



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0135532
(43) 공개일자 2016년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/97 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/03 (2006.01) A61K 36/31 (2006.01)
A61K 36/64 (2006.01) A61Q 9/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/97 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0068969

(22) 출원일자 2015년05월18일

심사청구일자 2015년05월18일

(71) 출원인

(주)애니닥터헬스케어

충청남도 천안시 동남구 대흥로 184, 1층(대흥동)

(72) 발명자

이성표

서울특별시 양천구 목동서로 70, 228동 206호(목동, 목동2단지아파트)

(74) 대리인

이희숙, 김석만

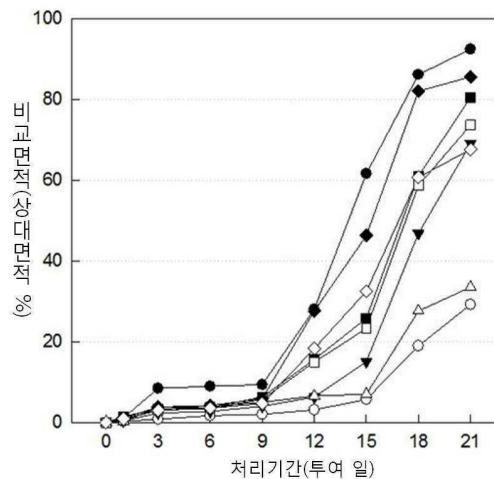
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 비듬제거와 탈모방지 개선 및 모발성장 촉진을 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 비듬제거와 탈모방지 개선 및 모발성장 촉진을 위한 조성물에 관한 것으로, 시스템채투불로사 추출물, 다시마 추출물, 브로콜리 새싹 추출물, 다채 추출물, 알팔파 추출물, 콜라비 추출물과, 레스베라트롤을 3(±0.2):1(±0.1):0.5(±0.07):0.1(±0.03):0.1(±0.03):0.1(±0.03):0.1(±0.03) 중량부로 혼합하여 이루어진다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/03 (2013.01)

A61K 36/31 (2013.01)

A61K 36/64 (2013.01)

A61Q 7/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

시스탄체투불로사 추출물, 다시마 추출물, 브로콜리 새싹 추출물을 $3(\pm 0.2):1(\pm 0.1):0.5(\pm 0.07)$ 중량부로 혼합하여 이루어진 비듬제거와 탈모방지 개선 및 모발성장 촉진을 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

다채 추출물 $0.1(\pm 0.03)$ 중량부, 알팔파 추출물 $0.1(\pm 0.03)$ 중량부, 콜라비 추출물 $0.1(\pm 0.03)$ 중량부와, 레스베라트롤 $0.1(\pm 0.03)$ 중량부 중 적어도 하나를 더 혼합하여 이루어진 비듬제거와 탈모방지 개선 및 모발성장 촉진을 위한 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 시스탄체투불로사 추출물 162mg/kg, 다시마 추출물 54mg/kg, 브로콜리 새싹 추출물 27mg/kg을 혼합하고, 다채 추출물 5.4mg/kg, 알팔파 추출물 5.4mg/kg, 콜라비 추출물 5.4mg/kg과, 레스베라트롤 5.4mg/kg 중 적어도 하나를 더 혼합하여 이루어진 비듬제거와 탈모방지 개선 및 모발성장 촉진을 위한 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 탈모 방지 및 모발성장용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 시스탄체투불로사 추출물과 다시마 추출물, 브로콜리새싹 추출물, 다채 추출물, 알팔파 추출물, 콜라비 추출물 및 레스베라트롤이 포함된 비듬제거와 탈모방지 개선 및 모발성장 촉진을 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 들어 중년 뿐 아니라 청년기에도 탈모가 증가하여 사회활동에 지장을 초래하는 경우가 크게 늘고 있다. 그러므로 탈모를 예방하고, 피모의 재생장 및 모발성장을 촉진할 수 있는 안전하고 간편한 소재의 탐색에 많은 관심이 집중되고 있어 큰 산업적 가치를 지니고 있다. 현재 탈모치료에 관한 수많은 연구가 진행되고 있지만, 아직까지 혁신적인 개발은 없다(Hwang, 2007). 따라서, 치료의 한 유형에 의존하는 것보다는 여러 가지 복합치료의 방법을 적용하는 것이 더 효과적이라는 것이 과학적으로 입증되었다.

[0003] 현재 시판되고 있는 발모제로는 미녹시딜(minoxidil, MXD), 피나스테라이드(finasteride), 프로페시아(propecia) 등이 있다. 미녹시딜은 고혈압 치료를 위한 혈관확장제로 개발되었으나 부작용으로 다모증이 보고되면서 발모제로 개발 되었다(Burton and Marshall, 1979). 이 미녹시딜의 발모효과에 대한 작용기전은 현재까지 명확히 밝혀지지 않았지만, 혈관확장을 통한 영양공급 증가 및 칼륨채널 개방(tassium channel opening) 효과 등이 모발 성장을 유도하는 것으로 생각되고 있다(Meisheri et al., 1988; Buhl et al., 1990a, 1990b). 이러한 미녹시딜은 대머리 치료 가운데서도 남성형 대머리(male-pattern baldness), 즉 남성호르몬에 의한 남성형 탈모증(androgenic alopecia)에 효과적인 것으로 알려져 있지만, 치료 중단 후 수 개월 이내에 치료효과가 사라지는 것으로 밝혀졌다. 이에 비해 피나스테라이드와 프로페시아는 전립샘비대증 및 전립샘암 치료제로, 테스토스테론(testosterone)을 전립샘비대 및 탈모의 원인물질인 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)로 전환시키는 효소인 타입 II 5-리덕타제(type II 5-reductase)를 억제한다(Kaufman et al., 1999). 이 효소는 모낭 기저부의 모유두 세포(hair papilla cells)에 존재하는 바, 피나스테라이드와 프로페시아는 남성형 탈모에

효과적이다.

[0004] 한편, 모낭은 그 스스로 생장기(anagen), 쇠퇴기(catagen), 휴지기(telogen) 및 탈락기(exogen)의 주기를 거치면서 리모델링된다(Paus and Cotsarelis, 1993). 쇠퇴기 동안에 모낭은 세포예정사(programmed cell death) 즉, 세포자살사(apoptosis) 과정을 거치며 크기를 줄여 휴지기로 들어간다(Cotsarelis, 1997). 모낭은 다음 생장기가 시작되면서 재생되는데, 모낭 팽윤부 내 줄기세포(stem cells)의 활성화가 필요하다(Cotsarelis et al., 1990). 증식된 줄기세포들은 초기 생장기 동안 새로운 모낭기질을 형성하고, 상대적으로 미분화된 기저부 세포로부터 피모줄기(hair shaft)와 모근내막(inner root sheath)이 유래된다(Oshima et al., 2001). 피모줄기의 크기와 길이는 각각 모낭의 크기와 생장기의 지속시간에 비례한다. 이러한 피모의 주기적 성장은 다양한 성장인자에 의해 조절된다.

[0005] 한편, 탈모의 가장 일반적인 형태는 남성형 탈모증 또는 일반 대머리, 휴지기 탈모증(telogen effluvium), 항암제 유발 탈모 및 원형탈모증(alopecia areata) 등으로 구분된다. 탈모연구를 위한 모델동물로는 C57BL/6 C3H/HeJ 마우스가 이용되고 있다. 이 C57BL/6 마우스는 체모가 검정 색이고, 자발적 탈모(spontaneous alopecia)가 일어나는 특징을 지니고 있다. 또한 C57BL/6 C3H/HeJ 마우스에는 멜라닌생성세포(melanocytes)가 모낭에만 한정적으로 존재하고, 멜라닌(melanin)의 합성이 모발성장주기(hair growth cycle)와 잘 일치되어 피부색으로 모발의 성장주기를 판정할 수 있는 장점이 있어 모발생리 연구에 널리 이용되고 있다(Pals et al., 1989; Miller-River et al., 2001). 이 C3H/HeJ 마우스는 조직학 및 면역조직학적 특성이 사람의 원형탈모증과 유사하다(Sundberg et al., 1994). 6개월 이상의 암컷 C3H/HeJ 마우스는 20%의 빈도로 원형탈모증으로 발전하는데, 모낭주위로 림프구가 침윤되고 스테로이드 제제에 효과적이어서 사람에서의 면역치료 효과와 유사한 양상을 나타낸다(Freyschmidt-Paul et al., 1999).

[0006] 상술된 바와 같이 탈모에 대한 다양한 원인을 제공하고, 치료제 또는 치료를 위한 기능성 조성물 등을 개발하는 등의 다양한 연구가 활발히 이루어지고 있지만 뛰어난 효과를 얻을 수 있는 해결책이 제시되지 않고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 일본 특개 JP2009-203199호(2009.09.10.)
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-0594342호(2006.07.03. 공고)
(특허문헌 0003) C3H/HeJ 마우스에서 모발성장에 대한 생약 추출물의 효과. Journal of Biomedical Research. 2008.9(3). pp.57-64

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기된 문제점을 해소하기 위해 안출된 본 발명의 목적은 시스탄체투불로사 추출물을 주요 성분으로 하고, 다시마 추출물, 브로콜리 새싹 추출물, 다채 추출물, 알팔파 추출물, 콜라비 추출물과, 레스베라트롤 중 적어도 하나를 일정 비율로 혼합하여 탈모를 방지함은 물론 모발성장을 촉진시킬 수 있도록 한 비듬제거와 탈모방지 개선 및 모발성장 촉진을 위한 조성물을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기된 목적을 달성하기 위해 본 발명에 따른 비듬제거와 탈모방지 개선 및 모발성장 촉진을 위한 조성물은, 시스탄체투불로사 추출물, 다시마 추출물, 브로콜리 새싹 추출물을 3(±0.2):1(±0.1):0.5(±0.07) 중량부로 혼합하여 이루어진 것을 특징으로 한다.

