

발간등록번호

11-1543000-002005-01

## 봉독을 이용한 탈모방지 및 양모촉진 헤어케어제품 개발

(Development of hair care products for  
preventing hair loss and promoting hair growth  
using bee venom)

고려대학교 산학협력단

농림축산식품부

# 제 출 문

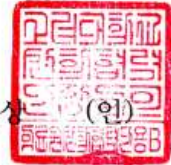
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “봉독을 이용한 탈모방지 및 양모촉진 헤어케어제품 개발” (개발기간 : 2014. 09. 25 ~ 2017. 09. 24.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017 . 12 . 29 .

주관연구기관명 : 고려대학교 산학협력단

고제상 (인)



참여기관명 : 유일팜테크

김규완 (인)



고려은단(주)

조영조 (인)



주관연구책임자 : 고려대학교 산학협력단

임영희

참여기관책임자 : 유일팜테크

마호우

고려은단(주)

천미정

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	114070-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2014.09.25.~ 2017.09.24.	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업				
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	붕독을 이용한 탈모방지 및 양모촉진 헤어케어제품 개발			
	세부 과제명				
연구책임자	임 영 희	해당단계 참 여 연구원 수	총: 18 명 내부: 4 명 외부: 14 명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 260,000천원 민간: 87,000천원 계: 347,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 51 명 내부: 12 명 외부: 39 명	총 연구개발비	정부: 780,000천원 민간: 261,000천원 계: 1,041,000천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	고려대학교 산학협력단			참여기업명 유일팜테크 고려은단(주)	
위 탁 연 구	연구기관명: 더마프로 건일제약			연구책임자: 백지훈 한덕주	
요약				보고서 면수: 234면	

## 〈 국문 요약문 〉

	코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>붕독에 함유된 melittin을 유효성분으로 하는 생장기 유도효과 및 퇴행기 억제 효과에 대한 효능 시험 및 작용기전에 대한 연구를 통해 과학적인 기전을 규명하고, 탈모방지 및 양모촉진 기능이 뛰어난 부가가치가 높은 남녀공용의 헤어케어 기능성화장품을 개발하는 것이 최종 목표 임.</p>				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 붕독의 정제과정 확립 후 기준물질인 멜리틴 함유량이 50% 이상인 정제 붕독 제조</li> <li>• 정제 붕독에 의한 생장기 양모 촉진 효과에 대한 검증 완료</li> <li>• 정제 붕독에 의한 퇴행기 탈모방지 효과에 대한 검증 완료</li> <li>• 붕독의 작용 기전을 규명                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 탈모 관련 인자의 활성 저해 측정함</li> <li>- 피부유래 세포의 증식 촉진 효과 측정: dermal papilla cell (DPC) cell 증식 측정함</li> <li>- 양모촉진 관련 인자의 활성 증가 효과 측정</li> <li>- 피부 염증 유발 미생물들에 대한 항염증 효과를 검증함</li> </ul> </li> <li>• 붕독원료의 대량생산을 위한 공정 최적화 조건 검토 후 붕독원료 제조공정의 최적화 및 대량생산 공정을 확립하였음</li> <li>• 붕독원료의 표준화(유효성분 melittin 50% 이상)를 확립함</li> <li>• 붕독원료에 대한 안전성 검증을 완료함</li> <li>• 붕독원료에 대한 기준 및 시험법 확립</li> <li>• 붕독원료의 안정성 시험 완료</li> <li>• 붕독의 탈모방지에 대한 인체적용시험 완료</li> <li>• 붕독의 유효성분을 함유한 제품개발을 위한 레시피 및 제형 개발</li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 붕독의 새로운 효과 개발 및 기술 이전에 따른 제품화가 기대됨</li> <li>• 국내에서 채취한 붕독 사용으로 제품화시, 양봉농가 소득 증대 예상</li> <li>• 탈모인구 감소를 유도하여 증가하고 있는 탈모질환 진료비 절감효과가 기대됨</li> <li>• 시장규모가 매우 큰 세계시장으로의 수출 확대에 의한 경제적인 효과가 기대됨</li> <li>• 연구에 참여한 기업의 기능성 원료 물질에 대한 산업화로 기업의 가치 향상에 기여</li> <li>• 본 연구의 연구방법과 연구 결과를 붕독의 새로운 기능성 개발 연구에 확대 적용이 기대됨</li> <li>• 특허출원에 의한 원천기술력 확보 및 붕독의 적응증 확대를 통한 기술력 확보</li> <li>• 참여한 연구 인력의 전문성 향상으로 천연한 원료유래 기능성 물질 전문 연구 인력의 양성에 기여</li> </ul>				
중심어 (5개 이내)	붕독	탈모억제	양모	세포증식촉진	헤어케어제품



## < SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>Bee venom (BV) has been used as a traditional medicine. In this study, BV containing over 50% melittin, an effective component, was prepared and evaluated the effect of BV on prevention of hair loss and promotion of hair growth. In addition, the mechanism of hair growth by treatment of BV was studied. The purpose of this study is to develop hair care products containing BV for preventing hair loss and promoting hair growth.</p>		
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Establishment of refining process of BV and production of refined BV containing over 50% melittin, an effective compound.</li> <li>• Confirm the effect of BV on the promotion of hair growth in anagen.</li> <li>• Confirm the effect of BV on the prevention of hair loss in catagen</li> <li>• Mechanism of action of bee venom was evaluated as follows:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– BV inhibits the activities of hair loss-related factors</li> <li>– BV stimulates the growth of dermal papilla cell (DPC) cell</li> <li>– BV increases the activities of the factors involved in promotion of hair growth</li> <li>– BV shows anti-inflammatory effect on pathogen-induced inflammation.</li> </ul> </li> <li>• After evaluating the process conditions in the mass production system, optimization of the manufacturing process of refined BV and mass production process were established.</li> <li>• Establishment of the standardization for BV (containing over 50% melittin)</li> <li>• Complete the evaluation of safety of BV.</li> <li>• Establishment of the standard analytical methods for BV.</li> <li>• Complete the evaluation of stability of BV.</li> <li>• Complete an intervention study to evaluate efficacy on hair-loss preventing effect of BV.</li> <li>• Development of recipes and product forms for the production of hair care containing BV as a functional ingredient.</li> <li>• Development of recipes and product forms for the production of hair care containing BV as a functional ingredient.</li> </ul>		
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expectation to reduce the expenses for treating hair loss by contributing to the reduction of people with hair loss.</li> <li>• Expectation to economic effects by extension of export of hair care products containing bee venom to global market.</li> <li>• Contribution to the enhancement of corporate value of companies participated in the research by production of hair care products containing bee venom.</li> <li>• Contribution to expand research area to develop new functions of bee venom.</li> <li>• Contribute to increase incomes of domestic bee farms by developing hair care</li> </ul>		

	products using domestic bee venom. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilization of the results obtained from this study to publish research papers and to acquire intellectual property rights.</li> <li>• Contribution to the training of professional researchers involved in the research by improving their practical skills and research ability.</li> </ul>				
Keywords	bee venom	prevention of hair loss	promotion of hair growth	cell growth stimulator	hair care products

## < Contents >

<b>Chapter 1. Overview of Research and Objectives</b> .....	1
Section 1 Objectives of Research and Development .....	1
Section 2 Necessity of Research .....	1
Section 3 Scope of Research and Development .....	6
<b>Chapter 2. R&amp;D Status in Domestic and Abroad</b> .....	8
Section 1 R&D Status in Domestic and Abroad .....	8
Section 2 Current Status of Intellectual Property Rights .....	13
Section 3 Status of Domestic and Foreign Markets .....	17
<b>Chapter 3. Research Contents and Results</b> .....	21
Section 1 Research Contents and Results .....	21
<b>Chapter 4. Achievement and Contribution</b> .....	217
Section 1 Achievement of Goals .....	217
Section 2 Contribution to Related Parts .....	220
<b>Chapter 5. Plans for the Practical Use of Results</b> .....	221
<b>Chapter 6. Information of Related Technologies Abroad</b> .....	222
<b>Chapter 7. Security levels of the Research</b> .....	223
<b>Chapter 8. Facilities and Equipments</b> .....	223
<b>Chapter 9. Safety Management of Lab</b> .....	224
<b>Chapter 10 Significant Research Outcomes</b> .....	230
<b>Chapter 11 Others</b> .....	231
<b>Chapter 12 References</b> .....	232

## < 목 차 >

제 1장 연구개발 과제의 개요 .....	1
제 1절 연구개발 목적 .....	1
제 2절 연구개발의 필요성 .....	1
제 3절 연구개발 범위 .....	6
<b>제 2장 국내외 기술개발 현황 .....</b>	<b>8</b>
제 1절 국내외 연구 현황 .....	8
제 2절 지적재산권 현황 .....	13
제 3절 국내외 시장 현황 .....	17
<b>제 3장 연구수행 내용 및 결과 .....</b>	<b>21</b>
제 1절 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	21
<b>제 4장 목표달성도 및 관련분야 기여도 .....</b>	<b>217</b>
제 1절 목표달성도 .....	217
제 2절 관련분야 기여도 .....	220
<b>제 5장 연구결과의 활용계획 등 .....</b>	<b>221</b>
<b>제 6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>221</b>
<b>제 7장 연구개발성과의 보안등급 .....</b>	<b>223</b>
<b>제 8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설, 장비현황 .....</b>	<b>223</b>
<b>제 9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....</b>	<b>224</b>
<b>제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....</b>	<b>230</b>
<b>제 11장 기타사항 .....</b>	<b>231</b>
<b>제 12장 참고문헌 .....</b>	<b>232</b>

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

# 제 1장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발 목적

### 1. 연구개발의 최종 목표

- 봉독에 함유된 melittin을 유효성분으로 하는 생장기 유도효과 및 퇴행기 억제 효과에 대한 효능 시험 및 작용기전에 대한 연구를 통해 과학적인 기전을 규명하고 탈모방지 및 양모촉진 기능이 뛰어난 부가가치가 높은 남녀공용의 헤어케어 기능성 화장품을 개발하는 것이 최종 목표이다.

## 제 2절 연구개발의 필요성

### 1. 탈모증 환자의 증가

- 모발은 외부 환경으로부터 두개골을 보호하는 역할뿐만 아니라 미용적인 역할도 지니고 있다.
- 우리 사회는 국민 경제가 발전하면서 외모에 대한 관심이 높아지게 되었고, 따라서 외모에 영향을 미치는 탈모 현상에 대한 관심이 증가하고 있다.
- 최근에는 유전적 요인과 더불어 남성 호르몬의 과다, 정신적 스트레스, 음주, 흡연 등 환경적 요인으로 인한 후천적 탈모가 급격히 증가하고 있다.
- 현재 불규칙한 식생활, 스트레스가 많은 사회적인 환경으로 인해 탈모인구가 꾸준히 증가하고 있다.
- 탈모의 원인은 유전적 요인, 남성호르몬의 영향, 두피의 혈액순환 장애 등이 있으며 유전적인 요인이 가장 컸으나 최근에는 심한 스트레스, 만성적인 피로, 수면부족, 자외선, 잦은 파마, 염색 등 환경오염 등으로 탈모의 시기 또한 많이 빨라지는 추세이다.
- 그 대상은 4,50대 중장년 남성에서만 나타나는 것이 아니라, 젊은 남성층과 여성층으로 급격히 확대되어 가는 추세로 탈모환자는 남녀 모두에서 크게 증가 추세이다.

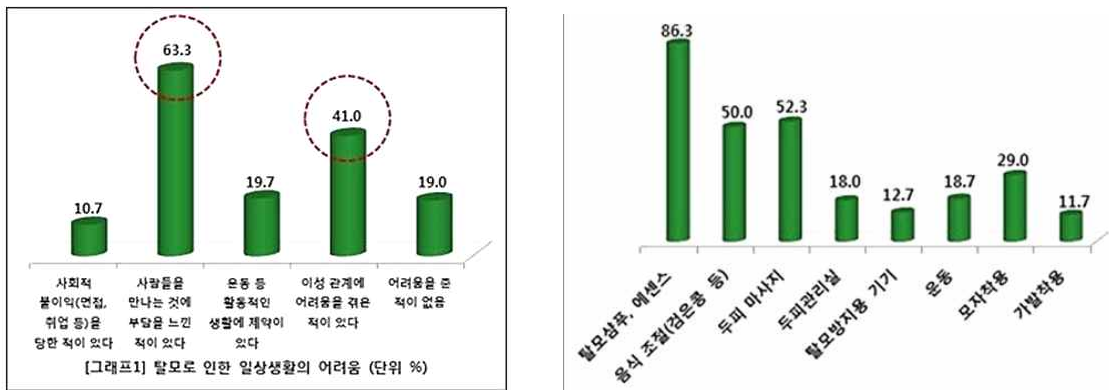


출처: 2014-05-04 YTN 뉴스



## 2. 탈모증 환자들의 탈모증에 대한 인식과 대응

- 탈모증 환자들은 탈모로 인한 우울증, 수치심 등으로 인한 스트레스 강도가 높아지며, 대인 또는 이성 관계에 어려움을 겪는 등 사회적, 정서적으로 장애를 겪고 있다.
- 경희의료원 심우영 교수가 조사한 자료에 따르면 국내 탈모 환자 중 55.7%는 사회생활에 지장을 받는다고 하였으며, 82.8%는 자신의 탈모를 타인이 인식할 때 수치심을 느끼는 것으로 나타났다.
- 이와 같이 탈모로 인해 일상생활에서의 어려움을 호소하고 있으나, 이를 질환으로 인식하지 못하고 있다.
- 따라서 국내에서는 탈모 증상을 자가 치료 방법을 통해 개선하려는 것으로 조사되었다.



(출처: 공감언론 뉴시스, 2012. 5. 9)

탈모 자가치료 비율



[국내 탈모환자의 자가 치료 비율 (출처: 국민건강보험공단 통계)]

- 탈모 환자 증가에 따른 진료비 또한 꾸준히 증가하고 있다.



(출처: 건강보험심사평가원)

- 탈모제 시장 규모를 보면 2013년 탈모치료제 생산·수입액은 590억원 이었으며 이는 2004년 133억원에 비해 4배 이상 증가했다.

탈모치료제 생산 및 수입현황

연도	생산금액(백만원)	수입금액(천달러)
<b>2004</b>	<b>8,087</b>	<b>5,309</b>
2005	9,124	2,742
2006	17,417	7,787
2007	30,847	11,093
2008	30,762	7,194
2009	21,648	9,097
2010	23,669	9,965
2011	28,140	8,942
2012	33,415	12,197
<b>2013</b>	<b>45,146</b>	<b>13,903</b>

출처 식품의약품안전처

### 3. 탈모치료제 시장 현황

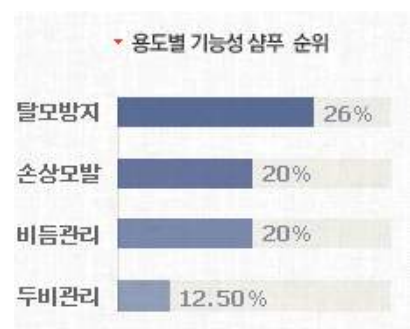
- 모발 성장은 생장기(anagen phase)에는 모낭의 기저부위, 즉 모구에서 세포분열이 활발히 이루어져 모발이 계속 자라게 되며, 퇴행기(catagen phase)에는 모구가 급속도로 위축되며 모낭의 성장활동이 정지되어 가고 휴지기(telogen phase)에는 모낭의 성장활동이 완전히 정지되게 된다.
- 휴지기 모낭의 기저부에서는 새로이 생장기 모발이 형성되게 되며 기존의 휴지기 모발은 새로운 생장기 모발에 의하여 밀려나 탈락되거나 또는 빗질 등의 기계적 작용에 의하여 빠지게 된다.
- 탈모방지 및 양모제 효과는 휴지기에서 생장기로의 전환을 촉진시키는 생장기 유도 효과 및 생장기에서 퇴행기로의 전환을 지연시키는 퇴행기 억제 효과를 동시에 보이는 성분을 발굴하여 제품화 할 필요성이 있다.
- 양모제는 모근을 자극하여 머리카락의 성장을 돕고, 그 탈락을 막을 목적으로 사용하여 의약품 분야로 분류되며, 식품의약품안전처 약사법 기준에 따르면 탈모방지 및 양모제는 의약품, 발모제는 의약품으로 구분되고 있으나 현재(2017년 8월 이후)는 탈모 방지를 위한 헤어케어제품은 의약품에서 화장품으로 분류되었다.
- 현재 미국 Food and Drug Administration(FDA)에서 허가된 탈모치료제 성분은 피나스테리드(finasteride) 및 미녹시딜(minoxidil)뿐이다.
- 국내에서 의약품으로 허가된 탈모치료제로는 외용 미녹시딜 성분의 외용 및 경구용 탈모치료제가 대표적이며 경구용 피나스테리드 성분을 함유한 경구용 탈모치료제가 시판되고 있다.
- 최근 이탈리아 탈모전문 제약회사 폴텐사가 개발한 트리코사카라이드(Tricosaccaride®)와



트리칼고실(Tricalgoxyl®)이라는 성분을 함유한 탈모제품이 국내에 시판되기 시작하였다.

- 미녹시딜의 경우 원재료를 수입에 의존하고 있고, 의약품으로 허가된 탈모치료제의 경우 모두 외국에서 개발한 성분을 함유한 탈모치료제이다.
- 세계적으로 프로페시아(피나스테리드 함유 제품), 로게인(미녹시딜 5% 함유)과 더불어 폴텐(트리코사카라이드와 트리칼고실 함유) 제품이 탈모치료용으로 처방되고 있다.
- 프로페시아는 성인 남성에게만 처방하고 있으며 정자수 감소 및 성기능 장애 등의 부작용이 보고되고 있다.
- 미녹시딜의 경우는 피부흡수에 시간이 소요되며 사용중지시 탈모가 재발되는 등의 부작용이 있으며 탈모 진행초기에 효과가 있으나 탈모가 완전히 진행된 후에는 치료효과가 거의 없는 단점이 있다.
- 또한 미녹시딜을 장기간 사용하였을 경우 가려움증, 홍반, 표피박리와 건성화를 동반한 피부염과 지루성 피부염 및 알레르기성 접촉성 피부염을 일으킬 수 있으며, 급격한 몸무게 증가, 부종, 심장 박동 증가, 협심증 및 혈액학적 부작용을 초래할 수 있는 것으로도 보고되고 있다.
- 현재 탈모치료제의 대부분의 기전이 남성호르몬과 관계있기 때문에 효능이 없거나, 기형아유발가능성이 있어 여성이 사용할 수 없다는 단점을 가지고 있어 여성탈모치료제가 없는 실정이다.
- 이러한 기존 약품의 여러 가지 부작용으로 인하여, 최근에는 천연물에 대한 관심이 증가하고 있다.
- 현재 국내에서 의약외품으로 허가되고 있는 탈모방지용 제품들을 보면 주로 한방 성분 및 천연물 유래의 기능성 성분을 함유한 제품으로 샴푸의 형태로 판매되고 있는 제품들과 헤어토닉 형의 제품이 있다.
- 2012년 용도별 기능성 샴푸 판매순위를 보면 탈모방지가 가장 높은 점유율을 보인다.

샴푸 종류	허가내용	관련법	제품군	판매처
일반화장품 샴푸	세정 및 보습 컨디셔닝 효과	화장품법에 따름	의약외품 의약품 마크를 달지 않은샴푸 천연 유기농샴푸(닥터 알카이티스)	일반 수퍼 및 온라인 판매
의약외품 샴푸	탈모 방지 및 양모 효과	약사법에 따름 (식약청 인증)	려 자양윤모 화윤생 샴푸(아모레퍼시픽) 엘라스틴 헤어케어인 샴푸(LG생활건강) 에스타르 헤어로스 솔루션 샴푸(애경) 당기머리 스칼토닉액(두리화장품) 등 30여 종	일반 수퍼 판매
의약품 샴푸	비듬 및 지루성 피부염 치료	약사법에 따름 (식약청 인증)	니조랄(한국안센) 세비프록스(한국스티렐) 단가드(한국스티렐) 등	약국에서 판매



4. 봉독을 이용한 탈모방지 및 양모촉진 제품 개발

- 봉독은 오래전부터 사용되어 온 한방재료로 신경성 질환 및 화농성 질환뿐만 아니라 최근에는 알츠하이머, 파킨슨병의 치료에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.
- 봉독은 peptide, PLA2 등의 효소류 및 아민류 등으로 구성되어 있으나 주성분으로 멜리틴이 40~50%가 함유되어 있다.
- 체내 호르몬 대사에 영향을 주지 않고 남녀 공용으로 특히 여성탈모인도 사용할 수 있는 국내 기술에 의한 기능성 탈모 방지 및 양모촉진용 의약외품을 개발할 필요가 있다.

봉독(Bee venom)의 주요성분 및 특성

Components	MW	Contents (% dry BV)	Major characteristics	Components	MW	Contents (% dry BV)	Major characteristics
<i>Peptides</i>				<i>Enzymes</i>			
Melittin	2840	40-50	26 amino acid Enhance of PLA <sub>2</sub> activity Cytotoxic effects against cancer cells Anti-inflammatory and anti-arthritis effects	PLA <sub>2</sub>	19,000	10-12	Cytotoxic effects against cancer cells Inflammatory effects Anti-tumor effects
Apamin	2036	2-3	10 amino acid Inhibition of Ca <sup>2+</sup> -activated K <sup>+</sup> channel Cytotoxic effect against cancer Nociceptive effect Anti-inflammatory properties	Hyaluronidase	38,000	1.5-2	Selectively attacks tissue hyaluronic acid polymers Increase the capillary permeability Immune response and tissue-spread properties Antigenic
MCD peptide	2588	2-3	22 amino acid Anti-inflammatory and analgesic effect Histamine release (low dose) Histamine release inhibition (high dose) Anti-allergic effect	Glucosidase	170,000	0.6	
Adolapin	11,500	1	Inhibition of PLA <sub>2</sub> and COX activity Anti-inflammatory activity Analgesic effect	Acid phosphomono-esterase	55,000	1	
Protease inhibitor	9000	<0.8		<i>Amines</i>			
Minimine	6000	2-3		Histamines	307.14	1.5	
Procamine A, B		1.4		Dopamine	189.64	0.13-1	
Secarpin		0.5		Norepinephrine	169.18	0.1-0.7	
Tertiapin		0.1		<i>Others</i>			
Melittin F		0.01		Carbohydrates	307.14	1.5	
Cardiopep		<0.7		r-Aminobutyric acid	189.64	0.13-1	
				B-Aminoisobutyric acid	169.18	0.1-0.7	

출처: Pharmacology & Therapeutics 115 (2007) 246-270

- 봉독과 같은 농림자원의 기능성 발굴 및 적응증 확대를 통해 탈모 방지 및 양모촉진용 헤어케어 기능성의 국내 수요뿐만 아니라 수출용 주력 제품을 개발할 필요성이 있다.

## 제 3절 연구개발 범위

### 1. 주요 연구내용

#### 가. 생장기 양모 효과 측정

- Hair 양모 효과 측정
- 모근 성장에 대한 조직 검사

#### 나. 퇴행기 탈모방지 효과 측정

- 생장기 모발 유지 효과 측정
- 생장기 모낭에 대한 조직 검사

#### 다. 피부유래 세포의 증식 촉진 효과 측정: dermal papilla cell (DPC) cell 증식 측정

#### 라. 봉독의 작용 기전 규명

- 탈모 관련 인자의 활성 저해 측정
- 양모촉진 관련 인자의 활성 증가 측정
- 두피의 혈액순환 증가
- 탈모의 원인이 될 수 있는 비듬 방지 및 치료-비듬 유발 균의 억제 효과 측정

#### 마. 원료의 표준화 및 안정성 시험

- 유효성분 규명
- 봉독 표준화 (유효성분 melittin 40% 이상)
- 원료에 대한 기준 및 시험법 작성 : 성상, 확인시험, 순도시험, 건조감량, 함량시험, 안정성시험, 히스타민시험, 항원성 시험 등에 관한 기준 설정

#### 바. 원료의 안전성 시험

- 세포 독성
- 시험동물에 대한 독성 시험
- 원료의 피부자극 시험

#### 사. 인체 적용 시험

- 인체적용시험 Protocol 개발
- 식약처 가이드라인에 따른 인체적용시험 실시

아. 시제품 제조

(1) 배합원료 검토

- 배합비율 검토 : 탈모에 효과가 있다고 알려진 미네랄들의 시너지 효과 등 검토
- 배합원료에 의한 시너지 효과 측정

(2) 제품의 레시피 개발

- 제형 및 제제연구 : 크림제, 스프레이제 등에 관한 검토
- 제품 내 원료 안정성을 높이기 위한 재료 검토
- 약리효과가 확실하고, 사용하기 편리한 제품개발

(3) 제품 형태 확립

- 헤어토닉, 헤어크림, 두피에센스 등 제형확립

(4) 제품표준화 확립

- 원료 품질관리 → 생산 중 공정관리 → 제품 품질관리
- 제품사용량 및 사용횟수 확립
- 제품의 안전성 시험: 식약처와 협의에 의해 시험 항목 조정 가능
- 면역독성시험
- 국소독성시험

자. 식약처 의약외품 허가 준비 및 관련자료 제출

- 양모제 안전성 및 유효성 심사를 위한 제출 자료의 범위 검토 및 관련자료 제출

# 제 2장 국내외 기술개발 현황

## 제 1절 국내외 연구 현황

### 1. 국내 연구 현황

#### 가. 탈모방지 및 양모촉진 연구 현황<sup>1)</sup>

- 모발 성장을 촉진하는 의약품은 프로페시아(Propecia)와 미녹시딜(Minoxidil)이 있다.
- 프로페시아는 성인 남성에게만 처방하고 있으며, 정자 수 감소 및 성기능 장애 등의 부작용이 보고되었고, 2017년 7월에 자살 유발, 우울증 발생 가능 경고<sup>2)</sup>가 추가되었다.
- 미녹시딜은 탈모 진행초기에 효과가 있으나 탈모가 완전히 진행된 후에는 치료효과가 거의 없으며, 복용 중단 시 탈모가 재진행되고, 부종, 협심증, 급격한 몸무게증가, 유방암, 가려움증, 홍반, 표피 벗겨짐과 건성화를 동반한 피부염, 알레르기성 접촉성 피부염 및 지루성 피부염 등의 부작용을 초래할 수 있는 것으로 보고되었다.
- 현재 탈모치료제의 대부분의 기전이 남성호르몬과 관계있기 때문에 여성에게 효능이 없거나, 기형아 유발 가능성이 있어 여성이 사용할 수 없다는 단점이 있다.
- 이러한 의약품의 부작용 문제로 인하여, 최근에는 천연물 유래 물질의 탈모방지 및 양모촉진에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

#### (1) 안드로젠탈모증에서 홍삼 추출물의 발모 촉진 효과

- 홍삼과 홍삼의 주요성분인 linoleic acid (LA),  $\beta$ -sitosterol (SITOS), bicyclo(10.1.0)tridec-1-ene (BICYCLO)가 Wnt/ $\beta$ -catenin과 Shh/Gli pathways를 통해  $\beta$ -catenin, Lef-1, Sonic hedgehog, Smoothed, Gli-1, Cyclin D1, Cyclin E의 발현을 증가시켜, 모발 성장을 촉진시킨다는 것을 보고하였다.<sup>3)</sup>

#### (2) 안드로젠탈모증에서 뽕미역 추출물의 발모 촉진 효과

- 뽕미역 추출물이  $5\alpha$ -reductase 활성을 감소시켰고, Wnt/ $\beta$ -Catenin과 ERK Pathways를 통하여, Cyclin D1, phospho(ser780)-pRB, Cyclin E, phospho-CDK2, CDK2의 발현을 증가시켜, dermal papilla cells의 증식을 촉진한다는 것을 보고하였다.<sup>4)</sup>

#### (3) CXL1과 CXL2 유전자의 동질이상과 원형탈모증의 상관관계

- Close control study를 통하여, s3117604 CXL1과 rs3806792 CXL2 유전자의 프로모터 부분 동질 이상이 원형탈모증 발병 위험성을 높인다는 것을 보고하였다.<sup>5)</sup>

#### (4) Epigallocatechin gallate와 microRNA 발현 패턴 분석

- 녹차함유 성분 epigallocatechin gallate를 human dermal papilla cells에 처리한 후, microarray를 통해 miRNA 발현 패턴을 분석한 결과, anti-oxidation-related, apoptosis and cell death-related, proliferation and cell growth-related, cell cycle-related gene ontology terms과 관련된 miRNA의 발현이 증가되었던 것을 보고하였다.<sup>6)</sup>

#### 나. 봉독 및 melittin의 효능 연구 현황

- 봉독은 peptide, PLA2등의 효소류 및 아민류 등으로 구성되어 있으며, 주성분으로는 멜라틴(Melittin)이 40 ~ 50%가 함유되어 있다.
- 봉독은 오래전부터 사용되어 온 한방재료로 골관절 질환, 신경성 질환 및 화농성 질환에 민간요법으로 많이 사용됨. 최근에는 이러한 봉독의 효능을 입증하기 위해, 질환별 효능 연구 및 작용기전 연구가 진행되고 있다.

##### (1) Melittin의 섬유증 억제 효과

- Melittin을 TGF  $\beta$  RII로 유도시킨 신장 섬유아세포 NRK-49F에 처리 시, TGF  $\beta$  -Smad2/3, ERK1/2, JNK의 인산화를 억제시키고, PAI-1 단백질의 발현을 감소시켜 신장 섬유증을 억제시킨다는 것을 보고되었다.<sup>7)</sup>

##### (2) Melittin의 연골보호 효과

- C57BL/6 mice 연골세포에 melittin을 처리 시, NF- $\kappa$ B와 AP-1의 핵 내 이동과 MMP-1 및 MMP-8의 발현을 감소시키고, TNF- $\alpha$ 에 의한 type II 콜라겐 분해를 억제시켜 연골을 보호한다는 작용기전을 보고되었다.<sup>8)</sup>

##### (3) Melittin의 상피간엽이행 억제 효과

- Melittin이 TGF  $\beta$  -1으로 유도시킨 마우스의 정상 간 세포주 AML12에서 TGF  $\beta$  /Smad와 JNK-MAPK signaling 억제를 통하여, 상피간엽이행을 감소시킨다는 것이 보고하였다.<sup>9)</sup>

##### (4) Melittin의 rotenone에 의한 신경세포 사멸 방지 효과

- 운동신경세포주 NSC34에 rotenone을 이용하여 미토콘드리아에 손상을 준 후 melittin을 처리하면, JNK의 인산화 감소와 ERK의 인산화 증가를 통하여, caspase-3 활성화에 의한 신경세포 사멸을 방지한다는 것을 보고하였다.<sup>10)</sup>

(5) 비센바이오 당뇨병치료제 ‘M4A’ 개발

- M4A는 봉독을 원료로 제1형 당뇨병 치료제로서 혈당 조절 효과와 췌장 베타세포의 기능이 활성화되는 것을 전임상 실험에서 확인하였고, 연구결과를 ‘The Journal of Pharmacy and Pharmacology’에 투고하였다.<sup>11)</sup>

(6) 구주제약 ‘아피톡신주’ 미국 FDA 신약 승인 대기 중

- 아피톡신은 건조밀봉독 유래 추출물로 2001년 ‘천연물신약연구개발촉진법’에 따라 천연물 신약 1호로 인정받았다. 국내에서는 골관절염의 통증개선 용도로 허가를 받았으며, 2013년 4월 미국 FDA로부터 3상 임상시험계획을 승인받았고, 2016년 12월 2일 임상 3상이 종료됨. 미국 FDA에 생물약품 허가신청을 하였고, 현재 승인 대기 중이다.<sup>12)</sup>

## 2. 국외 연구 현황

### 가. 탈모방지 및 양모촉진 연구 현황

- 미녹시딜과 피나스테라이드(프로페시아의 주성분)를 주성분으로 하는 제네릭 제품의 개발이 미국 등에서 활발히 이루어지고 있고, 동시에 천연물을 원료로 하는 연구 및 제품 개발 또한 지속적으로 이루어지고 있다.

(1) 비반응성 탈모증에서 tofacitinib의 발모 촉진 효과

- Janus kinase 3 억제제인 tofacitinib를 탈모 동물 실험 모델에 투여 후, 조직염색과 PCR을 통해 작용기전을 연구한 결과, VEGF의 mRNA와 단백질 발현을 증가시키고 염증반응을 감소시켜 모발 성장을 촉진시킨다는 것을 보고하였다.<sup>13)</sup>

(2) 안드로젠탈모증에서 백랍 추출물의 발모 촉진 효과

- 백랍과 백랍의 policosanol을 testosterone으로 유도된 탈모 동물 실험 모델에 투여한 결과, 5 $\alpha$ -reductase의 활성을 감소시켜 발모를 촉진시킨다는 것을 보고하였다.<sup>14)</sup>

(3) 안드로젠탈모증에서 *Avicennia marina* 추출물의 발모 촉진 효과

- *Androgenic alopecia*를 human hair dermal papilla cells (HHDPCs)에 처리한 결과, 5 $\alpha$ -reductase type 1의 활성을 감소시키고, HHDPCs에서 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone의 축적을 억제시킨다는 것을 보고하였다.<sup>15)</sup>

(4) 원형탈모증에서 미녹시딜의 발모 촉진 효과

- 원형탈모증 남성 환자에게 미녹시딜을 투여한 후, mRNA의 발현 패턴을

microarray를 통해 분석한 결과, keratin associated proteins(KRTAP7-1, KRTAP19-3, KRTAP19-5, KRTAP19-1, KRTAP13-2, KRTAP20-2)의 발현이 증가하였고, ILK, AKT, MAPKs의 인산화가 감소됨을 보고하였다.<sup>16)</sup>

#### 나. 봉독 및 melittin의 효능 연구 현황

- 봉독은 오래전부터 사용한 한방재료이기에 중국에서 봉독의 성분분석, 각종 질환 별 효능연구 및 작용기전 연구가 활발히 진행되고 있다.

##### (1) Melittin의 췌장암 성장 억제

- 췌장암 세포주 SW1990 세포에 melittin을 처리한 후, DNA microarray 분석을 통해 DNA 발현 패턴을 분석하였다. 그 결과 melittin이 cholesterol pathway gene clusterin의 발현을 감소 시켜 췌장암의 증식을 억제한다는 것을 보고하였다.<sup>17)</sup>

##### (2) Melittin의 유방암 전이 억제 효과

- Melittin이 유방암 세포주 MCF-7에서 cyclophilin A의 발현을 억제시키고, CD147에 의해 유도되는 MMP-9의 발현을 감소시켜 전이를 억제한다는 것을 보고하였다.<sup>18)</sup>

##### (3) Melittin의 위암 세포사멸 유도 효과

- Melittin을 위암 세포주 SGC-7901에 처리 시, 미토콘드리아에서 cytochrome C를 세포질로 방출시키고, Smac/direct IAP binding protein을 감소시켜 caspase 연쇄반응을 통해 세포사멸이 유도된다는 것을 보고하였다.<sup>19)</sup>

##### (4) Melittin의 종양 혈관신생 억제 효과

- UMR-106 osteosarcoma xenograft mouse model에 melittin을 처리 후, 면역염색 및 면역형광법을 이용하여, melittin이 SDF-1 $\alpha$ /CXCR4의 발현을 감소시켜, 종양 혈관신생을 억제시킨다는 것을 보고하였다.<sup>20)</sup>

### 3. 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- 유전체학(genomics), 단백질체학(proteomics), 대사체학(metabolomics), 시스템생물학(system biology) 연구를 기반으로 천연물 유래 물질에 대한 탐색 및 효과 등에 관한 다수의 연구가 행해지고 있으나, 연구결과가 제품화로 연결된 경우는 많지 않다.
- 현재까지 천연물 유래 물질을 이용하여 발모 촉진효과를 연구하거나, 탈모 유형별 작용기전에 대한 연구가 다수 행해지고 있다.



- 봉독의 주성분인 melittin은 주로 위암, 유방암, 췌장암, 방광암, 전립선 암세포를 이용하여, 암의 증식과 전이를 억제하는 항암효과 연구와 작용기전에 대한 연구가 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 다수 행해지고 있다.
- 최근까지 봉독과 봉독의 주성분인 melittin의 발모 촉진 효과 관련 논문은 발표된 적이 없었고, 본 연구를 통해 첫 번째로 봉독과 봉독의 주성분인 melittin의 발모 촉진 효과를 평가하고, 작용기전을 연구하여 논문을 게재하였다.
- 본 연구는 melittin을 유효성분으로 하는 봉독의 탈모 방지 및 양모촉진 효과에 대한 작용기전과 효능 및 독성 시험 연구를 통해, 새로운 작용기전을 규명하고, 독성과 부작용이 적고, 효능이 좋으며, 단기간 사용 시에도 효과를 입증할 수 있는 조성물을 개발하고자 연구하였다.

## 제 2절 지적재산권 현황

### 1. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

### 2. 검색어 및 특허검색 결과

#### 가. 탈모

- ‘탈모’와 관련되어 총 2,380건의 특허가 등록 상태이며, 연도별로 살펴 본 결과, 2012년 302건, 2013년 378건, 2014년 464건, 2015년 379건, 2016년 462건, 2017년 395건 등록되었다.

	특허명	출원인	출원일자	초록요약
1	탈모방지 또는 발모촉진용 조성물	차의과학대학교 산학협력단	2015.04.10	Sirt2 단백질과 단백질 전달 도메인의 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 탈모방지 또는 발모촉진용 조성물
2	감귤류 과피 추출물을 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물	명지대학교 산학협력단 제주대학교 산학협력단	2015.07.17	감귤류 추출물과 플라보노이드 화합물을 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물
3	물봉선 추출물을 포함하는 탈모 예방 및 발모 촉진 조성물	한국원자력연구원	2015.10.28	물봉선 추출물을 포함하는 탈모 예방, 발모 촉진 조성물 및 치료용 약학 조성물
4	오시멘을 유효성분으로 포함하는 탈모 예방 또는 치료용, 또는 발모 또는 육모 촉진용 조성물	연세대학교 산학협력단	2015.11.24	오시멘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 탈모 예방 또는 치료용, 발모 또는 육모 촉진용 약제학적 조성물

5	줄의관말 추출물을 포함하는 탈모 방지 또는 육모 촉진을 위한 조성물	제주대학교 산학협력단  재단법인 제주테크노파크	2015.12.28	줄의관말 추출물을 포함하는 탈모 방지 또는 육모 촉진을 위한 약학적 조성물
6	비타민 D를 이용한 화학요법 유발 탈모증의 예방 또는 완화	버그 엘엘씨	2015.12.28	유효한 양의 국소 제형의 비타민 D 화합물을 이용한 화학요법-유발탈모증(CIA)를 예방하거나 완화하기 위한 방법 및 약학조성물
7	진세노사이드 F5를 포함하는 탈모 방지 또는 육모 촉진용 조성물	(주)아모레퍼시픽 서울대학교산학협력단	2016.01.05	진세노사이드 F5를 이용한, 모유두 세포의 태반성장인자 분비를 촉진, 모공의 깊이와 두피 두께를 향상시키는 탈모 방지 또는 육모 촉진용 조성물
8	지모와 두릅의 복합 추출물을 함유하는 탈모 방지 및 발모 개선용 조성물	(주)메드빌	2016.04.27	지모와 두릅의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 및 발모 개선용 조성물
9	탈모의 예방, 치료, 또는 육모용 약학조성물 및 그 제조방법	강동원	2016.07.05	참깨, 잣, 마늘, 및 마를 유효성분으로 함유하는 탈모의 예방, 치료 또는 육모용 약학 조성물 및 그 제조방법을 제공
10	백화사설초 추출물을 함유하는 탈모 개선용 피부 외용제 조성물	(주)아모레퍼시픽	2017.05.19	백화사설초 추출물을 유효성분으로 함유하여 우수한5-알파 리덕타아제 저해 효과를 통해 탈모를 개선시키는 피부 외용제 조성물

- 탈모, 양모, 육모, 등 이와 관련된 특허는 95%이상이 생활필수(A)section에 속해 있으며, 이는 현대인의 생활과 밀접한 관련이 있어 실생활에서 개선하고자 하는 욕구가 있기 때문인 것으로 판단된다.
- 특허 출원인의 경우, 제약회사, 제약회사 부속 연구소, 대학교, 화장품회사, 화장품제조 연구소가 가장 높은 비중을 차지하였으며, 대부분이 제조방법과 조성물에 대한 내용을 담고 있다.

나. 봉독

- ‘봉독’ 과 관련되어 총 95건의 특허가 등록 상태이며, 연도별로 살펴 본 결과, 2012년 6건, 2013년 16건, 2014년 26건, 2015년 13건, 2015년 17건, 2017년 17건 등록되었다.

	특허명	출원인	출원일자	초록요약
1	봉독 및 프로폴리스를 함유하는 여드름 예방 또는 치료용 조성물	정도희	2012.02.01	봉독, 프로폴리스, 버드나무 추출물 및 선택적으로 기타 유용한 성분들을 유효성분으로 포함하는 여드름의 예방 및 치료를 위한 조성물
2	봉독을 유효성분으로 함유하는 호흡기 염증성 질환 예방 및 치료용 약학조성물	대구가톨릭대학교 산학협력단	2012.03.28	동결건조한 정제봉독을 유효성분으로 하는 호흡기 염증성 질환 예방 및 치료용 조성물
3	봉독-PLA2를 포함하는 이상 조절 T 세포 활성화 저하 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물	경희대학교 산학협력단	2012.06.04	리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 이상조절 T 세포 활성화 저하 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물
4	면역증강, 염증치료 및 통증치료용 수지봉독과 이를 이용한 비경구 투여용 조성물 및 그 제조방법	비센바이오 주식회사	2012.06.19	면역증강, 염증치료 및 통증치료용 수지봉독 조성물과 이를 이용한 비경구 투여용 조성물 및 그 제조방법
5	봉독을 포함하는 피부 소양증 개선용 조성물	대한민국 (농촌진흥청)	2012.10.16	피부 가려움증 억제 및 완화 효과를 갖는 봉독을 유효성분으로 포함하는 것이 특징인 피부 소양증 개선용 조성물
6	봉독의 지용성 분획을 포함하는 항노화 화장품조성물 및 그 제조방법	비센바이오 주식회사	2012.11.26	봉독의 지용성 성분을 포함하여 피부주름 개선과 같은 항노화 효과를 가지는 화장품조성물

7	붕독 정제물을 유효성분으로 포함하는 목 및 허리디스크를 포함하는 관절 질환 또는 염증성 질환 예방 및 치료를 위한 조성물 및 이의 제조 방법	신준식	2013.03.15	대식세포에서 세포증식 억제 및 항염증 효과를 나타내는 붕독 정제물을 포함한 관절 질환 또는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물
8	피부 내에 붕독의 분해 촉진을 위한 붕독 조성물	대한민국 (농촌진흥청)	2015.09.11	피부 내에 붕독의 분해 촉진을 통해 피부 질환 예방 및 치료 효과를 갖는 붕독 조성물
9	붕독을 유효성분으로 함유하는 발모촉진 및 탈모방지용 조성물	고려대학교 산학협력단 (고려은단주식회사)	2015.12.08	붕독을 유효성분으로 모발기 성장 유도 효과, 퇴행기 탈모 방지 효과 및 피부 세포 증식 효과를 보유하는 발모촉진 및 탈모 방지용 조성물
10	알러지 유발 물질을 저감시킨 정제 붕독을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물	신준식	2016.04.20	포스포리파제 A2 및 히스타민이 제거된 붕독을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

- 대부분이 제조방법과 조성물에 대한 내용을 담고 있으며, 피부 미백제, 염증 및 통증 완화, 피부 노화 및 여드름 개선 등에 관한 내용으로 미용 및 의학과 관련하여 이용된 특허가 많았다.
- 붕독을 이용한 탈모의 예방과 개선, 치료 등의 특허는 본 연구를 통해서 등록된 특허가 유일하다.

## 제 3절 국내외 시장 현황

### 1. 국내 시장 현황

#### 가. 탈모 시장 동향<sup>21)</sup>

- 국민건강보험공단은 국내 탈모인구 비율을 전 국민의 14% (약 700만 명)로 추산하고 있으며, 공단에서 추산한 탈모 잠재인구 약 300만 명을 합치면 우리 국민 다섯 명 중 한 명은 탈모 증세를 가지고 있는 것으로 추측된다.<sup>22)</sup>
- 건강보험심사평가원이 2011~2015년 5년 동안의 병원 진료기록을 분석한 결과, 탈모 치료를 받은 환자 수는 2011년 약 194,000명에서 2015년 약 213,000명으로 약 10% 증가하였고, 같은 기간 동안 진료비는 147억 6400만 원에서 187억 4800만 원으로 26.8%나 증가하였다.
- 건강보험심사평가원 통계 자료에 따르면 2015년 21만명 중 절반 이상이 20~30대 질환자로 나타났고, 청년층의 사회·경제적 스트레스, 강도 높은 다이어트, 잦은 펌과 염색 등의 다양한 요인으로 인해 증가하는 것으로 추측되어진다.
- 탈모 관련 용품 주 고객 비중이 40~50대 중장년층에서 20~30대 청년층으로 넘어가고 있고, G마켓에 따르면 20~30대 2017년 상반기 탈모용품 판매율이 전년대비 약 24% 증가하였고, 40~50대(전년대비 11% 증가)에 비해 2배 이상 구매 규모가 늘어났다.<sup>23)</sup>



#### 나. 화장품시장 확대를 위한 화장품법 개정<sup>24)</sup>

- 2017년 5월 30일자로 화장품법 및 화장품법 시행규칙이 개정되었다. 기능성화장품에 질병명에 따른 효능 효과를 기재할 수 있게 되었고, 약사법에서 의약외품으로 관리 받던 염모제, 탈모방지제가 화장품법 영역인 기능성화장품으로 분류돼, 관련 법률이 약사법에서 화장품법으로 전환되었다.
- 화장품법 및 화장품법 시행규칙 개정에 따라, 탈모완화 샴푸 같은 탈모방지제는 기능성화장품으로 분류돼 '탈모에 도움을 준다'는 내용의 효능효과를 기재할 수 있게 되었

다.

- 2017년 8월 4일 화장품 질병명 기재 의사 공익감사 요청이 기각됨에 따라 화장품법 및 화장품법 시행규칙 개정안은 정상궤도에 진입한 것으로 보이며, 다양한 제품 개발과 효능 효과 표시로 화장품 시장이 확대될 것으로 전망된다.<sup>25)</sup>

다. 여성 탈모치료제<sup>26)</sup>

- 탈모치료제의 대부분의 기전이 남성호르몬과 관계있기 때문에 효능이 없거나, 기형아 유발가능성이 있어 여성이 사용할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 하지만 2016년 3월 현대약품에서 용법과 용량을 여성에 맞춰 여성 탈모치료제 ‘마이녹실 3%’을 리뉴얼하여 출시하였다.
- 식품의약품안전처가 미녹시딜 3%, 2%의 제제에 여성형 탈모증 치료 효능을 추가함에 따라 적극적으로 여성 탈모 치료제 시장을 공략하기 위해 제품을 리뉴얼하였다.

라. 탈모치료제 및 두피 모발 관리 화장품 시장 현황

(1) 탈모치료제 시장 현황<sup>27)</sup>

- 2017년 8월 28일 의약품 시장조사기관 IMS헬스데이터에 따르면 올해 상반기 전문약에서는 프로페시아가 186억원으로 전년 동기대비 13.8% 상승했고, 판시틸은 전년 동기대비 29.3% 오른 38억원으로 일반약(OTC) 각각 시장 1위를 차지하고 있다.
- 2위 제품들은 전년 동기대비 하락세를 보이며 1위와 격차를 좁히는데 실패하였고, 전문약 부문에서는 아보다트가 126억원으로 전년 동기대비 17.4% 하락했다. 작년 1월 특허만료로 제네릭이 진입, 약가가 인하된 영향이 큰 것으로 추측된다.
- 약물 성장세는 크지 않은 것으로 이번 조사 결과에서 나타났고, 프로페시아, 아보다트 등 기존 오리지널약물에 대한 충성도가 높은데다 새로운 신약도 나오지 않고 있어 탈모치료제 시장은 정체 현상을 보이고 있다.

<단위: 백만 원, %>

구분	판매	제품명(성분명)	2016.1H	2016.2H	2017.1H	전분기비	전년비
전문약	MSD	프로페시아(피나스테리드)	16,409	18,970	18,668	-1.6	13.8
	글락소	아보다트(두타스테리드)	15,309	13,948	12,639	-9.4	-17.4
	JW식약	모나드(피나스테리드)	3,051	3,313	2,914	-12.0	-4.5
	한미약품	피나테드(피나스테리드)	1,383	1,373	1,260	-8.2	-8.9
	한독테바	자이가드(두타스테리드)	395	849	979	15.3	147.6
	JW식약	네오다트(두타스테리드)	882	767	877	14.3	-0.6
	한미약품	두테드(두타스테리드)	424	451	486	7.7	14.5
일반약	동국제약	판시틸	2,953	4,506	3,818	-15.3	29.3
	현대약품	마이녹실	2,865	2,385	2,720	14.0	-5.1
	현대약품	마이녹실S	1,417	1,453	1,330	8.5	-6.1
	멀츠	판토가	542	601	517	14.0	-4.6
	갈더마	엘크라넬알파	661	767	476	37.9	-27.9

(2) 두피 모발 관리 화장품 시장 현황<sup>28)</sup>

- 시장조사기관 닐슨에 따르면, 2016년 국내 샴푸시장 규모는 약 507억원이며, 국내 샴푸 시장에서 탈모방지 샴푸의 비중은 약 29.3%로 150억원 가량으로 집계되었다.
- 전체 샴푸시장 점유율 1위는 아모레퍼시픽의 려(呂)(33.7%)이며, 이어 LG생활건강의 리엔(18.3%)과 엘라스틴(15.4%)이 각각 2,3위를 차지하고 있다. 려(呂)의 경우, 탈모제품이 메인으로 전체 제품의 약 50~60% 가량이 탈모방지 샴푸이다.
- 아모레퍼시픽이 2016년도에 선보인 려(呂) 자양윤모 라인은 자체 개발한 인삼 추출물 제조 기술인 진센엑스(GinsenEXTM)를 바탕으로 대한민국 농림축산식품부로부터 탈모방지 신기술(NET) 인증까지 획득하였다.
- LG생활건강은 급증하는 탈모시장을 공략하기 위해 2017년 탈모관리 전문 브랜드 닥터그루트(Dr. Groot)를 출시하였다. 닥터그루트는 피지를 완화하는 지성 두피용, 모발 뿌리를 관리하는 힘없는 모발용, 손상된 모발을 관리하는 손상 모발용 3가지로 구성되어 있다.
- 탈모 관련 시장은 빠르게 확대되고 있는 가운데, 탈모완화 샴푸 같은 탈모방지제가 기존 의약외품에서 기능성화장품으로 이관되는 개정 화장품법 시행으로 경쟁은 더 치열해질 것으로 전망된다.

2. 국외 시장 현황<sup>29)</sup>

- 미국의 마켓 리서치 기관인 Grand View Research, Inc의 2016년 탈모 시장 분석 보고서에 따르면, 2015년 전세계 탈모 시장 규모는 73억 달러로 나타났으며, 2024년에는 시장규모가 118억 달러에 이를 것으로 예상된다.

〈단위: 백만 달러〉

	북미	유럽	남미	동아시아	중아시아	전세계
<b>2015년</b>	2,489	2,261	1,336	741	521	7,343

가. 미국 시장 현황

- Grand View Research, Inc의 탈모 시장 분석 보고서에 따르면, 2015년 북미의 탈모인구 수는 5,600만명이며, 남성은 3,500만명, 여성은 2,100만명으로 발표되었다. 2015년 북미 탈모 시장 규모는 24억 달러로 전세계에서 가장 큰 규모를 가진 것으로 나타난다.
- 미국 시장조사기관인 IBIS의 2016년 Hair Loss Treatment Manufacturing: Market Research Report에 따르면, 탈모치료제 제조 산업 진입 장벽이 높은 것으로 나타났다. 엄격한 정부 규제가 존재하고, 상당한 선행 투자가 요구되기 때문에 업계는 진입하기가 어려운 것으로 판단된다. 시장 또한 포화상태인 것으로 나타났으며, 경피흡수 및 경구 치료제, 레이저 치료 및 샴푸 제품 등의 탈모치료 및 완화 제품의 과다로 인해 탈모 치료 시장의 5.0 % 이상을 점유한 기업은 없는 것으로 보고된다.<sup>30)</sup>



나. 일본 시장 현황<sup>31)</sup>

- 일본에는 전국적으로 1200만 명 이상의 성인 남성에게서 탈모 증상이 목격되며 제약 회사들에게 커다란 시장이지만 허가된 의약품수는 불과 3품목 밖에 없다. 특히 그 유효 성분만 만진다면 피나스테리드와 미녹시딜 둘뿐이다.
- 2016년 4월 6일 일본 국가가 효과를 인정한 3번째 발모의약품인 피나스테리드정 ‘화이자’가 출시되었다. 유효성분은 피나스테리드로 남성호르몬 테스트스테론을 더욱 강력한 남성호르몬으로 바꾸는 효소의 작용 억제하며 박모(薄毛)현상의 진행을 막고 발모를 촉진한다고 보고된다.

다. 중국 시장 현황<sup>32)</sup>

- 중국 건강증진 및 교육협회 ‘탈모인구 조사’ 결과에 따르면, 2016년 기준 중국 탈모인구는 약 2억5000만 명으로 전체 인구의 약 10.8%를 차지한다. 이 중 남성 탈모인구는 약 1억3000만 명으로, 성인 남성 기준 평균 4명 중 1명이 탈모를 겪고 있으며 주로 20~40대 남성에게서 가장 많이 나타났다. 출산, 다이어트, 잦은 염색 및 펌 등으로 여성 탈모인구도 급증하고 있다. 탈모증 발병률은 매년 15% 정도의 증가율을 보이고 있어, 중국 발모제품 시장은 지속적으로 확대될 전망이다.
- 중국 발모제품 시장 규모는 해를 거듭할수록 확대되고 있다. 이에 따라 중국 복용발모제 시장 규모도 빠르게 확대되고 있다. 2010년 기준 6억3000만 위안이었던 복용 발모제 시장 규모는 2014년 11억5300만 위안으로, 2배 가까이 성장함. 현재 중국에서 판매되고 있는 발모제품은 도포용 발모제·복용 발모제·발모기기 등 종류가 비교적 다양한 편이다.



## 제 3장 연구수행 내용 및 결과

### 제 1절 연구개발 수행 내용 및 방법

#### (1) 원료의 표준화 및 안정성 시험

##### 1. 원료의 표준화

- 원료의 표준화는 제품의 일정 품질을 유지하는데 필수적인 요소이며, 의약품 허가를 위해서는 제품(건조밀봉독)의 기초 원료가 되는 봉독(출발물질)의 수거방법, 보관방법, 품질 관리 및 운송 과정도 포함된다. 출발물질을 표준화하기 위해 채취된 봉독의 원산지 증명, 운송 과정 중에 발생할 수 있는 품질관리를 위해 운송에는 의약품도매(KGSP) 허가를 가진 업체를 선정하여 유통 과정 중에 변질이나 파손 등을 방지할 수 있는 시스템을 마련하였으며, 최종 생산하는 제품(건조밀봉독)의 제품표준화를 위해 기초물질인 봉독의 품질관리 기준을 확정하였다.

##### 2. 품질관리 기준

- 기초물질인 봉독의 품질관리 기준은 정상, 확인시험(멜리틴 확인), 중금속(10ppm 이하), 건조감량(13% 이하), 멜리틴 함량(50% 이상)으로 정하였으며, 이 기준들은 향후 제품인 건조밀봉독의 의약품 허가 시에 적합한 규격이다. 원료는 밀폐용기에 포장하여 실온 또는 냉장 보관할 경우 안정한 것으로 평가되었다.

##### 3. 규격 설정

- 출발물질(봉독)의 규격 설정은 의약품 허가에 필요한 제품(건조밀봉독)의 항목과 규격을 설정한 후에 제품품질에 이상이 없는 출발물질(봉독)의 규격을 설정하는 방식을 택하였으며, 차후 대량생산을 위해서 제품의 품질에 영향이 있는 항목만을 설정하여 원료물질 봉독의 규격을 설정하였다. 설정된 규격은 아래와 같다(Table 1).

Table 1. 봉독의 규격 설정

Items	Specification
성상	방향성의 황갈색 분말
확인시험	
단백질 확인	푸른색으로 변함
멜리틴 확인	동일한 유지시간에서 피크를 나타냄
포스포리파제의 확인	밴드와 같은 위치에서 확인됨
순도시험	
중금속	10 ppm 이하
건조 감량	13.0% 이하
함량	
멜리틴의 정량	40% 이상
총 단백질 정량	53.0% 이상
안전성 시험	사망하지 않았음
히스타민 시험	혈압강하가 없었음
항원성 시험	기준에 적합함
Method: IHS	

#### 4. 원산지 증명이 가능한 업체 선정

- 천연물 기원 원료물질을 이용하여 의약품을 만들 경우 원산지 증명이 필요하므로 원산지 증명이 가능한 업체를 선정하여 원산지 증명서를 공급받아 향후 의약품 허가에 필요한 요건을 갖추었다(Fig. 1, Fig. 2).

## 원산지증명서

원료명 : 봉독(bee venom)  
별의 품종 : *Apis mellifera*  
채취 방법 : 비센 봉독채취기  
원산지 : 국내(수매지역 참조)  
연락처 : 070-7796-6685

수매지역	비율
전라남도	17.6 %
전라북도	1.8%
경상남도	5.6 %
경상북도	33.4 %
강원도	5.8 %
충청남도	23.0 %
충청북도	11.6%
경기도	1.1%

본 원료는 국내산임을 인증합니다.

2015. 1. 26



(주) 비센 대표이사 안창기



Fig. 1. 원산지 증명서

## 원료 품질관리기록서(시험성적서)

제 품 명	붕독	검체 채취량	
제조번호	WCBV010113	검체 채취자	
제조수량	100g	채취장소	
입고일자	2015.01.26	채취방법	
시험번호		접수일자	2015.01.26

### 1. 시험기준 및 결과

시험항목	기 준	시험결과	시험일자	적합여부	시험자
성 상	황색 또는 황갈색의 파우더	황갈색의 파우더	2015.01.26	적합	이민화
확인시험					
멜리틴확인	동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.	동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.	2015.03.10	적합	이민화
중금속	10ppm 이하	한도 내	2015.03.25	적합	이민화
건조감량	13.0% 이하	2.09%	2015.03.25	적합	이민화
멜리틴 함량	50% 이상	89.8%	2015.03.10	적합	이민화

### 2. 판정결과


판정결과	적합	판정일자	2015.03.25
판정자		비고	별규 규격에 따라 시험

Fig. 2. 붕독 품질 관리 성적서

## (2) 원료의 공정개선 연구

### 1. 석출법과 동결건조법 비교

- 제품(건조밀봉독)의 대량생산을 위해 추출법, 석출법, 동결건조법을 비교한 결과 동결건조 방법이 대량생산에 적합한 것으로 연구 되었다. 동결건조법을 사용할 경우 제품의 수율과 안정성이 증대되고, 품질안정성이 증대되어 고품질로 관리될 수 있음이 확인되었다 (Table 2).

Table 2. 석출법과 동결건조법 비교

석출법과 동결건조법 비교			
	추출법	석출법	동결건조법
결정화	해당없음	불량	우수
수율	해당없음	낮음	높음
불순물제거	해당없음	우수	우수
함량	해당없음	보통	높음
생산성		우수	우수

### 2. 용매 사용량

- 고순도의 제품(건조밀봉독)을 제조하기 위해서 불순물을 제거하는 공정을 연구한 결과 불순물 제거 효율 및 대량생산을 위한 생산속도를 감안하였을 경우 원료물질인 봉독을 용해하는 용매로는 증류수가 적합하며, 증류수 사용량은 봉독 무게의 30~50배를 사용하는 것이 효율적이고, 불순물을 제거하는 공정인 여과공정에서 여과시간을 단축시키고, 여과할 때 손실을 줄이기 위해서 1차 여과로 0.45~1 $\mu$ m membrane filter를 사용하고, 2차 여과로는 0.45~0.1 $\mu$ m membrane filter를 사용하여 여과하는 방법이 효과적이었으며, 총 2단계 여과공정으로 불순물 제거효율 증대, 수율 손실 최소화 및 여과속도 향상으로 생산성 향상이 가능한 것으로 확인되었다(Table 3).

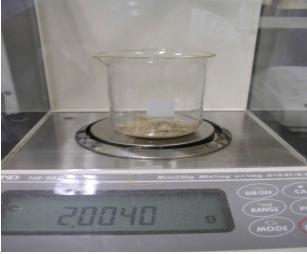

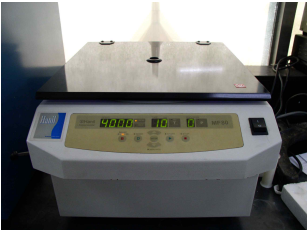



Table 3. 용매 사용량 연구결과

용매 사용량 연구결과					
	10배	20배	30배	40배	50배
여과성	나쁨	나쁨	보통	보통	우수
총여과시간	불량	불량	우수	우수	우수
수율	낮음	보통	높음	높음	높음
생산성평가	낮음	낮음	높음	높음	높음


### 3. 제품의 결정화

- 제품(건조밀붕독)을 결정화하기 위한 방법으로는 동결건조방법이 선택되었으며, 동결건조 연구결과 정제 여과된 붕독 용액을 -40℃로 급속 냉동시켜 용액 중 안정성을 증대시켜, 불순물 발생을 최소화 하고, 고진공에서 단계적인 온도 상승으로 제품(건조밀붕독)을 생산하는 방법이 산업화를 위한 최적방법임을 확인하였다.
- 제품(건조밀붕독)의 의약품 허가를 위해서는 생산할 때에 제조방법의 밸리데이션(process validation, PV)과 세척방법 밸리데이션(cleaning validation, CV)이 필요하며, 이를 수행하기 위한 프로토콜을 완료하였다.
- 생산된 제품(건조밀붕독)을 포장하기 위한 재질도 의약품 허가에 필요한 사항으로 제품(건조밀붕독)에 적합한 포장 재료를 선정하였으며, 이 포장 재료가 붕독원료 장기보관에 적합하다는 입증은 장기 안정성 시험으로 진행되었다.

#### 4. 봉독의 정제 공정도

순서	공정명	사진	설명	소요시간
1	수급	-	-	-
2	비정제봉독 칭량		- 비정제봉독의 무게를 측정 사진촬영(수율계산용)	0.1시간
3	용해		- 끓여서 식힌 정제수에 봉독을 2~3% 농도로 용해시켜 로테이터로 800rpm/30분간 교반	0.5시간
4	원심분리		- 교반시켜 용해된 봉독액을 원심분리 (4000rpm/10분) 가능하면 4℃ 유지	4시간
5	1차여과		- 상층과 하층에 분리된 이물질들을 종이필터로 여과(No.4)	4시간
6	2차여과		- 1차 여과가 끝난 액을 마이크로필터로 2차 여과 (pore size 0.2µm)	0.5시간
7	건조		- 필터가 완료된 액을 트레이에 투입 후 동결건조 (96~120시간)	120시간



8	분쇄 및 보관		<p>- 고상덩어리를 판상분말이 되도록 분쇄하여 보관(무게측정/수율계산)</p>	1시간
10	시험/제품적용		설정한 기준에 따라 실험	-
<p style="text-align: center;">총 제조 소요시간 6~7일의 기간 소요  1회 제조시 최대 150~200g 생산 가능  이후 공정은 위·수탁 관계에 의하여 생산과정이 이루어졌다.</p>				

### (3) C57BL/6를 이용한 봉독의 탈모방지 및 양모촉진 효과 측정

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 시약 및 재료

- Minoxidil, melittin, Dexamethasone은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Polyethylen glycol (PEG), ethanol은 J. T. Baker (Center Valley, PA, USA) 제품을 사용하였다. 봉독은 국전약품에서 제공된 것을 사용하였다.

##### 나. 실험 동물

- 본 실험에 사용된 6주령 C57BL/6 암컷 마우스 (Fig. 3)는 코아텍 (Peongtak, Korea)에서 48마리를 분양 받아 온도  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 5\%$ , 12시간 조명 주기 조건 하에서 식이와 식수를 자유롭게 섭취하도록 하였으며 7일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 본 연구에서의 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험 연구윤리위원회의 승인 (승인번호: KUIACUC-2014-230) 하에 수행되었다.



Fig. 3. C57BL/6 mouse

##### 다. C57BL/6를 이용한 퇴행기 억제 효과 측정

- 휴지기에서 성장기로의 전환을 촉진시키는 성장기 유도 효과를 확인함으로써 양모의 효력을 평가할 수 있다. 사람의 모발은 개개의 모발의 모발 주기가 다 다르지만 마우스의 경우에는 초기에는 모든 모발이 동일한 모발 주기에 있으며 또한 인위적인 방법으로 모발 주기를 동일하게 맞출 수 있어 모발 주기 변화를 보는 실험에 유용하다. C57BL/6 마우스는 색소를 만드는 멜라닌세포가 표피에는 존재하지 않고 모낭에만 존재하기 때문에 모낭의 멜라닌색소의 양에 의해 피부색이 결정되는 특성을 가지고 있기 때문에 피부 조직검사를 하지 않고도 피부색을 통해 모발주기를 확인할 수 있다. 본 실험에서는 휴지기 상태인 생후 6주령의 C57BL/6 마우스의 등의 모발을 동시에 제거하여 모든 모발을 동시에 성장기로 전환시킨 후 퇴행기 유도 약물과 시험물질을 처리하면서 피부색의 변화를 관찰하여 퇴행기 억제 정도를 평가하였다. 먼저 이발기를 이용하여 피부에 손상이 가지 않게 주의하여 마우스의 등 부위 털을 1차적으로 제거

하였다. 피부 속에 남아있는 모낭과 미세한 털을 제거하기 위하여 2차적으로 제모크림 (Veet, Reckitt Benckiser, England)(Fig. 4)을 발라 피부에 잘 흡수되도록 3분정도 방치한 후 면봉을 이용하여 모낭이 눈에 보이지 않을 때 까지 제거하였다. 이후 하루의 회복기를 거친 뒤 각 군당 3마리씩 무작위로 추출하여 무처리군, 음성대조군, 양성대조군, 농도에 따른 3개의 시험군의 6군으로 나누었다. 제모 후 7일 후부터 무처리군과 음성대조군에는 vehicle (polyethylen glycol : D.W. : ethanol = 5 : 3 : 2)을, 양성대조군에는 vehicle을 이용하여 조제한 2% minoxidil 용액을(Fig. 5), 시험군에는 vehicle을 이용하여 조제한 0.001%, 0.005%, 0.01% 봉독 용액을 각각 100  $\mu$ 씩 제모 된 등 부위에 매일 일정한 시간에 7일간 도포하였다. 또한 제모 후 9일 후부터 무처리군을 제외한 나머지 5군에 vehicle을 이용하여 조제한 퇴행기 유도 물질인 0.1% dexamethasone 용액 100  $\mu$ 를 5일간 도포하였다. 시료를 도포한 등 전체부위의 변화를 육안으로 관찰하기 위하여 디지털사진기를 이용하여 일정 간격으로 촬영을 하였다.



Fig. 4. 제모제

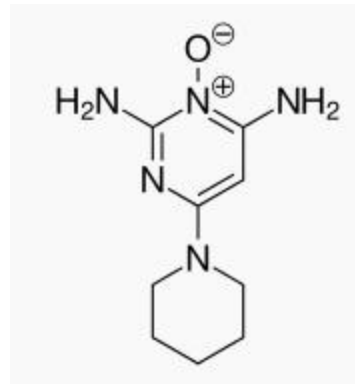


Fig. 5. Minoxidil

라. KGF, STD5A2의 mRNA 발현량 측정

- KGF (keratinocyte growth factor)는 섬유아세포 성장인자 family의 member로서 모발 성장을 자극하는 인자로 알려져 있다. 반면에 SRD5A2 (3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2) 유전자가 encoding하고 있는 5 $\alpha$ -reductase는 남성 호르몬인 테스토스테론(testosterone)을 모발 생성을 저해하는 물질인 디하이드로테스토스테론(DHT, dihydrotestosterone)으로 전환하는 효소이다. 따라서 KGF와 SRD5A2의 mRNA 발현을 통해 봉독의 탈모방지 효과 기전을 밝히고자 하였다. 본 실험에서 봉독의 KGF(keratinocyte growth factor)와 SRD5A2 (3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2)의 mRNA 발현 조절에 대해 분석하기 위하여 퇴행기 유도 실험을 마친 쥐를 이산화탄소 가스를 이용하여 희생시킨 후 시료를 도포했던 등 부위의 피부조직을 적출하였다.

