

화장품의 안전성 평가

럭키 화장품 연구소
강 상 진

서 론

화장품이 갖추어야 할 여러 요소 중에서 안전성의 중요성은 아무리 강조해도 지나치지 않을 것이다. 우리는 화장품 역사를 통하여 피부 안전성의 문제로 인하여 사회적 물의를 일으켰던 일을 여러번 보아왔으며, 소비자 보호, 나아가서는 우리의 고객에게 양질의 가치를 제공한다는 측면에서도 안전성의 문제를 소홀히 다룰 수 없다. 그러나 화장품의 원료와 제품에 대한 안전성 평가기술은 아직 만족할 수 없는 수준에 머물러 있다. 그동안에는 주로 사람이나 동물을 이용한 *in vivo test*에 의해 안전성을 평가해 왔으나, 근래에는 피부부작용 발생과정에 관한 학문적 연구에 힘입어 쉽고 정확한 *in vitro test* 방법의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 따라서 여기에서는 지금까지 진행되고 있는 안전성 평가기술의 발전 상황을 알아보고 한국의 산업계가 확보해야 할 평가기술에 대해 생각해보고자 한다.

1. Irritant Contact Dermatitis

화장품에 의해 발생하는 피부 부작용은 크게 irritant contact dermatitis와 allergic contact dermatitis가 있다. 여기서는 우선 irritant contact dermatitis에 관해 알아보고 이어서 allergy 유발성의 평가법을 검토하고자 한다. Irritation은 화장품 등에 함유되어 피부에 접촉하는 자극물질이 피부의 모든 층에서 그 영향을 나타내는 종합적인 현상이다¹⁾. 각질층에서는 수분과 지질의 손실, 단백질 변성 등을 일으켜 각층 박리를 유도하고 각질층의 견고성과 수분함량을 변화시켜 결과적으로 각질층의 barrier 기능을 변화시킨다. 각질층을 통과하여 표피의 생세포층에 도달한 자극물질은 세포막 기능과 여러가지 효소활성을 변화시키고, 세포 증식과 분화에 영향을 미치며, 다양한 염증매개물질의 방출을 유도한다. 이에 따라 세포의 손상과 사멸에 이르게 되고 그 결과 과

각화를 일으키는 등 각질층의 성질에도 영향을 준다. 따라서 한번의 사용으로는 부작용이 나타나지 않던 물질도 반복사용에 의해 각질층이 손상된 후 염증을 일으켜 누적자극 현상을 나타낼 수 있다. 한편 진피에서는 혈관계에 작용하여 염증을 일으키게 된다. 각각의 자극물질은 작용방식이 서로 다르지만 최종적으로는 피부에 염증을 일으켜 홍반, 부종, 발열, 가려움 및 통증 등의 형태로 나타나며 심한 경우에는 조직의 괴사에 이르게 된다.

in vivo 평가법

in vivo test 방법은 비교적 단순하다. 즉 시료를 사람이나 동물의 피부에 일정시간동안 적용(폐색, 개방 첩포)하고 홍반이나 부종 등의 변화를 육안 관찰에 의해 정량화한다. 사람의 눈으로 관찰되지 않는 변화를 측정하기 위해 기기측정법이 활용되기도 하는데 TEWL, 피부 탄력, 피부 혈류량 또는 피부의 색이나 온도의 측정 등이 이용된다²⁾. 그러나 현재까지의 평가법들은 상대적으로 강한 자극물질의 평가에는 많이 이용되고 있으나, 약한 자극의 경우에는 육안판정이나 기기적인 피부특성 평가로는 영향을 알아낼 수 없는 경우가 많다. 의약품과는 달리 화장품에 사용되는 원료들은 대부분 자극이 경미한 것들이고 이 약한 자극물질들에 의해 피부 반응이 나타나는 경우가 많으므로, 미세한 자극의 평가는 화장품의 안전성 평가에 필수적이라 생각된다. 최근 육안판정이나 TEWL의 측정으로는 평가할 수 없는 표피의 미세한 변화를 관찰할 수 있는 *in vivo* 평가법이 개발되었다³⁾. 즉 표피의 미세한 주름이 약한 자극에 의해 변화하는 것을 관찰하고, image analyzer를 이용하여 정량화하는 방법이다(그림 1).

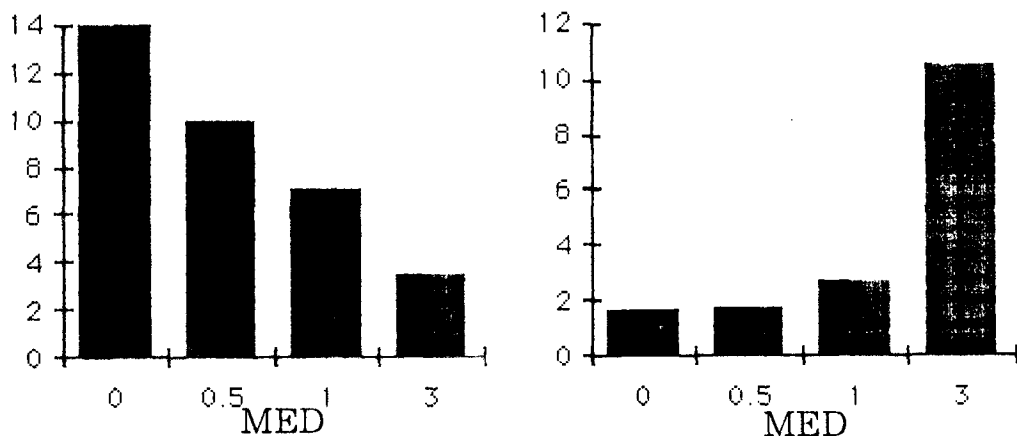


그림 1. TEWL과 잔주름 측정법의 sensitivity 비교. 자외선을 조사하고 3일 후 측정.
a) Wrinkle Density, b) TEWL

