



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월28일
(11) 등록번호 10-1892865
(24) 등록일자 2018년08월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0103352
(22) 출원일자 2017년08월16일
심사청구일자 2017년08월16일
(56) 선행기술조사문헌
Panminerva Med, 2014, 56(2 Suppl 3), pp. 1-7
JP2018039781 A
Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011,
63(6), pp. 849-859

- (73) 특허권자
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
김배환
대구광역시 수성구 청수로 213, 1107동 1201호 (황금동, 캐슬골드파크1단지)
문현덕
대구광역시 북구 연암공원로11길 3-9 (산격동)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 9 항

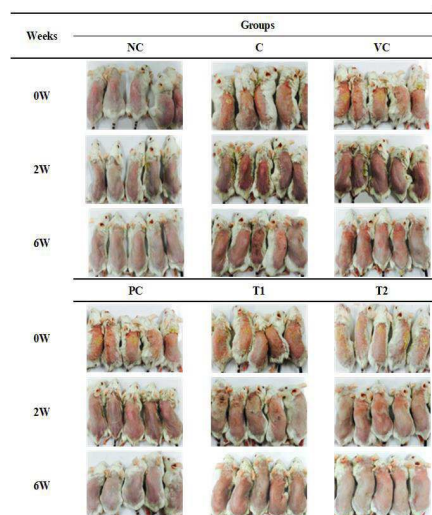
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 마퀴베리를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 마퀴베리를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 천연물질 소재인 마퀴베리 열수 추출물은 우수한 항산화 활성을 가지며, 옥사졸론 유도 아급성 피부염 동물모델 또는 2,4-디니트로클로로벤젠(2,4-dinitrochlorobenzene; DNCB) 유도 아토피성 피부염 동물모델에서 염증 반응 및 부종을 억제하고, 비만세포의 수, 호산구의 수 및 IgE 수준을 감소시키며, 면역 조절에 관여하는 사이토카인인 INF- γ 의 증가 및 IL-4의 감소를 통하여 면역학적 기전에 효과적으로 작용하는 것을 확인함으로써, 본 발명에 따른 마퀴베리 열수 추출물은 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물, 건강식품 조성물, 또는 화장품 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

A61K 2236/51 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

마퀴베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 마퀴베리 추출물은 열수 추출물인 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 마퀴베리 추출물은 항산화 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 항산화 활성의 측정은 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 전자공여능, 자유 라디칼 소거능 및 산화 질소 억제능으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나 이상을 측정하는 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 마퀴베리 추출물은 경피 수분 손실량 및 홍반도를 감소시키고, 피부 병변을 회복시키는 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 마퀴베리 추출물은 INF- γ 의 수준을 증가시키고, IL-4 및 IgE의 수준을 감소시키는 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 마퀴베리 추출물은 표피 두께, 염증세포 침윤, 비만세포 개수 및 호산구 개수를 감소시키는 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

마퀴베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 9

마퀴베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마퀴베리를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아토피성 피부염은 만성적인 재발성 피부습진 질환으로, 관련 증상으로는 소양증 및 홍반성 구진, 알레르기 질환, 건조증 등이 있다. 아토피성 피부염의 발생원인은 환경적 원인과 유전적 원인으로 나뉘 수 있으며, 현재까지 명확한 소인은 밝혀지지 않았으나, 외부 항원의 작용으로 인해 면역 관련 인자들이 과민하게 반응하는 것으로 보고된 바 있다. 최근 연구에 의하면 아토피성 피부염의 병인으로 피부의 표면 장벽 이상 징후에 대한 근거가 보고된 바 있으며, 이에 각질층 구성 인자의 면역학적 기전에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다.

[0003] 피부 표피의 수분 보유량은 정상인의 경우 약 15% 정도이며, 수분 보유량이 10% 이하로 떨어지는 경우에는 각질층의 세라마이드 농도가 감소되어 건조증 및 소양증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한, 이러한 손상은 2차적인 피부질환의 원인으로 알려진 알레르기 항원과 병원균의 침투로 인해 세포 매개성 염증에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 아토피성 피부염은 영유아기에서 주로 관찰되며, 성인기까지 지속되거나 발병할 수 있다. 현재 산업화가 진행 중인 중진국 및 선진국에서 아토피성 피부염의 유병률이 빠르게 증가하고 있으며, 난치성 피부질환으로 보고되고 있다. 아토피성 피부염에는 면역 병리학적 관련 인자들이 상호작용하여 피부 염증에 관여하며, 대표적인 관련 인자로 T 림프구(T lymphocyte), 면역글로불린 E(Immunoglobulin E; IgE), Th1 및 Th2 세포에서 발현되는 사이토카인(cytokines) 등이 있다.

[0005] 아토피성 피부염은 혈청 IgE의 비정상적인 항진으로 인한 외인성과, 정상적인 IgE의 수준에도 불구하고 아토피성 피부염과 유사한 병리학적 증상의 내인성으로 구분된다. IgE는 대응하는 항원과 반응하여 랑게르한스 세포(Langerhans cells)에서 T 림프구로 항원의 전달을 촉진시키며, T 림프구는 세포 매개 면역반응으로 병변의 유발과 면역반응의 지속성을 유지시킨다. T 세포에서 생성되는 사이토카인에 의해 Th1 및 Th2 세포 유형으로 분화되며, Th1 세포는 TNF, IL-2, IFN- γ 등의 사이토카인을 발현하여 대식세포를 활성화시켜 아급성 피부 염증을 유도한다. Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등의 사이토카인을 발현하여 과민반응을 유발하며, 호산구(eosinophil) 및 비만세포(mast cell)의 분화를 유도하고 IgE 생성 작용을 더욱 증가시키는 경향이 있다. 일반적으로 세포 간의 상호작용으로 면역반응의 균형을 유도하지만, 아토피성 피부염에는 Th2 세포의 분화와 관련된 사이토카인의 증가로 인해 아토피성 피부염의 염증 반응이 유발 및 촉진된다. Th1 세포의 유형에서 생성되는 사이토카인 중 하나인 인터페론-감마(interferon-gamma; IFN- γ)는 지연형 면역반응을 유도하고, Th2 세포의 유형에서 생성되는 사이토카인 중 하나인 IL-4는 IgE의 합성과 비만세포의 분화를 유도함으로써, 염증반응과 면역 병리학적 증상을 유발하게 된다. 따라서, 아토피성 피부염의 면역 기전에서는 Th2 세포의 상대적 촉진으로 Th1 세포의 발현이 억제된다. 이러한 체액성 면역반응이 피부의 아토피성 염증반응에 영향을 미치게 된다. 결국, 아토피성 피부염은 IgE 농도 변화와 IL-4와 같은 사이토카인의 발현 기전이 치료 및 완화에 중요한 지표로 볼 수 있다.

[0006] 아토피성 피부염에 사용되는 약물은 주로 면역 억제제, 국소 스테로이드 제제, 항히스타민제 등이 있다. 면역 억제제는 간과 신장에 독성을 유발하며, 세포 전해질 균형 양상에 부작용을 유발하기도 한다. 국소 스테로이드 제제는 단기성 처방 약물 제제로 피부 위축, 피부 경화 등의 부작용이 보고된 바 있으며, 특히 피부의 질환 발병과 만성적인 피부 질환의 위험으로 장기간 사용을 제한하는 추세이다. 항히스타민제는 아토피성 피부염의 체액성 면역반응에서 비만세포와 관련된 약물로서 아토피성 피부염의 개선에는 그 한계성이 보고된 바 있다. 따라서, 아토피 피부염의 개선을 위한 안전성이 확보된 새로운 약물 제제의 필요성이 요구되고 있는 실정이다.

[0007] 최근 국내외에서 아토피성 피부염 마우스 모델을 이용하여 면역학적 기전에 의한 항염 효과가 인정된 안전한 천연물질이 보고된 바 있다. 천연 유래 물질은 아토피성 피부염의 완화 제제로서 부작용을 줄이고 안전성 측면을 강조할 수 있다.

[0008] 마퀴베리(Aristotelia chilensis)는 퍼플 푸드(purple food)로서 아사이베리의 약 7배, 아로니아의 약 6.6배의 항산화 지수를 가져 슈퍼 항산화제로 보고된 바 있으며, 항산화 성분인 안토시아닌(anthocyanin)과 폴리페놀(polyphenol)이 풍부한 열매로 현재 마퀴베리의 효능에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 안토시아닌은 로돕신(rhodopsin)이라는 망막색소의 합성을 촉진시켜 백내장이나 녹내장 등 안과 질환 등을 예방하는데 유용한 항산화 물질이다. 피부 노화 물질 중 하나인 활성산소종을 감소시키며, 지질층과 콜라겐의 산화를 방지하는 피부 생리 활성에 대한 연구가 보고된 바 있다. 또한, 아토피성 피부염의 개선에 있어서, 폴리페놀류의 유의적인 효과가 보고되었으며, 폴리페놀 함량과 항산화 능력이 우수한 마퀴베리는 아토피성 피부염의 개선효과를 기대할

수 있다. 또한, 마퀴베리는 높은 항산화 능력으로 항당뇨, 항염증, 지질 생성 억제 등에 효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 피부 관련 질환, 특히 아토피성 피부염 효과에 대한 구체적인 면역학적 기전 연구는 현재까지 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 미국 공개특허 제 2014-0220165호(2014.08.07. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 마퀴베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 마퀴베리 열수 추출물의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 마퀴베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 마퀴베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 건강식품 조성물, 또는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 마퀴베리 분말을 물에 용해시킨 후, 70 내지 90℃에서 1 내지 5시간 동안 침적시켜 추출물을 제조하는 제 1단계; 및 상기 추출물을 여과한 후, 동결 건조하여 추출물의 분말을 제조하는 제 2단계;를 포함하는 마퀴베리 열수 추출물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 천연물질 소재인 마퀴베리 열수 추출물은 우수한 항산화 활성을 가지며, 옥사졸론 유도 아급성 피부염 동물모델 또는 2,4-디니트로클로로벤젠(2,4-dinitrochlorobenzene; DNCB) 유도 아토피성 피부염 동물모델에서 염증 반응 및 부종을 억제하고, 비만세포의 수, 호산구의 수 및 IgE 수준을 감소시키며, 면역 조절에 관여하는 사이토카인인 INF- γ 의 증가 및 IL-4의 감소를 통하여 면역학적 기전에 효과적으로 작용하는 것을 확인함으로써, 본 발명에 따른 마퀴베리 열수 추출물은 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물, 건강식품 조성물, 또는 화장품 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 마퀴베리 열수 추출물에 의한 전자공여능을 확인한 것이다.

도 2는 마퀴베리 열수 추출물에 의한 자유 라디칼 소거능을 확인한 것이다.

도 3은 마퀴베리 열수 추출물에 의한 세포 독성을 확인한 것이다.

도 4는 마퀴베리 열수 추출물 및 리포폴리사카라이드에 의한 세포 독성을 확인한 것이다.

도 5는 마퀴베리 열수 추출물에 의한 산화 질소 생성 억제 효과를 확인한 것이다.

도 6은 옥사졸론 유도 아급성 피부염 동물모델에서 마퀴베리 열수 추출물에 의한 귀 두께의 변화를 확인한 것이다.

도 7은 옥사졸론 유도 아급성 피부염 동물모델에서 마퀴베리 열수 추출물에 의한 귀 두께 억제율을 확인한 것이다.

도 8은 옥사졸론 유도 아급성 피부염 동물모델에서 마퀴베리 열수 추출물에 의한 귀 무게 억제율을 확인한 것이다.

도 9는 옥사졸론 유도 아급성 피부염 동물모델에서 마퀴베리 열수 추출물에 의한 염증세포 침윤 감소 효과를 헤마톡실린 & 에오신 염색으로 확인한 것이다.

도 10은 옥사졸론 유도 아급성 피부염 동물모델에서 마퀴베리 열수 추출물에 의한 표피 두께 감소 효과를 확인한 것이다.

