

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0054558

(43) 공개일자 2023년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01) *A23L 33/135* (2016.01)*A61K 36/70* (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)*A23L 33/135* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0137742

(22) 출원일자 2021년10월15일

심사청구일자 2021년10월15일

(71) 출원인

한밭대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동)

(72) 발명자

최종인대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트
207동702호**고준빈**대전광역시 유성구 학하중앙로 99 오투그란데리빙
포레아파트 304동703호**김소정**경기도 수원시 영통구 권선로908번길 72 래미안영
통마크원1단지 101동 1003호

(74) 대리인

원대규

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물****(57) 요약**

본 발명은 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물에 관한 것으로, 애기수영 추출물을 유효성분으로 포함하여 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선 효과를 나타낼 수 있다.

또한, 본 발명에 의하면 TNF- α 및 IL-6 농도 감소, NF- κ B 활성화 억제 및 혈청 내 IgE 농도 감소 활성을 통해 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선 효과를 나타낼 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 36/70 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/21 (2013.01)

A23Y 2220/17 (2013.01)

A23Y 2220/73 (2013.01)

A23Y 2300/25 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

애기수영(Rumex acetosella L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는

아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 애기수영(Rumex acetosella L.) 추출물은 발효 애기수영(Rumex acetosella L.) 추출물이며,

상기 발효에 사용하는 미생물로는 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei); 락토바실러스 람노수스(Lactobacillus rhamnosus); 비피도 박테리움 비피둠(Bifidobacterium bifidum) 비피더스균; 비피도 박테리움 브레브(Bifidobacterium breve) 비피더스균; 락토바실러스 아시도 필루스(Lactobacillus acidophilus); 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나가 접종되어 발효된 것인

아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₆의 저급 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 추출 용매를 이용하여 추출되는 것인

아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물을 포함하는

식품 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물을 포함하는

약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는 애기수영 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 서구화된 생활방식으로 인하여 과민면역반응 질환의 발병률은 지속적으로 증가하고 있으며, 특히 산업화된 국가들에서 25% 이상의 인구가 과민면역반응 질환에 영향을 받고 있다고 알려져 있다. 과민면역반응 질환은 알레르겐(allergen)이라고 알려진 항원물질에 면역글로불린E(IgE)을 매개하여 인체가 민감하게 반응하는 질환을 말하며, 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 천식(asthma), 음식 알레르기, 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 알레르기성 결막염(allergic conjunctivitis), 두드러기, 아나필락시스(anaphylaxis) 등의 다양한 임상증상으로 나타난다. 특정 알레르겐이 피부, 호흡기 또는 음식을 통해 소화기관에 접촉하여 비정상적 면역반응이 나타나면 면역글로불린(Immunoglobulin, Ig) 항체를 생산하는 B 림프구의 분화시키고 항원 특이적인

IgE를 생산하도록 만든다. IgE는 결합조직이나 점막에 존재하는 비만세포의 고친화성 수용체(FcεRI)에 항원과 교차결합하게 되면 비만세포가 활성화되어 혈관확장 및 염증유도작용을 갖는 아민류(e.g. histamine), 헤파린(heparin), 단백질 분해효소(proteases), 류코트리엔(leukotrienes), 프로스타글란딘(prostaglandins), 사이토카인, 케모카인 등이 다량 방출되어 각종 면역세포들의 분화와 활성을 조절하고 알레르기성 면역반응을 심화시키는 것으로 알려져 있다. 알레르겐의 노출에 의해 비만세포가 활성화되어 매개인자들이 방출되면 알레르기 면역반응과 더불어 염증반응이 동반된다. 혈관투과성 증가로 인한 부종이 유발되며 림프구와 면역세포들의 염증 부위로의 이동이 촉진된다. 이러한 반응에는 매개인자들 중 염증성 사이토카인인 TNF-α가 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데, TNF-α는 면역세포의 이동에 관여하는 내피 부착 분자 ICAM-1의 발현을 증가시킨다고 보고되었다. 알레르기성 면역반응의 기전의 개시와 유지에는 알레르겐에 의하여 활성화되는 Th2세포가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다. Th2 세포가 분비하는 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13 등) 및 케모카인은 B세포에서의 IgE 생산을 증가시키고, 비만세포, 호염기구 및 호산구 세포들의 활성화 유추, 점액의 과다분비, 상피하부 섬유증 등을 일으키고, 이에 수반되는 조직 손상에도 관여하고 있다. 따라서, IgE 매개 면역반응과 이에 수반되는 염증 반응 및 Th2 세포 활성을 조절하는 것이 알레르기 치료에서 중요하다고 할 수 있다.

[0003] 현재 알레르기 치료제로써 주로 사용되고 있는 것은 항히스타민제, 코르티코스테로이드(corticosteroid), 류코트리엔 길항제 등이 있다. 항히스타민제는 히스타민의 수용체인 H1의 기능을 억제하는 약물을 의미한다. 고전적인 1세대 항히스타민제와 같은 경우 중추신경계에 진정작용을 하여 졸음이나 어지럼증 등을 일으킨다고 보고되었으며, 이러한 부작용을 줄이기 위해서 중추신경계가 아닌 말초에 선택적으로 작용하는 2, 3세대 항히스타민제가 최근 사용되고 있으나 이들 약물 또한 근본적인 치료보다는 단지 증상을 완화하기 위한 것이다. 코르티코스테로이드 치료법도 알레르기 질환의 치료약물로 사용된다. 하지만 장기적으로 사용하였을 때 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome)과 같은 외인성 고코르티솔증을 일으키며, 골다공증, 부신기능부전 등의 부작용을 일으킨다는 보고가 있다. 이외에도 알레르기 환자에게 알레르겐을 소량씩 투여하여 알레르기 반응을 점차적으로 줄여나가는 방법이 있다. 그러나 이 방법은 환자에 따라 아나필락틱 쇼크(anaphylactic shock)를 일으킬 수 있는 위험성이 있고, 수 년 동안 시행해야 된다는 점에서 매우 불편하다.

[0004] 따라서, 이러한 단점들을 보완하기 위하여 기존의 약물에 비해 부작용이 적고, 안전하며, 근본적으로 알레르기를 유발하는 원인인 IgE 생성이나 과도한 면역 세포 활성을 조절할 수 있는 항알레르기 활성을 가진 천연물 소재의 발굴이 요구되고 있다.

[0005] 한편, 아토피는 심한 가려움증을 가지는 재발성 만성피부염으로, 어린이의 약 10 ~ 15%가 아토피성 피부염을 가지고 있으며, 90%는 5년 내 저절로 호전되는 것으로 보고되어 있다. 이러한 아토피는 성인기에는 대체로 호전되어 약 30 ~ 40%는 외관상으로 피부염이 재발되지 않으나, 나머지는 성인이 되어서도 피부 건조, 자극성 물질에 의한 피부자극, 주부습진 등의 피부염으로 어려움을 겪는 것으로 알려져 있다. 또한, 민감성 피부의 경우, 수분 보유력 및 그 회복력이 낮고, 피부 각질화, 가려움증 등이 나타나기 쉽기 때문에 아토피성 피부로 될 확률이 높다.

