



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2016년10월04일  
 (11) 등록번호 10-1661757  
 (24) 등록일자 2016년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 33/06* (2006.01) *A61K 33/14* (2006.01)  
*A61K 8/19* (2006.01) *A61Q 19/10* (2006.01)  
 (52) CPC특허분류  
*A61K 33/06* (2013.01)  
*A61K 33/14* (2013.01)  
 (21) 출원번호 10-2015-0178235  
 (22) 출원일자 2015년12월14일  
 심사청구일자 2015년12월14일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 최종보고서(2015.02.28)\*  
 KR1020120024328 A  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 한국해양과학기술원  
 경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)  
 (72) 발명자  
 김충곤  
 경기도 용인시 수지구 상현로 88, 281동 1604호  
 (상현동, 상현마을 현대성우3차아파트)  
 이윤호  
 서울특별시 강남구 도곡로18길 34, 2동 1011호 (도곡동, 현대아파트)  
 (74) 대리인  
 특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 10 항

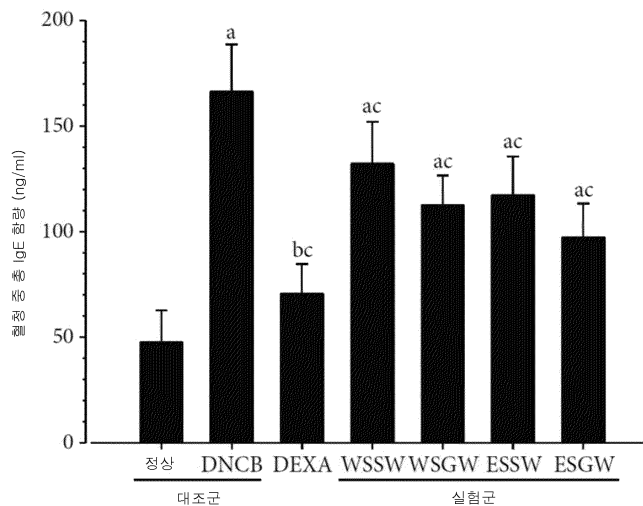
심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 **염지하수를 포함하는 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료용 조성물**

**(57) 요약**

본 발명의 염지하수 또는 이의 농축물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료용 피부 외용제 조성물, 또는 입욕제 조성물은 Ca: 1850 mg/L 내지 3250 mg/L, Mg: 200 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 330 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3860 mg/L를 함유하는 염지하수 또는 이의 농축물을 포함하며 우수한 항아토피 활성 또는 항알레르기성 피부염 활성을 갖는다.

**대표도** - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 8/19 (2013.01)

A61Q 19/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PE99255(고유사업)

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술원

연구사업명 해수 성분이 아토피성 피부질환에 미치는 치유 효과

연구과제명 해수 성분이 아토피성 피부질환에 미치는 치유 효과

기여율 1/2

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PE99365(고유사업)

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술원

연구사업명 염지하수의 아토피성 피부질환 치유 효과 규명 및 산업화 연구

연구과제명 염지하수의 아토피성 피부질환 치유 효과 규명 및 산업화 연구

기여율 1/2

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2015.08.01 ~ 2016.07.31

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

염지하수 또는 이의 농축물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료용 피부 외용제 조성물로서, 상기 염지하수는 대한민국 인천광역시 강화군 삼사면 석모도의 용궁온천의 암반 깊이 700m에서 채취한 서해 염지하수 또는 대한민국 경상북도 울진군 죽변면 후정리의 암반 깊이 689m에서 채취한 동해 염지하수이며, Ca: 1850 mg/L 내지 3250 mg/L, Mg: 200 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 330 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3860 mg/L를 함유하는, 피부 외용제 조성물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 염지하수는 22.40 내지 26.10 %의 염도를 갖는 것인, 피부 외용제 조성물.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 2000 mg/L, Mg: 800 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 60 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3300 mg/L를 함유하고, 염도가 25 내지 26 %인, 피부 외용제 조성물.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 1900 mg/L, Mg: 900 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 40 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3200 mg/L를 함유하고, 염도가 25 내지 26 %인, 피부 외용제 조성물.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 피부 외용제 조성물은 과발현된 Ig E 수준의 감소를 유도하는 것인, 피부 외용제 조성물.

#### 청구항 6

염지하수 또는 이의 농축물을 포함하는 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료용 입욕제 조성물로서, 상기 염지하수는 대한민국 인천광역시 강화군 삼사면 석모도의 용궁온천의 암반 깊이 700m에서 채취한 서해 염지하수 또는 대한민국 경상북도 울진군 죽변면 후정리의 암반 깊이 689m에서 채취한 동해 염지하수이며, Ca: 1850 mg/L 내지 3250 mg/L, Mg: 200 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 330 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3860 mg/L를 함유하는, 입욕제 조성물.

#### 청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 염지하수는 22.40 내지 26.10 %의 염도를 갖는 것인, 입욕제 조성물.

#### 청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 2000 mg/L, Mg: 800 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 60 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3300 mg/L를 함유하고, 염도가 25 내지 26 %인, 입욕제 조성물.

#### 청구항 9

제 6 항에 있어서,

상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 1900 mg/L, Mg: 900 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 40 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3200 mg/L를 함유하고, 염도가 25 내지 26 %인, 입욕제 조성물.

**청구항 10**

제 6 항에 있어서,

상기 입욕제 조성물은 과발현된 Ig E 수준의 감소를 유도하는 것인, 입욕제 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 염지하수 유래 물질을 유효 성분으로 포함하는 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료용 피부 외용제 조성물, 및 입욕제 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 아토피 피부염은 심한 가려움증을 가지는 만성적 염증성 피부상태를 나타내는 피부 질환으로 대개 영유아기간에 나타나 어른이 되어서도 지속 되거나 일생 동안 지속 되기도 한다. 어린이의 10-20%, 어른에게서는 1-3%의 유발률을 보이고, 이는 지난 30년간 2-3배 증가하였고, 최근에는 성인에서도 유발률이 증가하는 추세이다. 이런 아토피 피부염으로 인해 불면, 정서장애, 학습장애 및 사회적 활동의 어려움 등이 나타날 수 있는데, 유전적인 요소와 함께 면역학적, 생리학적 및 생화학적 유발 등의 복합적인 요인이 관여하는 것으로 알려져 있고 현재까지는 그 원인이 명확하게 밝혀져 있지 않다 (박영립 등, 대한피부연구학회지, 2007, 14(3), 67-72).

[0003] 아토피 피부염의 70-80%를 차지하는 외인성 피부염은 IgE 관련 면역 기전에 의해 발생 되는데, 이 경우 T세포 이상에 의한 지연성 면역 반응이 관여한다는 보고들이 많다. 아토피 피부염이 발생한 부위에는 대식세포, Th 림프구, 비만세포 등 면역관련 세포의 침윤이 크게 증가한다. 아토피 피부염 환자의 경우 혈중 IgE의 농도가 높는데 이는 Th2 세포의 수가 증가하며 이 세포가 분비한 IL-4 및 IL-13 등 Th2 사이토카인의 B 림프구 자극을 통해 IgE 분비를 촉진하기 때문이다. 특히 초기 아토피 피부염의 경우 IL-4 및 IL-13이 중요하게 작용한다 (Donald Y.M. Leung et al., J Clin Invest. 2004, 113, 651-657).

[0004] 근래의 보고에 의하면 thymic stromal lymphopoietin (TSLP)가 아토피 피부염에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이는 아토피 피부염 환자의 각질 형성세포에서는 TSLP의 농도가 증가하는데 반해, 다른 피부염에서는 그 농도가 정상과 비슷하여 아토피 피부염에 특이한 인자로 알려지고 있다. TSLP는 물리/화학적 자극에 노출된 각질 형성세포에서 증가한 pro-inflammatory cytokine과 Th2 cytokine에 의해 증가한다 (Eric B. Brandt et al. J Clin Cell Immunol, 2011, 2(3)). 이렇게 증가한 TSLP는 CD11c+ 수지상 세포를 활성화 시키고, 활성화된 수지상 세포는 T 세포로부터 Th2 사이토카인의 분비를 촉진시킨다. 또한 감각뉴런 다발을 자극하여 간지러움을 유발함으로써 아토피 피부염을 심화시킨다 (Sarah R et al., Cell, 155, 285-295).

[0005] 또한, 아토피 피부염에 대한 최근 연구를 보면, 대사조절 핵 수용체 중에 하나인 PPAR α (peroxisome proliferator-activators α)를 활성화하는 물질이 아토피 피부염을 개선시키는 것으로 보고되었다. Chiba 등은 NC/Nga 마우스에 집 먼지 진드기를 도포하여 아토피 피부염을 유도한 모델에서 PPAR α 활성화제가 아토피 피부염을 개선하고, 표피 두께의 증가 및 진피에서의 염증 세포를 감소시키며, IgE의 증가도 억제 시키는 등의 아토피 피부염에 대해 좋은 효과를 보고하였다. 반면 PPAR β/γ에서는 PPAR α와 같은 유의한 효과는 나타나지 않았다 (Chiba et al., Allergy, 2012, 67(7), 936-942). 또한, 옥사졸론(oxazolone)을 도포한 아토피 유도 마우스 모델에서 글루코코르티코이드와 함께 PPAR α 활성화제를 함께 처치하였을 때 글루코코르티코이드 도포에 따른 피부장벽 기능 이상을 예방하는 것으로 보고하였다. 이것은 무엇보다 PPAR α의 활성이 글루코코르티코이드 지속 도포에 따른 피부염의 재발이 나타나는 것을 예방하는 것으로 보고하고 있다 (Hatano et al., J Invest Dermatol, 2011, 131(9), 1845-1852).

[0006] 아토피 피부염의 치료를 위해서는, 보습제를 꾸준히 바르고, 심할 때는 스테로이드 연고나 항 히스타민제를 처방한다. 이는 일시적으로 증상을 완화해주는 효과는 있으나 스테로이드 호르몬제를 장기간 사용하게 되면 피부가 위축되거나 모세혈관이 확장될 수 있고, 오히려 피부 장벽기능의 약화 및 골다공증 유발 등의 부작용을 초래할 수 있다. 이에 중간 강도의 효과를 주는 국소 면역 조절제로서 사이클로스포린 A, FK506 등이 개발되어 각각

받고 있다. 따라서 아토피 치료에는 뛰어난 효과는 있으면서 부작용은 적은 새로운 기작의 아토피 치료제의 개발이 요구되고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명은 염지하수에 포함된 미네랄 성분을 이용하는, 알레르기성 피부염 또는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 피부 외용제 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 염지하수에 포함된 미네랄 성분을 이용하는, 알레르기성 피부염 또는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 입욕 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서,

[0010] 염지하수 또는 이의 농축물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료용 피부 외용제 조성물을 제공하며, 상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 3250 mg/L, Mg: 200 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 330 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3860 mg/L를 함유한다.

[0011] 상기 염지하수는 22.40 내지 26.10 %의 염도를 갖는 것일 수 있다.

[0012] 상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 2000 mg/L, Mg: 800 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 60 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3300 mg/L를 함유하고, 염도가 25 내지 26 %인 것일 수 있다.

[0013] 상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 1900 mg/L, Mg: 900 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 40 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3200 mg/L를 함유하고, 염도가 25 내지 26 %인 것일 수 있다.

[0014] 상기 피부 외용제 조성물은 과발현된 IgE 수준의 감소를 유도하는 것일 수 있다.

[0015] 상기 피부 외용제 조성물은, 스킨 로션, 스킨 소프너, 스킨 토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크 로션, 모이스처 로션, 영양 로션, 맛사지 크림, 영양 크림, 모이스처 크림, 핸드 크림, 연고, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징 폼, 클렌징 로션, 클렌징 크림, 바디 로션 및 바디 클렌저로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 제형을 갖는 것일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 다른 수단으로서,

[0018] 염지하수 또는 이의 농축물을 포함하는 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료용 입욕제 조성물을 제공하며, 상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 3250 mg/L, Mg: 200 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 330 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3860 mg/L를 함유한다.

[0019] 상기 염지하수는 22.40 내지 26.10 %의 염도를 갖는 것일 수 있다.

[0020] 상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 2000 mg/L, Mg: 800 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 60 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3300 mg/L를 함유하고, 염도가 25 내지 26 %인 것일 수 있다.

[0021] 상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 1900 mg/L, Mg: 900 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 40 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3200 mg/L를 함유하고, 염도가 25 내지 26 %인 것일 수 있다.

[0022] 상기 입욕제 조성물은 과발현된 IgE 수준의 감소를 유도하는 것일 수 있다.

**발명의 효과**

[0023] 본 발명에 의하면, 특정 함량의 미네랄 성분 [Ca (1856 mg/L 내지 3243.08 mg/L), Mg (207.79 mg/L 내지 1012 mg/L), K (38 mg/L 내지 325.91 mg/L), Na (3178 mg/L 내지 3850.67 mg/L) 등]을 함유하는 염지하수 또는 이의 유래 물질을 포함하는 조성물을 피부 외용제, 입욕제 또는 입욕수로 이용할 경우, 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염을 예방 또는 치료할 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 조성물은 DEXA 등과 같은 스테로이드계 치료제와 동등 수준의 피부 개선 효과를 나타내면서도, 스테로이드계 치료제의 장기간 사용 시 발생하는 부작용 (예를 들면, 피부 위축, 모세혈관 확장, 피부장벽기능의 약화 및 골다공증 유발 등)을 피할 수 있다. 따라서 본 발명의 조성물은 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 치료에는 뛰어난 효과는 있으면서 부작용은 적은 새로운 기작

의 피부 외용제 조성물, 입욕제 조성물 또는 입욕수로서 활용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0024]

도 1은 본 발명에 따른 일 실시예에서, 아토피 피부염을 유발한 과정을 포함한 동물 실험 과정을 설명하는 개념도이다.

도 2는 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군별로 실험기간 동안 체중 변화를 관찰한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 실험기간 동안 혈청 중 총 IgE 함량의 변화를 관찰한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 등 피부 조직의 조직학적 분석 이미지 결과이다 [EP = 표피(epidermis); DE = 진피(dermis); MT = Masson's trichrome. Scale bars = 40 m, (a) 정상 마우스 대조군, (b) 2,4-디니트로클로로벤젠(DNCB)에 의해 아토피 피부염 유발된 마우스 대조군, (c) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 표층수(WSSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군].

도 5는 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로, 각 실험군 별로 등 피부조직의 조직학적 분석 이미지 결과이다 [EP = 표피; DE = 진피; MT = Masson's trichrome. Scale bars = 40 m, (d) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 염지하수(WSGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (e) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 표층수(ESSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (f) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 염지하수(ESGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (g) 아토피 피부염이 유발되고, 1% DEXA 용액(스테로이드계 치료제)을 도포한 마우스 대조군].

도 6은 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 등 피부조직의 caspase-3, PARP, NT, 4-HNE, 및 MMP-9에 대한 면역조직화학 분석 결과이다 [PARP = 절단된 폴리(ADP-리보오스) 중합효소 (cleaved poly (ADP-ribose) polymerase); NT = 니트로타이로신 (nitrotyrosine); 4-HNE = 4-히드록시노네날 (4-hydroxynonenal); MMP = 기질 금속 단백질 분해효소 (matrix metalloprotease); ABC = 아비딘비오틴 결합 (avidin-biotin complex). Scale bars = 40 m. (a) 정상 마우스 대조군, (b) 2,4-디니트로클로로벤젠(DNCB)에 의해 아토피 피부염 유발된 마우스 대조군, (c) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 표층수(WSSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군].

도 7은 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 등 피부조직의 caspase-3, PARP, NT, 4-HNE, 및 MMP-9에 대한 면역조직화학 분석 결과이다 (PARP = 절단된 폴리(ADP-리보오스) 중합효소 (cleaved poly (ADP-ribose) polymerase); NT = 니트로타이로신 (nitrotyrosine); 4-HNE = 4-히드록시노네날 (4-hydroxynonenal); MMP = 기질 금속 단백질 분해효소 (matrix metalloprotease); ABC = 아비딘비오틴 결합 (avidin-biotin complex). Scale bars = 40 m. (d) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 염지하수(WSGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (e) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 표층수(ESSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (f) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 염지하수(ESGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (g) 아토피 피부염이 유발되고, 1% DEXA 용액(스테로이드계 치료제)을 도포한 마우스 대조군).

도 8은 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 등 피부조직 진피의 IFN-, iNOS, IL-1, IL-2, 및 TNF-에 대한 면역조직화학 분석 결과이다 (IFN = 인터페론 (interferon); IL = 인터류킨 (interleukin); iNOS = 유도성 일산화질소 합성 효소 (inducible nitric oxide synthase) (2); TNF = 종양괴사 인자 (tumor necrosis factor); ABC = 아비딘비오틴 결합 (avidin-biotin complex). Scale bars = 40 m. (a) 정상 마우스 대조군, (b) 2,4-디니트로클로로벤젠(DNCB)에 의해 아토피 피부염 유발된 마우스 대조군, (c) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 표층수(WSSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군).

도 9는 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 등 피부조직 진피의 IFN-, iNOS, IL-1, IL-2, 및 TNF-에 대한 면역조직화학 분석 결과이다(IFN = 인터페론; IL = 인터류킨; iNOS = 유도성 일산화질소 합성 효소; TNF = 종양괴사 인자; ABC = 아비딘비오틴 결합. Scale bars = 40 m. (d) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 염지하수(WSGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스

실험군, (e) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 표층수(ESSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (f) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 염지하수(ESGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (g) 아토피 피부염이 유발되고, 1% DEXA 용액(스테로이드계 치료제)을 도포한 마우스 대조군).

도 10은 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 비장 조직의 조직학적 분석 이미지를 보여주는 결과이다 (WP = 백색 수질(white pulp); RP = 적색 수질 (red pulp). Scale bars = 400 m. (a) 정상 마우스 대조군, (b) 2,4-디니트로클로로벤젠(DNCB)에 의해 아토피 피부염 유발된 마우스 대조군, (c) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 표층수(WSSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군).

