



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0138308
(43) 공개일자 2012년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/03 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0057676
(22) 출원일자 2011년06월14일
심사청구일자 2011년06월14일

(71) 출원인
강릉원주대학교산학협력단
강원도 강릉시 죽헌길 7(지변동)
(72) 발명자
유상권
강원도 강릉시 성덕로 316-22, 대우이안아파트
107동 1104호 (입암동)
김진철
강원도 춘천시 석사길 10, 번 (석사동)
(74) 대리인
이덕록

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 감태(Ecklonia cava) 유래 마이톨과 fucoidan의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 개선용 화장료 조성물

(57) 요약

본 발명은 갈조류 감태(Ecklonia cava) 유래 마이톨과 fucoidan을 유효성분으로 포함하는 항염증 활성 조성물 및 아토피 피부염 개선용 외용제에 관한 것으로, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 마이톨과 fucoidan을 각각 단독으로 사용하는 것보다 높은 시너지 효과를 나타낸다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

감태(Ecklonia cava)로부터 분리한 마이틀과 fucoidan을 혼합한 항염증 활성 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 마이틀은 감태(Ecklonia cava)로부터 분리한 유래 polyphenol을 유효성분으로 함유 하는 조성물.

청구항 3

감태(Ecklonia cava)로부터 분리한 유래 마이틀 0.3중량%와 fucoidan 0.5~2.0중량%를 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 아토피 피부염 개선용 외용제 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 항염증 활성이 있는 감태(Ecklonia cava)유래 마이틀과 fucoidan의 혼합소재 개발에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 감태 마이틀 유래 마이틀과 fucoidan의 일정비율로 혼합물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 해조류는 통상 바다에서 자생 또는 양식되는 거대조류를 가리키며, 서식하는 수심과 해조류의 색깔에 따라 갈조류, 녹조류, 홍조류 세 종류로 나뉜다. 대부분 국내에서 상업적으로 판매되는 해조류는 주로 양식에 의해 생산되고 있으며, 미역, 다시마, 김등이 대표적으로 국내에서 유통되고 있는 해조류이다. 해조류 중에서 갈조류는 일반적으로 다세포 조류로, 전 세계에 약 250속 1,500종이 알려져 있다. 해조류 중 가장 발달된 체제를 갖고 있으며, 단세포나 군체인 것은 거의 없고 대부분이 사상체 또는 막대기?나뭇가지 모양 등의 형태로 나누어진다. 갈조류의 대표적인 특징은 세포 안에 분화된 세포 기관이 있으며, 동화 색소로 엽록소 a와 엽록소 c 외에 갈조소를 가진다. 또한, 동화 저장 물질은 탄수화물의 일종인 만니톨, 라미나린 등이며, 유주세포는 옆쪽에 길고 짧은 2개의 편모를 갖는다. 갈조류 중 감태는 수심 약 10m 정도인 점심대에서 자라며, 길이 1?2 m 까지 성장한다. 줄기는 원기둥 모양이고 밑동은 뿌리 모양이며, 줄기 끝에는 결실조각을 가진 납작한 1개의 가운뎃잎이 달린다. 이 잎은 길이 1 m 정도이고 갈색이지만 말리면 검은빛이 되고, 두꺼우며 혁질이고 양쪽에 깃털의 작은잎이 달린다. 감태는 해중립을 구성하는 중요한 조류식물이며, 주로 전복과 소라 등의 먹이가 된다. 미역, 다시마와 같은 갈조류와 같이 알긴산이나 요오드, 칼륨을 만드는 주요 원료가 되고, 채취하여 식용으로 이용이 가능하나 거의 섭취하지 않는다. 우리나라에서는 남해안과 제주도 등지에 주로 분포한다. 최근에는 감태에 다량 함유되어 있는 폴리페놀계통의 성분인 "마이틀"이 의약품 및 건강기능식품의 원료로 사용되고 있다.

[0003] 항염증 (anti-inflammatory) 물질은 부종, 홍반, 동통, 발열등의 염증 증상을 억제하고, 염증에 의한 조직 손상을 경감시킬 목적으로 쓰이는 물질이다. 염증은 생체방어를 위한 정상적인 면역반응이다. 세포 손상에 의해서 histamine, serotonin, kinin, prostagladins, leukotrienes 등의 염증 유발 물질이 유리되면서 발열, 통증이 유발된다. 그리고 이후 세동맥 확장과 모세혈관 투과성 항진에 의한 발적, 부종 등이 일어난다. 아토피 피부염증은 민감성 피부 및 건조성 피부의 대표적인 질환으로 비정상적인 염증 유발 물질의 분비와 생체방어 기작인 면역체계의 비이상적인 작동의 결과이다. 아토피 피부염에는 스테로이드가 함유된 연고는 사용하지 말아야 하며, 염증 물질 분비 억제 효과가 있는 천연물 유래 물질을 이용한 치료법이 최근 관심을 받고 있다. 감태 유래 폴리페놀인 마이틀은 항산화 활성이 우수할 뿐만 아니라, 염증 억제활성도 상당히 우수한 천연화합물로 보고된다. 현재까지 연구된 감태 유래 특허를 살펴보면, 대한민국 등록특허 제 2002-0015816의 '감태 추출물을 함

유하는 미백화장료'에서는 감태를 용매 추출 후 수득된 추출물을 이용하여 티로시나아제 저해 효과가 탁월한 미백 화장료 조성물로 개시하였으며, 대한민국 등록특허 제 2001-0098018의 '감태로부터 분리된 신규 물질, 이의 추출 및 정제방법 및 항산화제로 사용하는 용도'에서는 감태로부터 신규 물질을 추출, 정제 후 신규 물질을 항산화제로 사용하기 위한 용도에 관한 것으로, 신규물질의 추출 및 정제 방법; 추출된 물질을 용매 분획하는 단계; 및 용매 분획물을 크로마토그래피법으로 정제하는 단계를 개시하였다. 또한 이 발명에 따라 감태로부터 추출된 물질은 항산화 활성이 높고, 열안정성이 우수하여 천연 항산화제로서 유용하게 응용할 수 있음을 개시하였다. 또한 최근에는 감태 마이톨로부터 비극성 용매인 헥산을 이용하여 마이톨에 포함된 복합 물질 중 가장 극성이 낮은 물질만을 분획하였다. 이 물질을 "마이톨"이라 명명하였으며, 마이톨도 또한 항산화 및 항염증 활성이 우수한 것으로 조사되었는데, 현재까지 감태 마이톨 유래 마이톨과 푸코이단을 혼합한 혼합소재의 항염증에 대한 연구는 수행된 바 없다.