[0006] 아토피 피부염의 정확한 병리 생리는 아직까지 완전히 이해되고 있지 않지만 유전적 소인과 함께 면역학적, 비면역학적 기전이 관여한다고 보고 있다. 아토피 피부염의 대부분을 차지하는 외인성 아토피 피부염은 IgE와 연관된 면역 기전에 의해 발생되는데 특정 알레르겐(allergen)에 대한 즉시형 면역 반응보다는 T세포 이상에 의한 지연성 면역 반응이 관여한다는 보고들이 많다. 또한, 요즘은 B세포로부터 IgE의 생성을 유도하는 IL-4 등 Th2 관련 사이토카인(cytokine)들이 아토피의 원인이라고 보고되고 있다(JS Kang et al., Inhibition of atopic dermatitis by topical application of silymarin in NC/Nga mice. intl immunopharm. (2008) 8. 1475-1480).

[0007] 이러한 아토피를 치료하기 위하여, 종래 세라마이드, 리놀레산, 식물유 또는 광물성 오일 등의 성분들, 하이드로코티손(hydrocortisone) 등의 스테로이드(steroid) 제제 또는 이들에 항균 및 항염 기능을 강화한 물질, 자외선 요법을 통한 DNA 합성 억제제, 세포 과증식 억제제, 염증 및 가려움증 억제제 등이 제안된 바 있다. 그러나, 상기 스테로이드 제제는 표피의 성장억제나 부작용 등의 역효과를 유발할 수 있으며, 우레아 퍼록사이드 등은 피부의 과다 자극을 야기할 수 있고, 항히스타민제 등의 항생물질은 균의 내성(resistance) 및 광과민 등의 부작용을 유발할 가능성이 높은 문제점이 있다. 또한, 장기간 피부에 적용시 모세 혈관 확장증 및/또는 각질층의 두께 증가 내지 확장을 유발하는 등의 심각한 부작용을 발생시킬 염려가 있으며, 최근 아토피 완화에 많이 쓰이는 감마-리놀레산(한국특허공개 2000-0046633호)은 쉽게 산화되므로 안정성이 열등함과 아울러, 피부 자극성이 비교적 강하여 민감한 피부에는 사용하기 곤란한 등의 문제점이 있다.

[0008] 이에 최근에는 아토피에 효과를 갖는 천연물질을 탐색하는데 초점을 맞추고 있다. 대표적으로, 쑥 추출물(대한

민국 특허등록 제10-0377262호), 영지버섯, 유근피, 감초, 백봉령, 백지마 및 백년초의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0517465호), 달맞이유, 알로에, 목초액, 제비꽃, 대추, 송이버섯, 두릅, 인삼, 녹차, 두충, 복분자, 오미자, 씩, 포공영, 삼백초, 황기, 하고초, 해송, 황금 및 우슬의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0451444호), 청자소엽과 적자소엽의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0454752호), 건물, 의이인, 오미자, 길경, 나복자, 맥문동 및 석창포의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0483539호), 라벤더, 유칼립투스 및 티트리 오일(대한민국 특허등록 제10-0597997호) 등이 있고, 그 외에도 상기생, 합환피, 창이자, 맥아 등이 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나, 상기 천연물질들은 그 효능이 미미하거나, 효과는 있더라도 민감성 피부에 있어서는 알레르기 과민반응을 보여 그 사용이 제한되는 단점이 있었다.

[0009] 따라서, 본 발명자들은 천연추출물 기반으로 하여 부작용에 문제가 없으면서도 종래 알려진 아토피 예방 및 치료제에 비해 보다 효과가 우수하며, 알레르기 과민반응 또한 나타나지 않는 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물을 제공하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 10-1213054 B1
(특허문헌 0002) KR 10-1700850 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 애기수영 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 천연 추출물을 유효성분으로 포함하여 부작용의 문제가 없어 장기간 복용에도 문제가 없으며, 아토피 및 면역 과민반응 예방 및 개선 효과를 기초로 다양한 식품에 포함될 수 있는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 천연 추출물을 유효성분으로 포함하여 아토피 및 면역 과민반응 예방 및 개선 효과가 나타나는 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 아토피 및 면역 과민반응 예방 및 개선용 조성물은 애기수영(*Rumex acetosella* L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 것이다.

[0015] 상기 애기수영(*Rumex acetosella* L.) 추출물은 발효 애기수영(*Rumex acetosella* L.) 추출물이며, 상기 발효에 사용하는 미생물로는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*); 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*); 비피도 박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*) 비피더스균; 비피도 박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*) 비피더스균; 락토바실러스 아시도 필루스(*Lactobacillus acidophilus*); 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나가 접종되어 발효된 것일 수 있다.

[0016] 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₆의 저급 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 추출 용매를 이용하여 추출되는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 식품 조성물은 아토피 및 면역 과민반응 예방 및 개선용 조성물을 이용하여 제조한 것이다.

[0018] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 약학 조성물은 아토피 및 면역 과민반응 예방 및 개선용 조성물을 이용하여 제조한 것이다.

- [0020] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 '추출물'은 상술한 바와 같이 당업계에서 조추출물(crude extract)로 통용되는 의미를 갖지만, 광의적으로는 추출물을 추가적으로 분획(fractionation)한 분획물도 포함한다.
- [0023] 즉, 천연 추출물은 추출용매를 이용하여 얻은 것뿐만 아니라, 여기에 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함한다. 예컨대, 상기 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 천연 추출물에 포함되는 것이다.
- [0024] 본 발명에서 이용되는 천연 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 '유효성분으로 포함하는'이란 하기의 천연 추출물의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 따른 아토피 및 면역 과민반응 예방 및 개선용 조성물은 애기수영(Rumex acetosella L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 것이다.
- [0027] 상기 애기수영(Rumex acetosella L.)은 쌍떡잎식물 마디풀목 마디풀과의 여러해살이 풀로 길가나 빈터에서 자란다. 뿌리줄기가 옆으로 번지면서 번식하고, 줄기는 곧게 서며 높이가 20~50cm이고 털 모양의 돌기가 있으며 모가 난 세로줄이 있고 자줏빛이 돌며 잎과 더불어 신맛이 난다. 뿌리에서 나온 잎은 뭉쳐나고 잎자루가 길며 창모양이고 끝이 뾰족하며 밑 부분에 귀 같은 돌기가 좌우로 퍼진다. 줄기에 달린 잎은 어긋나고 뿌리에서 나온 잎과 모양이 같으나 크기가 작다. 꽃은 암수딴그루이고 5~6월에 붉은빛이 도는 녹색으로 피며 줄기 끝에 원추꽃차례를 이루며 달린다. 수꽃은 지름이 3mm이고 꽃받침조각과 수술이 각각 6개이다. 암꽃은 수꽃보다 작고 꽃받침조각이 6개이며 암술이 1개이고 3개로 갈라진 암술대와 잘게 갈라진 암술머리가 있다. 열매는 수과이고 길이 2mm의 타원 모양이며 갈색이고 3개의 모가 난 줄이 있다.
- [0028] 상기 애기수영(Rumex acetosella L.)의 뿌리는 산모(酸模), 잎은 산모엽(酸模葉)이라하며 약용으로 사용된다. 뿌리에는 탄닌(tannin), 크리소파네인(chrysophanein) 및 히페린(hyperin)이 함유되어 있으며, 청열, 이뇨, 양열, 살충의 효능이 있으며, 열리, 임병, 소변불통, 노폐, 토혈, 악창 및 개선을 다스릴 수 있다.
- [0029] 상기 애기수영(Rumex acetosella L.)의 잎은 비텍신(vitexin), 히페린(hyperin), 비올라잔틴(violaxanthin) 및 비타민 C 63mg%, 탄닌(tannin) 17.3-36.7%가 함유되어 있고 경엽(莖葉)에는 수산칼슘, 주석산이 함유되어 있으며, 외용하면 창종, 창독을 해소하는 효능이 있으며 개선을 치료할 수 있다.
- [0030] 본원발명은 애기수영 추출물을 유효성분으로 포함함으로써 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선 효과를 나타낼 수 있다.
- [0031] 상기 면역과민반응은 정상적인 선천 면역 및 적응 면역 체계가 위험성이 없거나 매우 적은 항원에 대하여 부적절하고 과도하게 반응함으로써 유발되는 면역매개 질환을 의미한다.
- [0032] 면역과민반응은 제1형, 제2형, 제3형 및 제4형 과민반응으로 총 4형의 과민반응이 있으며, 그 중 제1형 과민반응이 보통 알레르기 또는 아토피로 불린다.
- [0033] 상기 제1형 과민반응은 천식, 아토피 피부염, 음식 알레르기 등과 같은 가장 일반적인 알레르기 질환이 나타나며 알레르기 반응은 IgE 항체와 이들과 결합하는 알레르기 항원들에 의해 시작된다.
- [0034] IgE 항체는 그 자체만으로는 파괴적이지 않으나, IgE 항체는 IgE의 불변부위를 특이적으로 인식하는 FcεR 수용체와 결합하는데, FcεR 수용체는 선천면역계의 비만세포, 호염구, 호산구 등에서 발현된다. IgE와 FcεR 수용체의 결합은 이들 선천 면역 세포들의 세포내 과립성분을 혈액으로 방출하는 탈과립 과정을 유발한다. 과립의 종류는 세포마다 다르지만 일반적으로 히스타민, 헤파린, 단백질 분해효소 등을 포함한다. 이들 과립 매개체들이 주변 조직이나 다른 면역세포에 작용하여 알레르기 증상을 유발하게 된다.
- [0035] 또한, 상기 면역과민반응 중 아토피는 심한 가려움증을 갖는 재발성 만성피부염으로, 피부 건조, 자극성 물질에 의한 피부자극, 주부습진 등의 피부염의 증상으로 아토피 피부염이 나타날 수 있다. 또한, 민감성 피부의 경우 수분 보유력 및 그 회복력이 낮으며, 가려움증 및 피부각질화가 나타나기 쉽기 때문에 아토피성 피부가 될 가능

