

|             |
|-------------|
| 발 간 등 록 번 호 |
|-------------|

|                      |
|----------------------|
| 11-1541000-000580-01 |
|----------------------|

## 나노-효소기술을 이용한 기능성 수산물의 한방소재화 및 실용화 기술개발

(Development of utilization and Korean medicine material  
of functional marine product by nano-enzyme techniques)

(주)서진바이오텍

농 립 수 산 식 품 부



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “나노-효소기술을 이용한 기능성 수산물의 한방소재화 및 실용화기술개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 09 월 27 일

주관연구기관명 : (주)서진바이오텍

주관연구책임자 : 김 학 주

세부연구책임자 : 이 철 원

연 구 원 : 이 강 덕

연 구 원 : 김 봉 조

연 구 원 : 탁 건 태

위탁연구기관명 : 대구한의과대학교

위탁연구책임자 : 권 영 규

위탁연구기관명 : 세명대학교

위탁연구책임자 : 김 이 화

참 여 기 업 : (주)서진바이오텍

(주)금강제약

(주)나비네트웍스

(주)신성수산

박기태한의원



# 요 약 문

## I. 제 목 : 나노-효소기술을 이용한 기능성 수산물의 한방소재화 및 실용화 기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내 연안에서 양식되고 있는 패류 및 기타 수산동물의 전체 생산량을 살펴보면 패류가 2009년 기준 약 326,544톤, 기타 수산동물(미더덕, 우렁쉥이 등)이 16,743톤으로 금액으로 환산하면, 4,940억 원과 229.8억 원이다(2009년 통계청 자료 참조).

그 중 가장 많이 생산되고 있는 품종을 살펴보면 패류의 경우 굴 240,911톤, 바지락 17,905톤, 홍합 55,035톤, 고막류 2,966톤, 피조개 1,714톤, 전복 6,207톤, 가리비 348톤, 가무락 74톤 등의 순으로 생산되었으며, 기타 수산동물의 경우 우렁쉥이 7,208톤, 미더덕 3,845톤, 오만둥이 5,690톤으로 생산되었다(2009년 통계청 자료 참조).

또한 패류의 연간 생산량의 변화를 살펴보면 1985년에 357,009톤이던 것이 1995년 311,963톤, 2004년 304,889톤, 2009년 326,544톤으로 1985년에 비하면 2009년에는 약 40만 톤 가량 감소하였다. 이러한 요인으로는 천해 양식 조건이 해양오염과 양식장 주변에 각종 생물폐기물들의 유입 등으로 인하여 양식 환경이 나빠지고 있기 때문인 것으로 추정된다.

현재 패류와 기타 수산동물에 있어서 가장 대표적으로 많이 생산되고 있는 것이 굴, 바지락, 홍합, 고막, 피조개, 전복, 멍게, 미더덕 등이며, 이들의 경우 폐각이 제거되지 않은 생물 상태로 유통도 되기도 하지만, 굴의 경우 대부분 가공공장에서 폐각을 제거한 후 대형마트나, 시장에 유통되고 있다. 그러나 가공 공장에서부터 미처리 상태로 놓여 있는 폐각이나 각종 수산생물의 껍질은 그 양이 매년 증가하고 있고, 공장 주위 및 양식장 부근 노지에는 이러한 폐기물로 넘쳐나고 있는 실정이다.

굴의 경우를 예로 들면, 전체 폐각 중 약 10%만이 사료, 비료, 수 처리 흡착제로 이용되고 있지만, 약 90%가까이는 여전히 폐기물 상태로 방치되어 어장의 오염과, 자연경관을 훼손과 악취 등으로 보건 위생상의 문제를 야기 시키고 있다. 실제 양식어장을 보유하고 있는 어민의 말을 들어보면 이 문제에 대해 심각하다 못해 포기하는 모습을 보이고 있다. 그러므로 폐각류에 대한 이용성의 확대 측면에서라도 다양한 분야의 사람들이 폭넓은 연구를 수행함으로써 그 이

용성을 확대 시켜나가야 할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 현재 폐기물 형태로 방치 되고 있는 각종 폐각류에 대한 이용성을 증대시키기 위한 방안을 모색하고자 새로운 저분자 가공기술과 첨단 분석 기술을 이용하여 새로운 기능성 물질을 탐색하고, 자원으로써 이용 가능성을 연구한 후 고 부가가치 산업으로 전환하기 위한 실용화 기술을 개발하고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 가. 연구개발 최종목표

본 연구는 현재 폐기물 형태로 방치 되고 있는 각종 폐각류에 대한 이용성을 증대시키기 위한 방안을 모색하고자 새로운 저분자 가공기술과 첨단 분석 기술을 이용하여 새로운 기능성 물질을 탐색하고, 한약 본초 자원에 근거한 약리작용을 규명하여 한약자원으로 사용가능성을 확인하고, 그 중 생리활성물질을 분리하여 전 임상과 임상실험을 통하여 자원으로 이용 가능성 확인한 후 경제성 분석과 공정개발연구를 통하여 응용제품개발 함으로서 폐각류 자원의 고부가가치화 및 실용화를 목표로 한다.

#### 나. 연차별 연구개발목표와 내용 및 범위

| 구 분              | 목 표   | 내용 및 범위   |
|------------------|---|---|
| 1 차년도<br>(2006년) | <ul style="list-style-type: none"> <li>▷원료의 1차 가공 처리기술의 개발과 조미제 및 나노 입자 가공분말의 제조</li> <li>▷가공원료에 대한 생리활성물질 탐색</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○원료수집</li> <li>○1차 원료 가공방법 탐색</li> <li>○가공방법별 시료의 제조(조미제·나노 입자 분말 제조 및 입도분석 등)</li> <li>○가공된 원료물질로 생리활성물질의 추출</li> <li>○가공물에 대한 생리활성 및 기능성 조사(단백질, 지방, 탄수화물, 비타민, 무기질, 항염증, 항균, 항 진균, 단백질 저해능 등)</li> </ul>  |
| 2 차년도<br>(2007년) | <ul style="list-style-type: none"> <li>▷나노 및 조미제 가공분말의 성분분석과 물리화학적 특성 검토</li> <li>▷정제된 분획물의 생리활성연구 및 생화학·물리화학적 특성 검토</li> <li>▷Conchiolin의 효소가수분해에 의한 기능성 펩티드 제조</li> <li>▷ 전임상 동물실험</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>○가공방법별 성분함량분석(중금속, 미네랄, 단백질, 탄수화물, 지방 등)</li> <li>○나노입자 분말의 제조 및 특성분석(표면장력, pH에 대한 표면장력의 변화, 계면장력 측정, HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value, 유화활성 및 유화안정성, 온도 및 열 안정성)</li> <li>○가공원료 추출물의 생리활성 분석(항염, 항산화)</li> <li>○정제 분획물에 대한 생리활성분석 및 성분분석(항산화, 항염증, 미백실험, TLC 분석, SDS-PAGE)</li> <li>○ 효소분해를 이용한 conchiolin의 펩티드 제조</li> <li>○전임상 동물실험(cell viability 측정, Nitric Oxide 생성량 측정, iNOS와 COX-2 발현 측정, cytokine 측정, 간·신장독성 측정)</li> </ul> |
| 3 차년도<br>(2008년) | <ul style="list-style-type: none"> <li>▷기능성물질의 대량 분리 정제 기술 개발 및 산업적 응용 소재연구</li> <li>▷분리 정제된 물질의 구조 특성 분석</li> <li>▷임상시험 및 안정성 실험</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○저비용 고효율의 대량 분리 정제법 개발</li> <li>○수율검증</li> <li>○기능성 수산생물 응용제품을 위한 소재 연구(한방피부과, 통증소재 등)</li> <li>○응용제품연구(한방피부외용제 등)</li> <li>○기능성이 검증된 분획물들의 구조 특성 분석(질량분석, 아미노산결합 서열분석 등)</li> <li>○간독성시험 및 피부염 질환모델 설치류를 이용한 동물실험</li> <li>○개발된 한방소재를 이용한 제품별 임상시험관련 protocol 개발</li> </ul>   |
| 4 차년도<br>(2009년) | <ul style="list-style-type: none"> <li>▷산업분야별 응용제품의 개발 및 제품평가</li> <li>▷한방과의 접목을 통한 제형연구및 한약처방기술개발</li> <li>▷임상시험 및 안전성실험</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○식품: 소아성장을 한방제제(성장화 등에 첨가되는 보조치료제) 등</li> <li>○화장품: 수산생물 유래 기능성 한방화장품 등</li> <li>○한방 피부외용제: 수산생물 유래 기능성 아토피치료제 등</li> <li>○제품평가</li> <li>○가공 방법 및 형태에 따른 치료 효율의 검증</li> <li>○한방피부과 및 내과 치료처방 개발(한방입욕제, 위, 장 치료기능 등)</li> <li>○아토피임상시험 피험자모집 및 피험자건료</li> </ul>   |
| 5 차년도<br>(2010년) | <ul style="list-style-type: none"> <li>▷생산선용화기술 개발 및 제품화</li> <li>▷신 제형 및 신 한약 처방 기술의 보급을 위한 제품평가 및 자료화</li> <li>▷임상시험 및 안전성실험</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>○가수분해기법을 이용한 기능성 펩타이드 탐색 및 약리기능검증</li> <li>○경제성을 고려한 원료의 대량처리 시스템 설계 및 개발</li> <li>○분말가공 처리 시스템 개발</li> <li>○대량분리정제 시스템 개발</li> <li>○Pilot plant 제작</li> <li>○제품에 대한 시장분석 및 산업화전략 등 마케팅방향연구</li> <li>○연구소 소속 한의사를 대상으로 한 제품평가 및 자료화</li> <li>○아토피 개선효과에 대한 임상시험용 피험자모집 및 인체적용시험실시</li> </ul>   |

#### IV. 연구개발결과

##### 1. 1 차년도(2006년)

| 연구 내용  | 연구 결과  |
|--|--|
| <p>가) 원료의 1차 가공 처리기술의 개발과 초미세 및 나노 입자 가공분말의 제조</p> <p>-원료수집</p> <p>-1차 원료 가공방법 탐색</p> <p>-가공방법별 시료의 제조</p> <p>-일반분말, 초미세분말, 나노분말 제조 및 입도분석</p>               | <p>국내에서 가장 많이 생산되고 있는 6 종류(굴, 홍합, 바지락, 피조개, 새조개, 동죽)의 폐각시료를 통영과 여수, 진해, 완도, 군산 등지에서 각각 100kg씩 구입한 후 염분과 이물제거 후 건조하여 사용</p> <p>-원료가공방법을 문헌을 통해서 각종 가공방법을 탐색하고 본연구와 적합한 가공방법을 선정하였음</p> <p>-원료의 1차 가공 처리기술을 개발하였고 일반분말, 초미세분말, 나노 가공분말을 제조하였음. 특히 나노 입자 가공분말 제조에 있어서 습식나노가공장치를 직접 고안하여 사용하였음.</p> <p>-일반분말은 핀크러셔밀로 279-140<math>\mu</math>m, 초미세분말은 Air Mill로 5-30<math>\mu</math>m, 나노분말은 습식나노가공분쇄법으로 200nm-900nm로 제조하여 사용함.또한 굴의 초미세분말을 이용하여 입도분석을 실시하였음.</p>  |
| <p>나)가공원료에 대한 생리활성물질 탐색</p> <p>- 가공된 원료물질로 생리활성물질의 추출</p> <p>- 폐각류의 성분별 함량분석(단백질, 지방, 탄수화물, 비타민, 무기물 등)</p> <p>- 추출물에 대한 생리활성분석(항염증, 항균, 항진균, 단백질 저해능 등)</p> | <p>6종류의 폐각류를 3가지 분말형태로 가공하여 6.5 M acetic acid로 상온에서 3시간동안 탈 석회 시킨 후, 불 용해된 침전물(Conchiolin)을 회수하였음.</p> <p>-6종류의 폐각에서 조단백질함량은 약 1% 내외 존재하는 것으로 확인</p> <p>-6종류의 폐각에서 조지방 함량은 약 0.02%-0.06%임을 확인</p> <p>-6종류의 폐각에서 조회분량은 평균 96-98%인 것으로 확인</p> <p>-6종류의 폐각에서 탄수화물함량은 0.21-0.35%인 것으로 확인</p> <p>-지용성 비타민에는 항산화능이 우수한 Astaxanthin, Retinol등 존재함을 확인함</p> <p>-지방산은 GC/MS를 이용하여 측정하였고 생리활성이 우수한 지용성비타민과 지방산, 미네랄 등을 분석하였음.</p> <p>-무기물은 Ca, Mg, Na, Se등이 다량 함유되어 있는 것으로 확인함</p> <p>-항염증 실험에서 Conchiolin의 우수한 항염작용을 확인하였음.</p> <p>-미백실험에서 Conchiolin의 우수한 미백작용을 확인하였음.</p> <p>-항염증, 항균 및 미백실험을 통하여 Conchiolin의 단백질 저해능을 확인하였음.</p> |



2. 2차년도(2007년)

| 연구 내용  | 연구결과   |
|--|--|
| <p>○나노입자 분말의 제조 및 특성분석(표면장력, pH에 대한 표면장력의 변화, 계면장력 측정, HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value, 유화활성 및 유화안정성, 온도 및 열 안정성)</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 폐각으로부터 분말로부터 나노분말을 제조함.</li> <li>• 나노분말의 물리적 특성을 측정함. 일반분말 (&gt;250<math>\mu</math>m)과 초미세 분말 (5-30<math>\mu</math>m), 그리고 나노분말 (&lt;200nm)에 대한 표면장력의 결과 buffer의 표면장력 72.3 mN/m에 비해 일반분말의 경우 평균 71.6 mN/m, 새조개 71.3mN/m, 동죽 71.9mN/m로 표면장력의 활성능력이 거의 없는 것으로 확인되었다. 그 외 HLB, 계면장력 측정, 유화활성 및 유화안정성, 온도 및 열 안정성 등도 동일한 결과로 나타남.</li> <li>• TG, DSC로 조 콘키올린 분말의 경우 200<math>^{\circ}</math>C이후부터 중량이 감소하는 것은 유기물(콘키올린)의 열분해가 진행되면서 중량이 감소되는 것으로 판단되며, 일반분말과 초미세분말의 경우 600<math>^{\circ}</math>C이후부터 700<math>^{\circ}</math>C사이에서 빠른 속도로 열 중량이 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 경향은 중량 대비 유기물의 함량이 5% 이내로 낮아 같은 농도 대비, 조 콘키올린처럼 200<math>^{\circ}</math>C 근처에서 유기물의 분해양상이 약하게 나타나며, 600<math>^{\circ}</math>C이후부터 급격히 열 중량 변화가 나타나는 것은 무기물들의 결합구조가 열에 의해 깨어지면서 급격한 중량 변화가 발생하는 것으로 판단됨. 시차주사열량계를 이용한 열량분석에서도 추출한 콘키올린과 나노분말이 일반분말과 초미세분말의 중량대비 반응열이 높은 것으로 나타났다</li> </ul> |
| <p>○ 효소분해를 이용한 conchiolin의 펩티드 제조</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 효소가수분해를 통해 항염 효과를 지닌 펩티드를 제조함.</li> <li>액상으로 판매되는 protamex와 neutrase과 분말 trypsin을 동일 역가대비 액상으로 만든 후 이들을 동일한 기질(콘키올린)량으로 반응하여 40-60<math>^{\circ}</math>C의 온도와 pH 6.0-8.0의 조건으로 각각 2시간 반응시킨 후 반응물에 대한 활성을 측정하여 최적 조건을 확인하였다. 그 결과 항산화, ACE저해, COX-2저해활성이 가장 높은 최적 단백질 분해효소로는 protamex이며, 반응 조건은 pH 6.0, 반응온도 50<math>^{\circ}</math>C였다</li> <li>• 그 결과 반응전과 반응 후에 대한 크로마토그램을 살펴보면 반응전 MW 20,000-61,000인 조 콘키올린이 반응 후 약 MW 8,800의 peak가 높게 생성되는 것으로 확인되어 펩타이드화가 진행됨을 알 수 있었다</li> </ul>  |

| 연구 내용   | 연구결과  |
|---|---|
| ○ 가공원료 추출물의 생리활성 분석(항염, 항산화)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 초미세폐각 분말로부터 urea와 citrate buffer를 사용하여 conchiolin 추출물을 얻음.</li> <li>• urea와 citrate buffer에서 추출한 추출물에서 conchiolin 회수율을 측정한 결과 회수율에는 큰 차이를 나타내지 않았지만 당은 urea로 추출했을 때 20배 정도 높게 측정됨.</li> <li>• urea와 citrate buffer를 이용한 conchiolin 추출물에서 항염활성을 나타냄.</li> <li>• urea conchiolin 추출물보다 citrate buffer conchiolin 추출물에서 항염활성이 더 높게 나타냄.</li> <li>• urea와 citrate buffer를 이용한 conchiolin 추출물에서 항산화 활성은 나타나지 않음.</li> <li>• TLC 분석을 통한 단백질 발색과 당 발색 실험 결과 폐각의 conchiolin 추출물에는 여러 단백질과 당이 포함되어 있음.</li> </ul> |
| ○ 정제 분획물에 대한 생리활성분석 및 성분 분석(항산화, 항염증, 미백 실험, TLC 분석, SDS-PAGE)                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 정제 분획물의 항염활성을 측정한 결과 항염활성을 나타냄</li> <li>• 정제 분획물에서 항산화 활성은 나타나지 않음</li> <li>• 정제 분획물에서 미백효과는 나타나지 않음</li> <li>• SDS-PAGE 실험결과 2-3개의 단백질 밴드를 확인함.</li> <li>• TLC 분석을 통한 단백질 발색과 당 발색 실험 결과 정제 분획물의 당단백질을 확인함.</li> </ul>  |
| ○ 전임상 동물실험(cell viability 측정, Nitric Oxide 생성량 측정, iNOS와 COX-2 발현 측정, cytokine 측정, 간·신장독성 측정) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Raw cell에서 conchiolin 추출물의 세포 독성을 측정한 결과 진주담치에서는 독성을 나타냈지만 굴과 동죽에서는 독성을 나타내지 않음.</li> <li>• conchiolin 추출물의 항염증관련 실험결과 LPS에 의한 증가된 NO, IL-6 및 TNF-<math>\alpha</math> 생성양과 발현양이 conchiolin 추출물에 의해 50% 정도 저해됨. • conchiolin 추출물의 랫드 동물 실험 결과 체중의 변화는 없음.</li> <li>• conchiolin 추출물의 간손상(GOT, GPT, LDH 수치)과 신장손상(BUN 수치)을 측정한 결과 간과 신장독성은 나타나지 않음.</li> </ul>   |

### 3. 3차년도(2008년)

| 연구 내용   | 연구 결과  |
|---|--|
| ○ 저비용 고효율의 대량 분리 정제법 개발                       | <p>- 폐각분말로부터 conchiolin을 고효율, 저비용으로 대량 분리 정제 할 수 있는 공정을 개발하였음.</p> <p>- 평균제조원가를 계산한 결과, 1일 10톤씩 1년간 300일 기준으로 생산할 경우 100mg당 10원으로 현재시판중인 COX-2저해제 대비 경제성이 있는 것으로 검토되었다.</p>  |
| ○ 수율검증  | <p>-폐각분말로부터 powder conchiolin을 추출하여 수율을 측정하였다.</p> <p>-균 폐각분말로부터 생성된 crude conchiolin의 회수율은 3.49% 이었으며, crude conchiolin 으로부터 0.1M citrate buffer 용액으로 추출하여 탈염 시킨 후, 생성된 conchiolin powder(B)와 탈염을 시키지 않은 conchiolin powder (C)의 폐각분말로부터의 수율은 각각 0.32 및 4.24% 이었다. 한편, conchiolin powder(B)와 conchiolin powder(C)의 단백질과 총 당 함량을 비교하였다. Conchiolin powder(C)의 경우, 수율은 높았지만, citrate salt가 다량 함유되어 있어 투석한 conchiolin powder(B)에 비해 상대적으로 상당히 낮은 단백질을 함유하고 있었다. 투석을 한 conchiolin powder(B)의 경우, 전체 중 단백질의 함량이 약 27% 이었고, 단백질과 총 당의 함량비는 약 17:1 이었다.</p> |
| ○ 기능성 수산생물 응용제품을 위한 소재연구( 한방피부과, 통증 클리닉 소재 등) | <p>- Powder conchiolin의 항염 활성을 측정한 결과, 활성이 우수하였다.</p> <p>- Powder conchiolin의 항염효능을 입증하기 위하여 국제적으로 유명한 제약회사의 우수한 항염증 제품 들(celecoxib, diclofenac, indomethacin 등)과 비교실험을 수행한 결과, conchiolin의 우수성을 입증하였다: COX-2의 저해율 (1mg/ml의 농도: conchiolin; 94.6%, celecoxib; 92.9%, diclofenac; 99.1%, indomethacin; 98.8%)</p> <p>- Powder conchiolin의 항산화 활성은 낮은 것으로 확인 되었다.</p>  |

| 연구 내용   | 연구결과   |
|---|--|
| ○ 응용제품연구(한방피부외용제 등)                               | <p>- Powder conchiolin을 함유하는 한방피부외용제인 아토피화장품 3종을 제조하여 그 특성 분석을 하였으며, 화장품 base 원료를 개발하였다.</p> <p>현재까지 연구결과를 근거로 보았을때 콘키올린은 항염증 PEG2기전 COX-1, COX-2에 탁월한 기능을 가진것으로 확인되었으나 항염증 기전중 NO억제 능, 항산화능은 약한 것으로 확인되어 제품화를 위한 처방보완이 필요하였다.</p> <p>Atopy skin products 의 경우 base 에서 96.8% 의 저해율을 나타내었으며 conchiolin 의 농도가 1 ~ 100 <math>\mu</math>l 로 증가함에 따라 95.4, 96.3 및 97.3% 으로 COX-2 저해율의 변화가 거의 나타나지 않았다. 이 결과는 본사에서 만든 atopy skin products 자체가 우수한 염증억제효능을 나타내는 제품을 의미하며, atopy cream products 의 경우에는 base 에서는 41.1% 의 저해율을 나타내었으며 conchiolin 의 농도가 1 ~ 100 <math>\mu</math>l 로 증가함에 따라 64.8, 67 및 67.2% 로 base 와 비교할 때 COX-2 저해율이 농도 의존적으로 증가하였으나, 큰 폭으로의 증가는 보이지 않았다. 이것은 Atopy cream에 사용된 원료물질에 영향을 받는 것으로 추정된다.</p> |
| ○ 기능성이 검증된 분획물들의 구조 특성 분석<br>(질량분석, 아미노산결합서열 분석등) | <p>- 6.5M 초산을 사용하여 원심분리한 후 얻은 조 콘키올린을 0.1M Citrate buffer(pH6.5)로 추출하여 동결건조한 시료를 이용하여 Sephadex G-100이 충전된 column(25X 900mm)에 넣고 시료를 분리 정제한 후 단백질 분리정제 전용 FPLC Superdex 200 column과 Ion column(Mono Q, S)등을 이용하여 분리 정제를 통하여 구조분석을 하였으며, 정제된 콘키올린의 구성당과 단백질의 비율은 전체 구조중 당이 차지하는 것이 약 15-20%, 단백질이 약 80-85%인 것으로 확인하였다.</p>   |
| ○ 피부염 유발 설치류를 이용한 동물실험                            | <p>- 피부염 유발 설치류를 이용한 동물실험을수행하였다: soluble conchiolin으로 도포한 실험군(0.03 g/ml)에서는 귀염증성 부종을 억제하였고, 증가된 IgE를 감소시키는 경향이 있었다. 또한, soluble conchiolin으로 도포한 실험군(0.01, 0.03, 0.10 g/ml)에서는유의한 IL-1<math>\beta</math>의 감소를 유도하여 염증을 억제시키는 것으로 나타났으며, 0.1 g/ml의 농도에서는 IL-6의 유의한 감소를 유도하였다.</p>   |

| 연구 내용                                    | 연구 결과  |
|--|--|
| ○ 개발된 한방소재를 이용한 제품별 임상 시험 관련 protocol 개발 | <p>-개발된 한방소재인 conchiolin을 이용한 제품별 임상시험관련 protocol을 개발하였다.</p> <p>- 피부 임상실험 프로토콜의 개발<br/>대구한외과대학교 임상시험센터(센터장 권영규 교수)에 의뢰하여 피부임상 프로토콜을 개발하였다(임상시험 Protocol 1 참조)</p> <p>-여드름 임상실험<br/>세명대학교 임상시험센터(센터장 김이화 교수)에 의뢰하여 임상대상자 30명을 대상으로 실험을 실시하였다(임상시험 Protocol 2 참조).</p> <p>(나)아토피 임상실험<br/>세명대학교 임상시험센터(센터장 김이화 교수)에 의뢰하여 임상대상자 23명을 대상으로 실험을 실시하였다(임상시험 Protocol 3 참조).</p> |

#### 4. 4 차년도(2009년)

| 연구 내용                                  | 연구 결과  |
|--|--|
| ○ 식품: 소아성장용 한방제제(성장환 등에 첨가 되는 보조치료제) 등 | - 균 폐각 유래 수용성 칼슘분말을 이용하여 한방 소아성장용 제제 및 골다공증 관련 제품을 제조하여 시제품을 개발하였다.<br>칼슘 청국환 제조 공을 삶아 불릴 때 수용성 칼슘을 3-12%를 넣고 부린 후 균주(Bacillus subtilis)를 접종하여 37℃에서 하루 동안 발효한 후 동결시킨 후 2-3일간 동결건조를 청국알맹이를 완성한 후 고농도 설탕물과 콩가루 그리고 칼슘분말을 0.5%씩 섞어서 건조하여 완성하였다.          |
| ○ 화장품: 수산생물 유래 기능성 한방화장품 등             | - conchiolin을 0.5% 함유하는 아토피 및 여드름 치료용 한방화장품을 제조하였으며, 추출물의 특성에 맞는 레스피를 개발하여 제품화하였다.   |
| ○ 한방 피부외용제: 수산생물 유래 기능성 아토피치료제 등       | - conchiolin을 0.09% 함유하는 한방피부외용제인 아토피치료제 3종(스킨,로션, 크림) 및 여드름치료제(세럼,재생크림)를 제조하였으며, 추출물의 특성에 맞는 레스피를 개발하여 제품화하였다.  |
| ○ 제품평가                                 | - 수산생물 유래 conchiolin을 함유한 한방 식품, 화장품 및 피부외용제를 제품화하여 기제품과 비교 평가한 결과, 항염증 작용에 우수한 제품 이었다.<br>- 본사의 제품인 atopy cream products 에서만 약 60% 이상의 염증억제효능이 나타났다. 이러한 conchiolin의 항염증 효과는 conchiolin을 활용한 피부치료제, 피부보호제 및 염증반응조절제 개발 및 폐각자원의 재활용 가능성이 높은 것으로 확인되었다. |

| 연구 내용  | 연구결과   |
|--|--|
| ○가공 방법 및 형태에 따른 치료 효율의 검증                      | <p>- 우수한 항염 효능이 있는 수용성 conchiolin추출물을 이용하여 치료 효율을 검증하였다.</p> <p>Atopy skin extracts 의 경우 base 에서는 23.9% 의 저해율을 나타내었으며 conchiolin 의 농도가 1 ~ 100 <math>\mu</math>l 로 증가함에 따라 27.3, 40.8 및 80.9% 로 COX-2 저해율의 증가를 나타내었다.</p> <p>atopy lotion extracts 의 경우 base 에서는 8.9% 의 저해율을 나타내었으며 conchiolin 의 농도가 1 ~ 100 <math>\mu</math>l 로 증가함에 따라 76.1, 76.7 및 77.2% 로 COX-2 저해율의 증가를 나타내었다.</p> <p>atopy cream extracts 와 acne extracts 에서는 base 에서 78.2 및 73.5% 의 저해율을 각각 나타내었으며, conchiolin 의 농도가 1 ~ 100 <math>\mu</math>l 로 증가함에 따라 atopy cream extracts 에서는 81.8, 85.0 및 84.1% 로 COX-2 저해율이 소폭 상승하는 것으로 확인하였다</p> |
| ○한방피부과 및 내과 치료처방개발(한방입욕제, 위, 장 치료기능 등)         | <p>- 한방피부과 치료 처방을 개발하여 레스피 개발과 시제품을 만들었으며, 입욕제를 개발하였다. 또한 내과 기준 처방을 이용하여 한의원에서 사용하전 모려분말과 Conchiolin 추출한 발생한 부산물을 가공하여 모려대용으로 사용한 결과 훨씬 치료성 효과가 높은 것으로 확인되었다.</p> <p>-아토피 입욕제는 한약성분 추출물과 혼합하여 5-30<math>\mu</math>m 극미세분말형태로 가공하여 목욕물에 타서 사용하여도 한약재 분말의 자극이 없으며, 미지근한 물에도 쉽게 용출되어 피부 침투효과가 뛰어났다</p>  |
| ○ 기능성이 검증된 분획물들의 구조 특성 분석(질량분석, 아미노산결합 서열 분석등) | <p>- 기능성이 검증된 분획물들을 회수하여 구조 및 특성분석을 진행하였다. 최종 검토결과, 수용성 콘키올린은 단백질이 아닌 당당백질로 확인되었으며, 그 물질의 구조 분석을 수행하였다. 그 결과 정제된 콘키올린에는 aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, cystein, leucine, tyrosine, phenylalanine, lysine, arginine이 함유되어 있는 것으로 확인 되었다</p>  |

| 연구 내용                 | 연구 결과  |
|-----------------------|--|
| ○ 임상시험용 피험자모집 및 피험자진료 | <p>- 본 시험에서는 만 18세 ~ 38세 사이의 한국인 남성 및 여성 피험자 30명을 대상으로 4주간 실험을 수행하였다. 전문의의 육안으로 한국형 여드름 중증도 시스템(KAGS-2)을 통한 육안상대평가 결과는 치료제를 바르기 전보다 바른 후 2주, 4주 후의 여드름 개선 효과가 통계적으로 유의성 있게 나타났다. 피부유분 함유량은 시료를 바른 후가 바르기 전보다 유의성 있게 유분량이 감소하였다. 총괄적 안전도 평가에 있어서 본 제품은 안전한 제품임을 알 수 있었다. 따라서 본 제품은 여드름 개선효과가 있었을 뿐 아니라, 우수한 피부 유분량 감소 효과도 있었고 여드름 개선효능을 나타내는 것으로 확인되었다.</p> |



5. 5 차년도(2010년)

| 연구 내용  | 연구 결과  |
|--|--|
| <p>○생산실용화기술 개발 및 제품화<br/>경제성을 고려한 원료의 대량처리 시스템 설계 및 개발<br/>-분말가공 처리 시스템 개발<br/>-대량분리정제 시스템 개발<br/>-Pilot plant 제작</p> <p>제품에 대한 시장분석 및 산업화전략 등 마케팅방향연구</p> | <p>-생산실용화기술개발을 위하여 각 단계별, 공정별 수익율을 계산하고, 대량생산을 위한 생산공정시스템을 설계하였다. 설계에 반영된 시설 비용과 원료, 포장재, 인건비 등을 계산하여 제조원가를 분석하고, 군 패각을 이용한 응용제품(식품, 화장품, 의약품) 판매에 적합한 제품기준에 따른 원료규격을 표준화하였다.</p> <p>1. 화장품 소재측면 : 신 개념의 천연 원료(항염증, 두피, 피부트리플 개선)<br/>2. 의약품 소재측면 : 신소재 천연 항염증제(전 세계 연구개발동향과 일치) 미FTA체결로 인한 의료 시장 변화에 따른 수입대체효과<br/>3. 식품 소재측면: 기존 골다공증, 성장관련 칼슘 시장의 접근성 용이<br/>4. 건축내장재 소재 : 불연내장 석고 보드시장 진입이 유리, 석고원료 공급에 대한 가격경쟁 우위</p> |
| <p>○신 제형 및 신 한약 처방기술의 보급을 위한 제품평가 및 자료화</p> <p>-연구소 소속 한의사를 대상으로 한 제품평가 및 자료화</p> <p>연구결과의 학술지 투고 및 홍보</p>   | <p>-화장품의 경우 아토피, 여드름 제품에 대해 임상실험을 통해 치료효과가 좋은 것으로 확인되었다.</p> <p>-식품의 경우 냄새 없는 칼슘 청국환을 만들었으며, 소비자들로부터 호평을 받았다.</p> <p>-한방소재로서 이용가능성은 본사 기술로 만든 칼슘분말을 사용하여 현삼 목패탕에 적용하여 기존 모려제품에 비해 효과가 좋은 것으로 한의사들이 직접 임상실험에 참가하여 이미 확인하였다.</p> <p>-아토피 입욕제의 경우 한의사인상을 통해 치료효율이 좋은 것으로 확인되었다(임상사진 참조).</p> <p>-연구결과의 학술지 투고 및 홍보자료는 물질 구조분석과, 신물질 여부 등이 결정되면, 특허와 5년간의 연구결과를 바탕으로 약 8편 이상의 논문 투고와 2건 이상의 특허를 신청할 예정이다.</p>                  |
| <p>○임상실험 및 안전성실험(위탁연구기관)</p> <p>-아토피 개선효과에 대한 임상시험용 피험자 모집 및 인체적용시험 실시</p> <p>-시험제품에 대한 안전성 검사 실시</p>  | <p>-아토피 임상실험은 세명대학교 임상시험센터와 더불어 수행하였으며, 23명의 아토피 환자를 대상으로 임상실험을 실시한 결과 아토피 치료에 상당한 도움을 주는 것으로 확인 되었다.</p> <p>- 아토피개선제품(가칭) 사용 전과 사용 4주, 8주 후에 실험실적 검사, 생명 징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한 결과 안전한 것으로 확인되었다</p>   |

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 국내에서 가장 많이 생산되는 6종류의 폐각으로부터 항염증 활성이 우수한 물질이 존재한다는 사실을 확인하였다.
- 저비용 생산공정의 개발로 가격 경쟁력이 있는 제품을 개발하는데 성공하였다.
- 현재 폐기물 형태로 방치되고 있는 폐각류를 고부가가치 자원화 기술개발에 성공하였다.  
원료의약품 원천기술 확보(관절염 치료제, 해열제 등 이용), 화장품 소재(아토피, 여드름, 피부 트러블 등), 기능성 식품소재(관절염 예방, 소아성장용 칼슘보강제, 골다공증 예방 등)
- 우리나라 석회석 매장량은 약 75년 후 고갈될 예정인데 그 대체물질로 이용 가능성을 확보함으로써 건축내장재, 시멘트, PVC, 인공뼈 소재, 페인트 등 다양한 산업분야에 이용이 가능하다.
- 해양환경문제를 유발한 폐각류의 처리방안이 확보됨으로서 해양환경보전은 물론 폐각류를 이용한 수익사업이 가능함으로서 지자체의 재정확보와 정부예산 절감효과를 가져다 줄 수 있다.
- 폐각처리에 대한 신기술을 확보함으로써 국내는 물론 해외에 수출이 가능하며, 항염증용 의약품 신소재를 확보함으로써 수입대체효과는 물론 외화획득이 가능하다.
- 수산 부산물의 재가치 창조  
수산 부산물인 폐각류를 고순도로 정제함으로서 고부가가치의 천연 항염증제, 기능성 화장품 원료, 고순도의 칼슘제 및 산업용 신소재 원료로 이용이 가능하여 수산산업의 활성화가 예상된다.
- 인공합성제제가 아닌 천연 제제로서 부작용이 거의 없는 것으로 확인 되었으며, 약물생동성 실험 등을 통한 임상기준이 확보되면 제약 산업에 항염증 원료의 원천 기술을 확보함으로써 수입에 의존해오던 항염증 원료를 대체할 수 있을 것으로 판단된다.
- 기존 쿼페각 처리방식에서 벗어나 각 지자체별로 폐각이용기술 이전을 통한 저비용, 고소득형 공장을 각 해안지역에 설립함으로써, 이민소득 증대에 기여할 것으로 판단된다. 생산성 향상 및 생산품의 질적 향상을 위한 일자리 창출 및 이민 소득증대를 기대할 수 있다. 또한, 가공 공정상 발생하는 부산물들을 이용한 산업화에 따른 소규모 중소기업들의 활성화가 기대된다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

Removes and used salt after buy shell free medical care of much that been manufactured 6 kinds (*Crassostrea gigas*, *Mytilus coruscus*, *Ruditapes philippinarum*, *Scapharca broughtonii schrenck*, *Fulvia mutica*, *Mactra veneriformis*) by each 100kg in Tongyeong and Yeosu, Jinhae, Wando, Gunsan etc. most in our country.

Normal powder 279 - 140 $\mu$ m, hyperfine powder is 5 - 30  $\mu$ m, nano powder pulverizes and used 200-900nm.

That burn at room temperature for 3 hours by 6.5 M acetic acids processing 6 kind of shells by 3 powder pattern after is decalcified Conchiolin retire ..

It is about 1% of crude protein to 6 kind of shell, and crude fat content is about 0.02% - 0.06%, and crud ash content is about 96 - 98%, and carbohydrate content was 0.21 - 0.35%.

Have Astaxanthin that antioxidation among fat soluble vitamin is excellent, Retinol, and inorganic matter confirmed Ca, Mg, Na, Se vast quantity that is included.

For Conchiolin, molecular weight had 37,000 daltons, some whitening function and antioxidation function.

Made peptide that retain anti-inflammatory effect through enzyme hydrolysis, and molecular weight was about 8800 daltons, and used enzyme was protamex.

For IC50 to display conchiolin's anti-inflammatory effect separating from *Crassostrea gigas*, 5  $\mu$ g it was.

It is no conchiolin's cell toxicity that extract at tunnel, and NO, IL-6 and TNF-  $\alpha$  are checked about 50% by conchiolin extract.

According to SD Rat biological test result of conchiolin extract, there was no change of weight.

Arms height toxicity did not appear according to result that measure GOT, GPT, LDH ) of conchiolin extract and height toxicity BUN.

Crude conchiolin's recovery percentage was 3.49% according to result that extract powder conchiolin from shell powder, and it was 0.32% after desalinization.

Result conchiolin that does Conchiolin and celecoxib, diclofenac, indomethacin and COX-2 depression effect by concentration of 1 mg/ml and experiments comparison ; 94.6%, celecoxib ; 92.9%, diclofenac ; 99.1%, indomethacin ; It was 98.8%.

In ear by DNCB erythema inflammation controlled ear inflammation using induction rat, and IgE creation more than 50%, and controlled to purposive sampling in IL-1  $\beta$ , IL-6.

Atopy and pimple clinical demonstration that result effect that do tester for 1 month is good confirm.

## Table of Contents

|   |    |
|---|----|
| <b>Chapter 1. Abstract of research and development subject</b> .....  | 8  |
| Paragraph 1. Objective of research and development.....   | 8  |
| Paragraph 2. Necessity of research and development.....   | 8  |
| 1. Utilisation of shells.....   | 8  |
| A. Material of herb medicine.....   | 8  |
| B. Food calcium .....   | 8  |
| C. Fertilizer .....   | 10 |
| D. Material of water treatment.....   | 10 |
| E. Biomaterials.....  | 12 |
| F. Etc.. .....  | 12 |
| 2. Industrial practical use and problem of domestic and foreign about shells.....                             | 12 |
| 3. The outlook for this business.....   | 13 |
| 4. The scope of research and development.....   | 14 |
| A. Final aim .....  | 14 |
| B. Research target and substance by order by year.....  | 14 |
| <b>Chapter 2. Domestic and foreign technical development present condition</b> .....                          | 16 |
| Paragraph 1. Technical development present condition about domestic and foreign related field.....            | 16 |
| Paragraph 2. Position that study's findings occupy in domestic and foreign technology present condition ..... | 19 |
| 1. Assessment about a developing technology.....  | 19 |
| 2. Material and manufacture facility countermeasure.....  | 20 |
| A. Resource supply .....  | 20 |
| B. Related law or governmental regulation.....  | 20 |
| C. Domestic and foreign market analysis and view by field shell's practical use that is possible .....        | 21 |
| (1) Domestic market scale of calcium carbonate.....   | 21 |
| (2) Market scale of calcium.....  | 21 |
| (a) World market scale of health functional food.....   | 21 |
| (b) Domestic market scale of health functional food .....   | 22 |
| (c) Anti-inflammation product market size.....  | 22 |
| (d) Market scale of bioceramic.....   | 23 |
| <b>Chapter 3. Research and development achievement contents and results</b> .....                             | 24 |
| Paragraph 1. Theoretical and experimental access method by order by year.....                                 | 24 |

|   |    |
|---|----|
| Paragraph 2. Method of study                              | 34 |
| 1. Shell processing technical development                 | 34 |
| A. Collection of sample                                   | 34 |
| B. Treat of sample  | 35 |
| C. Processing powdered manufacture                        | 35 |
| (1) Normal powder manufacture                             | 35 |
| (2) Hyperfine powder manufacture                          | 35 |
| (3) Nano powder manufacture                               | 36 |
| D. Componential analysis for shell powder                 | 38 |
| (1) Moisture  | 38 |
| (2) Crude protein   | 39 |
| (3) Crude fat   | 40 |
| (4) Crude ash   | 41 |
| (5) Carbohydrate  | 42 |
| (6) Minerals  | 42 |
| (7) Fatty acid and insoluble vitamin                      | 44 |
| E. Physicochemical analysis for shell powder              | 49 |
| (1) Surface tension measurement                           | 49 |
| (2) Change of surface tension about pH                    | 49 |
| (3) Interface tension measurement                         | 49 |
| (4) HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value            | 49 |
| (5) Emulsifying activity and stability measurement        | 49 |
| (6) Temperature and thermal stability                     | 50 |
| 2. Physiological active substance search of shell extract | 51 |
| A. Extraction and purification of crude conchiolin        | 51 |
| (1) Extraction of crude conchiolin                        | 51 |
| (2) Purification of crude conchiolin                      | 51 |
| (3) Protein quantitative analysis                         | 56 |
| (4) Sugar quantitative analysis                           | 56 |
| (5) Analysis of TLC(Thin layer chromatography)            | 58 |
| (6) SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)      | 58 |
| B. Biological activity analysis of crude conchiolin       | 58 |
| (1) Anti-oxidant(DPPH method)                             | 58 |

|  |    |
|--|----|
| (2) COX-1, COX-2 inhibition assay  | 59 |
| (3) NO inhibition assay  | 59 |
| (4) MTT assay  | 60 |
| (5) Tyrosinase inhibition assay  | 60 |
| (6) Collagenase inhibition assay   | 61 |
| (7) Linoleic acid automatic oxidation inhibition activity measurement  | 61 |
| (8) Antimicrobial and Antifungal activity  | 61 |
| (9) hemocytolysis activity measurement   | 62 |
| (10) Muscle contraction activity measurement   | 62 |
| (11) In Raw264.7 cells crude conchiolin's cell toxicity and anti-inflammatory activity measurement   | 62 |
| (a) Cell culture   | 62 |
| (b) Cell survival rate measurement   | 63 |
| (c) NO secretion amount measurement  | 63 |
| (d) Immunoblot analysis  | 63 |
| (e) Cytokine measurement   | 63 |
| 3. Animal experiment   | 64 |
| A. In Rat crude conchiolin's toxicity measurement  | 64 |
| (1) Body weight  | 64 |
| (2) GOT(Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(Glutamic pyruvic transaminase), LDH(Lactate dehydrogenase) and BUN (Blood urea nitrogen) measurement | 64 |
| B. Effect of getting in DNCB treat mouse's contact dermatitis  | 64 |
| (1) Experimental animal's breeding   | 64 |
| (2) Ear inflammatory induction and ear thickness measurement   | 64 |
| (3) Picking of blood   | 65 |
| (4) Experimental animal's sacrifice and picking of inflammatory induction ear  | 65 |
| (5) Immunoglobulin measurement   | 65 |
| (6) Cytokine measurement   | 66 |
| 4. Conchiolin peptide manufacture that use enzyme hydrolysis method  | 66 |
| A. Extraction and purification of conchiolin   | 66 |
| B. Purification and structure analysis   | 66 |
| (1) Amino acid analysis  | 66 |
| (2) Molecular weight analysis  | 67 |

|   |     |
|---|-----|
| C. Conchiolin peptide manufacture of enzyme hydrolysis·····   | 68  |
| 5. Manufacture of solubility in water calcium that use oyster shell·····                              | 69  |
| 6. Large scale manufacture technical development and development of application product·····          | 69  |
| A. Large scale purification method development of low cost high efficiency·····                       | 69  |
| B. Development and assessment of application product by industry·····                                 | 69  |
| (1) Food material·····  | 69  |
| (2) Cosmetic material·····  | 69  |
| (3) Herb medicine material·····   | 69  |
| (a) Development of herb medicine skin cure·····   | 69  |
| (b) Kind of product·····  | 70  |
| (4) Internal medicine treatment prescription development·····   | 71  |
| 7. Production utility technical development·····  | 72  |
| A. High-volume mass production process technical development and economic efficiency examination····· | 72  |
| B. Market analysis and industrialization plan etc..marketing direction research for product··         | 72  |
| 8. Clinical demonstration·····  | 72  |
| A. Development of skin clinical demonstration protocol·····   | 72  |
| B. Pimple clinical demonstration·····   | 72  |
| C. Atopy clinical demonstration·····  | 72  |
| D. Clinical demonstration protocol 1·····   | 73  |
| E. Clinical demonstration protocol 2·····   | 107 |
| F. Clinical demonstration protocol 3·····   | 130 |
| Paragraph 3. Result of study·····   | 139 |
| 1. Shell processing technical development ·····   | 139 |
| A. Sampling and processing result·····  | 139 |
| B. Processing powdered manufacture·····   | 139 |
| (1) Particle analysis of hyperfine powder·····  | 142 |
| (2) Particle analysis of nano powder·····   | 144 |
| C. Processing powdered componential analysis result·····  | 147 |
| (1) Moisture quantity·····  | 147 |
| (2) Crude protein quantity·····   | 147 |
| (3) Crude fatty acid quantity·····  | 147 |



|   |     |
|---|-----|
| (4) Crude ash quantity  | 148 |
| (5) Carbohydrate quantity   | 149 |
| (6) Comparison of normal composition in shell and shell's eating position                                     | 150 |
| (7) Mineral quantity  | 151 |
| (8) Vitamin and fatty acid quantity   | 151 |
| (9) Component parts analysis of organic compound  | 156 |
| 2. Results of Physicochemical analysis for shell powder   | 160 |
| A. Surface tension measurement  | 160 |
| B. Change of surface tension about pH   | 161 |
| C. Interface tension measurement  | 162 |
| D. HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value   | 162 |
| E. Emulsifying activity and stability measurement   | 163 |
| F. Temperature and thermal stability  | 163 |
| G. TG, DSC analysis   | 168 |
| 3. Result of biological active substance study of shell extract   | 169 |
| A. Extraction and purification of crude conchiolin  | 169 |
| (1) Extraction of conchiolin  | 169 |
| (a) Extraction method of conchiolin   | 169 |
| (b) Yield ration of conchiolin  | 169 |
| (c) Amino acid analysis   | 172 |
| (d) Biological active analysis of crude conchiolin  | 173 |
| ① Protein inhibition activity(COX, DOPA)  | 173 |
| ② Linoleic acid automatic oxidation inhibition activity measurement   | 181 |
| ③ Antimicrobial and Antifungal activity   | 182 |
| ④ hemocytolysis activity measurement  | 186 |
| ⑤ Muscle contraction activity measurement   | 187 |
| 4. Optimization of extraction from Shells   | 189 |
| A. Optimum buffer of conchiolin extraction in shell   | 189 |
| B. Comparison of protein and sugar concentration analysis of 0.1M Citrate buffer and 8.0M Urea buffer extract | 190 |
| C. Comparison of biological activity of selection buffer extraction   | 193 |

|  |     |
|--|-----|
| (1) COX-1, COX-2 inhibition assay .....  | 193 |
| (2) DPPH radical scavenging assay.....   | 193 |
| D. Conchiolin's molecular weight analysis separating from 6 kinds shell.....                                   | 198 |
| E. Biological active analysis of purified conchiolin.....  | 200 |
| (1) Conchiolin purification.....   | 200 |
| (2) COX inhibition assay.....  | 200 |
| (3) DPPH radical scavenging assay.....   | 205 |
| (4) In vitro tyrosinase inhibition assay.....  | 205 |
| F. TLC(Thin layer chromatography) of purified conchiolin.....  | 208 |
| G. SDS-PAGE of purified conchiolin .....   | 211 |
| 5. Conchiolin yield analysis for mass production.....  | 213 |
| A. Conchiolin yield analysis of oyster shell.....  | 213 |
| 6. Structure analysis of soluble conchiolin.....   | 216 |
| A. Purification of conchiolin from oyster shell.....   | 216 |
| B. Purified Conchiolin's purity confirmation and molecular weight verification.....                            | 217 |
| C. Amino acid analysis of purified conchiolin.....   | 217 |
| D. Structure analysis of soluble conchiolin.....   | 220 |
| 7. Manufacture of peptide by enzyme hydrolysis.....  | 221 |
| 8. Commercialize anti-inflammatory product and biological activity comparison about separating conchiolin..... | 224 |
| A. COX inhibition assay.....   | 224 |
| B. DPPH radical scavenging assay.....  | 228 |
| 9. Animal experiment.....  | 229 |
| A. In Raw264.7 cells crude conchiolin's cell toxicity and anti-inflammatory activity measurement.....          | 229 |
| B. Crude conchiolin's cell toxicity in SD Rat.....   | 229 |
| (1) Body weight.....   | 229 |
| (2) GOT, GPT, LDH.....   | 229 |
| C. Effect of getting in DNCB treat mouse's contact dermatitis.....   | 238 |
| (1) Effect of conchiolin in DNCB induced ear in mouse.....   | 238 |
| (2) Effect getting to serum IgE's concentration.....   | 238 |
| (3) Effect getting to concentration of IL-1 $\beta$ .....  | 238 |
| (4) Effect getting to concentration of IL-6 .....  | 238 |
| 10. Water soluble calcium manufacture from oyster shell.....   | 244 |

|   |     |
|---|-----|
| 11. Large scale manufacture technical development and development of application product                            | 245 |
| A. Large scale purification method development and economic analysis  | 245 |
| (1) Manufacturing process   | 245 |
| (2) Manufacturing process design(100 ton)   | 246 |
| (3) Production equipment unit cost  | 247 |
| (4) Manufacturing cost  | 248 |
| (5) Quality with domestic competition product and foreign competitive products, a technology, price comparison etc. | 249 |
| B. Application product development  | 250 |
| (1) Oyster shell origin conchiolin inclusion atopy cure and cosmetics development for pimple treatment              | 250 |
| (a) Development of cosmetics base material  | 250 |
| (b) The product picture   | 250 |
| (c) Prescription development of atopy treatment cosmetics for product   | 250 |
| ① Atopy skin lotion   | 251 |
| ② Atopy emulsion lotion   | 252 |
| ③ Atopy cream   | 253 |
| ④ Development of product for pimple   | 254 |
| (2) Cheonggukhwan's manufacture for oyster shell origin calcium inclusion development                               | 255 |
| (3) Product assessment  | 256 |
| (a) Anti-inflammation activity(Cyclooxygenase-2, NO inhibition assay)   | 256 |
| ① Cyclooxygenase-2  | 256 |
| ② NO inhibition assay   | 261 |
| ③ Cell toxicity   | 261 |
| ④ A toxicity experiment for processing powder and ability fraction  | 266 |
| (4) Herb medicin dermatology atopy prescription protocol  | 268 |
| (a) Herb medicin atopy bath powder  | 268 |
| (b) Atopy treatment prescription order  | 268 |
| (c) Clinical demonstration case   | 268 |
| (5) Internal medicine prescription development  | 270 |
| (a) Gland prescription  | 270 |
| (b) Removal of fever prescription   | 271 |
| 12. Clinical demonstration(pimple and atopy)  | 272 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Chapter 4. Achievement target achievement and contribution of related field</b> .....                     | 273 |
| <b>Chapter 5. Research and development result and practical use plan</b> .....                               | 274 |
| <b>Chapter 6. Foreign Science Technical information collecting in research and development process</b> ..... | 281 |
| <b>Chapter 7. Reference</b> .....  | 310 |
| <b>Attached paper 1, 2</b>   |     |

# 목 차

|   |    |
|---|----|
| <b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b> .....             | 9  |
| 제 1 절 연구개발의 목적 .....                      | 9  |
| 제 2 절 연구개발의 필요성 .....                     | 9  |
| 1. 폐각류에 대한 이용현황 .....                     | 9  |
| 가. 한약소재로서 이용 .....                        | 9  |
| 나. 식품 칼슘제로서의 이용 .....                     | 9  |
| 다. 비료로 이용 .....                           | 11 |
| 라. 수 처리제 .....                            | 11 |
| 마. 생체재료로 이용 .....                         | 13 |
| 바. 기타 .....                               | 13 |
| 2. 폐각류에 대한 국내·외 산업적 활용과 문제점 .....         | 13 |
| 3. 앞으로 전망 .....                           | 14 |
| 4. 연구개발의 범위 .....                         | 15 |
| 가. 최종 목표 .....                            | 15 |
| 나. 연차별 연구개발목표와 내용 .....                   | 15 |
| <b>제 2 장 국내외 기술 개발 현황</b> .....           | 17 |
| 제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발 현황 .....         | 17 |
| 제 2 절 연구결과가 국내·외 기술현황에서 차지하는 위치 .....     | 20 |
| 1. 개발기술에 대한 평가 .....                      | 20 |
| 2. 원료 및 제조시설 확보방안 .....                   | 21 |
| 가. 자원조달의 특성 .....                         | 21 |
| 나. 관련법령 또는 정부의 규제 .....                   | 21 |
| 다. 폐각의 활용 가능한 분야별 국내·외 시장규모 분석 및 전망 ..... | 22 |
| (1) 탄산칼슘의 국내시장규모 .....                    | 22 |
| (2) 칼슘제 시장규모 .....                        | 22 |
| (가) 건강 기능성식품의 세계시장 규모 .....               | 22 |
| (나) 국내 시장 규모 .....                        | 23 |
| (3) 항염증제 시장규모 .....                       | 23 |
| (4) Bioceramic 시장규모 .....                 | 24 |
| <b>제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과</b> .....        | 25 |
| 제 1 절 연차별 이론적 실험적 접근방법 .....              | 25 |
| 제 2 절 연구방법 .....                          | 35 |
| 1. 폐각 가공처리 기술개발 .....                     | 35 |

|  |    |
|--|----|
| 가. 시료수집 .....  | 35 |
| 나. 시료 처리 .....   | 36 |
| 다. 가공분말의 제조 .....  | 36 |
| (1) 일반분쇄 분말 제조 .....                                       | 36 |
| (2) 초미세분말 제조 .....   | 36 |
| (3) 나노분말 제조 .....  | 37 |
| 라. 폐각 분말에 대한 성분분석 .....                                    | 39 |
| (1) 수분 정량 .....  | 39 |
| (2) 조단백질 정량 .....  | 40 |
| (3) 조지방 정량 .....   | 41 |
| (4) 조회분 정량 .....   | 42 |
| (5) 탄수화물 정량 .....  | 43 |
| (6) 무기질 정량 .....   | 43 |
| (7) 지방산과 지용성비타민의 정량 .....                                  | 45 |
| 마. 폐각 분말에 대한 물리화학적 특성분석 .....                              | 50 |
| (1) 표면장력의 측정 .....   | 50 |
| (2) pH에 대한 표면장력의 변화 .....                                  | 50 |
| (3) 계면장력 측정 .....  | 50 |
| (4) HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value .....       | 50 |
| (5) 유화활성 및 유화 안정성 .....                                    | 50 |
| (6) 온도 및 열 안정성 .....                                       | 51 |
| 2. 폐각 추출물의 생리활성물질 탐색 .....                                 | 52 |
| 가. 폐각추출물(Crude conchiolin)의 추출 및 정제 .....                  | 52 |
| (1) Crude conchiolin의 추출 .....                             | 52 |
| (2) Conchiolin 정제 .....                                    | 52 |
| (3) 단백질 정량분석 .....   | 57 |
| (4) 당 정량분석 .....   | 57 |
| (5) TLC(Thin layer chromatography) 분석 .....                | 59 |
| (6) SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) ..... | 59 |
| 나. 폐각추출물(Crude conchiolin)에 대한 생리활성분석 .....                | 59 |
| (1) 항산화(DPPH method) .....                                 | 59 |
| (2) 항염증실험(COX-1, COX-2 저해활성 측정) .....                      | 60 |
| (3) NO 생성 저해능 측정 .....                                     | 60 |

|  |    |
|--|----|
| (4) 세포독성 측정(MTT assay) .....   | 61 |
| (5) 미백효과(Tyrosinase inhibition assay) .....  | 61 |
| (6) Collagenase 저해 활성 측정(주름관련 실험).....   | 62 |
| (7) Linoleic acid 자동산화 억제활성 측정 .....   | 62 |
| (8) 항균 및 항곰팡이 활성 측정 ( <i>Antimicrobial and Antifungal activity</i> ) .....   | 62 |
| (9) 용혈활성측정 .....   | 63 |
| (10) 근육수축활성 측정 .....   | 63 |
| (11) Raw264.7 cell에서 가공원료추출물(Crude conchiolin)의 세포독성 및 항염증 활성 측정 .....   | 63 |
| (가) 세포배양 .....   | 63 |
| (나) 세포 생존율 측정 .....  | 64 |
| (다) NO 생성량 측정 .....  | 64 |
| (라) Immunoblot analysis .....  | 64 |
| (마) Cytokine의 측정 .....   | 64 |
| 3. 전 임상 동물실험 .....   | 65 |
| 가. Rat에서 가공원료추출물(crude conchiolin)의 독성측정 .....   | 65 |
| (1) 체중측정 .....   | 65 |
| (2) GOT(Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(Glutamic pyruvic transaminase), LDH(Lactate dehydrogenase) 및 BUN (Blood urea nitrogen) 측정..... | 65 |
| 나. DNCB로 유도된 mouse의 접촉성 피부염에 미치는 영향 .....  | 65 |
| (1) 실험동물의 사육 .....   | 65 |
| (2) 귀부종 유발 및 귀두께 측정.....   | 65 |
| (3) 혈액의 채취 .....   | 66 |
| (4) 실험동물의 희생 및 부종유발 귀의 채취 .....  | 66 |
| (5) Immunoglobulin 측정 .....  | 66 |
| (6) Cytokine 측정.....   | 67 |
| 4. 효소 가수 분해법을 이용한 conchiolin peptide 제조 .....  | 67 |
| 가. 수용성콘키올린의 추출 및 정제 .....  | 67 |
| 나. 분리 정제 및 구조분석 .....  | 67 |
| (1) 아미노산 분석 .....  | 67 |
| (2) 분자량 측정 .....   | 68 |
| 다. 효소가수분해에 의한 펩타이드의 제조 .....   | 69 |
| 5. 균 폐각을 이용한 수용성칼슘의 제조 .....   | 70 |

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| 6. 대량분리정제 기술개발과 응용제품의 개발           | 70  |
| 가. 저비용 고효율의 대량분리정제법 개발             | 70  |
| 나. 산업분야별 응용제품의 개발 및 평가             | 70  |
| (1) 식품소재                           | 70  |
| (2) 화장품소재                          | 70  |
| (3) 한방제품개발                         | 70  |
| (가) 한방 피부외용제 개발                    | 70  |
| (나) 제품의 종류                         | 71  |
| (4) 내과치료처방개발                       | 72  |
| 7. 생산실용화 기술개발                      | 73  |
| 가. 대량생산공정기술개발 및 경제성 검토             | 73  |
| 나. 제품에 대한 시장분석 및 산업화 전략 등 마케팅 방향연구 | 73  |
| 8. 임상실험                            | 73  |
| 가. 피부 임상실험 프로토콜의 개발                | 73  |
| 나. 여드름 임상실험                        | 73  |
| 다. 아토피 임상실험                        | 73  |
| 라. 임상실험 protocol 1                 | 74  |
| 마. 임상실험 protocol 2                 | 108 |
| 바. 임상실험 protocol 3                 | 131 |
| <b>제 3 절 연구결과</b>                  | 140 |
| 1. 폐각가공처리 기술개발                     | 140 |
| 가. 시료 채취 및 처리결과                    | 140 |
| 나. 가공분말의 제조                        | 140 |
| (1) 초미세 분말에 대한 입도 분석 결과            | 143 |
| (2) 나노분말에 대한 입도분석결과                | 145 |
| 다. 가공분말의 성분분석 결과                   | 148 |
| (1) 수분 정량                          | 148 |
| (2) 조단백질 정량                        | 148 |
| (3) 조지방 정량                         | 148 |
| (4) 조회분 정량                         | 149 |
| (5) 탄수화물 정량                        | 150 |
| (6) 폐각과 폐류(가식부)의 일반성분 비교           | 151 |



|  |     |
|--|-----|
| (7) 무기질 정량 .....   | 152 |
| (8) 비타민 및 지방산 정량 .....   | 152 |
| (9) 유기물의 구성성분 분석 .....   | 157 |
| 2. 폐각분말의 물성분석결과 .....  | 161 |
| 가. 표면장력 측정 .....   | 161 |
| 나. pH에 대한 표면장력의 변화 .....   | 162 |
| 다. 계면장력 측정 .....   | 163 |
| 라. HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value .....                            | 163 |
| 마. 유화활성 및 유화 안정성 .....   | 164 |
| 바. 온도 및 열 안정성 .....  | 164 |
| 사. TG, DSC 열량분석 .....  | 169 |
| 3. 폐각 추출물의 생리활성물질 연구결과 .....   | 170 |
| 가. 폐각추출물의 추출 및 정제결과 .....  | 170 |
| (1) Conchiolin 의 추출 .....  | 170 |
| (가) Conchiolin 의 추출방법 .....  | 170 |
| (나) Conchiolin의 수득율 .....  | 170 |
| (다) 아미노산 분석 .....  | 173 |
| (라) Crude Conchiolin 에 대한 생리활성 분석 .....  | 174 |
| ① 단백질 저해활성(COX, DOPA) .....  | 174 |
| ② Linoleic acid 자동산화 억제활성 측정 .....   | 182 |
| ③ 항균 및 항곰팡이 활성 측정 .....  | 183 |
| ④ 용혈활성측정 .....   | 187 |
| ⑤ 근육강화활성 측정 .....  | 188 |
| 4. 폐각으로부터 Conchiolin의 최적 추출 조건 검토 .....  | 190 |
| 가. Conchiolin 추출용 최적 Buffer의 선정 .....  | 190 |
| 나. 0.1M Citrate buffer와 8.0M Urea buffer로부터 추출된 conchiolin의 단백질, 당 정량 분석 ..... | 191 |
| 다. 선정된 Buffer를 이용하여 각종 폐각으로부터 분리한 conchiolin의 생리활성 비교 분석 .....                 | 194 |
| (1) 항염증 활성 측정 (Cyclooxygenase, COX inhibition assay) .....                     | 194 |
| (2) 항산화 활성 측정 (DPPH radical scavenging assay) .....                            | 194 |

|  |     |
|--|-----|
| 라. 6종류 폐각으로부터 분리한 conchiolin의 분자량분석                                  | 199 |
| 마. Conchiolin의 분리정제 및 생리활성 연구  | 201 |
| (1) Conchiolin의 정제   | 201 |
| (2) 항염증 활성 측정 (Cyclooxygenase, COX inhibition assay)                 | 201 |
| (3) 항산화 활성 측정 (DPPH radical scavenging assay)                        | 206 |
| (4) 미백 활성 측정 (In vitro tyrosinase inhibition assay)                  | 206 |
| 바. 정제된 conchiolin의 TLC(Thin layer chromatography) 분석                 | 209 |
| 사. 정제된 conchiolin의 SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) | 212 |
| 5. 대량생산을 위한 Conchiolin의 수율검증   | 214 |
| 가. 굴 폐각을 이용한 Conchiolin 수율검증   | 214 |
| 6. Soluble conchiolin의 구조분석  | 217 |
| 가. 굴 폐각으로부터 추출한 conchiolin의 분리정제                                     | 217 |
| 나. 정제된 Conchiolin의 순도 확인 및 분자량 검증                                    | 218 |
| 다. 정제된 conchiolin의 아미노산 분석   | 218 |
| 라. 수용성 콘키올린의 구조분석  | 221 |
| 7. 효소가수분해에 의한 펩타이드의 제조   | 222 |
| 8. 상용화된 항염증 제품과 분리한 conchiolin에 대한 활성비교                              | 225 |
| 가. 항염증 활성 측정 (Cyclooxygenase, COX inhibition assay)                  | 225 |
| 나. 항산화 활성 측정 (DPPH radical scavenging assay)                         | 229 |
| 9. 전 임상 동물실험   | 230 |
| 가. Raw 264.7 cell에서 Crude conchiolin의 세포 독성 및 항염 활성 측정               | 230 |
| 나. SD Rat에서 crude conchiolin의 독성측정                                   | 230 |
| (1) 체중측정   | 230 |
| (2) GOT , GPT, LDH   | 230 |
| 다. 굴 폐각 유래 conchiolin과 나노 분말이 DNCB로 유도된 mouse의 접촉성 피부염에 미치는 영향       | 239 |
| (1) 귀 부종에 미치는 영향   | 239 |
| (2) 혈청 IgE의 농도에 미치는 영향   | 239 |
| (3) IL-1 $\beta$ 의 농도에 미치는 영향  | 239 |
| (4) IL-6의 농도에 미치는 영향   | 239 |
| 10. 굴폐각을 이용한 수용성칼슘제조   | 245 |
| 11. 대량분리정제 기술개발과 응용제품의 개발  | 246 |
| 가. 대량분리공정개발 및 경제성검토  | 246 |

|  |     |
|--|-----|
| (1) 제조공정 .....   | 246 |
| (2) 생산공정 설계도(100톤) .....                               | 247 |
| (3) 생산설비단가 .....                                       | 248 |
| (4) 제조원가(폐각분말 10톤/일 처리기준) .....                        | 249 |
| (5) 국내 경쟁사 제품 및 국외 경쟁사 제품과의 품질, 기술, 가격 비교 .....        | 250 |
| 나. 응용제품개발 .....  | 251 |
| (1) 균 폐각 유래 conchiolin 함유 한방 아토피 및 여드름 치료용 화장품개발.....  | 251 |
| (가) 화장품 베이스 원료의 개발 .....                               | 251 |
| (나) 제품사진 .....   | 251 |
| (다) 제품화를 위한 아토피치료용 화장품의 처방개발 .....                     | 251 |
| ① 아토피 스킨처방 .....                                       | 252 |
| ② 아토피 로션처방 .....                                       | 253 |
| ③ 아토피크림 .....  | 254 |
| ④ 여드름용 제품의 개발 .....                                    | 255 |
| (2) 균 폐각 유래 calcium 함유 성장용 청국환의 제조 .....               | 256 |
| (3) 제품평가 .....   | 257 |
| (가) 항염증 활성 평가(Cyclooxygenase-2 저해활성 , NO 생성 저해능) ..... | 257 |
| ① Cyclooxygenase-2 저해활성평가 .....                        | 257 |
| ② NO 생성 저해능 평가 .....                                   | 262 |
| ③ 세포독성 평가 .....  | 262 |
| ④ 가공분말 및 기능성 분획물에 대한 독성실험 .....                        | 267 |
| (4) 한방피부과 아토피 처방 protocol .....                        | 269 |
| (가) 한방아토피 입욕제 .....                                    | 269 |
| (나) 아토피 치료제의 치료 처방순서 .....                             | 269 |
| (다) 임상사례.....  | 269 |
| (5) 내과처방개발.....  | 271 |
| (가) 경부임파선 처방.....                                      | 271 |
| (나) 해열처방.....  | 272 |
| 12. 임상실험(여드름, 아토피).....                                | 273 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....                          | 274 |
| 제 5 장 연구개발 성과 및 활용계획.....                              | 275 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....                       | 282 |
| 제 7 장 참고문헌 .....                                       | 311 |
| 별 첨 4, 5   |     |



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

국내 연안에서 양식되고 있는 패류 및 기타 수산동물의 전체 생산량을 살펴보면 패류가 2009년 기준 약 326,544톤, 기타 수산 동물(미더덕, 우렁쉥이 등)이 16,743톤으로 금액으로 환산하면, 4,940억 원과 229.8억 원이다(2009년 통계청 자료 참조).

그 중 가장 많이 생산되고 있는 품종을 살펴보면 패류의 경우 굴 240,911톤, 바지락 17,905톤, 홍합 55,035톤, 고막 류 2,966톤, 피조개 1,714톤, 전복 6,207톤, 가리비 348톤, 가무락 74톤 등의 순으로 생산되었으며, 기타 수산동물의 경우 우렁쉥이 7,208톤, 미더덕 3,845톤, 오만둥이 5,690톤으로 생산되었다(2009년 통계청 자료 참조).

또한 패류의 연간 생산량의 변화를 살펴보면 1985년에 357,009톤이던 것이 1995년 311,963톤, 2004년 304,889톤, 2009년 326,544톤으로 1985년에 비하면 2009년 에는 약 40만 톤 가량 감소하였다. 이러한 요인으로는 천해 양식 조건이 해양오염과 양식장 주변에 각종 생물폐기물들의 유입 등으로 인하여 양식 환경이 나빠지고 있기 때문인 것으로 추정된다.

현재 패류와 기타 수산동물에 있어서 가장 대표적으로 많이 생산되고 있는 것이 굴, 바지락, 홍합, 고막, 피조개, 전복, 멍게, 미더덕 등이며, 이들의 경우 폐각이 제거되지 않은 생물 상태로 유통도 되기도 하지만, 굴의 경우 대부분 가공공장에서 폐각을 제거한 후 대형마트나, 시장에 유통되고 있다. 그러나 가공 공장에서부터 미처리 상태에 놓여 있는 폐각이나 각종 수산생물의 껍질은 그 양이 매년 증가하고 있고, 공장 주위 및 양식장 부근 노지에는 이러한 폐기물로 넘쳐나고 있는 실정이다.

굴의 경우를 예로 들면, 전체 폐각 중 약 10%만이 사료, 비료, 수 처리 흡착제로 이용되고 있지만, 약 90%가까이는 여전히 폐기물 상태로 방치되어 어장의 오염과, 자연경관을 훼손과 악취 등으로 보건 위생상의 문제를 야기 시키고 있다. 실제 양식어장을 보유하고 있는 어민의 말을 들어보면 이 문제에 대해 심각하다 못해 포기하는 모습을 보이고 있다. 그러므로 폐각류에 대한 이용성의 확대 측면에서라도 다양한 분야의 사람들이 폭넓은 연구를 수행함으로써 그 이용성을 확대 시켜나가야 할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 현재 폐기물 형태로 방치 되고 있는 각종 폐각류에 대한 이용성을 증대시키기 위한 방안을 모색하고자 새로운 저분자 가공기술과 첨단 분석 기술을 이용하여 새로

운 기능성 물질을 탐색하고, 자원으로써 이용 가능성을 연구한 후 고 부가가치 산업으로 전환하기 위한 실용화 기술을 개발하고자 한다.



## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 폐각류에 대한 이용현황

#### 가. 한약소재로서 이용

전통한의학 의서인 본초학을 근거로 폐각류에 대한 이용현황을 살펴보면, 한약처방에는 약 13가지(전복, 고막, 담치, 진주모, 유리조개, 굴, 가막(재첩) 조개, 대왕 조개, 백합, 바지락, 동죽, 칼조개, 맛조개 등)의 폐류가 약재로 이용되고 있으며, 이들은 청열해독과 위, 장, 간, 폐, 결막, 피부 농창 치료 등에 사용되고 있다. (동의약용동물학, 의성당) 그 외에도 고동을 비롯하여 해삼, 멧게, 게, 미더덕, 내하, 불가사리 등 약 100여 가지의 수산생물약재(어류, 해조류, 갑각류, 조류, 폐각류 등)가 수록되어 있다. 이들은 대부분 건조나 회화시켜 사용하고 있다.

현재 한의학에서 이용되고 있는 대표적인 종류와 약성을 보면 전복껍질은 간과 풍사를 진정시켜주며, 뼈골통, 지혈, 어지럼증, 위산과다, 불면치료 등에 사용되며, 꼬막은 혈액에 활력을 주어 이혈을 풀고 위산을 억제하고 체중을 내려준다. 진주모의 경우 간과 풍사를 가라앉히고, 경기를 멎게하고 지혈작용 등을 하며, 굴은 폐결핵에 의한 폐열, 임파선 결핵, 봉투내하 등을 치료하며, 바지락은 청열해독과 피부를 윤택하게 하고 창(피부염)을 치료하는 효과가 있다(표 1).

#### 나. 식품 칼슘제로서의 이용

과거에 소뼈 등으로부터 분리하여 사용한 칼슘이나 석회석에서 분리한 탄산칼슘제재를 대신해서 최근에는 굴 폐각을 소성하여 얻은 탄산칼슘과 구연산 칼슘 등이 칼슘보충제로 비타민과 글루코사민 등을 혼합하여, 관절염, 골다공증 예방 등의 용도로 사용되고 있다. 그 외 스낵이나 라면, 오뎅 등에 쓰이며 백색의 효과와 함께 쫄깃한 맛을 보충하는데 사용되어지고 있다.

#### 다. 비료로 사용

토양의 pH를 알칼리로 유지해주는 토양개량제 용도로 사용되며, 농작물에 칼슘공급과 부수적인 효과로는 살충, 살균용도로 사용한다.

#### 라. 수 처리제

굴을 비롯한 각종 폐각류는 수처리 제로서 폐수처리장에서 중금속 흡착을 원리를 이용한 중금속제거 용도로 사용되고 있다.

표 1. 폐각을 이용한 현재 한의학에서 사용 중인 대표적인 사례

| 구분      | 구성성분  | 약리작용   |
|---------|---|--|
| 전복껍질    | 탄산칼슘, 각 각질(Concholin, C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>11</sub> N <sub>8</sub> )과 담즙산을 함유하고 있다.   | 간을 평안하게 하고 양기를 가라앉힌다. 풍을 가라앉히고 진정시킨다. 눈을 뜨게 한다. 通淋, 지혈 등 頭目眩暈(어지럼증), 甘肅癆熱(뼈골이 쪼듯이 아프고 열이 난다), 녹색색맹, 內障眼, 위산과다, 임질, 토혈, 분면을 치료한다. |
| 밤고등류    | 폐각은 탄산칼슘과 인산칼슘을 함유하며, Arginine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Alanine 등 함유   | 고혈압, 머리 어지럼 증, 두통, 만성 간염 치료  |
| 소라뚜껑    | 여러종류의 교단백물질 함유, 소량의 칼슘과 알루미눔규산염도 함유   | 정습열, 거담화, 止下痢(설사명), 고혈압, 두통, 심복만통, 이질, 임질, 치질 및 개선(은)등을 치료한다.  |
| 피빨고등    | 주로 탄산칼슘을 함유   | 火炎滯積, 鎖肝燥風, 利氣清神 효능, 위통, 임파선 결핵, 筋攣(근육경련) 등을 치료한다.   |
| 빨소라고등   | β,β-dimethylacrylcholine과 prophylenacylcholine을 함유  | 청열해독, 軟堅散結(딱딱한 것은 풀어주고 흩어진 것은 결합시켜준다) 효능, 임파선 결핵을 치료한다.  |
| (새)꼬막   | 껍질을 사용한다. 탄산칼슘, 인산칼슘을 함유  | 活血祛瘀(혈액에 활력을 주어 어혈을 풀어준다), 制酸止痛(산을 마르게 하여 통증을 그치게 한다), 消痰散結(담을 사라지게 하고 흩어진 것을 다시 결합시킨다), 위통, 위산과다, 체중을 내려준다.<br>동상치료             |
| 진주      | 폐각: 각단백질(keratin)로 glycine, alanine, leucine, phenylalanine, serine, valine, methionine, cystine, arginine, histidine, tyrosine, aspartic acid, glutamic acid, threonine 등, Na, Mg, Fe, K, Sr, Li, Mn, Cu 등의 원소를 함유 | 신경을 편안하게 하고 진정시킨다. 열을 맑게 하여 눈을 밝게 한다, 생기를 돋우며, 해독과 통증을 그치게 한다. 熱病驚癇(열병으로 인한 경기), 번갈발변, 인후종통, 구설생창, 癢癢不寐, 口赤翳障, 肌膚粗裂 등을 치료한다.     |
| 진주모     | 주로 탄산칼슘 함유  | 간을 평안하게 하고 풍을 잠재우며, 음을 더하고 양을 가라앉힌다. 경기를 가라앉혀 피를 멎게 하고, 현기증과, 심계이명, 頭痛失眠, 토혈녹혈(吐血衄血), 붕루(崩漏), 예장(醫障) 등을 치료한다.                    |
| 굴(모려)   | 폐각: 탄산칼슘 80-95% 함유, 인산칼슘, 황산칼슘, 산화철 및 Al, Mg, Si 등과 유기물은 1.8% 함유하고 있다. 칼슘염은 모세혈관을 치민하게 하여 혈관의 삼투성을 저하시키며, 위에서 위산과 작용하여 가용성 칼슘을 형성한다. 칼슘이온은 흡수되어 전해질의 평형 조절작용을 하며 근육의 흥분을 억제한다. 산성추출물은 생체내에서 척수회질염 병독에 효과가 있다.       | 자음잠양(滋陰潛陽), 진경안신(鎮驚安神), 삼정염한(消精斂汗), 연건화담(軟堅化痰) 효능. 허로내열(虛勞煩熱): 폐결핵에 의한 폐열, 유정(遺精), 도한(盜汗), 임파선 결핵, 붕루내하 등을 치료한다.                 |
| 바지락(합자) | 폐각: 탄산칼슘, 인산칼슘, 탄산마그네슘, 각각질(각단백질, Conchiolin)을 함유, Cu, Hg, Mo, Bi, Sn, AS 등의 중금속도 미량 함유 되어 있다.  | 청열해독, 生肌斂瘡 효능이 있다.   |



### 마. 생체재료로 이용

생체재료란 의약품을 제외한 인공 또는 천연재료로서 인체 내에서 장·단기적으로 인체의 조직, 기관 또는 기능을 치료, 보강, 회복시키는데 사용재료를 말한다. 세라믹 생체재료는 바이오세라믹이라 부르며, 세라믹 재료의 특성을 고려 할 때 경조직 대체 재료로 주로 사용되고 있다. 생체 재료의 응용분야로는 치과용 임플란트, 인공관절, 인공치아, 골대체물 등의 원료로 사용된다.

### 바. 기타

건축용 내장재 및 제철소 재련과정에서 황을 없애는 탈황제로 사용되고 있다.



다양한 각도에서 실용화 기술이 개발되고 있으나 부가가치가 낮은 소재로 이용되고 있는 실정임

## 2. 폐각류에 대한 국내·외 산업적 활용과 문제점

골 폐각을 이용한 칼슘제재 개발은 국내를 비롯하여 전 세계적으로 이미 상용화하여 현재 제품에 적용 판매 중에 있으며, 일본의 경우 아오모리산 가리비의 폐각 원료를 이용한 연구를 진행하여 무좀 치료약으로 판매 중에 있으며, 하치노헤 공업대와 공동 연구를 실시, 폐각을 원료로 한 항균벽재와 항균냄새제거제 등을 상품화하였다. 그러나 칼슘제의 경우 핵심기술이라 할 수 있는 수용성 칼슘제재 제형화 기술 개발이 아직 미흡하고, 국내의 경우 대부분 수입에 의존하고 있으며, 일반 칼슘제에 비해 가격도 3배 이상 비싸게 판매되고 있기 때문에 용해성이 우수한 수용성 칼슘 제형 개발 기술이 요구되고 있다.

건축내장재 및 페인트 도료 첨가제로 사용하는데 있어 가장 핵심적인 요소는 탄산칼슘의 순도와 염분 농도 등인데 폐각류를 이용하여 석회석을 대체할 경우 생산단가가 높아 가격 경쟁력의 문제점을 안고 있다.

현재 실용화 기술이 개발된 분야는 비료와 bioceramics이지만, 운송 및 재활용을 위한 pilot plant 제작의 원가가 상승되면서 산업적 효용가치가 급격히 하락하고 있는 실정이다. 이러한 문제로 인해 폐각의 이용성이 떨어지게 되며 환경문제는 날로 더해가고 있다.

현재까지 국내·외적으로 연구 초점은 식품이나 사료나 비료, 수처리제, 탈황제 등에 관한 연구가 대부분으로 환경문제를 해결하기 위한 대체방안으로 연구를 집중하고 있기 때문에 수익산업으로 전환하기 힘들고 대부분 정부지원을 통한 사업으로 진행되기 때문에 산업적 연계성이나 지속성이 떨어지는 문제점이 있다.

### 3. 앞으로 전망

저이용성 수산부산물의 경우 90%가량이 현재 방치되고 있고 자원으로 활용할 경우 오히려 폐기물 수거비용을 받고 회수하여 사용할 수 있기 때문에 폐기물 재활용차원에서 10,000배에서 많게는 100,000배 이상의 고부가가치가 창출될 것으로 생각된다.

또한 이미 본 연구소에서는 예비실험을 통하여 굳 폐각과 오징어뼈, 전복 등의 폐각으로 초 미세 가공분말을 만들어 한약 추출물과 혼합하여 아토피성 피부질환치료제와 각종 염증치료 보조제로 사용, 임상실험을 통하여 그 가치 및 효용성에 대하여 이미 확인한바가 있고, 폐각에 존재하는 미네랄과 단백질 그 외 유기물질 등 각각에 대해서보다 종합적인 검토와 연구가 진행된다면 치료제로서의 개발 가능성이 높을 것으로 사료된다.

따라서 폐각류 연구의 핵심은 환경문제를 해결하기 위한 연구가 아니라 폐각류도 우리의 식생활과 연계하여 생산된 우리의 자원으로써 먹고 남은 폐기물이 아닌 우리의 자연환경에서 우수한 양식 기술로 탄생된 우리의 자원이라는 인식의 전환이 필요하고, 이 자원을 효율적으로 활용하고 고부가가치 산업으로 연계함으로써 산업적으로는 물론 환경문제까지 자연스럽게 해결할 수 있을 것으로 판단된다.

### 3. 연구개발의 범위

#### 가. 최종 목표

본 연구는 현재 폐기물 형태로 방치 되고 있는 각종 폐각류에 대한 이용성을 증대시키기 위한 방안을 모색하고자 새로운 저분자 가공기술과 첨단 분석 기술을 이용하여 새로운 기능성 물질을 탐색하고, 한약 본초 자원에 근거한 약리작용을 규명하여 한약자원으로 사용가능성을 확인하고, 그 중 생리활성물질을 분리하여 전 임상과 임상실험을 통하여 자원으로로서 이용 가능성 확인한 후 경제성 분석과 공정개발연구를 통하여 응용제품개발 함으로서 폐각류 자원의 고부가가치화 및 실용화를 목표로 한다.



나. 연차별 연구개발목표와 내용

| 구 분              | 목 표  | 내용 및 범위   |
|------------------|--|---|
| 1 차년도<br>(2006년) | <ul style="list-style-type: none"> <li>▷원료의 1차 가공 처리기술의 개발과 조미제 및 나노 입자 가공분말의 제조</li> <li>▷가공원료에 대한 생리활성물질 탐색</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>○원료수집</li> <li>○1차 원료 가공방법 탐색</li> <li>○가공방법별 시료의 제조(조미제·나노 입자 분말 제조 및 입도분석 등)</li> <li>○가공된 원료물질로 생리활성물질의 추출</li> <li>○가공물에 대한 생리활성 및 기능성 조사(단백질, 지방, 탄수화물, 비타민, 무기물, 항염증, 항균, 항 진균, 단백질 저해능 등)</li> </ul>  |
| 2 차년도<br>(2007년) | <ul style="list-style-type: none"> <li>▷나노 및 조미제가공분말의 성분분석과 물리화학적 특성 검토</li> <li>▷정제된 분획물의 생리활성연구 및 생화학·물리화학적 특성 검토</li> <li>▷Conchiolin의 효소가수분해에 의한 기능성 펩티드 제조</li> <li>▷ 전임상 동물실험</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>○가공방법별 성분함량분석(중금속, 미네랄, 단백질, 탄수화물, 지방 등)</li> <li>○나노입자 분말의 제조 및 특성분석(표면장력, pH에 대한 표면장력의 변화, 계면장력 측정, HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value, 유화활성 및 유화안정성, 온도 및 열 안정성)</li> <li>○가공원료 추출물의 생리활성 분석(항염, 항산화)</li> <li>○정제 분획물에 대한 생리활성분석 및 성분분석(항산화, 항염증, 미백실험, TLC 분석, SDS-PAGE)</li> <li>○ 효소분해를 이용한 conchiolin의 펩티드 제조</li> <li>○전임상 동물실험(cell viability 측정, Nitric Oxide 생성량 측정, iNOS와 COX-2 발현 측정, cytokine 측정, 간·신장독성 측정)</li> </ul> |
| 3 차년도<br>(2008년) | <ul style="list-style-type: none"> <li>▷기능성물질의 대량 분리정제 기술 개발 및 산업적 응용 소재연구</li> <li>▷분리 정제된 물질의 구조 특성 분석</li> <li>▷임상실험 및 안정성 실험</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○저비용 고효율의 대량 분리 정제법 개발</li> <li>○수율검증</li> <li>○기능성 수산생물 응용제품을 위한 소재 연구(한방피부과, 통증소재 등)</li> <li>○응용제품연구(한방피부외용제 등)</li> <li>○기능성이 검증된 분획물들의 구조 특성 분석(질량분석, 아미노산결합 서열분석, NMR 분석 등)</li> <li>○간독성시험 및 피부연 질환모델 설치류를 이용한 동물실험</li> <li>○개발된 한방소재를 이용한 제품별 임상시험관련 protocol 개발</li> </ul>   |
| 4 차년도<br>(2009년) | <ul style="list-style-type: none"> <li>▷산업분야별 응용제품의 개발 및 제품평가</li> <li>▷한방과의 접목을 통한 제형연구 및 한약처방기술개발</li> <li>▷임상실험 및 안전성실험</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○식품: 소아성장용 한방제제(성장환 등에 첨가되는 보조치료제) 등</li> <li>○화장품: 수산생물 유래 기능성 한방화장품 등</li> <li>○한방 피부외용제: 수산생물 유래 기능성 아토피치료제 등</li> <li>○제품평가</li> <li>○가공 방법 및 형태에 따른 치료 효율의 검증</li> <li>○한방피부과 및 내과 치료처방 개발(한방입욕제, 위, 장 치료기능 등)</li> <li>○여드름임상시험 피험자모집 및 피험자진료</li> </ul>   |
| 5 차년도<br>(2010년) | <ul style="list-style-type: none"> <li>▷생산선용화기술 개발 및 제품화</li> <li>▷신 제형 및 신 한약 처방기술의 보급을 위한 제품평가 및 자료화</li> <li>▷임상실험 및 안전성실험</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>○가수분해기법을 이용한 기능성 펩타이드 탐색 및 약리기능검증</li> <li>○경제성을 고려한 원료의 대량처리 시스템 설계 및 개발</li> <li>○분말가공 처리 시스템 개발</li> <li>○대량분리정제 시스템 개발</li> <li>○Pilot plant 제작</li> <li>○제품에 대한 시장분석 및 산업화전략 등 마케팅방향연구</li> <li>○연구소 소속 한의사를 대상으로 한 제품평가 및 자료화</li> <li>○아토피 개선효과에 대한 임상시험용 피험자모집 및 인체적용시험 실시</li> </ul>  |

## 제 2 장 국내외 기술 개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발 현황

한국과학기술정보연구원(KISTI)의 검색자료를 근거로 쿨 폐각과 관련된 논문발표 현황을 분석하면 1960년부터 2009년 까지 국내·외 총 323편의 논문이 발표되어 있다. 그 중 국내 논문이 총 51건이고, 국외논문이 272건으로 다른 해양 생물 소재 연구 논문발표 건수에 비해 극히 적은 수임을 알 수 있다.

특히, 국내에서 발표된 연구논문의 대부분이 중금속흡착, 탈황, 수처리제, 콘크리트 골재배합 연구가 거의 대부분이며, 식품과 제약 관련 논문은 식품 5건, 제약 1건, 바이세라믹 연구관련 5편 수산양식관련 논문 3건 등에 불과한 실정이다.

외국의 경우에도 마찬가지이다. 202편이 중금속흡착, 수처리제, 콘크리트 구조물 관련 논문이고, 그리고 수산생물학, 수산양식과 관련된 논문 53편 쿨폐각의 부착된 pearl의 구조적 특성연구와 단백질구조, 미네랄 연구는 불과 17편에 지나지 않는다.

KISTI에 소장하고 있는 자료가 전 세계적으로 발표되는 모든 논문을 보유하고 있지는 않지만 전 세계적으로 신뢰성이 높은 논문들을 많이 확보하고 있다고 하였을 때 쿨 폐각에 대한 연구가 많지 않음을 알 수 있고 특히, 식품소재로 활용되고 있는 칼슘제재와 관절염 치료제로 각광 받고 있는 뉴질랜드산 초록입 홍합추출물질인 Lyprinol성분이 들어 있는 식품과 의약품을 제외하고는 거의 연구가 미흡한 실정이다.

#### (1) 외국의 경우

○ 일본 : 아오모리산 가리비의 폐각을 사용한 상품 개발에 임하는 「체프 로즈 코오퍼레이션」은 폐각을 원료로 한 무좀 치료약의 제조 판매위한 연구를 수행하여 상품으로 판매중이며, 또한 하치노헤 공업대와 공동 연구를 실시, 폐각을 원료로 한 벽재 외 제균, 냄새 제거제 등을 상품화하고 있다. 이외 폐각 폐기물의 고부가가치 고기능성 의약품 및 식품첨가물 개발을 위해 수행하고 있다.

○ 미국 : 폐각의 나노입자 가공기술을 이용한 다양한 생리활성에 대해 연구 중이며, 대체의학의 한 분야로 한방에서 사용하고 있는 폐각에 대한 효능 검증에 대한 연구가 진행 중이다. 또한, 쿨 폐각을 이용한 다양한 칼슘 흡수제 및 화장품 원료로 이미 개발되어 상품화 되어 사용되고 있다.

○ 호주 : 1973년 호주의 맥랩사가 초록입 홍합 추출물 개발에 착수하여 홍합가루제품인

Seatone을 발매한 이후 약 30년간 물질 안정화 작업과 초임계분리공정을 개발하여 Lyprinol성분을 분리하는데 성공한 후 인체시험을 거쳐 제품을 출시하였으며, 국내에는 2009년 식약청으로부터 관절기능성식품으로 인정받아 현재 시판 중에 있다. 홍합껍질에서 추출한 것이 아닌 홍합육에서 추출한 성분으로 폐각이용기술은 아니지만 해양생물소재를 활용하여 제품화에 성공시킨 대표적인 사례이다.

(2) 국내의 경우

○ 부경대학교에서 수행한 수산폐기물을 이용한 신소재 개발 과제는 수산가공 부산물의 효율적 이용을 위하여 굴껍질로부터 칼슘의 회수 및 성분분석, 인산칼슘 등의 화합물에 펩티드의 도입, Rat을 이요한 체내흡수도 측정과 천연 수산화아파타이트를 이용한 바이오세라믹스 소재를 개발하기 위한 과제로 수행되었음.

○ 한밭대학교에서 수행한 각종 폐각 폐기물로부터 초미립 고분자 충전제 및 bioceramics 제조 및 응용과제는 각종 폐각 폐기물로부터 부가가치가 높은 제품을 생산하고 그 용도를 개발하기 위한 과제로 폐각 폐기물을 소성하여 생석회(CaO)를 얻고 이를 수화시켜 Ca(OH)<sub>2</sub>를 얻은 후 탄산화시켜, 교질·경질 탄산칼슘을 얻는 공정개발로 수행되었음.

○ 경상대학교에서 수행한 수산미이용 자원을 이용한 미생물 배양배지 및 기능성 펩티드 생산 과제는 굴폐각을 이용하여 미생물배지로의 응용 및 TGase를 이용한 새로운 펩타드 개발연구를 이미 수행하였으며, 산업화를 위한 준비를 진행 중에 있음.

(3) 폐각류 이용에 관한 특허 현황

| 폐각유래 유용물질의 추출방법                   |              |            |     |      |
|-----------------------------------|--------------|------------|-----|------|
| 특허명                               | 특허등록일자       | 법적 소유자     | 발명자 | 특허국가 |
| 폐각을 이용한 액상 염화칼슘의 제조방법             | 2005. 04. 26 | 삼일화학공업주식회사 | 김덕화 | 대한민국 |
| 폐각류를 이용한 고순도염화칼슘 제조공정             | 2001 12. 22  | (주)천우테크    | 박성식 | "    |
| 고순도 칼슘제의 제조방법                     |              |            |     |      |
| 특허명                               | 특허등록일자       | 법적 소유자     | 발명자 | 특허국가 |
| 폐각을 소성하여 이온화칼슘을 제조하는 소성설비         | 2006. 12. 13 | (주)에코윈     | 김순식 | 대한민국 |
| 폐각 이온화칼슘 제조방법 및 폐각 이온화칼슘 제조용 소성설비 | 2006. 08. 16 | (주)뉴카리온    | 윤상술 | "    |

|  |               |           |     |   |
|--|---------------|-----------|-----|---|
| 폐각폐기물의 재활용 방법 및 그 장치                       | 2005. 09. 26  | 고검섭       | 고검섭 | " |
| 폐각류를 이용한 칼슘 수용액 제조방법 및 칼슘 수용액을 함유하는 기능성 식품 | 2005. 07. 13  | (주)한결 바이오 | 최희욱 | " |
| 액상칼슘 및 그 제조방법                              | 2005. 01. 18  | (주)휴나     | 구창섭 |   |
| 폐각류를 직접 소성하여 이온화칼슘을 제조하는 방법                | 2000. 10. 23  | 김상범       | 김상범 | " |
| 폐각류를 이용한 알칼리성 칼슘 제조방법                      | 2000. 10. 23  | 유종구       | 유종구 | " |
| 산화칼슘의 제조 방법                                | 2000. 07. 28  | 정대규       | 정대규 | " |
| 폐각류를 이용한 알칼리성 칼슘 제조방법                      | 2000. 10. 23  | 유종구       | 유종구 | " |
| 폐각류 겉질은 이용한 젖산칼슘의 제조방법                     | 2001. 01. 31  | (주)한삼코라   | 조남수 | " |
| 탄산칼슘의 제조방법                                 | 1998. 05. 26. | (주)호만기업   | 박성식 | " |
| 폐각 폐기물을 이용한 수산화 칼슘의 제조방법                   | 1998. 05. 14  | 김석훈       | 김석훈 | " |
| 폐각류와 산을 이용한 이온화 칼슘의 제조방법                   | 1995. 11. 30  | 김상범       | 김상범 | " |

## 제 2 절 연구결과가 국내·외 기술현황에서 차지하는 위치

### 1. 개발기술에 대한 평가

○ 국내·외적으로 폐각이용기술개발 연구는 수용성칼슘제 개발과 중금속흡착제, Bioceramic 소재, 건축 구조물 배합제 개발 등과 관련된 원료이용기술에 연구개발 방향이 맞춰져 있다.

○ 본 연구는 각종 폐각으로부터 의약품 소재인 항염증치료용 소재를 개발하였으며, 효율적인 생산을 위한 공정기술 개발을 완료하였다.

○ 기존에 개발된 각종 폐각류를 활용한 수용성 칼슘제나 Bioceramic 소재개발, 건축내장재를 생산하기 위해서는 세척→탈염→회화→분리공정을 거치기 때문에 그 과정 중 발생하는 원가 상승 요인으로 인하여 가격 경쟁력이 떨어지는 문제점을 안고 있다.

○ 본 과제에서는 항염증 물질 추출과정 중 부산물로 수용성 칼슘제나 Bioceramic 합성을 위한 고순도 칼슘제를 생산할 수 있기 때문에 원가 절감효과는 물론 자원의 재 활용도를 높일 수 있다.

#### ○ 친환경적 생산공정의 개발

수용성 칼슘회수를 위해 폐각 가수분해과정 중에 사용하는 초산이나 염산 등을 사용하지 않기 때문에 쾌적한 작업환경을 유지할 수 있고, 폐수처리 등에 대한 문제를 동시에 해결할 수 있다.

○ 국내·외적으로 폐각으로부터 항염증 치료물질을 순수하게 분리하여 그 구조를 해석하고 상용화 기술을 개발한 사례는 없기 때문에 제약원료 원천기술을 확보하는 대표적인 사례이다.

○ 국내·외적으로 폐각으로부터 폐각처리과정 중에 생성되는 모든 부산물을 재활용할 수 있는 소재가공 system을 확보한 최초의 사례로 정부에서 표방하는 녹색성장 동력원을 확보하였다.

○ 개발된 기술로 확보된 항염증 물질은 화장품 소재, 식품 및 의약품소재로 사용이 가능하며, 물질 구조가 확인 되는 대로 인체적용시험을 거쳐 제품을 출시할 예정이다.



## 2. 원료 및 제조시설 확보방안

### 가. 자원조달의 특성

○ 천연물 생약인 항염증치료제와 고순도 칼슘제의 생산 원료인 폐각류는 현재 국내에서 생산되는 양은 369 천톤이며 가공 처리되어 이용되어지는 소비량은 92 천톤(25%)로서 나머지 276 천톤(75%)는 현재 방치되어 있는 상태이다. 따라서 제품을 생산하기 위한 원재료는 국내에서만도 무한하게 공급될 수 있다.

○반면 항염증 치료제와 산업소재로서 이용되어지고 있는 고순도 칼슘제는 대부분 외국에서 수입되어지고 있는 실정이어서 국내에 방치되고 있는 폐각을 이용하여 이러한 원재료를 생산한다면 그에 따른 수입대체 효과는 막대할 것으로 예측되어진다.

○ 또한 폐각을 이용한 한약재로서의 사용 및 산업소재 개발을 위한 원재료로서의 이용에 대한 중요성이 점점 부각되고 있는 실정에서 이러한 국내 버려지는 폐자원을 활용하는 확실한 기술만 개발된다면 국내 산재되어 있는 폐각류 자원의 특성상 조달에는 큰 어려움이 없을 것으로 사료된다.

○2009년 2월 현재 통영시 굴 폐각 생산량은 14만 톤으로 어업인 90명이 폐기물수거반업체로 등록하여 폐각 간이 집하장 4곳 설치하고 비료화 가공공장 설립 함. 처리비용의 경우 톤당 20,000원으로 정부가 80%를 보조하고, 어민이 20%를 부담하는 것으로 현재 처리하고 있다.

○ 따라서 지자체와 연계하여 원료 처리방안을 모색하고 산지별로 폐각추출 가공공장을 설립하여 운영한다면 원료수급에는 아무런 문제가 없으며, 지역의 균형적 발전에 기여할 것으로 판단된다.

### 나. 관련법령 또는 정부의 규제

동의보감이나 기성처방에 근거하여 현재 한의학에서 사용되는 폐각의 경우 사용이 가능하며 천연물 생약 및 제조에 관한 관계법령 및 규제에 따라 수치 억제 후의 사용은 가능하며, 폐기물 관리법상 폐류생산업체에서는 반드시 직접 폐기물을 처리하거나 위탁업체에 위임하여 처리토록하고 있어 환경처리 비용을 받고 수거할 수 있는 장점을 지니고 있다. 아울러 환경부의 GR 마크를 획득함으로써 각종 세제 지원이나 산자부 지원 정책에 따라 신기술 개발에 따른 생산 설비 지원 등의 혜택을 받을 수 있다.

## 다. 폐각의 활용 가능한 분야별 국내·외 시장규모 분석 및 전망

### (1) 탄산칼슘의 국내시장규모

탄산칼슘의 국내시장 규모는 약892만톤(2008년 기준)으로 국내공급이 860만톤으로 수요의 96.4%, 수입은 14만 톤으로 3.6%를 차지해 내부분 국내에서 공급되고 있다(지식경제부, 2008년 도 광산물 수급현황, 2009).

탄산칼슘의 용도는 PVC, 바닥재, 창호재, 전선용 컴파운드, 벽지, 기타 플라스틱분야 등에 사용된다.

탄산칼슘 가격에 있어 제지용 중탄은 톤당 12만원선, 경탄은 20만~45만원 정도에 거래되고 있다. 수입산은 국산품에 비해 평균 3배이상 비싼데, 특히 일본산은 kg당 800엔이상의 고가제품도 국내에 판매되고 있다.

국내에서는 대부분의 플라스틱용 탄산칼슘을 한국 오미아에서 공급하고 있고 창호재 등 고급제품은 주로 수입제품을 사용하고 있다. 제지용은 수요가 13만 톤 정도로 중탄이 12만 톤, 일부업체에서 사용하는 경탄이 1만 톤 정도이다. 중탄은 코팅지인 아트지에 주로 사용되고, 경탄은 박엽지, 골련지 등에 일부 사용된다.

### (2) 칼슘제 시장규모

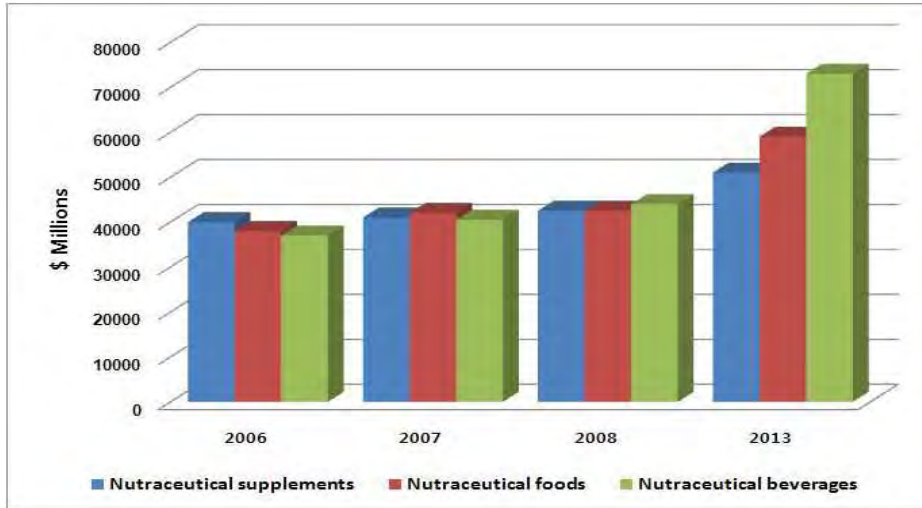
#### (가) 건강 기능성식품의 세계시장 규모

○ 기능성식품 산업의 글로벌 시장규모는 자료에 따라 다소 차이가 있으나 2006년 약 2,238억 달러에 이르는 것으로 보고하고 있음 (Nutrition Buisness Journal, 2007). 이를 과거 시장 성장률 7%(1999-2002) 보다 보수적인 연 6%의 성장률을 적용하더라도 2010년이면 시장규모는 2,880억 달러에 이를 것임.

○ 건강을 지향하는 식품[강화식품(fortified food), 식이보충제(dietary supplement) 등] 판매량은 전체 식품매출의 18%를 차지하고 있으며 지속적으로 증가될 것으로 전망됨. 특히 식품 개발 트렌드는 점차 예방 차원에서의 식품에 집중되어 있음. ('09 Euromonitor)

○ Food supplement 시장은 지난 10년 동안 연 4~6%씩 꾸준한 성장추세에 있으며 기능성을 강화한 식품은 북미, 서유럽, 일본 등의 선진국에서 많은 판매현황을 보이고 있음.

<세계 기능성 식품 시장규모>



[Source : Nutraceuticals: Global Markets and Processing Technologies, BCC Research, 2008]

(나) 국내 시장 규모

국내 칼슘제 시장은 연간 200t, 900억원 규모에 이른다. 하지만 소뼈나 조개껍데기, 석회조류, 퇴적산호 등을 주원료로 하기 때문에 대부분 수입에 의존하고 있다. 특히 최근에는 소비자들이 광우병과 조류독감, 납 함량 과다 등으로 동물성 칼슘 소재를 기피해 칼슘제 값이 뛰고 있는 실정이다. 세계시장규모도 1998년 8억달러에서 2000년 33억달러, 2010년에는 163억달러 규모로 급성장할 것으로 전망되고 있다.

(3) 항염증제 시장규모

| 천연물 생약 항염증치료제<br>(염증·관절염/건선 치료제) | 현재의 시장규모<br>( 2005 년 ) | 예상 시장규모<br>( 2012 년 ) |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------|
| 세 계 시 장 규 모                      | 241,000/15,000 억원      | 342,000/30,000 억원     |
| 한 국 시 장 규 모                      | 4,000/37 억원            | 4,560/60 억원           |

\* 산출근거 : 한국산업기술평가원

○관절염은 현재 국내성인 인구중 31%가 증상을 가지고 있을 정도로 발병율과 유병율에 있어서 1위를 기록하고 있는 질환이다. 관련 국내시장규모도 연간 약 4,000억 원 규모로 추산되고 있다.

○국내 소염진통제 시장 규모는 3,500억 원. 약 70~80여개 약물이 경쟁을 벌이고 있는데, 다국적 제약사가 판매하거나 다국적사로부터 수입한 약물이 대부분이다.