이 방법은 현재까지 보고된 기기평가법들보다는 민감하기 때문에, 광범위한 분석에 의해 기존의 다른 방법들과의 상관관계가 인정되면, 화장품 원료와 제품의 안전성 평가에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

in vivo 평가는 피부 반응을 직접 평가할 수 있다는 장점이 있으나 비용과 시간이 많이 소요되고, 제한된 양의 실험만이 가능하므로 광범위한 자극물질의 screening에는 어려움이 따른다. 또한 동물을 이용한 실험의 경우에는 경피흡수, 피부내의 대사, 염증 발생과정 등이 사람과 다르기 때문에 자극에 대한 피부 반응의 정도에도 차이가 있어 자극물질간의 상대적인 자극성 평가에는 *in vitro* 실험과 마찬가지로 어려움이 있다. 특히 약한 자극의 경우에는 피부 반응을 정량적으로 측정할 수 있는 방법이 거의 없어 개면활성제나 자외선 흡수제 등 비교적 강한 자극물질의 평가에만 주로 이용되고 있다. 따라서 최근에는 동물실험을 대체할 수 있으며 다양한 생물학적 현상을 정량적으로 평가하여 약한 자극도 측정할 수 있는 *in vitro* 평가법의 개발이 활발히 이루어지고 있다.

in vitro 평가법

in vitro model로는 흥반, 부종, 혈류량 등의 *in vivo* 현상들을 직접 측정할 수 없으므로 독성이나 자극의 심한 정도를 예측하기 위해 세포 수준의 지표들이나 세포간 매개물질을 측정하게 된다. 대부분의 *in vitro* 평가법은 최종적인 안전성 평가보다는 단순히 1차적인 screening 목적으로 사용되며, 농도와 반응의 관계를 정량화하여 시료의 독성을 비교 평가한다. 많이 사용되는 지표들은 다음과 같다.

- 1) HTD(highest tolerated dose): 형태변화를 유발하지 않는 최고 농도
- 2) TTC(toxic threshold concentration): 시료 제거후 시료에 의한 손상이 회복될 수 있는 최고농도
- 3) IC₅₀: 세포증식을 50% 억제하는 농도
- 4) CD₅₀: 50%의 세포를 유리시키는 농도
- 5) EC₅₀: 세포내 효소의 누출을 50% 증가시키는 농도
- 6) 활성세포의 수를 50% 감소시키는 농도
- 7) cytokine 또는 염증 매개물질의 방출을 50% 증가시키는 농도
- 8) 각질층의 투과성을 변화시키는 농도

표 1에 *in vitro* 평가에 사용되는 여러가지 시험방법과 지표들을 나타내었다. 세포의 증식이나 사멸과 dye absorption, 세포내 고분자의 방출 등이 안자극 및 피부 자극의 *in vitro* 평가에 널리 이용되어 온 지표들이다. 즉 활성세포의 수는 1) cell count, 2) 총단백질 정량, 3) Thiazolyl blue(MTT) conversion assay, 4) neutral

red (NR) uptake, 5) [³H]thymidine incorporation 등으로 평가된다. 그러나 이런 방법들은 비교적 심한 자극물질의 평가에는 적당하지만 sensitivity가 낮아 약한 자극을 평가하기에는 부족하다.

표 1. *in vitro* 피부독성 시험법

Test	Toxicity assessment	Endpoint
Morphology	Microscopy	HTD, TTC
Cell proliferation	Colony formation inhibition Cell number Thymidine incorporation Uridine incorporation Cell protein Neutral red uptake MTT conversion	IC ₅₀
Cell adhesion	Cell number Cell protein NR, MTT	CD ₅₀
Cell differentiation	Histology Protein markers Envelope formation	
Cell membrane integrity	NR, MTT Trypan blue retention Enzyme release (LDH) ⁵¹ Cr release Glucose uptake	EC ₅₀
Cell metabolism	Glucose utilization Heat shock protein Plasminogen activator	
S. corneum integrity	Percutaneous absorption	
Cell function impairment	Fibroblast-induced collagen contraction	EC ₅₀
Inflammatory mediators	Eicosanoids Interleukins	

최근 개발된 세포막의 active transport system의 손상을 측정하는 glucose uptake 평가법은 기존의 NR, MTT, total protein assay 등의 방법보다 약 10-100 배 정도의 sensitivity를 보여 미세자극의 평가에 유용하리라고 생각된다⁴⁾(그림 2).

