척한 다음 건조한 후 0.5% crystal violet으로 20분 동안 염색하였다. 바이오필름 바이오매스 형성 억제능은 crystal violet에 염색된 바이오필름을 70% 에탄올에 용해한 후 575 nm에서 spectrophotometer (Softmax M5, Molecular Devices, USA)로 흡광도를 측정하여 확인하였다.
- [0168] 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9에 나타난 바와 같이, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1)이 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 바이오필름 바이오매스 형성에 미치는 영향은 Zhou 등[Zhou, L., Ding, Y., Chen, W., Zhang, P., Chen, Y. and Lv, X. 2013. The in vitro study of ursolic acid and oleanolic acid inhibiting cariogenic microorganisms as well as biofilm. Oral Dis. 19, 494-500.]의 양적 분석방법을 이용하여 조사하였으며 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*) 배양액에 추출물을 0.2-2.0 mg/ml 농도로 처리하였을 때, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 바이오필름 형성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 추출물이 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mg/ml 농도로 처리된 배양액에서 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 바이오필름 형성율은 각각 80.9±0.09%, 65.4±0.08%, 31.2±0.06%, 27.1±0.02%, 24.8±0.01%, 25.3±0.02%로 추출물의 농도가 높아질수록 바이오필름 형성이 농도의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었고 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 생육도 추출물의 농도(0.2-2.0 mg/ml)가 높아질수록 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 강황에서 분리된 커큐민(curcumin)의 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 생물막 생성 억제와 병원성인자(virulence factor) 발현 억제에 관한 연구에서 커큐민(curcumin)의 농도가 높아질수록 생물막 생성 및 병원성 인자의 발현이 억제된다는 Kumbar 등[Kumbar, V. M., Peram, M. R., Kugaji, M. S., Shah, T., Patil, S. P., Muddapur, U. M. and Bhat, K. G. 2020. Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. Odontology. doi: 10.1007/s10266-020-00514-y.]의 보고와도 일치하는 결과이다.
- [0169] 또한, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1), 노각나무의 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2) 및 노각나무 잎의 상온 침지 추출물(실시예 3)을 이용하여, 농도에 따른 바이오필름(biofilm)의 상대적인 비율을 도 11에 나타내었다. 도 11을 참조하면, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1)은 농도에 따라 급격하게 감소하나, 0.8mg/ml의 농도에서는 점차 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 노각나무의 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2)에서는 농도에 의존적으로, 세균막의 형성비율이 낮아지는 것으로 나타났다.
- [0170] 따라서, 제시된 농도에서, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1) 및 노각나무의 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2)은 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 생육을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 바이오필름 형성도 억제할 수 있는 천연물 유래 구강 건강소재로써 유용하다고 판단된다.
- [0172] 또한, 도 10을 참조하면, 항생제를 사용한 경우, 도 10에 나타난 바와 같이, 치주 질환이 억제된다. 그러나, 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물을 이용하면, 항생제를 사용하지 않고도, 치주질환을 유발하는 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 병원성 인자인 바이오필름이 만들어지지 않기 때문에, 종래의 항생제

를 사용하여 발생하는 부작용 없이도, 치주 질환을 예방하는 효과가 있다.

[0174] <실험예 6> 주사전자현미경을 이용한 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 바이오필름 관찰

[0175] 노각나무 잎 추출물이 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 바이오필름 형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 주사전자현미경(Scanning electron microscope, SEM; MIRA3 LM, Tescan, Czech Republic)을 이용하여 추출물 처리에 의한 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 바이오필름 형성 여부를 관찰하였다. 커버슬립 (Coverslip, 12 mm, SPL Ltd, Korea)이 들어있는 48 well-plate에 $O.D_{600}=0.4$ 의 밀도로 TSAHM 액체배지에 현탁한 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*) 배양액을 분주한 후 추출물을 1 mg/ml이 되도록 처리한 다음 37℃에서 48 시간 동안 혐기배양하였다. 배양이 완료된 후 커버슬립은 PBS (Phosphate buffer saline, Bioneer, Daejeon, Korea) 완충용액에 2회 세척하고 0.5% glutaraldehyde (Sigma Aldrich Co., USA)로 고정한 다음 30, 50, 60, 70, 80, 95, 99.5%의 에탄올을 순차적으로 처리하여 완전히 탈수한 후 실온에서 건조하였다. 건조된 시료는 platinum으로 코팅한 후 주사전자현미경을 이용하여 추출물을 처리하지 않은 대조구와 1 mg/ml의 추출물을 처리한 처리구에서 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 바이오필름 형성 여부를 관찰하였다.