성이 높다.

- [0036] 상기 아토피 피부염은 아토피 피부염 발생에서 피부장벽기능 손상은 면 역학적 이상과 더불어 중요한 요인이 되는데, 피부 장벽인 피부 각질층은 각질세포와 lamella body에서 분비한 지질로 형성된 lipid lamella로 구성되어 전 해질과 수분손실을 억제하고 외부의 물리적 손상과 자극적 물질로부터 인체를 보호한다.
- [0037] 상기 각질층의 지질은 ceramide, 유리지방산, 콜레스테롤, triglyceride, steryl ester 및 cholesterol sulfate로 구성되며, 이중 ceramide가 26%정도로 가장 많이 존재하여 수분함유와 투과장벽으로 작용하므로 각질층의 지질은 단지 세포사이의 구조적 결합 뿐만 아니라 피부장벽의 기능적 조절자로서의 역할도 수행하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 장벽손상으로 발생하는 대표적 피부질환으로 아토피 피부염과 건선이 있다.
- [0038] 상기 각질층 내 ceramide는 분해되면서 sphingosine을 생성하여 PKC의 활성을 억제하는데, 아토피 피부염 유발 시에는 각질층내 ceramide 감소로 인해 PKC 활성이 유도되며 NF-kB를 자극한다.
- [0039] 상기 NF-kB는 전사인자로, cytokine(TNF- α , IL-1, IL-6), bacterial 또는 viral infection, stress 등의 다양한 자극에 의해 I κ B protein이 인산화되어 분해되고, 유리된 NF-kB는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF-kB binding site에 결합하여 염증관련유전자, anti-apoptosis 유전자 등의 발현을 유도한다. 전사인자 NF κ B는 TNF- α , IL-1 β 등의 proinflammatory cytokine과 LPS 등에 활성화가 유도되어 COX-2와 iNOS 등의 염증 효소와 세포 부착분자 ICAM-1등의 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직손상을 유도한다.
- [0040] 이에, 본원발명의 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물에 의하면, IgE 생성 억제활성, TNF- α 및 IL-6 억제활성 및 NF-kB활성화 억제를 통해 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선 효과를 나타낼 수 있다.
- [0041] 상기 애기수영(Rumex acetosella L.) 추출물은 발효 애기수영(Rumex acetosella L.) 추출물이며, 상기 발효에 사용하는 미생물로는 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei); 락토바실러스 람노수스(Lactobacillus rhamnosus); 비피도 박테리움 비피둠(Bifidobacterium bifidum) 비피더스균; 비피도 박테리움 브레브(Bifidobacterium breve) 비피더스균; 락토바실러스 아시도 필루스(Lactobacillus acidophilus); 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나가 접종되어 발효된 것일 수 있다.
- [0042] 바람직하게, 상기 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 람노수스(Lactobacillus rhamnosus) 또는 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) 및 락토바실러스 람노수스(Lactobacillus rhamnosus)를 모두 포함하여 애기수영 추출물을 발효함으로써 발효 애기수영 추출물을 제조할 수 있다.
- [0043] 상기 발효 애기수영 추출물을 포함함으로써 본원발명 조성물의 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선 효과를 높일 수 있다.
- [0044] 상기 아토피 및 면역 과민반응 예방 및 개선용 조성물은 연꽃 추출물, 두릅 추출물, 노니 추출물 및 산뽕폴 추출물을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0045] 상기 연꽃(Nelumbo nucifera)은 쌍떡잎식물 프로테아목 연꽃과의 여러해살이 수초로 진흙 속에서 자라면서도 청결하고 고귀한 식물로, 여러 나라 사람들에게 친근감을 주어 온 식물이다. 연못에서 자라고 논밭에서 재배하기도 한다. 뿌리줄기는 굵고 옆으로 뻗어가며 마디가 많고 가을에는 특히 끝부분이 굵어진다. 잎은 뿌리줄기에서 나와서 높이 1~2m로 자란 잎자루 끝에 달리고 둥글다. 또한 지름 40cm 내외로서 물에 젖지 않으며 잎맥이 방사상으로 퍼지고 가장자리가 밋밋하다. 잎자루는 겉에 가시가 있고 안에 있는 구멍은 땅속줄기의 구멍과 통한다. 꽃은 7~8월에 피고 홍색 또는 백색이며 꽃줄기 끝에 1개씩 달리고 지름 15~20cm이며 꽃줄기에 가시가 있다. 꽃잎은 달걀을 거꾸로 세운 모양이며 수술은 여러 개이다. 꽃받침은 크고 편평하며 지름 10cm 정도이고 열매는 견과이다. 종자가 꽃받침의 구멍에 들어 있으며, 종자의 수명은 길고 2천 년 묵은 종자가 발아한 예가 있다. 품종은 일반적으로 대륜·중륜·소륜으로 나눈다.
- [0046] 상기 연꽃잎(lotus)은 수렴제·지혈제로 사용하거나 민간에서 오줌싸개 치료에 이용한다. 땅속줄기는 연근(蓮根)이라고 하며, 비타민과 미네랄의 함량이 비교적 높아 생체나 그 밖의 요리에 많이 이용한다. 뿌리줄기와 열매는 약용으로 하고 여성에게 잘 나타나는 부인병에 쓰인다.
- [0047] 상기 연꽃 추출물은 보다 구체적으로 연꽃 잎을 건조한 이후, 추출 용매를 이용하여 추출하는 것이다.
- [0048] 상기 두릅은 두릅나뭇과(Araliaceae)의 낙엽 활엽 관목인 두릅나무(Aralia elata)의 어린순으로, 우리나라 전국 각지의 양지바른 산기슭이나 골짜기에 자란다. 두릅나무의 껍질은 당뇨병과 신장병의 약재로 쓰이며, 잎, 뿌리,

과실은 위의 기능을 촉진하거나, 이를 조절하는 약제인 건위제로 이용되어 왔다. 어린잎은 오래 전부터 식용되어 왔으며, 봄에 돋는 두릅순은 독특한 향이 난다. 상기 두릅은 단백질이 많고 지방, 탄수화물, 섬유질, 인, 칼슘, 철, 비타민(B1, B2, C)과 사포닌 등이 들어 있어, 혈당을 내리고 혈중지질을 낮추어 주므로 당뇨병, 신장병 및 위장병에 좋다.

