



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0053055
(43) 공개일자 2009년05월27일

(51) Int. Cl.

A61K 36/284 (2006.01) A61K 36/752 (2006.01)

A61K 36/57 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0119689

(22) 출원일자 2007년11월22일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

(주) 김형민한약연구소

경기도 안양시 만안구 안양2동 821-79

(72) 발명자

손은숙

서울 동대문구 이문2동 삼성래미안아파트 103동 1504호

(74) 대리인

이은선, 최규팔

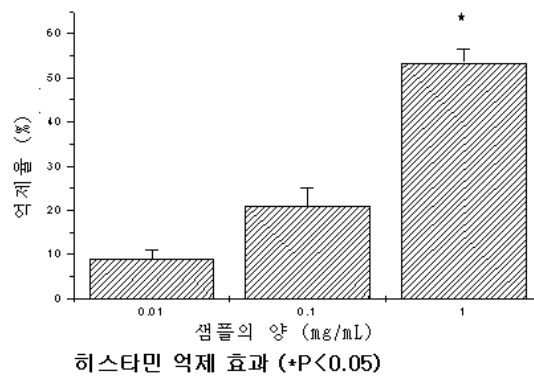
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 평위산 및 그 가감방의 피부질환의 예방 또는 치료용, 또는 면역증강용 의약 조성물 및 건강기능식품

(57) 요약

본 발명은 유효성분으로 창출, 진피, 후박, 감초 및 생강과 대추를 포함하는 평위산 및 그 가감방의 아토피성 피부질환을 포함하는 알레르기성 피부질환 및 염증성 피부질환의 예방 및 치료용 또는 면역증강용 의약 조성물 및 건강기능식품, 그의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

창출, 진피, 후박 및 감초의 수추출물 또는 수추출물의 건조분말을 함유하는, 알레르기성 피부질환 또는 염증성 피부질환의 예방 또는 치료용, 또는 면역증강용 의약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 생강 및 대추로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상을 추가로 혼합하여 얻은 수추출물 또는 수추출물의 건조분말을 포함하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 창출, 진피, 후박 및 감초의 중량비가 2~8 : 1.25~5 : 1~4 : 0.5~2인 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 대추 또는 생강이 창출의 총 중량을 기준으로 하여 각각 0.5~2의 중량비, 0.5~2의 중량비인 조성물.

청구항 5

창출, 진피, 후박 및 감초의 수추출물 또는 수추출물의 건조분말을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 피부질환 또는 염증성 피부질환의 개선용, 또는 면역증강용 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서, 생강 및 대추로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상을 추가로 혼합하여 얻은 수추출물 또는 수추출물의 건조분말을 포함하는 건강기능식품.

청구항 7

창출, 진피, 후박 및 감초 혼합물을 물로 추출하고, 그로부터 얻은 수추출물을 건조하여 얻어진 분말을 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 제1항에 따른 약제학적 조성물을 제조하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 대추 및 생강으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 혼합한 혼합물을 물로 추출하고, 그로부터 얻은 수추출물을 건조하여 얻어진 분말을 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 약제학적 조성물을 제조하는 방법.

청구항 9

창출, 진피, 후박 및 감초 혼합물을 물로 추출하고, 그로부터 얻은 수추출물을 건조하여 얻어진 분말을 식품으로 허용되는 담체와 혼합하여 제5항에 따른 건강기능식품을 제조하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 대추 및 생강으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 혼합한 혼합물을 물로 추출하고, 그로부터 얻은 수추출물을 건조하여 얻어진 분말을 식품으로 허용되는 담체와 혼합하여 건강기능식품을 제조하는 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 정제, 과립제, 캡셀제, 액상제제, 또는 시럽제 중에서 선택되는 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 경구용 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 연고제, 경고제, 파스타제, 카타플라스마제, 크림제, 또는 유제 중에서 선택되는

제형을 갖는 것을 특징으로 하는 피부도포용 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 알레르기성 피부질환은 아토피성 피부질환인 것을 특징으로 하는 의약 조성물.

