



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년07월01일  
 (11) 등록번호 10-1414133  
 (24) 등록일자 2014년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 36/258** (2006.01) **A61P 25/00** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-0090799  
 (22) 출원일자 2012년08월20일  
 심사청구일자 2012년08월20일  
 (65) 공개번호 10-2014-0024171  
 (43) 공개일자 2014년02월28일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 이석화, 주의력결핍 과잉행동장애에서 고려인삼의  
 임상 효과, 단국대학교 대학원 석사학위논문,  
 2010.11.\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**주식회사 한국인삼공사**  
 대전광역시 대덕구 벚꽃길 71 (평촌동)  
**건국대학교 산학협력단**  
 서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)  
 (72) 발명자  
**신찬영**  
 서울특별시 양천구 목동동로 350 목동5단지아파트  
 532-1305  
**류종훈**  
 서울특별시 강남구 남부순환로 3032 미도아파트  
 101-609  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**한양특허법인**

전체 청구항 수 : 총 4 항

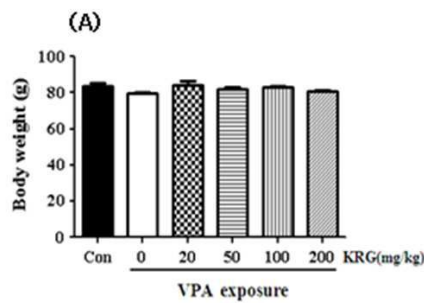
심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 **홍삼 추출물을 포함하는 자폐증 및 신경발달 장애 억제용 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 홍삼 추출물을 포함하는 자폐증 및 신경발달 장애 억제용 조성물에 관한 것이다.

**대표도** - 도1a



(72) 발명자

**정재훈**

경기도 남양주시 퇴계원면 퇴계원로50번길 17  
강남2차아파트 201-511

**김빛나**

서울특별시 강북구 도봉로101길 33-3, 101호

**박진희**

서울특별시 성동구 독서당로 375 신동아아파트  
3-509

**백인호**

대전광역시 유성구 가정로 30 KGC 중앙연구원

**윤수현**

대전광역시 유성구 가정로 30 KGC 중앙연구원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011A0130021

부처명 재단 및 기타

연구사업명 학술연구용역사업

연구과제명 (고려인삼학회)임신 중 고려 홍삼 섭취에 의한 자폐증 및 신경발달 장애 억제 효과 규명

기 여 율 1/1

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2011.06.01 ~ 2012.04.30

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

유효량의 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 자폐증에서 사교성 지표 개선용 약학 조성물.

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 상기 유효량은 100mg~200mg/kg체중인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

**청구항 3**

유효량의 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 자폐증에서 사교성 지표 개선용 기능성 식품 조성물.

**청구항 4**

제 3항에 있어서, 상기 유효량은 100mg~200mg/kg체중인 것을 특징으로 하는 기능성 식품 조성물.

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 홍삼 추출물을 포함하는 자폐증 및 신경발달 장애 억제용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 현행법상 홍삼은 '인삼을 증숙 또는 팽숙하거나 기타의 방법으로 인삼의 녹말을 호화한 것을 말한다'라고 정의된다. 주된 약리성분으로 알려진 인삼사포닌인 진세노사이드(ginsenoside)는 다른 식물에서 발견되는 사포닌과 다른 특이한 화학 구조 뿐 아니라 그 효능도 매우 상이하다. 최근 분리분석 기술의 발달에 따라 지금까지 30여종의 인삼사포닌의 화학구조가 밝혀져 있으며, 인삼사포닌은 화학구조의 특성에 따라 Protopanaxadiol(PD)계, protopanaxatriol(PT)계, oleanane계 사포닌으로 구분하는데, 현재까지 각각 19종, 10종, 1종의 화합물이 분리정제되어있다.

[0003] 홍삼은 중추신경에 대해서 진정작용과 흥분작용이 있으며 말초에서는 간을 보호하고 내분비계에 작용하여 생식 효과에 간접적으로 유효하게 작용하며, 특히 항염(抗炎) 및 항종양작용(抗腫瘍作用)에 효능이 있는 것으로 알려지고 있다.

[0004] 홍삼의 효과 중 중요한 것은 어댑토젠(adaptogen: 適應素) 효과로서 주위 환경으로부터 오는 각종 유해작용인 누병(淚病), 각종 스트레스 등에 대해 방어능력을 증가시켜 생체가 보다 쉽게 적응하도록 하는 능력이 있음이 입증되고 있다.

[0005] 현재 임신 중 인삼 및 홍삼 제품의 섭취에 대한 대중의 불안감으로 인하여 많은 연구가 진행되어 있지는 않지만 최근의 한 연구 보고에 의하면 임신 중 홍삼 섭취는 수컷 및 암컷의 생식독성 혹은 후세대의 발생 독성을 유발하지 않음이 보고되었다. 고려홍삼 추출물의 생식 발생독성을 평가하기 위해 멸균정제수에 녹여 수컷 동물에는 동거 9주 전부터 임신 확인일까지, 배 태자발생시험의 암컷에는 동거 2주 전부터 임신말기까지, 수태능 및 모체 기능 조합시험의 암컷에는 동거 2주 전부터 이유 시까지 매일 경구투여한 결과, 모든 모동물에서 시험 전 기간 동안 고려홍삼 투여에 의한 임상증상은 관찰되지 않았고, 체중변화, 사료 및 음수섭취량, 발정주기, 교미율, 수태율, 부검시 장기중량, 육안 및 병리조직학적 소견에서 이상이 발견되지 않았다. 배 태자발생시험의 임신말기 부검결과 태자의 사망률, 외표이상, 성비 및 생존태자 체중에 있어 고려홍삼으로 인한 영향이 나타나지 않았다. 조합시험에서도 유산, 조산, 난산 등의 이상이 관찰되지 않았고, 임신기간, 출산율, 성비, 생존자 수, 사망률,

포육 4일째의 생존율, 이유율 등에 있어 대조군과 모든 고려 홍삼 투여군 사이에 어떠한 차이도 관찰되지 않았다. 또한 분만 후 자세대의 체중변화, 신체발육, 반사기능, 운동능력 및 학습/기억력, 8주령에서의 장기중량에 있어서도 고려홍삼 투여로 인한 영향이 전혀 나타나지 않았다.