[0049] 상기 두릅 추출물은 보다 구체적으로 두릅 어린순을 건조한 이후, 추출 용매를 이용하여 추출하는 것이다.

[0050] 상기 노니(noni)는 쌍떡잎식물 용담목 꼭두서니과의 상록관목으로 높이 3~12m로 크기가 다양하다. 잎은 달걀 모양으로 길이 30cm, 나비 15cm이다. 꽃은 작고 흰색인데, 무리를 이루어 잎겨드랑이에서 나오며 주로 여름에서 가을까지 여러 번 핀다. 열매는 크기 약 10cm로 감자처럼 생겼으며 표면이 울퉁불퉁하고 패인 자국이 있다. 상기 노니의 잎, 줄기, 꽃, 열매, 씨 등이 민간요법에 사용되어 왔으며, 노니는 혈관 내 염증을 막는 파이토케미컬 성분이 많아 항염 효과에 효능이 있으며, 노니의 열매와 뿌리에 들어있는 강력한 항산화 물질 담나칸탈은 암 세포의 생성과 증식 억제에 중요한 역할을 한다. 뿐만 아니라, 안트라퀴논, 세로토닌 등의 성분이 들어 있어 소화작용을 돕고 통증을 줄여주며 고혈압에도 효과가 있다.

[0051] 상기 노니 추출물은 보다 구체적으로 노니 열매를 건조한 이후, 추출 용매를 이용하여 추출하는 것이다.

[0052] 상기 산뿔풀(Achillea ptarmicoides Maxim.)은 산가새풀 또는 자주뿔풀로도 불린다. 쌍떡잎식물 초롱꽃목 국화과의 여러해살이풀로, 산지 풀밭에서 자라며, 높이 50~110cm로 뿌리줄기가 옆으로 길게 뻗으며 여러 대가 한 곳에서 모여 나온다. 줄기는 곧게 서고 윗부분에 털이 뽀뽀하게 나 있고, 잎은 어긋나며 잎자루가 없고 길이 6~10cm의 타원형 바소풀이다. 끝은 둔하고 밑부분이 원줄기를 감싸며 빗살처럼 갈라지며 가장자리에 날카로운 톱니가 있다. 꽃은 7~10월에 흰색 또는 분홍색의 두화(頭花)가 가지와 줄기 끝에 산방꽃차례로 달리고, 꽃의 지름은 4mm 정도이다. 열매는 길이 3mm 정도의 수과로 10~11월에 익는다.

[0053] 상기 산뿔풀의 전초(풀 전체)는 건위제·강장제·진통제 등 약용으로 사용한다.

[0054] 본원발명의 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물은 애기수영 추출물에 더하여, 연꽃 추출물, 두릅 추출물, 노니 추출물 및 산뿔풀 추출물을 더 포함하는 경우, 복합 추출물로 구성함에 따라, 애기수영 추출물만을 사용하는 경우에 비해, IgE 생성 억제활성, TNF- α 및 IL-6 억제활성 및 NF- κ B활성화 억제 활성을 통해 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선 효과가 더욱 우수하게 나타날 수 있다.

[0055] 바람직하게, 본 발명의 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물은 상기 애기수영 추출물 100 중량부에 대하여 연꽃 추출물 5 내지 15 중량부, 두릅 추출물 5 내지 15 중량부, 노니 추출물 10 내지 30 중량부 및 산뿔풀 추출물 1 내지 10 중량부를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0056] 상기 중량부 범위 내에서 복합 추출물로 사용하는 경우, 각 추출물의 상호 작용에 의한 상승효과로 임계적 의의가 있는 정도의 상승효과가 발생되며, 상기 범위를 벗어나는 경우 상승효과가 급격히 저하되거나 거의 없게 된다.

[0057] 보다 바람직하게, 상기 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물은 발효 애기수영 추출물 100 중량부에 대하여 연꽃 추출물 5 내지 15 중량부, 두릅 추출물 5 내지 15 중량부, 노니 추출물 10 내지 30 중량부 및 산뿔풀 추출물 1 내지 10 중량부로 포함할 수 있다.

[0058] 상기 범위에 의하는 경우, 발효하지 않은 애기수영 추출물을 사용하는 경우에 비해 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선 활성이 보다 우수할 수 있다.

[0059] 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₆의 저급 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 추출 용매를 이용하여 추출되는 것일 수 있다.

[0060] 상기 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 침출법 및 환류 추출법 등 당업계의 통상적인 추출 방법일 수 있다. 구체적으로 세척 및 건조로 이물질이 제거된 천연물을 물, 탄소수 1 내지 6의 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 상기 용매들을 순차적으로 시료에 적용하여 추출한 추출물일 수 있다.

[0061] 상기 초음파 추출법은 30 내지 50℃, 0.5 내지 2.5시간 동안 반응을 진행하며, 추출용매는 물 또는 50 내지 100%의 탄소수 1 내지 6의 알코올에 의한 것이다. 구체적으로는 40 내지 50℃, 1 내지 2.5시간 동안 추출하며, 추출용매로 물 또는 70 내지 80%의 탄소수 1 내지 6의 알코올에 의한 것이다.

[0062] 상기 침출법은 15 내지 30℃, 24 내지 72시간 동안 진행하며, 추출 용매로 물 또는 50 내지 100%의 탄소수 1 내지 6의 알코올을 이용한다. 보다 구체적으로는 20 내지 25℃, 30 내지 54시간 동안 진행하며, 추출 용매는 물

또는 70 내지 80%의 탄소수 1 내지 6의 알코올에 의한 것이다.

