

발 간 등 록 번 호

안내서-0777-02

건강기능식품 기능성 평가 가이드

‘피부건강에 도움을 줄 수 있음’ 편

2019. 6.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

건강기능식품 기능성 평가 가이드
(‘피부건강에 도움을 줄 수 있음’편)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 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 :)	
	☐ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 ‘예’에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 ‘예’라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음. 2019년 6 월 일 담당자 확 인(부서장) 이 혜 영		

이 안내서는 건강기능식품 기능성 원료 평가에 대하여 이해를 돕고자, 현재의 과학기술 수준에서 일반적인 사항과 시험방법 등이 제시된 참고자료이며, 질병에 관련된 내용이 포함되는 경우 기능성에 대한 전반적인 이해를 돕기 위한 것이지, 질병의 치료 및 예방을 목적으로 기능성을 설명하는 것은 아닙니다.

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 2019년 6월 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 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구팀으로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1		2014.12.	제정
2	안내서-0777-01	2017.7.28.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」에 따른 등록번호 일괄 정비 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16.)
3	안내서-0777-02	2019.6.	개정 (기능성 시험방법 등 업데이트)

CONTENTS

※ 건강기능식품의 기능성 개요	1
※ 약어	3
 Ⅰ 서 론	4
 Ⅱ 일반적 사항	4
1. 개요	4
2. 보건학적 중요성	12
 Ⅲ 기능성 시험 방법	13
1. 바이오마커의 선정	13
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	19
3. 시험 설계 시 고려사항	26
 Ⅳ 참고문헌	28

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

건강기능식품법률 제3조(정의) : 기능성이란 인체의 구조와 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다.

□ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

○ 건강기능식품의 기능성 구분

기능성 구분	기능성 내용	기능성을 가진 원료 또는 성분
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용	영양소
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능 향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능	기능성 원료
질병발생 위험감소 기능	질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능	

□ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준은 다음과 같다.

○ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

구분	기능성 내용	인정기준
질병발생 위험 감소 기능 ¹⁾	○○발생위험 감소에 도움을 줌	기반연구 자료를 통해 생리학적인 효과 또는 기전이 명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 다수의 인체적용시험 (RCT)에서 확보되어야 함 ※ 질병 관련 바이오마커의 확인
생리활성 기능 ²⁾	○○에 도움을 줄 수 있음	기반연구 자료를 통해 기능성 있는 생리학적인 효과 또는 기전을 추측할 수 있어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 최소 1건 이상의 인체적용시험(RCT)에서 확보되어야 함(추측 제안기전과 관련한 바이오마커가 기반연구시험과 인체적용시험에서 일관성 있게 확인되어야 함) ※ 생리활성 관련 바이오마커의 확인

- 1) 제출된 기능성 자료가 질병의 발생 위험 감소를 나타내며, 확보된 과학적 근거 자료의 수준이 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)에 이를 수 있을 정도로 높을 경우 인정. 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)란 성분 또는 원료와 건강효과 간의 상관성이 새로운 과학에 의해 뒤집어지지 않을 정도의 수준으로 관련 분야의 전문가들에 의한 만장일치에 가까운 합의 수준을 말함
- 2) 제출된 기능성 자료가 인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능향상 또는 건강유지개선을 나타내는 경우 인정

약 어

AP-1	activator protein-1
TGF	transforming growth factor
NF- κ B	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells
MMP	matrix metalloproteinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
NMF	natural moisturizing factor
HAS-1	hyaluronic acid synthase-1
TEWL	transepidermal water loss
IL	interleukin
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
SOD	superoxide dismutase
GPH-Px	glutathione peroxidase
CAT	catalase
COX-2	cyclooxygenase-2
COL1A1	collagen type 1 alpha 1
MED	minimal erythema dose

I

서론

이 가이드는 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 식품의약품안전처의 기능성(피부건강에 도움) 평가 원칙 및 기준 등을 알림으로써 산업체의 기능성원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

II

일반적 사항

1. 개요

가. 피부의 구조

피부는 크게 표피(epidermis), 진피(dermis), 피하지방(subcutaneous fat)으로 구성되어 있다. 표피는 각질층, 과립층, 유극층, 기저층으로 구성되어 있으며, 28일 정도 주기로 새로운 세포로 교체되고 있다. 또한 케라틴으로 되어있는 케라티노사이트, 멜라닌을 형성·분비하는 멜라노사이트, 면역관련세포(langerhans cell) 및 지각관련세포(merkel's corpuscles)등 여러 가지 세포로 이루어져 있어 외부자극이나 병원균의 침입을 방지하고 체온조절, 수분과 지질 성분 유지 작용을 한다. 진피는 섬유성분과 기질성분으로 구성되어 있는데 그 중 콜라겐은 입체구조 유지, 인장강도 부여 등의 피부를 보호하는 역할을 수행하며 진피층의 90%를 차지하고 있다. 엘라스틴은 탄력섬유로서 진피층의 3~4%정도를 차지하며 입체구조 사이를 스프링처럼 작용하여 피부탄력을 유지한다. 그 외에 수분보유능이 강한 히알루론산, 뮤코 다당체 등의 고분자 지질성분이 있다.

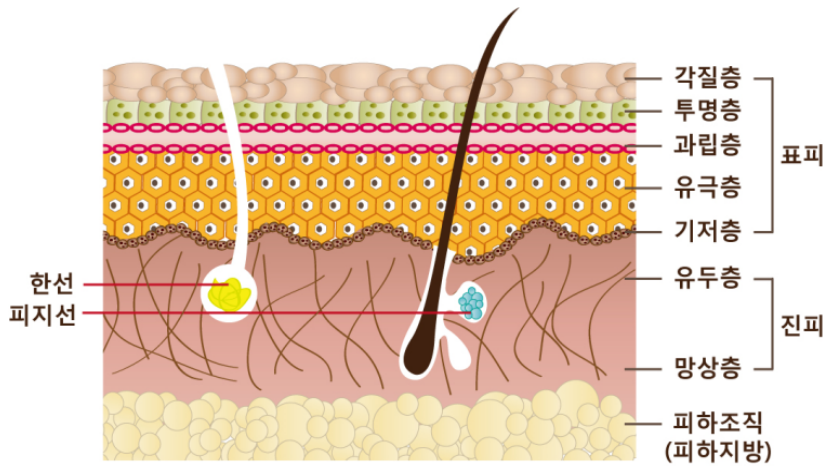


그림 1. 피부의 구조

[출처: 이해하기 쉬운 건강기능식품, 2019]

나. 피부의 기능

(1) 보호작용

피부는 인체의 표면에 있는 것으로 다양한 외부 유해물질이나 물리적인 자극으로부터 피부를 보호한다. 또한 체내의 모든 기관을 외부의 기계적인 힘의 전달에 대해 완충작용을 하여 피부의 손상을 막아 준다. 특히, 피지선에서 분비된 피지가 땀과 어우러져 피부 겉 표면에 pH 4.5~6.5의 산성막을 형성하여 세균이나 곰팡이 등 미생물의 침입을 막아 피부를 보호한다. 피부표면의 굴곡에 의한 태양광선의 반사와 각질층에 의한 광선의 산란 등에 의해 햇볕을 쏘이면 생기는 피부의 멜라닌색소 증가 및 화상 등을 막아준다.

