



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월15일
(11) 등록번호 10-1536652
(24) 등록일자 2015년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/9066 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0115997
(22) 출원일자 2013년09월30일
심사청구일자 2013년09월30일
(65) 공개번호 10-2015-0036937
(43) 공개일자 2015년04월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110051162 A*
KR1019990038423 A
Curcumin helps improve immune function, Life extension foundation for longer life(2012.05.29.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국인스팜(주)
전라남도 화순군 동면 동농공길 17
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
재단법인 전남생물산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
(72) 발명자
이정민
경기 용인시 기흥구 흥덕중안로105번길 24, 1009동 401호 (영덕동, 흥덕마을10단지동원로얄듀크아파트)
김용재
광주 남구 효사랑길 14, 107동 907호 (봉선동, 포스코더샵아파트)
(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 2 항

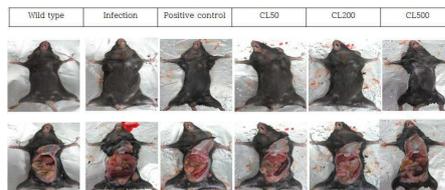
심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 **울금 추출물을 포함하는 면역증강용 조성물**

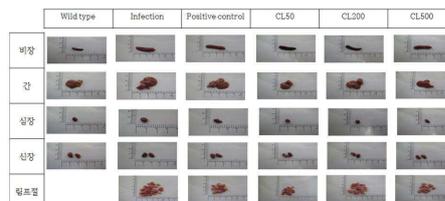
(57) 요약

본 발명은 울금 추출물이 면역결핍 유도된 C57BL/6 마우스에서의 체중, 각종 장기 등에 대한 변화실험에서 별다른 체중 및 각종 장기 무게상의 변화가 없었으며(실험예 1), 비장세포(splenocyte)의 사이토카인 발현실험에서 IL-2, -4, -6, -10, -12, -15, TNF- α , IFN- γ 등의 사이토카인 발현을 효과적으로 억제하였고(실험예 2); 비장세포에서의 T/B 세포의 증식능에 미치는 영향실험에서 T 세포 증식능 및 B 세포 증식능을 증가시켰고(실험예 3); 혈중 항원 특이 항체(IgG, IgE, IgA)양에 미치는 영향실험에서 혈중 항원 특이 항체의 양을 감소시키고(실험예 3); 비장세포에서의 자연살해세포(Natural killer (NK) cell) 활성화에 미치는 영향실험에서 NK 세포 활성화도가 증가(실험예 4)를 확인하여 면역 저하 및 면역계가 손상된 면역저하증의 예방, 억제 및 치료에 우수한 면역증강 효능을 갖는 의약품 및 건강기능식품에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



1-A. 외관 관찰 및 부검 결과



1-B. 주요 장기 관찰

5-alpha reductase inhibitory effect of Curcuma aromatica SALISB in rat prostate homogenate. Data are expressed as mean \pm S.D.

(72) 발명자

전우진

광주 북구 설죽로 595, 106동 1703호 (일곡동, 롯데아파트)

김선오

전남 장흥군 안양면 우드랜드길 288,

황권택

광주 광산구 신창로161번길 34, 319동 605호 (신창동, 신창3차부영사랑으로아파트)

이유현

서울 강남구 언주로 203, 1005호 (도곡동, 매봉아파트)

백흠영

서울 도봉구 노해로70길 12, 1동 1401호 (창동, 동아아파트)

이기행

전남 화순군 동면 동농공길 17,

유선아

경기 수원시 영통구 청명로 100, 421동 805호 (영통동, 건영아파트)

김옥경

광주 북구 안산로 76, 102동 401호 (삼각동, 삼각동우미타운)

남다운

서울 노원구 동일로214길 21, 404동 709호 (상계동, 상계주공4단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20114007
부처명	농림수산식품부
연구관리전문기관	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	기술사업화지원사업
연구과제명	난대성 특화작물 산업화 연구단
기 여 율	1/1
주관기관	한국인스팜주식회사
연구기간	2011.11.03 ~ 2014.11.02

명세서

청구범위

청구항 1

울금(Curcuma aromatica SALISB) 재료를 동결 건조하여 마쇄한 후 시료 중량의 2 내지 20배에 달하는 부피의 1 내지 30%(v/v) 물 및 주정 혼합용매로 30 내지 80℃에서 2 내지 12시간 동안에서 열수 추출하여 추출한 후 감압여과 및 농축하여 제조되는 울금(Curcuma aromatica SALISB) 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 약학조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

울금(Curcuma aromatica SALISB) 재료를 동결 건조하여 마쇄한 후 시료 중량의 2 내지 20배에 달하는 부피의 1 내지 30%(v/v) 물 및 주정 혼합용매로 30 내지 80℃에서 2 내지 12시간 동안에서 열수 추출하여 추출한 후 감압여과 및 농축하여 제조되는 울금(Curcuma aromatica SALISB) 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 건강기능식품.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] [문헌 1] Richard A. Goldsby, et al., KUBY Immunology, 2000

[0003] [문헌 2] Dawson T.M., et al., Annu. Rev. Med, 47, pp.219-227, 1996

[0004] [문헌 3] Eisenberg et al., N. Eng. J. Med., 328, pp.246-252

[0005] [문헌 4] Abul K. Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology 6th, pp.298-301, 2007

[0006] [문헌 5] Richard A. Goldsby, et al., KUBY Immunology. 2000

[0007] [문헌 6] Ryuat al.. Applied chemistry, 9: 57-60 (2005)

[0008] [문헌 7] 김창렬. 식품의약품안전처, pp 1-98 (2006)

[0009] [문헌 8] Chatterjee, S. et al, Food Research International. 32.487-490. 1999.

- [0010] [문헌 9] Ho JN, Kang ER, Yoon HG, Jeon H, Jun W, Watson RR, Lee J, Biosci biotechnol biochem. 2011 Jul;75(7):1234-9
- [0011] [문헌 10] Cook WJ, Green KA, Obar JJ, Green WR. J Virol methods. 2003. Mar;108(1):49-58
- [0012] [문헌 11] Morse HC 3rd, McCarty T, Giese NA, Taddesse-Heath L, Grusby MJ. 1999 Aug;73(8):7093-5.
- [0013] [문헌 12] Wang Y, Huang DS, Liang B, Watson RR. 1994. Oct;124(10):2024-32). (Seo YS, Shin KS, J Korean Soc Food Sci Nutr. 2012 41(1):95-102.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 면역계는 자연저항, 비특이성 면역체계 및 특이성 면역체계로 구분할 수 있다. 자연저항(1차 방어선)이란 미생물을 위시한 모든 침입자들을 그들의 종류에 관계없이 막아내는 해부생리학적 요소들을 말하며, 비특이적 면역(2차 방어선)은 자연저항을 돌파하여 체내로 들어온 침입자들을 제거하는 식세포로 구성된 방어체계를, 그리고 특이성 면역계(3차 방어선)는 림프구들로 구성된 면역체계를 말하는데, 이중 특이성 면역계는 기억능 그리고 자기와 비자기를 구분할 수 있는 능력을 지닌 고도로 발달한 면역체계이다(Richard A. Goldsby, et al., KUBY Immunology, 2000).
- [0016] 백혈구는 2차 또는 3차 방어선을 구성하여 1차 방어선을 돌파하여 체내에 들어온 이물을 담당하게 되며, 세균, 바이러스 감염 또는 염증 반응 시, 대식세포 및 림프구 활성화의 조절은 의약품의 치료 효과의 결정에 있어서 중요한 역할을 한다. 대식세포(Macrophage)는 다양한 기능을 가진 세포로 산화적 스트레스 상황에서 여러 가지 사이토카인(cytokine)과 일산화산소(NO)를 생성하여 면역체계에서 중요한 역할을 한다. 특히 대식세포에서 리포다당류(Lipopolysaccharide; LPS), 사이토카인, TNF- α 와 같은 자극에 의해 발현되는 iNOS는 장시간 동안 다량의 NO를 생산하여, NF κ B 활성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 활성화된 대식세포에 의한 슈퍼옥사이드 음이온(superoxide anion, O $_2^-$), 과산화수소(hydrogen peroxide, H $_2$ O $_2$)와 같은 활성산소종(reactive oxygenspecies; ROS) 및 일산화질소(nitric oxide, NO)의 생산은 비특이적 면역에 있어서 중요한 세포독성 및 세포활성제기작이다. 대식세포에 의한 ROS 및 NO의 생성에 어떤 천연화합물이 영향을 미치는지 많은 연구들이 수행되어 왔다. 대식세포는 항원을 제시하거나(antigen-presenting), 종양을 없애거나(tumoricidal) 미생물세포를 죽이는(microbicidal) 세포로서, 세포매개(cell-mediated) 또는 체액성 면역(humoral immunity)에 중심적인 역할을 하는 조절세포로, 활성화된 대식세포에서 생산되는 NO는 비특이적 숙주방어기작인 대식작용, 그리고 세균 및 암세포의 증식억제활성을 보인다(Dawson T.M., et al., Annu. Rev. Med, 47, pp.219-227, 1996).
- [0017] 현재 전 세계적으로 면역력 증강을 통해 건강을 증진시키고자 많은 한약재가 사용되고 있다. 미국에서 한약재들은 의약품뿐만 아니라 건강기능성 식품으로도 인정받고 있다. 아시아에서뿐만 아니라 미국인구의 3분의 1이 적어도 한 번은 대체의약의 형태로 한약재를 복용하고 있음이 알려져 있다(Eisenberg et al., N. Eng. J. Med., 328, pp.246-252). 한약재 유래의 약품은 질병의 예방과 치료를 위한 활성성분의 동정에 초점이 맞추어져 왔다.
- [0018] 서양주목의 수피로부터 얻어진 항암제인 탁솔(Taxol)이 그 대표적인 예이다. 현대 서양 약물치료는 대부분 특정 생화학적 경로를 표적으로 하는 정제된 화합물이나, 우리나라가 과거부터 사용한 한약재는 다양한 화합물의 복합물이며 부작용이 거의 없이 치료효과를 나타낸다
- [0019] 동의보감 등 과거 한의학 서적에 한약재들에 대한 효능은 언급되어 있지만, 문헌에 의한 정보가 현재의 특정 질병이나 증상과 접목돼 있는 것은 아니다. 또한 한약재의 성분 중 어느 성분이 직접적인 효과를 내는지는 밝혀지지 않았다. 동의보감이나 중의학 대사전에 수록된 한약재들 중 면역증강효과가 있는 것으로 알려져 있는 한약재들은 현대의 과학적인 연구에 의하여 면역증강효능에 대한 검증이 요구된다.