- [0063] 상기 환류 추출법은 물, 탄소수 1 내지 6의 알코올 100mL기준으로, 천연물의 분쇄물 10 내지 30g, 환류 시간 1 내지 3시간 및 50 내지 100%의 탄소수 1 내지 6의 알코올 또는 물에 의한다. 보다 구체적으로, 탄소수 1 내지 6의 알코올 100mL 또는 물 100mL 기준으로, 천연물의 분쇄물 10 내지 20g, 환류 시간 1 내지 2 시간 및 70 내지 90%의 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 물에 의한 것이다.
- [0064] 상기 추출 용매는 시료의 중량 기준으로 2 내지 50배를 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로는 2 내지 20배이다. 추출을 위해 시료는 추출 용매에서 침출을 위해 1 내지 72 시간 동안 방치될 수 있으며, 보다 구체적으로 24 내지 48시간 동안 방치될 수 있다.
- [0065] 추출 후, 추출물은 새로운 분획 용매를 순차적으로 적용하여 분획할 수 있다. 분획시 사용하는 분획 용매는 상기 용매는 물, 헥산, 부탄올, 에틸아세트산, 에틸 아세테이트, 메틸렌클로라이드 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상이며, 바람직하게는 에틸아세테이트 또는 메틸렌클로라이드이다.
- [0066] 추출물 또는 분획물을 얻은 후에는 농축 또는 동결건조 등의 방법을 추가적으로 사용할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 식품 조성물은 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물을 이용하여 제조한 것이다.
- [0068] 상기 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물은 오미자 추출물, 딸기 추출물, 아사이베리 추출물, 아로니아 추출물, 블루베리 추출물, 크랜베리 추출물, 자몽 추출물, 오렌지 추출물, 레몬 추출물, 초코민트 추출물, 바질 추출물, 페퍼민트 추출물, 세이지 추출물, 라벤더 추출물, 파슬리 추출물, 곰피 추출물, 방풍나물 추출물, 머위 추출물, 달래 추출물 및 이들의 혼합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.
- [0069] 바람직하게, 상기 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 식품 조성물은 레몬 추출물, 달래 추출물 및 블루베리 추출물을 추가로 포함하는 경우, 애기수영 추출물 또는 발효 애기수영 추출물 고유의 향 또는 맛으로 인해 떨어지는 기호성을 향상시킬 수 있다.
- [0070] 더 바람직하게, 상기 애기수영 추출물 또는 발효 애기수영 추출물 100 중량부에 대하여 레몬 추출물 0.1 내지 1 중량부, 달래 추출물 1 내지 5 중량부 및 블루베리 추출물 0.1 내지 1 중량부를 포함할 수 있다.
- [0071] 보다 더 바람직하게, 애기수영 추출물, 연꽃 추출물, 두릅 추출물, 노니 추출물, 산뽕폴 추출물을 모두 포함하는 복합 조성물 100 중량부에 대하여, 레몬 추출물 0.1 내지 1 중량부, 달래 추출물 1 내지 5 중량부 및 블루베리 추출물 0.1 내지 1 중량부를 포함할 수 있다.
- [0072] 상기 범위에 의하는 경우, 천연추출물 고유의 향 또는 맛에 의해 떨어지는 기호도를 향상시킴으로써 맛과 향이 개선된 식품 조성물을 제공할 수 있다.
- [0073] 구체적으로, 상기 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물을 포함하는 식품 조성물을 이용하여 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선 효과를 증강시킬 수 있는 가공식품을 제조할 수 있다. 이런 가공식품에는 예를 들어, 과자, 차, 음료, 주류, 발효식품, 통조림, 우유가공식품, 육류가공식품, 국수 등을 포함한다. 과자는 비스킷, 파이, 케익, 빵, 캔디, 젤리, 껌, 시리얼 등을 포함한다. 음료는 음용수, 탄산음료, 기능성 이온음료, 주스(예를 들어, 사과, 배, 포도, 알로에, 감귤, 복숭아, 당근, 토마토 주스 등), 식혜 등을 포함한다. 주류는 청주, 위스키, 소주, 맥주, 양주, 과일주 등을 포함한다. 발효식품은 간장, 된장, 고추장 등을 포함한다. 통조림은 수산물 통조림(예를 들어, 참치, 고등어, 꽁치, 소라 통조림 등), 축산물 통조림(쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 칠면조 통조림 등), 농산물 통조림(옥수수, 복숭아, 과일애플 통조림 등)을 포함한다. 우유가공식품은 치즈, 버터, 요구르트 등을 포함한다. 육류가공식품은 돈까스, 비프까스, 치킨까스, 소세지, 탕수육, 너겟류, 너비아니 등을 포함한다. 밀봉포장 생면 등의 국수를 포함한다. 이 외에도 상기 조성물은 레토르트식품, 스프류 등에 사용될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0075] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있

다.

[0076] 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 본 발명의 식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르트메)를 이용할 수 있다. 상기 건강기능식품 조성물 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다.

[0077] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 약학 조성물은 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물을 이용하여 제조한 것이다.

[0078] 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 하는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.

[0079] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0080] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올 레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0081] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0082] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 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 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 면역치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

발명의 효과

[0083] 본 발명의 애기수영 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물에 의하면 장기간 복용에도 부작용의 문제가 없으며, TNF- α 및 IL-6 분비 억제, NF- κ B활성화 억제 및 혈중 IgE 농도 감소 활성을 통해 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선 효과를 나타낼 수 있는 천연 추출물 기반의 조성물을 제공할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는

실시예에 한정되지 않는다.

[제조예 1: 천연추출물의 제조]

1. 애기수영 추출물의 제조

애기수영 어린순을 세척 및 건조하고, 분쇄한 뒤 추출 용매인 증류수를 1:10(w:v)의 비율로 가한 다음 완전히 침지 시킨 후, 80℃에서 환류시키면서 3시간씩 3회 반복 추출하였다. 추출액은 Whatman No. 2 여과지로 여과하였다. 여과액은 60℃에서 감압 농축하여 분말 시료를 제조하여 실험에 사용하였다. 열수 추출하고, 농축 여과하여 애기수영 추출물(RE)을 제조하였다.

2. 발효 애기수영 추출물의 제조

애기수영 추출물에 대한 발효공정을 통한 상승효과를 확인하기 위하여 하기의 [표 1]과 같이 발효균주에 차이를 두어 발효를 진행함으로써, 발효 애기수영 추출물(Ref 1 내지 3)을 제조하였다. 진행하였다. 발효(S)균주로 S1(락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei)), S2(락토바실러스 아시도 필루스(Lactobacillus acidophilus)) 및 S1 및 S2를 혼합 접종(S3)하면서 상승효과를 확인하였다.

표 1

	Ref1	Ref2	Ref3
추출물	RE	RE	RE
발효균주(S)	S1	S2	S1+S2

상기 애기수영 추출물 또는 발효 애기수영 추출물을 일정한 농도로 희석하며 이하 실험을 진행하였다.

3. 기타 추출물의 제조

상기 애기수영 추출물(RE)과 동일한 방법으로 열수 추출하여 연꽃 추출물(LE), 두릅 추출물(AE), 노니 추출물(NE) 및 산뽕풀 추출물(SE)을 제조하였다.

상기 연꽃 추출물은 연꽃 잎 추출물이며, 두릅 추출물은 두릅의 어린순을 이용한 두릅 어린순 추출물이며, 노니 추출물은 노니 열매를 이용한 노니 열매 추출물이다.

4. 복합 추출물의 제조

상기 애기수영 추출물(RE), 발효 애기수영 추출물(Ref1 내지 Ref3), 연꽃 추출물(LE), 두릅 추출물(AE), 노니 추출물(NE), 및 산뽕풀 추출물(SE)을 하기 표 2와 같은 함량 범위로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

표 2

	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10
RE	100	100	100	100	100	-	-	-	-	-
Ref3	-	-	-	-	-	100	100	100	100	100
LE	1	5	10	15	20	1	5	10	15	20
AE	1	5	10	15	20	1	5	10	15	20
NE	1	10	20	30	40	1	10	20	30	40
SE	0.1	1	5	10	20	0.1	1	5	10	20

(단위 : 중량부)

[실험예 1: 피부세포 HaCaT 에서의 아토피 개선 효과]

1. 피부 세포 배양

human keratocytes(각질형성세포)인 HaCaT 세포(ATCC에서 구입)를 10% FBS, 2 mM L-글루타민(glutamine), 100IU/ml 페니실린(penicillin) 및 100 ug/ml 스트렙토마이신(streptomycin) 항생제가 포함되어 있는 RPMI 배

지에서 계대배양하였다.

