



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0119482  
(43) 공개일자 2011년11월02일

(51) Int. Cl.

A61K 31/357 (2006.01) A61K 36/185 (2006.01)

A61K 8/67 (2006.01) A61P 27/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0039225

(22) 출원일자 2010년04월27일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

(주)뉴트리

경기도 성남시 중원구 상대원동 190-1 에스케이  
엔테크노파크 테크 -1109

(주)바이오케어

서울 마포구 동교동 201-19 201호

(72) 발명자

김도연

경기도 성남시 분당구 야탑동 535 대우아파트 20  
9동 1402호

황재관

경기도 고양시 덕양구 화정동 870번지 은빛마을  
553-1104

(74) 대리인

이희숙, 김석만

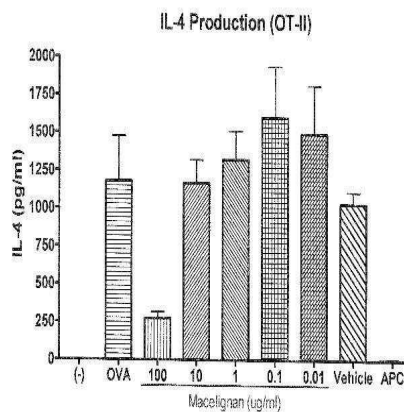
전체 청구항 수 : 총 6 항

#### (54) 알레르기성 질환의 예방 및 치료용 조성물

##### (57) 요약

본 발명은 메이스리그난 또는 육두구 추출물 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서 더욱 상세하게는 면역 세포의 증식, 면역글로불린 및 사이토카인(cytokine)의 생산을 감소시키는 작용 및 기타 알레르기성 질환의 증상을 완화하는 알레르기성 질환의 예방, 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 및 화장료 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 알레르기성 질환의 과도한 면역 반응 및 기타 증상을 완화하는 기능을 가지므로 알레르기성 질환 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

메이스리그난 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 2

메이스리그난 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 완화를 위한 식품 조성물.

### 청구항 3

메이스리그난 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환 예방 및 개선용 화장료 조성물.

### 청구항 4

육두구 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 5

육두구 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 완화를 위한 식품 조성물.

### 청구항 6

육두구 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환 예방 및 개선용 화장료 조성물.

## 명세서

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 메이스리그난(macelignan), 육두구(nutmeg) 추출물 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 면역 세포의 증식, 면역글로불린 및 사이토카인(cytokine)의 생산을 감소시키는 작용 및 기타 알레르기성 질환을 예방, 치료 또는 개선하는 약품 조성물, 식품 조성물 또는 화장료 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

알레르기성 질환은 생물체가 어떤 외래성 물질과 접하게 되면 항원항체반응에 의하여 생체 내에 급격한 반응 능력의 변화가 생기는데, 이를 알레르기(Allergy)라고 한다. 생체는 이종물질에 대해서는 그 항원에 특이적으로 반응하는 항체와 림프구를 생산하고 재차 항원과 접하면 여러 가지 면역반응을 일으킨다. 이 면역응답 또는 면역반응은 생체의 자기 보존을 위한 중요한 방어메커니즘의 하나인데, 보통 생체에 대해 보호적으로 작용하지만 때로는 이 메커니즘이 생체에 불리하게 작용하여 장애를 일으키는 경우가 있다. 이처럼 생물체의 면역 반응이 과민하여 생체에 장애를 일으키는 것이 알레르기이다. 이러한 알레르기성 질환은 근래 대기 오염, 식생활의 변화, 육체적 또는 정신적 스트레스의 증가, 거주 환경 변화에 따른 실내 오염 등의 환경 변화 또는 인간 체질 변화에 의한 것이나, 그 원인이 명확하지 않고, 최근에는 알레르기성 질환에 걸리는 사람들이 증가하고 있다.

[0003]

이러한 알레르기를 일으키는 물질을 알러젠(allergen)이라고 한다. 전형적인 알러젠은 꽃가루, 약물, 식물성 섬유, 세균, 음식물, 염색약, 화학물질 등이 있다. 알러젠이 생체 내에 들어오면 항체가 만들어지고, 항원항체반응이 일어나게 된다. 이로 인해 알레르기의 증상이 발생한다. 알레르기는 면역 과민 반응에 속하는 것으로, 여기에는 알레르기 반응 이외에도 접촉성 피부염, 과민성 쇼크 반응 등 5가지가 포함되며, 각각의 항원항체반응이 상이하다.

- [0004] 천식은 환자의 유전적인 요인과 환경적인 요인의 상호작용에 의해 발생하는 복합유전질환이다. 환경적인 요인의 대표적인 예로 원인 알러젠의 노출에 의한 알레르기반응이 중요하며, 최근 들어 알러젠의 증가로 천식의 유병율이 증가하는 추세에 있다. 천식으로 인한 기도의 폐쇄에는 주로 비만 세포와 호산구가 관여한다. 만약, 기도에 집먼지 진드기나 꽃가루와 같은 항원이 침투하게 되면 체내 면역계가 이를 감지하여 항체 IgE 를 생성하게 되는데, 이 IgE는 기관지 상의 비만 세포의 수용체로 작용하게 되며, 이로써 추후 항원의 재침투시 비만 세포가 항원에 반응하여 히스타민과 같은 기도의 염증 반응을 일으키는 여러 물질을 분비하게 한다. 한편, 호산구는 비만 세포가 분비한 물질의 자극에 의해 활성화되어, 마찬가지로 기도의 염증 반응을 일으킨다. 이러한 염증 반응에 의해 기도 점막의 부종이 일어나면 기도가 폐쇄되는 천식의 전형적인 증상이 나타나게 된다. 천식은 천명(색색거름), 호흡곤란, 기침 등의 증상을 유발하며 급성 기도 폐색으로 사망에 이를 수도 있다.
- [0005] 아토피성 피부염이란 피부를 자극하거나 알레르기 반응을 일으키는 물질에 노출되었을 때 나타나는 피부 염증이다. 천연 화학물질이나 인공 화학물질 중의 많은 종류가 아토피성 피부염을 촉진할 수 있는데 비누, 세척제, 세제, 귀금속류, 향수, 공업용 용매, 화장품, 식물 마감, 샴푸, 항생제 연고 등의 성분에서 발견된다. 이는 원인에 따라 자극성 아토피 피부염과 알레르기성 아토피 피부염으로 나눌 수 있고, 특히 알레르기성 아토피 피부염은 어떤 화학제품에 선천적으로 매우 민감한 일부 사람에서 나타나는 면역 반응이다. 노출된 물질 (알레르기 항원)에 접촉한 지 24-36 시간이 지날 때까지 염증은 일어나지 않는다. 이것은 우리 몸의 면역 방어 능력 때문에 약간의 시간이 걸리는 것이다. 피부 알레르기는 사람마다 매우 다르다. 식물, 금속, 고분자 화합물 등 매우 다양한 알러젠에 의하여 유발된다. 알레르기성 아토피 피부염은 피부 발적, 물집 및 심한 가려움증을 수반한다. 아토피 피부염이 심할 경우, 가려움증과 함께 창상이 생길 수도 있다. 이는 지연성 과민반응의 형태이기 때문에 증상은 알러젠에 노출된 후 수 시간 내지 수일 후에 나타날 수 있다.
- [0006] 이들 알레르기 질환의 제1치료는, 알러젠을 피하는 것이다. 그러나, 이러한 소극적인 치료법은 시간이 걸리며, 또한 환자의 행동을 상당히 제한한다.
- [0007] 천식 치료로는, 발작을 정지하거나 발작을 예방하는 대증치료 (symptomatic treatment)가 행해지고 있고, 아드레날린 등의 교감 신경계약, 부신피질스테로이드호르몬제, 테오필린계 등의 약이 사용되고 있다. 그러나, 아직까지 이를 완치시키는 치료법은 없다.
- [0008] 아토피성 피부염은, 유아기시에는 그 가려움 때문에 환자 뿐 아니라 그 부모도 괴롭히는 것이며, 대부분은 성인이 되기 전에 낫지만 성인기까지 계속되면 얼굴이나 가슴, 팔꿈치나 무릎 안 쪽 등의 피부가 두껍게 되어, 심한 가려움을 유발한다. 이 아토피성 피부염의 치료법으로는 외용 요법이 주된 방법으로서, 증상에 따라서 부신피질 호르몬제, 항히스타민제, 기타 항염증제를 이용한다. 가려움이 강한 경우에는, 항히스타민제를 내복해야 할 필요가 있게 된다.
- [0009] 그러나, 이들 요법은 대증요법으로서 알레르기 질환을 완치시키는 것이 아니고, 또한 약을 이용함에 따른 부작용 등도 있다. 또한, 천식이나 아토피성 피부염의 치료를 위한 많은 민간약도 있지만, 때로는 오히려 증상을 위중하게 하기도 한다.
- [0010] 미리스티카 프라그란스(Myristica fragrans)는 열대지방에서 재배되는 다년생 식물로서 메이스(mace)나 육두구(nutmeg)로 알려진 이것의 과실은 오래전부터 향신료로 이용되어 왔다. 메이스리그난은 미리스티카 프라그란스에서 발견되는 대표적인 리그난계 화합물로 (Phytochemistry, 26: 1542-1543, 1987) 아포토시스(apoptosis)를 유도하는 카스파제(caspase)-3 활성 증진작용(Biol. Pharm. Bull., 27: 1305-1307, 2004), 구강미생물에 대한 항균활성(대한민국특허 공개특허공보 10-2005-0035954), 뇌세포 지질 과산화 및 활성산소 생성 억제 효과(Biochem. Biophys. Res. Commu., 331: 1264-1269, 2005) 등이 보고되었다. 그러나 아직까지 메이스리그난의 알레르기성 질환 및 가려움증 또는 창상 완화에 대한 효능에 대해서는 연구 보고된 바가없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0011] 이에 본 발명자들은 여러 종류의 천연물을 대상으로 하여 알레르기성 질환을 치료 또는 예방할 수 있는 활성 물질을 찾고자 탐색한 결과, 미리스티카 프라그란스로부터 분리된 메이스리그난 및 육두구 추출물이 알레르기성 질환의 예방 및 치료에 효과를 가짐을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

- [0012] 따라서 본 발명의 목적은 메이스리그난 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 메이스리그난 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 완화용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 메이스리그난 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 육두구 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 육두구 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 완화용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 육두구 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0018] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 메이스리그난 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 메이스리그난 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 완화를 위한 식품 조성물을 제공한다
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 메이스리그난 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 육두구 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 육두구 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 완화를 위한 식품 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 육두구 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명의 조성물은 메이스리그난 또는 이의 염 및 육두구 추출물을 유효성분으로 포함하며 알레르기성 질환의 예방 및 치료 및 가려움증 또는 창상의 예방 및 개선의 목적으로 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 알레르기성 질환은 천식, 아토피 피부염, 알레르기성 비염, 알레르기성 소화관염, 알레르기성 결막염을 포함하는 것이다.
- [0027] 육두구는 육두구과(Myristicaceae family)에 속한 육두구수(Myristica fragrans Houtt)의 열매 부위로서, 넛트맥(nutmeg)또는 메이스(mace)로 잘 알려져 있다. 육두구에는 정유 성분이 8-15% 정도 함유되어 있고, 정유성분으로는 알파피넨( $\alpha$ -pinene), 캄펜(camphene), 터르펜 알콜(terpene alcohol), 유게놀(eugenol), 미리스틴산(myristic acid)등이 있다(Sonavane, G.S. 등, Pharmacol. Biochem. Be., 71: 247-252, 2002). 육두구에서 분리된 대표적 단일물질은 미리스틴(myricitin), 엘리미신(elimicin), 디하이드로우 구아이레틴산(dihydroguaiaretic acid) 등이며, 상기 성분들은 항암 및 항염증효과를 나타내는 것으로 보고 된 바 있다(Ozaki, Y. et al., Jpn. J. Pharmacol., 49: 155-163, 1989). 본 발명의 메이스리그난 화합물은 육두구의 유기용매 추출물이나 육두구를 압착하여 얻은 오일로부터 분리 정제할 수 있다.
- [0028] 추출 용매로는 정제수(water), 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올

(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethylacetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane), 시클로헥산(cyclohexane), 석유에테르(petroleum ether) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 옥두구의 추출물로부터 메이스리그난 화합물의 분리 및 정제는 실리카겔(silica gel)이나 활성 알루미나(alumina) 등의 각종 흡성수지를 충전한 컬럼 크로마토그래피(column chromatography) 및 고속액체크로마토그래피(HPLC) 등을 단독으로 혹은 병행하여 사용할 수 있다. 그러나, 유효성분의 추출 및 분리정제 방법은 반드시 상기한 방법에 한정되는 것은 아니다.

- [0029] 본 발명의 일실시예에서는 메이스리그난이 T세포에 직접적으로 미치는 영향을 알아보기 위하여 in vitro 실험을 실시하였다. 알러젠으로 인한 자극이 유발되면 생체 내에서는 T세포의 증식이 증가하고, 증식된 T세포는 면역 반응을 일으키는 사이토카인을 분비한다. 아토피피부염 및 천식의 병리기전과 관련된 사이토카인은 IL-4가 대표적이다.
- [0030] 그 결과, 메이스리그난이 T세포의 증식에 직접적으로 관여하는 것은 아니나, IL-4의 분비를 감소시키는 것을 확인하였다. 이로서 메이스리그난이 아토피성 피부염(atopic dermatitis)이나 천식(asthma)에 도움이 될 수 있음을 알 수 있었다. (실시예 1 참고)
- [0031] 본 발명의 일실시예에서는 메이스리그난 및 옥두구 추출물이 아토피 피부염의 치료 및 예방에 대하여 효능이 있는지 여부를 알아보기 위하여 동물 실험을 실시하였다.
- [0032] 그 결과, 본 발명의 메이스리그난 및 옥두구 추출물을 경구 투여 또는 피부 도포의 방법으로 생체 내에 주입할 경우, 혈청 내 IgE 수치를 감소시키고, 피부장벽의 회복능을 가지며, 면역 세포(비만 세포, 호산구 등)의 수가 감소되는 것을 확인하였다. (실시예 2 참고)
- [0033] 또한 본 발명의 일실시예에서는 메이스리그난 및 옥두구 추출물이 피부 가려움증 및 창상의 예방 및 개선에 효능이 있는 지 여부를 알아보기 위하여 동물 실험을 실시하였다.
- [0034] 그 결과, 본 발명의 메이스리그난 및 옥두구 추출물을 경구 투여 또는 피부 도포의 방법으로 생체 내에 주입할 경우, 경피수분손실을 억제하고, 피부 수분도를 증가시키며, 홍반을 억제하는 효능을 가지는 것을 확인하였다. (실시예 2참고)
- [0035] 본 발명의 일실시예에서는 메이스리그난이 천식의 치료 및 예방에 대하여 효능이 있는지 여부를 알아보기 위하여 동물 실험을 실시하였다. 천식이 유발되면 일반적으로 기도과민성이 증가하고, 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage (BAL) fluid)의 염증세포의 수 및 뮤신(mucin)의 분비가 증가하게 된다. 또한 IL-4가 천식의 병리기전과 관련이 있음은 상기 살펴보았다. 실시예 3에서는, 알러젠으로 천식을 유발한 후 메이스리그난을 투여한 군과 투여하지 않은 군의 기도과민성, BAL액의 호산구(eosiniphile) 수 및 당단백질 농도, IL-4분비 세포의 수를 확인하였다.
- [0036] 그 결과, 메이스리그난을 투여한 군에서는 기도과민성, BAL액 내의 호산구 수 및 당단백질 농도가 투여하지 않은 군에 비하여 감소되는 것을 확인하였고, IL-4 분비세포의 수도 감소된 것을 확인하였다. (실시예 3 참고)
- [0037] 이에 본 발명의 조성물은 알레르기성 질환의 예방 및 치료 및 피부 가려움증 또는 창상 예방 및 개선에 탁월한 효능이 있음을 확인하였다.
- [0038] 본 발명의 조성물은 상술한 바와 같은 효능을 나타낼 뿐만 아니라, 천연물에서 유래한 추출물을 유효 성분으로 포함하고 있기 때문에, 인체에 대한 부작용이 합성 의약보다 극히 적다.
- [0039] 따라서 본 발명의 메이스리그난 및 옥두구 추출물은 면역 세포의 증식, 면역글로불린 및 사이토카인의 생산을 감소시키는 작용 및 기타 알레르기성 질환의 증상을 완화하여 알레르기성 질환의 예방, 치료 및 개선에 효과가 있음을 알 수 있다.
- [0040] 따라서 본 발명은 메이스리그난, 또는 옥두구 추출물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0041] 본 발명에 따른 메이스리그난 또는 옥두구 추출물은 그 자체 또는 이의 염의 형태로 사용될 수 있다. 특히 약학적 조성물의 경우 “약학적으로 허용가능한 염”의 형태로 포함될 수 있는데, 이는 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여시 통상적인 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말하며, 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다. 상기 유리산은 유기산과 무기



산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탄산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한, 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

[0042] 알레르기성 질환의 치료의 목적으로 투여되는 경우에 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당 업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다.

