



식품의약품안전처



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

2020. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

**바이오생약심사부 화장품심사과**

## 지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

피부의 주름개선에 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.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2020년 9월 24일		
담당자 확 인(부서장)		김광제 장정운

이 안내서는 피부의 주름개선에 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 8월 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 주름개선에 도움을 주는 기능성화장품의  
유효성평가 가이드라인  
(민원인 안내서)

제·개정번호	승인일자	주요 내용
BI-2008-4-001	2005.07.	기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인 II 제정 (주름개선)
안내서-0329-01	2017.05.01.	가이드라인 명칭 및 등록번호 변경
안내서-0329-02	2020.09.24.	가이드라인 명칭 변경 시험방법 추가

# 목 차

<b>I. 서론</b> .....	<b>1</b>
<b>II. 유효성 또는 기능을 입증하는 자료</b> .....	<b>2</b>
1. 개요 .....	2
2. 시험방법 .....	2
가. 효력시험자료 .....	2
(1) 세포내 콜라겐 생성시험 .....	3
(2) 세포 내 콜라게나제 활성 억제시험 .....	8
(3) 엘라스타제 활성 억제시험 .....	13
나. 인체적용시험 .....	16
(1) 피부주름의 측정 평가 .....	16
3. 결과보고 .....	22
4. 용어해설 .....	23

# I. 서론

## 1. 배경

- 가. 화장품산업의 과학화, 국제화가 급속하게 추진되고 있어 기능성화장품과 관련한 과학적이고 효율적인 평가방법에 대한 가이드라인이 요구됨
- 나. 2003년 국제심포지엄과 기능성화장품안전성관리사업의 연구결과를 토대로 주름 개선에 도움을 주는 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인(안)을 도출하였으며 화장품과 관련된 학계, 업계, 연구기관 전문가들의 의견을 반영하여 가이드라인 제정
- 다. 2020년 화장품 효력평가법 연구사업의 연구결과 및 심사사례 등을 토대로 주름 개선에 도움을 주는 기능성화장품의 유효성평가에서 활용 가능한 시험방법을 추가하고자 함

## 2. 목적

- 가. 평가방법의 과학적 타당성, 객관성, 투명성을 확보하고, 평가기술의 수준을 향상시켜 주름개선 기능성화장품의 효능을 확보함으로써 국민 보건향상에 기여함
- 나. 과학적이고 체계적인 연구기반을 조성하여 화장품산업 발전에 도움을 주고자 함
- 다. 기능성화장품의 유효성 평가 및 기능성화장품의 제조·수입을 위한 기능성화장품 심사서류 작성에 도움을 줌으로써 민원인의 편의를 도모하고자 함

## II. 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품의 유효성 또는 기능을 입증하는 자료

### 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. 제출자료의 범위 및 요건 (「기능성화장품 심사에 관한 규정」 제5조 발췌)

#### (1) 효력시험에 관한 자료

심사대상 효능을 포함한 효력을 뒷받침하는 비임상 시험자료로서 효과발현의 작용기전이 포함되어야 하며, 다음 중 어느 하나에 해당할 것

(가) 국내외 대학 또는 전문 연구기관에서 시험한 것으로서 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 적용시 효능·효과 등 기능을 입증할 수 있는 자료로서, 관련분야 전문의사, 연구소 또는 병원 기타 관련기관에서 5년 이상 해당 시험경력을 가진 자의 지도 및 감독하에 수행·평가되고, 효력시험에 관한 자료의 (가) 및 (나)항에 해당할 것

## 2. 시험방법

### 가. 효력시험자료

피부주름의 발현과 연관성이 있는 ‘콜라겐’, ‘엘라스틴’의 생성, 분해, 활성화 정도를 실험하는 방법이다.

## (1) 세포내 콜라겐 생성시험(Collagen synthesis assay)

### (가) 효소면역측정법(ELISA법, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)을 통한 콜라겐양 측정법

이 시험방법은 섬유아세포(fibroblast) 배양 시 시료의 세포내 콜라겐 생성 증가 정도를 효소면역측정법(ELISA법, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법으로 측정하는 것이다.

#### 1) 세포주 선택 및 세포배양

사람섬유아세포(Human dermal fibroblast) 또는 이와 유사한 세포를 배양 접시의 바닥에 접종한 후 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 µg/mL), 10% 소태아혈청(FBS, fetal bovine serum)을 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지 혹은 동등 이상의 성장력을 갖는 배지를 넣고 37°C를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양한다.

#### 2) 검액의 조제

본 시험의 검액 농도는 세포독성도(세포증식반응) 측정법(MTT assay) 등을 이용한 예비실험<sup>주1)</sup>을 통하여 세포독성이 나타나지 않는 농도를 선택한다. 효력을 나타내는 농도를 3개 이상을 선정하여 효력의 농도 의존성을 확인할 수 있어야 한다. 시험물질을 녹이거나 희석시킬 때는 혈청이 함유되지 않은 DMEM 배지를 사용한다. 다만 시험물질이 DMEM 배지에 녹지 않는 경우에는 에탄올 등 적당한 용매를 사용하여 녹인다. 실험결과에 신뢰도 향상을 위하여 형질전환증식인자-β(TGF-β) 등 양성대조 물질을 사용한다.

