



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0125616
(43) 공개일자 2016년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/752 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/752 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0056243
(22) 출원일자 2015년04월22일
심사청구일자 2015년04월22일

(71) 출원인
농업회사법인(주)산들촌
전라남도 담양군 담양읍 예코길 11-9
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
윤호근
경기도 고양시 일산동구 강송로 195 (마두동, 강촌마을8단지아파트) 801동 2202호
최경철
서울특별시 양천구 목동서로 38 (목동, 목동신시가지아파트1단지) 123동 1303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 유자 추출물을 함유한 면역증강용 조성물

(57) 요약

본 발명은 유자 추출물을 함유하는 면역저하증 보호용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 추출물은 대식세포에 대한 세포독성실험(실험예 1)에서 독성을 나타내지 않았으며; 산화질소(Nitric Oxide) 유도능에 미치는 영향(실험예 2)에서 NO의 분비가 농도 의존적으로 증가함을 확인하였으며; TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 등의 면역능 관련 시토킨 발현(실험예 3)을 농도 의존적으로 증가시킴을 확인하였으며; NK(Natural Killer) 세포 활성을 증가시키고(실험예 4); 비장세포의 증식을 촉진시키는 등(실험예 5)의 면역기능을 활성화시킴을 확인하여, 면역 저하증의 치료 및 예방용 식품, 건강기능식품, 의약품, 의약외품 등의 조성물로 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

대표도 - 도2

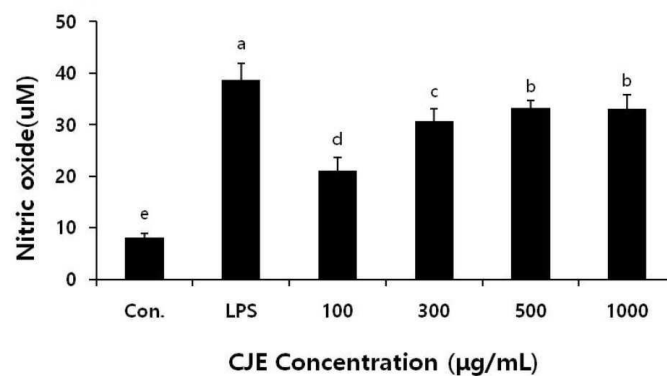


Fig. 2. Effect of CJE on nitric oxide production by RAW264.7. Values with the different letters above bargraphs are significantly different by one way ANOVA test(P<0.05).

(72) 발명자

차민석

전라남도 담양군 담양읍 예코길 11-9

유양희

광주광역시 북구 호동로 100 현대아파트 103동
1503호

김진영

광주광역시 서구 화정로 96 중흥광명아파트 105동
1501호

명세서

청구범위

청구항 1

유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역저하증의 치료 및 예방용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매에 가용한 추출물임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 면역저하증은 화학요법 및 방사선요법과 같은 항암요법에 의한 면역기능의 저하 또는 골수이식 후 면역저하로 인한 질환, 면역계손상으로 인한 에이즈 및 면역기능의 저하로 인한 암질환임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 4

유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역저하증의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제 4항에 있어서, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태인 건강기능식품.

청구항 6

유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역저하증의 예방 및 개선용 건강보조식품.

청구항 7

유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역저하증의 예방 및 개선용 식품 또는 식품첨가제.

청구항 8

유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 유자 추출물을 함유한 면역증강용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] [문헌 1] Immunology. 49, 1992 Dig dis Sci. 52, pp 1890-1896, 2007; J Life Sci. 19, pp 479-485, 2009; Biol Pharm Bull. 27, pp 617-620, 2004

[0003] [문헌 2] J. Allergy clin immunol. 9, pp 616, 1993; Immunology. 47, pp 75, 1982

[0004] [문헌 3] A-Reum Yu, Ho-Young Park, Yun-Sook Kim, Sang-Keun Ha, Hee-Do Hong, Hee-Don Choi. 2012. Immuno-enhancing Effect of Seed Extracts on a RAW 264.7 Macrophage Cell Line. J Korean Soc Food Sci Nutr 41(12): 1671-1676

[0005] [문헌 4] Uthaisangsook S, Day NK, Bahna SL, Good RA, Haraguchi S. 2002. Innate immunity and its role against infections. Ann. Allergy Asthma Immunol. 88: 253-264

[0006] [문헌 5] Birk RW, Gratchev A, Hakiy N, Politz O, Schledzewski K, Guillot P, Orfanos CE, Goerdts S.

2001. Alternative activation of antigen-presenting cells: concepts and clinical relevance. *Hautarzt* 52: 193-200

- [0007] [문헌 6] Seon A Yoo, Ok Kyung Kim, Da-Eun Nam, Yongjae Kim, Humyoung Baek, Woojin Jun, Jeongmin Lee. 2014. Immunomodulatory Effects of Fermented *Curcuma longa* L. Extracts on RAW 264.7 Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(2): 216-243
- [0008] [문헌 7] Myung-Woo Byun. 2013. Immunomodulatory Activities of Apple Seed Extracts on Macrophage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42(9): 1513-1517
- [0009] [문헌 8] Yi Seul Seo and Kwang-Soon Shin. 2012. Immune System-Stimulating Activities of Mucilage Polysaccharides Isolated from *Opuntia humifusa*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41(1): 95-102
- [0010] [문헌 9] A-Reum Yu, Ho-Young Park, In-Wook Choi, Yong-Kon Park, Hee-Do Hong, Hee-Don Choi. 2012. Immune Enhancing Effect of Medicinal Herb Extracts on a RAW 264.7 Macrophage Cell Line. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41(11): 1521-1527
- [0011] [문헌 10] 정보섭외, 도해향약대사전, 영림사, pp782-783, 1998년.
- [0012] [문헌 11] KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 43, No. 1, pp. 65~71 (2011) 이한나 외 4명, 등골나물 추출물의 항염증효과;
- [0013] [문헌 12] KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 43, No. 1, pp. 65~71 (2011) 이한나 외 4명, 등골나물 추출물의 항염증효과
- [0014] [문헌 13] *J Korean Soc Food Sci Nutr* 한국식품영양과학회지 천년초에서 분리한 점질다당의 면역자극 활성 서이슬, 신광순, vol 41, pp 95~ 102, 2012
- [0015] [문헌 14] *J Korean Soc Food Sci Nutr* 한국식품영양과학회지 동과 분획물이 3T3-L1 지방세포 분화 억제에 미치는 영향 유양희, 전우진, vol 41, pp 895~900, 2012