도 11은 2,4-디니트로클로로벤젠(2,4-dinitrochlorobenzene; DNCB) 유도 아토피성 피부염 동물모델에서 마퀴베리 열수 추출물에 의한 피부 병변 변화를 확인한 것이다.

도 12는 DNCB 유도 아토피성 피부염 동물모델에서 마퀴베리 열수 추출물에 의한 피부 손상 점수를 확인한 것이다.

도 13은 DNCB 유도 아토피성 피부염 동물모델의 비장세포 내 마퀴베리 열수 추출물에 의한 IFN- γ 및 IL-4의 발현 변화를 확인한 것이다.

도 14는 DNCB 유도 아토피성 피부염 동물모델에서 마퀴베리 열수 추출물에 의한 염증 세포 침윤 감소 효과를 헤마톡실린 & 에오신 염색으로 확인한 것이다.

도 15는 DNCB 유도 아토피성 피부염 동물모델에서 마퀴베리 열수 추출물에 의한 표피 두께 감소 효과를 확인한 것이다.

도 16은 DNCB 유도 아토피성 피부염 동물모델에서 마퀴베리 열수 추출물에 의한 비만세포 감소 효과를 톨루이딘 블루 염색으로 확인한 것이다.

도 17은 상기 도 16의 결과를 그래프로 도시하여 나타낸 것이다.

도 18은 DNCB 유도 아토피성 피부염증 모델에서 마퀴베리 열수 추출물에 의한 호산구 감소 효과를 콩고 레드 염색으로 확인한 것이다.

도 19는 상기 도 18의 결과를 그래프로 도시하여 나타낸 것이다.

도 20은 인공피부모델 Labcyte EPI-MODEL24을 수행하여 마퀴베리 열수 추출물에 의한 세포 생존율을 확인한 것이다.

도 21은 안점막자극시험(Bovine Corneal Opacity and Permeability; BCOP)을 수행하여 마퀴베리 열수 추출물에 의한 혼탁도를 확인한 것이다.

도 22는 안점막자극시험을 수행하여 마퀴베리 열수 추출물에 의한 투과도를 확인한 것이다.

도 23은 안점막자극시험을 수행하여 마퀴베리 열수 추출물에 의한 각막 자극 수치를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 발명자들은 우수한 항산화 활성을 가지는 마퀴베리 열수 추출물을 제조하였으며, 상기 마퀴베리 열수 추출물이 아급성 피부염 동물모델 및 아토피성 피부염 동물모델에서 우수한 피부염 치료 효과를 나타내고, 면역학적 기전에 효과적으로 작용하는 것을 확인하며 본 발명을 완성하였다.
- [0019] 본 발명은 마퀴베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0020] 바람직하게는, 상기 마퀴베리 추출물은 열수 추출물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0021] 바람직하게는, 상기 마퀴베리 추출물은 항산화 활성을 증가시킬 수 있다.
- [0022] 상기 항산화 활성은 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 전자공여능, 자유 라디칼 소거능 및 산화 질소 억제능으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나 이상을 측정하여 확인할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0023] 바람직하게는, 상기 마퀴베리 추출물은 경피 수분 손실량 및 홍반도를 감소시키고, 피부 병변을 회복시킬 수 있다.
- [0024] 바람직하게는, 상기 마퀴베리 추출물은 INF- γ 의 수준을 증가시키고, IL-4 및 IgE의 수준을 감소시킬 수 있다.
- [0025] 바람직하게는, 상기 마퀴베리 추출물은 표피 두께, 염증세포 침윤, 비만세포 개수 및 호산구 개수를 감소시킬

수 있다.

- [0027] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0028] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 증진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당 업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 0.001 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은 마퀴베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.
- [0032] 바람직하게는, 상기 마퀴베리 추출물은 열수 추출물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0034] 본 발명의 조성물이 건강식품 조성물인 경우, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 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. 그 밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 건강식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, 식품첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0036] 상기 식품첨가물공전에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.
- [0037] 이때, 건강식품 조성물을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 조성물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 마퀴베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0040] 바람직하게는, 상기 마퀴베리 추출물은 열수 추출물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0042] 본 발명의 조성물이 화장품 조성물인 경우, 상기 화장품 조성물은 상기 유효성분 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 화장품 조성물은 그 효과를 증진시키기 위해 피부 흡수 촉진제를 추가로 포함할 수 있다.

- [0043] 상기 화장품 조성물의 제형은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 화장품 조성물은 화장수, 유액, 스킨, 토너, 로션, 에센스, 선 스크린, 크림, 메이크업 베이스, 파운데이션, 파우더, 팩, 젤, 샴푸, 린스, 스프레이, 메이크업 제거제 및 세정제 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아님을 명시한다.
- [0044] 상기 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0045] 상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0047] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0049] 또한, 마퀴베리 분말을 물에 용해시킨 후, 70 내지 90℃에서 1 내지 5시간 동안 침적시켜 추출물을 제조하는 제 1단계; 및 상기 추출물을 여과한 후, 동결 건조하여 추출물의 분말을 제조하는 제 2단계;를 포함하는 마퀴베리 열수 추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0050] 바람직하게는, 상기 제 1단계는 2 내지 4회 반복 수행하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0052] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0054] **실시예 1 : 시약 및 기구**
- [0055] 12-o-테트라데카노일포르볼-13-아세테이트(12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TPA) 및 덱사메타손(dexamethasone)은 시그마 알드리치(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, DMEM, 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; P/S)은 론자(Lonza Company, Walkersville, USA)에서 구입하였다. 마우스 사이토카인/케모카인 마그네틱 비드 패널(milliplex Mouse Cytokine/Chemokine magnetic bead panel)은 밀리포어(Millipore, Billerica, MA, USA)에서 구입하였으며, 마우스 IgE ELISA 키트(Mouse IgE ELISA kit)는 시바야기(Shibayagi, Japan)에서 구입하였다. 그 외 일반 시약들은 특급 등급을 사용하였다.
- [0056] 홍반도 및 수분 손실량의 측정에는 각각 색차계(Mexameter, MX18,CK electronic GmbH, Germany) 및 경피 수분 손실량 측정기(Tewameter, CM825, CK electronic GmbH, Germany)를 이용하였으며, CO₂ 배양기(MCO-17AIC, Sanyo, ,Japan), 무균대(Clean bench, DBB-922, Daeil, Korea), 초저온 원심분리기(VS-550, 비전과학, Korea), 전자저울(XT220A, Precisa, Swiss), 광학 현미경(DM500, Leica, Germany), 미세절편기(RM2235, Leica, Germany), 전자동 면역염색기(Roche-Ventana, Benchmark, USA) 및 실험실에서 사용하는 일반기구를 사용하였다.
- [0058] **실시예 2 : 마퀴베리 열수 추출물 제조**
- [0059] 마퀴베리는 칠레산 동결건조 분말을 구입하여 시료로 사용하였으며, 분말 시료 100 g을 80℃, 물 1 L에 3시간 동안 침적시키고, 3회 반복 추출한 후 여과 과정을 거쳐 72시간 동결건조 분말 상태의 마퀴베리 열수 추출물(Aristotelia chilensis water extract; ACWE)을 제조하였다.
- [0061] **실시예 3 : 항산화 활성 분석**

[0062] 3-1. 총 폴리페놀 함량

[0063] 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis(1912) 법에 의거하여 측정하였다. 증류수 7.5 mL, 시험물질 1 mL, 폴린 시약 0.5 mL를 혼합하여 섞은 다음 3분간 방치하였다. 그 후, 35% Na₂CO₃ 포화용액 1 mL 첨가하여 1시간 동안 반응시키고, 1N HCl(0.1 mL)을 첨가하고 760 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 탄닌산(tannic acid)을 이용한 표준곡선으로 폴리페놀의 양을 환산하여 나타내었다.

[0064] 그 결과, 하기 표 1을 참조하여 보면, 총 폴리페놀 함량은 3회 반복 실험하여 평균값으로 측정한 것으로, 마귀베리 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량은 63.5 mg/g인 것을 확인하였다.

표 1

Test material	Phenolic contents (mg/g)				
	1	2	3	Mean	SD
ACWE	57.6	69.4	63.5	63.5	5.88

[0066]

[0068] 3-2. 총 플라보노이드 함량

[0069] 추출한 시료 1 mg에 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO) 1 mL를 첨가한 후, 실험 적용 농도에 맞게 희석하여 준비하였다. 희석한 시료 100 mL에 디에틸렌 글라이콜(diethylene glycol) 1 mL를 첨가하여 교반한 후, 5분간 방치하였다. 그 후, 1N NaOH 100 mL를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 다음 420 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 케르세틴(quercetin)을 이용한 표준곡선으로 플라보노이드의 양을 환산하여 나타내었다.

[0070] 그 결과, 하기 표 2를 참조하여 보면, 총 플라보노이드 함량은 3회 반복 실험하여 평균값으로 측정한 것으로, 마귀베리 열수 추출물의 총 플라보노이드 함량은 33.99 mg/g인 것을 확인하였다.

표 2

Test material	Flavonoid contents (mg/g)				
	1	2	3	Mean	SD
ACWE	33.4	35.2	33.4	33.99	1.03

[0072]

[0074] 3-3. 전자공여능

[0075] 전자공여능(electron donating abilities)은 Blois(1958) 법에 의거하여 측정하였다. 각 시료 용액 2 mL에 0.2 mM의 DPPH 1 mL를 첨가하여 교반한 후, 30분간 방치한 다음 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료 용액의 첨가군과 대조군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[0076] 그 결과, 도 1을 참조하여 보면, 마귀베리 열수 추출물의 전자공여능은 농도의존적으로 양-반응 관계를 나타내

었으며, 농도 1000 ppm에서는 97.5% 전자공여능을 나타냈었고, 대조군으로 사용한 아스코르브산(ascorbic acid)과 유사한 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0078] 3-4. $ABTS^+$ 라디칼 소거능

[0079] 자유 라디칼(free radical) 소거능(scavenging ability)은 $ABTS^+$ 양이온 탈색 분석법(cation decolorization assay)을 이용하여 분석하였다. 7 mM $ABTS(2,2\text{-azino-bis}(3\text{-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid}))$ 및 2.45 mM 과황산칼륨(potassium persulfate)을 최종 농도로 혼합하고 실온의 암실에서 12시간 동안 방치하여 $ABTS^+$ 을 형성시킨 후, 734 nm 파장에서 흡광도 값이 $0.7(\pm 0.02)$ 이 되게 에탄올로 희석하였다. 각 농도 별로 희석된 시험물질 100 mL에 희석된 $ABTS^+$ 용액 100 mL를 첨가하고, 암실에서 7분 동안 방치한 후, 734 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 라디칼 소거 활성은 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 흡광도 값으로 보정하여 나타내었다.

[0080] 그 결과, 도 2를 참조하여 보면, 마퀴베리 열수 추출물의 자유 라디칼 소거능은 농도 의존적으로 양-반응 관계를 나타내었고, 1000 ppm에서 99.6%의 자유 라디칼 소거능을 나타내었으며, 아스코르브산과 유사한 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0082] 실시예 4 : 세포 실험

[0083] 4-1. 세포 배양

[0084] 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071, Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 10% 우태아혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

[0086] 4-2. 세포 독성 분석(MTT assay)

[0087] RAW 264.7 세포는 10% 우태아혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 72시간 동안 배양하여 세포를 안정화시킨 후, 실험에 사용하였다.

[0088] 안정화된 RAW 264.7 세포는 96 웰 플레이트(96 well plate)에 1×10^5 세포/웰 농도로 분주하고 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, 농도 별로 희석한 시료 20 μ L를 배지 180 μ L와 혼합하여 세포에 처리하고 같은 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 상층액을 제거한 후, RAW 264.7 세포를 인산완충식염수(phosphate buffered saline; PBS)로 1회 세척하고, 0.5 mg/mL의 MTT가 함유된 PBS를 200 μ L씩 넣은 후, 37°C, 5% CO_2 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 그 후, 상층액을 제거한 다음 DMSO를 200 μ L씩 넣고 진탕기(shaker)에서 15분 동안 세포를 녹인 후, ELISA 리더기(reader)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0090] 세포 생존율은 하기 계산식 1에 의해 산출하였다.