##### 주1) 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, phosphate buffered saline)으로 세척한 다음 소태아혈청(FBS)을 포함하지 않는 새로운 배지로 갈아주고 일정농도의 시험물질을 처리하여 세포를 24시간 배양한다. 세포독성도(세포증식반응)(MTT)용액 (0.5% 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-2H-tetrazolium bromide액)을 각 웰(well)에 넣고,

2시간 동안 배양한다. 배양액을 제거한 다음 디메틸설폭사이드(DMSO) 용액 150  $\mu\text{L}$ 씩을 넣고 충분히 흔들어 준 다음 마이크로플레이트 판독기 (microplate reader)로 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

### 3) 조작

섬유아세포를 48-웰 플레이트(well plate)에 웰(well)당  $5 \times 10^4$  개로 분주한 다음 세포배양조건에서 24시간 배양한다. 배지를 버리고 10 % 인산완충생리식염수 (PBS, phosphate buffered saline)로 세척한 다음 검액 및 새로운 배지를 넣고 24시간 배양한다. 배양액을 취하여 콜라겐 양을 측정한다.<sup>주2)</sup> 측정된 콜라겐 양은 로우리법(Lowry assay)<sup>주3)</sup> 등으로 구한 총 콜라겐 양으로 보정한다. 정확도와 정밀도 향상을 위하여 세부조작조건의 변경은 가능하다.

#### 주2) 콜라겐양 측정

Antibody-PoD conjugate solution 100  $\mu\text{L}$ 를 well에 넣은 다음 1/5로 희석한 배양액 및 표준액 20  $\mu\text{L}$ 를 넣고 37°C에서 3시간 배양한다. well에서 배양액을 제거한 다음 인산완충생리식염수(PBS, phosphate buffered saline) 400  $\mu\text{L}$ 로 4회 씻는다. 발색시약 100  $\mu\text{L}$ 를 넣고 상온에서 15분간 배양하고 1 N 황산 100 $\mu\text{L}$ 을 넣은 다음 450nm에서 효소면역측정기(ELISA reader)로 측정한다.

- a) 표준액조제 : 콜라겐표준품에 물을 넣어 녹여 각각 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640ng/mL가 되도록 희석한다.
- b) 시약 : Procollagen type I peptide EIA kit (Takara Biomedical Co.) 또는 이와 동등한 키트 사용

#### 주3) 로우리법(Lowry assay)

소혈청알부민(Bovine serum albumin) 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100  $\mu\text{g}$ 씩을 각각의 시험관에 넣고, D시액 2 mL씩을 추가한다. 상온에서 10분간 방치한 다음 폴린페놀(folin-phenol) 시액 0.2 mL씩을 각각 넣고 혼합한 다음 상온에서 30분간 방치하여 각각의 표준액으로 한다. 배양액을 가지고 표준액과 동일하게 조작하여 검액으로 한다. 검액 및 표준액을 가지고 600 nm에서 흡광도를 측정하여 표준액으로부터 얻은 검량선으로부터 검액의

단백질량을 측정한다.

- A시액 : 2 % 무수탄산나트륨 · 0.1 N 수산화나트륨 용액
- B시액 : 1 % 주석산칼륨나트륨 용액
- C시액 : 0.5 % 황산동 용액
- D시액 : A시액 · B시액 · C시액 혼합액(48:1:1)
- 폴린페놀시액 : 2 N 폴린페놀 · 물 혼합액(1:1)

**(나) 실시간 중합효소연쇄반응(RT-qPCR, Real-time polymerase chain reaction)을 통한 콜라겐 mRNA 발현 측정법**

이 시험방법은 섬유아세포(fibroblast) 배양 시 시료의 세포내 콜라겐 mRNA 발현 정도를 실시간 중합효소연쇄반응(RT-qPCR, Real-time polymerase chain reaction) 방법으로 측정하는 것이다.

**1) 세포주 선택 및 세포배양**

위 ‘(가)’와 동일

**2) 검액의 조제**

위 ‘(가)’와 동일

**3) 조작**

섬유아세포를 6-웰 플레이트(6-well plate)에 웰(well)당  $2 \times 10^5$ 개로 분주한 다음 세포배양조건에서 24시간 배양한다. 배지를 버리고 인산완충생리식염수(PBS, phosphate buffered saline)로 세척한 다음 검액 및 양성대조군을 소태아 혈청(FBS, fetal bovine serum)을 포함하지 않는 새로운 배지에 넣고 24시간 배양한다. 세포를 취하여 RNA를 추출한 후 정량하고 실시간 중합효소연쇄반응(RT-qPCR, Real-time polymerase chain reaction)을 통한 콜라겐 mRNA 발현을 측정한다.<sup>주)</sup> RNA 정량은 분광 광도계를 이용하여 정량한다. 정확도와 정밀도 향상을 위하여 세부 조작조건에 변경은 가능하다.