[0043] 일반적인 의약품의 형태로 제제화할 경우에는 보통 사용하는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 메이스리그난에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 연고제, 크림제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식 및 경피 투여 방식에 의한다. 주사 주입 방식의 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 메이스리그난을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제화한다. 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배로, 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니멘트제, 에어로졸제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 "경피 투여"는 약학적 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학적 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.

[0045] 본 발명의 메이스리그난 및 육두구 추출물의 유효 용량은 1회 복용량이 0.1 내지 1,000 mg/kg이고, 바람직하게는 20 내지 800 mg/kg이며, 하루 1 내지 3 회 투여될 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0046] 이들 제형은 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania)에 기술되어 있다.

[0047] 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA).

[0048] 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 알레르기성 질환을 예방 및 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[0049] 아울러, 본 발명에 따른 메이스리그난 또는 육두구 추출물 또는 이의 염은 알레르기성 질환을 완화하기 위한 목적으로 식품 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0050] 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 메이스리그난 또는 육두구 추출물 또는 이의 염 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 본 발명의 메이스리그난 또는 육두구 추출물과 알레르기성 질환에 개선효과가 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.

[0051] 또한, 기능성 식품으로는 음료(알코올성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 메이스리그난 또는 육두구 추출물 또는 이의 염을 첨가하여 제조할 수 있다.

- [0052] 또한, 본 발명의 메이스리그난 또는 육두구 추출물 또는 이의 염을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 이 때에 메이스리그난 또는 육두구 추출물은 최종적으로 제조된 식품 중 0.01 내지 50 중량%가 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] 또한, 본 발명은 메이스리그난 또는 육두구 추출물을 포함하는 알레르기성 질환 예방 및 개선용 화장료 조성물을 제공한다. 본 발명의 화장료 조성물은 본 발명의 메이스리그난 또는 육두구 추출물 또는 이들의 염과 함께 화장료 조성물의 제조 분야에서 일반적으로 사용되는 하나 이상의 부형제 및 첨가제를 포함하여 당 분야의 공지의 방법에 따라 용이하게 제조될 수 있다.
- [0054] 보다 구체적으로 본 발명의 화장료 조성물은 본 발명의 메이스리그난, 육두구 추출물 또는 이들의 염을 유효성분으로 함유하며 피부학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 기초 화장품 조성물(화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼 및 클렌징 워터와 같은 세안제, 팩, 보디오일), 색조 화장품 조성물(화운데이션, 립스틱, 마스카라, 메이크업 베이스), 두발 제품 조성물(샴푸, 린스, 헤어컨디셔너, 헤어젤) 및 비누 등의 형태로 제조될 수 있다. 상기 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유화제, 농화제 및 용매를 포함할 수 있다. 또한, 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0055] 예를 들면, 본 발명의 메이스리그난 또는 육두구 추출물을 포함하는 세안제 및 비누를 제조하는 경우에는 통상의 세안제 및 비누 베이스에 메이스리그난 또는 육두구 추출물을 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 크림을 제조하는 경우에는 일반적인 수중유적형(O/W)의 크림베이스에 메이스리그난 또는 육두구 추출물을 첨가하여 제조할 수 있다. 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등과 물성개선을 목적으로 한 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 추가로 첨가할 수 있다.
- [0056] 상기 본 발명의 화장료 조성물에 함유되는 메이스리그난 또는 육두구 추출물의 함량은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 10 중량% 범위로 함유될 수 있다.

### 발명의 효과

- [0057] 따라서 본 발명은 메이스리그난 또는 육두구 추출물 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방, 치료 및 개선용 약학적 조성물, 식품 조성물 또는 화장료 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 면역 세포의 증식, 면역글로불린 및 사이토카인의 생산을 감소시키는 작용 및 기타 알레르기성 질환의 증상을 완화하여 알레르기성 질환의 예방, 치료 또는 개선에 유용하게 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 T 세포 증식에 메이스리그난이 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- 도 2는 IL-4 생산에 메이스리그난이 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- 도 3은 IFN- $\gamma$  생산에 메이스리그난이 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- 도 4는 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 IgE의 변화를 나타낸 것이다.
- 도 5는 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 TEWL의 변화를 나타낸 것이다.
- 도 6은 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 피부 수화(skin hydration)의 변화를 나타낸 것이다.
- 도 7은 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 홍반의 변화를 나타낸 것이다.
- 도 8은 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 피부조직염색 (H&E staining) 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 피부조직염색 (Toluidine blue staining) 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 피부조직염색 (Congo red

staining) 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 ALN에서의 IL-4 수준 변화를 나타낸 것이다.

도 12는 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 ALN에서의 IFN- $\gamma$  수준 변화를 나타낸 것이다.

도 13은 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 피부 병변에서의 IL-13 mRNA 변화를 나타낸 것이다.

도 14는 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 피부 병변에서의 TNF- $\alpha$  mRNA 변화를 나타낸 것이다.

도 15는 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 비장에서의 T-bet 발현양 변화를 나타낸 것이다.

도 16은 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 비장에서의 GATA-3 발현양 변화를 나타낸 것이다.

도 17은 메이스리그난 및 육두구 추출물의 피부도포(A) 및 경구투여(B)에 따른 변화를 육안으로 평가한 결과이다.

도 18은 메이스리그난 투여에 따른 기도과민성의 변화를 나타낸 것이다.

도 19는 BAL 액 내에서의 전체 면역 세포의 수를 나타낸 것이다.

도 20은 BAL 액 내에서의 종류별 면역 세포의 수를 나타낸 것이다.

도 21은 BAL 액 내에서의 호산구 수를 나타낸 것이다.

도 22은 폐 속의 IL-4 분비세포 숫자를 나타낸 것이다.

도 23은 BAL 액내에서의 당단백질의 양을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### <실시예 1>

#### 메이스리그난의 알레르기성 질환의 예방/치료효과 확인

##### 1. 실험방법

메이스리그난이 T 세포에 직접적으로 어떤 영향을 주는지 알아보기 위하여, 세포 배양 시, 자극을 주고 메이스리그난을 동시에 처리하여 보았다. 세포는 크게 wild type 과 OT-II 형질전환 쥐의 CD4 T 세포, antigen presenting cell을 이용하였다 (여기서 OT-II 형질전환 쥐의 CD4 T cell은 T cell receptor가 OVA peptide<sub>323339</sub>에 specific하다). 자극은 wild type CD4 T cell은 anti-CD3, anti-CD28 antibody (BD Pharmingen, San Diego, CA)로 주었고, OT-II transgenic CD4 T cell은 OVA peptide (Baylor College of Medicine Protein Co-facility)로 주었다. 메이스리그난의 효과는 T cell의 증식 정도를 MTT assay로 확인하고, 사이토카인(cytokine) 생산 정도를 확인하였다. 사이토카인 생산 정도는 4 일간의 배양 후, 그 상층액을 ELISA로 확인 하였으며 MTT assay는 cell proliferation assay kit I (Roche)를 이용해 측정하였다. 사이토카인은 IL-4, IFN- $\gamma$ 를 확인 하였으며, ELISA는 1차 항체(primary antibody), 2차 항체(secondary antibody), 스트렙타비딘-알칼리성 포스파타아제(streptavidin-alkaline phosphatase; BD Pharmingen), 포스파타아제 기질(phosphatase substrate; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 실시하였다. 본 실시예에서의 실험군의 명칭은 하기 표 1과 같다.



**표 1**

(-)	No treatment (only APC & T cell co-culture)
Ab	CD3 & CD28 antibody (stimuli to WT T cell)
OVA	323339 (stimuli to OT-II T cell)
100, 10, 1, 0.1, 0.01	메이스리그난 concentration (μg/ml) treated with stimulation
Vehicle	DMSO (Dimethyl sulfoxide)
APC	Antigen presenting cell only (No T cell)

그 결과, 도 1에서 보듯이, 음성 대조군에 비해서 항체 자극(Ab stimulation)을 준 군에서 T 세포 증식이 활발하게 일어났으며, 메이스리그난이나 담체(vehicle)가 T 세포 증식에 미치는 영향은 없음을 알 수 있었다.

IL-4 생산에 메이스리그난이 미치는 영향을 확인한 결과, 도 2에서 보듯이, 음성 대조군에 비해서 오브알부민 펩티드 자극(OVA peptide stimulation)을 준 군에서 IL-4 생산이 증가하였으며, 고농도의 메이스리그난 (100 μg/ml)을 처리하였을 때 OT-II T 세포의 IL-4 생산이 현저히 감소하였다. 이로서 메이스리그난이 IL-4가 병리기전에서 중요한 질병인 아토피성 피부염(atopic dermatitis)이나 천식 (asthma)에 도움이 될 수 있음을 알 수 있었다.

IFN-γ 생산에 메이스리그난이 미치는 영향을 확인한 결과, 도 3에서 보듯이, 음성 대조군에 비해서 항체 자극을 준 군에서 IFN-γ 생산이 증가하였으며, 메이스리그난이나 담체(vehicle)가 T 세포의 IFN-γ 생산에 미치는 영향은 없었다. 이로서 메이스리그난이 전반적인 T 세포 기능 저하로 인해 기회 감염을 유발할 가능성은 그다지 크지 않음을 알 수 있었다.

**<실시예 2>**

**메이스리그난 및 육두구 추출물의 아토피성 피부염의 예방/치료효과 확인**

**2-1. 실험동물**

암컷 8주령의 SPF (specific pathogen-free) NC/Nga 마우스 (20~25 g)는 중앙실험동물에서 공급받았다. 동물은 실험 당일까지 고형사료 (카길에그리퓨리나, Korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12시간(light-dark cycle)에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

**2-2. 피부도포용 크림의 제조**

크림의 제조는 스테아릴 알코올(stearyl alcohol) 및 화이트 바세린(white vaselin), 메이스리그난 (macelignan) (또는 육두구 추출물(nutmeg extract))를 75℃로 한 비이커에 중탕으로 가온하고 다른 비이커엔 트윈 80(tween 80), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 정제수를 중탕 가온한 다음 호모믹서(homomixer)로 균질하게 혼합하여 냉장하였다. 각 재료에 대한 비율은 하기 표 2와 같다.

**표 2**

Preparation	Low (%)	High (%)
Stearyl alcohol	20	20
White vaselin	10	10
Tween 80	3.5	3.5
Propylene glycol	10	10

Distilled water	56	55
Macelignan/Nutmeg	0.5	1.5
Total	100	100

[0076] 1회 도포량은 100mg으로 메이스리그난 또는 육두구 추출물이 저농도(20mg/kg/day), 고농도(60mg/kg/day)가 되도록 제조하였다.

### [0077] 2-3. 경구투여 시료의 제조

[0078] 육두구 추출물 (75 % 메탄올 추출) 및 메이스리그난에 시료중량의 1.5배로 트윈 80을 혼합한 다음 1회 경구투여량인 300  $\mu$ l에 육두구 추출물 및 메이스리그난의 최종농도가 저농도는 50mg/kg, 고농도는 150mg/kg가 되도록 생리식염수로 제조하였다.

### [0079] 2-4. 알러젠(Allergen)을 이용한 NC/Nga 마우스의 아토피 피부염의 유도

[0080] 8 주령의 NC/Nga 마우스 (20-25g)는 중앙실험동물에서 공급받아 1주간 적응시킨 후, 90% 에틸 에테르(DUCSAN, Korea)로 마취한 후 체모크림 (Reckitt Benckiser, France)을 이용하여 NC/Nga 마우스의 후두부, 등 부위의 털을 제거하였다. 미세상처의 치유를 위해 1일 방치한 후 귀, 후두부, 등 부위에 아토피피부염의 주요 유발인자인 *Dermatophagoides farinae*를 주원료로 한 mite antigen cream (Biostir, Inc. Japan)을 주 3회 (9주 ~ 13주, 총 5주) 100mg씩 고르게 도포하였다. mite antigen cream 도포 2시간 전에는 피부의 지방성분 및 큐티클 층 파괴를 유도하여 mite antigen cream의 피부 흡수력을 높이기 위해 같은 부위에 4% SDS용액을 도포하였다. 도포 3주 후부터 아토피 피부염이 유도되는 것을 정량적으로 확인하기 위해 IgE 수치를 측정하였다. 아토피 피부염 유도 확인 후 약물처리기간 (12 ~ 13주)에도 아토피피부염의 자연적 치료를 방지하고자 mite antigen cream을 매 주 3회씩 100mg씩 도포하였다.

### [0081] 2-5. 약물처리 및 치료평가

[0082] 아토피 피부염 유도를 위해 (-)control은 제외하고 매주 3회씩 3주간 (9주령~11주령) NC/Nga 마우스의 귀, 후두부, 등 부위에 4% SDS용액 도포 2시간 경과 후 mite antigen cream을 100mg씩 도포하였다. 도포 3주 후 피부발진 및 홍반, 각질화 등을 확인하여 아토피 피부염의 유도를 현상학적으로 확인하였다. (-)control을 제외한 모든 군의 아토피 피부염 유발을 확인한 후 약물처리 및 치료평가를 위해 각 케이지 당 n=5로 경구투여군과 피부도포군을 각 6개 군씩((-)control, (+)control, 메이스리그난 저농도, 메이스리그난 고농도, 육두구 추출물 저농도, 육두구 추출물 고농도) 총 12개 군으로 나누었다. 그 후, 2주간 (12주령~13주령)의 약물처리 및 평가기간에 4% SDS용액 및 mite antigen cream을 도포하지 않은 (-)control군에는 매일 생리식염수 (경구투여군) 또는 base cream (피부도포군)을 처리하였고, 매주 3회씩 4% SDS용액 도포 2시간 후 mite antigen cream 100mg을 도포한 (+)control군에는 매일 생리식염수 (경구투여군) 또는 base cream (피부도포군)을 처리하였다. 경구투여군은 매주 3회씩 4% SDS용액 도포 2시간 후 mite antigen cream 100mg을 도포하였고 매일 메이스리그난, 육두구 추출물을 각각 저농도 (50mg/kg/day), 고농도(150mg/kg/day)로 처리하였다. 피부도포군은 매주 3회씩 4% SDS용액 도포 2시간 후 mite antigen cream 100mg을 도포하였고 매일 메이스리그난 크림, 육두구 추출물 크림을 각각 저농도 (20mg/kg/day), 고농도 (60mg/kg/day)로 처리하였다. 실험종료 하루 전 경피수분손실도, 피부보습, 홍반 정도를 측정하였고 안와채혈을 통해 혈청을 얻었다. 실험 종료 후 (14 주령) 비장 및 후두부와 등 부위의 피부조직을 절제하여 -70℃에 보관하였고 ALN (axially lymph node)은 2% FBS 함유 DMEM(Fetal Bovine Serum containing DMEM)에 보관하였다. 피부조직은 10% 포르말린 용액에 담가 보관하였다.

[0083] 각 군 별 처리방법을 정리하면 하기 표 3 및 표 4와 같다.