[0091] [계산식 1]

[0092] 세포 생존율(%) = $(A_{\text{실험군}} / A_{\text{대조군}}) \times 100$

[0094] 그 결과, 도 3을 참조하여 보면, 마퀴베리 열수 추출물 2000 ppm 농도에서 94.2%의 세포 생존율을 나타내는 것을 확인하였다. 본 실험에서는 NO 억제 효과를 측정하기 위해 2000 ppm 이하 농도의 마퀴베리 열수 추출물을 처리하였다.

[0096] 4-3. 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide; LPS) 처리에 의한 세포 독성 분석

[0097] RAW 264.7 세포는 10% 우태아혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 72시간 동안 배양하여 세포를 안정화시킨 후, 실험에 사용하였다.

[0098] 안정화된 RAW 264.7 세포는 96 웰 플레이트에 1×10^5 세포/웰 농도로 분주하고 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, LPS(0.1 μ g/mL)가 첨가된 시료를 DMEM 배지에 농도 별로 희석하여 200 μ L씩 세포에 처리하고 같은 조건에서 24시간 동안 배양하였다.

[0100] 세포 생존율은 하기 계산식 1에 의해 산출하였다.

[0101] [계산식 1]

- [0102] 세포 생존율(%)= (A 실험군/A 대조군) × 100
- [0104] 그 결과, 도 4를 참조하여 보면, LPS 만을 처리하였을 때, 95.98%의 세포 생존율을 나타냈고, 마퀴베리 열수 추출물을 농도 별로 각각 62.5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm 처리하였을 때, 각각 97.9%, 95.0%, 90.4%, 91.5%, 89.1%, 90.0%의 세포 생존율을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0106] 4-4. 산화 질소(nitric oxide; NO) 생성 억제 분석
- [0107] 안정화된 RAW 264.7 cell는 96 웰 플레이트에 1×10^5 세포/웰 농도로 분주하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, LPS(0.1 µg/mL)가 첨가된 시료를 DMEM 배지에 농도 별로 희석하여 200 µL씩 세포에 처리하고 같은 조건에서 24시간 동안 배양하였다.
- [0108] 이후 플레이트의 상층액 100 µL를 수거하고, 동일한 양의 Griess 시약을 첨가한 다음 ELISA 리더기를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. NaNO₂ 표준 용액의 정량곡선을 이용하여 세포 배양액 내 NO 농도를 계산 하였다.
- [0109] 그 결과, 도 5를 참조하여 보면, 마퀴베리 열수 추출물은 농도의존적으로 NO 생성을 억제하였으며, 2000 ppm에서 29.3%의 NO 생성 억제율을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0111] **실시예 5 : in vivo 아급성 피부염 동물모델**
- [0112] 5-1. 옥사졸론(oxazolone) 유도 아급성 피부염 동물모델
- [0113] 생후 7주령의 수컷 BALB/c 마우스는 (주)샘타코(오산, 한국)에서 분양받아 일주일간 특정 병원체 부재 무균 사육실에서 온도 22±3℃, 습도 0±5%, 명암주기 12시간 밤/12시간 낮으로 조절되는 표준 사육환경 조건에서 순화 과정을 거친 후, 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 사료(Purina, 한국)와 물의 양은 제한 없이 공급하였다. 실험의 모든 과정은 계명대학교 동물실험 윤리위원회의 승인(승인번호 KM-2016-21)을 받아 동물실험 규정에 의거 하여 실험을 수행하였다.
- [0115] 5-2. 실험군 구성
- [0116] 각 군 당 4마리씩 난피법에 의해 분류하였고, 하기 표 3과 같이, 정상군(N), 옥사졸론을 도포하여 아급성 피부염을 유발한 대조군(C), 용매대조군(VC), 아급성 피부염을 유발한 뒤 텍사메타손(dexamethasone) 연고 0.5%를 처리한 양성대조군(PC), 아급성 피부염을 유발한 뒤 ACWE 1%를 처리한 실험군(T1), 아급성 피부염을 유발한 뒤 ACWE 5%를 처리한 실험군(T2), 아급성 피부염을 유발한 뒤 마퀴베리 열수 추출물(ACWE) 10%를 처리한 실험군(T3)으로 구성하였다.

표 3

Groups	Subacute dermatitis induction	Test compound	No. mice
Normal (N)	-	-	4
Control (C)	+	-	4
Vehicle Control (VC)	+	Acetone	4
Positive Control (PC)	+	0.5% Dexamethasone	4
Experimental 1 (T1)	+	1% ACWE	4
Experimental 2 (T2)	+	5% ACWE	4
Experimental 3 (T3)	+	10% ACWE	4

[0118]

[0120]

5-3. 아급성 피부염 유발 및 시료 도포

[0121]

아급성 피부염 유발 실험을 위해, 마우스의 귀 부위를 동물용 전기 제모기(electric clipper)로 제모하고, 이후부터 일주일 간격으로 제모를 수행하였다.

[0122]

옥사졸론을 아세톤에 용해시켜 2% 옥사졸론 용액을 제조하고, 상기 용액 50 mL을 제모된 마우스 귀 부위 피부에 2일 간격으로 2회 도포하여 아토피성 피부염을 감작(sensitization)시켰다. 실험 6일째에 마우스의 양쪽 귀에 2% 옥사졸론 용액을 20 mL씩 도포하여 아급성 피부염을 유발(challenge)하였다. 아급성 피부염을 유발(challenge)하고 15분 후, 아세톤을 이용하여 시험물질을 농도 별로 용해시킨 다음 20 μ L씩 양쪽 귀에 도포하였다. 2% 옥사졸론 용액 도포 6시간 후에 시험물질을 동일한 부위에 2차 도포하였다.

[0124]

5-4. 음수량, 사료량, 체중 변동 및 사료 효율 산출

[0125]

음수량, 사료량, 체중 변동은 매주 1회, 오전 10시에 측정하였으며, 사료 효율은 사료량과 체중 변동의 결과값을 수식에 대입하여 산출하였다.

[0127]

사료 효율은 하기 계산식 2에 의해 산출하였다.

[0128]

[계산식 2]

[0129]

사료 효율(%) = (체중 증가량/사료 섭취량) $\times$ 100

[0131]

그 결과, 하기 표 4를 참조하여 보면, 음수량에서는 실험군에서 경미한 증가양상이 관찰되었고, 사료양에서는 실험군에서 증가 양상이 관찰되었다. 체중 변동에서 실험군과 양성대조군이 감소 양상을 나타내었으며, 사료 효율에서는 T3군이 양성대조군보다 높은 유의성 있는 수치의 효율을 나타내었다.

표 4

Items	Groups						
	NC	C	VC	PC	T1	T2	T3
Water intake (ml/day)	11.83±1.33 ^a	15.00±6.32 ^a	14.17±3.25 ^a	14.17±2.75 ^a	15.00±2.47 ^a	13.17±1.44 ^a	15.00±2.14 ^a
Feed intake (g/day)	3.89±0.84 ^a	4.51±0.35 ^{ab}	4.76±0.33 ^b	4.44±0.67 ^{ab}	4.62±0.31 ^b	4.43±0.49 ^{ab}	4.89±0.61 ^b
Body weight gain (g/day)	0.41±0.24 ^c	0.41±0.27 ^c	0.04±0.08 ^a	0.22±0.17 ^{abc}	0.23±0.16 ^{abc}	0.16±0.09 ^{ab}	0.34±0.13 ^{bc}
Feed efficiency ratio ¹⁾ (%)	9.96±5.93 ^c	8.99±6.10 ^c	0.89±1.57 ^a	5.37±4.55 ^{abc}	5.17±3.80 ^{abc}	3.51±1.18 ^{ab}	7.21±3.01 ^{bc}

[0133]

[0135] 5-5. 귀 무게 및 귀 두께 억제율 분석

[0136] 실험 7일째에 2% 옥사졸론 용액 도포 24시간 후, 마우스는 경추 탈골법으로 안락사 시키고, 귀 두께를 측정 후 6 mm 생검 펀치로 귀 샘플을 채취하여 무게를 측정하였다.

[0138] 억제율은 하기 계산식 3에 의하여 산출하였다.

[0139] [계산식 3]

[0140] $\text{억제율}(\%) = 1 - (\text{시험 위치} - \text{비 처리}) / (\text{옥사졸론 위치} - \text{비 처리})$

[0142] 그 결과, 도 6을 참조하여 보면, 옥사졸론 유도 아급성 피부염 동물모델에서 귀 두께 변화 결과는 대조군과 용매대조군에서 증가 양상을 나타내었고, 실험군과 양성대조군에서 유의한 귀 두께의 감소 양상을 나타내었다.

[0143] 도 7은 옥사졸론 유도 아급성 피부염 동물모델의 귀 두께 측정 결과를 이용하여 평균값으로 각 군의 억제율을 나타낸 것이다. 양성대조군에서 84.7%의 높은 귀 두께 억제율을 나타내었고, 마퀴베리 열수 추출물의 실험군 1%, 5%, 10%에서는 각각 48.8%, 51.3%, 69.3%로 농도의존적인 높은 귀 두께 억제율을 나타내었다.

[0144] 또한, 도 8은 옥사졸론 유도 아급성 피부염 동물모델의 귀 무게 측정 결과를 이용하여 평균값으로 각 군의 억제율을 나타낸 것이다. 양성대조군에서 46.4%의 높은 귀 무게 억제율을 나타내었고, 마퀴베리 열수 추출물의 실험군 1%, 5%, 10%에서는 각각 25.5%, 29.8%, 28.1%로 농도의존적인 높은 귀 무게 억제율을 나타내었다.

[0146] 5-6. 헤마톡실린 & 에오신 염색 분석

[0147] 부검 시, 절취한 피부조직을 10% 포르말린(formalin)으로 24시간 동안 고정시킨 후, 조직 처리 과정에 따라 수 세, 탈수, 투명, 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직은 4 μm 두께의 절편으로 제조하여 헤마톡실린 & 에오신(hematoxylin & eosin; H&E) 염색을 수행한 다음 광학 현미경을 이용하여 표피의 두께, 염증세포 침윤 등 피부조직의 변화를 관찰하였다.

[0148] 그 결과, 도 9 및 도 10을 참조하여 보면, 옥사졸론만 처리한 대조군과 용매대조군에서 표피 두께의 증가 및 많은 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 실험군과 양성대조군에서는 상대적으로 표피 두께가 감소하였으며, 염증세포의 침윤 또한 감소하여 정상군과 유사한 수준을 나타내었다. 마퀴베리 열수 추출물을 처리한 실험군에서 농도의존적으로 표피의 두께와 염증의 침윤이 감소하는 것을 관찰하였다.

[0150] 실시예 6 : in vivo 아토피성 피부염증 동물모델

[0151] 6-1. DNCB 유도 아토피성 피부염증 모델

[0152] 생후 5주령의 수컷 BALB/c 마우스를 (주)샘타코(오산, 한국)에서 분양받아 일주일간 특정 병원체 부재 무균 사육실에서 온도 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$, 명암주기 12시간 밤/12시간 낮으로 조절되는 표준 사육환경 조건에서 순화 과정을 거친 후, 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 사료(Purina, 한국)와 물의 양은 제한 없이 공급하였다. 실험의 모든 과정은 계명대학교 동물실험 윤리위원회의 승인(승인번호 KM-2016-21)을 받아 동물실험 규정에 의거하여 실험을 수행하였다.

