



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2013-0130573

(43) 공개일자

2013년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/03 (2006.01) A61K 35/56 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0054488

(22) 출원일자

2012년05월22일

심사청구일자

2012년05월22일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

최병대

경상남도 통영시 진남2길 43-10 장원썬비치 905호

몽크자칼

경상남도 통영시 한실7길 1-6 게스트원룸 301호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정홍식, 김태현, 이현수

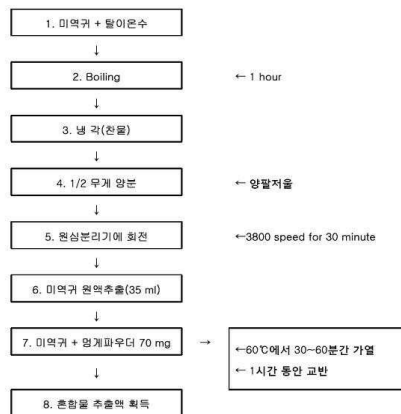
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 미역귀와 멧게껍질 혼합물 추출액을 포함하는 아토피성 피부염 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 혼합물 추출액을 포함하는 아토피성 피부염 개선용 조성물에 관한 것으로, 미역귀 추출물의 항염증 효과와 멧게껍질 정제물의 세포재생 효과가 상호 상승작용을 통해 우수한 아토피성 피부염의 개선효과를 나타낸다. 본 발명의 조성물은 사이토카인의 생성억제에는 관여하지는 않았지만, 염증생성을 억제함과 동시에 피부를 재생시키는 효과를 통해 효능을 나타내는 것으로 추측된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김명숙

부산광역시 북구 화명신도시로 48 현대2차아파트
201동 1102호

정성훈

경상남도 고성군 고성읍 성내로 24-54 하이캐슬 4
차 707호

박시향

경상남도 통영시 한실4길 18

최순옥

경상남도 통영시 무전8길 22-16 진우하이빌2차 40
9호

특허청구의 범위

청구항 1

미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 혼합물 추출액을 포함하는 아토피성 피부염 개선용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미역귀 추출물은 열수 추출물인 것을 특징으로 하는, 아토피성 피부염 개선용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 미역귀 추출물은 후코이단을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는, 아토피성 피부염 개선용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 미역귀 추출물은 기장산 미역귀 또는 통영산 미역귀를 원료로 하는 것을 특징으로 하는, 아토피성 피부염 개선용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 멧게껍질 정제물은 멧게껍질의 건조분말인 것을 특징으로 하는, 아토피성 피부염 개선용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 멧게껍질 정제물은 글리코사미노글리칸을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는, 아토피성 피부염 개선용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 혼합비는 1:0.5 내지 1:4 인 것을 특징으로 하는, 아토피성 피부염 개선용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

식품학적 조성물, 화장학적 조성물, 또는 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는, 아토피성 피부염 개선용 조성

물.

청구항 9

하기 단계들을 포함하는 아토피성 피부염의 개선 효능을 갖는 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 혼합물 추출액의 제조방법:

- 1) 미역귀와 멧게껍질을 건조 및 파쇄하여 분말을 얻는 단계;
- 2) 상기 1)에서 얻은 미역귀 분말을 물에 넣고 중탕한 후 원심분리하여 미역귀 추출물을 얻는 단계; 및
- 3) 상기 2)에서 얻은 미역귀 추출물과 상기 1)에서 얻은 멧게껍질 분말을 혼합한 후 가열 및 교반하여 혼합물 추출액을 얻는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 단계1)에서 건조는 1 내지 5 일간 대기 중에서 자연건조 한 후 80 내지 150 ℃ 온도 건조기에서 0.5 내지 4시간 동안 건조하는 것을 특징으로 하는, 혼합물 추출액의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 단계2)에서 물은 탈이온수인 것을 특징으로 하는, 혼합물 추출액의 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 단계3)에서 40 내지 80℃에서 10 내지 120 분간 가열한 후 300 내지 700 rpm의 속도로 0.5 내지 3시간 동안 교반하는 것을 특징으로 하는, 혼합물 추출액의 제조방법.

명 세 서

기술 분야

[0001] 본 발명은 미역귀와 멧게껍질의 혼합물 추출액을 포함하는 아토피성 피부염 개선용 조성물 및 상기 미역귀와 멧게껍질의 혼합물 추출액의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아토피성 피부염은 피부염증과 색소침착, 간지러움 등의 고통 외에도, 잦은 재발로 인한 치료 시간의 증가로 정신적 스트레스를 안고 살아가기 때문에 정신적으로 삶의 질이 현저히 떨어져 있고, 또한 잘못 전달된 아토피 피부염 치료정보가 스테로이드 제제의 불신으로 이어져 여러 민간요법 및 이차적 치료법을 찾다보니 환자들의 삶의 질을 떨어뜨리는 비용적 요인으로 작용하고 있기도 하다.

[0003] 이러한 아토피 피부염을 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.

[0004] 그러나, 상기 스테로이드 제제는 표피의 성장억제나 부작용 등의 역효과를 유발할 수 있으며, 우레아 퍼록사이

드 등은 피부의 과다 자극을 야기할 수 있고, 항히스타민제 등의 항생물질은 균의 내성 및 광과민 등의 부작용을 유발할 가능성이 높은 문제점이 있다.

[0005] 아토피 피부염의 정확한 병리 생리는 아직까지 완전히 이해되고 있지 않지만 유전적 소인과 함께 면역학적, 비면역학적 기전이 관여한다고 보고되어 있다. 아토피 피부염의 대부분을 차지하는 외인성 아토피 피부염은 면역글로브린 E (IgE)와 연관된 면역기전에 의해 발생되는데 특정 알러젠(allergen)에 대한 즉시형 면역 반응보다는 T세포 이상에 의한 지연성 면역 반응이 관여한다는 보고들이 많다.

[0006] 또한, 요즘은 B세포로부터 IgE의 생성을 유도하는 인터루킨(IL)-4 등 Th2 관련 사이토카인(cytokine)들이 아토피 피부염의 원인이라고 보고되고 있다. 그러므로 아토피 피부염의 가장 큰 문제는 면역기능의 비정상적인 활성화로 염증반응이 항진되어 사이토카인의 발생이 증가하는 것이다.