[0004] 이에 본 발명자들은 우리나라에 많이 자생하나 거의 식용하지 않는 감태를 산업적으로 이용하기 위하여 본 발명을 수행하였다. 특히 감태의 폴리페놀중 비극성물질을 추출 하고, 폴리페놀을 추출 하고 남은 부산물을 산업적으로 이용하기 위해 예의 연구를 거듭한 결과, 감태 마이톨 유래 마이톨과 fucoidan을 혼합할 경우 감태 마이톨과 fucoidan을 단독으로 사용하였을 때 보다 높은 항염증 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 감태 마이톨과 fucoidan을 적정 비율로 혼합한 혼합소재를 이용하여 항염증 및 아토피 개선용 크림의 사용가능성을 밝혀내어 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서 본 발명의 목적은 감태 마이톨 유래 마이톨과 fucoidan을 혼합한 소재의 신규한 용도를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 혼합소재를 함유한 항염증활성을 갖는 아토피 개선용 topical 화장료 조성물 및 외용제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 상기 목적은 감태 (*Ecklonia cava*)로부터 마이톨 유래 마이톨을 추출한 후, 남은 잔사로부터 fucoidan을 추출하여 이들을 혼합한 혼합소재를 제조하고, 상기 제조된 혼합소재와 상기 마이톨 및 fucoidan을 단독 사용하였을 때의 in vitro 및 in vivo 에서 항염증 활성 및 아토피 개선효과를 확인함으로써 달성되었다.

[0008] 본 발명에 따른 방법은 감태 유래의 마이톨과 fucoidan을 혼합하는 단계; 및 상기 제조된 혼합소재를 항염증 활성 및 아토피 개선용으로 피부외용제로 적용하고 평가하는 단계로 이루어진다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 감태 유래의 마이톨과 fucoidan의 혼합소재는 감태 마이톨 또는 fucoidan의 단독 사용 하였을 때보다 항염증 활성과 아토피 개선효과가 매우 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 Effect of cavanol, mitol and mitol+fucoidan treatment on the viability of Raw 264.7 cells.

도 2는 Effect of cavanol, mitol and mitol+fucoidan treatment on NO production from LPS induced Raw 264.7 cells.

도 3은 Suppression effect of cavanol, mitol and mitol+fucoidan treatment on inflammation-associated gene expression in Raw 264.7 cells.

도 4는 Macroscopic skin appearance 관찰결과이다.

도 5는 Microscopic skin appearance 관찰결과를 보인 것이다.

도 6은 Skin thickness 측정결과이다.

도 7은 Spleen index 측정결과이다.

도 8은 혈청 IgE 농도 측정결과이다.

도 9는 Interleukin-4 농도 측정결과이다.

도 10은 Interferon- γ 농도 측정결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은 감태 마이톨과 fucoidan을 혼합한 혼합소재를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 개선용 화장료 조성물을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 fucoidan이라 함은 다당류로 감태를 물과 에틸알콜을 이용하여 수득한 함황다당류를 의미하나, 이에 제한되는 것은 아니며, 이미 알려진 다른 다당류일 수도 있다.

[0012] 본 발명에서는 감태에서 항산화, 항암 활성을 갖는 함황다당류인 fucoidan을 추출하였다. 우선 감태를 건조하고, 건조된 시료를 80% 에틸알콜로 상온에서 12시간 동안 교반 추출을 수행하고, 원심분리하여 펠렛을 수득한다. 수득된 펠렛을 80% 에틸알콜을 이용하여 상온에서 12시간동안 교반 추출 후, 원심분리하여 펠렛을 수득한다. 수득된 펠렛은 아세톤을 이용하여 색소, 지질 및 저분자 단백질을 제거 후, 상온에서 건조하여 건조된 감태 분말을 획득한다.

[0013] 상기에서 수득한 감태 분말에 증류수를 첨가하여 60°C에서 2시간 교반 추출 후, 원심분리를 이용하여 상등액을 수득한다. 펠렛은 다시 증류수를 첨가하여 60°C에서 2시간 교반 추출 후, 원심분리를 이용하여 상등액을 수득한다. 상기의 2회에서 수득된 상등액에 1% 농도의 CaCl₂를 첨가하여 4°C에서 18시간 보관 후, 원심분리를 이용하여 상등액만 수득한다. 수득된 상등액은 감압 농축기를 이용하여 농축 후, 에틸알콜을 첨가하여 fucoidan을 침전 시켰고, filtration을 이용하여 fucoidan을 획득 하였다.

[0014]

[0015] 또, 마이톨(mitol)의 추출 분리공정은 감태(*Ecklonia cava*)를 먼저 증류수로 세척하여 이물질을 제거하고 음지에서 건조한 후, 이를 파쇄한 다음 상기 감태

[0016] 분말 500g을 중량 대비 20배량의 10% 에틸알콜을 사용하여 2시간 동안 환류 추출하였다. 이러한 추출과정을 2회 반복하였다. 그 다음, 잔사를 걸러내어 제거하고 회전 증발농축기를 사용하여 에틸알콜 추출액을 감압 농축하였다. 농축액을 20배량의 증류수에 현탁시키고, 동일량의 에틸아세테이트 용매를 사용하여, 3회 추출하여 에틸아세테이트 분획을 모은 후 감압 농축하였다. 에틸아세테이트 분획 농축액을 15배량의 실리카겔에 로딩한 후 에틸아세테이트와아세톤을 부피비 9:1로 혼합한 용매를 사용하여 활성성분이 녹아있는 분획들을 모아 농축하여 해조류 추출물을 얻었다. 폴린 시약을 사용하여 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과 95.6%로 나타났다.

[0017] 상기 획득된 fucoidan을 마이톨과 혼합하여 in vitro 및 in vivo 항염증 활성을 측정 하는데 사용하였다. 이와 같이 항염증 활성을 관찰한 결과 감태 마이톨과 fucoidan을 혼합한 혼합소재는 감태 마이톨과 fucoidan을 각각 단독으로 사용하였을 때보다 항염증 활성이 우수한 것으로 나타났다.

[0018] 이하 본 발명의 바람직한 실시 형태를 실시예를 참고로 하여 보다 상세하게 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0019] <실험예 1> 감태 마이톨과 푸코이단의 혼합소재가 항염증에 미치는 영향에 대한 in vitro 활성 조사

[0020] 마이톨과 푸코이단 혼합 소재의 Macrophage proliferation에 미치는 영향

[0021] 본 실험에서는 마이톨, 푸코이단, 마이톨과 푸코이단이 함유된 제품(cavanol)과 상업용 아토피 크림

(아토팜)의 항염증 효과에 미치는 조사를 macrophage cell의 증식능과 분비되는 염증 유발 물질인 nitrate의 분비억제 효과와 nitrate의 생성과 관련된 유전자인 iNOS mRNA의 발현으로 조사하였다. 혼합시료의 제조는 마이톨 0.3중량%를 기준으로 푸코이단 0.5중량% 와 2.0중량%를 혼합하였다.