적출한 피부조직 50 mg을 1 ml의 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 넣고 Taco™ Prep Bead beater (Taco, Taichung, Taiwan)를 이용해 분쇄하여 total RNA를 추출한 후 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 RNA 농도를 측정하였다. 그 후 Revert Aid First Strand cDNA kit (Fermentas, EU)를 사용하여 cDNA로 전환시킨 후 DyNamo™ MHS SYBR Green qPCR kit (FINNZYMES, Finland)와 Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 quantitative PCR (qPCR)을 실시하였다. qPCR 조건은 다음과 같다: 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 20 sec, 60°C for 20 sec, 72°C for 30 sec. House keeping gene으로 GAPDH를 사용하였고 PCR에 사용된 primer (Bioneer, Seoul, Korea)는 Table 4에 나타내었다.

Table 4. KGF, SRD5A2, GAPDH의 primer

Gene	Primers	Sequence (5' → 3')
KGF	Forward	CCCCTCCTTCCATGTAGTCA
	Reverse	CGCAAATGGATACTGACACG
SRD5A2	Forward	AATGTGCTGCTGGGTCTCTT
	Reverse	AGAAGGCAGTGGCTTTCAGA
GAPDH	Forward	GTGATGGCATGGACTGTGGT
	Reverse	AAGGGTCATCATCTCTGCC

마. 5 $\alpha$ -reductase 발현량 측정

- 본 실험에서 봉독의 5 $\alpha$ -reductase 생성 조절에 대해 분석하기 위하여 퇴행기 유도 실험을 마친 쥐를 이산화탄소 가스를 이용하여 희생시킨 후 시료를 도포했던 등 부위의 피부조직을 적출하였다. 적출한 피부조직 50 mg을 1 ml의 Pro-Prep protein extraction solution (Intron, Seoul, Korea)에 넣고 원심분리(13,000 rpm for 5 min at 4°C) 후 상등액에서 얻은 단백질을 Bradford assay를 이용하여 정량하였다. 30  $\mu$ g의 protein을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 전기영동하여 분리한 후 Trans-Blot semi-dry transfer cell (Bio-Rad)을 사용하여 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)로 이동시킨 후 5% non-fat skimmed milk(in PBS with 0.05% Tween 20)로 blocking (overnight at 4°C)하고, PBS-T로 15분씩 3번 세척하여 primary antibody (anti-5 $\alpha$  reductase, Santa Cruze Biotechnology)를 PBS-T에 1:100로 희석하였다. 2시간 동안 반응시킨 후 동일한 방법으로 세척한 후 secondary antibody (goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated antibody, Thermo Scientific)를 1:50000로 희석하여 1시간 동안 반응시켜 세척하고, WesternBright Sirius western blotting detection kit (Advansta, CA, USA)를 이

용하여 이미지 분석기 (FluorChem E Proteinsimple, CA, USA)로 분석하였다. Endogenous control로 anti-GAPDH antibody (Thermo Scientific, Rockford, IL)를 1:5,000로 희석하여 사용하였다.

#### 바. C57BL/6를 이용한 생장기 유도 효과 측정

- 본 실험에서는 휴지기 상태인 생후 6주령의 C57BL/6 마우스의 등의 모발을 동시에 제거하여 모든 모발을 동시에 생장기로 전환시킨 후 시험물질을 수 주간 처리하면서 피부색의 변화를 관찰하여 생장기 유도 정도를 평가하였다. 먼저 이발기를 이용하여 피부에 손상이 가지 않게 주의하여 마우스의 등 부위 털을 1차적으로 제거하였다. 피부 속에 남아있는 모낭과 미세한 털을 제거하기 위하여 2차적으로 제모크림 (Veet, Reckitt Benckiser, England)를 발라 피부에 잘 흡수되도록 3분정도 방치한 후 면봉을 이용하여 모낭이 눈에 보이지 않을 때 까지 제거하였다. 이후 하루의 회복기를 거친 뒤 각 군당 6마리씩 무작위로 추출하여 음성대조군, 양성대조군, 농도에 따른 3개의 시험군의 5군으로 나누었다. 음성대조군에는 vehicle (polyethylen glycol : D.W. : ethanol = 5 : 3 : 2)을, 양성대조군에는 vehicle을 이용하여 조제한 2% minoxidil 용액을, 시험군에는 vehicle을 이용하여 조제한 0.001%, 0.005%, 0.01% 봉독 용액을 각각 100  $\mu$ l씩 제모 된 등 부위에 매일 일정한 시간에 3주간 도포하였다. 시료를 도포한 등 전체부위의 변화를 육안으로 관찰하기 위하여 디지털사진기를 이용하여 일정 간격으로 촬영을 하였다. 또한 실험 마지막 날 쥐를 희생시켜 등 부위의 피부조직을 적출한 후 deep freezer(-80°C)에 보관하였다.

#### 사. 조직 관찰

- 조직학적 분석을 위하여 적출한 등 부위의 피부조직을 10% formalin 용액에 고정한 후 적당한 크기로 잘라내어 파라핀 블록을 제조하였다. 파라핀 블록을 마이크로톰을 이용하여 5  $\mu$ m의 조직절편으로 만든 후 H&E (Hematoxylin-Eosin) 염색을 하고 현미경을 이용하여 100배 확대하여 조직의 모양을 관찰하였다.

## 2. 연구 결과

### 가. 퇴행기 유도된 C57BL/6 마우스 육안적 관찰

- C57BL/6 마우스의 모발을 제거한 후 9일부터 5일간 처리되는 퇴행기 유도 물질인 0.1% dexamethasone (DM) 용액에 대한 봉독(0.001%, 0.005%, 0.01%)의 퇴행기 억제 효과는 육안적 관찰 (Fig. 6)을 통해 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인하였다. 특히 양성대조군으로 사용된 2% minoxidil 처리군 (C)에 비해 0.01% 봉독 처리군 (F)의 퇴행기 억제 효과가 더 뛰어남을 확인하였다.

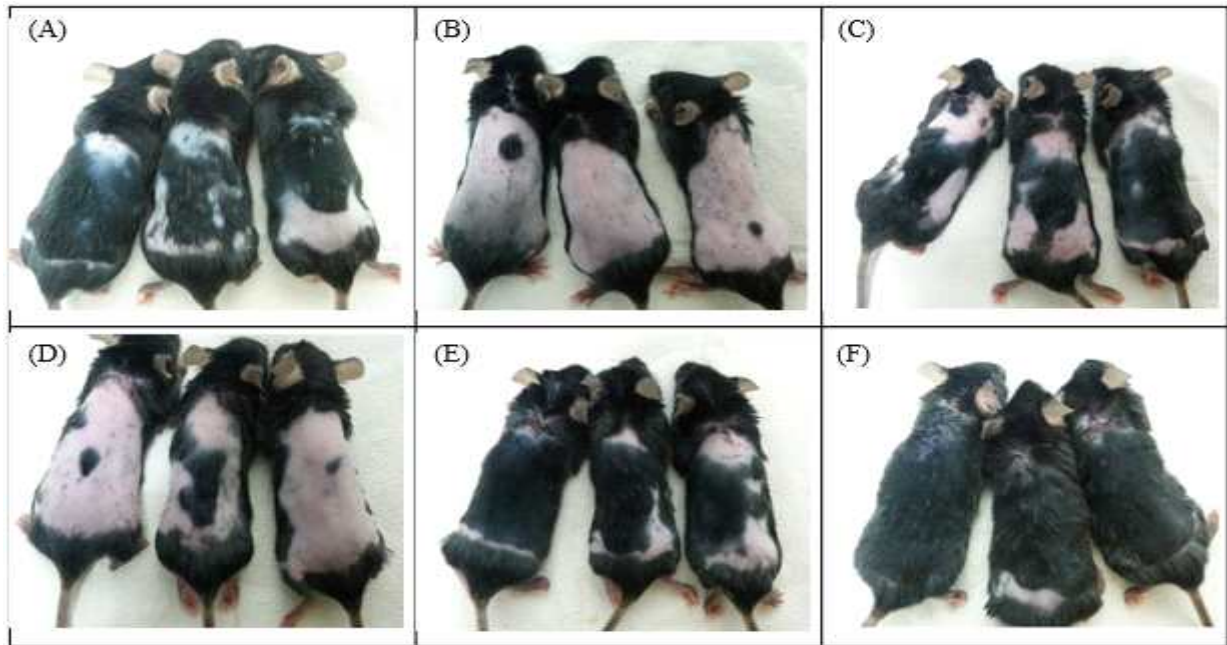


Fig. 6. The effect of bee venom on the prevention of hair loss in telogen phase in C57BL/6 female mice. (A), NC, treated vehicle only; (B), Dexamethasone (DM) treated; (C), DM+2% minoxidil; (D), DM+0.001% bee venom; (E), DM+0.005% bee venom; and (F), DM+0.01% bee venom.

#### 나. KGF, SRD5A2의 mRNA 발현량 측정

- C57BL/6 마우스의 모발을 제거한 후 9일부터 5일간 처리되는 퇴행기 유도 물질인 0.1% dexamethasone 용액에 대한 봉독(0.001%, 0.005%, 0.01%)의 퇴행기 억제 효과는 KGF(keratinocyte growth factor) mRNA의 발현 증가(Fig. 7)와 SRD5A2 (3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2)의 mRNA 발현 감소(Fig. 8) 양상을 통해 확인하였다. 모발 성장 촉진 인자인 KGF mRNA 발현은 dexamethasone만 처리한 대조군에 비해 봉독 0.001%, 0.005%, 0.01% 처리한 군에서 각각 416.9%, 474.8%, 564.6%로 나타나 농도 의존적으로 증가하였고, 특히 퇴행기 유도를 하지 않은 무처리군에 비해서도 각각 269.6%, 307.0%, 365.1%로 나타나 높은 발현량 증가를 보였다. 모발 성장 저해 인자인 SRD5A2 발현은 dexamethasone만 처리한 대조군에 비해 봉독 0.001%, 0.005%, 0.01% 처리한 군에서 각각 7.0%, 3.6%, 1.1%로 나타나 농도 의존적으로 감소하였고, 특히 양성대조군인 minoxidil 처리군에 비해서도 각각 85.1%, 44.0%, 12.9% 감소 효과를 보여 봉독의 뛰어난 탈모방지 효과를 확인하였다.

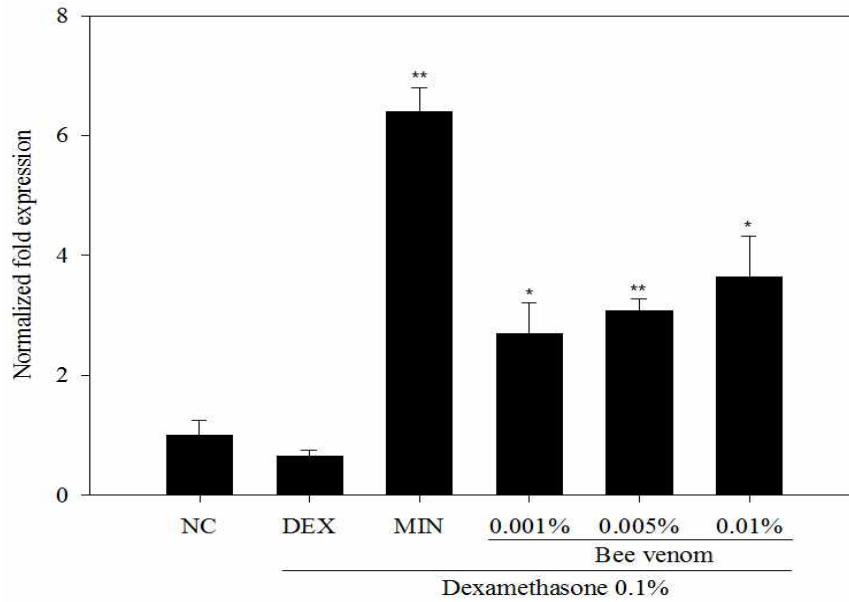


Fig. 7. Quantitative real-time RT-PCR of KGF (FGF7) in C57BL/6 mice treated with bee venom. KGF (keratinocyte growth factor) stimulates follicular proliferation. KGF gene expression significantly increased in bee venom-treated mouse. Significantly different compared with NC (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

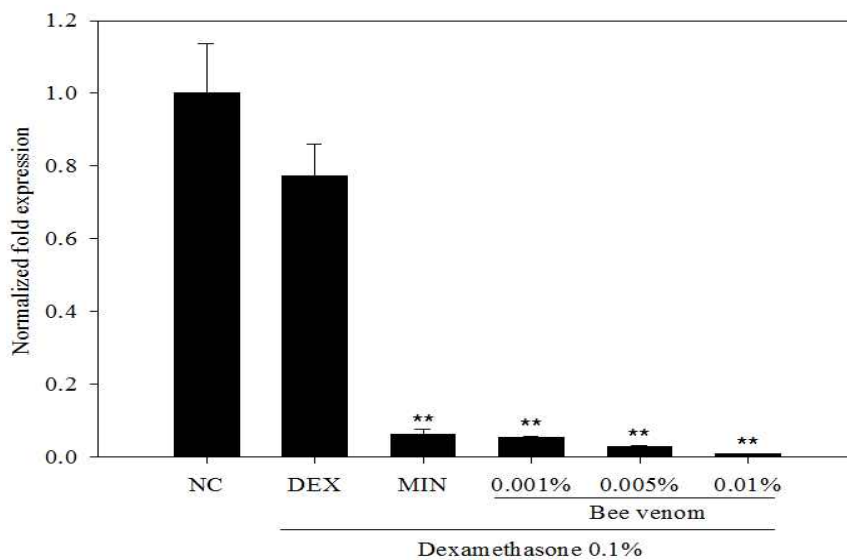


Fig. 8. Effect of bee venom on the expression of SRD5A2 gene encoding 5 $\alpha$ -reductase in C57BL/6 mice. Quantitative real-time RT-PCR of 5 $\alpha$ -reductase after treatment of bee venom (0.001%, 0.005%, and 0.01%). Significantly different compared with NC (\*\* $p < 0.001$ ).

다. 5 $\alpha$ -reductase 발현량 측정

- C57BL/6 마우스의 모발을 제거한 후 9일부터 5일간 처리되는 퇴행기 유도 물질인 0.1% dexamethasone 용액에 대한 봉독(0.001%, 0.005%, 0.01%)의 퇴행기 억제 효과는 5 $\alpha$ -reductase의 발현 감소(Fig. 9) 양상을 통해 확인하였다. 모발 성장 저해 인자인 5 $\alpha$ -reductase 발현은 dexamethasone만 처리한 대조군에 비해 봉독 처리한 군에서 감소함을 확인하였다.

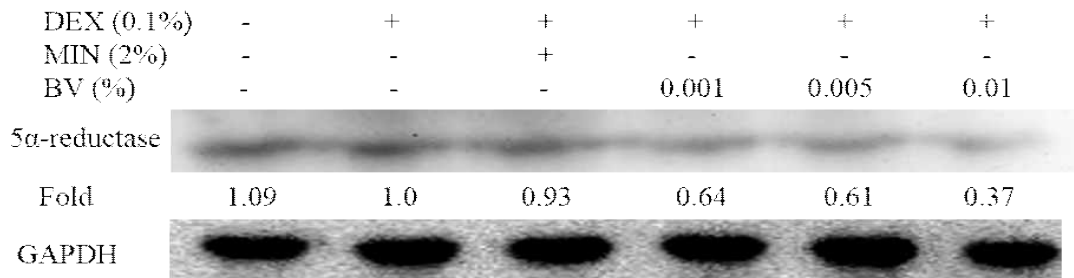


Fig. 9. Effect of bee venom on the expression of 5 $\alpha$ -reductase protein in C57BL/6 mice. Western blot of 5 $\alpha$ -reductase after treatment of bee venom (0.001%, 0.005%, and 0.01%).

라. 생장기 유도된 C57BL/6 마우스 육안적 관찰 및 조직 관찰

- C57BL/6 마우스의 모발을 제거한 후 3주간 처리된 봉독(0.001%, 0.005%, 0.01%)의 생장기 유도 효과는 육안적 관찰(Fig. 10)을 통해 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인하였다. 특히 양성대조군으로 사용된 2% minoxidil 처리군에 비해 0.005%, 0.01% 봉독 처리군의 생장기 유도 효과가 더 뛰어남을 확인하였다. H&E 염색 후 현미경을 이용하여 관찰한 조직의 모양(Fig. 11)을 통해 음성대조군(A)에 비해 봉독 처리군(C), (D), (E)의 모근이 매우 튼튼하게 형성되고 있음을 확인하였다.



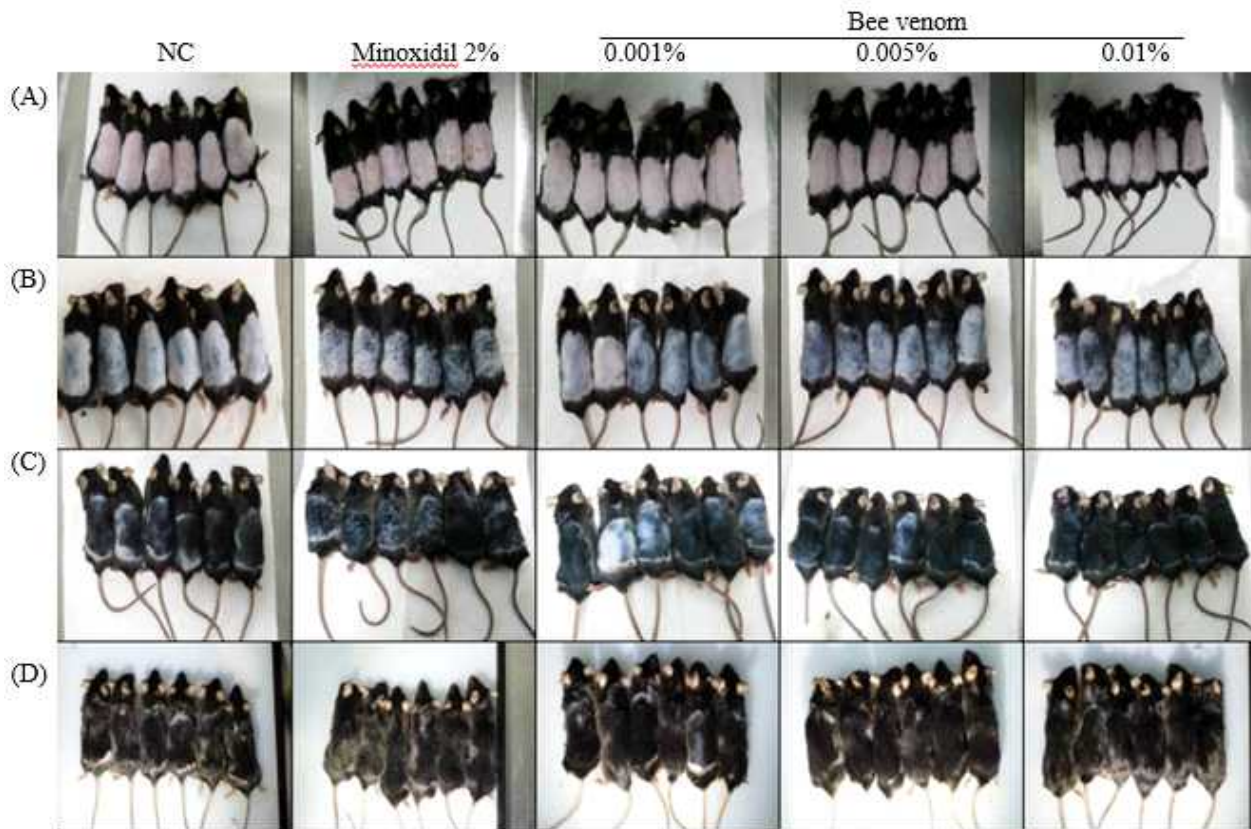


Fig. 10. Effect of bee venom on the hair growth in mouse. Bee venom was topically applied on dorsal skin for 19 days. Hair growth are shown after 1 day (A), 7 days (B), 11 days (C), and 19 days (D). NC, treated vehicle only.

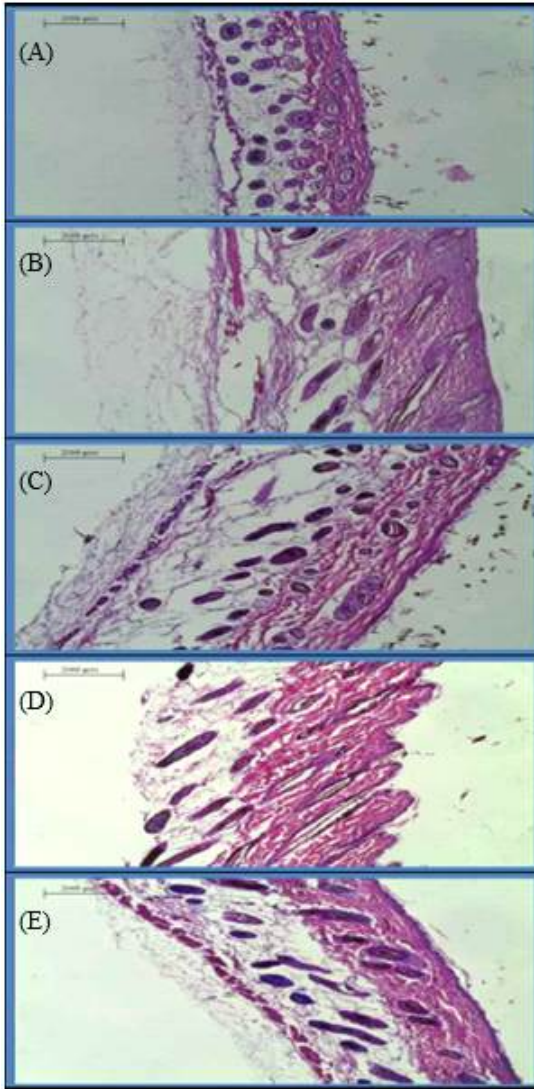


Fig. 11. The effect of bee venom on the histologic appearance of hair follicles in C57BL/6 mice (100 $\times$ ). (A), NC, treated vehicle only; (B), 2% minoxidil; (C), 0.001% bee venom; (D), 0.005% bee venom; and (E), 0.01% bee venom.

### 3. 재료 및 방법

#### 가. 시약 및 재료

- 봉독 (Bee venom)은 유일팜테크 (충북, 진천읍), Minoxidil은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Polyethylene glycol (PEG)는 DAEJUNG Chemicals & Metals Co. (Siheung-si, Korea), ethanol은 J. T Baker (Center Valley, PA, USA) 제품을 사용하였다.

#### 나. 실험동물

- 본 실험에 사용된 6주령 C57BL/6 암컷 마우스는 코아텍 (Peongtak, Korea)에서 25마리를 분양 받아 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 5\%$ , 12시간 조명 주기 조건하에서 식이와 식수를 자유롭게 섭취하도록 하였으며 7일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 본 연구에서의 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험 연구윤리위원회의 승인 (승인번호: KUIACUC-2015-283) 하에 수행되었다.

#### 다. C57BL/6를 이용한 양모 촉진 효과 측정

- 사람의 모발은 개별의 모발마다 모발주기가 다 다르지만 마우스의 경우에는 초기에 모든 모발이 동일한 모발 주기에 있으며 인위적인 방법으로 모발 주기를 동일하게 맞출 수 있어 모발주기 변화를 보는 실험에 유용하다. 또한 C57BL/6 마우스는 색소를 만드는 멜라닌세포가 표피에는 존재하지 않고 모낭에만 존재하기 때문에 모낭의 멜라닌색소 양에 의해 피부색이 결정되는 특성을 가지고 있으므로 피부 조직검사를 하지 않고도 피부색을 통해 모발주기를 확인할 수 있다. 본 실험에서는 휴지기 (telogen) 상 태인 생후 6주령의 C57BL/6 마우스의 등쪽 모발을 동시에 제거하여 모든 모발을 성장기 (anagen)로 전환시킨 후 시험물질을 수 주간 처리하면서 피부색의 변화와 등쪽 모발 성장을 관찰하여 양모 촉진 효과를 평가하였다. 적응기간을 거친 마우스의 등 부위의 털을 이발기를 이용하여 1차적으로 제거하였다. 미세한 털을 제거하기 위하여 2차적으로 제모크림(Veet, Reckitt Benckiser, England)을 발라 잘 흡수되도록 3분 정도 방치한 후 남아있는 털을 제거하였다. 하루 동안의 회복기를 거친 뒤 각 군당 5마리씩 무작위로 추출하여 음성대조군, 양성대조군, 농도에 따른 3개의 시험군의 5군으로 나누었다. 음성대조군에는 vehicle(50% ethanol : polyethylene glycol = 9 : 1)을, 양성대조군에는 vehicle을 이용하여 조제한 2% minoxidil용액을, 3개의 시험군에는 vehicle을 이용하여 조제한 0.05%, 0.1%, 0.5% 봉독 용액을 제모된 등 부위에 각각 150  $\mu$ l씩 파이프를 이용하여 일정한 시간에 16일간 도포하였다. 시료를 도포한 후의 양모촉진 효과를 육안으로 관찰하기 위하여 Isoflurane으로 마취시킨 후 디지털사진기를 이용하여 일정 간격으로 사진 촬영을 하였다. 실험 마지막 날에는 쥐를 희생시켜 등 부위의 피부조직을 적출한 후 deep freezer(-80°C)와 10% formalin용액에 나누어 보관하였다.

#### 라. 조직학적 분석 및 모발의 길이 측정

- 적당한 크기로 잘라서 10% formalin에 고정시켰던 등 쪽 피부조직을 단계별로 alcohol과 xylene으로 탈수 처리하여 파라핀으로 포매한 후, microtome을 이용하여 절편을 제작하고 다시 alcohol과 xylene으로 파라핀을 제거하였다. Hematoxylin과 Eosin으로 염색한 후, 광학현미경 (LEICA, Seoul, Korea)을 통해 100배 확대하여 조직의 모양을 관찰하였다. 또한 양모 촉진 효과를 비교하기 위하여 마우스 한 마리당 털 30개를 무작위로 털의 길이를 측정하여 각 군별로 비교하였다.

### 4. 실험 결과

#### 가. C57BL/6 마우스 육안적 관찰

- 본 실험에서는 봉독의 모발 성장 효능을 평가하고자 하는 목적으로 C57BL/6 마우스를 이용하여 육안적, 조직학적 관찰을 실시하였다. 마우스의 등 부위를 제모한 후 16일간 시험물질을 도포한 결과 양성대조군, 0.05% 봉독처리군, 0.1% 봉독처리군, 0.5% 봉독처리군에서

음성대조군보다 뚜렷한 모발성장효과를 볼 수 있었다(Fig. 12). 실험 2주 후 양성대조군은 80%정도로 모발이 성장하는 효과를 보였으며, 봉독그룹은 음성대조군보다는 빠르나 양성대조군보다는 느린 성장효과를 보였다. 시험 16일 후 봉독그룹은 양성대조군과 유사한 효과를 나타내었다. 따라서 봉독이 모발의 성장을 촉진시키며 그 효과가 양성대조군으로 사용된 Minoxidil과 유사하다는 것을 확인하였다. 또한 농도에 따른 각 봉독 그룹이 양성대조군과 유사한 효과를 보이는 것을 확인하였다. Image J라는 프로그램을 이용하여 일정구획 내의 마우스 모발 상태를 명암으로 비교하여 수치로 정량화 하였다(Fig. 13). 시료를 도포해 감에 따라 양성대조군과 농도별 봉독 그룹에서 털이 성장하여, 음성대조군에 비해 일정면적 당 검은색 부위가 증가하는 경향을 확인하였다.

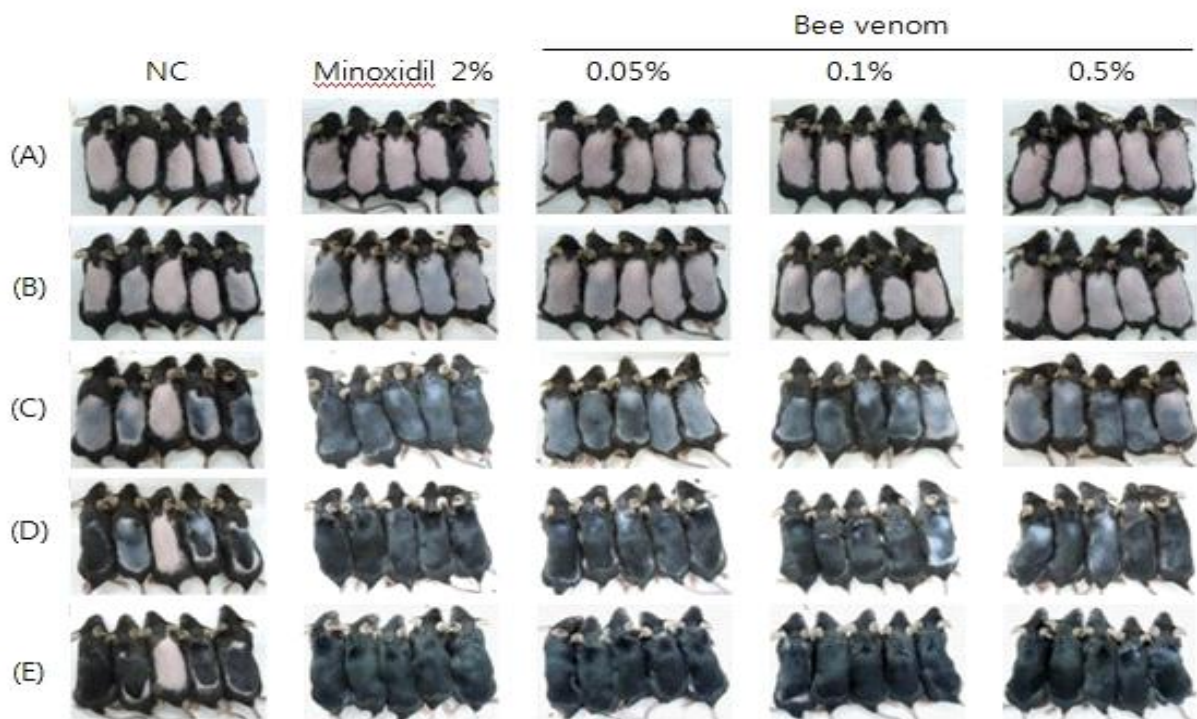


Fig. 12. C57BL/6 마우스에서 농도별 봉독에 따른 모발 성장 촉진 효과. (A) 시료도포 0일 차, (B) 7일 차, (C) 11일 차, (D) 14일 차, (E) 16일 차

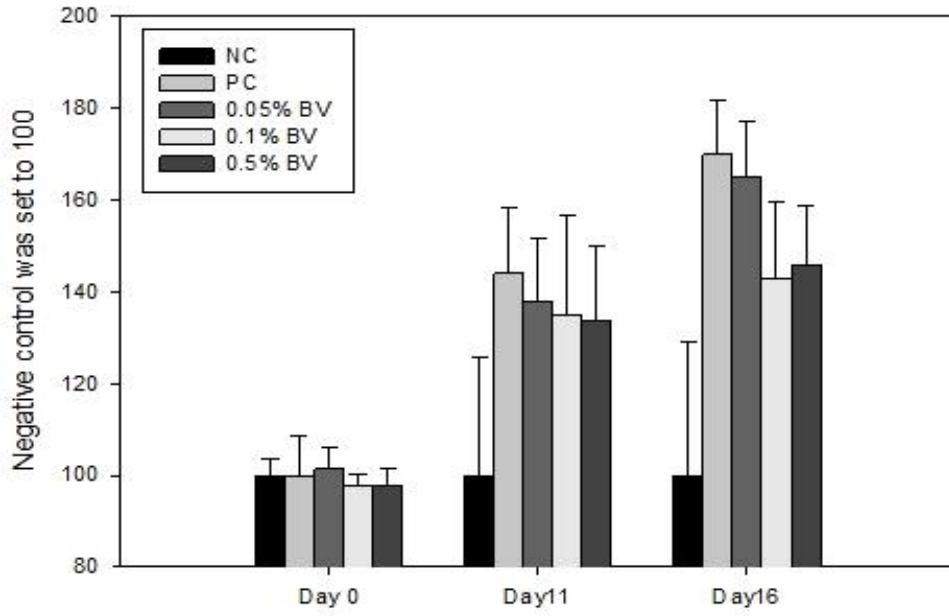


Fig. 13. C57BL/6 마우스 모발 상태를 명암으로 비교하여 나타낸 봉독의 양모 촉진 효과.

Image J 프로그램에서 흰색은 255, 검은색은 0으로 표기한 값을 음성대조(NC)에 대한 비율로 나타냄.



나. 조직학적 분석 및 모발의 길이 평가

- 시험물질이 모낭의 성장에 미치는 효과를 확인하기 위하여 H&E 염색 후 현미경을 이용하여 조직을 관찰하였다. 음성대조군에 비해 양성대조군과 봉독 처리군은 모낭의 수가 증가하고(Table 5, Fig. 14), 길이가 길어졌다(Table 6, Fig. 15).

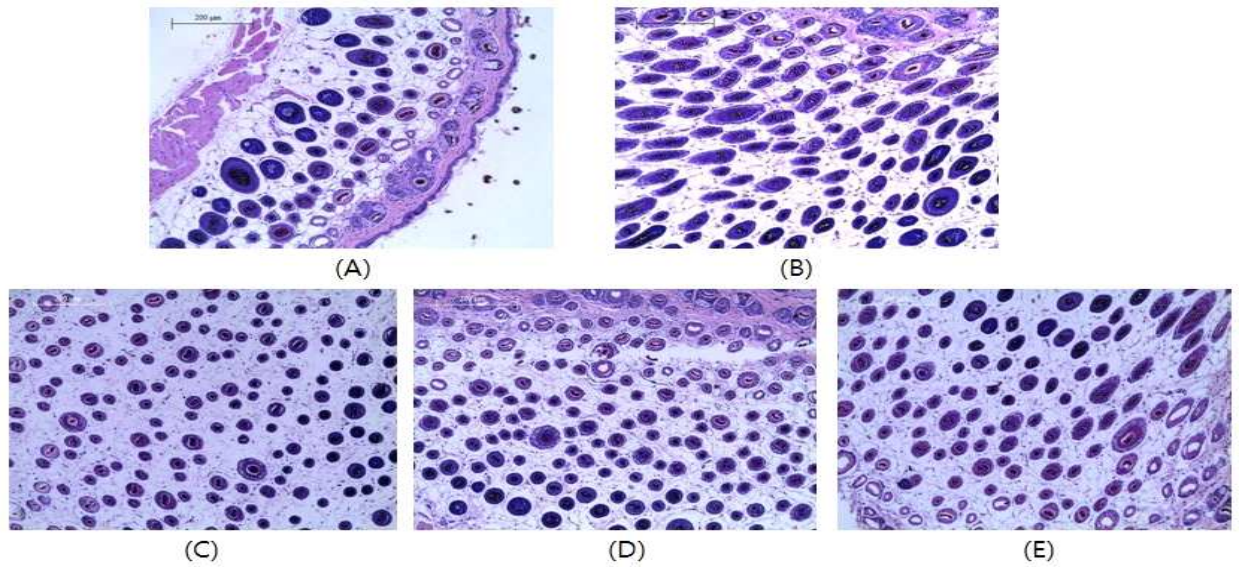


Fig. 14. 16일간 봉독처리에 따른 모낭의 조직학적 변화(H&E stain, Cross section,  $\times 100$ ). (A) 음성대조군, (B) 양성대조군, (C) 봉독 0.05%, (D) 봉독 0.1%, (E) 봉독 0.5%. Scale bar =  $200 \mu\text{m}$

Table 5. 16일간 봉독 처리 후 일정면적 당 모낭개수 (평균 $\pm$ 표준편차)

Negative control	2% Minoxidil	Bee venom 0.05%	Bee venom 0.1%	Bee venom 0.5%
15.75 $\pm$ 10.77	29.63 $\pm$ 3.70	32.75 $\pm$ 7.01	35.75 $\pm$ 10.25	26.00 $\pm$ 8.99

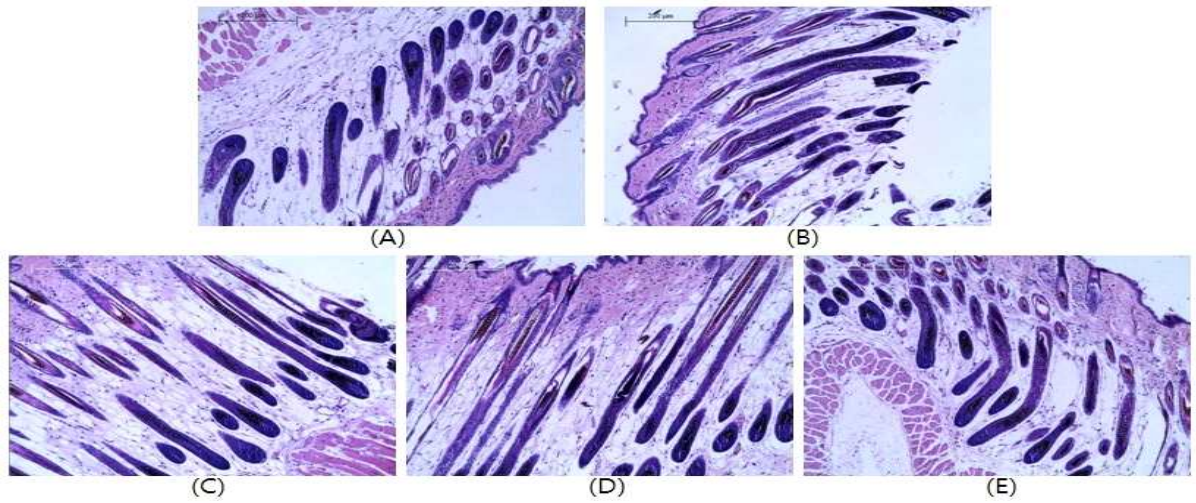


Fig. 15. 16일간 봉독처리에 따른 모낭의 조직학적 변화(H&E stain, Longitudinal section, X100). (A) 음성대조군, (B) 양성대조군, (C) 봉독 0.05%, (D) 봉독 0.1%, (E) 봉독 0.5%. Scale bar = 200  $\mu$ m

Table 6. 16일간 봉독 처리 후 무작위로 뽑은 모낭길이( $\mu$ m) (평균 $\pm$ 표준편차)

Negative control	2% Minoxidil	Bee venom 0.05%	Bee venom 0.1%	Bee venom 0.5%
150.79 $\pm$ 30.34	552.28 $\pm$ 160.7 7	579.05 $\pm$ 82.04	726.60 $\pm$ 97.45	354.63 $\pm$ 19.08

- 각 그룹당 4마리의 털을 무작위로 30개씩 뽑아 길이를 측정하였다. 양성대조군과 봉독 처리군 모두 음성대조군보다 털 길이가 증가하였으며, 봉독 0.1% 처리 그룹이 양성대조군보다 평균 털 길이가 현저히 증가하는 효과를 보였다(Fig. 16).

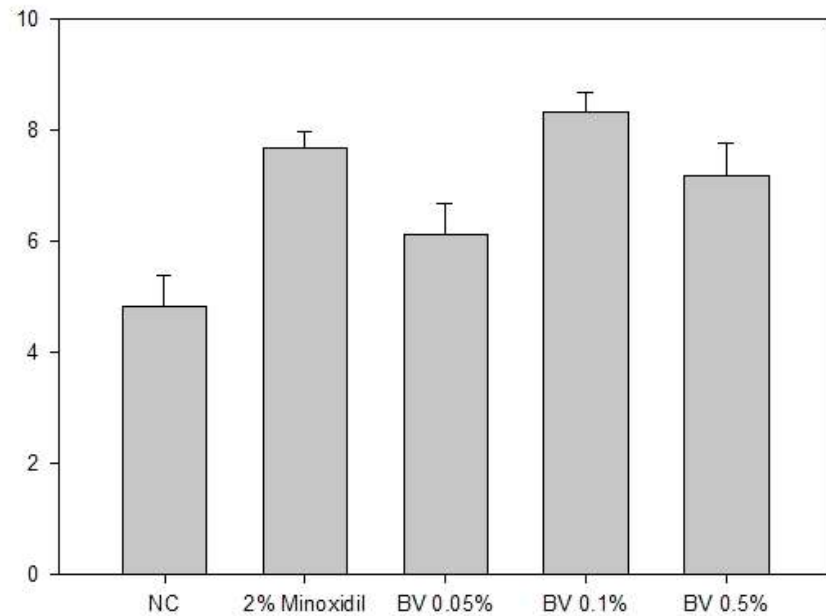


Fig. 16. 16일간 봉독 처리 후 무작위로 뽑아 측정한 마우스 털 길이

#### 다. 결과 요약

- 봉독처리에 의해 모발 성장이 농도 의존적으로 증가하였으며 양성대조군으로 사용한 Minoxidil과 유사한 효과를 확인하였다.
- 조직학적 관찰에서 H&E stain 결과 양성대조군과 봉독처리 그룹에서 음성대조군보다 일정 면적당의 모낭의 수가 증가하고 길이가 길어지는 경향을 확인하였다.
- 봉독 처리군에서 대조군에 비해 모근의 성장이 현저히 촉진 되는 결과를 얻었다.
- 결론적으로 봉독은 C57BL/6 마우스에서 모발성장효과가 있음을 확인 할 수 있었다.



## (4) 봉독의 피부 감작성 실험

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 시약 및 재료

- 봉독 (Bee venom)은 유일팜테크 (충북, 진천읍), Minoxidil은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Polyethylene glycol (PEG)는 DAEJUNG Chemicals & Metals Co. (Siheung-si, Korea), ethanol은 J. T Baker (Center Valley, PA, USA) 제품을 사용하였다. ATP 측정은 ATP-LITE™ kit를 이용하여 측정하였다. (Perkin Elmer™ Lifesciences, USA)

#### 나. 실험동물

- 본 실험은 식약처의 가이드라인에 따라 8-12주령 CBA/J 암컷 마우스를 이용하였다. 동물은 코아텍 (Peongtak, Korea)에서 분양받았으며, 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 5\%$ , 12시간 조명주기 조건하에서 식이와 식수를 자유롭게 섭취하도록 하였고 7일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 본 연구에서의 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험 연구윤리위원회의 승인 하(KUIACUC-2016-116)에 수행되었다.

#### 다. 실험 방법

- 실험방법은 식약처의 가이드라인에 따라 진행하였다. (DA법을 이용한 국소림프절시험 (Local Lymph Node Assay: DA))

##### - Day 1

개별동물에 표식을 하고 체중을 측정하며 임상 증상을 관찰하였다. 1% 라우릴황산 나트륨 (sodium lauryl sulfate, SLS) 용액을 붓을 이용하여 마우스 귀 배측 전체에 4~5회 도포하였다. SLS 처치 1시간 후 시험물질, 용매, 그리고 양성대조물질을 귀 배측에 각각  $25 \mu\text{L}$ 씩 적용하였다. 양성대조물질은 25% Hexyl cinnamic aldehyde를 이용하였다.

##### - Days 2, 3, 7

Day 1과 같이 1% SLS를 전처치 하고 시험물질을 도포하는 것을 반복하였다.

##### - Days 4, 5, 6

시험물질을 처치하지 않았다.

##### - Day 8

각 동물의 체중과 관찰된 임상 증상을 기록한다. Day 7째 시험물질을 적용하고 약 24~30시간 후 동물을 안락사 하였다. 각 마우스의 이개림프절 (auricular lymph node)을 적출하였고 이후 시험을 수행하였다.

- 세포 현탁액은 다음과 같은 방법으로 준비하였다. 각 동물에서 적출한 양쪽 림프절을 두 개의 유리 슬라이드 사이에 넣고 약하게 압력을 가해 으깨어서 단일세포 (LNC; lymph node cell)로 만들었다. 조직이 얇게 퍼진 것을 확인 후 슬라이드를 분리하였다. 슬라이드 한 쪽은 페트리디쉬에 넣고 다른 한 쪽은 잡아 고정 후 PBS로 세척하면서 cell scraper로 슬라이드에 남아 있는 조직을 긁어내었다. 총 PBS 1 mL로 두 슬라이드 세척하였다. Cell scraper로 페트리디쉬의 LNC 현탁액을 균질화하였다. 피펫으로 림프절의 막을 취하지 않도록 주의하면서 LNC 현탁액 20  $\mu$ L를 조심스럽게 취하여 PBS 1.98 mL에 혼합하여 2 mL 시료를 만들었다. 각 동물마다 두 개의 시료를 준비하여 ATP 양을 측정하였다. 키트는 Relative Luminescence Units (RLU)으로 bioluminescence를 측정하였으며, 각 시험군의 결과는 평균 자극지수(mean SI)로 표현하였다. 자극지수는 시험군과 양성대조군의 평균 RLU(mean RLU/mouse)를 용매대조군의 평균 RLU로 나눈 값이며, 용매대조군의 평균 SI값을 1로 정한다.  $SI \geq 1.8$ 이면 양성으로 간주하였다.

## 2. 실험 결과

### 가. ATP 측정 결과

- 용매대조군의 평균 자극지수(mean SI) 값을 1로 산정한 후 비교한 결과, 봉독 0.005% ( $1.33 \pm 0.32$ ), 0.01% ( $0.66 \pm 0.23$ ) 두 농도에서 SI값이 모두 1.8 이하였으므로 상기 농도에서는 피부에 자극이 없음을 알 수 있었다. 실험이 정상적으로 시행되었는지 확인하기 위한 positive control이었던 25% Hexyl cinnamic aldehyde를 처리했던 군 ( $2.21 \pm 0.31$ )에서는 양성이 확인되었다(Table 7).

Table 7. 봉독 피부감작성 실험 결과.

Group	Negative control	Positive control	BV 0.005%	BV 0.01%
SI index	$1 \pm 0.12$	$2.21 \pm 0.35$	$1.33 \pm 0.32$	$0.66 \pm 0.23$

SI= test average/negative control average.  $SI > 1.8$  이면 양성 판정

#### 나. 피부 홍반 관찰

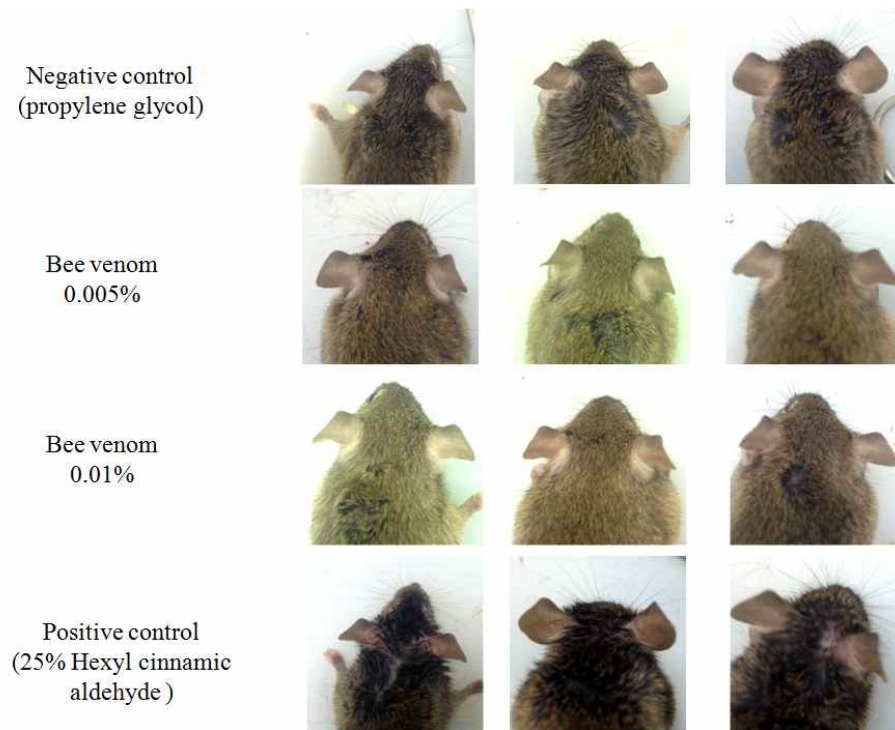


Fig. 17. 봉독 피부감작성 실험 홍반 관찰 결과

- 실험 시작 후 8일째 되는 날, 마우스의 귀 배측을 관찰한 결과, 양성대조군에서 홍반이 관찰되었으나, 봉독을 바른 군에서는 홍반이 관찰되지 않았다(Fig. 17). 홍반 관찰과 ATP 수치 확인을 통해 봉독은 상기 농도에서 피부에 자극을 주지 않은 것으로 확인되었다.

#### 다. 결과 요약

- 피부감작성 시험결과 사용한 봉독 농도 내에서는 피부자극이 없는 것으로 나타났다.
- 사용한 봉독 농도 내에서는 피부에 홍반을 유발하지 않았다.
- 따라서 사용 농도 내의 봉독을 이용한 제품에서 피부에 부작용을 나타내지 않을 것으로 생각된다.

## (5) hDPCs를 이용한 봉독의 양모 효과 측정

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 시약 및 재료

- 봉독은 유일팜테크 (충북, 진천읍)에서 제공된 것을 사용하였다. Mellitin, Dexamethasone은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Polyethylen glycol (PEG), ethanol은 J. T. Baker (Center Valley, PA, USA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, trypsin-EDTA는 HyClone (Logan, UT, USA) 제품을 사용하였다.

#### 나. 세포 배양 및 세포 증식 실험

- 본 실험에서 사용한 Human dermal papilla cells (hDPCs)(Fig. 18)는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양 받았다. Tissue culture dish에서 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)을 사용하여 배양기(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 배지는 2~3일에 한 번씩 교환하였다. 세포 증식 실험은 세포가 80% confluent된 상태일 때 진행하였다. 먼저 96-well plate의 각 well 마다 hDPCs를  $1 \times 10^5$ 개 만큼 seeding 한 후 24 시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨다. 그 후 봉독 (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)과 mellitin (200 ng/ml)을 처리하고 24 시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 WST-1 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5- (2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA)를 10  $\mu$ l 첨가하여 SpectraMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 흡광도(450 nm)를 측정하여 control of % 비로 비교하였다.

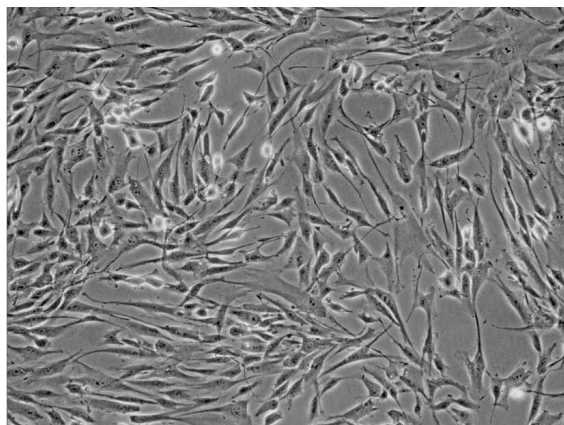


Fig. 18. hDPCs (Phase contrast, 100 $\times$ )

다. FGF2, FGF7, IGF-1R, VEGF mRNA 발현량 측정

- FGF2 (fibroblast growth factor 2)와 FGF7 (fibroblast growth factor 7)은 섬유모세포 성장인자로서 모발 성장을 자극하는 인자로 알려져 있다. IGF-1R(insulin-like growth factor 1 receptor)은 모발 재생에 관여하는 성장인자로 모낭세포의 자멸을 억제하고 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 또한 VEGF (vascular endothelial growth factor)는 휴지기에 신생혈관 생성을 촉진시키는 인자로 작동하여 새로운 모발의 성장기로 유도하는 인자로 알려져 있다. 따라서 FGF2, FGF7, IGF-1R, VEGF의 mRNA 발현을 통해 봉독의 양모촉진 효과 기전을 밝히고자 하였다. 본 실험에서 봉독의 FGF2 (fibroblast growth factor 2), FGF7(fibroblast growth factor 7), IGF-1R(insulin-like growth factor 1 receptor), 그리고 VEGF(vascular endothelial growth factor) mRNA 발현 조절에 대해 분석하기 위하여 먼저 6-well plate에 hDPCs를 seeding ( $2 \times 10^5$  cells/well)한 후 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 봉독 (100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)과 minoxidil (1  $\mu$ M)을 처리하고 24시간 동안 배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 1 ml Trizol 용액 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 처리하여 total RNA를 추출한 후 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 RNA 농도를 측정하였다. 그 후 Revert Aid First Strand cDNA kit (Fermentas, EU)를 사용하여 cDNA로 전환시킨 후 DyNamo TMHS SYBR Green qPCR kit (FINNZYMES, Finland)와 Step One Plus™Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 quantitative PCR (qPCR)을 실시하였다. qPCR 조건은 다음과 같다: 95°C 10min, 95°C 20 sec, 60°C 20 sec, 72°C 30 sec, 40 cycles. House keeping gene으로 GAPDH를 사용하였고 PCR에 사용된 primer (Bioneer, Seoul, Korea)는 Table 8에 나타내었다.

Table 8. FGF2, FGF7, IGF-1R, VEGF, GAPDH 의 primer.

Gene	Primers	Sequence (5' → 3')
FGF2	Forward	AGAAGAGCGACCCTCACATC
	Reverse	ACTGCCAGTTCGTTTCAGT
FGF7	Forward	CCTGAGCGACACACAAGAAG
	Reverse	GCCACTGTCCTGATTTCCAT
IGF-1R	Forward	CATTTACCTCCACCACCAC
	Reverse	AGGCATCCTGCCATCATAAC
VEGF	Forward	GGGCAGAATCATCAGGAAGT
	Reverse	TGGTGATGTTGGACTCCTCA
GAPDH	Forward	AAGGGTCATCATCTGCCC
	Reverse	GTGATGGCATGGACTGTGGT

## 라. VEGF 발현량 측정

- 본 실험에서 봉독의 VEGF 발현 조절에 대해 분석하기 위하여 먼저 60 mm dish에 hDPCs를 seeding ( $2 \times 10^5$  cells/well)한 후 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨다. 그 후 봉독 (100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)과 minoxidil (1 μM)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 PBS로 2회 세척 후 Pro-Prep protein extraction solution (Intron, Seoul, Korea)에 넣고 원심분리(13,000rpm for 5 min at 4°C) 후 상등액에서 얻은 단백질을 Bradford assay를 이용하여 정량하였다. 30 μg의 protein을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 전기영동하여 분리한 후 Trans-Blot semi-dry transfer cell (Bio-Rad)을 사용하여 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)로 이동시킨다. 그 후 5% non-fat skimmed milk in PBS-T(PBS with 0.05% Tween 20)로 blocking (overnight at 4°C)하고, PBS-T로 15분씩 3번 세척한 후 primary antibody (anti-VEGE antibody, BioLegend, San Diego, CA)를 PBS-T에 1:500로 희석하여 2시간 동안 반응시킨 후 동일한 방법으로 세척한 후 secondary antibody (goat anti-rabbit IgG antibody, Thermo Scientific)를 1:25,000로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 세척하고, WesternBright Sirius western blotting detection kit (Advansta, CA, USA)를 이용하여 이미지 분석기 (FluorChem E Proteinsimple, CA, USA)로 분석하였다. Endogenous control로 anti-β-actin antibody (Thermo Scientific)를 1:5,000로 희석하여 사용하였다.

## 2. 연구 결과

### 가. 세포 증식 측정

- hDPCs을 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 봉독(1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)을 처리하여 24시간 후 WST-1 assay를 통하여 세포 증식을 측정한 결과, 대조군에 비해 각각 97.8%, 102.8%, 107.4%, 112.7%, 116.6%로 나타나 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인하였다.(Fig. 19)

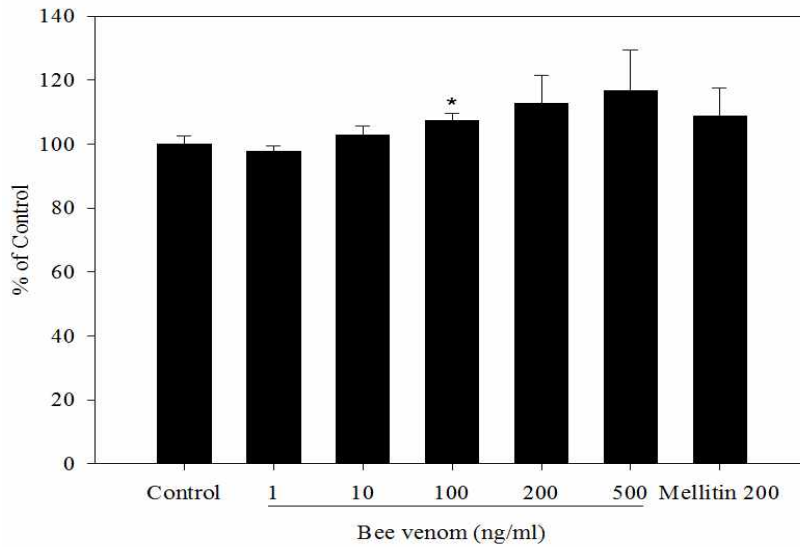


Fig. 19. The effect of bee venom on the proliferation of human dermal papilla cells (hDPCs). Cell proliferation was measured using WST-1 reagent (\* $p < 0.05$ ).

나. FGF2, FGF7, IGF-1R, VEGF mRNA 발현량 측정

- hDPCs을 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 봉독(100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)을 24시간동안 처리한 후 FGF2(fibroblast growth factor 2), FGF7(fibroblast growth factor 7), IGF-1R(insulin-like growth factor 1 receptor) 그리고 VEGF(vascular endothelial growth factor) mRNA 발현량을 측정한 결과 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인하였다(Fig. 20)(Fig. 21). 섬유모세포 성장인자인 FGF2와 FGF7의 mRNA 발현량은 음성대조군에 비해 봉독 처리군(100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)에서 각각 128.2%, 128.2%, 152.4%, 그리고 154.5%, 154.5%, 203.7%로 나타나 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 모발 재생에 관여하는 성장인자인 IGF-1R와 휴지기에 신생혈관 생성을 촉진시키는 인자인 VEGF의 mRNA 발현량은 음성대조군에 비해 봉독 처리군(100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)에서 각각 117.0%, 117.0%, 142.3%, 그리고 128.1%, 174.8%, 178.7%로 나타나 역시 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

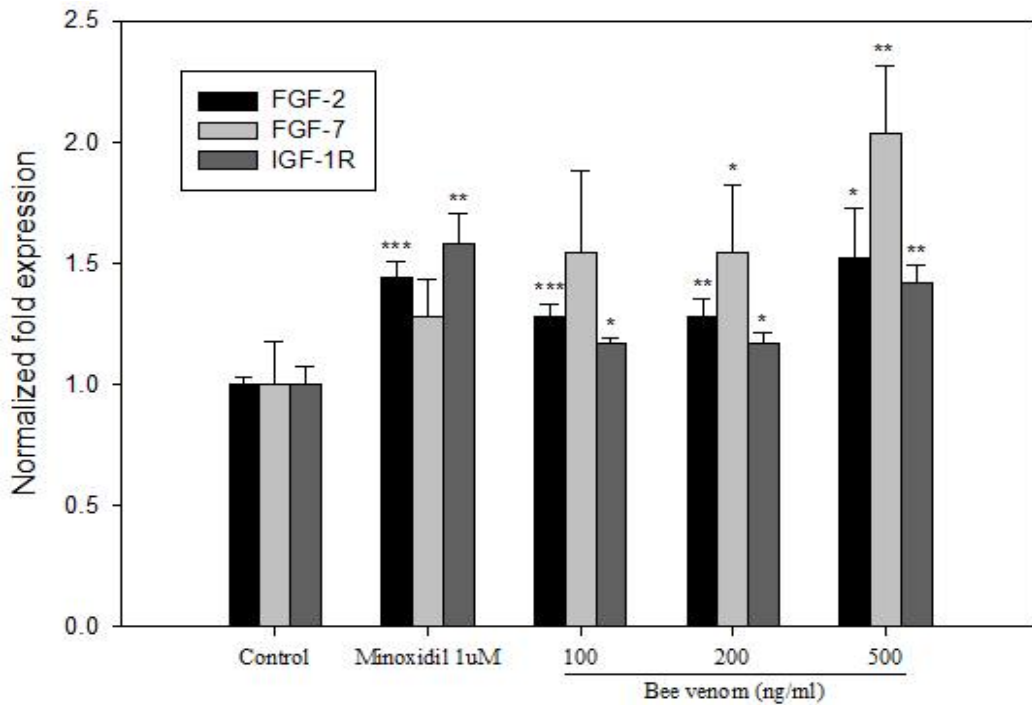


Fig. 20. Effect of bee venom on the expression of FGF-2, FGF-7, and IGF-1R gene in hDPCs. FGF-2 (Fibroblast growth factor 2), FGF-7 (Fibroblast growth factor 7), and IGF-1R (Insulin-like growth factor1 receptor) stimulate hair growth. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ )

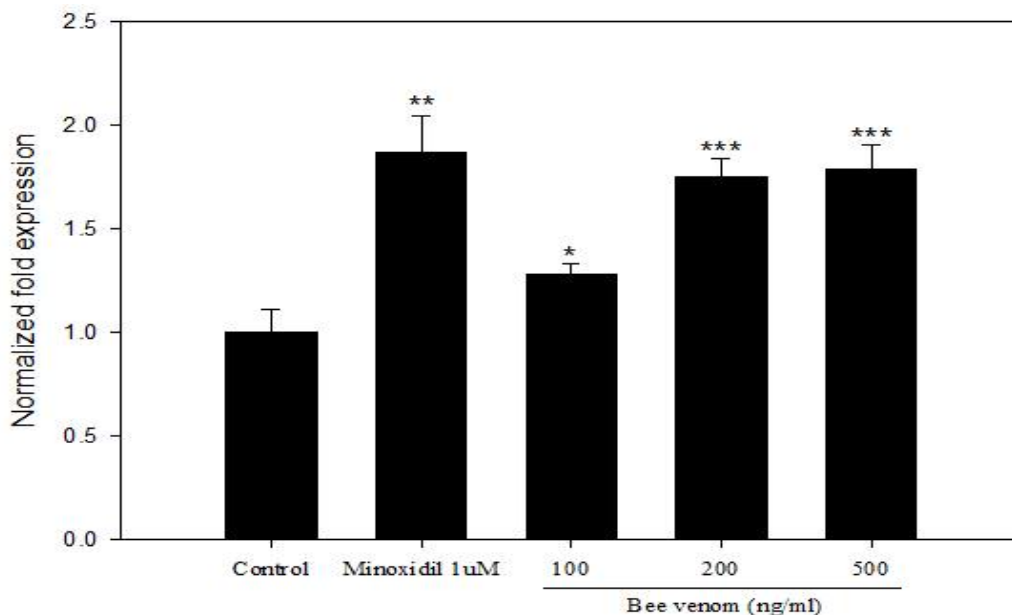


Fig. 21. Effect of bee venom on the expression of VEGF gene analyzed by quantitative real-time RT-PCR in hDPCs. VEGF (Vascular endothelial growth factor) stimulates dermal papilla. Both minoxidil and bee venom increased VEGF expression. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )



#### 다. VEGF 발현량 측정

- hDPCs을 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 봉독(100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)을 24시간 동안 처리한 후 VEGF(vascular endothelial growth factor) 발현량을 측정한 결과 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인하였다(Fig. 22). 휴지기에 신생혈관 생성을 촉진시켜 성장기로 유도하는 인자인 VEGF의 발현은 음성 대조군에 비해 봉독을 처리한 군에서 증가하여 양모촉진효과를 나타내었다.

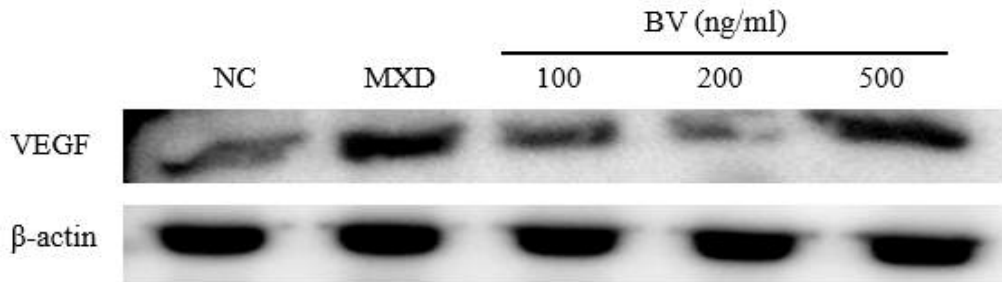
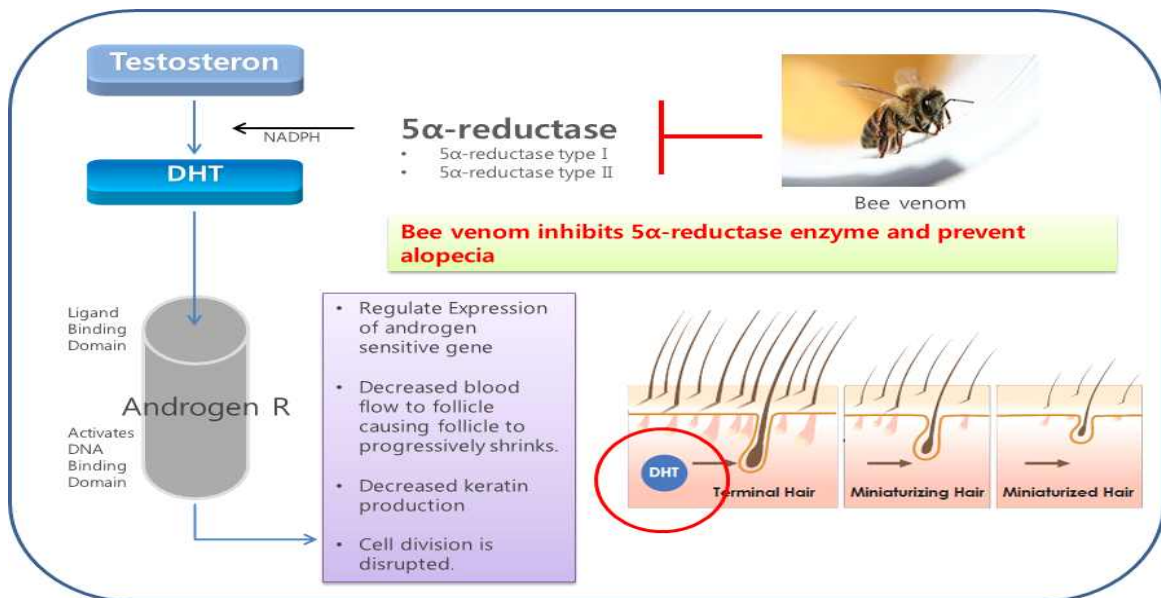


Fig. 22. Effect of bee venom on the expression of VEGF protein analyzed by Western blot in hDPCs. VEGF (Vascular endothelial growth factor) stimulates dermal papilla. Both minoxidil and bee venom increased VEGF expression.

#### 5. 봉독의 기능성에 대한 연구결과 요약

- 퇴행기가 유도된 C57BL/6를 이용한 봉독(bee venom)의 탈모방지 효과를 측정한 결과, 육안적 발모 관찰에서 0.01% 봉독 처리군은 양성대조군인 2% minoxidil 처리군보다 더 뛰어난 탈모방지 효과를 나타내었다.
- 모발 성장인자인 KGF의 mRNA 발현량은 농도 의존적으로 증가하였으며 탈모의 주 원인물질로 여겨지는 SRD5A2의 mRNA와 protein (5 $\alpha$ -reductase) 발현량은 농도 의존적으로 감소하였으며 이는 양성대조군인 2% minoxidil 처리군보다 더 뛰어난 효과를 나타내었다.
- 성장기의 C57BL/6를 이용한 봉독(bee venom)의 양모촉진 효과를 측정한 결과, 육안적 발모 관찰 및 조직 관찰에서 0.01% 봉독 처리군은 양성대조군인 2% minoxidil 처리군보다 더 뛰어난 양모촉진 효과를 나타내었다.
- hDPCs를 이용한 봉독(bee venom)의 양모촉진 효과를 측정한 결과, 세포 증식 실험에서 봉독 처리군의 세포 증식은 농도 의존적으로 증가하였다.
- 섬유모세포 성장인자인 FGF2, FGF7와 모발 재생에 관여하는 성장인자인 IGF-1의 mRNA 발현량은 농도 의존적으로 증가하였고 특히 FGF7은 양성대조군인 2% minoxidil 처리군보다 더 높은 발현량을 나타내었다.