2. 집진드기 추출물에 의한 PAR-2, ICAM-1 및 IL-6 발현 변화 확인

HaCaT 세포에서 아토피 유발 물질인 집진드기 처리에 의한 아토피 유발 농도를 확인하기 위하여, HaCaT 세포에 집진드기를 처리하고, PAR-2, ICAM-1 및 IL-6 유전자의 발현변화를 측정하였다. 구체적으로, 상기 실험예 1의 1. 피부 세포 배양에서 배양된 human keratocytes(각질형성세포)인 HaCaT 세포에 집진드기 추출물(연세대 의용절지동물소재은행에서 구입)을 0.5 ug/mL, 5 ug/mL, 50ug/ml 및 500 ug/ml 처리하고, 세포를 끊어서 균질화 완충 용액(homogenization buffer, 1 M HCl containing 5% (v/v) HCOOH, 1% (v/v) trifluoroacetic acid and 1% (w/v) NaCl)으로 용해시키고, 알콜 추출 방법(alcohol extraction method)으로 추출하여 세포내에 남아 있는 PAR-2, ICAM-1 및 IL-6 유전자의 발현 양을 실시간 중합효소연쇄반응(realtime PCR) 방법으로 측정하였다. 비교를 위해 집진드기 추출물을 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하였으며, 실험 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

	PAR-2	ICAM-1	IL-6
대조군(control)	1.22±0.11 ^a	1.24±0.12 ^a	1.25±0.19 ^b
0.5 ug/mL 집진드기	1.42±0.15 ^b	1.45±0.14 ^b	1.50±0.17 ^a
5 ug/mL 집진드기	1.54±0.13 ^a	1.60±0.16 ^{ab}	1.62±0.15 ^{ab}
50 ug/mL 집진드기	1.51±0.14 ^{ab}	1.54±0.15 ^{ab}	1.60±0.16 ^{ab}
500 ug/mL 집진드기	1.48±0.17 ^a	1.50±0.18 ^{ab}	1.57±0.14 ^b

(단위 : 상대적 mRNA levels / a, b, ab와 같이 알파벳이 상이함은 통계적으로 유의한 차이가 있음을 나타냄.(p<0.05))

상기 표 3에 따르면, 집진드기 추출물을 처리한 농도에 비례하여, PAR-2, ICAM-1 및 IL-6 유전자의 발현이 증가되었으나, 50ug/mL 이상의 높은 농도에서는 효과가 없거나 발현양이 오히려 감소하는 경향을 나타내었다.

따라서, HaCaT 세포에 집진드기 추출물을 처리하면, 아토피가 유발되어 PAR-2, ICAM-1 및 IL-6의 발현량이 증가함을 확인함에 따라, 이후 본원발명 애기수영 추출물 및 발효 애기수영 추출물의 아토피 예방 및 개선 효과 확인을 위한 농도로 5 ug/mL의 집진드기를 사용하였다.

3. 염증 사이토카인인 TNF-α 및 IL-6의 억제 활성

본원발명의 천연 추출물인 애기수영 추출물(RE) 및 발효 애기수영 추출물(REF1 내지 3)의 염증 사이토카인 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 하기 실험을 진행하였다.

구체적으로, 사이토카인(Cytokine) 분비 실험을 하기 2일 전에 1×10^6 HaCaT 세포를 12 웰 배양 플레이트(culture plates)로 옮긴 후 10% FBS, 2 mM L-글루타민(glutamine)과 항생제가 첨가된 RPMI 배지에서 배양하였다. 배양 후, 염증 사이토카인(Cytokine) 분비 실험을 하는 당일 RPMI 배지에 집진드기 추출물 5ug/ml을 처리하여 아토피를 유발한 뒤 0.2%(w/v) BSA와 애기수영 추출물(RE), 발효 애기수영 추출물(REF1 내지 3)을 각각 2 ul/ml 넣은 KRB 용액(pH 7.2)으로 바꾸어 주었다. 상기의 KRB(krebs ringer buffer) 용액의 처리 2시간 후에 KRB(krebs ringer buffer) 용액으로 분비되는 염증 사이토카인(inflammatory cytokines)인 TNF-α와 IL-6의 농도를 ELISA kit(eBioscience에서 구입)로 측정하였다. 집진드기 추출물을 처리하지 않은 군을 일반군으로 하였으며, 본원발명 추출물(RE, REF1 내지 3)을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하여 실험 결과 값을 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

	TNF-α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
일반군	440±87 ^a	556±101 ^a
대조군	1016±160 ^b	1267±146 ^a

RE	730 ± 120 ^a	871 ± 134 ^b
REf1	715 ± 145 ^{ab}	820 ± 147 ^b
REf2	686 ± 137 ^a	787 ± 129 ^{ab}
REf3	678 ± 126 ^c	739 ± 143 ^c

(단위 : pg/mL / a, b, c와 같이 알파벳이 상이함은 통계적으로 유의한 차이가 있음을 나타냄.(p<0.05))

상기 표 4를 참조하면, 애기수영 추출물(RE) 및 발효 애기수영 추출물(REf1 내지 3)을 처리한 경우, 대조군에 비해 TNF-a 및 IL-6의 분비량이 모두 감소함을 확인할 수 있다. 또한, 애기수영 추출물(RE)에 비해, 발효한 발효 애기수영 추출물(REf1 내지 3)을 아토피가 유발된 HaCaT 세포에 처리한 경우 TNF-a 및 IL-6 분비량이 보다 더 감소함을 확인하였으며, 그 중에서 특히 발효 애기수영 추출물(REf3)의 경우 가장 낮은 TNF-a 및 IL-6 분비량을 나타냄을 확인하였다.

이를 통해, 발효 애기수영 추출물(REf1 내지 3)이 애기수영 추출물에 비해 아토피가 유발된 HaCaT 세포에서 염증 사이토카인 중 TNF-a 및 IL-6의 분비를 현저히 감소시킴으로써 아토피 피부염 증세를 개선할 수 있음을 확인하였다.

4. NF-kB 활성화 변화 확인

아토피를 유발한 HaCaT 세포에서 본 발명의 애기수영 추출물(RE) 및 발효 애기수영 추출물(REf1 내지 3)을 처리하였을 때, NF-kB 기전의 활성화 변화를 확인하기 위하여, NF-kB의 기전이 활성화되면 발현이 증가되는 사이토카인(cytokine) 및 접착 분자(intracellular adhesion molecules, ICAM)의 발현 변화를 확인하였다.

구체적으로, HaCaT 세포에 집진드기 추출물(5 ug/ml)과 애기수영 추출물(RE) 또는 발효 애기수영 추출물(REf1 내지 3)의 30% 추출액을 2 ul/ml로 2시간동안 함께 처리한 다음, 웰에 있는 세포를 긁어서 균질화 완충 용액(homogenization buffer, 1 M HCl containing 5% (v/v) HCOOH, 1% (v/v) trifluoroacetic acid and 1% (w/v) NaCl)으로 용해시키고, 알콜 추출 방법(alcohol extraction method)으로 추출하여 세포내에 남아 있는 프로테아제 활성화 수용체 2(Protease-activated receptor 2, PAR 2), 인터류킨-6(interleukin-6, IL-6), 접착 분자(intracellular adhesion molecules, ICAM), 단핵구 화학유인물질 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 발현량을 실시간 중합효소연쇄반응(realtime PCR) 방법으로 측정하였다.