[0154] 6-2. 실험군 구성

[0155] 각 군 당 6마리씩 난괴법에 의해 분류하였고, 표 5와 같이, 정상군(N), 2,4-디니트로클로로벤젠(2,4-dinitrochlorobenzene; DNCB)을 도포하여 아토피성 피부염을 유발한 대조군(C), 아토피성 피부염을 유발한 뒤 아세트:올리브 오일 = 4:1(AOO)을 처리한 용매대조군(VC), 아토피성 피부염을 유발한 뒤 텍사메타손 연고 0.5%를 처리한 양성대조군(PC), 아토피성 피부염을 유발한 뒤 마퀴베리 열수 추출물(ACWE) 1%를 처리한 실험군(T1), 아토피성 피부염을 유발한 뒤 마퀴베리 열수 추출물 6%를 처리한 실험군(T2)으로 구성하였다.

표 5

Groups	Atopic-like dermatitis induction	Test compound	No. mice
Normal (N)	-	-	5
Control (C)	+	-	5
Vehicle Control (VC)	+	Acetone:Olive oil = 4:1	5
Positive Control (PC)	+	0.5% Dexamethasone	5
Experimental 1 (T1)	+	1% ACWE	5
Experimental 2 (T2)	+	6% ACWE	5

[0157]

[0159] 6-3. 아토피성 피부염 유발 및 시료 도포

[0160] DNCB를 용매 물질에 용해시켜 1% DNCB 용액을 제조하고, 상기 용액 150 μL 를 제모된 마우스 등 부위 피부에 3일간격으로 2회 도포하여 아토피성 피부염을 감작(sensitization)시켰다. 7일째 되는 다음 일주일에는 0.2% DNCB 용액을 3일간격으로 2회 도포하여 아토피성 피부염을 유발(challenge)하였다. 아토피성 피부염 유발 후, 주 5회, 4주 동안 텍사메타손 150 μL 또는 마퀴베리 열수 추출물 200 μL 를 환부에 도포하였다. 아토피성 피부염의 지속적인 유지를 위해, 시료 처리 기간 중 주 1회 0.2%의 DNCB 용액을 처리하였다.

[0162] 6-4. 음수량, 사료량, 체중 변동 및 사료 효율 산출

[0163] 음수량, 사료량, 체중 변동은 매주 1회, 오전 10시에 측정하였으며, 사료 효율은 사료량과 체중 변동의 결과값을 수식에 대입하여 산출하였다.

[0164] 그 결과, 하기 표 6을 참조하여 보면, 음수량에서 실험군은 다른 모든 군보다 경미한 증가 양상을 나타내었으며, 사료량에서 실험군과 양성대조군은 감소 양상을 나타내었다. 체중 변동에서 실험군은 경미한 증가 양상이 나타내었으며, 사료 효율에서 실험군은 다른 모든 군보다 증가 양상을 나타내었다.

표 6

Items	Groups					
	NC	C	VC	PC	T1	T2
Water intake (mL/day)	5.73±0.24 ^a	5.70±0.28 ^a	5.72±0.31 ^a	5.87±0.57 ^a	6.01±0.60 ^a	5.98±0.56 ^a
Feed intake (g/day)	4.44±0.30 ^b	4.15±0.62 ^{ab}	3.96±0.48 ^{ab}	3.71±0.16 ^a	4.36±0.72 ^{ab}	4.09±0.48 ^{ab}
Body weight gain (g/day)	0.43±0.40 ^b	0.46±0.43 ^b	0.42±0.53 ^b	-0.64±0.64 ^a	0.52±0.67 ^b	0.48±0.49 ^b
Feed efficiency ratio ¹⁾ (%)	9.74±9.39 ^b	7.45±6.97 ^b	7.91±10.42 ^b	-17.70±17.6 ^a	12.68±16.8 ^b	11.98±13.0 ^b

[0166]

[0168]

6-5. 행동학적(itching) 관찰

[0169]

아토피성 피부염 발생에 따른 행동학적 특징을 관찰하기 위해, 마우스가 다리를 이용해 안면, 목, 등 부위의 피부를 긁는 횟수(scratching frequency)를 시료 처리 전과 실험 종료 시에 30분간 측정하여 군 간 비교 분석하였다.

[0170]

그 결과, 하기 표 7을 참조하여 보면, 양성대조군과 실험군 T1, T2군에서는 시료 처리 6주 후 대조군에 비해 유의한 감소 경향을 나타내었다. 정상군에서는 긁는 횟수의 차이가 관찰되지 않았다.

표 7

Weeks	Groups					
	NC	C	VC	PC	T1	T2
0	1.0±0.70 ^a	14.2±4.44 ^b	13.3±3.27 ^b	13.33±3.78 ^b	13.5±2.17 ^b	14.0±4.34 ^b
6	1.0±1.00 ^a	16.8±5.26 ^c	15.7±2.34 ^c	5.80±2.59 ^b	9.17±1.72 ^b	9.67±3.33 ^b

[0172]

[0174]

6-6. 기기를 이용한 분석

[0175]

6-6-1. 경피 수분 손실량(transepidermal water loss, TEWL)

[0176]

시료 처리 전과 실험 종료 후의 경피 수분 손실량을 측정하기 위해, 경피 수분 손실량 측정기(tewameter)를 이용하여 마우스 등의 동일한 부위에 10회 반복 비침습 방법으로 측정하여 평균값을 구한 다음 군 간 비교 분석하였다.

[0177]

그 결과, 하기 표 8을 참조하여 보면, 아토피성 피부염을 유발한 군에서 높은 수분 손실량 수치를 보였으나, 시료 처리 실험 종료 후, 정상군을 제외한 모든 군에서 수치가 감소하는 것을 확인하였다.

표 8

Weeks	Groups					
	NC	C	VC	PC	T1	T2
0	12.76±2.23 ^a	35.86±4.12 ^b	43.51±6.39 ^c	44.30±5.21 ^c	42.52±6.82 ^c	37.87±3.61 ^{bc}
6	13.16±2.11 ^a	50.76±12.72 ^c	52.15±12.86 ^c	14.78±1.94 ^a	24.92±10.40 ^{ab}	28.17±6.82 ^b

[0179]

[0181]

6-6-2. 홍반도 측정

[0182]

시료 처리 전과 실험 종료 후의 홍반도를 측정하기 위해, 색차계(mexameter)를 이용하여 마우스 등의 동일한 부위에 5회 반복 비침습 방법으로 측정하고 평균값을 구한 다음 군 간 비교 분석하였다.

[0183]

그 결과, 하기 표 9를 참조하여 보면, 시료 처리 전 정상군에 비해 아토피성 피부염을 유발한 군에서 높은 홍반도 수치를 나타내었고, 대조군, 양성대조군, 실험군 간에 유의한 차이는 없었으며, 시료 처리 종료 후, 실험군 T1에서 가장 높은 홍반도 감소 수치를 나타내었다.

표 9

Weeks	Groups					
	NC	C	VC	PC	T1	T2
0	166.8±3.49 ^a	217.8±13.70 ^b	228.5±14.27 ^b	226.8±19.28 ^b	229.3±25.67 ^b	216.8±22.01 ^b
6	179.4±10.55 ^a	261.4±21.10 ^c	277.5±21.38 ^c	228.4±10.01 ^b	216.5±13.90 ^b	220.2±28.87 ^b

[0185]

[0187]

6-7. 피부 병변 육안관찰

[0188]

제모한 등 부위의 피부 병변 상태를 확인하기 위해, 주 1회 마취 후 사진 촬영을 수행하였다. 각 군의 아토피성 피부염 상태는 육안으로 관찰하였을 때 홍반, 부종, 가피, 찰과상, 태선화, 건조 등의 증상이 관찰되었으며, scored index 평가방법으로 없음(0), 경증(1), 중간(2), 중증(3)으로 판정하고, 각 군 별로 평균치를 산정하여 분석하였다.

[0189]

그 결과, 도 11 및 도 12를 참조하여 보면, 양성대조군과 실험군에서 시료 처리 2주차부터 피부 병변이 회복되는 양상을 나타내었고, 6주차에는 거의 정상군과 유사한 육안적 변화를 관찰할 수 있었다.

[0191]

6-8. 혈액학적 분석

[0192]

6-8-1. 혈액학적 면역 지표치의 변화 측정을 위한 채혈

[0193]

시료 처리 전 안와정맥총(retro-orbital plexus)에서 모세관 튜브(capillary tube)를 이용하여 약 100 mL의 혈액을 채취하였고, 실험 종료 후 희생 부검 시, 심장에서 채혈을 실시하여 혈액을 채취하였다. 안와채혈과 심장 채혈을 통해 얻은 혈액은 원심분리하여 혈청을 분리한 다음 - 80℃에서 냉동 보관하여 차후 분석을 수행하였다.

[0195] 6-8-2. 혈청 내 IgE 측정

[0196] 냉동 보관 중인 혈청은 측정 전 즉시 해동하여, 혈청 내 존재하는 IgE 수준을 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)으로 정량하였다. 항체가 코팅된 웰에 시험물질과 IgE 표준 용액을 각각 50 mL씩 첨가하고 20 내지 25℃ 조건에서 2시간 동안 배양시킨 후, 비오틴(biotin)이 접합된 항 IgE 항체를 50 mL씩 첨가하고 20 내지 25℃ 조건에서 2시간 동안 재배양시켰다. 이후, HRP(horse radish peroxidase)가 접합된 아비딘(avidin)을 50 mL씩 첨가하고 20 내지 25℃ 조건에서 1시간 동안 배양시킨 후, 마지막으로 발색 기질 시약(chromogenic substrate reagent)을 50 mL씩 첨가하고 20 내지 25℃ 조건에서 20분 동안 재배양시켰다. 그 후, 반응 종결제로 산성 용액을 50 mL씩 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 ELISA 리더기를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0197] 그 결과, 하기 표 10을 참조하여 보면, 아토피성 피부염을 유발한 군은 정상군에 비해 IgE 수준이 약 2.5배 정도 증가하였고, 군 간의 차이는 관찰되지 않았다. 시료 처리 6주 후, 정상군에서는 차이가 거의 관찰되지 않았고, 대조군과 용매대조군에 비해 실험군과 양성대조군에서 IgE 수준이 감소하였다.

표 10

IgE	Groups					
	NC	C	VC	PC	T1	T2
week 0	23.138±13.32 ^a	47.636±18.43 ^b	52.053±5.11 ^b	47.091±15.27 ^b	47.428±8.15 ^b	52.580±15.96 ^b
week 6	24.942±8.49 ^a	44.426±8.45 ^{bc}	53.158±15.73 ^c	27.807±9.47 ^a	33.729±7.32 ^{ab}	31.610±8.60 ^a

[0199]

[0201] 6-9. 비장 세포 배양 및 사이토카인 측정

[0202] 6-9-1. 비장세포 배양

[0203] 실험동물을 희생시키고 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI-1640 배지로 세척하였다. 세척한 비장을 멸균 유리봉으로 가볍게 분쇄하고 세포를 유리시켜 세포 현탁액 상태로 만든 후, 70 μm 나일론 세포 여과기(nylon cell strainer)에 통과시킨 다음 1500 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후, 비장 세포에 포함된 적혈구는 용해 버퍼(lysis buffer)를 이용하여 제거하고, 적혈구가 제거된 비장 세포는 3회 반복하여 세척하였다. 적혈구 제거를 위한 실험 과정은 24℃ 온도에서 수행하였으며, 다른 실험 과정은 4℃ 온도에서 수행하였다.

[0204] 세포 배양에 사용된 플레이트는 배양 24시간 전, 각 웰 당 1.25 μg/500 mL의 CD3e를 분주하여 코팅하였다. 세포 배양 시, 사용되는 배지는 10% 우태아혈청, 1 mM 피루브산 나트륨(sodium pyruvate), 50 mM 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 7.5% 탄산수소나트륨(sodium bicarbonate) 용액, MEM 비필수 아미노산(non-essential amino acid) 용액을 함유한 RPMI-1640 배지를 사용하였고, 2×10⁶ 세포/mL 농도로 희석하여 1 mL/웰 농도로 분주한 후, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 현미경을 이용하여 세포의 모양을 확인하고, 상층액을 모아 -80℃에 보관하였다.

