

## In Vitro Evaluation Methods for Development of Cosmeceutical Ingredients

Jae Sung Hwang, Ph D

경기 용인시 기흥읍 보라동 314-1 Skin Research Institute/ Amore Pacific R&D center

Tel: +82- , Fax: +82

E-mail: jshwang@amorepacific.com

### ABSTRACT

The cosmetics industry grows with advancement of the society and culture. It is one field of typical fine chemical industry where the basic science and application technique of chemistry, biology, physiology and the pharmacy are applied together. The cosmetics must have safety, efficacy, stability and user convenience. Recently the regulation against animal experiments is claimed in Europe and many *in vitro* methods are used and developed. In Korea, functional cosmetic fields are growing after cosmetic law was separated from pharmaceutical affairs law at June, 2000. Sunscreen, whitening and anti-wrinkle effects are three categories in functional cosmetic law. Recently many cosmeceutical ingredients are developed which have a more biological activity than before in these categories. *In vitro* evaluation methods for whitening, anti-wrinkle and slimming ingredients are introduced in this session.

Collagen and MMP-1 are well known biological targets for evaluation of anti-wrinkle ingredients. Usually human dermal fibroblast (HDF) is used for these assays. Cell proliferation assay using human keratinocyte and HDF is also commonly used. The selected ingredients are evaluated in *in vivo* animal or human study.

Initial evaluation of depigmenting properties should be performed on purified tyrosinase and other melanogenic enzymes, thereafter employing melanocyte cultures, cytotoxicity and effects on melanin synthesis should be assayed. For the biological evaluation, co-culture systems and reconstructed skin seem to be reliable methods to screen the capability of new agents to interfere with the pigmentary process, in particular following triggering stimuli such as UV irradiation, or exposure to  $\alpha$ -MSH or proinflammatory mediators. Finally, the *in vivo* activity of hypopigmenting formulation should be assessed by using non-invasive techniques, such as remittance spectrophotometry and UV light photography to obtain comparable values.

All these evaluation methods have limits and methods which have higher relationships with human should be developed continuously with reliable biomarkers.

## ● EDUCATION

- 1992            서울대학교 생물교육학과  
                  B.A.
- 1994            서울대 대학원  
                  M.S.
- 2002            아주대 의대 대학원  
                  Ph.D.

## ● EXPERIENCE

- 1999-2003    책임연구원, 미백제 개발 프로젝트 리더, Amore Pacific R&D center
- 2002-2003    National Institute of Health, Bethesda, MD, USA
- 2003-present    충북 대구 전략사업기획단 과제 평가위원
- 2004-present    Team Leader, Skin Research Institute, Amore Pacific R&D center

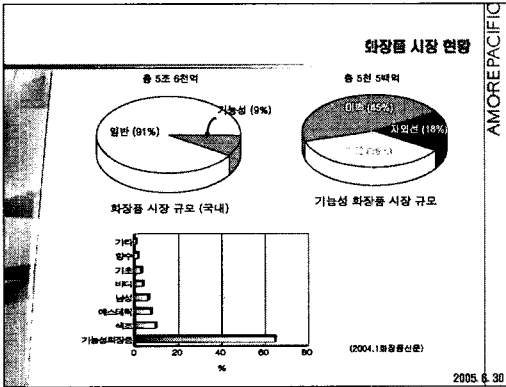
**In vitro evaluation methods for development of cosmeceutical ingredients**

**Jae Sung Hwang**

**Skin Research Institute, R&D Center,  
Amore-Pacific Corp., Kyonggi-do, Korea**

### Cosmeceuticals

- ▶ Neologism: Albert Kligman (Dermatologist, U. PENN)이 약 20년 전에 미국 화장품화학자회(SCC)에서 처음 소개함.
- Definition: 현재, 통일된 정의는 없으며, 기능면에서 Cosmetics and Drug의 중간 정도로 인식함. (Europe-subclass of cosmetics, USA-subclass of pharmaceuticals)  
 "A product with an activity that is intended to treat or prevent a (mild) skin (abnormality)"
- Characterization
  - 의학적 효성이 있고, 경성 또는 거의 경성의 피부에 사용할 수 있는 화장품
  - 가벼운 피부장애 (cosmetic indication)를 개선하는 구체적인 편익이 있을 것.
  - 위험도가 낮을 것.
- \* 유사용어 : Performance cosmetics, Functional cosmetics, Dermocosmetics, Active cosmetics, Quasidrugs(Japan, 약용화장품)