[0020] 방사성치료 또는 화학치료와 같은 항암 치료 시 조혈모세포들이 손상을 입게 되어 조혈세포와 면역세포들이 감소되고, 이로 인해 종종 조혈과 면역작용의 형성에 장애가 발생한다. 결과적으로, 환자들은 빈혈과 림프구 감소증, 혈소판 감소증 또는 과립백혈구 감소증을 경험하게 되며, 이것은 심각하고 치명적인 감염을 일으키고 환자들의 사망률을 높이게 된다. 임상적으로, 항암치료나 골수이식 후에 골수성장인자인 G-CSF, GM-CSF, IL-1~12, M-CSF 및 EPO 등을 사용하고 있으며, 이들 성장인자는 서로 상승작용을 일으키면서 CFU 와 BFU에서부터 세포 분화 및 생성을 촉진시키고, 세포의 이동, 식세포 작용, 슈퍼옥사이드 생성, 항체 자극에 따른 백혈구의 세포 해독작용 등도 증가시킨다(Abul K. Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology 6th, pp.298-301, 2007).

[0021] 대식세포는 많은 라이소솜을 가지고 있고 이들은 산성가수분해효소와 과산화효소를 함유하고 있다. 또한 유리면과 플라스틱 표면에 강하게 부착하는 성질이 있으며 미생물이나 종양세포 등을 활발하게 탐식한다. 상기 세포는 IFN- γ 등의 사이토카인 수용체를 가지고 있다. 이들은 보체성분, 인터페론, 인터루킨-1 및 종양괴사인자 같은 사이토카인을 생산하며 T-세포로부터 생산되는 여러 가지 사이토카인에 의해 기능이 증강될 수 있다(Richard A. Goldsby, et al., KUBY Immunology. 2000).

[0022] 울금(Curcuma aromatica SALISB)은 생강과에 속하는 다년생 초목으로 서 원산지는 인도, 중국 및 일본 등이고, 고온다습한 남부 아시아, 아프리카 및 중남미에서 자생하고 있으며 동인도 지방에서 재배가 시작되었다고 알려져 있다 (Ryuat al., Applied chemistry, 9: 57-60 (2005)). 울금은 한약재, 향신료 및 식용으로, 열대지방의 남아시아와 동남아시아에서 오랜 기간 동안 사용되어 왔는데, 울금의 가루나 추출액은 "본초강목"과 "동의보감"등의 고서나 기타 동물 실험에서 이담작용, 위액 분비 촉진 작용, 이뇨 작용, 해독 기능, 항암 작용, 항염 작용 및 항산화 작용 등이 알려져 있다 (김창렬. 식품의약품안전처, pp 1-98 (2006)). 또한, 울금의 뿌리, 줄기의 성분은 항산화와 세포보호 역할을 수행하는데, 주성분은 커큐민 (curcumin)과 커큐민(curcumin) 유도체 및 아로마틱 튜메론 (Aromatic turmerone)으로 알려져 있다(Chatterjee, S. et al, Food Research International. 32.487-490. 1999.).

[0023] 그러나, 상기 문헌의 어디에도 울금 추출물의 면역증강제로서의 효능에 대하여 언급되거나 개시된 바는 없다.

[0024] 본 발명의 울금 추출물은 면역결핍 유도된 C57BL/6 마우스에서의 체중, 각종 장기 등에 대한 변화실험에서 별다른 체중 및 각종 장기 무게상의 변화가 없었으며(실험예 1), 비장세포(splenocyte)의 사이토카인 발현실험에서 IL-2, -4, -6, -10, -12, -15, TNF- α , IFN- γ 등의 사이토카인 발현을 효과적으로 억제하였고(실험예 2); 비장세포에서의 T/B 세포의 증식능에 미치는 영향실험에서 T 세포 증식능 및 B 세포 증식능을 증가시켰고(실험예 3); 혈중 항원 특이 항체 (IgG, IgE, IgA)양에 미치는 영향실험에서 혈중 항원 특이 항체의 양을 감소시키고(실험예 3); 비장세포에서의 자연살해세포(Natural killer (NK) cell) 활성화에 미치는 영향실험에서 NK 세포 활성화도가 증가(실험예 4)를 확인함으로써 강력한 면역증강 효능을 나타내는데, 면역 저하 및 면역계가 손상된 면역저하증의 예방, 억제 및 치료에 우수한 면역증강 효능을 갖는 의약품 및 건강기능식품 등에 사용가능함을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0025] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 약학조성물을 제공한다.

[0026] 본원에서 정의되는 상기 추출물은 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 극성용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 주정 혼합용매, 보다 바람직하게는 물 또는 1 내지 30%(v/v) 물 및 주정 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.

[0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명의 울금 재료를 동결 건조하여 마쇄한 후 시료 중량의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 2 내지 20배에 달하는 부피의 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 극성용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 주정 혼합용매, 보다 바람직하게는 물 또는 1 내지 30%(v/v) 물 및 주정 혼합용매로 20

내지 120℃, 바람직하게는 30 내지 80℃에서 약 1 내지 72시간, 바람직하게는 2 내지 12시간 동안에서 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 열수 추출하여 추출한 후 감압여과 및 농축하여 본 발명의 울금 추출물들을 수득할 수 있다.

- [0029] 상기와 같은 방법으로 얻은 본 발명의 울금 추출물이 면역결핍 유도된 C57BL/6 마우스에서의 체중, 각종 장기 등에 대한 변화실험에서 별다른 체중 및 각종 장기 무게상의 변화가 없었으며(실험예 1), 비장세포(splenocyte)의 사이토카인 발현실험에서 IL-2, -4, -6, -10, -12, -15, TNF- α , IFN- γ 등의 사이토카인 발현을 효과적으로 억제하였고(실험예 2); 비장세포에서의 T/B 세포의 증식능에 미치는 영향실험에서 T 세포 증식능 및 B 세포 증식능을 증가시켰고(실험예 3); 혈중 항원 특이 항체 (IgG, IgE, IgA)양에 미치는 영향실험에서 혈중 항원 특이 항체의 양을 감소시키고(실험예 3); 비장세포에서의 자연살해세포(Natural killer (NK) cell) 활성화에 미치는 영향실험에서 NK 세포 활성도가 증가(실험예 4)를 확인함으로써 강력한 면역증강 효능을 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0030] 따라서, 본원 발명은 상기 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 약학조성물 또는 건강기능식품을 제공한다.
- [0031] 또한, 울금 추출물은 오랫동안 식용되거나 생약으로 사용되어 오던 약재로서 이로부터 추출된 본 발명의 추출물들 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없다.
- [0032] 상기 본 발명의 추출물을 함유하는 면역증강용 약학조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 50 % 중량백분율로 포함한다.
- [0033] 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 추출물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리카이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 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 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, 동결건조 제제, 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 위텝솔 (Witepsol), 마크로골, 트윈 (Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 추출물은 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, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내

(Intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

- [0038] 본원 발명의 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향료 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학 협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).
- [0039] 또한, 본 발명은 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 건강기능식품을 제공한다.
- [0040] 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0041] 본 발명의 면역증강용 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.01 내지 95 %, 바람직하게는 1 내지 80 % 중량백분율로 포함한다.
- [0042] 또한, 면역증강을 위한 목적으로 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.
- [0043] 본 발명은 면역증강용 효과를 나타내는 상기 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강보조식품을 제공한다. 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0044] 또한, 면역증강용 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 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 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 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.
- [0046] 상기 외에 본 발명의 추출물은 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, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 시료는 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 시료 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

- [0047] 상술한 바와 같이, 본 발명의 울금 추출물이 면역결핍 유도된 C57BL/6 마우스에서의 체중, 각종 장기 등에 대한 변화실험에서 별다른 체중 및 각종 장기 무게상의 변화가 없었으며(실험예 1), 비장세포(splenocyte)의 사이토카인 발현실험에서 IL-2, -4, -6, -10, -12, -15, TNF- α , IFN- γ 등의 사이토카인 발현을 효과적으로 억제하였고(실험예 2); 비장세포에서의 T/B 세포의 증식능에 미치는 영향실험에서 T 세포 증식능 및 B 세포 증식능을 증가시켰고(실험예 3); 혈중 항원 특이 항체 (IgG, IgE, IgA)양에 미치는 영향실험에서 혈중 항원 특이 항체의 양을 감소시키고(실험예 3); 비장세포에서의 자연살해세포(Natural killer (NK) cell) 활성화에 미치는 영향실험에서 NK 세포 활성도가 증가(실험예 4)를 확인하여 면역 저하 및 면역계가 손상된 면역저하증의 예방, 억제 및 치료에 우수한 면역증강 효능을 갖는 의약품 및 건강기능식품에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048]

도 1에 도 1-A는 면역과괴 유발 동물 모델에서 시료 처치에 의한 동물 외관 관찰 및 부검 결과를 나타낸 도이며, 도 1-B는 면역과괴 유발 동물 모델에서 시료 처치에 의한 각종 장기에 미치는 영향을 나타낸 도이며;

도 2는 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 혈중 IL-2 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 3은 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 혈중 IFN- γ 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 4는 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 혈중 IL-12 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 5는 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 혈중 IL-15 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 6은 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 혈중 IL-4 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 7는 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 혈중 IL-6 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 8는 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 혈중 IL-10 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 9은 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 혈중 TNF- α 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's

multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 10는 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 T 세포 증식능에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 11는 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 B 세포 증식능에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 12는 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 IgE 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 13는 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 IgG 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 14는 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 IgA 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄);

도 15는 울금 열수 추출물의 비장세포에서의 자연 자살세포(Natural killer (NK) cell) 활성능에 미치는 영향을 나타낸 도이다(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.(n=8)으로 표기하고 동일한 컬럼(column)내의 동일한 윗첨자는 던칸 다중시험법(Duncan's multiple test)상에서 5%에서 유의성이 없으며, Wild type: AIN 93G, Infection: AIN 93G, Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet, CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet, CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet, CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet을 각각 나타냄).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 본 발명을 하기 실시예, 참고예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0050] 단, 하기 실시예, 참고예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0051]

실시예 1. 울금 추출물의 제조

[0052]

다양한 추출용매를 이용한 울금 추출물의 제조는 다음과 같은 방법으로 실시하였다.

[0053]

1-1. 울금 80% 주정 추출물의 제조

[0054]

울금(하늘땅바다, 전남 진도군)을 감별과정을 거친 후 적합품을 칭량하여 30kg을 건조하여 추출/농축기(1ton, (주)명일이엔지)에서 정제수 60L, 및 주정 240L를 투입하고 75 °C에서 5시간 추출하였으며, 여과망을 이용하여 여과하였다. 농축기(1ton, (주)명일이엔지)를 이용하여 45 °C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축한 후, 정제수 100L를 투입하여 25 Brix로 2차 농축하고 농축액을 동결건조기(PVTFD10R, 일신랩)로 동결건조하여 울금 80% 주정 추출물 2,550g을 수득하여 하기 실험에 시료로 사용하였다.