[0022] 도 1은 cavanol, 아토팜, 마이톨, 마이톨+푸코이단 혼합소제가 Raw cell의 증식에 미치는 영향을 보여 준다. 도 1에서 볼 수 있듯이, 무첨가군과 비교했을 때, cavanol, 아토팜, 마이톨, 마이톨+푸코이단 혼합소제가 Raw cell의 증식에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그리하여, cavanol, 아토팜, 마이톨, 마이톨+푸코이단 혼합소제는 Raw cell에 대한 독성을 나타내지 않는 것으로 사료된다.

[0023] 마이톨과 푸코이단 혼합 소제가 Raw cell에서 분비되는 NO 억제효과

[0024] 본 실험에서는 Raw cell에서 분비되는 염증 유발 물질인 nitro oxide가 cavanol, 아토팜, 마이톨, 마이톨+푸코이단 혼합소제에 의해 억제되는 효과를 조사하였다. 도 2에서 보여지듯이, LPS 처리된 Raw cell로부터 생성되는 NO억제 효과는 모든 시료에서 농도에 의존하여 억제되는 것을 볼 수 있었다. 시료 중에서 상업용 아토팜 피 크림인 아토팜의 억제 효과가 가장 낮은 것으로 나타났고, Cavanol과 마이톨의 억제 효과는 유사한 것으로 나타났다. 반면, 푸코이단이 첨가된 혼합시료는 낮은 농도 (25 - 50 ug/mL)에서는 매우 우수한 효과를 나타내는 것으로 보였지만, 100ug/mL의 농도에서는 cavanol & 마이톨과 유사한 억제 효과를 보여주었다.

[0025] 마이톨과 푸코이단 혼합 소제가 Raw cell에서 분비되는 NO 억제효과

[0026] 본 실험에서는 Raw cell에서 분비되는 염증 유발 물질인 nitro oxide와 다른 염증유발 사이토카인들의 분비가 mRNA 유전자 발현과 관련이 있는지를 조사하였다. 도 3에서는 LPS 처리된 Raw cell로부터 발현되는 mRNA 유전자를 PCR로 증폭하여, gel-electrophoresis로 유전자를 처리한 것이다. 도 3에서 나타나듯이 LPS 처리된 대조군보다, cavanol, 아토팜, 마이톨, 마이톨+푸코이단 혼합소제가 iNOS 뿐만 아니라, 다른 사이토카인 분비를 일으키는 mRNA의 생성에 상당한 억제가 일어나는 것을 볼 수 있었다. 따라서, cavanol, 아토팜, 마이톨, 마이톨+푸코이단 혼합소제의 염증 억제 효과는 염증 유발 유전자의 발현 억제에 의한 결과라는 것을 추론할 수 있었다.

[0027] **<실험예 2> 항염증 활성 및 아토피 피부염 개선효과에 대한 in vivo 조사**

[0028] Fucoidan 함유 향 아토피 화장품 조성물 제조 및 시료 준비

[0029] 본 발명 실험에서 사용한 유사 아토피 유발 시약인 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene(DNCB)을 1%, 0.5%가 되도록 acetone에 용해시켜 제조하였다. Fucoidan과 마이톨을 함유한 본 발명 화장품 조성물인 로션(lotion)의 제조방법은 다음과 같다. 먼저 수상인 보습제인 glycerin과 water 그리고 점증제로서 xanthan gum (2% solution)을 혼합하여 75 ~ 80℃에서 용해하였다. 다음 오일상인 cetyl alcohol 지방산과 oil류인 squalane, meadowform seed oil을 혼합하여 75 ~ 80℃에서 용해하였다. 수상을 homogenizer로 5,000 rpm으로 교반하면서 오일상을 서서히 가하고 7분간 유회를 시켰다. 그 후 냉각을 시켜 유효성분이 없는 base lotion을 제조하였다. 이 base lotion에 마이톨 0.3%, 마이톨 0.3%와 Fucoidan 0.5%, 마이톨 0.3%와 Fucoidan 2%의 천연 화합물을 각각 넣어준 후 homomixer로 3,000 rpm으로 30분간 균질화 작업을 하여 본 발명 화장품 조성물 시료를 준비하였다. 또한 대조군으로 현재 시중에 판매되고 있는 (주) 네오팜의 Atopalm, (주) 보타메디의 Cavanol 향 아토피 로션을 사용하였다. 마지막으로 인산완충용액 (phosphate buffer saline, PBS)은 pH 7.4로 사용하였다.

[0030] In vivo 실험동물 준비

[0031] 본 실험에서는 (주) 오리엔트 바이오 (Sungnam, Korea)에서 공급받은 6주령 된 수컷 hairless mice (26 ± 2 g)를 실험동물로 사용했다. 공급받은 실험동물을 실험동물 사육장에서 1주일동안 적응기간을 갖게 한 후 실험을 진행하였다. 실험기간 중 사료와 물은 부족하지 않게 공급하여 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 실험동물 사육장의 온도는 23 ± 2℃, 상대습도는 55 ± 5%, 명암은 12시간 주기를 유지하였다. 실험이 총 9개 군으로 진행되므로 9개의 cage 안에 각각 4마리씩 사육하였으며, 실험을 시작하기 하루 전에 hairless mice의 꼬리 부분에 표식을 하여 개체를 구별할 수 있도록 하였다.