### 기능성화장품의 범위 (2000년7월)

화장품법 2조 2항

- 피부의 미백에 도움을 주는 제품
  - 피부에 멜라닌 색소가 침착하는 것을 방지하여 기미, 주근깨 등의 생성을 억제함으로써 피부의 미백에 도움을 주는 기능용 가진 화장품
  - 피부에 침착된 멜라닌 색소를 없애어 피부의 미백에 도움을 주는 기능용 가진 화장품
- 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품
  - 피부에 탄력을 주어 피부의 주름을 완화 또는 개선하는 기능용 가진 화장품
- 피부의 굳게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품
  - 강한 햇빛을 방지하여 피부의 굳게 태워주는 기능용 가진 화장품
  - 자외선을 차단 또는 선관시켜 자외선으로부터 피부를 보호하는 기능용 가진 화장품

### 기능성 고시원료 및 함량

주요 기능성 고시원료		미백 기능성 고시원료	
종류	함량	종류	함량
레티놀	2,500 IU	덕나우 추출물	2.0%
레티놀 팔미테이트	10,000 IU	알부민	2.0%
비타민 A (정제 에톡시레티놀 팔미테이트)	0.2%	유용성 강초 추출물	0.05%
아데노신	0.04%	3-Ethoxy Ascorbic acid	2.0%

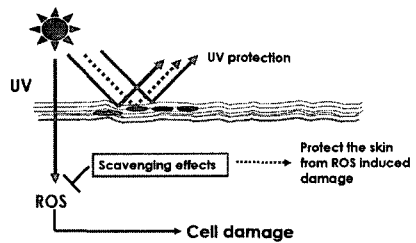
## 미백 기능성 화장품

### 화이트닝의 역사

- Whitening 개념의 화장품이 처음으로 등장: 60-70년 (vitamin C 배합)
- vitamin C를 안정화한 유도체 개발: 1974년을 기점으로 화이트닝의 인식 확대
- 95년도에 약용화장품의 등장: 기미, 주근깨를 내치하는 화이트닝 제품
- 95년도에는 AHA성분 배합: 각질제거, 안색이 거무칙하게 보이는 현상: 두꺼워진 각질과 증가된 멜라닌색소 때문이라는 시각으로 봄.

AMOREPACIFIC

### The Role of Melanin



AMOREPACIFIC

Comparison of Epidermal Melanocyte Number among Human Racial Groups in Two Different Regions of the Body

RACE	THIGH AND HIP	FOREARM
European American	1000 ± 70* (35)*	1100 ± 80 (9)
Asian	1290 ± 45 (3)	2650 ± 275 (3)
American Indian	1695 ± 115 (6)	2515 ± 250 (6)
African American	1415 ± 255 (7)	1955 ± 150 (4)

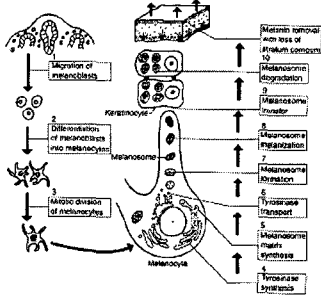
AMOREPACIFIC

Changes in Melanocyte Density of Skin Surface in Forehead and Thigh (Average Number of Melanocytes/mm<sup>2</sup> ± SE)

ANATOMIC SITE	FETUS	INFANTS(1-10 YEARS)	ADULTS(16-70 YEARS)	AGED(70+ YEARS)
Forehead	450 ± 20 (7)*	2140 ± 130* (8)	2010 ± 20 (8)	1145 ± 85 (4)
	710 ± 40 (9)	2310 ± 150* (8)		
Thigh	580 ± 30 (7)	1600 ± 110 (4)	1000 ± 70 (34)	560 ± 70 (4)
	810 ± 30 (8)			