도 11은 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 비장 조직의 조직학적 분석 이미지를 보여주는 결과이다 (WP = 백색 수질; RP = 적색 수질. Scale bars = 400 m. (d) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 염지하수(WSGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (e) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 표층수(ESSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (f) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 염지하수(ESGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (g) 아토피 피부염이 유발되고, 1% DEXA 용액(스테로이드계 치료제)을 도포한 마우스 대조군).

도 12는 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 비장 조직의 IFN-, iNOS, IL-1, IL-2, 및 TNF-에 대한 면역조직화학 분석 결과이다(IFN = 인터페론; IL = 인터류킨; iNOS = 유도성 일산화질소 합성효소(2); TNF = 종양괴사 인자; ABC = 아비딘비오틴 결합. Scale bars = 40 m. (a) 정상 마우스 대조군, (b) 2,4-디니트로클로로벤젠(DNCB)에 의해 아토피 피부염 유발된 마우스 대조군, (c) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 표층수(WSSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군).

도 13은 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 비장 조직의 IFN-, iNOS, IL-1, IL-2, 및 TNF-에 대한 면역조직화학 분석 결과이다(IFN = 인터페론; IL = 인터류킨; iNOS = 유도성 일산화질소 합성효소(2); TNF = 종양 괴사인자; ABC = 아비딘비오틴 결합. Scale bars = 40 m. (d) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 염지하수(WSGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (e) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 표층수(ESSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (f) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 염지하수(ESGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (g) 아토피 피부염이 유발되고, 1% DEXA 용액(스테로이드계 치료제)을 도포한 마우스 대조군).

도 14는 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 악하 림프절 조직의 조직학적 분석 이미지를 보여주는 결과이다 (CO = 피질 (cortex); FO = 림프여포 (lymphoid follicle); ME = 수질 (medulla), Scale bars = 400 m. (a) 정상 마우스 대조군, (b) 2,4-디니트로클로로벤젠(DNCB)에 의해 아토피 피부염 유발된 마우스 대조군, (c) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 표층수(WSSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군).

도 15는 본 발명에 따른 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 악하림프절 조직의 조직학적 분석 이미지를 보여주는 결과이다 (CO = 피질; FO = 림프여포; ME = 수질, Scale bars = 400 m. (d) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 염지하수(WSGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (e) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 표층수(ESSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (f) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 염지하수(ESGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (g) 아토피 피부염이 유발되고, 1% DEXA 용액(스테로이드계 치료제)을 도포한 마우스 대조군).

도 16은 본 발명에 따른 실시예에서 진행한 아토피 피부염 유발된 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 악하림프절 조직의 IFN-, iNOS, IL-1, IL-2, 및 TNF-에 대한 면역조직화학 분석 결과이다 (IFN = 인터페론; IL = 인터류킨; iNOS = 유도성 일산화질소 합성효소(2); TNF = 종양괴사 인자; ABC = 아비딘비오틴 결합. Scale bars = 40 m. (a) 정상 마우스 대조군, (b) 2,4-디니트로클로로벤젠(DNCB)에 의해 아토피 피부염 유발된 마우스 대조군, (c) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 표층수(WSSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군).

도 17은 본 발명에 따른 일 실시예에서 진행한 아토피 피부염을 유발 마우스를 이용한 실험 결과 중 일부로서, 각 실험군 별로 악하림프절 조직의 IFN-, iNOS, IL-1, IL-2, 및 TNF-에 대한 면역조직화학 분석 결과이다 (IFN = 인터페론; IL = 인터류킨; iNOS = 유도성 일산화질소 합성효소(2); TNF = 종양괴사 인자; ABC = 아비딘비오틴 결합. Scale bars = 40 m. (d) 아토피 피부염이 유발되고, 서해 염지하수(WSGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스



실험군, (e) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 표층수(ESSW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (f) 아토피 피부염이 유발되고, 동해 염지하수(ESGW)에서 자유 입욕을 실시한 마우스 실험군, (g) 아토피 피부염이 유발되고, 1% DEXA 용액(스테로이드계 치료제)을 도포한 마우스 대조군).

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0025] 본 발명은, 염지하수 또는 이의 농축물을 유효 성분으로 포함하는 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료용 피부 외용제 조성물; 또는 염지하수 또는 이의 농축물을 유효 성분으로 포함하는 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료 또는 완화용 기능성 입욕제 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 이하, 본 발명의 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료용 피부외용제 조성물; 및 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료 또는 완화용 기능성 입욕제 조성물에 대해서 구체적으로 설명한다.
- [0029] 상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 3250 mg/L, Mg: 200 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 330 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3860 mg/L를 함유하고, 미량의 기타 원소를 더 포함할 수 있다. 상기 미량의 기타 원소로는, 3.89 mg/L의 Fe, 0.0089 mg/L의 Zn, 0.510 mg/L의 Ag, 0.440 mg/L의 B, 1.570 mg/L의 Bi 및 14.0 mg/L의 Cl<sup>-</sup> 등을 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 염지하수는 Ca: 1856 mg/L 내지 3243.08 mg/L, Mg: 207.79 mg/L 내지 1012 mg/L, K: 38 mg/L 내지 325.91 mg/L, 및 Na: 3178 mg/L 내지 3850.67 mg/L를 함유하고, 기타 소량 원소를 더 포함할 수 있다. 상기 미량의 기타 원소로는, 3.89 mg/L의 Fe, 0.0089 mg/L의 Zn, 0.510 mg/L의 Ag, 0.440 mg/L의 B, 1.570 mg/L의 Bi 및 14.0 mg/L의 Cl<sup>-</sup> 등을 포함할 수 있다.
- [0031] 바람직하게는 상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 2000 mg/L, Mg: 800 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 60 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3300 mg/L를 함유하고, 미량의 기타 원소를 더 포함할 수 있다. 상기 미량의 기타 원소로는, 3.89 mg/L의 Fe, 0.0089 mg/L의 Zn, 0.510 mg/L의 Ag, 0.440 mg/L의 B, 1.570 mg/L의 Bi 및 14.0 mg/L의 Cl<sup>-</sup> 등을 포함할 수 있다.
- [0032] 더욱 바람직하게는 상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 1900 mg/L, Mg: 900 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 40 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3200 mg/L를 함유하고, 미량의 기타 원소를 더 포함할 수 있다. 상기 미량의 기타 원소로는, 3.89 mg/L의 Fe, 0.0089 mg/L의 Zn, 0.510 mg/L의 Ag, 0.440 mg/L의 B, 1.570 mg/L의 Bi 및 14.0 mg/L의 Cl<sup>-</sup> 등을 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 염지하수의 농축물은, 본 발명에 따른 염지하수를 공지의 방법으로 농축한 농축물을 의미한다. 상기 염지하수의 농축물은 염지하수에 포함된 미네랄 성분을 Ca: 1850 내지 3250 중량부, Mg: 200 내지 1020 중량부, K: 30 내지 330 중량부, 및 Na: 3170 내지 3860 중량부의 비율, 또는 Ca: 1856 내지 3243.08 중량부, Mg: 207.79 내지 1012 중량부, K: 38 내지 325.91 중량부, 및 Na: 3178 내지 3850.67 중량부의 비율, 바람직하게는 Ca: 1850 내지 2000 중량부, Mg: 800 내지 1020 중량부, K: 30 내지 60 중량부, 및 Na: 3170 내지 3300 중량부의 비율, 더욱 바람직하게는 Ca: 1850 내지 1900 중량부, Mg: 900 내지 1020 중량부, K: 30 내지 40 중량부, 및 Na: 3170 내지 3200 중량부의 비율로 포함하며, 농축물 그 자체로 또는 환원 회석물이 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료의 활성을 갖는다. 상기 농축의 방법으로는, 특별히 제한되지 않지만, 감압 농축, 가열 농축, 동결건조 등의 방법이 적용될 수 있다.
- [0034] 상기 염지하수는 22.40 내지 26.10 %의 염도를 갖는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 염지하수는, 대한민국 연근해의 암반 깊이 600 내지 800 m 지점에서 채취한 염지하수일 수 있고, 구체적으로, 동해 염지하수(ESGW, East Saline Ground Water)는 대한민국 경상북도 울진군 후정리의 암반 깊이 620 내지 750 m에서 채취한 것일 수 있으며, 서해 염지하수(WSGW, West Saline Ground Water)는 대한민국 인천광역시 강화군 삼사면 석모도의 암반 깊이 수심 630 내지 770 m에서 채취한 것일 수 있다.
- [0036] 이렇게 대한민국 연근해의 암반에서 채취한 염지하수는 위에서 설명한 것과 같이 고 함량의 미네랄을 포함하며 혈청 중 과발현된 Ig E 수준의 감소를 유도할 수 있어서, 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료용 피부 외용제 조성물이나 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료 또는 완화용 기능성 입욕제 조성물로 활용도가 높다.
- [0037] 상기 염지하수는 Ca: 1850 mg/L 내지 2000 mg/L, Mg: 800 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 60 mg/L, 및



Na: 3170 mg/L 내지 3300 mg/L, 바람직하게는 Ca: 1850 mg/L 내지 1900 mg/L, Mg: 900 mg/L 내지 1020 mg/L, K: 30 mg/L 내지 40 mg/L, 및 Na: 3170 mg/L 내지 3200 mg/L 를 함유하고, 염도가 25 내지 26 %일 수 있다. 상기의 미네랄 함량을 함유하는 염지하수는 동해 염지하수로서, 대한민국 경상북도 울진군 후정리의 암반 깊이 620 내지 750 m에서 채취한 것일 수 있다. 이러한 동해 염지하수는 서해 염지하수와 비교하여 아토피 피부염 또는 알레르기성 피부염 예방 또는 치료 또는 완화 활성이 더 우수하다.

- [0038] 본 발명의 염지하수는, 염지하수의 원수를 채취하고 그 성분 함량을 확인하는 제 1 단계, 상기 원수를 정제하여 이물질을 제거하고 염지하수를 얻는 제 2 단계; 및 상기 염지하수를 부형제와 혼합화 또는 제제화 하는 제 3 단계를 통해 상기 조성물로 제조될 수 있다.
- [0039] 상기 제 1 단계와 제 2 단계 사이, 또는 제 2 단계와 제 3 단계 사이에는 농축 단계가 더 포함될 수 있고, 이 농축 단계는 상기 염지하수의 유효 성분의 손실을 최소화하면서 농축하는 과정이라면 공지의 농축 방법 중 어느 것이든 적용될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 조성물이 피부 외용제 조성물인 경우, 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 부형제를 이용하여 공지의 방법으로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 상기 피부 외용제 조성물은 오일 또는 수성 매질에서 용액, 현탁액 또는 유화액의 형태로 제형화되거나, 사용하기 전에 무균상태이고 발열 물질이 제거된 물에 녹여 사용하는 건조 분말의 형태로 제형화될 수 있다.
- [0042] 또한 상기 피부 외용제 조성물은 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 약제학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있다.
- [0043] 상기 피부 외용제 조성물에 있어서, 유효 성분의 사용량은 0.001 mg/kg/일 내지 2000 mg/kg/일로 적용될 수 있으나, 실제 사용량은 증상의 중증도, 선택된 투여 경로, 대상의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태 등의 여러 관련 인자에 맞춰 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0044] 상기 피부 외용제 조성물을 화장료의 형태로 제형화할 경우, 예를들면, 유연화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 아이 크림, 영양 크림, 마사지 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 파우더, 에센스 또는 팩 등의 형태로 제형화될 수 있으며, 그 제형이 특별히 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명에 따른 조성물이 입욕제 조성물인 경우, 유효 성분인 미네랄 성분은 입욕제 조성물 전체를 기준으로 0.01 내지 99.9 중량% 함유될 수 있고, 필요에 따라 부형제, 보습제 또는 아미노산 등의 추가 성분들이 더 포함될 수 있다.
- [0047] 상기 부형제로는, 예를 들어 유당, 텍스트린, 전분, 백당, 만니톨, 소르비톨, 글루코스, 사카로스, 미세결정 셀룰로스, 젤라틴, 폴리비닐피리돈, 및 자일리톨로 구성된 그룹으로부터 선택된 1종 이상일 수 있고, 상기 보습제로는 예를 들어 실리카계 보습제가 적용될 수 있으며, 상기 아미노산으로는 예를 들어 글라이신, 알라닌, 류신, 리신, 메티오닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 아르기닌, 시스테인, 글루타민, 히스티딘 및 프롤린 등으로 구성된 그룹으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0048] 상기 입욕제 조성물은 용도에 따라 산제, 과립제, 정제(발포성), 캡슐제 또는 액제 등의 다양한 제형으로 제조할 수 있다.
- [0050] **[실시예]**
- [0051] 하기 실시예에서는 본 발명에 따른 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기의 실시예에 의해 제한되지 않는다.
- [0053] **실험방법**
- [0054] **1) 실험 동물의 준비**
- [0055] 126 마리의 SHK-1 털 없는 마우스 (6주령 암컷, OrientBio)를 11일간 순화시킨 후, 각 개체에 1주일 동안 하루에 1회씩 1% 2,4-디니트로클로로벤젠(DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene)로 감작(sensitization)을 수행하였으며, 그 후 각 개체에 4주일 동안 주 3회씩 0.5% DNCB로 부스팅(boosting)을 수행함으로써, 아토피 피부염을 유발하였다. 그 후, 군당 8 마리씩 7군(총 56마리)으로 구분하여 실험에 사용하였다. 실험 동물들은 온도(20 내지 25℃)와 습도(50 내지 55%)가 조절되는 방에서 폴리카보네이트 케이지 당 4 마리씩 보관되었고, 명암 주기는 12시간이 되도록 하였으며, 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험 동물들은 대구한의대학교 동물실험 윤리 위원회의 동물실험 윤리 기준에 따라 취급하였으며, 위원회의 사전 승인 하에 동물실험을 실시하

였다.

[0057] 2) 해수와 DEXA의 준비

[0058] 무색의 투명한 용액인 대한민국 서해 표층수(West Surface Sea Water, WSSW, 대한민국 인천광역시 강화군 내가면 외포리 인근 해수 수심 5m에서 채취), 서해 염지하수(West Saline Ground Water, WSGW, 대한민국 인천광역시 강화군 삼사면 석모도의 용궁온천의 암반 깊이 700m에서 채취), 동해 표층수(East Surface Sea Water, ESSW, 대한민국 경상북도 울진군 북면 나곡리 인근 해수 수심 5m에서 채취)와, 약한 노란빛을 띠는 용액인 동해 염지하수(East Saline Ground Water, ESGW, 대한민국 경상북도 울진군 죽변면 후정리의 암반 깊이 689m에서 채취)를 각각 1.2m GF/C 클래스 마이크로섬유 필터(Korea Filter Paper Co., Ltd.)를 이용하여 필터한 후 사용하였다. 다만, WSGW는 필터 과정 없이 이 실험에 사용하였다. 상기 해수 및 염지하수의 염분 및 미네랄 함량은 아래 표 1에 나타내었다.

표 1

[0059]

해수 종류	수온 (°C)	깊이 (m)	염도 (‰)	미네랄 조성(mg/L)			
				Ca	Mg	K	Na
일반 지하수 (GUGW)	30	-	0.40	81.00	121.00	12.00	569.00
서해 표층수 (WSSW)	22	5	26.20	234.61	923.67	481.34	7081.18
서해 염지하수 (WSGW)	70	700	22.40	3243.08	207.79	325.91	3850.67
동해 표층수 (ESSW)	21.9	5	34.00	417.50	1264.00	383.00	10672.00
동해 염지하수 (ESGW)	21.7	689	26.00	1856.00	1012.00	38.00	3178.00

[0060] 수용성의 흰색 분말 형태의 DEXA (dexamethasone, Sigma-Aldrich, St.Louise, MO, USA)는 이 실험에서 양성 대조군으로 활용하였다. 모든 시험 물질은 실험 진행 전에 빛과 습기를 차단하여 4°C 냉장고에 보관한 후 사용하였고, 해수는 입욕 30분 전에 약 37°C로 가온하여 적용하였다.

[0062] 3) 아토피 피부염의 유발

[0063] 아세톤과 올리브 오일(3:1) 혼합액에 용해시킨 1% DNCB 용액을 매일 1회씩 7일 동안 털 없는 마우스의 등쪽 피부 전체에 200µl/mouse/day의 용량으로 도포시켜 감작시켰다. 그 후, 28일 동안 주 3회씩 0.5% DNCB 용액을 도포하여, 부스팅시켜 아토피 피부염을 유발함으로써 실험군으로 적용하였다 (도 1 참조). 비히클(아세톤과 올리브 오일의 3:1 혼합액)을 위의 DNCB 용액과 동일하게 적용하여 정상 대조군으로 활용하였다.

[0065] 4) 입욕 및 DEXA 처리

[0066] 4 cm 깊이의 절식판 (fasting plates)를 포함하는 마우스 사육상자 (200×260×130mm; DJ-101, Daejong Instrument Ind. Co., Seoul, Korea)에 체온(37°C) 정도로 가온된 WSSW, WSGW, ESSW 및 ESGW 각각을 약 1900 ml 담고, 각 그룹당 8 마리인 실험군들의 마우스를 상기 해수가 담긴 마우스 사육상자에서 매일 20분씩 6주 동안 자유롭게 입욕하도록 하였다.

[0067] DEXA (Sigma-Aldrich, St.Louise, MO, USA)는 멸균 증류수에 1% 농도로 용해시킨 다음 200µl/mouse씩 등쪽 피부 전체에, 감작 시작 5주 후부터 매일 1회씩 6주 동안 국부적으로 도포하였다. DNCB 대조군 (아토피 피부염 유발된 털 없는 쥐로서, 별도 해수 처리 및 DEXA 처리를 하지 않은 마우스 실험군) 및 정상 대조군 (아토피 피부염 유발되지 않은 정상 털 없는 쥐로서, 비히클이 처리된 마우스 실험군)에서는 동일한 입욕 스트레스를 가하기 위해, WSSW, WSGW, ESSW 및 ESGW 대신 멸균 증류수에 동일한 방법으로 입욕시켰다.