주) 콜라겐 mRNA 발현 측정

배양된 세포를 회수하여 트리졸 1 mL로 용해 한 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 원심분리한다. 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시킨 후 디에틸 피로카보네이트-증류수(DEPC-DW, diethyl pyrocarbonate-distilled water)로 펠릿(pellet)을 현탁 시킨 후 분광 광도계를 이용하여 RNA를 정량한다. 정량된 RNA와 올리고 디티(oligo dT), 알티 프리믹스(RT PreMix) 및 디에틸피로카보네이트-증류수(DEPC-DW, diethyl pyrocarbonate-distilled water)를 이용하여 상보적DNA(cDNA)를 42  $^{\circ}$ C 60분, 94  $^{\circ}$ C에서 5분, 4  $^{\circ}$ C에서  $\infty$ 조건으로 합성한다. 합성된 상보적DNA(cDNA)는 실시간 중합효소연쇄반응 마스터 믹스(Real time PCR Master Mix) 및 콜라겐1 택맨 프로브(Collagen1 TaqMan probe)와 디에틸피로카보네이트-증류수(DEPC-DW, diethyl pyrocarbonate-distilled water)를 넣어 혼합하여 20  $\mu$ L가 되도록 한다. 95  $^{\circ}$ C 3분, 95  $^{\circ}$ C 15초, 60  $^{\circ}$ C 30초 39 사이클 조건에서 실시간 중합효소연쇄반응(RT-qPCR, Real-time polymerase chain reaction) 장비를 사용하여 측정한다. 중합효소연쇄반응(PCR) 장비 및 사용 시약에 따른 세부 조건 변경은 가능하다.

※ 분석 방법

시험결과는 상대정량 분석 ( $\Delta$ Ct값)을 통해 콜라겐 mRNA 발현을 분석한다.

(다) 참고문헌

- 1) Retinoic acid-induced inhibition of type I collagen gene expression by human lung fibroblasts *Biochimica et Biophysica Acta* 1219:335-341. 1994
- 2) Regulation of Collagen synthesis by ascorbic acid transforming growth factor- $\beta$  and interferon- $\gamma$  in human demal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel are photoaging and aging-independents. *J. of Derma. Sci.* 15:188-200, 1997
- 3) A new method to measure type I and III collagen synthesis in human skin in vivo: demonstration of decreased collagen synthesis after topical glucocorticoid treatment. *J. Invest. Dermatol.* 98:220-225, 1992
- 4) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193:

265–275, 1951.

- 5) Collagen Synthesis Is Suppressed in Dermal Fibroblasts by the Human Antimicrobial Peptide LL-37. *J Invest Dermatol* 129(4): 843–850.2009
- 6) Fn14, a Downstream Target of the TGF- $\beta$  Signaling Pathway, Regulates Fibroblast Activation. *PLoS ONE* 10(12): e0143802.2015
- 7) Collagen Metabolism Is a Novel Target of the Neuropeptide  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating Hormone. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 6959–6966.2004
- 8)  $\beta$ -Lapachone Regulates the Transforming Growth Factor- $\beta$ -Smad Signaling Pathway Associated with Collagen Biosynthesis in Human Dermal Fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* No.4p.524–531.2016

## (2) 세포내 콜라게나제 활성 억제시험(Collagenase inhibition assay)

### (가) 효소면역측정법(ELISA법, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)을 통한 콜라게나제 양 측정법

이 시험방법은 섬유아세포(fibroblast) 배양 시 시료가 세포내 콜라게나제 생성억제 정도를 효소면역측정법(ELISA법, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)으로 측정하는 것이다.

#### 1) 세포주 선택 및 세포배양

세포내 콜라겐 생성시험에 따른다.

#### 2) 검액의 조제

본 시험의 검액 농도는 세포독성도(세포증식반응) 측정법(MTT assay) 등을 이용한 예비실험<sup>주1)</sup>을 통하여 세포독성을 나타내지 않는 농도를 선택한다. 다만, 효력을 나타내는 농도 3개 이상을 선정하여 효력의 농도 의존성을 확인할 수 있어야 한다. 시험물질을 녹이거나 희석시킬 때는 혈청이 함유되지 않은 DMEM 배지를 사용한다. 다만 시험물질이 DMEM 배지에 녹지 않는 경우 에탄올, 디메틸설폭사이드(DMSO)등 적당한 용매를 사용하여 녹인다. 실험결과의 신뢰도 향상을 위하여 레티노산 등을 양성대조 물질로 사용한다.

#### 주1) 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, phosphate buffered saline)으로 세척한 다음 10% 소태아혈청(FBS)을 포함하지 않는 새로운 배지로 갈아주고 일정농도의 시험물질을 처리하여 세포를 24시간 배양한다. 세포독성도(세포증식반응)(MTT)용액 (0.5% 3-(4,5-dimethyl tiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide액)을 각 웰(well)에 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

섬유아세포를 6 mm배양접시에  $4 \times 10^5$ 개로 분주한 다음 세포배양조건에서 24시간 배양한다. 배지를 버리고 인산완충생리식염수(PBS, phosphate buffered saline)로 세척한 다음 인산완충생리식염수(PBS, phosphate buffered saline) 2 mL를 넣어주어 자외선(UVB) 10 mJ을 조사한 다음 인산완충생리식염수(PBS, phosphate buffered saline) 제거 후 소태아혈청(FBS, fetal bovine serum)이 포함되지 않은 새로운 배지에 검액 및 양성대조물질을 넣고 24시간 배양한다. 24시간 후 배양액을 취하여 기질금속단백질분해효소(MMP-1)양을 측정<sup>주2)</sup>하며 측정된 기질금속단백질분해효소(MMP-1)양은 로우리법 등으로 구한 총 단백질량으로 보정한다.