[0006] 최근 흥미롭게도 홍삼성분이 dioxin에 의한 고환 독성을 유발할 수 있음이 보고된 바 있으며 이러한 효과는 홍삼의 항 산화 효과 및 독성물질의 대사에 의해 산화적 손상을 유발할 수 있는 대사효소의 발현 변동과 관련이 있을 수 있음을 나타내는 결과가 보고된 바 있다.

[0007] 또한 황금, 길경, 황련해독탕 등 천연물 및 한방 의약품의 경련, 뇌졸중등의 중추 질환 및 기도 무신 분비등 말초 효과에 관한 연구 결과도 해외 논문에 발표해 왔다.

[0008] 한편, 자폐증(Autism)은 반복적 행동과 사회적 교류의 부족을 나타내며 심도의 다양성으로 최근에는 Autism spectrum disorder로 분류되는 심각한 신경 발달 장애이다. 총 1%의 유병률을 나타내며 유전적 요인과 환경적 요인이 복합적으로 작용하고 그 발병 기전이 명확히 알려지지 않아 진단과 치료에 많은 문제점을 지니고 있다. 질환 원인의 발생이 임신 중 신경계 발달 과정 중에서 비롯되는 질환으로 질환의 발병을 막기 위해서는 원인 역제가 임신 중에서부터 이루어져야할 필요가 있다.

[0009] 자폐증의 원인 현상이 이미 발달단계에서부터 나타날 것으로 생각되므로 질환이 이미 진행된 환자에 대한 대증적인 치료는 효과에 한계를 가질 수밖에 없으며 발달 단계에서의 예방 및 치료가 필요하다. 현재까지 개발된 치료제는 모두 대증요법제로서 모체가 아닌 질환 보유자에 적용된다는 공통점을 가지고 있으며 치료제가 아닌 증상 완화제로만 사용되고 있다. 만약 발달 단계에서의 고려 홍삼의 자폐증 억제 효능이 입증된다면 이는 발달 장애 질환 치료제 연구의 패러다임 자체에 변화를 주는 획기적인 연구가 될 것이다. 이와 같은 연구는 고려 홍삼의 자폐증 억제 효과를 확인할 뿐 아니라 뇌신경 발달 전반에 대한 영향 및 치료 효능에 대한 전기를 마련해 고려 홍삼의 적용 범주를 크게 확장시키는 계기가 될 것이다.

[0010] 본 발명은 고려 홍삼 투여가 자폐증을 비롯한 신경계 발달에 미치는 있는 효능을 증명하고, 신경계 발달 질환에 대한 전반적인 적용 가능한 신약 타겟 발굴에 토대를 마련한 것이다.

[관련 선행특허]

대한민국 특허공개번호 제10-2004-0029072호

[0011] 삭제

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0012] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 자폐증 모델로 널리 사용되는 VPA 동물모델을 사용해 자폐증 발현 억제 및 증상 경감 가능성을 가지는 물질을 확인하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 자폐증의 주요 증상인 사회적 교류 행동 감소가 임신 중 특정 물질 투여에 의해 개선될 수 있는지를 확인하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 자폐증 동물모델에서 나타나는 crooked tail 현상이 특정 물질에 의해 억제될 수 있는지 확인하여 해당 물질의 태아 기형 억제 가능성을 확인하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 자폐증 모델 동물에서 나타나는 경련 역치 저하 현상이 임신 중 특정 물질 투여에 의해 정상화될 수 있는지를 확인해 해당 물질의 뇌 신경 세포 발달 정상화 작용을 규명하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0016] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 유효량의 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 자폐증 억제용 약학 조성물을 제공한다,

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유효량은 100mg~200mg/kg체중인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [0018]     또 본 발명은 유효량의 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 자폐증 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0019]     또한 본 발명은 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경발달 장애 억제용 약학 조성물을 제공한다.
- [0020]     또 본 발명은 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경발달 장애 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0021]     본 발명의 홍삼추출물을 유효 성분으로 포함하는 억제학적 조성물은 상기 유효 성분 이외에 억제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0022]     상기 억제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 억제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 억제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0023]     상기 억제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 억제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 율활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 억제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0024]     또한, 본 발명은 상기 홍삼추출물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0025]     본 발명에 따른 식품 조성물은 상기 억제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.
- [0026]     본 발명은 상기 조성물을 포함하는 건강기능식품을 제공한다.
- [0027]     본 발명은 또한 자폐증 억제용 의약 또는 식품의 제조를 위한 상기 홍삼추출물을 유효 성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기 홍삼추출물을 유효 성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 자폐증 억제 및 신경발달장애 억제와 관련된 질환의 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.
- [0028]     또한 본 발명은 포유동물에게 치료상 유효량의 홍삼추출물을 투여하는 것을 포함하는 자폐증 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0029]     여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0030]     여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 또는 기타 임상적 의의에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 억제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 홍삼추출물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 1mg/kg~250mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

