

최 종
연구보고서

국내산 상황버섯(*Phellinus baumii*)으로부터

피부면역활성 에센스 오일 개발

Development of cosmetic essential oil from

Phellinus baumii

(주)아이지에스

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 상황버섯(*Phellinus baumii*)으로부터 피부면역활성 에센스 오일 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 23 일

주관연구기관명 : (주)아이지에스

총괄연구책임자 : 강세찬

연구원 : 최 한
고현자
구현정

협동연구기관명 : 성균관대학교

협동연구책임자 : 지옥표

위탁연구기관명 : (주)더마랩

위탁연구책임자 : 정의수

요 약 문

I. 제 목

국내산 상황버섯(*Phellinus baumii*)으로부터 피부면역활성 에센스 오일 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

화장품 시장의 급속한 성장 및 발전에 힘입어 중국과 유럽 시장에서의 한국제품의 경쟁력 확보가 이루어지고 있으며, 새로운 기능성 화장품에 대한 전반적인 인식의 변화 및 수요자의 수요 욕구가 증대되고 있는 가운데 화장품의 개념이 소비자의 욕구증대와 화장품 관련 기술발달로 단순 미화에서 고기능·다기능 제품으로 변화하고 있다. 화장품법 제정·시행(2000. 7. 1)으로 기능성화장품이 분리 신설됨에 따라 관련 기업의 활발한 연구개발과 시장이 확대되고 있으며 단순 미용개념의 화장품에서 기능성 화장품 신소재 개발 요구가 증대되고 있는 상황에서 특히 국내는 풍부한 약용작물을 이용한 천연추출물 화장품 원료개발이 유리하다는 장점을 가지고 있다. 더구나 기능성 화장품 원료개발은 의약품 및 건강기능식품 개발비용에 비해 저렴하지만, 시장에 대한 파급효과 및 매출은 대등하므로 천연물 화장품 소재개발의 사회, 경제적 중요성이 크게 부각되고 있다. 미백화장품의 경우 한국, 일본, 중국, 동아시아 시장이 증대되고 있으며 천연자원 활용 시 뽕나무의 멀베린과 같이 1제품 당 국내 년 2백억 원 매출이 예상되고 있으며, 천연식물을 활용한 기능성 원료개발은 의약품 개발보다 상대적 진입이 용이한 반면 시장규모도 적지 않다. 또한 기능성 화장품 원료개발 시 동시에 의약품 원료 개발 가능의 부가적 이점을 가지고 있으며, 천연원료는 특성상 다양한 생리활성 성분을 함유하고 있어 다양성이 증시 되고 있는 미래 화장품 원료개발에 적합하고 소재개발의 기간 단축 및 비용 절감의 장점을 가지고 있으므로 본 연구에서는 상황버섯을 이용한 기능성 천연추출물 화장품을 개발하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내산 상황버섯으로부터 피부 면역 활성을 지닌 에센스 오일을 개발하고자 피부 면역 활성 효능을 규명하기 위한 유효성 시험 및 안전성을 확인하기 위한 독성시험을 실시하였고, 유효성과 안전성을 확인한 후 이를 응용한 시제품을 제작하였다. 이를 위하여 시제품 제작 시 고품질의 상황버섯 에센스 오일 생산을 위한 각 연구 및 생산단계별로 기능성 및 기초 독성을 check하였고, 시제품을 대상으로 한 화장품원료 등재 시험(독성/문헌자료)을 실시하였으며, 응용제품을 대상으로 하여 기능성 화장품 등록시험을 실시(기능성, 독성, 문헌자료)하였다. 또한 특허보완과 국제특허출원을 위한 기능성 연구보완 및 특허청구 범위를 확대하였고 기사용 화장품의 정유 성분과 생리활성을 비교 연구하여 상황버섯의 정유 성분을 분석 및 규명하고, 기사용 화장품 정유성분과의 보습효과에 대한 비교임상을 실시하였다. 본 연구의 결과물을 사업화하기 위하여 국제 화장품 원료 규격집 등재를 위한 독성 및 기능성 시험을 보완하였고, 각종 학회 등 전시회 출품을 위한 문헌 및 조사연구를 병행하였으며, 생산시설 확충 및 고품질의 에센스 오일 생산을 위한 생산단계 별 기능성/독성 연구를 진행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 상황버섯 에센스 오일의 생물학적 활성규명

(1) 항산화 작용

피부세포 배양물에 과산화수소를 이용, 활성산소 생성을 유발하여 상황버섯 오일 첨가에 의한 세포내 활성산소가 억제됨을 확인하였다.

(2) 상황버섯의 동정

수거검체 3종에 대한 ITS부위의 염기서열분석 결과를 확인한 결과 각각 *Phellinus*

*igniarius*와 98%, *Phellinus linteus*와 99%, *Phellinus baumii*와 99.8%의 상동성이 나타남을 확인하였고 이는 유통되고 있는 진흙버섯류의 제품명과 동정결과가 일치하였으며, 이 중에서 초원농장에서 제공한 상황버섯은 *Phellinus baumii*로 나타나 정유성분 등 에센스 오일 시험을 위한 원료로 사용하였다.

(3) 면역세포 증진, 항체 형성능 촉진

인체혈액으로부터 림프구를 분리하여 배양, 상황버섯 에센스 오일 및 시제품을 첨가하여 림프구 생장이 촉진됨을 DNA 합성량을 통하여 확인하였다.

(4) IgE 억제를 통한 피부 알러지 보호

IgE 생성억제를 측정하기 위하여 비만세포 (RBL2HB)에 상황버섯 에센스 오일을 첨가한 결과 세포탈과립화가 억제됨을 확인하였다. 특히 BuOH층과 EA층에서 비슷한 정도의 탈과립화 억제결과가 나타나 상황버섯 오일에 함유되어 있는 성분은 극성 방향성 화합물일 것으로 추정되며 약 10%의 탈과립화 억제효과가 나타났다.

(5) Systemic anaphylaxis 억제 효과

Mouse model에서 anaphylaxis를 유발한 쥐에 상황버섯 에센스 오일을 복강주사하였을 때 anaphylaxis가 억제됨을 확인하였으며, 혈청에서도 histamine 분비가 억제됨을 확인하였다.

(6) Cytokine 발현조절 기능 평가

인체 비만세포인 HMC-1으로부터 상황버섯 에센스 오일 시제품에 의한 TNF- α 와 IL-6와 같은 cytokine 발현이 감소함을 Bio-plex system을 이용하여 확인하였다.

2. 상황버섯 에센스 오일의 생산공정 연구

(1) 에센스 오일 생산공정 연구

상황버섯으로부터 에센스 오일을 생산하기 위하여 증류법, 용매추출법, 오일추출

법, 초음파 추출물을 사용하여 생산량을 비교한 결과 오일을 용매로한 초음파 추출이 가장 생산수율이 높았다.

(2) 최적 생산공정

따라서, 증류법을 이용한 1차 생산을 통하여 에센스 오일을 생산하는 동안 부산물로 화장수 190kg을 얻었으며, 최종 오일을 용매로한 초음파추출을 통하여 100kg의 상황버섯으로부터 (사용한 상황버섯은 성분 및 효능은 동일하나 겉모양 및 가공과정에서 외관이 손상된 비상품으로 하였다) 160ml의 농축 에센스 오일을 얻었으며, 추출물 70kg을 얻어 최종 15kg으로 농축하였다. 따라서, 본 생산을 통하여 최종적으로 에센스 오일, 상황버섯추출물, 상황버섯 화장수를 생산할 수 있었다.

3. 상황버섯 에센스 오일의 개발 및 효력/독성 전임상

(1) 상황버섯 에센스 오일 및 시제품의 단회 투여 독성 평가

본 시험에서 시험물질 투여와 관련된 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았으며 LD₅₀값은 50ml/kg을 훨씬 상회할 것으로 생각되었다. 이상의 결과에서 상황버섯 에센스 오일 및 시제품은 수컷 마우스에 의한 경구투여를 통한 단회 투여 독성시험에서 안전한 물질인 것으로 판단되었으며, 따라서 식품 및 화장품 소재로의 이용에 적합할 것으로 사료된다.

(2) 피부트러블 억제

Benzoic acid와 같은 염증유발 물질을 마우스의 귀에 처치하고 상황버섯 에센스 오일을 처리한 결과 유발 물질에 의한 피부트러블이 완화됨을 확인하였으며, 상황버섯 에센스 오일이 5% 함유된 Olive oil 및 chemical을 동시에 처리한 경우에는 마우스의 귀에 피부트러블 및 염증이 유도되지 않았다.

(3) 피부암 억제

피부암세포(마우스 melanoma, B16-BL6)를 마우스의 등배부에 주입하여 암세포

에 의한 폐사율 억제 (Life span 증가) 및 암세포 크기를 측정한 결과, 시험기간 중 사망동물은 대조군에서만 1례가 관찰되었고 암세포의 무게 변화는 대조군에 비해 상황버섯 에센스 오일 10ml/kg/day 투여군에서 암세포의 크기가 42.54% 감소하였다.

(4) 안점막 시험

안검사에 있어서는 시험물질 투여 후 1, 24, 48, 72, 96 시간 및 7일째에 관찰을 실시하였는데, 모든 동물에서 투여 후 7일째까지 각막, 홍채, 결막에서 모두 이상소견이 전혀 관찰되지 않았다.

(5) 국소독성시험

시험물질인 상황버섯 에센스 오일을 New Zealand White계 토끼 등 피부의 찰과·비찰과부위에 경피도포한 결과, 시험물질에 기인한 일반증상의 변화는 관찰되지 않았으며 사망동물도 없었다. 또한, 시험물질 적용 후 7일째에는 홍반과 가피형성정도가 대체적으로 뚜렷한 회복 경향을 나타내었으며 찰과와 비찰과피부 모두에서 부종은 관찰되지 않았다.

4. 활용 방안

상황버섯 중에서 *P. baumii*는 자체로서의 제품뿐만 아니라 식품첨가제, 기능성화장품 등 기타 식의약화장품의 첨가제로서의 가능성을 확인하였으며, 이로 인하여 제품의 다양화를 가져와 농가수입의 증대가 예상되며, 상황버섯의 원물 수확 시 다량 발생하는 파쇄된 절편 부산물을 이용할 수 있으므로 부가적인 농가소득의 향상을 기대할 수 있다. 또한 피부암세포억제, 항산화효과, 면역세포활성이 확인 된 바 제품화 성공가능성이 매우 높을 것으로 예상되고, 성장속도가 빠른 상황버섯을 이용하므로 국내산 상황버섯의 생산원가 절감과 인력절감이 기대되며, 에센스 오일의 추출에 있어서도 기존의 추출설비를 이용하므로 생산비 절감도 기대할 수 있다.

특히, 본 연구결과를 토대로 증류법과 오일을 용매로 이용한 초음파추출을 통하여 champhor 및 borneol 함량이 각각 6.25 및 0.5%정도인 상황버섯 에센스 오일을

100kg의 비상품 상황버섯으로부터 160ml을 획득할 수 있으며, 이외에 부가적으로 190kg의 상황버섯 성분함유 화장수와 최종농축물 15kg의 상황버섯 추출물을 생산할 수 있으므로, 상황버섯 에센스 오일과 함께 다양한 화장품 용도로 개발이 가능하다.

SUMMARY

I. Title

Development of cosmetic essential oil from *Phellinus baumii*

II. Major Results and Conclusion

1. Biological examination of essential oil from *Phellinus baumii*

(1) Anti-oxidative activity

After generation of oxygen free radical, essential oil from *Phellinus baumii* was treated to 3T3-L1 cells. As a result, the amount of oxygen free radical in cells was decreased.

(2) Isolation of *Phellinus baumii*

Sequence analysis of ITS part was carried out to 3 kinds of samples, as a result, they had a homology with *Phellinus igniarius* (98%), *Phellinus linteus* (99%) and *Phellinus baumii* (99.8%), respectively. These results corresponded with *Phellinus gilvus* which is circulated in market. Among them, sample supplied from Chowon Farm was certified as *Phellinus baumii* and it was used for raw material for essential oil extraction.

(3) Activation of immunocyte & antibody formation

Lymphocyte was isolated from human blood and cultured. Then, essential oil from *Phellinus baumii* and prototype were treated to cells. As a result, we verified the activation of lymphocyte proliferation through DNA synthesis.

(4) Anti-allergic activation by suppression of IgE

To investigate the suppression of IgE production, essential oil from *Phellinus baumii* was treated to mast cell (RBL2H3). As a result, degranulation was suppressed by essential oil from *Phellinus baumii*. Especially, BuOH and EA layer showed similar activities (10%) each other and these results suggested that effective ingredient in essential oil from *Phellinus baumii* might be polar aromatic compound.

(5) Systemic anaphylaxis

When essential oil from *Phellinus baumii* was administered to anaphylactic shock-induced mice by IP, anaphylaxis was attenuated and histamine release in serum was also decreased.

(6) Regulation of cytokine expression

Prototype of essential oil from *Phellinus baumii* decreased the expressions of cytokines such as TNF- α and IL-6 in HMC-1, human mast cell.

2. Development, effect and safety of essential oil from *Phellinus baumii* (preclinical)

(1) Acute toxicity of essential oil from *Phellinus baumii* and prototype

There were neither dead animals nor significant changes of body weights during the experimental period. In addition to, no significant essential oil from *Phellinus baumii* and prototype related changes were found in clinical sign and other findings. No histopathological lesions were observed in both control and treated animals. Above data suggested that no observed adverse effect level (NOAEL) of test materials in ICR mice might be over 50ml/kg in this study.

(2) Suppression of skin trouble

Inflammation inducing agent such as benzoic acid was treated on mouse ear. After induction of inflammation, essential oil from *Phellinus baumii* was applied on the same

part, as a result, skin trouble caused by benzoic acid was attenuated. Moreover, in case of co-treatment of olive oil contains 5% of essential oil from *Phellinus baumii* and benzoic acid, skin trouble and inflammation of mouse ear were not induced.

(3) Suppression of skin cancer

Mouse melanoma cell line, B16-BL6 was inoculated to the back of mouse for tumorigenic study. The essential oil from *Phellinus baumii* decreased tumor size (42.54%) at dose of 10ml/kg/day.

(4) Ocular irritation

The essential oil from *Phellinus baumii* did not affect on clinical sign, mortality, body weight, and irritation in case of the ocular application throughout this study.

(5) Local irritation

This study was performed to evaluate irritation potential of the essential oil from *Phellinus baumii* in male New Zealand White Rabbits. The test substance was topically applied on both normal and scratched dorsal skin. Then the skin was evaluated for signs of irritation. No toxic sign and significant body weight were observed relating to test substance treatment. On the abraded skin of treated section, 1 and 24 hours after application, slight erythema was observed in all three animals. 48 hours after application, slight erythema was observed in two animals. 72 hours after application, slight erythema was observed in one animals. On the intact skin of treated section, no abnormal signs were observed throughout the study. On the basis of the above results, the essential oil from *Phellinus baumii* was classified as a non-irritant in this study.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. Current Status on Domestic and Foreign Technology	4
Chapter 3. Experiment and Results	5
Chapter 4. Achievements of objects and contribution	90
Chapter 5. Future plan	91
Chapter 6. References	93

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 개발경위	2
제 2 절 기술개발(제품)의 중요성 및 전망	2
제 2 장 국내외 기술개발 현황	4
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	5
제 1 절 상황버섯 에센스 오일의 생물학적 활성규명	5
제 2 절 상황버섯 용매 분획 및 오일 시제품의 생물학적 활성규명	12
제 3 절 상황버섯 에센스 오일의 생산공정 연구	18
제 4 절 상황버섯 에센스 오일의 생산공정 표준화 및 제제화 연구	25
제 5 절 상황버섯 에센스 오일의 성분분석 연구	30
제 6 절 상황버섯 에센스 오일의 개발 및 효력/독성 전임상	37
제 7 절 상황버섯 에센스 오일 시제품의 개발 및 독성 전임상	64
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	90
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	91
제 6 장 참고문헌	93

제 1 장 연구개발과제의 개요

상황버섯 에센스 오일은 국내 유통 중인 목질진흙버섯류(이하, 상황버섯) 중 가장 목질화되어 있는 *Phellinus baumii* 종으로부터 휘발성 정유(essence oil; 이하, 에센스 오일)를 추출하여 이의 생물학적 작용(특히, 피부면역활성)을 규명하여 상품화한 것이다.

대상제품	상황버섯 에센스 오일
용 도	피부면역활성 에센스 오일 및 화장품 조성제
기 능	<ul style="list-style-type: none"> - 인체혈액 중 림프구 활성화증대 - 면역세포 B cell의 외부 알러지 유발물질에 대한 항체형성 증대 - 알러지 유발 물질에 의한 염증반응 예방 및 완화 - 피부보습 및 항산화, 노화방지 - 자외선 차단
특 성	<ul style="list-style-type: none"> - 세계 최초로 고품질 버섯으로부터 기능성 에센스 오일 생산 - 피부면역활성에 대한 기초연구 완료 - 급성독성 및 피부암억제 효과 확인 - 국내, 일본 상황버섯인 <i>P. linteus</i>, 중국의 상황버섯인 <i>P. igniarius</i>에 비해 정유 성분 다량 함유
기대효과	<ul style="list-style-type: none"> - 공해, 병원성세균 등 알러지 유발물질에 의한 질환 예방 - 무독성, 비자극 메커니즘에 의한 유아/어린이 아토피성 질환예방 - 오일 생산 후 부산물로 생겨나는 유효성분의 항암식품 활용 - 프랑스 주도의 에센스 오일 생산기술과 대등한 고품질 오일 생산으로 타 농산물, 한약재 등 천연원료에서 오일 생산기술 확보 - 상황버섯 재배농가에서 원물 출하 시 파쇄된 부분 등 형태적으로 상품화하기 어려운 상황버섯 부산물을 이용하므로 농가소득 극대화

제 1 절 개발경위

상황버섯의 항암력 등에 대한 생물학적 활성 규명에 따라 상황버섯 재배농가가 늘어났음에도 불구하고 형태 및 기능면에서 다양한 제품이 개발되지 않아 농가 소득 저해 및 불안정한 유통구조가 형성되어 있으며, 중국/일본에 비해 상황버섯의 기능성, 제품화 연구가 미흡한 실정이다. 특히, 항암기능으로 널리 알려진 β -glucan 등의 고분자 물질 외에 고기능성의 저분자물질 분리 연구 중 *P. baumii*로부터 다량의 정유성분이 함유되어 있음을 확인하였다. 정유성분이 함유된 상황버섯 추출물로부터 β -glucan 이외의 성분에 의한 면역활성, 암세포증식억제, 항산화작용을 확인하였으며, 상황버섯 total extract의 급성독성이 없음을 확인하였다. 또한, 상기 추출물로부터 피부암세포 증식억제 효과를 확인하였고, 항산화효과 등 기초 연구를 실시하여, 피부면역활성의 에센스 오일 상품화 system 구축 및 인프라를 확보하였다.