[0069] 5) 체중의 변화 측정

[0070] 체중의 변화는 DNCB 감작 시작 1일 전부터 1주일 간격으로 측정하였으며, 6주간의 입욕 또는 DEXA 국소 도포 기

간 및 11 주간의 실험 모든 기간 동안의 체중 변화를 측정하였다.

[0071] 실험 모든 기간인 11주 동안의 총 증체량(g/head)은 희생시의 체중에서 DNCB 감작 시작시 체중을 뺀 값으로 계산하였고, 해수 입욕 또는 1% DEXA가 적용된 6주 간의 증체량(g/head)은 희생시의 체중에서 해수 입욕 시작시 또는 1% DEXA 적용시의 체중을 뺀 값으로 계산하였다.

[0073] 6) 임상적 피부 심각성 점수(clinical skin severity scores)의 측정

[0074] (1) 소양증(pruritus/itching), (2) 홍반/출혈(erythema/hemorrhage), (3) 부종(edema), (4) 표피 박리/긁힘(excoriation/erosion), 및 (5) 각질/건조(scaling/dryness)의 5가지 피부 병변에 대해 각각 없음(0), 약함(1), 중증(2), 심함(3)으로 평가하고 최고 15점이 되도록 합산하였다. 평가는 각각 DNCB 감작 시작 후 35, 38, 42, 49, 56, 63, 70, 및 77 일째에 진행되었다.

[0076] 7) 긁기 행동(scratching behavior)의 측정

[0077] 각각의 실험 동물의 긁기 행동은 케이지 내에서 DNCB 감작 시작 후 35, 38, 42, 49, 56, 63, 70, 및 77 일째에 30분 동안 관찰하여 평가하였다.

[0079] 8) 혈청 중 Ig E 함량의 측정

[0080] 최종 희생일에 1mL의 정맥혈을 채취하여 혈청 중 Ig E 함량을 측정하였다. 혈액은 15,000 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 상등액인 혈청만 분리하였다.

[0081] 혈청 중 Ig E 함량은 샌드위치 ELISA법을 이용하여 측정하였는데, 마우스 IgE ELISA set (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)가 사용되었다. 즉, 포획 항체로 코팅된 플레이트를 버퍼로 코팅하고 4℃에서 하룻밤 배양했다. 플레이트는 PBS-Tween 20 (0.05%)으로 세척된 후 10% FBS로 20℃에서 1시간 동안 반응시켜 블로킹 시키고, 농도 별 표준 항체 또는 샘플을 이 플레이트에 가하여 20℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 세척 후에 biotin-conjugated anti-mouse Ig E와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 플레이트에 가하여 1시간 동안 20℃에서 반응시켰다. 테트라메틸벤지딘(TMB, tetramethylbenzidine)을 이용하여 발색시켜 ELISA 리더(reader) (Tecan; M<sup>2</sup> annedorf, Switzerland)에서 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0083] 9) 림프관 장기의 무게 측정

[0084] 입욕 시작 6주 후와 최종 희생일에 비장(spleen)과 악하 림프절(left submandibular LN)을 수집했다. 각각의 림프관 장기의 무게를 g 단위로 측정하였다. 실험 동물의 개체 별 체중 차이를 최소화하기 위하여 상대 중량(체중량에 대한 %)을 계산하였고, 희생시 체중량과 장기의 절대중량을 아래 방법으로 계산하였다.

[0085] 상대 장기 질량(% 체중량 대비) = (장기의 절대중량/희생시 체중량)\*100

[0087] 10) 비장 사이토카인 함량 측정

[0088] TNF-, IL-1, 및 IL-10의 비장에서의 함량을, 마우스 TNF- ELISA kit (BD Biosciences/Pharmingen, San Jose, CA, USA), 마우스 IL-1 ELISA kit (Genzyme, Westborough, MA, USA), 및 마우스 IL-10 ELISA kit (Genzyme, Westborough, MA, USA) 각각을 이용하여 ELISA로 측정하였다. 약 10 내지 15 mg의 조직 샘플을 1ml 라이시스 버퍼(lysis buffer)(2mM PMSF, aprotinin, leupeptin, 및 pepstatin A 각각을 1mg/mL 함유하는 PBS)를 함유하는 티슈 그라인더(tissue grinder)에서 균질화하였다. 분석은 100ml의 표준 샘플과 위의 조직 샘플을 각각 10, 50, 또는 100ml 적용하여 수행되었고, 각각의 샘플들은 2번씩 측정되었다. 결과는 각각의 단백질의 pg/mg으로 표현되었다.

[0090] 11) Quantitative RT-PCR

[0091] Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출된 총 RNA는 CFX96 Real-Time System(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량화되었다. 샘플들은 recombinant DNase I (DNA-free; Ambion, Austin, TX, USA)을 이용하여 DNA를 제거한 후 측정되었고, RNA는 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 역전사되었다. GAPDHmRNA 발현을 대조군으로 적용하였다.

[0093] 12) GSH Assay

[0094] 피부 GSH 수준을 형광 분석법(fluorescence assay)을 이용하여 분석하였다. 피부 조직(1:3, w/w dilution)을

5mM의 EDTA (buffer 1)를 함유하는 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100mM에서 균질화하였다. 이후, 30% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 처리하고 원심분리 하였다. 형광은 상등액을 활용하여 fluorescence spectrophotometer (RF-5301PC; Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)로 측정되었다.

[0095] 상등액 100 L을 1ml의 buffer 1과 100 L의 오르쏘프탈알데히드(o-phthalaldehyde) (1mg/mL in methanol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 혼합하였다. 15분 후 형광(exc = 350 nm; em = 420 nm)이 측정되었고, 표준 곡선은 GSH (0.0-75.0 M)를 이용하여 마련되었다. 피부 조직에서의 단백질 mg당 GSH의 함량을 M로 표시하였다.

[0097] 13) 지질 과산화

[0098] 지질 과산화(lipid peroxidation) 정도는 TBARS(Thiobarbituric acid reactive substances) 측정법을 적용하여 측정하였다. 트리클로로아세트산 (10%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 균질액에 넣고 이 혼합액을 원심분리 하였다(3 분, 1,000 ×g). 단백질이 제거된 샘플에 티오바르비톨산(thiobarbituric acid) (0.67%)을 넣고 15분 동안 증탕하였다. microplate spectrophotometer reader (Tecan; M<sup>annedorf</sup>, Switzerland) 상에서의 535nm 및 572 nm에서의 흡광도 차이에 의해 지질 과산화의 중간 산물인 MDA를 측정하였고, 그 결과는 단백질 mg당 nM로 나타내었다.

[0100] 14) 과산화물 음이온 생성물

[0101] 조직 내의 과산화물 음이온(superoxide anion) 생성물의 정량화를 위해 NBT(nitro blue tetrazolium) assay가 수행되었다. 조직 균질화물 50 L를 NBT (1mg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 L와 함께 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 상등액을 조심스럽게 제거하고 120 L의 2M KOH와 140L의 DMSO를 가하여 용해시켰다. NBT 환원은 microplate spectrophotometer reader (Tecan; M<sup>annedorf</sup>, Switzerland)를 이용하여 600nm 파장에서 측정되었고, 정규화된 데이터를 단백질 함량으로 표시하였다.

[0103] 15) 조직 병리학(Histopathology) 관찰 방법

[0104] 등의 피부, 비장 및 악하 림프절 샘플들은 분리되어 10% 포르말린으로 고정된 파라핀 블록으로 제조되어 3~4 mm 간격으로 절단되고 염색되었다. 일반적인 조직 병리학적 관찰을 위해서는 H&E(hematoxylin and eosin)로 염색되었고, 콜라겐 섬유 관찰을 위해서 MT(Masson's trichrome)로 염색되었으며, 비만세포 관찰을 위해서는 톨루이딘 블루(toluidine blue)로 염색되었으며 광학현미경(Nikkon, Tokyo, Japan)으로 관찰되었다.

[0105] 구체적으로, 피부 상피의 평균 두께 ( $\mu\text{m}$ ), 진피 내 염증세포 및 비만세포의 침윤 수(cells/mm<sup>2</sup> of dermis), 비장 전체 두께 (mm/central regions), 비장 백색 수질의 수(white pulps/mm<sup>2</sup> of splenic parenchyma)와 적색 수질 세포의 수( $\times 10^3$  cells/mm<sup>2</sup> of splenic parenchyma), 악하 림프절의 전체 두께(mm/central regions), 피질 내 림프소절의 수(follicles/mm<sup>2</sup> of cortex) 등이 이미지 분석을 통해 분석되었다. 이미지 분석을 위해 이미지 분석 프로그램(iSolution FL ver. 9.1, IMT -solution Inc., Quebec, Canada)을 이용하였고, 임상 병리사에 의한 분석이 진행되었다.

[0107] 16) 면역 조직화학(Immunohistochemistry) 분석

[0108] 피부, 악하 림프절 또는 비장 조직 파라핀 섹션에서 파라핀을 제거한 후 epitope retrieval pretreatment가 수행되었다.

[0109] 10mM 시트레이트 버퍼(citrate buffers) (pH 6.0)를 함유하는 염색 접시와 함께 수조의 온도를 95-100°C가 되도록 승온시켰다. 20분 동안 인큐베이션 시킨 후 염색 접시를 20분 동안 실온에 방치하였다. epitope retrieval 후에는, 조직 절편들을 아비딘비오틴 결합(avidin-biotin complex, ABC)법을 이용하여 면역 염색하였고, 각각 caspase-3, PARP, NT, 4-HNE, MMP-9, IFN-, iNOS, IL-1, IL-2, 및 TNF-에 대한 결과를 관찰하였다.

[0110] 내인성 과산화 효소 활성은 30분 동안 메탄올과 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 인큐베이션하여 블로킹하고, 면역글로블린의 비특이적 결합은 습윤 챔버에서 1시간 동안 normal horse serum blocking solution (Vector Lab., Burlingame, CA, USA, dilution 1:100)과 반응시키는 방법으로 블로킹하였다. 1차 면역염색은 4겹의 습윤 챔버에서 하루밤 동안 처리되었고, 비티닐이 부착된 이차 항체(Vector Lab., Burlingame, CA, USA, dilution 1 : 50) 및 ABC 시약(Vectastain Elite ABC Kit, Vector Lab., Burlingame, CA, USA, 희석 1:50)를 실온의 습윤 챔버에서 1시간 동

안 반응시켰다. 그 후, 실온에서 3분 동안 peroxidase substrate reagents (Vector Lab., Burlingame, CA, USA) 하에서 배양되었다.

[0111] 세포 또는 섬유는 각각의 면역 혈청(caspase-3, PARP, NT, 4-HNE, MMP-9, IFN-, iNOS, IL-1, IL-2, 및 TNF-)에 대해 진피 카라티노사이트 또는 진피 섬유와 비교하여 평가되었고, 30% 이상의 면역 반응성이 있으면 양성으로 평가하였다. 피부 표피 세포 내의 면역활성 세포 수(cells/100 epithelial cells)도 각각 caspase-3, PARP, NT, 및 4-HNE에 대해서 평가되었고, 진피 세포에서의 면역반응 세포수(cells/mm<sup>2</sup> of dermis), 비장에서 면역반응 세포수(cells/mm<sup>2</sup> of spleen), 그리고 악하 림프절에서 면역반응 세포수(cells/mm<sup>2</sup> of LN)를 각각 IFN-, iNOS, IL-1, IL-2, 및 TNF-에 대해 평가하였다. 평가에는 이미지 분석 기법이 적용되었다. MMP-9 면역활성 섬유에 의해 반응한 퍼센트는 진피에서 계산되었다(%/mm<sup>2</sup> of dermis). 위의 분석은 임상 병리사에게 그룹 분포를 가린 채 샘플의 결과를 분석하도록 하였다.

[0113] 17) 통계 분석

[0114] 모든 결과는 8마리의 털 없는 마우스의 평균 ± 표준편차(SD)로 나타내었다. 서로 다른 용량의 그룹들 사이에 다중 비교검정이 수행되었다. 변이 균일성(Variance homogeneity)은 레벤 테스트(Levene test)로 수행되었고, 만약, 레벤 테스트가 변이의 균일성을 나타내는 유의성을 나타내지 않는 경우에는, 얻어진 데이터를 그룹들 간에 유의미한 차이가 있는지를 결정하기 위해, LSD(least-significant differences multicomparison) 테스트에 의한 one-way ANOVA 테스트로 분석하였다. 만약, 레벤 테스트에서 변이 균일성(Variance homogeneity)의 유의미한 차이가 있는 경우에는, 검정 비교가 수행되었으며, Kruskal-Wallis 를 이용하였다. Kruskal-Wallis 테스트를 통해서 유의미한 차이점이 관찰되면, Mann-Whitney (MW) 테스트를 도입하여 유의미하게 다른 집단 비교를 수행하였다. 통계분석은 SPSS(for Windows, 14.0K, IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA)를 이용하였다.

[0115] 정상 대조군 및 DNCB 대조군에서, DNCB에 의하여 유도된 아토피 유사 병변의 심각도도 관찰되어 계산되어 평가되었고, DNCB 대조군 및 해수욕 적용 실험군 또는 1% DEXA 적용 실험군에서의 결과도 관찰되어 아래 식으로 평가되었다.

[0117] 실험 결과

[0118] 이하, 실험 결과의 설명에서 실험군과 대조군은 아래 표 2와 같이 약칭한다.

표 2

[0119]

그룹/약칭	아토피 유도 처리방법	실험 방법	비고
대조군 1 / 정상 대조군	아토피 유도 없음	6주 동안 하루에 한번 20분씩 탈이온수에서 자유롭게 입욕(bathing)을 실시	아토피 피부염이 유발되지 않은 정상적인 털 없는 쥐
대조군 2 (DNCB) / DNCB 대조군	DNCB	6주 동안 하루에 한번 20분씩 탈이온수에서 자유롭게 입욕을 실시	아토피 피부염이 유발된 털 없는 쥐
대조군 3 (DEXA) / DEXA(양성) 대조군	DNCB	6주 동안 하루에 한번 씩 등 부분에 국부적으로 1% DEXA 용액(스테로이드계 치료제) 200 $\mu$ l를 도포함	
실험군 1 / WSSW	DNCB	6주 동안 하루에 한번 20분씩 서해 표층수(WSSW)에서 자유롭게 입욕을 실시	
실험군 2 / WSGW	DNCB	6주 동안 하루에 한번 20분씩 서해 염지하수(WSGW)에서 자유롭게 입욕을 실시	
실험군 3 / ESSW	DNCB	6주 동안 하루에 한번 20분씩 동해 표층수(ESSW)에서 자유롭게 입욕을 실시	
실험군 4 / ESGW	DNCB	6주 동안 하루에 한번 20분씩 동해 염지하수(ESGW)에서 자유롭게 입욕을 실시	



[0120] 1) 체중의 변화 측정 결과

[0121] 감작 시작 6일 및 7일 후에 정상 대조군에 비해 DNCB 대조군에서 유의성 있는 체중의 감소가 확인된 반면 (p<0.01), 부스팅(boosting) 시작 3주 후에는 정상 대조군에 비해 DNCB 대조군에서 유의성 있는 체중의 증가가 일시적으로 확인되었다(p<0.05). 6주간의 입욕 기간 및 11주간의 실험 전체 기간 동안, 정상 대조군과 DNCB 대조군 사이에 유의성 있는 증체량의 변화는 확인되지 않았다. 또한 4 종류의 해수 각각을 처리한 실험군 1 내지 4와 DEXA를 도포한 DEXA(양성) 대조군에서는 DNCB 대조군과 비교하여 유의미한 체중 변화나 증체량의 변화는 확인되지 않았다(도 2 참조).

[0122] 2) 임상적 피부 심각성 점수의 변화 관찰 결과

[0123] 아래 표 3에 정리된 결과를 참조하면, 본 실험의 아토피 피부염 유발된 마우스들은 임상적 피부 심각성 점수가 10 이상인 실험 동물들을 DEXA 처리 또는 실험군에서 입욕 처리를 수행하기 하루 전에 선발하여 실험에 적용하였으므로, DNCB 대조군은 정상 대조군과 비교하여 유의미하게 높은 임상적 피부 심각성 점수를 나타냈으며, 최초 입욕 시작일로부터 24시간 전의 시점에서부터 실험이 끝나는 시점까지 유지되었다(p<0.01).

[0124] 한편 1% DEXA를 국소 도포한 DEXA(양성) 대조군과 WSGW 실험군에서는 각각 도포 또는 입욕시작 1주일 후부터 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 임상적 피부 심각성 점수의 감소를 보였다 (p<0.01 또는 p<0.05). ESGW 실험군에서는 입욕 시작 2주 후부터, WSSW 실험군과 ESSW 실험군에서는 각각 입욕 시작 3주 후부터 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 임상적 피부 심각성 점수의 감소를 보였다 (p<0.01또는 p<0.05).