[0206] 6-9-2. 비장 내 사이토카인 측정

[0207] 비장 세포 내 분비되는 마우스 사이토카인의 농도는 마우스 사이토카인/케모카인 마그네틱 비드 패널(Milliplex mouse cytokine/chemokine magnetic bead panel)을 이용하여 Luminex 200로 INF-γ 및 IL-4를 각각 측정하였다.

[0208] 그 결과, 하기 표 11을 참조하여 보면, Th1 생성 사이토카인인 INF-γ는 대조군 및 용매대조군과 비교하여 실험군 및 양성대조군에서 유의하게 증가하였다. Th2 생성 사이토카인인 IL-4는 아토피성 피부염을 유발하지 않은

정상군에서 가장 낮은 수준을 보였고, 대조군 및 용매대조군과 비교하여 실험군 및 양성대조군에서 유의하게 감소하였다.

표 11

IgE	Groups					
	NC	C	VC	PC	T1	T2
IFN- γ	91.410 $\pm$ 16.62 ^d	51.858 $\pm$ 6.83 ^a	59.119 $\pm$ 15.56 ^{ab}	79.415 $\pm$ 18.13 ^{cd}	70.229 $\pm$ 32.25 ^{abc}	72.533 $\pm$ 22.93 ^{bc}
IL-4	45.596 $\pm$ 11.57 ^a	98.459 $\pm$ 37.71 ^c	86.416 $\pm$ 21.95 ^{bc}	57.060 $\pm$ 15.20 ^{ab}	75.704 $\pm$ 55.78 ^{bc}	66.247 $\pm$ 21.41 ^{ab}

[0210]

[0212] 또한, 비장 T 림프구의 사이토카인 측정에 있어서, 동일 배양액 내 IFN- γ 및 IL-4의 생성 수준의 비(ratio)를 분석하기 위해, 배양액 내 생성된 IFN- γ 의 수준을 IL-4의 수준으로 나눈 생성비(IFN- γ /IL-4)를 계산하여 도 13에 나타내었다. 그 결과, 대조군과 용매대조군에서는 IFN- γ 의 감소와 IL-4의 증가로 인해 생성비가 정상군에 비해 유의하게 감소하고, 실험군과 양성대조군에서는 생성비가 유의하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0214] 6-10. 피부 조직의 병리학적 관찰

[0215] 6-10-1. 헤마톡실린 & 에오신 염색 분석

[0216] 부검 시, 절취한 피부조직을 10% 포르말린에 24시간 동안 고정시킨 후, 조직 처리 과정에 따라 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직은 4 μ m 두께의 절편으로 제조하여 헤마톡실린 & 에오신 염색을 수행한 다음 광학 현미경을 이용하여 표피의 두께, 염증세포 침윤 등 피부조직의 변화를 관찰하였다.

[0217] 그 결과, 도 14 및 도 15를 참조하여 보면, DNCB를 처리한 대조군과 용매대조군에서 표피의 두께가 정상군에 비해 많이 두꺼워졌으며, 실험군과 양성대조군에서는 표피의 두께가 정상군과 유사한 수준으로 감소한 것을 관찰할 수 있었다.

[0219] 6-10-2. 톨루이딘 블루 염색 분석

[0220] 포매된 조직은 4 μ m 두께의 절편으로 제조하여 톨루이딘 블루(toluidine blue) 염색을 수행한 다음 광학 현미경을 이용하여 진피 내 비만세포(mast cell)의 분포 및 탈과립 양상을 관찰하였다.

[0221] 그 결과, 도 16 및 도 17을 참조하여 보면, DNCB를 처리한 대조군과 용매대조군에서 비만세포의 개수가 정상군에 비해 높게 증가하였으며, 실험군과 양성대조군에서는 비만세포의 개수가 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0223] 6-10-3. 콩고 레드 염색 분석

[0224] 포매된 조직은 4 μ m 두께의 절편으로 제조하여 콩고 레드(congo red) 염색을 수행한 다음 광학 현미경을 이용하여 피부조직의 호산구 발현량을 관찰하였다.

[0225] 그 결과, 도 18 및 도 19를 참조하여 보면, DNCB를 처리한 대조군과 용매대조군에서 호산구의 개수가 정상군에 비해 높게 증가하였으며, 실험군과 양성대조군에서는 호산구의 개수가 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0227] 실시예 7 : 안전성 평가

[0228] 7-1. 인공 피부 모델 Labcyte EPI-MODEL24 을 이용한 자극시험

[0229] 사람의 표피 구조와 유사하게 기저층, 유극층, 과립층, 각질층으로 분화된 4개의 층을 가진 Labcyte EPI-

MODEL24(J-TEC. co)를 이용하여 실험을 수행하였다. 조직의 표면적은 0.64 cm^2 이며, 24 웰 플레이트에 담긴 아가로스 겔(agarose gel) 표면에 고정시켰다.

[0231] 7-2. 실험군 구성

[0232] Labcyte EPI-MODEL24는 자극성과 비자극성 판정을 위해 사용되었으며, 시험 물질과 군의 구성은 하기 표 12와 같다. OECD 시험법(test guideline) 437에서 제시된 음성 대조물질과 양성 대조물질을 참조하였으며, 음성 대조물질은 증류수(distilled water; D.W), 양성 대조물질은 5% 로릴 황산 나트륨(sodium lauryl sulfate; SLS)(Sigma, USA)을 이용하였다.

표 12

Groups	Test compound
Normal (N)	Distilled water
Positive Control (PC)	5% Sodium Lauryl Sulfate
Experimental 1 (T1)	10 mg/ml
Experimental 2 (T2)	100 mg/ml

[0234]

[0236] 7-3. 피부 자극 평가

[0237] 자극 평가 시험은 (주)J-TEC에서 제조된 Labcyte EPI-MODEL24를 당일 배송 받아 세포의 안정화를 위해서 전-배양(pre-incubation)을 실시하였고, 각 웰 당 0.5 mL의 배지를 첨가한 24 웰 플레이트에 인공 피부 모델의 insert를 배치시킨 후, 37℃, 5% CO₂ 조건으로 15시간 동안 전-배양시켰다. 그 후, Labcyte EPI-MODEL24의 insert 내부에 직접 25 mL의 시험물질을 고르게 적용시켰다. 물질 적용 시간 15분(± 30초) 이후, 시험물질의 세척을 수행하였다. 세척병을 이용하여 insert 내부의 세포를 건들지 않게 인산완충식염수를 insert 벽을 타고 흘러 10회 세척하여 시험물질을 제거하고, 멸균된 면봉과 거즈를 이용하여 물기를 제거한 후, 24 웰 플레이트에 insert를 넣고 각 웰 당 1 mL 배지를 분주한 24 웰 플레이트에 Labcyte EPI-MODEL24의 insert를 넣고 37℃, 5% CO₂ 조건으로 42시간(± 1시간) 동안 후-배양(post-incubation)을 실시하였다.

[0238] MTT 분석 실험에서 MTT 용액은 사용 직전 용시조제를 원칙으로 하였다. 30분 전 37℃로 유지시킨 분석 배지에 0.3 mg/mL로 조제한 MTT 용액을 24 웰 플레이트에 0.5 mL씩 분주해 놓고 후-배양이 끝난 Labcyte EPI-MODEL24의 insert를 배치시킨 뒤 차광하여 37℃, 5% CO₂ 조건으로 3시간(±5분) 동안 배양하였다. 배양을 마친 뒤 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol, Wako, Japan)을 0.3 mL/웰 씩 넣어 놓은 마이크로 튜브(micro tube)에 insert의 세포를 꺼내어 옮긴 후, 차광하여 15 내지 30시간 동안 포르마잔(formazan)을 추출하였다. 추출한 포르마잔 용액을 96 웰 플레이트에 200 μL씩 분주하여 ELISA 리더기를 이용해 570 nm 파장에서 흡광도를 측정한 후 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0240] 세포 생존율은 하기 계산식 4에 의해 산출하였다.

[0241] [계산식 4]

[0242] 측정된 OD = [570 nm OD 실험군 - 570 nm OD 비처리] - [650 nm OD 실험군 - 650 nm OD 비처리]

[0244] 세포 생존율(%) = (측정된 OD 실험군/Mean 측정된 OD 대조군) × 100

[0246] 음성 대조물질의 세포 생존율을 100%로 하고, 음성 대조물질의 세포 생존율을 기준으로 양성 대조물질의 세포 생존율을 백분율(%)로 나타내었다. 50% 이상의 세포 생존율을 보이면 비자극성, 50% 미만의 세포 생존율을 보이면 자극성으로 판정하여 관찰한다.

[0247] 그 결과, 도 20은 LabCyte EPI-MODEL24의 피부 자극 평가 결과를 나타낸 것으로, OECD 시험법 437의 자극성 분류기준에 의거하여 양성대조군은 자극성으로 제시되어 분류된 물질이며, 시험 결과 세포 생존율이 50% 이하인 3.4%로 자극성으로 판정되었다. T1, T2군에서 실험 물질에 의한 세포 생존율은 각각 88.3%, 93.7%로 비자극성으로 판정되었다. LabCyte EPI-MODEL24의 허용기준 결과는 하기 표 13과 같다.

표 13

No.	LabCyte			Mean	Result	Reference result
	1	2	3			
NC	106.2	96.5	97.2	100.0	NI	NI
PC	3.2	3.7	3.2	3.4	I	I
T1	83.2	93.4	88.3	88.3	NI	NI
T2	88.16	99.2	93.7	93.7	NI	NI

[0249]

[0251] 7-4. BCOP(bovine corneal opacity and permeability) 분석을 이용한 자극 시험

[0252] 7-4-1. 소 각막 분리

[0253] 소의 안구는 도축장에서 식용 및 상업적 용도에 의해 도축된 것을 공수 받아 사용하였다. 소의 안구는 OECD 시험법 437에서 제시하는 12개월 이상, 60개월 이하이며, 외부적 요인의 의한 손상이 없는 것을 적출하였다. 적출된 소의 안구는 100 IU/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신이 첨가된 4℃ HBSS(Hank's balanced salt solution) 용액에 보관하여 운반하였다. 각막 적출은 공막 2 내지 3 mm 정도로 절개하여 각막과 나머지 부분을 분리하여 사용하였다.

[0255] 7-4-2. 실험군 구성

[0256] BCOP를 이용하여 안점막자극성을 확인하기 위해 사용된 물질의 군 분리는 하기 표 14와 같다. 시약은 OECD 시험법 437에서 제시된 음성 대조물질과 양성 대조물질을 참조하여, 음성 대조물질은 증류수를 사용하였고 양성 대조물질로는 에탄올(Sigma, USA)을 사용하였다.

표 14

Groups	Test compound
Normal (N)	Distilled water
Positive Control (PC)	Ethanol
Experimental 1 (T1)	10 mg/ml
Experimental 2 (T2)	100 mg/ml

[0258]

[0260]

7-5. 혼탁도(opacity) 측정

[0261]

자극 평가 실험을 위해, 분리된 각막을 4℃ HBSS 용액으로 세척한 후, 상피가 상단 챔버 방향을 향하도록 위치시키고, 후방 챔버와 나사를 사용하여 홀더에 장착하였다. 양쪽 챔버에는 페놀 레드(phenol red)가 함유되지 않은 MEM을 채웠다. 초기 혼탁도(initial opacity) 측정은 각막의 초기 혼탁도를 측정하기 위해, 1시간 동안 32℃ 배양기에서 배양한 후, 양쪽 챔버에 페놀 레드가 함유되지 않은 새로운 MEM 배지를 채워 안점막 자극 측정장비(opacitometer)를 사용하여 lux 값을 측정하였다. 혼탁도가 7 이하인 각막만 안자극 실험에 사용하였다. 시험물질 적용 및 배양에서 홀더의 상단 챔버에 있는 MEM 배지를 제거하고 시험물질을 750 μL씩 적용하였다. 안자극 정도를 측정하는 시험물질은 모두 액체물질로서 10분간 적용하였고, 시험물질 처리 후 페놀 레드가 함유된 MEM 배지를 이용하여 3회 이상 세척하였다. 이후 페놀 레드가 함유되지 않은 MEM 배지로 최종적으로 세척한 후, 후-배양하기 전, 페놀 레드가 함유되지 않은 MEM 배지로 채워주었다. 후-배양은 2시간 동안 실시하였다. 최종 혼탁도(final opacity)측정은 각막의 최종 혼탁도를 측정한 후, 상단 챔버의 MEM 배지를 제거하였다. 혼탁도는 각막을 장착하지 않는 홀더의 lux 값과 한 시간 전, 배양한 각막의 lux 값을 대입하여 계산하였으며, 최종 혼탁도는 각막을 장착하지 않는 홀더의 lux 값과 시험물질 처리 2시간 후, 배양한 각막의 lux 값을 계산하였다.