- 또한 휴지기에 신생혈관 생성을 촉진시키는 인자인 VEGF의 mRNA와 protein 발현량은 농도 의존적으로 증가하여 뛰어난 양모촉진 효과를 나타내었다.
- 신생혈관 생성을 촉진시키는 인자인 VEGF의 mRNA와 protein 발현량은 농도 의존적으로 증가하여 뛰어난 양모촉진 효과를 나타내었다.
- 결론적으로 봉독은 우수한 양모 촉진 및 탈모방지 효과를 보이는 물질로 탈모방지 및 양모촉진용 헤어케어 제품의 원료로 이용가능성이 높은 재료로 생각된다.
- 봉독의 모발 성장에 대한 효과 정리



## (6) 비듬 유발 진균의 항진균 효과 측정

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 시약 및 재료

- 봉독 (Bee venom)은 유일팜테크 (충북, 진천읍)에서 제공된 시료를 이용하였다. 비듬 유발 진균에 대한 항균 효과를 측정하기 위해 사용된 균주는 *Malassezia furfur* (*M. furfur*)과 *Filobasidium uniguttulatum* (*F. uniguttulatum*)이며, 모두 KCCM (한국미생물보존센터)에서 분양받아 사용하였다. Paper disc (Adventec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)와, 양성대조군에 사용된 Ketoconazole은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO)에서 구매하였으며 Difco Yeast extract peptone dextrose (YPD medium), Difco Sabouraud Dextrose Agar (SDA medium)은 Beckton Dickinson (Franklin Lakes, USA) 제품을 이용하였다.

### 2. 실험 방법

- 비듬 유발 진균에 대한 항균 활성은 평판배지확산법 (agar diffusion method)으로 측정하였다. 각 공시균주를 평판배지에 도말 접종한 다음, 직경 8mm의 멸균된 paper disk를 평판배지에 밀착시킨다. 봉독 시료를 농도에 맞게 점적한 후 37°C (*M. furfur*), 25°C (*F. uniguttulatum*)로 유지된 배양기에서 48시간 배양하면서 생성된 투명환(clear zone)의 크기를 mm단위로 측정하여 항균 활성도를 측정하였다.

### 3. 실험 결과

- Paper disc에 봉독을 농도별로 점적시킨 후 균을 배양시킨 결과, 봉독에서 항균효과가 검출되었다. *M. furfur* 에서 양성 대조군인 Ketoconazole 10 mg ( $31 \pm 1.4$  mm)은 항균효과를 보였고, 봉독 0.5% ( $0.7 \pm 0.0$ mm), 봉독 1% ( $1.05 \pm 0.1$ mm)에서도 항균 효과가 검출되었다. 음성 대조군에서는 항균효과가 검출되지 않았다. *F. uniguttulatum* 에서는 양성 대조군인 Ketoconazole 10mg ( $6 \pm 0.0$  mm)의 효과가 있었고, 봉독은 봉독 0.5% ( $1 \pm 0.3$ mm), 봉독 1% ( $1.3 \pm 0.4$ mm)에서도 항균 효과가 검출되었다 (Table 9).

Table 9. 봉독의 항균효과 평판 배지법 측정 결과

	Ketoconazole 10 mg	BV 0.5 %	BV 1 %
<i>M. furfur</i>	$31 \pm 1.4$ mm	$0.7 \pm 0.0$ mm	$1.05 \pm 0.1$ mm
<i>F. uniguttulatum</i>	$6 \pm 0.0$ mm	$1 \pm 0.3$ mm	$1.3 \pm 0.4$ mm

### 4. 결과 요약

- 사용된 봉독의 농도 내에서 항진균작용은 있었으나 양성대조군에 비해 크게 나타나지 않았다.

## (7) hDPCs를 이용한 봉독의 병원성진균에 의한 염증완화 효과 측정

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 시약 및 재료

- 봉독은 유일팜테크 (충북, 진천읍)에서 제공된 것을 사용하였다. 세포 배양에 사용된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (Fetal bovine serum), Penicillin/Streptomycin은 HyClone 제품을 사용하였다. 균 배양에 사용된 SDB (Sabouraud Dextrose Broth, BD 제품)에 Agar powder (junsei 제품)을 섞어 사용하였다. DMSO (Dimethyl Sulfoxide)는 DAEJUNG 제품을 사용하였다.

#### 나. 세포 및 균

- Human dermal papilla cells (hDPCs)  
본 실험에서 사용한 Human dermal papilla cells는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양 받았다. Tissue culture dish에서 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)을 사용하여 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.
- *Malassezia furfur* (*M. furfur*)  
본 실험에서 사용한 *Malassezia furfur*는 1% peptone, 4% glucose, 10% olive oil, 0.2% Tween 80이 포함된 Sabouraud dextrose agar에 4일 동안 배양기(37°C)에서 배양되었다. 4일 동안 배양된 *M. furfur*는 PBS에 2번 세척 후 80°C에서 30분간 열중탕하여 사균 처리 하였다.

#### 다. hDPCs의 생존력 시험

- 본 실험에서 균에 의한 염증유발을 확인 할 수 있는 적당한 봉독과 균의 농도를 설정하기 위해 hDPCs의 생존력 시험을 시행하였다. 생존력 시험을 위해 hDPCs는 80%정도 자랐을 때 진행되었으며, 먼저 96-well plate에 각 well마다 hDPCs를  $1 \times 10^5$ 개만큼 seeding 한 후 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 봉독 (2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml)과 *M. furfur* ( $1 \times 10^5$  cells/ml,  $1 \times 10^6$  cells/ml,  $1 \times 10^7$  cells/ml,  $5 \times 10^7$  cells/ml,  $1 \times 10^8$  cells/ml)를 처리하고 24시간동안 배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 반응 후, MTT 시약(4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide)을 첨가하여 formazan을 형성한 후 DMSO를 이용해 formazan을 녹여 SpectraMax microplate reader를 사용하여 흡광도(540 nm)를 측정하여 control of %로 hDPCs의 생존력을 시험하였다.

라. IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA 발현량 측정

- IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 는 염증성 사이토카인으로 세균이나 바이러스 감염 등에 따른 염증 반응에 깊이 관여하는 사이토카인이다. 따라서 IL-6, TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현을 통해 봉독이 균에 의한 염증완화에 영향을 미치는지 밝히고자 하였다.

본 실험에서 IL-6, TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현 조절을 분석하기 위하여 먼저 6-well plate에 hDPCs를  $2 \times 10^5$  cells/well로 seeding한 후 24시간동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 봉독 (2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml)과 *M. furfur* ( $1 \times 10^7$  cells/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 각 well 당 1 ml Trizol 용액 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 처리하여 total RNA를 추출한 후 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 RNA 농도를 측정한 뒤 Revert aid first strand cDNA kit (Fermentas, EU)를 사용하여 RNA를 cDNA로 전환시킨 후 Step One Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 이용하여 quantitative PCR (qPCR)을 실시하였다. qPCR 조건은 다음과 같다: 95°C 10 min, 95°C 20 sec, 60°C 20 sec, 72°C 30 sec, 40 cycles. House keeping gene으로 GAPDH를 사용하였고 PCR에 사용된 primer (Bioneer, Seoul, Korea)는 다음과 같다. GAPDH Forward 5' -ACC CAC RCC RCC ACC TTT GA-3' , Reverse 5' -CTG TTG CTG TAG CCA AAT TCG T-3' ; IL-6 Forward 5' -GGA GCC CAG CTA TGA ACT CC-3' , Reverse 5' -GGT CAG GGG TGG TTA TTG CA-3' ; TNF- $\alpha$  Forward 5' -CAG AGG GCC TGT ACC TCA TC-3' , Reverse 5' -GGA AGA CCC CTC CCA GAT AG-3' .

마. IL-6, TNF- $\alpha$  단백질 발현량 측정

- 본 실험에서 IL-6, TNF- $\alpha$ 의 사이토카인 생성량을 분석하기 위하여 먼저, 6-well plate에 hDPCs를  $2 \times 10^5$  cells/well로 seeding한 후 24시간동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 봉독 (2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml)과 *M. furfur* ( $1 \times 10^7$  cells/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 배양한 세포 상등액을 가지고 단백질 발현량을 측정하였다. 측정에는 Human IL-6 ELISA set (BD Biosciences Pharmingen CA, US), Human TNF- $\alpha$  ELISA set (BD Biosciences Pharmingen CA, US)를 사용하였다.

바. 현광현미경을 이용한 apoptosis 완화 확인

- 본 실험에서 균에 의해 유도되는 apoptosis의 완화를 분석하기 위하여 먼저, 24-well plate 바닥에 cover glass를 깔고 그 위에 hDPCs를  $5 \times 10^4$  cells/well로 seeding한 후 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 봉독 (2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml)과 *M. furfur* ( $1 \times 10^7$  cells/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양기

(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. EzWay™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Komabiotech INC., Seoul, Korea)를 이용하여 형광염색 후 Fluoview FV1000 (confocal laser scanning biological microscope)를 이용하여 518 nm와 620 nm에서 측정하였다.

## 2. 연구결과

### 가. hDPCs의 생존력 시험

- hDPCs을 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 24시간 동안 배양 시킨 후 봉독 (2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml)과 *M. furfur* (1 × 10<sup>5</sup> cells/ml, 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml, 1 × 10<sup>7</sup> cells/ml, 5 × 10<sup>7</sup> cells/ml, 1 × 10<sup>8</sup> cells/ml)를 처리하고 24시간 후 MTT assay를 통하여 세포 생존력을 측정한 결과, 봉독의 경우 대조군에 비해 각각 99.9%, 99.7%, 99.9%, 100.3% 로 나타나 세포에 생존력에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. *M. furfur*의 경우 대조군에 비해 각각 99.3%, 98.4%, 99.3%, 87.6%, 84.6% 로 나타나 1 × 10<sup>7</sup> cells/ml 농도까지는 세포 생존에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다(Fig. 23).

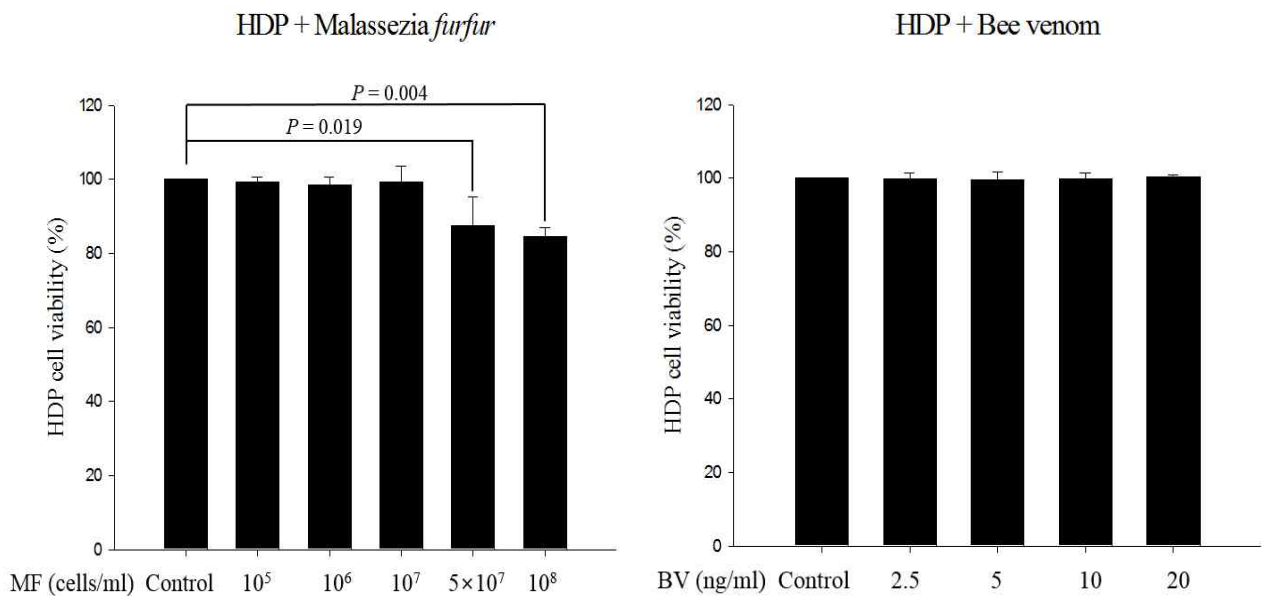


Fig. 23. The effect of bee venom and *M. furfur* on the viability of Human Dermal Papilla Cells (hDPCs).

### 나. IL-6, TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현량 측정

- hDPCs을 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 봉독 (2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml)과 *M. furfur* (1 × 10<sup>7</sup> cells/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 cell에서 추출한 mRNA를 이용해 염증성 사이토카인 IL-6, TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현량을 측정한 결과 봉독 농도에 의존적으로 감소하는 경향

을 확인하였다(Fig. 24).

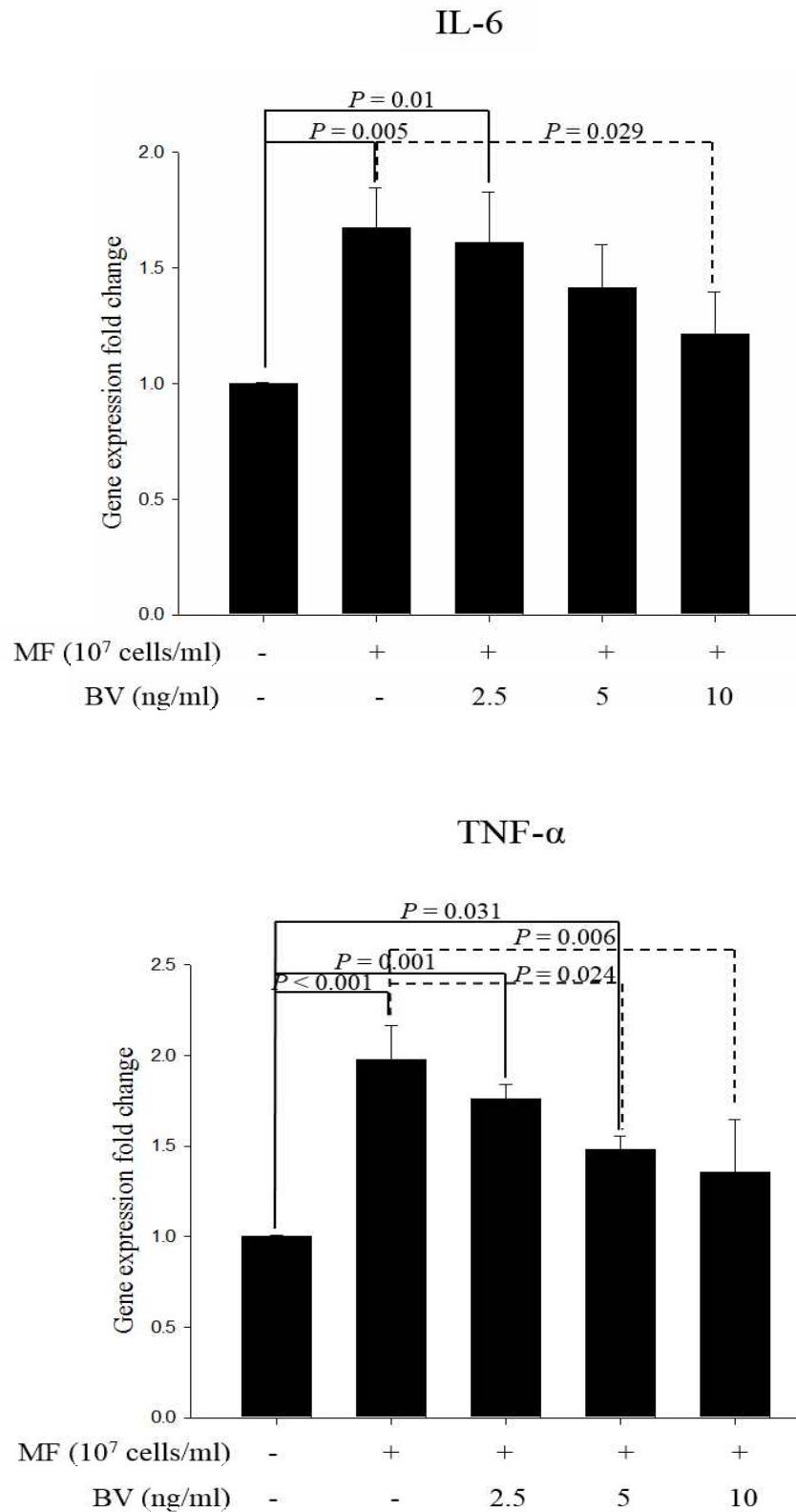


Fig. 24. Bee venom inhibits the pro-inflammatory cytokines in Human dermal papilla cells (hDPCs). Cells were cultured with bee venom and heat killed *Malassezia furfur* (*M. furfur*) treatment for 24h. Expression of inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), tumor

necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were inhibited by bee venom.

다. Pro-inflammatory cytokine 발현량 측정

- hDPCs를 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 봉독 (2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml)과 *M. furfur* (1 × 10<sup>7</sup> cells/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 cell을 배양한 상등액을 이용하여 사이토카인을 측정하였다(Fig. 25).

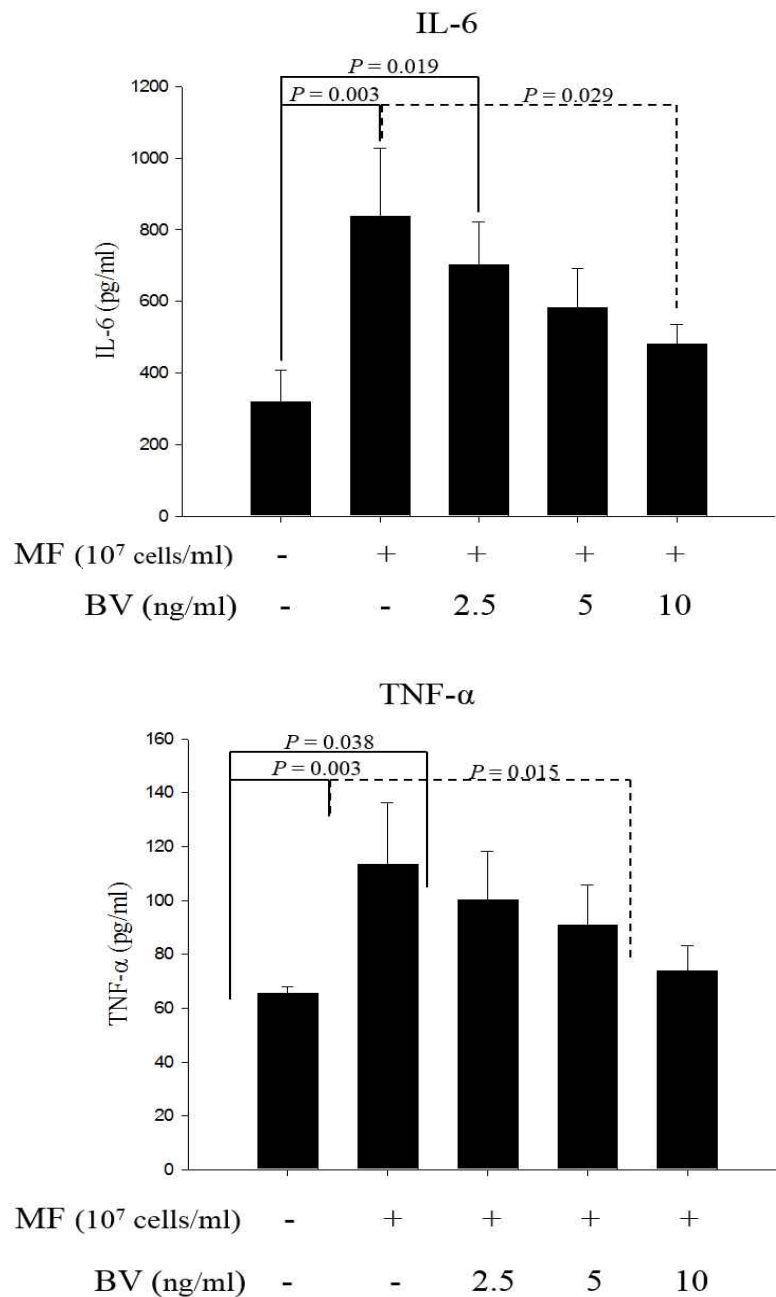


Fig. 25. Bee venom inhibits the pro-inflammatory cytokines in Human dermal papilla cells (hDPCs). Cells were cultured with bee venom and heat killed *Malassezia furfur* (*M. furfur*) treatment for 24h. Pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were inhibited by bee venom.



라. 형광현미경을 이용한 apoptosis 완화 확인

- hDPCs를 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 봉독 (2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml)과 *M. furfur* (1 × 10<sup>7</sup> cells/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 cell을 annexin V-FITC, PI 염색하여 세포사멸을 육안으로 확인하였다(Fig. 26). 육안적으로 확인했을 때 봉독을 처리한 세포에서 세포사멸사가 완화되는 것처럼 보였다. 하지만 추후에 유세포 분석을 통해 명확한 수치를 확인해볼 필요성이 있다.

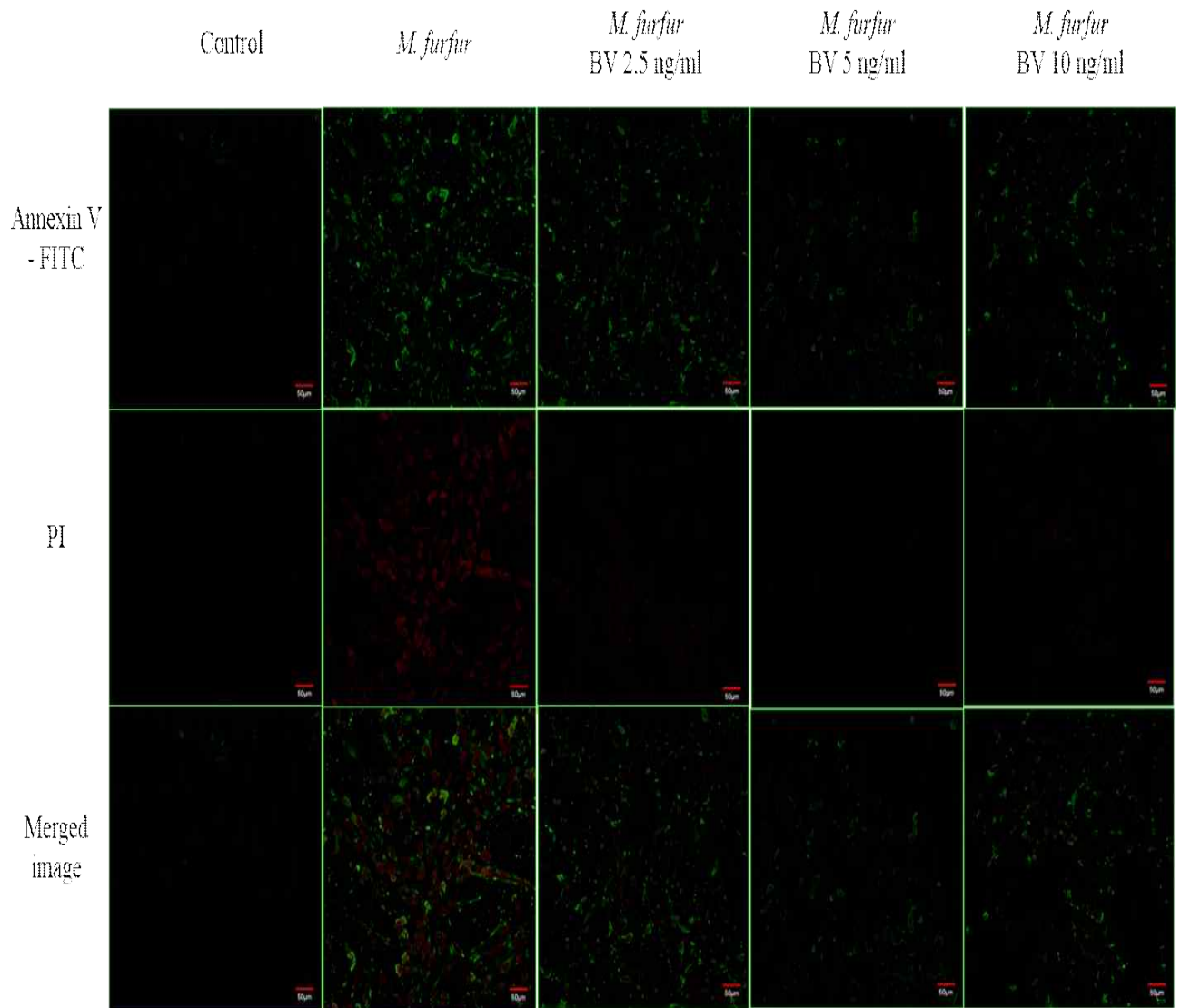


Fig. 26. Bee venom inhibits apoptosis in Human dermal papilla cells (hDPCs). Fluorescence images for apoptotic cells were cultured with bee venom and heat killed *Malassezia furfur* (*M. furfur*) treatment for 24 h. Cells stained with annexin V-FITC (green) for cell membrane and PI (red) for nuclear in hDPCs. The scale bar represents 100 μM. (200×)

## (8) HaCaT cell을 이용한 진균에 의한 염증완화효과

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 시약 및 재료

- 봉독은 유일팜테크 (충북, 진천읍)에서 제공된 것을 사용하였다. 세포 배양에 사용된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (Fetal bovine serum), Penicillin/Streptomycin은 HyClone 제품을 사용하였다. 균 배양에 사용된 SDB (Sabouraud Dextrose Broth, BD 제품)에 Agar powder (junsei 제품)을 섞어 사용하였다. DMSO (Dimethyl Sulfoxide)는 DAEJUNG 제품을 사용하였다.

#### 나. 실험방법

##### 1) Cell viability 측정

- 본 실험에서 사용한 *Candida albicans*는 ATCC (ATCC® 90028TM) 에서 구입하여 사용하였다. HaCaT cell (human keratinocyte)은 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양 받았다. *C. albicans*와 봉독이 HaCaT cell의 Viability에 미치는 영향을 분석하기 위하여 Tissue culture dish에서 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)에서 배양시켰다. 그 후, 96well plate에 HaCaT cell을 seeding ( $1.0 \times 10^5$  cells/ml) 한 후 24시간 동안 배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 배지는 2~3일에 한 번씩 교환하였다. 그 후 봉독은 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, *C. albicans*는  $10^3$  cells/ml,  $10^4$  cells/ml,  $10^5$  cells/ml,  $10^6$  cells/ml,  $10^7$  cells/ml 각각 처리하고 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 FBS가 함유되지 않은 DMEM 배지에 0.5mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetra-zolium bromide(MTT) 시약을 첨가하여 한 시간 동안 배양 후 DMSO를 이용해 formazan을 녹인 후 SpectraMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 흡광도(540 nm)를 측정하여 control of % 비로 비교하였다.

##### 2) Pro-inflammatory cytokine, Growth factor mRNA 발현량 측정

- 염증유도성 싸이토카인과 성장인자의 mRNA 발현 변화량을 분석하기 위하여 먼저 6-well plate에 HaCaT cells을 seeding ( $1 \times 10^5$  cells/ml)한 후 24시간 동안 배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 *C. albicans* ( $10^6$  cells/ml)와 봉독 (1 ng/ml, 10 ng/ml, and 100 ng/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 1 ml AccuZol™ 용액 (Bioneer, Seoul, Korea)을 처리하여 total RNA를 추출한 후 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 RNA 농도를 측정하였다. 그 후 RevertAid First Strand cDNA kit

(Fermentas, Burlington, Ontario, Canada)를 사용하여 cDNA로 전환시키고 KAPA SYBR FAST qPCR kit (KAPA Biosystems, Cape Town, South Africa)와 Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 quantitative PCR (qPCR)을 실시하였다. qPCR 조건은 다음과 같다: 95°C 10 min, 95°C 15 sec, 60°C 15 sec, 72°C 20 sec, 40 cycles. House keeping gene으로 GAPDH를 사용하였고 PCR에 사용된 primer (Bioneer, Seoul, Korea)는 GAPDH; forward: 5' - ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA, reverse: 5' - CTG TTG CTG TAG CCA AAT TCG T, interleukin 1 beta(IL-1 $\beta$ ); forward: 5' - AAC AGG CTG CTC TGG GAT TC, reverse: 5' - TAT CCT GTC CCT GGA GGT GG, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ); forward: 5' - CTC CTT CCT GAT CGT GGC AG, reverse: 5' - CCC AAA GTA GAC CTG CCC AG, insulin like growth factor 1 (IGF-1); forward: 5' - CAT TTC ACC TCC ACC ACC AC, reverse: 5' - AGG CAT CCT GCC CAT CAT AC, fibroblast growth factor 2 (FGF-2); forward: 5' - GGT GAA ACC CCG TCT CTA CA, reverse: 5' - TCT GTT GCC TAG GCT GGA CT를 사용하였다.

### 3) Pro-inflammatory cytokine 발현량 측정

- 염증유도성 싸이토카인의 발현량을 측정하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (BD biosciences; Franklin Lakes, SD, USA)를 사용하였다. 6-well plate에 HaCaT cells을 seeding ( $1 \times 10^5$  cells/ml)한 후 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 *C. albicans* ( $10^6$  cells/ml)와 봉독 (1 ng/ml, 10 ng/ml, and 100 ng/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 해당하는 실험군의 상등액을 수거해 샘플로 사용하였다. 그 후 과정은 Kit 제조사의 protocol에 따랐다.

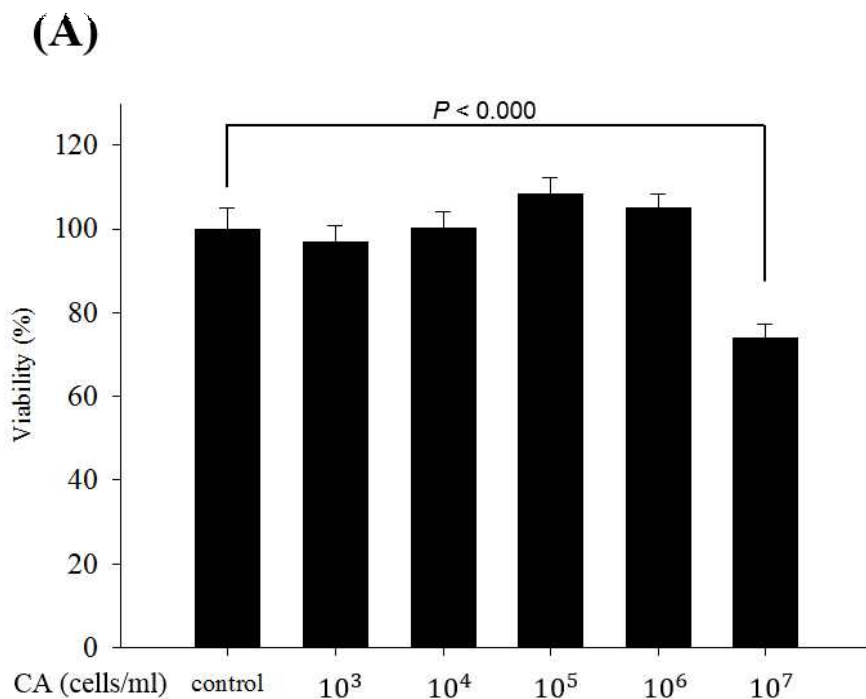
### 4) Anti-apoptotic effect 측정

- 봉독의 세포사멸 억제 능력을 평가하기 위해 FACS analysis를 진행하였다. 12-well plate에 HaCaT cells을 seeding ( $1 \times 10^5$  cells/ml)한 후 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨다. 그 후 *C. albicans* ( $10^7$  cells/ml)와 봉독 (1 ng/ml, 10 ng/ml, and 100 ng/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 상등액과 trypsin-EDTA를 처리한 세포를 모아 염색과정을 진행하였다. 세포사멸을 확인하기 위한 염색은 EzWay Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (KOMA Biotech Inc., Seoul, Republic of Korea)를 사용하였고 사용법은 제조사의 protocol을 따랐다.

## 2. 실험결과

### 가. Cell viability 측정

- HaCaT cells을 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 각각 *C. albicans*는 (10<sup>3</sup> cells/ml, 10<sup>4</sup> cells/ml, 10<sup>5</sup> cells/ml, 10<sup>6</sup> cells/ml, 10<sup>7</sup> cells/ml), 붕독(1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, and 200 ng/ml)을 처리하여 24시간 후 MTT assay를 통하여 cell Viability을 측정한 결과, 대조군에 비해 각각의 물질을 처리하였을 경우 *C. albicans*는 대부분의 농도는 생존율에 영향을 미치지 않았고 10<sup>7</sup> cells/ml에서만 유의하게 viability가 감소하였다. 그에 비해 붕독을 처리한 실험군은 cell viability를 떨어뜨리지 않고 약간의 농도 dependent한 증식효과를 보았다(Fig. 27).



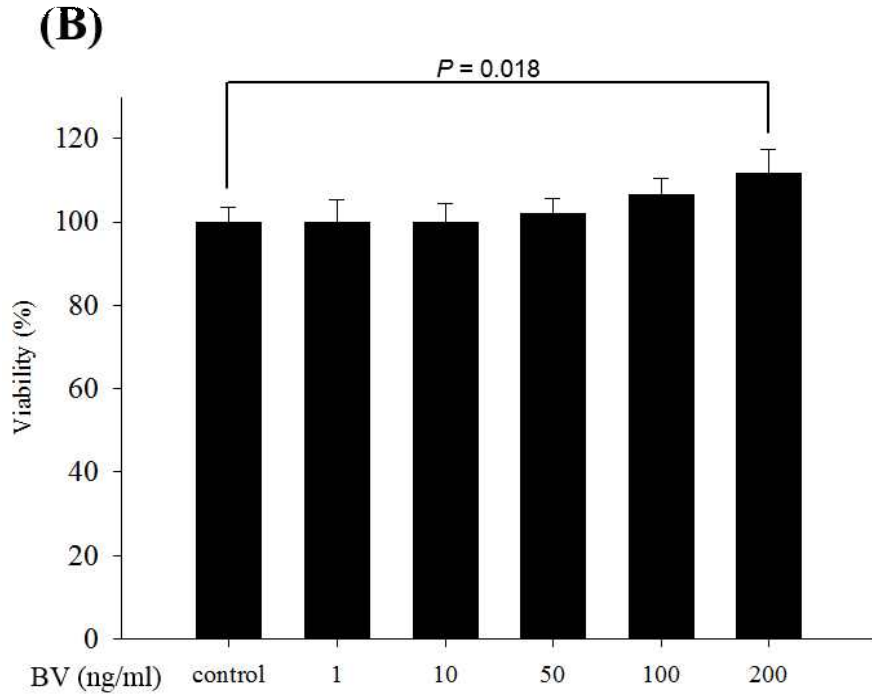
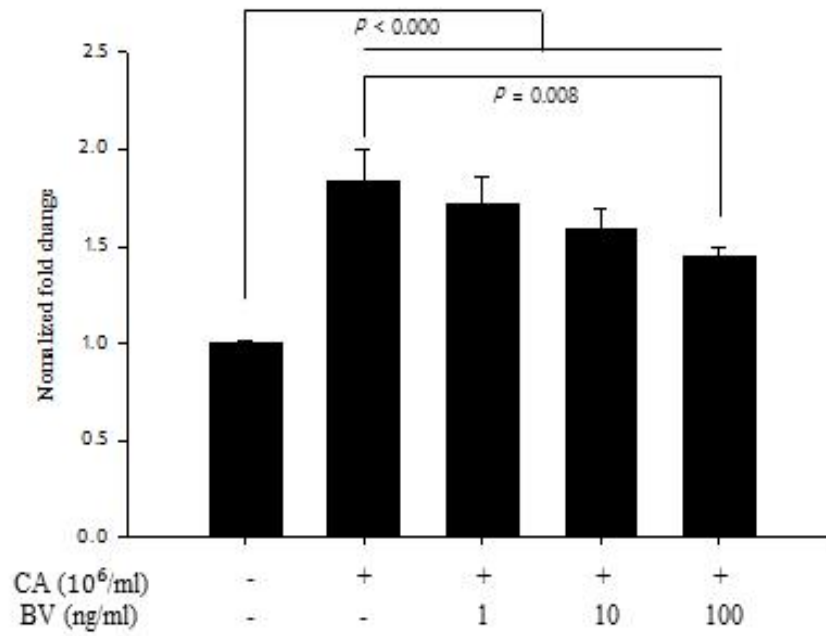


Fig. 27. Effect of *C. albicans* (A) and bee venom (B) on the viability of HaCaT cells. Various concentrations of CA and BV were applied to cells, respectively, for 24h. In the case of CA, most concentration were stable and the viability decreased drastically at  $10^7$  cells/ml concentration. On the other hand, the BV did not affect the survival rate according to the concentration.

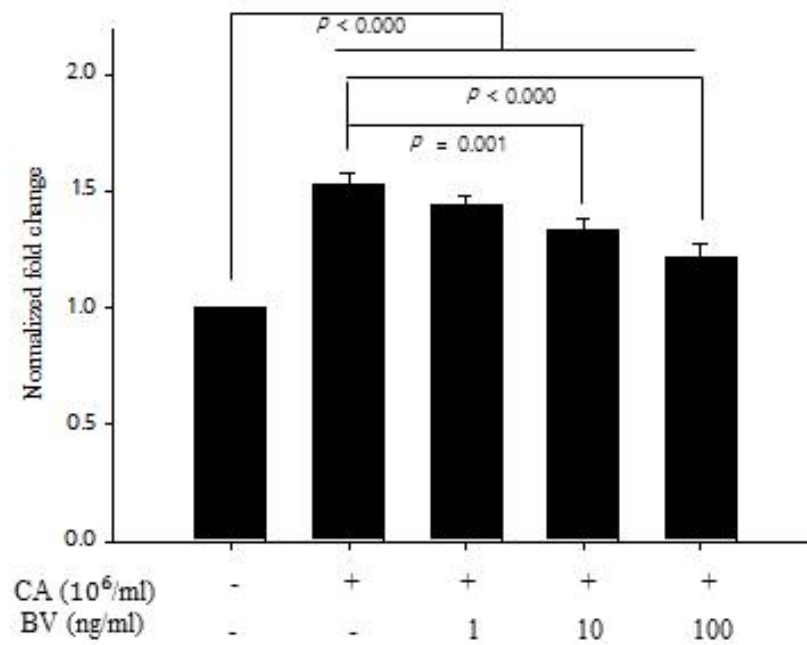
나. Pro-inflammatory cytokine, Growth factor mRNA 발현량 측정

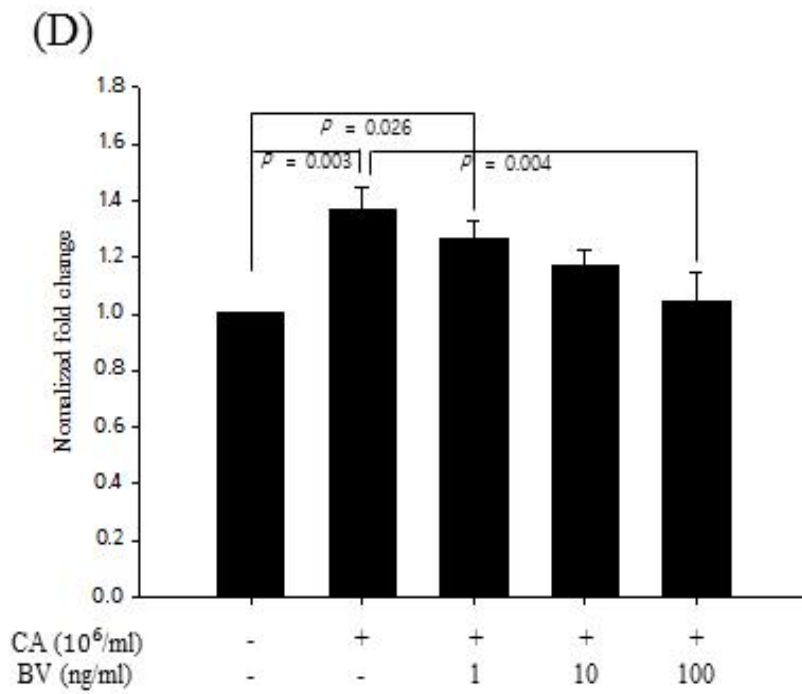
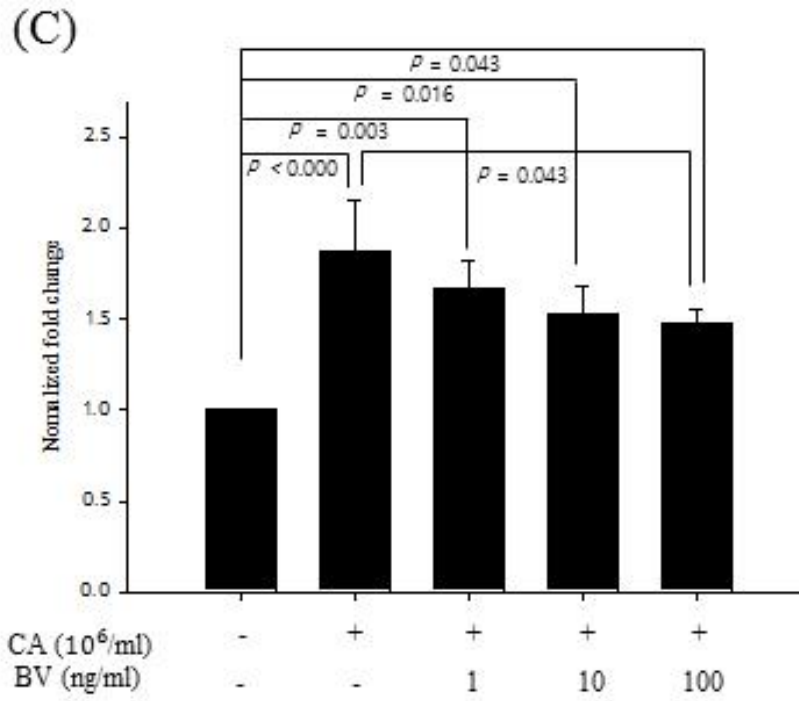
- HaCaT cells을 24시간 동안 배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 *C. albicans* (10<sup>6</sup> cells/ml)와 봉독(1 ng/ml, 10 ng/ml, and 100 ng/ml)을 24시간동안 처리한 후 FGF2 (fibroblast growth factor 2), IGF-1(insulin-like growth factor 1), IL-1 $\beta$ (interleukin 1-beta), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha), IL-8 (interleukin 8) 그리고 TLR2 (toll-like receptor2)의 mRNA 발현량을 측정한 결과 *C. albicans*만 처리한 경우 염증에 의해 Pro-inflammatory cytokine의 발현량이 음성대조군에 비해 증가하고 growth factor의 발현량은 음성대조군에 비해 감소한 것을 확인할 수 있었다. 봉독을 처리한 그룹의 결과는 growth factor의 경우 양성대조군에 비해 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인하였고 Pro-inflammatory cytokine의 경우 양성대조군에 비해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 28).

(A)



(B)





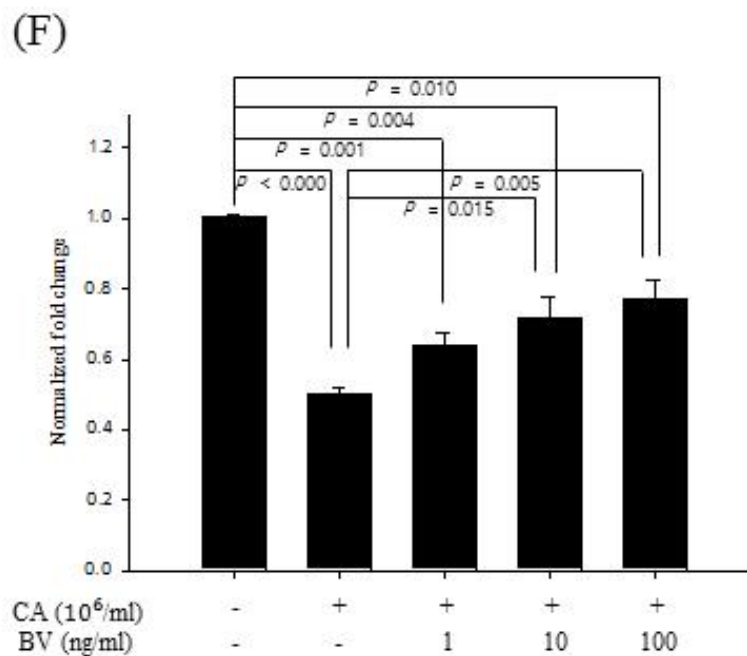
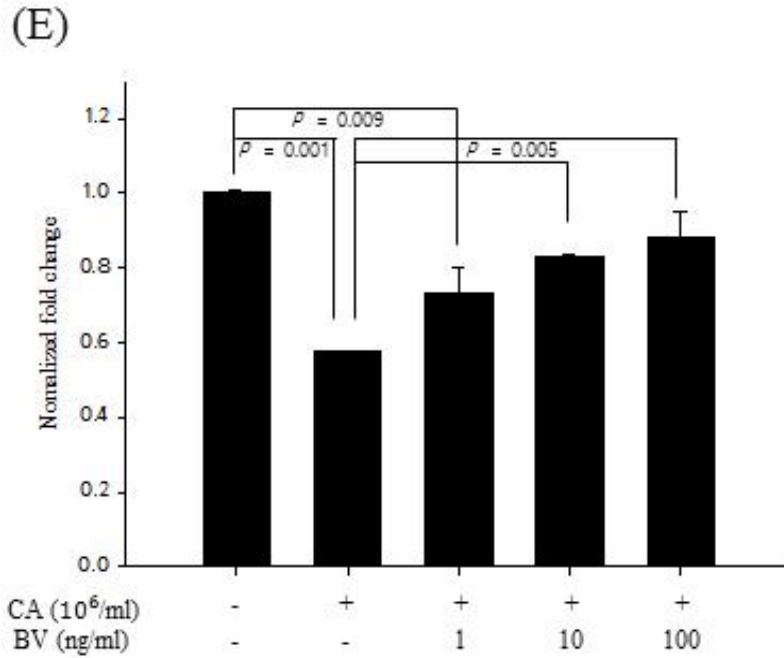
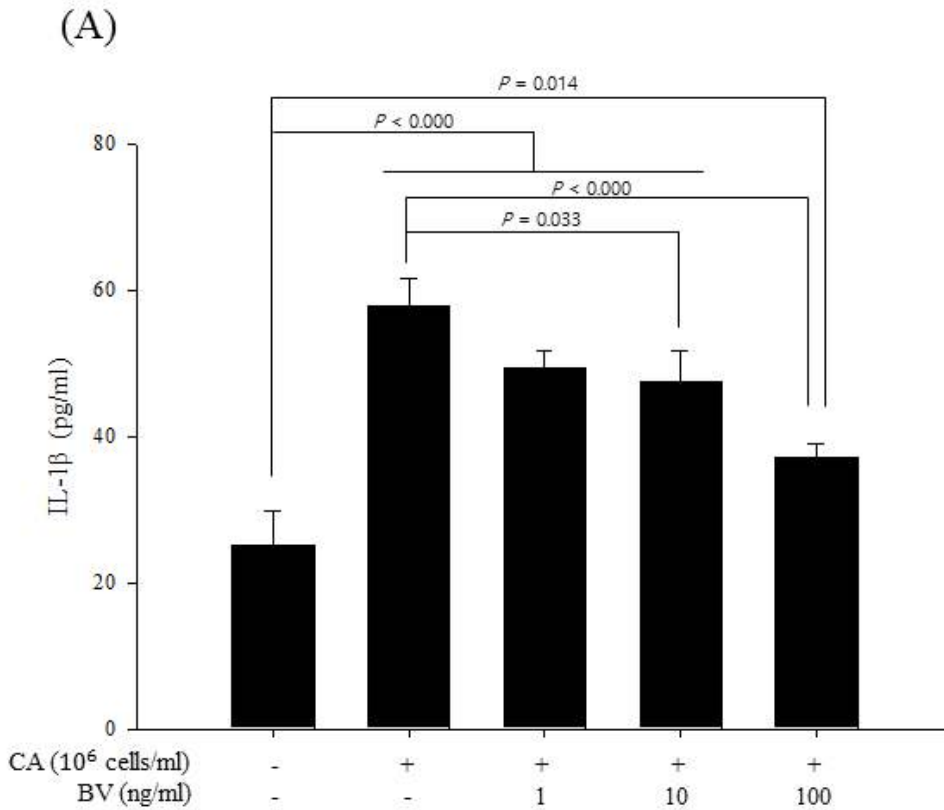


Fig. 28. Effect of bee venom on the expression of Growth factors, Toll-like receptor and pro-inflammatory cytokines gene analyzed by quantitative real-time RT-PCR in HaCaT cells. Bee venom(BV) promotes growth factors such as IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B) and inhibits the receptor and pro-inflammatory cytokine such as IL-8 (C), TLR-2 (D), IGF-1 (E), FGF-2 (F) in HaCaT cell. In particular, effect of 10 or 100 ng/ml of BV were efficacious against inflammation.



다. pro-inflammatory cytokine 발현량 측정

- HaCaT cells을 24시간 동안 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 *C. albicans* (10<sup>6</sup> cells/ml)와 봉독(1 ng/ml, 10 ng/ml, and 100 ng/ml)을 24시간 동안 처리한 후 IL-1 $\beta$  (interleukin 1-beta) 그리고 TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha)의 발현량을 측정한 결과 *C. albicans*만 처리한 경우 염증에 의해 Pro-inflammatory cytokine의 발현량이 음성대조군에 비해 증가하고 growth factor의 발현량은 음성대조군에 비해 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 봉독을 처리한 그룹의 결과는 growth factor의 경우 양성대조군에 비해 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인하였고 Pro-inflammatory cytokine의 경우 양성대조군에 비해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 29).



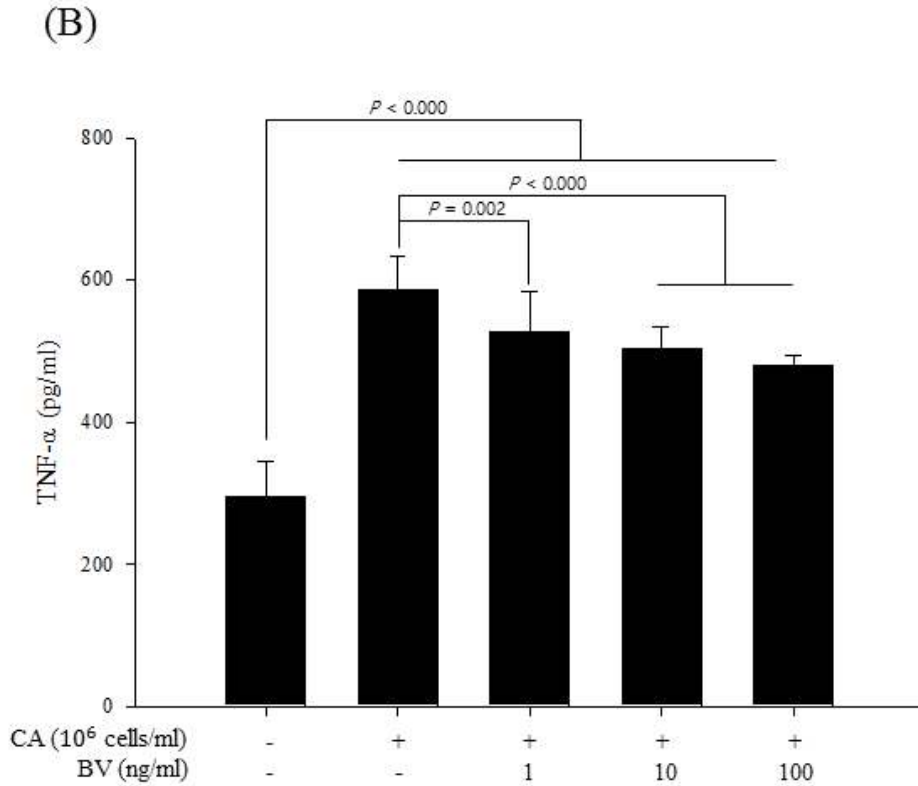


Fig. 29. Effect of bee venom on the expression of Pro-inflammatory cytokine analyzed by ELISA kit in HaCaT cells. Bee venom(BV) inhibits IL-1 $\beta$ (A), TNF- $\alpha$ (B) in HaCaT cell. In particular, effect of 10 or 100 ng/ml of BV were efficacious against inflammation.

라. anil-apoptotic effect 측정

- 6-well plate에 HaCaT cells을 seeding ( $1 \times 10^5$  cells/well)한 후 24시간 동안 배양기 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 *C. albicans* (10<sup>6</sup> cells/ml)와 봉독 (1 ng/ml, 10 ng/ml, and 100 ng/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 상등액과 trypsin-EDTA를 처리한 세포를 모아 염색 후 세포사멸 정도를 확인해보았다. *C. albicans*만 처리한 경우 음성대조군에 비해 사멸한 세포의 비율이 매우 높아진 것을 확인하였고 봉독을 함께 처리한 경우 농도 의존적으로 사멸율이 감소한 것을 확인하였다(Fig. 30).

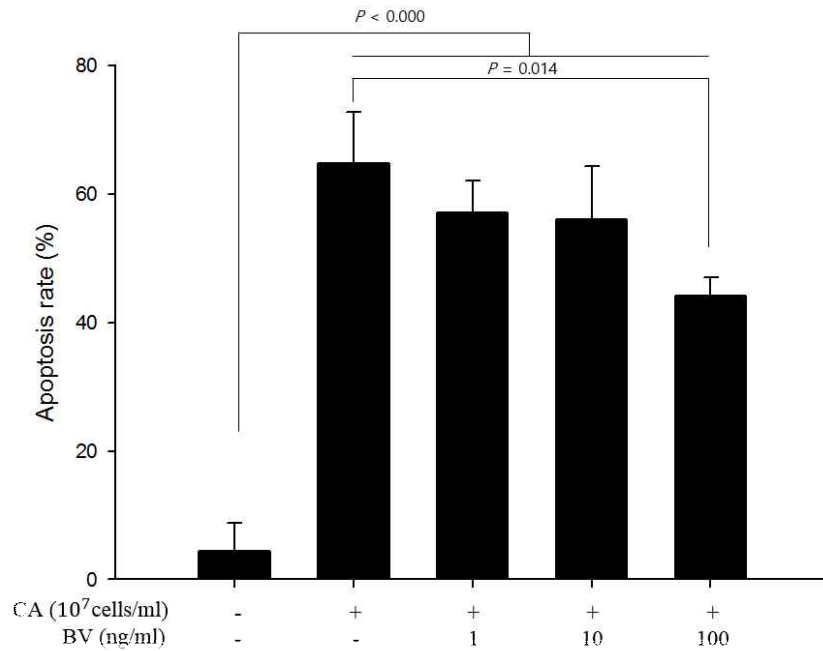
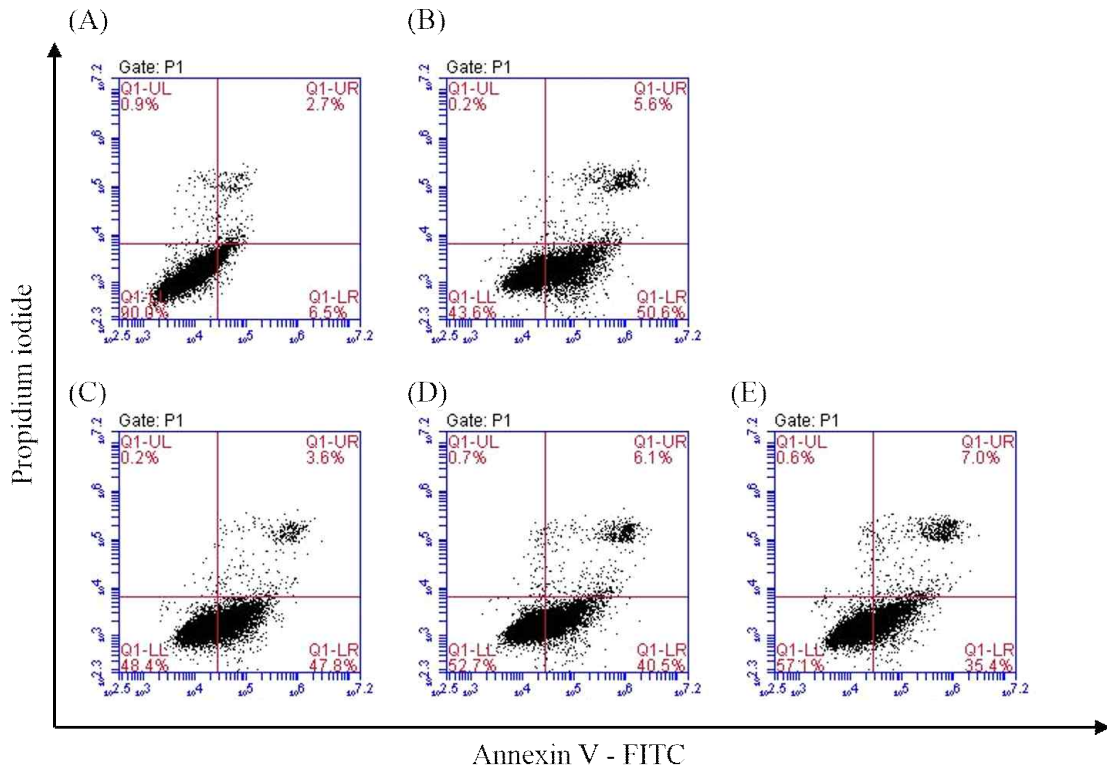


Fig. 30. Effect of bee venom on the anti apoptotic reaction analyzed by FACS in HaCaT cells. FACS plots represent apoptosis in vehicle (A), only CA treated (B) whereas figures (C), (D) and (E) show the sample treated with CA and BV. BV were treated with 1,10,100 ng/ml respectively.

## (9) 혈액 응고에 대한 봉독 (Bee Venom, BV)의 효과

### 1. 실험 방법

#### 가. 혈액 응고 시간 측정

PT는 조직이 손상되었을 때 일어나는 외인성 혈액 응고계로서 혈액 응고 인자 VIII의 활성을 시작으로 하여 혈전 (fibrin clot)을 형성할 때까지의 시간이며, aPTT는 혈관이 손상되었을 때 일어나는 내인성 혈액 응고계로서 트롬보플라스틴(thromboplastin)이 혈액 응고 인자 Xa, Va, Ca<sup>2+</sup>과 더불어 혈전을 형성시킬 때까지의 시간이다. TT는 TCT (thrombin clotting time)라고도 하며 플라즈마(plasma)에 과량의 트롬빈(thrombin)을 첨가한 후 혈액 응고 시간을 측정하는 것으로 TT는 공통혈액응고 경로를 시험하는 일반적인 방법이다. 혈액 응고 시간의 연장은 혈액 응고, 즉 혈전의 형성시간을 연장시킨다는 의미로 혈액 응고 억제 지표가 된다. 또한, 혈전의 형성은 혈관이 손상 되었을 때 혈관 손상 부위에서의 혈소판 응집과 혈액 응고가 서로 상호적으로 일어났을 때 진행되므로, 봉독에 의한 혈액 응고 시간 연장은 혈전의 형성을 억제하는데 기여한다고 볼 수 있다. 혈장은 건강한 성인 남자의 전혈로부터 조제하였으며, 3.2% sodium citrate tube에 채혈 후 즉시 1,500 g 로 15분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하고 2시간 이내에 실험하였다.

#### 1) 프로트롬빈 시간 (Prothrombin time (PT))

플라스틱 큐벳 내에 정상의 citrate-anticoagulated human PPP(Platelet-Poor Plasma) 90 µl와 봉독 (최종 농도: 0, 0.5, 1, 5, 10, 20 µg/ml) 10 µl를 첨가하여 37°C에서 1분간 정치한 후, PT 시약 (AMP DIAGNOSTICS) 200 µl를 혼합하여 혈액응고 시간을 혈액응고 자동분석기를 사용하여 측정하였다. 혈액응고 시간은 초로 나타내었다.

#### 2) 활성 부분 트롬보플라스틴 시간 (Activated partial thromboplastin time (aPTT))

플라스틱 큐벳 내에 정상의 citrate-anticoagulated human PPP(Platelet-Poor Plasma) 90 µl와 봉독 (최종 농도: 0, 0.5, 1, 5, 10, 20 µg/ml) 10 µl, APTT 시약 (AMP DIAGNOSTICS) 100 µl를 첨가하고 37°C에서 2분간 정치한다. 여기에 0.25 M 염화칼슘 (CaCl<sub>2</sub>) 수용액 100 µl를 가하여 혼합한 후, 혈액응고 자동분석기(DCA-2, Dutch Diagnostics)를 사용하여 혈액응고 시간을 측정하였다. 혈액응고 시간은 초로 나타내었다.

#### 3) 트롬빈 시간 (Thrombin time (TT))

플라스틱 큐벳 내에 정상의 citrate-anticoagulated human PPP(Platelet-Poor Plasma) 90 µl와 BV (최종 농도: 0, 0.5, 1, 5, 10, 20 µg/ml) 10 µl를 첨가하여 37°C에서 2분간 정치한 후, 100 µl의 thrombin 시약 (Haematologic Technologies Inc.)을 혼합하고 혈액응고 시간을 혈액응고자동분석기로 측정하였다.

#### 나. 혈액응고인자 결핍 혈액에 대한 혈장응고 억제 작용

건강한 지원자의 전혈에서 조제한 혈장 대신 혈액 응고인자 결핍 인자 혈장을 이용하여 aPTT와 PT를 측정하였고, 방법은 위와 동일하다. 혈액 응고인자 결핍 혈장은 Haematologic Technologies Inc.에서 구입하였다. 혈액 응고 기작에서 내인계와 외인계에 공통으로 작용하는 factor V와 factor X 결핍 혈장은 PT와 aPTT 모두 측정하였고, 외인계 인자인 factor VII 결핍혈장은 PT, 내인계 인자인 factor VIII, IX, XI, XII 결핍 혈장은 aPTT를 측정하였다.

#### 다. 단백질 분해 효소 활성 억제 작용

혈장인자가 결핍된 혈장에서 봉독 투여 시 혈장응고시간이 크게 증가하는 결과로부터 혈장응고의 공통적인 특성인 세린 단백질 분해 효소 활성 저하가 혈장응고에 관련된 것으로 판단되어 봉독성분 중의 단백질 분해효소 저해제에 의한 효과를 보기 위해 세린 단백질분해효소(Serine protease) 저해 활성을 측정하였다. 세린 단백질분해효소는 구조에 따라 크게 2가지 종류로 나뉘는 것으로 알려져 있다. 카이모트립신(a-chymotrypsin), 트립신(trypsin), 엘라스타제(elastase)와 같은 단백질 분해효소 및 서브틸리신(subtilisin)과 같은 그룹이 있다. 서브틸리신은 주로 원핵생물에 존재하고 있으며, 혈액응고인자들 (VII, IX, X, XI, XII, thrombin, plasminogen) 및 단백질 C(protein C)는 트립신계 단백질 분해 효소로 분류되고 있다. 따라서, 봉독의 세린 단백질 분해효소 저해제의 특성이 세린 단백질 분해효소인 응고인자(coagulant factor)의 작용을 저해하여 항응고 효과를 보이는지 검토하기 위해, 같은 종류의 세린 단백질 분해효소인 트립신과 카이모트립신의 작용 또한 억제시킬 것으로 생각되므로 봉독에 의한 트립신과 카이모트립신의 활성 저해 효과를 측정하였다.

##### 1) 트롬빈 활성 억제시험

96 well plate에 7.5 mM EDTA, 150 mM NaCl을 포함한 50 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4)로 희석한 BV 110  $\mu$ l (최종 농도: 0, 0.5, 1, 5, 10, 20  $\mu$ g/ml)에 Anti-thrombin III (Haematologic Technologies Inc) 30  $\mu$ l (최종 농도: 200 nM) 첨가하여 37°C 2분간 정치한 후, thrombin solution 30  $\mu$ l (최종 농도: 10 U/ml)을 첨가하고 37°C 1분간 정치하였다. Substrate S-2238 (Chromogenix) 30  $\mu$ l (final concentration: 1.5 mM)을 첨가하여 405 nm에서 120s 동안 spectrophotometer을 이용해 흡광도를 측정하였다. Anti-thrombin III (AT III) 대신 buffer를 넣고 같은 방법으로 측정한 값과 비교하여 AT III에 의존적으로 혈액 응고를 저해하는지 알아보았다. (Positive control로 heparin을 사용하였다.)

##### 2) 세린 단백질분해효소 저해 활성

96 well plate에 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% TritonX-100을 포함한 100 mM Tris-HCl Buffer (pH

8.0) 로 희석한 BV 160 $\mu$ l (최종 농도: 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu$ g/ml)에 Trypsin 또는  $\alpha$ -chymotrypsin (sigma) 400 ng (최종 농도: 2  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 정치하였다. BApNA 또는 SucAAPF-pNA (sigma) 20 $\mu$ l (최종 농도: 0.4 mM)을 첨가하여 405nm에서 120s 동안 spectrophotometer을 이용해 흡광도를 측정하였다.

## 2. 연구 결과

### 가. 혈액 응고 시간 측정

aPTT시험의 경우, 대조군에서는 33.2초에 혈장응고가 완료된 반면, 봉독투여 시료군의 경우 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20  $\mu$ g/ml 처리시 각각 38.0, 42.8, 55.8, 65.9, 86.9초에 혈장응고가 완료되는 결과를 보여 농도 의존적으로 응고시간이 증가하는 결과를 보였다. PT시험 결과를 보면 대조군의 경우는 13.5초에 혈장응고가 완료된 반면 봉독투여군의 경우는 5, 10, 20  $\mu$ g/ml 처리군에서 각각 15.1, 17.3, 22.9초에 응고가 완료되는 결과를 얻었다. 이 결과들로 볼 때 봉독은 혈장응고 시간을 지연시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. Table 10의 결과를 가지고 항응고활성을 계산한 결과를 Table 11에 나타내었다.

$$\text{항응고활성 (\%)} = \frac{\text{시료응고시간} - \text{대조군응고시간}}{\text{시료응고시간}} \times 100$$

Table 10 에 표시된 바와 같이 PT, aPTT 모두 봉독 농도가 5  $\mu$ g/ml일 때부터 농도에 따라 응고시간이 연장되었고, Table 11에 나타난 것처럼 항응고 활성 또한 농도에 따라 증가하였다. TT는 BV 농도가 증가하더라도 거의 연장되지 않으므로 BV는 항응고 작용을 하지만 공통 혈액응고과정에 미치는 영향은 적은 것으로 생각된다.

Table 10. 혈액 응고 시간

샘플	농도 ( $\mu$ g/ml)	aPTT (s)	PT (s)	PT (INR)	TT (s)
대조군	PBS	33.2 $\pm$ 1.2	13.5 $\pm$ 0.5	1.19	10.2 $\pm$ 0.8
봉독	0.5	38.0 $\pm$ 3.6	12.9 $\pm$ 0.3	1.13	10.4 $\pm$ 0.8
	1.0	42.8 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup>	13.4 $\pm$ 0.4	1.18	10.7 $\pm$ 1.2
	5	55.8 $\pm$ 4.9 <sup>c</sup>	15.1 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	1.36	11.0 $\pm$ 1.0
	10	65.9 $\pm$ 6.4 <sup>c</sup>	17.3 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	1.59	10.9 $\pm$ 1.9
	20	86.9 $\pm$ 2.3 <sup>c</sup>	22.9 $\pm$ 1.7 <sup>c</sup>	2.21	11.1 $\pm$ 0.8
헤파린 (Heparin)	1.5	>300	-	-	>300
	15	-	13.6 $\pm$ 0.5	1.21	-

\*\* INR = (patient PT/Mean normal PT), 대조군에 대해서 <sup>a</sup>  $p < 0.1$ , <sup>b</sup>  $p < 0.05$ , <sup>c</sup>  $p < 0.0$

Table 11. 항응고 활성화

BV 농도 ( $\mu\text{g/ml}$ )	aPTT (%)	PT (%)
5	40.5	10.6
10	49.6	22.0
20	61.8	41.0

나. 혈액응고인자 결핍 혈액에 대한 혈장응고 억제 작용

특정 혈액 응고인자가 결핍된 혈장에서 응고시간이 증가하지 않는다면 결핍된 응고 인자에 봉독이 특이적으로 작용하는 것이라고 할 수 있는데, 각각의 응고인자들이 결핍된 혈장을 이용해 실험을 수행한 결과 응고인자가 결핍된 혈장 모두에서 봉독 투여 시 혈장 응고시간이 크게 증가하는 결과를 얻었다(Table 12). 이는 특정 혈장응고인자에 대한 특이적인 저해보다는 응고인자 전반에 걸쳐 효과를 보이는 것으로 생각된다.