[0055]

1-2. 울금 20% 주정 추출물의 제조

[0056]

울금(하늘땅바다, 전남 진도군)을 감별과정을 거친 후 적합품을 칭량하여 30kg을 건조하여 추출/농축기(1ton, (주)명일이엔지)에서 정제수 240L, 및 주정 60L를 투입하고 95 °C에서 5시간 추출하였으며, 여과망을 이용하여 여과하였다. 농축기(1ton, (주)명일이엔지)를 이용하여 45 °C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축한 후, 정제수 100L를 투입하여 25 Brix로 2차 농축하여 농축액을 동결건조기(PVTFD10R, 일신랩)로 동결건조하여 울금 20% 주정 추출물 2,490g을 수득하여 하기 실험에 시료로 사용하였다.

[0057]

1-3. 울금 실은 물 추출물의 제조

[0058]

울금(하늘땅바다, 전남 진도군)을 감별과정을 거친 후 적합품을 칭량하여 30kg을 건조하여 추출/농축기(1ton, (주)명일이엔지)에서 정제수 300L를 투입하고 실온에서 70rpm으로 교반하면서 24시간 추출하였으며, 여과망을 이용하여 여과하였다. 농축기(1ton, (주)명일이엔지)를 이용하여 45 °C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축한 후, 농축액을 동결건조기(PVTFD10R, 일신랩)로 동결건조하여 울금 물 추출물 2,400g을 수득하여 하기 실험에 시료로 사용하였다.

[0059]

1-4. 울금 열수 물 추출물의 제조

[0060]

울금(하늘땅바다, 전남 진도군)을 감별과정을 거친 후 적합품을 칭량하여 30kg을 건조하여 추출/농축기(1ton, (주)명일이엔지)에서 정제수 300L를 투입하고 100 °C에서 5시간 추출하였으며, 여과망을 이용하여 여과하였다. 농축기(1ton, (주)명일이엔지)를 이용하여 45 °C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축한 후, 농축액을 동결건조기(PVTFD10R, 일신랩)로 동결건조하여 울금 물 추출물 2,730g을 수득하여 하기 실험에 시료로 사용하였다.

[0061]

실험예 1: in vivo 상에서의 체중, 각종 장기 등에 대한 변화 실험

[0062]

상기 실시예 시료들의 in vivo에서 면역결핍 유도된 C57BL/6 마우스에서의 체중, 각종 장기 등에 대한 변화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Ho JN, Kang ER, Yoon HG, Jeon H, Jun W, Watson RR, Lee J, Biosci biotechnol biochem. 2011 Jul;75(7):1234-9)

[0063]

1-1. LP-BM5 바이러스의 제작

[0064]

마우스에서 백혈병을 유발하여 면역 체계의 붕괴를 유도하는 설치류성 AIDS 바이러스인 LP-BM5 MuLV 바이러스 혼합물은 비중양성 림프증식성 질환을 가진 성체 마우스에서부터 만들어졌다.

[0065]

골수의 기질 세포는 바이러스에 감염된 쥐로부터 분리해냈고 그 바이러스를 가진 세포 cell line으로 증식시킨다. 설치류성 RNA 종양 바이러스의 감염은 주로 비장과 림프절과 같은 림프상 기관의 거대화를 유발한다. 숙주의 반응에서 기회감염성 병원균이나 악성 신생물에 대한 저항성 또한 감소시키는 엄청난 면역 억제를 일으킨다. BM5 ecotropic virus의 gag는 65KD 다단백질을 암호화하는 반면에 BM5 defective virus는 60KD의 좀 더 작은

protein을 암호화하고, pol과 env region이 대부분 결손 되어 있어 단독으로는 MAIDS를 유도하지 못하기 때문에 BM5 ecotropic virus와 defective virus를 혼합하여 마우스에 주사하면 MAIDS를 유도한다고 알려져 있다. (Cook WJ, Green KA, Obar JJ, Green WR. J Virol methods. 2003. Mar;108(1):49-58)

[0066] 따라서 마우스의 SC-1 세포에 비종양성 림프증식성 질환을 가진 성체 마우스에서부터 만들어진 LP-BM5 바이러스 DNA를 주입해 세포에서부터 배양액으로 바이러스 입자를 방출하게 하였다.

[0067] **1-2. 실험동물 및 처치**

[0068] 썬타코 실험동물 사육장으로부터 공급받은 20 g 내외의 4주령 암컷 C57BL/6 마우스를 일주일 동안 설치류 사육실에서 적응시킨 후 적응기간 중 일반 상태를 관찰하여 건강한 개체만 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도 23 ± 3° C 습도 50±5%에서 Light cycle 12 시간으로 유지하였다.

[0069] 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군 분리를 실시하였다. 면역과피 유발 동물 모델을 만들기 위하여 마우스에서 면역체계를 무너뜨리는 바이러스인 LP-BM5를 SC-1 세포(NIH, 1215)의 배양액으로부터 얻은 뒤, 병원균에 민감한 종류인 C57BL/6 마우스에 복강 내 주사로 2회 주입, 바이러스에 감염시켜 백혈병을 유발해 면역을 파괴시켰다. 바이러스에 감염되어 면역 체계가 붕괴 된 마우스를 13주 동안 울금 주정 20% 추출물을 함유한 식이를 제공하면서 식이량, 체중을 매주 1회씩 측정하고 13주 후 희생시켰다.(표 1 참조)

표 1

식이조성표

[0070]

Group	면역과피유발	제공식이
Wild type	-	AIN 93G
Infection	+	AIN 93G
Positive control	+	AIN 93G + 홍삼분말 300 mg/kg
울금 (CL)50	+	AIN 93G + 울금 주정 20% 추출물 50 mg/kg
울금 (CL)200	+	AIN 93G + 울금 주정 20% 추출물 200 mg/kg
울금 (CL)200	+	AIN 93G + 울금 주정 20% 추출물 500 mg/kg

[0071] **1-3. 해부학적 변화 소견 및 장기무게 변화(도 1A 및 1B 참조)**

[0072] **1-3-1. 림프절 무게 변화**

[0073] 본 실험에서 비감염군에서 림프절을 육안으로 관찰하기 어려웠으나 감염군에서는 크기가 커졌으며 무게도 4.71 ± 0.21 g으로 나타났다. 반면 양성대조군에서 림프절 크기가 감소되었음을 볼 수 있었으며 무게도 2.09 ± 0.78 g으로 감소하여 감염군과 통계적으로 유의적인 차이를 보였다. 울금 주정 20% 추출물 섭취군 중 200 mg/kg, 500 mg/kg는 양성대조군과 유의적 차이를 보이지 않음 정도로 200 mg/kg에서는 2.22 ± 0.57 g, 500 mg/kg에서는 2.08 ± 1.47 g으로 림프절의 무게가 감소되었으며 농도의 차이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 울금 주정 20% 추출물 500 mg/kg에서 림프절의 크기를 가장 많이 감소시키는 것을 알 수 있었다.

[0074] **1-3-2. 비장무게 변화**

[0075] 본 실험에서 정상군의 경우 0.07 ± 0.01 g으로 나타난 반면, 감염군의 경우 0.84 ± 0.22 g으로 유의적으로 비장의 무게가 증가하였음을 확인하였다. 이 결과는 LP-BM5 retrovirus의 감염이 정상적으로 진행이 되었음을 나타내는 결과이며 LP-BM5 외의 다른 병원체에 의한 영향은 없었음을 나타내는 것이다.

[0076] 양성대조군, 울금 주정 20% 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg에서 각각 0.66 ± 0.13 g, 0.76 ± 0.20 g, 0.69 ± 0.04 g, 0.57 ± 0.21 g으로 네 군간의 유의적 차이는 보이지 않았으나 감염군과 비교하였을 때 특히, 500 mg/kg 농도에서 유의적으로 감소되었음을 볼 수 있다.

[0077] **1-3-3. 간 무게 변화**

[0078] 본 실험에서 정상군의 간 무게가 0.82 ± 0.06 g으로 나타난 반면, 감염군에서는 1.44 ± 0.21 g으로 정상군과 비교하여 유의적으로 간의 무게가 증가하였음을 확인할 수 있다. 양성대조군, 울금 주정 20% 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg에서 각각 1.22 ± 0.03 g, 1.36 ± 0.21 g, 1.28 ± 0.06 g, 1.25 ± 0.28 g으로 나타나 감염군에 비해 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다.

[0079] **1-3-4. 신장 무게 변화**

[0080] - LP-BM5 retrovirus 감염 시 신장의 무게에 있어서 큰 변화를 보인다는 연구결과는 아직 알려지지 않았다. 이에 근거하여 본 실험에서는 정상군과 감염군의 신장 무게가 통계적으로 유의적인 차이가 없었으며 양성대조군과 울금 주정 20% 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

[0081] **1-3-5. 심장 무게 변화**

[0082] LP-BM5 retrovirus 감염시 심장의 무게 또는 크기가 미세하지만 증가한다는 보고가 일부 있었지만 아직 결정적인 확인은 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 일부 보고와 다르게 정상군 0.13 ± 0.01 g, 감염군 0.10 ± 0.01 g으로 감염군이 유의적으로 감소했음을 확인하였다. 울금 주정 20% 추출물 500 mg/kg는 0.13 ± 0.02 g으로 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않았다(표 2).

표 2

개개 장기 무게 변화

[0083]

Group	Spleen (g)	Lymph node (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Heart (g)
Wild type	0.07 ± 0.01^c		0.82 ± 0.06^b	0.26 ± 0.01^b	0.13 ± 0.01^a
Infection	0.84 ± 0.22^a	4.71 ± 0.87^a	1.44 ± 0.21^a	0.29 ± 0.03^{ab}	0.10 ± 0.01^c
Positive control	0.66 ± 0.13^{ab}	2.09 ± 0.78^b	1.22 ± 0.03^a	0.29 ± 0.02^{ab}	0.11 ± 0.01^{bc}
CL50	0.76 ± 0.20^{ab}	4.11 ± 1.16^a	1.36 ± 0.21^a	0.28 ± 0.02^{ab}	0.11 ± 0.01^c
CL200	0.69 ± 0.04^{ab}	2.22 ± 0.57^b	1.28 ± 0.06^a	0.31 ± 0.03^a	0.12 ± 0.01^{bc}
CL500	0.57 ± 0.21^b	2.08 ± 1.47^b	1.25 ± 0.28^a	0.30 ± 0.02^{ab}	0.13 ± 0.02^{ab}

Values are means \pm SD, n=8. The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test.
 Wild type: AIN 93G
 Infection: AIN 93G
 Positive control: AIN 93G+2.5% red ginseng 300 mg/kg diet.
 CL 50: AIN 93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet.
 CL 200: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet.
 CL 500: AIN93G+2.5% Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet.