[0177] 그 결과를 도 7에 나타내었다. 즉, 노각나무 잎 추출물이 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 바이오필름 형성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 노각나무 잎 추출물을 1 mg/ml의 농도로 처리한 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)와 추출물을 처리하지 않은 무처리 대조구를 주사전자현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다. 추출물을 처리하지 않은 대조구는 추출물 처리구에 비해 세포가 군집을 이루고 모여 있었으며 세포 주변에 바이오필름이 형성된 것을 관찰할 수 있었지만(도 7의 A), 노각나무 잎 추출물을 1 mg/ml의 농도로 처리한 처리구는 대조구에 비해 세포가 군집을 이루지 않고 독립적으로 존재하고 있었으며 세포 주변에서 바이오필름을 관찰할 수 없었다(도 7의 B). Zhang 등[Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, X., Cao, P., Wei, S. and Lu, Y. 2017. Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. Microb. Pathog. 113, 396-402.]의 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 정향(*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) 오일(oil)에서 분리된 유게놀(eugenol)의 항균활성과 바이오필름 억제에 관한 보고에 의하면 유게놀(eugenol)을 처리하지 않은 대조구의 경우 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)는 군집을 이루고 있고 바이오필름을 형성된 반면 31.25 μ M의 유게놀(eugenol)을 처리한 처리구의 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)는 흩어져 있으며 바이오필름의 부피와 두께가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서도 추출물을 처리한 처리구의 세포가 군집을 이루지 않고 독립적으로 존재한다는 점에서는 Zhang 등의 보고와 일치하였다.

[0179] <실험예 7> 노각나무 잎 추출물 처리에 따른 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 섬모(fimbriae)에 대한 mRNA 발현 변화

[0180] 노각나무 잎 추출물이 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 섬모에 대한 mRNA 발현에 미치는 영향은 *fimA*, *fimB*, 및 *MfaI* 유전자를 프라이머로 사용한 qRT-PCR로 조사하였다. 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)는 37℃에서 48 시간 동안 혐기 배양한 후 액체배지에 현탁하였고($O.D_{600}=0.4-0.6$) 액체배지에 현탁한 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 0.2-2.0 mg/ml 농도로 추출물을 처리한 다음 37℃에서 배양하였다. Total RNA는 추출물이 처리된 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 배양액을 원심분리하여 얻은 pellet으로부터 RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 분리하였다. cDNA는 iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 합성하였고 qRT-PCR은 CFX96 touch™ qRT-PCR detection system (Bio-Rad, USA)을 이용하여 수행하였으며 실험에 사용된 프라이머는 표 3과 같다. PCR 반응은 ssadvanced™ universal SYBR green supermix (Bio-Rad, USA)를 사용하여 95℃에서 5분 동안 denaturation 시킨 후 95℃에서 1분, 52℃에서 1분, 72℃에서 30초씩 35 cycle을 반복하여 수행하였다. PCR 반응 종결 후 melt-curve analysis를 수행하여 유전자 증폭의 정확성을 재확인하였으며 유전자의 상대적 발현량

은 endogenous control로 사용한 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 하우스 키핑 유전자(housekeeping gene)인 16S rRNA에 대한 *fimA*, *fimB*, 및 *Mfa1* 유전자의 상대적 mRNA 발현 값으로 나타내었다.

표 6

유전자	프라이머	서열(Sequence)
16s rRNA (house keeping)	Forward (서열번호 1)	5'-TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA-3'
	Reverse (서열번호 2)	5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT-3'
<i>fimA</i>	Forward (서열번호 3)	5'-GCG CAG CCT ACG ATA ACA TT-3'
	Reverse (서열번호 4)	5'-AAT GTT ATC GTA GGC TGC GC-3'
<i>fimB</i>	Forward (서열번호 5)	5'-CCC CGT CCG TTT CGC CTG ACC-3'
	Reverse (서열번호 6)	5'-GCG TCC ATC ATC AGT CGG TC-3'
<i>Mfa1</i>	Forward (서열번호 7)	5'-CGG ATA TCA GAT GGG TTG TTG-3'
	Reverse (서열번호 8)	5'-GTT TCG TTC CTA CCA GCA GC-3'

[0181]

[0183]

도 12는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)가 잇몸 상피 세포(gingival epithelial cell)에 부착되어 세균막을 형성하는 메커니즘 및 관련 유전자를 개략적으로 나타낸 것이다.

[0184]

구체적으로, 세균막의 형성과 관련하여, 섬모는 부착(attachment) 기능 및 집락 형성(colonization) 기능의 유전자로 분류할 수 있다. 섬모와 관련한 유전자로는 주요 유전자로 긴 섬모를 형성하는 *fimA* 유전자 및 마이너 유전자로 짧은 섬모를 형성하는 *Mfa1* 유전자로 분류되며, 상기 섬모 유전자가 억제되면, 섬모의 형성이 억제되고, 이로 인해 세균막은 형성되지 않는다.

[0185]

노각나무 잎 추출물이 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 섬모에 대한 mRNA 발현에 미치는 영향은 *fimA*, *fimB*, 및 *Mfa1* 유전자를 프라이머로 이용한 qRT-PCR로 확인하였으며 그 결과는 도 13 내지 도 15에 나타내었다. qRT-PCR을 이용하여 추출물(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mg/ml) 처리 농도에 따른 *fimA*, *fimB*, 및 *Mfa1* 유전자의 발현 변화를 확인한 결과, 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 *fimA*, *fimB* 및 *Mfa1* 유전자의 발현은 추출물의 농도가 높아질수록 농도 의존적으로 억제되는 경향을 나타내었다.