#### 주2) 콜라게나제 양 측정

정량용완충액 100 $\mu$ l를 웰(well)에 넣은 다음 1/5로 희석한 배양액 및 표준액 각 100 $\mu$ l를 넣고 상온에서 2시간 배양한다. 웰(well)에서 배양액을 제거한 다음 세척용 완충액 400 $\mu$ l로 3회 씻는다. 항혈청(antiserum) 100 $\mu$ l를 넣고 상온에서 2시간 반응시킨 다음 세척용 완충액 400 $\mu$ l로 3회 씻는다. 퍼옥시데이즈 컨쥬게이션 용액(Peroxidase conjugate solution) 100 $\mu$ l를 넣고 상온에서 2시간 반응시킨 다음 인산완충생리식염수(PBS, phosphate buffered saline) 400 $\mu$ l로 3회 씻는다. 티엠비 기질(TMB substrate) 100 $\mu$ l를 넣고 상온에서 30분간 반응시킨다. 1M 황산 100 $\mu$ l를 넣고 450nm에서 효소면역측정기(ELISA reader)로 측정한다.

- a) 표준액조제 : Human pro MMP-1에 정량용완충액을 넣어 녹여 각각 0, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50ng/mL가 되도록 희석한다.
- b) 시약 : 기질금속단백질 분해효소(Matrix metalloproteinase-1(MMP-1)) human biotrak ELISA system(Amersham life science) 또는 이와 동등한 키트 사용

(나) 실시간 중합효소연쇄반응(RT-qPCR, Real-time polymerase chain reaction)을 통한 콜라게나제 mRNA 발현 측정법

이 시험방법은 섬유아세포(fibroblast) 배양시 시료가 세포내 콜라게나제 생성억제 정도를 실시간 중합효소연쇄반응(RT-qPCR, Real-time polymerase chain reaction) 방법으로 측정하는 것이다.

1) 세포주 선택 및 세포배양

위 ‘(가)’와 동일

2) 검액의 조제

위 ‘(가)’와 동일

3) 조작

섬유아세포를 6 mm배양접시에  $4 \times 10^5$ 개로 분주한 다음 세포배양조건에서 24 시간 배양한다. 배지를 버리고 인산완충생리식염수(PBS, phosphate buffered saline)로 세척한 다음 인산완충생리식염수(PBS, phosphate buffered saline) 2 mL를 넣어주어 자외선(UVB) 10 mJ을 조사한 다음 인산완충생리식염수(PBS, phosphate buffered saline) 제거 후 소태아혈청(FBS, fetal bovine serum)이 포함되지 않은 새로운 배지에 검액 및 양성대조물질을 넣고 24시간 배양한다. 세포를 취하여 RNA를 추출한 후 정량하고 실시간 중합효소연쇄 반응(RT-qPCR, Real-time polymerase chain reaction)을 통해 기질금속단백질 분해효소(MMP-1) mRNA 발현을 측정한다.<sup>주1)</sup> RNA 정량은 분광 광도계를 이용하여 정량한다. 정확도와 정밀도 향상을 위하여 세부조작조건의 변경은 가능하다.

주1) 콜라게나제 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-증류수(DEPC-DW, diethyl pyrocarbonate-distilled water)로 펠릿(pellet)을 현탁시킨 후 분광 광도계를 이용하여 RNA를 정량한다. 정량된 RNA 와 올리고 디티(oligo dT), 알티 프리믹스(RT Premix) 및 디에틸 피로카보네이트-증류수(DEPC-DW, diethyl pyrocarbonate-distilled water)를 이용하여 상보적 DNA(cDNA)를 42 °C 60분, 94 °C에서 5분, 4 °C에서 ∞조건으로 합성한다. 합성된 상보적 DNA(cDNA)는 실시간 중합효소연쇄반응 마스터 믹스(Real time PCR Master Mix) 및 엠엠피-1 택맨 프로브(MMP-1 TaqMan probe)와 디에틸피로카보네이트-증류수(DEPC-DW, diethyl pyrocarbonate-distilled water)를 넣어 혼합하여 20 μL가 되도록 한다. 95 °C 3분, 95 °C 15초, 60 °C 30초 39 사이클 조건에서 실시간 중합효소연쇄반응(RT-qPCR, Real-time polymerase chain reaction) 장비를 사용하여 측정한다. 연쇄중합반응(PCR) 장비 및 사용 시약에 따른 세부 조건 변경은 가능하다.

※ 분석 방법

시험결과는 상대정량 분석 ( $\Delta Ct$ 값)을 통해 기질금속단백질분해효소(MMP-1) mRNA 발현을 분석한다.

(다) 참고문헌

- 1) Retinoic acid Inhibition of collagenase and gelatinase Expression in human skin fibroblast culture. Evidence for dual mechanism *The Journal of Investigative Dermatology* 81: 162-169, 1983.
- 2) Regulation of Collagen synthesis by ascorbic acid transforming growth factor- $\beta$  and interferon- $\gamma$  in human demal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel are photoaging and aging-independents. *J. of Derma. Sci.* 15:188-200, 1997.
- 3) A new method to measure type I and III collagen synthesis in human skin in vivo: demonstration of decreased collagen synthesis after topical glucocorticoid treatment. *J. Invest. Dermatol.* 98:220-225, 1992.
- 4) Cordycepin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase expression by suppressin the NF-K $\beta$  pathway in human dermal fibroblasts. *Experimental &*

*Molecular Medicine* 548-554. 2009.