[0032] 아토피 피부염 유발 및 시료처리

[0033] 실험동물을 각각 4마리씩 9군으로 나누어 실험을 진행했다. 아무것도 처리하지 않은 정상군 4마리(Group.1), DNCB만을 도포한 대조군 4마리(Group.2), DNCB를 도포하며 인산완충용액(pH 7.4)을 처리한 실험군 4마리(Group.3), DNCB를 도포하며 bass lotion을 처리한 실험군 4마리(Group.4), DNCB를 도포하며 마이톨 0.3중량%를 함유한 로션을 처리한 실험군 4마리(Group.5), DNCB를 도포하며 마이톨 0.3중량%와 Fucoidan 0.5중량%를 함유한 로션을 처리한 실험군 4마리(Group.6), DNCB를 도포하며 마이톨 0.3중량%와 Fucoidan 2중량%를 함유한 로션을 처리한 실험군 4마리(Group.7), DNCB를 도포하며 Cavanol(마이톨 0.3중량%함유)을 처리한 실험군 4마리(Group.8), DNCB를 도포하며 Atopalm을 함유한 로션을 처리한 실험군 4마리(Group.9)로, 총 36마리의 hairless mice로 실험을 진행하였다. 먼저 hairless mice를 사육장 환경에 일주일동안 적응을 시킨 후, Group.1을 제외한 각 군의 개체에 1%의 DNCB 100 μL를 매일 같은 시간에 실험동물의 등에 골고루 도포해주었다. 이와 같은 방법으로 7일 동안 아토피를 유발시킨 후, 실험시작 2주째부터는 0.5% DNCB 100 μL를 이틀 간격으로 실험동물의 등에 도포해 주면서, 각 군에 해당하는 시료는 매일같이 같은 시간에 100 μL를 골고루 처리해주었다. DNCB를 처리하는 날과 시료를 처리하는 날이 겹치는 날에는 먼저 0.5%의 DNCB를 처리한 후, 7시간 후에 각 시료를 처리해 주었다. 실험은 총 6주 동안 진행되었다.

[0034] 아토피 피부염 증상 관찰 및 피부 두께 측정

[0035] (1) Dorsal skin 외형적 변화 관찰

[0036] 실험 시작일 부터 아토피 피부염이 유발된 hairless mice의 dorsal skin의 변화를 관찰하였다. 적응기간이 끝난 실험동물의 등 쪽 피부에 1% DNCB를 일주일 동안 매일같이 도포해주었을 때, 정상군인 Group.1을 제외한 나머지 Group에서는 DNCB를 도포한 부위가 매우 건조해지면서 아토피 증상과 유사한 홍반, 인설, 가피, 태선화 등의 외형적 변화가 일어났고, 실험동물들이 DNCB가 도포된 부위를 긁는 모습이 관찰되었다. 그리고 육안으로 보기에 피부두께가 정상 피부에 비해 점차 두꺼워졌음이 느껴졌다. 실험기간동안 이러한 피부변화를 좀더 정밀하게 측정해보기 위해 실험기간 동안 새로운 주(week)가 시작되기 전 날, 각 Group의 개체마다 digital camera (SINY DSLR-A203)와 skin diagnosis system (Aramo TS, Aram HUVIS Co., Ltd. Sungam. Korea)으로 외형의 변화를 관찰한 후 기록을 하였고, digimatic indicator (No.99MAH007B, Series No.543)를 이용하여 피부 두께의 변화를 관찰하였다.

[0037] (가) Macroscopic skin appearance 관찰

[0038] 실험 기간 동안 아토피 피부염이 유발된 실험동물의 외형변화를 digital camera (SINY DSLR-A203)로 관찰하였다 (도 4). 정상군인 Group.1은 1주차부터 6주차까지 크게 차이가 없었다. 반면, Group.2부터 Group.9의 모든 개체들은 1주차동안 도포된 DNCB의 영향으로 피부가 붉어지며 하얗게 인설이 일어나고, 피부의 두께가 두꺼워지고 거칠어지는 등 아토피와 유사한 증상들이 뚜렷하게 나타났다. 그 후 각 시료들을 실험 종료일인 6주차까지 매일 100 μL 처리하자 DNCB만을 도포하여 아토피 증상이 계속 유지된 Group.2를 제외한 나머지 군에서는 아토피 증상이 개선되었으나, 그 정도의 차이는 약간씩 나타났다. 인산완충용액(PBS, pH7.4)을 처리한 Group.3에서는 6주차로 갈수록 가피가 없어진 듯 보였으나, 약간의 인설과 홍반은 여전히 남아있음을 관찰할 수 있었다. 마이톨과 Fucoidan이 함유된 시료와 상용화되고 있는 Cavanol, Atopalm을 처리한 실험군에서는 모두 아토피 피부염 증상이 개선에 효과가 있었다. 특히 3주차 때부터는 뚜렷한 효과를 나타내기 시작했다. 실험종료일인 6주차 때는 약간의 인설과 건조증이 남아있기는 하였지만 그 정도가 아토피가 유발된 처음 상태에 비해 매우 미미할 정도로 아토피 피부증상이 눈에 띄게 개선되어 정상적인 hairless mouse의 피부와 비슷한 상태로 돌아왔다. 그 중에서도 Cavanol, Atopalm을 처리한 Group.8과 Group.9에서는 눈에 띄게 피부가 정상화 되는 것을 관찰할 수 있었다. bass lotion을 처리한 Group.4 또한 아토피 증상의 개선효과가 있었는데 이는 건조해진 피부에 수분을 많이 포함하고 있는 로션을 처리함으로써 부족한 수분을 보충하고 피부에 안정을 주었기 때문이라 생각된다. 하지만 Group.5부터 Group.9까지의 항 아토피 효능이 있는 lotion을 처리한 실험군보다는 개선 효과가 적고 개선 속도 또한 느렸다. 시료를 처리한 군들에서는 1주차에서 6주차로 갈수록 전체적으로 아토피 피부염 증상은 개선되었음은 확인할 수 있었으나 그 차이를 정확하게 측정할 수는 없었다.

[0039] (나) Microscopic skin appearance 관찰

[0040] 아토피 피부염이 유발된 부위의 피부를 diagnosis system을 이용해 60배로 확대하여 관찰했다 (도 5). 정상군의 피부는 도 2에 보이는 것과 같이 매 측정 때마다 큰 차이가 없었다. 이 정상군의 피부와 다른 실험군의 피부를 비교해봄으로 각 Group 개체들의 시료처리 부위에 얼마나 많은 각질과 인설, 태선화와 같은 다양한 증상이 나타났는지를 비교해 볼 수 있었다. 대조군인 Group.2는 1주차에서 6주차로 갈수록 아토피 피부 개선의 효과 없이 아토피 피부염 증상이 유지되었다. 나머지 군에서는 2주차가 되자 피부를 덮고 있던 가피가 많이 제거되었으며, 시간이 흐를수록 아토피 증상이 완화되었다. 인산완충용액을 처리한 Group.3의 경우, 도 4에서는 실험 종료일 육안으로 보기에는 각질이 많이 없어지고 아토피로 인한 피부염 증상이 호전되어 비교적 깨끗한 피부가 된 것으로 보였으나 diagnosis system으로 확인해본 결과 여전히 피부조직은 수분이 손실되어 갈라져 있으며, 하얗게 인설이 일어나 있는 것이 관찰되었다. Group.4부터 Group.9까지 각 시료를 처리한 실험군에서는 diagnosis system에서도 모두 아토피 피부염이 개선된 모습을 보여주었다. 최종적으로 6주차가 되었을 때 정상군처럼 완전히 깨끗한 상태는 아니지만 거의 비슷한 상태까지 피부가 개선되었고, Group.4의 경우에는 항 아토피 성분이 들어있는 다른 제품들에 비해 피부 개선 효능이 적은 것으로 확인되었다. 전체적으로 피부개선의 차이는 미미하지만 Cavanol, Atopalm이 비교적 빠르게 개선이 진행되었고 보습력 또한 우수한 하였다. Group.5, Group.6, Group.7을 비교해 보았을 때, 마이틀 0.3%만을 함유한 로션보다 Fucoidan을 함께 넣어준 로션이 보다 더 뛰어난 항아토피 효능을 보였으며, Fucoidan을 0.5중량% 첨가했을 때보다 2중량% 첨가했을 때 피부개선 속도 면에서나 피부개선 정도 면에서 더 효능이 나타났다.