표 3

[0125]

그룹 항목	대조군		DEXA	-
	정상	DNCB		
35	1.00±0.76	12.13±1.55 <sup>a</sup>	12.25±1.39 <sup>a</sup>	-
38	1.13±0.99	11.75±1.28 <sup>a</sup>	11.00±1.51 <sup>a</sup>	-
42	0.75±0.71	11.50±1.41 <sup>a</sup>	8.75±1.28 <sup>ab</sup>	-
49	1.00±0.53	10.63±1.41 <sup>a</sup>	7.00±1.20 <sup>ab</sup>	-
56	1.00±0.53	10.13±1.46 <sup>a</sup>	6.13±1.13 <sup>ab</sup>	-
63	1.25±0.71	9.75±1.49 <sup>a</sup>	4.75±1.49 <sup>ab</sup>	-
70	1.13±0.64	9.13±1.46 <sup>a</sup>	4.00±1.31 <sup>ab</sup>	-
77	2.00±0.76	8.38±1.30 <sup>a</sup>	3.50±1.07 <sup>ab</sup>	-
그룹 항목	실험군			
	WSSW	WSGW	ESSW	ESGW
35	12.25±1.83 <sup>a</sup>	12.00±1.51 <sup>a</sup>	12.13±1.25 <sup>a</sup>	12.25±1.67 <sup>a</sup>
38	11.38±1.41 <sup>a</sup>	11.13±0.99 <sup>a</sup>	11.00±1.20 <sup>a</sup>	11.25±1.67 <sup>a</sup>
42	10.75±1.04 <sup>a</sup>	10.25±1.16 <sup>ac</sup>	10.50±1.20 <sup>a</sup>	10.38±1.30 <sup>a</sup>
49	9.88±0.83 <sup>a</sup>	8.88±1.13 <sup>ab</sup>	9.75±1.16 <sup>a</sup>	8.63±1.06 <sup>ab</sup>
56	9.00±1.20 <sup>ac</sup>	8.13±0.99 <sup>ab</sup>	9.00±1.20 <sup>ac</sup>	8.00±1.07 <sup>ab</sup>
63	7.75±1.04 <sup>ab</sup>	6.88±1.25 <sup>ab</sup>	7.63±0.92 <sup>ab</sup>	6.50±0.93 <sup>ab</sup>
70	7.25±0.71 <sup>ab</sup>	6.25±1.04 <sup>ab</sup>	6.88±0.64 <sup>ab</sup>	5.75±0.71 <sup>a</sup>
77	6.25±0.71 <sup>ab</sup>	5.25±1.16 <sup>ab</sup>	5.88±0.64 <sup>ab</sup>	4.88±0.83 <sup>a</sup>

[0126] 주) 표 3에서 항목은 DNCB 감작 5주 뒤부터의 입욕 진행 날짜를 말한다. 모든 값들은 8 마리의 실험 동물의 평



균±SD 값을 나타낸다. 점수의 최대값(Max)=15. <sup>a</sup>p < 0.01 정상 대조군과 LDS test에 의해 비교; <sup>b</sup>p < 0.01 및 <sup>c</sup>p < 0.05 DNCB 대조군과 LSD 테스트로 비교.

[0128] 3) 긁기 행동(Scratching Behaviors) 관찰 결과

[0129] 아래 표 4에 정리된 결과를 참조하면, 본 실험의 아토피 피부염 유발 마우스들은 긁기 행동이 300회 이상으로 증가된 실험 동물들을 DEXA 처리 또는 실험군에서 입욕 처리를 수행하기 하루 전에 선발하여 실험에 적용하였으므로, DNCB 대조군에서는 입욕 시작 24시간 전부터 정상 대조군에 비해 유의성 있는 긁기 행동의 증가를 보였으며(p<0.01) 실험 전체 기간 동안에 확인되었다.

[0130] 한편 1% DEXA로 국소 도포한 DEXA(양성) 대조군에서는 도포 시작 1 주일 후부터 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 긁기 행동의 감소를 보여, 실험 전체 기간 동안 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.05, p<0.01). WSGW 실험군 및 ESGW 실험군에서는 각각 입욕 시작 2주 후부터, WSSW 실험군 및 ESSW 실험군에서는 각각 입욕 시작 4주 후부터 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 긁기 행동의 감소를 보였으며 실험 전체 기간 동안 확인되었다(각각 p<0.01, p<0.05).

표 4

[0131]

그룹 항목	대조군		DEXA	-
	정상	DNCB		-
35	15.31±9.09	478.13±112.61 <sup>a</sup>	480.88±109.99 <sup>a</sup>	-
38	13.63±6.07	468.50±111.31 <sup>a</sup>	436.13±101.11 <sup>a</sup>	-
42	13.00±4.41	456.25±102.61 <sup>a</sup>	324.88±88.38 <sup>ac</sup>	-
49	14.63±6.67	448.63±97.87 <sup>a</sup>	223.25±47.38 <sup>ab</sup>	-
56	16.63±5.42	431.25±90.00 <sup>a</sup>	177.50±22.67 <sup>ab</sup>	-
63	17.38±5.60	412.38±68.67 <sup>a</sup>	149.25±34.85 <sup>ab</sup>	-
70	18.00±4.28	410.50±77.21 <sup>a</sup>	90.63±24.11 <sup>ab</sup>	-
77	19.25±5.06	405.00±65.20 <sup>a</sup>	70.88±30.89 <sup>ab</sup>	-
그룹	실험군			
항목	WSSW	WSGW	ESSW	ESGW
35	484.50±105.49 <sup>a</sup>	480.63±101.37 <sup>a</sup>	475.50±97.90 <sup>a</sup>	481.88±120.67 <sup>a</sup>
38	461.13±106.48 <sup>a</sup>	441.50±87.29 <sup>a</sup>	455.25±93.97 <sup>a</sup>	435.38±88.52 <sup>a</sup>
42	448.13±101.73 <sup>a</sup>	393.00±52.97 <sup>a</sup>	415.00±76.14 <sup>a</sup>	390.00±77.26 <sup>a</sup>
49	407.00±85.47 <sup>a</sup>	340.50±42.52 <sup>ac</sup>	369.50±68.29 <sup>a</sup>	432.00±53.17 <sup>ac</sup>
56	381.38±83.58 <sup>a</sup>	306.88±27.97 <sup>ab</sup>	355.63±66.34 <sup>a</sup>	299.38±32.11 <sup>ab</sup>
63	312.13±66.85 <sup>ac</sup>	290.38±37.89 <sup>ab</sup>	307.88±39.20 <sup>ab</sup>	273.63±29.66 <sup>ab</sup>
70	288.38±70.04 <sup>ab</sup>	251.75±26.60 <sup>ab</sup>	284.00±39.37 <sup>ab</sup>	229.75±24.02 <sup>ab</sup>
77	273.00±63.19 <sup>ab</sup>	230.25±27.77 <sup>ab</sup>	258.88±30.68 <sup>ab</sup>	203.75±24.32 <sup>ab</sup>

[0132] 주) 표 4에서 항목은 DNCB 감작 5주 뒤부터의 입욕 진행 날짜를 말한다. 표 4에서 모든 값들은 8 마리의 실험 동물의 평균±SD 값을 나타낸다. 긁기 행동은 빈도수/30분으로 측정. <sup>a</sup>p < 0.01 정상 대조군과 MW 테스트에 의해 비교; <sup>b</sup>p < 0.01 및 <sup>c</sup>p < 0.05 DNCB 대조군과 MW 테스트에 의해 비교.

[0134] 4) 혈청 중 총 IgE 함량의 변화

[0135] 도 3의 결과를 참고하면, DNCB 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 혈청 중 총 Ig E 함량의 증가를 보였다( $p < 0.01$ ). DEXA(양성) 대조군과 ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군 순으로 각각 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 혈청 중 총 Ig E 함량의 감소를 보이는 것으로 확인되었다 ( $p < 0.01$ ).

[0136] 혈청 중 총 IgE 함량은 DNCB 대조군에서는 정상 대조군에 비해 249.23% 더 높은 변화를 나타내었으며, DEXA(양성) 대조군, WSSW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군 및 ESGW 실험군에서 각각 DNCB 대조군에 비해 -57.63, -20.50, -32.30, -29.46 및 -41.55%의 변화를 나타내었다.

[0138] 5) 악하 림프절 및 비장 중량의 변화

[0139] 아래 표 5를 참고하면, DNCB 대조군에서 정상 대조군에 비해 유의성 있는 악하 림프절 및 비장의 절대 중량 및 상대 중량의 증가가 각각 확인되었다 ( $p < 0.01$ ).

[0140] DEXA(양성) 대조군, ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군의 순으로 각각 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 악하 림프절 및 비장의 절대 중량 및 상대 중량의 감소가 확인되었다( $p < 0.01$ ).

표 5

[0141]

항목	절대 중량(g)		상대 중량 (체중량의 백분율(%))	
	비장	악하 림프절	비장	악하 림프절
정상	0.098±0.014	0.007±0.003	0.395±0.069	0.029±0.009
DNCB	0.237±0.032 <sup>a</sup>	0.019±0.003 <sup>a</sup>	0.909±0.135 <sup>a</sup>	0.073±0.011 <sup>a</sup>
DEXA	0.123±0.017 <sup>bc</sup>	0.009±0.002 <sup>c</sup>	0.472±0.082 <sup>c</sup>	0.035±0.00 <sup>bc</sup>
WSSW	0.192±0.026 <sup>ac</sup>	0.015±0.003 <sup>ac</sup>	0.730±0.092 <sup>ac</sup>	0.057±0.007 <sup>ac</sup>
WSGW	0.163±0.027 <sup>ac</sup>	0.013±0.003 <sup>ac</sup>	0.640±0.094 <sup>ac</sup>	0.052±0.013 <sup>ac</sup>
ESSW	0.177±0.023 <sup>ac</sup>	0.014±0.003 <sup>ac</sup>	0.705±0.115 <sup>ac</sup>	0.055±0.015 <sup>ac</sup>
ESGW	0.144±0.021 <sup>ac</sup>	0.012±0.002 <sup>ac</sup>	0.564±0.076 <sup>ac</sup>	0.046±0.009 <sup>ac</sup>

[0142] 주) 표 5에서 모든 값들은 8 마리의 실험 동물의 평균±SD 값을 나타낸다. <sup>a</sup>  $p < 0.01$  및 <sup>b</sup>  $p < 0.05$ 는 정상 대조군과 LDS 테스트에 의해 비교; <sup>c</sup>  $p < 0.05$ 는 DNCB 대조군과 LSD 테스트로 비교.

[0144] 6) 비장 사이토카인 함량의 변화 측정 결과

[0145] 아래 표 6의 결과를 참고하면, DNCB 대조군에서 정상 대조군에 비해 유의성 있는 비장 조직 내 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-10함량의 증가가 각각 확인되었다( $p < 0.01$ ). 한편 DEXA(양성) 대조군, ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군에서 각각 기재된 순서로 각각 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 비장 조직 내 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-10함량의 감소가 확인되었다(각각  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ).

표 6

[0146]

항목	비장 사이토카인 함량 (pg/mg 단백질)		
	종양괴사 인자- $\alpha$	인터류킨-1 $\beta$	인터류킨-10
정상	164.92±23.50	49.22±12.57	216.95±54.25
DNCB	30.62±113.24 <sup>c</sup>	196.31±21.62 <sup>a</sup>	88.86±131.07 <sup>c</sup>
DEXA	198.70±19.33 <sup>de</sup>	87.83±14.66 <sup>ab</sup>	317.61±52.05 <sup>ce</sup>
WSSW	373.00±39.06 <sup>ce</sup>	150.59±18.60 <sup>a</sup>	514.88±103.99 <sup>cf</sup>
WSGW	322.99±67.87 <sup>ce</sup>	125.91±14.36 <sup>ab</sup>	443.48±76.07 <sup>ce</sup>

ESSW	352.92±64.20 <sup>ce</sup>	141.80±21.29 <sup>ab</sup>	508.11±73.76 <sup>ce</sup>
ESGW	296.31±65.51 <sup>ce</sup>	114.18±23.27 <sup>ab</sup>	402.62±71.39 <sup>ce</sup>

[0147] 주) 표 6에서, 모든 값들은 8 마리의 실험 동물의 평균±SD 값을 나타낸다. <sup>a</sup>  $p < 0.01$ 은 정상 대조군과 LDS 테스트에 의해 비교; <sup>b</sup>  $p < 0.01$ 은 DNCB 대조군과 LSD 테스트로 비교; <sup>c</sup>  $p < 0.01$  및 <sup>d</sup>  $p < 0.05$ 는 정상 대조군과 MW 테스트로 비교; <sup>e</sup>  $p < 0.01$  및 <sup>f</sup>  $p < 0.05$ 는 DNCB 대조군과 MW 테스트로 비교.

[0149] 7) 피부 조직 내 사이토카인 mRNA 발현의 변화

[0150] 아래 표 7을 참조하면, RT-PCR 분석을 통해 확인된 정상 대조군과 대비하여 DNCB 대조군의 등 피부 조직 내 TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 및 IL-13 mRNA 발현은 유의성 있게 증가한 것이 확인되었다 ( $p < 0.01$ ). 한편, DEXA(양성) 대조군, ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 등 피부 조직 내 TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 및 IL-13 mRNA의 발현의 감소가 확인되었다 (각각.  $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ).

표 7

[0151]

항목	피부 mRNA 발현(상대적 발현/GAPDH mRNA)			
	비장	악하 림프절	비장	악하 림프절
정상	1.03±0.08	1.01±0.05	1.04±0.11	1.01±0.08
DNCB	5.62±1.22 <sup>a</sup>	4.94±0.74 <sup>a</sup>	5.50±1.14 <sup>a</sup>	3.07±0.54 <sup>a</sup>
DEXA	2.74±1.20 <sup>ab</sup>	1.88±0.56 <sup>ab</sup>	2.25±0.52 <sup>ab</sup>	1.40±0.21 <sup>ab</sup>
WSSW	4.18±0.52 <sup>ac</sup>	3.87±0.60 <sup>ac</sup>	3.95±0.89 <sup>ab</sup>	2.30±0.37 <sup>ab</sup>
WSGW	3.46±0.77 <sup>ac</sup>	3.06±0.50 <sup>ab</sup>	3.47±0.82 <sup>ab</sup>	1.98±0.26 <sup>ab</sup>
ESSW	3.94±0.62 <sup>ac</sup>	3.59±0.66 <sup>ab</sup>	3.70±0.71 <sup>ab</sup>	2.16±0.28 <sup>ab</sup>
ESGW	2.82±1.22 <sup>ac</sup>	2.55±0.79 <sup>ab</sup>	3.13±0.63 <sup>ab</sup>	1.74±0.34 <sup>ab</sup>

[0152] 주) 표 7에서, 모든 값들은 8 마리의 실험 동물의 평균±SD 값을 나타낸다. <sup>a</sup>  $p < 0.01$  정상 대조군과 MW 테스트에 의해 비교; <sup>b</sup>  $p < 0.01$  및 <sup>c</sup>  $p < 0.05$  DNCB 대조군과 MW 테스트에 의해 비교.

[0154] 8) 피부 조직 내 항산화 방어 시스템의 변화

[0155] 아래 표 8을 참조하면, 정상 대조군과 비교하여 DNCB 대조군에서 유의성 있는 피부 조직 내 GSH 함량의 감소와 지질 과산화-MDA 함량 증가 및 과산화물 음이온(superoxide anion) 생산량의 증가가 각각 확인되었다 ( $p < 0.01$ ). 한편, ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군의 순서로 각각 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 피부 조직 내 GSH 함량의 증가, 지질 과산화의 감소 및 과산화물 음이온 생산량의 감소가 확인되었다 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ). DEXA(양성) 대조군은 DNCB 대조군과 비교하여 유의성 있는 피부 조직 내 GSH 함량 변화, 지질 과산화 정도 변화 및 과산화물 음이온 생산량의 변화는 확인되지 않았다.

표 8

[0156]

항목	피부 조직 내 항산화 방어 시스템		
	글루타티온 ( $\mu$ M/mg 단백질)	지질 과산화-말론디알데히드 (nM/mg 단백질)	과산화물 음이온 생산량 (NBT reduction/OD at 600nm)
정상	1.49±0.27	0.38±0.13	0.41±0.12
DNCB	0.44±0.17 <sup>a</sup>	2.66±0.70 <sup>d</sup>	1.68±0.27 <sup>d</sup>
DEXA	0.43±0.13 <sup>a</sup>	2.58±0.87 <sup>d</sup>	1.57±0.62 <sup>d</sup>

WSSW	0.67±0.10 <sup>ac</sup>	1.83±0.35 <sup>df</sup>	1.28±0.26 <sup>df</sup>
WSGW	0.83±0.22 <sup>ab</sup>	1.38±0.22 <sup>de</sup>	1.03±0.22 <sup>de</sup>
ESSW	0.76±0.18 <sup>ab</sup>	1.72±0.20 <sup>df</sup>	1.14±0.17 <sup>de</sup>
ESGW	1.01±0.27 <sup>ab</sup>	1.03±0.31 <sup>de</sup>	0.73±0.25 <sup>de</sup>

[0157] 주) 표 8에서, 모든 값들은 8 마리의 실험 동물의 평균±SD 값을 나타낸다. <sup>a</sup>  $p < 0.01$ 은 정상 대조군과 LDS 테스트에 의해 비교; <sup>b</sup>  $p < 0.01$  및 <sup>c</sup>  $p < 0.05$ 는 DNCB 대조군과 LSD 테스트로 비교; <sup>d</sup>  $p < 0.01$ 은 정상 대조군과 MW 테스트로 비교; <sup>e</sup>  $p < 0.01$  및 <sup>f</sup>  $p < 0.05$ 는 DNCB 대조군과 MW 테스트로 비교.

[0159] 9) 등 피부 조직의 조직 병리학적 변화

[0160] 아래 표 9 및 표 10, 그리고 도 4 내지 도 9의 결과를 참고하면, 4 종류의 실험군 각각의 아토피성 피부염 관련 조직 병리학적 과민 반응에 있어서, ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군의 순으로 DNCB 대조군과 비교하여 유의성 있게 감소되었다 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ). 1% DEXA로 국소 도포한 DEXA(양성) 대조군에서도 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 상피 두께, 침윤 비만 세포의 수 및 염증 세포의 수, 표피 내 caspase-3, PARP, NT 및 4-HNE 면역 반응세포의 수, 진피 내 MMP-9 면역 반응성, 진피 내 IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$  면역 반응세포의 수의 감소를 각각 나타내었으나( $p < 0.01$ ), 진피 내 콜라겐 섬유가 차지하는 비율은 DNCB 대조군과 유사하게 확인되었다.