- [0031] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 홍삼추출물을 유효 성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0032] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0033] 본 발명은 자폐증 질환 동물 모델에 임신 중 고려 홍삼을 투여해 고려 홍삼이 자폐증을 비롯한 신경 발달 질환의 발생에 미치는 영향을 분석하고 고려 홍삼이 신경계 발달에 미칠 수 있는 효능을 입증하고자 한다.
- [0034] 자폐증 동물 모델로 valproic acid model (VPA) 사용하여 동물에 자폐증 증상을 재현하고 VPA 투여 시기 전후와 동물의 신경세포 생성 시기를 전후하여 홍삼 추출물을 투여해 자폐증 억제 효과를 포함해 신경 발달 영향을 연구한다. VPA 동물 모델에서 나타나는 신경관 이상과 관련된 crooked tail 현상을 기준으로 본 발명에서는 동물에 홍삼 성분을 투여해 홍삼이 VPA에 의해서 나타나는 해부학적 이상 현상을 억제할 수 있는지 확인한다.
- [0035] 또한 자폐증에서 흥분성 신경의 과도한 흥분과 억제성 신경의 약화로 낮은 자극에서 경련이 발생하며 홍삼 투여군과 대조군의 경련 발생 역치를 비교함으로써 홍삼이 신경 분화 정상화 효과를 지니는지 확인한다.
- [0036] 또한 VPA 동물 모델에서 나타나는 뇌 구조의 이상이 고려 홍삼 성분에 의해 억제될 수 있는지 연구한다.
- [0037] 본 발명으로 사회적 문제로 대두되고 있는 자폐증의 예방 및 치료법 개발을 모색, 자폐증 동물 모델에 홍삼을 적용함으로써 신경계 발달 이상 질환에 대한 홍삼 성분의 뇌 신경 발달 과정의 정상화 및 긍정적 효과를 규명한다. 이와 같은 발명을 통해 질환 예방, 치료 가능성을 모색할 뿐 아니라 임신 중 신경계 발달에 대한 홍삼 사용의 안전성 검증까지 확인하여 다양한 신경발달 질환에 대한 전반적인 적용이 가능한 신약개발용 혹은 기능성 식품 개발을 위한 의약조성물 개발의 토대가 될 것이다.
- [0038] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0039] 1) 자폐증 동물 모델인 VPA 동물의 확보와 발달 단계에서의 홍삼 엑기스 투여
- [0040] 동물모델: ADHD의 동물 모델로 가장 광범위하게 사용되고 있는 Valproic acid (VPA) 동물 모델을 이용하였다. 임신 12일에 VPA를 실험 동물에 피하 주사하고 대조군에는 생리 식염수를 투여했다. 종은 SD(Sprague Dawley) rats를 사용했다.
- [0041] 홍삼의 투여: 20, 50, 100, 200 mg/kg을 임신 10-15일에 경구투여하며 실험에 적용했다. 우선 꼬리 기형 억제 효과를 통해 적정 효능 농도가 정해지면 정해진 농도에서 행동 검색 등의 다른 실험을 수행하였다.
- [0042] 2) 고려 홍삼 엑기스의 경구 투여에 의한 자폐증 증상 개선의 검색
- [0043] 꼬리 기형 (crooked tail) 검사
- [0044] 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA 동물에서 동물이 태어난지 4주 후에 꼬리가 흰 정도와 빈도를 조사하여 홍삼의 꼬리 기형 억제 효과를 조사했다.
- [0045] ※ 고려 홍삼 엑기스 소요량: 임신 10일-15일에 경구 투여하였다.
- [0046] 고려 홍삼 extract: 120mg/마리 x 100 마리 = 12 g + 제조 및 투약 손실분 5 g = 총 17g 필요하였다.
- [0047] 3) 홍삼 엑기스 투여에 의한 자폐증 증상 개선의 행동약리학적 검색(Behavioral Study)
- [0048] 일반운동 활성 (Locomotor activity)
- [0049] 운동 기능의 향진과 저하, 진정, 흥분, 불안, 우울, 회피 정도 및 독성을 검색하는데 활용된다. EthoVision system(Noldus IT b.v., Netherlands)과 같은 행동 관찰 장치 및 프로그램 세트를 이용했다. 시험 박스 중앙에 흰 쥐 또는 생쥐를 놓고 10-20분간 행동 양상 관찰했다
- [0050] 사회적 상호작용 (Social interaction)
- [0051] 원래 케이지에 있는 동물에 처음 보는 동물을 노출시켜 냄새를 맡아보는 횟수, 기간 기타 타고 누르는 행위, 목덜미를 무는 행위 등을 측정하였다. 각각의 행동 지표는 공격적 행동과 비공격적 행동으로 나누어 평가한다. 새로운 동물에 보이는 관심도를 측정한다. 두 동물을 물리적으로 서로 접촉가능하게 하거나 혹은 한 동물을 투명하고 냄새가 통할 수 있는 아크릴 박스 안에 가두어 보고 냄새 맡는 것 외에 직접 물리적인 접촉은 할 수 없게 하는 등의 조건에서 수행한다.
- [0052] 불안 (Anxiety) : elevated plus maze로 측정하였다.



