



식품의약품안전처



**피부의 미백에 도움을 주는 기능성화장품  
유효성평가 가이드라인  
[민원인 안내서]**

**2020. 9.**



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

**바이오생약심사부 화장품심사과**

## 지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

피부의 미백에 도움을 주는 기능성화장품의 유효성평가 가이드라인(민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

<b>등록대상 여부</b>	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 : _____ )	
	<input type="checkbox"/> 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
<b>지침서·안내서 구분</b>	<input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
<b>기타 확인 사항</b>	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
<b>상기 사항에 대하여 확인하였음.</b>		
<b>2020년 9월 24일</b>		
<b>담당자 확 인(부서장)</b>		<b>김광제 장정운</b>

이 안내서는 피부의 미백에 도움을 주는 기능성화장품의 유효성평가에 대하여 알기쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식 (~하여야 한다 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2020년 9월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ “민원인 안내서”란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것 (식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전처식품의약품 안전평가원 바이오생약심사부 화장품심사과에 문의하시기 바랍니다.

담당부서	식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 화장품심사과
연락처	전화 : 043-719-3609, 3608, 3610, 3613 팩스 : 043-719-3600

## 제·개정 이력

피부의 미백에 도움을 주는 기능성화장품의  
유효성평가 가이드라인  
(민원인 안내서)

제·개정번호	승인일자	주요 내용
B1-2003-4-001	2003.11.	기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인 (제정)
B1-2015-4-004	2015.09.	시험방법 추가
안내서-0334-01	2017.05.01.	가이드라인 명칭 및 등록번호 변경
안내서-0334-02	2020.09.24.	가이드라인 명칭 변경 효력시험 추가

# 목 차

<b>1. 개요</b> .....	<b>1</b>
<b>2. 시험방법</b> .....	<b>2</b>
가. 효력시험 .....	2
(1) 타이로시나제 활성 저해시험 .....	2
제1법 체외 타이로시나제 활성 저해시험 .....	2
제2법 세포 내 타이로시나제 활성 저해시험 .....	3
(2) 세포 내 타이로시나제 mRNA 발현 저해시험 .....	5
(3) 체외 DOPA 산화반응 저해시험 .....	9
(4) 멜라닌 생성 저해시험 .....	10
나. 인체적용시험 .....	13
(1) 인공색소침착후 미백효과평가지험 .....	13
(2) 과색소침착증에서 미백효과평가지험 .....	19
<b>3. 결과보고</b> .....	<b>21</b>

## 1. 개요

가. 화장품법 제4조 제1항에 따라 기능성화장품으로 인정받아 판매 등을 하려는 화장품제조업자, 화장품책임판매업자 또는 총리령으로 정하는 대학 연구소 등은 품목별로 안전성·유효성에 관하여 식품의약품안전처장의 심사를 받거나 보고서를 제출하여야 한다.

### 나. 자료의 범위 및 요건

#### (1) 효력시험에 관한 자료

심사대상 효능을 포함한 효력을 뒷받침하는 비임상시험자료로서 효과발현의 작용기전이 포함되어야 하며, 다음 중 어느 하나에 해당하여야 한다.

(가) 국내·외 대학 또는 전문 연구기관에서 시험한 것으로서 당해 기관의 장이 발급한 자료(시험시설 개요, 주요설비, 연구인력의 구성, 시험자의 연구경력에 관한 사항이 포함될 것)

(나) 당해 기능성화장품이 개발국 정부에 제출되어 평가된 모든 효력시험자료로서 개발국 정부(허가 또는 등록기관)가 제출받았거나 승인하였음을 확인한 것 또는 이를 증명한 자료

(다) 과학논문인용색인(Science Citation Index 또는 Science Citation Index Expanded)에 등재된 전문학회지에 게재된 자료

#### (2) 인체적용시험자료

사람에게 적용 시 효능·효과 등 기능을 입증할 수 있는 자료로서, 관련분야 전문의사, 연구소 또는 병원 기타 관련기관에서 5년 이상 해당 시험경력을 가진 자의 지도 및 감독 하에 수행·평가되고, '효력시험에 관한 자료' (가) 및 (나)에 해당하여야 한다.

## 2. 시험방법

### 가. 효력시험

피부의 색을 결정짓는 멜라닌은 과도한 생성 또는 축적으로 인해 기미·주근깨 등의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 본 시험은 멜라닌의 생성 기전에 있어 주요한 역할을 하는 타이로시나제의 활성 저해, 타이로시나제 mRNA 발현 저해, DOPA 산화 활성저해, 또는 세포의 멜라닌 생성 저해정도를 시험함으로써 미백성분의 효과발현에 대한 작용기전을 설명할 수 있는 방법이다.

#### (1) 타이로시나제 활성 저해 시험(Tyrosinase inhibition assay)

타이로시나제는 인체 내 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도결정단계에 관여하는 효소로서, 이 효소의 활성 저해는 멜라닌 생성을 저해하는 결과를 나타낸다.

#### 제1법 : 체외 타이로시나제 활성 저해 시험(*In vitro* tyrosinase inhibition assay)

이 시험은 시험관내에서 시험시료, 정제된 타이로시나제 및 기질인 타이로신을 반응시켜 타이로시나제 활성 저해에 대한 시험시료의 효과를 평가하는 방법이다.