[0084] **1-4. 몸무게 변화량 및 식이효율**

[0085] 실험동물의 식이섭취는 모든 군에서 통계적 유의성을 나타내지 않았으며 이 결과는 실험의 모든 데이터가 식이섭취율의 차이에 의한 것이 아님을 확인 시켜 준 것으로 인식된다. 체중의 증가는 비감염군에 비해 감염군 모두에서 유의적인 증가를 나타내었는데 이것은 LP-BM5 retrovirus 감염 시 부종이 많으며 체내에 염증반응 등으로 체중이 증가하는 현상에 기인한 것으로 생각된다. 식이효율은 나타내는 FER의 경우에도 마찬가지로 비감염군에 비해 감염군 모두에서 FER이 증가한 것으로 나타났으며 각 군마다 유의적 차이가 나타나지 않았다(표 3).

표 3

[0086]

식이효율, 체중에 대한 변화

Group	Food consumption (g/day)	Weight gain ¹⁾ (g/13weeks)	FER ⁴⁾
Wild type	2.57±0.37	6.33±0.65 ^{2)bc3)}	0.027±0.002 ^b
Infection	2.24±0.28	9.96±2.27 ^a	0.051±0.010 ^a
Positive control	2.37±0.32	10.34±1.79 ^a	0.048±0.008 ^a
CL5)50	2.30±0.30	10.61±2.46 ^a	0.052±0.011 ^a
CL200	2.43±0.31	12.18±2.85 ^a	0.057±0.013 ^a
CL500	2.44±0.32	11.50±2.89 ^a	0.049±0.012 ^a

¹⁾ Weight gain(g/13weeks)=final body weight(g)-initial body weight(g).
²⁾ Values are means ±SD, n=8
³⁾ The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test
⁴⁾ FER(Food efficiency rate) = { weight (g) / food intake (g) } * 100
⁵⁾ CL : 20% ethanol extract of Curcuma aromatica SALISB

[0087]

도 1-A는 면역결핍 유발 동물 모델에서 시료 처치에 의한 동물 외관 관찰 및 부검 결과를 나타낸 도이며, 바이러스 감염을 시킨 군은 정상군에 비해 탈모가 진행되었고, 목과 다리 사이에 존재하는 림프절이 정상군에 비해 감염군에서 비대해 진 것을 관찰하였다. 도 1-B는 면역결핍 유발 동물 모델에서 시료 처치에 의한 각종 장기에 미치는 영향을 나타낸 도이며, 림프절과 비장의 경우 농도의존적으로 크기가 감소하는 것으로 관찰되었으며, 이는 시료의 처치가 면역결핍 유발에 따라 나타나는 증상을 완화시킨 것으로, 시료의 효과가 나타난 것으로 생각된다.

[0088]

실험예 2: in vivo 상에서의 비장세포 사이토카인 생성능에 미치는 양향실험

[0089]

상기 실시예 시료들의 면역 상태 확인을 위한 비장세포(splenocyte)의 사이토카인 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Ho JN, Kang ER, Yoon HG, Jeon H, Jun W, Watson RR, Lee J, Biosci biotechnol biochem. 2011 Jul;75(7):1234-9)

[0090]

2-1. 비장세포 사이토카인 생성 능력 측정 (IL-2, -4, -6, -10, -12, -15, TNF-α, IFN-γ)

[0091]

비장세포 (Splenocyte)의 분리 및 배양을 위해 실험중인 마우스를 경추탈골로 희생시킨 다음에 70% 에탄올로 복부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출한 후, 멸균된 homogenizer(Kinematica, PT1200B)로 비장을 균일화 시킨 다음 50 ml Cornig tube(SPL, Korea, 50050)에 40-mesh 크기의 망을 올려놓는다. 10% Fetal Bovine Serum (Hyclone Laboratories, USA, SH30919.03), 1% Penicillin (Hyclone Laboratories, USA, SV30010)이 포함된 RPMI 1640 (Hyclone, USA, SH30027.01) 배양액으로 적신 후에 균일화된 비장을 통과시켜 다시 RPMI 1640으로 2회 세척(washing)하였다.

[0092]

적혈구를 제거하기 위해 Red blood cell lysing buffer (Sigma, USA, RNBC5060)과 DPBS (Welgene, Korea, LB001-02)를 동량으로 혼합한 용액에서 적혈구를 파괴한 다음에 PBS 용액으로 다시 두 번 동일한 방법으로 세척(washing)하여 trypan blue strain (gibco, USA, lot#1129155) exclusion test로 세포의 생존 정도를 확인한 후에 96-well plate에 각 well 당 1×10^6 cells/200μl 씩 seeding한다. 시딩(Seeding)한 96-well plate에 다음 표 4와 같이 ConA 5μg/mL 또는 LPS 5μg/mL의 농도로 웰(well)에 넣은 후 표에 나온 시간 동안 배양하여 생성된 사이토카인(cytokine)의 양을 Duoset sandwich ELISA Mouse kit (R&D system, USA)를 사용하여 측정하였다. (IL-2: R&D system, USA, DY402, IL-4: R&D system, USA, DY404, IL-6: R&D system, USA, DY406, IL-10: R&D system, USA, DY417, IL-12: R&D system, USA, DY419, IL-15: R&D system, USA, DY447, TNF-α: R&D system,

USA, DY410, IFN- γ : R&D system, USA, DY485),

표 4

Cytokine	Mitogen	Incubation time
IL-2	ConA	24h
IL-4	ConA	24h
IL-6	LPS	24h
IL-10	ConA	24h
IL-12	LPS	48hr
IL-15	LPS	48hr
TNF- α	LPS	24h
IFN- γ	ConA	72h

[0093]

[0094]

ELISA용 96-well plate(costar, USA, 3590)에 각 cytokine 측정에 특성화 된 1차 항체를 PBS에 희석 후 100 μ l 씩 분주해 하루 동안 처리한 후, 그 다음날, washing buffer (PBST, 0.05% Tween 20(USB Corporation, USA, Lot#123229) in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워주기 위해 완충액 {assay buffer (1% BSA, Sigma, USA, Lot#99H1081) in PBS (IL-4, -6, -10, -12, -15 TNF- α) 또는 0.1% BSA in TBST (IL-2, IFN- γ)}를 넣어 2시간 동안 처리한 뒤 세척용 완충액(washing buffer)으로 씻어낸다. 표준 곡선(Standard curve)를 위한 용액과 위에서 seeding한 splenocyte 세포의 배양액을 100 μ l씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시킨 후, 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 어세이 완충액(assay buffer)에 2차 항체를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100 μ l씩 분주하고 2시간 동안 처리한다. 이 과정이 끝나면 세척용 완충액을 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 기질(substrate) 시약 (R&D systems, USA, DY999)을 100 μ l 넣어 반응시킨 뒤 ELISA 판독기(reader) (VERSAMAXSL-20 Molecular Devices, Korea) 570 nm에서 흡광도를 측정하고 Standard curve를 이용해 세포에서 생성된 시토킨(cytokine)의 양을 계산하였다.

[0095]

2-2-1. IL-2 cytokine 발현 조절

[0096]

정상군에서는 679.84 \pm 49.29 pg/mL로 나타난 반면, 감염군에서는 64.19 \pm 30.75 pg/mL로 유의적으로 크게 감소되었음을 확인하였다. 양성대조군에서는 118.60 \pm 26.57 pg/mL로 감염군과 비교하여 유의적으로 증가 되었음을 확인하였다. 울금 주정 20% 추출물 200 mg/kg는 153.85 \pm 20.80 pg/mL로 양성대조군과 유의적 차이를 보이지 않았으며 500 mg/kg는 185.44 \pm 13.57 pg/mL로 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 IL-2 발현이 증가되었음을 확인하였다(도 2).

[0097]

2-2-2. IFN- γ cytokine 발현

[0098]

본 실험에서 정상군에서는 804.08 \pm 15.42 pg/mL로 유의적으로 가장 높은 발현을 나타냈으며 감염군에서는 166.57 \pm 10.92 pg/mL로 유의적으로 감소되었음을 확인하였다. 양성대조군에서는 166.57 \pm 10.92 pg/mL로 LP-BM5 retrovirus 감염으로 감소된 IFN- γ 의 발현을 억제시켰음을 확인하였다. 울금 주정 20% 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg 각각 감염군과 유의적인 차이가 나도록 발현이 농도 의존적으로 증가되었다(도 3).

[0099]

2-2-3. IL-12 의 발현

[0100]

본 실험에서 감염군의 IL-12 발현은 정상군에 비해 유의적으로 감소한 것으로 나타났다. 울금 주정 20% 추출물 식이섭취군은 감염군뿐만 아니라 정상군과도 유의적 차이를 나타내지 않음을 확인 할 수 있었다(도 4).

[0101]

2-2-4. IL-15 의 발현

[0102]

본 실험에서 정상군에서는 46.95 \pm 4.02 pg/mL로 나타난 반면, 감염군은 36.83 \pm 1.79 pg/mL로 유의적으로 감

소되었음을 확인하였다. 양성대조군은 43.58 ± 4.23 pg/mL로 감염군과 비교하여 유의적으로 증가되었음을 확인하였다. 또한 울금 주정 20% 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg 각각 42.08 ± 4.49 pg/mL, 42.57 ± 1.79 pg/mL, 44.88 ± 3.88 pg/mL로 양성대조군 및 정상군과 유의적 차이를 보이지 않았다(도 5).

[0103] **2-2-5. IL-4 의 발현**

[0104] 본 실험에서는 감염군에서 131.31 ± 7.25 pg/mL로 정상군 8.38 ± 2.16 pg/mL에 비하여 IL-4 발현이 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. 울금 주정 20% 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg는 각각 98.06 ± 13.73 pg/mL, 71.23 ± 5.75 pg/mL, 15.60 ± 4.77 pg/mL로 발현이 감염군에 비해 유의적으로 감소되었다(도 6).

[0105] **2-2-6. IL-6 의 발현**

[0106] 본 실험에서 감염군의 IL-6 발현은 정상군에 비해 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 울금 주정 20% 추출물 식이섭취군 중 200 mg/kg, 500 mg/kg는 감염군에 비해 농도 의존적으로 유의적인 감소를 한 것을 확인 할 수 있었다(도 7).

[0107] **2-2-7. IL-10 의 발현**

[0108] 본 실험에서는 정상군에서 IL-10 발현량이 31.84 ± 4.73 pg/mL인 반면, 감염군에서는 621.19 ± 55.51 pg/mL로 IL-10발현이 유의적으로 증가하였다. 양성대조군에서 254.38 ± 29.88 pg/mL로 감염군과 비교해 유의적으로 발현이 감소되었음을 확인하였다. 또한 울금 주정 20% 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg에서 각각 553.69 ± 41.35 pg/mL, 493.85 ± 7.11 pg/mL, 416.78 ± 10.73 pg/mL로 발현량이 감염군과 비교했을 때 유의적으로 감소하였으며 농도 의존적으로 IL-10발현이 억제되었음을 확인 할 수 있었다(도 8).