[0263]

혼탁도는 하기 계산식 5에 의해 산출하였다.

[0264]

[계산식 5]

[0265]

$$\text{혼탁도} = (I_0/1-0.09894)/0.0251$$

[0266]

(I₀: 배지만 적용한 홀더의 lux, 1: 각막을 장착한 후 lux 또는 시험물질을 처리한 각막의 lux)

[0268]

7-6. 투과도(permeability) 측정

[0269]

투과도는 Fluorescein sodium을 처리한 각막에서 하단 챔버의 MEM 배지에 통과한 플루오레세인 나트륨(fluorescein sodium) 양을 측정하였다. 32℃ 플루오레세인 나트륨을 1 mL을 각막에 적용하고 32℃ 배양기에서 90분간 적용하였다. 배양 후, 하단 챔버의 MEM 배지를 완전히 뽑아내어 균질하게 섞어준 다음 96 웰 플레이트에 300 μL씩 넣고 ELISA 리더기를 이용하여 490 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

[0271]

투과도는 하기 계산식 6에 의해 산출하였다.

[0272]

[계산식 6]

[0273]

$$\text{투과도} = \text{시험물질 흡광도} - \text{대조군 흡광도}$$

[0275]

7-7. 각막의 자극 수치 측정

[0276]

각막의 자극수치 IVIS(In Vitro Irritancy Score)는 하기 계산식 7에 의해 산출하였으며, 하기 표 15와 같이,

OECD 시험법 437에 등재되어 있는 기준치로 자극을 분류하였다.

[계산식 7]

IVIS = 혼탁도 평 + 15 × 투과도 평균

표 15

<i>In Vitro</i> Irritancy Score	UN GHS
≤ 3	Not classified
> 3 ≤ 55	No prediction can be made
> 55	Category 1

그 결과, 도 21 내지 23 및 하기 표 16을 참조하여 보면, 혼탁도는 양성대조군에서 자극성이 유의하게 높았으며, 정상군과 실험군은 낮은 비자극성을 나타내었다. IVIS 수치는 자극을 분류하기 위한 기준이 되며, OECD 시험법 437에 명시되어 있는 기준으로 시험결과를 판정하였다. 실험군은 정상군과 유사한 낮은 비자극성을 나타내었다.

표 16

Group	BCOP assay		
	Opacity	Permeability	IVIS
NC	1.7 ± 0.4 ^a	0.025±0.003 ^a	2.1±0.4 ^a
PC	30.7± 5.8 ^c	1.979±0.187 ^b	62.0±8.3 ^b
T1	3.1 ± 0.9 ^{ab}	-0.003±0.005 ^a	4.8±0.2 ^a
T1	5.7 ± 0.5 ^b	0.029±0.023 ^a	7.8±0.9 ^a
T3	3.8 ± 0.2 ^{ab}	0.000±0.003 ^a	5.5±0.8 ^a

실시예 8 : 통계 분석

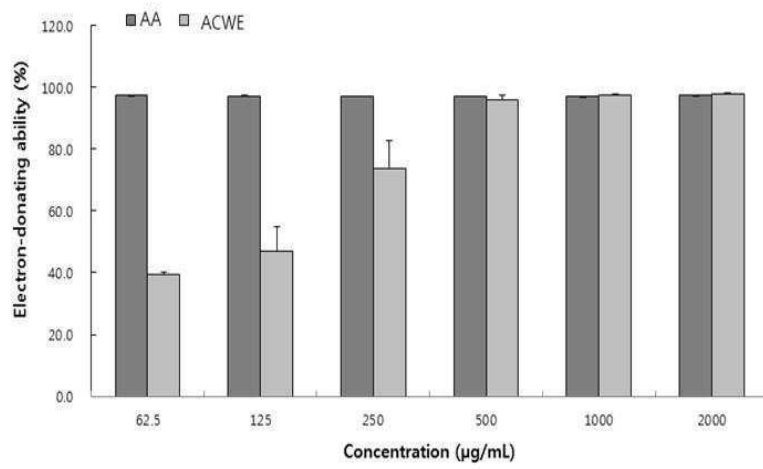
SPSS 21.0(SPSS Inc.,USA) 통계 프로그램을 이용하여 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 수행하였다. 각 군 간의 차이를 검정하기 위하여 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 수행하였다. 본 실험의 통계학적인 유의성 검증 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

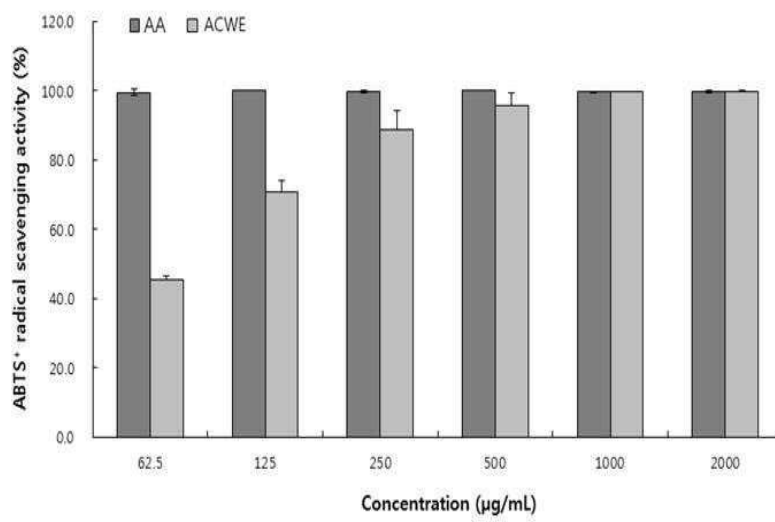
본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