표 9

[0161]

그룹 항목	대조군		DEXA	-
	정상	DNCB		
상피 두께	29.72±6.61	113.81±21.68d	36.6±5.03ef	-
콜라겐 섬유 차지 영역 %	41.2±6.97	79.36±7.91a	78.48±7.72a	-
침윤 세포	-			
염증	22±11.54	390.25±115.56 <sup>d</sup>	70.13±21.72 <sup>df</sup>	-
비만	124.88±42.04	819.25±102.87 <sup>a</sup>	221.5±37.03 <sup>bc</sup>	-
그룹 항목	실험군			
	WSSW	WSGW	ESSW	ESGW
상피 두께	70.08±15.31 <sup>df</sup>	53.28±10.49 <sup>df</sup>	59.34±11.17 <sup>df</sup>	46.95±7.80 <sup>df</sup>
콜라겐 섬유 차지 영역 %	65.35±9.43 <sup>ac</sup>	58.92±8.01 <sup>ac</sup>	62±8.66 <sup>ac</sup>	51.79±7.77 <sup>bc</sup>
침윤 세포	-			
염증	233.38±60.46 <sup>df</sup>	161.63±26.80 <sup>df</sup>	215.75±18.91 <sup>df</sup>	126.25±29.03 <sup>df</sup>
비만	628.25±101.19 <sup>ac</sup>	492.88±112.89 <sup>ac</sup>	572.50±92.16 <sup>ac</sup>	341±71.43 <sup>ac</sup>

[0162] 주) 표 9에서, 모든 값들은 8 마리의 실험동물의 평균±SD 값을 나타낸다. <sup>a</sup>  $p < 0.01$  및 <sup>b</sup>  $p < 0.05$ 는 정상 대조군과 LDS 테스트에 의해 비교; <sup>c</sup>  $p < 0.01$ 은 DNCB 대조군과 LSD 테스트로 비교; <sup>d</sup>  $p < 0.01$  및 <sup>e</sup>  $p < 0.05$ 는 정상 대조군과 MW 테스트로 비교; <sup>f</sup>  $p < 0.01$ 은 DNCB 대조군과 MW 테스트로 비교.

표 10

[0163]

그룹 항목	대조군		DEXA	-
	정상	DNCB		

Caspase-3	3.13±1.96	85.00±7.33 <sup>a</sup>	37.00±10.62 <sup>ab</sup>	-
PARP	6.50±2.20	85.00±10.01 <sup>c</sup>	21.38±5.40 <sup>cd</sup>	-
니트로 타이로신	16.38±3.74	87.63±6.55 <sup>c</sup>	16.63±3.50 <sup>d</sup>	-
4-HNE	3.63±1.41	85.38±12.78 <sup>c</sup>	24.25±7.03 <sup>cd</sup>	-
MMP-9	10.37±5.62	55.34±10.24 <sup>a</sup>	38.74±10.80 <sup>ab</sup>	-
IFN-γ	7.42±2.04	138.52±25.95 <sup>c</sup>	39.46±15.48 <sup>cd</sup>	-
iNOS	6.68±2.14	237.05±28.70 <sup>c</sup>	62.15±20.37 <sup>cd</sup>	-
IL-1β	4.83±2.37	185.70±26.59 <sup>c</sup>	41.73±14.26 <sup>cd</sup>	-
IL-2	3.52±1.75	86.46±20.19 <sup>c</sup>	17.15±6.12 <sup>cd</sup>	-
TNF-α	5.22±1.29	65.15±14.79 <sup>c</sup>	16.42±5.19 <sup>cd</sup>	-
그룹	실험군			
항목	WSSW	WSGW	ESSW	ESGW
Caspase-3	71.13±7.04 <sup>ab</sup>	54.25±10.62 <sup>ab</sup>	64.13±11.47 <sup>ab</sup>	34.13±10.74 <sup>ab</sup>
PARP	69.25±9.47 <sup>ce</sup>	48.00±14.58 <sup>cd</sup>	55.13±11.29 <sup>cd</sup>	38.63±12.32 <sup>cd</sup>
니트로 타이로신	71.38±10.93 <sup>cd</sup>	42.50±10.63 <sup>cd</sup>	60.75±12.38 <sup>cd</sup>	27.25±7.27 <sup>cd</sup>
4-HNE	67.50±6.12 <sup>ce</sup>	55.38±11.12 <sup>cd</sup>	64.13±11.78 <sup>cd</sup>	39.63±15.05 <sup>cd</sup>
MMP-9	41.53±6.54 <sup>ab</sup>	34.69±7.06 <sup>ab</sup>	39.28±7.70 <sup>ab</sup>	24.68±6.22 <sup>ab</sup>
IFN-γ	110.67±13.62 <sup>ce</sup>	83.71±13.67 <sup>cd</sup>	101.45±12.69 <sup>cd</sup>	61.28±12.98 <sup>cd</sup>
iNOS	196.20±23.12 <sup>ce</sup>	133.28±39.82 <sup>cd</sup>	154.53±20.51 <sup>cd</sup>	88.08±19.61 <sup>cd</sup>
IL-1β	129.77±31.57 <sup>cd</sup>	87.36±13.42 <sup>cd</sup>	110.18±11.01 <sup>cd</sup>	62.02±17.18 <sup>cd</sup>
IL-2	45.13±9.42 <sup>cd</sup>	30.47±11.94 <sup>cd</sup>	39.48±17.42 <sup>cd</sup>	23.50±5.76 <sup>cd</sup>
TNF-α	38.96±14.48 <sup>cd</sup>	24.26±3.42 <sup>cd</sup>	32.67±9.78 <sup>cd</sup>	20.97±2.58 <sup>cd</sup>

[0164] 주) 표 10에서, 모든 값들은 8 마리의 실험 동물의 평균±SD 값을 나타낸다. <sup>a</sup>  $p < 0.01$ 은 정상 대조군과 LDS 테스트에 의해 비교; <sup>b</sup>  $p < 0.01$ 은 DNCB 대조군과 LSD 테스트로 비교; <sup>c</sup>  $p < 0.01$ 은 정상 대조군과 MW 테스트로 비교; <sup>d</sup>  $p < 0.01$  및 <sup>e</sup>  $p < 0.05$ 는 DNCB 대조군과 MW 테스트로 비교.

[0166] 10) 비장의 조직 병리학적 변화

[0167] 아래 표 11 및 도 10 내지 13의 결과를 참조하면, 정상 대조군과 비교하여 DNCB 대조군에서 유의성 있는 비장 전체 두께, 적색 수질 세포의 수, 비장 조직 내 IFN-γ, iNOS, IL-1β, IL-2 및 TNF-α 면역 반응세포의 수적인 증가가 각각 확인 되었다 ( $p < 0.01$ ). 한편, DEXA(양성) 대조군, ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군의 순으로 조직 병리학적 비장 증대 소견이 유의성 있게 감소되었다 (각각,  $p < 0.01$  과  $p < 0.05$ ). 정상 대조군과 비교하여 DNCB 대조군 및 각 실험군들에서 유의성 있는 비장 백색 수질의 수적인 변화는 확인되지 않았다.

표 11

그룹 항목	대조군		DEXA	-
	정상	DNCB		
전체 두께	1.55±0.28	3.42±0.59a	1.67±0.29 <sup>c</sup>	-

백색 수질	12.75±1.49	14.00±1.69	12.88±2.03	-
적색 수질	2.91±0.87	29.40±7.33 <sup>a</sup>	5.09±2.65 <sup>bc</sup>	-
TNF-α	14.13±6.20	430.88±90.74 <sup>a</sup>	46.50±19.67 <sup>ac</sup>	-
IFN-γ	57.13±28.54	697.63±121.01 <sup>a</sup>	132.75±39.64 <sup>ac</sup>	-
iNOS	64.38±20.28	791.25±144788	146.63±30.65 <sup>ac</sup>	-
IL-1β	143.38±49.11	814.88±172.80 <sup>a</sup>	145.63±65.53 <sup>c</sup>	-
IL-2	89.38±47.11	889.88±148.36 <sup>a</sup>	138.88±45.04 <sup>bc</sup>	-
그룹	실험군			
항목	WSSW	WSGW	ESSW	ESGW
전체 두께	2.34±0.39 <sup>ac</sup>	1.92±0.25 <sup>bc</sup>	2.08±0.25 <sup>ac</sup>	1.73±0.12 <sup>c</sup>
백색 수질	14.38±2.13	13.00±1.51	13.25±1.67	13.63±2.72
적색 수질	21.83±3.20 <sup>ad</sup>	15.54±2.15 <sup>ac</sup>	18.37±2.19 <sup>ac</sup>	11.21±4.27 <sup>ac</sup>
TNF-α	287.38±79.22 <sup>ac</sup>	162.25±39.33 <sup>ac</sup>	220.75±56.24 <sup>ac</sup>	96.63±16.40 <sup>ac</sup>
IFN-γ	526.25±67.50 <sup>ad</sup>	360.00±100.05 <sup>ac</sup>	413.88±87.74 <sup>ac</sup>	239.13±81.36 <sup>ac</sup>
iNOS	574.00±117.85 <sup>ac</sup>	385.50±72.73 <sup>ac</sup>	495.38±81.59 <sup>ac</sup>	286.63±82.41 <sup>ac</sup>
IL-1β	607.63±105.33 <sup>ad</sup>	415.38±114.67 <sup>ac</sup>	551.88±111.26 <sup>ac</sup>	332.88±98.48 <sup>ac</sup>
IL-2	594.75±141.99 <sup>ac</sup>	367.1±107.45 <sup>ac</sup>	462.38±117.65 <sup>ac</sup>	240.88±117.08 <sup>ac</sup>

[0169] 주) 표 11에서, 모든 값들은 8 마리의 실험 동물의 평균±SD 값을 나타낸다. <sup>a</sup> $p < 0.01$  및 <sup>b</sup> $p < 0.05$ 는 정상 대조군과 MW 테스트에 의해 비교; <sup>c</sup> $p < 0.01$  및 <sup>d</sup> $p < 0.05$ 는 DNCB 대조군과 MW 테스트로 비교.

[0171] 11) 악하 림프절의 조직 병리학적 변화

[0172] 아래 표 12 및 도 14 내지 도 17의 결과를 참조하면, 악하 림프절 전체 두께, 피질 내 림프구성 세포의 수, 피질 두께, 악하 림프절 조직 내 IFN-γ, iNOS, IL-1β, IL-2 및 TNF-α 면역 반응세포의 측면에서, 정상 대조군에 비해 DNCB 대조군에서 유의미한 유의성 있는 수적인 증가가 확인되었다 ( $p < 0.01$ ).

[0173] 한편, DEXA(양성) 대조군, ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군의 순으로 악하 림프절의 조직 병리학적 민감도 증대 소견이 유의미하게 감소되었다 ( $p < 0.01$ ).

표 12

[0174]

그룹 항목	대조군		DEXA	-
	정상 매체	DNCB		
전체 두께	0.73±0.17	1.70±0.39 <sup>a</sup>	0.98±0.20 <sup>bc</sup>	-
세포 수	11.38±2.77	35.00±5.81 <sup>a</sup>	14.50±2.73 <sup>c</sup>	-
피질 두께	353.27±104.03	981.34±123.88 <sup>a</sup>	399.76±98.96 <sup>c</sup>	-
TNF-α	7.52±2.03	131.36±24.32 <sup>d</sup>	20.13±11.80 <sup>de</sup>	-
IFN-γ	7.80±5.27	206.72±15.82 <sup>d</sup>	18.97±5.99 <sup>de</sup>	-
iNOS	8.65±4.11	153.55±24.80 <sup>d</sup>	19.38±7.03 <sup>de</sup>	-
IL-1β	15.07±6.75	123.60±20.31 <sup>d</sup>	43.47±12.23 <sup>de</sup>	-
IL-2	2.85±1.54	84.57±17.53 <sup>d</sup>	15.30±5.39 <sup>de</sup>	-
그룹	실험군			



항목	WSSW	WSGW	ESSW	ESGW
전체 두께	1.34±0.14 <sup>ac</sup>	1.09±0.17 <sup>ac</sup>	1.28±0.22 <sup>ac</sup>	0.97±0.12 <sup>bc</sup>
여포 수	28.25±5.60 <sup>ac</sup>	22.88±3.60 <sup>ac</sup>	25.25±5.75 <sup>ac</sup>	14.63±2.07 <sup>ac</sup>
피질두께	822.82±100.84 <sup>ac</sup>	753.92±123.13 <sup>ac</sup>	807.70±119.32 <sup>ac</sup>	528.73±128.20 <sup>ac</sup>
TNF-α	94.60±12.60 <sup>de</sup>	65.21±23.35 <sup>de</sup>	91.63±14.44 <sup>de</sup>	38.52±11.13 <sup>de</sup>
IFN-γ	157.95±25.35 <sup>de</sup>	79.41±15.14 <sup>de</sup>	112.41±14.85 <sup>de</sup>	46.65±27.73 <sup>de</sup>
iNOS	113.57±21.64 <sup>de</sup>	64.26±12.58 <sup>de</sup>	82.10±26.17 <sup>de</sup>	37.52±15.17 <sup>de</sup>
IL-1β	94.51±13.83 <sup>de</sup>	63.23±95.66 <sup>de</sup>	78.8±18.19 <sup>de</sup>	42.50±14.74 <sup>de</sup>
IL-2	45.56±13.55 <sup>de</sup>	29.20±7.20 <sup>de</sup>	31.96±8.98 <sup>de</sup>	21.36±72.07 <sup>de</sup>

[0175] 주) 표 12에서, 모든 값들은 8주의 실험동물의 평균±SD 값을 나타낸다. <sup>a</sup>  $p < 0.01$  및 <sup>b</sup>  $p < 0.05$ 는 정상 대조군과 LSD 테스트에 의해 비교; <sup>c</sup>  $p < 0.01$ 은 DNCB 대조군과 LSD 테스트에 의해 비교; <sup>d</sup>  $p < 0.01$ 은 정상 대조군과 MW 테스트로 비교; <sup>e</sup>  $p < 0.01$ 은 DNCB 대조군과 MW 테스트로 비교.

[0177] **실험 결과의 검토**

[0178] 일반적으로 DNCB로 감작 시 마우스에서 체중 감소가 확인되나, 이후 만성적인 DNCB 노출에 의한 과민 반응이 유발됨에 따라, 체중의 증가가 확인되어, 전체적인 체중의 변화에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 본 실험의 결과에서도 감작 기간 동안, 정상 대조군에 비해 DNCB 대조군에서 유의미한 체중의 감소가 확인된 반면, 부스팅 기간 동안에는 DNCB 대조군에서 정상 대조군에 비해 현저한 체중의 증가가 확인되어, 11주간의 실험 전체 기간 및 6주간의 입욕 기간 동안의 유의미한 증체량의 변화는 확인되지 않았다. 즉, DEXA 대조군 및 4 가지 실험군 모두에서 DNCB 대조군과 비교하여 의미 있는 체중 및 증체량의 변화는 확인되지 않았다.

[0179] 아토피성 피부염 발생시 피부 조직에는 비만 세포, 호산구, 호염기구 및 T 림프구 등과 같은 다양한 염증 세포의 침윤이 유발되고, 만성 재발성의 소양증, 습진성 병변 및 과각화증 등과 같은 일반적인 피부 증상이 초래되며, DNCB의 반복적인 피부 적용 시에도 이와 유사한 일반 피부 증상과 함께 다양한 염증 세포의 침윤 및 피부 경화증이 유발되는 것으로 알려져 있다 [Kandolf- Sekulovic et al., 2003; Nadworny et al., 2008]. 따라서 실험 동물의 긁기 행동과 함께 소양증/가려움증, 홍반/출혈, 부종(edema), 표피 박리/긁무름(excoriation/erosion) 및 스케일링/건조를 토대로 하는 임상적 피부 심각성 점수가 아토피성 피부염의 진행 정도를 파악하는데 귀중한 지표로 이용되고 있다. 비만 세포는 과민 및 알레르기 반응과 같은 만성 염증 질환을 매개하는 중요한 세포로 세포막의 Ig E 수용체를 매개로, 항원과 결합시 히스타민, 류코트리엔(leukotriene), 프로테아제, 프로스타그란딘(prostaglandin) 및 사이토카인과 같은 다양한 염증 매개 화학 물질을 분비하여, 염증 반응을 시작하게 한다. 히스타민은 초기 염증반응 시 비만세포로부터 유리되어, 소양증을 일으키는 주요 원인으로 즉시형 과민반응(type I allergic responses)을 시작시키는 염증 매개성 화학 물질로 알려져 있고, 다양한 종류의 아토피성 피부염 발생시 현저한 비만 세포의 증식 및 침윤이 피부 조직에서 관찰되고 있다. 위의 실험에서는, 이들 Ig E 매개성 과민 반응, 피부 경화증, 염증 및 비만 세포의 침윤 소견이 DEXA(양성) 대조군, ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군의 순서로 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 위의 실시예에서 적용한 본 발명에 따른 염지하수가 DNCB로 유발된 아토피성 피부염의 증상들을 현저히 완화시키는 직접적인 증거로 판단된다.