(2) 체온조절작용

인체의 대부분의 열소실(80%)은 피부를 통해 이루어지고 나머지 열소실(20%)은 호흡기계와 분비물을 통해 이루어진다. 따라서 피부는 발한이나 피부혈관의 확장·수축에 의한 피부 혈류량의 변화로 신체의 열 발산을 조절하여 체온을 일정하게 유지함으로써 인간의 몸이 항상 최적의 상태로 활동할 수 있도록 한다.

(3) 지각작용

진피와 피부 및 조직 내에 감각신경종말이 존재하며, 이러한 감각기들을 통해 온도, 촉감, 압박, 통증 등의 외부자극을 감지하여 신경세포에 전달하는 수용체로 작용하여 몸을 보호한다.

(4) 체내 노폐물의 분비·배출작용

피지선에서 피지, 땀샘에서 땀을 분비하고 적은 양의 염분, 물과 유기물 등의 체내 노폐물을 배출한다. 피지선의 크기와 발달은 성별, 나이 등에 영향을 받는다.

(5) 흡수작용

피부를 통한 흡수경로는 각질층을 통한 흡수, 모공 및 한선을 통한 흡수로 나눌 수 있다. 이는 주로 확산에 의해 이루어지며, 분자량, 물질의 물리·화학적 성질, 혈류량, 피부온도 등에 따라 달라진다.

(6) 저장작용

피하조직은 여분의 영양물질을 저장하고, 피부에는 18~20%의 수분이 포함되어 있다.

다. 피부노화

피부의 노화는 크게 내인성 노화와 외인성 노화(광노화)로 나눌 수 있다. 내인성 노화의 임상적 특징은 비교적 경미하며, 잔주름, 피부건조증, 탄력감소 등을 들 수 있다. 외인성 노화(광노화)의 경우 내인성 노화에 비하여 굵고 깊은 주름과 잔주름이 발생하며, 심한 경우 피부건조증, 탄력감소, 색소성 질환, 양성종양, 피부암 등을 증가시킨다.

(1) 내인성 노화

나이가 들어감에 따라 섬유아세포의 작용과 세포수가 감소하여 콜라겐, 엘라스틴, 피브릴린 등 세포의 기질 단백질 섬유의 합성량이 줄어들고 구조가 느슨해져서 탄력이 감소되며 피부 세포 내 수분이 손실되고 각질층의 구조가 변한다. 또한 콜라게나아제의 작용이 증가하여 콜라겐의 가교된 형태가 증가함으로써 보습이 감소된다.

(2) 광노화

태양광선의 자외선에 대한 자극에 의하여 활성산소종(ROS)이 발생되고, 전염증성 사이토카인의 생성이 촉진되어 여러 가지 신호전달 체계를 활성화시킨다. 또한 AP-1을 활성화시켜 TGF- β 및 TGF- α 를 억제함으로써 진피의 주된 성분인 collagen I 과 collagen III의 합성을 감소시키며, AP-1과 NF- $\kappa\beta$ 의 활성화는 MMPs, 특히 MMP-1, MMP-3, MMP-9을 활성화시켜 진피내 결합조직의 분해를 촉진시킨다.

장기간 UV 노출 시 피부조직에서는 표피 두께가 2~3배 증가하며, 표피층에서는 유극세포의 증가, 각질세포의 다형성 등이 관찰되는 것이 특징이다. 또한 무정형의 엘라스틴을 포함한 물질들이 표피와 진피 연결층 위에 침착되며 진피층에서는 콜라겐과 엘라스틴의 섬유구조가 변형되고 탄력섬유의 증가로 인한 일광탄력섬유증(elastosis)이 발생한다.

(3) 산화적 스트레스

피부가 자외선에 노출되었을 때, 세포가 반응하는 신호전달 체계를 작동시키고 과산화수소 등 활성산소종의 발생을 증가시키며, 항산화 효소의 발현을 감소시킨다. 이러한 활성산소종의 증가는 유전자와 단백질의 구조를 변화시켜 세포 내외의 항상성이 파괴되어 피부의 손상을 가져오게 된다.

라. 주름 발생기전

노화와 자외선 등으로 인한 피부노출은 MAPK(mitogen-activated protein kinase)를 활성화시킨다. MAPK에서 가장 많이 영향을 받는 인자는 AP-1이다. AP-1은 Jun과 Fos family 단백질로 이루어진 전사인자로 c-Jun과 c-Fos의 heterodimer 형태로 존재 할 때 전사활성이 가장 높다. 사람의 피부가 자외선에 노출되지 않았을 때는 c-Fos와 JunD의 이합체로 존재하나, 자외선, 외부 환경적 자극 등에 의하여 c-Jun과 c-Fos 단백질의 발현이 증가하게 되고, c-Jun은 JNK와 p38에 의한 인산화에 의하여 활성화된다. AP-1은 세포와 분화에 관련되는 많은 유전자의 발현을 조절하고 몇몇 MMPs의 발현을 강력히 조절한다. MMP는 zinc이온을 요하는 endoprotease로 세포외기질 단백질을 분해하는 효소이다. AP-1에 의해 발현이 조절되는 MMP중 MMP-1은 collagenase 1으로 알려져 있으며, type I 와 III collagen을 기질로 한다. MMP-3는 stromelysin 1이라고도 하며, 기저막의 type IV collagen을 분해하며 zymogen인 proMMP-1을 활성화시킨다. MMP-9은 gelatinase B로 collagenase에 의해 분해된 산물을 더 작게 가수분해한다. 자외선에 의하여 MMP-1가

fibillar collagen (types I 와 III)으로 쪼개면서 콜라겐을 분해시키고, 연이어 MMP-3, MMP-9를 증가시킨다.