제 2 절 기술개발(제품)의 중요성 및 전망

1. 상황버섯 에센스 오일

버섯류는 고등균류 중 대부분 담자균류에 속하며 특유의 맛과 향, 또한 당질, 단백질, 비타민, 무기질 등 다양한 영양소를 함유하고 있을 뿐만 아니라, 항암활성, 면역증가 효과 및 항산화 효과 등의 약리효과가 보고되고 있어 최근 건강기능식품 및 의약품, 화장품 소재로 이용되고 있다. 다당류에 의한 항암효과는 암세포를 직접 파괴하며 세포독성을 나타내는 화학요법제와는 달리 정상세포의 면역증강효과에 기인하여 항암효과를 나타내기 때문에 최근에 그 중요성이 커지고 있다. 이 중 상황버섯(*Phellinus linteus*, *P. baumii*, *P. igniarius*)은 잔나비겉상과(다공균과, Polyporaceae)에 속하는 다년생버섯으로 목질진흙버섯 및 말뚝진흙버섯으로 불리고 있으며, 다른 담자균류보다 높은 항암활성을 가지고 있어 다양한 용도의 소재로써 그 가능성이 제시되고 있다.

그러나, 주로 중국, 일본 등에 의하여 다양한 용도의 소재로 이용하기 위한 생물학적 기능성 규명 연구가 진행되고 있는 반면, 국내에서는 대부분 항암활성에 의존한 식품개발에 국한되고 있으며, 이 또한 현재 건강기능식품법상 그 기능이 인정되고 있지 않다. 따라서, 이러한 항암활성에 의존한 제품개발 외에 상황버섯 특유의 면역활성에 의한 제품개발이 필요하며, 특히 상황버섯 에센스 오일의 개발은 본 기술개발에서 전 세계적으로도 최초로 시도되는 바, 국제특허를 비롯한 지적 재산권 뿐만 아니라 새로운 소재 및 용도로써 고부가가치의 제품 및 농가수익증대에 기여될 전망이다.

2. 에센스 오일 생산기술

면역활성 기능의 상황버섯 에센스 오일 자체가 본 제품개발과제에서 전 세계적으로 최초로 시도됨은 물론이며, 국내 아로마 therapy, 향균방향제, 식품첨가제, 식품향료 등으로 널리 이용되고 있는 에센스 오일은 현재 거의 대부분 수입에 의존하고 있다. 특히, 화장품 산업에서 에센스 오일이 차지하는 범위는 실로 막대하나 프랑스를 위주로 한 유럽 등지에서 전량 수입에 의존하고 있으며, 최근에 일부 프랑스로부터 시설을 도입하여 수목으로부터 추출한 정유를 통한 향균 등의 효과를 갖는 제품생산이 시도되고 있다. 본 연구과제에서는 상황버섯 에센스 오일의 생물학적 기능성 측면뿐만 아니라, 참여기업인 (주)더마랩에서 정유(에센셜 오일) 추출 설비인 스팀 증류와 응축 및 분리 시스템을 갖추고 있으므로 국내 기술 자체만으로도 정유(에센셜 오일)성분의 생산을 위한 연구를 진행하여 본 개발 과제의 완성도를 높여나갈 수 있을 전망이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

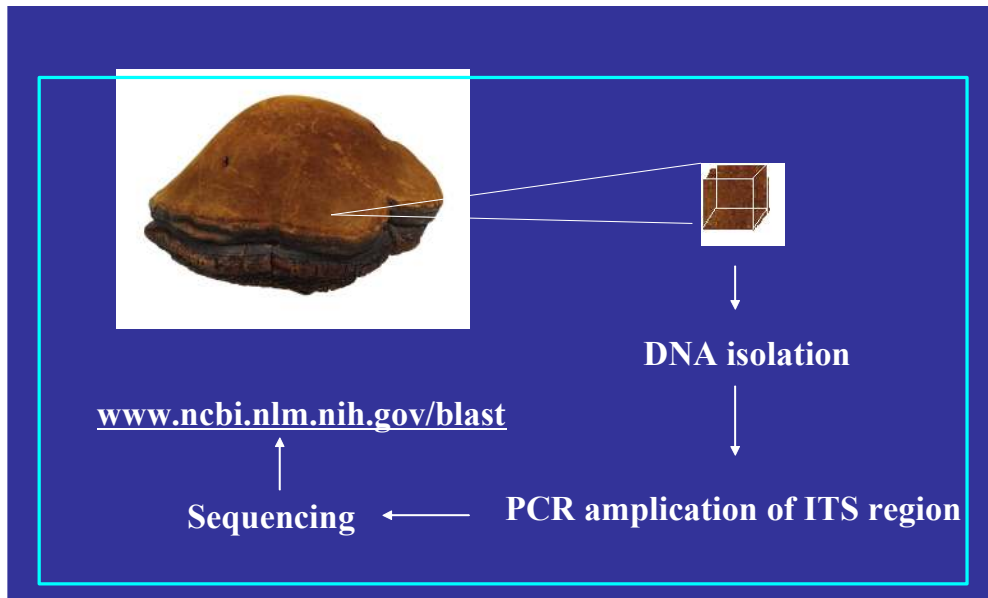
국내에서 유일하게 (주)엔바이타에서 프랑스 피톤치드로부터 기술 이전하여 편백 정유 성분을 추출하여 제품 판매를 시도하고 있으나, 혈압완화 및 항균력을 갖는 성분으로 화장품 등 그 활용 폭이 넓지 않은 현실이다. 따라서, 국내기술을 이용하여 다양한 농산물, 산림자원으로부터 다양한 기능의 에센스 오일을 생산하여 프랑스 등으로 부터의 수입대체 및 자원 활용을 통한 지적재산권 확보가 절실히 필요하다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

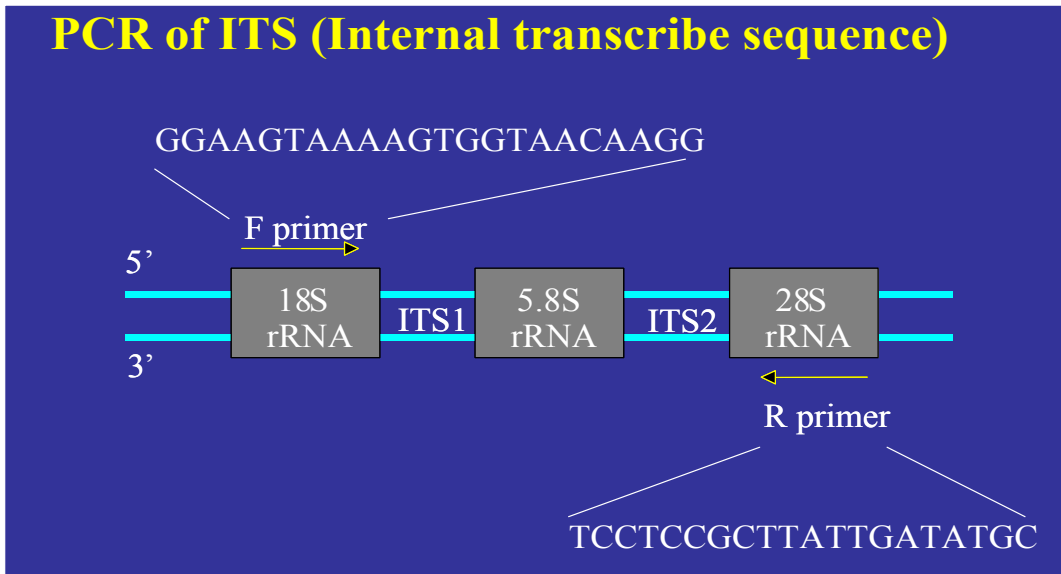
제 1 절 상황버섯 에센스 오일의 생물학적 활성규명

1. 상황버섯의 동정

- 가. 상황버섯 1g을 액체질소로 급속냉동한 후 유발/유봉을 이용하여 미세분말화
- 나. 핵산추출 버퍼를 이용하여 세포벽 파괴
- 다. QIAGEN DNA extraction kit를 사용하여 DNA 추출



라. ITS 지역의 Primer제작 및 PCR유전자 증폭



마. 염기서열 분석 및 NCBI 염기서열 비교를 통한 상황버섯 동정
본 연구에 사용된 수거검체 3종에 대한 ITS부위의 염기서열분석 결과를 다인바이오(주)로부터 수령하여 alignment를 수행

바. 결과

수거검체 3종에 대한 ITS부위의 염기서열분석 결과를 다인바이오(주)로부터 수령하여 alignment를 수행한 결과 각각 *Phellinus igniarius*와 98%, *Phellinus linteus*와 99%, *Phellinus baumii*와 99.8%의 상동성이 나타남

⇒ 유통되고 있는 진흙버섯류의 제품명과 동정결과가 일치하였으며, 이 중에서 초원 농장에서 제공한 상황버섯은 *Phellinus baumii*로 나타나 정유성분 등 에센스 오일 시험을 위한 원료로 제공

[상황버섯의 동정]

```
cggcccttgtcctcaatccattcaaccctgtgcaccctatgggagttactagtcgacag
|||||
cggcccttgtcctcaatccattcaaccctgtgcaccctatgggagttactagtcgacag

ttagttagtagtcgagaggcgaacactcggcggcgaacacttcagctattatcaacctt
|||||
ttagttagtagtcgagaggcgaacactcggcggcgaacacttcagctattatcaacctt

tggtgtcatgtagaatgtaatgctccttgtggcgaaatgaaatacaactttcaacaacg
|||||
tggtgtcatgtagaatgtaatactccttgtggcgaaatgaaatacaactttcaacaacg

gatccttggctctcgcacatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaaatgtgaattg
|||||
gatccttggctctcgcacatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaaatgtgaattg

cagaattcagtgaatcatcgaatcttgaacgcaccttgcgcccttggattccgaggg
|||||
cagaattcagtgaatcatcgaatcttgnacgcaccttgcgcccttggattccgaggg

gcatgcctgtttgagtgtcatgttaatctcgattccccttgttttctaactcgggtgtg
|||||
gcatgcctgtttgagtgtcatgttaatctcgattccccttgttttctaactcgggtgtg
```

Score = 1013 bits (527), Expect = 0.0

Identities = 538/545 (98%)

Strand = Plus / Plus

2. 항산화 작용

피부세포 배양물에 과산화수소를 이용, 활성산소 생성을 유발하여 상황버섯 오일 첨가에 의한 세포 내 활성산소 억제 측정

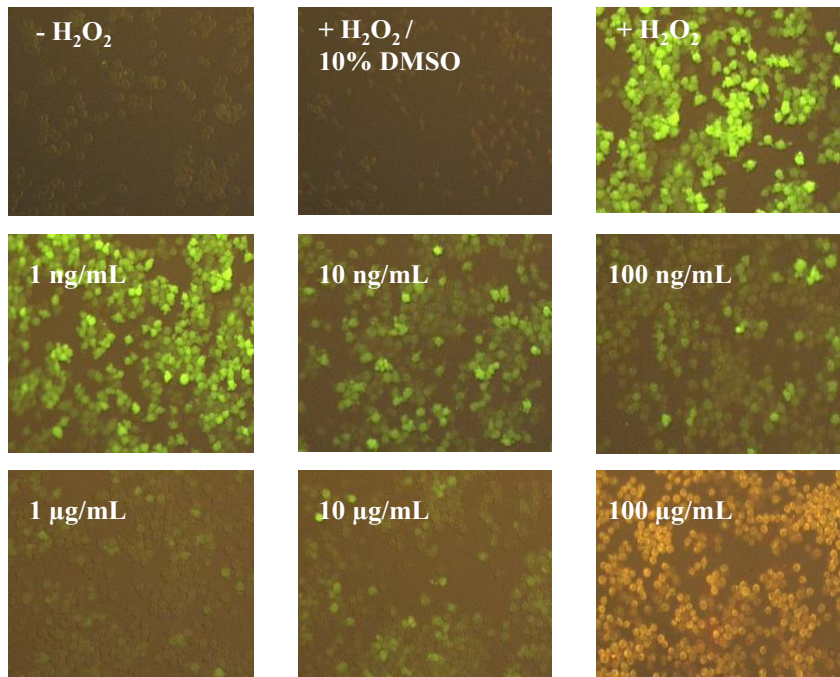


Fig. 1. 상황버섯 에센스 오일에 의한 체내 활성산소 억제 효과

3. 면역세포 증진, 항체 형성능 촉진

인체혈액으로부터 림프구를 분리하여 배양, 상항버섯 에센스 오일을 첨가하여 림프구 성장촉진을 ELISA를 이용하여 측정

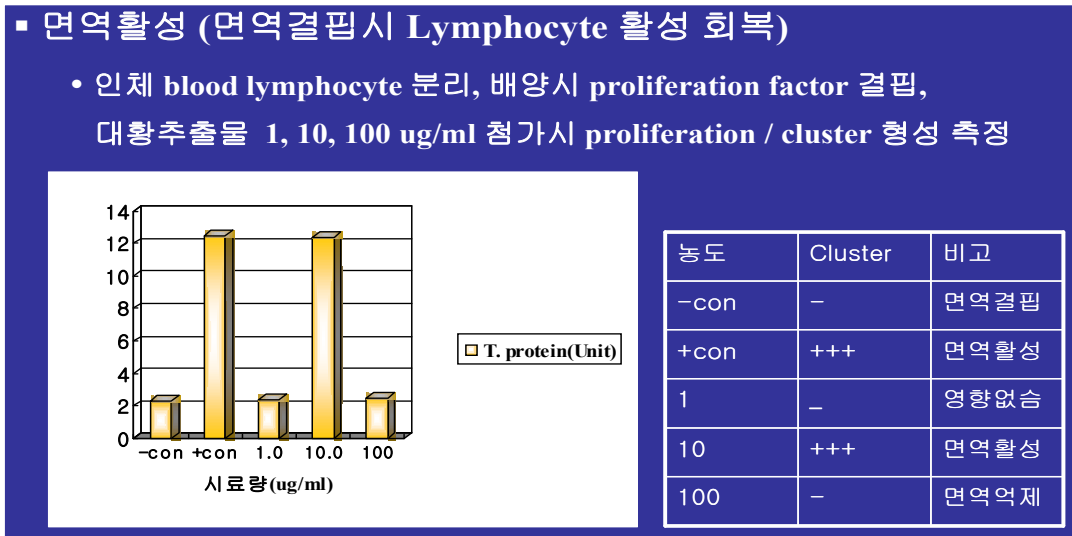


Fig. 2. 림프구성장 촉진을 통한 인체 면역활성 촉진

4. IgE 억제를 통한 피부알러지 보호

IgE 생성 억제를 측정하기 위하여 면역세포(RBL2H3)에 상황버섯 에센스 오일을 첨가하여 세포탈과립화 억제 시험 (그림 3 참조)

- [시험방법]
- ① 24 well plate 한판씩 cell을 seeding한다. (500 μ l씩)
 - ② 24시간 후 phenol red 無첨가 배지로 배지를 교환해준다
 - ③ 배지교환 10분 후 Rat ant-DNP BSA를 3~4시간 처리를 한다.
 - ④ Tyrode B 500 μ l washing 3회, Tyrode B 160 μ l 처리 후 10분 pre-incubation
 - ⑤ Sample(BuOH, DW, EtOAc, MC, hexane) 20 μ l 처리 후 20분 pre-incubation
 - ⑥ DNP BSA 처리 후 30분 incubation, ice에 10분간 incubation
 - ⑦ 4 $^{\circ}$ C 2000rpm에서 10분 원심분리
 - ⑧ 상층액을 25 μ l씩 따서 96well plate 에 옮긴다
 - ⑨ 즉시 pNAG 25 μ l 씩 넣는다 - 37 $^{\circ}$ C incubation 1시간
 - ⑩ Stop sol. 200 μ l - 405nm 측정

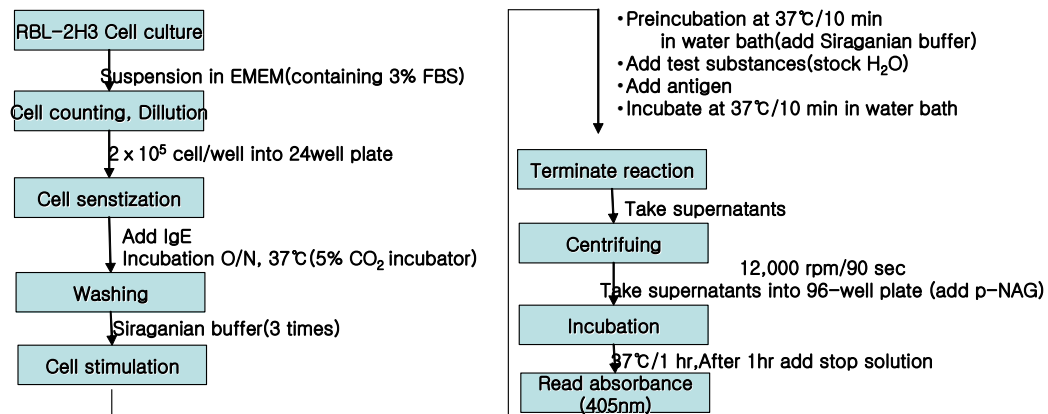


Fig. 3. 면역세포 탈과립화 억제 시험방법

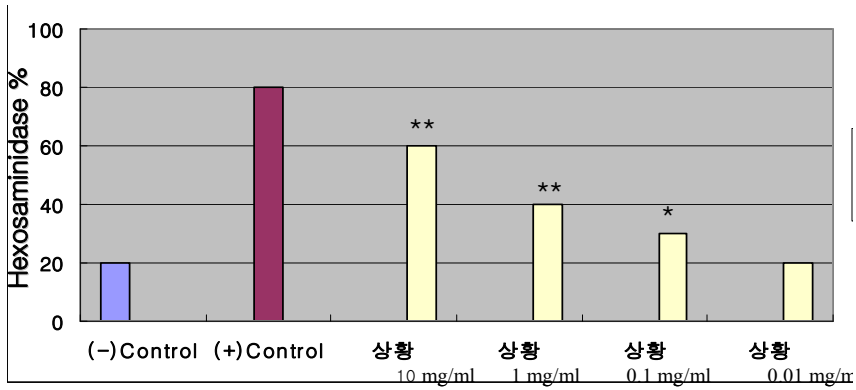


Fig. 4. 비만세포 탈과립화 억제

5. 작용기전 규명

상기의 면역세포 탈과립화는 IgE생성 억제에 의하여 나타나므로 IgE의 생성에 관여하는 IL-4유전자 및 항염증 작용에 관여하는 TNF-alpha를 Real-time으로 측정