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 인체는 항상성을 유지하려고 하는 특징을 가지고 있으며 이는 면역 시스템에서도 작용을 하게 된다. 면역이란 생체가 자기 성분 이외의 물질 등이 생체의 항상성을 깨뜨리거나 자기를 위협하는 것을 배제하기 위해 일어나는 일련의 생체 방어 반응을 의미하며 피부, 소화관, 호흡기 등을 통해 침입한 유해물질로부터 신체를 보호하는 방어체계에 외부 자극물질을 제거하는 대식 작용을 하거나, 상처에 발생한 심각한 염증을 줄이는 작용을 통한 항상성 유지 활동이라고 할 수 있다. 체내 병원균의 유입으로 인해 활성화 되었던 염증 반응을 포함한 모든 면역 작용은 병원균의 제거가 이루어지고 나면 정상의 상태로 돌아오게 되지만 면역 조절에 어려움이 있는 경우, 면역 반응이 정상인 사람에 비해 현저히 높거나 낮게 발생한다. 면역기능이 결핍되거나 저하된 상태를 면역부전이라고 하며 이 상태에서는 면역반응이 제대로 활성화 되지 못하여 체내의 이물질에 대한 반응을 제대로 못하여 감염을 일으키게 된다. 반대로 면역과민반응은 일부의 면역반응이 과하게 반응하여 면역체계가 불균형을 이루어 결과적으로 알레르기 반응을 일으키는 것이다 (*Immunology*. 49, 1992; *Dig dis Sci*. 52, pp 1890-1896, 2007; *J Life Sci*. 19, pp 479-485, 2009; *Biol Pharm Bull*. 27, pp 617-620, 2004).
- [0017] 면역 체계가 정상적으로 조절되지 못하고 불균형을 이루게 되면 체내 사이토카인의 불균형, T/B 세포의 증식 불균형, 항산화 영양소 고갈 등의 원인으로 면역 조절에 장애가 발생하여 염증성 물질 분비가 증가하여 세포와 조직에 손상을 입히게 되며 병원체 유입에 대처하지 못하여 염증의 심화가 이루어질 수 있다. 따라서 인체의 면역 반응은 균형을 이루어 조절이 정상적으로 되어야 건강을 유지할 수 있으므로 면역 조절 능력은 질병 예방과 치료에 중요시 된다 (*J Allergy clin immunol*. 9, pp 616, 1993; *Immunology*. 47, pp 75, 1982).
- [0018] 비장에서는 면역조절에 관여하며 interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α 과 interleukin (IL)-1 β , IL-5, IL-6, PGE2 등의 사이토카인을 분비한다. 이런 사이토카인은 면역반응의 실행단계에서 작용을 나타내며, 면역 세포와 염증계간의 신호 전달 과정에서도 중요한 역할을 한다.

- [0019] 2000년 이후 전 세계적으로 급성호흡기증후군 SARS, 조류독감, 에볼라 바이러스 등과 같은 급성 신종 전염병들이 등장하면서 이러한 전염병에 대한 인체의 방어능력인 면역력의 중요성이 더욱 대두되고 있다. 인체의 체내 항상성이 깨지거나 병원균의 침입과 같이 위협이 되는 것들에 대한 생체방어력인 면역력은 대식세포나 Natural killer(NK) 세포 등이 관련된 비특이적 면역과 T 세포나 B 세포가 관여하는 특이적 면역으로 분류할 수 있다(1. A-Reum Yu, Ho-Young Park, Yun-Sook Kim, Sang-Keun Ha, Hee-Do Hong, Hee-Don Choi. 2012. Immuno-enhancing Effect of Seed Extracts on a RAW 264.7 Macrophage Cell Line. J Korean Soc Food Sci Nutr 41(12): 1671-1676). 병원균이 인체에 침입했을 때 neutrophil(호중구), monocyte(단핵구), macrophage(대식세포)와 같은 탐식세포(phagocytes)들은 가장 먼저 인체를 병원균들로부터 방어하는 선천 면역반응의 주요 세포군이다(Uthaisangsook S, Day NK, Bahna SL, Good RA, Haraguchi S. 2002. Innate immunity and its role against infections. Ann. Allergy Asthma Immunol. 88: 253-264). 특히, 대식세포는 상피세포 장벽 이후의 생체방어에 있어 최초 대응세포로 항원제시세포(antigen presenting cell)로써의 기능도 수행하며, 적응면역과 관련하여 T 세포에 작용에도 영향을 주고(3. Birk RW, Gratchev A, Hakiy N, Politz O, Schledzewski K, Guillot P, Orfanos CE, Goerdt S. 2001. Alternative activation of antigen-presenting cells: concepts and clinical relevance. Hautarzt 52: 193-200), 병원균에 감염된 세포나 암세포 등도 제거하고, 면역반응에 기여하는 nitric oxide (NO) 와 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 cytokine등도 분비한다(4Seon A Yoo, Ok Kyung Kim, Da-Eun Nam, Yongjae Kim, Humyoung Baek, Woojin Jun, Jeongmin Lee. 2014. Immunomodulatory Effects of Fermented Curcuma longa L. Extracts on RAW 264.7 Cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 43(2): 216-243).
- [0020] 인체의 적응면역이 작동하기 전에 질병들로부터 대응할 수 있는 선천성 면역기능을 담당하는 대식세포의 활성 인자를 찾기 위한 천연물질들의 연구가 활발히 진행되고 있다. 유 등(5.A-Reum Yu, Ho-Young Park, In-Wook Choi, Yong-Kon Park, Hee-Do Hong, Hee-Don Choi. 2012. Immune Enhancing Effect of Medicinal Herb Extracts on a RAW 264.7 Macrophage Cell Line. J Korean Soc Food Sci Nutr 41(11): 1521-1527)은 생약 추출물을 이용하여 대식세포의 면역증강 효과를 보고하였고, 변은 사과씨 에탄올 추출물을 이용하여 대식세포 면역조절 활성 보고하였으며(6.Myung-Woo Byun. 2013. Immunomodulatory Activities of Apple Seed Extracts on Macrophage. J Korean Soc Food Sci Nutr 42(9): 1513-1517), 유 등은 RAW264.7 대식세포주에서 발효율금의 면역조절 효과를 보고하였다. (4Seon A Yoo, Ok Kyung Kim, Da-Eun Nam, Yongjae Kim, Humyoung Baek, Woojin Jun, Jeongmin Lee. 2014. Immunomodulatory Effects of Fermented Curcuma longa L. Extracts on RAW 264.7 Cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 43(2): 216-243)
- [0021] 대식세포는 탐식작용을 하는 면역세포로 인체의 거의 모든 조직에 존재하는 내재면역의 중요한 1차 방어기능을 담당한다. Macrophage는 세균이나 이물질을 탐색, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine을 분비하고 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 면역세포이다(12Yi Seul Seo and Kwang-Soon Shin. 2012. Immune System-Stimulating Activities of Mucilage Polysaccharides Isolated from Opuntia humifusa. J Korean Soc Food Sci Nutr 41(1): 95-102). 대식세포에서 생성되는 NO는 면역계에서 종양세포나 세포내 감염된 미생물에 대한 방어작용을 하는 중요한 신호전달물질로 유 등은 감초, 건지황, 당귀, 도라지, 목련료의 생약추출물의 RAW264.7에서의 NO생성능을 평가하였는데, 이들 생약추출물들은 양성대조군인 LPS의 처리와 비슷한 수준으로 대식세포의 NO생성능을 보였었다(5.A-Reum Yu, Ho-Young Park, In-Wook Choi, Yong-Kon Park, Hee-Do Hong, Hee-Don Choi. 2012. Immune Enhancing Effect of Medicinal Herb Extracts on a RAW 264.7 Macrophage Cell Line. J Korean Soc Food Sci Nutr 41(11): 1521-1527).
- [0022] 유자는 운향과의 식물인 유자나무 (*Citrus junos* Tanaka.)의 과실로서, 성분으로는 헤스페레딘(hesperidin), 구연산, 사과산, 호박산, 당류, 펙틴(pectin), 제라니올(geraniol), 리모넨(limonene) 쿠마린(coumarin) 등을 함유한 것으로 알려져 있으며, 제주도 및 전남지역에 분포하며 차와 같은 식품으로 음용되고 있다 (정보섭외, 도해향약대사전, 영림사, pp782-783, 1998년).
- [0023] 이에 본 발명자들은 유자 추출물을 대상으로 한 대식세포에 대한 세포독성실험(실험예 1)에서 독성을 나타내지 않았으며; 산화질소(Nitric Oxide) 유도능에 미치는 영향(실험예 2)에서 NO의 분비가 농도 의존적으로 증가함을 확인하였으며; TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 등의 면역능 관련 시토킨 발현(실험예 3)을 농도 의존적으로 증가시킴을 확인하였으며; NK(Natural Killer) 세포 활성을 증가시키고(실험예 4); 비장세포의 증식을 촉진시키는 등