[0010] 또한, 다채 추출물 0.1(±0.03) 중량부, 알팔파 추출물 0.1(±0.03) 중량부 콜라비 추출물 0.1(±0.03) 중량부와, 레스베라트롤 0.1(±0.03) 중량부 중 적어도 하나를 더 혼합하여 이루어진 것을 특징으로 한다.

[0011] 그리고, 시스탄체투불로사 추출물 162mg/kg, 다시마 추출물 54mg/kg, 브로콜리 새싹 추출물 27mg/kg을

혼합하고, 다채 추출물 5.4mg/kg, 알팔파 추출물 5.4mg/kg, 콜라비 추출물 5.4mg/kg과, 레스베라트롤 5.4mg/kg 중 적어도 하나를 더 혼합하여 이루어진 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0012] 상술된 바와 같이 본 발명에 따르면, 시스탄체투불로사 추출물에 다시마 추출물과 브로콜리 새싹 추출물을 일정 비율로 혼합하여 탈모를 방지함은 물론 모발성장을 촉진할 수 있는 효과가 있다.
- [0013] 또한, 다채 추출물, 알팔파 추출물, 콜라비 추출물 및 레스베라트롤 중 적어도 하나를 더 추가 혼합함으로써, 혈행 개선 강화, 모발 영양성분 제공 및 혈전 용해 등을 통해 탈모 방지와 모발성장 촉진을 극대화할 수 있는 효과가 있다.
- [0014] 또, 이들 성분이 혼합된 조성물은 두피의 비듬 억제 및 항염증 효과에 탁월한 효과가 있다.
- [0015] 그리고, 본 발명의 조성물은 샴푸 또는 헤어토닉 형태뿐만 아니라, 알약 또는 음료 형태의 기능성 식품 등으로 다양하게 제공하여 탈모방지과 육모를 활성화할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 본 명세서에서 첨부되는 다음의 도면들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 예시하는 것이며, 발명의 상세한 설명과 함께 본 발명의 기술사상을 더욱 이해시키는 역할을 하는 것이므로, 본 발명은 그러한 도면에 기재된 사항에만 한정되어 해석되어서는 안된다.
- 도 1은 본 발명에 따른 비듬제거와 탈모방지 개선 및 모발성장 촉진을 위한 조성물에 포함되는 시스탄체투불로사 추출물, 다시마 추출물, 브로콜리 새싹 추출물, 다채 추출물, 알팔파 추출물, 콜라비 추출물과, 레스베라트롤의 단독 또는 혼합 비율에 따른 조성물과 정상대조군 및 비교물질군 등을 포함한 각 시험물질에 대한 발모 증가율을 21일 동안 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 도 1에서 21일째 실험용 마우스의 경시별 육모 정도를 나타낸 사진이다.
- 도 3은 도 1에서 21일째 실험용 마우스의 조직 변화를 나타낸 사진이다.
- 도 4a와 도 4b는 도 1에서 14일째 및 21일째 나타난 γ -GTP 활성도를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 도 1의 시험물질을 마우스에 도포 또는 경구 투여한 후에 측정한 ALP 활성도가 도시된 그래프이다.
- 도 6은 도 1의 시험물질을 마우스에 도포 또는 경구 투여한 후에 측정한 EGF 발현량을 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 도 1의 시험물질을 마우스에 도포 또는 경구 투여한 후에 측정한 VEGF 발현량 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 도 1의 시험물질을 정형화된 탈모 환자들에게 경구 투여한 후 16주 후 모발밀도 변화를 비교하여 나타낸 사진이다.
- 도 9는 도 1의 시험물질을 정형화된 탈모 환자들에게 경구 투여한 후 8주 후 및 16주 후의 모발밀도 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 10은 도 1의 시험물질을 정형화된 탈모 환자들에게 경구 투여한 후 16주 후의 모발굵기 변화를 나타낸 사진이다.
- 도 11은 도 1의 시험물질을 정형화된 탈모 환자들에게 경구 투여한 후 8주 후 및 16주 후의 모발굵기 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 12는 도 1의 시험물질을 정형화된 탈모 환자들에게 경구 투여한 후 8주 후 및 16주 후 시험자들에 의한 비듬과 염증 및 탈모개선에 대한 시각적 평가 점수를 나타낸 그래프이다.
- 도 13은 도 1의 시험물질을 정형화된 탈모 환자들에게 경구 투여한 후 8주 후 및 16주 후 시험자들에 의한 비듬과 염증 및 탈모개선에 대한 주관적 평가 점수를 나타낸 그래프이다.
- 도 14는 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 시스탄체투불로사 추출물, 다시마 추출물, 조성물1,2의 단독 또는 혼합 비율에 따른 비듬균 증식억제효능을 평가한 결과를 도시한 사진이다.
- 도 15는 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 시스탄체투불로사 추출물, 다시마 추출물, 조성물1,2를 RAW 264.7 세포배양계에서 증가된 대식세포의 질소 생성억제효과를 평가한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 16은 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 시스탄체투불로사 추출물, 다시마 추출물, 조성물1,2를 공기주머니 내의 염증 유발물질에서의 질소 농도 억제 및 프로스타글라딘E₂ 함량 억제에 대한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 17은 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 시스탄체투불로사 추출물, 다시마 추출물, 조성물1,2에 대한 염증세포의 침윤에서 공기주머니 내 피하조직 염증반응을 관찰한 결과(염증세포 침윤억제)를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하에서는 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 쉽게 실시할 수 있도록 바람직한 실시 예를 상세하게 설명한다. 다만, 본 발명의 바람직한 실시 예에 대한 동작 원리를 상세하게 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0018] <구성>
- [0019] 본 발명에 따른 비듬제거와 탈모방지 개선 및 모발성장 촉진을 위한 조성물은 시스탄체투불로사(Cistanche tubulosa) 추출물, 다시마 추출물과 브로콜리(broccoli) 새싹 추출물을 주재료로 하고, 다채 추출물, 알팔파 추출물, 콜라비 추출물, 레스베라트롤(resveratrol)을 보조재료로 한다. 이하에서는 각 재료 및 혼합 비율에 대해 자세히 설명한다.
- [0020] 먼저, 시스탄체투불로사 추출물은 3(±0.2) 중량부로 혼합된다. 이러한 시스탄체투불로사 추출물은 시스탄체투불로사를 80% 에탄올로 추출, 살균 및 건조하여 추출된 분말형태이다. 여기서, 시스탄체투불로사는 황막 초원에 분포하며, 굵고 육질이 두터우며 단면이 기름지고 윤기가 나 '사막의 인삼'이라고 부른다. 또한, 시스탄체투불로사는 염증세포로부터 산화질소(NO)를 분리하는데 필요한 주요 사이토키나아제(cytokine)인 TNF-와 IL-4 생성을 낮추는 것으로 보고되었으며, 동물실험에서도 강력한 항염증 효과를 보여 주었다(Yamada et al., 2010; Kyung et al., 2012). 또한, 시스탄체투불로사는 혈중 콜레스테롤을 강하시킴으로써 혈행개선에 뛰어난 효과를 발휘하고(himoda et al., 2009), 혈행 촉진, 혈관확장 작용, 모발성장과 비듬 및 염증개선의 효능에 대해 후술된 실험에서 확인할 수 있었다.
- [0021] 또한, 다시마 추출물(후코이단 포함)은 1(±0.1) 중량부로 혼합된다. 이 다시마 추출물은 다시마를 세정, 건조, 분쇄하여 60℃에서 하루 동안 열수 추출한 후 0.45μm 막여과로 걸러내고, 농축, 살균, 분무, 건조 및 농축하여 얻었다. 최근에 다시마 추출물이 혈전용해 효능을 가지고 있어 허혈성 질환의 예방 및 개선에 우수한 것으로 보고되어 있다(Min et al., 2012a, 2012b). 이러한 다시마 추출물은 많은 나라에 분포된 다시마(Laminaria japonica), 미역귀(Undaria pinnatifida Sporophyll), 큰실말(Cladophora okamuranus)과 같은 해조류로부터 얻을 수 있는 황산염 다당류 복합체(sulfate polysaccharide complex)로, 오랫동안 동양의학에서 치료제로 사용되어 왔다. 이전의 연구에서 다시마 추출물은 항산화, 항응고, 항암 및 항염증 효능이 보고되었다(Feldman et al., 1999; Wang et al., 2010). 따라서 염증성 질환, 허혈, 면역능 저하 및 종양에 대한 다시마 추출물의 유용성이 연구자들의 관심을 모으고 있다(Bojakowski et al., 2001; Li et al., 2005). 이 다시마 추출물은 본 발명의 조성물에서 혈행 개선, 항응고 및 혈전용해를 통해 두피와 모근의 면역기전을 강화하여 건강한 모발의 유지와 생성에 대한 효능을 후술된 실험에서 확인할 수 있었다.
- [0022] 또, 브로콜리(broccoli) 새싹 추출물은 0.5(±0.07) 중량부로 혼합된다. 이 브로콜리 새싹 추출물은 비타민 C, K, A 및 섬유질이 풍부한 대중적인 채소인 브로콜리의 새싹을 세정, 건조, 분쇄하여 40℃에서 70% 에탄올로 추출, 살균, 건조 및 농축하여 얻었다. 본 발명의 브로콜리 새싹 추출물은 설포라판(sulforaphane)을 주요 성분으로 하고 있다. 이 설포라판은 브로콜리 성체보다 새싹에 더 많이 함유되어 있고(Fahey et al., 2002), 항암효소 유도, 암세포의 아포토시스(apoptosis), 세포손상 억제, 혈관신생 억제 작용 등을 통해 암 예방 및 항암효과를 가지는 것으로 알려져 있으며, 면역증강과 해독효능도 가지고 있는 것으로 보고되어 있고(Fahey et al., 2002; Haristoy et al., 2003; Yanaka et al., 2009), 본 발명의 조성물에서 두피와 모근은 영양성분 강화와 비듬 및 비듬 및 염증개선에 대해 후술된 실험에서 확인할 수 있었다.
- [0023] 그리고, 다채 추출물은 0.1(±0.03) 중량부로 혼합된다. 이 다채 추출물은 십자화과에 속하는 녹황색 채소인 다채를 70% 에탄올로 추출, 살균, 건조 및 농축하여 얻었다. 다채는 비타민 성분이 많이 함유되어 비타민 또는 비타민채라고도 하고, 비타민 A의 전구체인 카로틴의 함량이 시금치의 2배나 되며, 다채 100g에 성인 하루 비타민 필요량의 80%를 함유하고 있어, 조혈 작용을 돕고 혈액순환을 좋게 하는 기능성이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 다채로부터 얻은 다채 추출물은 본 발명의 조성물에서 조혈 작용, 혈행 촉진 강화를 통해 모발 건강 및 모

발성장에 효능이 있음이 후술된 실험에서 확인할 수 있었다.