#### (가) 시험방법

시료는 에탄올이나 적당한 용매에 녹이고, 타이로시나제 활성 저해를 확인할 수 있는 농도범위를 설정하여 희석하되 최소 5개의 농도가 되도록 처리하고 시험시료의 농도는 구체적으로 명시한다. 시험관에 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5) 220  $\mu$ L, 시료액 20  $\mu$ L, 머쉬룸 타이로시나제액(1500 U/mL~2000 U/mL)(혹은 휴먼 타이로시나제) 20  $\mu$ L를 순서대로 넣는다. 이 액에 1.5 mM 타이로신액 40  $\mu$ L를 넣고 37  $^{\circ}$ C에서 10~15분 동안 반응시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 측정한다. 활성저해율이 50%일 때의 시료 농도(IC<sub>50</sub>)를 적절한 프로그램을 이용하여 산출한다. 시료액 대신 시료를 녹인 용매를

사용하여 공시료액으로 하여 보정한다. 양성대조군으로는 알부틴 또는 에칠아스코빌에텔 등을 사용하여 그 결과를 비교한다. 실험조건에 따라 시험방법의 변경은 가능하다.

$$\text{타이로시나제 활성저해율(\%)} = 100 - \frac{b - b'}{a - a'} \times 100$$

- a : 공시료액의 반응 후의 흡광도
- b : 시료액의 반응 후의 흡광도
- a', b' : 타이로시나제 대신 완충액으로 대체하여 측정된 흡광도

#### (나) 참고문헌

Ishihara Y., Oka M., Tsunakawa M., Tomita K., Hatori M., Yamamoto H., Kamei H., Miyaki T., Konishi M. and Oki T., Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. J. Antibiotics, **44**, 25. 1991.

#### 제2법 : 세포 내 타이로시나제 활성 저해시험 (Intracellular tyrosinase inhibition assay)

이 시험은 시험물질과 대조물질의 인간 유래 멜라닌 생성 세포의 타이로시나제 활성 억제정도를 비교하는 방법이다.

#### (가) 시험방법

##### 1) 세포주 선택 및 세포배양

사람 멜라노마 세포(Human Melanoma Cell, SK-MEL-2) 또는 이와 유사한 세포를 배양접시의 바닥에 접종하고 페니실린(100 IU/mL) 및 스트렙토마이신 (100 µg/mL) , 10% 소태아혈청(FBS)을 함유하는 RPMI1640(Roswell Park Memorial Institute) 배지 혹은 사용하는 세포에 적합한 배지를 선택하여 넣고 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 37°C를 유지하여 배양한다.



## 2) 검액의 조제

검액농도는 세포독성도(세포증식반응) 측정법(MTT assay) 등을 이용한 예비실험을 통하여 세포독성을 나타내지 않는 농도를 선택한다. 다만, 효력을 나타내는 농도 3개 이상을 선정하여 효력의 농도의존성을 확인할 수 있어야 한다. 시험물질을 녹이거나 희석시킬 때는 혈청이 함유되지 않은 RPMI1640배지를 사용한다.

다만 시험물질이 RPMI1640배지에 녹지 않는 경우에는 에탄올, 디메틸설폭사이드(DMSO)등 적당한 용매를 사용하여 녹인다.

### ※ 검액농도 설정 예비시험

- 세포독성도(세포증식반응)(MTT assay): 세포를 96-웰 플레이트(96-well plate)에 웰(well)당  $1 \times 10^4$ 개로 분주한 후 세포배양조건에서 24시간 배양한다.

배지를 버리고 인산완충생리식염수(PBS)로 세척한 다음 10% 소태아혈청(FBS)를 포함하지 않는 새로운 배지로 갈아주고 일정농도의 시험물질을 처리하여 세포를 24시간 배양한다.

세포독성도(세포증식반응)(MTT) 용액(0.5% 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)을 각 웰(well)에 넣고, 2시간 동안 배양한다. 배양액을 제거한 다음 디메틸설폭사이드(DMSO) 용액 150  $\mu$ L 씩을 넣고 충분히 흔들여 준 다음 마이크로플레이트 판독기(microplate reader)로 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

## 3) 조작

사람 멜라노마 세포(SK-MEL-2)를 60 mm 배양접시에  $6 \times 10^5$ 개로 접종하고 세포배양 조건에서 24시간 배양한다. 배지를 제거하고 세포를 인산완충생리식염수(PBS)로 세척한 다음 검액 및 새로운 배지를 넣고 24시간 배양한다. 배지를 제거한 후 세포를 인산완충생리식염수(PBS)로 세척한다. 배양된 세포는 회수하여 원심분리 후 상등액을 제거하고 펠렛(pellet)을 얻는다. 이 펠렛(pellet)에 1% 트리톤 X-100(Triton X-100)을 포함하는 10 mM 인산완충생리식염수(PBS)(pH 7.0) 100  $\mu$ L와 원심분리하여 얻어진 상등액 40  $\mu$ L를 96-웰 플레이트(96-well plate)에 혼합하여 37°C에서

반응시킨 뒤 마이크로플레이트 판독기(microplate reader)로 475 nm에서 흡광도를 측정한다. 세포 내 타이로시나제 활성은 시료를 녹인 용매를 처리한 공시료액의 결과와 비교한다. 양성대조군으로는 누룩산(kojic acid)등을 사용하여 그 결과를 비교한다. 실험조건에 따라 시험방법의 변경은 가능하다.

