

발간등록번호

11-1541000-001393-01

**토종꿀과 생약초로부터 생리활성 소재
개발에 관한 연구**

(Development of Physiology Activity Material from Herbal
Honey and Medicinal Herbs)

순천대학교 산학협력단

농림수산식품자료실



0007337

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “토종꿀과 생약초로부터 생리활성 소재 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 04월 09일

주관연구기관명 : 순천대학교

주관연구책임자 : 나재운

세부연구책임자 : 나재운

연 구 원 : 장미경

연 구 원 : 최창용

연 구 원 : 남정표

연 구 원 : 정 현

연 구 원 : 최선주

연 구 원 : 김원석

연 구 원 : 박준규

연 구 원 : 손동희

연 구 원 : 홍락준

연 구 원 : 김영민

연 구 원 : 이경재

연 구 원 : 김민성

협동연구기관명 : 조선대학교

협동연구책임자 : 박윤경

요 약 문

I. 제목

토종꿀과 생약초로부터 생리활성 소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

피부는 감각 기능, 체온 조절 기능 등과 같은 외부 변화를 인지하기 위한 기능뿐만 아니라 체액의 손실을 막고 환경 변화에 대응하여 신체를 보호하며 독성물질이나 미생물, 물리적인 자극, 자외선에 대한 장벽기능을 수행하고 있다. 특히, 피부의 가장 바깥에 위치한 각질층은 피부 방벽기능의 중요한 역할로 피부 표면의 수분과 전해질의 손실을 억제함으로써 피부가 정상적인 기능을 수행하도록 한다. 각질층의 이상으로 인해 수분의 함량이 떨어지면 피부가 건조해지고, 윤기가 없어져 피부손상이 일어난다. 이러한 질환으로 건선염과 아토피 피부염(atopic dermatitis) 등이 알려져 있다. 이 중 아토피 피부염은 산업의 발달과 많은 화학물질들이 상업적으로 이용되고 유해가능물질 등이 급격히 증가함에 따라 발병률이 급격히 증가하고 있으며 피부건조증, 홍반, 삼출과 같은 특징적인 습진 증상을 동반하는 만성피부질환이다.

아토피 피부염은 주로 유아기와 소아기에서 발생빈도가 높으며 현대에는 성인에게도 자주 발생한다. 아토피 피부염 원인에 대한 여러 가지 학설이 보고되고 있으나 그 근본적인 원인과 발생기전은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않고 있으며, 단지 유전적인 요인, 환경적인 요인, 면역계에 의한 요인, 정신적인 요인 등이 복합적으로 작용해 아토피가 발생하는 것으로 추정하고 있을 뿐이다. 이러한 아토피 피부염 치료제로는 현재 주로 스테로이드 제제가 사용되고 있으나 장기간 사용 시 여러 가지 부작용 발생의 문제점을 가지고 있다. 따라서 아토피 피부염 치료를 위해서 이러한 부작용 및 약물의 내성 등을 해결하기 위하여 천연물질에서 유래된 물질의 발굴 및 개발이 필요하다.

천연 감미료 및 건강식품으로 사용되고 있는 벌꿀에는 과당, 비타민 C, 광물질이 함유되어 있으며 다량 함유된 각종 생리활성물질의 여러 효능을 인정받아 화장품 및 제약원료로 그 수요가 확대되고 있다. 또한 벌꿀에는 유해한 미생물 억제작용, 상처 치유촉진 작용, 항산화 작용 등이 있는 것으로 알려지고 있다. 최근에는 각 지역의 벌꿀에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있으며 특히 감염성 질병의 치료를 위한 항균활성에 관한 연구들이 많이 보고되고 있다.

키토산은 최근 천연 기능성 소재로 주목 받고 있는 다가양이온성 고분자 물질로서 항암 효과, 면역력 강화 효과, 상처 치료 효과 및 항균 활성 등의 다양한 생리 활성을 가지고 있어 화장품 원료, 외과용 인공피부, 생분해성 필름 등 여러 분야에 폭넓게 사용되고 있다.

본 연구에서는 기존의 아토피 피부염 치료제의 심각한 부작용 유발, 약물의 내성 등에 의한

치료효과 저하라는 문제점을 극복하기 위하여 피부세포인 케라티노사이트를 활성화 시킬 수 있는 천연물 특히 토종꿀, 생약초, 수용성키토산을 이용하여 아토피 피부염에 유용한 생리활성 물질을 발굴하고 소재를 개발하고자 한다. 또한 개발된 생리활성 물질에 나노기술과 바이오기술을 융합하여 아토피 피부염에 유용한 스킨케어 제품을 개발하고 상품화하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

산업의 발달과 많은 화학물질들이 상업적으로 이용되고 각종 유해 가능물질 등이 급격히 증가함에 따라 아토피 피부염의 발생률이 증가하고 있다. 현재 이러한 아토피 피부염의 치료제로 주로 사용되는 제품은 경구용 항히스타민제, 국소용 스테로이드, 경구용 스테로이드, 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 탈감작 요법, 생균제, 경구용 및 국소용 면역억제제 등이 이용되고 있는데 이를 장기간 사용하였을 경우 피부의 위축이나 소아 환자에서 성장지연의 가능성 등 각종 부작용의 문제점들이 대두되어 있어 이를 극복할 치료제의 개발이 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 토종꿀, 생약초, 수용성키토산 등을 이용하여 다음과 같은 조사를 통해 연구개발을 진행하였다.

- 토종꿀과 생약초의 물리화학적 특성 규명
- 토종꿀과 생약초의 항균활성 및 독성 규명
- 토종꿀과 생약초의 혼합 조성에 따른 항균활성 규명 및 최적 조성비 도출
- 수용성 키토산의 분자량별 분획 및 최적의 생리활성을 갖는 분자량대의 생리활성 수용성 키토산의 발굴
- 수용성 키토산과 토종꿀의 혼합조성에 따른 생리활성 특성 규명
- 아토피 피부염이 유발된 동물 모델 개발
- 아토피 피부염에 효과 규명(in vivo)
- 유효성분을 담지할 수 있는 수용성키토산 마이크로 입자 개발 및 안정성 평가
- 수용성키토산 마이크로 입자를 이용한 스킨케어 제제화
- 스킨케어 제품 개발

IV. 연구개발 결과

본 연구는 기존 아토피 피부염 치료제들의 문제점으로 인한 새로운 치료제의 개발이 요구되는 시점에서 토종꿀, 생약초, 수용성 키토산을 이용하여 최적의 항균활성과 낮은 독성을 보이는 최적의 조성을 확립하고 도출된 조성물의 안정성 및 활성을 추가할 수 있는 제형을 통한 아토피 피부염 치료제 개발에 관한 것으로써, 여러 분석 장비들을 이용하여 각각의 특성을 확인하였으며, 한외여과막을 이용하여 수용성 키토산을 분자량대별로 분획하고 최고의 활성을 가

지는 분자량의 수용성 키토산을 분리하였으며, 이들을 조성별로 혼합물을 제조하고 이들의 항균 활성 및 독성 실험 결과로부터 최적의 조성을 확립하였다.

최종 혼합물의 아토피 피부염 치료제로서의 효과를 평가하기 위해 5주령의 NC/Nga 마우스에 DNCB 용액을 도포하여 아토피 피부염을 유발시킨 후 혼합 조성물 및 혼합 조성물을 이용하여 제조한 크림과 대조 약물로 면역억제제인 노바티스사의 엘리델을 도포하여 아토피 발진 억제에 미치는 영향을 조사하였다. 피부염이 유발된 마우스에 혼합조성물 및 조성물 크림을 처리하였을 경우 아토피 피부염의 개선으로 인해 양성대조군보다 관능 평가 score 및 scratching 거동이 감소하였으며, 약제대조군보다도 더 우수한 결과를 얻을 수 있었다. 면역 관련 사이토카인 결과에서도 동일한 결과를 얻었다.

또한, 생리활성 물질을 담지할 수 있는 키토산 마이크로입자를 교반속도 및 키토산의 농도 등에 따라 제조하였다. 이 결과 성공적으로 키토산 마이크로 입자를 제조되었으며 최적조건을 도출할 수 있었다. 아울러 생리활성 물질이 담지된 키토산마이크로입자를 이용하여 아토피 피부염이 유발된 동물에 처리한 결과 우수한 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 아토피성 피부염에 효과적인 화장품 개발에 성공하였으며, 현재 제품화 단계에 있다.

V. 연구성과

본 연구의 목적은 기존의 아토피성 피부염 치료제의 부작용 및 약물 내성을 해결하고자 천연물로부터 아토피성 피부염에 효과적인 새로운 제품을 개발하고 나노기술과 바이오 기술의 접목을 통하여 상기제품의 상용화에 있다.

본 연구의 결과로부터 참여기업이 제품화에 성공하였으며 제품명, 디자인 등을 확정하고 상표 출원을 하였으며, 온라인 쇼핑몰 등을 통한 판매를 준비하고 있다. 또한 학술적 성과로는 SCI 급 논문 게재, 국내·외 학술대회 발표하였으며, 연구결과의 우수성을 인정받아 3건의 우수논문상을 수상하였다. 아울러 연구 결과와 관련된 특허 등록이 이루어졌다.

본 연구 결과의 산업적·기술적 완성을 위해서 다양한 전문 인력 확보 및 타 기관과의 협조를 통한 임상 시험을 지속적으로 진행할 것이다.

SUMMARY

I . Title

Development of Physiology Activity Material from Herbal Honey and Medicinal Herbs

II. Goal and Necessity of This Study

Skin has a function of sensing external changes such as recognizing sensation and temperature control. It also has a barrier function of preventing the loss of body fluid and protecting the body from toxic materials, microbial or physical stimulation, and ultraviolet rays. Skin's outermost horny layer plays an important barrier's role and enables the skin to carry out its normal function of suppressing the loss of moisture and electrolyte from the skin surface. When disorder in the horny layer lowers the moisture content, the skin is damaged as it becomes dry and loses its luster. Psoriasis and atopic dermatitis are typical examples of such a skin disease. Atopic dermatitis is a chronic inflammatory skin disease that accompanies symptoms of eczema such as xeroderma, erythema and exudation whose morbidity rate is rapidly increasing as the commercial use of toxic chemical materials increases with advances in industries.

Atopic dermatitis attacks mostly infants and young children but nowadays adults are also afflicted with it. Although there are many theories about the cause of atopic dermatitis, its causes and outbreak mechanisms are not clearly understood yet. It is still merely inferred that a complex combination of genetic hereditary, environmental, immunological and mental factors seem to be causing atopic dermatitis. Currently, steroid is being used to treat atopic dermatitis. The problem is its various side effects when applied for a long time. For the treatment of atopic dermatitis, development of materials derived from natural is needed to solve various side effects and drug resistance.

Herbal honey, which is used for natural sweetening and health food, contains fructose, Vitamin C, minerals and a variety of biologically active materials whose effectiveness as cosmetic and pharmaceutical materials is widely recognized and its demand is on the increase. Moreover, it is known that herbal honey is capable of suppressing harmful microbes and accelerating wound cure and anti-oxidation function. Recently, researchers have been focusing on the antibacterial activity of bee honey produced in many regions of the world to be used for the treatment of infectious diseases.

Chitosan is a polycationic polymer which has a variety of biological activities which are

effective in anti-cancer, immunity-enhancing, wound curing treatment. Thus chitosan is being used in many different fields as materials cosmetics, artificial skin for surgery and bioanalytic films.

In this study, bioactive compounds which are useful atopic dermatitis using natural substance especially, herbal honey and chitosan develop to solve various problems of atopic dermatitis agents such as serious side effects of treatment, drug resistance. Also, the skin care products develop and commercialize using bioactive compounds by NT/BT.

III. Scope of This Study

The incidence of atopic dermatitis is increasing according to the industrial development and dramatically increased use of harmful chemicals. Currently, the agents used to treatment of atopic dermatitis are an oral antihistamine, local steroids, oral steroids, antibiotics, antivirals, antifungals, desensitization therapy, probiotics and oral/topical immunosuppressants. These agents have the possibility of atrophy of the skin or growth retardation in pediatric patients by long-term administration. For the treatment of atopic dermatitis, development of materials derived from natural is needed to solve various side effects and drug resistance. In this study, bioactive compounds which are useful atopic dermatitis using natural substance especially, herbal honey and chitosan develop to solve various problems of atopic dermatitis agents

- Physicochemical characterization of herbal honey and medicinal herbs
- Antibiotics activity and cytotoxicity of herbal honey and medicinal herbs
- Antibiotics activity according to the composition ratio of herbal honey and medicinal herbs and optimization
- Fraction of water soluble chitosan according to the molecular weight and development of water soluble chitosan with optimal biological activity
- Biological activity according to the composition of water soluble chitosan and herbal honey
- Induction of atopic dermatitis on NC/NGa mice
- Investigation of treatment effects of the atopic dermatitis (In vivo)
- Preparation of water soluble microparticle which is able to load functional ingredient and the evaluation of stability
- Percutaneous absorption formulation using water soluble microparticle
- Development of skin care products

IV. Results of This Study

This study is the development of novel atopic dermatitis agents with optimal antibiotics activity and low cytotoxicity using herbal honey, chitosan and medicine herbs. We confirmed physicochemical characterization, antibiotic activity, biological activity, and treatment effects of according to the composition ratio of these natural materials. Also, we successfully separated by molecular weight of chiosan using ultra membrane system and characterized physicochemical properties and biological activity. Furthermore we introduced to optimal composition ratio chitosan and herbal honey for treatment of atopic dermatitis.

The atopic dermatitis was induced five-week old male NC/Nga mouse by applying DNCB solution for evaluation of final material with optimal composition ratio. The effects of atopic dermatitis treatment were investigated by applying final optimal composition and commercial drug to induced atopic dermatitis mice. The sensory evaluation and scratching frequency of optimal composition of herbal honey and chitosan group was significantly lower than the drug control group. Also, experiments of immune-related cytokines were obtained the same results. The chitosan microparticles which are able to load functional substance were prepared to various factors such as stirring speed and concentration of chitosan solution. We successfully prepared chitosan microparticles and introduced optimal condition. For the treatments of these chitosan microparticles to atopic dermatitis mice, we were able to get excellent results. We were successful in developing effective cosmetics to atopic dermatitis. Currently, these cosmetics are in commercialization stage.

IV. Accomplishment of This Study

The aims of this study were developed novel atopic dermatitis products using natural materials to solve various problems of atopic dermatitis agents such as serious side effects of treatment, drug resistance. Also, the skin care products develop and commercialize using bioactive compounds by NT/BT.

From the results of this study, the participating company has succeeded product and created a product name and design. Furthermore, the participating company applied for the trademark application. Currently, company is ready to sell through online/offline shopping mall. Academic achievements, we presented SCI grade articles and many presentation of domestic and/or international symposium. And we won the best paper award (3) by good results in related society. Also, we successfully registered patents(Korea).

To industrialize results of these researches more effectively, we will continuously expand manpower supplement, communication with expert in the other area.

CONTENTS

Chapter 1 Summary of Research	15
Paragraph 1 Aim and Necessity of Research	15
Paragraph 2 Goal and Scope of Research	18
Chapter 2 Domestic/Oversea Technical Development Status	21
Paragraph 1 Domestic Technical Development Status	21
Paragraph 2 Oversea Technical Development Status	21
Chapter 3 Results and Contents of Research	25
Paragraph 1 Contents of research according to Project	25
Paragraph 2 Organization and Design of Research	29
Paragraph 3 Methods and Results of Research	32
Chapter 4 Attainment and Contribution of Goal	175
Paragraph 1 Attainment of Goal according to the Year	175
Paragraph 2 Contribution to the Related Field	178
Chapter 5 Accomplishment and Application Plan of Results ...	179
Paragraph 1 Accomplishment of Research	179
Paragraph 2 Plan of Industrialization/commercialization	186
Paragraph 3 Application of other Research Field	189
Chapter 6 Overseas Technology Information	191
Chapter 7 Reference	193

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	15
제 1 절 연구개발의 필요성 및 목적	15
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	18
제 2 장 국내외 기술개발 현황	21
제 1 절 국내 기술 현황	21
제 2 절 국외 기술 현황	21
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	25
제 1 절 과제별 연구 개발 내용	25
제 2 절 연구개발 추진 체계 및 설계	29
제 3 절 연구방법 및 결과	32
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	175
제 1 절 연차별 목표 달성도	175
제 2 절 관련분야 기여도	178
제 5 장 연구개발성과 및 성과 활용 계획	179
제 1 절 연구개발 성과	179
제 2 절 실용화·산업화 계획	186
제 3 절 타연구 등에 활용	189
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	191
제 7 장 참고문헌	193

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구 개발의 필요성 및 목적

1. 연구개발의 필요성

피부는 환경 변화에 대응하여 인체 내부의 항상성을 유지하기 위한 장벽 기능, 외부 변화를 인지하기 위한 감각 기능, 체온 조절 기능 등 인체가 생존하는 데 있어 필수적인 다양한 기능을 수행하고 있다. 특히 피부의 가장 외층인 표피는 외부 환경으로부터 인체를 보호할 뿐 아니라, 수분증발 및 손실을 억제하여 피부 건조화를 막는다. 표피는 15~20%의 수분을 함유하고 있으며 수분이 10%이하로 떨어지면 피부가 건조해지고, 거칠며 윤기가 없어져 피부손상이 일어난다.[1-3] 피부 건조로 일어나는 질환으로 건선염과 아토피 피부염(atopic dermatitis) 등이 알려져 있는데 이 중 특히 아토피성 피부염은 아토피 알레르기를 가진 사람에서 나타나는 대표적인 피부질환으로 환경의 급속한 변화, 유기 화합물에 노출이 증가되는 사회구조로 인하여 최근 유아에서부터 성인에 이르기까지 다양한 연령층에서 급속도로 증가하고 있다. 아토피 피부염의 발병원인은 유전적, 면역학적 요인, 환경적, 정신적 요인 등이 악화 요인으로 작용한다고 알려져 있으나 그 원인은 확실하게 규명되지 못하고 있다.[4-10]

아토피 피부염은 영아와 어린이에게 집중적으로 발생하며, 최근에는 성인층에서도 빈번하게 발생하는 만성, 재발성, 염증성 피부질환으로 피부 건조화뿐만 아니라 표피 과증식, 홍반, 부종, 심한 소양증, 삼출과 부스럼 딱지를 특징으로 한다. 급성기에는 표피 내에 수포를 형성하며 만성기에는 피부에 비후가 생기는 피부염증 등과 같은 여러 증상을 같이 수반하는 피부질환이다.[11-14] 이러한 아토피 피부염으로 고통 받고 있는 환자가 전 세계적으로 증가하고 있으며, 미국, 일본, 프랑스, 독일, 영국, 스페인, 이탈리아 등 세계 7대 거대 시장의 4,000만 명 이상이 아토피 피부염으로 고통 받고 있는 것으로 보고되고 있다. 국가별로는 미국에서 아토피 피부염 발병률이 6.4%로 가장 높게 발생하는 것으로 보고되었다. 세계 7개국 아토피 피부염 환자의 연령별 발병률 분석 결과 0세 ~ 4세 소아에게서 21% 정도의 높은 발병률을 보이고 있다. 이러한 보고에서 보듯이 국가마다 약간의 편차는 보이지만 아토피 피부염으로 수많은 환자들이 전 세계적으로 고통 받고 있다.[15-17]

국내에서도 급격한 산업화와 서구화 등의 영향으로 피부 면역질환 발병률이 매년 증가하고 있으며, 유아의 18%정도가 아토피 피부염으로 시달리고 있으며, 2007년 대한피부과학회 보고에 의하면, 06년 아토피 피부염으로 전국 43개 종합병원 피부과를 방문한 환자는 총 31,466명으로 96년에 비해 2.7배나 증가하였다. 12세 이하의 소. 유아가 전체의 50%정도를 차지하고 있다. 이러한 보고에서 보듯이 국내를 비롯한 전 세계 아토피 피부염 발병률은 매년 증가하고 있으며, 여러 가지 유발 요인 등으로 인해 증가 추세가 지속될 것으로 전망되어 커다란 사회적 문제로 대두되고 있다.

또한 아토피 피부염 환자는 대인기피증과 사회 부적응증을 갖기 쉬우며, 우울증, 소외감, 불안증, 수면장애 등 심각한 정신적, 육체적, 사회적 장애를 유발한다. 아토피 환자들은 천식 및 알레르기성 비염으로 발전하는 등 아토피는 피부뿐 만 아니라 체내 면역질환까지 일으키는 큰 질환이다. 이러한 아토피 피부염 치료제로 현재 사용되고 있는 치료제는 증상을 완화시키는 목적의 치료제로써, 근본적이며 획기적인 치료제 개발이 절실한 상황이다. 현재 아토피 피부염 치료제로 사용되고 있는 스테로이드제, 항히스타민제, 항생제, 면역억제제 등은 각각 인체에 심각한 부작용을 초래할 수 있어 지속적인 사용이 어려운 실정이다.[18-20] 아토피 피부염은 전 세계적 사회 문제로 이슈화 되고 있어 이러한 피부질환에 대한 관심이 고조 되고 있으며 새로운 치료제의 개발에 대한 요구를 증가시키고 있다. 아토피 피부염 증가와 더불어 관련 시장도 매년 25%이상 비약적으로 성장하고 있다.

구 분	현재의 시장 규모 (2012년)	예상 시장 규모 (2015년)
세계시장규모	2조 9282억원	3조8,974원
한국시장규모	1,756억원	2,338억원

※산출근거 : 한울제약, 2008년

현재 다양한 종류의 피부질환 치료제가 시판되고 있으나, 이러한 약제의 대부분은 그 약용성분이 인공적으로 합성(특히 부신피질 스테로이드제 함유)된 것으로 해당 질환에는 효과가 클 수 있지만, 장기간 사용하는 경우 심각하게 호르몬을 교란시키는 부작용을 초래하거나 또는 병원균의 내성을 유발하여 기대하는 치료효과를 얻지 못하는 문제점을 갖고 있다.[21, 22] 이와 관련된 국내·외적 현황을 살펴보면 다음과 같다.

□ 국외

○ 난치성 피부질환 치료제로서 면역억제제, 항염증제, 항진균제, 항균제 등이 많이 사용되고 있지만, 피부질환 특이적인 치료제로 개발되지 않아 피부질환 치료에만 국한되어 있지 않은 실정이다.

○ 아토피 등 난치성 피부질환에 대한 치료제 내지 증상완화제로서 흔히 사용되는 천연물 유래 국부용 제제 등 대체의약품의 상당수는 신뢰할 임상자료의 미비, 함량의 심각한 편차, corticosteroids 등 합성물에 의한 오염 등으로 심각한 부작용이 보고되는 예가 많아 미국, 유럽 등에서는 이들에 대한 감시와 규제 및 규격화의 필요성이 대두되고 있다.

○ 난치성 피부질환에 대한 특허출원은 아토피에 집중되어 있으며 2005년까지 미국, 일본, 유럽 등에서 각각 651, 706, 248 건의 특허가 출원되었다. 이들 중에서 천연물의 경우는 일본이 압도적으로 많아 257건을 이루나, 미국과 유럽은 30건 이하로서 대부분의 특허가 합성물질에 집중되어 있다.

□ 국내

국내의 기술 현황 역시 세계적인 추세와 비슷하게 인공적인 합성물질에 집중되어 있으나 최근에는 약물치료의 부작용에 의한 의식주 생활 개선에 주안점을 두고 있거나 천연물 유래 생리활성 물질에 대하여 연구를 진행하고 있으나 미비한 실정이다.

○ 보습 및 약물 치료제 개발 : 부신피질 스테로이드, 항염진통제, 국소용 면역 억제제, 항히스타민제, 2차감염시 국소 항생제, 항진균제 등이 있다.

○ 아토피용 화장품 개발 : 아토피성 피부에 궁극적인 치료를 목적으로 하기보다는 아토피성 증상을 완화 또는 개선이 주목적이며, 피부에 바르는 외용제로서 번거로움이 있다. 이에 따라 냉각 스프레이, 청량감을 주는 멘톨, 카올린, 아로마 등의 피부진정제 등에 관한 연구가 진행되고 있다.

○ 약물 치료에 따른 부작용 호소로 인해 유기농산물섭취, 천연섬유, 유해물질 제거 등 의식주 생활 개선에 주안점을 두고 있다.

2. 연구개발의 목적

본 연구에서는 기존의 아토피 피부염 치료제의 심각한 부작용 유발, 약물의 내성 등에 의한 치료효과 저하라는 문제점을 극복하기 위하여 피부세포인 케라티노사이트를 활성화 시킬 수 있는 천연물 특히 토종꿀, 생약초, 수용성키토산을 이용하여 아토피 피부염에 유용한 생리활성 물질을 발굴하고 소재를 개발하고자 한다.

토종꿀의 경우, 피부의 멜라민 색소를 얹게 하는 기능, 보습효과 등이 있어 화장료로 많이 사용되고 있다. 또한 모세 혈관의 성장과 형성을 촉진하며 산화를 방지하는 물질은 염증과 부종을 억제하는 효과가 있어 피부질환의 억제 및 유해 세균의 사멸 효과를 기대할 수 있다.[23-27]

한방에서 많이 사용되는 생약초 중 피부개선, 피부 질환의 치료에 유용한 약초가 다수 있으며, 그 중 작약, 줄풀, 미치광이풀 등은 이러한 질환에 효과적인 것으로 민간 의학에서 많이 활용되고 있다. 작약은 병원성 세균의 사멸효과, 피부의 진정 작용, 항염증 등에 효과가 우수하다.[28, 29] 줄풀의 경우, 줄풀을 끓인 물에 목욕을 하였을 때 병원균과 노폐물을 배출하는 효과가 있을 뿐만 아니라 습진, 욕 등 피부질환에 유용하다. 미치광이풀은 피부개선 및 피부 진정효과가 우수한 것으로 알려져 있다. 아울러 이러한 생약초는 토종꿀과 혼합되었을 때 토종꿀의 발효를 억제하여 토종꿀의 보존 기간을 증가시킬 수 있는 역할을 동시에 할 수 있을 것이다.

수용성 키토산은 기능성 물질을 안전하게 보호할 수 있는 역할을 할 수 있어 최근 약물이나 유전자 전달체의 담체로 많은 연구가 진행되고 있다. 또한 키토산은 자체적으로 생리활성이 우수한 물질로 항균작용, 면역력 증강이 효과가 높아 피부의 정상화, 빠른 시간내에 피부를 재생시킬 수 있으며, 화장독, 기미, 주근깨 등의 제거 효과가 높다. 특히 수용성이 높은 키토산의

경우 피부세포와 친화력이 높아 아토피성 피부염, 건선 피부병, 알레르기성 피부병에 효과가 아주 우수하다.[30, 31]

따라서 본 연구에서는 이러한 천연물(토종꿀, 생약초, 수용성키토산)을 이용하여 바이오 기술과 나노기술을 융합하여 아토피 피부질환 등에 최적의 효과를 얻을 수 있는 신기능성 생리활성 소재를 개발하고자 한다.

제 2 절. 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종 목표

- 기존의 아토피성 피부염 치료제의 부작용을 최소화하고 효과를 최대화하기 위하여 키토산/토종꿀을 이용하여 아토피 피부염에 유용한 생리활성 물질의 발굴 및 제형화
- 생리활성 물질을 담지한 아토피성 피부염에 유용한 스킨케어 제품 개발을 통한 상품화

2. 연차별 연구 목표 및 내용

가. 1차년도

연도	세부 과제	세부연구개발 목표	연구개발의 내용
2009년	제1 세부	토종꿀로부터 아토피 피부염에 유용한 생리활성 소재 발굴	<ol style="list-style-type: none"> 1. 활성물질의 물리화학적 특성 조사 2. 생리활성 물질의 독성 확인 3. 생리활성 물질의 항균성 확인 4. 토종꿀의 보습성 확인
	제1 협동	생약초로부터 아토피 피부염에 유용한 생리활성 소재 발굴	<ol style="list-style-type: none"> 1. 생리활성 물질 추출 2. 활성물질의 물리화학적 특성 조사 3. 생리활성 물질의 독성 확인 4. 생리활성 물질의 항균성 확인

나. 2차년도

연도	세부 과제	세부연구개발 목표	연구개발의 내용
2010년	제1 세부	토종꿀과 생약초를 이 용한 아토피 피부염에 효과적인 생리활성 물 질의 조성비 최적화	1. 토종꿀과 생약초의 혼합 조성에 따른 항균성 및 독성 확인 2. 혼합조성의 최적 비율 도출 - 항균성 - 세포독성 3. 수용성키토산을 이용한 토종꿀과 생약초 혼합물의 제제연구
	제1 협동	토종꿀과 생약초를 이 용한 생리활성 물질의 아토피 피부염 효과 입증	1. 아토피 피부염이 유발된 동물 모델화 - NC/Nga 마우스 2. 토종꿀과 생약초를 이용한 생리 활성 물질의 관능 평가 3. 혈액 중 백혈구와 호중구, 호산구와 혈장 IgE 함량 평가

다. 3차년도

연도	세부 과제	세부연구개발 목표	연구개발의 내용
2011년	제1 세부	상품화를 위한 생리 활성 물질의 다양한 제품 개발	1. 발굴된 생리 활성 물질이 담지된 수 용성키토산 나노/마이크로 입자 등의 제품 개발 2. 수용성키토산과 토종꿀의 생리활성 물질의 스킨케어 제품화 3. 수용성키토산 나노/마이크로 입자의 안정성 실험
	제1 협동	상품화를 위한 생리 활성 물질의 다양한 제품 개발	1. 발굴된 생리 활성 물질과 수용성키토 산을 이용한 화장료(스킨, 로션, 팩 등) 개발 2. 세포실험 및 동물실험을 통한 아토피 피부염 개선용 화장료 효능 입증 3. 전임상 실험을 통한 화장료의 제품화 기틀 마련

제 2장 국내외 기술 개발 현황

제 1절 국내 기술 개발 현황

현재 국내에서 개발된 피부질환 치료제는 전무한 실정으로 치료제의 개발보다는 피부염을 개선하기 위한 화장품 및 식품 분야에 집중되어 왔으나, 90년대 후반 이후 아토피 피부염 치료제를 개발하기 위한 연구가 제약회사나 벤처기업 등을 중심으로 추진되고 있다.

□ 포항공대 벤처 기업인 제노마인(주)는 아토피 피부개선용 화장품인 "아토웰빙"을 출시하여 하였으며, 주로 항균, 보습 등을 위한 천연생리활성 물질로 구성되어 있음

□ 동아제약은 2008년 출시를 목표로 천연물 유래(다래 추출물) 아토피 치료제 DA-9102에 대한 임상 2상 실험을 진행 중이며 상품화 시 비스테로이드 치료제로서의 차별성 효과가 기대되며, (주)팬제노믹스와 아토피 치료제 개발을 위한 공동 연구 진행 중

□ (주)비피도의 지근억 박사팀은 인체의 면역 불균형이 아토피 발생과 관련이 있다는 사실을 토대로 유아들의 장 면역 기능을 활성화하는 비피더스 유산균을 개발, 유산균을 이용하여 아토피 피부염 예방기술 개발

□ 아토피 피부염의 원인이 다양하여 하나의 물질로는 개선할 수는 있어도 완치하기 어려움, 이에 다양한 물질들이 혼합되어 있는 한방을 이용한 아토피 치료제 개발 시도가 많이 이루어지고 있음

□ 국내 피부질환 치료제 시장의 규모를 보여주는 정확한 통계수치는 아직까지 없는 실정이나, 그 규모를 추정해 볼 때 아토피 및 습진의 경우 예방 및 치료를 위해 사용되는 금액은 약 4천~5천억이 소요될 것

제 2절 국외 주요 기술 개발 현황

미국, 일본 등 선진국을 중심으로 아토피 피부염의 치료를 위한 치료제 개발이 활발히 진행되고 있으며, 신규 고 효능 합성 또는 생물유래물질의 개발 및 응용 연구에 집중하고 있으며 아토피 피부염의 발병 메카니즘 규명을 위한 많은 연구 개발도 추진 중에 있다.

□ 아토피 피부염 환자의 스테로이드의 용량을 줄이는 연구를 많이 수행하고 있고, 특히 세포 간 지질을 구성성분(세라마이드, 지방산, 콜레스테롤)으로 하는 피부 외용제에 스테로이드를 함께 사용하면 스테로이드의 양을 1/10로 감소하여도 같은 효과를 나타낸다고 보고됨

○ 세라마이드를 한가지 사용하는 것보다 두 종류의 세라마이드를 사용하는 것이 더 효과적이며, phytosphingosine을 함께 사용하면 더 좋은 치료 효과 보임

□ 2000년 미국 Human Genome Sciences사는 새로 만들어진 'Met-Ckb7'이란 분자가 알려지기를 야기하는 혈액세포의 운동을 방해한다는 사실을 발견하여 이 분자가 약품으로 개발될 수

있는지를 연구 중이며, 이 약이 상용화되면 각종 알러지 반응들을 원천적으로 예방할 수 있을 것으로 기대하고 있음

□ 2002년 10월 미국 여러 대학의 공동연구로 아토피 피부염 환자에서 천연 항균 펩타이드 (cathelicidins과 beta defensins)의 함량이 감소하는 현상을 발견함

○ 항균 펩타이드 포도상구균의 사멸을 유도하는 기능을 수행하고 있어, 항균펩타이드의 감소 원인을 규명하여, 이를 보충하는 방법으로 아토피를 개선하고자 함

□ 2002년 일본 히로사키대 의학부 부속병원 피부과 나카노 하지메 조교수 연구팀은 인공 DNA를 이용한 아토피성 피부염 치료제를 개발

○ NF-kB와 결합하는 유전자와 유사한 인공 DNA(NFkB decoy DNA)를 개발하여 NF-kB와 결합시킴으로써 NF-kB의 작용을 억제시키는 원리로 아토피 및 염증 질환 치료제를 연구함

○ 2005년 인공 DNA를 이용한 아토피성 피부염 연고제가 임상에서 우수한 치료효과가 있는 것으로 확인된 바 있음

□ 세계적인 피부과 전문회사인 스티펠(Stiefel Laboratories)사의 아토피성 피부염 치료제인 미믹스 크림(MimyX Cream)이 '05년 미 FDA에서 판매승인을 받음

○ 미믹스 크림은 국소적용 비스테로이드 치료제로서 모든 연령 사용가능함. 피부 가장 외곽층인 각질(stratum comeum)의 구조와 성분을 회복시킴으로써 아토피를 치료하는 새로운 접근방식임

□ 일본 기린맥주사는 알레르기 증상을 강력히 완화하는 유산균(Lactobacillus paracasei)를 발견, 2005년 9월 관련 제품 출시

○ 유산균 유래의 활성화 분획이 macrophage와 같은 면역에 관련되는 보조세포를 자극하여 IL-12/IL-18을 생성하여 Th1 cell을 많이 생성하고 Th2 cell을 적게 생성하는 방법으로 결과적으로 아토피에 효과적인 IFN-gamma를 대량생산하는 메카니즘임

□ 최근 미국에서는 EPA를 비롯하여 DHA, GLA, LA 등 천연의 고도불포화 지방산의 함량 아토피 활성을 개와 양들에 대한 동물실험으로 입증함

○ 이들이 arachidonic acid cascade에 미치는 활성기작이 널리 규명되어 있어서 피부 질환 치료제에의 개발가능성이 높게 평가받고 있음. 따라서 이들이 고농도로 함유된 어유(fish oil), 식물의 종자유 등이 피부질환 증상완화제의 성분으로 널리 활용되고 있음

□ 기존 합성 의약품의 부작용 등으로 천연물을 이용한 신약 개발 활발

○ 미국은 '94년에 제정된 DSHEA(Dietary Supplements and Human Education Act) 법을 토대로 생물유래물질 산업이 급성장의 모멘텀을 갖추게 되었으며, 정부와 의회의 지원 정책으로 세계 전통의약의 현대화 연구를 미국이 주도. 미국 FDA는 DSHEA의 후속조치로 2000년에 "Botanical Drugs Guidance for Industry"를 만들어 전통약물을 포함하는 생약원료를 이용한 생물유래물질 신약에 대한 새로운 등록허가 요건 규정을 만들어 시행함으로써 향후 세계 전통약물의 현대화와 산업화의 주도권을 장악할 수 있는 토대를 마련함

○ 생약 내지는 생물유래물질 제품이 개발품을 이름(USPTO 에 등록된 관련제품의 특허 등록 건수는 1976년에서 2003년까지 28년 동안 1,968건이 등록된 것에 비해, 2001년부터 2003년까지 1,359건의 특허가 등록됨)

□ 세계적으로 아토피 및 습진, 건선, 진균질환, 여드름 시장이 가장 큰 것으로 알려져 있으며, 현재 피부질환 치료제를 판매하는 세계 상위 30개 회사의 매출은 약 121억\$ 정도 (자료출처 : DataMonitor 2007)

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 과제별 연구개발 내용

1. 제 1세부과제 : 토종꿀로부터 생리활성 소재 개발

가. 토종꿀에서 아토피 피부염에 유용한 생리활성 물질의 물리화학적 특성 조사

토종꿀의 물리화학적 특성을 규명하기 위하여 성상을 조사하고 UV, IR, NMR 분석과 함께 저분해능 및 고분해능 HPLC 분석을 통해 특성 규명

나. 생리활성 물질의 독성 확인

Human Keratinocyte cell(HaCaT)을 이용하여 세포 생존율을 평가하여 토종꿀의 세포독성을 측정한다. 이 세포는 fetal bovine serum을 포함하는 RPMI-1640배지에서 증식한다. 토종꿀을 단계적으로 희석시킨 후에 충분히 증식시킨 세포를 96-well plate에 적당량이 되도록 만들고 37°C에서 24시간 배양(incubation)시킨다. 여기에 MTT용액(5mg/ml MTT in phosphate-buffered saline)을 각 웰에 가하여, 37°C에서 4시간 incubation 한 후, DMSO 용액을 가하여 생성된 MTT-formazan 생성물을 녹인다. 그 후 ELISA reader를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정한다.

다. 생리활성 물질의 항균활성 확인

항균활성측정에 필요한 bacterial cells을 배양한 후 토종꿀을 필터로 걸러준 후 Bactopectone을 이용하여 96 well microtiter plate(Nunc)에 단계적으로 적당량 넣고 희석한다. 항생제도 위와 같은 방법으로 희석한다. 여기에 bacterial cells가 포함된 배지를 적당량 가한 후, 일정한 온도에서 하룻밤 방치한다. 그 후 *Escherichia coli*, *B. subtilis*는 LB agar, *Pseudomonas aeruginosa*는 NA+0.5NaCl agar, *Staphylococcus aureus*는 TSA 배지를 이용하여 spreading하여 배양한 후 그 결과를 확인한다.

라. 토종꿀의 보습성 확인

토종꿀의 보습성 확인을 위해 처치부위의 수분량 변화로 피부 보습 효과를 측정한다.

마. 토종꿀과 생약초의 혼합 조성에 따른 항균성 및 독성 확인

(1) 토종꿀과 생약초의 혼합조성에 따른 항균성 측정은 항균활성 측정에 필요한 bacterial cells을 배양한 후 토종꿀을 필터로 걸러준 후 bactopectone을 이용하여 96 well microtiter plate(Nunc)에 단계적으로 적당량 넣고 희석한다. 항생제도 위와 같은 방법으로 희석한다. 여기에 bacterial cells가 포함된 배지를 적당량 가한 후, 일정한 온도에서 하룻밤 방치한다. 그 후 *Escherichia coli*, *B. subtilis*는 LB agar, *Pseudomonas aeruginosa*는 NA+0.5NaCl agar, *Staphylococcus aureus*는 TSA 배지를 이용하여 spreading하여 배양한 후 그 결과를 확인한다.

(2) 토종꿀과 생약초의 혼합조성에 따른 독성 측정은 Human Keratinocyte cell(HaCaT)을

이용하여 세포 생존율을 평가하여 추가적으로 토종꿀의 세포 독성을 측정한다. 이 세포는 fetal bovine serum을 포함하는 RPMI-1640배지에서 증식한다. 토종꿀과 항생제를 단계적으로 희석시킨 후에 충분히 증식시킨 세포를 96-well plate에 적당량이 되도록 만들고 37°C에서 24시간 배양(incubation)시킨다. 여기에 MTT용액(5mg/ml MTT in phosphate-buffered saline)을 각 웰에 가하여, 37°C에서 4시간 incubation 한 후, DMSO 용액을 가하여 생성된 MTT-formazan 생성물을 녹인다. 그 후 ELISA reader를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정한다.

바. 토종꿀과 생약초 혼합조성의 최적 비율 도출

토종꿀과 생약초의 혼합조성에 따른 세포 및 동물 실험을 통하여 항균성 및 독성실험 결과에 따라 항균성이 매우 높은 성분 비율과 독성이 가장 낮은 성분 비율을 선택하여 최적화

사. 수용성키토산을 이용한 토종꿀과 생약초의 혼합물의 제제 연구

토종꿀과 생약초가 혼합된 생리활성 물질을 수용성키토산 나노입자/마이크로 입자로 제조 한 다음 다양한 제품 개발

아. 발굴된 생리활성 물질이 담지된 수용성키토산 나노/마이크로 제형 개발

본 연구실에서 보유하고 있는 수용성키토산 나노입자 제조기술과 키토산 마이크로 입자 제조 기술을 활용하여 수용성키토산을 이용한 토종꿀과 생약초의 혼합물을 다양한 제품으로 개발

자. 수용성키토산 나노/마이크로 입자의 안정성 평가

주사전자현미경(SEM)과 투과전자현미경(TEM)을 통해 제조된 나노/마이크로 입자의 morphology와 생리활성 물질의 담지능력 확인

차. 수용성키토산과 생리활성 물질의 스킨케어 제제화

토종꿀과 생약초가 혼합된 수용성키토산 나노입자/마이크로 입자를 다양한 제형으로 만든 후, 아토피가 유발된 동물 모델을 이용한 아토피 동물실험을 통해 적합한 제형을 선택 후 스킨케어 제제화

카. 상품화

(1) 최종 선발된 생약초와 토종꿀이 담지된 수용성키토산 나노/마이크로 스킨케어 제제를 전임상 실험을 통하여 제품의 효과를 입증

(2) 전임상 실험의 결과를 바탕으로 이를 제약업체에 기술 이전하여 대량 생산화 구축하여 상품화

2. 제 2 세부과제

가. 생약초로부터 생리활성 물질의 물리화학적 특성 조사

생약초에서 추출한 생리활성 물질의 물리화학적 특성을 규명하기 위하여 성상을 조사하고 UV, IR, NMR 분석과 함께 저분해능 및 고분해능 HPLC 분석을 통해 특성 규명

나. 생리활성 물질의 독성 확인

Human Keratinocyte cell(HaCaT)을 이용하여 세포 생존율을 평가하여 생약초의 세포 독성을 측정한다. 이 세포는 fetal bovine serum을 포함하는 RPMI-1640배지에서 증식한다. 토종꿀과 항생제를 단계적으로 희석시킨 후 충분히 증식시킨 세포를 96-well plate에 적당량이 되도록 만들고 37°C에서 24시간 배양(incubation)시킨다. 여기에 MTT용액(5mg/ml MTT in phosphate-buffered saline)을 각 웰에 가하여, 37°C에서 4시간 incubation 한 후, DMSO 용액을 가하여 생성된 MTT-formazan 생성물을 녹인다. 그 후 ELISA reader를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정한다.

다. 생리활성 물질의 항균활성 확인

항균활성측정에 필요한 bacterial cells을 배양한 후 생약초를 필터로 걸러준 후 bactopectone을 이용하여 96 well microtiter plate(Nunc)에 단계적으로 적당량 넣고 희석한다. 항생제도 위와 같은 방법으로 희석한다. 여기에 bacterial cells가 포함된 배지를 적당량 가한 후, 일정한 온도에서 하룻밤 방치한다. 그 후 *Escherichia coli*, *B. subtilis*는 LB agar, *Pseudomonas aeruginosa*는 NA+0.5NaCl agar, *Staphylococcus aureus*는 TSA 배지를 이용하여 spreading하여 배양한 후 그 결과를 확인한다.

라. 아토피 피부염이 유발된 동물 모델 개발

(1) NC/Nga 마우스에서 아토피성 피부염의 유발

마우스의 등을 귀 하단부에서부터 꼬리 상단부까지 전체를 제모한 후에 수산화알루미늄액과 오범알부민을 복강주사한 후, 3일째 되는 날 인산완충용액을 등에 도포하고 증발을 막기 위하여 Tegadum을 부착한다. 나머지 군들은 인산완충용액과 오범알부민을 같은 방법으로 도포하고 부착한다. 3일이 지난 후 부착한 패치를 떼어내고 2주일간의 잠복기를 둔다. 2주일 후 두 번째 피부자극을 위해 대조군은 인산완충용액을 복강주사하고 다른 군들은 오범알부민을 인산완충용액에 녹여서 복강 주사한다. 3일 후 첫 번째 패치를 부착하였던 것과 동일한 방법으로 등피부에 두 번째 패치를 부착하였다가 3일 후 떼어낸다.

(2) NC/Nga 마우스에서 아토피성 피부염의 유발

마우스의 등을 귀 하단부에서부터 꼬리 상단부까지 전체를 제모하고 24시간 방치한 후, DNCB용액을 제모 부위에 도포하고 3일 후 2차 도포한다. 1차 도포 후 7일째부터는 1주일에 3회씩 5주간 DNCB용액을 재도포하여 아토피성 피부염을 유발한다.

마. 생리활성물질의 관능 평가

시험물질 도포 후 1, 3, 7, 14일이 되는 시점에 실시한다. 본 평가방법은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법으로서 아토피성 피부염의 심각성 정도를 다

음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총합으로 나타낸다. 평가항목은 홍반(erythema), 가려움과 건조피부(pruritus & dry skin), 부종과 혈종(edema & excoriation), 짓무름(erosion), 그리고 태선화(lichenification)이다. 각각의 항목에 대해 증상 없음(0점), 증상 약함(1점), 보통(2점), 심함(3점),으로 채점한 후, 5항목의 점수를 합산함으로써 최소 0점(아무증상이 없는 상태)에서 최고 15점(모든 항목의 증상이 심한 상태)사이의 평가점수를 부여한다.

사. 혈액 중 백혈구와 호중구, 호산구와 혈장 IgE 함량 평가

최종 관능평가를 실시한 후, EDTA 처리된 튜브형 주사기로 심장 혈액 0.5ml을 채취한다. 전혈의 혈액 중 백혈구와 호중구, 호산구의 함량을 측정하고 ELISA kit를 사용하여 혈청 중 IgE 함량을 측정한다.

아. 세포실험 및 동물 실험을 통한 효능 입증

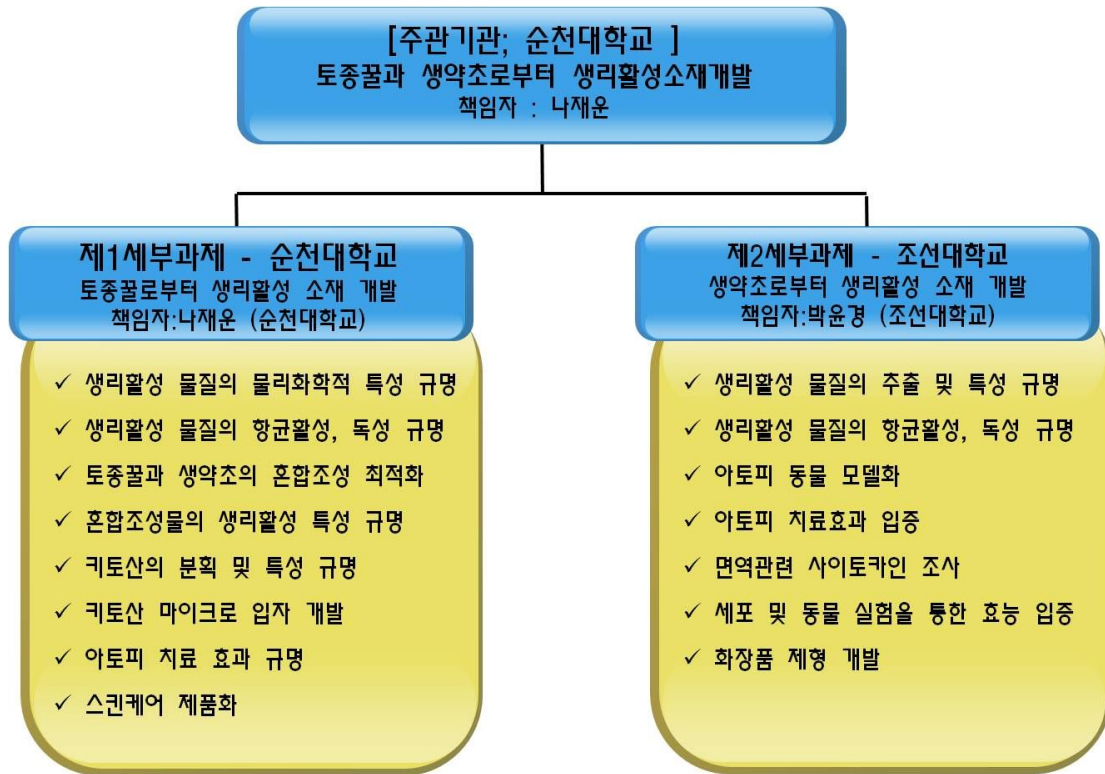
생약초에서 추출한 생리활성 물질이 세포 및 동물 실험을 통해 독성이 없고 항균활성이 뛰어나며 임상적 육안 평가법을 통해서 효능 입증

자. 전임상 실험을 통한 화장료의 제품화

- (1) 세포실험 및 동물실험을 통한 아토피 피부염 개선용 화장료 효능 입증
- (2) 전임상 실험의 결과를 바탕으로 이를 기술 이전하여 대량 생산화 구축

제 2 절. 연구개발 추진 체계 및 설계

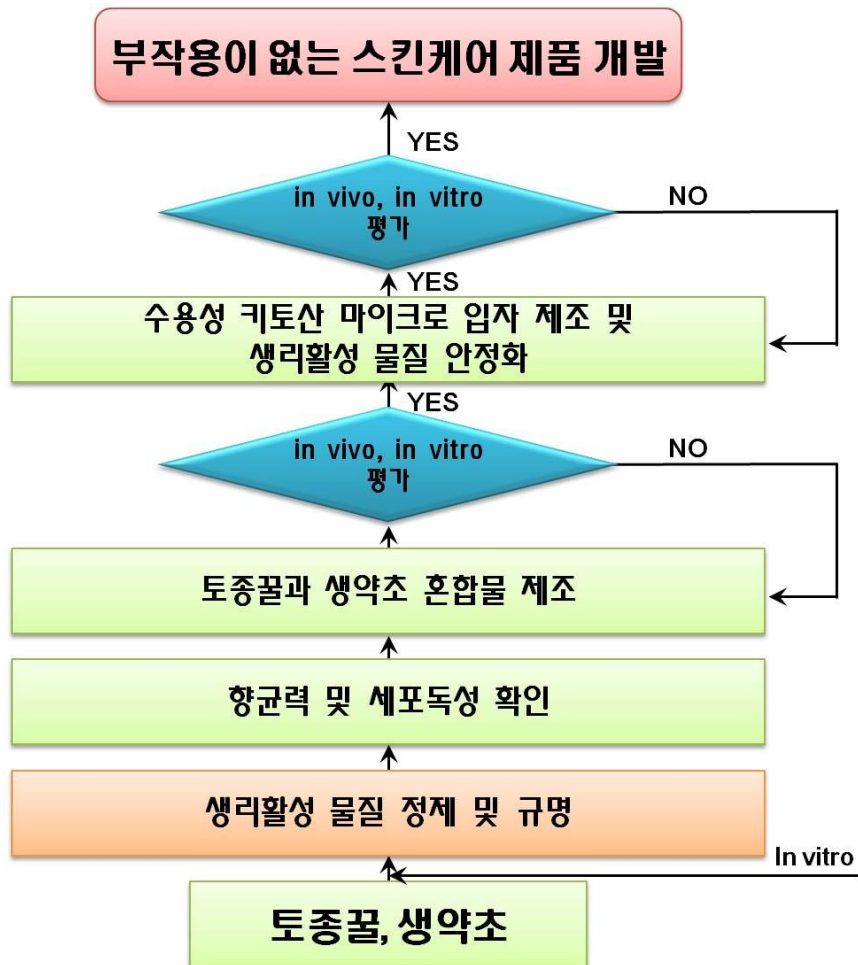
1. 연구개발 추진 체계



본 연구는 토종꿀/생약초/키토산으로부터 아토피성 피부염에 유용한 최적의 생리활성을 갖는 물질을 발굴하고 이를 이용한 스킨케어 제품을 개발하기 위하여 공학과 생물학을 접목시키는 두 개의 세부과제로 구성하였다.

제 1세부과제에서는 생리활성 물질과 키토산의 물리화학적 특성 등을 규명하며, 키토산을 이용한 기능성 물질을 담지 할 수 있는 마이크로 입자를 개발함으로써 기능성 물질에 대한 안정성 부여 및 이를 이용한 스킨케어 제품을 개발하였다. 제 2세부 과제에서는 생리활성 물질의 추출 및 특성 규명, 아토피 유발 동물 모델화 및 이를 통한 아토피 치료효과에 대한 효능을 입증하고 화장품 제형 등을 제시하였다.

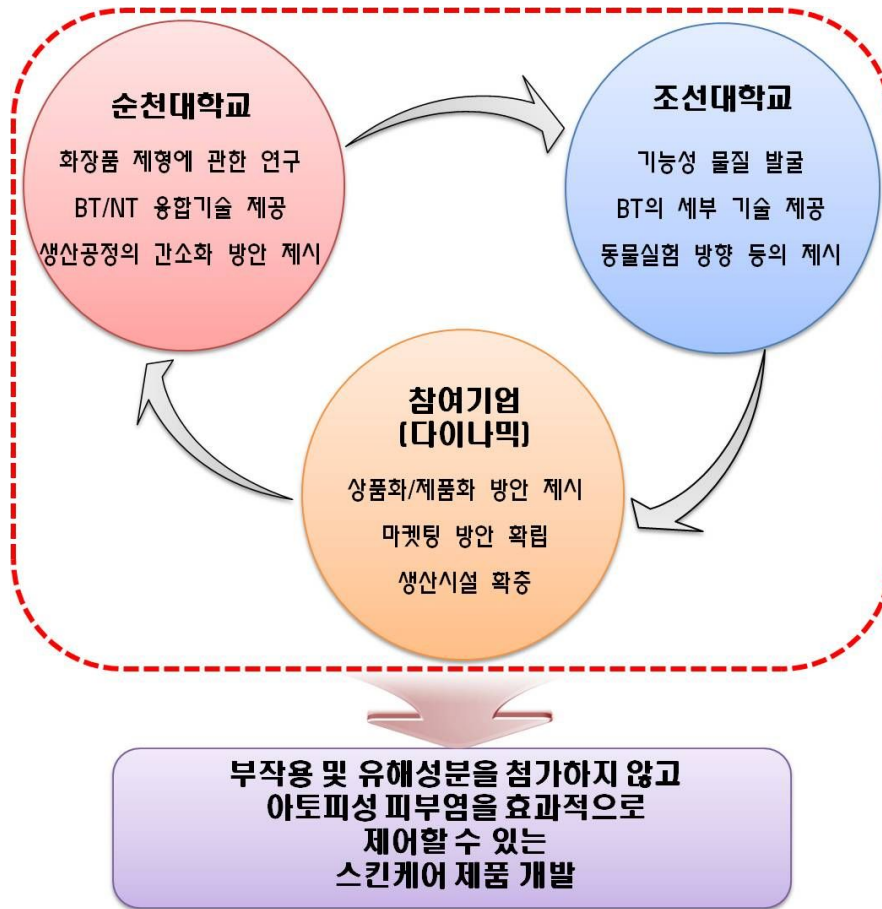
2. 연구개발 방법의 설계



본 연구에서는 기존의 아토피성 피부염 치료제에 함유되어 있는 스테로이드를 포함하지 않으면서 이와 동등한 효과를 나타낼 수 있는 천연물에서 유래된 키토산/토종꿀 등을 이용하여 부작용이 없는 스킨케어 제품을 개발하고자 하였다.

세부과제 간 도출된 결과를 바탕으로 다양한 조건을 변화시키면서 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통하여 최적의 혼합조성을 도출하고 최종적으로 최적화된 혼합조성에서 화장품 시제품을 제작하였다.

3. 기관별 협력 체계



본 연구에서는 부작용 및 유해성분을 첨가하지 않고 아토피성 피부염을 효과적으로 제어할 수 있는 스킨케어 제품 개발을 위하여 순천대학교, 조선대학교, 참여기업(다이내믹(주))간 세부화된 업무분장 및 협력을 하였다.

순천대학교에서는 공학적인 관점에서 화장품 제형에 관한 연구, BT/NT의 융합기술 제공, 생산 공정의 간소화 방안을 제시하고, 조선대학교에서는 새로운 기능성 물질의 발굴, BT의 세부 기술 제공, 동물실험 방향 등을 제시하였다. 아울러 참여기업인 다이내믹(주)에서는 연구결과를 바탕으로 상품화/제품화 방안을 확립하고 마케팅 방안을 마련하고 생산시설 확충 등을 계획하였다.

제 3 절. 연구방법 및 결과

1. 제 1 세부과제

가. 1차년도

토종꿀은 피부의 멜라민 색소를 얹게 하는 기능, 보습효과 등이 있어 화장품료로 많이 사용되고 있다. 또한 모세 혈관의 성장과 형성을 촉진하며 산화를 방지하고 염증과 부종을 억제하는 효과가 있어 피부질환의 억제 및 유해 세균의 사멸 효과를 기대할 수 있다. 따라서 본 연구에서 사용된 토종꿀은 피부염 치료에 있어 유용한 생리활성 물질이 될 것으로 사료된다.

(1) 연구 방법

(가) 실험재료

① 토종꿀 채밀

토종꿀은 우리나라 토종 야생벌이 산속을 자유롭게 날아다니며 돌이나 나무 사이에 벌집을 지어 만든 꿀이다. 본 연구에 사용된 토종꿀은 전남 지리산의 해발 1,800 m 이상의 고지대에서 10월 중·하순에 채밀된 것을 사용하였다. 지리산 토종꿀은 무공해 청정지역에서 철따라 피는 약초 꽃이나 야생화들을 먹고 서식하는 토종벌에 의해 만들어지는 것으로 로얄제리, 프로폴리스, 화분, 밀납, 비타민류, 무기물 등이 다량함유 되어있다.

② 인조꿀의 제조

본 연구에 사용된 토종꿀의 화학적 성분 및 구성, 생리활성 특성을 규명하기 위하여 단당류와 다당류를 이용하여 인조꿀을 제조하여 대조군으로 사용하였다. 일반적으로 알려진 꿀의 조성은 단당류인 fructose가 25~45 %, glucose가 25 ~ 37%, 이당류인 maltose가 2 ~ 12 %, sucrose가 0.5 ~ 3%로 구성되어 있다고 알려져 있다. 그림 1은 당의 화학적 구조를 나타냈다. 본 연구에서 사용한 인조꿀은 fructose, glucose, maltose, sucrose, 증류수를 40 : 32 : 5 : 2 : 21의 비율로 제조하여 50 ℃에서 용해시켜 만든 후 상온 보관하여 분석에 사용하였다. 이때 사용된 당류는 Sigma사(미국)에서 표준시료를 구입하여 사용하였다.

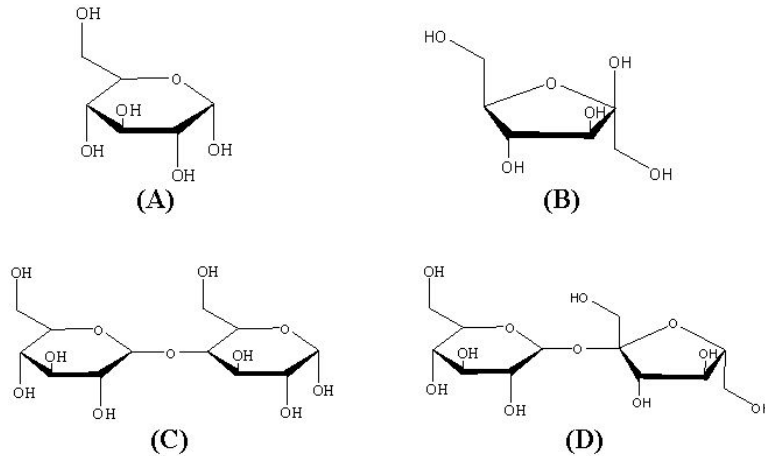


그림 1. 꿀에 포함되어 있는 당. (A) glucose, (B) fructose, (C) maltose, (D) sucrose.

(나) 실험 방법

① 토종꿀과 인조꿀의 구조 분석

㉠ 핵자기 공명장치(NMR) 분석 : 토종꿀과 인조꿀의 구조에서 나타날 수 있는 수소(H)의 구조적 환경을 규명하기 위하여 FT-NMR (Bruker, AVNCE 400, Germany)를 이용하여 ^1H NMR 분석방법을 사용하였다. ^1H NMR 분석은 각각의 토종꿀과 인조꿀 및 표준 당(fructose, glucose, maltose, sucrose)을 NMR 용매인 D_2O 에 용해시킨 후 화학적 이동을 ppm 단위로 기록하여 구조 분석을 하였다.

㉡ 적외선 분광광도계(FT-IR Spectroscopy) 분석 : 토종꿀과 인조꿀 구조의 작용기를 분석하기 위하여 FT-IR(Shimadzu, FT-IR 8700, Japan)을 이용하여 KBr법으로 분석하였다. 표준 당류는 시료와 KBr을 무게비 1 : 100으로 잘 혼합하여 펠릿을 제조한 후 상온에서 감압 건조하여 수분을 제거한 후 적외선 영역인 $4600\text{ cm}^{-1} \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 에서 측정하였다. 액상으로 존재하는 토종꿀과 인조꿀은 성분의 변화를 최소화하기 위하여 $-90\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 진공 동결건조하여 분말 상태를 얻은 후 표준 당류의 분석과 동일한 방법으로 측정하였다.

㉢ 자외선 분광광도계(UV Spectroscopy) 분석 : 토종꿀과 인조꿀 내의 당류 이외의 유효 성분을 규명하기 위하여 UV(Shimadzu, UV1601, Japan)를 이용하여 분석하였다. 각각의 시료를 증류수에 1 mg/ml 의 농도로 잘 용해시킨 후 자외선 영역인 $200 \sim 500\text{ nm}$ 에서 측정하였다.

㉣ 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 분석 : 토종꿀과 인조꿀 내의 당의 종류와 함량을 규명하기 위하여 HPLC(Agilent, Agilent 1200 series, USA)를 이용하여 분석하였다. 표준 당인 glucose, fructose, sucrose, maltose를 각각 1% 수용액으로 제조하여 분석에 사용하였다. HPLC 분석은 이동상으로 82% (v/v %) acetonitrile을 이용하였으며 분석 시 흐름속도 1.5 ml/min 로 유지하였다. 분리용 컬럼은 carbohydrate 컬럼 (agilent, $5\mu\text{m}$, $4.6 \times 150\text{ mm}$)을 사용하였으며 컬럼의 온도는 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. 분석결과는 굴절률 검출계를 이용하여 검출하여 머무름 시간 (retention time, RT)으로 나타냈다.

② 토종꿀과 인조꿀의 독성 규명 (MTT Assay)

토종꿀의 독성을 규명하기 위하여 대조 실험군으로 본 연구에서 제조한 인조꿀을 사용하여 MTT assay를 통하여 세포 생존율을 측정하여 결정하였다. 독성 실험에 사용한 세포는 인간의 피부에 존재하는 정상피부세포(Human Keratinocyte Cell)인 HaCaT를 이용하였다. 실험 전 이 세포를 fetal bovine serum을 포함하는 RPMI 배지에서 실험에 필요한 양이 되도록 96-well tissue culture plate 증식시켰다. 토종꿀과 인조꿀 점도 특성 때문에 3차 증류수를 이용하여 50%(v/v, %) 용액을 만들고 단계적으로 희석한 용액을 세포에 처리한 후 37 °C에서 24시간 배양(incubation) 시켰다. 여기에 5 mg/ml MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 용액(MTT in Phosphate-buffered saline)을 각 well당 10 μ l씩 첨가한 후 37 °C에서 4시간 동안 incubation 하여 MTT가 환원 되게 한 후 supernatant를 제거하고 DMSO를 100 μ l를 첨가하여 생성된 MTT-formazan을 용해시킨 후 ELISA reader(SpectraMax M5, Molecular Device, Canada)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{세포생존율} = \frac{OD_{570, \text{ sample}} - OD_{570, \text{ blank}}}{OD_{570, \text{ control}} - OD_{570, \text{ blank}}} \times 100$$

또한 토종꿀과 기존 상용화된 항생제와의 세포독성을 비교하기 위하여 그람 양성균과 음성균에서는 세프피라미드(Cefpiramide), 진균에는 클로트리마졸(Clotrimazol)을 각각 사용하여 결과를 비교하였다.