(실험예 5)의 면역기능을 활성화시킴을 확인하여, 면역증진 효과가 탁월함을 확인하고 면역 저하증의 치료 및 예방용 식품, 의약품, 의약외품 등의 조성물로 유용하게 이용될 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0024] 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 조성물을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역저하증의 치료 및 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [0026] 본원에서 정의되는 추출물은 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매 바람직하게는 물 또는 물 및 주정의 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.
- [0027] 상기 추출물의 약학조성물은 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%로 사용이 가능하다.
- [0028] 본원에서 정의되는 면역저하증은 화학요법 및 방사선요법과 같은 항암요법에 의한 면역기능의 저하 또는 골수이식 후 면역저하로 인한 질환, 면역계손상으로 인한 에이즈 및 면역기능의 저하로 인한 암질환 등과 같은 면역저하증, 바람직하게는 화학요법 및 방사선요법과 같은 항암요법에 의한 면역기능의 저하 또는 골수이식 후 면역저하로 인한 질환, 보다 바람직하게는, 고령자에서의 세균성/바이러스성 감염, 만성 호흡기감염, 만성 요로감염, 욕창, 독감, 폐렴, 소아에 다발하는 수두, 홍역, 돌발성 발진, 수족구병, 풍진, 또는 크론병을 포함한다.
- [0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명의 추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다.
- [0031] 예를 들어, 건조 상태의 유자에 시료 중량의 약 1 내지 100배(v/w)의 물, 주정, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매를 가하여 30 내지 150℃, 바람직하게는 50 내지 120℃에서 1 내지 24시간, 바람직하게는 2 내지 12시간동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각추출 또는 가열추출법, 바람직하게는, 환류 추출법으로 2차 추출하는 제 1단계; 상기 수득한 시료를 여과하여 농축시키는 제 2단계: 상기 농축된 추출물을 동결건조시켜 분말을 수득하는 제 3단계를 포함하는 공정을 통하여 본원 발명의 추출물을 제조가능하다.
- [0032] 상기 제조방법으로 제조된 유자추출물을 대상으로 한 대식세포에 대한 세포독성실험(실험예 1)에서 독성을 나타내지 않았으며; 산화질소(Nitric Oxide) 유도능에 미치는 영향(실험예 2)에서 NO의 분비가 농도 의존적으로 증가함을 확인하였으며; TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 등의 면역능 관련 시토킨 발현(실험예 3)을 농도의존적으로 증가시킴을 확인하였으며; NK(Natural Killer) 세포 활성을 증가시키고(실험예 4); 비장세포의 증식을 촉진시키는 등(실험예 5)의 면역기능을 활성화시킴을 확인하여, 면역 저하증의 치료 및 예방에 유용함을 확인하였다.
- [0033] 따라서, 본 발명은 상기 제조방법 및 상기 제조방법으로 유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 약학 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 면역저하증의 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 99% 중량으로 포함된다.
- [0035] 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 또한 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로

필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 외용제제에는 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 g/kg 내지 5 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역저하증의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0041] 또한, 본 발명은 상기 유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역저하증의 예방 및 개선용 건강보조식품을 제공한다.

[0042] 따라서, 또한, 본 발명은 유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역저하증의 예방 및 개선용 식품 또는 식품첨가제를 제공한다.

[0043] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 면역저하증의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0044] 본 발명의 추출물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0045] 본 발명의 상기 추출물은 면역저하증의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0046] 본 발명의 식품은 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 환자식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 추출물을 첨가하는 것도 포함된다. 본 발명의 식품 조성물은, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 추출물은, 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량부에 대하여 0.1 내지 70 중량부, 바람직하게는 2 내지 50 중량부 첨가될 수 있다. 상기 추출물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형

제, 결합제, 봉해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.