[0007] 최근의 연구에서 피부세포막에 존재하는 단백질분해효소 활성화 수용체인 프로티네이즈-활성화 리셉터-2(proteinase-activated receptor-2; PAR-2)의 발현이 증가하고 활성화되면 세포내의 I κ B kinase (IKK) --> nuclear factor kappa B (NF- κ B)의 기전을 활성화시켜 염증반응을 증가시키고, 그 결과 다양한 염증물질인 사이토카인(tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6, IL-10)과 시클로옥시게나아제(COX)-2, 사이토카인-inducible nitric oxide synthases (iNOS), adhesion molecules의 발현을 증가시켜 아토피 피부염을 악화시키는 것이 보고되었다.

[0008] 즉, PAR-2 활성화는 피부염증과 색소침착, 간지러움 등을 유발하므로 이것을 억제하는 것이 아토피 피부염의 호전에 도움이 될 것으로 생각된다. 최근 연구에 따르면 PAR-2 억제제가 임상에서 국소도포제로 사용되었을 때 아토피 피부염을 임상적으로 호전시킨다는 것이 보고되어서, PAR-2 억제제가 국소도포제로 개발될 수 있는 가능성을 보여 주기도 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 천연 추출물로서 항염증 효과 및 세포재생 효과를 나타내는 미역귀와 멧게껍질 추출물을 포함하는 아토피성 피부염의 치료 및 개선에 유용한 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 혼합물 추출액을 포함하는 아토피성 피부염 개선용 조성물을 제공한다.

[0011] 일 예에서, 상기 미역귀 추출물은 열수 추출물일 수 있으며, 유효성분으로서 후코이단을 함유할 수 있다. 바람직하게는 탈이온수로 열수 추출한 추출물일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 유효성분으로서 후코이단을 포함하는 것이라면 알코올 추출과 같은 공지의 다양한 추출법을 통해 얻은 추출물일 수도 있다.

[0012] 일 예에서, 상기 미역귀는 부산시 기장에서 얻은 기장산 미역귀 또는 경남 통영시에서 얻은 통영산 미역귀일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 경남 통영시 한산면 용초도와 부산시 기장에서 양식된 것을 사용하였다.

[0013] 일 예에서, 상기 멧게껍질 정제물은 멧게껍질의 건조분말일 수 있고, 유효성분으로서 글리코사미노글리칸을 함유하는 것일 수 있다. 그러나, 효성분으로서 글리코사미노글리칸을 포함하는 것이라면 알코올 추출과 같은 공지의 다양한 추출법을 통해 얻은 추출물일 수도 있다.

[0014] 일 예에서, 상기 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 혼합비는 1:0.5 내지 1:4인 것이 바람직하다.

[0015] 일 예에서, 본 발명의 아토피성 피부염 개선용 조성물은 다양한 용도로 이용될 수 있는바, 예를 들어 식품학적 조성물, 화장학적 조성물, 또는 의약학적 조성물일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 단계들을 포함하는 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 혼합물 추출액의 제조방법을 제공한다.

[0017] 1) 미역귀와 멧게껍질을 건조 및 파쇄하여 분말을 얻는 단계;

[0018] 2) 상기 1)에서 얻은 미역귀 분말을 물에 넣고 중탕한 후 원심분리하여 미역귀 추출물을 얻는 단계; 및

[0019] 3) 상기 2)에서 얻은 미역귀 추출물과 상기 1)에서 얻은 멧게껍질 분말을 혼합한 후 가열 및 교반하여 혼합물

추출액을 얻는 단계.

[0020] 일 예에서, 상기 단계1)에서 건조는 1 내지 5 일간 대기 중에서 자연건조 한 후 80 내지 150℃ 온도 건조기에서 0.5 내지 4시간 동안 건조하는 2단계 건조과정을 거칠 수 있다.

[0021] 일 예에서, 상기 단계2)에서 물은 탈이온수일 수 있다.

[0022] 일 예에서, 상기 단계3)에서 40 내지 80℃에서 10 내지 120 분간 가열한 후 300 내지 700 rpm의 속도로 0.5 내지 3시간 동안 교반할 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 아토피성 피부염 개선용 조성물은 후코이단을 유효성분으로 포함하는 미역귀 추출물과 글리코사미노글리칸 함유 멧게껍질 정제물을 혼합/추출한 추출액을 포함하는바, 미역귀 추출물의 항염증 효과와 멧게껍질 정제물의 세포재생 효과가 상호 상승작용을 통해 우수한 아토피성 피부염의 개선효과를 나타낸다.

[0024] 본 발명의 조성물은 사이토카인의 생성억제에는 관여하지는 않았지만, 염증생성을 억제함과 동시에 피부를 재생시키는 효과를 통해 효능을 나타내는 것으로 추측된다. 또한, 본 발명의 조성물은 천연물질이므로 독성이 없고 장기간 사용에도 안전한 이점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 일 예에 따른 혼합물 추출액의 제조과정의 순서도이다;

도 2 내지 도 5는 본 발명의 실험예 1에 따른 아토피성 피부염의 치료 전, 후의 비교사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 하기의 정의를 가지며 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미에 부합된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0027] 용어 "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0028] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 구성요소, 또는 단계 또는 구성요소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 구성요소, 또는 단계 또는 구성요소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.

[0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0030] 아토피성 피부염 개선용 조성물

[0031] 본 발명에 따른 아토피성 피부염 개선용 조성물은 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 혼합물 추출액을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0032] 상기 미역귀는 갈조류 곤포과에 속하는 미역의 포자엽으로 항균, 항암 등의 기능성 식품으로서 개발 가능성이 높은 물질로 밝혀지고 있으며, 최근 미백 및 황산화 활성화에 관한 연구가 많이 이루어짐을 보고하고 있어 다양한 생리활성을 기대할 수 있을 것이라 사료된다. 특히, 후코이단(Fucoidan)과 같은 해조다당류의 미백활성에 관한 연구가 많이 이루어지고 있고, 미역귀에는 다시마(2.71%)에 비해 3배 정도 높은 6.65% 푸코이단이 함유된 것으로 보고되어 있다.