청구항 14

제5항에 있어서, 알레르기성 피부질환은 아토피성 피부질환인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

- <1> 본 발명은 아토피성 피부질환을 포함하는 알레르기성 피부질환 및 건선, 습진 여드름을 포함하는 염증성 피부질환을 예방 및 치료하고, 면역력을 증강시키는 생약 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 유효성분으로서 창출, 진피, 후박, 감초 및 생강과 대추를 포함하는 평위산 및 그 가감방을 함유하는, 아토피성 피부질환을 포함하는 알레르기성 피부질환 및 건선, 습진 여드름을 포함하는 염증성 피부질환의 예방 또는 치료용, 또는 면역증강용 의약 조성물 및 건강기능식품, 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 인체의 피부는 물리적·화학적으로 외계로부터 신체를 보호하는 동시에 전신의 대사에 필요한 생화학적 기능을 영위하는 생명유지에 필수 불가결한 기관이다. 비교적 흔한 피부질환에는 아토피 피부염, 접촉피부염, 지루성 피부염, 두드러기, 무좀, 완선, 건선, 단순포진/대상포진, 피부건조증, 주부습진, 여드름 등이 있다.
- <3> 현재 피부 트러블 및 피부질환을 가진 환자의 수가 계속적으로 증가하는 추세이다. 미국 등 선진국의 경우 전 인구의 10% 정도가 피부질환으로 고통받고 있고, 우리나라의 경우도 비슷한 형편이다.
- <4>
- <5> 피부질환의 외인으로는 외계로부터 직접 피부에 작용하는 마찰, 압박, 타박 등의 기계적 자극을 비롯하여, 동물성, 식물성 및 광물성의 독물, 그 밖에 약품, 방사선, 온열, 한랭, 또는 세균, 사상균, 원충, 바이러스 등의 미생물이나 피부기생동물 등을 들 수 있으며, 내인으로는 위장장애, 간장병, 신장병, 물질대사장애, 혈액질환, 내장종양, 내분비장애 등을 들 수 있다. 또한, 유전성 피부질환 및 모반(母斑)·모반증 등은 그 원인이 유전자에 의한 것이므로 내인성 피부병에 포함된다.
- <6> 피부질환 중, 특히 아토피 피부염은 아토피 알레르기를 가진 사람에서 나타나는 대표적인 피부질환이며, 흔히 태열이라 불리는 만성피부질환의 하나로서, 심한 소양감을 가지는 재발성 만성 피부염이다. 최근 수십년 동안 환경 오염 등에 의한 공기 매개성 알레르기 유발물질(allergen)의 증가와 건조성 피부를 형성시키는 조건의 증가 등으로 인하여 아토피 피부염에 대한 유병율이 계속 상승하고 있으며, 세계 전 인구의 10 내지 20%가 이 피부염으로 고통받고 있는 것으로 알려져 있다. 주증상은 가려움증 및 피부건조증이고, 면역학적 특성을 보여 다른 알레르기 질환인 두드러기, 천식, 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염 등을 동반하는 경우도 있다.
- <7> 아토피 피부염의 알레르기 반응은 초기의 특이적 면역반응과 후기의 염증 반응으로 나눌 수 있다. 전기 알레르기 반응은 거의 대부분 비만세포를 매개로 일어나며, 세포막에 존재하는 고친화성의 IgE 수용체(FcεRI)를 통해서 활성화된다. IgE 수용체에 결합되어 있는 IgE 항체가 항원에 의하여 가교(bridge)를 형성하면 포스포리파아제 C, 단백질 인산화효소 C, 칼슘 이온의 작용을 거쳐서 과립에 저장되어 있던 히스타민(histamine), 콘드로이틴(chondroitin) 황산염, 헤파린(heparin), 단백질 분해효소 등이 유리되며, 이들이 반응 초기 단계를 매개한다. 히스타민을 포함하는 전기 화학 전달물질들은 알레르기 반응의 초기에 볼 수 있는 여러 가지 임상증상을 유발하는 원인물질들이며, 가장 많은 양을 차지하는 것은 히스타민이다. 따라서 알레르기 반응에서는 히스타민에 의한 작용이 주요하며, 그 증상으로는 혈관 확장, 부종 등이 있다. 이 밖에도, 프로스타글란딘(prostaglandin), 혈소판 활성화인자(platelet-activating factor) 등도 알레르기 반응에서 주목받고 있는 화학 전달물질들이며, 화학 전달물질의 작용으로 인하여 나타나는 증상으로는 담마진, 소양증, 피부 발적 등의 피부

증상이 있다.