- [0053] 불안과 관련된 정서적 행동의 검색에 활용한다. EthoVision system(Noldus IT b.v., Netherlands)과 같은 행동 관찰 장치 및 프로그램 세트를 이용한다. 1주일간 동물을 안정화 시키고 실험 전날 옆의 장치에서 10분간 1회 이상 적응시켰다. 시험 물질 투여 30분 또는 1시간 후 그림과 같은 장치 중앙에 흰 쥐 또는 생쥐를 놓고 10-20분간 행동 양상 관찰 및 분석한다. 총 이동 거리와 총 이동 시간, 총 이동 각 (Total turn angle), 열린 공간/닫힌 공간 머무르는 시간 비, 열린 공간/닫힌 공간 출입 횟수 비, 10분 또는 20분간 rearing 횟수 등을 data화 했다.
- [0054] 집중력 (Attention) : Y maze로 측정하였다.
- [0055] 3 개의 가지로 구성되어 있으며 각 가지(arm)의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 가지가 접하는 각도는 120° 이다. 모든 실험 장치는 검정색의 poly vinyl plastic으로 구성된다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한 쪽 가지에 동물을 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 mouse가 들어간 가지를 기록했다. 세 개의 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점 (실제 변경, actual alternation)씩 부여하여 다음 공식으로 그 변경 행동력을 계산했다.
- [0056] ※ 변경 행동력 (%) = 실제변경 (actual alternation) / 최고변경 (maxium alternation) X 100 (최고변경: 총 입장횟수 - 2)
- [0057] 4) 전기유발 경련 역치 측정: Electroshock Seizure Threshold
- [0058] -랫드의 양쪽 귀에 전극을 설치하고 Constant current stimulator로 전기 자극을 주어 hind limb extension을 일으키는지 확인하였다. 주어진 전기 자극에 반응을 하였을 경우, 다음 랫드는 3mA 낮은 수치로 자극을 주고, 반응하지 않았을 경우에는 3mA 높은 수치로 자극을 준다. 20 마리의 랫드에 대해 실험을 한 후, convulsive current 50 (CC50) 수치를 통해 경련 역치를 구한다.
- [0059] 5) 뇌 구조 변화 검사
- [0060] -신경세포의 분화와 뇌 층상 구조의 생성이 활발한 시기인 생후 4주에 실험동물의 뇌를 꺼내고 조직을 얇게 자른 후 면역학적 염색을 통해 신경 세포의 생성 양상과 뇌의 구조적 변화를 관찰한다. cresyl violet 염색과 신경세포 특이적 항체인 Tuj-1 염색을 통해 VPA 모델에서 신경 발달 과정 중 나타나는 이상에 대한 홍삼의 효과를 확인한다.
- [0061] 또 본 발명은 자폐증 동물 모델로 valproic acid model (VPA) 사용하여 동물에 자폐증 증상을 재현하고 VPA 투여 시기 전후와 동물의 신경세포 생성 시기를 전후하여 홍삼 추출물을 투여해 자폐증 억제효과를 해부학적, 신경학적, 행동학적 관점에서 제공한다.

### 발명의 효과

- [0062] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명은 홍삼이 자폐증 뿐 아니라 ADHD, 태아 알콜 증후군과 같은 신경발달 질환에 적용 가능하다.

### 도면의 간단한 설명

- [0063] 도 1은 자폐증 동물 모델인 VPA 투여 동물에 고려 홍삼을 농도 별로 처리한 후 각 그룹의 몸무게를 나타낸 그래프와 꼬리 기형(crooked tail)을 검사한 사진이다.
- 도 2는 자폐증 동물 모델인 VPA 투여 동물에 고려 홍삼을 농도 별로 처리한 후 open-field test를 수행하여 일반 운동 활성을 관찰한 결과이다.
- a : distance moved를 통해 자폐증의 동물모델에서 과잉행동이 나타나고 고려 홍삼 투여 시 과잉행동이 감소함을 나타낸 그림
- b: movement duration을 통해 자폐증의 동물모델에서 과잉행동이 나타나고 고려 홍삼 투여 시 과잉행동이 감소함을 나타낸 그림
- 도 3은 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA동물의 사회적 상호작용을 알아보는 실험으로 sociability를 측정 한 결과이다.
- a : 같은 종의 처음 보는 동물 (conspecific stranger side)이 들어 있는 side를 방문하는 횟수를 나타낸 그림

b : 같은 종의 동물이 들어 있지 않는 empty side를 방문하는 횟수를 나타내는 그림

c : conspecific stranger side frequency와 empty side frequency를 구해 Sociability Index (SI)를 구해 사회적 상호작용이 어떻게 변화하는가 나타낸 그림으로 고농도 홍삼을 투여한 그룹이 VPA 대조군에 비해 frequency를 이용한 SI값이 증가하여 나타는 결과를 도출

d : conspecific stranger side 와 empty side 에 머무르는 시간을 나타낸 그림

e : conspecific stranger side duration과 empty side duration를 구해 Sociability Index (SI)를 구해 사회적 상호작용이 어떻게 변화하는가 나타낸 그림으로 고농도 홍삼을 투여한 그룹이 VPA 대조군에 비해 duration를 이용한 SI값이 증가하여 나타는 결과를 도출

f: 아크릴 박스 내에서 familiar side 와 empty side 를 동물이 지나간 경로를 나타낸 그림

도 4는 사회적 상호작용을 알아보는 추가적인 실험으로 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA 노출된 자폐 유발 동물의 사회적 호기심 정도를 측정하기 위한 social preference test 실시 결과이다.

a : 익숙한 동물 (familiar side)이 들어 있는 side를 방문하는 횟수를 나타낸 그림

b : 처음 보는 같은 종의 동물이 들어 있는 (novel side)를 방문하는 횟수를 나타내는 그림

c : familiar side side frequency와 novel side frequency를 구해 social preference Index (SPI)를 구해 사회적 호기심 정도가 어떻게 변화하는가 나타낸 그림으로 고농도 홍삼을 투여한 그룹이 VPA 대조군에 비해 frequency를 이용한 SPI값이 증가하여 나타는 결과를 도출

d : familiar side 와 novel side 에 머무르는 시간을 나타낸 그림

e : familiar side duration과 novel side duration를 구해 social preference Index (SPI) 를 구해 사회적 호기심 정도가 어떻게 변화하는가 나타낸 그림으로 고농도 홍삼을 투여한 그룹이 VPA 대조군에 비해 duration를 이용한 SPI값이 증가하여 나타는 결과를 도출,

f: 아크릴 박스 내에서 familiar side 와 novel side 를 동물이 지나간 경로를 나타낸 그림

도 5는 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA 노출된 자폐 유발 동물의 불안과 관련된 정서적 행동을 검색하고자 elevated plus maze를 실시한 결과이다.