[0041] (2) Skin thickness 측정

[0042] digimatic indicator (No. 99MAH007B, Series No. 543)를 통해 각 주차마다 동일한 부위의 피부를 mm로 6주 동안 측정하였다 (도 6). 피부 두께를 측정함으로써 아토피와 피부 두께의 상관관계에 대해 파악할 수 있었다. 정상군은 1주차에서 6주차로 갈수록 피부 두께는 큰 차이가 없었다. 1%의 DNCB를 일주일 동안 처리한 실험군들에서는 피부두께가 정상군에 비해 2배에서 3배정도로 증가하였다. 그 후 6주차로 갈수록 피부두께의 수치는 점점 감소하는 경향을 보였다. 이처럼 아토피가 유발된 피부염에서는 경피수분손실도의 증가로 피부의 가피, 인설, 태선화 같은 경피의 각질층이 일어나 피부 두께가 증가하였으나, 각 시료를 처리한 실험군에서는 피부의 각질 정도가 감소를 하였고, 실험종료일에는 정상피부의 두께까지 수치가 감소하지는 못했지만, 꾸준히 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 여기서 DNCB만 도포했던 Group.2 역시 피부두께가 감소된 것을 볼 수 있었는데, 이는 1주차가 지난 후 DNCB의 양을 0.5%로 줄이고 이틀에 한번 씩 처리해 줬기 때문에 1주차보다 상태가 호전된 모습이 나타난 것이다. 그러나 2주차 후로는 비슷한 수치로 아토피 증상이 유지되는 것을 알 수 있다. 최종 결과를 볼 때 Atopalm의 피부개선도가 가장 높은 것으로 나타났으나, 각 Group간의 유의차가 미미한 것으로 나타났다.

[0043] 아토피 피부염의 면역학적 관찰

[0044] 면역학적 평가를 위해 실험 종료일, 시료 수집은 실험 종료일에 실험동물을 heparinized capillary tube와 주사기를 이용해 안와와 심장에서 채혈하였다. 혈액을 채취하여 10,000 rpm, 4℃에서 30분간 원심분리를 하여 혈청을 분리한 후 분석 시까지 -70℃ deep freezer에 보관하였다. 이후 경추탈골을 통해 실험동물을 희생시켜 비장을 적출하고 그 무게를 analytical balances (Sartorius/Cp324s, USA)를 통해 측정하였다.

[0045] (1) Spleen index 측정

[0046] 외부에서 알레르기 원인물질이 피부로 들어오면 특정한 T림프구에서 염증반응을 일으키는 Cytokine을 분비한다. 이로 인해 면역글로불린 E (IgE)가 증가하게 되고 이는 호산구의 증가로 이어져 아토피 질환의 각종 증상이 발생하게 된다. 이와 같이 아토피가 유발되면 호산구가 증가하게 되는데 호산구는 비장에 저장되므로 비장의 수치를 측정함으로써 호산구의 변화를 알아보았다 (도 7). DNCB에 대한 mouse의 면역반응을 검토하기 위하여 실험종료일에 mouse를 희생시켜 비장을 적출하고 무게를 측정하였다. 비장수치(spleen index)는 아토피 피부염 mouse의 body weight (g)로 나눔으로써 얻을 수 있었다. 실험결과 Group.1부터 Group.9까지 차례대로 평균 3.7663, 7.6144, 6.2357, 5.452, 4.492, 4.5872, 5.127, 4.7641, 5.2636의 수치가 측정되었다. 도 7에서 나타

났듯이 정상군은 3.77정도의 수치를 나타냈지만, DNCB로 아토피를 유발시킨 Group.2에서는 7.61정도로 약 2배 정도의 증가한 수치를 나타내었다. 이는 아토피 피부염으로 인해 호산구수가 정상수치보다 비정상적으로 늘어났음을 나타내는 것이다. 또한 인산완충용액을 처리한 Group.3도 정상군에 비해 2배에 약간 못 미치는 상당히 높은 수치가 나왔다. 이것 또한 DNCB에 의한 비장내의 T림파구가 현저하게 증가하였음을 나타내고, 인산완충용액은 T림파구의 증가를 제대로 억제하지 못한 것으로 볼 수 있다. Group.4를 보면 bass lotion의 수분공급으로 인해 아토피 증상이 약간 완화된 것을 알 수 있고, Group.5부터 Group.9까지 항 아토피 시료를 처리한 실험동물에서는 T림파구의 억제능이 우수하여 인산완충용액이나 bass lotion에 비해 비장의 수치가 더 낮게 나왔다. 비장수치의 차이가 미미하지만 마이틀 0.3중량% 함유한 로션의 비장수치가 가장 낮게 나왔으며, 그 다음으로는 마이틀 0.3중량%와 Fucoidan 0.5중량%함유 로션, Atopalm, Cavanol, 마이틀 0.3중량%와 Fucoidan 2중량%함유 로션 순으로 비장수치가 측정되어 각각 시료에 대한 항아토피 효능을 비교할 수 있었다.