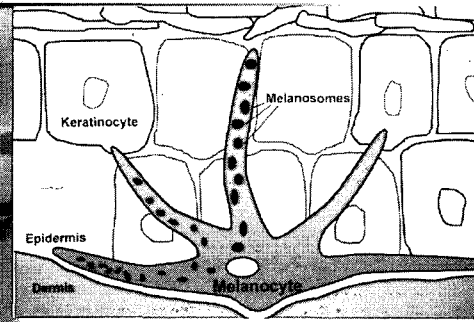
AMOREPACIFIC

### Melanocytes

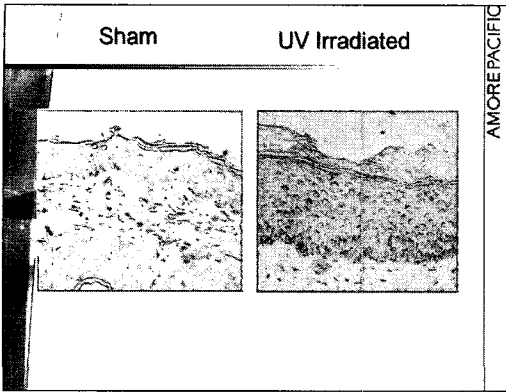


AMOREPACIFIC

### Melanocyte



AMOREPACIFIC



### 멜라닌 생성을 억제하는 방법

a. 자외선 방어  
 - 자외선 흡수제 및 산란제기 사용  
 - 최근 피부노화와 흑변에 대한 작용으로 UV A가 주목을 받음

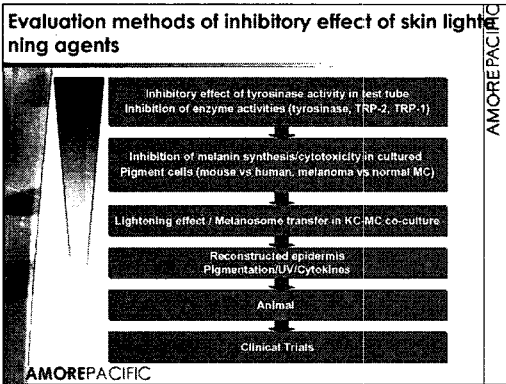
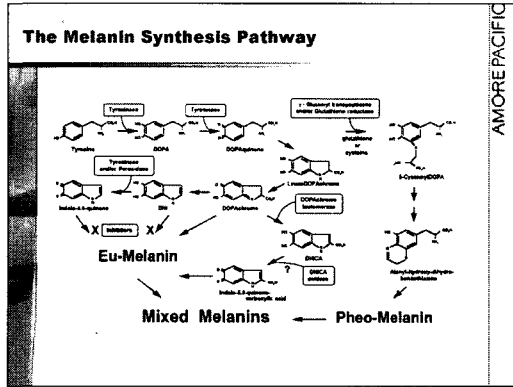
b. 티로시나제의 활성의 저해  
 - 많은 물질이 알려져 있으며, 현재 미백효과와 주목을 이룸  
 - 알토는 생약과 구조활성의 상관관계도 연구 필요  
 - 페커니네: tyrosinase 활성부위(active site)에 구리(Cu<sup>++</sup>)이온에 킬레이트(kojic acid)

c. 기생성된 멜라닌의 환원, 또는 환원성의 억제  
 - 아스코르브산 연산 미네랄: 2가지 기능  
 - 장기간의 Dopamine을 환원하여서 멜라닌의 생성을 억제하는 기능  
 - 검은색의 산화형 멜라닌을 환원하여 검은색의 환원형 멜라닌으로 만드는 작용  
 - 비타민 E: 자외선에 의해서 생성된 라디칼을 소거해 주는 역할을 수행

d. 각질의 박리에 의한 멜라닌을 표피에서 배출  
 - 각질층을 박리하여서 표피내에 존재하는 멜라닌의 양을 감소  
 - 구연산, 살리실산, 요소  
 - 모모주올룰: 대사를 촉진하여 각질을 박리함  
 - Vit A: 각질 박리의 정상화, 적극적인 멜라닌의 배출

e. 멜라노사이트에 대한 특이한 세포독성  
 - 아이드로퀴논: 멜라노사이트에 대한 독성을 지님  
 - In vivo test: 발색효과 규명  
 - 연구발색의 가능성  
 - 문해점을 개선: 아이드로퀴논의 배당체인 Arbutin이 개발

f. Cytokine network 조절제  
 - 멜라노사이트의 microenviroment에 존재하는 cytokine network  
 - 표 이상  
 - 멜라닌 생성을 증가 cytokine의 작용을 저해



### 미백 시험법

• In vitro method

1. Tyrosinase 활성억제시험
  - 1) Spectrophotometry 를 이용한 Tyrosinase 활성억제시험
  - 2) 방사성 동위원소를 이용한 Tyrosinase 활성억제시험
2. 멜라닌세포(melanocyte) 배양을 이용한 시험법
  - 1) In situ tyrosinase 활성억제시험
  - 2) 멜라닌(melanin) 신규합성 (de novo synthesis) 억제시험
  - 3) 총 멜라닌 (melanin) 생성억제시험
3. 피부조직배양 (3D-culture)을 이용한 시험법