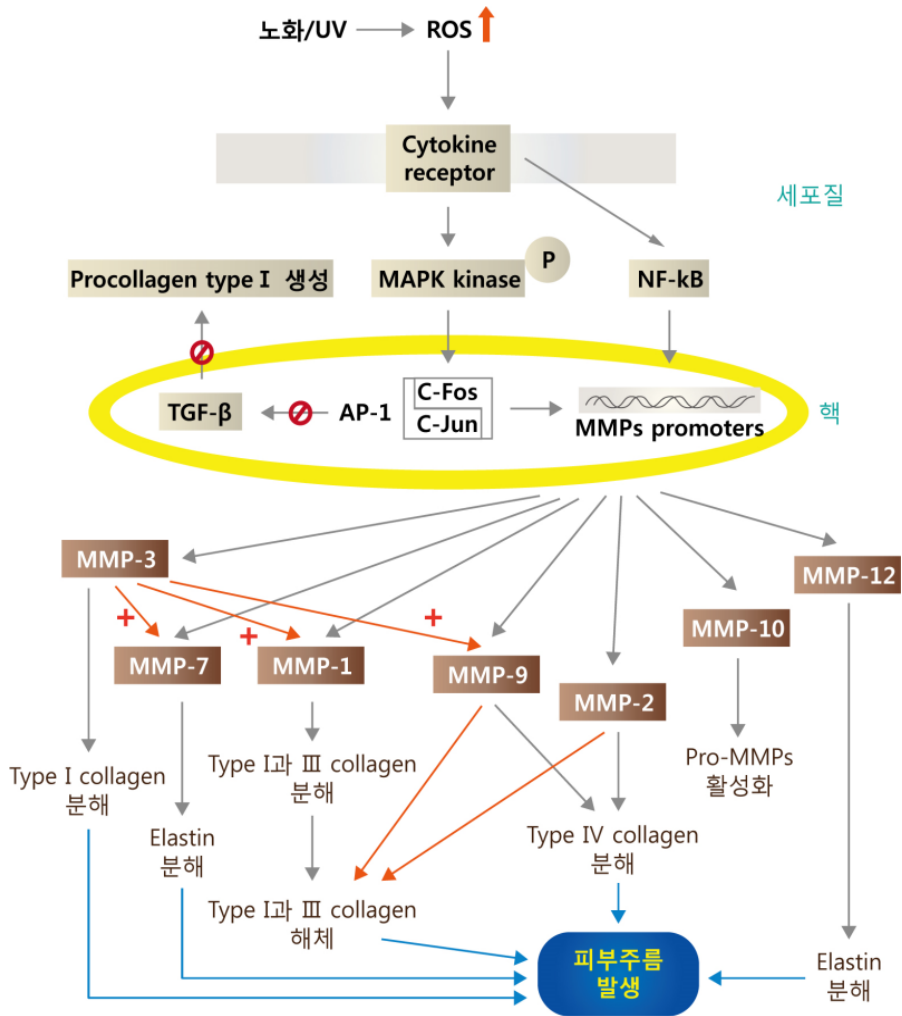


그림 2. 피부의 주름 생성 메커니즘

[출처: Pittayaprupek P et al., 2016]

마. 피부보습 관련 인자

피부의 탄력성이나 보습은 피부의 가장 외층인 표피의 각질층에 존재하는 수분과 진피에 존재하는 콜라겐에 의해 유지된다. 각질층의 수분 함량은 표피에서 생성 분비되는 지질 혼합체인 피지막과 각질층 내에 존재하는 수용성 성분인 자연 보습인자(NMF: natural moisturizing factor)에 의해 결정된다. 건강한 표피의 각질층은 15-20%의 수분을 함유하고 있으며 수분이 10% 이하로 떨어지면 피부가 건조해지고 윤기와 탄력이 없어져 주름이 증가하게 된다.

(1) 콜라겐(collagen)

교원섬유라고도 불리며, 진피의 85~90%를 차지한다. 세포와 기질의 주요 구성 성분인 콜라겐은 섬유아세포의 작용에 의해 프로콜라겐의 형태로 생성되는 단백질이다. 새롭게 합성된 프로콜라겐은 효소반응을 거쳐 피부세포의 세포외 공간으로 분비되어 삼중나선구조의 microfibril을 형성하고, microfibril들은 leucine-rich small proteoglycans과 결합하여 피브릴을 형성하는데, 이러한 과정을 fibrillogenesis라고 한다. 결과적으로 이렇게 만들어진 피브릴들이 모여 콜라겐 섬유를 형성하게 되어 피부의 결합력과 탄력성을 갖게 한다. 피부 콜라겐 중 대부분을 차지하는 것은 type-1 콜라겐이다. 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포 분할과 분화 유도 등이다. 콜라겐은 피부, 골, 인대, 연골 및 치아 등에 높은 농도로 존재하고 트립신과 같은 단백질 분해효소의 작용을 받지 않으나 콜라게나아제에 의해 분해된다.

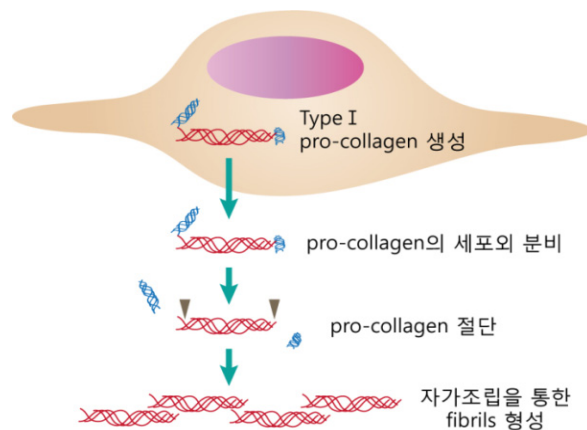


그림 3. Fibrillogenesis 과정

[출처: Ireton JE et al., 2013]

(2) 세라마이드(ceramide)

지질성분들로 구성된 세라마이드는 세포간 intercellular cement의 35~40%를 차지하며 피부의 수화와 관련이 있다. 따라서 세라마이드의 지질성분들의 생성 및 분비 감소가 lamellae 구조를 파괴되면서 경피수분손실(TEWL)이 증가하여 피부는 건조해지고 표면이 메마르며 각질이 생성된다.

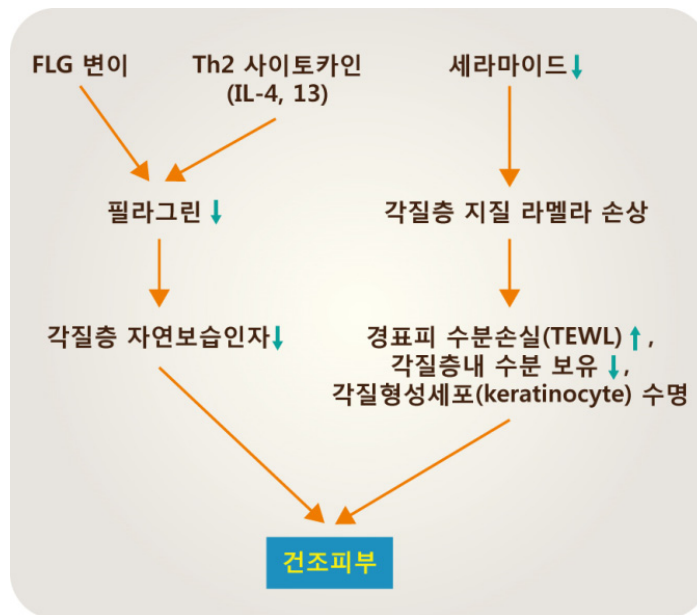


그림 4. 건조피부 형성 과정

[출처: 건강기능식품 기능성평가 가이드라인, 2014]

단백질 및 인지질 분해과정에서 제공되는 세린과 palmitoyl-CoA의 결합에 의해 생성되며, 관련 효소명은 serine palmitoyltransferase이다. 이와 같은 De novo 경로에 의해 형성된 세라마이드는 glucosylceramide 또는 sphingomyelin으로 전환이 가능한데, 즉 glucosylceramide synthase 및 sphingomyelin synthase에 의해 glucosylceramide 또는 sphingomyelin으로 전환되며, 또한 이들은 cerebrosidase 및 sphingomyelinase에 의해 다시 세라마이드로 전환된다. De novo 및 대사 과정에 의해 형성된 세라마이드는 스펡고신과 지방산으로 최종 분해되는데 관련 효소명은 ceramidase이고 또한 이들 분해 산물은 세라마이드 synthase에 의해 다시 세라마이드로 전환될 수도 있다.