(4) Bioceramic 시장규모

| 산업적 소재의 원료<br>(바이오세라믹/인공치아) | 현재의 시장규모<br>( 2001 년 ) | 예상 시장규모<br>( 2010 년) |
|-----------------------------|------------------------|----------------------|
| 세 계 시 장 규 모                 | 15,700 / 11,200 억원     | 39,250 / 22,400 억원   |
| 한 국 시 장 규 모                 | - / 347 억원             | - / 700 억원           |
| * 산출근거 : 보건산업기술동향           |                        |                      |

# 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

## 제 1 절 연차별 이론적 실험적 접근방법

### 1. 1 차년도(2006년)

| 연구 내용   | 연구 결과  | 연구수행 방법<br>(이론적·실험적 접근방법)  | 비고 |
|---|--|--|----|
| <p>가) 원료의 1차 가공 처리기술의 개발과 초미세 및 나노 입자 가공분말의 제조</p> <p>-원료수집</p> <p>-1차 원료 가공방법 탐색</p> <p>-가공방법별 시료의 제조</p> <p>-일반분말, 초미세분말, 나노분말 제조 및 입도분석</p>                  | <p>국내에서 가장 많이 생산되고 있는 6 종류(굴, 홍합, 바지락, 피조개, 새조개, 동죽)의 패각시료를 통영과 여수, 진해, 완도, 군산 등지에서 각각 100kg씩 구입한 후 열분과 이물제거 후 건조하여 사용</p> <p>-원료가공방법은 문헌을 통해서 각종 가공방법을 탐색하고 본연구와 적합한 가공방법을 선정하였음</p> <p>-원료의 1차 가공 처리기술을 개발하였고 일반분말, 초미세분말, 나노가공분말을 제조하였음. 특히 나노 입자 가공분말 제조에 있어서 습식나노가공장치를 직접 고안하여 사용하였음.</p> <p>-일반분말은 핀크러셔미로 279-140mm, 초미세분말은 Air Mill로 5-30mm, 나노분말은 습식나노가공분쇄법으로 200nm-900nm로 제조하여 사용할 또한 굴의 초미세분말을 이용하여 입도분석을 실시하였음.</p>   | <p>이론적 접근방법:<br/>원료가공방법을 문헌을 통해서 각종 가공방법을 탐색하고 본연구와 적합한 가공방법을 선정하였음</p> <p>나노 입자 가공분말 제조에 있어서 습식나노가공장치를 직접 고안하여 사용하였음</p> <p>실험적 접근방법:<br/>패각류의 가공방법인 일반분쇄, 초미세분쇄 및 나노입자분쇄로 시료를 제조하였음. 일반분말은 핀크러셔미, 초미세분말은 에어밀 나노분말은 습식나노가공분쇄법으로 만들어 사용하였음. 또한 굴의 초미세분말을 이용하여 입도분석을 실시하였음.</p> |    |
| <p>나)가공원료에 대한 생리활성물질 탐색</p> <p>- 가공된 원료물질로 생리활성물질의 추출</p> <p>- 패각류의 성분별 함량분석 (단백질, 지방, 탄수화물, 비타민, 무기물 등)</p> <p>- 추출물에 대한 생리활성분 분석(항염증, 항균, 항진균, 단백질 저해능 등)</p> | <p>6종류의 패각류를 3가지 분말형태로 가공하여 6.5 M acetic acid로 상온에서 3시간동안 탈 석회 시킨 후, 탈 용해된 침전물(Conchiolin)을 회수하였음.</p> <p>-6종류의 패각에서 조단백질함량은 약 1% 내외 존재하는 것으로 확인</p> <p>-6종류의 패각에서 조지방 함량은 약 0.02%-0.06%임을 확인</p> <p>-6종류의 패각에서 조회분량은 평균 96-98%인 것으로 확인</p> <p>-6종류의 패각에서 탄수화물함량은 0.21-0.35%인 것으로 확인</p> <p>-지용성 비타민에는 항산화능이 우수한 Astaxanthin, Retinol등 존재함을 확인함</p> <p>-지방산은 GC/MS를 이용하여 측정하였고 생리활성이 우수한 지용성 비타민과 지방산, 미네랄 등을 분석하였음</p> <p>-무기물은 Ca, Mg, Na, Se등이 다량 함유되어 있는 것으로 확인함</p> <p>-항염증 실험에서 Conchiolin의 우수한 항염작용을 확인하였음</p> <p>-미백실험에서 Conchiolin의 우수한 미백작용을 확인하였음</p> <p>-항염증, 항균 및 미백실험을 통하여 Conchiolin의 단백질 저해능을 확인하였음.</p> | <p>이론적 접근방법:<br/>실험방법은 문헌 연구를 통하여 자료를 조사한 후 실시 하였으며, 연구결과를 도출한 후 이들과 비교하여 검토하였음</p> <p>실험적 접근방법:<br/>문헌을 근거로 연구방법을 설정한 후 실험을 실시하였으며, 도출한 결과를 바탕으로 새로운 추출법과 분리방법을 고안하여 연구를 실시하였음.</p> <p>성분분석은 식품공전에 명시된 방법으로 실험을 하였으며, 항염증, 항산화, 미백, 항균, 용혈 등 각종 분석방법은 문헌에 근거하여 실험하였음</p>      |    |

2. 2차년도(2007년)

| 연구 내용   | 연구결과   | 연구수행방법<br>(이론적·실험적 접근방법)  | 비고 |
|---|--|---|----|
| <p>○ 나노입자 분말의 제조 및 특성분석(표면장력, pH에 대한 표면장력의 변화, 계면장력 측정, HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value, 유화활성 및 유화안정성, 온도 및 열 안정성)</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 패각으로부터 분말로부터 나노분말을 제조함.</li> <li>• 나노분말의 물리적 특성을 측정함. 일반분말(&gt;250<math>\mu</math>m)과 초미세분말 (5-30<math>\mu</math>m), 그리고 나노 분말 (&lt;200nm)에 대한 표면장력의 결과 buffer의 표면장력 72.3 mN/m에 비해 일반분말의 경우 굴 71.6 mN/m, 새조개 71.3mN/m, 동죽 71.9mN/m로 표면장력의 활성능력이 거의 없는 것으로 확인되었다. 그 외 HLB, 계면장력 측정, 유화활성 및 유화안정성, 온도 및 열 안정성 등도 동일한 결과로 나타남.</li> <li>• TG, DSC로 조 큰키울린 분말의 경우 200<math>^{\circ}</math>C이후부터 중량이 감소하는 것은 유기물(콘키올린)의 열분해가 진행되면서 중량이 감소되는 것으로 판단되며, 일반분말과 초미세분말의 경우 600<math>^{\circ}</math>C이후부터 700<math>^{\circ}</math>C사이에서 빠른 속도로 열 중량이 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 경향은 중량대비 유기물의 함량이 5% 이내로 낮아 같은 온도 대비, 조 큰키울린처럼 200<math>^{\circ}</math>C 근처에서 유기물의 분해양상이 약하게 나타나며, 600<math>^{\circ}</math>C이후부터 급격히 열 중량 변화가 나타나는 것은 무기물들의 결합구조가 열에 의해 깨어지면서 급격한 중량 변화가 발생하는 것으로 판단됨. 시차주사열량계를 이용한 열량분석에서도 추출한 큰키울린과 나노분말이 일반분말과 초미세분말의 중량대비 반응열이 높은 것으로 나타났다.</li> </ul> | <p>이론적 접근방법:<br/>나노기술을 저비용 수산부산물에 이용함으로써 재활용이 아닌 치료용 한약 소재 분야로 이용될 수 있다.</p> <p>실험적 접근방법:<br/>조미세 패각분말(particle size=30<math>\mu</math>m)을 종류수에 넣고 저어준 후, rod homogeniser를 이용하여 20,000 rpm 으로 분쇄하고 pore size 0.45<math>\mu</math>m filter로 filtering하였다. 그 여액을 다시 pore size 0.2<math>\mu</math>m filter로 filtering한 다음 rotary evaporator로 수분을 증발시키고 3500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻어진 상층액을 pore size 0.2<math>\mu</math>m filter로 filtering하여 나노분말을 회수하였다. 액상의 나노분말은 동결 건조하여 분말상태로 만들었다.</p> |    |
| <p>○ 효소분해를 이용한 conchiolin의 펩티드 제조</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 효소가수분해를 통해 항염 효소를 지닌 펩티드를 제조함.</li> <li>• 액상으로 판매되는 protamex와 neutrase과 분말 trypsin을 동일 역가대비 액상으로 만든 후 이들을 동일한 기질(콘키올린)량으로 반응하여 40-60<math>^{\circ}</math>C의 온도와 pH 6.0-8.0의 조건으로 각각 2시간 반응 시키 후 반응물에 대한 활성을 측정하여 최적 조건을 확인하였다. 그 결과 항산화, ACE저해, COX-2저해활성이 가장 높은 최적 단백질 분해효소는 protamex이며, 반응 조건은 pH 6.0, 반응온도 50<math>^{\circ}</math>C였다.</li> <li>• 그 결과 반응전과 반응 후에 대한 크로마토그램을 살펴보면 반응 전 MW 20,000-61,000인 조 큰키울린이 반응 후 약 MW 8,800의 peak가 높게 생성되는 것으로 확인되어 펩타이드화가 진행됨을 알 수 있었다.</li> </ul>   | <p>이론적 접근방법:<br/>펩티드는 단백질보다 훨씬 짧은 아미노산 서열을 가지며 다양한 생리 기능을 나타낸다. 따라서 conchiolin 단백질로부터 전환된 펩티드 중 활성이 뛰어나며 가장 작은 펩티드를 제조하여 아미노산 분석을 통해 고 기능·고 부가가치 의약품 창출할 수 있다.</p> <p>실험적 접근방법:<br/>패각류에서 분리된 conchiolin 단백질을 효소(trypsin)를 이용하여 펩티드로 전환시킨 후, 펩티드의 항염 활성을 측정하였다.</p>   |    |

| 연구 내용  | 연구결과   | 연구수행방법<br>(이론적·실험적 접근방법)  | 비고 |
|--|--|---|----|
| <p>○ 가공원료 추출물의 생리활성 분석(항염, 항산화)</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 초미세파각 분말로부터 urea와 citrate buffer를 사용하여 conchiolin 추출물을 얻음.</li> <li>• urea와 citrate buffer에서 추출한 추출물에서 conchiolin 회수율을 측정하고 회수율에는 큰 차이를 나타내지 않았지만 당은 urea로 추출했을 때 20배 정도 높게 측정됨.</li> <li>• urea와 citrate buffer를 이용한 conchiolin 추출물에서 항염활성을 나타냄.</li> <li>• urea conchiolin 추출물보다 citrate buffer conchiolin 추출물에서 항염활성이 더 높게 나타냄.</li> <li>• urea와 citrate buffer를 이용한 conchiolin 추출물에서 항산화 활성은 나타나지 않음.</li> <li>• TLC 분석을 통한 단백질 발색과 당 발색 실험결과 파각의 conchiolin 추출물에는 여러 단백질과 당이 포함되어 있음.</li> </ul> | <p><u>이론적 접근방법:</u><br/>저이용 수산부산물들로부터 저렴한 가격으로 생리활성물질을 추출할 수 있는 공정의 개발을 위해 식품이나 의약품으로 사용시 문제가 되지 않는 buffer를 선정하여 초미세파각분말로부터 생리활성 물질을 추출하여 생리활성을 분석하였다.</p> <p><u>실험적 접근방법:</u><br/>초미세파각으로부터 추출물을 얻기 위해 urea 추출법과 citrate buffer 추출법을 사용하였다. Crude conchiolin과 추출 용액(urea or citrate buffer)에 bead를 넣고, 37℃에서 200rpm으로 2시간동안 교반하면서 단백질을 추출하였다. 추출된 상등액은 dialysis tube에서 1차 증류수로 3회 탈염 시킨 뒤 overnight 투석하고, 원심분리를 통하여 부유물을 제거하여 추출물을 얻었다. 가공원료 추출물의 항염, 항산화의 생리활성을 수행하였고, SDS-PAGE 실험을 통해 가공원료 추출물을 확인하였다.</p> |    |
| <p>○ 정제 분획물에 대한 생리활성분석 및 성분분석(항산화, 항염증, 미백 실험, TLC 분석, SDS-PAGE)</p>                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 정제 분획물의 항염활성을 측정하고 항염활성을 나타냄</li> <li>• 정제 분획물에서 항산화 활성은 나타나지 않음</li> <li>• 정제 분획물에서 미백효과는 나타나지 않음</li> <li>• SDS-PAGE 실험결과 2-3개의 단백질 밴드를 확인함.</li> <li>• TLC 분석을 통한 단백질 발색과 당 발색 실험결과 정제 분획물의 당단백질을 확인함.</li> </ul>  | <p><u>이론적 접근방법:</u><br/>저 이용 수산부산물로부터 생리활성을 갖는 물질을 분리, 정제함으로써 고순도 conchiolin을 제조하여 부작용이 적은 천연 생리활성 물질로 고부가가치를 창출할 수 있다.</p> <p><u>실험적 접근방법:</u><br/>conchiolin 단백질을 phosphate buffer에 녹인 후 0.20µm filter로 여과하여 Sephadex G-100 column에 걸여주고 phosphate buffer(pH7.0)로 용출하면서 10ml씩 분획한다. 분획물의 단백질과 당 정량 후 단백질의 농도가 높고 당의 농도가 낮은 분획물을 모아 prep-LC를 이용하여 정제한다. prep-LC를 이용하여 정제된 분획물의 항염, 항산화, 미백실험의 생리활성을 분석하였고, TLC 분석과 SDS-PAGE 실험을 통해 정제분획물을 확인하였다.</p>   |    |
| <p>○ 전임상 동물실험(cell viability 측정, Nitric Oxide 생성량 측정, iNOS와 COX-2 발현 측정, cytokine 측정, 간·신장독성 측정)</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Raw cell에서 conchiolin 추출물의 세포 독성은 측정하고 결과 진주담치에서는 독성을 나타냈지만 굴과 동족에서는 독성을 나타내지 않음.</li> <li>• conchiolin 추출물의 항염증관련 실험결과 LPS에 의한 증가된 NO, IL-6 및 TNF-α 생성량과 발현양이 conchiolin 추출물에 의해 50% 정도 저해됨.</li> <li>• conchiolin 추출물의 랫드 동물 실험 결과 체중의 변화는 없음.</li> <li>• conchiolin 추출물의 간손상(GOT, GPT, LDH 수치)과 신장손상(BUN 수치)을 측정하고 결과 간과 신장독성은 나타나지 않음.</li> </ul>   | <p><u>이론적 접근방법:</u><br/>conchiolin의 유효성(면역기능)과 안전성(간·신장독성)을 전임상실험을 통하여 평가한다.</p> <p><u>실험적 접근방법:</u><br/>Murine macrophage cell line인 Raw cells는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% FBS, 100u/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. Raw cells에 crude conchiolin을 처리한 다음 cell viability 측정, Nitric Oxide 생성량 측정, iNOS와 COX-2 발현 측정, cytokine, 간·신장독성을 측정하였다.</p>   |    |

3. 3차년도(2008년)

| 연구 내용                          | 연구 결과   | 연구수행 방법<br>(이론적·실험적 접근방법)   | 비고 |
|--------------------------------|---|---|----|
| <p>○ 저비용 고효율의 대량 분리 정제법 개발</p> | <p>- 폐각분말로부터 conchiolin을 고효율, 저비용으로 대량 분리 정제 할 수 있는 공정을 개발하였음.</p> <p>- 평균제조원가를 계산한 결과, 1일 10톤씩 1년간 300일 기준으로 생산할 경우 100mg당 10원으로 현재시판중인 COX-2저해제 대비 경제성이 있는 것으로 검토되었다.</p>   | <p><u>이론적 접근방법:</u><br/>연구결과를 근거로 경제성있는 생산시설기준을 설정하고, 저비용으로 시설이 가능한 공정들을 검토하여 최소원가기준의 공정계획을 수립한다.</p> <p><u>실험적 접근방법:</u><br/>각 공정단계별 수율과 항연증 및 각종기능성을 검토하여, 제조원가대비 최적생산공정을 설계한다(현재시판중인 제품과의 가격대비 포함).</p>  |    |
| <p>○ 수율검증</p>                  | <p>-폐각분말로부터 powder conchiolin을 추출하여 수율을 측정하였다.</p> <p>-균 폐각분말로부터 생성된 crude conchiolin의 회수율은 3.49%이었으며, crude conchiolin 으로부터 0.1M citrate buffer 용액으로 추출하여 탈염 시킨 후, 생성된 conchiolin powder(B)와 탈염을 시키지 않은 conchiolin powder (C)의 폐각분말로부터의 수율은 각각 0.32 및 4.24% 이었다. 한편, conchiolin powder(B)와 conchiolin powder(C)의 단백질과 총 당 함량을 비교하였다. Conchiolin powder(C)의 경우, 수율은 높았지만, citrate salt가 다량 함유되어 있어 투석한 conchiolin powder(B)에 비해 상대적으로 상당히 낮은 단백질을 함유하고 있었다. 투석을 한 conchiolin powder(B)의 경우, 전체 중 단백질의 함량이 약 27% 이었고, 단백질과 총 당의 함량비는 약 17:1 이었다.</p> | <p><u>이론적 접근방법:</u><br/>Acetic acid로 용해한 폐각류 분말로부터 생성되는 침전물과 상등액의 수율비 측정 및 citrate buffer 추출법을 이용하여 생성된 conchiolin의 수율을 비교 측정하므로 폐각류의 총 추출수율은 검증하여 폐각류의 특성을 연구한다.</p> <p><u>실험적 접근방법:</u><br/>폐각으로부터 추출물을 얻기 위해 citrate buffer 추출법을 사용한다. Crude conchiolin 과 추출용액인 citrate buffer에 bead를 넣고, 37℃에서 200rpm으로 2시간동안 교반하면서 단백질을 추출하며, 추출된 상등액은 dialysis tube에서 1차 증류수로 3회 탈염시킨 후, overnight 투석하고, 원심분리를 통하여 부유물을 제거한 후, 동결건조하여 수율을 측정한다.</p> |    |



| 연구 내용   | 연구결과  | 연구수행방법<br>(이론적·실험적 접근방법)  | 비고 |
|---|---|---|----|
| <p>○ 기능성 수산생물 응용제품을 위한 소재 연구 (한방피부과, 통증 클리닉 소재 등)</p> | <p>- Powder conchiolin의 항염 활성을 측정할 결과, 활성이 우수하였다.</p> <p>- Powder conchiolin의 항염효능을 입증하기 위하여 국제적으로 유명한 제약회사의 우수한 항염증제품들(celecoxib, diclofenac, indomethacin 등)과 비교실험을 수행한 결과, conchiolin의 우수성을 입증하였다: COX-2의 저해율 (1mg/ml의 농도: conchiolin; 94.6%, celecoxib; 92.9%, diclofenac; 99.1%, indomethacin; 98.8%)</p> <p>- Powder conchiolin의 항산화 활성을 측정할 결과, 활성이 미약하였다.</p>   | <p>이론적 접근방법:<br/>패각류로부터 유래한 생리활성물질인 conchiolin을 정제·분말화 한 후 정량적으로 유명한 제약회사의 우수한 항염증제품들(celecoxib, diclofenac, indo- methacin 등)과 비교실험을 수행하므로 conchiolin의 항염 효력을 입증한다.</p> <p>실험적 접근방법:<br/>Crude conchiolin과 추출용액인 citrate buffer에 head를 넣고, 37℃에서 200rpm으로 2시간 동안 교반하면서 단백질을 추출하며, 추출된 상등액은 dialysis tube에서 1차 증류수로 3회 탈염시킨 후, overnight 두석하고 원심분리를 통하여 부유물을 제거한 후, 동결건조하여 powder conchiolin을 제조한 후, 실험에 사용한다. 측정방법으로는 항염증실험에 Chemiluminescent COX inhibitor screening assay를 이용하고, 항산화 실험에는 DPPH radical scavenging assay를 이용한다.</p> |    |
| <p>○ 응용제품연구(한방피부외용제 등)</p>                            | <p>- Powder conchiolin을 함유하는 한방피부외용제인 아토피화장품 3종을 제조하여 그 특성 분석을 하였으며, 화장품 base 원료를 개발하였다.</p> <p>현재까지 연구결과를 근거로 보았을 때 콘키올린은 항염증 PEG2기전 COX-1, COX-2에 탁월한 기능성을 가진 것으로 확인되었으나 항염증 기전중 NO의제 능, 항산화능은 약한 것으로 확인되어 제품화를 위한 처방보완이 필요하였다.</p> <p>Atopy skin products의 경우 base에서 96.8%의 저해율을 나타내었으며 conchiolin의 농도가 1~100 ㎍로 증가함에 따라 95.4, 96.3 및 97.3%으로 COX-2 저해율의 변화가 거의 나타나지 않았다. 이 결과는 분사에서 받은 atopy skin products 자체가 우수한 염증의제효능을 나타내는 제품임을 의미하며, atopy cream products의 경우에는 base에서는 41.1%의 저해율을 나타내었으며 conchiolin의 농도가 1~100 ㎍로 증가함에 따라 64.8, 67 및 67.2%로 base와 비교할 때 COX-2 저해율이 농도 의존적으로 증가하였으나, 큰 폭으로의 증가는 보이지 않았다. 이것은 Atopy cream에 사용된 원료물질에 영향을 받는 것으로 추정된다.</p> | <p>이론적 접근방법:<br/>한방피부외용제 및 아토피화장품 베이스에 soluble conchiolin을 정량적으로 혼합하여 응용제품을 연구한다.</p> <p>실험적 접근방법:<br/>한방피부외용제 및 아토피화장품 베이스에 soluble conchiolin을 정량적으로 (1~10g)혼합하여 물성 및 생리활성을 측정한다.</p>   |    |
| <p>○ 기능성이 검증된 분획물들의 구조 특성 분석 (질량분석, 아미노산결합서열 분석등)</p> | <p>- 6.5M 초산을 사용하여 원심분리한 후 얻은 조 콘키올린을 0.1M Citrate buffer(pH6.5)로 추출하여 동결건조한 시료를 이용하여 Sephadex G-100이 충전된 column(25X 900mm)에 넣고 시료를 분리 정제한 후 단백질 분리정제 전용 FPLC Superdex 200 column과 Ion column(Mono Q, S) 등을 이용하여 분리 정제를 통하여 구조분석을 하였으며, 정제된 콘키올린의 구성당과 단백질의 비율은 전체 구조중 당이 차지하는 것이 약 15-20%, 단백질이 약 80-85%인 것으로 확인하였다.</p>   | <p>이론적 접근방법:<br/>제 이용 패각류로부터 생리활성을 갖는 물질을 분리, 정제함으로써 고순도의 conchiolin을 제조하여 부작용이 적은 천연 생리활성 물질로 고부가가치를 창출한다.</p> <p>실험적 접근방법:<br/>패각류에서 분리한 conchiolin 단백질을 효소들(trypsin 등)을 이용하여 펩티드로 전환시켜 정제한 후, 정제된 분획물의 질량분석, 아미노산결합서열 분석 등을 분석한다.</p>  |    |

| 연구 내용                                   | 연구 결과  | 연구 수행방법<br>(이론적·실험적 접근방법)   | 비고 |
|---|--|---|----|
| ○ 피부염 유발 설치류를 이용한 동물실험                  | - 피부염 유발 설치류를 이용한 동물실험을 수행하였다: soluble conchiolin으로 도포한 실험군(0.03 g/ml)에서는 귀염증성 부종을 억제하였고, 증가된 IgE를 감소시키는 경향이 있었다. 또한, soluble conchiolin으로 도포한 실험군(0.01, 0.03, 0.10 g/ml)에서는 유의한 IL-1β의 감소를 유도하여 연증을 억제시키는 것으로 나타났으며, 0.1 g/ml의 농도에서는 IL-6의 유의한 감소를 유도하였다.   | 이론적 접근방법:<br>conchiolin의 약효성을 피부염 유발 설치류(DNCB로 유도된 접촉성 피부염 유발)를 이용한 동물실험을 통하여 평가한다.<br><br>실험적 접근방법:<br>- 설치류의 귀부종 유발 및 귀두께 측정<br>- 혈청의 Immunoglobulin E 측정<br>- Cytokine(IL-1β, IL-6) 측정   |    |
| ○ 개발된 한방소재를 이용한 제품별 임상시험 관련 protocol 개발 | -개발된 한방소재인 conchiolin을 이용한 제품별 임상시험 관련 protocol을 개발하였다.<br>- 피부 임상시험 프로토콜의 개발 대구한의과대학교 임상시험센터(센터장 권영규 교수)에 의뢰하여 피부임상 프로토콜을 개발하였다(임상시험 Protocol 1 참조)<br>-여드름 임상시험 세명대학교 임상시험센터(센터장 김이화 교수)에 의뢰하여 임상대상자 30명을 대상으로 실험을 실시하였다(임상시험 Protocol 2 참조).<br>(나)아토피 임상시험 세명대학교 임상시험센터(센터장 김이화 교수)에 의뢰하여 임상대상자 23명을 대상으로 실험을 실시하였다(임상시험 Protocol 3 참조). | 이론적 접근방법:<br>(아토피)피부염에 사용되는 도포용 치료제는 국소 혹은 전신 스테로이드 치료제가 대부분을 차지하고 있다. 그러나 이러한 도포용 치료제는 혈관의 확장, 피부의 위축, 저색소 침착, 자반등과 같은 부작용을 일으키게 되어 장기간의 도포가 어렵고 사용에 있어 주의를 요하고 있다. 이러한 스테로이드 치료제의 부작용을 최소화 할 수 있는 천연치료제의 개발이 필요하다.<br><br>실험적 접근방법:<br>천연 콘키올린소재를 이용한 제품을 (아토피)피부염 치료에 응용하고자 항염실험 및 전임상시험의 결과에 근거하여 임상에서 제품의 피부염 증상개선 효과를 확인한다. 콘키올린소재 한방제품을 濕熱의 樣相을 띤 (아토피) 피부염에 사용가능한 지, 濕熱과 祛濕의 경우 모두 잘 반응을 하는지 어느 체질 변증(辨證)의 경우에 더 효과적인지 그 효과를 비교함으로써 한국인 체질에서 가장 많은 비율을 차지하고 있는 태음인 전용(아토피) 피부염 제품개발의 가능성을 평가한다. 이에 동일한 한방 콘키올린소재 제품을 기존 치료와 병행하면서 도포할 경우, 체질에 따른 관련성을 임상시험을 통하여 검증한다. |    |

4. 4 차년도(2009년)

| 연구 내용                                  | 연구 결과  | 연구수행 방법<br>(이론적·실험적 접근방법)  | 비고 |
|--|--|--|----|
| ○ 식품: 소아성장용 한방제제(성장환 등에 첨가 되는 보조치료제) 등 | - 굴 폐각 유래 수용성 칼슘분말을 이용하여 한방 소아성장용 제제 및 골다공증 관련 제제를 제조하여 시제품을 개발하였다.<br>칼슘 청국환 제조 공을 짧아 부릴 때 수용성 칼슘을 3-12%를 넣고 부린 후 균주(Bacillus subtilis)를 접종하여 37℃에서 하루동안 발효한 후 동결시킨 후 2-3일간 동결 건조를 청국알맹이를 완성한 후 고농도 설탕물과 콩가루 그리고 칼슘분말을 0.5%씩 섞어서 건조하여 완성하였다.        | <u>이론적 접근방법:</u><br>한방 소아성장용 제제에 보조치료제로서 수용성 칼슘을 3~12% 혼화하여 응용제품을 연구한다.<br><u>실험적 접근방법:</u><br>한방 소아성장용 제제에 보조치료제로서 수용성 칼슘을 3 ~ 12% 혼화한 후, 생리활성을 측정한다.   |    |
| ○ 화장품: 수산생물 유래 기능성 한방화장품 등             | - conchiolin을 0.5% 함유하는 아토피 및 여드름 치료용 한방화장품을 제조하였으며, 추출물의 특성에 맞는 레스피를 개발하여 제품화하였다.   | <u>이론적 접근방법:</u><br>화장품 베이스에 soluble conchiolin을 정량적으로 혼합하여 응용제품을 연구한다.<br><u>실험적 접근방법:</u><br>화장품 베이스에 conchiolin을 0.09 ~ 0.9% 혼합하여 COX-2 저해능 실험 및 NO 억제효능 등 생리활성을 측정한다.  |    |
| ○ 한방 피부외용제: 수산생물 유래 기능성 아토피치료제 등       | - conchiolin을 0.09% 함유하는 한방피부외용제인 아토피치료제 3종(스킨,로션, 크림) 및 여드름치료제(세럼,재생크림)를 제조하였으며, 추출물의 특성에 맞는 레스피를 개발하여 제품화하였다.  | <u>이론적 접근방법:</u><br>한방 피부외용제 및 아토피화장품 베이스에 soluble conchiolin을 정량적으로 혼합하여 응용제품을 연구한다.<br><u>실험적 접근방법:</u><br>한방 피부외용제 및 아토피화장품 베이스에 conchiolin을 0.09 ~ 0.9% 혼합하여 COX-2 저해능 실험 및 NO 억제효능 실험 및 세포독성실험을 수행한다.                               |    |
| ○ 제품평가                                 | - 수산생물 유래 conchiolin을 함유한 한방 식품, 화장품 및 피부외용제를 제품화하여 기제품과 비교평가한 결과, 항염증 작용에 우수한 제품이었다.<br>- 본사의 제품인 atopy cream products 에서만 약 60% 이상의 연증억제효능이 나타났다. 이러한 conchiolin의 항염증 효과는 conchiolin을 활용한 피부치료제, 피부보호제 및 염증반응조절제 개발 및 폐각자원의 재활용 가능성이 높은 것으로 확인되었다. | <u>이론적 접근방법:</u><br>생리활성물질인 conchiolin을 정제·분말화 하여 응용제품들을 만든 후, 기제품과 비교실험을 수행하여 conchiolin의 항염 효과를 입증한다.<br><u>실험적 접근방법:</u><br>Powder conchiolin을 제조하여 응용제품들을 만든 후, COX inhibitor screening assay 및 NO 억제효능실험을 이용한 항염증실험 및 세포독성실험을 수행한다. |    |

| 연구 내용                                   | 연구결과   | 연구수행방법<br>(이론적·실험적 접근방법)  | 비고 |
|---|--|---|----|
| ○가공 방법 및 형태에 따른 치료 효율의 검증               | <p>- 우수한 항염 효능이 있는 수용성 conchiolin추출물을 이용하여 치료 효율을 검증하였다.</p> <p>Atopy skin extracts 의 경우 base 에서는 23.9% 의 저해율을 나타내었으며 conchiolin 의 농도가 1 ~ 100 <math>\mu</math>l 로 증가함에 따라 27.3, 40.8 및 80.9% 로 COX-2 저해율의 증가를 나타내었다.</p> <p>atopy lotion extracts 의 경우 base 에서는 8.9% 의 저해율을 나타내었으며 conchiolin 의 농도가 1 ~ 100 <math>\mu</math>l 로 증가함에 따라 76.1, 76.7 및 77.2% 로 COX-2 저해율의 증가를 나타내었다.</p> <p>atopy cream extracts 와 acne extracts 에서는 base 에서 78.2 및 73.5% 의 저해율을 각각 나타내었으며, conchiolin 의 농도가 1 ~ 100 <math>\mu</math>l 로 증가함에 따라 atopy cream extracts 에서는 81.8, 85.0 및 84.1% 로 COX-2 저해율이 소폭 상승하는 것으로 확인하였다</p> | <p><u>이론적 접근방법:</u><br/>피부흡수성과 염증억제능력 등</p> <p><u>실험적 접근방법:</u><br/>치료 효율을 검증하기 위해 항염증활성과 항산화활성 등을 분석을 통해 확인한다.</p>   |    |
| ○한방피부과 및 내과 치료 처방개발(한방입욕제, 위, 장 치료기능 등) | <p>- 한방피부과 치료 처방을 개발하여 레스피 개발과 시제품을 만들었으며, 입욕제를 개발하였다. 또한 내과 기준 처방을 이용하여 한의원 에서 사용하전 모려분발과 Conchiolin 추출한 발생한 부산물을 가공하여 모려대용으로 사용한 결과 훨씬 치료성고가 높은 것으로 확인되었다.</p> <p>-아토피 입욕제는 한약성분 추출물과 혼합하여 5-30 <math>\mu</math>m 극미세분발형태로 가공하여 목욕물에 타서 사용하여도 한약재분만의 자극이 없으며, 미지근한 물에도 쉽게 용출되어 피부 침투효과가 뛰어났다</p>   | <p><u>이론적 접근방법:</u><br/>치료처방 및 제품화 처방개발과 시제품을 제작한 후 임상실험에 이용한다. 내복약 처방의 경우 기성처방을 활용하여 대체하는 방식으로 접근한다.</p> <p><u>실험적 접근방법:</u><br/>외용제의 경우 시제품을 만들어 사용전과 후의 결과를 사진으로 담아 자료화 하고, 내복약의 경우 한의학서에 나오는 처방기준에 따라 내조군과 실험군을 나누어 실험을 실시한다.</p> |    |

| 연구 내용  | 연구 결과   | 연구 수행방법<br>(이론적·실험적 접근방법)   | 비고 |
|--|---|---|----|
| ○가공분말 및 기능성 분획물에 대한 독성실험                         | - RAW 264.7 cell을 이용한 일반 분말로로부터 추출한 conchiolin 을 이용하여 세포독성실험인 MTT assay를 수행한 결과, conchiolin 의 농도가 0.1 ~ 0.2 mg/ml 까지는 세포독성이 나타나지 않았으나, 0.5mg/ml 의 농도 이후로는 세포독성이 나타났다. 또한, 폐각류를 나노입자상태로 가공하였을 때, 전반적으로는(1.25~50 µg/ml) 세포독성이 나타나지 않았으나, 10µg/ml 의 농도에서는 약간의 세포독성을 나타내었다.   | 이론적 접근방법:<br>MTT는 살아있는 세포의 미토콘드리아 활성도의 indicator로서 세포생존의 index 로 주로 사용되고 있다. 즉, 생존세포의 active mitochondrial dehydrogenase는 MTT를 절단하여 formazan을 생성하게 되는 데 이 양은 곧 대사적으로 활동적인 세포의 수와 직접적인 상관관계에 놓여있다.<br><br>실험적 접근방법:<br>시료를 농도별로 처리하고 세포배양 20시간이 지난 후, 5 mg/ml 의 MTT 시약을 이용하여 0.1 mg MTT/(200 µl) well 에 넣고 4시간 동안 배양하였다. 각 실험군당 well 수는 3으로 하였고, 배양 후 상등액을 제거하고 200 µl 의 PBS 로 세척한 후, 100 µl의 DMSO를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan을 용해시킨 후, ELISA microplate reader(Model: MQX200R, BioTek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다. |    |
| ○ 기능성이 검증된 분획물들의 구조 특성 분석(질량 분석, 아미노산결합 서열 분석 등) | - 기능성이 검증된 분획물들을 회수하여 구조 및 특성분석을 진행하였다. 최종 검토결과, 수용성 콘키올린은 단백질이 아닌 당당백질로 확인되었으며, 그 물질의 구조 분석을 수행하였다.  | 이론적 접근방법:<br>저 이용 폐각류로부터 생리활성을 갖는 물질을 분리, 정제함으로써 고순도의 conchiolin 을 제조하여 부작용이 적은 천연 생리활성 물질로 고부가가치를 창출한다.<br><br>실험적 접근방법:<br>폐각류에서 분리한 conchiolin 단백질을 효소들(trypsin 등)을 이용하여 펩티드로 전환시켜 정제한 후, 정제된 분획물의 질량분석, 아미노산결합서열 분석을 시도한다.  |    |
| ○ 임상시험용 피험자모집 및 피험자진료                            | - 본 시험에서는 만 18세 ~ 38세 사이의 한국인 남성 및 여성 피험자 30명을 대상으로 4주간 실험을 수행하였다. 전문의의 육안으로 한국형 여드름 중증도 시스템(KAGS-2)을 통한 육안상대평가 결과는 치료제를 바르기 전보다 바르기 후 2주, 4주 후의 여드름 개선 효과가 통계적으로 유의성 있게 나타났다. 피부유분 함유량은 시료를 바르기 후가 바르기 전보다 유의성 있게 유분량이 감소하였다. 총괄적 안전도 평가에 있어서 본 제품은 안전한 제품임을 알 수 있었다. 따라서 본 제품은 여드름 개선효과가 있었을 뿐 아니라, 우수한 피부 유분량 감소 효과도 있었고 여드름 개선효능을 나타내는 것으로 확인되었다. | 이론적 접근방법:<br>- 1차 유효성 평가변수: KAGS GRADE에 의한 객관적 병변 상태를 평가한다.<br>- 2차 유효성 평가변수: 피험자의 유분량에 대해 기기적으로 평가함. 피험자의 방문(0주, 2주, 4주)시 이마에서 유분량을 3회 연속 측정하여 평균값을 측정치로 정한다.<br><br>실험적 접근방법:<br>피험자에게 conchiolin 을 함유한 여드름치료제를 4주간 도포했을 때 여드름 개선효과 및 안전성을 평가 한다. 시료를 수령한 후, 일반 피험자 만 18~38세의 한국 남성 및 여성을 대상으로 피부 진정의 경우 28일간 1일 1회 이상 도포하도록 하고 2, 4주 후 본 임상센터 내 피부 진단실 항온항습조건(22±2℃,40~60%)에서 대기하면서 측정을 하여 여드름 개선효과를 평가한다.   |    |

5. 5 차년도(2010년)

| 연구 내용   | 연구 결과   | 연구수행 방법<br>(이론적·실험적 접근방법)   | 비고 |
|---|---|---|----|
| <p>○ 생산실용화기술 개발 및 제품화<br/>- 경제성을 고려한 원료의 대량처리 시스템 설계 및 개발<br/>- 분말가공 처리 시스템 개발<br/>- 대량분리정제 시스템 개발<br/>- Pilot plant 제작</p> <p>- 제품에 대한 시장분석 및 산업화전략 등 마케팅방향 연구</p> | <p>- 생산실용화기술개발을 위하여 각 단계별, 공정별 수득율을 계산하고 대량생산을 위한 생산공정시스템을 설계하였다. 설계에 반영된 시설비용과 원료, 포장제, 인건비 등을 계산하여 제조원가를 분석하고, 굴패각을 이용한 응용제품(식품, 화장품, 의약품) 판매에 적합한 제품기준에 따른 원료규격을 표준화하였다.</p> <p>1. 화장품 소재측면 : 신 개념의 천연 원료(항염증, 두피, 피부트러블 개선)<br/>2. 의약품 소재측면 : 신소재 천연 항염증제(전 세계 연구개발동향과 일치) 미FTA체결로 인한 의약품 시장 변화에 따른 수입 대체 효과<br/>3. 식품 소재측면 : 기존 콩다공증, 성장관련 관습시장의 접근성이<br/>4. 건축내장재 소재 : 불연내장 석고 보드시장 진입이 유리, 석고원료 공급에 대한 가격경쟁 우위</p> | <p>이론적 접근방법:<br/>4년간의 연구결과를 근거로 통하여 최적의 조건을 확립하였으며, 원가분석 경제성 검토를 위한 자료수집 및 분석을 통하여 설계에 반영한다.</p> <p>실험적 접근방법:<br/>- 원가절감을 위한 생산실용화 기술개발을 위하여 새로운 추출방법의 검정과 생산 설비 시스템의 재검정과 분석을 통한 원료수율과 효과에 대한 재검정을 실시한다.<br/>- 제품화를 위해서는 각 제품군 별(식품, 화장품, 의약품)로 적합한 기준을 제시하고 원료규격화를 위한 조건 검토를 실시한다.</p>  |    |
| <p>○ 신 제형 및 신 한약 처방 기술의 보급을 위한 제품평가 및 자료화</p> <p>- 연구소 소속 한의사를 대상으로 한 제품평가 및 자료화</p> <p>- 연구결과와 학술지 투고 및 홍보</p>   | <p>- 화장품의 경우 아토피, 여드름 제품에 대해 임상실험을 통해 치료효과가 좋은 것으로 확인되었다.<br/>- 식품의 경우 냄새 없는 칼슘정국 환을 만들었으며, 소비자들로부터 호평을 받았다.<br/>- 한방소재로서 이용가능성은 분사 기술로 만든 칼슘분말을 사용하여 현상물패당에 적용하여 기존 무려 제품에 비해 효과가 좋은 것으로 한의사들이 직접 임상실험에 참가하여 이미 확인하였다.<br/>- 아토피 입욕제의 경우 한의사 임상을 통해 치료효율이 좋은 것으로 확인되었다(임상사진 참조).<br/>- 연구결과와 학술지 투고 및 홍보 자료는 물질 구조분석과, 신물질 여부 등이 결정되면, 특허와 5년간의 연구결과를 바탕으로 약 8편 이상의 논문투고와 2건 이상의 특허를 신청할 예정이다.</p>                       | <p>이론적 접근방법:<br/>소비자들의 성향분석과 요구사항에 맞는 제품의 향과 사용감, 식감 등을 분석하고 고려해서 제품구성에 반영한다.</p> <p>실험적 접근방법:<br/>제형과 관련된 레시피를 개발하고, 샘플제작을 통한 효과검증과 소비자들의 요구사항에 맞는 제품과 한의위 진료환경에 적합한 진료 protocol을 완성한다.</p>  |    |
| <p>○ 임상실험 및 안전성실험 (위탁연구기관)</p> <p>- 아토피 개선효과에 대한 임상시험용 피험자모집 및 인체 적용시험 실시</p> <p>- 시험제품에 대한 안전성 검사 실시</p>   | <p>- 아토피 임상실험은 생명대학교 임상시험센터와 더불어 수행하였으며, 23명의 아토피 환자를 대상으로 임상실험을 실시한 결과 아토피 치료에 상당한 도움을 주는 것으로 확인 되었다.</p> <p>- 아토피개선제품(가칭) 사용 전과 사용 4주, 8주 후에 실험실적 검사, 생명 징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응은 평가한 결과 안전한 것으로 확인되었다</p>   | <p>이론적 접근방법:<br/>- Hanifin과 Rajka의 진단기준에 따라 주소견 중 3개 이상, 부소견 중 3개 이상의 증상이 있는 아토피 피부염 환자<br/>- 치료를 받지 않은 정도로 심하지 않은 아토피 피부염을 가진 환자<br/>- 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 환자</p> <p>- 피험자 제외기준에 포함되지 않은 자</p> <p>실험적 접근방법:<br/>- 1차 유효성 평가 (Primary endpoint)<br/> <ul style="list-style-type: none"> <li>SCORAD Index 측정</li> <li>병변부위 이미지 촬영</li> <li>제품 도포 후 4주, 8주 2회 평가</li> </ul> - 2차 유효성 평가 (Secondary endpoint)<br/> <ul style="list-style-type: none"> <li>피부측정장비를 통한 기기적 평가 (피부수분 함유량, 경피수분 손실량, 피부 산성도)</li> </ul> </p> |    |







## 제 2 절 연구방법

### 1. 패각 가공처리 기술개발

#### 가. 시료수집

본 과제를 수행하기 위해 패류 생산량이 많은 지역을 중심으로 시료를 수집하여 사용하였다. 시료 수집은 가을(9월-10월)에 하였으며, 국내에서 생산량이 가장 많은 굴(*Crassostrea gigas*), 홍합(*Mytilus coruscus*), 바지락(*Ruditapes philippinarum*), 피조개(*Scapharca broughtonii schrenck*), 새조개(*Fulvia mutica*), 동죽(*Macra veneriformis*)을 기본실험에 사용하였다. 이 들 시료는 각각 산지별로 sampling을 하였으며, 굴은 통영시 소재 덕명수산에서, 홍합, 바지락은 통영 서호시장에서 구입 하였으며, 피조개는 진해시 속천에서, 새조개는 여수시 교동 선어소매시장에서, 동죽은 군산시 해망동 수산물종합센터에서 구입하여 실험에 사용하였다(Table 1).

Table 1. The kind of shells which use in this experiment

| Korea name | Scientific name                | English name                  | Sampling area | *Photograph   |
|------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------|---|
| 굴          | <i>Crassostrea gigas</i>       | <i>Pacific oyster</i>         | Tongyeong     |  |
| 홍합         | <i>Mytilus coruscus</i>        | <i>Hard shelled mussel</i>    | "             |  |
| 바지락        | <i>Ruditapes philippinarum</i> | <i>Filipino venus</i>         | "             |  |
| 피조개        | <i>Scapharca broughtonii</i>   | <i>Broughton's ribbed ark</i> | Jinhae        |  |
| 새조개        | <i>Fulvia mutica</i>           | <i>Japanese cockle</i>        | Yeosu         |  |
| 동죽         | <i>Macra veneriformis</i>      | <i>Surf clam</i>              | Gunsan        |  |

\* Photograph citation: NFRDI(National Fisheries Research & Development Institute)

## 나. 시료 처리

시료는 기본적으로 100kg을 수집하여, 생물 상태로 ice box에 냉장상태로 직접 수송하였으며, 연구소에서 육과 폐각을 분리한 후 폐각에 존재하는 이물질들을 모두 제거하여 그늘에서 7일간 선풍기 바람으로 자연 건조한 후 실험에 이용하였다.

## 다. 가공분말의 제조

### (1) 일반분쇄 분말 제조

폐각류를 1차로 핀밀을 이용하여 약 100mesh 입도로 분쇄하였으며, (주)만수제약에 의뢰하여 분말화 하였다.

### (2) 초미세분말 제조

초미세 가공 분말은 (주)만수제약에 의뢰하여 Fig.1의 에어밀 분쇄장치(HTM100, Powder Technology & System Engineering Co.,Korea)를 사용하여 800-1000mesh 이상(5-30 $\mu$ m) 크기로 분말화 하여 사용하였다. 입도분석은 Sympatec Co.에 의뢰하여 HELOS 측정기와 RODOS 분산기를 사용하여, Particle Size를 측정하였다.

### (가) 분쇄원리

고속으로 회전하는 임펠러와 분쇄영역의 톱니형상 사이에서 형성된 기류에 의해 입자들이 빈번하게 충돌하게 되어 1차 전단이 이루어지고, 2차 분쇄실에서는 절단리브 (cutting rib)로 섬유질을 분쇄하며, 3차 분쇄실에서는 반원형상안에서 고속교란에 의해 입자들이 반복적이고 연속적인 충돌로 상승적인 자기 분쇄를 통하여 초미세입자의 분말을 얻을 수 있다.

### (나) 보유 장비의 특징

- ① 분쇄중 온도상승 40℃이하
- ② 영양소 파괴의 최소화
- ③ 맛, 향기 및 색상 변화 최소화
- ④ 중금속 발생 FDA규정이내.

### (다) 원료소재 분쇄 분야

- ① 식품소재, 한의약품 소재, 화장품 소재
- ② 복식사이크론 분급기에 의해 평균입도 5-20 $\mu$ m이하로 분쇄 가능



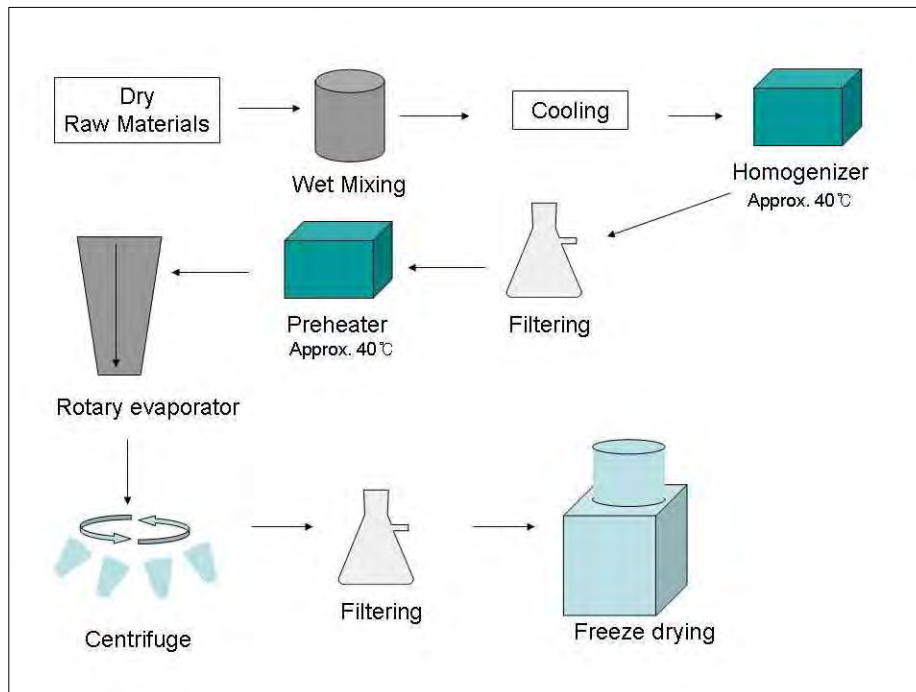


**Fig. 1. Air mill equipment (Model: HTM100, Powder Technology & System Engineering Co.,Korea)**

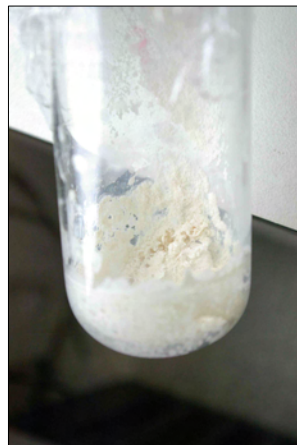
### (3) 나노분말 제조

나노분말 가공은 (주)만수제약에 의뢰한 초미세분말을 사용하여, 나노분말의 가공처리를 위하여 본 연구소에서는 차기년도 계획의 하나인 습식 나노공정가공법을 플랜트급으로 개발하기 전에, 회사 자체연구비로 실험실 규모에서 분말제조공정을 재차 확인하였으며, 450nm 이하 및 200nm이하의 분체 입도를 가지는 나노분말을 제조하는데 성공하였다. 본 연구소에서 수행한 나노 분말제조공정 검증방법은 다음과 같다(Fig 2). 초미세 폐각분말(particle size=30 $\mu$ m)을 증류수에 넣고 저어준 후, rod homogeniser를 이용하여 20,000 rpm 으로 분쇄하고 pore size 0.45 $\mu$ m filter로 filtering하였다. 그 여액을 다시 pore size 0.2 $\mu$ m filter로 filtering한 다음 rotary evaporator로 수분을 증발시키고 자체 응집된 분말을 제거하기 위하여 3500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻어진 상층액을 pore size 0.2 $\mu$ m filter로 filtering하여 나노분말을 회수하였다. 액상의 나노분말은 동결 건조하여 분말상태로 만들어 입도분석을 위한 시료로 사용하였다(Fig. 3).

또한, 단양석회석 신소재 연구소에 의뢰하여 초미세분말을 이용하여, 습식 Ball Mill은 2mm, 5mm zirconia ball : 초미세분말=10 : 1로 넣고, DW : Ethanol= 1 : 1로 섞어 300hr 이상 가공하였으며, 건식 Attrition Mill을 이용하여, 5mm zirconia ball : 초미세분말 = 5:1의 함량비로 300시간 이상공하여 입도분석을 입도분석기(Particle Size Analyzer, LS 13320, Beckman Coulter Co. USA)를 사용하여 분석하였다.



**Fig. 2. Schematic diagram of manufacture process of nano particle using mollusk shell powder.**



**Fig. 3. Photograph of nano particle from Pacific oyster.**

## 라. 패각 분말에 대한 성분분석

### (1) 수분 정량

건식 수분 측정 장치인 Mettler HB43 (Mettler Toledo Co))를 이용하여 식품공전에 수록된 상압가열건조법으로 정량하였다(1).

#### (가) 상압가열건조법

##### ① 시험법 적용범위

이 시험법은 식품의 종류, 성질에 따라서 가열온도를 ㉠ 98~100℃ ㉡ 100~103℃ ㉢ 105℃ 전후(100~110℃) 및 ㉣ 110℃이상으로 한다. 즉 ㉠은 동물성 식품과 단백질 함량이 많은 식품 ㉡는 자당과 당분을 많이 함유한 식품 ㉢는 식물성 식품 ㉣는 곡류 등의 신속법으로 쓰인다.

##### ② 분석원리

검체를 물의 비점보다 약간 높은 온도 105℃에서 상압건조시켜 그 감소되는 양을 수분량으로 하는 방법으로서 가열에 불안정한 성분과 휘발성분을 많이 함유한 식품에 있어서는 정확도가 낮은 결점이 있으나 측정원리가 간단하여 여러 가지 식품에 있어서 많이 이용된다.

##### ③ 장치

###### ㉠ 칭량접시

상부직경 55 mm, 하부직경 50 mm, 높이 25 mm 또는 상부직경 75 mm, 하부직경 70 mm, 높이 35 mm로서 뚜껑이 있으며 중량은 전자가 약 25 g, 후자가 약 35 g의 알루미늄으로 만들어진 것을 사용한다.

###### ㉡ 유리봉

해사(정제) 20 g을 칭량접시에 옆으로 삽입했을 때 적어도 1.5 cm이상 해사로부터 나와 있어야 하며 뚜껑을 닫을 수 있을 정도의 길이일 것.

###### ㉢ 자동조절기가 달린 건조기 : 적어도 $\pm 1^\circ\text{C}$ 이내의 온도조절이 가능해야 한다.

##### ④ 시험조작

미리 가열하여 항량으로 한 칭량접시에 검체 3~5 g을 정밀히 달아(건조가 어려운 검체인 경우에는 20mesh 정제해사 20 g과 유리봉을 넣어 항량이 되게 하고 이에 검체를 넣어 잘 섞은 후 유리봉은 그대로 넣어 둔다), 뚜껑을 약간 열어 놓고 각 식품마다 규정된 온도의 건조기에 넣어 3~5시간 건조한 후 데시케이터 중에서 약 30분간 식히고 무게를 단다.

다시 칭량접시를 1~2시간 건조하여 항량이 될 때까지 같은 조작을 반복한다. 일반적인 것은 1회에 4시간(유 및 유제품 등은 3시간) 건조하여 수분량을 측정한다.

⑤ 계산방법

$$\text{수분(\%)} = \frac{b-c}{b-a} \times 100$$

a : 칭량접시의 무게(g)

b : 칭량접시와 검체의 무게(g)

c : 건조 후 항량이 되었을 때의 무게(g)

(2) 조단백질 정량

Kjeldahl 법으로 정량하였으며, Buechi Auto Kjeldahl Unit K-370(Buechi)을 사용하였다(2).

(가) 시험법의 적용범위

총질소 및 조단백질을 측정하고자 하는 대부분의 식품에 적용가능하다.

(나) 분석원리

단백질 분석기를 이용하여 검체를 황산으로 분해하고 증류하여 질소를 유리시킨 후 염산 용액으로 적정한다.

(다) 장치

- ① 단백질 분해장치
- ② 증류 및 적정장치

(라) 시약 및 시액

- ① 황산
- ② 분해촉진제 (Kjeltabs)
- ③ 0.1 N 염산
- ④ 붕산용액 :  $H_3BO_3$  100g(또는 400g), 0.1% 브로모크레졸그린용액 100mL 및 0.1% 메틸 레드용액 100mL를 넣어 10 L로 정용한 1%(또는 4%) 붕산용액
- ⑤ 수산화나트륨용액 : 20% 및 40% 수산화나트륨용액

(마) 시험용액의 조제(분해과정)

- ① 검체 약 1g(3~25%의 단백질을 함유한 식품의 경우)을 정밀하게 취하여 분해튜브에 넣고 분해촉진제 2알을 넣는다. 분해촉진제는  $H_2SO_4$  과  $K_2SO_4$ 의 비율이 1.4~2.0 : 1이 되어야 분해가 효율적으로 이뤄진다.
- ② 분해튜브에 진한 황산 12 mL를 넣는다. 검체의 지방 함량이 10% 이상이면 진한 황산 15 mL를 넣는다.
- ③ 420℃의 분해장치에서 45~60분간 분해하여 분해액의 색이 투명한 연푸른색(구리 촉매제를 사용한 경우) 또는 투명한 노란색(셀레늄 촉매제를 사용한 경우)이 되면 상온으로 냉각시킨다.

(바) 시험조작(증류 및 적정)

자동장치인 경우 다음의 증류, 적정, 계산과정이 모두 자동으로 수행된다.

- ① 분해된 시험용액에 80 mL의 증류수를 주의하여 첨가한다.
- ② 25 mL의 혼합지시약이 섞인 포집용액을 삼각 플라스크에 넣은 후, 이를 증류장치에 넣고 삼각플라스크 받침대를 들어 올려준다. 증류시 증류액이 포집용액으로 들어간다.
- ③ 40% NaOH 50 mL(분해시 사용한 황산의 4배에 해당하는 양)를 분해튜브에 넣는다.
- ④ 증류장치에서 3~4분간 증류한다. 증류장치의 삼각 플라스크에 있는 포집용액이 증류액에 함유되어 있는 알칼리(암모니아)를 포집하면서 녹색으로 변한다.
- ⑤ 증류액을 염산용액(일반적으로 0.1 N 또는 0.2 N)을 이용하여 종말점이 옅은 핑크빛에 도달할 때까지 적정한다. 적정에 사용된 산의 양을 기록한다.

(사) 계산방법

$$\% \text{ 조단백질} = \frac{(\text{HCl 소비 mL} - \text{공시험 mL}) \times M \times 1.401}{\text{검체량 (mg)}} \times F \times 100$$

1.401 : 질소의 원자량

M : HCl의 몰농도

F : 킬달 계수(1.1.3.1 가. 5)의 질소계수 이용)

(3) 조지방 정량

조지방의 측정은 식품공전에 근거하여 Soxhlet 추출장치로 에테르를 순환시켜 검체 중의 지방을 추출하여 정량하였다(3).

(가) 시험법 적용범위

이 법은 식용유등 주로 중성지방으로 구성된 식품에 적용한다. 다만, 가열·조리등의 가공과정을 거치지 않은 식품에 적용된다.

(나) 분석원리

속슬렛추출장치로 에테르를 순환시켜 검체 중의 지방을 추출하여 정량한다.

(다) 시험조작

미세한 분말로 한(필요한 경우) 검체 2~10 g을 달아 원통여과지에 넣고 검체 위에 탈지면을 가볍게 충전하여 이를 적당한 용기에 담아 100~105℃의 건조기에서 2~3시간 건조한 후, 데시케이터에서 식히고 속슬렛추출장치의 추출관에 넣는다. 받는 그릇에 무수에테르 약 1/2용량을 넣어 장치하고 8시간 추출한다.

추출이 끝난 후, 냉각기를 떼고 추출관 속의 원통여과지를 핀셋으로 꺼내고 다시 냉각기를 모두 추출관에 연결하여 수욕상에서 가온하여 받는 그릇중의 에테르가 전부 추출관에 옮겨지면 받는 그릇을 떼어 수욕중에서 에테르를 완전히 증발시킨다.

받는 그릇의 바깥을 거즈로 깨끗이 닦은 후, 98~100℃의 건조기에 넣어 약 1시간 항량이

될 때까지 건조한 다음 데시케이터에서 식히고 칭량한다.

조지방의 양은 다음 식에 따라 산출한다.

$$\text{조지방(\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

$W_0$  : 받는 그릇의 무게(g)

$W_1$  : 조지방을 추출하여 건조시킨 받는 그릇의 무게(g)

$S$  : 검체의 채취량(g)

#### (4) 조회분 정량

회화로 Thermolyne F6010 (Thermolyne Co.) 장치를 이용하여 550℃에서 overnight 시켰으며, 식품공전에 수록된 건식 회화법으로 회분을 정량하였다(4).

##### (가) 시험법 적용범위

고춧가루 또는 실고추, 전분, 밀가루, 수산물 등 식품에 적용한다.

##### (나) 분석원리

검체를 도가니에 넣고 직접 550~600℃의 온도에서 완전히 회화처리 하였을 때의 회분의 양을 말한다. 즉 식품을 550~600℃로 가열하면 유기물은 산화, 분해되어 많은 가스를 발생하고 타르(tar)모양으로 되며 점차로 탄화(炭火)한다.

탄소는 더욱 산화되어 탄산가스(CO<sub>2</sub>)로 되어 방출되지만, 인산이 많은 검체에서는 강열하면 양이온과 결합하지 않고 용융상태로 되며, 또한 산소의 공급이 불충분하게 되어 오히려 회화의 진행이 어렵게 된다.

일부의 식품에서는 무기질의 염소이온(Cl<sup>-</sup>)등 휘발성 무기물은 휘산되기도 하고, 양이온의 일부는 공존하는 음이온과 반응하여 인산염, 황산염 등으로 되기도 하며, 유기물 기원의 탄산염으로 되기 때문에 조회분(粗灰分, crude ash)이라고 한다.

##### (다) 시험조작

###### ① 도가니의 항량

깨끗한 도가니를 전기로 또는 가스버너에서 600℃이상으로 여러 시간 강하게 가열한 후 데시케이터에 옮겨 실온으로 식힌 다음 곧 화학천칭으로 칭량한다. 다시 2시간 강하게 가열하여 건조 칭량하고 이 조작을 항량이 될 때까지 반복한다.

###### ② 검체의 전처리

검체를 도가니에 정밀히 달아 넣고 필요하면 회화에 앞서 다음의 전처리를 한다.

###### ③ 회화

위와 같이 전처리가 끝나면 용기를 그대로 회화로에 옮겨 550~600℃에서 여러시간 가열하여 백색~회백색의 회분이 얻어질 때까지 계속한다.

회화가 끝난 후, 가열을 그치고 그대로 식혀 온도가 약 200℃로 되었을 때 데시케이터에

옻겨 식힌 후 칭량한다. 만일, 회화에 있어서 대량의 탄소가 남아 회백색의 회분을 얻을 수 없는 검체일 경우에는 얻은 흑회색의 회분을 식힌 여 가용분을 침출하여 정량 여과지로 작은 비커에 여과하고, 잔류물은 다시 물로 씻어, 다음 약 15 mL의 물을 가하여 탄 덩어리를 유리봉으로 부수어 수욕상에서 잘 가운하 씻은 액은 비커에 넣는다. 여과지상의 잔류물은 여과지와 같이 먼지의 도가니에 옻겨 건조 후 550~600℃에서 회화시킨다. 비커의 액은 수욕상에서 농축하여 잔류물을 회화한 먼지의 도가니에 옻기고 소량의 물로 비커를 씻고, 씻은 액도 도가니에 넣는다. 다시 도가니를 수욕상에서 증발 건조하고, 500~600℃에서 2시간 가열하면 탄소가 함유되지 아니한 회분을 얻는다.

회화한 다음 데시케이터에 옻겨 식히고 실온으로 되면 곧 칭량하여 검체의 회분량(%)을 다음식에 따라 산출한다.

#### ④ 계산방법

$$\text{회분(\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

$W_0$  : 항량이 된 도가니에 무게(g)

$W_1$  : 회화 후의 도가니와 회분의 무게(g)

$S$  : 검체의 채취량(g)

#### (5) 탄수화물 정량

본 실험에서의 탄수화물 함량 phenol-sulfuric acid 방법(5)으로 정량화 하였다. 탄수화물의 total sugar정량을 위하여 6종류의 시료(귤, 홍합, 바지락, 피조개, 새조개, 동죽)에 대한 일반 분말과 초미세가공분말을 이용하였으며, 0.1mg 까지 측정 가능한 미세저울에서 정확하게 분말을 10mg 정량한 후 0.2ml 물에 넣고, 그 시료에 5% phenol 0.2ml와 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1ml를 가하여 강하게 vortex를 하였다. 그 후 상온에서 15분간 방치하고 10,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등 액을 분광 광도계를 이용하여 480nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (6) 무기질 정량

각 패각 시료별 무기물의 함량을 분석하기 위해 ICP OES 5300 DV(Perkin elmer Co.)를 이용하여 분석을 실시하였다. ICP의 기기조건은 Table 2와 같다.

**Table 2.** Conditions of ICP-OES 5300DV (Perkin elmer)

| <b>Inorganic component</b> | <b>nm</b> | <b>Detection limit(ppb)</b> |
|----------------------------|-----------|-----------------------------|
| Ca                         | 317.933   | 0.05                        |
| Mg                         | 285.213   | 0.04                        |
| Se                         | 196.026   | 4.0                         |
| Cu                         | 327.393   | 0.4                         |
| K                          | 766.490   | 1.0                         |
| P                          | 213.617   | 4.0                         |
| Sn                         | 189.927   | 2.0                         |
| As                         | 188.979   | 2.0                         |
| Cd                         | 228.802   | 0.1                         |
| Co                         | 228.616   | 0.2                         |
| Cr                         | 267.716   | 0.2                         |
| Fe                         | 238.204   | 0.1                         |
| Li                         | 670.784   | 0.3                         |
| Mn                         | 257.610   | 0.1                         |
| Mo                         | 202.031   | 0.5                         |
| Ni                         | 231.604   | 0.5                         |
| Pb                         | 220.353   | 1.0                         |
| Sb                         | 206.836   | 2.0                         |
| Zn                         | 206.200   | 0.2                         |



① 시료 전처리 : 건식 회화법(6)

회분 실험 후 얻어진 회분을 실온으로 식힌다.



회분을 몰로 적시어 염산용액(1→4) 약 2ml를 가하여 수욕 상에서 수분 가열한다.



가열 후 투명하게 되면 100ml 메스플라스크에 여과하고 0.2% 질산용액을 가하여 100ml로 하여 시험용액으로 한다.

② 표준액 전처리

혼합 표준품(1000ppm/2% HNO<sub>3</sub>)을 10ml 취한 후 2% 질산을 가하여 100ml로 정용한 것을 표준용액(100ppm)으로 한다.



표준용액을 각각 1ml, 10ml, 20ml를 취해 2% 질산을 가하여 100ml로 정용한다.



각 용액을 std 1(1ppm), std 2(10ppm), std 3(20ppm)로 사용한다.



표준액 및 시험용액을 ICP로 분석한다.

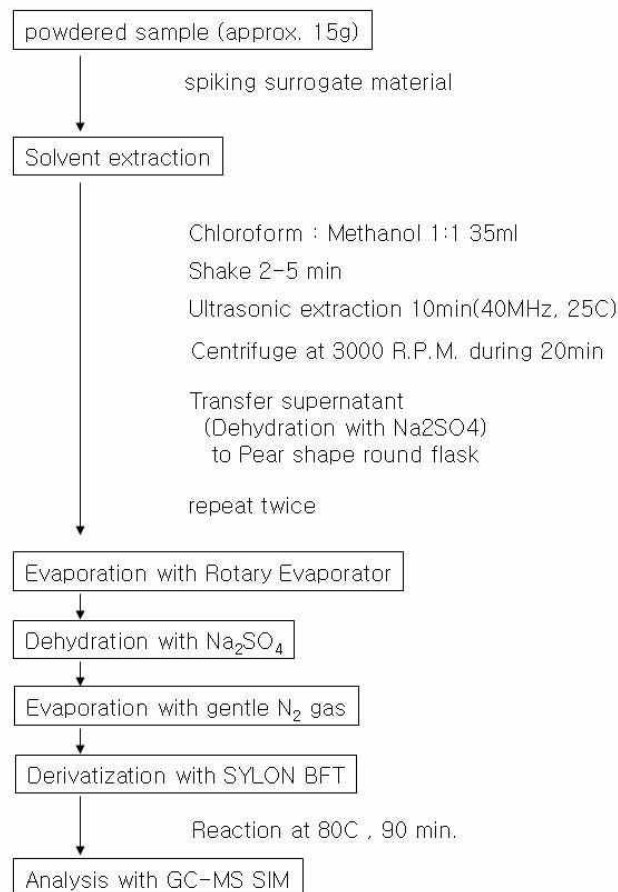
(7) 지방산과 지용성비타민의 정량

(가) 표준물질과 분석시약

콜레스테롤과 콜레스테롤 산화물질은 표준품으로 순도 99 % 이상의 정제된 시약을 사용하였으며, 모든 용매는 B&J사의 잔류농약등급 순도의 것을 이용하여 분석하였다. 본 연구에서 이용된 유도체화 시약인 Bis-[trimethylsilyl] trifluoroacetamide (BSTFA)+1% trimethylchlorosilane (TMCS); Sylon BFT는 Supelco Inc.(Bellefonte, PA)로부터 구입하였고, 무수황산 나트륨은 Kanto사의 잔류농약등급을 구입하였다. 시료의 전처리는 50ml 폴리프로필렌튜브에 초미세분말 15g을 정확히 칭량하고, surrogate material로서 Glycerol triundecanoate 10ppm 100 $\mu$ l를 microdispensor로 spiking 한 뒤, Methanol:Chloroform 1:1 용매 35ml를 넣고 2분간 혼든 뒤 10분간 40MHz 초음파 세척기를 이용해 추출한다. 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 250ml recovery flask로 무수황산나트륨과 No. 2 filter paper를 이용해 걸러 옮겼다.

남은 잔사는 다시 반복추출을 수행한 후, Rotary evaporator(Buechi Co.)를 이용해 용매를 2ml까

지 날린 후, Pasteur pipette(Corning Co.)에 탈지면을 넣고, 무수황산나트륨을 pasteur pipette에 채운 뒤, 15ml graduated tube에 pasteur pipette으로 잔사를 옮겨 넣고, Chloroform 3ml씩 3회에 걸쳐 recovery flask를 씻어주면서 pasteur pipette에 loading 액량이 11ml 가 될 때까지 채운다. 질소가스를 이용해 20 $\mu$ l가 될 때까지 증발시킨다. n-Hexane 5ml를 다시 넣고 질소가스를 주입하면서 20 $\mu$ l가 될 때까지 용매를 증발시킨다. tube에 n-Hexane 180 $\mu$ l를 넣고, 이를 2ml autosampler vial용 500 $\mu$ l insert에 옮겨, Bis-[trimethylsilyl] trifluoroacetamide (BSTFA)+1% trimethylchlorosilane (TMCS) ; Sylon BFT를 100 $\mu$ l를 넣고 질소가스를 충전하여 봉인하고, 85 $^{\circ}$ C 건조기에서 1시간 30분간 반응시킨 뒤 방냉 하였다(Fig.4) .



**Fig. 4. Analytical procedure of fatty acids and fat soluble vitamins**

(나)GC/Mass 사용기기 및 조건

위와 같이 준비된 시료를 Shimadzu GCMS-QP2010을 이용하여 측정감도를 높이기 위해, splitless injection, Selected Ion Mode로 분석하였으며, 기기 사용 전 PFTBA(Base peak : m/z 69)를 이용하여 leak test와 autotune을 수행한 뒤 기기분석을 수행하였다. 사용된 칼럼의 종류와 기기조건은 다음과 같다(Table 3, 4).

**Table 3. GC/Mass analytical method of fatty acids**

|                |   |                |                     |
|----------------|---|----------------|---------------------|
| Column         | J&W DB-5MS (30m long, 0.25mm id, 0.25 $\mu$ m film thickness) |                |                     |
| Injection temp | 290 °C  | Injection mode | splitless injection |
| Sampling time  | 1 min   | Pressure       | 68.1 kPa            |
| Total flow     | 10.2 ml/min   | Column flow    | 1.2 ml/min          |
| Ion source     | 200 °C  | Transfer line  | 300 °C              |
| Ramp. rate     | 5ml/min   | Initial temp.  | 50 °C               |
| Final temp.    | 280 °C  |                |                     |

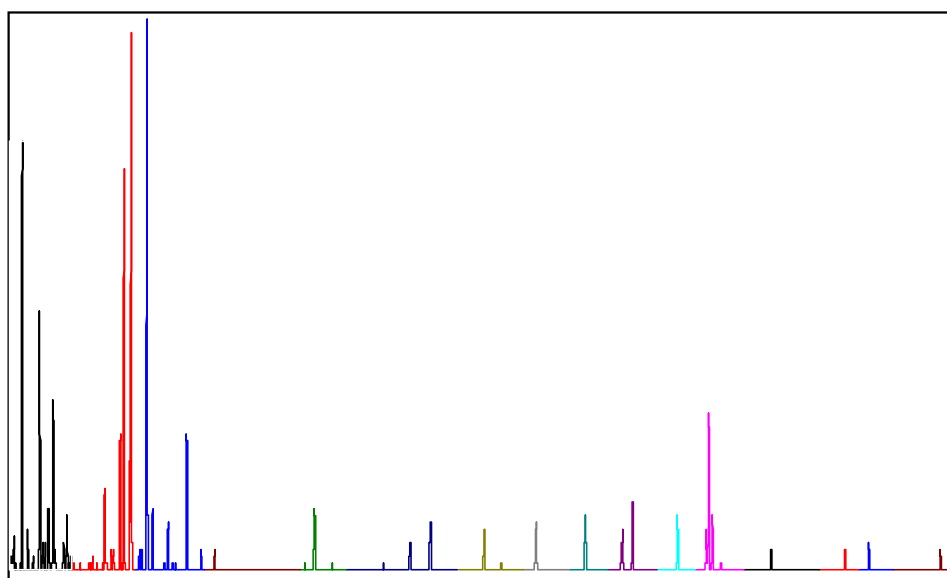
**Table 4. GC/Mass analytical method of the fat-soluble vitamins**

|                |   |                    |                     |
|----------------|---|--------------------|---------------------|
| Column         | J&W DB-5MS (30m long, 0.25mm id, 0.25 $\mu$ m film thickness) |                    |                     |
| Injection temp | 290 °C  | Injection mode     | splitless injection |
| Sampling time  | 1 min   | Pressure           | 123.5 kPa           |
| Total flow     | 10.2 ml/min   | Column flow        | 1.2 ml/min          |
| Ion source     | 200 °C  | Transfer line      | 300 °C              |
| Initial temp.  | 180 °C  | Initial ramp. rate | 0 ml/min            |
| Middle temp.   | 260 °C  | Middle ramp. rate  | 8 ml/min            |
| Final temp.    | 300 °C  | Final ramp. rate   | 5 ml/min            |

지방산과 지용성비타민 정량에 사용된 standard 물질은 Table 5, 6과 같으며 모두 시그마알드리치에서 구입한 특급시약을 사용하였다. standard 시약을 통하여 GC/MS로 분석된 각 물질들은 retention time으로 정성분석을 하였으며, 각 시약별 농도별로 표준 곡선을 그어 지방산과 비타민의 함량에 대한 정량분석을 실시하였다(Fig. 5, 6)

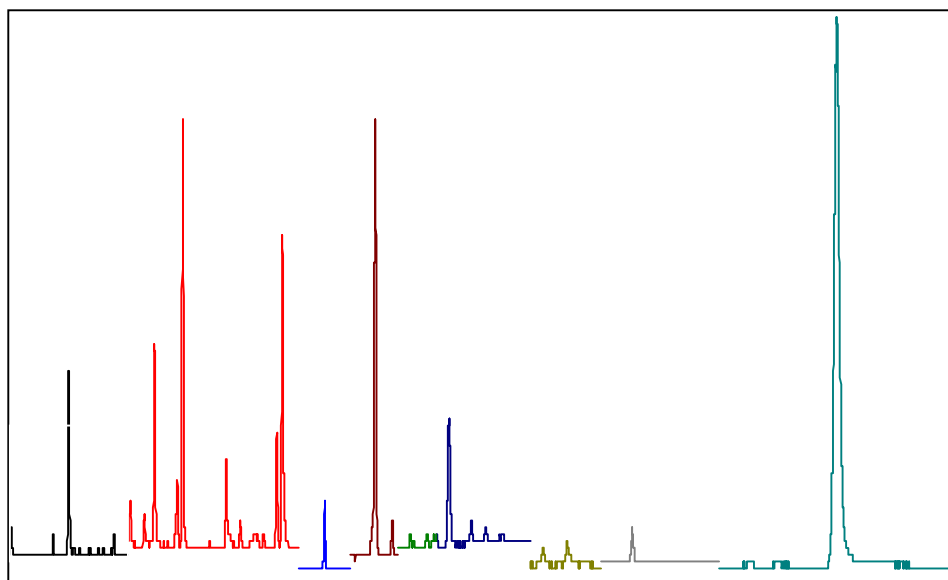
**Table 5. Monitored ions of each fatty acids**

| Compounds                           | RT    | Quantitation ion | Reference ion 1 | Reference ion 2 |
|-------------------------------------|-------|------------------|-----------------|-----------------|
| Hexanoic acid                       | 12.02 | 73               | 75              | 117             |
| Heptanoic acid                      | 14.92 | 73               | 75              | 117             |
| Octanoic acid                       | 17.71 | 73               | 75              | 117             |
| surrogate material                  | 21.89 | 74               | 43              | 87              |
| Decanoic acid                       | 22.73 | 73               | 75              | 117             |
| Dodecanoic acid                     | 27.48 | 73               | 75              | 117             |
| Tridecanoic acid                    | 29.67 | 73               | 75              | 117             |
| Tetradecanoic acid                  | 31.71 | 73               | 75              | 117             |
| Pentadecanoic acid                  | 33.71 | 73               | 117             | 75              |
| Palmitoleic acid                    | 35.09 | 73               | 75              | 55              |
| Palmitic acid                       | 35.61 | 73               | 75              | 117             |
| Heptadecanoic acid                  | 37.32 | 73               | 117             | 75              |
| Linoleic acid                       | 38.57 | 73               | 75              | 67              |
| Petroselinic acid                   | 38.67 | 73               | 117             | 75              |
| Linolenic acid                      | 38.68 | 79               | 75              | 73              |
| Oleic acid                          | 38.69 | 73               | 75              | 55              |
| Elaidic acid                        | 38.83 | 73               | 75              | 55              |
| cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid | 41.19 | 73               | 79              | 67              |
| Docosahexanoic acid                 | 44.17 | 73               | 79              | 91              |
| Erucic acid                         | 45.10 | 73               | 75              | 55              |
| Nervonic acid                       | 47.98 | 73               | 75              | 55              |

**Fig. 5. Total Ion Chromatogram of fatty acids (1ppm standard)**

**Table 6. Monitored ions of each vitamins**

| Name               | RT    | Quantitation ion | Reference ion 1 | Reference ion 2 |
|--------------------|-------|------------------|-----------------|-----------------|
| 13-cis retinol     | 10.13 | 73               | 69              | 105             |
| Retinol            | 11.06 | 73               | 69              | 55              |
| Astaxanthin        | 13.69 | 57               | 43              | 169             |
| delta-Tocopherol   | 14.76 | 474              | 475             | 476             |
| gamma-Tocopherol   | 15.80 | 73               | 223             | 488             |
| Cholecalciferol    | 16.50 | 118              | 73              | 119             |
| Ergocalciferol     | 16.85 | 118              | 69              | 119             |
| alpha-tocopherol   | 17.37 | 73               | 43              | 237             |
| Vitamin K1         | 19.83 | 43               | 57              | 186             |
| Vitamin K2         | 21.17 | 69               | 41              | 43              |
| surrogate material | 26.56 | 57               | 43              | 71              |



**Fig. 6. Total Ion Chromatogram of vitamins (1ppm standard)**

## 마. 패각 분말에 대한 물리화학적 특성분석

### (1) 표면장력의 측정

표면장력계(TD-1, Lauda, German)로서 표면장력을 측정한다. 시료농도는 일반분말과 초미세 분말, 나노분말을 사용하였으며, 농도는 2%(w/v)의 시료를 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)를 녹인 후 측정하였다.

### (2) pH에 대한 표면장력의 변화

2%(w/v)분말을 3종류의 buffer(pH3.0-6.0, 50mM citrate, sodium citrate buffer ; pH 6.0-8.0, 100mM phosphate buffer ; pH 9.0-10.0, 50mM boric acid- NaOH buffer)에 녹인 후 이들 시료 5%(v/v)를 해당 pH별 완충용액에 넣고 표면장력계(TD-1, Lauda, German)를 사용하여 pH별 표면장력의 변화를 측정하였다.

### (3) 계면장력 측정

20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 2%(w/v)의 분말을 녹여서 준비한 후 동일한 buffer 9.5ml에 준비한 시료 0.5ml를 넣고, 5%(v/v) olive oil을 넣고 1분간 강하게 vortex 시킨 후 10분간 정치시켜 계면장력을 측정하였으며, 대조군으로 Tween 80을 50 $\mu$ l를 넣고 결과를 비교하였다. 계면장력의 측정은 표면장력계(TD-1, Lauda Co. Germany)를 사용하였다.

### (4) HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value

Hydrophilic lipophilic balanced의 측정은 Porter(1994)등에 의한 titration method로서 측정하였다. 측정은 0.01g의 각종 분말 시료를 10ml의 D.W.에 녹인 후 4% (v/v)benzen과 96%(v/v) 1,4-dioxane이 혼합된 유기용제로서 적정을 하였다. 각종 분말 시료가 녹아있는 10ml의 용액은 magnetic stirrer로 계속 교반하면서 적정하며, HLB 값은 clear한 종말점이 나올 때까지 계속 유기용제를 적하시켜 적하량으로 구한다.

### (5) 유화활성 및 유화 안정성

분말을 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 각각 2% (w/v)씩 넣고 Rosenberg E. 등(1979)의 방법(9)을 응용하여 유화활성도를 측정하였다. 사용된 기질로는 olive oil을 사용하였으며, 유화안정성은 유화활성도 측정법과 동일한 방법으로 실험을 행한 후 10분, 30분 간격으로 620nm에서 흡광도를 측정하여 변화된 값의 기울기로부터 Kd 값을 산출하였다.

$$Kd = ( \log X_2 - \log X_1 ) / 10$$

(X<sub>1</sub> : 진탕 후 10분 정치시킨 후의 흡광도 값, X<sub>2</sub> : 매 30분 간격마다 측정한 흡광도 값)

(6) 온도 및 열 안정성

20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 분말 2%를 녹여 액상시료를 만든 후 온도 및 열안정성을 측정하였다. 실온(25℃)에서 측정한 유화활성도 값과 100℃에서 10분간 열처리한 시료의 유화활성도 값을 비교하였다.

## 2. 패각 추출물의 생리활성물질 탐색

### 가. 패각추출물(Crude conchiolin)의 추출 및 정제

#### (1) Crude conchiolin의 추출

패각류(굴, 진주담치, 바지락, 피조개 동족 및 새조개)의 조미세 가공분말을 이용하여 crude conchiolin을 추출한 후 생리활성측정에 사용하였다. 활성 단백질을 추출하기 위해 1차년도 과제 수행에서는 urea 추출법을 사용하여 불용성 단백질을 추출하였으나, 투석 한 후에도 추출물에 urea가 100% 제거가 되지 않고 미량 잔존하면서 추출된 단백질에 변성을 일으키는 문제가 발생하여 crude conchiolin으로부터 당과 불순물의 추출을 최소화하면서 활성 단백질만을 추출할 수 있는 최적 추출조건을 찾기 위해 7가지 buffer를 선정하여 단백질과 당추출을 비교 분석하였다. 추출 용액은 H<sub>2</sub>O와 8M urea(pH8.5)을 control 추출 용액으로 하여 0.1M Citrate buffer(pH6.0), 0.2M Sodium phosphate buffer(pH6.0), 0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH buffer(pH6.0), 0.2M Sodium phosphate buffer(pH8.0), 0.2M Sodium phosphate buffer(pH8.0), 0.1M Glycine buffer(pH 8.5), 0.1M Trizma buffer(pH8.5)와 0.1M Glycylglycine(pH8.5) 용액을 사용하였으며, 이들 buffer로부터 추출된 단백질과 당의 농도를 비교하였다. 0.01g의 crude conchiolin과 1ml 추출 용액에 bead를 넣고 vortexing한 뒤 15,000rpm으로 15분간 원심 분리하여 얻어진 상층액의 단백질과 당의 함량을 측정하고, 그 결과에 따라 최적 추출용액으로 0.1M citric acid를 선정하여 실험하였다. 단백질 측정은 lowry 방법을 사용하여 BSA 표준검정곡선에 따라 그 양을 산정하였고, 당 측정은 phenol-sulfuric acid법에 따라 glucose 표준검정곡선에 의해 그 양을 나타내었다.

#### (2) Conchiolin 정제

##### (가) Method 1

6.5M acetic acid와 반응하여 탈석회화 된 crude conchiolin(A)에 8M urea를 1:60(W/V) 비율로 가열 추출하였다. 원심분리를 통해 얻어진 상층액(B)은 투석막을 이용해 증류수로 urea를 제거하고, 투석 후 부유물을 제거한 상층액은 동결 건조(C)하였다(10). 동결 건조된 conchiolin(C)을 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)로 용해시켜 그 부유물을 0.20 $\mu$ m syringe filter로 제거하고, 0.1M phosphate buffer 전개용매를 이용하여 Sephadex G-100으로 충전된 open column을 통과시켜 단백질(D, Table 6)을 분리시켰다. 5ml씩 분취된 7~14개의 분획 중 단백질 함량이 높고 당의 함량이 낮은 분획을 선택(Pacific oyster fraction-3, 4, 5, Short necked clam-3, 4, 5, Ark shell-3, 4, Surf clam-2, Blue mussel-2, 3, 4, 5)하여 prep-LC(Preparative Liquid Chromatography) 정제를 위한 시료(F)로 사용하였다. Prep-LC를 이용해 Table 7의 조건으로 정제하여 정제된 분획(G)은 감압 농축하여 생리활성 분석을 위한 시료로 사용하였다(Fig. 7).



Table 6. Sephadex G-100 fractions(E) of conchiolin from various mollusk shells.

*Crassostrea gigas*

| Fraction number                  | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12  | 13 | 14 |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|-----|----|----|
| Protein con.( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0   | 9   | 684 | 778 | 442 | 208 | 92 | 68 | 51 | 39 | 34 | 273 | 24 | 24 |
| Sugar con.( $\mu\text{g/ml}$ )   | 441 | 441 | 431 | 436 | 244 | 104 | 24 | 21 | 23 | 13 | 16 | 16  | 17 | 12 |

*Mytilus coruscus*

| Fraction number                  | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7   | 8  | 9   | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----------------------------------|-----|------|------|------|------|------|-----|----|-----|----|----|----|----|----|
| Protein con.( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0   | 1939 | 2690 | 2342 | 1673 | 1051 | 468 | 67 | 101 | 56 | 55 | 20 | 19 | 22 |
| Sugar con.( $\mu\text{g/ml}$ )   | 335 | 384  | 318  | 167  | 128  | 43   | 24  | 0  | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |

*Ruditapes philippinarum*

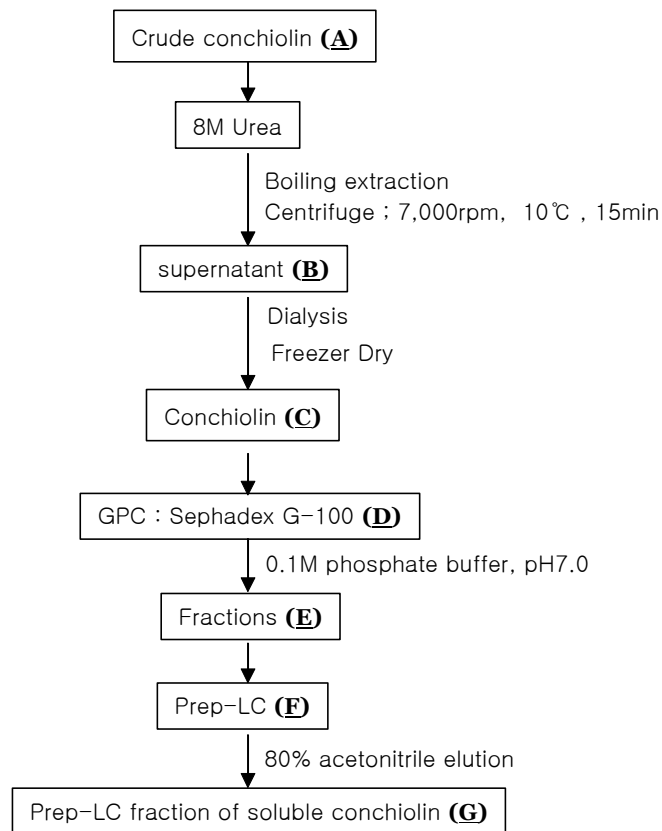
| Fraction number                  | 1   | 2    | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |
|----------------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|
| Protein con.( $\mu\text{g/ml}$ ) | 14  | 652  | 742 | 453 | 350 | 224 | 147 | 98 | 75 | 52 | 30 | 14 |
| Sugar con.( $\mu\text{g/ml}$ )   | 465 | 1131 | 83  | 0   | 0   | 81  | 33  | 12 | 3  | 5  | 0  | 0  |

*Scapharca broughtonii schrenck*

| Fraction number                  | 1    | 2    | 3    | 4    | 5   | 6   | 7   | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----------------------------------|------|------|------|------|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|
| Protein con.( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0    | 435  | 1705 | 1496 | 840 | 383 | 144 | 79 | 34 | 24 | 10 | 6  | 0  | 1  |
| Sugar con.( $\mu\text{g/ml}$ )   | 1949 | 2085 | 1214 | 841  | 402 | 203 | 0   | 3  | 7  | 39 | 16 | 15 | 3  | 2  |

*Macra veneriformis*

| Fraction number                  | 1    | 2   | 3   | 4   | 5  | 6  | 7 |
|----------------------------------|------|-----|-----|-----|----|----|---|
| Protein con.( $\mu\text{g/ml}$ ) | 59   | 258 | 124 | 120 | 93 | 0  | 0 |
| Sugar con.( $\mu\text{g/ml}$ )   | 1023 | 662 | 191 | 123 | 43 | 54 | 0 |



**Fig. 7. Schematic diagram for conchiolin purification using Sephadex G-100 and Prep-LC from various mollusk shells.**

**Table 7. Prep-LC(Preparative Liquid Chromatography) conditions for conchiolin purification from various mollusk shells.**

|                      |  |
|----------------------|--|
| Instrument           | JAI Recycling Preparative LC (JAI-prep 9104)   |
| Column               | JAI GEL-GS310 Prep-column ( 20Φ × 500mm )<br>Hydrophilic column( GFC, Partition Adsorption ) |
| Eluent               | acetonitrile : DW = 8 : 2  |
| Flow rate            | 8ml/min  |
| Injection volume     | 3ml  |
| Detection Wavelength | 280nm  |

(나) Method 2

패각류의 가공분말(A)을 6.5M acetic acid와 1:10 (W:V)비율로 37℃에서 12시간 동안 탈석회 시켰다. 15분간 10℃에서 7,000rpm으로 원심 분리 하여 모아진 침전물(B)을 회수한 후, 침전물에 남아있는 여분의 acetic acid를 증류수로 제거하였다. 증류수로 세척 된 침전물을 동결 건조 하여 powder(crude conchiolin, C) 상태로 만들었다. 동결 건조 된 crude conchiolin powder 0.3g을 추출 용액 (0.1M citrate buffer pH6.0, D) 15ml(1:60, W:V)에 bead를 넣고, 37℃에서 200rpm으로 교반하면서 추출하였다. 추출된 상등액은 dialysis tube에서 1차 증류수로 3회 탈염 시킨 뒤 overnight 투석하고, 부유물은 원심분리를 통하여 제거하여 conchiolin(E)을 제조한 후 동결 건조 하여 실험을 위한 시료로 사용하였다(Fig. 8). 분리정제를 위해서 Table 7의 조건으로 Prep-LC 를 사용하였다.

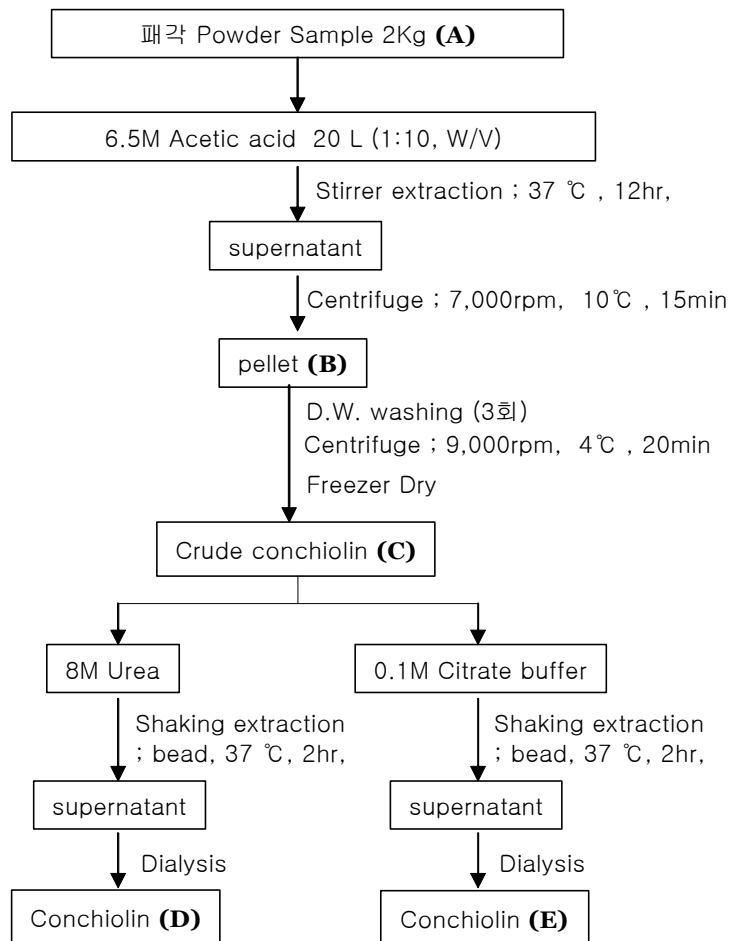


Fig. 8. Schematic diagram methods for conchiolin extraction using 8M Urea and 0.1 M citric acid.

#### (다) 수율 검증

균 폐각의 초미세 가공분말을 이용하여 conchiolin을 대량 분리정제 할 수 있는 공정법을 개발하기 위해 추출 단계별 수율 측정 및 단백질과 당 함량을 측정하여 최적의 분리 정제 공정법을 개발하였다. 단백질의 측정은 Lowry 방법을 사용하여 BSA 표준검정곡선에 따라 그 양을 산정하였고, 당 측정은 phenol-sulfuric acid법에 따라 glucose 표준검정곡선에 의해 그 양을 측정하였다.

균 폐각의 초미세 분말로부터 단백질을 추출하기 위해 폐각 가공분말을 6.5 M acetic acid와 1:10(W:V) 비율로 37℃에서 12시간동안 탈석회화 하였다. 20분간 4℃에서 8,000rpm로 원심 분리하여 모아진 침전물을 회수한 후, 침전물에 남아있는 여분의 acetic acid를 증류수로 제거하였다. 증류수로 세척 된 침전물(crude conchiolin A)은 증류수 세척 과정 동안 두 개의 분획으로 나누었으며, 하나의 분획은 동결 건조하여 powder 상태로 만들어 수율을 측정하였고, 다른 분획은 0.1M citrate buffer과 1:60(W:V) 비율로 37℃에서 200rpm으로 2시간동안 교반하면서 2회 반복 추출하였다. 추출된 상등액은 투석 전후의 수율을 측정하기 위해 같은 용량으로 두 분획으로 나누어 한 분획은 dialysis tube에서 1차 증류수로 3회 탈염 시킨 뒤 overnight 투석하였고, 부유물은 원심분리를 통하여 제거한 후, 동결 건조를 하여 powder(conchiolin powder B) 상태로 만들어 수율을 측정하였고 또한, 다른 한 분획은 투석 과정을 거치지 않고 동결 건조를 하여 powder(conchiolin powder C) 상태로 만들어, 투석 전후의 conchiolin powder(B, C)의 수율 및 단백질과 총 당 함량을 측정하였다.

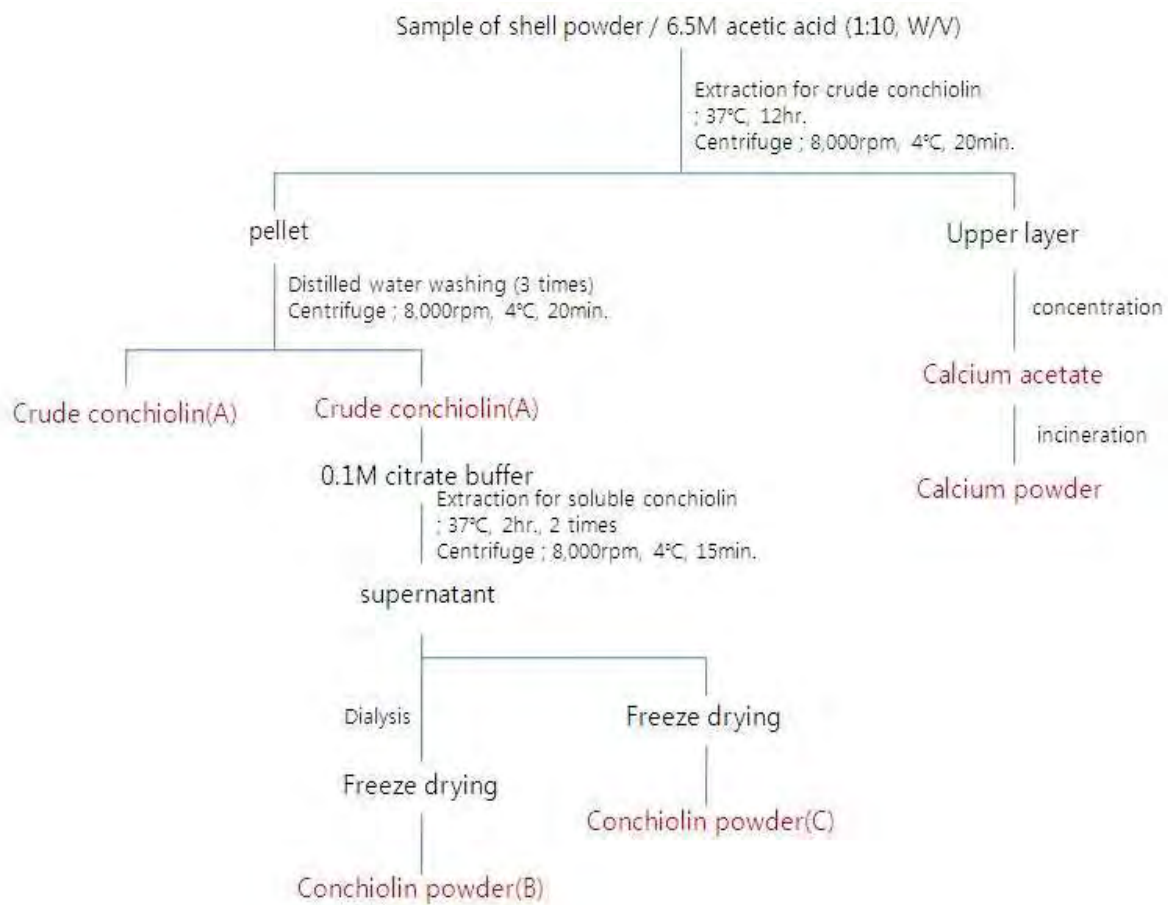
한편, 균 폐각을 6.5M acetic acid로 탈석회화 시킨 후, 침전물을 회수하고 남은 상등액을 70℃ 수욕상에서 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 103℃ 건조기에서 건조하여 탈석회화 과정 중 발생한 수용성 초산 칼슘을 500℃ 회화로에서 회화 시킨 후, 생성된 칼슘 분말의 수율은 측정하였다(Fig. 9).

#### (3) 단백질 정량분석

Lowry의 방법(11)을 사용하여 단백질을 정량하였다. 시료 40 $\mu$ l와 1% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 2% K · Na-tartrate, 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.1N NaOH의 시약을 1:1:100으로 조제한 lowry complex solution 200 $\mu$ l와 10분간 반응시킨 뒤, 2N Folin-ciocalteu's phenol reagent와 증류수를 1:1 로 조제한 Folin reagent를 20 $\mu$ l 넣고 실온에서 30분간 반응 시킨다. Blank 값은 8M urea와 0.1M citrate buffer로 하여 흡광도 750nm에서 측정한 뒤 bovine serum albumin으로 작성된 표준검정곡선에 의하여 단백질을 정량 분석하였다.

#### (4) 당 정량분석

당 정량분석에는 phenol-sulfuric acid법(5)를 사용하였다. 시료 60 $\mu$ l, 5% phenol 30 $\mu$ l, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



**Fig. 9. Schematic diagram methods for conchiolin extraction from shell powder.**

150 $\mu$ l를 섞은 후 실온에서 30분간 반응시켰다. Blank 값은 8M urea와 0.1M citrate buffer로 하여 흡광도 490nm에서 측정한 뒤 glucose로 작성된 표준검정곡선에 의하여 당을 정량 분석하였다.

#### (5) TLC(Thin layer chromatography) 분석

유기물의 구성성분은 TLC (Thin layer chromatography)로 분석하였다. TLC 분석에는 silica gel 60 F<sub>254</sub> glass plate(Merck Co., German)를 사용하고 전개용매는 BEA(n-butanol : acetic acid : water = 2 : 1 : 1, v/v)를 사용하였으며, 검출시약은 당 분석을 위해  $\alpha$ -naphtoresorcinol, 단백질은 ninhydrine, 지질은 rhodamin 6G를 사용하였다(12).

#### (6) SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

단백질 확인을 위한 SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 실험 후, 단백질 염색(silver staining)을 통하여 가공원료 추출물의 단백질을 확인하였다. 가공원료추출물(crude conchiolin) 15 $\mu$ g을 sample buffer(60mM Tris-HCl, pH6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 함께 20분간 끓인 후 15% SDS-polyacrylamide gel에 loading을 한다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 후 단백질 염색을 위해 silver staining과 coomassie staining을 수행하였다. silver staining을 위해 SDS-polyacrylamide gel을 고정액에서 1시간 고정한다. 50% Ethanol에서 20분간 반응시킨 후 0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 용액에서 5분간 반응시킨다. 증류수로 세척 후 AgNO<sub>3</sub> 용액에서 30분간 반응시킨다. 증류수로 SDS-polyacrylamide gel을 가볍게 씻어 주고 developer 용액(0.4% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 6% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)에서 단백질 밴드가 확인될 때까지 반응시킨다. 단백질 밴드가 확인되면 정지액(5% acetic acid)으로 developer 반응을 정지시킨다. coomassie staining을 위해 SDS-polyacrylamide gel을 coomassie blue R-250 시약에서 1시간동안 반응시킨 후 destaining solution(10% methanol, 10% acetic acid)을 교체해 주면서 SDS-polyacrylamide gel의 단백질 밴드가 보일 때까지 destaining 한다.

### 나. 패각추출물(Crude conchiolin)에 대한 생리활성분석

#### (1) 항산화(DPPH method)

항산화활성을 측정하기 위해 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity를 측정하였다. 전자공여능(EDA: electron donating ability) 측정법으로 Blios의 방법을 변형하여 측정하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 질소 원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질을 가지고 있다. 따라서 항산화성 물질과 반응하여 수소원자를 받아들임으로서 자체의 정색성을 잃게 되는 성질을 이용하여 항산화능의 정도를 측정할 수 있

다.

각 시료는 D.W. 1.0ml에 1.0g을 녹여 각 농도별로 희석하여 사용하였으며, 시료 용액 10 $\mu$ l(control: 99.5% ethanol)에 0.1mM DPPH (in 99.5% ethanol) 용액을 190 $\mu$ l를 가하고, vortex mixer로 10초간 진탕하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응 시킨 후, microplate reader(Bio-Tek, USA)를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로는 시료 대신 methanol를 10 $\mu$ l 첨가하여 반응시켰고, 양성대조군으로는 L-ascorbic acid, BHA(Butylated hydroxyanisole)를 사용하여 같은 방법으로 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 대조군에 비하여 감소된 흡광도로부터 radical 제거율을 계산하였다(13-16).

$$\text{EDA(\%)} = \frac{\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100$$

Sample O.D. : 시료를 가한 시험액의 흡광도

Control O.D. : 시료를 가하지 않은 시험액의 흡광도

## (2) 항염증실험(COX-1, COX-2 저해활성 측정)

COX-1(Cyclooxygenase-1), COX-2(Cyclooxygenase-2)의 저해활성을 측정하였다. 이 실험에는 Cayman chemical Co.(USA)로부터 구입한 COX inhibitor screening assay kit를 사용하였다. COX-1, COX-2 저해 활성을 측정하기 위해 2개의 well 에 20%(v/v) heme 10 $\mu$ l, 효소(COX-1, COX-2) 10 $\mu$ l 그리고 solvent 10 $\mu$ l를 첨가하였으며, Sample(inhibitor)은 물 1.0ml 당 1.0g을 녹인 시료를 각 희석 농도별로 10 $\mu$ l씩 첨가하였다. Standard inhibitor로 Indomethacin 0.1mg을 DMSO(dimethyl sulfoxide) 1.0ml에 용해시켜 희석하여 사용하였으며, 모든 well에 10 $\mu$ l의 chemiluminescent substrate와 50 $\mu$ l의 arachidonic acid를 첨가하여 Luminometer로 저해능을 측정하였다(17-20).

## (3) NO 생성 저해능 측정

Murine melanoma(B16F10) 세포로부터 생성된 NO의 양을 LPS 처리 후, 20시간에 있어서 측정하였으며, 각 실험군당 well 수는 3으로 하였다. 96 well plate에 세포 배양상등액 100 $\mu$ l 와 Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1%  $\alpha$ -naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 150 $\mu$ l를 혼합한 후, 5분 동안 반응시켜 ELISA microplate reader(Model: MQX200R, BioTek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선 작성을 위해 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 표준품으로 사용하여 비교하였다(21).



#### (4) 세포독성 측정(MTT assay)

세포독성 평가를 위해 사용된 cell은 Murine melanoma(B16F10)를 미국 ATCC에서 분양을 받아 실험에 사용하였다. 사용된 배지는 FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM배지를 사용하였다. 6-well plate에  $1 \times 10^5$  으로 Cell seeding한 후 CO2 incubator(Sanyo, Japan)에 넣고 37°C에서 배양하였다(21).

MTT는 살아있는 세포의 미토콘드리아 활성도의 indicator로서 세포생존의 index 로 주로 사용되고 있다. 즉, 생존세포의 active mitochondrial dehydrogenase는 MTT를 절단하여 formazan을 생성하게 되는 데 이 양은 곧 대사적으로 활동적인 세포의 수와 직접적인 상관관계에 놓여있다. 시료를 농도별로 처리하고 세포배양 20시간이 지난 후, 5 mg/ml 의 MTT 시약을 이용하여 0.1 mg MTT/(200 ul) well 에 넣고 2시간 동안 배양하였다. 각 실험군당 well 수는 3으로 하였고, 배양 후 상등액을 제거하고, 200 ul 의 PBS 로 세척한 후, 100 ul의 DMSO를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan을 용해시킨 후, ELISA microplate reader(Model: MQX200R, BioTek, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존률은 control cell 에 대한 백분율로 나타내었다 [Cell viability (% of control) =  $100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})$ ].

#### (5) 미백효과(Tyrosinase inhibition assay)

미백효과를 확인하는 방법으로 ‘기능성 화장품 효력을 측정하기 위한 가이드라인(22)에 따라 티로시나아제의 활성 저해능을 측정하였다. 멜라닌 합성과정의 속도 결정 단계를 촉매하는 tyrosinase의 활성 저해율을 측정하여 미백 성분의 효과를 평가하는 방법으로, 0.1M Na-phosphate buffer(pH 6.5) 183 $\mu$ l 에 test sample 17 $\mu$ l과 17 $\mu$ l의 mushroom tyrosinase(2000 Unit/ml), substrate(tyrosine) 33 $\mu$ l을 첨가하여 최종 반응액이 250 $\mu$ l이 되도록 96-well microplate 에 넣는다. 이 반응액을 37°C에서 15분간 배양한 후, 신속하게 ice에서 5분 동안 방치하여 반응을 중단시킨 후, microplate reader (BioTek, USA)를 이용하여 490nm의 파장에서 흡광도를 측정한다(23).

Tyrosinase의 활성 저해율은 다음식에 의해 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성 저해율 (\%)} = \frac{100 - (b - b')}{a - a'} \times 100$$

a : 공시료액의 반응 후 흡광도

b : 시료액의 반응 후 흡광도

a', b' : tyrosinase 대신 완충액을 처리한 흡광도

(6) Collagenase 저해 활성 측정(주름관련 실험)

Collagenase 저해활성 측정은 Qi W.방법(2009)(24)을 변형시켜 사용하였다. 50mM Tris-HCl buffer 50 ul에 5 ul collagenase (2 mg/ml) 과 희석된 시료 (미후도에서 추출하여 동결 건조 분말 시료를 농도별로 녹인시료)10 ul 용액을 37℃에서 10 min간 전 처리한 후, 중탕 가열한 6mg/ml 의 gelatin이 포함된 기질용액 0.5ml(50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)과 37℃에서 30min 간 반응 시켰다. 효소 반응을 정지시키기 위해 10.0 %(w/v) trichloroacetic acid(TCA) 0.5 ml를 첨가한 후, ninhydrin 용액 0.5 ml을 혼합하여 100℃, 10 min간 끓이고, ice-water에서 냉각시켰다.

가수분해 되지 않은 단백질을 침전시키기 위해 50.0% 1-propanol을 가하여 15min간 방치한 후, 10,000 rpm에서 10 min간 원심분리하여 570 nm에서 측정하였다. 저해율(%)은 저해제를 첨가한 것의 반응 전(A)과 반응 후(B)의 흡광도, 저해제를 첨가하지 않은 것의 반응 전(C)과 반응 후(D)의 흡광도로부터 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \frac{(D-C)-(B-A)}{(D-C)} \times 100$$

(7) Linoleic acid 자동산화 억제활성 측정

시료 (1mg)을 1ml의 증류수, 0.13ml의 linoleic acid, 10ml의 ethanol, 10ml의 50mM phosphate buffer(pH 7.0)에 녹이고 flask에서 혼합한다. 40℃의 어두운 곳에 보관하면서 1시간 반응 후 혼합물을 취하여 thiobarbituric acid(TBA)법 (Ramirez and Spillman, 1987)에 따라 산화 정도를 측정한다. 그리고 반응 혼합물 50μl를 0.8ml의 증류수, 0.2ml의 8.1%(w/v) SDS, 1.5ml의 20%(v/v) acetic acid (pH3.5)와 1.5ml의 0.8% (w/v)TBA 용액에 첨가하고 60분 동안 100℃에서 가열 한 후, 얼음에서 식힌다. 이를 5,000×g에서 10분 동안 원심분리하고 상층액의 흡광도를 532nm에서 측정하고 시료의 산화활성을 malondialdehyde 농도로 표시한다(25).

(8) 항균 및 항곰팡이 활성 측정 (*Antimicrobial and Antifungal activity*)

추출한 시료에 대한 항균활성의 측정방법은 filter paper disk method (Advantec, Toyo, 8 mm, Japan)를 이용하여 시험세균은 대장균 (*E. coli* ATCC 10788), 식중독균인 [*황색포도상구균 (Staphylococcus aureus)*, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 14509], *Citrobacter freundii*, *Krebsiella pneumonia* ATCC 15313, 효모 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC7968, *Candida albicans* ATCC 10231, 곰팡이 *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* KACC 40250를 대상으로 성장억제를 관찰함으로써 확인하였다. 활성 측정법은 다음과 같다 ; 시험균 주를 37℃로 TSB에서 mid-logarithmic phase까지 배양하였고, 항균활성을 측정하고자 하는 시료

들은 일정농도를 취하여 멸균된 증류수 (50 $\mu$ l)에 녹인 후, paper disk에 흡수시켜 건조하였다. 배양한 균주는 원심분리 (10분, 2,000  $\times$  g)한 후 0.1mM phosphate buffer (PBS, pH 6.7)로 3회 반복하여 세척한 후 배양한 균액 100 $\mu$ l ( $A_{570\text{ nm}} = 0.1$ )를 Trypticase Soy Agar (TSA)에 도말하고 준비한 paper disk를 배지 위에 일정간격으로 정치시켜 37 $^{\circ}$ C에서 18 시간동안 배양하여 항균활성을 측정하였다(26).

#### (9) 용혈활성 측정

추출 시료들에 대한 용혈활성을 측정하기 위해 human 혈액을 사용하였다. 채혈된 신선한 혈액을 BCS Hemoglobin kit를 사용하여 Cyanmethemoglobin법으로 유리되는 hemoglobin의 양을 측정하였으며, 국제 혈액 표준위원회 표준법으로써 혈액과 potassium ferricyanide가 반응해서 hemoglobin이 methemoglobin으로 전환되고 다시 potassium cyanide와 반응해서 cyanmethemoglobin으로 전환되는 것을 비색 측정하므로 유리되는 hemoglobin의 양을 측정하였다. 상세히 설명하면, hemoglobin 시약 5ml에 sample 0.02ml을 넣고 혼든 후, 혈액 0.02ml을 넣어 잘 혼합하여 실온에서 5분간 방치하고 표준액(16g hemoglobin/dl)을 이용하여 만든 표준곡선을 대조로 하여 파장 540nm에서 흡광도를 측정한 후, 유리된 hemoglobin의 양을 정량하였다(27).

#### (10) 근육수축활성 측정

금붕어 장관표본을 만들기 위해 먼저 복부를 절개한 후, 장관을 약 2.0-3.0cm 길이로 적출하여 결체조직 등을 제거하였다. 장관의 길이가 약 1cm가 되도록 하여 아래쪽 말단을 반응조의 지지봉에 고정하고 다른 한 쪽 끝을 isometric transducer에 연결하였다. 연결한 장관에 1.0g의 장력을 준 뒤, 실온에서 15분 간격으로 완충액을 교체하면서 안정화 시켰다. 사용한 완충액의 조성은 다음과 같다: 110mM NaCl, 2mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 10mM Glucose/ 500mM Tris-HCl(pH7.8) 5ml. 활성측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입하면서, 20 mM Tris-HCl(pH7.0) 10ml에 0.2g의 굵 분말을 용해하여 침전시킨 후 얻은 상등액 50 $\mu$ l(굵 분말용액 A)와 urea에 녹아있는 conchiolin 용액 50 $\mu$ l(conchiolin용액 B)를 반응조에 주입하여 physiograph로 기록하였다. 활성정도는 acetylcholine (Ach) 5  $\times$  10<sup>-7</sup>M에 대한 수축반응을 기준으로 하였다.

#### (11) Raw 264.7 cell에서 가공원료추출물(Crude conchiolin)의 세포 독성 및 항염 활성 측정

##### (가) 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국 세포주 연구재단에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지

않은 cell만 사용하였다.

(나) 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주한 다음 가공원료추출물(Crude conchiolin)을 농도별로 처리한 다음, 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.1 - 3.0 mg/ml의 농도로 가공원료추출물(Crude conchiolin)을 처리하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양 후 생존 세포에 MTT (0.5 mg/ml)를 4시간 처리한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) =  $100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})$ ].

(다) NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100  $\mu$ l와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1%  $\alpha$ -naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

(라) Immunoblot analysis

20mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137mM sodium chloride, 10% glycerol, 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 25mM b-glycerophosphate, 2mM sodium pyrophosphate, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000 $\times$ g로 10분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 antimouse iNOS, COX-2 antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, anti p-I-kBa antibody를 사용하여 p-I-kBa protein을 측정하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse와 anti-goat antibody를 사용하였다. iNOS와 COX-2, p-I-kBa protein의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다.

(마) Cytokine의 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cells ( $1 \times 10^6$ /ml)을 분주하고 가공원료추출물(Crude conchiolin)을 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리 후 6-12시간에

배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 -70℃에서 보관하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

### 3. 전임상 동물실험

#### 가. Rat에서 가공원료추출물(crude conchiolin)의 독성측정

##### (1) 체중측정

실험동물(rat)의 체중은 가공원료추출물(crude conchiolin) 투여 후 1~14일에 체중을 측정하여 기록하였다. 측정된 data는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다.

##### (2) GOT (Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (Glutamic pyruvic transaminase), LDH (Lactate dehydrogenase) 및 BUN (Blood urea nitrogen) 측정

단회투여 독성실험으로 실험 군 당 5 마리의 rat 사용하였으며, 가공원료추출물(Crude conchiolin)을 2g/kg로 처치하고 14일 후 실험동물의 혈액을 채취하였다. Plasma에서의 GOT (Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (Glutamic pyruvic transaminase), LDH (Lactate dehydrogenase) 및 BUN (Blood urea nitrogen)의 함량은 자동혈액분석기를 사용하여 분석하였다. (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

#### 나. DNCB로 유도된 mouse의 접촉성 피부염에 미치는 영향

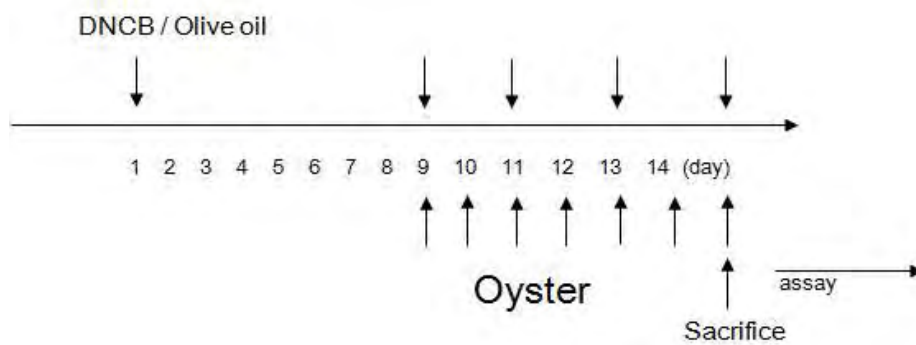
##### (1) 실험동물의 사육

실험동물은 male BALB/c mouse (오리엔트, 한국)를 사용하여, 접촉성 피부염(귀부종)을 유도하지 않고 tap water를 투여한 Normal군, 귀부종을 유도하고 tap water를 투여한 Control군, 귀부종을 유도하고 시료를 처리한 실험군으로 나누어 각 군당 5마리씩 총 30마리를 실험에 사용하였다. 실험동물은 7마리씩 분리하여 polycarbonate cage에 수용하고, 온도 20-25℃ 및 습도 30-35%로 조절된 항온항습 및 공기청정 시스템 (동물사육시스템, 한국)에서 사육하고, 명암주기는 12/12시간으로 조절하였다. 사료(한란, 한국)및 음용수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다.

##### (2) 귀부종 유발 및 귀두께 측정

귀부종을 유발하기 위해 acetone과 olive oil을 4:1로 섞어 만든 용매에 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)를 녹여서 만든 1% DNCB 용액을 사용하였다. 실험시작 1주일 전에

20  $\mu\text{l}$ 의 1% DNCB 용액을 마우스의 오른쪽 귀안에 도포하여 sensitization한 후, 1주일에 3번씩 20  $\mu\text{l}$ 의 1% DNCB 용액을 1주 동안 반복적으로 도포하여 접촉성 피부염을 유발하였다. 시료는 굵 패각의 초미세분말 유래 conchiolin(OF; conchiolin from Oyster fine particle, 0.01, 0.03, 0.10 g/ml) 과 나노분말(ON; Oyster nano particle, 0.001, 0.01, 0.03, 0.10 g/ml)로서 시료를 각각 20  $\mu\text{l}$ 씩 매일 환처에 도포하였다(Fig. 3). 대조군으로는 물을 매일 20  $\mu\text{l}$ 씩 도포하였으며, 귀 두께는 Micrometer (Mitutoyo, Kawasaki, Japan)를 이용하여 측정하였다.



**Fig. 6. Experimental Design.**

### (3) 혈액의 채취

Heparinized capillary tube(Superior, Germany)를 이용하여 mouse의 눈외자를 찔러 채혈한 다음, 1.5 ml tube에 넣어 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청은 immunoglobulin 측정 전까지 -70℃에 보관하였다.

### (4) 실험동물의 희생 및 부종유발 귀의 채취

부종이 유발된 마우스의 오른쪽 귀를 잘라 무게를 측정하고 귀 무게의 30배에 해당되는 양의 PBS-T (PBS + 0.1% Tween20)를 첨가하여 homogenizer (IKA®-Werke, Germany)로 조직을 마쇄한 후, 12,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. Cytokine 측정을 위한 상등액은 실험에 사용하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

### (5) Immunoglobulin 측정

Microtiter plate (96-well)에 미리 준비한 혈액의 상등액 sample을 dilution buffer (0.1% BSA in PBSN)로 희석한 후 37℃에서 3시간 이상 반응시킨 후, 3차례 세척하였다. IgE의 antibody를 처리하여 37℃에서 2시간 배양한 후, 기질인 pNPP(p-nitrophenyl-phosphate)를 첨가하여 배양하여 spectrophotometer (GENious plus, Tecan, Austria)로 405nm에서 측정하고, 492nm의 background를 감하였다.

#### (6) Cytokine 측정

IL-1 $\beta$ , IL-6는 시판되는 ELISA kit (Pierce Endogen, Rockford, IL, USA)를 구입하여 사용자 방법에 준하여 측정하였다.

### 4. 효소 가수분해법을 이용한 conchiolin peptide 제조

#### 가. 수용성콘키올린의 추출 및 정제

패각류의 가공분말(A)을 6.5M acetic acid와 1:10 (W:V)비율로 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 탈석회시켰다. 15분간 10 $^{\circ}$ C에서 7000rpm으로 원심 분리 하여 모아진 침전물(B)을 회수한 후, 침전물에 남아있는 여분의 acetic acid를 증류수로 제거하였다. 증류수로 세척 된 침전물을 동결 건조 하여 powder(crude conchiolin, C) 상태로 만들었다. 동결 건조 된 crude conchiolin powder 0.3g을 추출 용액 (0.1M citrate buffer pH6.0, D) 15ml(1:60, W:V)에 bead를 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 200rpm으로 교반하면서 단백질을 추출하였다. 추출된 상등액은 dialysis tube에서 1차 증류수로 3회 탈염 시킨 뒤 overnight 투석하고, 부유물은 원심분리를 통하여 제거하여 conchiolin(E)을 제조하였다.

conchiolin의 가수분해는 trypsin을 이용하여 가수분해를 하였다(F). 가수 분해가 끝난 뒤 중화 과정을 거친 후, 원심분리를 통하여 부유물을 제거한 다음, 생리활성이 있는 분획물을 분석하기 위해 COX-1과 COX-2의 저해활성을 측정(H)한 후, COX-1과 COX-2의 저해 활성이 확인된 분획물을 LC/MS(Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, I)를 이용하여 분석하였다(Fig. 10).

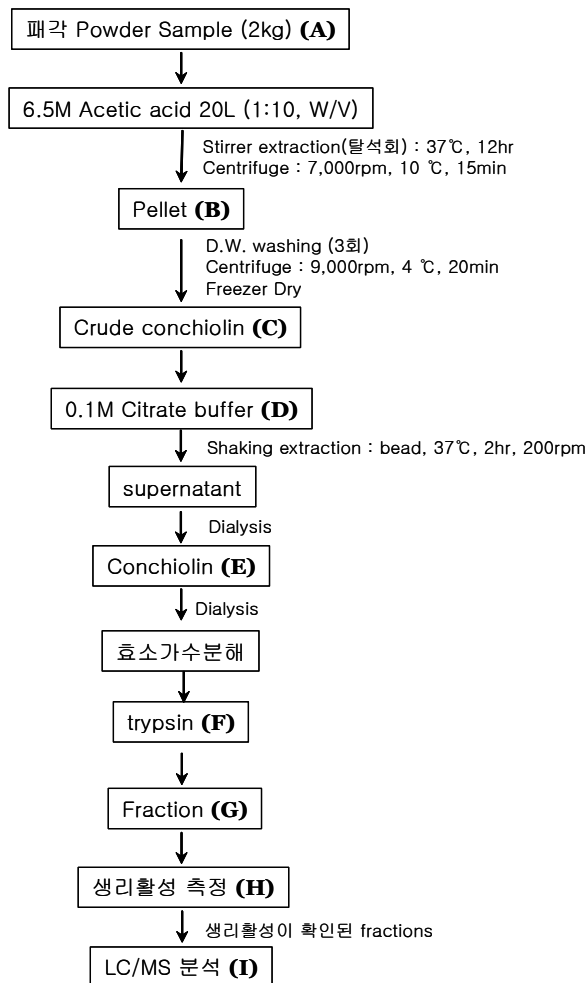
#### 나. 분리 정제 및 구조분석

수용성 콘키올린의 분리 정제하기위하여 투석하여 동결 건조된 분말을 이용하여 Sephadex G-100에 0.1M Citrate buffer(pH 6.5)를 사용하여 1차로 분리 정제하였으며, 분리 정제된 시료는 FPLC column Superdex 200과 Mono Q column 등을 이용하여 분획 물을 획득하고, 이것은 COX-2 활성분석법으로 활성을 검증한 후 구조 분석하는데 사용하였다. 그리고 물질의 분자량은 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였으며, 이 콘키올린에 대한 아미노산을 분석하여 조 콘키올린과의 구성아미노산을 비교하였다. 또한 단백질을 가수분해하여 peptide화하여 항염증활성을 비교하였다. 이렇게 만들어진 시료는 LC/MS/MS, GC/MS/MS, NMR 등을 통하여 구조를 분석하였다.

##### (1) 아미노산 분석

정제된 분획 물을 동결 건조한 후 아미노산분석기(Biochrom 20 Plus Amino Acid Analyzer, UK)를 사용하여 아미노산 함량을 분석하였다. 시료는 1ml당 12N HCl을 1ml 처리하여 110 $^{\circ}$ C에서 24hr 가수분해를 시켰으며, 가수분해물은 40 $^{\circ}$ C이하에서 증발시켰으며, 농축시료에 citrate

buffer(pH 2.2)를 1ml 넣고 녹인 후 10배 희석한 시료 40 $\mu$ l을 아미노산 분석기에 넣고 분석하였다.



**Fig. 10. Schematic diagram for crude conchiolin from various mollusk shells by acidic or enzymatic hydrolysis.**

## (2) 분자량 측정

정제한 Conchiolin의 분자량은 SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)를 사용하여 확인하였다. 표준 marker로는 M.W. 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75 kd가 혼합된 것으로 사용하였으며, 가공원료추출물(crude conchiolin)과 정제물질을 각각 15 $\mu$ g씩 sample buffer(60mM Tris-HCl, pH6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 함께 20분간 끓인 후 15% SDS-polyacrylamide gel에 loading을 한다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 후 단백질 염색을 위해 silver staining과 coomassie staining을 수행하였다. silver staining을 위해 SDS-polyacrylamide gel을 고정액에서 1시간 동안 고정한 후 50% ethanol에서 20분간 반응시켜



0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 용액에서 5분간 반응 시켰다. 증류수로 세척 후 AgNO<sub>3</sub> 용액에서 다시 30분간 반응시킨 후 증류수로 SDS-polyacrylamide gel을 가볍게 씻어 주고 developer 용액(0.4% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 6% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)에서 단백질 밴드가 확인될 때까지 반응시켜 밴드가 확인되면, 정지액(5% acetic acid)으로 developer 반응을 정지시켰다. coomassie staining을 위해 SDS-polyacrylamide gel을 coomassie blue R-250 시약에서 1시간동안 반응시킨 후 destaining solution(10% methanol, 10% acetic acid)을 교체해 주면서 SDS-polyacrylamide gel의 밴드가 보일 때까지 destaining하였다.

다. 효소가수분해에 의한 펩타이드의 제조

조 콘키올린을 이용하여 펩타이드 제조를 위해서 시판중인 효소(Protamex, Trypsin, Neutrase)를 이용하여 조건에 따른 반응과 반응 후 물질에 대한 항염증, 항산화, ACE저해 등의 기능을 검토하여 최적의 효소와 조건을 확립하였다. 3 종류의 효소 중 protamex는 threonine을 제외한 거의 대부분의 아미노산을 절단하는 특징을 가지고 있으며, trypsin은 lysine과 arginine부위를 neutrase는 glutamine과 asparagine부위를 절단하는 특징을 가진 상업용 효소이다(Table 8).

액상으로 판매되는 protamex와 neutrase과 분말 trypsin을 동일 역가대비 액상으로 만든 후 이들을 동일한 기질(콘키올린)량으로 반응하여 40-60℃의 온도와 pH 6.0-8.0의 조건으로 각각 2시간 반응 시킨 후 반응물에 대한 활성을 측정하여 최적 조건을 확인하였다.

Table 8. Characterization of catalytically hydrolysis of protamex, neutrase and trypsin

| Enzymes  | Amino acid cutting position   |
|----------|---|
| Protamax | <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓</p> <p style="text-align: center;">Leu-Trp-Lys-Arg-Glu-Ile-Tyr-Phe-Gln-Ser-Val-Asp-Thr-Ala-Pro-Asn</p> |
| Trypsin  | <p style="text-align: center;">↓ ↓</p> <p style="text-align: center;">Leu-Trp-Lys-Arg-Glu-Ile-Tyr-Phe-Gln-Ser-Val-Asp-Thr-Ala-Pro-Asn</p>                                 |
| Neutrase | <p style="text-align: center;">↓ ↓</p> <p style="text-align: center;">Leu-Trp-Lys-Arg-Glu-Ile-Tyr-Phe-Gln-Ser-Val-Asp-Thr-Ala-Pro-Asn</p>                                 |

## 5. 균 폐각을 이용한 수용성칼슘의 제조

해양에 존재하는 모든 폐각류에는 수용성콘키올린을 분리하기 위해서는 탈 석회화 과정을 거치게 되는데, 이 과정 중에 회수된 것이 칼슘분말이다. 따라서 균 폐각을 6.5M acetic acid로 탈석회화 시킨 후, 침전물을 회수하고 남은 상등액을 70℃ 수욕상에서 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 103℃ 건조기에서 건조하여 탈 석회화 과정 중 발생한 수용성 초산 칼슘을 500℃ 회화로에서 회화 시킨 후, 생성된 칼슘 분말을 실험을 위한 시료로 사용하였다. 또한 수용성칼슘 제조를 위하여 초산과, 구연산을 이용하여 수용성 칼슘을 회수하여 수율과 용해도를 조사하였다.

## 6. 대량분리정제 기술개발과 응용제품의 개발

### 가. 저비용 고효율의 대량분리정제법 개발

폐각으로부터 추출한 항염증 소재를 분리하는 방법과 그로부터 발생하는 칼슘 등을 처리할 수 있는 생산공정시스템을 구성하여 그 시스템에 맞는 조건으로 처리하였을 때 수율 등을 검증하였다.

### 나. 산업분야별 응용제품의 개발 및 평가

#### (1) 식품소재

##### (가) Calcium 청국성장환의 개발 및 평가

청국장을 발효한 후 청국환을 코팅할 때 수용성 칼슘을 3%(6 g), 6%(12 g), 9%(18 g) 및 12%(24 g)를 청국장분말과 혼합하여 코팅을 한 후 시제품을 개발하였으며, 국제경락면역학회 한의사들을 통하여 제품평가를 실시하였다.

#### (2) 화장품소재

화장품업계에서 가장 큰 이슈로 대두되고 있는 분야중에 하나가 피부트리플과 관련된 제품 개발이며, 그 중 핵심소재가 항염증 소재이다. 따라서 폐각류로부터 항염증 소재를 분리하여 그 기능성을 임상실험을 통해 평가하였다(임상실험결과 참조).

#### (3) 한방제품개발

##### (가) 한방 피부외용제 개발

한방 피부외용제의 베이스 원료의 개발은 향후 제품의 질적 향상을 위해 중요한 요인으로 작용하기 때문에 베이스 원료의 개발은 필수적인 요소이다. 이에 부응하여, 본사에서는 피부친

화력과 흡수력이 우수한 제품 및 피부의 답답함을 없애주고 보습력이 지속적으로 유지되는 제품을 생산하기 위해 콘키올린성분 배합에 적합한 베이스 원료를 개발하였으며, 나아가 천연한방 추출물과의 배합을 통한 피부조건에 따른 단계별 한방화장품 및 한방 피부외용제의 베이스 원료를 개발하였다.

(나) 제품의 종류

① 선 아토스킨(제품명: Sun Atoskin)

- 제품 컨셉 : 무알코올, 피부친화력이 우수하고 향균, 항염증 치료
- 용 도 : 중성피부 및 지성피부
- 보 습 력 : 10 - 15%
- 보습지속시간 : 2 - 3시간
- 콘키올린 농도 : 0.9 % [혼합비율: 10배 희석된 base 10 ul + conchiolin 100 ul(conchiolin 의 농도: 10 mg/ml)]
- 기타 : 피부수분유도용 한약추출물질 1%

② 선 아토로션(제품명: Sun Atolotion)

- 제품 컨셉 : 피부친화력과 보습력이 우수하고 향균, 항염증 치료
- 수분보습력 : 30-40%
- 보습지속시간 : 10시간
- 콘키올린 농도 : 0.9 % [혼합비율: 10배 희석된 base 10 ul + conchiolin 100 ul(conchiolin 의 농도: 10 mg/ml)]
- 기타 : 피부수분유도용 한약추출물질 2%, 세라마이드 3%

③ 선 아토크림(제품명: Sun Atocream)

- 제품 컨셉 : 피부친화력과 보습력이 우수하고 향균, 항염증 및 피부재생효과
- 수분보습력 : 45%이상
- 보습지속시간 : 12시간 이상
- 콘키올린 농도 : 0.9% [혼합비율: 10배 희석된 base 10 ul + conchiolin 100 ul(conchiolin 의 농도: 10 mg/ml)]
- 기타 : 피부수분유도용 한약추출물질 2%, 피부재생물질 0.5%, 세라마이드 3%

④ 임상실험용 여드름세럼(제품명: Sun Acne skin serum)

- 제품 컨셉 : 피부친화력이 우수한 항염증용 제품

- 용 도 : 중증 여드름피부, 염증성 피부
- 효능 효과 : 유분감소, 피지억제, 항염증 등
- 콘키올린 농도 : 조 콘키올린 분말 0.5%

⑤ 선 여드름 세럼(제품명: Sun Acne skin serum)

- 제품 컨셉 : 피부친화력이 우수하고 항균, 항염증 치료
- 용 도 : 중증여드름 피부
- 효능 효과 : 청열해독, 항균, 항산화, 항염증
- 콘키올린 농도 : 조콘키올린 분말 0.5%(w/v)
- 기타 : 항균 및 항진균, 항산화, 피지억제용 고농축 한약추출물질 1%(v/v)

⑥ 선 여드름 재생크림(제품명: Sun Acne skin regeneration cream)

- 제품 컨셉 : 피부친화력과 보습력이 우수하고 항균, 항염증 및 피부재생효과
- 용 도 : 중증여드름 피부
- 효능 효과 : 무유분, 항균, 항염증, 피지억제, 피부재생
- 콘키올린 농도 : 조콘키올린 분말 0.5%(w/v)
- 기타 : 항균 및 항진균, 항산화, 피지억제용 고농축 한약추출물질 1%(v/v)

(4) 내과치료처방개발

패각으로부터 추출 분리한 conchiolin과 calcium 분말을 이용한 치료 효율 검증을 위하여 한 의학서를 근거로 처방을 연구하여 그 처방을 근거로 내복약을 조제하여 임상 실험을 실시하였으며, 외용제의 경우 자체에서 실험 분석한 한약제 성분을 근거로 처방을 구성하여 임상실험을 실시하였다.

(가) 방법기술:

- ① 현삼목패탕(현삼 12g, 모려 120g, 패모 30g)-경부 임파선염 치료(처방: 전통의학연구소 발행, "한방임상응용" P108참조)
- ㉞ 탕제법 : 모려분120g에 물 600ml를 넣고 계속 끓여 350ml가 되게 한 후 현삼과 패모를 넣고 100ml가 되게 달여 복용하도록한 후 두통과 임파선이 부은 환자에게 복용케하여 효과를 확인하였다.
- ㉟ 복용법 : 하루 3회 100ml씩 복용

② 치료효율 검증: 동의보감, 방약합편, 한약임상응용 등과 같은 한의학서를 근거로 처방연구를 하였으며, 이 중 가장 약효를 빠르게 확인할 수 있는 처방을 중심으로 동의 문헌을 참고

로 하여 한방피부과 및 내과 치료처방을 개선 개발하였다. 남상천 한의원(서울 서초구 소재) 내원 환자 기준 두통과 임파선이 부은 환자를 대상으로 처방 후 그 경과를 확인하였다. 대조군으로는 일반 모려분말과 서진바이오텍에서 제공한 모려분말을 이용하여 처방한 후 그 효과를 확인하였다.

## 7. 생산실용화 기술개발

### 가. 대량생산공정기술개발 및 경제성 검토

연구된 내용을 근거로 생산 수율시료의 준비과정에서부터 반응 수율과 처리과정 등을 검토하여 생산 공정을 개발하였으며, 그 내용을 근거로 본 제품에 대한 제조설비, 기타부대시설, 인건비 등을 고려하여 제조원가를 산정하여 가격 경쟁력이 높은 생산설비를 개발하였으며, 경제성에 관한 검토를 실시하였다.

### 나. 제품에 대한 시장분석 및 산업화 전략 등 마케팅 방향연구

제품에 대한 시장분석은 항염증소재, 칼슘소재, 건축소재로 구분하여 시장분석을 실시하였으며, 가격동향, 시장의 흐름, 향후 발전 가능성을 고려하였으며, 본 연구과제를 통해 개발된 생산공정시스템과 제조원가 분석을 근거로 하여, 향후 매출전망과 마케팅 방향을 설정하였다.

## 8. 임상실험

### 가. 피부 임상실험 프로토콜의 개발

대구한의학대학교 임상시험센터(센터장 권영규 교수)에 의뢰하여 피부임상 프로토콜을 개발하였다(임상시험 Protocol 1 참조)

### 나. 여드름 임상실험

세명대학교 임상시험센터(센터장 김이화 교수)에 의뢰하여 임상대상자 30명을 대상으로 실험을 실시하였다(임상시험 Protocol 2 참조).

### 다. 아토피 임상실험

세명대학교 임상시험센터(센터장 김이화 교수)에 의뢰하여 임상대상자 23명을 대상으로 실험을 실시하였다(임상시험 Protocol 3 참조).

라. 임상실험 protocol 1.