피부 부작용은 최종적으로 염증의 형태로 나타난다. 염증매개물질은 조직의 자극 또는 손상의 명백한 증거로서 *in vitro* 독성 평가에 응용이 가능하다(표 2). 염증 매개물질은 IC₅₀ 또는 CD₅₀의 농도보다 매우 낮은 농도의 자극물질에 의해 방출되는 것이 측정 가능하므로, 현재에는 기존의 세포독성이나 세포막의 기능 손상을 측정하는 방법보다는 배양 세포로부터 염증 매개물질인 eicosanoid(PGE₂, LTB₄, HETEs 등) 또는 cytokine(IL-1 등)의 방출 정도로부터 자극정도를 평가하는 방법의 개발이 활발히 이루어지고 있다⁵⁾. 이때 사용되는 세포로는 fibroblast와 급성 염증 발현에 필수적으로 요구되는 mast cell이 있다. 매개물질의 측정은 방출된 매개물질을 직접 측정하거나, 손상된세포의 배양액이 다른 세포에 미치는 영향을 평가하여 매개물질 방출 정도를 간접 평가하기도 한다. 즉 배양액 중에 존재하는 매개물질이 정상 세포에 작용하여 나타나는 증식촉진(DNA 합성), 특수한 물질의 합성 증가(fibroblast에 의한 뮤코다당류 합성), 백혈구의 활성 증가(chemotaxis) 등을 평가한다. 현재까지의 결과로는 매개물질의 측정 방법으로 약한 irritant의 검출이 가능하지만 강한 irritant들은 오히려 이러한 현상을 억제하기도 하므로 결과의 해석에 유의하여야 한다.

표 2 Pro-inflammatory cytokine mediators

Cytokine	Cell origin	
Histamine(H) platelets	Mast cells, basophils,	Preformed
Prostaglandins(PG) keratinocytes	Mast cells, macrophages,	Generated
Leukotrienes(LT)	Macrophages, keratinocytes	Generated
Platelet-activating factor (PAF)	Activated leucocytes	Generated
Chemotactic factors (ECF-A, NCF)	Mast cells, basophils, neutrophils(ECF)	Preformed
Interleukin-1 (IL-1)	Macrophages, keratinocytes	Generated
Interferon (IFN)	Macrophages, fibroblasts(α, β) lymphocytes(γ)	Generated

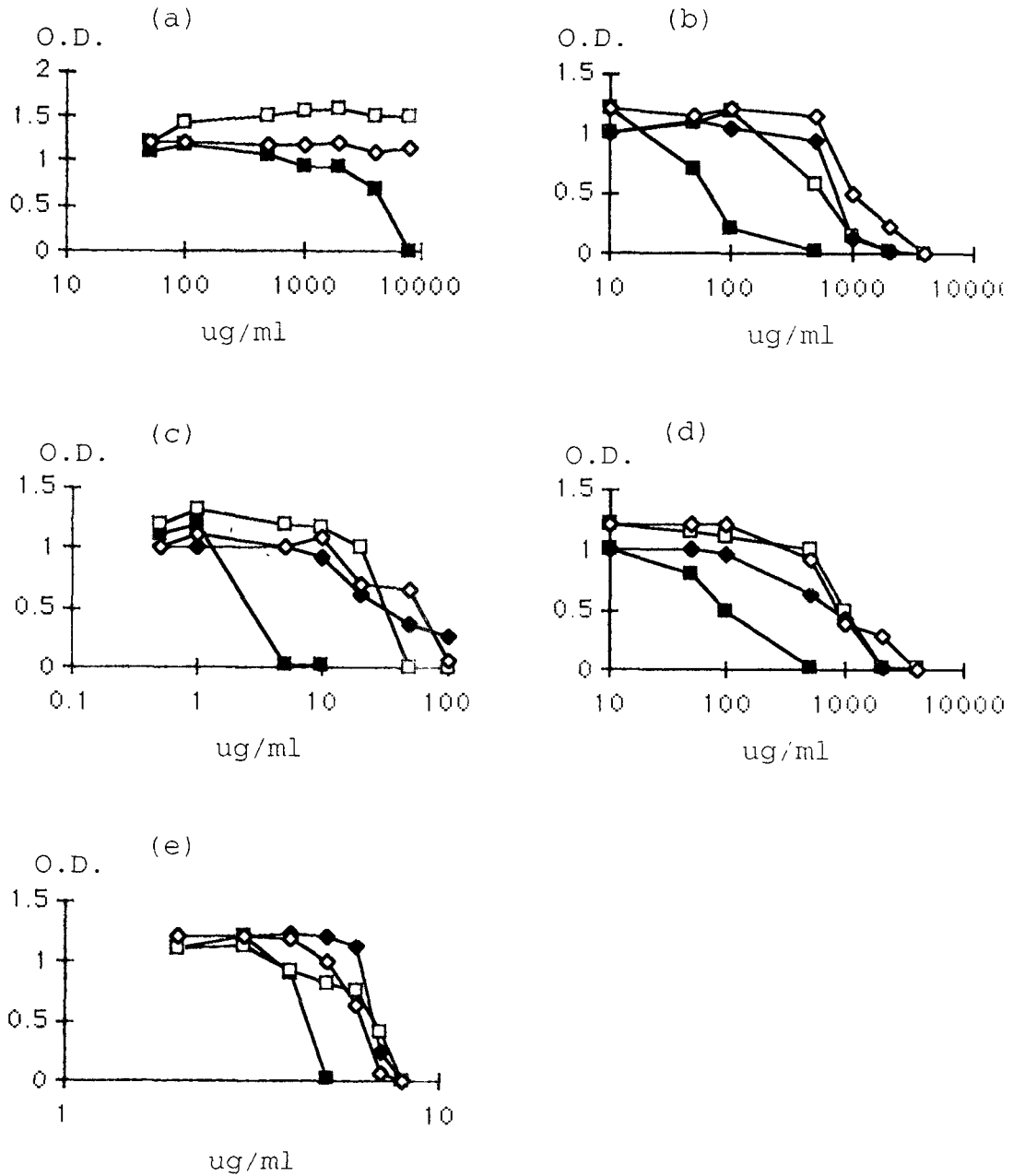


그림 2. A431 cell(human epidermoid carcinoma)에 대한 화장품 원료의 독성 평가. a)HCO-40(PEG-40-hydrogenated castor oil), b)Myrj52, c)Emalex NP-12, d)Tween-80, e)SLS