[0024] 또한, 알팔파 추출물은 $0.1(\pm 0.03)$ 중량부로 혼합된다. 이 알팔파 추출물은 콩과에 속하는 다년생 초본식물로 자주개자리라고 불리는 알팔파를 70% 에탄올로 추출, 살균, 건조 및 농축하여 얻었다. 알팔파는 단백질 함량이 25% 이상이며, 그 외의 영양성분(질소, 인, 칼륨, 칼슘, 붕소, 유황, 몰리브덴, 마그네슘 등)의 조성도 매우 우수하며, 최근에는 피토에스트로겐(phytoestrogen)의 일종인 퀘세틴(quercetin)과 쿠메스테롤(coumesterol)을 다량 함유하고 있는 알팔파에 대해 콜레스테롤을 낮추고, 피부미용, 고혈압 개선 등의 효능으로 인해 인체에 대한 기능성이 부각되면서 이용하는 양이 점차 증가하고 있다. 이러한 알팔파로부터 얻은 알팔파 추출물은 콜레스테롤과 혈압을 낮추는 효능과 더불어 모발의 영양성분 강화 및 모발성장에 효능이 있음이 후술된 실험에서 확인할 수 있었다.

[0025] 또, 콜라비 추출물은 $0.1(\pm 0.03)$ 중량부로 혼합된다. 이 콜라비 추출물은 콜라비 (Brassica oleracea, Kohlarbi)는 양귀비목(Papaveraceae) 배추과 (Brassicaceae)에 속하는 2년생 채소이고, 순무양배추 또는 구경양배추 라고도 하는 콜라비를 70% 에탄올로 추출, 살균, 건조 및 농축하여 얻었다. 콜라비는 항암효과가 우수한 물질로 알려진 안토시아닌(anthocyanin), 카로티노이드(carotenoid), 비타민 C와, 글루코시노레이트(glucosinolates) 등을 풍부하게 함유하고 있으며, 양배추 등 일반 채소에 비하여 비타민 C와 칼륨이 풍부하고, 면역력 향상 작용, 소염 등의 효능이 있으며, 열량도 낮으면서 식이섬유가 풍부해 다이어트에 유효하다고 알려져 있으며, 항돌연변이 작용도 있는 것으로 보고되어, 항염증 및 모발성장에 시너지 효능이 있음이 후술된 실험에서 확인할 수 있었다.

[0026] 그리고, 레스베라트롤(resveratrol)이 $0.1(\pm 0.03)$ 중량부로 혼합된다. 이 레스베라트롤은 포도로부터 추출한다. 포도는 갈대나무목(Rhamnaceae) 포도과(Vitaceae)에 속하며, 열매는 생식으로 이용되거나 음료, 와인, 잼, 포도씨유 등으로 가공되어 이용되고 있다. 지금까지 포도를 이용한 연구로는 심혈관질환이나 항암활성, 면역 조절 활성을 가진다는 연구가 많다. 이러한 효능을 나타내는 생리활성물질 중 대표적인 물질로 레스베라트롤이 있으며, 이외에도 페놀산, 카테킨, 플라보노이드, 프로안토시아니딘 등이 다양하게 존재한다. 포도를 채배할 때 일반적으로 포도 어린잎은 가지치기를 하는데, 이들은 일반적으로 버려진다. 그런데 어린 포도 잎은 식용으로 사용할 수 있을 뿐만 아니라 항산화 효과 및 항염증 효과가 있어 인체질환의 예방 및 개선에 활용될 수 있다. 여기서, 레스베라트롤은 채취된 포도 잎을 즉시 신선한 물로 세척하여 건조기에서 $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ 로 하루 정도 건조하고, 포도 잎 100g에 대해 80% 에탄올 1,000ml를 주입하여 일주일 동안 추출한 후 여과하고, 회전공농축기(Eyela A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 감압한 후, -70°C 에서 동결건조기(Eyela, FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 건조하여 추출하였다. 이러한 레스베라트롤은 혈전용해 효능이 탁월하고, 종래의 혈전용해제에 비해 식용식물의 대사산물로서의 안전성과 활성이 우수하여, 주로 정맥주사를 통해 투여되는 종래의 혈전용해제와 달리 경구 투여로 가능하므로 관상동맥 질환, 맥혈전증 및 뇌혈관질환 등의 혈전 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하고, 특히 혈행 개선, 모발성장 촉진에 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

[0027] <실험>

[0028] [동물실험]

[0029] 본 발명에 따라 시스탄체투불로사 추출물, 다시마 추출물, 브로콜리 새싹 추출물, 다채 추출물, 알팔파 추출물, 콜라비 추출물과, 레스베라트롤을 일례로 3:1:0.5:0.1:0.1:0.1:0.1로 혼합하여 조성물을 만든다. 본 발명에 따른 조성물의 실험 및 결과 대비를 위해 본 발명의 조성물을 비롯하여 다양한 시험물질을 제조하였다. 이 시험물질로는 식염수(Saline)의 정상대조군, 미녹시딜 3%의 비교물질군과, 개별 재료군에 대해 54mg/kg의 시스탄체투불로사 추출물 1, 18mg/kg의 다시마 추출물 1, 162mg/kg의 시스탄체투불로사 추출물 2, 54mg/kg의 다시마 추출물 2를 준비하였다. 또한, 본 발명의 조성물에 대해 조성물 1(저용량)과 조성물 2(고용량)로 구분하고, 조성물 2는 조성물 2에 대해 각 재료들을 대략 3배 정도로 많은 용량을 투입하여 제조하였다. 여기서, 조성물 1은 시스탄체투불로사 54mg/kg, 다시마 추출물 18mg/kg, 브로콜리 새싹 추출물 9mg/kg, 다채 추출물 1.8mg/kg, 알팔파 추출물 1.8mg/kg, 콜라비 추출물 1.8mg/kg, 레스베라트롤 1.8mg/kg을 혼합하여 제조하였다. 또한, 조성물 2는 시스탄체투불로사 162mg/kg, 다시마 추출물 54mg/kg, 브로콜리 새싹 추출물 27mg/kg, 다채 추출물 5.4mg/kg, 알팔파 추출물 5.4mg/kg, 콜라비 추출물 5.4mg/kg, 레스베라트롤 5.4mg/kg을 혼합하여 제조하고, 사용 전까지 대략 4°C 에서 저장하여 사용하였다.

[0030] 1. 실험동물

- [0031] 본 발명에 따른 조성물의 실험용 동물은 오리엔트바이오(회사명, 한국)로부터 모발성장 연구를 위해 5주령 수컷 C57BL/6 마우스, 염증연구를 위해 수컷 ICR 마우스를 공급받아 약 1주간 순화과정을 거친 후 220(가로)×200(세로)×145(높이) (mm) 크기의 마우스용 케이지에 수용하여 실험하였다. 실험실의 환경은 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 10\%$, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150~300Lux로 조절하였다. 실험동물용 펠릿형 고형 사료인 퓨리나 랫 초우(Purina Rat Chow)를 바이오피아(업체명, 한국)로부터 공급받아 급여하였고, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.
- [0032] 6주령에 마우스의 등쪽 부위를 전기면도기로 제모하여 휴지기 상태의 모근이 성장기로 유도되도록 하였다(Hattori and Ogawa, 1983). 즉, 제모한 피부가 균일하게 핑크색을 띠 때까지 기다려 핑크색이 확인되면 남아있는 피모를 면도기로 피부에 상처가 나지 않도록 가볍게 면도하였다(Lee et al., 2006; Kim et al., 2009).
- [0033] 2. 시험물질
- [0034] 2-1. 정상대조군
- [0035] 면도 다음날부터 식염수를 면도 부위에 21일 동안 1~2회/일 피부에 도포하였다. 이에 대한 발모의 결과가 도 1에 도시되어 있다.
- [0036] 2-2. 비교물질군
- [0037] 면도 다음날부터 미녹시딜 3%를 21일 동안 1회/일 약 0.2mL의 약을 붓으로 제모된 피부에 도포하였다. 이에 대한 발모의 결과가 도 1에 도시되어 있다.
- [0038] 2-3. 시스탄체투불로사 추출물 1
- [0039] 시스탄체투불로사 추출물 54mg/kg을 21일 동안 1회/일 경구 투여하였다. 이에 대한 발모의 결과가 도 1에 도시되어 있다.
- [0040] 2-4. 다시마 추출물 1
- [0041] 다시마 추출물 18mg/kg을 21일 동안 1회/일 경구 투여하였다. 이에 대한 발모의 결과가 도 1에 도시되어 있다.
- [0042] 2-5. 시스탄체투불로사 추출물 2
- [0043] 시스탄체투불로사 추출물 162mg/kg을 21일 동안 1회/일 경구 투여하였다. 이에 대한 발모의 결과가 도 1에 도시되어 있다.
- [0044] 2-6. 다시마 추출물 2
- [0045] 다시마 추출물 54mg/kg을 21일 동안 1회/일 경구 투여하였다. 이에 대한 발모의 결과가 도 1에 도시되어 있다.
- [0046] 2-7. 조성물 1
- [0047] 시스탄체투불로사 추출물 54mg/kg, 다시마 추출물 18mg/kg, 브로콜리 새싹 추출물 9mg/kg, 다채 추출물 1.8mg/kg, 알팔파 추출물 1.8mg/kg, 콜라비 추출물 1.8mg/kg, 레스베라트롤 1.8mg/kg을 혼합하여 제조한 조성물을 21일 동안 1회/일 경구 투여하였다. 이에 대한 발모의 결과가 도 1에 도시되어 있다.
- [0048] 2-8. 조성물 2
- [0049] 시스탄체투불로사 추출물 162mg/kg, 다시마 추출물 54mg/kg, 브로콜리 새싹 추출물 27mg/kg, 다채 추출물 5.4mg/kg, 알팔파 추출물 5.4mg/kg, 콜라비 추출물 5.4mg/kg, 레스베라트롤 5.4mg/kg을 혼합하여 제조한 조성물을 21일 동안 1회/일 경구 투여하였다. 이에 대한 발모의 결과가 도 1에 도시되어 있다. 여기서, 조성물 1과 조성물 2에서 각 재료들의 용량은 임상예정용량인 10mg/70kg과 300mg/70kg으로부터 체중대비 체표면적환산비($K_m=37/\text{마우스 } K_m=3$)를 적용하여 산출하였다.
- [0050] 3. 경시별 육모분석
- [0051] 시험물질 투여 전(0일)과 투여 후 3일 간격으로 육모 효과를 판정하기 위해 실험동물의 등 부위를 사진 촬영하였다. 이때, 촬영기로는 전산이미지분석시스템(Computerized image analysis system, Imageinside(업체명), 한국)을 이용하고, 사진상으로 전체 제모한 피부 단위면적 당 피모가 자란 면적(regrowth area/shaved area)의 육모비율을 구하였다.
- [0052] 3-1. 경시별 육모분석 결과

