



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0085196

(43) 공개일자

2014년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/708 (2006.01)

A61K 36/718 (2006.01)

A61K 36/539 (2006.01)

A61P 17/14 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0155483

(22) 출원일자

2012년12월27일

심사청구일자

2012년12월27일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

(72) 발명자

김배환

대구 수성구 청수로 213, 1116동 503호 (황금동, 캐슬골드파크1단지)

김민지

대구 수성구 청수로3길 34-17, (중동)

이인철

대구 동구 동부로 1, 103동 705호 (신천동, 신천주공아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

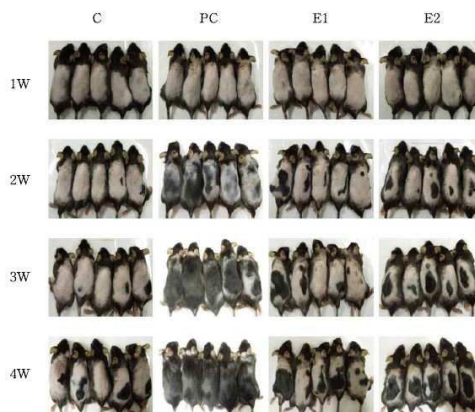
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **삼황사심탕을 유효성분으로 함유하는 모발성장 촉진용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 삼황사심탕을 유효성분으로 함유하는 모발성장 촉진용 조성물에 관한 것으로, 상기 삼황사심탕은 모발 성장과 관련된 다양한 효소와 모발 성장인자의 활성화 촉진 및 모발 억제인자의 발현 감소를 통해 모낭의 성장기를 원활하게 유지해 줌으로써 모발 촉진 효과를 나타낼 뿐 아니라, 천연 추출물로서 부작용이 적은 안전한 소재이므로, 모발 성장 촉진을 위하여 샴푸와 같은 화장료 조성물이나, 기능성 식품 또는 약제로서 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

삼황사심탕 총 100 중량부에 대하여 대황 35 내지 50 중량부, 황련 25 내지 35 중량부 및 황금 25 내지 35 중량부를 포함하는 삼황사심탕을 유효성분으로 함유하는 모발성장 촉진용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 삼황사심탕 총 100 중량부에 대하여 대황 42 중량부, 황련 29 중량부 및 황금 29 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 모발성장 촉진용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 삼황사심탕은 대황, 황련 및 황금에 대하여 10 중량배의 용매를 첨가하여 추출하며, 상기 용매는 에탄올, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 모발성장 촉진용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 화장료 조성물, 약학조성물 또는 기능성 식품인 것을 특징으로 하는 모발성장 촉진용 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 헤어토닉, 모발 영양화장수, 스칼프트리트먼트, 헤어트리트먼트, 헤어린스, 헤어샴푸 및 헤어로션으로 이루어진 군으로부터 선택된 제형인 것을 특징으로 하는 모발성장 촉진용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 삼황사심탕을 유효성분으로 함유하는 모발성장 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 전 세계적으로 탈모인구는 지속적으로 증가하고 있으며, 이전에 비해 모발 관리 대상자의 연령층도 20~30대로 점점 낮아지고 있고, 여성에서의 탈모 인구 비중 또한 급증하고 있는 추세이다. 국내의 경우 최근 성인 남성의 23%인 350만 명이 탈모 증세를 보이고 있고, 여성과 청소년을 포함하여 탈모증을 호소하는 환자의 숫자는 천만 명을 넘을 것으로 추정되고 있어 이에 따른 사회경제적 문제도 심각하다고 할 수 있다.

[0003] 탈모의 원인으로는 유전적 요인과 스트레스 및 노화 등이 있는데, 그 대표적인 기전을 보면 남성호르몬인 테스토스테론(T)이 5 α -리덕타제(RD)에 의하여 디하이드로테스토스테론(DHT)으로 전환되어 두피의 모낭을 위축시켜 탈모가 유발되게 된다. 나이가 들게 되면 DHT가 증가되어 모낭세포의 단백질 합성이 지연되고 이로 인해 휴지기 모낭의 비율이 증가되게 되면서 탈모의 진행이 빠르게 진행된다고 볼 수 있다.

[0004] 탈모는 각 성장주기에 작용하는 모발의 다양한 인자들의 변화에 의해 진행된다. 이들 인자 중 모발성장을 촉진하는 생화학적 효소인 γ -글루타밀 트랜스펩타타제(γ -GT)는 모발 주기의 휴지기에는 감소하였다가 성장기에는 증가하는 것으로 알려져 있으며, 증식과 분열이 활발한 세포내에서 많이 발현된다. 모낭세포 내에서 γ -GT는 글루타메이트, 시스테인, 글리신으로 구성된 글루타티온으로부터 시스테인을 분리하는 과정에 작용하여 이로부터 케라틴 단백질을 합성하는 것으로 알려져 있다. 또 하나의 모발 성장인자로서 중요하게 고려될 수 있는 알칼린 포스포타타제(ALP)는 모발생성과정 중 모기질(hair matrix)내 새로운 혈관의 생성에 관여하여 모발성장을 촉진하는 것으로 알려져 있고, 모발성장 촉진 시 활성이 증가됨이 관찰되고 있기 때문에 모발성장의 지표로 활용될 수 있는 효소이다.

[0005] 모발주기는 모발의 성장이 촉진되는 성장기(anagen), 성장을 멈추고 모구부가 축소되면서 대사과정이 늦어지는 퇴행기(catagen), 모낭이 수축되면서 위쪽으로 올라가는 휴지기(telogen)로 구분된다. 모발의 각 성장주기에

있어서 다양한 인자들이 작용하여 양모 또는 탈모를 유발하게 된다. 아직까지 모발 성장주기를 조절하는 기전은 명확하게 밝혀져 있지는 않지만, 다양한 성장인자와 단백질 카이나제C- α , 줄기세포 인자(stem cell factor)와 같은 사이토카인 등의 요인들이 중요하게 작용하는 것으로 알려져 왔다. 즉 다양한 신호 전달 인자(signal transduction factor)가 모발의 성장주기에 따라 적절히 작용함으로써 발모 또는 탈모를 유발시킨다. IL-1과 TNF 등은 피부에 존재하는 사이토카인으로 모발세포의 세포사를 유발하여 탈모를 일으키며, 형질전환 성장인자- β 1(TGF- β 1)은 모발의 성장기 시기에서 모발성장을 방해하고, 남성호르몬인 안드로젠(androgen)은 모발의 성장기를 단축시켜 정상보다 빨리 퇴행기로 접어들게 한다. 반면에 Bcl-2는 항 아세포시스(anti-apoptosis) 인자로 알려져 있으며, 기존 연구에 의하면 Bcl-2 결핍 마우스에서 모발성장기가 지연된다고 알려져 있고, Bcl-2의 발현은 모발 성장 주기에서 성장기의 발육능력을 촉진시키고, 모낭의 퇴화를 억제시킨다고 보고되어 있다.

