



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0085546  
(43) 공개일자 2015년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 33/06 (2006.01) A61K 31/198 (2006.01)  
A61K 31/51 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0004929

(22) 출원일자 2014년01월15일  
심사청구일자 2014년01월15일

(71) 출원인

에스미디아주식회사  
서울 성북구 서경로 124, 710호, 711호 (정릉동, 서경대학교 본관)  
을지대학교 산학협력단  
경기도 성남시 수정구 산성대로 553 (양지동, 을지대학교)

(72) 발명자

윤현수  
서울 서초구 강남대로34길 18, 402호 (양재동, 미라보아파트)  
윤정수  
서울 강서구 등촌로51나길 18-12, (등촌동)  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

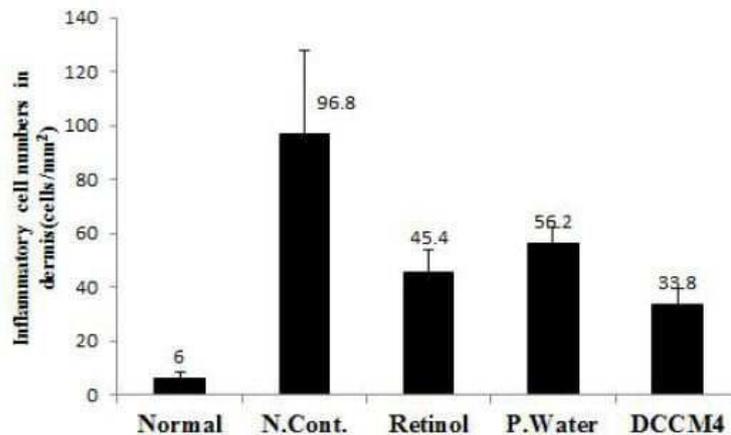
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 피부세포 배양배지를 유효성분으로 포함하는 피부상태 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 피부세포 배지를 유효성분으로 포함하는 피부상태 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 현저한 피부염증완화, 주름개선, 피부재생, 미백, 피부탄력 개선, 피부노화 방지, 피부보습 개선 효과를 나타낸다. 본 발명의 조성물은 화장품 및 의약외품에 매우 효과적으로 적용될 수 있다.

대표도 - 도11



(72) 발명자

**전진현**

경기도 용인시 기흥구 동백2로 37 대원칸타빌  
4106-901호

**최은주**

경기도 용인시 수지구 상현로 67-12, 132동603호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-03-02

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 바이오-메디테크 산업화 지역혁신센터 연구개발 지원사업

연구과제명 세포 배양기술을 이용한 피부상태 개선 조성물의 개발

기여율 1/1

주관기관 을지대학교 산학협력단(바이오-메디테크 산업화 지역혁신센터)

연구기간 2013.10.01 ~ 2013.12.31

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

무기염류 75-80 wt%, 비타민 0.01-0.02 wt%, 아미노산 5-10 wt%, 지질 0.001-0.003 wt% 및 세포의 에너지원 12-17 wt%로 이루어진 피부 상태 개선용 조성물로, 상기 조성물은 pH 7.2-7.6 및 280-320(mOsmol/kg H<sub>2</sub>O) 삼투압을 유지하고; 상기 무기염류는 소듐 클로라이드, 소듐 하이드로젠 카르보네이트, 포타슘 클로라이드, 칼슘 클로라이드 디하이드레이트, 마그네슘 설페이트(heptahydrate), 소듐 디하이드젠포스페이트, 마그네슘 클로라이드, 징크 설페이트(Zinc sulfate), 페릭 설페이트 및 쿠프릭 설페이트(cupric sulfate)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 무기염류이며; 상기 비타민은 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B3, 비타민 B5, 비타민 B6, 비타민 B9, 비타민 B12, 비타민 F 및 비타민 H로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 비타민이고; 상기 아미노산은 알지닌, 타이로신, 라이신, 류신, 이소류신, 트레오닌, 발린, 페닐알라닌, 히스티딘, 세린, 글라이신, 시스테인, 메치오닌, 프롤린, 트립토판, 아스파라긴, 글루타믹에씨드, 아스파틱에씨드 및 알라닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 아미노산이며; 상기 지질은 리포익산(lipoic acid) 및 리놀레익산(linoleic acid)으로부터 선택되는 1종 이상의 지질이고; 상기 에너지원은 글루코오스 및 소듐 피루베이트(sodium pyruvate)로부터 선택되는 1종 이상의 에너지원인 것을 특징으로 하는 피부 상태 개선용 조성물.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서, 상기 피부상태 개선은 피부염증완화, 주름개선, 피부재생, 미백, 피부탄력 개선, 피부노화방지, 피부보습 개선, 검버섯 제거, 여드름 치료 또는 상처 제거인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 3**

제 1 항에 있어서, 상기 피부상태 개선은 피부염증완화인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 4**

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 화장품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001]

본 발명은 피부세포 배양배지를 유효성분으로 포함하는 피부상태 개선용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 상기 조성물은 피부의 항노화, 노화되는 피부의 주름방지 및 개선, 피부 보습, 피부의 재생을 촉진하는 기능을 갖는 화장품의 조성물로 이용될 수 있다.

**배경 기술**

[0002]

인간과 동물의 세포를 배양하는 배지는 세포치료제의 생산과 유전자 재조합방식에 의한 생리활성물질과 생물의 약품의 생산에 널리 이용되고 있으며, 최근에는 피부세포나 다양한 줄기세포를 배양한 후 수거된 배양액이나 배양액의 분리된 분획물을 유효성분으로 화장품 조성물로 사용하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Sauirkaya 외 3인, Turk J Vet Anim Sci 8:779, 2004).

[0003]

기존의 상용화된 배지는 Choline Chloride, Hypoxanthine-sodium salt, Thymidine, Putrescine Dihydrochloride, Ferric nitrate, L-glutamin, 페놀레드, 항생제 등, 인체에 투여가 제한됨과 동시에 화장품

원료로 허용되지 않는 성분들이 포함되어 있으므로 화장품의 조성물로 직접 이용하기에 적합하지 않다. 그러나 피부 줄기세포의 배지 제조기술을 적용하여, 화장품 원료로 허용된 성분으로만 제조한 배지가 본 연구자 등에 의하여 국제화장품원료집(INCI)에 원료명: Defined Cell Culture Media 4(DCCM4)으로 등재고시 된 바 있으며(Choi 외 2인, 2012), 이 배지는 화장품의 조성물로 사용하였을 때 피부상태를 개선하는 유효성이 확인된 바 있다(Choi 외 2인, 2012).

[0004] 한편 피부의 손상으로 나타나는 피부의 노화는 내인성 노화와 외인성 노화로 구분한다(El-domyati et al 2002; Park et al, 2009). 외인성 노화는 각종 오염물질, 강한 자외선 같은 외부 요인에 의해(Yang et al., 2010) 피부세포들이 손상을 입게 되고, 세포 증식이 원활하게 되지 않아 피부의 탄력이 감소되고, 굵고 깊은 주름이 발생하며, 과각질화 되는 현상을 나타내게 된다(Georg et al., 2003; Seo et al., 2001; So et al 2007). 특히 피부가 장기간 자외선에 노출되어 진행되는 광노화시에는 표피에서 홍반과 각질층의 지질의 변화, 이로 인한 피부장벽의 손상, 염증반응 등이 동반되며, 진피층 내에서는 콜라겐의 양이 감소하고, 글리코사미노글리칸이 크게 증가하며, 엘라스틴의 변성으로(Zheng &Kligman, 1991) 피부는 건조하고 거친 표면형태를 보이며, 주름의 발생이 증가하고, 탄력성의 감소되는 증상이 나타난다.

[0005] 피부의 재생과 관련해 중요한 역할을 담당하는 줄기세포는 모낭(hair follicle)에 존재하며, 모발과 피부의 재생과 성장에 중요한 역할을 수행하고, 표피의 기저층에 존재하는 줄기세포와 진피층의 섬유아세포는 피부재생과 건강에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Fuchis. Cell Stem Cell. 4(6):499, 2009). 따라서, 적절한 수소이온 농도와 삼투압을 유지하며 미네랄, 아미노산, 비타민, 에너지원이 포함된 배지는 피부를 구성하는 세포들의 증식, 분화, 재생을 촉진할 수 있으므로 노화를 방지하는 미용 효과를 나타낼 수 있다.

[0006] 최근 광노화에 의한 주름을 억제시키고, 피부상태를 개선하기 위하여, 항산화 기능을 갖는 다양한 종류의 식물추출물을 이용하거나, 과각질화된 각질을 제거하는 물리화학적 방법 등이 이용되고 있으며, 화장품의 조성물로는 레티놀 등이 널리 사용되고 있다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 본 발명자들은 피부염증완화, 피부노화 방지 및 피부 재생을 촉진 시킬 수 있는 화장료 조성물을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 무기염류, 비타민, 아미노산, 지질 및 세포의 에너지원으로 이루어진 영양성분을 포함하는 피부세포 배양용 배지가 피부 염증을 완화시키고, 피부 노화를 방지하며 주름형성을 방지하고, 피부 재생을 효과적으로 촉진시킨다는 것을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 본 발명의 목적은 피부세포 배양용 배지를 유효성분으로 포함하는 피부상태(skin conditions) 개선용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

**과제의 해결 수단**

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 무기염류 75-80 wt%, 비타민 0.01-0.02 wt%, 아미노산 5-10 wt%, 지질 0.001-0.003 wt% 및 세포의 에너지원 12-17 wt%로 이루어진 피부 상태 개선용 조성물로, 상기 조성물은 pH 7.2-7.6 및 280-320(mOsmol/kg H<sub>2</sub>O) 삼투압을 유지하고; 상기 무기염류는 소듐 클로라이드, 소듐 하이드로젠 카르보네이트, 포타슘 클로라이드, 칼슘 클로라이드 디하이드레이트, 마그네슘 설페이트(heptahydrate), 소듐 디하이드리포스페이트, 마그네슘 클로라이드, 징크 설페이트(Zinc sulfate), 페릭 설페이트 및 쿠프릭 설페이트

(cupric sulfate)로 구성된 균으로부터 선택되는 1종 이상의 무기염류이며; 상기 비타민은 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B3, 비타민 B5, 비타민 B6, 비타민 B9, 비타민 B12, 비타민 F 및 비타민 H로 구성된 균으로부터 선택되는 1종 이상의 비타민이고; 상기 아미노산은 알지닌, 타이로신, 라이신, 류신, 이소류신, 트레오닌, 발린, 페닐알라닌, 히스티딘, 세린, 글라이신, 시스테인, 메치오닌, 프롤린, 트립토판, 아스파라긴, 글루타믹에씨드, 아스파틱에씨드 및 알라닌으로 구성된 균으로부터 선택되는 1종 이상의 아미노산이며; 상기 지질은 리포익산(lipoic acid) 및 리놀레익산(linoleic acid)으로부터 선택되는 1종 이상의 지질이고; 상기 에너지원은 글루코오스 및 소듐 피루베이트(sodium pyruvate)로부터 선택되는 1종 이상의 에너지원인 것을 특징으로 하는 피부 상태 개선용 조성물을 제공한다.