표 3

경구투여군	(-)control	(+)control	메이스리그난 처리군	Nutmeg 처리군
4% SDS 용액 (9주령~13주령)	-	+	+	+
Mite antigen cream (9주령~13주령)	-	+	+	+
약물처리 및 평가 (12주령~13주령)	생리식염수	생리식염수	메이스리그난 저농도(50mg/kg/day) 고농도(150mg/kg/day)	Nutmeg 저농도(50mg/kg/day) 고농도(150mg/kg/day)

표 4

피부도포군	(-)control	(+)control	메이스리그난 처리군	Nutmeg 처리군
4% SDS 용액 (9주령~13주령)	-	+	+	+
Mite antigen cream (9주령~13주령)	-	+	+	+
약물처리 및 평가 (12주령~13주령)	Base cream	Base cream	메이스리그난 cream 저농도(20mg/kg/day) 고농도(60mg/kg/day)	Nutmeg cream 저농도(20mg/kg/day) 고농도(60mg/kg/day)

## 2-6. 혈청 내 Total IgE 수치 측정 시험

B세포의 분화과정에서 분비되어 염증반응을 유도하는 IgE는 아토피 피부염에서 높은 수치를 나타내는 경향을 띤다. 따라서 아토피 유도 및 치료의 효과를 관찰하기 위해 각각의 마우스를 희생직전 IgE 수치를 측정하여 그 변화를 관찰하였다.

모세관(Capillary tube; Chase Scientific Glass, Inc., USA)으로 안와채혈을 실시하였고 그 혈액을 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻었고 마우스 IgE ELISA kit (Immunology Consultants Laboratory, Inc., USA)을 통해 지시된 방법대로 IgE 수치를 측정하였다.

그 결과, 도 4A 및 표 5에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총 5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)은 control(-)에 비해 현저한 IgE증가를 보였으며 ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 total IgE 수치를 감소하는 효과가 있었다( $p<0.01$ ). 아울러, 도 4B 및 표 6에서 보듯이, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군도 control(+)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 total IgE 수치를 감소하는 효과가 있었다( $p<0.01$ ).

표 5

메이스리그난 및 육두구 추출물 피부도포에 따른 IgE의 변화

	Control (-)Control (-)	Control (+)Control (+)	ML-20ML-20	ML-60ML-60	NE-20NE-20	NE-60NE-60
IgE( $\mu$ g/ ml)	3.3 $\pm$ 0.53. 3 $\pm$ 0.5	37.8 $\pm$ 6.337. 8 $\pm$ 6.3	22.1 $\pm$ 3.62.1 $\pm$ 3.6	18.6 $\pm$ 4.118.6 $\pm$ 4.1	15.7 $\pm$ 5.315. 7 $\pm$ 5.3	18.8 $\pm$ 6.118.8 $\pm$ 6.1

[0091] (ML-20: 메이스리그난 20mg/kg, ML-60: 메이스리그난 60mg/kg, NE-20: 육두구 추출물 20mg/kg, NE-60: 육두구 추출물 60mg/kg, 이하 같음)

표 6

[0092] 메이스리그난 및 육두구 추출물 경구투여에 따른 IgE의 변화

	Control (-)	Control (+)	ML-50	ML-150	NE-50	NE-150
IgE( $\mu\text{g/ml}$ )	2.9 $\pm$ 0.9	37.7 $\pm$ 9.1	19.6 $\pm$ 13.5	16.6 $\pm$ 5.3	11.5 $\pm$ 4.9	18.1 $\pm$ 2.7

[0093] (ML-50: 메이스리그난 50mg/kg, ML-150: 메이스리그난 150mg/kg, NE-50: 육두구 추출물 50mg/kg, NE-150: 육두구 추출물 150mg/kg, 이하 같음)

[0094] 2-7. 피부장벽 회복능 시험

[0095] 실험종료 하루 전 피부장벽의 회복능을 정량적으로 비교하기 위해 경피수분손실도, 피부보습, 홍반 수치를 측정하였다. 기기는 경피수분손실도 (TEWL)측정에 tewameter (TM300), 피부보습 측정에 corneometer (CM825), 홍반도 (erythema) 측정에 mexameter (MX18)를 사용하였다.

[0096] 경피수분손실도(TEWL)를 측정한 결과, 도 5A 및 표 7에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총 5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 경피 수분 손실증가를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 표피를 통한 수분손실을 억제하는 효과가 있었다( $p<0.01$ ). 아울러, 도 5B 및 표 8에서 보듯이, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군도 control(+)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 표피를 통한 수분손실을 억제하는 효과가 있었다( $p<0.01$ ).

표 7

[0097] 메이스리그난 및 육두구 추출물 피부도포에 따른 TEWL의 변화

	Control (-)	Control (+)	ML-20	ML-60	NE-20	NE-60
TEWL (g/hr $\cdot$ m <sup>2</sup> )	7.1 $\pm$ 5.9	80.5 $\pm$ 12.9	25.8 $\pm$ 3.1	26.2 $\pm$ 4.9	17.2 $\pm$ 9.4	26.7 $\pm$ 3.4

표 8

[0098] 메이스리그난 및 육두구 추출물 경구투여에 따른 TEWL의 변화

	Control (-)	Control (+)	ML-50	ML-150	NE-50	NE-150
TEWL (g/hr $\cdot$ m <sup>2</sup> )	7.3 $\pm$ 5.1	60.5 $\pm$ 11.7	17.6 $\pm$ 8.1	21.5 $\pm$ 9.2	9.7 $\pm$ 3.7	13.2 $\pm$ 5.6

[0099] 피부수분도(Skin Hydration)를 측정한 결과, 도 6A 및 표 9에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 피부수분도 감소를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 피부 수분도를 증가하는 효과가 있었다( $p<0.01$ ). 아울러, 도 6B 및 표 10에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 피부수분도 감소를 보였으며, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군은 control(+)과 비교하여 피부 수분도를 증가하는 효과가 있었다.

표 9

[0100] 메이스리그난 및 육두구 추출물 피부도포에 따른 Skin Hydration의 변화

	Control (-)	Control (+)	ML-20	ML-60	NE-20	NE-60
Skin Hydration (AU)	16.3±5.3	5.7±3.0	12.4±3.9	13.4±4.7	13.6±5.2	11.5±4.3

표 10

[0101] 메이스리그난 및 육두구 추출물 경구투여에 따른 Skin Hydration의 변화

	Control (-)	Control (+)	ML-50	ML-150	NE-50	NE-150
Skin Hydration (AU)	16.3±5.3	3.7±0.9	5.0±0.8	6.4±2.8	8.3±6.6	8.9±5.8

[0102] 피부홍반도(erythema)를 측정한 결과, 도 7A 및 표 11에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총 5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 피부홍반 증가를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 피부 홍반도를 통계학적으로 유의하게 피부 수분도를 감소하는 효과가 있었다(p<0.01). 아울러, 도 7B 및 표 12에서 보듯이, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 경구투여군도 control(+)과 비교하여 피부 홍반도를 통계학적으로 유의하게 피부 수분도를 감소하는 효과가 있었다(p<0.01).

표 11

[0103] 메이스리그난 및 육두구 추출물 피부 도포에 따른 홍반의 변화

	Control (-)	Control (+)	ML-20	ML-60	NE-20	NE-60
Erythema Index	148±21	265±26.4	163.3±4.0	190±24	193±39	208.58±42

표 12

[0104] 메이스리그난 및 육두구 추출물 경구투여에 따른 홍반의 변화

	Control (-)	Control (+)	ML-50	ML-150	NE-50	NE-150
Erythema Index	138±29	255.6±30.1	198.5±46.8	190±24.4	193±39.0	208.5±42.6

[0105] 2-8. 면역조직화학검사

[0106] 실험 종료 후, 후두부 부분의 피부를 분리하여 표피(epidermis), 진피(dermis), 각질세포(keratinocyte)에서 비만세포(mast cell), 뉴트로필(nutrophil), 호산구(eosinophil) 등 염증성 세포들의 변화량을 식별하고 피부의 두께변화를 확인하기 위해 헤마토실린/에오신(hematoxylin/eosin, H&E) 염색을 시행하였고 비만세포를 선택적으로 염색하는 토루이딘 블루(toluidine blue) 염색, 호산구(eosinophil)를 선택적으로 염색하는 콩고 레드(congo red) 염색을 시행하였다.

[0107] H&E 염색을 분석한 결과, 도 8A에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총 5주간의 mite antigen cream을 도포한



control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 염증성(inflammatory) 세포 증가, 표피 두께(epidermal thickness) 증가를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 염증성 세포와 표피 두께가 감소하는 효과가 있었다. 아울러, 도 8B에서 보듯이, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군은 control(+)과 비교하여 염증성 세포와 표피 두께가 감소하는 효과가 있었다.

[0108] 톨루이딘 블루 염색을 분석한 결과, 도 9A에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총 5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 비만 세포 (mast cell) 증가를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 비만세포 (mast cell)가 감소하는 효과가 있었다. 아울러, 도 9B에서 보듯이, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군은 control(+)과 비교하여 비만세포 (mast cell)가 감소하는 효과가 있었다.

[0109] 쿡고 레드 염색을 분석한 결과, 도 10A에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총 5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 호산구 (eosinophil) 증가를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 호산구 (eosinophil)가 감소하는 효과가 있었다. 아울러, 도 10B에서 보듯이, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군도 control(+)과 비교하여 호산구 (eosinophil)가 감소하는 효과가 있었다.

## [0110] 2-9. ALN(Axillary Lymph Node)에서의 사이토카인수준(cytokine level) 측정

[0111] 실험종료 후, ALN(axillary lymph node)를 적출한 후 4℃로 유지된 2% FBS 함유 DMEM에 보관하였다. 적출된 ALN은 실린지의 피스톤 끝부분을 이용하여 cell strainer에 통과시킨 후 5ml의 DMEM-10(100mL fetal bovine serum/1L DMEM, Invitrogen Life Technologies, USA)에 현탁 시켰다. 현탁된 세포를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하였고 얻어진 펠렛(pellet)을 1ml RBC lysis buffer (Biolegend, USA)에 현탁시켰다. 5-10분간 실온(room temperature)에서 배양(incubation)한 후 9ml의 DMEM-10을 넣고 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 펠렛을 3ml DMEM-10에 현탁하여  $5 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 24-웰 플레이트에 넣은(seeding) 후 Dfb powder (Biostir, Inc., Japan)를 working concentration이 1μg/ml가 되도록 각 웰에 넣어주었다. 48시간 후 상등액을 모아 T세포, B세포에서의 사이토카인을 ELISA 분석을 이용하여 측정하였다.

## [0112] 2-10. ALN에서의 사이토카인 측정

[0113] ALN은 만성아토피질환 동물모델에서 중요한 역할을 하는 면역기관으로 일부 심한 아토피 환자의 경우 겨드랑이가 부어오르고 ALN의 크기가 증가되어 있다는 보고가 있고, mite antigen cream으로 유발된 NC/Nga 마우스의 경우 ALN이 2개 이상인 경우도 해부학적으로 관찰되었으며, 최근 많은 NC/Nga 마우스를 이용한 아토피 연구보고에서 ALN을 목표로 하여 연구결과를 보고하고 있다. 본 실험에서는 국부 염증(local inflammation) 관련 면역반응을 담당하는 ALN에서 Th1/Th2 cell 관련 사이토카인인 IFN-γ 및 IL-4 수치를 측정하였고 이를 통해 피부병변에서의 염증과 Th1 cell 활성화에 따른 아토피 만성화에 시료가 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## [0114] 2-11. IL-4의 측정

[0115] IL-4는 Th2 세포에서 분비되는 대표적인 사이토카인으로 아토피 피부염에서 그 수치가 증가하여 B 세포, 비만세포, 대식세포(macrophage) 등 염증세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 임파구에서 IL-4 수치를 측정함으로써 시료가 Th2 세포 및 염증에 미치는 영향을 확인하고자 본 실험을 시행하였다. IL-4 수치는 마우스 IL-4 ELISA kit (ID Labs<sup>TM</sup> inc., Canada)를 이용하여 림프구(lymphocyte) 배양액에서의 수치를 지시된 방법에 따라 측정하였다.

[0116] ALN에서의 IL-4 level를 측정한 결과, 도 11A 및 표 13에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총 5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 IL-4 증가를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-

60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 IL-4 level이 통계학적으로 유의하게 감소하는 효과가 있었다( $p<0.01$ ). 아울러, 도 11B 및 표 14에서 보듯이, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군도 control(+)과 비교하여 IL-4 level이 통계학적으로 유의하게 감소하는 효과가 있었다( $p<0.01$ ).

표 13

[0117] 메이스리그난 및 육두구 추출물 피부도포에 따른 ALN에서의 IL-4 level의 변화

	Control (-)	Control (+)	ML-20	ML-60	NE-20	NE-60
IL-4 (pg/ml)	2.8±1.8	22.2±5.9	6.6±4.7	4.2±3.9	3.3±1.9	4.6±2.8

표 14

[0118] 메이스리그난 및 육두구 추출물 경구투여에 따른 ALN에서의 IL-4 level의 변화

	Control (-)	Control (+)	ML-50	ML-150	NE-50	NE-150
IL-4 (pg/ml)	2.74±1.6	19.2±4.4	5.1±1.6	4.3±0.9	6.0±5.5	9.4±6.4

[0119] 2-12. IFN- $\gamma$ 의 측정

[0120] IFN- $\gamma$ 는 Th1 세포에서 분비되는 대표적인 사이토카인으로 아토피피부염에서 그 수치가 감소하여 Th2 세포의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 임파구에서 IFN- $\gamma$  수치를 측정함으로써 시료가 Th1 세포와 관련된 면역에 미치는 영향을 확인하고자 본 실험을 시행하였다. IFN- $\gamma$  수치는 마우스 ELISA IFN- $\gamma$  kit (Assay designs, Inc., Greece)를 이용하여 림프구의 배양액에서의 수치를 지시된 방법에 따라 측정하였다.

[0121] ALN에서의 IFN- $\gamma$  level를 측정한 결과, 도 12A 및 표 15에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 IFN- $\gamma$  증가를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 IFN- $\gamma$  level이 통계학적으로 유의하게 감소하는 효과가 있었다. ( $p<0.01$ ) 아울러, 도 12B 및 표 16에서 보듯이, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군은 control(+)과 비교하여 IFN- $\gamma$  level이 통계학적으로 유의하게 감소하는 효과가 있었다. ( $p<0.01$ )

표 15

[0122] 메이스리그난 및 육두구 추출물 피부도포에 따른 ALN에서의 IFN- $\gamma$  level의 변화

	Control (-)	Control (+)	ML-20	ML-60	NE-20	NE-60
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	0.3±0.025	3.9±1.0	0.3±0.6	0.3±0.01	0.3±0.03	1.0±0.9

표 16

[0123] 메이스리그난 및 육두구 추출물 경구투여에 따른 ALN에서의 IFN- $\gamma$  level의 변화

	Control (-)	Control (+)	ML-20	ML-60	NE-20	NE-60
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	0.3±0.04	2.5±1.1	0.4±0.2	0.3±0.03	0.3±0.01	0.9±0.6

[0124] 2-13. 피부 병변(skin lesion)에서의 염증성 사이토카인 mRNA 수준 측정

[0125] IL-13은 Th2 세포, 비만 세포 등에서 분비되어 B 세포 및 호산구 등에 영향을 미쳐 피부염증에 관여하는 것으로

알려져 있으며 TNF- $\alpha$ 는 비만 세포 및 대식세포 등 염증관련 세포에서 분비되어 아토피 만성화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 피부병변에서 아토피에 의한 피부염증 및 아토피의 만성화 정도를 확인하기 위하여 역전사-중합효소 연쇄반응으로 IL-13, TNF- $\alpha$ 의 mRNA 수준(level)을 측정하였다.