[0006] 일반적으로 모발성장인자로 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-1), 혈관내피성장인자(VEGF)가 알려져 있고 모발억제 인자로 TGF- β 1과 카스파제-3(Caspase-3)이 알려져 있으며, 이들 지표는 항체를 이용한 면역 조직 염색을 통해 쉽게 그 발현 양상을 평가해 볼 수 있다.

[0007] 지금까지 모발 성장촉진에 효과가 있는 약물로는 미국 식약청(Food and Drug Administration, FDA)에서 공식적으로 허가를 받은 미녹시딜(minoxidil)과 피나스테라이드(finasteride)가 있다. 미녹시딜은 미국 Pharmacia & Upjohn사에서 개발한 고혈압 치료제로 Rogaine이란 상품명으로 승인 받았으나 욕모효과가 인정되면서 바르는 발모제로 개발되었다. 그러나 피부에 가려움증, 홍반, 표피 벗겨짐과 건성화를 동반한 염증을 유발하고 몇몇 사례에서는 알레르기성 접촉성 피부염 및 지루성 피부염을 일으키는 등의 부작용이 보고되면서 사용상 주의를 필요로 하고 있다. 한편 피나스테라이드는 Propecia라는 상품명으로 제약회사인 Merck에서 개발한 5- α -리덕타제 억제제로서, 처음에는 전립선 치료제로 개발되었다가 부작용으로 발모작용이 나타나 먹는 발모제로 전환되어 사용되고 있다. 발모작용 기전은 명확히 밝혀져 있지는 않지만 영양공급을 증가시키기 위해 혈관을 확장하거나 칼륨 통로를 여는 등의 효과가 모발성장을 유도하는 것이라 알려지고 있다. 이러한 약물은 욕모 효능은 우수하지만 모발성장 효과 유지를 위해 평생 동안 지속적으로 사용해야 하는 단점이 있고, 또한 일부 약물은 남성의 성기능 억제와 가임여성의 기형아 출산과 같은 부작용이 수반될 수 있기 때문에 안전성 측면에서 문제점을 야기할 수 있다.

[0008] 이러한 안전성의 문제로 인하여 최근에는 전 세계적으로 모발성장 효능은 우수하면서 안전성이 좋은 천연 추출물에 대한 관심이 높아지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 모발성장 촉진 효과를 갖는 천연 추출물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 삼황사심탕 총 100 중량부에 대하여 대황 35 내지 50 중량부, 황련 25 내지 35 중량부 및 황금 25 내지 35 중량부를 포함하는 삼황사심탕을 유효성분으로 함유하는 모발성장 촉진용 조성물을 제공한다.

[0011] 보다 바람직하게는, 상기 삼황사심탕 총 100 중량부에 대하여 대황 42 중량부, 황련 29 중량부 및 황금 29 중량부를 포함할 수 있다.

[0012] 상기 삼황사심탕은 대황, 황련 및 황금에 대하여 10 중량배의 용매를 첨가하여 추출하며, 상기 용매는 에탄올, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.

[0013] 본 발명에 따른 조성물은 화장료 조성물, 약학조성물 또는 기능성 식품의 형태로 제공될 수 있다.

[0014] 특히, 상기 조성물은 헤어토닉, 모발 영양화장수, 스칼프트리트먼트, 헤어트리트먼트, 헤어린스, 헤어샴푸 및 헤어로션으로 이루어진 군으로부터 선택된 제형인 것이 바람직하다.

[0015] 금계요락에 처음 기재된 처방인 삼황사심탕은 고혈압, 고지혈증, 동맥경화증, 불면증, 구내염 등의 치료에 많이 활용되는 처방중 대표적인 것으로, 항산화, 항균에도 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 삼황사심탕은 대황, 황련, 황금으로 된 생약복합체제의 처방이며 청열사화, 해독, 청열화습, 사하, 지혈 등의 효능이 있어, 심화상염으로 인한 실열을 치료하는 기본 처방이기도 하다.

- [0016] 대항의 경우 약효연구에서 실험동물에 대한 총 콜레스테롤의 상승을 억제하는 효과를 보이는 것으로 알려져 있고, 황금과 황련의 약효 연구에서는 동맥경화의 예방효과가 있다고 보고되어져 있으며, 황금의 플라보노이드 성분에 대한 연구에서 실험적 고지혈증, 지방간 형성 및 간 콜레스테롤 및 중성지방 수치의 저하작용이 보고되어져 있다.
- [0017] 한편, 본 발명자는 C57BL/6 마우스를 이용한 육모 모델에서 육안적 및 조직학적 관찰, 효소활성도 측정 및 조직면역학적 분석을 통해 모발촉진제로서 삼황사심탕의 실용가능성을 확인하였으며, 대체시험법을 통한 안전성을 검증하여 본 발명을 완성하게 된 것이다.
- [0018] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 젤 또는 크림 타입일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니고, 헤어토닉, 모발영양화장수, 스칼프트리트먼트, 헤어트리트먼트, 헤어린스, 헤어샴푸 또는 헤어로션 등의 다양한 제형으로 제공될 수 있다.
- [0019] 또한, 각각의 제형에 있어서 상기한 필수성분 이외에 다른 성분들은 기타 외용제의 종류 또는 사용목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적합하게 선정하여 배합할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 따른 약학조성물은 본 발명에 따른 약학조성물은 약학조성물 총 중량에 대하여 삼황사심탕을 0.01 내지 50.0 중량부로 함유하는 것이 바람직하다. 만약, 삼황사심탕을 상기 함량 범위를 벗어나 소량으로 함유하면 원하는 모발성장 촉진효과를 얻기 곤란한 반면, 과량으로 함유하면 용량에 비해 모발성장 촉진효과가 둔화될 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명에 따른 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 약학조성물은, 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.
- [0024] 본 발명의 약학추출물의 사용량은 투여경로, 질병의 정도, 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0025] 상기 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 비강, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 기능성 식품은 건강 기능식품 또는 건강음료로 사용할 수 있으며, 기능성 음료, 환제, 정제 또는 상기 성분을 건조 분말화하여 충전한 연질 또는 경질 캡슐제의 형태로 이용하는 것이 바람직하다.
- [0027] 본 발명의 삼황사심탕을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어 각종 식품류, 캔디, 초코릿, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고 분말, 과립, 정제, 환제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 건강 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 장어 추출물을 함유하는 것 이외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 이때, 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토오스, 수크로오스 등의 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올을 들 수 있다. 또, 상기 향미제로는 천연향미제 예를 들어 타우마틴, 스테비아 추출물, 헤바우디오시드 A, 글리시르히진과 합성 향미제 예를 들어 사카린, 아스파르탐 등을 사용할 수 있다.
- [0029] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 삼황사심탕은 모발 성장과 관련된 다양한 효소와 모발 성장인자의 활성화 촉진 및 모발 억제인자의 발현 감소를 통해 모낭의 성장기를 원활하게 유지해 줌으로써 모발 촉진 효과를 나타낼 뿐 아니라, 천연 추출물로서 부작용이 적은 안전한 소재이므로, 모발 성장 촉진을 위하여 샴푸와 같은 화장품 조성물이나, 기능성 식품 또는 약제로서 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 제모한 등 부위 발모상태를 육안으로 관찰한 것이다.
 도 2 내지 도 5는 절취한 등 부위 피부조직을 H&E로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 것이다.
 도 6은 피부조직 내 ALP의 효소 활성도를 측정한 것이다.
 도 7은 피부조직 내 γ -GT 활성을 주차별로 측정한 것이다.
 도 8은 피부조직의 면역조직학적 관찰을 나타낸 것이다.
 도 9는 KeraskinTM을 이용한 피부일차 자극 평가 결과를 나타낸 것이다.
 도 10은 인공각막을 이용한 안점막 자극시험 평가 결과를 나타낸 것이다.
 도 11은 LLNA법을 이용한 피부 감작성 평가 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이러한 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이러한 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0033] <실시예 1> 삼황사심탕 제조