## 한방 콘키올린 소재의 피부염 증상개선효과 및 체질과의 관련성에 대한 임상시험

2007년 10월

대구한의대학교 임상시험센터

## 목 차

1. 임상시험의 명칭
2. 임상시험 실시기관명 및 주소
3. 임상시험 책임자, 담당자 및 공동연구자의 성명 및 직명
4. 임상시험용 화장품 관리약사의 성명 및 직명
5. 임상시험 의뢰자명 및 주소
6. 임상시험의 목적 및 배경
  - 6.1. 목적
  - 6.2. 배경
7. 임상시험에 사용되는 한방 **콘키올린** 소재제품
  - 7.1. 임상시험용(한방 **콘키올린** 소재제품)
    - (1) 주성분명, 원료약품 및 그 분량
    - (2) 제형 및 성상
  - 7.2. 대조약
  - 7.3. 보관방법
  - 7.4. 획득방법
8. 대상질환
9. 피험자의 선정기준, 제외기준, 목표한 피험자의 수 및 그 근거
  - 9.1. 선정기준
  - 9.2. 제외기준
10. 임상시험 기간
11. 임상시험 방법
  - 11.1. 투여량 및 투여방법
  - 11.2. 투여기간
  - 11.3. 병용요법
12. 관찰항목, 임상검사항목 및 관찰검사 방법
  - 12.1. 항목 및 일정
  - 12.2. 관찰 및 검사 방법
    - (1) 환자의 배경 및 병력
    - (2) 일반 신체 검사
    - (3) 체질검사
    - (4) 임상 병리 검사
    - (5) 임상증상 검사
    - (6) 이상반응 평가
13. 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항
  - 13.1. 예측 이상반응
  - 13.2. 사용상의 주의사항

14. 시험중지, 탈락 기준
  - 14.1. 중지자
  - 14.2. 탈락자
  - 14.3. 중지자 및 탈락자 처리 기준
15. 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법 (통계분석방법)
  - 15.1. 1차 유효성 평가변수
    - (1) 평가변수
    - (2) 평가시기
    - (3) 평가방법
  - 15.2. 2차 유효성 평가변수
    - (1) 평가변수
    - (2) 평가시기
    - (3) 평가방법
  - 15.3. 해석방법 (통계분석방법)
16. 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법
  - 16.1. 이상반응의 정의
  - 16.2. 안전성 평가기준 및 평가방법
  - 16.3. 이상반응 및 임상검사치의 이상변동 평가
  - 16.4. 이상반응의 보고방법
17. 피험자 동의서 양식
18. 피해자 보상에 대한 규약
19. 임상증상에 대한 기록용지 양식
20. 임상시험후 피험자의 진료 및 치료 기준
21. 피험자의 안전보호에 관한 대책 등
22. 기타 임상시험을 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항
  - 22.1. 윤리적 요구사항
  - 22.2. 환자동의
  - 22.3. 비밀보장
  - 22.4. 임상시험모니터링
  - 22.5. 시험결과의 기록 및 이용
    - (1) 시험결과의 기록
    - (2) 시험결과의 이용
  - 22.6. 임상시험계획서의 수정
23. 참고문헌
  - 별 첨 1. 임상연구 참여 동의서 및 동의 설명서
  - 별 첨 2. 피해자 보상에 대한 규약
  - 별 첨 3. 증례조사표 (Case Report Form)



## 1. 임상시험의 명칭 및 단계

한방 콘키올린 소재제품의 (아토피) 피부염 증상개선 및 체질과의 관련성 평가를 위한 임상시험

## 2. 임상시험 실시기관명 및 주소

- 실시기관명 : (임상실시 의료기관명)
- 주 소 : (임상실시 의료기관 소재지 주소)

## 3. 임상시험 책임자, 담당자 및 공동연구자의 성명 및 직명

- 임상시험 책임자 : (임상시험 담당진료 의사이름, 임상시험 담당진료 의사 소속)
- 임상시험 담당자 : (임상시험 담당진료 전공의 이름, 임상시험 담당진료 전공의 소속)

## 4. 임상시험용 화장품 관리약사의 성명 및 직명

- 임상시험 관리약사 : (임상시험용 제품 관리담당 약사이름, 관리담당 약사 소속)

## 5. 임상시험 의뢰자명 및 주소

- 의뢰자명 : (주)서진바이오텍 대표이사 김학주
- 주 소 : 경기도 수원시 영통구 매탄3동 489-2번지 큐피디텍빌딩 3층

## 6. 임상시험의 목적 및 배경

### 6.1. 목적

한방 콘키올린 소재제품의 피부염 증상개선 효과 및 습열(濕熱)형 (아토피)피부염 환자에게 콘키올린 소재를 함유한 제품의 체질별 치료 반응을 평가하고자 한다.

### 6.2. 배경

(아토피) 피부염에 사용되는 도포용 치료제는 국소 혹은 전신스테로이드 치료제가 대부분을 차지하고 있다. 그러나 이러한 도포용 치료제는 혈관의 확장, 피부의 위축, 저색소 침착, 자반등과 같은 부작용을 일으키게 되어 장기간의 도포가 어렵고 사용에 있어 주의를 요하고 있다. 이러한 스테로이드 치료제의 부작용을 최소화 할 수 있는 치료제의 개발이 필요한 상태이다. 이에 한약재 중에서 콘키올린소재를 이용한 제품을 (아토피) 피부염에 응용하고자 하기 위하여 실험실 결과에 근거하여 임상시험을 거쳐 제품의 증상개선 효과 및 한방제품의 특징을 상품화할 수 있는 마케팅 포인트에 대한 근거를 마련하고자 한다. 콘키올린소재 한방제품을 濕熱의 樣치을 띤 (아토피) 피부염에 사용가능한 지, 濕熱과 祛濕의 경우 모두 잘 반응을 하는지 어느 체질 변증(辨證)의 경우에 더 효과적인지 그 효과를 비교함으로써 한국인 체질에서 가장 많은 비율을 차지하고 있는 태음인 전용 (아토피) 피부염제품 개발의 가능성을 평가할 수 있을 것으로 예상된다. 이에 동일한 한방 콘키올린소재 제품을 기존 치료와 병행하면서 본 임상시험제품을 도포할 경우 체질에 따른 관련성을 임상시험을 통하여 알아보하고자 한다.

## 7. 임상시험에 사용되는 제품

### 7.1. 임상시험용 한방 콘키올린소재 제품

- (1) 주성분명, 원료약품 및 그 분량  
콘키올린을 주약재로 하는 제품 (1-5g)
- (2) 제형 및 성상 :  
연고타입의 제품

### 7.2. 대조약 : 없음

7.3. 보관방법 : 시험용제품은 실온에서 기밀용기에 보관한다.

7.4. 획득방법 : 시험용제품은 (주)서진바이오텍 으로부터 무상으로 제공된다.

## 8. 대상질환

(아토피) 피부염

## 9. 피험자의 선정기준, 제외기준

### 9.1. 선정기준

- A. (아토피) 피부염의 진단기준 : 현재 국제적으로 통용되고 있는 1980년 Hanifin 과 Rajka의 진단기준을 근거로 주증상 중 3개 이상, 부증상 중 3개 이상의 임상증상이 있을 경우에 (아토피) 피부염으로 진단하였다.
- B. 만 6세 - 40세 비만의 심하지 않은 (아토피) 피부염을 가진 남, 여 자원자
- C. Table 1.에 해당하는 조건을 가지고 있는 자
- D. 피험자 제외기준에 포함되지 않은 자
- E. 본 임상시험에 자의로 참여결정하고 동의서에 서명한 자
- F. 시험기간 동안 추적관찰이 가능한 자원자

**Table 1. 아토피 피부염의 일반적인 증상의 변별기준**

|  | 濕 熱  | 血 燥  |
|--|--|--|
| 홍반(erythema)                                     | 홍반의 부위가 넓으며 홍반주변이 습윤한 경우가 많다.  | 홍반의 부위가 좁으며 인설이 같이 있고 태선화의 양상도 볼 수 있다.                         |
| 경결(induration)<br>구진화(papulation)                | 황색이나 홍색의 구진이 발생하며 크기는 다양하다. 미란과 삼출물이 혼재되어 있는 경우가 많다.                           | 홍백색의 구진이 간혹 있으며 건조하거나 태선화가 같이 있는 경우가 많다.                       |
| 소양감(pruritus)                                    | 심하며 얼굴을 동반한다. 땀을 흘린 후 더 심해진다.  | 극심하다. 반복 발작하는 경향이 있으며 야간에 더욱 심하다.                              |
| 찰상(excoriation)                                  | 소양감으로 긁어서 생기며 황색의 삼출물 혹은 가피가 덮혀져 있고 습윤하다. 혈성의 삼출물도 있을 수 있으며 손상 부위가 명확한 경우가 많다. | 소양감으로 긁어서 발생하고 혈성의 가피 혹은 소량의 삼출물을 볼 수 있다. 손상부위가 명확하지 않고 광범위하다. |
| 태선화<br>(lichenification)                         | 태선화의 양상이 없거나 미약하고 표면은 습윤하다.  | 태선화의 양상이 많다.   |
| 인설(scaling)<br>건조(dryness)                       | 인설은 습윤하며 피부의 건조는 거의 없다.  | 인설이나 피부의 건조가 심하다.  |
| 미란(erosion)<br>진물(oozing)<br>삼출물(weeping)        | 미란이 자주 보이고 황색의 진물이나 삼출물을 관찰할 수 있다. 간혹 혈성 삼출물도 관찰할 수 있다. 악취가 날 수도 있다.           | 미란보다는 찰상이 많으며 이로 인한 혈성 삼출물을 관찰할 수 있다.                          |
| 상기의 7가지 항목 중 두드러지게 띠는 항목이 5가지 이상일 경우 해당 변증으로 본다. |  |  |

**9.2. 제외기준**

- A. 심한 (아토피) 피부염이 있는 경우
- B. 면역계에 영향을 미치는 특별한 치료제를 사용하고 있는 자
- C. 조습착잡증(燥濕錯雜證)의 환자
- D. 기울증(기울증, 스트레스성)의 환자
- E. 계절 변화에 증상이 민감하게 변하는 자
- F. 변증이 곤란한 자
- G. 기타 위의 사항들 외에 연구시험책임자가 연구수행이 곤란하다고 판단하는 경우

**10. 임상시험 기간**

2009.( )월.( )일-2009.( )월.( )일 (6개월)

## 11. 임상시험 방법

### 11.1. 투여량 및 투여방법

전향적, 개방적(prospective open study)으로 (아토피) 피부염 환자에게 한방 콘키올린소재 제품을 제공하여 매일 수시로 환부에 도포하게 하고 심한 소양증시 도포를 중지하고 임상시험 담당연구 책임자와 상담하도록 하되, 개인적으로 국소 혹은 전신 스테로이드 제제의 도포나 복용은 금한다.

### 11.2. 투여기간

4주간으로 한다.

### 11.3. 병용요법

시험기간 동안 (아토피) 피부염에 처방되는 기간동안 한방치료는 병행하되, 다만 효능 평가에 영향을 준다고 여겨지는 국소 혹은 전신 스테로이드제제의 처방은 금지한다. 치료기간 중 합병질환 발생 시 한방 콘키올린소재 제품의 투약을 중단하되 그 치료에 사용한 약의 이름, 투여경로, 1일 투여량, 투여기간 등을 증례기록지에 기록한다.

## 12. 관찰항목, 임상검사항목 및 관찰검사 방법

### 12.1. 항목 및 일정

| 항 목             | 검 사 일 정 |         |        |
|-----------------|---------|---------|--------|
|                 | 치료전     | 치료 2주후  | 치료 4주후 |
| 환자동의서           | ○       |         |        |
| 신징기준/지외기준       | ○       |         |        |
| 환자배경 및 병력검사     | ○       |         |        |
| 체질 검사           | ○       |         |        |
| 일반신체 검사         | ○       |         | ○      |
| 임상 병리 검사        | ○       |         | ○      |
| 임상증상 검사         | ○       | ○       | ○      |
| 총관적 유효성 평가      |         |         | ○      |
| 순응도 검사          |         | ○       | ○      |
| 이상반응 조사         |         | ←—————→ |        |
| 안전성 평가          |         |         | ○      |
| 한방**소재 제품 배포    | ○       |         |        |
| 잔여 한방**소재 제품 수거 |         | ○       | ○      |

## 12.2. 관찰항목 및 관찰검사 방법

### (1) 환자배경 및 병력

치료 전에 환자의 성명, 성별, 나이, 생년월일, 신장, 체중, 진단명, 이병기간 병력 및 기초질환, 병용약제를 관찰하고 증례조사표에 기록한다.

### (2) 일반신체검사

치료 전 및 치료 4주후에 실시하고 증례조사표에 기록한다.

### (3) 체질검사

치료 전에 변증을 통해 체질검사를 실시한다.

### (4) 임상병리검사

치료 전 및 치료 4주후에 다음과 같은 항목에 대하여 측정한다.

측정치의 정상·비정상 여부를 평가하여 시험화장품 도포 후 비정상적 변화가 나타난 경우에는 시험화장품과의 관련성을 평가하고 추적조사를 실시하여야 한다.

- 일반 혈액 검사 : Eosinophil

- 혈청검사 : IgE(정량)

### (5) 임상증상 검사

각 평가는 치료 전 상태를 기록하고 치료 후 상태를 판정하여 치료전후 비교 판정

|                |                                 |
|----------------|---------------------------------|
| 1차 유효성<br>평가변수 | SCORAD INDEX 에 의한 객관적 병변 상태의 평가 |
| 2차 유효성<br>평가변수 | 환자의 주관적 호소 증상에 대한 평가            |

### (6) 이상반응 평가

임상병리검사 및 기타 이상반응 발생여부로서 치료 2주, 4주후 방문 시 평가한다.

## 13. 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항

### 13.1. 예측 이상반응

체질에 따른 국소의 가려움증, 발적, 발진 등의 악화

### 13.2. 사용상의 주의사항

- 1) 눈 및 점막에 사용하지 말 것.
- 2) 피부에 손상이 있을 경우에 사용하던 일과성의 자극감이 있을 수 있으므로 주의할 것.

## 14. 시험중지, 탈락 기준

### 14.1. 중지자

다음에 해당하는 경우는 ‘중지자’로 분류한다.

- A. 담당자가 임상시험용 제품과 ‘관련없음’으로 판정한 이상반응으로 인하여 조기에 시험을 중지한 경우
- B. 시험용 제품과 관련성이 명백하지 않은 기타의 이유로 조기에 시험을 중지한 경우
- C. 임상시험 계획서를 심하게 벗어난 경우(예를 들면, 검사를 받지 않거나 계획된 일정을 따르지 않는 경우, 더 이상의 투약을 거부하는 경우)

‘중지자’에 해당하는 피험자는 다른 피험자로 대체하며 임상시험 계획서에 따라 임상 시험을 실시한다.

### 14.2. 탈락자

다음에 해당하는 경우는 ‘탈락자’로 분류하고 최종 분석 평가시에 ‘악화’로 판정한다.

- A. 담당자가 임상시험제품과 ‘관련이 있을 수 있음’ 또는 ‘명백한 관련이 있음’으로 판정한 이상 반응으로 인하여 조기에 시험을 중지한 경우
- B. 효과가 없어(증상이 중증이거나 악화되어) 조기에 시험을 중지한 경우

‘탈락자’는 새로운 피험자로 대체될 수 없다.

### 14.3. 중지자 및 탈락자 처리 방법

중지자 및 탈락자가 발생한 경우 다음과 같이 처리한다.

- A. 조기 시험 중지 보고서 작성
- B. 최종 일반 신체 검사 실시
- C. 이상반응에 의한 경우라면 이상반응 발생 보고서 작성
- D. 중대한 이상반응이 발생한 경우에는 담당자가 보고받은 후 24시간 이내에 연구책임자 및 의뢰자에게 통지하고, 발생 5일 이내에 문서로 상세한 내용이 포함된 추가보고를 한다.
- E. 환자중례조사표 및 잔여 시험화장품을 의뢰자에게 송부
- F. 중지자의 경우는 안전성 평가에 포함시킨다.
- G. 탈락자의 경우는 4주후 평가항목을 평가한다.

모든 탈락자는 총괄적 유효성 평가시에 ‘악화’로 판정하고, 탈락하기 이전까지의 안전성으로써 총괄안전도를 판정한다. 그 중 이상반응에 의한 탈락이라면 총괄안전도 평가 시에 ‘안전하지 않음’으로 평가한다.

- H. 중지·탈락자에 대한 차후의 치료에 대하여는 담당자의 판단에 따른다.

## 15. 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법(통계분석방법)

### 15.1. 1차 유효성 평가변수

(1) 평가변수

- SCORAD INDEX 에 의한 객관적 병변 상태의 평가

(2) 평가시기

- 치료전 및 치료후 매2주 방문시마다 SCORAD INDEX에 따라 평가하고 해당 점수를 증례조사 표에 기록한다.

(3) 평가방법

- 아래 Table 2. 3.에 대해 연구원 1인에 의해 전체 환자의 상태를 객관적으로 판단하여 기재 하도록 한다.

Table 2. 부위 및 병변 상태의 점수표

| 신체부위별 항목           | 점수       |
|--------------------|----------|
| 두피(scalp)          |          |
| 얼굴(face-복을 포함)     |          |
| 전면 체간(Ant. trunk)  |          |
| 후면 체간(Post. trunk) | 0=0%     |
| 팔(arms-손목이상)       | 1=10%    |
| 손(hand-손목이하)       | 2=10-30% |
| 둔부(buttock)        | 3=30%이상  |
| 다리(leg-무릎과 발을 제외)  |          |
| 무릎(knee-슬와포함)      |          |
| 발(feet-발목이하)       |          |

신체부위를 10부위로 나누고 각 부위별로 (아토피) 피부염이 표면의 몇 %를 차지하는지 0-3까지 척도로 등급을 정하고 각 부위의 점수를 합산한다.

Table 3. 병변 부위의 객관적 증상에 대한 점수표

| (아토피) 피부염 병변의 심한정도                    | 점수              |
|---------------------------------------|-----------------|
| 홍반(erythema)                          |                 |
| 경결(induration), 구진화(papulation)       |                 |
| 소양감(pruritus)                         | 0=없음            |
| 찰상(excoriation)                       | 1=경증(mild)      |
| 태선화(lichenification)                  | 2=중등도(moderate) |
| 인설(scaling), 건조(dryness)              | 3=중증(severe)    |
| 비란(erosion), 진물(oozing), 삼출물(weeping) |                 |

## 15.2. 2차 유효성 평가변수

### (1) 평가변수

- 환자의 주관적 호소 증상에 대한 평가

### (2) 평가시기

- 치료 전 및 치료 후 매2주 방문시마다 평가하고 해당 점수를 증례조사표에 기록한다.

### (3) 평가방법

- 아래 Table 4. 에 대해 연구원 1인에 의해 전체 환자의 상태를 객관적으로 판단하여 기재하도록 한다.

Table 4. 환자의 주관적 호소 증상에 대한 점수표

---

주관적인 소양감

0: 전혀 급지 않음

1: 급으나 수면장애는 없음

2: 소양감으로 수면장애가 가끔 있음

3: 소양감으로 인해 하루에 2번 이상의 수면장애가 있음

---

## 15.3. 해석방법(통계분석방법)

본 분석을 위하여 이용하는 통계 패키지는 SPSS Window. version 11.5이며, 통계적 유의성을 위해 유의수준은 0.05로 설정하고, 분석을 위하여 이용되는 통계적 방법은 아래와 같다.

- 전체 피험자의 baseline characteristics은 동질성검사를 위하여 frequency analysis 및 descriptive analysis로 분석한다.
- 1차 유효성 평가변수 및 2차 유효성 평가변수의 그룹간 비교를 위해서는 Mann-Whitney U test를 이용한다.
- 각 군내의 처치 전후 수치 비교를 위해 Wilcoxon signed rank test를 이용한다.
- 각 집단 간의 안정성평가, 총관안전도 분석은 chi-square test를 이용하여 분석한다.

## 16. 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법

### 16.1. 이상반응의 정의

‘이상반응’이란 임상시험에 사용되는 제품을 투여 받은 피험자에서 발생한 바람직하지 않고 의도되지 않은 증후(sign), 증상(symptom), 질병(disease) 등으로 임상 병리 검사에서 의학적으로 이상치로 나타나는 경우를 포함한다.



## 16.2. 안전성 평가기준 및 평가방법

### (1) 피부자극도

시험용 제품 도포부위의 홍반과 부종의 정도에 따라 다음과 같이 3등급으로 평가한다.

- 경증(Mild) : 발적 및 부종이 약간 있음
- 중등증(Moderate) : 발적이 있으며 1mm 이하의 부종이 있음
- 중증(Severe) : 심한 발적이 있으며 1mm 이상의 심한 부종이 있음

### (2) 기타 이상반응

피부자극외의 이상반응 정도는 의학적 기준에 따라 다음의 3등급으로 평가한다.

- 경증(Mild) : 잘 인지될 수 없을 정도의 약간 불편한 증상
- 중등증(Moderate) : 명확한 증상은 있으나 별다른 처치가 필요 없음
- 중증(Severe) : 매우 불편하여 신속한 처리를 요함

- 중증(severe)이상반응은 ‘중대한 이상반응’과는 구별된다.

\* 중대한 이상반응 : 임상시험에 사용되는 제품의 임의의 용량에서 발생한 이상반응 또는 이상약물 반응 중에서 다음에 해당하는 경우

1. 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우
2. 입원 또는 입원기간의 연장이 필요한 경우
3. 지속적 또는 의의 있는 불구나 기능저하를 초래하는 경우
4. 신천적 기형 또는 이상을 초래하는 경우

### (3) 총괄안전도

최초 임상시험제품 치료 4주후에 피부자극도 및 임상화학적 검사, 기타 이상반응 발생 여부에 따라 다음과 같이 총괄안전도를 평가한다.

- 안전(4) : 시험제품에 의한 이상반응 없음
- 대체로 안전(3) : 경증의 이상반응은 있으나 투약을 중지할 정도는 아님
- 안전에 문제 있음(2) : 중등증의 이상반응이 있으나 투약을 중지할 정도는 아님
- 안전하지 않음(1) : 이상반응으로 인하여 투약을 중지함

## 16.3. 이상반응 및 임상검사치의 이상변동 평가

이상반응 또는 임상검사치의 이상변동이 시험제품 도포와 관련이 있음을 부인할 수 없을 때는 각 증상, 발현시기, 중증도, 처치, 치료 및 경과에 관하여 이상반응 발생보고서에 기재하여야 한다. 시험제품과의 관련성에 관하여 모든 이상반응은 다음의 3등급으로 판정한다.

- 관련 없음(No Relation) : 시험용 제품으로 인한 이상반응으로 판단되지 않으며 다른 원인에 의한 것임
- 관련이 있을 수 있음(Possible) : 시험용 제품으로 인한 일시적인 이상반응이며 임상증상에 별다른 영향을 미치지 않음
- 명백한 관련 있음(Definite) : 시험용 제품으로 인한 명백한 이상반응임

#### 16.4. 이상반응 보고방법

- 중대한 이상반응이 발생하는 경우에는 시험책임자는 계획서나 임상시험 자료집 등에서 즉시 보고하지 않아도 된다고 명기한 것을 제외한 모든 중대한 이상반응을 보고받은 후 24시간 이내에 임상시험 담당자에게 알려야 하고, 발생 5일 이내에 문서로 상세한 내용이 포함된 추가보고를 한다. 별도의 지시가 있을 때까지 시험용 제품에 대한 임상 시험을 중지하여야 한다.
- 의뢰자는 기타 관련된 시험자, 심사위원회 및 식품의약품안전청장에게 증대하고 예상하지 못한 모든 이상약물반응을 다음 각 호에서 정한 기간 내에 신속히 보고한다.
  1. 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고받거나 알게 된 날로부터 7일 이내. 다만, 이 경우 상세한 정보를 최초 보고일로부터 8일 이내에 추가로 보고한다.
  2. 다른 모든 증대하고 예상하지 못한 이상약물반응의 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고 받거나 알게 된 날로부터 15일 이내에 추가로 보고한다.
- 이상반응 발생으로 인하여 조기에 시험을 중지하여야 할 경우에는 이상반응 발생보고서를 작성하고 최종 임상화학적 검사를 실시한다.
- 담당자는 일단 이상반응이 발생한 피험자에 대하여는 그 이상반응 소실 여부에 관계없이 계속 신중히 관찰한다.

17. 피험자 동의서 양식 : 별첨 1과 같다.

18. 피해자 보상에 대한 규약 : 별첨 2와 같다.

19. 임상증상에 대한 기록용지 양식 : 별첨 3과 같다.

#### 20. 임상시험후 피험자의 진료 및 치료 기준

임상시험 중 중지되거나 탈락된 피험자에 대한 진료 및 치료는 일반적인 진료 및 치료 기준 원칙에 따른다. 즉, 환자의 상태나 의사에 따라 다른 종류의 약물요법을 시행하거나 대증요법 및 지지요법을 시행한다.

## 21. 피험자의 안전보호에 관한 대책 등

임상시험실시기관은 본 시험계획서에 규정된 대로 임상시험이 적절히 진행될 수 있도록 임상시험에 필요한 설비와 전문인력을 갖추고 피험자의 안전보호에 만전을 기하도록 한다. 임상시험담당자는 본 계획서에 명시된 이상반응 및 주의사항 등에 대하여 사전에 충분히 숙지하고 시험도중 적절한 조치를 취한 후 임상시험심사위원회 및 시험의뢰자에게 통보한다.

## 22. 기타 임상시험을 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항

### 22.1. 윤리적 요구사항

- 본 임상시험은 헬싱키선언, 임상시험관리기준(KGCP)에 근거하여 진행한다.

### 22.2. 환자동의

- 임상시험 담당자는 임상시험이 시작되기 전 대상자 선정기준 및 제외기준을 모두 만족시키는 환자를 대상으로 환자 및 그들의 보호자에게 시험에 관련된 모든 사항을 자세히 설명하고, 모든 예측가능한 결과에 대하여 알 수 있는 충분한 기회를 주어야 한다. 환자가 동의한 내용은 반드시 문서로 기록한다.

- 시험 담당자는 환자동의서에 서명하여 확인을 한다. 시험 담당자는 환자로 부터 동의를 얻기 전에는 임상시험만을 목적으로 특별한 검사를 하지 않는다.

### 22.3. 비밀보장

모든 환자명은 비밀을 유지하도록 한다. 서명을 받은 환자동의서는 시험책임자가 보관 한다. 시험책임자는 환자번호 및 환자명이 기록된 목록을 갖추어 놓아 나중에 기록을 찾을 수 있도록 한다.

### 22.4. 임상시험 모니터링

시험은 시험자료가 국내외에서 인정될 수 있도록 하기 위하여 시험의뢰자측에서 모니터링 및 감사를 실시할 수 있다.본 시험의 모니터링시에는 중례조사표가 완전하고 명확한지의 확인 및 시험담당자의 입회하에 대조검토가 필요하며 시험담당자는 언제든지 시험의뢰자에게 협조하여야 한다.

### 22.5. 시험결과의 기록 및 이용

#### (1) 시험결과의 기록

- 본 시험중에 수집된 모든 자료는 시험의뢰자가 제공한 중례조사표에 시험담당자가 기록하도록 한다.

- 임상시험 의뢰자는 임상시험 관련 자료들을 임상시험 종료 후 10년간, 임상시험 책임자는 5년간 보관하여야 한다.

- 중례조사표를 기입할 때는 흑색볼펜(연필이나 만년필은 사용하지 말 것) 으로 분명하고 알아볼 수

있도록 기록하여야 한다.

- 자료가 누락된 경우에는 시험담당자가 타당한 설명을 붙여야 한다.

- 기록이 끝난 증례조사표는 시험의뢰자에게 교부한다.

- 증례기록의 근거자료가 되는 진료기록을 다른 사람이나 단체에 교부할 경우에는 시험의뢰자에게 통보하여야 한다.

- 증례조사표에 기입한 내용을 수정하는 경우에는 원 기록을 알아볼 수 있도록 하여야 하고 수정날짜와 수정한 임상시험 담당자의 서명을 하여야 한다.

## (2) 시험결과의 이용

본 시험계획서에 서명함으로써 시험담당자는 본 시험의 결과를 등록, 발표 및 의약학 전문가들을 위한 정보제공 등의 목적으로 사용하는데 동의한 것이다.

본 시험의 결과를 학술잡지 또는 학회지에 발표하기 전에 시험의뢰자는 발표내용을 검토할 권리가 있다.

## 22.6. 임상시험계획서의 수정

임상시험책임자나 의뢰자 어느 쪽도 상대방의 동의 없이는 시험도중 본 임상시험계획서의 내용을 변경할 수 없다. 계획서의 내용을 변경하는 경우에는 모든 관련 당사자들이 서명하여 서면으로 동의하여야 한다.

## 23. 참고문헌

1. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 아토피 피부염. 피부과학 2001; 161-166
2. 김혜원, 박찬욱, 이철현, 이정옥. 한국인 아토피 피부염 환자에서 0.1% tacrolimus 연고의 치료 효과. 대한피부과학회지 2005 ; 43(3) : 312-319.
3. 김정희. 아토피피부염의 최신 지견. 소아알레르기 및 호흡기학회지 2004 ; 14(2) : 12-23.
4. 권지애, 노기영, 고보경, 김진우. 한국인 청장년기 아토피피부염 환자의 임상적 특징에 관한 연구. 대한피부과학회지 2004 ; 42(8) : 949-954.
5. 김명남, 신봉주, 탁우정, 노병인, 박애자. 아토피 피부염에서 말초 혈액내 호산구 수, 혈청 총 IgE, eosinophil cationic protein, IL-4 및 soluble E-selectin의 변화. 대한피부과학회지 2002 ; 40(11) : 1367-1373.
6. 윤화정, 고우신. 아토피 피부염 환자의 한의학적 유형분류에 대한 임상적 연구. 동의한의연 2001 ; 5(0) ; 43-57
7. 고보경, 이현정, 김동재, 하석준, 하혜정, 박영민, 변대규, 김진우. 아토피피부염 환자의 민간요법에 관한 연구. 대한피부과학회지 2001 ; 39(1) ; 16-21

## 별 첨

별 첨 1. 임상연구 참여 동의서 및 동의 설명서

별 첨 2. 피해자 보상에 대한 규약

별 첨 3. 증례조사표 (Case Report Form)

별첨 1. 임상연구 참여 동의서 및 동의 설명서

## 동 의 서

본인은 이번 임상연구에 참여하기에 앞서 다음 항목에 대하여 충분한 설명을 듣고 설명문을 받아 보았으며 연구의 목적과 방법을 정확하게 이해하였습니다.

연구의 목적: (아토피) 피부염 한방 콘키올린 소재제품을 1일 3회 이상 도포하는 경우 피부염 증상개선 및 체질과의 관련성을 평가하기 위함.

연구의 방법: 한방 콘키올린 소재제품을 환부에 하루 3회 이상, 총 4주간 도포 기대하는 효과: (아토피) 피부염에 대한 증상완화 예측되는 이상반응: 체질에 따른 가려움증, 발적, 발진 등의 악화 편의 제공

- 혈액검사(Eosinophil, IgE) 및 체질진단비 면제
- 한방 콘키올린 소재제품 제공
- 교통편 실비 지급

연구에 참여하더라도 언제든지 포기할 수 있고 포기하더라도 불이익을 받지 않는다는 사실

이에 본인은 자신의 자유로운 의사에 따라 본 연구에 참여함을 동의합니다.

년 월 일

성 명 : (인)  
주 소 :  
전화번호 :

보호자 또는 대리인 : (인)  
환자와의 관계 :  
주 소 :  
전화번호 :

본인은 본 연구의 내용에 대하여 환자 또는 보호자에게 성실하게 설명하였으며, 제기된 의문에 대하여 충분히 답변을 하였습니다. 본 연구과정에서 의사로서 환자에 대한 관리 의무를 충실히 하겠습니다.

년 월 일

담당의사 : (인)

## 동의 설명서

### 임상시험의 목적

본 연구의 목적은 (아토피) 피부염의 한방 콘키올린 소재제품을 1일 수회 도포하는 경우 피부염 증상개선 및 체질과의 관련성을 평가하기 위함 입니다

### 연구방법

한방 콘키올린 소재제품을 환부에 하루 수회, 총 4주간 도포합니다.

### 예측 효능·효과

(아토피)피부염에 대한 증상개선 및 완화입니다.

### 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항

- 예측되는 이상반응 : 때때로 국소의 가려움증, 발적, 발진 등을 일으킬 수 있습니다.
- 사용상의 주의사항
  - 1) 눈 및 점막에 사용하지 말 것.
  - 2) 피부에 손상이 있을 경우에 사용하면 일과성의 자극감이 있을 수 있으므로 주의할 것.

### 편의 제공

- 혈액검사(Eosinophil, IgE) 및 체질진단비 면제
- 화장품 제공
- 교통편 실비 지급

### 시험에의 참여동의 및 동의철회

본 시험에 참여할 것인가의 여부는 귀하의 자유의사에 따라 결정하여 주십시오.  
귀하가 시험참가에 동의하지 않더라도 치료에 전혀 불이익을 받지 않습니다.  
귀하는 시험기간 중 언제든지 시험참가를 중단할 수 있으며, 그 경우에는 담당 의사가 귀하의 질병을 치료하기 위하여 다른 적절한 약제를 처방하거나 치료법을 실시할 것입니다.

### 환자의 준수사항

본 한방 콘키올린 소재제품의 투여로 귀하의 증상이 개선되고 완화가 효과적으로 이루어지고, 정확한 과학적 연구에 기여하도록 하기 위하여 담당의사의 지시에 따르는 것이 매우 중요합니다.

본 시험 기간동안 제공되는 한방 콘키올린 소재제품 및 귀하의 담당의사가 인정한 약물 외의 다른 약물을 복용하거나 기타의 치료법을 받아서는 안 됩니다.

귀하가 시험참가 동의를 중단한 후라도 본 제품을 최종 도포한 날을 담당의사에게 알려주셔야 합니다.

본 시험화장품 도포기간 동안 예상치 못한 효과나 유해한 작용으로 의심되는 증상이 나타날 경우 즉시 담당의사에게 알려주시기 바랍니다.

### **피해발생시 보상 및 치료 대책**

귀하에게 본 임상시험에 참여한 결과로 직·간접적 손해가 발생되었을 경우, 귀하의 담당의사가 손해의 치료를 위하여 최선의 조치를 취할 것이며, 시험 의뢰자인 (주)서진바이오텍에서 모든 법률상의 책임을 부담할 것입니다.

### **자료보호**

모든 데이터는 엄격히 비밀이 유지되며 보호를 받게 됩니다. 귀하가 본 시험에 참가하기로 동의할 경우 본 시험을 통하여 귀하에 관하여 수집된 자료는 익명으로 다루어집니다. 본 연구의 결과는 학술적 논문 제출용으로만 이용될 것이며 개인의 비밀은 보호됩니다.

본 시험과 관련하여 의문사항이 있을 경우 언제라도 담당의사에게 문의하실 수 있습니다.

임상시험의뢰자 : (주)서진바이오텍 대표이사 김학주

임상시험담당의사 : \_\_\_\_\_



별 첨 2. 피해자 보상에 대한 규약

**피해자 보상에 대한 규약**

1) 원 칙

- ① (주)서진바이오텍은 환자의 신체적인 손상(사망포함)에 대하여 보상한다.
- ② 손상의 원인이 임상연구용 제품으로 인하여 발생하였을 때는 (주)서진바이오텍은 환자에게 보상한다.
- ③ 일시적 통증 또는 쉽게 치료될 수 있는 정도의 손상이 아니라 지속적이고 불구가 될 수 있을 정도의 보다 심각한 손상에 대해서만 보상한다.
- ④ 임상시험 제품에 의하여 생긴 부작용이나 부작용처리 과정에서 발생된 손상이 있는 경우, 임상시험용 제품이 직접적인 원인이 된 손상에 대하여 보상한다.

2) 다음 경우에는 보상하지 아니한다.

- ① (주)서진바이오텍의 후원 하에 집행되지 않았거나 (주)서진바이오텍이 제공하지 않은 의약품 등으로 발생한 부작용에 의한 손상
- ② 임상시험용 제품의 적응증에 대한 효과 또는 혜택을 제공하지 못하는데 대한 보상
- ③ 서로 합의한 임상시험계획서에서 이탈함으로써 야기된 손상
- ④ 환자의 부주의에 의하여 초래된 손상

3) 보상평가기준

- ① 보상수준은 손상의 본질, 그 정도, 지속성 여부 등에 적절한 액수여야 하며, 한국의 법정에 의하여 유사손상들에 대한 일반적으로 지급되는 것과 동일해야 한다.
- ② 보상수준에 대해서 환자와 의뢰자 사이에 이견이 있을 경우, 양자가 수용할 수 있는 전문가의 자문을 구하여야 한다.

우리 회사는 앞에서 언급한 제반내용을 참고하여, 환자가 본 시험에 의하여 어떠한 불이익도 받지 않도록 주의하며, 만약 본 임상시험에 의하여 문제점이 발생한 경우 피해자 보상규약에 의거하여 책임을 질 것을 서약합니다.

년 월 일

(연구피험자)

성 명: \_\_\_\_\_ (서명)

주민등록번호:

전 화:

(의뢰회사)

회사명: (주)서진바이오텍

직 명: 대표이사

성 명: 김 학 주 (인)

|                                     |
|-------------------------------------|
| <b>증례조사표<br/>(Case Report Form)</b> |
|-------------------------------------|

한방 콘키올린 소재제품의 피부염증상 개선 및  
체질과의 관련성에 대한 임상시험

|                   |  |
|-------------------|--|
| 병 원 명             |  |
| 피험자성명(영문이니셜)      |  |
| 환자 번호(Charter 번호) |  |
| 연 구 자 명           |  |

\* 기록상 주의점

1. 임상조사표는 흑색볼펜으로 기입해 주십시오.
2. 기록 수정시에는 원래 기재한 내용을 읽을 수 있게 한 줄은 그은 후 수정한 다음 날짜와 기록자의 날인을 기입해주십시오.

## 1. 관찰항목 및 임상검사 항목에 대한 Flow Chart

| 항 목          | 검 사 일 정 |         |        |
|--------------|---------|---------|--------|
|              | 치료전     | 치료 2주후  | 치료 4주후 |
| 환자동의서        | ○       |         |        |
| 신정기준/저외기준    | ○       |         |        |
| 환자배경 및 병력검사  | ○       |         |        |
| 체질 검사        | ○       |         |        |
| 일반신체 검사      | ○       |         | ○      |
| 임상 병리 검사     | ○       |         | ○      |
| 임상증상 검사      | ○       | ○       | ○      |
| 총관적 유효성 평가   |         |         | ○      |
| 순응도 검사       |         | ○       | ○      |
| 이상반응 조사      |         | ←—————→ |        |
| 안전성 평가       |         |         | ○      |
| 시험용 제품 배포    | ○       |         |        |
| 잔여 시험용 제품 수거 |         | ○       | ○      |

## 2. 피험자 방문일

|        | 예정일 | 방문일 |
|--------|-----|-----|
| 치료전 검사 |     | 월 일 |
| 치료 2주후 | 월 일 | 월 일 |
| 치료 4주후 | 월 일 | 월 일 |

### 3. 피험자의 선정기준 및 제외기준

| 선정기준   | 예 아니오* |   |
|--|--------|---|
| A. (아토피) 피부염의 진단기준 : 현재 국제적으로 통용되고 있는 1980년 Hanifin 과 Rajka의 진단기준을 근거로 주증상 중 3개 이상, 부증상 중 3개 이상의 임상증상이 있을 경우에 (아토피) 피부염으로 진단하였다. | ■      | ■ |
| B. 만 6세 - 40세 미만의 심하지 않은 (아토피) 피부염을 가진 남, 여 자원자  | ■      | ■ |
| C. Table 1.에 해당하는 조건을 가지고 있는 자   | ■      | ■ |
| C. 피험자 제외기준에 포함되지 않은 자   | ■      | ■ |
| D. 본 임상시험에 자의로 참여결정하고 동의서에 서명한 자   | ■      | ■ |
| E. 시험기간 동안 추적관찰이 가능한 자원자   | ■      | ■ |

\*Note : "아니오"에 해당하는 경우 탈락시킨다.

Table 1. (아토피) 피부염의 일반적인 증상의 변별기준

|   | ■ 濕 熱   | ■ 血 燥  |
|---|---|--|
| 홍반(erythema)  | ■ 홍반의 부위가 넓으며 홍반주변이 습윤한 경우가 많다.   | ■ 홍반의 부위가 좁으며 인설이 같이 있고 테선화의 양상도 볼 수 있다.                         |
| 경결(induration) 구진화(papulation)  | ■ 황색이나 홍색의 구진이 발생하며 크기는 다양하다. 미란과 삼출물이 혼재되어 있는 경우가 많다.                          | ■ 홍백색의 구진이 간혹 있으며 건조하거나 테선화가 같이 있는 경우가 많다.                       |
| 소양감(pruritus)   | ■ 심하며 열감을 동반한다. 땀을 흘린후 더 심해진다.  | ■ 극심하다. 반복 발작하는 경향이 있으며 야간에 더욱 심하다.                              |
| 찰상(excoriation)   | ■ 소양감으로 긁어서 생기며 황색의 삼출물 혹은 가피가 덮혀져 있고 습윤하다. 혈성의 삼출물도 있을 수 있으며 손상부위가 명확한 경우가 많다. | ■ 소양감으로 긁어서 발생하고 혈성의 가피 혹은 소량의 삼출물을 볼 수 있다. 손상부위가 명확하지 않고 광범위하다. |
| 테선화(lichenification)  | ■ 테선화의 양상이 없거나 미약하고 표면은 습윤하다.   | ■ 테선화의 양상이 많다.   |
| 인설(scaling) 건조(dryness)   | ■ 인설은 습윤하며 피부의 건조는 거의 없다.   | ■ 인설이나 피부의 건조가 심하다.  |
| 미란(erosion) 진물(oozing) 삼출물(weeping)   | ■ 미란이 자주 보이고 황색의 진물이나 삼출물을 관찰할 수 있다. 간혹 혈성 삼출물도 관찰할 수 있다. 악취가 날 수도 있다.          | ■ 미란보다는 찰상이 많으며 이로 인한 혈성 삼출물을 관찰할 수 있다.                          |
| <p>상기의 7가지 항목 중 두드러지게 띠는 항목이 5가지 이상일 경우 해당 변증으로 본다.</p> <p style="text-align: center;">■ 濕熱                      ■ 血燥</p> |   |  |

| 제외기준   | 예 | 아니오* |
|--|---|------|
| A. 심한 (아토피) 피부염이 있는 경우                             | ■ | ■    |
| B. 면역계에 영향을 미치는 특별한 치료제를 사용하고 있는 자                 | ■ | ■    |
| C. 조습착잡증(燥濕錯雜證)의 환자                                | ■ | ■    |
| D. 기울증(기울증, 스트레스성)의 환자                             | ■ | ■    |
| E. 계절 변화에 증상이 민감하게 변하는 자                           | ■ | ■    |
| F. 변증이 곤란한 자                                       | ■ | ■    |
| G. 기타 위의 사항들 외에 연구시험 책임자의 판단으로 연구수행이 곤란하다고 판단되는 경우 | ■ | ■    |

\*Note : "예"에 해당하는 경우 탈락시킨다.

연구 대상으로 적합성 여부 : ■적합 ■부적합

#### 4. 피험자의 배경 및 병력검사

|   |  |         |               |      |
|---|--|---------|---------------|------|
| 환 자 성 명   |  | 성 별     | ■남 ■여         |      |
| 나 이   | 만 세  | 생 년 월 일 | 년 월 일         |      |
| 체 중   | kg   | 신 장     | cm            |      |
| 진 단 명   |  | 이 병 기 간 | _____년_____개월 |      |
| <b>병력 및 기초질환</b><br><input type="checkbox"/> No<br><input type="checkbox"/> Yes | 관련기관   | 질환명     | 질환중증도         | 이병기간 |
|   | Circulatory  |         |               |      |
|   | Digestive  |         |               |      |
|   | Respiratory  |         |               |      |
|   | Nervous  |         |               |      |
|   | Muscular   |         |               |      |
|   | Genitourinary  |         |               |      |
|   | Endocrine  |         |               |      |
|   | Immune   |         |               |      |
|   | Hematopoietic  |         |               |      |
|   | Others   |         |               |      |
|   | * comment란에 질병의 진행여부 및 치료여부에 대해 자세히 기입해 주세요.<br><b>Comment :</b> |         |               |      |
| <b>병용약제</b><br><input type="checkbox"/> No<br><input type="checkbox"/> Yes      | 약제명  | 투여경로    | 1일 투여량        | 투여기간 |
|   |  |         |               |      |
|   |  |         |               |      |
|   |  |         |               |      |
|   |  |         |               |      |
| * comment란에 질병의 진행여부 및 치료여부에 대해 자세히 기입해 주세요.<br><b>Comment :</b>                |  |         |               |      |

## 5. 일반신체검사

| 항목                 | 치료전 검사      | 치료 4주후      |
|--------------------|-------------|-------------|
| Appearance         | ■정상    ■비정상 | ■정상    ■비정상 |
| Head               | ■정상    ■비정상 | ■정상    ■비정상 |
| Eyes               | ■정상    ■비정상 | ■정상    ■비정상 |
| Ears, Nose, Throat | ■정상    ■비정상 | ■정상    ■비정상 |
| Neck               | ■정상    ■비정상 | ■정상    ■비정상 |
| Lymph Nodes        | ■정상    ■비정상 | ■정상    ■비정상 |
| Lung               | ■정상    ■비정상 | ■정상    ■비정상 |
| Heart              | ■정상    ■비정상 | ■정상    ■비정상 |
| Abdomen            | ■정상    ■비정상 | ■정상    ■비정상 |
| Musculo-skeletal   | ■정상    ■비정상 | ■정상    ■비정상 |
| Neurological       | ■정상    ■비정상 | ■정상    ■비정상 |
| Comment :          |             |             |

## 6-1. 1차 유효성 평가

- SCORAD INDEX 에 의한 객관적 병변 상태의 평가 -

치료전(점수 : )

■ 부위 및 병변 상태의 점수표

(점수 : 부위별 0 = 0%    1 = 10%이하    2=10-30%    3=30%이상)

| 신체부위별 항목           | 점수 |
|--------------------|----|
| 두피(scalp)          |    |
| 얼굴(face-목을 포함)     |    |
| 전면 체간(Ant. trunk)  |    |
| 후면 체간(Post. trunk) |    |
| 팔(arms-손목이상)       |    |
| 손(hand-손목이하)       |    |
| 둔부(buttock)        |    |
| 다리(leg-무릎과 발을 제외)  |    |
| 무릎(knee-슬와포함)      |    |
| 발(feet-발목이하)       |    |

■ 병변 부위의 객관적 증상에 대한 점수표

증상별 0=없음    1=경증(mild)    2=중증도(moderate)    3=중증(severe)

| (아토피) 피부염 병변의 심한정도                    | 점수 |
|---------------------------------------|----|
| 홍반(erythema)                          |    |
| 경결(induration), 구진화(papulation)       |    |
| 소양감(pruritus)                         |    |
| 찰상(excoriation)                       |    |
| 태선화(lichenification)                  |    |
| 인설(scaling), 건조(dryness)              |    |
| 미란(erosion), 진분(oozing), 삼출분(weeping) |    |



치료2주후(점수 : )

■ 부위 및 병변 상태의 점수표

(점수 : 부위별 0 = 0% 1 = 10%이하 2=10-30% 3=30%이상)

| 신체부위별 항목           | 점수 |
|--------------------|----|
| 두피(scalp)          |    |
| 얼굴(face-복을 포함)     |    |
| 전면 체간(Ant. trunk)  |    |
| 후면 체간(Post. trunk) |    |
| 팔(arms-손목이상)       |    |
| 손(hand-손목이하)       |    |
| 둔부(buttock)        |    |
| 다리(leg-무릎과 발을 제외)  |    |
| 무릎(knee-슬와포함)      |    |
| 발(feet-발목이하)       |    |

■ 병변 부위의 객관적 증상에 대한 점수표

증상별 0=없음 1=경중(mild) 2=중중도(moderate) 3=중중(severe)

| (아토피) 피부염 병변의 심한정도                    | 점수 |
|---------------------------------------|----|
| 홍반(erythema)                          |    |
| 경결(induration), 구진화(papulation)       |    |
| 소양감(pruritus)                         |    |
| 찰상(excoriation)                       |    |
| 태신화(lichenification)                  |    |
| 인설(scaling), 건조(dryness)              |    |
| 미란(erosion), 진물(oozing), 삼출물(weeping) |    |

치료4주후(점수 : )

■ 부위 및 병변 상태의 점수표

(점수 : 부위별 0 = 0% 1 = 10%이하 2=10-30% 3=30%이상)

| 신체부위별 항목           | 점수 |
|--------------------|----|
| 두피(scalp)          |    |
| 얼굴(face-복을 포함)     |    |
| 전면 체간(Ant. trunk)  |    |
| 후면 체간(Post. trunk) |    |
| 팔(arms-손목이상)       |    |
| 손(hand-손목이하)       |    |
| 둔부(buttock)        |    |
| 다리(leg-무릎과 발을 제외)  |    |
| 무릎(knee-슬와포함)      |    |
| 발(feet-발목이하)       |    |

■ 병변 부위의 객관적 증상에 대한 점수표

증상별 0=없음 1=경중(mild) 2=중중도(moderate) 3=중중(severe)

| (아토피) 피부염 병변의 심한정도                    | 점수 |
|---------------------------------------|----|
| 홍반(erythema)                          |    |
| 경결(induration), 구진화(papulation)       |    |
| 소양감(pruritus)                         |    |
| 찰상(excoriation)                       |    |
| 태선화(lichenification)                  |    |
| 인설(scaling), 건조(dryness)              |    |
| 미란(erosion), 진물(oozing), 삼출물(weeping) |    |

## 6-2. 2차 유효성 평가

### - 1. 환자의 주관적 호소 증상에 대한 평가 -

#### 치료전(점수 : )

주관적인 소양감

- 0: 전혀 굶지 않음
- 1: 굶으나 수면장애는 없음
- 2: 소양감으로 수면장애가 가끔 있음
- 3: 소양감으로 인해 하루에 2번 이상의 수면장애가 있음

#### 치료2주후(점수 : )

주관적인 소양감

- 0: 전혀 굶지 않음
- 1: 굶으나 수면장애는 없음
- 2: 소양감으로 수면장애가 가끔 있음
- 3: 소양감으로 인해 하루에 2번 이상의 수면장애가 있음

#### 치료4주후(점수 : )

주관적인 소양감

- 0: 전혀 굶지 않음
- 1: 굶으나 수면장애는 없음
- 2: 소양감으로 수면장애가 가끔 있음
- 3: 소양감으로 인해 하루에 2번 이상의 수면장애가 있음

- 2. 혈액학적 검사(Eosinophil, IgE) -

| 검사일(년/월/일) | 치료전 | 치료4주후 |
|------------|-----|-------|
|            | / / | / /   |
| Eosinophil |     |       |
| IgE        |     |       |

- 총괄적 유효성 평가 -

\* 해당점수를 기입하십시오.

| 총괄적 유효성 평가 | 피험자  | 담당자 |
|------------|--|-----|
|            |  |     |
| 평가기준       | 1. : 증상이 없어졌음<br>2. : 전반적으로 증상이 뚜렷이 좋아짐<br>3. : 전반적으로 증상이 약간 좋아짐<br>4. : 투여전과 증상의 변화가 없음<br>5. : 투여전보다 증상이 나빠짐 |     |

## 7. 순응도 검사

|                        | 치료 2주후                     | 치료 4주후                     |
|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 도포 후 남은<br>용량 조사       | ■없음<br>■있음<br>(        g)  | ■없음<br>■있음<br>(        g)  |
| 명용 약품 변동조사<br>(투여전과차이) | ■없음<br>■있음<br>(아래에 자세히 기록) | ■없음<br>■있음<br>(아래에 자세히 기록) |

### 명용 약품 변동 조사

|           |   |     | 치료 2주후 | 치료 4주후 |
|-----------|---|-----|--------|--------|
| 중단한 경우    | 1 | 약품명 |        |        |
|           |   | 사용량 |        |        |
|           |   | 중단일 |        |        |
|           | 2 | 약품명 |        |        |
|           |   | 사용량 |        |        |
|           |   | 중단일 |        |        |
|           | 3 | 약품명 |        |        |
|           |   | 사용량 |        |        |
|           |   | 중단일 |        |        |
| 새로 투약한 경우 | 1 | 약품명 |        |        |
|           |   | 사용량 |        |        |
|           |   | 개시일 |        |        |
|           | 2 | 약품명 |        |        |
|           |   | 사용량 |        |        |
|           |   | 개시일 |        |        |
|           | 3 | 약품명 |        |        |
|           |   | 사용량 |        |        |
|           |   | 개시일 |        |        |

## 8. 안전성 평가

- 피부자극도 -

■ 없 음                      ■ 있 음

| 증 상          | 발 현 일  | 정 도*  | 처 치 방 법 | 처치 후<br>소실여부<br>(소실:○ 비소실■) | 소 실 일 | 중단여부 |    |
|--------------|--|-------|---------|-----------------------------|-------|------|----|
|              |  |       |         |                             |       | 중단   | 계속 |
|              | / /  | 1 2 3 |         |                             | / /   |      |    |
|              | / /  | 1 2 3 |         |                             | / /   |      |    |
|              | / /  | 1 2 3 |         |                             | / /   |      |    |
|              | / /  | 1 2 3 |         |                             | / /   |      |    |
| *기준<br>(3단계) | 1. 경 증(mild) : 발적 및 부종이 약간 있음<br>2. 중등도(moderate) : 발적이 있으며 1mm 이하의 부종이 있음<br>3. 중 증(severe) : 심한 발적이 있으며 1mm이상의 심한 부종이 있음 |       |         |                             |       |      |    |

-기타 이상반응-

■ 없 음                      ■ 있 음

| 증 상           | 발 현 일  | 정 도*  | 처치<br>방법              | 처치 후<br>소실여부<br>(소실:○ 비소실■) | 소 실 일 | 시험화장품과의<br>관련성** | 중단여부 |    |
|---------------|--|-------|-----------------------|-----------------------------|-------|------------------|------|----|
|               |  |       |                       |                             |       |                  | 중단   | 계속 |
|               | / /  | 1 2 3 | comment 라인에<br>자세히 기입 |                             | / /   | 1 2 3            |      |    |
|               | / /  | 1 2 3 |                       |                             | / /   | 1 2 3            |      |    |
|               | / /  | 1 2 3 |                       |                             | / /   | 1 2 3            |      |    |
|               | / /  | 1 2 3 |                       |                             | / /   | 1 2 3            |      |    |
| comment       |  |       |                       |                             |       |                  |      |    |
| *기준<br>(3단계)  | 1. 경 증(mild) : 잘 인지될 수 없는 정도의 약간 불편한 증상<br>2. 중등도(moderate) : 명확한 증상은 있으나 별다른 처치가 필요 없음<br>3. 중 증(severe) : 매우 불편하여 신속한 처리를 요함   |       |                       |                             |       |                  |      |    |
| **기준<br>(3단계) | 1. 관련없음(NO Relation): 시험용 제품으로 인한 이상반응으로 판단되지 않으며 다른 원인에 의한 것임<br>2. 관련이 있을 수 있음(Possible): 시험용 제품으로 인한 일시적인 이상반응이며 임상증상에 별다른 영향을 미치지 않음<br>3. 명백한 관련이 있음(Definite): 시험용 제품으로 인한 명백한 이상반응임 |       |                       |                             |       |                  |      |    |

## 9. 시험 조기 중지 보고서

계획된 시험 종료일 이전에 치료를 중단하게 된 피험자에 대하여 작성

최종 시험용 제품 사용일 :       년       월       일

중지 및 탈락 사유

| 분류                           | 기준  | 평가유무                               |
|------------------------------|---|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 중지자 | <input type="checkbox"/> 임상시험용 제품과 '관련없음'으로 판정한 이상반응으로 인하여 조기에 시험을 중지한 경우<br><input type="checkbox"/> 임상시험용 제품과의 관련성이 명백하지 않은 기타의 이유로 조기에 시험을 중지한 경우<br><input type="checkbox"/> 임상시험계획서를 심하게 벗어난 경우(예를 들면, 검사를 받지 않거나 계획된 일정을 따르지 않는 경우, 더 이상의 투약을 거부하는 경우 ) | 최종 분석시<br>안전성 평가에<br>포함시킴          |
| <input type="checkbox"/> 탈락자 | <input type="checkbox"/> 임상시험용 제품과 '관련이 있을 수 있음' 또는 '명백한 관련 있음'으로 판정된 이상반응으로 시험을 중지한 경우<br><input type="checkbox"/> 효과가 없어(증상이 중중이거나 악화하여) 조기에 시험을 중지한 경우   | 최종 분석시<br>유효성 및<br>안전성 평가에<br>포함시킴 |

처리방법 : 중지자 및 탈락자에 대하여 다음과 같은 처리가 이루어졌는지 확인하십시오.

- 조기 시험 중지 보고서 작성
- 최종 일반 신체검사 및 임상화학적 검사(부작용의 경우만 해당) 실시
- 이상반응의 경우, 이상반응 발생 보고서 작성
- 중대한 이상반응의 경우,  
 담당자 - 연구책임자 및 의뢰자에게 통지  
 연구책임자 - 임상시험위원회 및 의뢰자에게 보고
- 환자 증례조사표 및 잔여 시험용 제품을 의뢰자에게 송부
- 탈락자의 경우 시험 4주후 평가항목을 모두 실시
- 중지자의 경우 시험 4주후 안전성 평가항목을 실시

기타의견

담당의사 성명 및 날인

(       년       월       일)

# 굴 폐각 유래 항염증제의 여드름 개선효과에 대한 임상시험

2008년 10월

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터



## 목 차

1. 임상시험의 명칭
2. 임상시험 실시기관명 및 주소
3. 임상시험 책임자, 담당자 및 공동연구자의 성명 및 직명
4. 임상시험 의뢰자명 및 주소
5. 임상시험의 목적
6. 임상시험에 사용되는 한방\*\*소재제품
  - 6.1. 임상시험용(한방\*\*소재제품)
    - (1) 주성분명, 원료약품 및 그 분량
    - (2) 제형 및 성상
  - 6.2. 대조약
  - 6.3. 보관방법
  - 6.4. 획득방법
7. 대상질환
8. 피험자의 선정기준, 제외기준, 목표한 피험자의 수 및 그 근거
  - 9.1. 선정기준
  - 9.2. 제외기준
9. 임상시험 기간
10. 임상시험 방법
  - 10.1. 투여량 및 투여방법
  - 10.2. 투여기간
  - 10.3. 병용요법
11. 관찰항목, 임상검사항목 및 관찰검사 방법
  - 11.1. 항목 및 일정
  - 11.2. 관찰 및 검사 방법
    - (1) 환자의 배경 및 병력
    - (2) 일반 신체 검사
    - (3) 체질검사
    - (4) 임상 병리 검사
    - (5) 임상증상 검사
    - (6) 이상반응 평가
12. 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항
  - 12.1. 예측 이상반응
  - 12.2. 사용상의 주의사항
13. 시험중지, 탈락 기준
  - 13.1. 중지자

- 13.2. 탈락자
- 13.3. 중지자 및 탈락자 처리 기준
- 14. 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법 (통계분석방법)
  - 14.1. 1차 유효성 평가변수
    - (1) 평가변수
    - (2) 평가시기
    - (3) 평가방법
  - 14.2. 2차 유효성 평가변수
    - (1) 평가변수
    - (2) 평가시기
    - (3) 평가방법
  - 14.3. 해석방법 (통계분석방법)
- 15. 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법
  - 15.1. 이상반응의 정의
  - 15.2. 안전성 평가기준 및 평가방법
  - 15.3. 이상반응 및 임상검사치의 이상변동 평가
  - 15.4. 이상반응의 보고방법
- 16. 피험자 동의서 양식
- 17. 피해자 보상에 대한 규약
- 18. 임상증상에 대한 기록용지 양식
- 19. 임상시험후 피험자의 진료 및 치료 기준
- 20. 피험자의 안전보호에 관한 대책 등
- 21. 기타 임상시험을 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항
  - 21.1. 윤리적 요구사항
  - 21.2. 환자동의
  - 21.3. 비밀보장
  - 21.4. 임상시험모니터링
  - 21.5. 시험결과의 기록 및 이용
    - (1) 시험결과의 기록
    - (2) 시험결과의 이용
  - 21.6. 임상시험계획서의 수정

별첨 1. 임상연구 참여 동의서 및 동의 설명서

별첨 2. 중례조사표 (Case Report Form)

## 1. 임상시험의 명칭 및 단계

굴 패각 유래 항염증제의 여드름 개선효과에 대한 임상시험

## 2. 임상시험 실시기관명 및 주소

- 실시기관명 : 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터
- 주 소 : 충북 제천시 신월동 산 21-11

## 3. 임상시험 책임자, 담당자 및 공동연구자의 성명 및 직명

- 임상시험 책임자 : 김이화, 한의학박사, 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터
- 임상시험 담당자 : 피부과 전문의 백종현, 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터  
김용민, 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터  
이정현, 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

## 4. 임상시험 의뢰자명 및 주소

- 의뢰자명 : (주)서진바이오텍
- 주 소 : 경기도 수원시 영통구 매탄3동 489-2번지 큐피디텍빌딩 3층  
(주)서진바이오텍

## 5. 임상시험의 목적

4주 동안 경증에서 경중 중 여드름 염증에 대한 예방과 치료를 가지는 굴 패각유래 항염증 제품의 여드름 개선효과 및 안전성 평가를 목적으로 한다.

## 6. 임상시험에 사용되는 제품

### 6.1. 임상시험용 제품

- (1) 주성분명, 원료약품 및 그 분량  
굴 패각에서 추출한 항염증제를 주약재로 하는 제품
- (2) 제형 및 성상 :  
W/S type 제품

### 6.2. 대조약 : 없음

### 6.3. 보관방법 : 시험용제품은 실온에서 기밀용기에 보관한다.

6.4. 획득방법 : 시험용제품은 (주)서진바이오텍으로부터 무상으로 제공된다.

## 7. 대상질환

여드름

## 8. 피험자의 선정기준, 제외기준

### 8.1. 선정기준

- A. 신체 건강한 남/여성
- B. 나이: 20-35세
- C. 경증/경중도/여드름이 있는 자(GAGS grade 에서 1-30해당)
- D. 연구기간 동안 방문일정이 가능하고 인체 동의서에 서명하며 연구지시를 따를 수있는 자

### 8.2. 제외기준

- A. 화장품, 의약품에 자극이나 알러지가 있는 경우
- B. 실험을 시작하기 전이나 실험 중, 28일이내에 면역억제제를 복용한 경우.
- C. 얼굴용 국소 여드름 치료제를 실험을 시작하기 한달 전 동안 혹은 실험하는 동안 사용한 경우.
- D. 실험 시작 전이나 실험 중, 염증반응에 대해 효과가 있는 것으로 알려져 용인된 체계적인 약물치료법 혹은 치료법을 처치 받은 경우.
- E. 실험을 시작하기 전적 달 내에 로아큐틴 성분을복용한 경우
- F. 정해진 날짜에 해당되는 지속적인 방문 혹은 연구자의 판단과 상충되는 의료적 조건에 부합하는 경우 혹은, 부적합한 피험자가 될 가능성이 있는 경우.
- G. 임신 중, 수유 중, 혹은 실험 기간 동안 임신할 가능성이 있는 경우.

## 9. 임상시험 기간

2008.( 9)월 (14)일-2009.( 9)월.(13)일

## 10. 임상시험 방법

### 10.1. 투여량 및 투여방법

전향적, 개방적(prospective open study)으로 여드름이 있는 피험자에게 한방\*\*소재 제품을 제공하여 매일 수시로 환부에 도포하게 하고 심한 소양증시 도포를 중지하고 임상시험 담당연구 책임자와 상담하도록 하되, 개인적으로 국소 혹은 전신 스테로이드 제제의 도포나 복용은 금한다.

### 10.2. 투여기간

4주간으로 한다.

## 11. 관찰항목, 임상검사항목 및 관찰검사 방법



## 12. 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항

### 12.1. 예측 이상반응

국소 또는 시험부위의 홍반, 부종, 건조, 인설의 증상이 발생할 수 있음

### 12.2. 사용상의 주의사항

- 1) 눈 및 점막에 사용하지 말 것.
- 2) 피부에 손상이 있을 경우에 사용하면 일과성의 자극감이 있을 수 있으므로 주의할 것.

## 13. 시험중지, 탈락 기준

### 13.1. 중지자

다음에 해당하는 경우는 ‘중지자’로 분류한다.

- A. 담당자가 임상시험용 제품과 ‘관련없음’으로 판정한 이상반응으로 인하여 조기에 시험을 중지한 경우
- B. 시험용 제품과 관련성이 명백하지 않은 기타의 이유로 조기에 시험을 중지한 경우
- C. 임상시험 계획서를 심하게 벗어난 경우(예를 들면, 검사를 받지 않거나 계획된 일정을 따르지 않는 경우, 더 이상의 투약을 거부하는 경우)

‘중지자’에 해당하는 피험자는 다른 피험자로 내치하며 임상시험 계획서에 따라 임상시험을 실시한다.

### 13.2. 탈락자

다음에 해당하는 경우는 ‘탈락자’로 분류하고 최종 분석 평가시에 ‘악화’로 판정한다.

- A. 담당자가 임상시험제품과 ‘관련이 있을 수 있음’ 또는 ‘명백한 관련이 있음’으로 판정한 이상반응으로 인하여 조기에 시험을 중지한 경우
- B. 효과가 없어(증상이 중증이거나 악화되어) 조기에 시험을 중지한 경우

‘탈락자’는 새로운 피험자로 대체될 수 없다.

### 13.3. 중지자 및 탈락자 처리 방법

중지자 및 탈락자가 발생한 경우 다음과 같이 처리한다.

- A. 조기 시험 중지 보고서 작성
- B. 이상반응에 의한 경우라면 이상반응 발생 보고서 작성
- C. 중대한 이상반응이 발생한 경우에는 담당자가 보고받은 후 24시간 이내에 연구책임자 및 의뢰자에게 통지하고, 발생 5일 이내에 문서로 상세한 내용이 포함된 추가보고를 한다.
- D. 환자증례조사표 및 잔여 시험화장품을 의뢰자에게 송부
- E. 중지자의 경우는 안전성 평가에 포함시킨다.
- F. 탈락자의 경우는 4주후 평가항목을 평가한다.

- G. 모든 탈락자는 총괄적 유효성 평가 시 판정하지 않고, 탈락하기 이전까지의 안전성으로써 총괄안전도를 판정한다. 그 중 이상반응에 의한 탈락이라면 총괄안전도 평가 시에 ‘안전하지 않음’으로 평가한다.
- H. 중지·탈락자에 대한 차후의 치료에 대하여는 담당자의 판단에 따른다.

## 14. 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법(통계분석방법)

### 14.1. 1차 유효성 평가변수

#### (1) 평가변수

- GAGS GRADE 에 의한 객관적 병변 상태의 평가

#### (2) 평가시기

- 치료전 및 치료후 매2주 방문시마다 GAGS GRADE에 따라 평가하고 해당 점수를 중례조사표에 기록한다.

#### (3) 평가방법

- 아래 표에 대해 연구원 1인에 의해 전체 환자의 상태를 객관적으로 판단하여 기재하도록 한다.

표. Global acne grading system(GAGS)

| Location |           |   |
|----------|-----------|---|
| I.       | 이마        | 2 |
| II.      | 우측 뺨      | 2 |
| III.     | 좌측 뺨      | 2 |
| IV.      | 코         | 1 |
| V.       | 턱         | 1 |
| VI.      | 가슴 및 상부 등 | 3 |

\* Grade 0, 병변없음

Grade 1, 1개이상의 면포(comedone);      Grade 2, 1개이상의 구진(papule);

Grade 3, 1개이상의 농포(pustule);      Grade 4, 1개이상의 절절(nodule)

### 14.2. 2차 유효성 평가변수

#### (1) 평가변수

- 피험자의 유분량에 대한 기기적 평가

피부의 유분량은 Sebumeter (Sebumeter 810 PC, Courage & Khazaka, Germany)를 이용하여

측정하였다. 피험자의 방문(0주, 4주, 8주)시 이마와 좌측코에서 유분량을 3회 연속 측정하여 평균값을 측정치로 정하였다.

### (2) 평가시기

- 치료전 및 치료후 매2주 방문시마다 평가하고 해당 점수를 증례조사표에 기록한다.

### (3) 평가방법

- Sebumeter (Sebumeter 810 PC, Courage & Khazaka, Germany)를 이용하여 이마와 좌측코에서 유분량을 3회 연속 측정하여 평균값을 측정치로 정하였다.

## 14.3. 해석방법(통계분석방법)

본 분석을 위하여 이용하는 통계 패키지는 SPSS Window. version 10.0이며, 통계적 유의성을 위해 유의수준은 0.05로 설정하고, 분석을 위하여 이용되는 통계적 방법은 아래와 같다.

- 전체 피험자의 baseline characteristics은 동질성검사를 위하여 frequency analysis 및 descriptive analysis로 분석한다.
- 1차 유효성 평가변수 및 2차 유효성 평가변수 처치 전후 수치 비교를 위해 Wilcoxon signed rank test를 이용한다.
- 총괄안전도 분석은 chi-square test를 이용하여 분석한다.

## 15. 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법

### 15.1. 이상반응의 정의

‘이상반응’이란 임상시험에 사용되는 제품을 투여 받은 피험자에서 발생한 바람직하지 않고 의도되지 않은 증후(sign), 증상(symptom), 질병(disease) 등으로 임상 병리 검사에서 의학적으로 이상치로 나타나는 경우를 포함한다.

### 15.2. 안전성 평가기준 및 평가방법

#### (1) 피부자극도

시험용 제품 도포부위의 홍반과 부종의 정도에 따라 다음과 같이 3등급으로 평가한다.

- 경증(Mild) : 홍반 및 부종이 약간 있음
- 중등증(Moderate) : 홍반이 있으며 1mm 이하의 부종이 있음
- 중증(Severe) : 심한 홍반이 있으며 1mm 이상의 심한 부종이 있음

#### (2) 기타 이상반응

피부자극외의 이상반응 정도는 의학적 기준에 따라 다음의 3등급으로 평가한다.



- 경증(Mild) : 잘 인지될 수 없을 정도의 약간 불편한 증상
- 중등증(Moderate) : 명확한 증상은 있으나 별다른 처치가 필요 없음
- 중증(Severe) : 매우 불편하여 신속한 처리를 요함

- 중증(severe)이상반응은 ‘중대한 이상반응’과는 구별된다.

\* 중대한 이상반응 : 임상시험에 사용되는 제품의 임의의 용량에서 발생한 이상반응 또는 이상약물 반응 중에서 다음에 해당하는 경우

1. 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우
2. 입원 또는 입원기간의 연장이 필요한 경우
3. 지속적 또는 의미 있는 불구나 기능저하를 초래하는 경우
4. 신천적 기형 또는 이상을 초래하는 경우

### (3) 총괄안전도

최초 임상시험제품 치료 4주후에 피부자극도 및 임상화학적 검사, 기타 이상반응 발생 여부에 따라 다음과 같이 총괄안전도를 평가한다.

- 안전(4) : 시험제품에 의한 이상반응 없음
- 대체로 안전(3) : 경증의 이상반응은 있으나 투약을 중지할 정도는 아님
- 안전에 문제 있음(2) : 중등증의 이상반응이 있으나 투약을 중지할 정도는 아님
- 안전하지 않음(1) : 이상반응으로 인하여 투약을 중지함

### 15.3. 이상반응 및 임상검사치의 이상변동 평가

이상반응 또는 임상검사치의 이상변동이 시험제품 도포와 관련이 있음을 부인할 수 없을 때는 각 증상, 발현시기, 중증도, 처치, 치료 및 경과에 관하여 이상반응 발생보고서에 기재하여야 한다. 시험제품과의 관련성에 관하여 모든 이상반응은 다음의 3등급으로 판정한다.

- 관련 없음(No Relation) : 시험용 제품으로 인한 이상반응으로 판단되지 않으며 다른 원인에 의한 것임
- 관련이 있을 수 있음(Possible) : 시험용 제품으로 인한 일시적인 이상반응이며 임상 증상에 별다른 영향을 미치지 않음
- 명백한 관련 있음(Definite) : 시험용 제품으로 인한 명백한 이상반응임

### 15.4. 이상반응 보고방법

- 중대한 이상반응이 발생하는 경우에는 시험책임자는 계획서나 임상시험 자료집 등에서 즉시 보고하지 않아도 된다고 명기한 것을 제외한 모든 중대한 이상반응을 보고받은 후 24시간 이내에 임상시험 담당자에게 알려야 하고, 발생 5일 이내에 문서로 상세한 내용이 포함된 추가보고를 한다. 별도의 지시가 있을 때까지 시험용 제품에 대한 임상 시험을 중지하여야 한다.

- 의뢰자는 기타 관련된 시험자, 심사위원회 및 식품의약품안전청장에게 중대하고 예상하지 못한 모든 이상약물반응을 다음 각 호에서 정한 기간 내에 신속히 보고한다.
  1. 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고받거나 알게 된 날로부터 7일 이내. 다만, 이 경우 상세한 정보를 최초 보고일로부터 8일 이내에 추가로 보고한다.
  2. 다른 모든 중대하고 예상하지 못한 이상약물반응의 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고 받거나 알게 된 날로부터 15일 이내에 추가로 보고한다.
- 이상반응 발생으로 인하여 조기에 시험을 중지하여야 할 경우에는 이상반응 발생보고서를 작성하고 최종 임상화학적 검사를 실시한다.
- 담당자는 일단 이상반응이 발생한 피험자에 대하여는 그 이상반응 소실 여부에 관계없이 계속 신중히 관찰한다.

16. **피험자 동의서 양식** : 별첨 1과 같다.

17. **피해자 보상에 대한 규약** : 별첨 2와 같다.

18. **임상증상에 대한 기록용지 양식** : 별첨 3과 같다.

## 19. 임상시험후 피험자의 진료 및 치료 기준

임상시험 중 중지되거나 탈락된 피험자에 대한 진료 및 치료는 일반적인 진료 및 치료 기준 원칙에 따른다. 즉, 환자의 상태나 의사에 따라 다른 종류의 약물요법을 시행하거나 내중요법 및 지지요법을 시행한다.

## 20. 피험자의 안전보호에 관한 대책 등

임상시험실시기관은 본 시험계획서에 규정된 대로 임상시험이 적절히 진행될 수 있도록 임상시험에 필요한 설비와 전문인력을 갖추고 피험자의 안전보호에 만전을 기하도록 한다. 임상시험담당자는 본 계획서에 명시된 이상반응 및 주의사항 등에 대하여 사전에 충분히 숙지하고 시험도중 적절한 조치를 취한 후 임상시험심사위원회 및 시험의뢰자에게 통보한다.

## 21. 기타 임상시험을 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항

### 21.1. 윤리적 요구사항

- 본 임상시험은 헬싱키선언, 임상시험관리기준(KGCP)에 근거하여 진행한다.

## 21.2. 환자동의

- 임상시험 담당자는 임상시험이 시작되기 전 대상자 선정기준 및 제외기준을 모두 만족시키는 환자를 대상으로 환자 및 그들의 보호자에게 시험에 관련된 모든 사항을 자세히 설명하고, 모든 예측가능한 결과에 대하여 알 수 있는 충분한 기회를 주어야 한다. 환자가 동의한 내용은 반드시 문서로 기록한다.
- 시험 담당자는 환자동의서에 서명하여 확인을 한다. 시험 담당자는 환자로 부터 동의를 얻기 전에는 임상시험만을 목적으로 특별한 검사를 하지 않는다.

## 21.3. 비밀보장

모든 환자명은 비밀을 유지하도록 한다. 서명을 받은 환자동의서는 시험책임자가 보관한다. 시험책임자는 환자번호 및 환자명이 기록된 복록을 갖추어 놓아 나중에 기록을 찾을 수 있도록 한다.

## 21.4. 임상시험 모니터링

시험은 시험자료가 국내외에서 인정될 수 있도록 하기 위하여 시험의뢰자측에서 모니터링 및 감사를 실시할 수 있다.

본 시험의 모니터링시에는 증례조사표가 완전하고 명확한지의 확인 및 시험담당자의 임회하에 대조검토가 필요하며 시험담당자는 언제든지 시험의뢰자에게 협조하여야 한다.

## 21.5. 시험결과의 기록 및 이용

### (1) 시험결과의 기록

- 본 시험 중에 수집된 모든 자료는 시험의뢰자가 제공한 증례조사표에 시험담당자가 기록하도록 한다.
- 임상시험 의뢰자는 임상시험 관련 자료들을 임상시험 종료 후 5년간, 임상시험 책임자는 5년간 보관하여야 한다.
- 증례조사표를 기입할 때는 흑색볼펜(연필이나 만년필은 사용하지 말 것) 으로 분명하고 알아볼 수 있도록 기록하여야 한다.
- 자료가 누락된 경우에는 시험담당자가 타당한 설명을 붙여야 한다.
- 기록이 끝난 증례조사표는 시험의뢰자에게 교부한다.
- 증례기록의 근거자료가 되는 진료기록을 다른 사람이나 단체에 교부할 경우에는 시험의뢰자에게 통보하여야 한다.
- 증례조사표에 기입한 내용을 수정하는 경우에는 원 기록을 알아볼 수 있도록 하여야 하고 수정날짜와 수정한 임상시험 담당자의 서명을 하여야 한다.

### (2) 시험결과의 이용

본 시험계획서에 서명함으로써 시험담당자는 본 시험의 결과를 등록, 발표 및 의약학 전문가들을 위한 정보제공 등의 목적으로 사용하는데 동의한 것이다.

본 시험의 결과를 학술잡지 또는 학회지에 발표하기 전에 시험의뢰자는 발표내용을 검토할 권리가 있다.

## 21.6. 임상시험계획서의 수정

임상시험책임자나 의뢰자 어느 쪽도 상대방의 동의 없이는 시험도중 본 임상시험계획서의 내용을 변경할 수 없다. 계획서의 내용을 변경하는 경우에는 모든 관련 당사자들이 서명하여 서면으로 동의하여야 한다.

## 별 첨

별 첨 1. 임상연구 참여 동의서 및 동의 설명서

별 첨 2. 증례조사표 (Case Report Form)

별첨 1. 임상연구 참여 동의서 및 동의 설명서

## 동 의 서

본인은 이번 임상연구에 참여하기에 앞서 다음 항목에 대하여 충분한 설명을 듣고 설명문을 받아 보았으며 연구의 목적과 방법을 정확하게 이해하였습니다.

- 연구의 목적: 한방\*\*소재 제품을 1일 1회 이상 도포하는 경우 여드름 개선효과를 평가하기 위함
- 연구의 방법: 한방\*\*소재제품을 환부에 하루 1회 이상, 총 4주간 도포
- 예측되는 이상반응: 체질에 따른 가려움증, 홍반, 발진 등의 악화
- 편의 제공
  - 한방\*\*소재 제품 제공
  - 교통편 실비 지급
- 연구에 참여하더라도 언제든지 포기할 수 있고 포기하더라도 불이익을 받지않는다는 사실

이에 본인은 자신의 자유로운 의사에 따라 본 연구에 참여함을 동의합니다.

년 월 일

성 명 : (인)  
주 소 :  
전화번호 :

보호자 또는 대리인 : (인)  
환자와의 관계 :  
주 소 :  
전화번호 :

본인은 본 연구의 내용에 대하여 환자 또는 보호자에게 성실하게 설명하였으며, 제기된 의문에 대하여 충분히 답변을 하였습니다. 본 연구과정에서 의사로서 환자에 대한 관리 의무를 충실히 하겠습니다.

년 월 일

연구책임자 : (인)

## 동 의 설 명 서

### 임상시험의 목적

본 연구의 목적은 한방\*\*소재 제품을 1일 수회 도포하는 경우 여드름 개선효과를 평가하기 위함입니다

### 연구방법

한방\*\*소재 제품을 환부에 하루 1회, 총 4주간 도포합니다.

### 예측 효능·효과

여드름 개선 및 완화입니다.

### 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항

- 예측되는 이상반응 : 때때로 국소의 가려움증, 홍반, 발진, 건조, 인설 등을 일으킬 수 있습니다.
- 사용상의 주의사항
  - 1) 눈 및 점막에 사용하지 말 것.
  - 2) 피부에 손상이 있을 경우에 사용하면 일과성의 자극감이 있을 수 있으므로 주의할 것.

### 편의 제공

- 화장품 제공
- 교통편 실비 지급

### 시험에의 참여동의 및 동의철회

본 시험에 참여할 것인가의 여부는 귀하의 자유의사에 따라 결정하여 주십시오.

귀하가 시험참가에 동의하지 않더라도 치료에 전혀 불이익을 받지 않습니다.

귀하는 시험기간 중 언제라도 시험참가를 중단할 수 있으며, 그 경우에는 담당 의사가 귀하의 질병을 치료하기 위하여 다른 적절한 약제를 처방하거나 치료법을 실시할 것입니다.

### 환자의 준수사항

본 한방\*\*소재 제품의 투여로 귀하의 증상이 개선되고 완화가 효과적으로 이루어지고, 정확한 과학적 연구에 기여하도록 하기 위하여 연구자의 지시에 따르는 것이 매우 중요합니다.

본 시험 기간동안 제공되는 한방\*\*소재제품 및 귀하의 연구자가 인정한 약물 외의 다른 약물을 복용하거나 기타의 치료법을 받아서는 안됩니다.

귀하가 시험참가 동의를 중단한 후라도 본 제품을 최종 도포한 날을 연구자에게 알려주셔야 합니다.

본 시험화장품 도포기간 동안 예상치 못한 효과나 유해한 작용으로 의심되는 증상이 나타날 경우 즉시 연구자에게 알려주시기 바랍니다.

### **피해발생시 보상 및 치료 대책**

귀하에게 본 임상시험에 참여한 결과로 직·간접적 손해가 발생되었을 경우, 귀하의 연구자가 손해의 치료를 위하여 최선의 조치를 취할 것이며, 시험 의뢰자인 (주)서진바이오텍에서 모든 법률상의 책임을 부담할 것입니다.

### **자료보호**

모든 데이터는 엄격히 비밀이 유지되며 보호를 받게 됩니다. 귀하가 본 시험에 참가하기로 동의할 경우 본 시험을 통하여 귀하에 관하여 수집된 자료는 익명으로 다루어집니다. 본 연구의 결과는 학술적 논문 제출용으로만 이용될 것이며 개인의 비밀은 보호됩니다.

본 시험과 관련하여 의문사항이 있을 경우 언제든지 연구자에게 문의하실 수 있습니다.

임상시험의뢰자 : (주)서진바이오텍 대표

임상시험연구자 : 피부과전문의 백종현



|  |
|--|
| <b>증례 조사표</b><br><b>(Case Report Form)</b> |
|--|

한방\*\*소재 제품의 여드름 개선효과에 대한 임상시험

|                   |  |
|-------------------|--|
| 피험자성명(영문이니셜)      |  |
| 환자 번호(Charter 번호) |  |
| 연 구 자 명           |  |

\* 기록상 주의점

1. 임상조사표는 흑색볼펜으로 기입해 주십시오.
2. 기록 수정시에는 원래 기재한 내용을 읽을 수 있게 한 줄을 그은후 수정한 다음 날짜와 기록자의 날인을 기입해주십시오.

## 1. 관찰항목 및 임상검사 항목에 대한 Flow Chart

| 항 목             | 검 사 일 정 |        |        |
|-----------------|---------|--------|--------|
|                 | 치료전     | 치료 2주후 | 치료 4주후 |
| 환자동의서           | ○       |        |        |
| 선정기준/제외기준       | ○       |        |        |
| 환자배경 및 병력검사     | ○       |        |        |
| 임상증상 검사         | ○       | ○      | ○      |
| 총괄적 유효성 평가      |         |        | ○      |
| 순응도 검사          |         | ○      | ○      |
| 이상반응 조사         |         | ←————→ |        |
| 안전성 평가          |         |        | ○      |
| 한방**소재 제품 배포    | ○       |        |        |
| 잔여 한방**소재 제품 수거 |         | ○      | ○      |

## 2. 피험자 방문일

|        | 예정일 | 방문일 |
|--------|-----|-----|
| 치료전 검사 |     | 월 일 |
| 치료 2주후 | 월 일 | 월 일 |
| 치료 4주후 | 월 일 | 월 일 |

### 3. 피험자의 선정기준 및 제외기준

| 선정기준   | 예 아니오*                   |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 신체 건강한 남/여성                                    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 나이: 20-35세                                     | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 경증/경증도/여드름이 있는 자(GAGS grade 에서 1-30회당)         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 연구기간 동안 방문일정이 가능하고 인체 동의서에 서명하며 연구지시를 따를 수있는 자 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

\*Note : "아니오"에 해당하는 경우 탈락시킨다.

| 제외기준   | 예 아니오*                   |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 화장품, 의약품에 자극이나 알러지가 있는 경우  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 실험을 시작하기 전이나 실험 중, 28일이내에 면역억제제를 복용한 경우  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 얼굴용 국소 여드름 치료제를 실험을 시작하기 한달 전 동안 혹은 실험하는 동안 사용한 경우                               | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 실험 시작 전이나 실험 중, 염증반응에 대해 효과가 있는 것으로 알려져 용인된 체계적인 약분치료법 혹은 치료법을 처치 받은 경우          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 실험을 시작하기 전석 달 내에 로아큐틴 성분을복용한 경우  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 정해진 날짜에 해당되는 지속적인 방문 혹은 연구자의 판단과 상충되는 의료적 조건에 부합하는 경우 혹은, 부적합한 피험자가 될 가능성이 있는 경우 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 임신 중, 수유 중, 혹은 실험 기간 동안 임신할 가능성이 있는 경우   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

\*Note : "예"에 해당하는 경우 탈락시킨다.

연구 대상으로 적합성 여부 : 적합 부적합

#### 4. 피험자의 배경 및 병력검사

|   |           |      |   |      |
|---|-----------|------|---|------|
| 환자성명  |           | 성별   | <input type="checkbox"/> 남 <input type="checkbox"/> 여 |      |
| 나이  | 만세        | 생년월일 | 년 월 일   |      |
| 체중  | kg        | 신장   | cm  |      |
| 진단명   |           | 이병기간 | _____년_____개월   |      |
| 병용약제<br><input type="checkbox"/> No<br><input type="checkbox"/> Yes | 약제명       | 투여경로 | 1일 투여량  | 투여기간 |
|   |           |      |   |      |
|   |           |      |   |      |
|   |           |      |   |      |
|   |           |      |   |      |
| * comment란에 질병의 진행여부 및 치료여부에 대해 자세히 기입해 주세요.                        | Comment : |      |   |      |

#### 5. 순응도 검사

|                     | 치료 2주후   | 치료 4주후   |
|---------------------|--|--|
| 도포 후 남은 용량 조사       | <input type="checkbox"/> 없음<br><input type="checkbox"/> 있음<br>(      g)    | <input type="checkbox"/> 없음<br><input type="checkbox"/> 있음<br>(      g)    |
| 병용 약품 변동조사 (투여전과차이) | <input type="checkbox"/> 없음<br><input type="checkbox"/> 있음<br>(아래에 자세히 기록) | <input type="checkbox"/> 없음<br><input type="checkbox"/> 있음<br>(아래에 자세히 기록) |

## 6. 안전성 평가

- 피부자극도 -

없 음                      있 음

| 증 상          | 발 현 일  | 정 도*  | 처 치 방 법 | 치 치 후<br>소 실 여부<br>(소실:O 비소실X) | 소 실 일 | 중 단 여부 |     |
|--------------|--|-------|---------|--------------------------------|-------|--------|-----|
|              |  |       |         |                                |       | 중 단    | 계 속 |
|              | / /  | 1 2 3 |         |                                | / /   |        |     |
|              | / /  | 1 2 3 |         |                                | / /   |        |     |
|              | / /  | 1 2 3 |         |                                | / /   |        |     |
|              | / /  | 1 2 3 |         |                                | / /   |        |     |
| *기준<br>(3단계) | 1. 경 증(mild) : 홍반 및 부종이 약간 있음<br>2. 중등도(moderate) : 홍반이 있으며 1mm 이하의 부종이 있음<br>3. 중 증(severe) : 심한 홍반이 있으며 1mm이상의 심한 부종이 있음 |       |         |                                |       |        |     |

-기타 이상반응-

없 음                      있 음

| 증 상           | 발 현 일  | 정 도*  | 처 치<br>방법                  | 치 치 후<br>소 실 여부<br>(소실:O 비소실X) | 소 실 일 | 시 험 화 장 품 과 의<br>관 련 성** | 중 단 여부 |     |
|---------------|--|-------|----------------------------|--------------------------------|-------|--------------------------|--------|-----|
|               |  |       |                            |                                |       |                          | 중 단    | 계 속 |
|               | / /  | 1 2 3 | comment<br>련에<br>자세히<br>기입 |                                | / /   | 1 2 3                    |        |     |
|               | / /  | 1 2 3 |                            |                                | / /   | 1 2 3                    |        |     |
|               | / /  | 1 2 3 |                            |                                | / /   | 1 2 3                    |        |     |
|               | / /  | 1 2 3 |                            |                                | / /   | 1 2 3                    |        |     |
| comment       |  |       |                            |                                |       |                          |        |     |
| *기준<br>(3단계)  | 1. 경 증(mild) : 잘 인지될 수 없는 정도의 약간 불편한 증상<br>2. 중등도(moderate) : 명확한 증상은 있으나 별다른 처치가 필요 없음<br>3. 중 증(severe) : 매우 불편하여 신속한 처리를 요함   |       |                            |                                |       |                          |        |     |
| **기준<br>(3단계) | 1. 관련없음(NO Relation): 시험용 제품으로 인한 이상반응으로 판단되지 않으며 다른 원인에 의한 것임<br>2. 관련이 있을 수 있음(Possible): 시험용 제품으로 인한 일시적인 이상반응이내 임상증상에 별다른 영향은 미치지 않음<br>3. 명백한 관련이 있음(Definite): 시험용 제품으로 인한 명백한 이상반응임 |       |                            |                                |       |                          |        |     |

## 7. 시험 조기 중지 보고서

계획된 시험 종료일 이전에 치료를 중단하게 된 피험자에 대하여 작성

최종 시험용 제품 사용일 :       년       월       일

중지 및 탈락 사유

| 분류    | 기준   | 평가유무                               |
|-------|--|------------------------------------|
| □ 중지자 | <input type="checkbox"/> 임상시험용 제품과 ‘관련없음’으로 판정한 이상반응으로 인하여 조기에 시험을 중지한 경우<br><input type="checkbox"/> 임상시험용 제품과의 관련성이 명백하지 않은 기타의 이유로 조기에 시험을 중지한 경우<br><input type="checkbox"/> 임상시험계획서를 심하게 벗어난 경우(예를 들면, 검사를 받지 않거나 계획된 일정을 따르지 않는 경우, 더 이상의 투약을 거부하는 경우) | 최종 분석시<br>안전성 평가에<br>포함시킴          |
| □ 탈락자 | <input type="checkbox"/> 임상시험용 제품과 ‘관련이 있을 수 있음’ 또는 ‘명백한 관련 있음’으로 판정된 이상반응으로 시험을 중지한 경우<br><input type="checkbox"/> 효과가 없어(증상이 중증이거나 악화하여) 조기에 시험을 중지한 경우  | 최종 분석시<br>유효성 및<br>안전성 평가에<br>포함시킴 |

### 처리방법

중지자 및 탈락자에 대하여 다음과 같은 처리가 이루어졌는지 확인하십시오.

- 조기 시험 중지 보고서 작성
- 최종 일반 신체검사 및 임상화학적 검사(부작용의 경우만 해당) 실시
- 이상반응의 경우, 이상반응 발생 보고서 작성
- 중대한 이상반응의 경우,  
 담당자 - 연구책임자 및 의뢰자에게 통지  
 연구책임자 - 임상시험위원회 및 의뢰자에게 보고
- 환자 증례조사표 및 잔여 시험용 제품을 의뢰자에게 송부
- 탈락자의 경우 시험 4주후 평가항목을 모두 실시
- 중지자의 경우 시험 4주후 안전성 평가항목을 실시

### 기타의견

연구자 성명 및 날인

(       년       월       일)

아토피 피부염 환자에 대한 “아토피개선제품  
(가칭)”의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한  
단일기관, 무작위배정 비교 임상시험

2009 년 10월

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

제목 : 아토피 피부염 환자에 대한 “아토피개선제품(가칭)”의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 비교 임상시험

화장품 : 아토피개선제품(가칭)

시험계획서 번호 : SMAD-90650

의뢰자 : 서진바이오텍

연구자 : 세명대학교 산학협력단  
(세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터)

- 임상시험 책임자 : 김이화, 한의학박사, 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터
- 임상시험 담당자 : 피부과 전문의 백중현, 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터  
김용민, 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터  
이정현, 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

작성일 : 2009 년 10 월

본 시험계획서는 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터의 재산으로 기밀 서류입니다. 본 서류를 접수받는 것은 공개적으로는 사용하지 않으나 여기에 포함되어 있는 정보를 본 시험을 수행하기 위하여 승인을 받기 위한 임상시험심사위원회(IRB)에서의 사용을 제외하고는 누설하지 않겠다는데 대한 동의를 의미합니다. IRB에게는 비밀의 유지가 요구되며 또 기대됩니다. 위 회사의 동의 없이는 본 자료를 전체 또는 부분적으로 사용하거나 발표할 수 없습니다.



❖ 임상시험계획서 개요

|           |  |
|-----------|--|
| 임상시험의 명칭  | 아토피 피부염 환자에 대한 “아토피개선제품(가칭)”의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정 비교 임상시험   |
| 임상시험책임자   | 임상시험책임자 : 김이화  |
| 임상시험실시기관  | 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 : 충북 제천시 신월동 21-11번지  |
| 임상시험의 목적  | 아토피 질환 피험자에게 아토피개선제품(가칭)을 투여했을 때 아토피 피부염의 증상 개선 등 유효성 및 안전성을 평가하고자 한다.   |
| 시험설계      | 단일기관, 무작위 배정 임상시험  |
| 피험자수      | 최종 평가 가능한 피험자 수 30명(시험군: 30명) 탈락율을 20%로 가정한다면 총 피험자 수는 36명   |
| 대상질환      | 아토피 피부염  |
| 피험자의 선정기준 | <p><u>선정기준</u> (대상피험자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Hanifin과 Rajka의 진단기준에 따라 주소전 중 3개 이상, 부소전 중 3개 이상의 증상이 있는 아토피 피부염 환자</li> <li>2) 치료를 받지 않을 정도로 심하지 않은 아토피 피부염을 가진 환자</li> <li>3) 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 환자</li> <li>4) 피험자 제외기준에 포함되지 않은 자</li> </ol>  |
| 피험자의 제외기준 | <p><u>제외기준</u> (다음 어느 하나라도 해당되는 피험자는 본 연구에 참여할 수 없다)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 심한 아토피 피부염으로 약물치료(항히스타민제, 부신피질호르몬제, 한약 등)를 하고 있는 환자</li> <li>2) 면역계에 영향을 미치는 특별한 치료제를 사용하고 있는 환자</li> <li>3) 본 시험에 영향을 줄 수 있다고 생각되는 건강보조식품을 복용하고 있는 환자</li> <li>4) 임신부, 수유부 또는 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임기 여성</li> <li>5) 기타 위의 사항들 외에 시험책임자의 판단으로 연구 수행이 곤란하다고 판단되는 환자</li> </ol> |

|                   |  |
|-------------------|--|
| 제 품 명             | 아토피개선제품(가칭)  |
| 사용방법 및<br>사 용 기 간 | 시험군과 대조군에 공급되는 제품을 하루 2~3회 8주간 피부 병변 부위에 적당히 도포한다.   |
| 시 험 기 간           | 각 피험자별 총 10주(스크리닝 2주, 아토피개선제품(가칭) 사용기간 8주)가 소요되며, 결과분석 및 통계처리에 약 2주 정도 예상되므로, 총 임상시험 실시기간은 최소 모집 시점부터 약 12주 이상 소요될 것으로 예상된다.   |
| 시 험 방 법           | <p><b><u>유효성 (efficacy)</u></b></p> <p>① 1차 유효성 평가 (Primary endpoint)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ SCORAD Index 측정</li> <li>▪ 병변부위 이미지 촬영</li> <li>▪ 제품 도포 후 4주, 8주 2회 평가</li> </ul> <p>② 2차 유효성 평가 (Secondary endpoint)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 피부측정장비를 통한 기기적 평가<br/>(피부수분 함유량, 경피수분 손실량, 피부산성도)</li> </ul> <p><b><u>안전성 (safety)</u></b></p> <p>① 아토피개선제품(가칭) 사용 전과 사용 4주, 8주 후에 실험실적 검사, 생명 징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다.</p> |

### 1. 임상시험의 명칭 및 단계

아토피 피부염 환자에 대한 “아토피개선제품(가칭)”의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정 비교 임상시험

### 2. 임상시험 실시기관명 및 주소

실시기관명 : 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

주 소 : 충북 제천시 신월동 산21-11번지

### 3. 임상시험책임자, 담당자 및 공동연구자의 성명 및 직명

| 임상시험의 직명 | 소 속                     | 전공 분야   | 성 명 | 직 명   |
|----------|-------------------------|---------|-----|-------|
| 시험담당자    | 세명대학교 한방바이오산업<br>임상지원센터 | 경혈학     | 김이화 | 부교수   |
| 시험책임자    | 세명대학교 한방바이오산업<br>임상지원센터 | 피부과전문의  | 백종현 | 교수    |
| 시험담당자    | 세명대학교 한방바이오산업<br>임상지원센터 | 의학      | 김용민 | 신임연구원 |
| 시험담당자    | 세명대학교 한방바이오산업<br>임상지원센터 | 한방식품영양학 | 이정현 | 연구원   |

### 4. 임상시험 의뢰자명 및 주소

의뢰자명 : 서진바이오텍

### 5. 임상시험의 목적

- 1) 본 시험의 주 목적은 피험자에게 “아토피개선제품(가칭)”을 사용하였을 때 아토피 피부염 증상 개선 등의 유효성을 평가하려는 것이다.
- 2) 두 번째 목적은 생명징후, 실험실적 수치들에 대한 영향, 이상반응의 측면에서 “아토피개선제품(가칭)”의 안전성을 평가하려는 것이다.

### 6. 임상시험용 제품의 품명, 원료제품의 분량 및 제형

#### 6.1 제품명

아토피개선제품(가칭)

#### 6.2 원료제품의 분량

- 1) 실험군

아토피개선제품(가칭)

## 7. 대상질환

5~50세의 아토피 피부염 환자

## 8. 피험자의 선정기준, 제외기준

### 8.1 선정기준

대상피험자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.

- 1) Hanifin과 Rajka의 진단기준에 따라 주소견 중 3개 이상, 부소견 중 3개 이상의 증상이 있는 아토피 피부염 환자
- 2) 치료를 받지 않을 정도로 심하지 않은 아토피 피부염을 가진 환자
- 3) 치료를 받을 정도로 심한 아토피 피부염을 가졌지만 최근 2개월 이내 약물치료를 하지 않고 있는 환자
- 4) 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 환자
- 5) 피험자 제외기준에 포함되지 않은 자

### 8.2 제외기준

다음 조건의 어느 하나라도 해당되는 피험자는 본 연구에 참여할 수 없다.

- 1) 심한 아토피 피부염으로 약물치료(항히스타민제, 부신피질호르몬제, 한약 등)를 하고 있는 환자
- 2) 면역계에 영향을 미치는 특별한 치료제를 사용하고 있는 환자
- 3) 본 시험에 영향을 줄 수 있다고 생각되는 건강보조식품을 복용하고 있는 환자
- 4) 임신부, 수유부 또는 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임기 여성
- 5) 기타 위의 사항들 외에 시험책임자의 판단으로 연구 수행이 곤란하다고 판단되는 환자

## 9. 목표한 피험자 수 및 그 근거

### 9.1 연구의 설계

본 연구는 단일기관, 무작위배정 비교 임상시험으로 아토피 피부염 피험자에게 아토피개선제품(가칭)을 투여했을 때 아토피 피부염의 증상 개선 등 유효성 및 안전성을 평가하고자 한다. 대상자들은 8주간의 시험기간을 거친 후에 효과를 평가한다.

### 9.2 피험자 수 산출 및 그 근거

Primary end point는 아토피개선제품(가칭) 사용 후 8주 후의 아토피 피부염 증상 개선율이며, 시험 전과

시험 후의 아토피 피부염 증상의 개선율이 두 군간에 차이가 있는지를 검정하기 위하여 ttest를 시행한다.

과거에 수행된 임상시험을 바탕으로 최종 평가 가능한 피험자수를 30명(시험군: 30명)로 하였으며, 탈락율을 20%로 가정한다면 총 피험자 수는 36명이 필요하다.

## 10. 임상시험 기간

각 피험자별 총 10주(스크리닝 2주, 아토피개선제품(가칭) 사용기간 8주)가 소요되며, 결과분석 및 통계 처리에 약 2주 정도 예상되므로, 총 임상시험 실시기간은 최초 모집 시점부터 약 12주 이상 소요될 것으로 예상된다.

## 11. 임상시험방법

### 11.1 사용량 및 사용방법

#### 1) 실험군

① 사용량 : 4주일에 250g의 시험제품 사용

② 사용방법 : 하루 2~3회 8주간 피부 병변 부위에 먼저 스킨 제품을 바르고 난 후 크림 제품을 피부가 촉촉할 정도로 도포한다.

## 12. 관찰항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법

### 12.1 Screening (Week - 2)

#### 1) Screening 기간

이 시험에 들어가기 전 2주간의 screening 기간을 갖고 피험자가 시험의 대상요건에 적합한지를 판단하여야 한다. 검사치가 선정기준에 해당하고, 1개월 이내에 다른 시험약분이나 아토피 피부염 증상에 영향을 미치는 의약품이나 건강기능식품을 복용한 적이 없는 경우, 실험실적 검사 등 screening 평가항목을 실시하여 평가 결과 연구자의 판단에 따라 선정기준에 해당한 경우 screening 기간을 줄일 수 있다.

#### 2) 평가항목

Screening 방문시(시작일 2주전)에 임상시험담당자는 9.1에 명시된 선정/제외 기준에 따라 피험자의 참여 의사를 타진하여 병용약분이 없거나 병용약분이 있는 경우 연구자 판단에 따라 선정기준에 해당하면 피험자로부터 서면동의서(별첨1)를 얻고 screening 검사를 실시한다.

##### ① 피험자 동의

② 기초 조사 : 생년월일, 성별, 주소 등을 조사한다.

③ 병력/약물 복용력 조사 : 일차성 진단, 질병의 지속기간, 약물복용 기록, 현재 상태와 가족력을 기록한다. 또한 최근 30일간의 모든 약물 복용과 치료를 모두 기록한다.

- ④ 아토피 피부염 진단기준
- ⑤ 임상시험 설명 및 참여의사 타진하여 피험자 동의 절차 완료

### 12.3 평가일정 및 평가항목

통상적으로 screening 방문 2주 후에 임상시험담당자는 9.1에 명시된 선정/제외 기준에 따라 피험자를 선별하고, 다음 일정에 따라 평가한다.

#### 1) 투여직전 (0주, Baseline)

- ① 선정 / 제외 기준 판정
- ② 병변부위 사진 촬영
- ③ SCORAD 측정
- ④ 피부 산성도 측정
- ⑤ 피부 수분 함유량 측정
- ⑥ 경피수분 손실량 측정

#### 2) 시험 진행 중의 측정 (4주)

- ① SCORAD 측정
- ② 병변부위 사진 촬영
- ③ 피부 수분 함유량 측정
- ④ 경피수분 손실량 측정
- ⑤ 피부 산성도 측정
- ⑥ 이상반응 조사

#### 3) 시험 종료 시 측정 (8주)

8주 시험을 종료한 후에 다음의 항목을 측정한다.

- ① SCORAD 측정
- ② 병변부위 사진 촬영
- ③ 피부 산성도 측정
- ④ 경피수분 손실량 측정
- ⑤ 피부 수분 함유량 측정
- ⑥ 이상반응 조사
- ⑦ 총관적 유효성 평가
- ⑧ 설문조사

### 13. 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항

#### 13.1 예측 이상반응

아토피개선제품(가칭)는 대체로 이상반응이 나타나지 않지만 간혹 홍반, 소양감 등 아토피 피부염의 증상이 악화되는 경우도 있는데 이는 일반적으로 아토피 피부염의 특징 중 하나인 증상의 호전과 악화가 반복되는 과정이므로 시험 중단을 요하지는 않고 가역적이다.

### 14. 중지, 탈락기준

시험자에 의한 중지, 탈락 또는 피험자에 의한 중지, 탈락의 경우는 그 대상피험자의 시험을 중지하고, 시험담당자는 시험 중지일, 이유, 처치 및 임상증상에 대한 소견을 증례기록서에 기록한다.

### 15. 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법 (통계분석방법)

#### 15.1 유효성 평가대상

- 1) 선정기준에 적합한 피험자
- 2) 아토피개선제품(가칭)을 8주간 사용한 피험자

#### 15.2 유효성 평가

0일, 4주와 8주째 SCORAD Index 측정, 병변부위 이미지 촬영 등 아토피 피부염에 대한 육안적 평가를 시행하고, 피부수분 함유량, 경피수분 손실량, 피부 산성도 등 피부측정장비를 통한 기기적 평가를 시행한다.

#### 15.3 통계분석 방법

실험군의 제품 사용 전후의 SCORAD Index를 비교하기 위하여 단일표본 t-검정 )을 실시한다. 또한 2차 평가항목에 대한 사용전후의 차이에 관해서도 동일한 통계분석을 실시한다.

## 제 3 절 연구결과

### 1. 폐각가공처리 기술개발

#### 가. 시료 채취 및 처리결과

국내에서 가장 많이 생산되고 있는 6 종류(균, 홍합, 바지락, 피조개, 새조개, 동죽)의 폐각시료를 참여기업인 신성수산의 도움을 받아 통영과 여수, 진해, 완도, 군산 등지에서 각각 100kg씩 구입하여, 생물 상태로 당일배송한 후 본 연구소에서 직접 육과 이물질을 제거 하여 세척하였다. 염분 제거를 위해 상수도를 이용하여 흐르는 물에 하루 밤 동안 폐각을 담가 두었으며, 재 세척 후 그늘에서 선풍기바람을 이용하여 7일간 완전 건조하여 최종적으로는 각 종류 별로 각각 약15~20kg의 폐각을 회수하였고 이것을 실험 재료로 사용하였다.

#### 나. 가공분말의 제조

회수된 6종류의 폐각은 (주)만수제약에 의뢰하여 핀크리셔밀과 에어밀을 이용하여 일반분말은 50-100mesh(279-140 $\mu$ m), 초미세분말은 800mesh(18 $\mu$ m) 수준으로 가공하였다. 이때 일반분말의 회수율은 약 97%(w/w), 초미세분말 회수율은 약 90%(w/w)였다.

나노분말은 초미세분말을 사용하여 가공 하였으며, 연구소에서 직접 고안한 습식장치를 사용하여 200nm수준의 나노분말을 만들었다(Fig. 11). 본 연구소에서 고안한 습식나노장치는 Rod homogenizer를 직접 소형 reactor에 장착하고, reactor 벽면 내부에 baffle을 부착하여 용액의 접촉면적을 높여줌과 동시에 순환펌프를 하부에 장착하여 스프레이 노즐을 통해 reactor 내부에 있는 scratched plate에 분사하는 연속순환방식의 장치를 사용하였다. 이때 처리과정중에 발생할 수 있는 열을 감안하여 반응기 외부에 water jacket을 부착하였으며 칠러를 사용하여 온도를 40 $^{\circ}$ C이하로 유지시켰다. 이렇게 만들어진 액을 0.2 $\mu$ m filter로 여과한 후 여액을 동결 건조시켜 나노분말을 완성하였다. 이때 회수된 분말의 수율은 약20%(w/w)였으며, running time은 150시간이었다. 본 장치를 고안하게 된 배경은 최초 과제 제안시 외주가공을 계획하고 국내 모 업체에 의뢰하였으나, 고가의 가공비와 시료수에 따른 가공기간이 너무 길어 과제 수행이 어렵겠다는 판단으로 고안하게 되었다. 그리고 본 과제의 목적이 나노분말 장치개발이 아닌 점, 본 장치를 사용할 경우 처리기간에 비해 수율이 낮고, 적은 처리용량, 경제성 등을 고려하여, 2차년도 이후 실험에서 부터는 충북단양에 있는 석회석연구소에 의뢰하여 나노분말을 제조하였다(Fig. 12).



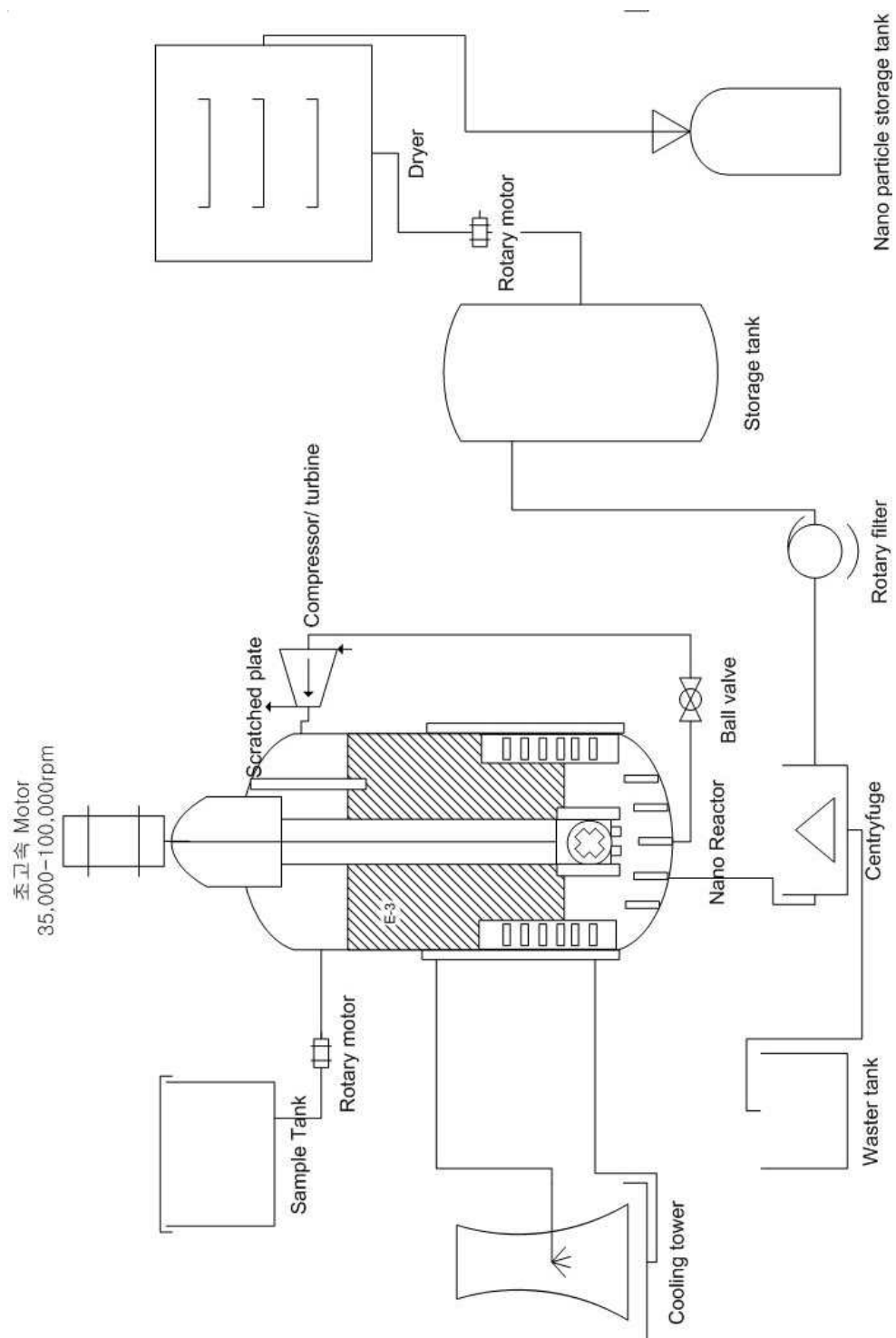


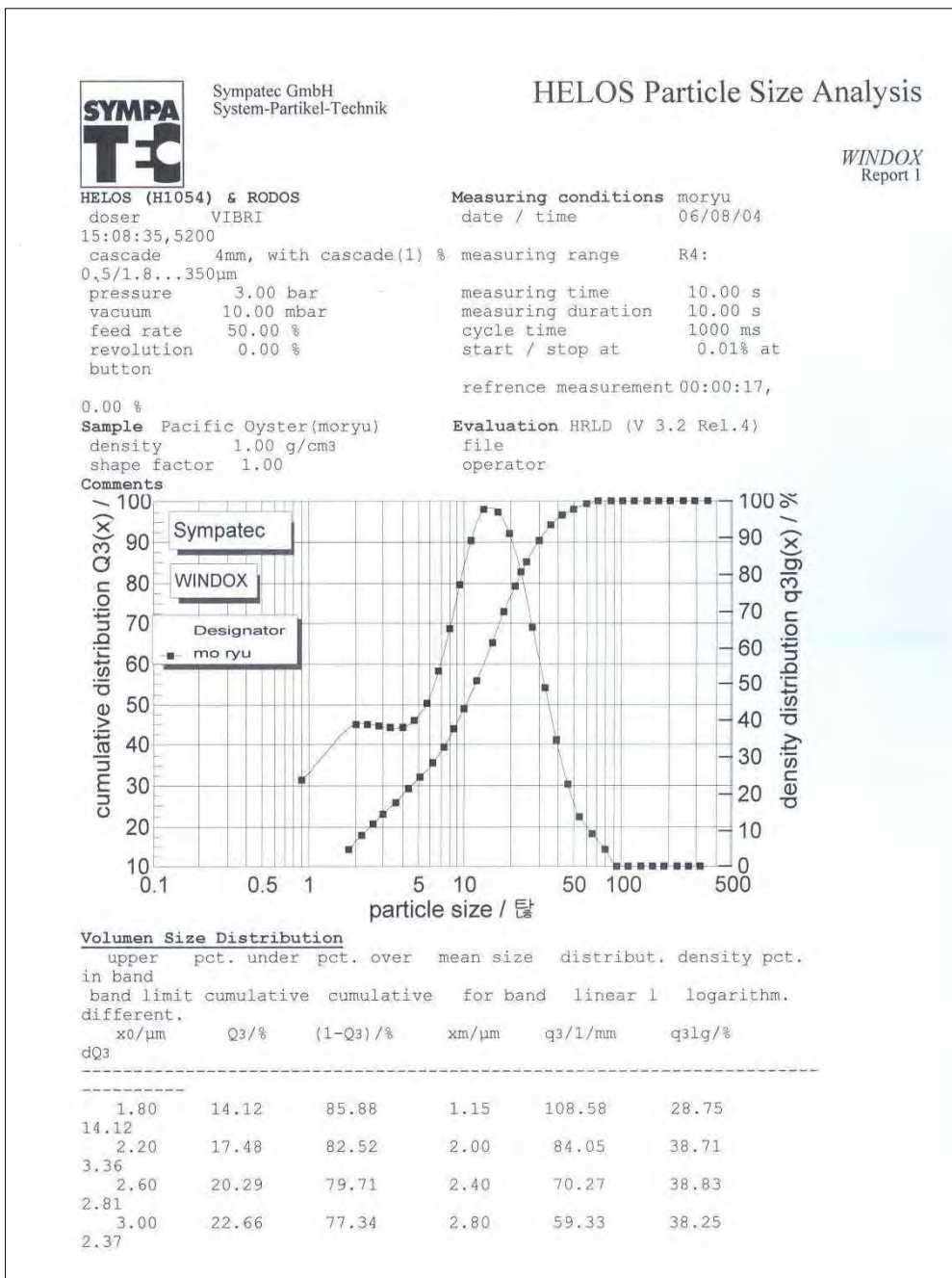
Fig. 11. Manufacture process scheme of nano particle.



**Fig. 12. Comparative photograph of normal, hyperfine and nano-scale powder.**

(1) 초미세 분말에 대한 입도 분석 결과

6개의 시료 중 대표적으로 국내에서 가장 많이 생산되는 굴 패각에 대한 입도분석을 HELOS & RODS장비를 사용하여 분석한 결과 5-30 $\mu\text{m}$ 의 분체입도를 가지는 것으로 확인 되었으며(Fig. 13), 아주 적은 량의 0.9-5 $\mu\text{m}$ 와 30-50 $\mu\text{m}$ 의 분체입도를 가진 분말도 존재하는 것으로 확인되었다. 굴 패각외 다른 종류의 경우 같은 장비로 같은 조건에서 가공하기 때문에 입도분석을 생략하였다.



|        |                                     |       |                            |        |        |
|--------|-------------------------------------|-------|----------------------------|--------|--------|
| 3.60   | 25.64                               | 74.36 | 3.30                       | 49.69  | 37.76  |
| 2.98   |                                     |       |                            |        |        |
| 4.40   | 28.94                               | 71.06 | 4.00                       | 41.19  | 37.94  |
| 3.30   |                                     |       |                            |        |        |
| 5.20   | 31.82                               | 68.18 | 4.80                       | 36.07  | 39.87  |
| 2.89   |                                     |       |                            |        |        |
| 6.20   | 35.21                               | 64.79 | 5.70                       | 33.90  | 44.49  |
| 3.39   |                                     |       |                            |        |        |
| 7.40   | 39.30                               | 60.70 | 6.80                       | 34.02  | 53.26  |
| 4.08   |                                     |       |                            |        |        |
| 8.60   | 43.52                               | 56.48 | 8.00                       | 35.21  | 64.87  |
| 4.23   |                                     |       |                            |        |        |
| 10.00  | 48.56                               | 51.44 | 9.30                       | 35.97  | 77.02  |
| 5.04   |                                     |       |                            |        |        |
| 12.00  | 55.59                               | 44.41 | 11.00                      | 35.18  | 89.10  |
| 7.04   |                                     |       |                            |        |        |
| 15.00  | 65.02                               | 34.98 | 13.50                      | 31.43  | 97.71  |
| 9.43   |                                     |       |                            |        |        |
| 18.00  | 72.69                               | 27.31 | 16.50                      | 25.56  | 97.11  |
| 7.67   |                                     |       |                            |        |        |
| 21.00  | 78.78                               | 21.22 | 19.50                      | 20.30  | 91.17  |
| 6.09   |                                     |       |                            |        |        |
| 25.00  | 84.88                               | 15.12 | 23.00                      | 15.26  | 80.80  |
| 6.10   |                                     |       |                            |        |        |
| 30.00  | 90.06                               | 9.94  | 27.50                      | 10.36  | 65.59  |
| 5.18   |                                     |       |                            |        |        |
| 36.00  | 93.93                               | 6.07  | 33.00                      | 6.44   | 48.97  |
| 3.87   |                                     |       |                            |        |        |
| 42.00  | 96.22                               | 3.78  | 39.00                      | 3.81   | 34.20  |
| 2.29   |                                     |       |                            |        |        |
| 50.00  | 97.89                               | 2.11  | 46.00                      | 2.09   | 22.18  |
| 1.68   |                                     |       |                            |        |        |
| 60.00  | 98.96                               | 1.04  | 55.00                      | 1.06   | 13.48  |
| 1.06   |                                     |       |                            |        |        |
| 72.00  | 99.65                               | 0.35  | 66.00                      | 0.58   | 8.81   |
| 0.70   |                                     |       |                            |        |        |
| 86.00  | 100.00                              | 0.00  | 79.00                      | 0.25   | 4.52   |
| 0.35   |                                     |       |                            |        |        |
| 102.00 | 100.00                              | 0.00  | 94.00                      | 0.00   | 0.00   |
| 0.00   |                                     |       |                            |        |        |
| 122.00 | 100.00                              | 0.00  | 112.00                     | 0.00   | 0.00   |
| 0.00   |                                     |       |                            |        |        |
| 146.00 | 100.00                              | 0.00  | 134.00                     | 0.00   | 0.00   |
| 0.00   |                                     |       |                            |        |        |
| 174.00 | 100.00                              | 0.00  | 160.00                     | 0.00   | 0.00   |
| 0.00   |                                     |       |                            |        |        |
| 206.00 | 100.00                              | 0.00  | 190.00                     | 0.00   | 0.00   |
| 0.00   |                                     |       |                            |        |        |
| 246.00 | 100.00                              | 0.00  | 226.00                     | 0.00   | 0.00   |
| 0.00   |                                     |       |                            |        |        |
| 294.00 | 100.00                              | 0.00  | 270.00                     | 0.00   | 0.00   |
| 0.00   |                                     |       |                            |        |        |
| 350.00 | 100.00                              | 0.00  | 322.00                     | 0.00   | 0.00   |
| 0.00   |                                     |       |                            |        |        |
| x10 =  | 1.42 μm                             | x50 = | 10.41 μm                   | x90 =  | 29.94  |
| μm     |                                     |       |                            |        |        |
| x16 =  | 2.02 μm                             | x84 = | 24.42 μm                   | x99 =  | 60.76  |
| μm     |                                     |       |                            |        |        |
| Sv =   | 1.4 m <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> | Sm =  | 1.4E+04 cm <sup>2</sup> /g | Copt = | 2.92 % |

**Fig. 13. Particle size of hyperfine powder.**

(2) 나노분말에 대한 입도분석결과

나노분말과 수용성콘키올린의 활성비교를 위해 나노분말을 제조하였다. 본 연구를 위해서 초미세분말은 (주)만수제약에서 에이밀을 이용하여 30 $\mu$ m크기의 균폐각 초미세분말을 가공하였으며, 나노분말은 Ball Mill을 이용한 습식가공과 Attrition Mill을 이용한 건식 가공을 단양석회석 신소재 연구소에 의뢰하여 가공하였다(Fig. 14). 건식과 습식가공을 병행한 것은 2가지 나노가공 기술 중 균 폐각에 적합한 나노 가공기술을 선택할 목적으로 실시하였으며, 그 결과 건식 가공보다는 습식가공이 적합한 것으로 확인되었다(Fig. 15).

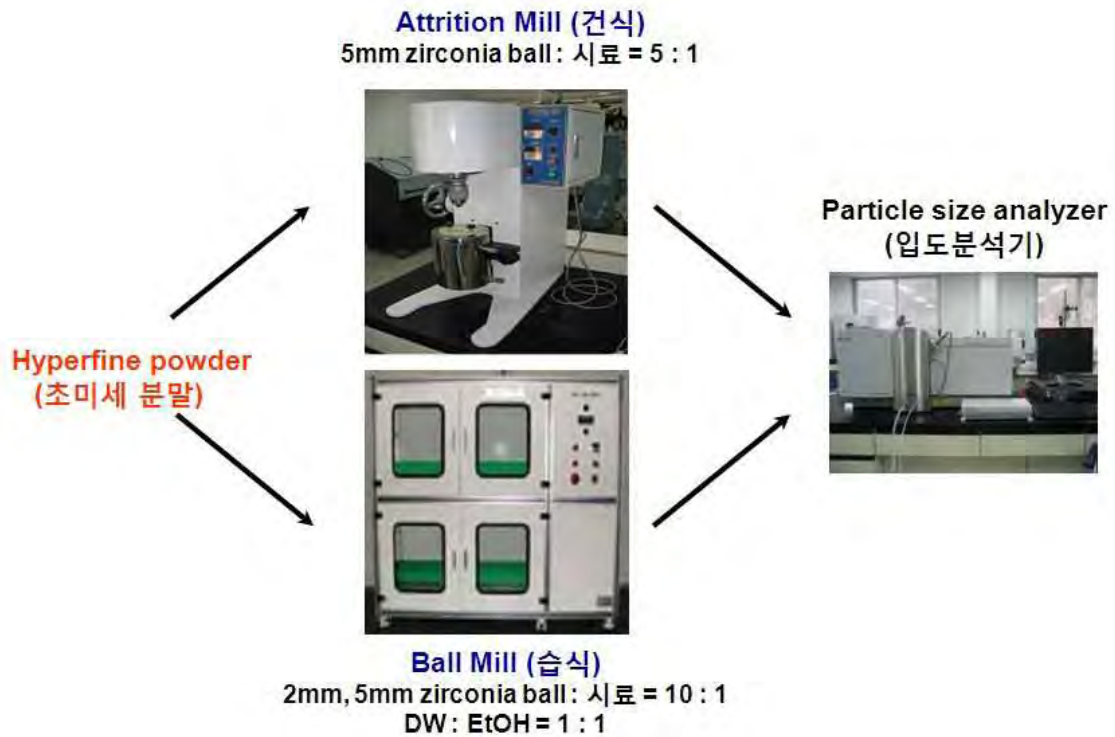


Fig. 14. Schematic diagram of manufacture process of nano particle using mollusk shell powders.