[0047] 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제, 기타 영양제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0049] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0050] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 추출물은 대식세포에 대한 세포독성실험(실험예 1)에서 독성을 나타내지 않았으며; 산화질소(Nitric Oxide) 유도능에 미치는 영향(실험예 2)에서 NO의 분비가 농도 의존적으로 증가함을 확인하였으며; TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 등의 면역능 관련 시토킨 발현(실험예 3)을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였으며; NK(Natural Killer) 세포 활성을 증가시키고(실험예 4); 비장세포의 증식을 촉진시키는 등(실험예 5)의 면역기능을 활성화시키는 것을 확인하여, 면역 저하증의 치료 및 예방용 식품, 의약품, 의약외품 등의 조성물로 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 CJE 시료의 RAW264.7 대식세포의 세포생존율에 미치는 영향을 나타낸 도이며(상기 결과는 삼중치의 mean \pm D를 나타내고. n.s.: 유의성 없음(no significance)을 의미함);

도 2은 CJE 시료의 RAW264.7 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (막대상 서로 상이한 문자는 ANOVA 시험법(P<0.05)상에 유의적으로 상이함);

도 3는 CJE 시료의 RAW264.7 대식세포의 시토킨 발현 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (막대상 서로 상이한 문자는 ANOVA 시험법(P<0.05)상에 유의적으로 상이함);

도 4는 CJE 시료의 비장세포에서 NK 세포 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (막대상 서로 상이한 문자는 ANOVA 시험법(P<0.05)상에 유의적으로 상이함);

도 5는 CJE 시료의 마우스 1차 비장세포 증식능에 미치는 영향을 나타낸 도이다 (막대상 서로 상이한 문자는 ANOVA 시험법(P<0.05)상에 유의적으로 상이함);

도 6는 CJE 시료 및 CJE-DY의 비장세포에서 NK 세포 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (막대상 서로 상이한 문자는 ANOVA 시험법(P<0.05)상에 유의적으로 상이함); ; CJE : 300 ug/mL의 유자추출물; CJE+DY : 유자추출물 + 덱스트린 제제; DY : 덱스트린 (양성대조군)을 각각 의미함).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0053] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1. 시료 1의 제조**

[0055] 유자 30% 주정추출물(Citrus junos Sieb. ex Tanaka Ethanol extract-CJE) 제조에 사용된 유자 0.12kg는 (경일 약업사, 경남 거제산)에서 구입하였고, 30% 에탄올 0.36L과 정제수 0.84L로 (환류추출, 추출온도 90℃ 및 시간 4hr)추출한 후 추출액을 Whatman No.4 filter paper(Whatman plc, Kent, UK)로 여과하여, 감압농축기(100kg, (주)대명이엔지)를 사용하여 추출용매를 제거한 후 동결건조하여 얻어진 24g분말 형태(이하 CJE라 함)를 다시 멸균한 3차 증류수에 녹여서 실험에 사용하였다.

[0056] **실시예 2. 시료 2의 제조**

[0057] 상기 실시예 1의 유자 30% 주정추출물과 70%텍스트린(말토텍스트린, 대상, 한국)를 완전하게 혼합하여 실험에 및 제제예에 사용하였다(이하, “CJE+DY” 라 함).

[0058] **실험예 1. 세포생존율 실험**

[0059] 상기 실시예 시료의 면역증진 효과를 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 대식세포에 대한 세포독성을 하기와 같이 실험을 수행하였다(J Korean Soc Food Sci Nutr 한국식품영양과학회지 동과 분획물이 3T3-L1 지방세포 분화 억제에 미치는 영향 유양희, 전우진, vol 41, pp 895~900, 2012)

[0060] 1.1. 세포 배양

[0061] RAW264.7은 마우스 유래의 대식세포(TIB-71, ATCC)이고, YAC-1(TIB-160, ATCC)세포는 마우스 림프종 유래 세포로 두 세포주 모두 경희대학교 의학영양학과(Suwon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양을 위한 배지의 조성은 RAW264.7 세포는 DMEM(Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA)에, YAC-1 세포는 RPMI1640 (Hyclone Laboratories)에 각각 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Hyclone Laboratories)과 100U/mL penicillin, 100 µg/mL sterptomycin을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0062] 1.2. 세포 생존율 실험

[0063] CJE의 RAW264.7 세포에 대한 최적 처리 농도를 결정하기 위하여 WST(Water soluble Tetrazolium Salt) 시약인 키트(EZ-CYTOX Cell Viability assay kit, EZ1000, DAEILLAB SERVICE CO., LTD, Seoul, Korea)를 이용하여 살아 있는 세포의 양을 측정하였다.

[0064] RAW254.7 세포는 1×10^4 cells/well이 되도록 96 well cell culture plate에 분주하여 안정화시킨 후 유자 추출물을 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL의 농도로 DMEM 배지에 희석하여 48시간 배양하였다. WST 시약을 20 µL씩 각 well에 넣고 37℃, 5% CO₂ 조건에서 3시간 동안 반응시킨 후 판독기 (microplate reader, SpectraMAX340PC384, Molecular Devices, CA, USA)에서 450 nm로 흡광도를 측정하였다.

[0065] 1.3. 실험 결과

[0066] 세포 실험에 사용할 유자추출물의 최적 농도를 결정하기 위해 실시한 세포독성 시험에서 유자 30%주정 추출물(CJE)은 최저 농도 25 µg/mL에서부터 최고농도 1000 µg/mL까지 RAW264.7 세포에 처리 한 결과 최고 농도에서도 48시간까지 독성을 나타내지 않았다. 세포독성 시험 결과는 도 1 및 표 1에 제시하였으며, 독성실험 결과에서 확인된 안전농도 범위 안에서 이 후의 실험을 진행하였다.

표 1

CJE Con.	0	25	50	100	200	400	600	800	1000
Mean±SEM	100 ±4.4	103.9 ±3.2	103.8 ±4.7	104.5 ±3.7	108.4 ±1.4	107.3 ±4.0	103.9 ±4.2	106.9 ±2.0	103.5 ±1.8

실험예 2. 산화질소(Nitric Oxide) 유도능 평가

상기 실시예 시료의 면역증진 효과를 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 산화질소(Nitric Oxide) 유도능에 미치는 영향을 하기와 같이 실험을 수행하였다(KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 43, No. 1, pp. 65~71 (2011) 이한나 외 4명, 등굴나물 추출물의 항염증효과)

2.1. 산화질소(Nitric Oxide) 유도능 평가

RAW264.7 세포(TIB-71, ATCC)를 1×10^4 cells/well이 되도록 96well cell culture plate에 분주하여 안정시킨 후 DMEM 배지에 희석한 CJE를 농도별로 처리하였고, 양성대조군으로 1 µg/mL의 LPS(Lipopolysaccharide, L4291, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처리하여 24시간 배양하였다. 새로운 96well plate에 세포배양 상등액 50 µL와 동량의 그리스 시약(Griess reagent; G4410, Sigma, St. Louis, MO, USA) 시약을 넣어 상온에서 15분 간 반응시킨 후 판독기(microplate reader; Molecular Devices, CA, USA)에서 흡광도 540 nm로 측정하였다. 산화질소(NO)의 농도는 sodium nitrite(S2252, NaNO₂, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 얻은 표준곡선으로 계산하였다.