—■— glucose uptake (OD x 10) —□— MTT test (OD x 3)
 —◆— neutral red uptake —◇— total cell protein

대부분의 *in vitro* 평가법은 *in vivo* 현상과의 상관관계에 문제가 있어 한가지 방법으로 시료물질의 자극성 정도를 평가하는 것은 무리가 있으므로 몇가지 방법으로 평가하여 종합적으로 분석하여야 한다.

in vitro model

irritant에 대한 *in vivo* 반응은 복잡한 과정을 통해 일어나며, 이 과정에 관여하는 세포의 종류도 다양하여 keratinocyte, fibroblast를 비롯하여 melanocyte, Langerhans' cell, mast cell 등이 포함된다. 이 복잡성 때문에, 피부 반응을 완전히 모방할 수 있는 *in vitro* model의 개발은 거의 불가능하다. 현재까지 사용되고 있는 *in vitro* culture model로는 explant 또는 organ culture와 일반적인 세포배양 그리고 공기에 노출시킨 세포배양법들이 있다¹⁾.

Explant culture에서는 일정한 크기의 피부 조직을 배양액 속에 잠기게 하는 방법과, 조직의 진피 부분은 배양액에 잠기게 하고 표피 부분은 공기중에 노출시키는 방법이 있다. 두가지 방법 모두 얻을 수 있는 피부의 양에 의해 실험의 양이 제한된다. 또한 배양중에 세포가 조직 밖으로 성장하고 조직내부에서는 부분적인 사멸이 일어나므로 자극물질의 적용시간을 길게 할 수 없는 단점이 있다⁶⁾. 단 표피부분을 공기중에 노출시킨 경우에는 불용성 물질이나 복잡한 조성의 formulation도 표피 위에 도포하여 실험할 수 있다.

세포배양에 의한 자극평가에는 fibroblast와 keratinocyte가 주로 사용되는데, 많은 양의 균일한 세포를 얻을 수 있으므로 다수의 시료에 대해 여러 농도에서 대규모의 자극성 screening이 가능하다. Keratinocyte의 경우 배양액 중의 Ca^{++} 농도를 조절하여 monolayer culture나 분화된 세포층을 얻을 수 있다. 시험의 재현성 확보를 위해서는 배양과 실험조건이 명확해야 한다¹⁾. 이 조건들에는 세포의 계대수, confluency, 시료에 노출되는 시간, 시료 투여 후의 배양시간, 시료의 투여방법 등이 포함된다. 특히 시료의 투여 방법이 중요한데, 투여방법에 따라 배양액의 pH와 삼투압이 영향을 받으며, 배양액 중의 단백질을 변성시키거나 필수 cofactor 및 substrate의 사용가능성이 변하고, 불용성의 입자가 생길 수도 있기 때문이다. 한편 배양액에 의해 시료가 분해되거나 흡착하여 시료의 유효농도가 변할 가능성도 검토되어야 한다. 세포배양법에서는 세포가 배양액 속에 잠겨 있으므로 불용성 시료 또는 용해도가 낮은 시료와 복잡한 formulation의 평가는 제한된다. 또 배양세포의 형태와 생화학적 특성은 정상피부와 많이 다르고(표 3), 특히 각질층이 없거나 불완전하여 경피흡수에 관해서는 전혀 고려되지 않으므로 *in vivo* (경피도포)의 결과를 충분히 예측하기는 곤란하다.

표 3. Expression of epidermal characteristics

Epidermal characteristics	Cultures		Native epidermis
	Submerged	Air-exposed	
Tissue architecture			
Stratification	B layer 2-5 SPB layers	All epidermal strata (SB, SS, SG, SC)	All epidermal strata (SB, SS, SG, SC)
Lamella bodies	Absent	Present, in lower amounts than <i>in vivo</i>	Present
Desmosomes	Present	Present	Present
Hemidesmosomes	Absent	Present	Present
Cornified envelope	Present in low	Present	Present
Expression of differentiation-specific protein markers			
Keratins	BC layers: K5, K14 SB: K5, K14 SPB layers: K6, K16 SPB layers: K1, K10 K4, K13, K19, K10 K1		S B : K 5 , K 1 4 SPB layers: K6, K16 K1, K10
Involucrine	SPB layers	SS, SG	SG
Transglutaminase	SPB layers	SS, SG	SG
Filagrin	Absent	SS, SG	SG
Lipid markers related to keratinocyte differentiation			
Sphingolipids	Low amount	High amount	High amount
AC, AGC	Absent	Present	Present
Other ceramides	Present	Present	Present
Lanosterol	Absent	Present	Present
Triglycerides	High	High	Low
EFA	Low	Low	Normal

특히 각질층이 없거나 불완전하여 경피흡수에 관해서는 전혀 고려되지 않으므로 *in vivo*(경피도포)의 결과를 충분히 예측하기는 곤란하다.