<8> 한편, 세포의 노화는 생리적 자연현상으로 인해 피부를 구성하고 있는 기본 단위인 피부 세포의 분열이 정상적으로 이루어지지 않고 재생되는 기간이 점점 길어지면서 진행된다. 세포가 노화되면, 피부는 탄력을 잃고 노화 각질이 쌓이고 건조해지면서 주름이 생성된다. 현재, 노화로 인한 피부를 회복시키기 위해 수술이나 연고 및 비타민 C 요법 등을 사용하고 있지만 팽팽하고 탄력 있는 피부를 유지하기는 역부족이다.

<9> 최근 천연물을 이용한 피부 노화 방지 및 피부 개선제 등이 개발되고 있다. 하지만 그 가운데는 남성호르몬인 안드로겐(androgen) 억제작용 및 그에 따른 피지분비증가 억제작용에 대한 피부 개선제로서의 기능 등을 가진 경우도 있으나 피부질환에 대한 치료제로서의 실질적인 효과를 제공하지는 못하고 있다. 최근에는 메디칼 스킨 케어(medical skin care)라 해서, 의학적 치료와 스킨 케어가 접목된 피부 치료가 우리나라뿐만 아니라 미국, 유럽, 일본 등지에서도 피부 치료를 위해 개발되고 있고, 알레르기 피부질환등에 효과를 보이는 예도 있으나, 여드름이라든지 기미, 주근깨 등을 개선시킬 뿐 여전히 많은 피부질환은 극복되지 않는 실정이다.

<10> 한편, 면역세포에서 분비되는 인터페론-감마(interferon- γ)는 단구와 대식세포에서 항원 특이적 · 비특이적 면역반응을 통하여 면역조절능을 증가시키는 중요한 역할을 한다. 인터페론-감마의 분비가 감소되면 IgE 생성의 증가 혹은 항원제거 능력의 감소로 아토피 증상이 심해진다. 또한 인터페론 감마는 T 림프구에 작용하여 이들의 분화 및 성숙을 증진시킨다. 또한 CD4 T 림프구에서 Th1 림프구의 분화를 촉진시키며, Th2 림프구의 증식을 억제한다. 이러한 효과는 IL-12를 분비하도록 단핵식세포를 활성화시키고, T 림프구가 기능적인 IL-12 수용체를 발현하도록 활성화시킴으로써 매개된다.

<11> 이러한, 아토피 피부염, 염증성 피부염 등을 포함하는 피부질환의 치료에는 보통 스테로이드제가 널리 사용되고 있다. 그러나, 스테로이드제는 면역기능 저하, 피부의 박화나 위축, 홍조 등의 다양한 부작용을 발현할 수 있고, 장기 연용시에는 스테로이드성 여드름, 스테로이드성 피부(피부위축, 모세혈관 확장, 자반), 스테로이드성 주사, 입주위 피부염, 다모, 색소탈실, 선조, 수포성 피부염, 피부출혈 등이 나타날 수 있다. 또한, 원인은 그대로 둔 채 투여된다는 문제와, 약물의 의존성이 생길 우려도 있다.

<12> 스테로이드제 이외에도 현재 항염증 또는 피부질환 치료효과 등이 알려진 생약들의 유효성분을 추출하여 피부질환 치료제로 개발된 예들이 다수 알려져 있으나, 대부분 가려움증이나 염증 등을 경감시켜 줄 뿐 그 치료 효과에 있어서는 만족할 만한 수준이 아니어서 실제로는 그 적용에 한계가 있는 실정이다. 이처럼, 아직까지 부작용이 적으면서도 우수한 효과를 발휘하는 예방 또는 치료목적인 한방제제는 개발되지 않고 있어, 심각한 부작용을 나타내는 스테로이드 제제가 대부분 사용되고 있는 실정이다.

<13> 또한, 최근에는 면역억제제가 피부질환 치료제로 개발되어 사용되기도 하였는데, 이런 제제는 면역기능 저하, 피부위축, 어린이 성장장애, 모세혈관 확장, 여드름, 부신피질기능 억제 등의 부작용이 수반되기 때문에 임상적 사용에 매우 주의해야 하는 문제점이 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<14> 이에 본 발명자는 종래의 피부질환 치료제가 갖는 면역기능 저하, 신기능 저하, 호르몬 분비 이상 등의 부작용을 최소화하면서, 알레르기성, 염증성 피부질환의 예방 및 치료효과를 갖고 면역증강효능이 있는 조성물 개발을 위하여 지속적인 연구를 수행하였으며, 그 결과, 위장병 치료에 널리 쓰이는 한방 처방인 평위산이 아토피 피부염을 포함하는 알레르기성 피부질환 및 기타 염증성 피부질환 개선 효과 및 면역증강효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