#### (나) 참고문헌

- 1) Basic studies on gene therapy of human malignant melanoma by use of the human interferon beta gene entrapped in cationic multilamellar liposomes. 1. Morphology and growth rate of six melanoma cell lines used in transfection experiments with the human interferon beta gene. *J Cell Mol Med*, 5, 402. 2011.
- 2) Melanin from epidermal human melanocytes: study by phrolytic GC/MS. *J Am Soc Mass Spectrom*, 20, 464. 2009.
- 3) Secretion of proinflammatory cytokines by normal human melanocytes in response to lipopolysaccharide. *Acta Biochim Pol*, 58, 507. 2011.
- 4) Inhibitory Effect of Morus alba Extracts on Tyrosinase Activity and Melanogenesis in SK-MEL-2 cells. *Kor J Aesthet Cosmetol*, 9, 1. 2011.
- 5) Screening of plant extracts for human tyrosinase inhibiting effects. *Int J Cosmet Sci*, 34, 202. 2012.
- 6) Effects of Rubus coreanus Miquel on the Expressions of Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16 Melanoma Cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 21, 1456. 2007.
- 7) Asiaticoside, a component of Centella asiatica, inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma. *Mol Med Rep*, 10, 503. 2014.

#### (2) 세포내 타이로시나제 mRNA 발현 저해 시험

이 시험은 멜라닌 생합성 경로에 관여하는 효소인 타이로시나제의 mRNA

발현 저해 효과를 평가하는 방법이다. 쥐 또는 사람 유래 멜라닌세포에 타이로시나제 mRNA 발현을 유도하고 시험 시료를 처리하여 타이로시나제 mRNA 발현 저해에 대한 시험 시료의 효과를 평가하는 방법이다.

## (가) 시험방법

### 1) 세포주 선택 및 세포배양

쥐 유래 흑색종 세포(Murin melanoma Cell(B16F10)) 또는 사람 유래 흑색종 세포(Human Melanoma Cell(SK-MEL-2))를 배양접시의 바닥에 접종하고 페니실린(100 IU/mL) 및 스트렙토마이신(100  $\mu$ g/mL), 10% 소태아혈청(FBS)을 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지 혹은 사용하는 세포에 적합한 배지를 선택하여 넣고 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 37  $^{\circ}$ C를 유지하여 배양한다.

### 2) 검액의 조제

본 시험의 검액 농도는 세포독성도(세포증식반응) 측정법(MTT assay) 등을 이용한 예비실험을 통하여 세포독성을 나타내지 않는 농도를 선택한다. 다만, 효력을 나타내는 농도 3개 이상을 선정하여 효력의 농도의존성을 확인할 수 있어야 한다. 시험물질을 녹이거나 희석시킬 때는 혈청이 함유되지 않은 DMEM 배지를 사용한다. 다만 시험물질이 DMEM 배지에 녹지 않는 경우에는 에탄올, 디메틸설폭사이드(DMSO)등 적당한 용매를 사용하여 녹인다.

#### ※ 검액농도 설정 예비시험

세포독성도(세포증식반응) 측정법(MTT assay): 세포를 96-웰 플레이트(96-well plate)에 웰(well)당  $1 \times 10^4$ 개로 분주한 후 세포배양 조건에서 24시간 배양한다. 배지를 버리고 인산완충생리식염수(PBS)으로 세척한 다음 10% 소태아혈청(FBS)를 포함하지 않는 새로운 배지로 갈아주고 일정농도의 시험물질을 처리하여 세포를 24시간 배양한다. 세포증식반응(MTT)용액(0.5% 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-2H-tetrazolium bromide액)을 각 웰(well)에 20  $\mu$ L씩 넣고, 2시간 동안 배양한다. 배양액을 제거한 다음 디메틸설폭사이드(DMSO)

용액 150  $\mu$ L씩을 넣고 충분히 흔들어 준 다음 마이크로플레이트 판독기 (microplate reader)로 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

### 3) 조작

쥐 유래 흑색종 세포(B16F10) 또는 사람 유래 흑색종 세포(SK-MEL-2)를 각각 6-웰 플레이트(6-well plate)에 웰(well)당  $7 \times 10^4$  및  $2 \times 10^5$ 개로 분주한 다음 세포배양조건에서 24시간 배양한다. 배지를 제거하고 세포를 인산완충생리식염수 (PBS)로 세척한 다음 타이로시나제 유도 물질로 알려진 알파-멜라노사이트 자극 호르몬( $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone) 또는 3-이소부틸-1-메틸산틴 (IBMX, 3-Isobutyl-1-methylxanthine)와 검액 및 새로운 배지를 넣고 48시간 배양한다. 음성대조군으로는 타이로시나제 억제 물질인 누룩산(kojic acid)을 48시간 동안 처리한다.

4) 실시간 중합효소연쇄반응(RT-qPCR)을 통한 타이로시나제 mRNA 발현 측정 배양된 세포를 회수하여 트리졸 1 mL로 용해한 후 클로로포름 200  $\mu$ L를 첨가하여 15분간 원심분리한 후 상층액을 따로 취한다. 상층액에 이소프로판올 200  $\mu$ L를 넣어주어 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 80% 에탄올을 첨가하여 5분간 원심분리 한다. 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시킨 후 디에틸피로카보네이트-중류수(DEPC-DW)로 펠렛(pellet)을 현탁시킨 후 분광광도기(spectrophotometer)를 이용하여 RNA를 정량한다. 정량된 RNA와 올리고 디티(oligo dT), 알티 프리믹스(RT PreMix) 및 디에틸피로카보네이트-중류수 (DEPC-DW)를 이용하여 상보적 DNA(cDNA)를 42  $^{\circ}$ C 60분, 94  $^{\circ}$ C 5분, 4  $^{\circ}$ C  $\infty$ 조건으로 합성한다. 합성된 상보적 DNA(cDNA)는 실시간 중합효소연쇄반응 마스터 믹스(Real time PCR Master Mix) 및 타이로시나제 택맨 프로브 (tyrosinase TaqMan probe)와 디에틸피로카보네이트-중류수(DEPC-DW)를 넣어 혼합하여 총 볼륨이 20  $\mu$ L가 되도록 한다. 95  $^{\circ}$ C 3분, 95  $^{\circ}$ C 15초, 60  $^{\circ}$ C 30초 39 cycle 조건에서 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-Time PCR) 장비를 사용하여 측정한다. 연쇄중합반응(PCR) 장비 및 사용 시약에 따른 세부 조건 변경은 가능하다.