실험 결과의 비교를 위해 집진드기 추출물을 처리하지 않은 군을 일반군으로 하였으며, 본원발명 추출물(RE, REf1 내지 3)을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하여 실험 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

	PAR-2	IL-6	ICAM	MCP-1
일반군	1.19 ± 0.11 ^c	1.18 ± 0.15 ^c	1.20 ± 0.13 ^b	1.22 ± 0.14 ^a
대조군	1.78 ± 0.22 ^b	1.80 ± 0.22 ^b	1.90 ± 0.22 ^b	1.89 ± 0.22 ^b
RE	1.33 ± 0.19 ^a	1.45 ± 0.17 ^a	1.48 ± 0.16 ^c	1.48 ± 0.21 ^a
REf1	1.28 ± 0.16 ^a	1.34 ± 0.13 ^b	1.36 ± 0.15 ^a	1.37 ± 0.16 ^c
REf2	1.25 ± 0.17 ^c	1.25 ± 0.14 ^a	1.28 ± 0.13 ^b	1.26 ± 0.13 ^b
REf3	1.22 ± 0.21 ^c	1.20 ± 0.11 ^b	1.21 ± 0.11 ^a	1.21 ± 0.15 ^a

(a, b, c : 통계적으로 유의한 차이가 있음을 나타냄.(p<0.05))

상기 표 5를 참조하면, HaCaT 세포 내 아토피 증세가 나타나는 경우 발현이 증가하는 PAR-2 발현이 집진드기 추출물 처리한 대조군의 경우 증가함을 확인하였으며, 애기수영 추출물(RE) 및 발효 애기수영 추출물(REf1 내지 3)을 처리한 경우, 대조군에 비해 PAR-2, IL-6, ICAM-1 및 MCP-1의 발현량이 모두 감소함을 확인하였다.

[0127] 특히, 애기수영 추출물(RE)에 비해 발효를 진행한 애기수영 추출물(Ref1 내지 3)의 경우 PAR-2, IL-6, ICAM-1 및 MCP-1의 발현량이 모두 더 감소함을 통해 애기수영 추출물(RE)에 발효를 진행한 발효 애기수영 추출물(Ref1 내지 3)을 처리한 경우 아토피 피부 세포에서 사이토카인, 접착 분자 및 단백질 화합유인물질의 발현을 현저히 감소시킴으로 본원발명의 애기수영 추출물 및 발효 애기수영 추출물이 NF-κB 기전을 억제하여 아토피 피부염 증세를 완화시키는데 현저한 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0129] **[실험예 2: 과민면역반응으로 발생된 알레르기성 부종반응 억제 및 혈청 중 IgE 억제 효과]**

[0130] **1. 알레르기성 부종반응 억제 효과**

[0131] **1-1. OVA 감작 마우스 모델 구축**

[0132] 습도 55±10%, 조명주기 12시간인 실험동물실 환경에 2주간 적응시켰다. 2주 후 마우스가 8주령이 되었을 때, 18~20g의 마우스 총 35마리를 그룹당 5마리로 나눈 후, 정상군(Normal), 양성대조군(OVA-sensitized), 비교예(Dexamethasone), 애기수영 추출물(RE) 및 발효 애기수영 추출물(Ref1 내지 3) 투여군(100mg/kg/day)으로 분류하여 실험하였다.

[0133] 항원인 난황알부민(ovalbumin, OVA)(grade V; sigma-Aldrich, St Louis, MO) 20μg과 수산화알루미늄(imject alum, Thermo Scientific, Cramlington, UK) 1mg을 100μl 인산완충식염수(PBS) 용액에 녹인 뒤, 정상군을 제외한 나머지 6군에 복강주사하여 1차 감작시키고, 2주 후에 같은 비율의 난황알부민과 수산화알루미늄 주사용액을 복강주사하여 2차 감작시켰다. 정상군에는 PBS 용액만을 1차 및 2차 주사하였다. 애기수영 추출물(RE)과 발효 애기수영 추출물(Ref1 내지 3)은 각각 100mg/kg, Dexamethasone은 0.5mg/kg의 농도로 2차 감작시킨 당일로부터 마우스를 희생시킨 날까지 13일 간 1% CMC(caeboxymethyl cellulose) 용액에 혼합하여 1일 1회 일정한 시각에 경구투여하였다.

[0134] **1-2. 귀 부종 반응 측정**

[0135] 알레르기성 부종억제에 관한 효능을 확인하기 위하여, 상기와 같이 OVA 감작이 유도된 마우스의 귀 조직에 0.1% OVA 용액을 20μl를 피내주사하여 시간에 따른 마우스 귀 두께의 변화를 Thickness gage로 측정하고, 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0136]

	경과시간	정상군	양성대조군	비교예	RE	Ref1	Ref2	Ref3
귀 두께(mm)	8 시간	0.23	0.59	0.46	0.44	0.42	0.41	0.38
	16 시간	0.23	0.55	0.39	0.37	0.34	0.32	0.28

[0137] (단위 : mm)

[0138] 상기 표 6을 참조하면, OVA로 감작을 유도하여 알레르기를 유도한 양성대조군에서 8시간 및 16시간 후에 귀 두께가 정상군에 비해 현저하게 증가하였으나, 애기수영 추출물(RE) 및 발효 애기수영 추출물(Ref1 내지 3)을 처리한 경우 OVA 감작에 의해 귀 두께가 시간에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 발효 애기수영 추출물(Ref1 내지 3)의 경우 귀 두께 감소 효과가 보다 우수함을 확인할 수 있었다.

[0139] 이를 통해 애기수영 추출물(RE) 및 발효 애기수영 추출물(Ref1 내지 3)을 처리함으로써 알레르기성 부종반응이 감소할 수 있음을 확인하였다.

[0141] **2. 혈청 중 IgE 억제 효과**

[0142] 상기 1. 알레르기성 부종반응 억제 효과에서 OVA감작된 마우스를 에테르 마취 하에 경추탈골법으로 희생시키고 혈액을 복부대동맥으로부터 채취하였다. 채취한 혈액을 상온에서 30분간 방치하고, 3,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 혈청을 얻어 총 IgE와 OVA 특이적인 IgE를 ELISA 방법으로 분석하고 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

	정상군	양성 대조군	비교예	RE	REf1	REf2	REf3
IgE 농도(μg/ml)	1	7	5	4	3	3	2
OVA-specific IgE 농도 (U/ml)	0	115	66	59	55	54	50

(단위 : μg/ml, U/ml)

상기 표 7을 참조하면, 알레르기를 유도한 양성대조군의 혈청 내 총 IgE와 OVA특이적인 IgE 농도가 정상군에 비하여 증가하였으며, 애기수영 추출물(RE) 및 발효 애기수영 추출물(REf1 내지 3)을 투여한 RE, REf1 내지 REf3의 농도가 현저히 감소된 것을 확인할 수 있다.

특히, 애기수영 추출물(RE)을 발효한 발효 애기수영 추출물 중 REf3의 경우 혈청 내 총 IgE와 OVA특이적인 IgE 농도 감소가 가장 현저함을 확인할 수 있었다.

따라서, 본원발명의 애기수영 추출물(RE) 또는 발효 애기수영 추출물(REf1 내지 3)의 처리에 의해 알레르겐이라고 알려진 항원물질에 매개하는 IgE를 억제함으로써, 과민면역반응을 예방 및 개선할 수 있음을 확인하였다.