[0034] 본 실험에서 사용된 실험물질로서 삼황사심탕은 경북 영천 소재의 (주)옵니허브에서 구입하여 사용하였으며, 물로 세척하고 음건 후 대황(42.8g), 황련(28.6g), 황금(28.6g)을 구성비로 섞은 후, 시료 중량대비 10배의 70% 에탄올 가하여 실온에서 24시간 동안 교반 추출하고, 상등액과 침전물을 분리하는 방법을 3회 반복하여 추출하였다. 각 추출물을 여과 농축하여 동결건조 후 올리브 오일에 녹여 각 실험에 사용하였다.

[0035] <실험예 1> In vivo 육모효과 실험

[0036] 1) 실험동물 및 처치

[0037] 6주령 수컷 C57BL/6 마우스를 (주)샘타코로부터 분양받아 사육실에서 1주간 적응과정을 거친 후, 등 부위를 동물용 전기제모기(electric clipper)로 제모하고 난괴법에 의해 군당 10마리씩 4개 군으로 군 분리하여 시료를 1일 1회 150 μ l씩 주 5회 4주간 경피 도포하였다. 실험군은 용매로 올리브 오일을 도포한 대조군(C), 3 중량% 미녹시딜을 도포한 양성대조군(PC), 1 중량% 삼황사심탕을 도포한 실험군1(E1) 및 2 중량% 삼황사심탕을 도포한 실험군2(E2) 군으로 나누어 실험을 실시하였다. 사육실 온도는 22 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C, 습도는 50 $\pm$ 10%, 명암주기 12시간 밤과 낮 단위로 조절되는 표준사육 환경에서 사육하였고 실험기간 동안 사료(Purina, 한국)와 물의 양은 제한 없이 공급하였다. 실험의 모든 과정은 계명대학교 동물실험 윤리위원회의 허가(승인번호 KM-2011-62)를 얻은 후 가이드라인에 의거하여 실험을 진행하였다.

[0038] 실험동물은 2, 4주차에 군당 각각 5마리씩 부검하였으며, 12시간 전부터 절식시킨 후 에테르(ether) 마취하여 비장, 흉선을 적출하여 무게를 측정하였다. 피부조직은 절취하여 조직학적 변화를 보기 위해 10% 포르말린 용액에 고정하였고 일부는 효소 활성 및 유전자 발현 검사에 사용하기 위해 냉동보관 하였다.

[0039] 2) 시료조제 및 도포

[0040] 동결 건조된 시료의 에탄올추출물을 올리브 오일에 녹여 전기제모기로 2cmx4cm로 제모 후 등 부위에 1일 1회 150 μ l씩, 주 6일, 4주간 경피 도포하였다.

[0041] 3) 음수량, 사료량, 체중 및 사료효율 측정

[0042] 음수량, 사료량, 체중 및 사료효율은 매주 1회 오전10시에 측정하였다. 이때, 사료효율(%)은 [체중변동/사료량 X 100]으로 산출하였다.

[0043] 그 결과, 표 1과 같이 일일 체중 증가량에 있어서 양성대조군이 다른 군에 비해 경미하게 높은 수치를 보이긴 하였으나, 통계적 유의성은 없었다($p>0.05$).

표 1

[0044]

항목	실험군			
	C	PC	E1	E2
음수량(ml/day)	5.86 ^{ab}	5.96 ^{ab}	6.04 ^b	5.84 ^a
사료량(g/day)	3.32 ^b	3.28 ^b	2.42 ^a	3.18 ^b
체중변동(g/day)	0.12	0.18	0.15	0.12
사료효율(%)	3.29 ^a	5.65 ^b	5.67 ^b	3.57 ^a

[0045] 4) 장기 무게 측정

[0046] 적출한 비장, 흉선은 생리식염수로 씻어내고 여과지로 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다.

[0047] 그 결과, 표 2와 같이 비장, 흉선의 상대 무게는 모든 군에서 양성대조군에 비해 유의적으로 낮게 관찰되었다($p<0.05$). 절대무게의 경우 비장은 양성대조군이 다른 군에 비해 높았으나 흉선은 실험군1에 비해 높게 나타났다($p<0.05$).