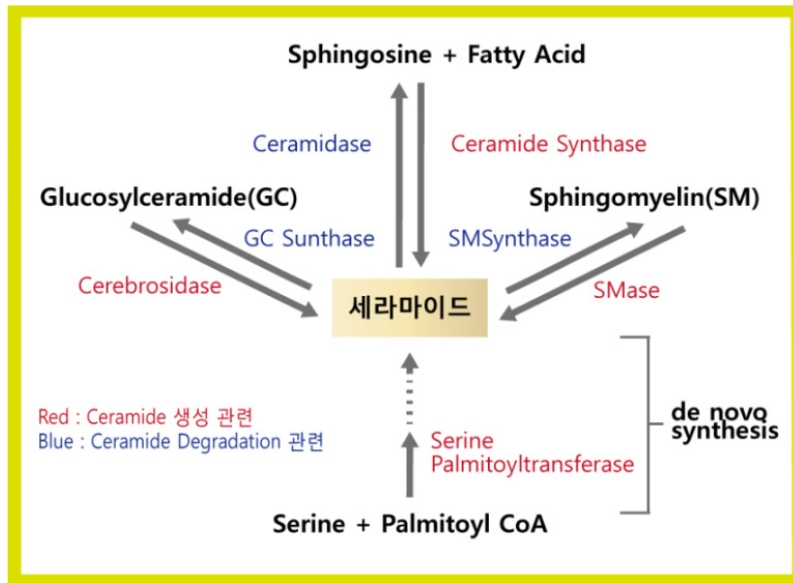


그림 5. 세라마이드 형성 과정

[출처: 건강기능식품 기능성평가 가이드라인, 2014]

(3) 히알루론산(Hyaluronic acid)

피부에 존재하는 히알루론산은 섬유모세포 및 각질형성세포에서 형성되며 점다당질의 구성 성분으로 다당류가 많이 들어있어 수분을 상당량 함유할 수 있는 특징이 있다. 주기는 2~4.5일이며, 무게가 자신의 1,000배인 수분과 결합하여 피부장벽 기능의 조절과 세포의 기질을 수화시켜 조직 내 수분의 항상성을 유지시킨다. 또한 히알루론산은 진피뿐만 아니라 표피의 세포 간격, 특히 가시층에 있으나 각질층과 과립층에는 존재하지 않는다. 그러나 현재 까지 히알루론산이 피부수화에 어떤 역할을 수행하는지에 대해서는 확실하게 알려져 있지 않다.

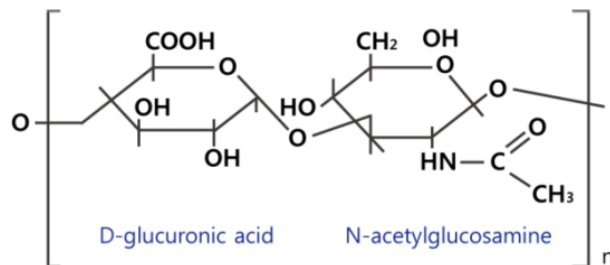


그림 6. 히알루론산 구조

2. 보건학적 중요성

가. 피부건강의 의의

일반적으로 피부노화는 나이의 증가와 활성산소종, 자외선 등 외부인자들이 주요 원인인 것으로 알려져 있다. 이로 인하여 노화된 피부는 표피세포의 분열 속도와 재생속도가 감소되어 상처 치유 능력이 저하되며, 피부의 세포면역이 저하되어 있어 각종 바이러스나 진균에 의한 피부감염과 종양에 취약해진다. 또한 항산화시스템의 기능 저하로 인하여 피부의 산화손상은 점점 더 증가되며, 콜라겐의 변화와 MMPs의 증가로 인하여 주름이 형성 된다.

피부노화를 예방하기 위하여 비타민C, 비타민 E 등 항산화 물질 섭취가 피부의 항산화 작용에 도움이 된다. 또한 피부의 노화는 수분을 유지하는 능력 저하와 주름 발생으로 진행 되므로, 보습제와 자외선 차단을 위하여 일광 차단제를 사용해야 한다. 그 외에도 레티노이드제 사용은 표피에서 각질세포의 증식을 유도하고 이상분화를 막아주며, 진피의 두께를 증가시켜 주는 능력이 있음이 잘 알려져 피부노화의 치료에 사용되고 있다.

Ⅲ

기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 연구유형별 바이오마커

‘자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강 유지’ 기능성 확인을 위한 측정 가능한 시험 연구유형별 바이오마커(biomarker)는 다음 표 1과 같다. 각 바이오마커는 자외선에 의한 피부손상 보호와 관련된 기전을 확인할 수 있는 바이오마커와 임상적으로 효과를 확인할 수 있는 임상적 개선 바이오마커로 구분되어 있다.

표 1. 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강 유지 기능성 확인을 위한 바이오마커

구 분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		in vitro	in vivo	Human
피부보호	MAPK, AP-1, p-38, c-Fos, c-Jun, JNK	○	○	
	MMPs 발현량	○	○	○
	Ki-67, 8-OHdG cells		○	
	표피·진피 두께 (thickness of epidermis·dermis)		○	○
	최소홍반량(MED)		○	○
	SOD, GSH-Px, CAT	○	○	
	사이토카인(cytokine)	○	○	
	COX-2	○		
임상적 개선	피부주름(skin wrinkle)		○	○
	피부탄력(skin elasticity)		○	○

‘피부보습’ 기능성 확인을 위한 측정 가능한 시험 연구유형별 바이오마커(biomarker)는 다음 표 2와 같다. 각 바이오마커는 피부보습과 관련된 기전인 피부 구조 및 기능유지를 확인할 수 있는 바이오마커와 임상적으로 효과를 확인할 수 있는 임상적 개선 바이오마커로 구분되어 있다.

표 2. 피부보습 기능성 확인을 위한 바이오마커

구 분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		in vitro	in vivo	Human
피부 구조 및 기능유지	세라마이드(ceramide)		○	○
	프로콜라겐(procollagen)	○		○
	콜라겐 섬유		○	○
	콜라겐 합성 유전자	○		○
	콜라겐-I (Collagen- I)		○	
	엘라스틴(elastin)	○		○
	피브릴린 함량(fibrillin content)			○
	히알루론산 함량	○	○	
	히알루론산 합성 효소(HAS)			○
	콜라게나아제 억제 활성	○	○	
	엘라스타아제 억제 활성	○		
임상적 개선	피부수분량 (skin hydration)		○	○
	경피수분손실량 (TEWL)		○	○
	각질화 정도 (stratum corneum flexibility)		○	○
	피부 거칠기 (skin roughness)			○
	피부 탄력 (skin elasticity)		○	○

나. 바이오마커 설명

(1) 피부보호

(가) MAPK(mitogen-activated protein kinase)/p-38/c-Fos/c-Jun/JNK (c-Jun N-terminal kinase)/AP-1(activator protein-1)

피부주름 생성 인자로 MAPK pathway를 통하여 JNK, AP-1의 Jun와 Fos family 단백질은 세포의 증식과 분화에 관련되는 많은 유전자의 발현을 조절하고 몇몇 MMPs의 발현을 강력히 유도한다.

(나) MMPs(matrix metalloproteinase) 발현량

MMP는 zinc이온을 요하는 endoprotease로 세포외기질 단백질을 분해하는 효소이다. 과도한 자외선은 AP-1를 활성화시켜 MMPs의 발현을 유도하여 콜라겐을 포함한 세포외기질 단백질을 분해시킨다.

(다) Ki-67, 8-OHdG

Ki-67는 세포의 증식 마커이며, ribosomal RNA 전사와 관련이 있다. 8-OHdG은 DNA 손상관련 산화적 마커로서 암 생성과 관련이 있다. 자외선에 의하여 Ki-67, 8-OHdG의 증가는 피부의 탄력을 저하시킨다.

(라) 표피·진피 두께(thickness of epidermis·dermis)

표피의 두께는 0.05~0.1 mm정도로, 각질층, 과립층, 유극층, 기저층으로 구성되어 있으며, 28일 정도 주기로 새로운 세포로 교체되고 있다. 진피는 섬유성분과 기질성분으로 구성되어 있으며 두께는 표피의 15~40배정도이다.