[0186]

구체적으로, 도 13에는 qRT-PCR을 이용하여 추출물(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mg/ml) 처리 농도에 따른 *fimA*와 *fimB* 유전자의 발현 변화를 확인한 결과, 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 *fimA*와 *fimB* 유전자의 발현은 추출물의 농도가 높아질수록 농도의존적으로 억제되는 경향을 나타내었다. 상세하게, 도 14에는 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1) 및 노각나무의 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2)을 이용하여, 섬모 관련 *fimA* 유전자의 억제 정도가 나타나 있다. 구체적으로, 상기 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1) 및 노각나무의 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2)에서 상기 프라이머를 이용하여, 농도에 따라, 섬모 관련 *fimA* 유전자의 발현 정도를 확인한 결과, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1)의 추출물을 처리한 경우, 농도 의존적으로 현저하게, *fimA* 유전자의 발현이 억제된 것이 나타났다. 또한, 노각나무의 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2)의 경우, 일정 농도 범위 내에서, 상기 유전자의 발현이 감소하는 것으로 나타났다.

[0187]

따라서, 섬모 형성이 억제되면, 세균막 형성이 억제되어, 치주질환을 유발할 수 없고, 이로 인해 치주 질환으로부터 유발되는 통증의 완화 효과가 있는 것으로 확인되었다. 이로부터, 본 발명의 조성물이 구강 건강 개선 용도로 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0188]

또한, 도 15에는 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무의 잎의 열수 추출물(실시예 1) 및 노각나무 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2)에서, 상기 프라이머를 이용하여, 섬모 관련 *mfa1* 유전자의 발현의 억제 정도가 나타나

있다. 구체적으로, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1) 및 노각나무의 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2)은 섬모 관련 *mfa1* 유전자의 발현을 약하게 억제하는 것으로 나타났다.

[0189] 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)는 치아표면에 부착하여 바이오필름을 형성하면서 병원성 인자인 섬모와 단백질분해효소를 암호화하는 유전자 *fimA*, *fimB* 및 *rgpA*와 *kgp*를 가지고 있다. 이 중에서 섬모(fimbriae)는 세균의 외막에 부착된 단백질성 부속기(proteinaceous appendages)로서 생물막 형성과정 중 초기 부착단계에 관여하며 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 표면에는 FimA subunit으로 구성된 긴 섬모와 Mfa1 subunit으로 구성된 짧은 섬모가 존재하고 있다. 긴 섬모는 생물막 형성과정에서 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 치은 섬유 모세포 및 상피 세포 부착에 필수적인 뿐만 아니라 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)와 스트렙토코쿠스 고르도니(*S. gordonii*)의 자가응집력(autoaggregation)에도 관여한다. 섬모를 암호화하는 유전자인 *fimABCDE* 유전자는 *fim* 클러스터(cluster)를 이루고 있으며 *fimA* 유전자 결손 돌연변이체는 인간 치은 섬유 모세포 및 상피 세포에 대한 부착을 감소시켜 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)가 치은연하(subgingival)에서 바이오필름을 형성할 수 없다. 따라서 노각나무 잎 추출물의 처리 농도에 따라 *fimA*, *fimB* 및 *mfa1* 유전자 발현이 감소하였다는 것은 바이오필름 형성 단계에서 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 초기 치은 섬유 모세포 및 상피 세포 부착이 저해됨을 나타낸다.

[0191] <실험예 8> 노각나무 잎 추출물 처리에 따른 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 염증반응 유도 관련 유전자에 대한 mRNA 발현 변화

[0192] 도 16에는 qRT-PCR을 이용하여, 구강 미생물인, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에서 염증반응 유도과 관련된 유전자의 발현 변화를 확인한 결과가 나타나 있다. 구체적으로, 염증반응 유도와 관련하여, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에서 생성하는 독성 효소이며, 염증반응을 유도하는 단백질 분해효소 진지페인(Gingipain)과 관련된 유전자를 탐색하였다. 그 결과, 아르기닌-특이 시스테인 프로테이나제 유전자(Arg-specific cysteine proteinase gene)인, *RgpA* 및 *RgpB* 유전자 및 리신-특이 시스테인 프로테이나제 유전자(lys-specific cysteine proteinase gene)인, *Kgp* 유전자가 탐색되었다.

[0193] 하기 표 7에는 상기 유전자들의 발현을 확인하기 위한 프라이머가 나타나 있다. 표 7을 참조하면, 하우스 키핑 유전자인 16s rRNA를 대조군으로 선별할 수 있는 프라이머 서열, *RgpA* 유전자 및 *Kgp* 유전자를 선별할 수 있는 프라이머의 서열이 나타나 있다.

표 7

유전자	프라이머	서열(Sequence)	Size(bp)
16s rRNA (house keeping)	Forward (서열번호 9)	5'-TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA-3'	138
	Reverse (서열번호 10)	5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT-3'	
<i>kgp</i>	Forward (서열번호 11)	5'-CCG TTA GGC GTT TCT TCG AA-3'	104
	Reverse (서열번호 12)	5'-GGA AAA CCG TCG TTG ACT GC-3'	
<i>rgpA</i>	Forward (서열번호 13)	5'-GCG TAT CTC CGA AAG AGT GC-3'	112
	Reverse (서열번호 14)	5'-GTG GTT CTC AAG TGG GAA GC-3'	

[0194]

[0196] 도 17에는 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1) 및 노각나무 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2)을 이용하여, 염증반응 유도 관련 *RgpA* 유전자의 억제 정도가 나타나 있다. 구체적으로, 상기 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1) 및 노각나무 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2)에서 상기 프라이머를 이용하여, 농도에 따라, 염증반응 유도 관련 *RgpA* 유전자의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1)을 처리한 경우, 염증반응 유도 관련 *RgpA* 유전자의 발현을 약하게 억제하는 것으로 나타났

다.