Table 12. 혈액응고인자 결핍 혈액에 대한 혈장응고 억제 작용

	봉독 ( $\mu\text{g/ml}$ )	PT(s)	aPTT(s)
혈액 응고인자 V 결핍 혈장 (Factor V deficient plasma)	0	42.7	156.5
	1	43.9	186.1
	20	65.9	>420
혈액 응고인자 VII 결핍 혈장 (Factor VII deficient plasma)	0	99.2	
	0.5	98.2	
	1	95.9	
	10	134.8	
	20	160.0	
혈액 응고인자 VIII 결핍 혈장 (Factor VIII deficient plasma)	0		74.1
	1		90.0
	20		265.3
혈액 응고인자 IX 결핍 혈장 (Factor IX deficient plasma)	0		84.8
	0.5		89.8
	1		121.3
혈액 응고인자 X 결핍 혈장 (Factor X deficient plasma)	0	148.6	85.4
	1	135.3	142.2
	20	>420	>420
혈액 응고인자 XI 결핍 혈장 (Factor XI deficient plasma)	0		108.0
	0.5		141.6
	1		163.3
혈액 응고인자 XII 결핍 혈장 (Factor XII deficient plasma)	0		136.2
	1		185.3
	20		>420

다. 단백질 분해 효소 활성 억제 작용

1) 트롬빈 활성 억제시험

Fig. 31 에서 보듯이 봉독은 10 mg/ml이상의 농도에서 트롬빈에 대한 저해 작용을 보이며, ATⅢ가 있는 경우와 없는 경우 트롬빈 활성저하 정도가 거의 유사하게 나타났으므로 ATⅢ가 없는 상태에서도 항응고작용을 보임을 알 수 있었다.

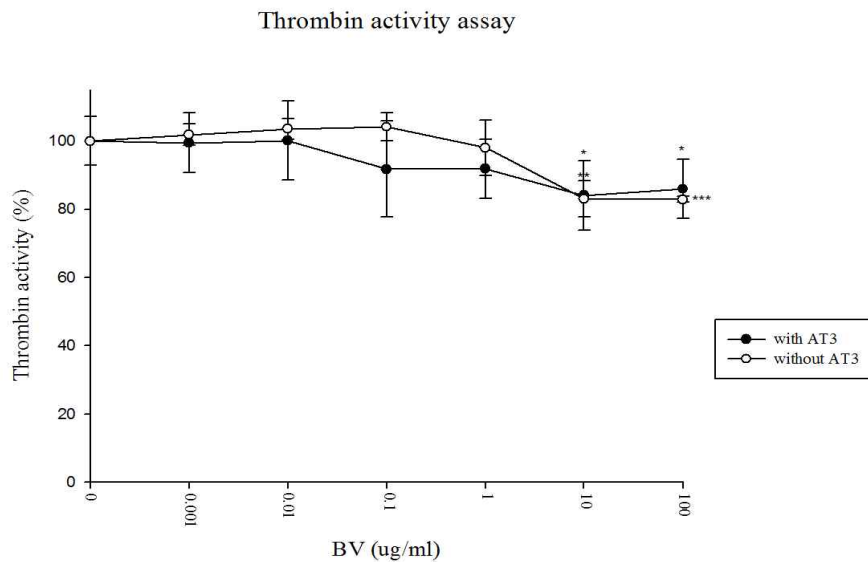


Fig. 31. 트롬빈 활성 억제시험.

Student t-test, \* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$

2) 세린 단백질분해효소 저해 활성

혈장인자가 결핍된 혈장에서 봉독 투여 시 혈장응고시간이 크게 증가하는 결과로부터 혈장응고의 공통적인 특성인 세린 단백질 분해 효소 활성 저하가 혈장응고에 관련된 것으로 판단되어 봉독성분 중의 단백질 분해효소 저해제에 의한 효과를 보기 위해 세린 단백질분해효소(Serine protease) 저해 활성을 측정하였다(Fig. 32). 봉독이 농도 의존적으로 trypsin과  $\alpha$ -chymotrypsin의 작용을 억제하는 것으로 보아 같은 종류의 세린단백질 분해 효소인 응고인자들의 작용을 억제한다고 볼 수 있다.



### Serine protease inhibitor activity assay

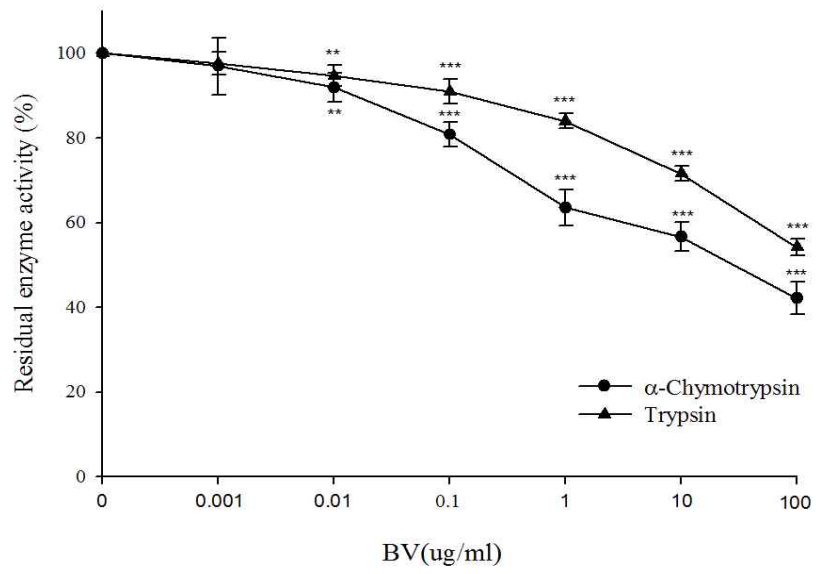


Fig. 32. 세린 단백질분해효소 저해 활성.

Student t-test, \* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$

## (10) 혈행개선 효과 평가

### 1. 세포독성실험 (LDH assay)

봉독의 혈소판 독성을 평가하기 위해, 세포 사멸시 방출되는 lactate dehydrogenase (LDH) 양을 측정하였다.

#### 가. 시약 및 재료

봉독 (Bee venom)은 유일팜테크 (충북, 진천읍)에서 제공받은 것을 이용하였다. Triton X-100은 Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden), Sodium pyruvate은 JUNSEI chemica(Tokyo, Japan) 제품을 사용하였으며  $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide ( $\beta$ -NADH), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO) 제품을 이용하였다.

#### 나. 실험동물

본 실험은 7주령 Spague-Dewley 수컷 랫을 이용하였다. 동물은 코아텍 (Peongtak, Korea)에서 분양 받았으며, 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 5\%$ , 12시간 조명 주기 조건 하에서 식이와 식수를 자유롭게 섭취하도록 하였고 7일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 본 연구에서의 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험 연구윤리위원회의 승인 하(KUIACUC-2015-246)에 수행되었다.

#### 다. 실험 방법

봉독이 혈소판에 독성을 주는지를 평가하기 위하여 LDH유리를 측정하였다. 7일간의 적응기간을 거친 랫을 ethyl ether로 마취된 후 3.8% Sodium citrate 항응고제가 담긴 튜브에 혈액을 채취하였다. 혈액은 채취 후 2시간 내에 분석되었고,  $150 \times g$  에 15분 원심분리하여 Platelet rich plasma(PRP)를 분리하였다. 그 후 남은 혈액을  $500 \times g$  에 20분 원심분리하여 platelet poor plasma (PPP)를 채취하였다. PRP는 cell 수를 세어  $2 \times 10^8$  cells/ml로 희석한다. 이때 희석은 PPP를 이용하여 희석하였다. 개수를 맞춘 PRP와 물질은 각각  $37^\circ\text{C}$  에서 incubation한 후 동량을 섞어 5분 동안  $37^\circ\text{C}$  에서 반응시켰다. 반응시킨 후  $1000 g$ 에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 상층액은 Tris-EDTA buffer에 희석한  $0.17\text{mM}$   $\beta$ -NADH에 넣은 후  $37^\circ\text{C}$  에서 10분간 반응시켰다. 10분 후  $14\text{mM}$  pyruvate를 첨가한 직후  $340\text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다. 상층액에 LDH가 많을수록 NADH가  $\text{NAD}^+$ 로 변하여 흡광도가 감소하는 원리를 이용한 assay이다. LDH release 100%는 1% Triton X-100을 첨가한 군의 흡광도 감소율을 기준으로 산정하였다.

## 라. 실험 결과

봉독의 혈소판에 대한 세포독성을 평가하기 위해 혈소판의 LDH 유리 정도를 지표로 이용하였다. 혈소판에 봉독을 농도별로 가한 후 LDH 유리 정도를 물질을 처리하지 않은 대조군을 100%로 산정하여 비교한 결과, 5  $\mu\text{g/ml}$ ( $105.0 \pm 7.3\%$ ), 10  $\mu\text{g/ml}$ ( $107.9 \pm 9.6\%$ ), 20  $\mu\text{g/ml}$ ( $118.3 \pm 11.2\%$ )에서 모두 대조군(100%)과 비교하였을 때, 유의적인 LDH 유출이 없었다(Fig. 33). 이때 대조군과 비교하였을 때  $p < 0.05$  정도로 차이를 보이는 경우를 유의성 있는 LDH 유출로 보고자 하였으며, 5  $\mu\text{g/ml}$ ( $105.0 \pm 7.3\%$ ), 10  $\mu\text{g/ml}$ ( $107.9 \pm 9.6\%$ ), 20  $\mu\text{g/ml}$ ( $118.3 \pm 11.2\%$ )에서 모두 이 정도의 차이가 없어 유의한 LDH 유출은 없었던 것으로 확인되었다. 이렇게 유의한 LDH 유출이 없는 결과를 통해 상기 농도에서 봉독은 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

### 세포독성실험 (LDH assay)

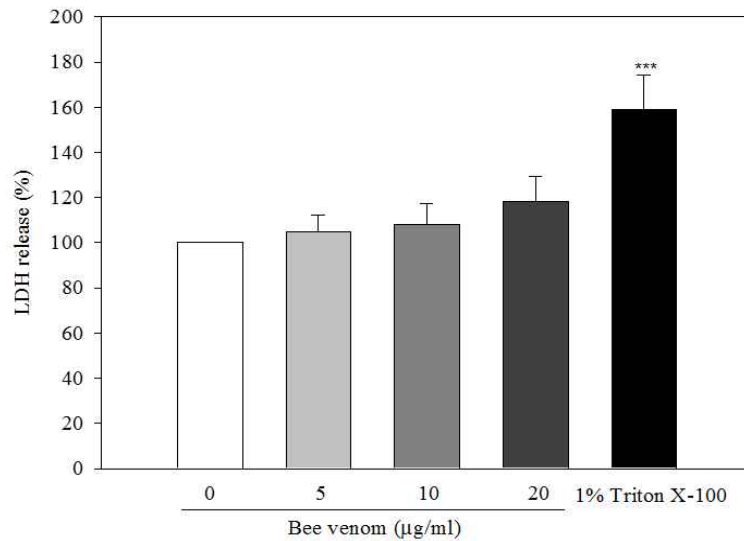


Fig. 33. 봉독의 혈소판 독성 평가 (LDH assay)

## 2. 출혈지연시간 측정 (Tail bleeding time)

상지 추출물의 항혈소판 효과가 혈액응고 지연시간에 영향을 주는지 알아보기 위해 tail bleeding time을 평가하였다.

### 가. 시약 및 재료

봉독 (Bee venom)은 유일팜테크 (충북, 진천읍)에서 제공받은 것을 이용하였다. Aspirin은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO)사 제품을 이용하였다.

### 나. 실험동물

본 실험은 8주령 ICR 수컷 마우스를 이용하였다. 동물은 코아텍 (Peongtak, Korea)에서

분양 받았으며, 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 5\%$ , 12시간 조명 주기 조건하에서 식이와 식수를 자유롭게 섭취하도록 하였고 7일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 본 연구에서의 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험 연구윤리위원회의 승인 하 (KUIACUC-2015-281)에 수행되었다.

#### 다. 실험 방법

ICR 마우스는 적응기를 거친 후, 실험에 사용되었다. 적응기를 지난 마우스는 꼬리정맥 주사로 시료를 주입한 후 30분 후에 ether로 마취한 상태에서 꼬리 끝 3mm를 절단하여 출혈시간을 측정하였다. 양성 대조군인 아스피린은 논문을 참조하여  $500 \mu\text{M}$  농도를 선정하였다. 봉독 용량은 임상용량 ( $0.25 \text{ mg/kg}$ )을 최고 농도로 하여 실험하였다.

#### 라. 실험 결과

대조군( $133 \pm 33.6$  초)과 봉독  $0.0625 \text{ mg/kg}$  ( $144 \pm 49.6$  초),  $0.125 \text{ mg/kg}$  ( $145.8 \pm 17.2$  초),  $0.25 \text{ mg/kg}$  ( $143 \pm 22.3$  초)를 비교한 결과 출혈지연반응이 나타나지 않았으므로 출혈지연에 대한 부작용은 없음을 확인할 수 있었다. 반면에 양성 대조군인 aspirin ( $500 \mu\text{M}$ )은  $244.3 \pm 66.1$  초로 유의하게 증가하여 출혈을 지연시킴을 확인하였다(Fig. 34).

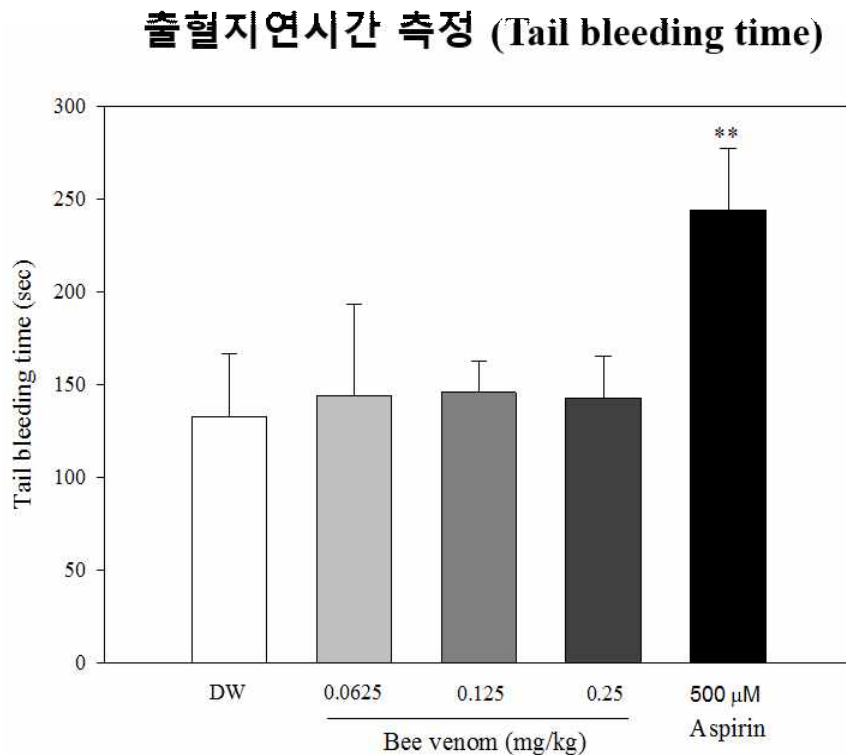


Fig. 34. 봉독을 주사한 모델에서 출혈시간 측정 결과

### 3. 혈행개성 효과에 대한 연구결과 요약

- 붕독은 PT, aPTT를 연장시키지만 TT에는 영향을 주지 않으므로 공통 혈액 응고 과정을 통하지 않는 경로로 항응고 작용을 하며, 특정 혈장응고인자에 대한 특이적인 저해보다는 응고인자 전반에 걸쳐 효과를 보이는 것으로 생각된다.
- 또한, 응고시스템(coagulation system) 중에서 트롬빈 형성에 관여하는 세린단백질 분해 효소인자의 활성을 억제함으로써 항응고 효과를 보이는 것으로 생각된다.
- 사용한 붕독의 농도내에서는 세포 독성을 나타내지 않았다.
- 임상적으로 사용되는 붕독의 양에서도 출현지연시간이 증가하지 않아 저농도 사용시 부작용이 적은 것으로 생각된다.

## (11) 원료물질(봉독) 특성

### 1. 성상: 원료 봉독의 성상

- 방향성의 황갈색 분말이며 맛이 쓰다.
- 물, 생리식염수, 글리세린 및 산에 잘 녹으나 알코올에는 거의 녹지 않는다.

### 2. 건조감량: 1g의 시료를 감압 하에서 4시간 건조 후 건조 감량이 13.0% 이하이다.

### 3. 중금속

- 시료 1 g을 취하여 약전 일반시험법 중 중금속 시험법 제 3법에 따라 시험하였다. 비교액에는 납 표준액 1 mL를 사용하였다.
- 시험 결과: 10 ppm 이하임을 확인하였다.

### 4. 봉독의 성분

Substance Group	Component	% of dry weight
Proteins (Enzymes)	<u>Phospholipase A2</u>	10-12
	Phospholipase B	1
	Hyaluronidase	1-2
	Phosphatase	1
	$\alpha$ -Glucosidase	0.6
Peptides	<u>Melittin</u>	40-50
	Apamine	2-3
	MCD peptide	2-3
	Secapine	0.5-2
	Pamine	1-3
	Minimine	2
	Adolapine	0.5-1
	Procamine A, B	1-2
	Protease inhibitor	0.1-0.8
	Tertiapine, cardiopep, melittin F	1-2
Phospholipids		1-3
Biogenic amines	Histamine	0.5-2
	Dopamine	0.2-1
	Noradrenalin	0.1-0.5
Amino acids	Aminobutyric acid, $\alpha$ -amino acids	1
Sugars	Glucose, fructose	2-4
Volatiles(pheromones)	Complex ethers	4-8
Minerals	P, Ca, Mg	3-4

## (12) 건조밀봉독의 구조 및 특성(Elucidation of Structure and other characteristics)

### 1. Elucidation of structure

#### 가. Elementary analysis

건조밀봉독의 원소(C, H, N)을 측정하였다(Fig. 35).

Sample information: 건조밀봉독 1601

Model name: vario MICRO cube

No.	Weight [mg]	Name	Method	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	N Area	C Area	H Area	S Area	N Factor	C Factor	H Factor	S Factor	Info	Date Time	H Blank	S Blank
1	2.0000	Test	Blank with O2	8.951	0.212	1.902	0.836	7623	219	3822	179	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	Co,Su	24.08.2017 16:27	0	0
2	2.0000	Test	2mgChem70s	0.325	0.000	0.131	0.344	137	0	3	44	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	Cnp,Nu,Hu,Su	24.08.2017 16:36	0	0
3	2.0000	Test	Blank with O2	0.175	0.000	0.135	0.303	6	0	10	32	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	Cnp,Nu,Hu,Su	24.08.2017 16:45	0	0
4	2.0000	Blank	Blank with O2	0.000	0.000	0.000	0.000	0	0	4	45	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		24.08.2017 16:54	4	43
5	2.0000	Blank	Blank with O2	0.000	0.000	0.000	0.000	10	16	26	43	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		24.08.2017 17:03	26	41
6	2.2570	RunIn	2mgChem80s	16.507	41.018	4.169	8.992	16021	29395	9867	2745	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		24.08.2017 17:14	0	0
7	2.2760	RunIn	2mgChem80s	16.509	41.203	4.263	10.114	16149	29775	10184	3121	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		24.08.2017 17:23	0	0
8	2.1310	sulfamylamide	2mgChem80s	16.260	41.850	4.680	18.620	15150	27770	9414	3008	0.9829	1.0199	1.1094	1.3871		24.08.2017 17:36	0	0
9	2.3770	sulfamylamide	2mgChem80s	16.260	41.850	4.680	18.620	16820	30947	10701	3539	0.9885	1.0205	1.0924	1.6987		24.08.2017 17:47	0	0
10	2.0510	1	2mgChem80s	4.835	49.963	8.296	2.005	4220	31886	16388	274	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429		24.08.2017 17:58	0	0
11	2.1970	1	2mgChem80s	4.886	50.480	8.410	1.416	4580	34502	17818	195	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429	Su	24.08.2017 18:09	0	0
12	2.1170	2	2mgChem80s	4.215	51.251	8.905	1.400	3782	33756	18183	183	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429	Su	24.08.2017 18:20	0	0
13	2.1960	2	2mgChem80s	4.273	51.771	8.952	1.313	3985	35367	18977	177	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429	Su	24.08.2017 18:31	0	0
14	2.3920	3	2mgChem80s	4.232	53.155	9.272	1.082	4311	39543	21445	154	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429	Su	24.08.2017 18:41	0	0
15	2.0610	3	2mgChem80s	4.234	55.000	9.346	1.143	3696	35263	18587	135	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429	Su	24.08.2017 18:52	0	0
16	2.0330	4	2mgChem80s	3.868	57.997	9.939	1.324	3316	36676	19512	162	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429	Su	24.08.2017 19:03	0	0
17	2.5690	4	2mgChem80s	3.869	58.164	9.991	0.896	4230	46456	24862	131	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429	Su	24.08.2017 19:14	0	0
18	2.0520	BVM	2mgChem80s	13.594	44.829	7.531	1.849	12133	28632	14857	249	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429		24.08.2017 19:25	0	0
19	2.1190	BVM	2mgChem80s	13.478	44.436	7.492	1.868	12427	29306	15270	262	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429		24.08.2017 19:36	0	0
20	0.0000			0.000	0.000	0.000	0.000	0	0	0	0	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429			0	0
21	0.0000			0.000	0.000	0.000	0.000	0	0	0	0	0.9857	1.0202	1.1009	1.7429			0	0

Fig. 35 Elucidation of structure

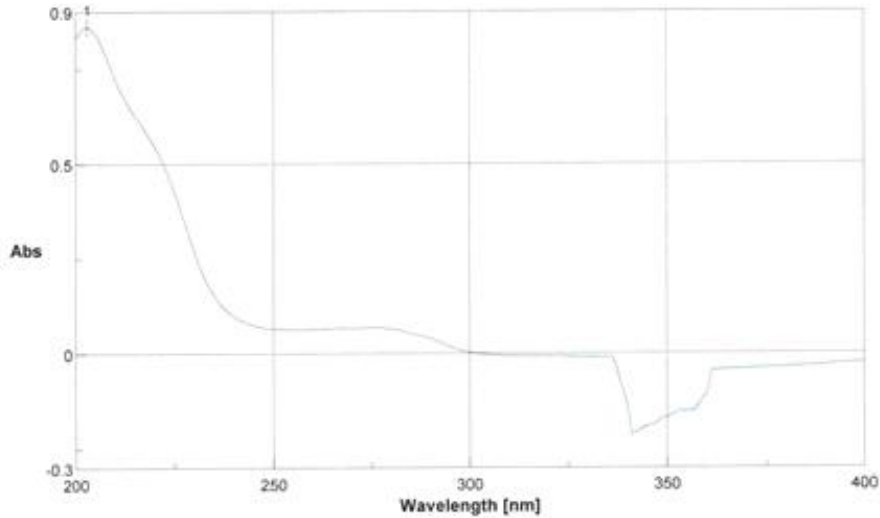
#### 나. Ultraviolet-visible Spectrophotometry

건조밀봉독은 0.01%의 농도로 정제수로 희석하여 자외선 흡수 스펙트럼을 측정하였다 (Fig. 36).

Sample information: 건조밀봉독 1601

Production company: TS science

Model name: V-530



Date 2017-09-11 3:05오  
 File name 건조밀봉독1601.jws  
 Model V-530  
 Serial No. B027560512  
 Band width 2.0 nm  
 Response Medium  
 Measurement range 400 - 200 nm  
 Data pitch 1nm  
 Scanning speed 400nm/min  
 Sample ID 18  
 No. of cycle 1  
  
 Sample name  
 Operator QC  
 Comment

No.	nm	Abs
1	203	0.86124

Fig. 36. Ultraviolet-visible Spectrophotometry

#### 다. Infrared Spectrophotometry

건조밀봉독의 적외선 흡수 스펙트럼은 ATR method에 따라 측정되었다. 작용기의 흡수 파수( $\text{cm}^{-1}$ )는 다음과 같다(Fig. 37).

Sample information: 건조밀봉독 1601

Production company: JASCO

Model name: FT/IR-4200

Method: ATR method

Wave number ( $\text{cm}^{-1}$ )	Functional Groups	Intensity
3297.68	O-H	m, medium
1649.8	C=O	s, strong
1542.77	N-H	s, strong
1078.01	C-N	m, medium
673.035	C-H	s, strong



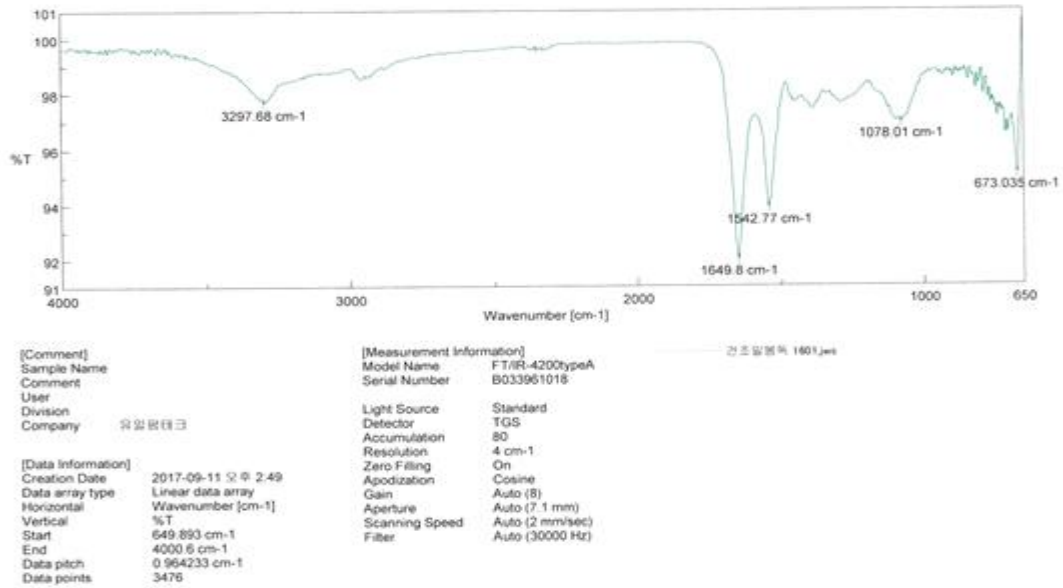


Fig. 37. Infrared Spectrophotometry

라. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (<sup>1</sup>HNMR(water-d<sub>6</sub>,400MHz),ppm)

건조밀봉독의 핵자기공명스펙트럼(<sup>1</sup>HNMR)을 측정하였다(Fig. 38, 39).

Sample information: 건조밀봉독 1601

Production company: BRUKER

Model name: AVAVCE III 400MHz

Solvent: 정제수

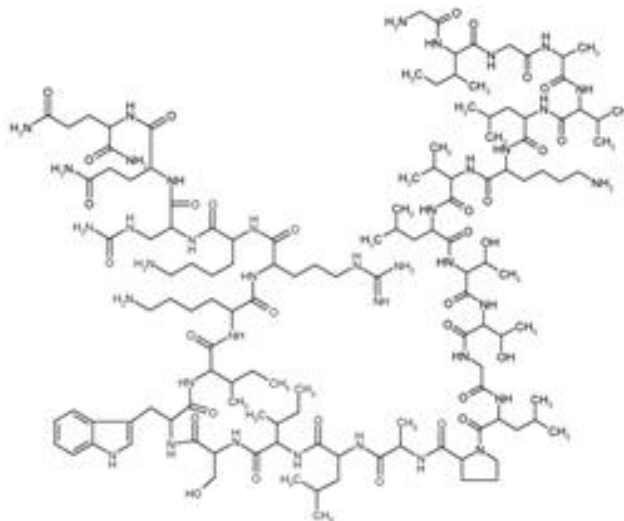


Fig. 38. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

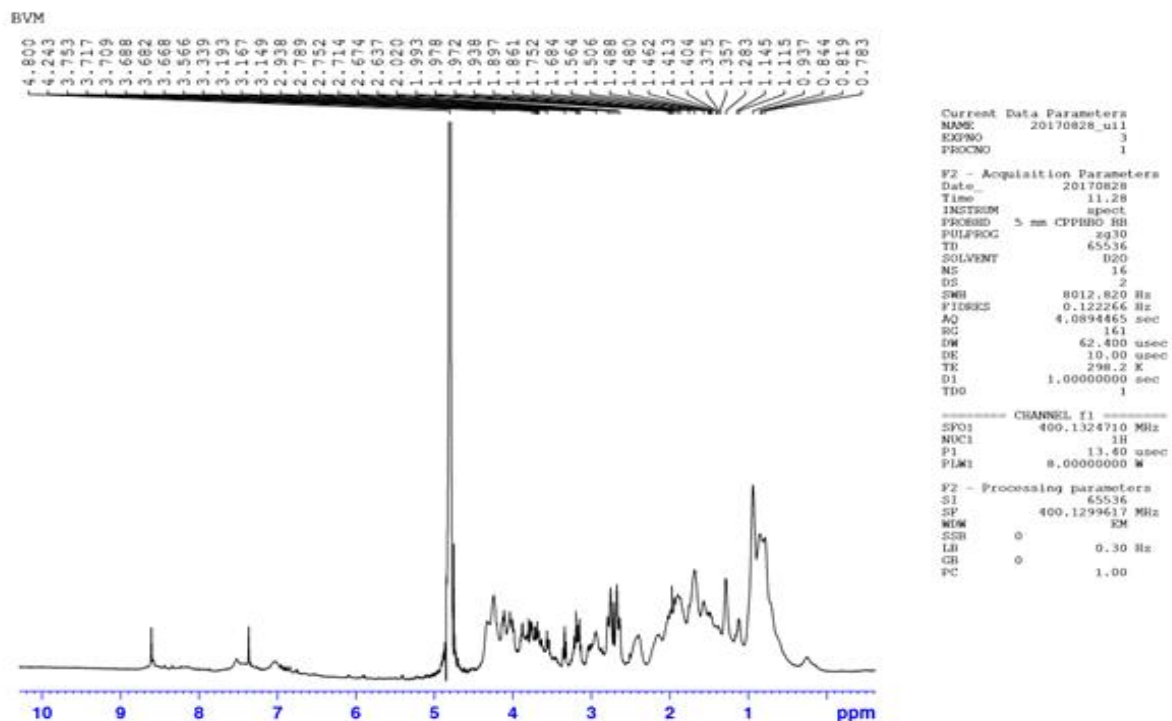


Fig. 39. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy(2)

마. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ( $^{13}\text{C}$ NMR(water-d<sub>6</sub>,400MHz),ppm)

건조밀봉독의 핵자기공명스펙트럼( $^{13}\text{C}$ NMR)을 측정하였다(Fig. 40, 41).

Sample information: 건조밀봉독 1601

Production company: BRUKER

Model name: AVAVCE III 400MHz

Solvent: 정제수

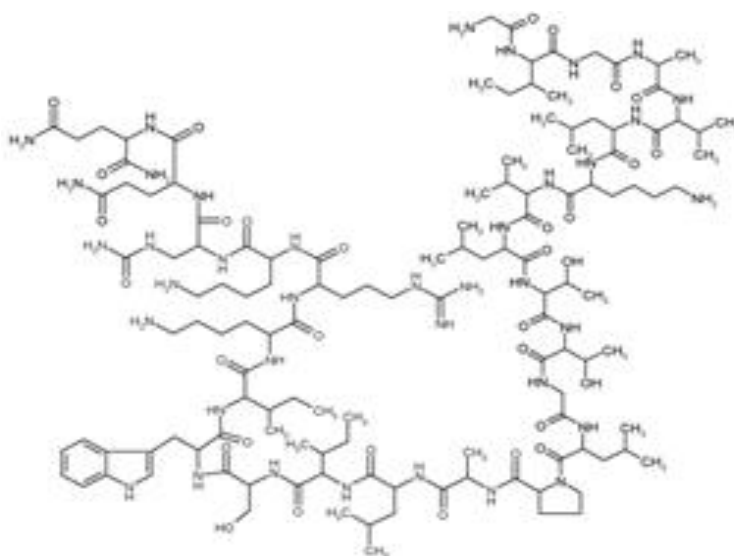


Fig. 40. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

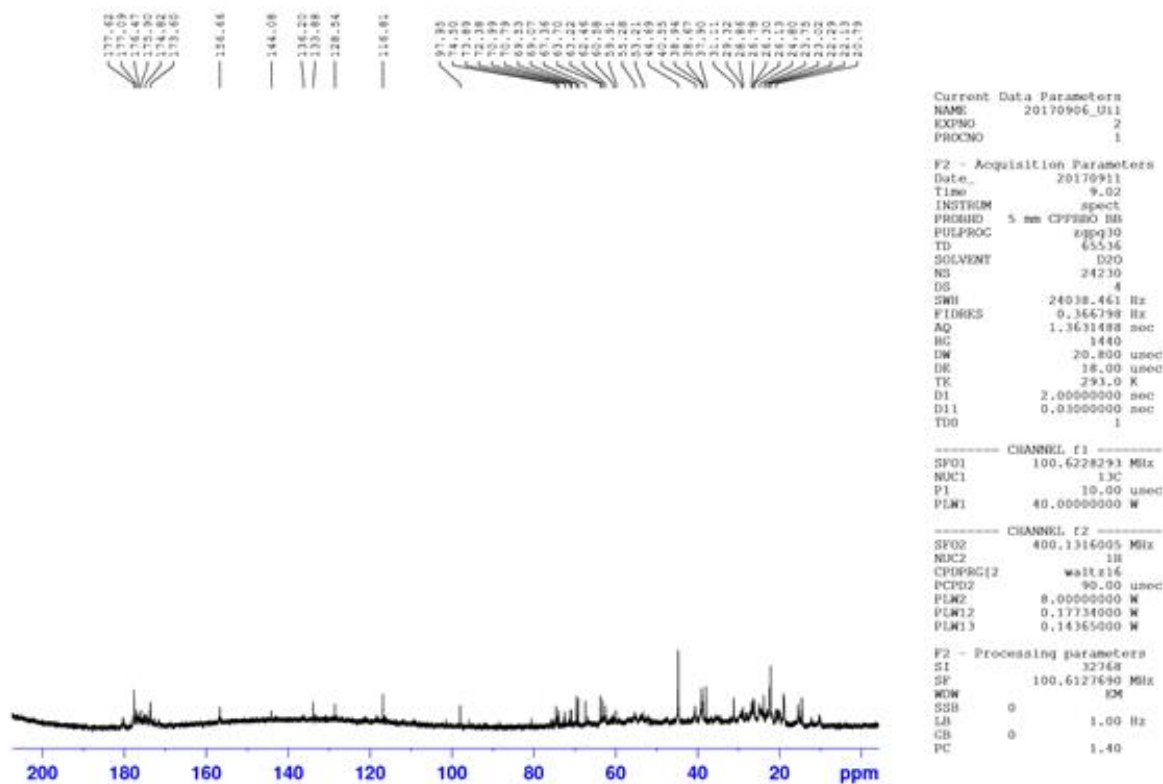


Fig. 41. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

## 2. Physicochemical characterization

### 가. Appearance

건조밀봉독의 성상은 방향성의황갈색의 분말이다(Fig. 42).

Production company: PAN Analytical

Sample information: 건조밀봉독 1601

Model name: X' Pert PRO MRD

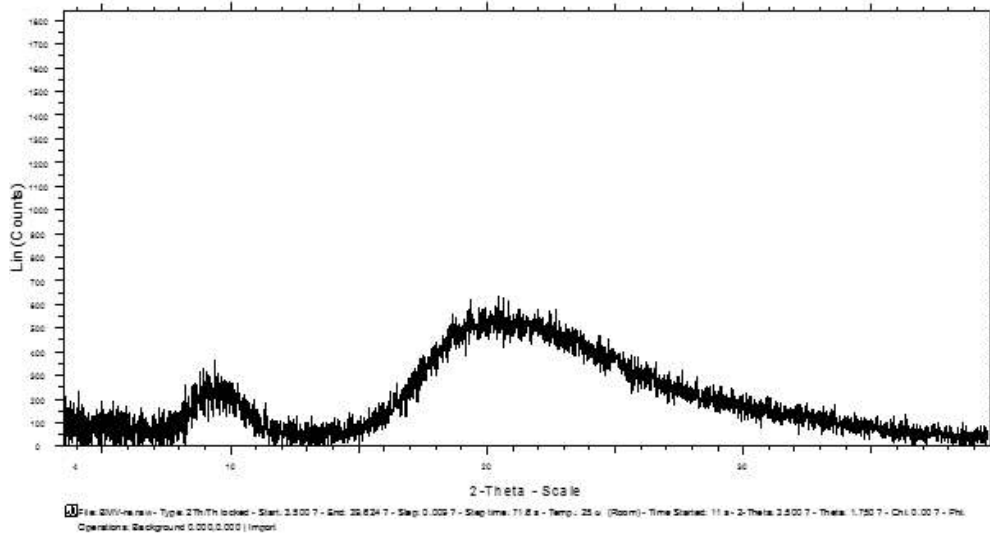


Fig. 42. Appearance

### 나. Solubility

다양한 용매에서 건조밀봉독의 용해도를 확인하고, 대한약전(KP) 방법에 따라 분석하였다. 건조밀봉독은 각각의 용매에서 15 ~ 25 °C에서 5 분 간격으로 30 초간 흔들어주었다. 녹는 정도를 30 분 이내에 결정해주었다.

대한약전(KP)기준은 다음과 같다.

Descriptive Term	Amount of solvent required for 1g(or 1mL) of solute	
Very soluble	Less than 1 mL	
Freely soluble	Not less than 1 mL to Less than 10 mL	
Soluble	Not less than 10 mL to Less than 30 mL	
Sparingly soluble	Not less than 30 mL to Less than 100 mL	
Slightly soluble	Not less than 100 mL to Less than 1000 mL	
Very slightly soluble	Not less than 1000 mL to Less than 10000 mL	
Practically insoluble	Not less than 10000 mL	
Solvents	Amount of solvent required for 1g (or 1mL) of solute	Results
Water	Less than 1 mL	Very soluble
Octanol	Not less than 10000 mL	Practically insoluble

다. Hygroscopicity: 해당사항 없었다.

라. pH: 건조밀봉독 1.0 g을 정밀하게 달아 정제수 100 mL에 녹인 후 각 용액의 pH를 측정 하였다(Table 13).

Table 13. pH측정 결과

Lot No.	pH			
	1	2	3	Average
1501	5.01	5.02	5.01	5.01
1601	5.01	5.01	5.02	5.01
1701	4.97	4.98	4.95	4.96
			Average(total)	4.99

마. Melting point: 녹는점 측정불가 하였다.

바. Thermal analysis

Differential scanning calorimetry (DSC): 녹는점 측정불가 하였고 결과는 다음과 같다(Fig. 43).

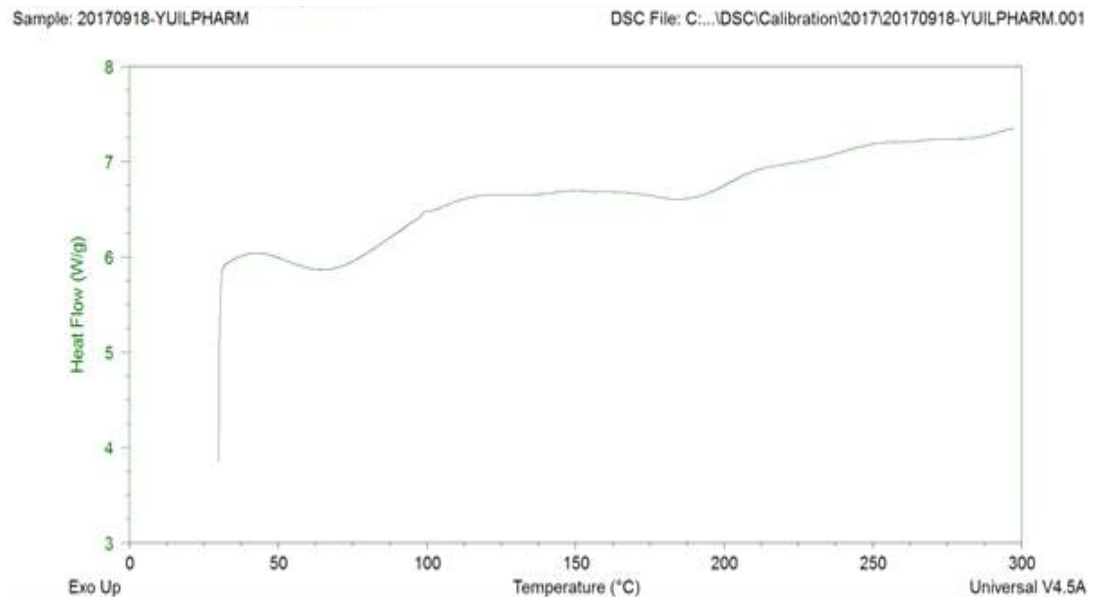


Fig. 43. Thermal analysis

사. Dissociation constant (Table 14)

건조밀봉독을 정제수에 녹였다.

Henderson-Hasselbalch equation :  $\text{pH} = \text{pKa} + \log(a_B/a_A)$  if  $a_B=a_A$ , then  $\text{pH}=\text{pKa}$

Table 14. Dissociation constant

Lot No.	pH			
	1	2	3	Average
1501	5.01	5.02	5.01	5.01
1601	5.01	5.01	5.02	5.01
1701	4.97	4.98	4.95	4.96
			Average(total)	4.99

아. Distribution coefficient & Distribution ratio: 해당사항 없음

자. Polymorphism: 해당사항 없음

차. Specific optical rotation: 결과는 다음과 같다(Table 15).

Table 15. Specific optical rotation

Lot No.	Specific optical rotation ( $[\alpha]_D^{20}$ )			
	1	2	3	Average
1501	-29.1	-29.3	-29.2	-29.2
1601	-30.3	-30.2	-30.2	-30.2
1701	-30.5	-30.5	-30.5	-30.5
			Average(total)	-30.0

### (13) 시험원료의 품질관리 진행

본 연구팀은 제1협동기관인 유일팜테크에서 2차레에 걸쳐 Lab sample의 원료 품질관리 시험을 진행하였다. 사용한 원료는 건조밀봉독으로서, 비정제 봉독을 수급하여 용해, 원심 분리 및 여과와 동결건조를 거쳐 대량생산하기 전 시험실에서 품질관리(Quality Control)기준을 설정하기 위함에 그 목적이 있다.

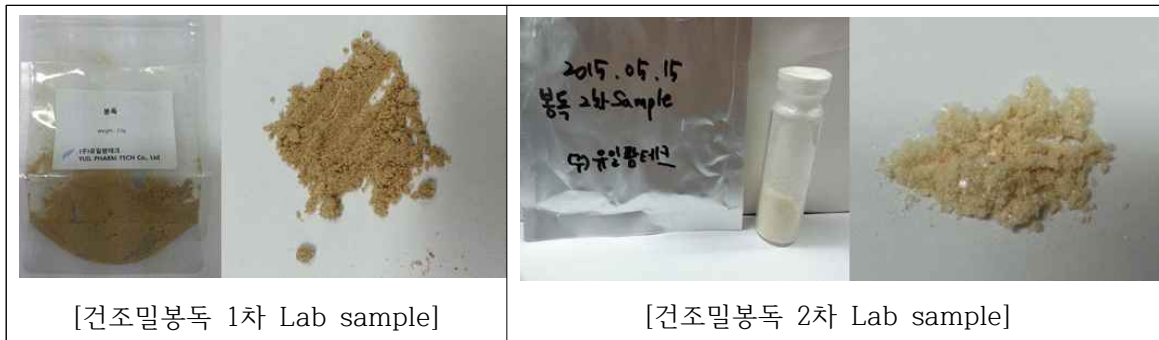


Fig. 44 건조밀봉독

Table 16. Lab sample test 품질관리 결과

Items	Specification
성상	방향성의 황갈색 분말
확인시험	
단백질확인	푸른색으로 변함
멜리틴확인	동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.
포스포리파제의 확인	밴드와 같은 위치에서 확인된다.
순도시험	
중금속	10ppm 이하
건조감량	13.0% 이하
함량	
멜리틴의 정량	40% 이상
총 단백질 정량	53.0% 이상
안정성 시험	이상한 증상이 나타나지 않아야 한다.
히스타민 시험	히스타민 시험법에 적합함.
항원성 시험	기준에 적합함.
Method: IHS	

## 1. 시험방법

### 가. 단백질 확인시험

증류수 600  $\mu$ l 와 Bradford Dye (발색시약, Bio-Rad, USA complex Brilliant Blue Green) 200  $\mu$ l 를 넣은 시험관에 이 약 0.1 mg/ml 용액 200  $\mu$ l 를 넣어 흔들어, 증류수 800  $\mu$ l 와 Bradford Dye 200  $\mu$ l 를 넣은 시험관과 비교해 볼 때 푸른색으로 변하면 적합으로 판정하였다. → 단백질 함량: 64.95%로 적합하였다.

### 나. 포스포리파제의 확인시험

#### 1) 표준액 조제

포스포리파제 표준품 10 mg을 정밀히 달아 D.W 10 ml로 녹인 후 이중 100  $\mu$ l 를 취하여 Microcentrifuge tube에 넣고 여기에 D.W 100  $\mu$ l 를 가한 후 혼화시켜 표준액으로 사용하였다.

#### 2) 검액의 조제

이 약 10 mg을 취하여 D.W 2 ml를 넣어 녹인 후 이중 200  $\mu$ l 를 취하여 Microcentrifuge tube에 넣어 검액으로 사용하였다.

#### 3) 시약 제조과정

##### ① Solution A 제조(100 ml 조제)

Acrylamide 29.2 g 및 Bis-acrylamide 0.8 g을 D.W 50 ml 녹인 후 D.W를 가해 100 ml가 되게 하여 혼화한 후 사용하였다.

##### ② Solution B 조제(100 ml 조제)

Trizma base 18.15 g 을 100 ml 비이커에 넣어 D.W 37.5 ml로 녹인 후 교반하면서 HCl로 점적하여 pH를 8.8로 맞추었다. 이 용액에 D.W를 가하여 75 ml가 되게 한 후 10% SDS 용액을 4 ml 가하여 교반 혼화시키고 D.W를 100 ml가 되게 하여 혼화한 후 사용하였다.

##### ③ 10% SDS 용액(100 ml 조제)

SDS 10g을 D.W로 녹여 100 ml가 되게 하여 혼화한 후 사용하였다.

##### ④ Solution C 조제(100 ml 조제)

Trizma base 6.05 g을 100 ml 비이커에 넣고 D.W 25 ml를 가해 녹인 후 교반하면서 HCl을 점적하여 pH가 6.8이 되게 하였다. 이 용액에 다시 D.W를 가하여 100 ml가 되게 한 후 혼화하여 사용하였다.

##### ⑤ 10% Ammoniumpersulfate (10 ml 조제)

Ammoniumpersulfate 1.0 g을 D.W로 녹여 10 ml가 되게 하여 혼화하여 사용하였다.



⑥ Electrophoresis buffer (1 L 조제)

Trizma base 3.0 및 Glycine 14.4 g을 D.W 900 ml에 녹인 후 이 용액에 10% SDS 용액 10 ml를 가하여 교반혼화 한 후 D.W로 1 L가 되게 하여 혼화한 후 사용하였다.

⑦ 1M Tris-HCl 용액 (100 ml 조제)

Trizma base 12.1 g을 100 ml 비이커에 넣고 D.W 50 ml를 가해 녹인 후 교반하면서 HCl을 점적하여 pH가 6.8이 되게 하였다. 이 용액에 다시 D.W를 가하여 100 ml가 되게 한 후 교반 혼화하여 사용하였다.

⑧ 1% Bromophenolblue (10 ml 조제)

Bromophenolblue 0.1 g을 D.W에 녹여 10 ml가 되게 하여 혼화 한 후 사용하였다.

⑨ Sample buffer (10 ml 조제)

1M Tris-HCl 용액 0.6 ml 및 Glycerol 2.5 ml, 10% SDS 용액 2 ml, 2-mercaptoethanol 0.5 ml, 1% Bromophenolblue 용액 1.0 ml 등을 정확하게 취하여 10 ml 용량 플라스크에 넣고 D.W를 가하여 10 ml가 되게 한 후 혼화하여 사용하였다.

⑩ 염색액 (1 L 조제)

Coomassie blue R-250 1.0g을 Methanol 200 ml에 녹인 후 Methanol을 가하여 450 ml가 되게 하였다. 이 용액에 D.W 450 ml 및 빙초산 100 ml를 가하여 혼화한 후 사용하였다.

⑪ 탈 염색액 (1 L 조제)

Methanol 100 ml 및 빙초산 100 ml를 1L 용량 플라스크에 넣은 후 D.W를 가하여 1 L가 되게 하여 혼화한 후 사용하였다.

4) 조작과정

표준액 및 검액에 각각 TCA(Trichloroacetic acid) 20  $\mu$ l를 첨부하여 혼화 시킨 후 냉동고(0°C 이하)에서 15분 동안 냉동시켰다. 냉동된 표준액 및 검액을 실온에서 녹인 후 11,000 rpm 에서 5분간 원심분리를 2회 실시하여 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 제외한 상등액을 취하여 버리고 0.1 N 수산화나트륨 용액 20  $\mu$ l를 넣어 침전된 단백질을 녹인 후 샘플완충액 5 $\mu$ l를 첨가하여 혼화하였다. 혼화된 표준액 및 검액을 100°C 수욕상에서 10분 동안 가온한 후 실온으로 식혔다. 조제한 SDS Polyacrylamide Gel의 Well에 표준액 및 검액을 10  $\mu$ l씩 Hamiltion syringe을 이용하여 Loading 하고 Power supply와 Electrophoresis Chamber를 연결하여 120V 전압으로 90분 동안 전개시켰다.

### 5) 염색 및 확인

미리 조제한 염색액에 (4)에서 전개된 Gel 판을 분리하여 담그고 1시간 동안 Shaking 하면서 염색하였다. 염색한 Gel 판을 다시 탈 염색액에 옮겨서 1시간동안에 탈염색을 2~3회 교체하여 Shaking 하면서 탈색 시킨 후 표준액 및 검액에서의 band 위치를 확인 하였다.

- 이 약은 다음의 시험법(전기영동법)에 준하여 시험할 때 검액의 밴드는 포스포리파제 표준액에서 나타나는 밴드와 같은 위치에서 확인 되어야 한다.
- 결과: 표준품과 비교하여 같은 분자량의 밴드가 확인되었다. → 적합

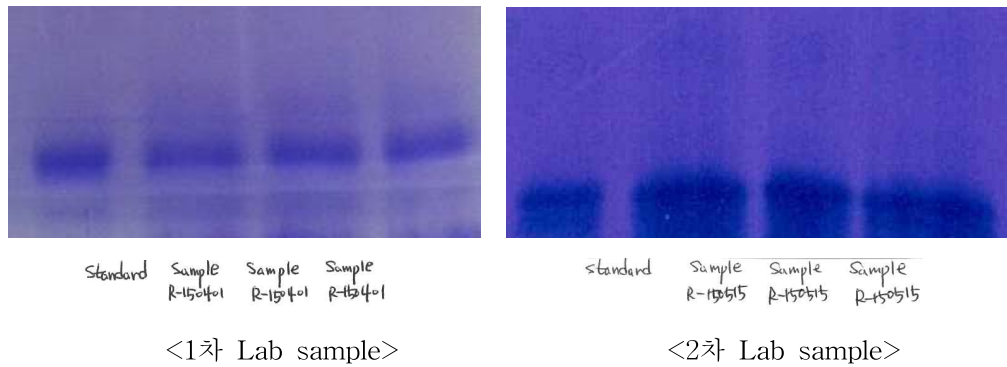


Fig. 45. 포스포리파아제 확인 (Coomassie blue 염색)

#### 다. 멜리틴 확인시험

이 약은 다음 함량 시험법(HPLC)에 준하여 시험할 때, 멜리틴 표준액과 동일한 유지시간에 피크를 나타내는 것으로 확인하였다. → 적합

#### 라. 멜리틴 정량시험

##### 1) 표준액 조제

멜리틴 표준품 5.0mg을 정밀히 달아 정제수에 녹여 정확히 10 ml로 하여 표준액으로 사용하였다.(0.5 mg/ml)

##### 2) 검액의 조제

본 품 10mg 을 정확히 취하여 10 ml 용량 플라스크에 넣고 정제수로 표선을 맞춘 액을 검액으로 사용하였다. (1 mg/ml)

##### 3) 고속액체크로마토그래프 조작조건(HPLC)

- 주입량 - 10  $\mu$ l
- 컬럼 - Kinetex 2.6  $\mu$ m XB-C18 100Å, 75 × 4.6 mm 또는 이와 동등한 컬럼
- 컬럼온도 - 30°C

- 샘플온도 - 20℃
- 이동상 - 0.2% TFA in H2O : 0.2% TFA in ACN = 56.5 : 43.5
- 검출기 파장 - 214 nm
- 유량 - 0.7 mL/min
- 건조밀봉독 중 멜리틴의 함량(%)

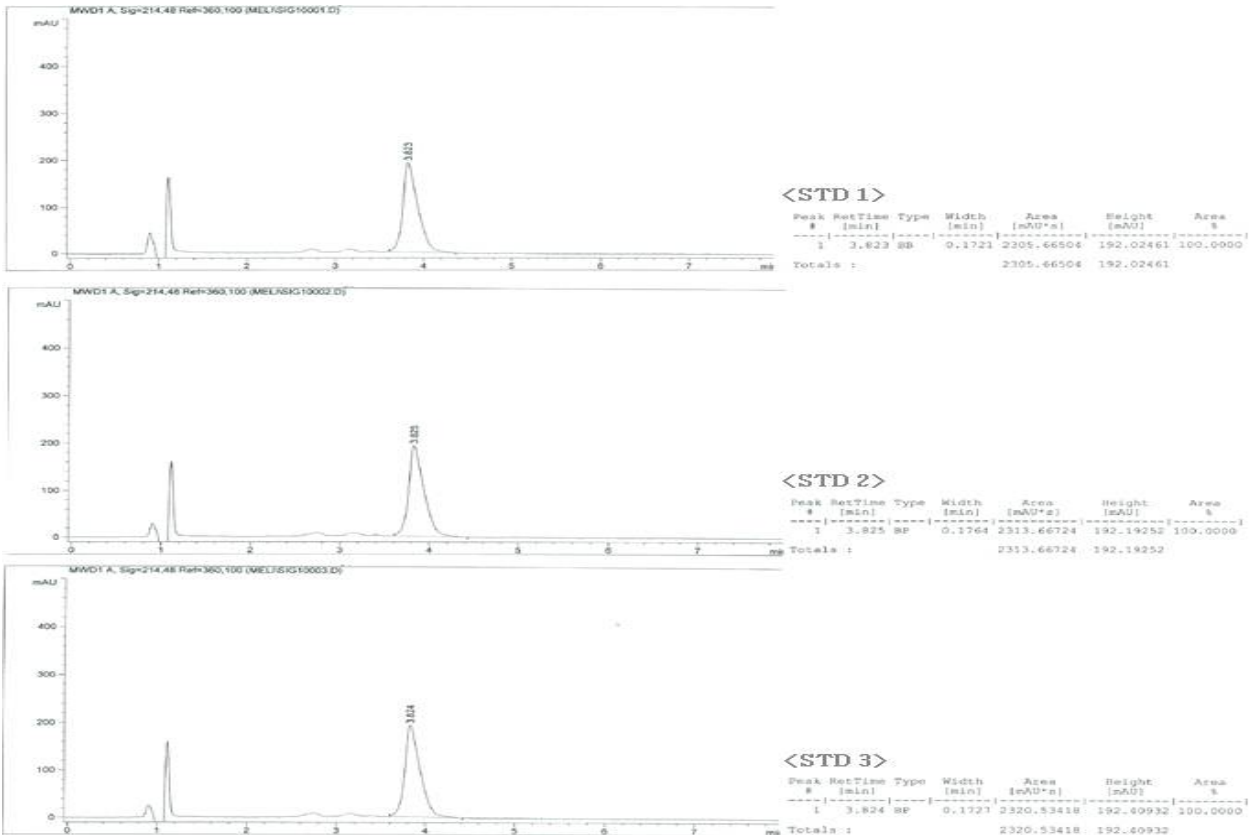
$$\frac{\text{표준품 취한 양(mg)} \times \text{표준품의 순도(\%)} \times \text{검액 중 멜리틴의 피크면적} \times 100}{100 \times \text{표준액 중 멜리틴의 피크면적} \times \text{검체의 취한 양(mg)}}$$

## 2. 연구 결과 (Fig. 46)

1차 Lab Sample 멜리틴 정량시험 40%이상 → 적합 (59.36%)

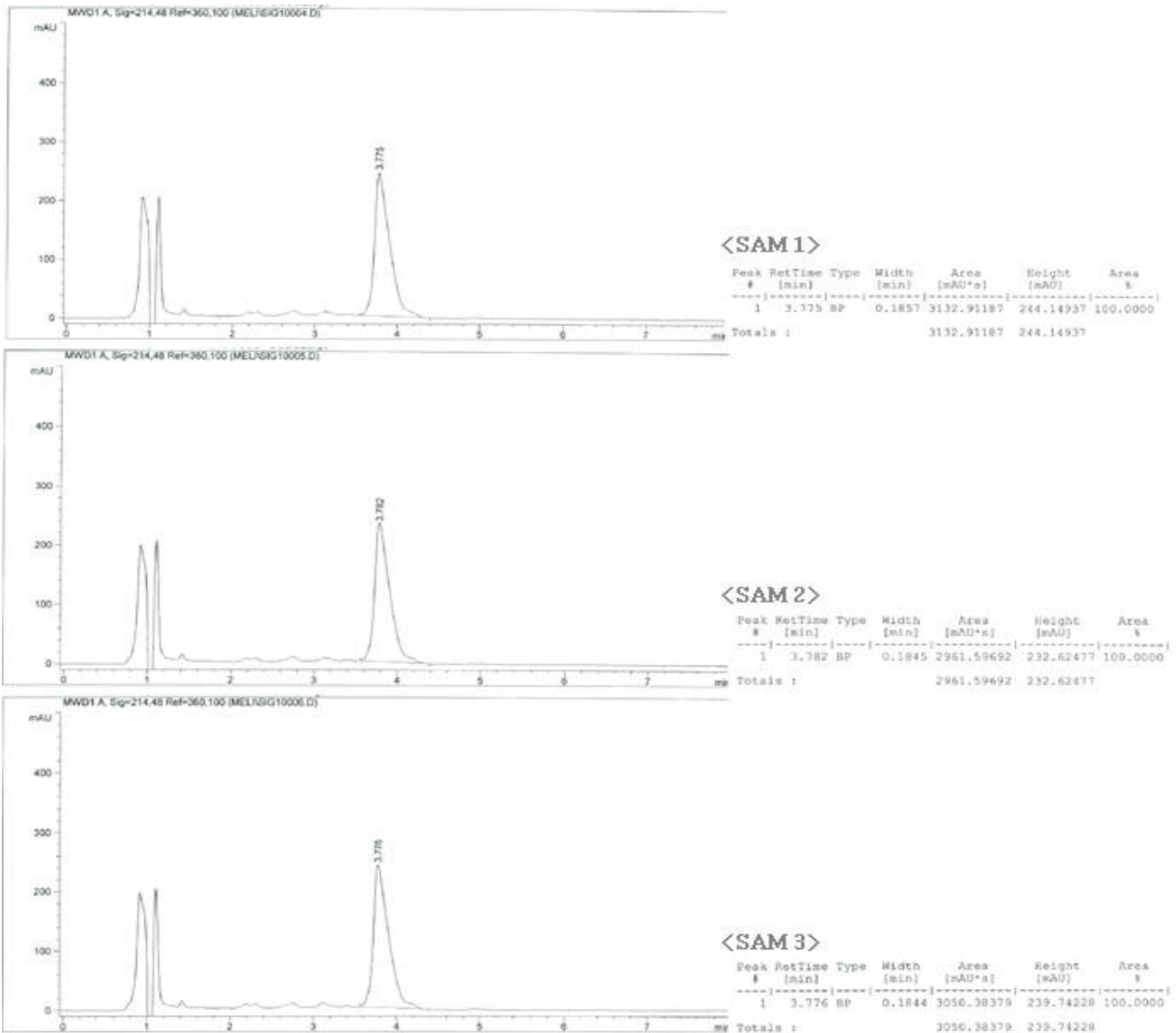
구분	SAM1	SAM2	SAM3	평균 함량(%)
함량(%)	59.42	58.46	60.21	59.36±0.88

### \* Raw data



구분	STD1	STD2	STD3	STD평균면적
STD 취한량(mg)	0.5	0.5	0.5	-
STD 면적	2305.66504	2313.66724	2320.53418	2313.28882

- STD를 0.5mg 취하여 D.W 1 ml에 녹여 시험을 진행하여 농도를 맞추었다.



구분	SAM1	SAM2	SAM3	STD평균면적
SAM 취한량(mg)	10.2	9.8	9.8	-
SAM 면적	3132.91187	2961.59692	3050.38379	2313.28882

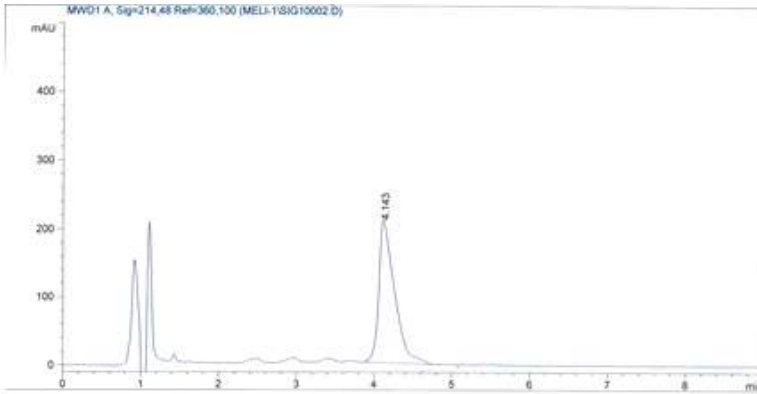
$$\begin{aligned}
 \text{<SAM 1> 함량(\%)} &= \frac{3132.91187}{2313.28882} \times \frac{0.5}{10.2} \times \frac{1\text{mL}}{10\text{mL}} \times 89.5\% = 59.42\% \\
 \text{<SAM 2> 함량(\%)} &= \frac{2961.59692}{2313.28882} \times \frac{0.5}{9.8} \times \frac{1\text{mL}}{10\text{mL}} \times 89.5\% = 58.46\% \\
 \text{<SAM 3> 함량(\%)} &= \frac{3050.38379}{2313.28882} \times \frac{0.5}{9.8} \times \frac{1\text{mL}}{10\text{mL}} \times 89.5\% = 60.21\%
 \end{aligned}$$

Fig. 46. 1차 정량실험 결과

2차 Lab Sample 멜리틴 정량시험 40%이상 → 적합 (54.06%)

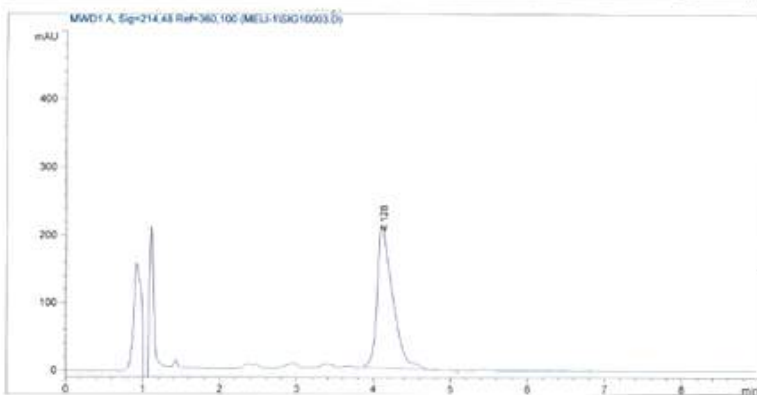
구분	SAM1	SAM2	SAM3	평균 함량(%)
함량(%)	53.51	54.52	54.14	54.06±0.51

\* Raw data



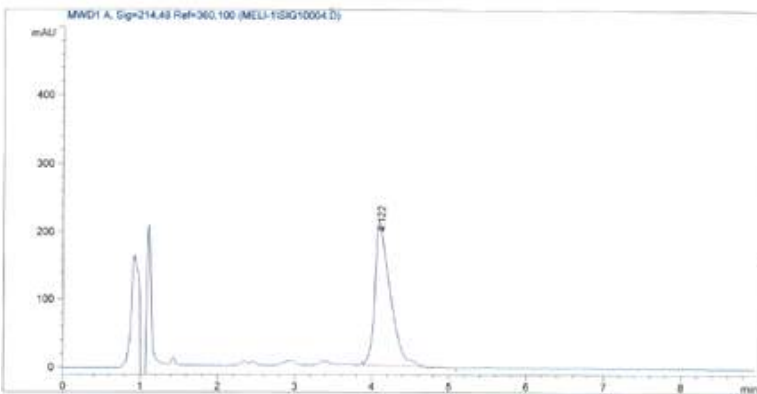
<STD 1>

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.143	BBA	0.2141	2922.66821	205.30504	100.0000
Totals :				2922.66821	205.30504	



<STD 2>

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.128	BBA	0.2211	2934.51953	197.78363	100.0000
Totals :				2934.51953	197.78363	



<STD 3>

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.122	BBA	0.2245	2915.72729	192.67624	100.0000
Totals :				2915.72729	192.67624	

구분	STD1	STD2	STD3	STD평균면적
STD 취한량(mg)	5.0	5.0	5.0	-
STD 면적	2922.66821	2934.51953	2915.72729	2924.30501

구분	SAM1	SAM2	SAM3	STD평균면적
SAM 취한량(mg)	10.0	9.8	9.9	-
SAM 면적	3496.51025	3491.72412	3502.26538	2924.30501

$$\begin{aligned}
 \langle \text{SAM 1} \rangle \text{ 함량}(\%) &= \frac{3496.51025}{2924.30501} \times \frac{5.0 / 10\text{mL}}{10.0 / 10\text{mL}} \times 89.5\% = 53.51\% \\
 \langle \text{SAM 2} \rangle \text{ 함량}(\%) &= \frac{3491.72412}{2924.30501} \times \frac{5.0 / 10\text{mL}}{9.8 / 10\text{mL}} \times 89.5\% = 54.52\% \\
 \langle \text{SAM 3} \rangle \text{ 함량}(\%) &= \frac{3502.26538}{2924.30501} \times \frac{5.0 / 10\text{mL}}{9.9 / 10\text{mL}} \times 89.5\% = 54.14\%
 \end{aligned}$$

Fig. 47. 2차 정량실험 결과

## (14) 원료의 안전성, 항원성 및 히스타민 시험

시험항목	시험기준
1.단백질의 확인	푸른색으로 변한다.
2.포스포리파제의 확인	검액의 밴드는 포스포리파제에서 나타 내는 밴드와 같은위치에서 확인 된다.
3.총단백질 정량	53.0%이상
4.안전성 시험	체중 20g 전후의 마우스 수컷 5 마리를 사용하여 체중 kg당 25mL를 정맥내 주사할 때 72시간 이내에 사망 또는 기타 이상한 증상이 나타나지 않아야 한다.
5.히스타민 시험	검체를 주사할 때에 일어나는 혈압강하가 체중 kg 당 0.1µg의 히스타민에 의하여 일어나는 혈압강하보다 작을 때 적합하다.
6.항원성 시험	체중 kg 당 검액 2ml 를 제 1 일째와 제 5 일째에 각각 피하투여 하고, 제 15일째와 제 25일째에 저용량군 검액을 kg당 1ml 정맥주사할 때 호흡곤란, 허탈 및 치사 등의 쇼크 증상이 없어야 한다.
비고	

### 1. 안전성 시험

#### ◎ 안전성시험

마우스 5마리에 시료 0.5mL 미정액 주사 후 72시간 이내에 한 마리도 사망하지 않아야 한다.

#### ◎ 시료 제조

시료 (생리식염주사액으로 밀리리터당 0.02밀리그램 함유)

#### ◎ 시험 방법

몸무게 약 20g 인 영양상태가 좋은 건강한 흰 마우스 5수를 가지고 각각에 0.5mL씩을 미정액 주사하고 관찰할 때 72시간 이내에 죽지 않아야 한다.  
주사 후 72시간 이내에 1수라도 죽은 경우에는 흰 마우스 10수를 가지고 재시험 할 때 72시간 안에 모두 살아있어야 한다.