• In vivo method : Brown guinea pig, Black mouse

• Human test (cosmetic clinical study)

1. 인공색소침착 (artificial tanning) 을 이용한 시험법
2. 과색소침착증상 (hyperpigmented disorder)이 있는 환자자 이용

### 티로시나제(Tyrosinase) 활성억제 시험

**의의:** 멜라닌 생성성 과정을 가장 첫번째 단계에 관여하는 효소로써 전체 멜라닌 합성 과정에 rate-limiting step이므로 이 효소의 활성을 억제함으로써 멜라닌 합성을 억제할 수 있다.

**실험방법**  
1-1-1. Spectrophotometry를 이용한 티로시나제(tyrosinase) 활성억제 시험.

475 nm에서 흡광도 측정.

AMOREPACIFIC

### 2. 방사선동위원소를 이용한 티로시나제(tyrosinase) 활성 억제 시험

Tyrosinase의 활성이 낮은 시료(eg. Normal human melanocyte)의 효소 활성을 측정시 주로 이용.

Tyrosinase source: Melanoma, Human melanocyte

LSC(Liquid Scintillation counter)로 방사능 측정

AMOREPACIFIC

### 1-2. 피부 멜라닌세포(Melanocyte)배양용 이용한 미백효능시험

**의의:**

- 실제로 멜라닌이 합성되는 세포인 피부 멜라닌 세포배양용 이용함으로써 in vitro tyrosinase 활성 억제 시스 평가가 용이한 생체와 유사한 검색 시스템이다.
- 색소세포 내에서 다양하게 전개되는 멜라닌 생성기에 대한 전반적인 영향력 분석할 수 있다.

**사용 가능한 멜라닌 세포**

- B16 murine melanoma cell line
- Melan-a murine cell line
- HM3KO human melanoma cell line
- Normal human melanocyte

AMOREPACIFIC

### 1-2-1. In situ tyrosinase 활성억제 시험

멜라닌 세포 배양기에 시험물질과 <sup>3</sup>H-tyrosine을 첨가하여 배양한 후 배양액으로 유리되어 나오는 방사능 동위원소가 표지된 핵의 방사능을 LSC로 측정하여 세포내 tyrosinase의 활성을 구한다.