일반적인 배양세포의 단점을 해결하기 위하여 정상 피부와 유사한 구조와 기능을 갖는 skin equivalent가 개발되었다. 진피와 비슷한 성질의 몇가지의 substrate(fibroblast가 있는 collagen gel⁷⁾, 표피를 제거한 진피⁸⁾ 등)위에 keratinocyte를 배양하고 이것을 공기중에 노출시키면 keratinocyte의 분화가 일어나서 각질층을 포함하여 표피의 모든 층이 만들어지고 각 층은 정상피부와 거의 같은 형태와 생화학적 특성을 갖게 된다(표 2). 이와 같이 만들어진 skin equivalent는 표피의 진제 형태뿐 아니라 분화와 관련된 단백질 marker, 지질 조성, barrier 기능, 대사활성 등이 몇가지 예외를 제외하고는 거의 유사하다⁸⁾. 즉 keratin 1과 10을 비롯하여 involucrin, fillagrin, transglutaminase 등의 분화관련 단백질이 발현되는데

keratin 6과 16이 나타나고 단백질의 발현위치가 정상피부와는 다르다. 또 barrier 기능에 필수적인 ceramide등이 충분히 합성되지만 triglyceride와 linoleic acid의 함량은 정상피부와 상당히 다르다. Skin equivalent의 또다른 장점으로는, 정상피부의 모든 효소를 모두 갖고 있어서 침투된 물질의 생화학적 변형이 정상피부와 같이 일어날 수 있으므로 약물대사에 의한 자극의 완화나 새로운 자극물질의 생성에 의한 영향도 평가될 수 있다는 것이다⁹⁾.

각질층의 기본 기능은 피부를 통한 수분손실과 피부에 접촉하는 물질의 침투를 막는 barrier 기능이다. 피부 자극은 각질층을 통과하여 살아있는 세포층에 도달한 자극물질의 양에 의해 좌우되므로 *in vitro* 평가법 개발에 있어서 *in vitro* model의 barrier 기능에 관한 정보가 필수적으로 요구된다. 아직까지는 skin equivalent의 barrier 기능에 관한 정보가 충분하지 않은데 각 chemical에 대하여 상당한 차이가 있으며 정상피부에 비하여 약 100배까지 barrier 기능이 약한 것으로 알려지고 있다¹⁰⁾. Barrier 기능을 향상시키기 위해 공기중의 수분을 감소시키거나 배양액에 분화 촉진제를 첨가하는 등 몇가지 노력이 시도되고 있다^{8),10)}.

배양세포를 이용하는 위의 방법들 외에도 luminescence(Microtox), 단백질 응집(Skintex/Eytex), 혈관계의 변화(CAMVA) 등을 이용한 방법이 개발되어 있다¹¹⁾. 이 중 Eytex는 sensitivity가 높고 *in vivo* 결과와의 상관관계도 우수하여 최근에 많이 이용되고 있다¹²⁾.

이상과 같이 다양한 *in vitro* model이 개발되고 있지만 각국의 법규에서는 아직까지 *in vivo* 평가결과를 안전성 자료로 요구한다. 근래에 CTFA와 유럽의 FRAME 같은 단체에서는 동물실험을 대체하는 *in vitro* 평가법을 관련 규제법에 적용하기 위하여 우수한 *in vitro* 평가법을 개발하고 그 결과와 *in vivo* 평가 결과와의 상관관계 등의 연구를 대규모로 수행하고 있어¹³⁾ 오래지 않아 *in vitro* 평가 결과를 공식 안전성 자료로 인정하게 되리라 생각한다.

2. Allergic contact dermatitis

자주 발생하는 피부 알러지 반응은 allergic contact dermatitis 또는 contact eczema로 불리는 것으로, 피부 내로 침투한 antigen이나 hapten에 대한 세포성 면역 반응(cell-mediated immune reaction)인 delayed hypersensitivity 반응이다¹⁴⁾. 이 반응은 통상적인 항체 없이 특정 입파구에 의해 나타난다. Allergic contact dermatitis의 발현기구는 크게 감작유도(induction)와 유도에 의해 감작된 후의 감작유

발(elicitation)로 구성된다(그림 3, 4). 세포성 면역반응에는 입파구 외에 antigen presenting (AP) 기능을 갖는 accessory cell을 필요로 한다. Antigen presenting cell(APC)는 antigen을 식균작용 등에 의해 세포 내로 옮기고 phagosome에서 부분적인 분해 등으로 antigen을 변형한 후 세포막으로 수송하며 막에서 major histocompatibility complex(MHC) gene product인 Ia antigen과 결합시켜 세포막 외부로 내놓는다. 입파구는 이 antigen-Ia complex를 인지하여 면역반응을 일으키게 된다.

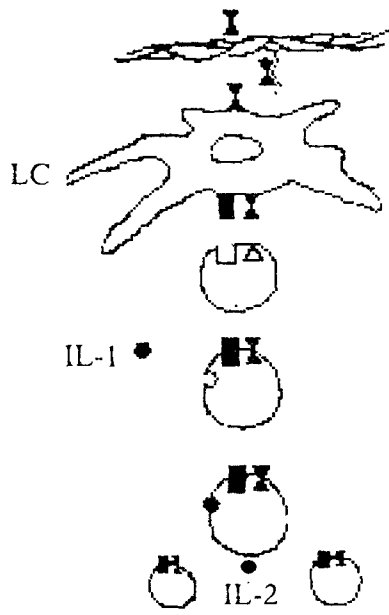


그림 3. Contact sensitization induction phase

Langerhans'cell 내부로 들어간 antigen은 MHC product Ia antigen과 함께 막표면으로 표현되며 특정 T cell이 이를 인식하여 IL-1 receptor를 만든다. LC나 KC로부터 방출된 IL-1에 의해 T cell이 IL-2를 만들고 그 영향으로 특정 T cell의 증식이 일어난다.