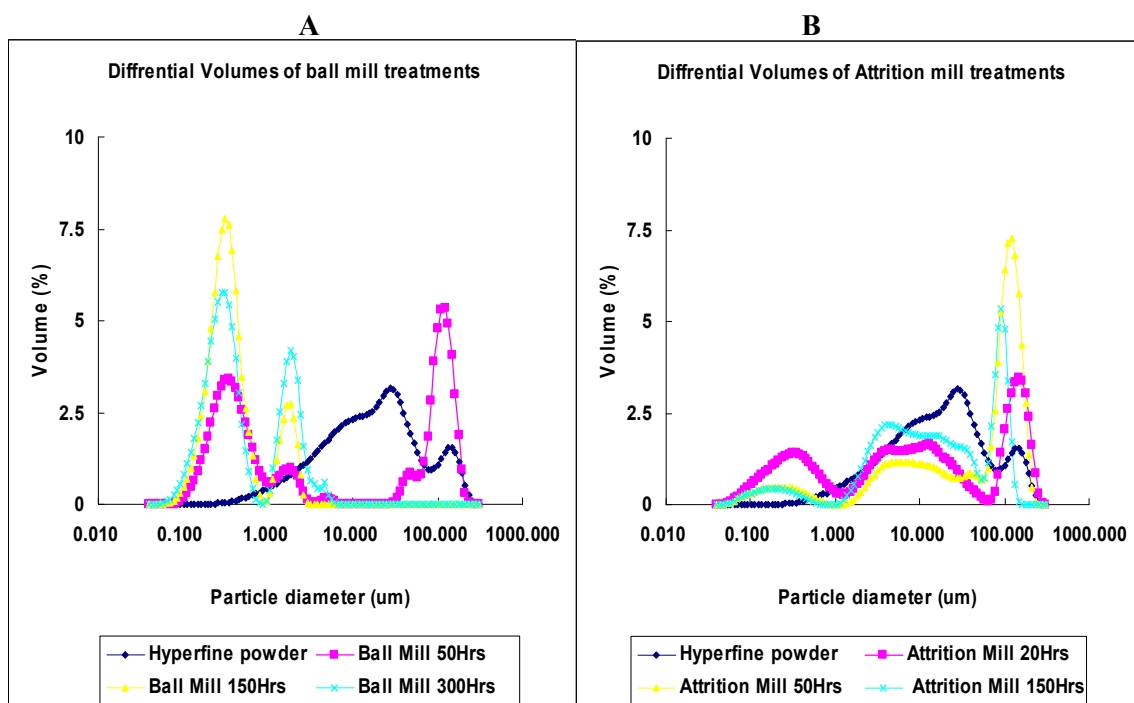
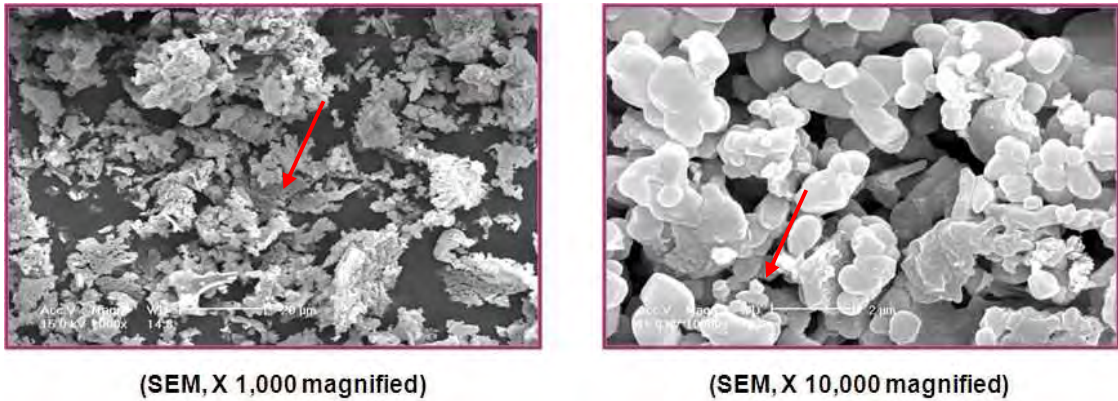


Fig. 15. Particle size analysis of differential volumes of attrition mill(B) and ball mill(A) treatments of hyperfine powder.

그리고 Fig. 15의 결과를 보면 볼밀의 경우 150시간 가공했을 때보다, 300시간 가공했을 때 분체입도가 커진 것을 볼 수 있는데, 이것은 볼밀 가공시 통상 계면 활성제를 사용하여 분자 간 엉킴(정전기력과 반데르발스력에 의해 발생)을 방지하게 되는데, 본 가공에서는 나노분말에 관한 기능성평가를 위해 계면 활성제를 사용하지 않았기 때문에 나타나는 현상으로 해석하면 된다. 이것을 확인하기 위해서 전자 현미경으로 분체입도를 관찰하였다(Fig. 16).



**Fig. 16. Photograph of scanning electron microscope(SEM) of nano scaled powder of Pacific oyster.**

전자현미경(SEM)으로 분석한 결과 X10,00의 Bar 크기는  $2\mu\text{m}$ 로 500nm에서 200nm이하의 나노 분체가 골고루 분포되어 있으며, 분체 간 서로 엉켜있음을 확인 할 수 있었다. 이렇게 습식으로 가공된 나노분말은 건조 후 기능성 연구에 사용하였다(Fig. 17). 그러나 나노분말을 가공할 경우, 가공 공정 자체만을 놓고 볼 때 현재 국내 가공 수준이나 제조하는데 걸리는 시간, 수율, 나노가공장비의 가격적인 문제 등을 고려하면 경제성이 떨어지는 것으로 확인 되었다.



**Fig. 17. Pacific oyster shell's nano scaled powder photograph.**

A: Attrition Mill powder, B, Ball Mill powder

다. 가공분말의 성분분석 결과

일반 및 초미세 가공분말에 대한 일반성분을 분석하였다. 일반성분에 대해서는 일반분말과 초미세분말 등에서 거의 2% 이내로 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 가공 시 40℃이하에서 가공 처리하기 때문에 열에 대한 변성 등 성분에 큰 차이를 보이지 않아 성분분석에서는 방법 일반분말과 초미세분말에 대해서 주로 조사하였고, 일반 분쇄, 초미세 분쇄, 나노 분쇄 가공방법에 따라 물성의 변화가 일어날 가능성이 있어 3종류 모두 실험에 이용하였다.

(1) 수분 정량

건식 수분 측정 장치인 Mettler HB43 (Mettler Toledo Co.)를 이용하여 수분을 정량하였다. Table 6의 결과에서 알 수 있듯이 6개의 시료 모두 초미세분말과 일반분말의 함수율은 1%(w/w) 이하 인 것으로 확인 되었으며, 일반분말에 비해 초미세분말이 함수율이 약간 높은 것은 분말 입도가 작아 비표면적이 증가하면서 공기 내 수분을 포집하여 증가하는 것으로 추정된다(Table 9).

**Table 9. Moisture content of various mollusk shells.<sup>1)</sup> (Unit: %)**

| Powdre type | <i>Crassostrea gigas</i> | <i>Mytilus coruscus</i> | <i>Ruditapes philippinarum</i> | <i>Scapharca broughtonii schrenck</i> | <i>Fulvia mutica</i> | <i>Macra veneriformis</i> |
|-------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------|---------------------------|
| Normal      | 0.48±0.03 <sup>2)</sup>  | 0.43±0.11               | 0.44±0.04                      | 0.36±0.04                             | 0.50±0.04            | 0.54±0.05                 |
| Hyperfine   | 0.64±0.05                | 0.91±0.03               | 0.79±0.03                      | 0.69±0.05                             | 0.64±0.06            | 0.59±0.03                 |

<sup>1)</sup> Dry condition: 100℃, <sup>2)</sup> All experimental date were mean±SD of triple determinations.

(2) 조단백질 정량

Kjeldahl 법으로 정량하였으며, Buechi Auto Kjeldahl Unit K-370(Buechi)을 사용하였다. 결과에 의하면, 일반 분말과 초미세분말 모두 6개의 시료중 홍합을 제외하고 1%(w/w)내외의 단백질을 함유하는 것으로 확인 되었으며, 일반 분말의 경우 초미세분말 보다 6개의 시료 모두에서 조단백질 함량이 굽은 40.5%, 홍합 71.5%, 바지락 38.9%, 피조개 37.0%, 새조개 50.0%, 등죽 32.4% 이상 많은 것으로 확인 되었다. 이것은 초미세 분말의 입도가 아주 작아 가공 중 패각 내 고분자의 단백질이 소실된 것으로 추정 된다(Table 10).

(3) 조지방 정량

조지방의 측정은 Soxhlet 지방추출법을 사용하여 정량하였다. 일반분말과 초미세분말 모두



조지방 함량은 0.02 ~ 0.06%로 가공 형태에 따라 조지방의 차이는 있지만, 큰 차이는 없는 것으로 확인 되었다(Table 11).

**Table 10. Crude protein content of various mollusk shells.<sup>1)</sup> (Unit: %)**

| Powdre type | <i>Crassostrea gigas</i> | <i>Mytilus coruscus</i> | <i>Ruditapes philippinarum</i> | <i>Scapharca broughtonii schrenck</i> | <i>Fulvia mutica</i> | <i>Mactra veneriformis</i> |
|-------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------------|
| Normal      | 1.18±0.01 <sup>1)</sup>  | 3.17±0.06               | 1.00±0.02                      | 1.00±0.05                             | 1.11±0.01            | 0.98±0.02                  |
| Hyperfine   | 0.84±0.01                | 1.85±0.21               | 0.72±0.07                      | 0.73±0.01                             | 0.74±0.07            | 0.74±0.03                  |

<sup>1)</sup> All experimental date were mean±SD of duplicate determinations

**Table 11. Crude fat content of various mollusk shells.<sup>1)</sup> (Unit: %)**

| Powdre type | <i>Crassostrea gigas</i> | <i>Mytilus coruscus</i> | <i>Ruditapes philippinarum</i> | <i>Scapharca broughtonii schrenck</i> | <i>Fulvia mutica</i> | <i>Mactra veneriformis</i> |
|-------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------------|
| Normal      | 0.06±0.01 <sup>1)</sup>  | 0.02±0.02               | 0.03±0.01                      | 0.02±0.01                             | 0.05±0.02            | 0.03±0.01                  |
| Hyperfine   | 0.02±0.02                | 0.02±0.01               | 0.03±0.01                      | 0.03±0.01                             | 0.04±0.02            | 0.05±0.01                  |

<sup>1)</sup> All experimental date were mean±SD of duplicate determinations

#### (4) 조회분 정량

회화로 Thermolyne F6010 (Thermolyne Co.) 장치를 이용하여 550℃에서 overnight 시켰으며, 건식 회화법으로 회분을 정량하였다. Table 12에 의하면, 일반분말과 초미세분말의 조회분 함량이 약 96 ~ 98% 수준으로 거의 비슷한 것으로 나타났다.

**Table 12. Crude ash content of various mollusk shells.<sup>1)</sup> (Unit: %)**

| Powdre type | <i>Crassostrea gigas</i> | <i>Mytilus coruscus</i> | <i>Ruditapes philippinarum</i> | <i>Scapharca broughtonii schrenck</i> | <i>Fulvia mutica</i> | <i>Mactra veneriformis</i> |
|-------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------------|
| Normal      | 97.84±0.89 <sup>1)</sup> | 96.22±0.48              | 97.62±0.52                     | 97.35±0.57                            | 97.88±0.79           | 97.61±0.38                 |
| Hyperfine   | 97.16±0.52               | 95.95±0.28              | 96.22±0.36                     | 96.48±0.44                            | 97.18±0.62           | 96.41±0.32                 |

<sup>1)</sup> All experimental date were mean±SD of triple determinations

(5) 탄수화물 정량

본 실험에서의 탄수화물 함량 Phenol-sulfuric acid 방법으로 정량화 하였다. 탄수화물의 total sugar정량을 위하여 6종류의 시료(굴, 홍합, 바지락, 피조개, 새조개, 동죽)에 대한 일반 분말과 초미세분말을 이용하였으며, 0.1mg 까지 측정 가능한 미세저울에서 정확하게 분말을 10mg 정량한 후 0.2ml 물에 넣고, 그 시료에 5% phenol 0.2ml와 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1ml를 가하여 강하게 vortex를 하였다. 그 후 상온에서 15분간 방치하고 10,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등 액을 분광광도계를 이용하여 480nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 당 함량이 굴의 일반 분말과 초미세분말에서 약 0.34%(w/w)로 타 시료에 비해 높게 나왔고, 홍합(약 0.26%(w/w))을 비롯한 그 외 다른 시료에서는 거의 유사한 당 함량 %(w/w)를 가지는 것으로 확인되었다. 지금까지 결과로 보면(Table 13) 각 시료의 전체 성분함량(수분, 조단백, 지방, 탄수화물, 회분)의 합이 100%에 미치지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 그 외 밝혀지지 않는 다른 성분들이 있는 것으로 추정된다.

Table 13. Compositions of various mollusk shells.<sup>1)</sup>

(Unit: %)

| Powder type      | Moisture | Crude protein | Crude fat | Sugar     | Crude ash |       |
|------------------|----------|---------------|-----------|-----------|-----------|-------|
| A <sup>1)</sup>  | 0.48     | 1.18          | 0.06      | 0.34±0.01 | 97.84     |       |
| B                | 0.43     | 3.17          | 0.02      | 0.26±0.02 | 96.22     |       |
| Normal powder    | C        | 1.00          | 0.03      | 0.21±0.03 | 97.62     |       |
|                  | D        | 0.36          | 1.00      | 0.21±0.01 | 97.35     |       |
|                  | E        | 0.5           | 1.11      | 0.05      | 0.23±0.01 | 97.88 |
|                  | F        | 0.54          | 0.98      | 0.03      | 0.25±0.03 | 97.61 |
| A                | 0.64     | 0.84          | 0.02      | 0.35±0.02 | 97.16     |       |
| B                | 0.91     | 1.85          | 0.02      | 0.27±0.01 | 95.95     |       |
| Hyperfine powder | C        | 0.79          | 0.72      | 0.03      | 0.22±0.01 | 96.22 |
|                  | D        | 0.69          | 0.73      | 0.03      | 0.25±0.02 | 96.48 |
|                  | E        | 0.64          | 0.74      | 0.04      | 0.23±0.01 | 97.18 |
|                  | F        | 0.59          | 0.74      | 0.05      | 0.26±0.01 | 96.41 |

<sup>1)</sup>A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Mactra veneriformis*.

(6) 패각과 패류(가식부)의 일반성분 비교

국립수산과학원의 해양수산연구정보 중 한국수산물성분표에 기록된 패류 (가식부)의 일반 성분표와 본 연구에서 정량한 패각의 일반 성분표를 비교해보면, 패각에 있어서는 조회분 함량이 96 ~ 98%로 주류를 이루었고, 패류(가식부)에서는 수분함량이 74 ~ 83%로 주류를 이루었다. 필수영양소인 조단백질, 조지방 및 탄수화물 (당질)에 있어서는 패류 (가식부)가 월등히 많은 것으로 조사되었으며(Table 14), 조회분 함량이 96~98%인 패각과는 많은 차이를 보이고 있었다. 따라서 패각류의 가식부와 패각은 각기 다른 용도로 기능별로 분류하여 사용한다면, 상업적으로도 활용가치가 높을 것으로 사료된다.

Table 14. Compositions of edible portion from various mollusk shells. (Unit: %)

| Mollusk shells                        | Content (%) |               |           |       |           |
|---------------------------------------|-------------|---------------|-----------|-------|-----------|
|                                       | Moisture    | Crude protein | Crude fat | Sugar | Crude ash |
| <i>Crassostrea gigas</i>              | 80.4        | 10.5          | 2.4       | 5.1   | 1.6       |
| <i>Mytilus coruscus</i>               | 82.8        | 9.7           | 1.2       | 4.0   | 2.3       |
| <i>Ruditapes philippinarum</i>        | 82.2        | 13.0          | 1.1       | 0.7   | 3.0       |
| <i>Scapharca broughtonii schrenck</i> | 81.2        | 11.8          | 2.2       | 3.0   | 1.8       |
| <i>Fulvia mutica</i>                  | 73.9        | 21.5          | 1.9       | 1.3   | 1.4       |
| <i>Macraa veneriformis</i>            | 82.7        | 11.8          | 1.6       | 0.9   | 3.0       |

\* Origin: National Fisheries Research & Development Institute

### (7) 무기질 정량

6종류 시료 내에 함유된 무기물에 대한 분석을 실시한 결과 Ca, Na, Mg, Se, K, Fe, P, Li, Mn 등이 함유되어있는 것으로 확인되었다(Table 15). 폐각 내에 존재하는 주된 무기물질은 Ca, Na이 거의 대부분을 차지하고 있고, 그 뒤를 Mg, K이 차지하고 있다. 일반적으로 Se의 경우 항암작용과 관련해서 많이 보고 있는데, 폐각 내 Se가 미량 함유되어있는 것으로 확인되어 분말을 이용한 건강 기능성 식품에도 활용이 가능할 것으로 생각된다. 그리고 D(피조개) 시료의 경우 다른 시료에 비해 Fe함량이 높은 것으로 확인되었다. 따라서 피조개 폐각을 가공한 보혈 및 칼슘보강제의 개발도 가능 할 것으로 사료된다. P의 경우 균과 혼합에 함유되어 있는 것으로 확인 되었다. 따라서 이러한 무기질을 기능별로 분류하고 정제 가공하여 사용할 경우 상업적으로 이용 가능한 제약, 화장품, 식품 분야 등에 활용이 가능할 것으로 사료 된다. 일반분쇄 분말과 초미세 분말에 대한 무기질 분석 결과 같은 시료임에도 무기질 농도에 차이를 보이고 있는 것은 초미세분말의 경우 분체입도가 작아 비표면적이 커지면서 용매에 대한 용해도가 일반분말보다 증가하여 무기질함량이 일반분쇄분말보다 약간 높게 나오는 것으로 사료된다.

### (8) 비타민 및 지방산 정량

초미세분말을 이용하여, 각각의 지방산과 지용성 비타민을 분석하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

6종류의 시료에 대한 지방산과 지용성비타민을 분석한 결과(Table 16, 17) 바지락의 폐각 미세 분말에서 지용성 비타민인 Astaxanthin, Retinol과 지방산인 Elaidic acid가 각각 1,033.94ng/g, 1,039.02ng/g, 4,360.57ng/g, 새조개에서는 Retinol, Elaidic acid, Nervonic acid가 각각 790.13ng/g, 5,617.63ng/g, 685.79ng/g이 타 시료에 비해 비교적 높게 함유되어 있는 것으로 확인되었으며, 각 시료에 대해서도 대부분 Elaidic acid, Nervonic acid, Palmitic acid, Tetradecanoic acid의 순으로 지방산 함량이 높은 것으로 확인되었다. 특히, 지방산 구성비 중 가장 높은 비중을 차지하는 Elaidic acid는 이미 트랜스 지방으로 널리 알려져 있다. 트랜스 지방산은 우리 몸의 필수 지방산과 대체되어 세포막, 호르몬 각종 효소 등 생체 기능 조절 물질을 방해하는 인자로 작용하여 면역력 저하를 유발한다. 트랜스 지방의 섭취가 2% 증가하면, 심장병 위험이 25-30% 증가하는 것으로 영국의학 전문 잡지인 LANCET에 보고되고 있으며, 미국 하버드 의대 프랭크 후 박사는 트랜스 지방의 섭취를 2% 늘리면 당뇨병 발생률이 39% 증가한다고 보고되고 있다. 그러나 트랜스 지방이 나쁜 것 만은 아니다. 2006년 일본 도후쿠 대학 엔도야스시 교수 등이

Table 15. Mineral compositions of normal and hyperfine powder from various mollusk shells<sup>1)</sup>  
(Unit: ppm)

| Minerals  | Normal powder   |       |       |       |       |       | Hyperfine powder |       |       |       |       |       |
|-----------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | A <sup>2)</sup> | B     | C     | D     | E     | F     | A                | B     | C     | D     | E     | F     |
| <b>Mg</b> | 38.19           | 23.42 | 4.49  | 4.25  | 4.34  | 2.78  | 44.48            | 37.24 | 3.28  | 3.75  | 7.33  | 2.25  |
| <b>Se</b> | 0.12            | 0.23  | 0.11  | 0.17  | 0.11  | 0.17  | 0.20             | 0.18  | 0.15  | 0.22  | 0.16  | 0.17  |
| <b>Cu</b> | - <sup>3)</sup> | -     | -     | -     | -     | -     | -                | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>K</b>  | 13.35           | 3.03  | 7.13  | 4.03  | 8.20  | 5.62  | 16.49            | 7.07  | 10.98 | 6.48  | 11.09 | 5.54  |
| <b>P</b>  | 0.60            | 0.46  | -     | -     | -     | -     | 0.15             | 0.26  | -     | -     | -     | -     |
| <b>Sn</b> | -               | -     | -     | -     | -     | -     | -                | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>Ca</b> | 4,716           | 5,196 | 4,683 | 4,659 | 3,957 | 5,089 | 4,252            | 3,844 | 3,474 | 4,523 | 3,980 | 3,779 |
| <b>Na</b> | 218.2           | 90.16 | 163.8 | 145.4 | 182.8 | 169.5 | 260              | 171.5 | 229.2 | 177.4 | 265.3 | 205.4 |
| <b>As</b> | -               | -     | -     | -     | -     | -     | -                | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>Cd</b> | -               | -     | -     | -     | -     | -     | -                | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>Co</b> | -               | -     | -     | -     | -     | -     | -                | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>Cr</b> | -               | -     | -     | -     | -     | -     | -                | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>Fe</b> | -               | 0.08  | 0.18  | 1.08  | -     | 0.43  | -                | 0.80  | 0.06  | 0.01  | 0.66  | 0.43  |
| <b>Li</b> | 0.07            | 0.02  | 0.10  | 0.01  | -     | -     | 0.03             | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>Mn</b> | 0.21            | 0.10  | 0.48  | 0.41  | 0.04  | 0.36  | 0.16             | -     | 0.08  | 0.17  | 0.01  | 0.11  |
| <b>Mo</b> | -               | -     | -     | -     | -     | -     | -                | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>Ni</b> | -               | -     | -     | -     | -     | -     | -                | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>Pb</b> | -               | -     | -     | -     | -     | -     | -                | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>Sb</b> | -               | -     | -     | -     | -     | -     | -                | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>Zn</b> | -               | -     | -     | -     | -     | -     | -                | -     | -     | -     | -     | -     |

<sup>1)</sup> All experimental data were triple determinations.

<sup>2)</sup> A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.

<sup>3)</sup> - : Not detected

The journal of general and applied microbiology에 투고한 내용을 살펴보면, 트랜스 지방인 elaidic acid는 장내 유산균(Lacto bacillus)의 세포막 구성성분으로 이용되어 유산균의 증식을 촉진하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 트랜스 지방산이 prebiotics로 작용할 가능성을 제시 하였으며, 동시에 트랜스 지방을 감소시키기 위해서는 유산균을 활용한 발효기술을 접목하는 것도 좋은 방법일 것으로 판단된다.

꽤각가운데 Elaidic acid의 비율은 종에 따라 다르지만, 전체 지방산 가운데 바지락의 경우에는 76%, 새조개는 68%로 높은 비중을 차지하고 있는 것으로 보여지나 실제 그 농도는 약 4-6 $\mu\text{g/g}$ 으로, 우리나라 평균 1일 트랜스 지방 섭취량인 0.37g인 점을 감안해 볼 때 꽤각분말 1kg을 복용해도 4-6mg 이므로 그다지 걱정할 수준은 아닌 것으로 판단된다.

Retinol은 동물의 장(腸) 점막세포에 존재하며, 녹황색 식물에 많이 들어 있다. 활성 형태인 레티노인산(retinoic acid)으로 변형되기도 하며, 포피세포가 원래의 기능을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 피부세포에 존재하는 세포 핵 가운데 DNA로 하여금 RNA를 발현시켜 세포분화를 촉진하고, 동물의 세포 사이에 섬유상 고체로 존재하는 경단백질인 콜라겐과 탄성섬유로 구성된 엘라스틴 등의 생합성을 촉진해 주름을 감소시키고 피부 탄력을 증대시키는 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Fig 18).

피부의 방사선에 대한 고유 민감도와 RAR- $\beta$ 의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있는 Retinol의 경우, 동죽과 바지락에서 13-cis retinol 함량이 높게 확인되었으며, 지용성비타민 가운데 Vitamin A에 관련된 8종에 관한 세부 추후연구가 요구된다. 또한 강력한 항산화제인 Tocopherol의 경우, 피조개가  $\alpha$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol이 1,134.44 ng/g, 1,333.80 ng/g으로 6개의 시료 중 가장 높은 함량을 가지는 것으로 밝혀졌다.

골다공증에 관여하는 Vitamin K2는 굴과 새조개에서 각각 673.84 ng/g, 611.84 ng/g, 557.44 ng/g으로 높게 검출되었다.

특히, 항산화제인 Tocopherol보다 100배 이상의 항산화력을 지닌 Astaxanthin은 수피 Vt E (Tocopherol)라 불리는 천연 카로티노이드 계 물질로 현재까지 알려진 가장 강력한 항산화물질 중의 하나로 특히 일중항산소의 활성산소제거능이 탁월하다. 이러한 Astaxanthin은 바지락에 1,033.94 ng/g으로 가장 많이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다.

Table 16. Burdens of fatty acid on mollusk shells.

(Unit:ng/g)

| Fatty acids                         | A <sup>1)</sup> | B               | C        | D        | E        | F        |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|----------|----------|----------|----------|
| Hexanoic acid                       | 2.16            | 57.14           | 20.34    | 4.24     | 139.93   | 0.25     |
| Heptanoic acid                      | 14.81           | 267.49          | 12.19    | 26.42    | 18.33    | 5.20     |
| Octanoic acid                       | 17.69           | 290.66          | 15.53    | 46.56    | 16.46    | 6.98     |
| Decanoic acid                       | 4.33            | 1.33            | 13.45    | 10.27    | 20.99    | 6.93     |
| Dodecanoic acid                     | 50.52           | 4.76            | 16.56    | 19.96    | 17.64    | 6.37     |
| Tridecanoic acid                    | 8.02            | - <sup>2)</sup> | 5.94     | 10.66    | 8.38     | 5.02     |
| Tetradecanoic acid                  | 233.95          | 41.76           | 50.09    | 71.86    | 76.37    | 32.67    |
| Pentadecanoic acid                  | 27.02           | 11.99           | 23.22    | 33.50    | 36.76    | 13.89    |
| Palmitoleic acid                    | 39.06           | 46.17           | 56.24    | 87.50    | 87.17    | 34.22    |
| Palmitic acid                       | 302.30          | 139.51          | 234.35   | 356.43   | 349.17   | 153.41   |
| Heptadecanoic acid                  | 75.25           | 12.35           | 84.91    | 177.12   | 29.80    | 46.04    |
| Linoleic acid                       | 107.91          | 58.57           | 46.88    | 54.60    | 65.40    | 30.02    |
| Petroselinic acid                   | 51.14           | 18.93           | 76.78    | 55.64    | 102.67   | 30.43    |
| Linolenic acid / Oleic acid         | 90.80           | 9.79            | 14.23    | 13.84    | 25.51    | 4.47     |
| Elaidic acid                        | 838.52          | 1,583.38        | 4,360.57 | 2,770.90 | 5,617.63 | 1,339.77 |
| cis-5,8,11,14 Eicosatetraenoic acid | 21.30           | 468.54          | 34.08    | -        | 397.56   | 71.51    |
| Docosahexanoic acid                 | 107.70          | 143.36          | 101.88   | 107.68   | 457.52   | 60.38    |
| Erucic acid                         | 42.44           | 307.94          | 96.99    | 70.41    | 88.13    | 6.77     |
| Nervonic acid                       | 80.20           | 0.88            | 464.96   | 366.19   | 685.79   | 271.96   |

<sup>1)</sup>A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.

<sup>2)</sup> - : Non detected

Table 17. Burdens of fat-soluble vitamins on mollusk shells.

(Unit:ng/g)

| Vitamins         | A <sup>1)</sup> | B      | C        | D               | E      | F      |
|------------------|-----------------|--------|----------|-----------------|--------|--------|
| 13-cis retinol   | 0.96            | 0.96   | 0.96     | - <sup>2)</sup> | -      | 781.26 |
| Retinol          | 297.72          | 189.26 | 1,039.02 | 690.57          | 790.13 | 230.91 |
| Astaxanthin      | 90.73           | 186.16 | 1033.94  | -               | 291.45 | -      |
| delta-Tocopherol | -               | 1.63   | -        | -               | -      | -      |
| gamma-Tocopherol | -               | 3.05   | -        | 1,333.80        | -      | -      |
| Cholecalciferol  | 10.94           | 30.80  | -        | -               | -      | -      |
| Ergocalciferol   | -               | -      | -        | -               | -      | -      |
| alpha tocopherol | -               | -      | -        | 1,134.44        | -      | -      |
| Vitamin K1       | 239.01          | -      | -        | 165.80          | -      | 218.57 |
| Vitamin K2       | 673.84          | 431.24 | 280.25   | 388.30          | 611.94 | 557.44 |

<sup>1)</sup>A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.

<sup>2)</sup> - : Non detected



(9) 유기물의 구성성분 분석

유기물의 구성성분은 TLC (Thin layer chromatography)로 분석하였다. TLC 분석에는 silica gel 60 F<sub>254</sub> glass plate(Merck Co., German)를 사용하고 전개용매는 BEA(n-butanol : acetic acid : water = 2 : 1 : 1, v/v)를 사용하였으며, 검출시약은 당 분석을 위해 α-naphtoresorcinol, 단백질은 ninhydrine, 지질은 rhodamin 6G를 사용하였다. 6종류의 폐각에서 분리한 chonchiolin에 대한 성분을 TLC로 분석하였다. 전개 후 105℃ 건조기에서 20분간 TLC판을 건조하고, ninhydrin spray로 분무하여 TLC판에 적신 후 105℃ 건조기에서 반응을 시켜 spot의 색을 확인 하였다. 그 결과 Rf=0.581(a)의 이동거리에 각 시료에서 분리한 conchiolin의 spot이 동시에 확인되었다. 표준물질로 사용된 glutamic acid(Rf=0.065)는 ninhydrin 반응 시 진청색의 색깔이 나타났지만 6종류에서 동시에 나타난 Rf=0.581(a)의 경우 노란색 빛의 spot 주변에 진청색의 연한 테두리가 형성됨을 알 수 있다.

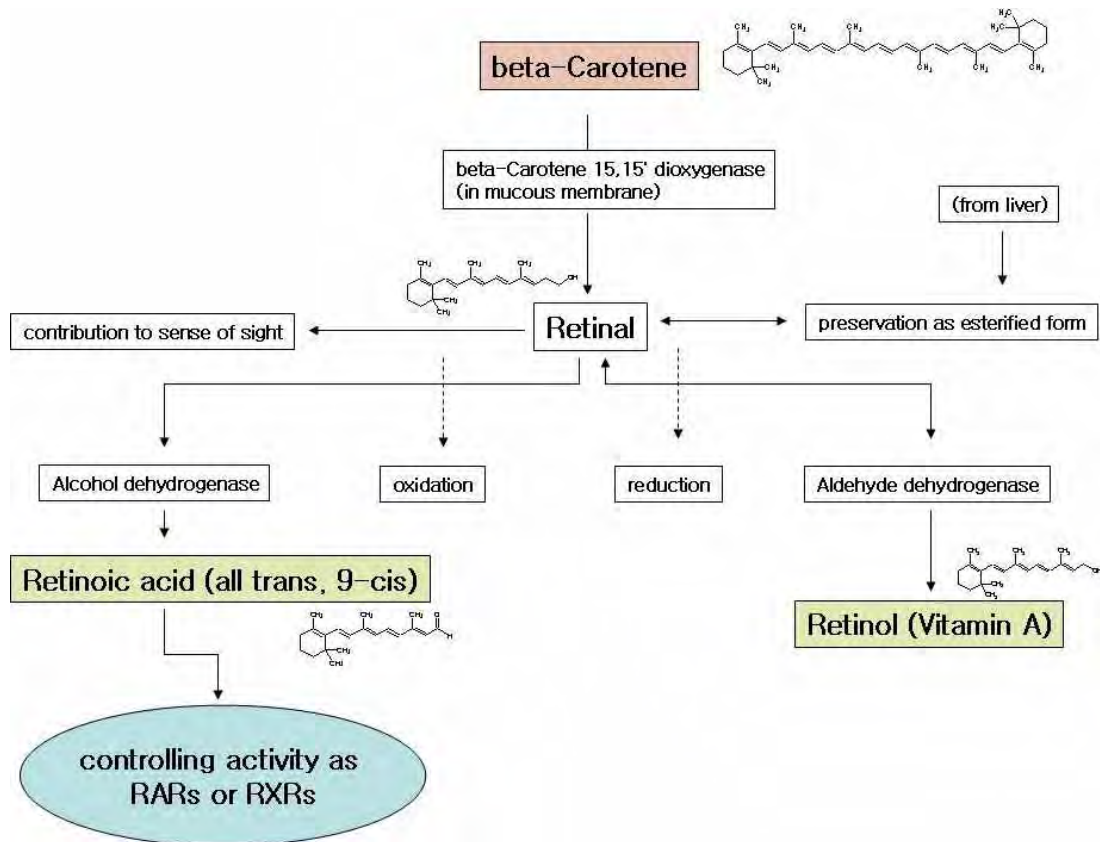
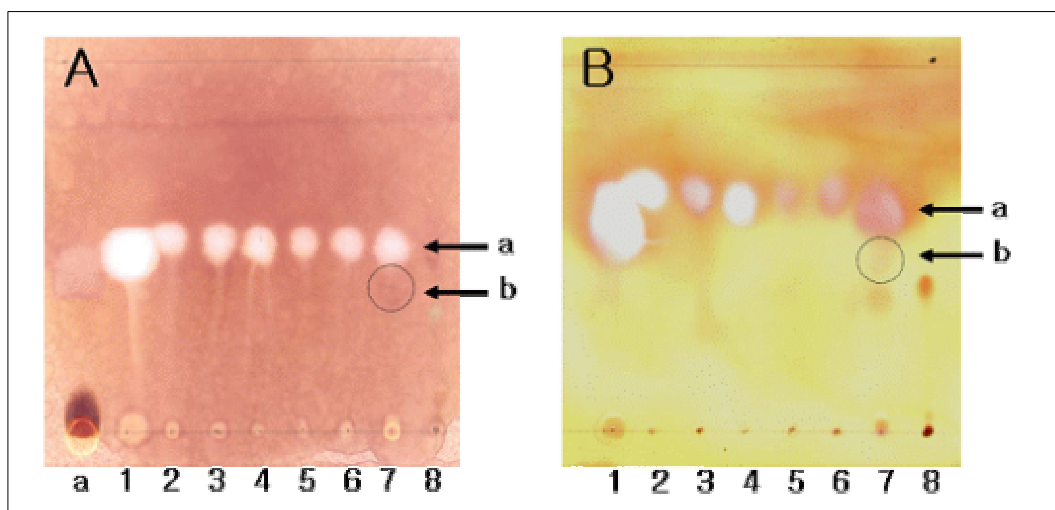


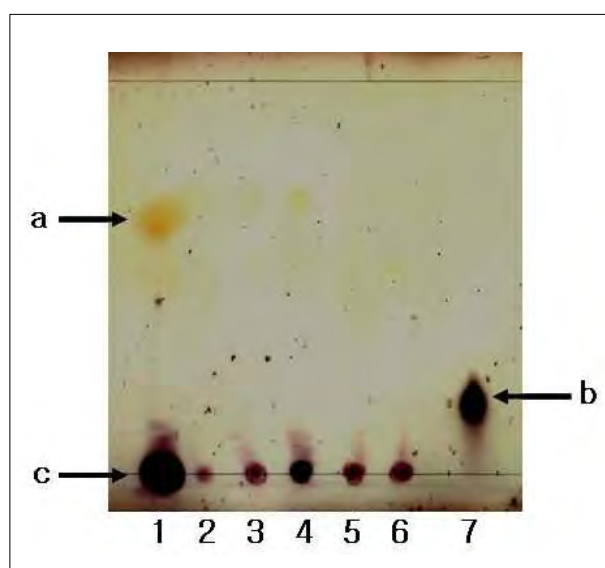
Fig. 18. Generation pathway of Retinol derivatives

따라서 추출한 conchiolin의 경우 단백질임은 확인되었지만, 단일 단백질인지 다른 종류가 결합된 복합체인지 명확하지 않았다. 왜냐하면 ninhydrin의 경우 아미노산과 peptide등에 포함되어 있는 아민기와 주로 반응을 하여 진청의 발색을 하기 때문에 고분자 단백질의 구조에 따라 발색의 정도가 달라진다. 따라서 단백질인지의 여부를 확인하기 위해 A plate에는 굳에서 추출한 conchiolin에 pepsine 용액 (0.1% w/v, pepsine/ 50mM tris-HCl pH 7.0 buffer)을 B plate에는 Trypsine (0.1% trypsin/ 50mM tris-HCl pH 7.0 buffer)을 처리하여 각각에 100 $\mu$ l의 용액을 conchiolin 용액 900 $\mu$ l에 넣고 37 $^{\circ}$ C 1시간 반응하여 단백질을 가수분해 시켰다. 그 결과 pepsine을 처리한 A plate에는 7번 lane의 b spot(Rf=0.452)이 확인되었고 B plate 에도 7번 lane의 b spot (Rf=0.452)이 확인되어 단백질임이 증명되었다. 또한 이 가수분해 효소들을 이용할 경우 peptide를 유도해 낼 수 있어, conchiolin을 이용한 기능성 peptide 연구에 대한 가능성을 확인할 수 있었다(Fig. 19)

당 분석을 위하여 단백질 분석과 동결한 전개용매를 사용하여 건조 후 TLC판을 전개하였으며 105 $^{\circ}$ C 건조기에서 20분간 건조 후 먼저 당 발색을 위한  $\alpha$ -naphtholresorcinol 시약을 사용하였다. 발색을 위하여 먼저 A solution (20% v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/EtOH)에 TLC판을 dipping 하여 건조하고 다시 B solution (0.2%  $\alpha$ -naphtholresorcinol/EtOH)에 dipping 하여 건조 한 후 발색을 관찰하였다. Fig. 20에 7번 lane에 glucose를 점적하여 표준 발색 물질을 하였으며, 1-6번 lane에 있는 c spot의 모든 시료가 7번과 동일한 색깔을 나타내었다. 따라서 conchiolin에 일부 함유된 당류는 고분자 다당으로 추정되어진다. a spot은 노란색으로 발색 하는데 이것은 A solution 처리 시 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 의해 건조 과정 중에 발색되는 것으로 추정되어진다. 따라서 TLC 두 결과를 종합해보면, a spot 부위는 단백질로 Fig. 20의 c spot 부위는 당으로 추정된다. 따라서 이들을 분리 정제한 후 재 분석 할 경우 정확한 결과를 알 수 있을 것으로 사료된다.



**Fig. 19.** TLC analysis of enzymatic hydrolysis products from conchiolin and six different conchiolin. Spots were detected with the ninhydrin reagent. Lane a: Glutamic acid, Lane1-6: Conchiolin (*Crassostrea gigas*, *Mytilus coruscus*, *Ruditapes philippinarum*, *Scapharca broughtonii schrenck*, *Fulvia mutica*, *Macra veneriformis*), Lane7-8: Treated enzyme (A: Pepsine, B: Trypsine)



**Fig. 20.** TLC analysis of six different conchiolin extracted from shells. Spots were detected with the  $\alpha$ -naphtoresorcinol. Lane1-6: Conchiolin (*Crassostrea gigas*, *Mytilus coruscus*, *Ruditapes philippinarum*, *Scapharca broughtonii schrenck*, *Fulvia mutica*, *Mactra veneriformis*), Lane7: Glucose

## 2. 껍질분말의 물성분석결과

### 가. 표면장력 측정

시료농도는 일반분말(>250 $\mu\text{m}$ )과 초미세분말(5-30 $\mu\text{m}$ ), 나노분말(<200nm)을 사용하였으며, 농도는 2%(w/v)의 시료를 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)를 녹인 후 측정하였다. 실험 대조군으로 일반적으로 널리 사용되고 있는 Tween 80을 사용하였으며 농도는 50 $\mu\text{l}$ /Buffer 10ml에 넣고 vortex 해서 교반한 후 측정 하였다. 그 결과 Tween 80의 표면장력은 42.3mN/m로 측정 되었으며 실험 내 사용된 6종류의 껍질에 대한 일반분말(>250 $\mu\text{m}$ )과 초미세 분말 (5-30 $\mu\text{m}$ ), 그리고 나노 분말 (<200nm)에 대한 표면장력의 결과 buffer의 표면장력 72.3 mN/m에 비해 일반분말의 경우 평균 71.6 mN/m, 새조개 71.3mN/m, 동족 71.9mN/m로 표면장력의 활성능력이 거의 없는 것으로 확인 되었다. 그러나 초미세 분말에서 나노 분말로 분체 입도가 작아질수록 표면장력의 활성 능력이 좋아지는 것은 측정결과 확인 할 수 있었지만 Tween 80과 같은 유화제로서의 기능을 갖는 것으로 해석하기는 힘들며, 분체입도가 작아지면서 물분자간의 결합력을 방해하여 나타나는 현상으로 사료된다. 그 중 가장 표면장력 저해능이 우수한 것은 혼합으로 나노 분체의 경우 62.3 mN/m의 표면장력을 가지는 것으로 확인 되었다(Fig. 21)

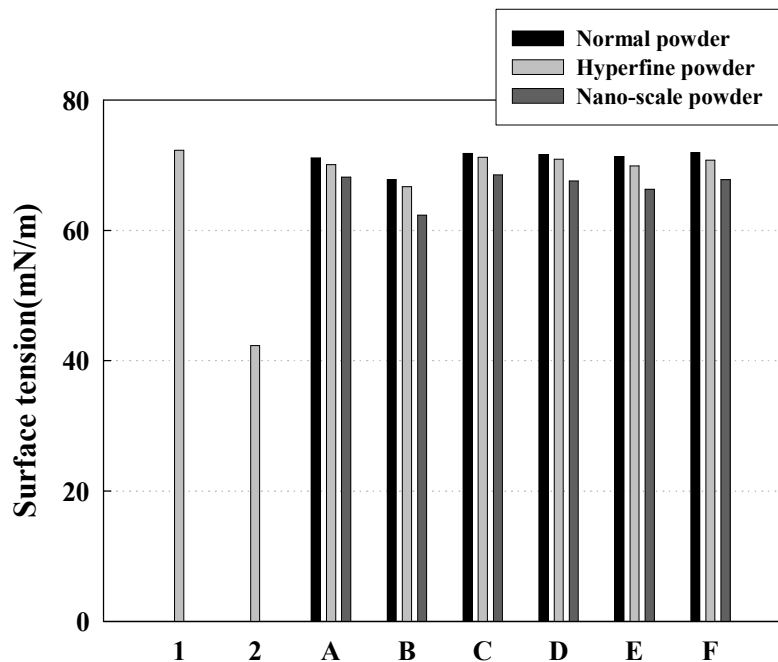


Fig. 21. Surface tension of various mollusk shells. 1: Control, 2: Tween 80, A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Mactra veneriformis*.

나. pH에 대한 표면장력의 변화

2%(w/v)분말을 3종류의 buffer(pH3.0-6.0, 50mM citrate, sodium citrate buffer ; pH 6.0-8.0, 100mM phosphate buffer ; pH 9.0-10.0, 50mM boric acid- NaOH buffer)에 녹인 후 이들 시료 5%(v/v)를 해당 pH별 완충용액에 넣고 표면장력계(TD-1, Lauda, German)를 사용하여 pH별 표면장력의 변화를 측정하였다. 본 실험에 사용된 시료는 표면장력 활성이 좋은 홍합의 나노분말을 사용하였으며, pH 변화에 따른 표면장력의 변화를 분석한 결과 pH 5.0에서 62mN/m로 표면장력의 저하능이 가장 우수하여 최적는 pH 5.0임을 확인하였다. 또한 pH 3.0이하에서는 표면장력 저하능이 급격히 떨어지는 것으로 보아 나노 입자의 물에 대한 용해성이 떨어지는 것으로 확인할 수 있고 pH 5.0-9.0까지는 비교적 안정적으로 표면장력이 유지되는 것으로 확인되었다 (Fig. 22).

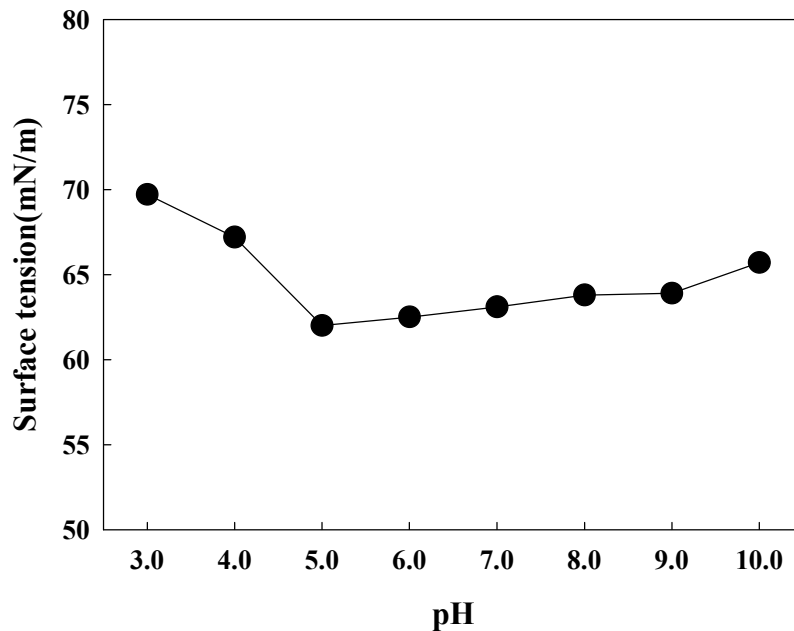


Fig. 22. Effect of pH on the surface tension of hard-shelled mussel solution. The pH of hard-shelled mussel solution in three kinds of buffer was varied, and it was measure at 25℃. pH3-6: 50mM citrate sodium citrate buffer, pH6-8:100mM phosphate buffer, pH8-10; 50mM Boric acid NaOH buffer.

다. 계면장력 측정

20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 2%(w/v)의 분말을 녹여서 준비한 후 동일한 buffer 9.5ml에 준비한 시료 0.5ml를 넣고, 5%(v/v) olive oil을 넣고 1분간 강하게 vortex 시킨 후 10분간 정치시켜 계면장력을 측정하였으며, 대조군으로 Tween 80을 50 $\mu$ l를 넣고 결과를 비교하였다. 본 실험에 사용된 시료는 6종류의 일반 분말, 초미세 분말과 나노 분말을 사용하였으며, 대조군으로 사용된 20mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer는 42mN/m, Tween 80 12mN/m 으로 측정 되었으며, 6개 시료 중 가장 표면장력 저하능이 우수한 혼합 나노 분말 시료의 경우 30.1mN/m로 측정되었다. 이것은 앞서 설명한 표면장력과 유사한 결과로 일반분말 보다는 나노 분말로 갈수록 계면 장력의 활성이 높아짐을 알 수 있었다. 결과는 오일과 물에 대한 시료의 반응성(용해도 포함)을 측정하기 위한 결과로 유화제에 비해 활성이 많이 낮음을 알 수 있다(Fig. 23).

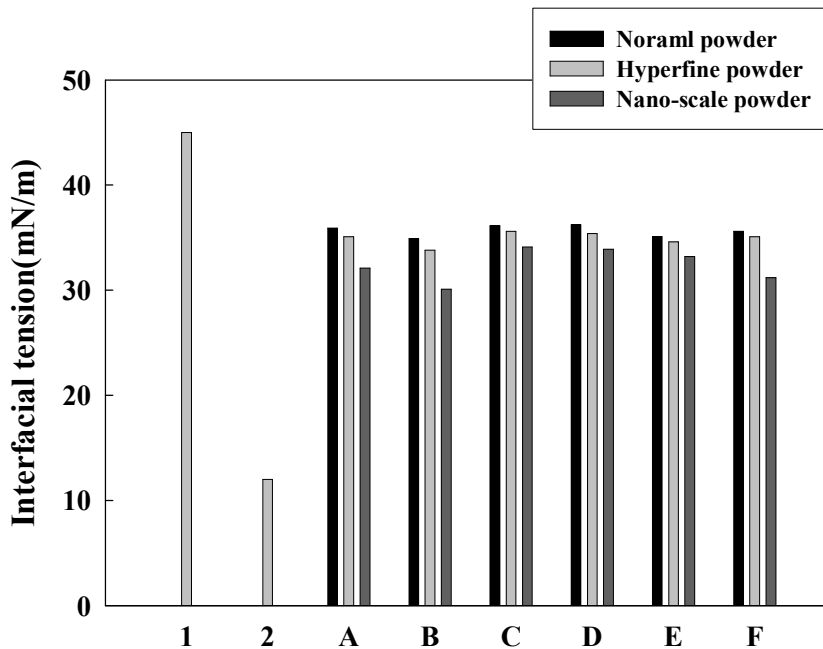


Fig. 23. Interfacial tension of six species shelles. 1: Control, 2: Tween 80, A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Maetra veneriformis*.

라. HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value

HLB는 계면활성제가 갖는 양친매성 성질에 대한 물리적 특성을 분석하기 위해 사용하는 실험 방법으로서 현재 사용 중인 모든 종류의 계면활성제의 기준이 되는 측정방법이다. 사용되는 6종류 시료는 모두 패각 류로 유화제로서의 기능보다는 용매에 대한 친화력 또는 용해도를 분석함을 목적으로 하기 때문에 실험 결과를 얻을 수 없었고 표면장력이나 계면장력의 결과에

서 볼 수 있듯이 유화활성이 아주 낮아 유화제로써의 기능이 없는 것으로 사료된다.

#### 마. 유화활성 및 유화 안정성

##### (1) 유화 활성

분말을 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 각각 2% (w/v)씩 넣고 Rosenberg E. 등(1979)의 방법을 응용하여 유화활성도를 측정하였다. 사용된 기질로는 olive oil을 사용하였으며, 유화안정성은 유화활성도 측정법과 동일한 방법으로 실험을 행한 후 10분, 30분 간격으로 620nm에서 흡광도를 측정하여 변화된 값의 기울기로부터 Kd 값을 산출하였다.

$$Kd = ( \log X_2 - \log X_1 ) / 10$$

(X<sub>1</sub> : 진탕 후 10분 정치시킨 후의 흡광도 값, X<sub>2</sub> : 매 30분 간격마다 측정한 흡광도 값)

6 종류의 시료에 대한 가공 방법별 (일반, 초미세, 나노) 유화활성도를 측정한 것과 대조구로 사용된 20mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer, Tween 20, Tween 60, Tween 80의 유화 활성도는 각각 0.49, 0.865, 2.016, 1.9740의 흡광도를 나타냈으며, 시료의 경우 control군인 buffer와 비교해서 활성도 차가 0.04-0.4 사이에 있기 때문에 유화 활성이 아주 낮은 것으로 분석되었다(Fig. 24).

##### (2) 유화 안정성

유화 활성을 유지하는 정도를 판단하는 유화 안정성 실험은 kd값이 (-) 값으로 낮아질수록 안정성이 떨어진다. 유화 활성을 주어진 방법에 의해 실험하고 10분간 정치시켜 흡광도를 측정하고 30분후 재차 흡광도를 측정하여 그 값의 변화를 분석하여 유화안정성을 확인한다. 실험결과, 대조구로 사용된 Tween 60(kd=-0.000129), Tween 80(kd=-0.00022)은 유화 안정성이 아주 우수하였으나 Tween 20(kd=-0.0124)은 Tween 60과 80에 비해 안정성이 매우 떨어졌다. 시료의 경우 buffer(kd=-0.0303)에 비해 유화 안정도는 우수하나 Tween 계열의 유화제와는 비교대상이 될 수 없는 것으로 확인되었다(Fig. 25).

#### 바. 온도 및 열 안정성

20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 분말 2%를 녹여 액상시료를 만든 후 온도 및 열안정성을 측정하였다. 실온(25℃)에서 측정한 유화활성도 값과 100℃에서 10분간 열처리한 시료의 유화활성도 값을 비교하였다. 본 실험에 사용된 시료는 6종류의 초미세 분말을 사용하였으며, 실온과 100℃에서 가열 처리한 시료를 이용하여 유화활성을 측정한 결과 유화활성도 변화에는 큰 차이가 없는 것으로 확인되어 폐각류 분말에 대한 열 안정성은 우수한 것으로 확인하였다(Fig. 26).



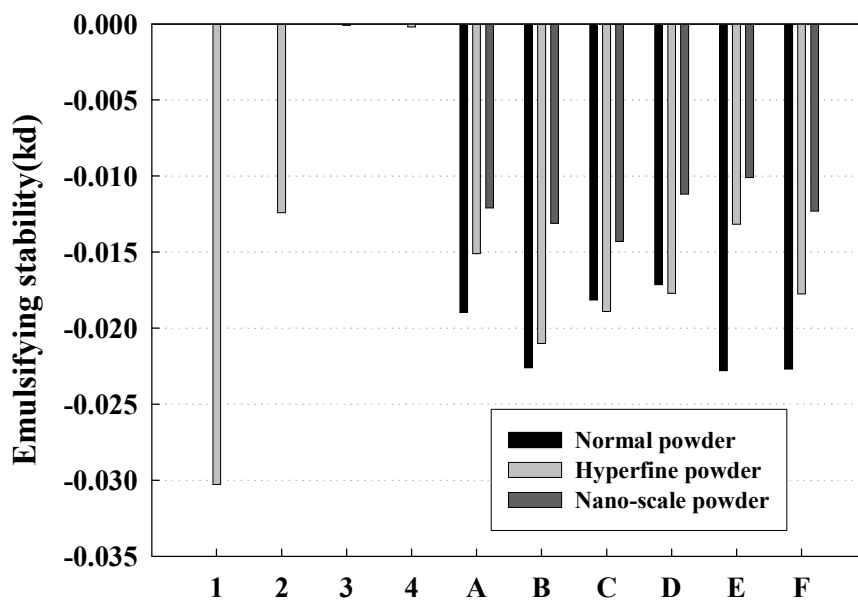


Fig. 24. Emulsifying stability of various mollusk shell. 1: Control, 2: Tween 20, 3: Tween 60, 4: Tween 80, A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macraa veneriformis*.

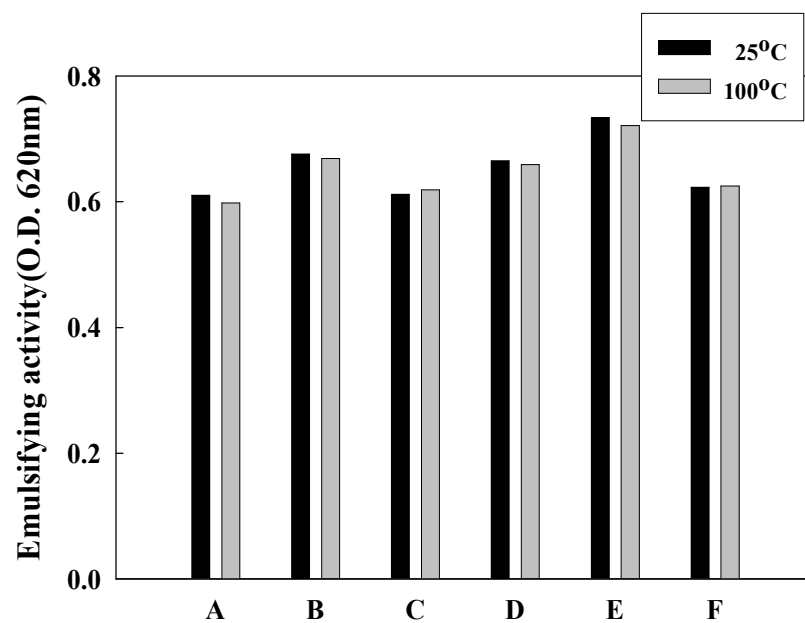


Fig. 25. Comparison of emulsifying activity for heat treatment samples. (A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.)

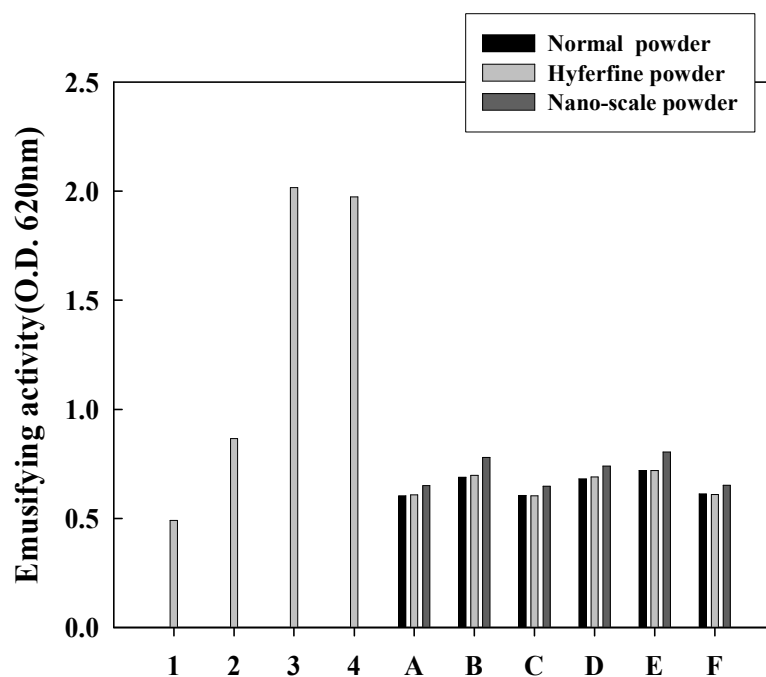


Fig. 26. Emulsifying activity of various mollusk shells. (1: Control, 2: Tween 20, 3: Tween 60, 4: Tween 80, A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.)

사. TG, DSC 열량분석

핀밀을 이용한 일반 분말과 초미세분말, 나노분말 그리고 콘키올린분말에 대한 TGA(Thermogravimetry analysis), 즉, 열 중량을 분석을 실시하였다. 조 콘키올린 분말의 경우 200℃이후부터 중량이 감소하는 것은 유기물(콘키올린)의 열분해가 진행되면서 중량이 감소되는 것으로 판단되며, 일반분말과 초미세분말의 경우 600℃이후부터 700℃사이에서 빠른 속도로 열 중량이 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 경향은 중량대비 유기물의 함량이 5% 이내로 낮아 같은 농도 대비, 조 콘키올린처럼 200℃ 근처에서 유기물의 분해양상이 약하게 나타나며, 600℃이후부터 급격히 열 중량 변화가 나타나는 것은 무기물들의 결합구조가 열에 의해 깨어지면서 급격한 중량 변화가 발생하는 것으로 판단된다. 그러나 나노분말의 경우에는 온도가 올라감에 따라 서서히 열 중량이 감소하다가 100℃정도 뒤늦은 700℃이후부터 무기물이 분해되는 것으로 확인 되었다. 이러한 경향은 일반분말이나 초미세분말에 비해 나노분자로 가공이 되었기 때문에 일반분말에 비해 나노 분자의 비표면적이 크고 분자 간 결합력이 강하게 작용하는 것으로 판단된다(Fig. 27). 또한 시차주사열량계를 이용한 열량분석에서도 추출한 콘키올린과 나노분말이 일반분말과 초미세분말의 중량대비 반응열이 높은 것으로 나타났다(Fig. 28).

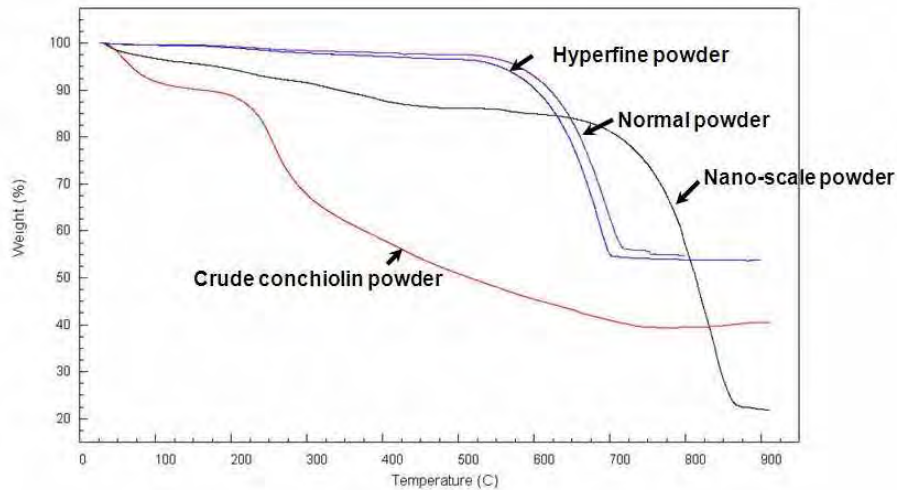
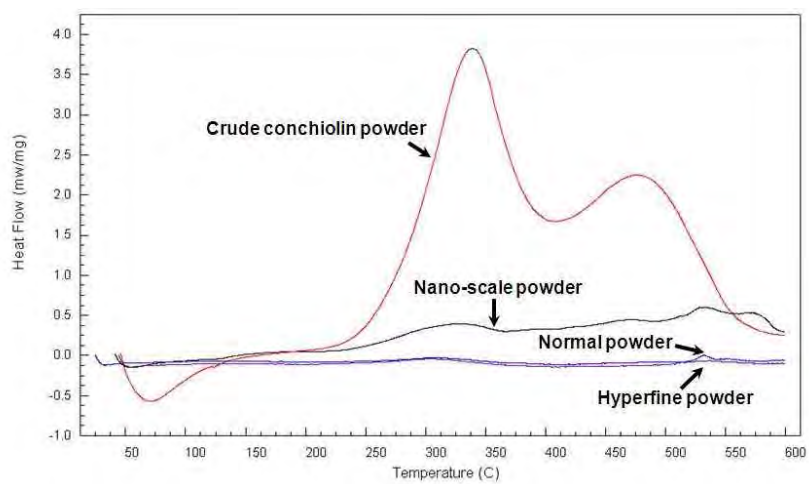


Fig. 27. Thermogravimetric analysis (TGA) of Pacific oyster



**Fig. 28. Differential Scanning Calorimeter (DSC) analysis of Pacific oyster**

### 3. 패각 추출물의 생리활성물질 연구결과

#### 가. 패각추출물의 추출 및 정제결과

##### (1) Conchiolin 의 추출

패각류 (굴, 홍합, 바지락, 피조개, 새조개 및 동죽)의 일반 및 초미세 가공분말을 이용하여 conchiolin을 추출한 후, 수득 율을 계산하여 생리활성측정에 사용하였다.

##### (가) Conchiolin 의 추출방법

패각류의 가공분말 30g을 이용하여 300 ml의 6.5 M acetic acid로 상온에서 3시간동안 탈 석회 시킨 후, 원심분리 (15 min, 12,000g)하였다. 불 용해된 침전물(Conchiolin)을 회수한 후, pellet 에 남아있는 여분의 acetic acid를 DDW로 제거하였고 65℃ dry oven에서 12시간동안 건조시킨 후 시료로 사용하였다(Fig. 29).

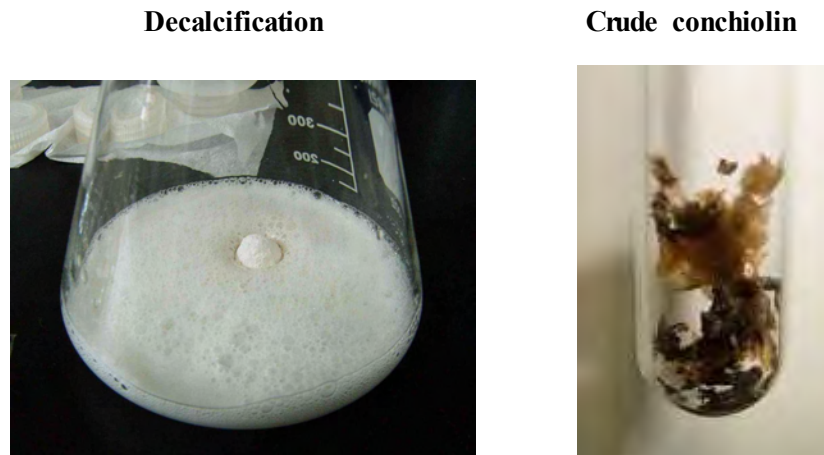


Fig. 29. Photograph of decalcification and recovery crude conchiolin

##### (나) Conchiolin의 수득율

Conchiolin의 추출방법에 의해 각종 패각의 conchiolin 수득 율을 구했으며 결과는 Table 18 와 같다. 패각의 종류에 따른 conchiolin의 수득 율은 동죽(일반)이 가장 낮은 0.53%, 홍합(일반)이 가장 높은 2.94%로, 종에 따른 차이는 존재하였으나 패각의 입도에 따른 차이는 1.5% 미만인 것으로 나타났다 (Fig. 30). 일반 분말과 초미세 분말의 제조단가 차이가 5배인 것을 감안 할 때, conchiolin의 수득 율의 차이가 1.5% 미만인 결과를 바탕으로 일반분쇄를 통해 얻어진

conchiolin에서 추출된 soluble conchiolin을 생리활성실험에 사용하는 것이 효율적인 것으로 판단되어 본 실험에 이용하였다.

**Table 18. Recovery rate of conchiolin from various mollusk shells<sup>1)</sup>**

| <b>Powder type</b>      |                       | <b>Dry weight (g)</b> | <b>Yield ratio(%)</b> | <b>Mean ± SD</b> |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| <b>Normal powder</b>    | <b>A<sup>2)</sup></b> | 0.5381                | 1.7937                | 1.66 ± 0.20      |
|                         |                       | 0.4549                | 1.5163                |                  |
|                         | <b>B</b>              | 0.9479                | 3.1597                | 2.94 ± 0.31      |
|                         |                       | 0.8166                | 2.7220                |                  |
|                         | <b>C</b>              | 0.2504                | 0.8347                | 0.83 ± 0.01      |
|                         |                       | 0.2490                | 0.8300                |                  |
|                         | <b>D</b>              | 0.1991                | 0.6637                | 0.67 ± 0.01      |
|                         |                       | 0.2000                | 0.6667                |                  |
|                         | <b>E</b>              | 0.1530                | 0.5100                | 0.57 ± 0.09      |
|                         |                       | 0.1908                | 0.6360                |                  |
|                         | <b>F</b>              | 0.1585                | 0.5283                | 0.53 ± 0.01      |
|                         |                       | 0.1597                | 0.5323                |                  |
| <b>Hyperfine powder</b> | <b>A</b>              | 0.5570                | 1.8567                | 1.80 ± 0.09      |
|                         |                       | 0.5200                | 1.7333                |                  |
|                         | <b>B</b>              | 0.4927                | 1.6423                | 1.39 ± 0.35      |
|                         |                       | 0.3441                | 1.1470                |                  |
|                         | <b>C</b>              | 0.2431                | 0.8103                | 0.87 ± 0.09      |
|                         |                       | 0.2800                | 0.9333                |                  |
|                         | <b>D</b>              | 0.1588                | 0.5293                | 0.60 ± 0.10      |
|                         |                       | 0.2006                | 0.6687                |                  |
|                         | <b>E</b>              | 0.2095                | 0.6983                | 0.60 ± 0.14      |
|                         |                       | 0.1492                | 0.4973                |                  |
|                         | <b>F</b>              | 0.2262                | 0.7540                | 0.73 ± 0.03      |
|                         |                       | 0.2123                | 0.7077                |                  |

<sup>1)</sup> All experimental data were mean ± SD of duplicate determinations.

<sup>2)</sup> A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.

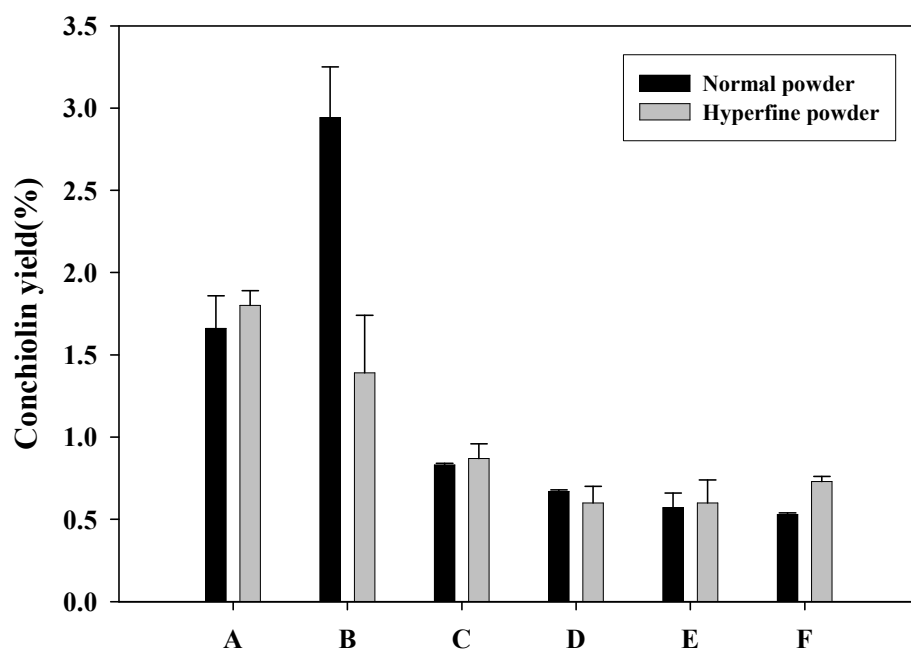


Fig. 30. Comparison of extraction efficiency on crude conchiolin yield between normal and hyperfine powder. The crude conchiolin of shell, which is only 1-3% by weight and there was no significant difference in crude conchiolin contents between both groups: A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.



(다) 아미노산 분석

6 종류의 초미세분말 시료로부터 탈 석회화 과정을 거쳐 추출한 conchiolin을 24시간 이상 투석하여 건조한 후 아미노산 분석에 사용한 결과 6종류의 대부분의 시료에서 Glutamic acid(14.48-15.34%)>Aspartic acid(11.2-12.43%)>Valine(7.28-7.79%)>Phenyl-alanine(6.98-8.10%)>Lysine (6.63-7.13%)>Leucine(4.98-7.03%)>Methionine(5.46-6.20%)>Glycine(4.81-5.38%)>Alanine (4.15-4.57%)>Histidine(3.89-4.14%)>Arginine(3.57-5.6)>Threonine(3.09-4.96)> Isoleucine(2.77-3.80%)>Serine(2.52-3.87)>Proline(2.21-3.42%)>Ammonia(1.59-2.22%)>Cystine(0.13-0.69)의 순서로 아미노산이 함유되어 있는 것으로 확인 되었다(Table 19).

**Table 19. Amino acid contents of six different conchiolins extracted from various mollusk shells**

| Amino acid contents<br>(mol %) | Mollusk shells  |       |       |       |       |       |
|--------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                | A <sup>1)</sup> | B     | C     | D     | E     | F     |
| Aspartic acid                  | 11.44           | 11.20 | 12.20 | 12.43 | 11.83 | 12.29 |
| Threonine                      | 4.96            | 4.85  | 3.09  | 3.65  | 4.18  | 4.08  |
| Serine                         | 3.87            | 3.83  | 2.52  | 2.88  | 3.20  | 3.13  |
| Glutamic acid                  | 15.34           | 15.04 | 15.10 | 15.24 | 15.13 | 14.48 |
| Proline                        | 2.21            | 3.37  | 2.86  | 3.00  | 3.42  | 3.00  |
| Glycine                        | 5.31            | 5.38  | 5.37  | 4.81  | 5.11  | 5.06  |
| Alanine                        | 4.57            | 4.56  | 4.18  | 4.21  | 4.37  | 4.15  |
| Cystine                        | 0.28            | 0.41  | 0.38  | 0.69  | 0.13  | 0.20  |
| Valine                         | 7.76            | 7.19  | 7.79  | 7.50  | 7.44  | 7.28  |
| Methionine                     | 5.85            | 5.46  | 6.16  | 5.74  | 6.02  | 6.20  |
| Isoleucine                     | 3.80            | 3.56  | 3.34  | 3.29  | 3.32  | 2.77  |
| Leucine                        | 7.00            | 7.03  | 6.33  | 6.21  | 6.10  | 4.98  |
| Tyrosine                       | 4.04            | 4.51  | 5.01  | 5.14  | 4.77  | 5.67  |
| Phenylalanine                  | 7.07            | 6.98  | 7.46  | 7.53  | 8.10  | 8.03  |
| Histidine                      | 4.14            | 4.07  | 4.12  | 4.00  | 3.89  | 3.96  |
| Lysine                         | 7.05            | 6.91  | 7.13  | 6.94  | 6.63  | 6.88  |
| Ammonia                        | 1.75            | 1.59  | 2.21  | 1.89  | 1.92  | 2.22  |
| Arginine                       | 3.57            | 4.04  | 4.76  | 4.84  | 4.43  | 5.60  |

<sup>1)</sup>A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Mactra veneriformis*.

(라) Crude Conchiolin 에 대한 생리활성 분석

Conchiolin의 추출방법에 의해 추출한 conchiolin을 8M urea 30ml에 녹이고 24시간 이상 투석한 후, Lowry 방법에 의하여 단백질을 정량하여 생리활성실험을 수행하였다.

① 단백질 저해활성(COX, DOPA)

㉞ Cyclooxygenase 저해활성측정

염증이 일어나는 과정은 감염성 물질(infectious agents), 허혈(ischemia), 항원-항체 반응, 열 또는 다른 신체적인 상처 등과 같은 수많은 자극에 의하여 유도되는 일련의 반응을 수반하며, 염증반응에는 홍반(erythema), 부종(edema), 압통(tenderness), 통증 등의 임상증상이 나타난다(28).

Arachidonic acid는 cyclooxygenase (COX)에 의해서 생체 내 염증전달 반응에 중요한 역할을 하는 각종 prostaglandin과 혈소판 응집에 관여하는 thromboxane을 생성하는 데, COX 효소는 정상조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 COX-1 효소와 염증과정에서 일시적으로 발현이 증가하는 유도성 효소인 COX-2 효소로 구성되어있다. COX-1(type 1; constitutive form) 효소는 조직의 구성 요소이며 위장관계를 포함한 조직에 산재하는 것으로 알려져 있다. 이 효소는 각 조직에서 혈류(vascular flow)의 유지, 세포분화(cell division), 점액(mucus)과 중탄산염(bicarbonate)의 생성 등에 관여하는 국소적인 prostaglandin의 양을 조절하는데, 이러한 COX-1 효소의 활성을 NSAIDs (Non Steroidal Analgesic Inflammation Drugs)가 저해함으로써 위 장관과 신장의 부작용 및 항 혈소판 작용(antiplatelet activity)이 나타난다. 다시 말해서 COX-1 효소는 염증이 퍼지지 않도록 혈액을 응고시키고 피가 잘 통하지 않게 하고 혈관을 수축시키는 물질(Thromboxan A2)을 만들어내는 효소이며, 동시에 위점막이 파괴되지 않도록 점막 보호 물질을 만들어내는 효소다. 반면에, COX-2(type 2; induced form) 효소는 뇌와 신장에서 주로 발견되며, 일부 염증성 세포(inflammatory cells)에서도 발견되고, 특히 염증부위에서 유도되는 것으로 알려져 있다. COX-2 효소는 염증을 유발하는 물질인 Prostaglandin E2를 생성하는 효소이며 또한 혈전을 예방하고 혈관을 확장하는 물질인 Prostacyclin (Prostaglandin I2)의 생성도 촉진하는 효소이다 [29-31](Fig. 31).

Fig. 32 에 IC 50에 의한 COX-1과 COX-2의 활성을 저해하기 위해 요구되는 다양한 약들의 농도가 표시되었으며 사선 아래에 있는 약들이 COX-2에 대해 더욱더 효능 있는 억제제들이다. 본 연구에서는 이 억제제들 중 비 스테로이드계의 항염증제인 indomethacin을 양성 대조약물로 사용하였다(32-33). Indomethacin의 IC<sub>50</sub>은 COX-1에 대해서 약 0.3 $\mu$ M 그리고 COX-2에 대해서 약 0.7 $\mu$ M로 발표 (Fig. 32)되어 있으나 최근에 Cayman chemical company에서 Johnson 등 (1995)의 논문을 기준으로 하여 만든 kit로 측정한 indomethacin의 IC<sub>50</sub>은 ovine COX-1 과 COX-2에 있어서 각각 0.1 과 6  $\mu$ M 이었다.

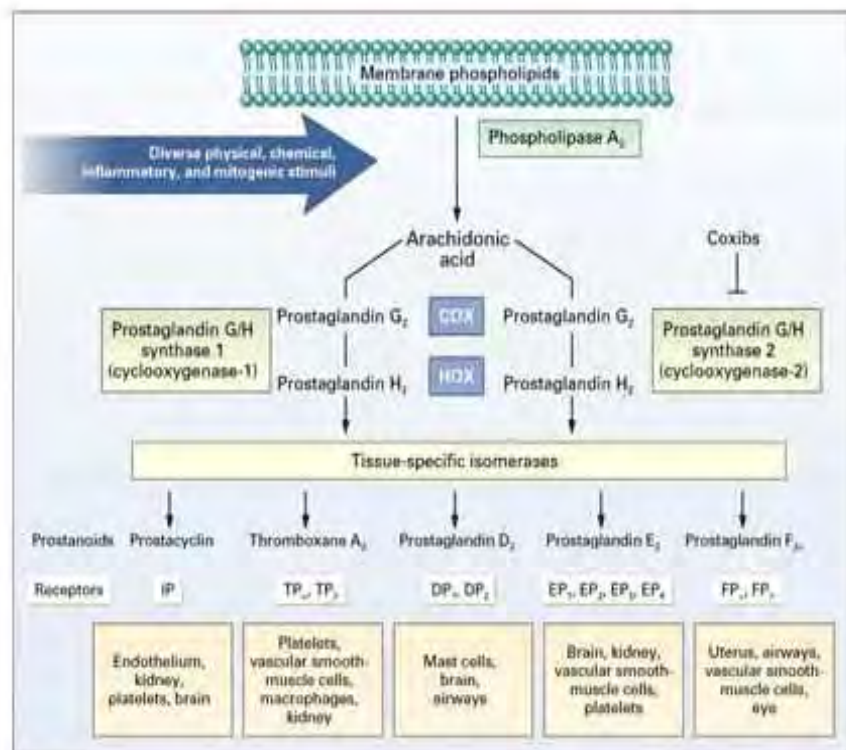
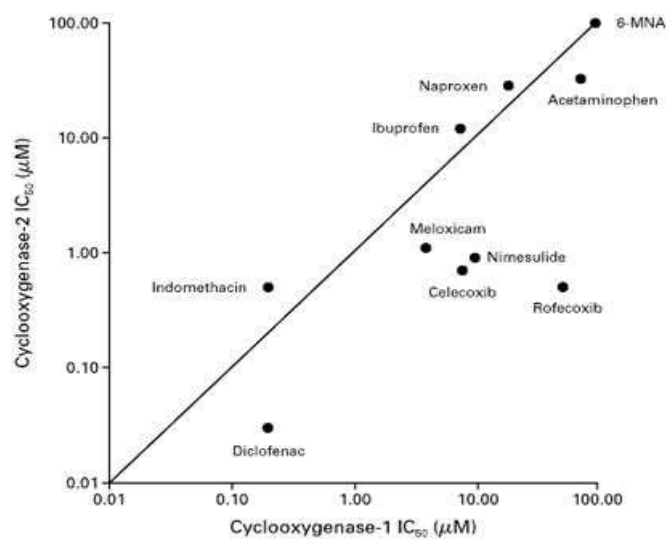


Fig. 31. Production and actions of prostaglandins and thromboxane.

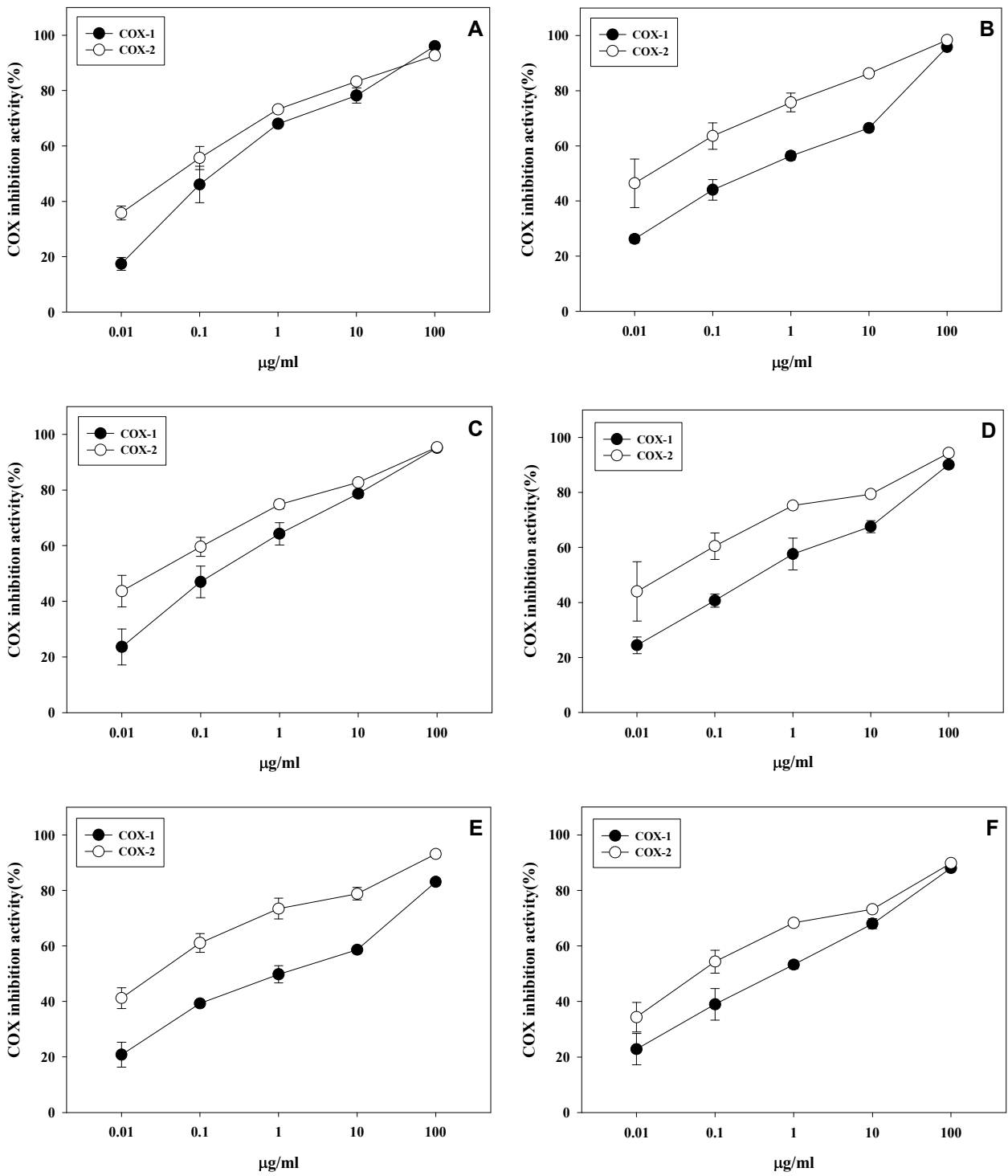


**Fig. 32. Concentrations of Various Drugs Required to Inhibit the Activity of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 by 50 Percent (IC<sub>50</sub>) in Assays of Whole Blood. Each point is the mean of three or four values. Drugs plotted below the diagonal line indicating equivalence are more potent inhibitors of cyclooxygenase-2 than drugs plotted on or above the line. 6-MNA denotes 6-methoxy-2-naphthyl acetic acid.**

본 연구에 있어서 양성 대조약물인 indomethacin에 대한 측정치는 COX-1에 대해서 0.15 $\mu$ M의 농도에서 60.5%, 0.1 $\mu$ M의 농도에서 47.7%, 0.05 $\mu$ M의 농도에서 25.0%의 저해율을 나타내었고, COX-2에 대해서는 18 $\mu$ M의 농도에서 83.6%, 6 $\mu$ M의 농도에서 48.7%, 3 $\mu$ M의 농도에서 24.7%의 저해율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Johnson 등(1995)이 보고한 indomethacin의 IC<sub>50</sub>은 ovine COX-1 과 COX-2에 있어서 각각 0.1 과 6.0 $\mu$ M 이었다는 결과와 일치하는 것으로 확인되었다.

6종류의 패각분말 (굴, 홍합, 바지락, 피조개, 새조개 및 동죽)로부터 추출한 conchiolin을 사용하여 유발되는 염증을 억제하는 conchiolin의 효능을 평가하였다 (Fig. 33과 Table 20). Fig. 33과 Table 20은 용해된 conchiolin(단백질 농도: 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu$ g/ml)에 의하여 유발되는 COX-1과 COX-2 의 저해율을 비교 평가하였다.

Fig. 33과 Table 20에 의하면, 각 패각류의 용해된 conchiolin의 단백질 농도가 0.01~100 $\mu$ g/ml로 증가됨에 따라 유발되는 COX-1 과 COX-2 의 저해율이 증가하였다. 이러한 결과는 Ibuprofen 이나 Diclofenac 및 Naproxen 같은 모든 기존 소염 진통제가 COX-1도 억제하지만 COX-2도 억제하는 것과 동일한 현상을 나타냈으며, 굴의 경우 100  $\mu$ g/ml 의 농도에서 96.1%의 COX-1 저해율을 나타내었으며 92.7%의 COX-2 저해율을 나타내었다. 이러한 데이터는 COX-1 효소를 억제시킴으로 위 점막 보호물질의 생산을 차단하는 것이고 COX-2 효소를 억제시킴으로 염증을 유발하는 물질인 prostaglandin E2의 생성을 억제하여 염증을 억제시킨다는 것이다. 또한 COX-1 의 경우 단백질농도가 0.1 ~ 1 $\mu$ g/ml 에서 IC<sub>50</sub>이 설정되었으며, COX-2의 경우 단백질농도가 0.01 ~ 0.1 $\mu$ g/ml 에서 IC<sub>50</sub>이 설정되었다. 이 결과는 각 패각 류의 conchiolin이 COX-1 보다 COX-2의 억제에 더욱더 효과가 있다는 것이다. Johnson 등(1995)의 보고에 의하면, Indomethacin이나 Diclofenac 등은 COX-1을 더욱더 억제시키는 효소이며, 반면에 NS-398, Nimesulide 및 Niflumic acids 등은 COX-2를 더욱더 억제시키는 효소이다. 최근에 개발되기 시작한 소염진통제들이 COX-2 만을 선택적으로 저해하여 위장장애나 출혈의 부작용을 줄이는 방향으로 초점이 맞추어지고 있으나 심장을 비롯한 순환기계에 부작용을 초래한다는 보고가 많다(34). 그러므로 지금까지의 연구결과들을 근거로 하여 천연물에서 유래하는 conchiolin을 이용한 위장장애나 출혈의 부작용이 적은 천연 소염 진통제를 개발하는 연구가 더욱더 필요할 것으로 사료된다.



**Fig. 33. Inhibitory rate of COX-1 and COX-2 by various soluble conchiolin. All experimental data were mean±SD of duplicate determinations.**

Table 20. Inhibitory effects of soluble conchiolin from various mollusk shells on cyclooxygenase activity<sup>1)</sup> (Unit: %)

| Conchiolin      | 100 µg/ml |           | 10 µg/ml  |           | 1 µg/ml   |           | 0.1 µg/ml |           | 0.01 µg/ml |                         |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------------------|
|                 | COX-1     | COX-2     | COX-1     | COX-2     | COX-1     | COX-2     | COX-1     | COX-2     | COX-1      | COX-2                   |
| A <sup>2)</sup> | 96.1±0.19 | 92.7±1.05 | 78.2±2.71 | 83.3±0.42 | 68.0±1.29 | 73.2±0.84 | 46.1±6.58 | 55.6±4.18 | 17.4±2.29  | 35.8±2.51               |
| B               | 95.8±0.25 | 98.4±0.11 | 66.5±1.28 | 86.3±1.21 | 56.4±1.55 | 75.7±3.40 | 44.1±3.74 | 63.6±4.83 | 26.3±1.53  | 46.4±2.78               |
| C               | 95.1±0.22 | 95.4±0.17 | 78.7±1.32 | 82.7±0.86 | 64.2±3.99 | 74.8±1.54 | 47.0±5.66 | 59.6±3.42 | 23.6±2.42  | 43.7±5.65               |
| D               | 90.1±0.49 | 94.3±0.15 | 67.5±2.18 | 79.4±0.92 | 57.6±5.81 | 75.2±1.08 | 40.7±2.38 | 60.5±4.77 | 24.5±3.02  | 44.0±2.77               |
| E               | 83.1±0.44 | 93.2±1.30 | 58.6±1.25 | 78.8±2.28 | 49.7±3.11 | 73.5±3.75 | 39.3±1.20 | 61.1±3.42 | 20.8±4.47  | 41.2±3.75 <sup>1)</sup> |
| F               | 88.0±0    | 89.8±0.38 | 68.0±1.82 | 73.2±1.13 | 53.2±1.44 | 68.3±0.75 | 39.0±5.71 | 54.0±4.15 | 22.8±2.62  | 34.3±2.28               |

<sup>1)</sup> All experimental data were mean±SD of duplicate determinations.

<sup>2)</sup> <sup>1)</sup>A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.

㉔ *In vitro* DOPA oxidation inhibition assay (*In vitro* tyrosinase inhibition assay)

색소침착의 과정은 주로 melanocyte 성장인자, 염증계의 화학적 매개자, 자외선에 의한 DNA 손상 및 활성산소 등에 의해 일어난다. 이들의 주된 색소침착 원인은 melanocyte와 tyrosinase의 활성증가가 주요인 인 것으로 알려져 있다 [21,23].

인간의 피부색조는, 그 조직 내에 포함되어 있는 2개의 melanin 색소의 비율로 결정되어 있으며 melanin색소에는 흑색의 eumelanin과 적갈색의 pheomelanin이 있다. Melanin의 melanocyte에서의 합성경로를 보면 melanin은 tyrosine이 tyrosinase 효소에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 hydroxylation 되는 과정을 시작으로 dopaquinone, dopachrome의 과정을 거쳐 melanin으로 합성된다[35]. Dopachrome은 자연히 decarboxylation되어 DHI가 되고 빠르게 산화되어 indole-5,6-quinone이 된다. 그러나 특정한 금속이온과 효소가 있는 경우 carboxylated intermediate인 DHICA가 만들어지며 DHICA-oxidase의 작용을 받아 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid가 되어 eumelanin을 형성한다. 그러나 dopaquinone이 cysteine이나 glutathione과 같은 SH compound를 만나게 되면 cysteinyldopa가 만들어지고 결국에는 pheomelanin이 만들어 진다 (Fig. 34).

Tyrosinase는 tyrosine을 수산화해 DOPA로 변환하는 tyrosine hydroxylase활성, DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase활성을 가지고 있는 melanin 합성 반응에 있어 가장 중요한 역할을 하고 있고 또한, 최근에서는 DHI (5, 6-dihydroxyindole)을 indole-5, 6-quinone에 산화하는 DHoxidase 활성을 소유하는 것으로 보고 되어 있다. Tyrosinase에는 T1, T2, T3의 3개의 isozyme이 존재하고, Tyrosinase는 그 일차구조 내에 sialic acid, mannose 및 galactose의 당을 가진다 [23].

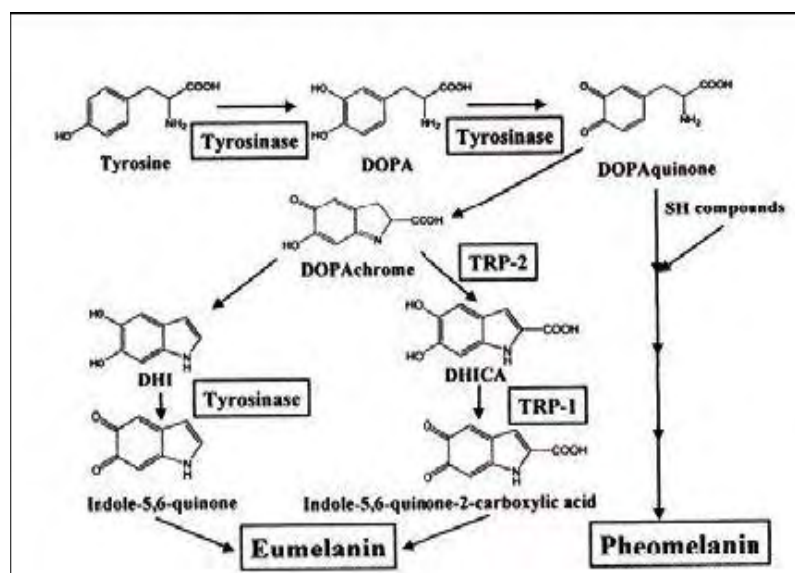
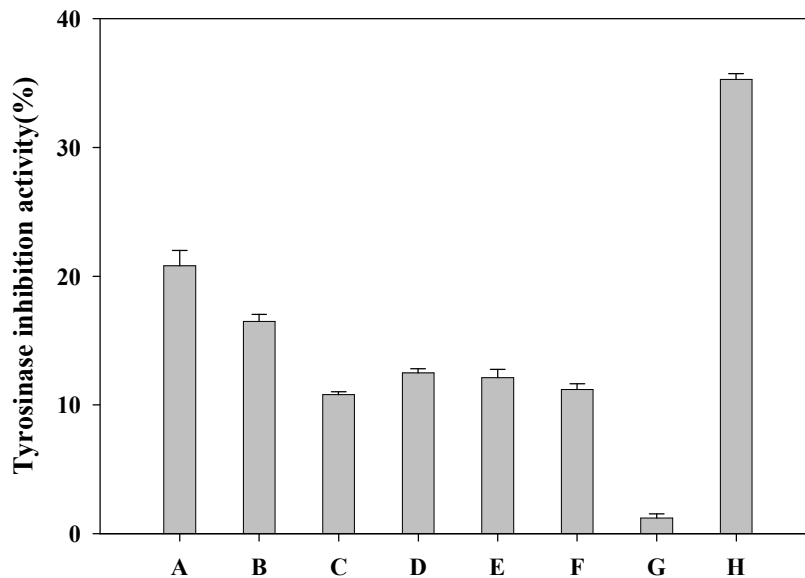


Fig. 34. Synthetic pathway of Melanin



Tyrosinase는 인체 내의 melanin 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도결정단계에 관여하는 효소로서 이 효소의 활성을 억제함으로써 melanin 색소의 형성을 막아 피부의 색소 침착을 막을 수 있다. 그러므로 tyrosinase의 활성 저해능을 측정하여 생리활성 물질의 미백효과를 평가할 수 있다. 본 연구에서 사용한 측정법은 식약청에서 고시한 ‘기능성화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인’[22]에 따라 실시하였다. Conchiolin의 tyrosinase 활성 저해능을 측정한 결과는 Fig. 35와 같다. 각 패각 류의 Conchiolin 용액은 170ug/ml의 단백질 농도에서 그 활성이 패각 류의 종류에 따라 굴에서는 20.81%, 홍합에서는 16.49%, 바지락에서는 10.81%, 피조개에서는 12.49%, 새조개에서는 12.13% 및 동죽에서는 11.19% 저해되었고, 반면에 양성대조군으로 측정한 Arbutin의 경우도 170ug/ml의 농도에서 35.30% 저해되었으며 그 이후의 농도에서는 tyrosinase 활성을 완만하게 억제하였다 (Fig. 35).



**Fig. 35. Effect of conchiolin from various mollusk shells on tyrosinase inhibition activity: A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Maetra veneriformis*, G: dialyzed Urea, H: Arbutin. All experimental data were mean±SD of triple determinations.**

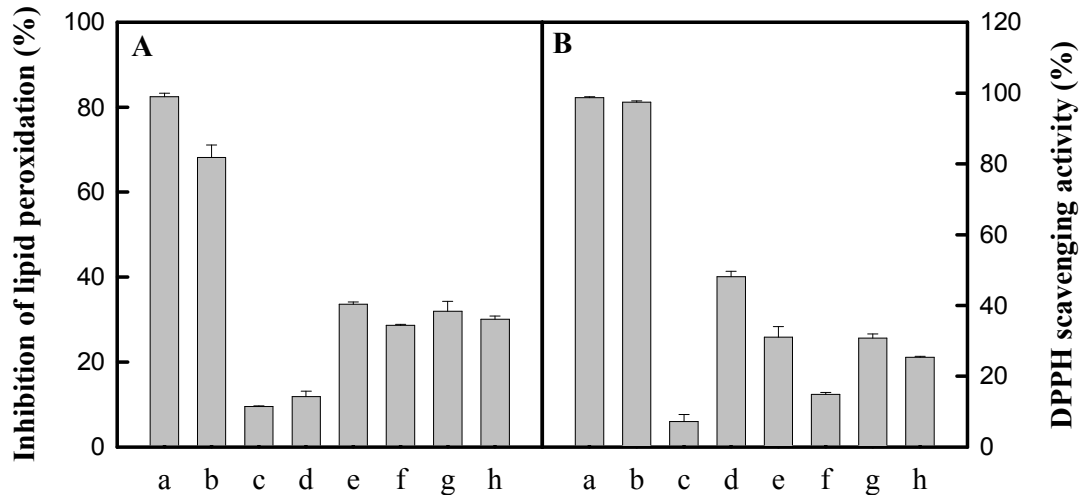
Arbutin은 월굴나무(Bearberry)에서 추출한 천연 식물 성분으로 현재까지 인체에 대한 부작용이 전혀 없는 안전한 미백 성분으로 알려져 있으며, 기미주근깨의 원인이 되는 멜라닌 생성세포(Melanocyte)에 대해 매우 강한 멜라닌 생성 억제작용을 가진다 [36,37]. 또한 멜라노마세포의 증식을 억제하지 않고, 멜라닌의 생성을 억제하며, 자외선 조사에 의한 사람의 일소방지 효과도 있다고 한다. 본 연구에서 사용된 패각류 중 균의 Conchiolin 용액은 20.81%의 tyrosinase 활성 저해능을 보유하고 있는 것으로 본 실험에서 증명되었으며, No 등[38]이 천연물인 녹차의 구성성분 중 GCG (galocatechin 3-O-gallate)를 이용한 tyrosinase 활성 저해능 실험에서 72%의 저해능이 있는 것으로 보고한 바가 있다. 아직까지는 연구의 시작이라 패각류의 Conchiolin 용액 자체를 이용하였으나 Conchiolin 용액을 정밀히 정제하고 효소 가수분해에 의한 분획들을 이용한다면 녹차의 구성성분 중 GCG 와 같은 우수한 tyrosinase 활성 저해제를 개발가능성도 있을 것으로 사료된다.

## ② Linoleic acid 자동산화 억제활성 측정

세포독성과 관련된 활성산소 종(ROS)은 노화, 암, 심장질환, 치매와 같은 퇴행성 질환이나 병리학적 질병을 초래하게 되는 것으로 알려지고 있다. ROS로 인한 과산화물들과 분해산물들은 반응성이 높아 주변의 생체분자(DNA, 단백질, 다른 세포 인자)들의 구조와 기능을 변화시킨다[30,39]. 생체 내에는 활성산소 종(ROS)을 방어하는 기전들을 다양하게 보유하고 있지만, 세포내의 ROS농도가 초과했을 때 손상은 부득이하다. 그래서 외부로부터 항산화 물질의 섭취를 통하여, 간접적으로는 세포자가면역조절능을 증가시킴으로서 조직의 산화적 손상을 저하시키고[40], 직접적으로는 free radical species의 소거를 돕는다[41].

Conchiolin의 생리활성 연구의 항산화 능력은 두 가지 측정방법으로 측정하였다. 첫째는 DPPH radical scavenging activity를 측정하는 방법이고, 둘째는 lipid peroxidation에 대한 저해활성을 측정하는 방법이다. DPPH는 proton free radical을 가지고 있는 물질 중의 하나로서 DPPH 소거능은 항산화 물질의 수소 공여능에 의해서 수소를 잘 받아들임으로써 이루어진다 [42]. 실험에 사용된 각 패각 종류별 conchiolin의 농도는 0.5 mg/ml로 하여 분석하였다. 그 결과 6종류의 패각류 중 혼합에서 추출한 crude conchiolin에서 가장 높은 DPPH 소거능(48.2%)이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 36B). 그리고 가장 활성이 낮은 것은 균 패각 추출 conchiolin으로 약 9%였다. 생물학적 시스템에서 지질과산화물은 생체막의 파괴와 세포 손상의 중요한 원인으로 알려져 있다. Malondialdehyde는 불포화 지방산의 파괴로부터 형성된다. 6종의 패각으로부터 얻어진 conchiolin은 linoleic acid 산화물에 대해서 비교적 낮은 수준의 저해율을 보였지만, 균과

홍합을 제외한 나머지 그룹에서는 28.6-33.6%로 그 중 높은 활성을 나타내었다(Fig. 36A).



**Fig. 36.** Inhibition of lipid peroxidation in linoleic acid (A) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity (B) of the conchiolin extracted from six different shells: Ascorbic acid (a), caffeic acid (b), *Crassostrea gigas* (c), *Mytilus coruscus* (d), *Ruditapes philippinarum* (e), *Scapharca broughtonii schrenck* (f), *Fulvia mutica* (g) and *Mactra veneriformis* (h). All experimental data were mean±SD of triple determinations.

Torita 등[42]은 가리비(*Patinopecten yessoensis*) 패각 추출물의 DPPH 소거능과 지질과산화물 저해 능에 관해 연구하였다. 그 결과 추출물의 농도가 0.5 mg/ml일 때 50%의 DPPH 소거능을 나타내었고, 지질과산화물은 가리비 패각 추출물 0.75mg/ml의 농도에서 40% 저해율을 보였다. 이들의 연구는 conchiolin과 다른 추출방법을 이용한 실험이긴 하지만, 결과는 흡사한 저해율을 나타내고 있다. 버섯 자실체로부터 추출한 당-단백질의 free radical 소거능은 Liu 등[43]에 의해서 보고 되었으며, 그들은 버섯 다당체의 항산화 능력이 그에 연결된 단백질(펩타이드)의 양에 의존적이라는 연구 결과를 보고하였다. 현재까지 항산화력과 conchiolin의 상관관계에 대해서 설명하긴 힘들지만, 앞으로 conchiolin의 정제 및 기능성 peptide 조제 등을 통한 분자적 특성 연구를 수행할 경우 그러한 관계도 규명 할 수 있을 것으로 판단된다.

### ③ 항균 및 항곰팡이 활성 측정

본 연구에 사용된 시험세균은 내장균 (*E. coli* ATCC 10788), 식중독 균인 [황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*), *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 14509], *Citrobacter freundii*, *Krebsiella pneumonia* ATCC 15313 이고, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC7968, *Candida albicans* ATCC 10231, 곰팡이는 *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* KACC 40250 이며, 이를 대상으로 총6종의 패각에서 추출된 conchiolin의 항 세균, 항 효모, 항 곰팡이

실험을 실시하였다. 그 결과 추출물 6종 모두 항균 작용이 없는 것으로 확인 되었다(Fig. 38, Table 21).

**Table 21. Antimicrobial effect of conchiolin extracted from six different shells.**

| Strains                               | Mollusk shells  |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|---------------------------------------|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
|                                       | A <sup>1)</sup> |   | B |   | C |   | D |   | E |    | F  |    |
|                                       | N <sup>2)</sup> | H | N | H | N | H | N | H | N | H  | N  | H  |
|                                       | 1               | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| <i>E. coli</i>                        | - <sup>3)</sup> | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  |
| <i>S. aureus</i>                      | -               | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  |
| <b>Bacteria</b> <i>S. typhimurium</i> | -               | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  |
| <i>B. cereus</i>                      | -               | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  |
| <i>K. pneumonia</i>                   | -               | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  |
| <b>Yeast</b> <i>S. cerevisiae</i>     | -               | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  |
| <i>C. albicans</i>                    | -               | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  |
| <b>Fungi</b> <i>A. niger</i>          | -               | + | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  |
| <i>A. flavus</i>                      | -               | - | - | - | - | - | - | - | - | +  | -  | -  |

<sup>1)</sup> A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Maetra veneriformis*.

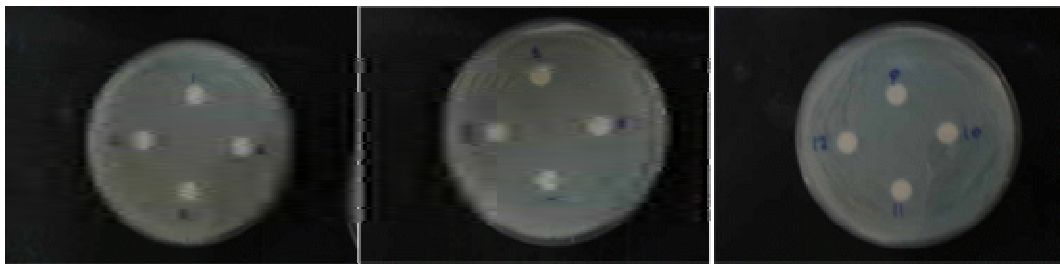
<sup>2)</sup> N: Normal powder, H: Hyperfine powder.

<sup>3)</sup> +: No growth, ±: Uncertain in growth, -: Growth.

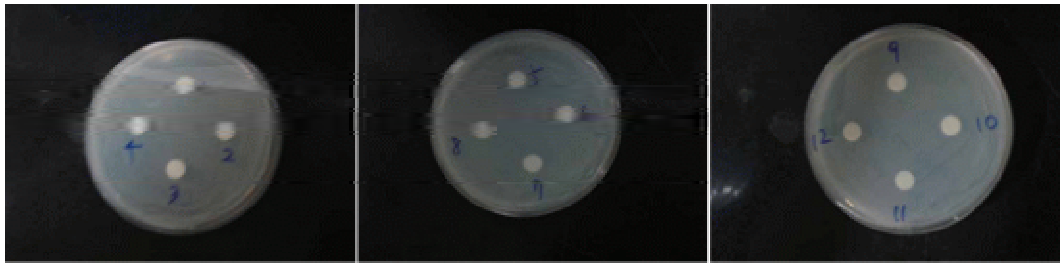
*E. coli*



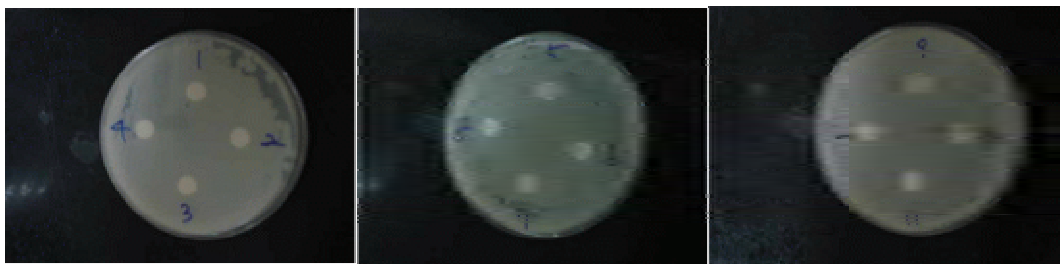
*Staphylococcus aureus*



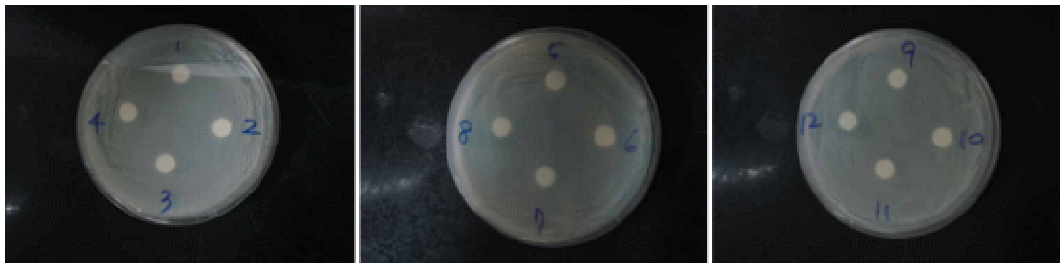
*Salmonella typhimurium*



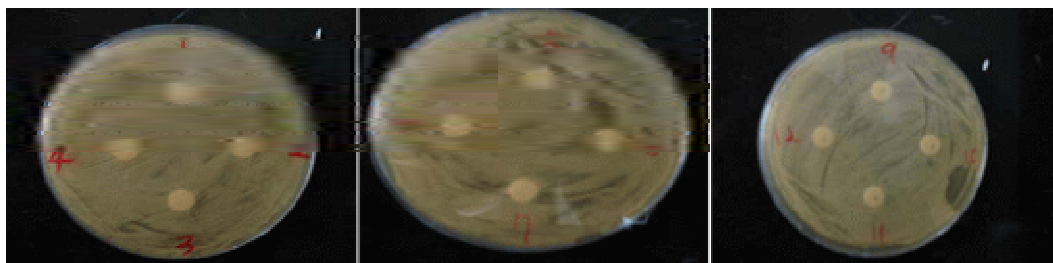
*Bacillus cereus*



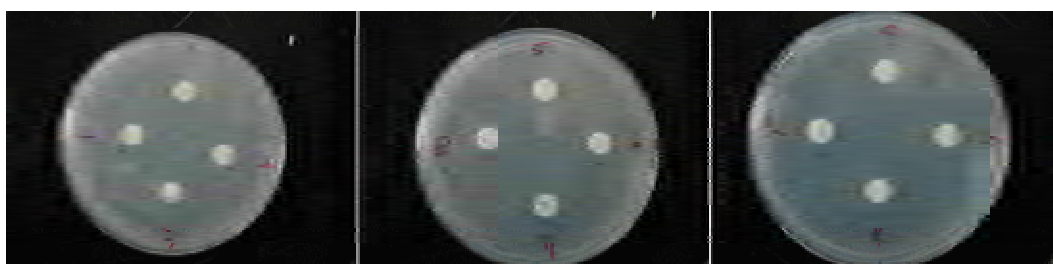
*Klebsiella pneumoniae*



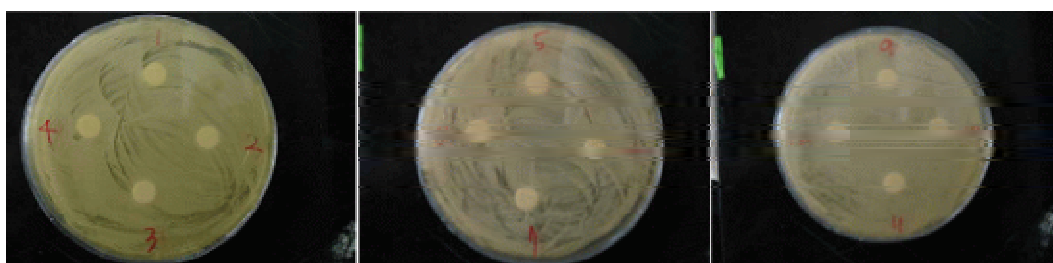
*Saccharomyces cerevisiae*



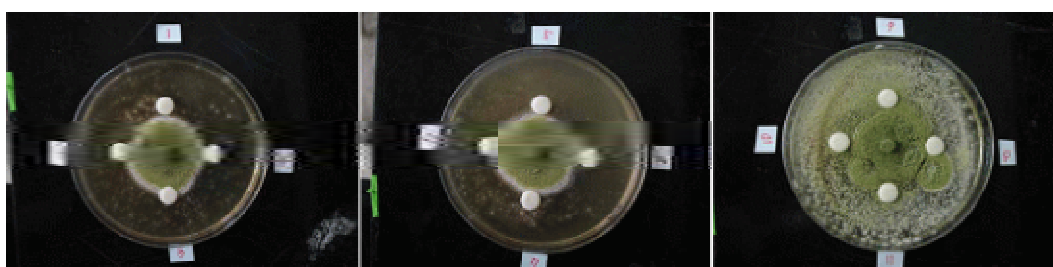
*Citrobacter freundii*



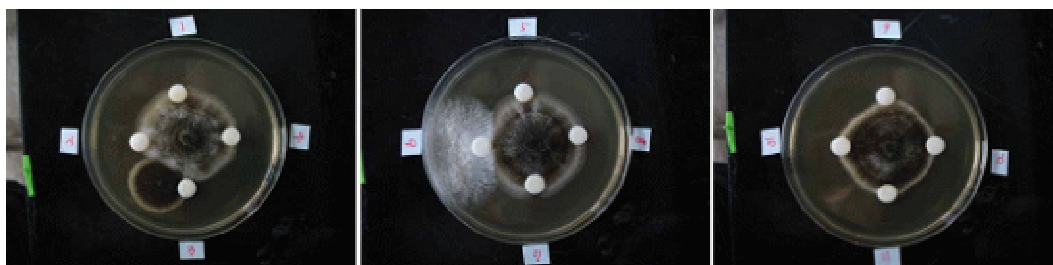
*Candida albicans*



*Aspergillus flavus*



*Aspergillus niger*



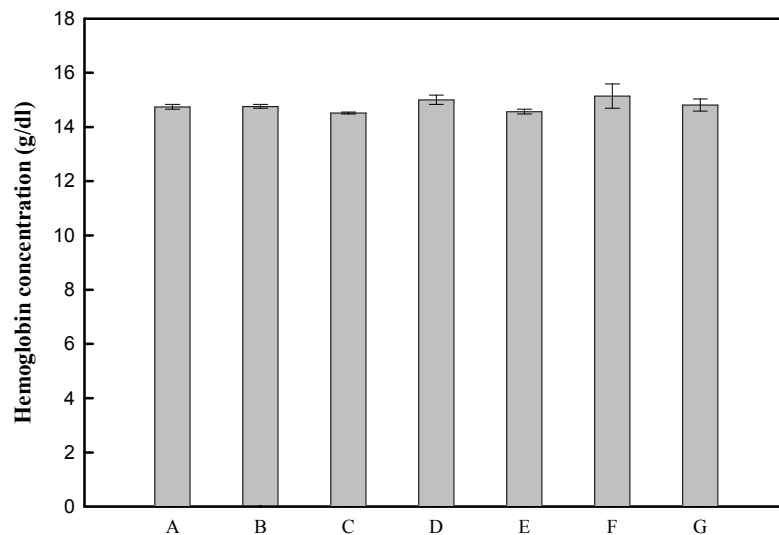
**Fig. 38.** Morphological change on antimicrobial activity by soluble conchiolin.

#### ④ 용혈활성측정

추출 시료들에 대한 용혈활성을 측정하기 위해 human 혈액을 사용하였다. 채혈된 신선한 혈액을 BCS Hemoglobin kit를 사용하여 Cyanmethemoglobin법으로 유리되는 hemoglobin의 양을 측정하였으며, 국제 혈액 표준위원회 표준법으로써 혈액과 potassium ferricyanide가 반응해서 hemoglobin이 methemoglobin으로 전환되고 다시 potassium cyanide와 반응해서 cyanmethemoglobin으로 전환되는 것을 파장 540nm에서 비색 측정하므로 유리되는 hemoglobin의 양을 측정하였다.

용혈이란 적혈구 내에 있는 hemoglobin이 유출되는 현상을 말하며, 그 원인에 따라 삼투적 용혈, 화학적 용혈 및 독물에 의한 용혈 등으로 나누어진다. 삼투적 용혈은 적혈구의 삼투농도가 그 주위 액체의 삼투농도보다 높거나 낮은 경우에 일어나며, 화학적 용혈은 에테르, 알코올, 클로로포름, 담즙산, 사포닌, 산성 및 염기성 화학물질 등이 적혈구 막에 접촉되면 용혈현상이 일어나고, 독물에 의한 용혈로는 암세포에서 유래되는 독소 말라리아 원충, 독사와 독거미의 독성물질 및 influenza virus 등도 적혈구를 용혈 시킨다 [44,45].

Fig. 39에 의하면, 정상 혈액(A)에서 용출된 Hemoglobin의 농도( $14.74 \pm 0.09$  g/dl)와 정상 혈액을 이용하여 굴, 홍합, 바지락, 피조개, 새조개 및 동죽의 conchiolin 용액( $20\mu\text{g protein}$ )과 반응시켜 생긴 Hemoglobin의 농도( $14.51 \sim 15.13$  g/dl)와의 차이가 거의 나타나지 않았다. 이러한 결과는 conchiolin용액이 적혈구 막을 파괴시키지 않는다는 것을 의미하며, 적혈구의 삼투압에도 영향을 미치지 않는 것으로 추정 할 수 있다 [45].



**Fig. 39. Hemolytic activity of soluble conchiolin extracted from six different shells: Whole blood (A), *Crassostrea gigas* (B), *Mytilus coruscus* (C), *Ruditapes philippinarum* (D), *Scapharca broughtonii schrenck* (E), *Fulvia mutica* (F), *Macrta veneriformis* (G). All experimental data were mean±SD of triple determinations.**

### ⑤ 근육강화활성 측정

Vasopressin과 Oxytocin은 포유류의 뇌하수체 후엽에 잔존하는 신경성 peptide 이며, 9개의 amino acid로 이루어져있고 이 물질들은 구조적으로 매우 비슷하나 서로 다른 생리적 기능을 갖는다. 척추동물에서는 Vasopressin이 항 이뇨작용, 혈압조절 및 삼투조절 활성을 갖는 반면, Oxytocin은 자궁수축, 유즙분비 및 혈관 평활근 조절작용을 갖는다[46].

활성측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입하면서, 20 mM Tris-HCl(pH 7.0) 10 ml에 0.2g의 굴 분말을 용해하여 침전시킨 후 얻은 상등액 50 ul와 urea에 녹아있는 conchiolin 용액 50 ul를 반응조에 주입하여 physiograph로 기록하였다. 활성 정도는 acetylcholine (Ach)  $5 \times 10^{-7}$  M에 대한 수축반응을 기준으로 하였다(Fig. 40).

본 연구에 있어서 굴의 분말용액과 conchiolin 용액에 의한 평활근의 수축강도를 비교하였다(Fig. 41). 평활근 수축강도에 있어서, 굴의 분말용액(A)을 이용한 실험에서는 2.5분경에 수축강도의 변화가 일어나기 시작하였으나 강도의 변화는 conchiolin 용액 (B)에 비해 미약하였다. Conchiolin 용액(B)을 이용한 실험에서는 3분경부터 수축강도의 변화가 일어나기 시작하였으며 굴의 분말용액(A)을 이용한 실험에 비해 상승곡선을 나타내었다. 이 결과는 conchiolin 용액이 굴의 분말용액에 비해 강한 평활근 수축 활성을 갖는 것을 의미한다. Go 등[47]의 보고에 의하면 붕장이의 뇌 추출물로 금붕어 장관 평활근 bioassay를 이용하여 평활근 수축 활성을 갖는 peptide를 분리 정제하였으며, 이 물질이 포유류, 파충류, 양서류 및 조류에서 자궁수축, 혈압, 이뇨작용 및 생식기능에 관여한다고 알려져 있다 [48]. 본 연구에서 사용한 crude conchiolin은 평활근 수축작용이 있는 것으로 확인 되었지만 실제 콘키올린의 영향인지 그 외 조 콘키올린에 함유된 다른 물질의 영향인지는 분리 정제를 통하여 확인 해보아야 할 것으로 판단된다. 그러나 평활근 수축에 관여하는 물질이 존재하는 것은 확실하기 때문에 vasopressin이 갖는 항 이뇨작용, 혈압조절 및 삼투조절 활성과 oxytocin이 갖는 자궁수축, 유즙분비 및 혈관 평활근 조절작용 등 효과 있는 생리활성 물질을 만들어낼 것으로 사료된다.



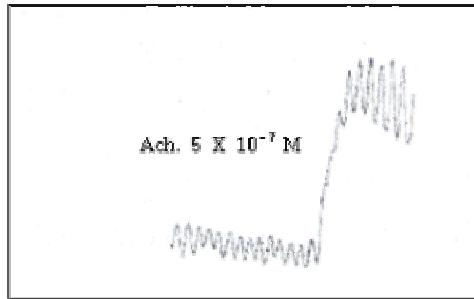


Fig. 40. Typical tracing illustrating the contractile activity of Acetylcholine (Ach).