③ 토종꿀과 인조꿀의 항균활성 확인 (MIC(minimum inhibitory concentration) Test)

토종꿀의 항균활성 시험은 최소저해농도(MIC)로 실험하였으며, 이때 값의 측정은 two fold dilution 법에 의하여 수행하였다. 항균활성에 사용된 균주로는 그람 양성균인 *S. aureus*, *B. Subtilis*, 그람 음성균인 *E. Coli*, *P. aeruginosa*, 진균인 *C. Albicans*, *T. beigelli*를 사용하여 다음과 같이 항균활성 시험을 하였다. 96-well plate에 토종꿀과 인조꿀을 농도별로 희석하여 분주하였다. 그람 양성균과 음성균의 경우 여기에 각각의 균주가 포함된 배지를 well당 100 μ l (well당 최종 균주수 : 2×10^5 CFU/ml)씩 가하여 37 °C에서 24시간 방치한 후 *E. Coli*, *B. Subtilis*는 LB 아가 배지, *P. aeruginosa*는 NA+0.5% NaCl 아가 배지, *S. aureus*는 TSA 아가 배지에 도말하고 12시간 배양 한 후 최소저해농도를 MIC로 나타냈다. 진균의 경우 각각의 균주가 포함된 배지를 well당 50 μ l(well당 최종 균주수 : 2×10^4 CFU/ml)씩 가하여 28 °C에서 24시간 방치한 후 YPD 아가 배지에 도말하고 12시간 배양 한 후 최소저해농도를 MIC로 나타냈다. 또한 토종꿀과 기존 상용화된 항생제와의 항균활성 능력을 비교하기 위하여 그람 양성균과 음성균은 세프피라미드(Cefpiramide), 진균은 클로트리마졸(Clotrimazol)을 각각 사용하여 결과를 비교하였다.

④ 토종꿀의 보습성 확인

토종꿀과 인조꿀의 보습효과를 확인하기 위하여 데시케이터내에서 수분손실을 측정하

였다. 각각의 시료를 1.0 % 수용액이 되도록 증류수에 용해시켜 실험에 사용했다. 실리카겔 블루와 마그네슘 클로라이드 포화 수용액이 존재하는 데시케이터에 각각의 시료 10 g 을 넣고 25 ℃에서 시간에 따른 중량변화를 관측하여 얻은 증발량을 이용하여 수분 증발율을 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{수분 증발율} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

여기에서 A는 초기의 시료의 무게, B는 각 시간대별 시료의 무게이다.

(2) 연구 결과

일반적으로 알려진 꿀은 단당류인 glucose, fructose와 이당류인 maltose, sucrose, 수분으로 구성되어 있다. 따라서 본 연구에서는 단당류와 다당류를 적당한 비율로 혼합하여 인조꿀을 제조하여 본 연구에서 사용한 토종꿀과 비교하여 토종꿀의 구조, 및 생리활성 후보 물질로 요구되는 세포 독성 및 항균활성 등을 규명하였다.

(가) 구조분석

① ^1H NMR 연구

그림 2 ~ 5는 glucose, fructose, maltose, sucrose의 ^1H NMR 결과로 수소의 화학적 이동을 ppm 단위로 기록하여 분석하였다. 그림 2는 glucose의 결과로 5.13 ppm에서 1번 위치의 수소, 4.55 ppm에서 2번 위치의 수소, 3.58~3.80 ppm에서 5번과 6번 위치의 수소, 3.13 ~ 3.43 ppm에서 3번과 4번 위치의 수소의 특성 피크를 모두 확인할 수 있었다.

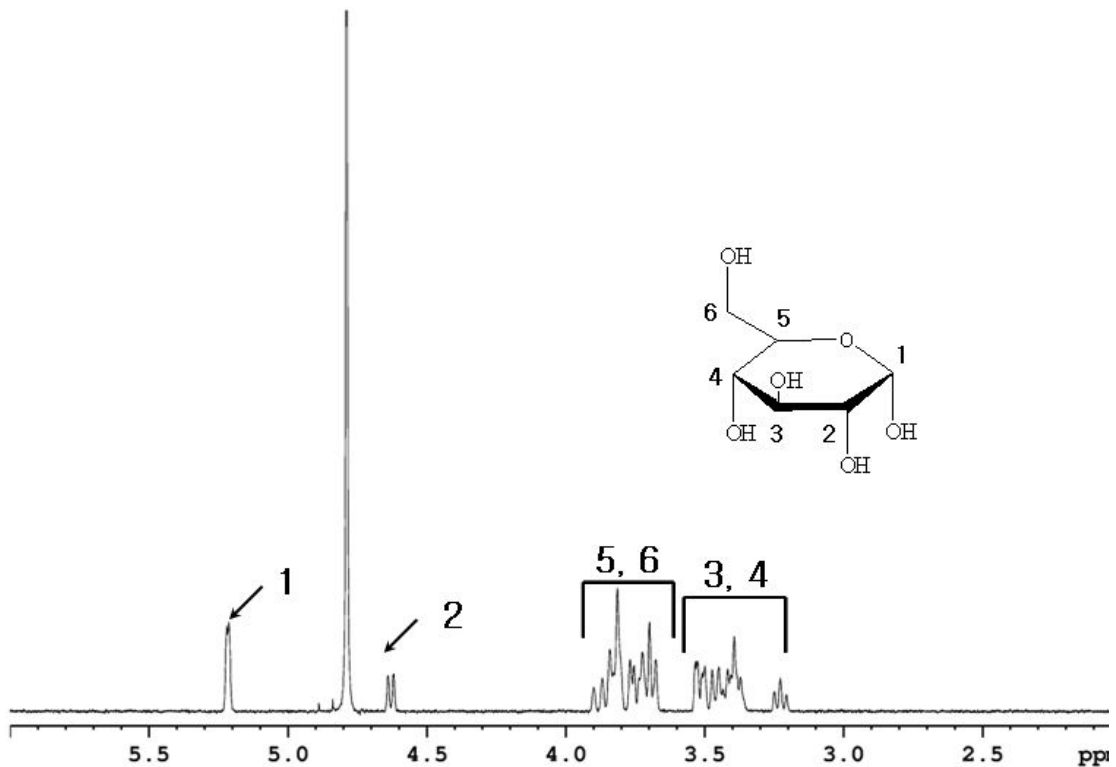


그림 2. Glucose의 ^1H NMR 결과.

그림 3은 fructose의 ^1H NMR 결과로 3.89~4.01 ppm에서 3, 4번 위치의 수소, 3.70~3.81 ppm에서 5번 위치의 수소, 3.54~3.62 ppm에서 1,2번 위치의 수소, 3.42~3.47 ppm에서 6번 위치의 수소의 특성 피크를 모두 확인할 수 있었다.

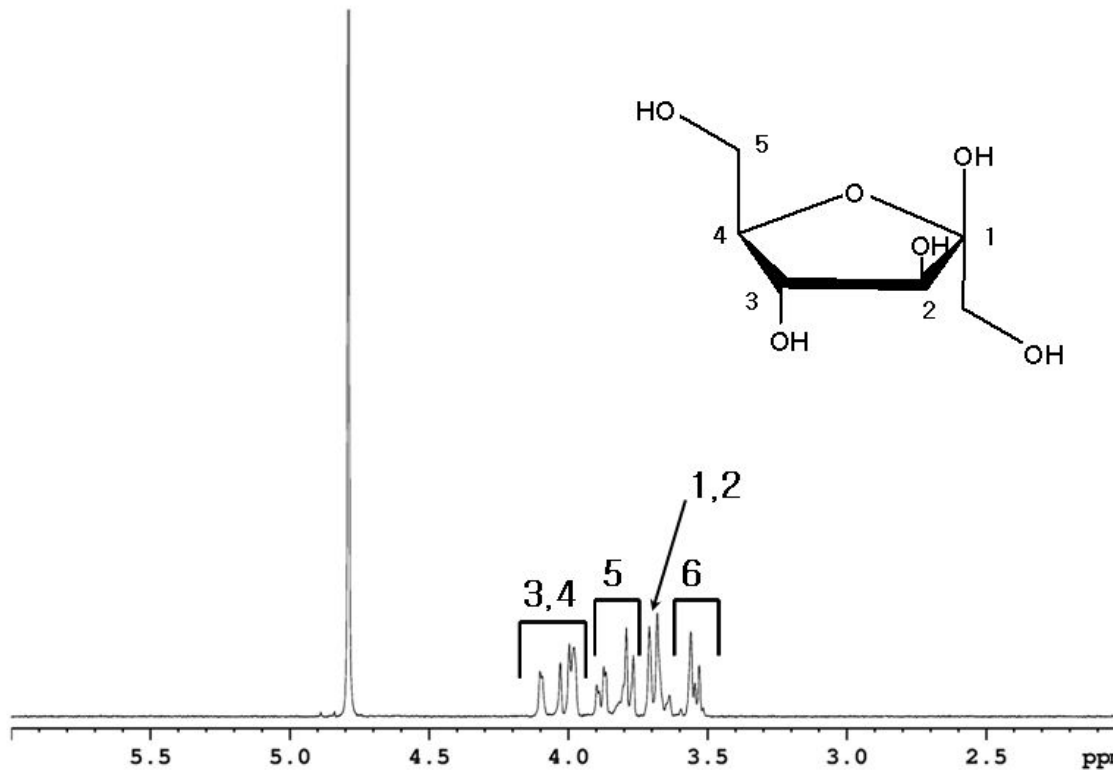


그림 3. Fructose의 ^1H NMR 결과.

그림 4는 maltose의 ^1H NMR 결과로 5.31 ppm에서 1'번 위치의 수소, 4.56 ppm에서 1번 위치의 수소, 3.74~3.89 ppm에서 5, 5'번 위치의 수소 3.46 ~ 3.68 ppm에서 2, 2', 3, 3', 6, 6'번 위치의 수소, 3.12 ppm에서 4번 위치의 수소, 3.17 ppm에서 4'번 위치의 수소의 특성 피크를 모두 확인할 수 있었다.

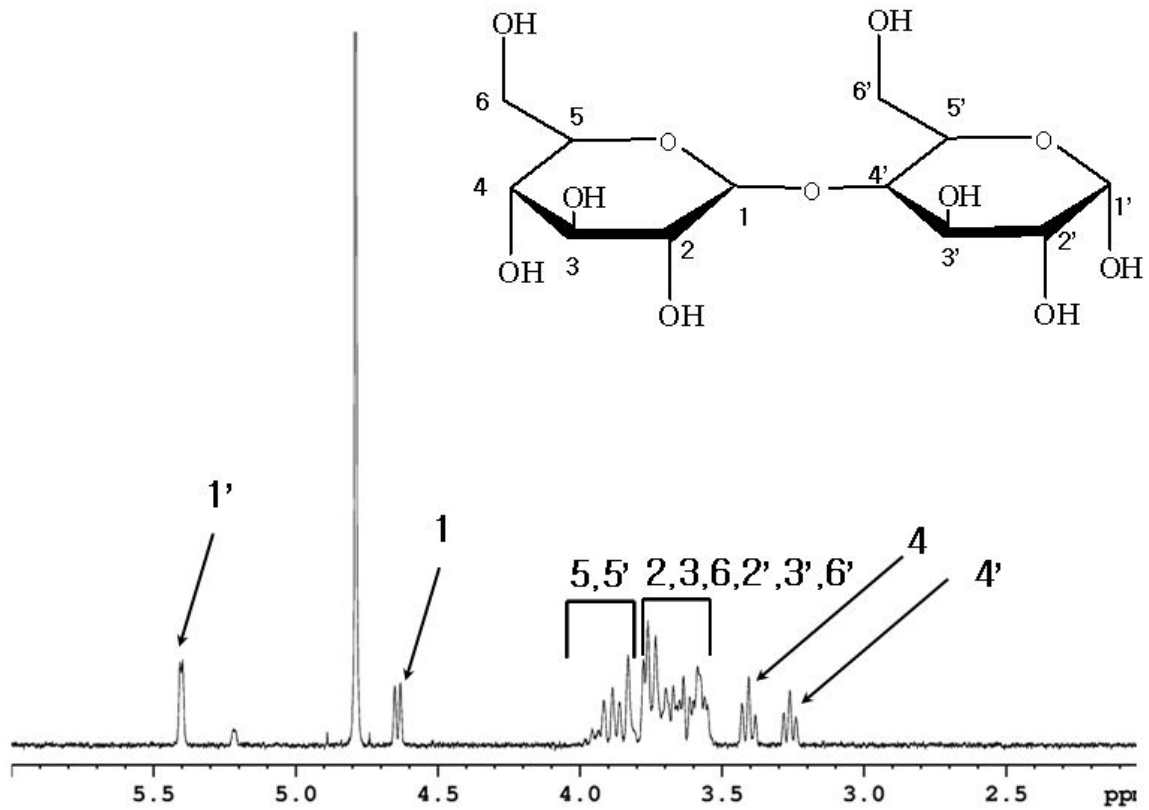


그림 4. Maltose의 ^1H NMR 결과.

그림 5는 sucrose의 ^1H NMR 결과로 5.32 ppm에서 1번 위치의 수소, 4.12 ppm에서 8번 위치의 수소, 3.95 ppm에서 7번 위치의 수소, 5.57~3.80 ppm에서 2, 5, 6, 9, 11, 12 번 위치의 수소, 3.45 ppm에서 3번 위치의 수소, 3.48 ppm에서 4번 위치 수소의 특성 피크를 모두 확인 할 수 있었다.

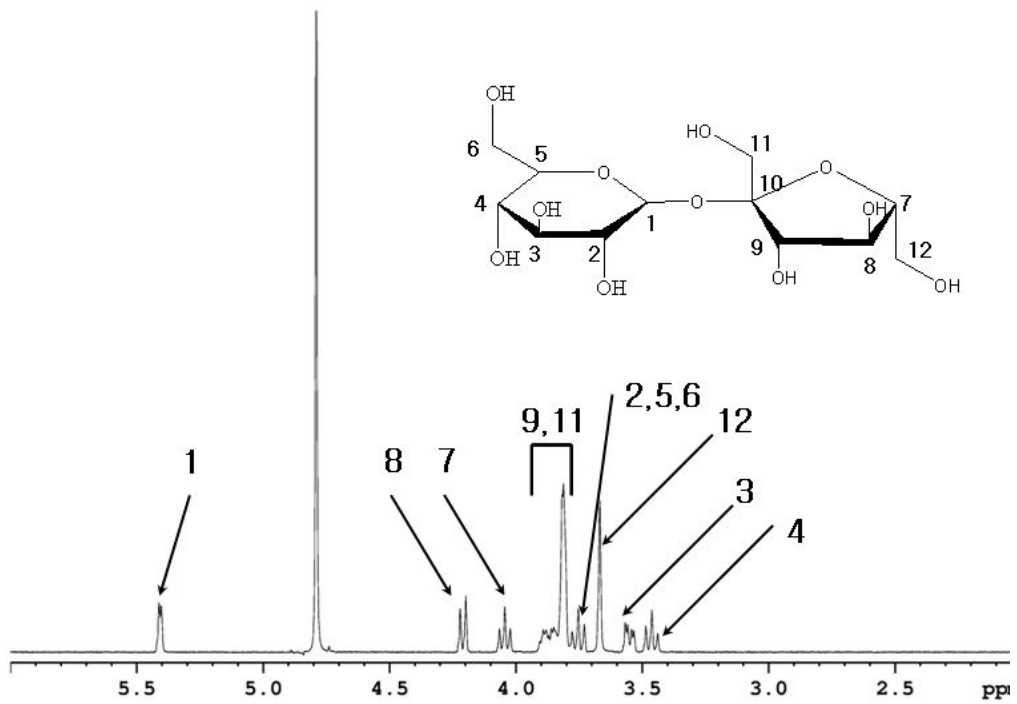


그림 5. Sucrose의 ^1H NMR 결과.

그림 6은 표준 당과 이들의 조합으로 만들어진 인조꿀의 ^1H NMR 결과로 표준 당에서 분석된 각각의 단당류와 이당류의 특성피크를 인조꿀에서 모두 확인 할 수 있었다. 이러한 결과에서 본 연구에서 제조된 인조꿀이 토종꿀과 비교할 수 있을 정도의 꿀의 형태를 갖고 있다고 할 수 있다.

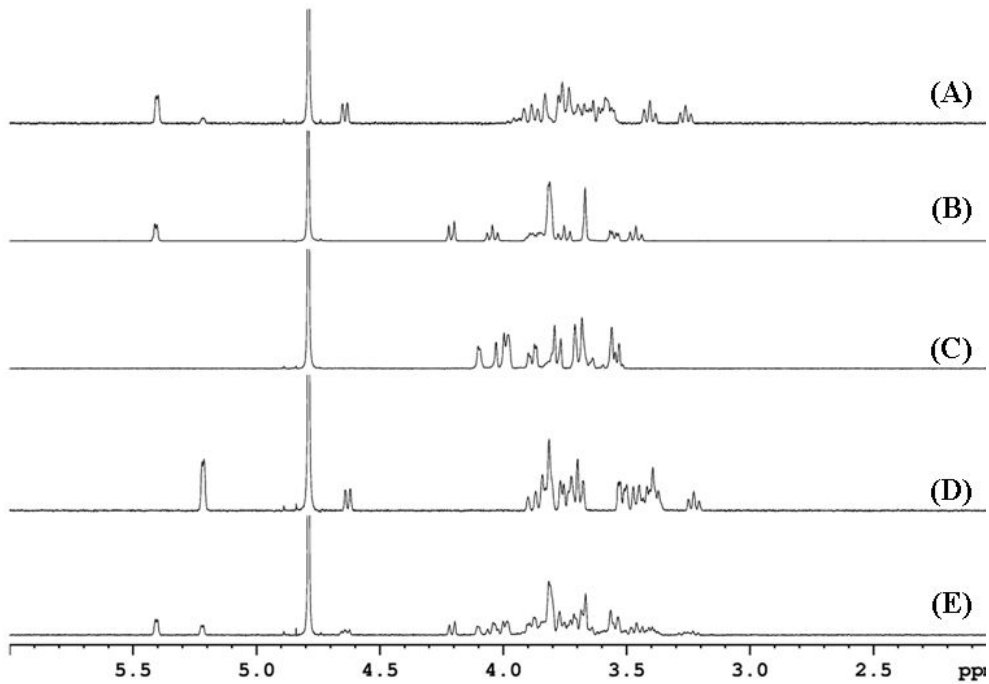


그림 6. 표준 당과 인조꿀의 ^1H NMR 결과.

(A) Maltose, (B) Sucrose, (C) Fructose,
(D) Glucose, (E) Artificial Honey.

그림 7은 인조꿀의 ^1H NMR 결과로 표준 당의 각각의 특성 피크 위치를 규명한 결과이다. 5.31 ppm에서 sucrose와 maltose에 의한 특성 피크, 5.12 ppm에서 glucose에 의한 특성 피크, 4.55 ppm에서 maltose와 glucose에 의한 특성 피크, 4.01 ppm에서 sucrose에 의한 특성 피크, 3.89 ~ 3.94 ppm에서 fructose에 의한 특성 피크, 3.14 ppm에서 maltose에 의한 특성 피크를 확인 할 수 있었다.

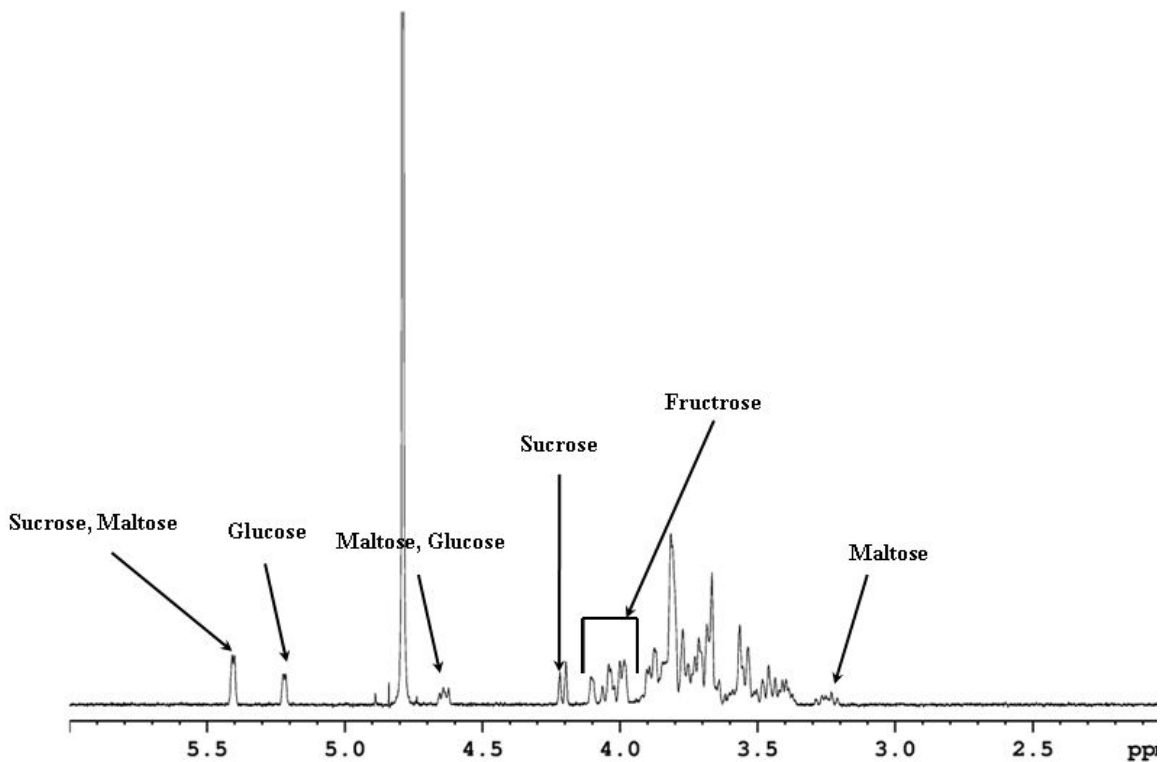


그림 7. 인조꿀의 ^1H NMR 결과.

그림 8은 토종꿀과 인조꿀의 ^1H NMR 결과로 (A)는 인조꿀의 결과이고, (B)는 토종꿀의 결과이다. 그림 8(B)에서 볼 수 있듯이 인조꿀에서 확인한 단당류와 이당류를 모두 확인함으로써 토종꿀이 단당류인 glucose, fructose와 이당류인 maltose, sucrose로 구성되어 있음을 확인 할 수 있었다. 그리고 3.28 ~ 3.80 ppm 범위 내에서 인조꿀에서 나타나지 않은 수소가 토종꿀에서 나타나는 일부 특성 피크는 비타민 B, C, 니오신 등에 의한 피크로 사료된다. 또한 인조꿀과 토종꿀의 ^1H NMR의 특성 피크의 형태가 약간 다르게 검출되는 것은 토종꿀에 함유되어 있는 여러 가지 생리활성 물질의 수소 결합 및 분자내 원자의 환경에 의해서 인조꿀보다 약간 넓은 형태를 보이는 것이다. 이러한 비타민 종류와 꿀의 무기물은 인체의 유효한 생리활성 물질이며, 항균활성 및 면역성 증강에 유효한 역할을 할 것이다. 본 연구에서 사용한 토종꿀은 일반적인 꿀에 포함되어 있지 않는 이당류를 포함하고 있으며, 이는 단당류 보다 분자 내에 수분을 함유할 수 있는 능력이 뛰어나서 보습성에 효과가 있으며, 유해세균을 억제할 수 있는 능력이 있다. 이러한 토종꿀의 구조적, 성분적 특성은 아토피 치료에 있어 유효한 물질일 것으로 사료 된다.

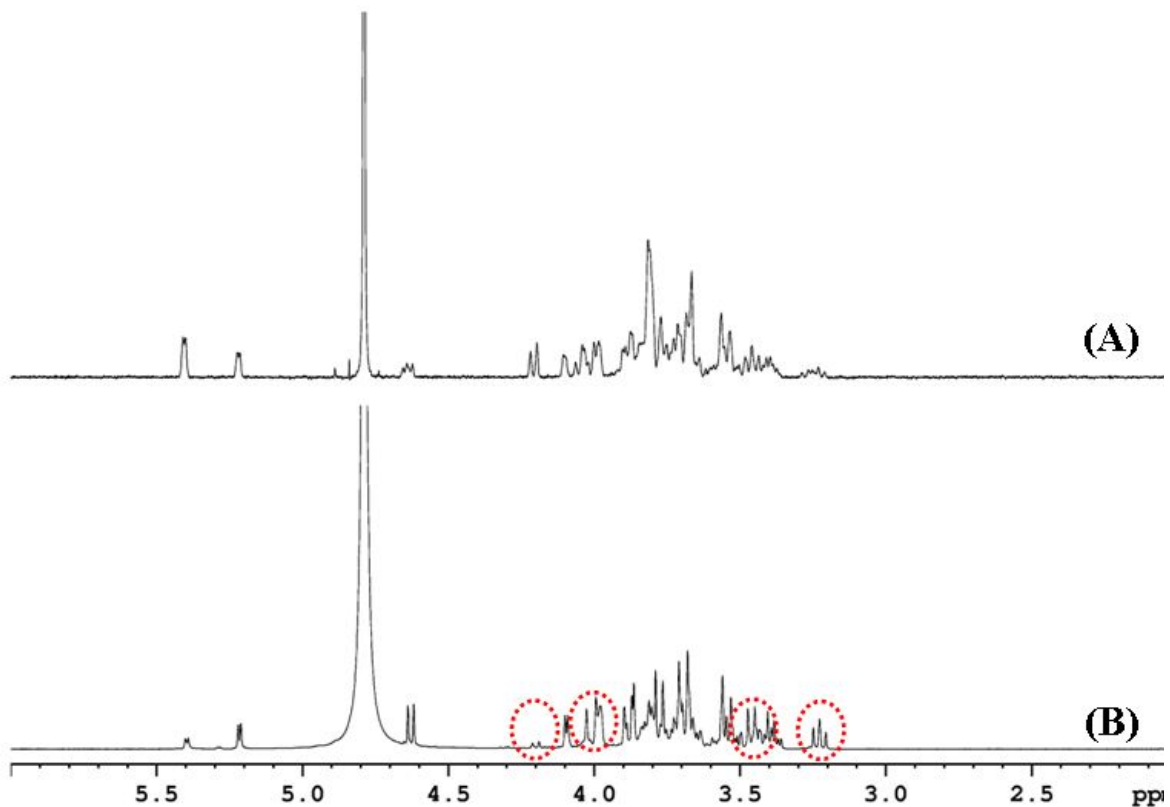


그림 8. 토종꿀과 인조꿀의 ^1H NMR 결과.
(A) Artificial honey, (B) Natural honey.

② FT-IR Spectroscopy 연구

그림 9는 표준 당인 glucose, fructose, maltose, sucrose의 FT-IR 결과를 나타낸 것이다. 그림 9에서 볼 수 있듯이 표준 당은 전형적으로 당의 구조에서 관찰 되는 -OH, -CH₂, -C-O-의 특성 피크를 확인하였다. 그림 9의 결과에서 3500 cm⁻¹ 부근에서 -OH에 의한 신축 피크, 2800 ~ 3000 cm⁻¹ 부근에서 -CH₂ 의한 신축 피크, 1100 ~ 1500 cm⁻¹ 부근에서 -C-O- 의한 신축 피크를 모두 확인함으로써 표준 당의 구조를 ¹H NMR 결과에서와 동일하게 확인하였다.

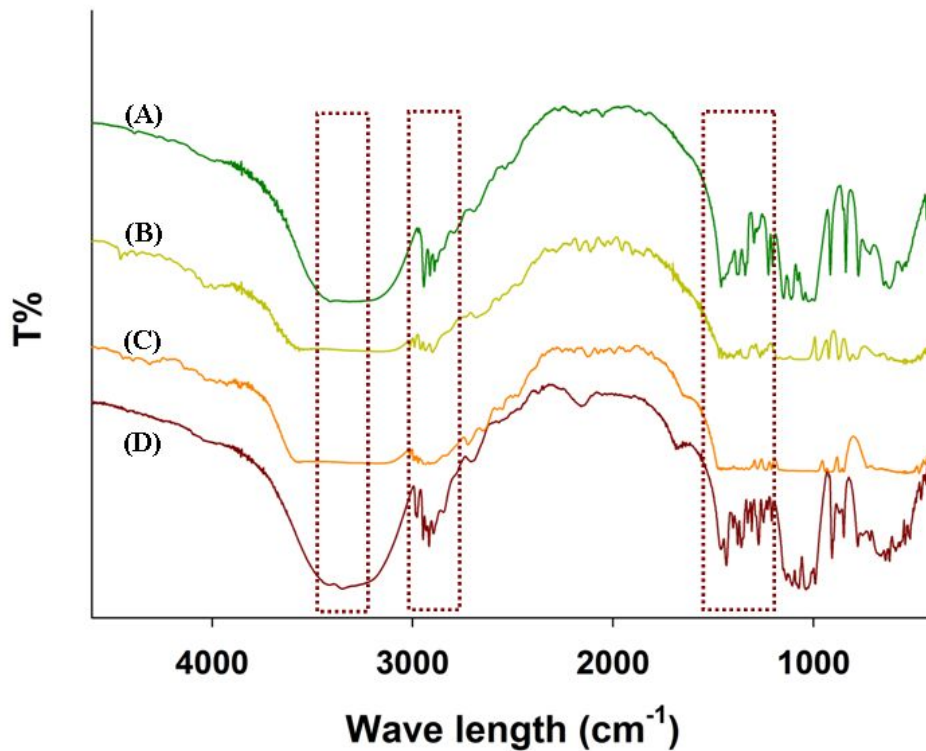


그림 9. 표준 당의 FT-IR 결과.

(A) Glucose, (B) Fructose, (C) Sucrose, (D) Maltose.

그림 10은 토종꿀과 인조꿀의 구조적 작용기를 규명하기 위한 FT-IR 결과이다. 그림 10(A)는 인조꿀의 결과로 표준 당에서 규명되어진 -OH, -CH₂, -C-O-의 모든 특성 피크를 확인 할 수 있었다. 그림 10(B)는 토종꿀의 결과로 당에서 관찰되는 특성 피크를 동일한 파장에서 관찰 되었으며, 여기에서 인조꿀에서는 나타나지 않는 1700 cm⁻¹에서 새로운 특성 피크가 나타나는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 1700 cm⁻¹에서는 분자구조내의 -C=O 특성 피크가 나타나는 데 이것으로 보아 토종꿀 내에는 당 성분 외에 다른 성분이 함유되어 있는 것으로 사료된다. 토종꿀의 경우 일반적인 당성분외에 유기물로는 각종 비타민류 등을 포함하고 있다. 따라서 그림 10 (B)의 1700 cm⁻¹에서 나타나는 특성피크는 비타민의 분자 구조 내에 -C=O에 의한 것으로 사료된다. 또한 전체적으로 토종꿀의 특성 피크의 형태가 인조꿀에 비하여 broad하게 나타나는 것을 알 수 있는데 이것은 토종꿀 내의 비타민 등과 같은 다양한 유기 성분에 의해 분자 내 또는 분자간의 수소결합 등과 같은 상호 작용에 의해 이러한 결과를 보이는 것이다. 이상의 FT-IR과 ¹H NMR 결과로부터 토종꿀은 당 성분 외에 비타민 등과 같은 유용한 생리활성 물질을 함유하고 있음을 확인할 수 있다.

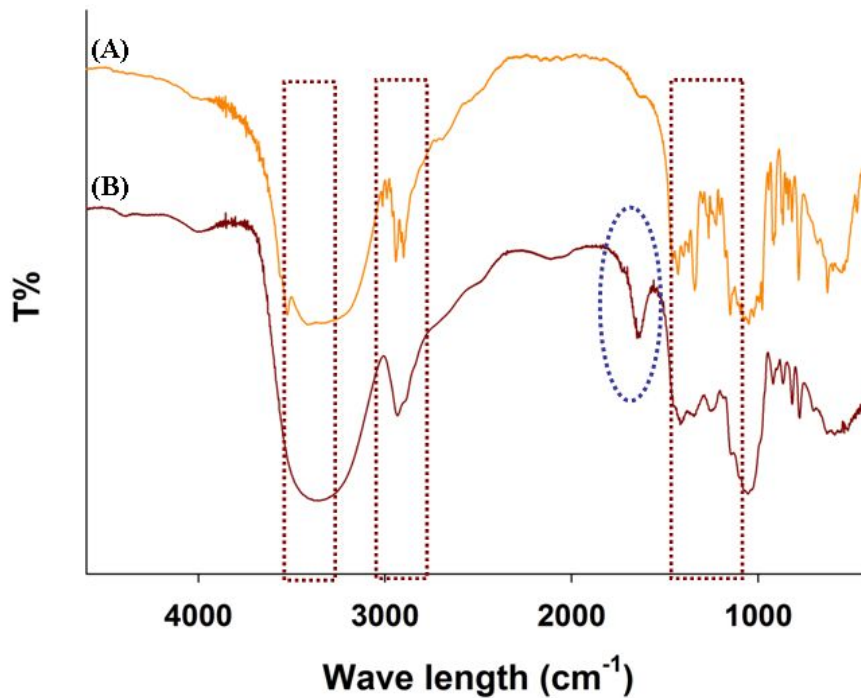


그림 10. 토종꿀과 인조꿀의 FT-IR 결과.
 (A) Artificial honey, (B) Natural honey.

③ UV Spectroscopy 연구

그림 11은 토종꿀과 인조꿀의 작용기 규명을 위한 UV 결과이다. 그림 11(A)는 인조꿀의 UV 결과로 어느 파장대에서도 UV 흡수 밴드가 관찰되지 않았다. 이것은 인조꿀의 경우 단당류와 다당류로만 구성되어 있어 당의 구조상 UV에 작용할 수 있는 작용기를 갖고 있지 않기 때문이다. 반면 그림 11(B)는 토종꿀의 결과로 280 nm에서 UV 흡수 피크를 확인 할 수 있다. 일반적으로 주요한 약리성분에는 카르보닐그룹이나 아민 그룹의 존재에 의해 UV 영역에서 흡수 밴드가 관찰된다. 특히, 비타민 종류는 용매를 물로 사용하여 UV 흡수를 관찰하였을 때 약 278 ~ 282 nm 파장대에서 특성 피크가 나타난다. 이러한 UV결과와 앞서 설명한 NMR, FT-IR결과를 비교하면 그림 11(B)에서 나타나는 특성피크는 비타민류에 의한 것으로 사료된다.

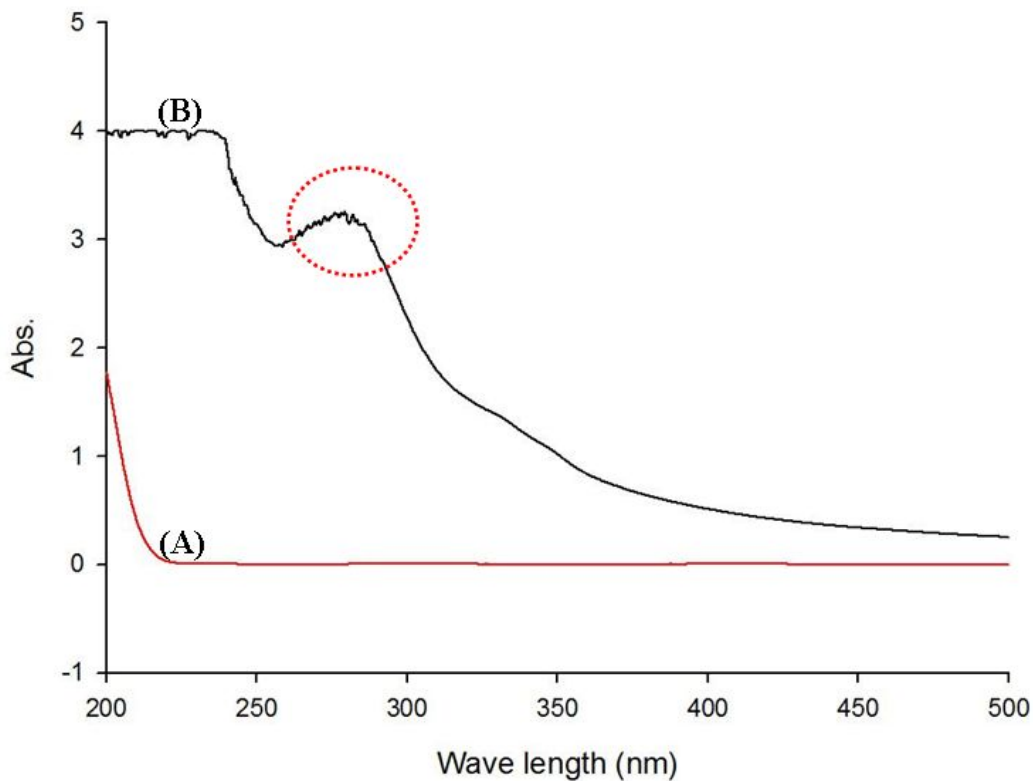


그림 11. 토종꿀과 인조꿀의 UV 결과.
(A) Artificial honey, (B) Natural honey.

④ 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 연구

토종꿀을 당 성분을 규명하기 위하여 HPLC 분석을 하였다. 그림 12는 인조 꿀을 구성하고 있는 표준 당의 HPLC 결과 이다. 그림 12(A) ~ (D)는 각각 maltose, sucrose, glucose, fructose의 HPLC 결과로 분자량에 의해 컬럼 분리가 일어나며 이때 머무름 시간은 각각 24 min, 18 min, 9 min, 7min으로 분자량이 커질수록 머무름 시간이 길어짐을 알 수 있었다. 분자량이 같은 fructose와 glucose의 경우 fructose가 glucose보다 분자내의 입체적 공간 배열이 더 조밀하여 정지상과 상호작용이 상대적으로 적어 먼저 분리되기 때문이다. 그림 12(E)는 이들 당을 물리적으로 혼합하여 fructose와 glucose가 효과적으로 분리되는 것을 보여주는 것으로 본 연구에서 사용한 HPLC 조건을 이용하여 토종꿀의 당 성분 분석에 유효한 방법임과 동시에 효과적으로 분석할 수 있다.

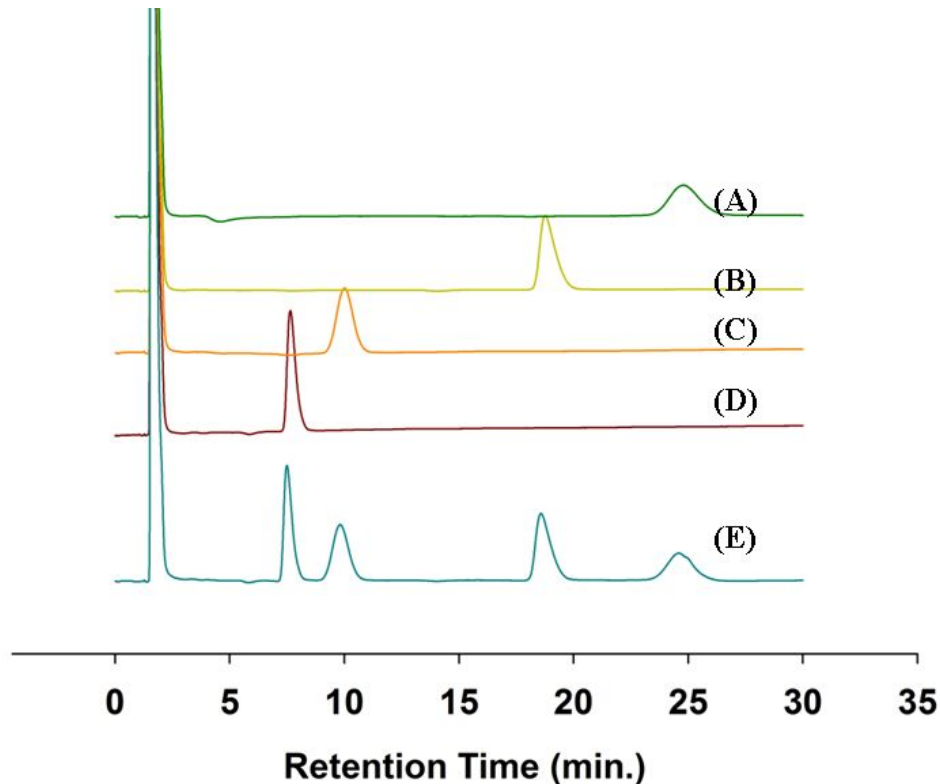


그림 12. 표준당의 HPLC 결과.

(A) Maltose, (B) Sucrose, (C) Glucose, (D) Fructose,
(E) Mixer of maltose, sucrose, glucose, fructose.

토종꿀과 인조꿀의 당 성분을 규명한 HPLC 결과는 그림 13에 나타났다. 그림 13(A)는 인조꿀의 HPLC 결과로 단당류인 fructose와 glucose는 검출되었으나 이당류인 sucrose와 glucose는 소량 검출 되는 것을 확인 하였는데, 이는 인조꿀 제조 후 보관 중에 이당류의 분해로 인한 결과로 사료 된다. 그림 13(B)는 토종꿀의 결과 fructose, glucose, sucrose, glucose 등이 모두 검출 되었으며 이때의 비율은 각각 49.9 %, 40.2 %, 3.9 %, 3.1 %로 구성되어 있으며, 나머지 2.9 %는 각종 비타민 등 각종 유기물로 사료된다. 이당류의 경우 섭취하였을 때 단당류에 비해 체내흡수가 떨어져 생체 이용율면에서는 좋지 않다. 그러나 이당류의 경우 단당류 보다 분자 내에 수분을 함유할 수 있는 능력이 우수하고, 유해세균을 억제하는 능력이 있어 피부에 도포하였을 때 보습효과와 세균의 번식을 억제 할 수 있어 피부염 치료, 피부 활성화에 우수한 효과를 보일 것이다.

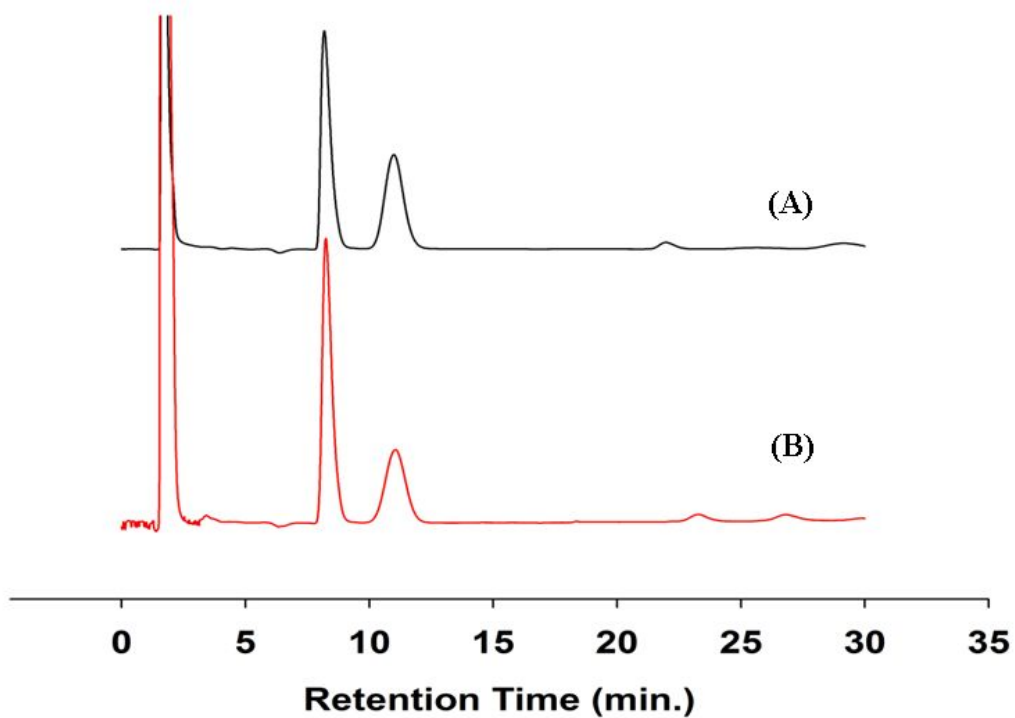


그림 13. 토종꿀과 인조꿀의 HPLC 결과.
(A) Artificial honey, (B) Natural honey.

(나) 세포 독성 연구

그림 14는 토종꿀과 인조꿀의 MTT 분석을 통한 세포내 독성 실험 결과이다. HaCaT 세포주를 이용하여 1일 동안의 세포 독성을 실험한 결과 대조군으로 사용한 상용화된 항생제인 세프피라미드(Cefpiramide)와 클로트리마졸(Clotrimazol)의 경우 강한 세포 독성을 보이는 것을 확인하였다. 인조꿀의 경우 고농도에서도 세포 생존율이 80 % 이상인 반면 토종꿀의 경우 낮은 농도에서는 90 % 이상의 세포 생존율을 보였으나 고농도에서는 약 70 % 정도의 생존율을 보였다. 인조꿀과 비교하였을 때 고농도에서 세포 생존율이 약간 감소하는 것을 알 수 있는데, 이것은 인조꿀과 토종꿀의 구성 성분의 차이에 의한 것으로 보인다. 앞선 구조 분석 등에서 언급한 것처럼 토종꿀은 당 성분 이외에 무기물, 비타민 등을 포함하고 있기 때문에 이러한 요인이 세포에 영향을 주는 것으로 사료된다. 일반적으로 세포 생존율이 50 % 이상일 때는 독성이 없는 것으로 간주하고 있으므로 이 농도에서 인체에 사용은 아무런 문제가 없다고 사료된다.

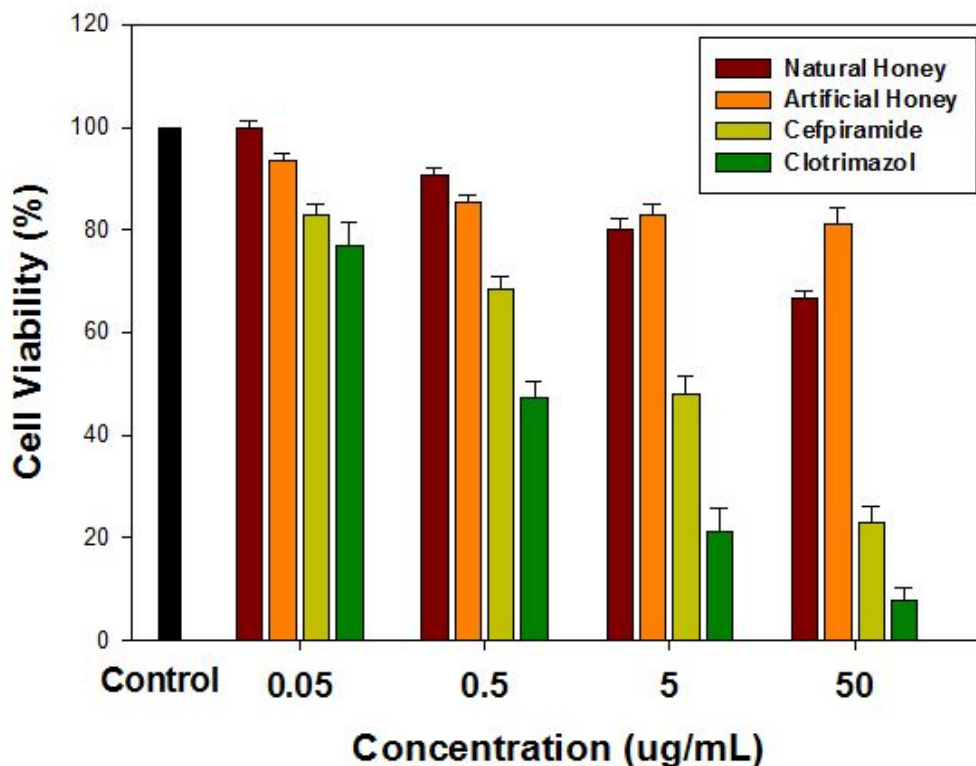


그림 14. 독성실험 결과. (\pm S.D., n=3).

(다) 항균 활성 연구

① 세균 (Bacteria)에 대한 항균 활성

세균에 대한 항균 활성 결과는 표 1에 그람 양성균과 음성균으로 구분하여 나타냈다. 토종꿀의 경우, 32 ~ 64 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가하였을 때 그람 양성균과 음성균의 생육이 억제됨을 알 수 있었다. 반면에 인조꿀의 경우 128 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서도 어떠한 항균활성을 보이지 않았다. 더 이상의 농도에서는 항균 활성을 보일 수 있으나 실험의 유효성을 고려하여 진행하지 않았다. 이러한 토종꿀은 피부 2차 감염을 유발하는 세균에 대한 유효한 항균성 결과는 아토피나 습진 등의 피부질환을 예방하는 도움이 될 것으로 생각된다. 항생제로 상용화되어 있는 cefpiramide의 경우 토종꿀보다 낮은 농도인 2.5 ~ 5 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가하였을 때 항균활성을 보이는 것을 보였다. 그러나 세포 독성 결과와 비교하였을 때 토종꿀이 우수한 피부염 치료 후보 물질이 될 수 있을 것으로 사료되며, 본 연구의 2차년도에 계획되어 있는 “토종꿀과 생약초의 혼합”은 예비 실험 결과 토종꿀 자체 보다 우수한 항균 활성을 보여 정확한 혼합 조성의 규명은 아토피 등의 피부염 치료에 도움이 되는 물질이 될 것으로 생각된다.

표 1. 세균에 대한 토종꿀의 항균 활성

Bacterial strains		MIC($\mu\text{g/ml}$)		
		Natural Honey	Artificial Honey	Cefpiramide
Gram-Positive	<i>S. aureus</i>	64	>128	5
	<i>B. Subtilis</i>	32	>128	2.5
Gram-Negative	<i>E. Coli</i>	32	>128	2.5
	<i>P. aeruginosa</i>	64	>128	5

② 진균 (Fungi)에 대한 항균 활성

진균에 대한 항균 활성 결과는 표 2에 나타냈다. 토종꿀의 경우, 64 ~ 128 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가하였을 때 진균의 생육이 억제됨을 알 수 있었다. 반면에 인조꿀의 경우 256 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서도 어떠한 항균활성을 보이지 않았다. 이러한 토종꿀의 진균에 대한 유효한 항균성 결과는 피부염증 등의 피부질환을 예방하는 도움이 될 것으로 생각된다. 항생제로 상용화되어 있는 clotrimazole의 경우 상당히 낮은 농도에서 항균활성을 보이는 것을 보였다. 그러나 앞선 세균에 대한 결과와 동일하게 clotrimazole이 높은 세포 독성을 갖고 있다는 점을 고려하면 토종꿀이 우수한 피부염 치료 후보 물질이 될 수 있다.

표 2. 진균에 대한 토종꿀의 항균 활성

Fungi strains	MIC($\mu\text{g/ml}$)		
	Natural Honey	Artificial Honey	Clotrimazole
<i>C.alicans</i>	64	>256	<0.63
<i>B. Subtilis</i>	128	>256	<0.63

(라) 보습력 측정

그림 15는 토종꿀과 인조꿀의 시간의 따른 보습력을 수분 증발율로 나타낸 것이다. 시간에 따라 토종꿀이 인조꿀보다 좀 더 우수한 보습력을 갖고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 토종꿀과 인조꿀 간의 점도에 의한 영향, 또한 각각의 구성 성분의 차이 즉, 토종꿀에 소량 함유하고 있는 이당류의 영향 등에 의한 결과로 사료된다. 1차년도 연구의 남은 기간 동안 토종꿀의 보습성 확인을 위하여 상대습도에 따른 보습력 측정, 피부에서의 보습력 등을 다양하게 고려할 계획이다. 피부질환의 대부분이 피부 건조에 의한 가려움증에서부터 시작하여 세균에 의한 이차 감염에 의해 심해지는 특성을 보인다. 따라서 본 연구에서 제시한 토종꿀의 보습성, 항균활성 등의 결과를 종합적으로 고려하면 토종꿀이 피부질환 치료에 아주 유효한 물질이 될 것으로 사료된다.

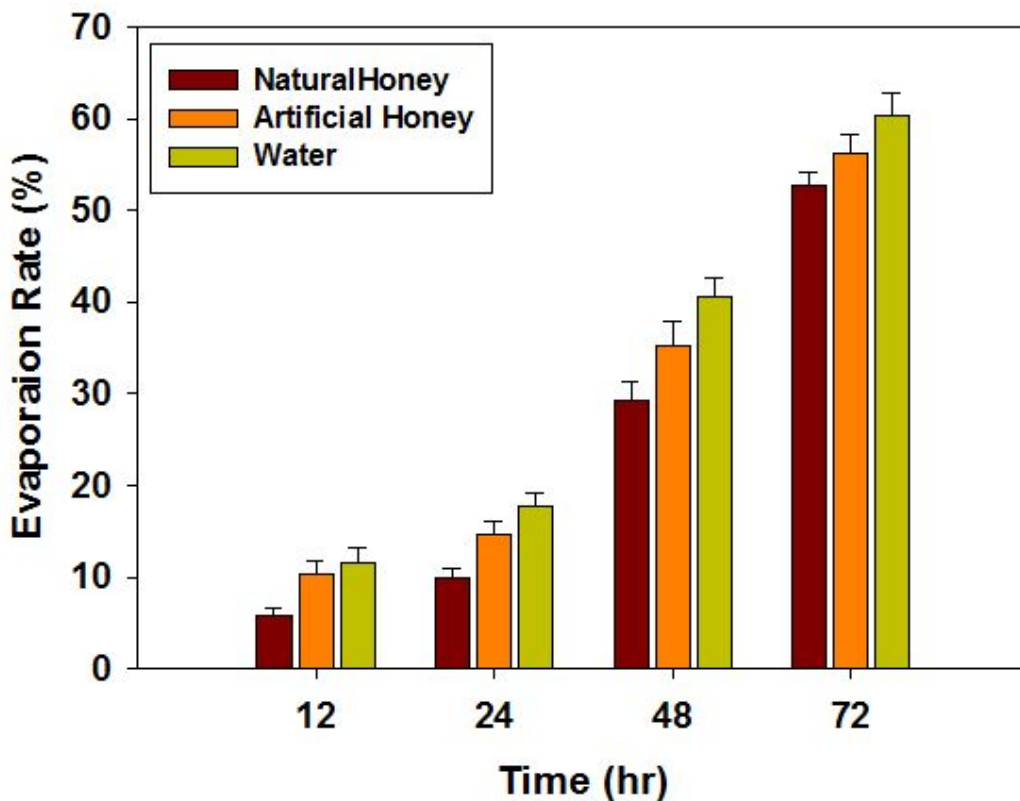


그림 15. 시간에 따른 토종꿀과 인조꿀에서 수분 증발율. (\pm S.D., n=3).

나. 2차년도

수용성 키토산의 항균활성 및 여러 가지 특성을 확인하고 안정성 및 활성을 가지는 수용성 키토산을 이용하여 1차년도 연구 결과를 바탕으로 토종꿀과 생약초를 혼합하여 최적의 항균활성과 낮은 독성을 보이는 최적의 조성을 확립하고 도출된 조성물의 안정성 및 활성을 추가할 수 있는 제제를 개발함으로써 아토피 피부염 치료에 있어 유용한 재료로써 사용될 것으로 사료된다.

(1) 연구 방법

(가) 실험재료

① 분자량별 수용성 키토산

효소분해를 통하여 제조된 수용성 키토산을 (주) 키토라이프로에서 구입하여 사용하였다. 이 키토산의 경우 넓은 분자량 분포를 가지고 있어 정확한 항균활성을 갖는 분자량대의 수용성 키토산을 규명할 수 없기 때문에 본 연구에서는 이러한 수용성 키토산을 한외여과법을 이용하여 분자량대별로 분리하였다. 이때 사용된 한외여과막은 서로 다른 분리능을 갖는 4가지 종류(MWCO 1, 3, 10, 30 kDa)를 이용하였다.

② 토종꿀, 생약초, 수용성 키토산의 혼합용액 제조

1차년도 연구결과 및 수용성 키토산 기초실험을 바탕으로 토종꿀, 생약초, 수용성 키토산을 여러 가지 농도로 혼합용액을 제조하였다. 제조된 혼합용액의 항균활성 및 독성실험을 통해 최적의 혼합조성을 확립하고 이를 이용하여 아토피피부염이 유발되어진 마우스에 적용하여 그 효능을 확인하였다.

(나) 실험 방법

① 수용성 키토산의 구조 분석

㉠ 핵자기 공명장치(NMR) 분석 : 분리된 수용성 키토산의 구조에서 나타날 수 있는 수소(H)의 구조적 환경을 규명하기 위하여 FT-NMR (Bruker, AVNCE 400, Germany)를 이용하여 ^1H -NMR 분석방법을 사용하였다. ^1H NMR 분석은 각각의 분자량별 수용성 키토산을 NMR 용매인 D_2O 에 용해시킨 후 화학적 이동을 ppm 단위로 기록하여 구조 분석을 하였다.

㉡ 적외선 분광광도계(FT-IR Spectroscopy) 분석 : 분리된 수용성 키토산 구조의 작용기를 분석하기 위하여 FT-IR(Shimadzu, FT-IR 8700, Japan)을 이용하여 KBr법으로 분석하였다. 시료와 KBr을 무게비 1:100으로 잘 혼합하여 펠렛을 제조한 후 상온에서 감압 건조를 하여 수분을 제거한 후 적외선 영역인 $4600\text{ cm}^{-1} \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 에서 측정하였다.

㉢ 겔 투과 크로마토그래피(GPC) 분석 : 고순도 키토산의 제조에 있어서 가장 중요한 요인 중의 하나가 분자량 및 분자량 분포이다. 따라서 한외여과법을 이용하여 분리한 수용성 키토산을 광산란 검출기가 장착된 겔 투과 크로마토그래피(GPC-MALLS)를 이용하여 절대분자량 및 분자량 분포를 측정하였다.

② 수용성 키토산의 항균활성 시험

㉔ 최저성장억제농도(MIC)의 측정 : 수용성 키토산의 항균활성 시험은 최저성장억제농도(MIC) 방법을 이용하였으며 이때 사용된 균주인 *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Escherichia coli* (ATCC25922), *E. coli* O-157 (ATCC 43895), 및 *Vibrio vulnificus* (ATCC29307)는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입했으며, *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Bacillus megaterium* (KCTC3709), *Bacillus subtilis* (KCTC 1918), *Enterococcus faecalis* (KCTC 2011), *Proteus vulgaris* (KCTC2433), *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1637), *Streptococcus epidermidis* (KCTC 3096), 및 *Salmonella typhimurium* (KCTC 1926)는 생명공학연구소 Korean Collection for Type Culture (KCTC)로부터 분양 받은 후 각 bacterial cells는 Broth media에서 mid-log phase까지 배양하여 사용하였다. 수용성 키토산은 10mM sodium phosphate (pH 5.4 또는 7.4)에 희석하여 0.22 μ m 필터로 멸균 후 사용하였다. 96-well microtiter plate에 단계적으로 희석한 수용성 키토산 용액을 각 well 당 50 μ l씩 넣고, 여기에 bacterial cells가 포함된 10%배지를 50 μ l씩 가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 방치하였다(well당 박테리아 수: 5×10^5 CFU/ml). 620nm에서 흡광도를 측정하고, 흡광도가 나타나지 않는 농도를 최저성장억제농도(MIC: minimal inhibitory concentration)로 결정하였다.

㉕ 균의 형태학적 변화 관찰(광학현미경) : *B. megaterium*과 *E. coli* O-157 균에 MIC의 1/2 농도의 수용성 키토산을 처리한 후, 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에 보관한다(well당 미생물 수 : 1×10^6 CFU/ml). 16시간 동안 보관 후 각각의 샘플을 광학현미경으로 관찰하였다.

㉖ 균의 형태학적 변화 관찰 (주사전자현미경) : *S. aureus*와 *E. coli* 를 SP buffer(10 mM sodium phosphate, 100 mM NaCl, pH 5.4)로 씻어주고 키토산과 함께 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨다(균 수 : 10^8 CFU/ml). 30분 후 0.2 M sodiumcacodylate buffer (pH 5.4)로 희석한 5 % (v/v) glutaraldehyde를 동일 양만큼 넣고 세포를 고정시킨다(4 $^{\circ}$ C, 2시간). isopore filter (0.2 μ m pore size, Millipore)로 필터하고 0.1 M cacodylate buffer(pH 7.4)로 씻어준다. 이후 1% (w/v) osmium tetroxide를 처리하고 cacodylate buffer로 희석한 5 % (w/v) sucrose로 씻어준 다음, ethanol 농도를 높여가며 탈수시킨다. 동결건조하고 금으로 코팅한 후, 주사전자현미경(HITHACHI S-2400)를 이용하여 sample을 분석하였다.

③ 수용성 키토산의 살균력 측정

E. coli O-157에 10mM SP (pH 5.4)로 녹인 MIC, MIC 두 배 농도의 수용성 키토산을 처리한다(well당 박테리아 수: 2×10^6 CFU/ml). 정해진 시간마다 샘플을 처리한 균을 agar plate에 도말한 다음 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에 16시간 두어 생긴 colony 수를 측정하였다.

④ 수용성 키토산의 독성 시험

㉓ 적혈구 용혈활성 측정 : 수용성 키토산의 세포독성은 사람의 적혈구 용혈 활성으로 측정하였다. 사람의 적혈구 (human Red Blood Cell)를 phosphate-buffered saline (PBS)로 세 번 세척한다. PBS로 희석한 적혈구 용액을 96-well microtiter plate에 100 μ l씩 loading한 후, 여기에 수용성 키토산 용액을 100 μ l씩 혼합한다(최종 적혈구 농도, 8% v/v). 이 시료를 37 °C에서 1시간 배양하고 800 xg에서 원심분리하여 상등액만을 모았다. 414 nm에서의 흡광도를 측정하여 용혈활성을 분석하였으며, 1% Triton X-100로 처리하였을 경우의 값을 100% 용혈도로 계산하였다. 수용성 키토산의 % hemolysis는 다음의 식에 의하여 계산하였다.

$$\% \text{ Hemolysis} = \frac{\text{Abs.414nm in the sample solution} - \text{Abs.414nm in PBS}}{\text{Abs.414nm in 0.1\% Triton X100} - \text{Abs.414nm in PBS}} \times 100$$

㉔ 균의 탈분극 현상 측정 : 박테리아 막의 탈분극현상은 DiS-C3-5라는 dye를 사용했다. *E. coli* O-157 균을 buffer A(20 mM glucose, 5 mM HEPES, pH 7.3)로 한번 씻어준다. 그리고 0.1 M KCl이 포함된 buffer A로 균을 희석한다(OD600 = 0.05). 1 μ M의 DiS-C3-5를 첨가하고 형광이 기준치에 도달할 때 까지 반응시킨다. 균을 96-well plate에 분주하고, buffer A로 희석된 적정 농도의 키토산(chitosan)을 처리한 다음 DiS-C3-5 형광이 증가하는 정도를 측정하였다 (excitation wavelength, 622 nm; emission wavelength, 670 nm).

㉕ 리포솜으로부터 용출된 calcein 양 측정 : Calcein이 포함된 리포솜을 만들고, 크로마토그래피를 통해 분리한 다음, 0.2 μ m의 필터를 통해 직경이 0.2 μ m 이하의 리포솜만을 선별한다. 20 μ M의 리포솜에 다양한 농도의 수용성 키토산을 처리하고, 방출된 calcein의 흡광도를 측정하였다(excitation wavelength, 480 nm; emission wavelength, 520 nm). 0.1 % Triton X-100을 처리하였을 경우 측정된 값을 100% 용출도로 계산하였다. 수용성 키토산의 % release는 다음의 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Release (\%)} = \frac{F - F_0}{F_t - F_0} \times 100$$

여기서 F와 Ft는 각각 수용성 키토산과 Triton X-100을 처리한 후를 의미하며, F0은 아무것도 처리하지 않은 리포솜의 흡광도를 의미한다.

⑤ 키토산의 미생물에 대한 작용 기전 규명

로다민으로 표지한 수용성 키토산 (rhodamine-labeled 수용성 키토산, MW1과 MW10)의 *E. coli* O-157 내 위치를 알아보기 위하여 공초점 현미경을 사용하였다. 먼저 균을 SP buffer(10mM sodium phosphate, pH5.4 또는 pH 7.4)로 두 번 씻어주고, MIC 농도의 10mM SP pH 7.4로 희석한 로다민-표지 수용성 키토산 (MW1 또는 MW10,)을 처리하여 37°C에서 반응시킨다(균수 : 1 x 10⁶ CFU/ml). 로다민-표지 수용성 키토산의 세포내 위치는 confocal laser scanning microscope (LSM510META, Carl Zeiss, Germany)에 연결된 Leica TCS 4D 를 이용하여 확인하였다.

⑥ 상처 부위에서 키토산의 생리활성 측정(in vivo)

㉔ 상처 부위에서 키토산의 살균 능력 측정 : 6~7주된 수컷 생쥐를 5mg/kg zylazine과 8mg/kg tiletamine + zolazepam을 복강 내로 주입해 마취시키고 옆구리를 1 cm 절개한다. 상처를 내고 12시간 후, 쥐를 다시 동일한 방법으로 마취시키고 상처부분을 다시 열어 *S. aureus* (10^7 CFU/ml) 100 μ l로 감염시킨다. 감염 시킨 다음날 20 mg/kg 또는 40 mg/kg 키토산이 첨가된 키토산 필름(chitosan film)을 감염부위에 적용한다. 그 다음날 그 상처부위와 주변 조직을 잘라내어 차가운 PBS 500 μ l에 두고 무게를 잰다. 그 샘플을 5분간 vortex 하고 CFU 농도를 결정하였다.