[0109] **2-2-8. TNF- α 의 발현**

[0110] 본 실험에서 감염군의 TNF- α 발현은 311.35 ± 29.96 pg/mL로 정상군 47.59 ± 7.61 pg/mL의 발현과 비교하여 유의적으로 증가되었다. 양성대조군은 174.5 ± 29.05 pg/mL로 감염군과 비교하여 유의적으로 감소되었으며 울금 주정 20% 추출물 500 mg/kg에서는 174.28 ± 3.05 pg/mL로 양성대조군과 유의적 차이를 보이지 않을 정도로 감소되었다(도 9).

[0111] **실험예 3: in vivo 상에서의 비장세포에서의 T/B 세포의 증식능에 미치는 영향실험**

[0112] 상기 실시예 시료들의 비장세포에서의 T/B 세포의 증식능에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Ho JN, Kang ER, Yoon HG, Jeon H, Jun W, Watson RR, Lee J, Biosci biotechnol biochem. 2011 Jul;75(7):1234-9)

[0113] **3-1. T/B 세포의 증식 능력 측정**

[0114] 마취시켜 혈액을 채취한 마우스를 해부하고 비장을 적출하여 PBS로 세척(washing)한 후 0.45 cell strainer(BD Falcon, USA, REF352340)에 넣고 조직을 갈아낸 뒤 10% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지(Hyclone, USA, Cat# SH30027.01)에 세포를 모아 원심분리시킨 뒤에 적혈구 분해 용액(Sigma, USA, Lot# RNBC5060)을 넣어 1분간 반응시킨 뒤 2회 더 원심분리 한다. 여기에 Trypan blue 염색약(gibco, lot# 1129155)으로 세포를 염색시켜 숫자를 셀 뒤, 96-well plate에 1×10^7 cells/mL의 농도로 세포를 채운 뒤, LPS (Sigma, US, Lot#032M4082v)와 ConA (Sigma, USA, Lot#090M8703v)를 각각 5 μ g/ml 씩 처리하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 에서 배양(incubation)시킨다. 그 후 EZ-CyTox (Deilab INC, Korea, DLS1212)를 10 μ l 씩 분주한 후 4시간 동안 배양(incubation)시킨 뒤에 ELISA reader (VERSAMAXSL-20 Molecular Devices, Korea) 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0115]

3-2. T/B 세포의 증식능 반응성 측정

[0116]

3-2-1. T 세포의 mitogen에 대한 증식능 반응성 측정

[0117]

정상군의 T 세포 증식능을 100%로 하였을 때 LP-BM5 retrovirus의 감염군은 39.54 ± 12.02%의 증식능을 보여 정상군에 비해 유의적으로 크게 감소하였음을 확인하였다. 반면 양성대조군에서는 76.51% ± 12.92%로 감염군에 비해 T 세포 증식능을 유의적으로 증가시켰음을 알 수 있다. 울금 주정 20% 추출물 200 mg/kg, 500 mg/kg는 각각 56.35 ± 3.48%, 77.86 ± 7.53%로 감염군에 비해 유의적으로 증가했으며 그 중 500 mg/kg의 경우 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 감염군에 비해 T 세포 증식능이 증가하였다(도 10).

[0118]

3-2-2. B 세포의 mitogen에 대한 증식능 반응성 측정

[0119]

본 실험에서 정상군의 B 세포 증식능이 100%였을 때 감염군은 40.44 ± 6.27%로 크게 감소되었다. 양성대조군에서 57.46 ± 7.68%로 LP-BM5 retrovirus의 감염으로 감소되었던 B 세포 증식능이 유의적으로 증가되었다. 울금 주정 20% 추출물 200 mg/kg는 56.26 ± 5.05%로 양성대조군과 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 500 mg/kg의 경우 74.59 ± 8.92%로 양성대조군보다 유의적으로 증가했음을 확인하였다(도 11).

[0120]

실험예 4: in vivo 상에서의 혈중 항원 특이 항체 (IgG, IgE, IgA)양에 미치는 영향실험

[0121]

상기 실시예 시료들의 혈중 항원 특이 항체 (IgG, IgE, IgA)양에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Morse HC 3rd, McCarty T, Giese NA, Taddesse-Heath L, Grusby MJ. 1999 Aug;73(8):7093-5. Wang Y, Huang DS, Liang B, Watson RR. 1994. Oct;124(10):2024-32).

[0122]

4-1. 항원 특이 항체 측정 (IgG, IgE, IgA)

[0123]

동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 serum를 얻어서 다음 시험에 사용하였다.

[0124]

4-1-1. IgE 양 측정실험

[0125]

ELISA용 96 well plate에 IgE 측정에 특성화된 1차 항체(BD OptEIA, USA, 555248)를 PBS에 희석 후 100 μl씩 분주해 하루 동안 처리한 후, 그 다음날, washing buffer (PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워주기 위해 assay buffer (10% FBS in PBS)를 넣어 1시간 동안 처리한 뒤 washing buffer로 씻어냈다. Standard curve를 위한 용액과 위에서 채취한 혈청(serum) 100 μl씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 세척완충액(washing buffer)로 씻어내고 어세이완충액 (assay buffer)에 2차 항체를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100 μl씩 분주하고 1시간 동안 처리한다. 이 과정이 끝나면 세척 완충액을 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 기질용 시약(substrate reagent; R&D systems, USA, DY999)을 100 μl 넣어 반응 시킨 뒤 ELISA 판독기(reader, VERSAMAXSL-20 Molecular Devices, Korea) 570 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준 곡선(Standard curve)를 이용해 혈중 내에 생성된 IgE의 양을 계산하였다. (BD OptEIA, USA, 555248)

[0126]

4-1-2. IgG, IgA 양 측정실험

[0127]

IgG (Mouse IgG kit: immunology consultants laboratory Inc. USA, E-90G), IgA (Mouse IgA ELISA kit: immunology consultants laboratory Inc. USA, E-90E) ELISA kit를 사용하여 측정하였다. IgG, IgA용 96-well plate에 Standard curve를 위한 용액과 위에서 채취한 혈청(serum) (IgG는 Running buffer에 5만배 희석, IgA는 Running buffer에 4천배 희석) 100 μl씩 각 well에 넣어 1시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 뒤 세척 완충액으로 씻어내고 Running buffer(IgG: immunology consultants laboratory Inc. USA, E-90G/IgA: immunology consultants laboratory Inc. USA, E-90E)에 접합체(enzyme-antibody conjugate)를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100 μl씩 분주하고 30분 동안 처리한다. 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 기질(substrate)시약을 100 μl 넣어 상온에 어두운 상태에서 10분간 반응시킨 후에 ELISA 판독

기(reader) (VERSAMAXSL-20 Molecular Devices, Korea) 흡광도 570 nm에서 측정 하거나 또는 정지용액(Stop solution; (IgG: immunology consultants laboratory Inc. USA, E-90G/IgA: immunology consultants laboratory Inc. USA, E-90E))을 각 well당 100 μ l씩 분주한 후 흡광도 450 nm에서 측정하여 Standard curve를 이용해 혈중 내에 생성된 IgG, IgA 의 양을 계산한다.

[0128] **4-2. 항원특이항체(IgG, IgE, IgA) 반응성 측정**

[0129] **4-2-1. IgE 측정 결과**

[0130] 본 실험에서 감염군의 IgE 발현은 $285.58 \pm 6.03 \mu\text{g/mL}$ 로 정상군 $121.32 \pm 22.49 \mu\text{g/mL}$ 의 발현과 비교하여 크게 증가되었다. 양성대조군은 $138.85 \pm 4.55 \mu\text{g/mL}$ 로 감염군과 비교하여 유의적으로 감소되었으며 울금 주정 20% 추출물 식이 섭취군 중 500 mg/kg는 $142.10 \pm 21.10 \mu\text{g/mL}$ 로 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 감소되었다 (도 12).

[0131] **4-2-2. IgG 측정 결과**

[0132] 본 실험에서는 감염군의 IgG 발현은 $85.49 \pm 3.81 \mu\text{g/mL}$ 로 정상군 $5.44 \pm 1.84 \mu\text{g/mL}$ 의 발현과 비교하여 크게 증가되었다. 양성대조군은 $42.67 \pm 1.67 \mu\text{g/mL}$ 로 감염군과 비교하여 유의적으로 감소되었으며 울금 주정 20% 추출물 식이섭취군 중 200 mg/kg는 $46.79 \pm 4.32 \mu\text{g/mL}$ 로 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 감소되었다. 특히, 500 mg/kg는 $35.21 \pm 2.39 \mu\text{g/mL}$ 로 양성대조군에 비해 유의적으로 IgG 발현을 감소시켰음을 확인 할 수 있었다(도 13).

[0133] **4-2-3. IgA 측정**

[0134] 본 실험에서 감염군의 IgA 발현은 $92.96 \pm 5.91 \mu\text{g/mL}$ 로 정상군 $20.07 \pm 2.39 \mu\text{g/mL}$ 의 발현과 비교하여 크게 증가되었다. 양성대조군은 $52.61 \pm 5.96 \mu\text{g/mL}$ 로 감염군과 비교하여 유의적으로 감소되었으며 울금 주정 20% 추출물 식이 섭취군 중 500 mg/kg는 $51.86 \pm 2.85 \mu\text{g/mL}$ 로 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 감소되었다(도 14).

[0135] **실험예 4: in vivo 상에서의 비장세포에서의 자연살해세포 활성화에 미치는 영향실험**

[0136] 상기 실시예 시료들의 비장세포에서의 자연살해세포(Natural killer (NK) cell) 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Seo YS, Shin KS, J Korean Soc Food Sci Nutr. 2012 41(1):95-102)

[0137] **4-1. Natural killer (NK) cell 활성화 평가**

[0138] 분리한 비장세포를 96-well plate에 각 well당 1×10^4 cells/mL을 100 μ l씩 seeding 한 후 effector cell로 이용하였다. Target cell로는 YAC-1 세포(ATCC, TIB-160)를 이용하였으며 effector cell과 target cell의 비율을 1:1로 조정하고 37°C, 5% CO₂ 에 4시간 배양한 후 NK 세포가 암세포의 일종인 YAC-1 세포 (NK sensitive cell line)을 공격하여 파괴된 YAC-1세포로부터 유리된 LDH를 측정하는 방법인 cytotox 96 Non-radioactive Cytotoxicity assay kit (Promega, USA, REF G1782)를 이용하여 ELISA 판독기(reader) (VERSAMAXSL-20 Molecular Devices, Korea) 490 nm 측정하여 Cytotoxicity (%)로 나타내었다.