- [0012] 본 발명자들은 피부염증완화, 피부노화 방지 및 피부 재생을 촉진 시킬 수 있는 화장료 조성물을 개발하고자 노력하였고 그 결과, 본 발명자들은 무기염류, 비타민, 아미노산, 지질 및 세포의 에너지원으로 이루어진 영양성분을 포함하는 피부세포 배양용 배지가 피부 염증을 완화시키고, 피부 노화를 방지하며 주름형성을 방지하고, 피부 재생을 효과적으로 촉진시킨다는 것을 규명하였다.
- [0013] 본 발명의 배지 성분은 대한민국 식약청에서 고시한 화장품원료집에 등재되어 있는 성분을 사용하며, 각 성분의 함량을 조순수 정제수에 혼합하여 충분히 용해시켜 제조한다. 이때, 본 발명의 배지의 구성성분 중 물에 대한 용해도가 낮은 아미노산과 일부의 성분들은 염산, 수산화나트륨, 알콜 등을 사용하여 용해시킨 후 배지에 첨가한다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 포함되는 피부세포 배양용 배지에 이용되는 무기염류의 양은 배지에 포함된 총 영양성분 중 60-90 wt%, 보다 바람직하게는 65-85 wt%, 보다 더 바람직하게는 70-80 wt%, 그리고 가장 바람직하게는, 77 wt%에 해당하는 양이 이용되고, 상기 무기염류는 소듐 클로라이드, 소듐 하이드로젠 카르보네이트, 포타슘 클로라이드, 칼슘 클로라이드 디하이드레이트, 마그네슘 설페이트(heptahydrate), 소듐 디하이드젠포스페이트, 마그네슘 클로라이드, 징크 설페이트(Zinc sulfate), 페릭 설페이트 및 쿠프릭 설페이트(cupric sulfate)로 구성된 균으로부터 선택되는 1종 이상의 무기염류를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에 이용되는 비타민의 양은 배지에 포함된 총 영양성분 중 0.005-0.1 wt%, 보다 바람직하게는 0.005-0.05 wt%, 보다 더 바람직하게는 0.007-0.03 wt%, 그리고 가장 바람직하게는, 0.008 wt%에 해당하는 양이 이용되고, 상기 비타민은 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B3, 비타민 B5, 비타민 B6, 비타민 B9, 비타민 B12, 비타민 F 및 비타민 H로 구성된 균으로부터 선택되는 1종 이상의 비타민을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에 이용되는 아미노산의 양은 배지에 포함된 총 영양성분 중 1-25 wt%, 보다 바람직하게는 2-20 wt%, 보다 더 바람직하게는 5-10 wt%, 그리고 가장 바람직하게는, 7 wt%에 해당하는 양이 이용되고, 상기 아미노산은 20종의 필수아미노산을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에 이용되는 지질의 양은 배지에 포함된 총 영양성분 중 0.0005-0.01 wt%, 보다 바람직하게는 0.001-0.003 wt%, 그리고 가장 바람직하게는, 0.002 wt%에 해당하는 양이 이용되고, 상기 지질은 리포익산(lipoic acid) 및 리놀레익산(linoleic acid)으로부터 선택되는 1종 이상의 지질을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에 이용되는 세포의 에너지원의 양은 배지에 포함된 총 영양성분 중 5-20 wt%, 보다 바람직하게는 10-20 wt%, 보다 더 바람직하게는 12-17 wt%, 그리고 가장 바람직하게는, 15 wt%에 해당하는 양이 이용되고, 상기 세포의 에너지원은 글루코오스 및 소듐 피루베이트(sodium pyruvate)로부터 선택되는 1종 이상의 에너지원을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지는 pH 6.0-8.5, 보다 바람직하게는 pH 6.5-8.2, 보다 더 바람직하게는 pH 7.0-8.0, 그리고 가장 바람직하게는 pH 7.2-7.6을 유지한다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지는 삼투압 200-400(mOsmol/kg H<sub>2</sub>O), 보다 바람직하게는 230-370(mOsmol/kg H<sub>2</sub>O), 보다 더 바람직하게는 260-340(mOsmol/kg H<sub>2</sub>O), 그리고 가장 바람직하게는 280-320(mOsmol/kg H<sub>2</sub>O)을 유지한다.

- [0021] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 피부세포 배양 배지의 화장품학적 유효량(cosmetically effective amount); 및 (b) 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 화장품 조성물이다. 본 명세서에서 용어 화장품학적 유효량은 상술한 본 발명의 조성물의 피부 개선 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0022] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0026] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록사이드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도메타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서의 펩타이드와 담체 성분 이외에, 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물에 의한 피부 상태 개선은 피부염증완화, 주름개선, 피부재생, 미백, 피부탄력 개선, 피부노화 방지, 피부보습 개선, 검버섯 제거, 여드름 치료 및 상처 제거를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 의한 피부 상태 개선은 피부염증완화이다.
- [0031] 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 피부 상태 개선용 조성물은 피부 재생 효과를 나타내며 림프구, 대식구 및 호중구와 같은 염증 관련 세포들을 감소시킴으로써 염증 억제 효과를 나타내고, 주름 억제 및 개선 효과와 보습, 미백 효과를 나타낸다.
- 발명의 효과**
- [0032] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0033] (a) 본 발명은 피부세포 배지를 유효성분으로 포함하는 피부상태 개선용 조성물에 관한 것이다.
- [0034] (b) 본 발명의 조성물은 현저한 피부염증완화, 주름개선, 피부재생, 미백, 피부탄력 개선, 피부노화 방지, 피부보습 개선 효과를 나타낸다.

[0035] (c) 본 발명의 조성물은 화장품 및 의약외품에 매우 효과적으로 적용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0036] 도 1은 피부세포 배양용 배지(DCCM4) 처리(12시간)에 따른 NHDF 세포의 이주 효과를 나타내는 결과이다.  
 DCCM4 25%, 50%, 100%, DMEM를 NHDF 세포에 처리하고 세포 이주 정도를 창상치유 어세이(Wound Healing assay)를 이용하여 분석함. \*DMEM 대조군과 비교하여 p<0.05.

도 2는 DCCM4 처리(12시간)에 따른 NHDF 세포의 증식 속도를 측정한 결과이다.  
 (A), (B), (C), (D)는 0시간에 측정한 것이고, (E), (F), (G), (H)는 12시간에 측정한 것임. DMEM 및 DCCM4 25%, 50%, 100%를 처리한 NHDF 세포의 이주 정도를 창상치유 어세이를 이용해 분석함.

도 3은 DCCM4 처리(24시간)에 따른 HaCaT 세포의 이주 효과를 나타내는 결과이다.  
 DCCM4 25%, 50%, 100%, DMEM를 HaCaT 세포에 처리하고 세포 이주 정도를 창상치유 어세이를 이용하여 분석함. \*DMEM 대조군과 비교하여 p<0.05.

도 4는 DCCM4 처리(12시간)에 따른 HaCaT 세포의 증식 속도를 측정한 결과이다.  
 (A), (B), (C), (D)는 0시간에 측정한 것이고, (E), (F), (G), (H)는 12시간에 측정한 것임. DMEM 및 DCCM4 25%, 50%, 100%를 처리한 HaCaT 세포의 이주 정도를 창상치유 어세이를 이용해 분석함.

도 5는 광노화에 의한 피부조직의 두께변화를 나타낸다.  
 Normal: 정상군, 무처리; N. Cont.: 음성대조군, UV & Sq-OOH 처리; Retinol: 레티놀 팔미에이트 처리군, UV & Sq-OOH 및 레티놀 팔미에이트 화장료 처리; P. Water: 정제수 처리군, UV & Sq-OOH 및 정제수 화장료 처리; DCCM4: DCCM4 처리군, UV & Sq-OOH 및 DCCM4 화장료 처리.

도 6은 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부의 조직학 절편을 H&E 염색한 결과이다(배율: x40).  
 Sq-OOH를 처리한 SKH-1에 UVB를 조사함(스케일 바: 100 μm).

도 7은 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부의 조직학 절편을 H&E 염색한 결과이다(배율: x400).

도 8은 표피의 지질 막층(lipid lamella)의 두께를 측정한 결과이다(μm).  
 Normal: 정상군, 무처리; N. Cont.: 음성대조군, UV & Sq-OOH 처리; Retinol: 레티놀 팔미에이트 처리군, UV & Sq-OOH 및 레티놀 팔미에이트 화장료 처리; P. Water: 정제수 처리군, UV & Sq-OOH 및 정제수 화장료 처리; DCCM4: DCCM4 처리군, UV & Sq-OOH 및 DCCM4 화장료 처리.

도 9는 표피의 지질 막층 축적을 측정한 결과이다(%/표피).  
 Normal: 정상군, 무처리; N. Cont.: 음성대조군, UV & Sq-OOH 처리; Retinol: 레티놀 팔미에이트 처리군, UV & Sq-OOH 및 레티놀 팔미에이트 화장료 처리; P. Water: 정제수 처리군, UV & Sq-OOH 및 정제수 화장료 처리; DCCM4: DCCM4 처리군, UV & Sq-OOH 및 DCCM4 화장료 처리.

도 10은 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부의 조직학 절편을 오일 레드O로 염색한 결과이다(배율: x100, 화살표: 지질 막층).  
 Sq-OOH를 처리한 SKH-1에 UVB를 조사함(스케일 바: 100 μm).

도 11은 피부에서 염증세포의 수를 측정한 결과이다(세포/mm<sup>2</sup>).  
 Normal: 정상군, 무처리; N. Cont.: 음성대조군, UV & Sq-OOH 처리; Retinol: 레티놀 팔미에이트 처리군, UV & Sq-OOH 및 레티놀 팔미에이트 화장료 처리; P. Water: 정제수 처리군, UV & Sq-OOH 및 정제수 화장료 처리; DCCM4: DCCM4 처리군, UV & Sq-OOH 및 DCCM4 화장료 처리.