표 2

[0048]

항목	실험군			
	C	PC	E1	E2
비장	0.063 ^{1)a}	0.090 ^b	0.070 ^a	0.064 ^a
	0.266 ^{2)a}	0.354 ^b	0.282 ^a	0.272 ^a
흉선	0.050 ^a	0.060 ^b	0.050 ^a	0.053 ^a
	0.215 ^{ab}	0.238 ^b	0.201 ^a	0.226 ^{ab}

[0049] 5) 육안적 관찰

[0050] 제모한 등 부위의 발모상태를 보기 위해 실험 1, 2, 3, 4주차에 주 1회 에테르 마취 후 사진 촬영하였다. 각 군의 모발성장 효과는 각각의 동물을 육안으로 관찰하여 발모 정도에 따라 0-19%(-), 20-39%(±), 40-59%(+), 60-79%(++), 80-100%(+++)로 판정하였으며, 각 군별로 평균치를 산정하였다.

[0051] 그 결과, 표 3 및 도 1과 같이 실험 1주차에는 모발이 자라지 않았으나 실험 2주차부터 양성대조군과 실험군2, 실험군1, 대조군 순으로 등 부위에서 털이 조금씩 자라는 것이 관찰되었다. 특히 양성대조군과 실험군1, 실험군2에서는 털이 자라는 모습이 뚜렷하게 관찰되었다. 실험 3주차에는 모든 군의 마우스 등 부위에서 털이 자라는 것을 관찰할 수 있었으며 양성대조군과 실험군1은 40% 이상의 모발성장을 보이기 시작하였다. 실험 4주차에는 양성대조군 90%, 실험군2에서 52%의 모발성장을 보였으며 실험군1에서도 38%의 모발성장이 나타났다. 반면 대조군은 다른 군에 비해 미미한 모발성장(20%)을 보였다($p<0.05$).

표 3

[0052]

주차	실험군			
	C	PC	E1	E2
1	-	-	-	-
2	-	+	-	-
3	-	++		
4		+++	+	++

6) 털 길이 및 털 무게

제모한 등 부위의 발모상태에서 실험 2, 4주차에 털을 뽑아 털 길이와 털 무게를 측정하였다.

그 결과, 표 4와 같이 실험 2주차에서의 털 길이는 실험군2, 실험군1, 양성대조군, 대조군순으로 등 부위 털이 긴 것으로 관찰되었고 유의성은 나타나지 않았다. 실험 4주차에서의 털 길이에 있어 대조군에 비해 시험물질 처치군에서 유의성이 관찰되었고 실험군1, 양성대조군, 실험군2, 대조군 순으로 등 부위 털이 긴 것으로 관찰되었다. 털 무게에 있어서는 실험 2주차에서는 털이 많이 길지 않아서 무게가 측정되지 않았고, 실험 4주차에서는 대조군에 비해 시험물질 처치군에서 유의성은 없었지만 증가되는 양상이 관찰되었고 양성대조군은 유의한 증가가 관찰되었다($p<0.05$).

표 4

주차		실험군			
		C	PC	E1	E2
털길이(mm)	2	1.889	2.000	2.667	3.000
	4	5.083 ^a	7.400 ^b	7.533 ^b	6.467 ^b
털무게(mg)	4	3.400 ^a	67.600 ^b	9.400 ^a	8.800 ^a

7) 조직학적 관찰

실험 2, 4주차에 절취한 피부조직을 10% 중성 포르말린용액에 24시간 고정한 다음 통상적인 방법에 따라 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매 하였다. 포매 된 조직을 두께 4 μ m로 절편을 만들어 hematoxylin and eosin(H&E) 염색한 후 100배율 광학현미경으로 모낭 수를 계수하고, 진피의 두께와 모낭 깊이의 변화는 현 미경 프로그램의 scale bar를 이용하여 측정하였고, 그 결과는 도 2 내지 도 5에 나타내었다.

100배율에서 육안적으로 확인된 모낭의 수는 2주차에서 양성대조군이 대조군에 비해 189% 유의하게 증가하였고, 실험군1과 실험군2는 각각 48%, 56% 유의하게 증가하였다(도 2 참조). 4주차에서는 양성대조군이 대조군에 비해 91% 유의하게 증가하였고, 실험군1과 실험군2에서는 각각 36%, 51% 유의하게 증가하였다($p<0.05$).

모낭깊이(μ m)에 있어서 100배율에서 scale bar를 이용하여 측정한 결과 2주차에서 양성대조군이 대조군에 비해 120% 유의하게 증가하였으며, 실험군1과 실험군2는 각각 112%, 112% 유의하게 증가하였다(도 3 참조). 4주차에서는 양성대조군이 대조군에 비해 114% 유의하게 증가하였고 실험군1과 실험군2에서는 각각 대조군에 비해 62%, 104% 유의하게 증가하였다($p<0.05$).

진피 피부두께(μ m)를 100배율에서 scale bar를 이용하여 측정한 결과 2주차에서 양성대조군이 대조군과 유사하였으며, 실험군1과 실험군2는 각각 대조군에 대해 88%, 101% 수준이었다. 그리고 4주차에서 대조군에 비해 양성대조군이 98%였고, 실험군1과 실험군2에서는 98%, 110% 수준이었다. 진피두께에서는 실험군간 유의적 차이가 발견되지 않았다(도 4 참조).

대조군에 비해 양성대조군> 실험군2> 실험군1 순으로 모낭의 수와 진피두께, 모낭깊이가 더 많이 성장된 것을 관찰할 수 있었고 4주차에서 모낭수가 가장 많아지고 진피두께, 모낭깊이도 가장 많이 두꺼워짐을 알 수 있었다(도 5 참조).

8) 피부조직의 효소활성도 측정

i) 알칼린 포스파타제(Alkaline phosphatase; ALP)

실험 2, 4주차에 피부조직을 절취하여 빙냉하에서 미세절편으로 만들고, 그 중 일정량을 칭량한 후, 피부조직의 4배량의 인산완충용액(phosphate buffer solution, PBS)을 가하여 마쇄기(homogenizer)를 이용하여 균질액을 만들었다. 이 균질액을 원심분리기를 이용하여 4℃에서 12,000rpm으로 20분간 원심 분리하여 그 상층액을 자동 생화학 분석기를 이용하여 분석하였다.

그 결과, 도 6과 같이 2주차에서 대조군에 비해 양성대조군이 가장 높은 활성을 나타내었고, 실험군1, 실험군2는 유의성을 나타내지 않았다. 4주차에서는 양성대조군이 대조군에 비해 64%, 실험군1과 실험군2는 각각 32%, 39%로 통계적으로 유의하게 높았다($p<0.05$). ALP 활성은 주차별로 증가하는 경향을 보였으며, 2주차, 4주차 모

두 양성대조군> 실험군2> 실험군1> 대조군 순으로 높은 활성을 보였다.