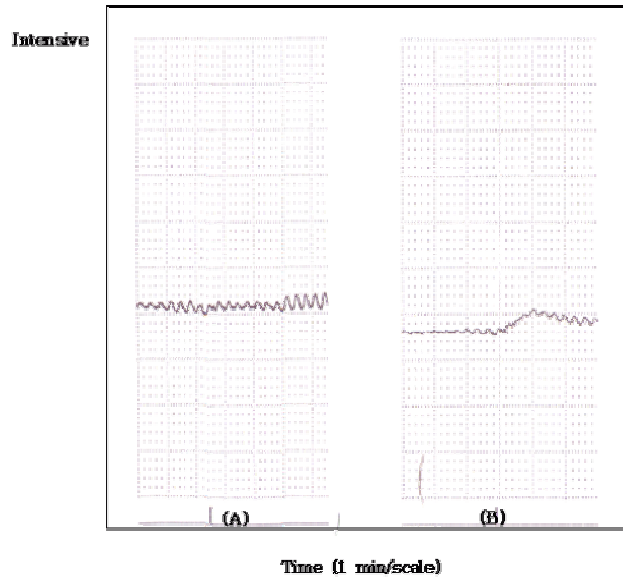


Fig. 41. Contractile intensity with smooth muscle of the goldfish, *Carassius auratus* : *Crassostrea gigas* powder (A) and conchiolin (B).

#### 4. 패각으로부터 Conchiolin의 최적 추출 조건 검토

##### 가. Conchiolin 추출용 최적 Buffer의 선정

패각(굴, 홍합, 바지락, 피조개, 새조개, 동죽) 분말로부터 acetic acid로 탈 석회화 과정을 거쳐 생성된 crude conchiolin의 활성 단백질을 추출하기 위해 기존에 불용성 단백질 추출에 널리 사용되어왔던 urea를 이용하여 추출하였다. Urea를 이용하여 추출한 결과 투석 후에도 urea의 100% 제거가 어려웠으며 제거되지 않은 urea의 영향으로 단백질의 변성으로 인한 생리활성 측정에 문제가 있었다. 또한 추출물속에 당 함량이 높아 분리정제에 많은 문제점을 내포하고 있어 패각으로부터 Crude conchiolin의 추출이 용이하고 분리정제가 쉬운 추출용매를 찾기 위해 대표적으로 굴 패각을 이용하여 7가지 buffer를 자체적으로 선정하여 단백질과 당추출을 비교 분석하였다(Table 22).

8M urea(pH8.5)로 conchiolin을 추출 했을 때  $96.92\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 단백질이 추출되었고, 동일 조건에서 7가지 buffer를 사용해 추출하였을 때 0.1M citrate buffer(pH6.0)와 0.2M sodium phosphate buffer(pH8.0)에서  $84.04\mu\text{g}/\text{ml}$ 와  $69.62\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 단백질량이 가장 높게 측정되었다. 0.2M Sodium phosphate buffer(pH6.0)추출 시 단백질과 당의 추출 비율이 65.87 : 1로 불순물의 추출을 최소화 하는데는 이상적이나 단백질 추출량이  $57.88\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 기존 추출량의 60%에 미치지 못해 단백질 수득률이 낮았다. 반면 0.1M Citrate buffer(pH6.0)를 이용하여 추출 했을 때 단백질 양에 대비하여 당의 비율은 8.83 : 1(proteins : sugars)로 낮게 측정되었고, 단백질 추출량은 기존 urea 추출의 85%이상으로 불순물을 최소화하면서 단백질 추출을 최대화하기 위한 용액으로 효과적인 것으로 확인되었다. citrate(Citric acid · sodium citrate)는 식품첨가물로 사용되는 물질로 차후 제품화 하는데에도 이상적이므로 본 연구소에서는 crude conchiolin으로부터 활성 단백질을 추출하기 위한 최적 조건으로 0.1M citrate buffer(pH6.0)를 선정하였다.

Table 22. Comparison for conchiolin extraction using various buffers from *Crassostrea gigas*

|   | Buffers   | Protein con.<br>( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | Sugar con.<br>( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | Ratio<br>(Protein:Sugar) |
|---|---|---|---|--------------------------|
| 1 | H <sub>2</sub> O  | 12.88±0.047                                 | 0.00±0.037                                | 12.88 : 0                |
| 2 | 8M urea, pH8.5  | 96.92±0.265                                 | 14.72±0.196                               | 6.58 : 1                 |
| 3 | 0.1M Citrate buffer, pH6.0                                | 84.04±0.232                                 | 9.52±0.144                                | 8.83 : 1                 |
| 4 | 0.2M Sodium phosphate buffer, pH6.0                       | 57.88±0.111                                 | 0.88±0.059                                | 65.87 : 1                |
| 5 | 0.1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaOH buffer, pH6.0 | 37.50±0.194                                 | 1.48±0.065                                | 25.26 : 1                |
| 6 | 0.2M Sodium phosphate buffer, pH8.0                       | 69.62±0.093                                 | 4.01±0.090                                | 17.36 : 1                |
| 7 | 0.1M Glycine buffer, pH 8.5                               | 30.77±0.144                                 | 2.70±0.077                                | 11.41 : 1                |
| 8 | 0.1M Trizma buffer, pH8.5                                 | 50.38±0.133                                 | 6.23±0.112                                | 8.08 : 1                 |
| 9 | 0.1M Glycylglycine, pH8.5                                 | 45.96±0.088                                 | 8.05±0.130                                | 5.71 : 1                 |

나. 0.1M Citrate buffer와 8.0M Urea buffer로부터 추출된 conchiolin의 단백질, 당 정량분석

패각 분말로부터 6.5M acetic acid로 탈석회화 과정을 거쳐 생성된 crude conchiolin으로부터 활성 단백질을 추출하기 위해 기존에 불용성 단백질 추출에 사용되어왔던 urea 추출과 본 연구소에서 최적 조건으로 선정한 citrate buffer 두 가지 추출용매를 사용하여 추출 단백질과 당의 수득률을 비교·분석하였다. 6종(굴, 홍합, 바지락, 피조개, 새조개, 동죽)의 crude conchiolin powder에 8M urea(pH8.5)와 0.1M citrate buffer(pH6.0)를 사용하여 bead를 첨가한 뒤 37℃에서 2 시간 동안 동일조건으로 반응시키고, 그 상층액의 단백질(Table 23, Fig. 43) 농도와 당(Table 24, Fig. 44)의 농도를 측정하였다.

추출물의 단백질 농도 측정결과 citrate buffer를 이용하여 추출한 바지락, 홍합, 새조개는 urea를 이용하여 추출된 단백질의 농도보다 높았지만, 피조개의 경우 citrate buffer를 이용한 추출보다 urea를 이용하여 추출하였을 때 단백질 농도가 2배 정도 높게 측정되었다. 동죽의 경우 urea와 citrate buffer를 이용한 추출물에서 단백질 농도가 유사하게 측정되었다. 두 가지 추출용매를 사용하여 추출된 당의 농도를 비교한 결과 홍합을 제외한 5가지 패각의 crude conchiolin에서 citrate buffer를 이용하여 추출했을 경우 urea 추출물에 비해 당의 농도가 최대 20배 정도 낮게 측정되었다.

따라서 패각으로부터 활성 단백질을 추출하기 위해 citrate buffer 추출법을 사용하여 실험결과 urea 추출법 보다 단백질 수득율이 증가하였고, 당의 수득율 또한 낮았기 때문에 활성 단백질을 추출하는데 citrate buffer 추출법이 적합한 buffer라고 생각되어 진다.

**Table 23. Comparison of crude conchiolin yield from various mollusk shells between urea and citrate buffer.**

| Extraction Time   | 2 hour           |          |                     |          |
|-------------------|------------------|----------|---------------------|----------|
|                   | 8M urea          |          | 0.1M citrate buffer |          |
| Extraction Buffer |                  |          |                     |          |
| Conchiolin        | $\mu\text{g/ml}$ | Yield(%) | $\mu\text{g/ml}$    | Yield(%) |
| Mollusk shells    |                  |          |                     |          |
| A                 | 152.00           | 0.61     | 132.00              | 0.66     |
| B                 | 22.19            | 0.09     | 34.50               | 0.17     |
| C                 | 61.23            | 0.24     | 198.54              | 0.99     |
| D                 | 68.73            | 0.27     | 22.19               | 0.11     |
| E                 | 94.12            | 0.38     | 115.27              | 0.58     |
| F                 | 80.08            | 0.28     | 56.62               | 0.28     |

A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Mactra veneriformis*.

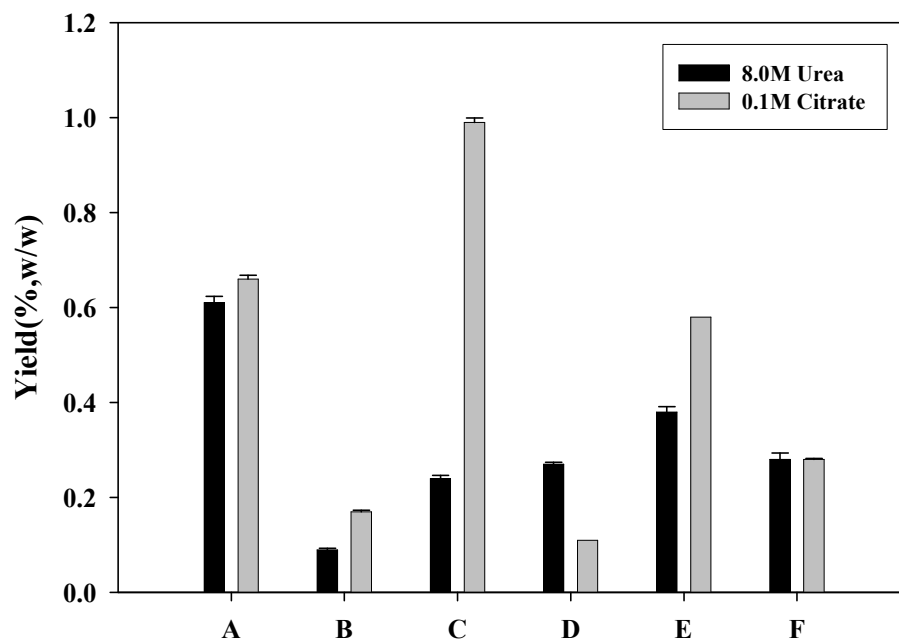


Fig. 43. Concentration and yield of crude conchiolin from various mollusk shells using urea and citrate buffer. A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.

Table 24. Sugar Concentration and yield from various mollusk shells using urea and citrate buffer.

| Extraction Time              | 2 hour           |          |                     |          |
|------------------------------|------------------|----------|---------------------|----------|
| Extraction Buffer            | 8M urea          |          | 0.1M citrate buffer |          |
| Conchiolin<br>mollusk shells | $\mu\text{g/ml}$ | Yield(%) | $\mu\text{g/ml}$    | Yield(%) |
| A                            | 157.6            | 0.63     | 23.5                | 0.12     |
| B                            | 13.2             | 0.05     | 10.8                | 0.05     |
| C                            | 7.2              | 0.03     | 0.0                 | 0.00     |
| D                            | 16.7             | 0.07     | 2.3                 | 0.01     |
| E                            | 33.1             | 0.13     | 2.2                 | 0.01     |
| F                            | 23.2             | 0.09     | 0.0                 | 0.00     |

A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macraa veneriformis*.

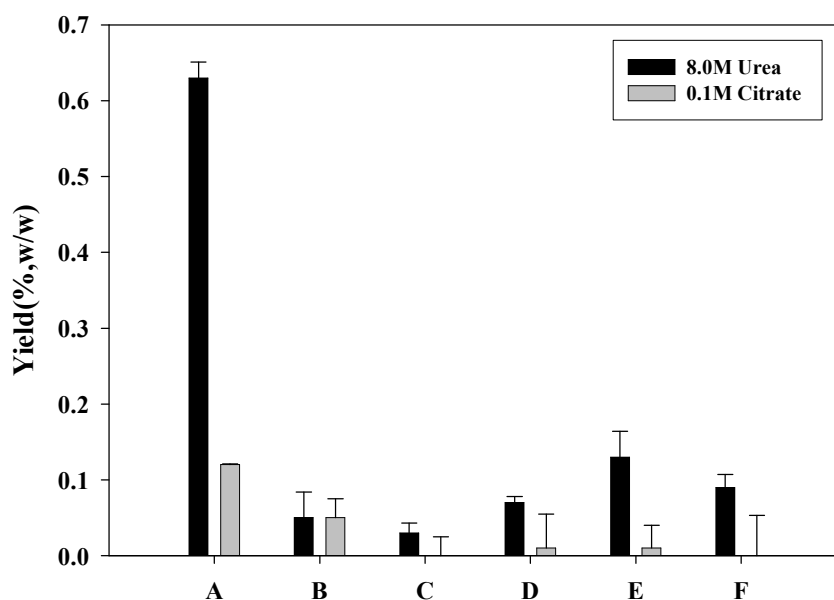


Fig. 44. Sugar Concentration and yield from various mollusk shells using urea and citrate buffer. A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macraa veneriformis*.

다. 선정된 Buffer를 이용하여 각종 패각으로부터 분리한 conchiolin의 생리활성 비교분석

(1) 항염증 활성 측정 (Cyclooxygenase, COX inhibition assay)

기존의 8M Urea에 의해 추출된 conchiolin의 경우, 정제 과정에서 당을 포함한 불순물을 상당량 함유하고 있어서 prep LC column 이용 시 분리가 용이하지 않았으며, 그 수득율 또한 낮았다. 따라서 Crude conchiolin으로부터 불순물은 최소화 하면서 최대의 단백질만을 추출할 수 있는 8M Urea 대체 buffer인, citrate buffer를 이용하여 추출된 가공원료 추출물(crude conchiolin)의 생리활성을 비교 분석하였다.

본 연구에서는 8M Urea를 사용하여 추출한 conchiolin이 가진 COX-2 저해활성과 0.1M citrate buffer로 추출한 conchiolin의 활성을 비교하기 위해 6종류의 패각으로 부터 crude conchiolin을 8M Urea와 0.1M citrate buffer로 2시간 추출한 후 투석과정을 거쳐 conchiolin의 항염증 효과를 비교 평가하였다. Fig. 45와 Table 25는 용해된 conchiolin (단백질 농도 : 10 µg/ml)에 대한 COX-2의 저해율을 비교·평가한 결과들이다.

Fig. 45와 Table 25에 의하면, 8M Urea와 0.1M citrate buffer로 용해된 각 패각류의 conchiolin의 단백질 농도가 10µg/ml일 때 COX-2 저해율 비교 시, 6가지 패각류(굴, 홍합, 바지락, 피조개, 새조개, 동죽)에서 0.1M citrate buffer를 사용하여 추출된 conchiolin이 8M Urea를 사용하여 추출된 conchiolin 보다 COX-2 저해율이 높음을 확인할 수 있었다. 굴의 경우, 8M Urea를 사용하여 추출된 conchiolin의 COX-2 저해율은 69.2%이나, 0.1M citrate buffer로 추출된 conchiolin의 경우 82.9%로 항염 효과가 높고, 홍합의 경우에도, 8M Urea 사용 시 15.2%, 0.1M citrate buffer 사용시 57.9%로 약 3-4배 항염 효과가 높게 평가되었다. 반면, 5가지 패각류와는 달리, 피조개에서는 8M Urea를 사용하여 추출된 conchiolin이 0.1M citrate buffer 사용 추출시 보다 COX-2 저해율이 높았으나, 그 저해율이 각각 62.2% (8M Urea로 추출된 conchiolin)와 48.8% (0.1M citrate buffer로 추출된 conchiolin)로 그 차이가 크지 않음을 알 수 있다.

이러한 결과는 0.1M citrate buffer를 이용하여 용해된 conchiolin이 기존의 8M Urea를 사용시 용해된 conchiolin과 비교 시, 항염 효과가 동일하거나 우수할 뿐만 아니라, 정제 과정 중 문제가 되었던 당을 상당 부분 제거함으로써 앞으로 항염증 효과가 우수한 고순도 conchiolin 생산의 공정비용을 줄여 줄 것으로 예상된다.

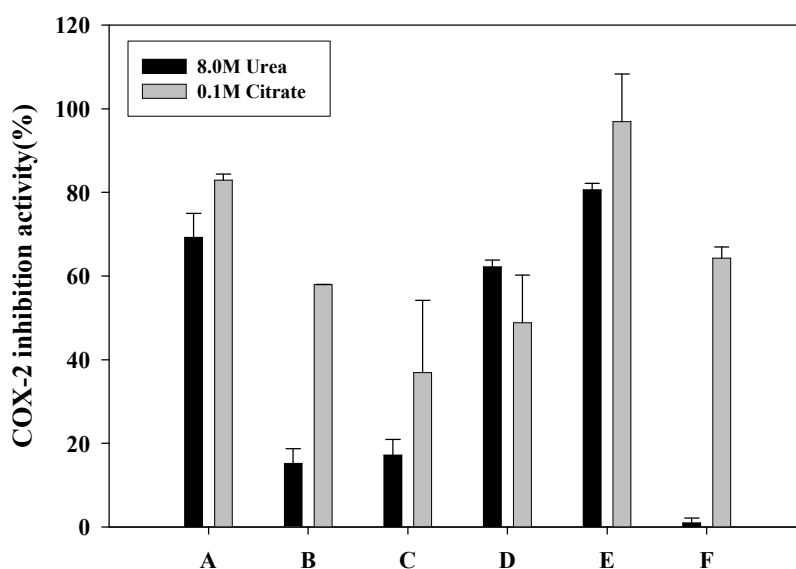
(2) 항산화 활성 측정 (DPPH radical scavenging assay)

생명체가 산소를 이용한 대사를 할 때 산소분자의 대부분은 세포내의 미토콘드리아에서 respiratory chains을 거치면서 물(H<sub>2</sub>O)로 환원되지만 일부의 산소분자들은 부분 환원되는 과정에서 중간대사물(intermediates)을 생성하는데 이들을 reactive oxygen species (ROS)라고 하며 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl radical (OH<sup>·</sup>), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등이 여기에 속한다.

**Table 25. Comparison of COX-2 inhibition activity using conchiolin from various mollusk shells.**

| mollusk shells | 8M Urea(%) | 0.1M citrate buffer(%) |
|----------------|------------|------------------------|
| A              | 69.2 ± 5.8 | 82.9 ± 1.5             |
| B              | 15.2 ± 3.5 | 57.8 ± 0.1             |
| C              | 17.2 ± 3.7 | 36.9 ±17.3             |
| D              | 62.2 ± 1.6 | 48.8 ±11.4             |
| E              | 80.6 ±18.7 | 96.9 ± 0.1             |
| F              | 1.0 ± 1.1  | 64.3 ± 2.5             |

A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.



**Fig. 45. Comparison of COX-2 inhibition activity of extracted conchiolin from various mollusk shells using urea and citrate buffer. The used urea and citrate buffer was 8M and 0.1M. A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.**

ROS는 화학 반응성이 강하기 때문에 저농도에서는 세포내 신호전달 물질(signaling molecule) 역할을 하지만 고농도에서는 지질, 단백질, 핵산 등 기존 분자 구조를 변형시켜서 세포의 손상(oxidative injury)을 일으킬 수 있다. 그러므로 산소를 이용하는 모든 생명체는 진화 과정에서 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxide (GPX) 등의 효소나 혹은 vitamin과 같은 물질을 통해서 이들을 소거(scavenge)하여 세포를 보호하고자 하는 기전(antioxidant reserve)을 가지게 되었다. 그러나 ROS의 생성이 과도하거나 또는 antioxidant reserve가 비정상적으로 줄어들면 양자의 균형이 무너지는데 이러한 상태를 oxidative stress라 하며 oxidative injury로 인해 생체조직의 구조와 기능에 이상을 초래할 수 있다. Redox state는 흔히 환원 glutathione과 산화 glutathione의 비(GSH/GSSG)로서 표현되는데 이는 세포내 oxidative stress를 나타내는 예민한 지표이다. 활성산소들은 혼자서 존재하거나 활동하는 일이 없다. 이들은 전형적으로 연쇄반응의 산물이며 하나의 활성산소가 다른 활성산소를 생성시킨다. 'superoxide radical ( $O_2^-$ )'이라고 불리우는 것은 호흡에 의하여 들이마신 산소가 영양분을 태워서 에너지를 만들 때 발생하는 것이다. Superoxide radical은 세포내의 미토콘드리아에서 끊임없이 발생하는데 체내에서 장시간 머물러 있다. 이는 부대전자를 가진 free radical이며 체내에 가장 많이 존재한다. Superoxide radical이 한 개의 전자를 받아서 'hydrogen peroxide( $H_2O_2$ )'가 된다. Hydrogen peroxide 자체는 그만큼 활성이 높지 않지만 체내에 있는 철이온과 같은 금속이온과 반응하면 즉시 활성력이 강한 'singlet oxygen( $O_2$ )'이나 'hydroxyl radical(OH)'로 변한다. Hydroxyl radical은 강한 산화력을 가진 활성산소이다. 활성산소의 그룹은 아니지만 활성산소로 말미암아 동일한 독성을 가지는 것이 'lipid peroxide'이다. 이것은 불포화지방산이 활성산소에 의해서 산화된 것으로서 다른 불포화지방산을 산화시켜 차례로 lipid peroxide를 증대하여 간다. 또 다른 free radical은 'nitric oxide(NO)'로 지질과 반응하여 lipid peroxide을 만든다[29](Fig. 46).

이들 활성산소는 세포구성 성분들에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴 작용을 함으로써 지질을 산화시키고 단백질도 변성을 초래하여 세포막이 파괴되고, DNA도 손상을 입히 백내장, 당뇨병, 간염, 신장염, 아토피성피부염, 관절염, 위염, 기미, 주근깨, 주름, 백내장, 파킨슨씨병, 알츠하이머형 치매 등 난치병의 90% 이상을 일으킨다[30]. 또한 정상세포의 유전자의 고리를 절단하여 최초의 단일한 암세포를 만드는 발암과정에도 깊게 관여하고 있다. 따라서 최근 암, 당뇨, 뇌질환, 심혈관질환 등 모든 성인병의 원인을 oxidants와 antioxidants의 밸런스의 파괴에 의한 결과로 해석하는 시각이 대두되고 있으며, 이들 질병의 치료 및 예방을 위한 목적으로 항산화 물질에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 항산화 물질의 역할은 크게 금속 이온의 착염화 기능, enzyme 활성과 enzyme 유사활성 물질에 의한 free radical 포집력으로 radical 반응을 종결시켜 이들 활성산소에 의한 지방질 산화 및 DNA의 손상을 억제시킴으로써 동맥경화, 심장병예방, 노화 억제 등의 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있다.오래 전부터 항산화제로는 효소계열과 비효소계열의 천연 항산화물질들이 많이 사용되어져 왔으나, 가장 실용화 된 것 중의 하나인



tocopherol은 항산화 효과가 비교적 낮은 편이고, BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisol), PG(propyl gallate), TBHQ(tertiary butylhydroquinone)와 같은 합성 항산화제의 경우 일정 수준 이상 섭취 시 여러 질병을 유발하는 것으로 알려져 안전성의 문제가 제기 되면서 규제를 강화하고 있다[31]. 또한 사람들은 건강에 대한 욕구의 증대로 인공합성품의 사용을 제한하려는 추세에 있어 안전성의 확보와 각종 질병의 예방 및 치료와 밀접한 관계를 갖고 있는 천연물을 이용한 천연 항산화제 개발이 필요한 실정이다.

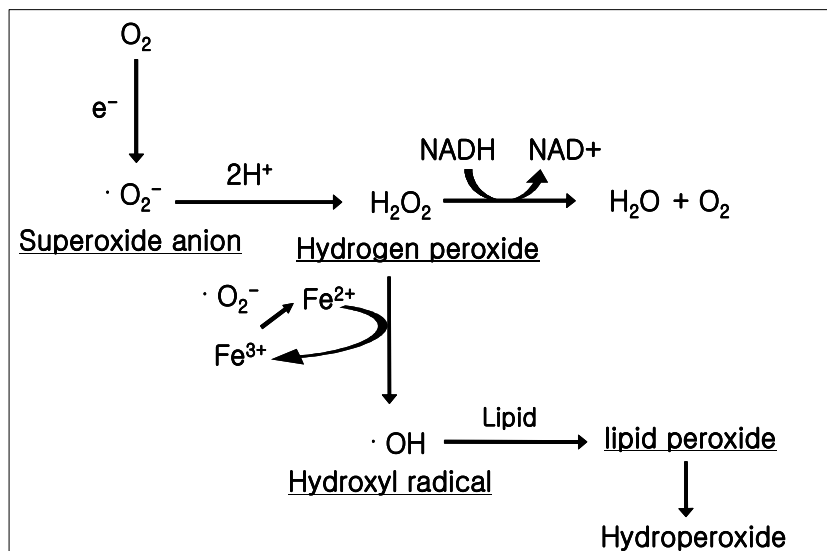
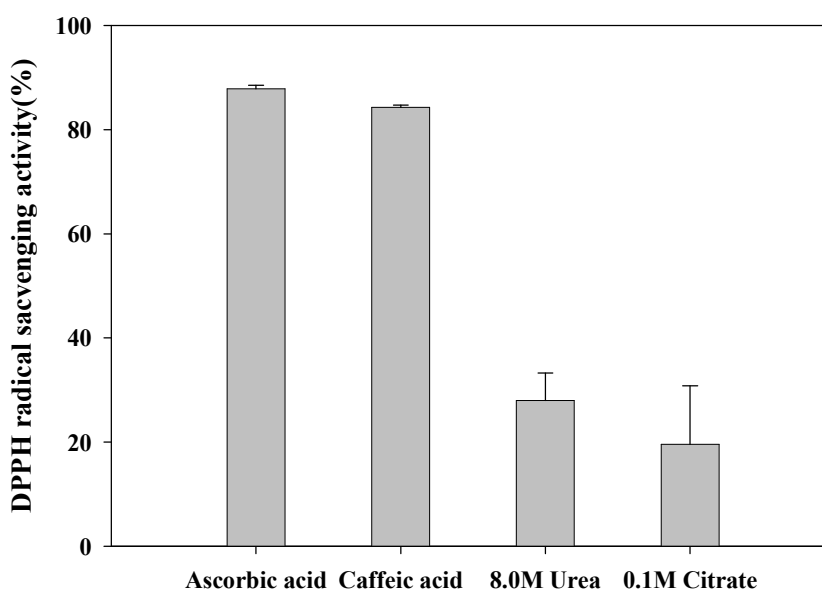


Fig. 46. Diagram of ROS production.

본 연구에서는 1차년 과제 수행에서 사용된 urea 추출법을 이용하여 폐각으로부터 추출된 활성 단백질 추출물과, urea의 잔존과 가열 추출에 의한 과량의 불순물이 문제가 되어 2차년 과제 수행에서 최적 추출조건으로 확립한 citrate buffer 추출법을 이용하여 추출된 활성단백질 추출물과의 항산화 활성을 비교하기 위해 추출물의 DPPH에 대한 전자공여효과로 시료의 환원력을 측정하는 방법에 따라 DPPH radical 제거 효과를 측정하였다. 균의 crude conchiolin으로부터 추출 용매를 달리하여 추출된 conchiolin 0.5mg/ml에서 DPPH radical 형성 억제 활성을 측정한 결과는 Table 26, Fig. 47과 같다. 추출 용매로 사용한 0.1M citrate buffer(pH6.0)와 8M urea(pH8.5)에서 추출된 conchiolin의 free radical 소거활성은 19.58%(±11.21)와 27.99%(±5.26)로 오차범위내에서 활성이 유사함을 확인 할 수 있었다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 caffeic acid는 현재 항산화 물질로 사용되고 있는 정제된 물질로 80%이상의 우수한 활성을 나타내었다. 따라서 균의 crude conchiolin으로부터 추출된 단백질의 항산화 활성이 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid와 caffeic acid에 비해서는 활성이 떨어지는 것으로 나타났으나, 기존에 사용된 urea 추출법과 새롭게 확립한 citrate buffer 추출법에 의해 추출된 conchiolin간의 DPPH에 대한 전자공여효과가 유사함에 따라 보다 손쉽게 conchiolin 정제 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

**Table 26. Comparison of DPPH radical scavenging activity by 8.0M Urea and 0.1M citrate buffer extraction from *Crassostrea gigas*.**

| Samples                     | mg/ml | DPPH radical scavenging activity |
|-----------------------------|-------|----------------------------------|
| Ascorbic acid               | 0.5   | 87.70 ± 0.70                     |
| Caffeic acid                | 0.5   | 84.13 ± 0.42                     |
| 8.0M Urea buffer extract    | 0.5   | 27.99 ± 5.26                     |
| 0.1M Citrate buffer extract | 0.5   | 19.58 ± 11.21                    |



**Fig. 47. Comparison of DPPH radical scavenging activity by 8.0M Urea extraction and 0.1M citrate buffer extraction from *Crassostrea gigas*.**

#### 라. 6 종류 패각으로부터 분리한 conchiolin의 분자량분석

본 연구에서는 최초 사용한 8.0M Urea에 추출된 conchiolin과 최적 추출 조건인 0.1M citrate buffer 추출물의 conchiolin의 분자량을 비교하기 위해 SDS-PAGE를 이용하여 실험하였다. 6종류의 패각(굴, 바지락, 피조개, 동죽, 진주담치, 새조개)의 crude conchiolin에서 urea와 citrate buffer를 이용하여 추출된 conchiolin의 단백질을 확인한 결과 citrate buffer를 이용하여 2시간, 24시간 추출 했을 때 6종류의 패각 모두에서 약 37 kDa의 단백질을 확인하였다. 또한 약 75kDa~15kDa 사이에 여러 개의 단백질 밴드를 확인하였다. urea를 이용하여 2시간 추출 했을 때 6종류의 패각 모두에서 citrate buffer 추출 했을때와 마찬가지로 약 37 kDa의 단백질을 확인하였다. 또한 약 75kDa~15kDa 사이에 여러 개의 단백질 밴드를 확인하였다. 24시간 추출 했을 때 6종류의 패각에서 약 75kDa~15kDa 사이에 2-3개의 단백질 밴드를 확인하였다. citrate buffer를 이용하여 추출된 conchiolin의 단백질은 단백질 밴드가 깨끗하게 염색이 된 반면, Urea를 이용하여 추출된 conchiolin의 단백질은 전체적으로 끌림이 나타났다. Urea를 이용하여 추출한 실험결과 urea는 투석 후에도 100% 제거가 되지 않고 남아 있어 SDS-PAGE 실험을 할 때 끌림 현상이 나타나는 원인이 된다. 기존에 사용된 urea 추출법과 새롭게 확립한 citrate buffer 추출법에 의해 추출된 conchiolin 단백질의 패턴은 비슷하였으나 urea를 이용한 추출법은 urea의 제거가 완벽하게 이루어 지지 않아 새로운 추출법인 citrate buffer를 이용하여 conchiolin을 추출하는 것이 바람직한 것으로 확인되었다(Fig. 48).

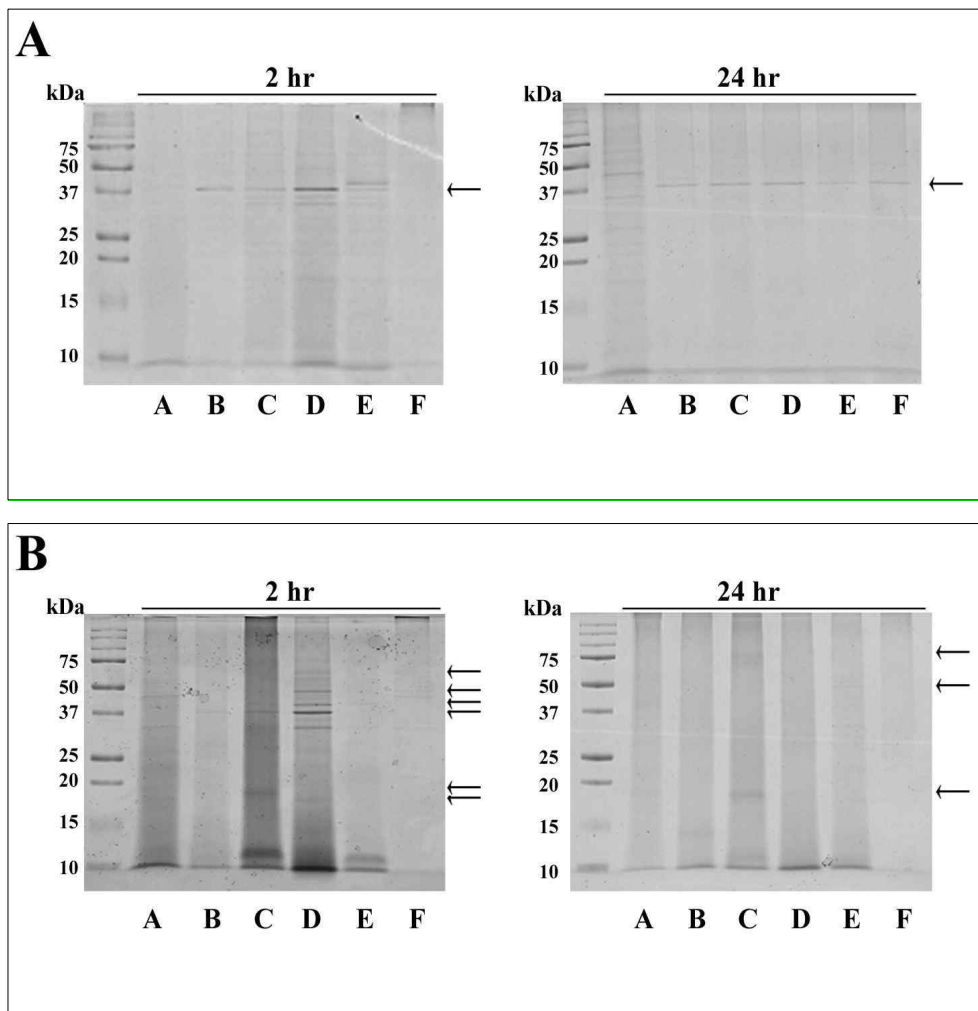


Fig. 48. Analysis by SDS-PAGE of the 8.0M Urea extraction and 0.1M citrate buffer extraction from various shells. Conchiolin extracted with urea(A) and citrate buffer(B), resolved by SDS-PAGE and then stained with coomassie R-250. A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Fulvia mutica*, F: *Macra veneriformis*.

## 마. Conchiolin의 분리정제 및 생리활성 연구

### (1) Conchiolin의 정제

0.1M citrate buffer(pH6.0)을 사용하여 6종류의 폐각으로부터 Fig. 6의 방법으로 분리하여 Table 7의 Fraction을 회수하여 280nm에서 흡광도를 측정한 후 정제된 conchiolin 분획물을 회수하였다. 5ml씩 분취된 7~14개의 분획 중 단백질 함량이 높고 당의 함량이 낮은 분획을 선택 (Pacific oyster fraction-3, 4, 5, Short necked clam-3, 4, 5, Ark shell-3, 4, Surf clam-2, Blue mussel-2, 3, 4, 5) 하여 prep-LC(Preparative Liquid Chromatography) 정제를 위한 시료(F)로 사용하였다. Prep-LC를 이용해 Table 7의 조건으로 정제하여 정제된 분획(G)은 감압 농축하여 생리활성 분석을 위한 시료로 사용하였다.

### (2) 항염증 활성 측정 (Cyclooxygenase, COX inhibition assay)

염증은 세균 감염이나 물리적, 화학적 자극 또는 허혈, 항원 · 항체반응, 열 등의 다양한 자극이 생체의 세포나 조직의 변화를 일으킬 때 그 손상에 대해 수복, 재생하여 장기를 보호하는 생체의 자기 방어 과정이다. 이런 생체의 자기 방어의 불균형에 의한 염증의 5대 증상으로 발열(heat), 발적(redness), 통증(pain), 부종(swelling) 및 기능 장애 (loss of function)을 들 수 있으며 면역반응, 백혈구 증가와 같은 전신 증상도 나타난다[28].

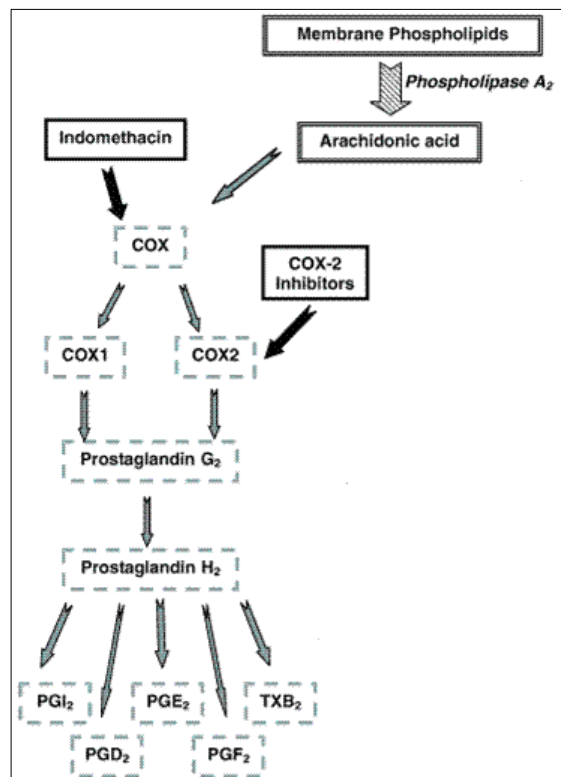
염증에 관여하는 chemical mediator로는 5-hydroxytryptamine (5-HT), kinins, histamine, prostaglandins (PGs), leukotrienes (LTs), platelet-activating factor (PAF), cytokines 등이 있고, 이들이 자극시 활성화되어 상호 작용을 통해 염증 반응을 유발한다[16,20].

한편, 세포가 자극되거나 손상을 받으면 세포막에 존재하는 phospholipids로부터 phospholipase A2(PLA2)에 의해 arachidonic acid (AA)가 생성되어 주요한 mediator system이 진행된다. arachidonic acid는 cyclooxygenase(COX)와 lipoxygenase (LOX)의 작용 하에 몇 가지 경로로 대사 되는데 그 중 하나는 COX에 의한 것으로 혈관 수축, 혈소판 응집 작용이 있는 thromboxane, 혈관 확장, 혈관 투과성 항진 및 통증 유발 작용이 있는 prostaglandin (PGs)이 생성된다[19,49]. COX는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 변환시키는 효소로서 정상조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 COX-1과 염증과정에서 일시적으로 발현이 증가하는 유도성 효소인 COX-2의 두 가지 isoform으로 존재한다.

과거에 개발된 NSAIDS들은, 예를 들면 indomethacin, 2가지 COX의 활성을 비특이적으로 억제하기 때문에 체내 COX-1 의존적인 항상성을 파괴하여 위장관 출현, 신기능 장애 등의 부작용을 유발, 그 사용에 있어서 한계에 부딪치게 된다. 따라서 이러한 부작용을 줄여 안전하고도 효율적인 NSAIDS를 개발하기 위한 전략으로 나온 분자 표적 약물이 COX-2 선택적 억제제이다(Fig. 49)[50].

그러나 COX-2 효소는 염증을 유발하는 물질인 Prostaglandin E<sub>2</sub>가 생성되게 하는 효소인 반면,

혈전을 예방하고 혈관을 확장하는 물질인 Prostacyclin (Prostaglandin I<sub>2</sub>)의 생성도 촉진하는 효소다. 따라서 COX-2를 억제하면 염증은 억제되지만 혈전이 조장되고 혈압이 오를 수 있다. 특히 심장병이나 혈관에 병태가 있는 자는 더욱 악화된다. 반면, COX-1 효소는 염증이 일어나지 않도록 혈액을 응고시키고 피가 잘 통하지 않게 하고 혈관을 수축시키는 물질을 만들어 내는 효소이면서 동시에 위점막이 파괴되지 않도록 점막 보호 물질을 만들어내는 효소다. 염증이 발생하면 COX-1도 작동하는 것이 생리적 방어 반응인데, COX-2 선택적 억제제는 COX-2를 주로 억제하고 COX-1은 활동하도록 남겨 놓는 것은 비생리적 상태다.



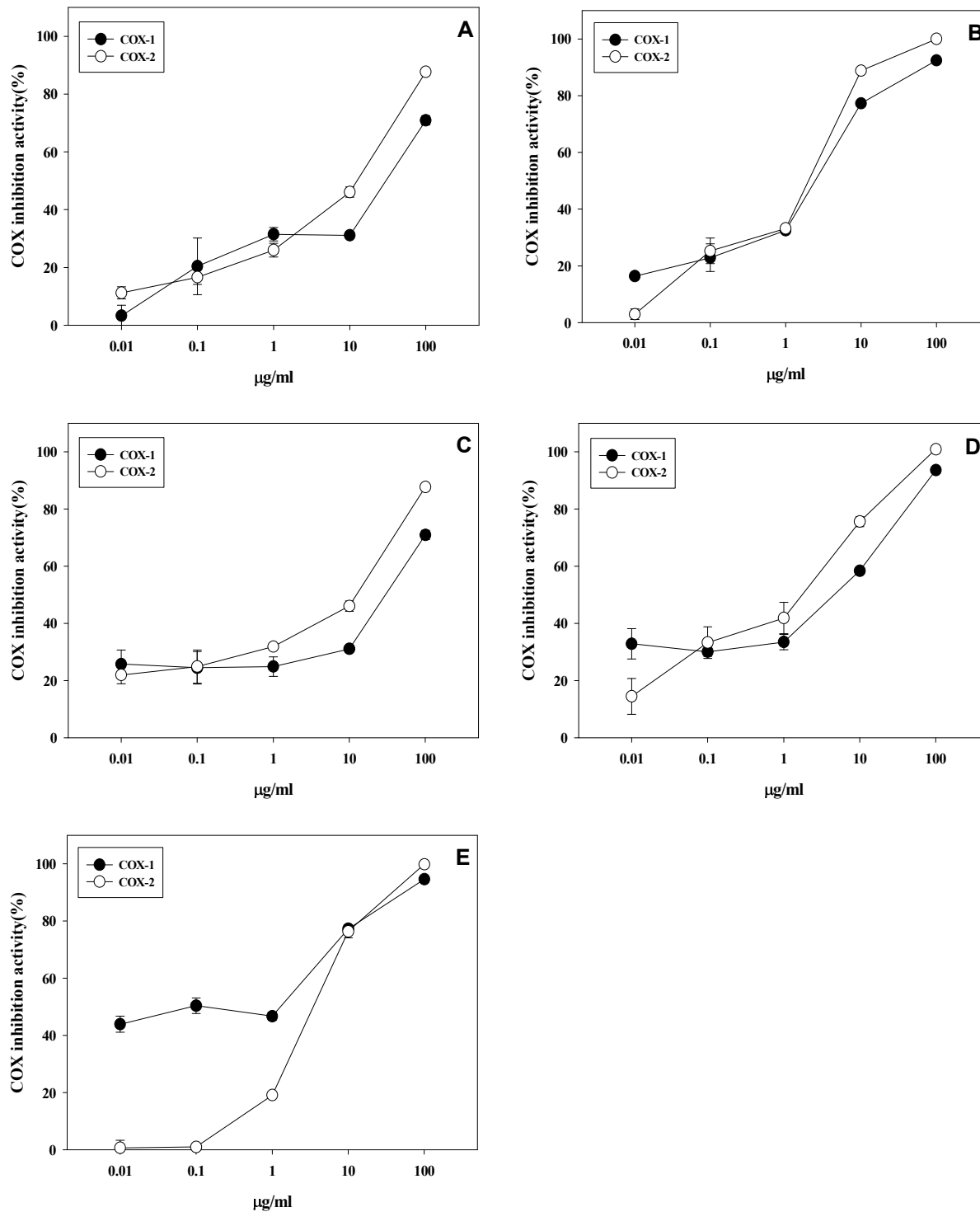
**Fig. 49. Mechanism of chemotherapeutic agents on arachidonic acid pathways.**  
(COX: Cyclooxygenase, PG: Prostaglandin)

따라서 혈전을 예방하는 Prostaglandin I<sub>2</sub> 생성은 억제해 버리고 COX-1의 기능인 혈전을 조장하는 Thromboxan A<sub>2</sub>의 생성을 내버려 두기 때문에 COX-2 선택적 억제제는 위점막 상해는 다소 보호할 수 있을지도 모르지만, 필요 없이 혈액이 응고되어 피가 통하지 않게 되고 혈관이 수축하여 혈압이 오르고, 순환기병이 있는 자는 심장순환계가 악화되기 쉽다[17,18,51]. 따라서 COX-1도 억제하고 COX-2도 억제하는 기존의 소염진통제들을 복용하는 것이 위점막은 상할 수도 있지만 혈전 예방 작용은 유지될 수 있다.

1차년도 연구에서 6종류의 폐각분말 (귤, 진주담치, 바지락, 피조개, 동죽 및 새조개)로부터 추출한 conchiolin을 사용하여 conchiolin의 항염 효능 평가시, 각 폐각류의 용해된 conchiolin의 단백질 농도가 0.01 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가됨에 따라 유발되는 COX-1과 COX-2의 저해율이 증가하였다. 이에 다음 연구 단계로 항염 활성을 갖는 물질을 분리, 정제하고자 Sephadex G-100 전처리 과정을 거쳐 prep LC를 이용하여 정제였으며, 새조개 시료의 경우 확보된 폐각분말이 없어 5종류의 폐각시료를 사용하여 항염증 효과를 분석하였다.

귤, 홍합, 바지락, 피조개 및 동죽 폐각으로부터 추출한 conchiolin을 prep LC를 이용하여 정제한 후 그 fraction의 염증 억제 효능을 평가하였다. Fig 50과 Table 27은 정제된 분획물(단백질 농도별 : 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 의하여 유발되는 COX-1과 COX-2의 저해율을 비교 평가한 결과들이다. 양성 대조 약물로는 비 스테로이드계의 항염증제인 indomethacin을 사용하였다[32, 33]. Cayman chemical company에서 Johnson 등(1995)의 논문을 기준으로 하여 만든 kit로 측정된 indomethacin의 IC<sub>50</sub>은 ovine COX-1 과 COX-2에 있어서 각각 0.1 과 6  $\mu\text{M}$  이었다. 본 연구에 있어서 양성 대조약물인 indomethacin에 대한 측정치는 COX-1에 대해서 0.15 $\mu\text{M}$ 의 농도에서 58.4%, 0.1 $\mu\text{M}$ 의 농도에서 46.0%, 0.05 $\mu\text{M}$ 의 농도에서 36.7%의 저해율을 나타내었고, COX-2에 대해서는 18 $\mu\text{M}$ 의 농도에서 69.7%, 6 $\mu\text{M}$ 의 농도에서 49.0%, 2 $\mu\text{M}$ 의 농도에서 34.3%의 저해율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Johnson 등(1995)이 보고한 indomethacin의 IC<sub>50</sub> 값이 COX-1 과 COX-2에 있어서 각각 0.1 $\mu\text{M}$  과 6 $\mu\text{M}$  이었다는 결과와 일치하는 것으로 확인되었다.

Fig 50과 Table 27에 의하면, 각 폐각류의 정제된 분획물의 단백질 농도가 0.01 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가됨에 따라 유발되는 COX-1 과 COX-2 의 저해율이 증가하였다. 이러한 결과는 Ibuprofen이나 Diclofenac 및 Naproxen 같은 모든 기존 소염 진통제가 COX-1도 억제하지만 COX-2도 억제하는[32]과 동일한 현상을 나타냈으며, 귤의 경우 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  의 농도에서 84.4%의 COX-1 저해율을 나타내었으며 94.3%의 COX-2 저해율을 나타내었다. 이러한 데이터는 COX-1 효소를 억제시킴으로 비록 위 점막 보호물질의 생산을 차단하지만 혈전 예방 작용은 유지되는 것이고, COX-2 효소를 억제시킴으로 염증을 유발하는 물질인 prostaglandin E<sub>2</sub>의 생성을 억제하여 염증을 억제시키는 것이다. 또한 COX-1과 COX-2의 경우 단백질농도가 1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  에서 IC<sub>50</sub>이 설정되었다.



**Fig. 50. Inhibitory rate of COX-1 and COX-2 by various prep LC fraction of soluble conchiolin from *Crassostrea gigas*. All experimental data were mean±SD of duplicate determinations.**



**Table 27. Inhibitory effects of purified conchiolins from various mollusk shells on cyclooxygenase activity[1] (COX-1 and -2) by protein concentrations.**

(Unit: %)

| Purified conchiolin<br>(µg/ml)<br>Samples | 0.01     |          | 0.1      |          | 1        |          | 10       |          | 100      |           |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
|   | COX-1    | COX-2    | COX-1    | COX-2    | COX-1    | COX-2    | COX-1    | COX-2    | COX-1    | COX-2     |
| A   | 3.3±3.6  | 11.2±2.1 | 20.4±9.8 | 16.6±2.5 | 31.5±2.3 | 26.0±2.4 | 52.5±4.3 | 50.7±1.4 | 84.4±0.2 | 94.3±0.6  |
| B   | 16.4±0.4 | 3.0±1.9  | 22.9±4.9 | 25.3±4.5 | 32.5±0.7 | 33.2±0.5 | 77.3±0.0 | 88.8±0.1 | 92.4±0.0 | 100.0±0.2 |
| C   | 25.8±4.9 | 22±3.1   | 24.5±5.7 | 24.9±5.8 | 24.9±3.4 | 31.9±0.2 | 31.1±0.2 | 46.1±1.8 | 70.9±1.6 | 87.7±0.0  |
| D   | 32.9±5.3 | 14.5±6.3 | 30.1±1.6 | 33.3±5.5 | 33.5±2.7 | 41.9±5.5 | 58.4±0.3 | 75.6±1.8 | 93.6±0.7 | 100.9±0.0 |
| E   | 43.9±2.8 | 0.7±2.6  | 50.4±2.7 | 1.0±0.7  | 46.7±1.4 | 19.1±0.7 | 77.3±1.3 | 76.4±2.3 | 94.6±0.0 | 99.8±0.3  |

<sup>1)</sup> All experimental data were mean±SD of duplicate determinations.

A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Mactra veneriformis*.

이 결과는 crude conchiolin의 COX-1과 COX-2 저해율과 비교 시, 동일한 경향을 나타내지만 IC<sub>50</sub> 의 경우 약 crude conchiolin에 비해 약 20% 감소하는 경향을 보였다. 이러한 원인은 첫째, 실험을 위해 사용한 분말시료가 실험초기에 사용했던 폐각분말로 실온에서 2년 가까이 방치된 시료를 사용하여 COX저해물질의 역가 문제가 원인이 될 수 있다는 점. 둘째, 항염증에 영향을 미치는 물질이 콘키올린 뿐만 아니라 제 2, 3의 물질이 존재할 가능성이 있다는 점. 셋째, COX 활성측정에 사용되는 kit의 반응시약의 효소 역가문제 등이 그 원인으로 추정된다.

따라서 향후 연구에서는 이러한 점을 감안하여 다시 재 점검 할 필요성이 있는 것으로 판단된다.

최근에 개발되기 시작한 소염진통제들이 COX-2 만을 선택적으로 저해하여 위장장애나 출혈의 부작용을 줄이는 방향으로 초점이 맞추어지고 있으나 심장을 비롯한 순환기계에도 부작용을 초래한다는 보고가 많아서 아스피린 발명 이후 가장 획기적인 소염진통제라 평가 받기도 했던 미국의 머크(Merck) 제약회사의 바이옥스 (성분명 : Rofecoxib)가 전 세계적인 취하 및 자진회수를 발표했다(약 2만 7000여 명이 바이옥스 복용으로 심장질환을 일으켜 사망한 것으로 추정된다.). 따라서 COX-2도 억제하지만 COX-1도 억제하여, 위점막은 상할 수도 있지만 혈전 예방작용은 유지되는 과거의 소염진통제 개발이 심각한 부작용을 낳지 않을 것으로 사료된다. 이에

본 연구기관은 지금까지의 연구결과들을 근간으로 하여 천연물인 패각류에서 유래하는 conchiolin을 재료로 지금의 정제 과정보다 더 고순도 분리 정제에 성공한다면 위장장애나 출혈의 부작용이 적은 천연 소염 진통제를 개발이 가능하리라 사료된다.

### (3) 항산화 활성 측정 (DPPH radical scavenging assay)

패각으로부터 활성 단백질을 추출하여 항산화 활성을 측정함으로써 효능을 규명하고, 간단한 방법으로 활성측정이 용이한 점을 이용하여 정제과정 중 활성성분 분리를 위한 지표로 삼고자 본 실험을 진행하였다. 5종의 패각 crude conchiolin으로부터 urea 가열 추출법에 의해 추출된 conchiolin을 정제하기 위하여 shephadex G-100을 이용하여 당과 불순물을 전처리하였다. 전처리된 시료는 prep-LC를 이용하여 정제하여 정제된 단백질에 대한 항산화 활성을 측정하였다. 0.5mg/ml에서 DPPH radical 형성 억제 활성을 측정한 결과는 Table 28, Fig. 51과 같다. Pacific oyster의 경우 0.5mg/ml에서 free radical제거 활성이 35.12%로 5종의 패각 보다 높게 측정 되었으며, blue mussel과 ark shell는 0.5mg/ml 동일 농도에서 25.43%, 24.21%로 유사한 활성이 측정되었다. Short necked clam의 경우 0.20%로 항산화 활성이 거의 없는 것으로 확인되었다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 caffeic acid는 80%이상의 우수한 활성을 나타내었다.

### (4) 미백 활성 측정 (In vitro tyrosinase inhibition assay)

조미제 분말로부터 정제된 정제물의 미백활성을 측정하기 위해 식약청에서 고시한 ‘기능성 화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인[22] in vitro tyrosinase inhibition assay를 수행하였다. 1차년 연구결과 urea를 통하여 추출된 crude conchiolin의 미백활성은 굴, 바지락, 피조개, 진주담치 및 새조개에서 10-20% 정도의 활성밖에 없었고 동족에서는 5% 미만의 활성을 나타냈다. 따라서 Crude conchiolin을 Sephadex G-100과 prep-LC를 이용 하여 분리, 정제를 한 후 in vitro tyrosinase inhibition assay를 통한 미백실험을 수행하였다.

Tyrosinase는 인체 내의 melanin 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도 결정 단계에 관여하는 효소로서 이 효소의 활성을 억제함으로써 melanin 색소의 형성을 막아 피부의 색소 침착을 막을 수 있다. 그러므로 tyrosinase의 활성 저해능을 측정하여 생리활성 물질의 미백효과를 평가할 수 있다. 각 패각류(굴, 홍합, 바지락, 피조개, 동족)에서 정제된 분획물의 tyrosinase 활성 저해능을 측정한 결과는 Fig. 52과 같다. 각 패각류에서 정제된 분획물 170ug/ml의 단백질 농도에서 tyrosinase 저해 활성 측정 결과 굴에서는 7.9%, 바지락에서는 5.56%, 피조개에서는 12.96%, 동족에서는 5.1% 및 홍합에서는 4.1% 저해되었다. 양성대조군으로 측정한 Arbutin의 경우 170ug/ml의 농도에서 86.7% 저해되었다 (Fig. 52, Table 29).

Table 28. DPPH radical scavenging activity of the partial purified conchiolins from various mollusk shells. DPPH radical scavenging activity measured by the DPPH decolorization assay, compared with ascorbic acid and caffeic acid.

| Samples |                                       | Purified conchiolin(0.5 mg/ml)       |
|---------|---------------------------------------|--------------------------------------|
|         |                                       | DPPH radical scavenging activity (%) |
| 1       | Ascorbic acid                         | 87.70±0.58                           |
| 2       | Caffeic acid                          | 84.13±0.67                           |
| A       | <i>Crassostrea gigas</i>              | 35.12±2.45                           |
| B       | <i>Mytilus coruscus</i>               | 25.43±3.41                           |
| C       | <i>Ruditapes philippinarum</i>        | 0.20±1.42                            |
| D       | <i>Scapharca broughtonii schrenck</i> | 24.21±3.63                           |
| E       | <i>Macraa veneriformis</i>            | 14.78±4.91                           |

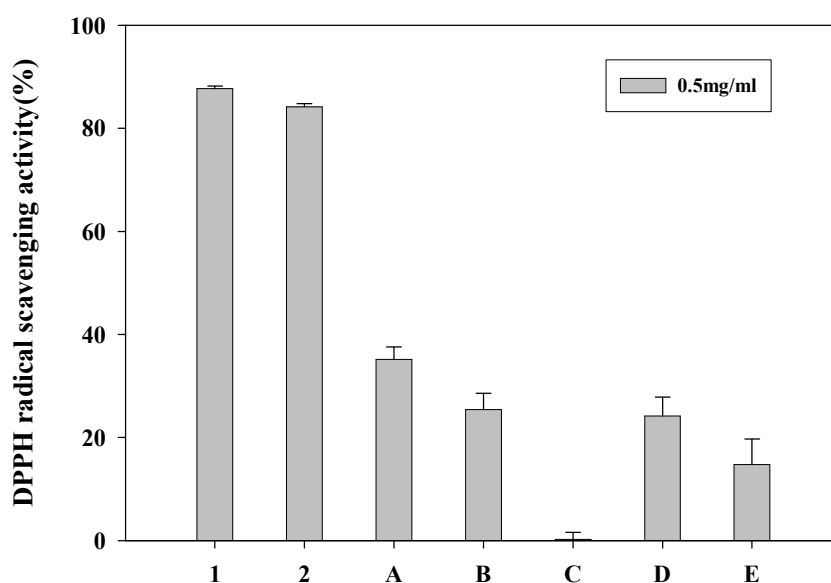
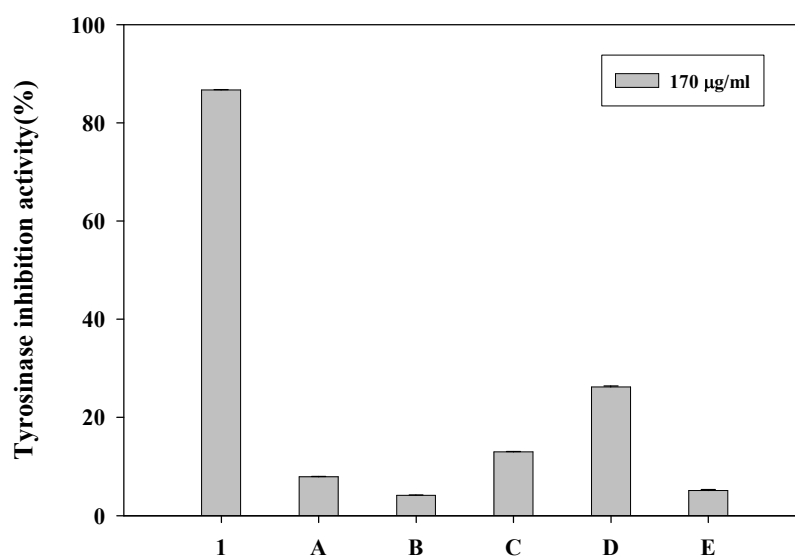


Fig. 51. DPPH radical scavenging activity of the prep-LC fraction from various mollusk shells. DPPH radical scavenging activity measured by the DPPH decolorization assay, compared with ascorbic acid and caffeic acid. 1: Ascorbic acid, 2: Caffeic acid, A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Macraa veneriformis*.

**Table 29.** Effect of prep-LC fraction of conchiolin from various mollusk shells on tyrosinase inhibition activity. L-Tyrosine oxidation by tyrosinase was spectrophotometrically determined.

| Samples  |                                       | Purified conchiolin(170µg/ml)        |
|----------|---------------------------------------|--------------------------------------|
|          |                                       | DPPH radical scavenging activity (%) |
| <b>1</b> | <b>Arbutin</b>                        | 86.7±0.087                           |
| <b>A</b> | <i>Crassostrea gigas</i>              | 7.9±0.043                            |
| <b>B</b> | <i>Mytilus coruscus</i>               | 4.1±0.050                            |
| <b>C</b> | <i>Ruditapes philippinarum</i>        | 5.6±0.087                            |
| <b>D</b> | <i>Scapharca broughtonii schrenck</i> | 12.9±0.160                           |
| <b>E</b> | <i>Macraa veneriformis</i>            | 5.1±0.220                            |



**Fig. 52.** Effect of prep-LC fraction of conchiolin from various mollusk shells on tyrosinase inhibition activity. L-Tyrosine oxidation by tyrosinase was spectrophotometrically determined. 1:Arbutin, A: *Crassostrea gigas*, B: *Mytilus coruscus*, C: *Ruditapes philippinarum*, D: *Scapharca broughtonii schrenck*, E: *Macraa veneriformis*.

#### 바. 정제된 conchiolin의 TLC(Thin layer chromatography) 분석

5종의 폐각 crude conchiolin으로부터 urea 가열 추출법에 의해 추출된 conchiolin을 정제하기 위하여 shephadex G-100을 이용하여 당과 불순물을 전처리하였다. 전처리된 시료는 prep-LC를 이용하여 정제하여, 정제 전 시료와 정제된 단백질에 대한 유기물의 구성성분을 TLC (Thin layer chromatography)를 사용하여 비교·분석하였다. Silica gel glass plate에 시료를 10 $\mu$ l 점적하여 전개 후 TLC판을 건조하고, 2% ninhydrin spray로 분무하여 TLC판에 적신 후 hotplate에서 가열 반응을 시켜 spot의 색을 확인 하였다. 발색 측정된 결과는 Fig. 53와 같다. 정제 전 conchiolin 시료의 발색을 확인 결과 5종의 폐각 conchiolin 모두에서 Rf=0.66, 0.61, 0.49, 0.39, 0.5개의 proteins spot이 확인되었다. 이들 물질로 prep-LC를 사용하여 분리한 시료의 경우 Rf=0.61 spot이 동시에 확인 되었으며, Ark shell 정제 시료에서는 Rf=0.66 spot이 함께 발색되었다. 표준물질로 사용된 BSA(Rf=0.0)과 glycine(Rf=0.36)의 경우 ninhydrin 반응 시 핑크색, 짙은 오렌지색이 나타났고, 5종류에서 동시에 나타난 spot 경우 핑크색의 spot 주변에 노란색의 테두리가 형성됨을 알 수 있다. Ninhydrin의 경우  $\alpha$ -아미노산, 펩티드 및 단백질들과 100 $^{\circ}$ C에서 반응하여 자주색 또는 붉은 자주색의 착색물질을 만든다. 착색물질의 색은 아미노산에 따라 다른데 프롤린과 하이드록시프롤린의 경우 황색의 착색물질을 만든다. 따라서 5종의 폐각 추출 conchiolin에는 여러 아미노산과 단백질이 포함되어있으며 prep-LC로 정제된 시료의 경우 황색을 띄는 spot이 주를 이루었으므로 프롤린 또는 하이드록시프롤린으로 구성된 단백질일 것으로 사료된다.

당 분석을 위하여 단백질 분석과 동결한 전개용매를 사용하여 건조 후 TLC판을 전개하였으며 전개 후 TLC판을 건조하고 발색반응을 측정하였다. 발색을 위하여 먼저 A solution (20% v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/EtOH)에 TLC판을 dipping 하여 건조시키고, B solution (0.2%  $\alpha$ -naphtholresorcinol/EtOH)을 spray하여 hotplate로 가열 건조한 후 발색을 관찰하였다.

Glucose를 점적하여 표준 발색 물질을 하였으며, 그 결과는 Fig. 54과 같다. Glucose의 경우 Rf=0.55에서 청색 발색을 하였으며, 폐각 conchiolin 시료의 경우 Rf=0.66에서 노랑빛을 띄었고, Rf=0.43, 0.0에서 청색 spot이 확인되었다. prep-LC 정제된 시료의 경우 Rf=0.65에서 노랑색 spot이 나타났다.

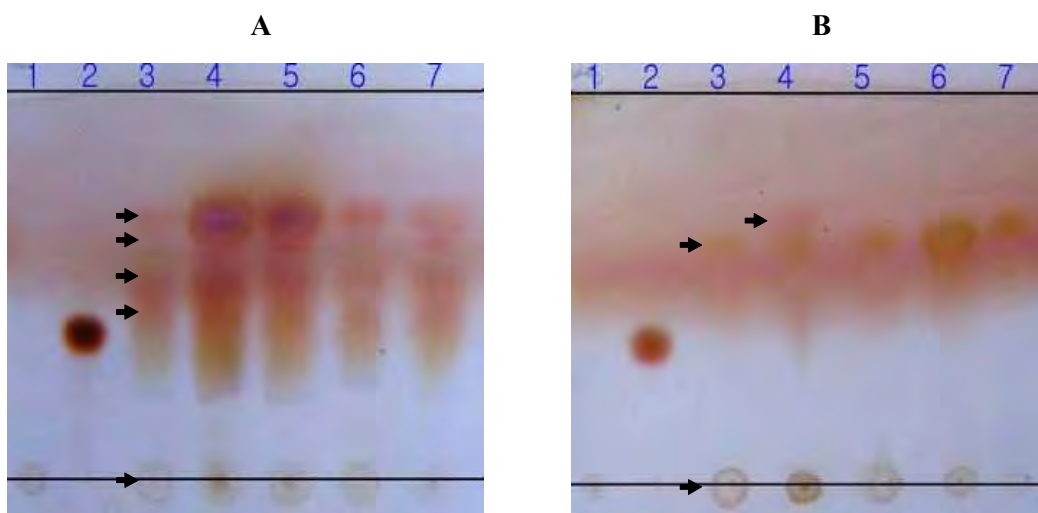
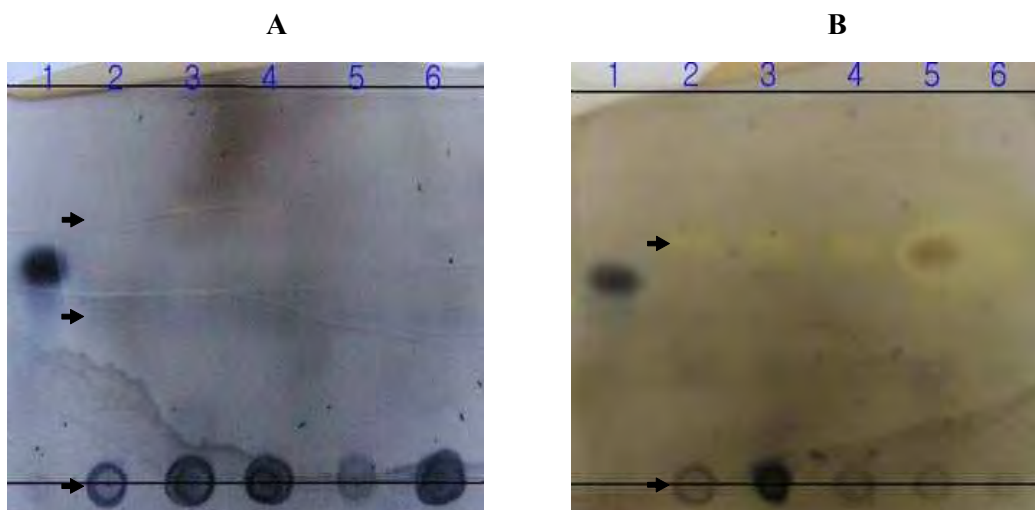


Fig. 53. TLC analysis of the prep-LC fraction from five different conchiolin of shells. Spots were detected with the ninhydrin reagent. A : Conchiolin, B : Prep-LC fraction. Lane 1: BSA, Lane 2: Glycine, Lane 3 : *Crassostrea gigas*, Lane 4 : *Scapharca broughtonii schrenck*, Lane 5 : *Ruditapes philippinarum*, Lane 6 : *Mytilus coruscus*, Lane 7 : *Mactra veneriformis*.



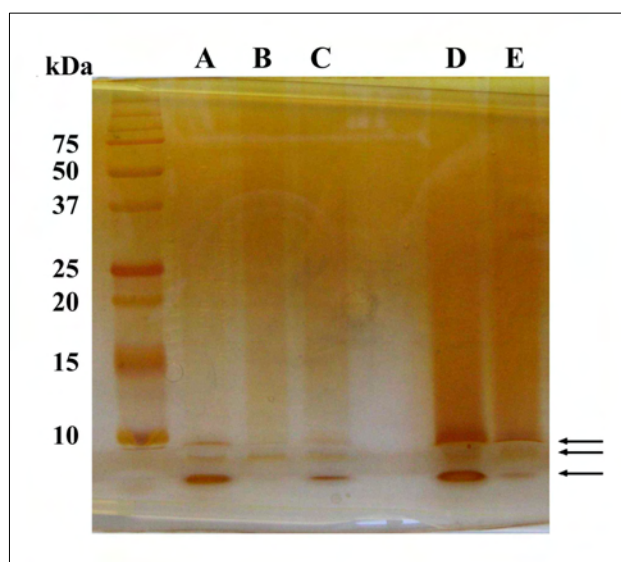
**Fig. 54.** TLC analysis of the prep-LC fraction from five different conchiolin of shells. Spots were detected with the  $\alpha$ -naphtoresorcinol. **A :** Conchiolin, **B :** Prep-LC fraction  
**Lane 1:** Glucose, **Lane 2 :** *Crassostrea gigas*, **Lane 3 :** *Scapharca broughtonii schrenck*, **Lane 4 :** *Ruditapes philippinarum*, **Lane 5 :** *Mytilus coruscus*, **Lane 6 :** *Macra veneriformis*.

Naphtolresorcinol 시약은 알도오스, 케토오스, 요산, 디옥시당, 글리코사이드, 올리고당 확인시 사용되며, 알도오스는 파랑 또는 보라색 발색을 나타내고 케토오스는 분홍 또는 붉은 색, 요산은 푸른색 점으로 나타난다. 따라서 청색이 나타난 패각 conchiolin에 일부 함유된 당류는 고분자 다당이 포함되어있을 것으로 추정되어진다. 정제 전·후에 나타난 Rf=0.65의 노란색 spot은 그 발색 위치가 proteins 발색위치와 동일한 점으로 미루어보아 당단백질일 것으로 사료된다.

#### 사. 정제된 conchiolin의 SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

초미세 분말로부터 정제된 정제물의 단백질을 확인하기 위해 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 실험을 수행하였다. 5종의 패각 crude conchiolin으로부터 추출된 conchiolin을 shephadex G-100을 이용하여 당과 불순물을 전 처리하였다. 전 처리된 시료는 prep-LC를 이용하여 정제하였고 정제된 분획물의 단백질 확인을 위해 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 실험 후 silver staining을 수행하여 단백질을 확인하였다(Fig. 55). 각 패각류에서 정제된 분획물 15 $\mu$ g을 loading한 다음 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 실험결과 굴과 피조개, 동죽, 진주담치는 10KDa보다 작은 크기의 3개의 protein band를 확인하였다. 바지락은 2개의 protein band만 확인되었다. conchiolin 단백질은 20-60KDa크기의 단백질로 알려져 있으나[22] 본 실험 결과에서는 10KDa 미만의 단백질을 확인하였다. 처음 crude conchiolin에서 추출시 사용했던 Urea는 강력한 detergent로 단백질을 변성시키는 역할을 한다. 20-60KDa의 conchiolin단백질이 본 실험에서 10KDa 미만에서 확인이 되었고 또한 여러 개(2-3)로 확인되었다. Urea로 인한 단백질 변성으로 인한 conchiolin의 subunit이 나타낸 것으로 생각되어지며 2-3개의 subunit을 합치면 기존에 알려진 크기인 약 20-30KDa 단백질로 확인이 될 거라 생각되어진다.





**Fig. 55.** Analysis by SDS-PAGE of the prep-LC fraction of conchiolin from various shells. Conchiolin were purified with prep-LC, resolved by SDS-PAGE and then stained with silver nitrate. *Crassostrea gigas* (A), *Ruditapes philippinarum* (B), *Scapharca broughtonii schrenck*, (C), *Macrta veneriformis* (D), *Mytilus coruscus* (E).

## 5. 대량생산을 위한 Conchiolin의 수율검증

앞선 결과들을 근거로 이미 실험에 사용된 6종류의 폐각류들의 거의 대부분이 유사한 종류의 conchiolin을 함유하는 것으로 확인 되었다. 따라서 향후 대량생산을 위해서는 우리나라에 생산되고 있는 폐각류 중 가장 많이 생산되고 환경오염원이며, conchiolin의 함량이 많고 항염증 활성이 가장 우수한 소재가 굴 폐각이라 판단되어, 소재의 원활한 공급과 제조공정에 기준을 확립하기 위해 향후 연구에서는 굴 폐각을 최적소재로 선정하고 그와 관련된 추출조건과 분리공정을 개발연구를 실시하였다.

### 가. 굴 폐각을 이용한 Conchiolin 수율검증

선행연구에서 이미 굴 폐각분말로부터 탈 석회화 과정을 거쳐 생성된 crude conchiolin을 0.1M citrate buffer(pH6.0)를 사용하여 추출 하였을 때, 정제 conchiolin은 단백질/당의 비율이 8.83 : 1임을 확인 하였다. 그리고 Citrate(Citric acid · sodium citrate)를 사용하기 때문에 정제 과정을 거치지 않고서도 바로 식품첨가물이나 화장품 소재로 이용할 수 있는 장점을 가지고 있어 차후 제품화하는 데에도 이상적으로 판단된다.

탈석회화 과정에 의해 추출된 crude conchiolin powder(A)과 회수된 crude conchiolin으로부터 0.1M citrate buffer로부터 회수된 soluble conchiolin powder(B), 탈염과정을 거친 soluble conchiolin powder(C)에 대한 회수율을 확인 하였다. 그 결과 crude conchiolin(A)의 회수율은 3.49%(w/w), Soluble conchiolin powder(B)는 4.24%(w/w), 탈염과정을 거친 Soluble conchiolin powder(C)는 0.32%(w/w)로 확인되었다. crude conchiolin powder(A)에 비해 회수된 soluble conchiolin powder(B)의 회수율이 높은 이유는 추출 과정 중에 사용한 citric acid가 분말화 과정 중 증량된 것으로 보여 진다(Fig. 56, 57).

한편, 투석을 통해 얻은 conchiolin powder(C)와 투석을 하지 않은 conchiolin powder(B)의 단백질과 총 당 함량을 비교한 결과를 Table 1.에 나타내었다. 두 단백질을 증류수에 같은 농도(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 용해시킨 후, Lowry법과 페놀-황산법으로 각각의 단백질과 총 당 함량을 측정하였으며, 그 결과 투석 전 conchiolin powder (A)의 경우 수율은 높았지만, citrate salt가 다량 함유되어 있어 투석한 conchiolin powder(C)에 비해 상대적으로 상당히 낮은 단백질을 함유하고 있음을 알 수가 있었다. 투석한 conchiolin powder(C)의 경우, 전체 중 단백질의 함량이 약 27%임을 확인할 수 있었고, 단백질과 총 당의 함량비는 약 17:1 이었다(Table 30).

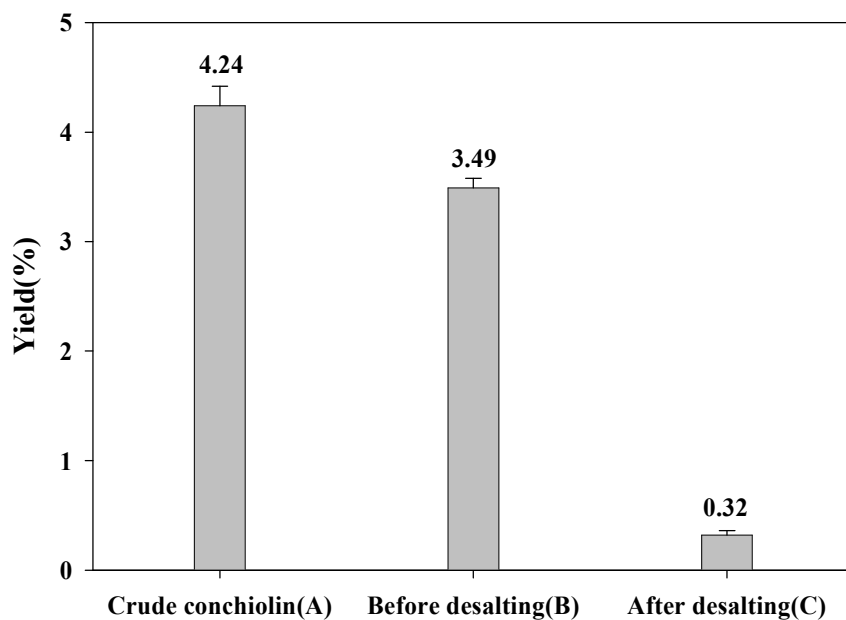


Fig. 56. Yield of extracted crude conchiolin on each phase of the process. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of duplicate determinations.



Fig. 57. Extracted conchiolins on each phase of the process.

**Table 30. Yield, amount of crude protein and total sugar of conchiolins before and after desalting.**

| <b>Materials</b>                   | <b>Yield(%)</b> | <b>Amount of crude protein(<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b> | <b>Amount of total sugar(<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b> |
|------------------------------------|-----------------|--|--|
| <b>Conchiolin before desalting</b> | <b>4.24</b>     | <b>1.00</b>  | <b>0.13</b>  |
| <b>Conchiolin after desalting</b>  | <b>0.32</b>     | <b>138.00</b>  | <b>8.13</b>  |

\* Data are expressed as mean  $\pm$  SD of duplicate determinations.

## 6. Soluble conchiolin의 구조분석

### 가. 굴 패각으로부터 추출한 conchiolin의 분리정제

굴 패각 미세분말에 6.5M 초산을 사용하여 원심분리한 후 얻은 조 콘키올린을 0.1M Citrate buffer(pH6.5)로 추출하여 동결 건조한 시료를 이용하여 Sephadex G-100이 충전된 column(25X 900mm)에 넣고 시료를 분리 정제하였다. 그 결과(Fig. 58, Table 31) 9번 fraction에서 항염증활성 가장 높게 나왔으며 이 분획물을 탈염 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

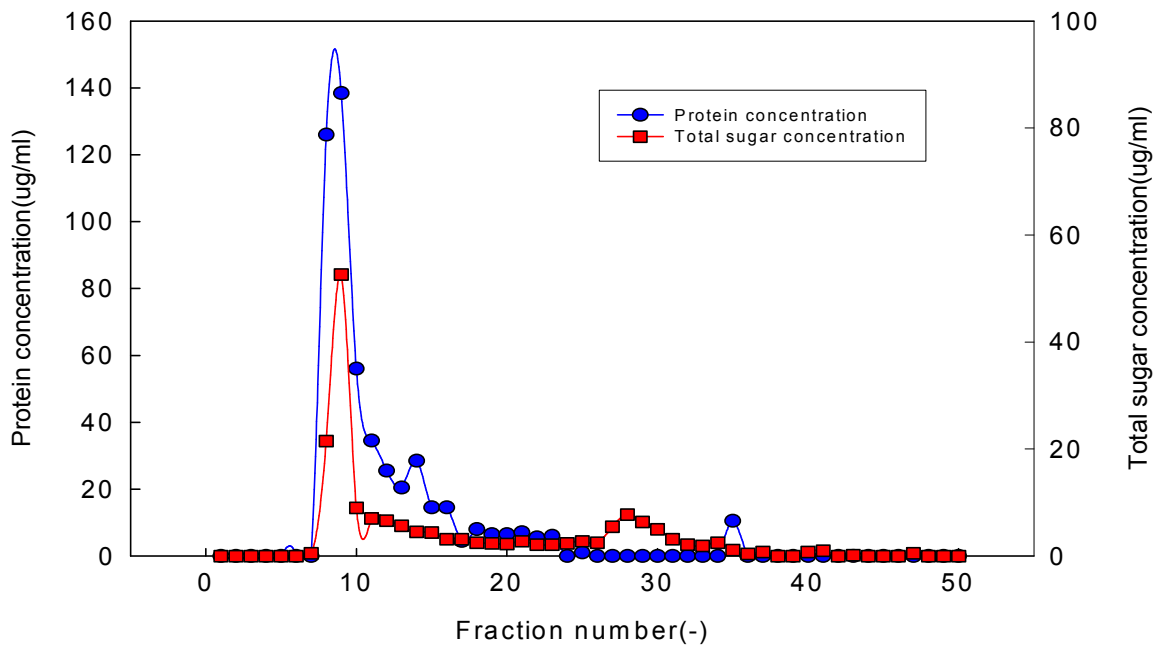


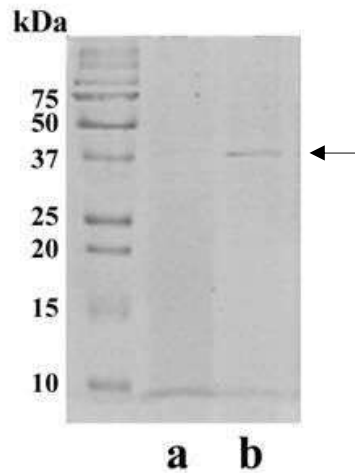
Fig. 58. Chromatogram of purified conchiolin from sephadex G-100

Table 31. Anti-inflammatory activity comparison by Fraction numbers

| Fraction No. | Protein( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | Total sugar( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | COX-2 inhibitory activity(%) |
|--------------|------------------------------------|--|------------------------------|
| Control      | 0                                  | 0                                      | 0                            |
| 9            | 138.5                              | 52.6                                   | 21.38                        |
| 14           | 28.5                               | 4.5                                    | 5.77                         |
| 28           | 0.1                                | 7.5                                    | 2.12                         |
| 35           | 10.5                               | 1.13                                   | 7.04                         |

#### 나. 정제된 Conchiolin의 순도 확인 및 분자량 검증

앞선 연구결과와 마찬가지로 순도와 분자량 검증을 위해 SDS-PAGE를 하였으며, 그 결과 앞선 연구결과와 동일하게 분자량은 약 37kd으로 확인 되었으며, 순도는 아주 높은 것으로 확인 되었다(Fig. 59).



**Fig. 59. Molecular weight analysis of purified conchiolin from pacific oyster that use SDS-PAGE. a: crude conchiolin, b: purified conchiolin**

#### 다. 정제된 conchiolin의 아미노산 분석

정제된 분획 물을 동결 건조한 후 아미노산분석기(Biochrom 20 Plus Amino Acid Analyzer, UK)를 사용하여 아미노산 함량을 분석하였다. 시료는 1ml당 12N HCl을 1ml 처리하여 110℃에서 24hr 가수분해를 시켰으며, 가수분해물은 40℃이하에서 증발시켰으며, 농축시료에 citrate buffer(pH 2.2)를 1ml 넣고 녹인 후 10배 희석한 시료 40 $\mu$ l을 아미노산 분석기에 넣고 분석하였다. 그 결과, 정제된 콘키올린에는 aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, cystein, leucine, tyrosine, phenylalanine, lysine, arginine이 함유되어 있는 것으로 확인 되었다(Fig. 60). Unknown compound들 중 앞쪽 RT 4.466의 peak는 가수분해 산화물인 cysteic acid 혹은 methionine sulfoxid일 가능성이 아주 높으며, 그 외 2종류의 peak는 미지의 물질인 것으로 판단된다. 본 결과에서 보면 단백질 정량값과 아미노산 분석 결과가 약간 차이가 나는 것을 알 수 있는데 이것은 대개 단백질 정량법이 tyrosine의 함량비에 의해 정량값이 구해지기 때문에 tyrosine의 함량비가 일정하지 못하면 정확한 양을 알 수 없기 때문에 약간의 차이를 보일 수가 있다.

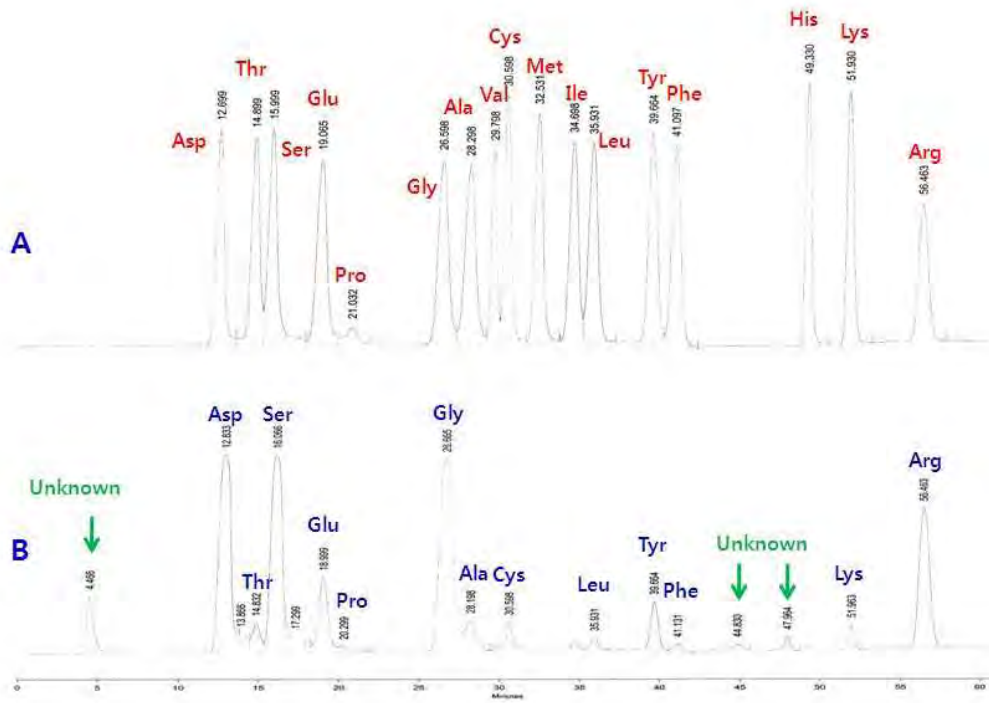


Fig. 60. Amino acid analysis result of purified conchiolin. A: Standard amino acid, B: Purified conchiolin

정제된 콘키올린에는 구성 아미노산 중 arginine과 aspartic acid의 함량이 각각 23.87%와 22.67%로 다량 함유되어있는 것으로 확인 되었고, serine과 glycine이 15.2%와 12.87%로 각각 함유되어 있으며, glutamic acid, proline, tyrosine, alanine, threonine, cystine, lysine, leucine, phenylalanine순으로 함유되어 있는 것으로 확인되었다(Table 32).

**Table 32. Amino acid content analysis result of crude conchiolin and purified conchiolin**

| <b>Amino acid</b>    | <b>Crude conchiolin(%)</b> | <b>Purified conchiolin(%)</b> |
|----------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <b>Aspartic acid</b> | <b>11.44</b>               | <b>22.67</b>                  |
| <b>Threonine</b>     | <b>4.96</b>                | <b>1.98</b>                   |
| <b>Serine</b>        | <b>3.87</b>                | <b>15.20</b>                  |
| <b>Glutamic acid</b> | <b>15.33</b>               | <b>7.02</b>                   |
| <b>Proline</b>       | <b>2.21</b>                | <b>5.11</b>                   |
| <b>Glycine</b>       | <b>5.31</b>                | <b>12.87</b>                  |
| <b>Alanine</b>       | <b>4.57</b>                | <b>2.01</b>                   |
| <b>Cystine</b>       | <b>0.28</b>                | <b>1.96</b>                   |
| <b>Valine</b>        | <b>7.76</b>                | <b>0.00</b>                   |
| <b>Methionine</b>    | <b>5.85</b>                | <b>0.00</b>                   |
| <b>Isoleucine</b>    | <b>3.80</b>                | <b>0.00</b>                   |
| <b>Leucine</b>       | <b>7.00</b>                | <b>0.75</b>                   |
| <b>Tyrosine</b>      | <b>4.04</b>                | <b>4.48</b>                   |
| <b>Phenylalanine</b> | <b>7.07</b>                | <b>0.69</b>                   |
| <b>Histidine</b>     | <b>4.14</b>                | <b>0.00</b>                   |
| <b>Lysine</b>        | <b>7.05</b>                | <b>1.39</b>                   |
| <b>Ammonia</b>       | <b>1.75</b>                | <b>0.00</b>                   |
| <b>Arginine</b>      | <b>3.57</b>                | <b>23.87</b>                  |
| <b>Total</b>         | <b>100</b>                 | <b>100</b>                    |



## 라. 수용성 콘키올린의 구조분석

현재까지 국내외 연구 동향을 살펴보면 콘키올린은 glycoprotein으로 알려져 있으나, 분자량에 대한 대략적인 예측 수준에 불과하고 실제 그 구조를 입증한 사례가 없기 때문에 현재 당단백질의 구조분석을 위해 연구를 집중하고 있으나 쉽지 않은 상태이다. 현재 당단백질 구조분석을 위해 접근하고 있는 방법으로는 당과 단백질을 각각 나누어 해석하고자 하였다.

6.5M 초산을 사용하여 원심분리한 후 얻은 조 콘키올린을 0.1M Citrate buffer(pH6.5)로 추출하여 동결건조한 시료를 이용하여 Sephadex G-100이 충전된 column(25X 900mm)에 넣고 시료를 분리 정제한 후 단백질 분리정제 전용 FPLC Superdex 200 column과 Ion column(Mono Q, S)등을 이용하여 분리 정제를 통하여 본 연구에 정제된 콘키올린이 당단백질이라는 것을 이미 확인하였다.

구조분석을 위하여 정제된 콘키올린에 구조적으로 결합된 구성당조성과 단백질의 아미노산배열등을 확인하기 위해 당 구조결합을 끊을 수 있는 glycosidase 효소와 산과 알칼리가수분해(4M TFA, 100℃, 4h, NaOH, NaBH<sub>4</sub> 등)를 이용하여 O,N-glycosidic linkage 결합을 끊어내는 과정을 병행하여 실시하였지만 쉽지 않았고 현재까지의 효소와 산가수분해 결과로 볼때 정제된 콘키올린의 구성당과 단백질의 비율은 전체 구조중 당이 차지하는 것이 약 15-20%, 단백질이 약 80-85%인 것으로 확인하였다.

그리고 아미노산 배열구조는 Poly Asp block과 Poly Arg block, Ser-Gly dipeptide 등이 연계된 배열사이에 구조결합을 형성하는 아미노산들이 위치하고 있는 것으로 추정되지만 아직 정확하게 확인된 바는 없다.

현재 당과 아미노산의 결합배열에 대한 분석이 진행되고 있고, 구조 아미노산의 함량비를 볼때 지금까지의 연구보고와는 다른 종류의 glycoprotein으로 해석되며, 굴뚝각으로 부터 분리한 콘키올린의 정확한 구조와 관련하여 발표된 논문이 전혀 없어 연구에 많은 어려움이 있으며, 현재 이 부분에 대한 연구는 계속진행 중에 있다.

## 7. 효소가수분해에 의한 펩타이드의 제조

조 콘키올린을 이용하여 펩타이드 제조를 위해서 시판중인 효소(Protamex, Trypsin, Neutrase)를 이용하여 조건에 따른 반응과 반응 후 물질에 대한 항염증, 항산화, ACE저해 등의 기능을 검토하여 최적의 효소와 조건을 확립하였다. 3 종류의 효소중 protamex는 threonine을 제외한 거의 대부분의 아미노산을 절단하는 특징을 가지고 있으며, trypsin은 lysine과 arginine부위를 neutrase는 glutamine과 asparagine부위를 절단하는 특징을 가진 상업용 효소이다(Table 8).

액상으로 판매되는 protamex와 neutrase과 분말 trypsin을 동일 역가대비 액상으로 만든 후 이들을 동일한 기질(콘키올린)량으로 반응하여 40-60℃의 온도와 pH 6.0-8.0의 조건으로 각각 2시간 반응 시킨 후 반응물에 대한 활성을 측정하여 최적 조건을 확인하였다. 그 결과 항산화, ACE저해, COX-2저해활성이 가장 높은 최적 단백질 분해효소로는 protamex이며, 반응 조건은 pH 6.0, 반응온도 50℃였다(Table 33).

이러한 조건을 바탕으로 반응한 콘키올린 단백질이 실제 펩타이드화 되었는지를 확인하기 위해서 Superdex 200(16/60) column을 AKTA prome plus 장비에 장착하여 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.0 buffer를 사용하여 분자량을 확인하였다. 이때 사용된 지표단백질로는 Table 34에 명시한 단백질을 사용하였으며, 검출기 파장은 280nm에서 실시하였다.

그 결과 반응전과 반응 후에 대한 크로마토그램을 살펴보면 반응전 MW 20,000-61,000인 조 콘키올린이 반응 후 약 MW 8,800의 peak가 높게 생성되는 것으로 확인되어 펩타이드화가 진행됨을 알 수 있었다(Fig. 61). 따라서 반응시간 효소 반응량을 고려하여 반응하여 펩타이드 단백질을 회수할 수 있었다.

**Table 33. Response surface method for screening physiological function of optimal condition for peptides from crude conchiolin**

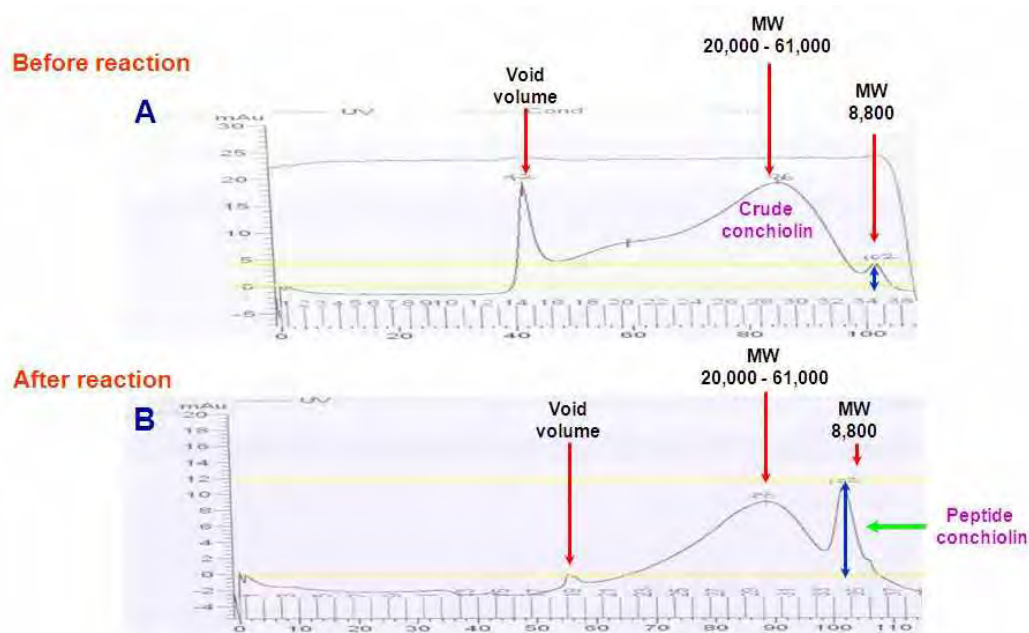
| Row | Protease  | Vol.( $\mu$ l) | Temp.( $^{\circ}$ C) | pH,1ml | DPPH | ACE  | COX-2 |
|-----|-----------|----------------|----------------------|--------|------|------|-------|
| 1   | Protamex  | 432            | 60                   | 7      | 7.3  | 10.2 | 73.2  |
| 2   | Protamex  | 432            | 50                   | 8      | 8.5  | 11.4 | 72.2  |
| 3   | Protamex  | 432            | 50                   | 6      | 34.6 | 37.6 | 87.4  |
| 4   | Trypsin   | 614            | 50                   | 8      | 9.0  | 13.2 | 57.7  |
| 5   | Neutrased | 480            | 40                   | 6      | 10.4 | 15.7 | 69.8  |
| 6   | Trypsin   | 614            | 50                   | 6      | 0    | 0    | 69.4  |
| 7   | Neutrased | 480            | 50                   | 7      | 0    | 0    | 64.9  |
| 8   | Trypsin   | 614            | 40                   | 7      | 0    | 0    | 59.1  |
| 9   | Neutrased | 480            | 40                   | 8      | 11.8 | 17.2 | 66.5  |
| 10  | Protamex  | 432            | 40                   | 7      | 0    | 0    | 64.6  |
| 11  | Trypsin   | 614            | 60                   | 7      | 0    | 0    | 59.9  |
| 12  | Neutrased | 480            | 50                   | 7      | 0    | 0    | 64.0  |
| 13  | Neutrased | 480            | 60                   | 6      | 4.8  | 5.2  | 70.2  |
| 14  | Neutrased | 480            | 60                   | 8      | 10.3 | 16.8 | 62.0  |
| 15  | Neutrased | 480            | 50                   | 7      | 0    | 0    | 68.7  |

**Table 34. Marker protein for molecular weight verification of hydrolyzed conchiolin peptide**

| Mark proteins      | Ve   | Ve/Vo | MW      |
|--------------------|------|-------|---------|
| Cytochrome C       | 101  | 2.405 | 12,400  |
| Carbonic anhydrase | 94   | 2.238 | 29,000  |
| Albumin            | 84.5 | 2.012 | 66,000  |
| Apoferritin        | 72   | 1.714 | 443,000 |

☞ Vo : Void volume. 44mL, blue dextran flow volume

☞ Ve : Standard protein volume



**Fig. 61. Chromatography of FPLC for produced peptide conchiolin from crude conchiolin using protamex, pH 6.0 at 50 °C for 2 hr. A, crude conchiolin pattern before reaction; B, peptide conchiolin pattern after reaction using protamex.**

## 8. 상용화된 항염증 제품과 분리한 conchiolin에 대한 활성비교

### 가. 항염증 활성 측정 (Cyclooxygenase, COX inhibition assay)

본 연구에서는 crude conchiolin을 0.1M citrate buffer를 이용하여 용해하여 투석 한 후, 동결건조하여 분말화한 후, 시료로 사용하였으며 특히, powder conchiolin의 우수한 항염증효능을 입증하기 위하여 국제적으로 유명한 제약회사의 우수한 항염증제품들(celecoxib, diclofenac, indomethacin)과 비교 실험을 수행하였다(Fig. 62, 63, 64).

균 폐각에서 추출한 conchiolin을 분말화 하였으며, powder conchiolin의 농도가 0.01 ~ 1,000  $\mu$ g/ml 로 증가함에 따라 유발되는 염증 억제효능을 측정하였다(Fig. 62, 63).

Fig. 62에 의하면, powder conchiolin의 농도가 0.01 ~ 0.1 $\mu$ g/ml 에서는 COX-2의 저해율이 나타나지 않았으며, 0.1 ~ 1,000  $\mu$ g/ml 로 증가함에 따라 유발되는 COX-2의 저해율이 증가하였다. 한편, celecoxib, diclofenac 및 indomethacin 또한 농도가 0.01 ~ 1,000  $\mu$ g/ml 로 증가함에 따라 유발되는 COX-2의 저해율이 증가하는 양상을 나타내었다. 그러나 powder conchiolin 과 비교할 때, 100 ~ 1,000  $\mu$ g/ml 의 농도에서는 COX-2의 저해율(1,000  $\mu$ g/ml 의 농도: conchiolin; 94.6%, celecoxib; 92.9%, diclofenac; 99.1%, indomethacin; 98.8%)이 비슷하였으나, 그 아래의 농도에서는 차이가 많았다. 이러한 powder conchiolin의 결과는 1, 2차년도의 conchiolin 단백질 농도 기준의 COX-2 저해율 결과와 비슷한 경향을 보였으며, 이는 conchiolin의 농도가 감소됨에 따라 COX-2를 저해하는 conchiolin의 효능이 급감되는 것으로 사료되어진다. 또한, diclofenac 및 indomethacin의 농도가 0.01 ~ 1,000  $\mu$ g/ml 로 증가함에 따라 유발되는 COX-1의 저해율은 증가하였으며, celecoxib 및 conchiolin의 농도가 0.01 ~ 10 $\mu$ g/ml 에서는 COX-1의 저해율이 나타나지 않았으며, 10 ~ 1,000  $\mu$ g/ml 로 증가함에 따라 유발되는 COX-1의 저해율은 증가하였다(Fig. 63). 이는 celecoxib은 일반적으로 NSAID 보다 분자크기가 크기 때문에 COX-1 효소에 비해 비교적 큰 크기의 소수성채널인 COX-2 효소를 억제한다. 즉, celecoxib은 비교적 작은 COX-1 효소의 소수성 채널에 들어가기에는 너무나 크기가 크다. 그러므로 celecoxib은 COX-1에 비하여 COX-2에 대해 대략 100배정도의 높은 선택성을 나타낸다. 즉, celecoxib은 COX-2를 선택적으로 억제하는 약물이므로, 낮은 농도에서는 COX-1을 저해하지 않을 것으로 추정하며, conchiolin도 이와 유사한 메커니즘이 있을 것으로 사료된다. 또한, 아스피린(acetylsalicylic acid)을 이용하여 동일한 방법으로 실험을 하였으나, 재현성이 나오지 않아 다른 방법으로의 실험이 요구되어진다.

항염증약품들(celecoxib, diclofenac, indomethacin)과 conchiolin에 의한 COX-1과 COX-2의 저해율을 비교 실험한 결과(Fig. 64), indomethacin은 COX-2 보다 COX-1을 저해하는 약물이었으며, celecoxib, diclofenac 및 conchiolin은 COX-1 보다 COX-2 저해하는 약물로 확인되었다. 이 결과는 Fitzgerald(23) 등이 보고한 다양한 약물들의 COX-1 과 COX-2에 대한 저해성의 결과와 일치

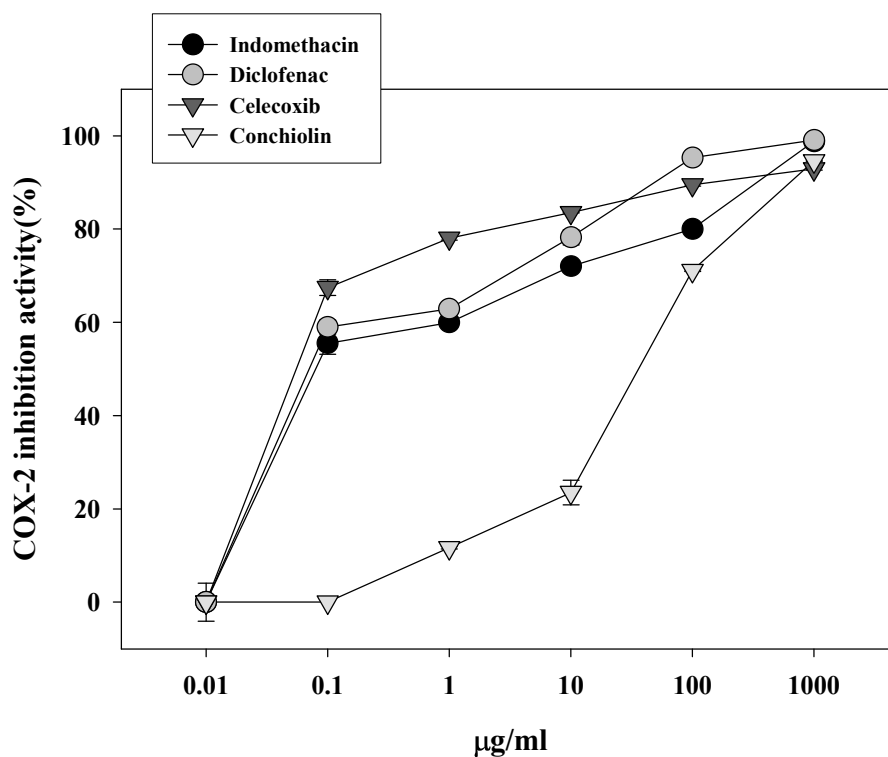


Fig. 62. Comparison of COX-2 inhibitory activity of NSAIDs(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs), COX-2 selective inhibitor(Celecoxib) and powder Conchiolin from *Crassostrea gigas*. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of duplicate determinations.

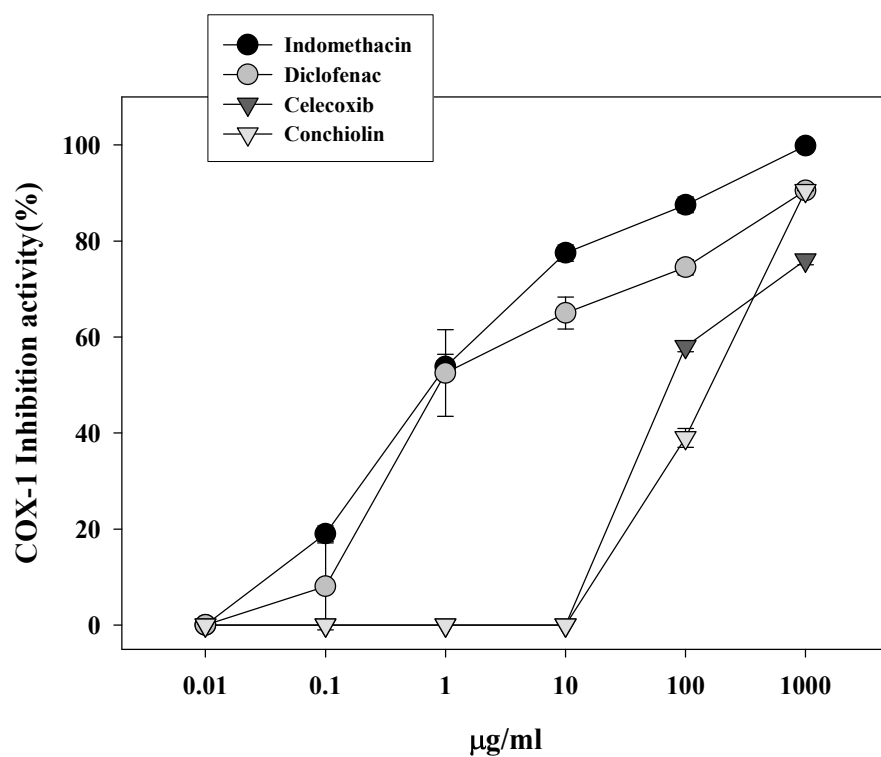
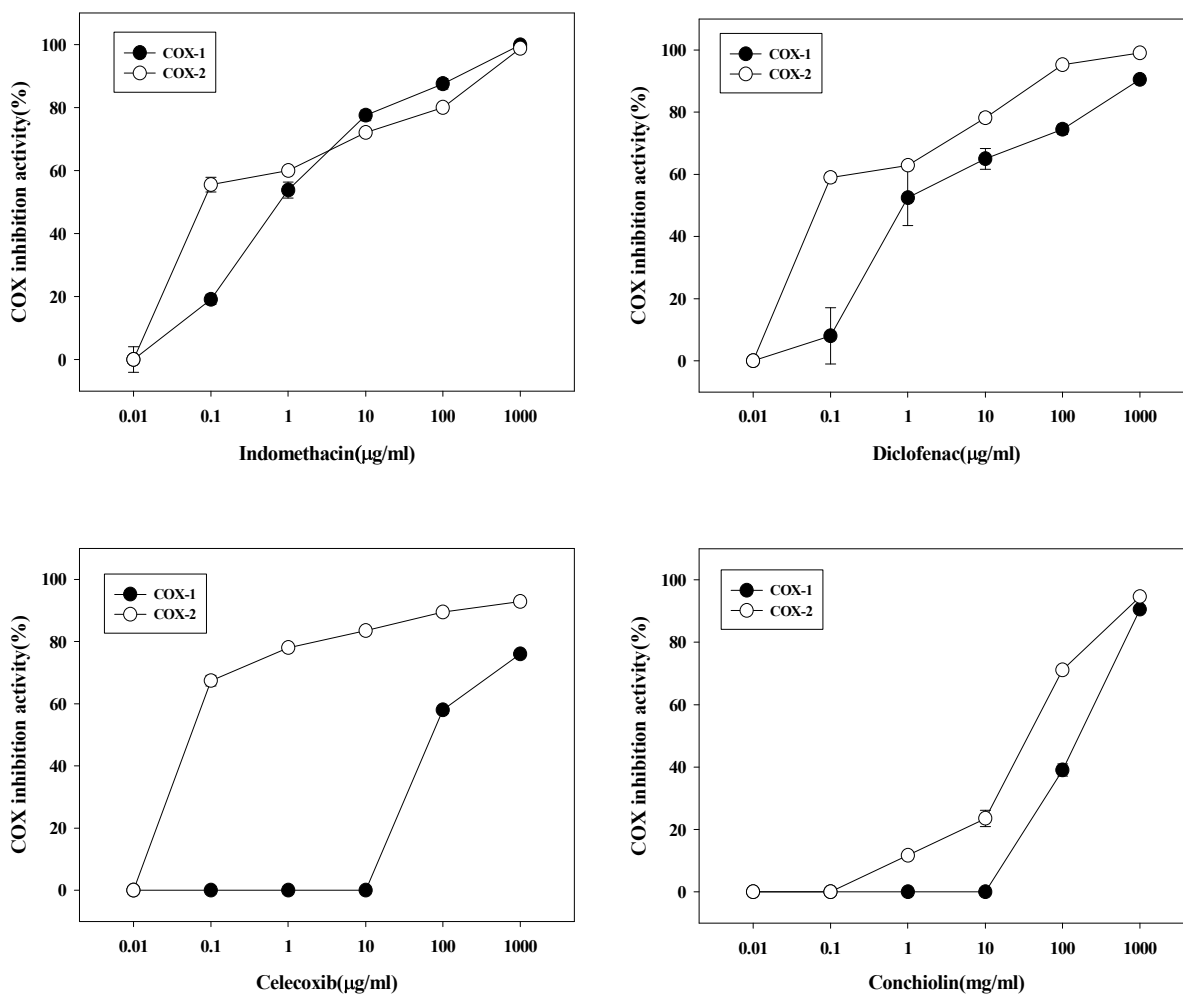


Fig. 63. Comparison of COX-1 inhibitory activity of NSAIDs(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs), COX-2 selective inhibitor(Celecoxib) and powder Conchiolin from *Crassostrea gigas*. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of duplicate determinations.



**Fig. 64. Comparison of Inhibitory rate of COX-1 and COX-2 by NSAIDs(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs), COX-2 selective inhibitor(Celecoxib) and powder Conchiolin from *Crassostrea gigas*. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of duplicate determinations.**



하였다.

최근에 개발되는 소염진통제들이 COX-2 만을 선택적으로 저해하여 위장장애나 출혈의 부작용을 줄이는 방향으로 개발이 진행되고 있으나, 심장혈관부작용을 초래한다는 보고가 많다. 따라서 COX-2도 억제하지만 COX-1도 억제하여, 위점막의 손상이나 출혈을 최소한으로 하며 혈전 예방 작용을 유지하는 소염진통제 개발이 필요하다. 이에 부응하여, 천연 폐각류에서 유래하는 conchiolin을 고 순도 분리 정제한다면, 위장장애나 출혈의 부작용을 최소화하며, 현재 사용되고 있는 COX-2 선택적 억제제의 잠재적인 현상인 심장혈관부작용을 최소화하는 천연 소염 진통제 개발이 가능하리라 사료된다.

나. 항산화 활성 측정 (DPPH radical scavenging assay)

Citrate buffer 추출법을 이용하여 추출된 활성단백질의 항산화 활성을 측정하기 위하여 추출물의 DPPH에 대한 전자공여효과로 시료의 환원력을 측정하는 방법에 따라 DPPH radical 제거효과를 측정하였으며, 굴의 crude conchiolin 으로부터 0.1M citrate buffer(pH6.0) 용매를 이용하여 추출 된 conchiolin(0.5mg/ml)에서의 DPPH radical 형성 억제 활성을 측정한 결과, free radical 소거활성은 19.58% 이었다. 굴의 crude conchiolin 으로부터 추출한 단백질의 항산화 활성이 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid(87.70%)에 비해서는 다소 미약하였다. 당해연도의 연구에서는 powder conchiolin을 이용하여 동일한 방법으로 실험을 수행한 결과, 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid에 비해서 항산화활성이 낮은 것으로 확인되어 본 연구에서 분리한 conchiolin의 항산화 활성은 낮은 것으로 확인되었다(Table 35).

**Table. 35. Comparison of DPPH radical scavenging activity by ascorbic acid and powder conchiolin from *Crassostrea gigas*.**

| Concentration( $\mu\text{g/ml}$ ) | 2.5            | 5              | 10             |
|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| EDA(%) of ascorbic acid           | 26.5 $\pm$ 3.0 | 53.1 $\pm$ 3.1 | 85.2 $\pm$ 1.3 |
| Concentration( $\mu\text{g/ml}$ ) | 100            | 500            | 1,000          |
| EDA(%) of powder conchiolin       | 3.6 $\pm$ 5.1  | 8.0 $\pm$ 2.7  | 12.7 $\pm$ 2.3 |

\* EDA(%): EDA(%)= (A-(B-C))/A\*100, EDA: Electron donating ability: A; Blank, B; Reagent sample, C; Sample only(not DPPH solution)

## 9. 전임상 동물실험

### 가. Raw 264.7 cell에서 Crude conchiolin의 세포 독성 및 항염 활성 측정

Raw 264.7 cell에서 가공원료추출물(Crude conchiolin)의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 진주담치, 굴, 동죽의 가공원료추출물(Crude conchiolin)를 0.1mg/ml과 0.3mg/ml로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS에 의해 증가된 NO 생성량은 홍합, 굴, 동죽을 진 처리했을 때 NO의 생성을 억제하였다. 또한 진주담치와 굴은 염증매개인자인, IL-6, TNF-alpha, PGE2를 농도 의존적으로 억제하였다. 그러나 동죽은 IL-6, TNF-alpha, PGE2의 염증매개물질의 억제에는 유의한 결과를 나타내지 않았다. 일반적으로 COX-2의 감소는 PGE2의 감소를 유도하지만, 동죽에서는 어떠한 이유로 IL-6, TNF-alpha, PGE2의 염증매개인자를 억제하지 못하는지는 전사인자 및 COX-2의 활성 등을 중심으로 좀 더 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다(Fig 65, 66, 67). 단백질 발현량을 측정할 수 있는 immunoblot analysis 실험결과 LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2는 가공원료추출물(Crude conchiolin)에 의해 발현량이 감소하는 것으로 나타났다(Fig 68). 따라서 패각에서 추출한 추출물(Crude conchiolin)의 항염효과를 측정한 결과 항염활성을 나타내는 것으로 나타났다.

### 나. SD Rat에서 crude conchiolin의 독성측정

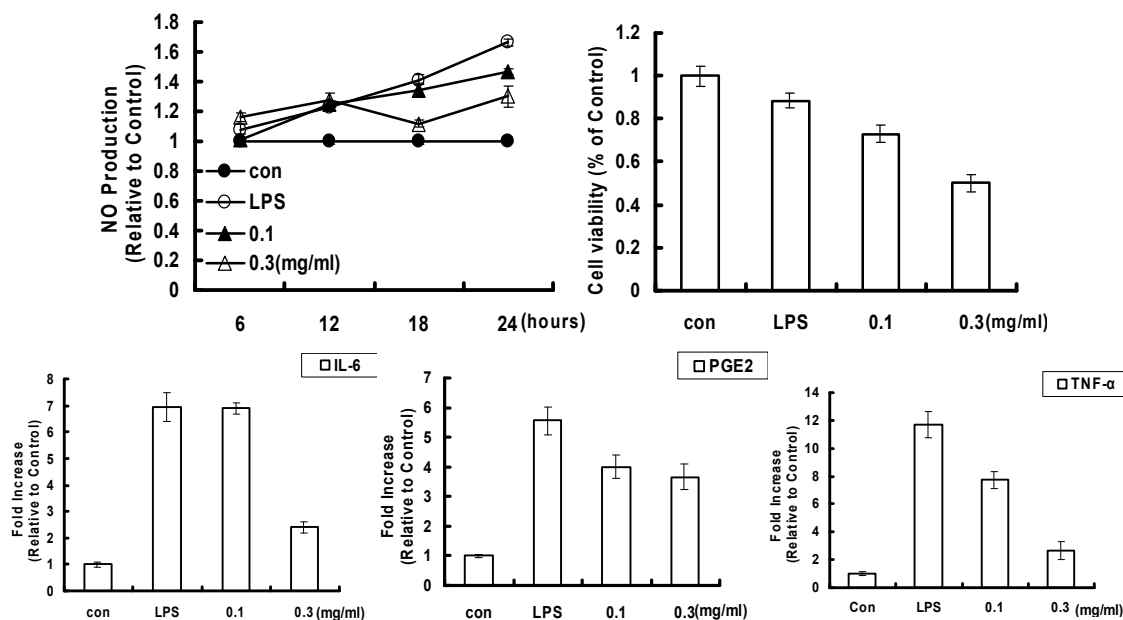
#### (1) 체중측정

6종류 패각의 crude conchiolin의 독성실험을 하기 위해 rat을 실험동물로 사용하였다. crude conchiolin을 실험동물에 투여 후 1~14일에 체중을 측정하여 기록하였다. Rat 동물 실험 결과 crude conchiolin에 의한 이상적인 체중변화는 관찰되지 않았으며(Fig 69), 간, 신장의 무게 및 체중 당 간, 신장의 무게 역시 유의한 결과는 관찰되지 않았다(Fig 70, 71).

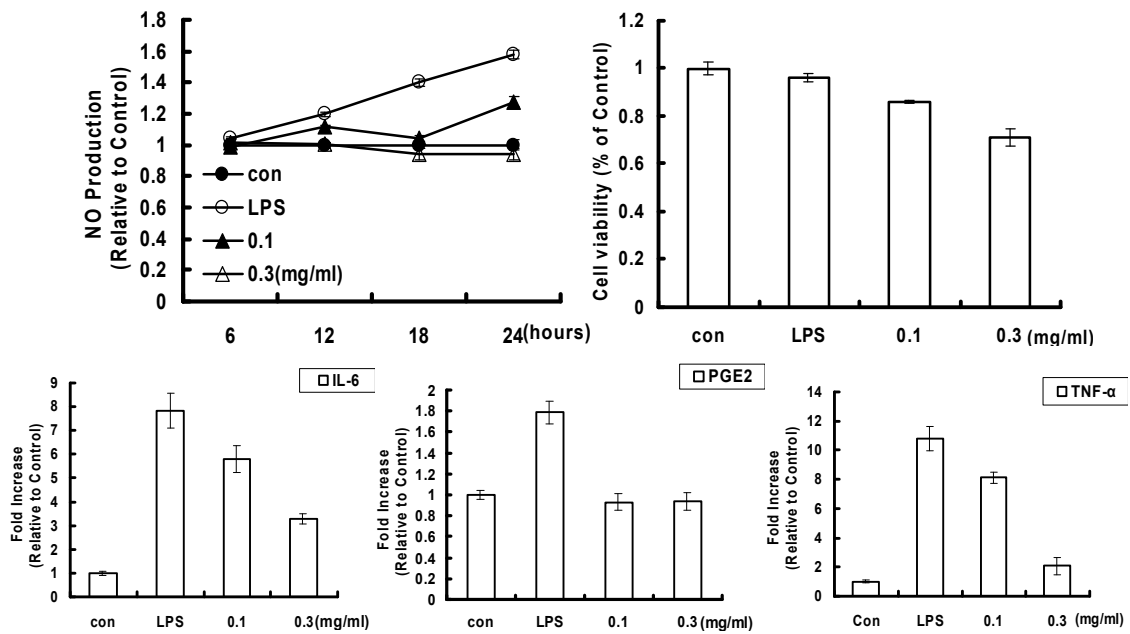
#### (2) GOT (Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (Glutamic pyruvic transaminase), LDH (Lactate dehydrogenase) 및 BUN (Blood urea nitrogen) 측정

Crude conchiolin의 간 손상과 신장 손상을 실험하기 위해 rat에 투여 후 14일후에 간 손상의 지표인 GOT, GPT 및 LDH와 신장손상의 지표가 될 수 있는 BUN를 측정하였다.

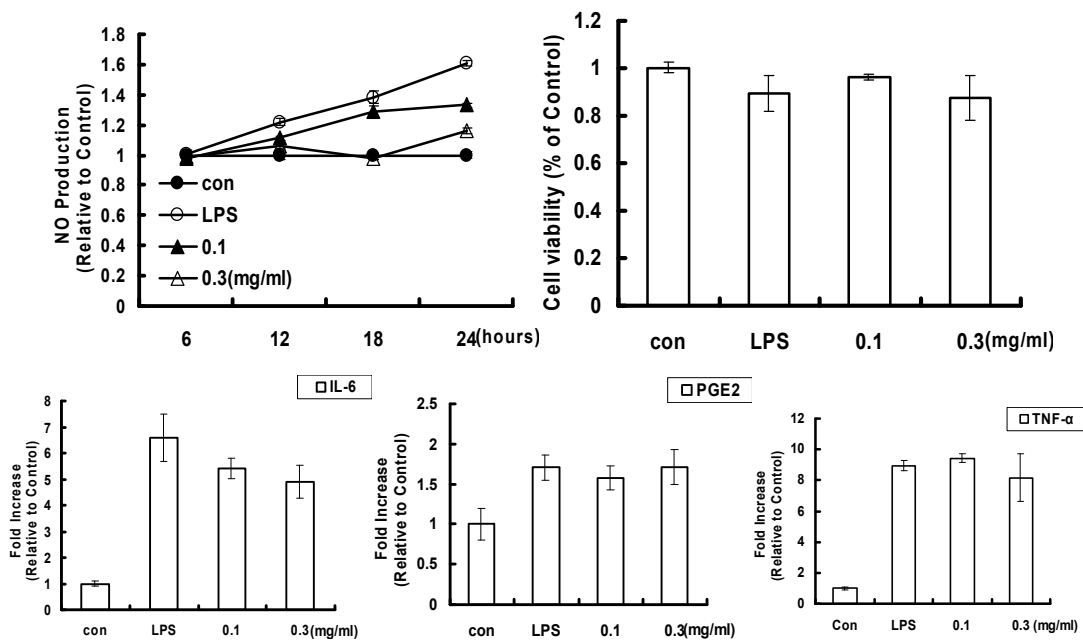
Crude conchiolin의 투여는 간 손상의 지표인 GOT, GPT 및 LDH의 수준을 유의하게 변화시키지 않았으며, 또한 신장손상의 지표가 될 수 있는 BUN에 있어서도 유의한 변화를 유도하지 않았다(Fig. 72).