도 12는 피부에서 비만세포의 수를 측정한 결과이다(세포/mm<sup>2</sup>).  
 Normal: 정상군, 무처리; N. Cont.: 음성대조군, UV & Sq-OOH 처리; Retinol: 레티놀 팔미에이트 처리군, UV &

Sq-OOH 및 레티놀 팔미에이트 화장료 처리; P. Water: 정제수 처리군, UV & Sq-OOH 및 정제수 화장료 처리; DCCM4: DCCM4 처리군, UV & Sq-OOH 및 DCCM4 화장료 처리.

도 13은 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부의 조직학 절편을 톨루이딘 블루 염색한 결과이다(배율: x100, 화살표: 비만 세포).

Sq-OOH를 처리한 SKH-1에 UVB를 조사함(스케일 바: 40 μm).

도 14는 진피층 내 교원섬유(collagen fiber)의 분포를 분석한 결과이다(%/진피 mm<sup>2</sup>).

Normal: 정상군, 무처리; N. Cont.: 음성대조군, UV & Sq-OOH 처리; Retinol: 레티놀 팔미에이트 처리군, UV & Sq-OOH 및 레티놀 팔미에이트 화장료 처리; P. Water: 정제수 처리군, UV & Sq-OOH 및 정제수 화장료 처리; DCCM4: DCCM4 처리군, UV & Sq-OOH 및 DCCM4 화장료 처리.

도 15는 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부의 조직학 절편을 메이슨 트리크롬(Masson trichrome) 염색한 결과이다(배율: x100, 화살표: 교원섬유).

Sq-OOH를 처리한 SKH-1에 UVB를 조사함(스케일 바: 100 μm).

도 16은 진피층 내 탄력섬유(elastic fiber)의 분포를 분석한 결과이다(%/진피 mm<sup>2</sup>).

Normal: 정상군, 무처리; N. Cont.: 음성대조군, UV & Sq-OOH 처리; Retinol: 레티놀 팔미에이트 처리군, UV & Sq-OOH 및 레티놀 팔미에이트 화장료 처리; P. Water: 정제수 처리군, UV & Sq-OOH 및 정제수 화장료 처리; DCCM4: DCCM4 처리군, UV & Sq-OOH 및 DCCM4 화장료 처리.

도 17은 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부의 조직학 절편을 베르호프 반 기슨(Verhoeff-van Gieson) 염색한 결과이다(배율: x100, 화살표: 탄력섬유).

Sq-OOH를 처리한 SKH-1에 UVB를 조사함(스케일 바: 40 μm).

도 18은 Sq-OOH를 처리하고 UVB를 조사한 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부의 피부 모사판(replica) 이미지를 나타낸다.

도 19는 UVB를 조사한 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부의 피부 모사판(replica) 이미지를 나타낸다.

도 20은 Sq-OOH를 처리하고 UVB를 조사한 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부 표면을 전자 현미경으로 촬영한 사진이다(배율: x100).

도 21은 UVB를 조사한 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부 표면을 전자 현미경으로 촬영한 사진이다(배율: x400).

도 22는 Sq-OOH를 처리하고 UVB를 조사한 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부 표면을 전자 현미경으로 촬영한 사진이다(배율: x1,000). 열린 모공이 관찰됨.

도 23은 Sq-OOH를 처리하고 UVB를 조사한 무모생쥐(SKH-1) 등쪽 피부 표면을 전자 현미경으로 촬영한 사진이다(배율: x1,000). 케라틴에 의한 닫힌 모공이 관찰됨.

도 24는 Sq-OOH를 처리하고 UVB를 조사한 무모생쥐(SKH-1)의 두피를 전자 현미경으로 촬영한 사진이다(배율: x1,000).

N. Cont.: 음성대조군, UV & Sq-OOH 처리; P. Water: 정제수 처리군, UV & Sq-OOH 및 정제수 화장료 처리; DCCM4: DCCM4 처리군, UV & Sq-OOH 및 DCCM4 화장료 처리.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0038] 실시예

[0039] 실시예 1: 배지의 제조

[0040] 본 발명에서 배지의 성분개발 및 제조를 위한 배지의 조성은 표 1과 같다. 제시한 각 성분의 함량을 초순수 정제수에 혼합하여 충분히 용해시켜 제조한다. 배지의 성분은 대한민국 식약청에서 고시한 화장품원료집에 등재되어 있는 물질을 사용한다.

[0041] 본 발명의 배지 제조과정에서 물에 용해도가 낮은 아미노산과 일부의 성분들은 염산, 수산화나트륨, 알콜 등을 사용하여 용해시킨 후 첨가하였다. 모든 성분들이 녹은 것을 확인하여 0.22 μm 여과기로 여과시킨 후 4℃에 보관하며 세포의 배양과 화장품 제조에 사용하였다.

[0042] 또한, 본 발명의 배지의 제조에 있어서 완성된 배지의 pH는 7.2-7.6 사이를 유지하며, 삼투압은 280(mOsmol)에서 320(mOsmol) 사이를 유지하고, 고농도의 화장품의 조성물로 사용하기 위하여 2배에서 10배 사이의 농축액으로 제조한 후 다른 조성물과 혼합하여 사용하였다.

**표 1**

[0043] 피부세포 배양용 배지(DCCM4)의 조성과 함량

성분명칭	화장품원료집 명칭	g/L
Sodium chloride	소듐클로라이드	6.575900
Sodium hydrogen carbonate	소듐바이카보네이트	2.225600
Potassium chloride	포타슘클로라이드	0.300000
Calcium chloride dihydrate	칼슘클로라이드	0.214500
Magnesium sulfate (heptahydrate)	마그네슘설페이트	0.052800
Sodium dihydrogenphosphate	소듐포스페이트	0.121500
Magnesium chloride	마그네슘 클로라이드	0.028600
Zinc sulfate	징크설페이트	0.000645
Ferric sulfate(heptahydrate)	페리스설페이트	0.001225
Cupric sulfate(pentahydrate)	키퍼설페이트	0.000002
D-glucose	글루코오스	1.500000
Sodium pyruvate	소듐피루베이트	0.330000
L-arginine-hydrochloride	알지닌	0.147500
L-tyrosine sodium, -hydrate	타이로신	0.067080
L-lysine-hydrochloride	라이신	0.091250
L-leucine	류신	0.070800
L-isoleucine	이소류신	0.065400
L-threonine	트레오닌	0.064200
L-valin	발린	0.063420
L-phenylalanine	페닐알라닌	0.042600
L-histidine hydrochloride, hydrate	히스티딘에이치씨엘	0.037800
L-serine	세린	0.031500
Glycine	글라이신	0.022500
L-cysteine hydrochloride, hydrate	시스테인 에이치씨엘	0.058800
L-methionine	메치오닌	0.020700
L-proline	프롤린	0.020700
i- Inositol	이노시톨	0.015120
L-tryptophane	트립토판	0.010800
L-asparagine-monohydrate	아스파라긴	0.009000
L-glutamic acid	글루탐릭애씨드	0.008820
L-aspartic acid	아스파틱애씨드	0.007800
L-alanine	알라닌	0.005340
Folic acid	폴릭애씨드	0.003975
D-calcium pantothenate	칼슘판토테네이트	0.003375
Thiamine-HCl	티아민에이치씨엘	0.003225
Pyridoxine-HCl	피리독신에이치씨엘	0.003045
Niacinamide	나이아신아마이드	0.003030
Vitamine B12	사이아노코발라민	0.001050
Rivoflavin	리보플라빈	0.000330
Lipoic acid	치오틱애씨드	0.000158
Linoleic acid	리놀레익애씨드	0.000060
D-biotin	바이오틴	0.000006

[0044] 실시예 2: 피부세포 배양용 배지(DCCM4)로 화장료의 제조

[0045] 본 발명에서 피부세포 배양용 배지(DCCM4)의 항노화 효과를 확인하기 위한 화장품은 피부세포 배양액을 유효성분으로 하는 DCCM4 화장료와 레티놀팔미테이트가 첨가된 레티놀화장료, 정제수화장료로 구분하여 제조한 후 사용하였다. DCCM4 배지는 총47종의 성분으로 이루어져 있으며, 삼투압은 280-320 Osm, pH는 7.2-7.4로 조정하였다(최 외 2인).

[0046] 본 발명에서 사용한 각각의 화장료는 미백색의 세럼형태로 제조하였으며, DCCM4 화장료는 DCCM4 배지를 최종농도를 90%가 되도록 수분베이스로 사용하였으며, 레티놀화장료와 정제수화장료는 정제수를 수분베이스로 사용하였다.

[0047] 본 발명에서 레티놀화장료는 대한민국 기능성 화장품의 인정기준에 따라 레티놀팔미테이트의 용량을 10,000IU 농도로 첨가하였으며, 본 발명에서 제조되어 사용된 모든 화장료에는 히알루론산과 베타글루칸을 각각 0.2% 농도가 되도록 첨가하여 사용하였다.

표 2

[0048] 화장품의 제조성분 비율.

원재료 구분	원료 규격	DCCM4 화장료	레티놀 화장료	정제수 화장료
DCCM4(2X)	2X(200%)	45.0%	0%	0%
혈청단백질	100%	10.0%	10.0%	10.0%
EGF	20 µg/ml	1.0%	1.0%	1.0%
bFGF	2 µg/ml	1.0%	1.0%	1.0%
올리고-히알루론산	100%	10.0%	10.0%	10.0%
베타글루칸	1%	20.0%	20.0%	20.0%
레티놀 팔미에이트	20%	0.0%	5.0%	0.0%
정제수	18MΩ	3.0%	53.0%	58.0%
합계	-	100.0%	100.0%	100.0%

[0049] 실시예 3: 세포의 이주능력 분석을 통한 피부세포 배양용 배지(DCCM4)의 재생효과 확인

[0050] 상처치유 효과 및 피부 조직의 재생능력 검증에 주로 이용되는 세포이주 시험 중에서 Wound-healing(“scratch”) 어세이(O’ Toole et al., 1997)를 이용하였다.

[0051] 본 발명의 배지 제조과정에서 세포의 이주능력 분석에 의한 피부세포 배양용 배지(DCCM4)의 재생효과를 확인하기 위하여 사용한 세포는 인간 섬유아세포(Normal Human Dermal Fibroblast, NHDF)와 각질세포(Immortalized Human Keratinocyte Cell line, HaCaT)이며, 각군의 배지에 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)과 항생제 페니실린-스트렙토마이신(10 mL/Liter)을 첨가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

[0052] 본 발명의 배양세포 이주시험을 위하여 인간섬유아세포와 각질형성세포주를 배양하여 배양접시 면적의 90% 이상 배양되었을 때, 파이펫 팁을 이용하여 중앙부분을 긁어낸 후 대조군인 DMEM과 DCCM4 25%, 50%, 100%배지로 교체하여 섬유아세포는 12시간 후에, 각질형성세포는 24시간 후에 세포의 이주(migration) 정도를 관찰 분석하였다.