[0198] 또한, 도 18에는 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무의 상온 침지한 가지 및 열수 추출한 잎을 이용하여, 염증반응 유도 관련 *Kgp* 유전자의 억제 정도가 나타나 있다. 구체적으로, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1)에서 진지페인(Gingipain) 염증반응 유도 관련 유전자인, *Kgp* 유전자가 농도 의존적으로 발현이 현저하게 억제되는 것이 나타났다.

[0200] <실험예 9> 노각나무 잎 추출물 처리에 따른 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 통증과 관련된 염증반응 매개 물질 관련 유전자에 대한 mRNA 발현 변화

[0201] 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에서 생성하는 독성 효소이며, 염증반응을 유도하는 단백질 분해효소 진지페인(Gingipain)에 의해 통증과 관련된 염증반응을 유도하는 유전자를 탐색하였다.

[0202] 도 19에는 qRT-PCR을 이용하여, 구강 미생물인, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에서 통증과 관련된 염증반응 매개물질과 관련된 유전자의 발현 변화를 확인한 결과가 나타나 있다. 구체적으로, 잇몸 상피세포(Gingival epithelial cells)에서는 *TNF- α* 및 *IL-8* 및 *IL-6*을 제외한 *IL-1*만이 발현되었으며, 잇몸 섬유아세포(Gingival fibroblasts)에서는 *IL-1 β* , *IL-18*, *NLRP6*, *카스파제-1(caspase-1)*의 유전자가 발현되는 것으로 나타났다.

[0203] 또한, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에서 생성하는 독성 효소이며, 염증반응을 유도하는 단백질 분해효소 진지페인(Gingipain)에 의해 통증과 관련된 염증반응을 유도하는 유전자 중 시토카인(cytokine)인, *TNF- α* , *IL-6* 및 *IL-12* 가 증가하는 것이 확인되었고, 케모카인(chemokines)인, *IL-8*이 증가하는 것으로 나타났다.

[0204] 따라서, 이 중 *IL-6* 및 *IL-8* 유전자의 발현 정도를 확인하여, 통증의 완화 효과를 검증하고자 하였다.

[0206] 하기 표 8에는 상기 유전자들의 발현을 확인하기 위한 프라이머가 나타나 있다. 표 8을 참조하면, β -actin 유전자를 대조군으로 선별할 수 있는 프라이머 서열, *IL-6* 유전자 및 *IL-8* 유전자를 선별할 수 있는 프라이머의 서열이 나타나 있다.

표 8

유전자	프라이머	서열(Sequence)	Size(bp)
β -actin	Forward (서열번호 15)	5'- TGA CTT AGT TGC GTT ACA CCC TTT CTT G-3'	118
	Reverse (서열번호 16)	5'- CTG TCA CCT TCA CCG TTC CAG TTT T-3'	
<i>IL-6</i>	Forward (서열번호 17)	5'- CGC CTT CGG TCC AGT TGC C-3'	120
	Reverse (서열번호 18)	5'- GCC AGT GCC TCT TTG CTG CTT T-3'	
<i>IL-8</i>	Forward (서열번호 19)	5'- CTC TTG GCA GCC TTC CTG ATT TC-3'	125
	Reverse (서열번호 20)	5'- TTT TCC TTG GGG TCC AGA CAG AG-3'	

[0207]

[0209] 도 20에는 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1) 및 노각나무 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2)을 이용하여, 염증반응 유도 관련 *IL-6* 유전자의 억제 정도가 나타나 있다. 구체적으로, 상기 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1) 및 노각나무 가지의 상온 침지 추출물(실시예 2)에서 상기 프라이머를 이용하여, 농도에 따라, 염증 반응 유도 관련 *IL-6* 유전자의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1) 추출물을 처리한 경우, 염증반응 매개물질인 시토카인 관련 유전자인, *IL-6* 유전자의 발현

을 약하게 억제하는 것으로 나타났다.

[0210] 또한, 도 21에는 본 발명의 일 실시예에 따른 노각나무의 상온 침지한 가지 및 열수 추출한 잎을 이용하여, 염증반응 유도 관련 *IL-8* 유전자의 억제 정도가 나타나 있다. 구체적으로, 노각나무 잎의 열수 추출물(실시예 1)에서 염증반응 매개물질인 케모카인 관련 유전자인, *IL-8* 유전자가 농도 의존적으로 발현을 약하게 억제하는 것으로 나타났다.