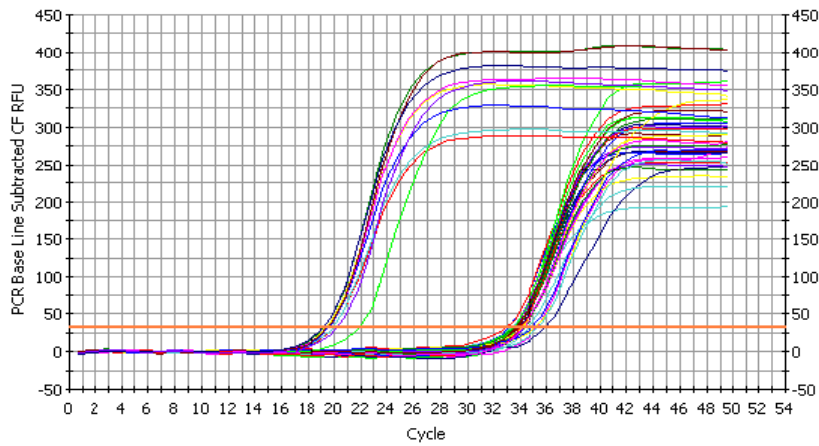


Fig. 5. 염증반응 억제 유전자 평가

가. Real time PCR을 이용하여 피부세포(fibroblast)의 IL-4 및 TNF-alpha에 대한 에센스 오일 농도에 따른 유전자 발현 억제 평가

나. 3차례의 반복시험을 통한 data신뢰도 제고

제 2 절 상황버섯 용매 분획 및 오일 시제품의 생물학적 활성규명

1. 비만세포 탈과립화 억제 평가

RBL-2H3 세포주의 탈과립화 억제 평가를 통하여 항알러지 효과 규명

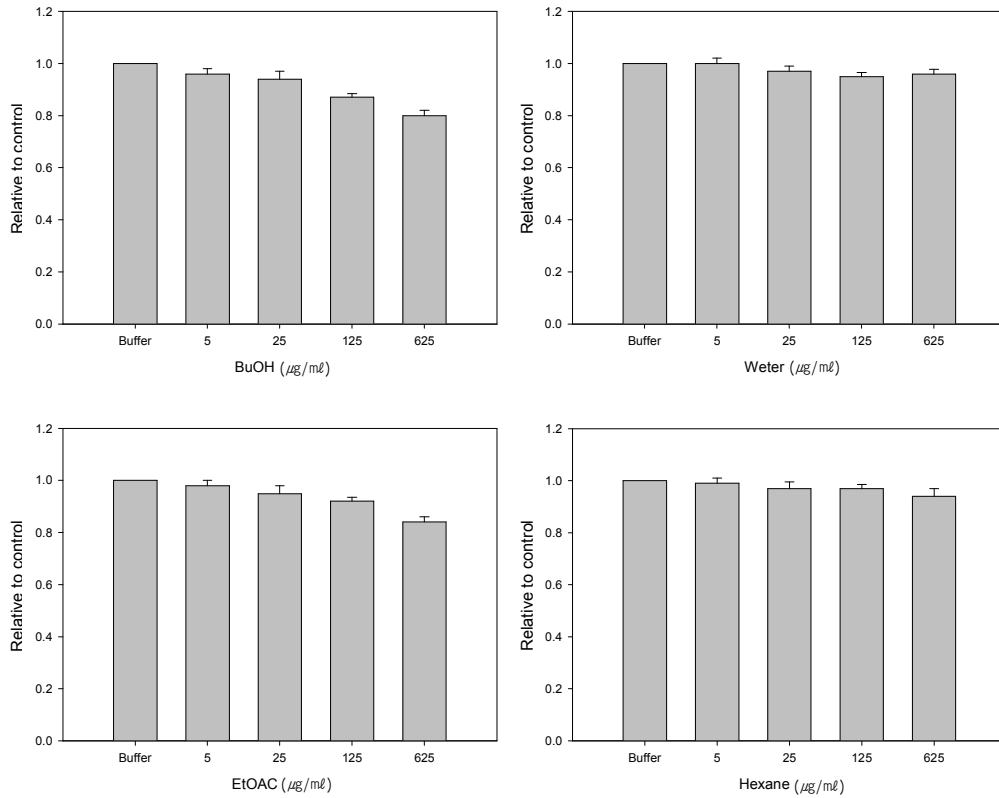


Fig. 6. 상황버섯 용매분획의 탈과립화 억제

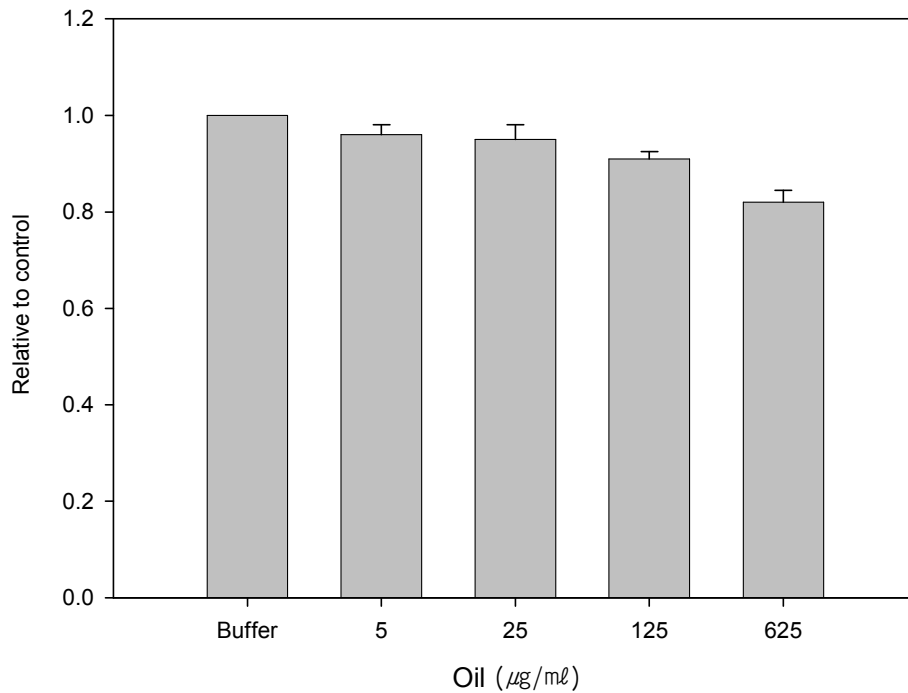


Fig. 7. 상황버섯 오일의 탈과립화 억제

가. BuOH, EA층과 비슷한 정도의 탈과립화 억제결과가 나타나 상황버섯 오일에 함유되어 있는 성분은 극성 방향성 화합물일 것으로 추정

나. 약 10%의 탈과립화 억제효과가 나타남

2. 면역세포 증진, 항체 형성능 촉진

인체혈액으로부터 림프구를 분리하여 배양, 상황버섯 에센스 오일 시제품을 첨가하여 림프구 성장촉진을 DNA 합성량을 통하여 비교

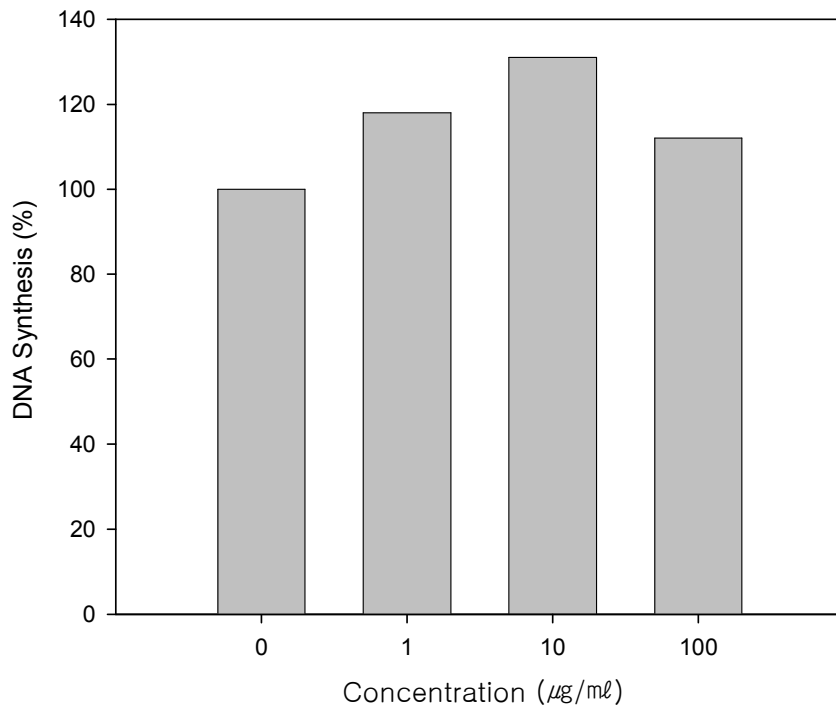


Fig. 8. 상황버섯 오일의 인체 혈액 림프구 cluster 형성촉진 작용

3. Systemic anaphylaxis 억제 효과

Mouse model에서 anaphylaxis를 유발한 쥐에 상황버섯 에센스 오일을 복강주사하였을 때 anaphylaxis억제율 평가, 이를 통하여 항알러지 효과에 대한 동물시험 효능 평가

상기의 혈청에서 histamine 분비 억제 평가

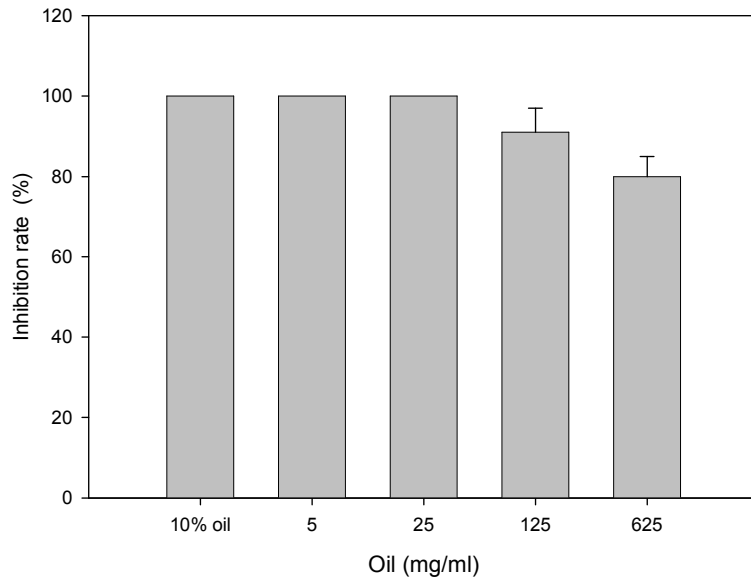


Fig. 9. 상황버섯 오일의 anaphylaxis억제 효과

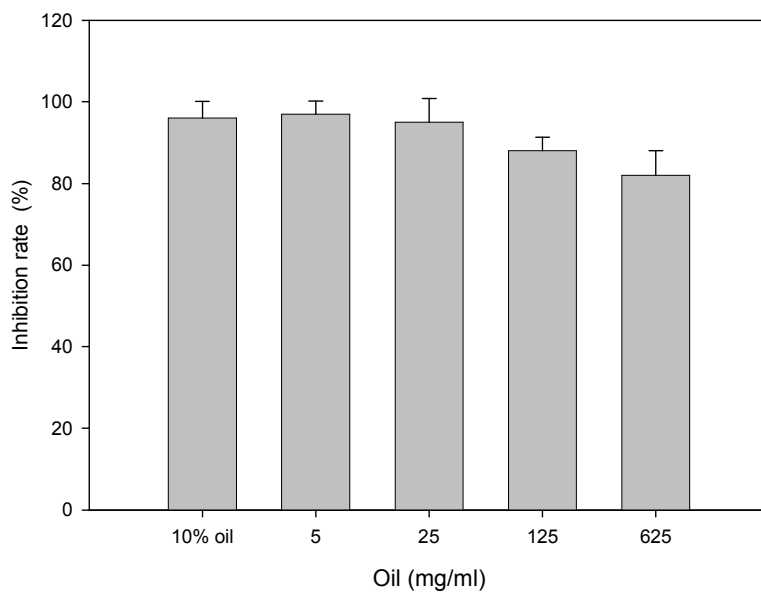


Fig. 10. Histamine 분비 억제

[시험방법]

-Systemic anaphylaxis

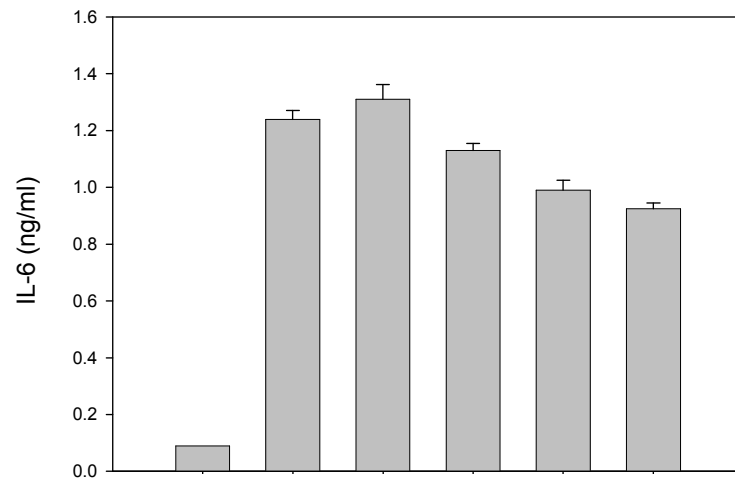
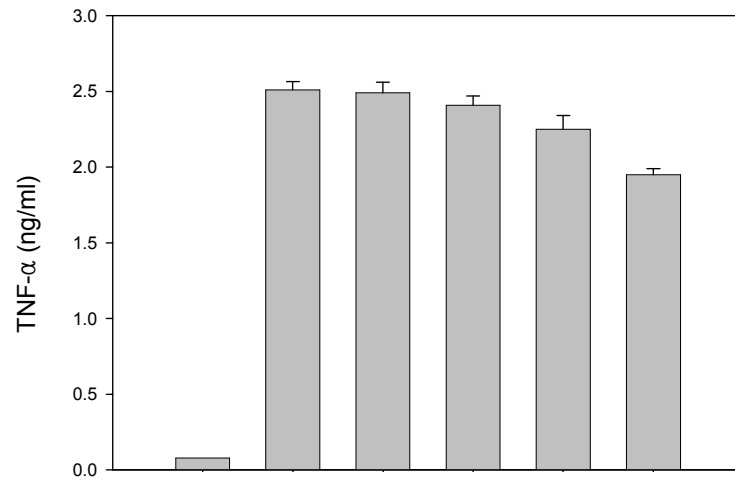
- ① Test 시료(BuOH)를 농도별(5, 25, 125, 625 mg/kg) 복강 투여한다.
- ② 시료처리 1시간 후, compound 48/80을 8mg/kg로 복강 투여한다.
- ③ 1시간 동안 관찰하여 사망하는 mouse수를 기록하고 혈액을 취하여 혈청분리
- ④ 분리된 혈청으로 histamine에 대한 ELISA assay 실시

- Anaphylaxis 시험에서 얻어진 혈청으로부터 histamine에 대한 분석

- ① Systemic anaphylaxis에서 얻은 혈청을 ice에 둔다
- ② Histamine ELISA kit을 이용하여 sample을 acetylation 시킨다.
- ③ Sample 50 μ l을 96 well assay plate에 각각 분주한다. 1hr R.T
- ④ 3회 wash 한다.
- ⑤ Histamine 항체를 처리한다. 3hrs R.T
- ⑥ 3회 wash 한다.
- ⑦ TMB substrate solution을 처리한다. 40min R.T 200rpm
- ⑧ 100 μ l의 stop solution 처리 450nm에서 흡광도 측정

4. Cytokine 발현조절 기능 평가

인체 비만세포인 HMC-1으로부터 상황버섯 에센스 오일 시제품에 의한 Cytokine 발현조절을 평가하기 위하여 Bio-plex system에서 평가



PMA+A23187	-	+	+	+	+	+
Oil (μg/ml)	-	-	5	25	125	625

Fig. 11. Cytokine 발현조절 효과

제 3 절 상황버섯 에센스 오일의 생산공정 연구

1. 상황버섯 에센스 오일 공정개발 연구

: 상황버섯에 함유된 오일성분 및 정유성분을 이용한 실험을 진행하기 위해서 아래의 3 가지 시험법을 사용하여 연구에 적용하도록 하였음.

가. 용매이용 정유성분 추출

·Hexane 용매 추출공정 개발



[*Phellinu baumii*]



·10Kg의 상황버섯을 MeOH로 증탕추출을 한 후 회전농축기(Rotary Evaporator)를 이용하여 농축하고 이 농축 건고물에 정제수와 hexane을 동일량 투여하여 상분리를 시킨다. 분리된 hexane 층을 농축하여 오일을 얻었다. 수율 : 70g

나. 오일용매를 이용 오일로 에센스 오일을 추출

용매 : caprylic/capric acid triglyceride 혹은 Isopropyl myristate
시료 : 상황버섯
비율 : 상황버섯 1Kg에 용매 5Kg
조건 : 50℃ 증탕
수율 : 5.1Kg 회수 (100g의 상황버섯 성분함유 오일 획득)
=> 오일함량 분석 및 추출공정개발에 이용

다. Steam distillation 법

용매 : 수증기
시료 : 상황버섯
무게 : 10kg
조건 : 고압의 steam 증류
수율 : 50g 회수



Steam distillation



Oil-oil extraction

[생산성 평가]

- Oil-oil extraction : 총 생산성은 높으나 순도 낮음, 2차년도 상황버섯 오일 함유량 평가가 필요
- 용매 추출 : 순도 및 생산성이 높으나, 용매제거 시 소실을 증가 -> 2차년도 공정개발 필요
- Steam distillation : 순도가 높으나, 생산성이 낮음 -> 고압 및 증류조건 개선

2. 오일추출법 검토 및 비교

: 상황버섯 에센스 오일의 생산공정 상의 장/단점 평가하고자 표준공정 설정하여 각 생산공정을 실험실 규모로 시행하였으며 각 공정의 특징을 조사하였음.

가. 증류법에 의한 추출

공정요약	
	<ol style="list-style-type: none"> ① 상황버섯을 가루내어 10Kg을 준비한다. ② 상황버섯 가루를 스팀 증류기에 일정한 두께로 고르게 투입한다. ③ 125℃의 스팀을 추출기 하부를 통하여 투입하여 스팀이 상황버섯 층을 통과하게 한다. ④ 스팀을 냉각기로 보내어 냉각시켜 스팀과 함께 나온 오일을 분리한다. ⑤ 오일의 분리를 용이하게 하고 오일의 함량을 증가시키기 위하여 천일염을 소량가한다. ⑥ 상부의 오일을 분액한다.