AMOREPACIFIC

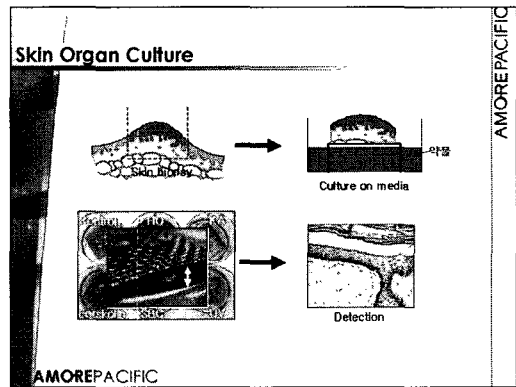
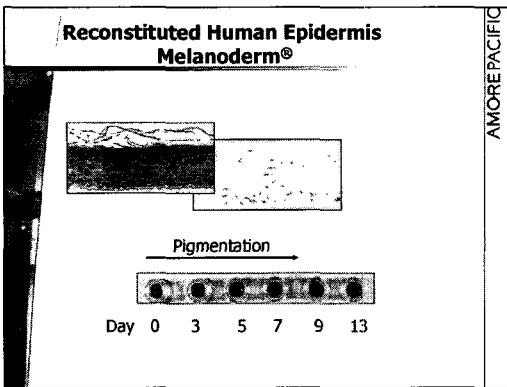
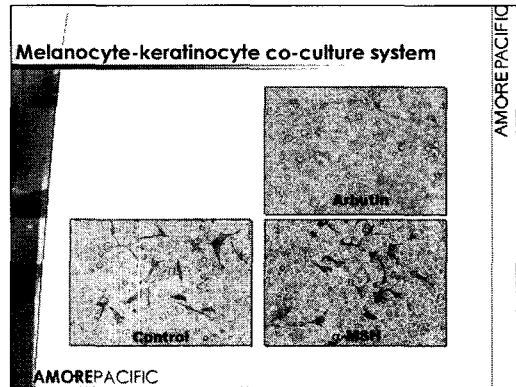
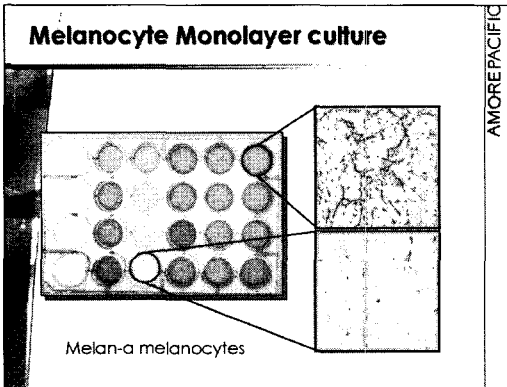
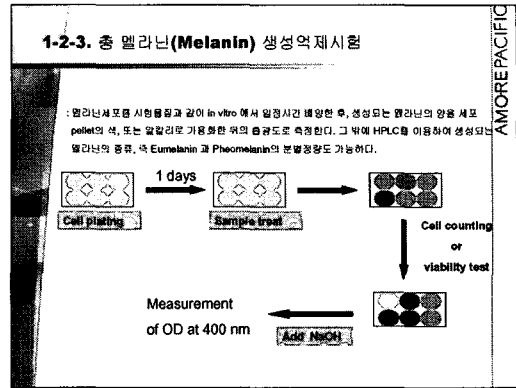
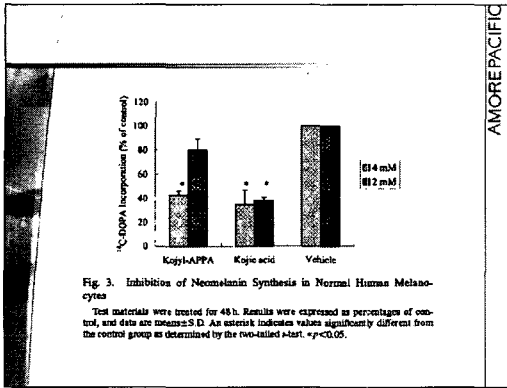
**Fig. 4. In Situ Tyrosinase Hydroxylase Activity**  
Melanocytes were seeded on 48 well culture dishes at 2x10<sup>5</sup> cells per well and were treated with 2 mM Kojic-APPA and Kojic acid containing 2 μCi [<sup>3</sup>H]Tyrosine per ml. Results were expressed as percentages of control, and data are mean±S.D. All statistical indicators values significantly different from the control group as determined by the t-test. \*p<0.05.

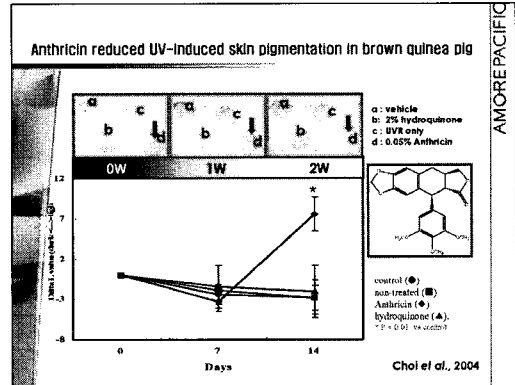
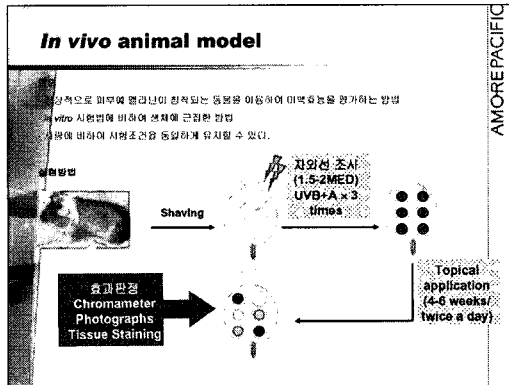
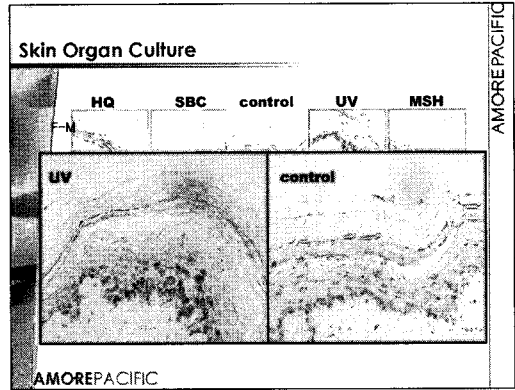
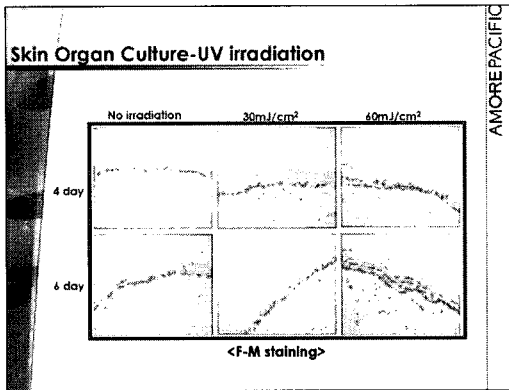
AMOREPACIFIC