#### ◎ 시험 결과 : 적합



시료 사진



건조밀분독 ( 국전약품 ) : BVN-12-D001



생리식염주사액 : R6L5K07 대한약품 (주)  
유효 기간 : 2015년 05월 28일

시 험 자 Tested by	김복국	확 인 자 Reviewed by	
--------------------	-----	----------------------	--

제품명 : 건조밀분독 ( 국전약품 )	제조번호 : BVN-12-D001	시험번호 : ATS1211 - 008	동물상태 사진
( 주사 전 , 종료 상태 사진 )			
1. 시험액 주사 전		2. 시험액 종료 후	

1. 이상독성시험 결과 DATA

마우스 번호 MOUSE NO.	체 중(g) WEIGHT	주사량(mL) INJ.VOLUME	주사시간(SEC) INJ. TIME	주사 전 건강상태 HEALTH OF SHORTLY INJ.	주사 후 건강상태 HEALTH OF AFTER INJ.
121123016	19	0.5	30	양 호	양 호
121123017	20	0.5	30	양 호	양 호
121123018	19	0.5	30	양 호	양 호
121123019	20	0.5	30	양 호	양 호
121123020	19	0.5	30	양 호	양 호

Fig. 48. 독성테스트 결과



## 2. 항원성 시험

### 1. 항원성시험

- 1) 고용량군: 유발항원 투여 후 증상의 변화 없음, 30분 및 24시간 후에 호흡곤란, 허탈, 치사 없어야 함.
- 2) 저용량군: 유발항원 투여 후 증상의 변화 없음, 30분 및 24시간 후에 호흡곤란, 허탈, 치사 없어야 함.

### 2. 시료제조 )

#### 1) 고용량군 검액


이 약 10바이알 이상을 취하여 건조밀봉독으로서 밀리리터당 1밀리그램이 되는 농도로 주사용수를 넣어 녹여 취합한 후 생리식염수로 0.5밀리그램/밀리리터가 되도록 희석한 후 희석액과 FCA ( Freund's complete adjuvant, Mycobacterium tuberculosis H37Ra. ATCC25177사균 1밀리그램/밀리리터 함유 ) 를 투여 직전에 동량 혼합한 액을 검액으로 한다.

#### 2) 저용량군 검액

이 약 10바이알 이상을 취하여 건조밀봉독으로서 밀리리터당 1밀리그램이 되는 농도로 주사용수를 넣어 녹여 취합한 후 생리식염수로 0.05밀리그램/밀리리터가 되도록 희석한 후 희석액과 FCA ( Freund's complete adjuvant, Mycobacterium tuberculosis H37Ra. ATCC25177사균 1밀리그램/밀리리터 함유 ) 를 투여 직전에 동량 혼합한 액을 검액으로 한다.

### 3. 시험방법 )

- 1) 고용량군 : 체중 300g 전후 기니픽 5마리에 검액을 2mL/kg당 제1일째 , 제5일째 피하투여.
- 2) 저용량군 : 체중 300g 전후 기니픽 5마리에 검액을 2mL/kg당 제1일째 , 제5일째 피하투여.
- 3) 고용량군 : 저용량군 검액을 1mL/kg당 제15일째 , 제25일째 정맥투여.
- 4) 저용량군 : 저용량군 검액을 1mL/kg당 제15일째 , 제25일째 정맥투여.
- 5) 고용량군 : 투여 30분 및 24시간 이후 호흡곤란,허탈,치사 증상의 변화가 없어야 한다.
- 6) 저용량군 : 투여 30분 및 24시간 이후 호흡곤란,허탈,치사 증상의 변화가 없어야 한다.

시 험 자 Tested by		확 인 자 Reviewed by	
--------------------	---	----------------------	---

시료 및 준비 사진 ( 건조밀봉독 : BVN-12-D001 , 승인번호 : Kuhnil - 121101 )



1. 시료 사진



2. 시료 사진

비고 :

\* 0.9% 주사용 생리식염수 \* 주사용수 \* 건조밀봉독 \* FCA

제품명 : 건조밀봉독	제조번호 : BVN-12-D001	시험번호: ATI1211 - 002	동물 상태 사진
-------------	--------------------	---------------------	----------

\* 상태 사진 \*

1일째.



5일째.



감작항원 : 복합주사 : 1, 5 일

15일째.



25일째.



유발항원 : 정맥주사 15, 25일 후

비고 : 이상없음 ( 고용량군 )



제품명 : 건조밀봉독	제조번호 : BVN-12-D001	시험번호: AT11211 - 002	동물 상태 사진
-------------	--------------------	---------------------	----------

\* 상태 사진 \*

1일째.



5일째.



감작항원 : 복강주사 : 1,5 일

15일째.



25일째.



유발항원 : 정맥주사 15, 25일 후

비고 : 이상없음 ( 저용량군 )

1. 항원성 결과 확인

기니픽 번호 Guinea Pig NO.	체중 (g) WEIGHT	주사량 (mL) INJ.VOLUME	주사시간 (SEC) INJ. TIME	주사 후 건 강 상 태 확인 HEALTH OF AFTER INJ.			
				복강주사 1,5 일		정맥주사 15, 25일 후	
시 료 ( 고용량군 ) 미정맥 주사 시료 : 저용량							
121126001	298	피하 2mL/kg당 미정맥 1mL/kg당	30	양 호	양 호	양 호	양 호
121126002	289	피하 2mL/kg당 미정맥 1mL/kg당	30	양 호	양 호	양 호	양 호
121126003	292	피하 2mL/kg당 미정맥 1mL/kg당	30	양 호	양 호	양 호	양 호
121126004	291	피하 2mL/kg당 미정맥 1mL/kg당	30	양 호	양 호	양 호	양 호
121126005	280	피하 2mL/kg당 미정맥 1mL/kg당	30	양 호	양 호	양 호	양 호
시 료 ( 저용량군 ) 미정맥 주사 시료 : 저용량							
121126006	294	피하 2mL/kg당 미정맥 1mL/kg당	30	양 호	양 호	양 호	양 호
121126007	293	피하 2mL/kg당 미정맥 1mL/kg당	30	양 호	양 호	양 호	양 호
121126008	287	피하 2mL/kg당 미정맥 1mL/kg당	30	양 호	양 호	양 호	양 호
121126009	296	피하 2mL/kg당 미정맥 1mL/kg당	30	양 호	양 호	양 호	양 호
121126010	284	피하 2mL/kg당 미정맥 1mL/kg당	30	양 호	양 호	양 호	양 호

비고 : 고용량군 , 저용량군 ( 이상없음 )

Fig. 49. 항원성 테스트 결과

### 3. 히스타민 시험

검체명	건조밀봉독
시험항목	히스타민 시험
규격	KP 일반시험법 중 히스타민 시험법
시료수	1건
기준	검체를 주사할 때에 일어나는 혈압강하가 체중 kg당 0.1 $\mu$ g의 히스타민에 의하여 일어나는 혈압강하보다 작을 때 적합하다.
시료 정보 및 요구사항	
기타	KP 일반시험법 중 히스타민 시험법을 따른다.

◎ 히스타민시험법 ( 적합 하여야 한다. )

( 검체 투여후 일어나는 혈압강하가 0.1  $\mu$ g/kg 의 히스타민에 의하여 일어나는 혈압강하 보다 작을 때. )

◎ 시료 제조

- 1) 시료 1mg 취하여 ( 1mg / mL 주사용수 ) 농도로 제조 한다.
- 2) 1) 을 취하여 ( 0.005mg / mL 주사용생리식염액 ) 함유 하는 용액을 제조 한다.

◎ 표준품 제조 : 표준 히스타민 1  $\mu$ g 함유 / mL 당


◎ 시료 투여량 : 검체 0.005mg / mL 주사용생리식염액 / 체중 kg 당 대퇴부정맥 투여 : 2 회 투여

◎ 표준품 투여량 : 0.05mL , 0.10mL , 0.15mL / 히스타민 1  $\mu$ g 함유 / mL / 체중 (Kg) : 3 회 투여

◎ 마취제 투여량 : 9Amp / 체중 4.0 Kg ( 표준 투여량 : 150mg / 체중 Kg 당 )

◎ 시험 방법

- 1) 페노바르비탈나트륨을 복강내 투여하여 전신마취
- 2) 대퇴부 정맥노출,미주신경분리후 캐놀라를 삽입
- 3) 우경동맥노출 기록식 키모그래프 가동하여 혈압변화 기록
- 4) 대퇴부 정맥에 표준히스타민액을 투여 및 검체 투여
- 5) 표준히스타민액 0.05mL/kg , 0.1mL/kg 및 0.15mL/kg 를 각각 5분 이상 간격으로 투여
- 6) 표준히스타민 0.1  $\mu$ g/kg 에 의하여 일어나는 혈압강하 ( 2.67kPa 이상 ) 측정 확인
- 7) 검체 투여에 의한 혈압강하 확인
- 8) 표준히스타민 투여 그리고 검체 투여 후 혈압 강하 비교

시험자 Tested By		확인자 Reviewed by	
------------------	---	--------------------	---

● 표준 히스타민



● 표준 히스타민 조제액



● 수술용 도구



\* 제조사 : 유고바실리스사

\* 기기명 : UNIRECORD 7050



● 준비사진

사진 찍지 못함



히스타민 시험  
Histamine Test

기준 Specifications	결과 Results	시험자 Tested by
검체 투여 후 일어나는 혈압강하가 0.1µg/kg 의 히스타민에 의하여 일어나는 혈압강하 보다 작을 때	적합	한영국

비 고 :

- 1) 표준품 조제 투여: 3회 및 시료 조제 투여: 2회 실시
- 2) 결과 데이터 확인: 이상 없으므로 적합 판정.
- 3) 수술 시 마취제 (루미날주 10%) (표준 투여량: 150mg / kg당)  
( 실제 투여량: 9Amp ( 900mg) / 4.0 kg )

Fig. 50. 히스타민 테스트 결과



## (15) 원료의약품(건조밀봉독)의 안정성시험

원료의약품(건조밀봉독)의 안정성 시험은 정제된 봉독의 저장방법 및 포장방법개발 하여 원료의약품 등록에 관한 규정<sup>33)</sup> (식품의약품안전처 고시)에 따라 실시(0, 3, 6, 9, 12개월에 대한 관련 자료 작성 및 18, 24개월 안정성 확보 연구)하였으며, 12개월 이상의 안정성을 확보하였다.

안정성 시험을 위해 설정한 시험 항목은 아래 표(Table. 17)와 같다.

Table 17. 안정성 시험 항목

번호	항목	세부항목	의약품 허가에 필요한 제품(건조밀봉독) 규격	원료물질 봉독의 규격
1	성상		방향성의 황갈색 분말	제품과 동일
2	확인시험	1) 단백질 확인	푸른색으로 변함	해당 없음
		2) 멜리틴 확인	동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.	제품과 동일
		3)포스포리파제의 확인	밴드와 같은 위치에서 확인된다.	해당 없음
3	순도시험	중금속	10ppm 이하	제품과 동일
4	건조감량		13.0% 이하	제품과 동일
5	함량	1) 멜리틴의 정량	40% 이상	50% 이상
		2) 총단백질 정량	53.0% 이상	해당 없음
6	안정성 시험		이상한 증상이 나타나지 않아야 한다.	해당 없음
7	히스타민 시험		히스타민 시험법에 적합함.	해당 없음
8	항원성 시험		기준에 적합함	해당 없음

안정성 시험을 실시한 결과 첫 번째 배치(2015년 8월 제조)와 두 번째 배치(2016년 2월 제조)는 지 품질에 적합하였으며 현재 세 번째 배치(2017년 1월 15일) 6개월 차 까지 품질에 적합한 것으로 확인되었다. 건조밀봉독의 안정성시험 결과 요약보고서는 다음과 같다.

Table 18. 1차 배치 테스트 결과



		안정성시험 결과 기록서				문서번호:	VIPQ-Q-06P-02	
						개정번호:	3.00	
						시험일:	2015-05-01	
						페이지:	1 of 1	
제품명	건조밀분동		제조번호	1501			제조일자	2015.08.25
시험구분	장기보존시험		보관조건	25℃±2℃ / 상대습도 60%±5%			포장상태	실온, 밀폐용기
순번	시험항목	시험기준	제조시	3개월	6개월	9개월	12개월	비고
			2015.08.25	2015.11.25	2016.02.25	2016.05.25	2016.08.25	
1.	성상	방향성의 황갈색 분말	황갈색 분말	황갈색 분말	황갈색 분말	황갈색 분말	황갈색 분말	
2.	확인시험	1) 단백질확인: 푸른색으로 변함	일치	일치	일치	일치	일치	
		2) 멜리틴 확인: 동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.	일치	일치	일치	일치	일치	
		3) 포스포리피제의 확인: 밴드와 같은 위치에서 확인된다.	일치	일치	일치	일치	일치	시험자: 고려은단
3.	순도시험	중금속: 10ppm 이하	한도내	한도내	한도내	한도내	한도내	
4.	건조감량	13.0% 이하	6.4%	6.4%	6.4%	6.4%	6.5%	
5.	합량	1) 멜리틴의 정량: 40% 이상	61.6%	61.6%	61.6%	61.6%	61.7%	
		2) 총 단백질 정량: 53.0% 이상	72%	71.9%	72.1%	72.2%	72.1%	시험자: 고려은단
6.	안정성시험	이상한 증상이 나타나지 않아야 한다.	이상증상없음	이상증상없음	이상증상없음	이상증상없음	이상증상없음	시험자: 건일제약
7.	히스타민 시험	히스타민 시험법에 적합함	적합	적합	적합	적합	적합	시험자: 건일제약
8.	항원성 시험	기준에 적합함	적합	적합	적합	적합	적합	시험자: 건일제약
		판정						
		시험책임자						
		품질관리책임자						

Table 19. 2차 배치 테스트 결과

		안정성시험 결과 기록서				문서번호:	VIPQ-Q-06P-02	
						개정번호:	3.00	
						시험일:	2015-05-01	
						페이지:	1 of 1	
제품명	건조밀분동		제조번호	1601			제조일자	2016.02.25
시험구분	장기보존시험		보관조건	25℃±2℃ / 상대습도 60%±5%			포장상태	실온, 밀폐용기
순번	시험항목	시험기준	제조시	3개월	6개월	9개월	12개월	비고
			2016.02.25	2016.05.25	2016.08.25	2016.11.25	2017.02.25	
1.	성상	방향성의 황갈색 분말	황갈색 분말	황갈색 분말	황갈색 분말	황갈색 분말	황갈색 분말	
2.	확인시험	1) 단백질확인: 푸른색으로 변함	일치	일치	일치	일치	일치	
		2) 멜리틴 확인: 동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.	일치	일치	일치	일치	일치	
		3) 포스포리피제의 확인: 밴드와 같은 위치에서 확인된다.	일치	일치	일치	일치	일치	시험자: 고려은단
3.	순도시험	중금속: 10ppm 이하	한도내	한도내	한도내	한도내	한도내	
4.	건조감량	13.0% 이하	5.5%	5.6%	6.4%	6.2%	5.7%	
5.	합량	1) 멜리틴의 정량: 40% 이상	56.5%	56.4%	56.5%	57.8%	56.1%	
		2) 총 단백질 정량: 53.0% 이상	69%	68.9%	69%	69.1%	69.1%	시험자: 고려은단
6.	안정성시험	이상한 증상이 나타나지 않아야 한다.	이상증상없음	이상증상없음	이상증상없음	이상증상없음	이상증상없음	시험자: 건일제약
7.	히스타민 시험	히스타민 시험법에 적합함	적합	적합	적합	적합	적합	시험자: 건일제약
8.	항원성 시험	기준에 적합함	적합	적합	적합	적합	적합	시험자: 건일제약
		판정						
		시험책임자						
		품질관리책임자						

Table 20. 3차 배치 테스트 결과


		안정성시험 결과 기록서				문서번호:	YIPQ-Q-06P-02.
						개정번호:	3.10.
						시험일:	2016-07-01.
						페이지:	1 of 1.
제품명	견조밀분동	제조번호	1701			제조일자	2017.01.15.
시험구분	장기보존시험	보관조건	25℃±2℃ / 상대습도 60%±5%			포장상태	실은, 밀폐용기
순번	시험항목	제조시	3개월	6개월	9개월	12개월	비 고
	시험기준	2017.03.16.	2017.06.16.	2017.09.16.			
1.	성상	방향성의 황갈색 분말	황갈색 분말	황갈색 분말	황갈색 분말		
2.	확인시험	1) 단백질확인: 푸른색으로 변함.	일치	일치	일치		
		2) 멜리틴 확인: 동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.	일치	일치	일치		
		3) 포스포리파제의 확인: 밴드와 같은 위치에서 확인된다.	일치	일치	일치		시험자: 고려은단
3.	순도시험	중금속: 10ppm 이하	한도내	한도내	한도내		
4.	건조감량	13.0% 이하	5.2%	6.4%	6.4%		
5.	함량	1) 멜리틴의 정량: 40% 이상	51.8%	51.5%	52.4%		
		2) 총 단백질 정량: 53.0% 이상	68%	68.1%	67.9%		시험자: 고려은단
6.	안정성시험	이상한 증상이 나타나지 않아야 한다.	이상증상없음	이상증상없음	이상증상없음		시험자: 건일제약
7.	히스타민 시험	히스타민 시험법에 적합함.	적합	적합	적합		시험자: 건일제약
8.	항원성 시험	기준에 적합함.	적합	적합	적합		시험자: 건일제약
판 정							
시험책임자							
품질관리책임자							



## (16) 제품 표준화 확립

건조밀봉독의 원료의약품 허가에 필요한 제품의 표준화를 확립하기 위하여, 제조방법의 표준화, 의약품등 밸리데이션 실시에 관한 규정<sup>34)</sup>(식품의약품안전처 고시), 원료의약품 등록에 관한 규정<sup>35)</sup>(식품의약품안전처 고시) 등을 참고하여 진행하였다.

제조방법의 표준화를 위해 표준화된 제조기록서를 작성하고, GMP 기준에 맞는 제조기록서와 고도의 품질관리에 교육, 훈련된 생산인원으로 제조하였으며, 이에 관련한 기록을 유지하고 있고, 이는 건조밀봉독의 원료의약품 허가에 필수적이다. 표준화된 제조기록서는 아래와 같이 관리되었다(Fig. 51).

	<b>건조밀봉독 요약보고서</b>	문서번호	
		개정번호	
		시행일	
		페이지	

### 목적

본 보고서는 건조밀봉독의 제조공정에 대한 validation의 실행이 protocol에 따라 2 batches에 모두 동일하게 적용되었으며, 수율 및 품질의 동등성을 확인하기 위한 것이다.

### PQ에 대한 사항

건조밀봉독의 2 batches에 대한 pv와 관련하여 각 제조 설비의 작동을 체크하였으며 이상이 없었음

### 품질에 관한 사항

Validation 실시 결과 건조밀봉독 품질에는 문제가 없었으며 각각에 대한 규격 및 성적은 다음과 같다.

시험항목	기 준	BVM-1501	BVM-1601
성 상	방향성의 황갈색 분말	방향성의 황갈색 분말	방향성의 황갈색 분말
확인시험	1) 단백질 확인.	일치	일치
	2) 멜리틴확인.	일치	일치
	3) 포스포리파제의 확인	일치	일치
순도시험	1) 중금속 : 10ppm 이하	한도 내	한도 내
건조감량	13.0%이하	6.4%	5.5%
	1)멜리틴의정량 40%이상	61.6%	56.5%
함량	2) 총 단백질 정량 53.0%이상	72%	69%
	안전성 시험	이상한 증상이 나타나지 않아야 한다.	이상증상없음
히스타민 시험	히스타민 시험법에 적합함	적합	적합
항원성 시험	기준에 적합함	적합	적합

### 결론

Validation protocol에 따라 생산 완료된 건조밀봉독 2 batches는 본 보고서에서 검토한 결과대로 제조시 및 기록서를 준수하여 동일하게 제조되었으며 제품에 대한 요구 규격을 모두 만족하였다. 따라서, 건조밀봉독의 제조공정은 validation되었음을 보증할 수 있다. 또한, 건조밀봉독 수율 및 품질의 동등성을 확인하고, Validation된 process로 제조된 건조밀봉독 2 batches는 품질이 적합하므로 이를 제품으로 사용할 수 있다.

BVM-150/

### 제 조 기 록 서

제 품 명	봉독		제 품 코드	Z8**
제 조 번 호	NA	실제생산량	66g	
제 조 일 자	2015년 07월 22일	제조종료일	2015년 07월 24일	
점 검 사 항		점 검 일	2015. 07. 28	
		점 검 자	과정환	
항 목	확 인	항 목	확 인	
제조지시 및 기록서(경동)	☑			
시험성적서(경동)	☑			
<p>이 제품은 엄격한 제조관리를 거쳐 생산 되었습니다.</p> <p>2015년 07월 22일</p>				
문서보존기한	(3+1년)	저장방법 : 기밀용기, 실온보관(1-30℃)		

경 동 제 약 주 식 회 사

KD.MREC.BR.봉독.1507-00(항생제동)

( 13 ) 페이지 중 ( 1 )

제 품 명		봉 독	제 조 번 호	NA		
번 호	공 정 명	세 척	실 시	작 업 일 시	작 업 자	확 인 자
지 시 사 항	작업자는 규정된 복장을 착용한다.		(양호)	불량	2014년 07월 20일	홍인출 이영해
	사용할 기계 및 기구를 점검한다.		(양호)	불량		
	작업설명, 작업실번호를 확인한다. 작업설명 : 세척실-1    작업실번호 : K301		(확인)			
1	청소규정에 따라 청소하고 실행임자의 확인 후 작업을 시작한다.		확 인	(서명)	이영해	
2	세척할 도구 및 기구를 확인하고 세척을 실시한다. * 동결 Tray 1. 정제수로 1차 세척한다. 2. 주사용수로 최종 세척한다.		(실시)	시작: 08:20	홍인출	이영해
	* 지 시 : 1. 세척 시 이상이 발견되면 세척을 즉시 중지하고, 책임자에게 알려 지시를 받을 것. 2. 세척기록서를 작성하고 제조기록서에 첨부할 것.			종료: 09:00		
3	세척된 동결용 Tray를 건열멸균기에 넣고 멸균한다.  장비명: 건열멸균기1 (DRS-1800) 관리번호 : M0003		(실시)	시작: 09:10	홍인출	이영해
	*지 시: 건열멸균기기록서를 작성하고 제조공정담당자의 확인을 받고 제조기록서에 첨부할 것.			종료: 10:11		
4	세척할 도구 및 기구를 확인하고 세척을 실시한다. * 충전용구 (봉독전용) 1. 여과호스 외부는 정제수로 1차 세척하고, 주사용수로 최종 세척한다. 2. 여과호스 내부는 주사용수 라인에 연결하여 5분간 Flushing 하여 세척한다. 3. 여과세트는 정제수로 1차 세척하고, 주사용수로 최종 세척한다.		(실시)	시작: 09:00	홍인출	이영해
	* 조제용구 (비이커 류 : 봉독 전용) 1. 정제수로 1차 세척을 실시하고, 주사용수로 최종 세척한다.			종료: 09:10		
5	* 지 시 : 1. 세척 시 이상이 발견되면 세척을 즉시 중지하고, 책임자에게 알려 지시를 받을 것. 2. 세척기록서를 작성하고 제조기록서에 첨부할 것.					
6	조제, 충전작업에 필요한 기구를 습열멸균 한다. 장비명: 습열멸균기1 (AC-1500) 관리번호 : M0035		(실시)	시작: 10:00	홍인출	이영해
	*지 시: 습열멸균기기록서를 작성하고 제조공정 담당자의 확인을 받고 제조기록서에 첨부할 것.			종료: 10:14		

경 동 제 약 주 식 회 사

KD.MREC.BR.봉독.1507-00(항생제등)

( 1/3 ) 페이지 중 ( 3 )

# 세척기록서(조제/충전도구)

제 품 명	제 조 번 호	작 업 일 자		
봉독	NA	2014. 07. 22		
1. 세척내용				
품 명	수 량	품 명	수 량	작업자
동검 트레이	1	/	/	홍인출
여과섬트(10개)	1			
여과로	2			
베이커(5L)	1			
/	/			
2. 세척기록				
세척대 상태 점검	세척수 상태 점검	이상 시 조치사항		
(양호) (불량)	(양호) (불량)	(없음)	조치내역	
/				
		확 인	제조공정담당자	신영희

경 동 제 약 주 식 회 사

KD.MREC.BR.봉독.1507-00(항생제동)

(13) 페이지 중 (4)

## 제 조 지 시 및 기 록 서

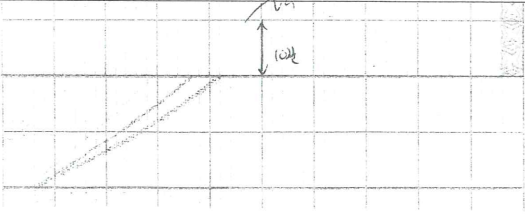
제 품 명	봉독			제조지시자	배관성				
제 조 번 호	NA	제 조 지 시 일	2015. 07. 20.	제 조 일 자	2015. 07. 22				
성 상	황색의 분말			사용(유효)기한	NA				
시험 번호 (관리번호)	원 료 명	단 위	지시량	사용량	작업자	확인자			
NA	봉독	g	100g	100g	홍 단출	이정환			
특기사항: * 수탁의 범위 : 조제, 여과, 동결건조 및 포장 * 제공된 봉독 분말을 제조공정에 투여한다. * 사용(유효)기간 : 제조일로부터 **개월 * 저장방법 : 기밀용기, 실온보관(1-30℃)									
수 율									
이론 생산량	실제 생산량	수 율(%)		확 인					
<del> </del>	66g	기준수율: ± %		<del> </del>					
				배관성					
특기사항: * 이론 생산량 : 봉독의 이론적 생산량 * 실제 생산량 : 동결건조 후에 생산된 봉독 분말의 양 * 수 율(%) : 실제 생산량/이론 생산량 X 100									
승 인	작성자	확인자	승인자	작성일	승인일	생 산	담당자	확인자	생산부서 책 임 자
	이정환	<del> </del>	배관성	2015. 07. 13	2015. 07. 22		홍 단출	이정환	배관성

경 동 제 약 주 식 회 사

KD.MREC.BR.봉독.1507-00(항생제등)

( 1/3 ) 페이지 중 ( 2 )

# 건열멸균기록서(충전도구)

제 품 명	제 조 번 호	작 업 일 자	
봉독	NA	2015.07.22	
1. 멸균내용			
품 명	수 량	작업자	
동결 트레이	1	정영희	
<del> </del>	<del> </del>		
<del> </del>	<del> </del>		
2. 멸균조건		장비명: 건열멸균기1 (DRS-1800) 관리번호: M0003	
	멸 균 기 준	가 동 조 건	작업자
T.I.C INLET	270 ℃	270℃	정영희
T.I.C OUTLET (멸 균 온 도)	250 ℃	250℃	
멸 균 시 간	1 시간	1hr	
3. 멸균기록			
멸균 시작시간	멸균 완료시간	멸균데이터	작업자
09:10	12:11		정영희
1. 멸균 후 온도기록지 부착할 것. 2. 멸균기 가동에 이상 ※ 특기사항: 없음			확인 받고
			정영희

경 동 제 약 주 식 회 사

KD.MREC.BR.봉독.1507-00(항생제동)

( / 3 ) 페이지 중 ( 5 )

2. 멸균조건		장비명: 건열멸균기1 (DRS-1800) 관리번호 : M0003	
	멸균기준	가동조건	작업자
T.I.C INLET	270 °C	→ 270°C	신영환
T.I.C OUTLET (멸균온도)	250 °C	→ 250°C	
멸균시간	1 시간	1시간	

3. 멸균기록			
멸균 시작시간	멸균 완료시간	멸균데이터	작업자
09:10	12:11		신영환
1. 멸균 후 온도기록지 부착할 것. 2. 멸균기 가동에 이상 ※ 특기사항 : 없음		하C 을 받고	
			신영환

KD.MREC.BR.봉독.150'

페이지 중 ( 5 )

# 습열멸균기록서(여과/충전도구)

제 품 명	제 조 번 호	작 업 일 자		
봉독	NA	2018.07.22		
1. 멸균내용				
품 명	수 량	품 명	수 량	작업자
여과세트 (9.2ml)	1	/		홍인환
여과호스	2			
비커 (5L)	1			
2. 멸균조건			장 비 명 : 습열멸균기1 (AC-1500) 관 리 번 호 : M0035	
		멸 균 기 준	가 동 조 건	작업자
온도 설정	자켓 온도	121.1℃	121.1℃	홍인환
	챔버 온도	121.1℃	121.1℃	
시간 설정	초기 진공 횟수	3 회	3회	
	멸균 시간	30 분	30분	
3. 멸균기록				
멸균 시작시간	멸균 완료시간	멸균데이터		작업자
10:21	10:54			홍인환
4. B.I(Biological Indicator) 시험결과				
시험구분	시점	시험결과	작업자	
B.I	멸균 후 B.I 48hr 이상 배양	2	정상	
C.I	멸균 후 C.I	2	정상	
1. 멸균후 온도기록서에 제품명, 제조번호, 가동일자를 작성하고 온도기록용지를 확인을 받고 부착할 것. 2. 멸균기 가동에 이상이 있을 시에는 반드시 그 사항을 기록할 것. 3. 멸균 전 B.I(Biological Indicator)를 밸리데이션된 지정된 위치에 놓았는지 확인할 것. 4. 멸균완료 후 C.I(Chemical Indicator)의 색 변화를 확인하여 멸균 공정 실시 여부를 확인할 것. 5. 멸균완료 후 B.I(Biological Indicator)를 48시간이상 배양한 다음 적합여부를 기록할 것.				
			확 인	제조공정담당자
				정상

경 동 제 약 주 식 회 사

KD.MREC.BR.봉독.1507-00(항생제동)

(13) 페이지 중 (6)



# 공정관리 기록서 (IPC Record)

결 재	담당	확인	승인
	이정환		
제 품 명	봉독	제 조 번 호	NA

## 1. 검사방법

항 목	기 준	방 법	비 고
액의 성상	황색의 맑은 액	육안검사	2차 여과 후
성상	황색의 분말	육안검사	동결 건조 후

## 2. 검사결과

검 사 일	항 목	결 과	비 고
2014년 07월 22일	액의 성상	황색의 맑은 액	2차 여과 후
2014년 07월 24일	성상	황색의 분말	동결 건조 후

## 3. 종합판정

판 정 일	2014년 07월 24일	종 합 판 정	적합
-------	---------------	---------	----

Fig. 51. 제조기록서

표준화된 제조를 위해서는 표준화된 설비를 사용해야 하며, 이를 위해서는 식약처의 밸리데이션 가이드라인에 따라 적격성 평가를 실시하여야 한다. 적격성 평가는 설계적격성평가(DQ), 설치적격성평가(IQ), 운전적격성평가(OQ), 성능적격성평가(PQ)가 있으며, 건조밀봉독 제조에 사용한 모든 설비는 식약처의 규정에 따라 실시하였다.

또한, 제품의 품질에 영향을 미치는 중요한 공정에 대해서는 공정 밸리데이션을 실시하여야 하며, 특별한 경우가 아니면 예측적 밸리데이션을 실시하게 되어있다. 본 연구에서는 식약처 규정에 적합한 예측적 밸리데이션 방법에 따라 표준화된 건조밀봉독을 제조하고 있으며, 예측적 밸리데이션은 연속된 3 bat 생산이 필요하며 현재 3차 배치 실험 중으로 2017년 9월 기준으로 6개월까지 실시가 완료된 상태이다.

제조된 건조밀봉독의 품질검사를 위해서는 품질검사 방법이 적합하다는 시험방법 밸리데이션을 실시하여야 하는바 식약처의 시험방법 밸리데이션 규정에 적합한 방법으로 원료 규격이 설정된 화학적 합성의약품 등에 대한 확인시험, 순도시험 중 불순물의 정량 및 한도시험, 유효성분 또는 기타 특정 성분에 대한 함량 또는 역가시험, 함량균일성 시험, 용출시험 중 분석법, 시험방법 밸리데이션 파라미터(Parameter)로는 특이성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 직선성, 범위 및 완전성이 있고 각 시험방법의 목적에 맞는 밸리데이션 파라미터를 선정·평가 하였다.

제조에 사용된 설비가 세척이 되지 않아서 오염이 되지 않도록 세척 밸리데이션을 실시하게 되어 있는바 건조밀봉독의 생산 전에 사용할 설비의 세척 및 사용 후 건조밀 봉독이 다른 의 약품을 오염시키지 않도록 하는 적합한 세척방법을 연구하였으며, 이렇게 개발된 세척방법이 적합한지 식약처의 세척 밸리데이션 규정 따라 실시하였다. 세척 밸리데이션은 연속 제조한 3 개 제조단위에 대하여 실시하여야 한다.

## (17) 제품에 대한 기준 및 시험법 작성

건조밀봉독의 기시험 작성은 의약품에 관한 기준 및 시험방법<sup>36)</sup>(식품의약품안전처 고시) 및 원료의약품 등록에 관한 규정(식품의약품안전처 고시)에 따라 진행하였으며, 시험방법 밸리데이션을 실시하여야 하는바 식약처의 시험방법 밸리데이션 규정에 적합한 방법으로 원료 규격이 설정된 화학적 합성의약품 등에 대한 확인시험, 순도시험 중 불순물의 정량 및 한도시험, 유효성분 또는 기타 특정 성분에 대한 함량 또는 역가시험, 함량균일성 시험, 용출시험 중 분석법, 시험방법 밸리데이션 파라미터(Parameter)로는 특이성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 직선성, 범위 및 완전성이 있고 각 시험방법의 목적에 맞는 밸리데이션 파라미터를 선정·평가 하였다.

설정된 기준 및 시험방법은 아래 표(Table 21)와 같으며, 시험방법 밸리데이션으로 적합성을 확인하였다.

Table 21. 설정된 기준 및 시험방법

시험항목	기 준	BVM-1501	BVM-1601
성 상	방향성의 황갈색 분말	방향성의 황갈색 분말	방향성의 황갈색 분말
확인시험	1) 단백질 확인.	일치	일치
	2) 멜리틴확인.	일치	일치
	3) 포스포리파제의 확인	일치	일치
순도시험	1) 중금속 : 10ppm 이하	한도 내	한도 내
건조감량	13.0%이하	6.4%	5.5%
함량	1)멜리틴의정량 40%이상	61.6%	56.5%
	2) 총 단백질 정량 53.0%이상	72%	69%
안전성 시험	이상한 증상이 나타나지 않아야 한다.	이상증상없음	이상증상없음
히스타민 시험	히스타민 시험법에 적합함	적합	적합
항원성 시험	기준에 적합함	적합	적합

## (18) 제품제형 검토 및 제품 제조 공정

### 1. 제품 제형 및 배합성분 검토

- 대한약전 제제총칙에 분류된 40개의 제제 중 적용 가능 제형인 겔제, 액제, 크림제 총 3가지 제형을 검토하였다.

가. 액제: 액상의 외용제로서 이 제제에는 보존제, 안정제, 완충제등의 첨가제를 검토하였다.

구분		원료	배합목적
		건조밀봉독	주원료
		D-판테놀	기제
		부틸히드록시아니솔	기제
		토코페롤아세테이트	기제
		농글리세린	습윤제
		에탄올	용제
		폴리옥시(10)올레일에테르	유화제
		피브이피 브이에이공중합체	-
		시트르산	pH 조절제
		정제수	용제

나. 겔제: 액제를 침투시킨 분자량이 큰 유기분자로 이루어진 외용의 반고형제로서, 주성분을 액체에 용해 또는 현탁시킨 다음, 분자량이 큰 유기분자를 넣어 잘 혼합하고 겔화제를 넣어 반고형으로 만들었다. 필요에 따라 보존제와 안정제를 추가하였다.

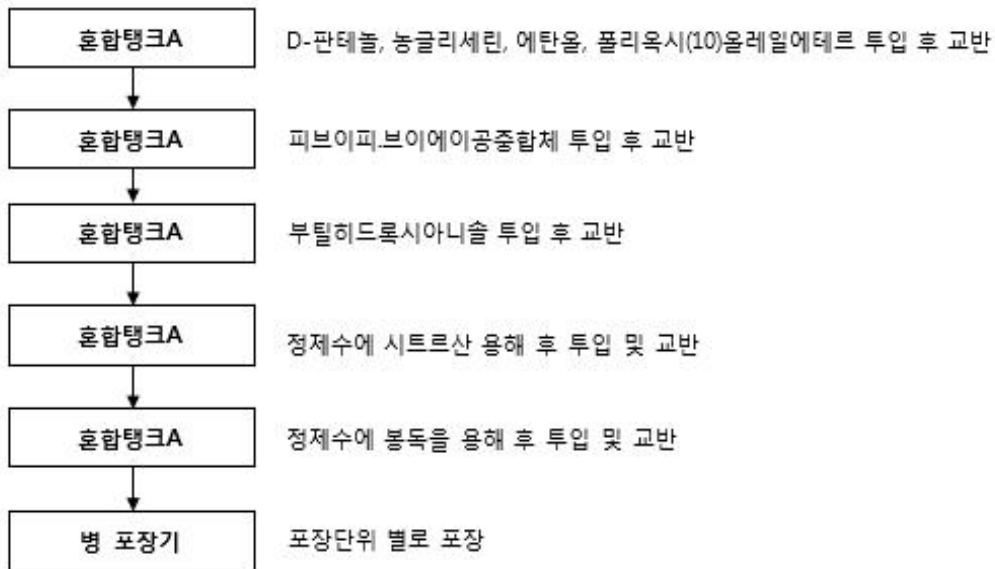
구분		원료	배합목적
		건조밀봉독	주원료
		에테트산나트륨	유화제
		농글리세린	습윤제
		이소프로판올	용해보조제
		카르보머940	기제
		트롤아민	점조제
		라벤다유	착향제
		정제수	용제

다. 크림제: 크림제는 피부에 쉽게 바를 수 있는 유중수형 또는 수중유형의 반고형 유제인 외 용제로서, 연고제의 제법에 따라 만들었다.

구분	원료	배합목적
	건조밀붕독	주원료
	미리스트산이소프로필	기제
	프로필렌글리콜	기제
	유동파라핀	기제
	카보머940	기제
	글리세린모노스테아레이트	안정화제
	폴리소르베이트60	유화제
	N-메칠피로리돈	용제
	파라옥시벤조산메틸	보존제
	정제수	용제

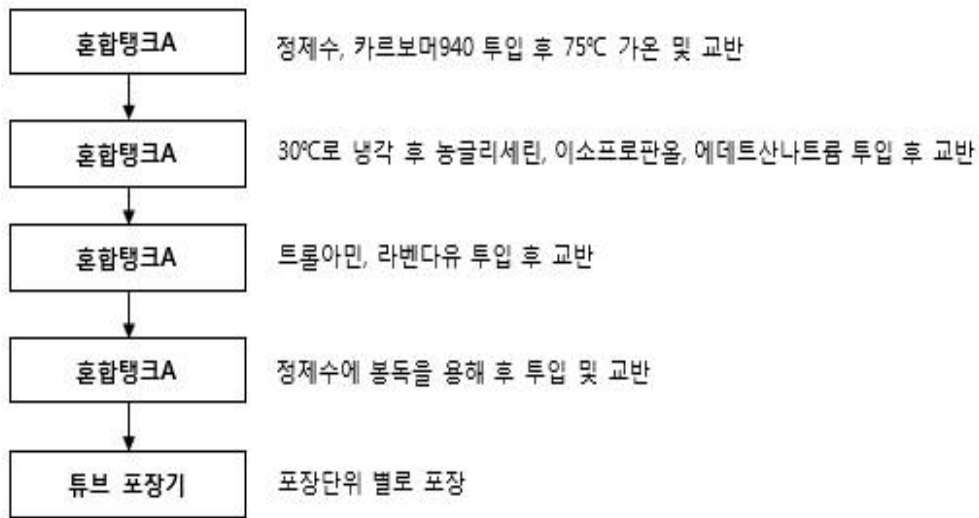
## 2. 제조 공정 확립

### 가. 액제



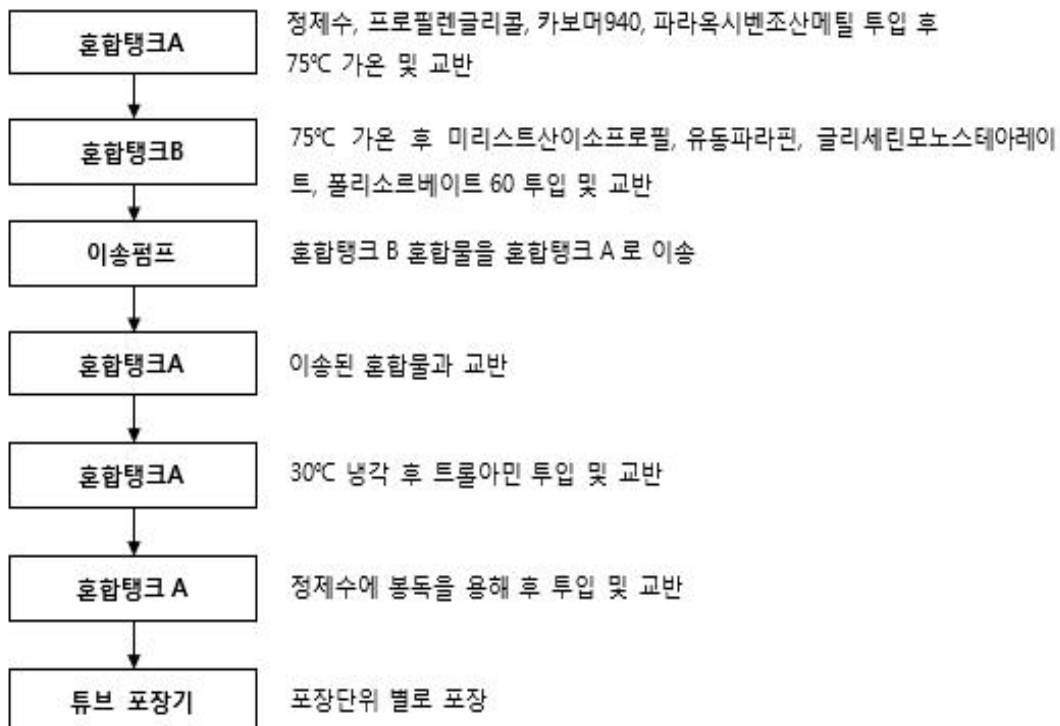
## 나. 겔제

### 제조공정(겔제)



## 다. 크림제

### 제조공정(크림제)



### 3. 제형별 제품 제조 및 시험법 밸리데이션

#### 가. 제형별 샘플 준비

- 위의 배합성분과 제조공정을 바탕으로 농도와 제형별로 0.01%, 0.05% 액제, 크림제, 겔제 시제품을 제조하였고 시제품을 이용하여 제형 결정, 선택된 제형에 대한 분석법 검증 및 안정성 평가를 진행하였다.




액제	농도	0.01%, 0.05%	
	성상	무색의 액	
	포장형태	스프레이타입	
겔제	농도	0.01%, 0.05%	
	성상	수용성 투명 겔	
	포장형태	연고튜브타입	
크림제	농도	0.01%, 0.05%	
	성상	유백색 크림	
	포장형태	연고튜브타입	

Fig. 52 농도 및 제형별 시제품

#### 나. 제형 결정

- 크림제와 겔제의 경우 두피에 흡수가 빠르지 않고 hair에 의해 발림성이 좋지 않다는 단점이 있어 두피에 흡수가 가장 뛰어나며 사용자가 제품을 두피에 도포하기 편한 액제 제형을 선택하였다. 또한 0.01% 경우 실제 생산에서 잘 사용되지 않는 낮은 농도로 대량 생산시 함량 미달의 위험이 있어 0.01% 대신 0.05% 농도의 액제 제품을 최종 선택하였다. 따라서 최종 결정된 제품에 대한 시험법 밸리데이션을 진행하였고 검증된 시험법으로 안정성 확인을 위한 장기보존시험을 진행하였다.


#### 다. 의약외품으로서의 정제봉독 헤어 에센스(BVP-1) 제조

- 유일팜테크의 정제봉독을 이용하여 태극제약(주)에 제조를 의뢰하였고 제조 후 제공받은 정제봉독 헤어 에센스로 시험법 밸리데이션 및 안정성 평가를 진행하였다.

라. 제품 분석조건 설정 및 시험법 밸리데이션

- 기존 원료분석과 동일한 분석조건으로 분석한 경우 Placebo(주원료인 멜리틴을 제외한 부형제로만 구성)에서 검출되는 피크들로 인해 분석이 어렵고 결과에 신뢰도가 좋지 않아 분석조건을 다음과 같이 변경하기로 하였다. 이렇게 변경 분석 조건에 대해 시험법 밸리데이션을 진행하여 검증하고자 하였다(Table 22.).

Table 22. 변경된 분석 조건

	기존 원료분석 조건	변경 분석 조건
Column	Kinetex 2.6 $\mu$ m XB-C18 100Å, 75 × 4.6 mm	Jupiter 4 $\mu$ m proteo 90Å C12, 150 × 4.6 mm
Injection volume	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Oven temperature	30°C	38°C
Flow rate	0.7 mL/min	1.2 mL/min
Mobile phase	0.2% TFA in water : 0.2% TFA in ACN = 56.5 : 43.5	0.2% TFA in water : 0.2% TFA in ACN = 58 : 42
Wavelength	214 nm	214 nm



(1) 실시항목 및 기준

실시항목 및 기준은 의약품등 벨리데이션 실시에 관한 규정<sup>37)</sup> 및 의약품등 시험방법 벨리데이션 가이드라인<sup>38)</sup>에 따라 진행하였다.

No.	항목		기준
1	시스템적합성		피크면적의 상대표준편차는 2.0% 이하 피크유지시간의 상대표준편차는 1.0% 이하
2	특이성		멜리틴 검출시간에 영향을 주는 인자가 없어야 한다.
3	직선성		상관계수( $R^2$ )=0.995 이상
4	정확성		회수율 평균 : 100 ± 2.0%
5	정밀성	반복성	상대표준편차 3.0% 이하
		실험실내 정밀성	상대표준편차 3.0% 이하
6	정량한계		최소 범위 이하
7	검출한계		최소 범위 이하

(2) 방법

(가) 시스템적합성

- 멜리틴 표준품 5 mg을 달아 물을 넣어 10 mL로 한 표준액을 6회 반복 분석하였다.

(나) 특이성

- 표준액은 멜리틴 표준품 5 mg을 달아 물을 넣어 10 mL로 하였고 Placebo 용액은 Placebo용액 적당량을 취하여 0.45 μm 멤브레인필터로 여과한 액을 사용하였다. 검액은 멜리틴 표준품 5 mg을 취하여 Placebo용액으로 10 mL가 되도록 표선하여 교반한 후, 0.45 μm 멤브레인필터로 여과한 액을 사용하였다.

(다) 직선성

- 시험농도의 20%, 40%, 80%, 100%, 120%에 해당하는 5농도의 표준액을 조제하여 분석조건으로 시험하였다(100, 200, 400, 500, 600 ppm).

(라) 정확성

- 시험농도의 40%, 80%, 100%에 해당하는 3 농도의 Spiked sample 용액을 조제하여 분석하였다.

(마) 정밀성

- 정확성과 동일하게 40%, 80%, 100%에 해당하는 농도의 분석샘플을 조제하여 3회 반복 분석하였다.

(바) 정량한계, 검출한계

- 직선성 시험의 검량선에서 표준편차( $\sigma$ )와 기울기(s)를 이용하여 계산식에 따라 구하였다.
  - ① 정량한계 =  $10 \sigma / s$
  - ② 검출한계 =  $3.3 \sigma / s$

(3) 결과 및 고찰

(가) 시스템적합성

- 봉독의 주성분인 멜리틴의 분석법을 Validation 하기 위해 시스템적합성으로 시스템의 적합성을 확인하였다. 분석 시 표준액으로 사용하는 농도인 멜리틴 500 ppm을 6번 반복하여 분석하였을 때, 멜리틴 피크 면적값에 대한 상대표준편차가 0.83%로 나타났고, Retention Time에 대한 상대표준편차는 0.38%로 우수한 결과를 얻었다 (Fig. 53, Table 23).

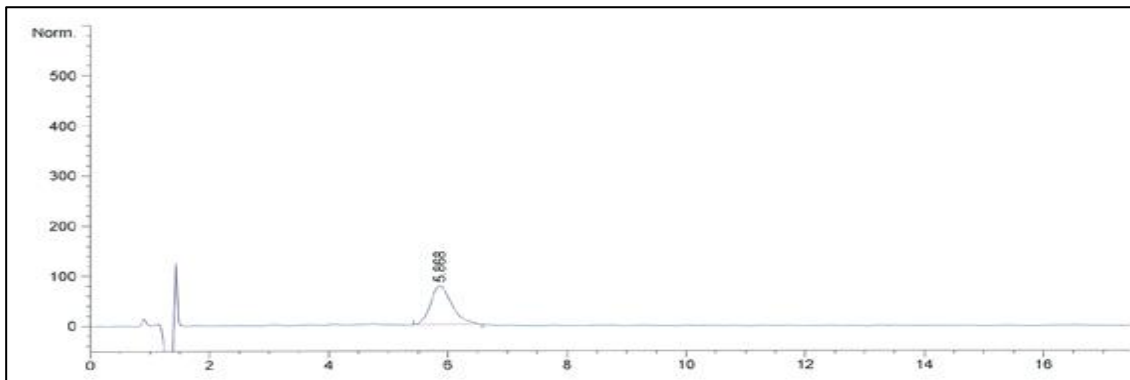


Fig. 53 시스템적합성 분석 크로마토그램

Table 23. 시스템적합성 시험 결과

① 면적

농도 (ppm)	검체		평균	표준편차	상대표준편차
	측정회수	Peak Area			
500	1	1928.59082	1930.93	15.99	0.83
	2	1904.87537			
	3	1948.26221			
	4	1938.95142			
	5	1921.87292			
	6	1943.05627			

② RT

검체		RT	평균	표준편차	상대표준 편차
농도 (ppm)	측정회수				
500	1	5.868	5.885	0.02	0.38
	2	5.848			
	3	5.887			
	4	5.898			
	5	5.902			
	6	5.906			

(나) 특이성

- 불순물, 분해물, 배합 성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는지를 보기위하여 특이성 분석을 실시하였다. 특이성 분석 결과 5.840분대에 멜리틴 peak가 나타났으며 Blank, 이동상, Placebo를 분석하였을 때 동일한 RT에 어떤 피크도 나타나지 않음을 확인하였다. 또한 Placebo에 멜리틴을 Spiking하여 분석하였을 때 동일한 RT에서 면적값이 큰 차이 없이 검출되었다. 따라서 특이성 분석 결과 멜리틴 검출시간에 영향을 주는 인자가 없음이 확인되었다 (Fig. 54).

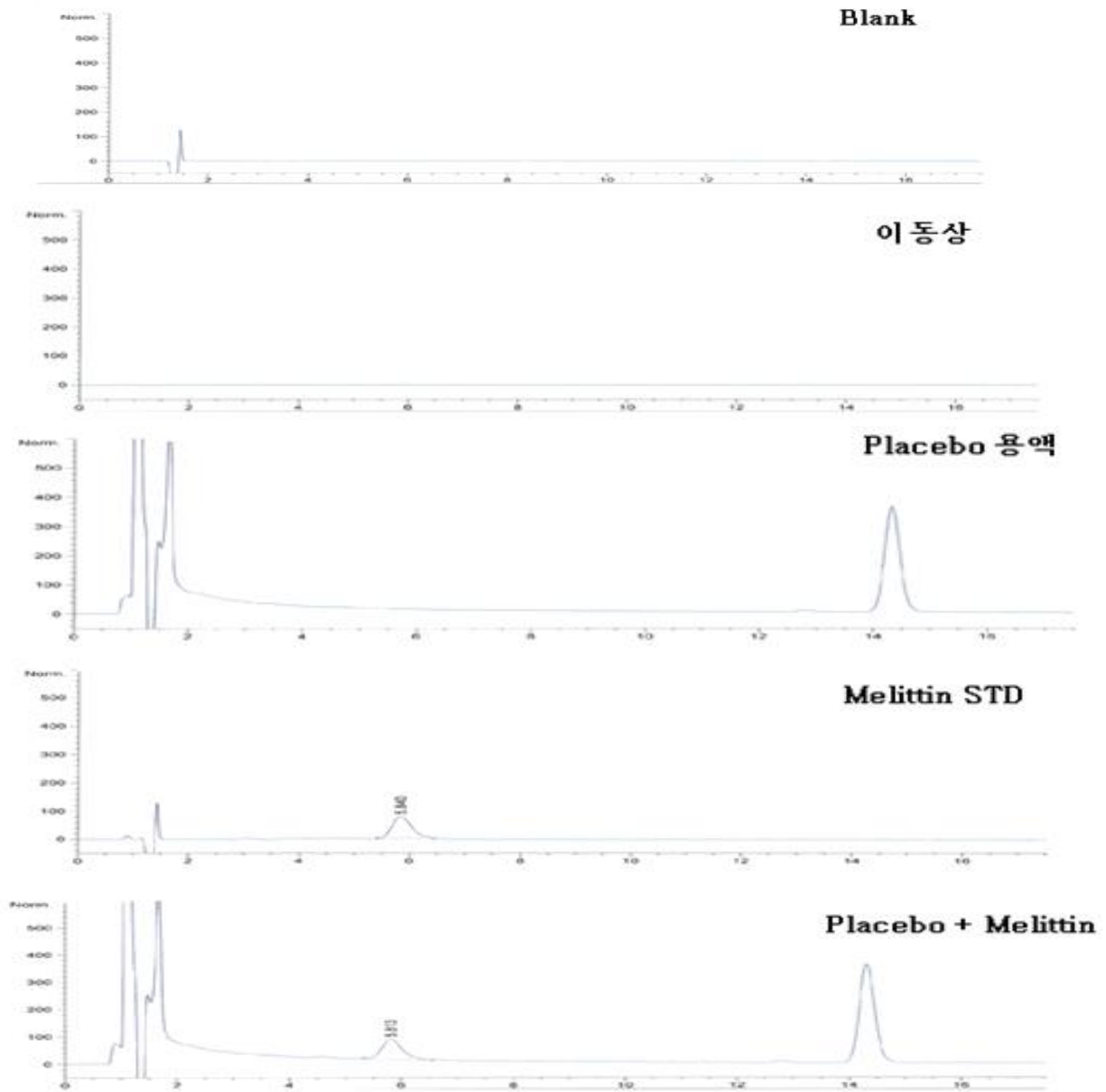


Fig. 54. 특이성 분석 크로마토그램

(다) 직선성

- 멜리틴의 양(또는 농도)에 비례하여 일정 범위 내에서 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는지를 확인하기 위해 직선성 분석을 실시하였다. 멜리틴의 직선성 농도범위를 100~600 ppm의 범위에서 분석하였고 면적비를 이용한 검량선으로 상관계수  $r^2$  을 구하여 양호한 직선성을 나타내는지 확인하였다. 농도 범위에서의 직선성 용액 (n=3)을 측정한 결과 상관계수  $R^2$  값이 0.9966~0.9991이었으며 평균 0.9983으로 기준에 적합하였다(Fig. 55).

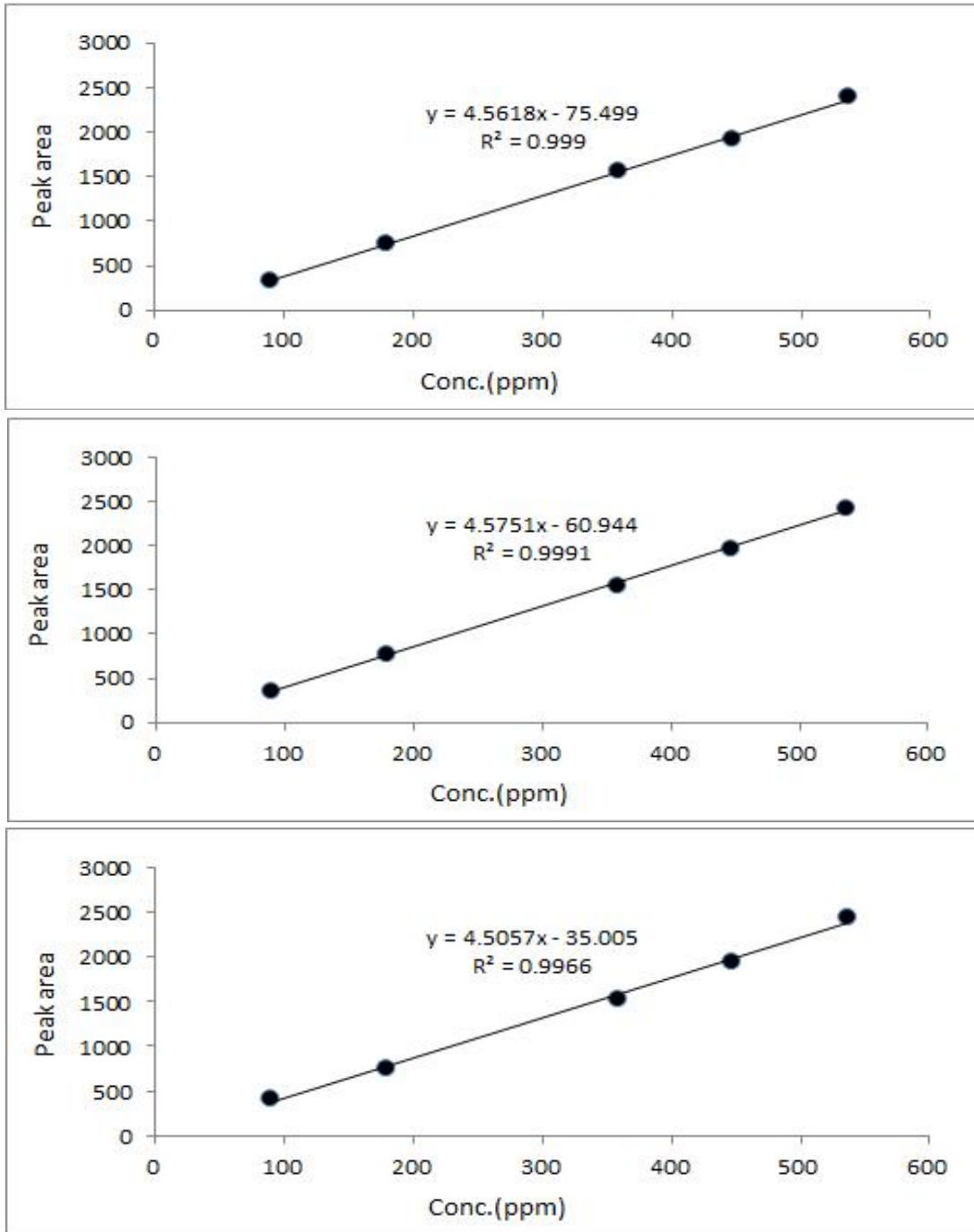


Fig. 55. 직선성 분석 결과 검량선(n=3)

(라) 정확성

- 정확성이란 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 말하는 것으로 Placebo용액에 알고 있는 농도의 멜리틴을 spike하여 확인하였으며 멜리틴의 회수율을 구하여 정확성을 확인하였다. 최종 검액이 200, 400, 500 ppm의 멜리틴을 함유하도록 제조한 검액(n=3)을 분석하여 회수율을 구한 결과가 적합하게 나타남을 확인하였다. 200 ppm 검액의 경우 회수율이 99.35 ~ 101.8%, 400 ppm 검액의 경우

회수율이 98.5~100.8%, 500 ppm 검액의 경우 회수율이 99.4~100.8%로 확인되었다 (Table 24).

Table 24. 정확성 시험 결과

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	참값 (ppm)	회수율 (%)	Difference (%)
200	179	771.83990	182.29	101.8	1.510
		770.18372	181.93	101.6	1.146
		752.89374	178.13	99.5	2.656
평균값		764.97245	180.78	101.0	1.771
표준편차		10.49	2.31	1.29	0.79

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	참값 (ppm)	회수율 (%)	Difference (%)
400	358	1575.65527	359.05	100.3	1.536
		1583.37463	360.75	100.8	3.233
		1546.98450	352.75	98.5	4.769
평균값		1568.67147	357.52	99.9	3.179
표준편차		19.17	4.22	1.18	1.62

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	참값 (ppm)	회수율 (%)	Difference (%)
500	448	1973.71033	446.59	99.8	0.898
		1964.78662	444.62	99.4	2.860
		1994.88184	451.24	100.8	3.758
평균값		1977.79293	447.48	100.0	2.505
표준편차		15.46	3.40	0.76	1.46

구분	회수율(%)	Difference
전체 평균값	100.29	2.485
전체 표준편차	1.09	1.31
표본의 크기	9	9
95% 신뢰구간	99.45      101.13	

(마) 정밀성

① 반복성

- 반복성이란 동일 실험실내에서 동일한 시험자가 동일한 장치와 기구, 동일제조 번호와 시약, 기타 동일 조작 조건하에서 균일한 검체로부터 얻은 복수의 검체를 짧은 시간차로 반복분석 실험하여 얻은 측정값들 사이의 근접성이며 검액 내 멜리틴의 반복성을 확인하기 위하여 200, 400, 500 ppm 농도의 검액을 3번 반복 주입하여 측정하였다. 측정결과 피크면적에 대한 상대표준편차(%RSD)가 0.78 ~ 1.37로 확인되었다(Table 25).

Table 25. 정밀성 시험 중 반복성 결과

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	평균값	표준편차	상대표준편차 (%RSD)
200	179	771.83990	764.97245	10.49	1.37
		770.18372			
		752.89374			

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	평균값	표준편차	상대표준편차 (%RSD)
400	358	1575.65527	1568.67147	19.17	1.22
		1583.37463			
		1546.98450			

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	평균값	표준편차	상대표준편차 (%RSD)
500	448	1973.71033	1977.79293	15.46	0.78
		1964.78662			
		1994.88184			

② 실험실내 정밀성

- 동일 실험실내에서 다른 실험일, 다른 시험자, 다른 기구 또는 장비 등을 이용하여 분석 실험하여 얻은 측정값들 사이의 근접을 실험실내 정밀성이라고 하며 다른 실험일, 다른 시험자로 멜리틴을 분석한 결과 피크면적에 대한 상대표준편차(%RSD)가 0.39 ~ 2.53%로 확인되어 기준에 적합하였다(Table 26).

Table 26. 정밀성 시험 중 실험실내 정밀성 결과

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	평균값	표준편차	상대표준편차 (%RSD)
200	179	795.33588	791.80601	20.39	2.58
		810.20007			
		769.88208			
400	358	1502.36755	1504.21293	5.81	0.39
		1499.55237			
		1510.71887			
500	448	1924.50488	1944.48828	17.49	0.90
		1957.01172			
		1951.94824			

(바) 정량한계, 검출한계

- 직선성 결과에 따라 표준편차( $\sigma$ ) 20.51, 기울기(s) 4.55로 측정되었다. 정량한계란 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량을 말하는 것으로 계산결과 45.1 ppm으로 확인되었고 검출한계란 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 말하며 결과 14.9 ppm으로 확인되었다.
- 모든 밸리데이션 항목에서 기준에 적합한 결과를 얻어 해당 분석조건으로 정제봉독 헤어 에센스(BVP- I)제품에 대한 안정성 시험을 진행하였다.

마. 정제봉독 헤어 에센스(BVP- I) 안정성 시험 연구

- 시제품의 안정성을 확인하기 위해 의약품등의 안정성시험 기준<sup>39)</sup>에 따라 가속조건(온도 40°C, 상대습도 75%, 항온항습기 보관)에서 24일간 BVP- I 제품을 보관한 후 멜리틴 함량을 측정하였다. 가속조건에서의 안정성 시험 결과 지표성분인 멜리틴이 기준 이하로 감소하는 결과를 얻었다. 이는 멜리틴 성분 자체가 높은 온도에 불안정하기 때문인 것으로 확인되었고 가속시험을 중단하였다.
- 이에 장기보존조건(온도 25°C, 상대습도 60%, 항온항습기 보관)에서의 안정성 시험만 6개월간 진행하였다. \* 시험기간 : 2015.11.18. ~ 2016.04.18. (총 6개월)



(1) 방법

(가) 성상

- 6개월 후 육안 평가하여 사진으로 기록하였다.

(나) 함량

- 멜리틴 표준품 5 mg을 달아 물을 넣어 10 mL로 한 액을 표준액으로 사용하였다 (0.5 mg/mL). 검액은 일정량을 취하여 0.45  $\mu$ m 멤브레인필터로 여과하여 사용하였으며 분석조건은 밸리데이션 분석조건과 동일하게 진행하였다.

(2) 시험 결과 및 고찰

(가) 성상

- 정제봉독 헤어 에센스(BVP- I)는 무색의 액에서 6개월 후 미황색으로 성상이 미미하게 변화하였다(Fig. 56).

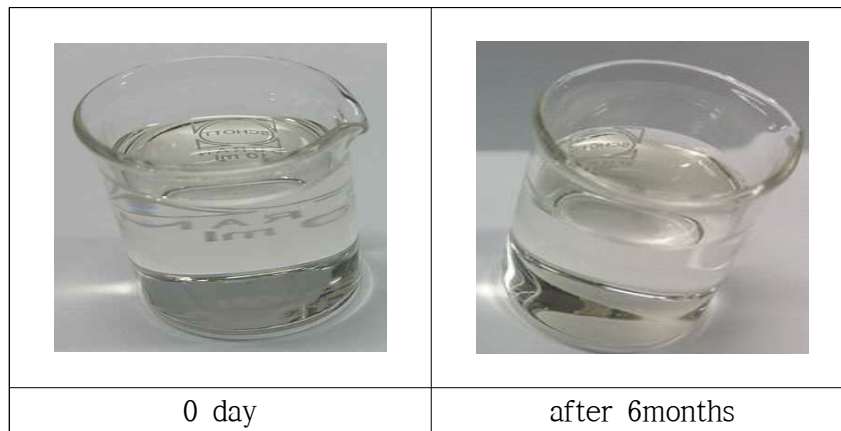


Fig. 56. 정제봉독 헤어에센스(BVP- I)의 성상 변화

(나) 함량

- 장기보존조건에서 6개월간 정제봉독 헤어에센스(BVP- I)에 대한 안정성을 확인하였다. BVP- I 제품 분석 조건으로 멜리틴 함량을 HPLC로 분석하였을 때 시간이 지남에 따라 함량 값이 다소 감소하는 경향을 보였으나 모두 기준에 만족하는 결과를 보였다 (Table 27, Fig. 57). 따라서 상온에서 정제봉독 헤어에센스(BVP- I)를 보관하였을 때 6개월 동안 비교적 안정하다는 결론을 내릴 수 있었다.

Table 27. 정제봉독 헤어에센스(BVP- I)의 멜리틴 함량 안정성 시험 결과

No.		함량(%)	평균(%)
1차	1	53.93	54.63
	2	56.37	
	3	53.61	
2차	1	56.07	53.43
	2	52.04	
	3	52.17	
3차	1	52.08	52.07
	2	51.72	
	3	52.40	
4차	1	49.95	50.09
	2	49.75	
	3	50.55	
5차	1	48.88	51.01
	2	50.33	
	3	53.82	
6차	1	52.87	50.44
	2	48.19	
	3	50.26	

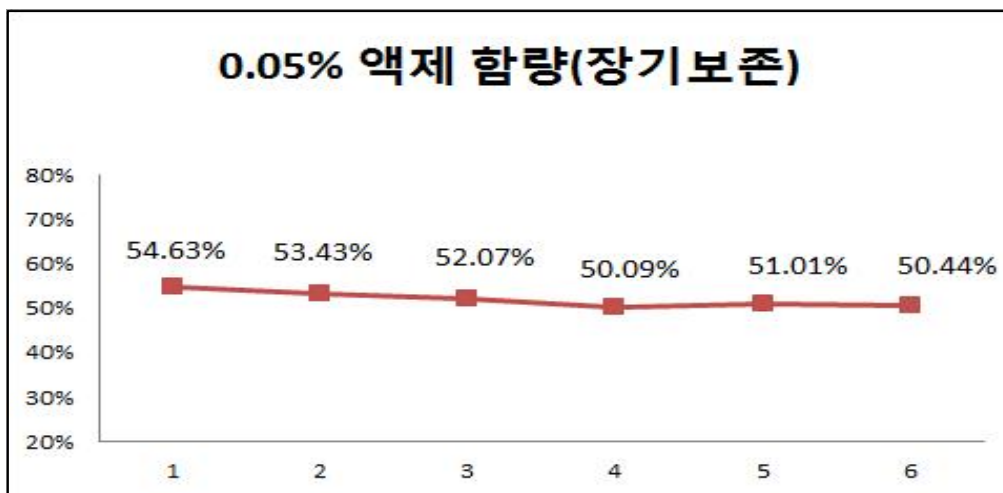



Fig. 57. 정제봉독 헤어에센스(BVP- I)의 멜리틴 함량 변화 그래프

## (19) 기능성화장품으로의 제품 연구


탈모방지제품이 의약외품에서 기능성화장품으로 변경됨<sup>40)</sup>에 따라 원료 업체를 의약품 원료 업체인 유일팜테크에서 화장품 원료로 사용가능한 봉독 제조 업체인 청진바이오텍으로 변경하였다. 제품 제조 업체 또한 의약품 제조업체에서 화장품제조업체로 변경하여 제조 의뢰하였다.