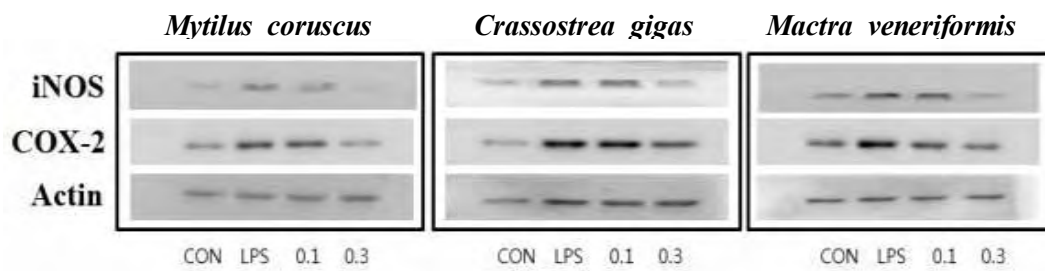
**Fig. 65. Effects of *Mytilus coruscus* on NO production and inflammatory mediator production in LPS stimulated Raw264.7 cells.** Raw264.7 cells were treated with various concentrations of *Mytilus coruscus* dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and the cells were further incubated for 6-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the Experimental procedures. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with eight separate experiments



**Fig. 66.** Effects of *Crassostrea gigas* on NO production and inflammatory mediator production in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of *Crassostrea gigas* dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1  $\mu$ g/ml), and the cells were further incubated for 6-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the Experimental procedures. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with eight separate experiments



**Fig. 67. Effects of *Mactra veneriformis* on NO production and inflammatory mediator production in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of *Mactra veneriformis* dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1  $\mu$ g/ml), and the cells were further incubated for 6-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the Experimental procedures. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with eight separate experiments**



**Fig. 68** Effect of *Mytilus coruscus*, *Crassostrea gigas*, and *Mactra veneriformis* on the induction of iNOS and COX-2 by LPS. The level of iNOS and COX-2 protein were monitored 18h after treatment of cells with LPS (1μg/ml) with or without shells extract pretreatment (i.e. 1h before LPS)

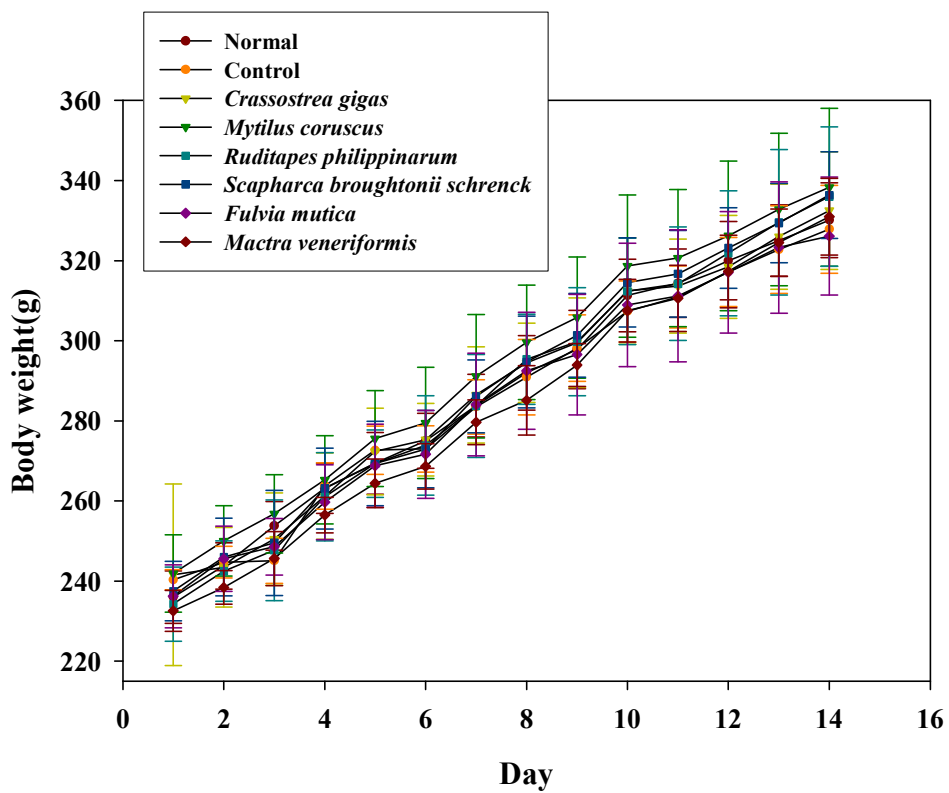


Fig. 69. Changes of body weights in male SD rat after administration of *Crassostrea gigas*, *Mytilus coruscus*, *Ruditapes philippinarum*, *Scapharca broughtonii schrenck*, *Fulvia mutica* and *Mactra veneriformis*.

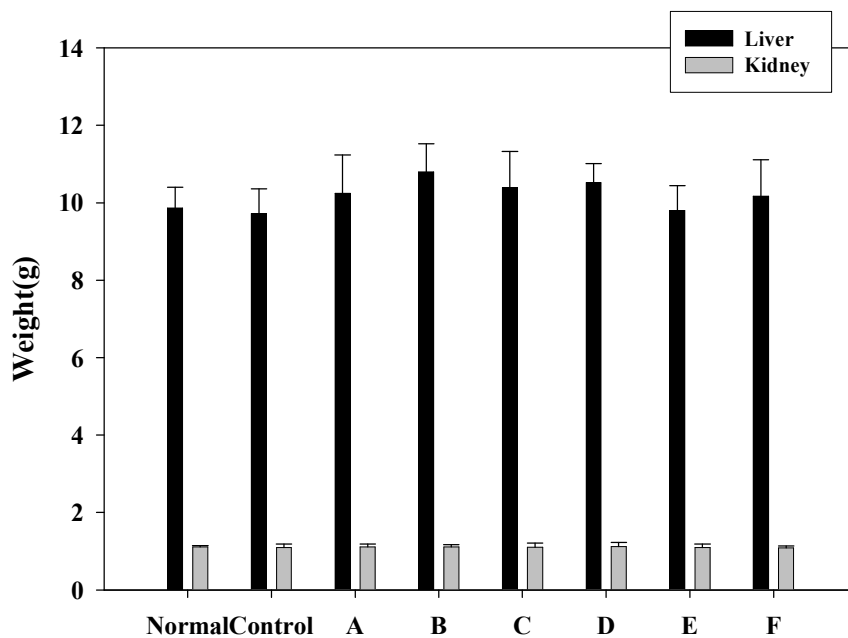


Fig. 70. Changes of liver and kidney weights in male SD rat after administration of *Crassostrea gigas*(A), *Mytilus coruscus*(B), *Ruditapes philippinarum*(C), *Scapharca broughtonii schrenck*(D), *Fulvia mutica*(E), and *Macra veneriformis*(F).



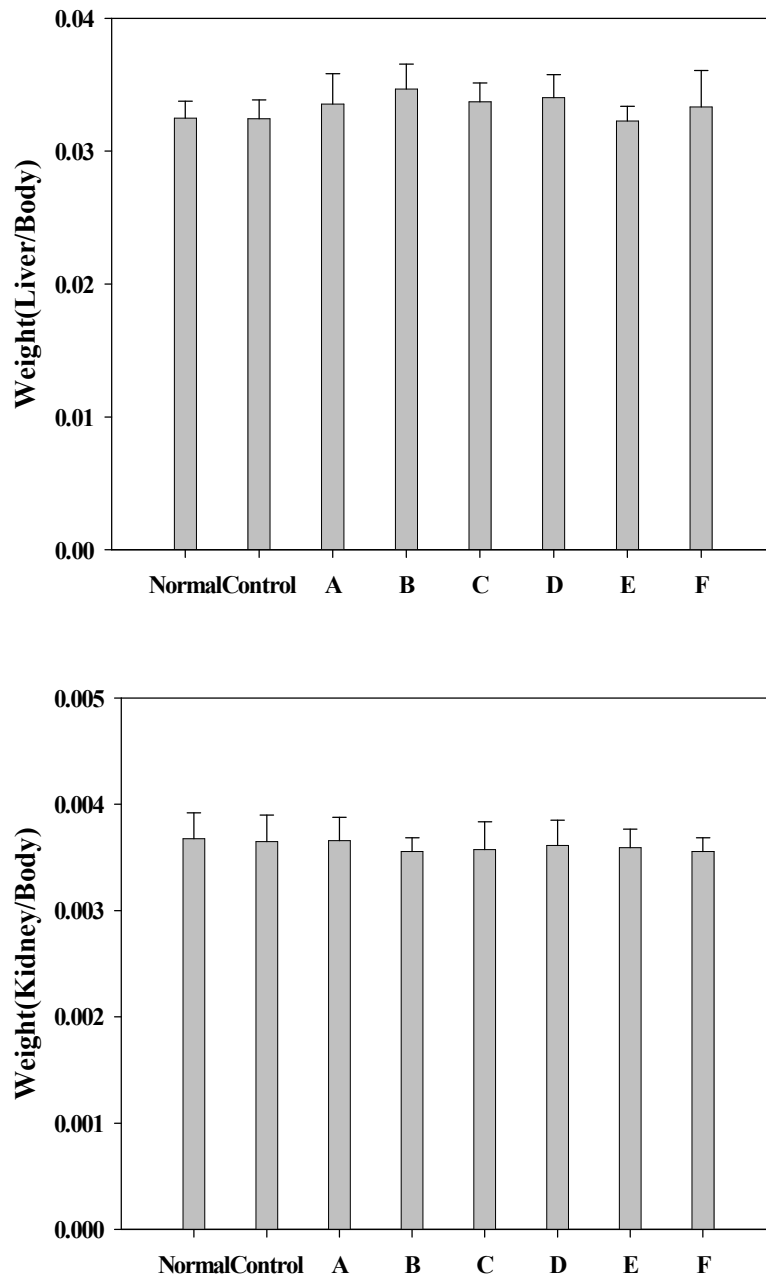
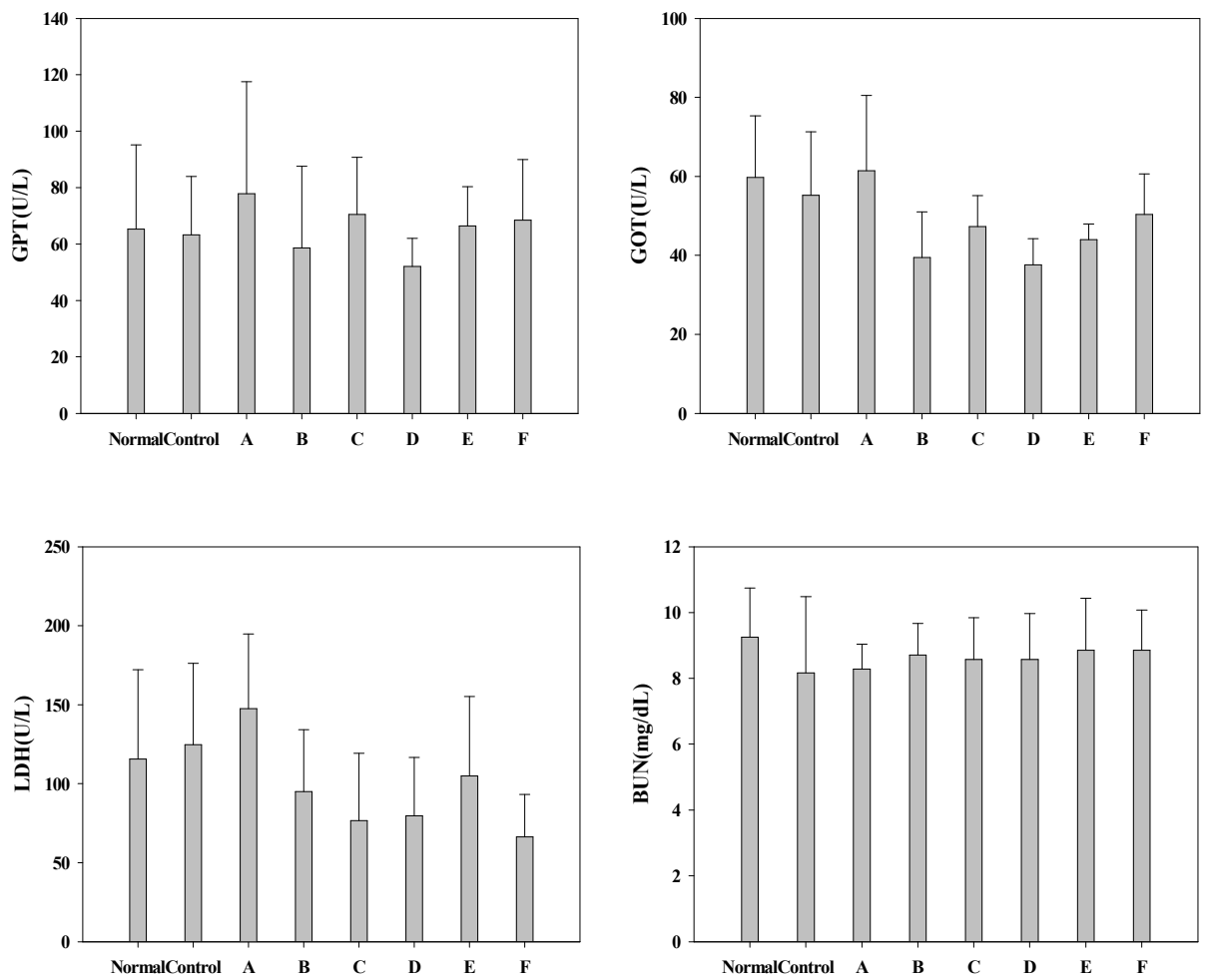


Fig. 71. Changes of liver/body and kidney/body weights in male SD rat after administration of *Crassostrea gigas*(A), *Mytilus coruscus*(B), *Ruditapes philippinarum*(C), *Scapharca broughtonii schrenck*(D), *Fulvia mutica*(E), and *Macraa veneriformis*(F).



**Figure 72. Changes of blood(GPT, GOT, LDH and BUN) in male SD rat after administration of *Crassostrea gigas*(A), *Mytilus coruscus*(B), *Ruditapes philippinarum*(C), *Scapharca broughtonii schrenck*(D), *Fulvia mutica*(E), and *Mactra veneriformis*(F).**

다. 굴 폐각 유래 conchiolin과 나노 분말이 DNCB로 유도된 mouse의 접촉성 피부염에 미치는 영향

(1) 귀 부종에 미치는 영향

DNCB에 반복적으로 노출된 control군은 14일에 normal군과 비교하여 유의한 귀 부종을 유발하였다(Fig. 73). OF를 도포한 실험군 (0.03 g/ml)에서는 귀부종의 유의한 감소를 유도하였다. 또한 ON을 0.001, 0.01, 0.03 g/ml을 도포한 군에서도 유의한 귀부종 감소를 유도하였다. 이러한 결과는 굴 폐각의 미세분말 유래 conchiolin 과 나노분말이 염증성 부종을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.

(2) 혈청 IgE의 농도에 미치는 영향

혈청중의 IgE의 함량을 ELISA로 측정하였다. DNCB를 처치한 군에서는 Control에 비교하여 유의한 IgE의 감소가 관찰되었다. OF를 처치한 일부 농도에서는 증가된 IgE를 감소시키는 경향이 있었으나, 유의한 감소를 유도하지는 못하였다(Fig. 74).

(3) IL-1 $\beta$ 의 농도에 미치는 영향

DNCB로 부종을 유발한 귀 조직중의 IL-1 $\beta$ 의 함량을 ELISA로 측정하였다. DNCB를 처리한 군에서는 normal군에 비교하여 유의성 있는 증가를 나타내었으며, OF를 도포한 실험군 (0.01, 0.03, 0.10 g/ml)에서는 유의한 IL-1 $\beta$ 의 감소를 유도하였다. 또한, 0.01 g/ml의 ON을 처치한 실험군에서도 IL-1 $\beta$ 의 유의한 감소를 유도하였다(Fig. 75).

(4) IL-6의 농도에 미치는 영향

DNCB로 부종을 유발한 귀 조직중의 IL-6의 함량을 ELISA로 측정하였다. DNCB를 처리한 군에서는 normal군에 비교하여 유의성 있는 증가를 나타내었으며, OF를 도포한 실험군에서는 0.1g/ml에서 유의한 IL-6의 감소를 유도하였으며, ON을 처치한 실험군에서는 0.001, 0.01 g/ml의 농도에서 유의한 IL-6의 감소를 유도하였다(Fig. 76).

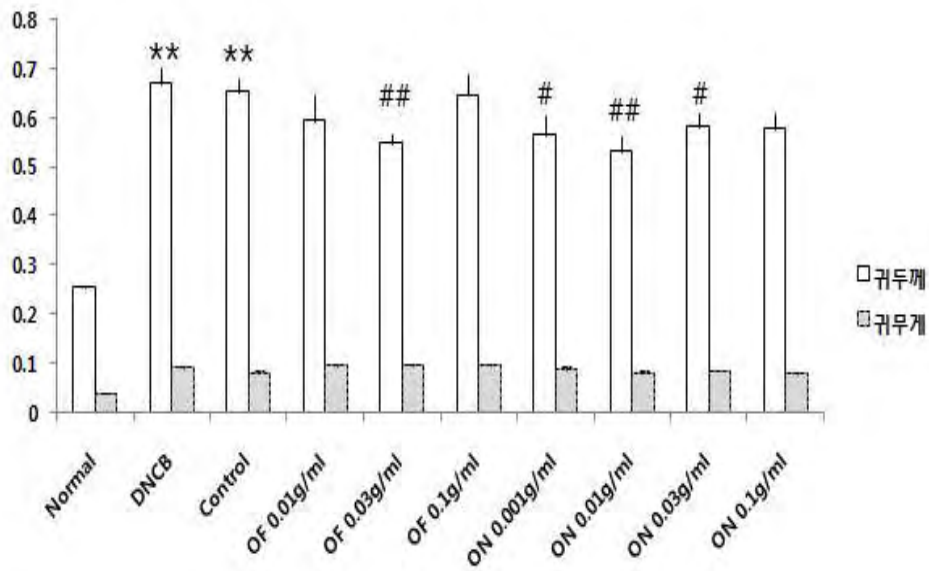
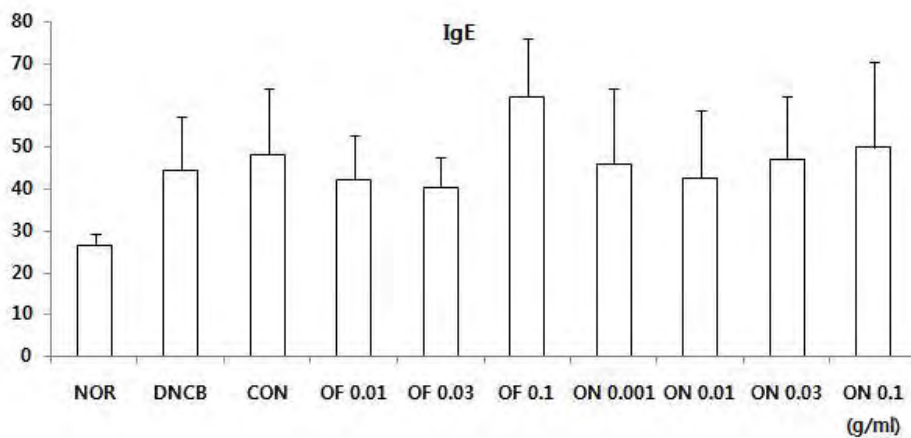
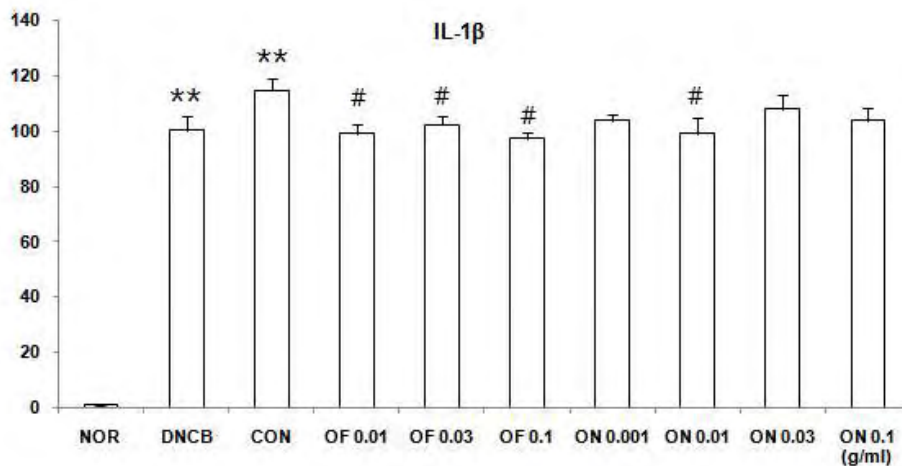


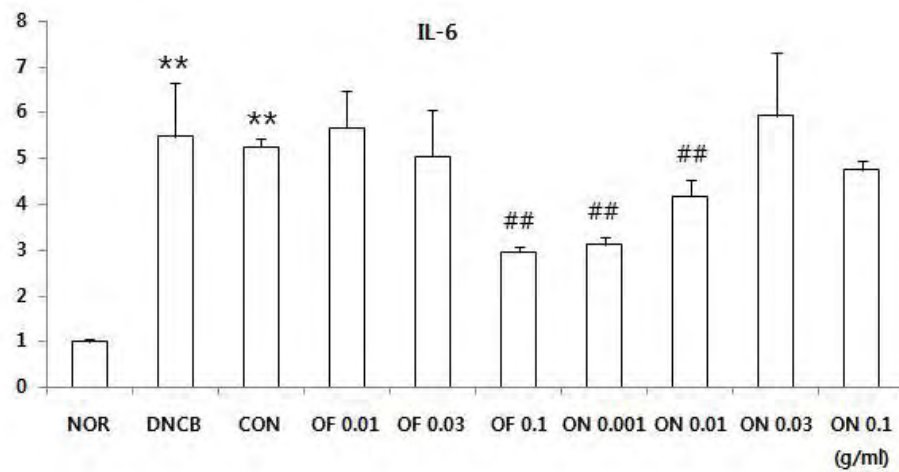
Fig. 73. Effect of OF and ON on the ear swelling induced by repeat elicitation of DNCB. Mice were sensitized on the inside of right ear by epicutaneous application of 20  $\mu\text{l}$  of 1% DNCB solution 7 days before first elicitation, and then the mice were repeatedly treated with DNCB from day 0 at 2 days interval (3 times/week). The ear thickness was measured at 14 days after first elicitation. Data were presented as the mean  $\pm$  S.D. (n = 7 for each group). \*,  $P < 0.05$  compared with normal, #;  $P < 0.05$  compared with control.



**Fig. 74.** Effects of OF and ON on immunoglobulin E levels in serum. Mice were sensitized on the inside of right ear by epicutaneous application of 20  $\mu\text{l}$  of 1% DNCB solution 7 days before first elicitation, and then the mice were repeatedly treated with DNCB from day 0 at 2 days interval (3 times/week). IgE was measured at 14 days after first elicitation. Data were presented as the mean  $\pm$  S.D. (n = 7 for each group).



**Fig. 75.** Effects of OF and ON on interleukin-1 $\beta$  levels in serum. Mice were sensitized on the inside of right ear by epicutaneous application of 20  $\mu\text{l}$  of 1% DNCB solution 7 days before first elicitation, and then the mice were repeatedly treated with DNCB from day 0 at 2 days interval (3 times/week). IL-1 $\beta$  was measured at 14 days after first elicitation. Data were presented as the mean  $\pm$  S.D. (n = 7 for each group). \*;  $P < 0.05$  compared with normal, #;  $P < 0.05$  compared with control.



**Fig. 76.** Effects of OF and ON on interleukin-6 levels in serum. Mice were sensitized on the inside of right ear by epicutaneous application of 20  $\mu\text{l}$  of 1% DNCB solution 7 days before first elicitation, and then the mice were repeatedly treated with DNCB from day 0 at 2 days interval (3 times/week). IL-6 was measured at 14 days after first elicitation. Data were presented as the mean  $\pm$  S.D. (n = 7 for each group). \*;  $P < 0.05$  compared with normal, #;  $P < 0.05$  compared with control.

## 10. 굴 껍데기를 이용한 수용성칼슘제조

### 가. 굴 패각 유래 calcium 함유 제품의 제조

굴 패각을 6.5M acetic acid로 탈석회화 시킨 후, 침전물을 회수하고 남은 상등액을 70℃ 수욕 상에서 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 103℃ 건조기에서 건조하여 탈석회화 과정 중 발생한 수용성 초산 칼슘을 500℃ 회화로에서 회화 시킨 후, 생성된 칼슘 분말을 실험을 위한 시료로 사용하였다(Fig. 77).

굴 분말 100g을 기준으로 Fig. 77의 과정을 거치면 칼슘회분은  $95.80 \pm 0.2\%$ (w/w)이 회수되며, 수용성칼슘은  $2.44 \pm 0.3\%$ (w/w)이 회수 되는 것으로 확인 되었다(Table 36).



Fig. 77. Collection diagram of calcium and conchiolin from oyster shell powder.



**Table 36. Yield ratio of organic and inorganic compound from oyster shell powder**

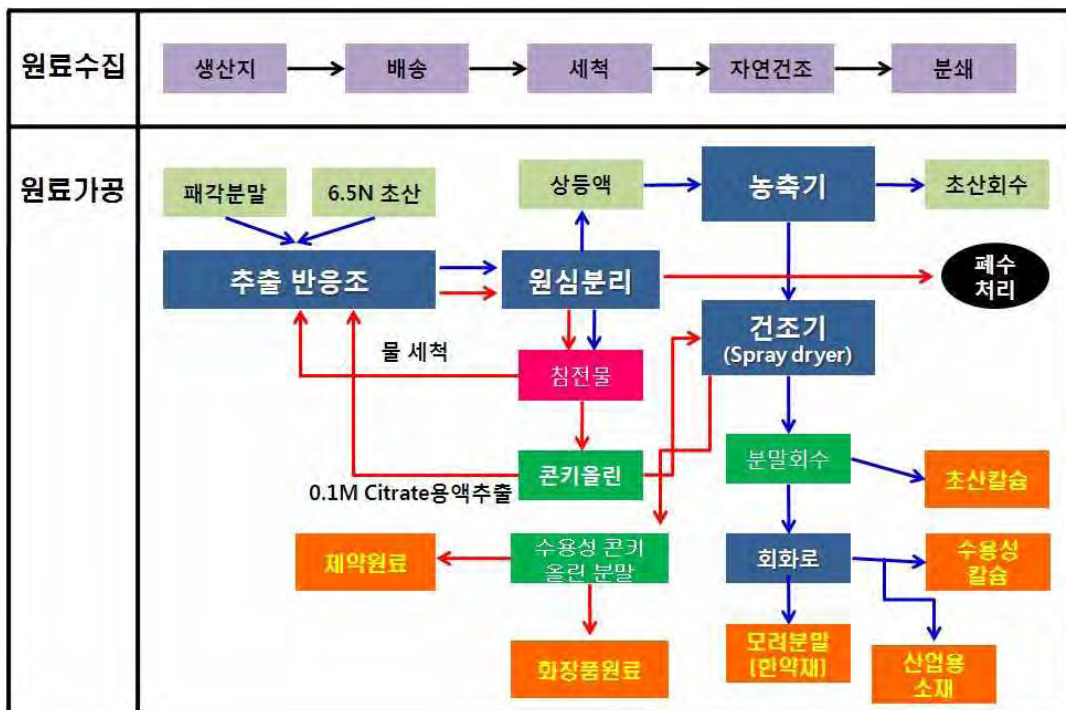
| <b>Division</b>                      | <b><i>Crassostrea gigas</i> powder 100g</b> | <b>Yield(%w/w)</b> |
|--------------------------------------|---|--------------------|
| <b>1. Calcium acetate powder</b>     | <b>156.80±2.0</b>                           | <b>156.80</b>      |
| <b>2. Ashing powder</b>              | <b>95.80±0.2</b>                            | <b>95.80</b>       |
| <b>3. Water insoluble calcium</b>    | <b>93.36±0.5</b>                            | <b>93.36</b>       |
| <b>4. Water soluble calcium</b>      | <b>2.44±0.3</b>                             | <b>2.44</b>        |
| <b>5. Crude conchiolin</b>           | <b>4.20±0.2</b>                             | <b>4.20</b>        |
| <b>6. Water insoluble conchiolin</b> | <b>3.85±0.2</b>                             | <b>3.85</b>        |
| <b>7. Water soluble conchiolin</b>   | <b>0.35±0.2</b>                             | <b>0.35</b>        |

## 11. 대량분리정제 기술개발과 응용제품의 개발

### 가. 대량분리공정개발 및 경제성검토

앞서 연구된 내용을 근거로 생산 수율시료의 준비과정에서부터 반응 수율과 처리과정 등을 검토하여 생산 공정을 개발하였으며, 그 내용을 근거로 본 제품에 대한 제조원가를 산정하여 경제성에 관한 검토를 실시하였다.

#### (1) 제조공정



#### (가) 원료수집

- 경남 통영 등 군 양식 주 생산지역별로 수거한다.
- 수거한 폐각은 수세 공정과 자연건조 공정을 거쳐 분쇄한다.

#### (나) 원료가공

##### ① 원료준비

- 폐각분말 10톤
- 6.5N 초산 90톤

##### ② 추출반응

- 온도 : 실온
- 시간 : 12시간

##### ③ 회수



## (3) 생산설비단가

## SUMMARY OF QUATATION

|          | Description                        | Specification | Q'ty | Unit price(₩) | Amount(₩)     |
|----------|------------------------------------|---------------|------|---------------|---------------|
| <b>A</b> | <b>Vessels &amp; Equipments</b>    |               |      |               |               |
| 1        | Extractor                          | 100KL         | 2    | 180,000,000   | 360,000,000   |
| 3        | Evaporator                         | 100KL         | 1    | 320,000,000   | 320,000,000   |
| 4        | Surface Condenser                  | ∅ 350x4000L   | 1    | 56,000,000    | 56,000,000    |
| 5        | Condensate Tank                    |               | 1    | 32,000,000    | 32,000,000    |
| 6        | Cooling Tower                      |               | 1    | 52,000,000    | 52,000,000    |
| 7        | Boiler                             |               | 1    | 120,000,000   | 120,000,000   |
| 8        | Cartridge Filter                   |               | 2    | 3,500,000     | 7,000,000     |
|          | <b>Sub Total 1</b>                 |               |      |               | 947,000,000   |
|          |                                    |               |      |               |               |
| <b>B</b> | <b>Pump</b>                        |               |      |               |               |
| 10.1     | Transfer Pump                      |               | 1    | 2,000,000     | 2,000,000     |
| 10.2     | Vacuum Pump                        |               | 1    | 8,600,000     | 8,600,000     |
| 10.3     | Cooling Water Pump                 |               | 1    | 5,300,000     | 5,300,000     |
|          |                                    |               | 1    |               |               |
|          | <b>Sub Total 2</b>                 |               |      |               | 15,900,000    |
|          |                                    |               |      |               |               |
| <b>C</b> | <b>Piping</b>                      |               | 1식   | 82,000,000    | 82,000,000    |
| <b>D</b> | <b>Structure &amp; Walk Way</b>    |               | 1식   | 52,000,000    | 52,000,000    |
| <b>E</b> | <b>Transfer &amp; Installation</b> |               | 1식   | 12,000,000    | 12,000,000    |
|          | <b>Sub Total 3</b>                 |               |      |               | 146,000,000   |
|          |                                    |               |      |               |               |
|          | 총 공사금액                             |               |      |               | 1,108,900,000 |
|          | 기업 이윤                              |               | 15%  |               | 166,335,000   |
|          |                                    |               |      |               |               |
|          | 총 견적금액                             |               |      |               | 1,275,235,000 |
|          | NEGO                               |               |      |               | 175,235,000   |
|          | 합계                                 |               |      |               | 1,100,000,000 |

(4) 제조원가(폐각분말 10톤/일 처리기준)

| 구분     |       | 단위(원)         | 산정내역   |
|--------|-------|---------------|--|
| 재료비    | 원료구입비 | 2,250,000,000 | 직접재료비(원료구입: 초산3,000,000원+구연산500,000원+원료가공비 3,000,000원)+간접재료비(직접재료비X10%=1,000,000원)=7,500,000원 X300일=2,250,000,000원   |
| 노무비    | 노무비   | 55,000,000    | 직접노무비(2500만원/인X2명=5000만원)+ 간접노무비(직접노무비의 10%) 500만원=5,500만원   |
| 경비     | 경비    | 274,900,000   | 전력비(10,000,000/년)+연료비(50,000,000원/년)+운전비(12,000,000원/년)+수도비(2,400,000원/년)+소모품비(30,000,000원/년)+수선비(2,000,000원/년)+기기감가상각비 (110,000,000원/년)+연구개발비 50,000,000원/년+기타경비(5,000,000원/년)+보험료(3,500,000원/년)=274,900,000원/년 |
| 일반관리비  |       | 257,990,000   | (재료비+노무비+경비=2,579,900,000원)X10%=257,990,000원   |
| 이윤     |       | 88,183,500    | (노무비+경비+일반관리비=587,890,000원)X15%=88,183,500원  |
| 제조원가   |       | 2,926,073,500 | 129,000kg/년(쿠페각10톤당430kg/일X300일/년=129,000kg/년)   |
| Kg당 원가 |       | 22,682원/kg    | 22.682원/g(화장품원료)   |

\* 기기감가상각비 : 장치비 1,100,000,000원/10년(110,000,000원/년)

\* 제약원료 : 화장품원료 22,682원/kg X13배(정제비용)=294,866원/kg

(5) 국내 경쟁사 제품 및 국외 경쟁사 제품과의 품질, 기술, 가격 비교

| 국내외경쟁사             | 품질            | 기술 | 1회복용량  | 가격(원/T) | 비교     |
|--------------------|---------------|----|--------|---------|--------|
| 본사제품               | COX-1,COX-2저해 | 추출 | 100mg  | 29.5    | 제조원가기준 |
| 한국화이자(Celebrex)    | COX-2저해       | 합성 | 200mg  | 978     | 보험수가기준 |
| 대웅제약(Airtal)       | COX-2저해       | 합성 | 100mg  | 316     | 보험수가기준 |
| 베링거인겔하임<br>(Mobic) | COX-2저해       | 합성 | 15mg   | 768     | 보험수가기준 |
| 신풍제약(복소펜)          | COX-2저해       | 합성 | 68.1mg | 186     | 보험수가기준 |
| 동화약품(복소닌)          | COX-2저해       | 합성 | 60mg   | 200     | 보험수가기준 |

제조원가는 가공처리 시 회수율을 근거로 작성하였으며, 제약으로 사용될 경우 현재 시판중인 COX-2저해제의 판매 가격이 보험수가 기준으로 200원-978원 이기 때문에 제약과정의 포장비를 포함하더라도 효능대비 가격경쟁력이 충분히 있을 것으로 판단된다. 따라서 추후 차기년도의 연구결과와 실제 임상실험에 적용하여 원료의약품으로 인정받을 경우 세계 최초로 패각유래 항염증 원료물질 생산국가로 경쟁력을 높일 수 있을 것으로 판단된다. 아울러 부산물로 나오는 초산칼슘, 수용성 칼슘 등을 비롯하여 석회질 성분 등 이들을 이용한 각종 응용제품에 대한 원료판매 수익까지 계산한다면 향후 환경문제 해결은 물론 엄청난 수익이 예상된다.

## 나. 응용제품개발

### (1) 굴 패각 유래 conchiolin 함유 한방 아토피 및 여드름 치료용 화장품개발

#### (가) 화장품 베이스 원료의 개발

현재 출시되고 있는 각종 아토피성 피부질환용 보습화장품의 경우 무수히 많은 대기업제품과 중소기업제품들이 난립하고 있다. 그러나 실제 본질을 놓고 보면, 중소기업제품의 경우 개발된 추출물에 일반적으로 화장품학 책에 나오는 베이스 원료를 구입하여 화장품을 만들어서 판매함으로써 실제 그 원료가 갖는 기능이 충분히 발휘되지 못하는 단점을 가지고 있거나, 사용감의 저하, 향 선택, 제조비용 등 많은 문제점들로 인해 실제 시장에 접목했을 때 상당히 많은 제품들이 출시된 후 곧바로 사장되는 경우가 많은 실정이다. 따라서 제품성을 높이기 위해서는 기능을 가진 원료도 중요하지만 실제 제품을 접목했을 때 나타나는 여러 가지 문제점들 중 거의 대부분이 제품의 사용감과 향이다. 따라서 판매와 관련된 측면에서 놓고 볼 때 화장품 베이스의 선택이 그 만큼 중요할 수밖에 없다.

따라서 화장품레스피의 개발은 향후 제품의 시장진입을 결정짓는 중요한 요인으로 작용하기 때문에 화장품 베이스 개발은 필수적인 요소이다

#### (나) 제품사진



아토피 스킨

아토피로션

아토피크림

#### (다) 제품화를 위한 아토피치료용 화장품의 처방개발

3차년도 시제품제작(상단사진 참조)을 근거로 아토피 치료용 화장품을 개발하고자 3차년도 화장품처방을 근거로 처방의 수정보완연구를 실시하였다. 현재까지 연구결과를 근거로 보았을 때 콘키올린은 항염증 PEG2기전 COX-1, COX-2에 탁월한 기능을 가진것으로 확인되었으나 항염증 기전중 NO억제 능, 항산화능은 약한것으로 확인되어 제품화를 위한 처방보완이 필요하였다. 따라서 제품화를 위한 화장품베이스의 최종 보완연구를 하였으며, 우수한 아토피 치료용 화장품의 제품화를 위한 콘키올린의 기능과 한방추출물의 처방구성 이들을 근거로한 기초화장품베이스의 안정화 과정을 거쳐 최종제품 레스피를 개발하였으며, 시제품을 제작한 후 타사제품과 비교를 통한 제품의 우수성을 검토하였다.

① 아토피 스킨 처방

㉔ 아토피 스킨 최종레시피 구성

| ICID                           | Ingredient(%) |
|--------------------------------|---------------|
| Water                          | 79.45         |
| 1,3 Butylene glycol            | 5.00          |
| Glycerine                      | 3.00          |
| Disodium EDTA                  | 0.03          |
| Dipotassium Glycyrrhizate      | 0.05          |
| Aminocoat(Betaine)             | 2.00          |
| Ethanol                        | 8.00          |
| PEG-40 Hydrogenated Castor Oil | 0.40          |
| Methylparaben                  | 0.15          |
| Phenoyethanol                  | 0.30          |
| Citrate                        | 0.04          |
| Sodium citrate                 | 0.10          |
| Sodium hyaluronic acid         | 0.05          |
| Fragrance                      | 0.03          |
| Conchiolin                     | 0.90          |
| Herb extracter                 | 0.50          |
| <b>Total</b>                   | <b>100.00</b> |

㉕ 한약추출물의구성

아토피제품에 있어 스킨의 기능은 열감을 해소하고 피부소양증, 항염증, 항균작용이 우수한 한약재를 근거로 구성하였다. 청열해서기능의 녹두, 청열사하 기능의 치자, 자초, 청열경혈 기능의 목단피, 생지황, 방항개구 기능의 용뇌, 신경해표 기능의 박하, 국화, 고삼약인 오배자를 처방 구성에 넣고 열수 추출하여 사용하였다.



② 아토피 로션 처방

㉠ 아토피로션 최종레스피 구성

| ICID                                  | Ingredient(%) |
|---------------------------------------|---------------|
| Water                                 | 76.1          |
| Methylparaben                         | 0.20          |
| Disodium EDTA                         | 0.02          |
| Dipotassium Glycyrrhizate             | 0.05          |
| Carbomer(Carbopol 940)                | 0.12          |
| Carbomer(Carbopol 941)                | 0.03          |
| Stearic Acid                          | 0.50          |
| Cetearyl Alcohol                      | 1.50          |
| Cerasynt 945                          | 0.30          |
| Sorbitan Stearate and Sucrose Cocoate | 2.00          |
| Polysorbate 60                        | 0.35          |
| Sorbitan Stearate                     | 0.25          |
| Glycerin                              | 7.00          |
| Isohexadecane                         | 7.00          |
| Trioctanoin                           | 1.50          |
| Dimethicone                           | 1.00          |
| Tocopheryl Acetate                    | 0.10          |
| Butylparaben                          | 0.05          |
| Propylparaben                         | 0.10          |
| Triethanolamine                       | 0.20          |
| Imidazolidinyl Urea                   | 0.10          |
| Sodium Hyaluronate                    | 0.03          |
| Fragrance                             | 0.10          |
| Conchiolin                            | 0.90          |
| Herb extracter                        | 0.50          |
| <b>Total</b>                          | <b>100</b>    |

㉡ 한약재 처방구성

로션과 관련된 한약재 처방의 목표는 피부조직으로 습을 유도하는 단계로 피부건조로 인한 피부의 보습자정 능력을 강화시키기 위한 처방으로 구성하였다. 스킨 처방구성의 연계를 위한 2단계 구성으로 신경해표약인 국화와 청열해독기능의 포공영, 토복령, 청열화열약인 천화분, 이수삼습의 백복령, 백사, 방향화습약인 후박, 창출을 구성군으로 열수 추출 후 사용하였다.

③ 아토피크림

㉞ 아토피크림 최종레스피 구성

| ICID   | Ingredient(%) |
|--|---------------|
| Water  | 70.92         |
| Methylparaben  | 0.20          |
| Disodium EDTA  | 0.04          |
| Dipotassium Glycyrrhizate  | 0.05          |
| Glycerin&Glyceryl Acrylate/Acrylic Acid Copolymer(and)Propylene Glycol | 3.00          |
| Carbomer   | 0.16          |
| Stearic Acid   | 2.00          |
| Cetearyl Alcohol   | 2.00          |
| Sorbitan Stearate and Sucrose Cocoate                                  | 3.00          |
| Polysorbate 60   | 0.50          |
| Sorbitan Stearate  | 0.20          |
| Glycerin   | 5.00          |
| Isohexadecane  | 2.00          |
| Squalane   | 3.00          |
| Shea Butter  | 0.50          |
| Macadamia Nut Oil  | 1.00          |
| Caprylic/Capric Triglyceride   | 3.00          |
| Dimethicone  | 0.50          |
| Tocopheryl Acetate   | 0.10          |
| Butylparaben   | 0.05          |
| Propylparaben  | 0.10          |
| Amisol soft  | 0.50          |
| Triethanolamine  | 0.45          |
| Imidazolidinyl Urea  | 0.20          |
| Sodium Hyaluronate   | 0.03          |
| Fragrance  | 0.10          |
| Conchiolin   | 0.90          |
| Herb extracter   | 0.50          |
| <b>Total</b>   | <b>100</b>    |

㉟ 한약재 처방구성

피부보습과 재생촉진을 위한 단계로서 피부에너지를 보해주고, 혈행을 개선시켜 피부의 재생과 염증을 완하시켜 아토피 치료의 마무리를 위한 단계로서 이기약인 진피, 목향, 이혈약인 백급, 활혈기능의 천궁, 보양보혈의 위한 감초, 백출, 하수오, 적작약, 보음, 고삼약인 맥문동, 오미자를 처방하여 열수 추출후 사용하였다.

④. 여드름용 제품의 개발

여드름의 병인에 대한 연구는 예전부터 많이 되어 왔으며, 항균과 항염증, 피지억제를 위한 제품들이 주로 많이 개발되어 현재에도 많이 사용되고 있다. 본 제품의 개발 의도는 콘키올린이 항염증작용에 효과가 있고, 피지억제에 얼마나 많은 영향을 주기위한 첫 단계로 지성여드름 환자를 대상으로 임상시험을 실시하고자 세명대학교 임상시험센터에 위탁연구를 의뢰하였으며, 임상연구에 사용된 제품의 레스피를 개발하였다. 처방구성에 가장 큰 핵심적인 요소는 여드름 치료용 화장품에 유분이 없이 보습을 유지하면서 피지감소를 유도해내고, 염증을 효과적으로 얼마나 억제시키는가에 맞춰 제품화방향을 설정하고 처방구성을 하였다.

㉞ 여드름 치료용 제품 처방의 개발

| ICID                    | Ingredient(%) |
|-------------------------|---------------|
| Water                   | 74.41         |
| Ethanol(95%)            | 10            |
| 1,3-Buthylene glycol    | 5             |
| Aminocoat               | 3             |
| Methylparaben           | 0.13          |
| Natrosol 250H           | 0.2           |
| KOH                     | 0.1           |
| Dipotassium glycizinate | 0.05          |
| Carbopol 940            | 0.23          |
| Hydrolite 5             | 1.0           |
| Citric acid             | 0.02          |
| Na-Citrate              | 0.01          |
| HCO-60                  | 0.35          |
| Sosium hyaluronic acid  | 5.0           |
| Conchiolin              | 0.50          |
| <b>Total</b>            | <b>100</b>    |

(2) 골 패각 유래 calcium 함유 성장용 청국환의 제조

콩을 삶아 부릴때 수용성 칼슘을 3-12%를 넣고 부린 후 균주(*Bacillus subtilis*)를 접종하여 37℃에서 하루동안 발효한 후 동결시킨 후 2-3일간 동결건조를 청국알맹이를 완성한 후 고농도 설탕물과 콩가루 그리고 칼슘분말을 0.5%씩 섞어서 건조하여 완성하였다.

(가) 제품사진



칼슘 청국환

(나) 제품의 특징

*Bacillus subtilis*로 발효할 경우 청국장 특유의 냄새가 사라져 어린이 간식으로 이용이 가능하고, 칼슘 등을 첨가함으로써 청국장의 정장기능과 더불어 어린이 성장에 도움을 주는 제품으로 개발이 가능 할 뿐만아니라 총명탕과 칼슘을 이용한 수험생용 총명청국환의 조제가 가능하다. 또한 성인에게도 골다공증 예방 및 정장기능에 좋은 제품으로 제품화 할 경우 많은 수익이 예상된다.

### (3) 제품평가

#### (가) 항염증 활성 평가(Cyclooxygenase-2 저해활성, NO 생성 저해능)

##### ① Cyclooxygenase-2 저해활성평가

염증은 여러 가지 형태의 감염이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 대한 생체 방어 반응이다. 염증반응은 계통 발생론적으로 가장 오래된 방어기전으로 cytokines, prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다. 대식세포의 외부 자극에 의한 염증반응에서는 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6(IL-6)와 같은 전염증성 cytokine의 발현이 유도되고, inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)를 코딩하는 유전자의 발현을 자극하게 되어 nitric oxide(NO) 및 PGE<sub>2</sub> 등의 염증인자가 생성된다. 일반적인 iNOS에 의한 NO의 생성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 역할을 하지만 과도한 생성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하는 것으로 보고되고 있다.

Cyclooxygenase는 중요한 생화학상 매개체인 prostaglandins, prostacyclin, thromboxanes 등을 포함하는 prostanoids 형성에 관여하는 효소이다. COX에는 COX-1과 COX-2가 존재하는데 COX-1은 항상성을 조절하기 위한 prostaglandin 합성에 관여하고 COX-2는 염증반응 부위에서 활성화된 대식세포에 의해 염증반응을 매개하는 prostaglandin 합성에 관여한다.

본 연구에서는 국제적으로 유명한 제약회사들의 우수한 항염증제품들(celecoxib, diclofenac, indomethacin)과 비교 실험을 수행하였으며, 그 결과 또한, conchiolin powder 의 우수성을 나타내었다. 당해연도에 있어서는 자사에서 제조한 우수한 제품들의 염증억제효능을 측정하였다 (Fig. 78, 79, 80).

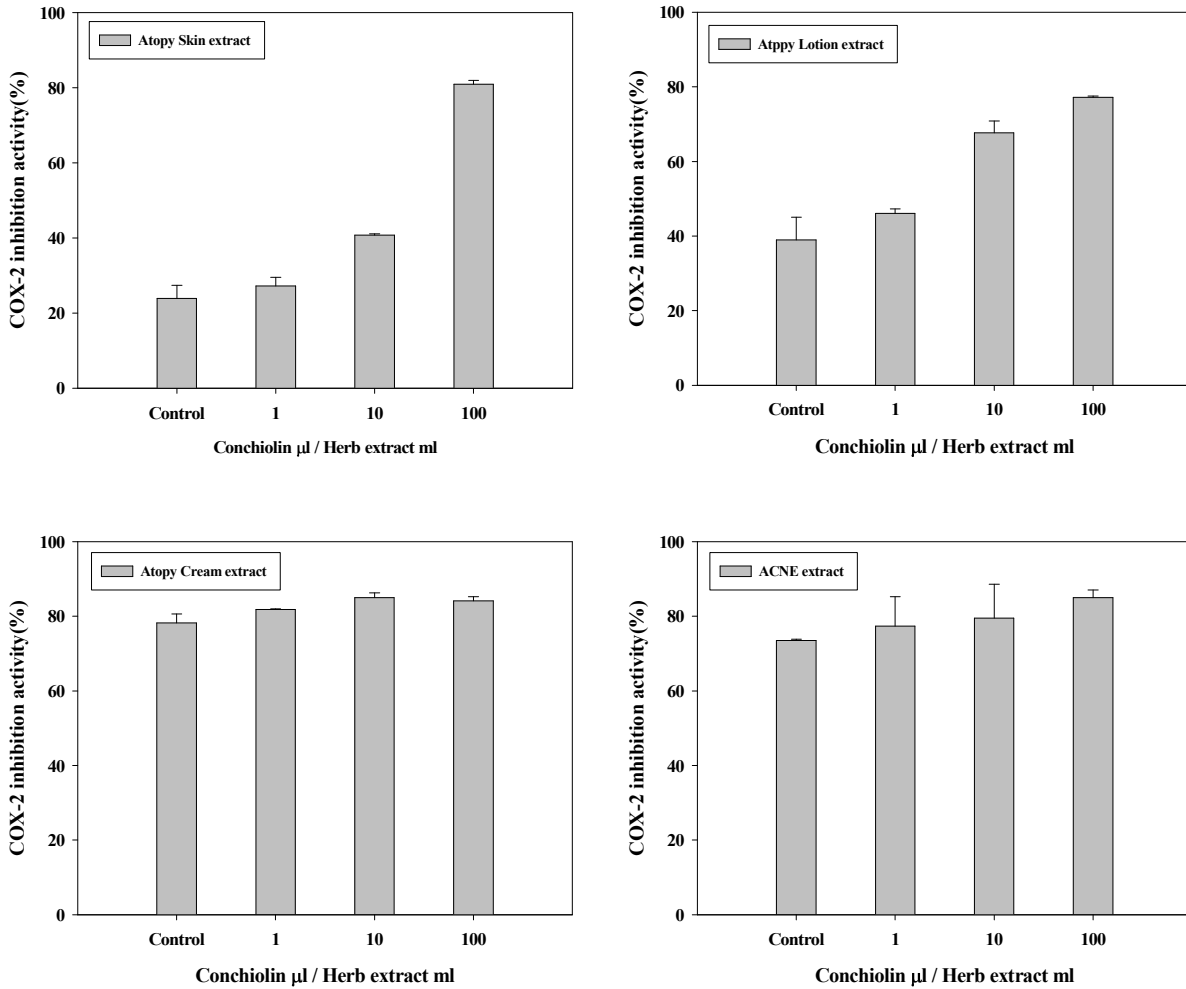
Fig. 78에 의하면, atopy skin extracts, atopy lotion extracts, atopy cream extracts 및 acne extracts 에 conchiolin을 농도별(1~100  $\mu$ l)로 첨가하여 만든 제품의 COX-2 저해율을 측정하였다. Atopy skin extracts 의 경우 base 에서는 23.9% 의 저해율을 나타내었으며 conchiolin 의 농도가 1 ~ 100  $\mu$ l 로 증가함에 따라 27.3, 40.8 및 80.9% 로 COX-2 저해율의 증가를 나타내었다. 이 결과는 conchiolin 의 첨가가 항염증에 시너지효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한, atopy lotion extracts 의 경우 base 에서는 8.9% 의 저해율을 나타내었으며 conchiolin 의 농도가 1 ~ 100  $\mu$ l 로 증가함에 따라 76.1, 76.7 및 77.2% 로 COX-2 저해율의 증가를 나타내었다. 이 결과는 atopy lotion extracts 의 base 에서는 염증억제효능이 미약하였으나 conchiolin 의 첨가로 염증억제효능이 급격히 증가하였다.

atopy cream extracts 와 acne extracts 에서는 base 에서 78.2 및 73.5% 의 저해율을 각각 나타내었으며, conchiolin 의 농도가 1 ~ 100  $\mu$ l 로 증가함에 따라 atopy cream extracts 에서는 81.8, 85.0 및 84.1% 로 COX-2 저해율이 소폭 상승하는 것으로 확인하였다. 마찬가지로 acne extracts 에서도 농도 의존적으로 소폭 증가하였다. 이러한 결과는 atopy lotion이나 skin과는 달리 atopy cream 한약추출물과 acne 한약추출물에서 염증억제효능이 강하게 작용하여 상대적으로 conchiolin의 첨가에 따른 영향이 적은 것으로 확인되었다.

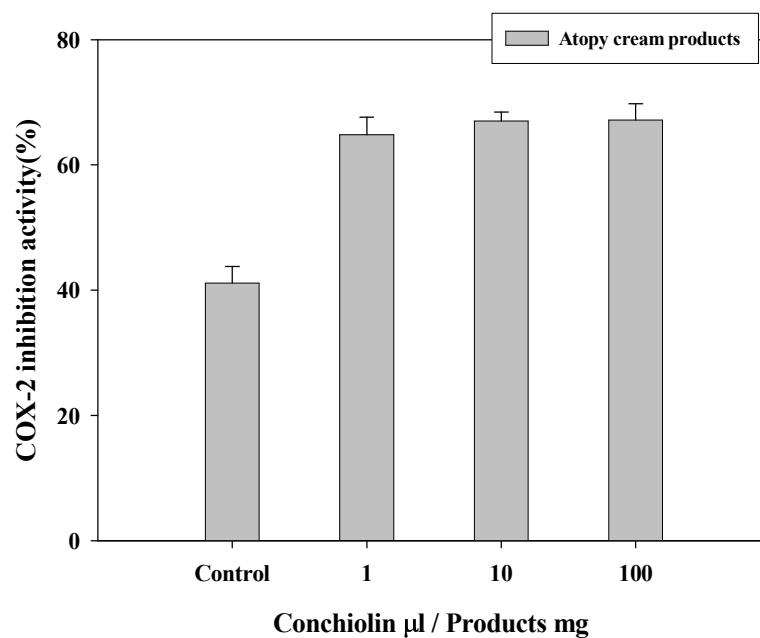
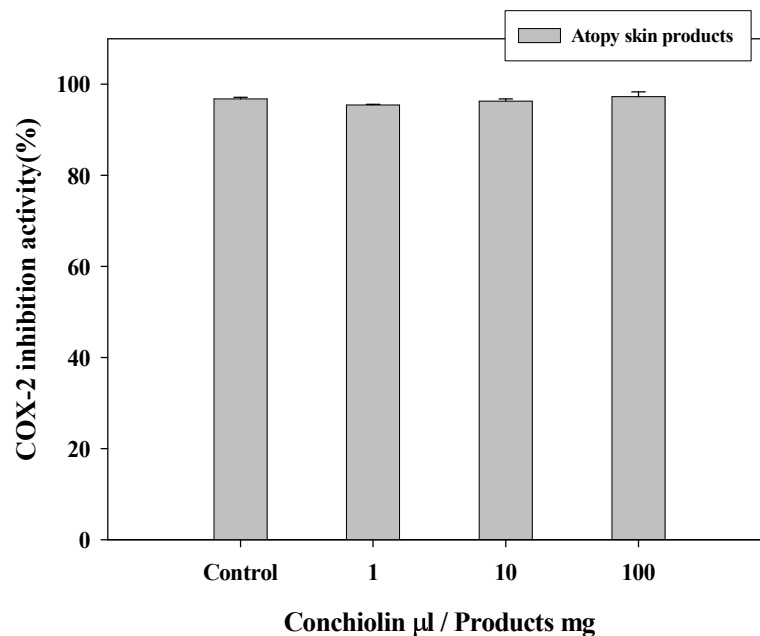
Fig. 79에 의하면, 본사에서 만든 아토피제품의 품질향상을 위하여 본사에서 만든 제품인 atopic skin products 와 atopic cream products 에 conchiolin을 농도별(1 ~ 100  $\mu$ l)로 첨가하여 더욱더 우수한 염증억제효능이 있는 제품을 만들려고 항염실험을 진행하였다. Atopy skin products 의 경우 base 에서 96.8% 의 저해율을 나타내었으며 conchiolin 의 농도가 1 ~ 100  $\mu$ l 로 증가함에 따라 95.4, 96.3 및 97.3% 으로 COX-2 저해율의 변화가 거의 나타나지 않았다. 이 결과는 본사에서 만든 atopy skin products 자체가 우수한 염증억제효능을 나타내는 제품을 의미하며, atopy cream

products 의 경우에는 base 에서는 41.1% 의 저해율을 나타내었으며 conchiolin 의 농도가 1 ~ 100  $\mu$ l 로 증가함에 따라 64.8, 67 및 67.2% 로 base 와 비교할 때 COX-2 저해율이 농도 의존적으로 증가하였으나, 큰 폭으로의 증가는 보이지 않았다. 이것은 Atopy cream에 사용된 원료 물질에 영향을 받는 것으로 추정된다.

따라서 본사에서 시판중인 atopy cream 제품에 conchiolin을 첨가할 경우 더욱더 우수한 염증억제효능이 있을 것으로 판단하여 제품을 개발하였으며, 이 제품을 이용하여 다른 유명회사의 제품(A ~ E)들과 비교평가를 실시하였다(Fig. 80). 다른 유명회사의 제품(A ~ E)은 염증억제효능이 나타나지 않았으며, 본사의 제품인 atopy cream products 에서만 약 60% 이상의 염증억제효능이 나타났다. 이러한 conchiolin의 항염증 효과는 conchiolin을 활용한 피부치료제, 피부보호제 및 염증반응조절제 개발 및 폐각자원의 재활용 가능성이 높은 것으로 확인되었다.

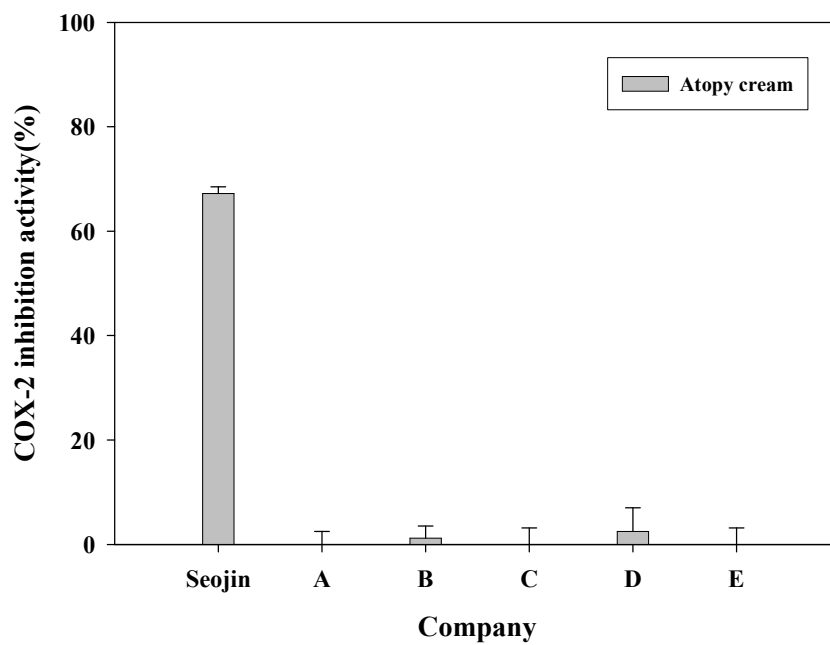


**Fig. 78. Comparison of COX-2 inhibitory activity by adding various concentration of conchiolin to the base of 3 atopic extracts and acne extracts. Data are expressed as mean± SD of duplicate determinations. Base(Atopy skin extracts) + Conchiolin 100 μl is corresponding to the SUN Atopy skin [Base(Atopy lotion extracts) + Conchiolin 100 μl, the SUN Atopy lotion; Base(Atopy cream extracts) +Conchiolin 100 μl, the SUN Atocream; Base(Acne extracts) + Conchiolin 100 μl, the SUN Acne skin].**



**Fig. 79. Comparison of COX-2 inhibitory activity by adding various concentration of conchiolin to atopic skin products and atopy cream products. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of duplicate determinations. Base(Atopy skin products) + Conchiolin 100  $\mu$ l is corresponding to the SUN Atopy skin [Base(Atopy cream products) + Conchiolin 100  $\mu$ l, the SUN Atopy cream].**





**Fig. 80.** Comparison of COX-2 inhibitory activity of various Atopy cream products. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of duplicate determinations. The Atopy cream(SeoJin) is corresponding to the SUN Atopy cream.

## ② NO 생성 저해능 평가

NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로의 가능성 등에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

Fig. 81. 에 의하면, atopy skin extracts, atopy lotion extracts, atopy cream extracts 및 acne extracts인 base에 conchiolin을 농도별(1 ~ 100  $\mu$ l)로 첨가하여 만든 제품들이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 나타나는 염증관련 지표인 NO(nitric oxide)에 미치는 영향을 평가하고자 실험을 진행하였다. Atopy skin extracts 군에서는 base 에서 LPS+ 에 대해 약 40%의 NO의 양이 억제되었으며, conchiolin 의 첨가에 대한 효과는 미미하였다. Atopy lotion extracts 군에서는 base 에서 약 22.8%의 NO의 양이 억제되었으며, base + conchiolin 100  $\mu$ l 군에서는 약 47%의 NO의 양이 억제되어, conchiolin의 첨가에 의해 약 24.2%의 NO의 양이 억제되었다. 이 결과는 conchiolin이 atopy lotion extracts 군에서 염증억제효능을 보유하고 있다는 것을 시사한다. Atopy cream extracts 와 acne extracts 군에서는 base 에서 각각 약 44% 및 47%의 NO의 양이 억제되었으며, conchiolin의 첨가에 대한 효과는 낮은 것으로 확인되었다. 이 결과는 본사에서 제조한 atopy skin 한약 추출물, atopy cream 한약 추출물 및 acne 한약 추출물이 우수한 염증억제효능이 있는 것으로 판단된다.

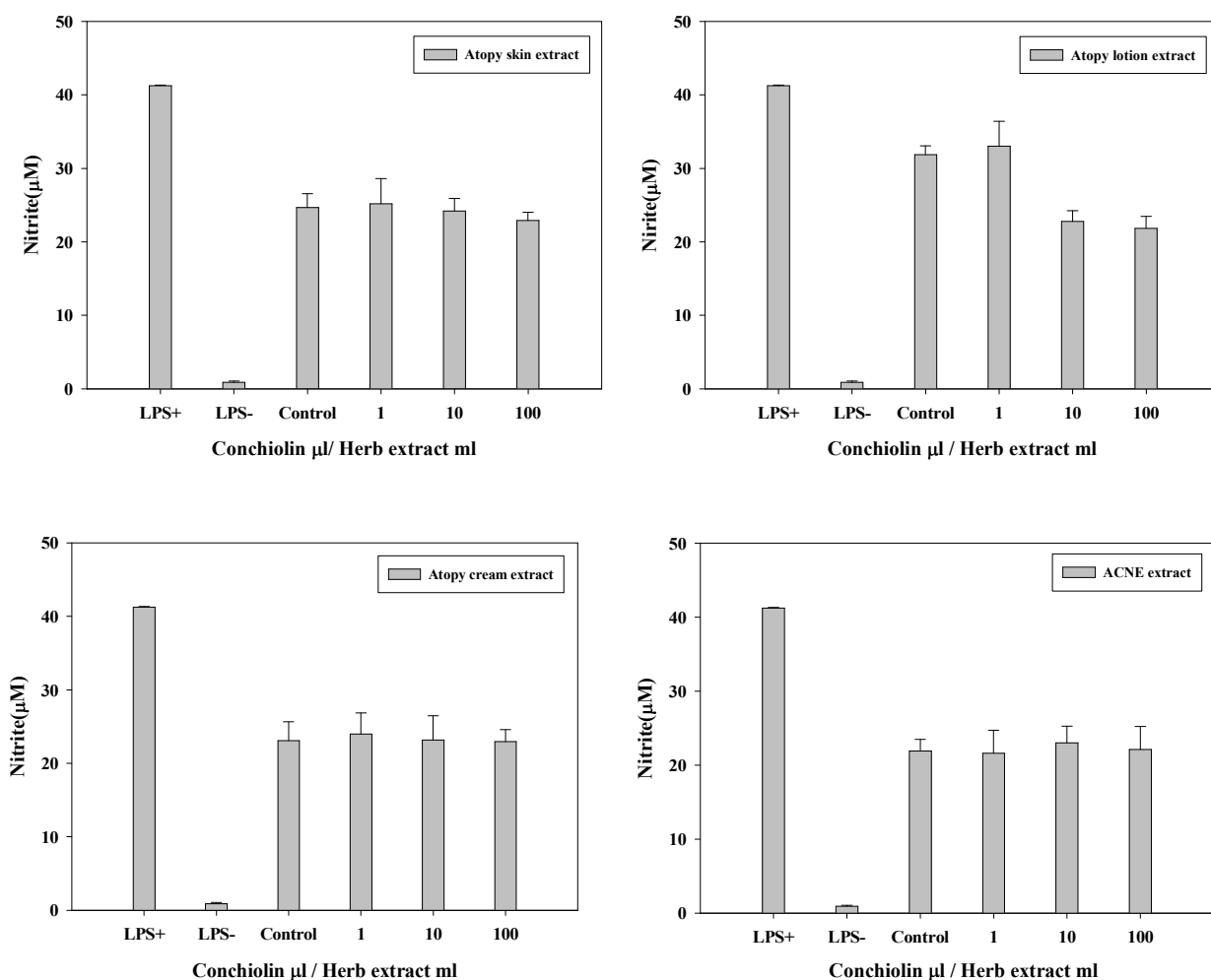
Fig. 82. 에 의하면, atopy skin products 와 atopy cream products 인 base에 conchiolin을 농도별(1 ~ 100  $\mu$ l)로 첨가하여 만든 제품들이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 나타나는 염증관련 지표인 NO(nitric oxide)에 미치는 영향을 평가하고자 실험을 진행하였다. Atopy skin products 군에서는 base 에서 LPS+ 에 대해 약 51%의 NO의 양이 억제되었으며, conchiolin 의 첨가에 의한 효과는 염증을 증가시키는 결과를 나타내었다. 이는 추후 보강실험이 요청되어진다. Atopy cream products 군에서는 base 에서 약 13.8%의 NO의 양이 억제되었으며, base + conchiolin 100  $\mu$ l 군에서는 약 34.9%의 NO의 양이 억제되어, conchiolin의 첨가에 의해 약 21.1%의 NO의 양이 억제되었다. 이 결과는 conchiolin이 atopy cream products 군에서 염증억제효능을 보유하고 있다는 것을 시사한다. 한편, atopy skin products 인 base 에서 약 51%의 NO의 양이 억제되어 본사에서 제조한 atopy skin products 가 우수한 염증억제효능을 가지는 것으로 확인되었다.

## ③ 세포독성 평가

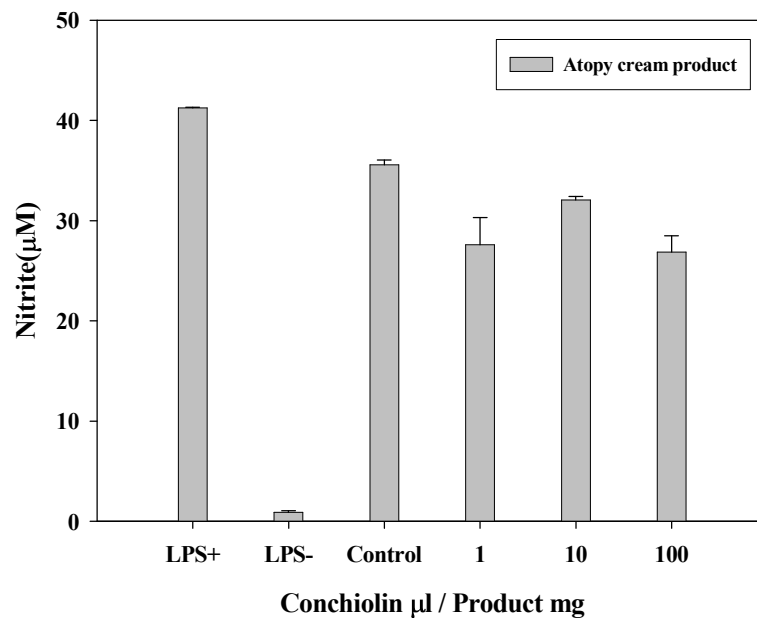
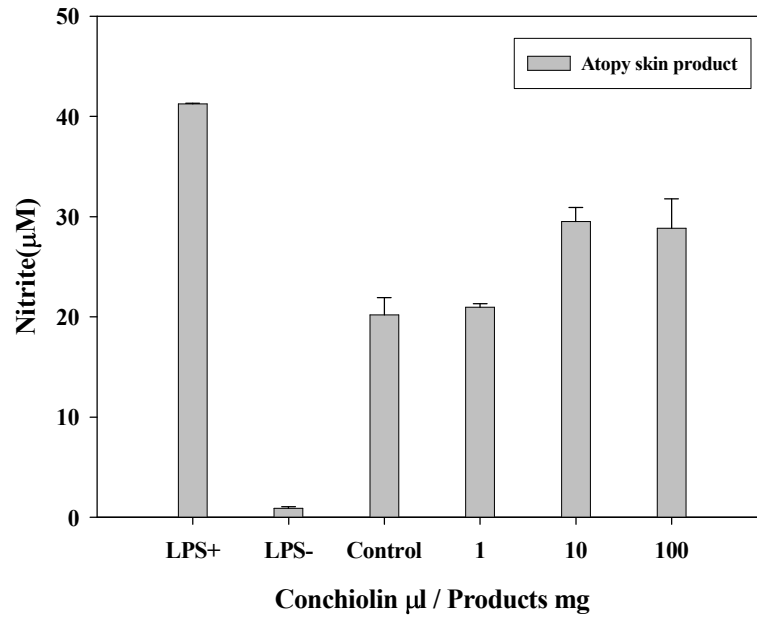
Atopy skin extracts, atopy lotion extracts, atopy cream extracts 및 acne extracts인 base에 conchiolin을 농도별(1 ~ 100  $\mu$ l)로 첨가하여 만든 제품들의 LPS로 유도된 NO 생성의 감소가 conchiolin 및 base의 세포독성으로 인한 것인지를 관찰하기 위하여 MTT assay를 실시하여 cell

viability를 측정하였다. Fig. 8에 의하면, atopy skin extracts, atopy lotion extracts, atopy cream extracts 및 acne extracts 군과 LPS+ 및 Control 군에서 세포독성이 나타나지 않았으므로 NO 생성 저해능 평가실험의 결과를 인정하여 이용할 수 있다.

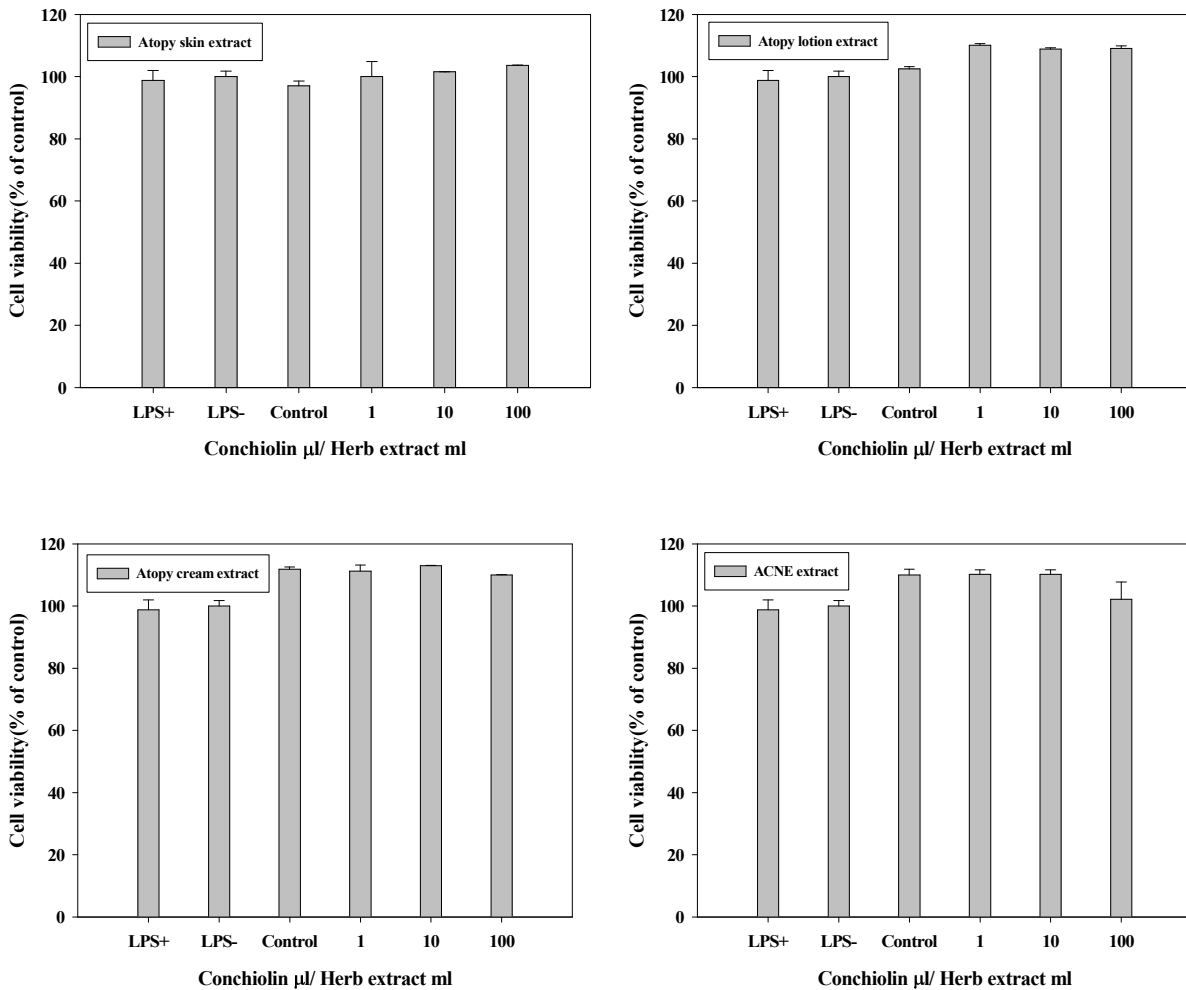
Fig. 83에 의하면, atopy skin products 와 atopy cream products 인 base에 conchiolin을 농도별(1 ~ 100  $\mu$ l)로 첨가하여 만든 제품들의 LPS로 유도된 NO 생성의 감소가 conchiolin 및 base의 세포독성으로 인한 것인지를 관찰하기 위하여 MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다.



**Fig. 81. Inhibitory effect of Conchiolin + Base on the LPS-induced NO production.** Raw 264.7 cells were treated with various concentration of Conchiolin + Base for 1 h prior to the addition of LPS (1  $\mu$ g/ml) and the cells were further incubated for 20 h. The concentrations of nitrite in culture medium were measured as described in the methods section. Values represent mean  $\pm$  S.D. of triplicate determinations. Base(Atopy skin extracts) + Conchiolin 100  $\mu$ l is corresponding to the SUN Atopy skin [Base(Atopy lotion extracts) + Conchiolin 100  $\mu$ l, the SUN Atopy lotion; Base(Atopy cream extracts) + Conchiolin 100  $\mu$ l, the SUN Atocream; Base(Acne extracts) + Conchiolin 100  $\mu$ l, the SUN Acneskin].

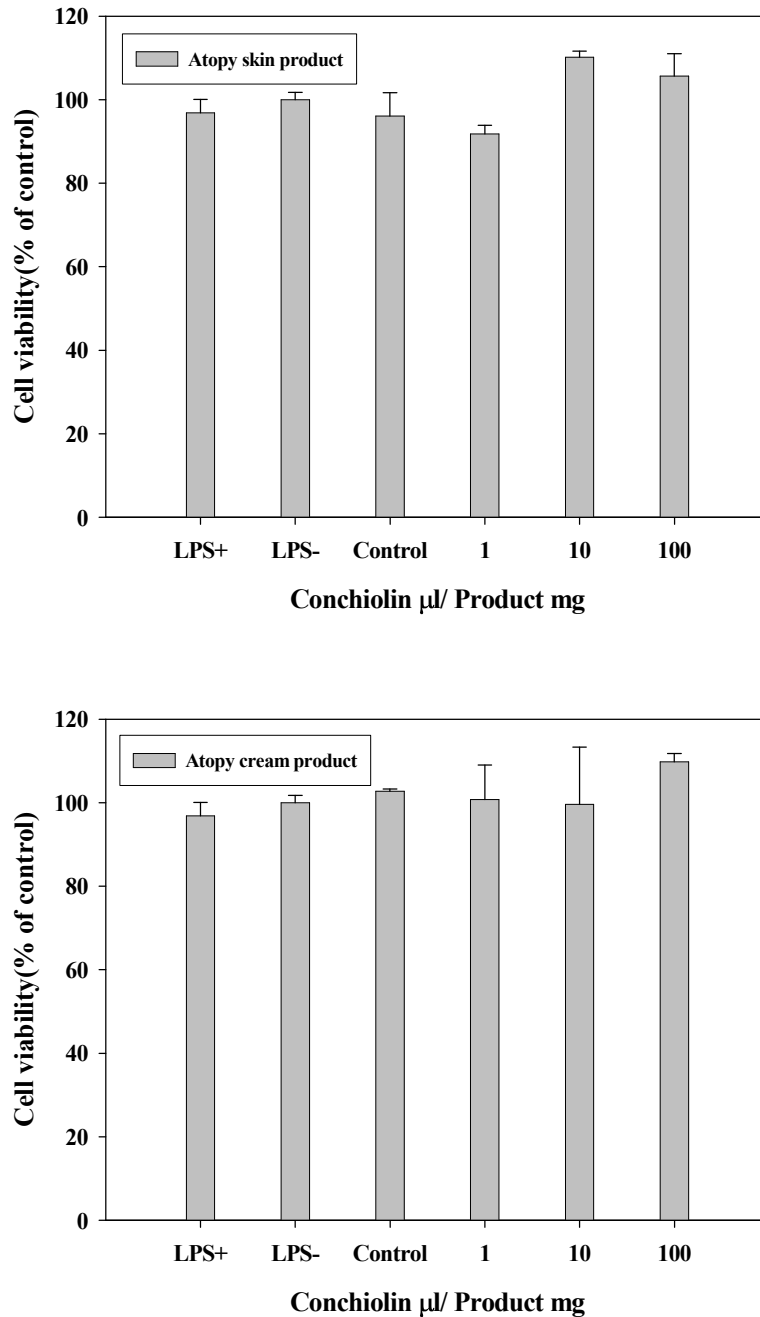


**Fig. 82. Inhibitory effect of Conchiolin + Base on the LPS-induced NO production.** Raw 264.7 cells were treated with various concentration of Conchiolin + Base for 1 h prior to the addition of LPS (1  $\mu$ g/ml) and the cells were further incubated for 20 h. The concentrations of nitrite in culture medium were measured as described in the methods section. Values represent mean  $\pm$  S.D. of triplicate determinations. Base (Atopy skin products) + Conchiolin 100  $\mu$ l is corresponding to the SUN Atopy skin [Base (Atopy cream products) + Conchiolin 100  $\mu$ l, the SUN Atopy cream].



**Fig. 83.** Effect of Conchiolin + Base on the LPS-induced cell viability. Raw 264.7 cells were treated with various concentration of Conchiolin + Base for 1 h prior to the addition of LPS (1  $\mu$  g/ml) and the cells were further incubated for 20 h. Values represent mean  $\pm$  S.D. of triplicate determinations. Base(Atopy skin extracts) + Conchiolin 100  $\mu$ l is corresponding to the Sun Atopy skin [Base(Atopy lotion extracts) + Conchiolin 100  $\mu$ l, the Sun Atopy lotion; Base(Atopy cream extracts) + Conchiolin 100  $\mu$ l, the SUN Atopy cream; Base(Acne extracts) + Conchiolin 100  $\mu$ l, the SUN Acne skin].

Atopy skin products 와 atopy cream products 군과 LPS+ 및 Control 군에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 84).



**Fig. 84. Effect of Conchiolin + Base on the LPS-induced cell viability.** Raw 264.7 cells were treated with various concentration of Conchiolin + Base for 1 h prior to the addition of LPS (1 μg/ml) and the cells were further incubated for 20 h. Values represent mean ± S.D. of triplicate determinations. Base(Atopy skin products) + Conchiolin 100 μl is corresponding to the SUN Atopy skin [Base(Atopy cream products) + Conchiolin 100 μl, the SUN Atopy cream].

#### ④ 가공분말 및 기능성 분획물에 대한 독성실험

가공분말들을 이용하여 세포독성실험(MTT assay)을 수행하였다(Fig. 85, 86). Fig. 85에 의하면, 일반분말로부터 추출한 conchiolin 을 이용하여 세포독성실험인 MTT assay 를 수행하였으며, conchiolin 의 농도가 0.1 ~ 0.2 mg/ml 까지는 세포독성이 나타나지 않았으나, 0.5 mg/ml 의 농도 이후로는 세포독성이 나타났다. 또한, 폐각류를 나노입자 상태로 가공하였을 때, 전반적으로는(1.25 ~ 50  $\mu$ g/ml) 세포독성이 나타나지 않았으나, 10  $\mu$ g/ml 의 농도에서는 약간의 세포독성을 나타내었다(Fig. 86). 이 결과로 추론해 볼 때, 일반분말의 conchiolin 을 사용할 때 적정량을 사용해야 한다는 것을 의미하며 과도한 양을 사용할 때는 독성을 나타낼 수 있다는 것을 시사한다. 나노입자의 경우에는, 그 성분내에 여러 가지 유기물 및 미네랄을 포함하고 있어 독성을 나타내지 않았음을 유추하며, 독성은 용량 의존적으로 나타나기 때문에 이에 대한 추가실험이 필요하다.

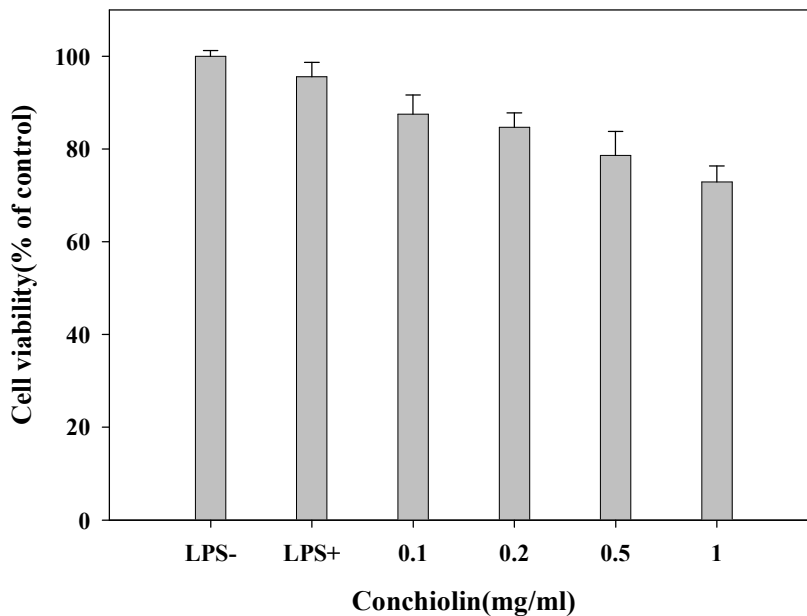
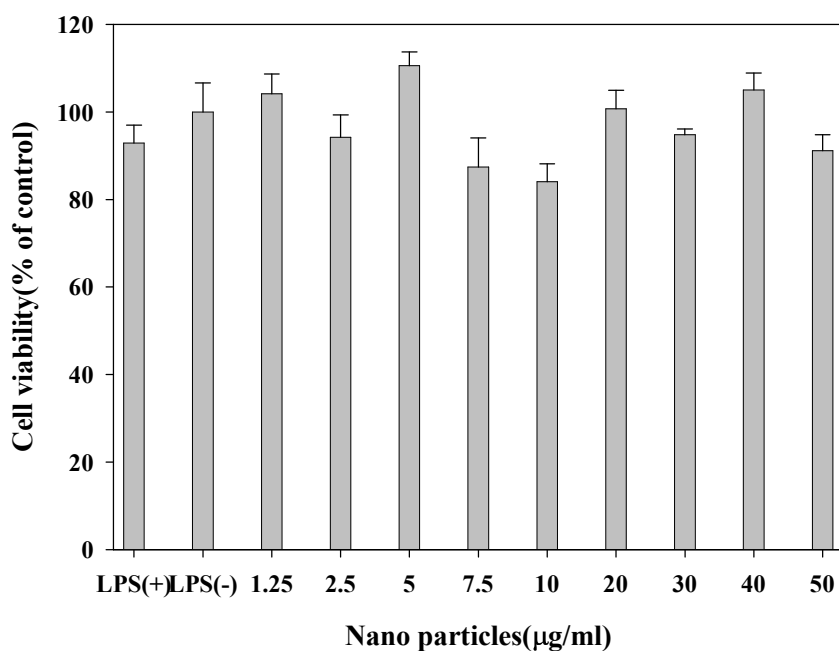


Fig. 85. Effect of Conchiolin on the LPS-induced cell viability. Raw 264.7 cells were treated with 0.1 ~ 4 mg/ml of Conchiolin dissolved in DMSO for 1h prior to the addition of LPS (1  $\mu$ g/ml) and the cell were further incubated for 20h. Values represent mean  $\pm$ SD of triplicate determinations.



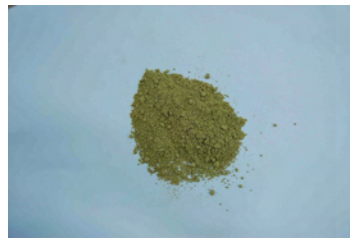
**Fig. 86.** Effect of Nano particles on the LPS-induced cell viability. Raw 264.7 cells were treated with 1.25 ~ 50 µg/ml of nano particles dissolved in DMSO for 1h prior to the addition of LPS (1 µg/ml) and the cell were further incubated for 20h. Values represent mean ± SD of triplicate determinations.



(4) 한방피부과 아토피 처방 protocol

(가) 한방아토피 입욕제

① 제품사진



② 제품구성

굴 패각으로부터 분리한 콘키올린 분말0.1%(w/w)와 한약재 분말(단삼, 정향, 황련, 토복령, 치자, 유흥, 고백반, 포공영, 금은화)

③ 용량 및 용법

㉠ 용량 : 300g

㉡ 용법 : 목욕물 100L 당 10g사용, 1회/1일

㉢ 욕조온도 : 38-40℃에서 15분간 입욕한다.

④ 가공형태

5-30 $\mu$ m 극미세분말형태로 가공하여 목욕물에 타서 사용하여도 한약재분말의 자극이 없으며, 미지근한 물에도 쉽게 용출되어 피부 침투효과가 탁월한 효과를 발휘한다

(나) 아토피 치료제의 치료 처방순서

① 미지근한 물에 가볍게 피부 저자극 물비누를 이용하여 샤워를 한다.

② 목욕물을 받아 입욕제 10g을 푼후 15분간 입욕한다.

③ 비누사용은 금하고 미지근한 물로 샤워를 한 후 수건으로 톡톡치면서 물기를 제거한다

④ 스프레이 방식의 아토피 스킨을 몸전체에 분무한 후 손으로 가볍게 두들기며 흡수시킨다

⑤ 아토피로션으로 아토피 상처 부위에 바른 후 완전히 흡수시킨다

⑥ 아토피 보습크림으로 상처부위에 발라준다

(다) 임상사례

본 임상은 한방피부과학연구회 회원들에게 개발된 제품을 제공하여 회원 각 한의원에서 직접 임상을 실시한 사례임.

1. 김\*\*(남, 10세)



사용전



사용후(4주)

임상 자료제공(부산 연재 ○○한의원)

2. 이\*\*(여, 5세)



사용전



사용후(4주)

임상자료제공(부산 연재 ○○한의원)

3. 김\*\*(남 70)



사용전



사용후(4주)

임상자료제공(서울 서초 ○○○ 한의원)

(5) 내과처방개발

(가) 경부임파선 처방

군패각 분말은 한방에서 모려분으로 본초학에서는 수록되어 있는 처방이다. 모려를 근거로한 처방을 살펴보면 현삼목패탕(현삼 12g, 모려 120g, 패모 30g)과 모려산(모려 15g, 황기 15g, 마황근 6g, 부소맥 18g) 처방을 들 수있다. 현삼목패탕의 경우 경부 임파선염에 주로 사용하는 처방이며, 모려산 처방은 오한, 자한에 사용되는 처방으로 원진연구를 통하여 처방을 확인하였다. 기존 한의원에 판매되는 모려분은 통상 군패각을 세척한후 건조하여 600℃에서 구워낸후 분쇄하여 한의원에 제공되는데 이 모려분과 본 연구에서 콘키올린을 추출한 후 발생된 부산물을 회화시켜 만든 모려분과 비교하여 그 약효를 검증하였다.

본 처방을 이용한 모려분의 효능연구는 서울 서초동 소재 ○○○2009년 1월 부터 3월 까지 내원한 환자중 경부 임파선염 증상을 보인 환자 18명을 대상으로 임상실험결과를 근거로 자료를 작성하였다. 경부임파선염 증세를 보인 환자에게 제공된 처방은 현삼목패탕으로 이 탕약은 본 연구소에서 제공한 모려분과 약업상에서 판매하는 모려분(S제약)을 2개의 군으로 나눠 아홉 케이스로 나눠 치료 효율을 검증하였다. 약복용량은 1일 100ml씩 3회 복용하는 것을 원칙으로 임상을 실시하였다(Table 37).

Table 37. 현삼목패탕을 복용한 경부임파선 환자들에 대한 임상평가 결과

| 구분             | 대상자 | 성별 | 나이 | 1일후 | 2일후 | 3일후 | 비고   |
|----------------|-----|----|----|-----|-----|-----|------|
| 본사<br>제공<br>모려 | 김** | 남  | 35 | △   | ○   | -   |      |
|                | 이** | 여  | 28 | ○   | -   | -   |      |
|                | 박** | 여  | 48 | △   | ○   | -   |      |
|                | 이** | 여  | 57 | ×   | △   | ○   | 변비증상 |
|                | 김** | 남  | 55 | ○   | -   | -   |      |
|                | 곽** | 여  | 46 | △   | △   | ○   |      |
|                | 신** | 여  | 62 | ○   | -   | -   |      |
|                | 김** | 여  | 39 | △   | ○   | -   |      |
|                | 이** | 여  | 44 | △   | △   | ○   | 변비증상 |
| S제약<br>모려      | 탁** | 여  | 45 | △   | ○   | -   |      |
|                | 김** | 남  | 66 | △   | △   | ○   | 변비증상 |
|                | 박** | 남  | 29 | △   | ○   | -   |      |
|                | 이** | 여  | 32 | ○   | -   | -   |      |
|                | 김** | 여  | 58 | △   | ○   | -   |      |
|                | 최** | 여  | 63 | △   | △   | ○   | 변비증상 |
|                | 박** | 남  | 41 | ○   | -   | -   |      |
|                | 변** | 여  | 57 | ×   | △   | ○   |      |
|                | 이** | 여  | 58 | △   | ○   | -   |      |

(○:완치, △호전, ×반응없음)

임상평가 결과 제약사에서 제공한 모려분과 본사에서 제공한 모려분 모두 약효를 가지는 것으로 확인 되었으며, 모려분으로 판매가 가능한 것으로 보여진다. 사람에 따라 임상적 차이를 보일 수 있어 두 제품 모두 어느것이 낫다라고 판명하기 어려우나 탕액을 조제한 후 찌꺼기 양을 확인 해본결과 본사에서 제공한 모려분이 제약사에서 제공한 모려분 보다 용해도 면에서는 나은 것으로 확인 되었다. Table 37에서 보여진 결과중 변비 증상이 나타난 환자들의 경우 복용을 3일간 복용하여 모려분이 가지는 수분흡수력으로 인한 변비 증상으로 보여지며, 이런 경우 수분섭취를 늘리면 변비도 개선 될 것으로 사료된다.

(나) 해열처방

한의원에서 사용되는 주 해열 처방으로는 황련해독탕을 들 수 있다. 황련해독탕의 경우 약성이 매우쓰기 때문에 복용에 많은 어려움을 환자들이 겪기 때문에 복용을 꺼리는 경우가 많다. 이런 약맛을 개선하고, 황련해독탕을 대체할 처방 개발이 절실히 요구되어 본사에서 연구 중인 콘키올린의 항염증 기능과 한약재 성분중 항염증 효과가 우수한 인진쑥, 황금을 이용하여 처방을 구성하였으며, 현재 환약으로 제조하여 어린이와 성인을 대상으로 임상실험을 진행 중이 현재까지 결과를 보면 항염증 및 빠른 해열효과가 나는 것으로 현재 경남 진주○○○○한의원에서 보고 되고 있다.



해열처방용 환약

**12. 임상실험**  
별첨 4,5참조

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

| 연도별             | 세부연구목표                                   | 가중치(%) | 평가의 착안점 및 척도  | 자체평가 | 비고 |
|-----------------|--|--------|---|------|----|
| 1차년도<br>(2006년) | 원료의 1차 가공 처리기술의 개발과 초미세 및 나노 입자 가공분말의 제조 | 10     | 1차 원료수집 및 가공방법 탐색 및 가공방법별 시료의 제조(초미세·나노 입자 분말 제조 및 입도분석 등)                        | 100  |    |
|                 | 가공원료에 대한 생리활성물질 탐색                       | 10     | 가공된 원료물질로 생리활성 및 기능성 조사(단백질, 지방, 탄수화물, 비타민, 무기물, 항염증, 항균, 항진균, 단백질 저해능 등)         | 100  |    |
| 2차년도<br>(2007년) | 나노 및 초미세가공분말의 성분분석과 물리화학적 특성 검토          | 5      | 나노 및 초미세가공분말을 제조 물리화학적 특성 분석  | 100  |    |
|                 | 정제된 분획물의 생리활성연구 및 생화학·물리화학적 특성 검토        | 5      | 정제된 conchiolin 분획물의 생리활성 측정 및 생화학·물리화학적 특성 검토                                     | 100  |    |
|                 | Conchiolin의 효소가수분해에 의한 기능성 펩티드 제조        | 5      | Conchiolin을 효소가수분해 하여 기능성 펩티드를 제조 및 생리활성을 측정                                      | 100  |    |
|                 | 전임상 동물실험                                 | 5      | Cell viability 측정, Nitric Oxide 생성량 측정, iNOS와 COX-2 발현 측정, cytokine 측정, 간·신장독성 측정 | 100  |    |
| 3차년도<br>(2008년) | 기능성물질의 대량 분리 정제 기술 개발 및 산업적 응용 소재연구      | 10     | 기능성물질의 대량 분리 정제 기술을 개발하였으며, 산업적 응용소재에 대한 연구를 수행하였음.                               | 100  |    |
|                 | 분리 정제된 물질의 구조 특성 분석                      | 5      | 분리 정제된 물질의 구조특성을 분석하였음.   | 100  |    |
|                 | 임상실험 및 안정성 실험                            | 5      | 개발된 소재를 이용한 동물실험을 수행하였으며, 임상시험 관련 protocol을 개발하였음.                                | 100  |    |
| 4차년도<br>(2009년) | 산업분야별 응용 제품의 개발 및 제품평가                   | 10     | 산업분야별 응용제품의 개발 및 제품평가(식품, 화장품)  | 100  |    |
|                 | 한방과의 접목을 통한 제형연구 및 한약처방기술개발              | 5      | 한방과의 접목을 통한 제형연구 및 한약처방 기술개발(식품, 내과 처방)   | 100  |    |
|                 | 임상실험 및 안전성실험                             | 5      | 여드름임상시험 피험자모집 및 임상실험  | 100  |    |
| 5차년도<br>(2010년) | 생산실용화기술 개발 및 제품화                         | 10     | 경제성을 고려한 원료의 대량 처리 시스템 설계 및 개발 및 응용제품개발   | 100  |    |
|                 | 신 제형 및 신 한약 처방 기술의 보급을 위한 제품 평가 및 자료화    | 5      | 제품에 대한 시장분석 및 산업화전략 등 마케팅방향연구 및 연구소 소속 한의사를 대상 제품평가 및 자료화                         | 100  |    |
|                 | 임상실험 및 안전성실험                             | 5      | 아토피 개선효과에 대한 임상시험용 피험자모집 및 인체적용시험실시   | 100  |    |
| 합 계             |  | 100    |   |      |    |

## 제 5 장 연구개발 성과 및 활용계획

### 제 1 절 연구개발 성과 및 활용계획

#### 1. 기술적 성과

가. 국내에서 가장 많이 생산되는 6종류의 폐각으로부터 항염증 활성이 우수한 물질이 존재한다는 사실을 확인하였다.

- (1) 원료의약품에 대한 원천기술 확보(관절염 치료제, 해열제 등 이용)
- (2) 화장품 소재로 이용 가능(아토피, 여드름, 피부트리블 등)
- (3) 기능성 식품소재이용(관절염 예방 등)

나. 저비용 생산공정의 개발로 가격 경쟁력이 있는 제품을 개발하는데 성공하였다.

다. 현재 폐기물 형태로 방치되고 있는 폐각류를 고부가가치 자원화 기술개발에 성공하였다.

제 1 단계 : 항염증물질 분리

제 2 단계 : 항염증물질 분리 후 부산물의 식·의약품 칼슘제 분리(소아성장용 칼슘보강제, 관절염 예방용 제품)

제 3 단계 : 우리나라 석회석 매장량은 약80년 후 고갈될 예정인데 그 대체물질로 이용 가능성을 확보함으로써 건축내장재, 시멘트, PVC, 인공뼈 소재, 페인트 등 다양한 산업분야에 이용이 가능하다.

라. 폐각에 존재하는 유기물과 무기물의 구성 물질을 밝힘으로서 산업적으로 이용 가능한 자료를 확보하였다.

마. 그 동안 해양환경문제를 유발한 폐각류의 처리방안이 확보됨으로서 해양환경보전은 물론 폐각류를 이용한 수익사업이 가능함으로서 지자체의 재정확보와 정부예산 절감효과를 가져다 줄 수 있다.

바. 폐각처리에 대한 신기술을 확보함으로써 국내는 물론 해외에 수출이 가능하며, 항염증용 의약품 신소재를 확보함으로써 수입대체효과는 물론 외화획득이 가능하다.

사. 수산 부산물의 재가치 창조

수산 부산물인 폐각류를 고순도로 정제함으로서 고부가가치의 천연 항염증제, 기능성 화장품 원료, 고순도의 칼슘제 및 산업용 신소재 원료로 이용이 가능하여 수산산업의 활성화가 예상된다.

## 2. 기대효과

### 가. 기술적 측면

#### (1) 첨단정제기술을 이용한 수산산업의 기술향상

폐각류를 고순도로 정제하는 첨단기술을 이용하여 고부가가치의 천연 항염증제, 기능성 화장품 원료, 고순도의 칼슘제 및 산업용 신소재 원료를 생산하여 수산산업을 발전시킬 수 있으며, 기술 확보를 통한 저비용 고 소득용 벤처형 공장을 각 지역 및 어민 단체별로 설립함으로써, 기술향상 및 생산품의 질적 향상을 기대할 수 있다. 또한 가공 시 얻어지는 신소재관련 기술영역의 확대 및 활성화로 인한 기술향상의 시너지 효과가 클 것으로 기대된다.

#### (2) 제약시장 원천기술 확보

원천기술의 확보로 한미 FTA 등으로 침체 일로에 접어든 국내 제약 산업의 위기를 극복할 수 있는 내안으로 기대된다.

### 나. 경제·산업적 측면

#### (1) 기술 확보 및 외국에 기술이전 가능성

본 연구 성과는 차별화된 분리정제기술로 특허 출원을 통하여 고기능성 소재 개발에 연관된 기술로 검증받고, 수산산업을 발전시킬 수 있으며, 수산가공산업에서 세계적인 경쟁력을 갖는 원천 특허 기술로서의 보호와 활용의 극대화, 기술혁신을 통해 국가 경쟁력을 창출하여 새로운 해외시장개척에 이바지 할 수 있으며 또한, 확보된 기술을 바탕으로 생산현장의 기술력과 품질·성능 등을 평가함으로서 기준이상의 품질수준을 유지하여 외국에 기술이전을 실시한다면 수입대체효과 및 수출증대에 크게 이바지하고 나아가 외화획득이 가능할 수 있다.

#### (2) 국내 한방산업의 활성화

기존에 사용해 오던 한약 소재인 폐각을 차별화된 고순도의 정제 과정을 거침으로서 질병의 치료 및 예방에 유효한 한약제 또는 생약류의 분말 혹은 추출물을 만들 수 있으며, 이



소재를 이용하여 인체에 유익한 활성성분의 침투와 흡수율을 높이고, 기능을 강화시킨 약제의 공급이 가능하게 될 것이다. 이는 약효는 물론 처방의 다양성과 제형변화에 따른 기능성 한약재로서 널리 응용 될 수 있으며, 한방산업을 활성화시킬 수 있을 것이다.

### (3) 고용창출효과 증대

기술 확보를 통한 저비용 고 소득용 벤처형 공장을 각 지역 및 어민 단체별로 설립함으로써, 생산성 향상 및 생산품의 질적 향상을 위한 일자리 창출 및 어민 소득증대를 기대할 수 있다. 또한 가공 시 얻어지는 신소재관련 사업 영역의 확대 및 활성화로 인한 경제적 시너지 효과가 클 것으로 기대되고 그와 관련된 종사자들의 고용창출 효과가 증대된다. 그리고 가공 공정상 발생하는 부산물들을 이용한 산업화에 따른 소규모 중소기업들의 활성화 성과도 함께 기대할 수 있다.

### 다. 사회·문화적 측면

- (1) 친 환경국가의 이미지 재고를 통한 국가 신뢰성 확보가 가능
- (2) 폐각류 처리에 대한 어민들의 정부 신뢰도에 기여함
- (3) 청정해역에서 생산된 수산물로부터 정제된 기능성물질에 대한 국민들의 신뢰성 확보가 가능
- (4) 천연 정제된 기능성물질을 이용한 산업적 소재 개발에 대한 사회의 신뢰성 확보가 가능

## 제 2 절 원료시장분석



### ■ 본 사업 전개의 착안점

1. 화장품 소개측면 : 신 개념의 천연 원료(항염증, 두피, 피부트러블 개선)
2. 의약품 소개측면 : 신소재 천연 항염증제(전 세계 연구개발동향과 일치) 미FTA제결로 인한 의료시장 변화에 따른 수입대체효과
3. 식품 소개측면 : 기존 골다공증, 성장관련 칼슘시장의 접근성 용이
4. 건축내장재 소개 : 불연내장 석고 보드시장 진입이 유리, 석고원료 공급에 대한 가격경쟁 우위

### ▶ 본 제품의 기회요인은

- 소재의 신선함
- 전세계 및 정부주도 친환경 녹색 성장 트렌드와 일치
- 의료시장 개방에 따른 원천기술확보와 수입대체 효과
- 각종 패각류 산업의 고부가가치 창출과 고수익 기대

### ▶ 본 제품의 위기요인은

- 역사자본의 영세성
- 화장품, 의약, 식품소재영역별 전문가는 확보하고 있지만, 산업용 건축소재개발, 판매유통과 관련 된 전문가 미확보

상기 기회요인을 발판 삼아 위기요인을 제거한다면 새로운 패러다임으로 각 산업분야별 시장 주도하는 기업으로 성장 가능할 것으로 예측

### 제 3 절 수익사업 모델

#### 수익 사업화 근거

##### 화장품 소재 판매

ICID에 화장품 소재로 등재 예정(12월30일 이전)

##### 의약품 소재 판매

1. 임상실험 진행 후 소재판매가 가능함(2011년 임상 1상 실험 계획 중)
2. 상용화 시점 : 2014년 가능(임상실험, CGMP제조설비 등), 경우에 따라서는 국내 및 외국에 특허기술판매도 고려 중(500억~1000억 예상-CRO를 통한 외국 이전 시)

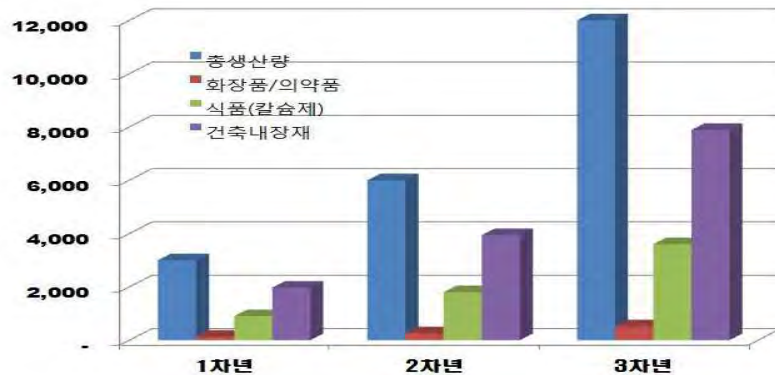
##### 식품소재(칼슘제)

생산설비 구축 후 고 품질 칼슘제 판매예정(국내 및 국외 시장이 이미 형성되어 있음)

##### 건축내장재 소재(석고보드 용) 판매

국내 1,2위 업체인 KCC, 프랑스 라파즈 등과 원료 공급 협의 예정

### 제 4 절 향후 3년간 생산계획 및 예상수익



\*의약품/화장품 소재 : 300,000,000원/ton, 식품(칼슘제)소재 : 1,500,000원/ton, 건축내장재 : 500,000원/ton을 기준으로 작성하였음 (현재 시세 기준)

## 제 5 절 생산설비 / 투자비 및 총 매출 예상규모

| 구 분             |             | 1차년도   | 2차년도   | 3차년도    |        |
|-----------------|-------------|--------|--------|---------|--------|
| 생산(ton)         | 화장품/의약품     | 129    | 258    | 516     |        |
|                 | 식품(칼슘제)소재   | 900    | 1,800  | 3,600   |        |
|                 | 건축내장재       | 1,971  | 3,942  | 7,884   |        |
|                 | 소계          | 3,000  | 6,000  | 12,000  |        |
| 판매(백만원)         | 화장품/의약품     | 38,700 | 77,400 | 154,800 |        |
|                 | 식품(칼슘제)소재   | 1,350  | 2,700  | 5,400   |        |
|                 | 건축내장재       | 985.5  | 1,971  | 3,942   |        |
|                 | 소계          | 41,036 | 82,071 | 164,142 |        |
| 원가(백만원)         | 화장품/의약품     | 300    | 600    | 1,200   |        |
|                 | 식품(칼슘제)소재   | 100    | 200    | 400     |        |
|                 | 건축내장재       | 100    | 200    | 400     |        |
|                 | 소계          | 500    | 1,000  | 2,000   |        |
| 투자비용(백만원)       | 공장및 시설비     | 2,000  | 2,000  | 4,000   |        |
|                 | 원료구입비       | 2,250  | 4,500  | 9,000   |        |
|                 | 기타          | 1,000  | 2,000  | 4,000   |        |
|                 | 소계          | 5,250  | 8,500  | 17,000  |        |
| 자산비용(백만원)       | 공장및 시설비     | 2,000  | 4,000  | 8,000   |        |
|                 | 본사보증금       | 20     | 1,000  | 10,000  |        |
|                 | 연구소자산       | 700    | 1,500  | 2,000   |        |
|                 | 소계          | 2,720  | 6,500  | 20,000  |        |
| 경상고정비용<br>(백만원) | 직원급여        | 사무직    | 1,000  | 2,000   | 3,000  |
|                 |             | 연구직    | 1,500  | 3,000   | 3,000  |
|                 |             | 생산직    | 2,000  | 4,000   | 6,000  |
|                 |             | 소계     | 4,500  | 9,000   | 12,000 |
|                 | 연구실운영비      | 2,000  | 3,000  | 4,500   |        |
|                 | 영업비         | 5,000  | 7,500  | 11,250  |        |
|                 | 기타          | 3,000  | 4,500  | 6,750   |        |
|                 | 소계          | 10,000 | 15,000 | 22,500  |        |
| 합계              | 14,500      | 24,000 | 34,500 |         |        |
| 관리비용(백만원)       | 반품(매출액 5%)  | 2,052  | 4,104  | 8,207   |        |
|                 | 판촉비(매출액10%) | 4,104  | 8,207  | 16,414  |        |
|                 | 인쇄물         | 100    | 200    | 400     |        |
|                 | 기타비용        | 200    | 400    | 800     |        |
|                 | 소계          | 6,455  | 12,911 | 25,821  |        |
| 수지차(백만원)        | 총매출         | 41,036 | 82,071 | 164,142 |        |
|                 | 총비용         | 28,705 | 52,191 | 96,821  |        |
|                 | 총매출-총비용     | 12,330 | 29,880 | 67,321  |        |
| 총매출이익(백만원)      |             | 12,330 | 29,880 | 67,321  |        |

## 제 6 절 예상손익 계산 및 분석

단위:백만 원

| 분 류  | 1차년도(85%) | 2차년도(90%) | 3차년도(95%) |
|------|-----------|-----------|-----------|
| 수 입  | 34,880.6  | 73,863.9  | 155,934.9 |
| 지 출  | 28,705    | 52,191    | 96,821    |
| 세전이익 | 6,175.6   | 21,672.9  | 59,113.9  |

초기 공장설립 후 폐각류 의 수거 시 ton당 20,000원의 수거비용을 받고 수거된 폐각류를 처리하여 칼슘 및 의학재료 그리고 그 외 부산물을 통하여 환경산업으로 녹색성장을 위한 기초가 되며, 의학, 화장품의 건설자재의 기초 원료를 판매함으로 매우 높은 부가가치를 갖는다고 볼 수 있다.