<15> 본 발명은 알레르기 반응의 억제, 염증의 완화 및 면역력 향상을 통해 알레르기성 및 염증성 피부질환의 예방 및 치료효과를 나타내고 또한 면역증강효능을 갖는 평위산 및 그 가감방을 포함하는 의약 조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

<16> 본 발명은 유효성분으로 창출, 진피, 후박, 감초를 주된 약효 물질로 하고 생강과 대추를 첨가한 평위산과 그 가감방의 아토피성 피부질환을 포함하는 알레르기성 피부질환 및 염증성 피부질환의 예방 또는 치료용, 또는 면역증강용 의약 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

효 과

- <17> 본 발명의 조성물은 히스타민 분비 억제 효과, 수동적 피부 억제 반응 및 이개 부종 억제 반응 등 알레르기 반응 및 염증 반응을 억제시킴으로써 아토피 피부염과 같은 알레르기 피부질환 및 염증성 피부질환에 대한 예방 및 치료 효과를 갖는다.
- <18> 또한, 인체 면역 기능 조절에 중요한 인터페론 감마 생성을 증가시킴으로써 면역기능을 증강시켜, 면역 기능 저하로 인한 피부노화, 건선, 피부건조증, 피부가려움증, 만성 습진 및 여드름의 치료 보조제로서 사용될 수 있다. 이러한 효과는 하기 실험예 1 내지 5로부터 확인하였다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <19> 본 발명에 이용된 평위산의 원료생약으로 사용되는 창출은 조습건비, 거풍습하고; 진피는 이기건비, 조습화담하며; 후박은 화습도체, 행기온중하고; 감초는 보비익기, 청열해독, 윤폐지해, 조화제약의 효능을 가진다.
- <20> 또한, 대추는 보비화위, 익기생진하며, 생강은 발한해표, 온중지구, 화폐지해의 효능을 가진다.
- <21> 본 발명에 따른 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의해 제제화할 수 있고, 추출물 자체 또는 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 등과 혼합하여 통상의 약학적 제제, 예를 들면 정제, 과립제, 캡슐제, 분말, 액상 제제, 또는 시럽제; 또는 연고제, 경고제, 파스타제, 카타플라스마제, 크림제, 또는 유제 등으로 제제화할 수 있으며, 사용시에 다른 제형으로 변경하여 사용할 수도 있고, 이를 여러 경로로 투여할 수 있다.
- <22> 또한, 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 담체는 약제학적 분야에서 통상적인 것으로, 예를 들면 경구투여용 제제의 경우에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 안정화제 등이 있고, 국소투여용 제제의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 있다.
- <23> 이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.
- <24> 본 발명에 따른 조성물에서, 창출, 진피, 후박, 감초 등의 각 생약들은 상업적으로 구입할 수 있는 통상의 생약 원물을 사용할 수 있고, 이들 생약의 뿌리, 과일껍질, 수피 근경 부분을 사용할 수 있으며, 생약들을 (i) 각각 추출하거나, (ii) 혼합한 후 추출물을 제조하여 사용하거나, (iii) 생약추출물을 농축건조시켜 분말화하여 사용할 수 있다.
- <25> 본 발명에 따른 조성물에서, 각 생약들은 바람직하게는 일정한 중량비로 혼합한 후, 물로 추출하여 얻어진다.
- <26> 본 발명에 따른 조성물은 바람직하게는 창출, 진피, 후박, 감초가 각각 2~8 : 1.25~5 : 1~4 : 0.5~2 중량비로 혼합된 것이다.
- <27> 아울러 본 발명은 추가로 대추 및 생강으로 구성된 그룹에서 선택되는 1종 이상의 생약을 포함할 수 있으며 창출을 기준으로 하여 대추가 0.5~2의 중량비로 포함되거나, 생강이 0.5~2의 중량비로 포함될 수 있다.
- <28> 더욱 바람직하게는, 본 발명에 따른 조성물은 창출, 진피, 후박, 감초, 대추, 생강이 각각 8 : 5 : 4 : 2 : 2 : 2의 중량비로 포함되는 것을 특징으로 한다.
- <29> 상기 언급한 생약들의 조성비의 하한치보다 낮을 경우 그 성분의 생리활성효과가 감소할 수 있으며 그 상한치보다 높을 경우 타성분의 생리활성효과가 감소될 수 있어 조성물의 상승작용 및 협동작용이 저하될 우려가 있다.
- <30> 본 발명의 조성물은 예를 들어, 이로 제한되는 것은 아니나, 창출 8g, 진피 5g, 후박 4g, 감초 2g 에 대추 2매, 1~3 mm로 썬 생강 3쪽을 넣고 물 600 mL를 붓고 약 2시간 반 동안 달여 약 150 mL로 농축시켜 탕제로 만들 수 있다.
- <31> 본 조성물의 통상적인 1회 투여용량은 평위산의 일회투여용량에 따르는 바 상기 탕제 기준 체중 1 kg 당 1.5~2.5 mL이며 이를 1일 3회 복용한다. 이 용량의 액제를 동결건조 분말로 할 경우 0.5~1g/1회에 달한다. 그러나, 본 발명의 조성물은 환자의 체중, 연령, 성별, 병증의 경중도와 소화상태에 따라 복용량을 적의 증감할 수 있다. 기타 제제에 있어서도 상기 액제 복용량을 고려하여 산출된 적정량을 경구 투여한다.
- <32> 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하지만 이들에 의해 본 발명의 범위가 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