[0047]

(2) Immunoglobulin E 농도 측정

[0048]

IgE는 비만세포(mast cell)나 백혈구(basophil)의 표면에 있는 수용체(receptor)와 결합을 해서 알레르기 반응을 유도한다. 비만세포(mast cell)나 백혈구는 histamine과 같은 알레르기 반응을 유발하는 매개체를 가지고 있기 때문이다. IgE의 결합으로 인해 세포들이 활성화가 되면 histamine을 분비하게 되어 염증반응이 일어나게 된다. 아토피 피부염을 가진 사람은 보통 혈청 내 IgE 수치가 높고 주변의 다양한 항원에 대해 민감하게 반응을 보인다. 또한 피부 증상이 심각해질수록 IgE 수치가 높아지므로 피부 증상의 완화는 IgE 수치 감소와 관련이 있다. 따라서 본 발명에서는 실험동물의 혈청 내에 있는 IgE의 수치를 측정해봄으로써 항아토피 효능을 평가해 보았다(도 8). 이 면역학적 평가를 위해 실험동물의 심장과 안와로부터 채취한 혈액을 원심분리 한 후 혈청 IgE 농도를 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 각 96 well plates에 hairless mice에서 취한 혈청 5 μ L와 dilution buffer 45 μ L를 혼합하여 각각의 well에 50 μ L를 분주하고 실온에서 shaker에 올려 2시간 동안 방치한 후, washing buffer solution으로 3회 세척하였다. 다시 biotin-conjugated anti-IgE antibody를 넣고 2시간 실온에 incubation 한 후에 다시 3회 세척하였다. HRP-conjugated avidin 50 μ L를 넣고 실온에서 shaker에 올려 1시간 incubation 한 후 다시 세척하였다. Chromogenic substrate (TMB) reagent 50 μ L를 넣고 5분간 incubation한 후 50 μ L dml stop solution을 넣고 ELISA reader (450nm)에서 흡광도를 측정하였다. 도 8은 아토피 피부염 mouse의 최종적인 IgE의 농도를 측정한 결과이다. Group.1부터 Group.9까지 차례대로 평균 62.735, 615.764, 530.634, 512.931, 369.55, 314.459, 256.138, 141.907, 191.625 ng/mL로 측정되었다. 먼저 정상군인 Group.1과 아토피가 유발된 Group.2를 비교해볼 때, 혈청의 IgE 농도가 정상군에 비해 10배까지 증가한 것을 확인할 수 있다. 인산완충용액을 처리한 Group.3의 경우에는 IgE의 억제율이 다른 항아토피 제품에 비해 상당히 낮은 것으로 확인되었다. 이는 bass lotion을 처리한 실험군에서도 마찬가지였다. 항 아토피 물질을 포함한 시료를 처리한 경우에는 Group.2에 비해 눈에 띄게 total IgE의 발현량이 줄어든 것을 볼 수 있었다. 그 중에서도 Cavanol을 처리한 Group.8의 IgE 농도가 가장 낮은 것으로 보아 항 아토피 효능이 가장 뛰어난 것으로 나타났다. 이는 Th1 cell이 활성화 되고 Th2 cell의 활성이 감소되면서 IgE의 발현량이 현저히 낮아진 것으로 보고 있다. 그 다음으로 Atopalm, 마이틀 0.3중량%와 Fucoidan 2중량%를 함유한 로션, 마이틀 0.3중량%와 Fucoidan 0.5중량%를 함유한 로션, 마이틀 0.3중량%를 함유한 로션 순으로 항아토피 효능이 나타났다. Group.5, Group.6, Group.7을 비교해 볼 때, Fucoidan의 함량이 많아질수록 IgE의 발현량이 줄어든다는 것, 즉 항아토피 효능이 더 많이 나타난다는 것을 확인할 수 있었다.

[0049]

(3) Cytokine 농도 측정

[0050]

실험동물의 심장과 안와에서 채취한 혈액을 원심분리 한 후 혈청 IL-4, INF- γ 의 농도를 enzyme immunometric assay kit (Assay Designs, Inc. USA)을 이용해 측정하였다. 시료를 96 well plate에 PBS로 180배 희석한 capture antibody를 100 μ L씩 분주하여 실온에서 overnight 시킨 후, block buffer 300 μ L를 분주하여 최소 1시간 실온에서 반응시켰다. 다음 reagent diluent로 희석한 각 샘플과 표준액을 100 μ L씩 분주한 후, 실온에서 2시간 반응시켰다. Streptavidin-HRP를 working dilution으로 희석하여 100 μ L씩 각 well에 분주하여 실온에 20분 동안 반응시킨 후, substrate solution을 100 μ L씩 분주하고 다시 실온에서 20분 동안 반응시켰다. 각 단계는 0.05% PBS-Tween으로 세척하였으며 마지막으로 발색 후 2N H₂SO₄를 50 μ L씩 넣고 반응을 정지시켰다. 동일한 과정을 통하여 purified cytokine을 표준으로 하여 ELISA reader (450 nm)로 측정하였다.

[0051]

[0052]

(가) Interleukin-4 농도 측정

[0053]

면역학적으로 정상적인 상태에서는 Th1 cell의 cytokine인 IFN- γ 와 Th2 cell의 IL-4가 서로를 조절하면서 균형을 이룬다. 하지만 아토피가 유발된 상태에서는 IL-4가 과발현되어 IFN- γ 의 발현을 억제함으로써 불균형이 초래된다. IL-4가 많이 생성되면 B-cell이 자극을 받아 IgE의 과발현을 유도함으로써 히스타민이 과도하게 배출되는 것이다. IL-4와 IgE는 아토피 증상에 직접적인 영향을 미칠 뿐만 아니라 유도하기 때문에 면역학적으로 중요한 인자이다. IL-4의 발현량 실험결과와 전반적으로 도 9와 유사한 경향을 보이고 있다 (도 9). IL-4의 발현량은 Group.1부터 Group.9까지 각각 평균 24.839, 106.022, 85.679, 79.055, 40.433, 47.349, 35.346, 29.249, 26.633 pg/mL로 측정되었다. 도 9에서 보듯이 아토피가 유발되자 IL-4의 발현은 정상수치보다 약 4배나 높게 증가하였다. 아토피 피부염으로 인해 Th1 cell과 Th2 cell 사이의 균형이 깨졌음을 알 수 있다. 2주차 때부터 항 아토피 효능이 있는 각 시료들을 처리한 Group들은 IL-4의 발현량이 현저하게 줄어들었는데, 이것으로 각 시료들은 Th2 cell의 cytokine의 과발현을 억제시켜 T cell들 사이의 균형을 유지하는 작용을 한다는 것이 입증되었다. 특히나 아토피 피부염이 유발된 실험군을 Atopalm으로 처리한 Group.9의 IL-4의 수치가 정상수치와 비슷하게 측정된 것으로 보아 항아토피 효능이 가장 우수한 것으로 나타났다. 그 다음으로 Cavanol, 마이톨 0.3중량%와 Fucoidan 2중량%를 함유한 로션, 마이톨 0.3중량%를 함유한 로션, 마이톨 0.3중량%와 Fucoidan 0.5중량%를 함유한 로션 순으로 항아토피 효능을 나타내고 있음이 관찰되었다.