도 6은 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA 노출된 자폐 유발 동물의 주의력 결핍 양상을 파악하기 위해 Y-Maze test를 실시한 결과이다.

도 7은 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA 노출된 자폐 유발 동물의 전기유발 경련 역치를 측정한 결과이다.

도 8은 신경 세포의 생성 양상과 뇌의 구조적 변화를 관찰하기 위해 면역 염색한 결과이다.

a: normal과 VPA 동물과 홍삼 투여한 동물의 뇌의 prefrontal cortex 부위를 cresyl violet staining한 사진

b: normal과 VPA 동물과 홍삼 투여한 동물의 뇌의 prefrontal cortex 부위를 Tuj-1 staining한 사진

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0064] 이하 본 발명을 비한정적인 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0065] 1) 꼬리 기형 (crooked tail) 검사

[0066] 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA동물에서 태어난 지 4주 후 꼬리가 흰 정도 및 빈도를 조사한 결과 홍삼을 투여한 그룹에서 농도에 따라 꼬리 기형이 억제되는 결과를 도출했다. 홍삼 200mg/kg 투여 군에서 꼬리 기형 억제 효과가 가장 컸으며 성별의 차이는 관찰되지 않았다.

[0067] 2) 일반 운동 활성

[0068] 일반 운동 활성 경향을 파악하기 위해 open-field test를 수행하였다. 이는 일정한 크기의 상자 안에서 동물이



일정시간 동안 얼마만큼 운동 활성을 보이는지를 측정할 수 있는 방법으로 본 발명자들은 이미 SHR 및 neonatal hypoxia ADHD모델을 이용한 연구에서 일반운동 활성을 효과적으로 측정할 수 있음을 확인하였다.(데이터 도시 안함) 이러한 연구에서와 마찬가지로 open-field test에서 VPA 동물모델을 이용한 홍삼의 일반 운동 활성 영향을 효과적으로 측정할 수 있었다. 본 발명에서는 꼬리 기형 및 일반 운동 활성을 통해 홍삼의 다양한 농도로 투여하여 가장 효과적인 홍삼의 농도를 정하고 다음의 행동 실험을 진행하고자 하였다. 임신 중에 VPA에 노출된 동물에 홍삼을 투여하여 태어난 새끼들의 움직임을 측정한 결과 VPA군에서는 normal 군에 비해 과잉행동 경향이 나타났고 이러한 과잉행동 경향이 홍삼을 투여한 그룹의 경우 농도 의존적으로 유의성 있게 줄어드는 결과를 도출했다.

[0069] 3) 사회적 상호작용 (Social interaction)

[0070] ● sociability

[0071] 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA동물의 사회적 상호작용을 알아보는 실험으로 먼저 sociability를 측정하였다. sociability의 경우 원래 케이지에 있는 동물에 처음 보는 동물을 노출시켜 아크릴 박스 안에서 직접적인 물리적 접촉 없이 stranger side와 empty side의 frequency를 측정하여 sociability index 값을 구하여 비교하였다. 홍삼을 투여한 그룹의 경우 VPA에 노출된 자폐유발 동물의 감소된 stranger side의 frequency를 normal 그룹의 수준으로 회복시켜주었다. 즉 VPA에 노출된 자폐유발 동물에서 사회적 상호작용 중의 하나인 sociability의 감소가 홍삼을 투여한 그룹에서 증가하는 결과를 확인하였으며, 100mg, 200mg의 고농도의 홍삼투여 그룹에서 유의성 있는 결과를 도출하였다.

[0072] ● social preference test

[0073] 사회적 상호작용을 알아보는 추가적인 실험으로 social preference test 실시, 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA 노출된 자폐 유발 동물의 사회적 호기심정도를 측정하였다. social preference test는 stranger 1 side(익숙한 동물)과 novel side(새로운 동물)의 frequency를 측정하여 social preference index 값을 비교하였다. 그 결과 홍삼을 투여한 그룹에서는 social preference index 값이 증가 하는 것을 확인하였다. 이는 VPA 노출된 자폐 유발 동물의 감소된 사회적 상호작용이 홍삼을 투여한 그룹에서 normal과 같은 수준으로 증가하였으며, 특히 200mg의 농도에서 유의성 있는 결과를 확인하였다.

[0074] 4) 불안 (Anxiety)

[0075] 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA 노출된 자폐 유발 동물의 불안과 관련된 정서적 행동을 검색하고자 elevated plus maze 실시하였다. EthoVision system(Noldus IT b.v., Netherlands)과 같은 행동 관찰 장치 및 프로그램 세트를 활용하여, open arm(열린 공간)/closed arm(닫힌 공간) 머무르는 시간 비, open arm/closed arm 출입 횟수 비를 data화 하여 비교하였다. 그 결과 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA 동물의 closed arm과 open arm에 머무는 시간 비에 따른 불안과 관련된 정서적 행동검색에서는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

[0076] 5) 집중력 (Attention)