(마) 최소홍반량 (MED)

최소홍반량(minimum erythema dose, MED)은 UVB를 사람의 피부에 조사한 후 16~24시간에서, 조사영역의 거의 대부분에 미세한 홍반을 나타낼 수 있는 최소한의 자외선량을 말한다. 최소홍반량의 증가는 자외선으로부터 피부를 보호하는데 효과가 있음을 의미한다.

(바) SOD/GSH-Px/CAT

과도한 자외선 노출로 인하여 활성산소의 농도는 증가하고, 이를 억제하는 것이 SOD, GSH-Px, CAT 항산화효소들이다. SOD는 초과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔줌으로써 독성으로부터 세포를 방어한다. GSH-Px의 경우, 과산화수소를 환원시켜 물을 만드는 반응을 촉매하고, CAT는 과산화수소를 물과 산소로 분해하여 과산화수소의 축적을 방지하도록 도와준다.

(사) 사이토카인(cytokine)

사이토카인은 표적세포의 세포막에 존재하는 특이적인 수용체에 결합하고 신호전달 경로를 활성화하여 궁극적으로 효소활성이나 유전자의 발현을 변화시킨다. 자외선으로 인한 염증성 사이토카인(IL-6, IL-1 α , IL-10, TNF- α 등) 증가는 피부탄력을 감소시킨다.

(아) COX-2

COX-2(cyclooxygenase-2)는 아라키돈산을 prostaglandin E2(PGE2)로 전환시키는 효소로, 염증이나 면역자극에 의해 발현된다. 자외선으로 인한 COX-2의 증가는 피부주름에 영향을 준다.

(2) 피부구조 및 기능유지

(가) 세라마이드

세라마이드는 단백질 및 인지질 분해과정에서 제공되는 세린과 palmitoyl-COA의 결합에 의해 생성된다. 세라마이드의 지질성분들의 분비 감소는 lamellae구조를 파괴시켜 각질을 생성한다.

(나) 프로콜라겐(procollagen)

콜라겐의 구성성분으로, fibroblast, osteoblast 등에서 합성되어, 최종적으로 프로콜라겐 펩타아제에 의해 콜라겐으로 전환된다. 프로콜라겐의 증가는 피부의 결합력, 탄력성과 연관성이 있다.

(다) 콜라겐 섬유

새롭게 합성된 프로콜라겐은 효소반응을 거쳐 피부세포의 세포외 공간으로 분비되어 삼중 나선구조의 microfibril을 형성하고, microfibrils들은 leucine-rich small proteoglycans와 결합하여 피브릴을 형성하는데, 이러한 과정을 fibrillogenesis라고 한다. 결과적으로 이렇게 만들어진 피브릴들이 모여 콜라겐 섬유를 형성하게 되어 피부의 결합력과 탄력성을 갖게 한다.

(라) 콜라겐 합성 유전자

콜라겐 합성하는 단백질 콜라겐 type 1,3,4 alpha 1,2가 있다. 이들은 각각 콜라겐 type I, II, III, IV를 만드는데 관여하고 있으며, 각각의 type들은 서로 연관성이 있다.

(마) 콜라겐-I(collagen- I)

콜라겐- I는 섬유아세포에서 수용성 프로콜라겐 I으로 합성된 후, 세포 외로 분비된다. 그 후, 가수분해 과정을 통해 비수용성 콜라겐 섬유 형태로 전환된다. 뼈, 치아, 힘줄 생성 등에 관여하며, 힘에 관여하는 섬유들을 생산하기 위해 중합하는 역할을 한다.

(바) 엘라스틴(elastin)

엘라스틴 유전자 발현에 따라 트리포엘라스틴이라는 단백질을 합성하게 되고, 이러한 트리포엘라스틴은 서로 다른 트리포엘라스틴과 결합하여 최종적으로 엘라스틴 단백질을 만들게 된다. 탄성섬유인 엘라스틴은 진피층의 3~4% 정도를 차지하며 피부의 탄력에 영향을 준다.

(사) 피브릴린 함량

탄력섬유의 골격을 이루는 섬유 성분으로 피프릴린으로 구성된 섬유 골격이 만들어지면 엘라스틴 단백질이 붙어서 탄력섬유를 이루게 된다. 또는 각질형 성세포와 섬유아세포가 협력하여 피프릴린의 섬유골격을 만든다.

(아) 히알루론산 함량

히알루론산은 동물의 유기체 관절액, 연골, 피부 등에 많이 존재하는 성분으로 물과 결합하여 겔 상태가 되어 관절의 윤활작용, 피부의 유연성 등에 관여한다. 피부 조직에서 히알루론산은 콜라겐과 엘라스틴 섬유조직 사이에 들어 있는 젤리상태의 물질이다.

(자) 히알루론산 합성 효소(HAS)

히알루론산 합성효소는 HAS-1, 2, 3이 있으며, 합성효소의 초기단계에 다당류에 글루쿠론산과 N-아세틸글루코사민을 반복적으로 추가하여 히알루론산을 생성한다.

(차) 콜라게나아제 억제 활성

콜라겐의 섬유질 기본단위는 세 개의 폴리펩타이드 사슬로 되어있는 트로포콜라겐(tropocollagen)으로 대부분이 글리신과 프롤린으로 구성되어 있는데, 콜라게나아제는 Pro-X-Gly-Y 구조의 글리신과 프롤린 사이의 결합을 가수분해하는 효소이다. 이 효소는 함량에 따라 피부탄력 유지와 연관성이 있다.

(카) 엘라스타아제 억제 활성

엘라스틴은 조직을 연결하여 탄력을 제공하는 세포의 세포간질 단백질로써, 피부 진피를 구성하는 탄력섬유로 피부 탄력에 영향을 주는데 이러한 엘라스틴을 감소시키는 효소로 엘라스타아제가 있다.

(3) 임상적 평가 지표

(가) 피부주름(skin wrinkle)

건강한 표피의 각질층은 15-20%의 수분을 함유하고 있으며 수분이 10% 이하로 떨어지면 피부가 건조해지고 윤기와 탄력이 없어져 주름이 증가하게 된다.

(나) 피부탄력(skin elasticity)

피부 탄력은 탄력섬유인 엘라스틴을 간접적으로 평가하는 지표로서 엘라스틴 함량이 증가함에 따라 피부 탄력이 증가하여 주름개선 효과가 있다고 알려져 있다.

(다) 피부 수분량(skin hydration)

일반적으로 표피의 각질층은 약 15~20% 정도의 수분을 함유하고 있으나 수분이 10% 미만이면 피부가 건조해져 주름이 쉽게 형성된다. ‘자연보습인자(natural moisturizing factor)’라는 수용성 성분은 표피의 각질층과 피지막에 존재하여 이는 피부의 수분 함량을 결정하는 중요한 인자이다.

(라) 경피수분손실량(transepidermal water loss, TEWL)

동물이나 사람의 피부표면에서 공기 중 수분을 fick 법칙에 의해서 확산하는 증기압을 구하여 표피로부터 증발하는 수분을 산정하는 방식이다. 따라서 인체외부로의 ‘경피수분 손실량’을 측정은 각질층의 보습 및 수분상태와 관련이 있다. 경피수분손실(TEWL)이 클수록 각질층의 보습 능력이 떨어지는 것을 의미한다.