- [0053] 비교물질군은 정상대조군에 비해 빠른 모발성장 촉진 효과가 확인되었고, 자세하게는 21일째에 정상대조군이 29.2%의 에 대해 92.4% 정도의 탁월한 발모 효능이 촉진되었다(도 1, 도 2A와 도 2B 참조).
- [0054] 또한, 다시마 추출물 1은 미녹시딜 3%의 비교물질군에 비해 발모 효능이 낮았지만, 다시마 추출물 2에서는 발모가 촉진되어 21일에는 69%에 이르렀다(도 1, 도 2C와 도 2D 참조).
- [0055] 또한, 시스탄체투불로사 추출물 1은 다시마 추출물 2와 유사하게 21일째에 73.6%까지 발모가 촉진되었고, 시스탄체투불로사 추출물 2는 21일째에 80.4% 정도의 발모가 촉진되었다(도 1, 도 2E와 도 2F 참조).
- [0056] 그리고, 조성물 1은 다시마 추출물 2와 유사하여 21일째에도 각 재료들의 상승 효과가 관찰되지 않았다. 반면, 조성물 2는 각 재료들의 상승 효과가 관찰되어 21일째 비교물질군의 미녹시딜 3%의 결과와 유사하게 나타나는 것으로 확인되었다(도 1, 도 2G와 도 2H 참조).
- [0057] 4. 조직학적 검사
- [0058] 시험 개시 후 14일 및 21일째에 발모가 왕성한 부위와 지연된 부위의 피부가 포함되도록 적출한 후 10% 중성 포르말린(formalin) 용액으로 고정하였다. 조직을 파라핀에 포매(embedding)한 후 5개의 조직절편을 만들고, 헤마톡실린에오진(hematoxylin-eosin)으로 염색하여 모낭의 수 및 조직학적 변화를 광학현미경으로 관찰하였다.
- [0059] 4-1. 조직학적 검사 결과
- [0060] 정상대조군(도 3A 참조)에 비해 비교물질군의 14일째와 21일째의 피부 조직검사 소견에서 모근의 충실도가 현저하게 개선되었다(도 3B 참조).
- [0061] 이러한 모근의 충실도는 비교물질군의 경우보다는 낮았지만 다시마 추출물 1,2에서도 개선되었고(도 3C와 도 3D 참조), 시스탄체투불로사 추출물 1,2와 조성물 1에서도 개선되었음을 알 수 있다.(도 3E 내지 도 3G 참조)
- [0062] 특히, 조성물 2의 경우 비교물질군의 결과보다 더 우수하게 개선되었음을 확인할 수 있었다(도 3H).
- [0063] 5. GTP(Glutamyl Transpeptidase) 및 ALP(Alkaline Phosphatase) 활성도 측정
- [0064] 적출한 피부조직을 즉시 액체질소에 동결해 두었다가 4배의 포스페이트 버퍼(phosphate buffer)(pH7.4)를 가하고 균질화하였다. 이 균질액을 대략 3,000rpm에서 대략 20분간 원심분리하고, 상층액을 GTP와 ALP 활성도 측정에 사용하였다. 이때, GTP와 ALP 활성도는 PNPP-DEAV(*p*-nitrophenolphosphate)를 이용한 GSCC(enzyme rate assay)로 측정하였다(Handiiski et al., 1994; Kim et al., 2009).
- [0065] 5-1. GTP와 ALP 활성도 측정 결과
- [0066] 모근을 생장기로 유도하는 것으로 알려진 GTP 활성도를 측정한 결과 정상대조군과 대비하여 보면 비교물질군은 14일(도 4A)과 21일(도 4B)에서와 같이 90~120% 증가하였다. 다시마 추출물 2의 경우에도 편차는 심했지만 GTP 활성도가 증가하는 경향을 나타냈다. 특히 시스탄체투불로사 추출물 2의 경우 14일째에 확연한 증가가 확인되었다. 또한, 조성물 1과 조성물 2의 경우 14일에 비해 21일에 두드러지는 상승효과를 나타내었다.
- [0067] 그리고, 동물의 골격성장 및 혈관생성 지표로 알려져 있는 ALP 활성도에 있어서도 정상대조군과 대비하여 보면 비교물질군은 14일(도 5A)과 21일(도 5B)에 모두 유의한 증가를 보였다. 또한, 다시마 추출물 1,2와 시스탄체투불로사 추출물 1,2 역시 농도 의존적으로 ALP 활성도를 증가시켰다. 여기서, 조성물 1,2의 경우 다시마 추출물 1,2와 시스탄체투불로사 추출물 1,2에 비해 더욱 상승하였음을 알 수 있다.
- [0068] 6. EGF(Epidermal Growth Factor)와 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor) 발현량 측정
- [0069] EGF와 VEGF를 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kits(R&D System, Minneapolis, USA)를 사용하여 측정하였다(Cross et al., 2003; Kim et al., 2009). 즉, 제조사의 안내서에 따라 마우스 EGF 및 VEGF에 특이적인 다클론항체(polyclonal antibodies)를 사용하는 샌드위치 효소면역측정법(sandwich enzyme immunoassay)로 두 성장인자의 생성을 정량하였다.
- [0070] 6-1. EFG와 VEGF 발현량 측정결과
- [0071] 피모성장을 촉진하는 EFG를 분석한 결과 정상대조군에 대비하여 비교물질군은 14일(도 6A)과 21일(도 6B) 모두 3.5배 이상 증가하였다. 또한, 다시마 추출물 1,2는 14일째에는 미미하게 증가하였지만 21일에는 의미있는 상승을 보여 주었다. 그리고, 시스탄체투불로사 추출물 1의 상승은 미약하지만 시스탄체투불로사 추출물 2는 14일과 21일에 탁월한 효과를 발휘하였다. 여기서, 조성물 1,2에서 보듯이 EFG 함량을 크게 증가시켜 6가지 물질 간의

상승효과가 확인되었다.

[0072] 한편, 혈관신생인자 VEGF를 분석한 결과, 정상대조군에 대비하여 비교물질군은 14일(도 7A)에 약 80%, 21일(도 7B)에서 약 50% 증가하였다. 또한, 다시마 추출물 1,2는 효과가 없었고, 시스탄체투불로사 추출물 1,2는 상당한 VEGF 상승효과를 나타냈다. 그리고, 조성물 1,2는 14일째에 VEGF의 증가에 있어서 상승효과가 확인되었다.

[0073] 7. 통계처리

[0074] 모든 측정값은 평균표준오차로 나타내었다. 일원분산분석(one-way ANOVA)로 분석 후 유의성이 관찰되면 터키 테스트(Turkey's test)를 통하여 $P < 0.05$ 의 수준에서 시험물질 간의 유의성을 검정하였다.

[0075] [임상실험]

[0076] 1. 시험물질

[0077] 시스탄체투불로사 추출물, 다시마 추출물, 브로콜리 새싹 추출물, 다채 추출물, 알팔파 추출물, 콜라비 추출물, 레스베라트롤을 3:1:0.5:0.1:0.1:0.1:0.1의 비율로 제조한 복합물(이하, MK-R7 또는 HGF-R7로 명명함)로써, 복용량에 따라 실험적 결과들을 비교하기 위해 대조군 말토덱스트린(Maltodextrin) 260mg을 포함하는 캡슐을 실험군에 제공하였다. 시스탄체투불로사 추출물, 다시마 추출물, 브로콜리 새싹 추출물, 다채 추출물, 알팔파 추출물, 콜라비 추출물과, 레스베라트롤을 포함하지 않은 위약 캡슐은 1일 2회 복용하는 조건으로 대조군에 제공하였다. 이를 아래 [표1]에서 간략히 한다.