[0033] 또한, 본 발명자들의 최근 연구에서 멧게껍질이 유효성분으로서 글리코사미노글리칸을 함유하고 있고, 이러한 멧게껍질 정제물은 피부 자극이 없으면서 피부의 주름 개선과 관련된 콜라게나아제 활성 저해 효과, 콜라겐 생성 촉진, 세포재생 활성이 우수하여 피부 주름 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 밝힌 바 있다.(특허 출원 10-2012-0045314)

- [0034] 이에, 본 발명자들은 면역증강, 항균, 항암효과를 가진 미역귀의 후코이단과 노화방지 및 보습효과를 가진 멧게 껍질의 글리코사미노글리칸을 혼합한 혼합 추출액을 in vitro, in vivo에서 생리활성을 평가함과 동시에 아토피 성 피부질환자의 피부에 도포하여 나타나는 피부의 상태변화를 평가하였다.
- [0035] 그 결과, 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물질이 사이토카인의 생성억제에는 관여하지는 않았지만, 미역귀 추출물이 항염증 효과를 보였고 멧게껍질 GAG가 세포재생 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명의 조성물은 사이토카인을 억제하는 기작보다는 염증생성을 억제함과 동시에 피부를 재생시키는 효과가 더 뛰어난 것으로 여겨진다.
- [0036] 또한 본 발명의 발명자들은 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 최적의 혼합비를 찾아냈다. 혼합비는 1:0.5 내지 1:4, 바람직하게는 1:1 내지 1:2, 특히 바람직하게는 약 1:1로 포함될 수 있다. 미역귀 추출물 대비 멧게 껍질 정제물의 비가 0.5 미만인 경우 염증생성 억제 및 피부 재생 효과가 약하며, 미역귀 추출물 대비 멧게 껍질 정제물의 비가 4 를 초과하더라도 4 이하인 경우와 비슷한 효과를 내므로 멧게껍질 정제물의 비율을 높일 경제 적 이유가 낮기 때문이다.
- [0037] 또한, 본 발명이 조성물은 식품학적 조성물, 화학학적 조성물, 또는 약제학적 조성물 등에도 다양하게 사용될 수 있어, 그 사용범위에 특별한 제한을 받지 않는다.
- [0038] 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 비히클(vehicle), 희석제(diluent), 부형제(excipient), 또는 이들의 조합을 포함하여 제조할 수 있다.
- [0039] 상기 비히클은 세포 또는 조직내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 상기 약제학적으로 허용되는 비히클로는 예를 들어, 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분 적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염 화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 등이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 또한, 상기 비히클은 본 발명의 유효성분과 양립가능해야 하며, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트 로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있고, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- [0041] 상기 희석제는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염 은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다.
- [0042] 상기 부형제는 예를 들어, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등의 고형 제제용 부형제, 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등을 포함하는 개념이다
- [0043] 필요에 따라, 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 성분으로서, 습윤제(wetting agent), 완충제, 현탁화제, 윤활제(lubricationg agent), 에멀전화제, 붕해제, 흡수제, 보존제, 계면활성제, 착색제, 풍미제(flavorant), 감미제(sweetener), 및 추가적인 치료제 중에서 선택된 1종 이상의 첨가제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 경구, 경피, 정맥내, 국소(topically), 흡입, 또는 직장으로 피험자에게 전달되며, 전달은 지속 방출(sustained release)에 의한 것일 수도 있다. 상기 약제학적 조성물은 캡슐, 정제, 분말, 과립제, 시럽, 주사가능한 유체, 크림, 연고, 친수성 연고, 흡입성 유체(inhalable fluids), 및 좌약으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법에 의해 투여될 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 당업자에게 알려진 모든 수단에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 경구, 비경구, 흡입 스프레이, 국소, 직장 투여, 비강, 협측(buccally), 질, 또는 매식 저장소(implanted reservoir)를 통하여 투여될 수 있다. 여기에서 사용되는 "비경구적"이란 용어는 피하, 복막내, 수막강내, 정구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 장관, 설하 및 주입 기술을 포함한다. 정확한 투여 프로토콜은 환자의 연령, 체중, 전반적인 건강상태(general health), 성별, 및

식이(diet)를 포함하는 다양한 인자에 의존하여 변경되며; 특정한 투여 절차의 결정은 이 분야의 당업자에게 일상적인 것이다.

- [0046] 본 발명의 약제학적 조성물은 일회량, 다중 분할 투여량(multiple discrete doses), 또는 연속 주입에 의해 투여될 수 있다. 펌프 수단, 특히, 피하 펌프 수단은 연속 주입에 유용하다.
- [0047] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 혼합물 추출액의 유효용량은 농도 의존적이나 바람직하게는 0.1 mg 내지 1,000 mg/kg이고, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 500 mg/kg이며, 하루 1 - 6회 투여할 수 있다. 따라서, 성인 체중 1 kg 당 0.1 ~ 6,000 mg/일 범위로 투여될 수 있다.
- [0048] 임의의 투여량 수준은 사용되는 특정 화합물의 활성 및 가능한 독성; 환자의 연령, 체중, 전반적 건강 상태, 성별, 및 식이(diet); 투여 시간; 배출 속도; 약물 조합; 질병의 심각성; 및 투여의 형태를 포함하는 다양한 인자에 의존하여 변경될 수 있다.
- [0049] 전형적으로, 시험관내의 용량-효과 결과는 환자 투약을 위한 적당한 투여량에 대한 유용한 가이드라인을 제공한다. 또한, 동물 모델에서 연구는 유용하다. 적당한 투여량 수준을 결정하기 위하여 고려할 사항들은 이 분야에 잘 알려져 있으며, 일반적인 의사가 갖는 기술에 속한다.
- [0050] 시간을 규칙적이 되게 하며 약물 전달의 연속을 위하여 공지된 모든 투약 요법은 본 발명의 방법에 있어서 효과적인 치료에 필요한 것으로서 사용되고 재검험될 수 있다. 상기 요법은 전처리(pretreatment) 및/또는 추가적인 치료제(들)과의 복합투여를 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 본 기술분야의 통상의 전문가가 용이하게 결정할 수 있다.
- [0052] 상기 식품 조성물은, 바람직하게는 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 혼합물 추출액이 항염증 활성을 나타낼 수 있는 건강 및 기능성 식품 조성물이다. 본 명세서에서 “건강 및 기능성식품”이란 일반 식품에 본 발명의 추출액을 첨가함으로써 일반 식품의 기능을 향상시킨 식품이며, 추출액을 일반식품에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조할 수 있다. 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오고 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하였기 때문에 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.
- [0053] 본 발명의 추출액을 식품 첨가물로 사용할 경우에는, 상기 추출액 그대로 첨가하거나, 아토피성 피부염 치료 활성을 나타내는 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있다. 그 외의 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에는, 원료의 전체중량에 대하여 0.0001 내지 30중량%, 바람직하게는 0.0001 내지 10 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 5 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로 조절할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강식품은 상기 약학적 조성물로 이용하는 경우는 측정된 독성 범위내의 추출액을 함유되도록 하는 것이 바람직하다.
- [0054] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 예를 들면 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 분유, 전식, 생식, 유산균 발효유, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 예를 들어, 본 발명 안토시아닌-다당류 복합체는 우유나 요쿠르트와 같은 음료, 식품 등에 대하여 일정 농도로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 식품 조성물은 상기의 유효 성분 외에 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있으며, 그 외에 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, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수도 있다. 이러한 첨가제 성분은 조성물 100 중량부 당 0.0001 내지 10 중량부로 첨가될 수 있다.
- [0056] 상기 화학학적 조성물에서, 본 발명의 추출액을 그대로 첨가하거나 다른 화장품 성분과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 추출액을 화장품 제조시에 원료의 전체중량에 대하여 0.0001 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 5 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 화장품으로는 스킨, 로션, 크림, 팩 및 색조화장품 등