[0067] ii) γ -글루타밀 트랜스펩티다제(γ -Glutamyl transpeptidase; γ -GT)

[0068] 실험 2, 4주차에 피부조직을 절취하여 병냉하에서 미세절편으로 만들고, 그 중 일정량을 칭량한 후, 피부조직의 4배량의 PBS를 가하여 마쇄기를 이용하여 균질액을 만들었다. 이 균질액을 원심분리기를 이용하여 4℃에서 12,000rpm으로 20분간 원심 분리하여 그 상층액을 자동생화학 분석기를 이용하여 분석하였다.

[0069] 그 결과, 도 7과 같이 2주차에서 양성대조군은 대조군에 비해 약 37% 유의하게 높은 활성을 나타낸 반면, 실험군1과 실험군2에서는 유의성이 없었다. 4주차에서는 양성대조군이 대조군에 비해 61%, 실험군1과 실험군2는 각각 28%, 37% 유의하게 높았다($p<0.05$). γ -GT 활성은 주차별로 증가하는 경향을 보였으며, 4주차에 특히 양성대조군과 실험군1과 실험군2 모두 대조군에 비해 높은 활성을 보였다. 또한 2주차, 4주차 모두 양성대조군> 실험군2> 실험군1> 대조군 순으로 높은 활성을 보였다.

[0070] 9) 피부조직의 면역조직학적 관찰

[0071] 실험 2, 4주차에 절취한 피부조직을 10% 중성포르말린용액에 고정한 다음 통상적인 방법에 따라 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매 하였다. 포매 된 조직을 두께 3 μ m로 절편을 만들어 전자동 면역 염색기를 이용하여 기기의 매뉴얼에 맞춰 조직을 면역염색 하였다. 측정을 위해 Ventana Ultraview DAB Kit를 사용하였다.

[0072] 면역 조직 염색에 사용된 항체는 성장인자로 IGF-1, VEGF를 사용하였고, 억제인자로 TGF- β 1, Caspase-3을 사용하였다.

[0073] 피부조직의 면역조직학적 관찰 결과는 표 5와 도 8에 나타내었다. 즉, 면역염색을 통해 관찰한 모발성장인자인 IGF-1과 VEGF의 염색정도를 점수화 하였을 때 양성대조군과 실험군2에서 높은 수치로 평가되었고, 양성대조군을 포함한 시험물질 처치군에서 짙고 뚜렷한 양성반점이 다수 관찰되었고 대조군에서는 거의 관찰되지 않았다. 모발성장억제인자인 TGF- β 1과 Caspase-3의 염색정도를 점수화 하였을 때 대조군에 비해 양성대조군 및 실험군에서 수치가 낮아지는 경향으로 평가되었고, 대조군에서 다수 관찰된 짙고 뚜렷한 양성반점이 시험물질 처치군에서는 거의 관찰되지 않았다.

표 5

[0074]

	실험군			
	C	PC	E1	E2
IGF-1	-	++	+	++
VEGF	-	+	+	+
TGF-1	++			+
Caspase-3	++			+

[0075] <실험예 2> 안전성 평가

[0076] 1) KeraskinTM을 이용한 피부일차 자극 평가

[0077] KeraskinTM을 PBS에 1회 세척한 후 0.9ml의 배지(Keraskin assay media)가 있는 6 well plate에 옮긴 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 22 ± 2시간 post-incubation 시켰다. KeraskinTM insert 내부에 시험물질인 삼황사심탕을 올리브 오일에 1 중량%, 2 중량% 녹여 물질 30 μ l를 적용 후 나일론 메쉬를 이용해 물질을 접촉 면적을 넓혔다. 물질처리 시간은 45분이며, 물질처치가 끝난 후 세척을 실시하였다. PBS 10ml로 KeraskinTM insert 내부를 overflowing 2회 반복하여 물질 및 메쉬를 제거하고 12 well plate에 KeraskinTM insert를 넣고 4 ml의 PBS로 overflowing하여 1분간 정제 후 PBS 10ml로 insert 안팎을 2회 세척하였다. 마이크로피펫을 이용하여 주변 PBS 및 물질 제거 후 각 well 당 0.9ml 배지를 분주한 6 well plate에 KeraskinTM insert를 넣고 37℃, 5% CO₂ 조건으로 42 ± 2시간 post-incubation을 실시하였다. 세포생존율을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하여 세포생존율 50% 이하 일 때 자극성으로 판정하였다.

[0078] 도 9에 도시된 바와 같이, 자극물질로 알려진 SLS(Sodium lauryl sulfate, 20%)는 50%보다 훨씬 낮은 세포생존

을로 자극물질로 확인되었고 비 자극물질로 알려진 PBS와 시험물질인 1 중량%, 2 중량% 삼황사심탕은 세포생존율이 50% 이상으로 피부일차 자극을 유발하지 않은 것으로 확인되었다.

[0079] **2) 인공각막을 이용한 안점막 자극시험 평가**

[0080] 인공각막모델을 PBS에 1회 세척한 후 0.9ml의 배지가 있는 6 well plate에 옮긴 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 22 ± 2시간 pre-incubation 시켰다. 시험물질인 삼황사심탕을 올리브 오일에 1 중량%, 2 중량% 녹여 물질 40μl를 10분간 적용 후 세척을 실시하였다. PBS 10ml로 인공각막모델 insert 내부를 overflowing 후 12 well plate에 인공각막모델 insert를 넣고 4ml의 PBS로 overflowing하여 1분간 정체 후 PBS 13ml로 insert 안팎을 1회 세척하였다. 마이크로피펫을 이용해 주변 PBS 및 물질 제거 후 6 well plate에 0.9ml 배지를 분주 후 인공각막모델 insert를 넣고 37℃, 5% CO₂ 조건으로 16 ± 1시간 post-incubation을 실시하였다. 세포생존율을 측정하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포생존율 50% 이하일 때 자극성으로 판정하였다.

[0081] 도 10에 도시된 바와 같이, 자극물질로 알려진 SLS(Sodium lauryl sulfate, 1%)는 50%보다 낮은 세포생존율로 자극물질로 확인되었고 비 자극물질로 알려진 PBS와 시험물질인 1 중량%, 2 중량% 삼황사심탕은 세포생존율이 50% 이상으로 안점막 자극을 유발하지 않은 것으로 확인되었다.