[0126] **2-14. 피부조직에서의 RNA 분리**

[0127] 피부병변에서 사이토카인의 mRNA level에서 측정하기 위해 실험 종료 후 후두부에서부터 등까지의 피부조직을 분리하였고 액체질소에 담겨 막자사발로 잘게 부순 후 TRIzol(InvitrogenLifeTechnologies,USA)500  $\mu$ l를 넣고 용해될 때까지 균질기(homogenizer)로 분쇄하였다. 이 조직분쇄 혼합 부유액에 클로로포름(chloroform) 200  $\mu$ l를 첨가하여 다시 15초간 혼합하고 이를 얼음에 3분간 방치한 후 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 그 상등액을 따서 새 튜브로 옮기고 이소프로판올(isopropanol) 500  $\mu$ l를 넣고 천천히 흔들어 실온(room temperature)에서 10분간 방치한 후 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 펠렛을 남기고 그 상등액은 버린다음 100% 에탄올(ethanol)로 2회 수세하여 건조시킨 후 스펙트로포토메트리(spectrophotometry)를 이용하여 RNA를 정량하였다.

[0128] **2-15. 역전사-중합효소 연쇄반응**

[0129] 역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 전체 RNA(total RNA) 2  $\mu$ g을 70℃에서 5분간 변성시켰다. 이에 역전사효소 프리믹스(Reverse Transcriptase Premix; Elpis Biotech Inc., Korea)에 변성된 RNA 16  $\mu$ l을 넣어 총 20  $\mu$ l를 42℃에서 55분, 70℃에서 15분으로 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 HiPi PCR Premix (Elpis Biotech Inc., Korea)에 넣고 primer 및 DEPC water를 첨가하여 총 부피 20  $\mu$ l가 되도록 한 후 PCR (polymerase chain reaction)을 시행하였다. IL-13의 조건은 pre-denaturation 95℃ 5분, denaturation 95℃ 30초, annealing 58℃ 1분, elongation 72℃ 1분을 35 cycle한 뒤 post-elongation 72℃ 5분으로 반응을 종결하였다. TNF- $\alpha$ 의 조건은 pre-denaturation 95℃ 5분, denaturation 95℃ 30초, annealing 64℃ 1분, elongation 72℃ 1분을 35 cycle한 뒤 post-elongation 72℃ 5분으로 반응을 종결하였다. 각 PCR 산물(product)은 5  $\mu$ l씩 1.5 % 아가로스겔(agarose gel)에 전기영동 하였다. 사용한 프라이머는 하기 표 17와 같다.

**표 17**

[0130]

Gene	Primer	Sequence
IL-13	Forward	5' -GCTCTGGGCTTCATGGCGCT-3'
	Reverse	5' -GAAGGGGCCGTGGCGAAACA-3'
TNF- $\alpha$	Forward	5' -GCGGAGTCCGGGCAGGTCTA-3'
	Reverse	5' -GGGGGCTGGCTCTGTGAGGA-3'
GAPDH	Forward	5' -CCCACTAACATCAAATGGGG-3'
	Reverse	5' -ACACATTGGTAGGAACA-3'

[0131] 피부 병변에서의 IL-13 mRNA 수준을 측정한 결과, 도 13A에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총 5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 IL-13 mRNA 증가를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 IL-13 mRNA level이 감소하는 효과가 있었다. 아울러, 도 13B에서 보듯이, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군은 control(+)과 비교하여 IL-13 mRNA level이 감소하는 효과가 있었다.

[0132] 피부 병변에서의 TNF- $\alpha$  mRNA 수준을 측정한 결과, 도 14A에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 TNF- $\alpha$  mRNA 증가를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 IL-13 mRNA level이 감소하는 효과가 있었다. 아울

러, 도 14B에서 보듯이, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군은 control(+)과 비교하여 TNF- $\alpha$  mRNA level이 감소하는 효과가 있었다.

[0133] **2-16. 비장(spleen)에서의 Th1/Th2 조절 전사인자 측정 시험**

[0134] Th1 세포의 대표 전사인자인 T-bet과 Th2 세포의 대표 전사인자인 GATA-3는 서로 경쟁적으로 발현하여 각 T 헬퍼 세포(T helper cell)에서 생산되는 사이토카인을 조절하므로 Th1/Th2 조절(modulating)을 통한 아토피 피부염 치료에 핵심인자이다. 본 실험에서는 전반적인 면역반응을 담당하는 비장에서 Th1/Th2 세포의 대표 전사인자의 발현수치를 단백질 수준에서 확인함으로써 Th1/Th2 세포의 균형을 알아보고자 하였다.

[0135] 마우스를 대상으로 하는 실험 종료 후 각각의 마우스에서 비장을 적출하여 RIPA lysis buffer (Elpis Biotech Inc., Korea)를 500  $\mu$ l 넣고 균질기(homogenizer)로 분쇄하였다. 조직분쇄 혼합 부유액을 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 수집하고 브래드포드 분석(bradford assay)을 이용하여 단백질을 정량하였다. 40  $\mu$ g의 단백질과, 항체로 Rabbit polyclonal to GATA-3, Rabbit polyclonal to T-bet/Tbx21 1차 antibody (abcam, UK) 및 2차 antibody (Bethyl laboratories inc., USA)를 이용하여 T-bet과 GATA-3의 발현수치를 웨스턴블롯으로 확인하였다.

[0136] 비장에서의 T-bet 발현량을 측정한 결과, 도 15A에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총 5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 T-bet 발현량 감소를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 T-bet 발현량이 증가하는 효과가 있었다. 아울러, 도 15B에서 보듯이, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군은 control(+)과 비교하여 T-bet 발현량이 증가하는 효과가 있었다.

[0137] 비장에서의 GATA-3 발현량을 측정한 결과, 도 16A에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군은 control(-)군에 비해 현저한 GATA-3 발현량 증가를 보였으며, ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군은 control(+)과 비교하여 GATA-3 발현량이 감소하는 효과가 있었다. 아울러, 도 16B에서 보듯이, ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군은 control(+)과 비교하여 GATA-3 발현량이 감소하는 효과가 있었다.

[0138] **2-17. 임상적 육안 평가**

[0139] 실험 종료 직전 각 마우스의 병변 부위를 사진촬영을 하여 피부병변의 변화를 육안으로 평가하였다.

[0140] 임상적 육안평가한 결과, 도 17A에서 보듯이, NC/Nga 마우스에 총 5주간의 mite antigen cream을 도포한 control(+)군에 비해 ML-20, ML-60, NE-20, NE-60 피부도포군에서 현저한 홍반/출혈 (erythema/hemorrhage), 건조/흉터 (dryness/scarring), 부종 (edema), 찰과상/미란 (excoriation/erosion), 태선화 (lichenification) 감소가 나타났으며 아토피 개선효과가 육안으로 관찰되었다. 아울러, 도 17B에서 보듯이, control(+)군에 비해 ML-50, ML-150, NE-50, NE-150 경구투여군에서도 현저한 홍반/출혈, 건조/흉터, 부종, 찰과상/미란, 태선화 감소가 나타났으며 아토피 개선 효과가 육안으로 관찰되었다.

[0141] **<실시예 3>**

[0142] **메이스리그난의 천식의 예방/치료효과 확인**

[0143] **3-1. 실험동물**

[0144] 수컷 7주령의 Specific pathogen-free C57BL/6 (B6) mice (20-25g)는 Jackson Laboratory에서 구매한 것으로, KAIST(Korea Advanced Institute of Science and Technology) 내의 SPF facility 에서 길러졌다. 온도 21~23°C, 습도 55~65%, 조명 150~300 lux 에서 물은 충분히 공급하고 사료는 standard diet (PMI LabDiet)로 공급하였다.

### [0145] 3-2. 시료의 준비

[0146] 분말형태의 메이스리그난을 1회 경구 투여량인 300 µl의 옥수수 오일 (corn oil)에 녹여서 사용하였다. 저농도는 400 µg/g, 고농도는 800 µg/g로 만들어 사용하였다.

### [0147] 3-3. 천식유도 및 메이스리그난 경구투여

[0148] 알러젠(Allergen)인 AP (Aspergillus protease, 1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 5 µl와 OVA (chicken egg ovalbumin, 0.5 mg/ml, Sigma-Aldrich) 45 µl를 혼합하여 4일 간격으로 3회 복강내 주사 (intraperitoneal injection)를 시행한 다음, 4일 간격으로 2회 비강내 자극(intranasal challenge)를 시행하여 천식을 유발하였다. 2회의 비강내 자극(intranasal challenge)는 이소플루란 (isoflurane) 흡입마취를 유도한 상태에서 시행하였다. 메이스리그난은 매일 위와 같은 농도로 옥수수 오일에 녹여서 경구 투여 하였다.

### [0149] 3-4. 메이스리그난 효과 평가

[0150] 마지막 알러젠 자극(allergen challenge)을 시행한 후 24시간 내에 0.1 mg/g의 펜토바비탈 소듐 (pentobarbital sodium)을 복강내 주사 (intraperitoneal injection)하여 마취를 시행하고, 기관내삽관 (intubation)후에 flexiVent(Scireq, Montreal, Canada)에 연결하여 원활한 ventilation을 유지한다. 그 후 정맥(intravenous) 라인을 잡고 0.08 mg/kg의 판쿠로니움 (pancuronium; Sigma-Aldrich)을 투여하여 횡문근을 이완시켰다. I.V.로 아세틸콜린 (acetylcholine; Sigma-Aldrich)을 투여하여 기도과민성을 검사한 뒤, 삽관 튜브 (intubation tube)에 주사기를 이용해 1 ml DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)를 2회 반복 주입하여 기관지폐포 세척(bronchoalveolar lavage)을 시행하였다. 그 후 흉부를 열어 폐를 얻어서 ELISpot에 사용하였다. 본 실시예에서 사용된 실험군의 기호는 다음과 같다: C : 음성대조군, V : 천식유발과 동시에 Vehicle (corn oil) 을 경구투여, ML400 : 천식유발과 동시에 메이스리그난 400 µg/g 경구투여, ML800 : 천식유발과 동시에 메이스리그난 800 µg/g 경구투여.

### [0151] 3-5. 기도 과민성 검사

[0152] 정상 쥐에 비해 천식이 유발된 쥐는 기도 점막뿐만 아니라 기도 평활근이 비후되어 있으며, 아세틸콜린 (acetylcholine)에 대한 기도의 반응성이 크다. 이러한 기도과민성을 검사하기 위해 펜토바비탈 소듐 (pentobarbital sodium)을 이용, 쥐를 마취하고 기관내삽관 (intubation)후에 flexiVent에 연결하여 원활한 ventilation을 유지 한다. 그 후 정맥 (intravenous) 라인을 잡고 자발호흡으로 인한 기도저항 측정의 오차를 줄이기 위하여 판쿠로니움 (pancuronium)으로 횡문근을 이완시켰다. 해당 용량의 아세틸콜린을 정맥 투여 직후 3번 연속 기도저항을 스냅샷 (snapshot)으로 측정, 그 평균값을 그 용량에 반응한 기도저항으로 표시하였다.

[0153] 그 결과, 도 18에서 보듯이, 음성대조군에 비해 천식을 유발한 쥐에게서 기도과민성의 증가가 관찰되었으며, 천식을 유발함과 동시에 담체 (옥수수 오일)을 경구 투여한 군에 비해서 메이스리그난을 경구 투여한 군에서 기도과민성이 줄어든 것이 통계학적으로 유의하게 관찰되었다 ( $p < 0.05$ ).

### [0154] 3-6. 기관지폐포 세척액 (bronchoalveolar lavage (BAL) fluid) 내의 면역세포 수 확인

[0155] 천식이 유발되면 기도에 각종 염증세포가 증가하게 된다. 이중에서 특히 호산구의 증가가 특징적이다. 이를 알아보기 위하여 삽관 되어있는 튜브로 1 ml의 DPBS를 투여하여 BAL을 시행한 후 세척액을 얻었다. 이를 한 번 더



반복하여 세척액을 모은 다음 부피를 측정하였다. 헤모사이토미터 (Hemocytometer)를 이용하여 BAL 액내의 전체 면역 세포 (total immune cell)를 측정한 다음, 싸이토스핀 (cytospin; 400 rpm, 5 min)을 이용해 슬라이드에 세포를 코팅하였다. Wright-Giemsa 염색을 통하여 각각의 면역 세포를 계수(differential immune cell counting)하였다.

[0156] 그 결과, 도 19에서 보듯이, 음성 대조군에 비해 천식 유발군 BAL 액 내의 전체 면역세포 수의 증가가 관찰되었다. 또한 도 20 및 도 21에서 보듯이, 천식을 유발함과 동시에 담체(옥수수 오일)을 경구 투여한 군에 비해서 메이스리그난을 400  $\mu\text{g/g}$ , 800  $\mu\text{g/g}$  으로 경구 투여한 군에서 호산구가 감소하였다. 호산구 외에 다른 면역세포의 감소는 관찰되지 않았다.

### [0157] 3-7. 폐 속의 IL-4 분비 세포 수 확인

[0158] 천식이 유발된 쥐의 폐 조직에는 Th2 세포가 증가하게 된다. Th2 세포는 특징적으로 IL-4를 분비하므로 이를 확인하기 ELISpot을 시행하였다. 실험 전날 ELISA 플레이트에 항-마우스 IL-4 항체 (BD PharMingen, San Diego, CA)를 코팅해 두었다. 쥐 흉부를 개방하여 폐를 얻은 후 그것을 cell strainer로 갈아서 세포를 얻었다. 미리 플레이트 블로킹 (plate blocking)을 시행한 뒤 ELISA 플레이트의 각 웰에 RPMI-CM을 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣어 두었다. 전체 세포(total cell)를 원심분리한 뒤 1 ml RPMI 완전 배지(RPMI complete media)로 재-현탁(re-suspension)하여 웰에 100  $\mu\text{l}$ 로 넣었다. 밤새 놓아 둔(Overnight incubation) 후에 비오틴 부착 항-마우스 IL-4 항체 (BD PharMingen)를 붙이고, 스트렙타비딘-알칼리성 포스파타아제 (BD PharMingen)를 붙였다. 기질 (substrate)을 0.6% low melting agarose에 녹여서 같이 넣어준 뒤에 4° C 에서 인큐베이션(incubation)하였다. 24시간 이내에 스팟(spot)을 계수하여 폐에 있는 IL-4 분비 세포의 수를 확인하였다.

[0159] 그 결과, 도 22에서 보듯이, 음성대조군에 비해서 천식을 유발한 쥐 폐 속의 IL-4 분비세포 수의 증가가 관찰되었으며, 천식을 유발함과 동시에 담체(옥수수 오일)을 경구 투여한 군에 비해서 메이스리그난을 400  $\mu\text{g/g}$ , 800  $\mu\text{g/g}$ 으로 경구 투여한 군에서 IL-4 분비세포 수가 줄어든 것을 확인할 수 있었다.

### [0160] 3-8. 기관지 폐포 세척액 내의 당단백질 농도 측정

[0161] 천식이 유발되면 기도에 뮤신 (mucin)의 분비가 증가하게 된다. BAL 액의 뮤신을 정량화 하기 위하여 당단백질 ELISA (glycoprotein ELISA)를 시행하게 되었다. 우선 삼관 되어있는 튜브로 1 ml의 DPBS를 투여하여 BAL을 시행한 후 세척액을 얻었다. 이를 한 번 더 반복하여 세척액을 모은 다음 원심분리 (4° C, 1200rpm, 5min)하여 상등액 (supernatant)을 얻었다. 이 상등액을 1:100으로 DPBS로 희석하여 표준 용액 (standard solution)과 함께 ELISA 플레이트에 코팅하였다. 블로킹 후에 비오틴 부착 자칼린 (biotinylated jacalin)을 처리하고, 스트렙타비딘-알칼리성 포스파타아제 (streptavidin-alkaline phosphatase)를 처리한 후 기질을 넣어 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 용액으로 계산된 표준곡선을 이용하여 BAL 액에 있는 당단백질의 농도를 측정하였다.