에 적용할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] **미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물의 혼합물 추출액 제조방법**

[0058] 본 발명에 따른 아토피성 피부염의 개선 효능을 갖는 미역귀 추출물과 멧게 껍질 건조분말의 혼합물 추출액은 다음과 같은 공정으로 제조할 수 있다:

[0059] 1) 미역귀와 멧게껍질을 건조 및 파쇄하여 분말을 얻는 단계;

[0060] 2) 상기 1)에서 얻은 미역귀 분말을 물에 넣고 중탕한 후 원심분리하여 미역귀 추출물을 얻는 단계; 및

[0061] 3) 상기 2)에서 얻은 미역귀 추출물과 상기 1)에서 얻은 멧게껍질 분말을 혼합한 후 가열 및 교반하여 혼합물 추출액을 얻는 단계.

[0062] 상기 단계 1)에서, 미역귀와 멧게껍질은 자연산 또는 양식일 수 있고, 국내 또는 국외에서 수득할 수 있으며 특별히 한정되지 않는다. 상기 건조는 1 내지 5 일간 대기 중에서 자연건조 한 후 80 내지 150 °C 온도 건조기에서 0.5 내지 4시간 동안 건조할 수 있다.

[0063] 상기 단계2)에서 용매로서 물, 구체적으로 정제수 또는 탈이온수를 미역귀의 4 내지 15배의 함량으로 사용하여 90 내지 150°C에서 1 내지 4시간 동안 중탕한다. 그런 다음 냉각시키고, 원심분리를 통해 침전물을 제거하고, 미역귀 원액 추출물을 얻는다.

[0064] 상기 단계 3)에서는 미역귀 추출물과 멧게껍질 분말을 40 내지 80°C에서 10 내지 120 분간 가열한 후 300 내지 700 rpm의 속도로 0.5 내지 3시간 동안 교반하여 혼합 추출액을 수득한다. 이때, 효소는 미역귀 추출액과 멧게 껍질 분말의 혼합비는 바람직하게는 0.5:1 내지 4:1 이다.

[0065] 상기한 바와 같이 미역귀 추출물과 멧게 껍질 건조분말의 혼합물 추출액은 미역귀 추출물 내의 후코이단 성분이 항염증 효능을 나타내고, 멧게껍질 추출물 내의 글리코사미노글리칸 성분이 콜라게나아제 활성 저해 효과, 콜라겐 생성 촉진 및 세포재생 활성을 발휘할 수 있다.

[0066] 따라서, 상기 혼합 추출액을 함유하는 본 발명의 조성물은 아토피성 피부염의 치료 및 개선용으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0067] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

[0068] **<실시예 1>**

[0069] **1-1. 미역귀 및 멧게 껍질의 분말 파우더의 제조 단계**

[0070] 본 실험에 사용한 미역귀는 경남 통영시 한산면 용초도(A-1)와 부산시 기장(A-2)에서 양식된 것을 사용하였다. 또한 멧게껍질은 통영시 수륙마을에서 수거하여 수세과정을 거쳤다. 대기 중에서 3일간 자연 건조시킨 후 건조기에서 107°C, 2 시간 건조하였다. 건조 후 1· 2차 파쇄과정을 거치는 과정에서 얻어진 미역귀 및 멧게껍질 분말 시료로 얻었다.

[0071] **1-2. 미역귀 및 멧게파우더 혼합 추출물 수득단계**

[0072] 도 1의 순서도에 나타난 것과 같이, 미역귀 분말시료 30 g을 탈이온수 180 ml에 잘 섞은 후 가스버너에 1시간 동안 중탕(boiling)한 후 찬물에 식힌다. 양팔저울에서 무게를 달아 반씩 나눈 후 원심분리기에 3,800 speed로 30분간 회전시킨다. 원액추출물 35 ml를 얻으면 염도측정기에 56%, Bix 7로 측정한다.

[0073] 미역귀 추출물 35 ml 와 멧게파우더 70 mg을 켄 후 60°C에서 30~60 분간 가열(heating) 한다. 그런 다음 500 rpm의 속도로 1시간 동안 교반(stirring)하면 혼합물 추출액을 얻게 된다.

[0074] **<실험예 1> 아토피성 피부염 임상효과**

[0075] 본 연구의 임상시험은 평소 아토피성 피부염과 생활에서 스트레스를 받고 있는 임상시험 대상자 20명을 선정하여 임상시험을 실시하였다. 4주 동안 임상시험 과정과 후에 각 임상시험자가 자각하는 아토피 피부염의 상태와 본 연구자의 관찰을 종합하여 아토피 피부염의 변화를 피부상태를 요약하여 하기 표 3에 나타내었다. 도 2 내지 3는 미역귀와 멧게껍질 분말 혼합추출액을 2주 동안 사용한 후 나타난 결과를 비교한 사진이다.