[실험예 3 : 복합추출물의 평가]

1. 복합추출물의 피부세포 HaCaT에서의 아토피 개선 효과

상기 실험예 1에 나타난 애기수영 추출물(RE) 및 발효 애기수영 추출물(REf3)의 실험방법과 동일한 방법으로 표 2의 복합추출물 K1 내지 K10의 효과를 비교하여 나타내었다.

그 결과를 하기 표 8에 종합적으로 나타내었으며, 객관적인 비교를 위하여 REf3의 효과를 지수 5로 나타내었고, 상기 지수는 그 숫자가 높을수록 우수한 것이다.

하기의 평가 지수는 1 내지 10의 지수로 변환하여 나타내었다.

표 8

	REf3	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10
TNF-α 억제 활성	5	5	5	6	6	5	6	8	8	9	8
IL-6 억제 활성	5	5	6	6	7	5	6	8	8	9	8
NF-kB 활성화 억제 활성	5	5	6	6	7	6	6	8	9	8	7

(단위 : 지수)

상기 표 8에 나타난 바와 같이, 발효 애기수영 추출물(REf3)만을 처리하는 경우에 비해, 혼합 조성물을 처리하는 경우 상승효과가 나타나는 것을 확인할 수 있으며, K1 내지 K10의 경우 TNF-α 및 IL-6 억제 활성 및 NF-kB 활성화 억제활성이 모두 REf3에 비해 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다.

또한, 애기수영 추출물(RE)을 포함하는 K1 내지 K5에 비해, 발효 애기수영 추출물(REf3)을 포함하는 K6 내지 K10의 경우 그 효과가 보다 우수한 것을 확인하였다.

특히, 연꽃 추출물(NE), 두릅 추출물(DE), 노니 추출물(NE) 및 산뽕 추출물(SE)의 바람직한 중량부를 포함하고 있는 M7 내지 M9의 경우 TNF-α 및 IL-6의 억제 활성 및 NF-kB 활성화 억제 활성을 통해 아토피 피부염 억제 활성이 나타남을 확인할 수 있어 본원발명 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물이 아토피 예방 및 개선 효과가 있음을 확인할 수 있다.

2. 복합추출물의 과민면역반응으로 발생된 알레르기성 부종반응 및 혈청 중 IgE 억제 효과

[0161] 상기 실험예 2에 나타난 애기수영 추출물(RE) 및 발효 애기수영 추출물(Ref3)의 실험방법과 동일한 방법으로 표 2의 복합추출물 K1 내지 K10의 효과를 비교하여 나타내었다.

[0162] 그 결과를 하기 표 9에 종합적으로 나타내었으며, 객관적인 비교를 위하여 Ref3의 효과를 지수 5로 나타내었고, 상기 지수는 그 숫자가 높을수록 우수한 것이다. 실험 결과는 1 내지 10의 지수로 변환하여 나타내었다.

표 9

[0163]

	Ref3	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10
귀부종 두께 감소 활성	5	4	5	6	6	5	6	7	8	9	7
IgE 농도 감소	5	5	5	6	6	5	6	8	8	9	8
OVA-specific IgE 농도 감소	5	5	6	6	6	5	6	8	9	8	7

[0164] (단위 : 지수)

[0165] 상기 표 9를 참조하면, 발효 애기수영 추출물(Ref3)만을 처리하는 경우에 비해, 혼합 조성물을 처리하는 경우 상승효과가 나타나는 것을 확인할 수 있으며, K1 내지 K10의 경우 귀 부종 두께 감소, IgE 및 OVA-specific IgE 농도 억제 활성 모두 Ref3에 비해 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0166] 또한, 애기수영 추출물(RE)을 포함하는 K1 내지 K5에 비해, 발효 애기수영 추출물(Ref3)을 포함하는 K6 내지 K10의 경우 그 효과가 보다 우수한 것을 확인하였다.

[0167] 특히, 연꽃 추출물(NE), 두릅 추출물(DE), 노니 추출물(NE) 및 산뽕풀 추출물(SE)의 바람직한 중량부를 포함하고 있는 M7 내지 M9의 경우 귀 부종 두께 감소, IgE 및 OVA-specific IgE 농도 억제 활성을 통해 아토피 피부염 억제 활성이 나타남을 확인할 수 있어 본원발명 아토피 및 면역과민반응 예방 및 개선용 조성물이 아토피 예방 및 개선 효과가 있음을 확인할 수 있다.

[0169] [제조예 2: 차음료 제형의 제조]

[0170] 상기 RE, Ref3, K3 및 K8을 기초 차음료로 제조하고, 추가적으로 레몬 추출물(F1), 달래 추출물(F2) 및 블루베리 추출물(F3)을 제조하고, 하기의 표 10과 같이 혼합하여 차음료 제형을 제조하였다.

표 10

[0171]

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
RE	100	100	100	100	-	-	-
Ref3	-	-	-	-	100	-	-
K3	-	-	-	-	-	100	-
K8	-	-	-	-	-	-	100
F1	0.01	0.1	1	3	1	1	1
F2	0.1	1	5	10	5	5	5
F3	0.01	0.1	1	3	1	1	1

[0172] (단위 : 중량부)

[0173] [실험예 4 : 차음료에 대한 기호도 평가]

[0174] 상기 RE, Ref3, K3 및 K8을 기초로 제조된 차음료와 상기 J1 내지 J8의 차음료에 대하여 20인의 시험자에게 시음하게 한 후, 맛과 향을 평가하게 하여 1 내지 10의 지수로 기호도를 평가하도록 하였다. 그 결과는 종합하여 평균한 뒤 하기 표 11에 나타내었으며, 하기의 지수는 높을수록 기호도가 우수한 것이며, 각 지수는 평균값에 반올림을 적용하여 나타내었다.

표 11

[0175]

	RE	Ref3	K3	K8	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
기호도	3	1	3	1	4	7	8	4	6	7	7

- [0176] (단위 : 지수)
- [0177] 상기 표 11을 참조하면, 본원발명 애기수영 추출물(RE)은 기호성이 낮으며, 발효를 진행한 REf3의 경우 보다 더 낮은 기호도를 나타냄을 확인하였다. 이는 추가로 천연추출물을 더 포함하는 K3 및 K8의 경우에도 기호도가 낮아짐을 확인할 수 있었다.
- [0178] 특히, 발효 공정이 적용된 K8의 경우 발효함으로써 나타나는 특유의 향으로 인해 전체적인 기호도가 상당히 저하됨을 확인하였다.
- [0179] 이에 따라, 레몬 추출물(F1), 달래 추출물(F2) 및 블루베리 추출물(F3)을 포함하여 기호도를 개선하고자 J1 내지 J7의 혼합제형을 평가하였다. 그 결과 J2 및 J3의 혼합범위에 의하는 경우, 애기수영 추출물 특유의 향이 중화되어 전체적인 기호도가 상승됨에 따라, 기호도 높은 식품 조성물을 제조할 수 있음을 알 수 있다.
- [0180] 또한, 발효를 통해 제조된 REf3을 포함하는 J5 및 J7의 경우에도 상당한 정도의 기호성 개선 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [0181] 따라서, 상기 혼합제형에 의하는 경우, 천연 식물 추출물을 기반으로 하여 애기수영 추출물(RE) 및 발효 애기수영 추출물(REf3)에 대한 기호도를 향상시킬 수 있음을 알 수 있으며, 이를 통해 장기간 복용에 따른 부작용 등의 문제가 없으면서도 우수한 맛과 향미를 갖는 기호성 있는 식품 조성물로서의 제공이 가능하다는 것을 확인할 수 있다.
- [0183] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.