### 1-2-2. 멜라닌 신규합성(de novo synthesis) 억제 시험

멜라닌세포 배양기에 시험물질과 [<sup>14</sup>C]-DOPA 또는 [<sup>3</sup>H]-DOPA를 첨가하여 일정시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 세포를 수확하여 <sup>14</sup>C 또는 <sup>3</sup>H에 도입된 멜라닌을 glass filter에 부착시켜 방사능량량 Liquid scintillation counter로 측정한다.

AMOREPACIFIC





### Human Test - cosmetic clinical study

#### Artificial Tanning 을 이용한 미백 기능성 시험

- Principle: Animal test와 유사. Pigmentation 유도 후 피부색 변화 측정
  - 다수의 시료간 측정 비교가 가능하다는 장점이 있으나, 자연상태의 색소침착이 인공적으로 tanning을 유도했다는 단점이 있음.
- Methods
  - Volunteers: 색소 이상증상, 광민감성이 없는 성인 남녀 (□표 당 20-30명)
  - Pigmentation: 1-1.5 MED x 2-3 times irradiation (UVA+UVB), 광 비노출부
  - MED (minimal erythmal dose): 피부에 출혈을 발생시키기 위해 필요한 최소 자외선량으로 Volunteer 개인별로 다르다.
  - Application: 1-2 times /day, 2-3 months, Topical
- Evaluation: Visual Scoring, Photography, Skin colorimeter

#### Hyperpigmented disorder 의 사람용 이용한 미백 기능성 시험

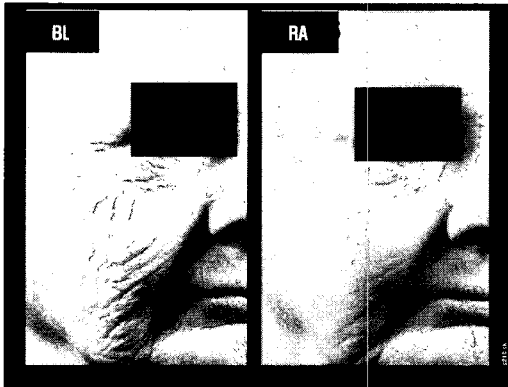
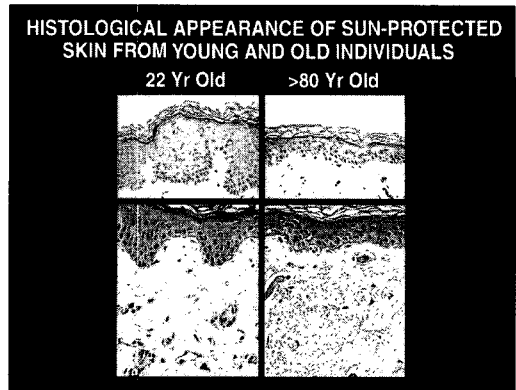
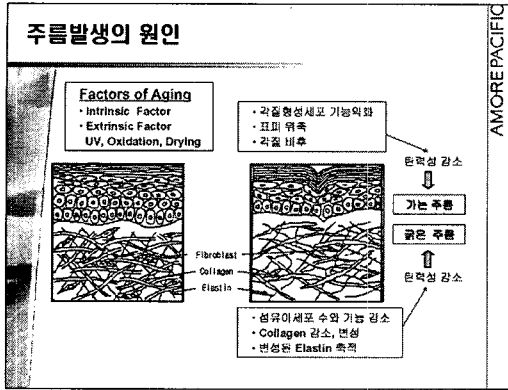
- 기미, 주근깨, 검버섯 등 피부에 과색소침착증이 있거나, 심하게 tanning 된 사람층 대상으로 별도의 tanning 조작 없이 실제 사용방법과 동일하게 시험함.