공정요약	
	<ul style="list-style-type: none"> ·장점 : 순수한 오일을 얻기가 용이하다. ·단점 : 상황버섯의 투입량에 비하여 그 수율이 저조하다. ·따라서 생산성을 높이기 어렵다. ·10Kg에서 얻은 오일 함량 : 약 5g

나. 용매 추출법에 의한 추출

공정요약	
	<p>① MeOH을 이용하여 증탕추출한다.</p> <p>② 추출액을 여과후 농축하고 농축한 액에 일정량의 물을 가하고 여기에 일정량의Hexane을 가하여 층분리를 한다.</p> <p>③ 상층의 Hexane 층을 분리하여 감압농축하고 수회 증류수를 이용하여 washing한다.</p>

공정요약	
	<p>·장점 : 오일의 추출이 용이하고 수율도 상대적으로 높다.</p> <p>·단점 : 추출에 사용한 용매가 유기 용매로 잔류의 위험성이 있다. 따라서 오일의 추출은 용이하고 수율도 높으나 잔류하는 용매를 제거하는 별도의 공정이 필요하며, 설비 및 생산 단가를 높인다.</p> <p>·수율 : 10Kg에서 얻은 오일 함량 : 약 50g</p>

다. 일반 오일을 용매로 한 추출

공정요약	
	<p>화장품 원료로 등재되어 있는 극성을 띠는 오일과 비극성의 오일을 이용하여 상황버섯을 추출한다.</p>

공정요약	
	<p>·장점 : 안전한 상황버섯 오일을 추출할 수 있다.</p> <p>·단점 : 상황버섯 오일 이외의 일반 성분도 용매의 극성에 따라 추출되어진다. 따라서 오일의 순도는 다소 저조할 수 있으나 안전성, 생산 비용 등이 저렴하여 생산적 가치를 가지고 있다.</p> <p>·수율 : 1Kg에서 얻은 오일 함량 : 약 3kg</p>

라. 초음파 추출법에 의한 추출

공정요약	
	오일의 추출함량을 증가시키기 위해 초음파(약 500W) 추출기에 상황버섯과 화장품 원료로 등재된 오일을 용매로 하여 추출을 한다. 이때 온도는 약 50℃를 넘지 않게 한다.

공정요약	
	<p>·장점 : 안전한 상황버섯 오일을 추출할 수 있다.</p> <p>·단점 : 상황버섯 오일 이외의 일반 성분도 용매의 극성에 따라 추출되어진다. 따라서 오일의 순도는 다소 저조할 수 있으나 오일을 안전성, 생산 비용 등이 저렴하여 생산적 가치를 가지고 있다. 그리고 초음파에 의한 오일의 추출 수율이 증가한다.</p> <p>·수율 : 1Kg에서 얻은 오일 함량 : 약 3kg</p>

마. 초음파 추출 장치를 변형한 증류법에 의한 추출

공정요약	
	<ol style="list-style-type: none"> ① 상황버섯을 초음파 추출기에 투입한다. ② 상황버섯에 증류수를 상황버섯이 잠길 정도로 투입한다. ③ 초음파 추출기의 온도를 약 50도로 조정한다. ④ 2시간 정도 가열 증탕 추출을 한다. ⑤ 증류한 액을 냉각시킨다. ⑥ 수층에 천일염을 투여하여 유수의 분리를 용이하게 하고 오일의 추출함량을 높인다.

공정요약	
<p>·장점 : 순수한 오일을 얻기가 용이하다.</p> <p>·단점 : 상황버섯의 투입량에 비하여 그 수율이 저조하다. 따라서 생산성을 높이기 어렵다. 그러나 일반적인 증류법 보다 생산 수율이 상대적으로 높다.</p> <p>·수율 : 5Kg에서 얻은 오일 함량 : 약 6kg</p>	

⇒ 공정검토결과 제품 적용을 위하여 오일을 용매로 한 초음파 추출공정을 최종 제품화 적용을 위한 공정으로 선정하였으며 이후 표준공정개발을 위한 시험을 진행하였음

제 4 절 상황버섯 에센스 오일의 생산공정 표준화 및 제제화 연구

1. 공정표준화 연구

상황버섯 100kg(상품화 후 잔여물)을 처리하여 제품개발용 시생산을 실시하였다. 증류수 스티를 사용하여 2시간 증류를 실시한다. 유수를 분리하여 Essential oil 13mL과, 오일함유 증류수 200kg을 얻었다. 증류 후 잔사를 건조후 Isopropyl myristate을 사용하여 1차 초음파 추출, 2차 침적추출과정으로 oil extraction을 실시하였다. 제균필터하고 최종 추출물로 70kg을 얻었다. 효능 및 독성시험을 위한 원료에는 방부제 처리전에 샘플링하여 성균관대학교에 제공하였다.

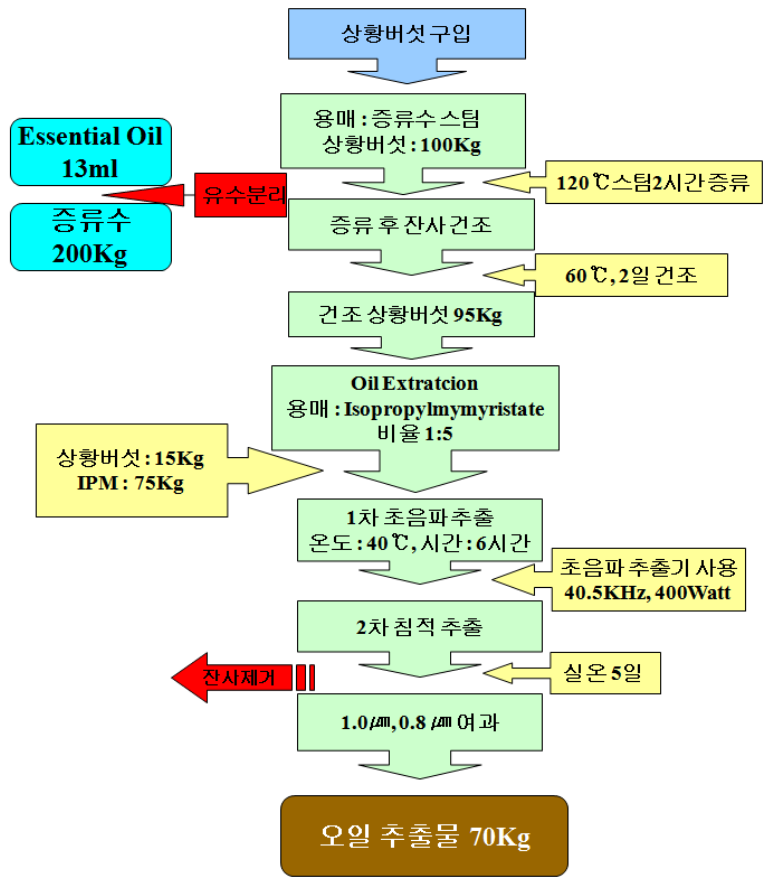


Fig. 12. 상황버섯 오일 추출과정

Essential oil의 경우 carrier oil을 사용하여 최종 160mL의 오일을 수득하였으며 오일함유 증류수의 경우 방부제로 phenoxy ethanol 을 처리하였고 섞여있는 오일상을 가용화되도록 가용화제로 Poly oxy ethylene을 처리하여 최종 오일함유 증류수를 만들어 내었다.

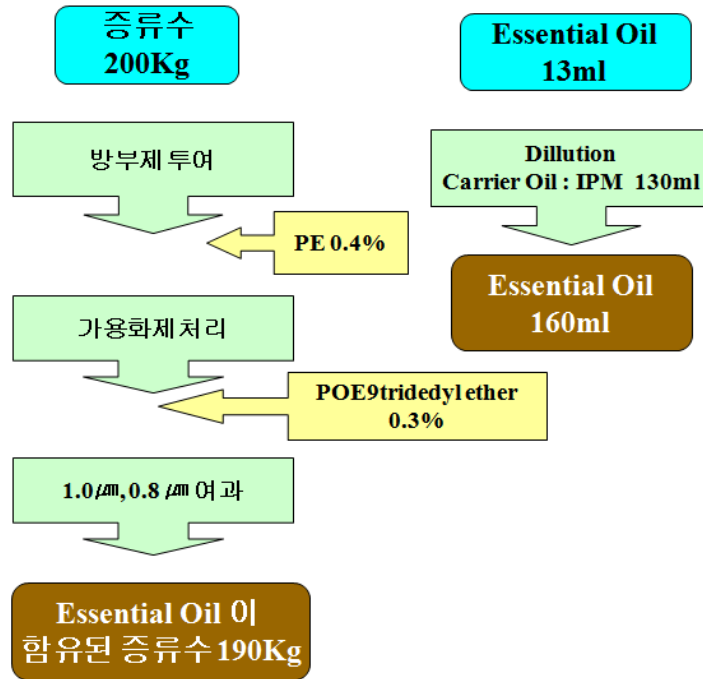


Fig. 13. 오일함유 증류수 및 에센셜 오일 제조과정 요약



Fig. 13. 최종 추출산물



Fig. 15. 상항버섯 에센셜 오일 추출장치



Fig. 16. 추출 샘플

2. 제제화 연구

상황버섯 에센스 오일을 이용한 화장품개발 및 아토피 효능에 대한 사전시험을 위하여 기존 base에 대하여 상황버섯 오일함유 증류수와 상황버섯 오일추출물에 대하여 물성에 맞는 formulation을 적용하여 아래의 내용과 같이 제제적용을 실시하였음

상	성분	합량	상	성분	합량
수상	상황버섯 증류수	77.090	유상	Olivem 1000	1.000
	Glycerine	10.000		Lanette O	2.000
	Hyaluronic Acid	5.000		Tego care 450	2.000
	Silicon oil	0.200		Puresyn 4	2.000
	Microcide-C	0.200		상황버섯 오일	10.000
	EDTA-2Na	0.010		DC 200/6cs	2.500
	Di water	0.000		Lipex Shea	1.000
	Keltrol F(1%)	5.000		Vitamin E Acetate	0.500
	Sepiplus 400	0.300		D-P	0.100
안정제	Di water	2.000	BHT	0.020	
	TEA	0.200			

제 5 절 상황버섯 에센스 오일의 성분분석 연구

1. 에센스 오일 성분분석

상황버섯 에센스 오일(순수 오일)의 표준화 및 품질관리를 위한 분석에 대하여 GC를 이용하여 Camphor와 Borneol을 지표성분으로 설정하고 이에 대한 분석법 Validation과 함량분석을 실시하였음

(1) 사용기기 및 분석조건

GC	HP6890 series	
Detector	FID	
Column	DB-1(60m, 0.32ID)	
carrier gas	N ₂	
유속	15psi	
분석온도	oven	180(20)-5-250(5)
	injector	280 °C
	detector	300 °C
injection	1 µl	
split	5:1	

(2) 표준품 및 분석 샘플 제조

* Camphor(99.8%) 0.08043g/50ml MeOH

Borneol(96.9%) 0.08077g/50ml MeOH

→ 두 용액 각 5ml 씩 합하여 최종 50ml이 되도록 한 후 희석하여 검량선 도출함.

* oil sample : 0.05082g/25ml MeOH

ext. sample : 0.5066g/50ml MeOH

* 검량선

- Camphor : $Y=2.4631X-0.8617$, $R^2=0.9996$

- Borneol : $Y=2.4138X-0.8413$, $R^2=0.9995$

* Retention time(min) : camphor 10.15 min / Borneol 13.49min

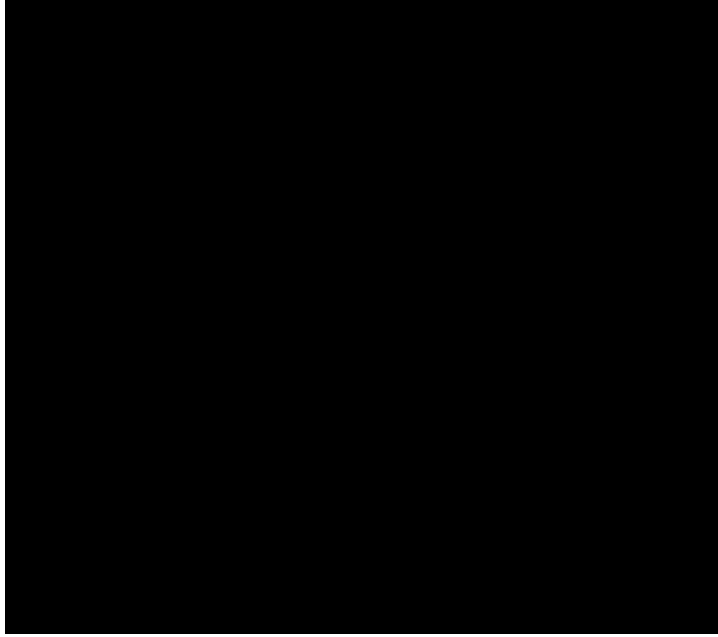


Fig. 17. Camphor 표준품을 이용한 검량선

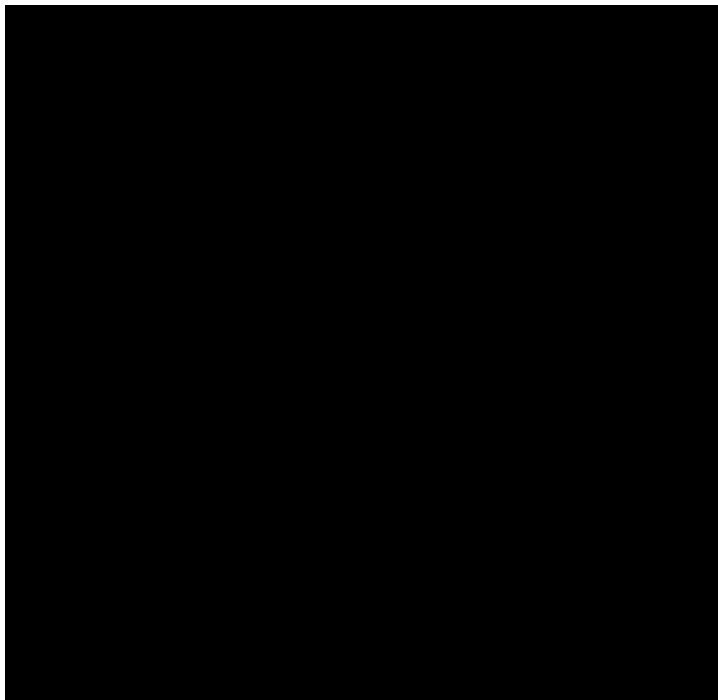


Fig. 18. Borneol 표준품을 이용한 검량선

(3) 분석결과

Sample	Camphor peak area	Borneol peak area	Camphor 함량(%)	Borneol 함량(%)
oil	309.77509	24.02539	6.20	0.51
	314.31754	23.27312	6.29	0.49
	평균값		6.25 %	0.50 %
ext.	검출안됨	검출안됨	-	-

* oil 샘플의 경우 11.69 min major peak 검출

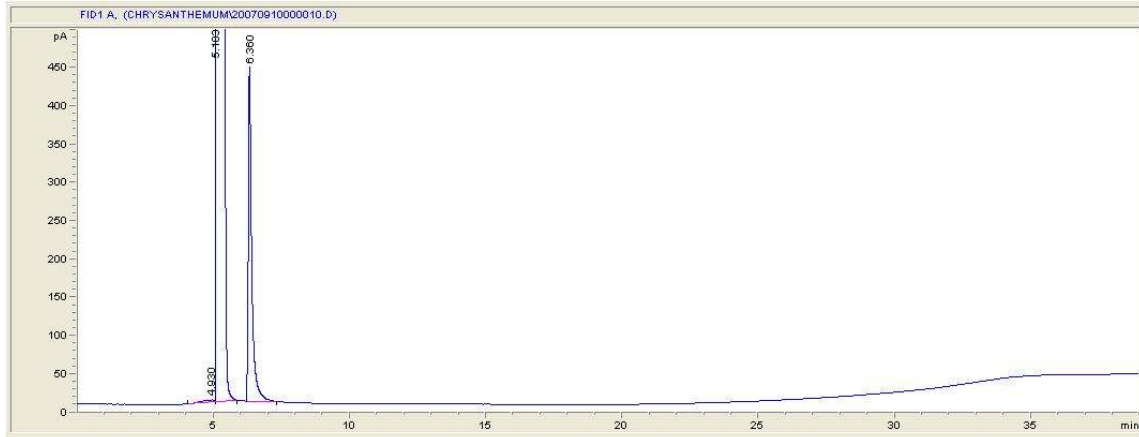
* ext. 샘플의 경우 6.36 min major peak 검출

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	4.93	111.4	2.9	0.4514	0.015	4.202
2	5.103	735914.8	95366.1	0.1286	99.465	6.85E-2
3	6.36	3848.4	436.2	0.1249	0.520	0.459

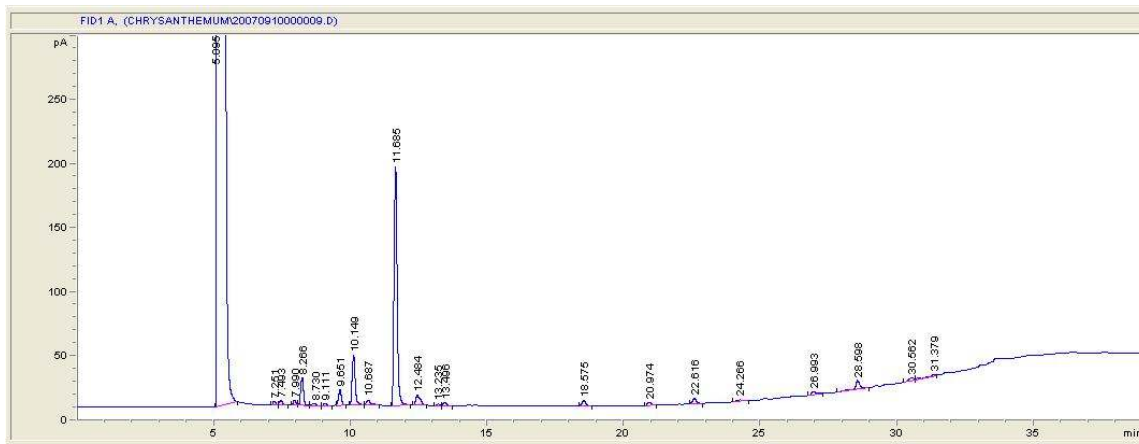
#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	5.095	767892.6	97434.1	0.0949	99.662	6.17E-2
2	7.251	20.6	3	0.1044	0.003	0.918
3	7.493	27.3	3.3	0.1123	0.004	1.109
4	7.99	26.9	3.7	0.1161	0.003	0.927
5	8.266	159.7	21.5	0.1207	0.021	1.169
6	8.73	15.7	1.2	0.1653	0.002	2.711
7	9.111	11.4	1.5	0.1201	0.001	1.077
8	9.651	90	12.3	0.1113	0.012	1.151
9	10.149	309.8	38.7	0.1275	0.040	0.863
10	10.687	51.5	4.2	0.1777	0.007	0.685
11	11.685	1477.2	186.2	0.1246	0.192	0.907
12	12.484	90.4	7.7	0.1691	0.012	0.536
13	13.235	10.8	1.2	0.1288	0.001	1.013
14	13.496	24	2.7	0.1365	0.003	0.918
15	18.575	41	4.1	0.1515	0.005	0.957
16	20.974	25	2.4	0.155	0.003	1.005
17	22.616	39.6	4.1	0.1363	0.005	0.783
18	24.266	14.1	1.2	0.1681	0.002	1.133
19	26.993	30.6	2.3	0.1884	0.004	0.756
20	28.598	75.6	6.8	0.1643	0.010	0.907
21	30.562	26.4	2	0.1704	0.003	1.492
22	31.379	34.8	1.5	0.2967	0.005	5.454