굴폐각 신소재사업은 국가가 갖고 있는 어려운 문제의 해결책으로 매우 중요한 역할을 할뿐 아니라 폐기물을 재사용함으로 자원의 활용면에서도 매우 큰 역할을 담당할 것이다.



|   |  |   |   |      |    |   |      |      |   |
|---|--|---|---|------|----|---|------|------|---|
| A study of the correlation between organic matrices and nanocomposite materials in oyster shell formation - design and processing of materials  |  | Biomaterials  | Choi, C.-S.C.-S. ; Kim, Y.-W.   | 2000 | 21 | 3 | 213  | 222  | IPC Science and Technology Press ; Elsevier Science Ltd |
| A Submerged Peat Deposit Off the Atlantic Coast of the United States  |  | Limnology and oceanography  | Emery, K. O. ; Wigley, R. L. ; Rubin, Meyer   | 1965 | 10 | 0 | 97   | 102  | American Society of Limnology and Oceanography          |
| Ability of Amphiascus sp. (Copepoda, Harpacticoida) to remove fouling diatoms on conchoceleis-bearing oyster shells in nori culture   |  | 日本水産學會誌=Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries                | MINE, TAKAYUKI ; KAWAMURA, YOSHIO ; UEDA, HIROSHI                                   | 2005 | 71 | 6 | 923  | 927  |   |
| Ability of Amphiascus sp. (Copepoda, Harpacticoida) to remove fouling diatoms on conchoceleis-bearing oyster shells in nori culture   |  | 日本水産學會誌=Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries                | MINE, TAKAYUKI ; KAWAMURA, YOSHIO ; UEDA, HIROSHI                                   | 2005 | 71 | 6 | 923  | 927  |   |
| Accumulation of heavy metals in bivalves shells of Jiaozhou Bay   |  | 海洋環境科學=Marine environmental science   | LIU, Shengfa ; FAN, Dejiang ; ZHANG, Aibin ; YAN, Wentao                            | 2008 | 27 | 2 | 135  | 138  | 海洋出版社   |
| Aggregation of ammonia-oxidizing bacteria in microbial biofilm on oyster shell surface  |  | World journal of microbiology & biotechnology                                   | Ivanov, Volodymyr ; Stabnikova, Olena ; Sihanonith, Praktitsin ; Menasveta, Piamsak | 2006 | 22 | 8 | 807  | 812  | Kluwer Academic Publishers                              |
| Amino-acid composition of heated oyster shells.   |  | Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America | Totten, D K ; Davidson, F D ; Wyckoff, R W  | 1972 | 69 | 4 | 784  | 785  | National Academy of Sciences                            |
| An effective transplanting technique using shells for restoration of Zostera marina habitats  |  | Marine pollution bulletin   | Lee, K.S. ; Park, J.I.  | 2008 | 56 | 5 | 1015 | 1021 | Macmillan Journals ; Elsevier Science Ltd               |
| An Experimental Investigation of Deformation and Fracture of Pearl Nacre&ndash;Mother of Pearl  |  | Experimental mechanics  | Barthelat, F. ; Espinosa, H. D.   | 2007 | 47 | 3 | 311  | 324  | Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers            |
| An Extract of a Letter to His Excellency Signior Francisco Cornaro, Ambassador from the Republic of Venice, to the Queen of Great Britain, etc. By Anthony Van Leeuwenhoek, F.R.S. Containing Microscopical Observations of the Salts |  | Philosophical transactions  | Leeuwenhoek, Anthony van  | 1707 | 25 |   | 2416 | 2424 | The Royal Society                                       |







|  |  |   |      |     |   |     |     |  |
|--|--|---|------|-----|---|-----|-----|--|
| Composites Measured by Accelerator Mass Spectrometry   | Ninomiya, Fumi ; Flores, Edgar Dulay ; Kunioka, Masao  | polymers and the environment  | 2009 | 82  | 2 | 201 | 213 | Academic Press in association with the Estuarine and Brackish-water Sciences Association |
| Biometric, microstructural, and high-resolution trace element studies in <i>Crassostrea gigas</i> of Cantabria (Bay of Biscay, Spain): Anthropogenic and seasonal influences | Higuera-Ruiz, R. ; Elorza, J.  | Estuarine, coastal and shelf science  | 2009 | 82  | 2 | 201 | 213 | Academic Press in association with the Estuarine and Brackish-water Sciences Association |
| Biotic potential and environmental resistance in the American oyster ( <i>Crassostrea virginica</i> ) in Long Island Sound   | MacKenzie, C.L.  | Aquaculture   | 1981 | 22  |   | 229 | 268 | Elsevier Scientific Pub. Co  |
| Can molluscan assemblages give insights into Holocene environmental changes other than sea level rise? A case study from a macrotidal bay (Marennes-Oleron, France)          | Poirier, C. ; Sauriau, P.G. ; Chaumillon, E. ; Allard, J.  | Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology                                 | 2009 | 280 | 1 | 105 | 118 | Elsevier   |
| CaO Powders from Oyster Shells for Efficient CO <sub>2</sub> Capture in Multiple Carbonation Cycles  | Ma, K. W. ; Teng, H.   | Journal of the American Ceramic Society   | 2010 | 93  | 1 | 221 | 227 | Blackwell Publishing Ltd.  |
| Characterization of organic matrix macromolecules from the shells of the Antarctic scallop, <i>Adamussium colbecki</i>   | Halloran, B.A. ; Donachy, J.E.   | Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology | 1995 | 111 | 2 | 221 | 231 | Elsevier   |
| Chemical-mechanical characteristics of crushed oyster-shell  | Yoon, G.-L. ; Kim, B.-T. ; Kim, B.-O. ; Han, S.-H.   | Waste management  | 2003 | 23  | 9 | 825 | 834 | Pergamon Press ; Elsevier Science Ltd  |
| Chitinase of <i>Bacillus licheniformis</i> from oyster shell as a probe to detect chitin in marine shells  | Islam, Shah Md. Asraful ; Cho, Kye Man ; Hong, Sun Joo ; Math, Renukaradhya K. ; Kim, Jong Min ; Yun, Myoung Geun ; Cho, Ji Joong ; Heo, Jae Young ; Lee, Young Han ; Kim, Hoon ; Yun, Han Dae | Applied microbiology and biotechnology  | 2010 | 86  | 1 | 119 | 129 | Springer-Verlag  |
| Chronology of an oyster reef on the coast of Bohai Bay, China: Constraints from optical dating using different luminescence signals from fine quartz and polymineral         | Zhang, J.-F. ; Fan, C.-F. ; Wang, H. ; Zhou, L.-P.   | Quaternary Geochronology  | 2007 | 2   | 1 | 71  | 76  | Elsevier BV  |





|   |  |  |      |     |    |      |      |   |
|---|--|--|------|-----|----|------|------|---|
| Differential Ingestion and Digestion of Bivalve Larvae by the Scyphozoan <i>Chrysaora quinquecirrha</i> and the Ctenophore <i>Mnemiopsis leidyi</i> | The Biological bulletin                        | Purcell, Jennifer E. ; Cresswell, Frances P. ; Cargo, David G. ; Kennedy, Victor S.  | 1991 | 180 | 1  | 103  | 111  | Marine Biological Laboratory  |
| Differential recruitment of introduced Pacific oysters and native mussels at the North Sea coast: coexistence possible?                             | Journal of sea research                        | Diederich, S.  | 2005 | 53  | 4  | 269  | 281  | Netherlands Institute for Sea Research ; Elsevier Science Pub. Co                         |
| Distribution of butyltin and derivatives in oyster shells and trapped sediments of two estuaries in Cantabria (Northern Spain)                      | Chemosphere                                    | Diaz, J. ; Higuera-Ruiz, R. ; Elorza, J. ; Irabien, A. ; Ortiz, I.   | 2007 | 67  | 3  | 623  | 629  | Pergamon Press  |
| Distribution of Symbiobacterium thermophilum and related bacteria in the marine environment.  | Bioscience, biotechnology, and biochemistry    | Sugihara, Takafumi ; Watsuji, Tomo-o ; Kubota, Shin ; Yamada, Kazune ; Oka, Kaori ; Watanabe, Kiyoshi ; Meguro, Michiko ; Sawada, Emi ; Yoshihara, Kiyoshi ; Ueda, Kenji ; Beppu, Teruhiko | 2008 | 72  | 1  | 204  | 211  | Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry                            |
| Early Development of the Clingfish, <i>Gobiesox strumosus</i> Cope  | Chesapeake science                             | Runyan, Suzanne  | 1961 | 2   | 3  | 113  | 141  | State of Maryland, Department of Research and Education, Chesapeake Biological Laboratory |
| Effect of epibiosis on the fitness of the sandy shore snail <i>Batillaria zonalis</i> in Hong Kong  | Marine biology                                 | Chan, Damgy H. L. ; Chan, Benny K. K.  | 2005 | 146 | 4  | 695  | 705  | Springer-Verlag   |
| Effect of grass&ndash;clover forage and whole-wheat feeding on the sensory quality of eggs  | Journal of the science of food and agriculture | Horsted, Klaus ; Hammersh&oslash;slash;j, Marianne ; Allesen-Holm, Bodil H   | 2010 | 90  | 2  | 343  | 348  | John Wiley & Sons, Ltd.   |
| Effect of oyster shell substituted for fine aggregate on concrete characteristics: Part I. Fundamental properties                                   | Cement and concrete research                   | Yang, E.I. ; Yi, S.T. ; Leem, Y.M.   | 2005 | 35  | 11 | 2175 | 2182 | Pergamon Press ; Elsevier Science Ltd   |
| Effect of partial replacement of sand with dry oyster shell on the long-term performance of concrete  | Construction & building materials              | Yang, E.I. ; Kim, M.Y. ; Park, H.G. ; Yi, S.T.   | 2010 | 24  | 5  | 758  | 765  | Butterworth Scientific ; Elsevier Science Ltd   |

|   |   |   |      |     |   |      |      |   |
|---|---|---|------|-----|---|------|------|---|
| Effect of reduced pH on shells of brooded veligers in the estuarine bivalve <i>Ostrea chilensis</i> Philippi 1845   | Journal of experimental marine biology and ecology  | Chaparro, O.R. ; Montory, J.A. ; Segura, C.J. ; Pechemik, J.A.      | 2009 | 377 | 2 | 107  | 112  | North-Holland Pub. Co. ; Elsevier Science Pub. Co |
| Effect of water temperature and chlorophyll abundance on shell growth of the Japanese pearl oyster, <i>Pinctada fucata martensii</i> , in suspended culture at different depths and sites | Aquaculture research  | Tomaru, Y ; Kumatabara, Y ; Kawabata, Z ; Nakano, S                 | 2002 | 33  | 2 | 109  | 116  | Blackwell Science Ltd                             |
| Effects of a variety of calcium sources on mineral metabolism in anemic rats.   | Drug-nutrient interactions  | Greger, J L ; Krashoc, C L  | 1988 | 5   | 4 | 387  | 394  | Alan R. Liss                                      |
| Effects of an oil spill on some organisms living on mangrove ( <i>Rhizophora mangle</i> L.) roots in low wave-energy habitats in Caribbean Panama   | Marine environmental research   | Garrity, S.D. ; Levings, S.C.                                       | 1993 | 35  | 3 | 251  | 271  | Applied Science Publishers ; Elsevier Science Ltd |
| Effects of high pressure treatment on physicochemical characteristics of fresh oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> )   | Innovative food science & emerging technologies : IFSET : the official scientific journal of the European Federation of Food Science and Technology | Cruz-Romero, M. ; Smiddy, M. ; Hill, C. ; Kerry, J.P. ; Kelly, A.L. | 2004 | 5   | 2 | 161  | 169  | Elsevier Science                                  |
| Effects of the winter Monsoon on the growth, mortality, and metabolism of adult oysters in Kimmen Island, Taiwan  | Aquaculture   | Huang, S.C. ; Hsieh, H.L. ; Chen, C.P.                              | 2006 | 251 | 2 | 256  | 270  | Elsevier Scientific Pub. Co                       |
| Effects of Water-Soluble Calcium Supplements Made from Eggshells and Oyster Shells on the Calcium Metabolism of Growing Rats  | Journal of food science and nutrition   | Jang, Se-Young ; Jeong, Yong-Jin ; Kwon, Taeg-Kyu ; Seo, Ji-Hyung   | 2010 | 15  | 1 | 78   | 82   | The Korean Society of Food Science and Nutrition  |
| Effects of water-soluble calcium supplements made from eggshells and oyster shells on the calcium metabolism of growing rats /  | Nutraceuticals and food   | Jang, Se-Young ; Jeong, Yong-Jin ; Kwon, Taeg-Kyu ; Seo, Ji-Hyung   | 2010 | 15  | 1 | 78   | 82   | The Korean Society of Food Science and Nutrition  |
| Element concentrations in shell of <i>Pinctada margaritifera</i> from French Polynesia and  | Food chemistry  | Chang, F. ; Li, G. ; Haws, M. ; Niu, T.                             | 2007 | 104 | 3 | 1171 | 1176 | Applied Science Publishers ; Elsevier             |

|   |  |      |     |    |      |      |  |  |  |  |  |  |
|---|--|------|-----|----|------|------|--|--|--|--|--|--|
| evaluation for using as a food supplement   |  |      |     |    |      |      |  |  |  |  |  | Science Ltd                                      |
| Entobia exogytratum (Fric, 1883) from the Upper Cretaceous of the Bohemian Cretaceous Basin   | Vodrazka, Radek  | 2006 | 13  | 3  | 199  | 201  |  |  |  |  |  | Taylor & Francis                                 |
| Environmental impact of intertidal juvenile dungeness crab habitat enhancement: effects on bivalves and crab foraging rate              | Iribarne, O. ; Armstrong, D. ; Fernandez, M.                     | 1995 | 192 | 2  | 173  | 194  |  |  |  |  |  | North-Holland Pub. Co ; Elsevier Science Pub. Co |
| Epibiont organisms on oyster shells from Pakistan (Northern Arabian Sea)  | Siddiqui, G. ; Ahmed, M.   | 2001 | 33  | 3  | 237  | 242  |  |  |  |  |  | ZOOLOGICAL SOCIETY OF PAKISTAN                   |
| Epibiosis on cerith shells in a seagrass bed: correlation of shell occupant with epizoite distribution and abundance                    | Creed, J. C.   | 2000 | 137 | 5  | 775  | 782  |  |  |  |  |  | Springer-Verlag                                  |
| ESR Detection of Irradiated Seashells   | Raffi, J. ; Hasbany, C. ; Lesgards, G. ; Ochin, D.               | 1996 | 47  | 11 | 1633 | 1636 |  |  |  |  |  | Pergamon Press ; Elsevier Science Ltd            |
| Evaluating Sediment Accretion on a Relic Oyster Reef in Mobile Bay, Alabama   | Saoud, Imad G. ; Rouse, David B.                                 | 2000 | 10  | 3  | 41   | 49   |  |  |  |  |  | Taylor & Francis                                 |
| Evaluation of calcium binding by molluscan shell organic matrix and its relevance to biomineralization                                  | Wheeler, A.P. ; Rusenko, K.W. ; George, J.W. ; Sikes, C.S.       | 1987 | 87  | 4  | 953  | 960  |  |  |  |  |  | Elsevier   |
| Evaluation of growing methods for use in a Sydney rock oyster Saccostrea commercialis (Iredale and Roughley) selective breeding program | Smith, I.R. ; Sheridan, A.K. ; Nell, J.A.                        | 1995 | 131 | 3  | 189  | 195  |  |  |  |  |  | Elsevier Scientific Pub. Co                      |
| Excavating sponges that are destructive to farmed pearl oysters in Western and Northern Australia                                       | Fromont, Jane ; Craig, Robert ; Rawlinson, Luisa ; Alder, Jackie | 2005 | 36  | 2  | 150  | 162  |  |  |  |  |  | Blackwell Science Ltd                            |
| Experimental assessment of oyster transfers   | Mineur, F. ; Belsher, T. ;                                       | 2007 | 137 | 2  | 237  | 247  |  |  |  |  |  | Applied Science                                  |

|  |  |   |      |     |   |     |     |  |  |   |
|--|--|---|------|-----|---|-----|-----|--|--|---|
| as a vector for macroalgal introductions   | conservation                                       | Johnson, M.P. ; Maggs, C.A. ; Verlaque, M.                |      |     |   |     |     |  |  | Publishers ; Elsevier Science Ltd ; Elsevier Science Pub. Co                              |
| Experimental deepwater Sydney rock oyster commercialis=Saccostrea cucullata) - I. Growth of vertical clumps of oysters (ten)   | Aquaculture  | Wisely, B. ; Holliday, J.E. ; Reid, B.L.                  | 1979 | 16  | 2 | 127 | 140 |  |  | Elsevier Scientific Pub. Co   |
| Experimental separation of effects of consumers on sessile prey in the low zone of a rocky shore in the Bay of Panama: direct and indirect consequences of food web complexity | Journal of experimental marine biology and ecology | Menge, B.A. ; Lubchenco, J. ; Ashkenas, L.R. ; Ramsey, F. | 1986 | 100 | 1 | 225 | 269 |  |  | North-Holland Pub. Co ; Elsevier Science Pub. Co  |
| Experimental spat collecting and growing of the oyster, Crassostrea rhizophorae guilding, in the Cienaga Grande de Santa Marta, Colombia                                       | Aquaculture  | Wedler, E.  | 1980 | 21  | 3 | 251 | 259 |  |  | Elsevier Scientific Pub. Co   |
| Facilitative effects of introduced Pacific oysters on native macroalgae are limited by a secondary invader, the seaweed Sargassum muticum                                      | Journal of sea research                            | Lang, A.C. ; Buschbaum, C.                                | 2010 | 63  | 2 | 119 | 128 |  |  | Netherlands Institute for Sea Research ; Elsevier Science Pub. Co                         |
| Factors Limiting Fecundity of Captive Brown-Headed Cowbirds  | The Condor   | Holford, Kenneth C. ; Roby, Daniel D.                     | 1993 | 95  | 3 | 536 | 545 |  |  | Cooper Ornithological Society   |
| Feeding ability during settlement and metamorphosis in the oyster Crassostrea virginica (Gmelin, 1791) and the effects of hypoxia on post-settlement ingestion rates           | Journal of experimental marine biology and ecology | Baker, S.M. ; Mann, R.                                    | 1994 | 181 | 2 | 239 | 253 |  |  | North-Holland Pub. Co ; Elsevier Science Pub. Co  |
| Field Studies of Shell Regrowth as a Bioindicator of Eastern Oyster (Crassostrea virginica Gmelin) Response to 2,4-D BEE in Maryland Tidewaters                                | Chesapeake science                                 | Rawls, Charles K.   | 1977 | 18  | 3 | 266 | 271 |  |  | State of Maryland, Department of Research and Education, Chesapeake Biological Laboratory |
| Flexibility of size of gills and palps in the Sydney rock oyster Saccostrea glomerata (Gould, 1850) and the Pacific oyster Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)                  | Journal of experimental marine biology and ecology | Honkoop, P.J.C. ; Bayne, B.L. ; Drent, J.                 | 2003 | 282 | 1 | 113 | 133 |  |  | North-Holland Pub. Co ; Elsevier Science Pub. Co  |
| Fluctuating asymmetry and mortality in   | Aquatic living                                     | Frechette, M. ; Goulettequer,                             | 2003 | 16  | 4 | 339 | 346 |  |  | Gauthier-Villars ;  |



|  |  |  |      |     |   |      |      |  |   |
|--|--|--|------|-----|---|------|------|--|---|
| cultured oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ) in Marennes-Oleron basin   | resources :<br>Ressources<br>vivantes aquatiques   | P. ; Daigle, G.  |      |     |   |      |      |  | Elsevier Science Ltd  |
| FLUORESCENCE FROM PEARLS AND SHELLS OF BLACK LIP OYSTER, PINCTADA MARGARITIFERA, AND ITS CONTRIBUTION TO THE DISTINCTION OF MOTHER OYSTERS USED IN PEARL CULTURE | Japanese journal of applied physics. Part 1, Regular papers & short notes                  | Miyoshi, Tadaki ; Matsuda, Yasunori ; Komatsu, Hiroshi | 1987 | 26  | 7 | 1069 | 1072 |  | Publication Board, Japanese Journal of Applied Physics                                    |
| FLUORESCENCE FROM PEARLS TO DISTINGUISH MOTHER OYSTERS USED IN PEARL CULTURE   | Japanese journal of applied physics. Part 1, Regular papers & short notes                  | Miyoshi, Tadaki ; Matsuda, Yasunori ; Komatsu, Hiroshi | 1987 | 26  | 4 | 578  | 581  |  | Publication Board, Japanese Journal of Applied Physics                                    |
| Food of the Oyster   | Botanical gazette  | Martin, G. W.  | 1923 | 75  | 2 | 143  | 169  |  | The University of Chicago Press   |
| Foraging ecology of the southern oyster drill <i>Thais haemastoma</i> (Gray): constraints on prey choice   | Journal of experimental marine biology and ecology   | Brown, K.M. ; Richardson, T.D.                         | 1988 | 114 | 2 | 123  | 141  |  | North-Holland Pub. Co ; Elsevier Science Pub. Co  |
| Fouling and predation; how do they affect growth and survival of the blacklip pearl oyster, <i>Pinctada margaritifera</i> , during nursery culture?              | Aquaculture international : journal of the European Aquaculture Society                    | Pit, Josiah H. ; Southgate, Paul C.                    | 2003 | 11  | 6 | 545  | 555  |  | Kluwer Academic Publishers  |
| Free choice feeding (whole-grain maize + complementary pellet concentrate + oyster shells) of pullets and laying hens in a hot climate                           | Revue d'écologie,levage et de m&eacute;decine v&eacute;t&eacute;rinaire des pays tropicaux | Yo, T. ; Picard, M. ; Guerin, H. ; Dauvilliers, P.     | 1995 | 48  | 1 | 67   |      |  | EXPANSION SCIENTIFIQUE FRANCAISE  |
| Further Observations on the Biology of the Sea Nettle and Jellyfishes in Chesapeake Bay  | Chesapeake science   | Cargo, David G. ; Schultz, Leonard P.                  | 1967 | 8   | 4 | 209  | 220  |  | State of Maryland, Department of Research and Education, Chesapeake Biological Laboratory |

|  |   |   |      |     |    |      |      |   |
|--|---|---|------|-----|----|------|------|---|
| Geo-environmental changes on the bohai bay muddy coast(II):results and discussions   | 第四紀研究=Quaternary sciences   | Wang, Hong  | 2003 | 23  | 4  | 393  | 403  | 科學出版社   |
| Gregarious Setting in the American Oyster <i>Crassostrea virginica</i> Gmelin  | Chesapeake science  | Hidi, Herbert   | 1969 | 10  | 2  | 85   | 92   | State of Maryland, Department of Research and Education, Chesapeake Biological Laboratory |
| Growth and mortality of oysters ( <i>Crassostrea virginica</i> ) on constructed intertidal reefs: effects of tidal height and substrate level            | Journal of experimental marine biology and ecology                      | Bartol, I.K. ; Mann, R. ; Luckenbach, M.  | 1999 | 237 | 2  | 157  | 184  | North-Holland Pub. Co. ; Elsevier Science Pub. Co   |
| Growth and survival of the pearl oyster <i>Pinctada imbricata</i> (R&ouml;uming 1758) in suspended and bottom culture in the Golfo de Cariaco, Venezuela | Aquaculture international : journal of the European Aquaculture Society | Lodeiros, C&eacute; ; Pico, Damelys ; Prieto, Antulio ; Narv&aacute;ez, Noelis ; Guerra, Alejandro              | 2002 | 10  | 4  | 327  | 338  | Kluwer Academic Publishers  |
| Growth of the native oyster <i>Ostrea angasi</i> using raft culture in Tasmania, Australia   | Aquaculture   | Dix, T.G.   | 1980 | 19  | 2  | 109  | 115  | Elsevier Scientific Pub. Co   |
| Heritability of shell pigmentation in the Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i>   | Aquaculture   | Evans, S. ; Camara, M.D. ; Langdon, C.J.  | 2009 | 286 | 3  | 211  | 216  | Elsevier Scientific Pub. Co   |
| High-frequency cycles in Upper-Miocene ramp-temperate carbonates (Sorbas Basin, SE Spain)  | Facies  | Puga-Bernab&eacute;u, &Aacute;ngel ; Braga, Juan C. ; Mart&iacute;n, Jos&eacute; ; M.                           | 2007 | 53  | 3  | 329  | 345  | Springer-Verlag   |
| Holocene raised shorelines on the Hatay coasts (Turkey): Palaeoecological and tectonic implications  | Marine geology  | Pirazzoli, P.A. ; Laborel, J. ; Saltege, J.F. ; Erol, O. ; Kayan, I. ; Person, A.                               | 1991 | 96  | 3  | 295  | 311  | Elsevier Scientific Pub. Co   |
| Hydrothermal manganese crusts from enarete and Palinuro Seamounts in the Tyrrhenian sea  | Marine georesources & geotechnology                                     | Eckhardt, J.-D. ; Glasby, G.P. ; Puchelt, H. ; Berner, Z.   | 1997 | 15  | 2  | 175  | 208  | Taylor & Francis Ltd  |
| Hydroxyapatite nano-powders produced hydrothermally from nacreous material   | Journal of the European Ceramic Society                                 | Lenos, A.F. ; Rocha, J.H.G. ; Quaresma, S.S.F. ; Kamnan, S. ; Oktar, F.N. ; Agathopoulos, S. ; Ferreira, J.M.F. | 2006 | 26  | 16 | 3639 | 3646 | Elsevier Science Publishers   |

|  |   |      |      |     |      |      |  |  |
|--|---|------|------|-----|------|------|--|--|
| Identification of a c-di-GMP-regulated polysaccharide locus governing stress resistance, biofilm and rugose colony formation in <i>Vibrio vulnificus</i> .                         | Guo, Yunzhi ; Rowe-Magnus, Dean A   | 2010 | 2010 |     |      |      |  | American Society for Microbiology        |
| Improved pearl quality and survival rate of operated-shells by using 1-year-old mother-shells of the pearl oyster, <i>Pinctada fucata martensii</i>                                | Iwanaga, Shunsuke ; Hirai, Masashi ; Hosokawa, Hidetsuyo                                      | 2008 | 56   | 1   | 73   | 79   |  | Suisan Z&omacr;shoku Danwakai            |
| Improved time control on Cretaceous coastal deposits: new results from Sr isotope measurements using laser ablation  | Burla, Stefan ; Oberli, Felix ; Heimhofer, Ulrich ; Wiechert, Uwe ; Weissert, Helmut          | 2009 | 21   | 5   | 401  | 409  |  | Blackwell Publishing Ltd                 |
| In vitro regulation of CaCO <sub>3</sub> crystal polymorphism by the highly acidic molluscan shell protein Aspein  | Takeuchi, T. ; Sarashina, I. ; Iijima, M. ; Endo, K.  | 2008 | 582  | 5   | 591  | 596  |  | North-Holland Pub ; Elsevier Science Ltd |
| Influence of food supply on the $\delta^{13}C$ signature of mollusc shells: implications for palaeoenvironmental reconstructions   | Lartaud, Franck ; Emmanuel, Laurent ; de Rafelis, Marc ; Pouvreau, Stephane ; Renard, Maurice | 2010 | 30   | 1   | 23   | 34   |  | Springer-Verlag                          |
| Influence of the parasite worm <i>Polydora</i> sp. on the behaviour of the oyster <i>Crassostrea gigas</i> : a study of the respiratory impact and associated oxidative stress     | Chambon, C. ; Legeay, A. ; Durrieu, G. ; Gonzalez, P. ; Ciret, P. ; Massabuau, J. -C.         | 2007 | 152  | 2   | 329  | 338  |  | Springer-Verlag                          |
| Inheritance of white coloration of the prismatic layer of shells in the Japanese pearl oyster, <i>Pinctada fucata martensii</i> , and its importance in the pearl culture industry | Wada, K.T.  | 1990 | 85   | 1   | 331  |      |  | Elsevier Scientific Pub. Co              |
| IN-SITU STUDY ON STRENGTH AND HYDRAULIC LOSSES OF FIBER REINFORCED PLASTIC PENSTOCK IN SEAWATER PUMPED STORAGE POWER PLANT   | TAKASHIMA, Kenji ; SATO, Kuniaki ; IWASHITA, Kazuyoshi  | 2005 | 2005 | 805 | 15   | 24   |  |  |
| Integrated constructed wetland systems employing alum sludge and oyster shells   | Park, W.H.  | 2009 | 35   | 8   | 1275 | 1282 |  | Elsevier Science                         |



|   | isheries  |   |      |      |       |     |     |  | FISHERIES                                 |
|---|---|---|------|------|-------|-----|-----|--|---|
| Microstructure of scallop and oyster shells infested with boring Polydora   | Bulletin of marine science  | Sato-Okoshi, W.   | 1997 | 60   | 2     | 622 |     |  | BULLETIN OF MARINE SCIENCE                |
| Microtexture of larval shell of oyster, Crassostrea nippona: A FIB-TEM study  | Journal of structural biology   | Kudo, M. ; Kameda, J. ; Saruwatari, K. ; Ozaki, N. ; Okano, K. ; Nagasawa, H. ; Kogure, T.                              | 2010 | 169  | 1     | 1   | 5   |  | Academic Press                            |
| Microtexture of larval shell of oyster, Crassostrea nippona: A FIB-TEM study.   | Journal of structural biology   | Kudo, Miki ; Kameda, Jun ; Saruwatari, Kazuko ; Ozaki, Noriaki ; Okano, Keiju ; Nagasawa, Hiromichi ; Kogure, Toshihiro | 2009 | 2009 |       |     |     |  | Academic Press                            |
| MICROTOPOGRAPHY AND ANTIFOULING PROPERTIES OF THE SHELL SURFACE OF THE BIVALVE MOLLUSCS MYTILUS galloprovincialis and PINCTADA IMBRICATA                                | Biofouling  | SCARDINO, ANDREW ; DE NYS, ROCKY ; ISON, ODETE ; O'CONNOR, WAYNE ; STEINBERG, PETER                                     | 2003 | 19   | suppl | 221 | 230 |  | Taylor & Francis                          |
| Mineral Metabolism of Aging Female Rats Fed Various Commercially Available Calcium Supplements or Yogurt  | Pharmaceutical research   | Behling, Alison R. ; Greger, Janet L.   | 1988 | 5    | 8     | 501 | 505 |  | Kluwer Academic/Plenum Publishers         |
| Mn labelling of living oysters: Artificial and natural cathodoluminescence analyses as a tool for age and growth rate determination of C. gigas (Thunberg, 1793) shells | Aquaculture   | Lartaud, F. ; de Rafelis, M. ; Ropert, M. ; Emmanuel, L. ; Geairon, P. ; Renard, M.                                     | 2010 | 300  | 1     | 206 | 217 |  | Elsevier Scientific Pub. Co               |
| Molluscan biomineralization: The proteinaceous shell constituents of Pinna nobilis L.   | Materials science & engineering. C, Biomimetic and supramolecular systems | Marin, F. ; Luquet, G.  | 2005 | 25   | 2     | 105 | 111 |  | Elsevier                                  |
| Monitoring and assesment of butyltins in Atlantic coastal waters  | Marine pollution bulletin   | Alzieu, C. ; Sanjuan, J. ; Michel, P. ; Borel, M. ; Dreno, J.P.   | 1989 | 20   | 1     | 22  | 26  |  | Macmillan Journals ; Elsevier Science Ltd |
| Multifrequency EPR Study of Carbonate- and Sulfate-Derived Radicals Produced by Radiation in Shells and Corallite   | Radiation research  | Strzelezak, G. ; Vanhaelewyn, G. ; Stachowicz, W. ; Goovaerts, E. ; Callens, F. ; Michalik, J                           | 2001 | 155  | 4     | 619 | 624 |  | Radiation Research Society                |

|   |  |      |     |   |      |      |   |
|---|--|------|-----|---|------|------|---|
| Mussel Watch: a review of Cu and other metals in various marine organisms in Taiwan, 1991-98            | Jeng, M.-S. ; Jeng, W.-L. ; Hung, T.-C. ; Yeh, C.-Y. ; Tseng, R.-J. ; Meng, P.-J. ; Han, B.-C. | 2000 | 110 | 2 | 207  | 215  | Elsevier Applied Science Publishers   |
| Natural Selection in a Cretaceous Oyster  | Sambol, Melvin ; Finks, Robert M.  | 1977 | 3   | 1 | 1    | 16   | Paleontological Society   |
| New Bryozoa from the Fox Hills Sandstone (Upper Cretaceous, Maestrichtian) of North Dakota              | Cuffey, Roger J. ; Feldmann, Rodney M. ; Pohlable, Ken E.                                      | 1981 | 55  | 2 | 401  | 409  | Society of Economic Paleontologists and Mineralogists and the Paleontological Society     |
| Noninvasive characterization of gonad maturation and determination of the sex of Pacific oysters by MRI | Davenel, A. ; Quellec, S. ; Pouvreau, S.   | 2006 | 24  | 8 | 1103 | 1110 | Pergamon Press  |
| Notes on the Biology of the Sea Nettle, Chrysaora quinquecirrha, in Chesapeake Bay                      | Cargo, David G. ; Schultz, Leonard P.  | 1966 | 7   | 2 | 95   | 100  | State of Maryland, Department of Research and Education, Chesapeake Biological Laboratory |
| Nutritional and environmental factors involved in egg shell quality of laying hens                      | Grizzle, J. ; Iheanacho, M. ; Saxton, A. ; Broaden, J.   | 1992 | 33  | 4 | 781  | 794  | Taylor & Francis  |
| Occurrence and taphonomy of bivalves from the Nijar reef (Messinian, Late Miocene, SE Spain)            | Jimenez, A.P. ; Braga, J.C.  | 1993 | 102 | 3 | 239  | 251  | Elsevier  |
| ON THE NORTHWEST COAST OF BOHAI BAY   | Fan, Changfu ; Gao, Shu ; Wang, Hong   | 2006 | 26  | 5 | 27   | 35   | 科學出版社   |
| Organotin accumulation in oysters and rock shells under field conditions                                | Tang, Chuan-Ho ; Wang, Wei-Hsien   | 2009 | 11  | 9 | 1601 | 1607 | The Royal Society of Chemistry  |
| Organotins and imposex in the rock shell, Thais clavigera, from oyster mariculture areas in Taiwan      | Hung, T.-C. ; Hsu, W.-K. ; Mang, P.-J. ; Chuang, A.  | 2001 | 112 | 2 | 145  | 152  | Elsevier Applied Science Publishers   |
| Origin of the Grayson Micromorph Fauna (Upper Cretaceous) of North-Central Texas                        | Mancini, Ernest A.   | 1978 | 52  | 6 | 1294 | 1314 | Society of Economic Paleontologists and Mineralogists and the                             |

|   |  |   |      |     |   |     |     |  |                         |
|---|--|---|------|-----|---|-----|-----|--|-------------------------|
| Oxygen and carbon isotope study of the Holocene oyster reefs and paleoenvironmental reconstruction on the northwest coast of Bohai Bay, China   | Marine geology   | Wang, H. ; Keppens, E. ; Nielsen, P. ; van Riet, A.                               | 1995 | 124 | 1 | 289 | 302 | Elsevier Scientific Pub. Co                                  | Paleontological Society |
| Oxygen and carbon isotopes in Jordanian phosphorites and associated fossils   | Journal of Asian earth sciences  | Sadaqah, R.M. ; Abed, A.M. ; Grimm, K.A. ; Pufahl, P.K.                           | 2007 | 29  | 5 | 803 | 812 | Elsevier Science Ltd ; Pergamon                              |                         |
| OXYSTER (CRASSOSTREA VIRGINICA) SHELL THERMAL CONDUCTIVITY: TECHNIQUE AND DETERMINATION   | Transactions of the ASAE   | Tulshian, Neera ; Wheaton, Fredrick   | 1986 | 29  | 2 | 626 | 632 | American Society of Agricultural Engineers]                  |                         |
| Oyster reef community interactions: The effect of resident fauna on oyster (Crassostrea spp.) larval recruitment  | Journal of experimental marine biology and ecology   | Barnes, B.B. ; Luekenbach, M.W. ; Kingsley-Smith, P.R.                            | 2010 | 391 | 1 | 169 | 177 | North-Holland Pub. Co ; Elsevier Science Pub. Co             |                         |
| OYSTER REEFS RESPONSE TO THE REGIONAL NEOTECTONICS AND EUSTATIC SEA-LEVEL, NORTHWEST COAST OF BOHAI BAY   | 第四紀研究=Quaternary sciences  | Fan, Changfu ; Wang, Hong ; Li, Jianfen ; Pei, Yandong ; Wang, Fu ; Shang, Zhiwen | 2005 | 25  | 2 | 235 | 244 | 科學出版社  |                         |
| Oyster shell as substitute for aggregate in mortar.   | Waste management & research : the journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA | Yoon, Hyunsuk ; Park, Sangkyu ; Lee, Kiho ; Park, Junbourn                        | 2004 | 22  | 3 | 158 | 170 | Academic Press ; Munksgaard                                  |                         |
| Oyster Shell Recycling and Bone Waste Treatment Using Plasma Pyrolysis  | Plasma science & technology  | Chae, Jae Ou ; Knak, S P ; Knak, A N ; Koo, H J ; Ravi, V                         | 2006 | 8   | 6 | 712 | 715 | Institute of Plasma Physics, the Chinese Academy of Sciences |                         |
| Oyster Shell Size and the Selection of Spawning Sites by Chasmodes bosquianus, Hyppleurochilus geminatus, Hypsoblennius ionthas (Pisces, Blenniidae) and Gobiosoma bosci (Pisces, Gobiidae) in Two South Carolina Estuaries | Estuaries  | Crabtree, Roy E. ; Middaugh, Douglas P.   | 1982 | 5   | 2 | 150 | 155 | Estuarine Research Federation                                |                         |

|   |   |  |      |      |   |     |     |                                       |
|---|---|--|------|------|---|-----|-----|---------------------------------------|
| Oyster Shells   | The Literary review   | Keppel, Tim  | 1985 | 29   | 1 | 55  | 64  | Fairleigh Dickinson University        |
| Oysters Produce an Organic-Inorganic Adhesive for Intertidal Reef Construction.   | Journal of the American Chemical Society  | Burkett, Jeremy R ; Hight, Lauren M ; Kenny, Paul ; Wilker, Jonathan J   | 2010 | 2010 |   |     |     | American Chemical Society]            |
| Oysters Produce an Organic-Inorganic Adhesive for Intertidal Reef Construction.   | Journal of the American Chemical Society  | Burkett, Jeremy R ; Hight, Lauren M ; Kenny, Paul ; Wilker, Jonathan J   | 2010 | 2010 |   |     |     | American Chemical Society]            |
| Palaeosalinity variations in the Early Cretaceous of the Neuquen Basin, Argentina: Evidence from oxygen isotopes and palaeoecological analysis  | Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology   | Lazo, D.G. ; Aguirre-Urreta, M.B. ; Price, G.D. ; Rawson, P.F. ; Ruffell, A.H. ; Ogle, N.  | 2008 | 260  | 3 | 477 | 493 | Elsevier                              |
| Paralytic toxicity in the ribbon worm Cephalothrix species (Nemertea) in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan and the isolation of tetrodotoxin as a main component of its toxins | Toxicon   | Asakawa, M. ; Toyoshima, T. ; Ito, K. ; Bessho, K. ; Yamaguchi, C. ; Tsunetsugu, S. ; Shida, Y. ; Kajihara, H. ; Mawatari, S.F. ; Noguchi, T. ; Miyazawa, K. | 2003 | 41   | 7 | 747 | 753 | Pergamon Press ; Elsevier Science Ltd |
| Part of Two Letters from Dr James Brewer to Dr Sloane, concerning Beds of Oyster-Shells Found Near Reading in Berkshire   | Philosophical transactions  | Brewer, James  | 1701 | 22   |   | 484 | 486 | The Royal Society                     |
| Permeability characteristics of dredged sludges mixed with crushed oyster shells  | Coastal geotechnical engineering in practice  | Lee, K. H. ; Kazama, M. ; Yanagisawa, E. ; Terada, K.  | 2002 | 2000 |   | 63  | 66  | Balkema,                              |
| Phosphorus adsorption characteristics of oyster shells and alum sludge and their application for nutrient control in constructed wetland system   | Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering | Park, W. H. ; Polprasert, C.   | 2008 | 43   | 5 | 511 | 517 | Taylor & Francis                      |
| Photoacoustic determination of the thermal properties of bivalve mollusk shells   | Marine biology  | G&oacute;mez-Mart&iacute;nez, O. ; Aldana-Aranda, D. ; Quintana, P. ; Pichardo, J. L. ; Alvarado-Gil, J. J.  | 2002 | 141  | 5 | 911 | 914 | Springer-Verlag                       |
| PIXE-method determination of the  | Nuclear   | Kuisma-Kursula, P. ;   | 1995 | 95   | 4 | 523 | 526 | North-Holland                         |



|   |  |  |      |     |    |     |     |  |  |   |
|---|--|--|------|-----|----|-----|-----|--|--|---|
| elemental composition of the European oyster <i>Ostrea edulis</i>   | instruments & methods in physics research. Section B, Beam interactions with materials and atoms | Donner, J. ; Raisanen, J.  |      |     |    |     |     |  |  | Physics Pub                                       |
| Pliocene channel deposits of oyster shells in the Salton Trough region, California  | Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology  | Watkins, R.  | 1990 | 79  | 3  | 249 | 262 |  |  | Elsevier  |
| Pollution related differences in the condition cycles of pacific oysters <i>Crassostrea gigas</i> from Manukau Harbour, New Zealand | Marine environmental research  | Roper, D.S. ; Pridmore, R.D. ; Cummings, V.J. ; Hewitt, J.E.                                     | 1991 | 31  | 3  | 197 | 214 |  |  | Applied Science Publishers ; Elsevier Science Ltd |
| Population dynamics of the oyster <i>Crassostrea rhizophorae</i> from the Cienaga Grande de Santa Marta, Colombia                   | Fisheries research   | Mancera, E. ; Mendo, J.  | 1996 | 26  | 1  | 139 | 148 |  |  | Elsevier Scientific Pub. Co                       |
| Possible effects of organotins on scallop recruitment   | Marine pollution bulletin  | Minchin, D. ; Duggan, C.B. ; King, W.  | 1987 | 18  | 11 | 604 | 608 |  |  | Macmillan Journals ; Elsevier Science Ltd         |
| Practical Use of Seafood Processing By-Products (Shells) to the Creation of Fishing Grounds   | 水産工學=Fisheries engineering   | TORII, Masaya  | 2008 | 44  | 3  | 205 | 209 |  |  | 日本水産工學會   |
| Precipitation of aragonite by calcitic bivalves in Mg-enriched marine waters  | Marine biology   | Checa, Antonio G. ; Jimenez-Lopez, Concepcion ; Rodriguez-Navarro, Alejandro ; Machado, Jorge P. | 2007 | 150 | 5  | 819 | 827 |  |  | Springer-Verlag                                   |
| Precipitation of iron in windowpane oyster shells by marine shell-boring Cyanobacteria  | Geomicrobiology journal  | Raghukumar, Chandralata ; Rao, V. P. C. ; Iyer, S. D.  | 1989 | 7   | 4  | 235 | 244 |  |  | Taylor & Francis                                  |
| Preparation of Oyster Functional Oligopeptides and Its ACE Inhibition Capability  | 無錫輕工大學學報. Journal of Wuxi University of Light Industry. 食品與生物技術                                  | Yu, Ya ; Yang, Ruijin ; Wang, Zhang  | 2004 | 23  | 2  | 49  | 52  |  |  | 無錫輕工大學學報編輯部                                       |

|  |  |  |      |     |   |      |      |                                       |
|--|--|--|------|-----|---|------|------|---------------------------------------|
| Presence of Protein Complex is Prerequisite for Aragonite Crystallization in the Nacreous Layer  | Marine biotechnology   | Matsushiro, Aizo ; Miyashita, Tomoyuki ; Miyamoto, Hiroshi ; Morimoto, Kohichi ; Tonomura, Ben&apos;ichiro ; Tanaka, Akio ; Sato, Koki | 2003 | 5   | 1 | 37   | 44   | Springer-Verlag                       |
| Preserved Ligament in a Radiolitic Rudist Bivalve and its Implication of Mantle Marginal Feeding in the Group                              | Paleobiology   | Skelton, Peter W.  | 1979 | 5   | 2 | 90   | 106  | Paleontological Society               |
| Pristine or altered: low-Mg calcite shells survived from massive dolomitization? A case study from Miocene carbonates                      | Geo-marine letters   | Lu, Feng H.  | 2008 | 28  | 5 | 339  | 349  | Springer-Verlag                       |
| Probing for heavy element impurities in the shell of the Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> , with nuclear microscopy                | Nuclear instruments & methods in physics research. Section B, Beam interactions with materials and atoms | Markwitz, A. ; Barry, B. ; Gauldie, R.W. ; Roberts, R.D.   | 2003 | 210 |   | 418  | 423  | North-Holland Physics Pub             |
| <i>Proctoees</i> sp. (Trematoda: Digenea) in the American Oyster, <i>Crassostrea virginica</i>   | Transactions of the American Microscopical Society   | Winstead, James T. ; Couch, John A.  | 1981 | 100 | 3 | 296  | 305  | American Microscopical Society        |
| Proton microprobe studies of fluorine distributions in mollusc shells  | Nuclear instruments & methods in physics research. Section B, Beam interactions with materials and atoms | Coote, G.E. ; Trompeter, W.J.  | 1995 | 104 | 1 | 333  | 338  | North-Holland Physics Pub             |
| Quali-quantitative characterization and wastewater treatment of a winery located in the mid-west of Santa Catarina state, South of Brazil. | Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research     | Ortigara, A R C ; Sezerino, P H ; Bento, A P ; Scaratti, D   | 2009 | 60  | 4 | 1025 | 1031 | Pergamon Press ; Elsevier Science Ltd |
| Quantifying sponge erosions in Western   | Aquaculture  | Daume, Sabine ; Fromont,   | 2010 | 41  | 9 | e260 | e267 | Blackwell Publishing                  |

|  |   |  |      |      |    |            |      |  |
|--|---|--|------|------|----|------------|------|--|
| Australian pearl oyster shells   | research  | Jane ; Parker, Fiona ; Davidson, Mark ; Murphy, David ; Hart, Anthony                      | 1995 | 1995 | 32 | 372        | 379  | Ltd  |
| Radiometric Dating of Late Quaternary Sea Levels of the Saurashtra Coast, Western India: an Experiment with Oyster and Clam Shells   | Memoir ; Geological Society of India              | Juyal, N. ; Pant, R. K. ; Bhushan, R. ; Somayajulu, B. L. K.                               | 1995 | 1995 | 6  | 2230       | 2234 | GEOLOGICAL SOCIETY OF INDIA  |
| Rapid detection of toxic metals in non-crushed oyster shells by portable X-ray fluorescence spectrometry   | Environmental pollution                           | Chou, J. ; Clement, G. ; Bursavich, B. ; Elbers, D. ; Cao, B. ; Zhou, W.                   | 2010 | 158  | 6  | 2230       | 2234 | Elsevier Applied Science Publishers  |
| Rapid detection of toxic metals in non-crushed oyster shells by portable X-ray fluorescence spectrometry.  | Environmental pollution                           | Chou, Ju ; Clement, Garret ; Bursavich, Bradley ; Elbers, Don ; Cao, Baobao ; Zhou, Weilie | 2010 | 2010 | 1  | 45         | 67   | Elsevier Applied Science Publishers  |
| Recent innovations in cultivation of molluscs in French Polynesia  | Aquaculture                                       | Coeroli, M. ; De Gaillande, D. ; Landret, J.P. ; AQUACOP                                   | 1984 | 39   | 1  | 45         | 67   | Elsevier Scientific Pub. Co  |
| Reconstructing estuarine conditions: oyster shells as recorders of environmental change, Southwest Florida   | Estuarine, coastal and shelf science              | Surge, D.M. ; Lohmann, K.C. ; Goodfriend, G.A.   | 2003 | 57   | 5  | 737        | 756  | Academic Press in association with the Estuarine and Brackish-water Sciences Association |
| Reconstruction of late Bajocian-Bathonian marine palaeoenvironments using carbon and oxygen isotope ratios of calcareous fossils from the Polish Jura Chain (central Poland) | Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology | Wierzbowski, H. ; Joachimski, M.   | 2007 | 254  | 3  | 523        | 540  | Elsevier   |
| Recycling waste oyster shells for eutrophication control   | Resources, conservation, and recycling            | Kwon, H.-B. ; Lee, C.-W. ; Jun, B.-S. ; Yun, J.-d. ; Weon, S.-Y. ; Koopman, B.             | 2004 | 41   | 1  | 75         | 82   | Elsevier ; Pergamon  |
| RED MUD EM DASH ALUMINA WASTE IS SOURCE OF USABLE IRON   | Chilton's iron age                                | Weimer, George A.  | 1979 | 222  | 21 | mp11, mp13 |      |  |
| Reductions in TBT concentrations in UK estuaries following legislation in 1986 and 1987  | Marine environmental research                     | Waite, M.E. ; Waldoock, M.J. ; Thain, J.E. ; Smith, D.J. ; Milton, S.M.                    | 1991 | 32   | 1  | 89         | 111  | Applied Science Publishers ; Elsevier Science Ltd  |
| Relation between mechanochemical   | Journal of  | Tongamp, William ; Kano,   | 2009 | 11   | 1  | 32         | 37   | Springer Japan   |

|   |  |   |      |     |    |     |     |   |
|---|--|---|------|-----|----|-----|-----|---|
| dechlorination rate of polyvinyl chloride and mill power consumption  | material cycles and waste management : official journal of the Japan Society of Waste Management Experts | Junya ; Suzuta, Yuichiro ; Saito, Fumio ; Themelis, Nickolas J.                         | 2006 | 62  | 4  | 301 | 314 | Applied Science Publishers ; Elsevier Science Ltd   |
| Relative importance of hydrocarbon pollutants, salinity and tidal height in colonization of oyster reefs  | Marine environmental research  | Hulathduwa, Y.D. ; Brown, K.M.  | 1963 | 3   |    | 253 | 266 | Pergamon Press  |
| Remarks on C14 dating of shell material in sea sediments  | Progress in oceanography   | Olsson, I.U. ; Gosta Eriksson, K.   | 2005 | 80  | 3  | 356 | 358 | John Wiley & Sons, Ltd.   |
| Removal of phosphate by adsorption onto oyster shell powder&mdash;kinetic studies   | Journal of chemical technology and biotechnology   | Namasivayam, C ; Sakoda, A ; Suzuki, M  | 2005 | 80  | 3  | 356 | 358 | John Wiley & Sons, Ltd.   |
| Removal of phosphate by adsorption onto oyster shell powder&mdash;kinetic studies   | Journal of chemical technology and biotechnology   | Namasivayam, C ; Sakoda, A ; Suzuki, M  | 2005 | 80  | 3  | 356 | 358 | John Wiley & Sons, Ltd.   |
| Response of an Estuarine Benthic Community to Application of the Pesticide Carbaryl and Cultivation of Pacific Oysters (Crassostrea gigas) in Willapa Bay, Washington | Marine pollution bulletin  | Dumbauld, B.R. ; Brooks, K.M. ; Posey, M.H.   | 2001 | 42  | 10 | 826 | 844 | Macmillan Journals · Elsevier Science Ltd   |
| Reuse of waste oyster shells as a SO&#x2082;/NOx removal absorbent  | Journal of industrial and engineering chemistry : Seoul, Korea   | Jung, Jong-hyeon ; Yoo, Kyung-seun ; Kim, Hyun-gyu ; Lee, Hyung-keun ; Shon, Byung-hyun | 2007 | 13  | 4  | 512 | 517 | The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry                                |
| Roles of oyster shells in an integrated constructed wetland system designed for P removal   | Ecological engineering   | Park, W.H. ; Polprasert, C.   | 2008 | 34  | 1  | 50  | 56  | Elsevier Science  |
| Seashells: Detoxifying Agents for Metal-Contaminated Waters   | Water, air, and soil pollution   | Tudor, Helen E. A. ; Gryte, Carl C. ; Harris, Colin C.                                  | 2006 | 173 | 1  | 209 | 242 | Springer Netherlands  |
| Seasonal Fouling and Oyster Settling on Asbestos Plates in Broad Creek, Talbot County, Maryland, 1963-65  | Chesapeake science   | Shaw, William N.  | 1967 | 8   | 4  | 228 | 236 | State of Maryland, Department of Research and Education, Chesapeake Biological Laboratory |

|  |  |      |     |   |      |     |  |
|--|--|------|-----|---|------|-----|--|
| Separation and determination of amino acids in oyster shells by micellar electrokinetic chromatography   | Wang, Yuan ; Yuan, Zhuobin   | 2003 | 22  | 5 | 73   | 75  | 北京大學出版社  |
| Shell deposits and shell preservation in quaternary and tertiary estuarine sediments in Georgia, U.S.A.  | Wiedemann, H.U.  | 1972 | 7   | 2 | 103  | 125 | Elsevier Scientific Pub. Co.]                    |
| Shell disease in eastern oysters, <i>Crassostrea virginica</i> , reared in France  | Renault, T.; Chollet, B.; Cochenne, N.; Gerard, A.   | 2002 | 79  | 1 | 1    | 6   | Academic Press                                   |
| Shell dynamics and microhabitat selection by striped legged hermit crabs, <i>Clibanarius vittatus</i> (Bosc)   | Rittschof, D.; Sarrica, J.; Rubenstein, D.   | 1995 | 192 | 2 | 157  | 172 | North-Holland Pub. Co ; Elsevier Science Pub. Co |
| Shell layers of <i>Ostrea edulis</i> as an environmental indicator of TBT pollution: the contribution of surface techniques                          | Medakovi&acute;acacutec;, Davorin ; Traverso, Pierluigi ; Bottino, Carlo ; Popovi&acute;acacutec;,, Stanko | 2006 | 38  | 4 | 313  | 316 | John Wiley & Sons, Ltd.                          |
| Shell repair as a reliable indicator of bivalve predation by shell-wedging gastropods in the fossil record   | Dietl, G.P.; Durham, S.R.; Kelley, P.H.  | 2010 | 296 | 1 | 174  | 184 | Elsevier   |
| Shell repair process in the green ormer <i>Haliotis tuberculata</i> : A histological and microstructural study                                       | Fleury, C.; Marin, F.; Marie, B.; Luquet, G.; Thomas, J.; Josse, C.; Serpentine, A.; Lebel, J.M.           | 2008 | 40  | 3 | 207  | 218 | Oliver & Boyd                                    |
| Shellfish face uncertain future in high CO2 world: influence of acidification on oyster larvae calcification and growth in estuaries.                | Miller, A Whitman ; Reynolds, Amanda C ; Sobrino, Cristina ; Riedel, Gerhardt F                            | 2009 | 4   | 5 | 5661 |     |  |
| Shematin: A family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster <i>Pinctada fucata</i>                                       | Yano, M.; Nagai, K.; Morimoto, K.; Miyamoto, H.  | 2006 | 144 | 2 | 254  | 262 | Pergamon ; Elsevier                              |
| Short-term effects on productivity and egg quality in nutrient-restricted versus non-restricted organic layers with access to different forage crops | Horsted, Klaus ; Hammersh&oslash;slash;,j, Marianne ; Hermansen, John E.                                   | 2006 | 56  | 1 | 42   | 54  | Taylor & Francis                                 |

|  |   |  |      |      |   |      |      |  |
|--|---|--|------|------|---|------|------|--|
| Site-specific success of three transplanting methods and the effect of planting time on the establishment of <i>Zostera marina</i> transplants | Marine pollution bulletin                                       | Park, J.I. ; Lee, K.S.   | 2007 | 54   | 8 | 1238 | 1248 | Macmillan Journals ; Elsevier Science Ltd                                    |
| Sources of CO <sub>2</sub> evasion from two subtropical rivers in North America  | Biogeochemistry   | Zeng, Fan-Wei ; Masiello, Caroline A.  | 2010 | 100  | 1 | 211  | 225  | Springer Netherlands   |
| Spatial and temporal patterns of <i>Crassostrea virginica</i> (Gmelin) recruitment: relationship to scale and substratum                       | Journal of experimental marine biology and ecology              | Michener, W.K. ; Kenny, P.D.   | 1991 | 154  | 1 | 97   | 121  | North-Holland Pub. Co ; Elsevier Science Pub. Co                             |
| Spawning grounds and nests of <i>Trachidermus fasciatus</i> (Cottidae) in the Kashima and Shiota estuaries system facing Ariake Bay, Japan     | Ichthyological research   | Onikura, Norio ; Takeshita, Naohiko ; Matsui, Seitchi ; Kimura, Seiro  | 2002 | 49   | 2 | 198  | 201  | Springer-Verlag Tokyo  |
| Spines and epibionts as antipredator defenses in the thorny oyster <i>Spondylus americanus</i> Hermann   | Journal of experimental marine biology and ecology              | Feifarek, B.P.   | 1987 | 105  | 1 | 39   | 56   | North-Holland Pub. Co ; Elsevier Science Pub. Co                             |
| Spionid polychaete infestations of intertidal pacific oysters <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg), Mahurangi Harbour, northern New Zealand     | Aquaculture   | Handley, S.J. ; Bergquist, P.R.  | 1997 | 153  | 3 | 191  | 205  | Elsevier Scientific Pub. Co  |
| Sr-isotope stratigraphy of the Upper Jurassic of central Portugal (Lusitanian Basin) based on oyster shells                                    | International journal of earth sciences ; Geologische Rundschau | Schneider, Simon ; F&uuml;rsich, Franz T. ; Werner, Winfried   | 2009 | 98   | 8 | 1949 | 1970 | Springer-Verlag  |
| Stabilization of Pb and Cd contaminated soils and soil quality improvements using waste oyster shells.   | Environmental geochemistry and health                           | Ok, Yong Sik ; Lim, Jung Eun ; Moon, Deok Hyun   | 2010 | 2010 |   |      |      | Science and Technology Letters ; Chapman & Hall ; Kluwer Academic Publishers |
| Stable Isotope Sclerochronology of Pleistocene and Recent Oyster Shells ( <i>Crassostrea virginica</i> )                                       | Palaos  | Kirby, M. X. ; Soniat, T. M. ; Spero, H. J.  | 1998 | 13   | 6 | 560  | 569  | SEPM SOCIETY FOR SEDIMENTARY GEOLOGY   |
| Stone-tool usage by Thai long-tailed macaques ( <i>Macaca fascicularis</i> )   | American journal of primatology                                 | Malarijittnon, Suchinda ; Lekprayoon, Chariya ; Tandavanitji, Nontivich ; Panha, Somsak ; Cheewatham, Cheewapap ; Hamada, Yuzuru | 2007 | 69   | 2 | 227  | 233  | Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company                           |

|   |   |  |      |     |      |      |         |  |
|---|---|--|------|-----|------|------|---------|--|
| Strontium and Magnesium in Water and in Crassostrea Calcite   | Science   | Lerman, Abraham  | 1965 | 150 | 3697 | 745  | 746+751 | American Association for the Advancement of Science                                  |
| Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells   | Biochemical and biophysical research communications           | Tsukamoto, D. ; Sarashina, I. ; Endo, K.   | 2004 | 320 | 4    | 1175 | 1180    | Academic Press   |
| Substrate of Bivalve Borers as Recorded on Phosphatic Fills of Gastrochaenolites, Palaeoenvironmental Context (Bohemian Cretaceous Basin, Czech Republic)                           | Ichnos : an international journal for plant and animal traces | Zitt, Jiri ; Mikulas, Radek  | 2006 | 13  | 3    | 191  | 198     | Taylor & Francis   |
| Systematics and Palaeoecology of Norian (Late Triassic) Bivalves from a Tropical Island Arc: Wallowa Terrane, Oregon  | Memoir  | Newton, Cathryn R. ; Whalen, Michael T. ; Prins, Thompson, Joel B. ; Nienke, David | 1987 | 22  |      | 1    | 83      | Paleontological Society  |
| Taphonomy and sequence stratigraphic significance of oyster-dominated concentrations from the San Julian formation, Oligocene of Patagonia, Argentina                               | Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology             | Parras, A. ; Casadio, S.   | 2005 | 217 | 1    | 47   | 66      | Elsevier   |
| Testing the potential effects of shellfish farming on swimming activity and spatial distribution of sole (Solea solea) in a mesocosm  | ICES journal of marine science : journal du conseil           | Laffargue, P. ; Begout, M.L. ; Lagardere, F.                                       | 2006 | 63  | 6    | 1014 | 1028    | Published by Academic Press for International Council for the Exploration of the Sea |
| The carbonic anhydrase domain protein naerein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc Pinctada fucata.  | Zoological science  | Miyamoto, Hiroshi ; Miyoshi, Fumiko ; Kohno, Jun                                   | 2005 | 22  | 3    | 311  | 315     | Zoological Society of Japan  |
| The Distribution and Age Feature of Late Pleistocene Palaeo-oyster Shell Beach and the Palaeo-environment of that the Oyster Shells Grew and Remain in Shenhwan Bay Fujian Province | 海洋科學=Marinescience  | Xu, Q.-h.  | 2002 | 26  | 4    | 58   | 62      | CHINA NATIONAL PUBLISHING  |
| The Dynamics of Metals in the American Oyster, Crassostrea virginica. II. Environmental Effects   | Chesapeake science  | Frazier, John M.   | 1976 | 17  | 3    | 188  | 197     | State of Maryland, Department of Research and  |

|  |   |  |      |     |      |      |      |   |
|--|---|--|------|-----|------|------|------|---|
| The effect of a taste-enhancement process for cold-stored raw shell-stock oysters ( <i>Crassostrea virginica</i> ) on the spillage of human enteropathogens                              | Parasitology research   | Graczyk, Thaddeus K. ; Tamang, Leena ; Pelz, Richard | 2007 | 101 | 6    | 1483 | 1486 | Education, Chesapeake Biological Laboratory |
| The effect of age and shell size on accumulation of fouling organisms on the Akoya pearl oyster <i>Pinctada fucata</i> (Gould)   | Aquaculture   | Guenther, J. ; Southgate, P.C. ; de Nys, R.          | 2006 | 253 | 1    | 366  | 373  | Elsevier Scientific Pub. Co                 |
| The effect of dietary calcium source, concentration and particle size on calcium retention, eggshell quality and overall calcium requirement in laying hens                              | British poultry science   | Lichovnikova, M.                                     | 2007 | 48  | 1    | 71   | 75   | Taylor & Francis                            |
| The effect of prolonged exposure to elevated temperatures on the biochemical constituents, gonadal development and shell deposition of the American oyster, <i>Crassostrea virginica</i> | Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry      | Ruddy, G.M. ; Feng, S.Y. ; Campbell, G.S.            | 1975 | 51  | 2    | 157  | 164  | Elsevier                                    |
| The Effects of Hydrocarbons on the Settling of the American Oyster, <i>Crassostrea virginica</i> , in Intertidal Habitats in Southeastern North Carolina                                 | Estuaries   | Smith, Craig M. ; Hackney, Courtney T.               | 1989 | 12  | 1    | 42   | 48   | Estuarine Research Federation               |
| The effects of particle size and origin of calcium carbonate on performance and ossification characteristics in broiler chicks.  | Poultry science   | Guinotte, F ; Nys, Y ; de Monredon, F                | 1991 | 70  | 9    | 1908 | 1920 | Poultry Science Association, etc            |
| The Evolution of British and American Middle and Upper Jurassic Gryphaea: A Biometric Study  | Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences | Hallam, A. ; Gould, S. J.                            | 1975 | 189 | 1097 | 511  | 542  | The Royal Society                           |
| The first incidence of clionid sponges (Porifera) from the Sydney rock oyster <i>Saccostrea commercialis</i> (Iredale and Roughley, 1933)  | Aquaculture   | Wesche, S.J. ; Adlard, R.D. ; Hooper, J.N.A.         | 1997 | 157 | 1    | 173  | 180  | Elsevier Scientific Pub. Co                 |
| The Manciano Sandstone: a shoreface deposit of Miocene basins of the Northern Apennines, Italy   | Sedimentary geology   | Martini, I.P. ; Cascella, A. ; Rau, A.               | 1995 | 99  | 1    | 37   | 59   | Elsevier Scientific Pub. Co.]               |



|  |  |   |      |     |   |     |     |  |
|--|--|---|------|-----|---|-----|-----|--|
| The physical characteristics and usage patterns of stone axe and pounding hammers used by long-tailed macaques in the Andaman Sea region of Thailand | American journal of primatology                                    | Gumert, Michael D. ; Kluck, Marius ; Malaivijitnond, Suchinda | 2009 | 71  | 7 | 594 | 608 | Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company     |
| The Process of Super Micron-Milling of Oyster Shells and the Powder Property   | 無錫輕工大學學報. Journal of Wuxi University of Light Industry. 食品與生物技術    | Wang, Liang ; Zhang, Min ; Sun, Jincai ; Du, Weihua           | 2004 | 23  | 1 | 58  | 61  | 無錫輕工大學學報編輯部  |
| The rates of calcium deposition in shells of molluscan larvae  | Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology | Maeda-Martinez, A.N.  | 1987 | 86  | 1 | 21  | 28  | Pergamon Press   |
| THE REMOVAL OF HEAVY METALS USING HYDROXYAPATITE   | Environmental engineering research                                 | Lee, Chan-Ki ; Kim, Hae-Suk ; Kwon, Jae-Hyuk                  | 2005 | 10  | 5 | 205 | 212 | Korean Society of Environmental Engineering            |
| The response of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in the Sydney Rock Oyster (Crassostrea commercialis), during depuration and storage      | International journal of food microbiology                         | Arumugaswamy, R.K. ; Proudford, R.W. ; Eyles, M.J.            | 1988 | 7   | 3 | 173 | 183 | Elsevier Science Publishers ; Elsevier Science Pub. Co |
| The shells of Etheria elliptica as recorders of seasonality at Lake Victoria   | Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology                  | Abell, P.I. ; Amegashitsi, L. ; Ochumba, P.B.O.               | 1996 | 119 | 3 | 215 | 219 | Elsevier   |
| The structure and mechanism of growth of calcium carbonate minerals in early stages of shells of the oyster Crassostrea Virginica                    | Journal of crystal growth  | Lee, D.D.   | 1990 | 102 | 1 | 262 | 268 | North-Holland Pub. Co                                  |
| The Thorny Oyster and the Voice of God: Spondylus and Strombus in Andean Prehistory  | American antiquity   | Paulsen, Allison C.   | 1974 | 39  | 4 | 597 | 607 | Society for American Archaeology                       |
| The use of allozymes and shell morphology to distinguish among sympatric species of the rock oyster Saccostrea in Thailand                           | Aquaculture  | Day, A.J. ; Hawkins, A.J.S. ; Visootviseth, P.                | 2000 | 187 | 1 | 51  | 72  | Elsevier Scientific Pub. Co                            |
| The use of sea urchins to control fouling  | Aquaculture  | Loderos, C. ; Garcia, N.                                      | 2004 | 231 | 1 | 293 | 298 | Elsevier Scientific                                    |



## 제 7 장 참고문헌

1. 식품의약품안전청, “제10. 일반성분시험법 10-1-1” 식품공전 제2권(2010)
2. 식품의약품안전청, “제10. 일반성분시험법 10-1-7” 식품공전 제2권(2010)
3. 식품의약품안전청, “제10. 일반성분시험법 10-1-33” 식품공전 제2권(2010)
4. 식품의약품안전청, “제10. 일반성분시험법 10-1-6” 식품공전 제2권(2010)
5. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350~356. (1956)
6. 식품의약품안전청, “제10. 일반성분시험법 10-1-56” 식품공전 제2권(2010)
7. 식품의약품안전청, “제10. 일반성분시험법 10-1-40” 식품공전 제2권(2010)
8. 식품의약품안전청, “제10. 일반성분시험법 10-1-64” 식품공전 제2권(2010)
9. Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz, and D. L. Gutnick. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1 : Isolation and Emulsifying Properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37(3) : 402-408.
10. Laurent B., Maria J.S., Frederic M., Christian M., Evelyne L., Michel G., 2001. Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of nacre proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128: 389-400
11. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265~275. (1951)

12. Hellmut J, Werner F., Walter F., Hans W., Thin- Layer Chromatography : *Reagent and detection methods*, vol. 1a(1990)
13. Blois, M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200. (1958)
14. Fitzgerald, G.A. and Patrono, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N. Engl. J. Med.* 345: 433-442. (2001)
15. Grosser, T., Fries, S. and Fitzgerald, G.A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J. Clin.Invest.* 116: 4-15. (2006)
16. Dawson, W. and Willoughby, D.A. : Inflammation mechanism and mediator. *Nonsteroidal antiinflammatory drugs of therapeutics*, pp77-109. (1985)
17. Flattery, M.P., Hylton Gravatt, L.A. : COX-2 inhibitors and cardiovascular risk, *Progress in Cardiovascular Nursing*, 20, pp.123-125. (2005)
18. Kortz, F., Schiele, T.M., Klauss, V., Sohn, H.Y. : Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction, *Journal of Vascular Research* 42: pp312-324. (2005)
19. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Haise, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P : Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: pp12013-12017. (1994)
20. Vane, J. and Botting, R. : Inflammation and the mechanism of action of antiinflammatory drugs, *FASEB. J.* 1: pp89-96. (1987)
21. Virador, V.M., Kobayashi, N., Matsunaga, J. and Hearing, V.J. : A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation, *Anal. Biochem.* 270, pp207-219. (1999)
22. 식품의약품안전청, 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인(2003).

23. 정진호, 조윤희 : 미용관련 기능성시험, 건강기능식품 시험법 가이드, 식품의약품안전청. (2004)
24. Qi W., Chen L., Chenglei L., Hui C., Liu S., Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. *Applied biochemistry and biotechnology* Vol.160(1) 129-139(2009).
25. Maurice A. Ramirez, D. M. Spillman, A Rapid Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances. *Journal of Food Science*. Vol52(2) 500,(1987)
26. 식품의약품안전청, “제10. 일반성분시험법 10-3-1” 식품공전 제2권(2010)
27. Bernheimer, A.W. and Schwartz, L.L. : Isolation and composition of staphylococcal alpha toxin. *J. Gen. Microbiol.* 30, 455-468(1963)
28. 대한병리학회 대구 · 경북 지부학회. 간추린 병리학. 서울 : 정문각 (2000)대한병리학
29. Gao, I., Igarashi, K., & NuKina, M., Three new phenylethanoid glycosides from *Caryopteris incana* and their antioxidative activity. *Chemical and Farmaceutical Blletin* 48: 1075-1078. (2000)
30. Aruoma, O.I., Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and chemical Toxicology* 62: 671-683. (1994)
31. Madavi, D.L., & Salunkhe, D.K., Toxicological aspects of food antioxidant. *Food antioxidants*, New York: Marcel Dekker, 267. (1995)
32. 고성권, 이충렬, 이학성, 김현, 백구현, 토쿠오카 키요시, 정성현, 종대황. 스틸벤 유도체의 cyclooxygenase 저해작용. *생약학회지* 34: 25-27 (2003)
33. Johnson, J.L., Wimsatt, J., Buckel, S.D., Dyer, R.D. and Maddipati, K.R. Purification and characterization of prostaglandin H sunthase-2 from sheep placental cotyledons. *Arch. Biochem, Biophys.* 324: 26-34 (1995)

34. 김정아, 만성 통증에서 cyclooxygenase-2 억제제의 사용. 가정의학회지 26: 별책(2005).
35. Okombi, S., Rival, D., Bonnet, S., Mariotte, A-M, Perrier, E. and Boumendjel, A. Analogues of N-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte tyrosinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 2252-2255 (2006).
36. Nihei, K and Kubo, I. Identification of oxidation product of arbutin in mushroom tyrosinase assay system. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 2409-2412 (2003).
37. 김선미, 손경훈, 윤미옥, 이정표, 양성준, 김재희, 양우검, 김영내, 허문영, 최상숙, 세포신호 전달기전을 이용한 미백화장품의 미백효과 평가방법 연구. 식품의약품안전청연구보고서 제8-1 권: 769-777 (2004).
38. No, J.K., Soung, D.Y., Kim, Y.J., Shim, K.H., Jun, Y.S., Rhee, S.H., Yokozawa, T. and Chung, H.Y. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci.* 65: 21, PL 241-246 (1999).
39. Ames, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radicals and degenerative disease. *Science* 221: 1256-1264 (1983).
40. Bae, J.T., Sim, G.S., Lee, D.H., Lee, B.C., Pyo, H.B., Choe, T.B. and Yun, J.W. Production of exopolysaccharide from mycelial culture of *Grifola frondosa* and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 expression in ultraviolet A-irradiated human dermal fibroblasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 347-354 (2005).
41. Beauchamp, C. and Fridovich, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-286 (1971).
42. Torita, A., Liu, Y.C. and Hasegawa, Y. Photoprotective activity of scallop shell water-extract in keratinocyte cells. *Fish. Sci.* 70: 910-915 (2004).
43. Liu, F., Ooi, E. and Chang, S.T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.* 60: 763-771 (1997).
44. Sato, S.B., Kawasaki, K. and Ohnishi, S-I. Hemolytic activity of influenza virus hemagglutinin

- glycoproteins activated in mildly acidic environments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 3153-3157 (1983).
45. Hatherill, J.R., Till, G.O., Bruner, L.H. and Ward, P.A. Thermal injury, intravascular hemolysis and toxic oxygen products. *J. Clin. Invest.* 78: 629-636 (1986)
46. Bodanszky, M., Sharaf, H., Roy, J.B. and Said, S.I. Contractile activity of vasotocin, oxytocin, vasopressin on mammalian prostate. *Eur. J. Pharmacol.* 216: 311-313 (1992).
47. Go, H. J., Kim, C.H., Kim, E.J., Kim, I.H., Park, H.Y., Yoon, H.D., Hong, Y.K and Park, N.G. Purification of vasopressin-related peptide, [Arg<sup>8</sup>]-vasotocin, from the brain of Conger Eel (*Conger myriaster*). *J. Kor. Fish. Soc.* 38: 6-11 (2005).
48. Takuwa-Kuroda, K., Iwakoshi-Ukena, E., Kanda, A. and Minakata, H. Octopus, which owns the most advanced brain in invertebrates, has two members of vasopressin/oxytocin superfamily as in vertebrates. *Regul. Pept.* 115: 139-149 (2003).
49. Dale, M.M., and Foreman, J.C., Introduction to the immunology and pathology of host defense mechanism & the neutrophil leucocyte. *Textbook of Immunopharmacology.* 1-18, 37-55 (1989)
50. Bombardier, C. An evidence-based evaluation of the gastrointestinal safety of coxibs. *The American journal of cardiology* 89: 3D-9D (2002)
51. Linton, M.F., Fazio, S., Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology* 4: 116-123. (2004)









<별첨 4>

(주)서진바이오텍  
한방\*\*소재제품의 여드름  
개선효과에 대한 인체적용시험

2009년 8월 11일

| 한방**소재제품의 여드름 개선효과에 대한<br>인체적용시험 |           |  |
|----------------------------------|-----------|--|
| 신청인                              | 회사명       | (주)서진바이오텍  |
|                                  | 법인소재지     | 경기도 수원시 영통구 매탄3동   |
|                                  | 법인 연락처    | Tel : 031-213-6699 Fax : 031-213-6698                                |
|                                  | 대표자성명     | 김학주  |
|                                  | 대표자 주소    | 경기도 수원시 영통구 매탄3동   |
|                                  | 대표자 연락처   | Tel : 031-213-6699 Fax : 031-213-6698<br>E-mail : sojun@dreamwiz.com |
| 연구자                              | 기관명       | 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터   |
|                                  | 연구기관장     | 김이화  |
|                                  | 연구책임자     | 백종현  |
| 내역                               | 항목        | 한방**소재제품의 여드름 개선효과에 대한 인체적용시험  |
|                                  | 시험제품      | 주)서진바이오텍이 개발한 여드름 개선제품 효과 측정   |
|                                  | 시험방법      | 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터의 규정에 의한 기능성화장품기준 및 시험방법                         |
|                                  | 인체적용 시험인원 | 30명  |

## 요 약 서 ( 초 록 )

### 1. 최종사업목표 및 내용

최종사업목표는 “한방화장품 소재제품의 여드름 개선효과에 대한 인체적용시험”이며, 전달기능을 극대화시킬 수 있는 고효율적인 여드름 개선효과 화장품을 개발하는 것으로써, 본 사업에서는 공급기관의 서비스 제공을 받아 한방화장품 제품의 여드름 개선효과에 대한 인체적용시험분석을 주요내용으로 한다.

### 2. 사업실적 및 성과

본 시험에서는 만 18세 ~ 38세 사이의 한국인 여성 및 남성 피험자 30명을 대상으로 4주간 실험을 수행하고, 전문가의 육안평가 및 Submeter를 이용하여 유분 함유량을 분석한 결과 시험제품 사용 4주 후 통계적으로 유의하게( $p<0.05$ ) 여드름 개선효과 있었다. 제품 사용상에도 이상반응이 보고되지 않아 안전한 제품임을 알 수 있었다.

### 3. 활용방안 및 기대효과

여드름 개선효과 한방화장품 제품화를 통해 기업의 생산성증대와 고용창출, 인력양성 및 지역경제의 활성화를 통한 기업 발전 및 국가경제발전에 이바지 할 것이다.

## 1. 연구개발의 목표 및 내용

### (1) 최종 목표

“한방소재 제품의 여드름개선 효과 시험분석”이며, 전달기능을 극대화시킬 수 있는 고효율적인 여드름 개선효과에 대한 한방소재 제품을 개발하는 것으로써, 본 사업에서는 공급기관의 서비스 제공을 받아 한방소재제품의 여드름 개선효과 임상 시험분석을 주요내용으로 함.

### (2) 연구개발 목표 및 내용

#### 1) 목표

피험자들에게 시료를 4주간의 도포했을 때 여드름 개선효과 및 안전성을 평가하고자 함.

#### 2) 연구개발 내용

최종 평가가능 예수 30례로 여드름 개선효과를 보기위해 4주간 시료를 도포하여 2주, 4주 후 기기 및 사진을 통해 평가하였고, 여드름 안전성 평가를 보기위해 도포 후 2주, 4주 후 관찰하였음

### 3. 제출문 및 품질보증

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터에서는 (주)서진바이오텍에서 의뢰한 한방\*\*소재제품의여드름 개선효과 시험분석 평가연구를 위탁 받고, 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터의 실험방법에 따라 성실히 연구를 수행하여 그 결과를 다음과 같이 보고합니다.

또한, 연구를 수행함에 있어 연구기관장 및 연구책임자는 본 임상지원센터의 표준작업지침서(SOP)의 준수와 연구의 성실성을 조사하고, 최종보고서와 본 연계된 실험결과를(RAW DATA) 관리 감독하였음을 확인합니다.

2009년 8월 11일

연구기관 : 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

연구기관장: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터장

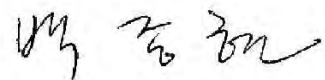
한의학 박사 김 이 화



---

인체적용시험 연구책임자: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터  
겸임교수

피부과 전문의 백 종 현



---

#### 4. 한방소재 제품의 여드름개선 효과에 대한 연구대상자 (피험자) 선정

##### 1) 연구대상자 모집

임상연구 모집 공고를 통하여 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터에 내원하여 피부과 전문의의 진료 후 피험자 선정기준에 합당하고 제외기준에 해당되지 않은 여드름 피험자 대상으로 임상연구를 진행 하였다. 구체적인 선정기준과 제외기준은 다음과 같다.

##### 2) 피험자 선정기준

피부질환이 없는 20세(만18세)이상 40세(만38세)이하의 신체 건강한 남녀로서 다음 피험자의 선정을 위한 설문지 양식을 통하여 질문을 하고, 전문가의 1차 진단을 한 사람. 다음 ‘가. 선정기준’에 부합하며 및 ‘나. 제외기준’에 부합하지 않은 사람을 선정하였다.

###### 가. 선정기준

- A. 연구자로부터 시험에 관련된 제반 내용을 듣고, 시험에 따른 이상반응에 대한 위험성을 이해한 후 인체시험 동의서를 작성한 사람.
- B. 여드름이 있는 사람(경증~중등증(구진기준. KAGS 1~3등급)/ 중등증~중증(결절기준. KAGS 4-6등급))
- C. 신체 건강한 사람.
- D. 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 사람.

###### 나. 제외기준

- A. 화장품, 의약품에 자극이나 알러지가 있는 사람.
- B. 실험을 시작하기 전이나 실험 중, 28일 이내에 면역억제제를 복용한 사람
- C. 얼굴용 국소 여드름 치료제를 실험하기 시작하기 한 달 전 동안 혹은 실험하는 동안 사용한 사람
- D. 실험 시작 전이나 실험 중, 염증 반응에 대해 효과를 있는 것으로 알려져 용인된 체계적인 약물치료법 혹은 치료법을 처치 받은 사람
- E. 실험을 시작하기 전 석 달 내에 로아큐틴 성분을 복용한 사람
- F. 정해진 날짜에 해당되는 지속적인 방문 혹은 연구자의 판단과 상충되는 의학적 조건에 부합하는 경우 혹은, 부적합한 피험자가 될 가능성이 있는 사람
- G. 임신 중, 수유 중 혹은, 실험기간 동안 임신할 가능성이 있는 사람



#### 다. 시험기간 중 자진탈퇴

시험기간 중 피험자는 언제든지 자유의사에 따라 자진 탈퇴할 수 있도록 하였다.

#### 라. 시험기간 중 시험중지, 탈락 기준

시험기간 중 다음과 같은 사유가 발생하면 해당 피험자는 시험 규정에 의하여 시험중지, 탈락 조치하였다.

##### (1) 중지자

다음에 해당하는 경우는 '중지자'로 분류한다.

- A. 담당자가 인체적용시험용 제품과 '관련없음'으로 판정한 이상반응으로 인하여 조기에 시험을 중지한 경우
- B. 시험용 제품과 관련성이 명백하지 않은 기타의 이유로 조기에 시험을 중지한 경우
- C. 인체적용시험 계획서를 심하게 벗어난 경우(예를 들면, 검사를 받지 않거나 계획된 일정을 따르지 않는 경우, 더 이상의 투약을 거부하는 경우)  
'중지자'에 해당하는 피험자는 다른 피험자로 대치하며 인체적용시험 계획서에 따라 인체적용시험을 실시한다.

##### (2) 탈락자

다음에 해당하는 경우는 '탈락자'로 분류하고 최종 분석 평가시에 '악화'로 판정한다.

- A. 담당자가 인체적용시험제품과 '관련이 있을 수 있음' 또는 '명백한 관련이 있음'으로 판정한 이상반응으로 인하여 조기에 시험을 중지한 경우
- B. 효과가 없어(증상이 중중이거나 악화되어) 조기에 시험을 중지한 경우 '탈락자'는 새로운 피험자로 대치될 수 없다.

##### (3) 중지자 및 탈락자 처리 방법

중지자 및 탈락자가 발생한 경우 다음과 같이 처리한다.

- A. 조기 시험 중지 보고서 작성
- B. 이상반응에 의한 경우라면 이상반응 발생 보고서 작성
- C. 중대한 이상반응이 발생한 경우에는 담당자가 보고받은 후 24시간 이내에 연구책임자 및 의뢰자에게 통지하고, 발생 5일 이내에 문서로 상세한 내용이 포함된 추가보고를 한다.

- D. 환자증례조사표 및 잔여 시험화장품을 의뢰자에게 송부
- E. 중지자의 경우는 안정성 평가에 포함시킨다.
- F. 탈락자의 경우는 4주 후 평가항목을 평가한다.
- G. 모든 탈락자는 총괄적 유효성 평가 시 판정하지 않고, 탈락하기 이전까지의 안전성으로써 총괄안전도를 판정한다. 그 중 이상반응에 의한 탈락이라면 총괄안전도 평가 시에 '안전하지 않음'으로 평가한다.
- H. 중지-탈락자에 대한 차후의 치료에 대하여는 담당자의 판단에 따른다.

**마. 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법**

본 연구센터는 모든 시험 수행 시 피험자의 안전을 최우선으로 고려하여 시험을 실시하였으며, 이에 대하여 연구기관장 및 연구책임자의 조사 및 관리를 수행하였다. 본 연구와 관련된 시험 중 시험에 연계된(도포한 시료) 알레르기 반응 등의 이상반응이 발생할 경우 시험을 즉시 중단하고 연구책임자에게 보고하여 적절한 대응조치를 취하도록 하였으며, 증상이 심할 경우 피부과 전문의에게 문진하여 치료를 받도록 하였다.

**(1) 이상반응의 정의**

'이상반응'이란 인체적용시험에 사용되는 제품을 투여 받은 피험자에서 발생한 바람직하지 않고 의도되지 않은 증후(sign), 증상(symptom), 질병(disease) 등으로 임상 병리 검사에서 의학적으로 이상치가 나타나는 경우를 포함하였다.

**(2) 안전성 평가기준 및 평가방법**

① 피부자극도

시험용 제품 도포부위의 홍반과 부종의 정도에 따라 다음과 같이 3등급으로 평가하였다.

- 경증(Mild) : 홍반 및 부종이 약간 있음
- 중등증(Moderate) : 홍반이 있으며 1mm 이하의 부종이 있음
- 중증(Severe) : 심한 홍반이 있으며 1mm 이상의 심한 부종이 있음

② 기타 이상반응

피부자극외의 이상반응 정도는 의학적 기준에 따라 다음의 3등급으로 평가하였다.

- 경증(Mild) : 잘 인지될 수 없을 정도의 약간 불편한 증상  
 중등증(Moderate) : 명확한 증상은 있으나 별다른 처치가 필요 없음  
 중증(Severe) : 매우 불편하여 신속한 처리를 요함

- 중증(severe)이상반응은 '중대한 이상반응'과는 구별된다.

\* 중대한 이상반응 : 인체적용시험에 사용되는 제품의 임의의 용량에서 발생한 이상반응 또는 이상약물반응 중에서 다음에 해당하는 경우

1. 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우
2. 입원 또는 입원기간의 연장이 필요한 경우
3. 지속적 또는 의미 있는 불구나 기능저하를 초래하는 경우
4. 선천적 기형 또는 이상을 초래하는 경우

### ③ 총괄안전도

최초 인체적용시험제품 치료 4주후의 피부자극도 및 임상화학적 검사, 기타 이상반응 발생여부에 따라 다음과 같이 총괄 안전도를 평가하였다.

- 안전(4) : 시험제품에 의한 이상반응 없음  
 대체로 안전(3) : 경증의 이상반응은 있으나 투약을 중지할 정도는 아님  
 안전에 문제 있음(2) : 중등증의 이상반응이 있으나 투약을 중지할 정도는 아님  
 안전하지 않음(1) : 이상반응으로 인하여 투약을 중지함

### (3) 이상반응 및 임상검사치의 이상변동 평가

이상반응 또는 임상검사치의 이상변동이 시험제품 도포와 관련이 있음을 부인할 수 없을 때는 각 증상, 발현시기, 중증도, 처치, 치료 및 경과에 관하여 이상반응 발생보고서에 기재하여야 한다. 시험제품과의 관련성에 관하여 모든 이상반응은 다음의 3등급으로 판정하였다.

- 관련 없음(No Relation) : 시험용 제품으로 인한 이상반응으로 판단되지 않으며 다른 원인에 의한 것임
- 관련이 있을 수 있음 (Possible) : 시험용 제품으로 인한 일시적인 이상반응이며 임상증상에 별다른 영향을 미치지 않음
- 명백한 관련 있음(Definite) : 시험용 제품으로 인한 명백한 이상반응임

#### (4) 이상반응 보고방법

- 중대한 이상반응이 발생하는 경우에는 시험책임자는 계획서나 인체적용시험자료집 등에서 즉시 보고하지 않아도 된다고 명기한 것을 제외한 모든 중대한 이상반응을 보고받은 후 24시간 이내에 인체적용시험 담당자에게 알려야 하고, 발생 5일 이내에 문서로 상세한 내용이 포함된 추가보고를 한다. 별도의 지시가 있을 때까지 시험용 제품에 대한 임상 시험을 중지하여야 하였다.
- 의뢰자는 기타 관련된 시험자, 심사위원회 및 식품의약품안전청장에게 중대하고 예상하지 못한 모든 이상약물반응을 다음 각 호에서 정한 기간 내에 신속히 보고하였다.
  1. 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고 받거나 알게 된 날로부터 7일 이내. 다만, 이 경우 상세한 정보를 최초 보고일로부터 8일 이내에 추가로 보고한다.
  2. 다른 모든 중대하고 예상하지 못한 이상약물반응의 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고 받거나 알게 된 날로부터 15일 이내에 추가로 보고한다.
- 이상반응 발생으로 인하여 조기에 시험을 중지하여야 할 경우에는 이상반응 발생보고서를 작성하고 최종 임상화학적 검사를 실시하였다.
- 담당자는 일단 이상반응이 발생한 피험자에 대하여는 그 이상반응 소실 여부에 관계없이 계속 신중히 관찰하였다.

#### (5) 피험자의 안전보호에 관한 대책 방법

인체적용시험실시기관은 본 시험계획서에 규정된 대로 인체적용시험이 적절히

진행될 수 있도록 인체적용시험에 필요한 설비와 전문인력을 갖추고 피험자의 안전보호에 만전을 기하도록 하였다. 인체적용시험담당자는 계획서에 명시된 이상반응 및 주의사항 등에 대하여 사전에 충분히 숙지하고 시험도중 적절한 조치를 취한 후 인체적용시험심사위원회 및 시험의뢰자에게 통보하였다.

## (6) 인체적용시험을 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항

### ① 윤리적 요구사항

본 인체적용시험은 헬싱키선언, 인체적용시험관리기준(KGCP)에 근거하여 진행하였다.

### ② 피험자동의

인체적용시험 담당자는 인체적용시험이 시작되기 전 대상자 선정기준 및 제외 기준을 모두 만족시키는 피험자를 대상으로 피험자 및 그들의 보호자에게 시험에 관련된 모든 사항을 자세히 설명하였고, 모든 예측 가능한 결과에 대하여 알 수 있는 충분한 기회를 주었다. 또한 피험자가 동의한 내용은 반드시 문서로 기록하였다.

시험 담당자는 피험자동의서에 서명하여 확인을 하였다. 시험 담당자는 피험자로부터 동의를 얻기 전에는 인체적용시험만을 목적으로 특별한 검사를 하지 않았다.

### ③ 비밀보장

모든 피험자명은 비밀을 유지하도록 하였다. 서명을 받은 피험자동의서는 시험책임자의 동의하에 문서보관실에 보관하였다. 시험책임자는 피험자번호 및 피험자가 기록된 목록을 갖추어 놓아 나중에 기록을 찾을 수 있도록 하였다.

### ④ 인체적용시험 모니터링

시험은 시험 자료가 국내외에서 인정될 수 있도록 하기 위하여 시험의뢰자측에서 모니터링 및 감사를 실시 할 수 있도록 하였다.

### ⑤ 시험결과의 기록

본 시험 중에 수집된 모든 자료는 시험의뢰자가 제공한 증례조사표에 시험담당자가 기록하도록 하였다.

증례조사표를 기입할 때는 흑색볼펜(연필이나 만년필은 사용 금지)으로 분명하고 알아볼 수 있도록 기록하였다.

증례조사표에 기입한 내용을 수정하는 경우에는 원 기록을 알아볼 수 있도록 하고 수정날짜와 수정한 인체적용시험 담당자의 서명을 하도록 하였다.

### 3) 피험자수

피험자선정에서 합격한 남, 여 총 30명을 선정하였다.

### 4) 시험부위

시험은 피험자의 얼굴 부위 여드름이 있는 상태에서 진행하였다.

### 5) 피험자 동의 설명서 및 동의서

본 연구에 사용한 피험자 동의 설명서와 동의서 양식은 Table 1, Table 2와 같다.

### 6) 인체적용시험 참여 포기 동의서

본 연구에 참여한 피험자가 포기를 할 때 양식은 Table 3과 같다.

### 7) 피험자 선정을 위한 설문지

본 연구에 사용한 피험자 선정을 위한 설문지 양식은 Table 4와 같다.

Table 1. 피험자 동의 설명서

### 피험자 동의 설명서

이 글은 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터에서 실시하는 화장품의 피부진정 및 피부 보습 효과를 평가하기 위해 문서화된 정보로써 귀하가 보다 안심하고 참여하실 수 있도록 본 연구에 관한 정보입니다. 이 설명서에 이해할 수 없는 단어나 의학 용어가 있는 경우에는 어떤 것이든지 시험책임자 등에게 자세한 설명을 요청하십시오.

#### 인체적용시험의 목적

본 연구의 목적은 한방\*\*소재 제품을 1일 수회 도포하는 경우 여드름 개선효과를 평가하는 것입니다.

#### 연구방법

한방\*\*소재 제품을 환부에 하루 1회, 총 4주간 도포합니다.

#### 예측 효능·효과

여드름 개선 및 완화입니다.

#### 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항

- 예측되는 이상반응 : 때때로 국소의 가려움증, 홍반, 발진, 건조, 인설 등을 일으킬 수 있습니다.
- 사용상의 주의사항
  - 1) 눈 및 점막에 사용하지 말 것.
  - 2) 피부에 손상이 있을 경우에 사용하면 일과성의 자극감이 있을 수 있으므로 주의할 것.

#### 편의 제공

- 화장품 제공
- 교통편 실비 지급

#### 시험에의 참여 동의 및 동의철회

본 시험에 참여할 것인가의 여부는 귀하의 자유의사에 따라 결정하여 주십시오. 귀하가 시험참가에 동의하지 않더라도 치료에 전혀 불이익을 받지 않습니다. 귀하는 시험기간 중 언제라도 시험참가를 중단할 수 있으며, 그 경우에는 담당 의사가 귀하의 질병을 치료하기 위하여 다른 적절한 약제를 처방하거나 치료법을 실시할 것입니다.

### **환자의 준수사항**

본 한방\*\*소재 제품의 투여로 귀하의 증상이 개선되고 완화가 효과적으로 이루어지고, 정확한 과학적 연구에 기여하기 위하여 연구자의 지시에 따르는 것이 매우 중요합니다.

본 시험 기간 동안 제공되는 한방\*\*소재제품 및 본 시험의 연구자가 인정한 약물 외의 다른 약물을 복용하거나 기타의 치료를 받아서는 안 됩니다.

귀하가 시험참가 동의를 중단한 후라도 본 제품을 최종 도포한 날을 연구자에게 알려주셔야 합니다.

본 시험화장품 도포기간 동안 예상치 못한 효과나 유해한 작용으로 의심되는 증상이 나타날 경우 즉시 연구자에게 알려주시기 바랍니다.

### **피해발생시 보상 및 치료 대책**

귀하에게 본 인체적용시험에 참여한 결과로 직·간접적 손해가 발생되었을 경우, 귀하의 연구자가 상해의 치료를 위하여 최선의 조치를 취할 것이며, 시험 의뢰자인 (주)서진바이오텍에서 모든 법률상의 책임을 부담할 것입니다.

### **자료보호**

모든 데이터는 엄격히 비밀이 유지되며 보호를 받게 됩니다. 귀하가 본 시험에 참가하기로 동의할 경우 본 시험을 통하여 귀하에 관하여 수집된 자료는 익명으로 다루어집니다. 본 연구의 결과는 학술적 논문 제출용으로만 이용될 것이며 개인의 신상에 관한 정보는 보호됩니다.

본 시험과 관련하여 의문사항이 있을 경우 언제든지 연구자에게 문의하실 수 있습니다.

인체적용시험의뢰자 : (주)서진바이오텍 대표

인체적용시험책임자 : 피부과전문의 백종현







Table 4. 피험자 선정을 위한 설문지

|   |      |          |  |
|---|------|----------|--|
| <b>피험자 선정을 위한 설문지</b>                                   |      |          |  |
| 이름 :  | 나이 : | 성별 : 남 여 |  |
| 1) 최근 1년간 병원(피부과 질환이 원인)에 간 일이 있습니까?      예 ,      아니오  |      |          |  |
| 예에 답한 경우, 병원에 간 이유 혹은 병명을 다음에 쓰고, 아래의 모든 질문에 답해 주       |      |          |  |
| 세요.      아니요에 답한 경우, 3) 문항 이후의 질문에 답해 주세요.              |      |          |  |
| 2) 1) 항문에 ‘예’로 답한 경우 이유를 적어 주세요.                        |      |          |  |
| 3) 화장품이나 의약품 사용 후 심한 증상이 나타난 적이 있습니까?      예 ,      아니오 |      |          |  |
| 있다면, 언제, 어디서, 어떤 증상이 나왔는지 적어 주세요.                       |      |          |  |
| 4) 민감 피부입니까 ?      예 ,      아니오                         |      |          |  |
| ‘예’의 경우는 그렇게 생각하는 이유를 적어주세요                             |      |          |  |
| 5) 최근 한 달 내 피부질환 치료를 위한 피부외용제를 사용한 적이 있습니까?             |      |          |  |
| 예 ,      아니오  |      |          |  |
| 있다면, 약의 이름과 어떤 부위에 사용하고 있는지 적어 주시기 바랍니다.                |      |          |  |
| 6) 최근 한 달 내 피부질환 치료를 위한 내복약을 사용한 적이 있습니까?               |      |          |  |
| 예 ,      아니오  |      |          |  |
| 7) 여성분들만 답해주세요.   |      |          |  |
| 임신 중      혹은      수유 중입니까?      예 ,      아니오            |      |          |  |
| 날짜 :      년      월      일                               |      |          |  |
| 연구책임자 :      백 중 현      (인)                             |      |          |  |

## 5. 여드름 개선효과 시험분석방법

피험자에게 시료를 4주간의 도포했을 때 여드름 개선효과 및 안전성을 평가하고자 하였다.

### (1) 연구개요

의뢰자로부터 시료를 수령한 후 일반 피험자 만 18~38세의 한국 남성 및 여성을 대상으로 피부 진정의 경우 28일간 1일 1회 이상 도포하도록 하고 2, 4주 후 본 임상센터 내 피부 진단실 항온항습조건(22±2℃, 40~60%)에서 대기하면서 측정을 하여 여드름 개선효과를 평가하였다.

### (2) 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법 (통계분석방법)

#### 1) 1차 유효성 평가변수

##### ① 평가변수

KAGS GRADE에 의한 객관적 병변 상태를 평가하였다.

##### ② 평가시기

치료 전 및 치료 후 매2주 방문시마다 KAGS GRADE에 따라 평가하고 해당 점수를 증례 조사표에 기록하였다.

##### ③ 평가방법

아래 표에 대해 연구원 1인에 의해 전체 환자의 상태를 객관적으로 판단하여 기재하도록 하였다.

표 1. Korean Acne Grading System : KAGS-2

| G r a d e<br>KAGS | KAGS-2    |           |                  |
|-------------------|-----------|-----------|------------------|
| Grade 1           | 구진 10개 이하 |           |                  |
| Grade 2           | 구진 11~30개 |           |                  |
| Grade 3           | 구진 31개 이상 | 결절 10개 이하 |                  |
| Grade 4           |           | 결절 11~20개 | 흉터가능성 증가<br>(강조) |
| Grade 5           |           | 결절 21~30개 |                  |
| Grade 6           |           | 결절 31개 이상 |                  |

#### 2) 2차 유효성 평가변수

##### ① 평가변수

피험자의 유분량에 대한 기기적 평가

피부의 유분량은 Sebumeter(Sebumeter 810 PC, Courage & Khazaka, Germany)를 이용하여 측정하였다. 피험자의 방문(0주, 2주, 4주)시 이마에서 유분량을 3회 연속 측정하여 평균값을 측정치로 정하였다.

② 평가시기

치료 전 및 치료 후 2주, 4주 방문시마다 평가하고 해당 점수를 증례조사표에 기록하였다.

③ 평가방법

Sebumeter (Sebumeter 810 PC, Courage & Khazaka, Germany)를 이용하여 이마에서 유분량을 3회 연속 측정하여 평균값을 측정치로 정하였다.

**3) 해석방법(통계분석방법)**

본 분석을 위하여 이용하는 통계 패키지는 SPSS Window. version 10.1이며, 통계적 유의성을 위해 유의수준은 0.05로 설정하고, 분석을 위하여 이용되는 통계적 방법은 아래와 같다.

- 전체 피험자의 baseline characteristics은 동질성검사를 위하여 frequency analysis 및 descriptive analysis로 분석하였다.
- 1차 유효성 평가변수 및 2차 유효성 평가변수 처치 전후 수치 비교를 위해 Wilcoxon signed rank test를 이용하였다.
- 총괄안전도 분석은 chi-square test를 이용하여 분석하였다.

**(3) 연구 일정 및 절차**

**가. 여드름 개선효과 - 0주차(시험 시작일)**

1) 1일차 - 피험자들은 본 인체적용시험센터 내 진찰실에서 임상연구책임자에 의해 피험자 선정을 위한 설문지를 작성하고, 인체적용시험에 대해 설명을 들은 후 자의적으로 동의서를 작성하였다.

2) 2일차(0주차) - 세안 후 30분간 피부 안정을 취한다음 한국형 여드름 중증도 시스템(Korean Acne Grading System; KAGS)에 맞추어 전문가에 의한 육안평가를 실시하고, 사진촬영 및 Visioface 측정을 통한 육안 상대평가를 실시하였다. 이후 Sebumeter(Sebumeter 810 PC, Courage & Khazaka, Germany)을 이용하여 얼굴부위의 유분량을 측정하였다. 시험부위는 이마부위를 기준으로 하고 삼각형모양으로 3부위를 측정하였다.

3) 3일차(2주차, 시험 시작 14일 후 ± 3일)

배포된 시료를 사용방법에 따라 2주 동안 사용한 피험자를 대상으로 안전성 평가, 육안평가, 기기평가(submeter)를 측정하여 효과를 평가 하였다.

4) 4일차(4주차, 시험 시작 28일 후 ± 3일)

배포된 시료를 사용방법에 따라 4주 동안 사용한 피험자를 대상으로 안전성 평가, 육안평가, 기기평가(submeter)를 측정하여 효과를 평가 하였다.

(4) 시료

표 2. 시료 기본정보

|        |   |
|--------|---|
| 시료관리번호 | SM-09-001-Y                               |
| 사용 방법  | 하루 1회 이상 사용하며 아침 또는 저녁으로 시험부위에 고르게 도포하였다. |

(5) 측정 및 평가

시료 도포 전(0주), 시료 도포 후 2주(±3일), 시료 도포 후 4주(±3일)에 본 센터에 방문하여 측정 및 평가를 실시하였다. 피험자 시험부위의 평가는 공기의 이동이 없고 직사광선이 없으며 향온 향습 조건(22±2℃, 40~60%)을 만족하고 있는 밀폐된 방에서 최소 30분간 피부 안정을 취한 다음 시험하였다.

가. 육안 평가

피부전문가에 의한 육안평가를 실시하였고, 사진촬영 및 Visioface 측정을 통한 육안 상대평가를 실시하였다.

나. 기기평가

피험자의 시험부위를 Submeter를 이용하여 이마부위의 유분량을 측정하였다. 시료 도포 전, 시료 도포 후 2주, 4주 경과 후에 본 임상센터에 방문한 피험자들의 시험부위를 측정하였다.

#### 다. 안전성 평가

피험자 방문 시마다 문진과 육안으로 이상반응(홍반(Erythema), 부종(Edema), 가려움(Itching), 자통(Stinging), 뻣뻣함(Tightness), 따끔거림(Prickling))이나 다른 이상반응이 발생하는지 육안평가와 문진으로 평가하였다.

### 6. 여드름 개선효과 시험결과

#### (1) 피험자 기본정보

표 3-1. 피험자 기본정보

| 피험자 번호 | 성 명  | 나 이  | 성 별 |    |
|--------|------|------|-----|----|
| 01     | LJL  | 20   | F   |    |
| 02     | HDB  | 20   | F   |    |
| 03     | YYJ  | 20   | F   |    |
| 04     | YSH  | 20   | M   |    |
| 05     | KYM  | 22   | F   |    |
| 06     | HAL  | 20   | F   |    |
| 07     | ABR  | 20   | F   |    |
| 08     | KHS  | 21   | F   |    |
| 09     | PJS  | 20   | M   |    |
| 10     | KLN  | 20   | F   |    |
| 11     | UIS  | 23   | M   |    |
| 12     | KWJ  | 25   | M   |    |
| 13     | LYS  | 25   | M   |    |
| 14     | PHS  | 25   | M   |    |
| 15     | KDH  | 22   | F   |    |
| 16     | KDY  | 21   | F   |    |
| 17     | YJY  | 19   | M   |    |
| 18     | PHJ  | 21   | F   |    |
| 19     | BHW  | 20   | F   |    |
| 20     | AYJ  | 22   | M   |    |
| 21     | SSE  | 24   | M   |    |
| 22     | WIH  | 20   | F   |    |
| 23     | HKA  | 19   | F   |    |
| 24     | LMA  | 21   | F   |    |
| 25     | LHJ  | 20   | F   |    |
| 26     | WMK  | 19   | F   |    |
| 27     | YIY  | 20   | M   |    |
| 28     | PSK  | 23   | M   |    |
| 29     | KYM  | 20   | F   |    |
| 30     | NGJY | 19   | F   |    |
| 평 균    |      | 21.0 | 남자  | 11 |
| 표준편차   |      | 1.8  | 여자  | 19 |

본 인체적용시험에 참가한 사람은 30명의 남성 및 여성으로 평균 연령은 약 21.0세, 표준 편차는 1.8 이었다.



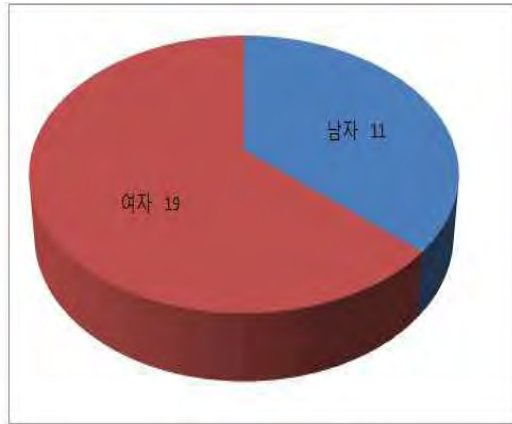


그림 1. 본 제품을 사용한 성별 비교

시험 도중 이상반응 및 그 밖의 이유로 탈락한 피험자는 없었으며 최종 피험자수는 30명이었다.

(2) 기기평가 결과

가. Submeter 를 이용한 피부유분 함유량 측정 결과

① 결과

시료 도포 전(0주), 시료 도포 후 2주, 4주 경과 후에 Submeter(Sebumeter 810 PC, Courage & Khazaka, Germany)를 이용한 측정 결과는 표 4-1에 정리했으며, 통계 결과는 다음과 같이 정리하였다.

표 4-1. Submeter 측정 결과

| 피험자 번호 | 성 명  | 0주    | 2주 후  | 4주 후  |
|--------|------|-------|-------|-------|
| 01     | LJL  | 98.3  | 75    | 80.8  |
| 02     | HDB  | 71.7  | 63.3  | 68.3  |
| 03     | YYJ  | 51.8  | 49.4  | 50.6  |
| 04     | YSH  | 132.5 | 125.2 | 77.7  |
| 05     | KYM  | 56.3  | 32.0  | 31    |
| 06     | HAL  | 54.7  | 39.4  | 29.3  |
| 07     | ABR  | 60    | 47.3  | 39.4  |
| 08     | KHS  | 49.4  | 42.4  | 49.6  |
| 09     | PJS  | 114.3 | 81.5  | 55.5  |
| 10     | KLN  | 74    | 63.7  | 61.6  |
| 11     | UIS  | 119.2 | 64.3  | 56.4  |
| 12     | KWJ  | 78.5  | 63.4  | 57.4  |
| 13     | LYS  | 94.7  | 86.5  | 72.3  |
| 14     | PHS  | 118.7 | 77.8  | 62.8  |
| 15     | KDH  | 108.1 | 82.2  | 76.7  |
| 16     | KDY  | 138.7 | 114.6 | 72.3  |
| 17     | YJY  | 86.3  | 87.7  | 81.4  |
| 18     | PHJ  | 42.7  | 38.7  | 36.5  |
| 19     | BHW  | 71.4  | 63.1  | 58.8  |
| 20     | AYJ  | 83.5  | 78.1  | 72.7  |
| 21     | SSE  | 191.7 | 90.5  | 78.1  |
| 22     | WIH  | 67.1  | 53.3  | 49    |
| 23     | HKA  | 89.2  | 63.2  | 52.0  |
| 24     | LMA  | 39    | 31.2  | 30.8  |
| 25     | LHJ  | 53.8  | 49.1  | 46.4  |
| 26     | WMK  | 58.2  | 54.4  | 46.9  |
| 27     | YIY  | 208.9 | 184.9 | 101.9 |
| 28     | PSK  | 185.8 | 105.7 | 81.7  |
| 29     | KYM  | 165.2 | 85.0  | 63.3  |
| 30     | NGJY | 92.7  | 77.5  | 57.6  |
| 평균     |      | 97.2  | 72.8  | 60.0  |
| 표준편차   |      | 46.9  | 31.7  | 17.6  |

## ② 결과 분석

Submeter를 이용한 기기 측정 결과 시료를 바르기 전 보다 시료를 바른 후 2주, 4주 후의 유분이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 유분의 감소정도는 0주에 95.2, 2주 후에는 72.3, 4주 후에는 60이었다.

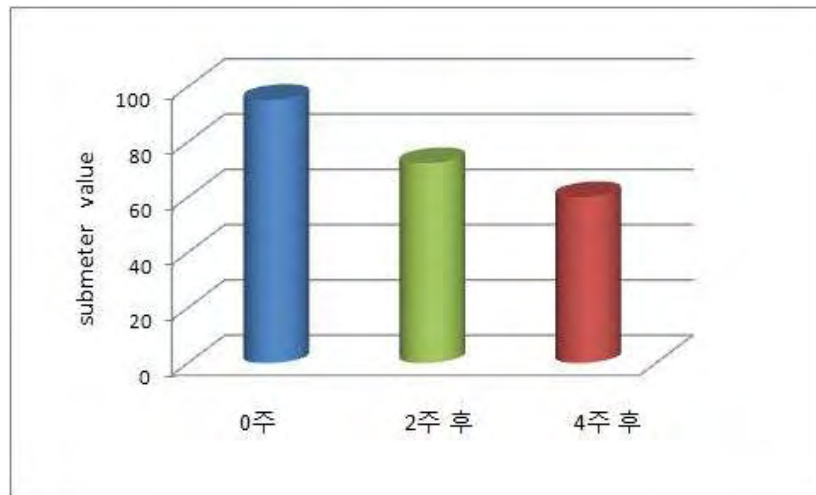


그림 2. 이마 부위의 유분량 측정 결과값

## (2) 육안평가 결과

육안평가는 전문의의 육안평가, 사진촬영평가, VisioFace(안면영상 분석기)를 통하여 실시하였다.

### 가. 육안상대평가(전문의의 육안평가)

본 연구에서는 한국형 여드름 중증도 시스템(KAGS-2)을 기준으로 피부과 전문의의 육안평가로 0주차(도포하기전), 2주차(도포 후 2주후), 4주차(도포 후 4주후)를 각각 평가 하였다.

표 5-1. 한국형 여드름 중증도 시스템(Korean Acne Grading System: KAGS)

| Grade \ KAGS | KAGS-2    |           |                  |
|--------------|-----------|-----------|------------------|
| Grade 1      | 구진 10개 이하 |           |                  |
| Grade 2      | 구진 11~30개 |           |                  |
| Grade 3      | 구진 31개 이상 | 결절 10개 이하 |                  |
| Grade 4      |           | 결절 11~20개 | 흉터가능성 증가<br>(강조) |
| Grade 5      |           | 결절 21~30개 |                  |
| Grade 6      |           | 결절 31개 이상 |                  |



그림 3. 6단계로 본 여드름 진단 기준

여드름 진단기준은 얼굴에 병변(주진, 결절 등)의 개수와 형태에 따라 6단계로 나누었으며 그 기준을 보면 1등급은 지름 5mm 이내의 ‘구진’(적색의 좁쌀처럼 솟아오른 병변)이 10개 이하, 2등급은 11~30개의 구진, 3등급은 구진 31개 이상과 ‘결절’ 10개 이하, 4등급은 결절 11~20개와 가벼운 진행성 흉터(반흔)가 있는 상태, 5등급은 결절 21~30개와 중등도의 진행성 반흔이 있는 증상, 6등급은 결절 31개 이상, 심한 진행성 반흔이 있는 증상이다.

① 결과

표 6-1. 전문의의 육안평가 결과

| 시험자<br>번호 | 성 명  | 0주-구진, 결절, grade |    |   | 2주 후 |    |   | 4주 후 |    |   |
|-----------|------|------------------|----|---|------|----|---|------|----|---|
|           |      |                  |    |   |      |    |   |      |    |   |
| 01        | LJL  | 15               | 8  | 2 | 13   | 7  | 2 | 15   | 7  | 2 |
| 02        | HDB  | 22               | 5  | 2 | 19   | 6  | 2 | 20   | 7  | 2 |
| 03        | YYJ  | 21               | 8  | 2 | 15   | 6  | 2 | 14   | 5  | 2 |
| 04        | YSH  | 12               | 10 | 2 | 7    | 8  | 1 | 4    | 5  | 1 |
| 05        | KYM  | 40               | 8  | 3 | 35   | 6  | 3 | 29   | 5  | 2 |
| 06        | HAL  | 21               | 10 | 2 | 11   | 10 | 2 | 4    | 5  | 1 |
| 07        | ABR  | 12               | 9  | 2 | 12   | 8  | 2 | 7    | 4  | 1 |
| 08        | KHS  | 17               | 3  | 2 | 10   | 2  | 1 | 7    | 1  | 1 |
| 09        | PJS  | 13               | 12 | 4 | 13   | 8  | 2 | 10   | 5  | 1 |
| 10        | KLN  | 20               | 15 | 4 | 17   | 10 | 2 | 10   | 8  | 1 |
| 11        | UIS  | 32               | 10 | 3 | 29   | 10 | 2 | 20   | 5  | 2 |
| 12        | KWJ  | 23               | 8  | 2 | 9    | 7  | 1 | 4    | 3  | 1 |
| 13        | LYS  | 11               | 9  | 2 | 9    | 8  | 1 | 5    | 3  | 1 |
| 14        | PHS  | 11               | 9  | 2 | 5    | 8  | 1 | 8    | 5  | 1 |
| 15        | KDH  | 11               | 8  | 2 | 5    | 7  | 1 | 2    | 4  | 1 |
| 16        | KDY  | 20               | 8  | 2 | 15   | 7  | 2 | 5    | 3  | 1 |
| 17        | YJY  | 40               | 11 | 4 | 35   | 10 | 3 | 37   | 9  | 3 |
| 18        | PHJ  | 14               | 20 | 4 | 13   | 10 | 2 | 11   | 12 | 2 |
| 19        | BHW  | 11               | 8  | 2 | 11   | 7  | 2 | 8    | 6  | 1 |
| 20        | AYJ  | 16               | 7  | 2 | 10   | 7  | 1 | 9    | 7  | 1 |
| 21        | SSE  | 13               | 6  | 2 | 7    | 7  | 1 | 5    | 7  | 1 |
| 22        | WIH  | 11               | 6  | 2 | 14   | 6  | 2 | 12   | 5  | 2 |
| 23        | HKA  | 20               | 9  | 2 | 7    | 6  | 1 | 4    | 4  | 1 |
| 24        | LMA  | 11               | 7  | 2 | 5    | 7  | 1 | 3    | 3  | 1 |
| 25        | LHJ  | 15               | 8  | 2 | 15   | 8  | 2 | 7    | 8  | 1 |
| 26        | WMK  | 11               | 7  | 2 | 5    | 8  | 1 | 5    | 7  | 1 |
| 27        | YIY  | 15               | 8  | 2 | 15   | 9  | 2 | 14   | 8  | 2 |
| 28        | PSK  | 11               | 9  | 2 | 7    | 5  | 1 | 5    | 3  | 1 |
| 29        | KYM  | 11               | 6  | 2 | 6    | 4  | 1 | 5    | 4  | 1 |
| 30        | NGJY | 11               | 3  | 2 | 9    | 3  | 1 | 7    | 2  | 1 |
| 평균        |      | 2.3              |    |   | 1.6  |    |   | 1.3  |    |   |
| 표준편차      |      | 0.7              |    |   | 0.6  |    |   | 0.5  |    |   |

## ② 결과 분석

한국형 여드름 중증도 시스템(KAGS-2)을 통한 전문의의 육안상대평가 결과는 시료를 바르기 전보다 시료 바른 후 2주, 4주 후의 여드름 개선 효과가 좋아 짐을 확인할 수 있었다. 0주 때의 KAGS-2의 평균 단계값을 보면 2.3에서 2주 후에는 1.6 단계, 4주 후에는 1.3 단계로 얼굴 부위에 있는 구진이나 결절이 줄어들음을 확인할 수 있었다.

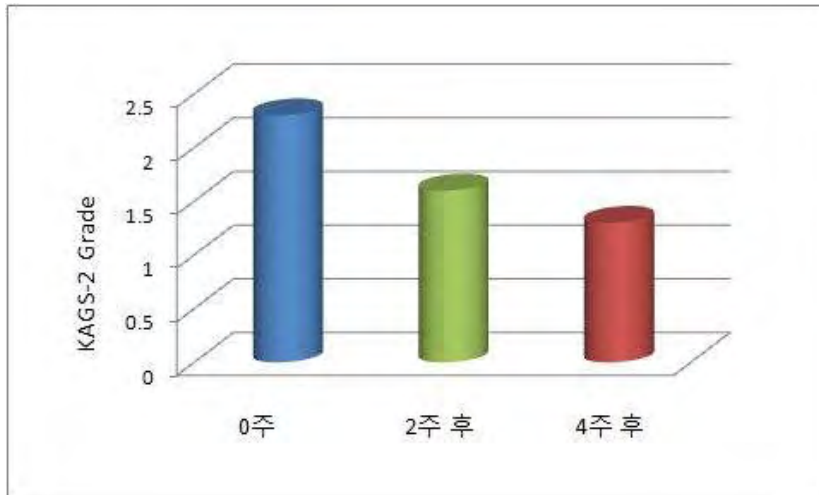


그림 4. 전문의의 상대적 육안 평가(KAGS-2)

나. 사진평가

001 LJL



0주차



2주차

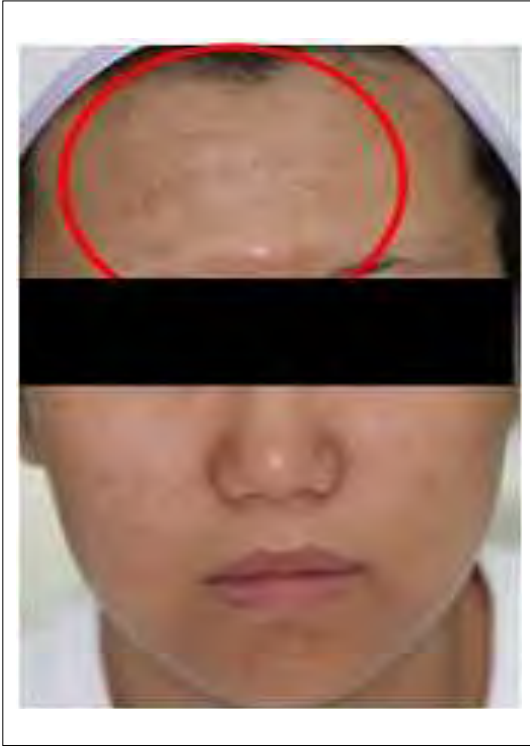


4주차





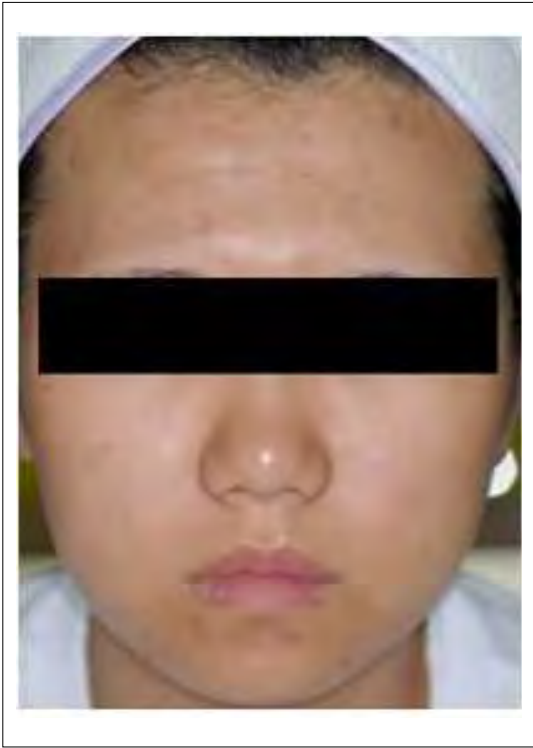
003 YYJ



0주차



2주차



4주차

005 KYM



0주차



2주차



4주차

006 HAL



0주차



2주차



4주차



010 KLN



0주차



2주차

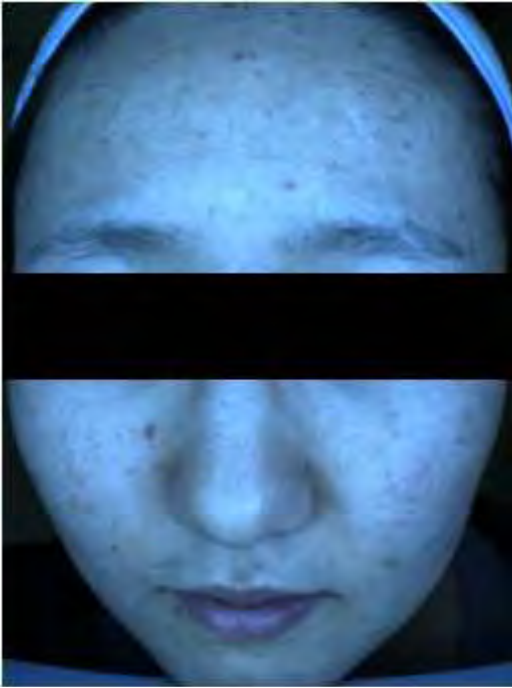


4주차

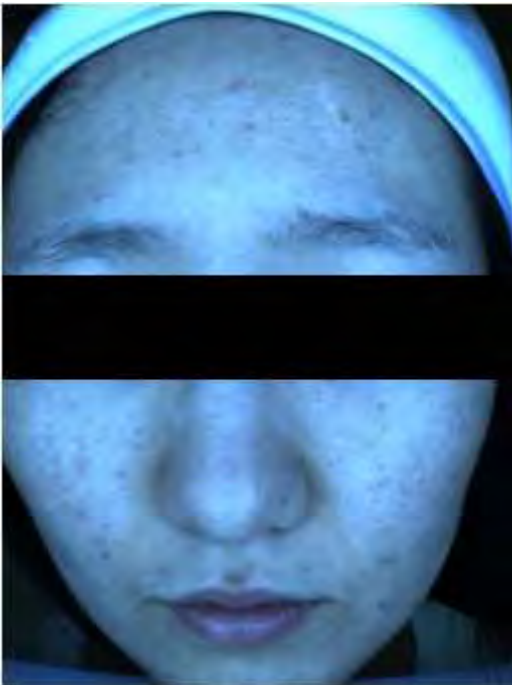
다. Visioface 평가(UV, 가시광선 사용)

001 L.JL

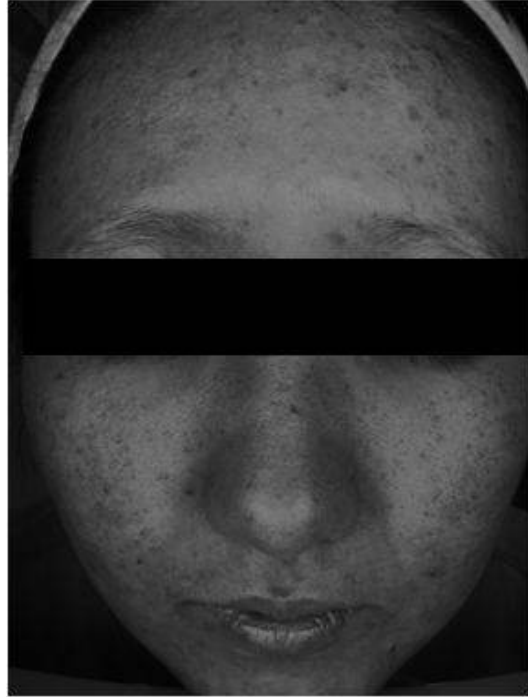
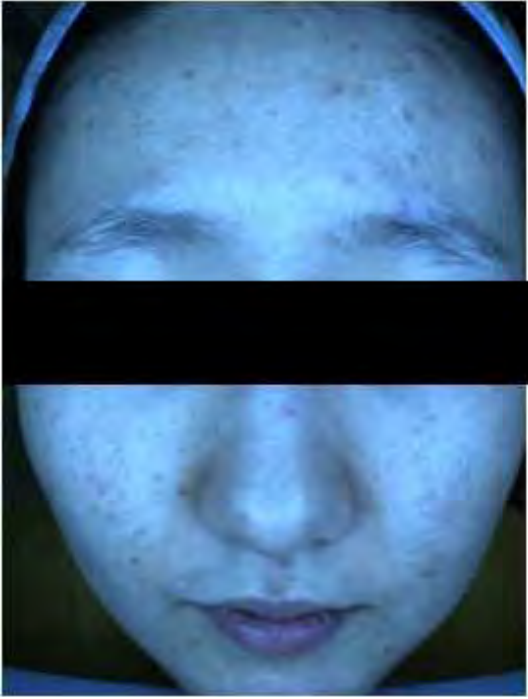
0주차



2주차

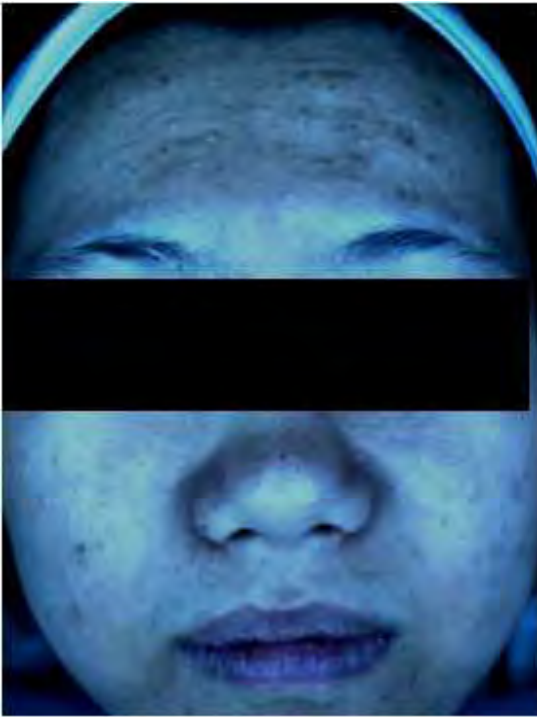


4주차

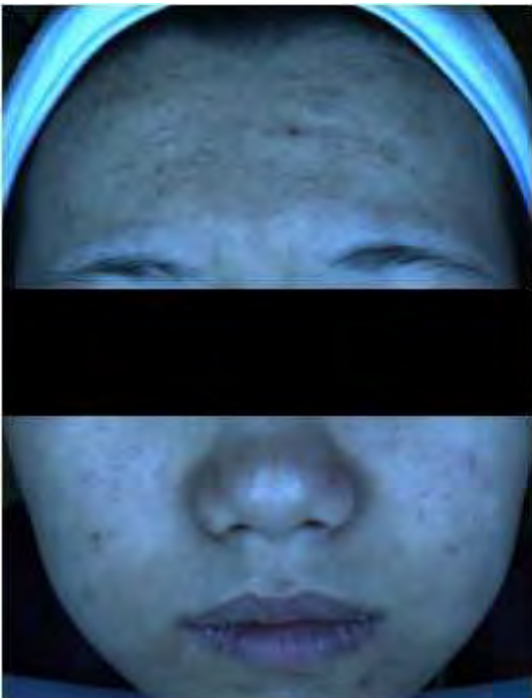


003 YYJ

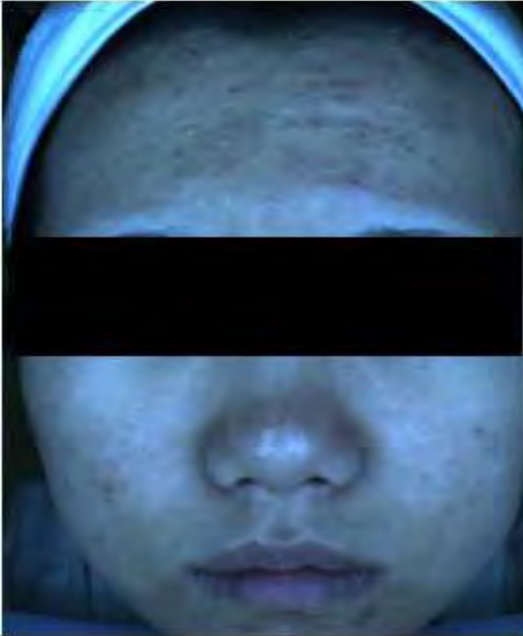
0주차



2주차



4주차



005 KYM

0주차

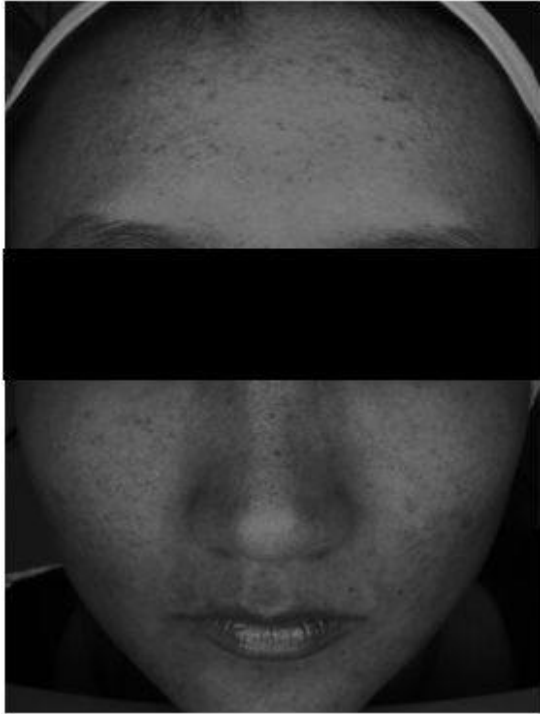
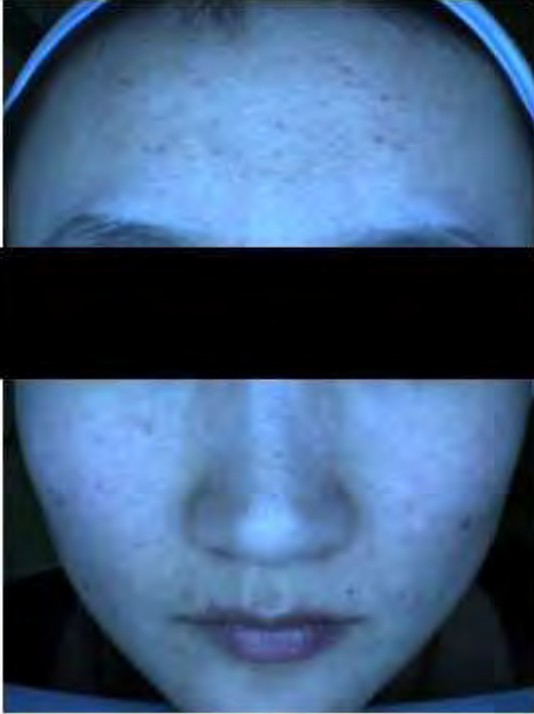


2주차





4주차

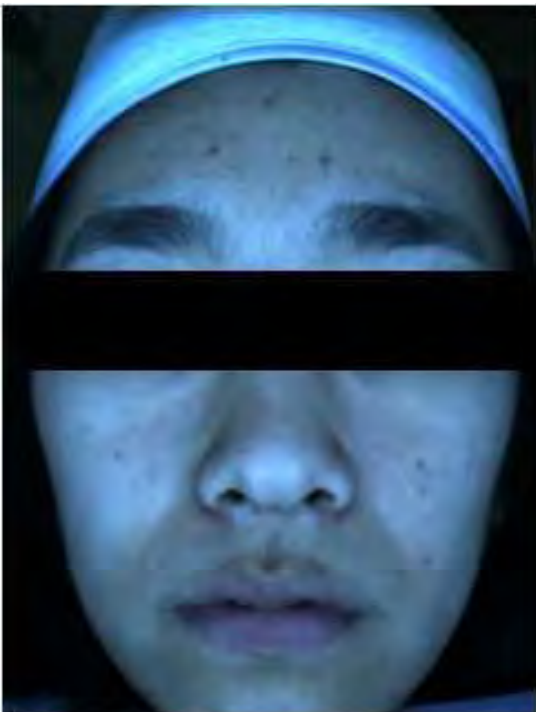


006 HAL

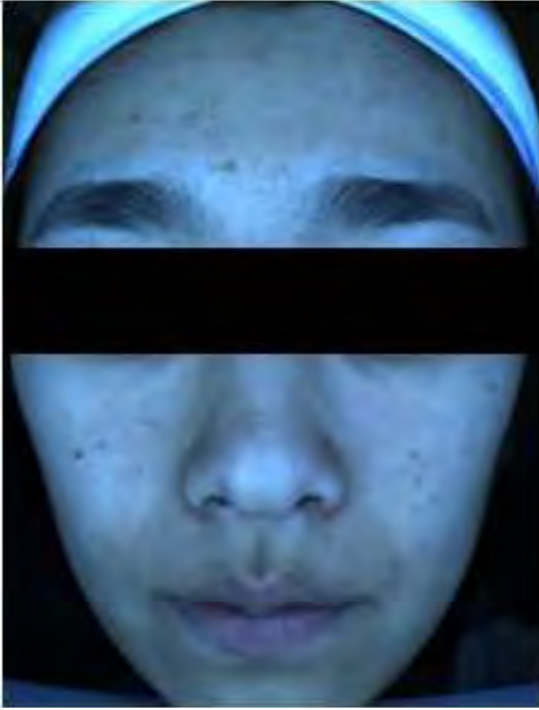
0주차



2주차

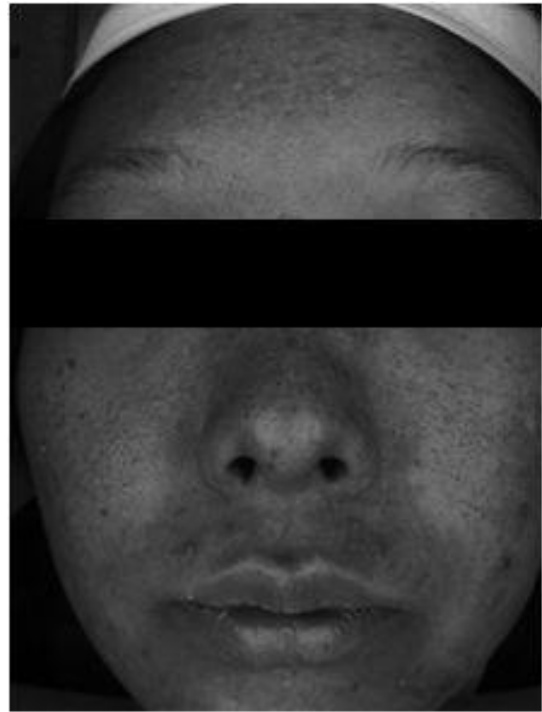
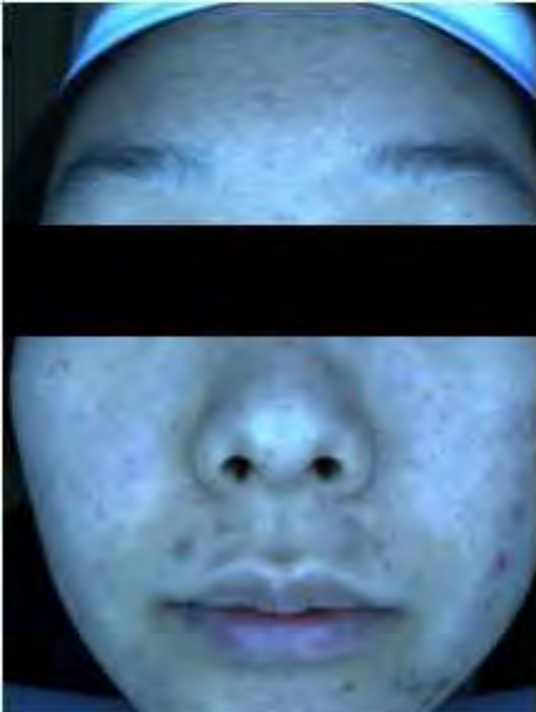


4주차

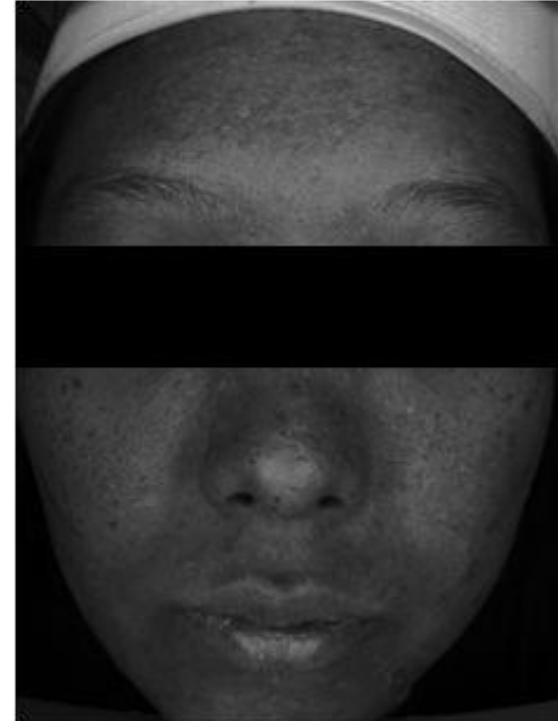
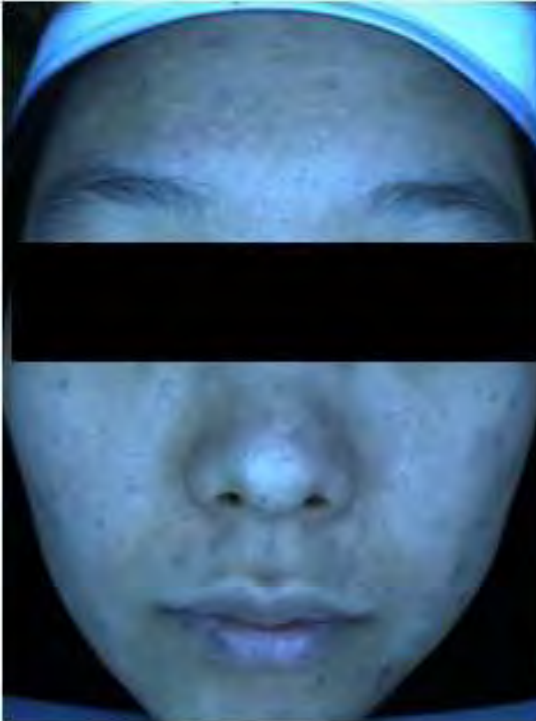


010 KLN

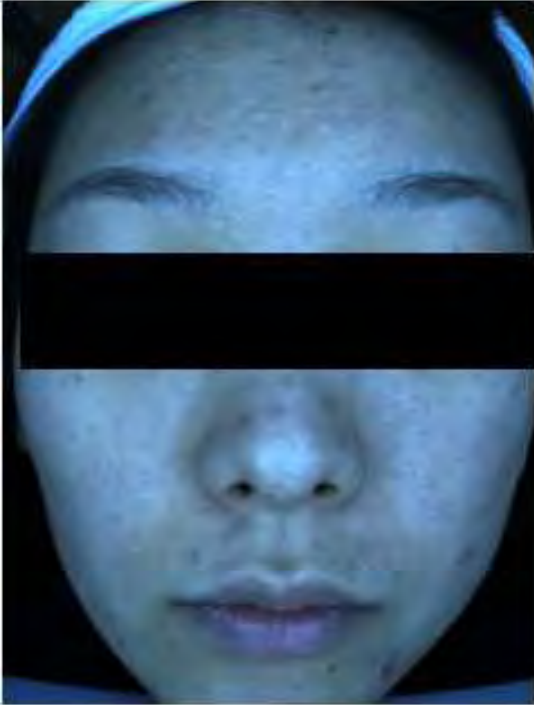
0주차



2주차



4주차



### (3) 설문평가 결과

본 연구에서는 여드름 개선 제품을 사용한 후 2주, 4주 후에 피험자의 동의하에 설문지를 작성하였다. 그 내용을 보면 본 제품을 사용한 후 얼굴에 유분기가 없어졌는지, 얼굴에 있던 여드름이 많이 없어졌는지, 모공의 크기가 현저하게 줄었는지, 제품을 사용한 후 피부 상태가 전보다 좋아졌는지에 관해서 설문을 받아 제품을 직접 사용한 사람들을 통해 객관적으로 평가 할 수 있었다.