2.2. 실험결과

CJE의 대식세포 면역조절능을 알아보기 위하여 RAW264.7 세포에 독성시험에서 안전성이 확인된 농도로 CJE를 0, 100, 300, 500, 1000 µg/mL까지 처리한 결과를 도 2 및 표 2에 나타내었다. CJE에 의한 RAW264.7 세포에서 NO의 분비량을 측정된 결과, CJE 농도 100 µg/mL에서부터 NO의 분비가 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났고, 500 µg/mL 이상에서는 NO의 증가가 크지 않은 것 나타났다. CJE의 NO 분비능은 양성대조군인 LPS 처리군 보다는 모두 낮은 증가를 보였다.

표 2

Group	Control	LPS	100	300	500	1000
mean±SD	8.0±1.03	38.7±2.49	21.1±2.5	30.6±1.7	33.2±3.1	33.1±2.4

실험예 3. 시토킨(cytokine) 발현능 평가

상기 실시예 시료의 면역증진 효과를 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 시토킨(cytokine) 발현능에 미치는 영향을 하기와 같이 실험을 수행하였다(KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 43, No. 1, pp. 65~71 (2011) 이한나 외 4명, 등굴나물 추출물의 항염증효과)

3.1. 실시간(Real-time) PCR에 의한 CJE의 cytokine 발현능 평가

RAW264.7 세포(TIB-71, ATCC)를 60 mm cell culture dish에 5×10^6 cells/well의 농도로 분주하여 안정화시킨 후, CJE 100 µg/ml, 300 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml와 LPS 1µg/ml을 양성대조군(postive control)로 하여 4시간 동안 처리 한 후 RNeasy extraction kit(Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)를 제조사의 실험방법에 따라 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA로 PrimeScriptTM Reverse Transcriptase(TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용하여 Real-time PCR을 PIKOREAL 96(Thermo SCIENTIFIC, MA, USA) 기기를 이용하여 실시하였다. 분석에 사용한 각각의 primer의 염기서열은 GAPDH forward

5' -CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA-3' , reverse 5' -GCG GCA CGT CAG ATC CA-3' , TNF- α forward 5' -CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A-3' , reverse 5' -TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC-3' , IL-1 β forward 5' -GGA GAA CCA AGC AAC GAC AAA ATA-3' , reverse 5' -TGG GGA ACT CTG CAG ACT CAA AC-3' , L-10 forward 5' -GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3' , reverse 5' -ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT-3' , IL-6 forward 5' -GTT TTC TGC AAG TGC ATC ATC G-3' , reverse 5' -GGT TTC TGC AAG TGC ATC ATC G-3' 와 같다.

3.2. 실험 결과

CJE의 면역조절 능력을 측정하기 위하여 RAW264.7에서 CJE처리에 따른 cytokine의 분비능을 알아보기 위해 Real-time PCR을 통하여 유전자의 발현을 측정하였다. 대식세포가 활성화 되면 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 등과 같은 cytokine을 분비하게 되고 이러한 cytokine 들은 다른 면역세포들과의 면역반응을 촉진시키는 역할을 하게 된다. 표 3 및 도 3의 (A)는 TNF- α 측정된 결과로 CJE 추출물의 농도 의존적으로 TNF- α 의 발현이 증가하는 것으로 나타났으나, 양성대조군인 LPS를 처리한 결과보다는 발현양이 적게 나타났다. 도 3의 (B)는 단핵구나 대식세포 등에서 분비되어 T 세포를 활성화시키는 것으로 알려진 IL-1 β 로 CJE의 처리로 그 발현양이 양성대조군인 LPS군과 비슷한 수준까지 증가하였다. (C)는 B세포 분화활성을 가진 cytokine인 IL-6로 CJE 처리에 의해 양성대조군인 LPS처리 군에는 못 미치는 발현량을 보였으며, 대조군과도 큰 차이가 없는 발현량을 보였다. 도 3 (D) IL-10으로 정상대조군과 CJE처리 군에서 모두 통계적으로 유의적인 차이는 보이지 않았다.

표 3

Group		Con.	LPS	100	300	500	1000
mean \pm SD	TNF- α	1.0 \pm 0.04	2.5 \pm 0.2	0.9 \pm 0.04	1.0 \pm 0.06	1.5 \pm 0.06	1.5 \pm 0.05
	IL-1 β	1.0 \pm 0.04	2.5 \pm 0.2	1.0 \pm 0.02	1.2 \pm 0.01	1.6 \pm 0.15	1.6 \pm 0.05
	IL-6	1.0 \pm 0.06	2.6 \pm 0.17	0.9 \pm 0.09	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.02
	IL-10	1.0 \pm 0.13	2.8 \pm 0.11	1.0 \pm 0.13	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.06	1.0 \pm 0.3

실험예 4. NK(Natural Killer) 세포 활성 측정

상기 실시예 시료의 면역증진 효과를 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 NK(Natural Killer) 세포 활성화에 미치는 영향을 하기와 같이 실험을 수행하였다(J Korean Soc Food Sci Nutr 한국식품영양과학회지 천년 초에서 분리한 점질다당의 면역자극 활성 서이슬 신광순, vol 41, pp 95~ 102, 2012)

4.1. NK(Natural Killer) 세포 활성 측정

YAC-1 세포(NK-sensitive cell line, TIB-160, ATCC)는 NK 세포에 의해 공격되는 세포로 YAC-1세포가 NK 세포에 의해 공격을 받아 배지에 유리된 Lactate Dehydrogenase(LDH)를 측정하여 NK 세포의 활성을 측정하였다. NK 세포와 YAC-1 세포를 96well plate에 농도별 CJE와 함께 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 조건에서 4시간 동안 배양한 후 유리된 LDH를 LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II(K313-500, Biovision, CA, USA)으로 Kit의 protocol을 따라 측정하였다.