위: ext. sample 분석결과
아래: oil sample 분석 결과

<ext. 분석>



<oil sample>



2. GC-MS를 이용한 성분규명 연구

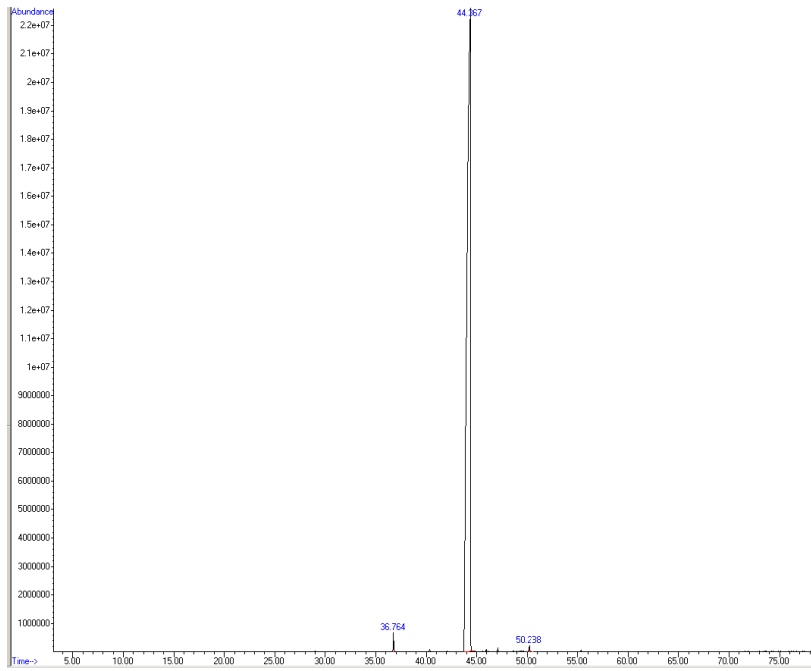
Instruments	Conditions
GC/MSD	Hewlett Packard 6890 series II/HP 5975 MSD
Column	DB-5 (0.25 μ m \times 30m \times 0.25mm)
Injection temp.	280 $^{\circ}$ C
Injection volume	1 μ l
Oven temperature	60 $^{\circ}$ C \rightarrow 3 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 250 $^{\circ}$ C(10min)
Carrier gas flow	1.0ml/min(He)
Ionization voltage	Electron impact mode with electron energies of 70eV
Monitoring mode	Selected ion monitoring(SIM) mode
Search Library	Wiley7Nist05.L

< IPM >

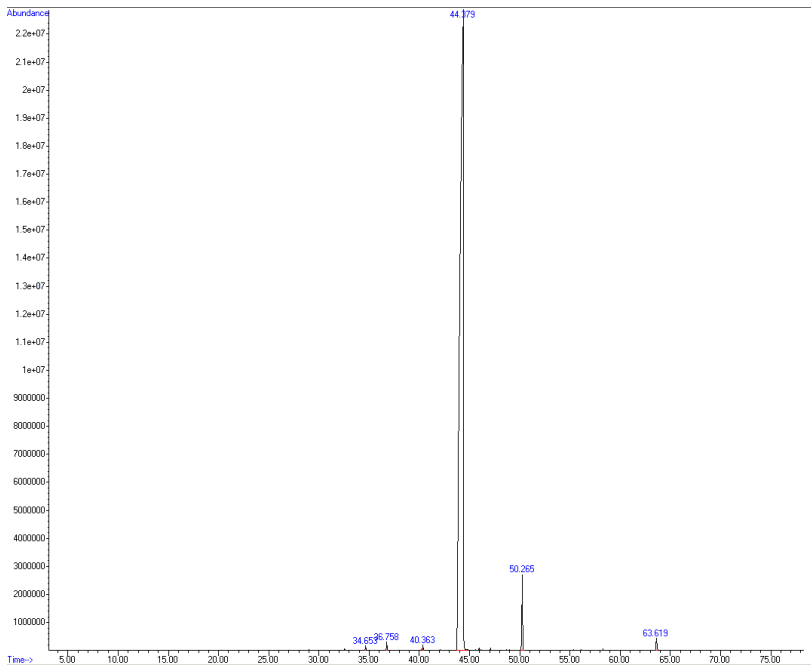
RT	Library/ID	Area	Area Pct	Qual
36.7626	Isopropyl laurate	23381286	0.4587	91
44.3718	Isopropyl Myristate	5065768769	99.3727	99
50.2407	Isopropyl Palmitate	8594440	0.1686	89

< Essential oil extract >

RT	Library/ID	Area	Area Pct	Qual
34.6549	Isopropyl 4-methylbenzenesulfonate	5699390	0.1065	98
36.7627	Isopropyl laurate	9746092	0.1821	91
44.3815	Isopropyl myristate	5207193968	97.2773	99
50.2601	Isopropyl Palmitate	106400502	1.9877	86
63.6191	dl-2-Ethylhexyl chloroformate	16745145	0.3128	64

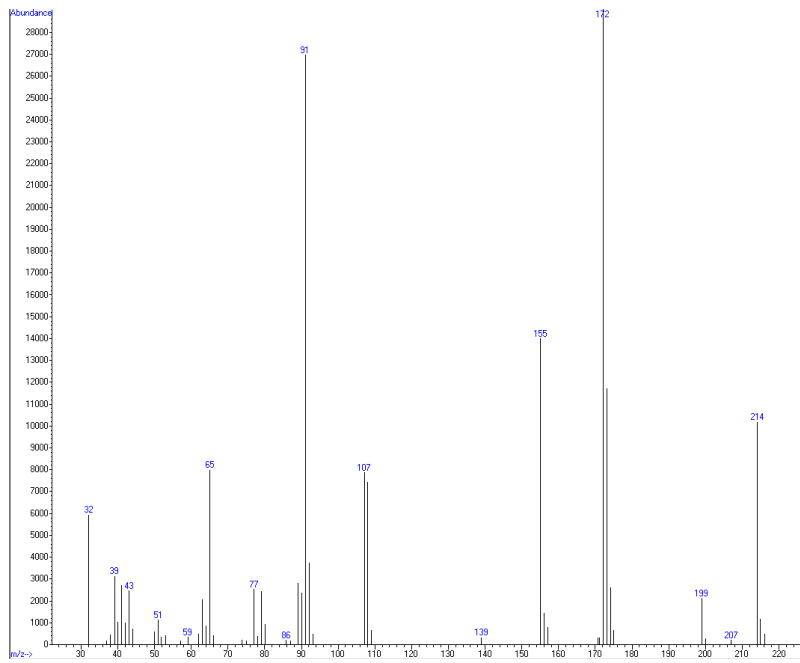


[Isopropyl myristate]

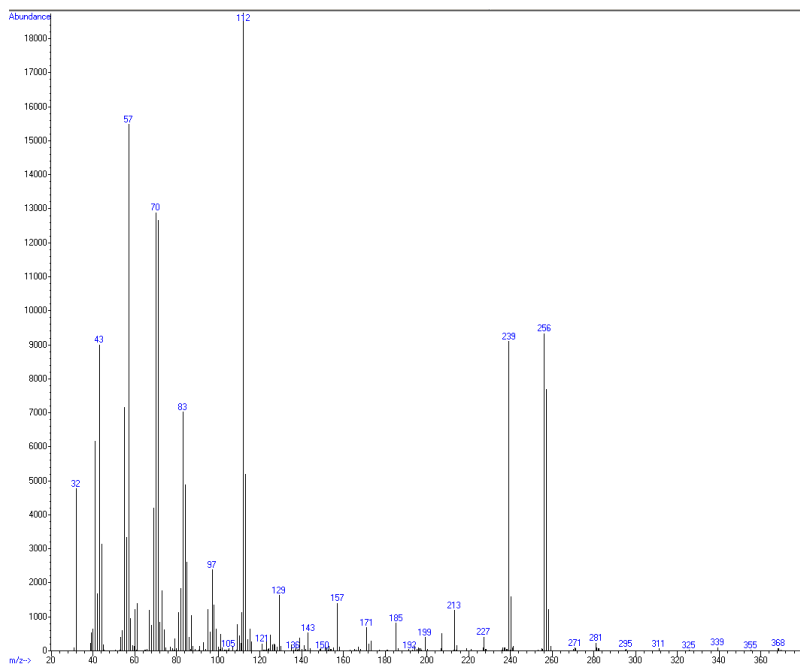


[Sanghwang Essential oil extract]

– Isopropyl 4-methylbenzenesulfonate : RT (34.7 min)



– dl-2-Ethylhexyl chloroformate : RT (63.6 min)



제 6 절 상황버섯 에센스 오일의 개발 및 효력/독성 전임상

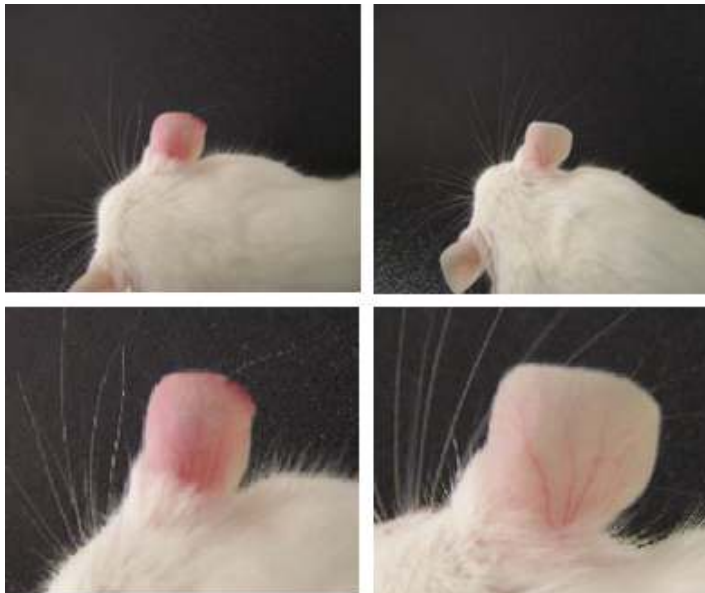
1. 피부트러블 억제

가. Benzoic acid 등 염증유발 물질을 마우스의 귀에 처치하고 상황버섯 에센스 오일에 의한 피부트러블 완화 또는 억제 규명

나. Chemical을 이용 피부 염증 유발 후 상황버섯 에센스 오일을 Olive oil에 희석하여 Olive oil을 대조군으로 하여 시험 실시 (무처치군은 음성대조군)

다. 결과

상황버섯 에센스 오일이 5% 함유된 Olive oil 및 chemical을 동시에 처리하였을 때 (시험군) 마우스의 귀에 피부트러블 및 염증이 유도되지 않았다.



2. 피부암 억제

피부암세포 (마우스 melanoma, B6BL16)를 마우스의 등배부에 주입하여 암세포에 의한 동물사망 억제 (Life span 증가) 및 암세포 크기를 측정

가. 시험기간 중 사망동물은 비처리군 (N.C)에서 1례 관찰

나. 암세포의 무게 변화는 음성대조(N.C)군에 비해 상황버섯 에센스 오일 10ml/kg /day 투여군에서, 암세포의 크기가 42.54% 감소

[Life span]

Group	22	23	24	25	26	27	28	..	37
C ¹⁾	0	0	0	0	0	0	0	..	0
N.C ²⁾	1	0	0	0	0	0	0	..	0
T1 ³⁾	0	0	0	0	0	0	0	..	0
T2 ⁴⁾	0	0	0	0	0	0	0	..	0

- 1) 피부암 비유도
- 2) 피부암 유도/무처리군
- 3) 피부암유도 10mg/kg 상황버섯 오일
- 4) 피부암유도 20mg/kg 상황버섯 오일

3. 상황버섯 에센스 오일의 단회 투여 독성

가. 실험재료 및 방법

1) 시험물질

시험물질은 (주)더마랩에서 공급받은 상황버섯 에센스 오일을 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 SPF(특정병원체 부재) ICR계 마우스를 중앙실험동물(주)로부터 분양하여 약 1주일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 배기 10~12회, 형광등 명암 12hrs cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 폴리카보네이트 사육상자(260W×420L×180H mm)에 5마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 물과 사료는 자유로이 공급하였다.

3) 시험군의 구성 및 용량설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였으며 각 군의 평균체중에 대한 군간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 단회투여시험에서 각 군은 암수 각 5마리씩 10마리로 구성하였으며, 투여용량의 설정은 예비시험결과 및 시험물질의 용해도 등을 고려하여 3단계의 등비용량(공비 2)으로 고용량군(50ml/kg), 중용량군(25ml/kg) 및 저용량군(12.5ml/kg)으로 설정하였으며, 대조군은 용매처치군으로 하여 1회 경구투여하였고, 2주간 관찰하였다.

4) 투여약액의 조제 및 투여방법

(주)더마랩에서 제공받은 시험물질인 상황버섯 에센스 오일을 용량별로 투여직전에 측정된 체중에 따라 시험물질의 투여량을 산출하여 마우스에 경구투여하였다.

5) 관찰 및 검사항목

가) 일반증상관찰

모든 실험동물에 대한 임상증상은 투여당일에는 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간, 투여 1일부터 7일까지는 1일 1회 이상씩 일정시간에 관찰하여 14일 동안 일반상태의 변화, 중독 증상 발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대해 주의하여 관찰하였다.

나) 체중측정

시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여당일 (0일), 7일, 부검시에 측정하여 기록하였다.

다) 부검

시험종료 후 생존례는 부검전에 체중을 측정하고 ether 마취하에 방혈치사시킨 다음 외관 및 내부장기 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다.

라) 통계학적 분석

시험물질에 대한 LD₅₀는 Litchfield & Wilcoxon법으로 산출하며, 그 외 본 실험에서 얻어진 체중 등의 자료에 대한 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 대조군과의 구간 유의성을 검정하였다.

나. 결과

1) 사망동물 및 임상증상의 관찰

전 투여군에서 사망 개체가 관찰되지 않았으며(Table 1), 특이할 만한 임상증상도 관찰되지 않았다(Table 2).

2) 체중변화

모든 생존개체 투여용량군에서 유의성 있는 체중 증감은 관찰되지 않았다(Table 3).

3) 육안적 부검소견

전 투여군 모두에서 특이할 만한 부검소견이 관찰되지 않았다(Table 4).

⇒ 본 시험에서 시험물질 투여와 관련된 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았으며 LD₅₀값은 50ml/kg을 훨씬 상회할 것으로 사료되었다. 이상의 결과에서 상황버섯 에센스 오일은 마우스에 의한 단회 경구투여 급성독성시험에서 안전한 물질인 것으로 판단되었으며, 따라서 식품 및 화장품 소재로의 이용에 적합할 것으로 사료된다.

Table 1. Mortality of the mice orally treated with the essential oil from *Phellinus baumii* once

Sex	Dose (ml/kg)	No. of mice	Hours after administration						Days after administration						Final mortality		
			1	2	3	4	5	6	3	6	10	11	12	13		14	
Male	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	12.5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	25	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	50	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	12.5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	25	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	50	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Table 2. Clinical signs of the mice orally treated with the essential oil from *Phellinus baumii* once

Sex	Dose (ml/kg)	Clinical signs	Days after administration								
			0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	Control	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	12.5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	4	5
	25	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	50	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	Control	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	12.5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	25	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	50	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5

NAD : Not abnormalities detected

Table 3. Body weights of the mice orally treated with the essential oil from *Phellinus baumii* once

Sex	Dose (ml/kg)	Number of mice	Days after administration				
			0	7	14		
Male	Control	5	Mean	33.7	37.7	41.7	
			S.D.	1.47	1.44	2.42	
	12.5	5	Mean	34.8	38.9	40.8	
			S.D.	2.80	2.62	2.13	
	25	5	Mean	33.5	40.2	41.7	
			S.D.	1.87	2.63	1.96	
	50	5	Mean	34.0	36.4	39.2	
			S.D.	2.06	2.37	1.23	
	Female	Control	5	Mean	32.8	37.9	38.5
				S.D.	1.75	2.47	2.75
12.5		5	Mean	35.5	34.9	38.9	
			S.D.	2.64	2.51	2.14	
25		5	Mean	35.0	37.5	40.3	
			S.D.	2.94	2.02	2.22	
50		5	Mean	34.5	39.1	39.8	
			S.D.	2.20	2.72	2.58	

S.D. : Standard deviation

Table 4. Gross findings of the mice orally treated with the essential oil from *Phellinus baumii* once

Incidence of gross findings									
		Male				Female			
Dose(ml/kg)		Control	12.5	25	50	Control	12.5	25	50
No. of mice		5	5	5	5	5	5	5	5
Items									
Adrenal gland									
NGF		5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain									
NGF		5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart									
NGF		5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver									
NGF		5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney									
NGF		5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen									
NGF		5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis									
NGF		5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)				
Ovary									
NGF						5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus									
NGF		5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

NGF : No gross finding, () : Percent of no gross finding

4. 상황버섯 에센스 오일의 피부 자극 시험

가. 실험재료 및 방법

1) 시험물질

시험물질은 (주)더마랩에서 공급받은 상황버섯 에센스 오일을 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 New Zealand White계 토끼를 (주)오리엔트 바이오로부터 분양하여 21일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 배기 10~12회, 형광등 명암 12hrs cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 스테인레스제 사육상자(380W×500L×330H mm)에 1마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C 에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 사료는 자유섭취시켰고 음수는 정수과정을 거친 상수도수를 자동급수시켰다.

3) 시험군의 구성 및 용량설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하였다. 동물의 개체식별은 순화기간 중에는 좌측 귓바퀴 내부, 시험기간 중에는 우측 귓바퀴 내부에 유성 매직으로 동물번호를 표시하고 개체 식별 카드 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 시험군은 6마리로 구성하였으며, 투여용량의 설정은 일반적인 피부자극시험에 많이 사용되는 용량인 0.5ml씩 건강 피부와 찰과 피부에 적용하여 시험물질을 처치하지 않은 건강 피부 및 찰과 피부와 비교하였다. 예비시험결과 및 시험물질의 용해도 등을 고려하여 50% 농도를 처치 농도로 설정하였다.

4) 투여약액의 조제 및 투여방법

(주)더마랩에서 제공받은 시험물질인 상황버섯 에센스 오일을 사용하였으며, 처치경로는 경피 적용하였다. 시험물질 처치 24시간 전에 전기 제모기를 이용하여 토끼의 피부에 상처가 생기지 않도록 가로 세로 약 10cm씩의 제모된 건강한 피부를 만들었다. 제모된 피부는 좌우로 나누어 좌를 처치구획, 우를 대조구획으로 하고 처치구획과 대조구획의 건강피부 또는 찰과 피부가 서로 대각선으로 분포하도록 구분하여 2.5cm × 2.5cm의 건강 (비찰과) 피부 2개소와 찰과 피부 2개소를 유성펜으로 표시하였다. 찰과 피부는 주사침 끝을 이용하여 표피는 손상되나 진피는 손상되지 않게 출혈이 생기지 않도록 찰과상을 입혀서 만들었다. 처치방법으로는 가로 세로 2.5cm의 처치구획 피부 부위에 0.5ml의 시험물질을 적용한 거즈를 덮어 시험물질과 피부가 잘 접촉할 수 있도록 하였다. 거즈 위에는 시험물질의 증발을 막기 위하여 침투성이 없고 자극성이 낮은 호일로 덮은 다음 종이테이프로 고정하였으며 처치 횟수는 처치 당일 1회 적용하였다.