[0139] **4-2. NK 세포 활성 측정**

[0140] 본 실험에서 정상군에서 $371.89 \pm 4.83\%$ 로 나타난 반면, 감염군에서는 $178.16 \pm 11.68\%$ 로 유의적으로 감소되었음을 확인하였다. 양성대조군은 $240.41 \pm 12.69\%$ 로 감염군과 유의적으로 차이가 없음을 확인하였다. 울금 주

정 20% 추출물 식이섭취군 중 50 mg/kg, 200 mg/kg를 제외한 500 mg/kg의 경우 $270.89 \pm 13.50\%$ 로 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 NK cell activity가 증가되었음을 확인하였다(도 15).

[0141]

실험예 5. 급성독성실험

[0142]

6 주령의 특정병원체부재 (Specific pathogen-free, SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 각 그룹당 2마리씩의 동물에 본 발명의 울금 추출물을 100 mg/kg의 용량으로 1회 경구투여 하였다. 실험 물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상 및 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 강장기와 흉강 장기의 이상여부를 관찰하였다.

[0143]

본 실험 수행 결과, 실험 물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 본 발명의 추출물은 랫트에서 각각 100 mg/kg 까지도 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량 (LD₅₀)은 100 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

[0144]

하기에 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0145]

제제예 1. 산제의 제조

[0146]

CW 추출물 ----- 20 mg

[0147]

유당 ----- 100 mg

[0148]

탈크 ----- 10 mg

[0149]

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0150]

제제예 2. 정제의 제조

[0151]

HW 추출물 ----- 10 mg

[0152]

옥수수전분 ----- 100 mg

[0153]

유당 ----- 100 mg

[0154]

스테아린산 마그네슘 ----- 2 mg

[0155]

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

[0156]

제제예 3. 캡슐제의 제조

[0157]

20% EtOH 추출물 ----- 10 mg

[0158]

결정성 셀룰로오스 ----- 3 mg

[0159]

락토오스 ----- 14.8 mg

[0160]

마그네슘 스테아레이트 ----- 0.2 mg

[0161]

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

[0162]

제제예 4. 주사제의 제조

[0163]

80% EtOH 추출물 ----- 10 mg

- [0164] 만니톨 ----- 180 mg
- [0165] 주사용 멸균 증류수 ----- 2974 mg
- [0166] Na₂HPO₄·12H₂O ----- 26 mg
- [0167] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

제제예 5. 액제의 제조

- [0168] CW 추출물 ----- 20 mg
- [0170] 이성화당 ----- 10 g
- [0171] 만니톨 ----- 5 g
- [0172] 정제수 ----- 적량
- [0173] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

제제예 6. 건강 식품의 제조

- [0174] 20% EtOH 추출물 ----- 1000 mg
- [0176] 비타민 혼합물 ----- 적량
- [0177] 비타민 A 아세테이트 ----- 70 μg
- [0178] 비타민 E ----- 1.0 mg
- [0179] 비타민 B₁ ----- 0.13 mg
- [0180] 비타민 B₂ ----- 0.15 mg
- [0181] 비타민 B₆ ----- 0.5 mg
- [0182] 비타민 B₁₂ ----- 0.2 μg
- [0183] 비타민 C ----- 10 mg
- [0184] 비오틴 ----- 10 μg
- [0185] 니코틴산아미드 ----- 1.7 mg
- [0186] 엽산 ----- 50 μg
- [0187] 판토텐산 칼슘 ----- 0.5 mg
- [0188] 무기질 혼합물 ----- 적량
- [0189] 황산제1철 ----- 1.75 mg
- [0190] 산화아연 ----- 0.82 mg
- [0191] 탄산마그네슘 ----- 25.3 mg
- [0192] 제1인산칼륨 ----- 15 mg
- [0193] 제2인산칼슘 ----- 55 mg
- [0194] 구연산칼륨 ----- 90 mg

[0195] 탄산칼슘 ----- 100 mg

[0196] 염화마그네슘 ----- 24.8 mg

[0197] 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 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0198] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

[0199] HW 추출물 ----- 100 mg

[0200] 비타민 C ----- 15 g

[0201] 비타민 E(분말) ----- 100 g

[0202] 젖산철 ----- 19.75 g

[0203] 산화아연 ----- 3.5 g

[0204] 니코틴산아미드 ----- 3.5 g

[0205] 비타민 A ----- 0.2 g

[0206] 비타민 B₁ ----- 0.25 g

[0207] 비타민 B₂ ----- 0.3 g

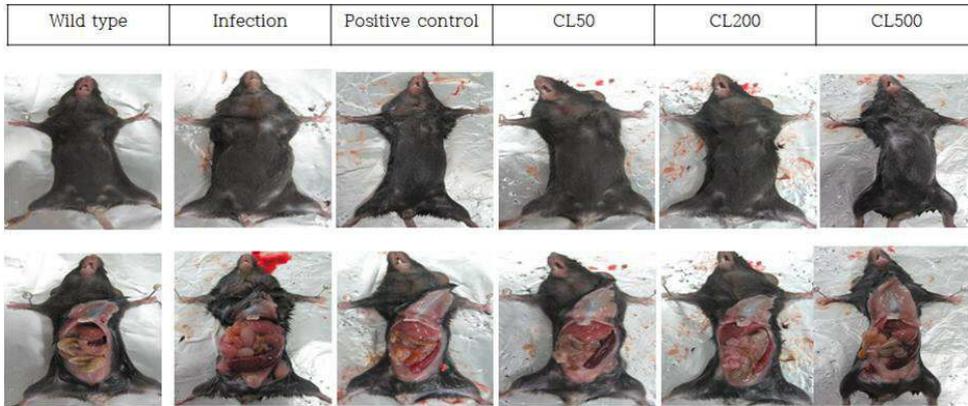
[0208] 물 ----- 정량

[0209] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 °C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

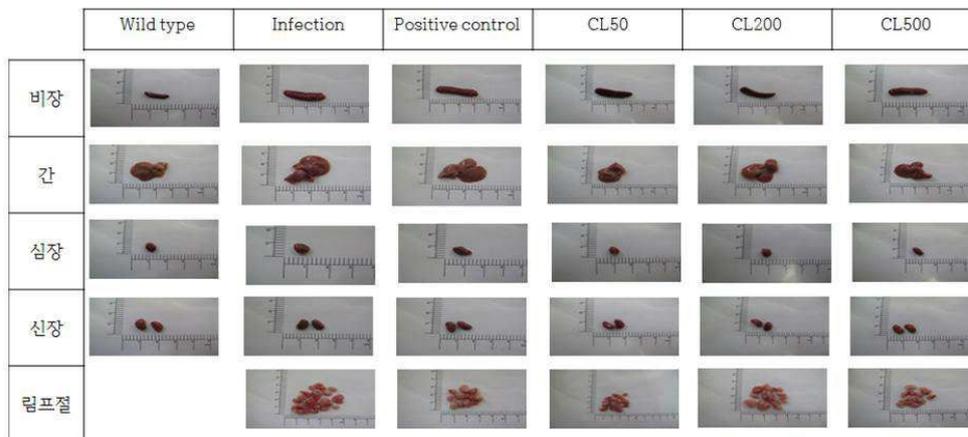
[0210] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

도면1



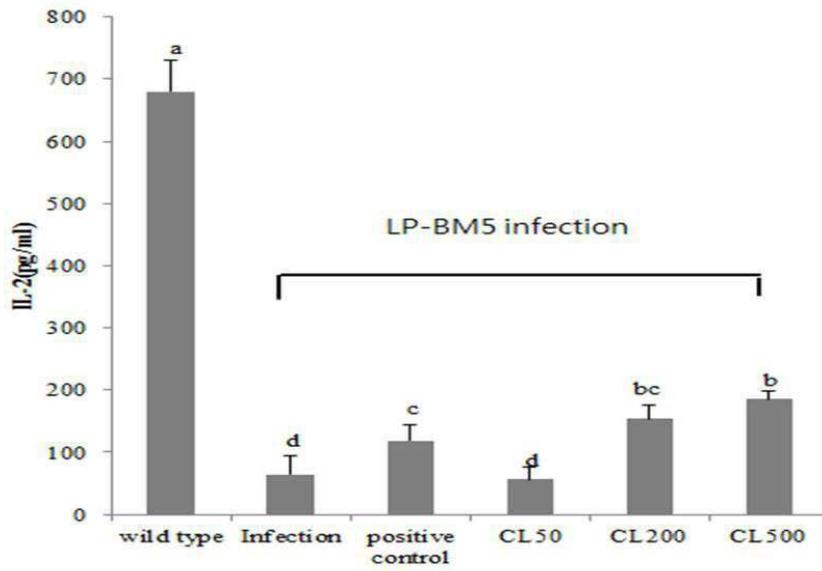
1-A. 외관 관찰 및 부검 결과



1-B. 주요 장기 관찰

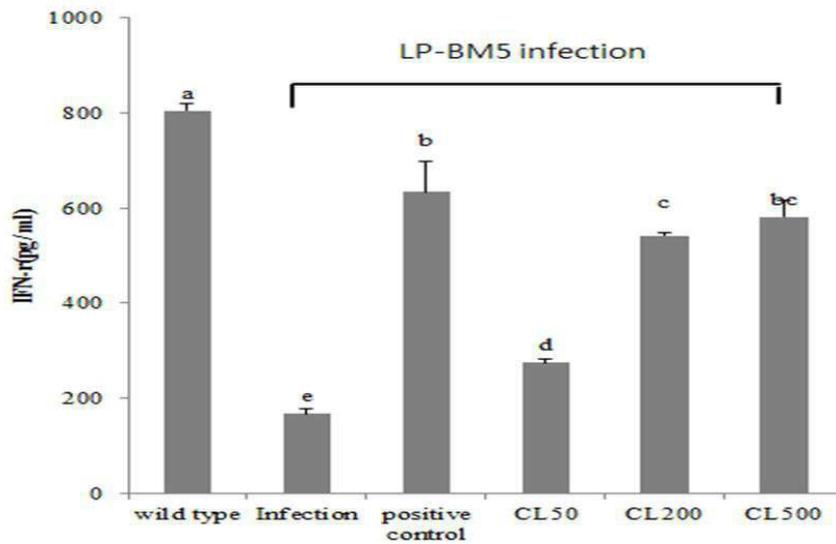
5-alpha reductase inhibitory effect of *Curcuma aromatica* SALISB in rat prostate homogenate. Data are expressed as mean \pm S.D.