4.2. 실험결과

NK 세포의 활성은 YAC-1세포에 대한 NK 세포의 공격으로 인해 발생한 LDH를 측정함으로써 평가하여 CJE처리에 따른 NK 세포 활성을 표 4 및 도 4에 제시하였다. CJE 추출물은 NK 세포의 활성화에 농도 의존적으로 영향을 주는 것으로 나타났다.

표 4

Group	Con.	100	300	500	1000
mean±SEM	18.6±1.7	21±1.5	34.6±3.1	51±3.7	52±3.9

실험예 5. 비장세포 증식능 측정

상기 실시예 시료의 비장세포 증식능에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 게재된 방법을 응용하여 확인하였다 (J Korean Soc Food Sci Nutr 한국식품영양과학회지 천년초에서 분리한 점질다당의 면역자극 활성 서이슬 신광순, vol 41, pp 95~ 102, 2012)

5.1. 비장세포 증식능 측정

유자 추출물의 비장세포에서 대한 증식능을 측정하기 위하여 6~7주령 male ICR 마우스(오리엔트 바이오, 한국)에서 분리한 비장세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 CJE를 농도별로 처리하고, 양성대조군으로 Concanavalin A(C5275, Sigma, USA) $1 \mu\text{g/mL}$ 을 처리하여 48시간 배양 후 EZ-CYTOX Cell Viability assay kit(EZ1000, DAEILLAB SERVICE CO., LTD, Seoul, Korea) 으로 37℃, 5% CO₂ 조건에서 3시간 동안 반응시킨 후 microplate reader(SpectraMAX340PC384, Molecular Devices, CA, USA)에서 450 nm로 흡광도를 측정하였다.

5.2. 실험 결과

CJE가 면역반응에 도움을 주는 지를 알아보기 위해 mouse의 비장세포 증식에 주는 영향을 측정하였다. CJE는 농도 의존적으로 비장세포의 증식을 촉진시키는 것으로 표 5 및 도 5의 결과에 나타났다.

표 5

Group	Con.	ConA	100	300	500	1000
mean±SEM	100±2.2	146.8±4.9	100.9±2.4	109.1±0.5	129.5±2.1	133.3±4.4

실험예 6. 제제의 NK(Natural Killer) 세포 활성 측정

상기 실시예 시료의 면역증진 효과를 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 NK(Natural Killer) 세포 활성에 미치는 영향을 하기와 같이 실험을 수행하였다(J Korean Soc Food Sci Nutr 한국식품영양과학회지 천년초에서 분리한 점질다당의 면역자극 활성 서이슬 신광순, vol 41, pp 95~ 102, 2012)

6.1. NK(Natural Killer) 세포 활성 측정

YAC-1 세포(NK-sensitive cell line, TIB-160, ATCC)는 NK 세포에 의해 공격되는 세포로 YAC-1세포가 NK 세포에 의해 공격을 받아 배지에 유리된 Lactate Dehydrogenase(LDH)를 측정하여 NK 세포의 활성을 측정하였다. NK 세포와 YAC-1 세포를 96well plate에 농도별 CJE와 함께 분주하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 4시간 동안 배양한 후 유리된 LDH를 LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II(K313-500, Biovision, CA, USA)으로 Kit의 protocol을 따라 측정하였다.

6.3 실험결과

NK 세포의 활성은 YAC-1세포에 대한 NK 세포의 공격으로 인해 발생한 LDH를 측정함으로써 평가하여 CJE+DY처리에 따른 NK 세포 활성을 표 6 및 도 6에 제시하였다. CJE+DY는 NK 세포의 활성에 농도 의존적으로 영향을 주는 것으로 나타났다.

표 6

Group	Con.	CJE300	CJE+DY	DY
mean±SEM	100.0±3.4	122.1±1.6	138.7±3.1	101.2±2.4

통계처리

모든 실험은 3번 이상 반복하여 평균값과 오차를 구하여 나타내었고, 통계처리는 SPSS(Statistical Package for Social Science, version 20.0. SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였으며, 실험군 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 P<0.05 수준에서 비교하였다.

본 발명의 추출물들을 포함하는 조성물의 제제 예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

제제예 1. 산제의 제조

CJE ----- 20 mg

유당 ----- 100 mg

탈크 ----- 10 mg

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

제제예 2. 정제의 제조

CJE ----- 10 mg

옥수수전분 ----- 100 mg

유당 ----- 100 mg

스테아린산 마그네슘 ----- 2 mg

상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

제제예 3. 캡슐제의 제조

CJE ----- 10 mg

결정성 셀룰로오스 ----- 3 mg

락토오스 ----- 14.8 mg

마그네슘 스테아레이트 ----- 0.2 mg

통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

제제예 4. 주사제의 제조

CJE ----- 10 mg

만니톨 ----- 180 mg

주사용 멸균 증류수 ----- 2974 mg

Na₂HPO₄12H₂O ----- 26 mg

[0129] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0130] **제제예 5. 액제의 제조**

[0131] CJE ----- 20 mg

[0132] 이성화당 ----- 10 g

[0133] 만니톨 ----- 5 g

[0134] 정제수 ----- 적량

[0135] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0136] **제제예 6. 건강 식품의 제조**

[0137] CJE ----- 1000 mg

[0138] 비타민 혼합물 ----- 적량

[0139] 비타민 A 아세테이트 ----- 70 μ g

[0140] 비타민 E ----- 1.0 mg

[0141] 비타민 B₁ ----- 0.13 mg

[0142] 비타민 B₂ ----- 0.15 mg

[0143] 비타민 B₆ ----- 0.5 mg

[0144] 비타민 B₁₂ ----- 0.2 μ g

[0145] 비타민 C ----- 10 mg

[0146] 비오틴 ----- 10 μ g

[0147] 니코틴산아미드 ----- 1.7 mg

[0148] 엽산 ----- 50 μ g

[0149] 판토텐산 칼슘 ----- 0.5 mg

[0150] 무기질 혼합물 ----- 적량

[0151] 황산제1철 ----- 1.75 mg

[0152] 산화아연 ----- 0.82 mg

[0153] 탄산마그네슘 ----- 25.3 mg

[0154] 제1인산칼륨 ----- 15 mg

[0155] 제2인산칼슘 ----- 55 mg

[0156] 구연산칼륨 ----- 90 mg

[0157] 탄산칼슘 ----- 100 mg

[0158] 염화마그네슘 ----- 24.8 mg

[0159] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합

한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0160] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