[0212] <실험예 10> 세포독성 결과

[0213] 본 발명에 따른 노각나무 추출물이 섬유아세포 CCD-986sk의 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 섬유아세포 CCD-986sk에 대한 노각나무 추출물의 세포 독성은 CCD-986sk에 추출물을 처리한 다음 WST-1 assay를 이용하여 확인하였다. 세포의 증식능력이나 세포생존력을 정량하는 대표적인 실험방법 중 하나인 WST-1 assay는 세포 내 미토콘드리아의 탈수소 효소에 의해 엷은 붉은색의 수용성 기질인 water soluble tetrazolium salts가 짙은 붉은색의 formazan으로 변환되는 성질을 이용하는 검사법으로 흡광도는 살아있는 세포 수에 비례한다. 섬유아세포 CCD-986sk에 노각나무 잎과 가지 추출물을 각각 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1 mg/ml의 농도로 처리한 다음 WST-1 assay에 의한 세포생존율을 조사한 결과, 노각나무 잎과 가지 추출물 처리구의 모든 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내어 노각나무 추출물은 세포독성은 나타나지 않는 것으로 판단되며 높은 농도의 노각나무 잎과 줄기 추출물 처리구에서는 세포생존율이 100% 이상을 나타내어 세포 증식이 촉진되는 것으로 판단된다. 노각나무 추출물에 의한 CCD-986sk세포의 증식 촉진효과에 관해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

[0215] <제제예 11> 노각나무 잎을 이용한 구강 청결제의 제조

[0216] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물의 효과를 확인하기 위하여, 노각나무 잎을 이용하여 구강 청결제를 제조하였다(도 22 참조).

[0218] 표 9에는 상기 구강 청결제의 성분 조성이 나타나 있다.

표 9

No.	원료명	영문명	함량% (w/w)	CAS. NO.
1	플루오르화나트륨	Sodium Fluoride	0.02	7681-49-4
2	에탄올(주정)	Alcohol	15.00	64-17-5
3	노각나무잎추출물	<i>Stewartia koreana</i> Leaf Extract	0.10	-
4	L-멘톨	Menthol	0.02	1490-04-6
5	박하유	<i>Mentha spicata</i> Herb Oil	0.02	84696-51-5
6	알란토인	Allantoin	0.10	97-59-6
7	정제수	Water	84.74	7732-18-5
합 계			100	

[0219]

[0221] 현재 시판되고 있는 구강 청결제는 항균물질을 이용하여, 살균작용을 가지나, 상기 살균작용에 의해 많은 부작용을 가질 수 있다. 그러나, 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물을 이용한 상기 구강 청결제의 경우, 살균작용을 하는 항균 물질에 비해 부작용이 적고, 바이오 필름의 형성을 억제하는 성분을 함유하고 있어, 사용 후에도 치아표면에 억제 성분이 잔존 하고, 이로 인해 바이오 필름을 형성하는 구강 미생물이 치아에 부착하는 것을 저해하여, 구강 건강을 유지할 수 있을 뿐 아니라, 개선 효과도 탁월한 것으로 확인되었다.

[0223]

결과

[0224]

본 발명의 조성물은 치주염의 원인균인 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대하여, 0.4mg/ml 이상의 농도에서 정균 효과 및 항균 효과가 나타났으며, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 섬모 형성 억제, 및 집락 형성을 억제하여, 치주질환의 발생을 억제하였다.

[0225]

또한, 염증반응 유도 인자인 진지페인(Gingipain)과 관련된 유전자인, *Kgp* 유전자의 mRNA의 발현을 농도 의존적으로 현저하게 억제하여, 통증 완화 효과를 확인하였다.

[0226]

나아가 세포 독성도 없는 것으로 확인되어, 구강 건강을 유지 또는 개선하는 조성물로 적합하다고 판단되었다.

[0228]

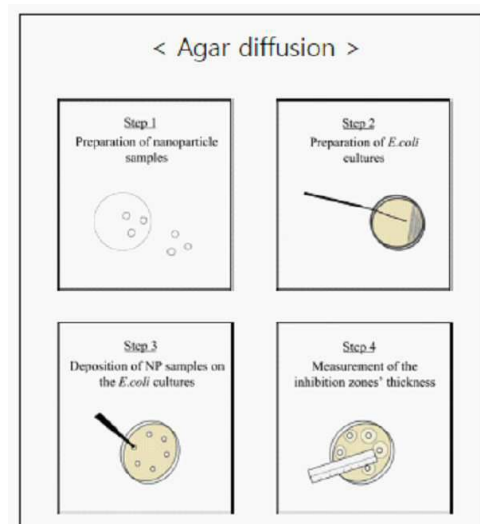
이상의 결과를 종합하면 노각나무 추출물은 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 항균 활성뿐만 아니라 세균의 섬모 형성 억제, 세균의 집락, 치면 세균막(dental biofilm) 형성 억제, 및 세균막의 바이오매스 형성을 억제하고, 통증 완화 및 항생제 사용에 의한 부작용을 줄일 수 있기 때문에 노각나무 추출물이 구강건강 개선소재로 개발된다면 치주질환을 유발하는 원인균의 생육을 억제하거나 사멸시키는 것이 아니라 치주질환을 유발하는 원인균의 병인성 인자 발현을 억제하여 항균 활성을 나타내는 새로운 치주질환 예방 및 치료 전략을 제시할 수 있다.