표 1

	시험제품	대조제품
제품명	MK-R7	플라시보(Placebo)
주성분	시스탄체투불로사 추출물, 다시마 추출물, 브로콜리 새싹 추출물, 다채 추출물, 콜라비 추출물, 레스베라트롤 추출물	말토덱스트린
제품성상	캡슐	캡슐
용법	1일 2회, 1회 1캡슐	1일 2회, 1회 1캡슐

[0079] 2. 모발의 밀도와 직경(굵기)

[0080] 탈모에 영향을 받은 임상시험자들의 정수리 근처 1cm 직경의 원형 형상으로 2mm 길이로 면도하였다. 원형 부위 중심에 실험적 타겟 부위는 1mm 검정 점으로 표시하였으며, 환자 모발의 밀도, 직경은 MK-R7 사용 전과 16주 후에 모주기검사(Phototrichogram)(비침습적 영상기기장치(Folloscope) 4.0, Lead M)를 이용하여 객관적으로 측정하였다. 모발의 밀도는 1cm^2 영역 내의 모발의 수를 세어 측정하였고, 모발의 직경은 측정된 모발 직경들의 평균값을 산출하여 측정하였다.

[0081] 2-1. 모발 밀도(단위 n/cm^2)의 변화량 결과(1차 유효성 평가 변수)

[0082] 테스트 그룹의 모발 밀도의 평균은 MK-R7 섭취 전 159.56 ± 28.34 (도 8A 참조)이고, 섭취 16주 후 182.84 ± 32.96 (도 8B 참조)이다. 대조군의 모발평균 밀도의 평균은 섭취 전 150.18 ± 39.57 (도 8C 참조)이고, 섭취 16주 후 160.53 ± 37.55 (도 8D 참조)이다. 임상시험에 참가한 모든 환자들이 모발밀도의 증가를 경험하였다. 여기서, 16주 후의 모발밀도 변화의 정도는 대조군은 10.35 ± 20.08 정도 증가하였고, 테스트 그룹은 23.29 ± 24.26 정도 증가하였으며, 이를 보면 대조군에 비해 테스트 그룹에서 더 증가하였음을 알 수 있다. 이처럼, 테스트 그룹의 모발밀도의 증가는 대조군과 비료하여 통계학적으로 유의하였음을 확인할 수 있다(도 9 참조).

[0083] 2-2. 모발 직경(굵기, 단위 mm)의 변화량 결과(2차 유효성 평가 변수)

[0084] 테스트그룹의 모발 직경의 평균은 MK-R7 섭취 전 0.063 ± 0.014 이고(도 10A 참조), 16주 후 0.086 ± 0.018 (도 10B)이다. 대조군은 MK-R7 섭취 전 0.071 ± 0.018 이고(도 10C 참조), 16주 후 0.077 ± 0.015 이다(도 10D 참조). 대조군과 테스트 그룹 모두 모발 직경의 증가를 보였다. 두 그룹 모두에서 모발 직경의 증가를 나타내었다. 다만, 16주 후에서 테스트 그룹은 대조군과 비교하여 모발직경에 있어 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다(도 11 참조).

- [0085] 3. 연구자 평가 점수 및 환자의 주관적 평가 점수
- [0086] 탈모 증상 및 비듬과 두피 염증의 개선 효과를 확인하기 위해 8주와 16주에 연구자에게 기준 상위에서 시험 대상자들의 머리 측면의 사진이 제공되었다. 전문가는 5점 척도로 개선의 정도를 판단하였다(-1:악화, 0:개선없음, +1:미세한 개선, +2:개선, +3:현저한 개선). 또한, 탈모 증상 및 비듬과 두피 염증의 개선에 관한 시험 피험자들의 주관적인 개선 효과를 확인하기 위해 8주와 16주에 질문을 했고, 피험자들은 5점 척도로 개선의 정도를 판단하였다(-1:불만족, 0:무관심, +1:다소 만족, +2:만족, +3:매우 만족).
- [0087] 3-1. 비듬과 염증 및 탈모 개선에 대한 연구자의 시각적 평가점수
- [0088] 탈모 임상 개선의 시각적 점수를 부여하는 맹검조사들에 의한 평가는 8주 후 테스트 그룹이 0.52 ± 0.66 을 받고, 대조군이 0.24 ± 0.63 을 받음으로써, 두 그룹들이 평균점수에서 개선을 보였다. 또한, 16주 후 테스트 그룹이 0.64 ± 0.78 을 받고, 대조군이 0.51 ± 0.82 를 받아 평가 점수의 증가를 보였으나, 두 그룹의 통계적 차이는 크지 않았다(도 12A 참조). 16주 후 각 그룹 안에 연구자들의 평가 점수의 변화 정도는 테스트 그룹과 대조군에서 주어진 점수가 통계학적으로 현저한 차이를 보였다. 또한 비듬과 염증에서 만들어진 개선 효과에 대한 연구자들의 시각적 평가는 8주후 테스트 그룹이 0.48 ± 0.62 의 평균점수를 받았고, 대조군이 0.30 ± 0.60 을 받았다. 두 그룹 모두에서 약간의 개선을 보였지만 두 그룹 사이에 현저한 통계적 차이는 보이지 않았다. 16주 후 테스트 그룹이 0.68 ± 0.64 의 평균점수를 받았고, 대조군이 0.35 ± 0.62 를 받았으며, 테스트 그룹과 대조군은 유의적인 차이를 보였다(도 12B 참조).
- [0089] 3-2. 환자의 주관적인 탈모 개선 만족도 평가점수
- [0090] 피험자의 주관적 탈모 개선 만족 평가 정도는 8주 후 테스트 그룹이 2.55 ± 1.02 , 대조군이 2.41 ± 1.04 의 평균 점수를 받았고, 16주 후 테스트 그룹이 2.82 ± 1.01 , 대조군이 2.49 ± 1.06 의 평균 점수를 받았으며, 대부분의 참가자가 만족 또는 매우 만족하고 있음을 입증하였다. 하지만, 두 그룹 간의 통계적인 유의한 차이는 없었다(도 13A 참조). 두피의 비듬과 염증의 개선에 대한 피험자의 만족도에 관해서는 8주 후 테스트 그룹의 평균 점수가 2.21 ± 1.02 이고, 대조군의 평균 점수가 2.02 ± 1.07 이다. 또한, 16주 후 테스트 그룹의 평균 점수가 2.65 ± 1.04 이고, 대조군의 평균 점수가 2.13 ± 1.05 이다. 이처럼 테스트 그룹과 대조군에 주어진 평균 점수들은 통계적으로 유의한 차이를 보였다(도 13B 참조).
- [0091] [비듬 및 염증 관련]
- [0092] 외부항원에 대한 면역반응으로서, 대식세포는 종양괴사인자수용체(tumor-necrosis factor- α , TNF- α), 인터류킨 1β (interleukin- 1β , IL- 1β), 인터류킨6(IL-6) 등과 같은 염증성 사이토키네스를 분비한다. 이러한 사이토키네스는 과립성백혈구(granulocytes), 단핵백혈구(monocytes), 림프구(lymphocytes), 비만세포(mast cell) 등의 염증세포를 손상조직 주위로 유도함으로써 이들 세포가 항원을 제거하고, 조직회복을 촉진하도록 해준다. 그러나, 과도한 염증세포의 침윤과 활성화는 조직손상을 악화시킴으로써, 염증반응의 주요 현상인 부종(혈관 누출)과 통증을 유발한다.
- [0093] 종양괴사인자수용체는 몇몇 세포에서 일산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, iNOS) 유전자를 유도하는 중요한 인자이다. 일산화질소 합성효소의 활성화는 질소(NO)의 생성을 촉진시키고, 이 질소(NO)는 세균을 사멸시키면서 혈관을 확장함은 물론, 염증을 일으킨다. 한편, 조직손상에 따라 인지질분해효소(phospholipases)에 의한 세포막 인지질(phospholipids)의 아라키돈산(arachidonic acid) 생산을 유발하는데, 이 아라키돈산은 고리형 산소화효소(cyclooxygenase, COXs)에 의해 프로스타글란딘(prostaglandins, PGs)로 더 분해된다. 콕스-II(cox-II) 활성화에 의한 과도한 프로스타글란딘E₂(prostaglandin E₂)의 생성은 다양한 염증유발 사이토키네스를 유도한다. 일산화질소와 프로스타글란딘E₂는 염증과 통증유발에 있어 중요한 요소이기 때문에 종양괴사인자수용체-일산화질소(TNF- α -NO) 및 콕스-II-프로스타글란딘E₂(COX-II-PGE₂) 경로(pathways)는 염증유발 과정의 주요 경로인데, 이 두 경로는 각각 스테로이드(corticosteroids)와 비스테로이드성 소염제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)에 의해 억제된다. 비록 염증성 질환 치료를 위한 다양한 스테로이드 제제와 NSAIDs가 있지만 이러한 약물들은 면역계, 위장관계, 콩팥, 간, 중추신경계, 혈압, 심혈관계 등에 부작용을 유발한다. 그러므로 이들 화학적 제제를 대체하거나 천연물과의 복합처방을 통해 부작용을 최소화할 필요가 있다.
- [0094] 1. 비듬균 배양 및 사멸효능
- [0095] 본 발명에 따른 조성물을 실험하기 위한 비듬균은 M.furfur ATCC 15421를 American Type Culture Collection (회사명, ATCC; Manassas, USA)에서 분양받아 사부로배지(Sabouraud dextrose agar, SDA)에서 배양하였다. 한천

희석검정(Agar-dilution assay)으로서, 사부로배지에 각각의 시험물질을 2mg/mL로부터 0.004mg/mL까지 연속 희석하여 배지를 제작하였다. 균을 파라핀 오일(paraffing oil)에 도말한 다음 1.5×10^8 세포(cells)(MacFaland N1. 0.5)에 맞춰 30 μ L씩 접종하고, 72시간 동안 배양하여 콜로니(colony)를 확인함으로써 균체의 성장여부를 판정하였다.