㉕ 상처 회복 : 6~7주 된 수컷 생쥐의 털 일부를 제거하고 넓적다리 부분을 절개한다. 절개된 상처 부분에 40 mg의 키토산 필름(chitosan film)을 처리한다.

⑦ 토종꿀, 생약초, 수용성키토산 혼합용액의 항균활성의 측정

혼합용액의 항균활성측정에 사용한 *Escherichia coli* (KCTC 1682)와 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1621)는 생명공학연구소 Korean Collection for Type Culture (KCTC)로부터 분양받았다. 각 bacterial cells는 Broth media에서 mid-log phase까지 배양하였다. 혼합용액은 phosphate buffered saline(PBS)에 희석하여 0.20 μ m 필터로 멸균하여 사용하였다. 96-well microtiter plate에 단계적으로 희석한 sample을 각 well당 50 μ l씩 넣고, 여기에 bacterial cells가 포함된 20%배지를 50 μ l씩 가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 방치하였다(well당 박테리아 수: 5×10^5 CFU/ml). 이후 96-well plate의 각 well에서 소량을 취해 agar plate에 도말하였고, cell이 보이지 않는 농도를 최저성장억제농도(MIC: minimal inhibitory concentration)로 결정하였다.

⑧ 최적혼합용액의 항균활성 측정

항균 활성에 사용할 세균으로는 그람 양성균으로써 아토피나 습진 등 피부 2차 감염에 관여하며 피부 외에 기관지 같은 호흡기 질환 등에 관여하는 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1621)와 *Bacillus subtilis* (KCTC 1918)를, 그람 음성균으로 요도감염과 장내 독성 및 피부염증에 관여하는 *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1637)와 *Escherichia coli* (KCTC 1682)을 선발하였고, 상기 세균 중 대장균과 *Bacillus subtilis*는 LB 배지, *Pseudomonas aeruginosa*는 NB+0.5 % NaCl 배지, *Staphylococcus aureus*는 TSB 배지에 대수기 중간단계(mid-log phase)까지 배양하여 실험에 이용하였다. 양성 대조구로 세팔로스포린 계열 3세대 항생제로 널리 이용되는 세프피라미드(cefpiramide)를 사용하였다. 항균활성 측정은 다음과 같이 측정하였다. 멸균한 3차 증류수 800 μ L와 브래드포드 용액(1리터 기준 함량: Coomassie brilliant blue G250 0.1g/50ml 에탄올, 인산 100ml, 3차 증류수 850 ml) 200 μ L를 첨가한 후 혼합용액을 10 μ L를 첨가하였다. 대조군은 본 발명의 혼합 조성물을 첨가하지 않고 증류수 800 μ L와 브래드포드 용액 200 μ L만 첨가하여 준비하였다. 분광기를 이용하여 595nm 파장에서 OD 값을 측정하였고, 아래의 계산식을 이용하여 정량을 계산하였다.

$$\text{OD595} < 0.241 \text{인 경우, 정량농도}(\mu\text{g/ml}) = (2.8136 * \text{OD595}) - 0.0146$$

$$\text{OD595} > 0.241 \text{인 경우, 정량농도}(\mu\text{g/ml}) = (11.702 * \text{OD595}) - 2.1208$$

상기 측정된 결과를 바탕으로, 혼합용액을 1% 박토펙톤(Bactopeptone)을 이용하여 96-well 마이크로티터 플레이트(Nunc)에 단계적으로 희석하였다. 상기 각 well에 항균활성을 측정할 세균이 포함된 배지를 100 μ L(well당 세균 수 : 2×10^5 CFU/ml) 씩 가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 방치하였다. 음성대조군은 혼합용액 또는 항생제를 전혀 첨가하지 않은 상태에서 동일하게 수행하였다. 하룻밤 배양한 대장균과 *Bacillus subtilis*는 LB 아가 배지에, *Pseudomonas aeruginosa*는 NA+0.5 % NaCl 아가 배지에, *Staphylococcus aureus*는 TSA 아가 배지에 도말하고 12시간 동안 배양하여 생육 여부를 확인하였다.

⑨ 최적혼합용액의 항진균 활성 측정

항진균 활성에 사용할 진균으로는 여성의 질염과 피부염증의 2차 감염을 유발하는 *Candida albicans* (KCTC 7121)와 지루성 피부염이라 불리는 비듬과 무좀을 유발하는 *Trichosporon beigelli* (KCTC 7707)를 선발하였다. 진균 배양용 배지는 YPD 배지를 이용하였다. 양성 대조구로 곰팡이의 피부 감염 시 연고로 쓰이고 있는 항진균 항생제인 클로트리마졸 (clotrimazole)을 사용하였다. 항진균 활성 측정은 다음과 같이 측정하였다. YPD배지를 이용하여 혼합용액과 항생제를 각 well당 50 μ L씩 넣고 단계적으로 희석하였다.

진균 수는 96-well 마이크로티터 플레이트에 각 well당 2×10^4 cell이 되도록 진균을 포함한 YPD배지 50 μ L 분주한 후 28 $^{\circ}$ C 배양기에서 24시간 방치하였다. 그리고 난후, YPD 아가 배지에 도말하고, 생육 여부를 측정하였다.

⑩ 최적혼합용액의 세포독성 측정

인간의 피부에 존재하는 정상피부세포인 케라티노사이트 세포(Human Keratinocyte cell)인 HaCaT 세포를 이용하여 혼합용액의 세포독성을 측정하였다. 상기 세포를 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 배양하고, 96-well 플레이트에 단계적으로 희석시킨 약초꿀과 항생제를 넣고, 이에 상기 세포를 각 well당 2×10^3 개 되도록 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양시켰다. 여기에 20 μ L의 MTT용액(5mg/ml MTT in phosphate-buffered saline)을 가하여, 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양한 후, DMSO 용액을 추가하여 생성된 MTT-포르마잔 생성물을 녹였다. 그 후 ELISA 리더를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 연구 결과

생리활성 물질의 안정화 제제의 원료로 사용하기 위하여 수용성 키토산을 분획하고 분자량에 따른 키토산이 가지고 있는 특성을 확인하였으며, 최적의 활성을 가지는 분자량 분포의 키토산을 이용하여, 토종꿀과 생약초와 적당한 비율로 혼합하여 항균활성 및 세포 독성을 확인하고 최적의 혼합조성을 도출하였다. 최적혼합용액을 이용하여 여러 가지 균에 대한 항균, 항진균 활성 및 세포 독성을 규명하였다.

(가) 수용성 키토산 구조분석

① ^1H NMR 연구

그림 16은 수용성 키토산(MW10)의 ^1H NMR 결과로 수소의 화학적 이동을 ppm 단위로 기록하여 분석하였다. 2.0 ppm에서 아세틸기의 수소, 1.2 ~ 1.4 ppm과 4.05 ppm에서 lactic acid의 수소, 4.7 ppm에서 키토산 1번 위치의 수소, 3.1 ppm에서 2번 위치의 수소, 3.4 ~ 3.9 ppm에서 3 ~ 6번 위치의 수소 특성 피크를 모두 확인할 수 있었다. 또한 나머지 분자량의 수용성 키토산에서도 동일한 결과를 확인하였다.

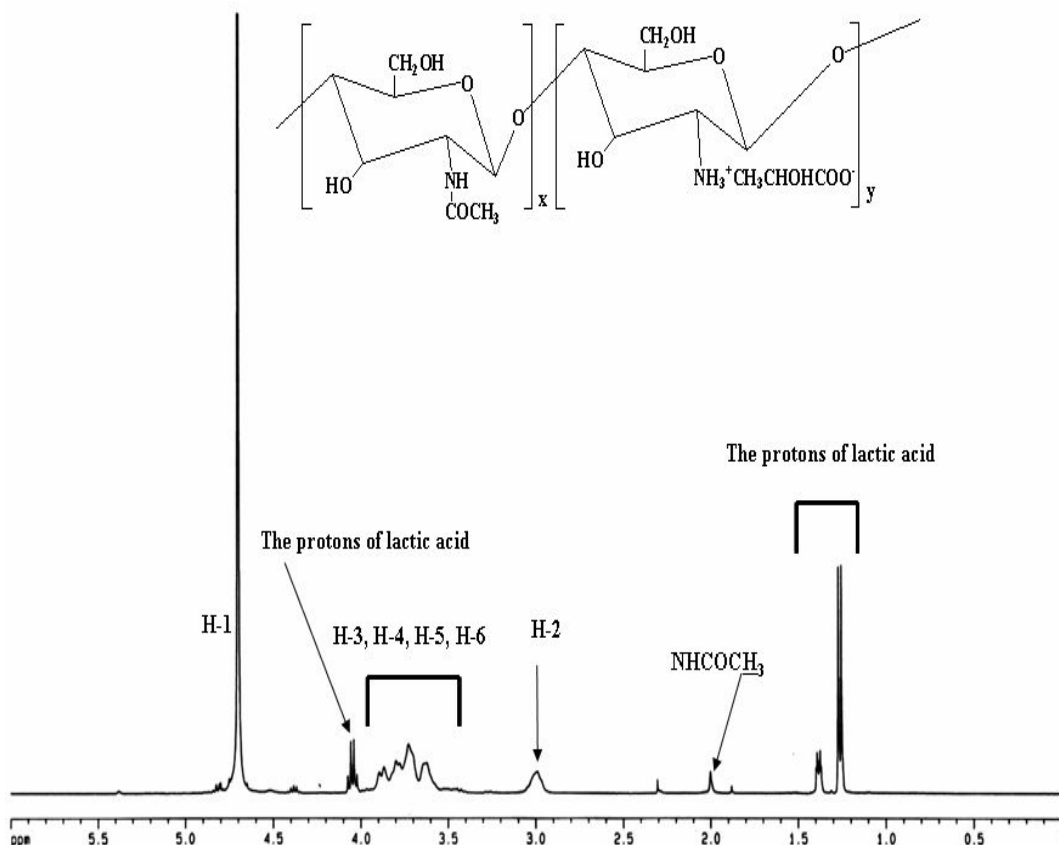


그림 16. 수용성 키토산(MW10)의 ^1H -NMR 결과

② FT-IR Spectroscopy 연구

그림 17은 수용성 키토산(MW10)의 FT-IR 결과를 나타낸 것이다. 그림 17에서 볼 수 있듯이 키토산의 특성 피크를 모두 확인함으로써 효소분해, 한외여과 과정 및 정제 과정에서 키토산의 분해가 일어나지 않고 순수한 키토산을 얻었음을 확인하였으며 다른 분자량도 동일한 결과를 확인하였다.

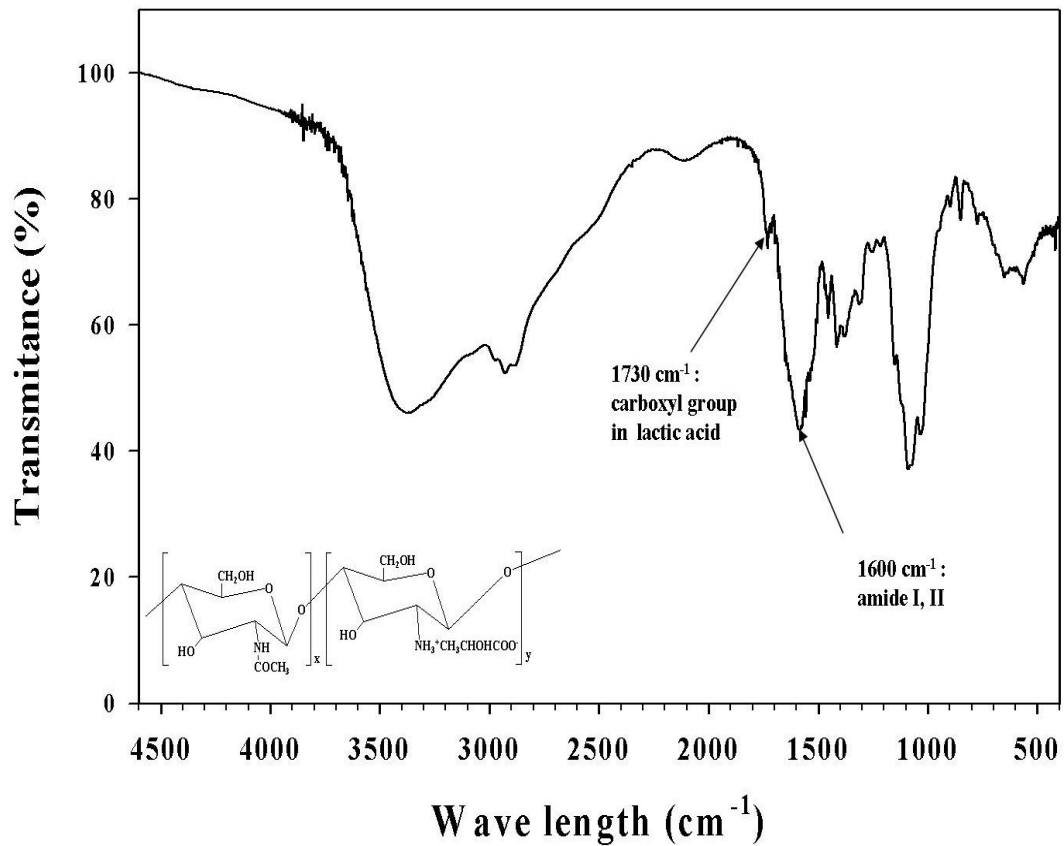


그림 17. 수용성 키토산(MW10)의 FT-IR 결과

③ 겔 투과 크로마토그래피(GPC) 연구

저분자량 수용성 키토산의 분자량은 겔 투과 크로마토그래피를 이용하여 절대분자량과 분자량 분포를 측정하였다. 분자량 별로 분급 분리한 수용성 키토산을 GPC-MALLS를 이용하여 실질 분자량을 측정한 결과 표 3에서 나타낸 것과 같이 Mn과 PDI 값을 구할 수 있었으며, 분석 결과 한외여과막에 의하여 성공적으로 분자량 별로 분급 분리가 되는 것을 알 수 있었다. (그림 18) 또한 분급 분리된 수용성 키토산의 경우 상당히 좁은 분자량 분포를 나타내는 것을 알 수 있었다.

표 3. 저분자량 수용성 키토산의 특성

Sample	Membranes	Mn ^(a)	PDI ^(a)	DDA ^(b) (%)
MW1	1K이하	1260	1.42	94.55
MW3	1K~3K	2700	1.24	92.96
MW5	3K~10K	6700	1.17	91.32
MW10	10K~30K	10500	1.13	90.17

(a) GPC 측정 (0.5M ammonium acetate, pH 5.5, 25°C)

(b) UV 1차 미분법

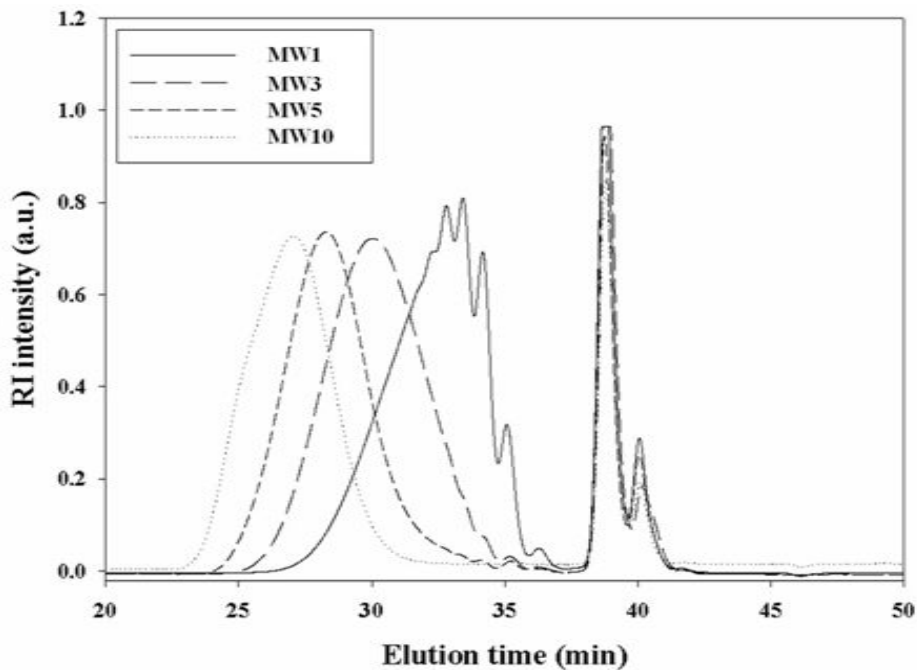


그림 18. 수용성 키토산의 겔 투과 크로마토그램

(나) 수용성 키토산의 항균활성 시험

① 최저 성장 억제 농도 (MIC) 측정

분자량이 다른 수용성 키토산(MW1, 3, 5, 10)을 가지고 pH 5.4와 pH 7.4 조건에서 다양한 균주에 대한 항균 활성 능력을 측정하였다. 수용성 키토산은 gram-positive 균 보다 gram-negative 균에서, pH 7.4보다 pH 5.4 에서 항균 활성이 좋았다(표 4). 결과에서 볼 수 있듯이 MW10의 경우 pH 7.4에서 MIC는 4.9 ~ 2,500 µg/ml, pH 5.4에서는 0.3 ~ 312.5 µg/ml를 보여 낮은 농도의 MIC를 보였다. 더불어 다른 분자량 범위인 MW1, 3, 5 보다 아주 높은 항균 활성 능력을 갖는 것을 확인 할 수 있었다. 표 4의 결과에서 보여 주듯이 키토산의 분자량이 높을수록 우수한 항균활성을 보이고 있음을 알 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 MW10의 경우 생리활성 물질로 사용이 가능 할 것으로 기대된다.

표 4. 다양한 균에 대한 분자량이 다른 수용성 키토산의 최저생장억제농도

Bacteria	MIC (µg/ml)							
	MW1		MW3		MW5		MW10	
	pH 7.4	pH 7.4	pH 5.4	pH 7.4	pH 5.4	pH 7.4	pH 5.4	pH 7.4
Gram (+) strains								
<i>B. cereus</i>	5000	>5000	5000	>5000	1250	2500	78.1	1250
<i>B. megaterium</i>	312.5	>5000	625	>5000	156.3	2500	9.8	625
<i>B. subtilis</i>	1250	>5000	2500	>5000	625	5000	39.1	625
<i>E. faecalis</i>	625	>5000	1250	>5000	156.3	2500	9.8	312.5
<i>L. monocytogens</i>	2500	>5000	2500	>5000	625	>5000	78.1	1250
<i>S. aureus</i>	5000	>5000	5000	>5000	1250	5000	312.5	1250
<i>S. epidermidis</i>	156.3	>5000	312.5	>5000	78.1	5000	19.5	156.3
Gram (-) strains								
<i>E. coli</i>	78.1	>5000	156.3	>5000	2.4	1250	0.3	39.1
<i>E. coli O-157</i>	78.1	>5000	156.3	>5000	19.5	>5000	4.9	625
<i>P. vulgaris</i>	2500	>5000	2500	>5000	1250	>5000	156.3	2500
<i>P. aeruginosa</i>	2500	>5000	2500	>5000	39.1	625	1.2	4.9
<i>S. typhimurium</i>	1250	2500	1250	2500	312.5	625	39.1	156.3
<i>V. vulnificus</i>	2500	>5000	2500	>5000	1250	>5000	312.5	1250

② 균의 형태학적 변화 관찰 (광학현미경)

균의 형태학적인 변화에 있어 분명한 차이를 알아보기 위해 *B. megaterium*과 *E. coli* O-157에 MIC의 1/2 농도의 수용성 키토산을 처리한 후 37°C 인큐베이터에 두고 광학현미경을 이용해 관찰하였다. MW1, 3, 5의 경우 cell이 길어지고 운동성이 없어지는 결과를 얻었지만, MW10에서는 이러한 결과가 나타나지 않았다(그림 19). MW1, 3, 5의 경우 MW10보다 상당히 높은 MIC를 갖고 있기 때문에 MIC의 1/2 농도여도 상당히 높은 농도이며, 이 순간부터 균의 생육이 억제되는 것을 알 수 있다. MW10의 경우는 MIC 이하에서는 전혀 독성이 없고, MIC 농도에 도달하였을 때 모든 균을 사멸 시키는 것으로 사료된다.

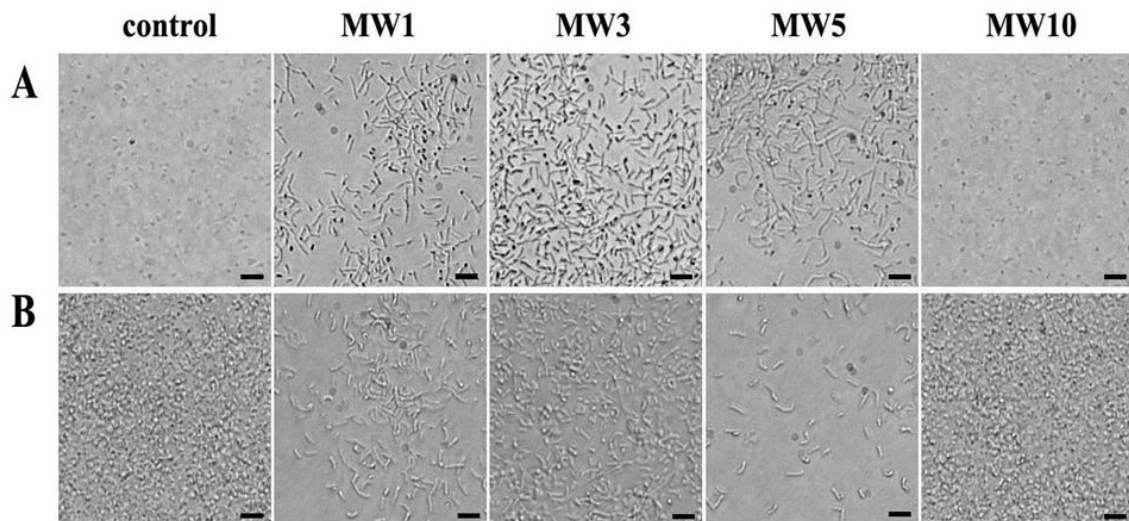


그림 19. 수용성 키토산에 의한 *B. megaterium* (A)과 *E. coli* O-57 (B)의 형태적 변화. (bar의 길이는 20 nm).

③ 균의 형태학적 변화 관찰 (주사전자현미경)

수용성 키토산이 균에 작용했을 때 일어나는 형태학적 변화를 알아보기 위해 주사 전자 현미경을 이용하였다. pH 5.4인 10mM SP buffer 내에서 *E. coli*와 *S. aureus*를 수용성 키토산과 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 0.2 M sodiumcacodylate buffer(pH 5.4)로 희석한 5 % (v/v) glutaraldehyde를 동일 양만큼 넣고 세포를 고정시키고(4°C, 2시간) ethanol 농도를 높여 가며 탈수시킨다. 동결건조하고 금으로 코팅한 후 이미지를 관찰하였다(그림 20). 그림 20에서 볼 수 있듯이 MW1을 처리한 경우, 키토산을 처리하지 않은 균과 동일한 형태를 보이고 있다. 반면 MW10의 경우 시험에 사용된 모든 균주에서 세포의 파괴가 일어나고 있음을 알 수 있었다.

분리된 수용성 키토산의 항균 활성 능력을 다양한 접근 방법을 통하여 규명하였으며 이 결과 가장 높은 분자량을 갖고 있는 MW10에서 아주 우수한 항균 활성을 보이고 있는 것을 확인 할 수 있었다.

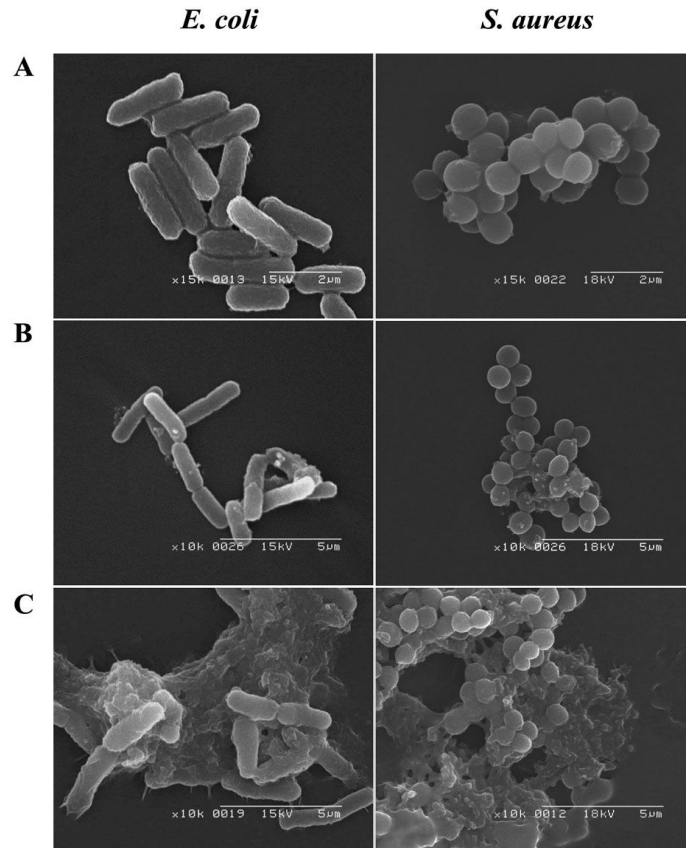


그림 20. 주사 전자 현미경을 통한 *E. coli*와 *S. aureus*의 형태적 변화 관찰.

A) 수용성 키토산을 처리하지 않은 균, B) MW1 처리, C) MW10 처리.

(다) 수용성 키토산의 살균력 측정

생장억제능력이 아닌 실제 살균력을 측정하기 위하여 *E. coli* O-157에 수용성 키토산 (MW1과 MW10)를 MIC, MIC 두 배 농도를 처리하여 농도, 시간에 따라 살균 정도를 측정하였으며 이 결과는 그림 21에 나타났다. 결과에서 볼 수 있듯이 MW10의 경우 거의 처리와 동시에 급격하게 균의 수가 감소되는 것을 확인 할 수 있었으며 MIC 두 배의 농도에서 MIC 농도보다 좀 더 빠른 살균력을 보이고 있으나 30분 정도에서 거의 모든 균이 사멸되고 있음을 알 수 있다. 반면에 MW1의 경우, 처리 후 30분정도까지는 균의 사멸이 미비하지만 그 이후 급격하게 감소되는 것을 보이고 있다. 이러한 결과는 앞서 언급한 MIC 결과나 광학 현미경을 이용한 균의 형태학적 관찰 결과와도 잘 일치하고 있다.

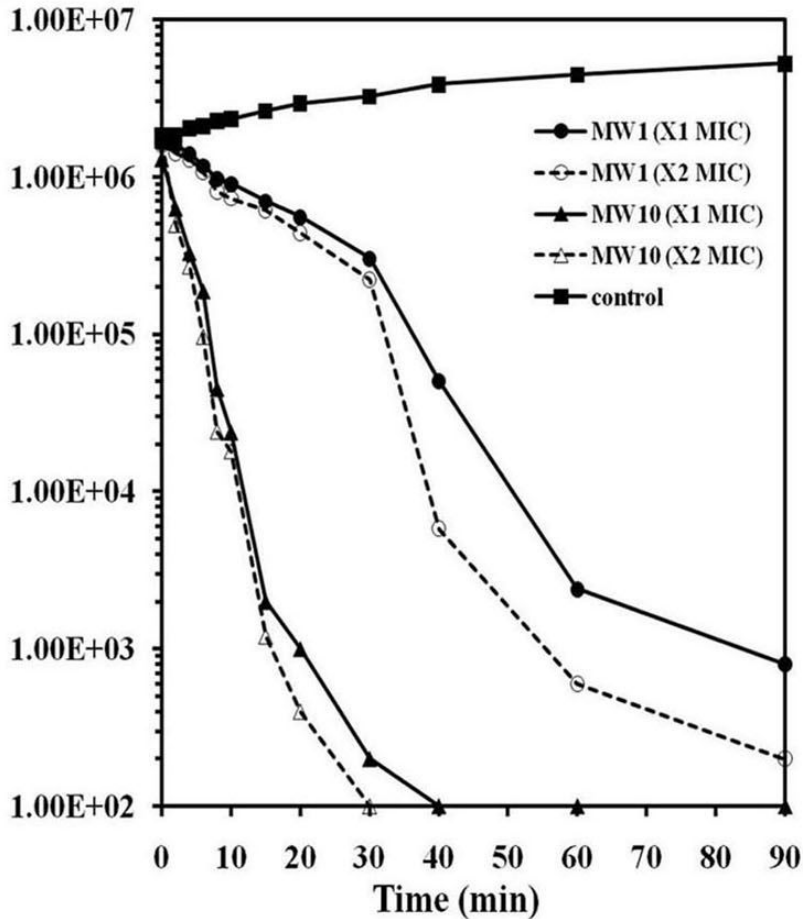


그림 21. 수용성 키토산의 살균력 측정 결과.

(라) 수용성 키토산의 독성 시험

① 적혈구 용혈활성 측정

항균 활성을 지닌 수용성 키토산이 숙주세포에 독성을 지니는지 알아보기 위해 사람의 적혈구 세포에 다양한 농도의 수용성 키토산을 1시간 동안 37°C에서 반응 시킨 후 원심분리하여 상등액만 취해 용혈력을 측정했다. 용혈력은 적혈구의 파괴 능력을 의미하며, 이 값이 클수록 세포 독성이 크다는 것을 의미한다. 수용성 키토산을 이용하여 MIC 농도 및 그 이상에서 적혈구 파괴능력을 측정하였으며 그 결과는 그림 22에 보였다. 이 결과에서 볼 수 있듯이 100% 용혈 활성을 지녀 대조군으로 사용했던 Melittin과 비교해보았을 때, 수용성 키토산의 MIC 부근에서는 거의 적혈구의 파괴현상이 관찰되지 않았으며, 상대적으로 높은 농도인 25 mg/ml에서도 적혈구 파괴현상을 보이지 않은 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 분리된 모든 분자량 대에서 수용성 키토산의 경우 사람에게는 전혀 독성을 보이지 않음을 보여 주고 있다.

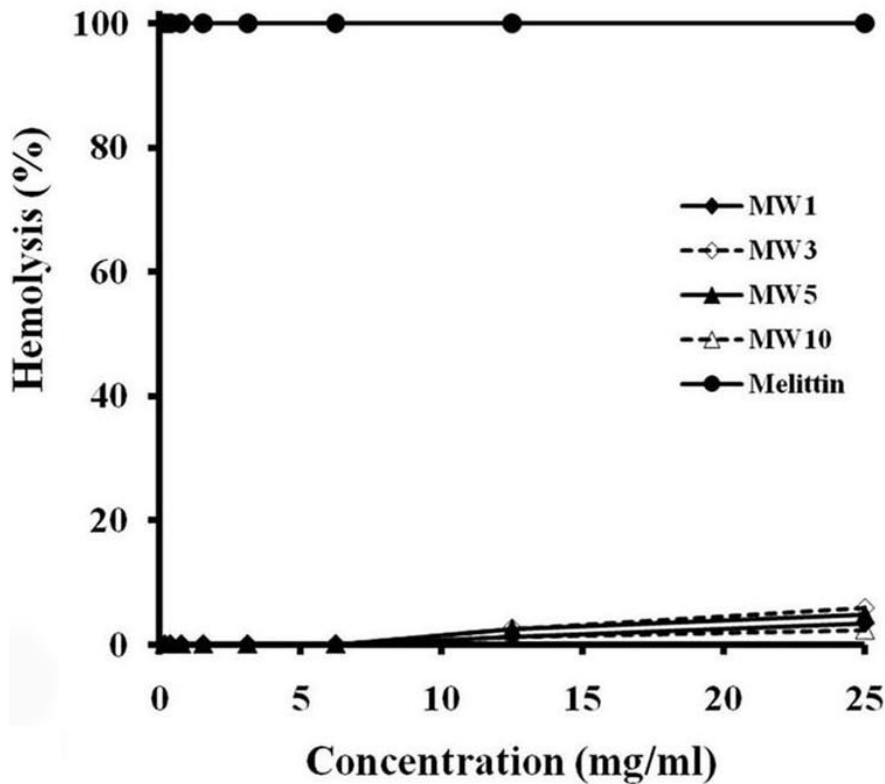


그림 22. 용혈력 측정 결과.

② 균의 탈분극 현상 측정

균의 원형질막과 상호작용하여 세포 사멸을 일으키는지 알아보기 위해 박테리아 막의 탈분극 유도를 측정하였다. *E. coli* O-157을 DiS-C3-5와 37 °C에서 1시간동안 미리 반응시키고, 농도별로 수용성 키토산을 처리한 후 형광의 변화정도를 spectrofluorometer를 사용하여 측정 (excitation, 622 nm; emission, 670 nm)하고, 최댓값을 점으로 표시하였다(그림 23). MW10은 매우 낮은 농도에서도 탈분극을 일으키는 반면 MW1과 MW3은 거의 일으키지 않았다. MW5는 가장 높은 농도에서 약 40% 정도 탈분극을 일으키는 것을 볼 수 있었다. 탈분극 현상의 세포막의 파괴를 일으키는 것을 의미하고 있으며, 이는 세포의 사멸을 간접적으로 알 수 있는 방법이다. 이러한 결과에서 볼 수 있듯이 MW10은 항균활성, 균의 사멸 능력 시험과 동일한 결과를 얻었다. 아울러 적혈구 용혈 현상 결과와 비교하였을 때 인체에는 전혀 독성을 보이지 않은 것을 알 수 있다. 따라서 MW10은 무독성이고 우수한 항균활성 능력을 갖고 있는 물질임을 확인하였으며, 다양한 분야에 응용 가능할 것으로 사료된다.

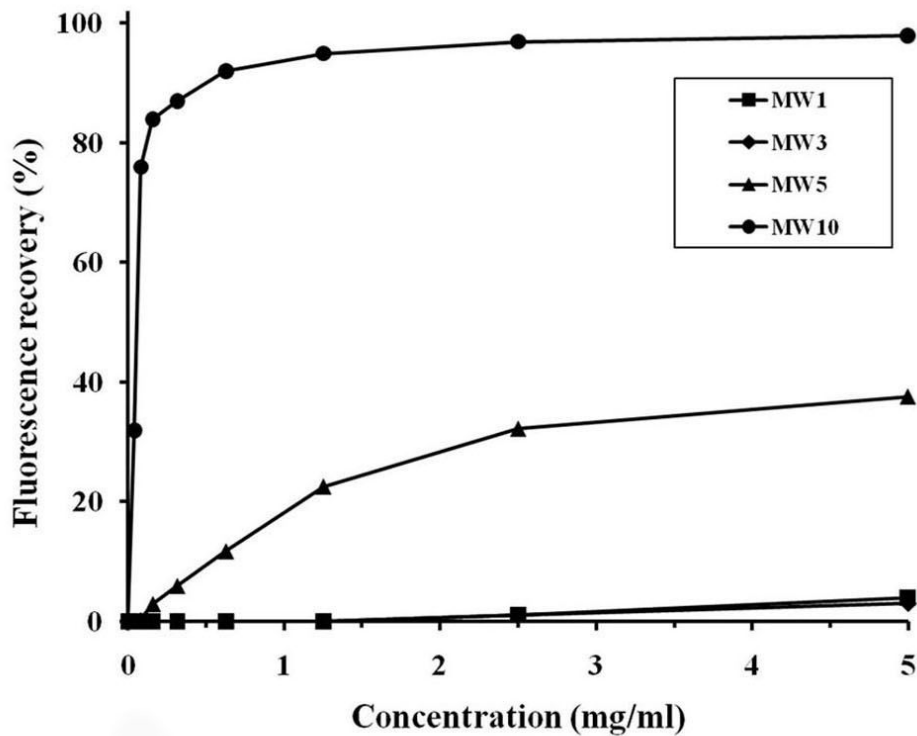


그림 23. 박테리아 막에의 수용성키토산 작용 측정

③ 리포솜으로부터 용출된 calcein 양 측정

수용성 키토산의 생리활성 기작을 더 조사하기 위하여, 인공적인 균의 막 성분과 수용성 키토산의 상호작용을 조사하였다. *E. coli* 막 성분과 비슷한 비율의 지질(PE/PG (w/w, 7:3))을 이용하여 calcein을 포함한 리포솜을 만들고, pH 5.4와 pH 7.4에서 다양한 농도의 수용성 키토산을 처리해 용출되는 calcein의 양을 측정하였다. calcein이 리포솜으로 분리되면 리포솜의 구조를 변화시키며 결국 세포의 사멸을 의미하게 된다. 100 % 용출 양은 1 % triton X-100을 이용해 얻었다. 수용성 키토산을 처리하여 용출된 calcein은 spectrofluorometer를 사용하여 측정(excitation, 480 nm; emission, 520 nm)하였으며 이 결과는 그림 24에 나타났다. MW10의 경우에는 다른 분자량대의 키토산에 비해 많은 calcein이 용출 되고 있는 것을 보였다. 이 결과는 MW10이 높은 항균 활성을 갖고 있다는 것을 간접적으로 보여주고 있다. 이 calcein 시험 결과는 MIC 시험, 독성 시험 등의 결과와 잘 일치하고 있다.

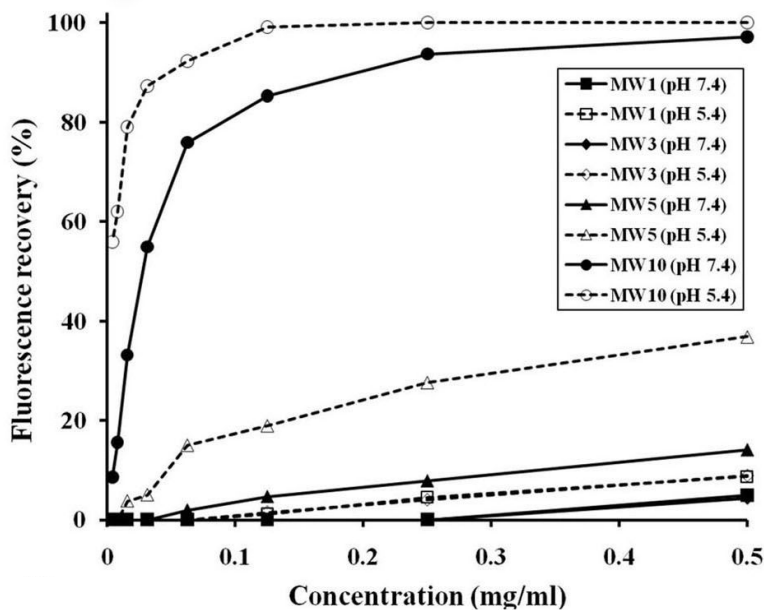


그림 24. 리포솜으로부터 용출된 calcein 양 측정.

(마) 수용성 키토산의 미생물에 대한 작용 기전 규명

수용성 키토산이 *E. coli* O-157의 어느 부분에 작용하는지 알아보기 위하여, MIC 농도의 로다민-표지 수용성 키토산을 두 pH 조건에서 박테리아와 반응시킨 후 공초점 현미경으로 관찰하였으며 그 결과는 그림 25에 나타냈다. 그림 25에서 볼 수 있듯이 MW10은 pH 5.4와 pH 7.4에서 *E. coli* O-157의 세포막에 축적되어 있다. MW1은 pH 7.4에서는 세포막에 축적되었지만 pH 5.4에서는 세포내 부분으로 들어감을 알 수 있었다. 이러한 결과는 동일한 키토산이지만 분자량에 따라 세포에 위치하는 부위가 다를 수 있으며, 이러한 결과는 다른 분야에도 유용하게 응용이 될 수 있을 것으로 사료된다.

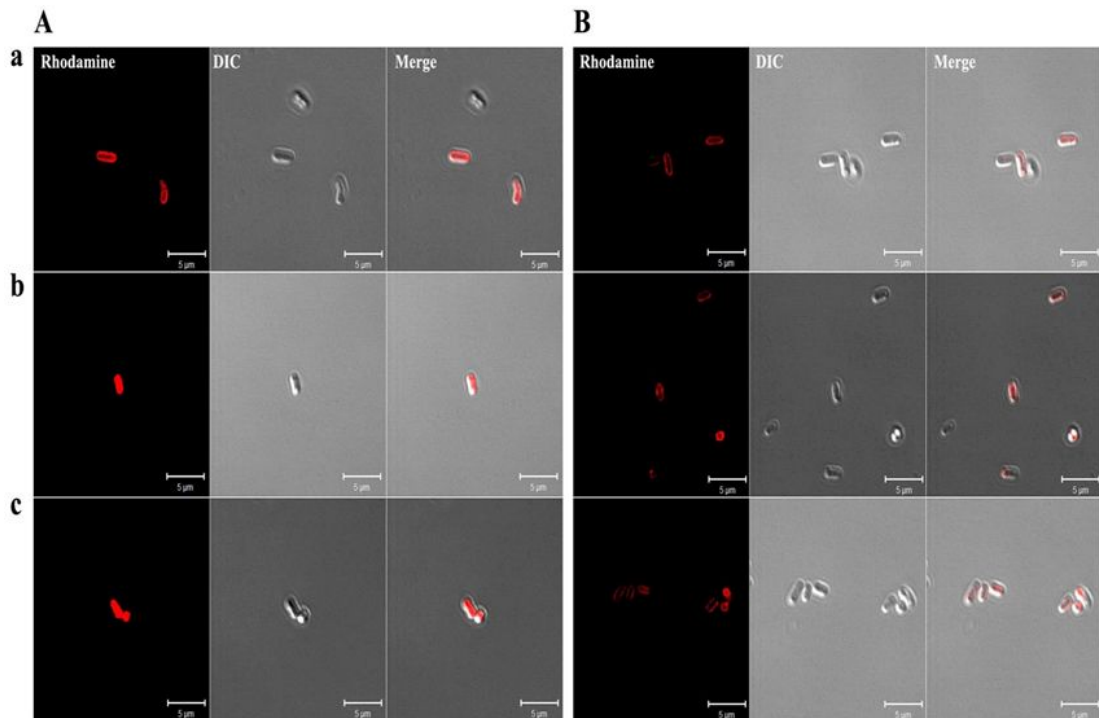


그림 25. 로다민-표지 수용성 키토산의 *E. coli* O-157에 대한
pH에 따른 작용 기전 ;

MW1 (A), MW10 (B) ; 10mM sodium phosphate pH 5.4 (a, b), pH 7.4 (c).

(바) 상처 부위에서 키토산의 생리활성 측정 (in vivo)

① 균의 상처부위 감염 후 수용성 키토산의 살균능력 측정

선천적 면역 항균 기작에 대한 세균 발육 저지 항생물질의 간접 현상을 조사하기 위하여, 먼저 상처부위에 균을 감염시킨 후 MW10을 처리하기 전과 후를 비교하였다. 6~7주된 수컷 생쥐를 마취시키고 옆구리를 절개하고 12시간 후, 쥐를 다시 마취시키고 상처부분을 다시 열어 *S. aureus* (10^7 CFU/ml) 100 μ l로 감염시켰다. 감염 시킨 다음날 20 mg/kg 또는 40 mg/kg 수용성 키토산 첨가된 키토산 필름 (chitosan film)을 감염부위에 적용하고 균의 수를 측정하였다. 그림 26의 A에서 육안으로 볼 수 있듯이 MW10을 40 mg/kg을 적용한 경우 상처 치유 효과가 더욱 좋은 것을 알 수 있었다. 또한 이때 상처 부위에서 *S. aureus*의 수의 측정 결과는 그림 26의 B로 균의 수가 MW10을 처리하였을 때 그렇지 않은 경우에 비해 현저히 감소하였음을 알 수 있었다.

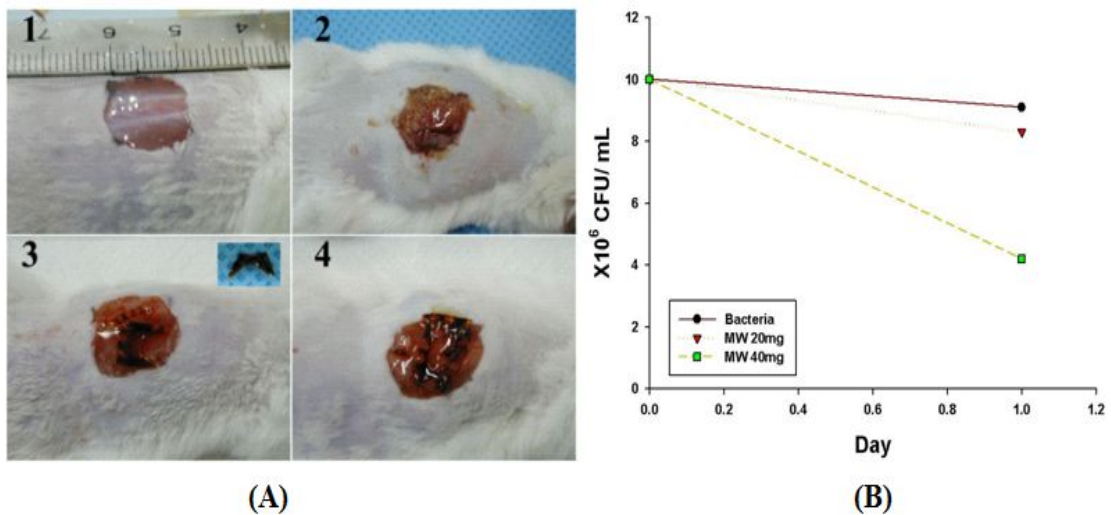


그림 26. 수용성 키토산의 *S. aureus* 살균능력 측정. (A) 1 ; 상처 낸 쥐의 피부, 2 ; *S. aureus* (1×10^7 cells) 감염, 3 ; film-type의 20mg MW10 처리, 4; film-type의 40mg MW10 처리. (B) 발견된 *S. aureus* colony 수.

② 수용성 키토산의 상처 회복 강화 능력

MW10을 처리하였을 때 상처회복능력을 시험하였다. 6~7주 된 수컷 생쥐의 넓적다리 부분을 절개하고, 40 mg의 키토산 필름(chitosan film)을 처리하여 동일한 쥐를 25일 동안 관찰하여 그림 27에 나타냈다. 결과에서 볼 수 있듯이 MW10을 처리하였을 때 좀 더 빠르고 상처에 염증 등의 부작용 없이 깨끗하게 치료 되는 것을 알 수 있었다. 이상의 수용성 키토산 특히 MW10은 아주 우수한 생리활성을 갖고 있는 물질임을 확인 할 수 있었으며, MW10을 아토피 등의 피부염에 적용할 경우 다양한 경로로 발생하는 2차 감염을 효과적으로 예방 할 수 있을 것으로 사료 된다.

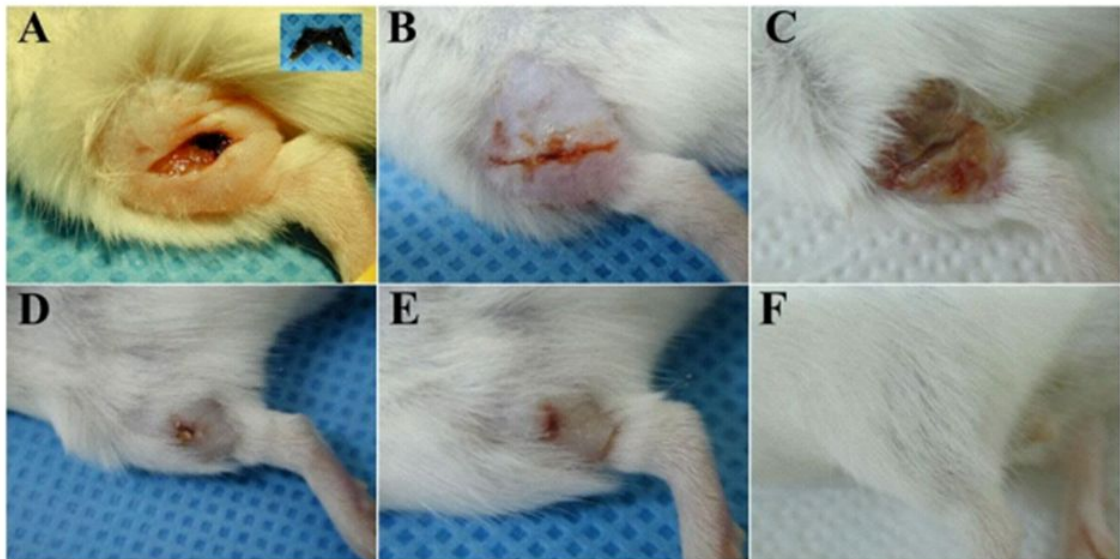


그림 27. 수용성 키토산(MW10)의 상처 치유 효과

A; 넓적다리 절개 후 MW10 처리, B; 0일, C; 2일, D; 5일, E, 10일, F; 25일

(사) 토종꿀, 생약초, 수용성 키토산 혼합용액의 항균활성의 측정

1차년도 결과를 바탕으로 표 5와 같은 조성으로 혼합하여 용액을 제조하였다. 제조된 8개의 sample을 사람의 염증 질환이나 기타의 질병을 유발하는 대표적인 균주에 대하여 항균활성 실험을 하였다. *E. coli*와 *S. aureus* 균주에 sample을 처리한 후 4시간 동안 37 °C에서 보관 한 후 plate에 도말하여 항균활성을 측정하였다(그림 28, 29). 그림 28에서 보는 것처럼 *E. coli*의 경우 토종꿀과 거의 비슷한 항균 활성을 보이거나, 좀 더 낮은 농도에서 항균 활성을 보였다. 그림 29의 *S. aureus* 도 역시 비슷한 결과를 보였다. 이러한 결과는 토종꿀이 항균활성에 주도적인 역할을 하고 있음을 보여 주며, 토종꿀의 함량이 감소할수록 항균활성이 감소되고 있음을 보여 준다.

표 5. 토종꿀과 생약초의 혼합 조성

	토종꿀(%)	작약(%)	측백(%)	대추(%)
sample1	100	0	0	0
sample2	50	50	0	0
sample3	50	0	50	0
sample4	50	0	0	50
sample5	33.3	33.3	33.3	0
sample6	33.3	33.3	0	33.3
sample7	33.3	0	33.3	33.3
sample8	25	25	25	25

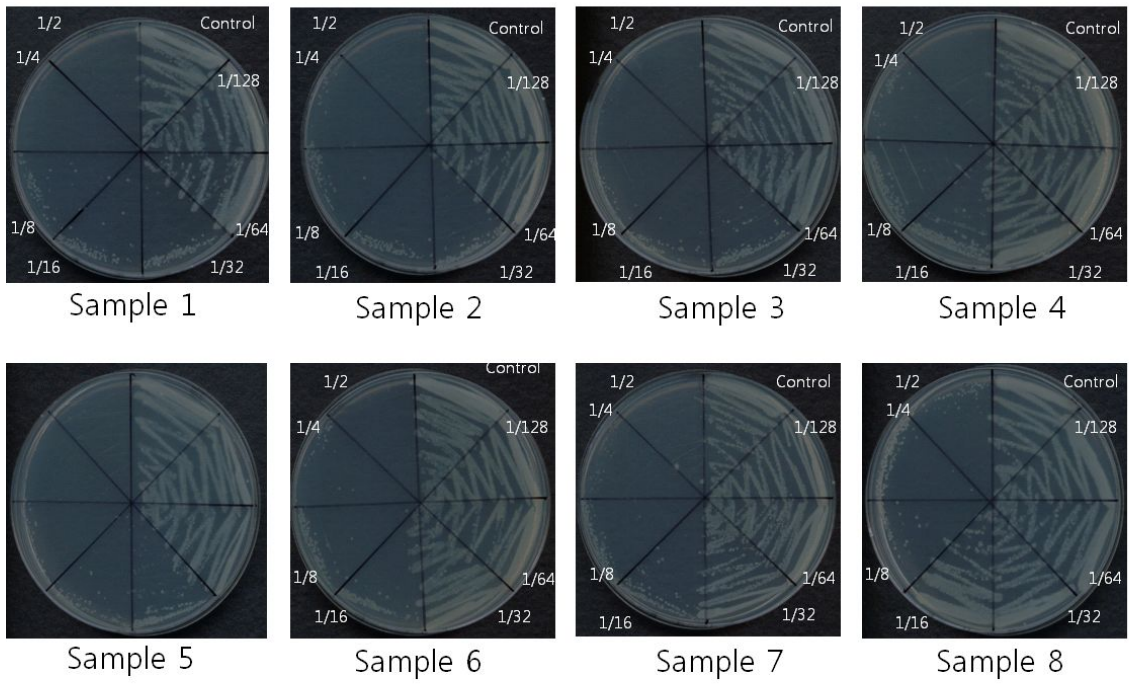


그림 28. *E. coli* 에 대한 혼합조성물의 항균활성

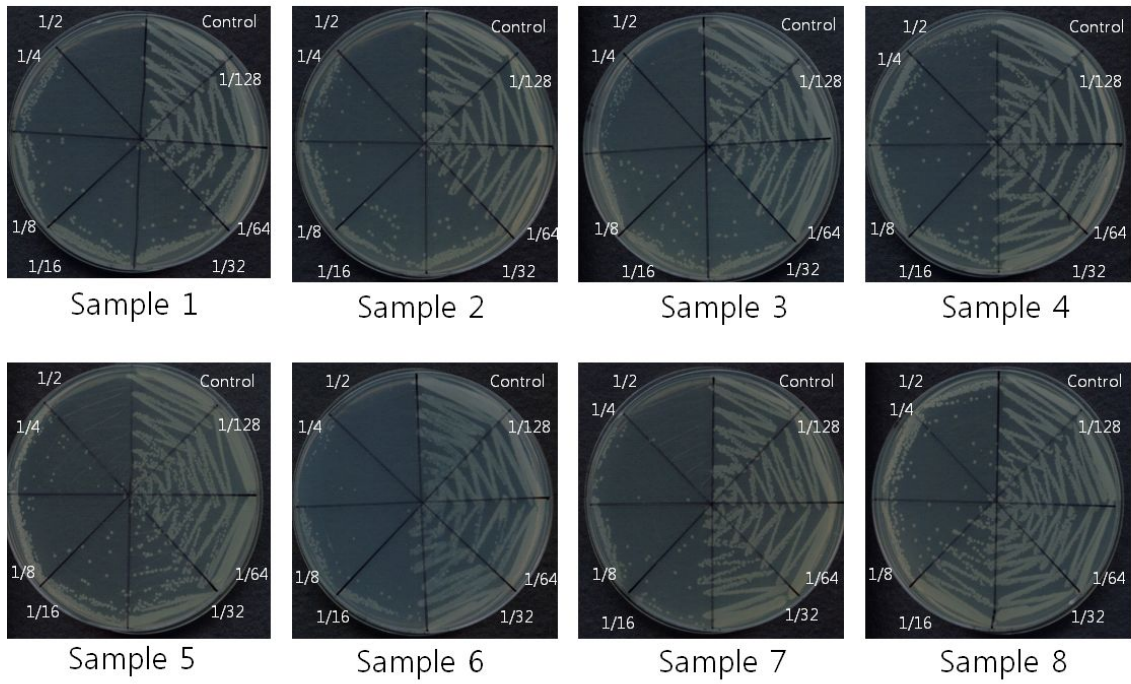


그림 29. *S. aureus* 에 대한 혼합조성물의 항균활성

이러한 결과를 바탕으로 토종꿀과 탈과립억제 효과를 가지는 작약 혼합 용액에 수용성 키토산의 농도를 조절하여 표 6과 같이 혼합용액을 제조하였고 이 혼합용액의 열에 의한 항균 활성의 변화를 확인하기 위해 제조된 용액을 80℃에서 30분 동안 가열하여 총 8개 sample의 항균활성을 측정하였다(그림30, 31). 그 결과 키토산의 농도가 증가함에 따라 용액의 항균활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 80℃에서 30분 동안 가열한 sample에서도 활성이 가열하지 않은 sample과 유사한 활성을 나타내었다. 이로 인해 본 sample이 화장품 제조 시 가열 조건에서도 항균활성을 유지함으로써 여러 가지 제품으로 응용되어질 수 있을 것이다.

표 6. 토종꿀, 생약초, 수용성 키토산의 혼합 조성

	토종꿀(ml)	작약(mg)	수용성키토산(mg)	온도
sample2-1	100	100	100	상온
sample2-2	100	100	200	
sample2-3	100	100	500	
sample2-4	100	100	1000	
sample2-5	100	100	100	80℃
sample2-6	100	100	200	
sample2-7	100	100	500	
sample2-8	100	100	1000	

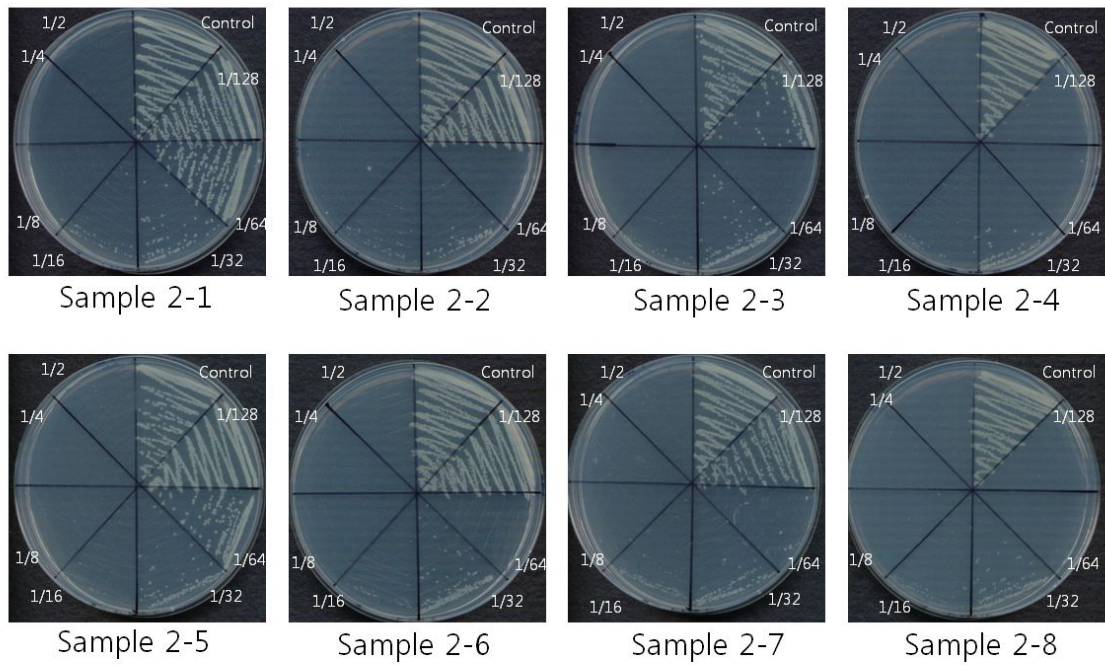


그림 30. *E. coli* 에 대한 토종꿀, 생약초, 수용성 키토산의 혼합 조성의 항균활성

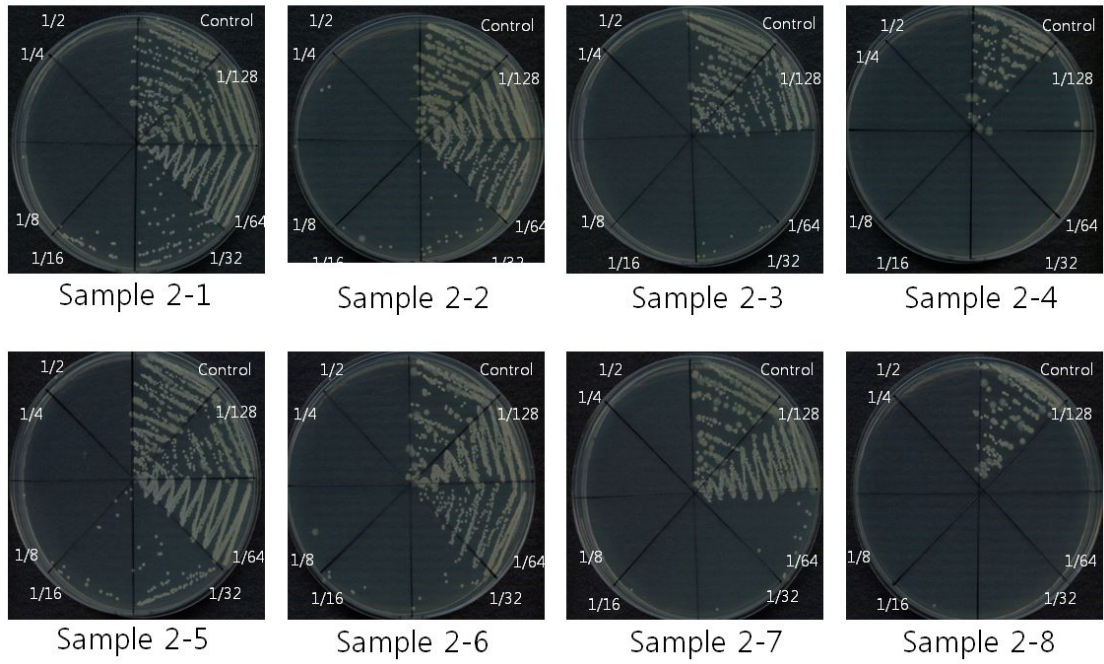


그림 31. *S. aureus* 에 대한 토폰꿀, 생약초, 수용성 키토산의 혼합 조성의 항균활성

(아) 최적혼합용액의 항균활성 측정

예비 실험을 통해 최적의 항균 활성을 가지는 sample2-4를 이용하여 그람 양성균으로써 아토피나 습진 등 피부 2차 감염에 관여하며 피부 외에 기관지 같은 호흡기 질환 등에 관여하는 *Staphylococcus aureus*(KCTC 1621)와 *Bacillus subtilis* (KCTC 1918)를, 그람 음성균으로 요도감염과 장내 독성 및 피부염증에 관여하는 *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1637)와 *Escherichia coli*(KCTC 1682)을, 양성 대조구로 세팔로스포린 계열 3세대 항생제로 널리 이용되는 세프피라마이드(cefpiramide)를 사용하여 항균활성 측정 결과를 그림 32에 나타내었다. sample2-4의 항균 활성 실험 결과 1.25 ~ 5 μ g/ml 을 첨가하였을 때 그람 양성균과 음성균의 생육이 억제됨을 알 수 있었다. 이는 양성대조구인 cefpiramide의 2.5 ~ 5 μ g/ml보다 낮은 농도에서 활성을 나타내는 것으로 아토피피부염이나 습진 등의 피부질환을 예방 및 치료에 도움이 될 것으로 기대된다. 이러한 결과로부터 혼합용액과 항생제의 다양한 세균에 대한 최소성장억제농도(MIC)를 표 7에 나타내었다.