[0230]

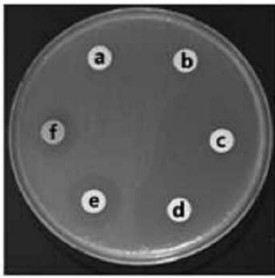
상기 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

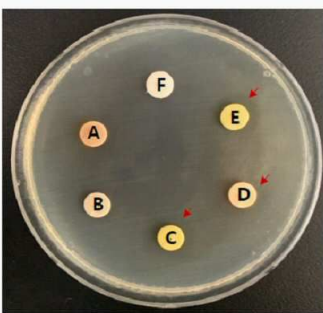
도면1



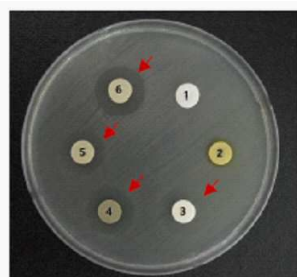
도면2



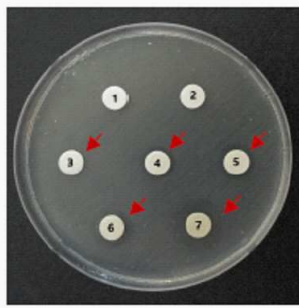
도면3



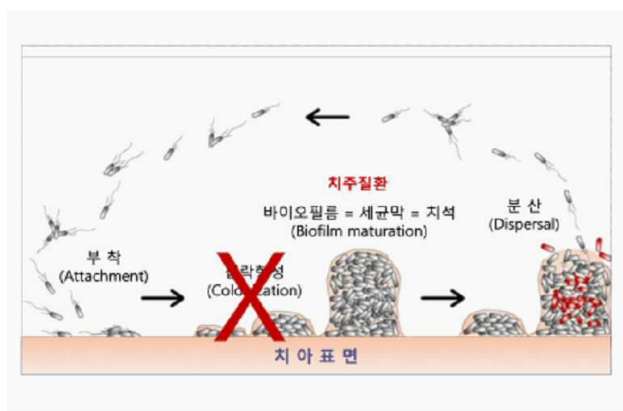
도면4



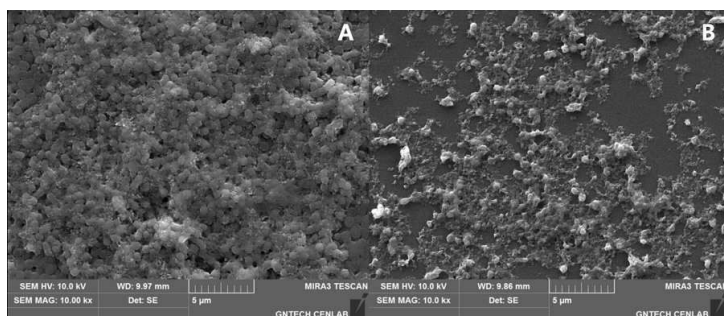
도면5



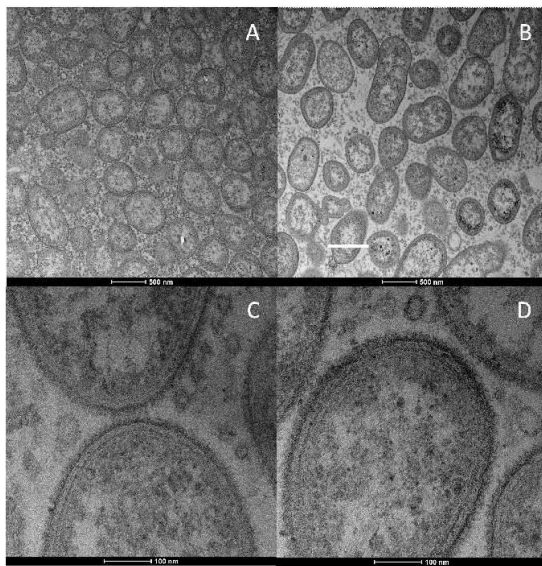
도면6



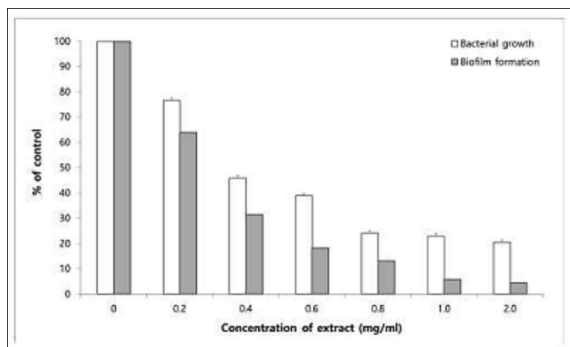
도면7



도면8



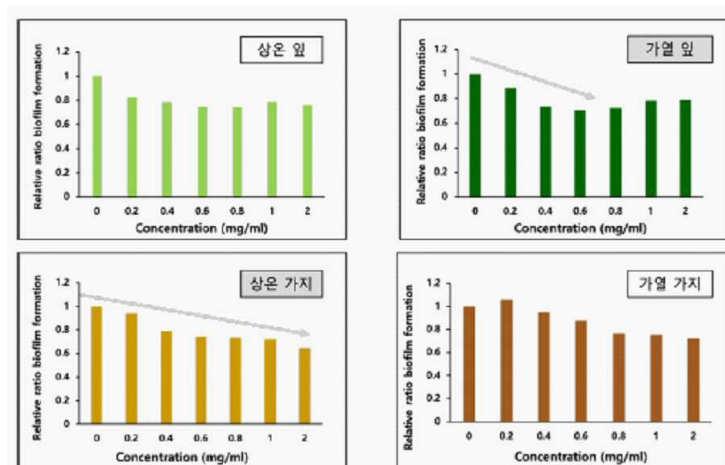
도면9



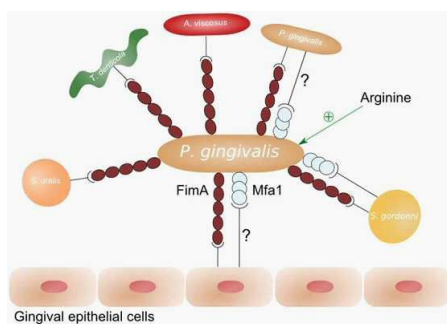
도면10



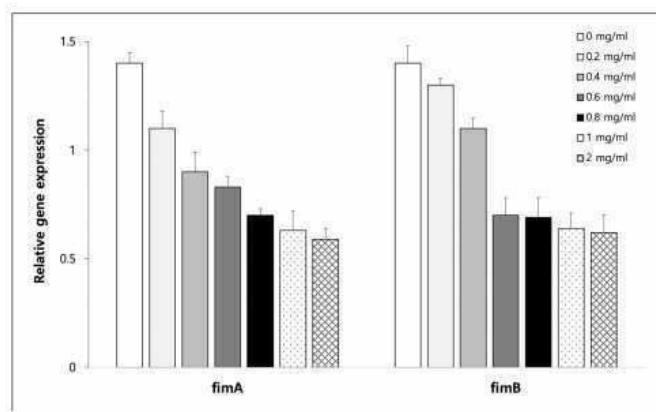
도면11



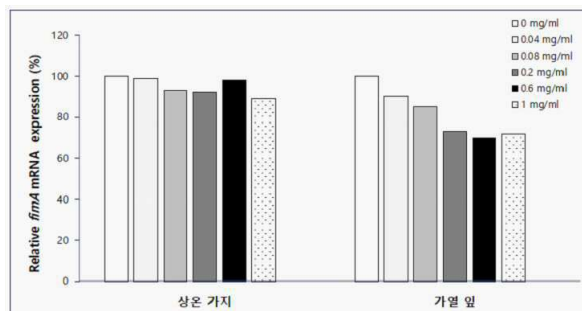
도면12



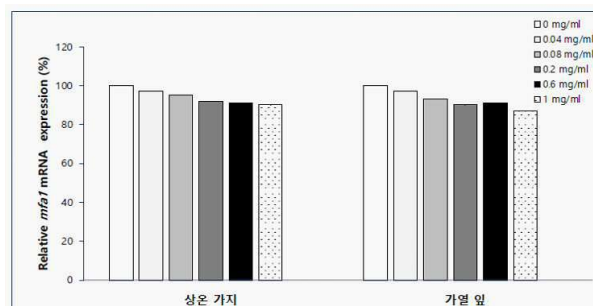
도면13



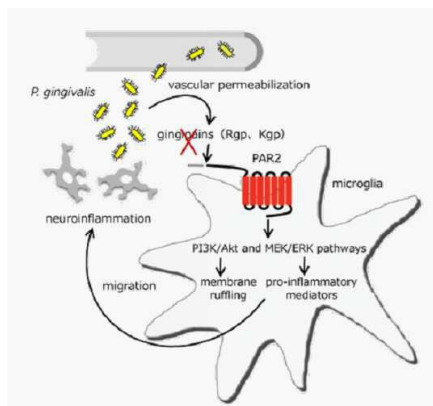
도면14



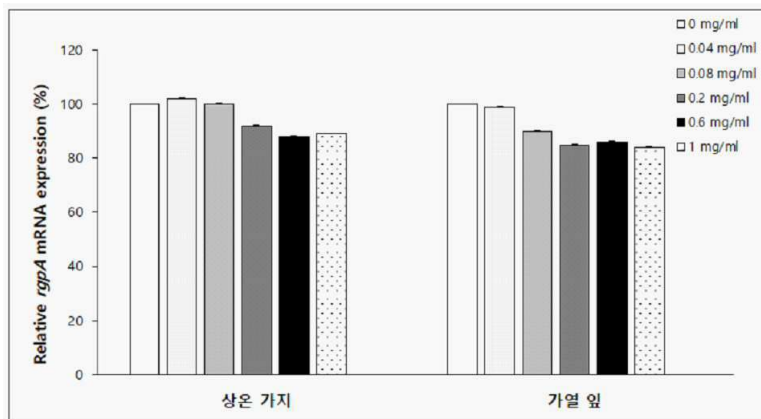
도면15



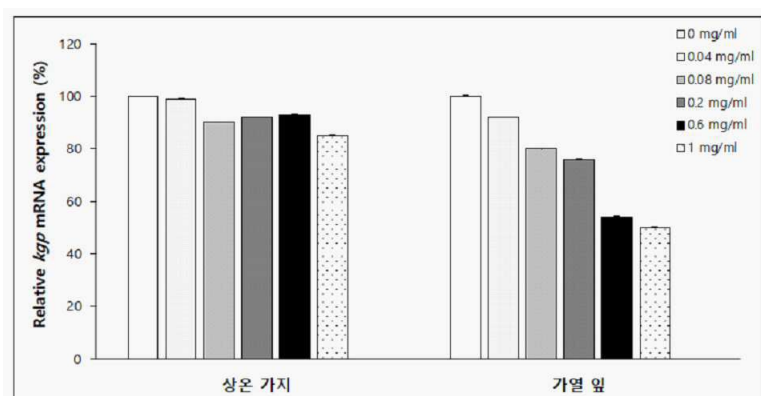
도면16



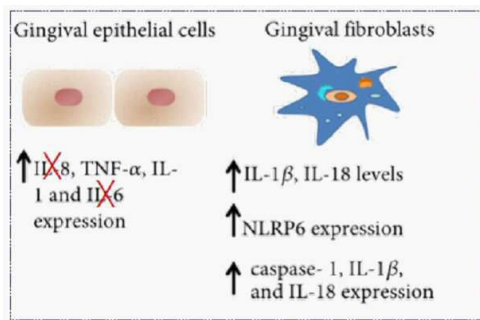
도면17



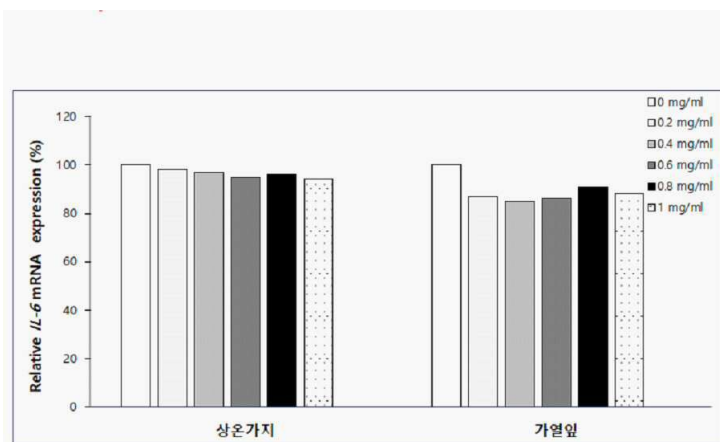
도면18



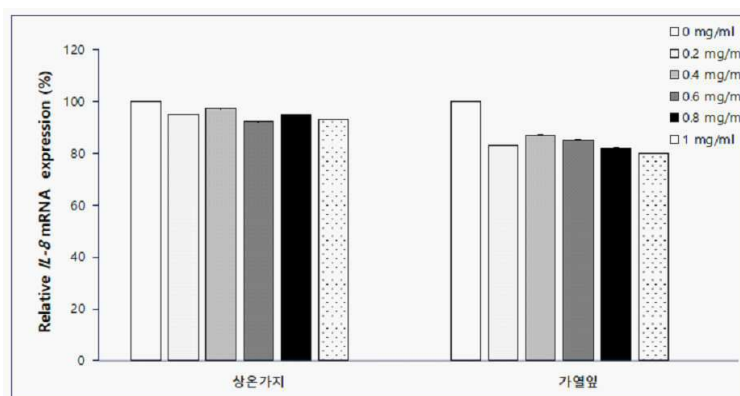
도면19