[0053] 본 발명에서 DCCM4 배지를 이용하여 섬유아세포의 이주능력 변화와 증식 속도를 조사한 결과, 각 농도별로 처리한 DCCM4 시험군의 세포이주능력은 DMEM 대조군과 비교하였을 때, 통계적으로 유의미한 차이가 없었으며, 대조군과 유사하게 이동하였다. 특히, DCCM4 100% 농도의 경우에는 대조군보다 같은 시간 내에 2.6% 더 많은 면적을 이동하였다(도 1, 2). 또한, 섬유아세포는 배양접시에 부착하여 증식하며, 기다란 방추체(Spindle) 모양의 세포를 형성하였으며, 전형적인 모습을 계속 유지하며 증식하였다.

[0054] 본 발명에서 DCCM4 배지를 이용하여 각질세포의 이주능력 변화와 증식 속도를 측정된 결과, 상용화된 배지인 DMEM 대조군과 비교하였을 때, 각 농도별로 처리한 DCCM4시험군의 세포이주능력이 통계적으로 유의미한 차이를 나타냈으며, 더 높게 나타났다. 같은 시간 내에 대조군보다 DCCM4 25% 시험군은 33.52%, 50% 시험군은 34.01%, 100%시험군은 36.04% 더 많은 면적을 이동하였다(도 3, 4). 또한, 각질세포는 방추모양의 섬유아세포와는 달

리 집락을 이루어 나가면서 세포사이에 공백 없이 증식과 부착이 잘 일어났으며, 평면 다각형의 전형적인 상피 세포의 모양을 잘 유지하였다.

**[0055] 실시예 4: 배지(DCCM4)로 제조한 화장료의 피부조직의 항노화 효과 확인**

**[0056]** 본 발명에서 피부세포 배양용 배지(DCCM4)로 제조한 화장료에서 피부 조직의 항노화 효과는 ICR/HR 계열의 무모 생쥐(hairless mouse, SKH1)를 사용하여 분석하였다. UVB 램프를 이용하여 조사하고 인체의 피지를 구성하는 주요성분인 스쿠알렌을 과산화시킨 Sq-OOH를 도포하였다. 무모생쥐를 이용해서 등쪽 피부를 좌우로 나누어서 똑같이 UVB를 조사했고, 한쪽에만 Sq-OOH를 처리하여 두 종류의 주름형성을 유도하였다. 본 연구결과에 서는 주로 UVB와 Sq-OOH를 동시에 처리한 결과를 이용하여 분석하였고, 레플리카 주름분석에서만 두 종류의 주름을 모두 촬영하여, 육안적 관찰분석에 이용하였다.

**[0057]** UVB 조사를 위한 광원으로서 방사(Emission) 스펙트럼이 280-360 nm이며, 최대 피크 360 nm인 UVB 램프(Sankyo Denki, 일본)를 사용하였다. 자외선 B(ultraviolet B) 조사는 최소 홍반량을(Minimal erythromal dose; MED) 60 mJ/cm<sup>2</sup> 으로 하여 1주일에 3회씩 마우스의 등 부위에 조사하였으며, 1주는 1MED, 2주는 2MED, 3주는 3MED, 4주부터는 4MED로 조사하였고, 총 6주간 조사하였다. 마지막 3일은 UVB의 직접적인 영향을 배제하고자, 조사를 중지하였다. 시료는 1일 2회, 주 6일, 6주 동안 도포하였으며, Sq-OOH는 100 μL씩 한쪽에만 도포하였고, 화장품은 매회 200 μL씩 등 전면에 도포하였다. 실험을 진행하는 동안 피부표면의 미용지표들과 무게를 측정 및 사진촬영을 하였고, 6주후에는 마취 후 피부 Replica 제작하였으며, 에테르를 이용한 과마취사를 통하여 장기적출하여 흉선과 비장의 무게를 측정하고, 피부조직을 적출하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 조직학적 검사에 사용하였다.

**[0058]** 상기에서 제조된 각 시험군의 화장료를 도포하여 피부조직의 항노화 효과를 파라핀 조직절편 분석 및 냉동 절편 분석법으로 확인하였다.

**[0059]** 본 발명에서 시험군의 설정은 노화를 유도하지 않은 정상대조군, 노화유도 시 DCCM4 화장료를 도포한 DCCM4 시험군, 노화유도 시 레티놀화장료를 도포한 양성대조군, 노화유도 시 정제수화장료를 도포한 정제수대조군, 노화유도 시 화장료를 도포하지 않은 음성대조군으로 구분하였다.

**[0060]** 본 발명에서 각각의 화장료 도포군은 노화 전 및 노화 후 시험군과 비교하였으며, 파라핀 조직절편 분석법으로 표피와 진피의 두께, 진피내 염증세포와 비만세포의 수, 진피내 탄력섬유와 교원질섬유의 분포양상을 분석하였고, 냉동 절편분석법으로는 표피와 진피의 지방조직 분포양상과, 표피 각질층의 지질 두께 및 축적에 대한 분포양상을 관찰하여 피부장벽(skin barrier)을 분석하였다.

**[0061]** 본 발명에서 사용한 피부조직의 염색방법은 Hematoxylin & Eosin(H&E), Masson trichrome, Verhoeff-van Gieson, PAS, Toluidine blue, Oil red O 방법을 사용하였다.

**[0062]** 본 발명에서 피부조직의 변화, 조직의 두께, 피지선, 모낭, 염증세포 등을 관찰한 결과로, 전반적인 피부조직의 변화, 조직의 두께, 피지선, 모낭, 염증 세포 등을 관찰한 결과는 정상군은 표피와 진피층 배열이 규칙적이며 염증관련 세포들이 거의 보이지 않는 반면, 음성대조군은 진피 내 염증세포가 많이 늘어났으며, 표피층과 진피층의 비후와 피지선의 증식이 관찰되었다(도 11). 이에 비해 화장품을 사용한 세 시험군은 음성대조군에 비하여 두께의 증식이 억제되었고, 림프구, 대식구 및 호중구와 같은 염증 관련 세포들이 대조군에 비해 많이 줄어들어 있음을 확인하였다. 그중에서도 DCCM4 시험군의 피지선의 증식억제와 염증세포수 억제효과가 가장 크게 나타났다(표 3, 도 7, 11).

**[0063]** 정상군의 조직의 두께에 비해 음성대조군은 현저한 두께의 비후현상을 볼 수 있다. 3종류의 화장품 시험군 모두 음성대조군에 비해서 두께의 증가가 억제되었지만, 그중에서도 DCCM4시험군이 정상군에 가장 가깝다고 할 수 있다(도 5-7).

**[0064]** 진피층 내 교원섬유의 양과 형태를 관찰할 수 있는데, 정상군이 교원섬유의 밀도가 조밀하고 배열이 규칙적으로 인데 비하여, 음성대조군은 교원섬유가 파괴되고, 다시 치유되고 증식되어지는 과정에서 오히려 표피와 진피의 두께도 늘어나고, 배열이 불규칙적이고, 변성이 일어났으며, 정상 군에 비해 교원섬유의 양도 약간씩 증가되었다. 또한 진피의 두께도 늘어난 것을 관찰할 수 있다. 화장품을 사용한 세시험군 중에서 DCCM4 시험군의 경우 콜라겐의 증식이 억제되어 정상군에 가장 가깝다(도 15, 17). 진피층 내 탄력섬유의 변화, 소실 및 퇴행성 변화 등을 관찰한 결과, 교원섬유보다 더욱 확연하게 차이가 있음을 알 수 있다. 정상군은 탄력섬유가 규칙적

인 반면, 음성대조군은 진피가 두꺼워지고 변성되고 영긴 탄력섬유가 증가하였다. 이에 비해 화장품을 사용한 세군은 탄력섬유증이 줄어들어 있음을 확인할 수 있다. 그중에서도 DCCM4 시험군이 정상군에 가장 가까운 양상을 보인다(도 16, 17).

[0065] 진피층 및 피하층 내 비만세포(mast cell)의 분포양상과 탈과립 정도를 관찰한 결과, 정상군은 비만세포가 적게 관찰되었고 탈과립이 거의 없는 반면, 음성대조군은 비만세포가 현저히 많이 관찰되었고 탈과립 정도가 심하게 나타났다. 화장품을 사용한 세 군은 음성대조군에 비해서 비만세포가 모두 줄어든 상태이며, DCCM4 시험군이 정상군에 가장 가까운 양상을 보이며, 비만세포 수가 적게 관찰되었고 탈과립 정도도 경미하다(도 12, 13).

[0066] 표피 각질층 내 지방과 지질 막층(Lipid lamella)의 분포양상을 확인 할 수 있다. 음성대조군에 비하여, 화장품을 사용한 세군의 표피 각질층의 라멜라구조를 이루는 지질이 보호되고 개선되었음을 알 수 있다. 특히 DCCM4 시험군이 정상군에 가장 가까운 양상을 보인다(도 8-10).

[0067] 음성대조군이 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 상피 두께, 염증 및 비만세포 수, 변성된 콜라겐 및 이상 탄력섬유의 비율의 증가가 있었으며, 화장품을 사용한 세군은 음성대조군에 비해서 모두 상피 지방층 두께 및 지방 피복 상피비율이 더 높으며, 잘 보존되었다. 이는 UVB에 의한 광노화 현상이 억제된 것으로 보여지며. 억제된 순서를 보면, DCCM4가 가장 월등하며, 이후 레티놀군과 정제수군의 순서로 광노화가 억제되었다.