표 7. sample2-4와 항생제(양성대조구)의 세균에 대한 최소성장억제농도(MIC)

	혼합조성물(μ g/ml)	세프피라마이드(μ g/ml)
<i>S. aureus</i>	5	5
<i>B. subtilis</i>	1.25	2.5
<i>E. coli</i>	2.5	2.5
<i>P. aeruginosa</i>	2.5	5

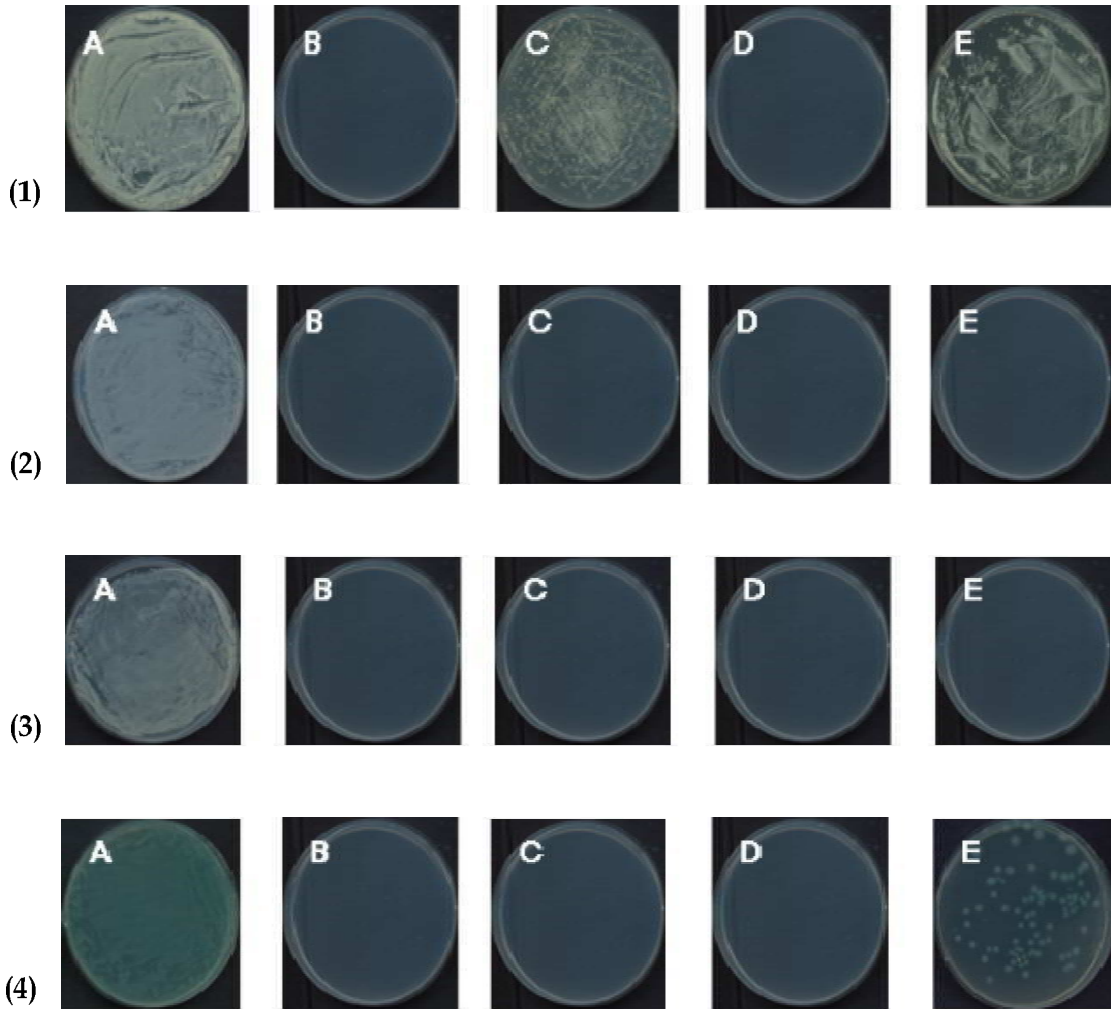


그림 32. 여러 가지 균주에 대한 sample2-4 혼합조성물의 항균활성
 (1) *S. aureus* (2) *B. subtilis* (3) *E. coli* (4) *P. aeruginosa*

(자) 최적혼합용액의 항진균 활성 측정

진균에 대한 항균 활성 결과를 표 8과 그림 33에 나타낸 것으로 혼합용액의 항진균 활성 결과 5 ~ 10 µg/ml을 첨가하였을 때 진균에 대한 생육이 억제되었으며 양성대조구로 사용된 항생제로 상용화되어있는 clotrimazole 의 경우 0.63µg/ml에서 항진균 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 혼합용액과 항생제의 다양한 진균에 대한 최소성장 억제농도(MIC)를 표 8에 나타내었다. 혼합용액에 비해 양성대조구인 clotrimazole이 더 낮은 항진균 활성을 보이거나 혼합용액 역시 상당히 좋은 항진균 활성을 가지는 것을 알 수 있으며 clotrimazole이 높은 세포 독성을 가지고 있다는 점을 고려하면 본 혼합용액이 아토피피부염 뿐만 아니라 여러 가지 피부질환을 예방하고 치료하는데 우수한 재료로 사용될 수 있을 것이다.

표 8. Sample2-4와 항생제(양성대조구)의 진균에 대한 최소성장억제농도(MIC)

	혼합조성물(µg/ml)	클로트리마졸
<i>C. albicans</i>	5	<0.63
<i>T. beigelli</i>	10	<0.63

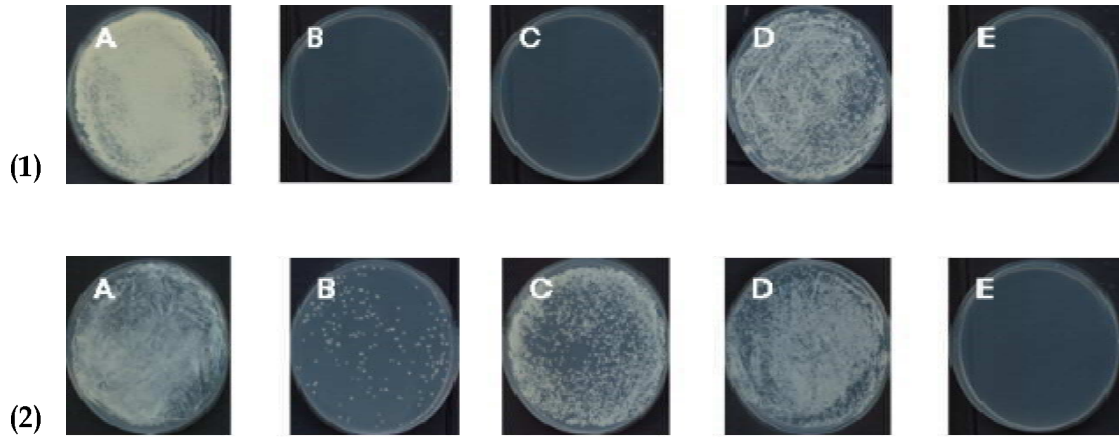


그림 33. 진균에 대한 sample2-4 혼합조성물의 항진균활성

(1) *C. albicans* (2) *T. beigelli*

(차) 최적혼합용액의 세포독성 측정

최적혼합용액의 세포독성 결과를 그림 34에 나타내었다. 측정결과 양성대조구인 clotrimazole의 경우 세포독성이 높게 나온 반면 혼합용액은 전혀 세포독성을 나타내지 않았다. 이러한 결과로 부터 본 혼합용액이 아토피피부염에 유효한 특성을 가지면서 매우 안전한 물질임을 알 수 있었다.

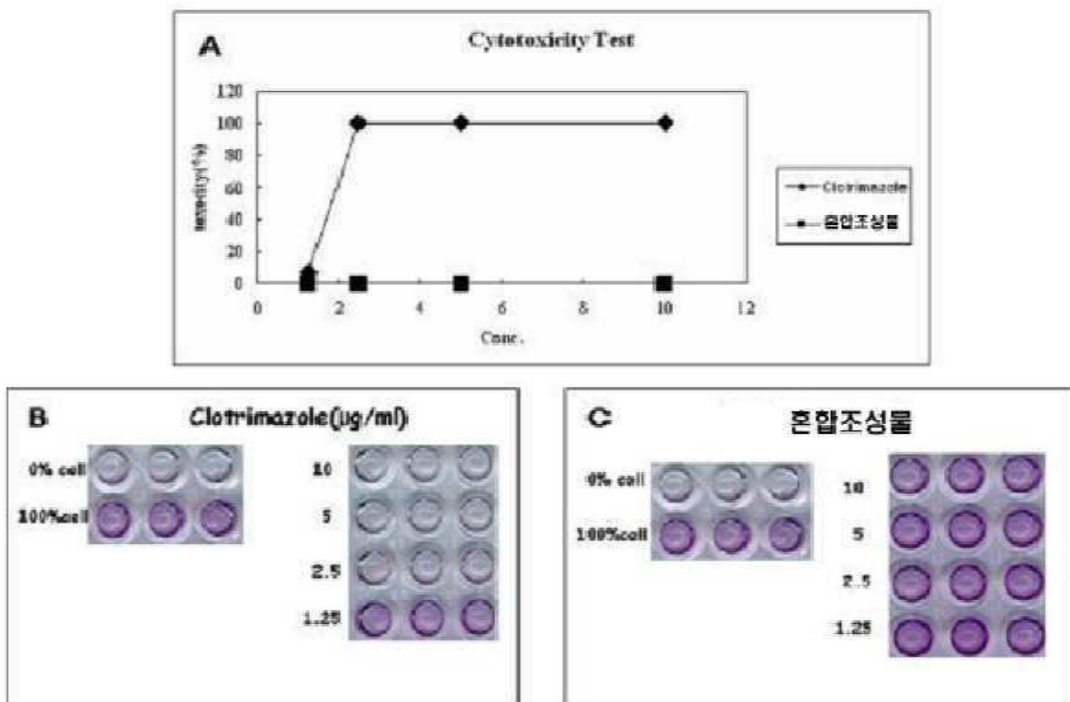


그림 34. sample2-4 혼합조성물의 세포독성

다. 3차년도

마이크로 입자는 약물분자보다 그 크기가 크고 생체 중에서 특이한 거동을 보이기 때문에 약물 전달체, 특히 표적지향성 제형으로 널리 응용되고 있다. 미립성 전달체의 조제에 쓰이는 소재로는 라이포솜이나 emulsion과 같은 지질과 미소구체와 같은 고분자 소재 등이 있다. 치료를 위한 약물을 함유한 마이크로 입자는 입자경, 전달체의 물리화학적 성질 등을 이용하여 인체 내의 형태적 기능적 성질에 의해 친화성이 좋은 부위에 높은 농도로 축적되게 되어 타부 위에는 독성을 최소화하면서 최대의 치료효과를 얻게 한다. 마이크로 입자를 스킨케어 제품화에 응용하기 위해서는 생물친화성, 생체분해성, 무독성, 주어진 상황에서 그 특성을 오랫동안 일정하게 유지할 수 있는 능력, 모세관에도 침투할 수 있는 적당한 크기, 약물의 방출 속도 제어 가능성 및 고도의 특이한 약물 표적화 등과 같은 조건을 갖추어야 한다.

약물전달체로 주로 사용되고 있는 마이크로 입자를 이용하여 2차년도에 도출된 유효성분의 안정성 및 효과를 극대화하고자 수용성 키토산을 이용하여 유효성분이 함유된 마이크로 입자를 개발하고 이를 아토피 피부염 개선용 화장품에 첨가하여 동물실험을 통한 아토피 피부염 개선 효과를 확인하고자 한다.

(1) 연구 방법

(가) 실험 방법

① 수용성 키토산 마이크로 입자 제조

수용성 키토산(MW10)을 10%의 농도로 용액을 20 g씩 제조한 후 이 용액을 유화제인 span 80 1.4 ml와 mineral oil 140 ml이 균일상으로 섞여있는 용액에 agitator를 사용하여 600rpm으로 교반하면서 30분에 걸쳐 첨가한 후 30분 동안 교반하였다. 그 후 glutaraldehyde saturated toluene을 3 ml 첨가하고 1시간 후에 25% aqueous glutaraldehyde 2 ml을 첨가하고 1시간 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 oil을 제거하기 위하여 hexane으로 여러 번 세척하였다. 그리고 가교제를 제거하기 위해 차가운 증류수로 세척 후 동결건조하여 수용성키토산 마이크로 입자를 제조하였다. 수용성키토산 마이크로 입자의 제조공정을 그림 35에 나타내었다.

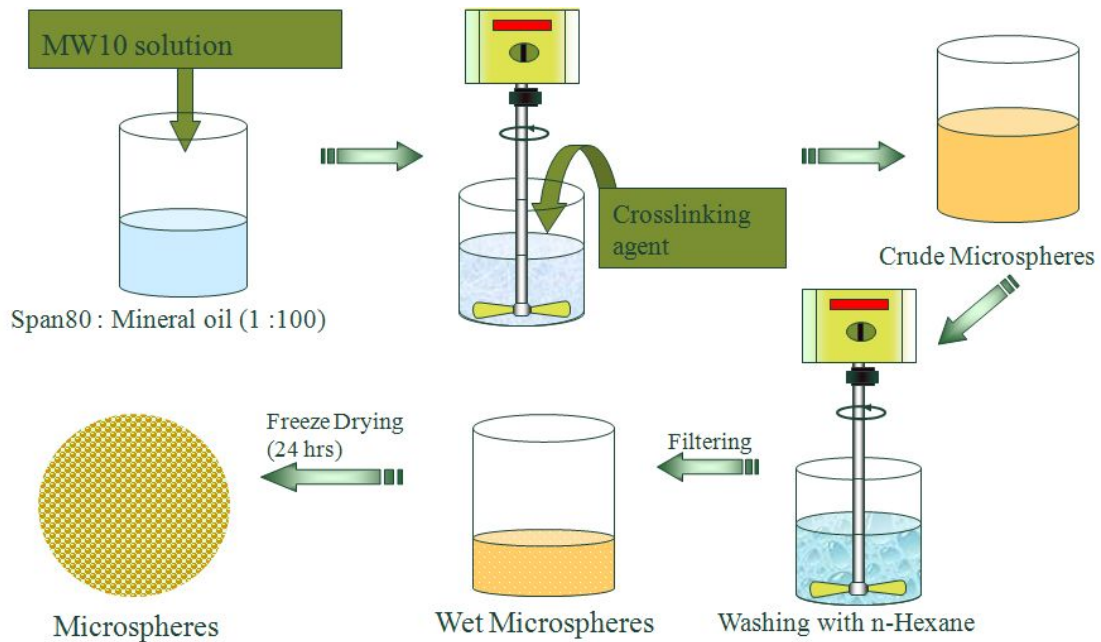


그림 35. 유화 중합법에 의한 수용성 키토산 마이크로 입자의 제조 방법

② 수용성 키토산 마이크로 입자의 표면관찰

수용성 키토산 마이크로 입자의 특성을 알아보기 위해 건조한 수용성 키토산 마이크로 입자를 금속 스테르브 위에 올려놓고 금으로 진공 증착하여 SEM (Hitachi, S570)을 사용하여 수용성 키토산 마이크로 입자의 표면을 관찰하였다.

③ 토종꿀이 혼합된 수용성 키토산 마이크로 입자 제조

수용성 키토산(MW10)을 10%의 농도로 용액을 20 g 제조한 후 이 용액에 토종꿀을 혼합하여 혼합된 용액을 유화제인 span 80 1.4 ml와 mineral oil 140 ml이 균일상으로 섞여있는 용액에 agitator를 사용하여 600rpm으로 교반하면서 30분에 걸쳐 첨가한 후 30분 동안 교반하였다. 이 후 과정은 마이크로 입자 제조과정과 동일하게 진행하여 토종꿀이 혼합된 수용성 키토산 마이크로 입자를 제조하였다.

④ 아토피피부염이 유발된 동물 모델화

가 동물

본 실험에 사용된 NC/Nga 마우스는 IgE 의 과생성에 의해 동반된 아토피성 피부염의 형태가 임상적으로나 조직학적으로 인간의 아토피성 피부염의 병변과 매우 흡사한 양태를 나타내고 X선조사와 오범아부민에 의해 유도되는 과민반응에 매우 민감하여 일반 재래 환경에서 아토피성 피부염과 같은 피부 습진성 상처가 쉽게 유발되는 실험동물이다. 수컷 5 주령의 NC/Nga 마우스는 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 공급받아 입수 시 외관을 육안적으로 검사한 후 시험을 실시할 동물실에서 7 일간 순화하면서 일반증상을 관찰하였다. 사료는 피드랩에서 생산된 Feedlab Formula M-07를 자유롭게 섭취하도록 하였고 물은 미세여과기를 이용하여 멸균한 물을 물병을 이용하여 자유 섭취 시켰다. 사육 조건은 온도 $23 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm$

15 %, 환기 횟수는 전외기 공조방식으로 10 ~ 20 회/hr, 조명조건은 조도 150 ~ 300 Lux로 12hr/day(08:00 점등 ~ 20:00 소등) 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 순화, 검역 및 관찰기간 중 스테인레스 망 사육 상자에 동물을 2 ~ 3수로 수용하여 사육하였다.

㉔ 시료

본 실험에 사용된 시료는 화장품 base에 토종꿀이 봉입된 수용성 키토산 마이크로 입자를 첨가하여 **항균 보습크림 (AMCH)**으로 제조되어졌다. 약물 대조군으로는 면역억제제인 노바티스사의 피메크로리무스 크림 1%을 구매하여 25℃이하로 보관하면서 사용하였다.

㉕ NC/Nga 마우스에서 아토피피부염 유발 및 시료처리

입수 후 일주일 동안 자유로운 식이와 식수를 제공받으면서 순화되어진 NC/Nga 마우스의 등을 귀 하단부에서 꼬리 상단부까지 전체를 제모하고 24시간 방치한 후, 2 ~ 4일에, 1% DNCB(dinitrochlorobenzene; 150 μ l/dorsal area in AOO(아세톤 : 올리브오일 = 3:1))를 처리하였다. 그 후 5주 동안 0.2 ~ 0.4 % DNCB(150 μ l/dorsal area in AOO)를 처리하여 아토피 성 피부염을 유발시켰다. 7주째 되는 첫째날에 DNCB 처리를 중단하고 그 후 5일 동안 1일 2회씩 본 AMCH를 마우스의 등에 도포하였다. 약물대조군으로 피메크로리무스 크림 1%을 동일한 방법으로 도포하였다. 실험 동물은 7마리씩 4군으로 나누어 실험을 실시하였다. 아무것도 처리하지 않은 음성대조군, DNCB를 처리한 양성대조군, DNCB 처리 후 피메크로리무스 크림 1%을 도포한 억제대조군, 그리고 DNCB 처리 후 AMCH를 도포한 실험군으로 나누어 실시하였다.

⑤ 생리활성물질의 관능 평가

㉖ 관능평가 및 Scratching 거동 시험

일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가 법을 이용하였으며 아토피 피부염의 심각성 정도를 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총합으로 나타낸다. 평가 항목에 대한 육안 평가 결과는 표 6의 다섯 가지 항목을 시험물질 도포 후부터 1, 3, 7, 14일이 되는 시점에 실시한다. 평가 항목은 발적과 출혈, 가피형성과 건조, 부종, 조직 손상, 이 조직 손상이다. 각각의 항목에 대해 증상 없음(0점), 증상 약함(1점), 중증도(2점), 심함(3점)으로 채점한 후, 모든 항목의 점수를 합산함으로써 최소 0점(아무증상이 없는 상태)에서 최고 15점(모든 항목의 증상이 심한 상태)사이의 평가점수를 부여한다. Scratching 거동은 시험물질 처치 마지막 날 뒷발 또는 앞발로 긁는 횟수를 15분 동안 관찰하여 측정하였다.

㉗ 비장의 무게 변화 측정

Sacrifice한 마우스의 비장을 적출하여 지방을 제거하고 그 무게를 측정하였다.

⑥ 혈액 중 호산구(Eosinophil), 호중구(neutrophil), 백혈구(White blood cell) 함량 측정

마우스에서 샘플링한 혈액은 EDTA tube (BD vacutainer, USA) 넣어 보관하고, 백혈구 수(WBCs), 호산구, 호중구의 수치를 혈구 계산법을 이용하여 계수하였다.

⑦ 혈장 IgE 함량 평가

마우스에서 샘플링한 혈액은 실온에서 30분 이상 방치한 다음 3000prm, 20분간 원심

분리하여 혈청만을 사용하고 IgE의 농도는 ELISA kit(Shibayagi, Japan)를 이용하여 분석하였다.

⑧ 조직검사 (H & E, Toluidine Blue Stain)

피부조직을 10% formalin에 24시간이상 고정시킨 후 파라핀 블록을 제작하고 4 μ m로 한 후 hematoxylin & eosin(Sigma, USA)염색을 하였으며 염증 세포를 좀 더 정확히 파악하고자 Toluidine Blue (Sigma, USA)염색을 하여 광학 현미경(Olympus, Bx51, Japan)으로 확인하였다. 또한 각 절편에서 비만세포의 분포 및 탈과립 유무를 광학현미경으로 관찰하였고 각각의 절편당 3개의 지점을 선정하여 관찰되는 비만세포의 수를 측정하여 평균하였다. 비만세포의 탈과립 수준은 비만세포의 탈과립 비율에 따라 나타내었다.

⑨ 통계학적 방법

얻은 자료에 대한 음성 대조군과 시험물질 투여군 간의 비교는 student's t-test를 사용하여 군 간의 차이를 검정하였다.

(2) 연구 결과

(가) 수용성 키토산 마이크로입자 제조

2차년도에의 결과로부터 항균활성이 우수한 분자량대의 수용성키토산(MW10)을 이용하여 수용성 키토산의 농도, 교반속도를 변화시키면서 유화중합법으로 수용성 키토산 마이크로입자를 제조하였다. 여기에서 유화제인 span 80은 1.4 ml, mineral oil은 140 ml로 고정하였다. 유화중합으로 마이크로 입자를 제조하는 경우에 입자의 크기에 가장 결정적인 영향을 주는 인자로는 일반적으로 에멀전 형성시의 교반속도이다. 따라서 가교제의 양을 3 ml, 키토산의 농도를 10 wt%로 고정하고 교반속도를 300, 600, 900 rpm으로 변화시켜가며 입자의 크기 변화를 관찰하여 그 결과를 그림 36에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 수용성 키토산 마이크로입자의 크기는 교반속도가 증가함에 따라 감소하였다. 이는 에멀전 형성 시 교반속도가 증가함에 따라 물리적인 힘에 의해 이상혼합과 교반이 일어나 생성되는 micelle의 크기가 작아짐으로써 수용성 키토산 마이크로 입자의 크기가 작아지는 것으로 사료되어진다.

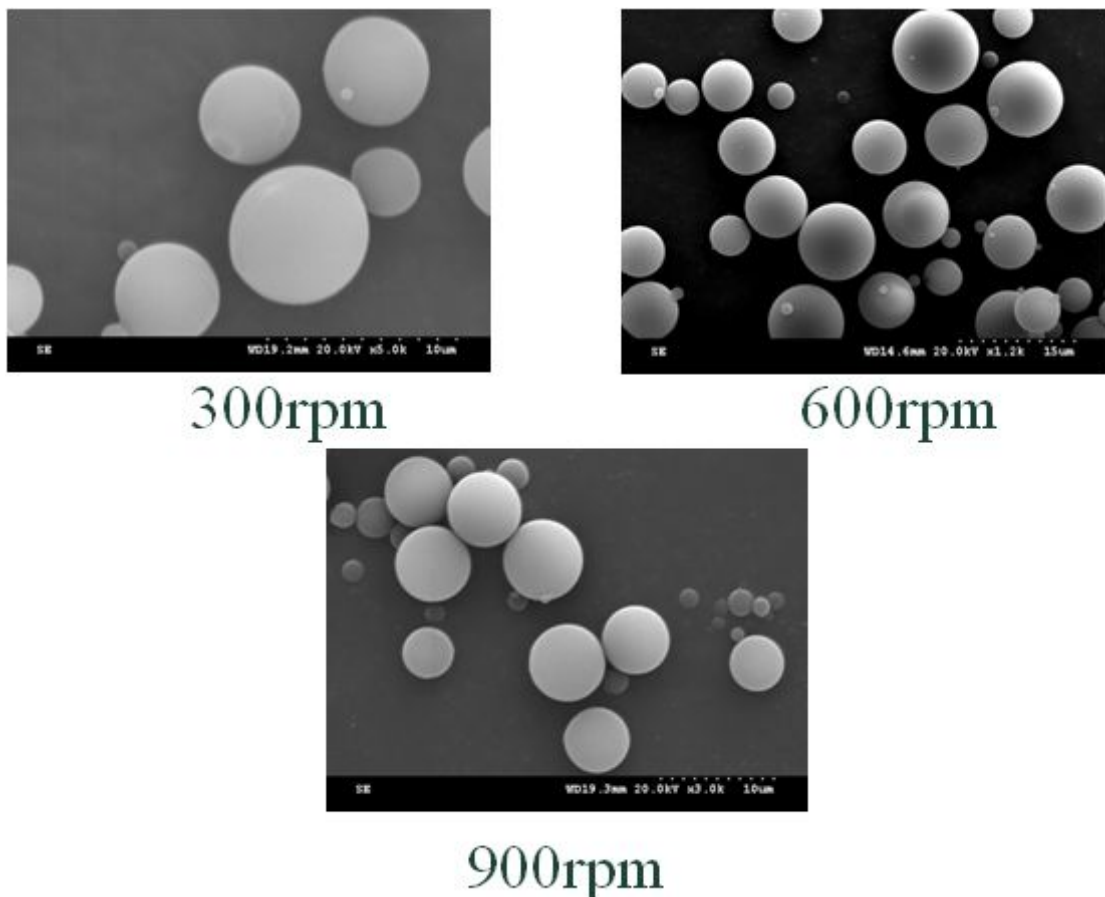


그림 36. 교반 속도에 따른 마이크로 입자의 SEM 이미지.

(나) 수용성 키토산 나노입자 제조

그림 37은 수용성 키토산 나노 입자를 제조하기 위해 agitator 대신 호모게나이저를 이용하여 교반속도를 10,000 rpm으로 하여 동일한 방법으로 나노 입자를 제조한 결과이다. 결과에서 보듯이 입자의 크기는 매우 작게 제조되어 졌으나 입자가 너무 작아 washing 및 건조 과정에서 입자들끼리 aggregation 된 것을 볼 수 있다. 입자들의 aggregation으로 인해 재분산이 잘 안 되는 문제점을 가지고 있어 제조 방법의 개선 및 추가 연구가 필요하다. 아울러 본 연구에서는 피부에 사용될 수 있는 제형 및 산업화를 고려할 때 마이크로 입자 크기면 충분할 것으로 사료된다.

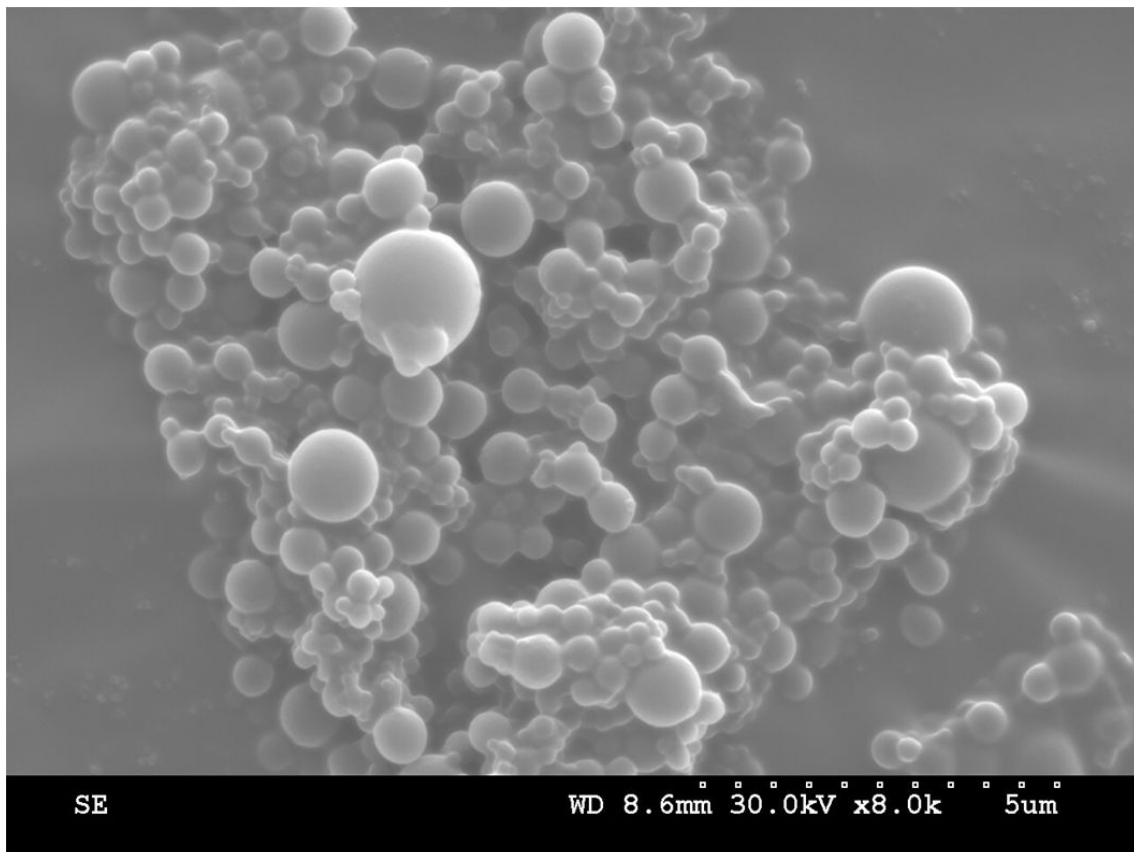


그림 37. 호모게나이저를 이용한 나노 입자의 SEM 이미지

그림 38은 수용성 키토산의 농도가 수용성키토산 마이크로 입자의 크기 및 형태에 미치는 영향을 조사하기 위하여 가교제의 양을 3 ml, 교반속도를 600 rpm으로 고정하고 수용성키토산의 농도를 5, 10, 15, 20wt%로 변화시켜 제조한 수용성 키토산 마이크로 입자의 크기와 표면을 관찰하여 나타낸 결과이다. 그림 38에서 보는 것처럼 수용성 키토산의 농도가 10 wt% 이상에서는 구형을 가지는 수용성 키토산 마이크로 입자가 제조되었으나 5 wt%에서는 aggregation되어진 불완전한 마이크로 입자를 얻었다. 이러한 현상은 에멀전 형성 시 수용성 키토산의 낮은 농도에서 수용성 키토산 용액의 점도가 감소하여 micelle이 제대로 형성되지 않아 입자가 aggregation되어진 것으로 사료된다.

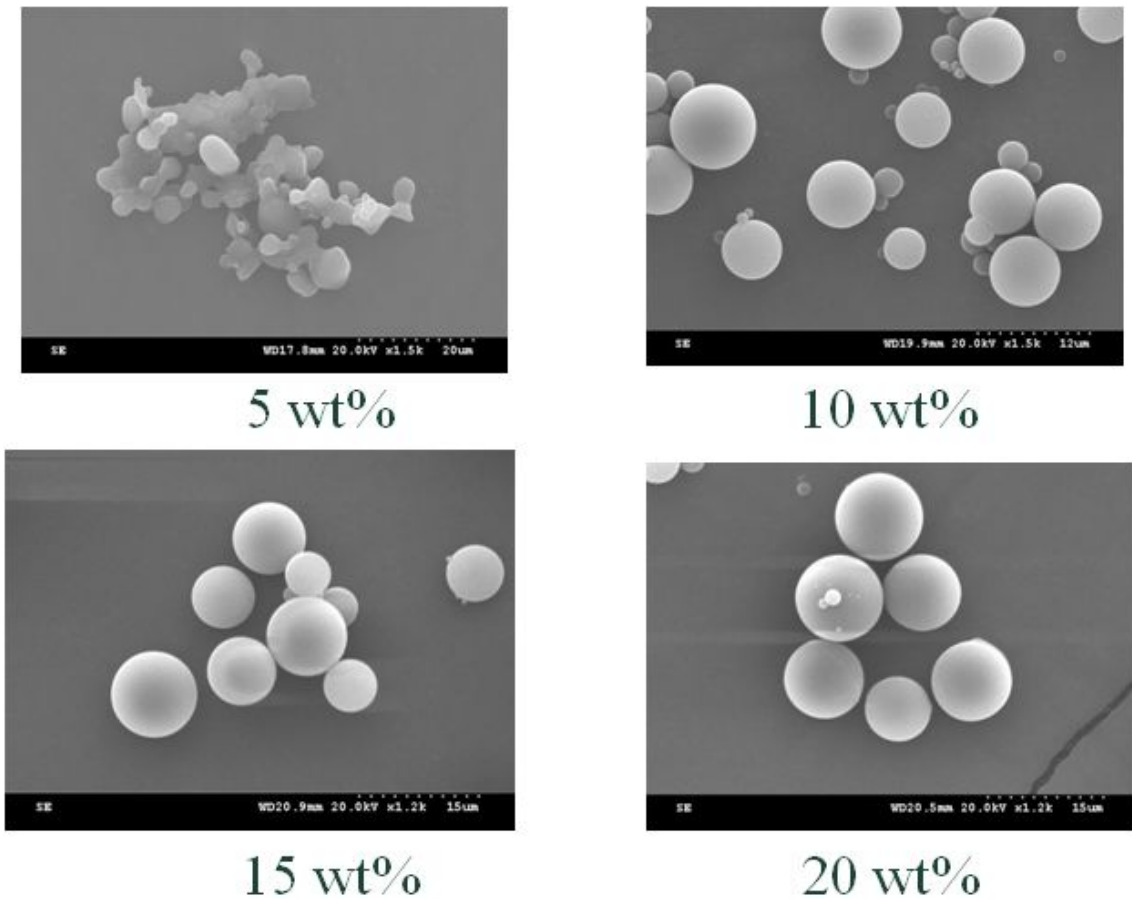


그림 38. 수용성 키토산 농도에 따른 입자의 SEM 이미지

이러한 결과들로부터 수용성 키토산 농도를 10%, 교반속도를 600rpm으로 하여 유효 성분이 혼합된 수용성 키토산 마이크로 입자를 제조하였다(그림 39). 그림 39에서 보듯이 3 ~ 10 μm 정도의 크기로 표면이 아주 매끄러운 구형을 가지는 수용성 키토산 마이크로 입자가 제조된 것을 확인할 수 있다.

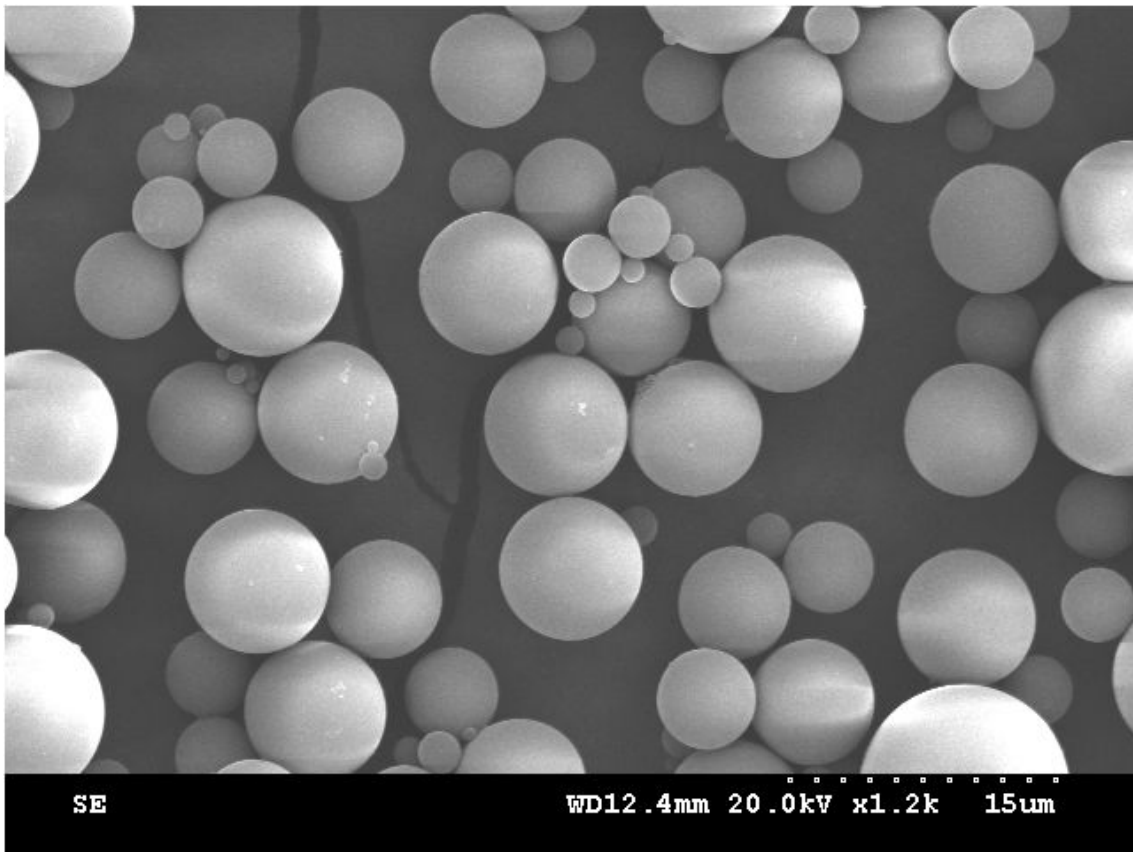


그림 39. 토종꿀이 함유된 수용성 키토산 마이크로 입자의 SEM 이미지

(다) 생리활성 성분의 스테로이드 검출 시험

신뢰성 있는 실험을 위해 생리활성 성분의 스테로이드 검출 시험을 한국화학시험 연구원에 의뢰하여 진행하였으며 그림 40은 그 결과이다. 결과에서 보듯이 본 실험에 사용된 생리활성 성분에는 28종의 모든 스테로이드 성분이 검출되지 않았다. 이러한 결과는 기존의 아토피 치료제의 스테로이드에 의한 문제점을 해결할 수 있을 뿐만 아니라 아토피 관련 시장에서 경쟁력을 갖출 것으로 사료된다.



YOUR PARTNER FOR THE BEST QUALITY

TEST REPORT

우 415-871 경기도 김포시 월곶면 교막리 7-6 TEL (031)999-3000 FAX (031)999-3001

성적서번호 : TAH-005584 접수 일자 : 2011년 06월 22일
 대표자 : 이재운 시험완료일자 : 2011년 07월 05일
 업체명 : 이재운
 주소 : 전남 순천시 왕지동 844

시료명 : Chito/H (화장품 원료)

시험결과

시험항목	단위	시료구분	결과치	시험방법
beclo methasone	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
beclo methasone 17-propionate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
beclo methasone 17, 21-dipropionate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
beclo methasone 21-acetate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
beclo methasone 21-hemisuccinate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
beclo methasone 21-propionate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
bethamethasone	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
bethamethasone 17-valerate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
bethamethasone 17, 21-dipropionate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
bethamethasone 21-acetate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
bethamethasone 21-hemisuccinate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
bethamethasone 21-valerate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
budesonide	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
clobetasol 17-propionate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
hydrocortisone 17-acetate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
hydrocortisone 21-acetate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
hydrocortisone 21-valerate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
cortisone 21-acetate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
dexamethasone	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
dexamethasone 21-acetate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
dexamethasone-21-hemisuccinate	ng/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)

- 다음 페이지 -



시험원 : 정정실
Tel : 031-999-3112



기술책임자 : 홍성택
E-mail : prohong@ktr.or.kr

2011년 07월 05일



한국화학융합시험연구원



Page : 1 of 2

전자문서본(Electronic Copy)



KTR KOREA TESTING & RESEARCH INSTITUTE



YOUR PARTNER FOR THE BEST QUALITY

TEST REPORT

우 415-871 경기도 김포시 월곶면 고막리 7-6

TEL (031)999-3000

FAX (031)999-3001

성적서번호 : TAH-005584

접 수 일 자 : 2011년 06월 22일

대 표 자 : 나재운

시험완료일자 : 2011년 07월 05일

업 체 명 : 나재운

주 소 : 전남 순천시 왕지동 844

시 료 명 : Chito/H (화장품 원료)

시험결과

시험항목	단위	시료구분	결과치	시험방법
hydrocortisone	mg/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
hydrocortisone 17-valerate	mg/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
prednisolone	mg/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
prednisolone 21-acetate	mg/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
prednisone 21-acetate	mg/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
triamcinolone acetonide	mg/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)
triamcinolone diacetate	mg/kg		검출안됨	US EPA 3550C : 2007 (HPLC)

- Method Detection Limit (MDL) -
개별 스테로이드 : 0.25 mg/kg

용 도 : 자체참고용

비 고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다.
2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용 등으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.

Jang-Sul Jang

시험원 : 경정실
Tel : 031-999-3112

Jang-Taeg Hong

기술책임자 : 홍성택
E-mail : prohong@ktr.or.kr

2011년 07월 05일



한국화학융합시험연구원장



Page : 2 of 2

전자문서본(Electronic Copy)

KTR KOREA TESTING & RESEARCH INSTITUTE

그림 40. 생리활성 성분의 스테로이드 검출 의뢰 시험 성적서

(라) 관능 평가 및 Scratching 거동

아토피 피부염의 주요 증상인 발적, 출혈, 가피형성 및 건조, 부종, 조직 손상, 깃무름 등을 관찰하여 평가하였다. 아토피 피부염이 유발된 양성대조군의 관능평가 점수는 6점으로 음성대조군의 0.6에 비해 상당히 증가하였다. 아토피 피부염 유발 후 약물을 처리한 약제대조군은 3.1점($p<0.01$), AMCH을 처리한 시험군은 2.1점($p<0.001$)의 유의성 있는 결과를 확인하였다 (그림 41). 결과로부터 AMCH 처리군이 가장 낮은 값을 보였으며 아토피 피부염 치료제로 사용되고 있는 약물보다 우수하였다.

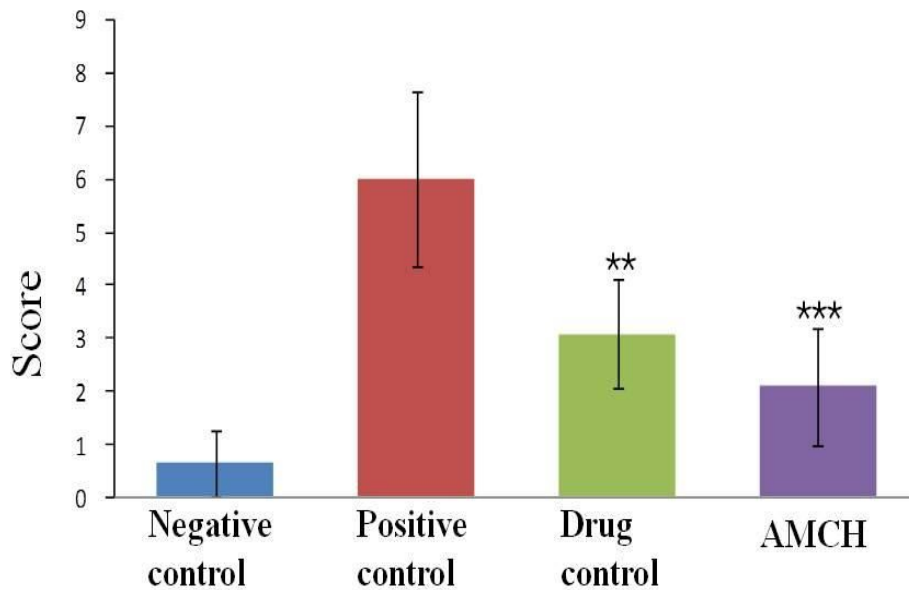


그림 41. 군별 관능평가에 따른 아토피 Score. 양성대조군에 대한 ** $p<0.01$, **** $p<0.001$

시험물질 처치 마지막 날 아토피 피부염의 소양증으로 인한 scratching 거동 횟수를 15분 동안 관찰한 결과, 양성대조군에서는 23.4회의 긁는 횟수를 확인하였으며, 그 횟수가 약물대조군 9.2회($p<0.01$), AMCH군 4.4회($p<0.001$)로 유의성 있게 감소하였다(그림 42). AMCH 군에서 긁는 횟수가 감소하는 것은 아토피 피부염 치료 작용에 따른 결과로 보여진다.

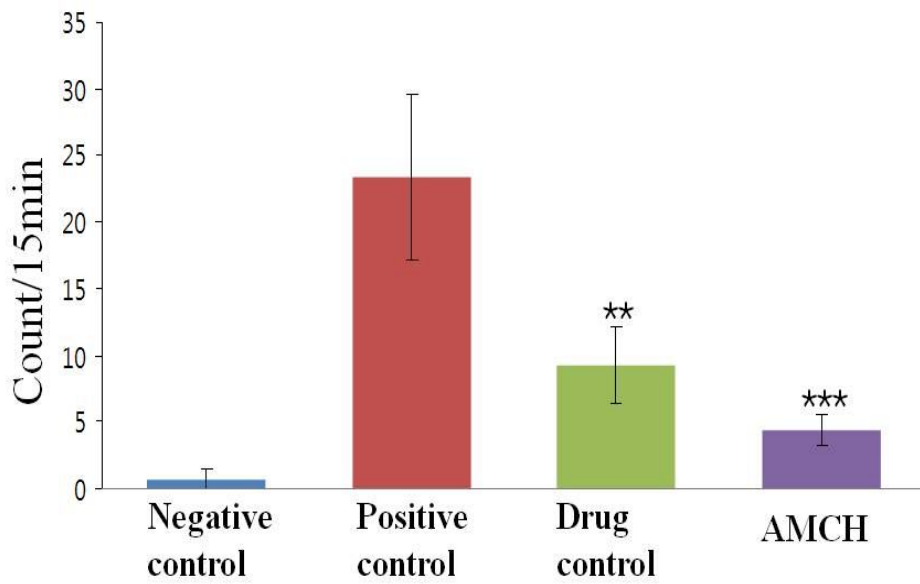


그림 42. 군별 관능평가에 따른 Scratching 거동. 양성대조군에 대한 ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

(마) 비장의 무게 변화

DNCB에 대한 마우스의 면역반응을 확인하기 위해 실험종료일에 마우스를 희생시켜 비장을 적출하고 그 무게를 측정하여 비장의 절대무게(absolute spleen weight)(그림 43(a))와 실험 종료일 마우스의 무게(g)에 대한 비장 무게 비(비장무게 비/마우스의 무게(g))인 비장 수치(spleen index)(그림 43(b))를 확인하였다. 그림 43에서 알 수 있듯이 양성대조군은 절대무게와 비장 수치가 0.25g과 1.03으로 음성대조군 0.17 g과 0.47 g에 비해 상당히 증가하는 것을 알 수 있다. 이것은 DNCB에 의해 비장 내의 T 림파구가 현저하게 증가하였음을 나타내고 있다. 약제대조군과 AMCH 군에서는 비장 무게 및 수치가 감소하였다. 이러한 결과는 약물 및 AMCH가 T 림파구의 억제 효능이 있는 것으로 보여지며 특히 AMCH가 약물에 비해 더 우수한 T 림파구 억제능이 있음을 알 수 있었다. AMCH가 T 림파구를 감소시킴으로 IgE의 발현량이 줄어들어 히스타민의 생성이 감소하여 아토피 피부염 증상 완화에 효과가 있는 것으로 사료된다.

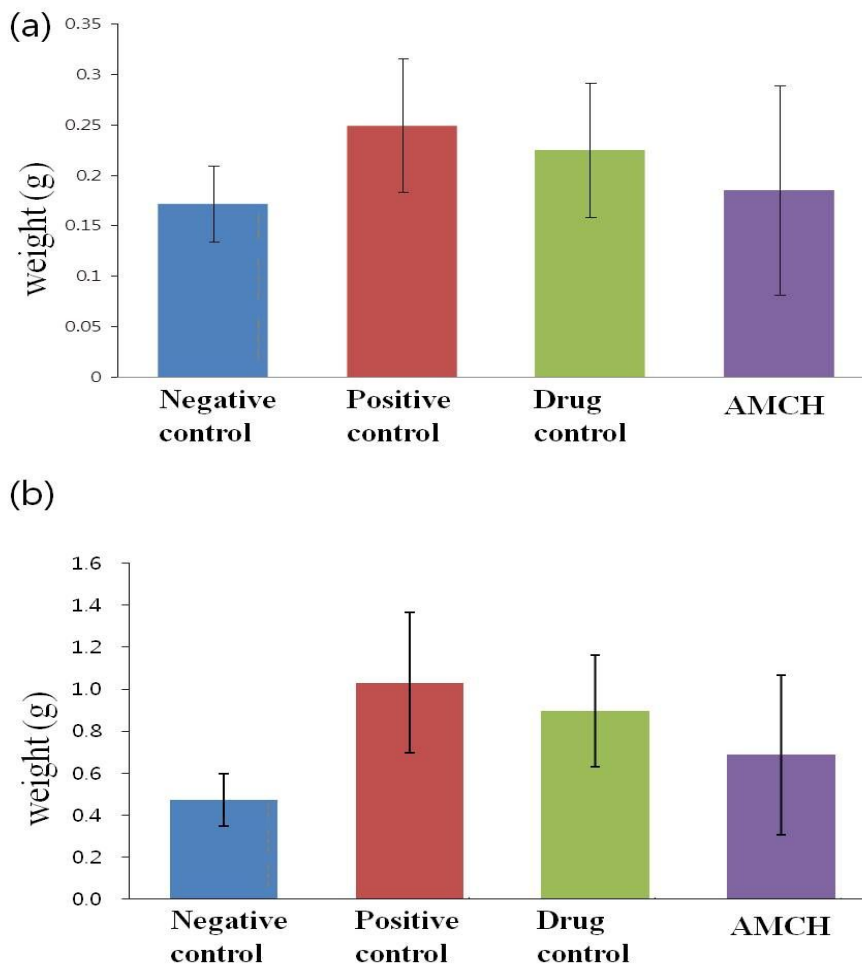


그림 43. 비장 무게변화에 따른 군별 효과. (a)절대무게, (b)비장수치

(바) 혈액 중 호산구, 호중구, 백혈구 함량

아토피 피부염의 발현 시 나타나는 혈액학적 변화인 백혈구, 호중구, 호산구의 함량 변화를 관찰하였다. 그림 44에서 보는 바와 같이 아토피 피부염 유발된 양성대조군에서 음성대조군에 비해 백혈구, 호중구, 호산구의 수치가 증가하는 것을 확인하였으며, 아토피 피부염 유발 후 약물과 AMCH 처리군에서는 유의성 있게 감소하는 것을 관찰하였다($p < 0.01$). 이러한 결과는 아토피 피부염 유발 시 염증이 발생되어 백혈구, 호중구, 호산구 수치가 증가하였다가 약물 및 AMCH 처리 시 피부염이 완화 되면서 그 수치가 감소함을 알 수 있었다. 또한 AMCH 처리 군에서 가장 유의성 있는 결과를 얻을 수 있었다.

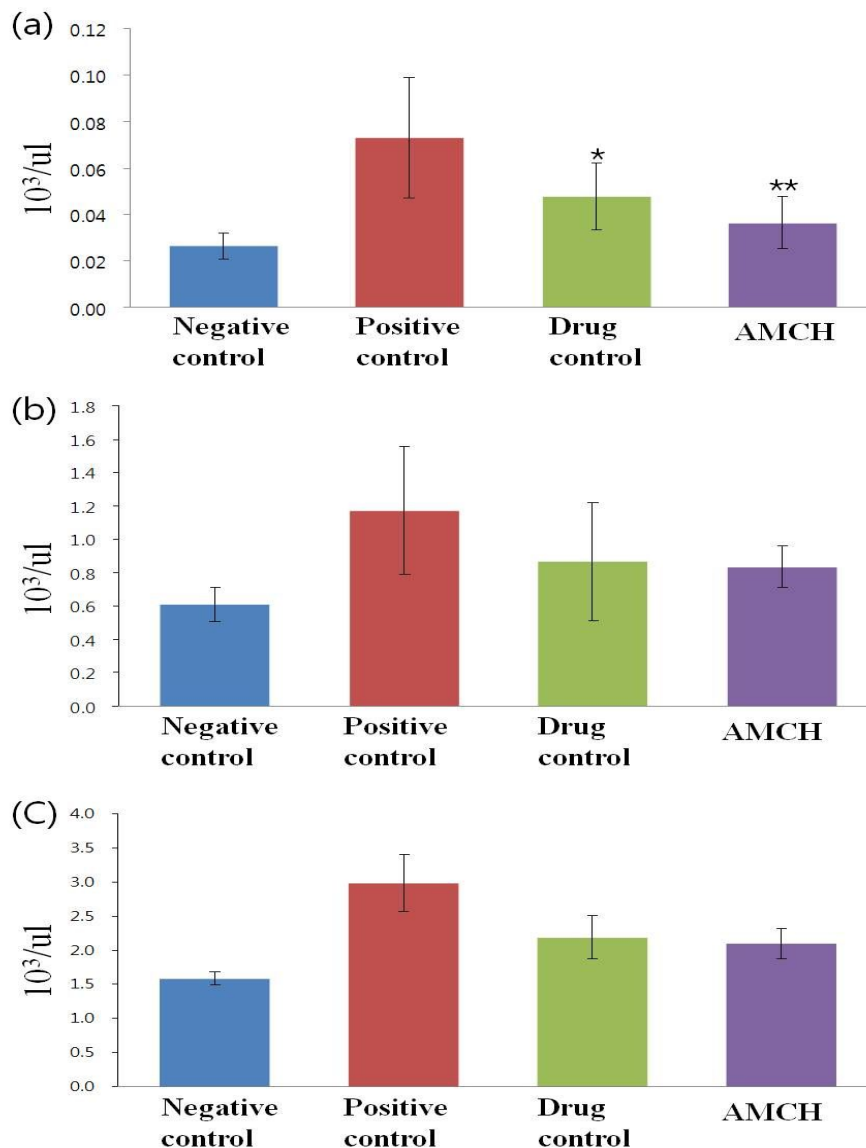


그림 44. 혈액 중 (a)호산구, (b)호중구, (c)백혈구 함량.
양성대조군에 대한 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

(사) 혈중 IgE 함량

아토피 피부염 발생 시 알레르기 유발 물질을 가장 먼저 인지하는 것은 피부에 존재하는 IgE이다. 그림 45는 IgE 함량 측정 결과로 아토피 피부염이 유발된 양성 대조군에서 증가하였으나, 약물 및 AMCH 처리 시 감소하는 것을 알 수 있었으며 AMCH 처리 군에서 더 유의성 있는 결과를 확인하였다($p < 0.01$). 이러한 결과로부터 AMCH가 알레르기 및 과민 반응에 효과가 있음을 알 수 있다.

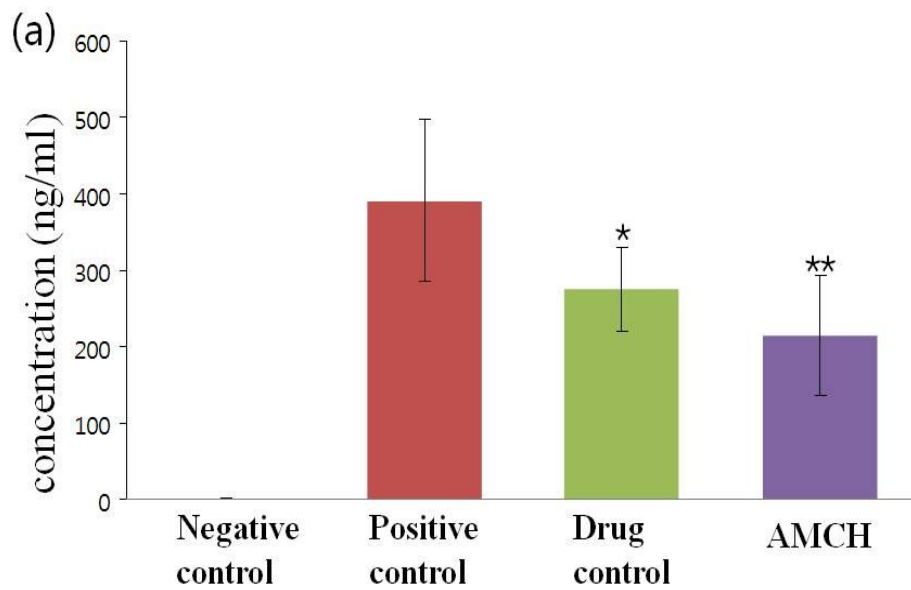


그림 45. 혈장 IgE 함량에 대한 군별 효과. 양성대조군에 대한 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

(아) Mast cell 및 Degranulation level 측정

그림 46은 mast cell 수와 탈 과립 억제 수준에 대한 결과로 아토피 피부염 유도 시 mast cell의 수가 증가하였으며 AMCH 처리 군에서 가장 낮은 값을 보였다($p < 0.01$). 또한 탈 과립억제 수준도 유사한 결과를 확인하였으며 AMCH 군에서 히스타민 유리를 억제하는 것을 알 수 있었다($p < 0.001$). 이러한 결과로부터 수용성 키토산의 항균활성 기능과 herbal honey의 감염성 질병의 치료를 위해 알려진 항균 활성의 상승효과에 의해 본 연구에서 제조한 AMCH가 아토피 피부염의 과민 반응을 억제하여 아토피 치료제로써의 가능성을 나타내는 것으로 확인되었다.

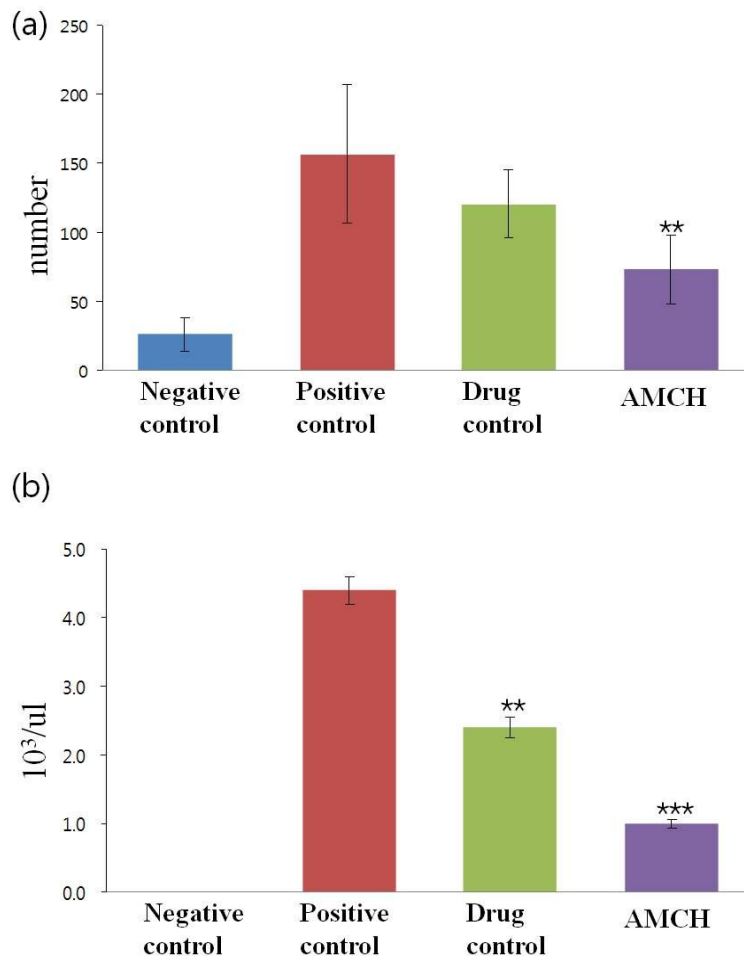


그림 46. 군별 (a)mast cell 수와 (b)탈 과립 억제 수준.
양성대조군에 대한 ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

(자) 조직검사(H & E, Toluidine Blue Stain)

그림 47 ~ 50은 각각의 군에 대한 조직검사 결과이다. 아토피 증상은 피부병소에서 피부의 부드러운 정도가 감소하고, 과각화증, 이상각화증과 함께 염증 세포의 침윤 증상을 동반한다. 그림 47은 음성 대조군들의 조직검사 결과로 특별한 이상이 없음을 알 수 있다.

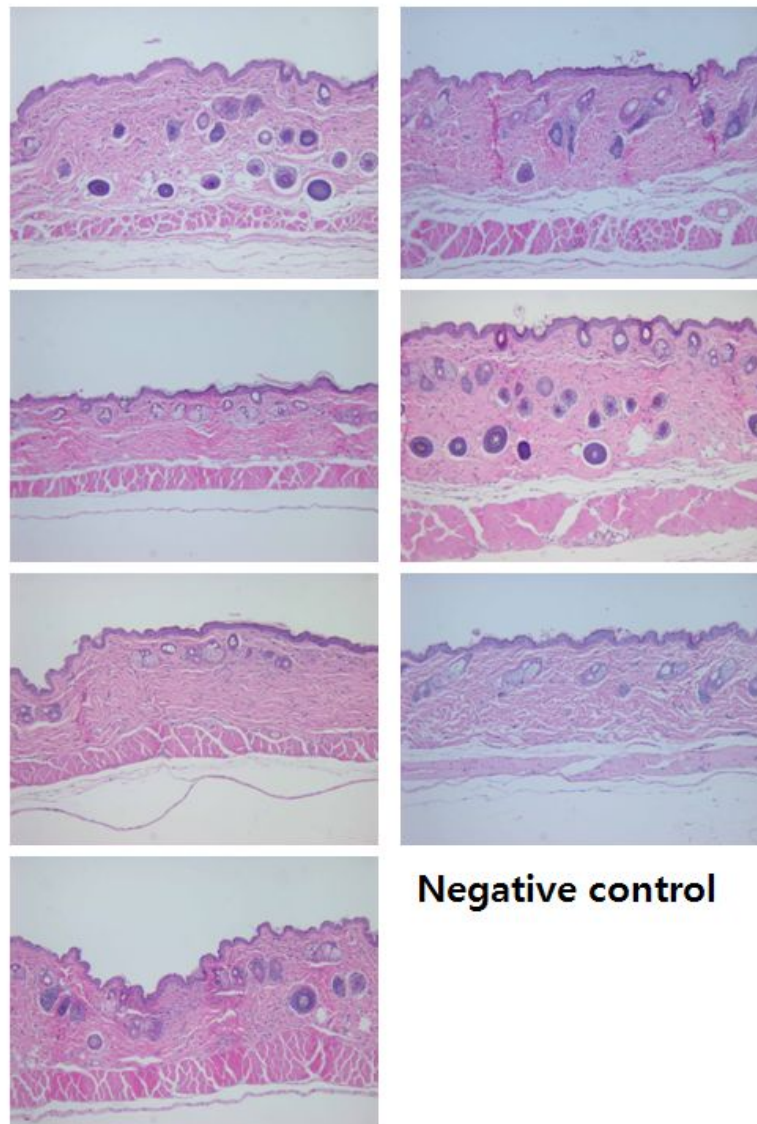


그림 47. 음성대조군의 조직검사 결과 (n=7)

그림 48은 양성대조구의 조직검사 결과로 그림에서 보이듯이 염증과 두터운 각질층이 형성되어 있음을 알 수 있다.

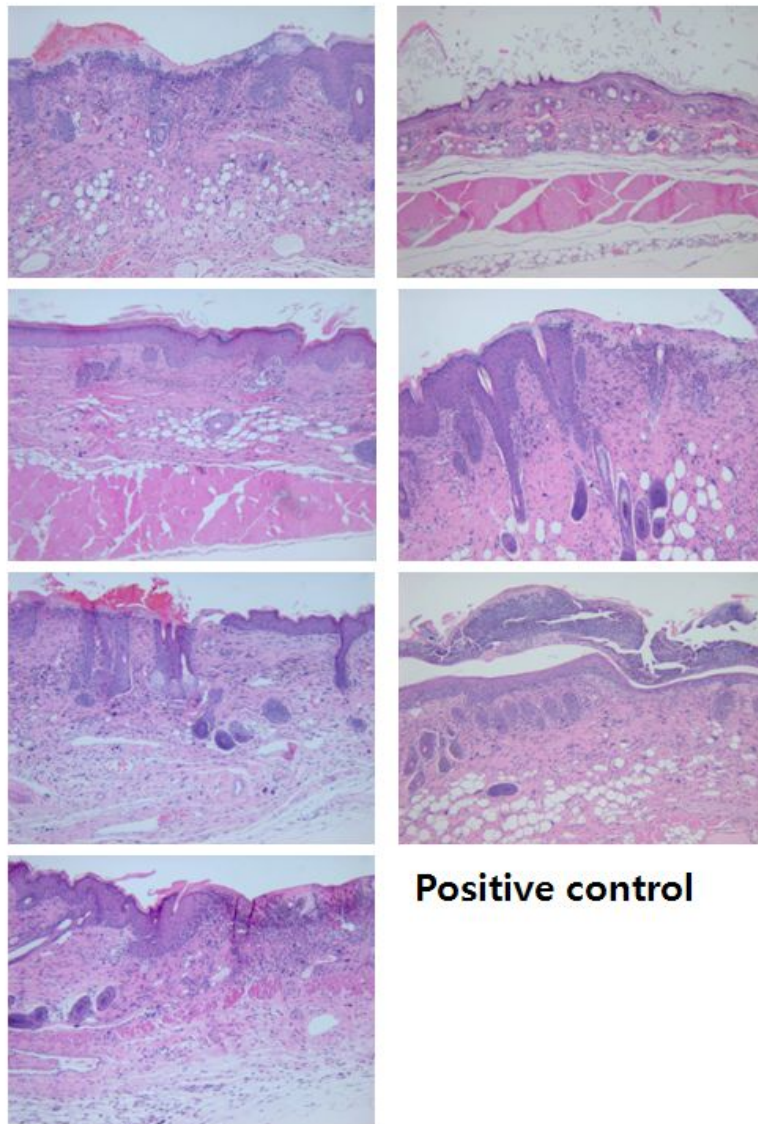


그림 48. 양성대조군의 조직검사 결과 (n=7)

그림 49는 약제 대조군의 조직 검사 결과이다. 양성 대조군에 비해 그 정도는 감소하였으나 염증과 두터운 각질층이 여전히 남아 있음을 확인할 수 있다.