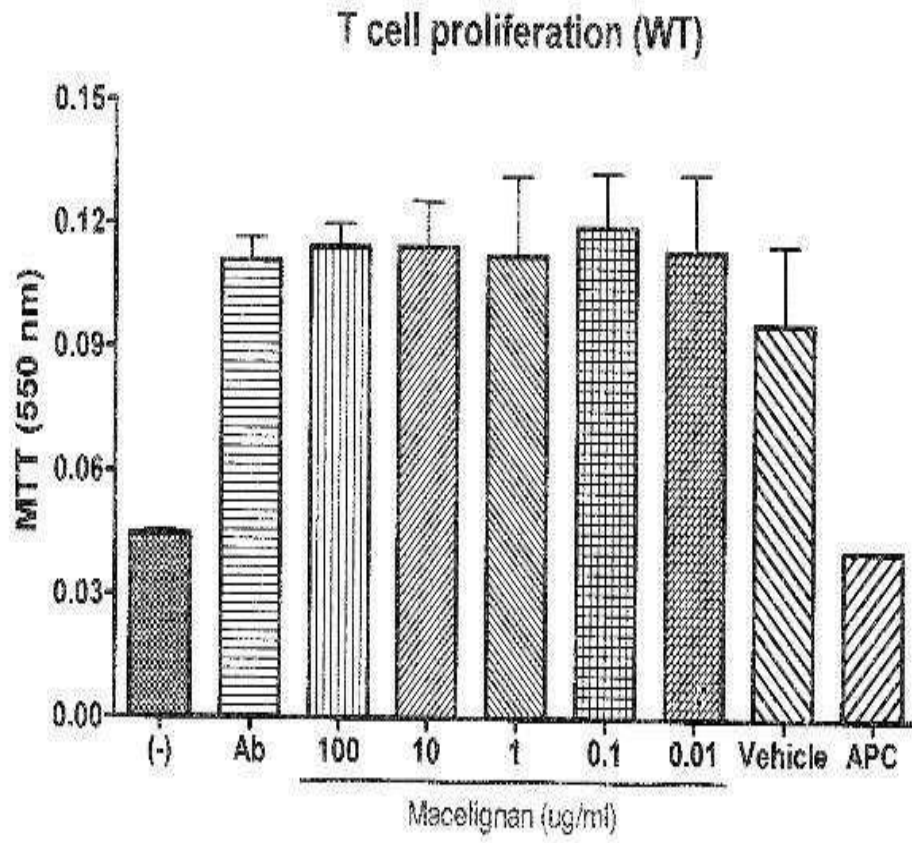
[0162] 그 결과, 도 23에서 보듯이, 음성대조군에 비해서 천식을 유발한 쥐의 BAL 액내에서 당단백질의 증가가 관찰되었으나, 메이스리그난을 400  $\mu\text{g/g}$ , 800  $\mu\text{g/g}$ 으로 경구 투여한 군에서는 당단백질의 함량이 감소함을 알 수 있었다.

## 산업상 이용가능성

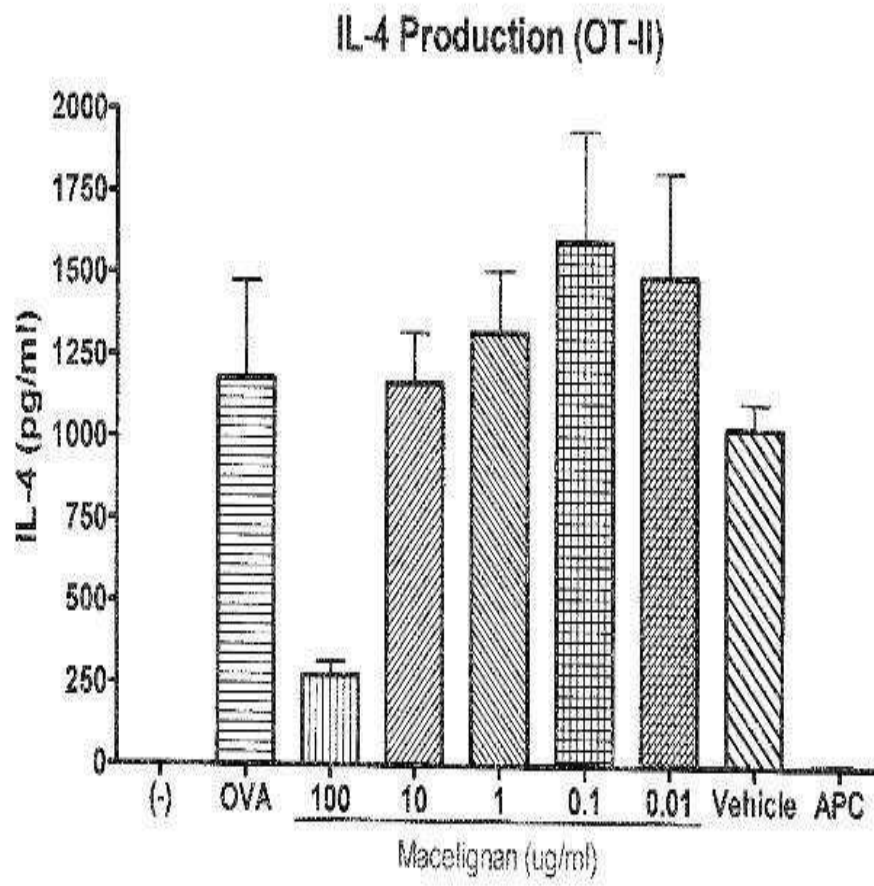
[0163] 본 발명은 메이스리그난 또는 옥두구 추출물 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환의 예방, 치료 및 개선용 약학적 조성물, 식품 조성물 또는 화장료 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 면역 세포의 증식, 면역글로불린 및 사이토카인의 생산을 감소시키는 작용 및 기타 알레르기성 질환의 증상을 완화하여 알레르기성 질환의 예방, 치료 또는 개선에 유용하게 사용할 수 있다.