※ 분석 방법

시험결과는 상대정량 분석 ( $\Delta\text{Ct}$ 값)을 통해 타이로시나제 mRNA 발현을 분석한다.

(나) 참고문헌

- 1) Chang, T.S., Chen, C.T. Inhibitory effect of homochlorcyclizine on melanogenesis in  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone-stimulated mouse B16 melanoma cells. *Arch Pharm Res.* Vol 35, No 1, 119-127 (2012)
- 2) Lv, N., Koo, J. H., yoon, H. Y., Yu, J., Kim, K. A., Choi, I. W, Kwon, K. B, Kwon, K. S, Kim, H. U, Park, J. W, Park, B. H. Effect of *Angelica gigas* extrat on melanogenesis in B16 melanoma cells. *Int J Mol Med* 20, 763-767 (2007)
- 3) Koo, J. H., Kim, H. T., Yoon, H. Y., Kwon, K. B., Choi, I. W., Jung, S. H., Kim, H. U., Park, B. H., Park, J. W. Effect of xanthohumol on melanogenesis in B16 melanoma cells. *Exp Mol Med* Vol 40, No. 3, 313-319 (2008)
- 4) JKoo, J. H., Rhee, K. S., Koh, H. W., Jang, H. Y., Park, B. H., Park, J. W. Guggulsterone inhibits melanogenesis in B16 murine melanoma cells by downregulating tyrosinase expression. *Int J Mol Med* 30, 974-978, (2012)
- 5) Mikami, M., Sonoki, T., Ito, M., Funasaka, Y., Suzuki, T., Katagata, Y. Glycosylation of tyrosinase is a determinant of melanin production in cultured melanoma cells. *Mol Med Rep* 8, 818-822 (2013)
- 6) Park, H. Y., Wu, C., Yonemoto L., Murphy-Smith, M., Wu, H., Stachur, C. M., Gilchrest, B. A. MITF mediates cAMP-induced protein kinase C-beta expression in human melanocytes. *Biochem J.* 395, 571-578 (2006)

### (3) 체외 DOPA 산화반응 저해시험(*In vitro* DOPA oxidation inhibition assay)

이 시험은 멜라닌 합성과정의 속도결정단계에 관여하는 타이로시나제의 DOPA 산화반응에 대한 활성 저해를 측정하여 미백성분의 효과를 평가하는 방법이다. 기질로서 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)를 사용한다.

#### (가) 시험방법

시료는 에탄올이나 적당한 용매에 녹이고, DOPA 산화반응에 대한 타이로시나제 활성 저해를 확인할 수 있는 농도범위를 설정하여 희석하되 최소 5개의 농도가 되도록 처리하고 시험시료의 농도는 구체적으로 명시한다. 시험관에 0.1 M 인산염완충액(pH 7.0) 850  $\mu$ L, 시료액 50  $\mu$ L, 머쉬룸 타이로시나제액(1500 U/mL~2000 U/mL)(혹은 휴먼 타이로시나제) 50  $\mu$ L를 순서대로 넣는다. 이 액에 0.06 mM L-DOPA액 50  $\mu$ L를 넣고 37  $^{\circ}$ C에서 반응시킨 다음 475 nm에서 흡광도를 측정한다. 활성저해율이 50%일 때의 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)를 적절한 프로그램을 이용하여 산출한다. 시료액 대신 시료를 녹인 용매를 사용하여 공시료액으로 하여 보정한다. 양성대조군으로는 알부틴 또는 에칠아스코빌에텔 등을 사용하여 그 결과를 비교한다. 실험조건에 따라 시험방법의 변경은 가능하다.

$$\text{DOPA 산화반응 저해율(\%)} = 100 - \frac{\text{각시료액의 반응흡광도}}{\text{공시료액의 반응흡광도}} \times 100$$

#### (나) 참고문헌

Kong K.H., Park S.Y., Hong M.P., Cho S.H., Expression and characterization of human tyrosinase from a bacterial expression system. *Comp. Biochem. Physiol.*, 125, 563. 2000.

Choi S.S., Noh H.S., Cho S.H., Kong K.H. Screening of inhibitors against tyrosinase activity from natural products. *Yakhak Hoeji*, 45, 522. 2001.

#### (4) 멜라닌 생성 저해시험

이 시험은 미백성분에 대한 세포의 멜라닌 생성 저해 효과를 평가하는 방법이다. 세포를 배양하여 세포 내 멜라닌의 양 또는 세포 내외의 총 멜라닌 양을 정량화하여 공시료액과 비교한다.

##### (가) 시험방법

###### 1) 세포주 선택 및 세포배양

murine melanoma (B-16 F1), Human epidermal melanocyte (HEM) 또는 이와 유사한 세포를 배양접시의 바닥에 접종하고 페니실린(100 IU/mL) 및 스트렙토마이신(100 µg/mL), 10% FBS (fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지 혹은 사용하는 세포에 적합한 배지를 선택하여 넣고 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 37 °C를 유지하여 배양한다.