### 1. 청진바이오텍 원료 품질 확인

- 봉독 제조업체인 청진바이오텍에서 제품 제조를 위한 정제봉독을 구입하였다.






**CHUNG JIN BIOTECH CO., Ltd.**  
A Leading World-Class Brand in Purified Bee Venom and Bee Venom collector

### CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product :	Purified Bee Venom	Buyer : 고려은단
Product Code :	PBV	Exp. Date : 2019-05-15
Batch No. :	201605	Date of Issue : 2016-12-07
Lot No. :	20160516	
Date of Manufacture :	2016-05-16	
Date of Analysis :	2016-05-23	
Country of Origin :	Republic of Korea	Certified By : 

Test	Specification	Method	Result
<b>Physical Assay</b>			
Appearance	Clear powder	Visual	Pass
color	Beige	Visual	Pass
Solubility	Soluble in water		Pass
Density	1.1-1.4		1.13
pH Value	5.1~5.5	Orion pH meter	5.26
<b>Chemical Assay</b>			
Melittin	45~65 %	HPLC	65.80%
Apamin	2.0~3.0 %	HPLC	2.74%
PLA <sub>2</sub>	11.0~13.0 %	HPLC	12.27%
Heavy Metals	≤ 1.0 ppm	AOAC	Conform
Total Ash	≤4.0 %	AOAC	Conform
<b>Microbial Assay</b>			
Aerobic Plate Count	Negate	Petrfilm 3M	Conform
Mold & Yeast	Negate	Petrfilm 3M	Conform
<i>S. aureus</i>	Negate	Petrfilm 3M	Conform
Histamine content		Histamine Enzymatic assay kit	0.175ppm (0.0175%)
Endotoxin test*	<0.25 EU/mL	EndoSafe®-PTS	Conform

The Endosafe®-PTS Endotoxin test utilizes existing FDA-licensed LAL formulation.

ISO 9001, ISO 14001

**F4, 15 Sungan2-gil, Sangrok-Gu, Ansan-Si, Gyeonggi-Do, Korea**  
 Phone: 82. 31. 409. 3707 FAX: 82. 31. 409. 3709  
 E-mail: younan99@biovenom.com Website: www.biovenom.com

**\* Endotoxin result**

The Endosafe®-PTS Endotoxin test utilizes existing FDA-licensed LAL formulation.

```
***** ENDOSAFE Test Record *****
V7.12C 8/25/2011
DateTime: ..... 01/01/98 @ 01:01:01AM
Device: ..... 7078
OperatorID: ..... CJB
Cartridge: ..... Endotoxin
Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C
Method: ..... KX-122
Cartridge Lot#: ..... 3294241
Cartridge Cal Code: ..... 427767245094
Range: ..... 0.5-0.005
Range Time: ..... Sec: 277-1072
Onset Times: ..... 948 672 978 294
Slope: -0.294 ..... Intercept: +2.351
Dilution: ..... 10
Sample Lot: ..... 20160516
Sample ID: ..... PBV 1HG/HL
Sample Rxn Time CV: ..... 2.2% Pass
Spike Value: ..... 0.005 EU/mL
Spike Rxn Time CV: ..... 5.0% Pass
Spike Recovery: ..... 98% Pass
Test Suitability: ..... Pass
Sample Value: ..... 0.070 EU/mL
```

Certified By :  \_\_\_\_\_

Date of Issue : 2016-12-07



F4, 15 Sungan2-gil, Sangrok-Gu, Ansan-Si, Gyeonggi-Do, Korea  
Phone: 82. 31. 409. 3707 FAX: 82. 31. 409. 3709  
E-mail: younan99@biovenom.com Website: www.biovenom.com

- 본 연구팀에서 해당 원료의 함량을 평가하였을 때 66.14, 65.16, 65.33%로 평균 65.55%로 멜리틴 함량이 측정되었다. 이는 청진바이오텍에서 제공한 성적서상의 결과 65.80%와 유사하게 확인되어 해당 원료를 제품 제조를 위해 사용하였다.

2. 기능성화장품으로서의 정제봉독 헤어 에센스(BVP-II) 제조

- 청진바이오텍에서 구입한 원료를 제공하여 스킨사이언스랩에서 정제봉독 헤어 에센스(BVP-II)를 제조 의뢰하였다. 제품의 배합성분은 Fig. 58과 같고 불투명한 액제 제품을 제공받아 시험법 밸리데이션 및 안정성 평가에 사용하였다.

3. 제품 분석조건 설정 및 시험법 밸리데이션(method validation)

- 기존 원료 및 BVP-I 제품 시험조건으로 분석하였을 때 Placebo peak에 의한 영향으로 멜리틴 검출이 불가능하여 분석조건을 재설정하였고 시험법 밸리데이션을 실시하여 해당 분석법에 대한 타당성을 검증하기 위하여 다음과 같은 일련의 과정을 진행하였다.


	성분명	
	정제수	곰솔잎추출물
	베르가모트열매오일	하수오추출물
	토코페릴아세테이트	카퍼트리펩타이드-1
	폴리소르베이트80	하이드롤라이즈드콜라겐
	봉독	1,2-헥사디올
	멘톨	나이아신아마이드
	에탄올	시트릭애씨드
	디포타슘글리시리제이트	콩추출물
	부틸렌글라이콜	살리실릭애씨드
	인디언구스베리추출물	실리카
	검정콩추출물	오죽추출물
	피이지-60하이드로제네이티드캐스터오일	

Fig. 58. 정제봉독 헤어에센스(BVP-II)의 성상 및 배합성분

가. 분석조건 설정

- 원활한 분리를 위해 분석컬럼을 ZORBAX Eclipse plus C18, 250×4.6mm,5µm(C18)으로 변경하였으며 이동상의 조성을 isocratic system에서 Gradient system으로 변경하였다.

Column	ZORBAX Eclipse plus C18, 250 x 4.6mm,5µm(C18)
Injection volume	20µL
Oven temperature	40° C
Flow rate	0.8 mL/min
Mobile phase	Gradient system % A - TFA : water (0.2 : 99.8, v/v) % B - TFA : ACN (0.2 : 99.8, v/v)
Wavelength	210nm

- 다음은 이동상 Gradient 조성 비율이다.

Time	% A	% B
0	70	30
3	70	30
20	50	50
25	40	60
38	40	60
39	70	30
50	70	30

나. 밸리데이션 실시 항목 및 기준

No.	항목	기준
1	시스템적합성	피크면적의 상대표준편차는 2.0% 이하 피크유지시간의 상대표준편차는 1.0% 이하
2	특이성	멜리틴 검출시간에 영향을 주는 인자가 없어야 한다.
3	직선성	상관계수( $R^2$ )=0.995 이상
4	정확성	회수율 평균 : $100 \pm 2.0\%$
5	반복성	상대표준편차 3.0 % 이하
	실험실내정밀성	상대표준편차 3.0 % 이하
6	정량한계	최소 범위 이하
7	검출한계	최소 범위 이하

다. 밸리데이션 항목별 시험 방법

(1) 시스템적합성

- 멜리틴 표준품 25 mg을 정밀하게 달아 물을 넣어 25 mL로 한 액을 표준원액으로 사용하였다. 이 액 3 mL를 취하여 물을 넣어 10 mL로 한 표준액을 6회 반복 분석 하였다.

(2) 특이성

- 위의 표준원액을 3 mL 취하여 물을 넣어 10 mL로 한 액을 표준액으로 하고 시험 샘플을 적당량 취하여 0.45  $\mu$ m 멤브레인필터로 여과한 액을 검액으로 하였다. 또한 멜리틴 표준품 3 mg을 정밀히 달아 Placebo용액을 넣어 10 mL로 한 액을 특이성 용액으로 사용하였으며 공시험액, 이동상, Placebo용액, 표준액, 검액, 특이성용액을 1회씩 주입하여 특이성을 확인하였다.

(3) 직선성

- 시험에 사용되는 5개 농도의 용액은 위의 표준원액을 이용하여 조제하였다. 50, 75, 100, 125, 150%에 해당하도록 1.50, 2.25, 3.00, 3.75, 4.50 mL의 표준원액을 취 하여 10 mL 용량플라스크에 넣고 물로 표선하여 조제(150, 225, 300, 375, 450

ppm) 하였으며 5개 농도의 용액을 3회 반복 측정하여 직선성을 확인하였다.

(4) 정확성

- 멜리틴 표준품 25 mg을 정밀하게 달아 Placebo용액을 넣어 50 mL로 한 액을 정확성 표준원액으로 하였다. 정확성 표준원액을 각각 2.25, 3.00, 3.75 mL를 5 mL 용량플라스크에 넣고 Placebo용액으로 표선하여 조제하였으며 3농도의 정확성용액을 각각 3회 제조하여 정확성을 확인하였다.

(5) 정밀성

- (4)항의 정확성용액과 같은 방법으로 정밀성용액을 조제하였고 반복성은 정확성 결과로 같음하고 실험실내 정밀성은 농도별 정밀성용액을 각각 3회 측정하여 확인하였다.

(6) 정량한계, 검출한계

- 직선성 시험의 검량선에서 도출된 표준편차( $\sigma$ )와 기울기(s)를 이용하여 정량한계와 검출한계를 계산하였다.

라. 결과 및 고찰

(1) 시스템적합성(System suitability)

- 분석 시 표준액으로 사용하는 농도인 300 ppm의 멜리틴 용액을 6회 반복주입하여 면적값과 Retention time을 확인하였다. 멜리틴 면적값에 대한 상대표준편차가 0.63%로 측정되었고 Retention time에 대한 상대표준편차가 0.09%로 우수하게 나타났다 (Fig. 59, Table 28).

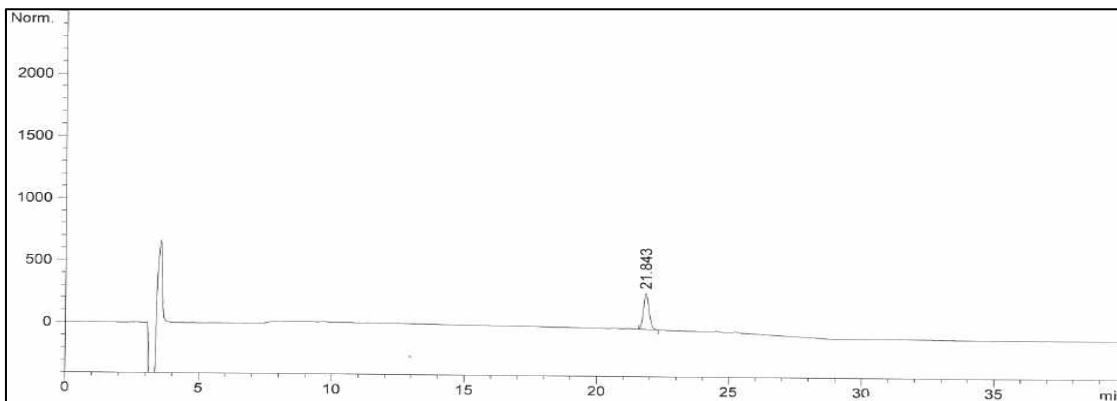


Fig. 59. 시스템적합성 분석 크로마토그램

Table 28. 시스템적합성 시험 분석 결과

① 면적

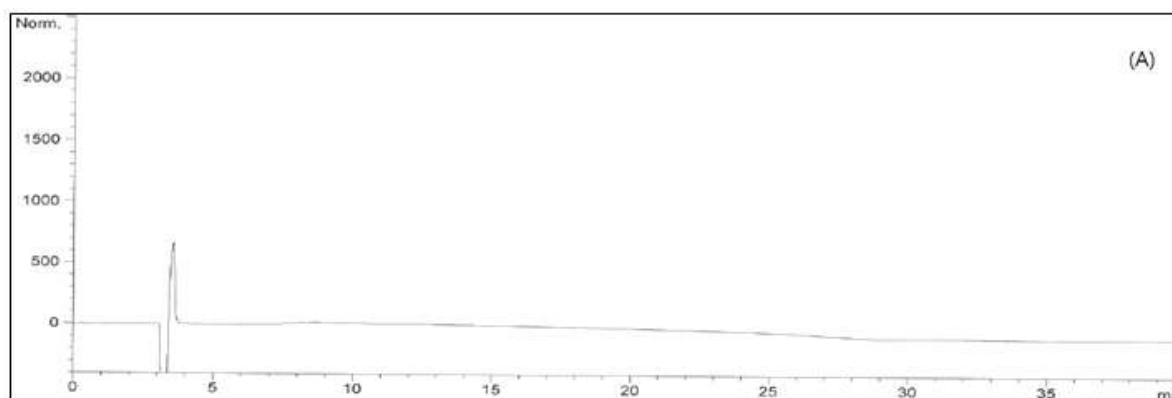
검체		Peak Area	평균	표준편차	상대표준편차
농도(ppm)	측정회수				
300	1	4219.04541	4252.26	26.90	0.63
	2	4226.41504			
	3	4243.90479			
	4	4262.59033			
	5	4276.36670			
	6	4285.24854			

② Retention time

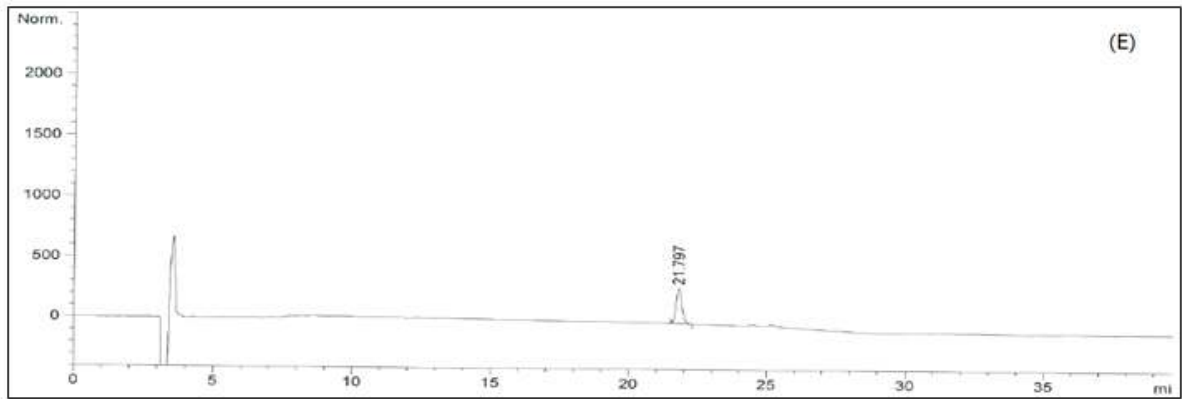
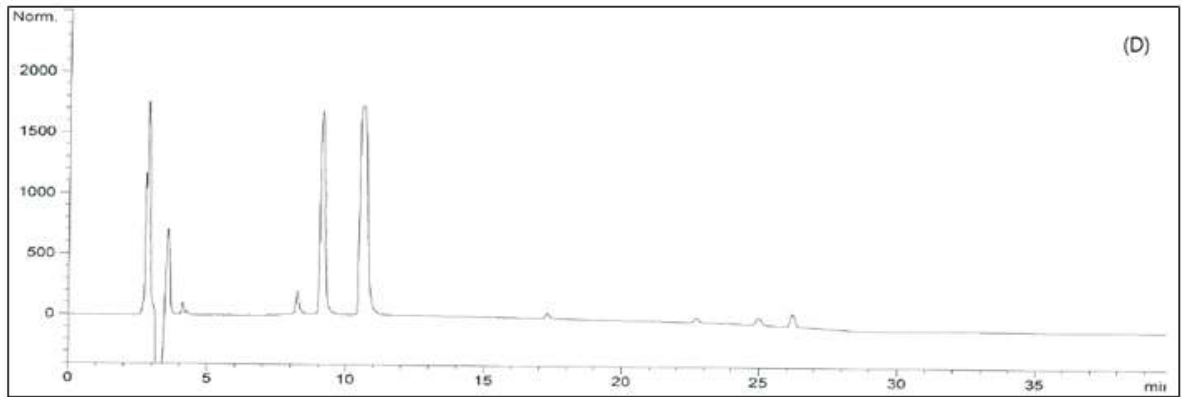
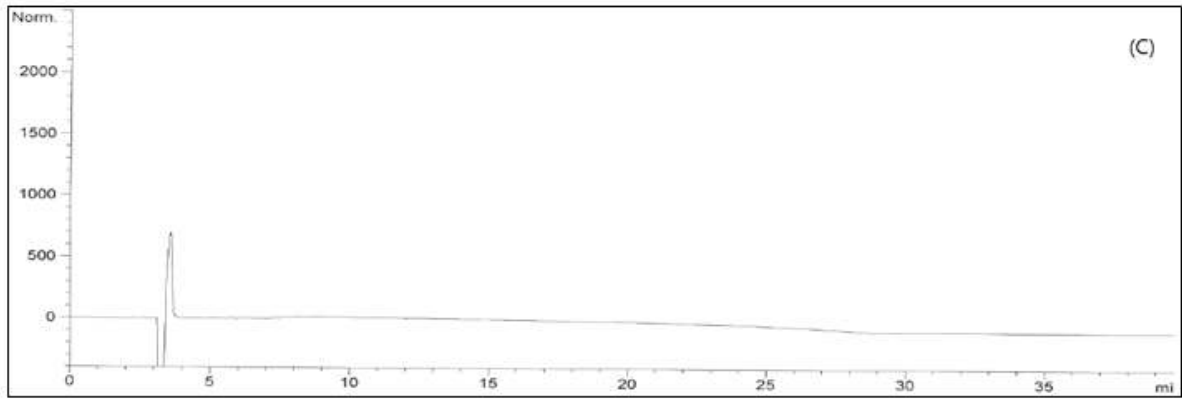
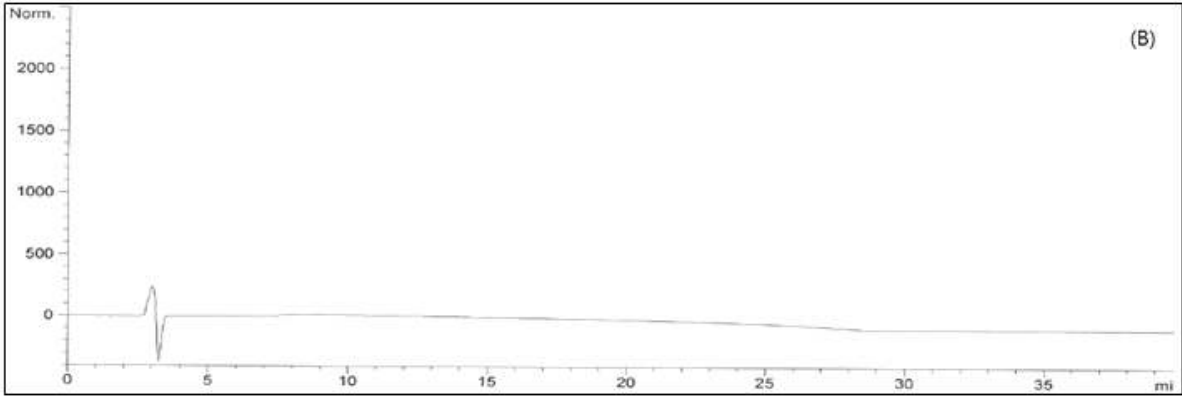
검체		Peak Area	평균	표준편차	상대표준편차
농도(ppm)	측정회수				
300	1	21.795	21.828	0.02	0.09
	2	21.816			
	3	21.831			
	4	21.838			
	5	21.844			
	6	21.843			

(2) 특이성(Specificity)

- 목적성분인 멜리틴 검출에 영향을 주는 인자가 없음을 확인하기 위하여 회석액, 이동상A, 이동상B, Placebo 용액, 검액, 특이성용액(Spiked sample)을 분석하였다. 분석 결과 멜리틴 peak에 간섭을 주는 인자가 검출되지 않았다. 또한 특이성 용액을 조제하여 분석했을 때에도 Placebo matrix에 의해 멜리틴이 영향을 받지 않음도 확인하였다(Fig. 60).







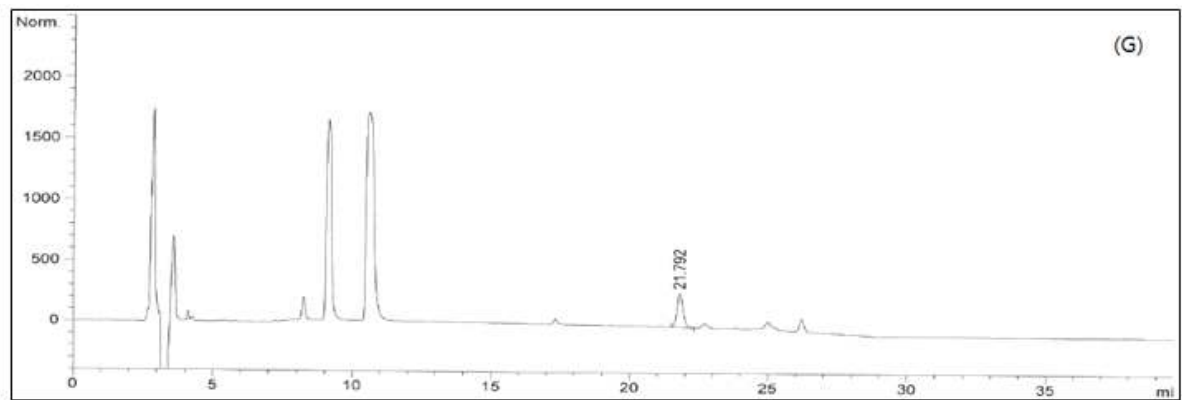
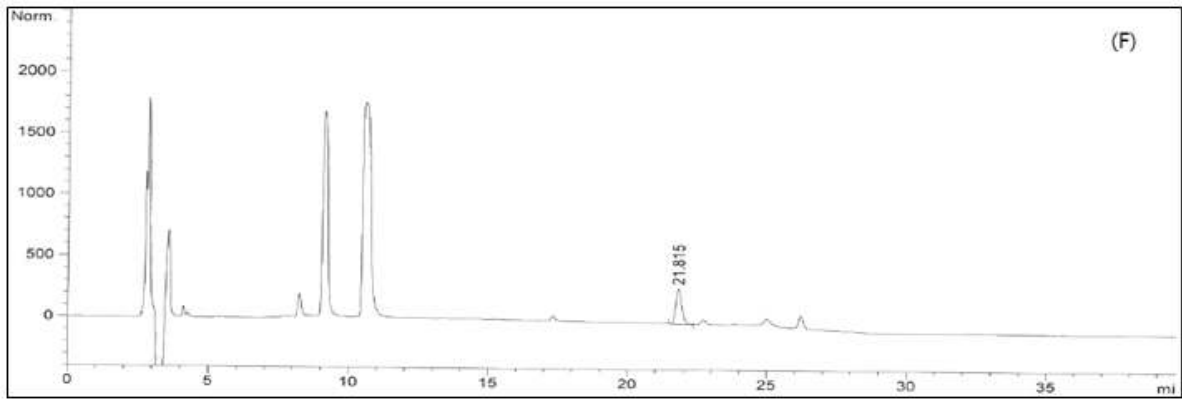


Fig. 60. 특이성 분석 크로마토그램 (A) 희석액, (B) 이동상A, (C) 이동상B,  
 (D) Placebo 용액, (E) 표준액, (F) 검액, (G) 특이성용액

(3) 직선성(Linearity)

- 본 실험에서 직선성의 범위는 제품의 품질관리 시험법 농도인 300 ppm 기준으로 하여 50%, 75%, 100%, 125%, 150% 을 범위로 설정하였고 calibration curve로 직선성을 평가하였다. 실험결과 R<sup>2</sup>값이 0.9993~0.9997(n=3)으로 적합함을 확인하였다 (Fig. 61).

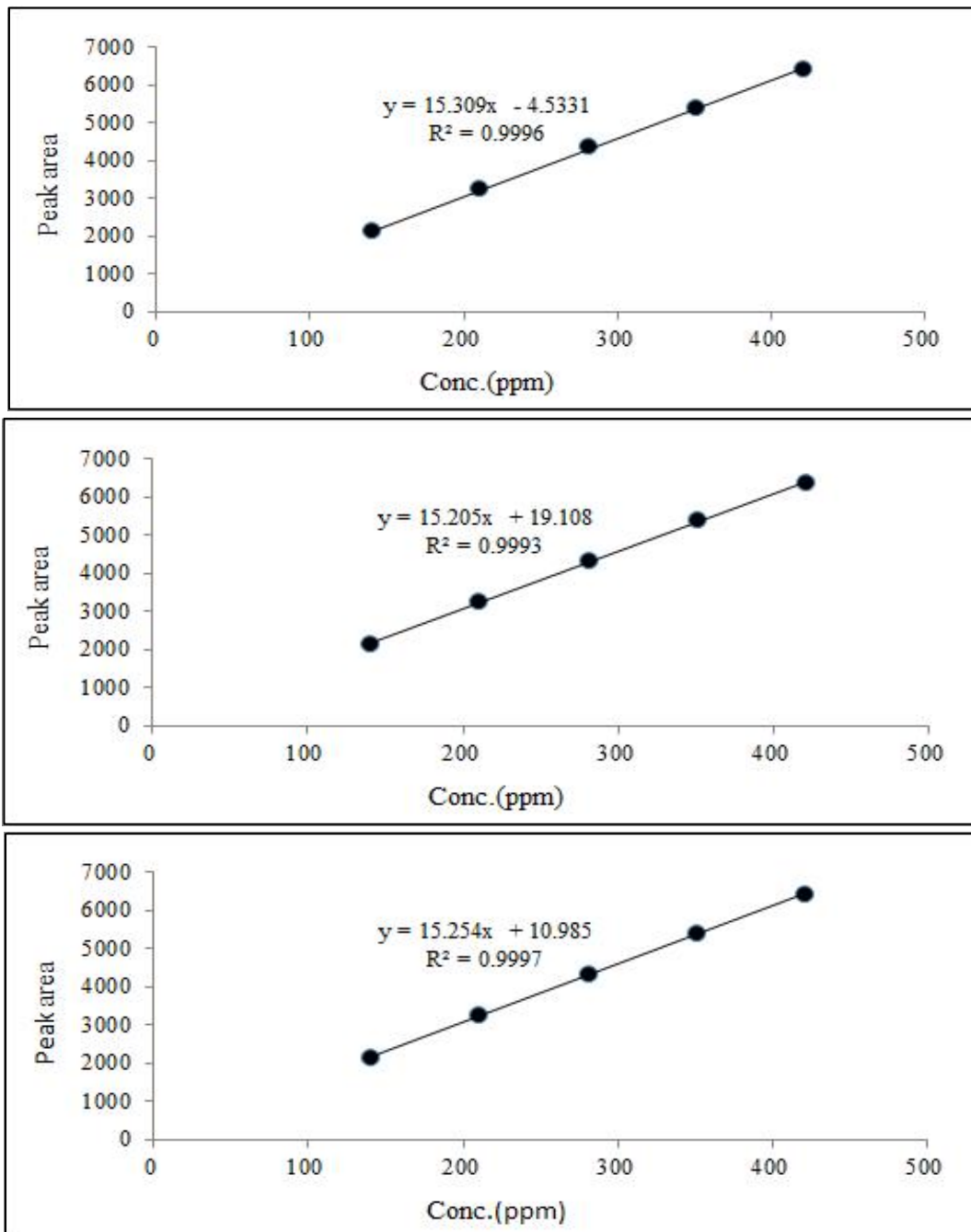


Fig. 61. 직선성 분석 결과 검량선(n=3)

(4) 정확성(Accuracy)

- 주성분 이외의 첨가제로 구성된 Placebo에 기지량의 분석대상물질을 첨가한 검체를 정량하여 회수율(%)로 평가하였다. 회수율 값 기준을  $100 \pm 5.0\%$ 로 설정하였고 정확성용액의 Peak area를 직선성 결과값과 대비하여 값을 계산하였다. 75, 100, 125% 범위의 세 농도에 대한 회수율을 확인하였을 때 회수율 평균값이 각각 100.1, 100.1, 99.6%로 기준에 만족하였다(Table 29).

Table 29. 정확성 시험 결과

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	참값 (ppm)	회수율 (%)	Difference (%)
225	211	3243.15771	212.02	100.6	1.185
		3230.87256	211.22	100.3	0.380
		3201.18726	209.27	99.3	1.566
	평균값	3225.07251	210.84	100.1	1.044
	표준편차	21.58	1.41	0.67	0.61
300	281	4297.24512	281.12	100.1	0.037
		4266.04248	279.07	99.4	2.008
		4326.73486	283.05	100.8	1.970
	평균값	4296.67415	281.08	100.1	1.339
	표준편차	30.35	1.99	0.71	1.13
375	351	5351.02637	350.19	99.7	0.636
		5366.90771	351.23	100.0	1.677
		5306.02637	347.24	98.9	2.313
	평균값	5341.32015	349.56	99.6	1.542
	표준편차	31.58	2.07	0.59	0.85

(5) 정밀성(Precision)

. 반복성 시험 결과 %RSD가 75, 100, 125 %의 농도에서 각각 0.67, 0.71, 0.59%로 측정되었고, 시험자와 시험일을 달리하여 분석한 실험실내 정밀성 시험 결과 %RSD가 동일농도에서 각각 0.76, 0.54, 0.41%로 측정되어 모두 기준에 적합한 결과를 얻었다(Table 30).

(가) 반복성

Table 30. 정밀성 시험의 반복성 및 실험실내 정밀성 결과

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	평균값	표준편차	상대표준편차 (%RSD)
225	211	3243.15771	3225.07251	21.58	0.67
		3230.87256			
		3201.18726			
300	281	4297.24512	4296.67415	30.35	0.71
		4266.04248			
		4326.73486			
375	351	5351.02637	5341.32015	31.58	0.59
		5366.90771			
		5306.02637			

(나) 실험실내 정밀성

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	평균값	표준편차	상대표준편차 (%RSD)
225	211	3251.03809	3234.23926	24.67	0.76
		3245.76660			
		3205.91309			
300	281	4224.11475	4250.08073	22.94	0.54
		4258.51221			
		4267.61523			
375	351	5347.69580	5335.50928	22.02	0.41
		5310.09326			
		5348.73877			

(6) 검출한계 & 정량한계(LOD&LOQ)

- 검량선에 근거하여 도출된 회귀직선(regression line)에서 표준편차( $\sigma$ )와 기울기(S)로 확인 하였을 때 각각 12.01, 15.26 으로 확인되었다. 해당 값으로 검출한계와 정량한계를 구하였을 때 2.6, 7.9 ppm로 측정되어 기준에 적합한 결과를 얻었다.
- 따라서 본 결과를 바탕으로 새롭게 설정한 분석법이 정제붕독 헤어 에센스(BVP-II)를 분석하는데 적합하여 이 분석법을 이용하여 안정성 평가를 진행하였다.

#### 4. 정제봉독 헤어 에센스(BVP-II)의 안정성 평가

##### 가. 안정성 보관 조건

- 멜리틴 성분이 열에 불안정함을 확인하였기 때문에 가속조건(온도 40℃, 상대습도 75%)에서의 시험은 의미가 없다고 판단하여 생략하고 장기보존조건(온도 25℃, 상대습도 60%)과 냉장조건(온도 2℃, 상대습도 35%)을 추가하여 평가하였다.

##### (1) 방법

- 멜리틴 표준품 10 mg을 취하여 물을 넣어 10 mL하고, 이 액을 적당히 취하여 150, 300, 450 ppm의 농도로 물을 넣어 희석한 액을 표준액으로 사용하였다. 시험용액은 BVP-II 검체 일정량을 취하여 0.45 µm membrane filter로 여과하여 사용하였다. 표준액 및 시험용액을 HPLC를 이용하여 검증된 분석조건(BVP-II)에 따라 분석하였다.

##### (2) 시험결과 및 고찰

- 장기보존조건에서 보관 시 점차적으로 함량이 감소하였으며 4주만에 함량이 절반 이상으로 감소하여 안정성이 없음을 확인할 수 있었다. 또한 냉장보관에서는 4주까지 비교적 안정함을 보였지만 8주차에 함량이 감소하여 보관온도에 의한 안정성 개선 효과는 볼 수 없었다(Table 31, Fig. 62).

Table 31. 정제봉독 헤어 에센스(BVP-II)의 안정성 시험 결과

	측정조건	함량(%)
0주	-	98.3
1주	장기보존	82.4
	냉장	98.1
2주	장기보존	76.5
	냉장	95.7
3주	장기보존	63.3
	냉장	95.1
4주	장기보존	46.3
	냉장	94.2
8주	장기보존	38.1
	냉장	64.3

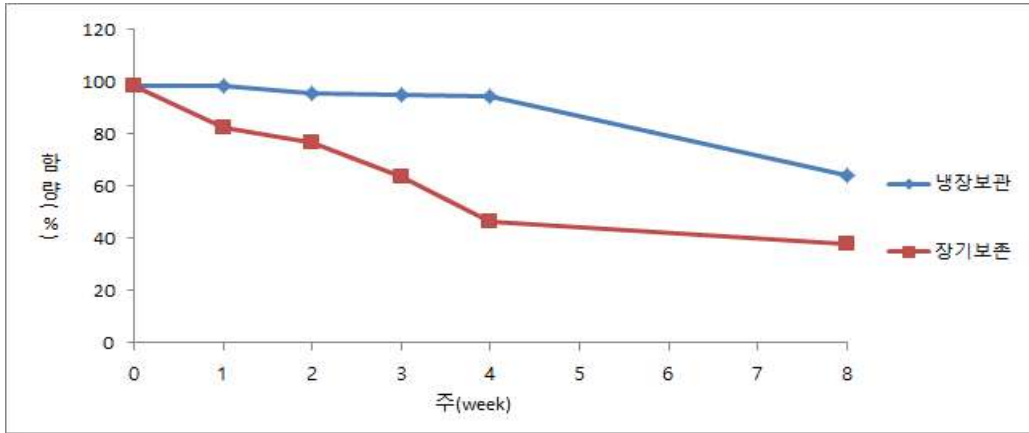


Fig. 62 보관조건에 따른 정제봉독 헤어 에센스(BVP-II)의 안정성 시험 결과 그래프

- 해당 연구를 바탕으로 냉장보관 시 장기보존에 비해 함량 감소 지연 패턴을 보이는 것을 확인할 수 있었으며 이를 검토한 결과 제품 내 보존제 역할을 하는 성분의 함유량이 적어 Biological한 반응에 의해 펠리틴에 변성이 생겨 함량 감소를 초래하게 될 수 있음을 추측할 수 있었다. 따라서 제품 성분과 배합비에 대한 전면적인 재검토를 진행하였고 새로운 시제품을 제작하였다.

5. 기능성화장품으로서의 정제봉독 헤어 에센스(BVP-III) 제조

- 봉독원료는 동일하게 청진바이오텍에서 구입하여 사용하였고 제품 제조업체를 SSL(스킨사이언스랩)에서 콧데(주)로 변경하였으며 새롭게 제작된 제품에는 방부·보존제 역할을 할 수 있는 성분을 첨가하여 제작 의뢰하였다(Fig. 63).


	성분명	
	정제수	판테놀
	프로판디올	바이오틴
	글리세린	에탄올
	하이드롤라이즈드호호바에스터	라벤더오일
	하이드록시아세톤페논	1,2-헥사디올
	피이지-60하이드로제네이티드캐스터오일	봉독

Fig. 63. 정제봉독 헤어 에센스(BVP-III)의 정상 및 배합성분

가. 분석조건 설정

- 봉독 원료 분석조건과 동일한 조건으로 제품 Method Validation을 실시하였고 분석법에 대한 타당성을 검증하기 위하여 다음과 같은 일련의 과정을 진행하였다.

Column	Jupiter 4um proteo 90 Å, 150 x 4.6mm(C12)
Injection volume	10 μL
Oven temperature	38° C
Flow rate	1.2 mL/min
Mobile phase	TFA : water (0.2 : 99.8, v/v) : TFA : ACN (0.2 : 99.8, v/v) = 58 : 42
Wavelength	214nm

나. 밸리데이션 실시 항목 및 기준

- 제 3절 3. 나. 의 항목 및 기준과 동일하게 진행하였다.

다. 밸리데이션 항목별 시험 방법

- 제 3절 3. 다. 의 항목별 시험 방법과 동일하게 진행하였다.

라. 결과 및 고찰

(1) 시스템적합성(System suitability)

- 멜리틴 용액(300ppm)을 6회 반복 주입하여 면적값과 Retention time을 확인하였을 때, 멜리틴 면적값에 대한 상대표준편차가 1.05%로 측정되었고 Retention time에 대한 상대표준편차가 0.32%로 측정되어 기준에 적합하였다(Fig. 64, Table 32).

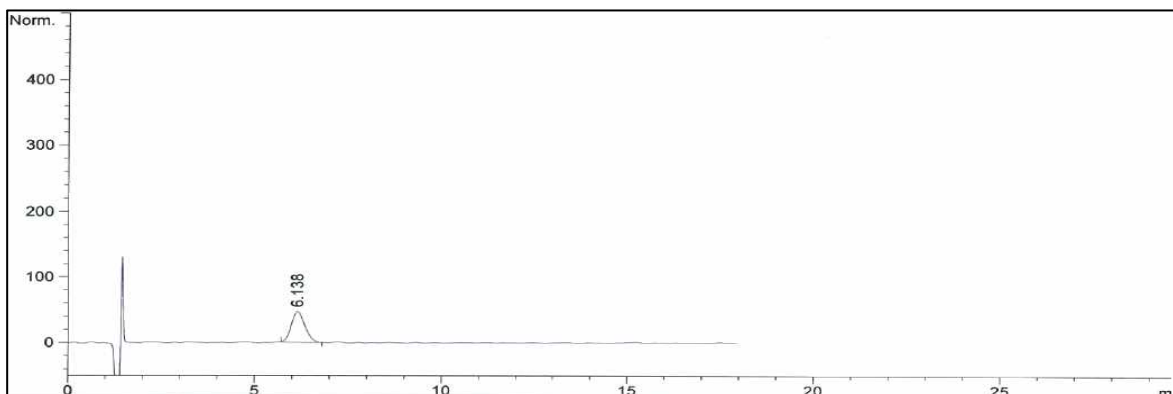


Fig. 64. 시스템적합성 분석 크로마토그램



Table 32. 시스템적합성 시험 결과

① 면적

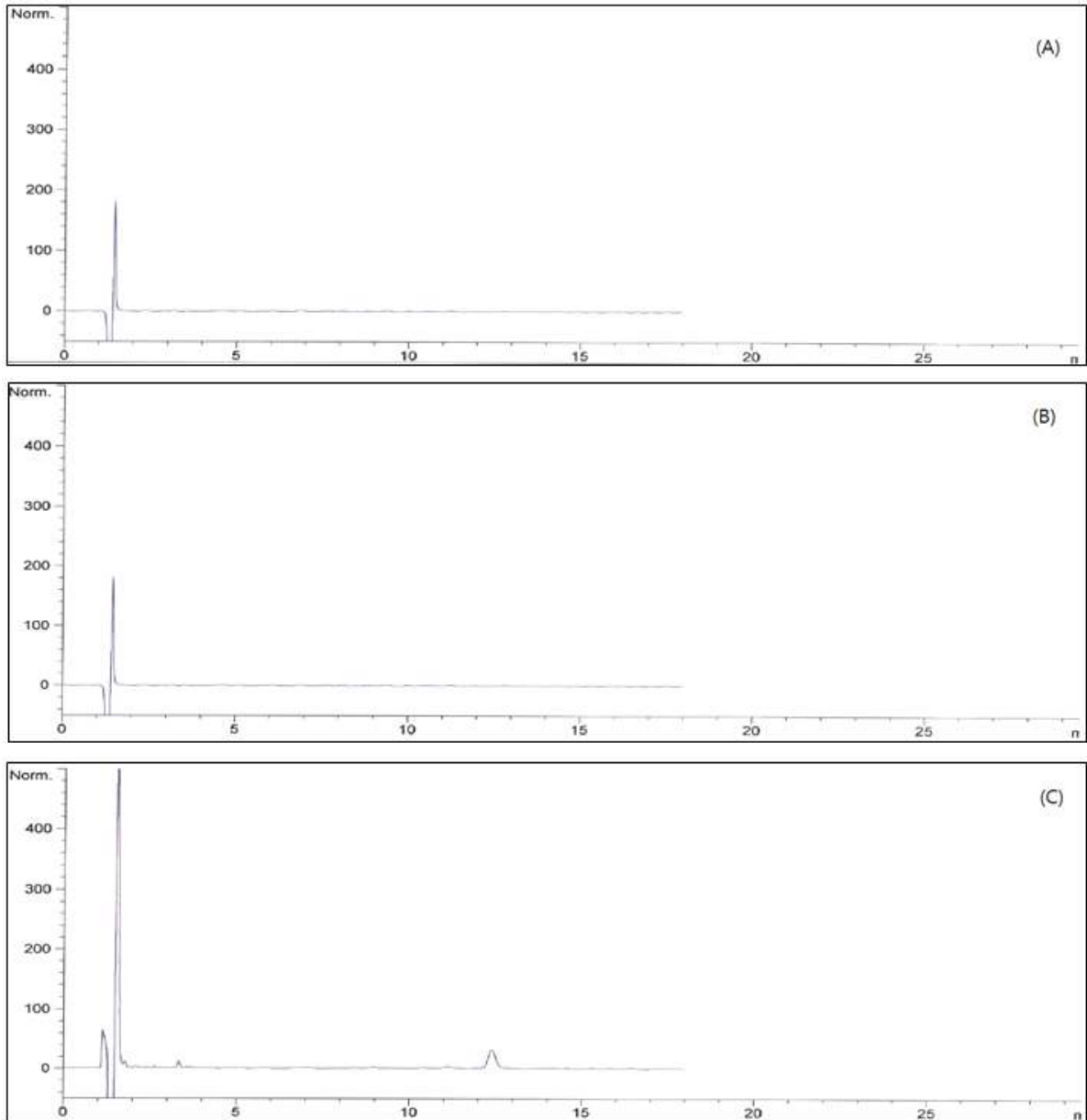
검체		Peak Area	평균	표준편차	상대표준편차
농도(ppm)	측정 회수				
300	1	1197.78223	1186.79	12.42	1.05
	2	1172.71667			
	3	1203.80042			
	4	1178.61328			
	5	1190.23755			
	6	1177.60010			

② Retention time

검체		Peak Area	평균	표준편차	상대표준편차
농도(ppm)	측정 회수				
300	1	6.191	6.163	0.02	0.32
	2	6.138			
	3	6.143			
	4	6.169			
	5	6.170			
	6	6.167			

(2) 특이성(Specificity)

- 희석액, 이동상, Placebo 용액, 검액, 특이성용액(Spiked sample)을 분석하였고 분석 결과 멜리틴 peak에 간섭을 주는 인자가 검출되지 않았다. 또한 특이성 용액을 조제하여 분석했을 때에도 Placebo matrix에 의해 멜리틴이 영향을 받지 않음도 확인하였다(Fig. 65).



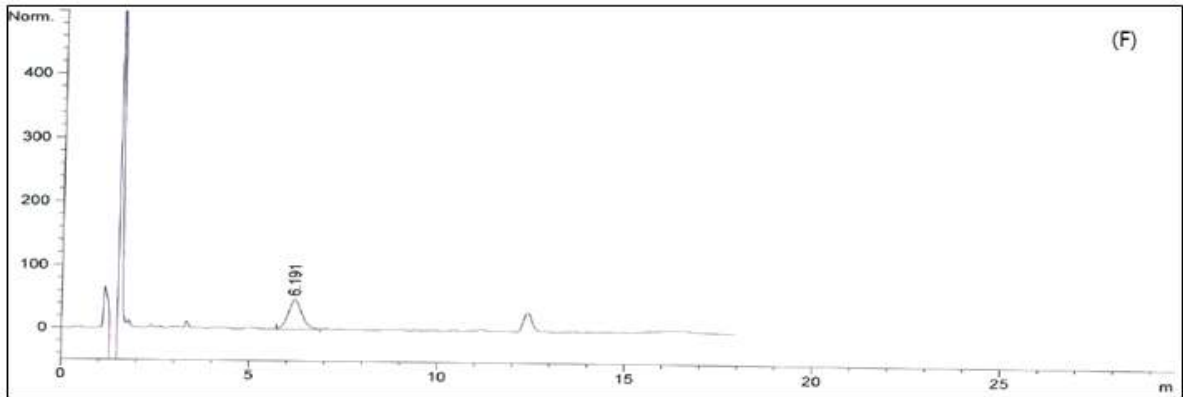
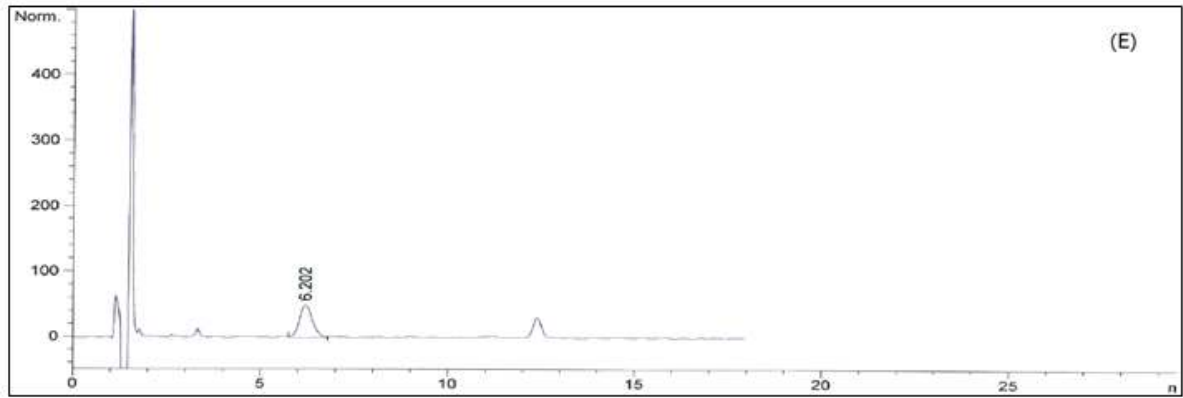
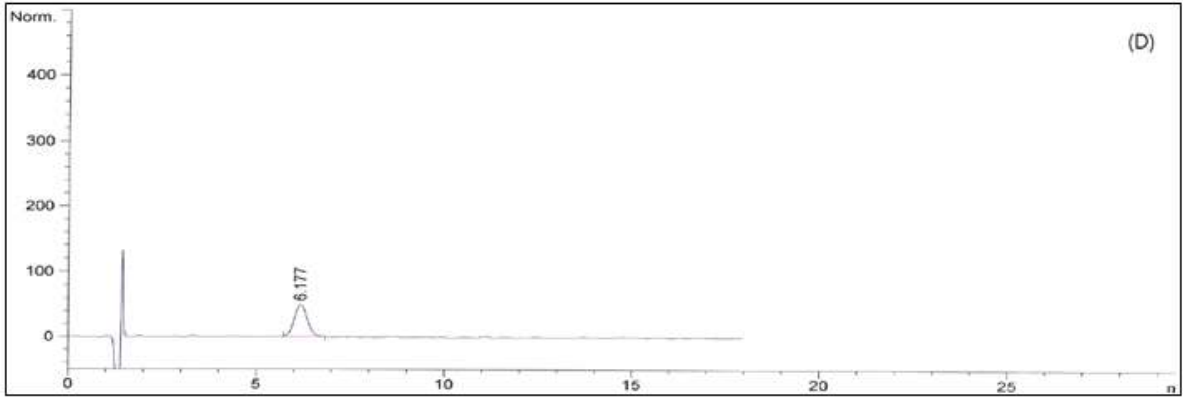


Fig. 65. 특이성 분석 크로마토그램 (A) 회석액, (B) 이동상, (C) Placebo 용액, (D) 표준액, (E) 검액, (F) 특이성용액

(3) 직선성(Linearity)

- 직선성의 범위는 제품의 품질관리 시험법 농도인 300 ppm 기준으로 하여 50%, 75%, 100%, 125%, 150% 을 범위로 설정하였고 calibration curve로 직선성을 평가하였다. 실험결과 R<sup>2</sup>값이 0.9982~0.9989(n=3)으로 적합하였다(Fig. 66)

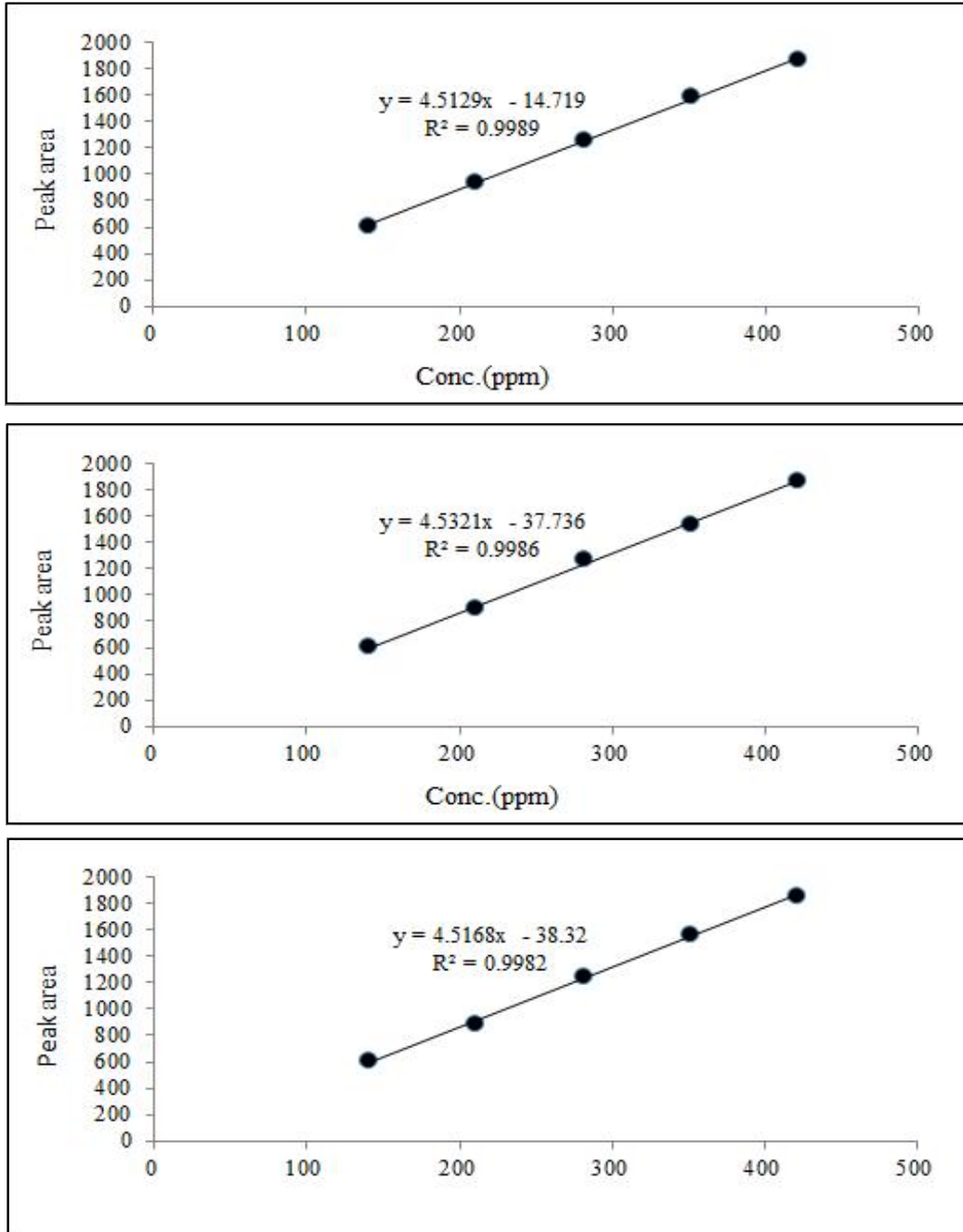


Fig. 66. 직선성 분석 결과 검량선(n=3)

(4) 정확성(Accuracy)

- 정확성용액의 Peak area를 직선성 결과값에 대비하여 75, 100, 125% 범위의 세 농도에 대한 회수율을 확인하였다. 회수율 평균값이 각각 100.5, 99.4, 100.9%로 기준에 적합한 결과를 얻었다(Table 33).

Table 33. 정확성 시험 결과

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	참값 (ppm)	회수율 (%)	Difference (%)
225	211	929.53870	212.32	100.8	0.648
		929.27893	212.26	100.8	0.591
		921.00958	210.43	99.9	1.239
	평균값	926.60907	211.67	100.5	0.826
	표준편차	4.85	1.07	0.51	0.36
300	281	1234.68835	279.82	99.6	0.584
		1225.57495	277.80	98.9	1.432
		1235.87842	280.08	99.7	0.847
	평균값	1232.04724	279.23	99.4	0.954
	표준편차	5.64	1.25	0.44	0.43
375	351	1573.88477	354.85	101.1	0.716
		1564.39343	352.75	100.5	1.384
		1573.66650	354.80	101.1	0.668
	평균값	1570.64823	354.13	100.9	0.922
	표준편차	5.42	1.20	0.34	0.40

(5) 정밀성(Precision)

- 반복성은 정확성 측정값을 이용하여 평가하였고 실험실내 정밀성은 실험일과 시험자를 달리하여 정밀성을 확인하였다. 반복성 시험 결과 %RSD가 75, 100, 125%의 농도에서 각각 0.52, 0.46, 0.34%로 측정되었고, 실험실내 정밀성 시험 결과 %RSD가 동일농도에서 각각 0.14, 0.38, 0.49%로 측정되어 모두 기준에 적합한 결과를 얻었다(Table 34).

Table 34. 정밀성 시험 결과

(1) 반복성

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	평균값	표준편차	상대표준편차 (%RSD)
225	211	929.53870	926.60907	4.85	0.52
		929.27893			
		921.00958			
300	281	1234.68835	1232.04724	5.64	0.46
		1225.57495			
		1235.87842			
375	351	5351.02637	5341.32015	31.58	0.59
		5366.90771			
		5306.02637			

(2) 실험실내 정밀성

이론값 농도 (ppm)	이론값 보정농도 (ppm)	Peak Area	평균값	표준편차	상대표준편차 (%RSD)
225	211	922.07678	923.40004	1.26	0.14
		923.54852			
		924.57483			
300	281	1231.69812	1236.03430	4.69	0.38
		1235.39075			
		1241.01404			
375	351	1597.48572	1592.05623	7.86	0.49
		1583.04687			
		1595.63611			

(6) 검출한계 & 정량한계(LOD&LOQ)

- 표준편차( $\sigma$ )와 기울기(S)를 확인 하였을 때 각각 13.46, 4.52로 확인되었고 해당 값으로 검출한계와 정량한계를 구하였을 때 9.8, 29.8 ppm로 측정되어 기준에 적합한 결과를 얻었다.
- 본 결과를 바탕으로 해당 분석법이 정제봉독 헤어 에센스(BVP-Ⅲ)을 분석하는데 적합한 것으로 확인되었고 이를 이용하여 안정성 평가를 진행하였다.

마. 정제봉독 헤어 에센스(BVP-Ⅲ)의 안정성 평가

- 해당 제품에 대한 장기보존조건(온도 25℃, 상대습도 60%)에서의 안정성 평가 시험을 진행하였으며 시험주기는 최초, 1주, 2주, 3주, 4주, 2개월, 3개월, 6개월, 9개월로 설정하여 시험주기에 맞춰 시험하였다.

(1) 방법

- 멜리틴 표준품 10 mg을 취하여 물을 넣어 10 mL로 한 후 이 액을 적당히 취하여 150, 300, 450 ppm의 농도로 물을 넣어 희석한 액을 표준액으로 하였다. 시험용액은 BVP-III 검체 일정량을 취하여 0.45 µm membrane filter로 여과하여 사용하였다. 표준액 및 시험용액을 HPLC를 이용하여 검증된 분석조건(BVP-III)에 따라 분석하였다.

(2) 결과 및 고찰

- 장기보존조건에서 보관한 정제봉독 헤어 에센스(BVP-III)의 멜리틴 함량이 9개월까지 안정함을 보였다(Table 35, Fig. 67).

Table 35. 정제봉독 헤어 에센스(BVP-III)의 멜리틴 함량 안정성 시험 결과

	멜리틴 함량(%)	분석일
최초	96.3	2016.10.05
1주	94.1	2016.10.11
2주	93.9	2016.10.19
3주	94.6	2016.10.25
4주	94.7	2016.11.01
2개월	95.1	2016.12.01
3개월	94.5	2017.01.02
6개월	94.5	2017.04.03
9개월	94.7	2017.07.03

- 배합성분 및 배합비를 조정함에 따라 제품의 안정성이 개선됨을 확인 할 수 있었고 안정성이 확보된 해당 시제품을 안전성 평가와 인체적용시험 샘플로 사용하였다.

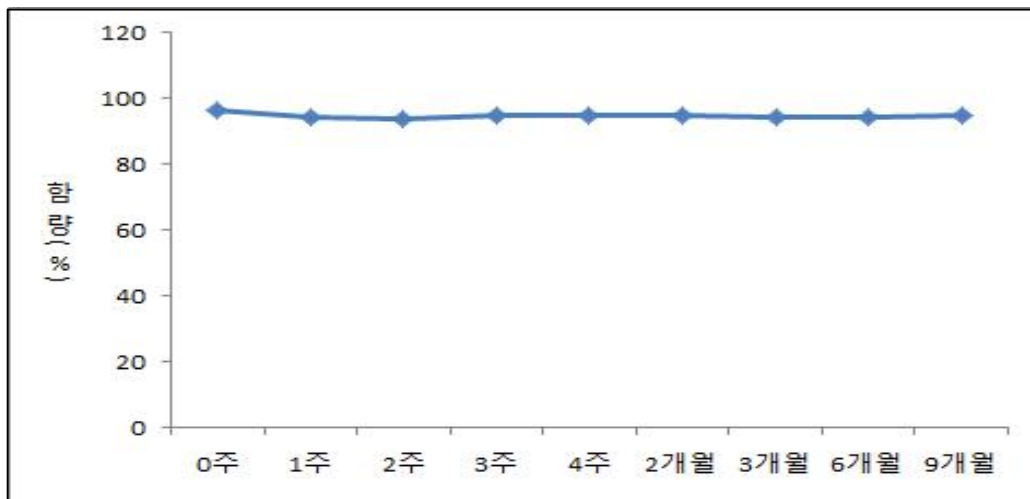


Fig. 67. 정제봉독 헤어 에센스(BVP-III)의 함량 변화 그래프

## (20) 레시피 및 시너지 효과 측정

### 1. 배합원료와의 시너지 효과: 인체모유두세포 증식능 시험

#### 가. 재료 및 방법

- 본 실험에서 사용한 Human dermal papilla cells(hDPCs)는 한국세포주은행에서 분양 받아 10% Fetal Bovine Serum(FBS)과 1% penicillin/streptomycin을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)을 배양액으로 하여 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 실험에 사용한 정제봉독은 (주)유일팜테크에서 제공된 것을 사용하였다.
- 모유두세포를 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cell/ml로 분주하고 16시간 동안 배양하여 세포를 안정화시킨 다음 정제봉독과 기타 원료를 20시간 동안 처리하였다. WST reagent를 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 control of % 비로 세포 증식 효과를 비교하였다.
- 시너지 효과 확인을 위해서는 하나의 plate에 각각의 시료를 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml로 처리한 well과 배합원료를 농도별로 처리한 well에 정제봉독 10 ng/ml을 같이 처리한 것과 정제봉독 100 ng/ml을 같이 처리한 것이 같이 구성되도록 하여 세포 증식 효과를 확인하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

##### (1) 정제봉독 및 배합원료에 의한 세포 증식 효과 확인

- hDPCs에 정제봉독을 10 ng/ml부터 3배수로 최대 1000 ng/ml까지 처리한 결과, 대조군에 비해 약 23% 이상의 세포 증식 효과를 나타냈으며 최고농도에서는 대조군 대비 35.7%로 우수한 세포 증식 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 68).

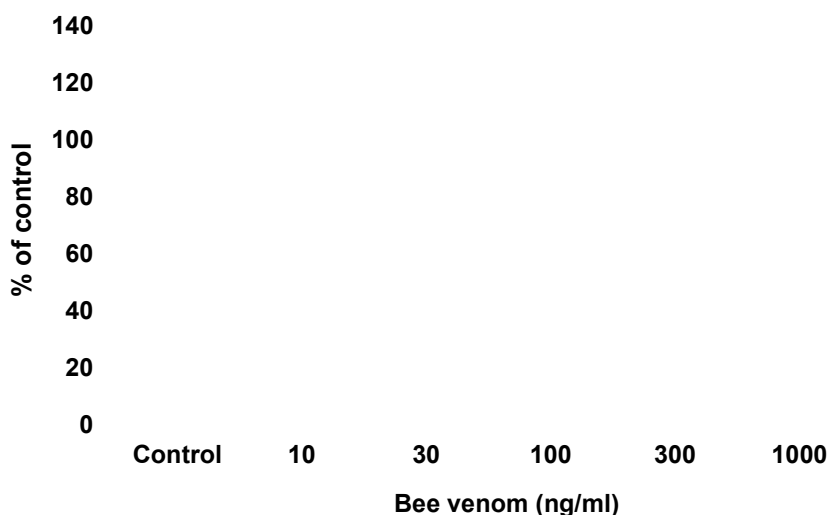


Fig. 68. 인체모유두세포에서 정제봉독의 세포 증식 효과



- 시너지 효과를 확인하기 위해 앞서 배합원료로 사용될 비타민 및 기타 시료 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml을 처리하여 각각의 세포 증식 효과를 확인하였다. 실험결과 vitamin B<sub>2</sub>, 판토텐산칼슘, vitamin B<sub>6</sub>, 비오틴, 엽산, 산화마그네슘, MSM에서 약 10~15%의 세포 성장 효과를 나타내었다. 또한 산화마그네슘을 제외하고는 모든 시료에서 고농도인 1000 ng/ml을 처리했을 때 세포 증식 효과가 감소하는 경향이 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 69).

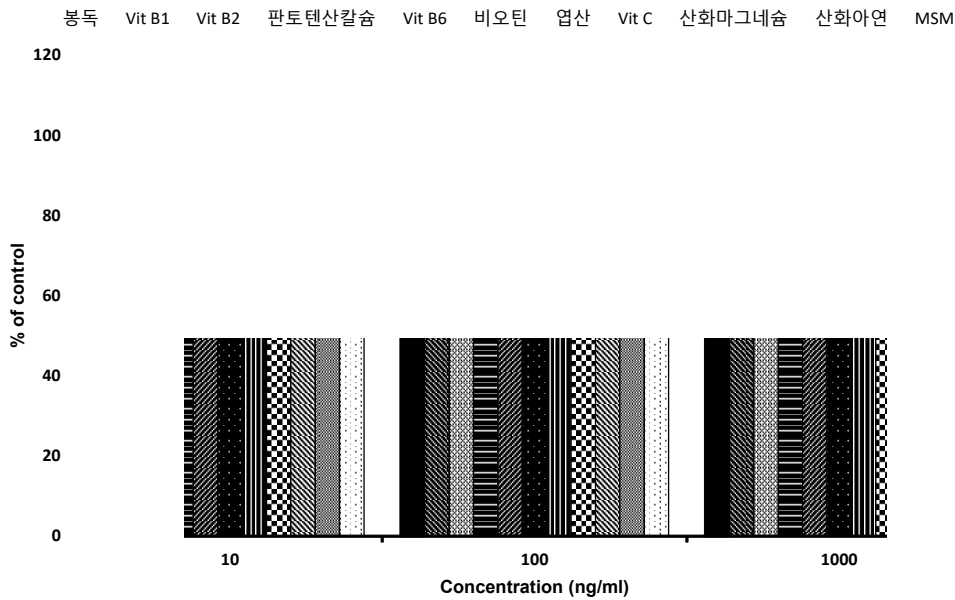


Fig. 69 인체모유두세포에서 배합원료의 세포 증식 효과

(2) 정제봉독과 여러 배합원료의 세포 증식 효과 확인 및 시너지 효과 확인

(가) Vitamin B<sub>1</sub>

- 정제봉독과 vitamin B<sub>1</sub> 10 ng/ml을 각각 처리했을 때, 대조군 대비 103.5%, 92.2%의 세포 증식 효과를 보인 데 비해 두 시료를 함께 처리했을 때에는 113.6%로 시너지 효과가 나타났다(Fig. 70).

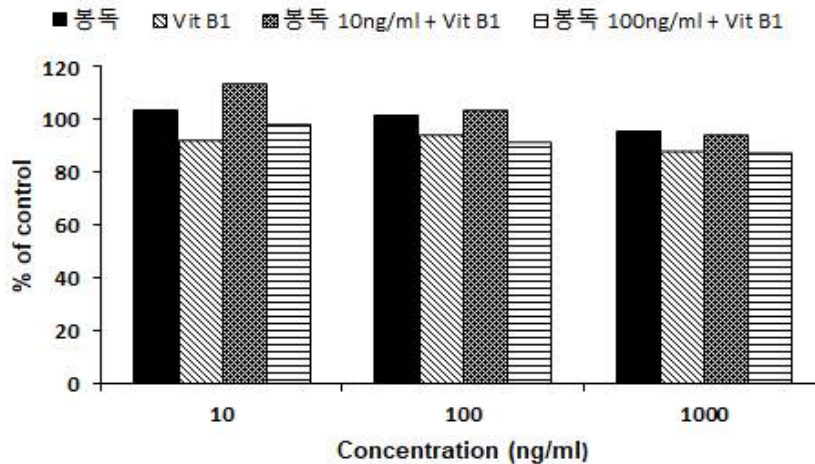


Fig. 70. 정제봉독과 vitamin B<sub>1</sub>에 의한 세포 증식 효과

(나) Vitamin B<sub>6</sub>

- 정제붕독과 vitamin B<sub>6</sub> 10 ng/ml을 각각 처리했을 때, 대조군 대비 103.5%, 106.4%의 세포 증식 효과를 보인 데 비해 두 시료를 함께 처리했을 때에는 115.8%로 시너지 효과가 나타났다. 정제붕독 10 ng/ml과 vitamin B<sub>6</sub> 100 ng/ml을 같이 처리했을 때에도 단일 처리 시 103.5%, 105.9%의 세포 증식 효과를 보이는 것에 비해 112.0%로 시너지 효과가 나타났다(Fig. 71).

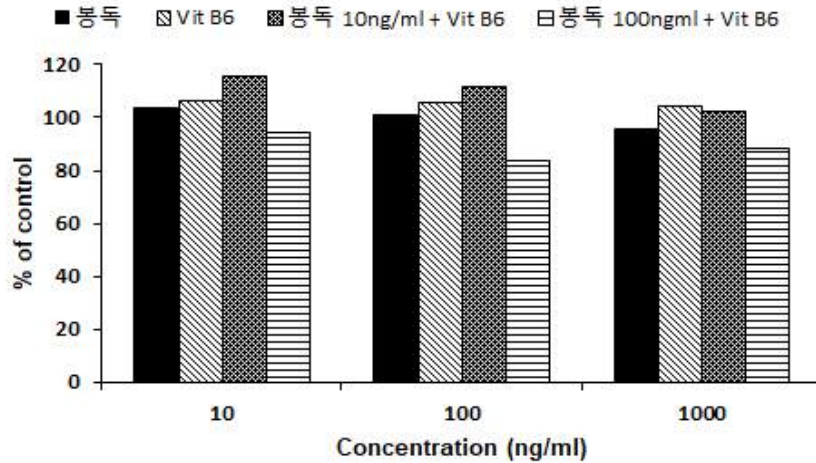


Fig. 71. 정제붕독과 vitamin B<sub>6</sub>에 의한 세포 증식 효과

(다) Vitamin B<sub>7</sub>

- 정제붕독과 vitamin B<sub>7</sub> 10 ng/ml을 각각 처리했을 때, 대조군 대비 103.5%, 93.7%의 세포 증식 효과를 보인 데 비해 두 시료를 함께 처리했을 때에는 114.1%로 시너지 효과가 나타났다. 정제붕독 10 ng/ml과 vitamin B<sub>7</sub> 100 ng/ml을 같이 처리했을 때에도 단일 처리 시 103.5%, 101.4%의 세포 증식 효과를 보이는 것에 비해 113.0%로 시너지 효과가 나타났다. 정제붕독 10 ng/ml과 vitamin B<sub>7</sub> 1000 ng/ml을 같이 처리했을 때에도 단일 처리 시 103.5%, 103.1%의 세포 증식 효과를 보인 데 비해 109.7%로 세포 증식 효과가 상승하였음을 확인할 수 있었다(Fig. 72).