5) 관찰 및 검사항목

가) 일반증상 및 사망동물의 관찰

시험 기간 중 모든 실험동물에 대하여 매일 1회 이상 일반상태의 변화, 사망동물의 유무 및 시험물질 처치 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대해 주의하여 관찰하였다.

나) 체중측정

시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 처치 전과 처치 후 24시간 및 72시간 후에 체중을 측정하여 기록하였다.

다) 처치부위의 육안적 관찰

처치부위의 육안적 변화는 처치 후 24시간 및 72시간에 관찰하였다.

라) 자극성의 평가

시험물질은 적용 24시간 경과 후 제거하고, 피검 시험물질이 잔류하지 않도록 생리식염수로 가볍게 씻어내었다. 시험물질 처치 후 24시간 및 72시간째에 도포 국소 부위의 홍반, 부종, 출혈, 가피 형성 등의 변화를 육안적으로 관찰하였다.

홍반과 가피형성 및 부종의 출현은 염증 반응을 근거하여 판정하는 것으로 홍반은 육안적으로, 부종은 가벼운 촉진을 병행하여 판정하였다. 피부 반응의 정도는 처치 후 24시간 및 72시간에 피부반응 기준에 따라 채점하여 기록하였다.

※ 피부 반응 평가 기준

① 홍반과 가피형성

반응	점수
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반(홍당무 색의 발적)과 가벼운 정도의 가피	4
총 가능한 홍반 점수	4

② 부종형성

반응	점수
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종(뚜렷하게 부어올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종(약 1mm정도 부어올랐을 경우)	3
심한 부종(1mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태)	4
총 가능한 부종 점수	4

마) 피부반응 성적의 평가

피부 반응을 채점한 것을 이용하여 시험물질 처치 후 24시간과 72시간 때의 홍반 평점과 부종 평점을 더해서 평균치를 산출하고, 이 수치로 피부자극성을 평가하였다. 이때 시험물질의 자극성은 일차자극지수외에도 시험기간 중 관찰된 일반증상 등을 고려하여 평가하였다.

※ 피부 일차 자극표

일차자극지수(P.I.I.)*	구분
0.0 ~ 0.5	비자극성
0.6 ~ 2.0	약한 자극성
2.1 ~ 5.0	중등도 자극성
5.1 ~ 8.0	강한 자극성

*P.I.I.(Primary Irritation Index : 일차자극지수) = 평균의 합계/4

나. 결과

1) 일반증상관찰 및 사망률

시험 전기간 동안의 일반증상 및 사망동물을 관찰한 결과 모든 동물에 있어서 시험물질의 처치에 의한 변화로 인정되어지는 일반증상은 관찰되지 않았다. 사망 동물도 관찰되지 않았다 (Table 5).

2) 체중변화

시험기간 동안 체중변화는 정상적인 성장을 보여 주었다 (Table 6).

3) 처치부위의 육안적 관찰

시험물질 처치 후 24시간 및 72시간째의 처치 부위를 육안적으로 관찰한 결과 처치 24시간째의 경우, 시험물질을 처치한 찰과부에서는 분명한 홍반이 1례, 아주 가벼운 홍반이 5례 관찰되었고, 비찰과부에서는 아주 가벼운 홍반이 3례 관찰되었으며 시험물질을 처리하지 않은 대조 찰과부에서는 아주 가벼운 홍반이 1례 관찰되었고, 비찰과부에서는 홍반이 관찰되지 않았다. 부종은 시험물질의 적용부와 비적용부 모두 관찰되지 않았다. 처치 72시간째, 시험물질을 처리한 찰과부에서는 아주 가벼운 홍반이 1례, 비찰과부에서는 홍반이 관찰되지 않았으며, 시험물질을 처리하지 않은 대조 찰과부에서는 아주 가벼운 홍반만이 1례 관찰되었다. 비찰과부에서는 시험물질의 적용부와 비적용부 모두 아무런 변화를 보이지 않았다 (Table 7, 8).

4) 자극성의 평가

시험물질 처치 후 24시간째와 72시간째의 홍반 평점과 부종 평점을 더한 평균치의 합계는 1.9로, 일차자극지수 P.I.I.(Primary Irritation Index)는 0.5로 비자극성에 해당되었다. 시험물질을 처리하지 않은 대조부에서도 평균치의 합계가 1.4로, 일차자극지수는 0.4로 비자극성에 해당되었다 (Table 9).

Table 5. Mortality and clinical findings

No. of animals	Mortality (%)	Clinical findings
6	0	No clinical finding

Table 6. Body weight changes

	(Unit; Kg)		
	Day after treatment		
	0	1	2
Mean	2.69	2.77	2.76
S.D.	0.200	0.199	0.037
N.	6	6	6

Table 7. Redness & Crust formation of the Application site

		Intact					Abraded				
Grade		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Test site	24 hrs	3	3	0	0	0	0	5	1	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0
Control site	24 hrs	6	0	0	0	0	0	5	1	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0

*No. of animals

※ Grades are follows :

Reaction	Grading
No redness	0
Slight Redness	1
Mild Redness	2
Severe Redness	3
Very Severe Redness	4

Table 8. Edema of the Application site

		Intact					Abraded				
Grade		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Test site	24 hrs	6*	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Control site	24 hrs	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0

*No. of animals

※ Grades are follows :

Reaction	Grading
No Edema	0
Very Slight Edema	1
Slight Edema	2
Mild Edema(= 1 mm)	3
Severe Edema(> 1 mm)	4

Table 9. Primary Irritation Index

Response	Test site								Control site							
	Redness, Crust formation				Edema				Redness, Crust formation				Edema			
Application site	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded		
Time (hours)	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72
Total	3	0	7	1	0	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0	0
Mean	0.5	0.0	1.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Sum	1.9								1.4							
P.I.I.*	0.5								0.4							

*P.I.I.(Primary Irritation Index : 일차자극지수) = 평균의 합계/4

5. 국소 림프절 시험법(Local lymph node assay)을 이용한 상황버섯 에센스 오일의 피부감작성 시험

가. 실험재료 및 방법

1) 시험물질

시험물질은 (주)더마랩에서 공급받은 상황버섯 에센스 오일을 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 6주령의 암컷 Balb/c 마우스를 (주)중앙실험동물로부터 분양하여 7일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 배기 10~12회, 형광등 명암 12hrs cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 폴리카보네이트 사육상자(260W×420L×180H mm)에 5마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C 에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 물과 사료는 자유로이 공급하였다.

3) 실험 방법

가) LLNA 시험

시험물질을 용량별로 25 μl 씩 마우스 양쪽 귀 배측에 조금씩 분할도포하여 시험물질이 정량적으로 흡수되도록 하였으며, 군당 6마리씩 1일 1회 3일 동안 연속해서 도포하여 감각시킨 후 2일 후에 부검을 실시하였다.

나) BrdU 투여 및 장기의 처리

부검하기 2시간 전에 BrdU를 100mg/kg으로 복강 주사하였다. 부검후에 이개 림프절의 중량을 측정하고, 귀 및 림프절을 통상적인 방법대로 중성 포르말린에 고정한 후, 파라핀 포매하였다.

다) BrdU 면역조직화학염색 및 allergen 판정

파라핀 제거과정을 거친 후 내재된 peroxidase를 차단하기 위하여 3% H_2O_2 를 상온에서 30분간 반응시켰다. Blocking solution을 상온에서 1시간 가한 후에

anti-BrdU antibody를 3시간 반응시켰다. 조직에 horse-radish peroxidase conjugated secondary antibody를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 기질로는 diaminobenzidine을 사용하여 발색시키고, 대조염색은 hematoxylin으로 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 림프절의 세포증식반응은 100개의 세포당 BrdU 양성 세포수를 BrdU LI로 측정하였다. Allergen 유무의 판정은 림프절에서 증식반응을 BrdU LI로 구하고 대조군과 비교하여 피질과 수질에서의 SI가 3 이상인 것을 양성으로 판정하였다.

라) Ear thickness 측정

Ear thickness는 부검일에 귀의 두께를 멩검법으로 micrometer를 사용하여 마우스의 귀를 세 번 반복 측정하여 구하였다.

나. 결과

1) 체중변화

시험물질을 투여하여 체중변화를 관찰한 결과, 마우스에 유의적인 체중 증감은 관찰되지 않았다(Table 1). 시험물질을 투여하여 이개림프절의 중량변화를 측정한 결과, 시험물질에 따른 마우스에서의 중량변화는 유의성이 없었다(Fig. 16).

2) 귀에서의 증식능 변화

시험물질을 귀에 도포한 후 귀에서 나타나는 두께와 증식능의 변화를 관찰하였다. 귀의 두께를 측정한 결과 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Table 11). 귀의 증식반응을 측정하기 위하여 BrdU 면역염색을 실시한 결과, 시험물질군에서 유의적인 변화를 관찰하지 못하였다 (Fig. 17).

3) 림프절의 증식반응 평가

시험물질에 대한 이개 림프절의 반응을 현미경으로 관찰할 결과, 대조군에 비해 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 시험물질의 이개 림프절의 증식반응을 측정하기 위하여 BrdU 면역염색을 실시하여 관찰하였다. 시험물질의 경우 대조군에 비하여 BrdU LI의 유의적인 증가가 관찰되지 않았다(Table 12).

Table 10. The change of body weight in mice treated with the essential oil from *Phellinus baumii*

Treatment	Body weight (g)	
	day 0	day 5
Control	21.7 ± 1.20	22.4 ± 0.94
Low	22.0 ± 1.06	21.8 ± 0.73
Mid	21.7 ± 0.78	21.9 ± 1.04
High	21.9 ± 0.94	22.5 ± 0.62

Data represents mean ±SD of six animals.

Table 11. The change of ear thickness in ear following treatment of mice with the essential oil from *Phellinus baumii*

Treatment	Ear thickness (mm)	
	Left	Right
Control	0.27 ± 0.070	0.28 ± 0.073
Low	0.29 ± 0.112	0.35 ± 0.039
Mid	0.28 ± 0.093	0.33 ± 0.083
High	0.28 ± 0.069	0.34 ± 0.103

Data represents mean ±SD (n=6).

Table 12. The change of cell proliferation in auricular lymph node following treatment of mice with the essential oil from *Phellinus baumii*

Treatment	Cell proliferation	
	BrdU LI/LN(C+M)	SI
Control	6.4 ± 1.93	
Low	6.5 ± 1.27	1.0
Mid	7.0 ± 1.42	1.1
High	6.7 ± 1.46	1.0

Data represents mean ±SD (n=6).

LN(C+M) represents the lymph node (cortex+medulla).

SI=mean ratio of values found in the essential oil from *Phellinus baumii*-treated mice to that in vehicle-treated mice.

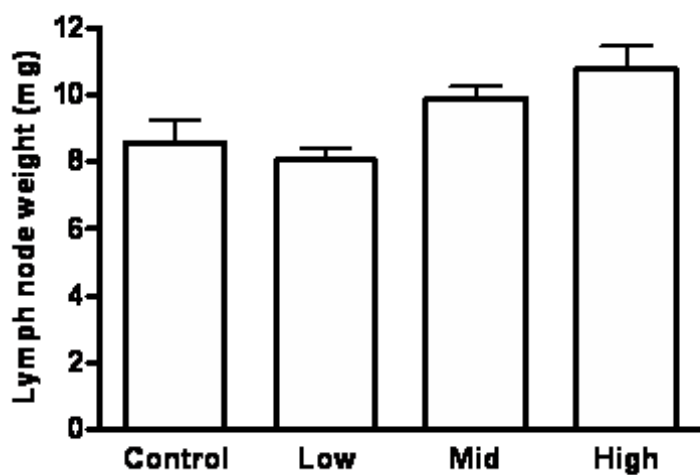


Fig. 19. The absolute weights of auricular lymph nodes in Balb/c mice treated with the essential oil from *Phellinus baumii*

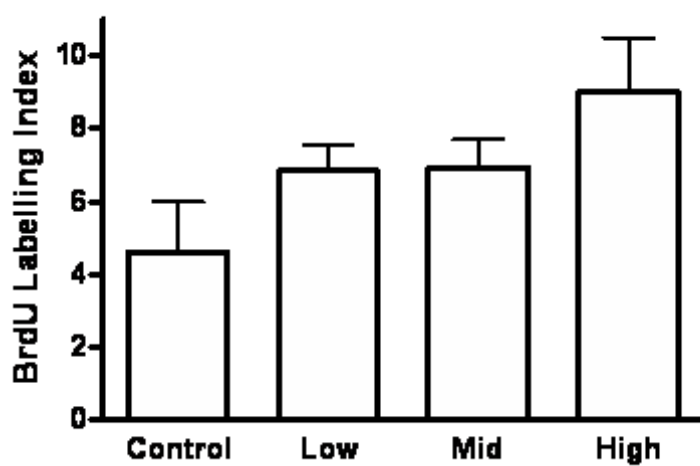


Fig. 20. Proliferative activity of ear after application of the essential oil from *Phellinus baumii*

6. 상황버섯 에센스 오일의 안점막 자극성 시험

가. 실험재료 및 방법

1) 시험물질

시험물질은 (주)더마랩에서 공급받은 상황버섯 에센스 오일을 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 New Zealand White계 토끼를 (주)오리엔트 바이오로부터 분양하여 21일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 배기 10~12회, 형광등 명암 12hrs cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 스테인레스제 사육상자(380W×500L×330H mm)에 1마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C 에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 사료는 자유섭취시켰고 음수는 정수과정을 거친 상수도수를 자동급수시켰다.

3) 실험 방법

OECD 기준 및 Draize법을 준용하여 시험물질을 국립독성연구소 표준작업지침서에 따라 관찰하여 평가하였다. 시험개시 약 24시간 전에 토끼의 좌우 안구의 각막, 결막, 홍채 등의 병변 상태를 검사한 후, 시험물질을 토끼의 결막낭에 0.1 ml씩 투여하였으며 1시간, 1일, 2일, 3일, 7일에 안구의 각막, 결막, 홍채 등을 관찰하였다.

[Evaluation of ocular irritation test]

평 가 구 분	평 가 치		
	I.A.O.I.	M.I.O.I.	Day-7 I.I.O.I.
무자극물	0~5	0(48시간 후)	
경도자극물	5~15	≤5(48시간 후)	
자 극 물	15~30	≤5(4일 후)	
중등도자극물	30~60	≤20(7일 후)	≤30(6마리 토끼 전부) ≤10(6마리 중 4마리 이상)
중강도자극물	60~80	≤40(7일 후)	≤60(6마리 토끼 전부) ≤30(6마리 중 4마리 이상)
강도자극물	80~110		

I.A.O.I. : The Index of Acute Ocular Irritation

M.I.O.I. : Mean Index of Ocular Irritation

I.I.O.I. : The Individual Index of Ocular Irritation

[안점막자극의 평가방법]

(1) 각막

- (A) 혼탁 : 안구의 혼탁의 정도 (가장 농후한 지점으로 판정)
- (a) 화농이나 혼탁이 없음 0
 - (b) 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있음 (정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨 1
 - (c) 반투명한 부분이 쉽게 식별됨. 홍채의 말단이 약간 불명확함 2
 - (d) 진주 색깔을 나타냄. 홍채의 말단이 관찰 안됨. 동공의 크기가 가까스로 관측됨 3
 - (e) 각막이 불투명 (혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨) 4
- (B) 혼탁된 각막의 범위
- (a) 1/4이하 (그러나 0은 아니다) 1
 - (b) 1/4이상 1/2미만 2
 - (c) 1/2이상 3/4미만 3
 - (d) 3/4이상 1까지 4

$A \times B \times 5$ 최대치 = 80

(2) 홍채

- (A) 반응치
- (a) 정상 0
 - (b) 현저한 주름의 형성, 출혈 종창, 각막 주위에 중등도의 충혈 (이상과 같은 단독 혹은 혼합), 홍채는 빛에 대해 반응함 (둔한 반응은 양성) 1
 - (c) 홍채는 빛에 대해 반응 없음. 출혈, 현저한 조직 파괴 (이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부). 2

$A \times 5$ 최대치 = 10

(3) 결막

- (A) 발적 (안검 결막, 안구결막에 한함. 각막, 홍채 제외)
- (a) 혈관은 정상 0
 - (b) 몇몇 혈관은 명확한 충혈 1
 - (c) 넓은 선홍색 색조, 각각의 혈관은 식별하기 어렵다 2
 - (d) 육류의 적색 (얇은 선홍색) 3
- (B) 결막 부종
- (a) 부풀지 않음 (종창) 0
 - (b) 정상보다 약간 종창 (순막 포함) 1
 - (c) 안검의 부분적 외진을 동반한 분명한 종창 2
 - (d) 눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창 3
 - (e) 눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 종창 4
- (C) 배출물
- (a) 배출물 없음 0
 - (b) 약간의 배출물 (정상동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은양 제외) 1
 - (c) 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물 2
 - (d) 눈 주위의 상당 부위와 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물 3

$(A + B + C) \times 2$ 최대치 = 20

나. 결과

시험물질에 대하여 각막의 혼탁 및 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무 등을 기준으로 안점막자극을 시험한 결과를 표시하였다(Table 13). 1시간 및 24시간에서 결막의 경미한 부종 이외에는 자극성이 인정되지 않았다.

Table 13. The change of body weight in mice treated with the essential oil from *Phellinus baumii*

Scoring time	Cornea	Conjunctivae	Iris	I.I.O.I.	M.I.O.I.	A.O.I.	Rating
1 hr	0/0/0/0/0/0	0/1/1/0/1/1	0/0/0/0/0/0	8	1.33		
24 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/1	0/0/0/0/0/0	2	0.33		
48 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0	1.33	Non-Irritant
72 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
7 day	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		

제 7 절 상황버섯 에센스 오일 시제품의 개발 및 독성 전임상

1. 상황버섯 에센스 오일 시제품의 선정

주관기관 및 위탁기관의 연구결과에 따라, 초음파를 이용한 오일용매 추출법으로 획득한 시제품에 대한 안전성 평가 실시

2. 상황버섯 에센스 오일 시제품의 단회 투여 독성

가. 실험재료 및 방법

1) 시험물질

시험물질은 (주)더마랩에서 공급받은 상황버섯 에센스 오일 시제품을 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 SPF(특정병원체 부재) ICR계 마우스를 중앙실험동물(주)로부터 분양하여 약 1주일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 배기 10~12회, 형광등 명암 12hrs cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 폴리카보네이트 사육상자 (260W×420L×180H mm)에 5마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C 에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 물과 사료는 자유로이 공급하였다.