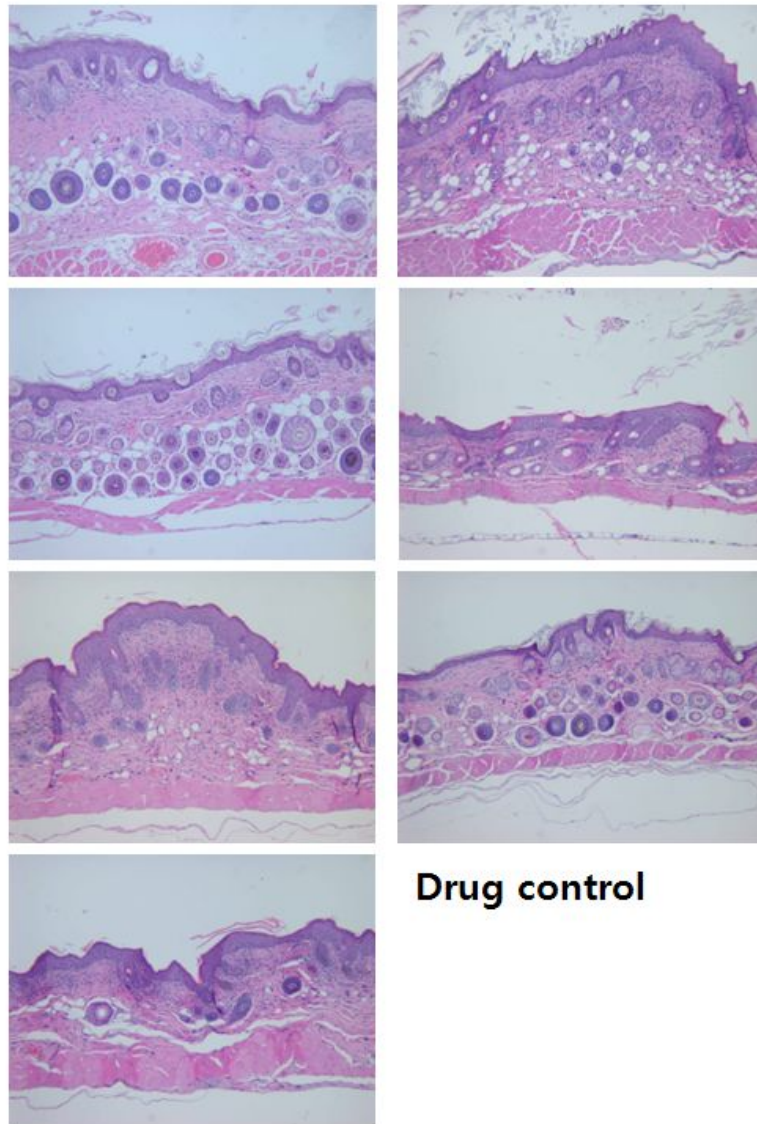


그림 49. 약제 대조군의 조직검사 결과 (n=7)

그림 50은 AMCH 군에 대한 조직학적 특성으로 다른 군에 비해 아주 우수한 결과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 기존의 약제를 장기간 사용할 경우 부작용 발생 우려가 있다는 것을 감안하면, 본 연구에서 토종꿀이 함유된 수용성 키토산 마이크로 입자가 아토피 피부염 치료에 우수한 물질이 될 것으로 생각된다.

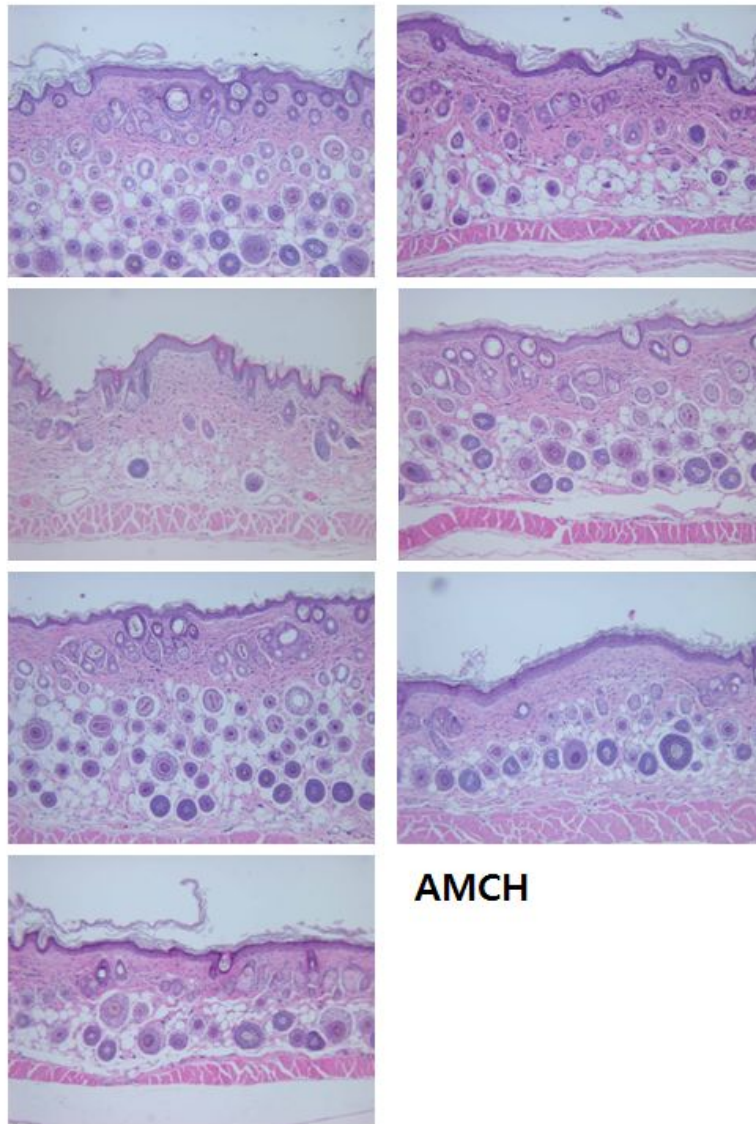


그림 50. AMCH군의 조직검사 결과 (n=7)

(차) 육안 평가

그림 51 ~ 54는 각 군에 대한 마우스의 외형적인 사진이다. 그림에서 보는 바와 같이 여러 가지 실험과 일치하는 결과를 확인할 수 있다. 그림 51은 음성대조군으로 제모 후 어떠한 처리도 하지 않고 실험 종료 시까지 피부상태를 관찰한 결과이다.

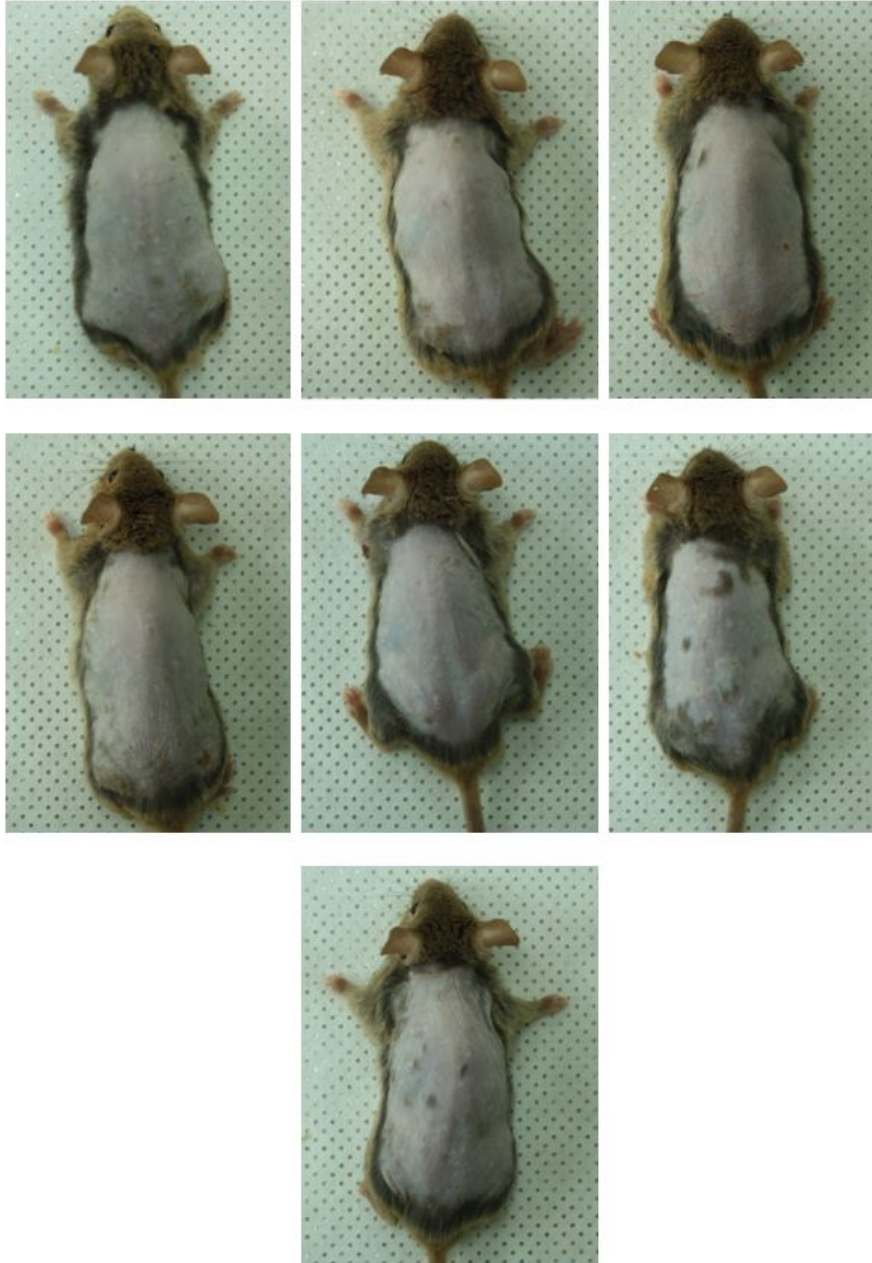


그림 51. 음성대조군의 관찰 이미지 (n=7)

그림 52는 양성대조군으로 제모 후 DNCB를 이용하여 아토피를 유발하고 피부 상태를 관찰한 것으로 NC/Nga 마우스 등에 아토피가 아주 잘 유발되었음을 확인할 수 있었다.



그림 52. 양성대조군의 관찰 이미지 (n=7)

그림 53은 억제대조군으로 제모 후 DNCB를 이용하여 아토피를 유발하고 그 후 피메크로리무스 1% 크림을 처리한 것으로 양성대조군에 비해 피부 상태가 조금은 나아진 것을 확인할 수 있으나 여전히 인설 및 가피 등의 증상을 보였다.

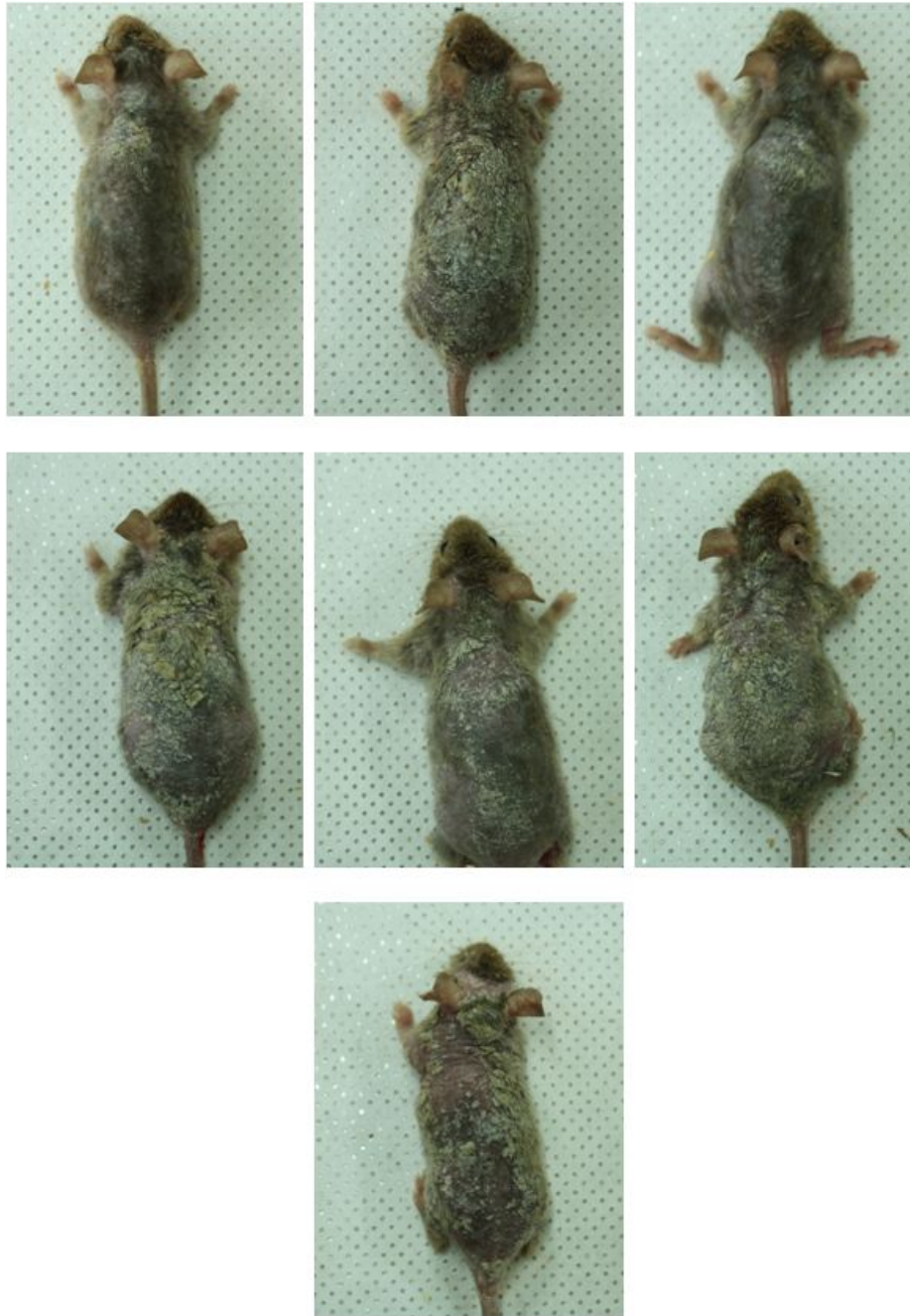


그림 53. 억제대조군의 관찰 이미지 (n=7)

그림 54는 AMCH을 처리한 군으로 제모 후 DNCB를 이용하여 아토피를 유발하고 그 후 혼합용액을 처리한 것으로 양성대조군과 억제대조군에 비해 피부 상태가 상당히 좋아진 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 본 연구에서 제조된 AMCH는 수용성 키토산의 항균활성 기능과 herbal honey의 감염성 질병의 치료를 위해 알려진 항균 활성의 상승효과에 의해 아토피 피부염의 개선에 효과가 있으며 항염증이나 상처치유에 도움을 준 것으로 사료된다.



그림 54. AMCH군의 관찰 이미지 (n=7)

2. 제 2세부과제

가. 1차 년도

본 연구에서 사용한 생약초는 한방에서 많이 사용되는 생약초 중 피부개선, 피부 질환의 치료에 유용하다고 알려진 약초 중, 작약, 줄풀, 대추, 측백, 미치광이풀 등을 실험재료로 사용하였다. 5종 생약초의 피부관련 질환 효능을 살펴보면 다음과 같다.

□ 작약(*Paeonia lactiflora*)은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 작약과에 속하는 다년초로 병원성 세균의 사멸효과, 접촉성 과민반응 억제작용, 피부 진정작용, 항염증, 항산화, 콜라겐 합성 촉진 효과, 통증치료효과, 피부재생, 피부 보습효과, 피부 유연효과, 소취효과 우수, 타박상 치료약재, 미백효능(반점치료, 색소침착 치료, 티로시나제 활성억제효과), 피부모공수축작용, 피부 노화방지, 주름방지효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 구근에 함유된 화합물 paeoniflorin은 항염작용, 진정효과 및 항케양 효과가 있으며, benzoylpaeoniflorin은 항알러지 작용이 있는 것으로 보고되었다.

□ 줄풀(*Zizania caudiflora*)의 생약명은 교백으로 예로부터 육제로 사용할 경우, 병원균과 노폐물을 배출하는 효과가 있을 뿐만 아니라 습진, 음, 종기 등 피부질환에 탁월한 치료효과가 있으며, 항염증 작용, 화상치료효과 등이 있으며, 주요성분으로는 사포닌, VtB1, VtB16, 칼슘, 인, 철분, 섬유질, 탄수화물, 정유 등이 함유되어있다.

□ 대추(*Zizyphus jujuba*)의 피부에 대하여 항알러지 효과, 피부각질제거능이 있으며, 다량의 비타민 C와 미량원소를 함유하여 피부를 매끈하고 청결하게 한다.

□ 측백나무(*Thuja orientalis*)의 잎은 민간에서 목욕제로 사용되어 왔으며 정유는 항균, 항산화, 살균작용, 피지 과분비 억제능(5 α -reductase 저해능)이 있으며, 열매(백자인)는 모근에 영양을 공급하여 탈모를 방지할 뿐만 아니라 피부 항산화작용이 있다.

□ 미치광이풀(*Scopolia japonica*)은 피부개선 및 피부 진정효과가 우수한 것으로 알려져 있으며 뿌리에는 부교감신경 억제성분인 scopolamine과 부종에 유효한 scopoletine 등이 함유되어 있다.

(1) 연구 방법

(가) 생약초(작약, 줄풀, 대추, 측백나무, 미치광이풀)로부터 추출물 조제

① 식물재료

본 연구에서 사용한 생약초는 한방에서 많이 사용되는 생약초 중 피부개선, 피부 질환의 치료에 유용하다고 알려진 약초 중, 작약, 줄풀, 대추, 측백, 미치광이풀 등을 실험재료로 사용하였으며, 표본검증은 부산대학교 한의학전문대학원 본초학실의 조수인 교수가 수행하였다. 작약(*Paeonia lactiflora*)은 의성작약을 사용하였으며 2009년 6월 11일에 건조된 구근(10 Kg)과 신선한 꽃(2 Kg)을 경북농업기술원 신물질연구소 작약시험장에서 구입하여 사용하였다. 줄풀(*Zizania caudiflora*)의 지상부는 2009년 4월 30일 음니허브로부터 건조품(5 Kg)을 구입하여 사용

하였다. 대추(*Zizyphus jujuba*)의 성숙열매는 2009년 5월 14일 전남생약조합에서 건조품(5 Kg)으로 구입하여 사용하였다. 측백(*Thuja orientalis*) 잎과 종자(백자인)는 각각 5 Kg 씩 2009년 5월 14일 전남생약조합에서 건조품으로 구입하였으며, essential oil를 분리할 신선한 지상부는 전남 함평군에서 직접 수집하여 사용하였다. 미치광이풀(*Scopolia japonica*)은 유독성식물로 판매하는 곳이 없어 한국추출물 은행으로부터 에탄올 추출물을 부위별(지하부, 지상부, 전초)로 각각 1 g 씩을 구입하여 사용하였다.

② 추출물 및 essential oil 조제

본 연구에 사용한 5종의 생약초로부터 crude extracts를 조제하기 위하여 식물체를 부위별로 분쇄하여 실온에서 진탕하면서 98 % 에탄올로 1주일 동안 추출한 후 여과(Whatman paper No 5.)하여 감압농축한 후, 동결건조 하였으며 냉장보관하면서 사용하였다. essential oil의 추출에는 수증기 증류법, 압착법, 흡수법, 용매 추출법 등 여러 가지 방법이 있으나, 본 실험에서는 수증기 증류법(Hydro distillation)을 이용하여 정유를 추출하였다. 깨끗하게 세척된 식물체를 잘게 절단하여 원형플라스크에 증류수와 함께 넣은 후, Fig. 1.과 같이 수증기 증류장치를 이용하여 5시간 동안 수증기 증류하여 상층에 모아진 essential oil과 수용성 정유성분을 함유한 하층의 floral water를 각각 분리하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 측백의 경우엔 정유추출의 효율성을 위하여 신선품을 2 kg까지 건조시킨 후, 수증기 증류하였다(그림 55).



그림 55. 수증기 증류법에 의한 essential oil 추출.

③ 추출물의 구조분석

추출물의 구조분석은 FT-NMR (Bruker, AVNCE 400, Germany), FT-IR(Shimadzu, FT-IR 8700, Japan) 등을 이용하여 분석하였다.

(나) 추출물의 피부염증 유발균에 대한 증식 저해활성

아토피 피부염 환자의 피부 대부분은 세균 환경이 좋지 않아 쉽게 세균 감염을 일으킬 수 있다. 피부 자체에 정상 세균 총의 균형이 파괴되며 정상인의 피부는 pH 5.5 인데 비해 아토피 환자의 경우 pH 6.0에 가까워 포도상구균, 연쇄상구균 등과 같은 일반 병원균이 쉽게 감염, 증식하게 된다. 따라서 유해세균을 억제하고 정상세균총은 활성화시키는 생약초의 천연물질을 개발할 필요가 있다. 본 연구에서는 5종의 생약초 추출물 및 측백 essential oil 을 시료로 하여 5종의 피부염증 유발 미생물에 대하여 항균 활성능을 분석하였다.

① 사용균주 및 배지

항균활성 검색은 대표적인 피부 미생물 5종의 균주를 사용하였으며, 본 연구에 사용한 균주 종류와 배지 조성은 표 9과 같다.

표 9. 항균활성에 사용된 균주.

Strains	Media	Temperature(°C)
<i>Candida albicans</i> KCTC 7965(Yeast)	YMB/YMA	37
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC1917	TSB	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12692	TSB/TBA	37
<i>Pityrosporum ovale</i> ATCC 112078	YM	37
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	YM	37

② 추출물의 항균력 측정

Paper disc method을 사용하여 추출물의 항균력을 분석하였다. 순수 분리된 각 균주의 단일집락을 취해 10 ml의 균 생육 액체배지에 접종하여 각각 균주의 생육적온에서 18~24시간씩 3회 배양한 후 항균활성 시험균주로 사용하였다. 항균성 시험용 평판배지의 조제는 각각 균주의 15 %의 한천이 첨가된 생육배지를 멸균하여 petri dish에 15 ml씩 분주하여 기층용 배지를 응고시키고, 각각의 시험균 농도를 650 nm에서 optical density (OD)값이 0.4 (10^6 CFU/ml)가 되게 한 후 0.7 % 한천이 첨가된 중층용 배지에 무균적으로 가하여 잘 혼합한 다음 기층용 배지 위에 분주한 다음 고르게 응고 시켜 2중의 균 접종 중층배지를 만들었다. 충분히 굳은 고체배지 위에 멸균된 8 mm paper disc를 올려놓은 후 solution의 30 μ l씩 disc에 흡수시킨 다음 37 °C에서 24시간동안 배양한 후 disc 주변의 clear zone을 관찰하였다.

(다) 작약구균 추출물로부터 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성 물질 분리

소용량 추출물을 이용한 예비실험 및 이 결과를 바탕으로 대량 추출물 분리 실험을 하여 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 활성 실험을 수행함으로 항균 활성 물질을 분리하였다.

(라) 탈과립 억제능 (β -hexosaminidase assay) 분석을 통한 추출물의 아토피 피부염 소양증 개선효과 검증

아토피 피부염의 주요 증상중의 하나는 피부 가려움증, 즉 소양증이 유발되는 것이며, 아토피 피부염의 병리기전은 비만세포의 탈과립과 혈중 히스타민의 유리, 특히 최근에는 1, 2형 helper T 세포에서 분비되는 면역조절 cytokine 간의 불균형 및 과도한 IgE 생산을 질환의 핵심기전으로 이해하는 바탕에서 이루어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 대표적인 mast cell 인 RBL-2H3 cell를 이용하여 5종 생약초 추출물의 탈과립 억제효능을 분석하였다.

① 추출물의 세포 생존율 농도 측정

RBL-2H3 세포를 EMEM(10% FBS)에 배양한 후, 96 well plate에 세포 수(2.0×10^4 cells/100 μ l) 를 조절하여 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 24 시간 배양하였다. 추출물을 농도별로 첨가하여 다시 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 24 시간 배양한 후, EZ-Cytox kit 10 μ l를 첨가하여 1시간 배양한 다음 세포생존율을 분석하였다.

② β -hexosaminidase assay

㉠ 세포배양 및 Cell sensitization : RBL-2H3 세포를 EMEM(10% FBS)에 배양한 후, 24 well plate에 세포수(2.0×10^5 cells/500 μ l) 를 조절하여 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 12 시간 배양한 다음, IgE (200 ng/ml, final con)를 처리하여 다시 12시간 배양하였다.

㉡ Cell activation : 세포배양액으로부터 배지를 제거한 후 37 $^{\circ}$ C siraganian buffer로 2회 세척한 다음, 추출물의 농도를 생존율 농도로 조정하여 final volume 190 μ l 가 되도록 추출물을 37 $^{\circ}$ C siraganian buffer와 혼합한 다음, 30분 동안 배양하였다. 항원(DNP-HSA, 25 ng/ml, final con.)을 처리하여 15분 배양한 다음, plate를 꺼내어 ice 상태에서 5분 방치한 후, 원심분리(3000 rpm, 3 min) 하여 160 μ l 의 상층액을 분리했다.

㉢ Hexosaminidase assay : 30 μ l의 상층액을 96 well plate에 가한 후, 30 μ l 1 mM P-NAG(in citrate buffer) 를 첨가한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하였다. 다시 250 μ l의 0.1M carbonate buffer를 가한 후 405 nm에서 흡광도를 조사하였다.

③ 탈과립 억제활성을 보인 추출물 농도의 세포독성 분석

㉠ 세포배양 및 Cell sensitization : RBL-2H3 세포를 EMEM(10 % FBS)에 배양한 후, 24 well plate에 세포 수(2.0×10^4 cells/100 μ l) 를 조절하여 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 12 시간 배양한 다음, IgE (200 ng/ml, final con.)를 처리하여 다시 12시간 배양하였다.

㉡ Cell activation : 세포배양액으로부터 배지를 제거한 후 37 $^{\circ}$ C siraganian buffer로 2회 세척한 다음, 추출물을 final volume 100 μ l 가 되도록 첨가하여 37 $^{\circ}$ C siraganian buffer와 혼합한 다음, 2시간 동안 배양하였다. 항원(DNP-HSA, 25 ng/ml, final con.)을 처리하여 15분 배양하였다.

㉢ Cell viability : EZ-Cytox kit 10 μ l를 첨가하여 1시간 배양한 다음 450 nm에서 세포 생존율을 분석하였다.

(2) 연구 결과

(가) 생약초(작약, 줄풀, 대추, 측백나무, 미치광이풀)로부터 추출물 조제

① 생약초의 추출

5종의 생약초(작약, 줄풀, 대추, 측백나무, 미치광이풀)로부터 에탄올 추출물 및 essential oil, floral water 를 추출, 분리한 결과는 표 10와 같으며, 이중 대추열매, 작약구근, 줄풀전초, 측백잎의 추출물은 주관기관인 순천대학교에 각각 50 g 씩 전달하여 실험에 사용토록 하였다.

표 10. 식물체 추출부위 및 추출물 량

Korean name	Part used	Weight of plant (Kg)	Extracts (g)
작약	Roots	7.5	814
줄풀	Aerial parts	5	53
대추	Fruits	5	60
측백	Leaves	5	55
	Fruits	2	23
	Aerial parts	10	12 ml (essential oil)
		10	1 L (floral water)
미치광이풀	Whole plant	-	1
	Aerial part	-	1
	Root	-	1

② 추출물의 구조분석

그림 56은 생약초에 대한 ^1H NMR 결과이다. 생약초로 부터의 초기 추출물의 경우 단일 물질로 분리되지 않는 상태로 생약초의 거의 모든 성분이 검출 되었다. 모든 생약초에서 당류가 검출 되었으며, 여기에 생리활성 등의 유효 성분으로 아미노산, 모노테레페노이드, 폴리페놀 등이 모두 확인 되었으며, 이러한 결과는 기존 연구의 각각의 생약초의 성분과 일치하고 있음을 보여 주고 있다.

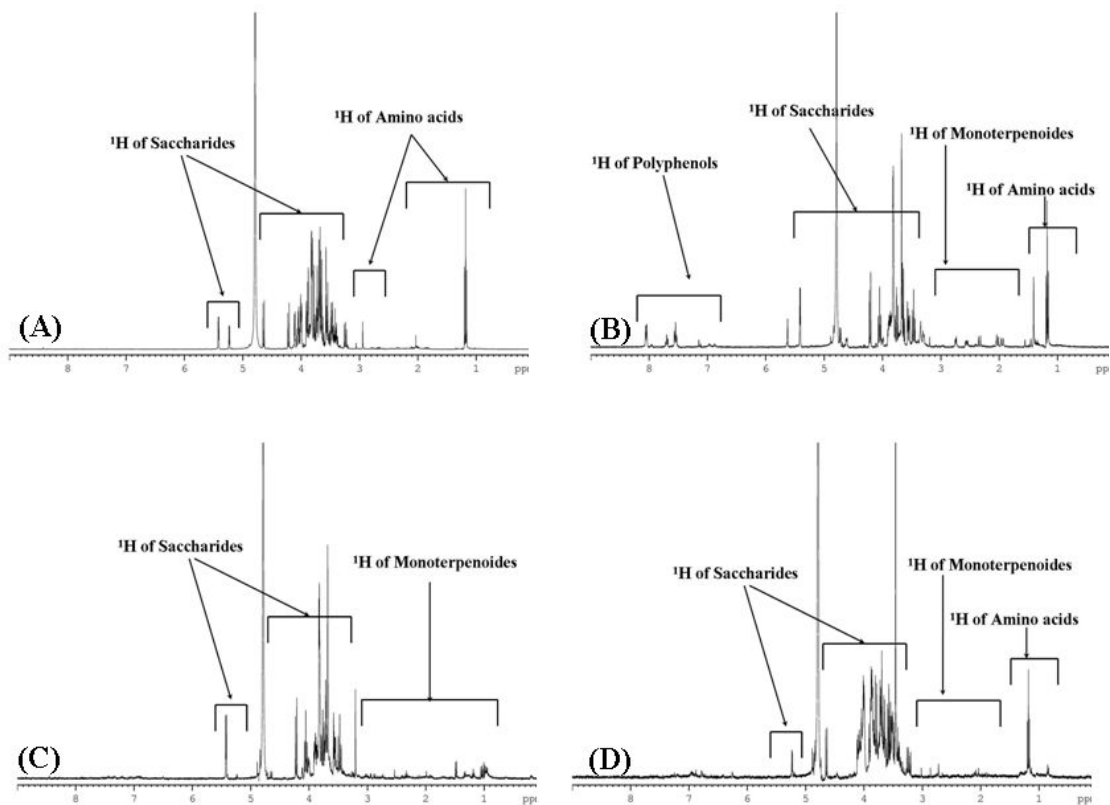


그림 56. 생약초의 ^1H NMR 결과. (A) 대추, (B) 작약, (C) 줄풀, (D) 측백.

그림 57은 생약초에 대한 FT-IR 결과이다. 그림 57에서 볼수 있듯이 3200 cm^{-1} 에서 -OH, 2900 cm^{-1} 에서 -CH, 1500 ~ 1800 cm^{-1} 에서 -C=O, -NH 등의 신축 피크를 확인할 수 있었다. 이러한 특성 피크는 당과 폴리페놀 등의 하이드록실, 아미노산의 카르복실, 아마이드, 모노테레페노이드의 카르보닐 등에 의해서 나타나는 피크로 NMR 결과와 비슷한 결과를 보였으며, 추출 물에는 다양한 물질이 포함되어 있는 것을 알 수 있었다.

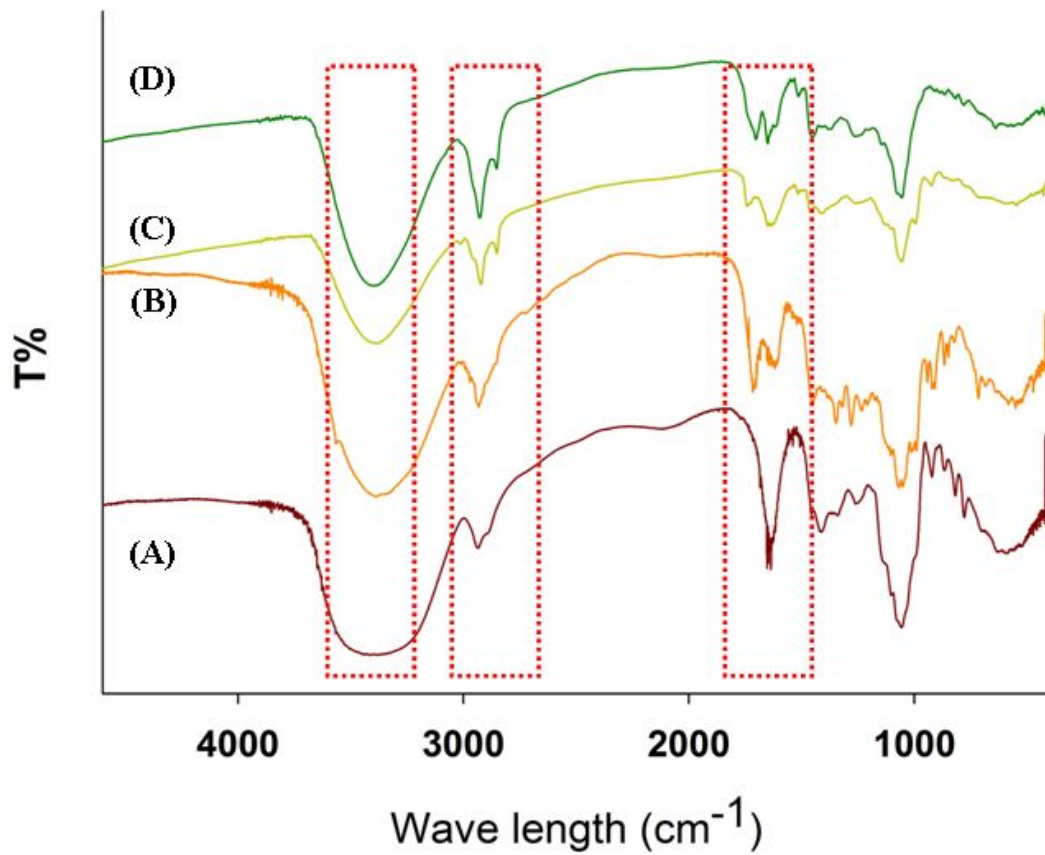


그림 57. 생약초의 FT-IR 결과. (A) 대추, (B) 작약, (C) 줄풀, (D) 측백.

(나) 추출물의 피부염증 유발균에 대한 증식 저해활성

① *C. albicans* 에 대한 추출물 및 essential oil의 증식 저해활성

C. albicans 에 대한 추출물의 증식 저해활성은 작약구근, 미치광이풀, 측백 잎의 순으로 추출물 농도가 높을 경우에만 저해능을 보였다(표 11, 그림 58). 그러나 측백 essential oil의 경우엔 모든 농도에서 우수한 증식 저해능을 보였다(표 12, 그림 59).

표 11. 생약초 추출물의 *Candida albicans*에 대한 항균활성.

Korean name	Con. of extracts (mg/ml)			
	100	10	1	0.5
	Diameter of inhibition zone (mm)			
작약 구근	5.6	-	-	-
줄풀	-	-	-	-
대추	-	-	-	-
측백 잎	1.5	-	-	-
미치광이풀(전초)	1.2	-	-	-

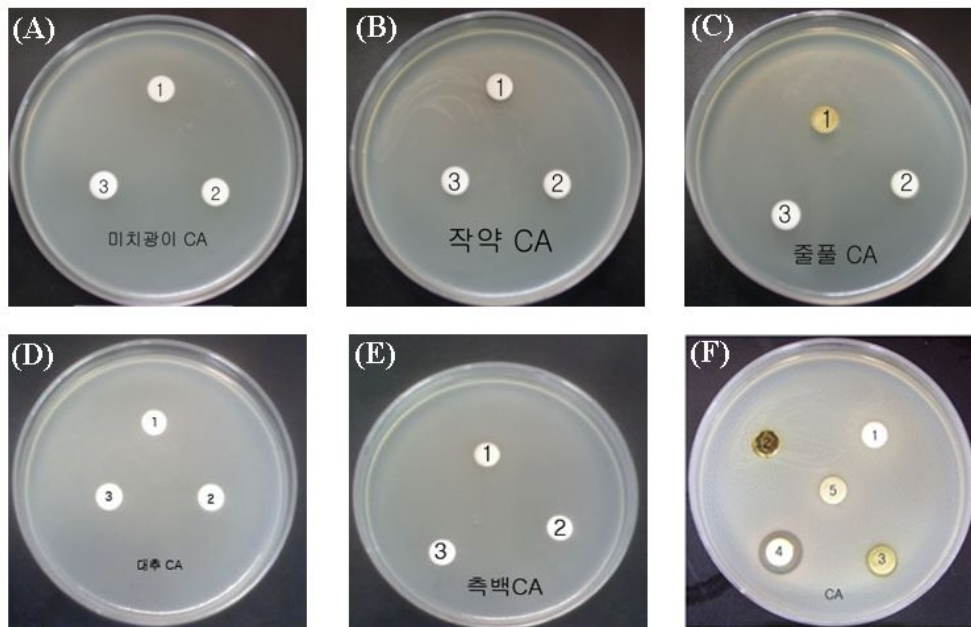


그림 58. 생약초 추출물의 *Candida albicans*에 대한 항균활성.

(A)~(E) 농도에 따른 항균활성 ; ① 10 mg/ml, ② 1 mg/ml, ③ 0.5 mg/ml,
 (F) 농도 100 mg/ml에서 생약초 종류에 따른 항균활성 ; ① 대추, ② 줄풀,
 ③ 측백 잎, ④ 작약구근, ⑤ 미치광이풀(전초).

표 12. 측백 essential oil의 *Candida albicans*에 대한 항균활성.

Korean name	Con. of essential oil (μl)				
	40	30	20	10	5
	Diameter of inhibition zone (mm)				
측백 지상부	6	5	5	4	3



그림 59. 측백 essential oil의 *Candida albicans*에 대한 항균활성.

① 40 μl , ② 30 μl , ③ 20 μl , ④ 10 μl , ⑤ 5 μl .

② *Staphylococcus epidermidis* 에 대한 추출물 및 essential oil의 증식 저해활성

*S. epidermidis*도 대표적인 피부상재균으로 피부에 염증 유발하는 균으로, 본 연구에서는 5종의 생약초 추출물과 측백 지상부에서 분리된 essential oil이 이 피부상재균의 증식억제에 미치는 영향을 분석하였다(표 13, 그림 60). 실험결과, 작약구근과 측백 잎 추출물에서 우수한 증식저해능을 보였으며, 대추와 미치광이풀은 고농도에서만 활성을 나타냈으며, 줄풀은 억제능을 보이지 않았다. 측백 essential oil은 모든 농도에서 상기의 *C. albicans* 보다 더 탁월한 증식 저해능을 보였다(표 14, 그림 61).

표 13. 생약초 추출물의 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 항균활성.

Korean name	Con. of extracts (mg/ml)			
	100	10	1	0.5
Diameter of inhibition zone (mm)				
작약 구근	6.3	5.0	-	-
줄풀	-	-	-	-
대추	3.0	-	-	-
측백 잎	4.0	0.8	0.5	0.3
미치광이풀(전초)	2.0	-	-	-

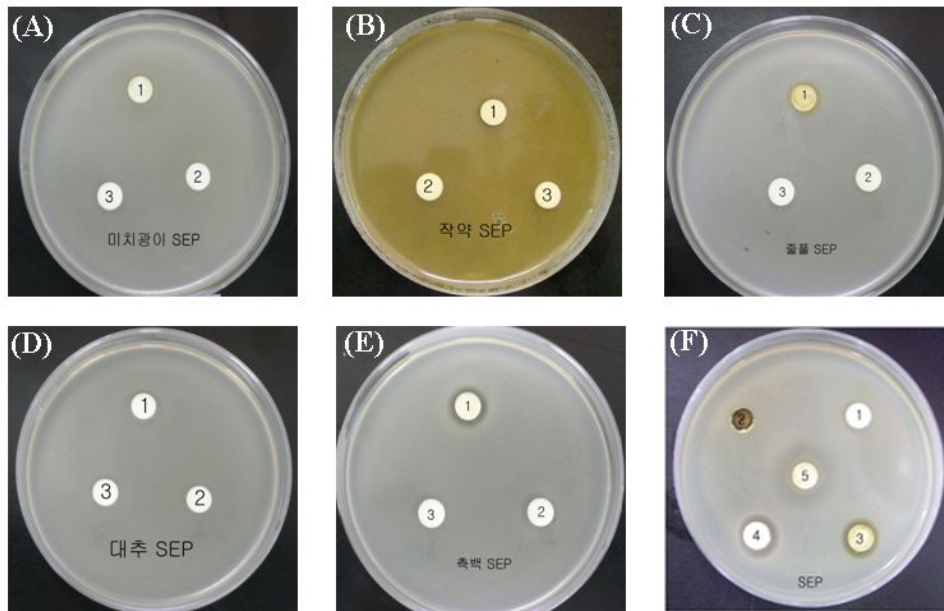


그림 60. 생약초 추출물의 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 항균활성.

(A)~(E) 농도에 따른 항균활성 ; ① 10 mg/ml, ② 1 mg/ml, ③ 0.5 mg/ml,
 (F) 농도 100 mg/ml에서 생약초 종류에 따른 항균활성 ; ① 대추, ② 줄풀,
 ③ 측백 잎, ④ 작약구근, ⑤ 미치광이풀(전초).

표 14. 측백 essential oil의 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 항균활성.

Korean name	Con. of essential oil (μl)				
	40	30	20	10	5
	Diameter of inhibition zone (mm)				
측백 지상부	10.0	9.0	8.0	7.0	6.0



그림 61. 측백 essential oil의 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 항균활성.

① 40 μl , ② 30 μl , ③ 20 μl , ④ 10 μl , ⑤ 5 μl .

③ *Staphylococcus aureus* 에 대한 추출물 및 essential oil의 미생물 저해활성

아토피성 피부에 과다증식하여 피부에 염증을 유발시키는 *Staphylococcus aureus*는 그람양성균으로 사람의 피부, 구인두, 위장관, 비뇨생식기계에 있는 정상세균 무리이며, 표피탈락 피부 증후군, 수포성 농가진(bullous impetigo), 뽀루지, 모낭염, 상처감염 등의 요인이 되고 있다(그림 62). 따라서 본 실험에서는 *S. aureus*에 대하여 집중적으로 항균활성 실험을 진행하였으며, 5종의 추출물과 측백 지상부에서 분리된 essential oil이 이 피부상재균의 증식억제에 미치는 영향을 분석하였다.

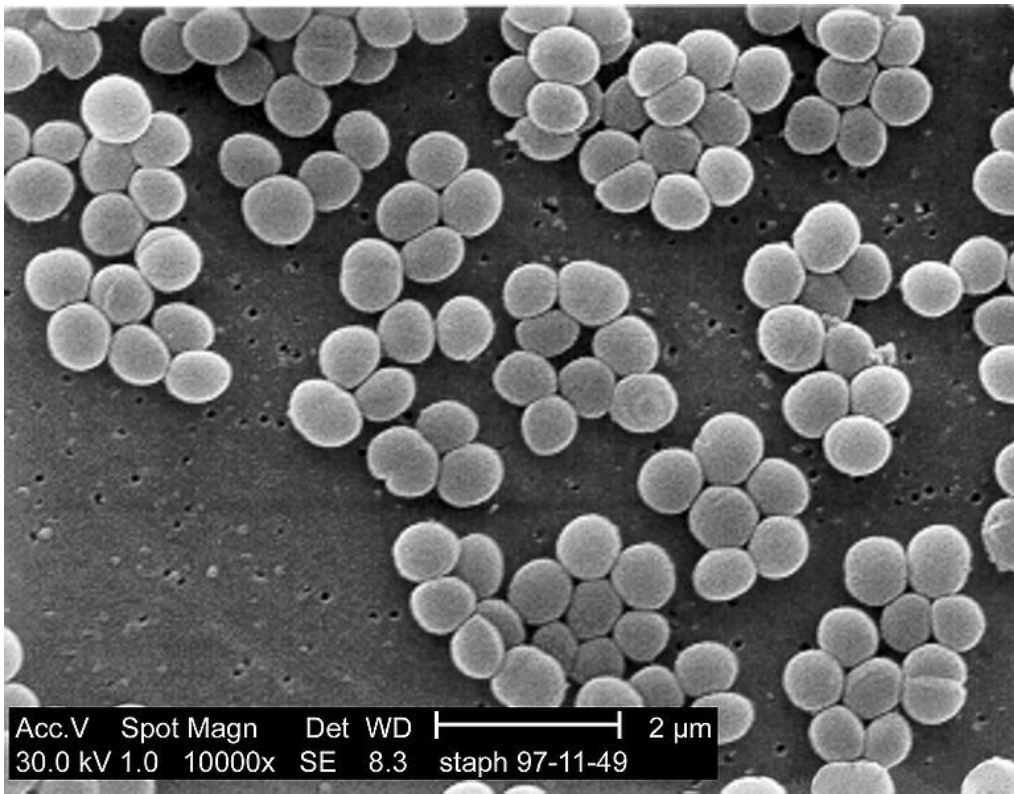


그림 62. 아토피성 피부에 과다증식하는 *S. aureus*의 SEM 현미경 사진.

분석 결과, 작약 구근과 측백 잎 추출물에서 좋은 증식저해능을 보였으며, 대추와 미치광이 풀은 고농도에서만 활성을 나타냈다(표 15, 그림 63). 측백 essential oil의 경우엔 *C. albicans*, *S. epidermidis*에서와 같이 탁월한 증식 저해능을 보여 주었다(표 16, 그림 64).

표 15. 생약초 추출물의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성.

Korean name	Con. of extracts (mg/ml)			
	100	10	1	0.5
Diameter of inhibition zone (mm)				
작약 구근	10.0	6.3	-	-
줄풀	-	-	-	-
대추	2.3	-	-	-
측백 잎	8.3	5.0	-	-
미치광이풀(전초)	3.0	-	-	-

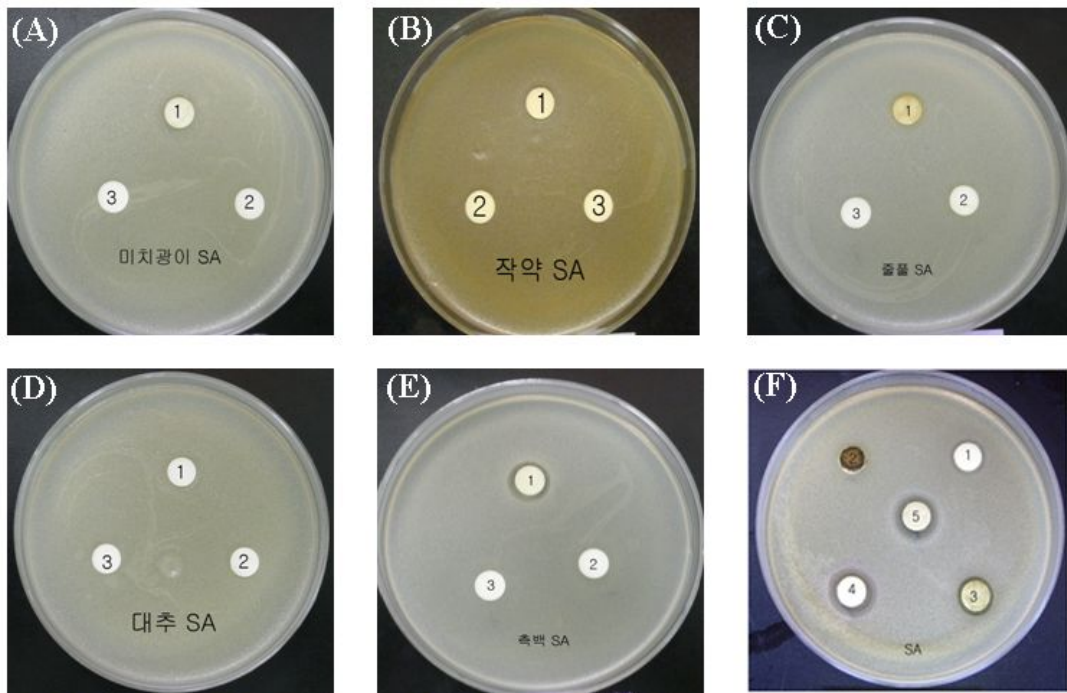


그림 63. 생약초 추출물의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성.

(A)~(E) 농도에 따른 항균활성 ; ① 10 mg/ml, ② 1 mg/ml, ③ 0.5 mg/ml,
 (F) 농도 100 mg/ml에서 생약초 종류에 따른 항균활성 ; ① 대추, ② 줄풀,
 ③ 측백 잎, ④ 작약구근, ⑤ 미치광이풀(전초).

표 16. 측백 essential oil의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성.

Korean name	Con. of essential oil (μl)				
	40	30	20	10	5
	Diameter of inhibition zone (mm)				
측백 지상부	9.0	8.0	8.0	7.0	3.0



그림 64. 측백 essential oil의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성.

① 40 μl , ② 30 μl , ③ 20 μl , ④ 10 μl , ⑤ 5 μl .

④ *Pityrosporum ovale* 에 대한 측백 잎 추출물의 증식 저해활성

우수한 항균활성을 나타낸 측백 잎 추출물은 *Pityrosporum ovale* 에 대하여도 강한 증식 저해능을 나타내었다(표 17, 그림 65).

표 17. 측백잎 추출물의 *Pityrosporum ovale*에 대한 항균활성.

Korean name	Con. of extracts (mg/disc)			
	0.5	0.25	0.125	MIC
	Diameter of inhibition zone (mm)			
측백 잎	5.3	5.0	4.0	3.1ug/ml



그림 65. 측백잎 추출물의 *Pityrosporum ovale*에 대한 항균활성.

① 0.5 mg ② 0.25 mg, ③ 0.125 mg.

⑤ *Malassezia furfur* 에 대한 측백 잎 추출물의 증식 저해활성

전반적으로 우수한 항균활성을 나타낸 측백 잎 추출물은 *Malassezia furfur* 에 대하여도 우수한 증식 저해능을 나타내었다(표 18, 그림 66).

표 18. 측백잎 추출물의 *Malassezia furfur*에 대한 항균활성.

Korean name	Con. of extracts (mg/disc)			
	0.5	0.25	0.125	MIC
	Diameter of inhibition zone (mm)			
측백 잎	5.0	3.5	-	25.0ug/ml



그림 66. 측백잎 추출물의 *Malassezia furfur*에 대한 항균활성.

① 0.5 mg ② 0.25 mg, ③ 0.125 mg.

(다) 작약구근 추출물로부터 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성 물질 분리

① 소량의 추출물을 이용한 활성분획 검색을 위한 예비실험

활성물질의 위치를 검색하기 위하여 본 실험에 착수하기 전, 소량(200g)의 추출물을 이용하여 추출물을 분획하여 예비실험을 수행하였다. 200 g의 메탄올 추출물로부터 n-hexane, ethylacetate(EtOAc), butanol(BuOH), DW로 용매 분획물을 얻었다(그림 67). 5종의 용매 분획 추출물 중 *S. aureus*에 대하여 paper disc법으로 항균성 검색을 시행한 결과, EtOAc 추출물(표 19, 그림 68)에서 가장 강한 항균활성을 보였다. 작약 구근의 Ethylacetate 층을 그림 69와 같이 Silicagel column chromatography 걸어 용매(n-Hexane : Acetone = 10 : 1 - 1 : 3)로 용출시켜 전개시켜 6개의 fraction을 얻었다. 분리한 6개의 fraction 중 항균활성이 높게 나온 fraction 2(표 20, 그림 71)를 다시 C18 column chromatography에 걸어 용매(MeOH : Water = 1 : 3 - 3 : 1)로 용출시켜 8개의 Fraction을 얻었고 항균활성이 가장 우수한 분획(Fr 2-6: 표 21, 그림 72)에 대하여 HPLC로 분석한 결과(그림 73), 단일물질일 가능성이 높음을 확인하고, 이를 토대로 하여 활성물질 분리를 위한 대량 추출물 조제 실험을 착수했다.

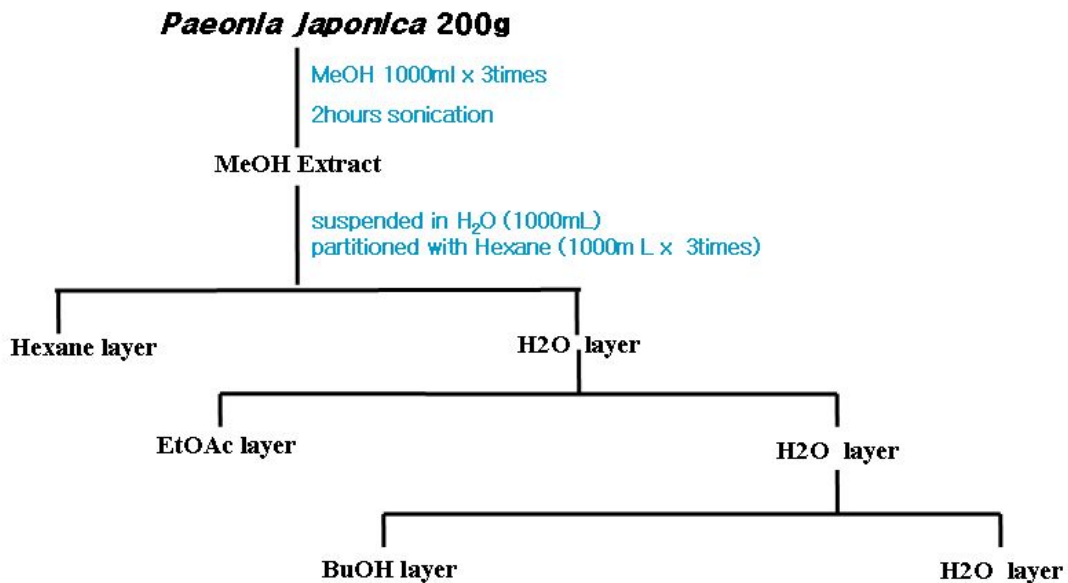


그림 67. 예비실험에서 작약구근 추출물로부터 MeOH 추출에 따른 분리도.

표 19. 작약 구근의 추출 용매에 따른 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성.

Solvent extracts	Con. of extracts (20 mg/ml)
	Diameter of inhibition zone (mm)
MeOH	9.0
EtOAc	11.0
BuOH	6.0
Hexane	-
Water	-

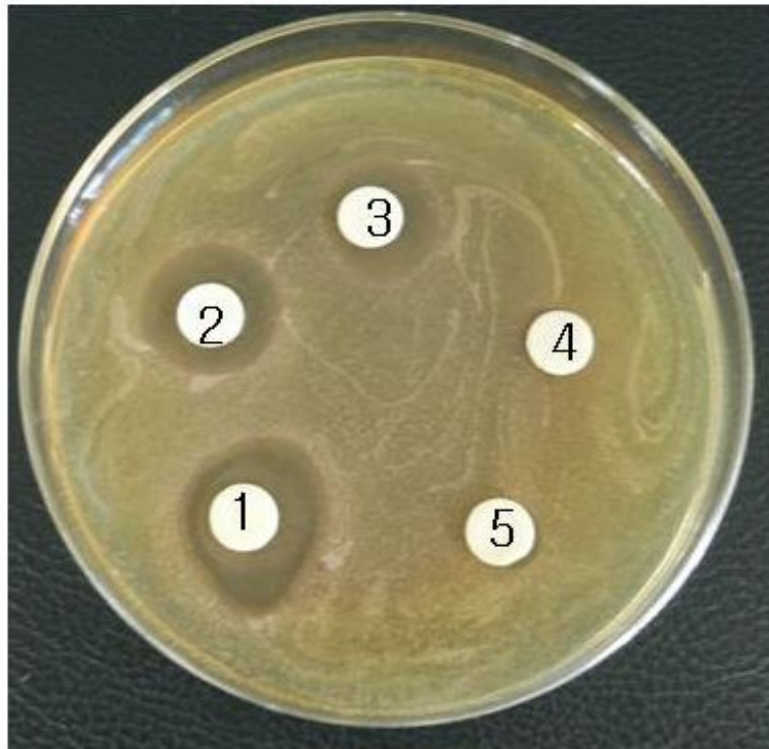


그림 68. 작약 구근의 추출 용매에 따른 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성.

① EtOAc ② MeOH, ③ BuOH, ④ Hexane, ⑤ Water

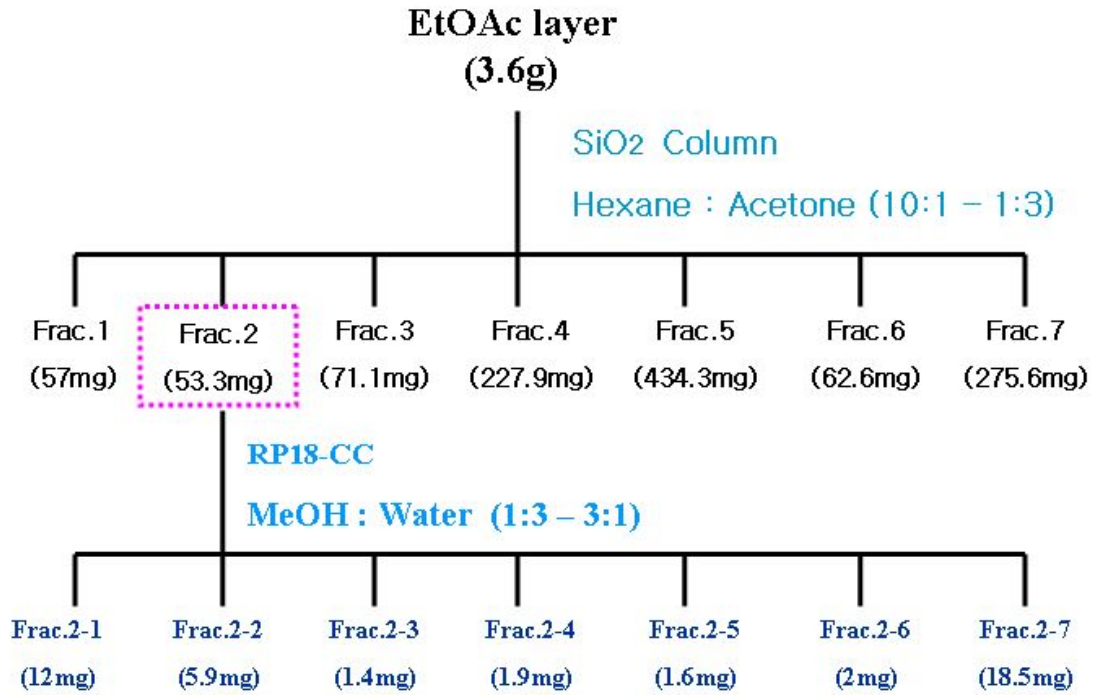


그림 69. Silicagel, C18 Column 통과에 의한 작약구근 추출물로부터 EtOAc 추출에 따른 분리도.

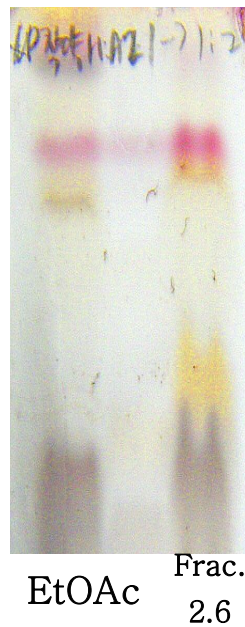


그림 70. Frac. 2-6에 대한 TLC pattern.

표 20. EtOAc로 추출한 작약 구근의 6개 fraction의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성.

Fractions	Con. of extracts (mg/ml)				
	20	10	5	2.5	1.25
	Diameter of inhibition zone (mm)				
1	5	3.7	2.3	-	-
2	8.3	4.5	3.0	0.7	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	4.3	2.5	-	-	-

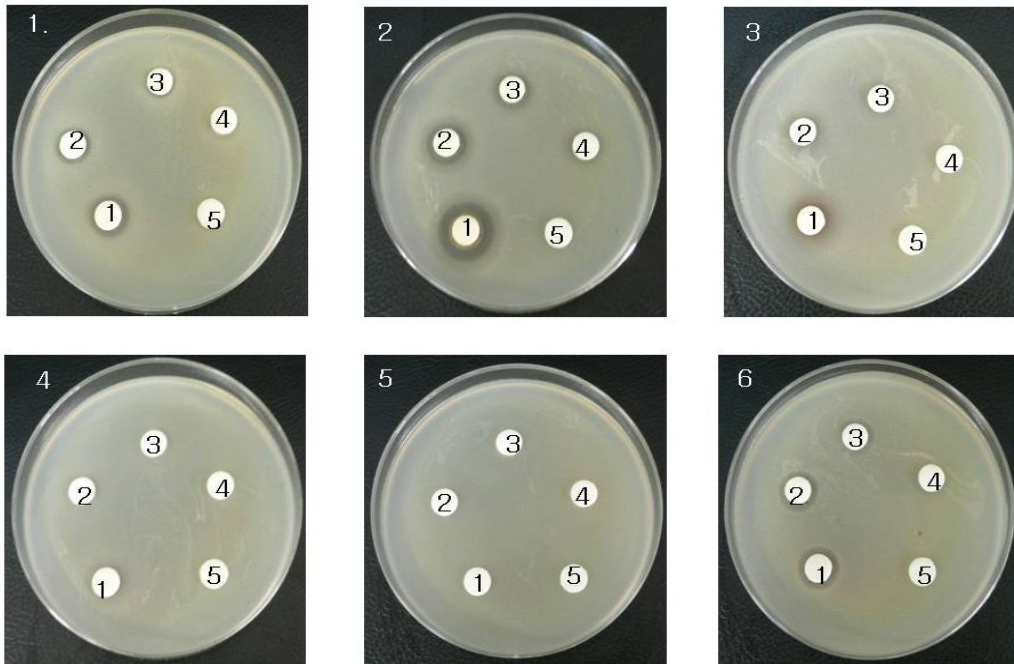


그림 71. EtOAc로 추출한 작약 구근의 6개의 fraction의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성.

① 20 mg/ml, ② 10 mg/ml, ③ 5 mg/ml, ④ 2.5 mg/ml, ⑤ 1.25 mg/ml.

표 21. EtOAc로 추출한 작약 구근의 Fr 2의 8개 fraction의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성.

Fractions	Con. of extracts (mg/ml)			
	10	5	2.5	1.25
	Diameter of inhibition zone (mm)			
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6(Frac. 2-6)	13.0	11.0	6.0	4.0
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-

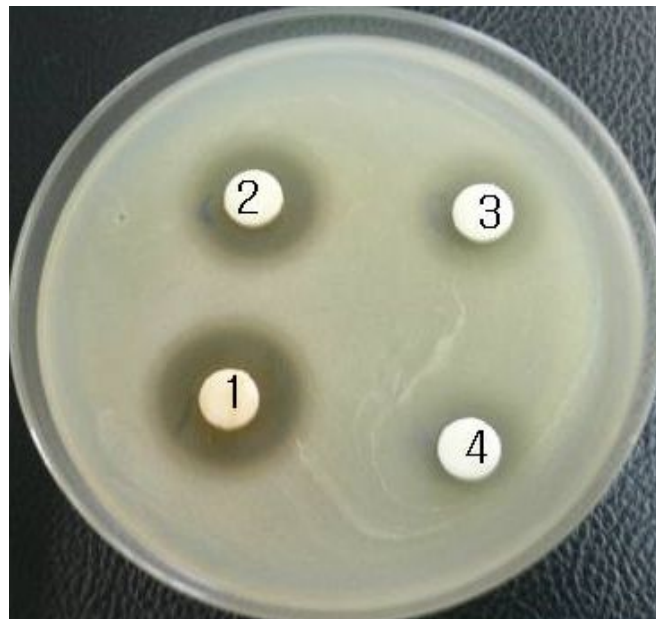


그림 72. EtOAc로 추출한 작약 구근의 Frac. 6(Fr 2-6)의 농도에 따른 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성.

① 10 mg/ml, ② 5mg/ml, ③ 2.5mg/ml, ④ 1.25mg/ml.

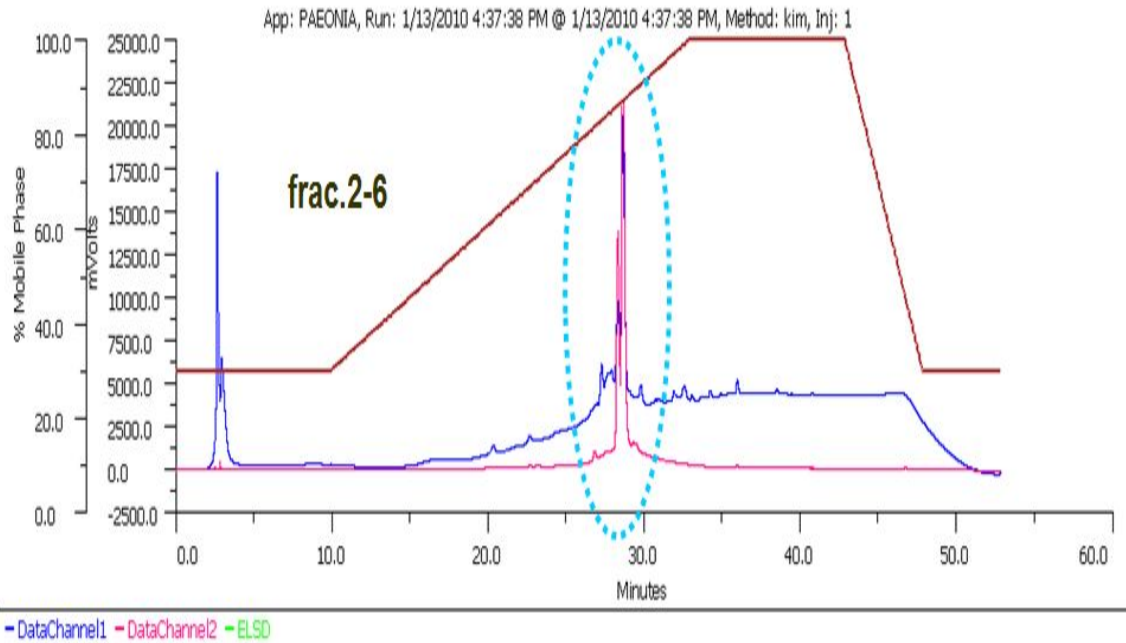


그림 73. Fr 2-6의 HPLC 결과.