- 5) Decursin inhibits UVB-induced MMP expression in human dermal fibroblasts via regulation of nuclear factor- $\kappa$ B. *International Journal of Molecular Medicine*. 477-483. 2012.
- 6) Sulforaphane Inhibits Ultraviolet B-induced Matrix Metalloproteinase Expression in Human Dermal Fibroblasts *Korean J. Oriental Physiology* 922-928. 2012.

### (3) 엘라스타제 활성 억제 시험 (Elastase inhibition assay)

#### (가) 효소면역측정법(ELISA법, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)을 통한 엘라스타제 양 측정법

이 시험방법은 섬유아세포(fibroblast) 배양 시 시료가 세포내 엘라스타제 활성억제 정도를 효소면역측정법(ELISA법, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)으로 측정하는 것이다.

#### 1) 세포주 선택 및 세포배양

사람섬유아세포(Human dermal fibroblast) 또는 이와 유사한 사람유래 섬유아세포 (CCD-25sk 등)를 배양접시의 바닥에 접종한 후 페니실린 (50 IU/mL), 스트렙토마이신(50 µg/mL), 10% 소태아혈청(FBS, fetal bovine serum)을 함유하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지 혹은 동등 이상의 성장력을 갖는 배지를 넣고 37 °C를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양한다.

#### 2) 엘라스타제 용액의 조제

배양된 세포를 인산완충생리식염수(PBS, phosphate buffered saline)로 세척한 후, 0.1% 트리톤 엑스-100(triton X-100) · 0.2M Tris(트리스) 액 (pH 8.0, 염산) 용액 (0.2M 트리소(Tris)액 (pH 8.0, 염산)에 트리톤 엑스-100(triton X-100)을 넣어 녹여 0.1% 로 한 액)을 넣어 녹인다. 이 용액을 액체 질소에서 얼렸다 녹였다를 3회 반복하거나, 초음파 분쇄를 통하여 세포를 균질화(homogenization) 한다. 이 용액을 4°C에서 3000 rpm으로 20분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 섬유아세포 엘라스타제를 포함하는 효소액으로 한다.

#### 3) 검액의 조제

본 시험의 검액농도는 세포독성도(세포증식반응) 측정법(MTT assay) 등을 이용한 예비실험<sup>주1)</sup>을 통하여 세포독성을 나타내지 않는 농도를 선택한다. 다만, 효력을 나타내는 농도 3개 이상을 선정하여 효력의 농도 의존성을 확인할 수 있어야 한다. 시험물질을 녹이거나 희석시킬 때는 0.2M Tris(트리스) 액

(pH 8.0, 염산)을 사용한다. 다만 시험물질이 0.2M Tris(트리스) 액 (pH 8.0, 염산)에 녹지 않는 경우에는 에탄올 등 적당한 용매를 사용하여 녹인다. 실험 결과의 신뢰도 향상을 위하여 포스포라미돈(phosphoramidon)등을 양성대조 물질로 사용한다.

#### 주1) 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, phosphate buffered saline)으로 세척한 다음 10% 소태아혈청(FBS)을 포함하지 않는 새로운 배지로 갈아주고 일정농도의 시험물질을 처리하여 세포를 24시간 배양한다. 세포독성도(세포증식반응)(MTT)용액 (0.5% 3-(4,5-dimethyl tiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-2H-tetrazolium bromide액)을 각 웰(well)에 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.

#### 4) 조작

위에서 만들어진 엘라스타제 용액을 브래드포드(Bradford)법<sup>주2)</sup>이나 로우리(Lowry)법<sup>주3)</sup>에 의하여 정량하여 각 웰(well) 당 100  $\mu$ g의 단백질을 함유하는 양을 96웰(well)에 넣고 0.2M 트리스 하이드로클로라이드(Tris-HCl) 완충액 (pH 8.0)을 넣어 88  $\mu$ L가 되도록 한다. 검액 10  $\mu$ L씩을 각 웰(well) 당 넣는다.

엘라스타제의 기질인 STANA (N-succinyl-tri-alanyl-p-nitroanilide, 50 mM) 액을 2  $\mu$ L씩 각 웰(well) 당 넣고 37°C에서 배양한다. 90 분후 405 nm에서 효소면역측정기(ELISA reader)로 측정한다.

#### 주2) 브래드포드 (Bradford assay)

소혈청알부민(Bovine serum albumin, 1 mg/mL)을 0, 2, 5, 10, 20  $\mu$ L씩 각각 1.5 mL 시험관에 넣는다. 여기에 3차 증류수 20, 18, 15, 10, 0  $\mu$ L씩을 각각 넣어 전체 부피를 20  $\mu$ L로 한다. 브래드포드 용액 1 mL씩 넣은 후

교반하고 상온에서 5분간 방치한 다음 표준액으로 한다. 시험물질 2  $\mu$ L를 취하여 여기에 3차 증류수 18  $\mu$ L를 넣은 후 표준액과 동일하게 조작하여 검액으로 한다. 검액 및 표준액을 가지고 595 nm에서 흡광도를 측정하여 표준액으로부터 얻은 검량선으로부터 검액의 단백질량을 측정한다.