AMOREPACIFIC

### 주름개선 기능성 화장품

AMOREPACIFIC





### 주름개선 기능성 시험법

- In vitro method
  - Skin Cell 을 이용한 시험법
    - 세포증식능 시험법 (Cell Proliferation Assay)
    - Collagen, GAGs (glycosaminoglycan) Synthesis Assay
    - MMPs(matrix metalloproteinase) 발현 억제 시험
    - 콜라제네이즈 저해시험 (Collagenase Inhibition Assay)
    - 엘라스타네이즈 저해시험 (Elastase Inhibition Assay)
  - 피부조직배양 (3D-culture)을 이용한 시험법
- In vivo method: Hairless mouse
- Human Test (cosmetic clinical study)

AMOREPACIFIC

### in vitro method - Cell proliferation assay

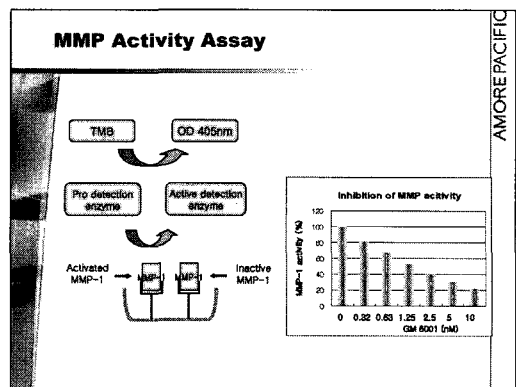
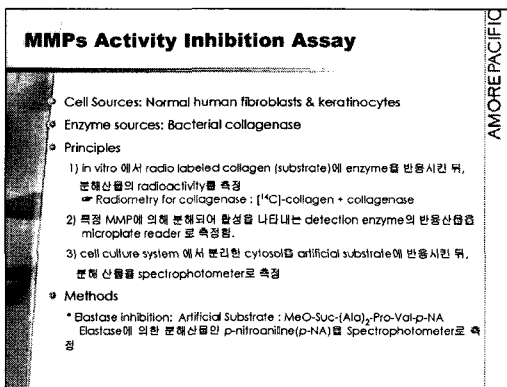
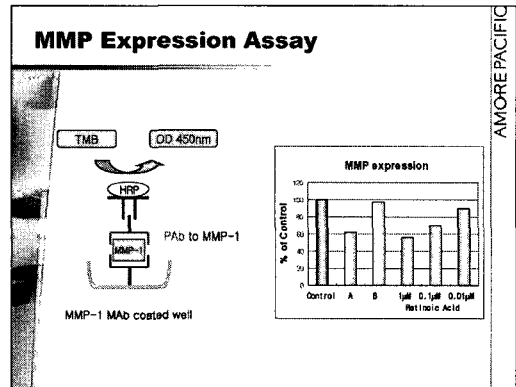
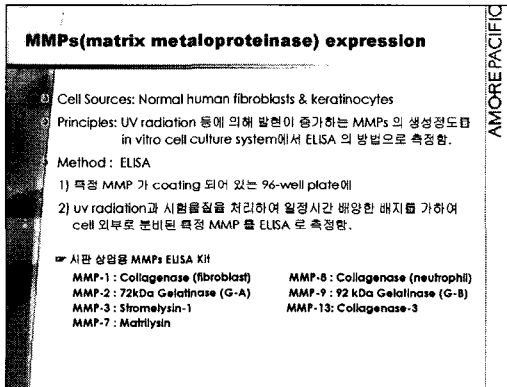
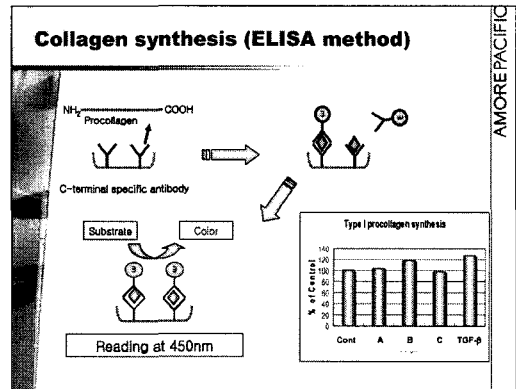
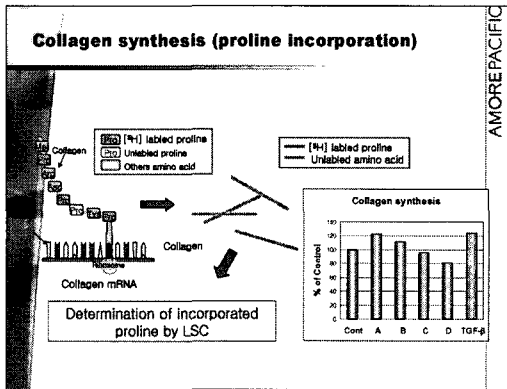
- Cell Sources: Normal human fibroblast, Normal human keratinocyte, Immortalized human keratinocytes (HaCat)
- Principles: 가장 기초적인 시험으로, 시험물질의 첨가에 의해 상승되는 세포의 수 및 활성을 색소 또는 방사성 동위원소법 이용하여 측정한다.
- Methods
  - [<sup>3</sup>H]-Thymidine Uptake Assay: DNA 합성 시, incorporation 되는 [<sup>3</sup>H]-Thymidine 의 양을 LSC로 측정함.
  - Neutral Red Uptake Assay: 살아있는 세포의 lysosome 의 concentration 되는 neutral red의 양을 비색법 (OD546nm) 으로 측정함.
  - MIT Assay: Mitochondria enzyme의 활성에 의해 형성된 formazan crystal의 양을 비색법 (OD540nm) 으로 측정함.
  - SRB assay: TCA-precipitated cellular protein의 basic amino acid에 binding 된 SRB의 양을 비색법 (OD564nm) 으로 측정함.