3) 시험군의 구성 및 용량설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였으며 각 군의 평균

체중에 대한 군간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 단회투여시험에서 각 군은 암수 각 5마리씩 10마리로 구성하였으며, 투여용량의 설정은 예비시험결과 및 시험물질의 용해도 등을 고려하여 3단계의 등비용량(공비 2)으로 고용량군(50ml/kg), 중용량군(25ml/kg) 및 저용량군(12.5ml/kg)으로 설정하였으며, 대조군은 용매처치군으로 하여 1회 경구투여하였고, 2주간 관찰하였다.

4) 투여약액의 조제 및 투여방법

(주)더마랩에서 제공받은 시험물질인 상황버섯 에센스 오일 시제품을 용량별로 투여직전에 측정된 체중에 따라 시험물질의 투여량을 산출하여 마우스에 경구투여하였다.

5) 관찰 및 검사항목

가) 일반증상관찰

모든 실험동물에 대한 임상증상은 투여당일에는 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간, 투여 1일부터 7일까지는 1일 1회 이상씩 일정시간에 관찰하여 14일 동안 일반상태의 변화, 중독 증상 발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대해 주의하여 관찰하였다.

나) 체중측정

시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여당일 (0일), 7일, 부검시에 측정하여 기록하였다.

다) 부검

시험종료 후 생존례는 부검전에 체중을 측정하고 ether 마취하에 방혈치사시킨 다음 외관 및 내부장기 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다.

라) 통계학적 분석

시험물질에 대한 LD₅₀는 Litchfield & Wilcoxon법으로 산출하며, 그 외 본 실험에서 얻어진 체중 등의 자료에 대한 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이

용하여 대조군과의 군간 유의성을 검정하였다.

나. 결과

1) 사망동물 및 임상증상의 관찰

전 투여군에서 사망 개체가 관찰되지 않았으며(Table 14), 특이할 만한 임상증상도 관찰되지 않았다(Table 15).

2) 체중변화

모든 생존개체 투여용량군에서 유의성 있는 체중 증감은 관찰되지 않았다(Table 16).

3) 육안적 부검소견

전 투여군 모두에서 특이할 만한 부검소견이 관찰되지 않았다(Table 17).

⇒ 본 시험에서 시험물질 투여와 관련된 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았으며 LD₅₀값은 50 ml/kg을 훨씬 상회할 것으로 사료되었다. 이상의 결과에서 상황버섯 에센스 오일 시제품은 마우스에 의한 단회 경구투여 급성독성시험에서 안전한 물질인 것으로 판단되었으며, 따라서 식품 및 화장품 소재로의 이용에 적합할 것으로 사료된다.

Table 14. Mortality of the mice orally treated with the prototype of essential oil from *Phellinus baumii* once

Sex	Dose (ml/kg)	No. of mice	Hours after administration						Days after administration						Final mortality		
			1	2	3	4	5	6	3	6	10	11	12	13		14	
Male	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	12.5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	25	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	50	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	12.5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	25	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	50	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Table 15. Clinical signs of the mice orally treated with the prototype of essential oil from *Phellinus baumii* once

Sex	Dose (ml/kg)	Clinical signs	Days after administration							
			0	1	2	3	4	5	6	7
Male	Control	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
	12.5	NAD	5	5	5	5	5	5	4	5
	25	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
	50	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	Control	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
	12.5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
	25	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
	50	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5

NAD : Not abnormalities detected

Table 16. Body weights of the mice orally treated with the prototype of essential oil from *Phellinus baumii* once

Sex	Dose (ml/kg)	Number of mice	Days after administration				
				0	7	14	
Male	Control	5	Mean	32.9	38.2	39.8	
			S.D.	1.59	1.61	1.24	
	12.5	5	Mean	34.3	38.1	41.0	
			S.D.	0.97	0.75	2.35	
	25	5	Mean	31.7	39.3	41.4	
			S.D.	0.92	2.64	2.25	
	50	5	Mean	33.4	36.6	39.6	
			S.D.	1.99	2.42	1.20	
	Female	Control	5	Mean	32.3	37.2	38.4
				S.D.	2.06	2.07	2.37
12.5		5	Mean	34.6	34.4	38.7	
			S.D.	2.20	2.67	2.11	
25		5	Mean	35.3	35.7	39.7	
			S.D.	2.85	1.97	2.59	
50		5	Mean	33.7	38.4	40.1	
			S.D.	1.78	2.97	2.70	

S.D. : Standard deviation

Table 17. Gross findings of the mice orally treated with the prototype of essential oil from *Phellinus baumii* once

Incidence of gross findings									
Male					Female				
Dose(ml/kg)	Control	12.5	25	50	Control	12.5	25	50	
No. of mice	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Items									
Adrenal gland									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)					
Ovary									
NGF					5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	
Thymus									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	

NGF : No gross finding, () : Percent of no gross finding

3. 상황버섯 에센스 오일 시제품의 피부 자극 시험

가. 실험재료 및 방법

1) 시험물질

시험물질은 (주)더마랩에서 공급받은 상황버섯 에센스 오일 시제품을 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 New Zealand White계 토끼를 (주)오리엔트 바이오로부터 분양하여 21일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 배기 10~12회, 형광등 명암 12hrs cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 스테인레스제 사육상자(380W×500L×330H mm)에 1마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C 에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 사료는 자유섭취시켰고 음수는 정수과정을 거친 상수도수를 자동급수시켰다.

3) 시험군의 구성 및 용량설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하였다. 동물의 개체식별은 순화기간 중에는 좌측 귓바퀴 내부, 시험기간 중에는 우측 귓바퀴 내부에 유성 매직으로 동물번호를 표시하고 개체 식별 카드 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 시험군은 6마리로 구성하였으며, 투여용량의 설정은 일반적인 피부자극시험에 많이 사용되는 용량인 0.5 ml씩 건강 피부와 찰과 피부에 적용하여 시험물질을 처치하지 않은 건강 피부 및 찰과 피부와 비교하였다. 예비시험결과 및 시험물질의 용해도 등을 고려하여 50% 농도를 처치 농도로 설정하였다.

4) 투여약액의 조제 및 투여방법

(주)더마랩에서 제공받은 시험물질인 상황버섯 에센스 오일 시제품을 사용하였으며, 처치경로는 경피 적용하였다. 시험물질 처치 24시간 전에 전기 제모기를 이용하여 토끼의 피부에 상처가 생기지 않도록 가로 세로 약 10cm씩의 제모된 건강한 피부를 만들었다. 제모된 피부는 좌우로 나누어 좌를 처치구획, 우를 대조구획으로 하고 처치구획과 대조구획의 건강피부 또는 찰과 피부가 서로 대각선으로 분포하도록 구분하여 2.5cm × 2.5cm의 건강 (비찰과) 피부 2개소와 찰과 피부 2개소를 유성펜으로 표시하였다. 찰과 피부는 주사침 끝을 이용하여 표피는 손상되나 진피는 손상되지 않게 출혈이 생기지 않도록 찰과상을 입혀서 만들었다. 처치방법으로는 가로 세로 2.5cm의 처치구획 피부 부위에 0.5ml의 시험물질을 적용한 거즈를 덮어 시험물질과 피부가 잘 접촉할 수 있도록 하였다. 거즈의 위에는 시험물질의 증발을 막기 위하여 침투성이 없고 자극성이 낮은 호일로 덮은 다음 종이테이프로 고정하였으며 처치 횟수는 처치 당일 1회 적용하였다.

5) 관찰 및 검사항목

가) 일반증상 및 사망동물의 관찰

시험 기간 중 모든 실험동물에 대하여 매일 1회 이상 일반상태의 변화, 사망동물의 유무 및 시험물질 처치 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대해 주의하여 관찰하였다.

나) 체중측정

시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 처치 전과 처치 후 24시간 및 72시간 후에 체중을 측정하여 기록하였다.

다) 처치부위의 육안적 관찰

처치부위의 육안적 변화는 처치 후 24시간 및 72시간에 관찰하였다.

라) 자극성의 평가

시험물질은 적용 24시간 경과 후 제거하고, 피검 시험물질이 잔류하지 않도록 생리식염수로 가볍게 씻어내었다. 시험물질 처치 후 24시간 및 72시간째에 도포 국소 부위의 홍반, 부종, 출혈, 가피 형성 등의 변화를 육안적으로 관찰하였다. 홍반과 가피형성 및 부종의 출현은 염증 반응을 근거하여 판정하는 것으로 홍반

은 육안적으로, 부종은 가벼운 촉진을 병행하여 판정하였다. 피부 반응의 정도는 처치 후 24시간 및 72시간에 피부반응 기준에 따라 채점하여 기록하였다.

※피부 반응 평가 기준

① 홍반과 가피형성

반 응	점 수
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반(홍당무 색의 발적)과 가벼운 정도의 가피	4
총 가능한 홍반 점수	4

② 부종형성

반 응	점 수
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종(뚜렷하게 부어올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종(약 1 mm정도 부어올랐을 경우)	3
심한 부종(1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태)	4
총 가능한 부종 점수	4

마) 피부반응 성적의 평가

피부 반응을 채점한 것을 이용하여 시험물질 처치 후 24시간과 72시간 때의 홍반 평점과 부종 평점을 더해서 평균치를 산출하고, 이 수치로 피부자극성을 평가하였다. 이때 시험물질의 자극성은 일차자극지수외에도 시험기간 중 관찰된 일반증상 등을 고려하여 평가하였다.

※피부 일차 자극표

일차자극지수(P.I.I.)*	구분
0.0 ~ 0.5	비자극성
0.6 ~ 2.0	약한 자극성
2.1 ~ 5.0	중등도 자극성
5.1 ~ 8.0	강한 자극성

*P.I.I.(Primary Irritation Index : 일차자극지수) = 평균의 합계/4

나. 결과

1) 일반증상관찰 및 사망률

시험 전 기간 동안의 일반증상 및 사망동물을 관찰한 결과 모든 동물에 있어서 시험물질의 처치에 의한 변화로 인정되어지는 일반증상은 관찰되지 않았다. 사망 동물도 관찰되지 않았다 (Table 18).

2) 체중변화

시험기간 동안 체중변화는 정상적인 성장을 보여 주었다 (Table 19).

3) 처치부위의 육안적 관찰

시험물질 처치 후 24시간 및 72시간째의 처치 부위를 육안적으로 관찰한 결과 처치 24시간째의 경우, 시험물질을 처치한 찰과부에서는 분명한 홍반이 2례, 아

주 가벼운 홍반이 4례 관찰되었고, 시험물질을 처리하지 않은 대조 찰과부에서는 분명한 홍반이 2례, 아주 가벼운 홍반이 4례 관찰되었고, 비찰과부에서는 홍반이 관찰되지 않았다. 부종은 시험물질의 적용부와 비적용부 모두 관찰 되지 않았다. 처치 72시간째, 시험물질을 처리한 찰과부에서는 아주 가벼운 홍반이 1례, 비찰과부에서는 홍반이 관찰되지 않았으며, 시험물질을 처리하지 않은 대조 찰과부에서는 홍반이 관찰되지 않았다. 비찰과부에서는 시험물질의 적용부와 비적용부 모두 아무런 변화를 보이지 않았다 (Table 20, 21).

4) 자극성의 평가

시험물질 처치 후 24시간째와 72시간째의 홍반 평점과 부종 평점을 더한 평균치의 합계는 1.5로, 일차자극지수 P.I.I.(Primary Irritation Index)는 0.4로 비자극성에 해당되었다. 시험물질을 처리하지 않은 대조부에서도 평균치의 합계가 1.3으로, 일차자극지수는 0.3으로 비자극성에 해당되었다 (Table 22).

Table 18. Mortality and clinical findings

No. of animals	Mortality (%)	Clinical findings
6	0	No clinical finding

Table 19. Body weight changes

	(Unit; Kg)		
	Day after treatment		
	0	1	2
Mean	2.64	2.80	2.73
S.D.	0.223	0.153	0.103
N.	6	6	6

Table 20. Redness & Crust formation of the Application site

		Intact					Abraded				
Grade		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Test site	24 hrs	6	0	0	0	0	0	4	2	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0
Control site	24 hrs	6	0	0	0	0	0	4	2	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0

*No. of animals

※ Grades are follows :

Reaction	Grading
No redness	0
Slight Redness	1
Mild Redness	2
Severe Redness	3
Very Severe Redness	4

Table 21. Edema of the Application site

Grade		Intact					Abraded				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Test site	24 hrs	6*	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Control site	24 hrs	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0

* No. of animals

※ Grades are follows :

Reaction	Grading
No Edema	0
Very Slight Edema	1
Slight Edema	2
Mild Edema(= 1 mm)	3
Severe Edema(> 1 mm)	4

Table 22. Primary Irritation Index

	Test site								Control site							
Response	Redness, Crust formation				Edema				Redness, Crust formation				Edema			
Application site	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded		
Time (hours)	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72		
Total	0	0	8	1	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	
Mean	0.0	0.0	1.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	
Sum	1.5								1.3							
P.I.I.*	0.4								0.3							

*P.I.I.(Primary Irritation Index : 일차자극지수) = 평균의 합계/4

4. 국소 림프절 시험법(Local lymph node assay)을 이용한 상황버섯 에센스 오일 시제품의 피부감작성 시험

가. 실험재료 및 방법

1) 시험물질

시험물질은 (주)더마랩에서 공급받은 상황버섯 에센스 오일 시제품을 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 6주령의 암컷 Balb/c 마우스를 (주)중앙실험동물로부터 분양하여 7일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 배기 10~12회, 형광등 명암 12hrs cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 폴리카보네이트 사육상자(260W×420L×180H mm)에 5마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C 에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 물과 사료는 자유로이 공급하였다.

3) 실험 방법

가) LLNA 시험

시험물질을 용량별로 25 μl 씩 마우스 양쪽 귀 배측에 조금씩 분할도포하여 시험물질이 정량적으로 흡수되도록 하였으며, 군당 6마리씩 1일 1회 3일 동안 연속해서 도포하여 감각시킨 후 2일 후에 부검을 실시하였다.

나) BrdU 투여 및 장기의 처리

부검하기 2시간 전에 BrdU를 100mg/kg으로 복강 주사하였다. 부검후에 이개 림프절의 중량을 측정하고, 귀 및 림프절을 통상적인 방법대로 중성 포르말린에 고정한 후, 파라핀 포매하였다.

다) BrdU 면역조직화학염색 및 allergen 판정

과라핀 제거과정을 거친 후 내재된 peroxidase를 차단하기 위하여 3% H₂O₂를 상온에서 30분간 반응시켰다. Blocking solution을 상온에서 1시간 가한 후에 anti-BrdU antibody를 3시간 반응시켰다. 조직에 horse-radish peroxidase conjugated secondary antibody를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 기질로는 diaminobenzidine을 사용하여 발색시키고, 대조염색은 hematoxylin으로 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 림프절의 세포증식반응은 100개의 세포당 BrdU 양성 세포수를 BrdU LI로 측정하였다. Allergen 유무의 판정은 림프절에서 증식반응을 BrdU LI로 구하고 대조군과 비교하여 피질과 수질에서의 SI가 3 이상인 것을 양성으로 판정하였다.

라) Ear thickness 측정

Ear thickness는 부검일에 귀의 두께를 멩검법으로 micrometer를 사용하여 마우스의 귀를 세 번 반복 측정하여 구하였다.

나. 결과

1) 체중변화

시험물질을 투여하여 체중변화를 관찰한 결과, 마우스에 유의적인 체중 증감은 관찰되지 않았다(Table 23). 시험물질을 투여하여 이개림프절의 중량변화를 측정한 결과, 시험물질에 따른 마우스에서의 중량변화는 유의성이 없었다(Fig. 18).

2) 귀에서의 증식능 변화

시험물질을 귀에 도포한 후 귀에서 나타나는 두께와 증식능의 변화를 관찰하였다. 귀의 두께를 측정한 결과 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Table 24). 귀의 증식반응을 측정하기 위하여 BrdU 면역염색을 실시한 결과, 시험물질군에서 유의적인 변화를 관찰하지 못하였다 (Fig. 19).

3) 림프절의 증식반응 평가

시험물질에 대한 이개 림프절의 반응을 현미경으로 관찰할 결과, 대조군에 비해 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 시험물질의 이개 림프절의 증식반응을 측

정하기 위하여 BrdU 면역염색을 실시하여 관찰하였다. 시험물질의 경우 대조군에 비하여 BrdU LI의 유의적인 증가가 관찰되지 않았다(Table 25).

Table 23. The change of body weight in mice treated with the prototype of essential oil from *Phellinus baumii*

Treatment	Body weight (g)	
	day 0	day 5
Control	21.2 ± 0.52	21.2 ± 0.56
Low	21.3 ± 0.44	21.0 ± 0.68
Mid	21.2 ± 0.49	21.1 ± 0.56
High	21.1 ± 0.82	21.6 ± 0.23

Data represents mean ±SD of six animals.

Table 24. The change of ear thickness in ear following treatment of mice with the prototype of essential oil from *Phellinus baumii*

Treatment	Ear thickness (mm)	
	Left	Right
Control	0.24 ± 0.031	0.26 ± 0.029
Low	0.25 ± 0.024	0.27 ± 0.026
Mid	0.24 ± 0.033	0.24 ± 0.031
High	0.23 ± 0.023	0.26 ± 0.021

Data represents mean ±SD (n=6).

Table 25. The change of cell proliferation in auricular lymph node following treatment of mice with the prototype of essential oil from *Phellinus baumii*

Treatment	Cell proliferation	
	BrdU LI/LN(C+M)	SI
Control	5.7 ± 1.75	
Low	6.0 ± 0.89	1.1
Mid	6.3 ± 0.82	1.2
High	6.7 ± 0.82	1.3

Data represents mean ±SD (n=6).

LN(C+M) represents the lymph node (cortex+medulla).

SI=mean ratio of values found in the prototype of essential oil from *Phellinus baumii*-treated mice to that in vehicle-treated mice.