###### 2) 검액의 조제

본 시험의 검액 농도범위는 MTT assay 등의 예비실험을 수행하여 세포독성이 나타나지 않는 농도로 설정하고, 효력을 확인하기 위한 3개 이상의 농도 범위를 결정한다. 시험시료를 녹이거나 희석시킬 때에는 혈청이 함유되지 않은 DMEM 배지 또는 세포 독성이 나타나지 않는 에탄올 등의 적당한 용매를 사용한다.

※ 검액농도 설정 예비시험

**MTT assay** : 일정농도의 시료를 넣어 세포를 배양한 다음 well에서 배지를 제거한다. PBS로 세척하고 MTT용액(3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-2H- tetrazolium bromide)을 넣어, 4시간 동안 배양한다. 배양액을 제거한 다음 DMSO (dimethylsulfoxide) 또는 isopropanol 300 µL씩을 첨가하고 10분간 흔들어 준 다음 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정한다.

###### 3) 조작

###### 가) 세포내의 멜라닌 양 측정방법

6-well plate에 well당  $1 \times 10^5$  개로 접종하고 세포배양조건에서 24시간

배양한다. 배지를 제거하고 세포를 PBS로 세척한 다음 검액 및 새로운 배지를 넣고 배양한다. 배지는 가급적 phenol red가 포함되지 않은 것을 사용하여 흡광도 측정에 영향을 미치지 않도록 한다. 배지에 a-MSH 또는 tyrosine을 처리하여 멜라닌 생성 과정을 촉진하게 할 수 있다. 배지를 제거하고 세포를 PBS로 세척한다. 회수된 세포는 hemacytometer를 이용하여 세포수를 측정한 다음 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet을 얻는다. 이 pellet에 1N 수산화나트륨용액 100  $\mu$ L 또는 적량의 cell lysis buffer를 넣고 60  $^{\circ}$ C 항온조에서 용해하고 원심분리한다. 상층액을 가지고 microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하고, 합성 멜라닌을 이용한 검량선으로 부터 멜라닌의 양을 구한다. 멜라닌 양은 세포일정수당 멜라닌 양 또는 일정단백질당 멜라닌 양으로 환산하고, 시료를 녹인 용매를 처리한 공시료액의 결과와 비교한다.

#### 나) 세포외의 멜라닌 양 측정방법

6-well plate에 well당  $1 \times 10^5$  개로 접종한 후 세포배양조건에서 24시간 배양한다. 배지를 제거한 세포를 PBS로 세척한 다음 검액 및 새로운 배지를 넣고 배양한다. 배지는 가급적 phenol red가 포함되지 않은 것을 사용하여 흡광도 측정에 영향을 미치지 않도록 한다. 세포 배지에 a-MSH 또는 tyrosine을 처리하여 멜라닌 생성 과정을 촉진하게 할 수 있다. 세포의 배지는 다른 용기에 옮기고, 남은 세포는 PBS로 세척한 후 회수하여 hemacytometer를 이용하여 세포수를 측정하거나, cell lysis buffer를 이용하여 단백질 양을 구한다. 배지는 490 nm에서 흡광도를 측정하고, 합성 멜라닌을 이용한 검량선으로 부터 멜라닌의 양을 구한다. 멜라닌 양은 세포일정수당 멜라닌 양 또는 일정단백질당 멜라닌 양으로 환산하고, 시료를 녹인 용매를 처리한 공시료액의 결과와 비교한다.

#### (나) 참고문헌

Eisinger M., Marko O., Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin.



*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2018. 1982.

Gordon P.R., Mansur C.P., Gilchrest B.A., Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J. Invest. Dermatol.*, 92, 565. 1989.

Peter S., Barbara A., Gilchrest B.A., Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *J. Cellular physiology*, 133, 88. 1987.

Imokawa G., Yada Y., Miyagishi N., Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J. Biol. Chem.*, 267, 24675. 1992.

Matsuda H., Kawaguchi Y., Yamazaki M., Melanogenesis Stimulation in Murine B16 Melanoma Cells by Piper nigrum Leaf Extract and Its Lignan Constituents. *Biol. Pharm. Bull.*, 27(10), 1611. 2004.

Ando H., Niki Y., Ito M., Matsui MS., Yarosh DB., Ichihashi M., Melanosomes Are Transferred from Melanocytes to Keratinocytes through the Processes of Packaging, Release, Uptake, and Dispersion. *J. Invest. Dermatol.*, 132(1222), 1611. 2012.

## 나. 인체적용시험자료

### (1) 인공색소침착후 미백효과평가지험(Efficacy evaluation on induced pigmentation)

피험자수는 통계적 비교가 가능하기 위해 20명 이상의 유효데이터를 확보하도록 하며, 대조군을 사용시 이중맹검법을 원칙으로 한다.

#### (가) 광원

- 1) 일반적으로 자연색소침착에 관여하는 자외선 B를 방출하는 기기 및 자외선 A와 자외선 B를 포함하여 방출하는 기기를 사용할 수 있다.
- 2) 광원으로는 태양광과 유사한 연속적인 방사스펙트럼을 갖고 특정피크를 나타내지 않은 Xenon arc lamp를 장착한 Solar simulator 또는 이와 유사한 광원을 사용한다. 이 때 290 nm 이하의 파장은 적절한 필터를 사용하여 제거한다. 광원은 시험 기간 동안 일정한 광량을 유지해야 한다.

#### (나) 최소홍반량 측정

최소홍반량측정을 위한 조사부위는 시험부위와 동일한 부위로 한다. 조사부위에 과도한 털, 색조가 특별히 차이가 있는 부분을 피하고 깨끗하고 마른 상태를 조사부위로 한다.