[0077] 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA 노출된 자폐 유발 동물의 주의력 결핍 양상을 파악하기 위해 우선 Y-Maze test를 실시하였다. 이 방법은 Y자형의 미로를 실험 동물이 순차적으로 탐험하는 것을 측정하는 것으로 공간 지각력과 한번 탐험한 곳을 다시 들어가지 않고 순차적으로 새로운 곳을 탐험하는 정도를 측정하여 집중력을 측정하는 방식이다. 이와 유사한 방식으로 8개의 arm이 있는 radial -arm maze를 사용할 수도 있으나 본 연구에서는 radial arm의 경우 동물이 공포 반응을 일으켜 freezing하는 경우가 상대적으로 많고 따라서 더욱 높은 개체차를 나타내므로 다량의 동물을 검색하기 위해 Y-Maze를 주로 연구에 사용하였다 (data not shown). 본 연구에서는 실험 동물이 5주령이 되었을 때, 앞선 행동실험의 결과를 토대로 홍삼의 농도를 100mg, 200mg로 선별하여 Y-Maze test를 실시하였다. 집중력 및 공간 지각력의 지표로 볼 수 있는 spontaneous alteration 경우 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA 노출된 자폐 유발 동물군에서 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

[0078] 6) 전기유발 경련 역치 측정: Electroshock Seizure Threshold

[0079] 홍삼을 투여한 그룹과 대조그룹의 VPA 노출된 자폐 유발 동물의 전기유발 경련역치를 측정하고자 랫드의 양쪽 귀에 전극을 설치하고 Constant current stimulator로 전기 자극을 주어 hind limb extension을 일으키는지 확인하였다. 주어진 전기에 반응을 하였을 경우, 다음 랫드는 3mA 낮은 수치로 자극을 주고, 반응을 하지 않았을 경우에는 3mA 높은 수치로 자극을 주어 convulsive current 50 (CC50) 수치를 통해 경련 역치를 비교하였다. 경련역치 측정의 경우 실험동물이 6주령이 되었을때, 홍삼의 농도를 선별하여 실시하였다. 그 결과 VPA 노출된 자폐 유발 동물의 낮아진 경련 역치를 홍삼을 투여한 그룹에서 홍삼 농도가 높아질수록 전기유발 경련 역치가 다시 normal에 가깝게 회복되는 결과를 도출하였다.

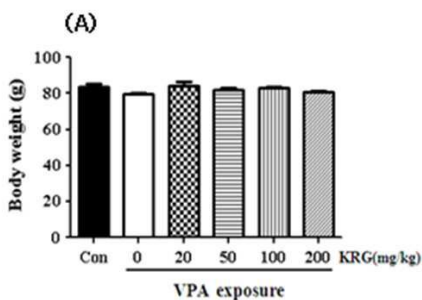
[0080] 7) 뇌 구조 변화 검사

[0081] 임신 중 VPA 노출에 의한 신경세포 생성 양상과 뇌의 구조적 변화 유무를 확인하기 위해 normal과 VPA 동물과 홍삼투여한 동물의 뇌를 적출하여 5~10um로 자른 후 면역학적 염색을 통해 신경 세포의 생성 양상과 뇌의 구조적 변화를 관찰했다. 신경세포 세포질 속에는 조면 소포체인 니슬소체(Nissl bodies)로 구성되어 있고, cresyl violet 염색은 염기성 아닐린 염료를 가지고 신경조직을 염색하는 가장 기본적인 방법으로 H-E 염색에서 관찰되는 모든 구조 외에 신경세포체의 니슬소체 뚜렷하게 관찰할 수 있다. 실험 결과 cresyl violet 염색을 통해 신경세포체의 니슬소체를 관찰한 결과 신경세포 크기 및 모양에는 유의한 차이가 없었지만 normal에 비해 VPA 동물에서 증가된 신경세포 및 신경그물을 홍삼을 투여한 동물에서는 normal과 유사한 경향을 나타내어 신경세포의 수가 정상화되어 있음을 관찰할 수 있었다. Cresyl violet 염색 뿐만 아니라 신경세포 특이적 항체인 Tuj-1(Neuron-specific class III beta-tubulin)염색을 통해 신경세포체와 axon등 신경섬유의 변화를 뚜렷하게 보고자 면역형광염색을 실험한 결과에서는 유의성 있는 차이를 확인 할 수 없었다. cresyl violet 염색결과를 바탕으로 홍삼 투여에 의해 VPA 유발로 인해 증가된 신경세포가 normal 수준으로 회복되는 결과를 도출하였다.

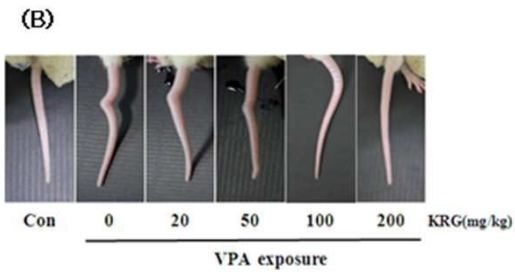
[0082] 따라서, 사회적 문제로 대두되고 있는 자폐증 연구를 위해 본 발명자들은 자폐증 동물 모델에 홍삼을 적용함으로써 신경계 발달 이상 질환에 대한 홍삼 성분의 뇌 신경 발달 과정의 정상화 및 긍정적 효과를 입증하였다.