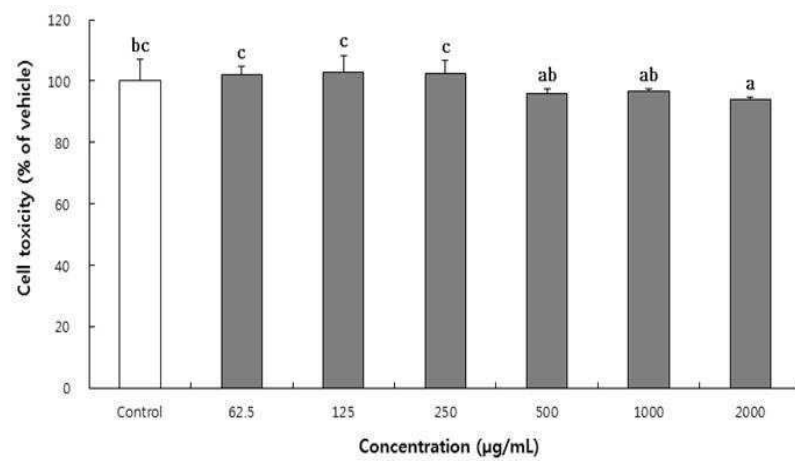
도면1



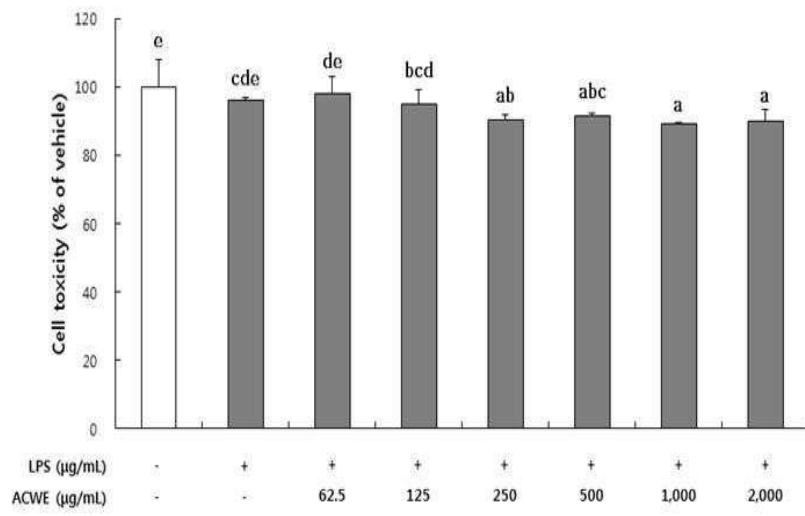
도면2



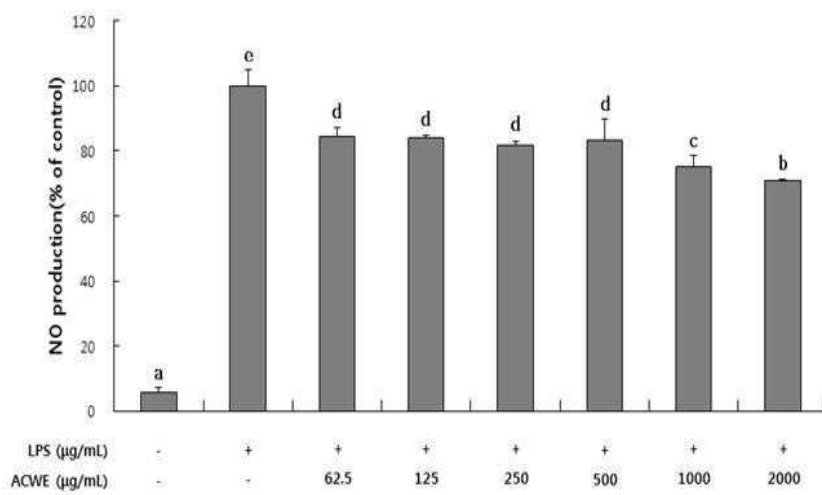
도면3



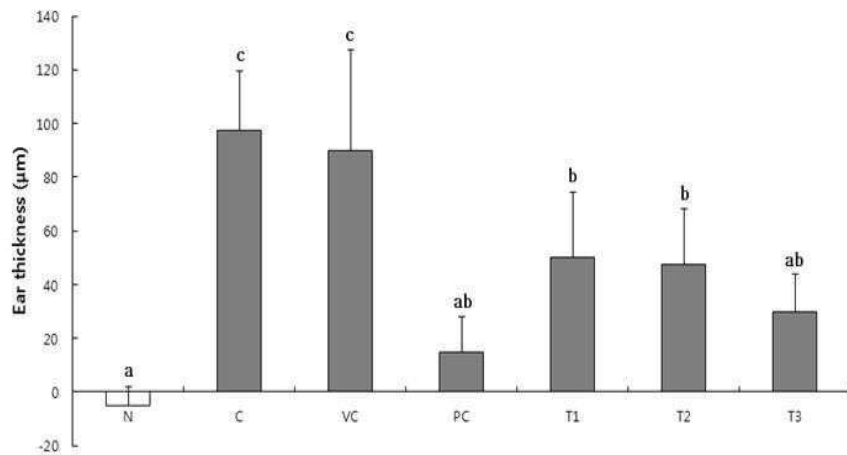
도면4



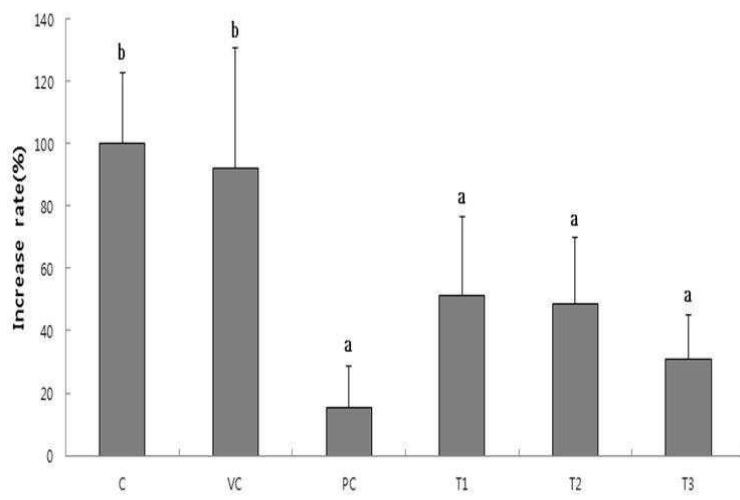
도면5



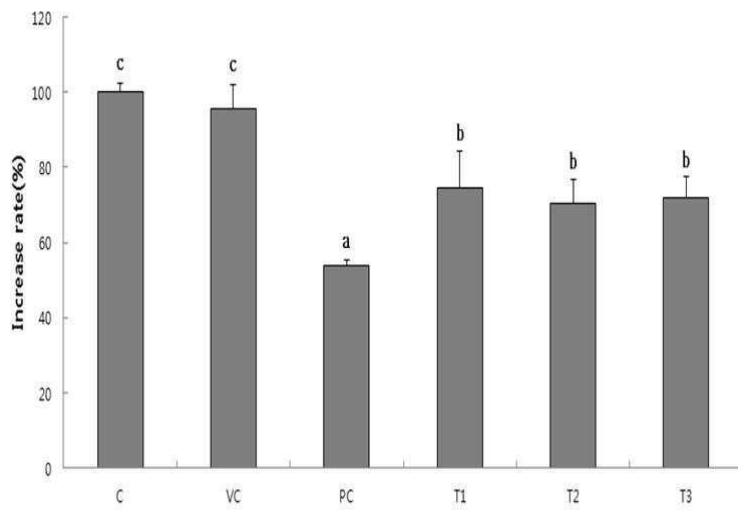
도면6



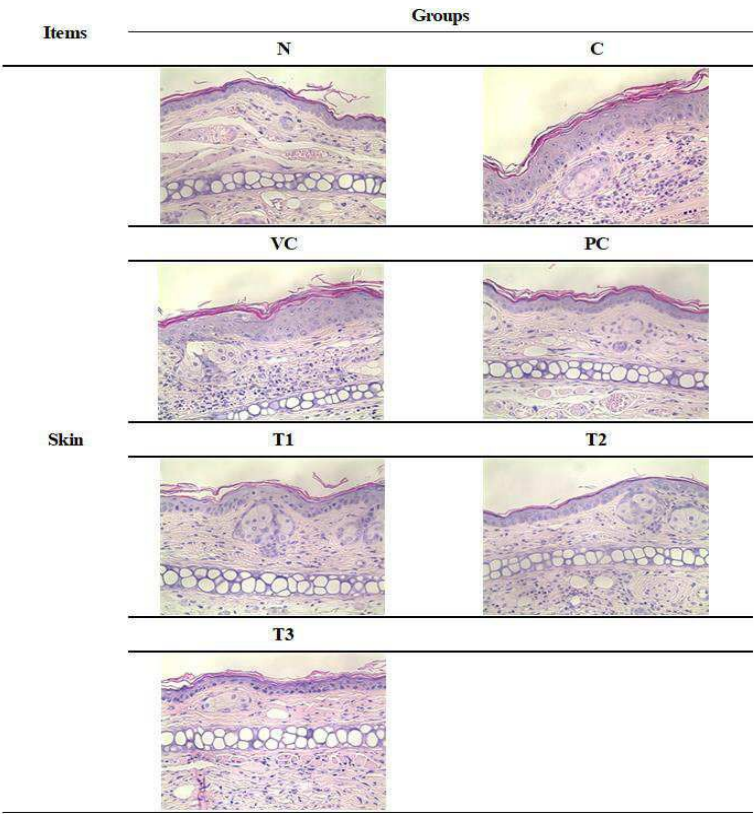
도면7



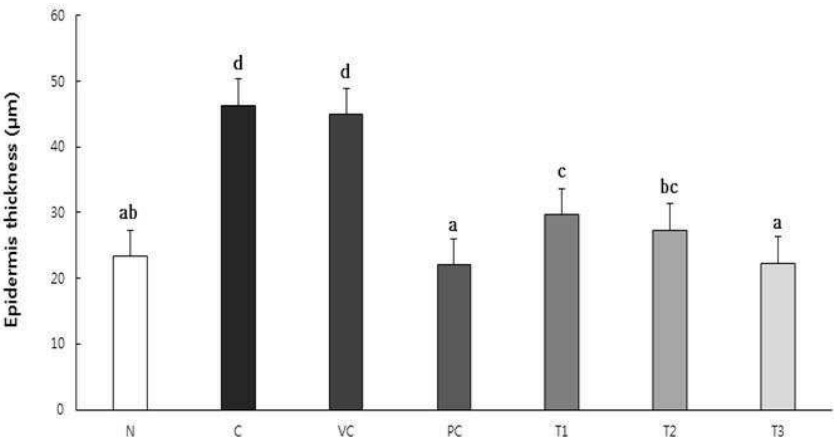
도면8



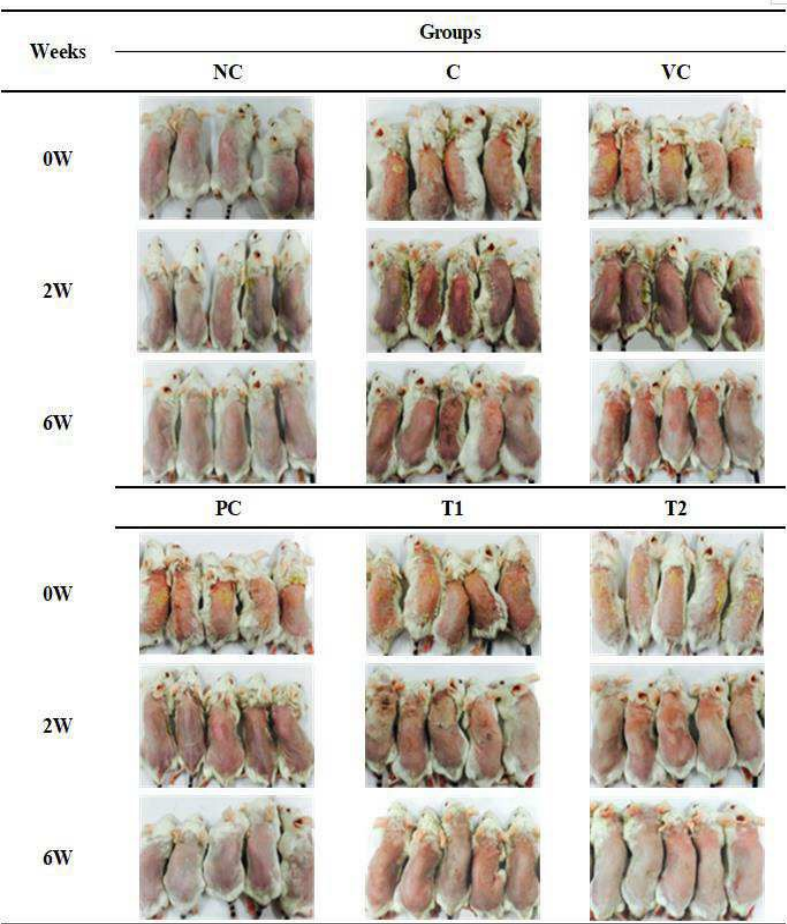
도면9



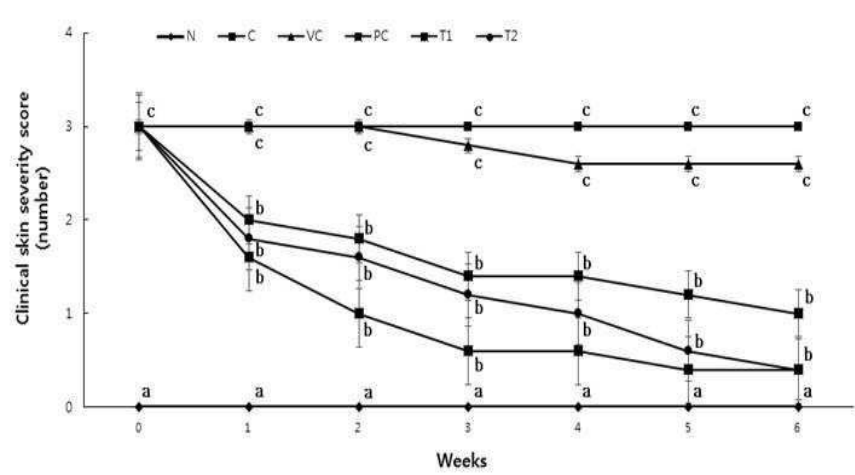
도면10