[0161] CJE ----- 100 mg

[0162] 비타민 C ----- 15 g

[0163] 비타민 E(분말) ----- 100 g

[0164] 젖산철 ----- 19.75 g

[0165] 산화아연 ----- 3.5 g

[0166] 니코틴산아미드 ----- 3.5 g

[0167] 비타민 A ----- 0.2 g

[0168] 비타민 B₁ ----- 0.25 g

[0169] 비타민 B₂ ----- 0.3 g

[0170] 물 ----- 정량

[0171] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0172] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0173] **제제예 8. 씨리얼의 제조**

[0174] CJE ----- 7.51 g

[0175] 쌀 ----- 40.49 g

[0176] 현미 ----- 24.29 g

[0177] 수수 ----- 2.02 g

[0178] 보리 ----- 2.02 g

[0179] 찹쌀 ----- 2.02 g

[0180] 소금 ----- 0.49 g

[0181] 깨 ----- 0.16 g

[0182] 설탕 ----- 17.75 g

[0183] 해바라기유 ----- 1.21 g

[0184] 물 ----- 정량

[0185] 통상의 씨리얼 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 압출성형, 1차건조, 숙성, 파칭, 시럽코팅, 2차건조 과정, 포장한 다음 본 발명의 씨리얼 조성물 제조에 사용한다.

[0186] 상기 조성비는 비교적 기호에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0187] **제제예 9. 초코 크런치의 제조**

- [0188] CJE+DY----- 5.00 g
- [0189] 쌀 ----- 21.50 g
- [0190] 정백당 ----- 23.02 g
- [0191] 혼합전지분유 ----- 27.78 g
- [0192] 코코아버터 ----- 15.35 g
- [0193] 식물성경화유 ----- 13.02 g
- [0194] 레시틴 ----- 0.15 g
- [0195] 폴리글리세린축합리시놀레인산에스테르 ----- 0.15 g
- [0196] 바닐린 ----- 0.03 g
- [0197] 통상의 초코크런치 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 혼합, 성형, 냉각, 선별, 포장한 다음 본 발명의 초코크런치 제조에 사용한다.
- [0198] 상기 조성비는 비교적 기호에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.
- [0199] **제제예 10. 과자류의 제조**
- [0200] CJE+DY ----- 5.00 g
- [0201] 전분 ----- 83.00 g
- [0202] 쌀가루 ----- 10.00 g
- [0203] 천일염 ----- 0.5 g
- [0204] 유자시즈닝 ----- 1.5 g
- [0205] 통상의 유처리과자류 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 압출성형, 1차건조, 숙성, 파칭, 시럽코팅, 2차 건조 과정, 포장한 다음 본 발명의 과자류조성물 제조에 사용한다.
- [0206] 상기 조성비는 비교적 기호에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

도면1

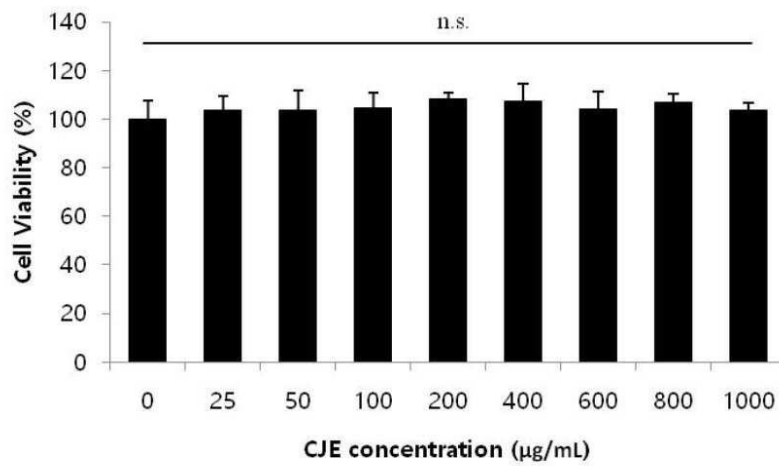


Fig. 1. Effect of *Citrus junos* ethanolic extracts(CJE) on the cell viability of RAW264.7 macrophage. The results are mean±SD of triplicate experiment. n.s.: no significance.

도면2

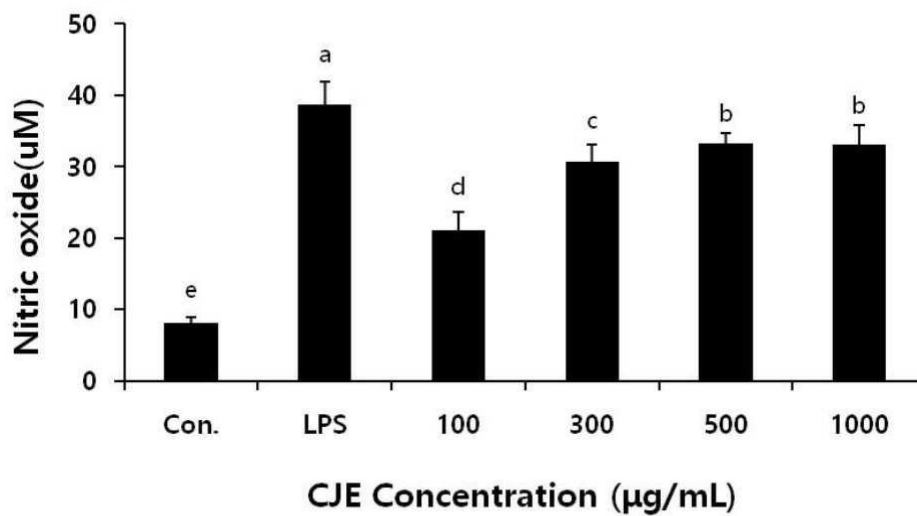


Fig. 2. Effect of CJE on nitric oxide production by RAW264.7. Values with the different letters above bargraphs are significantly different by one way ANOVA test($P < 0.05$).