피험자의 피부유형은 설문을 통하여 조사하고 이를 바탕으로 예상되는 최소홍반량을 결정한다. 시험부위를 구획하고, 피험자가 편안한 자세를 취하도록 한 다음 자외선을 조사한다. 자외선을 조사하는 동안에 피험자가 움직이지 않도록 한다. 조사가 끝난 후 16~24 시간 사이에 피험자의 홍반상태를 판정한다. 홍반은 충분히 밝은 광원하에서 복수의 숙련된 사람이 판정한다. 전면에 홍반이 나타난 부위에 조사한 자외선 B의 광량 중 최소량을 최소홍반량으로 한다.

#### (다) 자외선 조사부위

시험부위는 등 상부, 하부 또는 복부, 허벅지, 상완, 하완 내측에서 선택한다.

#### (라) 색소 침착 야기 (자외선 조사)

- 1) 일률적으로 2~3 MED를 조사하는 방법

2) 개개인의 흑화 정도를 고려하여 광량을 분산시키는 방법

예) 1일째 자외선 조사량은 피험자의 1 MED에 상당하는 자외선량을 조사한다. 이때, 자외선이 균일하게 조사되었는지를 확인하고 위치의 편평화가 잘 안된 경우 2일째는 1.25 MED를 개인의 상태를 고려하여 조사한다. 3일째 다시 자외선이 균일하게 조사되었는지를 확인하고 1.5 MED에 상당하는 자외선량을 조사할 수 있다. (단, 3일째의 자외선 조사전에 시험자가 시험부위를 관찰하여, 홍반의 정도가 심하다(다음날 부종(浮腫)을 일으킬 것 같다)고 판단한 경우는, 3일째의 자외선조사량을 1.5 MED 이하로 변경하여 조사할 수 있다.)

(마) 시료 도포

1) 시료군 및 대조군 도포

2) 시료 도포 전후 비교

횃수는 아침 저녁 2회를 원칙으로 하되, 실험시료의 효능 및 이상반응을 고려하여 도포 횃수 및 도포 총량을 결정할 수 있다.

(바) 시험부위의 평가

1) 시험장소

측정하는 방은 공기의 이동이 없고 직사광선이 없으며 항온항습 조건이며 밀폐된 방에서 최소 15분간 이상 피부 안정을 취한 다음 시험한다.

2) 측정

㉠ 육안평가

㉡ 육안상대평가: 피험자에 대한 2인 이상의 전문가 육안평가

예) 대조군

Bright & Clear(밝고 깨끗함)					Dark & Dull(어둡고 칙칙함)				
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

시료군

Bright & Clear(밝고 깨끗함)					Dark & Dull(어둡고 칙칙함)				
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

㉢ 사진촬영

사진촬영은 매회 같은 조건에서 실시하고, 디지털카메라 사용시 원본 또는 원본과 동일함을 입증할 수 있어야 한다.

예) 카메라를 이용하여 시험부위가 동일 시야에 들어오도록 앵글(angle)을 고정시키고, 스트로보를 사용하여 피험자를 확인할 수 있는 원거리촬영과 근접촬영을 시행한다. 또한, 시험부위와 렌즈의 거리가 매회 같아지도록 피험자와 카메라의 위치를 고정한다.

㉔ 기기평가

- ㉑ Colorimeter
- ㉒ Spectrophotometer
- ㉓ Mexameter

예) Spectrophotometer를 사용하여 제품사용 후 0, 2, 4, 6, 8주째에 시험부위 및 소정의 비조사부위의 L\*a\*b\* 수치를 각 부위 마다 3회씩 측정하여, 그 평균치를 측정일의 L\*a\*b\*로 하여 총 12회 측정한다.

자외선 조사 종료(흑화 확인) 7~10일 후 (제품사용 0주)

자외선 조사 종료(흑화 확인) 3 주 후 (제품사용 2주)

자외선 조사 종료(흑화 확인) 5 주 후 (제품사용 4주)

자외선 조사 종료(흑화 확인) 7 주 후 (제품사용 6주)

자외선 조사 종료(흑화 확인) 9주 후 (제품사용 8주)

㉕ 설문평가

설문 조사를 시행하여 주관적인 호전 정도를 변화 없음(no change), 조금 호전되었음(improved), 매우 호전되었음(much improved)으로 척도를 정해 평가한다.

(사) 피험자 선정방법

20세 ~ 60세의 성인 남녀 중에서 다음 1)항의 기준에 만족하며 2)항에 해당되는 사항이 없는 사람을 피험자로 선정한다.

주시험자는 “(자) 주시험자가 피험자에게 알려주어야 할 사항”을 피험자에게 설명하고, 피험자는 자의에 따라 ‘시험 참가 동의서’를 작성하고 실험에

참가한다.

1) 선정기준

- 가) “(자) 주시험자가 피험자에게 알려주어야 할 사항”에 대하여 충분히 설명을 듣고 자발적으로 시험 참가 동의서를 작성하고 서명한 자
- 나) 피부 질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자
- 다) Fitzpatrick 피부유형 분류기준표에 따라 유형 II, III, IV에 해당하는 자

Fitzpatrick의 피부유형 분류 기준표

유형	설명
I	항상 쉽게(매우 심하게) 붉어지고, 거의 검게 되지 않는다.
II	쉽게(심하게) 붉어지고, 약간 검게 된다.
III	보통으로 붉어지고, 중간 정도로 검게 된다.
IV	그다지 붉어지지 않고, 쉽게 검게 된다.
V	거의 붉게 되지 않고, 매우 검게 된다.
VI	전혀 붉게 되지 않고 매우 검게 된다.