(Gilson HPLC systems; Solvent system : MeOH in H₂O + 0.1 % formic acid; Mobile phase : 0 ~ 10 Min.(30 %), 10 ~ 32 Min.(30 ~ 100 %), 32 ~ 42 Min.(100 %), 42 ~ 48 Min.(100 ~ 30 %), 48 ~ 52 Min.(30 %); Column : Optima pak, 250 mm × 10 mm, 4.6 μ m particle size; Flow rate = 1 ml/min; UV detectors : Channel 1 (sensitivities : 0.001) = 205 nm, Channel 2 (sensitivities : 0.01) = 254 nm)

② 대량의 추출물을 이용한 활성물질 분리(그림 74)

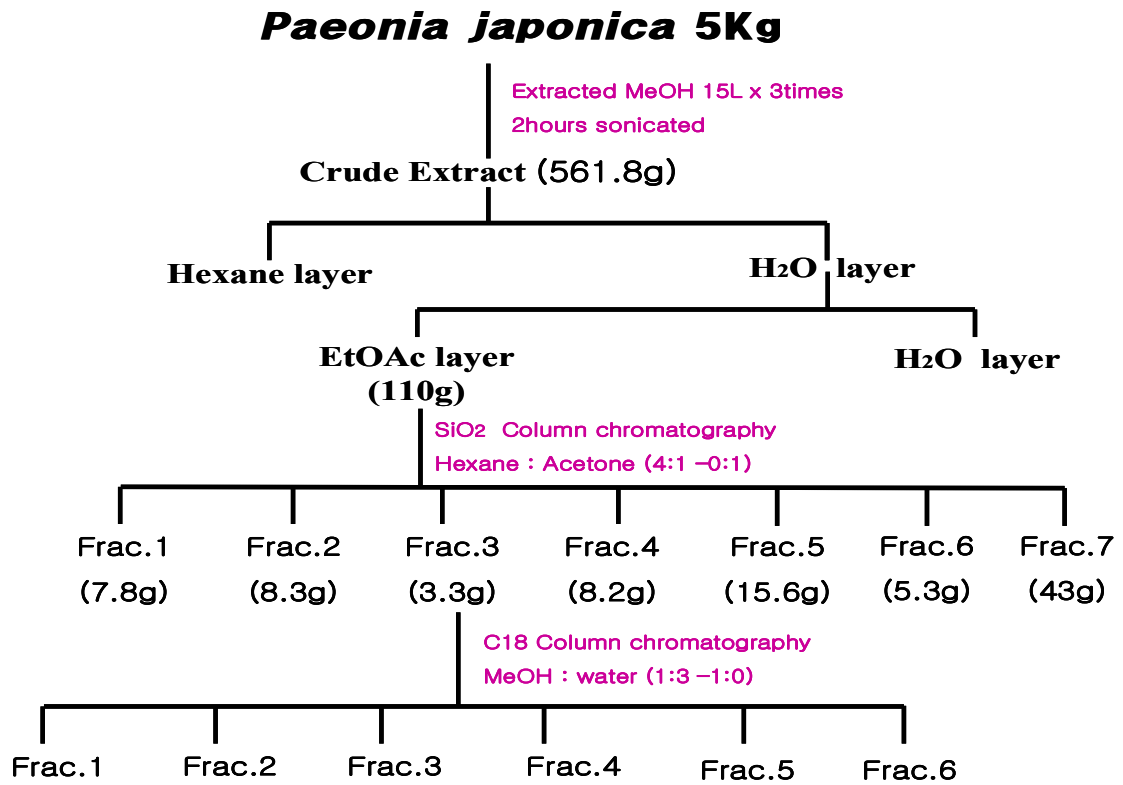


그림 74. 작약구근 추출물로부터 MeOH 추출에 따른 분리도.

③ 작약 구근으로부터 조 추출물 추출 및 조제

건조품 작약구근을 5 Kg을 세절하여 MeOH 15 L를 가하여 초음파 추출기에서 2시간 씩 3회 추출한 후 감압 농축하여 조추출물 561.8 g을 얻었다.

④ 조 추출물의 용매 분획

조 추출물(561.8g)을 90 % MeOH 2 L에 녹인 다음 hexane을 동량 가한 후 분획할때 기를 이용하여 3회 분획을 하여 불필요한 hexane 층을 제거하고, 90 % MeOH층을 다시 농축 하여 이를 증류수 1 L에 녹인 후, 동량의 ethylacetate(EtOAc)를 가한 후 분획을 3회 실시하여 EtOAc 층 98.4 g을 얻었으며, BuOH에 대하여도 상기와 같은 방법으로 3회씩 분획을 하였다. 용매분획물들에 대하여 항균활성을 확인하고, TLC 패턴을 조사하였다(그림 75).

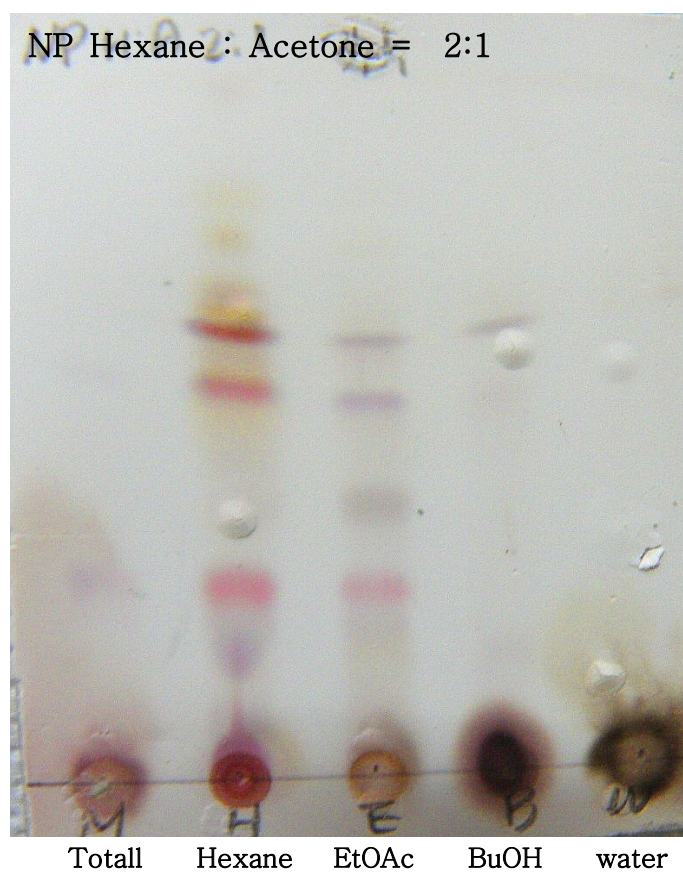


그림 75. 각각의 용매에 대한 TLC pattern.

⑤ EtOAc 분획 추출물의 silica gel column chromatography

각 용매의 분획물들(Hexane, EtOAc, BuOH, Water)을 항균활성을 분석한 결과, EtOAc층에서 그 효과가 가장 크게 나타났기에 EtOAc 분획 추출물로부터 활성성분을 분리하기 위한 1차 단계로 silica gel column chromatography을 수행하였다(그림 76). EtOAc층에 대하여 용매 Hexane : Acetone = 3:1 → 2:1 → 1:1 → 0:1 순으로 용출하여 7개의 fraction을 얻었다. 7개의 fraction 중 전의 활성 성분이 포함되어 있을 것으로 사료되는 4개의 fraction을 *S. aureus*에 대하여 항균성을 검색한 결과(표 22, 그림 77) Fraction 3에서 항균활성이 가장 높게 나타났고 EtOAc layer 각 Fraction을 TLC로 확인했다 (그림 78, 79).



그림 76. EtOAc 분획추출물의 Silicagel column chromatography.

표 22. EtOAc 추출물에서 분획된 4개 fraction의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 활성

Fractions	Con. of fraction (mg/ml)				
	20	10	5	2.5	1.25
	Diameter of inhibition zone (mm)				
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	11.0	8.0	6.0	4.5	4.0
4	7.0	5.0	2.0	-	-

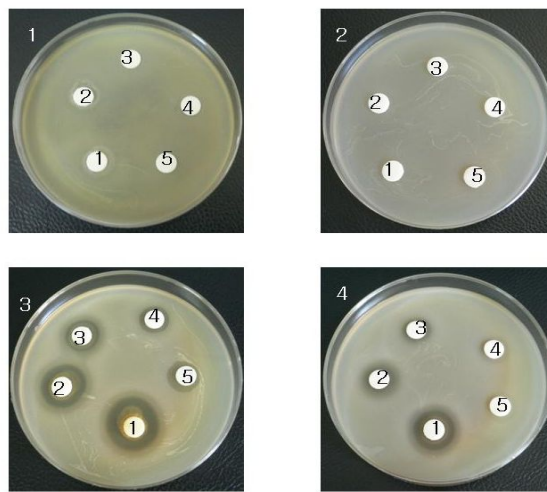
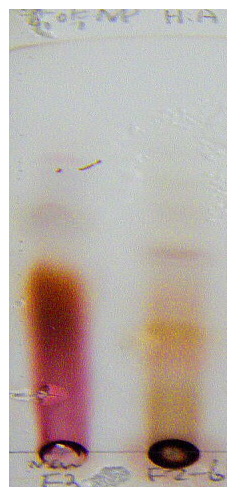


그림 77. EtOAc 추출물에서 분획된 4개 fraction의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 활성.

① 20 mg/ml, ② 10 mg/ml, ③ 5 mg/ml, ④ 2.5 mg/ml, ⑤ 1.25 mg/ml.



Frac. 3 Frac.2-6

그림 78. 활성성분인 frac.2-6 과 Fr 3의 TLC pattern.

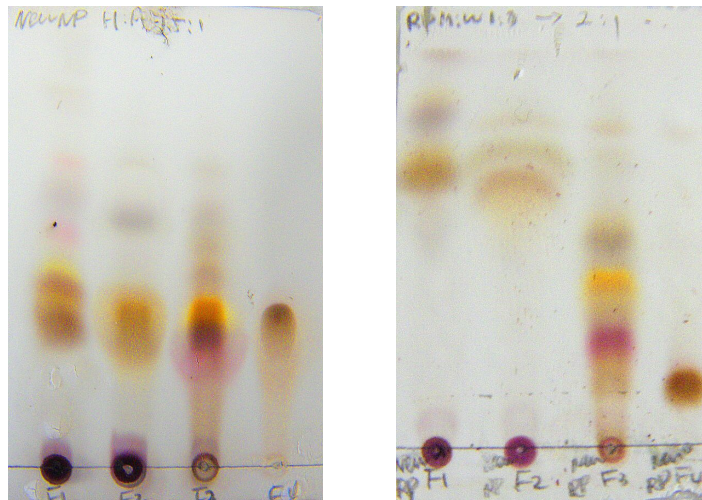
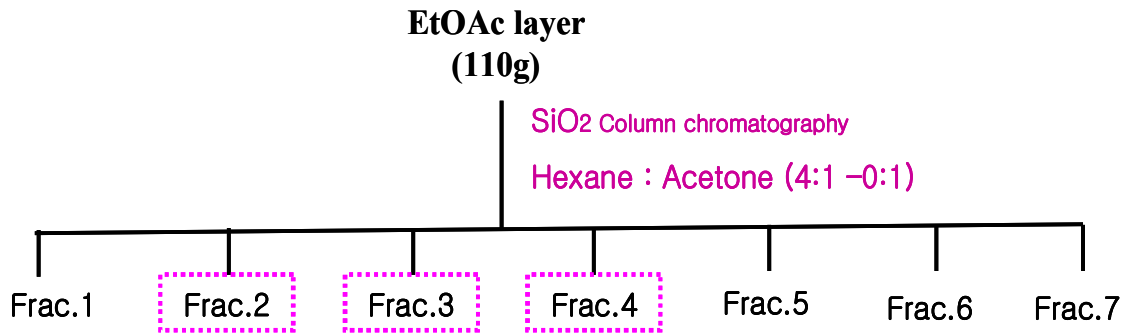


그림 79. EtOAc 추출물에서 Silicagel column chromatography로 분리한 fractions 1-4의 Silica 와 Reverse phase의 TLC pattern.

⑥ EtOAc 분획 추출물 및 각 fraction(Fr 2, 3, 4) HPLC profile 비교분석

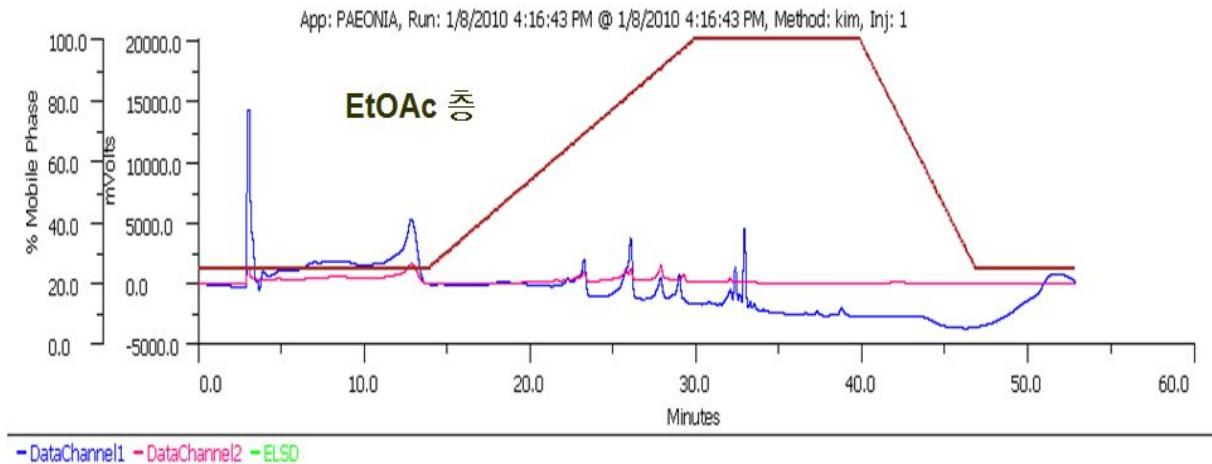
HPLC 시스템과 UV 감지기는 Gilson사에서 구입하였고 컬럼은 Optima Pak C18 column (10× 250 mm, 4.6 μm particle size, RS Tech, Korea)을 사용 하였다.

증류수는 1등급 정제수와 MeOH은 HPLC용 (Burdick & Jackson, USA)을 사용하였다. HPLC에 사용한 시료는 항균효과가 나타난 EtOAc층, Fr.2, Fr.3, Fr.4 를 MeOH 용매로 녹여 10mg/ml의 농도로 조절하였다.

HPLC 분석조건: 컬럼 이동상 용매는 (A) pump HPLC용 MeOH : (B) pump Water(3차 증류수)와 0.1% formic acid을 이용하였으며 용매비율은 MeOH/Water(30/70/V/V)로 gradient 조절하였으며, 유속은 1ml/min로 설정하였다. 시료의 주입량은 30ul로 하였으며 UV 205nm와 254nm로 검출 하였다.

EtOAc 층 추출물로부터 분리한 Frac 2, 3, 4를 HPLC 다음과 같이 분석해본 결과(그림 80, 81, 82, 83), 예비실험에서 검색된 Frac 2-6에 있는 활성성분이 대부분 Fr 3에 함유되어있는 것으로 보이며 Frac 2와 4에도 소량이 존재하는 것으로 확인되었다. 항균실험 결과, Frac 3이 우

수한 활성을 보였고, Frac. 4도 활성능을 보였다. HPLC profile로 이들 두 Fraction을 분석한 결과, Frac. 3과 4에 동일하거나 서로 다른 활성물질이 존재할 것으로 사료되기 때문에 현재 HPLC를 이용하여 Frac. 3와 4를 명확하게 분리정제하기 위하여 실험을 진행하였고, 분리정제 후 다시 항균활성효능을 확인하였다.



Gilson HPLC systems

Solvent system: MeOH in H₂O + 0.1% formic acid

Mobile phase: 0-10min (30%) 10-30 min (30-100%) 32-40 min (100%)
40-48min(100-30%) 48-52min(30%)

Column: Optima pak, 250 mm x 10.mm, 4.6μm particle size);

Flow rate = 1ml/min

UV-detectors: Channel 1(sensitivites:0.001)= 205nm;

Channel 2(sensitivites:0.01) = 254nm

그림 80. EtOAc 분획 추출물의 HPLC profile.

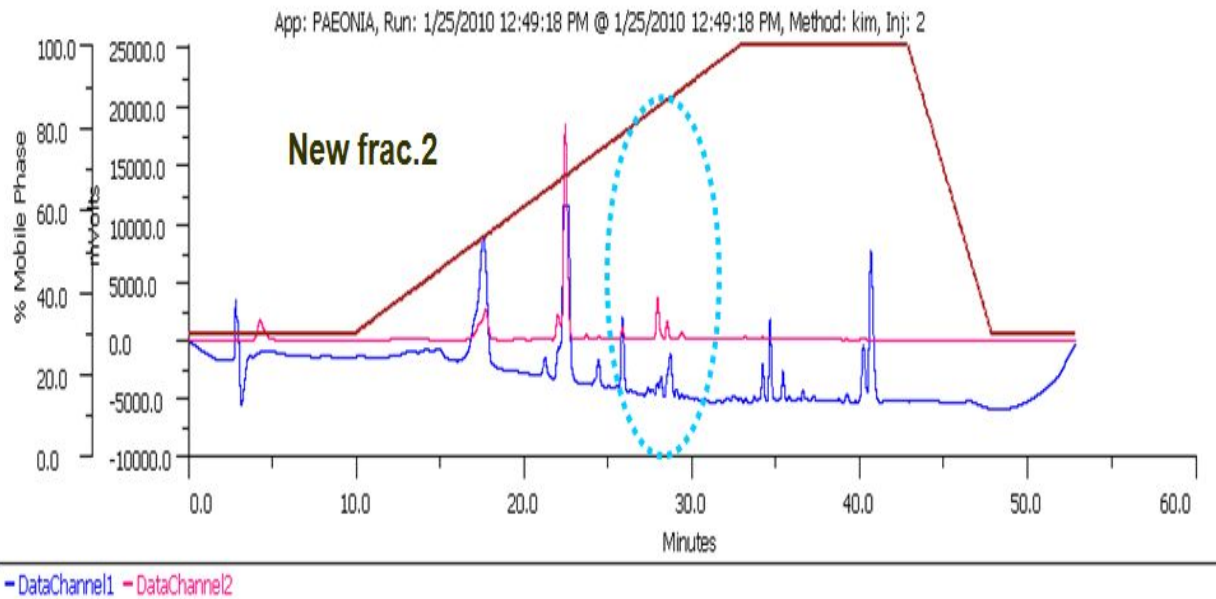


그림 81. Frac. 2의 HPLC profile.

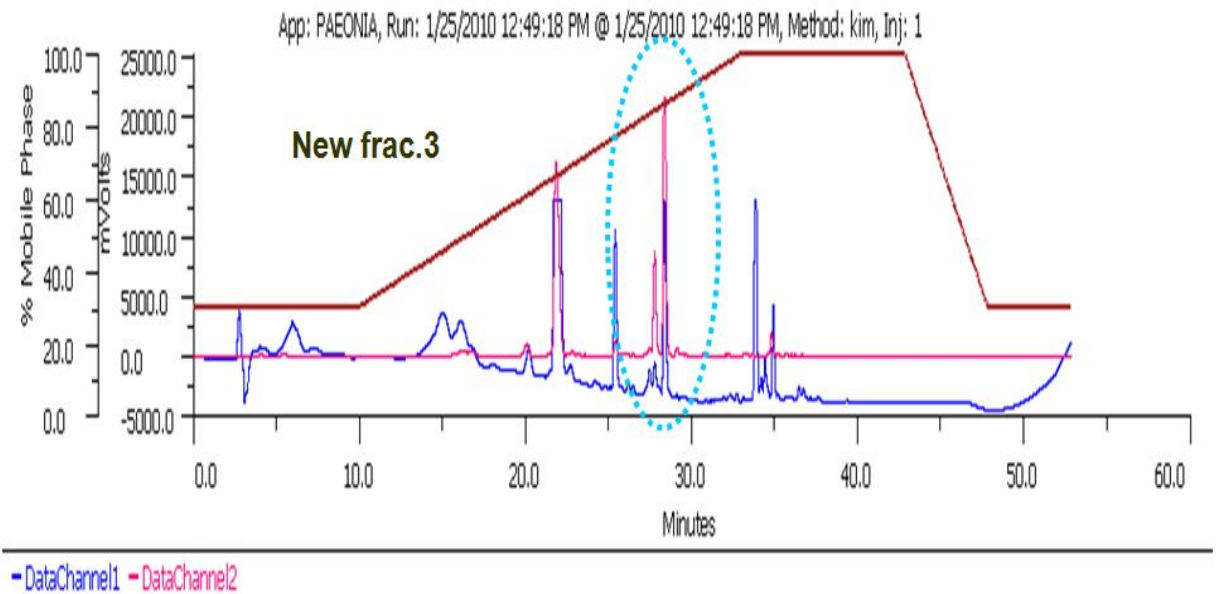


그림 82. Frac. 3의 HPLC profile.

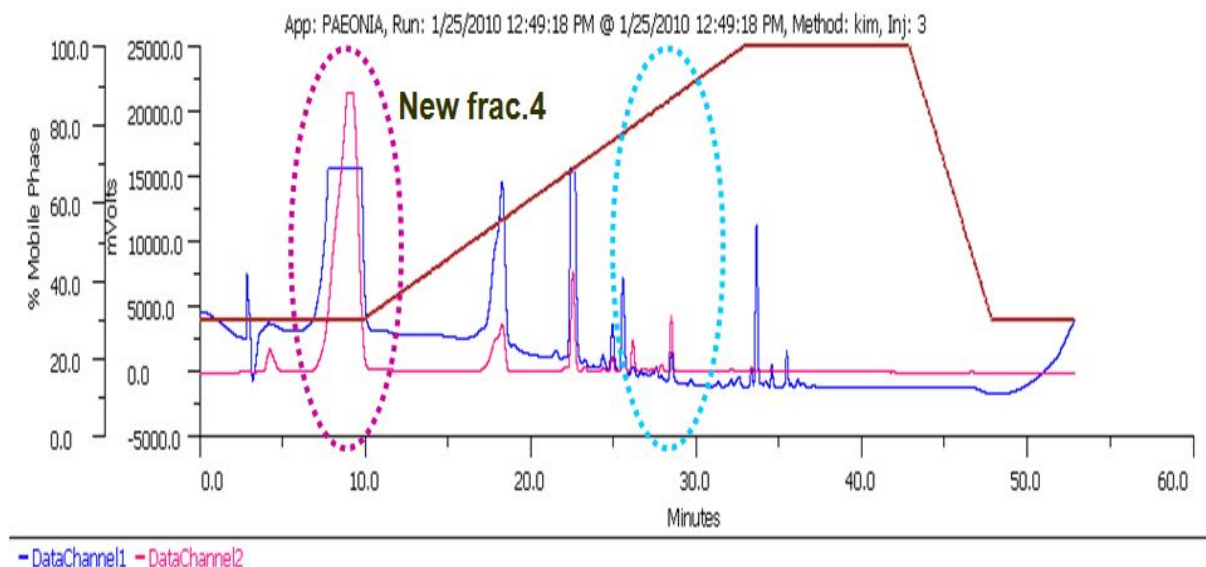


그림 83. Fr 4의 HPLC profile.

⑦ EtOAc 분획 추출물 - Frac. 3의 RP-C18 column chromatography

Frac. 3으로부터 소분획을 얻기 위해 RP-C18을 충전제로 사용하여 column chromatography를 시행하였다. Frac. 3(338mg)에 대하여 MeOH : Water 1:3 → 1:2 → 1:1의 용매비율로 용출하여 6개의 fraction (1-6)을 얻어 TLC로 확인하였다(그림 84). 분리한 fraction(1-6)의 항균활성을 확인한 결과 Frac. 3-4에서 가장 높은 활성을 보였고, 다음으로 Frac.3-5 → Frac.3-3 → Frac. 3-6 순이었다(그림 85, 표 23). Frac. 3으로부터 분리한 6개의 fraction을 표 24와 같은 분석조건으로 HPLC로 확인하였다(그림 86, 87, 88, 89, 90, 91). TLC와 HPLC로 확인 결과, RP TLC상에서 Frac. 3-4와 Frac. 3-5는 같은 Rf치와 색깔을 볼 수 있으며 HPLC 데이터에서는 같은 Retention time이므로 두 fraction은 같은 화합물에 의해 활성을 띄는 것으로 사료된다.

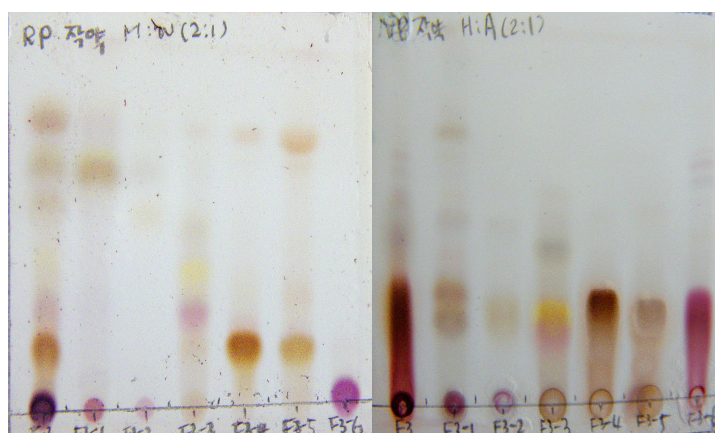


그림 84. fraction 3 으로부터 RP-C18 CC로 분리된 fraction 1-6의 Silica 와 Reverse phase TLC pattern.

표 23. fraction 3 으로부터 RP-C18 CC로 분리된 fraction의 항균활성

Fractions	Inhibition Zone Diameter(mm)				
	0.625(mg/ml)	1.25(mg/ml)	2.5(mg/ml)	5(mg/ml)	10(mg/ml)
3-1	-	-	-	-	-
3-2	-	-	-	-	-
3-3	-	-	2	5	5
3-4.	5	10	12	16.5	19.5
3-5	-	4	5	9	14
3-6	0.5	1	1	1	2

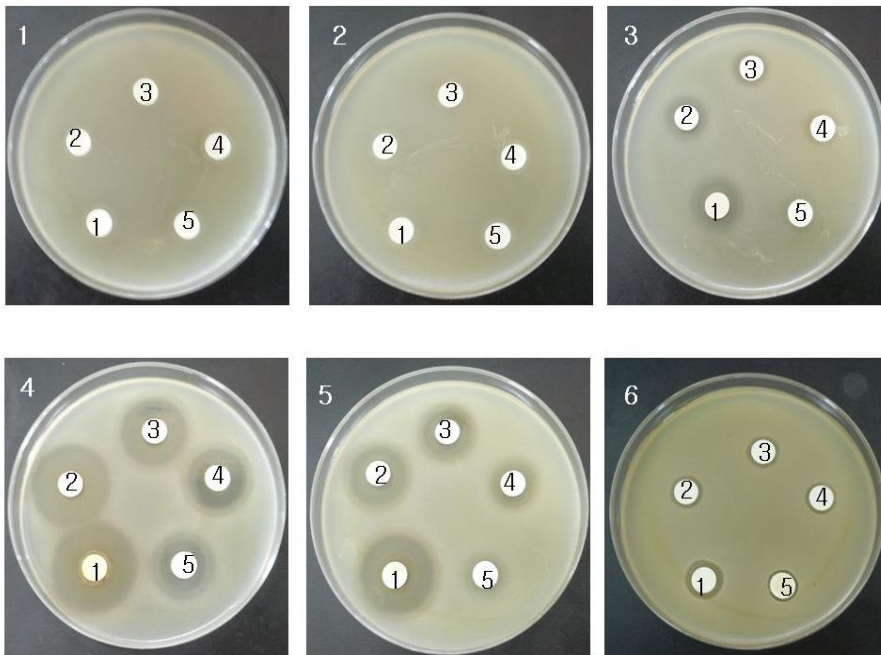


그림 85. Frac. 3의 RP-C18 column chromatography 분획된 6 fractions의 농도별 항균활성. ①10 mg/ml, ②5 mg/ml, ③2.5 mg/ml, ④1.25 mg/ml, ⑤0.625 mg/ml

표 24. 작약 분석을 위한 HPLC 분석 조건

Min	MeOH	H ₂ O(0.1% formic acid)
0'	81	19
10'	81	19
33'	100	0
42'	100	0
46'	100	19
50'	81	19

* column : Optimaapak * Pressure : 700~800psi
 * Flow rate : 2 ml/min * UV : 205,254 nm
 * Injection volumn : 50 μ l

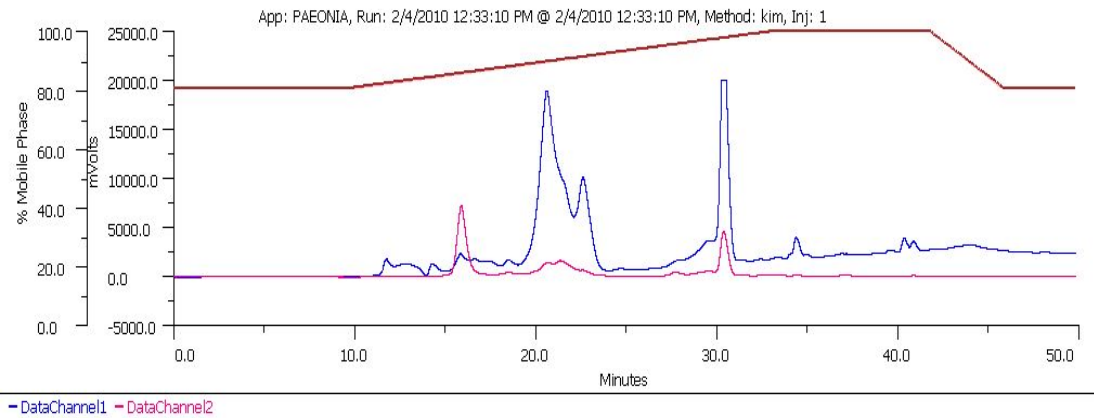


그림 86. Frac. 3-1의 HPLC profile

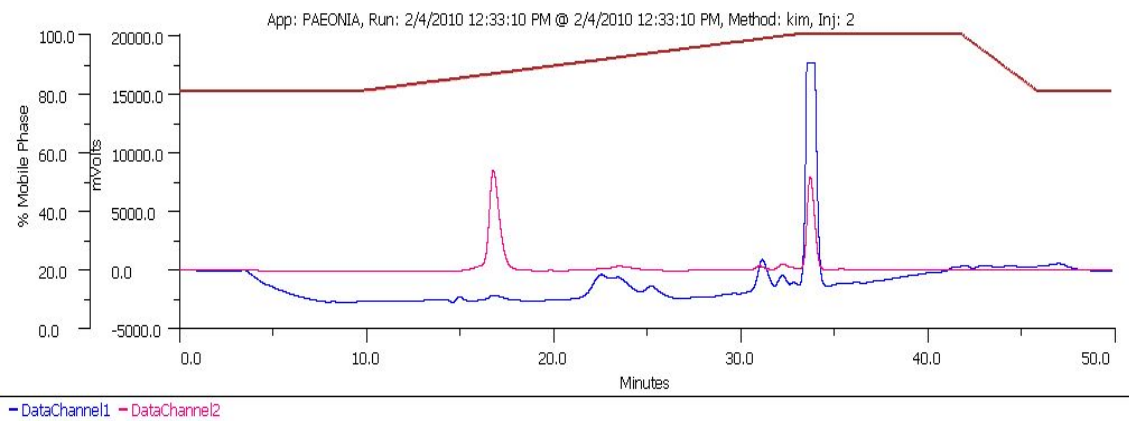


그림 87. Frac. 3-2의 HPLC profile

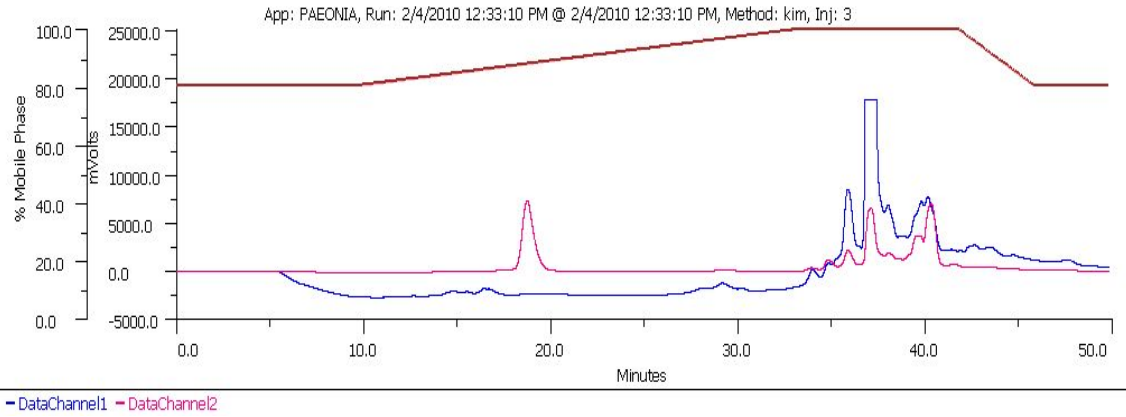


그림 88. Frac. 3-3의 HPLC profile

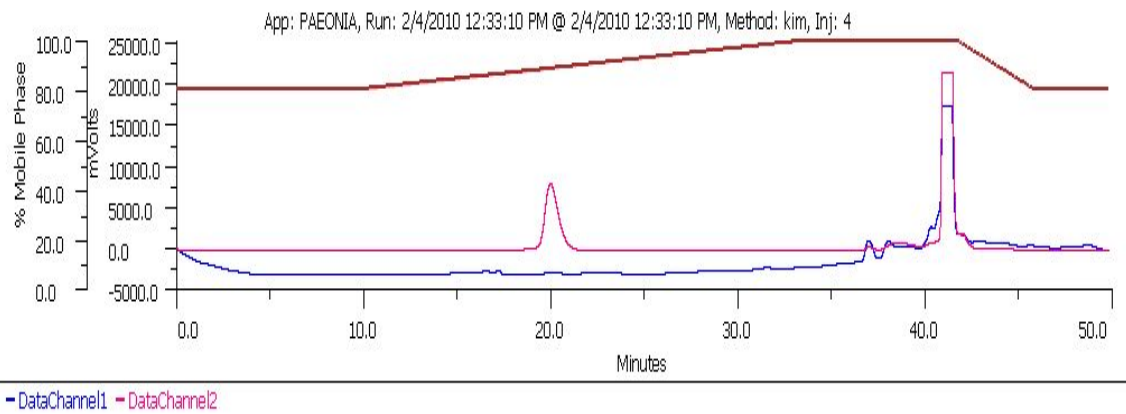


그림 89. Frac. 3-4의 HPLC profile

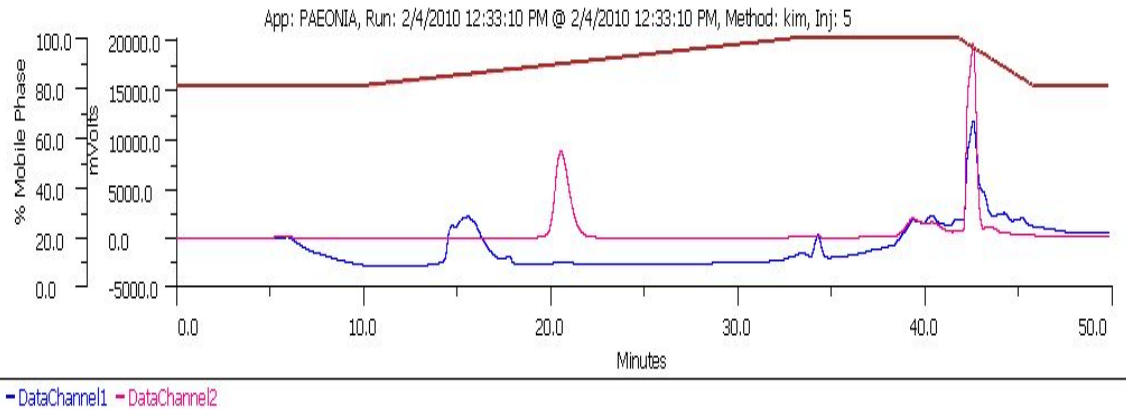


그림 90. Frac. 3-5의 HPLC profile

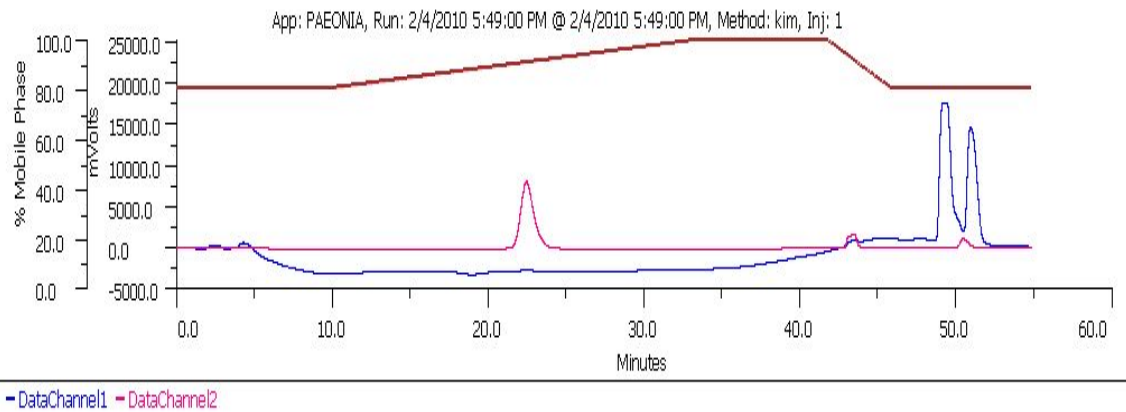


그림 91. Frac. 3-6의 HPLC profile

⑧ EtOAc 분획 추출물 - Frac. 4의 RP-C18 column chromatography

Frac. 4로부터 소분획을 얻기 위해 RP-C18을 충전제로 사용하여 column chromatography를 시행하였다. Frac. 4(800mg)에 대하여 MeOH : Water 1:2 → 1:1 → 3:1의 용매비율로 용출하여 9개의 fraction (1-9)을 얻어 Frac.3에서 분리한 활성 fraction과 비교해 TLC로 확인하였다(그림 92). 얻어진 9개의 fraction의 항균활성을 확인한 결과 Frac. 4-8에서 가장 높은 활성을 보였고, 다음으로 Frac. 4-3 → Frac. 4-7 → Frac. 4-9 → Frac. 4-6 순이었다(표 25)(그림 93). 항균활성 결과 fraction 4에서 활성이 가장 잘 나온 frac.4-8은 HPLC로 비교해 본 결과 Frac. 3-4과 동일 화합물로 판명 되었고 활성이 두 번째인 Frac. 4-3은 HPLC 분석결과 두 가지 화합물로 나왔다. (그림 94, 95).

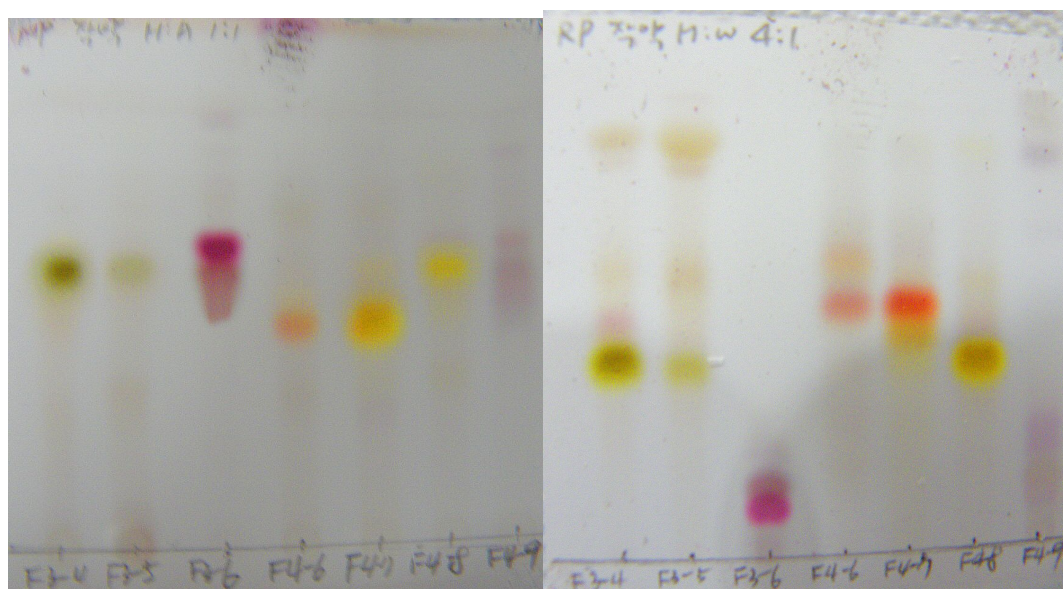


그림 92. frac. 3과 4에서 분리된 활성 fraction의 Silica 와 Reverse phase TLC pattern.

표 25. fraction 4 으로부터 RP-C18 CC로 분리된 fraction의 항균활성

Fractions	Inhibition Zone Diameter(mm)				
	0.625(mg/ml)	1.25(mg/ml)	2.5(mg/ml)	5(mg/ml)	10(mg/ml)
4-1	-	-	-	-	-
4-2	-	-	-	-	-
4-3	-	-	-	8	13.5
4-4	-	-	-	-	-
4-5	-	-	-	-	-
4-6	-	2	3	3	4
4-7	-	-	4	4	6.5
4-8	-	4.5	11.5	14.5	17.5
4-9	3	3	4	4	5

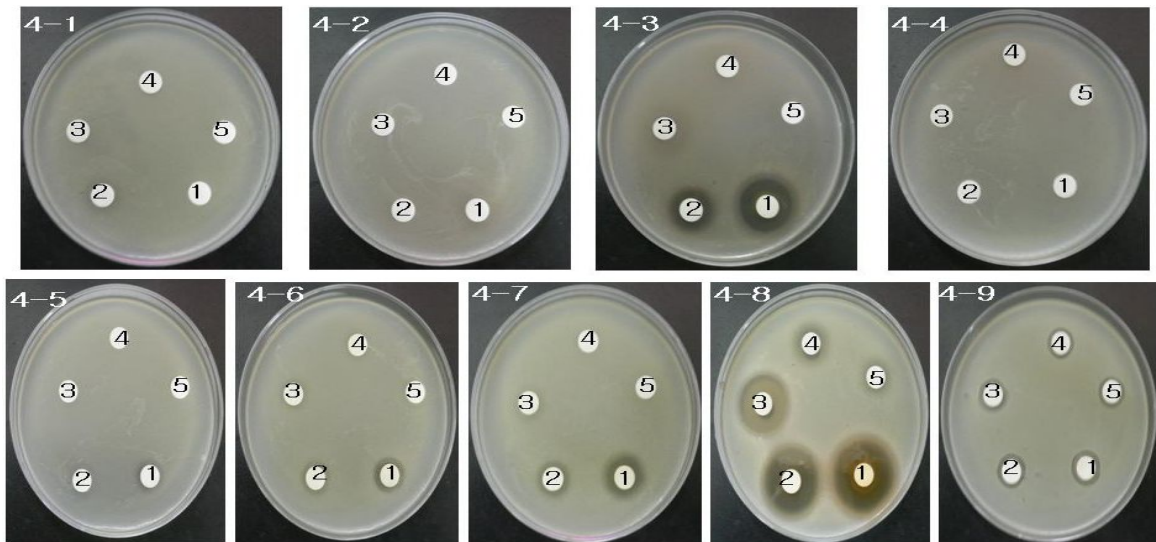


그림 93. Frac. 4의 RP-C18 column chromatography 분획된 9가지 fractions의 농도별 항균활성. ①10 mg/ml, ②5 mg/ml, ③2.5 mg/ml, ④1.25 mg/ml, ⑤0.625 mg/ml

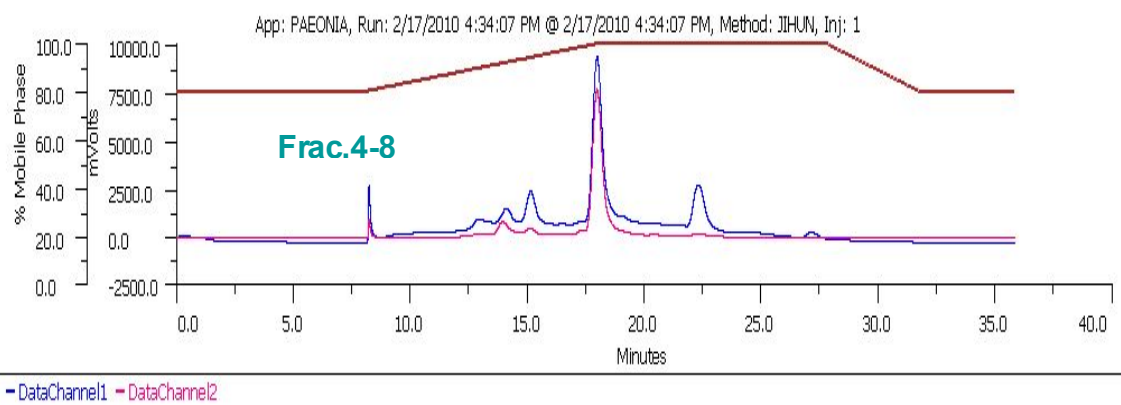
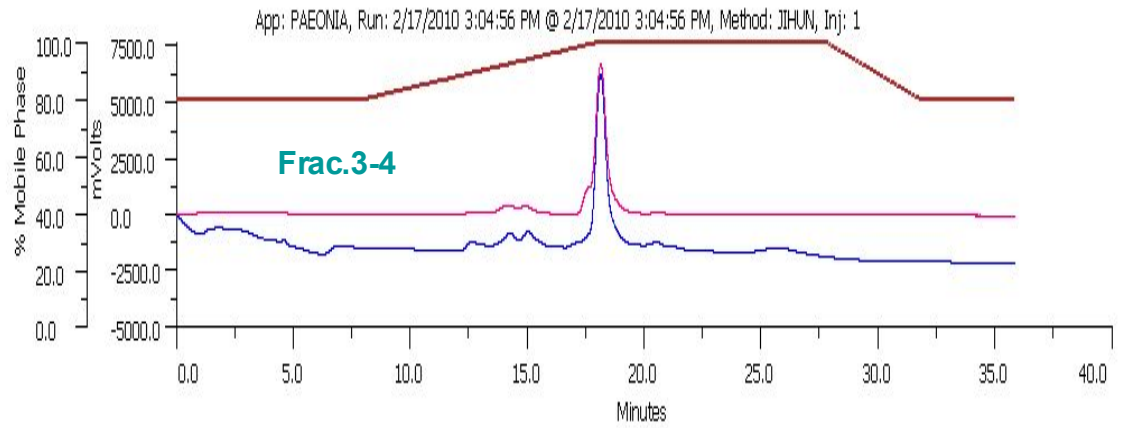


그림 94. Frac. 3-4 과 Fr.4-8의 HPLC profile

Frac.4-3, MeOH 50% 30 min '

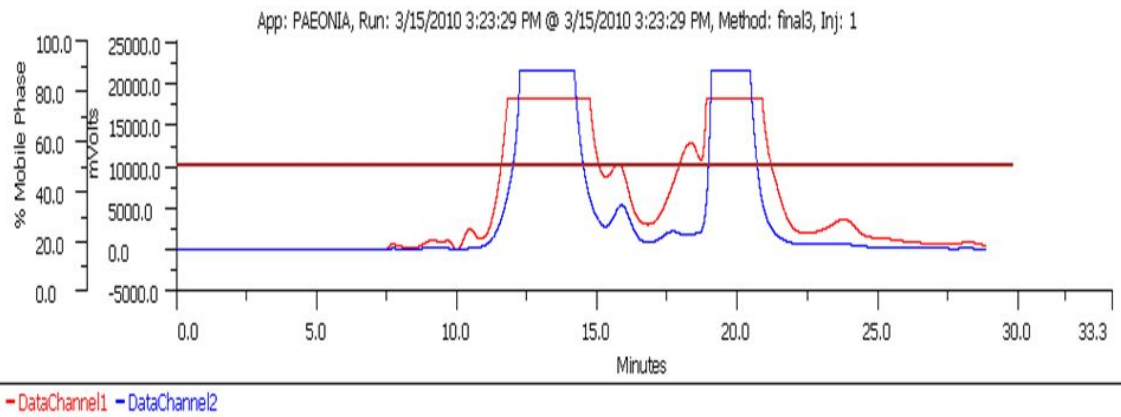


그림 95. Frac. 4-3의 HPLC profile

⑨ 단일물질 분리정제 및 ^1H NMR을 이용한 활성화합물의 구조분석

^1H NMR 분석은 Varian의 inova 300 and 500MHz spectrometer를 사용하여 측정 하였다. 항균활성이 좋았던 fraction 4에서 분리된 Frac. 4-3을 HPLC를 이용하여 분리·정제하여 두 화합물 4-3.1과 4-3.2를 얻어서 ^1H NMR 분석을 하였다. 4-3.1은 Methyl gallate, 4-3.2는 Methyl-O-methyl gallate로 결정하였다(그림 96, 97).

4-3.1의 ^1H -NMR을 보면 δ : 3.73(3H, s, COOCH_3), δ : 6.93(2H, s, H-2, 6); ^{13}C -NMR을 보면 δ : 119.1(C-1), δ : 108.7(C-2, 6), δ : 138.6(C-4), δ : 166.5(COOCH_3), δ : 51.8 (OCH₃)로 나타났다(그림 98, 99).

4-3.2의 ^1H -NMR을 보면 δ : 3.81(3H, s, COOCH_3), δ : 3.86(3H, s, COOCH_3), δ : 7.15(1H, dd, H-2) δ : 7.21(1H, dd, H-6); ^{13}C -NMR을 보면 δ : 121.6(C-1), δ : 111.6(C-2), δ : 148.6(C-3), δ : 139.7(C-4), δ : 145.8(C-5), δ : 105.7(C-5) δ : 167.1(COOCH_3), δ : 56.59(OCH₃), δ : 52.07(OCH₃)로 나타났다(그림 100, 101).

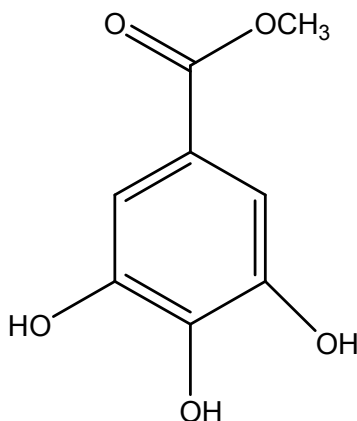


그림 96. Frac. 4-3.1(Methyl gallate)

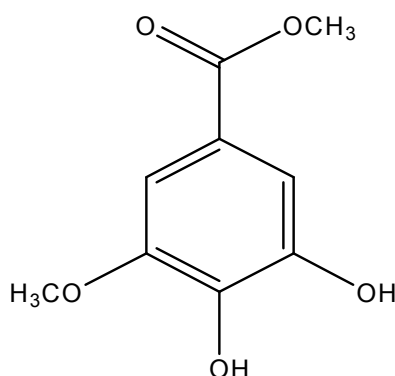


그림 97. Frac. 4-3.2(Methyl-O-Methylgallate)

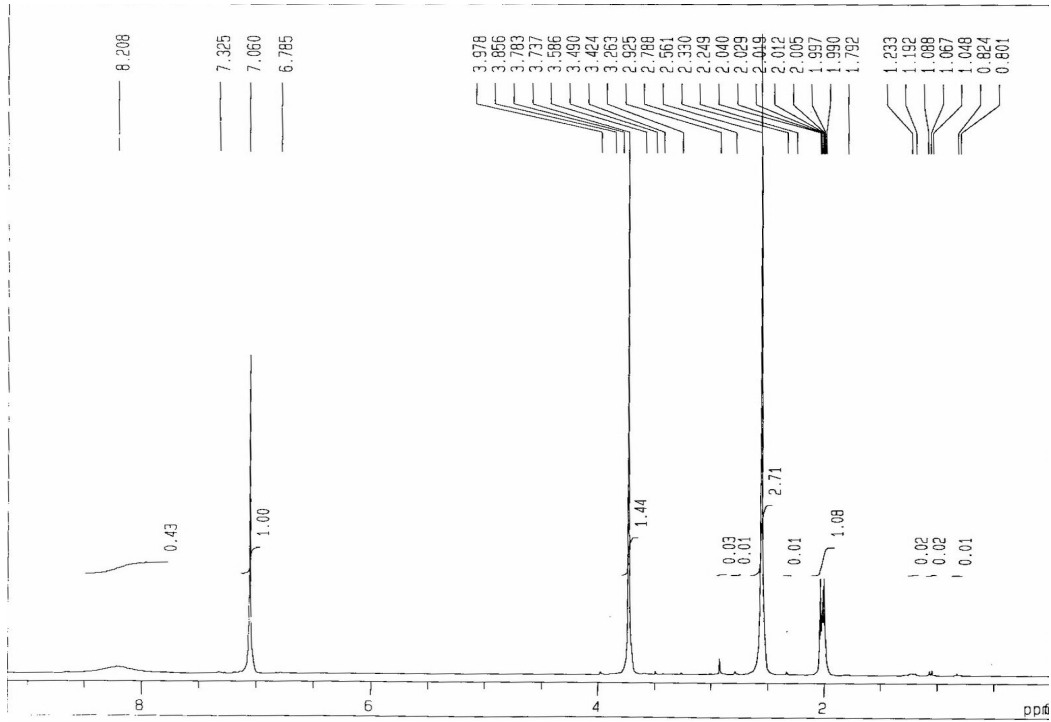


그림 98. Frac. 4-3.1 의 ^1H NMR spectrum. (300MHz, acetone- d_6)

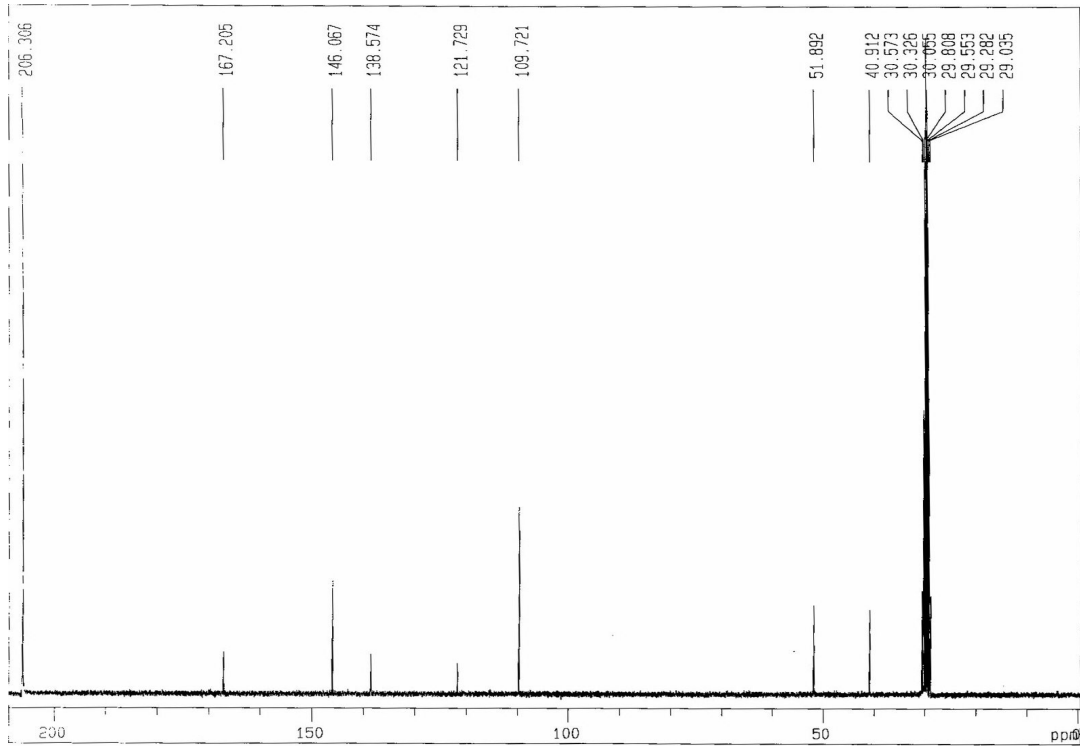


그림 99. Frac. 4-3.1 의 ^{13}C NMR spectrum. (75MHz, acetone- d_6)

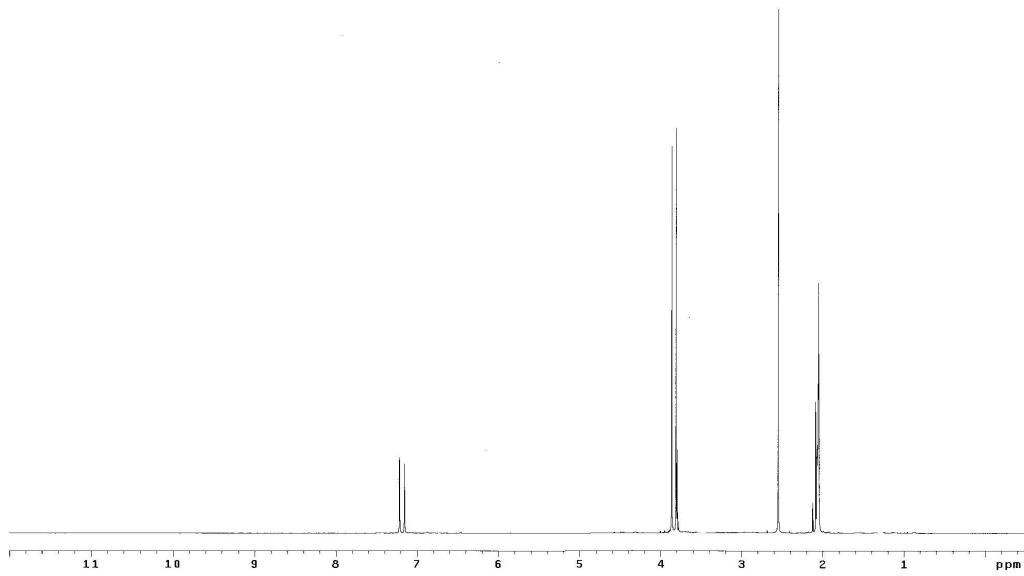


그림 100. Frac. 4-3.2 의 ^1H NMR spectrum. (500MHz, acetone- d_6)

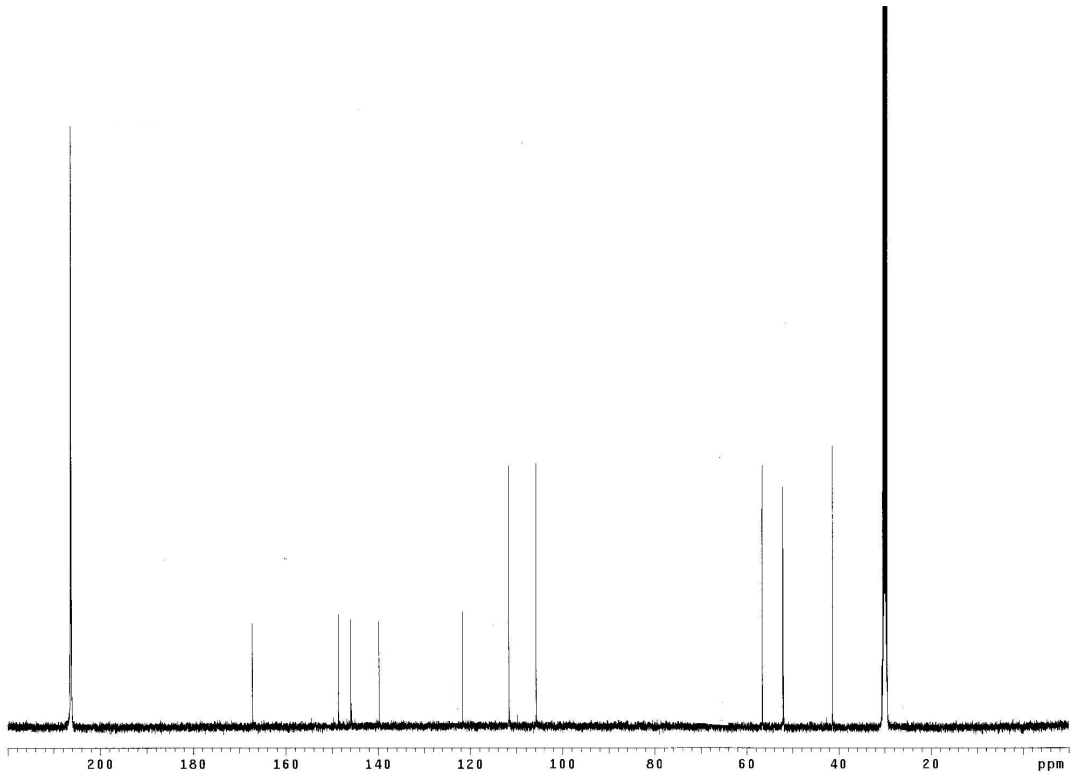


그림 101. Frac. 4-3.2 의 ^{13}C NMR spectrum. (100MHz, acetone- d_6)

(라) 탈과립 억제능(β -hexosaminidase assay) 분석을 통한 추출물의 아토피 피부염 소양증 개선효과 검증

① 작약구근 추출물의 탈과립 억제활성

1차적으로 독성테스트를 하여 독성이 없는 농도를 설정하였고, 2차적으로 독성이 없는 조건의 추출물 농도에서 작약의 탈과립 억제효과를 분석한 결과, 농도 의존적으로 탈과립 억제 효과가 있음을 알 수 있었으며, 마지막으로 탈과립 억제능을 측정된 농도에서 독성테스트를 실시한 결과, 독성이 없음을 확인하였다(그림 102, 103).

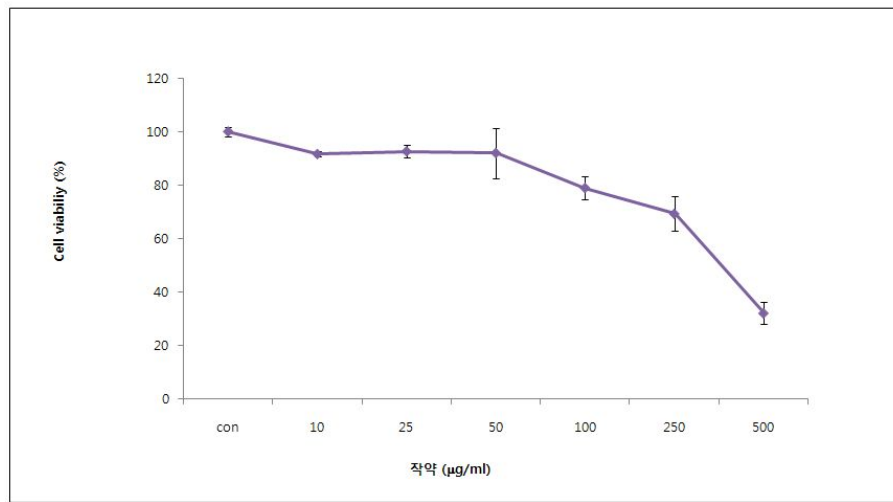


그림 102. 작약구근 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 세포 생존율. (\pm S.D., n=4).

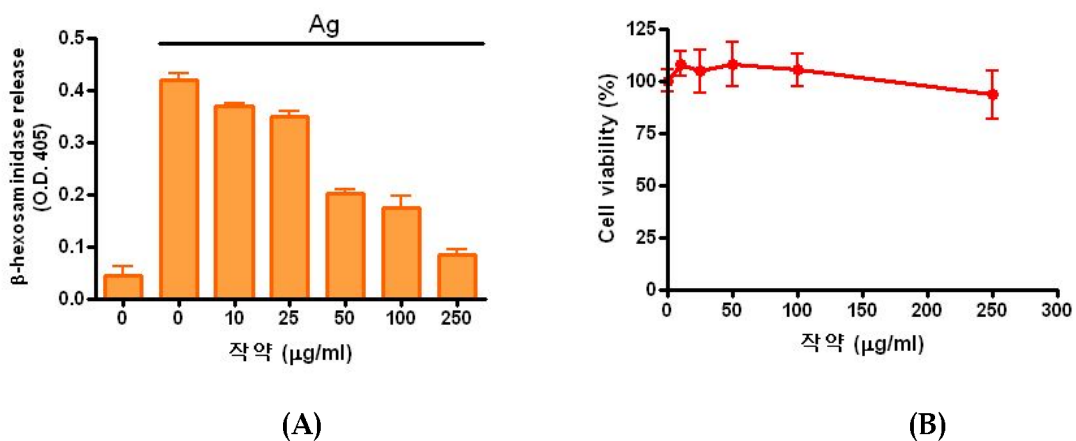


그림 103. 작약구근 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 탈과립 억제효과 및 세포독성.