[0180] 아토피 피부염은 유전적, 환경적, 면역적 요인 등 복잡한 요인들이 발병 기전으로 작용한다. 특히 Th2 세포에 의해 생산 분비되는 IL-4, IL-5 및 IL-13이 아토피 피부염을 유발시키는 가장 중요한 인자로 알려져 있다. 정확한 아토피성 피부염의 발병 기전 및 원인은 알려져 있지 않으나, 최근의 연구에 따르면 Th2 세포 매개성 사이토카인의 증가와 Th1 세포 매개성 사이토카인의 감소가 공통적으로 관찰되며, Th2 세포들은 초기 아토피성 피부염의 유발에 관여하며, Th1 세포들은 후기 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. IL-4에 의한 Ig E 함량의 증가는 아토피성 피부염의 가장 주된 특징이며, IL-4는 B 세포의 Ig E 생산을 촉진시키고, B 세포에서 유리된 Ig E는 비만 세포에 부착된다. 아토피성 피부염은 IL-4, IL-5 및 IL-13 분비에 의존적이며, 대부분의 아토피성 피부염

환자에서 Th2 세포에 의한 IL-4, IL-5 및 IL-13의 생산 증가에 따른 호산구 및 Ig E 함량의 증가가 관찰된다. TNF- $\alpha$ 는 잘 알려진 염증 전 사이토카인(proinflammatory cytokine) 중 하나로, DNCB로 유발된 아토피성 피부염에서도 현저한 증가가 관찰된다. IL-2는 면역 반응 시 정상적으로 T 세포에 의해 분비되고, 아토피성 피부염의 소양증 유발에 관여한다. IFN- $\gamma$ 는 20 kDa 내지 25 kDa의 당단백질로, IL-2에 반응하여, 세포독성 CD8+ T 세포, Th1 세포 및 자연살해 세포(natural killer cell)에서 생산되며, B 및 T 세포의 기능에 다양한 영향을 미치고, 자연살해 세포와 대식 세포를 활성화시킨다. IFN- $\gamma$ 의 상승 또는 활성 증가가 DNCB된 유발된 아토피성 피부염에서 확인되었다. 과량의 iNOS의 생성은 일반적으로 주변 환경에 산화성 손상을 유발하고, 세포 독성을 나타낸다. 즉 iNOS의 활성 증가는 내독소(endotoxin), IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 와 같은 다른 염증 전 제제(proinflammatory agent)의 활성을 높여, 신체에 쇼크 반응과 과도한 염증 반응을 초래하며, 아토피 피부염의 발병 기전으로 작용하고 있다. 따라서, iNOS, IL-2, TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  발현 감소는 다양한 알레르기성 질환의 치료를 유도할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 아토피성 피부염은 또한 전신 과민 반응으로, 말초 및 중추성 림프 조직에서의 림프구들, 특히 T 세포의 증식 및 분화를 초래한다.

[0181] 위의 실험에서는, DEXA(양성) 대조군, ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군의 순으로 위에서 설명한 DNCB로 유발된 아토피성 피부염의 전신 및 국소 반응이 유의미하게 억제되었고, 이러한 결과는 본 발명에 따른 조성물이 아토피 피부염 또는 알레르기 반응의 예방 또는 치료, 증상 완화 등의 용도로 활용도가 크다는 점을 의미한다.

[0182] 아토피 피부염은 GSH와 같은 내인성 항산화제의 고갈에 의해 초래되는 활성 산소종(ROS)과 항산화제의 불균형을 유도한다. GSH는 ROS 수준을 낮게 유지하여 조직 손상을 막아주는 항산화제고, 조직에서 방어적 항산화 인자로 작동한다. GSH는 세포 내 내인성 항산화 효소인 글루타티온 과산화효소 및 글루타티온 환원효소의 보조 인자로 작용하며, 세포 내에서 과산화수소와 지질 과산화를 감소시킨다. 4-HNE는 지질 과산화에 의해 생성되는  $\alpha$ ,  $\beta$ -불포화 히드록시알케날로 다양한 질병 특히, 만성 염증, 신경병성 질환, 성인 호흡곤란 증후군, 혈관계 질환, 당뇨 및 종양의 원인으로 주목 받고 있으며, 현재 지질 과산화의 마커로 사용되고 있다. NT는 퍼옥시니트라이트 음이온(peroxynitrite anion) 및 이산화질소와 같은 반응성 질소 종에 의해 매개되는 타이로신 니트로화 반응의 산물로, 다양한 산화 스트레스성 질환에 관여하며, 대표적인 iNOS 관련 산화 스트레스의 마커로 활용되고 있다. 위의 실험에서, DNCB에 의해 내인성 항산화제인 GSH 함량 감소와 함께 과산화물 음이온 생산량의 현저한 증가가 관찰되었으며, 피부 표피 내 NT 및 4-HNE 면역 반응세포의 수적인 증가가 각각 유발되었으나, 이러한 내인성 항산화제의 고갈 및 표피 내 산화 스트레스의 증가가 ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군 순으로 유의미하게 억제된 것을 TBARS assay에 의한 지질 과산화 지표인 MDA 함량 측정을 통해 확인하여, 본 발명의 조성물이 내인성 항산화 방어 시스템인 GSH 시스템을 유지시키고, DNCB 노출에 의한 산화 스트레스에 보다 효과적으로 저항할 수 있는 것으로 평가된다. 한편, DEXA(양성) 대조군에서도 표피 내 NT 및 4-HNE 면역 반응세포의 수적 감소가 확인되었으나, DNCB 대조군과 유사한 GSH 함량 및 과산화물 음이온 생산량이 관찰되었다.

[0183] 세포 자살(apoptosis)은 시토크롬이 유출되면서 미토콘드리아 손상이 발생하고, caspase-3와 같은 카스파제(caspase)가 활성화되며, 이는 PARP, 사이토케라틴 18과 같은 절단 단백질(cleavage protein)을 활성화시키고, 세포 자살의 형태학적, 생화학적 변화를 가져 온다. 따라서 caspase-3와 PARP는 세포 자살의 중요한 바이오 마커로 활용된다. 피부 각질세포에서 이들 caspase-3 및 PARP의 증가는 세포 자살에 의한 피부 세포의 손상을 의미하며, DNCB로 유발된 아토피성 피부염 발생시의 피부 병변에도 세포 자살이 관여하는 것으로 알려져 있다. 위의 실험에서도, DNCB의 도포에 의해 피부 표피 내 caspae-3 및 PARP 면역 반응세포의 증가가 면역 조직화학적으로 확인되었으나, DEXA 대조군, ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군의 순으로, 피부 조직의 일반 조직학적 변화와 잘 일치되어 표피 caspae-3 및 PARP 면역 반응세포의 수가 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 본 발명의 조성물이 강력한 세포 자살 억제 효과를 통한 피부 보호 작용을 나타내는 중요한 증거로 판단된다.

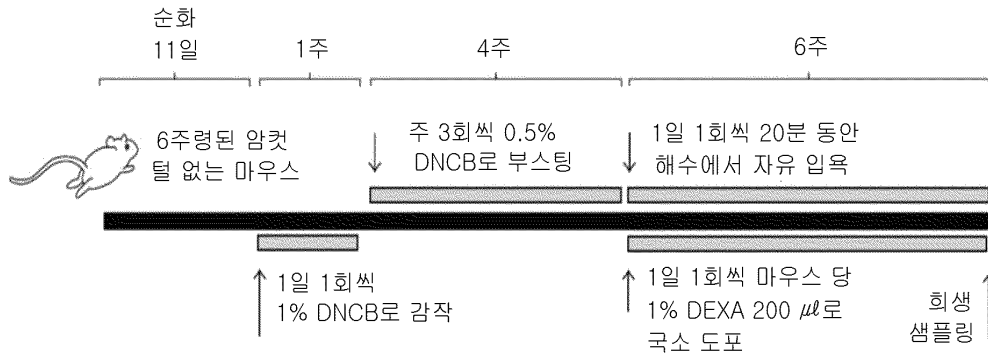
[0184] 일반적으로 정상 피부 세포에서의 MMP 발현은 매우 낮은 것으로 알려져 있으나, 자외선, 성장 인자, 사이토카인 및 발암성 물질 등 다양한 세포 외 자극에 의해 발현이 유도된다. 최근의 연구에 따르면 아토피성 피부염 발생 시에도 다양한 MMP발현, 특히 MMP-8및 MMP-9의 발현 증가가 초래되며, 이들 MMP 발현 억제는 아토피성 피부염의 진행을 억제, 예방 또는 치료할 수 있는 주요 표적으로 제안되고 있다. 위의 실험에서는, DNCB의 국소 도포에 의해 면역 조직화학적으로 진피 내 MMP-9 면역 반응성의 증가와 이와 관련된 진피 내 비정상적인 콜라겐 섬유 축적이 관찰되었으나, ESGW 실험군, WSGW 실험군, ESSW 실험군, 및 WSSW 실험군의 순으로 진피 내 MMP-9 면역 반응성의 증가 및 비정상적인 콜라겐 섬유 축적이 억제된다는 점을 확인하였고, 이는 본 발명의 조성물이 MMP 활성 억제 효과를 통해 피부 경화에 대한 완화 작용을 한다는 점을 보여주는 결과라고 평가된다. 한편 DEXA(양

성) 대조군에서도 현저한 진피 내 MMP-9면역 반응성의 증가 억제 효과가 확인되었으나, 진피 내 콜라겐 축적 억제 효과는 확인되지 않았다.

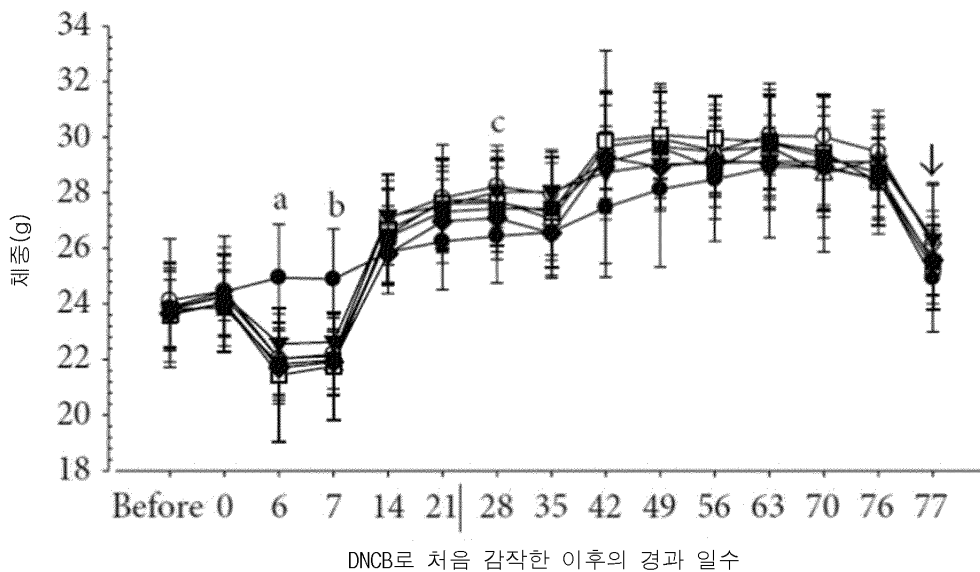
[0186] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

도면1

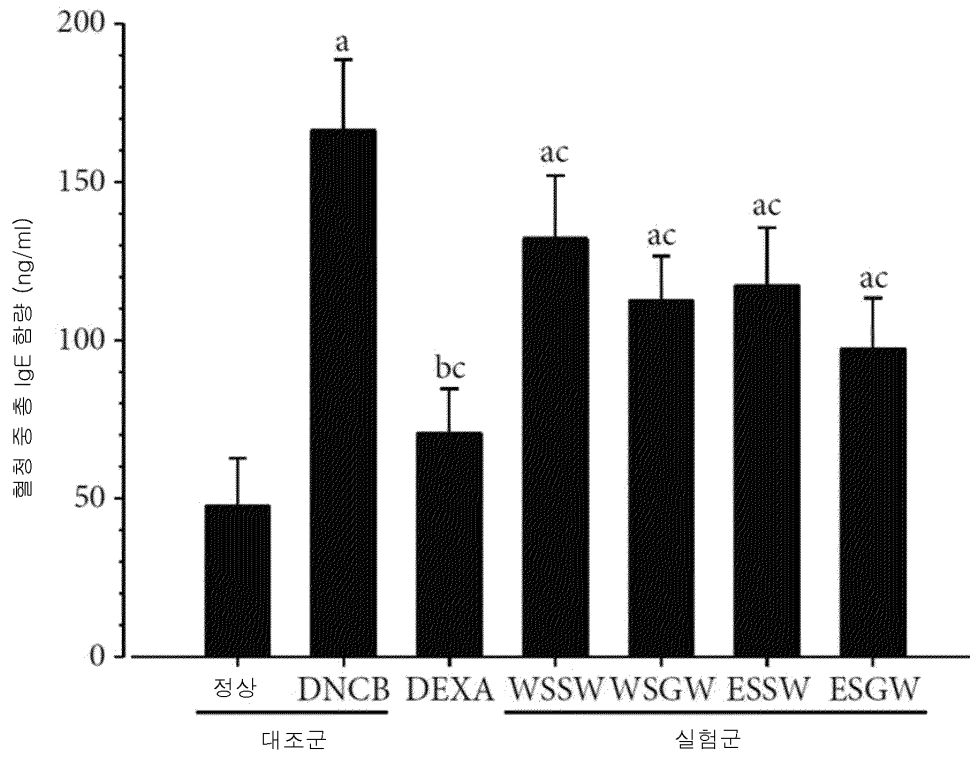


도면2

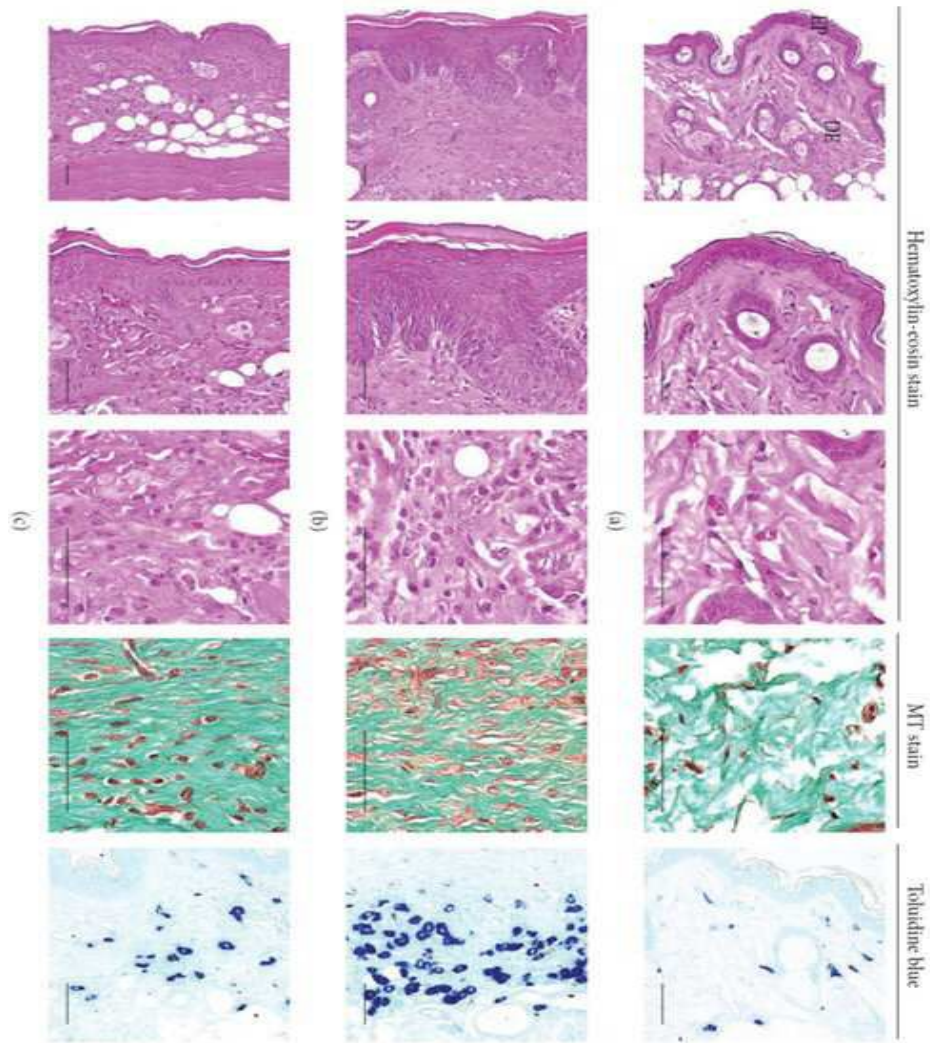


- 정상 대조군 마우스
- DNCB 대조군 마우스
- ▼ DNCB로 아토피 피부염 유발되고, DEXA 도포된 마우스
- △ DNCB로 아토피 피부염 유발되고, 서해 표층수에서 자유 입욕한 마우스
- DNCB로 아토피 피부염 유발되고, 서해 염지하수에서 자유 입욕한 마우스
- DNCB로 아토피 피부염 유발되고, 동해 표층수에서 자유 입욕한 마우스
- ◆ DNCB로 아토피 피부염 유발되고, 동해 염지하수에서 자유 입욕한 마우스