도면

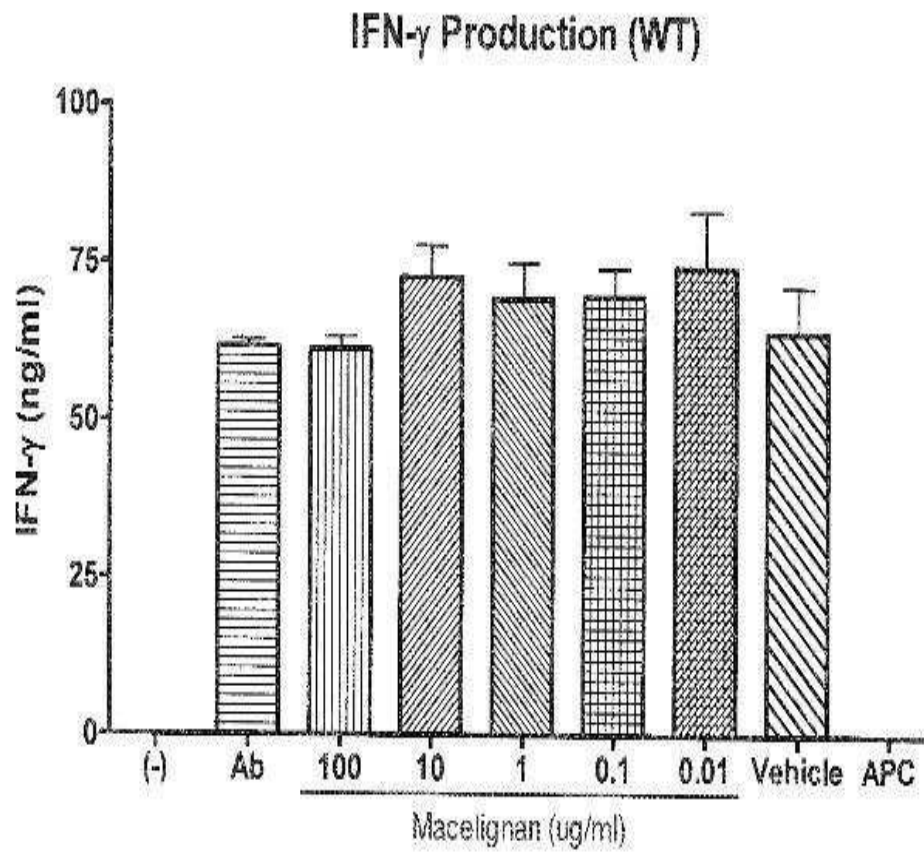
도면1



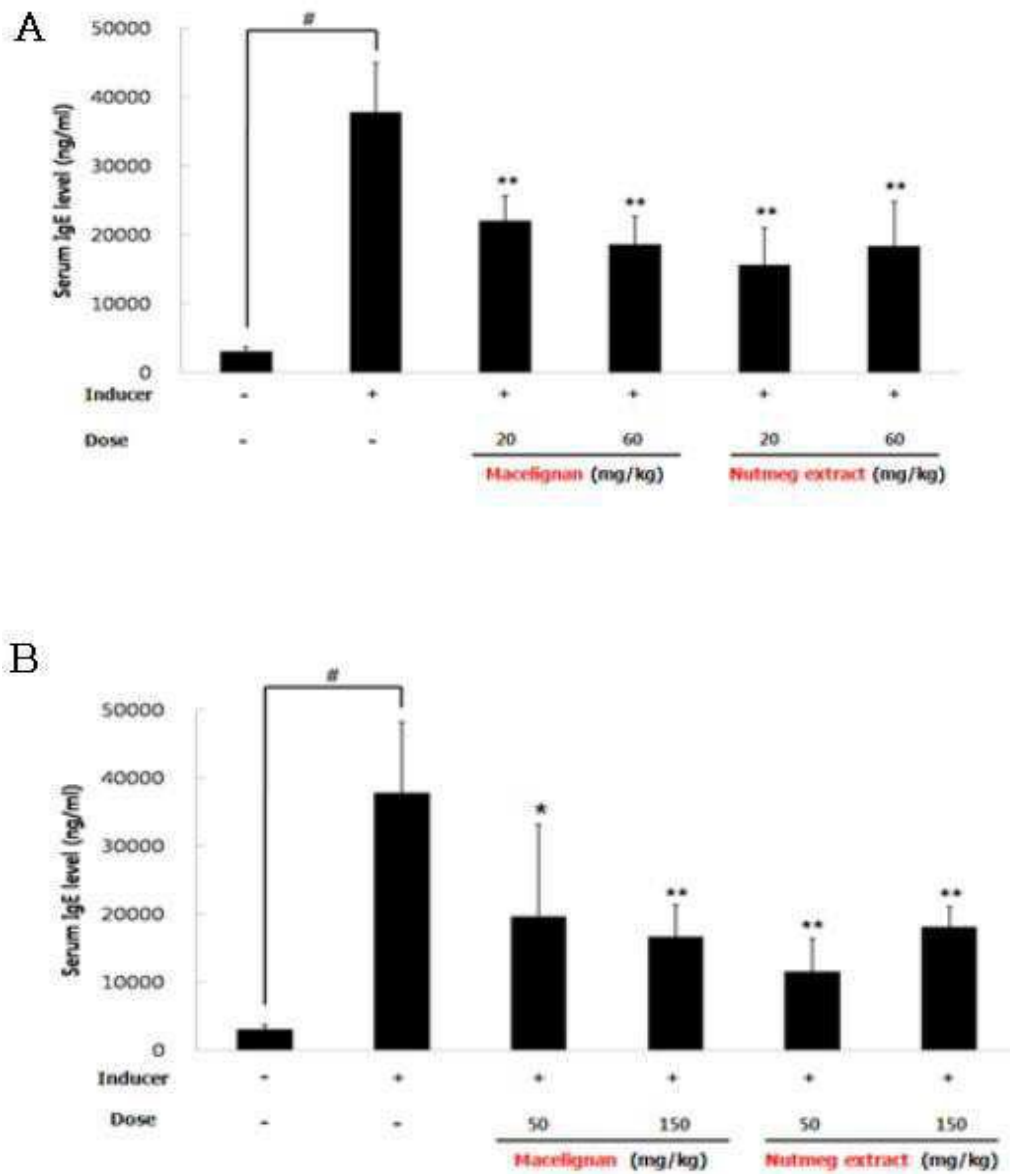
도면2



도면3

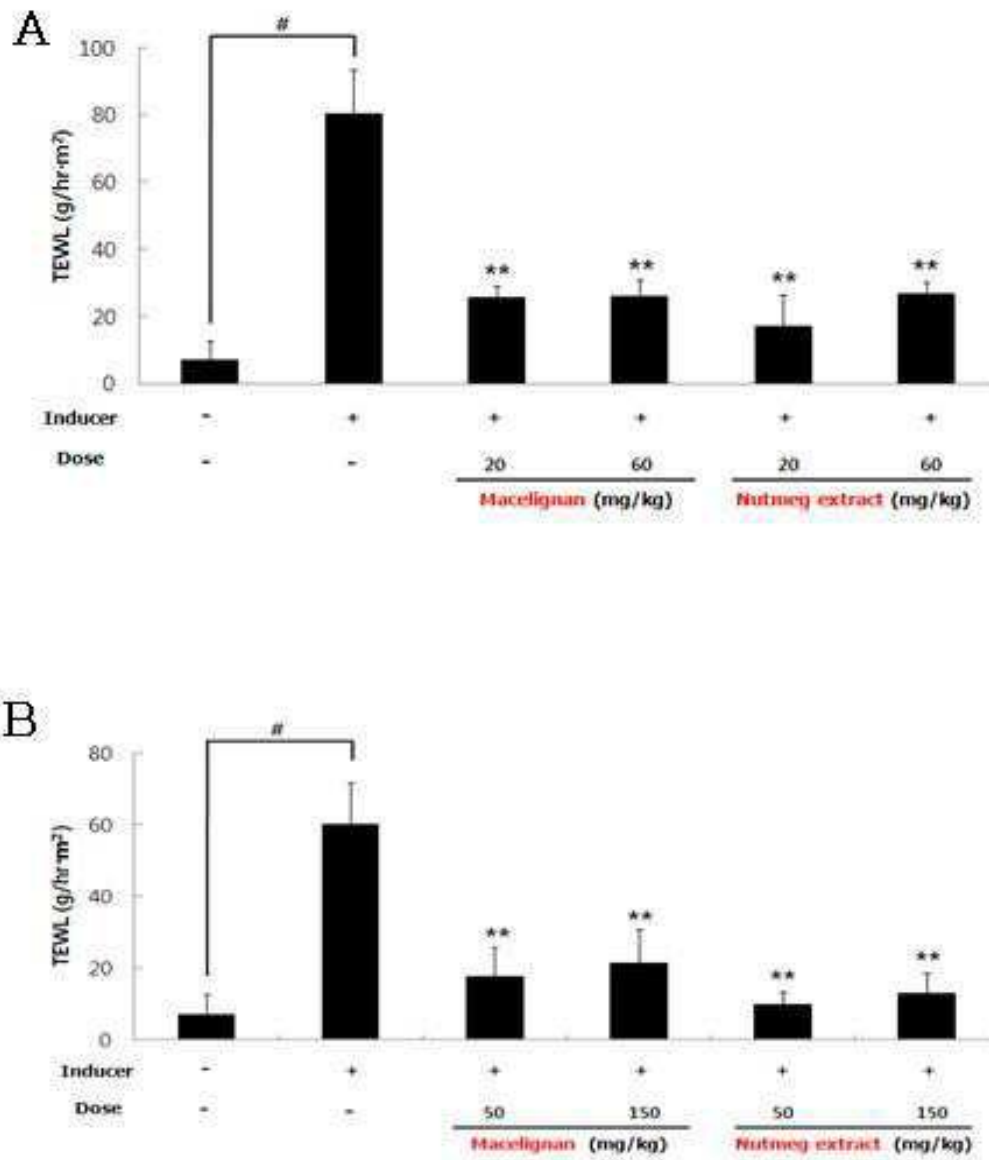


도면4

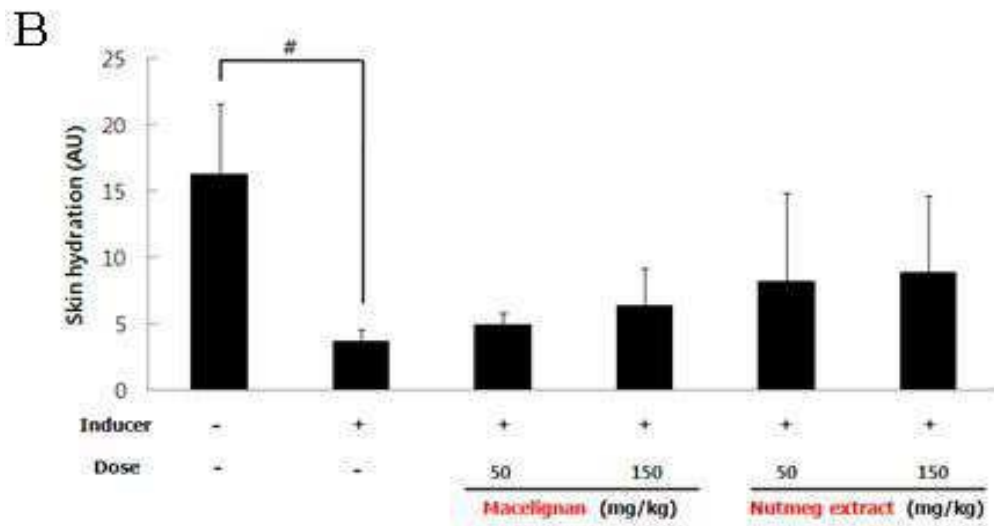
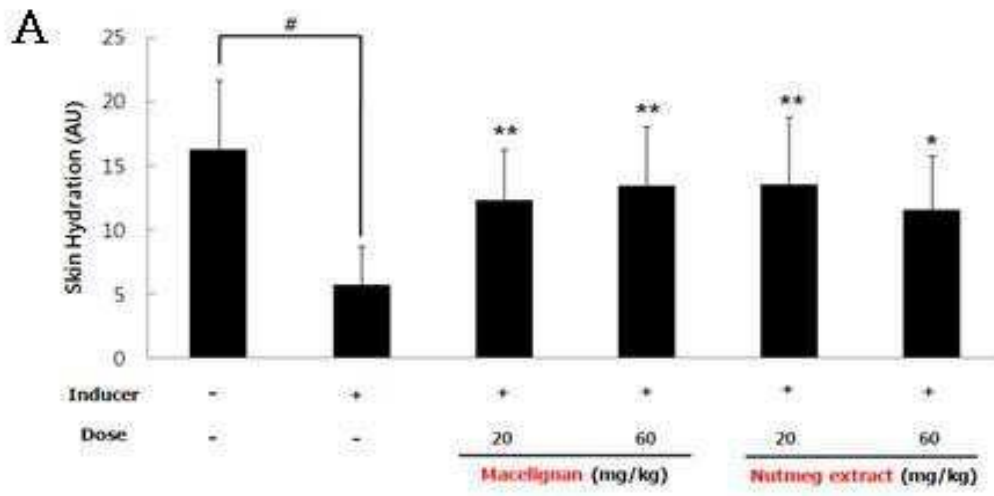