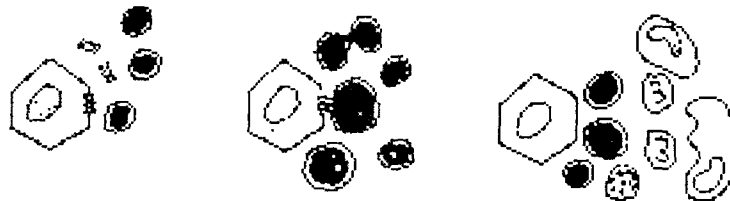


그림 4. Delayed hypersensitivity (cell-mediated immune response)

Antigen을 발현한 APC가 감작된 T cell과 접촉하면 lymphocyte가 분열하고 lymphokine을 방출하여 주위의 macrophage와 백혈구들을 유인하고 활성화 시킴으로서 염증을 일으킨다

대표적인 APC로는 macrophage와 Langerhans' cell(LC)이 있으나 effector T cell을 활성화시키는 기능은 LC가 강하여 피부에서는 LC가 주된 APC 기능을 담당하고 keratinocyte도 보조적인 기능을 한다¹⁵⁾. 감작의 정도는 각 개체의 유전적 특이성, antigen의 양, APC 표면에 나타난 antigen의 수, 감작된 후 혈관에 존재하는 T cell의 수에 의해 결정된다.

in vivo test

Delayed hypersensitivity를 검출하는 감작성 시험에는 guinea pig가 일반적으로 이용된다¹⁶⁾. 특히 induction에 대하여 다음과 같은 방법들이 제안되었다.

- 1) 감작의 성립에는 물질이 경피흡수되어 이물질로 인식되는 것이 필수조건이다. 이 단계를 피내주사로 대체하여 간편히 감작성 물질을 screen한다.
- 2) 면역보조제를 사용하여 약한 감작성 물질을 평가한다.
- 3) 실제로 물질이 사용되는 조건으로 실험하여 현실적인 위험성을 파악한다.

가장 고전적인 시험법은 Landsteiner와 Jacobs가 개발하여 후에 Draize가 개량한 방법이다. 이 방법의 특징은 시료를 생리식염수에 용해 또는 현탁시켜 이것을 격일간격으로 3주간(10회) 피내주사하여 감작을 유도하고, 2주후 다시 피내주사하여 allergy 반응을 일으키는 것이다. 이 방법으로는 강한 감작성 물질은 쉽게 평가되지만 약한 감작물질의 검출은 용이하지 않기 때문에, 면역증강제로서 Freund's complete adjuvant(FCA)를 사용하여 감작성 물질의 검출능을 높이는 방법인 Maximization test가 개발되었다¹⁷⁾. 이 방법에서는 감작 유도시에 시료를 FCA와 함께 피내주사하고, 1주후 SLS를 도포하여 시료의 폐색적용에 의한 감작검출능을 높인 것이다. 이 방법의 문제점은 화장품 원료 중 분체 또는 적당한 용매가 없어 피내 주사가 곤란한 물질에 대해서는 평가가 안된다는 것이다. 이런 물질에 대해서는 피내주사 대신 시료를 폐색침포하여 maximization test와 유사한 감도를 갖는 modified test(adjuvant and patch test)가 개발되었다¹⁸⁾ (그림 5).

이들 피내주사와 FCA를 사용하는 방법은 현실상황과는 다른 조건이므로 시료의 국소 적용에 의한 감작유도법도 제안되었다. Buehler의 topical closed patch법¹⁹⁾, Klecak의 open epicutaneous법²⁰⁾ 등이다. 각 방법들의 감도를 비교하기 위한 실험에서는 그림 6에서와같이 FCA를 사용한 두 방법은 거의 유사한 감도를 나타낸 반면 FCA를 사용하지 않은 방법들에서는 감작성이 검출되지 않았다¹⁸⁾.

	1	2	3					7	8	9	10									21	23	
maximization test	AS							S	S											■	●	●
	↓	↓						L		●	●											
modified test	AS	S	S					S	S											■	●	●
	↓	●	●	●				L		●	●											

A:adjuvant, S:sample, ↓:intradermal injection
 —●—:observation, ●:closed patch, ■:challenge
 SLS:topical application of 10% SLS

그림 5. 감작시험법(maximization test, modified test)