[0076] 연구자의 관찰과 각 임상시험자가 자각하는 아토피 피부염의 임상시험 결과에 의하면 혼합추출물은 연령 및 그 질환의 여러 가지 형태에 긍정적인 효능을 나타내었다. 임상 시험자 중 53세의 남자는 혼합추출물의 사용법에 따라 3일 후부터 가려움이 감소되어 붉은 반점이 거의 없어져 긁힌 자국만 조금 남아 있었고, 3주 후에는 거의 완치되었다. 16명의 임상시험자는 사용 후 1주일 무렵부터 가려움이 현저하게 감소되었으며, 2주후 감소가 1명, 3주후 감소가 1명으로 나타났다. 전체 임상시험자 중 7명은 4주 후에 완치에 가까운 수준으로 개선되었다.

[0077] 이 결과를 통해 미역귀와 멧게껍질의 혼합추출액이 4주 동안의 짧은 기간에도 아토피 피부염의 개선에 기여하는 바가 크다는 사실을 알 수 있었다. 그리고 임상시험자들의 아토피 피부염이 개선되는 과정을 살펴보면 동일한 혼합추출물을 사용하였음에도 치료되어 가는 과정이 각기 다르게 나타나 임상시험자들이 갖고 있는 각기 다른 요인과 특성 및 체질이 동일한 요법에도 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

표 1

[0078] <표 1> Questionnaire of Atopic dermatitis

No	Sex	Age	Before	After 4 weeks
1	여	8	얼굴 전체에 붉은 반점이 많고 따갑고 가려움증이 심함	가려움증이 거의 없어지고, 붉은 반점 자국도 없이 깨끗하게 완치됨
2	남	8	얼굴(눈등 위, 이마·입주위·코등)과 몸은 자주 가렵다고 함	추출액을 바르는 중에는 괜찮다가 다시 나타남
3	여	8	약간 가려움	가려움증이 사라지고 피부도 깨끗해졌음
4	여	8	입술주변이 진무르고 가려움	진물이 있는 곳에 바르면 상처가 아물어지고 딱지가 생김. 가렵지 않고 많이 좋아짐
5	남	10	조금 심한 편이었으나 병원약 복용으로 많이 좋아짐	많이 발랐을 때는 뭔가 불룩하게 1~2개 나왔음. 조금 발랐을때는 효과가 미미함.
6	여	11	조금 가려움. 피부색 변색	가려움이 진정되는 효과가 있음.
7	여	11	가려움증이 심함	가려움이 적고, 반점이 없어짐
8	남	11	팔 접히는 부분만 가끔씩 가려움	가려움이 줄어들고 상처도 많이 좋아졌음
9	여	11	팔 접히는 부분이 아직 가려움	처음에 발랐을 때 조금 가려워했지만 계속적으로 발라보니 가려움증이 나아졌음
10	여	12	팔꿈치, 다리 접히는 부분에 굵은 자국이 심하게 있으며 피부색이 변색되어 있음	피부색이 없어지고, 체 색깔로 많이 돌아왔음. 깨끗해졌음.
11	여	12	입술에 딱지가 앉아있고 팔꿈치, 다리 접히는 부분, 등에 붉은 반점. 가려움증이 심함	입술 딱지의 크기가 많이 작아지며, 가려움이 완화 되었음.
12	여	13	피부가 건조, 약간 가려움증 있음	피부가 가려울 때 바르면 불그스레한 부분이 사라지고 조금 깨끗해짐
13	여	13	약간 가려움	가려울 때 바르면 덜 가려움
14	남	19	가벼운 증상	1주 까지는 별 차도가 없음.
15	남	21	껍질이 벗겨졌고 가렵고 붉으며 약간 피부가 부어있음	가려움증이 완화됨
16	남	21	건조하고 가려움	치료제가 매우 끈적거리나 가려움증이 많이 가라앉고, 붉은 색의 피부가 누그러짐.
17	여	24	얼굴이 가렵고 붉게 달아오름	2주후부터 가려움이 감소되었고, 4주째에는 붉게 달아오름이 없어짐
18	남	50	피부가 건조, 등이 심하게 가려움	1주후부터 가려울 때 바르면 가려움증이 사라짐
19	남	53	등과 겨드랑이 사이가 붉은 반점이 많고 피부가 건조함.	3일 후 가려움증이 없어지고 붉은 반점이 깨끗이 가라앉음
20	여	74	가려움증이 심하며 팔에 굵은 자국과 부스럼 딱지가 앉아있음	부스럼 딱지의 크기가 작아지며 가려움이 덜함

<실험예 2> 혼합추출물 정제 실험; 항염증 효능의 측정

(1) 세포독성 측정

실험에 사용한 세포주는 모두 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 각 세포주를 10 cm well plate에서 배양하여 1주일에 2-3회 계대하였으며, 배지는 10% FBS 배지를 함유한 성장배지를 이용하였다. 세포주는 습도 95%, 5% CO₂, 36.5℃로 조절된 배양기에서 배양하였으며, 배지는 2일에 한번 씩 교환하였다.

후코이단 추출물의 세포독성은 RAW264.7 cell로 확인하였다. 즉 세포 배양용 플라스크에 배양한 RAW264.7 cell 을 10% FBS가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 배지로 배양하였다. 1×10⁴ cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고, 24시간 동안 35℃, 습도 95%, CO₂, 5%로 조절된 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 새로운 배지에 시료를 최종 농도가 0.1, 1, 10, 100 및 200 µg/mL이 되도록 녹여 세포주에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포주의 생존율을 측정하기 위해 MTS 시약을 이용하여 microplate reader (Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다.