(마) 각질화 정도(stratum corneum flexibility)

피부의 각질은 외부 환경에 대한 일차적인 방어기능을 담당하고 있다. 외부로부터의 물리적, 화학적 자극 및 미생물 등으로부터 생체를 보호하고 체액, 수분의 증발 등을 적절히 조절하여 항상성을 유지한다. 특히, 피부를 탄력있고, 부드럽게 해주는 역할을 하는 물질은 각질층에 대부분 존재한다. 각질층은 천연보습인자와 단백질 그리고 콜레스테롤, 지방산, 세라마이드로 구성된 지질로 이루어지며, 피부의 수분 정도와 관련이 있다.

(바) 피부 거칠기(skin roughness)

자외선, 노화 등으로 인하여 표피의 각질층 수분이 10%이하로 떨어지면 피부가 윤기와 탄력이 없어진다. 특히, 피부표면의 최외층에 있는 각질세포가 잘 떨어져 나가지 않아서 각질이 많이 쌓이게 되고 두터워지면 더욱 거칠고 건조해진다.

2. 주요 바이오마커의 측정 방법

가. 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강 유지

(1) MAPK(mitogen-activated protein kinase), p-38, c-Fos, c-Jun, JNK(c-Jun N-terminal kinase)

MAPK, p-38, c-Fos, c-Jun, JNK은 단백질 전기영동법을 이용하여 단백질 발현정도를 본다. 시험물질을 식이섭취 시킨 실험동물의 조직을 적출하여 lysis buffer를 넣고 균질화한 다음, 원심분리한다. 원심분리하여 얻은 상층액은 단백질을 정량하여 일정량의 단백질을 Sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 크기별로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA(bovine serum albumin)로 Blocking 과정을 거친 후, 아세틸콜린에스테라아제 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음, ECL 용액으로 반응시키고 X-ray film에 노출시켜 각각의 band를 정량화하여 측정한다.

(2) AP-1(activator protein-1)

Dual-Luciferase Reporter Assay System으로, 세포를 PBS로 씻어 DMEM으로 인큐베이션한다. Lipofectamine 2000 reagent에 따라, 세포를 pNF-kB, pAP-1-Luc reporter vector, pCMV- β -gal plasmid로 투여시킨다. 인큐베이션동안 luminometer를 이용하여 luciferase activity를 측정한다.

(3) MMPs(matrix metalloproteinase)

MMPs의 분석방법은 PCR, 단백질 전기영동법 등이 있다.

① PCR

시험물질을 식이섭취 시킨 실험동물의 조직을 적출하여 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 클로로포름을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심 분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 물에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 MMPs의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭한 후 유전자 발현량을 분석한다.

② 단백질 전기영동법

시험물질이 처리된 조직에 lysis buffer를 넣고 균질화한 다음, 원심분리한다. 원심분리하여 얻은 상층액은 단백질을 정량하여 일정량의 단백질을 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 크기별로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA(Bovine serum albumin)로 Blocking 과정을 거친 후, MMPs 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음, ECL 용액으로 반응시키고 X-ray film에 노출시켜 각각의 band를 정량화하여 MMPs를 측정한다.

(4) Ki-67, 8-OHdG

Anti-mouse Ki-67, anti-8-OHdG를 이용하여 immunoperoxidase technique를 사용한다. 항체에 퍼옥시다제를 결합시켜 항원에 결합한 항체의 위치 또는 양을 peroxidase 활성을 이용하여 확인하는 방법이다.

(5) 표피·진피 두께(thickness of epidermis·dermis)

표피, 진피의 두께는 digimatic calipers를 사용하여 측정한다. 또는 기저층부터 과립층까지의 두께를 biomicroscope, DP-72 CCD camera를 이용하여 측정한다.

(6) 최소홍반량(MED)

피험자의 등에 시험부위를 구획한 후 피험자가 편안한 자세를 취하도록 하여 자외선을 조사한다. 자외선을 조사하는 동안에 피험자가 움직이지 않도록 한다. 조사가 끝난 후 16~24시간 범위내의 일정시간에 피험자의 홍반상태를 판정한다. 홍반은 충분히 밝은 광원 하에서 두 명이상의 숙련된 사람이 판정한다. 전면에 홍반이 나타난 부위에 조사한 UVB의 광량 중 최소량을 최소홍반량으로 한다.

(7) SOD(superoxide dismutase), GPx(glutathione peroxidase), CAT(catalase)

상용화된 Kit을 이용하여 UV-spectrometer로 항산화 활성도를 측정한다.

(8) 사이토카인(cytokines)

시험물질이 처리된 세포에 lysis buffer를 넣고 균질화한 다음, 원심분리한다. 원심분리하여 얻은 상층액은 단백질을 정량하여 일정량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate polyac

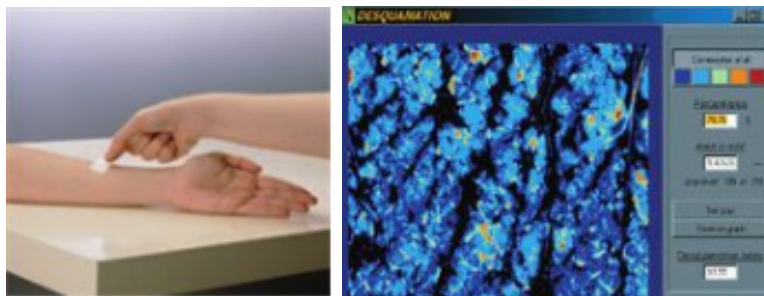
crylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 크기별로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA(bovine serum albumin)로 blocking 과정을 거친 후, 사이토카인 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음, ECL 용액으로 반응시키고 X-ray film에 노출시켜 각각의 band를 정량화하여 사이토카인을 측정한다.

(9) COX-2(cyclooxygenase-2)

시험물질이 처리된 세포에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 클로로포름을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심 분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 물에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. PCR을 이용하여, 합성된 cDNA에 COX-2의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭한 뒤, 유전자 발현량을 측정한다.

(10) 피부주름(skin wrinkle)

쥐의 dorsal skin을 replica-visualizer를 이용하여, R1~R5로 나누어 측정한다. R1은 피부 표면 가장 높은 값과 낮은 값 사이의 거리, R2는 5부위 측정치 중 R1의 가장 큰 값, R3는 4부위 측정치 R1의 평균, R4는 평활도 깊이, R5는 산술 평균 표면 거칠기를 평가한다.



[Visiometer]

[출처: 건강기능식품 기능성평가 가이드라인, 2014]

(11) 피부 탄력(skin elasticity)

실험동물의 dosal skin부분을 digimatic calipers 또는 cutometer를 사용하여 측정한다.

나. 피부 보습

(1) 세라마이드(ceramide) 함량

표피를 polytron으로 분쇄하고 HPLC-ELSD를 이용하여 세라마이드 양을 측정한다.

(2) 프로콜라겐(procollagen)

in vitro 시험법으로 프로콜라겐 type-1 C peptide(PIP) EIA kit를 이용하여 프로펩타이드의 양을 측정한다. 동물시험은 suction blister model 일종으로, 피부 범위 약 7 mm정도에 테스트를 진행한다. blister 생성을 위해, 그 부위에 Plexiglas suction chamber를 놓고 압력을 준다. 생성된 blister 액체를 sterile hypodermic syringes에 담아 보관하며, blister 액체로 ELISA kit를 이용하여 프로콜라겐 양을 측정한다.