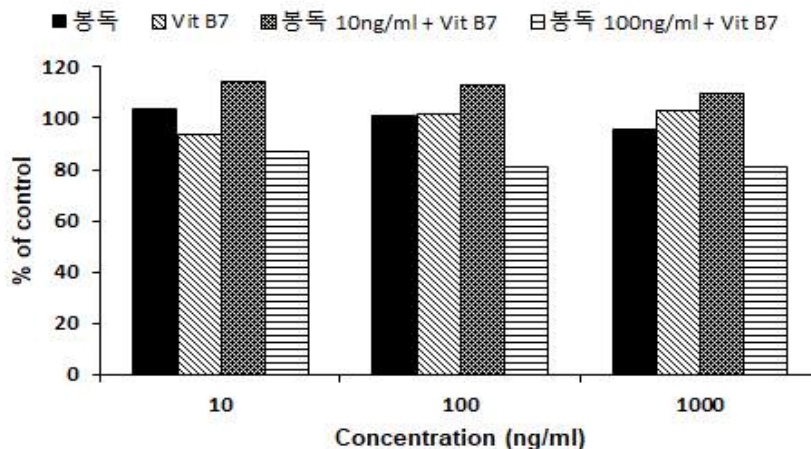


Fig. 72. 정제붕독과 vitamin B<sub>7</sub>에 의한 세포 증식 효과

(라) Vitamin C

- 정제붕독과 vitamin C 10 ng/ml을 각각 처리했을 때, 대조군 대비 103.5%, 90.8%의 세포 증식 효과를 보인 데 비해 두 시료를 함께 처리했을 때에는 112.9%로 시너지 효과가 나타났다. 정제붕독 10 ng/ml과 vitamin C 100 ng/ml을 같이 처리했을 때에도 단일 처리 시 103.5%, 89.3%의 세포 증식 효과를 보이는 것에 비해 109.8%로 세포 증식 효과가 상승하였으며, 정제붕독 10 ng/ml과 vitamin C 1000 ng/ml을 같이 처리했을 때에도 단일 처리보다 상승효과가 보였다(Fig. 73).

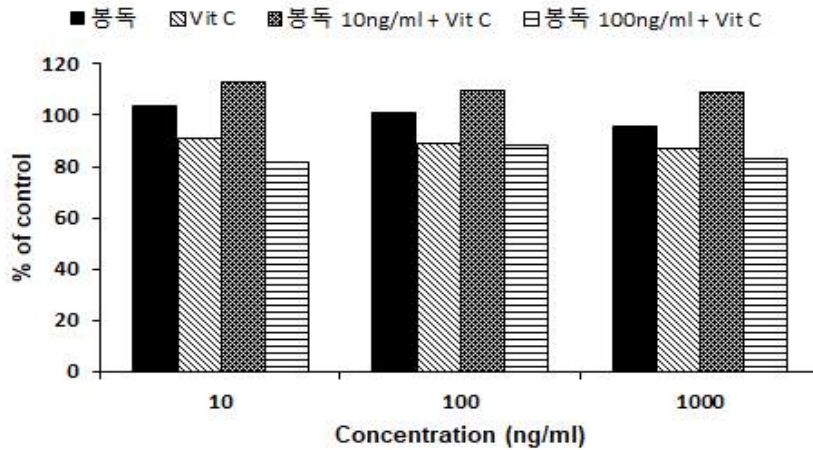


Fig. 73. 정제붕독과 vitamin C에 의한 세포 증식 효과

(마) MSM (Methylsulfonylmethane)

- 정제붕독과 MSM 10 ng/ml을 각각 처리했을 때, 대조군 대비 103.5%, 97.3%의 세포 증식 효과를 보인 데 비해 두 시료를 함께 처리했을 때에는 114.8%로 시너지 효과가 나타났다. 정제붕독 10 ng/ml과 MSM 100 ng/ml을 같이 처리했을 때에도 단일 처리 시 103.5%, 102.8%의 세포 증식 효과를 보이는 것에 비해 112.5%로 시너지 효과가 나타났다(Fig. 74).

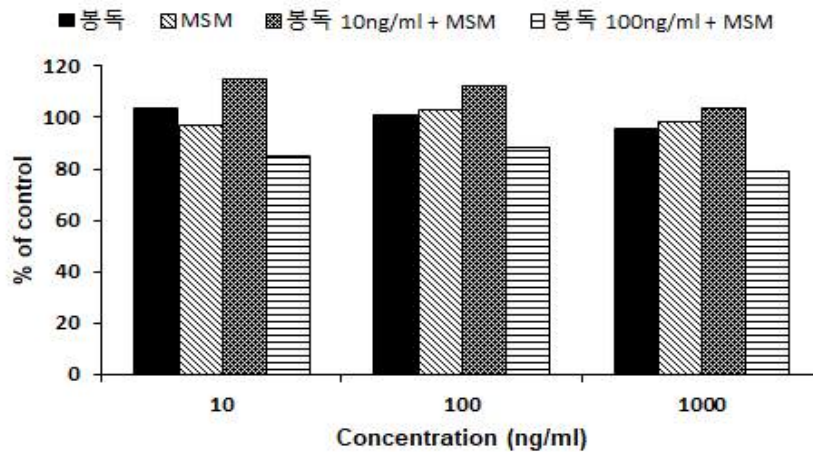


Fig. 74. 정제붕독과 MSM에 의한 세포 증식 효과

- 실험결과 정제붕독 10 ng/ml과 vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, C 그리고 MSM를 같이 처리할 때 세포 증식 효과가 단일 처리군 보다 증가함을 확인하였으나 그 차이는 미미하게 나타났다. 반면, 정제붕독 100 ng/ml과 같이 처리한 모든 시료에서는 세포 증식 효과가 감소함이 확인되었다. Vitamin B<sub>2</sub>와 산화아연의 세포 증식 효과는 관찰되지 않았으며 시너지 효과도 나타나지 않았다.

## (21) 정제봉독의 안전성 연구

### 1. Purified Bee Venom의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경피투여 독성시험

#### 가. 목적

- 기능성화장품의 원료로 (주)청진바이오텍의 Purified Bee Venom을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경피투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.

#### 나. 재료 및 방법

- 경피투여 독성시험에 대한 OECD(Organization for Economic Cooperation and Development) 가이드라인<sup>41)</sup>에서 제시하는 체중범위(200~300 g)를 맞추기 위하여 Sprague-Dawley 랫드 수컷은 8주령, 암컷은 10주령을 시험에 이용하였다. 시험군은 군당 10 마리(암수 각 5 마리)로 평균 체중이 비슷하도록 무작위 분배하였다.
- Purified Bee Venom 투여량은 임상예정용량인 1 mg/man(≒0.017 mg/kg)의 약 600배에 해당하는 10 mg/kg을 고용량으로 하여 아래로 공비 2로 5, 2.5 mg/kg의 용량으로 설정하였으며 부형제 대조군에는 멸균주사용수를 투여하였다. 임상예정경로인 경피투여로 투여액량은 5 mL/kg으로 하였다.
- 투여방법은 전일에 흉복배부를 중심으로 체표 면적의 10% 이상(약 7×9 cm)을 제모한 다음 투여일에 테가덤(Tegaderm™)에 부착된 첩포용 거즈(약 5×7 cm)에 투여시험물질을 투여액량에 맞게 골고루 도포한 후 제모된 부위에 부착하였다. 그 위에 탄력붕대(Coban)로 몸통 전체를 감아서 첩포용 거즈가 완전히 밀착되도록 하였다. 약 24 시간 후에 부착물을 제거하고 멸균주사용수를 적신 거즈를 이용하여 닦아주었다.
- 일반증상, 체중변화, 부검소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 36).

Table 36. Mortalities

Groups (mg/kg)	No. Dead/ No. Dosed	Days after dose									ALD <sup>a)</sup> Value
		1	2	3	4	5	6	7	8	9-15	
											Male
G1 (0)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10 > mg/kg
G2 (2.5)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0		
G3 (5)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0		
G4 (10)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0		
											Female
G1 (0)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10 > mg/kg
G2 (2.5)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0		
G3 (5)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0		
G4 (10)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0		

<sup>a)</sup> ALD: Approximate Lethal Dose

(2) 일반증상 관찰 결과, 시험물질에 의한 이상증상은 관찰되지 않았다.

(3) 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다(Table 37).

Table 37. Body weights

Gain <sup>a)</sup>	Groups (mg/kg)			
	G1 (0)	G2 (2.5)	G3 (5)	G4 (10)
Male	101.42±14.22	95.33±11.54	108.15±6.13	97.93±11.44
Female	15.32±8.49	22.34±10.07	15.45±16.74	25.16±8.75

<sup>a)</sup> 관찰 마지막 날 체중 - 투여 당일 체중 (mean ± S.D.)

(4) 부검소견 관찰 결과, 목 부위 가피형성(crust formation)이 부형제대조군 및 10 mg/kg 투여군 수컷에서 각 1례, 투여부위 가피형성이 2.5 및 10 mg/kg 투여군 수컷에서 각 1례 관찰되었다. 이는 부형제대조군을 포함하여 군간 상관성 없이 관찰되었기 때문에, 투여 시 첩포물 부착을 위해 몸통 전체를 코반으로 감아 놓음으로써 나타난 것으로 판단하였다(Table 38).

Table 38. Necropsy findings

Organs	Findings	Groups (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (2.5)	G3 (5)	G4 (10)
Male					
No gross findings		4	4	5	3
Neck	Partial crust formation	1	0	0	1
Administration site	Partial crust formation	0	1	0	1
Female					
No gross findings		5	5	5	5

- 이상의 결과로 보아, 시험물질 Purified Bee Venom을 Sprague-Dawley 랫드에 10 mg/kg 이하의 용량으로 단회 경피투여 하였을 때 사망동물은 관찰되지 않았기 때문에, 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 10 mg/kg를 상회하는 것으로 판단하였다.

## 2. Purified Bee Venom의 Hartley계 기니픽을 이용한 피부감작성시험\_Buehler 법

### 가. 목적

- Purified Bee Venom을 함유한 헤어 에센스에 대한 피부감작성을 평가하기 위하여 기니픽을 이용하여 시험<sup>42)</sup>하였다.

### 나. 재료 및 방법

- Hartley계 기니픽 수컷을 군당 5마리씩 평균 체중이 비슷하도록 무작위 분배하였고 예비시험 시 시험물질 원액(100% 농도)에서 피부자극이 관찰되지 않아 감작 및 야기의 투여농도를 100%로 설정하였다. 시험에는 시험물질(정제봉독 헤어 에센스), 음성대조물질(멸균주사용수), 양성대조물질(1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene; DNCB), 양성대조물질의 부형제인 80 % ethanol in D.W (감작 시 사용) acetone (야기 시 사용)이 사용되었다. 시험군의 구성은 Table 39와 같다.

Table 39. 시험군 구성

군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (mL/site)	투여량(%)	
					감작	야기
G1	M	5	1-5	0.5	0	Negative Control 100
G2	M	10	6-15	0.5	100	Negative Control 100
G3	M	5	16-20	0.5	0.1	0.1

G1: 음성대조군(멸균주사용수), G2: 시험물질 투여군, G3: 양성대조군(DNCB)

- 투여 방법은 감작과 야기로 나눠 경피투여하였다. 감작을 위해 시험 1 일 전에 좌측 측복부 10 × 10 cm 부위를 전모한 다음 투여당일 오전에 제모 하였다. 감작부위에 시험물질, 양성대조물질 및 음성대조물질을 각각 2.0 × 3.0 cm/0.5 mL로 약 6 시간 동안 첩포용 거즈위에 테가덤을 덮어주고, 그 위에 탄력붕대로 몸통 전체를 감아 폐쇄 첩포 하였다. 약 6 시간 후 각 물질을 제거하고 잔류하는 물질을 멸균주사용수를 적신 거즈를 이용하여 닦아주었고 감작은 주 1 회씩 3 주간 3 회 실시하였다. 최종 감작 2 주 후 우측 측복부를 야기 1 일 전에 전모한 다음 투여당일 오전에 제모 하였다.
- 음성대조군 및 시험물질 투여군은 우측에 각 2 개소씩, 양성대조군은 우측에 1 개소의 야기부위를 정한 뒤, 음성대조군 및 시험물질 투여군의 경우 앞부위에는 음성대조물질, 뒷부위에는 시험물질을, 양성대조군의 경우 양성대조물질을 2.0 × 3.0 cm, 0.5 mL/site씩 첩포용 거즈위에 테가덤을 덮어주고, 그 위에 탄력붕대로 몸통 전체를 감아 약 6 시간 동안 폐쇄첩포 하였다. 야기처치 제거 후 약 21 시간째에 제모 하였다.



- 각 물질을 제거한 후 24 및 48 시간의 피부반응을 평가하여, 이를 기초로 피부감작성을 평가하였다. 평가기준은 Table 40과 같다.

Table 40. 피부반응 및 피부감작성 평가기준

반응	정도
육안적으로 변화 없음	0
산재성의 부분적인 홍반	1
중등도의 전반적인 홍반	2
강도의 홍반 및 부종	3

감작율(%) <sup>a)</sup>	등급	분류
0-8	I	매우약함
9-28	II	약함
29-64	III	보통
65-80	IV	강함
81-100	V	매우강함

<sup>a)</sup> 감작율(%) = (감작된 동물 수/사용된 동물 수) x 100

#### 다. 결과 및 고찰

- (1) 시험물질에 의한 일반증상의 변화는 관찰되지 않았다.
- (2) 시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.
- (3) 피부감작성 평가 결과, 음성대조군 및 시험물질 투여군에서는 0%의 감작율을 보여 ‘매우약함’ (I 등급)으로 평가하였다. 반면, 양성대조군은 모든 동물에서 grade 2 인 중등도의 전반적인 홍반 및 grade 3 강도의 홍반 및 부종이 관찰되어 100% 감작률로 ‘매우강함’ (V 등급)으로 평가하였다(Table 41).

Table 41. Evaluation of skin reaction

		24 hr after challenge		48 hr after challenge	
		Negative control	Test article (100%)	Negative control	Test article (100%)
Groups	Animal ID	Grade <sup>a)</sup>		Grade	
G1 (Negative control)	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	Sensitization rate <sup>b)</sup> (%)		0	0	0
G2 (Test article)	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
	9	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	11	0	0	0	0
	12	0	0	0	0
	13	0	0	0	0
	14	0	0	0	0
	15	0	0	0	0
Sensitization rate (%)		0	0	0	0
G3 (Positive control)	16	3		2	
	17	3		2	
	18	3		2	
	19	3		2	
	20	3		2	
	Sensitization rate (%)		100		100

<sup>a)</sup> Grades are follows: 0: no visible change, 1: discrete or patchy erythema, 2: moderate and confluent erythema, 3: intense erythema and swelling

<sup>b)</sup> Sensitization rate (%) = (No. of animals with sign / No. of animals examined) × 100

- 이상의 결과로 보아, 본 시험 조건 하에서 시험물질 Purified Bee Venom의 피부감작율은 100% 농도에서 ‘매우약함’ (I 등급)으로 판정하였다.

### 3. Purified Bee Venom의 New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극시험

#### 가. 목적

- Purified Bee Venom을 함유한 헤어 에센스에 대한 피부자극 반응을 평가하기 위하여 토끼를 이용하여 시험<sup>6</sup>하였다.

#### 나. 재료 및 방법

- 입수된 New Zealand White계 수컷 토끼 중 제모 하였을 때 피부의 이상이 없는 6마리를 선정하여 시험에 이용하였다. 시험물질 적용 24 시간 전에 토끼의 배부 피부에 상처가 나지 않도록 제모하였다. 제모 된 피부는 좌우로 나누어 좌를 시험물질 적용구획으로 우를 대조구획으로 하고, 적용 구획과 대조구획의 건강(비찰과)피부 또는 찰과피부가 서로 대각선으로 분포하도록 구분하여, 건강(비찰과)피부 2 개소와 찰과피부 2 개소를 유성펜으로 표시하였다(Fig. 75).
- 찰과피부는 표피는 손상되나 진피는 손상되지 않도록 피가 나지 않는 정도로 찰과상을 입혀서 만들었고 적용방법으로는 표시한 적용구획 위에 2.5 cm × 2.5 cm/0.5 mL로 거즈에 시험물질(정제봉독 헤어 에센스)을 적용하여 피부와 접촉시켰다. 시험물질의 위에는 침투성이 없고 자극성이 낮은 의료용 테이프로 감아주었다.

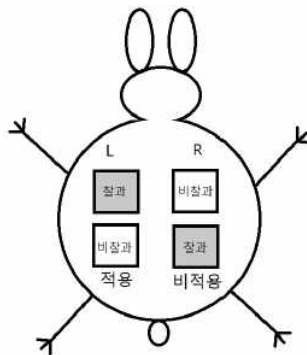


Fig. 75. 시험 디자인

- 적용 24 시간 경과 후 첩포를 제거하였고, 시험물질이 잔류하지 않도록 멸균주사용수로 가볍게 씻어냈다. 시험물질 적용 후 약 24 시간(시험물질 제거 30 분 후) 및 72 시간째에 도포 국소 부위의 홍반, 부종, 가피형성 등의 변화를 육안적으로 관찰하였다. 홍반과 가피형성 및 부종의 출현은 염증반응을 근거하여 판정하는 것으로 홍반은 육안적으로, 부종은 가벼운 촉진을 병행하여 판정하였다. 피부 반응의 정도는 피부 반응 평가기준(Table 42)에 따라 채점하여 기록하였다.

Table 42. 피부 반응 평가기준

홍반과 가피의 형성	
반응	정도
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반(홍당무 색의 발적), 가벼운 정도의 가피 형성(심부손상)	4

부종형성	
반응	정도
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종(뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종(약 1 mm 정도 부어 올랐을 경우)	3
심한 부종(1 mm 이상 부어 오르고 노출부위 밖까지 확장된 상태)	4

- 피부 반응을 채점 한 것을 이용하여 시험물질 적용 후 약 24 시간과 72 시간 때의 홍반 평점과 부종 평점을 더해서 평균치를 산출하였고, 이 수치로 피부자극성을 평가하였다(Table 43). 이때 시험물질의 자극성은 1 차 피부자극지수 외에도 시험기간 중 관찰된 일반증상 등을 고려하여 평가하였다.

Table 43. 1차 피부자극 지수

1차 피부자극 지수 <sup>a)</sup>	구분
0.0-0.5	비자극성
0.6-2.0	약한 자극성
2.1-5.0	중증도 자극성
5.1-8.0	강한 자극성

<sup>a)</sup> P.I.I. (Primary Irritation Index: 일차자극지수, 개체별 평균의 합을 4로 나눈 값)

다. 결과 및 고찰

(1) 일반증상 관찰 결과, Table 44와 같이 시험물질 적용부위에서 홍반 및 부종이 산발적으로 관찰되었다.

Table 44. Clinical signs

Animal ID	Signs	Observed on
1	Normal	Day 0, 2-3
	Erythema	Day 1
	Edema	Day 1
2	Normal	Day 0, 2-3
	Erythema	Day 1
	Edema	Day 1
3	Normal	Day 0-3
4	Normal	Day 0, 2-3
	Erythema	Day 1
	Edema	Day 1
5	Normal	Day 0, 2-3
	Erythema	Day 1
	Edema	Day 1
6	Normal	Day 0, 2-3
	Erythema	Day 1

\* The day of administration was designated as Day 0

(2) 시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

(3) 피부반응 관찰결과, 시험물질 적용 후 24 시간째 시험물질 적용부위의 찰과피부에서 grade 1 인 아주 가벼운 홍반, grade 2 인 분명한 홍반, grade 3 인 약간 심한 홍반이 각각 1, 3, 1 례 관찰되었으며, 비찰과 피부에서도 grade 1 인 아주 가벼운 홍반이 1 례 관찰되었다. 부종은 시험물질 적용부위의 찰과 피부에서 grade 1 인 아주 가벼운 부종이 4 례 관찰되었다. 72 시간째에는 아무런 변화도 관찰되지 않았다. 이를 바탕으로 한 1 차 피부자극지수(P.I.I.)는 0.6 이었다(Table 45).

Table 45. Evaluation of irritation

Control site								
Response	Erythema & Eschar formations <sup>a)</sup>				Edema <sup>b)</sup>			
Site	Intact		Abraded		Intact		Abraded	
Animal ID	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0	0	0	0	0	0	0	0
Sum	0							
P.I.I. <sup>c)</sup>	0							

Test article site								
Response	Erythema & Eschar formations				Edema			
Site	Intact		Abraded		Intact		Abraded	
Animal ID	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr
1	0	0	2	0	0	0	1	0
2	1	0	2	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	2	0	0	0	1	0
5	0	0	3	0	0	0	1	0
6	0	0	1	0	0	0	0	0
Total	1	0	10	0	0	0	4	0
Mean	0.17	0	1.7	0	0	0	0.7	0
Sum	2.57							
P.I.I.	0.6							

<sup>a)</sup> Erythema & Eschar formations\_Grades are follows:

0: no erythema, 1: very slight erythema (barely perceptible), 2: well-defined erythema, 3: moderate to severe erythema, 4: severe erythema (beef redness) to eschar formations (preventing grading of erythema)

<sup>b)</sup> Edema\_Grades are follows: 0: no edema, 1: very slight edema (barely perceptible), 2: slight edema (edges of area well defined by definite raising),

3: moderate edema (raised approximately 1 mm), 4: sever edema (raised more than 1 mm and extending beyond the area of exposure)

<sup>c)</sup> P.I.I. (Primary Irritation Index): sum/4

- 이상의 결과로 보아, 본 시험조건에 의한 시험물질 Purified Bee Venom의 New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극시험 결과, 약한 자극성 물질로 평가하였다.

#### 4. Purified Bee Venom의 New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극시험

##### 가. 목적

- Purified Bee Venom을 함유한 헤어 에센스에 대한 안점막자극 반응을 평가하기 위하여 토끼를 이용하여 시험하였다.

##### 나. 재료 및 방법

- New Zealand White계 수컷 토끼를 평균 체중이 비슷하도록 무작위 분배하였다. 시험물질 적용 24 시간 전에 미리 안검사를 실시하여 각막의 손상이 없는 동물을 사용하였으며, 시험물질(정제봉독 헤어 에센스)을 1 회 적용한 후 3마리(세안군)는 20 - 30 초 후 생리식염 주사액 약 50 mL로 1 분간 세안하였고, 6마리(미세안군)는 그대로 두었다. 좌안의 하안검을 안구로부터 당겨서 결막낭내로 적절한 기구를 사용하여 시험물질을 0.1 mL씩 적용하였고, 상하안검을 약 1 초간 서로 맞췄다. 우안은 적용하지 않는 상태로 두어 비적용 대조안으로 하였다.
- 시험물질 적용 후 1, 2, 3, 4 및 7 일에 토끼의 눈주위, 안구 및 행동을 관찰하였다. 안구는 각막의 혼탁, 혼탁 된 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무 등의 변화를 육안적으로 관찰하여 Table 46과 같이 평가하였다.

Table 46. 안구 병변의 등급

관찰항목		증 상	평 점
결막	발적	• 혈관은 정상	0
		• 몇몇 혈관은 명확히 충혈	1
		• 넓은 심홍색 색조, 각각의 혈관은 쉽게 관찰 안됨	2
• 옅은 선홍색		3	
결막 부종	• 부풀지 않음	0	
	• 정상보다 약간 종창(순막 포함)	1	
	• 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창	2	
	• 눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창	3	
	• 눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 종창	4	
배출물	• 배출물 없음	0	
	• 약간의 배출물(정상 동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은 양 제외)	1	
	• 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	2	
	• 눈 주위의 상당 부위와 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	3	
(발적 + 결막부종 + 배출물) x 2		최대치=10	

관찰항목		증 상	평 점
각막	혼탁	안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)	
		• 화농이나 혼탁이 없음	0
		• 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1
		• 반투명한 부분이 쉽게 관측되나, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
		• 진주 색깔을 나타내고 홍채의 말단이 관찰되지 않으며 동공의 크기가 가까스로 관측됨	3
• 각막이 불투명하고 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안 됨	4		
혼탁된 각막의 범위	• 1/4 이하(그러나 0은 아니다)	1	
	• 1/4 이상 1/2 미만	2	
	• 1/2 이상 3/4 미만	3	
	• 3/4 이상 1 까지	4	
혼탁 × 혼탁된 각막의 범위 × 5		최대치=80	



관찰항목		증상	평점
홍채	반응치	• 정상	0
		• 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막 주위에 중등도의 충혈이 단독 혹은 혼합되어 나타나고 홍채는 빛에 대해 반응함(둔한 반응은 양성)	1
		• 빛에 대해 반응 없으며, 출혈되고 대부분 파괴됨 (이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부)	2
반응치 × 5		최대치=10	

- 안반응은 안구병변의 등급에 따른 각 관찰일의 개체별 총점(I.I.O.I., The Individual Index of Ocular Irritation)의 합을 마리수로 나눈 평균값인 M.I.O.I.(Mean Index of Ocular Irritation)와 관찰기간 중 나타난 M.I.O.I.의 최대값인 I.A.O.I.(The Index of Acute Ocular Irritation)를 구하여 평가하였다. 시험물질의 안점막 자극정도는 아래의 기준에 따라 3 단계로 판정하였다. 1 단계: 시험물질 처치 후 3 일(72 시간) 내에 나타나는 I.A.O.I.값을 확인하고 I.A.O.I.±5 점 범위에 포함되는 관찰값을 보이는 개체가 전체 동물의 40% 이상이 되는지 확인하였다. 2 단계: 1 단계 판정에 따라 선정한 값을 바탕으로 Table 47의 기준에 따라 1 차 안점막자극 등급을 정하였다. 측정치가 각 등급의 경계값일 경우 높은 등급을 선택했다. 3 단계(최종판정): 1 차 안점막자극 등급을 바탕으로 Table 48의 기준에 따라 최종 안점막자극 등급을 판정하였다.

Table 47. 안점막자극 2 단계 판정 기준

1차 안점막자극 등급	평가지
무자극물(Nonirritating, N)	0-0.5
실질적 무자극물(Practically nonirritating, PN)	0.5-2.5
최소 자극물(Minimally irritating, M <sub>1</sub> )	2.5-15
약 자극물(Mildly irritating, M <sub>2</sub> )	15-25
중등도 자극물(Moderately irritating, M <sub>3</sub> )	25-50
중강도 자극물(Severely irritating, S)	50-80
강도 자극물(Extremely irritating, E)	80-100
강 자극물(Maximally irritating, M <sub>x</sub> )	100-110

Table 48. 안점막자극 3 단계 판정 기준

1차 안점막자극 등급	판정조건	최종 판정 등급
무자극물(N)	관찰 1일째 M.I.O.I. = 0	무자극물
	관찰 1일째 M.I.O.I. > 0	실질적 무자극물
실질적 무자극물(PN)	관찰 1일째 M.I.O.I. = 0	
	관찰 1일째 M.I.O.I. > 0	최소 자극물
최소 자극물(M <sub>1</sub> )	관찰 2일째 M.I.O.I. = 0	
	관찰 2일째 M.I.O.I. > 0	약 자극물
약 자극물(M <sub>2</sub> )	관찰 3일째 M.I.O.I. = 0	
	관찰 3일째 M.I.O.I. > 0	중등도 자극물
중등도 자극물(M <sub>3</sub> )	(1) 관찰 7일째 M.I.O.I. ≤ 20 (2) 관찰 7일째 I.I.O.I. ≤ 10(전체의 60%) 또는 I.I.O.I. > 30 이상인 개체가 없는 경우	
	(1) 관찰 7일째 M.I.O.I. > 20 (2) 관찰 7일째 I.I.O.I. > 10(전체의 60%) 또는 I.I.O.I. > 30 이상인 개체가 있는 경우	중강도 자극물
중강도 자극물(S)	(1) 관찰 7일째 M.I.O.I. ≤ 40 (2) 관찰 7일째 I.I.O.I. ≤ 30(전체의 60%) 또는 I.I.O.I. > 60 이상인 개체가 없는 경우	
	(1) 관찰 7일째 M.I.O.I. > 40 (2) 관찰 7일째 I.I.O.I. > 30(전체의 60%) 또는 I.I.O.I. > 60 이상인 개체가 있는 경우	강도 자극물
강도 자극물(E)	(1) 관찰 7일째 M.I.O.I. ≤ 80 (2) 관찰 7일째 I.I.O.I. ≤ 60(전체의 60%) 또는 I.I.O.I. > 100이상인 개체가 없는 경우	
	(1) 관찰 7일째 M.I.O.I. > 80 (2) 관찰 7일째 I.I.O.I. > 60(전체의 60%) 또는 I.I.O.I. > 100 이상인 개체가 있는 경우	강 자극물
강 자극물(M <sub>x</sub> )	(1) 관찰 7일째 M.I.O.I. ≤ 80 (2) 관찰 7일째 I.I.O.I. ≤ 60(전체의 60%)	
	(1) 관찰 7일째 M.I.O.I. > 80 (2) 관찰 7일째 I.I.O.I. > 60(전체의 60%)	강 자극물

다. 결과 및 고찰

(1) Day 0에 미세안균에서 결막 발적과 폐안이 관찰되었다(Table 49).

Table 49. Clinical signs

Groups	Animal ID	Signs	Observed on
G1 (Eye washing)	1	Normal	Day 0-7
	2	Normal	Day 0-7
	3	Normal	Day 0-7
G2 (No eye washing)	4	Hypermic conjunctiva	Day 0
		Eyelid closure	Day 0
		Normal	Day 1-7
	5	Hypermic conjunctiva	Day 0
		Eyelid closure	Day 0
		Normal	Day 1-7
	6	Hypermic conjunctiva	Day 0
		Eyelid closure	Day 0
		Normal	Day 1-7
	7	Hypermic conjunctiva	Day 0
		Eyelid closure	Day 0
		Normal	Day 1-7
8	Hypermic conjunctiva	Day 0	
	Eyelid closure	Day 0	
	Normal	Day 1-7	
9	Hypermic conjunctiva	Day 0	
	Eyelid closure	Day 0	
	Normal	Day 1-7	

The day of administration was designated as Day 0

(2) 시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

(3) 시험물질 적용 후 안반응 관찰 결과, 투여직후 미세안균에서 결막의 발적과 폐안이 관찰되었다. 이를 제외한 본 시험계획서 상의 평가 기준에 속하는 1, 2, 3, 4 및 7 일째의 안 반응의 평점은, 모두 0 이었다. 따라서, 급성 안자극지수 I.A.O.I.(The Index of Acute Ocular Irritation)는 세안균 및 미세안균 모두 0 이었다(Table 50).

Table 50. Score of ocular irritation in rabbits

Groups		G1(Eye washing)			G2(No eye washing)						
Animal ID Day		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Cornea	Opacity(A)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Diffuse areas of opacity(B)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Iris(C)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Conjunctivae	Redness(D)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Chemosis(E)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Secretion(F)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I.I.O.I. <sup>a)</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
M.I.O.I. <sup>b)</sup>	1		0				0				
	2		0				0				
	3		0				0				
	4		0				0				
	7		0				0				
I.A.O.I. <sup>c)</sup>	1-7		0				0				

<sup>a)</sup> I.I.O.I.: The Individual Index of Ocular Irritation = (A x B x 5) + (C x 5) + 2(D + E + F)

<sup>b)</sup> M.I.O.I.: Mean Index of Ocular Irritation = I.I.O.I./animal No.

㉔ I.A.O.I.: The Index of Acute Ocular Irritation

- 이상의 결과로 보아, 본 시험 조건 하에서 시험물질 Purified Bee Venom의 New Zealand White계 수컷 토끼를 이용한 안점막자극시험 결과, 무자극물로 평가되었다.

## (22) 정제봉독 헤어 에센스의 임상평가

### 1. 정제봉독 헤어 에센스의 인체피부 일차자극 시험

(DSA-HSPIT001(32)-16051/2, 주식회사 더마프로, 2016)

#### 가. 목적

- 정제봉독 헤어 에센스를 피부에 도포했을 경우 일어나는 피부자극성을 확인하기 위해 식품의약품안전처(MFDS)<sup>43)</sup>, 미국화장품협회(PCPC) 가이드라인 및 더마프로 피부과학 연구소 표준작업 지침서(SOP)에 따라 일차자극 시험을 수행하였다.

#### 나. 재료 및 방법

(1) 시험물질: 정제봉독 헤어 에센스(Bee venom(melittin) 0.05%)

(2) 인체피부 일차자극시험(48 h Single Patch Test)

##### (가) 시험 대상자

- 피험자 선정기준 및 제외기준에 부합되는 18 - 60세의 남성 또는 여성 30명 이상을 대상으로 실시하였다. 각각의 지원자들은 세부적인 사항에 따른다는 서면 동의서에 서명을 하였으며, 숫자로 된 고유 번호를 부여하였다.


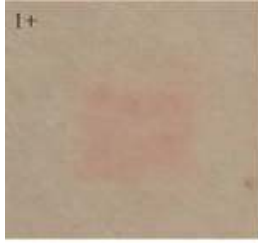
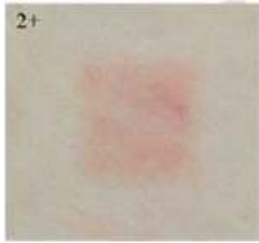
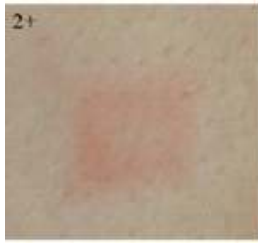




##### (나) 시험방법

- ① 시험 부위는 70% ethanol로 세척한 뒤 건조하였다.
- ② 시험 물질 16  $\mu$ l를 filter paper에 적하시킨 후 시험부위인 등 부위에 얹고, micropore tape으로 고정시켜 반폐쇄 첩포하였다.
- ③ 첩포는 48 시간 동안하며, 첩포를 제거한 후에는 skin marker로 시험 부위를 표시하고 30 분, 24 시간 후에 각 시험 부위를 관찰하였다.

##### (다) 판정기준

- 피부 반응은 Frosch & Kligman 법<sup>44)</sup>을 반영한 Table 51의 기준에 따라 평가하였다.

Table 51. Clinical standard photographs of visual assessment for human patch test

Description	After 30 min	After 24 hr
Slight erythema, either spotty or diffuse		
Moderate uniform erythema		
Intense erythema with edema		
Intense erythema with edema & vesicle		

(라) 결과 계산 방법

- 48 시간 및 72 시간의 평균 반응도를 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, 각 물질에 대한 평균 반응도는 Table 52의 기준에 따라 그 결과를 판정하였다.

$$\text{Response} = \frac{\sum (\text{Grade} \times \text{No. of Responders})}{4 (\text{Maximum grade}) \times n (\text{Total Subjects})} \times 100 \times 1/2$$

Table 52. Human primary irritation index for cosmetic products

Range of Response	Criteria
$0.00 \leq R < 0.87$	Slight
$0.87 \leq R < 2.42$	Mild
$2.42 \leq R < 3.44$	Moderate
$3.44 \leq R$	Severe

다. 결과 및 고찰

(1) 시험 대상자

- 총 30명이 본 시험의 전 과정에 참여하였고 피험자들의 평균 연령은  $41.83 \pm 3.63$  세였으며, 최고 연령자는 50세, 최저 연령자는 36세였다.. 피험자들의 피부 특성은 설문에 의해 조사되었으며, 그 결과는 다음과 같다(Table 53).

Table 53. Skin characteristics of subjects (n=30)

Item	Classification	Frequency(n)	Percentage(%)
Skin Type (피부타입)	Dry skin(건성)	13	43.33
	Normal skin(중성)	7	23.33
	Oily skin(지성)	0	0.00
	Dry to oily skin(건지성)	10	33.33
	Problem skin(문제성)	0	0.00
Irritability (자극 감수성)	Yes	0	0.00
	No	30	100.00
Stinging (따가움 감수성)	Yes	0	0.00
	No	30	100.00
Side effects by cosmetics (화장품부작용경 험)	Yes	0	0.00
	No	30	100.00
Allergy <sup>a)</sup> (알러지)	Food allergy (음식 알러지)	0	0.00
	Metal allergy (금속 알러지)	3	10.00
	Photoallergy(광 알러지)	0	0.00
	Extra allergy (기타 알러지)	0	0.00
	No	27	90.00



	Acne(여드름)	0	0.00
Skin diseases (피부 질환)	Atopy(아토피)	0	0.00
	Hair loss(탈모)	0	0.00
	Extra skin diseases (기타 피부 질환)	0	0.00
	No	30	100.00
Tight feeling (당기는 느낌)	Yes	0	0.00
	No	30	100.00
Taking supplements (건강보조식품 복용 유무)	Taking korean herbal medicines(한약 복용)	0	0.00
	Taking nutrients (영양제 복용)	1	3.33
	Taking extra supplements(기타 복용)	0	0.00
	No	29	96.67
Smoking (흡연 유무)	No	30	100.00
	Less than 10 pieces (10개피 이내)	0	0.00
	More than 10 pieces (10개피 이상)	0	0.00
Menstrual cycle (생리주기)	Within 1 week before menstruation (생리 전 1주 이내)	6	20.00
	During menstruation (생리 중)	8	26.67
	Within 1 week after menstruation (생리 후 1주 이내)	8	26.67
	The others(기타)	8	26.67

a) 금속 알러지에 응답한 피험자는 시험결과에 영향을 미치지 않을 것으로 판단하였다.

## (2) 결과

- 인체피부 일차자극 시험 결과, 본 시험제품에서 2명의 피험자가 1+ 또는 3+ grade 의 피부반응을 보였다.

Table 54. Results of human skin primary irritation test (n=30)

Test material	No. of responder	48hr				72hr				Reaction Grade		
		1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	48h	72h	Mean
정제붕독 헤어 에센스	2	1	-	-	-	-	-	2	-	0.8	5.0	2.9
Negative control	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

- 이상의 결과에서, 본 시험제품은 인체피부의 일차자극 측면에서 중자극 범주의 물질로 판단되었다.

2. 정제붕독 헤어 에센스에 대한 탈모 증상 완화효과 평가시험  
(DPE-HHGIT010(1)-16011, 주식회사 더마프로, 2017)

가. 시험방법

(1) 시험 대상자

- Basic and specific (BASP)<sup>45)</sup> 분류에 의해 basic type M2, C2 또는 U1 이상, specific type은 V1 또는 F1 이상으로 진단된 23 ~ 54세(평균연령 42.52 ± 8.25 세)의 안드로겐성 탈모증 여성 및 남성 지원자 중 시험의 목적, 내용 등에 대해 충분히 설명을 듣고 자발적으로 서면 동의서에 서명한 42명을 대상으로 하여 시험군 21명, 대조군 21명으로 구성하였다(Fig. 76).

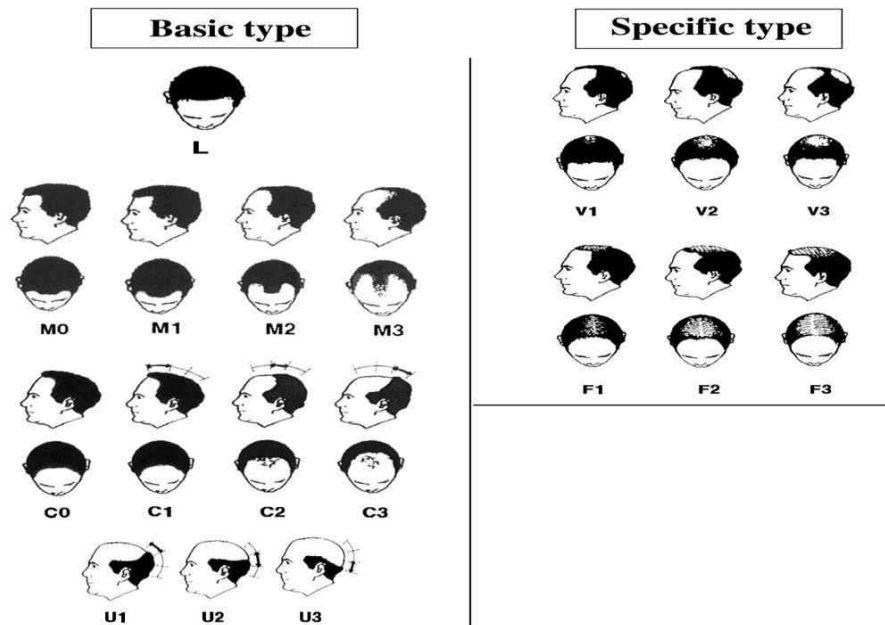


Fig. 76. Basic and specific (BASP) 분류

(2) 시험 기간: 24주

(3) 시험 제품: 정제봉독 헤어 에센스

(가) 시험군: Bee venom(melittin) 0.05% 함유 에센스

(나) 대조군: Bee venom(melittin) 미함유 에센스

(4) 사용방법

- 24주 동안 1일 1회 미온수로 두피를 깨끗하게 샴푸(트리트먼트)한 후, 시험제품을 두피 전체에 약 15회(1mL) 분사한 후 손가락 지문을 이용하여 마사지하듯 문질러 흡수시키도록 하였다.

(5) 평가방법

(가) 임상사진을 이용한 모발 상태 육안평가

- 제품 사용 전과 사용 8주, 16주 및 24주 후 시점에서 전두부 및 두정부 부위를 동일한 조건으로 촬영하였다. 촬영된 임상사진을 2명의 시험자가 시험제품 사용 전의 임상 사진과 비교하여 7단계의 척도(-3:매우 나빠짐, -2:나빠짐 -1:조금 나빠짐, 0:변화 없음, +1:좋아짐, +2:조금 좋아짐, +3:매우 좋아짐)로 평가하여 평균값을 분석하였다.

(나) Phototrichogram을 이용한 전체 모발 수 측정

- 제품 사용 전과 24주 후 시점에서 phototrichogram을 이용하여 전체 모발 수(지름 약 1 cm의 원내에 있는 모발 수)를 분석하였다.

(다) 피험자에 의한 설문평가

- 효능에 관한 설문평가는 제품 사용 8주, 16주 및 24주 후 시점에서, 사용성에 관한 설문평가는 제품 사용 24주 후 시점에서 1~5점 척도로 이루어졌으며, 평균값을 분석하였다.

(라) 안전성 평가

- 제품 사용 8주, 16주 및 24주 후 시점에서 문진과 시험자의 관찰에 의해 주관적 피부 자극감과 객관적 피부 자극을 평가하였다.

(6) GCP 규정 및 탈모 증상 완화에 도움을 주는 화장품의 인체적용시험 가이드라인<sup>46)</sup> (MFDS, 2017. 05)을 반영한 더마프로 피부과학연구소 표준작업지침서 (SOP)에 따라 시험을 수행하였다.

## 나. 시험결과

(1) 피험자 정보

(가) 시험군

① 남성: 10, 여성: 11

② BASP 분류 (명)

LF1	LF2	M0F1	M0V1	M1F1	M1V1	M2F1	M3V3	C0F1	C2F2
2	1	4	1	7	1	1	1	2	1

(나) 대조군

- ① 남성: 12, 여성: 9
- ② BASP 분류 (명)

LF1	M0F	M1F	M1F	M1V	M1V	M2	M2F	C2F	C2F	C2F	C3
	1	1	2	1	2		1	1	2	3	
1	3	6	1	1	1	2	1	1	1	1	2

(2) 군간 동질성 분석

- 두 군간의 무작위 추출의 타당성 여부를 위해 동질성 검증을 분석한 결과, 연령 및 제품 사용 전 전체 모발 수 항목에서 두 군간 유의한 차이가 없었으며, 이는 무작위 추출이 효과적으로 된 것임을 의미한다(Table. 55).

Table 55. Homogeneity of baseline value of evaluation parameters between test and control groups

Item	Test group	Control group	<i>p</i> -value
Age	42.10±8.12	42.95±8.56	0.741
Total hair counts	147.10±17.85	143.33±21.55	0.541

Data are expressed as mean±S.D. (n=42)

(3) 임상사진을 이용한 모발 상태 육안평가 분석

- 육안평가 분석 결과, 제품 사용 전과 비교시 대조군은 제품 사용 24주 후 시점에서 유의하게 개선되었고( $p < 0.05$ ), 모든 시점에서 군간 유의차는 없었다(Table 56, 57, Fig. 77).

Table 56. Descriptive statistical analysis of visual assessment

Group	Week	N	Mean <sup>a)</sup>	SD	<i>p</i> -value <sup>b)</sup>
Test	Before	21	0.00	0.00	-
	8W	21	-0.05	0.22	0.329
	16W	21	0.00	0.00	-
	24W	21	0.19	0.43	0.057
Control	Before	21	0.00	0.00	-
	8W	21	0.05	0.22	0.329
	16W	21	0.05	0.22	0.329
	24W	21	0.26	0.41	0.008

<sup>a)</sup> Increment of mean value represents improvement of hair condition on vertex and hairline

<sup>b)</sup> Significantly different at  $p < 0.05$  compared with before treatment

Table 57. Statistical analysis of visual assessment between test and control groups

Group	Week	<i>p</i> -value
Test vs. Control	8W	0.162
	16W	0.329
	24W	0.634

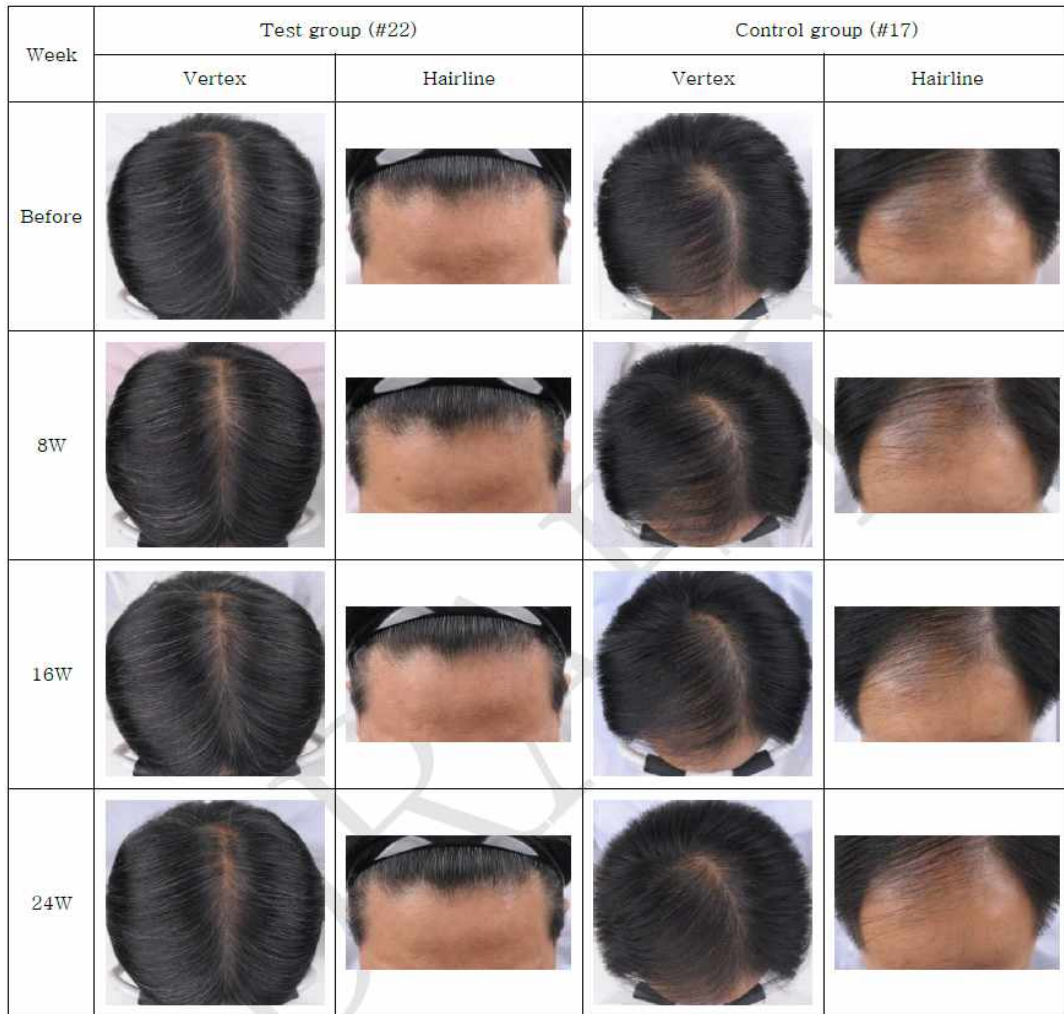


Fig. 77. 시험 제품의 24 주 연속 사용 후 탈모의 변화 이미지

(4) Phototrichogram을 이용한 전체 모발 수 분석

- 전체 모발 수 분석 결과, 제품 사용 전과 비교시 사용 24주 후 시점에서 시험군은 모발 수가 증가하는 경향을 보였고, 대조군은 감소하는 경향을 보였으나 유의차는 없었다(Table 58). 군간 비교시 *p*-value는 0.185로 유의차는 없었다.

Table 58. Descriptive statistical analysis of total hair count between test and control groups

Group	Week	N	Mean <sup>a)</sup> (n/cm <sup>2</sup> )	SD	<i>p</i> -value	Increment (%)
Test	Before	21	147.10	17.85	-	-
	24W	21	147.71	18.41	0.406	0.42▲
Control	Before	21	143.33	21.55	-	-
	24W	21	142.29	22.01	0.283	0.73▽

<sup>a)</sup> Increment of mean value represents improvement of hair counts (▲)

(5) 피험자에 의한 설문평가 분석

(가) 효능에 관한 설문 분석

- 시험군이 대조군에 비해 모든 항목에서 유의한 긍정적 효과가 없었다(Table 59, Fig. 78, 79).

Table 59. Results of positive answers in self-questionnaires for efficacy

Item	Week	Test group (n=21)		Control group (n=21)		p-value
		Mean	SD	Mean	SD	
탈모 부위 개선 (Improvement of depilation areas)	8W	3.33	0.48	3.38	0.59	0.447
	16W	3.33	0.80	3.48	0.68	0.623
	24W	3.52	0.51	3.38	0.59	0.536
탈락 모발 수 감소 (Decrease of hair loss)	8W	3.10	0.70	3.33	0.73	0.553
	16W	3.38	0.74	3.43	0.81	0.454
	24W	3.52	0.51	3.48	0.60	0.591
모발 성장속도 증가 (Increase of hair growth rate)	8W	3.19	0.68	3.33	0.48	0.282
	16W	3.33	0.73	3.52	0.51	0.195
	24W	3.43	0.51	3.29	0.56	0.525
모발 튼튼해짐 (Improvement of hair health)	8W	3.29	0.90	3.29	0.56	0.235
	16W	3.19	0.93	3.43	0.60	0.316
	24W	3.67	0.66	3.24	0.54	0.079
정수리 모발 개선 (Improvement of vertex hair)	8W	3.33	0.48	3.43	0.51	0.751
	16W	3.19	0.75	3.48	0.68	0.265
	24W	3.33	0.58	3.38	0.59	0.950
이마 라인 개선 (Improvement of forehead line)	8W	3.14	0.48	3.33	0.48	0.377
	16W	3.14	0.85	3.24	0.70	0.154
	24W	3.29	0.78	3.14	0.57	0.370
모발 만족도 (Hair satisfaction)	8W	2.95	0.92	3.24	0.44	0.013 <sup>a)</sup>
	16W	3.19	0.98	3.57	0.60	0.288
	24W	3.38	0.80	3.24	0.70	0.441

<sup>a)</sup> Significantly different at  $p < 0.05$  compared with control group

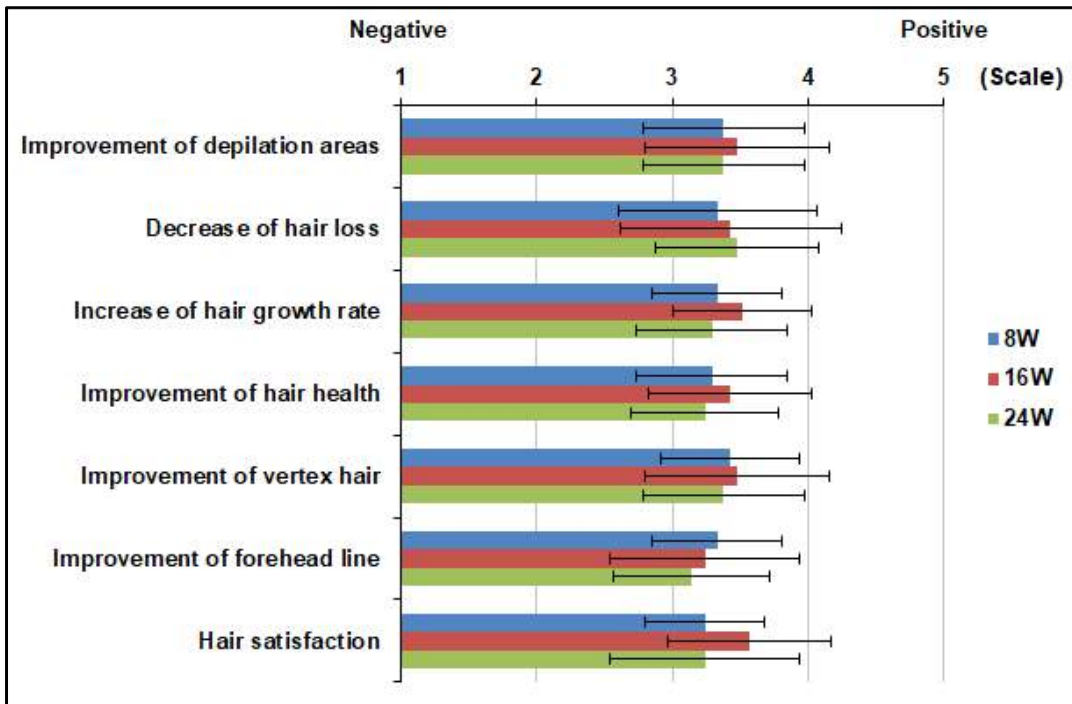


Fig. 78. Sensorial profile of the products for efficacy in test group (mean±SD)

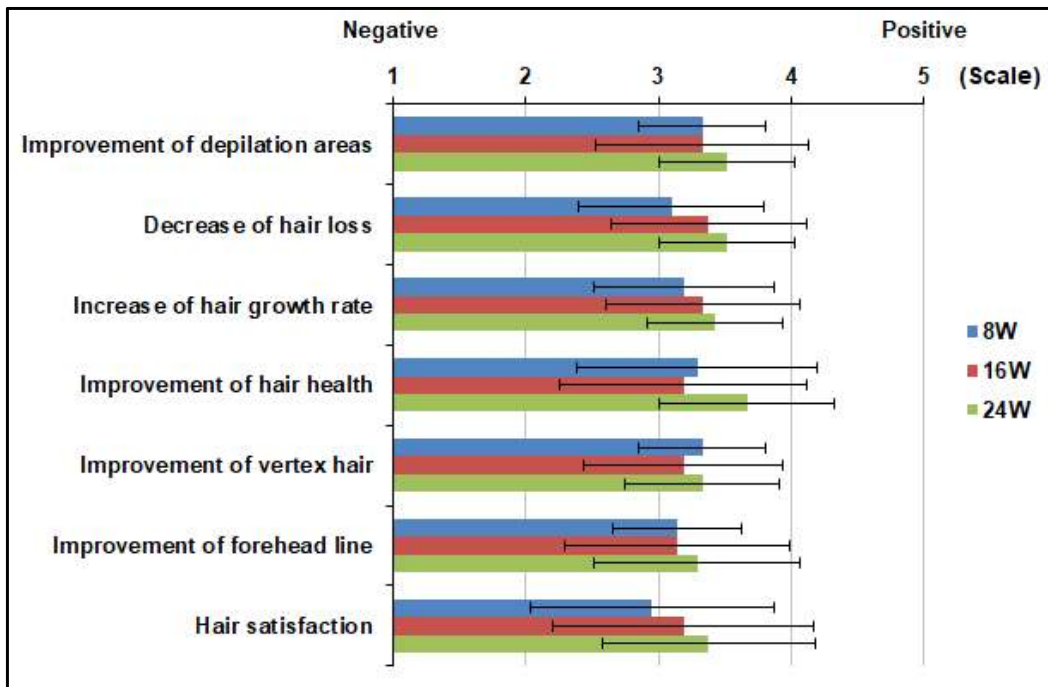


Fig. 79. Sensorial profile of the products for efficacy in control group (mean±SD)



(나) 사용성에 관한 설문 분석

- 모든 항목에서 군간 유의차는 없었다(Fig. 80). Scale 1은 부정적 ~ 5는 긍정적.

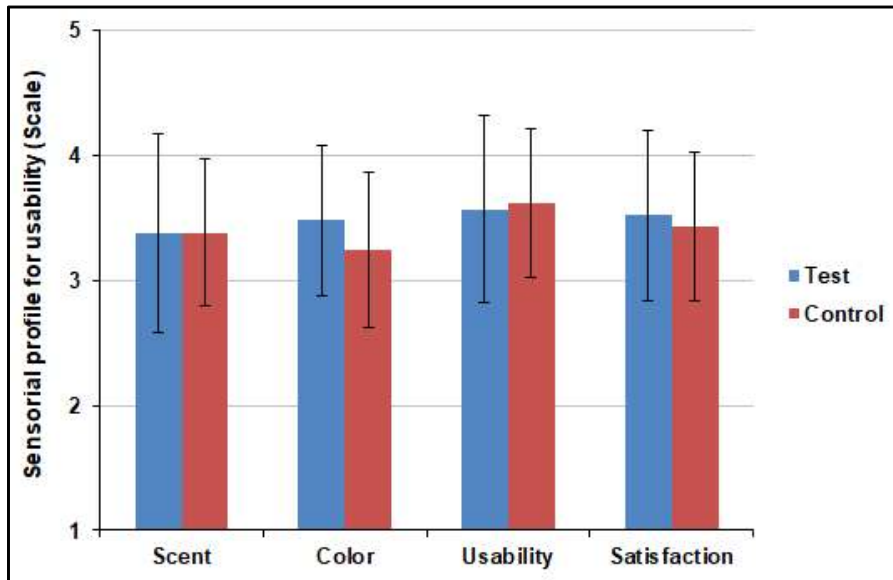


Fig. 80. Sensorial profile of the products for usability (mean±SD)

(6) 안전성 평가

- 본 시험기간 동안 피험자 1명(#38, 대조군)이 16주차 시점에 제품 사용 4개월 동안 생리가 없었음을 확인하였으며 피험자의 의지에 따라 시험을 중단하였다. 추적관찰 결과 시험 중단 2개월차에 피험자의 생리가 정상적으로 돌아왔으나, 시험제품과의 인과관계는 확인하지 못하였다. 이외의 모든 피험자에서 이상반응은 관찰되지 않았다(Table 60).

Table 60. Adverse reactions

증상(Symptom)		8W	16W	24W
주관적 자극 (Subjective irritation)	가려움(Itching)	0	0	0
	찌르듯이 아픔(Prickling)	0	0	0
	화끈거림(Burning)	0	0	0
	따끔거림(Stinging)	0	0	0
	뻣뻣함(Stiffness)	0	0	0
	당김(Tightening)	0	0	0
	기타(etc.)	0	0	0
객관적 자극 (Objective irritation)	홍반(Erythema)	0	0	0
	부종(Edema)	0	0	0
	인설(Scale)	0	0	0
	구진(Papule)	0	0	0
	기타(etc.)	0	0	0
기타	생리중단	0	1(#38)	0
총 이상반응 자의 수(Total number of subjects)		0	1	0

- 본 시험제품인 정제봉독 헤어 에센스에 대하여 안드로젠성 탈모증을 가진 남녀를 대상으로 모발상태 육안평가 및 전체 모발 수를 평가한 결과, 제품 사용 24주 후 시점에서 육안평가의 경우 대조군은 유의하게 증가하였고, 전체 모발 수의 경우 시험군은 증가, 대조군이 감소하는 경향을 보였으나 모든 항목에서 군간 유의한 차이는 없었다.

(7) 결론

- 세포와 동물에서 시험결과는 매우 우수함에도 불구하고 인체 적용시험에서 유의한 결과를 얻지 못했으나 인체적용시험 결과에 대해 다시 면밀히 원인(피험자 수 확대 및 제품내 유효성분의 균질화 등)을 파악한 후에 인체적용시험을 재수행하기 위한 계획을 수립하고 이를 위한 연구비를 확보하도록 하여 인체적용시험을 재추진 할 필요성이 있는 것으로 생각된다.

## (23) 기능성화장품 심사 및 관련 자료 작성

### 1. 기능성화장품 심사의뢰서

- 화장품법 시행규칙 [별지 제7호 서식]에 맞게 기능성화장품 심사의뢰서를 작성하였으며 그 외 관련 제출 자료는 기능성화장품 심사에 관한 규정<sup>36)</sup>을 적용하여 작성하였다.

■ 화장품법 시행규칙 [별지 제7호서식] <개정 2013.3.23>

### 기능성화장품 심사의뢰서 [ ]제조 [ ]수입

\* [  ]에는 해당되는 곳에  표시를 합니다. (앞쪽)

접수번호	접수일	처리기간	60일
제조판매업자	상호(법인인 경우 법인의 명칭) 고려은단(주)	제조판매업 등록번호	
	성명 조영조	생년월일 1974년 12월 20일	
	소재지 경기도 성남시 중원구 사기막골로 100 고려은단	전화번호 031-743-1155	

심사의뢰 품목

제품명	정제봉독 헤어 에센스
원료 성분 및 배합 비율	별첨
제형	백색의 불투명한 액제
효능·효과	별첨
용법·용량	별첨
사용할 때의 주의사항	별첨
기준 및 시험방법	별첨
제조소(원)	כות데(주)
비고	

「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제9조제1항에 따라 위와 같이 기능성화장품의 심사를 의뢰합니다.

2017 년      09 월      01 일

신청인 고려은단(주) (서명 또는 인)

담당자 성명 윤수민

담당자 전화번호 010-3395-1713

식품의약품안전평가원장 귀하

---

210mm × 297mm[일반용지 60g/m<sup>2</sup>(재활용품)]

- 가. 별첨 자료

## 정제붕독 헤어 에센스

심사의뢰서 별첨문서

# 고려은단

KOREA EUNDOAN

## 목차

1. 원료성분 및 배합비율 .....	3
2. 효능·효과 .....	3
3. 용법·용량 .....	3
4. 사용할 때의 주의사항 .....	4
5. 기준 및 시험방법 .....	4

1. 원료성분 및 배합비율

	원료성분	배합비율
1	정제수	80.28
2	프로판디올	5.475
3	글리세린	5.475
4	하이드롤라이즈드호호바에스터	1.5
5	판테놀	0.01
6	바이오틴	0.01
7	에탄올	5
8	피이지-60하이드로제네이티드캐스터오일	0.2
9	라벤더오일	0.5
10	1,2-헥사디올	1
11	하이드록시아세토페논	0.5
12	봉독	0.05

2. 효능·효과

탈모 증상의 완화에 도움을 줄 수 있음

3. 용법·용량

사용 전 충분히 흔들어서 사용 부위에 가까이 대고 적당량 분사한 후, 충분히 흡수되도록 손가락을 이용하여 마사지 하듯이 문질러 사용한다..

#### 4. 사용할 때의 주의사항

##### 4.1. 사용시 주의사항

4.1.1. 화장품 사용 시 또는 사용 후 직사광선에 의하여 사용부위가 붉은 반점, 부어오름 또는 가려움증 등의 이상 증상이나 부작용이 있는 경우 전문의 등과 상담할 것

4.1.2. 상처가 있는 부위 등에는 사용을 자제할 것

##### 4.2. 보관 및 취급 시의 주의사항

4.2.1. 어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관할 것

4.2.2. 직사광선을 피해서 보관할 것

#### 5. 기준 및 시험방법

##### 5.1. 시험일지 및 시험성적서 첨부

나. 기준 및 시험방법

(1) 시험일지

## 시 험 일 지

제 품 명	정제봉독 헤어 에센스	규 격	별규													
제조번호		시험번호														
시험항목	시험방법															
1. 성상	백색의 불투명한 액체															
	결과 :															
	시험완료일자		시험자													
2. 확인시험	이 액은 멜리틴 함량시험법(HPLC)에 준하여 시험할 때 멜리틴 표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.															
	결과 :															
	시험완료일자		시험자													
3. 정량시험 (멜리틴)	1) 표준용액의 조제 1.1. 멜리틴 표준품 10mg( )mg을 취하여 물을 넣어 10mL로 한다(1000 ppm). 이 액을 1.5, 3.0, 4.5mL를 각각 취하여 물을 넣어 10mL로 한다(150, 300, 450 ppm).  2) 시험용액의 조제 2.1. 검체 일정량을 취하여 0.45µm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 한다.  3) 분석방법 3.1. HPLC를 이용하여 아래의 분석조건에 따라 분석한다. 공시험액, 표준용액(150, 300, 450 µg/mL), 시험용액 각각 1회씩 주입하여 분석한다.															
	4) 분석조건 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 30%;">항목</td> <td style="width: 70%;">조건</td> </tr> <tr> <td>주입량</td> <td>10 µL</td> </tr> <tr> <td>컬럼온도</td> <td>38°C</td> </tr> <tr> <td>유량</td> <td>1.2 mL/min</td> </tr> <tr> <td>이동상</td> <td>TFA : water (0.2 : 99.8, v/v) : TFA : ACN (0.2 : 99.8, v/v) = 58 : 42</td> </tr> <tr> <td>컬럼</td> <td>Jupiter 4µm proteo 90Å, 150 x 4.6mm(C12) 또는 이와 동등한 컬럼</td> </tr> <tr> <td>검출파장</td> <td>214nm</td> </tr> </table>			항목	조건	주입량	10 µL	컬럼온도	38°C	유량	1.2 mL/min	이동상	TFA : water (0.2 : 99.8, v/v) : TFA : ACN (0.2 : 99.8, v/v) = 58 : 42	컬럼	Jupiter 4µm proteo 90Å, 150 x 4.6mm(C12) 또는 이와 동등한 컬럼	검출파장
항목	조건															
주입량	10 µL															
컬럼온도	38°C															
유량	1.2 mL/min															
이동상	TFA : water (0.2 : 99.8, v/v) : TFA : ACN (0.2 : 99.8, v/v) = 58 : 42															
컬럼	Jupiter 4µm proteo 90Å, 150 x 4.6mm(C12) 또는 이와 동등한 컬럼															
검출파장	214nm															



## 시 험 일 지

	5) 계산		
	C	x	1
	0.5	x	0.6
		x	P
		x	1000
			=                    %
	<p style="margin-left: 40px;">C : 시험용액중의 멜리틴 농도(ppm) P : 표준품 순도(%)</p>		
	6) 결과		
	시험완료일자		시험자
4. pH	<p>「기능성화장품 기준 및 시험방법」의 IX.일반시험법 47. pH측정법에 따라 시험할 때, 검체 약 2g 또는 2mL를 취하여 비커에 넣고 물 30mL를 넣어 수욕상에서 가온하여 지방분을 녹이고 흔들어 섞은 다음 냉장고에서 지방분을 응결시켜 여과한 액의 pH를 측정하였을 때 pH 6.0 ~ 8.0 이어야 한다.</p>		
	결과 :		
	시험완료일자		시험자

(2) 시험성적서

## 시 험 성 적 서

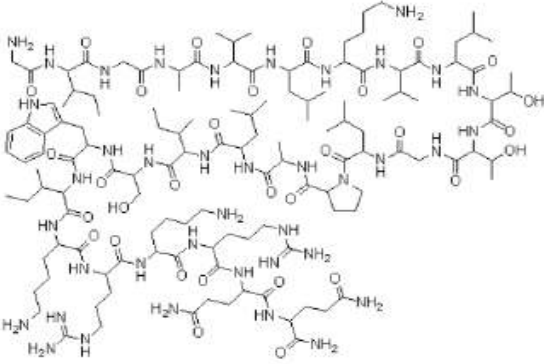
제 품 명	정제붕독 헤어 에센스	규 격	별규		
제조번호		시험번호			
시험항목	시험기준	시험결과	시험자	시험일	
1. 성상	백색의 불투명한 액제				
2. 확인시험	표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타냄				
3. 정량시험	멜리틴으로써 표시량의 90 % 이상				
4. pH	6.0 ~ 8.0				
판정	판정일자	확인자	승인자		

다. 기원 및 개발경위

<b>고려은단</b>	<b>정제봉독 헤어 에센스</b>	문서번호 : ST-BVP-1708
		개정번호 : 00
		작성일 : 2017.08.24.(Thu)
		페이지 : 1 of 1

1. 기원 및 개발경위

1.1. 기원

성분명(영문명)	벌독(Bee venom)
이명	봉독
기원 및 정의	이 원료는 주로 멜리틴(Melittin)으로 된 꿀벌 <i>Apis mellifera</i> 에서 수집된 물질
용도	탈모방지 기능성화장품 개발
주요성분	Melittin
주요성분의 구조식	 <p style="text-align: center;">Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trip-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH<sub>2</sub></p>

[출처 : 대한화장품협회, 화장품 성분 사전 외]

2. 개발경위

고려대학교에서 Human dermal papilla 세포를 이용한 시험 평가를 통해 일정 농도의 봉독이 세포에 독성을 유발하지 않으며 봉독 처리에 의해 세포증식이 촉진됨을 확인하였음. 또한 봉독처리 시 동물모델에서의 퇴행기 탈모방지 효과가 뛰어난을 확인하였음. 이를 토대로 2014년 농기평 농생명산업기술개발사업을 통해 원료 표준화, 제품표준화를 확립하고자 하였으며 동물모델에서의 안전성을 확인하여 이를 활용한 탈모방지제품을 개발하고자 함.