**도면**

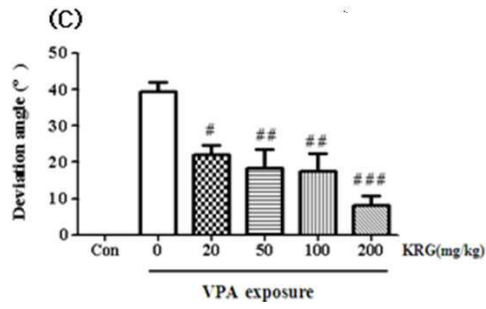
**도면1a**



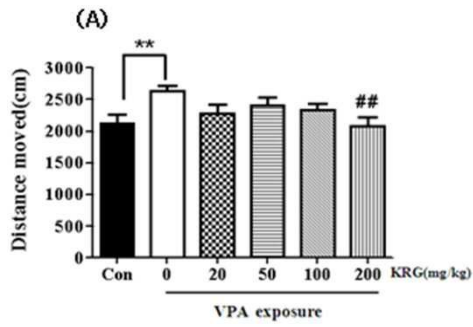
도면1b



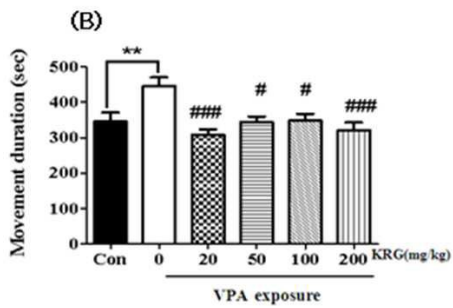
도면1c



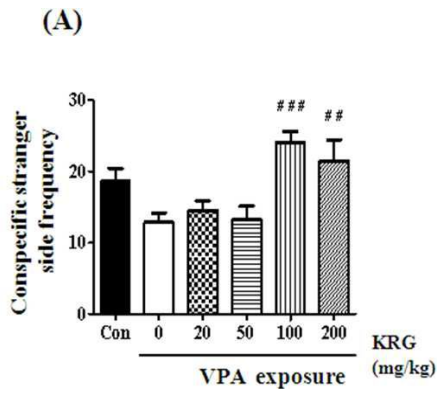
도면2a



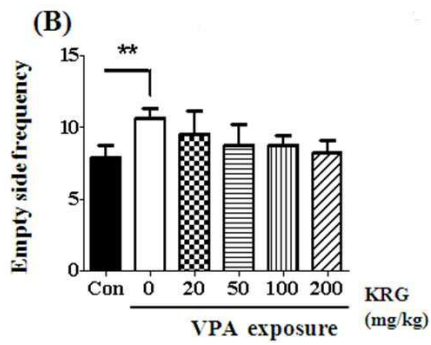
도면2b



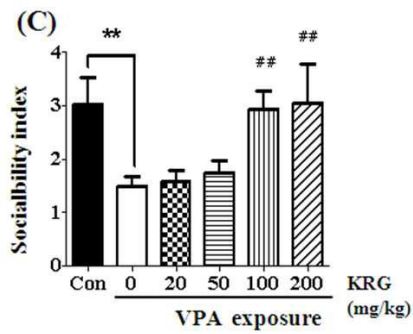
도면3a



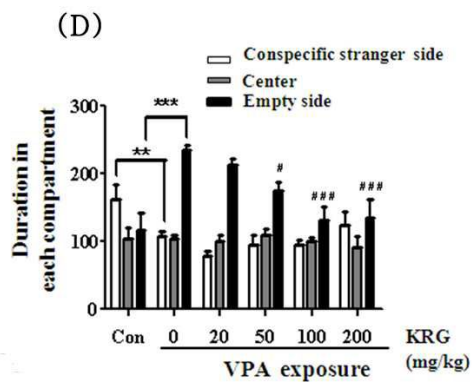
도면3b



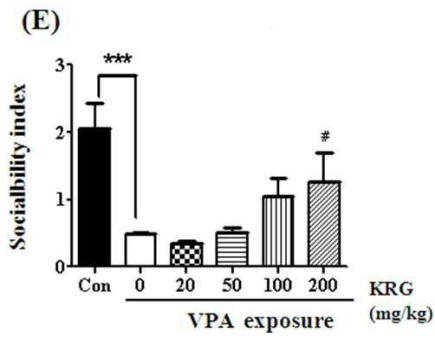
도면3c



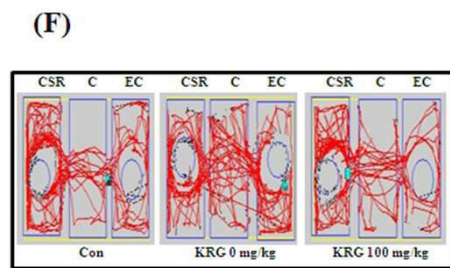
도면3d



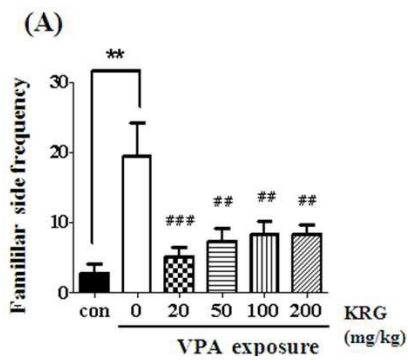
도면3e



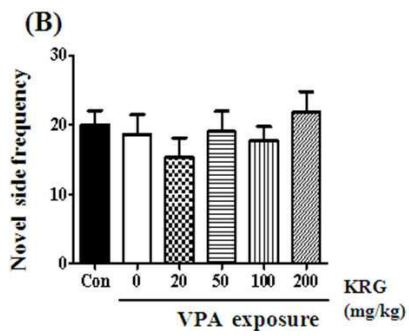
도면3f



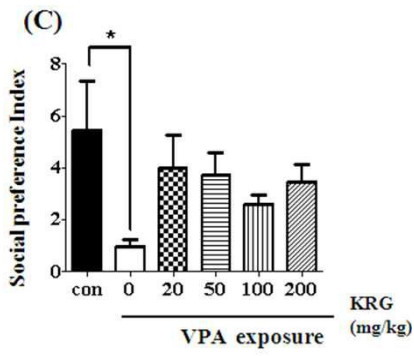
도면4a



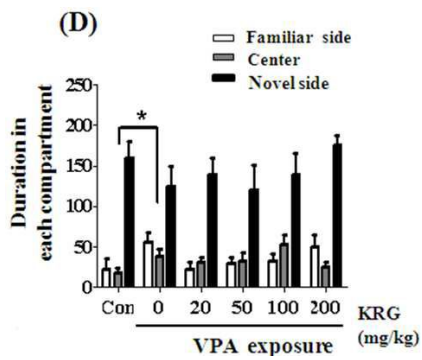