<33> **실시예 1: 액제의 제조**

<34> 창출 8g, 진피 5g, 후박 4g, 감초 2g 에 대추 2매(약 2g), 1~3 mm로 썬 생강 3쪽(약 2g)을 넣고 물 600 mL를 붓고 약 2시간 반 동안 달여 약 150 mL로 농축시켜 탕제로 만들었다.

<35> **실시예 2: 정제의 제조**

<36> 실시예1에 의하여 제조된 농축된 탕제를 동결건조시켜 분말화한 후, 상기 분말 500 mg, 유당 100 mg, 전분 150 mg을 혼합하고, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<37> **실시예 3: 기타 제제의 제조**

<38> 일반적으로 알려진 통상의 방법에 따라 상기의 추출물로 환제, 과립제, 캡셀제를 제조하였다.

<39> **실험예 1: 본 발명에 의한 히스타민 방출 억제효과**

<40> 한약 추출물에 의한 히스타민 방출 억제효과를 조사하였으며 실험은 다음과 같이 실시하였다.

<41> 흰쥐 복강에 30 mL 정도의 티로드(Tyrod) 완충용액 B(137mM NaCl, 5.3mM 글루코스, 12mM NaHCO₃, 2.7mM KCl, 0.3mM NaH₂PO₄)를 주입하고 복부를 90초 정도 마사지 한 후 복막을 조심스럽게 열어서 파스퇴르 파이펫으로 복강 내 세포를 포함하고 있는 티로드 완충용액 B를 수거하였다. 이어, 상기 세포함유 용액을 150 × g로 10분 동안 원심분리하여 세포를 침전시키고 침전된 세포에 티로드 완충용액 B를 가하여 파이펫팅한 후 22.5% 메트리지마이드 (metrizamide) 용액위에 살짝 적층하고 400 × g에서 15분 동안 원심분리하여 침전된 세포만을 얻었다. 전기 침전된 세포에 α-MEM(minimum essential medium)/50% FBS(fetal bovine serum)를 가하고, 파이펫팅하여 톨루이딘 블루염색 방법을 통해 비만세포가 95% 이상이고, 트립판 블루염색에 의해 생존능력이 97% 이상임을 확인하고 실험에 사용하였다.

<42> 전기 정제된 비만세포에 α-MEM/50% FBS를 가하고 조심스럽게 파이펫팅한 다음, 2 × 10⁵개의 세포가 되도록 분주하였다. 세포를 안정화시키기 위하여 한약 추출물을 처리하기 전에 37℃에서 10분 동안 미리 배양하고, 실시예 1에서 제조된 한약 추출물의 수용액을 각각 0.01, 0.1, 1.0 mg/mL (증류수 1 mL당 한약 추출물 0.01, 0.1, 1 mg을 녹인 것)가 되도록 가하고 37℃에서 30분 동안 처리한 다음, 곧바로 '화합물 48/80'(Baltzly *et al.*, 1949. A family of long acting depressors. Journal of American Chemical Society 71, 1301-1305) 각각 5.0 μg/mL(부피당 시약의 양)을 10분 동안 처리하였다. 반응 종료 후 400 × g에서 원심분리하여 상층액과 세포를 분리하였다.