**표 3**

[0068] 배지(DCCM4)로 제조한 화장료의 피부조직 항노화 효과 분석

시험군 피부조직분석	정상대조군 M±S.D.	음성대조군 M±S.D.	양성대조군 M±S.D.	정제수대조군 M±S.D.	DCCM4시험군 M±S.D.
표피(μm)	26.29 ± 5.57	191.61 ± 11.51	87.10 ± 10.09	111.68 ± 8.93	61.15 ± 8.54
염증세포 (cells/mm <sup>2</sup> )	6.0 ± 0.55	96.80 ± 30.89	45.40 ± 8.20	56.20 ± 5.76	33.80 ± 5.63
교원섬유 (%/mm <sup>2</sup> of dermis)	60.77 ± 3.65	86.64 ± 3.35	74.80 ± 5.43	79.59 ± 5.31	66.38 ± 4.27
탄력섬유 (%/mm <sup>2</sup> of dermis)	1.27 ± 0.63	12.59 ± 2.08	3.15 ± 0.57 <sup>fg</sup>	5.11 ± 1.02	1.91 ± 0.18
비만세포 (cells/mm <sup>2</sup> )	34.00 ± 8.00	114.80 ± 14.04	71.80 ± 5.90 <sup>fg</sup>	88.60 ± 16.68	54.60 ± 8.68
지질층 (μm)	9.33 ± 2.07	1.88 ± 0.50	5.41 ± 1.31	4.91 ± 0.54	8.55 ± 0.80
지질층 (%/epithelium)	80.03 ± 9.53	35.80 ± 8.34	56.23 ± 4.74	50.55 ± 8.16	71.49 ± 4.28

[0069] 실시예 5: 배지(DCCM4)로 제조한 화장료의 주름형성 억제효과 확인

[0070] 본 발명에서 시험군의 설정은 노화를 유도하지 않은 정상대조군, 노화유도 시 DCCM4 화장료를 도포한 DCCM4시험군, 노화유도 시 레티놀화장료를 도포한 양성대조군, 노화유도 시 정제수화장료를 도포한 정제수대조군, 노화유도 시 화장료를 도포하지 않은 음성대조군으로 구분하였다.

[0071] 본 발명에서 피부세포 배양용 배지(DCCM4)로 제조한 화장료의 주름형성 억제 및 주름의 개선의 효과 확인은 피부의 모사판(Replica) 분석법을 사용하였다.

[0072] 본 발명에서 피부 모사판의 제작은 ICR/HR 계열의 무모생쥐(hairless mouse, SKH1)의 피부에 산화된 스쿠알렌(Sq-OOH)을 도포하고, 자외선B(UVB)를 조사하는 방법으로 피부의 광노화를 유도하면서, 상기에서 제조된 각 시험군의 화장료를 도포하여 노화를 유도하였다.

[0073] 본 발명에서 각각의 화장품 도포군은 노화 전 및 노화 후 시험군과 비교하였으며, 노화유도 및 화장품 도포 6주 전 후 각 시험군의 생쥐를 마취시킨 후 실리콘폴리머를 등 부위에 얇게 도포하여 피부의 모사판을 제작하였다.

제작한 모사관은 디지털카메라로 촬영하여 형태적인 특징을 관찰하였고, Visioline VL650(Courage & Khazaka, 독일)을 사용하여 빛을 일정한 각에서 조사하였을 때 주름에 의하여 생기는 그림자의 면적을 측정하는 영상분석 방법으로 주름의 면적, 깊이 그리고 수를 정량 분석하였다. 또한, 본 발명에서 각 시험군에서 피부 표면의 미세구조 관찰은 주사전자현미경으로 관찰하여 분석하였다.

[0074] 본 발명에서 주름분석을 위해 제작한 피부표면 레플리카를 촬영하여 육안으로 관찰하였다. 마우스의 등 부위를 좌우로 나누어 두 종류의 피부노화를 유도하여 주름모델을 제작하였으며, UVB조사와 Sq-00H를 함께 처리하여 피부노화에 의한 주름을 유도하여 분석하였다(표 2, 도 18, 19).

[0075] 본 발명에서 정상군대조군은 원래 가지고 있던 모공이 잘 나타나고, 세밀하고 좁으면서 얇은 주름형태이며 주름능선의 간격이 조밀하였다. 이는 노화로 야기된 주름이 아니라 정상적인 피부굴곡의 형태를 확대하여 관찰하였을 경우에 보이는 모습으로서, 다수의 삼각형이 밀집되거나 혹은 방사선과 유사한 형태를 띠고 있다. 음성대조군과 정제수대조군은 기존의 정상적인 좁고 얇은 주름능선이 사라지면서, 주름능선의 간격이 매우 넓어졌으며, 주름의 형태가 굵고 깊으며 거칠게 나타났다. 양성대조군은 주름능선의 간격이 넓어지긴 했으나, 주름의 선이 얇고 깊이가 얕으며 표면이 매끄러웠으며, DCCM4시험군의 경우는 레티놀시험군보다 더욱 현저하게 주름의 선이 얇고 깊이가 얕으면서 주름능선의 간격이 좁았으며, 정상군의 형태에 가까운 모습을 나타냈다(표 2, 도 19).

[0076] 본 발명에서 육안관찰에 이어서, 주름에 대한 정량적 분석을 하였으며, 군별 주름 양상을 나타내는 객관적 지표들의 정량적 분석결과는 표 4와 같다.

[0077] 본 발명에서 주름의 총넓이, 주름이 차지하는 비율, 주름의 총길이(Total length), 주름의 평균 길이, 주름의 총 깊이, 주름의 평균 깊이, 주름의 최대 깊이를 측정하였으며, 모든 지표에서 세 화장료처리군 모두 음성대조군과 비교하였을 때, 낮은 수치를 보였으며 주름억제 효과가 있었다. 특히 DCCM4 시험군은 음성대조군과 비교하여, 통계적으로 유의미한 차이를 보였으며, 동시에 정상군과 유의미한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 DCCM4 시험군이 노화의 대표적인 징후인 주름개선 및 예방에 효과적인 것으로 나타났다.

[0078] 자외선조사와 Sq-00H도포를 통하여 노화 유도된 무모생쥐의 등 부위의 피부표면을 주사전자현미경으로 관찰하였다. 정상군의 경우, 모공에 아직 탈락되지 않은 각질이 남아있는 상태이나 피부굴곡이 일정하고 매끄러운 편이다. 이에 비해서 음성대조군의 경우 과각질화현상이 나타나고, 계속 쌓여서 거칠어졌으며, 모공이 거의 보이지 않고 막혀있다. 표면은 거칠었으며 일부 각질이 분리되어 들떠 있는 상태로 나타났다. 또한 피부굴곡이 깊게 파여 주름이 진 것을 알 수 있다(도 20, 21). 레티놀시험군의 경우 표면이 상당히 매끄럽고 각질이 정리된 모습을 관찰할 수 있었다. 그러나 피부의 굴곡은 정상군에 비해 높낮이가 큰 것으로 볼 때, 주름이 생긴 것을 확인 할 수 있었다. 정제수 시험군은 음성대조군과 비슷한 양상을 보이고 있으며, 각질비후현상과 더불어, 인테그리티(Integrity)를 유지하지 못하여 일부 각질이 뜯긴 듯한 모습으로 들떠있으며, 각질로 인해 모공이 닫혀있는 경우가 많으며, ‘막혀있는 모공과 깊고 굵은 주름이 눈에 띄었다(도 21-23).

[0079] DCCM4 배지 시험군은 정상군과 비교한 경우에는 과 각질 현상이 나타났으나, 음성대조군과 정제수 시험군에 비해서 각질비후현상이 현저하게 억제되었으며, 눈에 띄는 특이한 현상으로 모공에서의 각질탈락이 좀 더 원활하게 이루어진 결과로 볼 수 있는 ‘열려있는 모공’ 이 많은 편이다(도 21-23).

[0080] 무모생쥐이지만, Arbinio 계열에서 개발한 품종이기에 가는 털이 약간씩 발생하여 있는 특징을 가지고 있다. 피부에 있는 털과 모공의 상태를 관찰한 결과, 음성대조군의 경우 모공의 미세각질이 과다 생성된 것과 헤어의 모표피가 거칠고 건조하며 들떠있는 것을 볼 수 있다. 이에 비해 정제수 대조군과 DCCM4시험군은 좀 더 모표피의 거칠기가 억제되고 정돈된 것을 관찰 할 수 있다. 특히 DCCM4시험군의 털이 매끄럽고 정돈되어 있다(도 24).

**표 4**

[0081] 배지(DCCM4)로 제조한 화장료의 주름형성 억제효과 확인을 위한 주름의 지표분석

시험군 피부조직분석	정상 대조군	음성 대조군	양성 대조군	정제수 대조군	DCCM4 대조군
총 주름 면적[mm <sup>2</sup> ]	1.0±0.6	5.6±2.1	4.2±0.8	5.1±2.4	2.3±0.7
주름면적비율	1.5±0.9	8.8±3.2	6.6±1.3	7.9±3.7	3.6±1.2

주름 숫자	51.6±23.1	84.0±3.2	84.8±17.0	86.2±20.1	74.4±9.9
주름의 총 길이[mm]	13.3±7.6	37.3±7.9	34.5±6.2	36.9±11.4	23.6±4.7
평균 길이[mm]	0.2±0.0	0.4±0.1	0.4±0.0	0.4±0.1	0.3±0.0
주름 깊이[mm]	2.6±1.3	5.4±1.2	5.4±8.2	5.7±1.4	4.0±7.2
평균 깊이[μm]	48.5±2.0	61.1±5.2	64.7±4.5	61.7±7.4	54.3±1.8
최대 주름 깊이[μm]	93.8±14.2	276.3±110.0	173.7±16.7	186±53.3	155±33.2

**실시예 6: 배지(DCCM4)로 제조한 화장품의 피부지표 개선효과**

본 발명에서 시험군의 설정은 노화를 유도하지 않은 정상대조군, 노화유도 시 DCCM4 화장료를 도포한 DCCM4 시험군, 노화유도 시 레티놀화장료를 도포한 양성대조군, 노화유도 시 정제수화장료를 도포한 정제수대조군, 노화유도 시 화장료를 도포하지 않은 음성대조군으로 구분하였다.

본 발명에서 피부세포 배양용 배지(DCCM4)로 제조한 화장품의 항노화 효과 확인을 위한 피부표면의 미용지표는 상기에서 제조된 각 시험군의 화장료를 생쥐의 피부에 산화된 스쿠알렌(Sq-OOH)을 도포하고, 자외선B(UVB)를 조사하는 방법으로 피부의 광노화를 유도하면서 6주간 도포하여 분석하였다.

본 발명에서 피부의 수분함유량, Sebum, 홍반량, pH, 체온을 MPA-5 기기로 측정하여 분석하였다. 피부표면 수분 함유량 측정은 Corneometer CM 825(Courage & Khazaka, 독일), 홍반량(Erythema Index, EI) 측정은 Mexameter MX18(Courage & Khazaka, 독일), 피부 pH측정은 Skin-pH-meter pH 905(Courage & Khazaka, 독일), 유분측정은 Sebumeter SM815(Courage & Khazaka, 독일), 피부표면 온도 측정은 Skin-Thermometer ST500(Courage & Khazaka, 독일)을 사용하였고, 실험실내 온도, 습도 측정센서로 Ambient condition Sensor RTH100(Courage & Khazaka, 독일)를 사용하였다.