(3) 콜라겐 섬유(collagen fiber)

Anticollagen Type I antibody를 이용하여 면역조직화학염색(IHC)법으로 수행한다. 희생시킨 동물에서 혈액을 채취하고 조직을 적출하여 고정액에 담가 12~24 시간 고정한다. Free-floating 방법으로 고정된 조직은 30% sucrose용액에 넣고 24시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결절편기를 이용하여 35 μ m 두께의 연속가로 동결절편을 제작한다. 조직절편에 과산화수소(H_2O_2)를 처리하여 내인성 과산화효소를 제거하고 normal goat serum으로 처리한다. 희석한 1차 항체를 4℃에서 24~48시간 동안 반응시킨다. 2차 항체를 반응시킨 후, avidin biotin complex를 처리시키고, 3, 3'-diaminobenzidin tetrahydrochloride (DAB)로 발색시켜 콜라겐 섬유를 측정한다.

(4) 콜라겐 합성 유전자

Suction blister model의 방법을 사용하여 시험물질이 처리된 세포를 trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 클로로포름을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심 분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 물에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭한 뒤, 유전자 발현량을 분석하여 COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1을 측정한다.

(5) 콜라겐- I (collagen- I)

collagen- I 은 단백질 전기영동법을 이용하여 단백질 발현정도를 본다. 시험물질을 식이섭취 시킨 실험동물의 조직을 적출하여 lysis buffer를 넣고 균질화한 다음, 원심분리한다. 원심분리하여 얻은 상층액은 단백질을 정량하여 일정량의 단백질을 sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 크기별로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA(bovine serum albumin)로 Blocking 과정을 거친 후, 아세틸콜린에스테라아제 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음, ECL 용액으로 반응시키고 X-ray film에 노출시켜 각각의 band를 정량화하여 콜라겐- I 을 측정한다.

(6) 엘라스틴(elastin)

Suction blister model 일종으로, 피부 범위 약 7mm정도에 테스트를 진행한다. blister 생성을 위해, 그 부위에 plexiglas suction chamber를 놓고 압력을 준다. 생성된 blister 액체를 sterile hypodermic syringes에 담아 보관하며, blister 액체로 ELISA kit를 이용하여 elastin 양을 측정한다.

(7) 피브릴린 함량(fibrillin content)

Suction blister model 일종으로, 피부 범위 약 7mm정도에 테스트를 진행한다. blister 생성을 위해, 그 부위에 plexiglas suction chamber를 놓고 압력을 준다. 생성된 blister 액체를 sterile hypodermic syringes에 담아 보관하며, blister 액체로 ELISA kit를 이용하여 fibrillin 양을 측정한다.

(8) 히알루론산 함량

① PCR법

유전자 발현양 측정법은 시험물질이 처리된 세포에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 클로로포름을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심 분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 물에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 히알루론산의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭한 뒤, 유전자 발현량을 분석한다.

② ELISA법

ELISA법은 피부 표피, 진피 조직을 지방을 제거하는 등 전처리를 거쳐 enzyme-linked immunosorben assay인 hyaluronic acid kit를 이용하여 측정한다.

(9) 히알루론산 합성 효소(HAS-1)

Suction blister model의 방법을 사용하여 시험물질이 처리된 세포에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 클로로포름을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심 분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 물에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 HAS-1의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭한 뒤, 유전자 발현량을 분석하여 HAS-1 양을 측정한다.

(10) 콜라게나아제 억제 활성

EnzCheck gelatinase/collagenase assay kit를 사용하며, fluorescence micro plate reader를 통해 콜라게나아제 억제 활성도를 측정한다.

(11) 엘라스타아제 억제 활성

0.4 M TrisHCl buffer(pH 8.6)을 50 μ l, 농도별 추출물을 50 μ l, 50mM Tris-HCl buffer(pH 8.6)에 0.6U/ml이 되도록 희석한 enzyme(ex-porcine pancreas)을 50 μ l을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30min간 반응시킨 후 substrate(methoxysuccinyl-L-Ala-LVal-5-nitroanilide)를 100 μ l를 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 30 분간 반응시킨 후 다시 410nm에서 흡광도를 측정한다.

(12) 피부 수분량(skin hydration)

Corneometer를 이용하여 실험동물의 dosal skin부분을 수분함유량의 시험 전·후 변화를 기기적으로 측정한다.

(13) 경피수분손실량(TEWL)

Ventilated chamber method에 따라 전해물분석기를 이용하거나, 쥐의 dosal skin에 tewameter, corneometer 등을 이용하여 피부의 수분 정도를 측정한다.



[Tewameter]

[출처: Courage + Khazaka electronic GmbH]

(14) 각질화 정도(stratum corneum flexibility)

각질층의 수화와 두께 정도는 corneometer를 이용하여 측정한다.

(15) 피부 거칠기(skin roughness)

silicone imprint(replica)를 이용하여 피부의 모사판을 제작하고 이를 적합한 기기(예: visiometer, primos compact 등)를 사용하여 분석한다. 측정변수는 Rz, Rz, R3-R5 등을 측정한다.

(16) 피부 탄력(skin elasticity)

탄력측정기(예: Cutometer, Balisotmeter 등)를 이용하여 피부의 탄력을 측정한다. Cutometer의 경우 R2, R5등 변수는 1에 가까울수록 탄력성이 높은 것으로 평가된다.

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 시험관시험

(1) 시험계

- ① 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강을 유지하는데 도움: epidermal keratinocyte 등을 사용한다.
- ② 피부 보습에 도움: human dermal fibroblast 등을 사용한다.

(2) 바이오마커

- ① 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강을 유지하는데 도움: MMPs 발현량 등을 측정한다.
- ② 피부 보습에 도움: 콜라게나아제, 엘라스타아제 억제활성 등을 측정한다.

(3) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

나. 동물시험

(1) 실험동물

UV를 조사한 hairless mice 등의 실험동물을 사용한다.

(2) 바이오마커

- ① 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강을 유지하는데 도움: 피부주름, 표피두께, 콜라겐 함량 등을 측정한다.
- ② 피부 보습에 도움: 피부 수분량, 경피 수분손실(TEWL), 세라마이드 함량 등 다양한 바이오마커를 측정한다.

(3) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

다. 인체적용시험

(1) 시험대상

(가) 시험대상자(예시)

건강인, 피부건조증상(국소적)이 있는 자, 경증 아토피 피부염이 있는 자(긁무를 증상없음, 증상이 국소적)를 대상으로 한다.

(나) 대상자 제외기준(예시)

- 임신 또는 수유 중인 여성과 임신 가능성이 있는 여성
- 민감성 또는 과민성 피부를 가진 자
- 건선환자(면역억제제복용자), 중증 아토피 피부염환자(긁무를 증상, 전신증상, 스테로이드제 복용)
- (최소홍반량 실험시) 광알레르기 또는 광감작의 병력이 있는 자
- 그 외 연구책임자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 경우

(2) 시험설계

무작위배정, 위약대조연구(randomized, controlled trial; RCT)를 기본으로 한다.

(3) 바이오마커

- ① 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강을 유지하는데 도움: 피부주름, 피부 탄력 등을 측정한다.
- ② 피부 보습에 도움: 피부 수분량, 경피 수분손실량(TEWL) 등을 측정한다.