[0082] **3) LLNA법을 이용한 피부 감작성 평가**

[0083] 7주령 암컷 BALB/c 마우스를 오리엔트바이오에서 분양받아 사육실에서 1주간 적응과정을 거친 후, 군당 3마리씩 4개군으로 나누어 대조군(PBS), 삼황사심탕 0.1 중량%, 1 중량%, 2 중량%를 1일 1회 3일 동안 연속해서 각 용량별로 양쪽 귀에 각각 25μl씩 분할 도포하여 감작시킨 후 2일 후 부검을 실시하였다. 시험물질에 의한 림프절세포의 증식정도를 평가하기 위해 부검 24시간 전에 5-Bromo-2'-deoxy-uridine(BrdU)를 PBS에 녹여 100mg/kg으로 복강주사 하였다. BrdU 투여 24시간 후, 부검하여 양쪽 이개 림프절을 개체별로 채취해 flow cytometry 분석을 하였다. 사육실 온도는 22 ± 3℃, 습도는 50 ± 10%, 명암주기 12시간 밤과 낮 단위로 조절되는 표준사육 환경에서 사육하고 실험기간 동안 물과 사료(Purina, 한국)의 양은 제한 없이 공급하였다.

[0084] 부검하여 분리한 이개 림프절은 1ml PBS에 담근 후, 70μm nylon cell strainer를 이용하여 단일세포(LNCs)로 분리하여 세포 수 측정을 통해 1 X 10⁶ cell/ml로 맞춰주고 BD BrdU Flow Kits 매뉴얼에 따라 세포를 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 BrdU 증식능 정도를 분석하였다.

[0085] 자극지수(Stimulation index, SI)는 시험물질군의 세포수와 flow cytometry를 이용해 측정된 BrdU 증식능 정도를 곱한 값을, 대조군의 BrdU 증식능으로 나눠주어 개체별 자극지수를 구한 후, 군별 평균값으로 나타내었다. 군별 자극지수를 구하는 식은 아래와 같다.

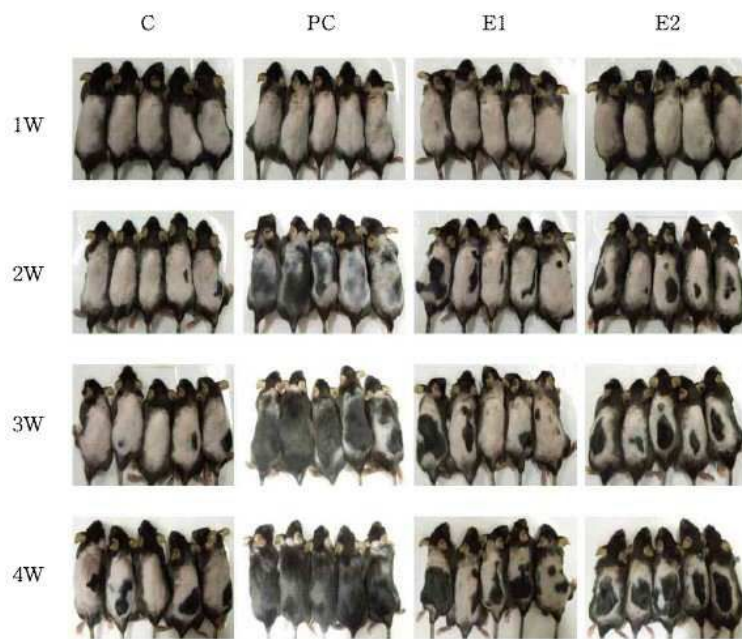
$$\text{자극지수 (SI)} = \frac{\text{Mean of BrdU incorporation cell in test group}}{\text{Mean of BrdU incorporation cell in vehicle group}}$$

[0086] [0087] 도 11에 도시된 바와 같이, 피부 감작성 유발물질로 알려져 있는 PPD의 경우 모든 농도에서 자극지수 3 이상의 수치를 보여 피부 감작성을 확인하였고, 삼황사심탕의 경우 모든 농도에서 자극지수가 3 이하의 수치를 보여 피부 감작성을 유발하지 않은 것으로 확인되었다.

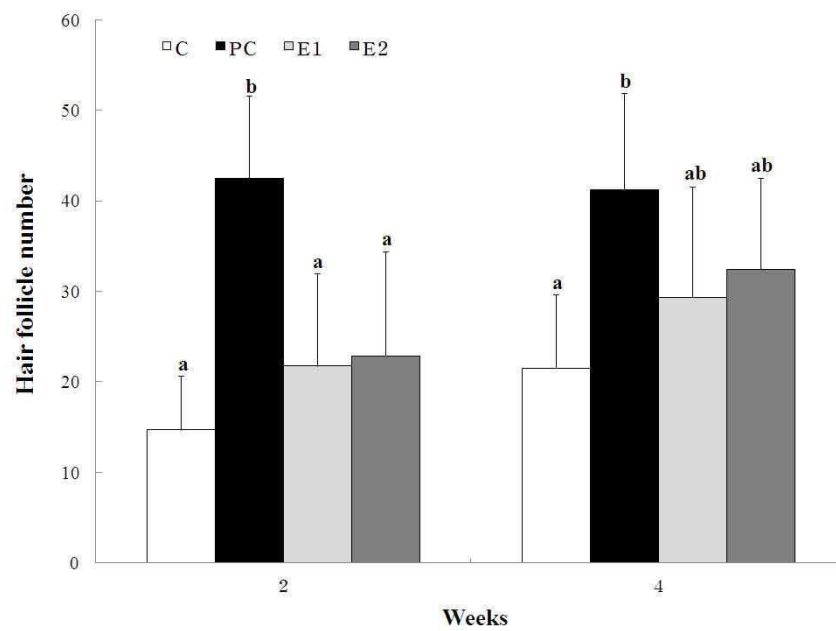
[0088] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