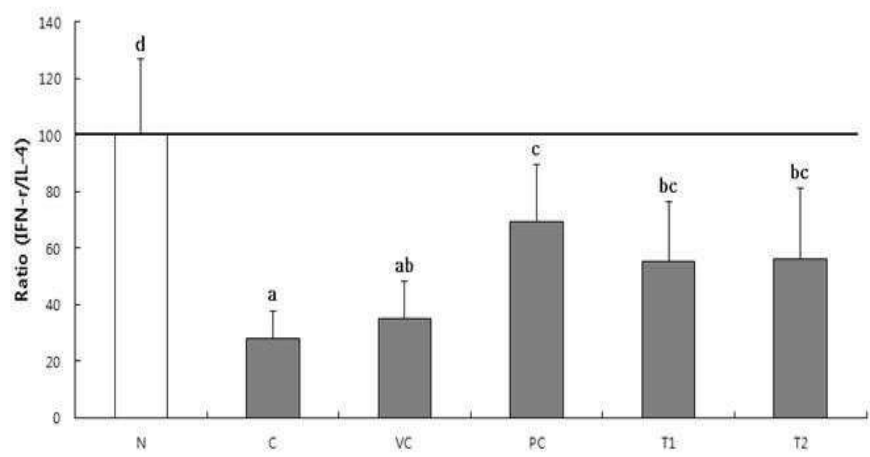
도면11



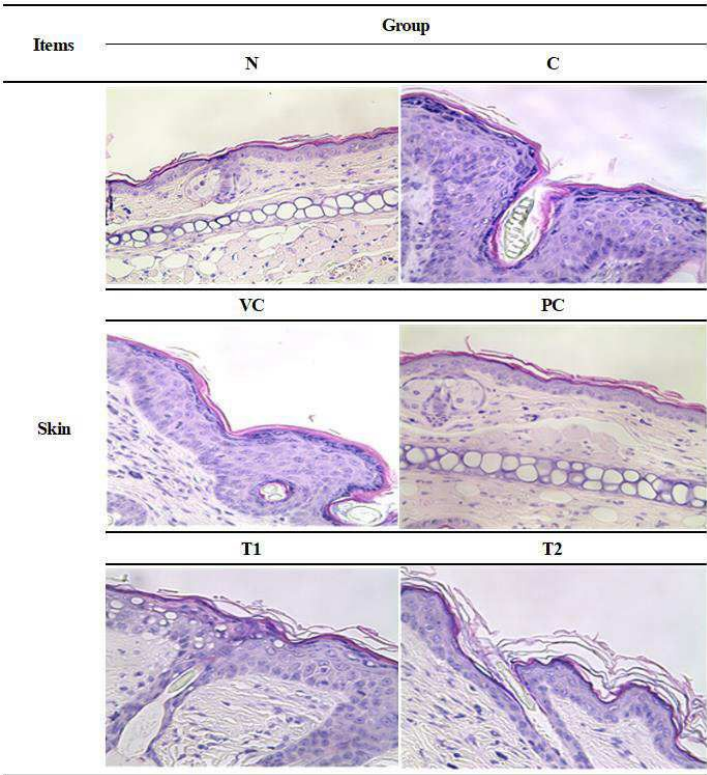
도면12



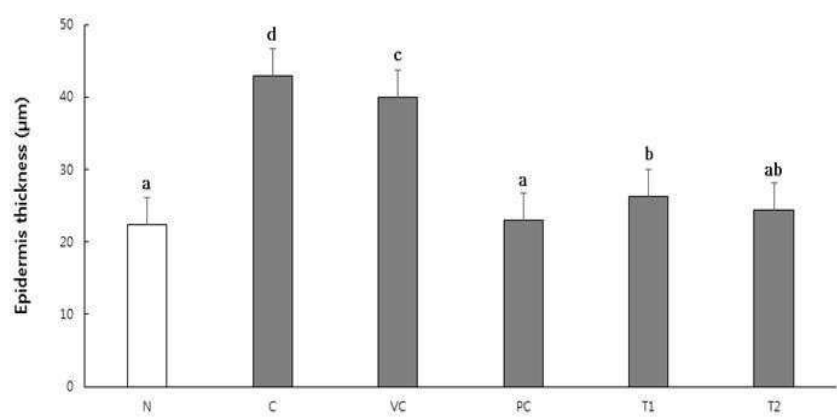
도면13



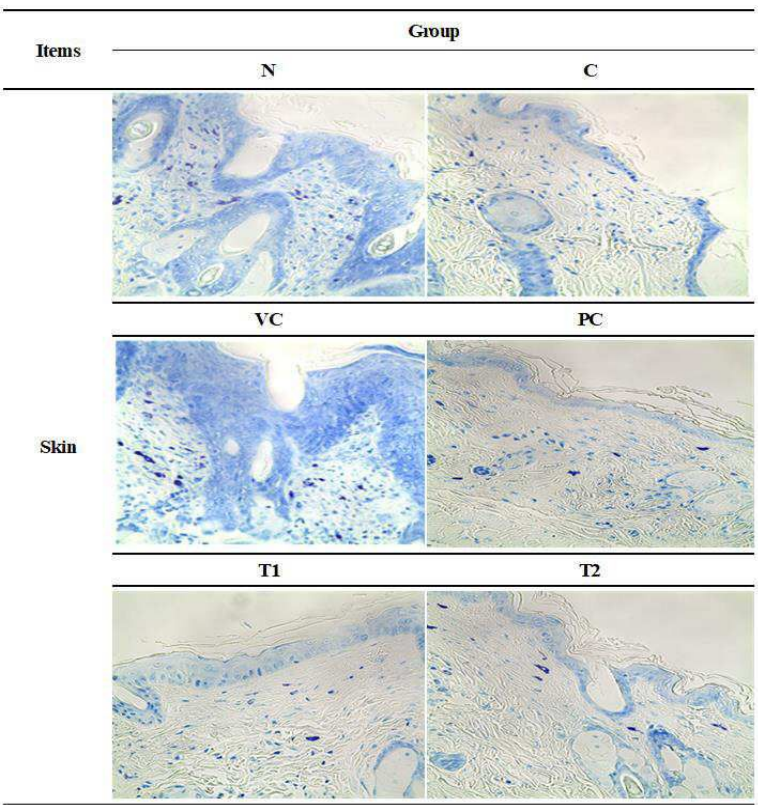
도면14



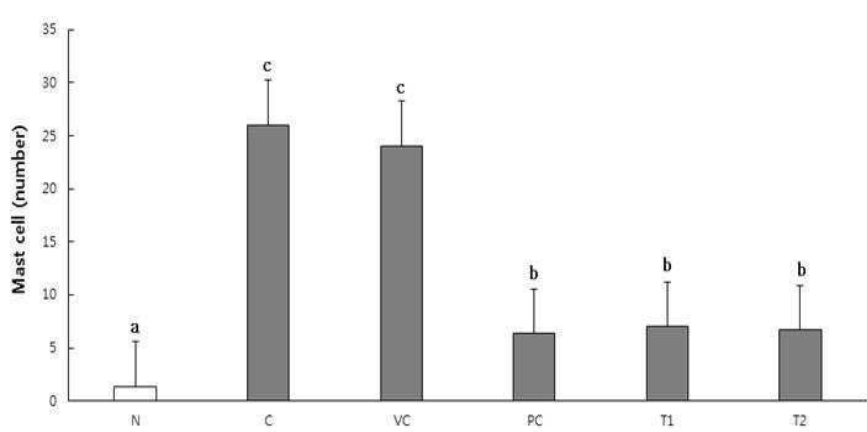
도면15



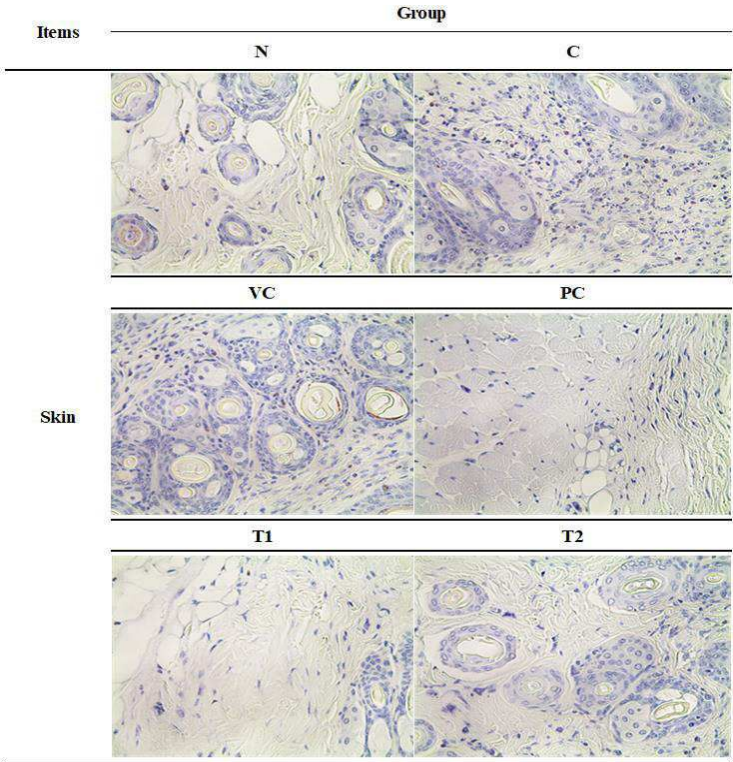
도면16



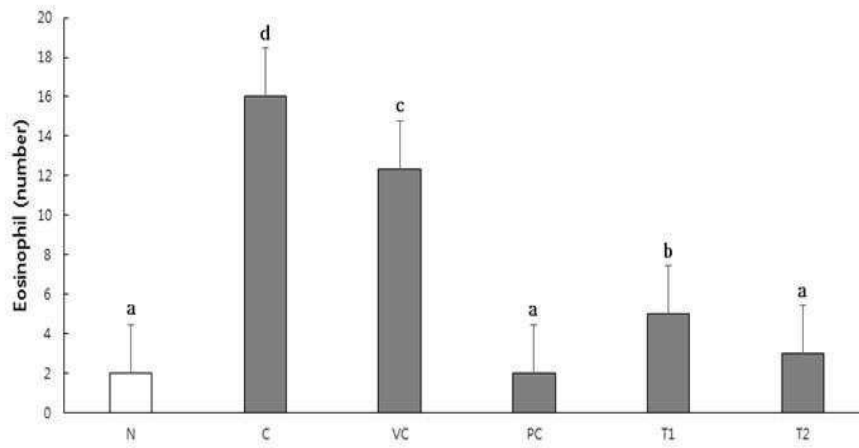
도면17



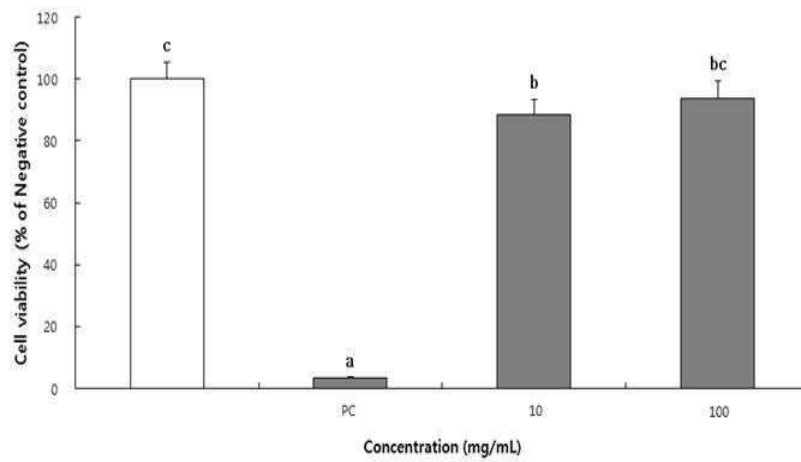
도면18



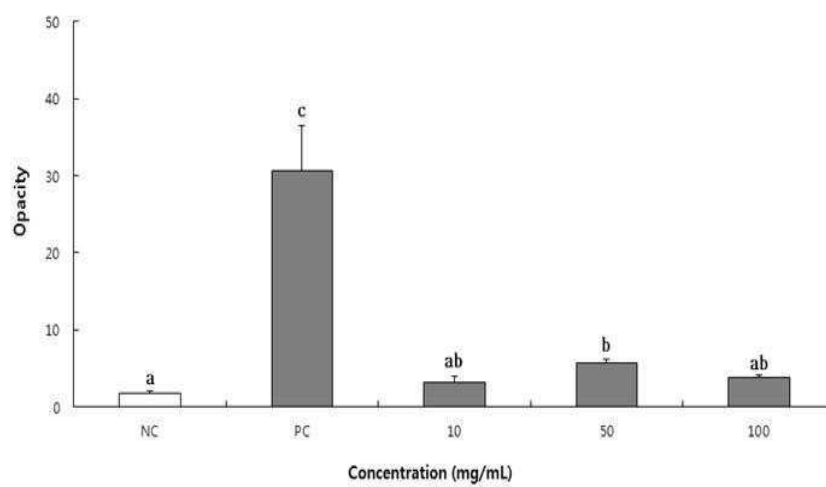
도면19



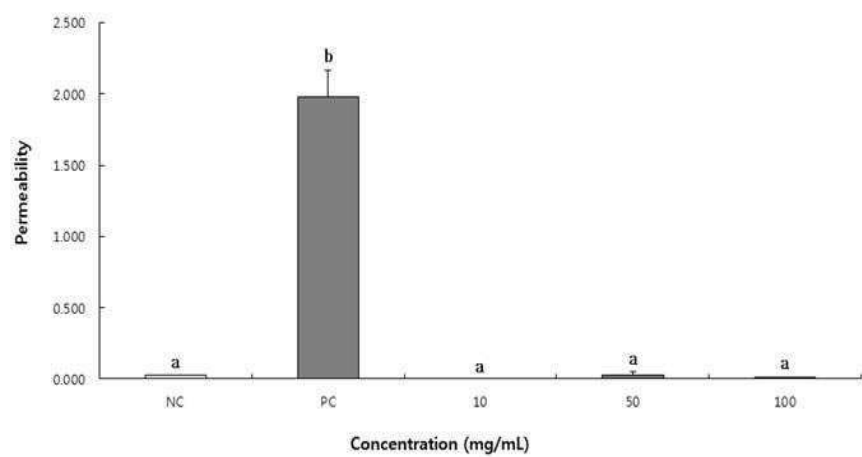
도면20



도면21



도면22



도면23