도면3

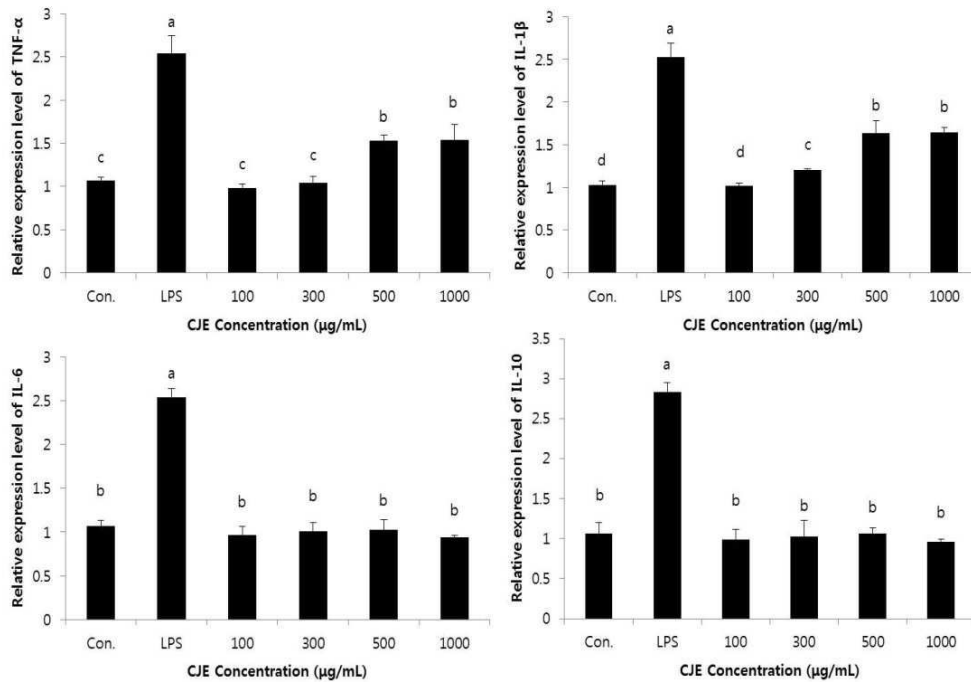


Fig. 3. Effect of CJE on cytokines expression levels by RAW264.7 macrophage. Values with the different letters above bargraphs are significantly different by one way ANOVA test(P<0.05).

도면4

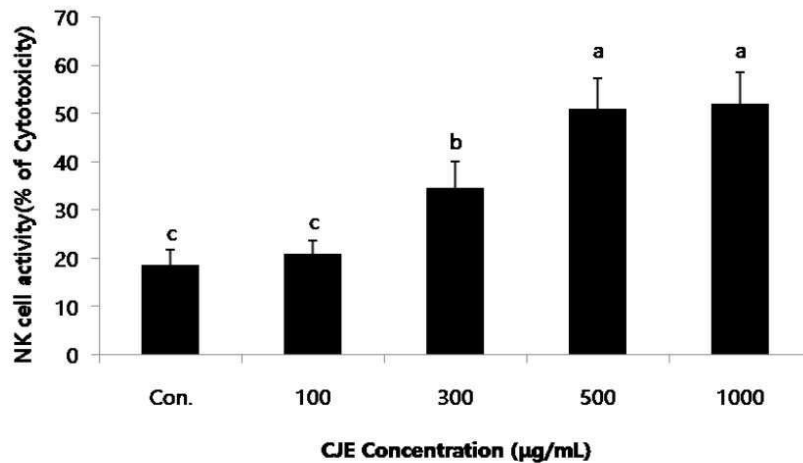


Fig. 4. Effect of CJE on NK cell activity by splenocytes. Values with the different letters above bargraphs are significantly different by one way ANOVA test(p<0.05)

도면5

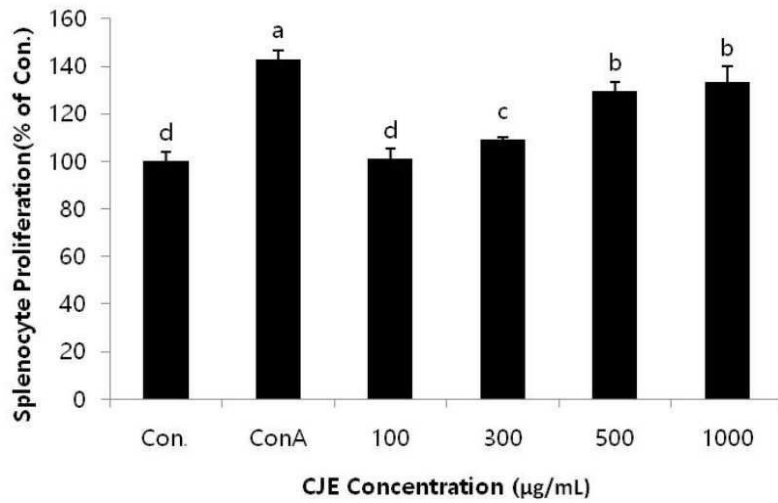


Fig. 5. Effect of CJE on proliferation rate of mouse primary splenocytes.

Values with the different letters above bargraphs are significantly different by one way ANOVA test($P < 0.05$).

도면6

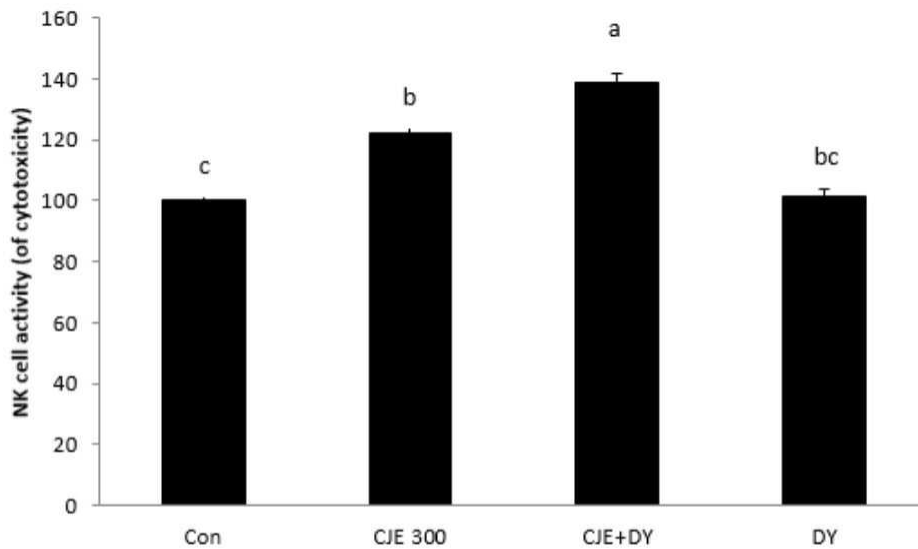


Fig. 6. Effect of CJE and CJE+DY on proliferation rate of mouse primary splenocytes.

Values with the different letters above bargraphs are significantly different by one way ANOVA test($P < 0.05$).