도면4b



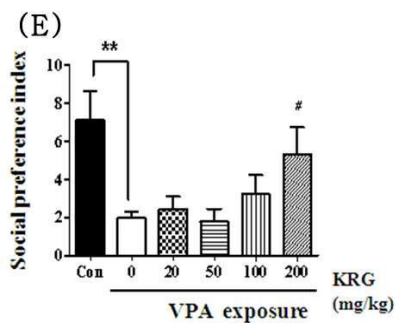
도면4c



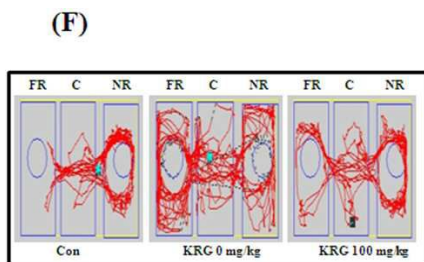
도면4d



도면4e

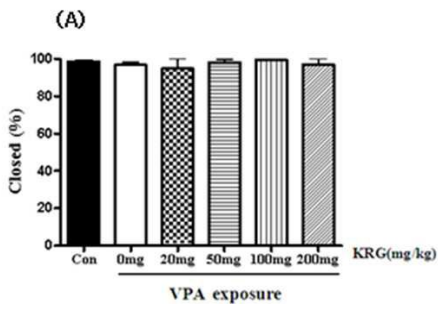


도면4f

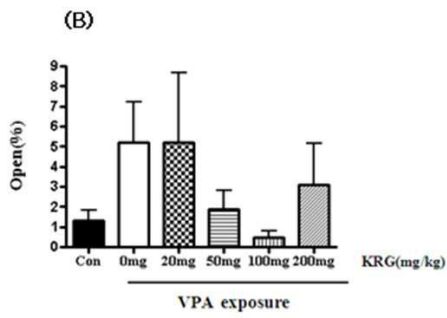




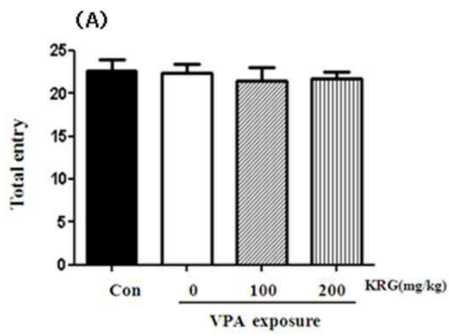
도면5a



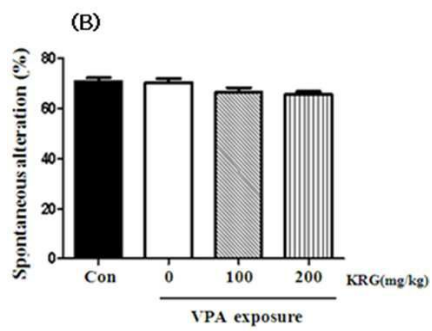
도면5b



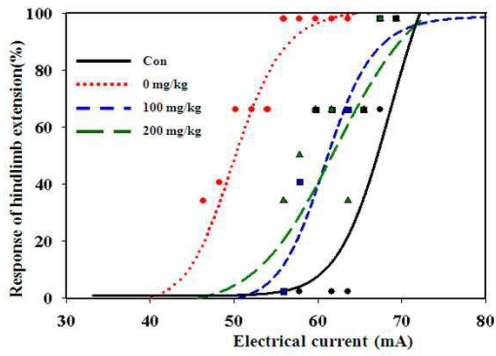
도면6a



도면6b



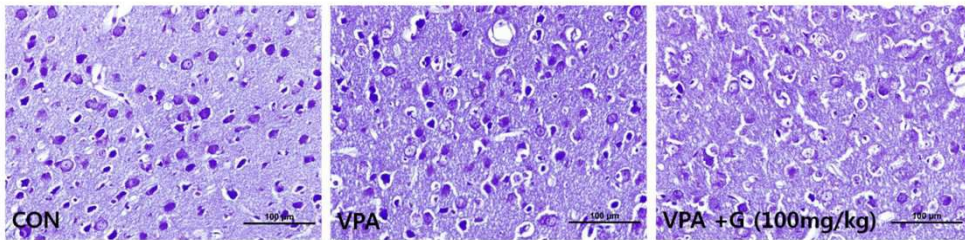
도면7



	Con	VPA exposure		
		KRG 0 mg/kg	KRG 100 mg/kg	KRG 200 mg/kg
CC50 (mA)	67.13±0.77	50.14±0.52	59.54±0.52	62.45±3.89

도면8a

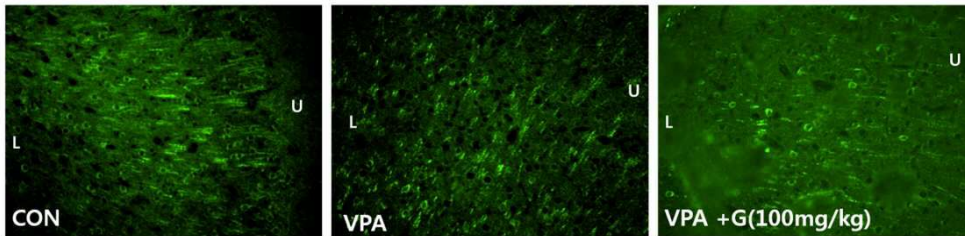
(A)



x 20

도면8b

(B)



x 20