[0096] 2. 세포배양 및 질소 정량

[0097] RAW 264.7 대식세포를 ATCC사(社)로부터 구입하여 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, 회사명 Sigma, St, Louis, USA)과, 항생제(antibiotics) 100U/mL penicillin(Sigma사(社)) 함유 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Sigma)으로 37°C 가습조건의 5% 이산화탄소 인큐베이터(CO₂ incubator)에서 배양하였다. 다시마 추출물과 시스테인테투볼로사 추출물이 질소(NO) 생성에 미치는 영향을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포(1×10^6 cells/mL)를 1-320 μ L/mL의 실험물질로 5분간 처리한 후 인터페론- γ (interferon- γ , IFN- γ) 10U/mL와 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 10 μ g/mL을 넣고, 24시간 동안 배양하였다. 질소의 산화반응물인 아질산염(nitrite, NO₂)를 질소의 지표로 측정하였고, 배양액을 동일량의 그리스 시약(griess reagent) 1% 설파닐아미드(sulfanilamide), 2.5% 인산(phosphoric acid) 내의 0.1% 나프틸렌디아민(naphthylethylenediamide)와 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 질소 함량은 540nm에서 흡광도를 측정하고, 아질산나트륨(sodium nitrite, NaNO₂) 표준정량곡선을 이용하여 정량하였다.

[0098] 3. 실험동물

[0099] 대한바이오링크(회사명, 음성, 한국)로부터 7주령 수컷 ICR 마우스를 공급받아 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용하였다. 동물은 케이지(220×200×145 mm)에 4마리씩 수용하였다. 동물실험실의 환경은 온도 23±2°C, 상대습도 55±10%, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300Lux로 조절되었다. 실험동물용 펠릿(pellet)형 고형사료인 퓨리나 랫 초우(Purina Rat Chow)를 바이오피아(회사명, 군포, 한국)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0100] 4. 실험물질 투여 및 염증유발

[0101] 마우스(n=8/group)에 다시마 추출물1(18mg/kg) 또는 다시마 추출물2(54mg/kg), 시스테인테투볼로사 추출물1(54mg/kg) 또는 시스테인테투볼로사 추출물2(162mg/kg), 다시마 추출물과 시스테인테투볼로사 추출물을 혼합한 혼합물1(18+54mg/kg) 또는 혼합물2(54+162mg/kg), 상기된 조성물1 또는 조성물2를 7일간 매일 경구로 투여하였다. 저용량의 다시마 추출물1과 시스테인테투볼로사1은 각각 임상예정용량인 100mg/70kg과 300 mg/kg으로부터 체중대비 체표면적환산비(성인 Km=37, 마우스 km=3)를 적용하여 산출하였다. 또한, 고용량의 다시마 추출물2와 시스테인테투볼로사2는 다시마 추출물1과 시스테인테투볼로사2의 3배의 용량이고, 이 둘을 단독 또는 복합으로 투여하였으며, 최고 용량은 5배로 설정하여 두 시험물질 간의 최고 상승효과를 평가하고자 하였다. 실험물질 투여 개시일에 마우스의 등부위 피하에 10mL의 멸균 공기를 주사하여 공기주머니(air-pouch)를 만들었다. 2일 및 5일 후 5mL의 공기를 추가로 주입하여 공기주머니를 안정되게 유지하고, 마지막 시험물질 투여 1시간 후 염증 유발을 위해 1mL의 카라기난(carrageenan, 1% in saline; Sigma) 또는 용매만을 공기주머니 내로 주입하였다.

[0102] 5. 삼출액 분석

[0103] 카라기난 주사 6시간 후 공기주머니를 1mL 차가운 염분(cold saline)으로 씻어 낸 다음 그 세척액(lavage fluid)의 순부피(net volume)를 기록하였다. 호중구(neutrophils), 단핵백혈구(monocytes), 림프구(lymphocytes) 등의 염증세포 수는 코울터 카운터(coulter counter)로 측정하였다. 염증 매개물질인 질소와 프로스타글란딘E₂는 각각 그리스 시약(Sigma)과 correlate-EIA kit(Assay Eesigns, Ann Arbor, Ann ArborUSA)를 이용한 효소면역분석법(enzyme immunoassay, EIA)로 측정하였다.

[0104] 6. 조직병리학적 검사

[0105] 공기주머니 내부조직을 포함하는 피부 및 피하조직을 채취하여 10% 중성 포르말린 용액으로 고정하였다. 조직을 파라핀에 포매한 후 슬라이드를 제작하여 헤마톡실린-에오진(hematoxylin-eosin)으로 염색하고, 염증소견을 광학현미경으로 관찰하였다.

[0106] 7. 통계처리

[0107] 모든 측정값은 평균±표준오차로 나타내었다. 일원분산분석(one-way ANOVA)로 분석 후 유의성이 관찰되면 터기

테스트(Turkey's test)를 통하여 $P < 0.05$ 의 수준에서 군간의 유의성을 검정하였다.

[0108] 8. 결과

[0109] 먼저, 시스탄체투불로사 추출물1,2와 다시마 추출물1,2 및 조성물1,2에 대한 비듬균 *M.furfur* 증식억제 효능을 평가한 결과, 조성물1,2의 1mg/mL의 농도에서부터 완전한 *M.furfur* 균의 증식억제효과를 보여줌으로써, 비듬균 사멸효능이 확인되었다(도 14참조).

[0110] 또한, 시스탄체투불로사 추출물1,2와 다시마 추출물1,2는 증가된 대식세포로부터의 질소 유리에 영향을 미치지 않았다. 이에 비해 조성물1,2는 32 µg/mL의 농도에서부터 질소 생성을 유의하게 억제함으로써 항염증 효능을 가지고 있음이 확인되었다(도 15 참조).

[0111] 또, 시스탄체투불로사 추출물1,2와 다시마 추출물1,2 및 조성물1,2에 대한 공기주머니 내의 질소 함량 측정 결과, 다시마추출물1,2와 시스탄체투불로사 추출물1,2는 미약한 효과를 보인 반면, 조성물1,2는 질소 농도를 탁월하게 낮추어 주었으며, 용량의존적으로 더욱 감소시켰다. 비슷한 양상으로 염증유발물질(카라기난)에 의해 증가된 프로스타글란딘E₂ 함량 역시 조성물1,2에 의해 상승적으로 억제되었다(도 16 참조).

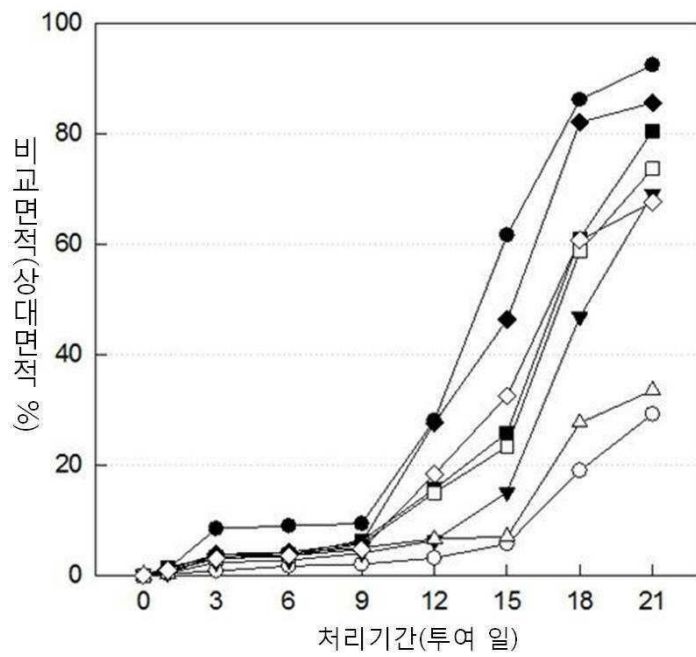
[0112] 그리고, 시스탄체투불로사 추출물1,2와 다시마 추출물1,2 및 조성물1,2에 대한 염증세포 침윤억제 효과를 평가한 결과, 시스탄체투불로사 추출물1,2 및 다시마 추출물1,2에 의해 탁월하게 완화되었으며, 특히 조성물1,2의 투여에 의해 항염증효과가 더욱 상승하였다(도 17 참조).

[0113] 결론적으로, 항염증 효과에 더하여 비듬형성에 의한 피부손상 및 가려움증 개선효과를 검증하기 위해 대표적인 비듬균인 *M.furfur*에 대한 항균효능을 평가한 결과 다시마 추출물과 시스탄체투불로사 추출물은 효과가 거의 없었지만, 조성물1,2에서는 1mg/mL의 농도 이상에서 완전한 증식억제 효능을 나타냈다. 또한, 염증세포 억제효과에 대하여 시스탄체투불로사 추출물과 다시마 추출물은 미약한 효과를 보인 반면, 조성물1,2는 대식세포의 활성화를 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다. 이는 세포배양계 및 동물실험에서 대식세포로부터 분비되는 주요 염증반응 물질인 질소에 대한 억제현상에서 입증되었다. 또, 중요한 염증 매개물질인 프로스타글라딘E₂ 역시 시스탄체투불로사 추출물과 다시마 추출물은 탁월한 억제효과를 보였으며, 조성물 1,2 또한 항염증효과를 더욱 상승시켰다. 이처럼 조성물1,2는 경구 및 도포 형식으로 적용할 경우 비듬형성 및 염증 등 그에 따른 증상을 개선시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