도면3

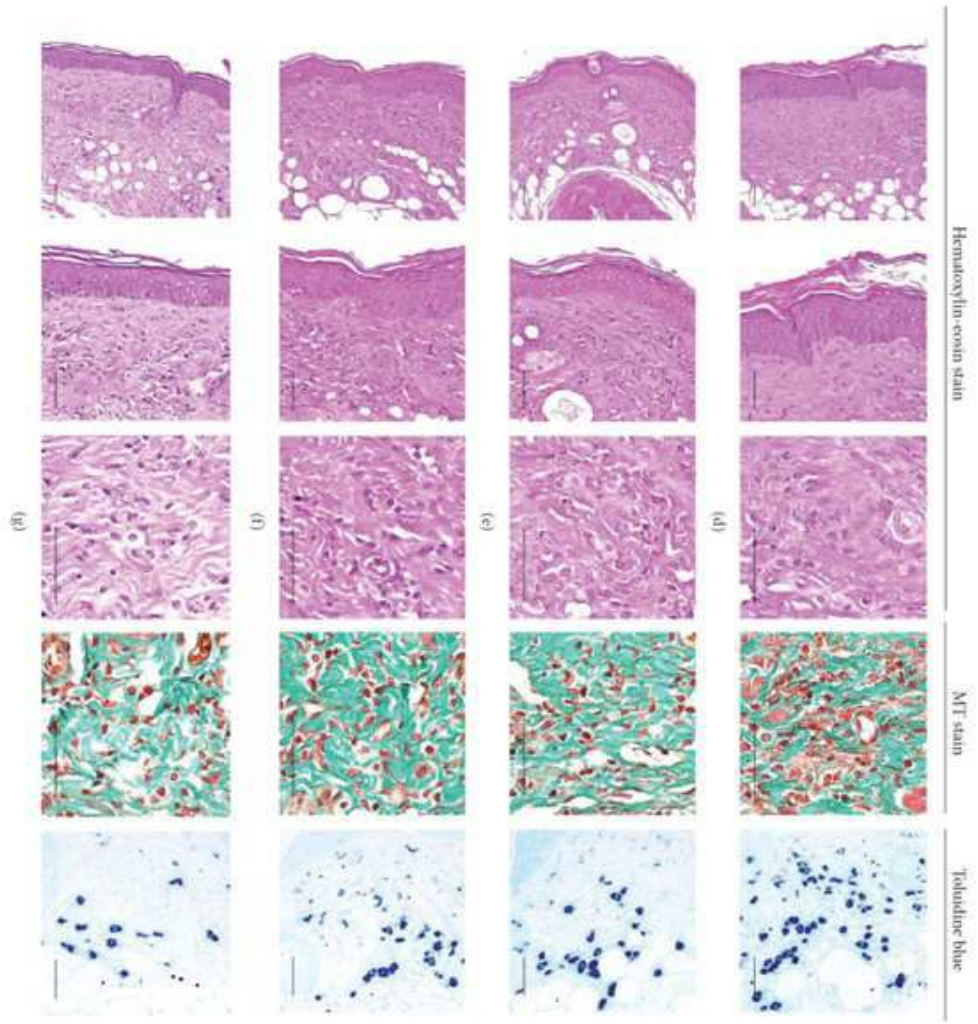


도면4



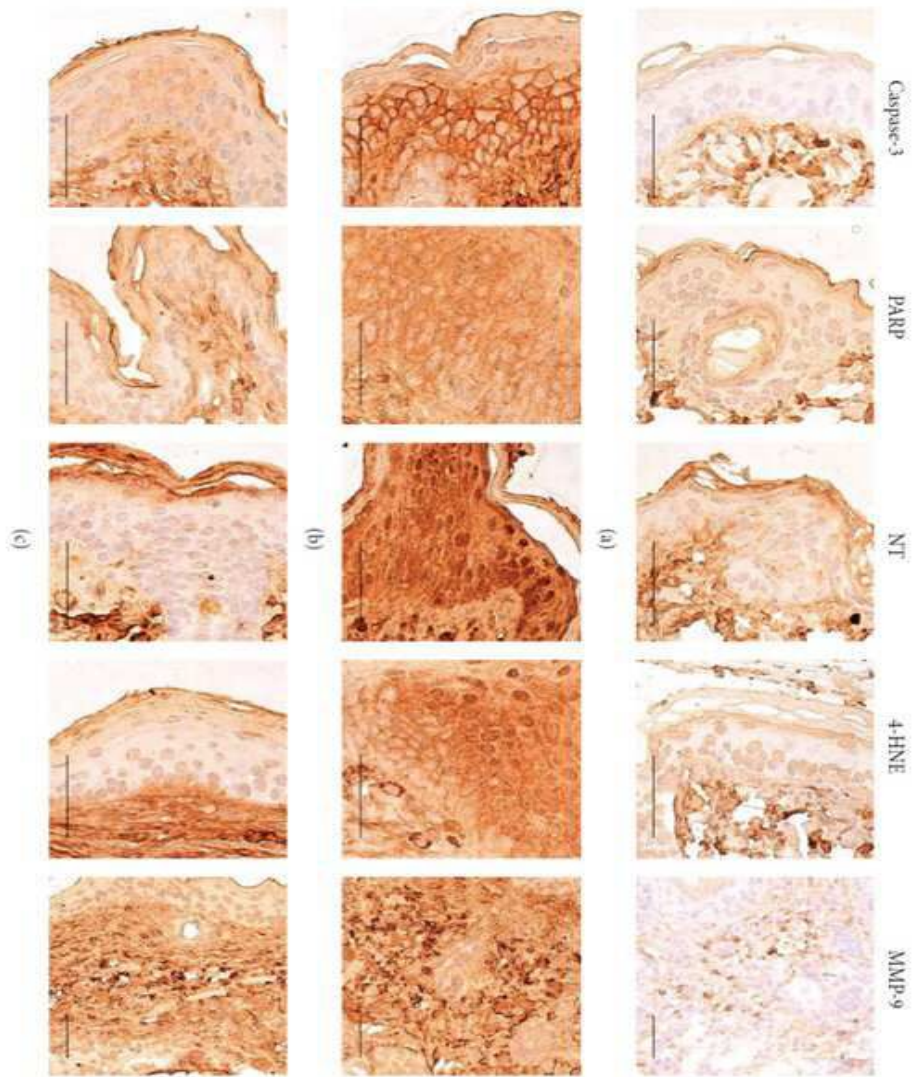


도면5

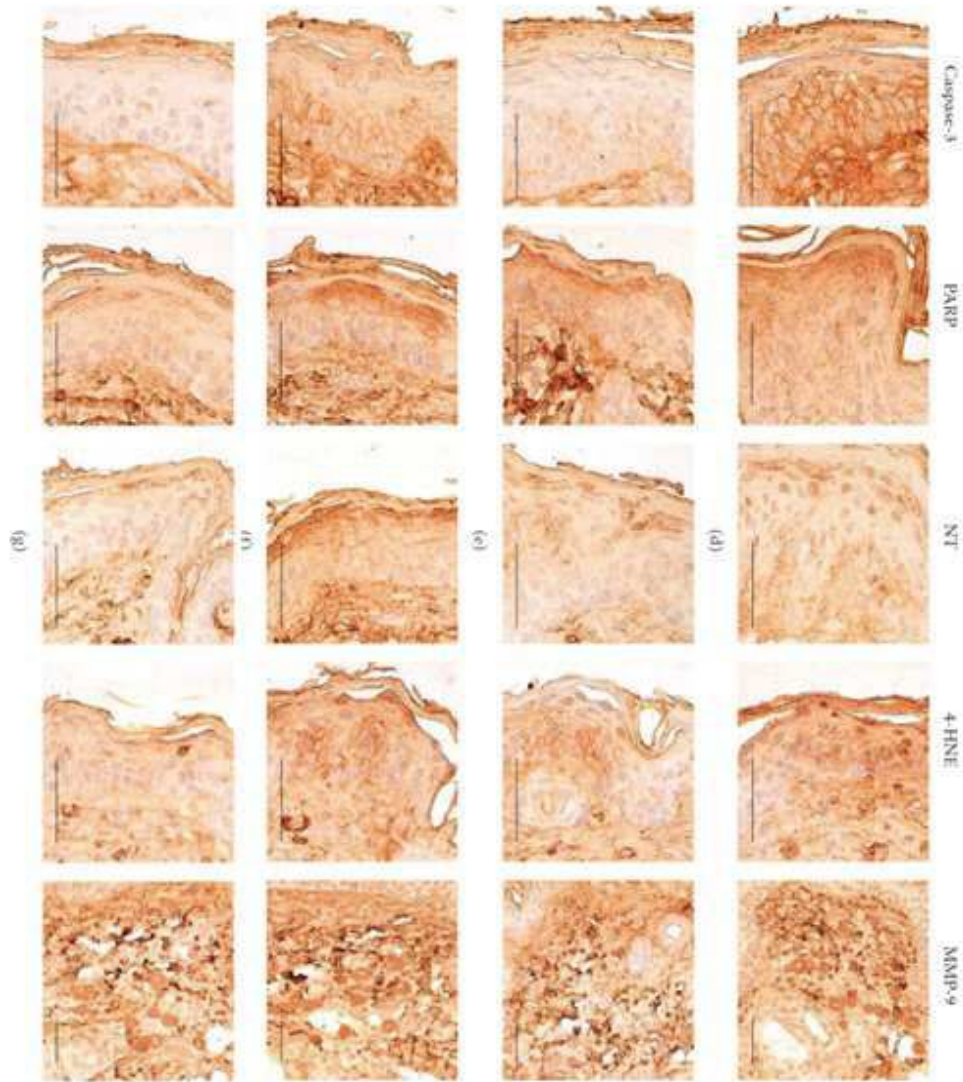




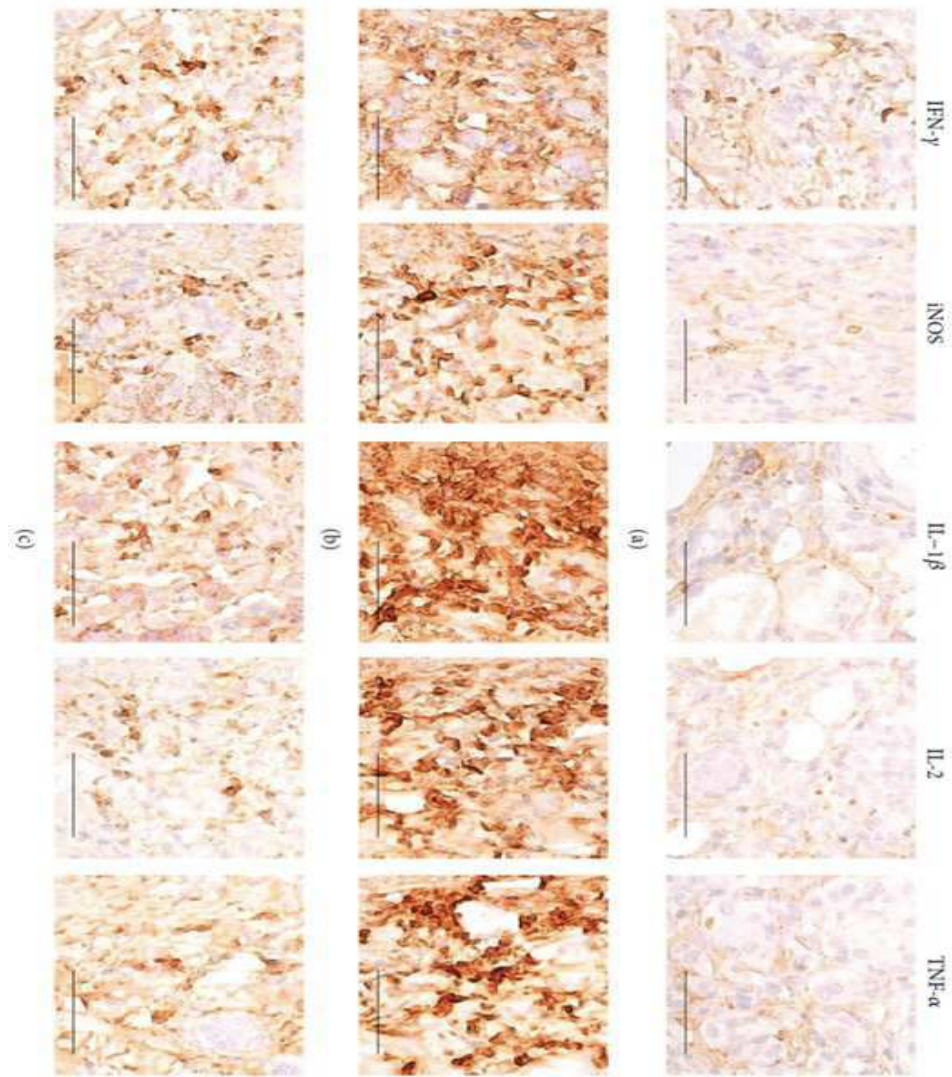
도면6



도면7

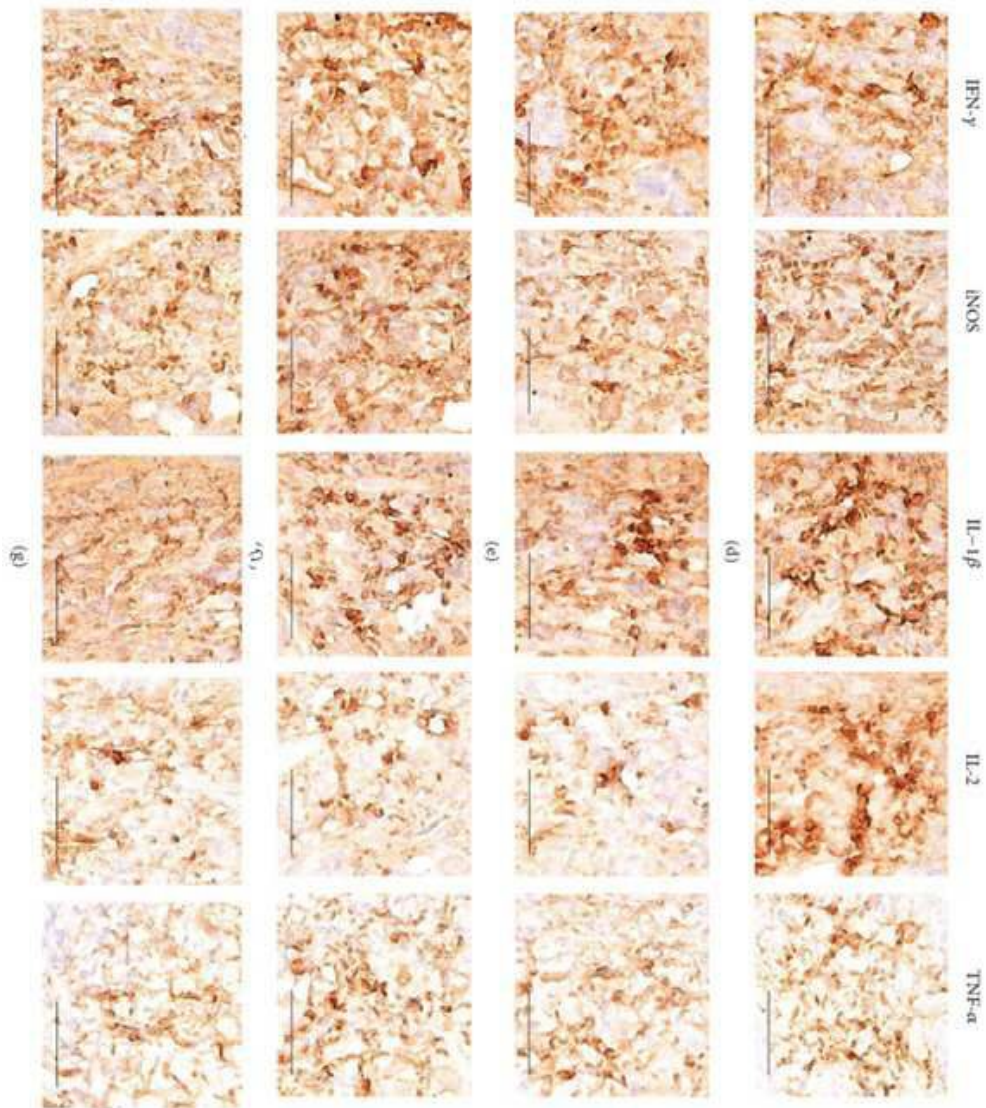


도면8

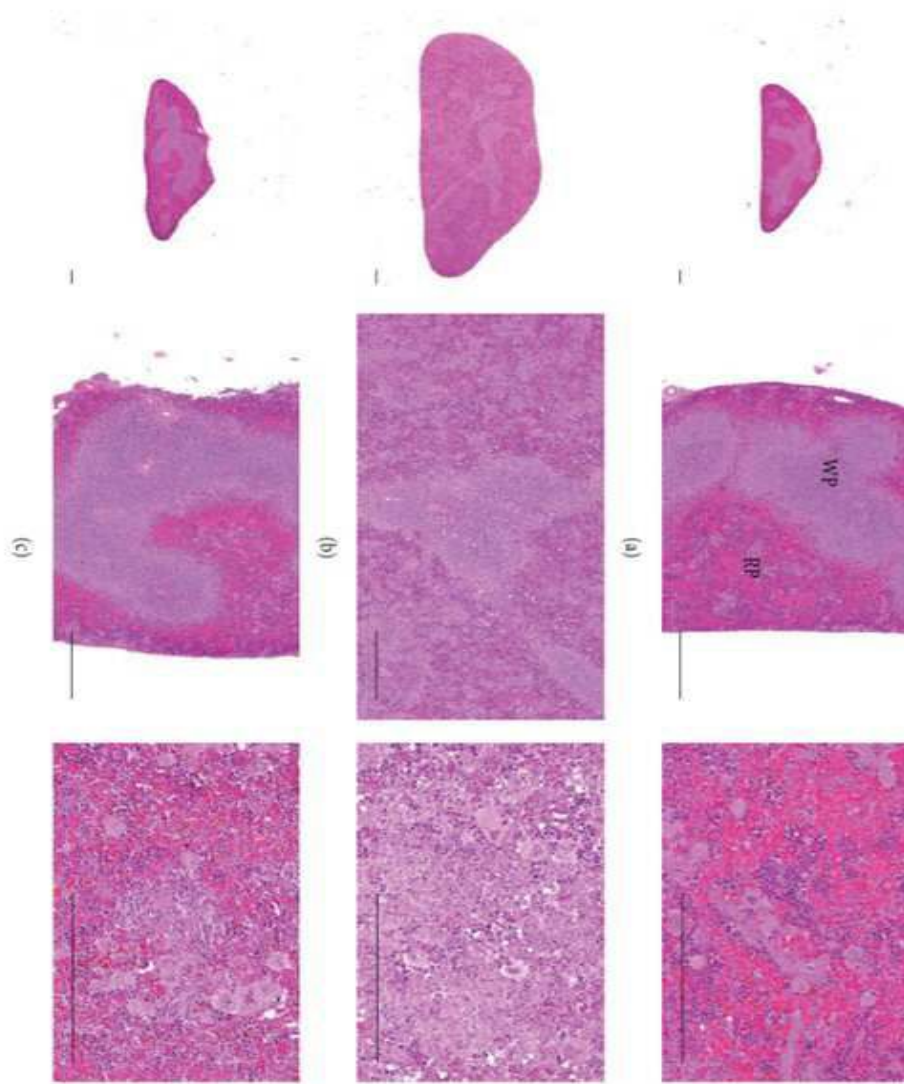