도면2



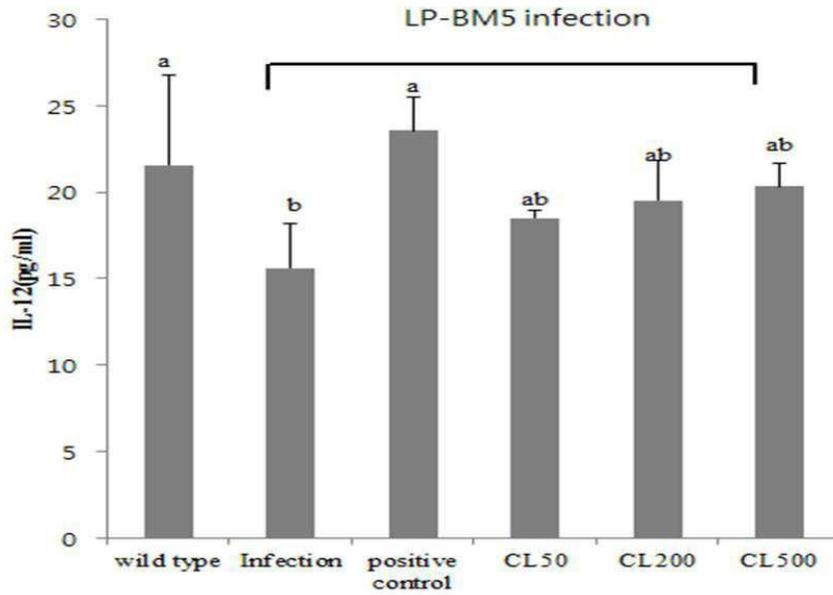
Effects of *Curcuma aromatica* SALISB 20% EtOH on IL-2 levels in splenocytes.

도면3



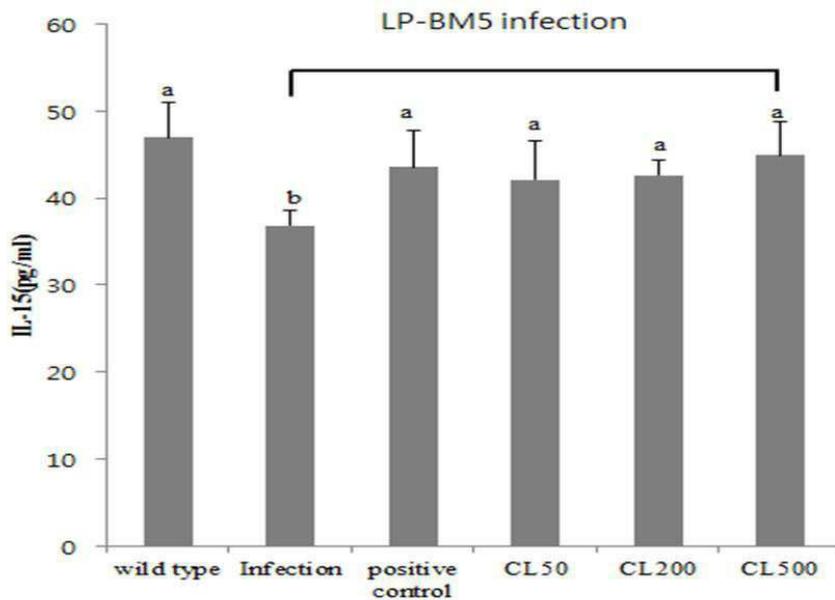
Effects of *Curcuma aromatica* SALISB 20% EtOH on IFN- γ levels in splenocytes.

도면4



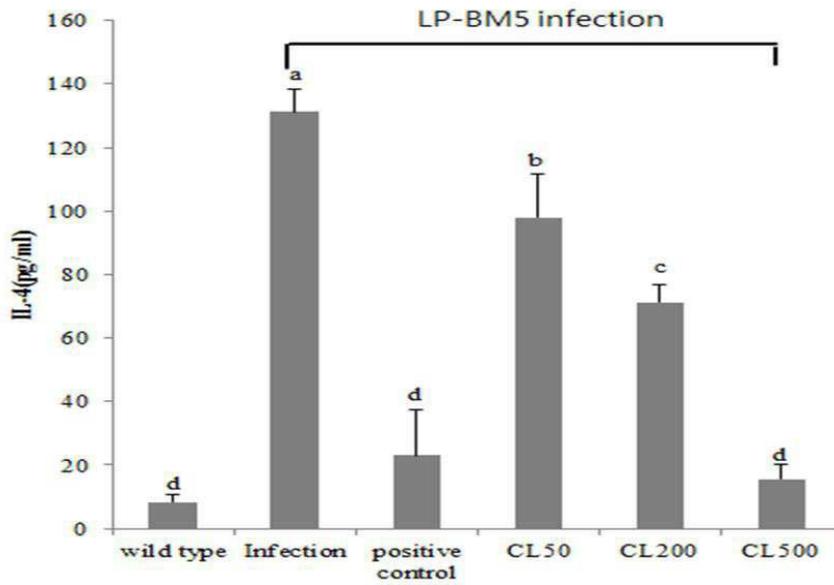
Effects of *Curcuma aromatica* SALISB 20% EtOH on IL-12 levels in splenocytes.

도면5



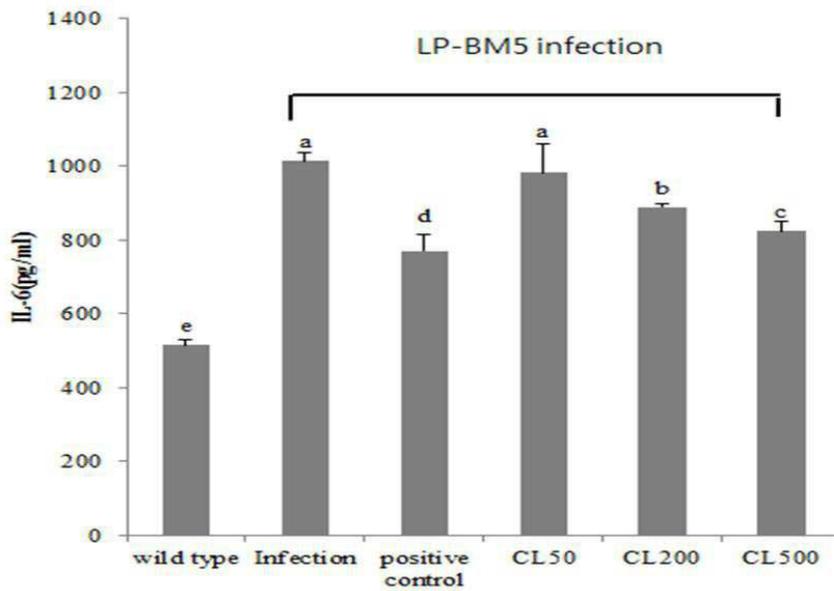
Effects of *Curcuma aromatica* SALISB 20% EtOH on IL-15 levels in splenocytes.

도면6



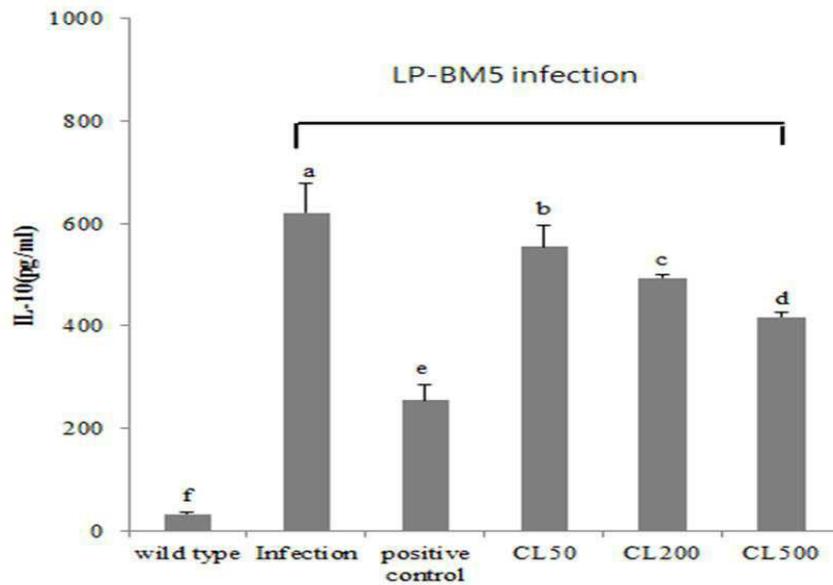
Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% EtOH on IL-4 levels in splenocytes.

도면7



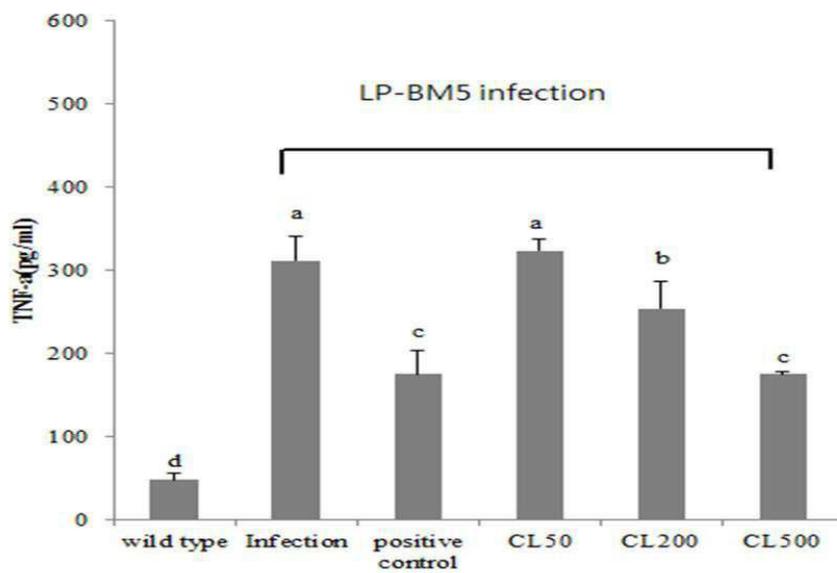
Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% EtOH on IL-6 levels in splenocytes.

도면8



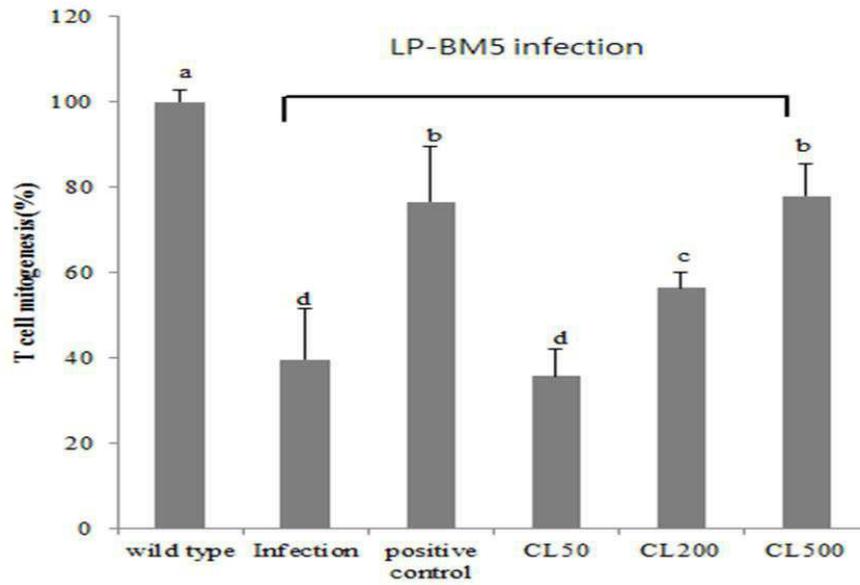
Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% EtOH on IL-10 levels in splenocytes.