(A) Degranulation of RBL-2H3 cells, (B) Cytotoxicity. (\pm S.D., n=3).

② 대추열매 추출물의 탈과립 억제활성

1차적으로 독성테스트를 하여 독성이 없는 추출물의 농도를 설정하였고, 2차적으로 독성이 없는 조건에서 추출물의 탈과립 억제효과를 측정한 결과, 농도 의존적으로 탈과립 억제효과가 나타남을 알 수 있었으며, 마지막으로 탈과립 억제효과를 보인 추출물의 농도로 독성테스트를 실시한 결과, 독성이 없음을 확인하였다(그림 104, 105).

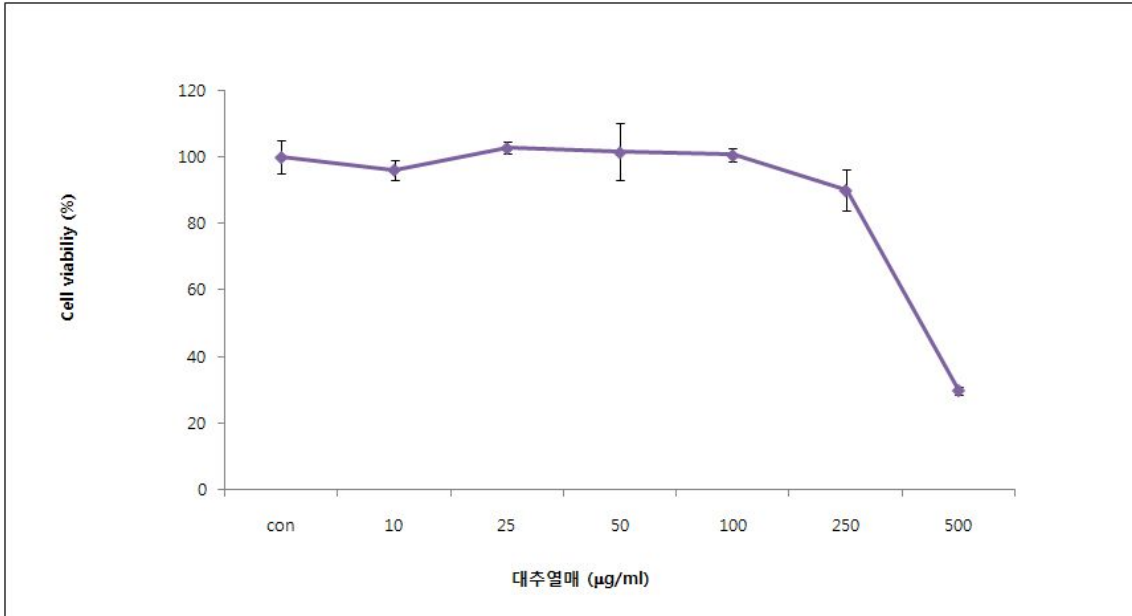


그림 104. 대추열매 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 세포 생존율. (\pm S.D., n=4).

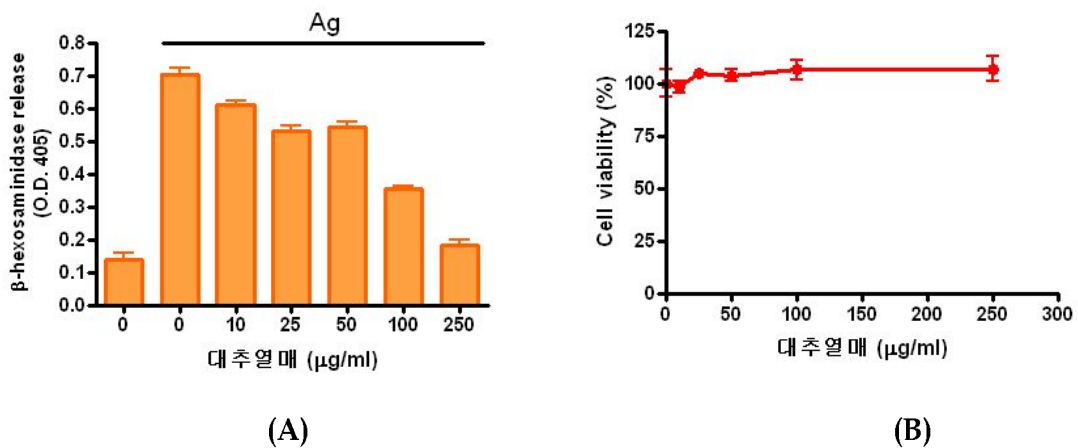


그림 105. 대추열매 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 탈과립 억제효과 및 세포독성.

(A) Degranulation of RBL-2H3 cells, (B) Cytotoxicity. (\pm S.D., n=3).

③ 줄풀 추출물의 탈과립 억제활성

1차적으로 독성테스트를 하여 독성이 없는 농도를 설정하였고, 2차적으로 독성이 없는 조건에서 추출물의 탈과립 억제효과를 측정한 결과, 추출물이 농도 의존적으로 탈과립 억제효과를 나타냈다. 100 ug/ml의 농도에서 탈과립을 거의 억제하였음을 알 수 있었으며, 마지막으로 탈과립 억제효과를 보인 추출물 농도에서 독성테스트를 실시한 결과, 독성이 없음을 확인하였다(그림 106, 107).

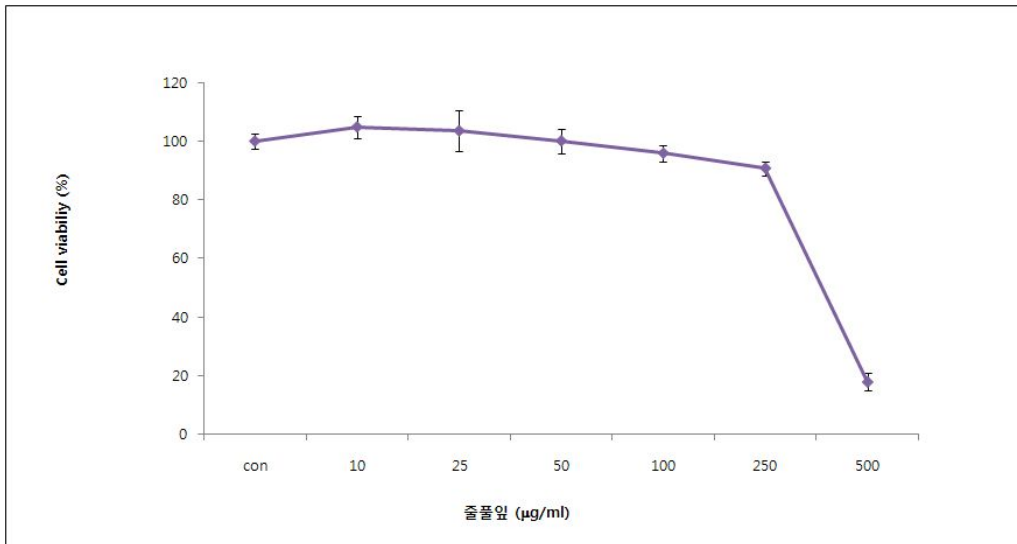


그림 106. 줄풀 지상부 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 세포 생존율. (\pm S.D., n=4).

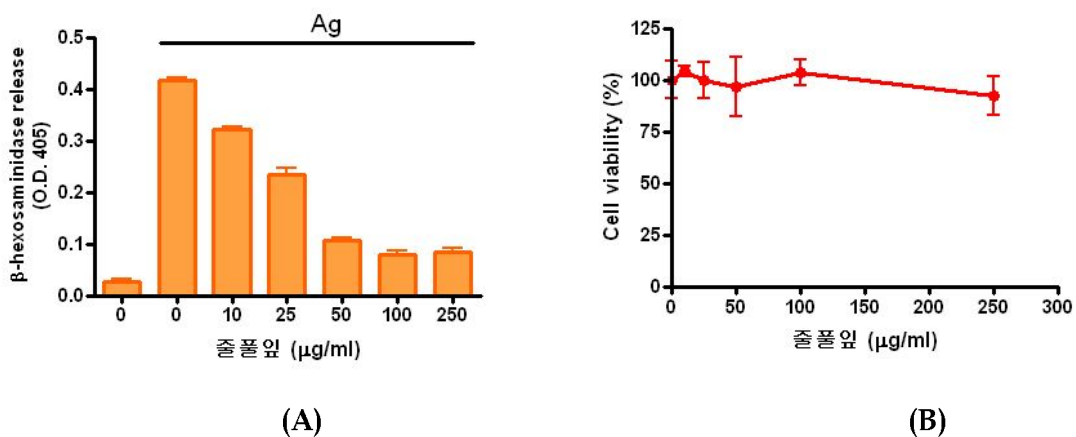


그림 107. 줄풀 지상부 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 탈과립 억제효과 및 세포독성.

(A) Degranulation of RBL-2H3 cells, (B) Cytotoxicity. (\pm S.D., n=3).

④ 측백 종자 (백자인) 추출물의 탈과립 억제활성

1차적으로 독성테스트를 하여 독성이 없는 농도를 설정하였고, 2차적으로 독성이 없는 조건에서 백자인 추출물의 탈과립 억제효과를 측정하였다. 농도 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 80% 정도의 탈과립 억제효과가 나타났으나 다시 농도가 높아지면서 증가하는 것으로 나타났다. 마지막으로 탈과립 억제효과를 나타낸 농도로 독성테스트를 실시한 결과, 독성이 없음을 확인하였다(그림 108, 109).

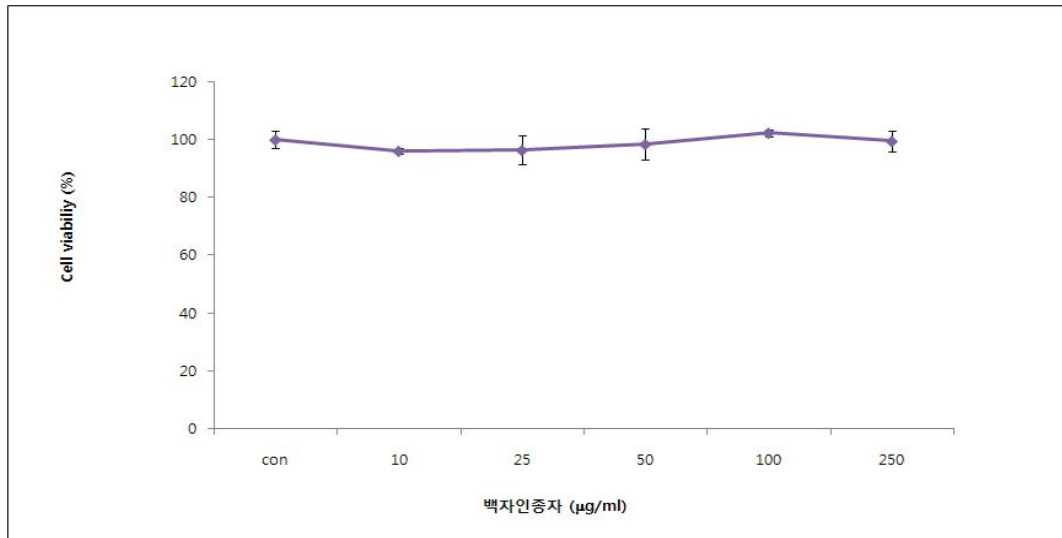


그림 108. 측백 종자 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 세포 생존율. (\pm S.D., n=4).

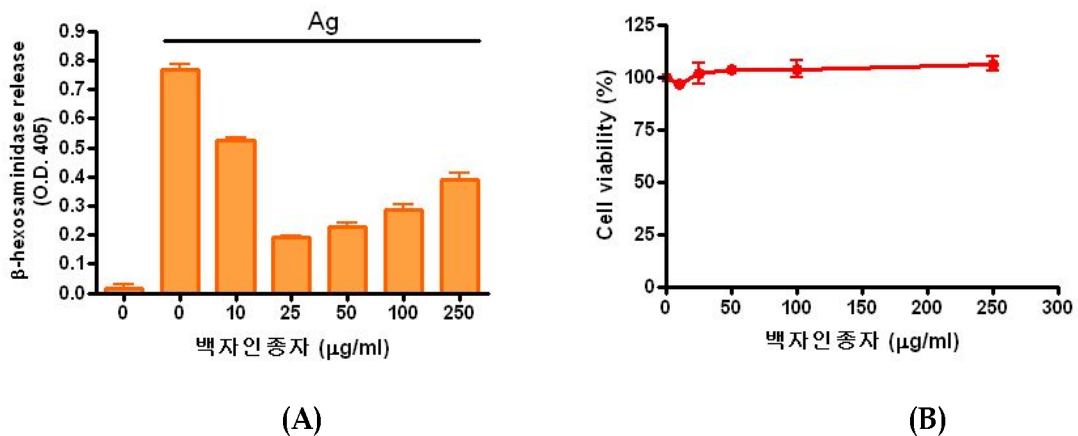


그림 109. 측백 종자 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 탈과립 억제효과 및 세포독성. (A) Degranulation of RBL-2H3 cells, (B) Cytotoxicity. (\pm S.D., n=3).

⑤ 미치광이풀 추출물의 탈과립 억제활성

1차적으로 독성테스트를 하여 독성이 없는 농도를 설정하였고, 2차적으로 독성이 없는 조건에서 미치광이풀 추출물의 탈과립 억제효과를 측정하는 결과, 탈과립 억제능을 보이지 않았다(그림 110, 111).

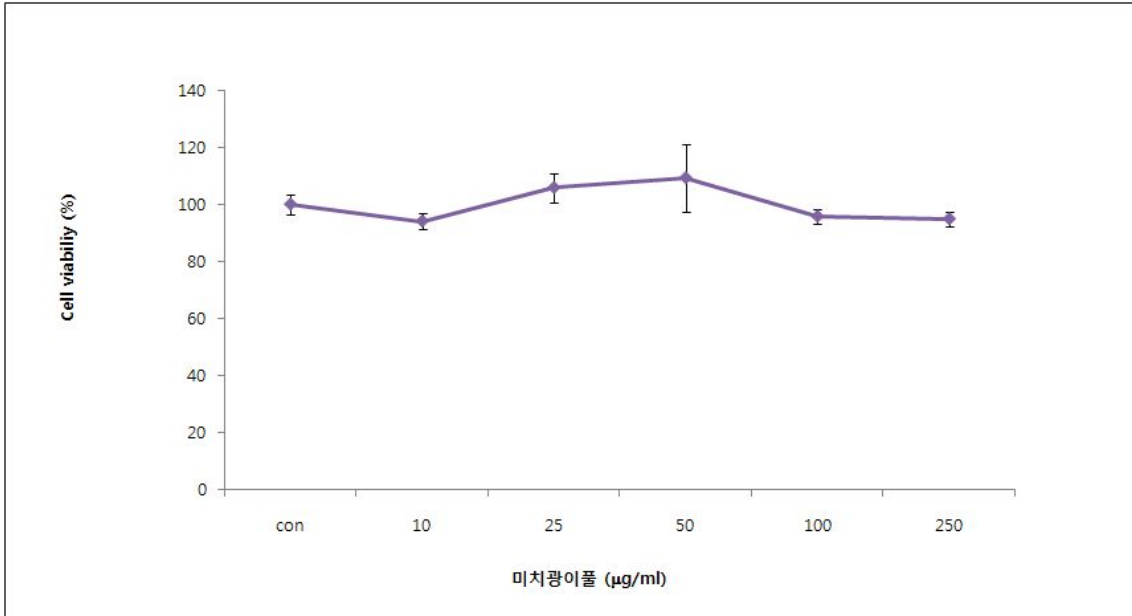


그림 110. 미치광이풀 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 세포 생존율. (\pm S.D., n=4).

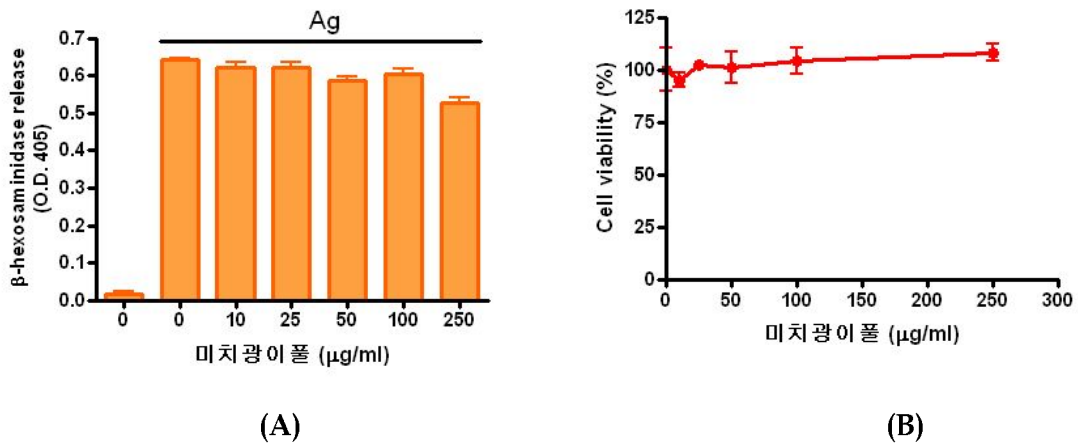


그림 111. 미치광이풀 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 탈과립 억제효과 및 세포독성. (A) Degranulation of RBL-2H3 cells, (B) Cytotoxicity. (\pm S.D., n=3).

⑥ 측백 잎 추출물의 탈과립 억제활성

1차적으로 독성테스트를 한 결과 다른 생약초에 비하여 독성이 강하게 나타나 독성이 없는 저농도로 측백 잎의 탈과립 억제효과를 측정된 결과, 탈과립 억제효과를 나타내지 않았다(그림 112, 113).

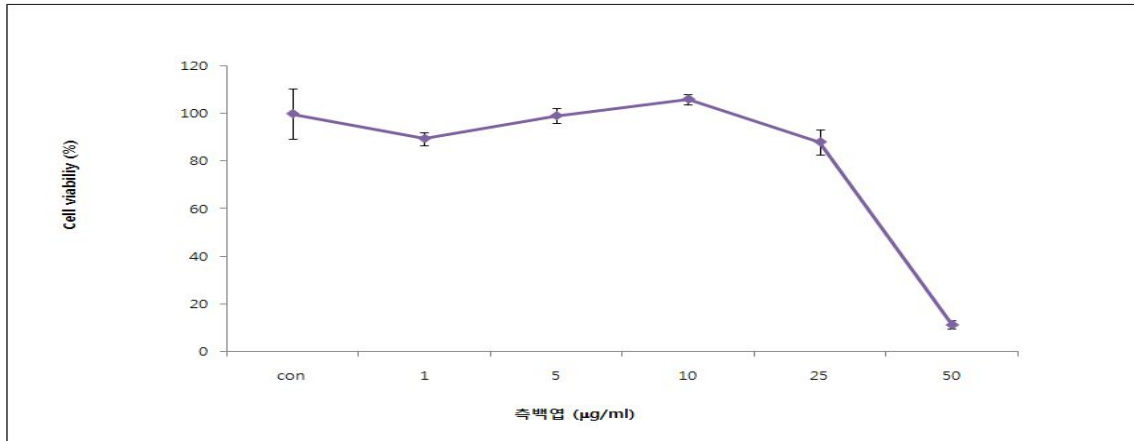


그림 112. 측백 잎 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 세포 생존율. (\pm S.D., n=4).

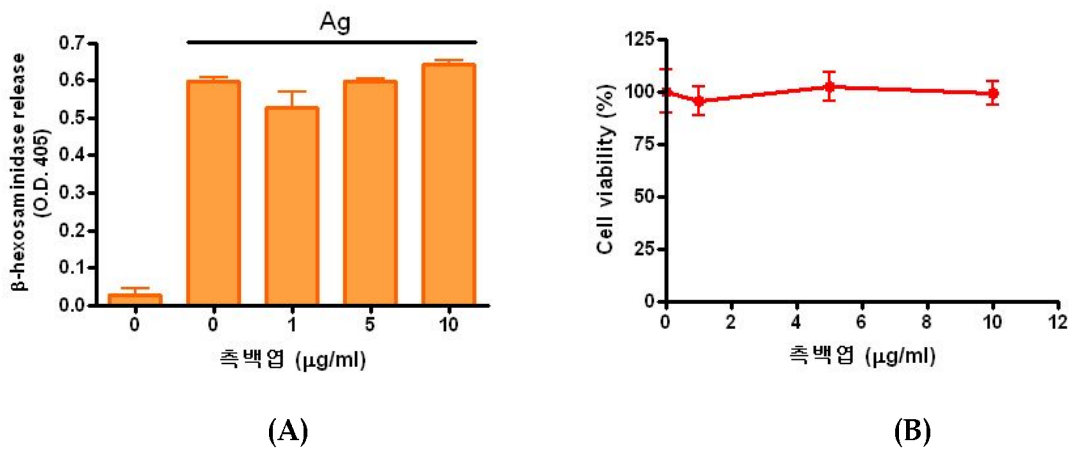


그림 113. 측백 잎 추출물의 RBL-2H3 cells에 대한 탈과립 억제효과 및 세포독성.

(A) Degranulation of RBL-2H3 cells, (B) Cytotoxicity. (\pm S.D., n=3).

이상의 결과와 같이 5종의 생약초 추출물이 아토피 피부염 환자에 유발되는 소양증을 개선할 수 있는지 탈과립 억제능(β -hexosaminidase assay) 분석을 통하여 확인한 결과, 미치광이풀, 측백 잎을 제외한 작약구근, 대추열매, 줄풀에서 상당한 탈과립 억제능을 보였음을 알 수 있었으며, 특히 줄풀 추출물은 저농도에서 우수한 억제능을 보였다.

나. 2차년도

피부의 가장 외층인 표피는 외부 환경으로부터 인체를 보호할 뿐 아니라 수분 증발 및 손실을 억제하여 피부의 건조화를 방지한다. 건강한 표피는 15 ~ 20%의 수분을 함유하고 있으며 수분이 10% 이하로 떨어지면 피부가 건조해지고, 거칠며 윤기가 없어져 피부 손상이 일어난다. 피부 건조가 일어나는 대표적인 질환으로 건선염과 아토피피부염이 알려져 있는데 이 중 특히 아토피피부염의 주 증상은 피부건조증과 소양증인데 이것들은 각질층의 장벽기능이 손상되어 외부의 자극물질이나 항원에 쉽게 반응하는 면역학적 이상반응이 증상 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다. 보통 아토피 피부염의 면역지표는 혈액 내 IgE의 농도와 호산구 수의 증가정도이다. 또한 혈액 내 IgC는 독성물질이나 바이러스를 없애며, 백혈구의 식·살균작용을 보조한다. 혈액 내 IgE의 증가는 혈액 내 IgG1의 증가에도 관여한다. 아토피 피부염은 항원의 자극을 받아 항체 IgE가 생산되고, 비만세포의 고친화성 수용체 (high affinity receptor)와 IgE가 결합한 상태에서 다시 항원의 자극을 받을 경우 알레르기 유발물질인 Cytokine, Histamine, Leukotrienes를 분비한다. 이 알레르기 유발 물질들의 분비로 인해 염증과 가려움증을 나타낸다. 따라서 아토피 피부염을 일으키는 중요한 인자인 IgE를 감소시키는 것이 아토피 피부염을 근본적으로 치료하는데 중요하다고 생각된다. 그러므로 아토피성 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐의 등에 토종꿀과 생약초 및 수용성 키토산이 최적의 비율로 혼합된 용액을 처리하여 IgE의 변동과 임상적 효과를 육안으로 검증하여 향후 대체요법으로써의 다양한 연구를 진행하는데 도움을 주고 나아가 아토피 환자의 치료에 활용할 수 있는 기초 자료를 얻고자 하였다.

(1) 연구 방법

(가) 아토피피부염이 유발된 동물 모델화

① 동물

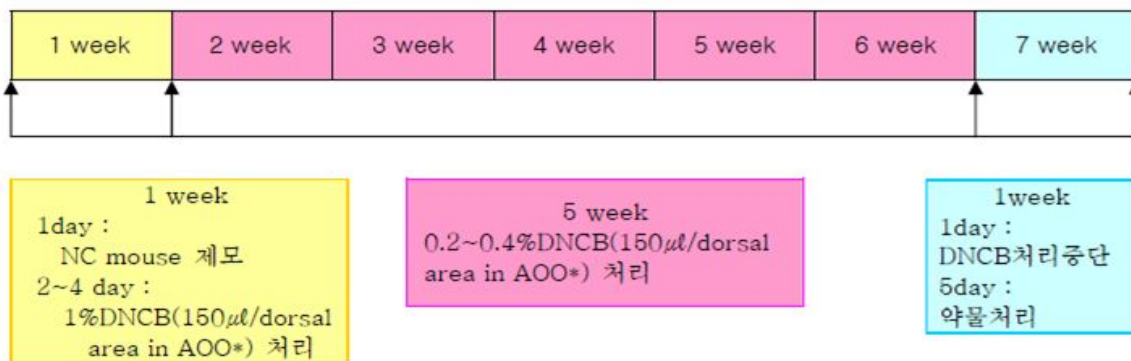
본 실험에 사용된 NC/Nga 마우스는 IgE의 과생성에 의해 동반된 아토피성 피부염의 형태가 임상적으로나 조직학적으로 인간의 아토피성 피부염의 병변과 매우 흡사한 양태를 나타내고 X선조사와 오범아부민에 의해 유도되는 과민반응에 매우 민감하여 일반 재래 환경에서 아토피성 피부염과 같은 피부 습진성 상처가 쉽게 유발되는 실험동물이다. 수컷 5주령의 NC/Nga 마우스는 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 공급받아 입수 시 외관을 육안적으로 검사한 후 시험을 실시할 동물실에서 7일간 순화하면서 일반증상을 관찰하였다. 사료는 피드랩에서 생산된 Feedlab Formula M-07를 자유롭게 섭취하도록 하였고 물은 미세여과기를 이용하여 멸균한 물을 물병을 이용하여 자유 섭취 시켰다. 사육 조건은 온도 23 ± 3 °C, 습도 55 ± 15 %, 환기 횟수는 전외기 공조방식으로 10 ~ 20 회/hr, 조명조건은 조도 150 ~ 300 Lux로 12hr/day(08:00 점등 ~ 20:00 소등) 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 순화, 검역 및 관찰기간 중 스테인레스 망 사육상자에 동물을 2 ~ 3수로 수용하여 사육하였다.

② 시료

본 실험에 사용된 시료는 순천대학교로부터 공급받은 2가지 sample을 냉장보관하면서 사용하였다. sample 1(KL A)는 토종꿀 100ml에 작약이 100mg 혼합되어진 용액이며, sample 2(KL B)는 sample 1에 수용성키토산(MW10)이 1,000mg 혼합되어진 용액이다. 약물 대조군으로는 노바티스사의 피메크로리무스 크림 1%을 구매하여 25℃이하로 보관하면서 사용하였다.

③ 아토피피부염 유발

입수 후 일주일 동안 자유로운 식이와 식수를 제공받으면서 순화되어진 NC/Nga 마우스의 등을 귀 하단부에서 꼬리 상단부까지 전체를 제모하고 24시간 방치한 후, 2 ~ 4일에, 1% DNCB(dinitrochlorobenzene; 150 μ l/dorsal area in AOO(아세톤 : 올리브오일 = 3:1))를 처리하였다. 그 후 5주 동안 0.2 ~ 0.4 % DNCB(150 μ l/dorsal area in AOO)를 처리하여 아토피 성 피부염을 유발시켰다. 7주째 되는 첫째날에 DNCB 처리를 중단하고 그 후 5일 동안 1일 2회씩 본 혼합용액을 마우스의 등에 도포하였다. 약물대조군으로 피메크로리무스 크림 1%을 동일한 방법으로 도포하였다(그림 114).



*AOO (Acetone : Olive Oil = 3 : 1)

*실험중간에 털이 자라나면 지속적으로 제모

그림 114. 아토피피부염 모델 유도 방법

(나) 생리활성물질의 관능 평가

① 체중 변화 측정

시험물질 도포 후부터 매일 측정하여 평가하였다.

② 관능평가

일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가 법을 이용하였으며 아토피 피부염의 심각성 정도를 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총합으로 나타낸다. 평가 항목에 대한 육안 평가 결과는 표 26의 다섯 가지 항목을 시험물질 도포 후부터 1,3,7,14일이 되는 시점에 실시한다. 평가 항목은 발적과 출혈, 가피형성과 건조, 부종, 조직 손상, 이 조직 손상이다. 각각의 항

목에 대해 증상 없음(0점), 증상 약함(1점), 중증도(2점), 심함(3점)으로 채점한 후, 모든 항목의 점수를 합산함으로써 최소 0점(아무증상이 없는 상태)에서 최고 15점(모든 항목의 증상이 심한 상태)사이의 평가점수를 부여한다(표 26).

표 26. 피부염 관능 평가 항목

평가항목 \ Score	없음	약함	중증도	심함
발적, 출혈	0	1	2	3
가피형성, 건조	0	1	2	3
부종	0	1	2	3
조직 손상	0	1	2	3
이 조직 손상	0	1	2	3

(다) 혈장 IgE 함량 평가

마우스에서 샘플링한 혈액은 실온에서 30분이상 방치한 다음 3000prm, 20분간 원심 분리하여 혈청만을 사용하고 IgE의 농도는 ELISA kit(Shibayagi, Japan)를 이용하여 분석하였다.

(라) 조직검사(H & E, Toluidine Blue Stain)

피부조직을 10% formalin에 24시간이상 고정시킨 후 파라핀 블록을 제작하고 4 μm로 절편한 후 hematoxylin & eosin(Sigma, USA)염색을 하였으며 염증 세포를 좀 더 정확히 파악하고자 Toluidine Blue (Sigma, USA)염색을 하여 확인하였다.

(마) 통계학적 방법

얻은 자료에 대한 음성 대조군과 시험물질 투여군 간의 비교는 student's t-test를 사용하여 군 간의 차이를 검정하였다.

(2) 연구 결과

(가) 아토피 피부염 모델화

본 실험에 사용된 수컷 5 주령의 NC/Nga 마우스의 등을 귀 하단부에서 꼬리 상단부 까지 전체를 제모하고 0.2 % ~ 1 % DNCB처리하여 성공적으로 아토피성 피부염을 유발시켰다.

(나) 생리활성물질의 관능 평가

① 체중 변화 측정

시험물질 도포 후부터 매일 측정하여 체중 변화를 확인하였다(그림 115). 확인 결과 음성 대조군에 비해 나머지 군들은 아토피피부염 유발로 인한 평균 체중이 현저히 낮았으며 유발이 종료되고 평가가 시작되는 시점에서부터 체중이 다시 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 약물대조군이나 양성대조군에 비해 혼합용액을 처리한 군에서 체중이 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 혼합용액이 아토피피부염으로부터 발생하는 스트레스를 줄임으로써 아토피 피부염 치료에 도움을 줄 것으로 기대된다.

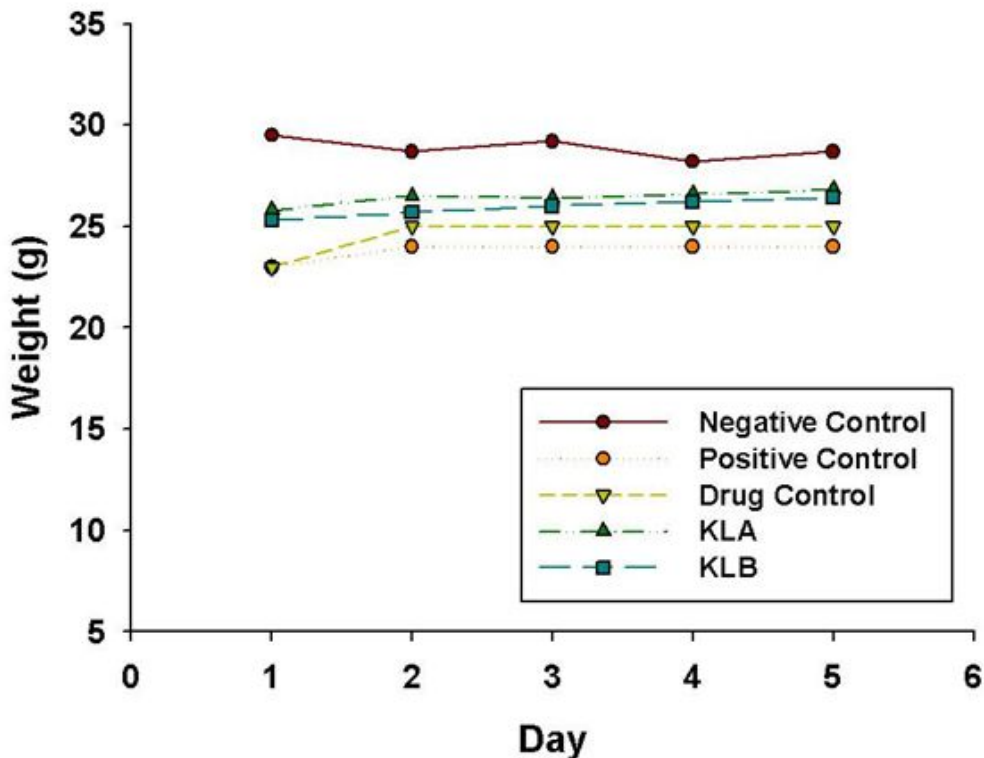
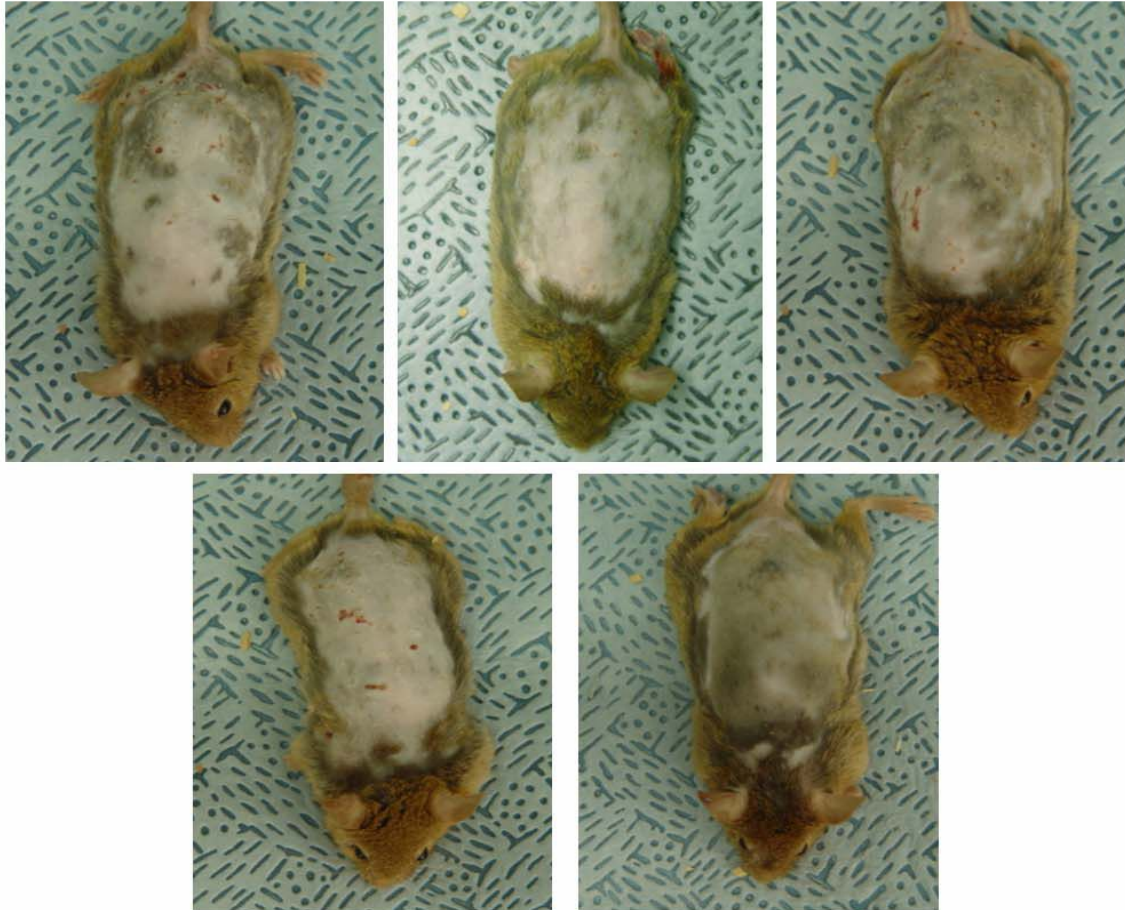


그림 115. 군별 체중 변화

② 육안평가

그림 116 ~ 120은 NC/Nga 마우스의 등 부위에 나타난 아토피 피부염 발현 및 혼합 용액의 효과에 관한 사진이다. 그림 116은 음성대조군으로 제모 후 어떠한 처리도 하지 실험 종료시까지 피부상태를 관찰하였다.

음성 대조군

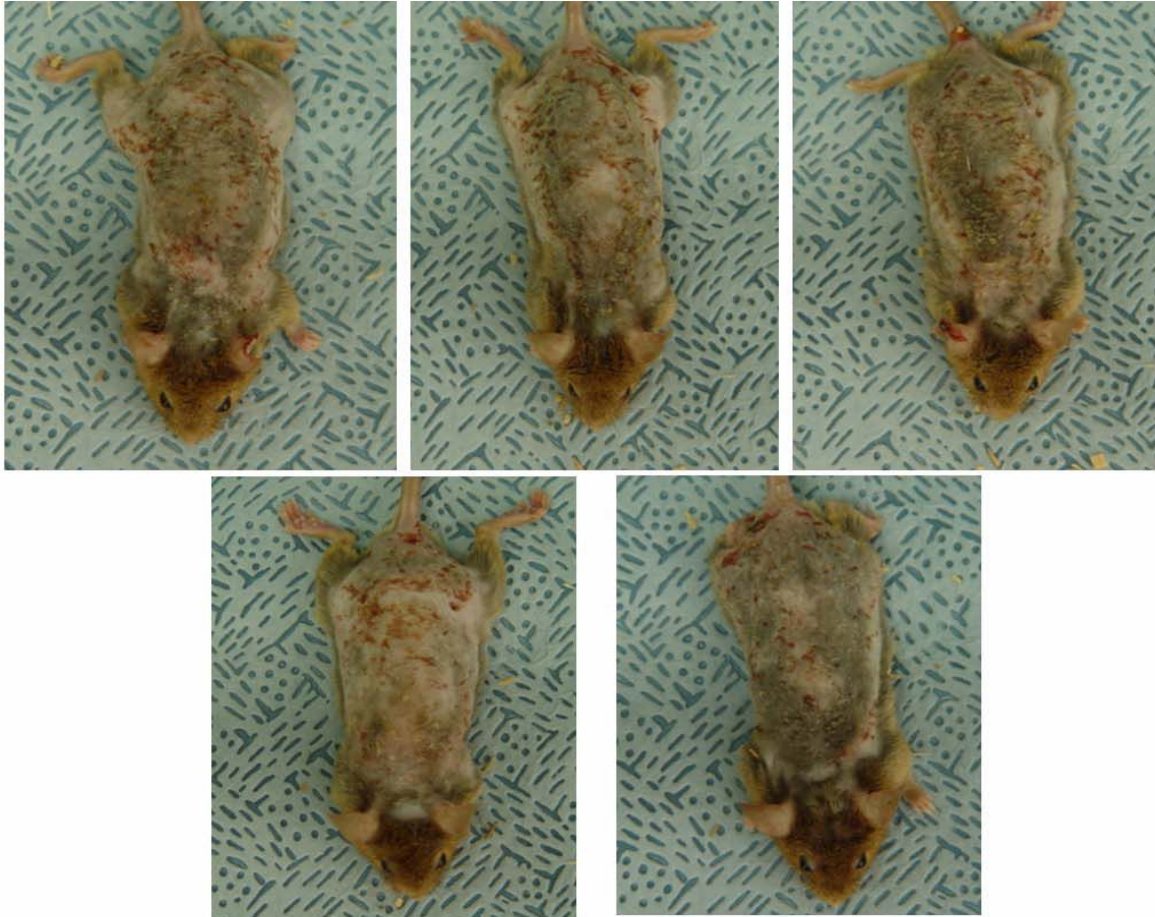


그룹	개체명	Score		
		A	B	Ave.
Negative control	NC1	2	4	3
	NC2	1	2	1.5
	NC3	2	4	3
	NC4	2	4	3
	NC5	0	0	0
	평균	2.10	±	1.3416

그림 116. 음성대조군 관찰 이미지

그림 117은 양성대조군으로 제모 후 DNCB를 이용하여 아토피를 유발하고 피부 상태를 관찰한 것으로 NC/Nga 마우스 등에 아토피가 아주 잘 유발되었음을 확인할 수 있었다.

양성 대조군



그룹	개체명	Score		
		A	B	Ave.
Positive control	PC1	15	14	14.5
	PC2	8	12	10
	PC3	9	14	11.5
	PC4	8	12	10
	PC5	7	11	9
	평균	11.00	±	2.1506

그림 117. 양성대조군 관찰 이미지

그림 118은 약제대조군으로 제모 후 DNCB를 이용하여 아토피를 유발하고 그 후 피메크로 리무스 1% 크림을 처리한 것으로 양성대조군에 비해 피부 상태가 조금은 나아진 것을 확인할 수 있었다.

약제 대조군

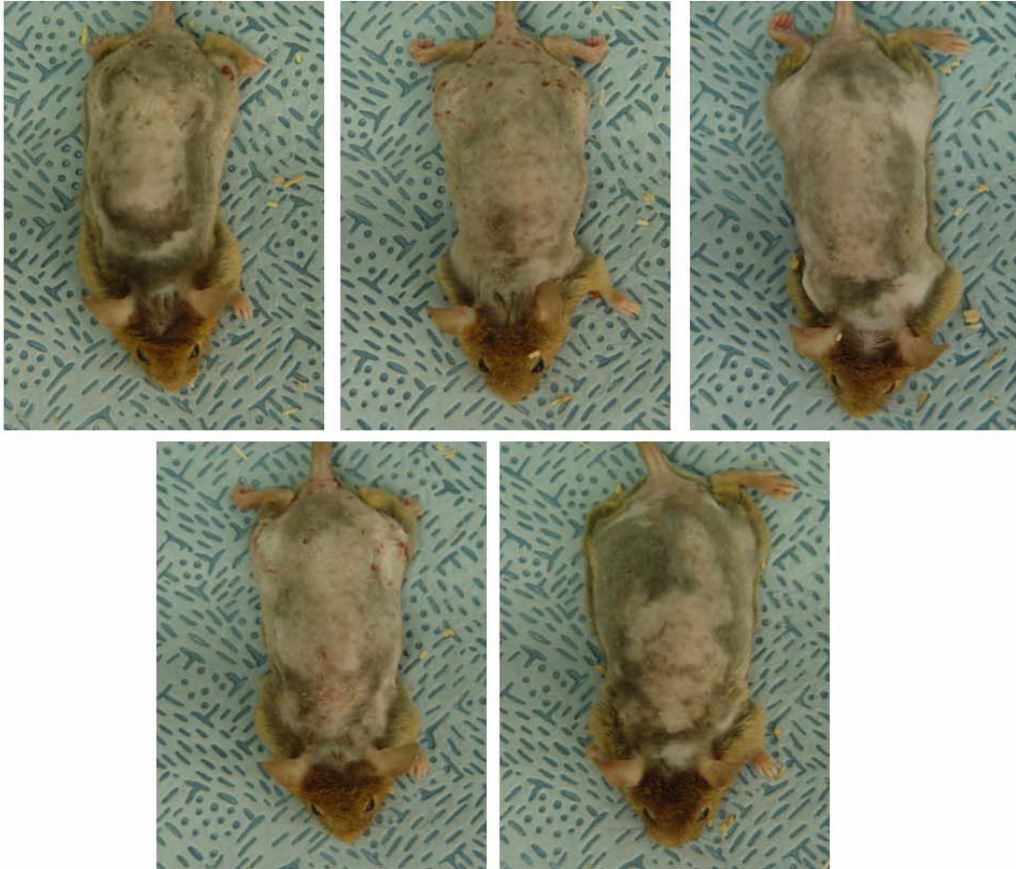


그룹	개체명	Score		
		A	B	Ave.
Drug control	D1	5	7	6
	D2	5	6	5.5
	D3	2	4	3
	D4	2	4	3
	D5	5	7	6
	평균	4.70	±	1.5652

그림 118. 약제대조군 관찰 이미지

그림 119는 sample 1(KLA)군으로 제모 후 DNCB를 이용하여 아토피를 유발하고 그 후 sample 1번 혼합용액을 처리한 것으로 양성대조군과 억제대조군에 비해 피부 상태가 상당히 좋아지며 음성대조군에 가깝게 치유되는 모습을 확인할 수 있었다.

KLA군

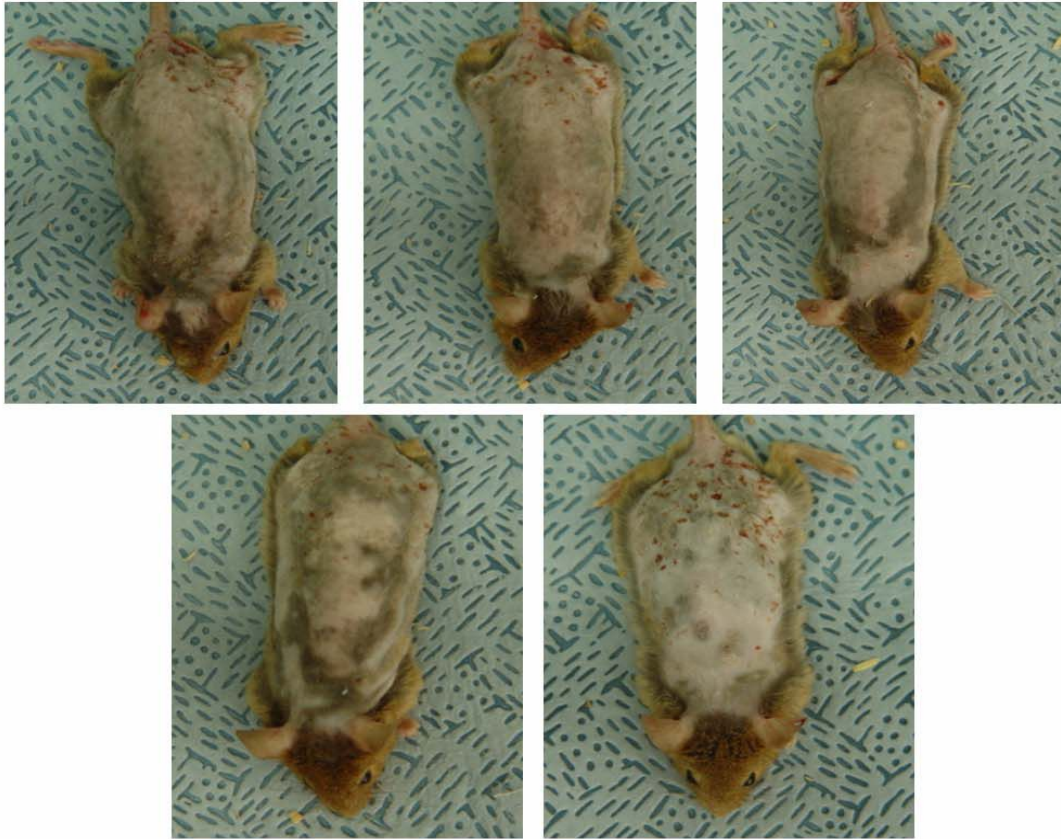


그룹	개체명	Score		
		A	B	Ave.
KL A	KLA1	1	4	2.5
	KLA2	3	5	4
	KLA3	0	3	1.5
	KLA4	2	5	3.5
	KLA5	0	2	1
	평균	2.50	±	1.2748

그림 119. KLA군 관찰 이미지

그림 120은 sample 2(KLB)군으로 제모 후 DNCB를 이용하여 아토피를 유발하고 그 후 sample 2번 혼합용액을 처리한 것으로 KLA군과 유사하게 양성대조군과 억제대조군에 비해 피부 상태가 상당히 좋아진 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 본 혼합용액이 아토피 증상을 완화하는 효과가 있으며 항염증이나 상처치유에 도움을 준 것으로 사료된다.

KLB군



그룹	개체명	Score		
		A	B	Ave.
KL B	KLB1	4	7	5.5
	KLB2	3	6	4.5
	KLB3	2	4	3
	KLB4	2	4	3
	KLB5	3	6	4.5
	평균	4.10	±	1.084

그림 120. KLB군 관찰 이미지

③ 관능평가

그림 121은 아토피 피부발진을 점수화하여 평균값을 나타낸 것이다. 아토피를 유발시키지 않은 군(음성대조군), DNCB를 피부에 도포하여 아토피 피부염을 유발시킨 후 아무것도 처리하지 않은 군(양성대조군), 약물대조군, KLA군 그리고 KLB군에 대한 육안 평가 결과를 점수화하여 나타낸 것이다. 관능 평가 결과 모든 군에서 양성대조군보다 나은 유의성 있는 결과를 나타내었으며($p < 0.001$), 특히 KLA군이 음성대조군과 유사한 결과를 나타내었고, KLB군 또한 약제대조군보다 나은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 KLA와 KLB sample이 아토피 피부염 완화와 상처치유에 효과적이며 상당한 도움을 줄 수 있음을 보여주는 결과이다.

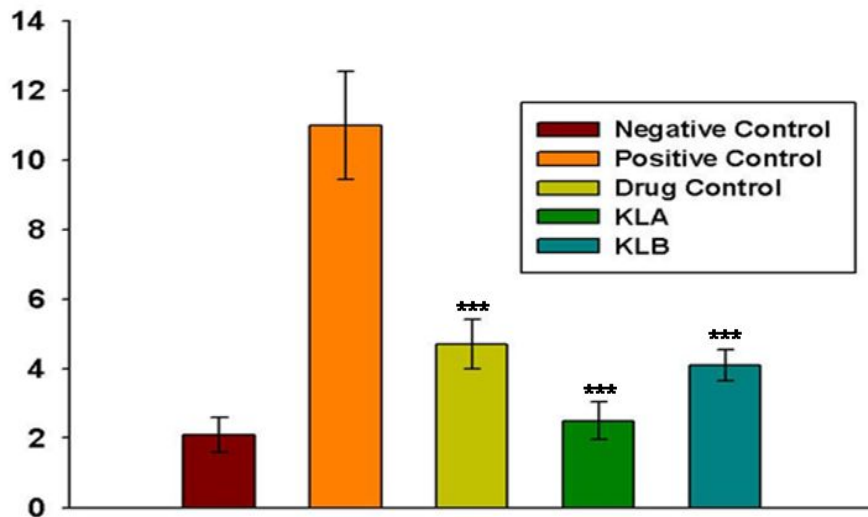


그림 121. 군별 관능평가에 따른 아토피 Score. 양성대조군에 대한 *** $p < 0.001$

(다) 혈장 IgE 함량 변동

혈청 내 IgE를 측정된 결과이다(그림 122). 본 실험에서의 IgE 양은 양성대조군에서 음성대조군보다 상당히 증가하는 것을 볼 수 있다. 이것은 아토피 유발에 의해 IgE의 양이 증가함을 알 수 있다. 결과에서 IgE 값을 음성대조군과 비교하였을 때 대조군에 근접한 값은 없었으나 그 중 KLA군이 약제대조군에 비해 적은 오차와 낮은 수치로 가장 유효한 값을 보였다 ($p<0.05$).

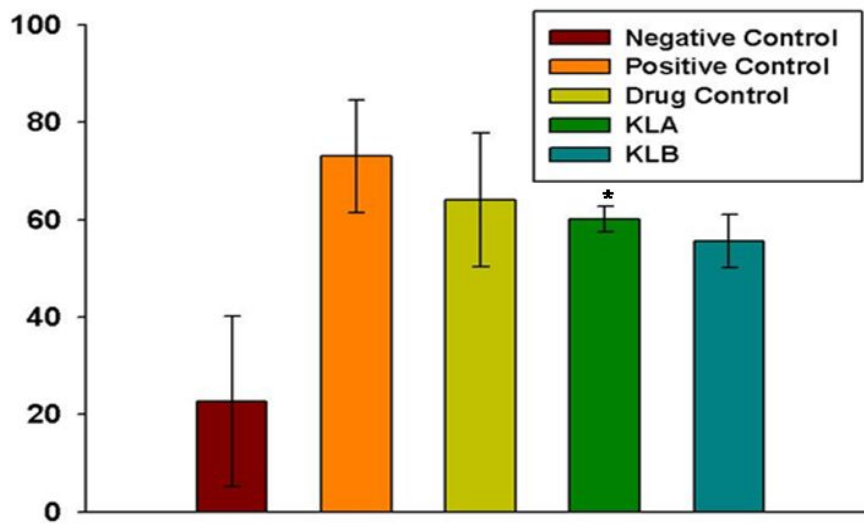


그림 122. 혈장 IgE 함량에 대한 군별 효과. 양성대조군에 대한 $*p<0.05$

(라) 조직검사(H & E, Toluidine Blue Stain)

그림 123은 약제대조군에 대한 조직검사 결과이다. 아토피 증상은 피부병소(skin lesions)에서 피부의 부드러운 정도(mild spongiosis)가 감소하고, 과각화증(epidermal hyperplasia), 이상각화증(parakeratosis)과 함께 염증 세포의 침윤 증상(infiltration with leukocytes)을 동반한다. 본 약제대조군에서는 그 정도는 감소하였으나 염증과 두터운 각질층을 보이고 있다.

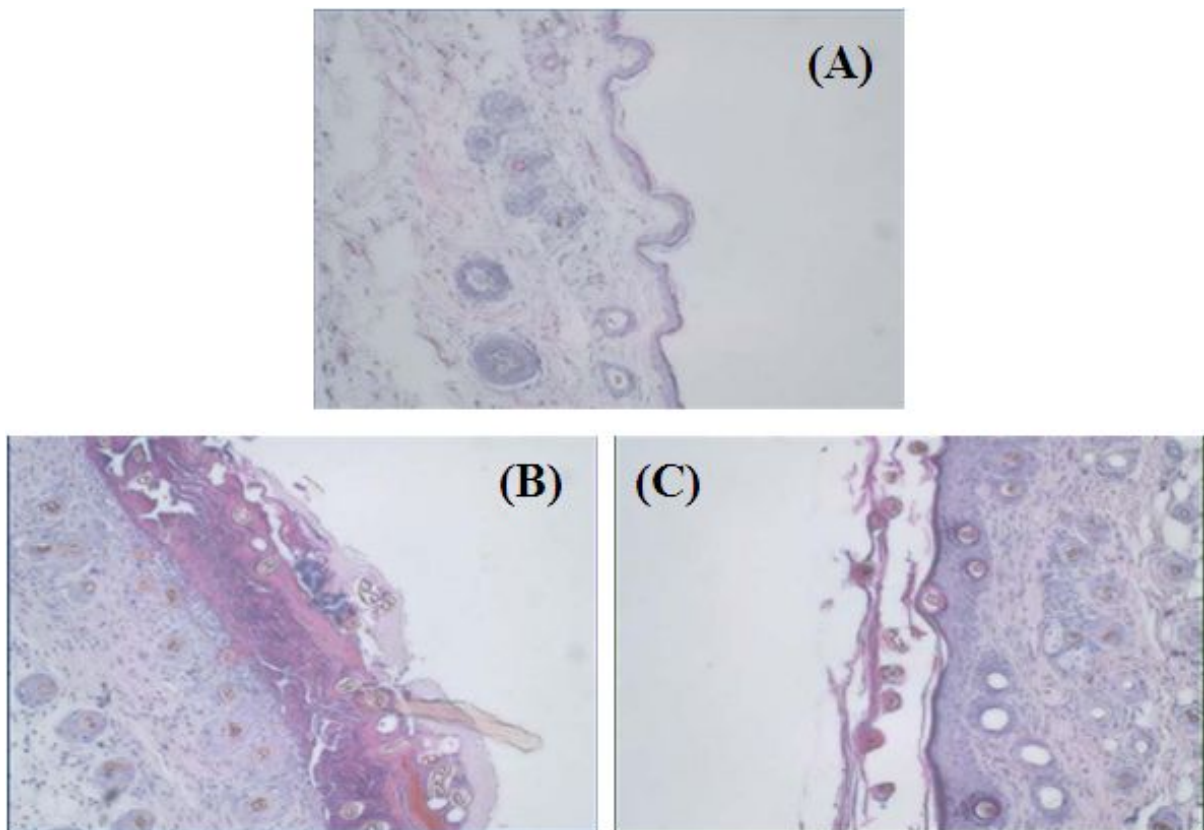


그림 123. 조직검사 결과 (A) Negative control, (B) Positive control,
(C) Drug control

그림 124는 KLA군에 대한 조직검사 결과이다. KLA군에서는 약간의 염증이 남아있긴 하나 이것은 정상개체에서도 나타나는 수준의 염증으로 아토피 피부염 치유 효과를 확인할 수 있었다.

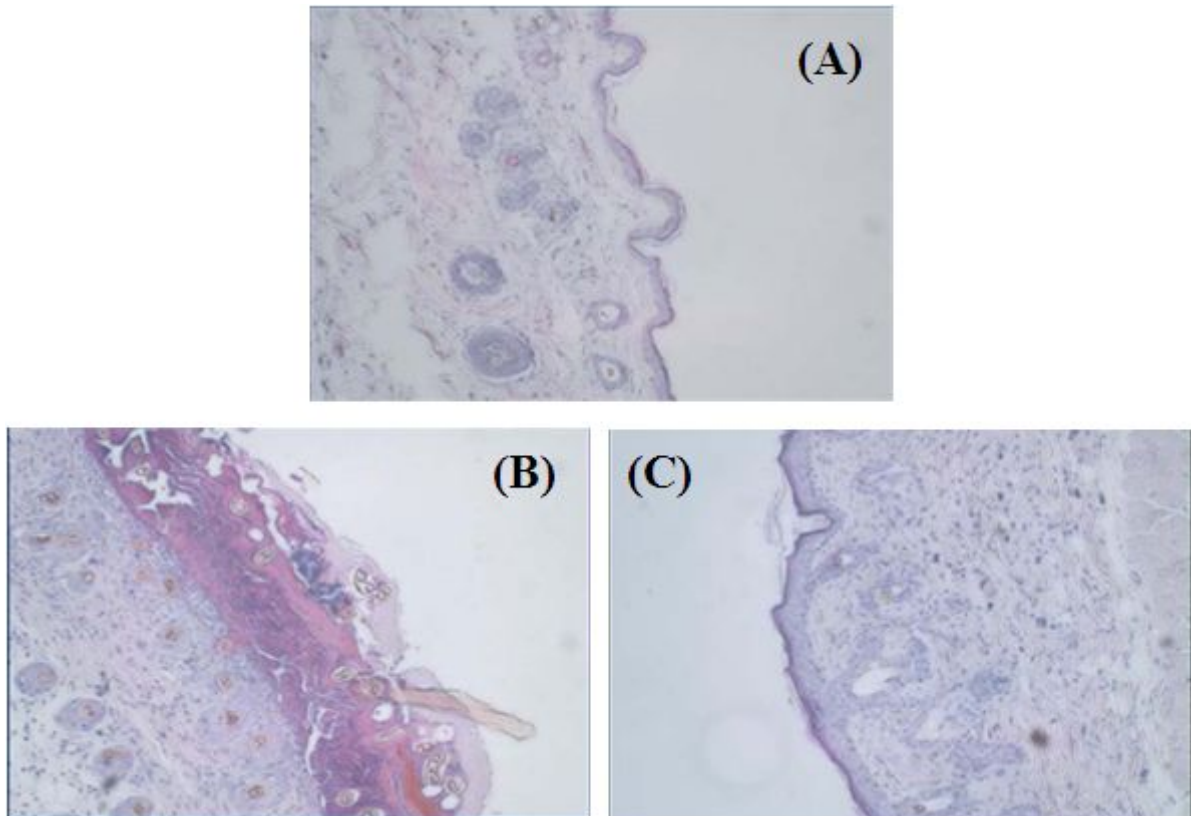


그림 124. 조직검사 결과 (A) Negative control, (B) Positive control, (C) KLA

그림 125는 KLB군에 대한 조직검사 결과이다. KLB군 또한 KLA군보다는 염증이 더 확인되거나 약제대조군보다는 나은 결과를 확인할 수 있었다.

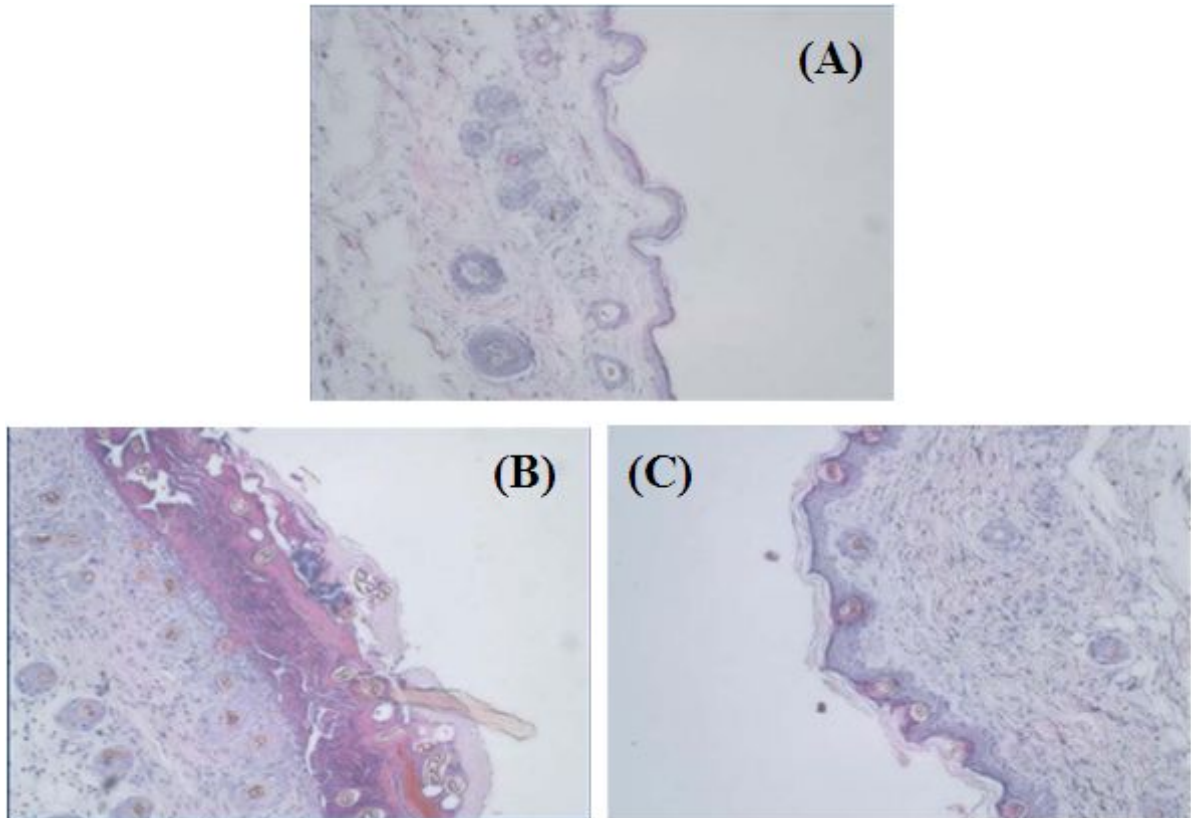


그림 125. 조직검사 결과 (A) Negative control, (B) Positive control, (C) KLB

다. 3차년도

2차년도의 결과를 바탕으로 생리 활성 물질과 수용성 키토산이 함유된 화장료를 개발하고 동물실험을 통해 아토피 피부염 치료제로서의 가능성을 확인하고자 한다. 또한 이렇게 입증된 결과를 토대로 제품화의 기틀을 마련할 수 있을 것으로 기대된다.

(1) 연구 방법

(가) 아토피피부염이 유발된 동물 모델화

① 동물

본 실험에 사용된 수컷 5 주령의 NC/Nga 마우스는 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 공급받아 입수 시 외관을 육안적으로 검사한 후 시험을 실시할 동물실에서 7 일간 순화하면서 일반증상을 관찰하였다. 사료는 피드랩에서 생산된 Feedlab Formula M-07를 자유롭게 섭취하도록 하였고 물은 미세여과기를 이용하여 멸균한 물을 물병을 이용하여 자유 섭취 시켰다. 사육 조건은 온도 23 ± 3 °C, 습도 55 ± 15 %, 환기 횟수는 전외기 공조방식으로 10 ~ 20 회/hr, 조명조건은 조도 150 ~ 300 Lux로 12hr/day(08:00 점등 ~ 20:00 소등) 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 순화, 검역 및 관찰기간 중 스테인레스 망 사육상자에 동물을 2 ~ 3수로 수용하여 사육하였다.