### 주3) 로우리법(Lowry assay)

소혈청알부민(Bovine serum albumin) 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100  $\mu$ g씩을 각각의 시험관에 넣고, D시액 2 mL씩을 추가한다. 상온에서 10분간 방치한 다음 폴린페놀(folin-phenol) 시액 0.2 mL씩을 각각 넣고 혼합한 다음 상온에서 30분간 방치하여 각각의 표준액으로 한다. 배양액을 가지고 표준액과 동일하게 조작하여 검액으로 한다. 검액 및 표준액을 가지고 600 nm에서 흡광도를 측정하여 표준액으로부터 얻은 검량선으로부터 검액의 단백질량을 측정한다.

- A 시액 : 2 % 무수탄산나트륨 · 0.1 N 수산화나트륨액 용액
- B 시액 : 1 % 주석산칼륨나트륨용액
- C 시액 : 0.5 % 황산동용액
- D 시액 : A시액 · B시액 · C시액 혼합액 (48:1:1)
- 폴린페놀시액 : 2 N 폴린페놀액 · 물 혼합액 (1:1)
- 시액·시액 : 무수탄산나트륨 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , CAS No : 497-19-8), 수산화나트륨 ( $\text{NaOH}$ ), 주석산칼륨나트륨 ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 황산동 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

### (나) 사용한 측정방법에 대한 참고문헌

- Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G (2001) The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. Photochemistry and photobiology 74:283-290.
- Tsukahara K, Takema Y, Moriwaki S, Tsuji N, Suzuki Y, Fujimura T, et al. (2001) Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation. The Journal of investigative dermatology 117:671-677.

## 나. 인체적용시험자료

### (1) 피부주름의 측정 평가

#### (가) 일반사항

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

#### (나) 피시험자의 선정

30세 ~ 65세의 성인 남녀 중에서 다음 1)항의 기준에 만족하며 2)항에 해당되는 사항이 없는 사람을 피시험자로 선정한다. 주시험자는 “(라) 주시험자가 피시험자에게 알려주어야 할 사항”을 피시험자에게 설명하고, 피시험자는 자의에 따라 ‘임상시험 참가 동의서’를 작성하고 실험에 참가한다.

#### 1) 선정기준

- 가) 주시험자가 피시험자에게 알려주어야 할 사항에 대하여 충분히 설명을 듣고 자발적으로 임상 시험 참가 동의서를 작성하고 서명한 자
- 나) 피부 질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자
- 다) 주시험자의 판단에 따라 시험부위에 주름을 가지고 있는 자
- 라) 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 자

#### 2) 선정제외 기준

지원자와의 면담에 의하여 다음 사항에 해당되는 사람은 피시험자에서 제외시킨다.

- 가) 임신 또는 수유중인 여성과 임신 가능성이 있는 여성
- 나) 피부 질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 1개월 이상 사용하는 사람
- 다) 동일한 실험에 참가한 뒤 6개월이 경과되지 않은 사람
- 라) 민감성, 과민성 피부를 가진 사람
- 마) 시험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 사람
- 바) 연구 시작 전 3개월 내에 시험부위에 동일 또는 유사한 화장품 또는 의약품을 사용하거나
- 사) 연구 시작 전 6개월 내에 피부박피술, 주름제거술 등을 받은 자
- 아) 그 외 주시험자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 사람

### 3) 중도탈락 기준

상기 기준에 의하여 선정된 피시험자라 할지라도 시험부위에 소양감이나 흥반 등의 이상반응이 발생하는 경우에는 실험 진행 중 주시험자와 연구원의 판단 하에 제외시키며, 이는 실험 결과 산정에서 제외하고 이를 보고서에 작성한다. 또한, 피시험자가 실험 진행과정 중 시험 부위에 과도한 자외선 노출을 하거나 지나친 음주, 흡연 등으로 결과의 평가에 장애가 발생할 경우, 이외에 피시험자가 실험 진행 과정 중 개인사정에 의해 추적관찰이 어려운 경우 주시험자와 연구원의 판단 하에 제외시키며, 이는 실험 결과 산정에서 제외하고 이를 보고서에 작성한다.

### 4) 정보의 비밀 유지와 성실 의무

가) 본 실험에 참여한 피시험자의 비밀은 보장된다. 단, 의학적인 목적에 의해서 피시험자의 신원이 밝혀지지 않는 범위에서 시험자료를 이용할 수 있다.

나) 피시험자는 본 실험을 통해 얻은 정보는 실험이 종료될 때까지 비밀을 유지해야 한다.

다) 본 실험에 참여하는 피시험자는 성실하고 정직하게 자료를 작성한다.

#### (다) 인체 실험 진행 규정

1) 실험 진행 중 주시험자와 그 외 연구원은 피시험자의 안전에 최선을 기할 것이며, 예측 가능한 이상반응 이외의 이상반응 발생시 신속하고 적절한 조치를 취하여 그 이상반응을 최소화 하여야 한다.

2) 실험 진행 중 도포된 시료에 의하여 피부 자극이 발생하는 경우에는 즉시 도포된 시료를 닦아내고, 증상이 호전되지 않을 경우 시험자에 의한 피부과적 평가와 적절한 치료를 받는다.

3) 기타 비정상적인 피부 반응이 발생할 경우 주시험자와 연구원은 피부과적 평가와 함께 적절한 조치를 취하며 증례 및 상황에 대하여 상세히 기록을 한다.