1) 제품 사용 후 얼굴에 유분기가 많이 없어졌습니까?

- ① 전혀변화없음 ② 거의변화없음 ③ 보통 ④ 약간 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

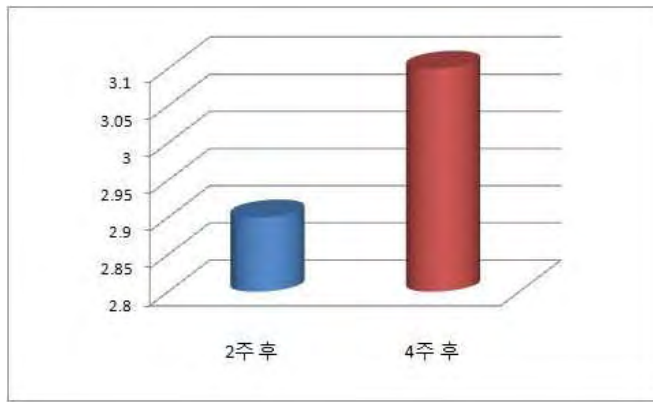


그림 5. 피험자의 피부유분 정도 설문평가

2) 제품 사용 후 얼굴에 있던 여드름 많이 없어졌습니까?

- ① 전혀변화없음 ② 거의변화없음 ③ 보통 ④ 약간 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

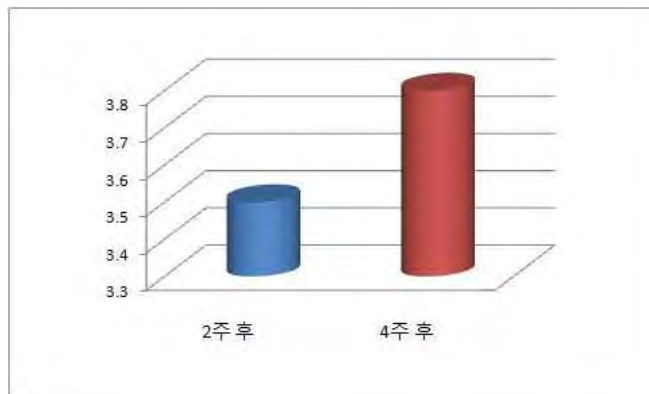


그림 6. 피험자의 여드름 정도 설문평가

3) 전반적으로 제품을 사용 한 후 피부상태가 전보다 좋아졌습니까?

- ① 전혀변화없음 ② 거의변화없음 ③ 보통 ④ 약간 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

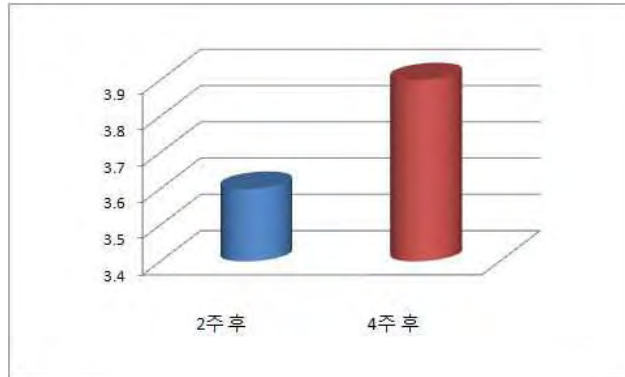


그림 7. 피험자의 피부상태 정도 설문평가

제품 설문평가에서 피험자들은 본인의 얼굴에 있던 여드름이 많이 없어졌다고 생각하고 있고, 전반적으로 제품을 사용한 후 피부상태가 전보다 좋아졌다가 평가하였다. 또한 여드름 개선 제품을 사용하는 동안 본 제품에 대해 트러블이 거의 없거나 전혀 없었다고 응답하였다.

#### (4) 총괄안전도

본 연구에서는 최초 인체적용시험제품 치료 4주후에 피부자극도 기타 이상반응 발생 여부에 따라 총괄안전도를 평가하였다.

평가한 결과 시험제품에 의한 이상반응이 없는 안전한 점수인 4점이 나왔다.

(4점: 안전, 3점: 대체로 안전, 2점: 안전에 문제 있음, 1점: 안전하지 않음)

#### 4. 통계분석 방법 및 결과

본 인체시험의 결과 정리 및 분석을 위하여 Excel program과 통계 소프트웨어인 SPSS Window version 10.1을 사용하였으며, 통계의 유의성을 위하여 유의 수준 0.05를 설정하였고, 분석을 위하여 이용되는 통계적 방법은 전체 피험자의 baseline characteristics은 동질성 검사를 위하여 frequency analysis 및 descriptive analysis로 분석하였다.

##### ① 기기 평가(Submeter 유분 측정)

|       | 0주        | 2주후       | 4주후       | P value |
|-------|-----------|-----------|-----------|---------|
|       | Mean±S.D  | Mean±S.D  | Mean±S.D  |         |
| 유분측정량 | 95.2±45.7 | 72.3±31.5 | 60.0±17.6 | 0.001   |

기기측정한 결과를 통계 분석해 본 결과 시료를 바르기 전과 시료를 바른 후의 상관계수는 77%이고, 95% 신뢰구간에서 상한 48, 하한 22%이며 유분량은 시료를 바른 후가 통계적으로 유의성 있게 감소하였다.

##### ② 육안상대평가(KAGS-2 전문의 평가)

|         | 0주       | 2주후      | 4주후      | P value |
|---------|----------|----------|----------|---------|
|         | Mean±S.D | Mean±S.D | Mean±S.D |         |
| KAGS 등급 | 2.3±0.7  | 1.6±0.6  | 1.3±0.5  | 0.001   |

전문의의 육안평가를 통계 분석한 결과는 시료를 바른 후 4주 후 통계적으로 유의하게 낮아졌으므로 여드름 개선효과가 있다고 판단하였다.

##### ③ 총괄적 유효성 평가(Global assesment of efficacy)

4주간의 임상연구 후 시험에 참여한 피험자(설문평가)와 시험을 담당할 담당자에게 총괄적 유효성 평가를 실시하였다. 피험자와 담당자 모두 시료를 바른 후(4주)가 유효성이 높게 나타났다.

| 피험자          |     | average | standard deviation |
|--------------|-----|---------|--------------------|
| Total (N=30) |     | 3.8     | 0.9                |
| time         | 2주후 | 3.5     | 0.8                |
|              | 4주후 | 3.8     | 0.9                |



| 담당자          |     | average | standard deviation |
|--------------|-----|---------|--------------------|
| Total (N=30) |     | 3.9     | 0.7                |
| time         | 2주후 | 3.6     | 0.8                |
|              | 4주후 | 3.9     | 0.7                |

4주간의 임상연구 후 시험에 참여한 피험자(설문평가)와 시험을 담당한 담당자에게 총괄적 유효성 평가를 실시하였다. 피험자와 담당자 모두 시료를 바른 후(4주)가 유효성이 높게 나타났다.

#### ④ 총괄적 안전도

4주간의 임상연구 후 시험에 참여한 피험자(설문평가)와 시험을 담당한 담당자 모두에서 별다른 이상반응에 대한 보고가 없었으며 총괄적 안전도 평가결과도 안전한 것으로 나타났으며, 이를 근거로 시험제품은 안전한 것을 알 수 있었다.

## 7. 고찰 및 결론

본 시험은 (주)서진바이오텍에서 개발한 한방소재제품의 여드름 개선효과 제품을 평가하기 위하여 수행되었다. 본 시험에서는 만 18세 ~ 38세 사이의 한국인 남성 및 여성 피험자 30명을 대상으로 4주간 실험을 수행하였다.

시료의 여드름 개선효과를 평가하기 위해 매일 1회 이상 아침, 저녁으로 시료를 여드름 부위에 도포하였으며, 시료 도포 전, 도포 2주, 4주 후 기기를 이용하여 측정하였다.

기기로 측정한 결과 시료를 바른 후의 결과값이 도포전과 비교하여 유의한 차이를 보였으며, 육안평가에서도 통계적으로 유의한 차이를 관찰하였다.

(1)총 연구대상자는 30명으로 남자 11명, 여자 19명이었다. 전체 평균 연령은  $21 \pm 1.8$ 세였다.

(2)전문의의 육안으로 한국형 여드름 중증도 시스템(KAGS-2)을 통한 육안상대평가 결과는 시료를 바르기 전보다 시료 바른 후 2주, 4주 후의 여드름 개선 효과가 통계적으로 유의성 있게 나타났다.

(3)피부유분 함유량은 시료를 바른 후가 바르기 전보다 유의성 있게 유분량이 감소하였다.

(4) 총괄적 유효성 평가는 피험자와 담당자 모두 시료를 바른 후 유효성이 높게 나타났다.

(5) 총괄적 안전도 평가 안전한 제품임을 알 수 있었다.

따라서 한방 소재의 여드름 개선 효과 제품은 우수한 피부 유분량 감소 효과가 있고 여드름 개선효능을 나타내는 것을 확인하였다.

## 8. 시험기관 실태조사서

### (1) 연구기관

연구기관명: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

주 소: 충북 제천시 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

### (2) 연구기관의 설립목적

본 연구기관(연구센터)은 기업체들이 센터의 지원을 통하여 안전성실험, 효능효과실험 등을 거쳐 안전하고 신뢰받는 바이오제품을 생산함으로써 고부가가치의 한방바이오 산업을 육성하고자 설립된 산업자원부 지정 지역혁신센터(RIC)로서, 특히 화장품 및 한방 화장품의 기능성 화장품 인증에 관련된 인체적용시험(자외선차단지수, 자외선A차단지수, 주름개선, 미백개선)을 수행하고, 이와 관련된 인력양성 및 기술 개발을 위해 설립된 기관이다.

### (3) 연구기관장

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터장      한의학 박사      김 이 화

### (4) 인체적용시험 연구책임자

맑은피부과 원장      피부과      전문의      백 종 현  
세명대학교 한의과대학 피부과학교실 외래부교수

### (5) 인체적용시험 공동연구자

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 한방피부과 전문의      김 희 택

### (6) 연구자

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 임상부팀장      김 용 민  
세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 선임연구원      호 동 수  
세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 연구원      엄 나 영  
세명대학교 한방병원      오 민 지

### (7) 연구기관의 시험항목

- A. 화장품 및 한방화장품의 자외선차단 평가시험
- B. 화장품 및 한방화장품의 자외선A차단 평가시험
- C. 화장품 및 한방화장품의 주름개선 평가시험

- D. 화장품 및 한방화장품의 미백개선 평가시험
- E. 화장품 및 한방화장품의 안전성 평가시험

(8) 연구기관의 주요시설 및 장비

- A. Multi-port Solar Simulator Multi601-150W
- B. PMA-2100 meter (탐침기 포함)
- C. Spectrophotometer CM-2600D
- D. Micro pipette M100
- E. 자외선 조사기 승강기
- F. 피험자용 자외선 조사 의자
- G. 항온항습기
- H. Nikon D200 디지털카메라, 60mm Nikon 렌즈, 후레쉬
- I. Skin-Visiometer SV-600
- J. Multi Probe-Adapter MPA5 및 Probe  
(Corneometer, Tewameter, Skin pH-meter, Skin thermometer,  
Frictionmeter, Reviscometer, Mexameter)
- K. Cutometer MPA580
- L. Mexameter Stand Alone
- M. Sensor for room condition SRC100
- N. Global Hair & Face photographic system
- O. Visio-Face
- P. Laser Doppler Perfusion Imager
- Q. 피험자 대기실
- R. 연구실  
(자외선조사실, 내수성평가욕조, 사진촬영실, 주름 및 보습 평가실  
미백 및 혈류량 평가실, 안전성평가실, in vitro 실험실, 샤워실)

# 증례 기록지

## 증례 조사표 (Case Report Form)

한방\*\*소재 제품의 여드름 개선효과에 대한 인체적용시험

|                   |  |
|-------------------|--|
| 피험자성명(영문이니셜)      |  |
| 환자 번호(Charter 번호) |  |
| 연구자명              |  |

\* 기록상 주의점

1. 임상조사표는 흑색볼펜으로 기입해 주십시오.
2. 기록 수정시에는 원래 기재한 내용을 읽을 수 있게 한 줄을 그은 후 수정한 다음 날짜와 기록자의 날인을 기입해주십시오.

## 1. 관찰항목 및 임상검사 항목에 대한 Flow Chart

| 항 목             | 검 사 일 정  |         |        |
|-----------------|----------|---------|--------|
|                 | 치료 전(2일) | 치료 2주후  | 치료 4주후 |
| 환자동의서           | ○        |         |        |
| 선정기준/제외기준       | ○        |         |        |
| 환자배경 및 병력검사     | ○        |         |        |
| 임상증상 검사         | ○        | ○       | ○      |
| 총괄적 유효성 평가      |          |         | ○      |
| 순응도 검사          |          | ○       | ○      |
| 이상반응 조사         |          | ←—————→ |        |
| 안전성 평가          |          |         | ○      |
| 한방**소재 제품 배포    | ○        |         |        |
| 잔여 한방**소재 제품 수거 |          | ○       | ○      |

## 2. 피험자 방문일

|         | 예정일 | 방문일 |
|---------|-----|-----|
| 치료 전 검사 |     | 월 일 |
| 치료 2주후  | 월 일 | 월 일 |
| 치료 4주후  | 월 일 | 월 일 |

### 3. 피험자의 선정기준 및 제외기준

| 선정기준   | 예 아니오*                   |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 신체 건강한 남/여성                                      | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 나이: 20-35세                                       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 경증/경중도/여드름이 있는 자(KAGS grade 에서 1-30해당)           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 연구기간 동안 방문 일정이 가능하고 인체 동의서에 서명하며 연구지시를 따를 수 있는 자 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

\*Note : "아니오"에 해당하는 경우 탈락시킨다.

| 제외기준   | 예 아니오*                   |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 화장품, 의약품에 자극이나 알러지가 있는 경우  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 실험을 시작하기 전이나 실험 중, 28일 이내에 면역억제제를 복용한 경우   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 얼굴용 국소 여드름 치료제를 실험을 시작하기 한 달 전 동안 혹은 실험하는 동안 사용한 경우                              | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 실험 시작 전이나 실험 중, 염증반응에 대해 효과가 있는 것으로 알려져 용인된 체계적인 약물치료법 혹은 치료법을 처치 받은 경우          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 실험을 시작하기 전 석 달 내에 로아큐틴 성분을 복용한 경우  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 정해진 날짜에 해당되는 지속적인 방문 혹은 연구자의 판단과 상충되는 의료적 조건에 부합하는 경우 혹은, 부적합한 피험자가 될 가능성이 있는 경우 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 임신 중, 수유 중, 혹은 실험 기간 동안 임신할 가능성이 있는 경우   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

\*Note : "예"에 해당하는 경우 탈락시킨다.

연구 대상으로 적합성 여부 : 적합 부적합



#### 4. 피험자의 배경 및 병력검사

|   |               |               |   |      |
|---|---------------|---------------|---|------|
| 환 자 성 명   |               | 성      별      | <input type="checkbox"/> 남 <input type="checkbox"/> 여 |      |
| 나           이   | 만           세 | 생   년   월   일 | 년    월    일   |      |
| 체           중   | kg            | 신           장 | cm  |      |
| 진    단    명   |               | 이   병   기   간 | _____년 _____개월  |      |
| 병용약제<br><input type="checkbox"/> No<br><input type="checkbox"/> Yes | 약제명           | 투여경로          | 1일 투여량  | 투여기간 |
|   |               |               |   |      |
|   |               |               |   |      |
|   |               |               |   |      |
|   |               |               |   |      |
| * comment란에 질병의 진행여부 및 치료여부에 대해 자세히 기입해 주세요.                        | Comment :     |               |   |      |

### 5. 순응도 검사

|                         | 치료 2주후   | 치료 4주후   |
|-------------------------|--|--|
| 도포 후 남은<br>용량 조사        | <input type="checkbox"/> 없음<br><input type="checkbox"/> 있음                 | <input type="checkbox"/> 없음<br><input type="checkbox"/> 있음                 |
| 비용 약품 변동조사<br>(투여전 과차이) | <input type="checkbox"/> 없음<br><input type="checkbox"/> 있음<br>(아래에 자세히 기록) | <input type="checkbox"/> 없음<br><input type="checkbox"/> 있음<br>(아래에 자세히 기록) |

## 6. 안전성 평가

- 피부자극도 -

□없 음                      □있 음

| 증 상                  | 발 현 일  | 정 도'  | 처 치 방 법 | 처치 후<br>소실여부<br>(소실:O 비소실 X) | 소 실 일 | 중단여부 |    |
|----------------------|--|-------|---------|------------------------------|-------|------|----|
|                      |  |       |         |                              |       | 중단   | 계속 |
|                      | / /  | 1 2 3 |         |                              | / /   |      |    |
|                      | / /  | 1 2 3 |         |                              | / /   |      |    |
|                      | / /  | 1 2 3 |         |                              | / /   |      |    |
|                      | / /  | 1 2 3 |         |                              | / /   |      |    |
| <b>*기준<br/>(3단계)</b> | 1. 경 증(mild) : 홍반 및 부종이 약긴 있음<br>2. 중등도(moderate) : 홍반이 있으며 1mm 이하의 부종이 있음<br>3. 중 증(severe) : 심한 홍반이 있으며 1mm이상의 심한 부종이 있음 |       |         |                              |       |      |    |

-기타 이상반응-

□없 음                      □있 음

| 증 상                   | 발 현 일  | 정 도'  | 처치<br>방법                       | 처치 후<br>소실여부<br>(소실:O 비소실 X) | 소 실 일 | 시험화장품과의<br>관련성™ | 중단여부 |    |
|-----------------------|--|-------|--------------------------------|------------------------------|-------|-----------------|------|----|
|                       |  |       |                                |                              |       |                 | 중단   | 계속 |
|                       | / /  | 1 2 3 | comment<br>란에<br>자사<br>히<br>기입 |                              | / /   | 1 2 3           |      |    |
|                       | / /  | 1 2 3 |                                |                              | / /   | 1 2 3           |      |    |
|                       | / /  | 1 2 3 |                                |                              | / /   | 1 2 3           |      |    |
|                       | / /  | 1 2 3 |                                |                              | / /   | 1 2 3           |      |    |
| comment               |  |       |                                |                              |       |                 |      |    |
| <b>*기준<br/>(3단계)</b>  | 1. 경 증(mild) : 잘 인지될 수 없을 정도의 약긴 불편한 증상<br>2. 중등도(moderate) : 명확한 증상은 있으나 별다른 처치가 필요 없음<br>3. 중 증(severe) : 매우 불편하여 신속한 처리를 요함   |       |                                |                              |       |                 |      |    |
| <b>**기준<br/>(3단계)</b> | 1. 관련없음(NO Relation): 시험용 제품으로 인한 이상반응으로 판단되지 않으며 다른 원인에 의한 것임<br>2. 관련이 있을 수 있음(Possible): 시험용 제품으로 인한 일시적인 이상반응이며 임상증상에 별다른 영향을 미치지 않음<br>3. 명백한 관련이 있음(Definite): 시험용 제품으로 인한 명백한 이상반응임 |       |                                |                              |       |                 |      |    |

## 7. 시험 조기 중지 보고서

계획된 시험 종료일 이전에 치료를 중단하게 된 피험자에 대하여 작성

최종 시험용 제품 사용일 :       년       월       일

중지 및 탈락 사유

| 분류                           | 기준   | 평가유무                               |
|------------------------------|--|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 중지자 | <input type="checkbox"/> 인체적용시험용 제품과 '관련없음'으로 판정한 이상반응으로 인하여 조기에 시험을 중지한 경우<br><input type="checkbox"/> 인체적용시험용 제품과의 관련성이 명백하지 않은 기타의 이유로 조기에 시험을 중지한 경우<br><input type="checkbox"/> 인체적용시험계획서를 심하게 벗어난 경우(예를 들면, 검사를 받지 않거나 계획된 일정을 따르지 않는 경우, 더 이상의 투약을 거부하는 경우) | 최종 분석시<br>안전성 평가에<br>포함시킴          |
| <input type="checkbox"/> 탈락자 | <input type="checkbox"/> 인체적용시험용 제품과 '관련이 있을 수 있음' 또는 '명백한 관련 있음'으로 판정된 이상반응으로 시험을 중지한 경우<br><input type="checkbox"/> 효과가 없어(증상이 증중되거나 악화하여) 조기에 시험을 중지한 경우  | 최종 분석시<br>유효성 및<br>안전성 평가에<br>포함시킴 |

### 처리방법

중지자 및 탈락자에 대하여 다음과 같은 처리가 이루어졌는지 확인하십시오.

- 조기 시험 중지 보고서 작성
- 최종 일반 신체검사 및 임상화학적 검사(부작용의 경우만 해당) 실시
- 이상반응의 경우, 이상반응 발생 보고서 작성
- 중대한 이상반응의 경우,  
담당자 - 연구책임자 및 의뢰자에게 통지  
연구책임자 - 인체적용시험위원회 및 의뢰자에게 보고
- 환자 증례조사표 및 잔여 시험용 제품을 의뢰자에게 송부
- 탈락자의 경우 시험 4주후 평가항목을 모두 실시
- 중지자의 경우 시험 4주후 안전성 평가항목을 실시

### 기타의견

연구자 성명 및 날인

(       년       월       일)

## 8 . 피시힘 부위의 평가

### (1) 육안평가

#### ① 육안상대평가: 전문의의 육안평가

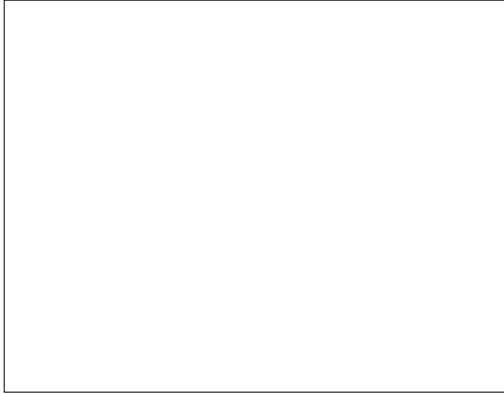
| \ 주차  | 0주차 | 2주차 | 4주차 |
|-------|-----|-----|-----|
| 구진 개수 |     |     |     |
| 결절 개수 |     |     |     |
| Grade |     |     |     |

#### ※ 한국형 여드름 중증도 시스템 (Korean Acne Grading System : KAGS)

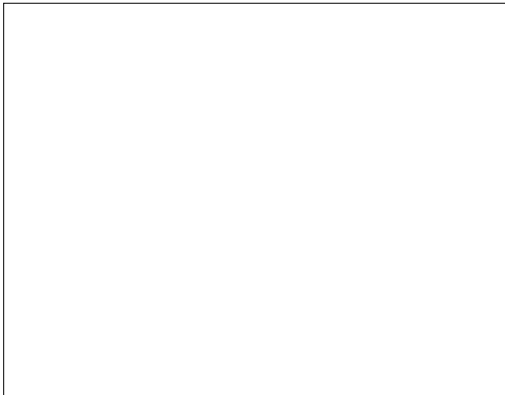
| Grade \ KAGS | KAGS-2    |           |                  |
|--------------|-----------|-----------|------------------|
| Grade 1      | 구진 10개 이하 |           |                  |
| Grade 2      | 구진 11~30개 |           |                  |
| Grade 3      | 구진 31개 이상 | 결절 10개 이하 |                  |
| Grade 4      |           | 결절 11~20개 | 흉터가능성 증가<br>(강조) |
| Grade 5      |           | 결절 21~30개 |                  |
| Grade 6      |           | 결절 31개 이상 |                  |

② 사진촬영

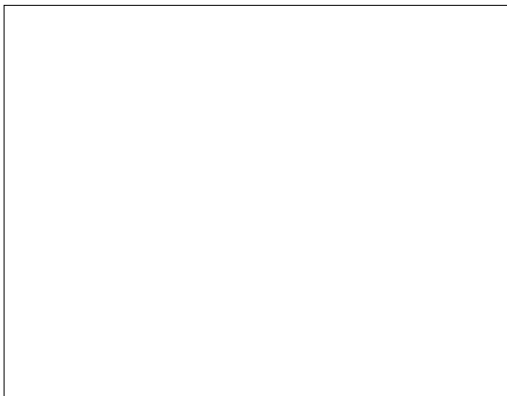
0주차



2주차

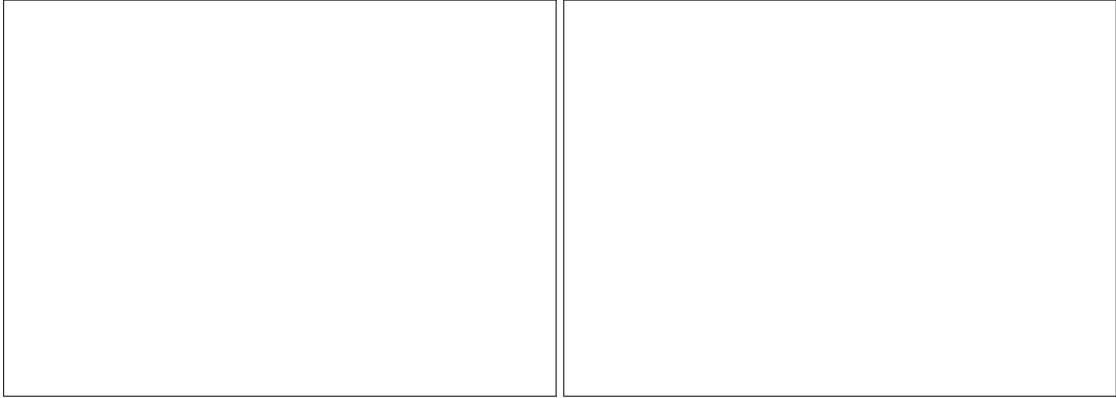


4주차

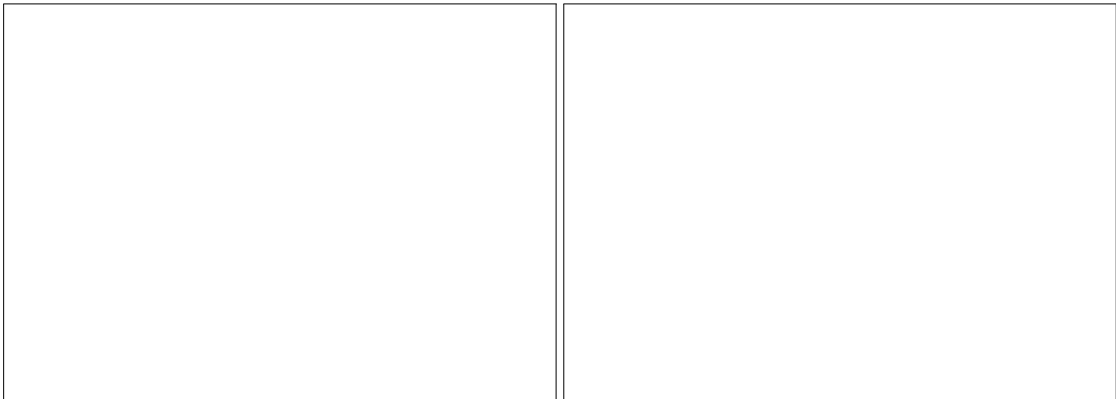


③ Visioface

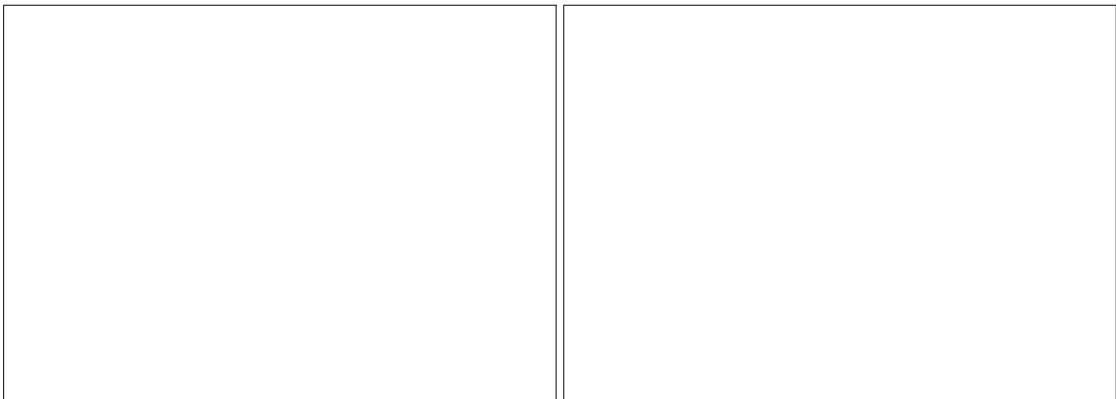
0주차



2주차



4주차



(2) 기기평가

Sebumeter

| 횟수 \ 주차 | 0주차 | 2주차 | 4주차 |
|---------|-----|-----|-----|
| 1       |     |     |     |
| 2       |     |     |     |
| 3       |     |     |     |
| 평균      |     |     |     |











<별첨 5>

(주)서진바이오텍  
“아토피 크림 00” 사용 후  
아토피 개선 효능평가  
인체적용시험 결과보고서

2010 년 09 월 10 일

## 목 차

|                                   |       |    |
|-----------------------------------|-------|----|
| I. 제출문 및 품질보증                     | ..... | 4  |
| II. 인체적용시험                        | ..... | 5  |
| 1. 인체적용시험 개요                      | ..... | 5  |
| 2. 시험 내용                          | ..... | 6  |
| 2.1. 인체적용시험의 명칭                   | ..... | 5  |
| 2.2. 인체적용시험 실시기관, 시험책임자/담당자 및 의뢰자 | ..... | 6  |
| 3. 인체적용시험의 목적                     | ..... | 7  |
| 4. 보고서관리번호                        | ..... | 7  |
| 5. 시료관리번호                         | ..... | 7  |
| 6. 시험 시료                          | ..... | 7  |
| 6.1. 시료 정보                        | ..... | 7  |
| 6.2. 시료의 주성분 및 함량                 | ..... | 7  |
| 7. 시험 일정                          | ..... | 8  |
| III. 시험 방법                        | ..... | 9  |
| 1. 시험 개요                          | ..... | 9  |
| 1.1. 아토피 피부염 증상 개선 평가 인체적용시험      | ..... | 9  |
| 1.2. 시험 요약                        | ..... | 9  |
| 2. 시험 일정                          | ..... | 9  |
| 3. 피험자 선정 방법                      | ..... | 10 |
| 3.1. 피험자 선정                       | ..... | 10 |
| 3.2. 피험자 선정 기준                    | ..... | 10 |
| 3.3. 피험자 제외 기준                    | ..... | 11 |
| 3.4. 피험자 주의 사항                    | ..... | 11 |
| 3.5. 시험기간 중도 탈락 기준                | ..... | 11 |
| 4. 피험자 수                          | ..... | 12 |
| 5. 인체적용시험 진행 규정                   | ..... | 14 |
| 6. 피부 이상 반응                       | ..... | 14 |
| 6.1. 피부 이상 반응 시 보상 대책             | ..... | 14 |

|  |    |
|--|----|
| 6.2. 피험자 자가 평가 .....                     | 14 |
| 6.3. 연구자에 의한 평가 .....                    | 14 |
| 7. 인체적용시험 평가 및 기기측정 .....                | 15 |
| 7.1. 육안평가 .....                          | 15 |
| 7.2. 피부 측정 장비를 통한 기기적 평가 .....           | 15 |
| 8. 효과평가 기준, 평가 방법 및 해석 방법(통계분석 방법) ..... | 18 |
| 8.1. 유효성 평가 대상 .....                     | 18 |
| 8.2. 유효성 평가 .....                        | 18 |
| 8.3. 통계분석 방법 .....                       | 18 |
| IV. 인체적용시험 평가 결과 .....                   | 19 |
| 1. 피험자 기본 정보 .....                       | 19 |
| 2. SCORAD INDEX 평가 결과 .....              | 20 |
| 2.1. SCORAD INDEX 평가 .....               | 20 |
| 2.2. SCORAD INDEX 평가 분석 .....            | 21 |
| 3. 경피수분손실량(TEWL) 평가 결과 .....             | 22 |
| 3.1. 경피수분손실량(TEWL) 측정 .....              | 22 |
| 3.2. 경피수분손실량(TEWL) 평가 분석 .....           | 23 |
| 4. 수분정도(Skin Hydration) 평가 결과 .....      | 24 |
| 4.1. 수분정도(Skin Hydration) 측정 .....       | 24 |
| 4.2. 수분정도(Skin Hydration) 평가 분석 .....    | 25 |
| 5. 피부 산성도(Skin pH) 평가 결과 .....           | 26 |
| 5.1. 피부 산성도(Skin pH) 측정 .....            | 26 |
| 5.2. 피부 산성도(Skin pH) 평가 분석 .....         | 27 |
| V. 병변 부위 이미지 비교 .....                    | 28 |
| VI. 결과 .....                             | 51 |
| VII. 결론 .....                            | 52 |

## # 별첨

I. 시험기관 실태 조사서

II. 연구자의 약력    III. 연구책임자의 연구경력

CRF 양식

# I. 제출문 및 품질보증

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터에서는 (주)서진바이오텍에서 의뢰한 “아토피 크림 OO”의 아토피개선효과 인체적용시험 평가 연구를 위탁 받고, 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터의 시험방법에 따라 성실히 연구를 수행하여 그 결과를 다음과 같이 보고합니다.

또한, 연구를 수행함에 있어 연구기관장 및 연구책임자는 본 임상지원센터의 표준작업지침서(SOP)의 준수와 연구의 성실성을 조사하고, 최종보고서와 본 연계된 시험결과를(RAW DATA)를 관리감독하였음을 확인합니다.

2010년 09월 10일

연구 기관: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

연구기관장: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터장

한의학 박사 김 이 화



연구책임자: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 겸임교수

피부과 전문의 백 중 현





## II. 인체적용시험

### 1. 인체적용시험 개요

|                      |  |
|----------------------|--|
| 시험 명칭                | “(주)서진바이오텍 아토피 크림 OO” 사용 후 아토피 개선 효능 평가를 위한 인체적용시험   |
| 시험실시기관<br>및<br>시험책임자 | 실시기관 : 세명대학교 산학협력단 한방바이오산업 임상지원센터<br>책임자 : 피부과 전문의 교수 백 중 현  |
| 의뢰 기관                | (주)서진바이오텍  |
| 시험 목적                | 본 시험의 주 목적은 피험자에게 “(주)서진바이오텍 아토피 크림 OO”을 사용하였을 때 아토피 피부염의 증상 개선 등의 유효성을 평가하는 것이었다.<br>두 번째 목적은 이상반응의 측면에서 “(주)서진바이오텍 아토피 크림 OO”의 안전성을 평가하는 것이었다. |
| 시험 일정                | 시작일: 2010 년 7 월 02 일<br>종료일: 2010 년 8 월 16 일   |
| 시험 시료                | (주)서진바이오텍 아토피 크림 OO  |
| 피험자 수                | 시험 완료한 피험자 수 : 23 명  |
| 시험 부위                | 아토피 증상이 있는 병변 부위   |
| 도포 기간                | 도포기간: 4 주 / 1 일 2 회(아침/저녁)   |
| 유효성 평가               | SCORAD INDEX 측정 및 사진 촬영<br>기기 측정<br>① 피부 수분 정도 - Corneometer<br>② 경피 수분 손실량 - Tewameter<br>③ 피부 산성도 - Skin pH meter                              |
| 안전성 평가               | 시험기간 동안 특별한 피부 이상반응은 보고되지 않아 안전한 제품으로 확인되었다.   |
| 보고서 관리번호             | SMC-100908-AT210   |
| 시료 관리번호              | SM-10-002-AT   |
| 보고서 작성일              | 2010 년 09 월 10 일   |

## 2. 시험 내용

### 2.1. 인체적용시험의 명칭

아토피 피부염 환자에 대한 “(주)서진바이오텍 아토피 크림 OO” 사용 후 아토피 개선 효능 평가를 위한 인체적용시험

### 2.2. 인체적용시험 실시기관, 시험책임자 / 담당자 및 의뢰자

#### 2.2.1. 실시기관 및 주소

실시기관 : 세명대학교 산학협력단 한방바이오산업 임상지원센터

주소 : 충북 제천시 신월동 세명로 117번지

Tel: 043-653-6303/6305, Fax: 043-653-6304

Homepage: <http://www.smctc.co.kr/>

#### 2.2.2 연구책임자 및 시험담당자

| 인체적용시험의 연구자 | 소 속                        | 전공 분야   | 성 명 | 직 명   |
|-------------|----------------------------|---------|-----|-------|
| 연구책임자       | 세명대학교<br>한방바이오산업<br>임상지원센터 | 피부과전문의  | 백종현 | 교수    |
| 공동연구자       | 세명대학교<br>한방바이오산업<br>임상지원센터 | 경혈학     | 김이화 | 부교수   |
| 시험담당자       | 세명대학교<br>한방바이오산업<br>임상지원센터 | 의학      | 김용민 | 선임연구원 |
| 시험담당자       | 세명대학교<br>한방바이오산업<br>임상지원센터 | 생물학     | 곽동욱 | 선임연구원 |
| 시험담당자       | 세명대학교<br>한방바이오산업<br>임상지원센터 | 한방식품영양학 | 엄나영 | 연구원   |

## 2.2.3. 의뢰기관 및 의뢰자

의뢰기관 : (주)서진바이오텍

주소 : 경기도 수원시 영통구 매탄3동 489-2번지 큐피디텍빌딩 3층

의뢰자: (주)서진바이오텍 대표이사 김 학 주

## 3. 인체적용시험의 목적

본 시험의 목적은 피험자에게 “(주)서진바이오텍 아토피 크림 OO”을 사용하였을 때 아토피 피부염의 증상 개선 등의 유효성 평가와 이상반응에서의 안전성 평가이다.

## 4. 보고서 관리 번호

SMC-100908-AT210

## 5. 시료 관리 번호

SM-10-002-AT

## 6. 시험 시료

## 6.1. 시료 정보

| 구 분        | 시험 제품                 |
|------------|-----------------------|
| 시료명        | (주)서진바이오텍 아토피 크림 OO   |
| 성상         | 백색의 크림                |
| 도포 부위      | 아토피 증상이 있는 병변 부위      |
| 도포 기간      | 4 주                   |
| 도포 횟수      | 1 일/2 회(아침,저녁)        |
| 도포 용량      | 아토피 증상이 있는 부위에 충분히 도포 |
| 용기 또는 포장상태 | 50g 밀폐용기              |

## 6.2. 시료의 주성분 및 함량

\* 상기 주성분 및 함량은 연구 의뢰자가 제공한 자료를 근거로 작성되었음.

## 7. 시험 일정

|            |               |
|------------|---------------|
| 평가 시료 접수일: | 2010년 03월 26일 |
| 시험 시작일:    | 2010년 07월 02일 |
| 시험 종료일:    | 2010년 08월 16일 |
| 보고서 작성일:   | 2010년 09월 10일 |

본 시험결과 보고서는 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터의 재산으로 기밀 서류입니다. 본 서류를 접수 받는 것은 공개적으로는 사용하지 않으나 여기에 포함되어 있는 정보를 본 시험. 위 회사의 동의 없이는 본 자료를 전체 또는 부분적으로 사용하거나 발표할 수 없습니다.

### III .시험 방법

#### 1. 시험 개요

##### 1.1. 아토피 피부염 증상 개선 평가 인체적용시험

피험자 수는 20 명 이상의 유효데이터를 확보하도록 하였다.

##### 1.2. 시험 요약

의뢰자로부터 시료를 수령한 후 아토피 피부염이 있는 남/ 여를 대상으로 4 주간 시험을 진행하였으며, 4 주간 제품을 1 일 2 회(아침, 저녁) 도포하도록 하고 시험부위의 사진촬영과 아토피 증상 개선을 평가하기 위한 SCORAD INDEX 측정, 기기 측정 및 안전성 평가, 설문평가 병행하여 효과를 평가하였다.

#### 2. 시험 일정

| 평가 : 총 2 회 방문 | Screening | Treatment period |     |
|---------------|-----------|------------------|-----|
|               | 0 주(선정)   | 0 주              | 4 주 |
| Visit         | 1st       | 2nd              | 3rd |
| 피험자 동의서 취득    | ○         |                  |     |
| 기초 조사         | ○         |                  |     |
| 아토피 피부염 진단기준  | ○         |                  |     |
| 선정 / 제외 기준 판정 | ○         |                  |     |
| SCORAD 측정     |           | ○                | ○   |
| 병변 부위 이미지 촬영  |           | ○                | ○   |
| 피부수분 정도 측정    |           | ○                | ○   |
| 경피수분 손실량 측정   |           | ○                | ○   |
| 피부 산성도 측정     |           | ○                | ○   |
| 이상반응 조사       |           |                  | ○   |
| 총괄적 유효성 평가    |           |                  |     |

1) 기초 조사: 생년월일, 성별, 주소 등을 조사한다.

2) 선정/제외기준 판정: 각각의 스크리닝 검사가 끝난 후 실시한다.

### 3. 피험자 선정 방법

#### 3.1. 피험자 선정

아토피 피부염 증상이 있는 남/여로서 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터에 방문하여 피부과 전문의 및 한방피부과 전문의의 진료 후 **대한아토피피부염학회(2005) 한국인 아토피 피부염 진단기준**에 의해 아토피 피부염으로 진단된 환자 중 피험자 선정기준에 합당하고 제외기준에 해당되지 않는 환자를 대상으로 인체적용시험을 진행하였다.

모든 피험자들은 어린이부터 성인까지 스크리닝을 통해서 피험자를 선별하였으며, 주 시험자는 피험자 또는 보호자가 알아야 할 시험에 관한 모든 내용들을 충분히 설명하고 피험자 또는 보호자가 완전하게 이해를 한 다음 ‘인체적용시험 참여 동의서’를 작성하도록 하였고 어린이 및 미성년자의 경우에는 보호자의 동의하에 피험자 참여 동의서를 작성하였다.

#### 3.2. 피험자 선정기준

본 시험에 참여하는 모든 피험자들은 다음의 선정기준에 적합하여야 한다.

- 가. 대한아토피피부염학회(2005) 한국인의 아토피 피부염 진단기준에 따라 주 소견 중 2 개 이상, 부 소견 중 2 개 이상의 증상이 있는 아토피 피부염 환자
- 나. 치료를 받지 않을 정도로 심하지 않은 아토피 피부염을 가진 환자
- 다. 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 자
- 라. 미성년자의 경우 보호자의 동의 하에 참여를 결정하고
- 마. SCORAD INDEX 60 이하인 자

### 3.3. 피험자 제외기준

다음 아래의 사항 중 하나라도 해당되는 피험자는 본 시험에 참여할 수 없다.

- 가. 심한 아토피 피부염으로 약물치료(항히스타민제, 부신피질호르몬제, 한약 등)를 하고 있는 환자
- 나. 면역계에 영향을 미치는 특별한 치료제를 사용하고 있는 환자
- 다. 본 시험에 영향을 줄 수 있다고 생각되는 건강보조식품을 복용하고 있는 환자
- 라. 임신부, 수유부 또는 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임기 여성
- 마. 기타 위의 사항들 외에 시험책임자의 판단으로 시험의 진행이 곤란하다고 판단되는 환자

### 3.4. 피험자 주의 사항

- 가. 검사일정 및 시간을 꼭 지키도록 하였다.
- 나. 제품 도포를 매일 2 회(아침, 저녁) 도포를 거르지 않도록 하였다.
- 다. 시험 부위가 과도한 자외선에 노출되지 않도록 하였다.
- 라. 인체적용시험 중 과음과 지나친 흡연을 삼가도록 하였다.

### 3.5. 시험기간 중도 탈락 기준

다음과 같은 경우에 인체적용시험을 중단하도록 하였으며, 중단된 경우 이는 시험 결과 산정에서 제외시켰다.

- 가. 피험자에게 중대한 이상 반응(Serious Adverse Events)이 발생한 경우 혹은 모든 제품 사용 부위에 소양감이나 홍반 등의 이상 반응이 발생하여 피험자가 시험 중단을 요구한 경우
- 나. 인체적용시험에서 발견치 못한 전신 질환이 발견된 피험자
- 다. 시험 진행 중 시험 부위에 과도한 자외선 노출을 한 자
- 라. 시험 진행 중 지나친 음주, 흡연 등으로 결과 평가에 장애가 발생할 경우

- 마. 인체적용시험 기간 중 피험자 또는 피험자의 법정 대리인이 시험 중단을 요구한 경우
- 바. 연구자나 피험자에 의해 시험계획을 위반한 경우
- 사. 피험자의 추적 관찰이 되지 않는 경우
- 아. 피험자에게 시험 화장품을 투여하는데 문제가 있는 경우
- 자. 경과 관찰 기간 동안 전문의의 지시 없이 연구결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 등을 복용한 경우
- 차. 기타 담당자의 판단에 의해 연구 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우

#### 4. 피험자 수

‘피험자의 선정’에 부합하며 본 시험에 참여한 피험자의 수는 아래의 표와 같다.

| 성 별   | 인 원  | 구 분     | 피험자 | 탈락<br>및<br>중도포기 | 최종피험자 |
|-------|------|---------|-----|-----------------|-------|
| 남     | 12 명 | 7 세 이하  | 8   |                 | 8     |
|       |      | 8-13 세  | 3   |                 | 3     |
|       |      | 14-19 세 | 0   |                 | 0     |
|       |      | 20-29 세 | 1   |                 | 1     |
|       |      | 30 세 이상 | 0   |                 | 0     |
| 여     | 12 명 | 7 세 이하  | 7   |                 | 7     |
|       |      | 8-13 세  | 1   |                 | 1     |
|       |      | 14-19 세 | 2   |                 | 2     |
|       |      | 20-29 세 | 0   |                 | 0     |
|       |      | 30 세 이상 | 2   | 1               | 1     |
| 총 피험자 |      |         | 24  | 1               | 23    |



## 5. 인체적용시험 진행 규정

- 5.1. 시험 진행 중 주 시험자와 그 외 연구원은 피험자의 안전에 최선을 다할 것이며, 예측 가능한 이상반응 이외의 이상반응 발생시 신속하고 적절한 조치를 취하여 그 이상반응을 최소화하도록 하였다.
- 5.2. 시험 진행 중 사용한 제품에 의하여 피부 자극이 발생하는 경우에는 즉시 도포한 제품을 닦아내고, 증상이 호전되지 않을 경우 시험자에 의한 피부과적 평가와 적절한 치료를 받도록 하였다.
- 5.3. 기타 비정상적인 피부 반응이 발생할 경우 주 시험자와 연구원은 피부과적 평가와 함께 적절한 조치를 취하며 증례 및 상황에 대하여 상세히 기록을 하도록 하였다.

## 6. 피부 이상 반응

### 6.1. 피부 이상 반응 시 보상 대책

본 연구센터는 모든 시험 수행 시 피험자의 안전을 위해 최선의 노력을 다하였으며, 예측 가능한 이상반응 이외의 이상반응 발생시 신속하고 적절한 조치를 취하여 그 이상반응을 최소화하려고 하였다. 이에 대하여 연구기관장 및 연구책임자는 조사 및 관리를 수행하였다. 본 연구와 관련된 시험 중 시험에 연계된(도포한 시료) 이상 반응이 발생한 경우에는 즉시 시험을 중단하도록 교육하였고, 증상이 호전되지 않을 경우 와 기타 비정상적인 피부 반응이 발생할 경우 피부과 전문의에게 문진하여 치료를 받을 수 있다고 피험자에게 설명하였다. 이상반응 발생시 연구책임자와 연구원은 피부과적 평가와 함께 적절한 조치를 취하며 증례 및 상황에 대하여 상세히 기록하도록 하였다.

### 6.2. 피험자 자가 평가

피험자는 이상반응 발생 즉시 본 센터로 보고하도록 하였다. 또한 방문 시 마다 이상반응 여부를 보고하도록 하였다. 시험이 진행되는 동안 피험자로부터 특별한 이상반응은 보고되지 않았으므로 “(주)서진바이오텍 아토피 크림 OO”은 피부 이상반응이 없는 것을 알 수 있었다.

### 6.3. 연구자에 의한 평가

피부과 전문의에 의한 이학적 검사상 시험제품 사용 후 홍반이나 소양감, 발진 등 피부 이상소견은 관찰되지 않았다. 따라서 “(주)서진바이오텍 아토피 크림 OO”은 피부에 자극이 없는 안전한 제품임을 알 수 있었다.

- ◆ 중대한 또는 예상하지 못한 이상반응이 발생한 경우에는 곧바로 시험책임자나 담당연구원에게 연락하도록 하였다.
- 연구책임자 : 백종현 교수 Tel. 043-653-6305
- 연구원 : 광동욱, 엄나영 Tel. 043-653-6303~5

## 7. 인체적용시험 평가 및 기기측정

아토피 피부염의 증상 정도에 대한 평가를 위해 매 방문 시마다 육안평가(SCORAD INDEX), 사진 촬영 및 Tewameter(경피수분손실량), Corneometer(수분정도측정), Skin pH meter(pH 농도측정)을 이용한 기기측정을 실시하였다.

모든 피험자들은 기기측정 전에 온도와 습도가 조절된 방에서 약 30 분간 대기하며 피부를 안정화시켰다. 피험자 대기실의 온도 범위는  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도는 40~60%였다.

### 7.1 육안평가

#### 가. SCORAD INDEX

매 방문 시 마다 SCORAD INDEX 지표를 기준으로 extent criteria, intensity criteria, subjective symptoms 에 대한 total score 를 계산하여 제품 사용 전과 사용 후 아토피의 증상 정도를 평가하였다.

#### 나. 사진 촬영

매 방문 시 마다 피험자의 병변 부위를 사진 촬영하였다.

### 7.2 피부측정 장비를 통한 기기적 평가

피부상태의 정확한 측정을 위하여 항온·항습 시설이 갖추어진 조건하에서 기기적 평가를 실시하였다. 항온·항습 조건은 실내온도  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 실내습도 40~60%로 설정하였다. 연구대상자가 항온·항습 조건 하에서 30 분간 안정을 취해 피부 표면의 온도와 습도를 측정 공간의 온도와 습도에 적응하게 하였고, 정확한 평가를 위해 수분 섭취를 제한하였다. 피부측정은 시험전과 시험 4 주 후 총 2 회에 걸쳐 실시하였고, 객관적인 결과를 얻기 위하여 연구자 1 인이 측정부위를 사진 촬영하고, 그 위치를 표시하여 4 주 후에도 동일한 부위를 측정할 수 있게

하였다. 피부측정은 피부수분 정도 측정, 경피수분손실량 측정, 피부산성도 측정 순으로 진행하였다.

가. 경피수분 손실량(TEWL) 측정

Tewameter TM300(Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany)을 이용해 병변 부위의 경피수분 손실량을 측정하였다.

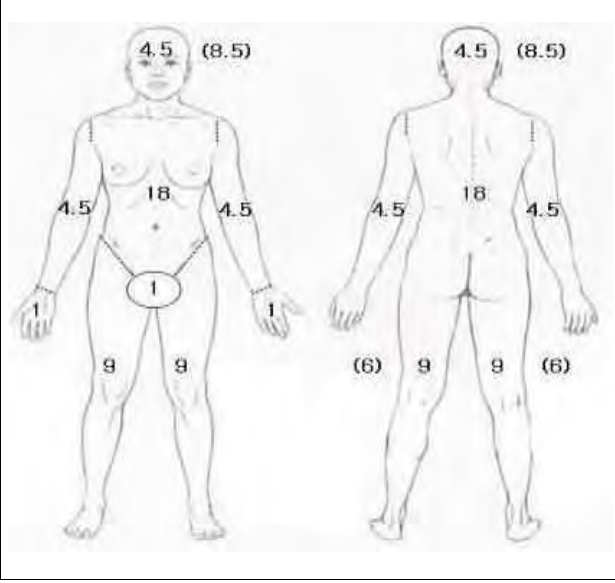
나. 피부수분 정도 측정

Corneometer CM825(Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany)을 이용해 병변 부위의 피부수분 정도를 측정하였다.

다. 피부 산성도 측정

Skin pH meter PH905(Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany)을 이용해 병변 부위의 피부 산성도를 측정하였다.

Table 1. SCORED INDEX

| SCORAD INDEX 측정  |                  |                 |                         |  |         |      |       |
|--|------------------|-----------------|-------------------------|--|---------|------|-------|
|   |                  |                 |                         | Region   | Ant     | Post | Total |
| Head   |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| Body   |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| Upper Extremity (Rt)   |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| Upper Extremity (Lt)   |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| Lower Extremity (Rt)   |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| Lower Extremity (Lt)   |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| Genital Area   |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| A. Extent Criteria(0-100)  |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| <b>B. Intensity Criteria (0-18) :</b>  |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| Erythema   | Edema/Papulation | Oozing/Crust    | Excoriation             | Lichenification  | Dryness |      |       |
| 0 1 2 3  | 0 1 2 3          | 0 1 2 3         | 0 1 2 3                 | 0 1 2 3  | 0 1 2 3 |      |       |
| * 0 = none    1 = mild    2 = moderate    3 = severe   |                  |                 |                         |  |         |      |       |
|  | 0                | 1               | 2                       | 3  |         |      |       |
| <b>Erythema</b>  | 없음               | 희미한 홍반          | 뚜렷한 발적                  | 깊고 강렬한 적색  |         |      |       |
| <b>Edema/Papulation</b>  | 없음               | 한정된 피부 융기       | 여러 곳에서 분명한 피부융기         | 넓은 지역에 걸쳐 경결된 피부융기   |         |      |       |
| <b>Oozing/Crust</b>  | 없음               | 희미한 삼출 또는 가피 증상 | 분명한 삼출이나 가피로 3군데 이하의 병소 | 현저하고 광범위한 삼출과 가피 병소  |         |      |       |
| <b>Excoriation</b>   | 없음               | 약간 긁힌 자국.       | 피부에 긁은 자국, 피부상해가 뚜렷한 병소 | 광범위한 삼출액과 출혈   |         |      |       |
| <b>Lichenification</b>   | 없음               | 주름이 없는 두꺼워진 단계  | 가벼운 색소침착과 주름이 두꺼워진 단계   | 깊은 색소침착과 주름이 뚜렷해진 단계   |         |      |       |
| <b>C. Subjective symptoms (during the 3 previous days) :</b>   |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| Pruritus   |                  |                 |                         | Insomnia   |         |      |       |
| 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10   |                  |                 |                         | 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10   |         |      |       |
| 0 : 전혀 가려움증 없음<br>1-3 : 무의식중에 긁음(생활, 수면에 방해가 되지 않음)<br>4-6 : 생활, 수면을 방해할 정도의 소양감(온종일은 아님)<br>7-9 : 생활, 수면을 방해할 정도의 소양감(대부분의 시간)<br>10 : 심한 소양감으로 생활과 수면에 장애가 아주 심함 |                  |                 |                         | 0 : 전혀 수면장애 없음<br>1-3 : 수면을 방해하지 않을 정도의 약간의 소양감<br>4-6 : 소양감 때문에 가끔 잠을 깬<br>7-9 : 소양감 때문에 하룻밤에 2회 이상 깬<br>10 : 소양감이 심해 거의 수면을 이루지 못함 |         |      |       |
| <b>Total score A(0-100)/5 + 7B(0-18)/2 + C(0-20)</b>   |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| Mild AD(Atopic Dermatitis) : Objective Score<15  |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| Moderate AD(Atopic Dermatitis) : 15<Objective Score<40   |                  |                 |                         |  |         |      |       |
| Severe AD(Atopic Dermatitis) : Objective Score>40  |                  |                 |                         |  |         |      |       |

## 8. 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법 (통계분석방법)

### 8.1 유효성 평가대상

- 1) 선정기준에 적합한 피험자
- 2) 시험제품을 4주간 사용한 피험자

### 8.2 유효성 평가

0 주, 4 주 제 SCORAD INDEX 측정, 병변 부위 이미지 촬영 등 아토피 피부염에 대한 육안적 평가를 시행하였고, 피부수분 정도, 경피수분 손실량, 피부 산성도 등 피부측정 장비를 통한 기기적 평가를 시행하였다.

### 8.3 통계분석 방법

본 임상시험의 결과 정리 및 분석을 위하여 Excel program 과 통계 소프트웨어인 SPSS Window. version 10.1 을 사용하였으며, 통계의 유의성을 위하여 유의 수준 5%로 설정하였고, 분석을 위하여 이용되는 통계적 방법은 대응표본 T-검정 해석방법으로 분석하였다.

## IV. 인체적용시험 평가결과

## 1. 피험자 기본 정보

| No.  | 피험자 | 나이   | 성별 | 비고       |
|------|-----|------|----|----------|
| 1    | OJS | 32   | F  | 중도탈락     |
| 2    | KSJ | 7    | F  |          |
| 3    | KKO | 6    | M  |          |
| 4    | JJY | 24   | M  |          |
| 5    | LHI | 6    | F  |          |
| 6    | LJH | 2    | M  |          |
| 7    | KSJ | 9    | F  |          |
| 8    | JHW | 5    | M  |          |
| 9    | KDK | 4    | M  |          |
| 10   | KSE | 7    | F  |          |
| 11   | KSH | 5    | M  |          |
| 12   | KJY | 2    | F  |          |
| 13   | K J | 9    | M  |          |
| 14   | KJW | 7    | M  |          |
| 15   | LDY | 5    | M  |          |
| 16   | LYL | 6    | F  |          |
| 17   | ABU | 9    | M  |          |
| 18   | KKH | 12   | M  |          |
| 19   | LEH | 7    | F  |          |
| 20   | YEH | 15   | F  |          |
| 21   | PJW | 3    | M  |          |
| 22   | JSB | 19   | F  |          |
| 23   | BJY | 5    | F  |          |
| 24   | JYH | 32   | F  |          |
| 평균   |     | 8.96 |    | 중도탈락자 제외 |
| 표준편차 |     | 7.28 |    |          |

## 2. SCORAD INDEX 평가결과

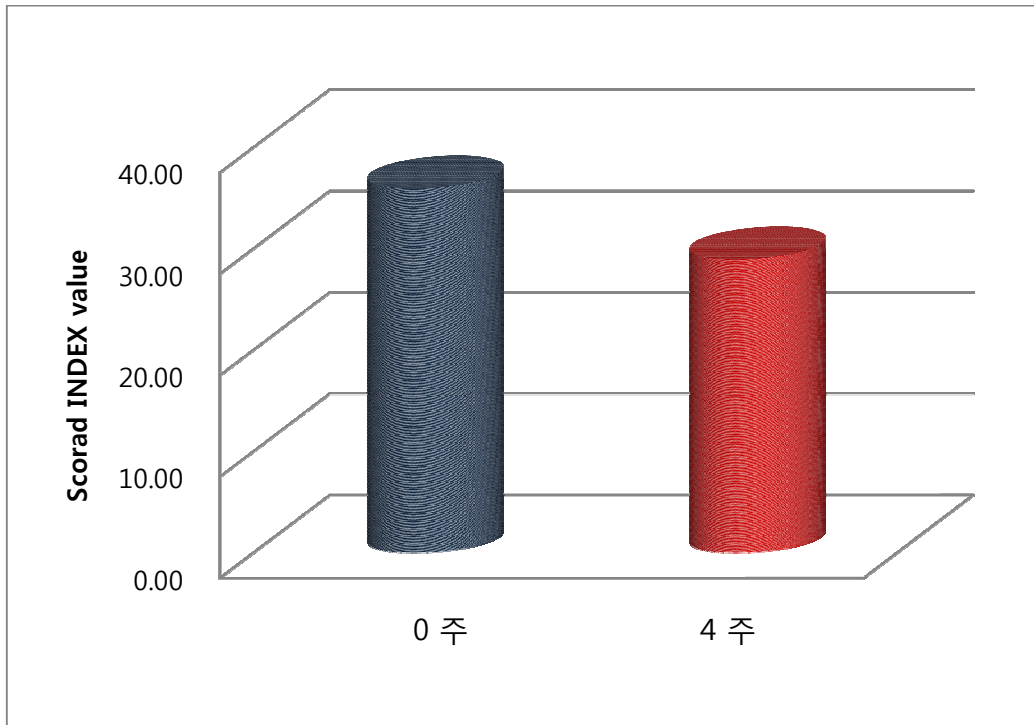
## 2.1 SCORAD INDEX 평가

| No.     | 피험자 | 0주      | 4주    |
|---------|-----|---------|-------|
| 2       | KSJ | 24.70   | 16.10 |
| 3       | KKO | 19.20   | 15.60 |
| 4       | JJY | 58.70   | 35.30 |
| 5       | LHI | 36.20   | 22.40 |
| 6       | LJH | 37.90   | 21.80 |
| 7       | KSJ | 33.40   | 24.40 |
| 8       | JHW | 34.10   | 19.20 |
| 9       | KDK | 23.80   | 15.70 |
| 10      | KSE | 49.50   | 49.70 |
| 11      | KSH | 50.80   | 53.70 |
| 12      | KJY | 22.10   | 19.90 |
| 13      | KJ  | 44.30   | 29.90 |
| 14      | KJW | 22.60   | 12.00 |
| 15      | LDY | 33.60   | 34.00 |
| 16      | LYL | 19.30   | 18.00 |
| 17      | ABU | 58.90   | 44.00 |
| 18      | KKH | 31.20   | 34.30 |
| 19      | LEH | 28.50   | 16.00 |
| 20      | YEH | 53.00   | 56.60 |
| 21      | PJW | 36.80   | 24.50 |
| 22      | JSB | 31.50   | 35.20 |
| 23      | BJY | 29.20   | 20.20 |
| 24      | JYH | 47.20   | 47.00 |
| 평균      |     | 35.93   | 28.93 |
| 표준편차    |     | 12.25   | 13.44 |
| P value |     | 0.00025 |       |



## 2.2 SCORAD INDEX 평가분석

그림 1. SCORAD INDEX 평가결과



SCORAD INDEX 는 아토피 증상이 심할수록 높은 수치로 평가 된다. 본 실험 결과 SCORAD INDEX 가 35.93 에서 4 주 후 28.93 으로 감소하였다. 유의 차 5%로 통계 분석한 제품 사용 4 주 후에서 통계적으로 유의하게 관찰되었다. 따라서 시험 제품 사용 부위의 아토피 증상이 완화된 것을 확인할 수 있었다.

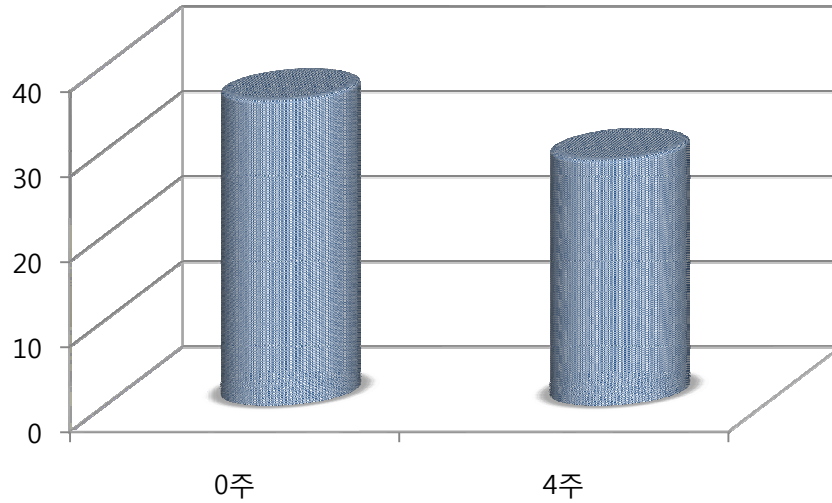
### 3. 경피수분손실량(TEWL) 평가결과

#### 3.1 경피수분손실량(TEWL) 측정

| No.            | 피험자 | 병변 부위         |       |
|----------------|-----|---------------|-------|
|                |     | 0 주           | 4 주   |
| 2              | KSJ | 37.93         | 22.70 |
| 3              | KKO | 35.57         | 43.47 |
| 4              | JJY | 98.07         | 54.20 |
| 5              | LHI | 45.17         | 37.17 |
| 6              | LJH | 54.77         | 41.47 |
| 7              | KSJ | 67.17         | 27.17 |
| 8              | JHW | 75.97         | 32.20 |
| 9              | KDK | 54.87         | 22.33 |
| 10             | KSE | 44.53         | 25.43 |
| 11             | KSH | 40.60         | 48.77 |
| 12             | KJY | 69.33         | 24.80 |
| 13             | KJ  | 87.33         | 25.63 |
| 14             | KJW | 40.93         | 34.13 |
| 15             | LDY | 65.17         | 67.60 |
| 16             | LYL | 28.20         | 29.57 |
| 17             | ABU | 47.33         | 37.00 |
| 18             | KKH | 30.03         | 15.83 |
| 19             | LEH | 25.63         | 20.53 |
| 20             | YEH | 62.20         | 57.17 |
| 21             | PJW | 44.30         | 15.80 |
| 22             | JSB | 41.73         | 37.23 |
| 23             | BJY | 84.43         | 50.50 |
| 24             | JYH | 60.10         | 60.70 |
| 평균             |     | 53.97         | 36.15 |
| 표준편차           |     | 19.71         | 14.69 |
| <b>P value</b> |     | <b>0.0002</b> |       |

### 3.2 경피수분손실량(TEWL) 평가분석

그림 2. 경피수분손실량(TEWL) 평가결과



경피수분손실량(TEWL)은 아토피 증상이 심할수록 높은 수치로 평가된다. 본 실험의 결과 병변 부위 경피수분손실량(TEWL)이 53.97 에서 4 주 후 36.15 로 감소하였다.

경피수분손실량(TEWL)의 변화 정도를 유의차 5%로 통계 분석한 결과 제품 사용 4 주 후 통계적으로 유의한 차이를 관찰하였다( $p < 0.05$ ). 따라서 시험 제품 사용 부위의 아토피 증상이 완화된 것을 확인할 수 있었다.

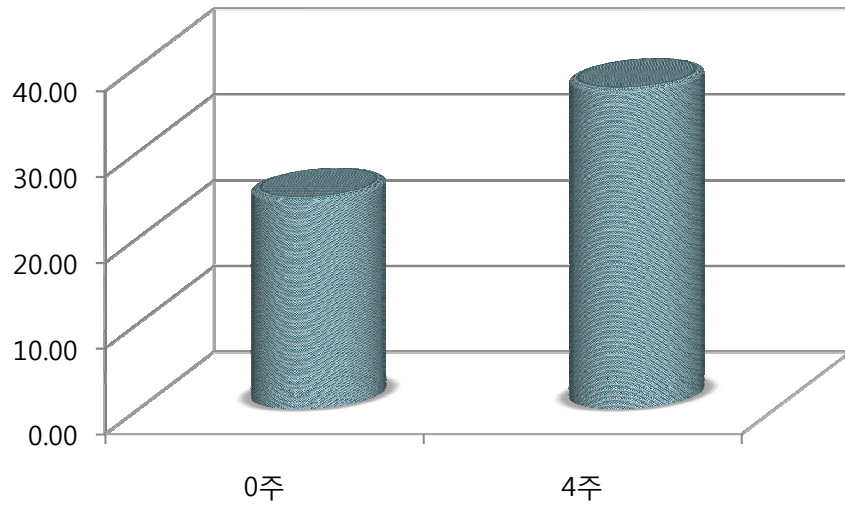
#### 4. 수분정도(Skin Hydration) 평가결과

##### 4.1 수분정도(Skin Hydration) 측정

| No.            | 피험자 | 병변 부위         |       |
|----------------|-----|---------------|-------|
|                |     | 0 주           | 4 주   |
| 2              | KSJ | 26.07         | 39.97 |
| 3              | KKO | 26.67         | 40.17 |
| 4              | JJY | 25.53         | 39.13 |
| 5              | LHI | 29.20         | 43.10 |
| 6              | LJH | 50.67         | 50.40 |
| 7              | KSJ | 26.73         | 49.30 |
| 8              | JHW | 36.57         | 47.13 |
| 9              | KDK | 20.20         | 27.47 |
| 10             | KSE | 17.47         | 37.93 |
| 11             | KSH | 12.47         | 31.00 |
| 12             | KJY | 18.23         | 44.47 |
| 13             | KJ  | 14.03         | 38.93 |
| 14             | KJW | 18.13         | 23.67 |
| 15             | LDY | 17.07         | 11.20 |
| 16             | LYL | 55.13         | 59.80 |
| 17             | ABU | 22.53         | 24.23 |
| 18             | KKH | 16.17         | 45.30 |
| 19             | LEH | 33.30         | 33.33 |
| 20             | YEH | 5.97          | 7.93  |
| 21             | PJW | 28.40         | 46.87 |
| 22             | JSB | 14.60         | 35.93 |
| 23             | BJY | 25.27         | 55.00 |
| 24             | JYH | 23.27         | 25.57 |
| 평균             |     | 24.51         | 37.30 |
| 표준편차           |     | 11.42         | 12.94 |
| <b>P value</b> |     | <b>0.0000</b> |       |

## 4.2 수분정도(Skin Hydration) 평가분석

그림 3. 수분정도(Skin Hydration) 평가결과



수분정도(Skin Hydration)은 아토피 증상이 심할수록 낮은 수치로 평가 된다.

본 실험의 결과 병변 부위 수분정도(Skin Hydration)가 24.51 에서 4 주 후 37.30 증가하였다. 수분정도(Skin Hydration)의 변화량을 유의차 5%로 통계 분석한 결과 제품 사용 4 주 후 통계적으로 유의하게 수분정도(Skin Hydration)가 증가하는 것으로 관찰되었다( $p < 0.05$ ). 따라서 시험 제품 사용 부위의 아토피 증상이 완화된 것을 확인할 수 있었다.

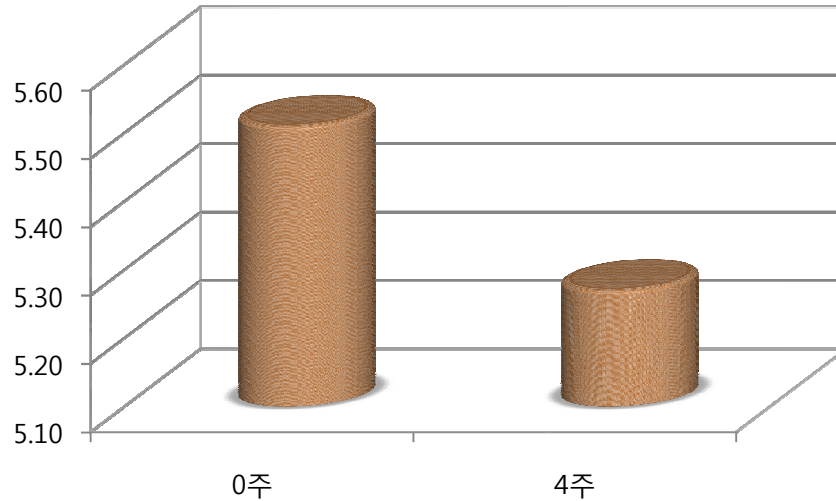
## 5. 피부 산성도 (Skin pH) 평가결과

### 5.1 피부 산성도 (Skin pH) 측정

| No.     | 피험자 | 병변 부위   |      |
|---------|-----|---------|------|
|         |     | 0 주     | 4 주  |
| 2       | KSJ | 5.53    | 5.53 |
| 3       | KKO | 5.65    | 5.76 |
| 4       | JJY | 6.57    | 6.09 |
| 5       | LHI | 6.22    | 5.99 |
| 6       | LJH | 5.79    | 5.24 |
| 7       | KSJ | 5.24    | 5.44 |
| 8       | JHW | 5.44    | 5.21 |
| 9       | KDK | 5.79    | 4.82 |
| 10      | KSE | 5.40    | 5.04 |
| 11      | KSH | 4.78    | 4.76 |
| 12      | KJY | 6.13    | 4.83 |
| 13      | KJ  | 6.23    | 5.48 |
| 14      | KJW | 4.68    | 5.05 |
| 15      | LDY | 5.02    | 5.68 |
| 16      | LYL | 4.59    | 4.72 |
| 17      | ABU | 4.84    | 4.90 |
| 18      | KKH | 4.98    | 5.04 |
| 19      | LEH | 5.05    | 4.53 |
| 20      | YEH | 5.53    | 5.73 |
| 21      | PJW | 6.08    | 5.23 |
| 22      | JSB | 5.80    | 5.20 |
| 23      | BJY | 5.91    | 5.35 |
| 24      | JYH | 5.56    | 5.49 |
| 평균      |     | 5.51    | 5.27 |
| 표준편차    |     | 0.55    | 0.42 |
| P value |     | 0.01967 |      |

## 5.2 피부산성도(Skin pH) 평가분석

그림 4. 피부산성도(Skin pH) 평가결과

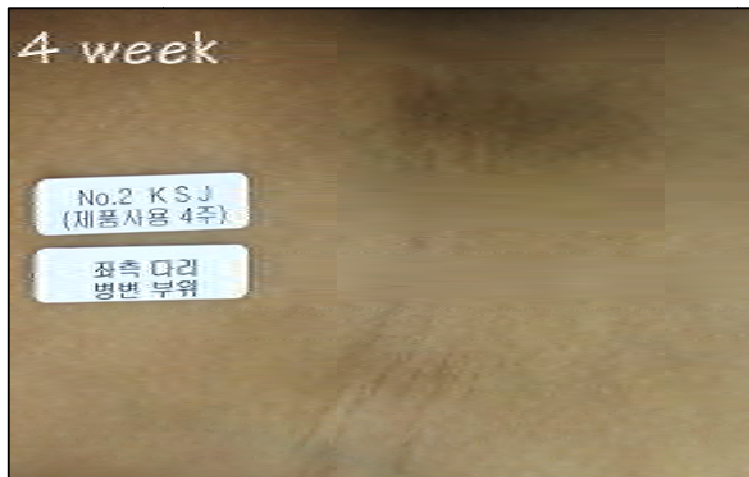
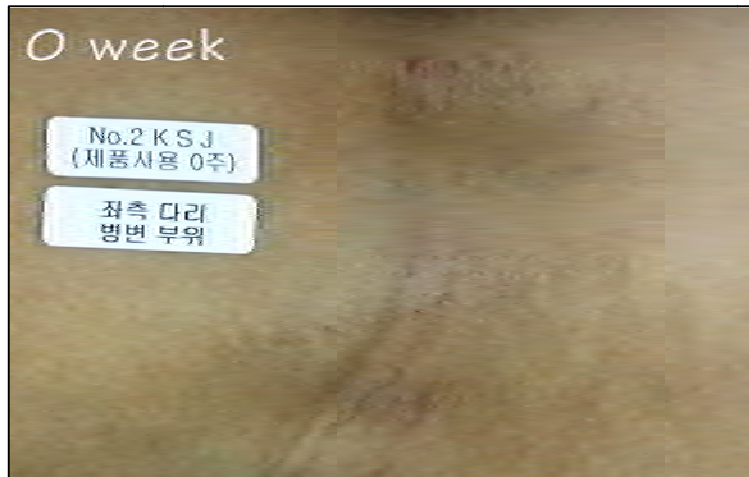


피부 산성도(Skin pH)는 아토피 증상이 심할수록 높은 수치로 평가된다.

제품 사용 후 병변 부위 피부산성도(Skin pH)가 5.51 에서 4 주 후 5.27 로 감소한 결과를 보였다. 유의차 5%로 통계 분석한 결과 통계적으로 유의하게 산성도(Skin pH)가 감소하는 것으로 관찰되었다( $p < 0.05$ ). 따라서 시험 제품 사용 부위의 아토피 증상이 완화된 것을 확인할 수 있었다.

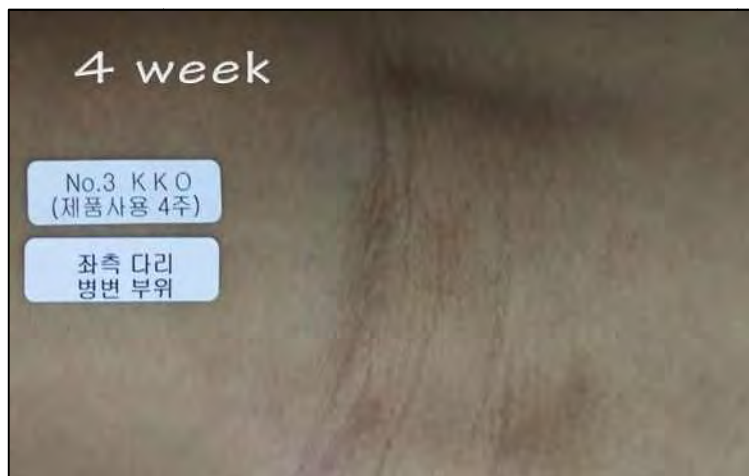
## V. 병변 부위 이미지 비교

# 002. KSJ





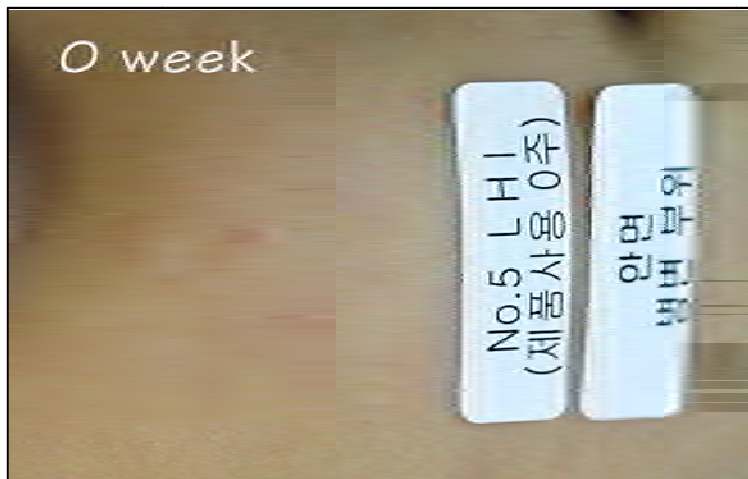
# 003. KKO



# 004. JJY



# 005. LHI



# 006. LJH



# 007. KSJ



# 008. JHW



# 009. KDK



# 010. KSE





# 011. KSH



# 012. KJY



# 013. KJ



# 013. KJW



# 015. LDY



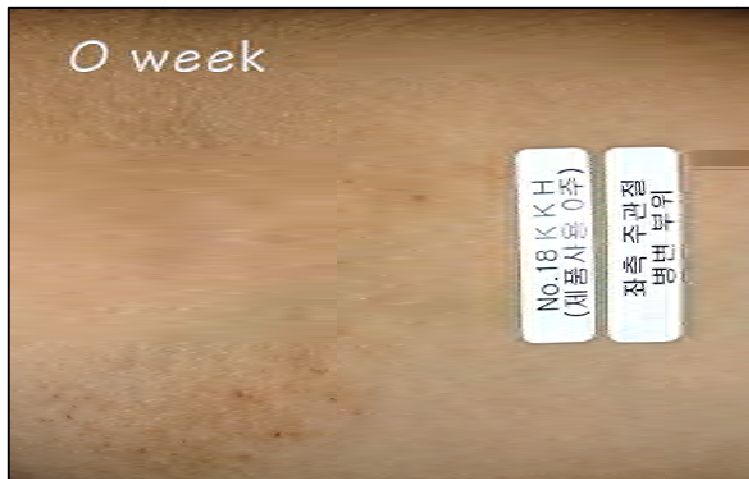
# 016. LYL



# 017. ABU



# 018. KKH





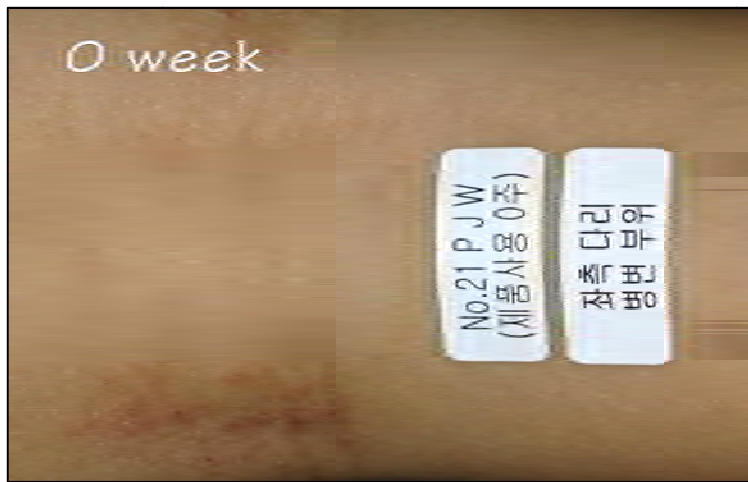
# 019. LEH



# 20. YEH



# 021. PJW



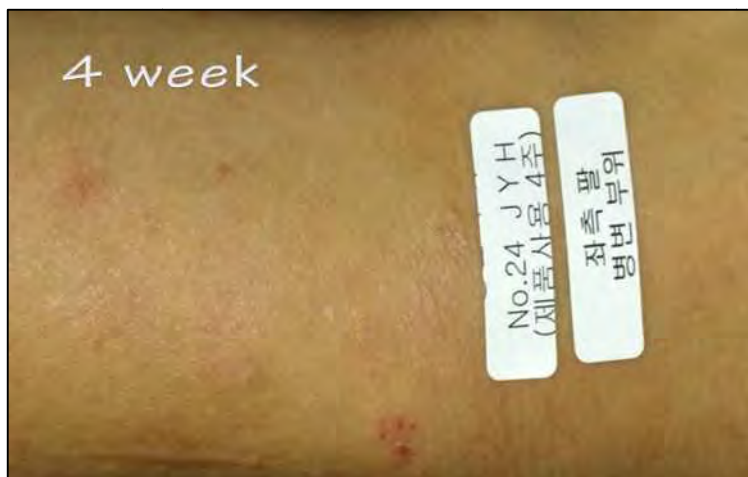
# 022. JSB



# 023. BJY



# 024. JYH



## VI. 결과

(1) 총 연구대상자는 23 명으로 남자 12 명, 여자 11 명이였다. 연령은 7 세 이하가 15 명, 8~13 세 4 명, 14~19 세 2 명, 20~29 세 1 명, 30 세 이상이 1 명이였다. 평균 연령은  $8.96 \pm 7.28$  세 이였다.

(2) SCORAD INDEX 는 0 주  $35.93 \pm 12.25$ , 4 주 후에는  $28.93 \pm 13.44$  으로 감소하였다. 따라서 전문가의 육안평가로 본 결과 시험제품은 통계적으로 유의한 수준에서 아토피 개선에 효과가 있었다.

(3) 피험자의 병변 부위 경피수분손실량(TEWL)은 시험제품 바른 부위를 측정한 결과 0 주  $53.97 \pm 19.71$ , 4 주 후에는  $36.15 \pm 14.69$  로 통계적으로 유의하게 감소하였다. 따라서 제품을 바른 부위의 아토피 증상이 통계적으로 유의한 수준에서 개선 효과가 있었다.

(4) 피험자의 병변 부위 수분정도(Skin Hydration)는 시험제품 바른 부위를 측정한 결과 0 주  $24.51 \pm 11.42$ , 4 주 후에는  $37.30 \pm 12.94$  로 통계적으로 유의하게 증가하였다. 따라서 제품을 바른 부위의 아토피 증상이 통계적으로 유의한 수준에서 개선 효과가 있었다.

(5) 피험자의 병변 부위 피부 산성도(Skin pH)는 시험제품 바른 부위를 측정한 결과 0 주  $5.51 \pm 0.55$ , 4 주 후에는  $5.27 \pm 0.42$  로 감소하였다. 따라서 제품을 바른 부위의 아토피 증상이 통계적으로 유의하게 개선된 것을 확인할 수 있었다.

## VII. 결론

“쥬서진바이오텍 아토피 크림 00”을 4 주 동안 아토피 병변 부위에 도포한 인체적용시험결과 육안평가 및 경피수분손실량, 수분정도, 피부산성도의 기기평가에서 통계적으로 유의한( $p < 0.05$ )한 개선효과를 보였다.

이를 근거로 “쥬서진바이오텍 아토피 크림 00”은 아토피개선에 도움을 주는 제품임을 확인 할 수 있다.



**\*별첨****I. 시험기관실태 조사서****1. 연구기관**

연구기관명: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

주 소: 충북 제천시 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

**2. 연구기관의 설립목적**

본 연구기관(연구센터)은 기업체들이 센터의 지원을 통하여 안전성실험, 효능효과시험 등을 거쳐 안전하고 신뢰받는 바이오제품을 생산함으로써 고부가가치의 한방바이오 산업을 육성하고자 설립된 산업자원부 지정 지역혁신센터(RIC)로서, 특히 화장품 및 한방 화장품의 기능성 화장품 인증에 관련된 인체적용시험(자외선차단지수, 자외선 A차단지수, 주름개선, 미백개선) 및 아토피 개선평가를 수행하고, 인체적용시험과 관련된 인력양성 및 기술 개발을 위해 설립된 기관이다.

**3. 연구기관장**

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터장 한의학 박사 김 이 화

**4. 연구책임자**

맑은피부과 원장 피부과 전문의 백 중 현

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 겸임교수(연구교수)

**5. 연구자**

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 책임연구원 김 용 민

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 선임연구원 곽 동 욱

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 연구원 엄 나 영

**6. 연구기관의 시험항목**

- A. 화장품 및 한방화장품의 자외선차단 평가시험
- B. 화장품 및 한방화장품의 자외선A차단 평가시험
- C. 화장품 및 한방화장품의 주름개선 평가시험
- D. 화장품 및 한방화장품의 미백개선 평가시험
- E. 화장품 및 한방화장품의 안전성 평가시험
- F. 화장품 및 한방화장품의 아토피 평가시험
- G. 화장품 및 한방화장품의 여드름 평가시험

- H. 화장품 및 한방화장품의 피부재생 평가시험
- I. 화장품 및 한방화장품의 탄력·보습 평가시험을 비롯한 다양한 피부 효능평가시험

## 7. 연구기관의 주요시설 및 장비

- A. Multi-port Solar Simulator Multi601-150W
- B. PMA-2100 meter (탐침기 포함)
- C. Spectrophotometer CM-2600D
- D. Micro pipette M100
- E. 자외선 조사기 승강기
- F. 피험자용 자외선 조사 의자
- G. 향온·향습기
- H. Nikon D200디지털카메라, 60mm Nikon렌즈, 후레쉬
- I. Skin-Visiometer SV-600
- J. Multi Probe-Adapter MPA5 및 Probe  
(Corneometer, Tewameter, Skin pH-meter, Skin thermometer, Frictionmeter, Reviscometer, Mexameter)
- K. Cutometer MPA580
- L. Mexameter Stand Alone
- M. Sensor for room condition SRC100
- N. Global Hair & Face photographic system
- O. Visio-Face
- P. Laser Doppler Perfusion Imager
- Q. 피험자 대기실
- R. 연구실  
(자외선조사실, 내수성평가욕조, 사진촬영실, 주름 및 보습 평가실  
미백 및 혈류량 평가실, 안전성평가실, in vitro 실험실, 샤워실)

## II. 연구자의 약력

### 1. 연구책임자: 백 중 현

- A. 근무처: 충북 제천시 청전동 125-7 맑은 피부과의원  
T e l : 043-643-5900 / Fax: 043-644-6655  
E-mail : [niche825@hanmail.net](mailto:niche825@hanmail.net)
- B. 학력  
1996.02 경희대학교 의과대학 의학사 취득  
2000.02 경희대학교 대학원 의학과 의학석사 취득
- C. 경력  
1996.03 의사면허 취득(면허번호: 59836)  
1996.03 ~ 1997.02 경희대학교 의과대학 부속병원 인턴  
1997.03 ~ 2001.02 경희대학교 의과대학 피부과학 교실 전공의  
2001.03 피부과 전문의 자격 취득(전문의 번호: 1192)
- F. 학회 활동  
대한 피부과학회 정회원  
대한 코스메틱 피부과학회 정회원  
대한 모발학회 정회원  
미국 피부과학회 정회원

### 2. 연구원: 김 용 민

- A. 근무처: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 연구교수  
T e l : 043-649-1975 / Fax : 043-653-6303  
E-mail : [dragonroom@hanmail.net](mailto:dragonroom@hanmail.net)
- B. 학력  
2000.02 인하대학교 공과대학 화공고분자생물공학부(학사)  
2002.02 인하대학교 공과대학 생물공학과부(공학석사)
- C. 경력  
2001.10 ~ 2007.07 (주)엘리드 피부과학연구소 선임연구원(기능성평가팀)  
2008.10 ~ 현재 한방바이오산업 임상지원센터 책임연구원

### 3. 연구원 : 곽 동 욱

- A. 근무처: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 선임연구원  
T e l : 043-649-1984 / Fax : 043-653-6305  
E-mail : [dwwak94@semyung.ac.kr](mailto:dwwak94@semyung.ac.kr)
- B. 학력  
2001. 02 한남대학교 생물학과 학사 졸업  
2007. 02 한남대학교 생명과학과 동물학 전공 이학석사
- C. 경력  
2007.04 ~ 2008.03 한국화학연구원 안전성평가연구소 독성평가팀 연구원  
2009.03 ~ 현재 한방바이오산업 임상지원센터 임상지원팀 선임연구원

## 4. 연구원 : 엄 나 영

- A. 근 무 처: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 연구원  
 T e l : 043-649-1984 / Fax : 043-653-6305  
 E -mail : [ric\\_ny471@semyung.ac.kr](mailto:ric_ny471@semyung.ac.kr)
- B. 학력  
 2003.02 제천여자고등학교 졸업  
 2007.02 세명대학교 한방식품영양학과 졸업
- C. 경력  
 2008.09 ~ 현재 한방바이오산업 임상지원센터 임상지원팀 연구원

### Ⅲ. 연구책임자의 연구 경력

#### 1. 주관연구책임자 : 백 중 현

Published Articles

| 논문실적 |   |  |
|------|---|--|
| 년도   | 논문제목  | 학회지  |
| 1999 | 아토피피부염 환자의 혈장 히스타민 농도   | 대한피부과학회지<br>1999;37:11:1553-1559             |
| 2000 | 알부틴의 항멜라닌 효과  | 대한피부과학회지<br>2000;38:10:1303-1309             |
| 1998 | 다양한 형태를 보인 진피멜라닌 세포증 1 예  | 대한피부과학회지<br>1998;36:6:1060-1064              |
| 1999 | 극저출생 체중아에서 발생한 전신성 칸디다증 2 예   | 의진균학회지<br>1999;4:1:63-68                     |
| 1999 | 피지선 모반에서 발생한 모모세포종 1 예  | 대한피부과학회지<br>1999;37:11:1659-1663             |
| 1998 | 신경섬유종증에 발행한 연소성 황색육아종 1 예   | 대한피부과학회지<br>1998;36:1:129-132                |
| 2003 | The prevalence and types of androgenetic alopecia in Korean men and women.  | Br J Dermatol. 2001<br>Jul;145(1):95-9       |
| 2001 | Periorbital congenital melanocytic nevus associated with ankyloblepharon.   | Pediatr Dermatol. 2001<br>Jan-Feb;18(1):31-3 |
| 2002 | Therapeutic effect of topical application of linoleic acid and lincomycin in combination with betamethasone valerate in melasma patients. | J Korean Med Sci. 2002<br>Aug;17(4):518-23   |
| 1999 | A case of pachyonychia congenital with oral leukoplakia and steatocystoma multiplex.  | J Dermatol. 1999<br>Oct;26(10):677           |

# 증례기록지

## (Case Report Form)

아토피 피부염 환자에 대한 시험제품의 사용 후 아토피  
개선을 평가하기 위한 인체적용시험

시험자 식별코드 : 

|   |   |   |   |  |  |  |
|---|---|---|---|--|--|--|
| S | M | C | - |  |  |  |
|---|---|---|---|--|--|--|

시험자 이니셜 : 

|  |  |  |
|--|--|--|
|  |  |  |
|--|--|--|

임상시험 연구책임자 : 백종현

임상시험 연구담당자 : 김이화, 김희택, 오민지

▶ 임상시험기관 주소

충청북도 제천시 신월동 세명로 117 번지 세명대학교

한방바이오산업임상지원센터

▶ 임상시험기관 연락처

043-653-6305

CRF 기록시의 주의사항

1. 검정색 볼펜을 사용하여 읽기 쉽도록 명확하게 기록하십시오. 가능한 약어 사용은 피하고, 완전한 단어로 기록하십시오. 동상 부호(ditto mark), 화살표를 사용해서는 안 됩니다.
2. 빈칸이 없도록 모든 항목을 기록하여 주시기 바랍니다. 만약 어떤 검사가 시행되지 않았거나, 적절치 않은 경우에는 이러한 내용을 주어진 칸에 알맞게 표기하십시오. (ex. 시행되지 않음=ND(Not Done). 적절치 않거나 결과가 없을 경우=NA(Not Applicable). 모름=UK(Unknown).
3. 기재사항을 수정할 때에는 잘못 기입된 내용도 읽을 수 있도록 하십시오. 잘못 기재된 내용에 지우개나 수정액을 사용하면 안 되고, 그 위에 겹쳐 써서도 안 됩니다. 틀린 부분을 한 줄로 긋고 가능한 가까운 곳에 수정할 내용을 기입한 다음, 정정한 시험자의 서명과 수정일 및 수정이유를 기록하십시오.
4. 문구나 문장이 필요한 경우에는 대문자를 사용하여 명확하게 기록하여 주십시오. 특히 이상반응을 기술하는 경우 등에 있어서 잘 알려진 의학용어를 사용하도록 합니다.
5. 기재항목을 기록하는 모든 페이지 상단에 피험자식별코드, 피험자 이니셜 등을 빠짐없이 기록하십시오.
6. 피험자가 임상시험이 중단되거나 종료된 경우 임상시험 종료 양식에 대한 기록이 완료되어야 합니다.
7. 중대한 이상반응이 발생할 경우 임상시험센터 [ 전화 043-653-6305, 팩스 043-653-6302]로 24 시간 이내에 알려야 합니다. 중대한 이상반응 발생시 적절한 치료를 해주시고, 필요하다면 임상시험을 중단하십시오. 3 일 이내 중대한 이상반응 보고서 양식을 작성하여 모니터에게 보내 주십시오. 증례기록지의 이상반응 기록표에 기록된 정보와 중대한 이상반응 보고서 양식의 기록이 일치하여야 합니다.
8. 피험자 식별코드는 다음 방법에 따라 기록하십시오.

실시기관 : 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터(SMCTC)

시험자 식별 코드 : 등록된 순서(ex. 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 3 번째

등록된 시험자: SMC-003)

9. 모든 날짜는 다음과 같은 형식으로 기록하십시오.

ex. 2010년 1월 11일 = 2010 / 01 / 11

YYYY / MM / DD

10. 시험자 이니셜은 다음과 같은 형식으로 기록하십시오.

ex. 홍길동

|   |   |   |
|---|---|---|
| H | G | D |
|---|---|---|



## 임상시험 진행 일정표(Study flow chart)

| Period       | Screening      | Treatment period |                |                |
|--------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
| Visit        | 1st<br>( 0 주 ) | 2nd<br>( 0 주 )   | 3rd<br>( 4 주 ) | 4th<br>( 8 주 ) |
| 피험자 동의서 취득   | ○              |                  |                |                |
| 아토피 피부염 진단기준 | ○              |                  |                |                |
| 선정/제외기준 판정   | ○              |                  |                |                |
| SCORAD 측정    |                | ○                | ○              | ○              |
| 병변 부위 사진 촬영  |                | ○                | ○              | ○              |
| 경피수분 손실량     |                | ○                | ○              | ○              |
| 피부 수분 정도     |                | ○                | ○              | ○              |
| 피부 산성도       |                | ○                | ○              | ○              |
| 이상반응 기록      |                |                  | ○              | ○              |
| 총괄적 유효성 평가   |                |                  |                | ○              |

※ 방문예정일에서 ±5 일의 차이는 허용함

※ Screening 에서 피험자로 선정되고 자발적 의사로 인체적용시험의 시작을 원할 경우 시험을 실시함

방 문 1 (Day 0)

Screening

| 피험자 식별코드 |   |   |   | 피험자 이니셜 |  |  | 방문일     |
|----------|---|---|---|---------|--|--|---------|
| S        | M | C | - |         |  |  | Visit 1 |

| 아토피 피부염 진단기준  |  |
|---|--|
| <b>주소견 major features</b>   |  |
| <input type="checkbox"/> 소양증<br><input type="checkbox"/> 특징적인 피부염의 모양 및 부위<br>1) 2 세 미만의 환자 : 얼굴, 몸통, 사지 신측부 습진<br>2) 2 세 이상의 환자 : 얼굴, 목, 사지 굴측부 습진<br><input type="checkbox"/> 아토피(천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염)의 개인 및 가족력  |  |
| <b>부소견 minor features</b>   |  |
| <input type="checkbox"/> 피부건조증<br><input type="checkbox"/> 백색 비강진<br><input type="checkbox"/> 눈 주위의 습진성 병변 혹은 색소침착<br><input type="checkbox"/> 귀 주위의 습진성 병변<br><input type="checkbox"/> 구순염<br><input type="checkbox"/> 손, 발의 비특이적 습진<br><input type="checkbox"/> 두피 인설<br><input type="checkbox"/> 모공 주위 피부의 두드러짐<br><input type="checkbox"/> 유두 습진<br><input type="checkbox"/> 땀 흘릴 경우의 소양증<br><input type="checkbox"/> 백색 피부묘기증<br><input type="checkbox"/> 피부단자시험 양성반응<br><input type="checkbox"/> 혈청 면역글로블린(IgE)의 증가 |  |
| 대한아토피피부염학회(2005) 한국인 아토피 피부염 진단기준   |  |

|  |
|--|
| 성별: <input type="checkbox"/> 남 / <input type="checkbox"/> 여<br>생년월일: _____ * 주민등록번호 앞의 6 자리와 동일하여야 합니다.<br>연령: 만 _____ 세 |
|--|

|  |         |     |   |   |  |  |  |  |  |  |  |  |         |
|--|---------|-----|---|---|--|--|--|--|--|--|--|--|---------|
| 피험자 식별코드   | 피험자 이니셜 | 방문일 |   |   |  |  |  |  |  |  |  |  |         |
| <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px; text-align: center;">S</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">M</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">C</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">-</td> <td style="width: 20px; text-align: center;"> </td> <td style="width: 20px; text-align: center;"> </td> <td style="width: 20px; text-align: center;"> </td> </tr> </table> | S       | M   | C | - |  |  |  | <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px; text-align: center;"> </td> <td style="width: 20px; text-align: center;"> </td> <td style="width: 20px; text-align: center;"> </td> <td style="width: 20px; text-align: center;"> </td> </tr> </table> |  |  |  |  | Visit 1 |
| S  | M       | C   | - |   |  |  |  |  |  |  |  |  |         |
|  |         |     |   |   |  |  |  |  |  |  |  |  |         |

| 선정/제외 기준 판정  |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 선정 기준  | 예                        | 아니오                      |
| 1. 한국인 아토피 피부염 진단기준에 따라 주소건 중 2 개 이상, 부소건 중 2 개 이상의 증상이 있는 아토피 피부염 환자                            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. 치료를 받지 않을 정도로 심하지 않은 아토피 피부염을 가진 환자   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 환자  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. 피험자 제외기준에 포함되지 않은 자   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 제외 기준  | 예                        | 아니오                      |
| 1. 심한 아토피 피부염으로 약물치료(항히스타민제, 부신피질호르몬제, 한약 등)를 하고 있는 환자   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. 면역계에 영향을 미치는 특별한 치료제를 사용하고 있는 환자  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. 본 시험에 영향을 줄 수 있다고 생각되는 건강보조식품을 복용하고 있는 환자   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. 임신부, 수유부 또는 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임기 여성   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. 기타 위의 사항들 외에 시험책임자의 판단으로 연구 수행이 곤란하다고 판단되는 환자   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 피험자 선정기준 및 제외기준에 대한 평가 결과 이 지원자는 임상시험에 참여할 수 있습니까?   |                          |                          |
| <input type="checkbox"/> 예 <span style="margin-left: 200px;"><input type="checkbox"/> 아니오</span> |                          |                          |

상기 내용이 정확하게 기록되었음을 확인합니다.

시험자 성명 : 김희택 (서명/인)                      작성완료일 : 2010년    월    일

방 문 1 (Day 0)

Measurement

|          |   |   |   |  |         |  |  |                            |  |
|----------|---|---|---|--|---------|--|--|----------------------------|--|
| 피험자 식별코드 |   |   |   |  | 피험자 이니셜 |  |  | 방문일                        |  |
| S        | M | C | - |  |         |  |  | Visit 3 (8 주)<br>2010년 월 일 |  |

| SCORAD INDEX 측정          |                      |     |      |       |
|--------------------------|----------------------|-----|------|-------|
|                          | Region               | Ant | Post | Total |
|                          | Head                 |     |      |       |
|                          | Body                 |     |      |       |
|                          | Upper Extremity (Rt) |     |      |       |
|                          | Upper Extremity (Lt) |     |      |       |
|                          | Lower Extremity (Rt) |     |      |       |
|                          | Lower Extremity (Lt) |     |      |       |
|                          | Genital Area         |     |      |       |
| A.Extent Criteria(0-100) |                      |     |      |       |

**B. Intensity Criteria (0-18) :**

| Erythema   | Edema/Papulation | Oozing/Crust | Excoriation | Lichenification | Dryness |
|--|------------------|--------------|-------------|-----------------|---------|
| 0 1 2 3  | 0 1 2 3          | 0 1 2 3      | 0 1 2 3     | 0 1 2 3         | 0 1 2 3 |
| * 0 = none    1 = mild    2 = moderate    3 = severe |                  |              |             |                 |         |

|                         | 0  | 1               | 2                        | 3                    |
|-------------------------|----|-----------------|--------------------------|----------------------|
| <b>Erythema</b>         | 없음 | 희미한 홍반          | 뚜렷한 발적                   | 깊고 강렬한 적색            |
| <b>Edema/Papulation</b> | 없음 | 한정된 피부 용기       | 여러 곳에서 분명한 피부용기          | 넓은 지역에 걸쳐 경결된 피부용기   |
| <b>Oozing/Crust</b>     | 없음 | 희미한 삼출 또는 가피 증상 | 분명한 삼출이나 가피로 3 군데 이하의 병소 | 현저하고 광범위한 삼출과 가피 병소  |
| <b>Excoriation</b>      | 없음 | 약간 긁힌 자국,       | 피부에 긁은 자국, 피부상해가 뚜렷한 병소  | 광범위한 삼출액과 출혈         |
| <b>Lichenification</b>  | 없음 | 주름이 없는 두꺼워진 단계  | 가벼운 색소침착과 주름이 두꺼워진 단계    | 짙은 색소침착과 주름이 뚜렷해진 단계 |

**C. Subjective symptoms (during the 3 previous days) :**

| Pruritus                           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    | Insomnia                      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 0                                  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 0                             | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 0 : 전혀 가려움증 없음                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    | 0 : 전혀 수면장애 없음                |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
| 1-3 : 무의식중에 긁음(생활, 수면에 방해가 되지 않음)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    | 1-3 : 수면을 방해하지 않을 정도의 약간의 소양감 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
| 4-6 : 생활, 수면을 방해할 정도의 소양감(온종일은 아님) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    | 4-6 : 소양감 때문에 가끔 잠을 깬         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
| 7-9 : 생활, 수면을 방해할 정도의 소양감(대부분의 시간) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    | 7-9 : 소양감 때문에 하룻밤에 2회 이상 깬    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
| 10 : 심한 소양감으로 생활과 수면에 장애가 아주 심함    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    | 10 : 소양감이 심해 거의 수면을 이루지 못함    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |

|  |  |
|--|--|
| <b>Total score A(0-100)/5 + 7B(0-18)/2 + C(0-20)</b><br>Mild AD(Atopic Dermatitis) : Objective Score<15<br>Moderate AD(Atopic Dermatitis) : 15<Objective Score<40<br>Severe AD(Atopic Dermatitis) : Objective Score>40 |  |
|--|--|

|   |         |     |   |   |  |  |  |   |  |  |  |                                  |
|---|---------|-----|---|---|--|--|--|---|--|--|--|----------------------------------|
| 피험자 식별코드  | 피험자 이니셜 | 방문일 |   |   |  |  |  |   |  |  |  |                                  |
| <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">S</td> <td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">M</td> <td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">C</td> <td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">-</td> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> </table> | S       | M   | C | - |  |  |  | <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> </table> |  |  |  | Visit 1(0 주)<br>2010 년    월    일 |
| S   | M       | C   | - |   |  |  |  |   |  |  |  |                                  |
|   |         |     |   |   |  |  |  |   |  |  |  |                                  |

|   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|
| <b>피부진단검사</b>   |   |   |   |   |   |
| 1. 경표피수분 손실량(TEWL)  |   |   |   |   |   |
| 시험부위  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
| 2. 피부수분 정도 측정(Corneometer)  |   |   |   |   |   |
| 시험부위  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
| 3. 피부 산성도 측정(Skin pH meter)   |   |   |   |   |   |
| 시험부위  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
| <b>임상시험용 제품 처방</b>  |   |   |   |   |   |
| <b>■ 피험자에게 임상시험용 제품을 처방하였습니까?</b><br><input type="checkbox"/> 예<br><input type="checkbox"/> 아니오<br>(사유 및 조치 : _____ ) |   |   |   |   |   |

상기 내용이 정확하게 기록되었음을 확인합니다.

시험자 성명 : 김희택 (서명/인)

작성완료일 : 2010 년    월    일

# 방 문 2 (4 주)

Measurement



|          |   |   |   |         |  |  |                           |
|----------|---|---|---|---------|--|--|---------------------------|
| 시험자 식별코드 |   |   |   | 시험자 이니셜 |  |  | 방문일                       |
| S        | M | C | - |         |  |  | Visit 2(4 주)<br>2010년 월 일 |

|  |   |   |   |   |   |
|--|---|---|---|---|---|
| <b>피부진단검사</b>  |   |   |   |   |   |
| <b>1. 경표피수분 손실량(TEWL)</b>  |   |   |   |   |   |
| 시험부위   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|  |   |   |   |   |   |
|  |   |   |   |   |   |
| <b>2. 피부수분 정도 측정(Corneometer)</b>  |   |   |   |   |   |
| 시험부위   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|  |   |   |   |   |   |
|  |   |   |   |   |   |
| <b>3. 피부 산성도 측정(Skin pH meter)</b>   |   |   |   |   |   |
| 시험부위   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|  |   |   |   |   |   |
|  |   |   |   |   |   |
| <b>임상시험용 제품 처방</b>   |   |   |   |   |   |
| <b>■ 시험자에게 임상시험용 제품을 처방하였습니까?</b><br><input type="checkbox"/> 예<br><input type="checkbox"/> 아니오<br>(사유 및 조치 : )                        |   |   |   |   |   |
| <b>이상반응 확인</b>   |   |   |   |   |   |
| <b>■ 지난번 방문(방문 1) 이후 평소와 다른 변화 또는 이상반응이 있었습니까?</b><br><input type="checkbox"/> 예 ⇒ 이상반응 페이지를 작성해 주십시오.<br><input type="checkbox"/> 아니오 |   |   |   |   |   |
| <b>임상시험용 제품 순응도 확인</b>   |   |   |   |   |   |
| <b>■ 임상시험용 제품을 지시대로 잘 사용하고 있습니까?</b><br><input type="checkbox"/> 예<br><input type="checkbox"/> 아니오 ⇒ 제품 사용에 대한 지도를 다시 한번 실시하여 주십시오.    |   |   |   |   |   |

상기 내용이 정확하게 기록되었음을 확인합니다.

시험자 성명 : 김희택 (서명/인)                      작성완료일 : 2010년 월 일

# 이상반응 및 중도탈락

|          |   |   |   |  |         |  |  |  |  |
|----------|---|---|---|--|---------|--|--|--|--|
| 시험자 식별코드 |   |   |   |  | 시험자 이니셜 |  |  |  |  |
| S        | M | C | - |  |         |  |  |  |  |

| 이상반응 기록표             |   |   |      |      |  |      |      |      |
|----------------------|---|---|------|------|--|------|------|------|
|                      | 이상반응 1  | 이상반응 2  |      |      |  |      |      |      |
| 이상반응<br>종 류          |   |   |      |      |  |      |      |      |
| 발 현 일                | <table border="1"> <tr> <td>년 YY</td> <td>월 MM</td> <td>일 DD</td> </tr> </table>  | 년 YY  | 월 MM | 일 DD | <table border="1"> <tr> <td>년 YY</td> <td>월 MM</td> <td>일 DD</td> </tr> </table> | 년 YY | 월 MM | 일 DD |
| 년 YY                 | 월 MM  | 일 DD  |      |      |  |      |      |      |
| 년 YY                 | 월 MM  | 일 DD  |      |      |  |      |      |      |
| 소 실 일                | <table border="1"> <tr> <td>년 YY</td> <td>월 MM</td> <td>일 DD</td> </tr> </table>  | 년 YY  | 월 MM | 일 DD | <table border="1"> <tr> <td>년 YY</td> <td>월 MM</td> <td>일 DD</td> </tr> </table> | 년 YY | 월 MM | 일 DD |
| 년 YY                 | 월 MM  | 일 DD  |      |      |  |      |      |      |
| 년 YY                 | 월 MM  | 일 DD  |      |      |  |      |      |      |
| 이상반응<br>정 도          | <input type="checkbox"/> 경증 (Mild)<br><input type="checkbox"/> 중등증 (Moderate)<br><input type="checkbox"/> 중증 (Severe)<br><input type="checkbox"/> 사망 (Death)  | <input type="checkbox"/> 경증 (Mild)<br><input type="checkbox"/> 중등증 (Moderate)<br><input type="checkbox"/> 중증 (Severe)<br><input type="checkbox"/> 사망 (Death)  |      |      |  |      |      |      |
| 중 대 한<br>이상반응<br>여 부 | <input type="checkbox"/> 예 (SAE report 작성)<br><input type="checkbox"/> 아니오  | <input type="checkbox"/> 예 (SAE report 작성)<br><input type="checkbox"/> 아니오  |      |      |  |      |      |      |
| 이상반응<br>결 과          | <input type="checkbox"/> 회복됨 / 해결됨<br><input type="checkbox"/> 회복 중임 / 해결 중임<br><input type="checkbox"/> 회복되지 않음 / 해결되지 않음<br><input type="checkbox"/> 회복되었으나 후유증이 남음<br>/ 해결되었으나 후유증이 남음<br><input type="checkbox"/> 사망<br><input type="checkbox"/> 알 수 없음   | <input type="checkbox"/> 회복됨 / 해결됨<br><input type="checkbox"/> 회복 중임 / 해결 중임<br><input type="checkbox"/> 회복되지 않음 / 해결되지 않음<br><input type="checkbox"/> 회복되었으나 후유증이 남음<br>/ 해결되었으나 후유증이 남음<br><input type="checkbox"/> 사망<br><input type="checkbox"/> 알 수 없음   |      |      |  |      |      |      |
| 인과관계                 | <input type="checkbox"/> 관련성이 명백함 (Definitely related)<br><input type="checkbox"/> 관련성이 많음 (Probably related)<br><input type="checkbox"/> 관련성이 의심됨 (Possibly related)<br><input type="checkbox"/> 관련성이 적음 (Probably not related)<br><input type="checkbox"/> 관련성이 없음 (Definitely not related)<br><input type="checkbox"/> 평가 불가능(Unknown) | <input type="checkbox"/> 관련성이 명백함 (Definitely related)<br><input type="checkbox"/> 관련성이 많음 (Probably related)<br><input type="checkbox"/> 관련성이 의심됨 (Possibly related)<br><input type="checkbox"/> 관련성이 적음 (Probably not related)<br><input type="checkbox"/> 관련성이 없음 (Definitely not related)<br><input type="checkbox"/> 평가 불가능(Unknown) |      |      |  |      |      |      |
| 관련조치                 | <input type="checkbox"/> 사용 중지 <input type="checkbox"/> 용량 변화 없었음<br><input type="checkbox"/> 감량 <input type="checkbox"/> 알 수 없음<br><input type="checkbox"/> 증량 <input type="checkbox"/> 해당 사항 없음   | <input type="checkbox"/> 사용 중지 <input type="checkbox"/> 용량 변화 없었음<br><input type="checkbox"/> 감량 <input type="checkbox"/> 알 수 없음<br><input type="checkbox"/> 증량 <input type="checkbox"/> 해당 사항 없음   |      |      |  |      |      |      |
| 요법처치<br>여부/내용        | <input type="checkbox"/> 아니오<br><input type="checkbox"/> 약제 및 요법<br><input type="checkbox"/> 입원<br><input type="checkbox"/> 기타 :  | <input type="checkbox"/> 아니오<br><input type="checkbox"/> 약제 및 요법<br><input type="checkbox"/> 입원<br><input type="checkbox"/> 기타 :  |      |      |  |      |      |      |
| 시험자<br>의 견           |   |   |      |      |  |      |      |      |

| 피험자 식별코드  | 피험자 이니셜 | 최종방문일 |   |   |  |  |  |  |  |  |  |  |               |
|---|---------|-------|---|---|--|--|--|--|--|--|--|--|---------------|
| <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30px; text-align: center;">S</td> <td style="width: 30px; text-align: center;">M</td> <td style="width: 30px; text-align: center;">C</td> <td style="width: 30px; text-align: center;">-</td> <td style="width: 30px;"></td> <td style="width: 30px;"></td> <td style="width: 30px;"></td> </tr> </table> | S       | M     | C | - |  |  |  | <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30px;"></td> <td style="width: 30px;"></td> <td style="width: 30px;"></td> <td style="width: 30px;"></td> </tr> </table> |  |  |  |  | <b>임상시험종결</b> |
| S   | M       | C     | - |   |  |  |  |  |  |  |  |  |               |
|   |         |       |   |   |  |  |  |  |  |  |  |  |               |

| 임상시험의 종료/중도 탈락   |                                 |  |   |  |   |                             |
|--|---------------------------------|--|---|--|---|-----------------------------|
| <p>▶ 임상시험 시작일 :        /        /        /</p> <p>▶ 임상시험 종료일 :        /        /        /</p> <p>▶ 임상시험 중지일 :        /        /        /</p> <p>▶ 임상시험 재시작일:        /        /        /</p> <p>▶ 임상시험 탈락일 :        /        /        /</p> <p>▶ 피험자가 임상시험계획서대로 본 임상시험을 종료하였습니까?<br/> <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오</p> <p>☞ "아니오"일 경우 아래 임상시험의 중도탈락 부분에 자세한 사항을 기록하십시오. 중지한 경우<br/> 중지 및 탈락 사유를 시험자 의견에 서술하십시오.</p> <p>▶ 임상시험의 중도탈락 이유</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;"><input type="checkbox"/> 계획서 위반</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><input type="checkbox"/> 시험자의 지시에 불응하는 피험자의 경우</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><input type="checkbox"/> 중대한 이상반응이 발생한 경우</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><input type="checkbox"/> 피험자가 임상시험 참가 동의를 철회한 경우</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><input type="checkbox"/> 연구 결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 등을 복용한 경우</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><input type="checkbox"/> 기타</td> </tr> </table> <p>시험자 의견 :</p> | <input type="checkbox"/> 계획서 위반 | <input type="checkbox"/> 시험자의 지시에 불응하는 피험자의 경우 | <input type="checkbox"/> 중대한 이상반응이 발생한 경우 | <input type="checkbox"/> 피험자가 임상시험 참가 동의를 철회한 경우 | <input type="checkbox"/> 연구 결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 등을 복용한 경우 | <input type="checkbox"/> 기타 |
| <input type="checkbox"/> 계획서 위반  |                                 |  |   |  |   |                             |
| <input type="checkbox"/> 시험자의 지시에 불응하는 피험자의 경우   |                                 |  |   |  |   |                             |
| <input type="checkbox"/> 중대한 이상반응이 발생한 경우  |                                 |  |   |  |   |                             |
| <input type="checkbox"/> 피험자가 임상시험 참가 동의를 철회한 경우   |                                 |  |   |  |   |                             |
| <input type="checkbox"/> 연구 결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 등을 복용한 경우  |                                 |  |   |  |   |                             |
| <input type="checkbox"/> 기타  |                                 |  |   |  |   |                             |

상기 내용이 정확하게 기록되었음을 확인합니다.

시험자 성명 : 김희택 (서명/인)

작성완료일 : 2010년    월    일