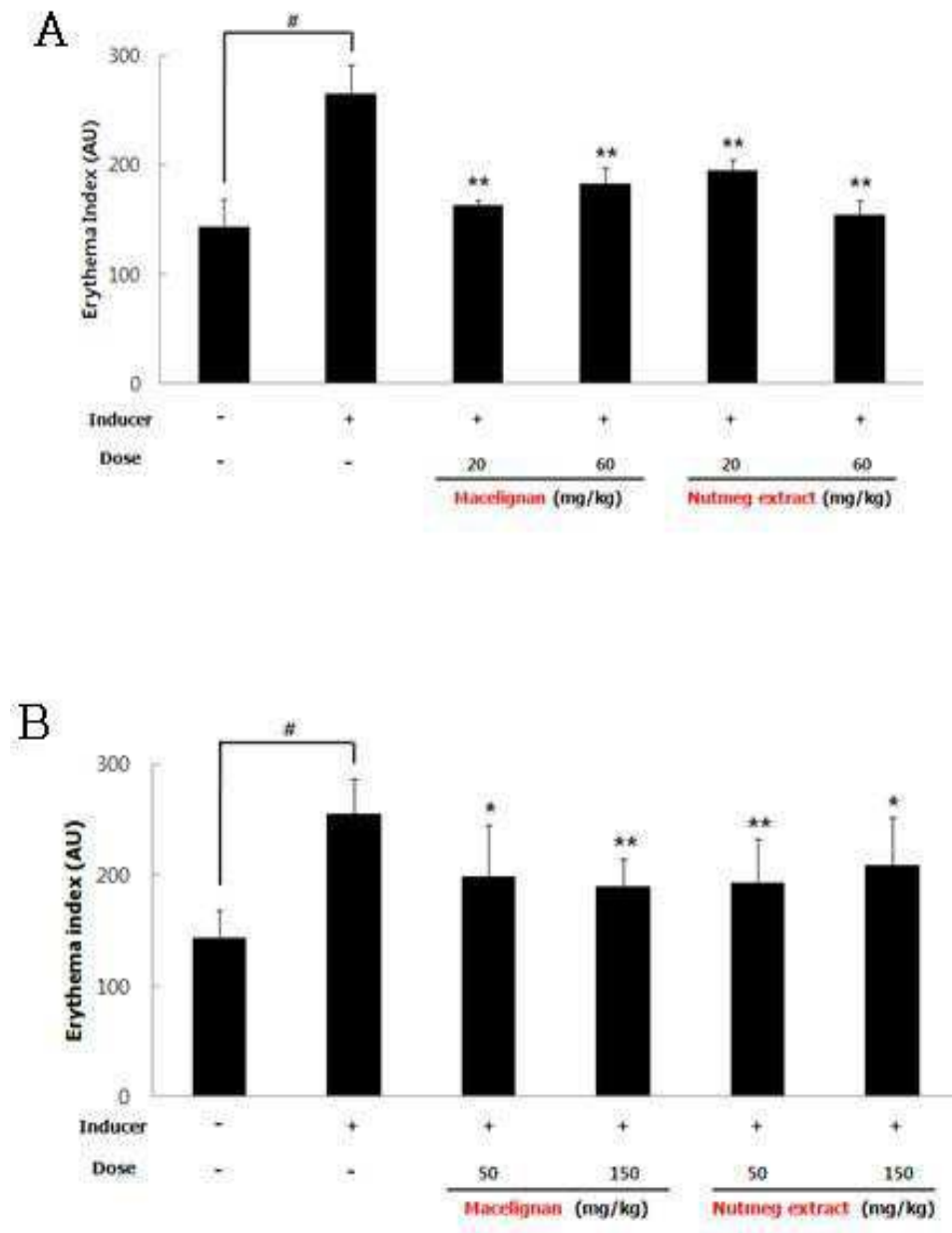
도면5



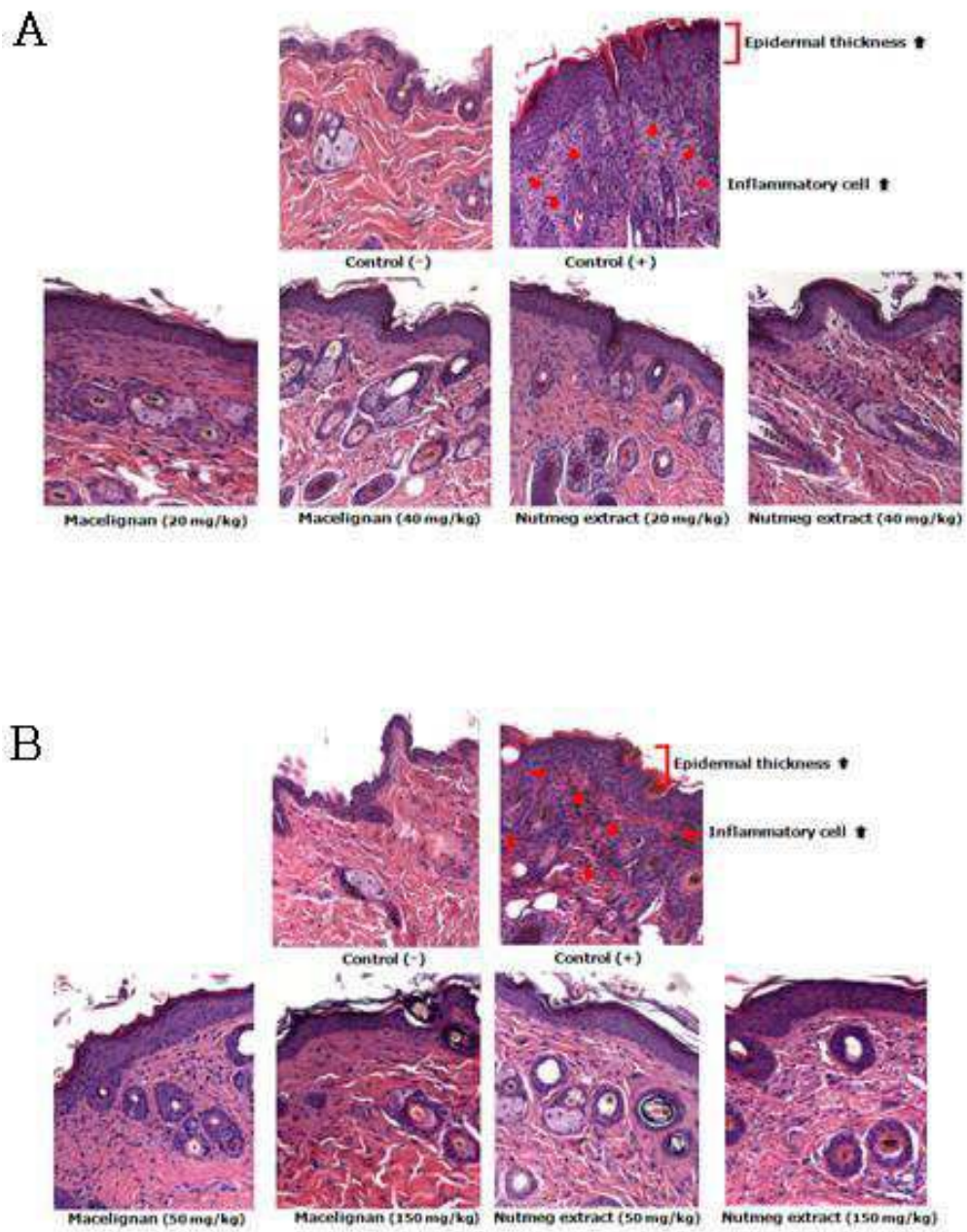
도면6



도면7

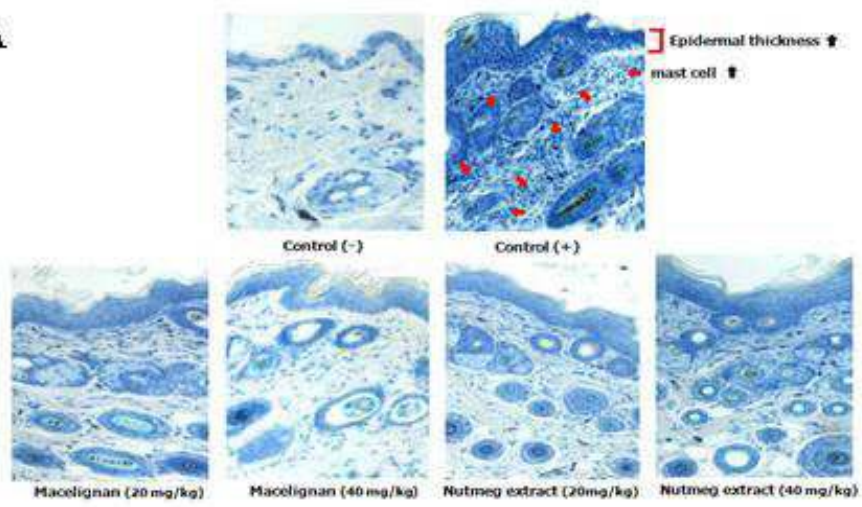


도면8

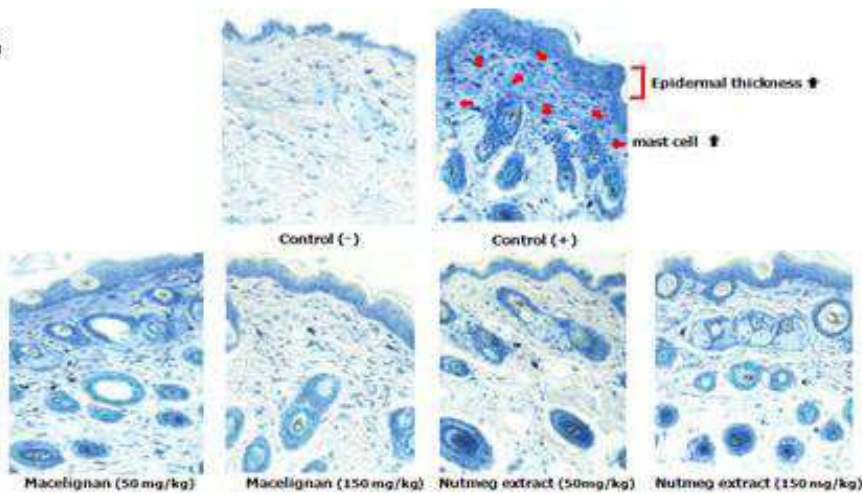


도면9

A

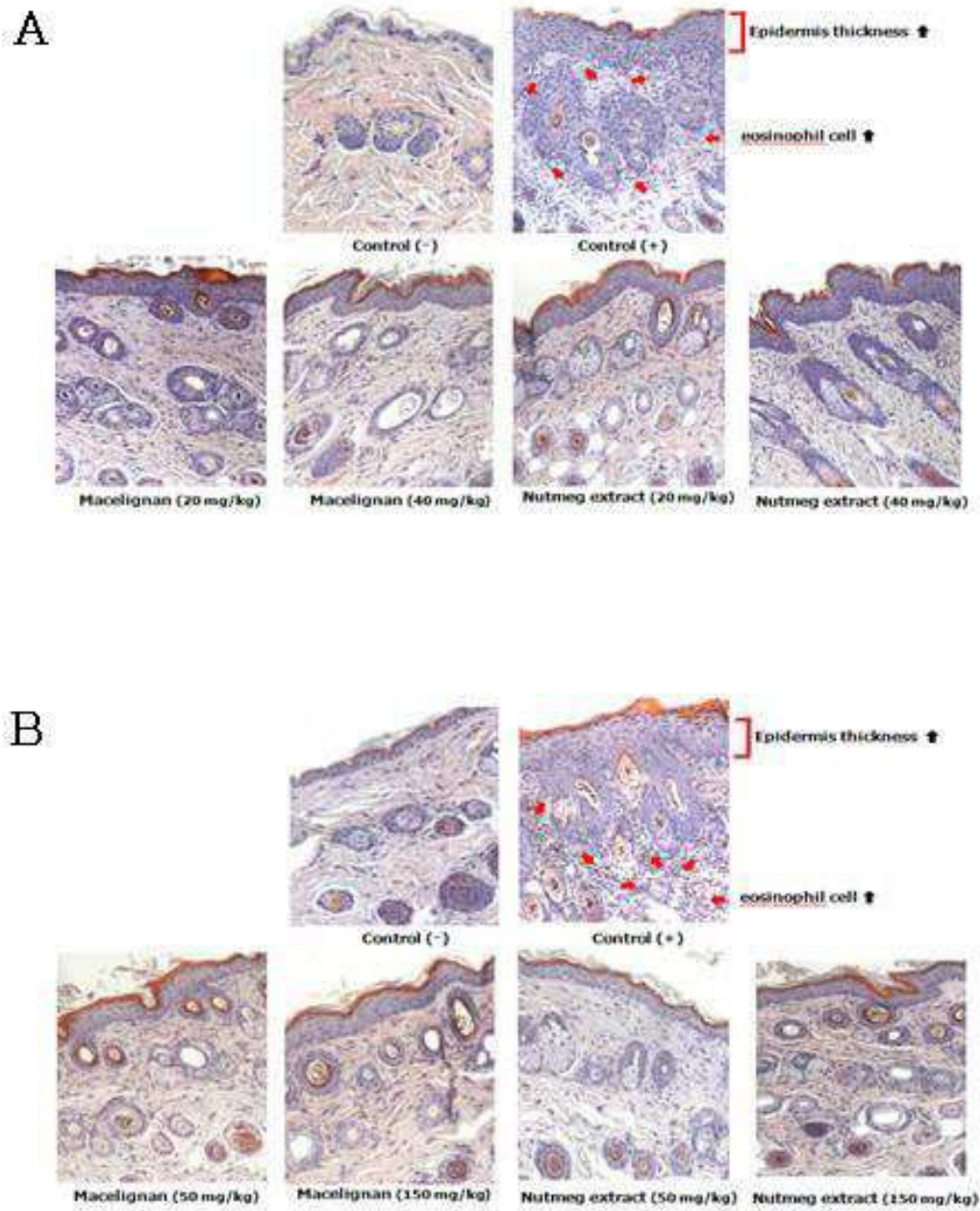


B

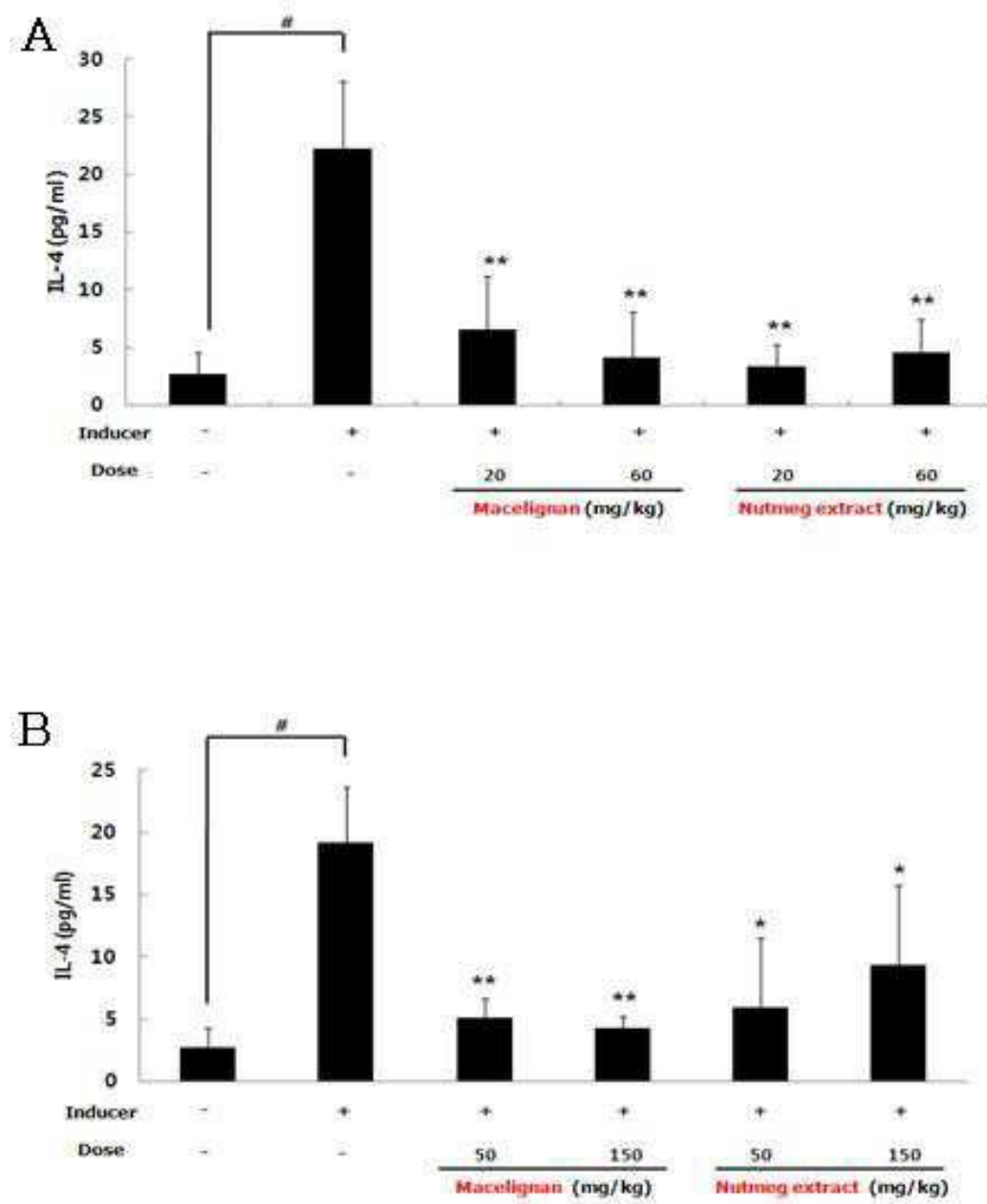




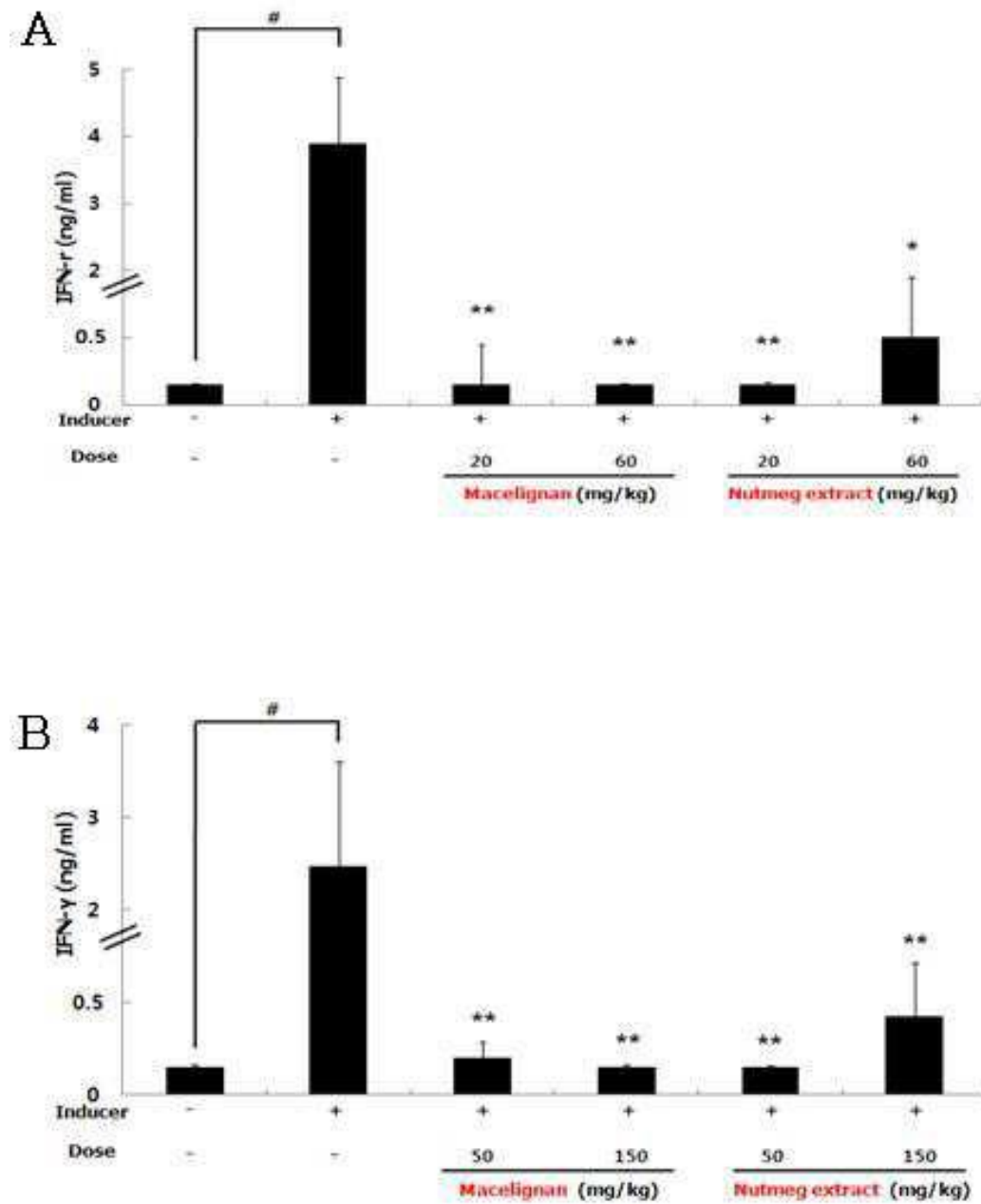
도면10



도면11

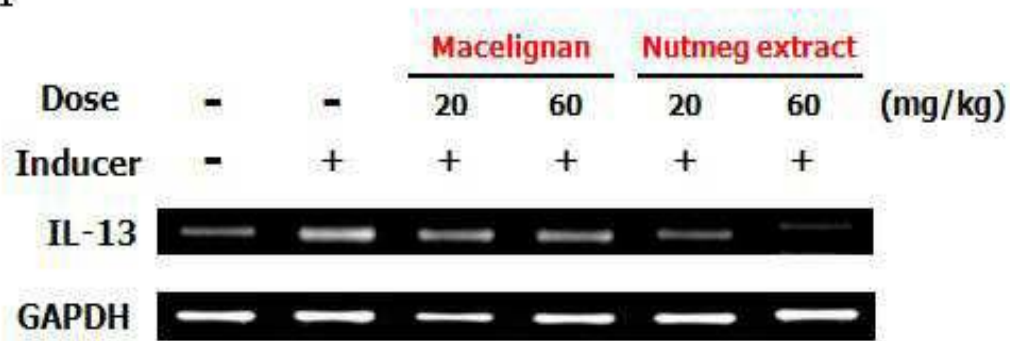


도면12

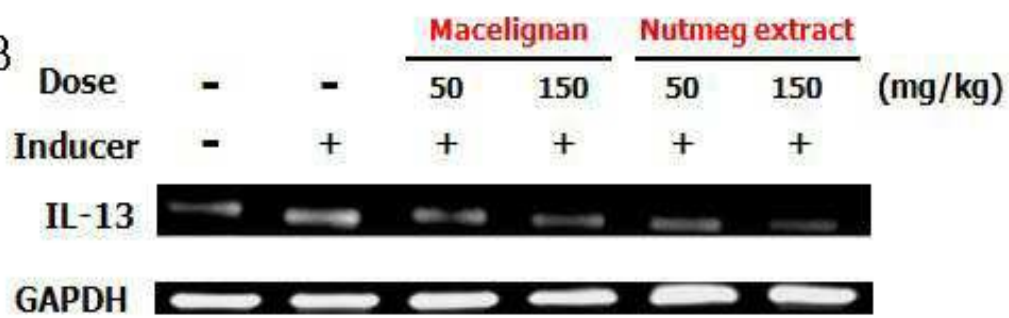


도면13

A

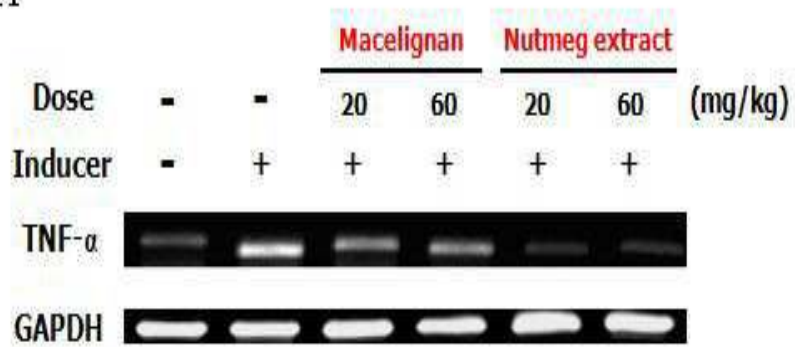