**표 5**

배지(DCCM4)로 제조한 화장품의 피부지표 개선효과

피부지표 시험군	수분량	홍반량	유분량	pH	피부온도
정상 대조군	66.8	112.0	1.2	5.8	37.4
음성 대조군	43.5	182.0	3.7	6.7	36.3
DCCM4 시험군	74.7	157.2	1.7	6.4	36.8
양성 대조군	57.4	223.1	1.6	6.4	36.7
정제수 대조군	61.2	216.2	3.4	6.6	37.1

본 발명에서 피부의 수분량은 자외선과 Sq-OOH로 광노화를 유도한 6주후에 DCCM4 시험군, 양성대조군, 정제수대조군은 모두 음성대조군과 비교하여 수분량이 높았으며, 가장 높은 수분량을 나타낸 DCCM4 시험군은 정상군과 차이가 없는 높은 수분함유량을 나타냈다.

본 발명에서 홍반량이 정상군과 비교하여 음성대조군과 양성대조군, 정제수대조군은 유의미하게 높았으나, DCCM4 시험군은 정상군과 통계적으로 차이를 보이지 않아 홍반 진정효과를 나타냈다. 본 발명에서 피부표면의 유분, pH, 체온의 변화를 분석하였을 때, DCCM4시험군에서 유분량과 pH는 음성대조군에 비하여 정상군 수준으로 낮았으며, 체온의 변화는 없었다.

**실시예 7: 배지(DCCM4)로 제조한 화장품의 보습, 미백, 주름개선, 사용감 관능평가**

[0090] 본 발명에서 피부세포 배양용 배지(DCCM4)로 제조한 화장료에 대하여 미백, 주름 개선 및 피부자극 효과를 평가하기 위하여 관능평가를 실시하였다. 피시험 대상은 25이상 55세 이하에 속하는 여성 20명으로 구성하였다.

[0091] 본 발명에서 사용한 화장품은 상기한 제조방법에 따라 피부세포 배양액을 유효성분으로 하는 DCCM4 화장료(DCCM 시험군)와, 레티놀팔미테이트가 첨가된 레티놀화장료(양성대조군), 정제수화장료(음성대조군)로 구분하여 제조한 후 사용하였다

[0092] 본 발명에서 피부세포 배양용 배지(DCCM4)로 제조한 화장료의 항노화 효과 확인을 위한 관능평가는 상기에서 제조한 3종류의 화장품을 사람의 피부에 일정기간 동일하게 매일 도포한 후 시험 후 10일차 및 20일차에 관능 평가하도록 하였다.

[0093] 본 발명에서 주름개선과 미백효과의 경우, 각각 피시험자가 느끼는 효과가 매우 우수할 경우에는 5점, 전혀 효과가 없을 경우에는 0점으로 하여 평가하도록 하였다.

**표 6**

[0094] DCCM4 화장료의 미백 및 주름개선 관능 평가.

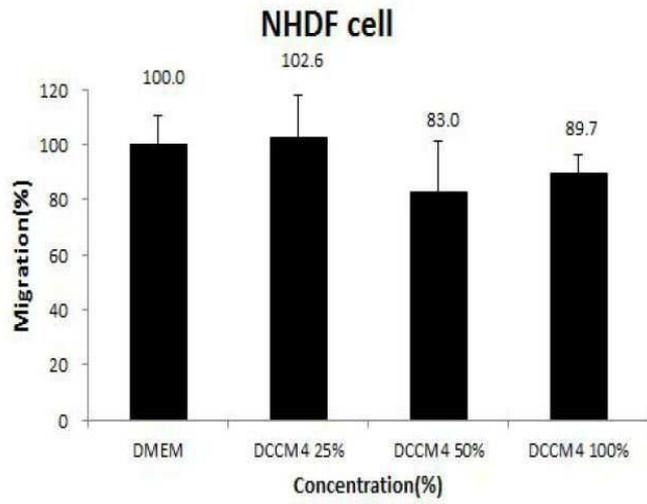
평가항목	10일차			20일차		
	DCCM4 시험군	양성 대조군	음성 대조군	DCCM4 시험군	양성 대조군	음성 대조군
보습효과	3.6	2.3	1.5	4.5	3.6	1.6
주름개선	3.3	2.2	1.8	4.3	3.4	1.8
미백효과	2.8	0.8	1.0	3.8	1.8	1.2
사용감 (피부자극)	0.1	1.1	0.1	0.0	1.8	0.1

[0095] 상기한 표 4에 나타난 바와 같이, DCCM4 시험군에서는 도포 후 시간이 경과함에 따라 보습, 미백 및 주름 개선 효과가 현저히 증가하였으나, 음성대조군에서는 주름개선 및 미백효과의 변화가 없었다. 특히 DCCM4 시험군의 개선효과는 레티놀이 첨가된 양성대조군보다 매우 높았다.

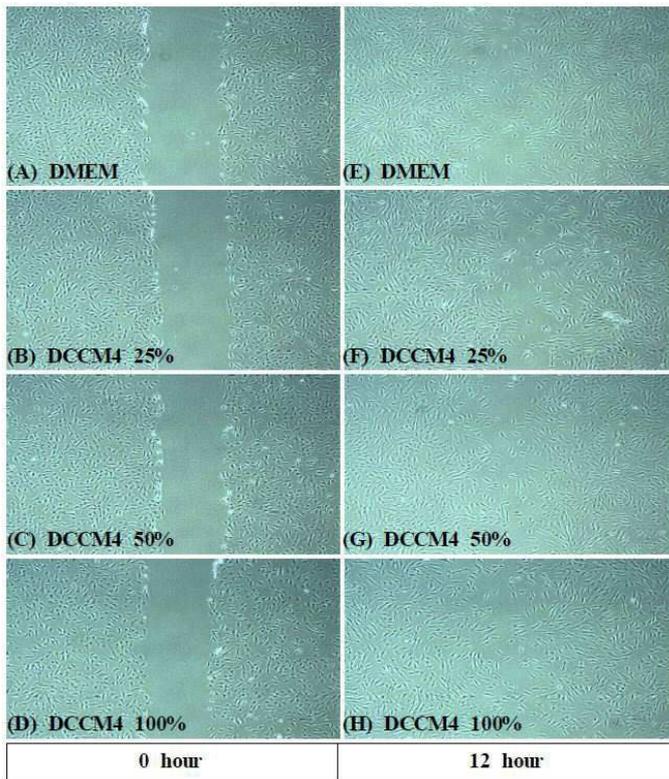
[0096] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