(4) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정함

IV

참고문헌

1. 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」, 식품의약품안전처 고시 2016-141호, 2016
2. 건강기능식품 시험법 가이드(II), 식품의약품안전청, 2004
3. 기능성식품학, 이형주, 장해동, 이기원, 이흥진, 강남주, 수확사, 2011
4. 김기쁨, 조아령, 차화준, 신상훈, 이정주, 이현경, 안인숙. Sericine과 Alpha-Mangostin의 주름개선 상승효과. Kor J Aesthet Cosmetol 13(6):729-734, 2015
5. 김나미, 구분석, 이성계, 황의일, 소승호, 도재호. 홍삼성분이 섬유아세포의 콜라겐 생합성과 MMP-1 활성화에 미치는 영향. J Ginseng Res 31(2):86-92, 2007
6. 김대선, 전병국, 최미은, 문연자, 박석돈, 우원홍. Hairless mouse에서 홍삼·교맥 복합물의 피부주름 생성 예방 효과. Kor J Orien Physiol Pathol 23(3):695-699, 2009
7. 김미진, 정택규, 박현철, 윤경섭. 질려자 추출물의 피부 볼륨 증진 및 주름개선 효과. Kor Biotech Bioeng J 31(3):178-185, 2016
8. 메디컬 스킨케어, 표영희, 박은경, 이해영, 이은주, 파워북, 2018
9. 생활속의 자외선, 장성재, 최상숙, 김영옥, 화장품신문 출판국, 2002
10. 소승호, 이성계, 황의일, 구분석, 한경호, 정진호, 이민정, 김나미. 홍삼 생약 복합물 (KTNG0345)의 피부 주름개선에 관한 작용기전. J Ginseng Res 32(1):39-47, 2008
11. 피부과학, 권혜영, 권혜진, 김미령, 김봉인, 메디시언, 2014
12. 피부과학, 대한피부과학회 교과서 편찬위원회, ㈜대학의학서적, 2014
13. Bandier J, Ross-Hansen K, Carlsen BC, Tanassi JT, Johansen JD, Heegaard NH. Quantification of Epidermal Filaggrin in Human Skin and its Response to Skin Irritation. J Invest Dermatol 136(6):1296-1299, 2016
14. Bertuccelli G, Zerbinati N, Marcellino M, Nanda Kumar NS, He F, Tsepakolenko V, Cervi J, Lorenzetti A, Marotta F. Effect of a quality-controlled fermented nutraceutical on skin aging markers: An antioxidant-control, double-blind study. Exp Ther Med 11(3):909-916, 2016
15. Cho S, Kim HH, Lee MJ, Lee S, Park CS, Nam SJ, Han JJ, Kim JW, Chung JH. Phosphatidylserine prevents UV-induced decrease of type I procollagen and increase of MMP-1 in dermal fibroblasts and human skin in vivo. J Lipid Res 49(6):1235-1245, 2008
16. Cho S, Lee S, Lee MJ, Lee DH, Won CH, Kim SM, Chung JH. Dietary Aloe Vera

- Supplementation Improves Facial Wrinkles and Elasticity and It Increases the Type I Procollagen Gene Expression in Human Skin in vivo. *Ann Dermatol* 21(1):6-11, 2009
17. Farrar MD, Nicolaou A, Clarke KA, Mason S, Massey KA, Dew TP, Watson RE, Williamson G, Rhodes LE. A randomized controlled trial of green tea catechins in protection against ultraviolet radiation-induced cutaneous inflammation. *Am J Clin Nutr* 102(3): 608-15, 2015
 18. Fayad S, Morin P, Nehme R. Use of chromatographic and electrophoretic tools for assaying elastase, collagenase, hyaluronidase, and tyrosinase activity. *J Chromatogr A* 1529:1-28, 2017
 19. Hwang IS, Kim JE, Lee HR, Lee YJ, Jang MJ, Son HJ, Lee HS, Oh CH, Kim BH, Lee SH, Hwang DY. UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med* 30(2):392-400, 2012
 20. Hwang YP, Kim HG, Han EH, Choi JH, Park BH, Jung KH, Shin YC, Jeong HG. N-Acetylglucosamine suppress collagenases activation in ultraviolet B-irradiated human dermal fibroblasts: Involvement of calcium ions and mitogen-activated protein kinases. *J Dermatol Sci* 63(2):93-103, 2011
 21. Jin YJ, Pyo YH. Effect of Monascus-Fermented Soybean Extracts on Antioxidant and Skin Aging-Related Enzymes Inhibitory Activities. *Prev Nutr Food Sci* 22(4):376-380, 2017
 22. Juliet MP, Anitra CC, Vissers MCM. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients* 9(8):866, 2017
 23. Juturu V, Bowman JP, Deshpande J. Overall skin tone and skin-lightening-improving effects with oral supplementation of lutein and zeaxanthin isomers: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 9:325-332, 2016
 24. Kimura Y, Sumiyoshi M. French maritime pine bark (*Pinus maritima* Lam.) extract (Flavangenol) prevents chronic UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis in melanin-possessing hairless mice. *Photochem Photobiol* 86(4):955-63, 2010
 25. Kyungho P. Role of Micronutrients in Skin Health and Function. *Biomol Ther*

- 23(3):207-217, 2015
26. Magcwebeba TU, Swart P, Swanevelder S, Joubert E, Gelderblom WC. In Vitro Chemopreventive Properties of Green Tea, Rooibos and Honeybush Extracts in Skin Cells. *Molecules* 21(12): E1622, 2016
27. Marini A, Grether-Beck S, Jaenicke T, Weber M, Burki C, Formann P, Brenden H, Schonlau F, Krutmann J. Pycnogenol effects on skin elasticity and hydration coincide with increased gene expressions of collagen type I and hyaluronic acid synthase in women. *Skin Pharmacol Physiol* 25(2):86-92, 2012
28. Oba C, Ohara H, Morifuji M, Ito K, Ichikawa S, Kawahata K, Koga J. Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 29(4):204-211, 2013
29. Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, Akiyama M, Fujimoto N, Kobayashi T, Tajima S. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J Dermatol* 37(4):330-338, 2010
30. Proksch E, Schunck M, Zague V, Segger D, Degwert J, Oesser S. Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis. *Skin Pharmacol Physiol* 27(3):113-119, 2014
31. Sadowski T, Klose C, Gerl MJ, Wojcik-Maciejewicz A, Herzog R, Simons K, Reich A, Surma MA. Large-scale human skin lipidomics by quantitative, high-throughput shotgun mass spectrometry. *Sci Rep* 7:43761, 2017
32. Tsuji K, Mitsutake S, shikawa J, Takagi Y, Akiyama M, Shimizu H, Tomiyama T, Igarashi Y. Dietary glucosylceramide improves skin barrier function in hairless mice. *J Dermatol Sci* 44(2):101-107, 2006
33. Zhang M, Dang L, Guo F, Wang X, Zhao W, Zhao R. Coenzyme Q(10) enhances dermal elastin expression, inhibits IL-1 α production and melanin synthesis in vitro. *Int J Cosmet Sci* 34(3):273-279, 2012
34. Zhuang Y, Hou H, Zhao X, Zhang Z, Li B. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation. *J Food Sci* 74(6):H183-188, 2009

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서) - ‘피부건강에 도움을 줄 수 있음’ 편 -

발 행 인 : 이동희

편 집 위 원 장 : 황인균

편 집 위 원 : 이해영, 권용관, 허수정, 서은채, 국주희, 김준영,
이미영, 오재명, 황경미, 방수진, 이요아, 정혜진,
김선후, 송진희

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2019년 6월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구팀

(043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430)

건강기능식품 기능성 평가 가이드

‘피부건강에 도움을 줄 수 있음’ 편



【부패. 공익신고】 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 국민신문고 > 부패.공익신고” 코너
- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 신고센터 > 부패.공익신고 상담” 코너