② 시료

본 실험에 사용된 시료는 순천대학교로부터 공급받은 sample을 냉장보관하면서 사용하였다. sample (HCMC)는 토종꿀과 수용성 키토산(MW10)을 증류수에 용해시키고 오일과 유화제를 70 °C에서 혼합하여 키토산과 토종꿀을 함유한 항균 보습크림 (HCMC)으로 제조되었다. 약물 대조군으로는 면역억제제인 노바티스사의 피메크로리무스 크림 1%을 구매하여 25°C이하로 보관하면서 사용하였다.

③ NC/Nga 마우스에서 아토피피부염 유발 및 시료처리

입수 후 일주일 동안 자유로운 식이와 식수를 제공받으면서 순화되어진 NC/Nga 마우스의 등을 귀 하단부에서 꼬리 상단부까지 전체를 제모하고 24시간 방치한 후, 2 ~ 4일에, 1% DNCB(dinitrochlorobenzene; $150\mu\text{l}/\text{dorsal area in AOO}$ (아세톤 : 올리브오일 = 3:1))를 처리하였다. 그 후 5주 동안 0.2 ~ 0.4 % DNCB($150\mu\text{l}/\text{dorsal area in AOO}$)를 처리하여 아토피성 피부염을 유발시켰다. 7주째 되는 첫째날에 DNCB 처리를 중단하고 그 후 5일 동안 1일 2회씩 본 HCMC를 마우스의 등에 도포하였다. 약물대조군으로 피메크로리무스 크림 1%을 동일한 방법으로 도포하였다. 실험 동물은 7마리씩 4군으로 나누어 실험을 실시하였다. 아무것도 처리하지 않은 음성대조군(negative control), DNCB를 처리한 양성대조군(positive control), DNCB 처리 후 피메크로리무스 크림 1%을 도포한 약제대조군(drug control), 그리고 DNCB 처리 후 HCMC을 도포한 실험군으로 나누어 실시하였다.

(나) 생리활성물질의 관능 평가

① 관능평가 및 Scratching 거동 시험

일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가 법을 이용하였으며 아토피 피부염의 심각성 정도를 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총합으로 나타낸다. 평가 항목에 대한 육안 평가 결과는 표 26의 다섯 가지 항목을 시험물질 도포 후부터 1,3,7,14일이 되는 시점에 실시한다. 평가 항목은 발적과 출혈, 가피형성과 건조, 부종, 조직 손상, 이 조직 손상이다. 각각의 항목에 대해 증상 없음(0점), 증상 약함(1점), 중증도(2점), 심함(3점)으로 채점한 후, 모든 항목의 점수를 합산함으로써 최소 0점(아무증상이 없는 상태)에서 최고 15점(모든 항목의 증상이 심한 상태)사이의 평가점수를 부여한다. Scratching 거동은 시험물질 처치 마지막 날 뒷발 또는 앞발로 긁는 횟수를 15분 동안 관찰하여 측정하였다.

② 비장의 무게 변화 측정

Sacrifice한 마우스의 비장을 적출하여 지방을 제거하고 그 무게를 측정하였다.

(다) 혈액 중 호산구, 호중구, 백혈구 함량 측정

마우스에서 샘플링한 혈액은 EDTA tube (BD vacutainer, USA) 넣어 보관하고, 백혈구 수(White blood cells, WBCs), 호산구(eosinophils), 호중구(neutrophils)의 수치를 혈구 계산법을 이용하여 계수하였다.

(라) 혈장 IgE 함량 평가

마우스에서 샘플링한 혈액은 실온에서 30분이상 방치한 다음 3000rpm, 20분간 원심분리하여 혈청만을 사용하고 IgE의 농도는 ELISA kit(Shibayagi, Japan)를 이용하여 분석하였다.

(마) 조직점사 (H & E, Toluidine Blue Stain)

피부조직(dorsal skin)을 10% formalin에 24시간이상 고정시킨 후 파라핀 블록을 제작하고 4 μ m로 한 후 hematoxylin & eosin(Sigma, USA)염색을 하였으며 염증 세포(inflammatory cell)를 좀 더 정확히 파악하고자 Toluidine Blue (Sigma, USA)염색을 하여 광학 현미경(Olympus, Bx51, Japan)으로 확인하였다. 또한 각 절편에서 비만세포(mast cell)의 분포 및 탈과립 유무를 광학현미경으로 관찰하였고 각각의 절편당 3개의 지점을 선정하여 관찰되는 비만세포의 수를 측정하여 평균하였다. 비만세포(mast cell)의 탈과립 수준(degranulation level)은 비만세포의 탈과립 비율에 따라 나타내었다.

(바) 통계학적 방법

얻은 자료에 대한 음성 대조군과 시험물질 투여군 간의 비교는 student's t-test를 사용하여 군 간의 차이를 검정하였다.

(2) 연구 결과

(가) 관능 평가

그림 126은 아토피 피부발진을 점수화하여 평균값을 나타낸 것이다. 아토피를 유발시키지 않은 군(음성대조군), DNCB를 피부에 도포하여 아토피 피부염을 유발시킨 후 아무것도 처리하지 않은 군(양성대조군), 약물대조군, 그리고 HCMC에 대한 육안 평가 결과를 점수화하여 나타낸 것이다. 관능 평가 결과 양성대조군의 관능평가 점수는 6 ± 1.63 으로 음성대조군의 1 ± 0.63 에 비해 6배 이상 증가하였고, 약물대조군(3 ± 1.02)과 HCMC군(3 ± 0.39)은 양성대조군에 비해 2배의 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.01$). 또한 HCMC군은 면역억제제인 약물대조군과 거의 유사한 값을 나타내었다. 이는 HCMC가 부작용이 없는 아토피 피부염의 치료제로서의 가능성이 있음을 보여주는 결과이다.

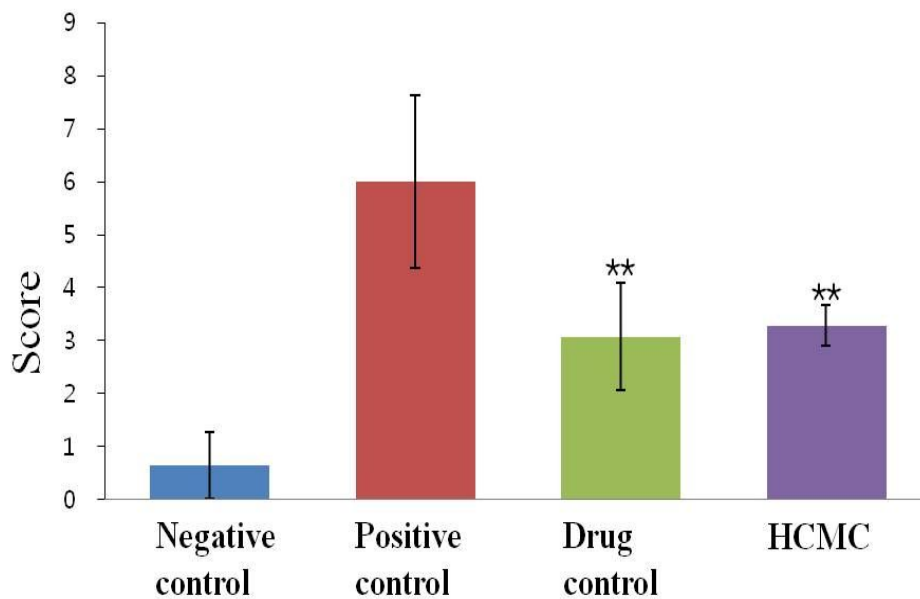


그림 126. 군별 관능평가에 따른 아토피 Score. 양성대조군에 대한 $**p < 0.01$

(나) Scratching 거동

시험물질 처치 마지막 날 아토피 피부염의 소양증으로 인한 scratching 거동 횟수를 15분 동안 관찰한 결과, 양성대조군(positive control)에서는 23.4 ± 6.23 회의 긁는 횟수를 확인하였으며, 그 횟수가 약물대조군 9.2 ± 2.86 회($p < 0.01$), HCMC군 6.8 ± 1.30 회($p < 0.001$)로 유의성 있게 감소하였다(그림 127). HCMC 군에서 긁는 횟수가 감소하는 것은 아토피 피부염(atopic dermatitis) 치료 작용에 따른 결과로 보여 진다.

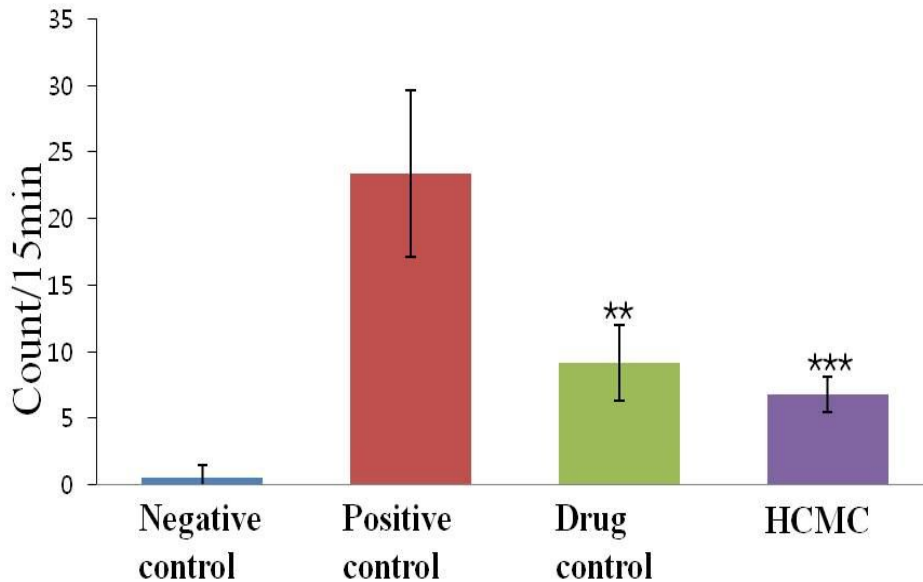


그림 127. 군별 관능평가에 따른 Scratching 거동. 양성대조군에 대한 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

(다) 비장의 무게 변화

그림 128은 마우스의 면역반응을 확인하기 위해 실험종료일에 마우스를 희생시켜 비장을 적출하고 그 무게를 측정하여 비장의 절대무게와 실험 종료일 마우스의 무게(g)에 대한 비장 무게 비(비장무게 비/마우스의 무게(g))인 비장 수치를 확인한 결과이다. 그림에서 알 수 있듯이 양성대조군은 절대무게와 비장 수치가 $0.2589 \pm 0.066\text{g}$ 과 1.03 ± 0.334 로 음성대조군 $0.1709 \pm 0.086\text{g}$ 과 0.47 ± 0.126 에 비해 상당히 증가하는 것을 알 수 있다. 이것은 DNCB에 의해 비장 내의 T 림파구가 현저하게 증가하였음을 나타내고 있다. 억제대조군(drug control)과 HCMC 군에서는 비장 무게 및 수치가 감소하였다. 이러한 결과는 약물 및 HCMC가 T 림파구의 억제 효능이 있는 것으로 보여지며 특히 HCMC가 약물에 비해 더 우수한 T 림파구 억제능이 있음을 알 수 있었다. HCMC가 T 림파구를 감소시킴으로 IgE의 발현량이 줄어들어 히스타민의 생성이 감소하여 아토피 피부염(atopic dermatitis) 증상 완화에 효과가 있는 것으로 사료된다.

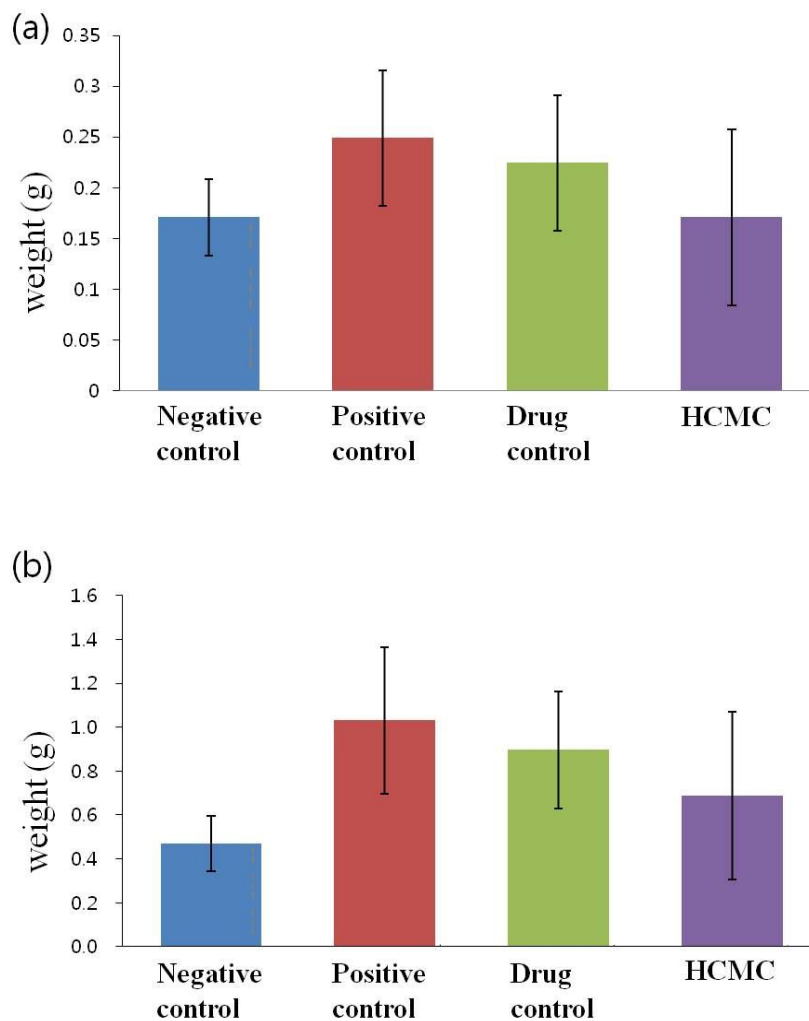


그림 128. 비장 무게변화에 따른 군별 효과. (a)절대무게, (b)비장수치

(라) 혈액 중 호산구, 호중구, 백혈구 함량

아토피 피부염의 발현 시 나타나는 혈액학적 변화인 백혈구, 호중구, 호산구의 함량 변화를 관찰하였다. 그림 129에서 보는 바와 같이 아토피 피부염 유발된 양성대조군에서 음성대조군에 비해 백혈구, 호중구, 호산구의 수치가 증가하는 것을 확인하였으며, 아토피 피부염 유발 후 약물과 HCMC 처리군에서는 유의성 있게 감소하는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 아토피 피부염 유발 시 염증이 발생되어 백혈구, 호중구, 호산구 수치가 증가하였다가 약물 및 HCMC 처리 시 피부염이 완화 되면서 그 수치가 감소함을 알 수 있었다. 또한 HCMC 처리군은 약물 처리군과 거의 유의성 있는 결과를 얻을 수 있었다.

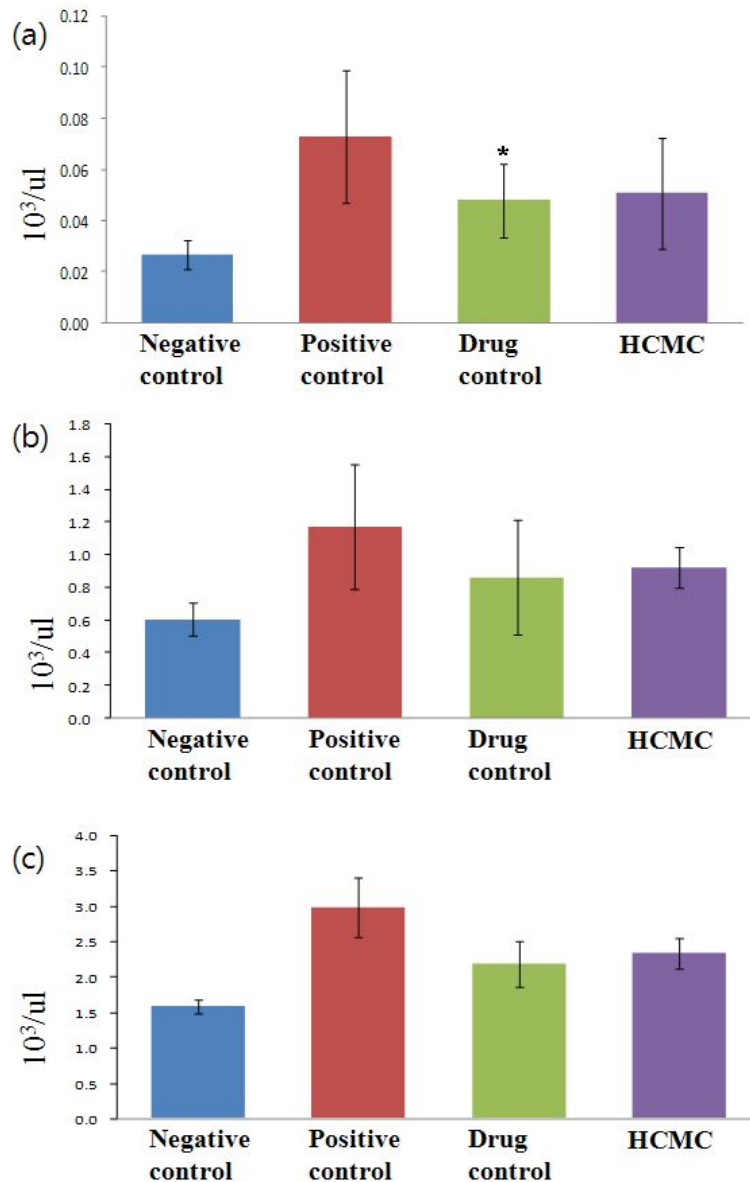


그림 129. 혈액 중 (a)호산구, (b)호중구, (c)백혈구 함량. 양성대조군에 대한 $*p < 0.05$

(마) 혈중 IgE 함량

아토피 피부염 발생 시 알레르기 유발 물질을 가장 먼저 인지하는 것은 피부에 존재하는 IgE이다. 그림 130은 IgE 함량 측정 결과로 아토피 피부염이 유발된 양성 대조군에서 증가하였으나, 약물 및 HCMC 처리 시 감소하는 것을 알 수 있었으며 HCMC 처리 군에서 약물 대조군과 거의 유사한 결과를 확인하였다. 이러한 결과로부터 HCMC가 알레르기 및 과민 반응에 효과가 있음을 알 수 있다.

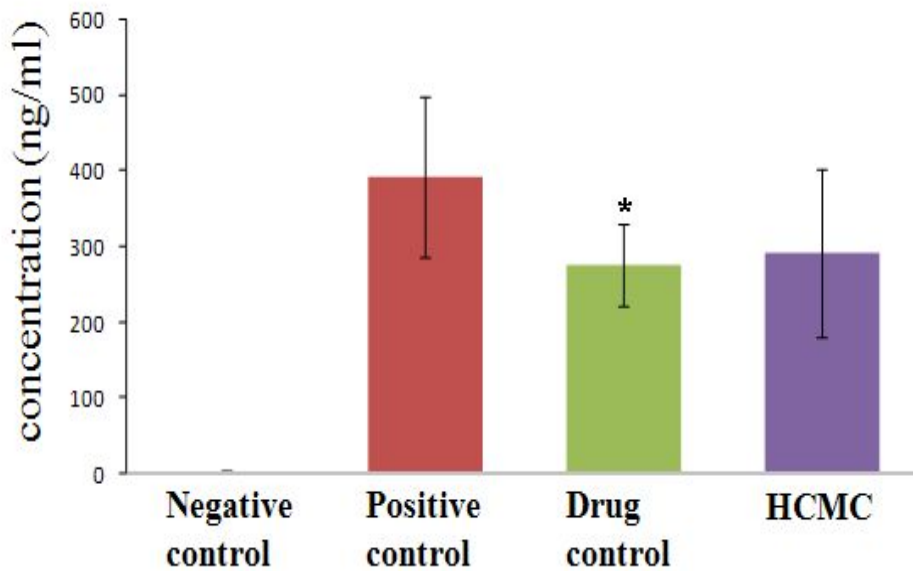


그림 130. 혈장 IgE 함량에 대한 군별 효과. 양성대조군에 대한 * $p < 0.05$

(바) 조직검사(H & E, Toluidine Blue Stain)

그림 131은 각각의 군에 대한 조직검사 결과이다. 아토피 증상은 피부병소에서 피부의 부드러운 정도가 감소하고, 과각화증, 이상각화증과 함께 염증 세포의 침윤 증상을 동반한다. 그림 131 (a)와 (b)는 각각 음성대조군과 양성대조군에 대한 조직학적 특성을 나타낸 것이며, 그림 131 (c)는 약제 대조군의 결과로 그 정도는 감소하였으나 염증과 두터운 각질층을 보이고 있다. 그림 131 (d)는 HCMC 군에 대한 조직학적 특성으로 다른 군에 비해 아주 우수한 결과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구에서 제조된 수용성 키토산과 토종꿀이 함유된 향균 보습 크림이 아토피 피부염 치료에 우수한 물질이 될 것으로 생각된다.

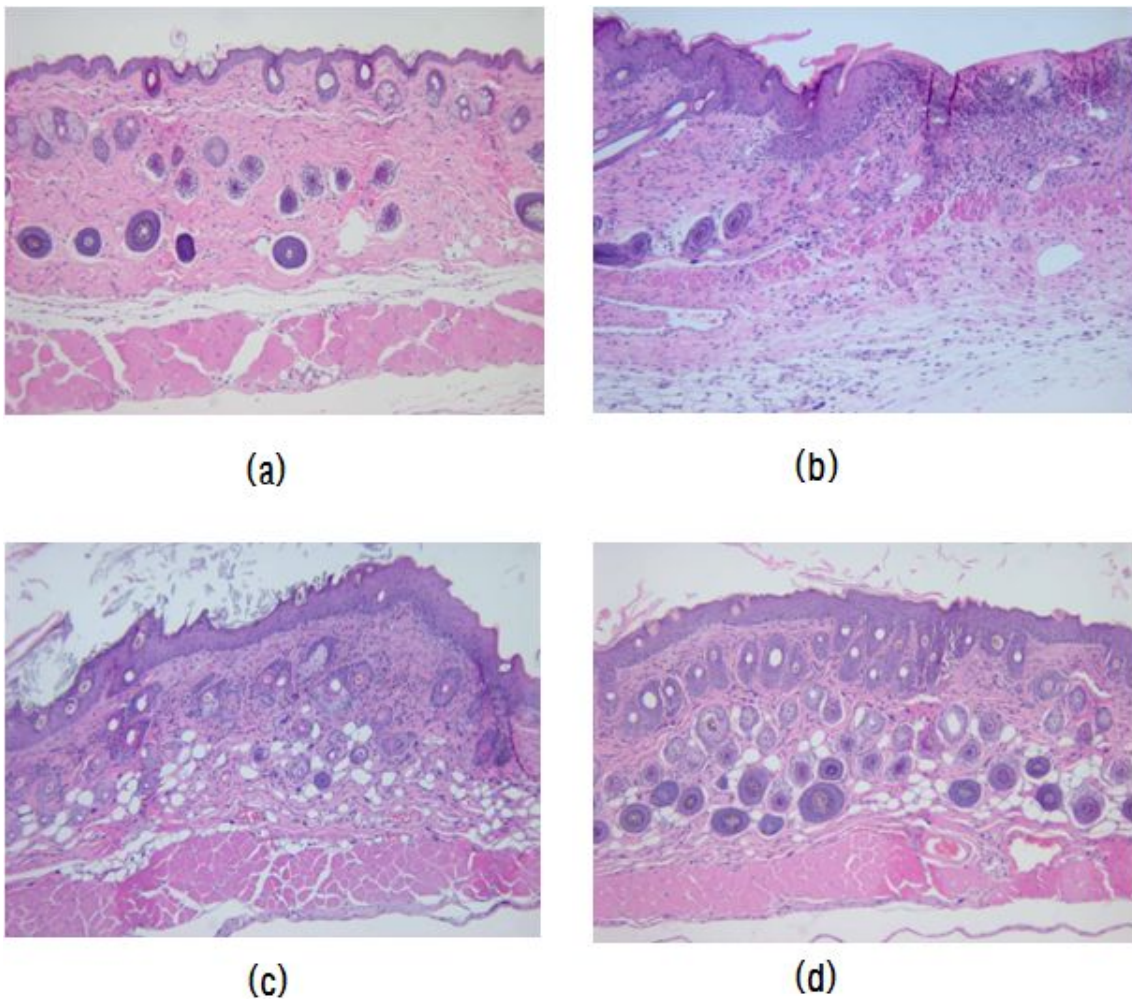


그림 131. 군별 조직검사 결과. (a)음성대조군, (b)양성대조군, (c)약제대조군, (d)HCMS 처리군

(사) 육안 평가

그림 132는 각 군에 대한 마우스의 외형적인 사진이다. 그림에서 보는 바와 같이 여러 가지 실험과 일치하는 결과를 확인할 수 있다. 그림 132 (a)는 음성대조군으로 제모 후 어떠한 처리도 하지 않고 실험 종료 시까지 피부상태를 관찰한 결과이며, 그림 132 (b)는 양성대조군으로 제모 후 DNCB를 이용하여 아토피를 유발하고 피부 상태를 관찰한 것으로 NC/Nga 마우스 등에 아토피가 아주 잘 유발되었음을 확인할 수 있었다. 그림 132 (c)는 약제대조군으로 제모 후 DNCB를 이용하여 아토피를 유발하고 그 후 피메크로리무스 1% 크림을 처리한 것으로 양성대조군에 비해 피부 상태가 나아진 것을 확인할 수 있으나 여전히 인설 및 가피 등의 증상을 보였다. 그림 132 (d)는 HCMC를 처리한 군으로 제모 후 DNCB를 이용하여 아토피를 유발하고 그 후 HCMC를 처리한 것으로 양성대조군에 비해 피부 상태가 상당히 좋아진 것을 확인할 수 있으며 약제대조군과 비교해도 거의 유의성 있게 좋아진 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 본 연구에서 제조된 HCMC는 수용성 키토산의 항균활성 기능과 herbal honey의 감염성 질병의 치료를 위해 알려진 항균 활성력의 상승효과에 의해 아토피 피부염의 개선에 효과가 있으며 항염증이나 상처치유에 도움을 준 것으로 사료된다.

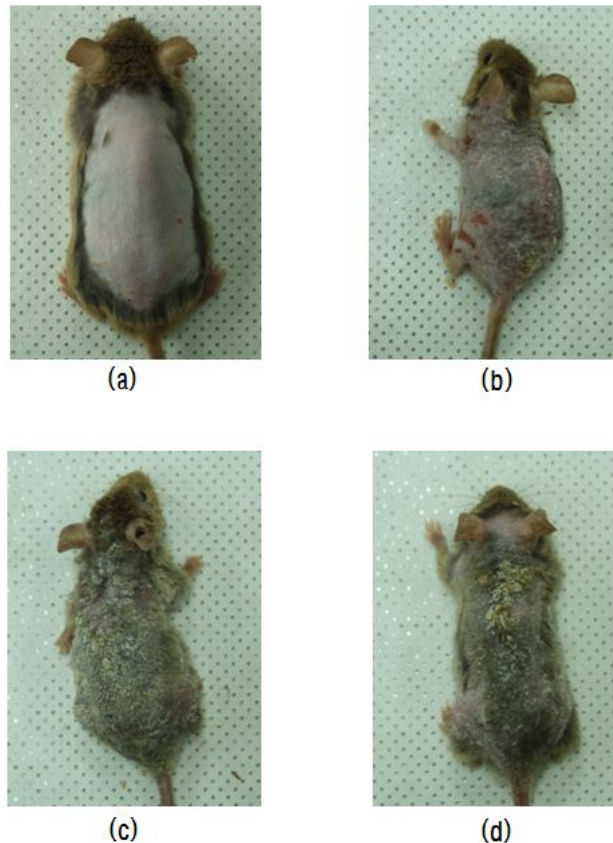


그림 132. 군별 관찰 이미지. (a)음성대조군, (b)양성대조군, (c)약제대조군, (d)HCMS 처리군

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

제 1 절. 연차별 목표 달성도

1. 1차년도

연구목표		추진 실적	
주요내용	비중	주요 내용	달성도
○ 생약초로부터 추출물 조제	10	- 작약구근, 줄풀 지상부, 대추열매, 측백 잎과 지상부, 미치광이풀로부터 추출물을 용매 등의 조건에 따라 성공적으로 생리활성 물질 추출	100
○ 생리활성물질의 물리화학적 특성 조사	15	- NMR, FT-IR, UV, HPLC 등의 분광학적인 방법을 이용하여 토종꿀과 생약초의 구조 및 성분을 성공적으로 규명	100
○ 생리활성 물질의 독성 확인	15	- 정상피부세포(Human Keratinocyte Cell)인 HaCaT에 대한 MIT 분석법을 이용하여 생리활성 물질이 독성이 나타나지 않음을 확인 · 대조군으로 Cefpiramide와 Clotrimazol 사용	100
○ 생리활성 물질의 항균성 확인	25	- 생리활성물질의 그람 양성균, 음성균 및 진균에 대한 우수한 항균, 항진균 활성 능력을 확인. · 대조군으로 Cefpiramide와 Clotrimazol 사용 - 작약 구근 추출물로부터 항균 활성을 나타내는 물질 분리	100
○ 토종꿀의 보습성 확인	10	- 토종꿀의 수분 증발량 측정을 통해 보습력 확인	100
○ 추출물의 탈과립 억제능 (β -hexosaminidase assay) 분석	25	- 탈과립 억제능 분석을 통한 5종 생약초 추출물의 아토피 피부염 소양증 개선효과 검증	100
계	100		

2. 2차년도

연구목표		추진 실적	
주요내용	비중	주요 내용	달성도
○ 수용성 키토산의 분자량대별 분획 및 특성 규명	15	<ul style="list-style-type: none"> - 한외여과막을 이용하여 분자량대의 키토산을 성공적으로 분리 - NMR, IR, GPC 등을 이용한 수용성 키토산의 구조 및 분자량 측정 - 분자량에 따른 항균성 활성 확인, 살균력 측정 및 적혈구 용혈활성 측정을 통한 독성확인을 통해 최적의 생리활성을 갖는 분자량대 확립 	100
○ 토종꿀, 생약초, 수용성 키토산의 혼합 조성에 따른 항균성 확인	10	<ul style="list-style-type: none"> - 토종꿀, 생약초 및 수용성 키토산을 여러 가지 농도로 혼합하여 혼합 조성에 따른 항균성 확인 	100
○ 혼합조성의 최적 비율 도출	15	<ul style="list-style-type: none"> - 각각의 조성을 달리하여 생리활성을 측정된 결과 아토피 피부염에 유용한 최적의 혼합조성물을 도출. 	100
○ 수용성키토산을 이용한 토종꿀과 생약초의 최적 혼합물의 제제 특성 연구	20	<ul style="list-style-type: none"> - 최적 혼합물의 항균, 항진균 확인 결과 항생제로 상용화되어 있는 cefpiramide 및 clotrimazole과 거의 유사한 항균, 항진균 활성을 나타냄. - 최적 혼합물의 세포 독성 결과 전혀 나타내지 않음. 	100
○ 아토피 피부염이 유발된 동물 모델화	15	<ul style="list-style-type: none"> - DNCB를 이용하여 NC/Nga 마우스에 아토피를 성공적으로 유발시켜 제조된 혼합조성물의 아토피 치료 효과를 규명하는데 유용하게 사용. 	100
○ 최적 혼합조성물의 아토피 피부염 효과 규명	25	<ul style="list-style-type: none"> - 아토피 피부염이 유발된 마우스에 혼합조성물과 약물대조군을 이용하여 아토피 효과를 확인 - 관능 평가 및 혈장 IgE 함량 평가에서 혼합조성물이 약물대조군에 비해 우수한 결과를 확인 - 조직 검사 및 육안 평가에서도 혼합조성물이 약물 대조군 보다 우수한 아토피 피부염 개선 효과를 보이는 것을 확인 	100
계	100		

3. 3차년도

연구목표		추진 실적	
주요내용	비중	주요 내용	달성도
○ 키토산 마이크로 입자 개발 및 안정성 평가	15	<ul style="list-style-type: none"> - 생리활성 물질을 효과적으로 담지하여 안정성을 부여할 수 있는 키토산 마이크로 입자의 제조 조건을 확립 - SEM을 이용하여 생리활성 물질이 담지된 2 ~ 10μm 크기의 표면이 매끄럽고 구형의 입자 형성 확인 	100
○ 최적 혼합조성물의 스테로이드 검출 시험	10	<ul style="list-style-type: none"> - 최적 혼합물의 스테로이드 검출 시험 결과 28종의 스테로이드 성분이 검출되지 않음. 	100
○ 최적 혼합 조성물을 이용한 화장품 제제 개발 및 아토피 피부염 효과 규명	25	<ul style="list-style-type: none"> - 아토피 피부염이 유발된 마우스에 혼합조성물이 함유된 화장품과 약물대조군을 이용하여 아토피 효과를 확인 - 관능 평가, Scarching 거동, 비장의 무게 변화, 호중구, 호산구 백혈구 함량 및 혈장 IgE 함량 평가에서 화장품 군이 약물대조군과 유사한 결과를 보임 - 조직 검사 및 육안 평가는 화장품군이 약물 대조군 보다 우수한 아토피 피부염 개선 효과를 보이는 것을 확인 	100
○ 키토산 마이크로 입자를 이용한 화장품 제제 개발 및 아토피 피부염 효과 규명	25	<ul style="list-style-type: none"> - 키토산 마이크로 입자가 함유된 화장품과 약물대조군을 이용하여 아토피 효과를 확인 - 관능 평가, Scarching 거동, 비장의 무게 변화, 호중구, 호산구 백혈구 함량, 혈장 IgE 함량 평가에서 화장품 군이 약물대조군에 비해 아주 우수한 결과를 보임 - 조직 검사, mast cell, 탈과립 억제 수준 및 육안 평가에서도 마이크로 입자가 함유된 화장품 군이 약물 대조군 보다 우수한 아토피 피부염 개선 효과를 보이는 것을 확인 	100
○ 스킨케어 제품 개발	25	<ul style="list-style-type: none"> 두 종(로션, 미스트)의 아토피성 피부염에 유용한 스킨케어 제품 개발에 성공. 	100
계	100		

제 2 절. 관련분야 기여도

현재 아토피성 피부염 치료제의 전 세계적인 트렌드는 스테로이드제 사용을 억제하면서 아토피를 치료할 수 있는 치료제에 대한 연구가 진행되고 있어 본 연구 결과는 이러한 트렌드와 부합되고 있다.

본 연구의 결과는 천연물을 이용하여 아토피성 피부염을 효과적으로 제어할 수 있는 생리활성 소재를 성공적으로 개발하고, 제품화에 성공함으로써 아토피 시장에서 경쟁력을 갖출 수 있을 것이다.

아울러 연구 과제 중에 개발된 기술력은 다양한 분야로의 확대가 가능할 것으로 보임으로 본 연구에서 도출된 생리활성 물질과 기술은 경제적·산업적으로 다음과 같은 기여를 할 수 있을 것이다.

□ 수입 대체 효과 및 부가가치 창출

○ 대부분 아토피 피부염 치료제는 대다수 수입에 의존하고 있어 난치성 피부질환 치료제 신규제제 개발은 수입 대체 효과와 막대한 부가가치 창출

○ 스테로이드를 사용하지 않음으로써 아토피 시장 선점 가능

□ 차별화된 전략적 틈새시장 공략이 용이

○ 다국적 제약기업들의 새로운 신약개발은 현재 주로 심혈관계, 신경정신계, 내분비계 등에 치중하여 연구를 진행하고 있으며 난치성 피부질환치료제 개발 시장은 비교적 경쟁이 치열하지 않아 우위를 점할 수 있음

○ 국내에는 피부질환 치료제 개발을 위한 연구가 아주 미미하게 진행되고 있는 실정이어서 시장 진입이 용이하며, 아토피 환자에게 새로운 가능성 부여

□ 저비용, 고부가가치 의약품 개발이 가능

○ 기존 및 신규 생리활성 물질의 안전성과 효능을 향상시킨 고부가가치 개량신약 의약품 개발을 통한 국내 신약 개발의 경쟁력을 확보 가능

○ Biotechnology 기술과의 접목은 약물의 안전성과 유효성을 높이는 개량신약의 개발이 용의하여 저비용, 단시간에 고부가가치의 의약품 개발 가능

□ 다양한 분야에 응용이 가능

○ 연구 개발 사업을 통하여 치료제로 이용될 수 있는 다양한 치료제 후보 물질들이 도출되어 있어 개발된 약제의 임상적용과 함께 용도 특허를 통한 타 분야 질환의 치료에도 쉽게 적용 가능

○ 타 분야 질환 치료제 개발에 소요되는 시간 및 비용을 줄일 수 있어 단기간의 시장 진입과 세계시장 선도 가능성이 높음

제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 연구개발 성과

1. 제품화 성과

본 연구 결과를 수행 중 최적 혼합용액 및 이를 이용한 화장품 제형을 개발하고 이들의 아토피 유발 마우스에 대한 효과를 현재 아토피 피부염 치료제로 사용 중인 면역억제제인 노바티스사의 엘리델과 비교하여 그 우수한 효과를 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 현재 참여기업 다이내믹(주)과 함께 두 가지 제품(로션, 미스트)을 출시하였으며 연구 결과를 응용하여 아토피 증상에 따른 아토피성 피부염에 유용한 화장품 제형에 대한 제품 라인 확대를 진행하고 있다.



ATO SOOP 로션

- 연구 개발을 통한 혼합 조성물을 이용한 아토피성 피부염에 유용한 화장품
- 미세입자화 기술 및 유화 기술을 이용한 유효 성분의 체내 이용률 증가



ATO SOOP 미스트

- 연구 개발을 통한 혼합 조성물을 이용한 아토피성 피부염에 유용한 화장품
- 가려움증 등과 같은 증상에 빠른 진정 효과

2. 산업적·학술적 성과

가. 지적 재산권 등록/출원

구분	내용	출원번호	등록번호	일자
특허	아토피성 피부염 예방 또는 치료 조성물		10-1070805	2011.10.10
상표	상표출원	40-2012-00037 97		2012.01.09
상표	상표출원	40-2012-00037 96		2012.01.09



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년10월10일

(11) 등록번호 10-1070805

(24) 등록일자 2011년09월29일

(51) Int. Cl.
A61K 31/722 (2006.01) A61K 33/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0105516

(22) 출원일자 2008년10월27일

심사청구일자 2008년10월27일

(65) 공개번호 10-2010-0046605

(43) 공개일자 2010년05월07일

(56) 선행기술조사문헌

KR100441270 B1*

KR100620248 B1*

KR1020040014623 A*

KR1020080079743 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

다이나믹(주)

광주 광산구 옥동 880-5

(72) 발명자

나재운

전라남도 순천시 조곡동 512 (22/1) 정원텍스빌아

파트

장미경

전남 순천시 가곡동 980-1번지 15/5, 드라마시티

목림마을

박윤경

전라남도 장성군 남면 분향리

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 5 항

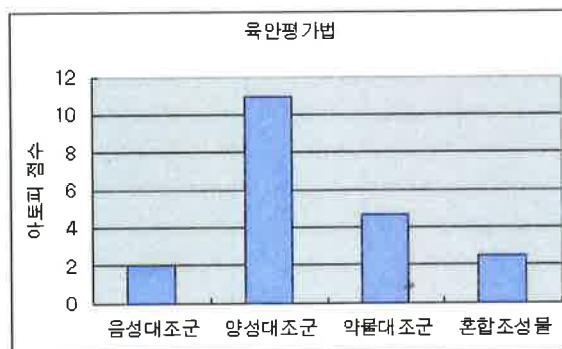
심사관 : 박정용

(54) 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 해양심층수 80~90 부피%, 빌콜 5~15 부피%, 식초 0.4~0.6 부피% 및 키토산 0.5~1.0 부피%를 포함하여 이루어지는 조성물로서, 2차 피부감염에 관여하는 세균 및 진균에 대한 억제활성을 나타내며, 아토피 유발 마우스에 대하여 아토피 완화 작용을 나타내는 바, 아토피성 피부염 등 피부질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도10



관인생략

출원번호통지서

【상표견본】

출원일자 2012.01.19
 특기사항 참조번호(1)
 출원번호 40-2012-0003796 (접수번호 1-1-2012-0052372-28)
 출원인명칭 다이나믹(주)(1-2007-032109-2)
 대리인성명 이원희(9-1998-000385-9)

특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
* 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12월, 상표-디자인은 6월 이내
* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.



관인생략

출원번호통지서

【상표견본】

출원일자 2012.01.19
 특기사항 참조번호(2)
 출원번호 40-2012-0003797 (접수번호 1-1-2012-0052374-19)
 출원인명칭 다이나믹(주)(1-2007-032109-2)
 대리인성명 이원희(9-1998-000385-9)

특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
* 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12월, 상표-디자인은 6월 이내
* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.



나. 학술적 성과

(1) 논문 게재 성과

게재 연도	논문명	학술지명	Vol.(No.)	SCI구분
2011	Antibacterial Action of Low Molecular Weight Water-Soluble Chitosan	<i>Polymer</i>	35(3)	SCI
2011	Antibiotic Actions and <i>in vivo</i> Evaluation of Low Molecular Weight Water-Soluble Chitosan against Various Pathogens	<i>Macromolecule Research</i>	19(5)	SCI
2011	Activity of Antibacterial and Immuno of Mixture composed Chitosan and Herbal Honey	<i>Journal of Chitin and Chitosan</i>	16(2)	KSCI
2012	Effect of mixed compounds derived from natural materials on immune reaction of atopy-induced mouse	<i>Human Immunology</i>	submitted (revision)	SCI

(2) 학술 대회 발표 성과

연번	제목	일자	발표 학회	비고
1	쑤백나무(<i>Thuja orientalis</i>) 지상부 추출물의 피부 염증 유발균에 대한 항균활성 및 항산화 효과	2009.08.20.	한국생물과 학협회	
2	LMWS-Chitosan: Antibiotic and Mechanism Study in various Fungal Pathogens	2009.09.18.	한국키티킨 토산학회	
3	Antibacterial Mechanism Action and <i>in vivo</i> Evaluation of Low Molecular Weight Soluble Chitosan (LMWSC) against Human Pathogens	2009.09.18.	한국키티킨 토산학회	
4	Biological Activities and Determination Sugar Composition of Herbal Honey	2009.10.08.	한국 고분자학회	
5	Antibacterial and Antifungal Activities of Herbal Honey	2009.10.16.	한국 공업화학회	
6	The screening of materials for remedy of atopic dermatitis by antimicrobial activity assay	2009.10.26.	약용 작물학회	
7	Antibacterial Actions and <i>in vivo</i> Evaluation of LMWSC against Various Pathogens	2009.11.10.	Korean Peptide and Protein Society	
8	The antibiotic properties of herbal honey	2009.11.28.	한국생체 재료 학회	우수 논문상
9	Low-Molecular Soluble Chitosan: Antibacterial Activity and Mechanism Study	2009.11.28.	한국생체 재료 학회	
10	Chemical composition and bioactive properties of herbal honey	2010.04.09.	한국 고분자학회	
11	Antibacterial mode of action of low molecular weight soluble chitosan(LMWSC) against human pathogenic cells	2010.05.13.	한국 공업화학회	

12	A molecular mechanism of pore formation by LMWS-Chitosan in lipid membranes	2010.05.13.	한국 공업화학회	
13	Physicochemical and antimicrobial properties of natural material	2010.05.14.	한국 공업화학회	우수 논문상
14	Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds from Uiseong Jakyak(<i>Paeonia lactiflora</i> .)	2010.05.14.	한국 공업화학회	
15	Cell Specificity, Antifungal Activity and Plausible fungicida Mechanism of LMWSC	2010.08.02.	The British Lichen Society	
16	Effect of Herbal Hoey on Immune Function in NC/Nga Mice	2010.10.07.	한국 고분자학회	
17	Antibiotic activity of the KW-series with an influence of alternating pattern of lysine and tryptophan residues and their mechanism of action against the bacterial membrane	2010.10.07.	한국 고분자학회	
18	Natural Antibiotics: Translocation into the inner membarane of gram-negative bacteria	2010.10.07.	한국 고분자학회	
19	Low Molecular Weight Soluble Chitosan(LMWSC): Mechanism and Antibacterial Actions against Staphylococcus aureus	2010.10.07.	한국 고분자학회	
20	Antimicrobial Activities of Extracts from Paeonialactiflora	2010.10.08.	한국 고분자학회	
21	Mechanism and Antibacterial Actions of Low Molecular Weight Soluble Chitosan against Various Bacterial Strains	2010.10.28.	한국 공업화학회	
22	Characterization of Herbal Honey for Atopic Dermatitis Treatment	2010.10.28.	한국 공업화학회	
23	Characterization and Fractions of Extract with Antibacterial Activity	2010.10.28.	한국 공업화학회	
24	The Effect of Herbal Honey on a model of Atopic Dematitis in NC/Nga Mice	2011.04.07.	한국 고분자학회	
25	Antibiotic Actions and Biochemical Study of Low Molecular Weigh Soluble	2011.04.07.	한국 고분자학회	
26	Inhibitory effects of antimicrobial peptide on biofilm forming clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa	2011.04.07.	한국 고분자학회	
27	The effect of chitosan mixture on atopic dematitis by induced NC/Nga mice skin	2011.04.28..	한국키틴 키토산학회	우수 논문상
28	Therapeutic Effect of Herbal Honey on Atopic Sermatitis like Skin Lesions in animal Model	2011.05.12.	한국 공업화학회	
29	Antimicrobial Activity of Chitosan Oligosaccharide according to Its Molecular Weight Anti-angiogenic	2011.08.12.	Asian Federation of Biotechnolo gy	
30	Therapeutic Effects of Oligochitosan and Herbal Honey containing Antiatopic Cream on the Atopic Dermatitis	2011.10.08.	YABEC	
31	Preparation and Effect of Herbal Honey Cream for Atopic Dermatitis Therapy	2011.11.03.	한국 공업화학회	

다. 기타 성과

(1) 작품 출품

연번	내용	일자	주관	비고
1	제2회 녹색환경 천연화장품, 천연비누 공모전 - 즉백 아토피 천연 화장수 및 로션	2009.10.21.	순천대학교	장려상
2	제2회 녹색환경 천연화장품, 천연비누 공모전 - 피부염증 예방용 즉백 미용비누	2009.10.21.	순천대학교	



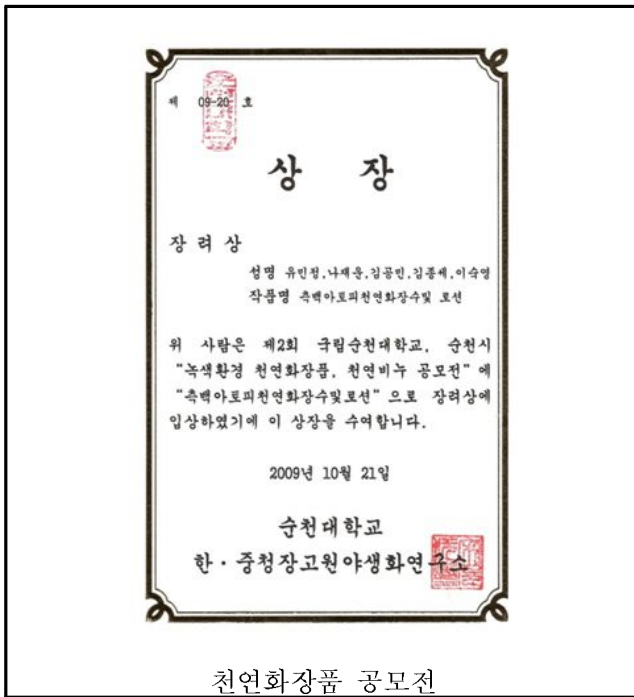
출품 화장수/로션



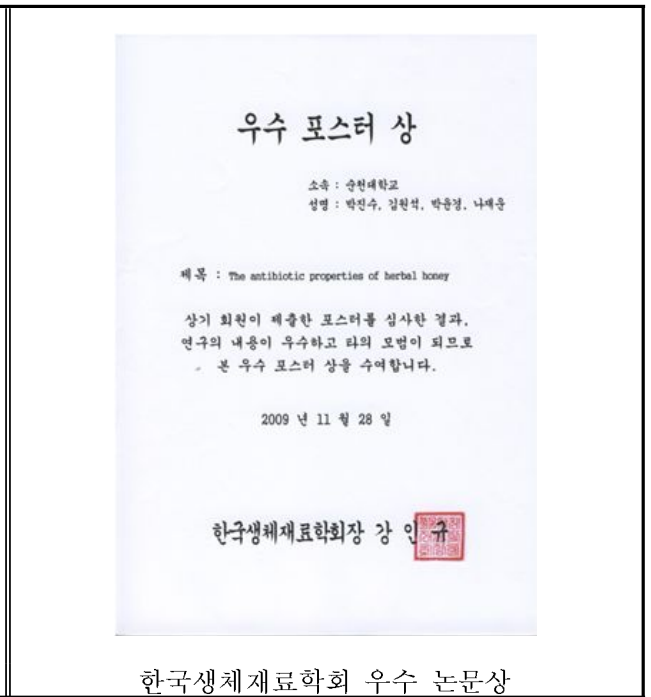
출품 비누

(2) 수상 실적

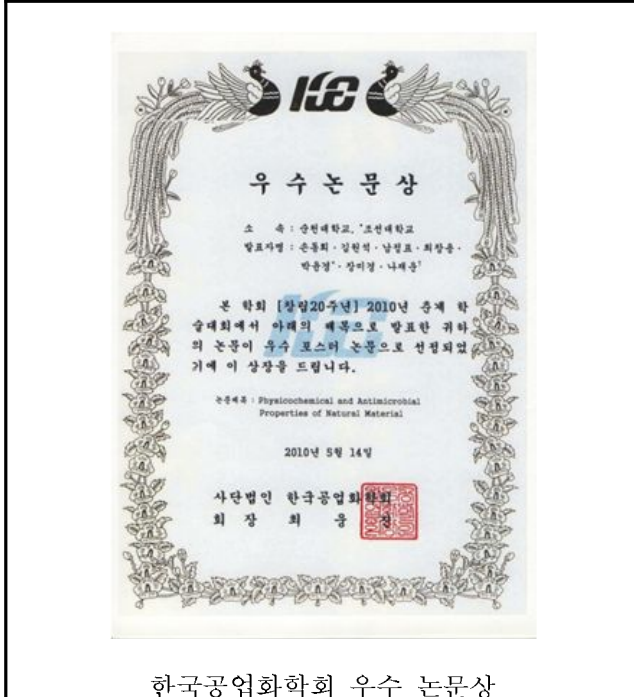
상훈	내용	일자	주관	비고
장려상	제2회 녹색환경 천연화장품, 천연비누 공모전	2009.10.21.	순천대학교	
우수 논문상	한국 생체 재료 학회 우수 논문상 -The antibiotic properties of herbal honey	2009.11.28.	한국생체 재료 학회	
우수 논문상	한국공업화학회 우수 논문상 -Physicochemical and antimicrobial properties of natural material	2010.05.14.	한국 공업화학회	
우수 논문상	한국키티킨키토산학회 우수 논문상 -The effect of chitosan mixture on atopic dematitis by induced NC/Nga mice skin	2011.04.28.	한국키티킨 키토산학회	



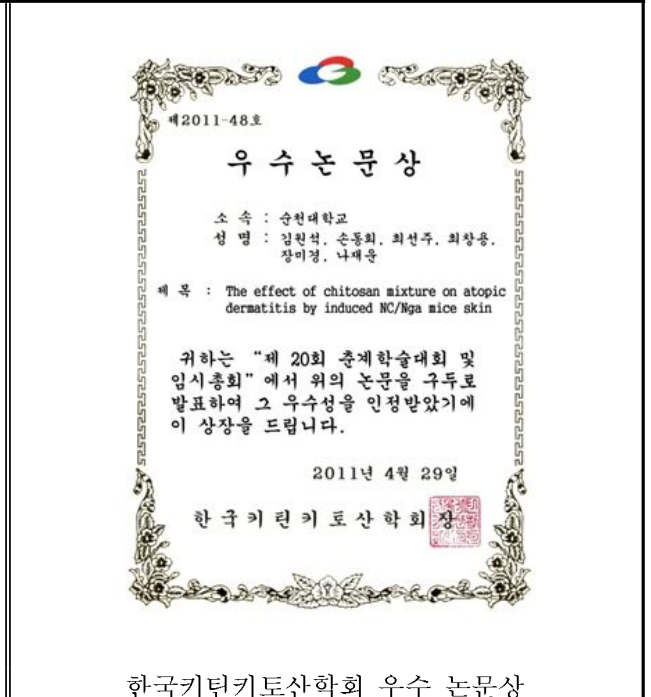
천연화장품 공모전



한국생체재료학회 우수 논문상



한국공업화학회 우수 논문상



한국키티킨키토산학회 우수 논문상

제 2 절. 실용화 · 산업화 계획

본 연구의 결과는 기존의 상업화된 아토피성 피부염과 차별화된 것으로써, 스테로이드제를 사용하지 않고 증상에 더욱 효과적인 것으로 확인되어, 연구 결과로부터 특허 등록된 성분을 이용하여 참여기관에서 제품화를 추진하고 있다.

1. 제품화 및 실용화 방안

- 디자인 전문 업체와 계약을 통하여 용기 디자인 확정, 상표 로고 확정 및 상표 등록 출원
- 현재 스킨케어 제품화 단계로 2종류의 제품을 출시하여 샘플 테스트를 진행 중에 있다.

○ 제품명 : ATO SOOP lotion


- 특허 성분 함유 및 미세 입자화 및 유화 기술을 이용하여 유효성분의 체내 이용률 증가

○ 제품명 : ATO SOOP mist

- 특허 성분 함유 및 빠른 피부 진정 효과

2. 마케팅 방안

- 온라인 판매를 위한 쇼핑몰 제작
 - 홈페이지 제작 전문업체와 쇼핑몰 제작 계약 및 제작
 - 도메인 등록 : www.naturalliz.com, www.naturaliz.co.kr, www.atooop.com
www.dy-namic.com, www.dy-namic.co.kr
- 사업의 확장성을 위하여 회사이름과 네추럴리즈를 통합하여 등록하였음.

 서울시 구로구 구로동 182-13 TEL : 1544-4370
대릉포스트타워 2차 11층 (주)가비아 FAX : 02)6008-6626

:: 도메인 및 모바일 주소 등록 신청서 접수 내역 ::


(주)가비아 서비스를 이용해 주셔서 감사합니다.
아래와 같이 도메인 및 모바일 주소 등록 신청서가 접수되었습니다.

- 아래 계좌로 도메인 및 모바일 주소 등록비용을 입금해 주시기 바랍니다.

주문번호	REG20111129-511970D		
결제금액	66,000원	입금은행	국민은행
입금계좌	67639011478755	예금주	LG데이콤(썬데이콤) or 가비아
신청도메인 및 모바일 주소	DY-NAMIC.COM(1년), DY-NAMIC.CO.KR(1년), ATOSOOP.COM(1년)		

▷ 도메인 및 모바일 주소 등록이 완료되면 등록 완료 메일을 보내드립니다.

가비아 도메인 고객센터
운영시간 : 오전9시 ~ 오후 8시 (24시간 정액상담)
대표전화 : 1544-4370 | FAX : 02)6008-6626

 서울시 구로구 구로동 182-13 TEL : 1544-4370
대릉포스트타워 2차 11층 (주)가비아 FAX : 02)6008-6626

:: 도메인 및 모바일 주소 등록 신청서 접수 내역 ::

(주)가비아 서비스를 이용해 주셔서 감사합니다.
아래와 같이 도메인 및 모바일 주소 등록 신청서가 접수되었습니다.

- 아래 계좌로 도메인 및 모바일 주소 등록비용을 입금해 주시기 바랍니다.


주문번호	REG20111129-511485D		
결제금액	44,000원	입금은행	국민은행
입금계좌	67639011996596	예금주	LG데이콤(썬데이콤) or 가비아
신청도메인 및 모바일 주소	NATURALLIZ.COM(1년), NATURALLIZ.CO.KR(1년)		

▷ 도메인 및 모바일 주소 등록이 완료되면 등록 완료 메일을 보내드립니다.

가비아 도메인 고객센터
운영시간 : 오전9시 ~ 오후 8시 (24시간 정액상담)
대표전화 : 1544-4370 | FAX : 02)6008-6626

□ 온라인 통신 판매 신고

- 쇼핑몰을 통한 통신 판매를 위한 신고

	
제 2012-전남순천-00414 호	관리부서명 경제통상과
	담당자명 장기준
	전화번호 061-749-3355

통신판매업신고증

상 호 : 다이나믹(주)순천점

소재지 : 전라남도 순천시 중앙로 255 (석현동, 순천대학교 공과대학 1호관 207)

대표자(성명) : 손선옥외 1명

주민등록번호 : 600515-23*****

전화번호 : 061-754-8247


전자우편 : cckyddyd@hanmail.com

인터넷도메인 : www.naturalliz.com

전자상거래등에서의소비자보호에관한법률 제12조제1항, 동법시행령 제13조제2항 및 동법시행규칙 제8조제2항의 규정에 의하여 통신판매업의 신고를 하였음을 증명합니다.

2012년 02월 27일

전라남도 순천시



3. 제품 생산 계획

- 현재 2종에서 아토피 증상에 따른 다양한 제품군 개발을 추진하고 있음
(ATO SOOP salve barm, ATO SOOP cream, ATO SOOP wash)
- 초기에는 참여기업에서 특허성분을 제공하고 OEM 업체를 통한 제작
- 전라남도 장흥군 편백숲 휴양림 일대의 해당산단에 입주를 추진하고 있으며, 대지 2000평, 건평 500평 규모의 생산설비(약 80억원) 투자를 계획하고 있음 (2012년 4월 중 장흥군과 다이나믹 간의 투자협약을 체결할 계획)

4. 수출계획

- 제품의 북미지역(캐나다) 등의 수출을 위하여 제품 박스의 한글 표기로 영문으로 디자인 하는 작업이 진행되고 있음
- 동남아 지역의 경우 우리나라처럼 아토피성 피부염이 심하지 않아 그 시장이 작으나 이 지역의 경제 발달 속도는 환경적 원인에 의한 아토피성 피부염의 발병이 증가할 것으로 판단되어 시장의 선점을 위하여 현재 참여 기업의 영업망을 통하여 영업 전략을 구상하고 있음

제 3 절. 타연구 등에 활용

1. 추가연구

가. 키토산의 항균성

- 분자량대별 키토산의 생리활성 특성을 규명하고, 특정 분자량 대에서 우수한 항균활성을 확인한 결과를 바탕으로 추후 병충해 등과 관련된 연구를 진행하여 친환경 유기 농자재 개발을 추진하고자 함

나. 기능성 물질 담지 기술

- 안정성 저하로 인하여 사용에 한계점을 보이는 천연 소재를 천연고분자에 담지함으로써 기능성 물질의 응용성 확대

다. 혼합조성물의 항균, 항진균 활성

- 혼합조성물의 우수한 항균, 항진균 활성 및 알러지 반응 억제 효과를 바탕으로 아토피 피부염 치료제뿐 아니라 습진, 질염, 피부염증, 비듬 및 무좀 등의 피부질환 치료제, 침구/의류 등의 방충제 및 향생제 대체 물질로 활용 가능할 것으로 사료되어 추가 연구를 통해 이러한 제품화를 추진하고자 함

2. 연구결과 활용

가. 기업체와 컨소시엄

□ 기업체와 지속적인 컨소시엄 관계를 유지하여 기업의 애로사항 해결 및 이를 통한 파생 기술에 원천 기술 확보

나. 학술성과 홍보

□ 연구결과의 업그레이드 및 신규 연구 분야 창출로 동분에 대하여 매년 SCI급 논문 게재 및 학술대회 발표 참여

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

아토피 피부염의 치료를 위한 치료제의 개발은 연구개발 초기와 특이적으로 변화되는 상황은 없으며, 여전히 미국, 일본 등에서 연구 개발을 주도하고 있다. 대부분의 연구는 스테이로이드의 용량을 줄이는 방향으로 연구가 진행되고 있다. 이러한 점은 우리의 연구결과가 세계적인 트렌드와 일치하고 있으며, 세계시장에서 경쟁력을 갖는 것으로 보인다.

아울러 현재 아토피성 피부염 및 트러블성 피부염 환자는 여전히 증가하고 있으며, 특히 북미 등의 건조한 지역에서 아토피성 피부염 환자가 급증하는 것으로 보고되고 있어, 본 연구결과에 의한 제품의 수출 경쟁력도 있을 것으로 판단된다.

제 7 장. 참고문헌

1. Macheleidt O, Kaiser HW, Sandhoff K., *J Invest Dermatol*, 119, 166 (2002)
2. Cork MJ, Robinson DA, Vasilopoulos Y, Ferguson A., Moustafa M, MacGowan A. *J Allergy Clin Immunol.*, 118, 3 (2006)
- 3 Choi, Y. S. You, C. E., Park, M. Y., Son, S. J., Whang, K. U. *Korean J. Dermatol.*, 44, 824 (2006)
4. Leung, D.Y.M., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105, 860 (2000)
5. Cooper, k.D., *J. Invest. Dermatol.*, 102, 128 (1994)
6. Pastore S, Mascia F, Giustizieri ml, Giannetti A, Girolomoni G., *Arch Immunol. Ther. Exp*, 481, 497 (2000)
7. S. Romagnani, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105, 399 (2000)
8. R.T. Stein, D. Sherrill, W.J. Morgan, C.J. Holberg, M. Halonen, L.M. Taussig, A.L. Wright, F.D. Martinez, *Lancet*, 354, 541 (1999)
9. Ernst P, Cormier Y., *J Respir Crit Care Med*, 161, 1563 (2000)
10. Van der Kleij H.P., Kraneveld A.D., Van Houwelingen A.H., Kool M., Weitenberg A.C., Redegeld F.A., Nijkamp F.P., *Inflammation*, 28, 115 (2004)
11. Boguniewicz M, Leung DY., *J Allergy Clin Immunol.*, 117, 475 (2006)
12. Heinzmann A, Daser A.. *Int Arch Allergy Immunol*, 127, 170 (2002)
13. Sung, H.C., W.J. Lee, S.J. Lee and D.W. Kim., *Kor. J. Dermatol.*, 44, 1051 (2006)
14. Y.L. Park, H.D. Kim, K.H. Kim, M.N. Kim, J.W. Kim, Y.S. Ro, C.W. Park, K.H. Lee, A.Y. Lee, S.H. Cho, and J.H. Choi,, *Korean J. Dermatol*, 44, 659 (2006)
15. 생명공학정책연구센터, 특허 분석 보고서 (2007)
16. Wuthrich B., *Ann Allergy Asthma Immunol.* 83, (1999) 464
17. Shiohara, T., Hayakawa, J., Mizukawa, Y., *J. of Derm. Sci.*, 36, 1 (2004)
18. Smith CH.. *Clin Exp Dermatol*, 25, 567 (2000)
- 19 H. Furukawa, K. Nakamura, X. Zheng, M. Tojo, N. Oyama and H. Akiba, et al., *J Dermatol Sci*, 35, 35 (2004)
20. D. H. Song, H. J. Kim, *J. Kor. Soc. Cosm.*, 15, (4) 1243 (2009)
21. Arellano, F. M., *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 860 (2007)
22. Furue, M., Terao, H., Moroi, Y., Koga, T., Kubota, Y., Nakayama, J., Furukawa, F.,

- Tanaka, Y., Katayama, I., Kinukawa, N., Nose, Y., Urabe, K., *J. Dermatol.* 31, 277 (2004)
- 23 K.M. Russell, P.C. Molan, A.L. Wilkins and P.T. Holland., *J. Agric. Food Chem.*, 38, 10 (1990)
24. S.K. Gupta, H. Singh and A.C. Varshney et al., *Ind J Anim Sci.*, 62, 521 (1992)
25. R.J. Weston,, *Food Chem.*, 70, 427 (2000)
26. D. H. Chung, S. H. Baek, *korean J. food and Nutr.*, 15(2) 158 (2002)
27. M. E. Jung, S. K. Lee, *korean j. Food Sci. Ani. Resour.* 28(3) 263 (2008)
28. B. T. Oh, C. H. Kim, S. H. Cho, *J. Agriculture and Life Sciences*, 40(1) 21 (2006)
29. S. J. Kim, J. H. Park, S. Y. Choi, K. H. Son, K. U. Kim, *korean J. Medicinal Crop Sci.*, 15(1) 6 (2007)
30. D. Knorr., *Food Technol.*, 45, 114 (1991)
31. I. Ikeda, M. Sugano, K. Yoshida, E. Sasaki, Y. Iwamoto and K. Hatano, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 431 (1993)