2) 선정제외 기준

지원자와의 면담에 의하여 다음 사항에 해당되는 사람은 피험자에서 제외시킨다.

- 가) 임신 또는 수유중인 여성과 임신 가능성이 있는 여성
- 나) 광알레르기 또는 광감작의 병력이 있는 자
- 다) 피부 질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 1개월 이상 사용하는 자
- 라) 동일한 실험에 참가한 뒤 6개월이 경과되지 않은 자
- 마) 민감성, 과민성 피부를 가진 자
- 바) 광선 조사부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 자
- 사) 연구 시작 전 3개월 내에 연구 부위에 동일 또는 유사한 화장품 또는 의약품을 사용한 자

- 아) 피부 미백효과를 표방하는 의약품 또는 식품을 섭취하는 자
- 자) 그 외 주시험자의 판단으로 실험에 부적합하다고 생각되는 자

### 3) 중도탈락기준

상기 기준에 의하여 선정된 피험자라 할지라도 모든 자외선 조사 부위에 소양감이나 홍반 등의 이상반응이 발생하는 경우에는 실험 진행 중 주시험자와 연구원의 판단 하에 제외시키며, 이는 실험 결과 산정에서 제외시킨다.

또한, 피험자가 실험 진행과정 중 시험부위에 과도한 자외선 노출을 하거나 지나친 음주, 흡연 등으로 정확한 홍반량 평가에 장애가 발생할 경우, 이외에 피험자가 실험 진행 과정 중 개인사정에 의해 추적관찰이 어려운 경우 주시험자와 연구원의 판단 하에 제외시키며, 이는 실험 결과 산정에서 제외시킨다.

### 4) 정보의 비밀 유지와 성실 의무

가) 본 실험에 참여한 피험자의 비밀은 보장된다. 단, 의학적인 목적에 의해서 피험자의 신원이 밝혀지지 않는 범위에서 시험자료가 이용될 수 있다.

나) 피험자는 실험이 종료될 때까지 본 실험을 통해 얻은 정보에 대해 비밀을 유지해야 한다.

다) 본 실험에 참여하는 피험자는 성실하고 정직하게 자료를 작성한다.

### (아) 인체 실험 진행 규정

- 1) 시험자는 실험 진행 동안 피험자의 안전에 최선을 다해야하며, 예측 가능한 이상반응 이외의 이상반응 발생시 신속하고 적절한 조치를 취하여 그 이상반응을 최소화 하여야 한다.
- 2) 시험자는 실험 진행 중 도포된 시료에 의해 피부 자극이 발생하는 경우에는 즉시 도포된 시료를 닦아내고, 증상이 호전되지 않을 경우 피험자가 피부과적 평가와 적절한 치료를 받을 수 있도록 한다.
- 3) 과도한 자외선 조사에 의하여 피부 표면에 수포가 발생할 정도의 홍반 반응이 발생할 경우, 시험자는 피험자가 피부과적 평가와 적절한 치료를

받을 수 있도록 한다.

- 4) 기타 비정상적인 피부 반응이 발생할 경우, 시험자는 피부과적 평가와 함께 적절한 조치를 취하며 증례 및 상황에 대하여 상세히 기록을 한다.

**(자) 주시험자가 피험자에게 알려주어야 할 사항**

1) 실험에 관한 일반적인 주지사항

시험자는 피험자들에게 본 실험의 목적과 방법, 기대 이득 효과와 실험으로부터 야기될수 있는 소양증 및 탈색소침착 등의 이상반응, 실험기간 종료와 동시에 즉시적인 실험군에서의 탈퇴, 본인의 실험 거부 또는 탈퇴로 다른 불이익을 받지 않게 됨을 확인하고 실험시료로 인한 모든 이상반응의 발생 가능성과 만일 이상반응 발생시 중도탈락 및 치료 등의 다른 조치가 고려될 수 있음에 대하여 충분히 설명한다.

2) 시료의 개수

시료군 및 시료군에서 유효성분이 없는 기제를 대조군으로 하여 시험하며, 시료가 2개 이상인 경우에는 시험자는 편의상 각 기제에 번호를 정한후 이중맹검법을 사용하여 피험자가 성분과 시료번호와의 관계를 알 수 없도록 한다.

3) 피험자의 주의사항

- 가) 시험부위를 햇빛에 노출시키지 말 것
- 나) 시료간 혼동하여 도포하지 말 것
- 다) 시료 도포를 거르지 말 것

**(차) 이상반응 평가**

이상반응 평가는 매회 피험자가 방문할 때 마다 문진과 육안으로 이상반응(Erythema(홍반), Edema(부종), Scaling(인설생성), Itching(가려움), Stinging(자통), Burning(작열감), Tightness(뻣뻣함), Prickling(따끔거림)) 및 다른 이상이 발생하는지 평가한다. 자극 증세 혹은 증상은 없었는지, 약한 정도인지, 중간 정도인지, 심한지 구분하여 증례기록서(CASE REPORT FORM)에 기록한다. 실험중지 또는 탈락사항이 발생하는 경우 증례기록서에 기입하고, 방문하는 날이 아니더라도 실험에 더 이상 참가 할 수 없게 되는

경우는 본인의 서명이 첨부된 “실험참가 포기동의서”를 쓰도록 한다.

#### (카) 통계분석 방법

통계적 분석은 SPSS등 통계처리 프로그램을 이용하여 기술적 통계분석을 실시하며 통계적 유의수준은  $p < 0.05$ 로 정하는 것을 원칙으로 한다.