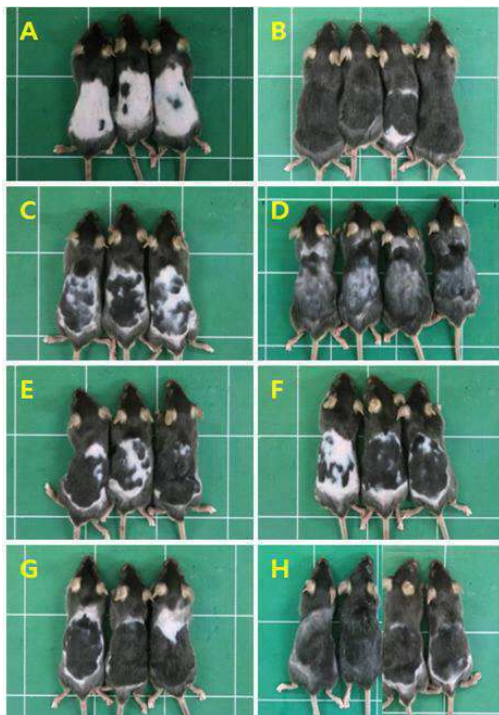
[0114] 설명한 바와 같이, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 상술한 실시예들은 모든 면에 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허등록청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허등록청구범위의 의미 및 범위 그리고 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