<43> 히스타민 정량은 OPA(o-phthaldialdehyde) 형광광도법(spectrofluorometry)으로 438nm에서 측정하였으며, 히스타민 분비의 억제율은 다음과 같은 식을 사용해 계산 하였다.

<44> **억제율 (%) = [(A - B) × 100] / A**

<45> A : 약물을 부가하지 않았을 때의 히스타민양

<46> B : 약물을 부가하였을 때의 히스타민양

<47> 그 결과, '화합물 48/80'에 의하여 유도된 복강 비만세포로부터 히스타민의 분비가 한약 추출물에 의해 농도 의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다. 최고 효과농도는 1 mg/mL이었으며 9%까지 억제함을 볼 수 있었고, 각각의 농도에 대해 *P* < 0.05로 유의한 결과를 나타내었다 (도 1).

<48> **실험예 2: 한약 추출물의 피부 알레르기 반응에 대한 효과**

<49> 수동적 피부 알레르기 반응에 대한 한약추출물의 효과를 조사하였다. 먼저 다음과 같은 방식으로 인위적인 피부 알레르기(passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 반응을 일으켰다.

<50> 실험동물로서 4-6 주령이고 몸무게가 25-35g인 ICR 품종의 흰쥐(mouse)를 실험 군별로 5마리씩 사용하여 반복 실험하였다. 먼저 충분히 섭식시킨 후 24시간 경과한 상기 흰쥐를 대상으로 하였다. 상기 흰쥐는 대한 동물센터로부터 입수하였다.

<51> 항-DNP(anti-DNP, dinitrophenyl) IgE를 상기 흰쥐의 피내 주입하여 피부를 감작시킨 다음, 48 시간 후에 항원 DNP-HSA (dinitrophenyl-human serum albumin)를 꼬리에 정맥 주사하여 IgE 의존성 피부 반응을 유발하였다. 이때 DNP-HSA는 PBS(phosphate buffered saline)으로 희석하였다. 흰쥐의 등에 항-DNP IgE 100ng을 주입하고 48 시간 경과 후 4% 에반스 블루(evans blue)와 DNP-HSA를 1:1로 혼합한 용액을 쥐의 꼬리정맥에 주사하였다.

항원(DNP-HSA)을 투여하기 1 시간 전에 실시예 1의 한약 추출물 1g(추출물)/kg(체중)을 흰쥐에 구강 투여하였다.

<52> 흰쥐를 치사시킨 후 반응이 일어난 부위를 절단하여 0.1N 수산화칼륨 500 μ l를 첨가한 다음, 아세톤과 인산 (5:13, w:w) 혼합용액을 4.5 mL씩 가하여 색소를 추출하였다. 620nm에서 추출물의 흡광도를 측정하고, 에반스 블루 표준 곡선을 이용하여 색소량을 측정하였다.

<53> 그 결과, 한약 추출물 1g/kg 용량에서 수동적 피부 알레르기 반응을 가장 많이 억제하였다. 이러한 결과는 한약 추출물의 경구투여를 통해 국소, 즉 피부 알레르기 반응을 현저하게 억제할 수 있음을 의미한다 (표1-수동적 피부 알레르기반응에 있어서 한약의 효과 *P<0.05).

표 1

<54>

한약재 추출물 (g/kg)	염색량 (μ g/site)	억제율 (%)
None (Saline)	8.94 $\pm$ 0.19	-
0.01	7.34 $\pm$ 0.21	17.9 $\pm$ 4
0.1	6.15 $\pm$ 0.22	31.2 $\pm$ 2*
1	5.31 $\pm$ 0.15	40.6 $\pm$ 2*

<55>

<56> 실험예 3: 한약 추출물의 이개 부종 반응에 대한 효과

<57> 실험동물로서 4-6 주령이고 몸무게가 25-35g인 ICR계 마우스(mouse)를 실험군별로 4마리씩 사용하여 반복 실험하였다. 먼저 충분히 섭식시킨 후 24시간 경과한 상기 흰쥐를 대상으로 하였다. 상기 흰쥐는 대한 동물센터로부터 입수하였다.