#### (라) 주시험자가 피시험자에게 알려주어야 할 사항

1) 실험에 관한 일반적인 주지사항

시험자는 피시험자들에게 본 실험의 목적과 방법, 기대 이득 효과와 실험으로부터 야기될 수 있는 소양증, 흥반, 자극 등의 이상반응, 실험기간 종료와 동시에 즉시적인 실험군에서의 탈퇴, 본인의 임상실험 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 실험자는 편의상 각 기제에 번호를 정한 후 이중 맹검법을 사용하여 피시험자군이 성분과 시료번호와의 관계를 알 수 없게 한다.

## 3) 피험자의 주의사항

가) 시험부위를 햇빛에 노출시키지 말 것

나) 시료간 혼동하여 도포하지 말 것

다) 시료 도포를 거르지 말 것

라) 시험기간 중 일상생활을 크게 벗어난 활동을 하지 말 것(다른 기후지역으로의 휴가, 과도한 스트레스 등)

마) 주름의 평가하기 12시간 전에는 화장을 하지 할 것.

### (마) 시험부위

시험부위는 얼굴의 눈가, 입가 등 주름을 보유하고 있는 부위를 선정한다. 얼굴 좌우측을 절반으로 나누어 시료와 대조군을 도포하거나 또는 2개 그룹으로 나누어 한 그룹에는 시료 다른 그룹에는 대조군을 도포한다. 또한 선정한 시험 부위를 다음 평가할 때 정확하게 인식하기 위하여 비닐종이 등을 얼굴에 대고 눈, 코, 입 등의 위치를 표시한 다음 시험부위를 표시하여 다음 평가 때 동일한 부위를 가지고 평가하도록 한다.

### (바) 시료도포

시료는 피시험자가 직접 시험부위에 도포하도록 한다. 피시험자의 직접 도포가 어려운 경우에 시험자가 도포한다. 도포횟수는 아침 저녁 2회를 원칙으로 하되, 시료의 용법, 효능 및 이상반응을 고려하여 도포횟수 및 도포총량을 결정할 수 있다.

1) 시료 및 대조군 도포

2) 시료 도포 전후 비교

### (사) 피시험 부위의 평가

1) 시험장소

주름을 평가하는 장소는 공기의 이동이 없고 직사광선이 없으며 항온항습조건

(22±2℃, 40-60%)이어야 한다. 피시험자는 시험장소에서 최소 30분간 피부 안정을 취한 다음 시험한다.

## 2) 주름측정

### 가) 육안평가

#### ① 육안상대평가 :

피시험자의 주름 정도를 미리 정한 판정기준에 따라 2명 이상의 전문가에 의해 판정한다. 필요에 따라 표준주름 그림을 이용한다.

판정기준예)

대조군

주름없음

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

주름많음

시료군

주름없음

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

주름많음

#### ② 사진촬영

사진촬영은 매회 촬영시 피시험자의 자세, 거리, 조도 등이 동일한 조건이 되도록 하고, 디지털카메라 사용시 원본과 같다는 증명이 될 수 있는 자료가 있어야 한다.

예) 카메라를 이용하여 피시험 부위가 동일 시야에 들어오도록 앵글(angle)을 고정시키고, 스트로보를 사용하여 피시험자를 확인할 수 있는 원거리 촬영과 근접촬영을 시행한다. 또한, 피시험부위와 렌즈의 거리가 매회 같아지도록 피시험자와 카메라의 위치를 고정한다.

### 나) 기기평가

#### ① 모사판을 이용한 주름 평가

주름의 기기평가방법은 피부의 모사판(replica)을 제작하여 주름을 측정하는 방법과 이미지 분석장치를 이용하여 피부의 주름을 직접 측정하는 방법이 있다. 모사판으로부터 주름을 측정하는 기기에는 optical profilometer, laser profilometer등이 있다. 현재 가장 많이 사용되는 주름 측정방법은 모사판을 제작한 후 optical profilometer로 주름을 정량하는 방법이다.

측정방법 예)

㉠ 모사판 제작

- i) 모사판 제작 제작부위를 중심으로 면도 및 세안을 하고 30분간 항온 항습 조건에서 안정을 취한다.
- ii) 모사판 제작용 실리콘 용액을 용법에 따라 준비한다.(ex : Silflo<sup>®</sup>, Kerr citricon<sup>®</sup> 등)
- iii) 피시험자를 침대에 편안하게 누인 후 제작틀을 일정위치에 붙이고 실리콘용액을 균일하게 도포한다. 제작위치를 동일하게 하고 실리콘 용액 제작과 도포과정에서 기포가 발생하지 않도록 주의한다.
- iv) 제작된 모사판의 형태, 기포발생 여부 등을 확인한 다음 상온에서 보관한다.
- v) 측정오차를 줄이기 위하여 시험기간 동안의 모든 모사판 제작이 완료된 후에 주름을 정량한다.

㉡ 광학 프로파일 측정기(optical profilometer)를 이용한 주름정량

생성된 주름 모사판에 일정 각도의 빛을 조사하면 주름의 굴곡에 따라 그림자의 명암의 정도 차이가 발생하고 생성된 그림자의 명암을 CCD 카메라로 찍어 이미지 파일을 생성한 다음 컴퓨터 영상분석시스템을 이용하여 주름 그림자 명암의 정도를 주름의 양으로 환산하여 정량한다.