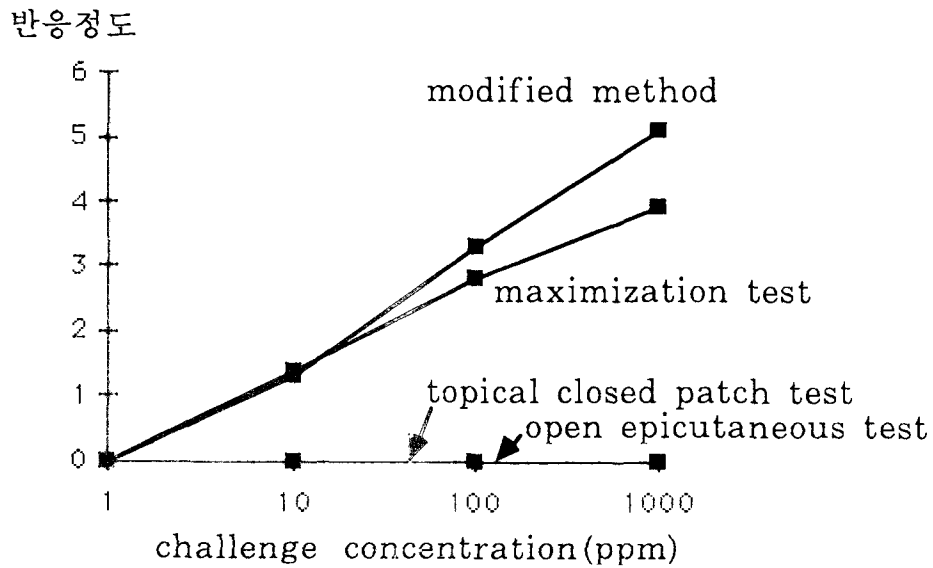


그림 6. 각 시험방법의 sensitivity 비교

in vitro test

전술한 바와 같이 동물실험은 비용과 시간이 많이 소요되고 실험의 양이 제한되어 다양한 화장품 원료들의 감작유발성 screening에는 어려움이 많다. 따라서 감작유발성의 평가에도 *in vitro* 평가법의 개발이 이루어지고 있는데 *in vitro* model에서는 복잡한 면역체계를 충분히 모방하는 것이 어렵기 때문에 자극성 평가법처럼 많은 방법들이 개발되거나 이용되지는 못하고 있다. Allergic contact dermatitis의 *in vitro* 평가법 개발에는 두가지 접근방법이 있다. 즉 시료가 APC에 의해 antigen으로 변형되고 T cell을 활성화하는 성질의 평가와 antigen에 의해 임파구로부터 방출되는 lymphokine을 측정하는 방법이 그것이다. 첫번째 접근방법은 더 어렵지만 감작성을 직접 측정하는 것으로 보다 확실한 정보를 제공한다.

APC에 의한 antigen processing 정도를 평가하기 위하여, APC에 antigen 또는 hapten을 투여한 후 막표면에 나타난 antigen-Ia complex를 정량하는 방법이 시도되었다. 그러나 변형된 antigen의 구조가 다양하고 Ia gene product도 여러가지가 있어 형태가 다양하므로 이 방법의 사용이 제한된다²¹⁾. 따라서 APC와 lymphocyte를 혼합한 계에서 lymphocyte의 변화를 관찰하는 것이 현실적이다.

T cell 활성화를 평가하는 방법으로, 표피 APC에 시료를 투여하여 감작된 APC를 만들고 여기에 같은 개체로부터 분리한 T cell을 첨가하여 감작된 T cell의 변화를 측정한다. 이 방법에서는 순수하게 분리된 LC는 면역학적 기능을 약 12시간 이내에 잃어버리므로 짧은 시간내에 실험을 행하여야 한다¹⁵⁾. Keratinocyte와 함께 분리한 LC는 이보다 오래동안 기능을 유지하므로 통상 LC가 많도록 분리한 표피세포를 사용한다. 평가 지표로는 IL-1 receptor의 발현, IL-1에 의한 IL-2의 합성 등이 이용된다²⁰⁾. 즉 감작된 T cell에 새롭게 발현된 IL-1 receptor를 monoclonal antibody를 사용하여 정량한다. 한편 감작된 T cell에 IL-1을 첨가하여 binding에 의해 나타나는 변화를 측정하는데, 이 경우에는 함께존재하는 LC나 KC로부터 방출되는 IL-1의 영향을 제거하는 것이 중요하다. IL-1은 여러가지 세포로부터 면역계와는 관계 없는 염증과정에 의해서도 방출되기 때문이다²²⁾. 감작된 T cell이 방출하는 IL-2는 radioactive monoclonal antibody를 사용하여 정량한다. IL-2는 감작된 lymphocyte에서만 만들어지므로, 여러 염증과정에서 다양한 세포에 의해 만들어지는 IL-1을 정량하는 방법보다 잇점이 있다.

감작된 T cell의 간접적인 평가로 IL-2를 포함하는 culture supernatant를 새로운 lymphocyte나 thymocyte에 투여하여 증식 또는 새로운 receptor의 발현 등을 관찰한다. 이때 활성이 낮으면 새로운 lymphocyte를 culture에 투입하는 방법으로 변경시킨다. [³H]thymidine uptake를 이용하여 Lymphocyte의 증식을 평가하며, IL-2의

영향을 받아 lymphocyte에 새로 발현되는 transferrin receptor⁴³⁾ 등의 marker를 측정하는 방법도 이용된다. 이밖에 부분적인 *in vitro* 평가법으로는, 감작된 동물의 lymphocyte를 추출하여 antigen에 의해 여러가지 lymphokine이 방출되고 이 lymphokine이 macrophage 등 다른 세포들에 미치는 영향을 관찰하는 방법들도 개발되어 있다.

이와같이 다양한 종류의 *in vitro* 평가법들이 개발되어 있으나 *in vivo* 감작유발성을 예측하기에는 어려움이 많다. 앞서서도 언급한 바와 같이 면역계에는 개체간의 유전적 차이가 있고, LC culture의 보존 시간이 짧으며, Ia 발현이 다양하여 이의 측정이 곤란하고, 특히 중요한 문제로는 *in vivo* 상태에 존재하는 antagonist system(예: suppressor cells)이 도입된 *in vitro* model이 아직까지는 개발되어 있지 않기 때문이다. 따라서 손쉽고 정확한 allergic contact dermatitis의 screening method가 개발되기까지는 더 많은 연구가 필요하다.