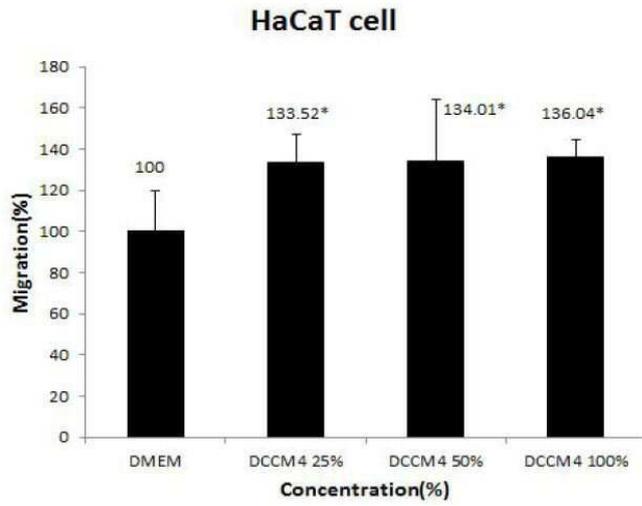
도면1



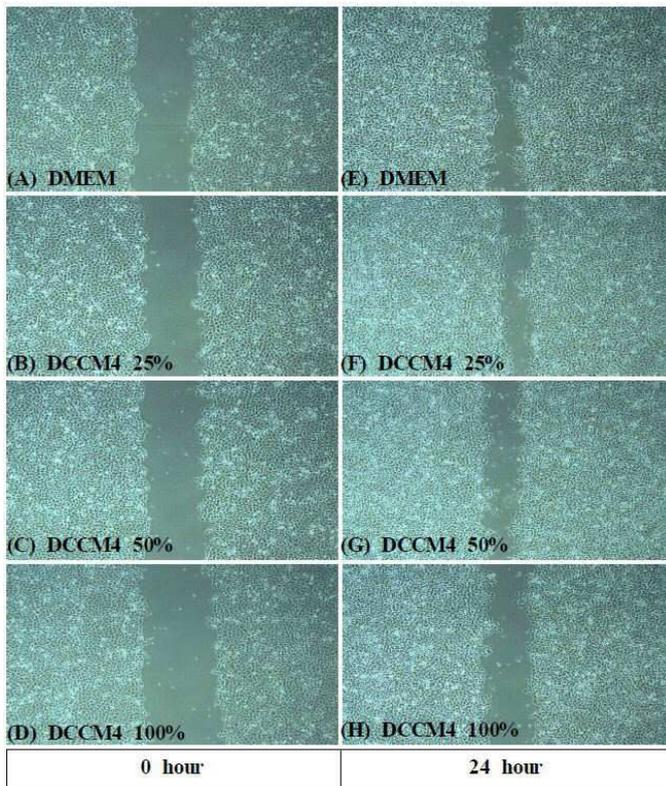
도면2



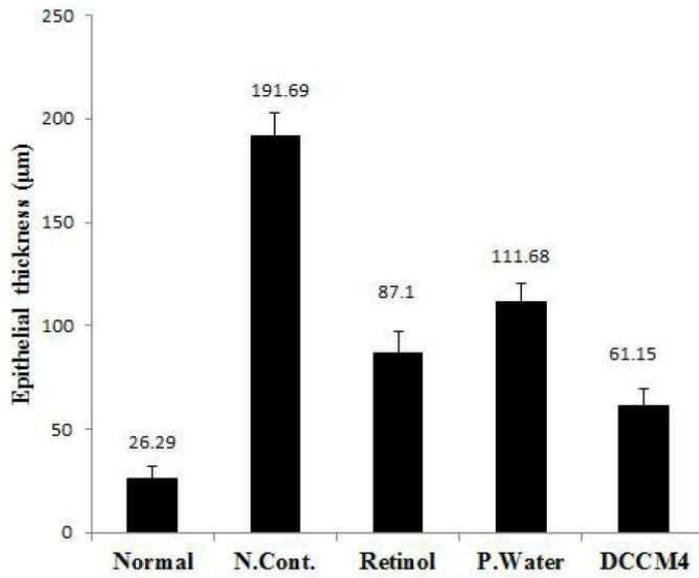
도면3



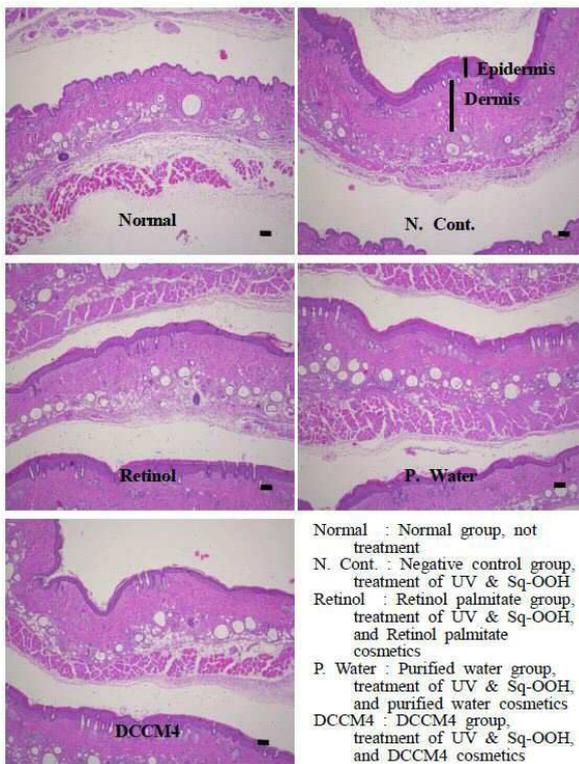
도면4



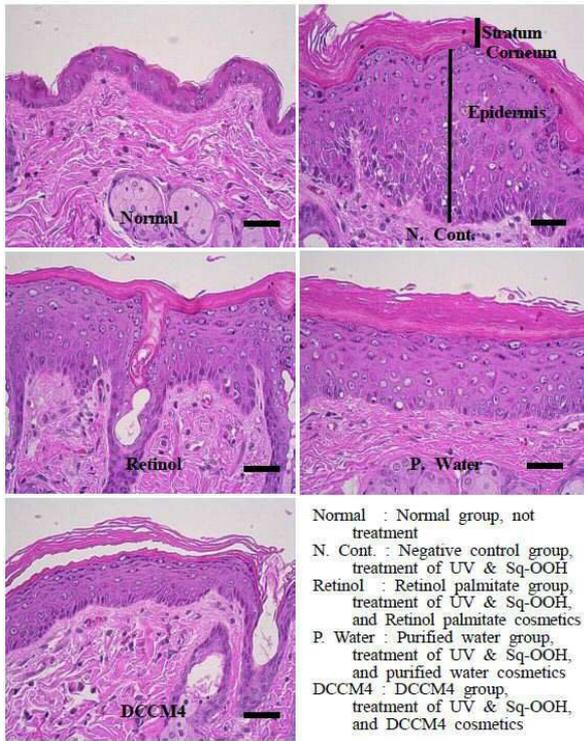
도면5



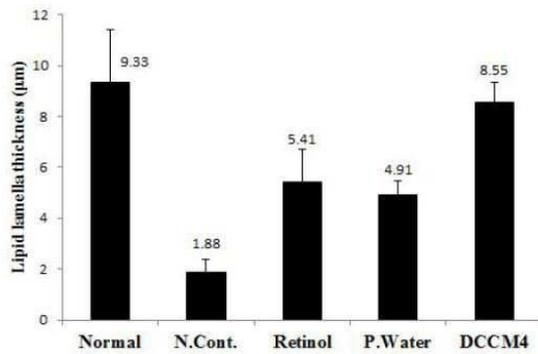
도면6



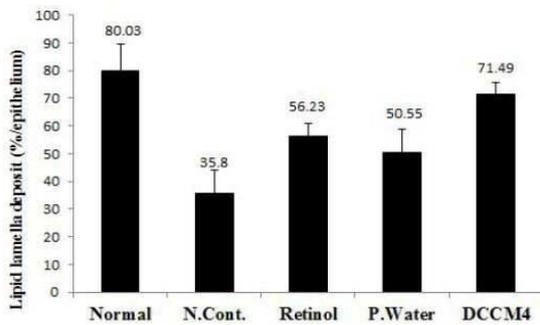
도면7



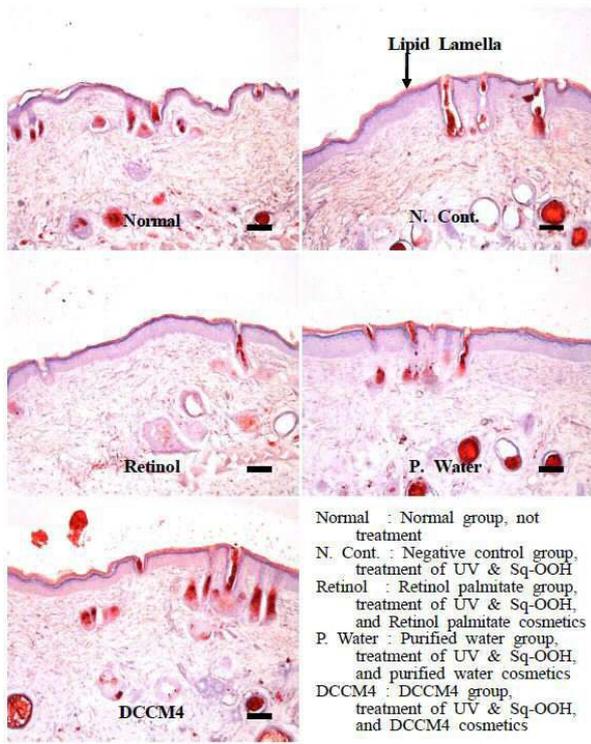
도면8



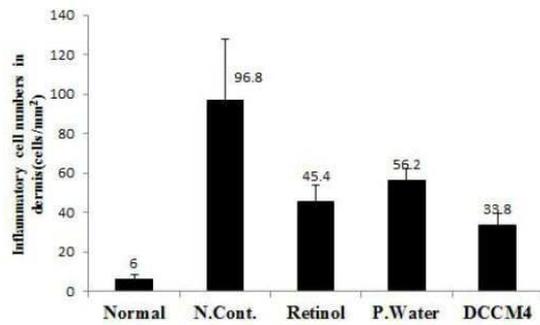
도면9



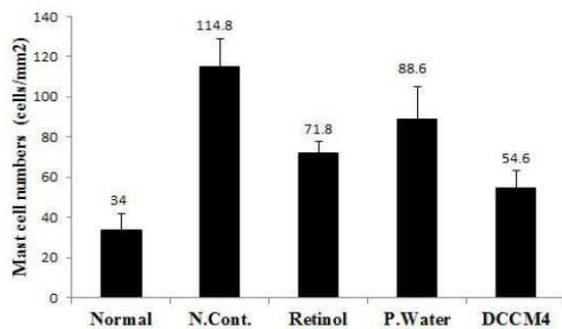
도면10



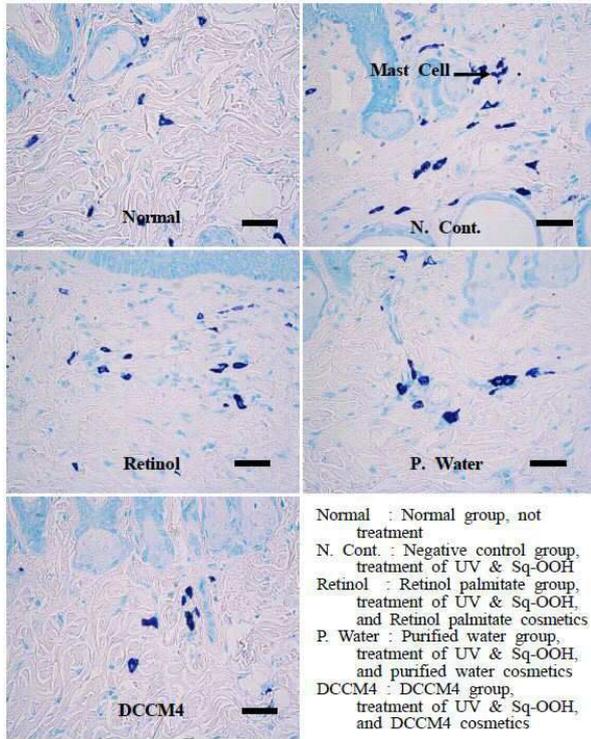