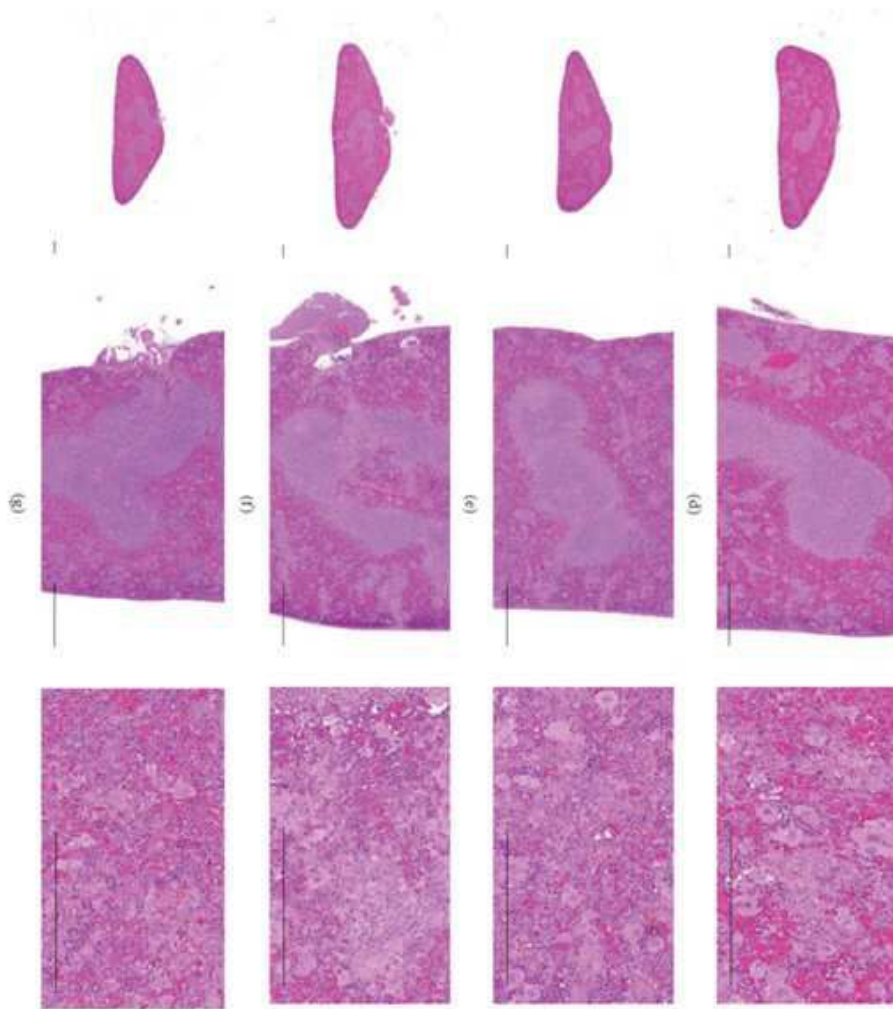
도면9



도면10

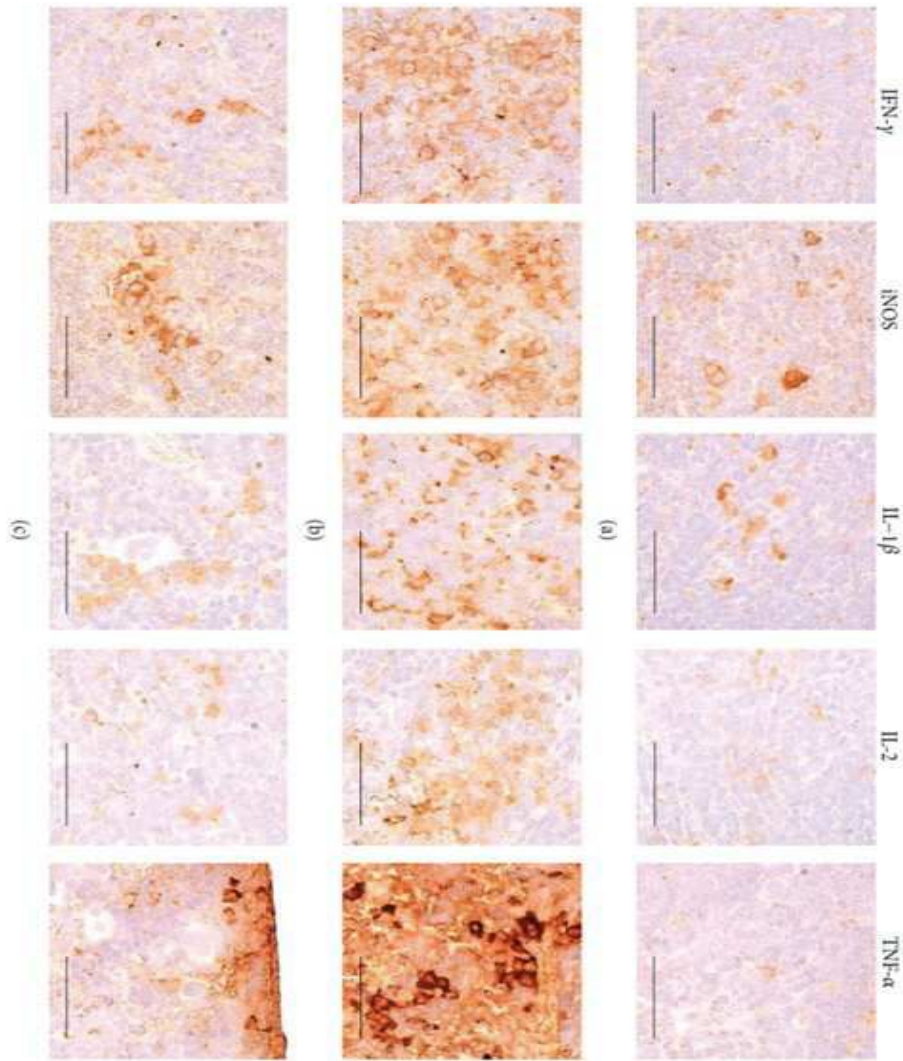


도면11

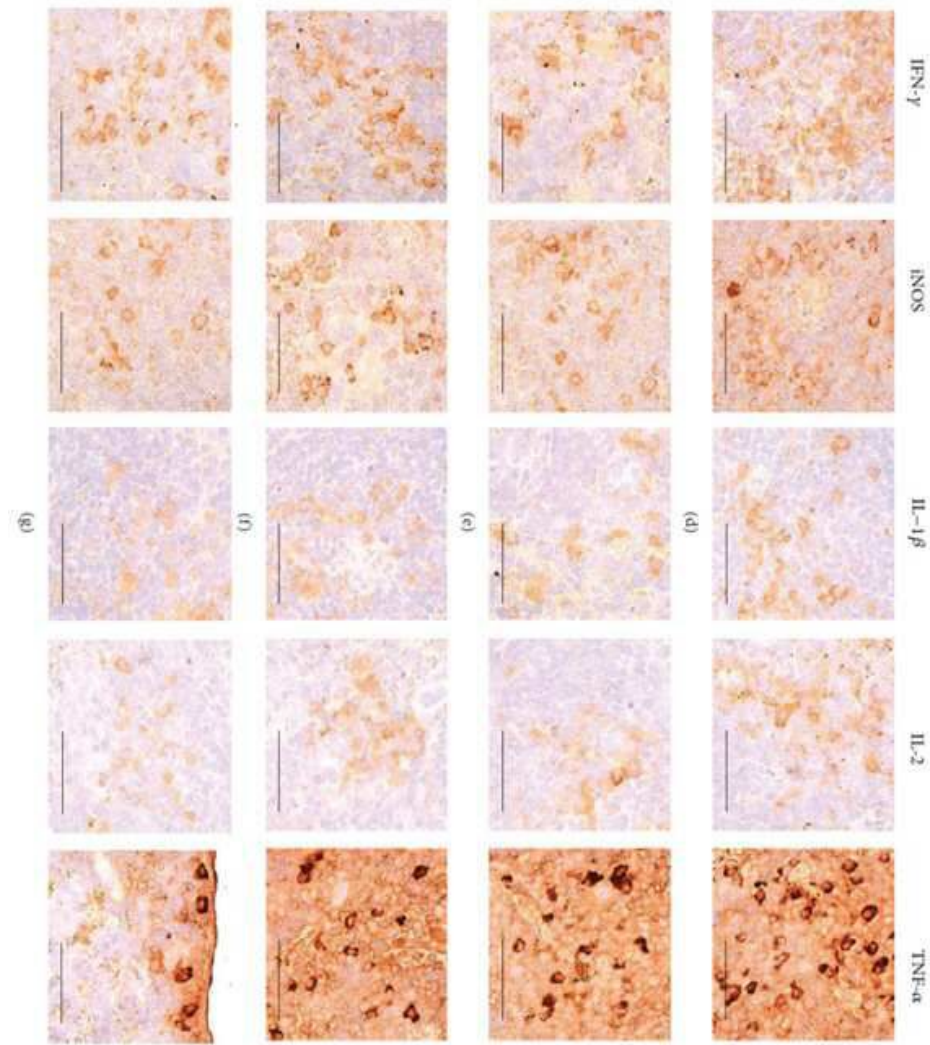




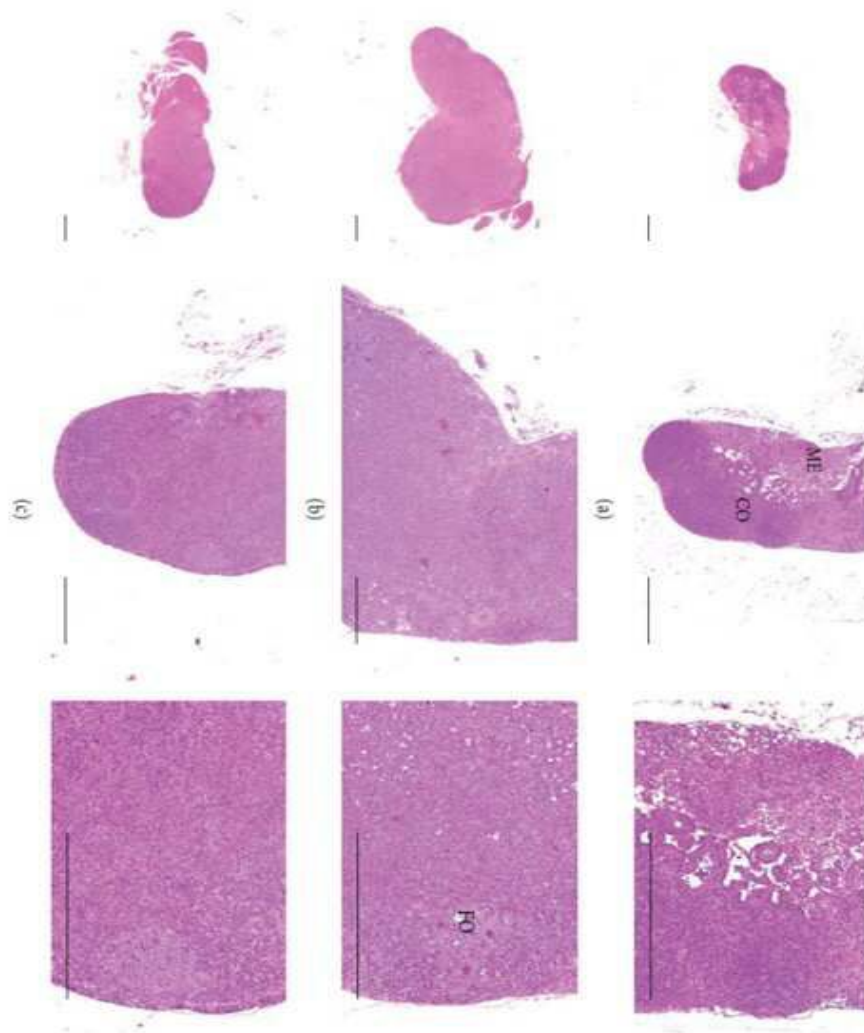
도면12



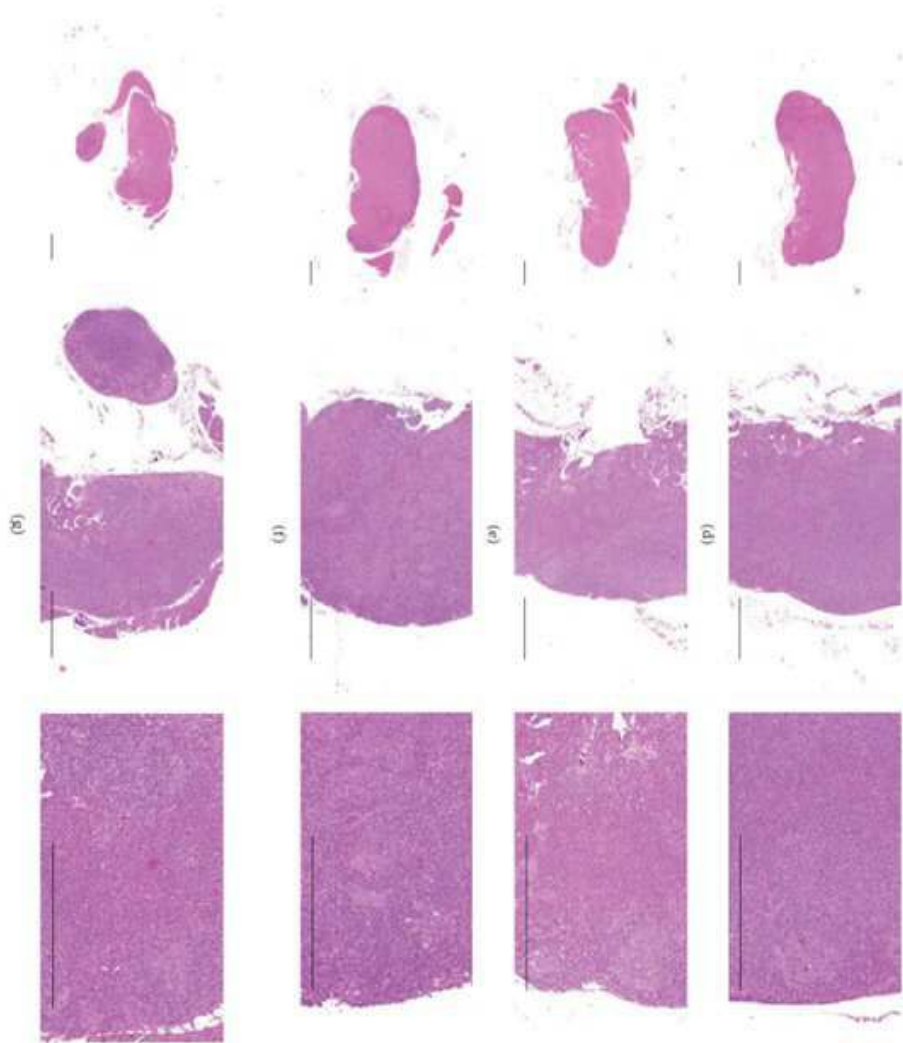
도면13



도면14

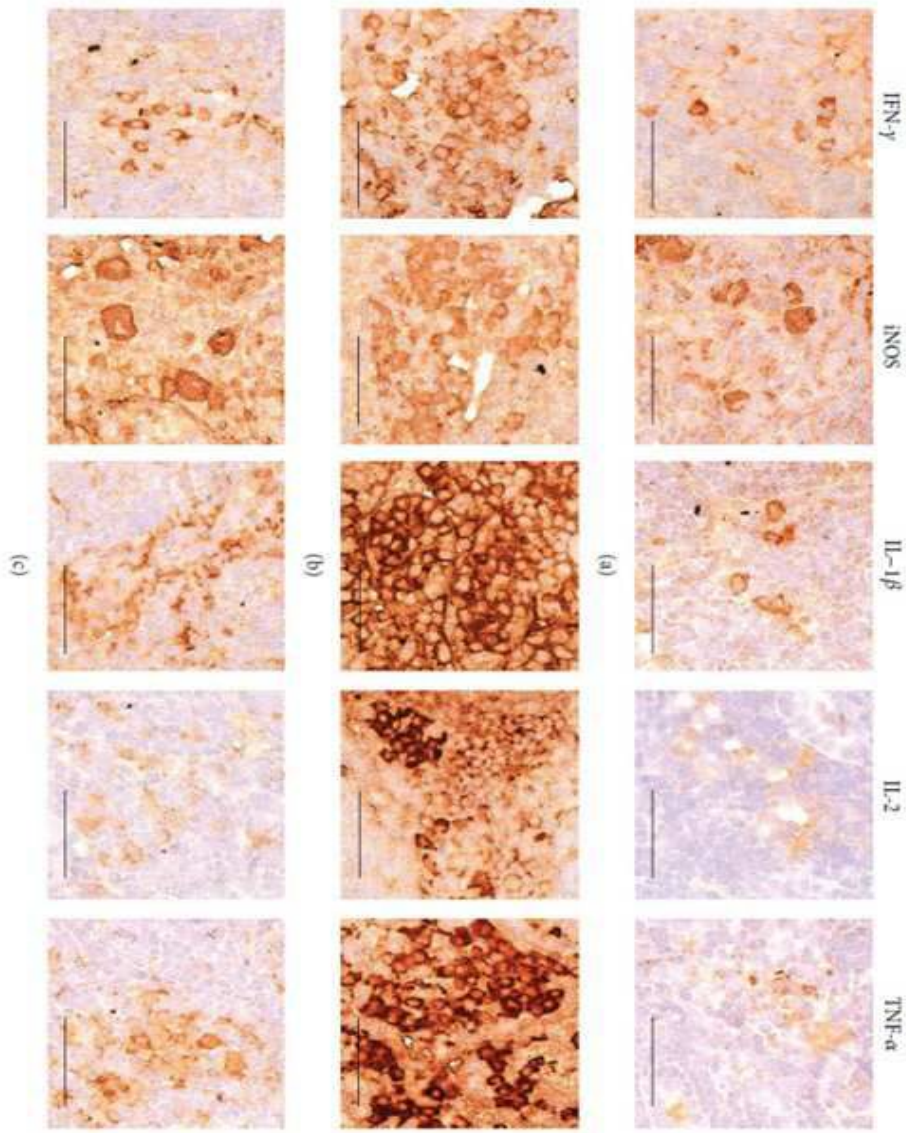


도면15





도면16



도면17