도면20



도면21



도면22



서열 목록

- <110> Gyeongsang National University
Gyeongsangnamdo
- <120> Composition for improving oral health comprising extracts of
Stewartia koreana Nakai and the product comprising the same
- <130> NPF35118
- <150> KR 10-2020-0174680
- <151> 2020-12-14
- <160> 20
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- tgtagatgac tgatggtgaa a 21
- <
- 210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 2
- actgttagca actaccgatg t 21
- <210> 3

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 gcgcagccta cgataacatt 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 aatgttatcg taggctgcgc 20

 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 ccccgtcggt ttgcctgac c 21
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 gcgtccatca tcagtcggtc 20
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7

cggatatcag atgggttggt g	21
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 8	
gtttcgttcc taccagcagc	20
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 9	
tgtagatgac tgatggtgaa a	21
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 10	
actgttagca actaccgatg t	21
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 11	
ccgttaggcg tttcttcgaa	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 12
 ggaaaaccgt cgttgactgc 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 gcgtatctcc gaaagagtgc 20

 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 gtggttctca agtgggaagc 20
 <210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 tgacttagtt gcgttacacc ctttcttg 28
 <210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 ctgtcacctt caccgttcca gtttt 25

 <210> 17
 <211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 cgcccttcggt ccagttgcc 19
 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 gccagtcct ctttgcgtgt tt 22
 <210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 ctcttggcag ccttcctgat ttc 23

 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 ttttccttgg ggtccagaca gag 23