멍게껍질 GAG와 미역귀 추출물 0.1, 1, 10, 100 및 200 µg/mL를 RAW 264.7 cell line에 첨가한 후 세포에 대한 독성을 나타내는 가를 측정하였다. 측정결과 상기의 농도 구간에서 세포에 대한 독성은 나타나지 않았다

표 2

<표 2> 24시간 샘플처리 후 RAW264.7 세포주의 세포독성 결과

샘플 농도 (µg/mL)		세포 생존율 (%)
Control		100.0± 4.0
GAG	0.1	102.3± 2.8
	1	101.2± 4.4
	10	107.1± 2.9
	100	109.3± 2.7
	200	100.2± 2.3
GAG:TSM (1:1)	0.1	96.6± 2.8
	1	99.4± 2.5
	10	105.4± 2.5
	100	104.0± 2.0
	200	102.3± 3.5
TF	0.1	99.9± 4.5
	1	91.7± 8.4
	10	107.7± 1.5
	100	109.5± 2.4
	200	109.2± 4.4
GF	0.1	102.6± 3.4
	1	107.1± 4.4
	10	104.6± 2.4
	100	110.2± 2.5
	200	109.5± 2.5

GAG: 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans), TSM: 통영 미역귀 추출물(Tongyeong seamustard extract), TF: 통영 미역귀 후코이단(Tongyeong seamustard fucoidan), GF: 기장 미역귀 후코이단(Gijang seamustard fucoidan).

(2) Nitric oxide (NO) 생성량의 측정

RAW264.7 세포주를 96 well에 분주한 후 세포가 바닥의 약 70~80% 정도를 덮을 때까지 배양하였다. 대조군으로는 시료 미처리군을, 양성 대조군으로는 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 1 µg/mL의 농도로 처리하였다. 시험군에는 양성 대조군과 동일한 농도의 LPS와 함께 시료의 최종 농도가 0.01, 0.1, 1, 10, 100 및 200 µg/mL가 되도록 처리하였고, 시료 처리 후 24시간 동안 배양하였다. NO 생성량은 Griess 시약으로 측정하

였다. Griess 시약은 5%의 질산용액에 1% sulfanilamide를 넣고 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride를 섞어 만들었다. 위에 배양한 세포의 상등액 50 μ l를 96 well plate에 취하고 여기에 Griess 시약 50 μ l를 가해 15분 동안 실온에서 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량의 변화는 시료를 처리하지 않은 대조군의 NO 생성량에 대한 시료 처리군의 NO 생성량으로 표시하였다.

[0088] Nitric oxide (NO)는 LPS와 같은 자극물질에 의해 활성화된 대식세포에서 분비되는 물질로서, 생체 내 다양한 면역반응을 매개하는 것으로 알려져 있다. 멧게껍질 GAG와 미역귀 추출물의 항염증 효능은 대식세포주 시료와 lipopolysaccharide(LPS)를 같이 처리하여 LPS로 염증을 유도한 후, RAW264.7 cell line으로 생성량의 변화를 측정하였다. 각각의 추출물은 0.1, 1, 10, 100 및 200 μ g/mL 농도로 처리하였고 대조군과 비교하였다(표 5). LPS는 NO 생성과 염증성 사이토카인의 생성을 유도하는 물질로 염증 유발인자로 사용된다.

[0089] LPS 및 시료를 처리하지 않은 대조군의 NO 생성량과 비교한 결과, 통영 및 기장 미역귀에서 얻어진 추출물(TSM, GSM)의 경우에는 200 μ g/mL 농도에서 NO 생성저해효과가 각각 61.3%, 68.0%로 나타났다. 그리고 멧게껍질 GAG와 통영 미역귀 삶은 물(TSM)을 1:1로 혼합한 200 μ g/mL 구에서도 항염증 효능을 확인하였다.

[0090] 그러나 멧게껍질에서 추출·정제한 GAG, TF(통영 미역귀에서 얻어진 fucoidan 추출물) 및 GF(기장 미역귀에서 얻어진 fucoidan 추출물)의 경우 LPS 1 μ g/mL와 거의 유사한 NO 생성 저해효과를 나타내었다. 일반적인 NO 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 억제하는 역할을 하나 과도한 생성은 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상을 일으키기도 한다.

[0091] (3) PGE2 생성량 측정

[0092] PGE2의 측정은 Prostaglandin E2 EIA Kit를 Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA)에서 구매하여 사용하였으며, 측정 방법은 제조회사의 분석방법에 따라 정량하였다. 즉, RAW264.7 세포에 해조 추출물을 0.1% LPS와 함께 1, 10, 100, 200 μ g/mL 농도로 24시간 전처리한 후 세포 배양 상층액을 PGE2 측정에 사용하였는데, 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각 배양액을 50 μ L씩 로딩(loading)하였다. 여기에 primary antibody solution 50 μ L와 PGE2 conjugate 50 μ L씩 첨가하여 4℃에서 18시간 동안 반응시킨 후, Washing buffer로 5회 세척한 후 Ellman's reagent을 200 μ L 씩 처리하여 60~90분간 교반하면서 반응시킨 후, 405~420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0093] Cyclooxygenase (COX)-2에 의하여 생성된 PGE2는 염증반응에 동반되는 홍반, 부종 및 통증 등과 같은 증상의 원인이다. 뿐만 아니라 PGE2는 염증성 질환을 포함한 다양한 생체반응에 있어서 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로써 각종 질병의 유발과 진행에 관여한다. 따라서 fucoidan 표준품과 미역귀 fucoidan 추출물이 PGE2 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 평가하기 위하여 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서의 염증 생성인자인 PGE2 생성 억제효과를 측정한 결과(표 6), 대조군으로 사용된 fucoidan 표준품은 각각 10, 100 μ g/mL 농도에서 71.7%, 38.0%로 농도증가에 따라 PGE2 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 미역귀 삶은 물 시료인 GSM과 TSM은 1 μ g/mL 농도에서는 억제효과가 적었으나, 100 μ g/mL 및 200 μ g/mL 농도에서 각각 77.9%, 77.9% 및 49.1%, 56.9%로 나타나 농도 의존적으로 PGE2 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 세포 내에서 생성된 과량의 NO는 COX-2 활성을 촉진시켜 PG 등의 합성을 유도하여 염증반응을 심화시키는 것으로 알려져 있다.