<58> 먼저 실시예 1의 한약 추출물을 0.01, 0.1, 및 1 g/mL 용량으로 경구 투여한 뒤 1시간동안 반응시켰다. 그런 다음 화합물 48/80 (20 g/L)을 미세 주사기를 사용하여 귀 귀 피부 내부에 주입하고 40분 후에 이개 부종 반응이 일어난 부위의 귀 두께를 잰다. 표 2에서 나타난 바와 같이 낮은 농도에서는 유의한 효과가 없음을 알 수 있었고 1 g/kg일 때 이개 부종반응을 가장 많이 억제함을 알 수 있었으며 P<0.05로 유의한 결과를 얻었다 (표 2 - 화합물 48/80 유도성 이개부종 반응에 있어서 추출물의 효과).

표 2

<59>

한약재 추출물 (g/kg)	귀의 두께 (thickness of ear, mm)	억제율 (%)
None (Saline)	0.161 $\pm$ 0.003	-
0.01	0.153 $\pm$ 0.006	5
0.1	0.120 $\pm$ 0.010	25.5 $\pm$ 1
1	0.084 $\pm$ 0.004	47.8 $\pm$ 1*

<60> 실험예 4: 한약 추출물의 인터페론감마 생성 효과

<61> 한약 추출물이 면역증강 기능을 담당하고 있는 인터페론 감마 생성을 유도하는지 여부를 조사하였다.

<62> 배양액 RPMI 1640/FBS에 T 세포주 Molt-4를 5% CO₂, 37℃에서 배양한 다음 3 $\times$ 10⁵개의 세포가 되도록 분주하였다. 세포를 안정화시키기 위하여 한약 추출물 처리하기 전에 37℃에서 10분 동안 미리 배양하고, 실시예 1의 한약 추출물의 수용액을 각각 0.01, 0.1, 1.0 mg/mL (중류수 1mL당 한약 추출물 0.01, 0.1, 1 mg을 녹인 것)가 되도록 가한 다음 24시간동안 반응시키고, 배양하였다. 반응 종료 후 400 $\times$ g에서 원심 분리하여 상층액과 세포를 분리하였다. 분리된 상층액 중 인터페론 감마의 단백질 수준을 조사하기 위하여 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)를 실행하였다.

<63> 인터페론 감마에 대한 단일클론 항체인 항 휴먼 (anti-human) 인터페론 감마 (1 μ g/mL)를 PBS (pH 7.4)로 희석하여, 96-웰 플레이트에 100 μ l씩 각각 코팅한 다음, 4℃에서 12시간 동안 방치하였다. 전기 플레이트를 0.05% 트윈(Tween)이 포함된 PBS로 세척한 다음, 1% BSA, 5% 수크로스(sucrose), 0.05% NaN₃를 함유한 PBS로 1 시간 동안 차단시켰다. 여러 차례 세척한 다음, 원심 분리하여 얻은 상층액과 표준 곡선으로 사용할 재조

합 인터페론 감마를 첨가한 후 37℃에서 2 시간 동안 방치시켰다. 이어, 각 웰을 다시 세척하고 2차 항체 바이오틴(biotin)이 결합된 인터페론 감마 (0.2 μ g/mL)를 첨가하여 다시 37℃에서 2시간 동안 방치시켰다. 웰을 세척한 다음, 아비딘(avidine) 이 연결된 과산화효소를 첨가하고 37℃에서 20분 동안 방치시켰다. 웰을 다시 세척한 다음, ABTS(2,2'-Azino-bis(3-ethyl benzthiazol-ine-6-sulfonic acid) 기질을 첨가하고, 발색반응을 ELISA 판독기를 사용하여 405nm에서 측정하였다.

<64> 실험 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, 한약 추출물이 인터페론 감마생성을 농도 의존적으로 증가시킴을 알 수 있었다 (* P <0.05).