AMOREPACIFIC

### Collagen synthesis assay

- Cell Sources: Normal human fibroblasts, Fibroblast cell line
- Principles: 신규로 합성되는 collagen 을 collagen 합성 시 incorporation 되는 [<sup>3</sup>H]-Proline 양이나 ELISA method로 측정함.
  - Proline 은 collagen의 중요한 구성성분임.
- Methods
  - [<sup>3</sup>H]-Proline incorporation assay : 배양기에 시험물질과 [<sup>3</sup>H]-proline 을 넣고 배양한 후, incorporation된 [<sup>3</sup>H]-proline 양을 LSC로 측정함.
  - ELISA 법: fibroblast 배양시 배지로부터 분리된 collagen 전구체인 procollagen의 c-terminal을 인지하는 항체를 이용하여 콜라겐생성 양을 ELISA method로 측정함.
    - 상업적으로 판매하는 ELISA kit 가 있음.
  - Collagen mRNA양을 측정하는 방법
    - 대량검색용으로 이용하기에는 부적합함.

AMOREPACIFIC



### in vivo method - animal study

- **Experimental Animal: Hairless Mouse**
- **Principles:** 털이 없고, 자외선 조사나 나이의 증가에 의해 피부에 주름이 많이 생기게 발생하므로, 주름개선효능이 있는 물질 및 재료의 효능검정에 자주 이용됨.
- **Methods:**
  - 1) 자외선을 일정기간 (3-6개월) 조사하여 주름을 발생시킨 뒤, 시험물질을 처리하여 주름개선효과를 판정
  - 2) 자외선 조사와 동시에 시험물질을 처리하면서 주름발생의 재효과 관찰
- **Evaluation:** Visual scoring, Photography, Histologic study
  - 1) 육안평가, 사진판독: 전문가가 주름등급을 blind test 로 평가
  - 2) 피부조직평가법
    - H&E staining
    - Immunostaining : Type I collagen, MMPs (collagenase, etc), Baslin, GAGs
  - 3) Replica method: 시판의 경우와 동일함.

**Replica analysis**

UV control  
control  
813  
818

Wrinkle score (µg/cm²)

Group	UV control	control	813	818
Mean	0.98	0.70	0.43	0.10
SD	0.96	0.86	0.33	0.03

### Human Test (cosmetic clinical test)

- **Volunteers:** 안전에 주름이 있는 사람 (group당 30명 이상)
- **Principles:** 완제품을 실제 사용방법과 동일하게 적용하고, 주름의 정도를 육안, 사진 및 기기를 이용하여 측정한 뒤, 시험제품 적용 전,후 또는 대조군과 비교하여 판정.
- **Test Period:** 3-6 months
- **Evaluation**
  - 1) Visual scoring: 전문가가 주름의 등급을 blind test 로 판단함.
  - 2) Photographic method: 시험제품 적용 전,후 비교가 가능함.
  - 3) Instrumental Analysis (Image analysis): 피부 표면의 주형 (replica)을 제작하여 주름의 수, 형태나 깊이 등을 기기를 이용하여 측정한다
  - 4) 설문조사 (주관적 측정법): Volunteer가 주관적으로 판단함.

감사합니다.