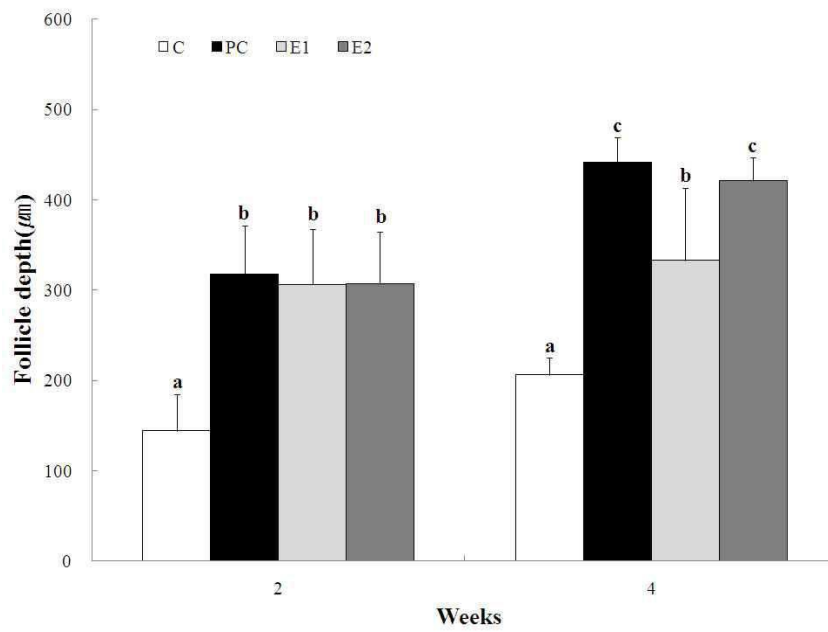
도면1



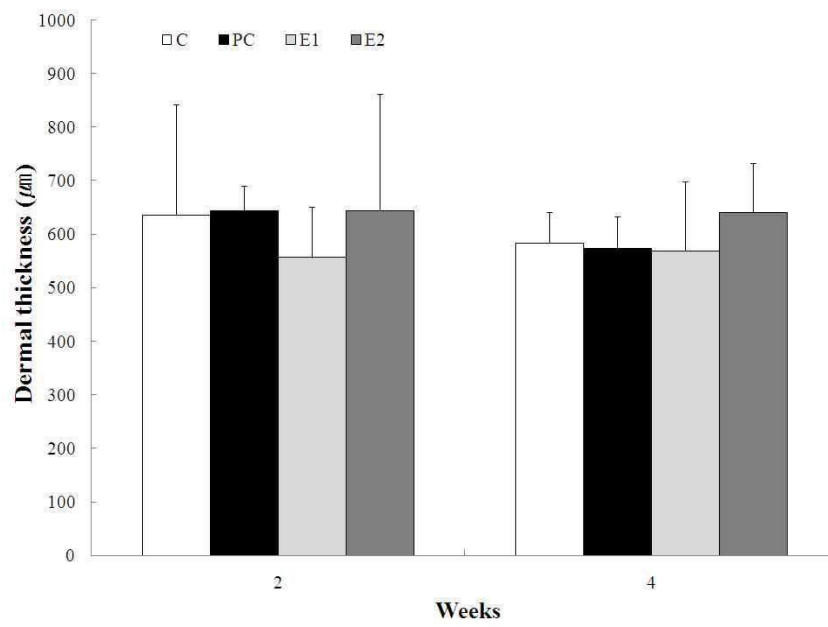
도면2



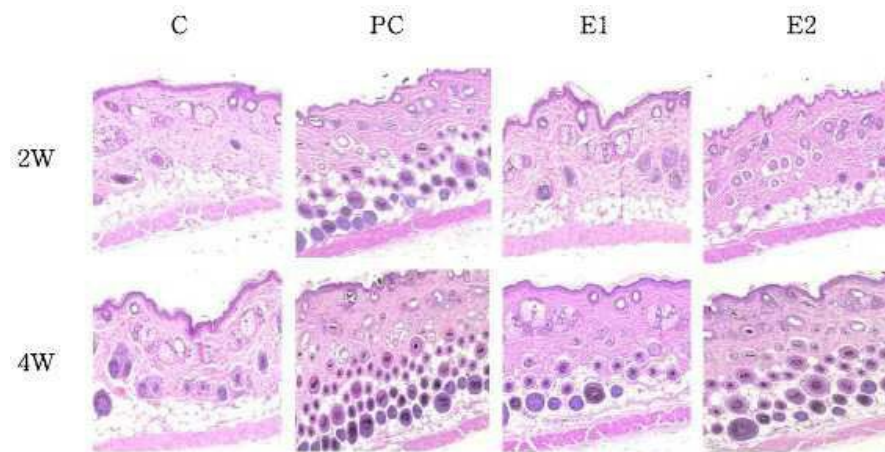
도면3



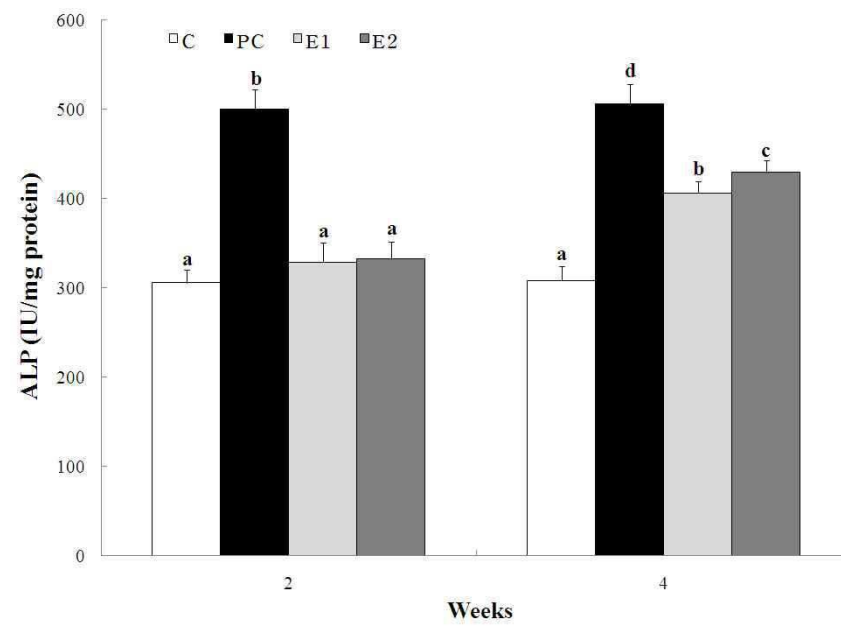
도면4