[0054]

(나) Interferon- γ 농도 측정

[0055]

앞서 설명했던 것과 같이 아토피 피부염이 유발되면 IL-4이 과발현되고, 이 과발현된 IL-4로 인해 IFN- γ 의 발현은 억제된다. 따라서 각 시료들이 IFN- γ 의 발현량에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 실험 종료일 실험동물의 혈청을 채집하여 각 Group의 IFN- γ 의 발현량을 측정해 보았다 (도 10). 측정결과 Group.1부터 Group.9까지 각각 평균 35.178, 18.752, 16.877, 22.698, 46.717, 49.851, 54.215, 62.821, 58.867 pg/mL로 결과가 나타났다. 아토피 피부염에 걸리면 IFN- γ 발현량이 억제되었기 때문에 정상군보다 Group.2의 IFN- γ 농도가 낮아진 것으로 나타났다. 항아토피 제품은 IFN- γ 의 발현량을 증가시키고 IL-4와 균형을 이루게 함으로써 면역학적으로 아토피 피부염의 증상을 완화시킬 수 있다. 따라서 도 10에서 IFN- γ 발현량의 수치가 높을수록 항아토피 효과는 우수하다고 볼 수 있다. 이런 관점에서 볼 때, 항아토피 효능이 가장 높은 것은 Cavanol을 처리한 Group.8이고, 그 다음으로 Atopalm, 마이톨 0.3중량%와 Fucoidan 2중량%를 함유한 본 발명 로션, 마이톨 0.3중량%와 Fucoidan 0.5중량%를 함유한 본 발명 로션, 마이톨 단독으로 0.3중량%를 사용한 로션 순으로 나타났다.

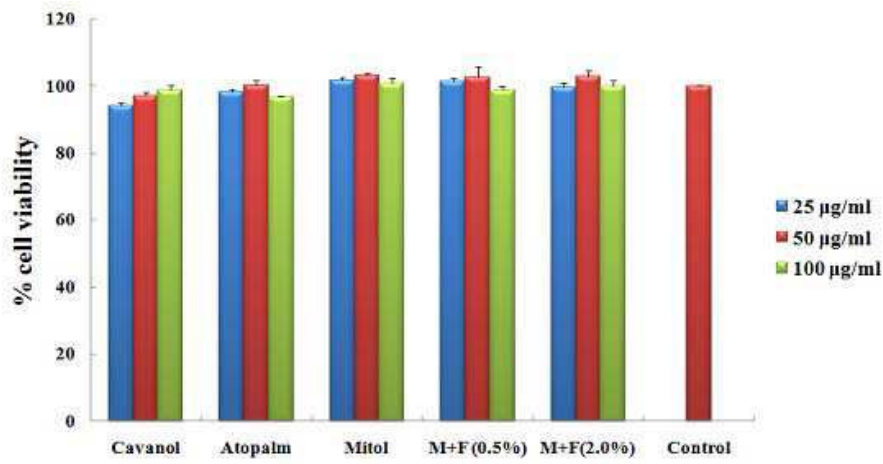
산업상 이용가능성

[0056]

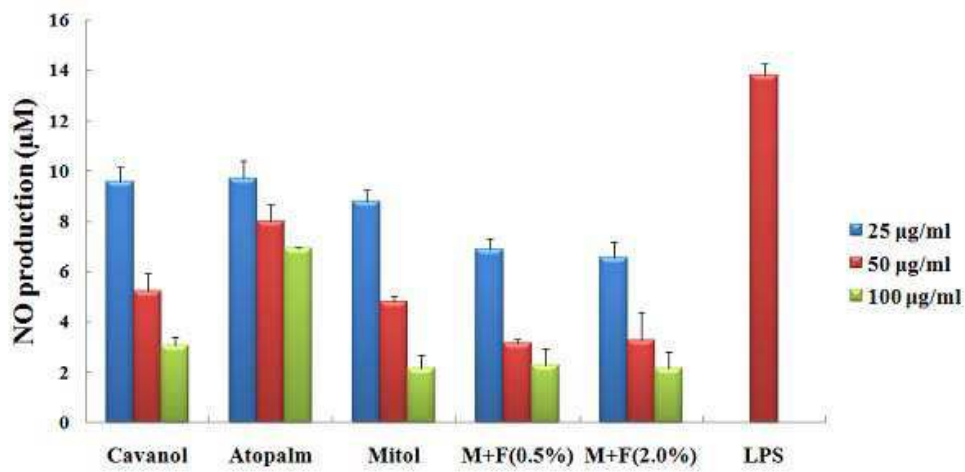
본 발명은 감태(Ecklonia cava) 유래의 마이톨과 푸코이단의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 항염증 활성 및 아토피 피부염 개선용 화장품 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있으므로 생물의약산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면