표 3

[0094] <표 3> 샘플 처리 24시간 후 RAW264.7 세포주의 NO 생성량

Sample concentration (μ g/mL)	NO production (%)
Control	-
+ LPS (1 μ g/mL)	100.0 $\pm$ 3.5

GAG	+ LPS (1 μg/mL)	0.1	103.0± 4.8
		1	106.7± 4.6
		10	106.6± 2.6
		100	108.7± 4.8
		200	99.9± 8.7
GAG:TSM(1:1)		0.1	119.6± 3.0
		1	122.3± 1.3
		10	122.9± 0.9
		100	96.2± 3.5
		200	76.5± 4.3
TF		0.1	113.1± 1.6
		1	113.1± 1.7
		10	104.3± 8.0
		100	102.0± 3.7
		200	135.3± 1.3
GF		0.1	120.9± 1.9
		1	118.4± 2.3
		10	120.9± 2.1
		100	116.0± 0.5
		200	139.1± 9.5
GSM	0.1	119.7± 6.0	
	1	116.0± 3.7	
	10	118.6± 3.1	
	100	107.1± 1.4	
	200	68.0± 3.1	
TSM	0.1	116.4± 5.5	
	1	113.5± 2.6	
	10	112.3± 6.1	
	100	92.0± 5.8	
	200	61.3± 6.2	

[0095] LPS:지질다당체(lipopolysaccharides), GAG:글리코사미노글리칸, TF:통영 미역귀 후코이단, GF: 기장 미역귀 후코이단, GSM: 기장 미역귀 추출물, TSM:통영 미역귀 추출물.

표 4

[0096] <표 4> RAW264.7 cell에서 PGE2 에 의한 후코이단과 추출물의 저해활성

Sample concentration (μg/mL)			PGE2 production (%)
Control + LPS (1 μg/mL)			100.0± 9.2
Fucoidan	+ LPS (1 μg/mL)	10	71.7± 11.1
		100	38.0± 10.4
GSM	+ LPS (1 μg/mL)	1	93.6± 15.4
		10	98.5± 6.3
		100	77.9± 14.6
		200	49.1± 13.3
TSM		1	90.1± 9.4
		10	97.9± 15.7
		100	77.9± 5.7
		200	56.9± 7.9

[0097] LPS:지질다당체, GSM: 기장 미역귀 추출물, TSM: 통영 미역귀 추출물.

[0098] <실험예 3> 아토피 치유 효능 실험

[0099] (1) HaCaT cell 배양 및 시료추출

[0100] 세포증식능은 인간 표피 세포주인 HaCaT cell로 확인하였다. 즉, 세포 배양용 플라스크에 배양한 HaCaT 세포주를 10 ml 피펫으로 세포를 플라스크에서 떼어내어 계대하였고, 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 배양하였다. HaCaT 세포주를 1x10⁴ cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고, 24시간 동안 35℃, 습도 95%, CO₂ 5%로 조절된 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 새로운 배지에 시료를 최종 농도가 1, 10, 100 및 200 µg/mL이 되도록 녹여 세포주에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포주의 생존율을 측정하기 위해 MTS 시약을 이용하여 microplate reader (Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다.

[0101] 각질형성세포주인 HaCaT cell을 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양하여 12 well plate에 500 µL씩 분주한 후, 세포가 바닥의 약 70~80% 정도를 덮을 때까지 배양하였다. 새로운 배지에 시료를 최종 농도가 0.1, 1, 10, 100 및 200 µg/mL이 되도록 녹여 세포주에 처리하여 8시간 배양 후 KRB (Krebs-Ringer bicarbonate) buffer (115 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.28 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 8.4% NaHCO₃ (wt/vol), 1 mg/mL BSA, pH 7.2)로 바꾸어 주었다. 2시간 동안 추출한 후 각각의 well로부터 KRB 용액을 수집하고, 모은 KRB 용액내의 inflammatory cytokines인 TNF-α (eBioscience, San Diego, CAUSA)와 IL-6의 농도를 ELISA Kit로 측정하였다.

[0102] (2) Inflammatory cytokines 생성량 측정

[0103] TNF-α, IL-6 생성량은 ELISA kit (eBioscience, San Diego, CA, USA) 를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 각 well에 capture antibody를 100 µL씩 분주하여 4℃에서 overnight 한 후, Assay diluent를 200 µL씩 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 HaCaT에서 추출한 추출액, KRB 용액 및 표준물질 100 µL를 가하여 2시간 동안 실온에서 반응시킨다. 그 후 각 well에 detection antibody 100 µL를 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시키고, Avidin-HRR을 100 µL 가하여 30분 동안 실온에서 반응하였다. 앞의 각 단계마다 wash buffer (1xPBS, 0.05% Tween 20/DIW)로 5회 세척한 후 다음 단계를 진행하였으며, 암소에서 cover를 씌워 암소에서 반응하였다. 마지막으로 기질 용액을 100 µL씩 가하여 15분 동안 반응시킨 후, stop solution (2 N H₂SO₄)을 50 µL 처리하여 microplate reader (Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 450 및 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0104] (3) 측정결과

[0105] 후코이단과 추출물의 알러지 억제 효능을 알아보기 위해 알러지 유발 사이토카인인 TNF-α 및 IL-6 생성량을 알아보기 위하여 HaCaT cell line에 최종 농도를 0.1, 1, 10, 100 및 200 µg/mL로 하여 억제효과를 측정한 결과는 표 7, 8과 같다. 대조구로 사용된 후코이단의 경우 농도가 0.1, 1.0 µg/mL에서는 TNF-α 생성량이 각각 50.1%, 42.3% 억제되었고 10 µg/mL 이상에서는 TNF-α 생성량의 변화가 없었다. 이와는 반대로 추출물의 경우, 멧게껍질 GAG, 미역귀 삶은 물 등 모든 시료에서 농도 증가에 따라 TNF-α 생성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 IL-6 생성 억제효과를 측정한 결과, 대조구로 사용된 후코이단의 경우는 농도가 증가할수록 IL-6 생성량이 약간씩 감소하는 경향으로 100 µg/mL 농도에서 28.3% 억제하였다. 멧게껍질 GAG와 미역귀 추출물의 경우 IL-6 생성량은 농도가 높아짐에 따라 생성량이 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 특히 멧게껍질 GAG의 경우 TNF-α 및 IL-6 생성량이 약 2.4~4.3배 증가하였다.

[0106] 그러나 알러지 환자에게 실험한 결과와 비교하면, 얼굴 전체에 붉은 반점이 많고 따갑고 가려움증이 심한 환자가 GAG:TSM(1:1) 구를 사용하기 시작한 후부터는 가려움증이 없어지고, 붉은 반점자국도 없이 깨끗하게 완치되었다고 하여 세포실험과는 상반된 결과를 보여주고 있다. 이는 미역귀 추출물과 멧게껍질 정제물질이 사이토카인의 생성억제에는 관여하지는 않았지만, 미역귀 추출물이 항염증 효과를 보였고 멧게껍질 GAG가 세포재생 효과를 나타낸다는 보고를 미루어 볼 때 사이토카인을 억제하는 기작보다는 염증생성을 억제함과 동시에 피부를 재생시키는 효과가 더 뛰어난 것으로 여겨진다.