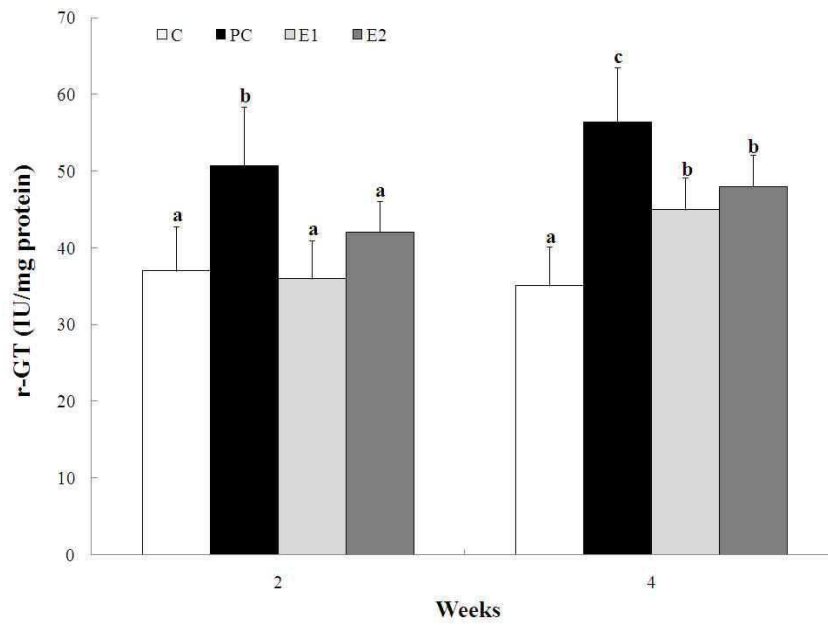
도면5



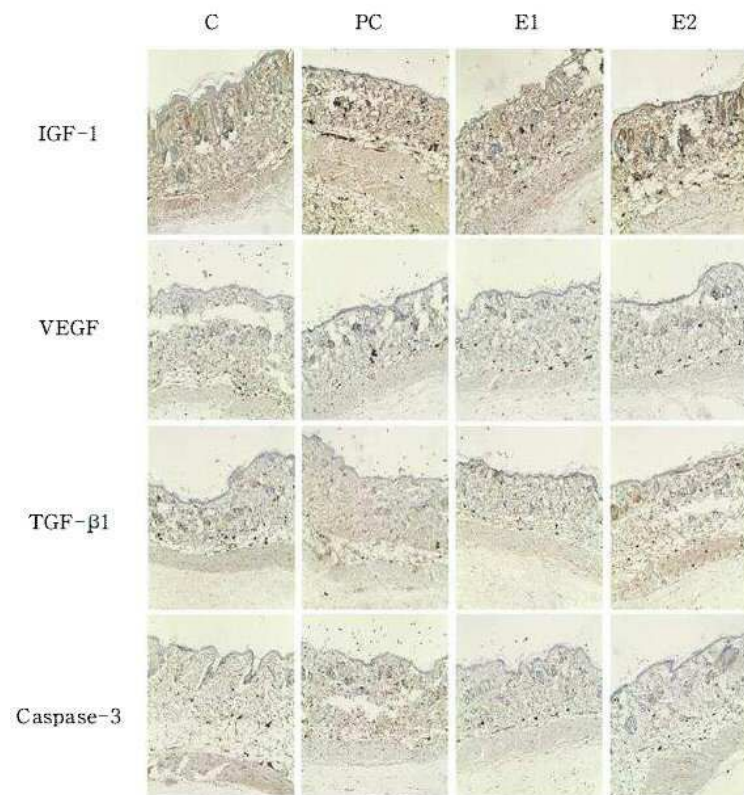
도면6



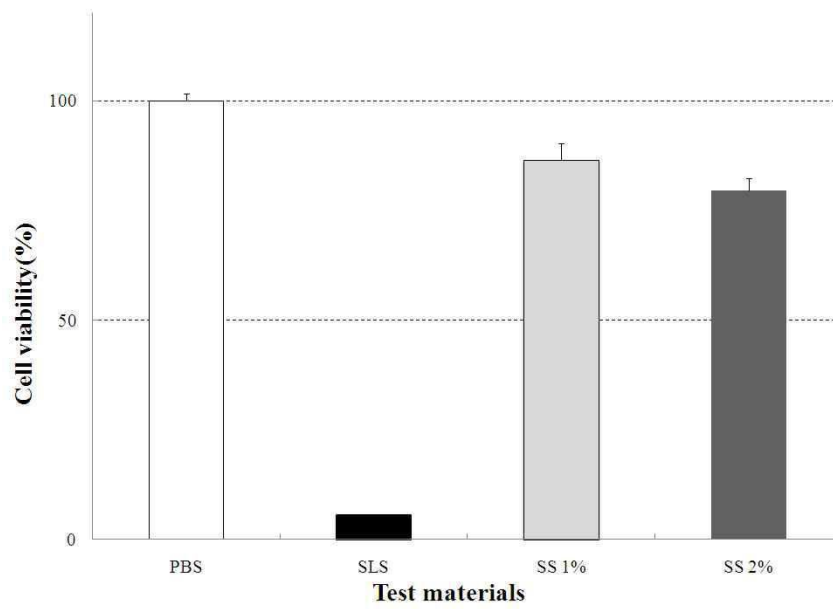
도면7



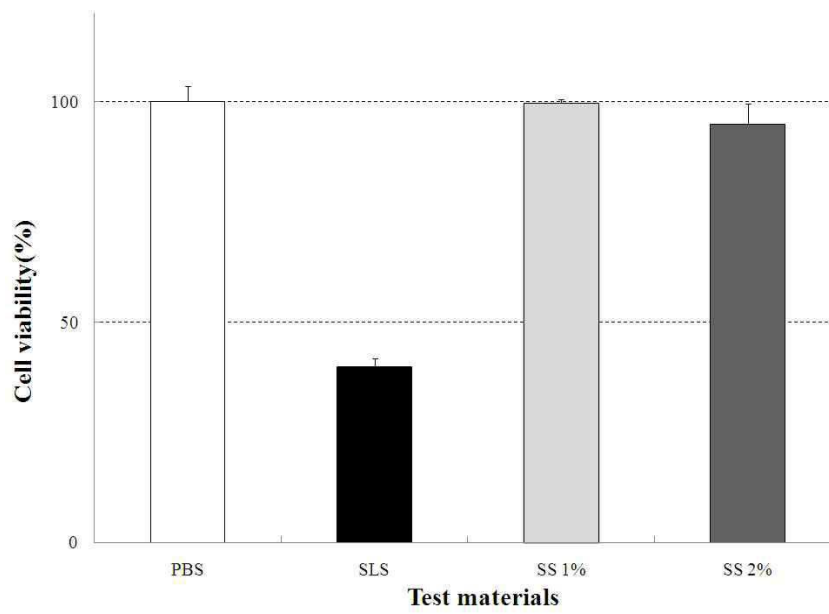
도면8



도면9



도면10



도면11