결 론

지금까지 1차 자극성과 감작성 시험법에 대하여 알아보았다. 이외에도 경구독성, 누적자극성, 광독성, 광감작성 등 여러가지 평가를 필요로 하지만, 화장품에서 이 두가지 반응이 자주 문제가 되므로 여기에서는 1차 자극성과 감작성에 대해서만 고려하였다. 종전에는 동물실험을 위주로 대부분의 평가가 행해져 왔으나 개체간의 차이, 비용, 시간 등의 제약조건과 동물 애호 단체의 압력 등으로 인해 근래에는 *in vitro* 평가법의 개발이 많이 이루어지고 있다. 자극성 시험을 위해서는 *in vivo* 현상과 상관관계가 우수한 시험법들이 개발되어 조만간 동물시험을 대체하는 공식 시험법으로 자리를 잡을 것으로 예상되나, allergy 유발성 시험에 있어서는 발생과정이 복잡하여 *in vitro*에서의 모방이 어려우므로 좋은 시험법 개발에는 많은 시간이 필요할 것으로 생각된다.

국제적으로는 관련 업계나 학계에서 많은 연구가 이루어지고 있으나 국내에서는 아직 초보적인 단계로서 주로 단순한 첩포시험에 의존하고 있으며 *in vitro* 평가법 개발도 미미한 실정이다. 학계나 대학병원 등에서 행하는 화장품 안전성 평가도 이 범주를 크게 벗어나지 않는다. 소비자를 화장품의 부작용으로부터 보호하는 것은 화장품 업계에 주어진 사회적 책임의 중요한 부분이고, 회사의 성장 발전에도 간접적으로 기여하게 되는 것이며, 현재 부분적으로 시도되고 있는 자체원료의 개발에도 필수적으로 요구되는 것이어서 국내에서도 관련 시험법의 연구개발 및 정착 노력이 시급히 요구된다 하겠다.

참고문헌

1. Ponc M., *In vitro* cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritant screening, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 14:245(1992)
2. Maes D., Marenus K. and Smith WP., Invisible irritation : a new look at product safety, *Cosmetics & Toiletries*, 105(10):43(1990)
3. Kim JJ., Park ME. and Kang SH., UVB-induced changes of barrier function and morphology of the hairless mouse skin, 17th IFSCC Int. Congress, Yokohama, pp 989(1992)
4. Kim YD. et al., The assessment of low-level irritation potential by glucose uptake measurement, submitted to 1st Scientific Conference of the Asian Soc. Cosmet. Sci., Kobe(1993)
5. Parish WE., Inflammatory mediators applied to *in vitro* toxicology : studies on mediator release and two-cell systems, *Toxicol. in vitro*, 4(4/5):231(1990)
6. Nakamura M. et al., Full-thickness human skin explants for testing the toxicity of topically applied chemicals, *J. Invest. Dermatol.*, 95:325(1990)
7. Bell E. et al., The living skin equivalent : its manufacture, its organotypic properties and its response to irritants, *Toxicol. in vitro*, 5:591(1991)
8. Regnier M., Asselineau D. and Lenoir MC., Human epidermis reconstructed on dermal substrates *in vitro* : an alternative to animals in skin pharmacology, *Skin Pharmacol.*, 3:70(1990)
9. Pham MA. et al., Reconstructed epidermis : a novel model for the study of drug metabolism in human epidermis, *J. Invest. Dermatol.*, 94:749(1990)
10. Mak VHW. et al., Barrier function of human keratinocyte cultures at the air-liquid interface, *J. Invest. Dermatol.*, 96:323(1991)
11. Silver PM., Product safety : *in vitro* assays, *Cosmetics & Toiletries*, 107(6):71(1992)

12. Gordon VC. and Kelly CP., An *in vitro* method for determining ocular irritation, *Cosmetics & Toiletries*, 104(10):69(1989)
13. Balls M., The replacement of animal testing : ethical issues and practical realities, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 13:23(1991)
14. Parish WE., Evaluation of *in vitro* predictive tests for irritation and allergic sensitization, *Fd. Chem. Toxicol.*, 24(6/7):481(1986)
15. Wolff K. and Stingl G., Cellular interactions and the skin : the epidermis as an immune organ, *Triangle*, 26(3/4):139(1987)
16. Kato S., Safety tests for cosmetics, *Toxicol. Forum*, 7(3):284(1984)
17. Magnusson B. and Kligman AM., The identification of contact allergens by animal assay : the guinea pig assay, *J. Invest. Dermatol.*, 52:268(1969)
18. Sato Y. *et al.*, A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens, *Contact Dermatitis*, 7:225(1981)
19. Buehler EV., Delayed hypersensitivity in guinea pig, *Arch. Dermatol.*, 91:171(1965)
20. Klecak G., Geleick H. and Frey JR., Screening of fragrance materials for allergenicity in the guinea pig : I. comparison of four testing methods, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 28:53(1977)
21. Kaufman JF. *et al.*, The Class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex, *Cell*, 36:1(1984)
22. Bird J. *et al.*, Release of interleukin-1 and low molecular weight lymphocyte activating factors by rat peritoneal macrophages and its enhancement by acute non-specific inflammatory process, *Br. J. Exp. Pathol.*, 66:271(1985)
23. Pauza CD., Bleil JD. and Lennox ES., The control of transferrin receptor synthesis in mitogen stimulated human lymphocytes, *Exp. Cell Res.*, 154:510(1984)