[0107]

<표 5> HaCaT cell 배양에서 TNF- α 발현에 대한 후코이단의 영향

Sample concentration ($\mu\text{g/mL}$)		TNF- α production (%)
Control		100.0 $\pm$ 25.3
Fucoidan	0.1	50.1 $\pm$ 8.6
	1	42.3 $\pm$ 3.3
	10	27.9 $\pm$ 17.9
	100	24.1 $\pm$ 4.6
	200	26.7 $\pm$ 10.9
GAG	0.1	96.0 $\pm$ 1.7
	1	94.8 $\pm$ 0.0
	10	145.7 $\pm$ 37.1
	100	121.1 $\pm$ 4.9
	200	246.3 $\pm$ 6.6
GAG:TSM(1:1)	0.1	108.7 $\pm$ 6.1
	1	102.3 $\pm$ 7.2
	10	110.1 $\pm$ 21.1
	100	125.2 $\pm$ 4.7
	200	174.3 $\pm$ 5.6
TF	0.1	99.4 $\pm$ 3.3
	1	101.2 $\pm$ 5.6
	10	101.2 $\pm$ 2.4
	100	104.1 $\pm$ 14.2
	200	137.4 $\pm$ 5.3
GF	0.1	101.2 $\pm$ 4.0
	1	102.3 $\pm$ 2.4
	10	92.6 $\pm$ 3.5
	100	126.1 $\pm$ 18.2
	200	114.0 $\pm$ 4.7
GSM	0.1	104.1 $\pm$ 9.5
	1	119.3 $\pm$ 1.4
	10	112.8 $\pm$ 3.7
	100	117.6 $\pm$ 2.1
	200	113.4 $\pm$ 6.2
TSM	0.1	94.8 $\pm$ 3.7
	1	108.7 $\pm$ 9.1
	10	113.4 $\pm$ 4.4
	100	105.2 $\pm$ 1.6
	200	110.5 $\pm$ 3.8

[0108]

GAG:글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans), TF: 통영 미역귀 후코이단, GF: 기장 미역귀 후코이단, GSM: 기장 미역귀 추출물, TSM: 통영 미역귀 추출물.

표 6

[0109]

<표 6> HaCaT cell 배양에서 IL-6 의 발현에 대한 후코이단의 영향

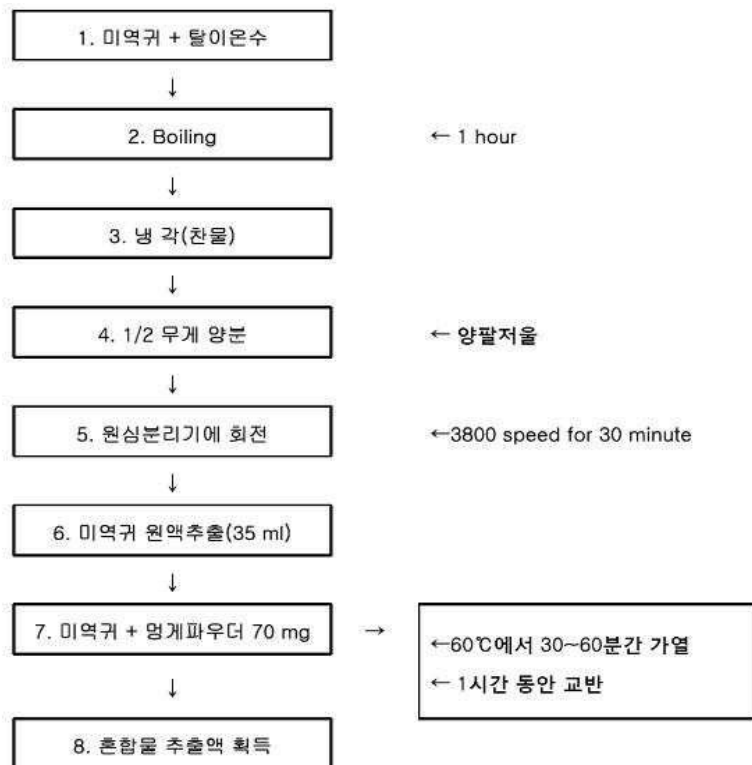
샘플농도 ($\mu\text{g/mL}$)		IL-6 production (%)
Control		100.0 $\pm$ 0.3
Fucoidan	0.1	93.9 $\pm$ 0.3
	1	87.2 $\pm$ 0.4
	10	88.5 $\pm$ 0.7
	100	71.7 $\pm$ 0.4
	200	75.4 $\pm$ 0.3

GAG	0.1	129.0± 2.9
	1	157.9± 3.6
	10	296.2± 7.7
	100	321.3± 8.6
	200	428.3± 5.1
GAG:TSM(1:1)	0.1	270.8± 0.1
	1	99.3± 1.0
	10	116.9± 6.1
	100	173.0± 2.0
	200	213.1± 6.4
TF	0.1	109.6± 21.6
	1	111.1± 18.8
	10	107.4± 12.3
	100	113.9± 8.9
	200	130.3± 8.1
GF	0.1	110.6± 12.2
	1	112.8± 7.6
	10	118.0± 14.7
	100	136.1± 6.0
	200	162.2± 5.7
GSM	0.1	114.5± 3.8
	1	113.0± 6.8
	10	116.1± 10.9
	100	152.2± 13.3
	200	194.2± 0.7
TSM	0.1	125.5± 5.0
	1	117.3± 7.1
	10	108.6± 2.5
	100	131.5± 13.1
	200	151.2± 7.1

[0110] GAG:글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans), TF: 통영 미역귀 후코이단, GF: 기장 미역귀 후코이단, GSM: 기장 미역귀 추출물, TSM: 통영 미역귀 추출물.

도면

도면1



도면2



No-1 도포 전



No-1 도포 후

도면3



No-2 도포 전



No-2 도포 후

도면4



No-3 도포 전



No-3 도포 후

도면5



No-4 도포 전



No-4 도포 후