### (2) 과색소침착증에서 미백효과평가지험(Efficacy evaluation on hyper melanosis)

피험자 수는 통계적 비교가 가능하게 하기 위해 20명 이상의 유효데이터를 확보하도록 하며, 대조군을 사용하는 경우 이중맹검법을 원칙으로 한다.

#### (가) 시험부위의 위치 설정

얼굴 좌우측을 절반으로 나누어 시료와 대조군을 도포한다. 또한 선정한 시험부위를 다음 평가시 정확히 인식하기 위하여 비닐종이 등을 얼굴에 대고 눈, 코, 입등의 위치를 표시한 다음 시험부위를 표시하여 다음 평가때 동일한 부위를 가지고 평가하도록 한다.

#### (나) 시료 도포

1) 시료군 및 대조군 도포

2) 시료 도포 전후 비교

횡수는 아침 저녁 2회를 원칙으로 하되, 실험시료의 효능 및 이상반응을 고려하여 도포 횟수 및 도포 총량을 결정할 수 있다.

#### (다) 시험부위의 평가, 인체 실험 진행 규정, 주시험자가 피험자에게 알려주어야 할 사항, 이상반응 평가, 통계분석 방법

인공색소침착 후 미백효과평가지험에 따른다.

#### (라) 피험자 선정방법

20세 ~ 60세의 성인 남녀 중에서 다음 1)항의 기준에 만족하며 2)항에 해당되는 사항이 없는 사람을 피험자로 선정한다.

주시험자는 인공색소침착후 미백효과평가지험의 “(자) 주시험자가 피험자에게 알려주어야 할 사항”을 피험자에게 설명하고, 피험자는 자의에 따라 ‘시험 참가 동의서’를 작성하고 실험에 참가한다.



1) 선정기준

가) 과색소침착증상으로 판단되는 자

나) “(자) 주시험자가 피험자에게 알려주어야 할 사항”에 대하여 충분히 설명을 듣고 자발적으로 ‘시험 참가 동의서’를 작성하고 서명한 자

다) 피부 질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자

2) 선정제외 기준, 실험 진행 중 제외 기준, 정보의 비밀 유지와 성실 의무

인공색소침착후 미백효과평가지험에 따른다.

(3) 참고문헌

Suzuki I., Kato T., Motokawa T., Tomita Y., Nakamura E., Katagiri T., Increase of pro-opiomelanocortin mRNA prior to tyrosinase, tyrosinase-related protein 1, dopachrome tautomerase, Pmel-17 /gp100, and P-protein mRNA in human skin after ultraviolet B irradiation. *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 73. 2002.

Stamatas S., Zmudzka B., Kollias N., Beer J., Non-Invasive Measurement of skin pigmentation in situ. *Pigment Cell Res.*, **17**, 618. 2004.

Talor S., Westerhof W., Im S., Lim J., Noninvasive techniques for the evaluation of skin color. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **54**, S282. 2006.

### 3. 결과보고

#### 가. 보고서 제목(시험기관, 기관장 직인)

#### 나. 시험기관

- (1) 의뢰자, 시료명(또는 처방), 시험항목, 시험책임자, 연구원의 구성
- (2) 시험자
  - (가) 시험책임자  
관련분야 전문의사, 연구소 또는 병원 기타 관련기관에서 5년 이상 해당 시험경력을 가진 자
  - (나) 연구원  
시험자의 성명, 생년월일, 학력, 직위, 근무년수, 연구경력, 발표논문
- (3) 시험자의 연구경력(관련분야 경력을 상세하게 기록)
- (4) 시설 및 장비 개요: 대학 또는 연구기관 등 국내외 전문기관(연구기관의 시험시설개요, 주요설비 등이 기재되어 있어야 함)

#### 다. 시험방법

- (1) 피험자 관리
  - (가) 피험자 개개인에 대한 세부사항 기재(피부형 및 피부상태 포함)
  - (나) 피험자 선정 및 제외 기준
  - (다) 이상반응을 포함한 안전성의 평가 및 보고방법
  - (라) 피험자의 중지 및 탈락에 대한 기준설정
  - (마) 시험기간 종료시 지급되었던 시험제품에 대한 수거 및 순응도 확인절차 이행
- (2) 연구대상 및 방법
  - (가) 대조군을 사용시 이중맹검법
  - (나) 세부적인 프로토콜(측정시간, 사용기기, 통계처리방법, 대조군설정)

#### 라. 결과

- (1) 세부연구결과(이상반응 모니터링결과, 시료군과 대조군의 시험결과(평균, 표준편차 등), 통계처리결과
- (2) 시험결과: 결과 및 시험책임자의 소견
- (3) 첨부물(개인별 시험자료(증례기록서, 시험측정치 및 이상반응 여부 포함), 설문평가자료 등)

#### 마. 결과 종합하는 방법

전문가 육안 평가, 기기 평가, 피험자 평가 등을 요약하고 상호 상관 관계를 기술한다.

### 4. 용어해설

- 이중맹검(double blind) : 시험하는 사람이나 시험에 참여한 사람 모두 어떤 것이 시료군이고 어떤 것이 대조군인지 모르는 상태
- 과색소침착증상 : 얼굴에 생기는 불규칙한 모양의 반점으로 기미, 주근깨등이 이에 속한다. 주로 여성에서 발생되며 임신, 에스트로겐 복용, 자외선 노출, 가족력, 갑상선기능이상, 화장품, 광독성약물, 항간질성약제 등과 연관이 있다.
- 최소홍반량 : 자외선조사 후 조사영역의 거의 대부분(2/3이상)에 홍반이 생기는 최소 자외선 조사량