도면9



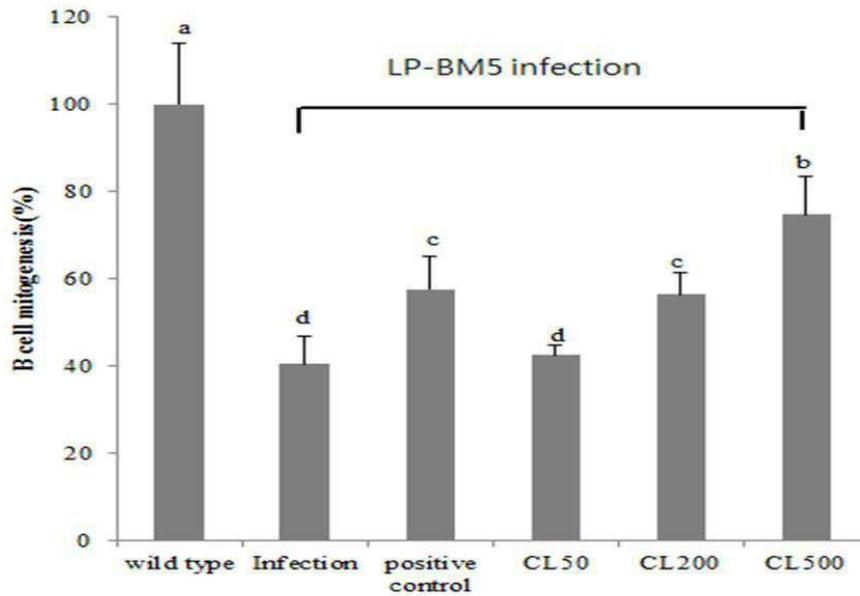
Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% EtOH on TNF-α levels in splenocytes.

도면10



Effects of *Curcuma aromatica* SALISB 20% EtOH on T cell proliferation in splenocytes.

도면11



Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% EtOH on B cell proliferation in splenocytes.

Values are means \pm SD, n=8. The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test.

Wild type: AIN 93G

Infection: AIN 93G

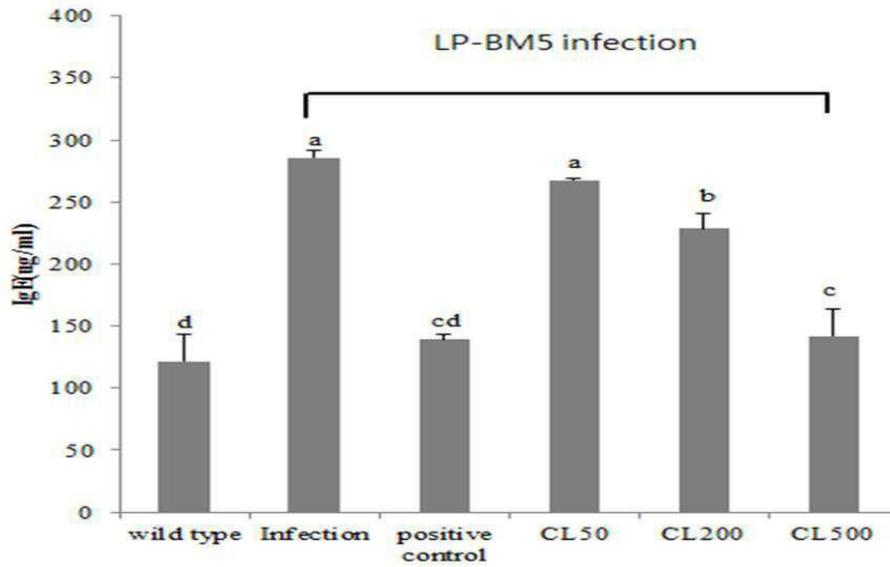
Positive control: AIN 93G+ red ginseng 300 mg/kg diet.

CL 50 : AIN 93G + Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50mg/kg diet.

CL 200 : AIN 93G + Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200mg/kg diet.

CL 500 : AIN 93G + Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500mg/kg diet.

도면12



Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% EtOH on IgE levels in splenocytes.

Values are means \pm SD, n=8. The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test.

Wild type: AIN 93G

Infection: AIN 93G

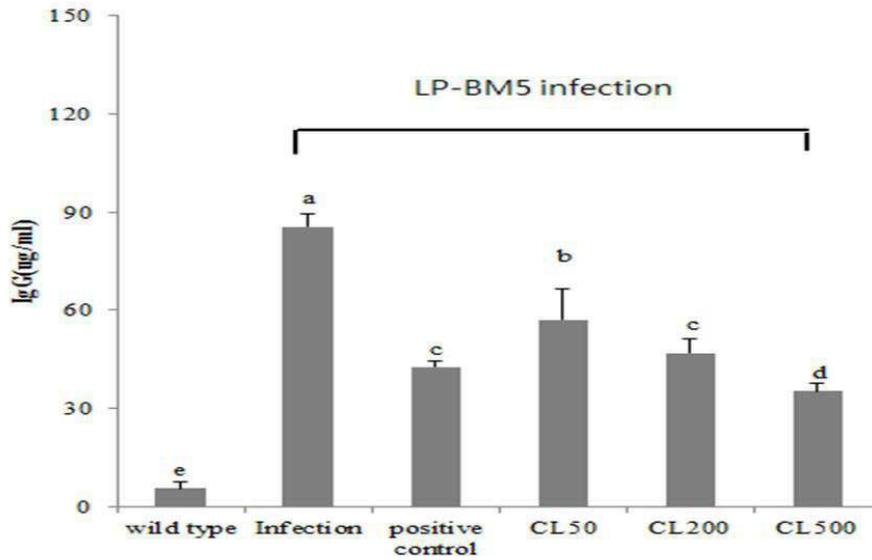
Positive control: AIN 93G+ red ginseng 300 mg/kg diet.

CL 50 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet.

CL 200 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet.

CL 500 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet.

도면13



Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% EtOH on IgG levels in splenocytes.

Values are means \pm SD, n=8. The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test.

Wild type: AIN 93G

Infection: AIN 93G

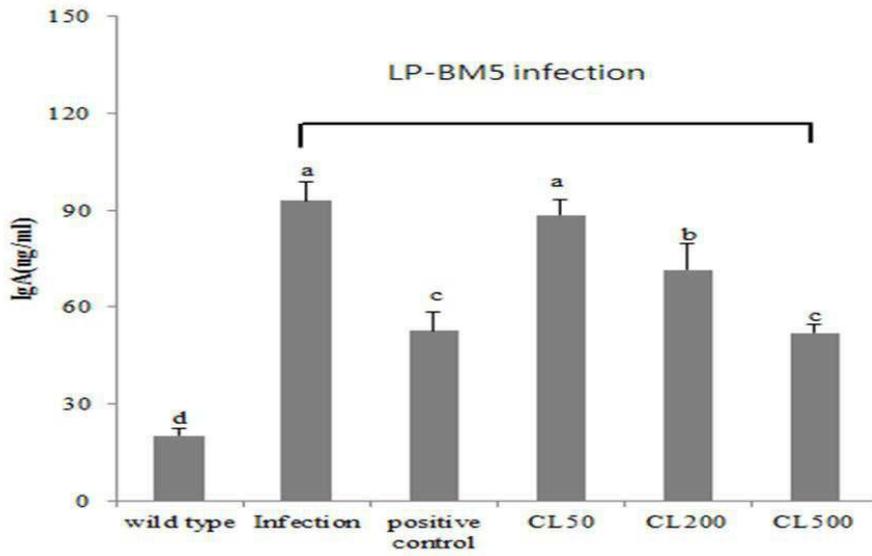
Positive control: AIN 93G+ red ginseng 300 mg/kg diet.

CL 50 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet.

CL 200 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet.

CL 500 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet.

도면14



Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% EtOH on IgA levels in splenocytes.

Values are means \pm SD, n=8. The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test.

Wild type: AIN 93G

Infection: AIN 93G

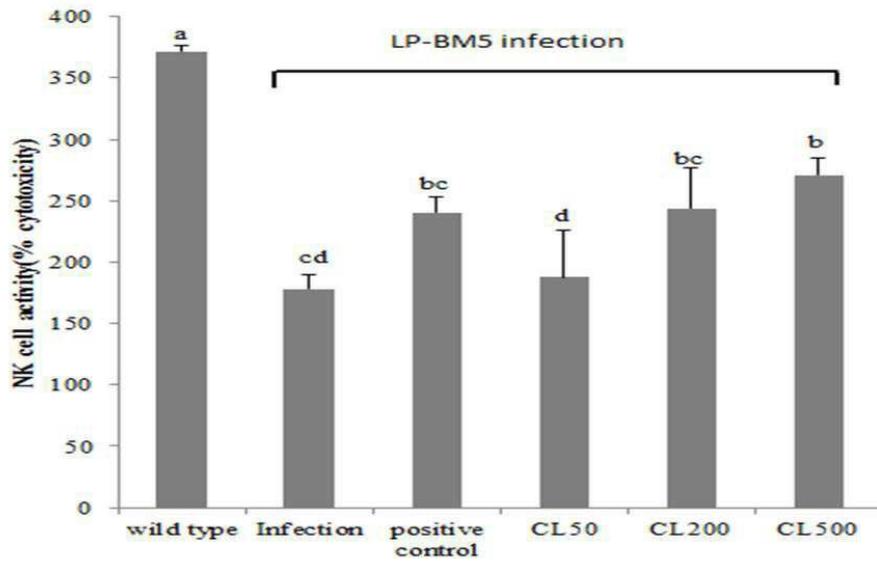
Positive control: AIN 93G+ red ginseng 300 mg/kg diet.

CL 50 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet.

CL 200 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet.

CL 500 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet.

도면15



Effects of Curcuma aromatica SALISB 20% EtOH on Natural killer(NK) cell activity in splenocytes.

Values are means \pm SD, n=8. The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test.

Wild type: AIN 93G

Infection: AIN 93G

Positive control: AIN 93G+ red ginseng 300 mg/kg diet.

CL 50 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 50 mg/kg diet.

CL 200 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 200 mg/kg diet.

CL 500 : AIN 93G + Curcuma aromatica SALISB 20% ethanol extract 500 mg/kg diet.