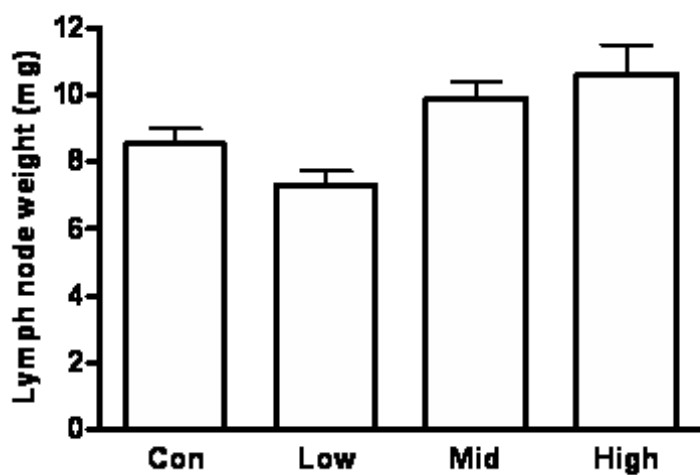


Fig. 21. The absolute weights of auricular lymph nodes in Balb/c mice treated with the prototype of essential oil from *Phellinus baumii*

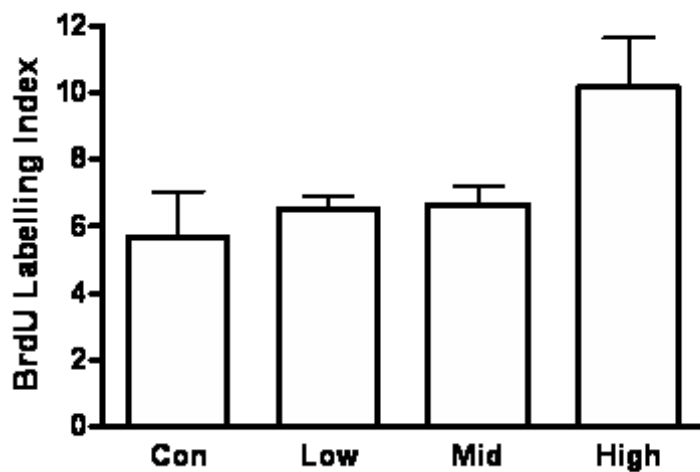


Fig. 22. Proliferative activity of ear after application of the prototype of essential oil from *Phellinus baumii*

5. 상황버섯 에센스 오일 시제품의 안점막 자극성 시험

가. 실험재료 및 방법

1) 시험물질

시험물질은 (주)더마랩에서 공급받은 상황버섯 에센스 오일 시제품을 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 New Zealand White계 토끼를 (주)오리엔트 바이오로부터 분양하여 21일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 배기 10~12회, 형광등 명암 12hrs cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 스테인레스제 사육상자(380W×500L×330H mm)에 1마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C 에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 사료는 자유섭취시켰고 음수는 정수과정을 거친 상수도수를 자동급수시켰다.

3) 실험 방법

OECD 기준 및 Draize법을 준용하여 시험물질을 국립독성연구소 표준작업지침서에 따라 관찰하여 평가하였다. 시험개시 약 24시간 전에 토끼의 좌우 안구의 각막, 결막, 홍채 등의 병변 상태를 검사한 후, 시험물질을 토끼의 결막낭에 0.1 ml씩 투여하였으며 1시간, 1일, 2일, 3일, 7일에 안구의 각막, 결막, 홍채 등을 관찰하였다.

[Evaluation of ocular irritation test]

평가구분	평가치		
	I.A.O.I.	M.I.O.I.	Day-7 I.I.O.I.
무자극물	0~5	0(48시간 후)	
경도자극물	5~15	≤5(48시간 후)	
자극물	15~30	≤5(4일 후)	
중등도자극물	30~60	≤20(7일 후)	≤30(6마리 토끼 전부) ≤10(6마리 중 4마리 이상)
중강도자극물	60~80	≤40(7일 후)	≤60(6마리 토끼 전부) ≤30(6마리 중 4마리 이상)
강도자극물	80~110		

I.A.O.I. : The Index of Acute Ocular Irritation

M.I.O.I. : Mean Index of Ocular Irritation

I.I.O.I. : The Individual Index of Ocular Irritation

[안점막자극의 평가방법]

(1) 각막

- (A) 혼탁 : 안구의 혼탁의 정도 (가장 농후한 지점으로 판정)
- (a) 화농이나 혼탁이 없음 0
 - (b) 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있음 (정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨 1
 - (c) 반투명한 부분이 쉽게 식별됨. 홍채의 말단이 약간 불명확함 2
 - (d) 진주 색깔을 나타냄. 홍채의 말단이 관찰 안됨. 동공의 크기가 가까스로 관측됨 3
 - (e) 각막이 불투명 (혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨) 4
- (B) 혼탁된 각막의 범위
- (a) 1/4이하 (그러나 0은 아니다) 1
 - (b) 1/4이상 1/2미만 2
 - (c) 1/2이상 3/4미만 3
 - (d) 3/4이상 1까지 4

$AxBx5$ 최대치 = 80

(2) 홍채

- (A) 반응치
- (a) 정상 0
 - (b) 현저한 주름의 형성, 출혈 종창, 각막 주위에 중등도의 충혈 (이상과 같은 단독 혹은 혼합), 홍채는 빛에 대해 반응함 (둔한 반응은 양성) 1
 - (c) 홍채는 빛에 대해 반응 없음. 출혈, 현저한 조직 파괴 (이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부) 2

$Ax5$ 최대치 = 10

(3) 결막

- (A) 발적 (안검 결막, 안구결막에 한함. 각막, 홍채 제외)
- (a) 혈관은 정상 0
 - (b) 몇몇 혈관은 명확한 충혈 1
 - (c) 넓은 선홍색 색조, 각각의 혈관은 식별하기 어렵다 2
 - (d) 육류의 적색 (넓은 선홍색) 3
- (B) 결막 부종
- (a) 부풀지 않음 (종창) 0
 - (b) 정상보다 약간 종창 (순막 포함) 1
 - (c) 안검의 부분적 외진을 동반한 분명한 종창 2
 - (d) 눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창 3
 - (e) 눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 종창 4
- (C) 배출물
- (a) 배출물 없음 0
 - (b) 약간의 배출물 (정상동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은양 제외) 1
 - (c) 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물 2
 - (d) 눈 주위의 상당 부위와 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물 3

$(A+B+C)x2$ 최대치 = 20

나. 결과

시험물질에 대하여 각막의 혼탁 및 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무 등을 기준으로 안점막자극을 시험한 결과를 표시하였다(Table 26). 1시간 및 24시간에서 결막의 경미한 부종 이외에는 자극성이 인정되지 않았다.

Table 26. The change of body weight in mice treated with the prototype of essential oil from *Phellinus baumii*

Scoring time	Cornea	Conjunctivae	Iris	I.I.O.I.	M.I.O.I.	A.O.I.	Rating
1 hr	0/0/0/0/0/0	1/0/0/1/0/0	0/0/0/0/0/0	4	0.67		
24 hr	0/0/0/0/0/0	1/0/0/1/0/0	0/0/0/0/0/0	4	0.67		
48 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0	0.67	Non-Irritant
72 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
7 day	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

년도	연구개발 수행내용	달성도 (%)	대외기여도
1차 연도	원료선정 : <i>P. baumii</i> 동정	100	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 상황버섯의 동정법 개발 - 상황버섯으로부터 에센스 오일의 수득의 다양한 방법을 개발, 이를 통하여 다양한 버섯의 에센스 오일 개발 방법 제공
	Lab. scale 에센스 오일추출	100	
	면역세포활성 증진 항산화, 항염 효과 항-UV 효과 피부 트러블 억제	100	
	일반독성(<i>in vivo</i>) 피부독성(<i>in vitro</i>) 피부감작(<i>in vivo</i>) 국소독성(<i>in vivo</i>)	100	
	시제품 생산용 에센스 오일 생산	100	
	2차 연도	시제품의 면역세포활성 증진 시제품의 항산화, 항염 효과 시제품의 항-UV 효과 시제품의 피부암 생장 억제 시제품의 피부 트러블 억제 시제품의 일반독성(<i>in vivo</i>) 시제품의 피부독성(<i>in vitro</i>) 시제품의 피부감작(<i>in vivo</i>) 시제품의 국소독성(<i>in vivo</i>) 조성물 및 기능성 특허출원	
3차 연도	국제 화장품 원료규격집 등재 (기존 등재)	100	<ul style="list-style-type: none"> - 유럽화장품 학회 초록 투고, 박사학위 논문자료 이용, SCI논문 투고(심사 중)등으로 상황버섯에 대한 대외 신인도 증대, 상황버섯 개발 자료를 통하여 화장품회사에 대한 자료 설명, 새로운 화장품 개발의 컨셉 제공
	유럽화장품 학회 등 전시회 출품	100	
	생산시설 확충 및 화장품제조회사 원료납품	100	
	기능성 화장품 컨셉 / 제제, 제형	100	
	기능성 화장품 생산/판매	100	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 활용분야 : 에센스 오일, 피부보호(면역활성, 보습, 항산화, UV-protecting) 및 기능성 화장품 첨가제, 식품첨가제, 아로마 therapy, 기타 식의약화장품 첨가제

2. 주활용분야 : 면역활성 에센스 오일

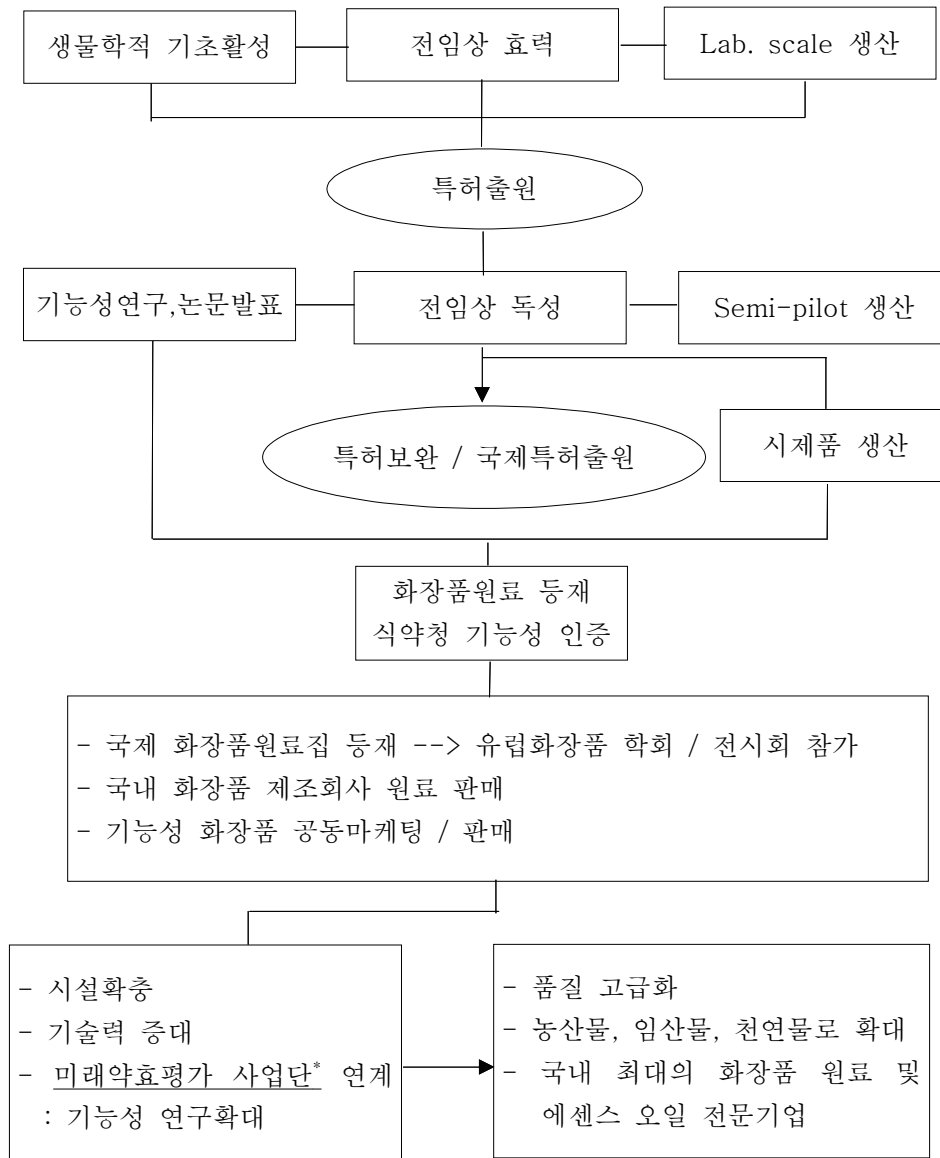
기존의 에센스 오일에서는 주로 보습과 항산화 성분을 이용하여 마케팅에 이용하고 있으며, 본 과제와 같은 면역활성을 증진시키는 효능의 에센스 오일은 개발된 바 없다. 따라서, 본 과제에서는 상황버섯 에센스 오일의 주요 성분의 분석을 통한 면역활성 증진기능을 밝힘으로써 차별화된 에센스 오일을 개발하고자 한다.

3. 활용유형 : PCT 국제특허, 참여기업을 통한 생산, 화장품 제조회사에 대한 원료판매(더마랩(주)), 에센스 오일 완제품에 대한 공동 마케팅

4. 추가기술 개발

- 고품질 오일생산을 위한 추가 공정/시설 확충
- 타 버섯류에 대한 오일 생산 확대
- 농산물, 임산물에 대한 적용 확대
- 기능성 다양화를 위한 연구 확대 : 면역활성 -> 항염증, 신경안정(불면증) 등

5) 사업화 계획



* 미래약효평가 사업단 : 협동연구기관인 경기의약연구센터에서 2004년도 산자부 및 경기도의 지원을 받아 2005년도부터 식품, 의약품, 화장품 분야 약효평가 사업 수행

* 위탁기관 및 참여기업인 (주)더마랩에서 사임당화장품 등 상황버섯 에센스 오일 판매망 확충 중

제 6 장 참고문헌

1. 김정숙. 버섯의 이용실태와 조리방법에 따른 조직감 및 기호특성, 영남대학교 대학원 박사학위논문, 1995.
2. 김병각. 버섯건강요법, 가림출판사, 1996.
3. 채영일, 패자옥, 서학주, 이영만. 기초생물통계학, 향문사, 1990.
4. 박성현, 조신섭, 김성수. Ver. SPSS 12K 한글 SPSS, 자유아카데미, 2004.
5. Cho EJ, Hwang HJ, Kim SW, Oh JY, Baek YM, Choi JW, Bae SH, Yun JW. Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelial cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in ob/ob mice. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75; 1257–1265, 2007.
6. Hwang HJ, Kim SW, Lim JM, Joo JH, Kim HO, Kim HM, Yun JW. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 76; 3069–3080, 2005.
7. Hwang HJ, Kim SW, Xu CP, Choi JW, Yun JW. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *J Appl Microbiol.* 96; 1296–1305, 2004.
8. Jang BS, Kim JC, Bae JS, Rhee MH, Jang KH, Song JC, Kwon OD, Park SC. Extracts of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baumii* inhibit pulmonary

inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. *Biotechnol Lett.* 26; 31–33, 2004.

9. 김영섭, 이병의, 조규봉, 이연태, 이대진. 재배산 목질진흙버섯의 항암 및 면역 활성, *한국면역학회지* 22; 165–171, 2000.

10. Nagao T, Matsuda H, Nakata K, Nanba K, Kubo M. *Shoyakugaku. Zasshi* 40; 375, 1986.

11. Naruse S, and Takeda S. Studies on antitumor activity of Basidiomycete polysaccharides II. Antitumor effects of polysaccharides prepared from cultured Basidiomycetes. *Mie. Medical. Journal* 23; 207, 1974.

12. Komatsu N, Okuba S, Likumoto S, Kimura K, Saito G, Sakaki S. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* 60; 137, 1969.

13. Oh-Hashi F, Kataoka T, Tsugagoshi S. Effect of combined use of anticancer drugs with a polysaccharide preparation, Krestin, on mouse leukemia P388. *Gann* 67; 713, 1976.

14. 증약대사전 제3권, 상해과학기술출판사, 소학관편 p2836.

15. Jiangsu New Medical College. Dictionary of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Science and Technology Publishing House: Shanghai, vol 1; 1967, 1977.

16. Alzbeto K, Babor K, Jozef R. *Chem. Zvesti* 23; 462, 1969.

17. Kirk TK, Lorenz LF, Larsen MJ. *Phytochemistry* 14; 281–284, 1975.
18. Gazaryan IG, Reshetnikova IA. *Biokhimiya (Moscow)* 60; 1017, 1995.
19. Gazaryan IG, Reshetnikova IA. *Dokl. Akad. Nauk* 329; 663, 1993.
20. Mo SY, Yang YC, He WY, Shi JG. *Chin. Chem. Lett* 14; 810–813, 2003.
21. Mo SY, Yang YC, Shi JG. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 28; 339–341, 2003.
22. Ali NAA, Jansen R, Pilgrim H, Liberra K, Lindequist U. *Phytochemistry* 41; 927–929, 1996.
23. Ohmura K, Miyase T, Ueno A. *Phytochemistry* 28; 1919–1924, 1989.
24. Wu ZJ, Ouyang MA, Yang CR. *Yun Nan Zhi Wu Yan Jiu* 21; 393–398, 1999.
25. Wang XF, Wei RF, Chen JY. *Acta Pharm. Sin* 16; 59–60, 1981.
26. Bolzani VDS, Trevisan LMV, Claudia M, Young M. *Phytochemistry* 30; 2089–2091, 1991.
27. Kobayashi, M., Krishina, MM, Ishida K, Anjaneyulu V. *Chem. Pharm. Bull* 40; 72–74, 1992.
28. He J, Feng XZ. *Nat. Prod. Res. Dev.* 12; 33–35, 2000.

29. Wei H, Wen DX, Liu XS, Tang RJ. *Zhong Guo ZhongYao Za Zhi* 23; 616-618, 1998.
30. Mo S, Wang S, Zhou G, Yang Y, LI Y, Chem X, Shi J. Phelligrins C-F: Cytotoxic pyranol[4,3-c][2]benzopyran-1,6-dione and Furo[3,2-c] pyran-4-one derivatives from the fungus *Phellinus igniarius*. *J. Nat. Procd* 67; 823-828, 2004.
31. Shon YH, Nam KS. Inhibition of cytochrome P450 isozymes and ornithine decarboxylase activities by polysaccharides from soybeans fermented with *Phellinus igniarius* or *Agrocybe cylindracea*, *Biotech Lett* 26; 159-163, 2004.
32. Shon YH, Nam KS. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes, *J Ethnopharmacol* 77; 103-109, 2001.
33. 김원근, 유익동 ; *신물질 탐색*. 자유아카데미 1996, 141-228.
33. Cvijic ME. Effects of Rla overexpression on Cisplatin Sensitivity in Human ovarian Carcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249; 723-727, 1998.
34. 이희순. DNA에 작용하는 항암 화학요법제의 개발. *신약뉴스* 3; 3-20, 1995.
35. 곽상수. 제주도 주목의 taxol 및 cephalomannine의 함량분석. *생약학지* 26; 116, 1995.
36. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AL, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanism of hepatotoxicity, *Toxicol. Sci.* 65; 1666, 2002.

37. Gocke E. Photochemical mutagenesis : example and toxicological relevance. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol* 20; 285, 2001.
38. Hollowell B. Drug antioxidant effects. *Drugs*. 42; 569, 1991.
39. Fukuzawa K, Takaishi Y. Antioxidants. *J. Act. Oxyg. Free Rad.* 1; 55, 1990.
40. 이순호, 이우영, 김미경, 한정아, 지영애, 홍무기. 진흙버섯류의 분류 및 분포도에 관한 연구. *The Annual Report of KFDA* 4; 238-246, 2000.
41. White T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocol : a guide to methods and applications. Eds. Innis. M. A. D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Eds. Innis, Academic press, San Diego, California. 482, 1990.
42. Oh TJ, Kim IG. Polyamines protect against DNA strand breaks and aid cell survival against irradiation in *Escherichia coli*. *Biotech. Tech* 12; 755-758, 1998.