도면11



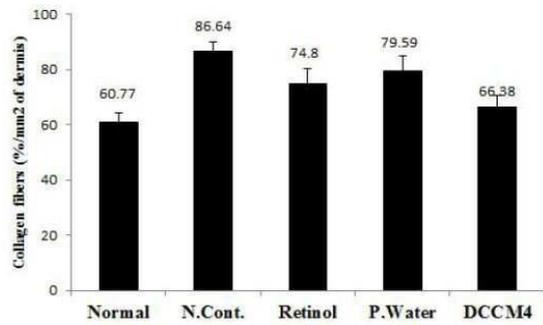
도면12



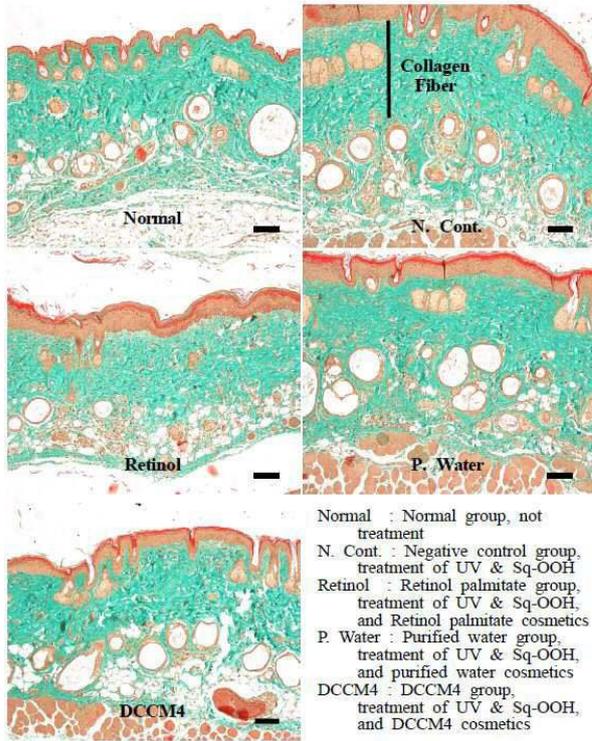
도면13



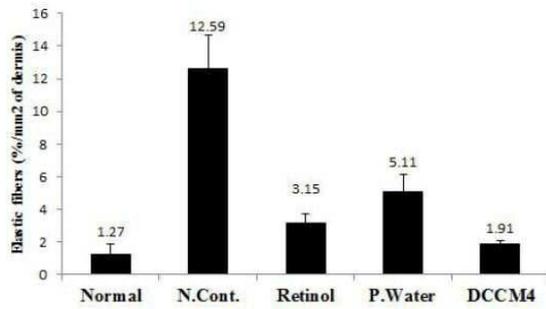
도면14



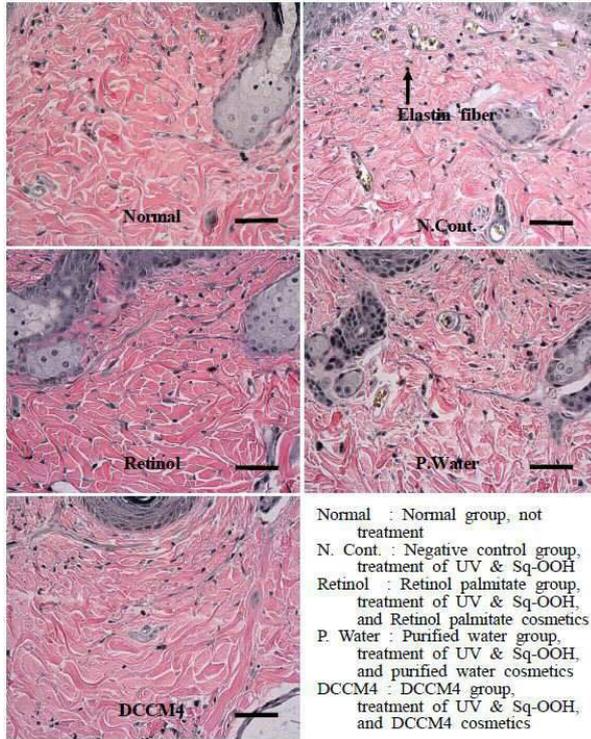
도면15



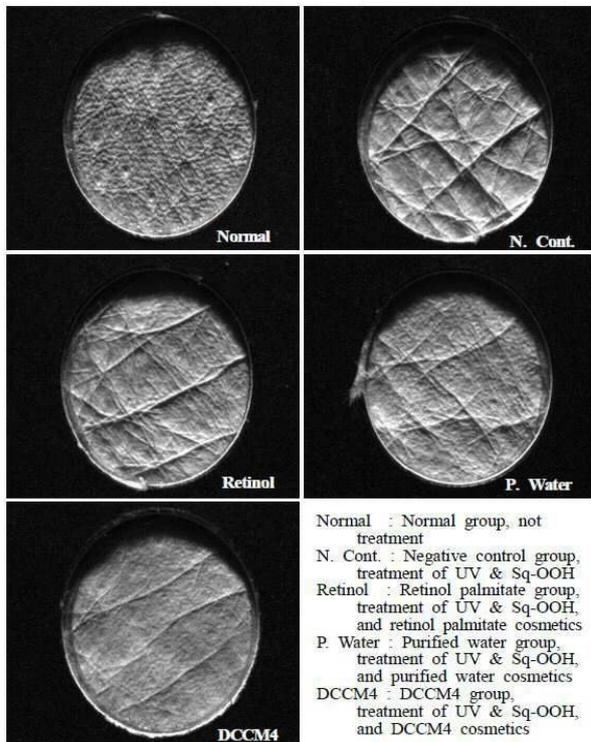
도면16



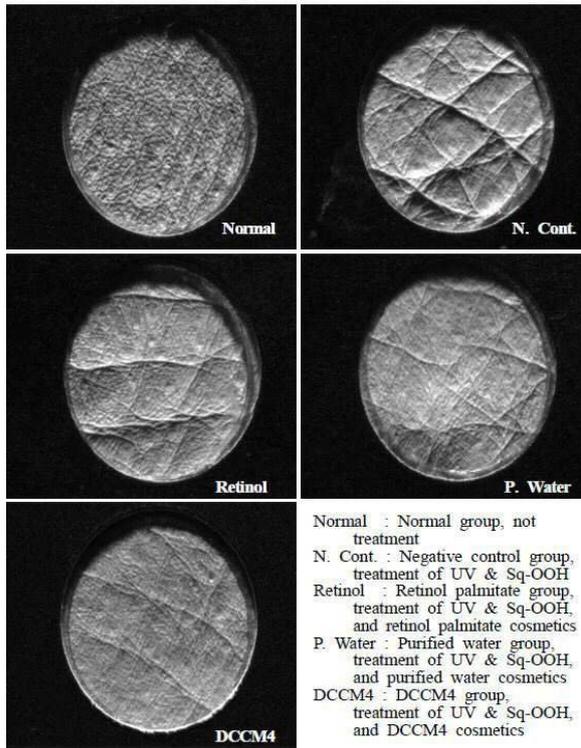
도면17



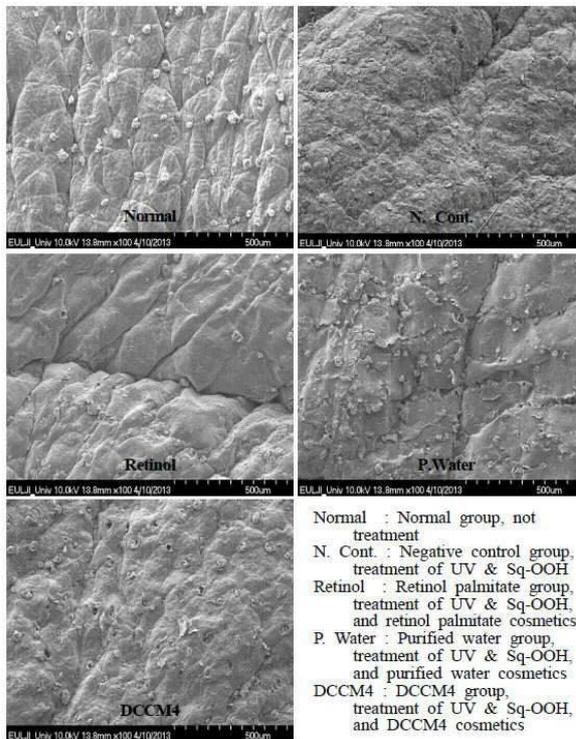
도면18



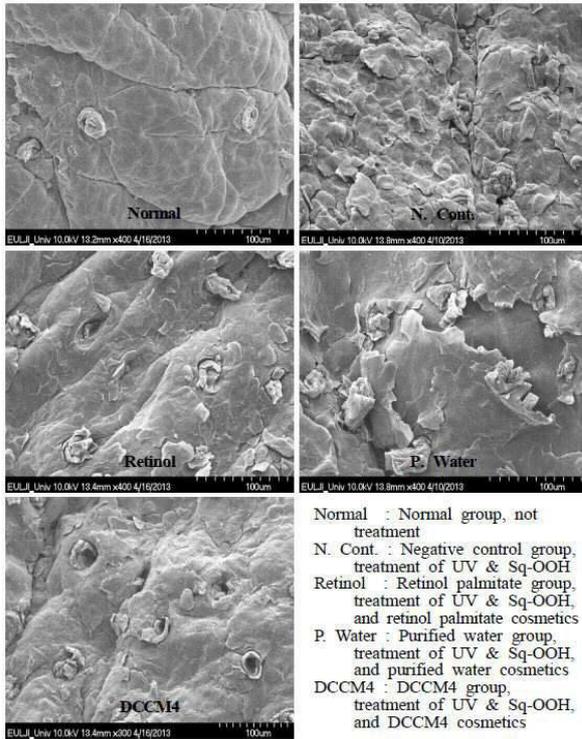
도면19



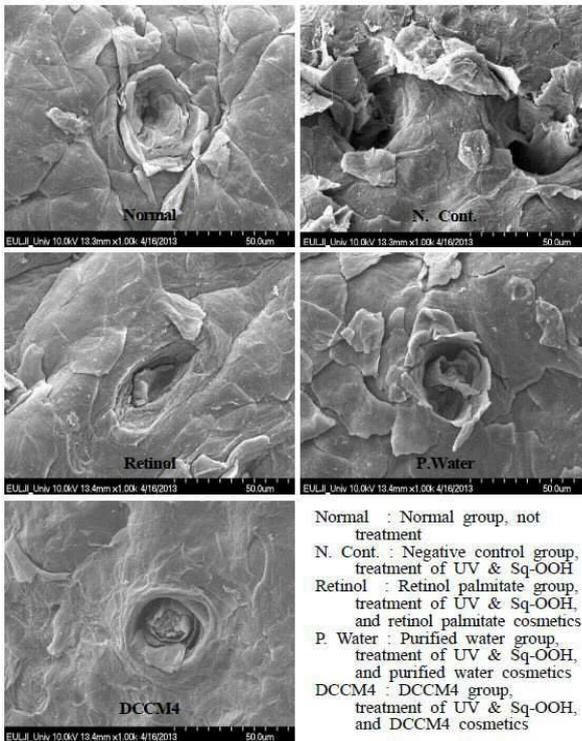
도면20



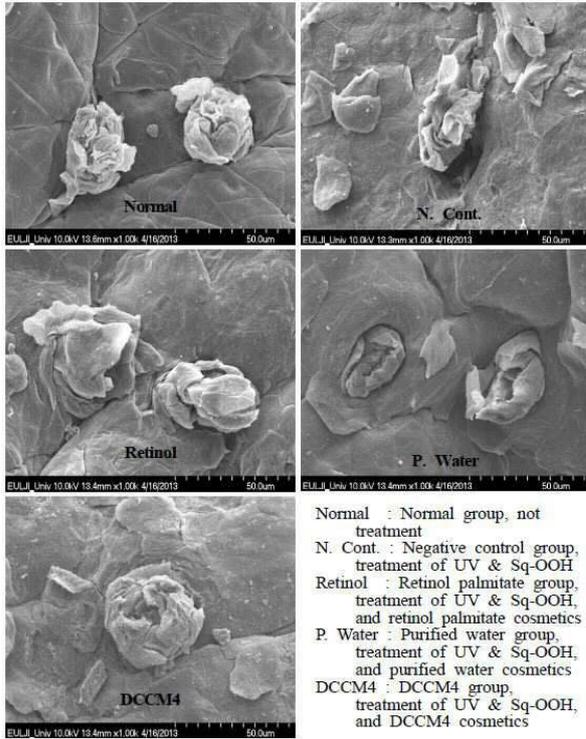
도면21



도면22



도면23



도면24