라. 안전성 및 유효성 또는 기능에 관한 자료

## 정제봉독 헤어 에센스

심사의뢰 첨부서류

# 고려은단

---

KOREA EUN DAN

<b>고려은단</b>	<b>정제봉독 헤어 에센스</b>	문서번호 : ST-BVP-1708
		개정번호 : 00
		작성일 : 2017.08.25.(Fri)
		페이지 : 2 of 18

## 목차

1. 안전성에 관한 자료.....	3
1.1. 단회 투여 독성시험.....	3
1.2. 피부 감작성시험.....	3
1.3. 피부자극시험.....	4
1.4. 안점막 자극시험.....	4
2. 유효성 또는 기능에 관한 자료.....	5
2.1. 효력시험 자료.....	5
2.2. 인체 적용시험.....	12

1. 안전성에 관한 자료

1.1. 단회 투여 독성시험

1.1.1. 목적

기능성화장품의 원료로 사용된 봉독원료를 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경피투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.

1.1.2. 방법

봉독원료를 2.5, 5, 10mg/kg의 용량으로 투여하는 시험물질 투여군과 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하여 군당 10마리(암수 각 5마리)에 단회 경피투여하였다. 일반증상, 체중변화, 부검소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였다.

1.1.3. 결과

- 1.1.3.1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 1.1.3.2. 일반증상 관찰 결과, 시험물질에 의한 이상증상은 관찰되지 않았다.
- 1.1.3.3. 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- 1.1.3.4. 부검소견 관찰 결과, 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

1.2. 피부 감작성시험

1.2.1. 목적

봉독을 함유한 헤어 에센스에 대한 피부감작성을 평가하기 위하여 Hartley계 기니픽을 이용하여 시험하였다.

1.2.2. 방법

시험물질(봉독을 함유한 헤어 에센스)을 100%농도로 적용하여 감작 및 야기한 후, 야기 처치 제거 후 24 및 48시간의 피부반응을 평가하여 이를 기초로 피부감작성을 평가하였다. 피부반응 및 피부감작성을 비교 평가하기 위해 음성대조군(멸균주사용수 사용) 및 양성대조군(1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene; DNCB 사용)을 두었다.

1.2.3. 결과

1.2.3.1. 시험물질에 의한 일반증상의 변화는 관찰되지 않았다

1.2.3.2. 시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

1.2.3.3. 피부감작성 평가 결과, 음성대조군 및 시험물질 투여군에서는 0%의 감작율을 보여 '매우약함' (I 등급)으로 평가하였다. 반면, 양성대조군은 모든 동물에서 흥반이 관찰되어 100%의 유발율을 보여 '매우강함'(V등급)으로 평가하였다.

이상의 결과로 보아, 본 시험 조건 하에서 시험물질의 피부감작율은 100% 농도에서 '매우약함'(I 등급)으로 판정하였다.

### 1.3. 피부자극시험

#### 1.3.1. 목적

봉독을 함유한 헤어 에센스에 대한 피부자극성을 조사하기 위하여 토끼를 이용하여 시험하였다.

#### 1.3.2. 방법

New Zealand White계 수컷 토끼(비찰과)피부 및 찰과피부에 시험물질(봉독을 함유한 헤어 에센스)을 적용한 후 피부반응을 평가하였다.

#### 1.3.3. 결과

1.3.3.1. 일반증상 관찰 결과, 시험물질 적용부위에서 흥반 및 부종이 산발적으로 관찰되었다.

1.3.3.2. 시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

1.3.3.3. 피부반응 관찰결과, 1차 피부자극지수(PII)는 0.6이었으며, 약한 자극성 물질로 구분되었다.

이상의 결과로 보아, 본 시험조건에 의한 시험물질 Purified Bee Venom의 New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극시험 결과, 약한 자극성 물질로 평가하였다.

### 1.4. 안점막 자극시험



1.4.1. 목적

붕독을 함유한 헤어 에센스에 대한 안점막자극성을 조사하기 위하여 토끼를 이용하여 시험하였다.

1.4.2. 방법

New Zealand White계 수컷 토끼의 안점막에 시험물질(붕독 함유 헤어 에센스)을 적용한 후 안구반응을 평가하였다.

1.4.3. 결과

1.4.3.1. Day 0에 미세안군에서 결막발적과 폐안이 관찰되었다.

1.4.3.2. 시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

1.4.3.3. 시험물질 적용 후 안반응 관찰 결과, 투여직후 미세안군에서 결막의 발적과 폐안이 관찰되었다. 이를 제외한 본 시험계획서 상의 평가 기준에 속하는 1,2,3,4 및 7 일째의 안 반응의 평점은 모두 0이었다. 따라서 급성 안자극지수 IA.OI.(The Index of Acute Ocular Irritation)는 세안군 및 미세안군 모두 0 이었다.

이상의 결과로 보아, 본 시험 조건하에서 시험물질의 New Zealand White계 수컷 토끼를 이용한 안점막자극시험 결과, 무자극물로 평가되었다.

2. 유효성 또는 기능에 관한 자료

2.1. 효력시험 자료

2.1.1. 붕독의 탈모방지 및 양모촉진 효과 측정

2.1.1.1. 방법

휴지기(telogen) 상태인 C57BL/6 마우스의 등쪽 모발을 제거하여 모든 모발을 성장기로 전환 시킨 후 시험물질을 수 주간 처리하면서 등쪽 모발 성장을 관찰하여 양모 촉진 효과를 평가하였다. 양모촉진 효과를 육안으로 확인하기 위하여 디지털사진기를 이용하여 일정 간격으로 사진 촬영을 하였으며 실험 마지막 날에는 쥐를 희생시켜 등 부위의 피부조직을 적출한 후



염색(Hematoxylin&Eosin)하여 조직을 관찰하였다. 또한 털을 무작위로 30개씩 뽑아 길이를 측정하였다.

2.1.1.2. 결과

2.1.1.2.1. C57BL/6 마우스의 육안적 관찰 및 명암 비교

2.1.1.2.1.1. 육안적 관찰 시 봉독이 모발의 성장을 촉진시키며 그 효과가 양성대조군으로 사용된 Minoxidil과 유사하다는 것을 확인하였다.

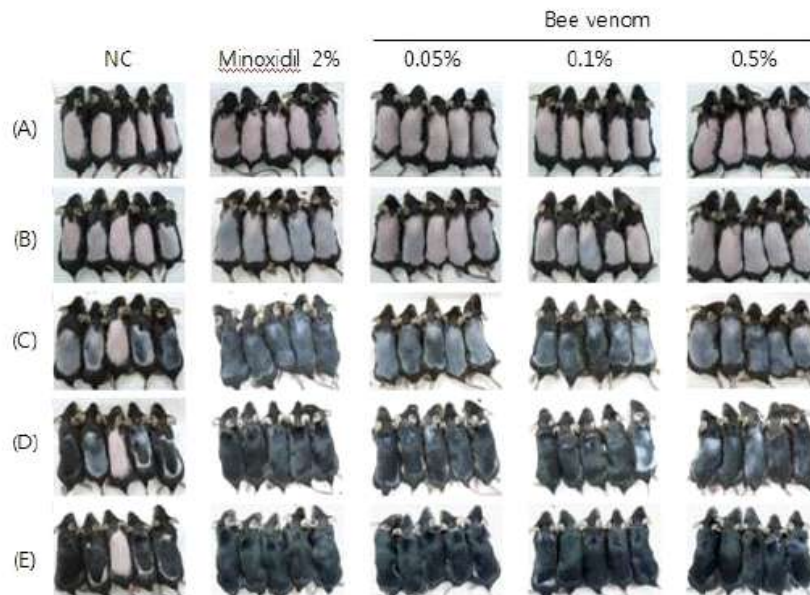


그림 1. C57BL/6 마우스에서 농도별 봉독에 따른 모발 성장 촉진 효과.

(A)시료도포 0 일 자, (B) 7 일 자, (C) 11 일 자, (D) 14 일 자, (E) 16 일 자

2.1.1.2.1.2. Image J라는 프로그램을 이용하여 일정구획 내의 마우스 모발 상태를 명암으로 비교하여 수치로 정량화하였을 때, 음성대조군(NC)에 비해 일정면적 당 검은색 부위가 증가하는 경향을 확인하였다.

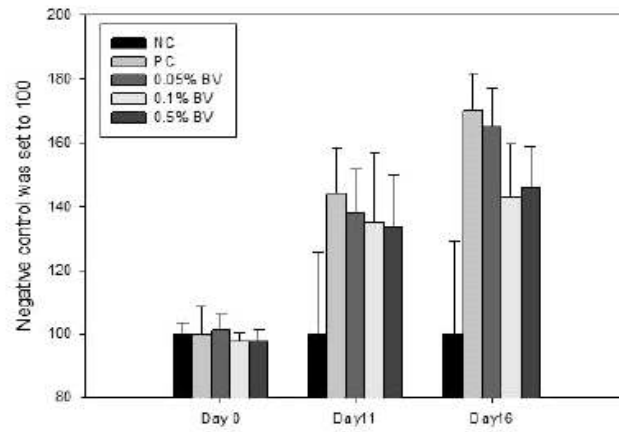


그림 2. C57BL/6 마우스 모발 상태를 명암으로 비교하여 나타난 붕독의 양모 촉진 효과.

2.1.1.2.2. 조직학적 분석

모낭의 성장에 미치는 효과를 확인하기 위해 Hematoxylin&Eosin 염색 후 현미경으로 조직을 관찰하였을 때 음성대조군에 비해 양성대조군과 붕독 처리군의 모낭의 수가 증가하고 모낭의 길이가 증가하였다.

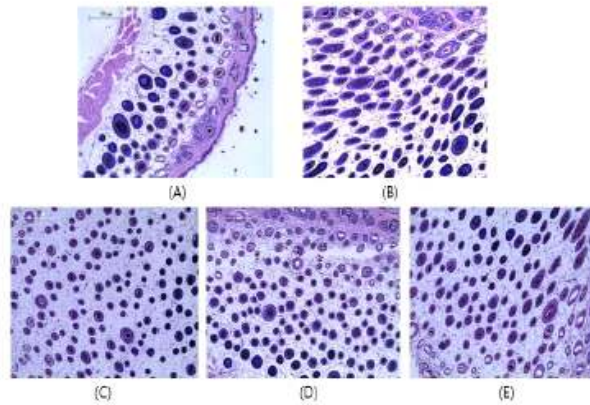


그림 3. 16일간 붕독처리에 따른 모낭의 조직학적 변화(H&E stain, Cross section, ×100).

(A) 음성대조군, (B) 양성대조군, (C) 붕독 0.05%, (D) 붕독 0.1%, (E) 붕독 0.5%. Scale bar = 200µm

<b>고려은단</b>	<b>정제봉독 헤어 에센스</b>	문서번호 : ST-BVP-1708
		개정번호 : 00
		작성일 : 2017.08.25.(Fri)
		페이지 : 8 of 18

Negative control	2% Minoxidil	Bee venom 0.05%	Bee venom 0.1%	Bee venom 0.5%
15.75±10.77	29.63±3.70	32.75±7.01	35.75±10.25	26.00±8.99

표 1. 16일간 봉독 처리 후 일정면적 당 모낭개수의 평균±표준편차.

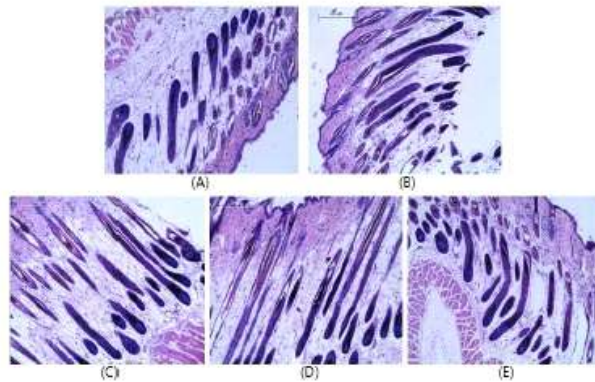


그림 4. 16일간 봉독처리에 따른 모낭의 조직학적 변화(H&E stain, Longitudinal section, X100).

(A) 음성대조군, (B) 양성대조군, (C) 봉독 0.05%, (D) 봉독 0.1%, (E) 봉독 0.5%. Scale bar = 200µm

Negative control	2% Minoxidil	Bee venom 0.05%	Bee venom 0.1%	Bee venom 0.5%
15.75±10.77	29.63±3.70	32.75±7.01	35.75±10.25	26.00±8.99

표 2. 16일간 봉독 처리 후 무작위로 뽑은 모낭길이(µm)의 평균±표준편차.

#### 2.1.1.2.3. 모발 길이 측정

양성대조군과 봉독처리군 모두 음성대조군보다 털의 길이가 증가하였으며 봉독 0.1% 처리 그룹이 양성대조군보다 평균 털 길이가 현저히 증가하였다.

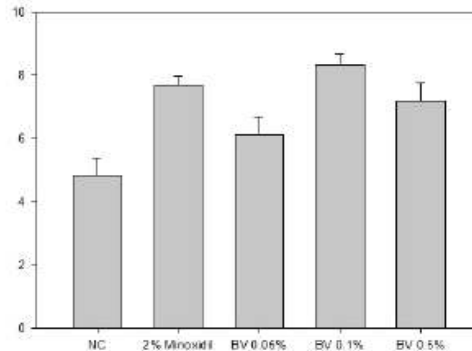


그림 5. 16일간 봉독 처리 후 무작위로 뽑아 측정한 마우스 꼬리 길이

## 2.1.2. 인체모유두세포 증식능 시험

### 2.1.2.1. 방법

96-well plate의 각 well 마다 hDPCs를  $1 \times 10^5$ 개만큼 seeding 한 후 24시간 동안 배양기(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 봉독 (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)과 mellitin (200 ng/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 WST-1 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA)를 10  $\mu$ l 첨가하여 SpectraMax microplate reader를 사용하여 흡광도(450 nm)를 측정하여 control of % 비로 비교하였다.

### 2.1.2.2. 결과

인체모유두세포 증식능이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인하였다(그림 6).



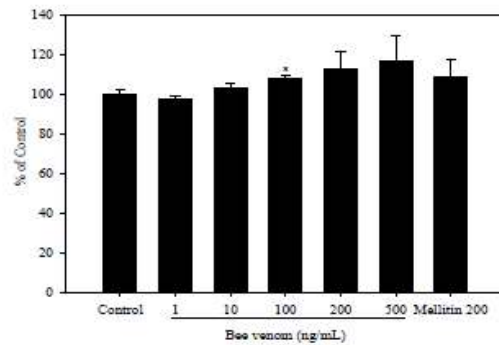


그림 6. The effect of bee venom on the proliferation of human dermal papilla cells (hDPCs).

Cell proliferation was measured using WST-1 reagent (\*p < 0.05).

### 2.1.3. VEGF 단백질 발현량 측정

#### 2.1.3.1. 방법

먼저 60 mm dish에 hDPCs를 seeding ( $2 \times 10^5$  cells/well)한 후 24시간 동안 배양기(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시켰다. 그 후 봉독 (100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)과 minoxidil (1 μM)을 처리하고 24시간 동안 배양기(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 PBS로 2회 세척 후 Pro-Prep protein extraction solution에 넣고 원심분리(13,000rpm for 5 min at 4 °C) 후 상등액에서 얻은 단백질을 Bradford assay를 이용하여 정량하였다. 30 μg의 protein을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 전기영동하여 분리한 후 Trans-Blot semi-dry transfer cell을 사용하여 PVDF membrane 로 이동시켰다. 그 후 5% non-fat skimmed milk in PBS-T(PBS with 0.05% Tween 20)로 blocking (overnight at 4°C)하고, PBS-T로 15분씩 3번 세척한 후 primary antibody 를 PBS-T에 1:500로 희석하여 2시간 동안 반응시킨 후 동일한 방법으로 세척한 후 secondary antibody를 1:25,000로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 세척하고, Western Bright Sirius western blotting detection kit를 이용하여 이미지 분석기로 분석하였

다. Endogenous control로 anti- $\beta$ -actin를 1:5,000로 희석하여 사용하였다.

### 2.1.3.2. 결과

신생혈관 생성을 촉진시키는 인자인 VEGF의 mRNA 발현량은 음성대조군에 비해 봉독 처리군(100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. hDPCs를 24시간 동안 배양기(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양시킨 후 봉독(100 ng/ml, 200 ng/ml, and 500 ng/ml)을 24시간 동안 처리한 후 VEGF 발현량을 측정된 결과 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인하였다.

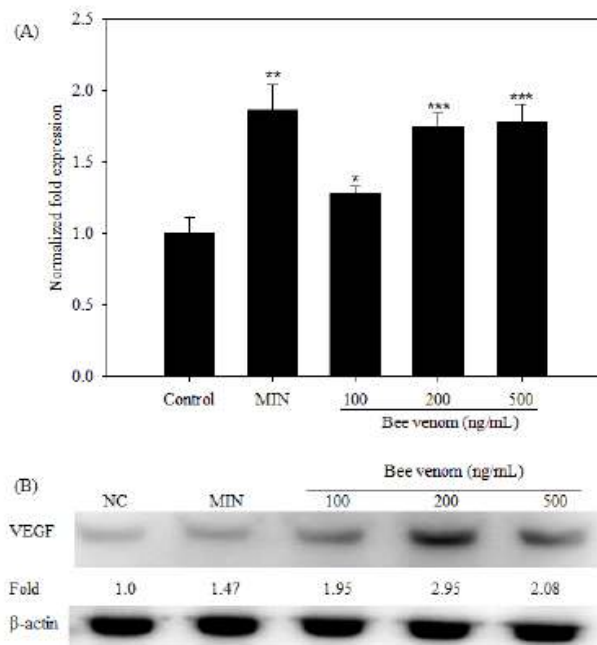


그림 7. The effect of bee venom on VEGF gene (A) and protein (B) expression by RT-PCR and western blot in hDPCs, respectively. MIN, 1  $\mu$ M minoxidil. (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001).

휴지기에 신생혈관 생성을 촉진시켜 성장기로 유도하는 인자인 VEGF의 발현은 음성대조군에 비해 봉독을 처리한 군에서 증가하여 양모촉진효과를 나타내었다.

## 2.2. 인체 적용시험

## 2.2.1. 정제봉독 헤어 에센스의 인체피부 일차자극 시험

## 2.2.1.1. 시험대상자

피험자 선정기준에 부합되는 18~60세 남성 또는 여성 30명 이상을 대상으로 실시하였다.

## 2.2.1.2. 시험방법

시험 부위를 70% 에탄올로 세척한 뒤 건조하고 시험물질(정제봉독 헤어 에센스)을 filter paper에 적하시킨 후 시험부위인 등 부위에 얹고 micropore tape으로 고정시켜 반폐쇄 접포하였다. 접포는 48 시간 동안하며, 접포를 제거한 후에는 skin marker로 시험 부위를 표시하고 30 분, 24 시간 후에 각 시험 부위를 관찰하였다. 피부 반응은 Frosch & Kligman 법을 반영하여 평가하였다.

## 2.2.1.3. 결과

피험자들의 평균 연령은 41.83 ± 3.63세였으며, 최고 연령자는 50세, 최저 연령자는 36세였다. 피험자들의 피부 특성은 설문 결과는 아래와 같다(표 3). 인체피부 일차자극 시험 결과 본 시험제품에서 2명의 피험자가 1+ 또는 3+ grade의 피부반응을 보였다(표 4). 이상의 결과에서, 본 시험제품은 인체피부의 일차자극 측면에서 중자극 범주의 물질로 판단된다.

Item	Classification	Frequency(n)	Percentage(%)
Skin Type (피부타입)	Dry skin(건성)	13	43.33
	Normal skin(중성)	7	23.33
	Oily skin(지성)	0	0.00
	Dry to oily skin(건지성)	10	33.33
	Problem skin(문제성)	0	0.00
Irritability	Yes	0	0.00

고려은단

정제봉독 헤어 에센스

문서번호 : ST-BVP-1708

개정번호 : 00

작성일 : 2017.08.25.(Fri)

페이지 : 13 of 18

(자극 감수성)	No	30	100.00
Stinging	Yes	0	0.00
(따가움 감수성)	No	30	100.00
Side effects by cosmetics	Yes	0	0.00
(화장품부작용경험)	No	30	100.00
Allergy <sup>a)</sup> (알러지)	Food allergy(음식 알러지)	0	0.00
	Metal allergy(금속 알러지)	3	10.00
	Photoallergy(광 알러지)	0	0.00
	Extra allergy(기타 알러지)	0	0.00
	No	27	90.00
Skin diseases (피부 질환)	Acne(여드름)	0	0.00
	Atopy(아토피)	0	0.00
	Hair loss(탈모)	0	0.00
	Extra skin diseases(기타 피부 질환)	0	0.00
	No	30	100.00
Tight feeling (당기는 느낌)	Yes	0	0.00
	No	30	100.00
Taking supplements (건강보조식품 복용 유무)	Taking korean herbal medicines(한약 복용)	0	0.00
	Taking nutrients(영양제 복용)	1	3.33
	Taking extra supplements(기타 복용)	0	0.00
	No	29	96.67

Confidential file

KOREA EUNDAN



<b>고려은단</b>	<b>정제봉독 헤어 에센스</b>	문서번호 : ST-BVP-1708
		개정번호 : 00
		작성일 : 2017.08.25.(Fri)
		페이지 : 14 of 18

	No	30	100.00
Smoking (흡연 유무)	Less than 10 pieces(10개피 이내)	0	0.00
	More than 10 pieces(10개피 이상)	0	0.00
Menstrual cycle (생리주기)	Within 1 week before menstruation (생리 전 1주 이내)	6	20.00
	During menstruation(생리 중)	8	26.67
	Within 1 week after menstruation (생리 후 1주 이내)	8	26.67
	The others(기타)	8	26.67

표 3. 피부 특성 설문 결과(n=30)

Test material	No. of responder	48hr				72hr				Reaction Grade		
		1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	48h	72h	Mean
정제봉독 헤어 에센스	2	1	-	-	-	-	2	-	-	0.8	5.0	2.9
Negative control	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

표 4. 인체피부 일차자극 시험 결과(n=30)

## 2.2.2. 정제봉독 헤어 에센스에 대한 탈모증상 완화효과 평가시험

### 2.2.2.1. 시험대상자

Basic and specific (BASP) 분류에 의해 basic type M2, C2 또는 U1 이상, specific type은 V1 또는 F1 이상으로 진단된 23 ~ 54세(평균연령 42.52 ± 8.25 세)의 안드로겐성 탈모증 여성 및 남성 지원자 중 시험의 목적, 내용 등에 대해 충분히 설명을 듣고 자발적으로 서면 동의서에 서명한 42명을 대상으로 하여 시험군 21명, 대조군 21명으로 구성하였다.

## 2.2.2.2. 시험방법

시험군(정제봉독 헤어 에센스) 또는 대조군을 시험 기간 24주 동안 1일 1회 미온수로 두피를 깨끗하게 샴푸한 후, 시험제품을 두피 전체에 약 15회(1mL) 분사한 후 손가락을 이용하여 마사지하듯 문질러 흡수시키도록 하였다.

## 2.2.2.3. 평가방법

## 2.2.2.3.1. 임상사진을 이용한 모발 상태 육안평가

제품 사용 전, 사용 8주, 16주, 24주 후 시점에서 전두부 및 두정부 부위를 동일한 조건으로 촬영하였다. 촬영된 임상사진을 2명의 시험자가 시험제품 사용 전의 임상 사진과 비교하여 7단계의 척도(-3:매우 나빠짐, -2:나빠짐 - 1:조금 나빠짐, 0:변화 없음, +1:좋아짐, +2:조금 좋아짐, +3:매우 좋아짐)로 평가하여 평균값을 분석하였다.

## 2.2.2.3.2. Phototrichogram을 이용한 전체 모발 수 측정

제품 사용 전과 24주 후 시점에서 phototrichogram을 이용하여 전체 모발 수(지름 약 1 cm의 원내에 있는 모발 수)를 분석하였다.

## 2.2.2.3.3. 피험자에 의한 설문평가

효능에 관한 설문평가는 제품 사용 8주, 16주 및 24주 후 시점에서, 사용성에 관한 설문평가는 제품 사용 24주 후 시점에서 1~5점 척도로 이루어졌으며, 평균값을 분석하였다.

## 2.2.2.3.4. 안전성 평가

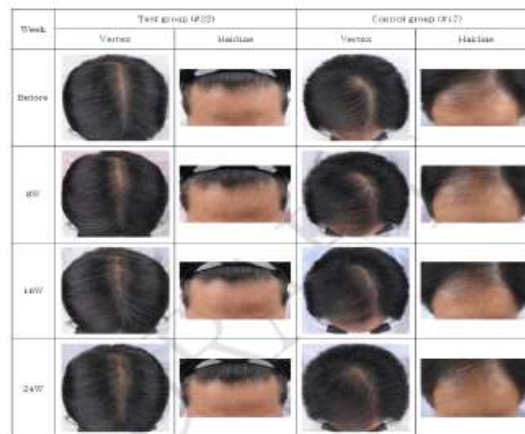
제품 사용 8주, 16주 및 24주 후 시점에서 문진과 시험자의 관찰에 의해 주관적 피부 자극감과 객관적 피부 자극을 평가하였다.

## 2.2.2.4. 시험결과

## 2.2.2.4.1. 임상사진을 이용한 모발 상태 육안평가

육안평가 분석 결과, 제품 사용 전과 비교시 대조군은 제품 사용 24주 후

시점에서 유의하게 개선되었고( $p < 0.05$ ), 모든 시점에서 군간 유의차는 없었다.



2.2.2.4.2. Phototrichogram을 이용한 전체 모발 수 측정

전체 모발 수 분석 결과, 제품 사용 전과 비교시 사용 24주 후 시점에서 시험군은 모발 수가 증가하는 경향을 보였고, 대조군은 감소하는 경향을 보였으나 유의차는 없었다.

Group	Week	N	Mean <sup>9)</sup> (n/cm <sup>2</sup> )	SD	p-value	Increment (%)
Test	Before	21	147.10	17.85	-	-
	24W	21	147.71	18.41	0.406	0.42▲
Control	Before	21	143.33	21.55	-	-
	24W	21	142.29	22.01	0.283	0.73▽

2.2.2.4.3. 피험자에 의한 설문평가

효능과 사용성에 관한 설문에서 모든 항목에서 유의한 긍정적 효과 및 유의차가 없었다.

2.2.2.4.4. 안전성 평가

본 시험기간 동안 피험자 1명(#38, 대조군)이 16주차 시점에 제품 사용 4개월 동안 생리가 없었음을 확인하였으며 피험자의 의지에 따라 시험을 중단하였다. 추적관찰 결과 시험 중단 2개월차에 피험자의 생리가 정상적으로 돌아왔으나, 시험제품과의 인과관계는 확인하지 못하였다. 이외의 모든 피험자에서 이상반응은 관찰되지 않았다.

증상(Symptom)		8W	16W	24W
주관적 자극 (Subjective irritation)	가려움(Itching)	0	0	0
	찌르듯이 아픔(Prickling)	0	0	0
	화끈거림(Burning)	0	0	0
	따끔거림(Stinging)	0	0	0
	뻣뻣함(Stiffness)	0	0	0
	당김(Tightening)	0	0	0
	기타(etc.)	0	0	0
객관적 자극 (Objective irritation)	홍반(Erythema)	0	0	0
	부종(Edema)	0	0	0
	인설(Scale)	0	0	0
	구진(Papule)	0	0	0
	기타(etc.)	0	0	0
기타	생리중단	0	1(#38)	0
총 이상반응 자의 수(Total number of subjects)		0	1	0

2.2.2.5. 결론

본 시험제품인 정제봉독 헤어 에센스에 대하여 안드로겐성 탈모증을 가진 남녀를 대상으로 모발상태 육안평가 및 전체 모발 수를 평가한 결과, 제품 사용 24주 후 시점에서 육안평가의 경우 대조군은 유의하게 증가하였고, 전체 모발 수의 경우 시험군은 증가, 대조군이 감소하는 경향을 보였으나 모든 항목에서 군간 유의한 차이는 없었다.

## 제 4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

### 제 1절 목표 달성도

연구목표	연구내용	달성도
<ul style="list-style-type: none"> <li>원료물질의 특성과약</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료물질 성상:               <ul style="list-style-type: none"> <li>방향성의 황갈색분말</li> <li>쓴맛을 보이는 물질</li> <li>생리식염수, 글리세린 및 산에 용해성</li> <li>알코올에 용해도가 낮음</li> <li>중금속: 납 표준액 기준으로 10 ppm 이하</li> <li>건조감량: 13.0% 이하</li> </ul> </li> <li>봉독에 함유된 물질 검토 진행:               <ul style="list-style-type: none"> <li>단백질, 멜리틴 확인</li> <li>포스포라이페이즈 확인</li> </ul> </li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>원료의 표준화 및 제조공정 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료 (멜리틴 50% 이상 함유) 표준화 확립</li> <li>원료 제조 및 대량 생산공정 확립</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>원료의 기준 및 시험법 설정 : 식약처기준 적용               <ul style="list-style-type: none"> <li>성상, 확인시험, 정량시험 등</li> <li>위탁시험 (안전성시험, 히스타민시험, 항원성시험)</li> <li>원료 안정성시험 Protocol 확립</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>식약처 기준을 적용하여 기준 및 시험법 설정 완료               <ul style="list-style-type: none"> <li>단백질 정량: Bradford 법</li> <li>멜리틴 함량 측정법: HPLC</li> <li>포스포리파제 확인법: 전기영동법</li> </ul> </li> <li>안전성 시험: 안정성 적합</li> <li>히스타민 시험: 적합</li> <li>항원성 시험: 이상 없음</li> <li>성상, 확인시험, 함량시험 진행 → 적합원료로 확인 완료</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>원료의 안정성(Stability) 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료안정성 시험을 위한 protocol 개발</li> <li>온도 및 보존환경 조건에서의 기능성 물질의 안정성 측정</li> <li>용매조건에 따른 기능성 물질의 안정성 측정</li> <li>유효기간 3년의 안정성 시험 protocol 작성</li> <li>안정성 시험계획수립 및 실시 단계별 안정성 시험실시 (0, 3, 6, 9, 12개월)</li> </ul>	100%

<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생장기 양모 효과 측정</li> <li>• 퇴행기 탈모방지 효과 측정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 동물실험을 통한 생장기 양모 효과를 확인</li> <li>• 모근의 성장 효과 확인</li> <li>• 양모효과에 대한 관련 유전자 발현 검토</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 피부유래 dermal papilla cell (DPC)의 증식 촉진 효과 측정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 봉독 농도 (1-500 ng/ml) 범위내에서 human dermal papilla cell의 증식 촉진효과를 검증</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 탈모방지 및 양모촉진 기전 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 탈모와 관련된 유전자 분석 및 단백질 분석</li> <li>▪ 피부 진균증의 원인 진균에 대한 항 진균 효과 측정</li> <li>▪ 봉독에 의한 혈행개선 효과 측정</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 봉독을 이용한 항염증 효과</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 항진균 효과 측정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 효모 (Candida, Malassezia species)에 의한 염증 유도 후 농도별 봉독을 처리했을 경우 관련 유전자 발현량의 변화를 관찰</li> <li>- 효모 (Candida, Malassezia species)에 의한 염증 유도 후 농도별 봉독을 처리했을 경우 세포의 사멸율의 변화를 관찰</li> </ul> </li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 봉독의 피부독성 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식약처 가이드라인에 따라 피부감작성 시험 수행</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식품의약품안전처 원료의약품 허가 준비</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 원료의약품 허가에 필요한 제품표준서, 제조기록서, 품질관리 기록서, 각종 validation 자료, 안정성 자료 등</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formulation 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 배합성분 검토: 원료 및 제형별로 유화제, 완충제, 젤화제, 보존제등 성분의 배합 비율 검토</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품의 형태 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제형검토 진행: 겔제, 액제, 연고제, 크림제 검토 및 배합을 통해 제형 검토</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 시너지 효과 및 제품내 원료 안정성을 높이기 위한 재료 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 배합원료 검토 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항산화 및 염증 제어</li> <li>- 유효성분 안정성 향상성분 검토</li> <li>- 영양공급 : 아미노산류, 미네랄류</li> <li>- 혈액순환 개선원료 검토</li> </ul> </li> <li>• 배합원료에 의한 시너지 효과 확인</li> </ul>	100%

<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품표준화 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품표준서 및 제조기록서 밸리데이션 프로토콜 설정</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품에 대한 기준 및 시험법 작성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기준 및 시험법 설정 : 식약처기준 적용 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 성상, 확인시험, 정량시험 등</li> <li>- 위탁시험 (안전성시험, 히스타민시험, 항원성시험)</li> </ul> </li> <li>• 탈모방지제품이 의약외품에서 기능성화장품으로 변경됨에 따라 제품에 대한 기준 및 시험방법을 기준에 맞게 작성</li> <li>• 설정된 분석방법이 정확하고 정밀한 결과를 도출해낸다는 것을 검증하기 위해 분석방법 밸리데이션을 실시하여 최적의 분석조건을 확립</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품의 안정성(Stability) 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품의 안정성(Stability) 시험</li> <li>• 온도 및 차광환경의 보존 조건에서의 제품의 안정성 측정 : 제품의 물성 및 외관에 대한 안정성 측정</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 인체적용시험 Protocol 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 탈모방지 및 양모촉진 효과를 검증하기 위한 인체적용시험 Protocol 작성 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 양모촉진 헤어 파라미터 검토</li> <li>- 성장기 모발과 퇴행기 모발 분류기준 설정</li> <li>- 연모와 경모 분석기준 설정</li> </ul> </li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 인체적용시험을 통한 기능성 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CRO기관에 의뢰하여 인체적용시험 수행 후 결과 보고서 검토 및 승인절차 진행</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식약처 화장품 허가준비 및 관련자료 제출</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 피부나 모발의 기능 약화로 인한 건조함, 갈라짐, 빠짐, 각질화 등을 방지하거나 개선하는 데에 도움을 주는 제품 개발과 관련된 자료 준비 및 제출</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 원료의 산업화 방안 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대량생산을 위한 원료 확보 방법 검토</li> <li>• 수출, 수입대체 또는 신규 연구를 위한 원료 판매 증대 검토</li> </ul>	100%



<ul style="list-style-type: none"> <li>• 시제품 개발 및 산업화 방안 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품의 레시피 개발</li> <li>• 대량생산을 위한 원료 확보 방법 검토: 봉독원료를 화장품재료로 판매하는 회사를 검토한 후, 해당 원료의 지표성분이 충분히 들어 있는지 확인시험을 실시하여 재료를 공급받는 방식으로 진행</li> <li>• 기능성 효과 및 안정성 평가 결과를 이용한 품목허가 자료 정리 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 주성분의 기능성 효과를 인체적용시험을 통해 확인한 후, 부원료의 검토를 통하여 레시피 정립</li> <li>- 안정성시험의 경우 자체적으로 기준 및 시험법을 설정하여 안정성 시험을 실시한 후 관련 자료 정리</li> </ul> </li> </ul>	<p>100%</p>
--	---	-------------

## 제 2절 관련분야 기여도

- 기존에 외국에서 수입하여 사용하던 봉독 원료를 국내 최초로 원료의약품 봉독으로 제조할 수 있는 공정 개발 및 표준품 제조 그리고 정제봉독에 대한 특성을 확립하였으므로 의약품 및 화장품 원료분야에 기여도가 클 것으로 생각된다.
- 봉독 원료의 표준화된 정제 봉독 제조방법을 확립하여 기존에 봉독 생산 농가에서 사용하던 방법에 비해 표준화된 방법으로 정제봉독의 제조에 적용될 수 있다.
- 표준화된 기준 및 시험방법을 확정하였으므로 봉독 원료에 대한 품질 검증 등에 기여 할 것이다.
- 천연원료의 정제과정 및 대량생산할 수 있는 제조공정의 최적화 및 대량 생산 공정 확립으로 유사 연구에 적용 가능하다.
- 탈모치료 시장에 새로운 기능성 물질에 의한 탈모방지 및 양모촉진 효과를 확인하였으므로 급속히 증가하고 있는 탈모 인구에 대한 의료비 절감 및 사회적 비용 절감 효과를 얻을 수 있어 의료분야에 기여도가 클 것으로 생각된다.
- 혈행개선 및 항염증 효과가 검증되었으므로 관련 제품의 개발 및 산업화를 위한 기반이 마련되어 관련 산업분야 발전에 기여할 수 있다.
- 혈행개선 및 항염증 효과 관련 분야 연구에 적용가능하다.

## 제 5장 연구결과의 활용계획

- 봉독의 새로운 효과 개발 및 기술 이전에 따른 제품화에 활용 할 계획이다.
- 시장규모가 매우 큰 세계시장으로의 수출 확대에 의한 경제적인 효과 창출에 활용 할 계획이다.
- 염증 유발균에 의한 염증 제어효과에 대한 연구결과를 바탕으로 피부염증 제어용 의약품 및 의약외품 개발 및 산업화에 활용 할 계획이다.
- 본 연구에서 검증된 기능성 성분 함유 봉독을 의약품 및 의약외품 물질로 개발 및 산업화하기 위해 기술 이전 추진 할 계획이다.
- 본 연구의 연구방법과 연구 결과를 바탕으로 정제봉독에 대한 새로운 기능성 개발 연구를 확대 할 계획이다.
- 봉독의 적응증 확대를 통한 기술력 확보에 활용 할 계획이다.
- 연구결과의 학술논문 발표 및 지적재산권 확보 등에 활용 할 계획이다.
- 참여한 연구 인력에 대한 천연한방 원료유래 기능성 물질 전문 연구 인력으로서의 양성에 활용 할 계획이다.

## 제 6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 봉독은 현재 국내에서 가장 다양한 분야에 이용되고 있으며 국내연구진에 의한 연구가 가장 활발히 진행되고 있다. 그러나 아시아권을 비롯하여 전 세계적으로 봉독의 효능에 대한 연구들이 발표되면서 봉독은 미용분야뿐만 아니라 질병 치료분야에서도 적용 사례가 증가하고 있음을 알 수 있다.
- 봉독이 rheumatoid synovial cells의 증식을 억제하는 효과를 보인다는 결과가 보고되었다<sup>7)</sup>. 이와 같은 봉독의 특성을 이용하여 국내를 비롯한 아시아지역뿐만 아니라 불가리아 및 아르헨티나에서도 골수염 및 류마티스 관절염 치료에 봉독을 사용하고 있다.
- 봉독은 파킨슨병을 비롯하여 다양한 신경성 뇌질환의 치료에 적용되고 있는데 이는 봉독이 MAP kinase activation을 변형시켜 glutamate-mediated neurotoxicity를 저해하는 기전에 기반하여 적용되고 있다<sup>48)</sup>.
- 미국 조지타운 의과대학의 연구진은 봉독이 CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells을 증가시키는 기전에 의해 다발성 경화증과 같은 신경성 질환에 적용될 수 있을 것으로 보고되었다<sup>49)</sup>.
- 미국 위스콘신 의대 연구진은 봉독의 유효성분인 아파민에 민감한 K<sup>+</sup> current가 arachidonic acid가 평활근 활성화를 통해 대동맥 이완을 유도하는 과정을 조절하는 것으로 보고하였다<sup>50)</sup>.
- 크로아티아 Rijeka 대학 병원 연구진은 어린이의 venom에 대한 알러지를 치료하기 위해 실시되는 어린이의 급속독면역법(rush venom immunotherapy)은 regulatory T 세포, IL-10 및 TGF-beta에 의해 유도하는 면역관용을 유도하는 것으로 보고하였다<sup>51)</sup>.
- 이란의 Medical Science 대학 Imani 연구진은 봉독을 당뇨쥐에 투여하여 대조군과 비교한 결과 봉독 투여군에서 혈당은 감소하였으며 인슐린 분비는 촉진되어 항당뇨 효과가 있는 것으로 보고되었다<sup>52)</sup>.
- 크로아티아 Zagreb 대학 연구진은 봉독의 멜리틴에 의한 phospholipase 2의 활성화에 의해 caspase 활성화에 의한 암세포의 apoptosis를 유도하여 암세포에 대한 cytotoxicity를 보이는 것으로 보고하였다<sup>53)</sup>.
- 한국, 뉴질랜드 및 오스트레일리아 연구진은 0.006% 봉독 함유 bee venom facial serum을 제조하여 인체에 적용한 결과 피부주름 개선에 효과적임을 보고하였다<sup>54)</sup>.
- 치료를 위해 봉독은 일반적으로 0.1~3 mg bee venom이 사용되나 관절염 치료를 위해서는 2~2.5 mg/treatment의 용량이 이용된다.

## 제 7장 연구개발결과의 보안등급

○ 해당사항 없음

## 제 8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
	해당사항 없음							

# 제 9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

## [고려대학교]

### 가. 안전점검 및 정밀안전진단

- 점검대상 : 자연계, 이공계열 모든 대학원 연구실 및 연구소(센터)
  - 점검목적 : 안전사고 예방 및 안전의식 고취
  - 점검개소 : 약 400개소
  - 점검안내 : ①포털 공지 ②그룹 메일 ③SMS 문자 전송
- 안전점검
  - 일상안전점검 : 연구활동 종사자 매일 점검 → 매월 4일 안전점검의 날
  - 정기안전점검 : 년 1회, 4~5월 실시(유자격자 또는 업체 위탁점검)
  - 특별안전점검 : 연구주체의 장이 필요하다고 인정하는 경우 실시
- 정기안전점검 범위
  - 연구실 일반관리, 소방, 기계, 산업위생, 화학약품, 생물, 전기, 가스
- 정밀안전진단
  - 진단개소 : 약400개소
  - 진단시기 : 2년 1회, 4~5월 실시
  - 진단분야 : 일반안전관리, 소방안전, 기계안전, 산업위생, 화공안전, 생물안전, 전기안전, 가스안전

### 나. 안전교육

- 교육대상자 : 연구활동 종사자(학부생, 대학원생, 연구원)
- 온라인 안전교육 : 전반기 6시간, 후반기 6시간
- 자체교육 : 실험·실습 수업 전 5분 자체 안전교육실시(지도교수 또는 조교의 지도하에 당해 실험 주의사항)
- 온라인교육 이수 홈페이지 : <http://kusafe.korea.ac.kr> (365일 교육수강 접속可)

◇ 교육영상 분류(풀에서 원하는 동영상 취사선택 / 지속 업데이트)

- |            |                |             |             |
|------------|----------------|-------------|-------------|
| ■ 기계분야(9개) | ■ 전기분야(11개)    | ■ 화공분야(36개) | ■ 소방분야(8개)  |
| ■ 가스분야(2개) | ■ 보건(위생)분야(5개) | ■ 생물분야(5개)  | ■ 생활안전(43개) |
| ■ 기타분야(5개) |                |             |             |

### 다. 상해보험 가입

- 대상: 자연계 연구 활동 종사자(학부생, 대학원생, 연구(보조)원)
- 보상기준 및 내용

구 분		내 용
보상 기준		-연구실에서 발생한 사고로 연구활동종사자가 부상, 질병, 신체장해, 사망 등 생명 및 신체상의 손해발생시 보상
보상 내용	사망	1인당 1억원
	후유장해	1억원을 한도로 후유장해등급별 정액 보상
	상해의료비	1천만원 한도로 1인당 상해등급별 정액 및 실손 보상

## 라. 건강검진

- 대상 : 자연계 연구활동종사자(학부생, 대학원생, 연구(보조)원)
- 시행 : 매년 3~4월, 교내에서 지정한 장소(2곳)

## 마. 추가 연구실 안전시설 안전성 확보

- 위험물 저장소 설치
  - 설치 : 생명과학대학(2), 이과대학(1), 공과대학(1)
  - 효과 : 실험실내 안전성 향상
- 비상샤워기 및 세안기 설치
  - 설치 : 유해 위험한 시약을 취급하는 모든 실험실 또는 실험실 복도
  - 효과 : 유해 화학물질 접촉시 긴급한 세척으로 피해예방
- 가스누설경보기 설치
  - 대상 : 가연성, 독성가스를 사용하는 모든 실험실 → 75개소
  - 효과 : 가스 누설시 자동차단으로 인명과 재산피해 예방 및 감소
- 가스용기 전도방지 고정장치 설치
  - 대상 : 가스용기를 사용하는 모든 실험실(스탠드식 → 78개소 등)
  - 효과 : 가스용기 전도예방 및 안전성 확보 등
- 안전보호구함 제작
  - 목적 : 안전보호구의 위생적 보관 및 관리
  - 효과 : 안전보호구 착용 및 안전의식 고취
- 안전관리팀 전담부서 설치
  - 목적 : 교내 안전관리 체계화 도모 및 전담부서 신설 추세.
  - 분장 : 연구실, 환경

## [참여기업]

### 1. 연구실 등의 안전조치 이행계획

가. 산업재해 발생 시

- (1) 산업재해가 발생할 급박한 위험이 있을 때 또는 중대재해가 발생했을 때에는 즉시 작업을 중지시키고, 연구자들을 작업장소로부터 대피시키는 등 필요한 안전·보건상의 조치를 한 후 작업을 다시 시작한다.
- (2) 산업재해가 발생할 급박한 위험으로 인하여 작업을 중지하고 대피하였을 때에는 지체 없이 그 사실을 바로 위 상급자에게 보고하고, 바로 위 상급자는 이에 대한 적절한 조치를 취한다.
- (3) 중대재해가 발생했을 때에는 그 원인 규명 또는 예방대책 수립을 위하여 중대재해 발생원인을 조사하고, 관계 전문가로 하여금 안전·보건진단이나 그 밖에 필요한 조치를 한다.

#### 나. 연구실 내 위험 예방 조치

- (1) 기계·기구, 그 밖의 설비에 의한 위험
- (2) 폭발성, 발화성 및 인화성 물질등에 의한 위험
- (3) 전기, 열, 그 밖의 에너지에 의한 위험  
→ 위의 위험을 예방하기 위해 안전관리 및 대처요령에 대해 교육 실시

#### 다. 건강장해 예방 조치

- (1) 원재료·가스·증기·분진·흠(fume)·미스트(mist)·산소결핍·병원체 등에 의한 건강장해
- (2) 연구실내에서 배출되는 기체·액체 또는 찌꺼기 등에 의한 건강장해  
→ 위의 문제를 확인하기 위하여, 1년 1회 건강검진을 실시

#### 라. 점검계획

점 검 명	점검횟수	점 검 내 용	점검대상	점검자
일일안전점검	1일 1회	시약 및 정리정돈 상태 등	연구실 (실험실)	품질관리부
정기점검	1년 1회	시약보관 상태, 가스관리 상태, 보호구착용 및 관리상태 외	연구실 (실험실)	품질관리부
정밀안전진단	1년 2회	작업환경측정 - 화학약품 반응위험도 점검 등	공장 전체	(주)진성 환경보건센터
전기진단	1주 1회	전기과부하 (안전관리자 대행)	공장 전체	전기 안전공사
안전순찰	1일 1회	일일점검일지 작성	공장 전체	기술지원팀

## 2. 연구실 등의 안전조치 이행실적

가. 연구실 내 위험 예방 조치

- 사용 설비, 사용 물질, 전기 안전 등에 대한 안전관리 및 대처요령 내부교육을 월 1회 실시하였다. 또한 사용 표준품 및 시약의 특성별 위험요소를 확인·관리하기 위해 표준품 관리대장을 작성하여 관리하였으며 MSDS 자료를 작성하여 실험실내 비치하였다.

나. 건강장해 예방 조치

- 건강장해에 대한 문제를 확인하고자 연 1회 건강검진을 수행했다.



Fig. 81. 2015년 및 2016년 건강진단결과표

다. 일일안전점검 : 1일 1회, 시약 및 정리정돈 상태 등

→ 일일안전점검표를 작성하여 1일 1회 일반, 전기, 시약 사용 관리에 대한 점검 실시

라. 정기점검 : 1년 1회, 시약보관 상태, 가스관리 상태, 보호구착용 및 관리상태 등

→ 연구실 정기점검표를 작성하여 일반, 전기, 시약, 가스, 산업 관리 및 상태에 대한 정기점검을 실시하여 연구실 전반의 위험성에 대한 안전 상태를 점검하였다.



2017 년도 8 월 연구·실험실 일일안전점검표

※ 연구활동중사자는 반드시 일일안전점검 실시 (점검방법 : 양호 O, 불량 X, 해당없음 -)

구분	안전점검항목	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
일반	연구실험실 정리정돈 및 정결상태 유지	O	O	O	O			O	O	O	O	O				O	O	O	O	O			O	O	O	O			O	O	O	O
	연구실험실내 흡연 및 음식물 섭취 금지	O	O	O	O			O	O	O	O	O				O	O	O	O	O			O	O	O	O			O	O	O	O
	안전수칙, 안전표지, 개인보호구, 구급 약품함 비치 및 비치	O	O	O	O			O	O	O	O	O				O	O	O	O	O			O	O	O	O			O	O	O	O
전기	미사용 전기기구 전원차단, 문어발식 콘센트 사용금지	O	O	O	O			O	O	O	O	O				O	O	O	O	O			O	O	O	O			O	O	O	O
	기타 전기안전 분야 위험 요소	O	O	O	O			O	O	O	O	O				O	O	O	O	O			O	O	O	O			O	O	O	O
시약	사용시약 목록관리 및 시약보관상태	O	O	O	O			O	O	O	O	O				O	O	O	O	O			O	O	O	O			O	O	O	O
	시약 라벨(개봉일, 책임자 등) 부착 상태	O	O	O	O			O	O	O	O	O				O	O	O	O	O			O	O	O	O			O	O	O	O
	인화성 시약인용 캐비넷 관리상태, 시약소량보관여부	O	O	O	O			O	O	O	O	O				O	O	O	O	O			O	O	O	O			O	O	O	O
	미사용 시약 적정 기간 보관 여부	O	O	O	O			O	O	O	O	O				O	O	O	O	O			O	O	O	O			O	O	O	O
	시약냉장고 관리 및 음식물 혼재상태	O	O	O	O			O	O	O	O	O				O	O	O	O	O			O	O	O	O			O	O	O	O
	실험폐액 및 폐기물 관리상태(분류, 용기, 뚜껑착용 등)	O	O	O	O			O	O	O	O				O	O	O	O	O			O	O	O	O			O	O	O	O	

Fig. 82. 연구·실험실 일일안전점검표 예시

2017 년도 연구실 정기점검표

※ 연구활동중사자는 반드시 일일안전점검 실시 (점검방법 : 양호 O, 불량 X, 해당없음 -)

구분	안전점검항목	양호	불량	해당없음
일반	일상점검 실시여부	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	연구실 내 정리정돈 및 정결상태 여부	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	연구실 내 취침, 취사, 흡연 행위	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	연구실 내 안전시설 조성여부 (전장파손, 누수, 장문파손 등)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
전기	전기 충전부 노출	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	콘센트 사용 및 관리 상태(문어발식, 접지콘센트 사용여부 등)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
시약	시약병 경고표지 부착(물질명 및 주의사항, 조제일자, 조제자명)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	시약용기 보관 상태(밀폐, 보관위치 등)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	미사용 시약 적정 기간 보관 여부	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	화학약품 성상별 분류 보관 여부	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	폐액용기 보관 상태	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	냉장고내 시약·음식 혼재	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
가스	독성물질의 사용 및 보관, 누출여부 확인 등 관리 상태	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	가스용기 고정 여부	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	가스 용기보관 위치(직사광선, 고온 주변 등)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	가스용기 밸브 보호캡 설치 여부	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	가스배관 및 부속품 부식 여부	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
산업	용기, 배관, 조정기 및 밸브 등 가스 누출 확인	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	가연성 및 독성가스 누출 여부	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	구급용구 비치 및 관리 상태	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	보호구 비치 및 착용	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Fig. 83. 연구실 정기점검표 예시(2017년)

마. 정밀안전진단 : 1년 2회, 작업환경측정

→ 공장 전체에 대한 작업환경측정을 외부점검기관인 (주)진성환경보건센터를 통해 수행

바. 전기진단 : 1주 1회, 전기과부하 점검

→ 공장 전체에 대한 전기과부하 점검을 외부점검기관인 전기안전공사를 통해 수행

사. 안전순찰 : 1일 1회

■ 산업안전보건법 시행규칙 [별지 제21호서식] <개정 2011.3.29>

### 작업환경측정결과 결과표 (2017년도 상반기)

1. 사업장 개요

사업장명	고려엔(주)	대표자	조창현
소재지	(482 - 807) 경기도 성남시 중원구 사기막길로 106 (상대원동)		
전화번호	02-2277-0006	모사전송번호	02-2277-5829
근로자수	75	업종	의약품 회합물 및 황색물질 제조업
주생산품	건강기능식품		

2. 작업환경측정 일시  
가. 측정 기간 : 2017년 02월 23일 ~ 2017년 02월 23일 (1일간)  
나. 측정 시간 : 09:35 ~ 17:25 (7 시간 50 분)

3. 작업환경측정지(분석지포함)

성명	자격종목 및 등급	자격등록번호	비고
안성민	산업위생관리기사	08201101747X	측정지
장진	관리학전공		분석지
백희정	관리학전공		분석지

4. 지정항목 및 측정실적

지정측정기관명	지정항목	측정 실시 사업장 일련번호(반기 기준) (총누적 / 5명이상 누계)
주식회사진성환경보건의터	840	( 118 / 107 )

5. 작업환경측정 결과 및 종합의견 : 불합  
「산업안전보건법」 제42조제1항에 따라 작업환경을 측정하고 그 결과를 통지합니다.

2017년 03월 23일

주식회사진성환경보건의터 직인

(사업주) 고려엔(주) 귀하

(별지 제21호서식)

### 작업환경측정결과표 (2017년도 상반기)

1. 사업장 개요

사업장명	고려엔(주)	대표자	조창현
소재지	13207 경기도 성남시 중원구 사기막길로 106 (상대원동)		
전화번호	02-2277-0006	FAX번호	02-2277-5829
근로자수	75명	업종	의약품 회합물 및 황색물질 제조업
주생산품	건강기능식품		

2. 작업환경측정 일시  
가. 측정일자 2017년 07월 24일 ~ 2017년 07월 24일 (01 일간)  
나. 측정시간 09 : 00 ~ 16 : 20 (06시간 20분)

3. 작업환경측정자(분석지 포함)

성명	자격종목 및 등급	자격등록번호	비고
장진민	산업위생관리기사	0902032400710	
신승비	관리학전공		분석사
장진	관리학전공		분석사

4. 지정항목 및 측정실적

지정측정기관명	지정항목	측정 실시 사업장 일련번호(반기 기준) (총 누적 / 5명이상 누계)
주식회사 진성환경보건의터	총 840개소 521이상 420개소	( 520 / 460 )

5. 작업환경측정 결과 및 종합의견 : 불합  
산업안전보건법 제42조제1항에 따라 작업환경을 측정하고 그 결과를 통지합니다.

2017년 08월 16일

측정자(측정기관의 장) 주식회사 진성환경보건의터  
(사업주) 조창현 귀하

Fig. 84. 2017년 상반기 및 하반기 작업환경측정결과표

### 전기설비 점검결과 통지서

보격별(상호): 고려엔(주) 귀중

고려번호	010101319	계약용량	480kVA	점검일자	2017.07.24	점검시간	11:00 ~ 17:00	점검결과	불합
수리번호	201900	V 수리용량	480kVA	발행기관명	주식회사	발행일자	2017.07.24	발행인명	박광진

1. 점검결과: 전기설비 점검을 통하여 부하전류, 누설전류 및 절연저항의 점검이 실시되었으며, 점검 결과 불합의 과오가 발생하였습니다.

2. 점검내역

구분	점검항목	점검결과	비고
A	전압계	정상	
	전압변동률	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	

3. 종합의견  
전기설비의 과-보수 점검은 반드시 점검상태에서 시행하시기 바랍니다.

4. 점검일자: 2017.07.24

5. 점검인명: 박광진

### 전기설비 점검결과 통지서

보격별(상호): 고려엔(주) 귀중

고려번호	010101319	계약용량	480kVA	점검일자	2017.07.24	점검시간	11:00 ~ 17:00	점검결과	불합
수리번호	201900	V 수리용량	480kVA	발행기관명	주식회사	발행일자	2017.07.24	발행인명	박광진

1. 점검결과: 전기설비 점검을 통하여 부하전류, 누설전류 및 절연저항의 점검이 실시되었으며, 점검 결과 불합의 과오가 발생하였습니다.

2. 점검내역

구분	점검항목	점검결과	비고
A	전압계	정상	
	전압변동률	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	
	전압조정기	정상	

3. 종합의견  
전기설비의 과-보수 점검은 반드시 점검상태에서 시행하시기 바랍니다.

4. 점검일자: 2017.07.24

5. 점검인명: 박광진

Fig. 85. 전기설비 점검결과 통지서

→ 원자재창고출입구, 농축실, 폐기창고, 옥상, LNG 차단밸브 등의 안전 상태에 대한 일일점검 일지를 작성하여 공장 전체의 안전 순찰 점검을 실시

## 제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Bee Venom Promotes Hair Growth in Association with Inhibiting 5 $\alpha$ -Reductase Expression	고려대 학교	교신 저자	Biological & Pharmaceuti cal Bulletin	1.683	2016.04.02.	단독사사	SCI
2	논문	Inhibitory effect of bee venom on blood coagulation via anti-serine protease activity	고려대 학교	교신 저자	Journal of Asia-Pacific Entomology	1.046	2017.03.29.	단독사사	SCI
4	특허	봉독을 유효성분으로 함유하는 발모촉진 및 탈모방지용 조성물	고려대 학교 산학협 력단, 고려은 단	-	대한민국	-	2017.03.24.	단독사사	특허등록
5	특허	혈액응고인자의 활성저해 및 세린 프로테아제 활성 저해 활성을 갖는 봉독을 포함하는 혈행개선 조성물	고려대 학교 산학협 력단, 고려은 단	-	대한민국	-	2016.08.19	단독사사	특허출원
6	기술 이전	혈액응고인자의 활성 저해 및 세린 프로테아제 활성 저해 활성을 갖는 봉독을 포함하는 혈행개선 조성물	고려대 학교 산학협 력단, 고려은 단	-	-	-	2017.09.01. 계약 체결		-

## 제 11장 기타사항

### ○ 연구의 후속 조치 내용

연구 종료 후에도 다음과 같은 사항을 검토하고 후속 연구에 반영해야 할 것이다.

- 봉독의 표준화: 봉독의 채취시기 등에 따라 유효 성분의 차이가 있을 수 있으므로 원료의 표준화를 위해 원료봉독의 채취 시기별 유효성분 함량을 분석해야 한다.
- 제품의 효능을 증진시키기 위해 봉독과 다른 원료물질을 활용한 시너지 효과 시험을 수행해야 한다.
- 탈모관련제품이 의약외품에서 기능성화장품으로 규정이 변경(2017년 5월 31일)됨에 따라 기능성화장품으로 허가 받기 위해 식약처기준을 통과할 수 있도록 변경사항을 면밀히 검토하여 자료를 준비할 예정이다.
- 인체적용시험 계획을 재수립하여 후속으로 2차 인체적용시험을 수행할 필요성이 있다.

## 제 12 장 참고문헌

1. 임정연외 1명, 탈방지제(발모제, 육모제, 양모제)의 최신 연구 동향, Kor.J.Aesthet. Cosmetol., Vol.12 No.6, 773-786, December 2014
2. 탈모 치료제 프로페시아 복용 후 우울증 주의, YTN, 2017.07
3. Van-Long Truong, et al., Hair Regenerative Mechanisms of Red Ginseng Oil and Its Major Components in the Testosterone-Induced Delay of Anagen Entry in C57BL/6 Mice, Molecules, 22(9), 1505, 2017
4. Jung-Il Kang, et al., Undariopsis peterseniana Promotes Hair Growth by the Activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin and ERK Pathways, Mar Drugs, 15(5): 130, 2017
5. Kim SK, et al., Polymorphisms in the promoter regions of the CXCL1 and CXCL2 genes contribute to increased risk of alopecia areata in the Korean population, Genet Mol Res, 14;14(3):9667-74, 2015
6. Shin S, et al., Epigallocatechin Gallate-Mediated Alteration of the MicroRNA Expression Profile in  $5\alpha$ -Dihydrotestosterone-Treated Human Dermal Papilla Cells, Ann Dermatol, 28(3):327-34, 2016
7. Park SH, et al., Melittin inhibits TGF- $\beta$ -induced pro-fibrotic gene expression through the suppression of the TGF $\beta$ RII-Smad, ERK1/2 and JNK-mediated signaling pathway, Am J Chin Med, 42(5):1139-52, 2014
8. Jeong YJ, Eet al., Melittin has a chondroprotective effect by inhibiting MMP-1 and MMP-8 expressions via blocking NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathway in chondrocytes, Int Immunopharmacol, 25(2):400-5, 2015
9. Park JH, et al., Suppression of Hepatic Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Melittin via Blocking of TGF $\beta$ /Smad and MAPK-JNK Signaling Pathways, Toxins (Basel), 13;9(4). pii: E138, 2017
10. Jung SY et al., Bee Venom Protects against Rotenone-Induced Cell Death in NSC34 Motor Neuron Cells, Toxins, 21;7(9):3715-26, 2015
11. 비센바이오 벌독 활용한 먹는 당뇨병 치료제 ‘M4A’ 개발, 이뉴스투데이, 2017.05
12. 1999년 허가 천연물신약 1호...미국 3상 임상시험 완료, 청년의사, 2017.01
13. Meephansan J, et al., Efficacy of topical tofacitinib in promoting hair growth in non-scarring alopecia: possible mechanism via VEGF induction, Arch Dermatol Res, 210.1007/s00403-017-1777-5, 2017
14. Zhan-di Wang, et al., Hair growth promoting effect of white wax and policosanol from white wax on the mouse model of testosterone-induced hair loss, Biomed Pharmacother, 89:438-446, 2017
15. Ruchy Jain, et al., Identification of a new plant extract for androgenic alopecia treatment using a non-radioactive human hair dermal papilla cell-based assay, BMC Complement Altern Med, 21;16:18 2016
16. Stamatas GN, et al., An analysis of gene expression data involving examination of

- signaling pathways activation reveals new insights into the mechanism of action of minoxidil topical foam in men with androgenetic alopecia, *Cell Cycle*, 16(17):1578-1584, 2017
17. Xinjing Wang, et al., Melittin inhibits tumor growth and decreases resistance to gemcitabine by downregulating cholesterol pathway gene CLU in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Lett*, 28;399:1-9, 2017
  18. Jianjun Wang, et al., Melittin inhibits the invasion of MCF-7 cells by downregulating CD147 and MMP-9 expression, *Oncol Lett*, 13(2): 599-604, 2017
  19. Gui-Mei Kong, et al., Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway, *World J Gastroenterol*, 22(11): 3186-3195, 2016
  20. Qin G, et al., Melittin inhibits tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells associated with the SDF-1  $\alpha$ /CXCR4 signaling pathway in a UMR-106 osteosarcoma xenograft mouse model, *Mol Med Rep*, 14(1):57-68, 2016
  21. 본건의료빅데이터개방시스템, 건강보험심사평가원, 2017
  22. [탈모 1000만 시대]달라진 인식...탈모인 80% “가발 긍정적“, *뉴시스*, 2017.05
  23. 청춘의 눈물 2030대 탈모관련용품 큰손 됐다, *이비뉴스*, 2017.07
  24. 기능성 화장품 범위 확대 관련 질의 응답지, *식품의약품안전처*, 2017.05
  25. 감사원, 화장품 질병명 기재 의사 공익감사 요청 기각, *데일리팜*, 2017.08
  26. 현대약품 여성 탈모치료제 '마이녹실' 리뉴얼 출시, *세계일보*, 2016.03
  27. 탈모약 프로페시아·판시딜 '질주'...경쟁품과 격차, *데일리팜*, 2017.08
  28. 아모레퍼시픽·LG생활건강, 4조원대 탈모 시장 ‘샴푸’ 맞대결, *메디컬투데이*, 2017.03
  29. Alopecia Market Analysis By Treatment (Oral, Topical, Injectable), By Gender And Segment Forecasts To 2024, *Grand View Research*, 2016.06
  30. Hair Loss Treatment Manufacturing: Market Research Report, *IBIS World*, 2016.11
  31. 발모제 시장, 거대 메이커 3파전, *한국의약통신*, 2015.07
  32. [유망] 中 증가하는 탈모인구, 커져가는 발모제품 시장, *Kotra 해외시장뉴스*, 2017.07
  33. 식품의약품안전처, 의약품등 밸리테이션 실시에 관한 규정, 제2014-181호 (2014)
  34. 식품의약품안전평가원, 의약품등 시험방법 밸리테이션 가이드라인 (2015)
  35. 식품의약품안전처, 의약품등의 안정성시험 기준, 제2014-59호 (2014)
  36. 식품의약품안전처, 기능성화장품 심사에 관한 규정 일부개정고시, 제2017-42호 (2017)
  37. OECD, Acute Dermal Toxicity. OECD Guideline for the testing of chemicals, Test No. 402 (1987)
  38. 식품의약품안전처, 의약품등의 독성시험기준, 제2015-82호 (2015)
  39. 식품의약품안전처, 기능성 화장품 심사에 관한 규정, 제2014-75호 (2014)
  40. Frosch PJ, Kligman AM. The soap chamber test. A new method for assessing the irritancy of soaps. *J Am Acad Dermatol*. 1(1), 35-41 (1979)
  41. Lee WS, et al. A new classification of pattern hair loss that is universal for men and women: Basic and specific (BASP) classification. *J Am Acad Dermatol*. 57(1), 37-46 (2007)
  42. 식품의약품안전처, 탈모 증상 완화에 도움을 주는 화장품의 인체적용시험 가이드라인

(2017)

43. 의약품등의 안정성시험 기준 (식품의약품안전처 고시 제2014- 59호 (2014. 2.12, 개정), 제2016-46호 (2016. 6.14, 개정), 제2016-60호 (2016. 6.30, 개정)
44. 의약품등 벨리데이션 실시에 관한 규정 식품의약품안전처 고시 제2014-181호 (2014.11.10, 개정)
45. 원료의약품 등록에 관한 규정 식품의약품안전처 고시 2014- 48호(2014. 2.12, 개정), 2015-109호(2015.12.28., 개정)
46. 의약품외품에 관한 기준 및 시험방법 식품의약품안전처 고시 제2016-68호(2016. 7. 19, 전부 개정)
47. Kim SK et al., Melittin enhances apoptosis through suppression of IL-6/sIL-6R complex-induced NF- $\kappa$ B and STAT3 activation and Bcl-2 expression for human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 78(5):471-477, 2011
48. Lee SM et al., Effects of bee venom on glutamate-induced toxicity in neuronal and glial cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012:368196, 2012
49. Castro HJ et al., A phase I study of the safety of honeybee venom extract as a possible treatment for patients with progressive forms of multiple sclerosis. *Allergy Asthma Proc*. 26(6):470-476, 2005
50. Kathryn M et al., Apamin-Sensitive KCurrents Mediate Arachidonic Acid-Induced Relaxations of Rabbit Aorta. *Hypertension*. 43:413-419, 200
51. Ajduk J, Turkalj M, Gagro A. Regulatory T cells in children undergoing rush venom immunotherapy. *Allergy and Asthma Proceedings*, 33:525-530, 201
52. Mousavi, SM et al., Effect of Iranian Honey bee (*Apis mellifera*) Venom on Blood Glucose and Insulin in Diabetic Rats. *Journal of Arthropod- Borne Diseases* 6(2):136-143, 2012
53. Orsolic, N. Bee venom in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* 31(1-2):173-194, 201
54. Han, S et al., The beneficial effects of honeybee-venom serum on facial wrinkles in humans. *Clinical Interventions in Aging* 10:1587-1592, 2015