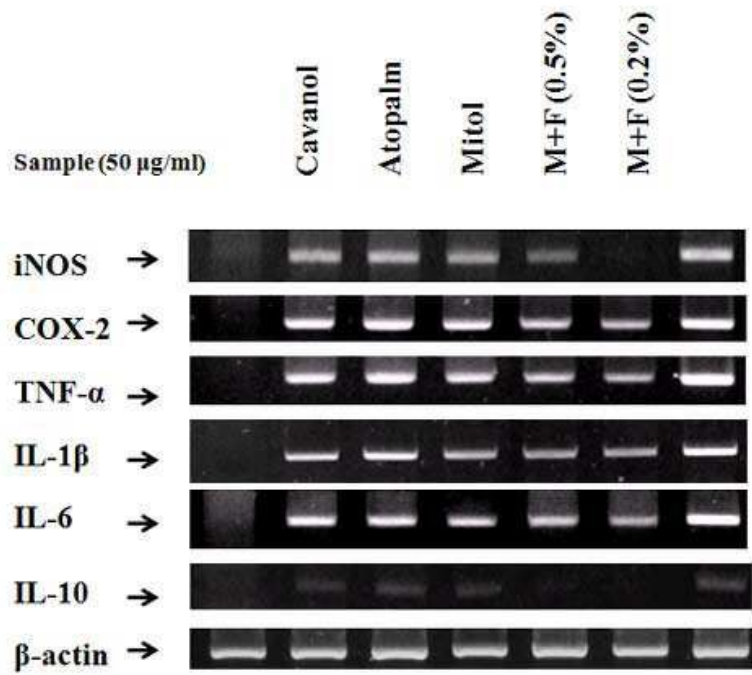
도면1



도면2



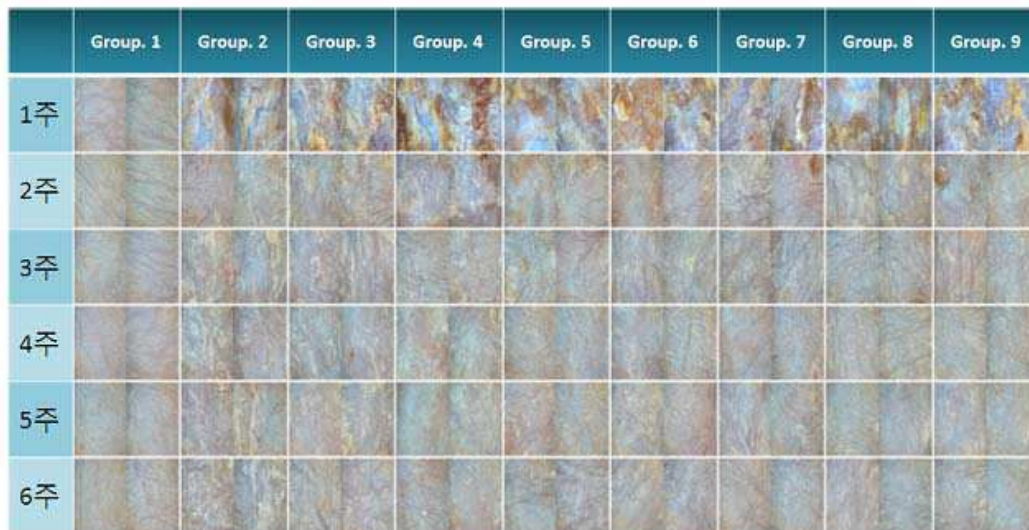
도면3



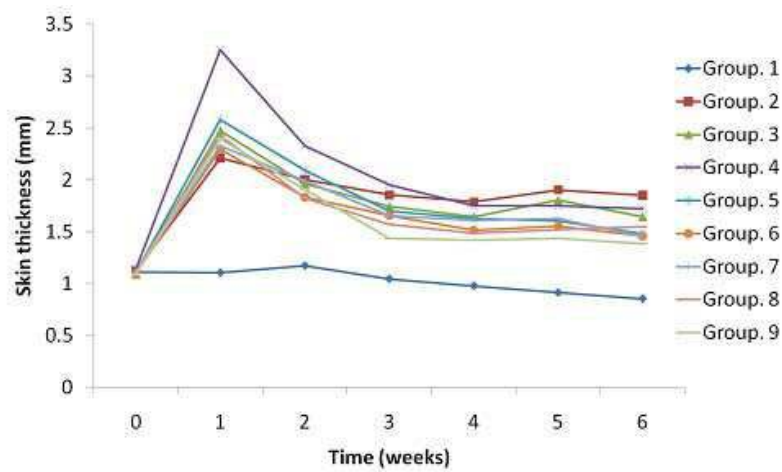
도면4



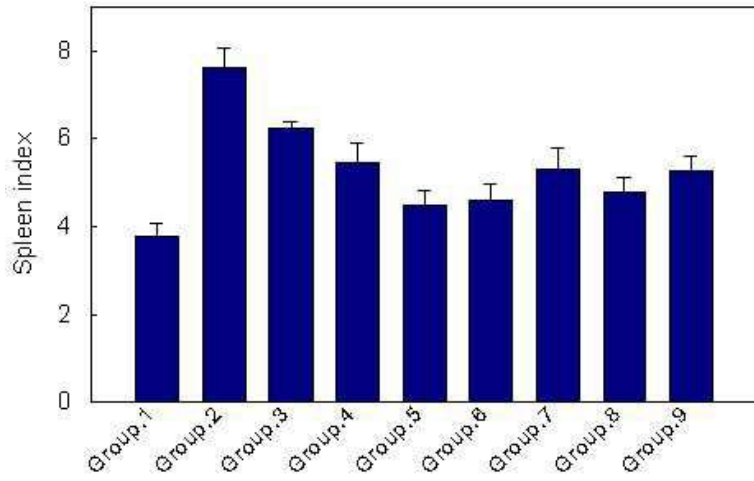
도면5



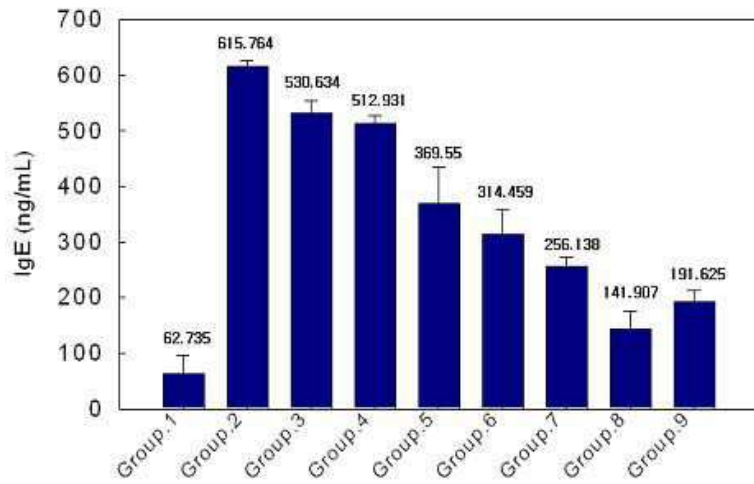
도면6



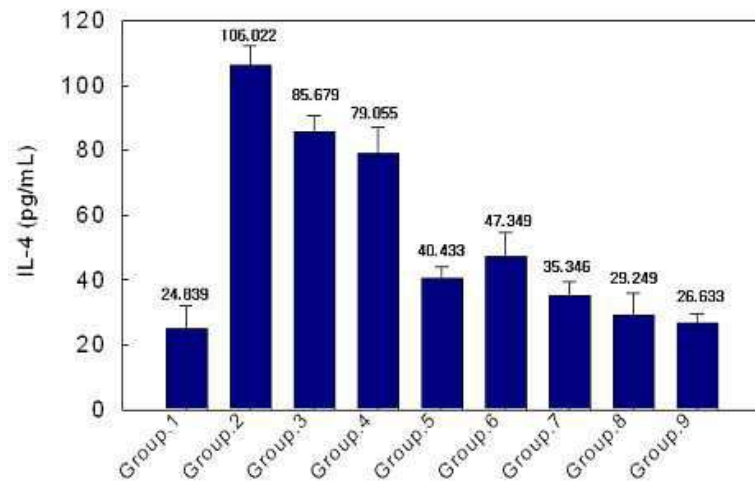
도면7



도면8



도면9



도면10