<65> 실험예 5: 한약추출물의 아토피성 피부염 개선효과

<66> 최근 아토피 질환 동물모델로서 사용되고 있는 NC/Nga 마우스는 SPF (specific pathogen free) 사육환경에서는 아토피 증상을 일으키지 않지만 통상의 조건(conventional condition)에서 사육될 경우 8주령 이후부터 홍반(erythema), 부종과 혈종(edema and excoriation), 진무름과 상처(erosion and scar), 털빠짐과 건조피부(hair loss and skin dryness) 같은 아토피 증상을 일으킨다. 실험예 5에서는 통상의 조건(conventional condition)에서 자연적으로 유발된 아토피 증상이 실시예 1의 한약 추출물의 경구 투여에 의해 개선되는 정도를 관찰하였다. 아토피 증상이 일어난 29주령 NC/Nga 마우스에 매일 각각 물 (water), 실시예 1의 한약 추출물을 각각 25 mg/kg, 250 mg/kg씩 경구 투여하였다. 하기 도 3의 결과로 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 한약 추출물을 투여한 마우스의 경우, 아토피 증상이 개선되는 결과를 나타냈다.

도면의 간단한 설명

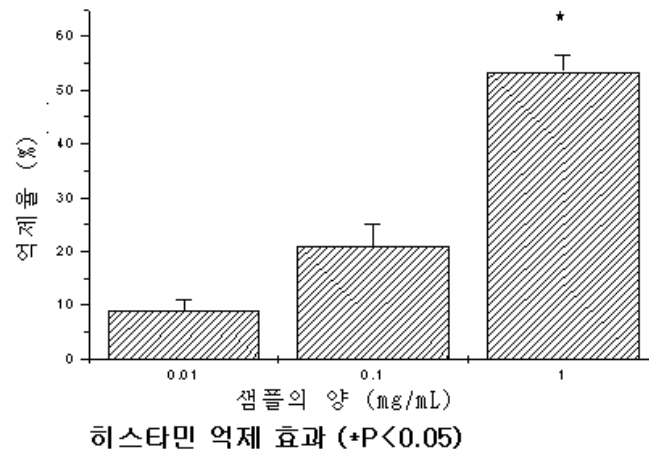
<67> 도1은 실시예1의 한약 추출물의 히스타민 억제효과를 도시한 것이고,

<68> 도2는 실시예1의 한약 추출물의 인터페론 감마생성효과를 도시한 것이며,

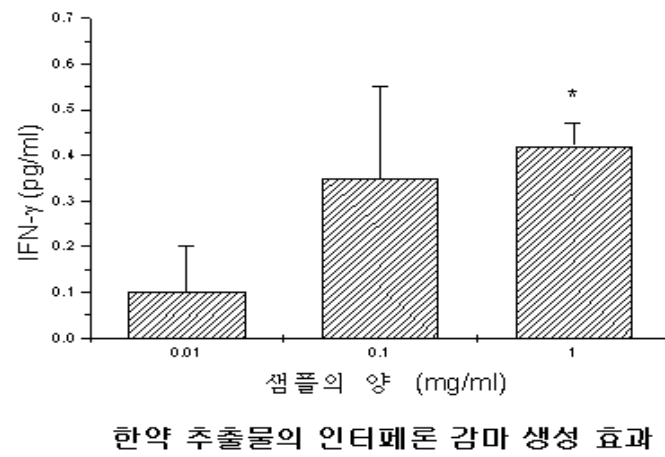
<69> 도3은 실시예1의 한약 추출물을 경구투여한 후 아토피 증상이 개선되는 결과를 도시한 것이다.

도면

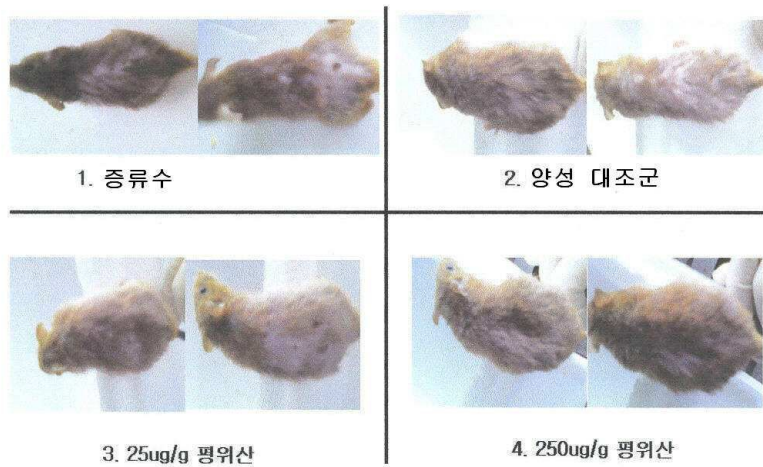
도면1



도면2



도면3



아토피성 피부염 개선효과