② 광학 3차원 피부 영상 측정기(PRIMOS High Resolution<sup>®</sup>)를 이용한 주름 평가

㉠ 광학 3차원 피부 영상 측정기(PRIMOS High Resolution<sup>®</sup>)를 이용한 주름 측정

광학 3차원 피부 영상 측정기(PRIMOS High Resolution<sup>®</sup>, Phaseshift Rapid In vivo Measurement Of Skin high resolution, GFMesstechnik GmbH, Germany)를 이용하여 주름을 측정하고, 시료 적용에 따른 주름을 프리모스 소프트웨어(PRIMOS software)를 이용하여 분석한다. 측정 부위의 수축 이완과 움직임 방지하기 위하여 특수 제작된 광학 3차원 피부 영상 측정기(PRIMOS High Resolution<sup>®</sup>) 측정용 고정 장비 세트에 연구

대상자의 얼굴을 고정하고, 매 측정 시 동일한 부위를 측정하기 위해 장비를 시험 부위에 일치하도록 고정하고 측정한다.

㉞ 이미지 분석(Image analysis)를 이용한 주름 분석

광학 3차원 피부 영상 측정기(PRIMOS High Resolution<sup>®</sup>)의 3차원 측정은 피부에 투사된 평행 투영선(parallel projection stripes)이 피부 표면의 높이 차이에 따라 변화되고, 이렇게 변화된 정도는 컴퓨터에 의해 정량적으로 계산된다. 광학 3차원 피부 영상 측정기(PRIMOS High Resolution<sup>®</sup>)에 의해 측정된 주름 이미지를 3차원 매칭(matching)을 이용하여 측정부위를 일치시킨다. 표면 거칠기(Roughness) 변수별 측정값의 변화를 관찰한다.

※ 표면 거칠기(Roughnes) 변수 예시)

- 중심선평균조도(Ra (Average roughness)): 단면의 거칠기 높이에 중심선을 그렸을 때 중심선에서 표면의 단면 곡선까지 길이의 절대값들의 평균
- 제곱평균 거칠기(Rq (Root mean square roughness)): 단면의 거칠기 높이에 중심선을 그렸을 때 중심선에서 표면의 단면 곡선까지 길이의 제곱평균 제곱근
- 최대높이조도(Rmax (Maximum roughness depth)): 단일 측정 범위 내에 가장 높은 산과 가장 낮은 골의 차이 값

㉟ 설문평가

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

(아) 이상반응 평가

이상반응 평가는 증례보고서(CASE REPORT FORM)에서 매회 피실험자가 방문할 때 마다 문진과 육안으로 이상반응(홍반(Erythema), 부종(Edema), 인설생성(Scaling), 가려움(Itching), 자통(Stinging), 작열감(Burning), 뻣뻣함(Tightness), 따끔거림(Prickling))이나 다른 이상이 발생하는지 평가한다. 자극 증세 혹은 증상은 없었는지, 약한 정도인지, 중간정도인지, 심한정도 인지를 구분

하여 기록한다. 그리고 실험중지 또는 탈락사항이 발생하는지 점검하여 증례보고서(CASE REPORT FORM)에 기입한다. 방문하는 날이 아니더라도 실험에 더 이상 참가 할 수 없게 되는 경우는 본인의 서명이 첨부된 “실험참가 포기동의서”를 쓰도록 한다.

#### (자) 통계분석 방법

통계적 분석은 통계처리 프로그램(SPSS등)을 이용하여 기술적 통계분석을 실시하며 통계적 유의수준은  $p < 0.05$ 로 정하는 것을 원칙으로 한다.

#### (차) 사용한 측정방법에 대한 참고문헌

- Grove GL, Grove MJ, Leyden JJ, Lufrano L, Schwab B, Perry BH, Thorne EG., Skin replica analysis of photodamaged skin after therapy with tretinoin emollient cream.. *Am Acad Dermatol.* 25(2 Pt 1):231-237, 1991

### 3. 결과보고

#### 가. 보고서제목(시험기관, 기관장 직인)

#### 나. 시험기관

- (1) 의뢰자, 시료명(또는 처방), 시험항목, 시험책임자, 연구원의 구성
  - (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
- (2) 시험자의 연구경력(관련분야 경력을 상세하게 기록)
- (3) 시설 및 장비 개요: 대학 또는 연구기관 등 국내외 전문기관(연구기관의 시험 시설개요, 주요설비 등이 기재되어 있어야 함)

#### 다. 시험방법

- (1) 피시험자관리
  - (가) 피시험자개개인에 대한 세부사항 기재(피부형 및 피부상태 포함)
  - (나) 피시험자 선정 및 제외 기준
  - (다) 이상반응을 포함한 안전성의 평가 및 보고방법

(라) 피시험자의 중지 및 탈락에 대한 기준설정

(마) 시험기간종료시 지급되었던 시험제품에 대한 수거 및 순응도 확인절차이행

(2) 연구대상 및 방법

(가) 대조군을 사용시 이중맹검(double blind)

(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(증례보고서(Case Report Form, 시험측정치 및 이상반응 여부 포함), 설문평가자료 등)

#### **마. 결과 종합하는 방법**

기기 평가, 전문가 육안 평가, 피험자 평가 등을 요약하고 상호 상관관계를 기술한다.

### **4. 용어해설**

- 이중맹검 : 시험하는 사람이나 시험에 참여한 사람 모두 어떤 것이 시료군이고 어떤 것이 대조군인지 모르는 상황에서 시험하는 검사방법