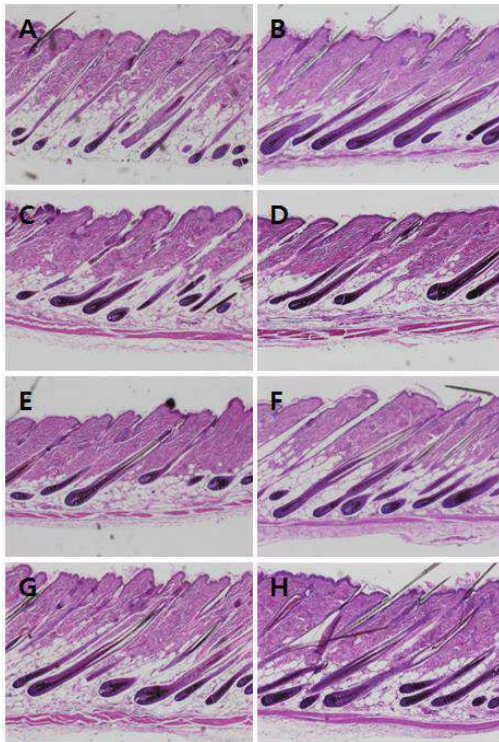
도면1



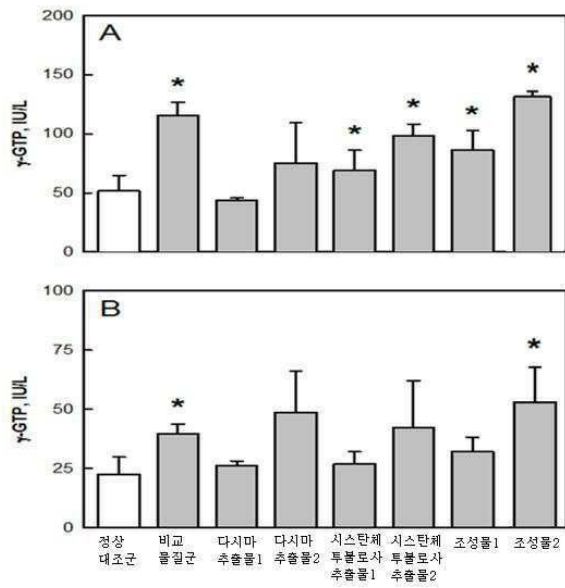
도면2



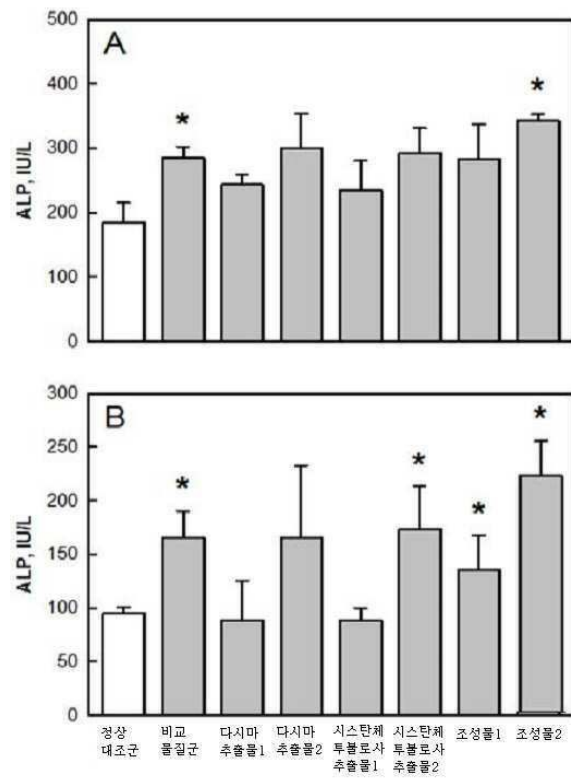
도면3



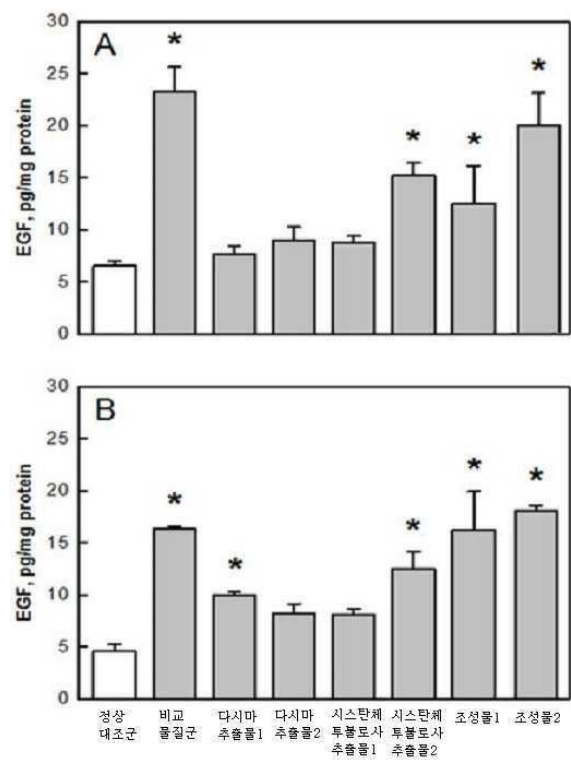
도면4



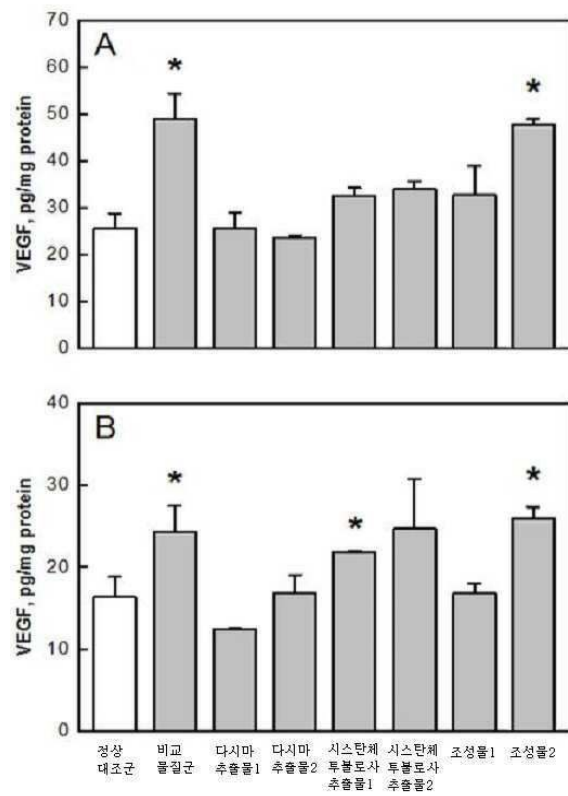
도면5



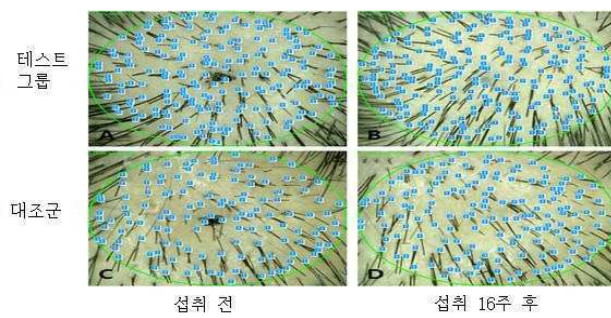
도면6



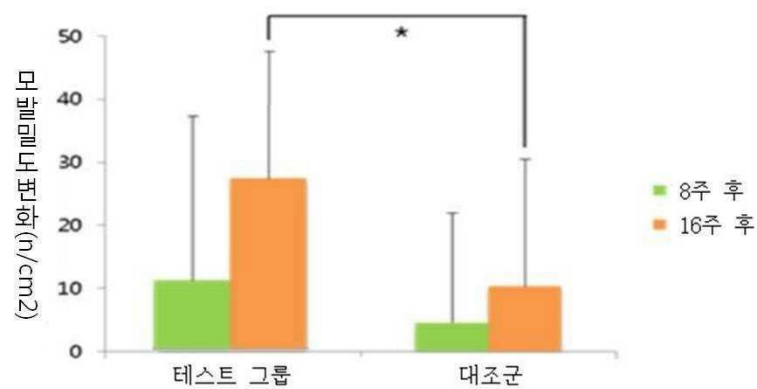
도면7



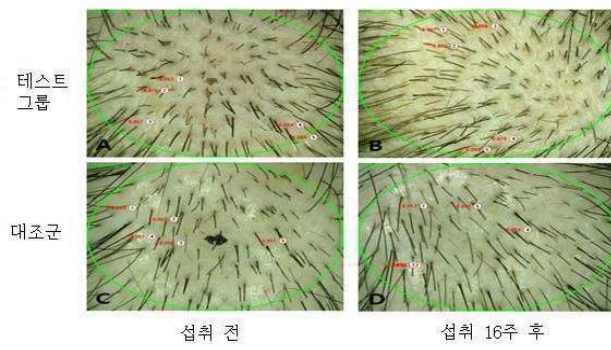
도면8



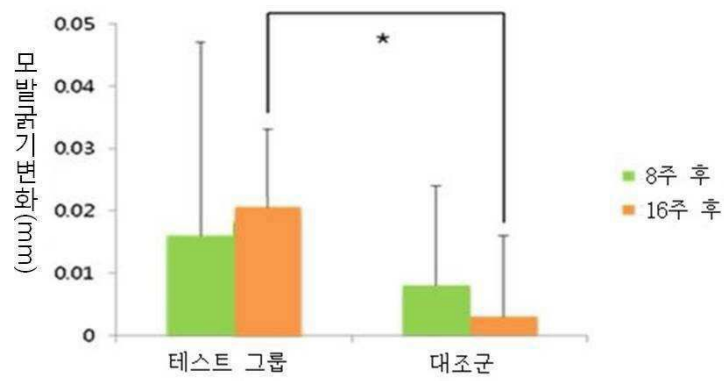
도면9



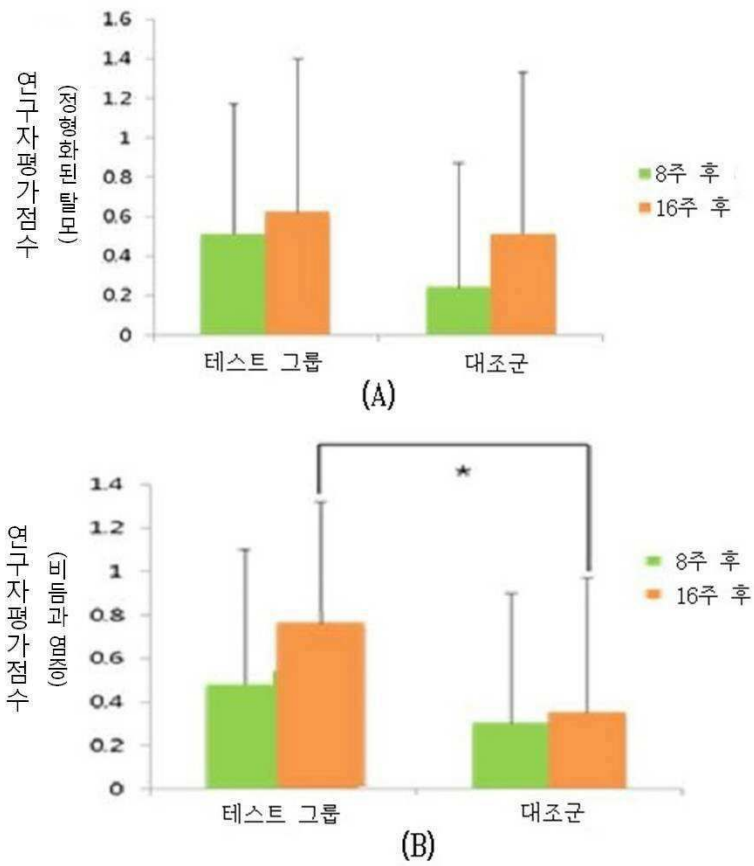
도면10



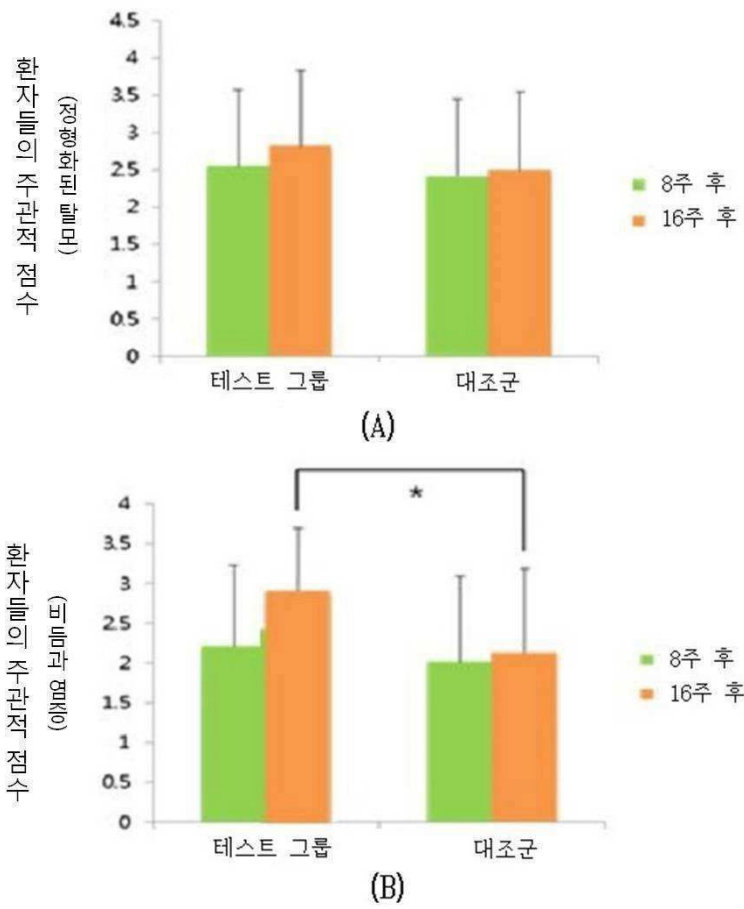
도면11



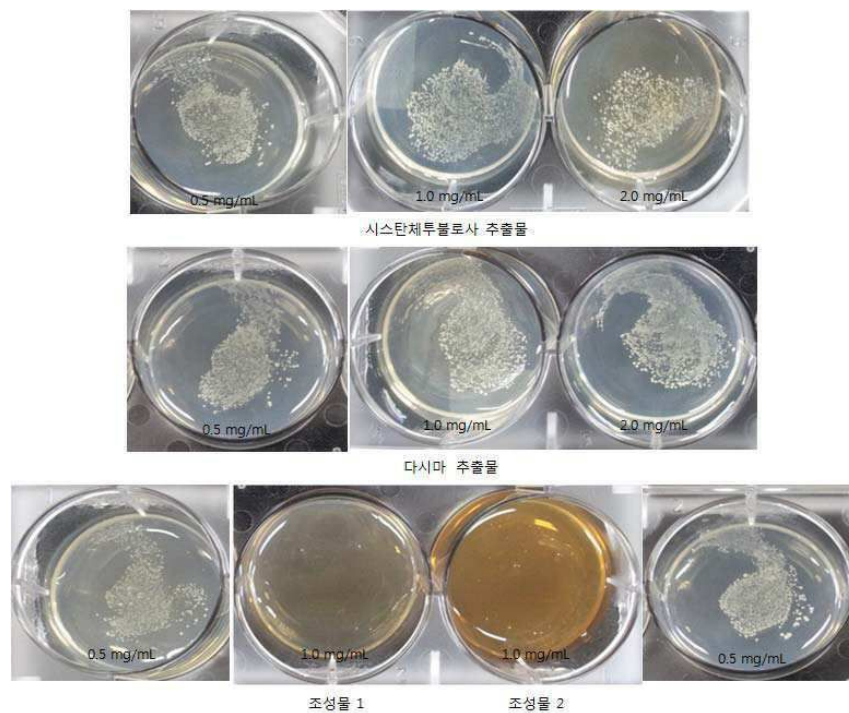
도면12



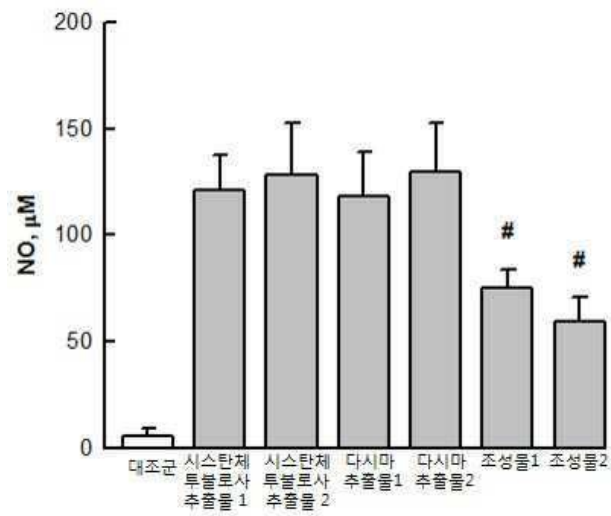
도면13



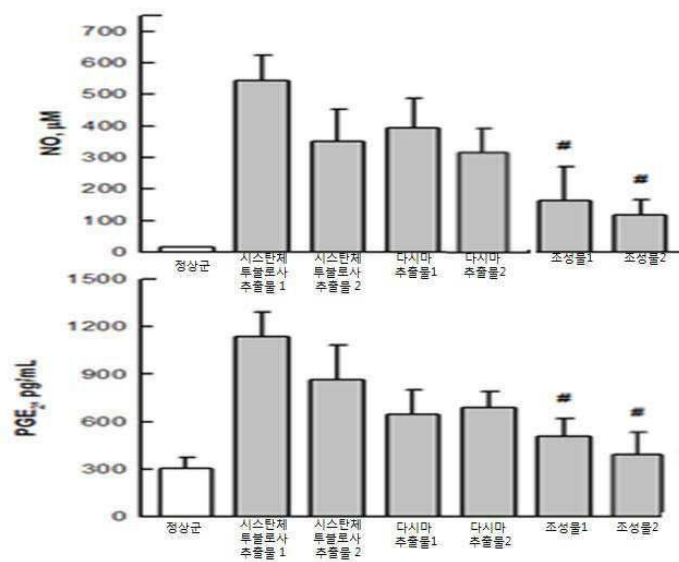
도면14



도면15



도면16



도면17