B

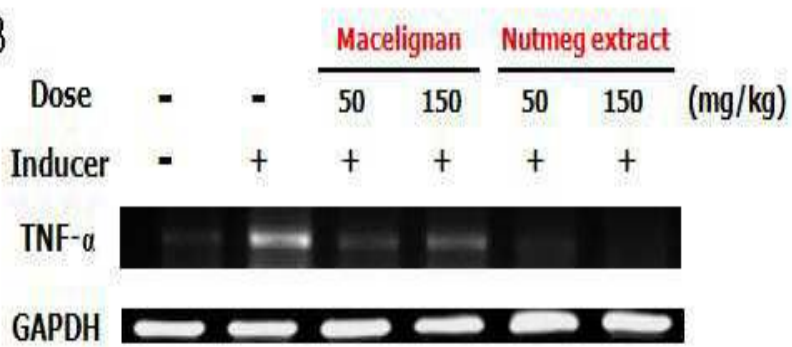


도면14

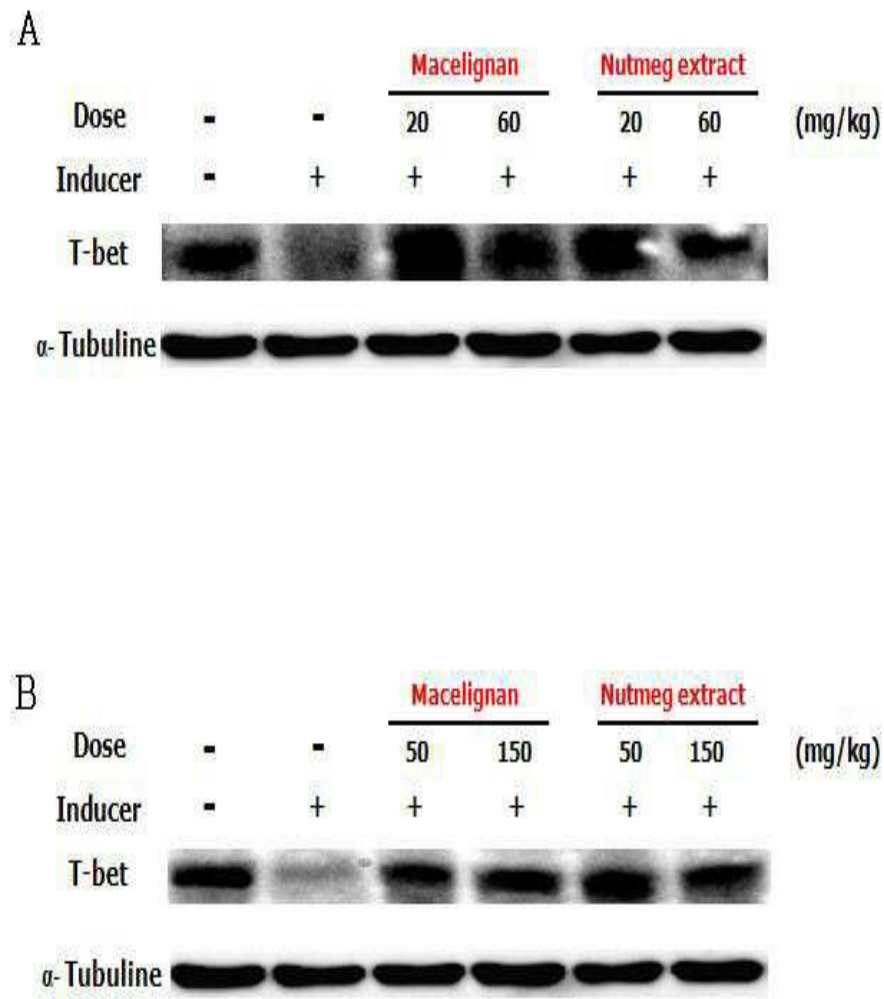
A



B

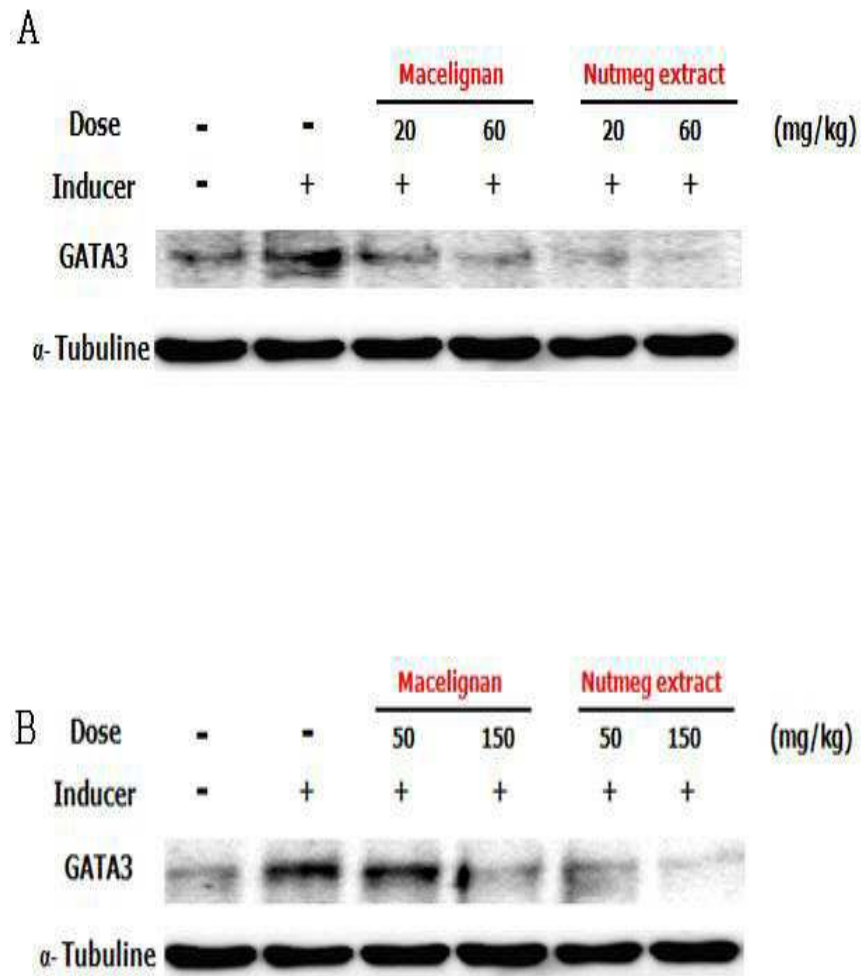


도면15

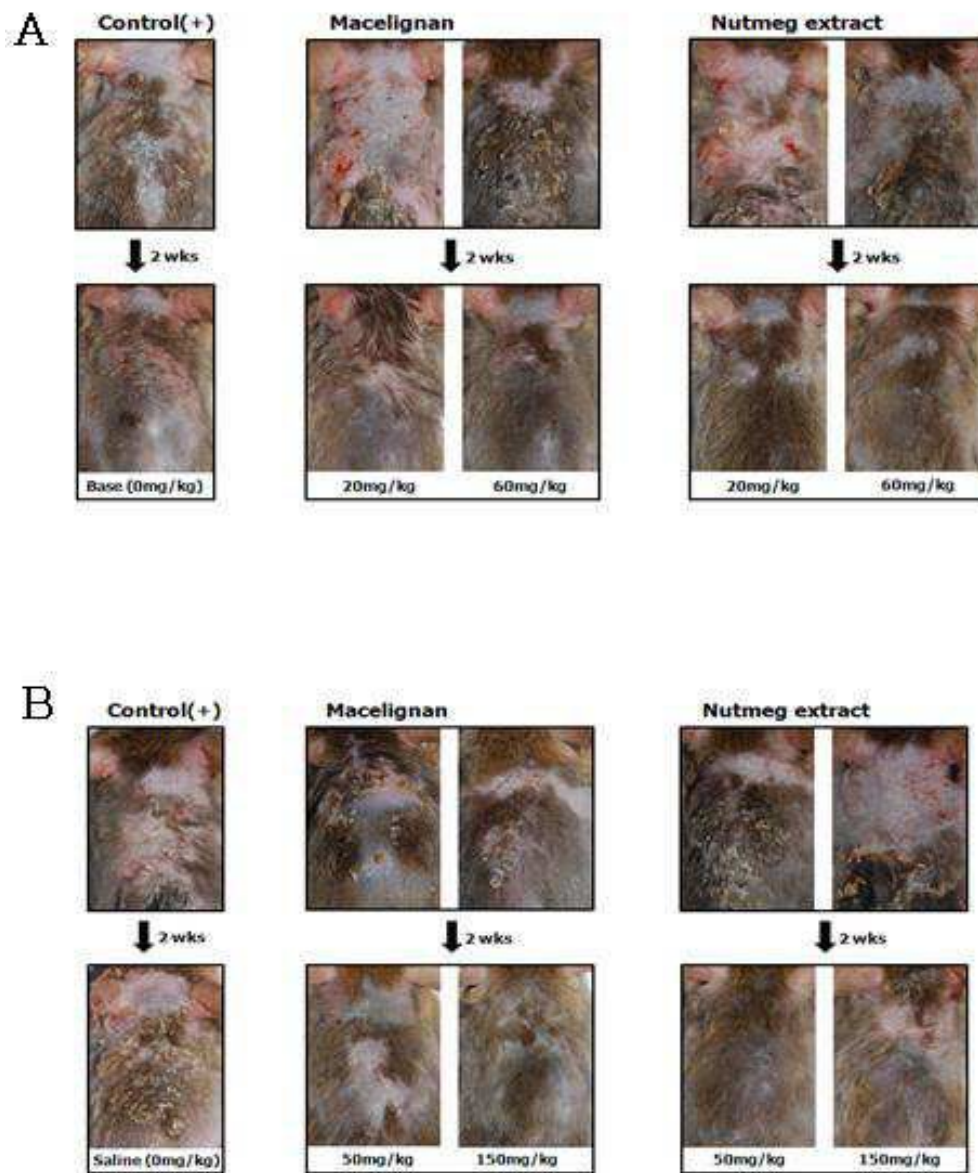




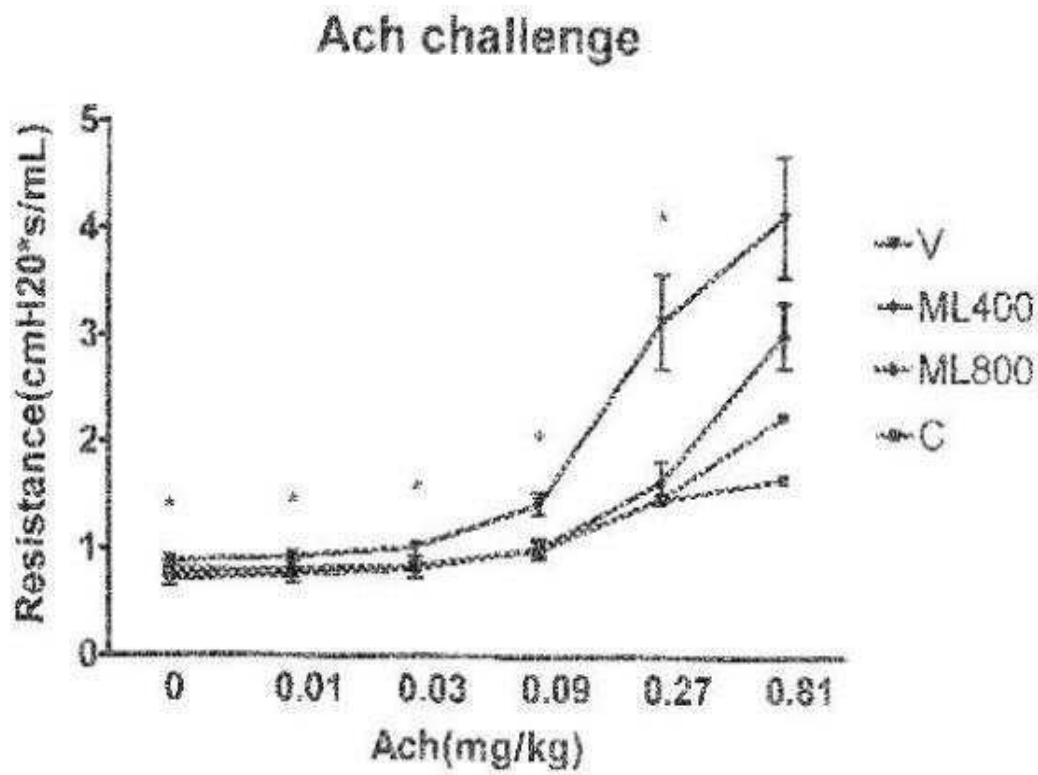
도면16



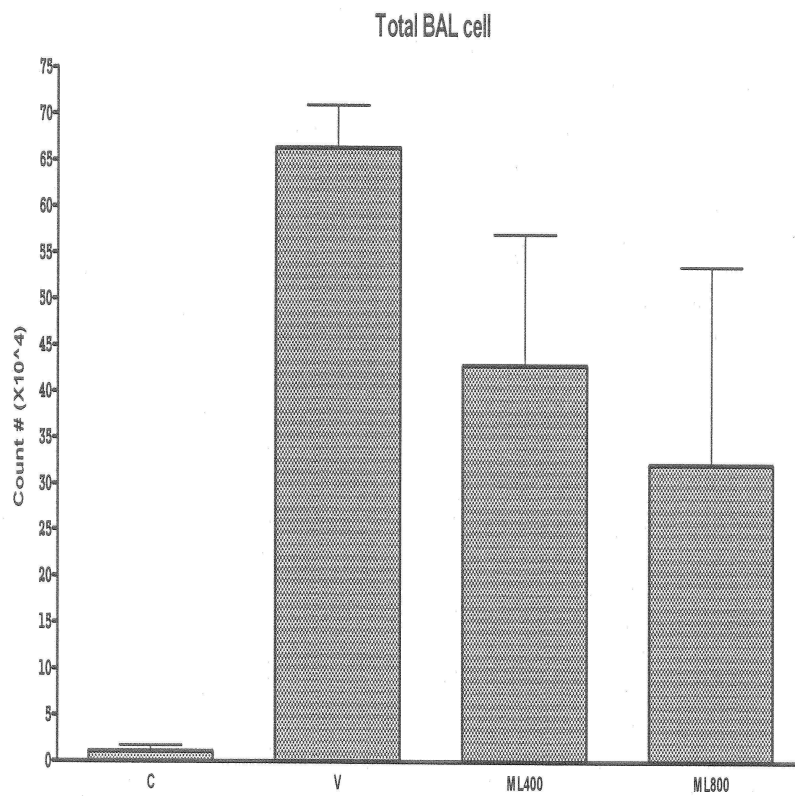
도면17



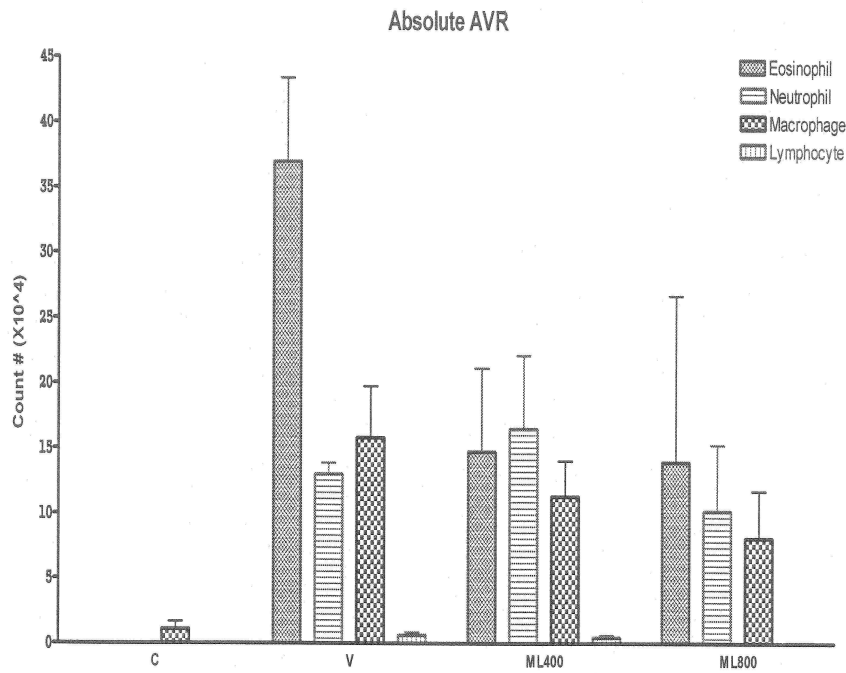
도면18



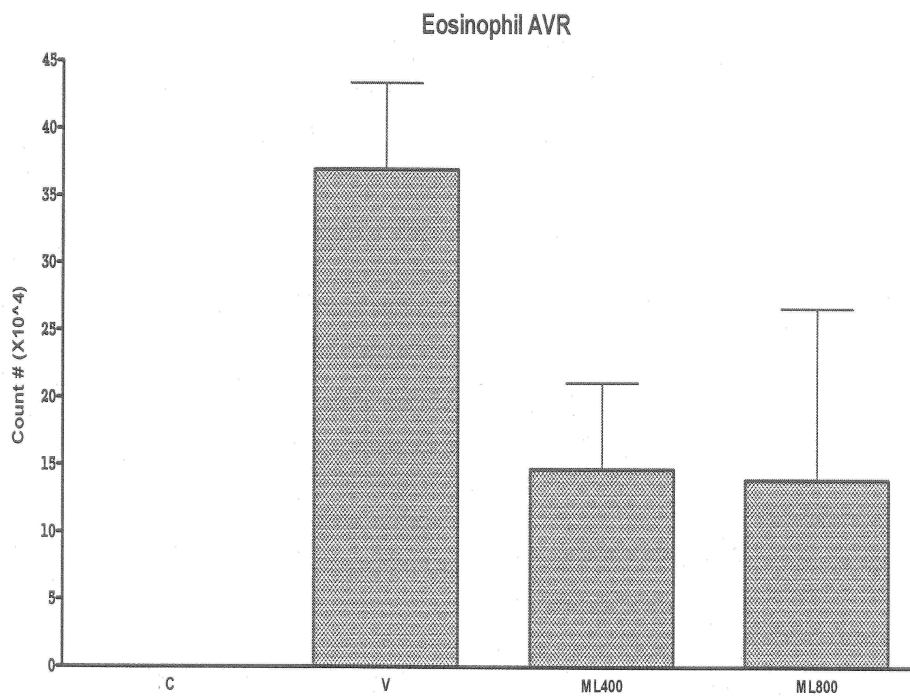
도면19



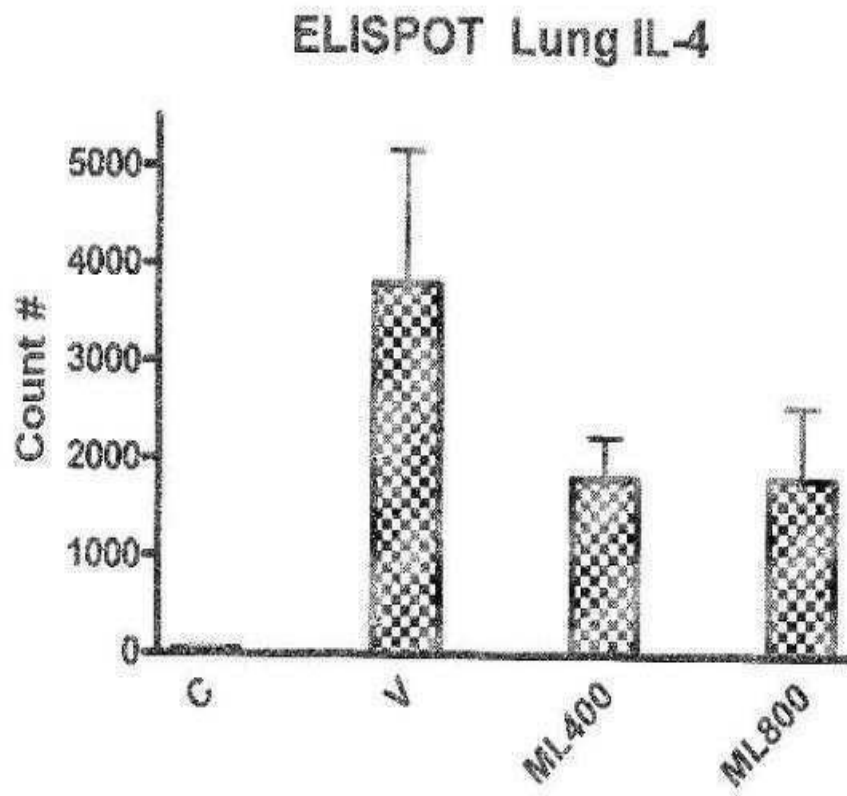
도면20



도면21



도면22



도면23

